

Studie

„Eigenschaften von kommerziellen HPLC RP-Säulen
im Vergleich“

Stavros Kromidas

Eigenschaften von kommerziellen HPLC RP-Säulen im Vergleich

Vorwort

Der Beweggrund für die vorliegende Arbeit ist folgender: Ich fühle mich dann wohl, wenn ich zu einem Thema eine Meinung habe, die eigener Erfahrung oder wenigstens eigener Überlegung entspringt. So auch in der HPLC, wenn es um Eigenschaften von Phasen bzw. um einen Vergleich von Säulen geht. Beim Zitieren von Publikationen oder Prospekten fühlte ich mich als unsicherer „Wiedergeber“. Die vorgestellten Tests, mit einer häufig auf einzelne Stoffe bezogene Betrachtungsweise, haben gewiss ihre Berechtigung – doch fehlt manchmal der unmittelbare Praxisbezug. Für die Anwender ist dieses Thema jedoch enorm wichtig. Nachdem nun in letzter Zeit doch viele neue Phasen eingeführt worden sind, habe ich mich wieder ins Labor begeben, um die Phasen selbst unter realistischen Bedingungen ein wenig näher kennen zu lernen. Für nur 2-3 Wochen dachte ich – nun, es ist etwas länger geworden... Das Ergebnis dieser Arbeit liegt jetzt vor.

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Ackenheil, Uniklinik München, bedanken, in dessen Laboratorien die Messungen durchgeführt wurden. Ebenso herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Herstellern für die Überlassung der Säulen. „Last but not least“ den Kollegen aus dem Team, ohne deren jeweiligen Beitrag die Studie in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Hans-Joachim Kuß hat vor Ort alles Organisatorische geleitet und er sorgte nicht nur dafür, dass ich bei langen Experimenten nächtens nicht verhungerte und verdurstete, sondern wir führten auch viele anregende Fachgespräche. Wolfgang Heumüller hat sich in äußerst kurzer Zeit in die Materie eingearbeitet und mehrere Experimente selbstständig durchgeführt. Werner Krapp war eine große wissenschaftliche Stütze bei manch diffiziler Fragestellung. Glücklicherweise hatten wir für die Chemometrie in Ullrich Panne einen Kollegen, der mathematisches mit chemischem Wissen verbindet. Reinhold Ellmer hat in vorzüglicher Kleinarbeit aus einer wissenschaftlicher Arbeit eine Software für die Praxis entwickelt. Und nicht zuletzt Antoni Kromidas. Es ist schon etwas ungewöhnlich, den eigenen Sohn zu loben, aber eigentlich eine Selbstverständlichkeit, zumal dieses Lob eher untertrieben ist. Im Abiturjahr hat er die nicht immer trivialen Wünsche seines Vaters in erstaunlicher Weise am Rechner umsetzen können.

Schließlich möchte ich Prof. Engelhardt und besonders Frank Steiner für die kritische Durchsicht des Manuskripts und die intensiven Gespräche herzlich danken.

Lesen Sie zunächst die „Einführung“ und entscheiden Sie entsprechend Ihren Interessen, welchen Kapiteln Sie sich schwerpunktmäßig widmen möchten.

Ich wünsche Ihnen viel Spaß beim Lesen und neue Erkenntnisse für die eigene Arbeit.

Stavros Kromidas, Saarbrücken

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung

- 1.1 Ziel der Studie
- 1.2 Zur Auswahl der untersuchten Säulen
- 1.3 Vorbemerkungen und Aufbau der Studie

2. Experimentelles

- 2.1 Apparatives, Chromatographische Bedingungen
- 2.2 Übersicht und Daten der 64 untersuchten Phasen/Säulen
- 2.3 Übersicht und Daten der untersuchten Substanzen

3. Säulenleistungstests

- 3.1 Packungsqualität
- 3.2 Druckabfall
- 3.3 Asymmetrie
- 3.4 Stabilität im Routinebetrieb, zeitliche Änderung der
 - ◆ Kapazität
 - ◆ Effizienz
 - ◆ Selektivität
- 3.5 Zusammenfassung

4. Chromatographische Charakterisierung von RP- Phasen

- 4.1 Vorstellung der bekanntesten Tests, Kommentierung
- 4.2 Metallionenkontamination
- 4.3 Silanophile Eigenschaften, Vorstellung von „strengen“ und „milden“ Tests
 - 4.3.1 Verhalten der Phasen gegenüber basischen Komponenten
 - 4.3.1.1 Tests in pufferfreien Eluenten
 - 4.3.1.2 Tests in gepufferten Eluenten
 - 4.3.2 Verhalten der Phasen gegenüber sauren Komponenten
- 4.4 Hydrophobe Eigenschaften
- 4.5 „Durchbruch Aceton“
- 4.6 „Uracil-Test“
- 4.7 „Homogenität“ der Oberfläche
- 4.8 Zusammenfassung

5. Trennverhalten der untersuchten Phasen gegenüber unterschiedlichen Analyttypen

- 5.1 Hydrophobe, mehrkernige, unsubstituierte Aromaten (Chrysen, Perylen)
- 5.2 Planare/nicht planare, hydrophobe Aromaten (Triphenylen, O-Terphenyl)
- 5.3 Hydrophobe Aromaten mit/ohne polarer Funktionalität (Fluoren, Fluorenon)
- 5.4 Methylengruppenselektivität bei einkernigen Aromaten (Toluol, Ethylbenzol, diverse Benzoate)
- 5.5 Methylengruppenselektivität bei Ketonen (Isopropyl-, Isobutylmethylketon)

- 5.6 Isomere Aromaten (Nitroaniline)
- 5.7 Steroide (Doppelbindungs-, Positionsisomere)
- 5.8 Tricyclische Antidepressiva
- 5.9 Metabolite von tricyclischen Antidepressiva
- 5.9a Schwache und starke aromatische Basen (Pyridin, Anilin, Benzylamin)
- 5.10 Schwache, aromatische Säuren (Benzoe- und Hydroxybenzoesäuren)
- 5.11 Mittelstarke aromatische Säuren (Phthal-, Terephthalsäuren)
- 5.12 Schwache und mittelstarke aromatische Säuren („diverse“ Säuren)

6. Zusammenfassung der Ergebnisse

- 6.1 Zur Ähnlichkeit der Phasen
 - 6.1.1 Ähnlichkeit über die Hydrophobie
 - 6.1.2 Ähnlichkeit über die Silanophilie
 - 6.1.3 Ähnlichkeit über Selektivitäten
 - Selektivitätsplots
 - Selektivitäts-Hexagone
 - Chemometrische Analyse
 - 6.1.4 Beeinflusst der pH-Wert, der Analytyp und der Eluent die Ähnlichkeit von Phasen?
- 6.2 Zur Säulenauswahl
 - 6.2.1 Für welche Substanzklassen eignen sich polare RP-Phasen?
 - 6.2.2 Für welche Substanzklassen eignen sich hydrophobe RP-Phasen?
 - 6.2.3 Die selektivsten Phasen für ausgesuchte Analytpaare
 - 6.2.4 Korrelation zwischen Log P und Retentions- bzw. Trennfaktoren
 - 6.2.5 „Universalsäule?“ – abschließende Bemerkungen

7. Anhang

- 7.1 Stichwortverzeichnis
- 7.2 Literatur

1.Einführung

1.1 Ziel der Studie

Bei vorliegender Studie handelt es sich um eine unabhängige Studie, die unter Leitung von Dr. Stavros Kromidas an der Universitätsklinik München durchgeführt wurde. Weitere beteiligte Wissenschaftler waren Dr. H.J. Kuss und Dr. Wolfgang Heumüller. Ziel der Arbeit war der Vergleich von kommerziellen RP-Säulen. Es wurden C₁₈, C₈ sowie einige Spezialsäulen getestet. Die Studie versteht sich als Entscheidungshilfe u.a. bei folgenden Fragen:

- Welche Säule (Säulentyp) könnte für *dieses* Trennproblem geeignet sein?
- Welche Alternativsäule(n) mit ähnlichen Eigenschaften stehen zur Verfügung
 - generell
 - für *diese* Substanzklasse
 - in *diesem* Eluenten, usw. ?
- Welche Säule(n) hat (haben) völlig andere Eigenschaften als die gerade Untersuchte, um bei der Trennungsoptimierung nicht auf eine ähnlich Ungeeignete zurückgreifen?

Es wurden insgesamt folgende 66 Säulen untersucht. Neben der Schreibweise der Namen entsprechend den Herstellerangaben wurden in dieser Arbeit auch vereinfachte „Arbeitsnamen“ verwendet, sie werden nachfolgend in Klammern aufgeführt.

AQUA
Bondapak
Chromolith Performance
Discovery Amid C₁₆ (“Discovery Amid”, “Discovery C₁₆”)
Discovery C₁₈
Fluofix IEW
Fluofix INW
Gromsil CP
Gromsil ODS AB („Gromsil AB“)
Hypercarb
HyPURITY ADVANCE (“Hypersil Advance”)
Hypersil BDS
HyPURITY C₁₈ (“Hypersil Elite”)
Hypersil ODS
Inertsil ODS2
Inertsil ODS3
Jupiter
Kromasil
LiChrosorb
LiChrospher
LiChrospher Select B
Luna 2 (“Luna”)
MP-Gel

Nova-Pak ("Novapak")
Nucleosil 50
Nucleosil 100
Nucleosil AB
Nucleosil HD
Nucleosil Nautilus
Nucleosil Protect 1
Platinum EPS
Platinum C₁₈ ("Platinum")
ProntoSIL AQ ("Prontosil AQ")
ProntoSIL 120-5-C₁₈H ("Prontosil")
ProntoSIL C₁₈ ACE EPS ("Prontosil ACE")
Purospher e ("Purospher")
Purospher Star
Prodigy
ReproSIL ODS 3 Pur ("Reprosil")
ReproSIL AQ ("Reprosil AQ")
Resolve
SMT OD C₁₈ ("SMT")
Spherisorb ODS 1
Spherisorb ODS 2
Supelcosil ABZ PLUS ("Supelcosil ABZ plus")
Supelcogel TRP 1 ("Supelcogel TRP")
Superspher
Superspher Select B
Symmetry C₁₈ ("Symmetry")
Symmetry Shield C₁₈
Synergi MAX RP ("Synergi MAX", "Max")
Synergi POLAR RP ("Synergi POLAR", "Polar")
TSKgel Super ODS ("TSK-Gel", "TSK", "Toso Haas TSK")
Ultrasep ES ("Ultrasep")
Vydac 201 HS ("Vydac")
XTerra
XTerra MS
YMC ODS AQ ("YMC AQ")
YMC Pro C₁₈ ("YMC Pro")
Zorbax Bonus
Zorbax Extend
Zorbax ODS
Zorbax SBC₈
Zorbax SBC₁₈

Das eindeutig primäre Ziel der Arbeit ist die Vorstellung von experimentell gesicherten Daten. Erst in einem zweiten Schritt werden mögliche Erklärungen angeboten und versuchsweise Schlussfolgerungen gezogen. Dazu werden die Ergebnisse mit den Eigenschaften der Säulen in Verbindung gebracht und diese Korrelationen in vielfältiger Weise visualisiert und kommentiert. Anschließend werden verwandte Phasen mit ähnlichen Eigenschaften zu Gruppen zusammengefasst und deren Eignung für eine bestimmte Applikation diskutiert.

Zur „Qualität“ der Chromatogramme:

Aus der dargelegten Zielsetzung ergibt sich zwangsläufig folgende Konsequenz: Es war hier nicht die Ambition, „schöne“ Chromatogramme zu erzeugen. Es ging auch nicht um Methodenentwicklung. Die erhaltenen Chromatogramme stellen somit keinesfalls Trennungen unter optimalen Bedingungen dar. Die „Variable“ in dieser Arbeit ist lediglich die stationäre Phase. Der Wechsel von Trennbedingungen (pH-Wert, Eluent usw.) diente ausschließlich dem Verständnis der Eigenschaften der Säulen bei den unterschiedlichen Bedingungen. Denn Peaks z.B. mit Tailing oder Fronting sind wichtige Hinweise für bestimmte Eigenschaften der Phasen. Dazu wurden bewusst auch recht problematische Substanzen getestet. Auch wurden für bestimmte Tests strengere Kriterien als in der Literatur üblich zugrunde gelegt. Schließlich wurden mehrere neue Tests entwickelt.

1.2 Zur Auswahl der untersuchten Säulen

Innerhalb von 18 Monaten wurden mehrere hundert HPLC-Anwender nach der von ihnen am häufigsten benutzten C₁₈/C₈-Säulen befragt. Es sind ca. 36 Säulen genannt worden, die alle in den Testsatz aufgenommen wurden. Weiterhin nahmen wir 20 neuere Säulen in die Testreihe auf, die in naher Zukunft an Wichtigkeit gewinnen könnten. Schließlich wurden noch 8 Säulen getestet, die erst vor kurzem vorgestellt wurden. Neben den C₁₈/C₈-Säulen wurde auch manche Säule getestet, die nicht zu den klassischen Alkylsäulen zählt: Fluofix, Hypercarb, Chromolith Performance, Synergi POLAR RP.

1.3 Vorbemerkungen und Aufbau der Studie

Vorbemerkungen

Der experimentelle Teil der Studie hat einen beträchtlichen Umfang, es wurden weit über 5.000 Trennungen durchgeführt. Die Ergebnisse werden jedoch in verdichteter Form präsentiert.

- Der Text wird knapp gehalten, vielleicht erscheint er manchmal "spartanisch". Der Leser möge es dem Autor nachsehen. Denn wollte man die Ergebnisse in einer Ausführlichkeit, wie in einer Publikation üblich, darstellen, so hätte die Studie einen etwas anderen Umfang. Sie hätte dabei jedoch womöglich ihr Ziel verfehlt. Der Autor steht für weitergehende Diskussionen gerne zur Verfügung. Tabellen, Grafiken, Chromatogramme usw. gehören üblicherweise in einen Fließtext. Der Einbau jedoch, auch nur von den „wichtigsten“, würde im vorliegenden Fall möglicherweise ein unbeschwertes Lesen verhindern. Auch manche(r) Leser(in) interessiert sich vielleicht ausschließlich für die Aussagen. Aus diesem Grunde wurde eine Auswahl von Tabellen, Grafiken usw. getroffen, die Aussagen und Zusammenhänge gut visualisieren. Diese werden in zwei Zusatzordner mitgeliefert, die Nummer der Abbildung findet sich an entsprechender Stelle im Text.
- Zu jedem Experiment gehörten selbstverständlich Wiederholmessungen, die der Bestätigung dienten. Diese werden im Text ebenso wenig erwähnt, wie z. B. die Injektion der einzelnen Substanzen zu Beginn eines Experimentes. Auch Experimente mit ähnlichen als den hier untersuchten Substanzen, die zu äquivalenten Aussagen, d. h. zu keinen nennenswerten neuen Erkenntnissen,

geführt haben, finden hier mit dem erklärten Ziel, den Umfang der Studie nicht unnötig anwachsen zu lassen, keine Erwähnung.

- Die Studie muss nicht unbedingt linear gelesen werden. Man kann problemlos hin und her „springen“. Dazu wurden die einzelnen Kapitel so verfasst, dass sie abgeschlossene Module darstellen. Damit bleibt nicht aus, dass mancher Zusammenhang an mehreren Stellen dargestellt werden musste. Kap. 3 und teilweise auch Kap. 4 dürften eher für „Vollblutchromatographen“ interessant sein. In Kap. 3 werden Säulenleistungstests vorgestellt, in Kap. 4 werden die Ergebnissen von klassischen und neuen Tests zur Phasencharakterisierung diskutiert. In Kap. 5 wird auf das Trennverhalten der Phasen gegenüber einzelnen Substanzklassen eingegangen. Leser, die mit der Analytik dieser (oder ähnlicher) Stoffe konfrontiert sind, finden hier detaillierte Angaben. Kap. 6 schließlich dürfte auf das größte Interesse bei dem anwendungsorientierten/„zeit-geplagten“ Leser stoßen. Hier werden die Ergebnisse zusammengefasst und kommentiert.

Vergleichbarkeit der Ergebnisse

Voraussetzung für eine Vergleichbarkeit von Ergebnissen ist die absolute Vergleichbarkeit von experimentellen Bedingungen. Daher wurden Messserien auch über 24 Stunden hin durchgeführt. Wurde die Messserie unterbrochen (z. B. Ausfall der Pumpe), wurde die gesamte Messserie wiederholt. Für Experimente, die einen Puffer benötigten, wurde die Pufferlösung in der benötigten Menge einmal angesetzt. Mit **diesem** Puffer wurden anschließend **alle** Messungen mit allen Säulen an **einer** Apparatur durchgeführt. Für die Gesamtdauer der Studie wurde streng darauf geachtet, dass die gleichen Chemikalien (Lösungsmittel, Salze etc.) verwendet wurden. Die Experimente wurden in drei zeitlich getrennten Blocks durchgeführt:

1. Block: 52 Säulen (Serie 1, S1),
2. Block: 10 Säulen (Serie 2, S2),
3. Block: 2 Säulen (Serie 3, S3).

Da chromatographische Bedingungen minimal variieren können (z. B. % Anteil Methanol in der Eluentenmischung, Injektionsvolumen) sind für die drei Blocks bei Bedarf auch getrennte Tabellen, Diagramme etc. erstellt worden; Die Ergebnisse werden stets innerhalb einer Messserie verglichen und diskutiert. Somit ist die Vergleichbarkeit von Zahlenwerten gewährleistet. Darüber hinaus wurden aus dem ersten Testblock mehrere Säulen mit unterschiedlichen Eigenschaften quasi als "interner Standard" ein zweites oder drittes Mal zusammen mit den Säulen aus dem zweiten und dritten Block vermessen. Letztendlich wurden zur Absicherung der experimentellen Abläufe einige Versuche mit allen 64 Säulen wiederholt.

Aufbau der Studie

Die Studie befasst sich mit vier Schwerpunkten.

- **Säulenleistungstests (Kap. 3)**
Bei diesen Tests handelt es sich um eine weitgehend Substanz-unspezifische Charakterisierung der Säulen, d. h. um die Ermittlung von allgemeingültigen Kenngrößen. Es geht hier beispielsweise um Packungsqualität, Druckabfall und um die Stabilität der Säulen im Routinebetrieb.

- **Chromatographische Charakterisierung von RP-Phasen (Kap. 4)**
In diesem Teil werden die Ergebnisse nach bekannten sowie neueren Tests zur Charakterisierung von RP-Phasen vorgestellt und kommentiert. Diese Tests führen zu Aussagen z. B. über das Vorhandensein von aktiven Silanolgruppen, über den apolaren Charakter einer Phase und über die Kontamination der Phasen mit Metallionen.
- **Trennverhalten (Kapazität, Selektivität) der untersuchten RP-Phasen (Kap. 5)**
Dieses Kapitel beschäftigt sich schwerpunktmäßig mit der Selektivität der untersuchten Phasen für eine Reihe von unterschiedlichen Substanzklassen (s. Übersicht unter "Experimentelles"). Neben dem chemischen Charakter der zu trennenden Komponenten wurde der Eluent (Methanol/Acetonitril) sowie der pH-Wert (sauer/alkalisch) variiert.
- **Zuordnung der untersuchten Phasen/Auswahl von Säulen (Kap. 6)**
Anhand der Ergebnisse werden nun die Säulen nach mehreren Kriterien bewertet. Anschließend werden die Phasen für die Trennung der untersuchten Substanzklassen in Gruppen "geeignet"/"nicht geeignet" eingeteilt. Es werden Selektivitätsplots für eine bestimmte Applikation (z. B. polare Selektivität) oder für den universellen Einsatz einer Säule erstellt und diskutiert. Zur Visualisierung der Ergebnisse wurden mehrere Darstellungen gewählt.
- **Anhang**
Hier findet sich ein Stichwortverzeichnis und ein Literaturüberblick zum Thema

2. Experimentelles

Um die Praxisrelevanz zu gewährleisten wurde bei der Auswahl und dem Design der Hardware bewusst darauf geachtet, dass übliche Alltagsbedingungen herrschen. Eine einfache Durchführung fördert die Bereitschaft, im eigenen Labor gegebenenfalls den einen oder anderen Test durchzuführen.

Beispiele:

Die HPLC-Apparaturen wurden nicht speziell optimiert, so betrug das Totvolumen 40 bzw. 50 µl; das sind durchaus übliche Werte.

Es wurden ausschließlich isokratische Trennungen durchgeführt, da solche "ehrlichere" Aussagen beim Säulenvergleich erlauben. Bei Gradiententrennungen könnten beispielsweise schmale Peaks eine besonders gute Effizienz vortäuschen.

Für die Tests wurden möglichst einfache Trennbedingungen entwickelt. So werden für alle Tests nur einige wenige Eluenten benötigt, s. unten. Das Ziel war ferner - neben eindeutigen Aussagen - auch akzeptable Retentionszeiten zu erzielen.

2.1 Apparatives, chromatographische Bedingungen

Die Experimente wurden an zwei modular aufgebauten HPLC-Apparaturen durchgeführt:

1. - HPLC-Pumpe, 515(Waters)
 - Probengeber, SIL-9A (Shimadzu), Injektionsventil, 7125 mit 10/100µl Schleife (Rheodyne)
 - Säulenofen, Mystral (Spark)
 - UV-Detektor, 481/2487 (Waters)
 - Integrator, C-R4AX (Shimadzu)

2. - HPLC-Pumpe, LC-9A (Shimadzu)
 - Injektionsventil, 7125/4097 mit 10/100 µl Schleife (Rheodyne)
 - Säulenofen, AVP (Shimadzu)
 - UV-Detektor, 440 (Waters), SPD-10 AV (Shimadzu)
 - Integrator, C-R4AX (Shimadzu)

Als Auswertesoftware wurde Clas VP (Shimadzu) verwendet.

Eluenten, Chemikalien

Die organischen Lösungsmittel waren stets HPLC-grade (LiChrosolv, Merck), das Wasser stammte aus einer Milli-Q Anlage. Die Salze für die Herstellung der Puffer waren von Fluka.

Herstellung der Eluenten

Die Eluenten wurden stets wie folgt hergestellt:

- MeOH/H₂O bzw. ACN/H₂O Mischungen

Ein entsprechendes Volumen an MeOH bzw. ACN wurde vorgelegt und mit Wasser auf 1 Liter aufgefüllt (geeichte Messzylinder). Obschon durch die konstante Arbeitsweise die Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet ist, empfiehlt sich für die Routineanalytik das Abwiegen der Lösungsmittel.

- Puffer

Die abgewogene Menge an KH₂PO₄ wurde in das entsprechende Volumen Wasser aufgelöst. Der pH-Wert (2,7 bzw. 7,6) wurde durch Titrieren mit einer 85 % H₃PO₄ bzw. gesättigten KOH-Lösung bei 25 °C eingestellt (Glaselektrode). Anschließend wurde das organische Lösungsmittel dazugegeben und im Ultraschallbad (ca. 10 min.) bzw. mit Helium (ca. 10 min.) entgast. Nach der Zugabe von MeOH/ACN verschiebt sich der pH-Wert zu höheren Werten:

pH = 2,7 \longrightarrow pH = ca. 3,2 bis 3.6

pH = 7,6 \longrightarrow pH = ca. 8,1 bis 8.5

Bei den einzelnen Experimenten herrschten folgende chromatographische Bedingungen:

Eluent	Temperatur [°C]	Wellenlänge [nm]	Fluss [ml/min]	Experiment/Kapitel
MeOH „1“	35	254	1	"Aromaten", 5.1
MeOH/H ₂ O 80/20 (v/v) „2“	40	254	0,5	"Metallionen", 4.2
MeOH/H ₂ O 80/20 bzw. 40/60 (v/v) „3“	40	254/220	1,5 bzw. 2	Hydrophobe Selektivität Polare Selektivität, 5.3, 5.4 bzw. 5.5, 5.6
32/78 ACN/H ₂ O (v/v) „4“	40	254	1,5 bzw. 2	Sterische Selektivität Silanophiler Charakter Apolarer Charakter, s.o.

40/60 MeOH/ Phosphatpuffer, 20 mM pH = 2,7 "5" bzw. pH = 7,6 "6"	40	254	1,5 bzw. 2	Polare Selektivität Sterische Selektivität Silanophiler Charakter, 5.5 – 5.12
32/78 ACN/ Phosphatpuffer, 20 mM, pH = 2,7 "7" bzw. pH = 7,6 "8"	40	254	1,5 bzw. 2	Polare Selektivität Sterische Selektivität Silanophiler Charakter Antidepressiva und deren Metabolite, s.o.
ACN/MeOH/H ₂ O (181 g/121 g/419 g) "9"	40	254	1,5 bzw. 2	"Steroide 1", 5.7
THF/MeOH/H ₂ O (100 g/300 g/400 g) "8"	40	254	1,2 bzw. 2	„Steroide 2“, 5.7

In Tabelle 1 sind die Analyte aufgeführt, die in der Studie verwendet wurden. In der Tabelle „Trennungen“ auf der mitgelieferten CD sind weitere Daten, sog. „QSAR-Properties“ (Quantitative Structure-Activity Relationships), da sind Eigenschaften, die sich aus der Molekülstruktur ableiten lassen, wie Moleküloberfläche, -volumen, Polarisierbarkeit usw. und die Strukturformel enthalten sowie die Kalottenmodelle der Verbindungen aufrufbar [1].

Bemerkung:

Bei allen Analyten, bis auf Coffein, „Steroid A“, „Steroid C“, Isopropyl- und Isobutylmethylketon handelt es sich um aromatische Verbindungen, deswegen wird nicht weiter darauf hingewiesen.

In Tabelle 2 sind die Analytpaare aufgelistet, die zur Untersuchung des Selektivitätsverhaltens der Phasen verwendet wurden. Ein kurzer Kommentar schildert die Charakteristik der jeweiligen Trennung.

Tab. 1.: Verwendete Analyte

Name, verwendete Abkürzung	Chemischer Charakter (grob!)
Anilin („Ani“)	Kleine, schwache Base
Pyridin („Pyr“)	Kleine, schwache Base
Benzylamin („Benz“)	Starke Base
Propranolol („Prop“)	Starke Base
4-, 3- und 2-Nitroanilin („4-Nan“, „3-Nan“ und „2-Nan“)	Isomere Aromaten
Toluol („T“)	Einkerniger Aromat
Ethylbenzol („EB“)	Einkerniger Aromat
4-Hydroxy-3-methoxyphenylessigsäure	Schwache organische Säure

(„Homovanilinsäure“, „HVS“)	
3-Hydroxy-4-methoxyphenylelessigsäure („Isohomovanilinsäure“, „IVS“)	Schwache organische Säure
5-Hydroxyindol-3-essigsäure („HIES“)	Schwache organische Säure
3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure („DOPAC“)	Schwache organische Säure
Isopropylmethylketon („Isopro“)	Organische, polare Komponente
Isobutylmethylketon („Isobu“)	Organische, polare Komponente
1, 3, 5 (10)-Estradien-3, 17- α -diol („Steroid E“)	Relativ polares Steroid
1, 3, 5 (10)-Estradien-3,17- β -diol („Steroid D“)	Relativ polares Steroid
1- α -Methyl-4-androsten-3,17-dion („Steroid A“)	Relativ apolares Steroid
1-Methyl-5- β -androst-1-en-3,17-dion („Steroid C“)	Relativ apolares Steroid
„Steroid B“	Unbekannte Verunreinigung
Amitriptylin („Ami“)	Organische Base
Nortriptylin („Nortri“)	Organische Base, Metabolit von Amitriptylin
Trimipramin („Trimi“)	Organische Base
Desmethyltrimipramin („Destri“)	Organische Base, Metabolit von Trimipramin
Desmethylmaprotylin („Desmapro“)	Organische Base, Metabolit von Maprotylin
Desipramin („Desipra“)	Organische Base , Metabolit von Imipramin
Clomipramin („Clomi“)	Organische Base
Desmethyldoxepin („Desdox“)	Organische Base
Chrysen („Chr“)	Großer, hydrophober Analyt
Perylen („Per“)	Großer, hydrophober Analyt

Benzoessäure („Benzoe“)	Schwache organische Säure
4- und 3-Hydroxybenzoessäure („4-OH“ und „3-OH“)	Schwache organische Säure
Phthalsäure („Phthal“)	Mittelstarke organische Säure
Terephthalsäure („Tere“)	Mittelstarke organische Säure
Coffein („Cof“)	Polarer Analyt, N-Heterocyclus
Phenol („Phe“)	Neutraler, polarer Analyt, Wasserstoff-Donator
Triphenylen („Tri“)	Großer, hydrophober, planarer Analyt
o-Terphenyl („o-Ter“)	Großer, hydrophober, nicht planarer (helicaler) Analyt
Fluoren („Fluoren“)	Großer, hydrophober Aromat
Fluorenon („Fluoro“)	Großer, hydrophober Aromat mit polarer Gruppe
Methyl-3-hydroxybenzoat („Methbenz“)	Einkerniger, polarer Aromat
Ethyl-3-hydroxybenzoat („Ethbenz“)	Einkerniger, polarer Aromat
Propyl-3-Hydroxybenzoat („Propbenz“)	Einkerniger, polarer Aromat
Uracil („Uracil“)	Inerte (?) Komponente
4,4'-Bipyridyl (4,4'')	Polarer Analyt
2,2'-Bipyridyl („2,2'")	Polarer Analyt, Komplexbildner

Die Analyte lassen sich in drei Gruppen einteilen, wobei innerhalb der Gruppe die Bandbreite der Eigenschaften groß ist:

- Neutrale Komponenten

Von stark hydrophoben Aromaten, z.B. Chrysen bis hin zu recht polaren, einkernigen Aromaten, z.B. Methylhydroxybenzoat. Weiterhin wurde der sterische Aspekt intensiv untersucht. So sind kleine/große planare/nicht planare sowie mehrere isomere Verbindungen getestet worden: Stellungsisomere, Doppelbindungsisomere.

- Saure Komponenten

Von schwachen, nahezu undissoziierten Säuren, z.B. Benzoesäure, bis hin zu stärker dissoziiert vorliegenden, aromatischen Säuren, z.B. Phthalsäure.

- Basische Komponenten

Vom tertiären Amin Pyridin, über hydrophobe, organischen Basen, z.B. Clomipramin (sekundäres Amin) bis hin zu kleinen, starken Basen, z.B. Benzylamin (primäres Amin).

Tab. 2.: Analytpaare

Analytpaar	Charakteristik der Trennung
Ethylbenzol / Toluol („EB / T“)	Methylengruppenselktivität bei einkernigen aromatischen Verbindungen
Methyl-3-hydroxybenzoat / Ethyl-3-hydroxybenzoat („Propbenz / „Metbenz“)	Methylengruppenselektivität bei polaren einkernigen aromatischen Verbindungen
Ethyl-3-hydroxybenzoat / Propyl-3-hydroxybenzoat („Prophez / Ethbenz“)	Methylengruppenselektivität bei polaren einkernigen aromatischen Verbindungen
Isobutylmethylketon / Isopropylmethylketon („Isobu / Isopro“)	Methylengruppenselektivität bei polaren, organischen (nicht aromatischen) Verbindungen
Ethylbenzol / Fluorenon („EB / Fluoro“)	Trennung eines neutralen von einem Aromaten mit einer polaren Gruppe („apolar / polar“-Trennung)
Fluoren / Fluorenon („Fluore / Fluoro“)	Wie oben, C=O-Selektivität („apolar / polar“- Trennung)
Chrysen / Perylen („Chry / Per“)	Große, hydrophobe Aromaten ohne Substituenten
Triphenylen / o-Terphenyl („o-Ter / Tri“)	Große, hydrophobe Aromaten, planar / nicht planar („shape selectivity“)
3-Nitroanilin / 4-Nitroanilin („3/4-Nan“)	Isomere Aromaten, schwache Basen, recht polar („polar- / polar“- Trennung)
2-Nitro-Anilin / 3-Nitro-Anilin	Isomere Aromaten, schwache Basen („apolar / polar“- Trennung)

Steroid C / Steroid A („Steroid 1“)	Relativ polare Steroide
Steroid E / Steroid D („Steroid 2“)	Relativ apolare Steroide
Benzylamin / Pyridin („Benz/Pyr“)	Starke Base / schwache Base
Trimipramin / Amitriptylin („Tri / Ami“)	Organische Basen, recht apolar (tricyclische Antidepressiva)
Desmethyltrimipramin / Nortriptylin („Desmeth / Nortri“)	Metaboliten von „Tri“ und „Ami“, polare organische Basen
Desipramin / Desmethylmaprotylin („Desipra / Desmapro“)	Die polarsten der untersuchten Metabolite
Clomipramin / Desmethyldoxepin („Clomi / Desdox“)	Das apolarste Antidepressivum und der polarste Metabolit
Propranolol / Benzylamin	Starke Base mit ausgeprägtem organischen Charakter / starke kleine Base
3-Hydroxybenzoesäure / 4-Hydroxybenzoesäure („3 OH / 4 OH“)	Schwache organische Säuren, isomere Aromaten („apolare“ Trennung)
4-Hydroxy-3-methoxyphenylelessigsäure / 5-Hydroxyindol-3-essigsäure („HVS/HIES“)	Schwache organische Säuren („apolare“ Trennung)
5-Hydroxyindol-3-essigsäure / 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure („HIES / DOPAC“)	Schwache organische Säure / etwas stärkere Säure als „HIES“
5- Hydroxyindol-3-essigsäure / 3-Hydroxy-4-methoxyphenylelessigsäure („HIES / IVS“)	Schwache organische Säure / mittelstarke organische Säure
Phthalsäure / Terephthalsäure („Phthal / Tere“)	Mittelstarke Säuren, isomere Aromaten („polare Trennung“)

In Tabelle 2.2.1 sind die physikalischen Eigenschaften der Phasen sowie die Säulendimensionen aufgeführt.

Bemerkungen zu den Zahlenwerten der Tabelle 2.2.1.

Bei den Zahlenwerten handelt es sich sowohl um selbst gemessene als auch um Literatur- oder Herstellerangaben. Es wurden in die Tabelle alle zur Verfügung gestandene Werte berücksichtigt – auch dann, wenn die Zahlenwerte nur für wenige Phasen bekannt waren, wie z.B. der pH-Wert des Kieselgels oder das Porenvolumen. Der eine oder andere Wert mag von Literaturangaben variieren. Das kann mit den üblichen chargenabhängigen Abweichungen zusammenhängen oder aber es handelt sich um Ab-/Aufrundungen z.B. bei der Berechnung des Bedeckungsgrades. Die Daten der Herstellerfirmen/Lieferanten befinden sich auf der CD unter „Säulen“.

In Abb. 2.2.1 bis Abb. 2.2.6 sind die Säulen nach folgenden physikalischen Eigenschaften sortiert: Porendurchmesser, spezifische Oberfläche, Kohlenstoffgehalt, spezifisches Porenvolumen, Bedeckungsgrad und Bedeckungsdichte.

3. Säulenleistungstests

In einem Säulenleistungstest werden Merkmale einer Phase/Säule ermittelt, die eine Charakterisierung möglichst unabhängig von dem zukünftigen Einsatz zulässt:

- Packungsqualität
- Asymmetrie
- Druckabfall
- Stabilität im Routinebetrieb

Die Eigenschaften von RP-Phasen sind häufig chargenabhängig. Die Unterschiede können marginal oder auch beträchtlich sein. Gesicherte Aussagen über die Eigenschaften einer Phase sind nur möglich, wenn Säulen aus mehreren Chargen untersucht werden. Dies hätte jedoch einen beträchtlichen Mehraufwand und einen längeren Versuchszeitraum erfordert. Deshalb war die Chargenreproduzierbarkeit nicht Gegenstand der vorliegenden Studie. Aus diesem Grunde haben manche der nachfolgend vorgestellten Befunde wie Bodenzahlen und Asymmetriefaktoren lediglich einen qualitativen Charakter; die ermittelten Zahlen haben keine statistische Relevanz.

3.1 Packungsqualität

Ein Maß für die Packungsqualität ist die Bodenzahl. Die errechnete Bodenzahl allerdings ist neben der verwendeten Berechnungsformel (z.B. welche „Peakbreite“ wird zugrunde gelegt?) abhängig von mehreren methodenspezifischen Faktoren wie Retentionszeit des Analyten, Viskosität, Flussgeschwindigkeit und Temperatur des Eluenten, Injektionsvolumen, Totvolumen der Apparatur („extra column effects“) usw. Ein Vergleich von Packungsqualitäten anhand von Daten aus der Literatur oder vom Hersteller erweist sich somit als recht problematisch. Bei Vergleichsexperimenten wie im vorliegenden Fall, sind Absolutwerte zweitrangig; vielmehr geht es hier um das Verhältnis der Bodenzahlen der einzelnen Säulen zueinander, die ja bei identischen Versuchsbedingungen ermittelt wurden. Es wurden die Bodenzahlen bei der Verwendung von fünf Analyten, zwei Flussgeschwindigkeiten und drei verschiedenen Eluenten verglichen.

Eluent	Fluss [ml/min]	Analyte
Methanol <u>“1”</u>	1	Uracil, Perylen
Methanol / Wasser (80/20, v/v) <u>“2”</u>	1,5	Uracil, Ethylbenzol, o-Terphenyl

Wasser / Methanol / Tetrahydrofuron (600 ml / 400 ml / 50 ml) „9“	1,5	Uracil, „Steroid A“

Diese Konstellationen wurden bewusst gewählt:

Eluenten

100 % MeOH:	Relativ polares, organisches Lösungsmittel
80/20 MeOH / H ₂ O:	Typischer RP-Eluent, erhöhte Viskosität
MeOH/H ₂ O/THF:	Mischung mit hoher Elutionskraft

Analyte

Uracil:	Inerte Komponente (siehe jedoch auch spätere Ausführungen in 4.3!)
Perylen:	Hydrophober, mehrkerniger Aromat
o-Terphenyl:	Helicale, sterisch „anspruchsvolle“ aromatische Struktur
Ethylbenzol:	Einkerniger Aromat, „typischer“ RP-Analyt
Steroid A	Apolares, „großes“ Steroid

Mit diesen Substanzen ist es möglich, sowohl die Packungsqualität (Bandenverbreiterung bei neutralen Analyten) als auch spezielle Wechselwirkungen z.B. bei Mischmechanismen (Massentransfer-Term der Van-Deemter-Gleichung) zu untersuchen.

Abb. 3.1.1 bis 3.1.3 zeigen die Bodenzahlen N für Uracil in den drei Eluenten, Abb. 3.1.4 bis 3.1.7 die Bodenzahlen der vier übrigen Analyte im jeweiligen Eluenten bei der Serie 1. Die Diagramme der Serie 2 entsprechen Abb. 3.B.1.1 bis 3.B.1.3 bzw. 3.B.1.4 bis 3.B.1.7.

Diskussion

Mit dem Ziel, den Vergleich der Tabellen und Grafiken zu vereinfachen, werden die Säulen in drei Gruppen eingeteilt. In jeder Gruppe der Serie 1 befinden sich ca. 16 Säulen, in denen der Serie 2 ca. 4 Säulen.

- Vorbemerkungen zur Bestimmung „der“ Bodenzahl

Laut Theorie der Chromatographie nimmt die theoretische Bodenzahl mit dem Retentionsfaktor zunächst ab, um ab einem k -Wert von ca. 5 konstant zu bleiben. Diese Forderung kann jedoch nur in sehr sorgfältig optimierten Apparaturen mit vernachlässigbaren Totvolumina („extra column effects“) erfüllt werden. Durch die üblichen Totvolumina in kommerziellen Apparaturen nimmt die Bodenzahl mit dem Retentionsfaktor zu, später eluierende Peaks weisen höhere Bodenzahlen auf. Dies gilt natürlich nur für die „physikalische“ Bandenverbreiterung von Substanzen auf der Basis idealer, kleiner Moleküle. Eine besonders langsame Kinetik (gehemmter Massentransfer, großer C -Term der Van-Deemter Gleichung) aufgrund von sterischen Effekten oder dualem Sorptionsmechanismus durch eine inhomogene Phasenoberfläche kann die Bodenzahl enorm erniedrigen. Die Bodenzahl also ist in jedem Fall abhängig von der Retentionszeit bzw. von dem Retentionsfaktor des Analyten. Ein Vergleich von absoluten Bodenzahlen ist somit per se nicht statthaft – es sei denn, die Retentionsfaktoren an den betreffenden Säulen sind zufällig praktisch identisch. Für Vergleichszwecke gäbe es die Alternative, die Bodenzahl einer inerten Komponente zu verwenden. So ist zwar die theoretische Bodenzahl einer Säule definiert, diese Zahl hat jedoch für die Praxis kaum eine Aussagekraft: Die gute/schlechte Effizienz einer Säule macht sich erst bei retardierten Substanzen bemerkbar, d.h. erst durch eine merkliche Verzögerung der Substanz in der betreffenden Säule kann überprüft werden, ob deren Bandenverbreiterung gering oder eben stark ausfällt.

Wie weiter oben erwähnt, ist ein direkter Vergleich der Bodenzahlen verschiedener Säulen nur mit Hilfe eines solchen Analyten möglich, der bei gegebenen Versuchsbedingungen möglichst ähnliche Retentionsfaktoren an den betreffenden Säulen aufweist. Er sollte darüber hinaus eine „unproblematische“ Substanz sein. Dafür eignet sich beispielsweise Ethylbenzol. So können in Tab. 3.1.1 bzw. Abb. 3.1.5 die Bodenzahlen von Zorbax ODS, SMT OD, Kromasil und Purospher e direkt miteinander verglichen werden, die k -Werte sind mit 2,30 bzw. 2,28 praktisch identisch.

Da jedoch Ethylbenzol an anderen Säulen erwartungsgemäß unterschiedliche Retentionsfaktoren aufweist, können die errechneten Bodenzahlen nicht mit den Werten der anderen Säulen direkt verglichen werden. Als Ausweg wird hier folgende Normierung vorgenommen: Bodenzahl geteilt durch quadratische Wurzel des k -Wertes bei retardierten Substanzen bzw. Bodenzahl geteilt durch Retentionszeit bei Uracil, siehe Abb. 3.1.8 bis 3.1.11 für die Analyte und Abb. 3.1.12 bis 3.1.14 für Uracil. Obwohl dem Autor aus der Literatur kein

mathematischer Zusammenhang zwischen der Wurzel des k-Wertes und der Bodenzahl bekannt ist, spiegelt die Darstellung in Abb. 3.1.8 wahrscheinlich eher die Realität wieder als die Darstellung in Abb. 3.1.5. Eine weitere Möglichkeit der Normierung stellt der Quotient $N_{\text{Uracil}}/N_{\text{Analyt}}$ dar. Darauf wird hier nicht weiter eingegangen, weil sie zu keinen neuen Erkenntnissen führt.

Als zweites Beispiel betrachten wir die Werte für o-Terphenyl, an Säulen, an denen dieser Analyt mit ähnlichen Retentionsfaktoren eluiert, vgl. Werte in Tab. 3.1.1 und Abb. 3.1.5 bzw. Abb. 3.1.9.

Auch hier werden recht große Unterschiede festgestellt. Wird eine bestimmte Bodenzahl an einer Säule bei einem früheren k-Wert erreicht im Vergleich zu einer anderen Säule, so ist Erstere effizienter. Die Bodenzahl von Perylen beispielsweise beträgt bei einem k-Wert von 1,35 an Luna 2 (Nr. 19, Tab. 3.1.2) etwa 10.000 während sie an MP-Gel (Nr. 20) trotz eines k-Wertes von 2,21 ebenfalls „nur“ 10.000 beträgt, s. Chromatogramm Chr. 3.1.1 (MP-Gel) und Chr. 3.1.2 (Luna 2). Der Quotient $N_{\text{Analyt}}/k_{\text{Analyt}}$ ist quasi ein Maß für die Effizienz mit der *dieser* Analyt bei *diesem* Retentionsfaktor eluiert.

So ist der Quotient $N_{\text{Per}}/k_{\text{Per}}$ bei Luna 2 günstiger (9.175) als an MP-Gel (6.792). Betrachten wir ein weiteres Beispiel, Bondapak (Nr. 1, Tab. 3.1.2) und Vydac (Nr. 46). Bei gleicher Korngröße von 10 μm und einer ähnlichen Bodenzahl von Uracil um die 3.000 zeigt erst der Quotient $N_{\text{Per}}/k_{\text{Per}}$, dass Bondapak mit 4.689 effizienter ist (eine bessere Trennleistung hat) als Vydac mit einem Quotienten von 3.983.

Es soll darauf hingewiesen werden, dass eine gegebene „bessere“ Effizienz nur eine aktuell bessere sein kann. So wird nur im vorliegenden Fall (für den Analyten „Perylen“) an Bondapak eine bessere Effizienz im Vergleich zu Vydac festgestellt. Für andere Analyte (z.B. Ethylbenzol, s. Abb. 3.1.8) zeigt Vydac die bessere Effizienz. In diesen Beispielen zeigt sich, wie wichtig die spezifischen Wechselwirkungen einer Substanz mit einer Phase sind. Das heißt konkret, dass der Massentransfer einen wichtigen Beitrag zur Bodenzahl hat. Praxisbezogen formuliert (bzw. „Marketing-optimiert“ handelnd) bedeutet das folgendes: Die „intelligente“ Wahl des Analyten – und natürlich auch der übrigen experimentellen Bedingungen – kann einer Säule mittlerer Qualität eine sehr gute Effizienz bescheren...

Große Quotienten N/\sqrt{k} weisen bei gleichen k-Werten auf eine kleine Korngröße (z.B. Discovery Amid C₁₆ Nr. 2, 8.043, oder TSKgel Nr 44, 7.469 in Tab. 3.1.1) oder auf gut gepackte Säulen hin, z.B. Jupiter Nr.14, 6.699 oder Zorbax SB C₈ Nr. 51, 6.199, ebenfalls in Tab. 3.1.1.

Quotienten N/\sqrt{k} sind somit nur zu vergleichen, wenn auch die k-Werte in etwa gleich sind.

Auffallend kleine Quotienten schließlich wie beim Analyten o-Ter z.B. an Phasen wie Nucleosil AB oder SMT OD (Abb. 3.1.9) zeugen von einem gehemmten Massentransfer. Der Grund hier liegt in einer langsamen Kinetik aufgrund der Polymerschicht an der Oberfläche dieser Phasen, s. Chr. 3.1.3.

In Tab. 3.1.1 sind u.a. auch die Werte für Ethylbenzol und o-Terphenyl enthalten. Vergleichen wir aus dieser Tabelle zwei weitere Säulen, HyPURITY C₁₈, Nr. 10 und

Jupiter, Nr. 14. Beide zeigen vergleichbare k-Werte für Ethylbenzol (0,92 bzw. 0,99) und o-Terphenyl (2,64 bzw. 2,68).

Der Quotient N/\sqrt{k} ist bei Jupiter größer (6.699 gegenüber 4.954), der Quotient dagegen N/\sqrt{k} ist identisch bzw. bei HyPURITY C₁₈ etwas größer (3.696 gegenüber 3.516). Offensichtlich ist die Säuleneffizienz von Jupiter besser, was mit Hilfe von „unproblematischen“ Analyten wie dem Ethylbenzol festgestellt werden kann. Sobald jedoch ein spezifischer Effekt zu einer langsamen Kinetik führt – wie es hier mit der räumlich relativ anspruchsvollen Struktur von o-Terphenyl im Zusammenhang mit dem 300Å Porendurchmesser von Jupiter der Fall ist – nimmt der entsprechende Quotient, hier No-Ter/ko-Ter relativ stark ab, s. Chr. 3.1.4 (HyPURITY) und Chr. 3.1.5 (Jupiter).

Vergleicht man nun die Auftragung NUracyl/tUracyl (Abb. 3.1.12) bzw. N/\sqrt{k} (Abb. 3.1.8) mit den Auftragungen NUracyl (Abb. 3.1.1) bzw. NEthylbenzol (Abb. 3.1.5) beobachtet man Folgendes: Je nach gewählter Darstellung ändert sich bei einigen Säulen die Position in dem Ranking. So befindet sich beispielsweise Inertsil ODS 3 in Abb. 3.1.5 (Auftragung N) im oberen Drittel, in Abb. 3.1.8 dagegen (Auftragung N/k), etwa in der Mitte.

Spherisorb ODS1 und Supelcosil ABZ PLUS befinden sich in Abb. 3.1.5 im unteren, in Abb. 3.1.8 jedoch in der Mitte oder im oberen Drittel. Ebenfalls nach unten „gerutscht“ sind u.a. Kromasil und Purospher. Andere Säulen, wie z.B. Zorbax SB C₈ und Nucleosil Protect 1 dagegen „wandern“ nach oben.

- Mögliche Erklärung

Ein kleiner Quotient N/\sqrt{k} ergibt sich durch einen verhältnismäßig großen k-Wert, ein großer Quotient weist dagegen auf einen relativ kleinen k-Wert hin. D.h. diejenigen Säulen, die nach oben „wandern“, weisen für diesen Analyten schwache Wechselwirkungen auf, diejenigen mit einer Tendenz nach unten dagegen gehen mit dem Analyten starke Wechselwirkungen ein. Tatsächlich befinden sich im unteren Drittel der Abb. 3.1.5 Phasen mit einem eher apolaren Charakter (Inertsil ODS 3, Purospher, Nucleosil HD, Nucleosil AB). Diese „gewanderten“ Phasen sind zu unterscheiden von Phasen, die sich bereits in Abb. 3.1.5 im unteren Drittel befanden (z.B. Nucleosil 100, Nova-Pak). Umgekehrt weisen Phasen, die nach oben „gewandert“ sind und sich nun in Abb. 3.1.8 im oberen Drittel befinden, einen polaren Charakter auf, z.B. Discovery Amid C₁₆, Zorbax SBC₈, Fluofix IEW, Spherisorb ODS 1. Die Größe des „Sprungs“ ist ein qualitatives Maß, inwieweit die Affinität eines Analyten gegenüber einer Phase die Bodenzahl beeinflusst. Die hier beschriebene Beobachtung wurde auch bei den Steroiden (Abb. 3.1.7 und 3.1.11) und dem o-Terphenyl (Abb. 3.1.6 und 3.1.9) gemacht.

Völlig analog – aber entgegengesetzt – liegen die Verhältnisse beim Uracyl: Es kann klar festgestellt werden, gegenüber welchen Phasen das „inerte“ Uracyl sich nicht inert verhält. Dieser Aspekt wird in Kap.4.6. ausführlich behandelt.

In der Praxis ist auch folgender Aspekt wichtig: Man möchte gerne mit Säulen arbeiten, die zwar eine hohe Bodenzahl aufweisen aber gleichzeitig auch einen moderaten Druckabfall erzeugen. In Abb. 3.1.16 und 3.1.16 sind der normierte Druckabfall und die normierte Bodenzahl für alle Säulen aufgetragen. Einige Säulen bauen einen verhältnismäßig hohen Druck auf - bei einer mittleren

Bodenzahl. Andererseits fällt der Druckaufbau an den Zorbax SB-Säulen bei guter Effizienz moderat aus.

- **Fazit:**
Eine große Differenz im Ranking bei den Auftragungen N/k und N zeugt von einem stark hydrophoben (hier!) Charakter der Phase. Generell stellt der „Sprung“ ein qualitatives Maß für die Affinität des Analyten zum entsprechenden Phasenmaterial dar.

Zusammenfassung

Es wurden große Unterschiede in den Bodenzahlen festgestellt. Zum einen wie erwartet aufgrund eines kleinen Teilchendurchmessers, zum anderen offensichtlich wegen einer guten Packungsqualität. Bestimmte Säulen liefern stets „große“ Bodenzahlen, sie befinden sich bei sämtlichen Konstellationen Eluent, Analyt, Fluss und unterschiedlicher Auftragsart stets im oberen Drittel.

Der direkte Vergleich von Bodenzahlen trotz unterschiedlicher Retentionsfaktoren an den einzelnen Säulen ist zwar in Publikationen Usus, erscheint jedoch aus den dargelegten Gründen als problematisch, da falsche Rückschlüsse bezüglich Packungsqualität gezogen werden können.

Eine Normierung unter Berücksichtigung von Retentionsfaktoren (N/\sqrt{k}) oder unter Bezug auf eine inerte (!) Komponente (NURacil/NAlyt) könnte einen akzeptablen Kompromiss darstellen. Der Vergleich N mit N/\sqrt{k} , bzw.

$N_1/\sqrt{k_1}$ mit $N_2/\sqrt{k_2}$ liefert darüber hinaus interessante Hinweise auf eine besondere Affinität eines Analyten mit einer gegebenen Phase. So kann eine Säule für bestimmte Analyttypen eine hervorragende Bodenzahl liefern, für andere Analyte jedoch aufgrund ionischer Wechselwirkungen oder sterischer Effekte eine dürftige. Manch andere Säule ähnlicher Packungsqualität zeigt dagegen für unterschiedliche Analyte einen stets schnellen Massentransfer und damit stets eine gute, gleichbleibende Effizienz.

3.2. Druckabfall

Der Druckabfall wurde in vier Experimenten unter folgenden Bedingungen registriert:

Eluent	Fluss [ml/min]	Temperatur [°C]
MeOH	1	35° C
MeOH/H ₂ O (80/20)	0,5 und 1,5	40° C
MeOH/H ₂ O (40/60)	1	40° C

In der Praxis interessiert zunächst der absolute Druckabfall an einer bestimmten Säule. Dieser kann nämlich unter Umständen den Einsatz dieser Säule für die gegebene Methode einschränken oder gar verhindern – trotz einer guten Selektivität.

Um allerdings die Säulen direkt miteinander vergleichen zu können, muss zunächst eine Normierung vorgenommen werden, da die Säulendimensionen unterschiedlich sind.

Es wurde hier zweifach normiert:

1. Eine Normierung bezogen lediglich auf das Volumen der Säule (bar/cm^3)
2. Eine Normierung, die die unterschiedlichen Längen (Proportionalität zwischen Länge und Druck) und die unterschiedlichen Innendurchmesser (umgekehrte quadratische Proportionalität zwischen Radius und Druck) der verwendeten Säulen berücksichtigt .

Der normierte Druck (bar/cm^3) ist ein Hinweis auf die mechanische Beanspruchung der Packung und somit mit ein Faktor für die erwartete Lebensdauer der Säule bezüglich Packungsqualität: Je kleiner die (normierten) Werte sind, um so geringer ist die mechanische Beanspruchung der Packung. Die Normierung, wie unter 2. beschrieben, ist in jedem Falle vorzuziehen. Im vorliegenden Fall wurde auf die Säulendimension $125 \times 4 \text{ mm}$ normiert, Abb. 3.2.1 zeigt den absoluten Druckabfall, Abb. 3.2.2 die normierten Werte (bezogen nur auf das Säulenvolumen), in Abb. 3.2.3 und 3.2.4 sind die normierte Werte unter Berücksichtigung von Säulenlänge **und** Säuleninnendurchmesser für die beiden Serien zu sehen, vgl. dazu auch die Werte in Tab. 3.2. Letztere Normierung wäre vorzuziehen, weil der Druck der Säulenlänge proportional und dem Innendurchmesser umgekehrt quadratisch proportional ist. Auf eine Normierung bezüglich Korngröße wurde verzichtet, weil die meisten der verwendeten Materialien eine $5\mu\text{m}$ -Körnung aufweisen. Die Reihenfolge der Diagramme von oben nach unten in Abb. 3.2.1 und 3.2.2 entspricht dem zeitlichen Ablauf der Experimente.

Diskussion

Erwartungsgemäß erzeugt manches $4\mu\text{m}$ -Material, z.B. Superspher, Superspher Select B einen hohen Druckabfall. Erstaunlicherweise weist das $4 \mu\text{m}$ Material Novapak und im besonderen Maße Discovery einen sehr moderaten Druckabfall auf. Dies könnte ein Hinweis auf eine enge Korngrößenverteilung sein. Des weiteren befinden sich im oberen Drittel Materialien, die offensichtlich „hart“ gepackt werden (z.B. Ultrasep ES), sowie Materialien, die bekannt sind für den hohen Druckabfall, den sie erzeugen, z.B. Nucleosil, Spherisorb. Die Ursache für einen von Anfang an hohen Druck liegt vermutlich an einer recht breiten Korngrößenverteilung oder an einer höheren Packungsdichte (vgl. z.B. Spherisorb ODS 1: $0,66\text{g Material}/\text{cm}^3$ Säulenvolumen). Letztere ergibt sich als Folge einer bestimmten Packtechnik (druckprogrammiertes Packen) oder charakterisiert einfach die Eigenschaft eines bestimmten Materials.

Steigt der Druck erst im laufenden Betrieb an, so kann dies ein Hinweis auf entstehenden Abrieb sein („fines“).

Niedriger Druckabfall herrscht in den $10 \mu\text{m}$ Säulen Bondapak und Vydac. Der in der Literatur geäußerte Verdacht, manche Hersteller würden mit dem Ziel einer höheren Bodenzahl, tatsächlich kleineres Material als das deklarierte verwenden, konnte, bis auf einzelne Unsicherheiten, generell nicht bestätigt werden. Neben einem auffallend hohen Druck müsste in einem solchen Fall auch auffallend hohe Bodenzahlen festzustellen sein. Das ist jedoch nicht der Fall, vergleiche dazu die entsprechenden Bodenzahlen im Abschnitt 3.1. Und man kann schwerlich annehmen, dass diese Hersteller ihre Säulen besonders schlecht packen...

Dem Vergleich von Abb. 3.2.1 , zweite von oben, (Absolutwerte), Abb. 3.2.2. , oben, („einfache“ Normierung) und Abb. 3.2.3 („exakte“ Normierung) kann folgendes entnommen werden:

- Einige Säulen wie Novapak, Prontosil, Symmetry zeigen recht hohe Absolut- und auch recht hohe normierte Werte - bei der einfachen Normierung. Die recht moderate Werte jedoch aus der Abb. 3.2.3 lassen vermuten, dass die Lebensdauer dieser Säulen zufriedenstellend sein dürfte.

Zusammenfassung

Es wurden große Unterschiede, sowohl was den absoluten Druckabfall als auch die normierten Werte betrifft, festgestellt. Diese Unterschiede sind naturgemäß vor allem beim Einsatz von Eluenten mit hoher Viskosität (H₂O/MeOH) von Bedeutung.

3.3. Asymmetrie

Es wurde die Asymmetrie von sechs Analyten in den Eluenten, wie unter „Packungsqualität“ angegeben, untersucht.

Eluent	Analyt(e)
Methanol	Uracil, Perylen
Methanol/Wasser (80/20, v/v)	Uracil, Ethylbenzol, Triphenylen, Isobuthylmethylketon
Methanol/Tetrahydrofuran/Wasser	Uracil, Steroide

Abb. 3.3.1 bis 3.3.3 zeigen die Werte von Uracil in den drei Eluenten, Abb. 3.3.4 bis 3.3.8 die der übrigen Analyte. In Abb. 3.3.5a und in Abb. 3.3.6a ist die Korrelation zwischen der „normierten“ Bodenzahlen und den Asymmetriefaktoren für Ethylbenzol (Abb. 3.3.5a) und o-Terphenyl (Abb. 3.3.6a), diese Korrelationen für die Säulen der Serie 2 sind der Abb. 3.B.3.5a und der Abb. 3.B.3.6a zu entnehmen.

In Abb. 3.3.9 bis 3.3.11 sind für einen anschaulichen Vergleich die A_s–Werte von je zwei Analyten unter gleichen Bedingungen aufgetragen. In den Abb. 3.B.1 bis 3.B.11 sind die entsprechenden Werte für Serie 2 dargestellt.

Diskussion

Die Asymmetrie ist eine Größe, die die Kinetik bei der Wechselwirkung zwischen Analyt und Phase individuell charakterisiert. Der Asymmetriefaktor wurde hier wie folgt berechnet (Auswertesoftware Clas VP, Shimadzu): Peakbreite in 5% Peakhöhe geteilt durch den zweifachen Abstand von der Peakfront zum Peakmaximum in 5% Peakhöhe.

Je nach verwendetem Analyt können die Werte stark schwanken. Der Effekt, dass basische Komponenten an nicht – oder nicht gut endcappten Phasen ein starkes Tailing aufweisen wird als bekannt vorausgesetzt und hier nicht weiter behandelt; zu dieser Problematik, s. Kap. 4. 3. Mit dem Ziel, Substanz-unspezifische Effekte wie Asymmetrie durch eine geringe Packungsqualität oder auf Grund von Totvolumina in

der Apparatur („extra column effects“) auszuschließen wurde eine Normierung vorgenommen, in dem folgende Quotienten gebildet und aufgetragen wurden:

$A_s \text{ Inert} / A_s \text{ Analyt}$ (z.B. $A_s \text{ Uracil} / A_s \text{ Perylen}$) bzw.

$A_s \text{ "harmlose" Substanz} / A_s \text{ Analyt}$ (z.B. $A_s \text{ Ethylbenzol} / A_s \text{ Triphenylen}$)

Obwohl hier bewusst eher „problemlose“ Substanzen für die Ermittlung der Asymmetrie ausgesucht wurden, ergaben sich große Unterschiede und interessante Erkenntnisse, dazu nachfolgend einige Beispiele:

Uracil zeigt in 100% Methanol bei vielen Phasen ein leichtes Tailing, wahrscheinlich die Folge von „extra column effects“. Je besser die Säule gepackt ist, um so stärker fällt die Asymmetrie von Uracil aus. An einigen Phasen, z.B. Hypercarb, YMC AQ, Fluofix INW zeigt Uracil eine auffallend geringe Symmetrie. Das sind just die Phasen, gegenüber denen Uracil sich nicht inert verhält, (s. Kap. 4.6).

Spät eluierende Peaks, z.B. Perylen, o-Terphenyl zeigen in der Regel an allen Phasen eine gute Symmetrie, „extra column effects“ spielen hier erwartungsgemäß kaum eine Rolle. Eine Ausnahme bilden Phasen mit einem kleinen (z.B. Nucleosil 50) bzw. einem großen (z.B. Jupiter) Porendurchmesser. An solchen Phasen zeigen Analyte mit einer sterisch anspruchsvollen Struktur Fronting oder Tailing, s. unten stehende Tabelle, sowie Chr. 3.1.5 und Chr. 3.3.1. Für einen direkten Vergleich sind in der Tabelle auch die Werte dieser Analyte auch an Discovery C₁₈ angegeben, eine Phase mit einem relativ „unproblematischen“ Porendurchmesser von 180Å.

	Uracil	Ethylbenzol	Triphenylen	Perylen	Steroid 1
Nucleosil 50	1,15	0,76	0,77	0,83	0,80
Jupiter	1,05	1,00	1,44	1,80	1,05
Discovery C ₁₈	0,98	0,99	0,96	1,05	1,05

Eine gute Selektivität – häufig durch ionische Wechselwirkungen oder sterische Effekte unterstützt – geht leider meist mit einer geringen Symmetrie einher.

Beispiel 1: $A_s \text{ Perylen} > A_s \text{ Uracil}$ an polaren Phasen

Beispiel 2: $A_s \text{ Isobu im Alkalischen} > A_s \text{ Isobu im Neutralen}$ s. auch „Vergleiche“ in Kap. 6.

Einige Phasen, z.B. ProntoSil AQ zeigen für alle Analyte einen nahezu konstanten Asymmetriefaktor von 0,9

Aromatische Verbindungen, auch „kleine“ Aromaten ohne „besonderen“ Substituenten wie Ethylbenzol, zeigen an mehreren Phasen ein leichtes Fronting (sterisch gehindert?). Ebenso verhalten sich Steroide.

Aus dem Gesagten geht hervor, dass das Urteil über „gute“ oder „schlechte“ Säulen faktisch durch die Wahl des Analyten festgelegt wird. So zeigen beispielsweise nahezu alle Phasen mit o-Terphenyl und Perylen (s. Abb. 3.3.4 und 3.3.5) eine hervorragende Symmetrie. Eine Differenzierung von Säulen anhand solcher Analyte ist schwer. Mit „problematischen“ Analyten fällt dies wesentlich leichter.

Zusammenfassung

- Je später die Peaks eluieren, um so symmetrischer sind sie in der Regel. Daraus folgt, strenge Tests bezüglich Symmetrie sollten:
 1. mit wasserarmen bzw. sehr apolaren Eluenten und
 2. mit Substanzen, die a) früh eluieren und b) sterisch anspruchsvolle Struktur besitzen, durchgeführt werden
- Die Wahl des Analyten und des Eluenten sind entscheidend für die resultierenden Asymmetriefaktoren. So ist es recht einfach, durch die Wahl von „optimalen“ Bedingungen dafür zu sorgen, dass ein Analyt an einer Phase den idealen Wert „1“ zeigt. Die gleiche Phase kann bei Wechsel von Analyt und Eluenten als „schlecht“ charakterisiert werden: Bei den hier besprochenen Experimenten ergaben sich Asymmetriefaktoren zwischen 0,75 und 2,9.
- In ungepufferten Systemen geht eine gute Selektivität oft mit einer geringen Symmetrie einher.
- Eine hohe Bodenzahl – bedingt durch eine kleine Korngröße oder/und eine gute Packungsqualität korreliert nicht automatisch mit einer guten Peaksymmetrie vgl. dazu die Werte in den Abb. 3.3.5a, 3.3.6a, 3.B.3.5a, 3.B.3.6a.
- Obschon eine Reihe der untersuchten Phasen stets im oberen Drittel zu finden ist und deren gute Asymmetriefaktoren ein (nicht sehr wichtiges) Entscheidungskriterium bei der Säulenauswahl darstellen, empfiehlt sich für eine Beurteilung einer Phase bezüglich Symmetrie das Verwenden der eigenen Analyte unter den applikationsrelevanten Bedingungen. Eine solche Messung zeigt direkt die Kinetik bei der Wechselwirkung *dieser* Substanz an *dieser* Säule unter *diesen* Bedingungen.

3.4. Stabilität im Routinebereich

In der Literatur sind verschiedentlich chromatographische „Stresstests“ beschrieben worden, mit deren Hilfe eine Alterung der Phase simuliert werden kann. Damit sind Aussagen über die Stabilität der Säulen im Routinebetrieb möglich. Solche Tests stellen zwar nur eine „künstliche“ Alterung dar, sind jedoch recht hilfreich, wenn im Alltag nur eine begrenzte Zeit zur Verfügung steht. In dieser Arbeit wurde auf solche Tests verzichtet. Vielmehr wurden die unten aufgeführten chromatographischen Kenngrößen von unterschiedlichen Analyttypen nach ca. 2 Monaten Dauerbetrieb unter wechselnden Bedingungen, sowie nach 6, 18, 24 Monaten Lagerung in Methanol/Wasser verfolgt.

Ergebnisse:

- Retentionszeit Uracil, diverse Retentionsfaktoren

Die Retentionszeiten von Uracil sind weitgehend konstant geblieben. Schwankungen wurden lediglich bei Phasen festgestellt, an denen Uracil sich nicht inert verhält, s. Kap. 4.6.

Die Absolutschwankungen bewegten sich zwischen 5 und 7 %; das ist für einen derartig langen Zeitraum durchaus akzeptabel. Des Weiteren wurden die Retentionsfaktoren von Ethylbenzol, Toluol, o-Terphenyl und Triphenylen verfolgt. Es wird generell eine leichte Zunahme der Retentionsfaktoren festgestellt, wobei interessanterweise die Zunahme bei den polaren Phasen marginal ausfällt oder sogar ganz fehlt.

- Trennfaktoren

a. α -EB/T

Bei den meisten Phasen wird eine geringe, aber eindeutige Zunahme der α -Werte festgestellt. An einigen polaren Phasen wie z.B. Zorbax SBC₈, Superspher Select B, LiChrospher Select B, Platinum EPS, Spherisorb ODS 1, Nucleosil Protect 1 wird eine Abnahme beobachtet.

b. α o-Ter/Tri

Es wird eine Zunahme der α -Werte festgestellt.

Im Routinebetrieb reichern sich offensichtlich organische Verunreinigungen irreversibel an der Oberfläche der Phasen an, der hydrophobe Charakter der Phase nimmt zu. Eine starke Neigung zu diesem Verhalten zeigen eher apolare Phasen („Ähnliches hält Ähnliches fest“). Die Retentionsfaktoren nehmen zu. In Kap. 6. wird diskutiert, inwieweit in ungepufferten Systemen ein gegensätzlicher Charakter zwischen Analyt und stationärer Phase zu einer guten Selektivität führt, z.B.: je apolarer die Phase ist (wird) um so selektiver ist (wird) sie für „polare“ Trennungen, damit sind Trennprobleme gemeint, bei denen eine Unterscheidung der Analyte durch polare Wechselwirkungen möglich ist. Bei der Trennung EB/T wird ein Mischmechanismus vermutet, deswegen kann die Selektivität sowohl zunehmen (hydrophobe Phasen) als auch abnehmen (polare Phasen). Eine gute Selektivität bei der Trennung Tri/o-Ter wird eindeutig bei polaren Phasen und bei Phasen mit einer Polymerschicht festgestellt. Wird nun eine Phase durch eine vermeintliche, irreversible Sorption apolarer Verunreinigungen apolarer, so trennt sie jetzt das „polare“ Analytpaar Tri/o-Tri selektiver. Eine große Veränderung der Selektivität wird bei apolaren Phasen festgestellt, also bei solchen Phasen, an denen durch diese Veränderung der Oberfläche polare Wechselwirkungen beeinflusst werden. Aus praktischer Sicht wäre noch folgendes zu beachten: Das „Einfahren“ bzw. Spülen einer polaren Phase dauert länger als einer hydrophoben Phase.

- Effizienz

Uracil

Die „normierte“ Bodenzahl von Uracil nimmt an allen Säulen merklich ab, wobei hier recht große Unterschiede festzustellen sind, siehe Abb. 3.4.1.

Ethylbenzol, Triphenylen

Bei den meisten Säulen wird eine Abnahme der „normierten“ Bodenzahl $N_{\text{Analyt}}/k_{\text{Analyt}}$ beobachtet – allerdings nicht so stark im Vergleich zu Uracil, s. Abb. 3.4.2. Das bedeutet, dass die Packungsqualität zwar eindeutig nachlässt, dass dies jedoch für reale Proben nicht so sehr ins Gewicht fällt. Je stärker die Differenz - $N_{\text{Analyt}}/k_{\text{Analyt}}$ „Anfang“ und „später“ ist, um so instabiler ist die Säule, d.h. entweder hat man mit einer merklichen Abnahme der Packungsqualität ($\Delta N \downarrow$) oder/und mit einer chemischen Veränderung der Oberfläche ($\Delta k \uparrow$) zu tun.

- Asymmetriefaktoren

Es wird kaum eine nennenswerte Veränderung festgestellt.

- Druckabfall

Es wird eine eindeutige Zunahme des Druckabfalls beobachtet.

Zusammenfassung

Erfreulicherweise haben Veränderungen an der Packung und an der stationären Phase unter üblichen chromatographischen Bedingungen in keinem Fall ein derartiges Ausmass, das den Einsatz einer Säule in Frage stellen würde.

- Der Druckabfall nimmt zu, die Packungsqualität (theoretische Bodenzahl) eindeutig ab, (s. die stark abnehmenden Bodenzahlen von Uracil). In der Praxis wird jedoch mit „realen“, sprich retardierten Komponenten gearbeitet. Deren Bodenzahlen liegen in kommerziellen Geräten stets höher als bei inerten Komponenten. Weiterhin spielt die Art der Wechselwirkung des Analyten mit der stationären Phase, also der Mechanismus, eine gewichtigere Rolle bei der Trennung als die Packungsqualität.
- Die Asymmetriefaktoren bleiben bei nahezu allen Phasen konstant. Dies belegt, dass eine Veränderung (Verschlechterung) der Packungsqualität nicht mit einer Zunahme von Peakasymmetrien einher geht: Asymmetrie korreliert nicht zwangsläufig mit der Effizienz.
- Die Retentionsfaktoren – bzw. die im Alltag eher interessierenden Retentionszeiten – verändern sich im Routinebetrieb. Diese Veränderung ist jeweils für apolare Phasen und apolare Analyte bzw. für polare Phasen und polare (ionische) Analyte stärker. Die größten Veränderungen bezüglich relativer Retentionszeiten (α -Werte) werden beobachtet, wenn polare Wechselwirkungen eine dominante Rolle spielen. Das bedeutet konkret: Die größeren Reproduzierbarkeits-Probleme sind anzutreffen bei polaren Phasen und ionischen Analyten bzw. Analyten, bei denen silanophile Wechselwirkungen die Selektivität maßgeblich beeinflussen wie Säuren, Basen, Aromaten und Isomere.

4. Chromatographische Charakterisierung von RP-Phasen

4.1. Einführung, Kurzinformationen zu den Tests

Das Verhalten bestimmter Analyttypen gegenüber einer Phase ermöglichen Aussagen über die vermeintliche Eignung einer Säule oder wenigstens eines Säulentyps für ein gegebenes Trennproblem. In diesem Abschnitt geht es um die Metallionenkontamination sowie um die silanophile/hydrophobe Eigenschaften der untersuchten Phasen. In Kap. 5 werden wir uns mit der Selektivität der Phasen für bestimmte Substanzklassen beschäftigen.

Metallionenkontamination

Befinden sich auf einer Phase Metallionen, so können sie mit komplexbildenden Analyten Komplexe eingehen; Folglich beobachtet man ein starkes Tailing oder sogar eine irreversible Sorption an der stationären Phase. Weiterhin begünstigen Metallionen die Dissoziation von Restsilanolgruppen, was ebenfalls zum Tailing bei basischen Komponenten führt. Ein sehr empfindlicher Test auf Metallionen ist die Injektion eines starken Komplexbildners, der auch auf geringe Konzentrationen von Metallionen reagiert. Ein solcher ist 2,2'-Bipyridyl, das deswegen hier als Indikator für Metallionen verwendet wurde.

Silanophilie

Mit Silanophilie wird, vereinfacht ausgedrückt, die Affinität von Oberflächen-Silanolgruppen gegenüber ionischen Substanzen - meist Basen - bezeichnet. Diese Eigenschaft der Phasen ist insofern wichtig, als die Bedeutung von ionischen (bzw. ionisierbaren) Substanzen wie z.B. Wirkstoffe mit aminischen Gruppen und deren polaren Metabolite, zunimmt. Die Aktivität nun von Silanolgruppen kann indirekt durch das Retentionsverhalten sowie die Asymmetrie von basischen und sauren Modellsubstanzen überprüft werden. In dieser Arbeit wurden zunächst die aus der Literatur bekannten Tests verwendet, von denen der Engelhardt-Test wohl der am häufigsten zitierte sein dürfte. Es hat sich jedoch gezeigt, dass letzterer sowie auch andere Tests nur eine recht grobe Unterscheidung zwischen „silanophil“/„hydrophob“ erlauben. Mit dem Ziel eines differenzierteren Vergleichs wurden zusätzlich mehrere neue Tests entwickelt.

Hydrophobie

Hydrophobie steht der Silanophilie diametral entgegen und stellt – vereinfacht – ein Maß für die Affinität einer Phase gegenüber apolaren Verbindungen dar. Wenn man sich über diese „Definition“ auch einig ist, so ist es trotzdem sehr schwierig, einen (oder einige) allgemein akzeptierten Analyte für die Klassifizierung der Phasen nach ihrer Hydrophobie zu finden. Die Schwierigkeit liegt schlicht und ergreifend darin, dass „reine“ RP-Wechselwirkungen kaum möglich sind: Es gibt keine „realen“ Moleküle (von Alkanen vielleicht abgesehen, die in der RP-Chromatographie nicht

gerade eine wichtige Rolle spielen), die keine polaren Gruppierungen wie Carboxyl, Phenyl usw. besitzen. Demzufolge haben wir es in der RP-Chromatographie fast ausschließlich mit überlagerten Mechanismen zu tun. Daher ist es problematisch von der „Hydrophobie“ zu sprechen. Dieses Thema wird uns ausführlicher in Kap. 6 beschäftigen. Dieser Problematik zu Trotz wurde für den hier besprochenen Zweck die „Klassiker“ Toluol und Ethylbenzol, zwei einkernige Aromaten, Propylhydroxybenzoat, ein polarerer Aromat sowie Isobutylmethylketon, eine nicht aromatische, organische Verbindung verwendet.

4.2. Metallionenkontamination

Zwei- und dreiwertige Metallionen, die im Kieselgelgerüst eingebaut sind bzw. während des Säulenbetriebs dorthin gelagert werden, können einen Einfluss auf die Eigenschaften der Phase haben. So begünstigen sie einerseits durch den ausgeübten –I-Effekt die Dissoziation der freien Restsilanolgruppen, andererseits können sie mit Komplexbildnern Komplexe eingehen. In beiden Fällen wird die Kinetik bei der Desorption des entsprechenden Analyten verlangsamt. Als Ergebnis beobachtet man stark tailende Peaks oder gar irreversible Sorption. Kieselgele der ersten Generation sind aufgrund des Ausgangsmaterials (Wasserglas) Metallionen-reich, Kieselgele der neueren Generation Metallionen-arm. Eine indirekte Überprüfung der Metallionenkonzentration auf der Phase erfolgt durch die Injektion eines starken Komplexbildners. Je stärker das Tailing, um so Metallionen-reich ist die Phase. Um dieses Tailing vom „silanophilen“ Tailing zu unterscheiden (Wechselwirkung des Analyten mit Restsilanolgruppen) wird simultan mit dem Komplexbildner eine zweite polare Komponente injiziert, die mit Metallionen keine Komplexe eingehen kann. Ein geeignetes Paar für diese Überprüfung ist 4,4'- und 2,2'-Bipyridyl. 2,2'-Bipyridyl ist ein starker Komplexbildner, 4,4'-Bipyridyl bildet keine Komplexe.

Wie erwartet wurden große Unterschiede festgestellt, siehe Tab. 4.2.1 (Serie 1) und Tab. 4.2.2 (Serie 2).

An 15 Phasen wurde 2,2'-Bipyridyl (bei der Erstinjektion!, Details siehe weiter unten) überhaupt nicht eluiert. An 21 Phasen eluiert 2,2' Bipyridyl so, dass man es gerade als Peak erkennen kann, oder aber mit einem sehr starken Tailing, s. Chr. 4.2.1. An 24 Phasen schließlich auf Basis hochreinen oder Säure-behandelten Kieselgels, eluiert 2,2'-Bipyridyl symmetrisch, s. Chr. 4.2.2.

Robustheit des Tests, Routinebetrieb

Der oben beschriebene Test ist sehr empfindlich. Sobald vorhandene Metallionen mit Komplexbildnern belegt sind (irreversible Sorption des Komplexbildners an der stationären Phase), eluiert 2,2'-Bipyridyl bei einer unmittelbar erfolgten zweiten Injektion je nach Phase als auswertbarer Peak, bzw. als symmetrischer Peak, s. Chr. 4.2.3 (Erstinjektion) und Chr. 4.2. 4 (Zweitinjektion).

Bereits eine Injektion reicht für eine Belegung aus – analog der Injektion eines starken Amins auf ein stark silanophiles Material. Die Metallionen könnten jedoch theoretisch im Routinebetrieb ausgewaschen werden, um dann durch „neue“ Metallionen, z.B. aus den Metallteilen der Apparatur ersetzt zu werden usw. Um diesen Effekt systematisch zu untersuchen wurde der 2,2'-Bipyridyltest

1. mit „brandneuen“ Säulen
2. unmittelbar danach als Zweitinjektion

3. nach ca. 40 Betriebsstunden
4. nach 18 und
5. nach 24 Monaten (dazwischen Lagerung in MeOH/H₂O) durchgeführt.

Wie oben bereits erwähnt, führt bereits die Zweitinjektion zu symmetrischen Peaks. Der Test nach 40 Stunden Betrieb, während dessen mit sehr unterschiedlichen Eluenten gearbeitet wurde, lieferte erfreuliche Ergebnisse: An allen Phasen wird der 2,2'-Bipyridyl-Peak symmetrischer eluiert als zu Beginn, s. Chr. 4.2.5 und Chr. 4.2.6. Offensichtlich belegen die 2,2'-Bipyridylmoleküle aufgrund ihrer hohen Komplexbildungskonstante die Metallionen irreversibel. Auch nach 18 bzw. 24-monatiger Lagerung und erneuter Benutzung der Säulen ändert sich weder der k-Wert noch der Asymmetriefaktor von 2,2'-Bipyridyl merklich. In der Literatur wurde berichtet, dass nach Pumpen von ca. 40 l Eluent so viele Metallionen aus der Apparatur auf der Phase gelagert würden, dass das Tailing von 2,2'-Bipyridyl stets zunimmt. Das konnte hier nicht bestätigt werden. In dieser Untersuchung wurde festgestellt, dass unter den beschriebenen Bedingungen ein hochreines Kieselgel auch nach längerem Betrieb mit starken Komplexbildnern wesentlich symmetrischere Peaks im Vergleich zu einem Metallionen-kontaminierten Kieselgel liefert.

4.3 Silanophilie der Phasen

Silanophilie hat viele „Gesichter“. Mit dem Ziel, den silanophilen/polaren Charakter einer Phase möglichst differenziert zu erfassen wurden hier mehrere Tests durchgeführt:

- Verhalten gegenüber schwachen und starken Basen im Neutralen, Sauren und schwach Alkalischen (Details, s. weiter unten).
Erkenntnis: Ionenaustauschkapazität im Neutralen und im Sauren, „totale“ Silanolgruppenaktivität im Alkalischen?
- Verhalten gegenüber schwachen Säuren, um die Fähigkeit einer Phase zur Wasserstoffbrückenbindung zu testen.
Erkenntnis: relative Gesamtkonzentration an (erreichbaren) Silanolgruppen? Grad des Endcappings der Phase?
- „Durchbruch“ von Aceton.
Erkenntnis: An welchen (polaren) Phasentypen wird Aceton nicht sorbiert?
- Verhalten gegenüber Uracil.
Erkenntnis: An welchen polaren (und sonstigen) Phasen verhält sich Uracil nicht inert?
- Homogenität der Oberfläche.
Erkenntnis: Bei welchen Phasen dominieren mehr als eine funktionelle Gruppen?

4.3.1. Verhalten gegenüber basischen und sauren Komponenten

In den letzten Jahren wurde der Charakterisierung der Phasen mit Hilfe basischer und saurer Komponenten große Beachtung geschenkt. Es erschienen mehrere, teilweise

exzellente Einzel- und Übersichtsartikel [2-8]. Daher werden nachfolgend nur die Ergebnisse der Tests mit kurzen Kommentaren vorgestellt.

Es wurden vier Basen sowie zwei Säuren unterschiedlicher Basizität bzw. Acidität verwendet.

	pK _s ⁽¹⁾
Anilin	4,56
Pyridin	5,20
Benzylamin	9,30
Propranolol	9,60
Coffein	13,39
Phenol	10,00

(1) Es sei angemerkt, dass in Anwesenheit von Methanol und Acetonitril sich die pK_s-Werte verschieben.

In der Literatur wird intensiv darüber diskutiert, ob für solche Tests gepufferte oder ungepufferte Eluenten verwendet werden sollten und ob MeOH oder vielleicht doch ACN „besser“ sei. Auch die Aussagekraft bestimmter Tests wird durch manchen Autor angezweifelt usw. Mit dem Ziel möglichst gesicherter Aussagen wurden die Tests in dieser Arbeit mit allen denkbaren Eluent-Kombinationen durchgeführt:

MeOH/H ₂ O	40/60 (v/v)
ACN/H ₂ O	32/68 (v/v)
MeOH/20mM Phosphatpuffer, pH = 2,7	40/60 (v/v)
ACN/20mM Phosphatpuffer, pH = 2,7	32/68 (v/v)
MeOH/20mM Phosphatpuffer, pH = 7,6	40/60 (v/v)
ACN/20mM Phosphatpuffer, pH = 7,6	32/68 (v/v)

4.3.1.1. Tests mit Basen in pufferfreien Eluenten

- MeOH/H₂O (40/60, v/v)

a. Pyridin/Phenol-Test (Tab. 4.3.1, Serie 1, und Tab. 4.3.2., Serie 2).

Erkenntnis: Aktivität von Silanolgruppen gegenüber einem tertiären Amin.
Entscheidungskriterium: Wenn Pyridin vor Phenol eluiert, ist die silanophile Aktivität der Phase gegenüber tertiären Aminen gering.

An 47 Phasen eluiert Pyridin vor Phenol.
An 3 Phasen wird Koelution festgestellt.
An 14 Phasen eluiert Pyridin nach Phenol.

Als weitere Differenzierungsmöglichkeiten für ein Ranking innerhalb der hydrophoben Phasen können folgende Kriterien gelten:

Von den 47 Phasen

- die mit dem kleinsten k-Wert für Pyridin, Abb. 4.3.1
- die mit dem größten α -Wert Phenol/Pyridin, Abb. 4.3.2
- die mit den besten Asymmetriefaktoren für Pyridin, Abb. 4.3.3

b. Anilin/Phenol-Test

Im Prinzip stellt dieser Test einen äquivalenten Test mit identischen Kriterien wie unter 1. dar. Er ist jedoch ein sehr „milder“ Test mit einer geringen Aussagekraft: Nur bei folgenden vier recht silanophilen Phasen eluiert Anilin nach Phenol, bzw. wird eine Koelution festgestellt:

Hypersil ODS
Zorbax SBC₈
Resolve
Platinum EPS

c. Benzylamin/Phenol-Test, Tab. 4.3.1 a und b (Serie 1) und Tab. 4.3.2 (Serie 2)

Benzylamin ist eine starke Base (sie liegt in diesem Eluenten protoniert vor), die mit aciden Silanolgruppen der Phasen-Oberfläche eine stärkere Wechselwirkung im Vergleich zu Pyridin eingeht. Folglich ist dieser Test strenger als der Pyridin/Phenol-Test.

Erkenntnis: Aktivität von Silanolgruppen gegenüber einem primären Amin.

Entscheidung: Wird Benzylamin überhaupt von der stationären Phase eluiert? Und wenn ja, wie stark ist die (relative) Retention?

Bei 42 Phasen wird eine Elution von Benzylamin beobachtet, bei 22 nicht.

In Chr. 4.3.1 ist dieser Test an drei Phasen („drei Generationen“) zu sehen. An der linken Phase wird Benzylamin nicht eluiert, an der mittleren wird es mit einem starken Tailing eluiert und an der rechten hydrophoben, sehr gut abgedeckten Phase eluiert es mit einer sehr guten Symmetrie.

Weitere Differenzierungsmöglichkeiten:

Von den 30 Phasen

- die mit dem kleinsten k -Wert für Benzylamin, Abb. 4.3.4., 4.3.5 und 4.3.6
- die mit dem kleinsten α -Wert Benzylamin/Phenol, Abb. 4.3.7 und 4.3.8
- die mit den besten normierten ($As_{\text{Benzylamin}}/As_{\text{Phenol}}$) Asymmetriefaktoren für Benzylamin, Abb. 4.3.9.

d. Propranolol –Test, Tab. 4.3.4 (Serie 1) und Tab. 4.3.5 (Serie 2)

Dies ist einer der empfindlichsten Tests überhaupt in ungepufferten Systemen, da Propranolol jede freie Silanolgruppe „aufspürt“. Sind freie, acide Silanolgruppen vorhanden, so wird Propranolol bei der Erstinjektion irreversibel adsorbiert, bereits eine unmittelbar anschließend erfolgte Zweitinjektion führt zu einem Peak mit einer akzeptablen Symmetrie.

Entscheidung: Wird Propranolol bei der Erstinjektion von der stationären Phase eluiert? Und wenn ja, ist der Peak auswertbar?

Bei 39 Phasen ist dies der Fall.

Weitere Differenzierung: Von den auswertbaren Peaks, die mit den besten Asymmetriefaktoren, s. Abb. 4.3.10 (Serie 1) und Abb. 4.3.11 (Serie 2).

Zusammenfassend kann zu den Tests mit Basen in MeOH/H₂O folgende Abstufung bezüglich Strenge der Tests festgehalten werden:

Propranolol-
Benzylamin- bzw. Benzylamin/Phenol-
Pyridin/Phenol-
Anilin/Phenol-Test.

- ACN/H₂O (32/68 v/v)

Alle oben vorgestellte Tests wurden auch in ACN/H₂O durchgeführt.

Ergebnisse

- Pyridin/Phenol-Test:
Nur an LiChrospher und Resolve eluiert Pyridin nach Phenol.
- Benzylamin/Phenol-Test:
Benzylamin wird nur an sehr stark silanophilen Phasen wie LiChrosorb irreversibel adsorbiert. An stark silanophilen Phasen eluiert Benzylamin nach Phenol (s. Chr. 4.3.2, rechts), an gut abgedeckten, stark hydrophoben Phasen wird nicht nur Pyridin sondern sogar Benzylamin vor Phenol eluiert (s. Chr. 4.3.2., links). Beispiele für solche Phasen sind: Symmetry, Discovery C₁₈, Gromsil CP, HyPURITY C₁₈, YMC Pro, Nucleosil HD, Kromasil, Inertsil ODS 3.
- Propranolol-Test :
Propranolol eluiert mit kleineren k-Werten im Vergleich zu MeOH/H₂O, die Asymmetriefaktoren sind auch an unterschiedlichen Phasentypen recht ähnlich und besser als in Methanol.

Fazit

Acetonitril ist für solche Tests weniger geeignet als MeOH, da eine gute Differenzierung der Phasen nicht möglich ist. Ionische Verbindungen werden offensichtlich im polaren MeOH – ähnlich dem Wasser – stabilisiert, der polare Charakter und dadurch silanophile Wechselwirkungen sind in MeOH ausgeprägter als in Acetonitril. Für die Praxis heißt es natürlich umgekehrt: Basen eluieren in Acetonitril im Vergleich zu Methanol mit einer besseren Symmetrie.

Abschließender Hinweis:

Den hier besprochenen Tests liegen sehr empfindliche Gleichgewichte zugrunde. Eine exakte und konstante Arbeitsweise und das Einsetzen von „nagelneuen“ Säulen sind eine unabdingbare Voraussetzung für gesicherte Aussagen. So führt beispielsweise bei zuletzt besprochenem Test mit Acetonitril/Wasser eine zweite Injektion von Pyridin auf das silanophile Resolve dazu, dass bei einer anschließenden Injektion von Benzylamin letzteres vor Phenol eluiert. Je silanophiler eine Phase ist, um so „besser“ wird sie im laufenden Betrieb für die Trennung von Basen. Voraussetzung für die Gültigkeit diese Aussage ist natürlich, dass ein „Bluten“ der Säule (Hydrolyse der Alkylborste) nicht stattfindet.

4.3.1.2 Tests mit Basen in gepufferten Eluenten

- MeOH bzw. ACN/20mM Phosphatpuffer, pH = 2,7

Im Sauren liegen die meisten Silanolgruppen undissoziiert vor, so dass ihre Affinität zu basischen Verbindungen dadurch herabgesetzt wird. Die Peakform von Basen im sauren Milieu ist deswegen an den meisten Phasen generell gut bis exzellent. Liegt nun eine starke Base im Sauren protoniert vor, so ist eine Wechselwirkung dieses Ions mit einer hydrophoben RP-Oberfläche kaum möglich. Sie eluiert sehr früh oder verhält sich sogar inert.

Umgekehrt bedeutet dies, dass, wenn eine Phase im Säuren mit basischen Verbindungen in Wechselwirkung treten kann, sie über reaktive, (acide) Silanolgruppen oder über andere polare Gruppen verfügt. Vor diesem Hintergrund ist hier eine Differenzierung der Phasen möglich, die in anderen Eluenten nicht möglich ist: Die „wirklich“ stark silanophilen Phasen werden gerade im Säuren „entlarvt“. So eluiert z.B. Pyridin an LiChrospher, nicht nur mit einem starken Tailing sondern sogar noch nach Phenol. In diesem Zusammenhang soll auf eine mögliche Fehlinformation hingewiesen werden: An hydrophoben, gut abgedeckten Phasen eluieren (starke) Basen mit einer hervorragenden Symmetrie – und täuschen, bei dürftiger Selektivität Peakhomogenität vor!, s. Chr. 4.3.3. Pyridin und Benzylamin eluieren an Hypersil ODS (linkes Chromatogramm) und Resolve (2. Chromatogramm von links) mit einem starken Tailing. Wir stellen zwar eine gute „Selektivität“ fest, die sehr geringe Symmetrie jedoch macht den Routineeinsatz derartig silanophiler Phasen für solche Trennprobleme unmöglich. Fluofix IEW (2. von rechts), eine zwar polare Phase allerdings ohne acide Silanolgruppen, zeigt nicht nur eine gute Selektivität sondern auch eine sehr gute Peakform. An einem hydrophoben Material wie Luna 2 (rechtes Chromatogramm) sind ionische/polare Wechselwirkungen nicht möglich. Als Ergebnis beobachtet man eine hervorragende Symmetrie aber keinerlei bzw. schwache Wechselwirkungen. Basen können inert bzw. früh eluieren und sie bleiben womöglich wegen mangelnder Selektivität einer hydrophoben Phase unerkant.

Wie bereits oben erwähnt, unterdrückt Acetonitril polare Wechselwirkungen. Das ist der Grund, weswegen beispielsweise Pyridin und Benzylamin im ACN/Puffer sehr früh, oder sogar inert eluieren. An einigen hydrophoben Phasen wird sogar Ionenausschluss beobachtet, starke Basen eluieren dann noch vor der Totzeit.

Gerade in einem solchen „ungünstigen“ Eluenten allerdings zeigen sich die stark silanophilen Phasen: Resolve, Spherisorb ODS 1, Platinum EPS sind so stark polar, dass sie sogar im sauren, aprotischen, ionische Wechselwirkungen nicht gerade fördernden ACN/Puffer Basen antrennen oder sogar recht gut trennen können, s. Chr. 4.3.4. Zu dieser Fähigkeit(?) sind Phasen in der Lage, die über polare Gruppen an der Oberfläche verfügen – kaum jedoch „embedded phases“. An Letzteren sowie an AQ-Phasen wird nur eine Antrennung beobachtet. Daraus kann man entnehmen, dass:

1. die „Hydrophilie“ von AQ-Phasen keinesfalls mit der von nicht-endcappten Phasen zu vergleichen ist und
2. die eingebaute polare Gruppe bei den „embedded phases“ tatsächlich eine „shield“-Funktion übernimmt.

Ergebnis

Im sauren Methanol-Puffer eluieren Basen später als im sauren Acetonitril-Puffer gleicher Elutionskraft. Es wird zudem in Methanol eine bessere Selektivität bei allerdings geringeren Effizienz beobachtet. Wenn im sauren Acetonitril-Puffer an einer Säule eine Trennung von Basen beobachtet wird, so ist dies ein Hinweis darauf, dass diese Phase einen stärkeren polaren Charakter hat als eine Vergleichbare. So weisen die „embedded phases“ Zorbax Bonus und HyPURITY ADVANCE (und teilweise auch

Prontosil ACE) wohl einen stärkeren polaren Charakter im Vergleich zu Nucleosil Nautilus und Symmetry Shield auf.

Organische Basen wie tricyclische Antidepressiva und deren Metabolite eignen sich gut, um Unterschiede in dem polaren Charakter einer Phase zu zeigen. Während die Selektivitätsunterschiede der Phasen gering ausfallen (s. Kap. 5), werden große Unterschiede bezüglich Peakform festgestellt. Es wird ein starkes Tailing bei solchen Phasen beobachtet, die über polare, Ionenaustausch-„fähigen“ Gruppen an der Oberfläche verfügen. Das können auf der einen Seite freie, acide Restsilanolgruppen bei nicht-endcappten oder auch bei nicht vollständig endcappten, Metallionen-haltigen Phasen sein, wie z.B. Nucleosil 100, Spherisorb ODS 2, Hypersil ODS. Andere Möglichkeiten sind protonierte Aminogruppen wie bei Supelcosil ABZ PLUS. In Chr. 4.3.5 wird die Aktivität von Silanolgruppen an drei Phasen gegenüber tricyclischen Antidepressiva im Sauren dargestellt. An Zorbax ODS stark (linkes Chromatogramm), an Spherisorb ODS 2 merklich (mittleres Chromatogramm) und an Luna 2 überhaupt nicht (rechtes Chromatogramm). „Embedded phases“ sind ebenfalls zu polaren Wechselwirkungen in der Lage – bei allerdings guter Peaksymmetrie. Eine verzögerte Kinetik wird also nicht beobachtet. Das deutet auf die „shield“-Funktion der eingebauten polaren Gruppe am Alkylrest gegenüber Matrixsilanolgruppen hin. Folgende Phasen zeigen im sauren eine erhöhte Ionenaustauschaktivität und damit eine unbefriedigende Peakform für basische Komponenten:

Supelcosil ABZ PLUS
Spherisorb ODS 1
Zorbax ODS
Platinum EPS
Hypersil ODS
LiChrospher
Superspher
Resolve

Die Metabolite (Desmethylverbindungen) sind zwar polarer haben jedoch einen weniger ausgeprägten basischen Charakter. Nur folgende vier Phasen zeigen hier ein starkes Tailing:

Resolve
Zorbax ODS
Platinum EPS
Hypersil ODS.

- MeOH/20 mM Phosphatpuffer 7,6, Tab. 4.3.6 bis 4.3.8

Im schwach Alkalischen liegt der Großteil der Silanolgruppen dissoziiert vor. Mit ihrer nun negativen Ladung sind sie zu ionischen Wechselwirkungen (Ionenaustauschkapazität) mit stark basischen Analyten, die protoniert vorliegen, befähigt. Die Betonung liegt im „stark basischen“, weil nur starke Basen mit pK_s -Werten von größer als ca. 8-9 im üblichen alkalischen Eluenten (ca. pH = 7-8) protoniert vorliegen und zu solchen Wechselwirkungen in der Lage sind (z.B.

Benzylamin). Schwache Basen, wie z.B. Pyridin und andere Amine liegen in einem pH-Wert-Bereich von ca. 7,6 vorwiegend undissoziiert vor, sie verhalten sich wie polare, jedoch neutrale Komponenten. Die Konsequenz lautet: Bei schwachen Basen werden in alkalischen Puffern in der Regel symmetrische Peaks erhalten. Testergebnisse mit schwachen Basen im Alkalischen sind nicht sehr aussagefähig. Die dissoziiert vorliegenden Silanolgruppen werden von den Pufferionen – die natürlich im Überschuß vorliegen – maskiert (neutralisiert). Analog zu den Versuchen im sauren Milieu besteht auch hier die Möglichkeit, - allerdings nicht in gleicher Eindeutigkeit - die am stärksten silanophilen Phasen ausfindig zu machen. Je polarer die Phase ist, um so später eluieren Benzylamin und Pyridin. In nachfolgender Tabelle werden nun die Ergebnisse aus diesem Test zusammengefasst.

<u>Säulen</u>	<u>Elutionsreihenfolge</u>	Schwach ionische/polare Wechselwirkungen	
- Hydrophobe Phasen (41 Stück)	- Benzylamin - Pyridin - Phenol		
- Resolve - Vydac - LiChrospher (7) - LiChrosorb - Nucleosil 50 - Bondapak - Hypercarb	- Benzylamin - Pyridin = Phenol		
- Gromsil AB - Spherisorb ODS 2 (3) - Nucleosil 100	- Pyridin = Benzylamin - Phenol		
- "embedded phases" (12)	- Pyridin, - Benzylamin - Phenol		
- Fluofix IEW ⁽¹⁾ (5) - Fluofix INW ⁽¹⁾ - Ultrasep ES - Zorbax ODS - Zorbax SB C ₈ ⁽¹⁾	- Benzylamin - Phenol - Pyridin		↓
- Platinum EPS - Spherisorb ODS 1 (2)	- Phenol=Pyridin - Benzylamin	Stark ionische/polare Wechselwirkungen	

(1) Symmetrische Peaks für Basen; Hinweis auf einen polaren Charakter der Phase durch den polaren Liganden aber gleichzeitig einer gut abgedeckten Oberfläche: keine Wechselwirkungen mit Oberflächen-Gruppen, dadurch schnelle Kinetik.

Das polare, protoniert vorliegende Benzylamin, eluiert an hydrophoben Phasen vor dem polaren, jedoch undissoziiert vorliegenden Pyridin. Schwach-ionische Wechselwirkungen (acide Silanolgruppen an der Oberfläche) führen zum starken Tailing beim Benzylamin (7-Gruppe) sowie Ultrasep ES und Zorbax ODS. An Phasen mit einer stark silanophilen Oberfläche, verbunden mit einer geringen Belegung wie bei Spherisorb ODS 1 und Platinum EPS, eluieren beide Basen nach Phenol.

Im Alkalischen wurde noch der Phenol/Coffein-Test durchgeführt:

Saure Komponenten können mit (Silanol)Gruppen der Oberfläche Wasserstoffbrückenbindungen eingehen. Ihre Retention nimmt dadurch zu, wie z.B. bei Coffein zu beobachten ist, nicht jedoch bei Phenol. Als Maß für die Fähigkeit einer Phase zur Wasserstoffbrückenbindung – und damit indirekt als Maß für die Gesamtkonzentration an verfügbaren Silanolgruppen – kann der α -Wert Phenol/Coffein dienen:

Je stärker eine Phase zu Wasserstoffbrückenbindung neigt, um so stärker ist die Affinität von Coffein zu dieser Phase. Coffein eluierte später und man erhielte einen kleinen α -Wert Phenol/Coffein, s. Abb. 4.3.12 und 4.3.13. Phasen aus dem oberen Drittel sind als hydrophob, Phasen aus den unteren Drittel als polar/silanophil zu bezeichnen. Für eine detaillierte Diskussion des Rankings, s. weiter unten, „Tests mit schwachen Säuren“.

- ACN/H₂O (32/68)

Die Ergebnisse der Versuche mit Acetonitril sind vergleichbar. Vor der Zusammenfassung sei noch auf folgendes hingewiesen: Bei Anwesenheit von Acetonitril nimmt der pK_s -Wert von starken Basen ab, so liegt der pK_s -Wert von Benzylamin hier bei ca. 8,3 (im Wasser: 9,3). D.h. in einem Acetonitril/Phosphatpuffer pH = 7,6 herrscht ein prototropes Gleichgewicht, es liegen zwei Spezies mit unterschiedlicher Ionisierung vor, die mit der stationären Phase wechselwirken. Das Ergebnis ist zwar eine bessere Selektivität im Vergleich zu Methanol aber auch eine merkliche Peakverbreiterung. Das bedeutet folgendes: Mit dem Ziel, keine falsche Schlussfolgerungen bezüglich Silanophilie einer Phase zu ziehen, sollte stets der aktuelle pK_s -Wert des Analyten im Auge behalten werden – in wichtigen Fällen wäre er zu bestimmen [9].

Zusammenfassung der Tests mit basischen Komponenten

Aus oben beschriebenen Tests ergeben sich folgende zwei Gruppen von Säulen mit ausgeprägten silanophilen bzw. hydrophoben Eigenschaften. Phasen, die nicht aufgeführt sind, nehmen eine Mittelstellung ein.

Silanophile Phasen		Hydrophobe Phasen
Platinum EPS	+ □	Hypersil BDS
Spherisorb ODS 1	+ □	Discovery C ₁₈
Fluofix IEW	□	HyPURITY C ₁₈
Fluofix INW	□	YMC Pro C ₁₈
Zorbax ODS	++ □	Luna 2
Zorbax SBC ₈	□	Nucleosil HD
Resolve	+	Prodigy
Vydac		Inertsil ODS 2 Synergi MAX RP
LiChrosorb		Inertsil ODS 3 Zorbax Extend
LiChrospher	++ □	SMT OD Reprosil
Superspher	++ □	Nucleosil AB Prontosil
Hypersil ODS	+	Gromsil CP Kromasil
Ultrasep ES	□	Toso Haas TSK Purospher e
“embedded phases”	+ ⁽¹⁾	Symmetry C ₁₈

(1) Dazu gehören neben den “klassischen” „embedded phases“ sowohl Materialien aus den Anfängen (Supelcosil ABZ PLUS) als auch „Kombinationsphasen“, z.B. Synergi POLAR RP: kurze Kette, eingebaute Ethergruppe, polare Endgruppe, hydrophiles Endcapping.

+: Ionenaustauschkapazität im sauren Medium (pH = 2,7)

□: Ionenaustauschkapazität im Alkalischen (pH = 7,6)

Mit Hilfe dieser Tests kann auch unterschieden werden, ob es zu polaren Wechselwirkungen mit polaren Gruppen an der Oberfläche oder mit einer polaren „Borste“ kommt. Die Phasen Synergi POLAR RP, Fluofix INW, Fluofix IEW und Zorbax SBC₈ sind zweifelsohne polare Phasen, allerdings mit einer gut abgedeckten Oberfläche. Ergebnis ist eine starke Retention von basischen Analyten bei guter Peaksymmetrie. Auch die unterschiedliche Natur der vorhandenen Silanolgruppen kommt zum Tragen: Phasen mit einem „+“ zeigen sogar im Sauren (pH = 2,7) eine merkliche Ionenaustauschkapazität, Phasen mit einem „□“ zeigen im Alkalischen (pH = 7,6) eine erhöhte Tendenz zum Ionenaustausch. Erstere sind nicht-endcappte Phasen bzw. verfügen über polare Gruppierungen an der Oberfläche. Zorbax ODS und Hypersil ODS beispielsweise verfügen über recht acide („aggressive“) Silanolgruppen, es wird ein starkes Tailing bei Basen im Neutralen und Sauren beobachtet. Im Alkalischen jedoch ist die Ionenaustauschkapazität von Hypersil ODS gering, da die Gesamtanzahl an Silanolgruppen an diesem Material verhältnismäßig klein ist. Die Peakform von Basen ist gut.

Es sei in diesem Zusammenhang zum Schluss kurz auf einige Eigenarten der organischen Modifier Acetonitril und Methanol in gepufferten Systemen eingegangen. Eine ausführlichere Besprechung findet sich in der Kap.6.

Vorausgesetzt werden Mischungen identischer Elutionskraft.

- Silanophile Wechselwirkungen sind in Methanol stärker; starke Basen eluieren im sauren Methanol/Phosphatpuffer später als im sauren Acetonitril/Phosphatpuffer, im Acetonitril-Eluenten können sie sogar ausgeschlossen werden.
- Im Sauren ist die Peaksymmetrie in Acetonitril besser als in Methanol, in Methanol wird bei längerer Retentionszeit und geringerer Effizienz häufig eine bessere Selektivität festgestellt. Generell ist die Peaksymmetrie im Sauren besser als im Alkalischen.
- Im Alkalischen ist die Peaksymmetrie in Methanol besser als in Acetonitril.
- Im Alkalischen werden zwischen Methanol und Acetonitril größere Selektivitätsunterschiede festgestellt als im Sauren.

4.3.2 Tests mit schwachen Säuren in pufferfreien und gepufferten Eluenten

Der bereits erwähnte Phenol/Coffein-Test wurde erneut bei anderen Bedingungen durchgeführt.

Die α -Werte für beide Serien sind den Abb. 4.3.14 bis 4.3.16a zu entnehmen. Die Messungen wurden in Methanol/Wasser, in Acetonitril/Wasser, im sauren Methanol- und im sauren Acetonitril/Phosphatpuffer durchgeführt.

Kommentare

Im oberen Drittel der Abb. 4.3.14 befinden sich hydrophobe Phasen. Eine Wechselwirkung mit polaren Gruppierungen an der Oberfläche wird beispielsweise durch eine Deaktivierung der Oberfläche (z.B. Hypersil BDS), durch eine starke Belegung (z.B. Symmetry C₁₈), eine spezielle Bindung der Borste (z.B. Synergi MAX RP) oder durch eine Polymerschicht (z.B. Gromsil CP) verhindert.

Der große α -Wert bei Supelcosil ABZ PLUS, Nucleosil Protect 1 und Discovery Amid erklärt sich durch die starke Wechselwirkung der eingebauten polaren Gruppe (alle drei Phasen gehören zu „embedded phases“, s. auch Abb. 4.3.15) mit Phenol. In diesem Zusammenhang sei erneut auf die „Klassiker“ Hypersil ODS und Zorbax ODS hingewiesen: Während beide Phasen über sehr acide Silanolgruppen verfügen (Tailing mit Basen) nehmen sie, was die Gesamtkonzentration an Silanolgruppen betrifft, eine Mittelstellung ein.

Bei der Serie 2 wurden bewusst – mehr als bei Serie 1 – hydrophobe Klassiker, silanophile Klassiker und „embedded phases“ zusammen getestet. Das Ranking der Säulen in Abb. 4.3.15 sollte anhand der Phaseneigenschaften „zweigeteilt“ interpretiert werden:

„Teil“ 1, „embedded phases“: Prontosil ACE bis HyPURITY Advance

„Teil“, 2, Klassiker : Zorbax Extend bis Platinum EPS

„Teil1“

Die starke Wechselwirkung von Phenol mit der polaren eingebauten Gruppe führt bei „embedded phases“ zu großen α -Werten Phenol/Coffein. Scheinbar neigt die Amidgruppe stärker dazu als die Carbamatgruppe.

„Teil 2“

Hier haben wir das klassische Ranking: Hydrophobe Phasen wie Zorbax Extend, XTerra MS und Purospher Star liegen vor den polaren Phasen AQUA, LiChrosorb und Platinum EPS.

Diese Befunde sind ein gutes Beispiel dafür, dass man bei der Deutung von Ergebnissen mit unterschiedlichen Phasentypen (im vorliegenden Fall einmal klassische RP-Phasen, und einmal „embedded phases“) stets den unterschiedlichen Wechselwirkungsmechanismus im Auge behalten sollte. Sonst können Selektivitäten falsch gedeutet werden.

In Acetonitril/Wasser liegen die Verhältnisse analog. Hier wird eine interessante Beobachtung gemacht: Die α -Werte Phenol/Coffein liegen in Acetonitril höher als in Methanol/Wasser.

Das ist ein weiterer Beleg dafür, dass in Acetonitril polare Wechselwirkungen unterdrückt werden: Die Wasserstoffbrückenbindung wird im aprotischen Acetonitril gehindert, Coffein eluiert relativ früh im Verhältnis zu Phenol, der α -Wert nimmt nominal zu.

4.4 Hydrophobe Eigenschaften

Als eine der wichtigsten Eigenschaften von RP-Phasen wird deren Hydrophobie angesehen. Ein Maß dafür kann der Retentionsfaktor einer kleinen, organischen Verbindung z. B. Toluol oder Ethylbenzol dienen, von der man „ideale“ RP (Van-der-Waals)-Wechselwirkungen erwarten könnte. Zum anderen kann als Kriterium der Trennfaktor bei einer ebenfalls „idealen“ RP-Trennung dienen. Zur Problematik von idealem, sprich einheitlichem Mechanismus in der RP-HPLC, s. Kap.6.

In der Literatur herrscht keine einheitliche Meinung, ob man bei der Überprüfung der Hydrophobie nun die Kapazität oder die Selektivität in den Vordergrund stellen sollte. Häufig werden als Maß für die Hydrophobie Retentionsfaktoren verwendet, selten auch Trennfaktoren. Statt jedoch von „Selektivität“ wird undifferenziert weiterhin von „Hydrophobie“ gesprochen. Folgende Sprachregelung könnte hier Klarheit schaffen und damit zu einer Vergleichbarkeit der Tests beitragen:

Hydrophobie: Stärke der Wechselwirkung einer apolaren Komponente mit der stationären Phase; als Maß kann beispielsweise der Retentionsfaktor von Toluol dienen.

Hydrophobe Selektivität: Fähigkeit einer Phase, zwei apolare Komponenten zu trennen.

„Apolar“ ist zweifelsohne ein „dehnbarer“ Begriff, besonders dann, wenn zwei Analyte betroffen sind, was ja bei den Trennfaktoren der Fall ist. Folgende Analytpaare sind geeignet, um die hydrophobe Selektivität der Phasen zu untersuchen:

1. Ethylbenzo/Toluol ; Methylengruppenselektivität für zwei einkernige, hydrophobe

Aromaten. Wegen der bei dieser Trennung geringen Bandbreite der Trennfaktoren wären – mit dem Ziel einer besseren Differenzierung der hydrophoben Selektivität der Phasen – folgende polarere Analytpaare alternativ zu verwenden :

2. Hydroxybenzoate, z.B. Methylengruppenselektivität für Ethyl-, Methyl-, und Propylhydroxybenzoat, und
3. Ketone, z. B. Methylengruppenselektivität für Isobutyl- und Isopropylmethylketon.

In der Praxis steht man häufig vor der Aufgabe, zwei apolare Analyte zu trennen, die sich um eine funktionelle Gruppe unterscheiden. Deswegen wurden auch folgende Analytpaare untersucht:

4. Ethylbenzol/Fluorenol, apolarer Aromat/durch die C=O-Gruppe recht polarer mehrkerniger Aromat
5. Fluoren/Fluorenol, recht apolarer Aromat/recht polarer Aromat, Unterschied eine C=O-Gruppe und schließlich
6. Phenol/Toluol, recht polarer, neutraler Aromat/apolarer Aromat, Unterscheidung eine HO- vs.eine CH₃-Gruppe.

Die Meinung des Autors lautet, dass hydrophobe Selektivität praxisrelevanter ist als die Retention von apolaren Analyten, weil die HPLC ja als Trenntechnik benutzt wird.

- Retentionsfaktoren (Hydrophobie)

Es wurden die Retentionsfaktoren von folgenden vier Analyten in Methanol/Wasser 40/60 in Betracht gezogen:

Ethylbenzol
Toluol
Methyl-3-hydroxybenzoat
Isobutylmethylketon.

Entsprechend den Anmerkungen (Kap. 3.1) zur übersichtlichen Kommentierung der Datenflut wird die Serie in drei Gruppen geteilt; die resultierenden Diagramme sind dann „gedrittelt“.

- Toluol, s. Abb. 4.4.1 bis 4.4.3 (die Ergebnisse mit Ethylbenzol sind äquivalent).

In dem oberen Drittel (ausgeprägter hydrophober Charakter) befinden sich Phasen mit folgenden Eigenschaften:

		Spez. Oberfläche [m ² /g]	Kohlenstoffgehalt [% C]
Kohlenstoff als Basismaterial	Hypercarb		
Große spezifische Oberfläche	Nucleosil 50 Prodigy Luna 2 Inertsil ODS 3	400 450 374 450	
Organische Schicht (monolayer) bzw. Siloxanschicht („Silikonschicht“)	SMT OD Gromsil CP		
Hoher Kohlenstoffgehalt, bzw. hoher Bedeckungsgrad	Ultrasep ES Purospher Purospher Star Zorbax ODS Inertsil ODS 2 Kromasil Symmetry LiChrospher Prontosil Reprosil		18,5 17 16 – 20 18,5 19 19 21 17 17
Spezielle Bindung der Alkylborste am Kieselgel	Zorbax Extend SynergiMAX RP		

Manche Phasen, die ebenfalls einen hohen Kohlenstoffgehalt aufweisen (MP-Gel mit 18 %, Nucleosil HD mit 21 %, Superspher mit 21%) befinden sich im mittleren Drittel. Das könnte zum einen damit zusammenhängen, dass die Borsten bei Nucleosil HD dicht beieinander liegen, es kann aus sterischen Gründen nicht zur maximalen Wechselwirkung kommen. Zum anderen könnte es sein, dass MP-Gel und Superspher aufgrund von vorhandenen freien Silanolgruppen (beide Phasen sind nicht endcapped) einen ausgeprägten polaren Charakter ausweisen, s. auch weiter unten. Der polare Charakter ist auch bei „embedded phases“ der dominante. So haben beispielsweise Prontosil ACE und Symmetry Shield zwar einen Kohlenstoffgehalt von 18,5 % bzw. 17,5 %, aber sie enthalten auch eine polare Gruppe in der Alkylborste, Amid bei Prontosil ACE, Carbamat bei Symmetry Shield. Diese polaren Gruppen prägen die Eigenschaften der „embedded phases“.

Im unteren Drittel befinden sich Phasen mit folgenden Eigenschaften:

		Spez. Oberfläche [m²/g]	Kohlenstoff-gehalt [% C]
Kleine spezifische Oberfläche und/oder geringer Kohlenstoffgehalt	Hypersil Elite	193	12
	Discovery C ₁₈	200	12,3
	Bondapak	330	10
	Vydac	275	12
	Jupiter	157	13,65
	Platinum C ₁₈	207	6,1
	Spherisorb ODS1	200	7
	Gromsil AB	200	11
Polarer Charakter, hervorgerufen durch:			
Kurze Kette (C ₈)	LiChrospher Select B Superspher Select B Zorbax SB C ₈		
Kurze Kette (C ₇) mit negativer Teilladung (CF ₃ [⊖])	Fluofix IEW Fluofix INW		
Kurze Kette (C ₈ , C ₁₂ , C ₁₆), in der eine polare Gruppe eingebaut ist („embedded phases“, geschützte Phasen)	Supelcosil ABZ PLUS Nucleosil Protect 1 HyPURITY Advance SynergiPOLAR RP		
Polare Gruppen an der Kieselgeloberfläche	Platinum EPS		

Propyl-3-hydroxybenzoat, s. Abb. 4.4.4 bis 4.4.6

Die Verhältnisse entsprechen auf den ersten Blick denen von Ethylbenzol. Bei genauerem Hinschauen jedoch fällt auf, dass einige polare Phasen beim Methylbenzoat einige Sprünge „nach vorne“ gemacht haben: Sie zeigen einfach eine verstärkte Wechselwirkung mit dem Hydroxybenzoat. Dazu einige Beispiele:

Serie 1

Ultrasep ES, TSKgel, Resolve, Spherisorb ODS 1;
vergleiche die Rangordnungen in Abb. 4.4.1. a (k_T) und in Abb. 4.4.4 (k_{PB})

Serie 2 (Abb. 4.4.2 und 4.4.5)

Rangordnung k _T : Purospher Star	Rangordnung k _{PB} : Prontosil ACE
	Zorbax Extend
	Nucleosil HD
	Prontosil ACE
	Nucleosil Nautilus
	Symmetry Shield
	Zorbax Bonus

Serie 3

Polar hat den kleinsten k_T-Wert (Abb. 4.4.3), „überholt“ jedoch in Abb. 4.4.6 die hydrophoberen Spherisorb ODS 1 und Zorbax SB C₈.

Wir haben offensichtlich sogar bei Verbindungen wie Hydroxybenzoaten, die häufig als „Muster“-RP-Analyte angesehen werden, einen überlagerten Mechanismus.

Neben den hydrophoben, RP-Wechselwirkungen werden polare Wechselwirkungen wirksam – wenn der Analyt eine polare Gruppe aufweist – und wenn die Phase über polare Funktionalitäten verfügt. Bei den Phasen der Serie 1 sind das freie Silanolgruppen – alle aufgeführten Phasen sind nicht endcapped – bei der Serie 2 und 3 ist es die polare Gruppe bei den „embedded phases“. Die Partnergruppe bei den Hydroxybenzoaten ist vermutlich die phenolische Funktion.

Isobutylmethylketon, s. Abb. 4.4.7 bis 4.4.9

Auch hier befinden sich im oberen Drittel in der Überzahl eindeutig hydrophobe Phasen, im unteren Drittel in der Überzahl eindeutig polare Phasen. Wie beim Hydroxybenzoat wird auch hier festgestellt, dass manche gut abgedeckte Phase eine offensichtlich verminderte Wechselwirkung mit dem „etwas“ polaren Keton eingehen kann, sie befindet sich in unteren Drittel in der Nähe von polaren Phasen. Umgekehrt befindet sich manche polare Phase im oberen Drittel.

In Abb. 4.4.10 und 4.4.11 sind alle drei Retentionsfaktoren zu sehen - nach abnehmendem Retentionsfaktor Toluol sortiert. Während zwischen Toluol und Propylhydroxybenzoat eine gute Korrelation herrscht, wird an mancher Phase, die über polare Gruppen verfügt, ein auffallend großer Retentionsfaktor für Isopropylmethylketon festgestellt.

Methylengruppenselektivität

In Abb. 4.4.12 und 4.4.13 sind die Trennfaktoren bei der Trennung Ethylbenzol/Toluol, Propylhydroxy-/Ethylhydroxybenzoat (in Abb. 4.4.13: Propylhydroxy-/Methylhydroxybenzoat) und Isobutyl-/Isopropylmethylketon dargestellt - nach dem Trennfaktor EB/T sortiert. Interessanterweise zeigen für die „polare“ Trennung der zwei Ketone gerade ausgesprochen hydrophobe Phasen eine gute Selektivität, solche Phasen rücken im Selektivitätsranking „nach vorne“. Methylengruppenselektivität ist nicht gleich „Methylengruppenselektivität“, polare Gruppen am Molekül spielen eine entscheidende Rolle. Für eine ausführliche Diskussion, s. Kap. 5.4 und Kap. 6.

Kommentar

Wie erwartet, verhalten sich Ethylbenzol/Toluol und die Hydroxybenzoate ähnlich. Die unterschiedliche chemische Natur von Isopropylmethylketon (kein Aromat) führt zu einem dazu, dass es ein anderes Retentionsverhalten zeigt. Zum zweiten wird bei den Ketonen eine wesentlich größere Bandbreite in den Selektivitäten festgestellt.

Hypercarb ist nach den hier besprochenen Kriterien die am stärksten hydrophobe Phase, die zwei Fluofix-Materialien die polarsten Phasen.

Trennfaktor Ethylbenzol/Fluorenol (hydrophobe Selektivität)

Abb. 4.4.14 zeigt die Zuordnung der Phasen nach dem Trennfaktor Ethylbenzol/Fluorenol. Je größer der α -Wert um so hydrophober ist die Phase. Die Ursache für einen hydrophoben Charakter kann eine Polymerschicht an der Oberfläche sein (z.B.

Gromsil CP, Nucleosil AB), eine starke Belegung (z.B. Zorbax ODS, Symmetry C₁₈) oder eine spezielle Bindung der Borste an der Oberfläche, die zu einer guten Abdeckung der Kieselmatrix führt (z.B. Zorbax Extend, Synergi MAX RP). Ab ca. Bondapak/Platinum C₁₈ handelt es sich um C₁₈/C₈-Phasen mit einem recht polaren Charakter ($\alpha = 1$). Bei sehr polaren Phasen (z.B. Spherisorb ODS1, Synergi POLAR RP) eluiert Fluoren nach Ethylbenzol. Die Trennung Fluoren/Fluorenon wird ausführlich in Kap. 5.3 besprochen.

„Trennfaktor“ Phenol/Toluol

Hinweis: Der Retentionsfaktor von Phenol wurde bei 40/60, von Toluol bei 80/20 Methanol/Wasser ermittelt, deswegen wird hier die Schreibweise „Trennfaktor“ verwendet. In Abb. 6.2.27a befinden sich die polaren Phasen im oberen Drittel, denn ihre Wechselwirkung mit dem apolaren Toluol ist gering, es ergibt sich ein kleiner Retentionfaktor für Toluol und dem entsprechend ein großer Trennfaktor Phenol/Toluol.

Abschließender Kommentar:

Nach Auffassung des Autors wird die hydrophobe Selektivität der Phasen durch die Darstellungen in den Abb. 4.4.14 und 6.2.27a am besten wiedergegeben.

4.5 „Durchbruch Aceton“

Eine geringfügige Modifizierung des bekannten Tests zur Ermittlung des Verweilvolumens einer Gradienten-Anlage führt zu einem einfachen Test, der eine Aussage über die Hydrophobie einer Phase erlaubt. Die Modifizierung besteht lediglich darin, die Säule nicht auszubauen. Die Idee entstand bei einem Gespräch mit Daniel Stauffer, Roche, Basel.

Das Prinzip:

Fast jeder organischer Analyt kann mit Wasser als „Eluent“ (hier, linearer Gradient beginnend mit 100% Wasser) an einer apolaren RP-Phase festgehalten werden. An polaren Phasen dagegen sollte eine Sorption kaum möglich sein. Aceton eignet sich auf Grund seines UV-Verhaltens gut, diesen Vorgang zu visualisieren. Je hydrophober nun eine Phase ist, um so stärker sollte Aceton an den Borsten festgehalten werden, um ab einer bestimmten Konzentration an Acetonitril im Eluenten „durchzubrechen“. An polaren Phasen müsste Aceton von der Acetonitril-Front „mitgenommen“ werden, ohne dass es zu einer Verzögerung kommt.

Nun zum Experiment:

Es wurde ein linearer Hochdruckgradient – der jedoch nach 4 bis 8 min. gestoppt wurde – unter folgenden Bedingungen gefahren:

A: 100 % Wasser
B: 100 % ACN + 0,5 % Aceton
 λ : 254 nm
T: 40° C
F: 2 ml/min

Die vermuteten Unterschiede bei den einzelnen Phasentypen konnten tatsächlich festgestellt werden. Bei stark polaren Phasen wird ein stetiger, linearer Anstieg der Basislinie beobachtet. Bei stark hydrophoben Phasen dagegen zeigt die Basislinie eine Verzögerung, um erst nach einem „Knick“ – der den Zeitpunkt des Durchbruchs von Aceton visualisiert - stetig linear anzusteigen. Je ausgeprägter und je länger diese Verzögerung ausfällt, d.h. je steiler der Anstieg der Basislinie ist, um so hydrophober ist die Oberfläche und somit der Gesamtcharakter der Phase.

Dieser Test hat natürlich einen qualitativen Charakter. Dennoch kann ein grobes Ranking der Phasen ermittelt werden: Man misst die Zeit des steilen Anstiegs, oder man verbindet an dem aufgezeichneten Gradienten den Punkt des beginnenden Anstiegs mit einem Punkt am Anstieg nach einer definierten Zeit miteinander und misst den Abstand von der Mitte dieser Sehne zu der gegenüber liegenden Verlaufslinie des Gradienten. Dieser Abstand stellt ein halbempirisches Maß für die Hydrophobie dar, s. Abb. 4.5.1.

Die Abb. 4.5.2 bis 4.5.4 zeigen für unterschiedliche Phasen typische Verläufe:

- stark hydrophobe Phasen, Abb. 4.5.2 (Chromolith Performance, SMT OD)
- recht hydrophobe Phasen, Abb. 4.5.3 (Zorbax ODS)
- stark polare Phasen, Abb. 4.5.4 (Supelcosil ABZ PLUS, HyPURITY Advance, Synergi POLAR RP)

Abb. 4.5.1 zeigt die Reihenfolge für 34 Phasen von polar zu apolar. Die Phasen können in folgende Gruppen eingeteilt werden:

1. Sehr polare Phasen; der polare Charakter wird durch Kombination von mehr als zwei polaren Elementen hervorgerufen: kurze Alkylkette und polare Gruppe an der Alkylkette (HyPURITY Advance), zusätzlich hydrophiles Endcapping (Synergi POLAR RP), eingebaute polare Gruppe am Alkylrest und zusätzlich polare Gruppen an der Oberfläche (Supelcosil ABZ PLUS). Nach diesem Test wären, neben Platinum EPS die Letztgenannten die polarsten der untersuchten Phasen. Die Polarität solcher Phasen ähnelt der einer CN-Phase, siehe Abb. 4.5.5. Dort wird das Profil an einer CN-Phase, einer speziell für diesen Test hergestellten CN/C₁₈-Mischphase und an Platinum EPS dargestellt.
2. Polare Gruppe an der Seitenkette, z.B. Nucleosil Nautilus, Symmetry Shield
 - Sterisch geschützte C₈-Phase: Zorbax SBC₈
3. Nicht endcappte Phasen, z.B. Spherisorb ODS1
 - C₈-Phasen, z.B. LiChrospher Select B
 - Phasen mit kleinen Poren, z.B. Nucleosil 50
4. Sehr hydrophobe Phasen, der hydrophobe Charakter wird z.B. durch eine starke Belegung der Oberfläche, z.B. Nucleosil HD, Symmetry oder eine Polymerschicht hervorgerufen, z.B. Nucleosil AB, SMT

In Abb. 4.5.6 wird der hier besprochene Effekt an zwei Phasen auf der Basis gleichen Kieselgels dargestellt, links klassische Belegung, rechts eine „embedded phase“.

Obwohl man von einem derartig einfachen Test zunächst nur grobe Aussagen erwarten kann, ist erstaunlicherweise doch manche Feindifferenzierung möglich, die durch andere Tests bzw. chemometrische Berechnungen bestätigt wird. Dazu einige Beispiele:

- Purospher ist identisch mit Purospher Star. Beide Phasen finden sich darüber hinaus bezüglich ihres Charakters in der Nähe von Phasen, die über eine polare Funktionalität verfügen.
- Durch eine polare Gruppe an der Seitenkette erhält eine Phase einen stark polaren Charakter. Eine kurze Alkylkette und/oder ein hydrophiles Endcapping sind Merkmale, die den polaren Charakter zusätzlich maximieren.
- Eine Polymerschicht (SMT) stellt ein sehr stark hydrophobes Element dar.
- Inertsil ODS2 ist aufgrund der stärkeren Belegung ($2,13 \mu\text{mol}/\text{m}^2$) hydrophober als Inertsil ODS3 ($1,3 \mu\text{mol}/\text{m}^2$), s. Abb. 4.5.7.
- Lediglich ein hydrophiles Endcapping verleiht den Phasen keinen starken hydrophilen Charakter. Bei zusätzlichen Experimenten – auf die hier nicht näher eingegangen wird - wurde tatsächlich eine gute Emulsion beim Rühren einer AQ-Phase in Wasser beobachtet, während bei hydrophoben Klassikern „Klumpen“ auftraten. Dennoch hatte die Emulsion auch physisch eine andere Konstitution als bei den „wirklich“ polaren Phasen, s. auch Abb. 4.5.8.
- Das Profil von Zorbax ODS und Hypersil erinnert eher an hydrophobe Phasen, vgl. dazu auch die Ergebnisse mit Coffein/Phenol (Abb. 4.3.12) und dem Trennfaktor Ethylbenzol/Fluorenol. Silanolgruppen-Aktivität im Sauren ist nicht unbedingt als Gegensatz zu hydrophoben Eigenschaften zu verstehen.

Dieses Experiment wurde schließlich auch an einigen Kieselgelsäulen durchgeführt. Es ergaben sich unterschiedliche Profile. Möglicherweise eignet sich dieser Test für einen qualitativen Vergleich von Kieselgelen und zwar über die Polarität ihrer Oberfläche (Anzahl an Siloxanbindungen).

4.6. Uracil-Test

Indirekter Hinweis auf polare Gruppierungen der Matrix und Einstufen des polaren Charakters mit Hilfe der Retentionszeit (Totzeit, t_m , I.U.P.A.C.-Nomenklatur: Durchflusszeit) der „inerten“ Komponente Uracil.

Die Totzeit, t_m , ist abhängig von dem Fluss, den Säulendimensionen und der Packungsdichte. Bei einem bestimmten Fluss und gleichen bzw. normierten Säulendimensionen müsste somit die Retentionszeit von Uracil, sofern sie eine inerte Komponente darstellt, konstant und unabhängig vom Phasenmaterial sein. Ist dies nicht der Fall, so kämen dafür zwei Gründe in Frage:

- Unterschiede in der Packungsdichte
- Uracil verhält sich nicht gegenüber allen Phasen inert

Diskussion

Die untersuchten Säulen lassen sich, was die Säulendimensionen betrifft, in fünf Gruppen einteilen:

125 x 4 mm
 150 x 3,9 mm
 150 x 4 mm
 125 x 4,6 mm
 150 x 4,6 mm

Auch in diesem Experiment wurden mit dem Ziel von zuverlässigen Aussagen die Werte bei unterschiedlichen experimentellen Bedingungen ermittelt.

Eluent	Fluss [ml/min.]	Temperatur [°C]	Experimentelle Bedingungen
MeOH	1	35	„1“
MeOH/H ₂ O (80/20, v/v)	0,5	40	„2“
MeOH/H ₂ O (80/20, v/v)	1,5	40	„3“
MeOH/H ₂ O 40/60	1	40	„4“

Die Werte für die Totzeit könnten innerhalb einer Gruppe (identisches Säulenvolumen) zunächst direkt miteinander verglichen werden. Mit dem Ziel, alle Säulen direkt miteinander vergleichen zu können, wurde für die Bedingungen „1“, „2“, und „3“ eine Normierung für die Säulendimension 125 x 4 mm durchgeführt. Abb. 4.6.1 bis Abb. 4.6.6 zeigen diese Werte für die experimentellen Bedingungen „2“ (Serie 1), in Abb. 4.6.7 schließlich für alle Säulen. Eine Normierung unter Bezug nur auf das Säulenvolumen kann jedoch mit Fehlern behaftet sein, weil die Phasen unterschiedliche Porenvolumina aufweisen. Um den Einfluß des Porenvolumens auf die Durchflußzeit zu überprüfen, wurde eine weitere Normierung unter Berücksichtigung des Säulen- **und** des Porenvolumens vorgenommen, s. Abb. 4.6.1a bis Abb. 4.6.6a und Abb. 4.6.8 für alle Säulen. Letztgenannte Normierung ist die exaktere.

Folgende empirische Gleichungen ermöglichen es, die erwartete Totzeit in grober Näherung abzuschätzen.

$$t_m \approx 0,1 \frac{L [\text{cm}]}{F [\text{ml/min}]} \quad \text{für 4,6 mm Innendurchmesser}$$

$$t_m \approx 0,08 \frac{L [\text{cm}]}{F [\text{ml/min}]} \quad \text{für 4,0 mm Innendurchmesser}$$

Die jeweilig errechnete Zeit wird in den Abb. 4.6.1 und 4.6.6 mit einem \uparrow angezeigt.

Heute werden die Säulen etwas „weicher“ gepackt, das könnte der Grund für die generell etwas höher festgestellten Werte sein. Unabhängig davon, wo genau der „korrekte“ Wert für die Totzeit liegt, kann festgehalten werden, dass die (normierten) Retentionszeiten für Uracil an den einzelnen Säulen merkliche Unterschiede aufweisen.

Eine Säule aus dem oberen Teil der Abb. 4.6.8 müsste entweder eine geringere Packungsdichte aufweisen oder aber Uracil wird an jener Phase aus bestimmten Gründen retardiert, jenes verhält sich also nicht inert. Große Differenzen in der Packungsdichte/bzw. eine „lockere“ Packung würden zu einem geringen relativen normierten Druckabfall führen, vergleiche Abb. 3.2.2. Das ist jedoch kaum der Fall.

Mögliche Erklärung:

In mehreren Experimenten dieser Studie wurde festgestellt, dass die Sterik auch für relativ kleine Moleküle, wie hier Uracil, möglicherweise eine wichtigere Rolle spielt als bis jetzt allgemein angenommen. Dies könnte erklären, warum im oberen Drittel der Abb. 4.6.8 alle Phasen mit den größten Porendurchmessern anzutreffen sind, im Unteren dagegen alle Phasen mit den kleinsten Porendurchmessern. Sehr eindrucksvoll ist dieser Effekt in Abb. 4.6.5a und Abb. 4.6.2a zu beobachten. So wird beispielsweise zwischen Jupiter und den Zorbax-Säulen, Säulen gleicher (!) Dimensionierung, ein Faktor von ca. 4 in den normierten Retentionszeiten für Uracil beobachtet. Jupiter ist ein 300Å-, die Zorbax-Phasen basieren auf ein 80Å-Material.

Die Vermutung, dass polare Wechselwirkungen (in weit abgeschwächter Form) auch mit ein Grund für das Retardieren von Uracil sind, wird durch den direkten Vergleich von Phasen mit identischer Matrix aber unterschiedlicher funktioneller Gruppe an der Oberfläche erhärtet: Uracil eluiert an der polaren „Version“ stets später, z.B.

Hydrophilere Phase	Hydrophobere Phase
Zorbax SBC ₈	Zorbax SBC ₁₈
Spherisorb ODS1	Spherisorb ODS 2
Discovery C ₁₆	Discovery C ₁₈
Reprosil AQ	Reprosil
Symmetry Shield	Symmetry
Nucleosil HD	Nucleosil AB
SynergiPOLAR RP	SynergiMAX RP
Zorbax Bonus	Zorbax Extend
HyPURITY Advance	HyPURITY C ₁₈

Die Säulen der rechten Spalte sind aus unterschiedlichen Gründen hydrophober als deren linkes Pendant:

Längere Kette (z.B. Discovery C₁₈), endcapped (z.B. Spherisorb ODS 2), Polymerschicht (z.B. Nucleosil AB) usw.

Wir haben hier offensichtlich mit einem überlagerten Effekt zu tun, wobei der sterische Effekt dominiert. So kann an einem Material mit einem kleinen Porendurchmesser Uracil möglicherweise ausgeschlossen werden.

Zusammenfassung

Das Sorptionsverhalten von Uracil darf sicherlich nicht überbewertet werden. Dennoch könnte folgende Beobachtung festgehalten werden:

- Die Retentionszeit von Uracil scheint ein Indikator für sterische Effekte und polare Wechselwirkungen zu sein. Möglicherweise kommt für eine Retardierung in erster Linie ein großer Porendurchmesser in Frage, durch den eine ungehinderte Diffusion zu einer Verzögerung führt. Erst dann spielen möglicherweise Schwermetallionen bzw. polare Gruppen direkt an der Oberfläche der Matrix eine Rolle: Silanolgruppen, z.B. Bondapak, LiChrosorb sowie andere polare Gruppierungen, die bewusst eingeführt wurden, z.B. Synergi POLAR RP, HyPURITY Advance, Fluofix.

Abschließende Bemerkung

Obschon theoretisch klar definiert, ist es in der Praxis nicht gerade einfach, eine inerte Komponente für alle, mittlerweile sehr unterschiedliche Phasentypen zu finden. Ein Analyt also, der einerseits absolut keinerlei Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingeht und andererseits auch keinem Größen-/Ionen-Ausschluss unterliegt oder aus sonstigen Gründen retardiert wird. Wird Uracil bei Phasen aus dem oberen Drittel von Abb. 4.6.8 als Marker für die Errechnung der Retentions- und Trennfaktoren verwendet, so führt dies zu relativ kleineren Retentions- und relativ größeren Trennfaktoren. Dies täuscht eine bessere Selektivität dieser Phasen vor als tatsächlich vorhanden! Uracil ist nun traditionell einer der am häufigsten verwendeten Analyte zur Bestimmung der Totzeit. Um die Ergebnisse aus dieser Studie mit anderen Arbeiten vergleichbar werden zu lassen werden auch hier – trotz der eben beschriebenen Problematik – die Retentions- und Trennfaktoren mit den Werten von Uracil als inerten Analyten berechnet.

4.7 „Homogenität der Oberfläche - Hinweis auf unterschiedlich aktive Gruppen

Es herrscht eine Korrelation zwischen $\log P$ und k -Wert, s. Kap. 6. Diese Korrelation ist um so „besser“ (großer Korrelationskoeffizient) je einheitlicher der Mechanismus ist. Gute Korrelation bedeutet also einen einheitlichen Mechanismus, für den *eine* funktionelle Gruppe verantwortlich ist. Wenn nun bewusst eine Mischung von Analyten unterschiedlicher chemischer Natur verwendet wird, so müsste die Retention durch mehrere funktionellen Gruppen der dann inhomogenen Oberfläche zu beeinflussen sein. Positiv ausgedrückt: Die unterschiedlichen funktionelle Gruppen zeigen eine

differenzierte Selektivität für unterschiedliche Analyttypen. Zur Erinnerung sei angemerkt, dass silanophile **und** hydrophobe Eigenschaften bei einer Phase in keinem Widerspruch zueinander stehen; man denke nur an die hochbelegten aber gleichzeitig Metallionen-haltige, silanophilen Zorbax ODS und LiChrospher oder an die sehr hydrophobe C₃₀ Alkylborste und gleichzeitig das hydrophile Endcapping bei Develosil.

Man kann nun den Korrelationskoeffizienten für eine lineare und eine quadratische Regression ermitteln. Je größer die Differenz beider Werte ist um so stärker ist der Hinweis auf unterschiedliche funktionelle Gruppen an der Oberfläche, die natürlich für den verwendeten Analyttypen relevant sind.

Dies wurde für mehrere Mischungen und bei unterschiedlichen Bedingungen überprüft. In Abb. 4.7.1 werden die säulenspezifischen Differenzen für die Trennung aus dem Experiment „Hydrophobie 1“ dargestellt. Es geht hier um die Trennung von neutralen Komponenten (Ethylbenzol und Toluol) und aromatischen planaren/nicht planaren Molekülen (Triphenylen und o-Terphenyl). Im oberen Teil der Abbildung 4.7.1 befinden sich Phasen, bei denen polare Wechselwirkungen dominant sind. Polare Gruppen als Ursache dafür sind beabsichtigt („embedded phases“, Platinum EPS) oder ergeben sich durch den Herstellprozess (Supelcosil ABZ PLUS). Oder sie stellen einfach die Restsilanolgruppen bei den nicht oder nicht vollständig endcappten Phasen dar. Solche Phasen zeigen in der Tat eine sehr gute „shape selectivity“, s. auch Ausführungen im Kap. 5. Im unteren Teil der Abb. 4.7.1 sind Phasen anzutreffen, die dieser Mischung keine spezielle Wechselwirkung „anbieten“, es sind Phasen mit einer recht homogenen, gut abgedeckten Oberfläche, deren „shape selectivity“ jedoch hält sich gerade deswegen in Grenzen.

Aussagekraft der vorgestellten Tests

Die Relevanz der Aussagen aus diesen Tests für die eigene Arbeit hängt von der konkreten Fragestellung ab. Dazu folgendes Beispiel:

Die Injektion von Basen in einem ungepufferten Methanol/Wasser-Eluenten ist ein sehr strenger Test, ebenso wie die Injektion in einem sauren Puffer, in dem nur die stark acide Silanolgruppen sich bemerkbar machen. Das bedeutet allerdings auch folgendes: Wird eine Phase, die bei diesem Test evt. nicht so gut „abschneidet“, in einem Acetonitril/Phosphatpuffer ausreichender Pufferkapazität und bei dem „richtigen“ pH-Wert betrieben, kann sie für schwächere organischen Basen durchaus gute Resultate erzielen: Gute Selektivität bei ausreichender Peaksymmetrie.

Halten wir folgendes fest (vereinfacht):

An einer silanophilen Phase erhält man bei der Trennung von Basen große Retentions- und Trennfaktoren bei geringer Peaksymmetrie. An einer hydrophoben Phase erhält man geringe Retentions- und Trennfaktoren bei guter Peaksymmetrie. Man bewegt sich also meist entlang einer Kompromisslinie. Der Kompromiss bezüglich Säulenwahl kann mit Hilfe des pH-Wertes stark positiviert werden.

Und schließlich: Den „besten“ Test gibt es nicht, es existieren lediglich strenge (z.B. primäre/sekundäre Amine und ungepufferte Eluenten) und weniger strenge (z.B. tertiäres Amin und gepufferte Eluenten). Es kommt bei der Wahl des Tests auf die Absicht an.

5. Trennverhalten der untersuchten RP- Phasen gegenüber unterschiedlichen Analyttypen

Ermittelte Kenngrößen, Vorbemerkungen

Zur Auswahl der eingesetzten Analyte und auf die experimentellen Bedingungen wurde in Kap. 2 eingegangen. Die zwei wichtigsten Eigenschaften einer Phase sind das Retentionsverhalten und die Selektivität gegenüber den interessierenden Komponenten. Das Trennverhalten einer Phase kann somit mit Hilfe des Retentionsfaktors (Kapazität, k -Wert) und des Trennfaktors (Selektivität, α -Wert) untersucht werden, wobei letzterer sicherlich der Wichtigere ist. In der Praxis spielen auch folgende Aspekte eine Rolle:

Gute Selektivität bei einer vertretbaren Analysendauer (k -Werte zwischen ca. 2 bis 8, das bedeutet für eine 125 x 4 mm-Säule und einen Fluss von 1 ml/min eine Analysendauer zwischen 3 und 10 min.) Daher werden nachfolgend an den Stellen, an denen es Sinn macht, die Quotienten k/α ebenfalls abgebildet.

Die interessierenden Peaks sollen symmetrisch und schmal sein, also eine gute Symmetrie und eine hohe Bodenzahl aufweisen. Dieser Aspekt wurde in Kap. 3 behandelt. Wurden bei einem Experiment auffallend asymmetrische Peaks erhalten, so wird an gegebener Stelle darauf eingegangen.

Im vorliegenden Kapitel 5 werden die Ergebnisse der Trennungen vorgestellt und kurz kommentiert. Eine zusammenfassende Diskussion und ein Vergleich der Säulen erfolgt in Kap. 6.

Wie bereits erwähnt, wurden bei der Serie 3 die Phasen Synergi MAX RP und Synergi POLAR RP untersucht. Zusammen mit diesen wurden – quasi als „interne“ Standards – mehrere Säulen aus der ersten Serie noch einmal vermessen. Serie 3 findet nachfolgend nur dann Erwähnung, wenn sich die Ausführungen auf die zwei oben genannten Säulen beziehen. Da, wo es sinnvoll erscheint, werden beide Säulen zusammen mit den Säulen der Serie 1 bzw. 2 besprochen.

Im Abschn. 5.1-5.7 wird das Trennverhalten von neutralen Komponenten behandelt. Dabei handelt es sich um ein- und mehrkernige Aromaten (recht polar bis sehr hydrophob), um Ketone sowie um Nitroaniline und Steroide.

Abschn. 5.8-5.9 handelt von der Trennung basischer Komponenten.

Im Abschn. 5.10-5.12 schließlich geht es um die Trennung von schwachen und mittelstarken, aromatischen Säuren.

5.1 Experiment „Aromaten“ (Chrysen, Perylen)

In Tab.5.1.1 und 5.1.2 sind die chromatographischen Daten der Analyte für beide Serien enthalten. In den Abb. 5.1.1 bis 5.1.4 sind die Retentions- und Trennfaktoren nach abnehmenden k bzw. α -Werten für beide Serien dargestellt.

Kapazität

Eine starke Affinität zu Perylen, einem großen hydrophoben Aromaten haben erwartungsgemäß solche Phasen, die zu hydrophoben Wechselwirkungen in der Lage sind. Der Grund für einen hydrophoben Charakter der Phase kann sein:

- polymere Schicht (SMT, Nucleosil AB) bzw. Siloxanschicht (Gromsil CP) μ
- hoher Kohlenstoffgehalt bzw. hoher Belegungsgrad λ
- Besondere Bindung der Borste zum Kieselgel Σ

Serie 1		
μ SMT	N. E.	
μ Nucleosil AB		
λ Ultrasep ES		
λ Purospher		
λ Nucleosil 50		
μ Gromsil CP		N. E.
λ LiChrospher		
λ Zorbax ODS		
λ Symmetry		N. E.
λ Superspher		N. E.
λ MP-Gel		
λ Kromasil		
Serie 2		
λ Purospher Star	P P	
λ Prontosil ACE		
λ Symmetry Shield		
Σ Zorbax Extend		

N. E.: nicht-endcapped

P: polare Gruppe an der Borste eingebaut („embedded phases“)

Selektivität

Eine gute Selektivität für die zwei Aromaten zeigen vor allem Phasen, die eine polare Funktionalität bzw. ein besonderes sterisches Merkmal aufweisen.

Polare Phasen sind:

- „embedded phases“ μ
- Nicht-endcappte bzw. nicht vollständig endcappte Phasen \diamond
- Phasen mit polaren Gruppen am Kieselgel +, siehe weiter unten
- „Sterische Erkennung“ X
- kleiner bzw. großer Porendurchmesser

Serie 1	Serie 2
μ Supelcosil ABZ PLUS	μ Symmetry Shield
\diamond Ultrasep ES	μ Prontosil ACE
X Nucleosil 50	+ Purospher Star
\diamond Spherisorb ODS 1	μ Platinum EPS
+ Platinum EPS	
μ Discovery Amid C ₁₆	

+ Purospher e ◇ LiChrosorb ◇ Nucleosil 100 ◇ MP-Gel ◇ LiChrospher ◇ Superspher ◇ Spherisorb ODS 2 X Nova-Pak Inertsil ODS 2	
---	--

Platinum EPS (Enhanced Polar Selectivity) ist als polare RP-Phase bekannt. Purospher e, Purospher Star (und teilweise Chromolith Performance) mit einer sehr guten Selektivität für Aromaten befinden sich interessanterweise ebenfalls häufig eher in der Nähe von „polaren“ Phasen als in der Nähe von ausgesprochen hydrophoben, gut abgeschirmten Phasen wie z. B. Kromasil, Symmetry, Nucleosil HD, Inertsil ODS 3, Prodigy, Luna, Synergi MAX RP, Zorbax Extend. Offensichtlich befinden sich auf der Oberfläche polare Gruppen, die hier für eine gute aromatische Selektivität sorgen. Nucleosil 50 und Novapak haben einen kleinen Porendurchmesser. Novapak und – in abgeschwächter Form auch Discovery C₁₈ - weist darüber hinaus eine kleine spezifische Oberfläche auf.

Zusammenfassung

Eine gute Selektivität für große, hydrophobe, aromatische Verbindungen ohne Substituenten wird in erster Linie mit polaren Phasen festgestellt, noch genauer: mit Phasen, die über polare Gruppen verfügen. Polare Gruppierungen an der Oberfläche oder an der Alkylborste („embedded phases“) können mit dem $\pi\cdots\pi$ -Elektronensystem der Aromaten wechselwirken. Lediglich die Abnahme der Hydrophobie z. B. durch eine Verkürzung der Alkylborste (z. B. Zorbax SB C₈, LiChrospher Select B, Superspher Select B) oder durch einen geringen Kohlenstoffgehalt bei gleichzeitigem Endcapping (Bondapak, Platinum C₁₈) führt hier nicht zu selektiven Wechselwirkungen. Die „Klassiker“, das sind gut abgedeckte, hydrophobe Phasen, nehmen eine Mittelstellung ein. Die vermeintliche Hydrophilie der AQ-Phasen kann sich in reinem Methanol aber auch in Methanol/Wasser nicht entfalten. Unter allgemein üblichen Bedingungen, (Methanol- bzw. Acetonitril/Wasser-Gemischen, und klassische Phosphatpuffer) verhalten sie sich wie klassische RP-Phasen, s. auch Kap. 4.5 „Durchbruch Aceton“.

Es sei noch angemerkt, dass in Methanol/Wasser-Eluenten oder gar in reinem Methanol wie hier der Fall, der Einfluss von polaren Gruppen, wie Silanolgruppen, verstärkt wird. In reinem Methanol sind polare Wechselwirkungen sehr wichtig. Erst in zweiter Linie scheint, ein besonderer sterischer Effekt für die Selektivität von Vorteil zu sein.

In den Abb. 5.1.5 und 5.1.6 sind die k/α -Auftragungen für beide Serien zu sehen.

Die selektivsten Säulen sind auch die effektivsten: Moderater k -Wert, großer α -Wert. Die drei polaren Phasen Spherisorb ODS 1, Platinum EPS und Discovery C₁₆ fehlen nach dem hier besprochenen Kriterium, weil deren k_{Per} -Wert gering ist. Sind in der Probe Matrixbestandteile nicht zu erwarten und herrschen robuste chromatographische Bedingungen, so zeigen nachfolgend aufgeführte Quotienten Routinetauglichkeit:

	k	α
Discovery C ₁₆	0,96	1,60
Spherisorb ODS 1	0,95	1,58

5.2. Planare, nicht-planare Aromate: o-Terphenyl, Triphenylen

In den Tab.5.2.1 bis 5.2.3 sind die chromatographischen Daten der Analyte beim Experiment „Hydrophobie 1“ abgebildet. Die Retentions- und Trennfaktoren sind den Abb. 5.2.1 bis 5.2.6 zu entnehmen.

1. Kapazität

Im oberen Drittel befinden sich folgende Phasen

Serie 1	Serie 2
Ultrasep ES	Purospher Star
Nucleosil 50	Prontosil ACE
SMT	Symmetry Shield
Inertsil ODS 3	Zorbax Extend
Purospher e	
Inertsil ODS 2	
LiChrospher	
Kromasil	
Gromsil CP	
Zorbax ODS	
Prodigy	
Luna 2	
Superspher	
Symmetry	
MP-Gel	

Im oberen Drittel der Abb. 5.2.1 befinden sich hydrophobe Phasen. Sowohl ein hydrophober (z. B. Inertsil ODS 3, Luna 2) als auch ein „aromatischer“ Charakter (z. B. SMT OD, Ultrasep ES, Purospher e, LiChrospher, MP-Gel) machen sich bemerkbar. In Abb. 5.2.7 sind die Retentionsfaktoren von Ethylbenzol und Triphenylen gegeneinander aufgetragen. Eine Korrelation ist eindeutig erkennbar. Bezüglich der Retention sind für beide Analyttypen die gleichen (RP-) Wechselwirkungen verantwortlich. Dies gilt jedoch nicht für die Selektivität, s. weiter unten.

Selektivität:

Im oberen Drittel befinden sich folgende Phasen:

Serie 1	Serie 2	Serie 3
Supelcosil ABZ plus	Symmetry Shield	Synergi POLAR RP
Ultrasep ES	Prontosil ACE	
SMT OD	HyPURITY Advance	
Nucleosil AB	Nucleosil Nautilus	
Discovery C ₁₆		
Purospher e		
Spherisorb ODS 1		
LiChrospher		
Superspher		
Nucleosil 50		
LiChrosorb		
Platinum EPS		
Nucleosil Protect 1		
MP-Gel		
Nucleosil 100		
Symmetry		

In den 80-iger und vor allem 90-iger Jahren wurde der sterischen Selektivität („shape selectivity“) große Aufmerksamkeit geschenkt (Wise, Sander, Tanaka, Engelhardt). Es handelt sich dabei um die Fähigkeit einer Phase, zwischen planaren und nicht planaren (verdrillten, helicalen) Molekülen zu unterscheiden. Man spricht vom molekularen Erkennungsmechanismus. Die zitierten Autoren verknüpfen eine gute, sterische Selektivität mit dem Polymercharakter der Phase. Es bestehe demnach ein Zusammenhang zwischen sterischer Selektivität und Polymercharakter der Phase bzw. Belegungsgrad. Als Modellsubstanzen wurden vielfach polykondensierte Aromaten und vor allem Triphenylen und o-Terphenyl verwendet. Letztgenannte Analyte besitzen als Modellsubstanzen den Vorteil, dass sie das gleiche Molgewicht und nahezu die gleiche Größe besitzen. Während jedoch Triphenylen planar aufgebaut ist, besitzt o-Terphenyl eine helical verdrillte Molekülstruktur. Abb. 5.2.8 zeigt die α -Werte Tri/o-Ter sowie zum Vergleich auch die α -Werte EB/T für eine Reihe von Säulen. Tatsächlich zeigen zwei Phasen mit einer Polymerschicht (Nucleosil AB, SMT) eine hervorragende Selektivität. Eine gute Selektivität zeigen jedoch auch und gerade Phasen, die über polare Funktionalitäten verfügen. Diese Feststellung kann nicht mit dem Postulat der oben erwähnten Autoren in Einklang gebracht werden. Man kann versuchen, dieses Verhalten folgendermassen zu erklären: o-Ter, Tri sind Aromaten; ähnlich wie bei Chrysen/Perylen sind auch hier polare Wechselwirkungen mit deren $\pi\dots\pi$ - System möglich. Der Unterschied in der Konformation führt zu einem Unterschied in der Aromatizität der zwei Analyten und damit auch in ihrem polaren Charakter. Schließlich führt er zu einer unterschiedlichen Affinität gegenüber polaren Gruppen der stationären Phase (Chr. 5.2.1 und Chr. 5.2.2). Chr. 5.2.2 zeigt die Trennung einer Mischung aus Uracil, unbekannte

Verunreinigung, Ethyl- und Propylhydroxybenzoat, Toluol, Ethylbenzol, o-Terphenyl, Triphenylen an einer modernen, sehr gut abgedeckten, hydrophoben Phase (SynergiMAX RP) und an einer nicht endcappeden, niedrig belegten Phase (Spherisorb ODS1). An SynergiMax werden die organischen Komponenten sehr gut abgetrennt, die Selektivität jedoch für die Trennung Tri/o-Ter ist gerade ausreichend (zwei letzte Peaks). Am silanophilen, niedrig belegten, nicht endcappeden Spherisorb ODS1 sind die Verhältnisse genau umgekehrt.

Um diesen Befund zu bestätigen, wurden in einem zweiten Experiment weitere polare (nicht endcapped, „embedded phases“) und diverse apolare Phasen auf deren Eignung zur Trennung einmal des „RP-Analytpaares“ Ethylbenzol/Toluol und einmal von Triphenylen/o-Terphenyl hin überprüft, siehe Abb. 5.2.9. Die hydrophoben Phasen zeigen eine gute Selektivität für die Trennung EB/T, eine geringe jedoch für Tri/o-Ter. Dagegen zeigen alle „embedded phases“ sowie LiChrosorb und PurospherStar mit deren polarer Funktionalität eine sehr gute sterische Selektivität.

Gute sterische Selektivität zeigen also tatsächlich solche Phasen, die auch eine gute „aromatische“ Selektivität zeigen. Allerdings gibt es zwei Ausnahmen: neu hinzugekommen sind hier Nucleosil AB und SMT, also zwei Phasen mit einer polymeren Schicht an der Oberfläche. Gerade in diese scheint das planare Triphenylen ungehindert diffundieren zu können, was dem aus der Ebene herausragenden o-Terphenyl nicht gelingt.

In Abb. 5.2.10 und 5.2.11 sind die Trennfaktoren bei der Trennung EB/T und Tri/o-Ter gegeneinander aufgetragen. Eine Korrelation herrscht aufgrund der unterschiedlichen Mechanismen erwartungsgemäß nicht. Die polare Phase Supelcosil ABZ PLUS ist für die Trennung Tri/o-Ter besonders selektiv, die apolare Phase Luna dagegen für die Trennung EB/T. Einen Kompromiss stellen die Phasen Spherisorb ODS 1, Inertsil ODS 2 und Hypersil BDS bzw. Prontosil ACE und Nucleosil Nautilus dar. Bezüglich Effektivität der Trennung betrachte man Abb. 5.2.12 und Abb. 5.2.13. Demnach wäre Platinum EPS, Nucleosil 50 und HyPURITY Advance, Prontosil ACE vorzuziehen: Die erstgenannten Phasen weisen bei vergleichbaren Trennfaktoren kürzere Analysenzeiten auf.

Fazit:

Für die Trennung planarer Aromaten von nicht planaren Aromaten eignen sich polare Phasen sowie Phasen mit einer Polymerschicht. In einem wasserarmen, pufferfreien Eluenten sind für die Trennung apolarer Analyte polare Wechselwirkungen entscheidend.

5.3. Hydrophobe Aromaten mit und ohne polarer Funktionalität (Fluoren/Fluorenol)

In Tab. 5.3.1 sind die chromatographische Daten der Analyte beim Experiment „Hydrophobie 2“ abgebildet. Die Retentions- und Trennfaktoren sind den Abb. 5.3.1 und 5.3.2 zu entnehmen. Abb. 5.3.3 gibt die Korrelation zwischen dem Retentionsfaktor von Fluoren und dem α -Wert wieder.

Die Retentionsfaktoren nehmen ebenso wie die Trennfaktoren mit der Hydrophobie der Phasen zu. Bei der hier besprochenen Trennung handelt es sich um ein hydrophobes, aromatisches Analytpaar, bei dem die Unterscheidung in der Polarität

von der funktionellen Gruppe ausgeht: CH₂ vs. C=O. Daraus kann man ableiten, dass man

- für eine Unterscheidung „polar“/„apolar“ hydrophobe Phasen benötigt (analog zur Adsorptionschromatographie: Polare stationäre Phase, apolare Analyte). Das unterscheidet diese Trennung von der Trennung Chrysen/Perylen (Kap. 5.1), bei der polare Phasen, die zu einer Wechselwirkung mit dem aromatischen π ... π -System befähigt sind, eine gute Selektivität zeigen.
- Es wird eine größere Bandbreite in den Selektivitäten festgestellt im Vergleich zu Trennungen bei denen keine polare Gruppe involviert ist, s. Abb. 5.3.2. Als Konsequenz für die Praxis muss man sich klar machen, dass eine andere Säule zu einer merklich anderen Selektivität führen kann. Die Säulenwahl spielt also eine größere Rolle als bei Trennungen, die im Kap. 5.4 besprochen werden.
- In dem vorliegenden Fall wird eine recht gute Korrelation zwischen Retentions- und Trennfaktoren beobachtet. Für die hier besprochene Trennung wären Nucleosil AB und Hypersil BDS zwei effektive Phasen, s. Abb. 5.3.3.

Chr. 5.3.1. und Chr. 5.3.2. zeigen einige Trennungen aus diesem Experiment. In Chr. 5.3.1. wird die Trennung an einer sehr polaren Phase (Synergi POLAR RP, oben links), an einer polaren Phase (LiChrospher, unten links) und an einer hydrophoben Phase (Synergi MAX RP, oben rechts) demonstriert. Fluorenon wird an Synergi POLAR RP vor Toluol, an LiChrospher kurz danach und an Synergi MAX RP wesentlich später eluiert. An Zorbax Bonus wird eine Koelution beobachtet, an dem „hydrophoberen“ Spherisorb ODS 2 wird Fluorenon ähnlich wie bei LiChrospher kurz nach Toluol eluiert, s. Chr. 5.3.2.

5.4, Methylgruppenselektivität bei einkernigen Aromaten (Ethylbenzol, Toluol, diverse Hydroxybenzoate)

Kapazität

Im Kap. 4.4 ist auf die Hydrophobie/hydrophobe Selektivität der Phasen eingegangen worden. Es wird auf die Abb. 4.4.1 und die Ausführungen dort verwiesen. Sämtliche chromatographische Daten für dieses Experiment sind in den Tab. 5.2.1 und 5.2.2 enthalten.

Selektivität

In den Abb. 5.4.1 bis 5.4.6 sind die Retentions- und Trennfaktoren aufgetragen. Bei der Serie 1 wurden Ethyl- und Propylhydroxybenzoat, bei den Serien 2 und 3 Methyl- und Propylhydroxybenzoat getrennt. Es liegt auf der Hand, dass das erstgenannte Trennproblem anspruchsvoller ist, weil die Analyte sich nur durch eine, beim zweiten Analytpaar jedoch durch zwei Methylgruppen unterscheiden.

Wie man leicht erkennt, sind geringe Selektivitätsunterschiede festzustellen. Beim offensichtlich dominierenden klassischen RP-Mechanismus wird eine stetige, geringe Abnahme der Selektivität mit zunehmender Polarität der Phasen beobachtet.

Eine merkliche Selektivitätsabnahme wird in der Abfolge beobachtet:

Charakteristikum der Phase		
C ₁₆ -Alkylborste mit polarer Gruppe	Discovery Amid C ₁₆	Serie 1
C ₁₆ -Alkylborste wie oben, anderes Herstellverfahren (1)	Supelcosil ABZ PLUS	
Basismaterial: Kohlenstoff	Hypercarb	
C ₈ -Alkylborste mit polarer Gruppe	Nucleosil Protect 1	
C ₇ -Alkylborste mit polaren CF ₃ [⊖] -Gruppen	Fluofix IEW	
C ₇ -Alkylborste mit polaren CF ₃ [⊖] -Gruppen	Fluofix INW	
C ₈ -Alkylborste mit eingebauter polaren Gruppe	HyPURITY ADVANCE	Serie 2
C ₃ -Alkylborste mit eingebauter polaren Gruppe, polarer Endgruppe plus hydrophiles Endcapping	Synergi POLAR RP	Serie 3

(1) Supelcosil ABZ PLUS wird in einem 2-Schritt-Verfahren hergestellt. Die Phase verfügt auch nach der Modifizierung über eine beträchtliche Anzahl von Oberflächen-Aminogruppen. Dadurch hat sie einen ausgeprägt polaren Charakter:
Supelcosil ABZ PLUS zusammen mit HyPURITY ADVANCE und Synergi POLAR RP gelten als die polarsten „embedded phases“.

An dieser Stelle soll noch einmal betont werden, dass man die hier besprochene Rangordnung nicht überbewerten darf: Bei der Serie 1 liegen die α -Werte von 40 Säulen zwischen 1,38 und 1,46, bei der Serie 2 liegen die α -Werte von 12 der 13 Säulen zwischen 1,36 und 1,49. Das bedeutet, die Selektivität für dieses Trennproblem wird von der stationären Phase im untergeordneten Maße beeinflusst.

Im oberen Drittel befinden sich Phasen mit einer großen spezifischen Oberfläche und mittlerem Kohlenstoffgehalt.

	Kohlenstoffgehalt [% C]	Spezifische Oberfläche [m ² /g]
Prodigy	15,5	450
Luna	17,3	374
Inertsil ODS 3	15	450

Andererseits sind dort aber auch Phasen, bei denen schwerlich Gemeinsamkeiten erkennbar sind. Im oberen Selektivitäts-Drittel finden sich sowohl ausgesprochen hydrophobe, gut abgedeckte Phasen wie Hypersil BDS und Reprosil PUR als auch recht polare Phasen wie Spherisorb ODS 1 und Superspher Select B. In Chr. 5.4.3. wird die Trennung von Uracil, den zwei Hydroxybenzoaten, Toluol/Ethylbenzol sowie o-Terphenyl/Triphenylen an Zorbax ODS dargestellt.

Die Selektivitätsverhältnisse bei den Hydroxybenzoaten entsprechen grundsätzlich denen von Ethylbenzol/Toluol. Es wird jedoch folgende Beobachtung gemacht: Zwei

polare Phasen, Superspher Select B und Spherisorb ODS 1 zeigen für EB/T eine recht gute Selektivität (oberes Drittel), für PB/EB jedoch eine auffallend schlechte. Einige hydrophobe, gut abgeschirmte Phasen, Nucleosil HD, Kromasil, Discovery C₁₈ und Gromsil CP andererseits, die bei EB/T im mittleren Drittel zu finden sind, zeigen eine gute Selektivität für PB/EB. Diese Beobachtung wurde durch Wiederholmessungen bestätigt. Sie führt zu einer allgemeingültigen Aussage über optimale Analytstruktur-Phase-Verhältnisse, die jedoch weiter verifiziert werden sollte, s. auch Kap.6. In ungepufferten Systemen führt eine Differenz in dem polaren Charakter des Analytpaares und der Phasenoberfläche zu einer guten Selektivität.

Fazit:

Für die Trennung neutraler Analyte sind hydrophobe Phasen geeignet, wobei die Selektivitätsunterschiede – bis auf die ausgesprochen polare Phasen – doch gering ausfallen; Die Säulenwahl ist hier nahezu zweitrangig.

5.5 Methylengruppenselektivität bei Ketonen (Isopropyl-, Isobutylmethylketon)

Das Trennverhalten der Phasen für diese Trennung wurde in sechs verschiedenen Eluenten untersucht:

- MeOH/H₂O
- MeOH/Puffer; pH=2,7
- MeOH/Puffer; pH=7,6
- ACN/H₂O
- ACN/Puffer; pH=2,7
- ACN/Puffer; pH=7,6

- MeOH/H₂O
In Tab. 5.5.1 bis 5.5.3 sind die chromatographischen Daten der Analyte beim Experiment „Ketone“ für die drei Serien enthalten. In Abb. 5.5.1 bis 5.5.4 sind die entsprechenden Retention- und Trennfaktoren abgebildet. Nachfolgend sind nach der „Drittel-Regelung“ der Retentionsfaktor für Isobutylmethylketon sowie die Trennfaktoren dargestellt:

klso bu

Serie 1	Serie 2	Serie 3
TSK Inertsil ODS 3 Luna Prodigy Nucleosil 50 Ultrasep ES Inertsil ODS 2 Nucleosil HD YMC AQ LiChrospher Purospher e Repro-Sil AQ LiChrosorb SMT OD Resolve Superspher Select B	Purospher Star AQUA Zorbax Extend XTerra MS	SynergiMAX RP

α -Wert

Serie 1	Serie 2	Serie 3
Hypersil ODS Inertsil ODS 3 Nucleosil HD Inertsil ODS 2 Prodigy Hypersil BDS Luna 2 TSK Jupiter Hypercarb SMT OD Zorbax SB C ₁₈ Gromsil CP Repro-Sil ODS Pronto sil C18 Zorbax ODS	AQUA Zorbax Extend Nucleosil HD Purospher Star (Zorbax Bonus = Pronto sil ACE = Symmetry Shield)	SynergiPOLAR RP

Betrachtet man die k-Werte, so befinden sich im oberen Drittel eher hydrophobe Phasen, ähnlich wie bei k_{EB} . Neu sind hier folgende Phasen: Ultrasep ES, YMC AQ, Repro-Sil AQ, LiChrosorb, Resolve, Superspher, Nucleosil HD. Bis auf die letzte handelt es sich um Phasen, die auch eine gewisse Polarität aufweisen, hier

kommt der polare Charakter von Isobutylmethylketon im Vergleich zu Ethylbenzol zum Tragen.

Der polare Charakter macht sich auch bei der Selektivität bemerkbar. 11 von 16 Phasen befinden sich hier und bei der Trennung Ethylbenzol/Toluol im oberen Drittel. Hinzu sind die Phasen Nucleosil HD, Hypercarb, SMT, Gromsil CP, Zorbax ODS gekommen. Das sind hydrophobe Phasen, die eine gute Selektivität für die Trennung des „polaren“ Isobu/Isopro-Paares zeigen.

- MeOH/20 mM Phosphatpuffer pH=2,7
In den Tab. 5.5.4 bis 5.5.5 sind die chromatographischen Daten der Analyte beim Experiment „Ketone, Methanol, sauer“ enthalten. Die entsprechenden Retentions- und Trennfaktoren sind in den Abb. 5.5.4 bis 5.5.8 dargestellt.

k-Isobutylmethylketon

Serie 1	Serie 2	Serie 3
Nucleosil 50 Inertsil ODS 3 Zorbax ODS Purospher e SMT OD Resolve Ultrasep ES LiChrospher Luna e Gromsil CP Kromasil ProntoSil AQ YMC AQ Superspher Repro-Sil AQ Zorbax SB C ₁₈	Purospher Star Zorbax Extend Nucleosil HD LiChrosorb	SynergiMAX RP Kromasil

α -Wert

Serie 1	Serie 2	Serie 3
Resolve Zorbax ODS Superspher Purospher e Nucleosil 50 Zorbax SB C ₁₈ Spherisorb ODS 2 Nova Pak LiChrospher Ultrasep ES Zorbax SB C ₈ Nucleosil 100 Gromsil CP Hypersil ODS Gromsil AB LiChrosorb	AQUA Zorbax Extend Purospher Star XTerra MS	Kromasil SynergiMAX RP

Im sauren Milieu verhalten sich die Analyte hydrophober. Somit zeigen hydrophobe Phasen eine stärkere Affinität gegenüber Isobutylmethylketon (s. K_{Isobu} -Werte). Folgende Phasen rücken im Vergleich zum ungepufferten System „nach vorne“: Zorbax ODS, Gromsil CP, Kromasil, Prontosil AQ, Zorbax SB C₁₈. Umgekehrt sind offensichtlich auch hier für eine gute Selektivität polare Wechselwirkungen nötig. Nur 3 der 16 Phasen des ersten Drittels sind hydrophob. Die restlichen Phasen sind entweder nicht-endcapped, haben einen geringen Kohlenstoffgehalt oder es sind C₈-Phasen (Zorbax SB C₈).

In gepufferten Systemen wird im Gegensatz zu ungepufferten System häufig beobachtet, dass diejenigen Phasen, die eine starke Affinität zu bestimmten Analyten zeigen, auch für deren Trennung selektiv sind: Starke Wechselwirkungen und gute Selektivität gehen miteinander einher (s. Kap.6). So sind 9 von 16 Phasen sowohl im oberen k- als auch im oberen α -Drittel anzutreffen. Folgende hydrophobe Phasen wurden in der α -Reihe durch polare „ersetzt“.

Phase nur in der k-Reihe	Phasen nur in der α -Reihe
Inertsil ODS 3 SMT OD Luna 2 YMC AQ Prontosil AQ Repro-Sil AQ Kromasil	Spherisorb ODS 2 Nova Pak Zorbax SB C ₈ Nucleosil 100 Hypersil ODS Gromsil AB LiChrosorb

Die Bandbreite der Trennfaktoren fällt wie erwartet geringer aus als bei den ungepufferten Eluenten.

- MeOH/20 mM Phosphatpuffer pH=7,6
In den Tab. 5.5.6 bis 5.5.7 sind die chromatographische Daten der Analyte beim Experiment „Ketone, Methanol, alkalisch“ enthalten. Die entsprechenden Retentions- und Trennfaktoren sind in Abb. 5.5.9 bis 5.5.10 dargestellt.

Die Ergebnisse gleichen denen des sauren Puffers:

- Es befinden sich die gleichen Phasen hier wie dort im oberen Teil des Ranking; Und zwar sowohl für die k - wie auch die α -Werte.
- Die Phasen, die eine starke Wechselwirkung gegenüber Isobutylmethylketon zeigen, weisen gleichzeitig auch eine gute Selektivität auf.
- Einige hydrophobe Phasen fehlen im oberen Selektivitätsdrittel.

Phasen nur in der k -Reihe	Phasen nur in der α -Reihe
SMT OD Luna 2 Prontosil C ₁₈ Kromasil Gromsil CP Prodigy	Nucleosil 50 Nova Pak LiChrosorb Nucleosil 100 Bondapak Hypersil ODS

Sämtliche Trennungen wurden auch in Acetonitril-haltigen Eluenten gleicher Elutionskraft durchgeführt.

Die chromatographischen Daten der Experimente „Ketone, Acetonitril“, „Ketone, Acetonitril, sauer“ und „Ketone, Acetonitril, alkalisch“ befinden sich in den Tab. 5.5.8 bis 5.5.11. Die entsprechenden Retentions- und Trennfaktoren sind in den Abb. 5.5.11 bis 5.5.15 dargestellt.

Es ist auffallend, wie gering sich die Trennfaktoren im alkalischen Acetonitril/Phosphatpuffer unterscheiden, während bei den Retentionsfaktoren schon merkliche Unterschiede festzustellen sind. Bei mehreren Experimenten wurde übereinstimmend festgestellt, dass bei der Verwendung von Puffern die Phasen ihren individuellen Charakter bezüglich Selektivität verlieren, weil polare/ionische Wechselwirkungen unterdrückt werden – und solche sind bis auf sehr hydrophobe Analyte stets möglich und wichtig. Konkret bedeutet dies, die Unterschiede im polaren Charakter der Phasen treten in Anwesenheit von Puffern in den Hintergrund, damit werden die Phasen ähnlich.

Selektivität in sauren/alkalischen Puffer

Es ist eine bekannte Tatsache, dass der pH-Wert bei der Trennung von ionisierbaren Analyten der entscheidende Faktor ist. Es hat sich hier herausgestellt, dass der pH-Wert auch die Trennung von polaren, nicht ionisierbaren Analyten beeinflussen kann.

Der Grund liegt wahrscheinlich in der negativen Ladung von Silanolgruppen im Alkalischen. Es bestätigt sich immer wieder, dass gerade polare Wechselwirkungen in RP-Systemen eine wichtige Rolle spielen.

In Abb. 5.5.16 sind die Trennfaktoren für die Trennung Isobutylmethylketon / Isopropylmethylketon im alkalischen/sauren Acetonitrilpuffer wiedergeben.

Hier handelt es sich um Analyte, die sich in ihrer Polarität merklich unterscheiden.

Feststellung:

- Die Selektivität für Analyte, die relativ große Polaritätsunterschiede aufweisen, ist im Sauren in der Regel besser. Polare Analyte dagegen lassen sich in der Regel selektiver im Alkalischen trennen.
- Je hydrophober die Phase (z.B. Zorbax Extend, XTerra MS) um so ausgeprägter ist die Differenz der Selektivitäten zugunsten des sauren Puffers.
- Je polarer die Phase ist, um so geringer fällt die Differenz aus, siehe Nucleosil Nautilus, Platinum EPS.
- Bei dem sehr polaren HyPURITY Advance schließlich ist die Selektivität im Alkalischen besser.

5.6 Isomere Aromaten (4-, 3-, 2-Nitroaniline)

Auch hier wurde das Trennverhalten der Phasen bei sechs unterschiedlichen Eluenten untersucht:

- MeOH/H₂O
- MeOH/Puffer; pH=2,7
- MeOH/Puffer; pH=7,6
- ACN/H₂O, ACN/Puffer; pH=2,7
- ACN/Puffer; pH=7,6

1. MeOH/H₂O

In den Tab. 5.6.1 bis 5.6.3 sind die chromatographischen Daten der Analyte beim Experiment „Nitroaniline, Methanol“ enthalten. In den Abb. 5.6.1 bis 5.6.4a sind die entsprechenden Retentions- und Trennfaktoren abgebildet. Nachfolgend sind für die einzelnen Serien die Retentionsfaktoren k für 4- und 2-Nitroanilin sowie die Trennfaktoren α dargestellt:

k-4-Nitroanilin

Serie 1	Serie 2
Nucleosil 50 Superspher Select B Symmetry Shield Inertsil ODS 3 LiChrospher Select B TSK Luna LiChrospher Purospher Ultrasep ES Prodigy Nucleosil 100	Nucleosil Nautilus Pronto ACE Zorbax Bonus

k-2-Nitroanilin

Serie 1	Serie 2	Serie 3
Nucleosil 50 Inertsil ODS 3 Ultrasep ES Purospher e LiChrospher Luna 2 Prodigy Superspher Select B Kromasil TSK SMT OD Gromsil CP Inertsil ODS 2	Pronto ACE Symmetry Shield Nucleosil Nautilus Zorbax Bonus Purospher Star	SynergiMAX RP

1.1. Selektivitäten

α 3-/4-Nitroanilin

Serie 1	Serie 2	Serie 3
Nucleosil AB Zorbax ODS SMT OD Hypersil BDS Symmetry Nova Pak Jupiter Gromsil CP Kromasil Ultrasep ES Discovery C ₁₈ HyPURITY C ₁₈ Prodigy MP-Gel Inertsil ODS 2 Hypersil ODS	Zorbax Extend Chromolith Performance Nucleosil HD XTerra MS	SynergiMAX RP

α 2-/3-Nitroanilin

Serie 1	Serie 2	Serie 3
Purospher e Zorbax ODS Nucleosil 50 Resolve P Hypersil ODS Ultrasep ES LiChrospher Nova Pak Superspher Zorbax SB C ₁₈ Inertsil ODS 3 Spherisorb ODS 2 LiChrosorb MP-Gel Jupiter Prodigy	Zorbax Extend XTerra MS Purospher Star	SynergiMAX RP

Kommentar:

Das Kapazitäts- und Selektivitätsverhalten der Phasen wird hier gemeinsam diskutiert. Die Anordnung der Phasen nach $k_{2\text{Nan}}$ ähnelt stark der von k_{Tri} . Neu hinzugekommen sind hier Superspher Select B, LiChrospher Select B und TSK, drei als schwach polar zu bezeichnenden Phasen mit einem kleinen Porendurchmesser: TSK ist ein 80 Å-Material und die zwei Select B Phasen sind C_8 -Phasen, das Basismaterial ist ein 60 Å Kieselgel.

Dennoch haben wir es hier eher mit klassischen RP-Wechselwirkungen zu tun. Beim 2-Nitroanilin ist der -I-Effekt der NH_2 -benachbarten NO_2 -Gruppe gering, 2-Nitroanilin ist das am stärksten hydrophobe der drei Stellungsisomere. Die NO_2 -Gruppe bei 4-Nitroanilin übt einen starken Elektronenzug aus, die NH_2 -Gruppe wird positiviert, 4-Nitroanilin ist das polarste der drei Stellungsisomere. Dies wird in Abb. 5.6.3. und 5.6.4 sichtbar: Polare Phasen wie Platinum EPS, Zorbax SB C_8 , Spherisorb ODS 1, Superspher Select B, LiChrospher Select B zeigen gegenüber 4-Nitroanilin eine stärkere Affinität. Dadurch, dass nun 4-Nitroanilin verhältnismäßig „spät“ eluiert, beobachten wir eine geringe Selektivität dieser Phasen, s. α -Werte für die Trennung 3-/4-Nitroanilin in Abb. 5.6.3. und Chr. 6.2.4.: Die polare „embedded phase“ XTerra zeigt eine geringe Selektivität (oberes Chromatogramm), das klassisch belegte XTerra MS Material eine gute (unteres Chromatogramm). Dieser „Sprung“ in der Selektivität wird bei der Trennung der zwei „hydrophoben“ 3- und 2-Nitroanilin nicht beobachtet. Es ergibt sich eine stetige Abnahme der Selektivität. Diese Phänomene sind bei geschützten Phasen erwartungsgemäß noch ausgeprägter: Es wird ein „Knick“ der α -Kurve beim Übergang von den geschützten zu den klassischen Phasen beobachtet.

Halten wir fest:

Je polarer die Phase ist, umso stärker gestaltet sich deren Wechselwirkung mit 4-Nitroanilin. Das führt nun so weit, dass bei folgenden Phasen eine Elutionsumkehr bzw. eine Koelution festgestellt wird.

a) Übliche Elutionsreihenfolge: 4-, 3-, 2-Nitroanilin

Fluofix INW	}	3-, 4-, 2-Nitroanilin
Fluofix IEW		
Nucleosil Nautilus		
Nucleosil Protect 1		
HyPURITY Advance		
Zorbax Bonus		

b) Prontosil ACE	}	3- = 4-, 2-Nitroanilin
XTerra		
Discovery C_{16}		

c) Supelcosil ABZ plus 2-, 3-, 4-Nitroanilin

Fazit:

Für die Trennung der „polaren“ Isomere 3- und 4- sind apolare Phasen geeignet, für die Trennung von 2-/3-Nitroanilin auch manche polare Phase. Bei stärker polaren Phasen wird Elutionsumkehr beobachtet.

2. MeOH/ 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH=2,7

In den Tab. 5.6.4 bis 5.6.6 sind die chromatographischen Daten der Analyte beim Experiment „Nitroaniline, Methanol, sauer“ enthalten. In den Abb. 5.6.5 bis 5.6.8 sind die entsprechenden Retentions- und Trennfaktoren abgebildet.

k-2-Nitroanilin

Serie 1	Serie 2	Serie 3
Nucleosil 50 Inertsil ODS 3 Purospher e Luna 2 Gromsil CP TSK Prodigy Kromasil YMC AQ SMT OD Ultrasep ES Zorbax ODS LiChrospher Prontosil AQ Resolve	Prontosil ACE Symmetry Shield Purospher Star	SynergiMAX RP

 α 3-/4-Nitroanilin

Serie 1	Serie 2	Serie 3
Hypersil BDS SMT OD Nucleosil AB Zorbax ODS Jupiter Kromasil Ultrasep ES Nova Pak HyPURITY C ₁₈ Hypersil ODS Gromsil CP Discovery C ₁₈	Purospher Star Chromolith Performance Zorbax Extend XTerra MS	SynergiMAX RP

Kommentar:

Die Ergebnisse sind völlig analog dem ungepufferten System. Die „Sprünge“ wie im ungepufferten System beobachtet, fallen jedoch hier wesentlich moderater aus. Übliche Elutionsreihenfolge: 4, 3, 2; Elutionsumkehr bzw. Koelution wird an folgenden Phasen beobachtet:

a) Zorbax Bonus Nucleosil Protect 1 Discovery C ₁₆ HyPURITY Advance	}	3, 4, 2
---	---	---------

b) Nucleosil Nautilus Prontosil ACE Supelcosil ABZ PLUS Fluofix INW Fluofix IEW	}	3 = 4, 2
---	---	----------

3. MeOH/20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH=7,6,

In den Tab. 5.6.6 und 5.6.7 sind die chromatographischen Daten der Analyte beim Experiment „Nitroaniline, Methanol, alkalisch“ enthalten. In den Abb. 5.6.9 bis 5.6.12 sind die entsprechenden Retentions- und Trennfaktoren abgebildet.

k-2-Nitroanilin

Serie 1	Serie 2
Inertsil ODS 3 Nucleosil 50 Kromasil Purospher e Ultrasep ES Prodigy LiChrospher Luna 2 Gromsil CP Hypercarb SMT OD Superspher Select B Zorbax ODS YMC AQ Prontosil Repro-Sil	Prontosil ACE XTerra MS Symmetry Shield Nucleosil Nautilus

α 4-/3-Nitroanilin

Serie 1	Serie 2
Hypercarb SMT OD Nucleosil AB Hypersil BDS Zorbax ODS Symmetry C ₁₈ Jupiter Nova Pak Ultrasep ES Gromsil CP HyPURITY Kromasil Hypersil ODS Inertsil ODS 2 Discovery C ₁₈ Nucleosil HD	Nucleosil HD Zorbax Extend XTerra MS Chromolith Performance

Die Ergebnisse entsprechen denen des ungepufferten Systems. Der Selektivitätssprung (Selektivitätsabnahme) mit zunehmender Polarität der Phasen ist noch schwächer ausgeprägt. Im Alkalischen herrscht mit Bezug auf die Selektivität ein „homogener“ Zustand der Oberfläche. Die Unterschiede der Phasen tendieren gegen Null. Sonst recht unterschiedliche Phasen verhalten sich in alkalischen Puffer gleichartig – Ausnahmen stellen „ganz“ andere Phasentypen wie Hypercarb dar, das eine erstaunlich gute Selektivität zeigt. Man kann folgende Schlussfolgerung ziehen: Puffer haben den Vorteil, robuste Trennungen zu garantieren (konstanter pH-Wert), der „richtig“ eingestellte pH-Wert „sorgt“ für scharfe Peaks. Der Nachteil ist, dass die individuellen Unterschiede der Phasen, die sich im polaren Charakter widerspiegeln, durch den Einsatz von Puffern teilweise egalisiert werden – besonders mit Acetonitril als organischem Lösungsmittel. Chr. 6.2.6. zeigt die Trennung von Uracil als Marker und 4-, 3-, und 2-Nitroanilin in einem alkalischen Acetonitril/Puffer auf vier recht unterschiedlichen Säulen:

Säule	Material
Symmetry Shield:	C ₁₈ „embedded phase“ mit Carbamat als polare Gruppe
Zorbax Bonus:	C ₁₄ „embedded phase“ mit Amid als polare Gruppe und zwei Diisopropylgruppen als sterische Schutzgruppen
Xterra MS:	Hybridmatrix, klassische, hydrophobe C ₁₈ -Phase
Nucleosil HD:	Klassisches Kieselgel, klassische hydrophobe C ₁₈ -Phase, hohe Belegung

Die Chromatogramme sind sehr ähnlich.

Wird dagegen lediglich Methanol/Wasser als Eluent verwendet, so kann sich der unterschiedliche Charakter der Phasen „entfalten“. Betrachten wir die besprochene Trennung der Nitroaniline nun in Methanol/Wasser an den zwei „embedded phases“ Symmetry Shield und Zorbax Bonus (Chr.6.2.7. bzw. Chr. 6.2.5.), so ergibt sich nicht nur optisch ein anderes Bild, es wird sogar Elutionsumkehr beobachtet.

a.) Übliche Elutionsreihenfolge: 4, 3, 2

b.) Zorbax Bonus }
Nucleosil Protect B } 3, 4, 2
Hypersil Advance }

c.) Prontosil ACE }
Nucleosil Nautilus } 3 = 4, 2
Discovery Amid C₁₆ }

4. ACN/H₂O, ACN/20 mM Phosphatpuffer pH=2,7, ACN/20 mM Phosphatpuffer pH=7,6

Ein Teil der Phasen wurde analog den Eluentenverhältnissen mit MeOH auch mit ACN getestet.

In den Tab. 5.6.10 bis 5.6.17 sind die chromatographischen Daten der Analyte bei den Experimenten „Nitroaniline, Acetonitril, sauer, alkalisch“ enthalten. In den Abb. 5.6.13 bis 5.6.18 („sauer“) sowie 5.6.19 bis 5.6.20 („alkalisch“) sind die entsprechenden Retentions- und Trennfaktoren abgebildet.

5.7 Steroide (Doppelbindungs-, Positionsisomere)

Es wurden je zwei Steroide getrennt. Bei „Steroide 1“ (Steroid „A“ und „C“) handelt es sich um Doppelbindungsisomere. Es sind recht unpolare Verbindungen. Bei den meisten Phasen wurde noch ein dritter unbekannter Peak abgetrennt (Steroid „B“). Die Mischung „Steroide 2“ besteht aus zwei Positionsisomeren (α -, β -) mit einem aromatischen Ring („D“, „E“). Dies sind relativ polare Verbindungen.

Steroide 1

In den Tab. 5.7.1 bis 5.7.3 sind die chromatographischen Daten der Analyte beim Experiment „Steroide A,C“ enthalten. Abb. 5.7.1 bis 5.7.6 zeigen die entsprechenden Retentions- und Trennfaktoren.

k Steroid C

Serie 1	Serie 2	Serie 3
Nucleosil 50 Inertsil ODS 3 YMC AQ Repro-Sil AQ ProntoSil AQ Prodigy TSK Luna 2 ProntoSil C ₁₈ Repro-Sil ODS Kromasil Zorbax SB C ₁₈ Zorbax SB C ₈ Resolve Gromsil CP Nucleosil 100	Purospher Star ProntoSil ACE Symmetry Shield Nucleosil HD	SynergiPOLAR RP Kromasil SynergiMAX RP

α Steroid C/B

Serie 1
Hypersil ODS Resolve Jupiter Zorbax ODS Zorbax SB C ₈ Fluofix INW Zorbax SB C ₁₈ Spherisorb ODS 2 LiChrospher Fluofix IEW Superspher Platinum C ₁₈ Inertsil ODS 2 Nova-Pak Prodigy

α -Wert Steroid C/A

Serie 1	Serie 2	Serie 3
Hypersil ODS Resolve Zorbax ODS YMC Pro C ₁₈ Jupiter Hypersil BDS Prodigy Luna 2 Inertsil ODS 2 Spherisorb ODS 2 Inertsil ODS 3 Superspher TSK Nova-Pak Kromasil Symmetry	XTerra MS Nucleosil HD Purospher Star Chromolith Performance	Resolve Kromasil SynergiMAX RP

Für die Trennung Steroid C/A zeigen eine gute Selektivität in erster Linie Phasen, die über saure Silanolgruppen und über eine hohe Metallionenkonzentration verfügen: Hypersil ODS, Resolve, Zorbax ODS. In zweiter Linie eignen sich hydrophobe Phasen bzw. Phasen mit einem großen/kleinen Porendurchmesser (Jupiter/Novapak). Hier liegt offensichtlich ein multipler Mechanismus vor.

Die hier besprochene Anordnung der Phasen ist ähnlich der Anordnung bei der Trennung von 2-/3-Nitroanilin, zehn Phasen folgen in der gleichen Reihenfolge aufeinander.

Für die Abtrennung der unbekannt Komponente B vom Steroid C eignen sich im Prinzip die gleichen Säulen wie für die C/A-Trennung. Auffallend ist auch hier die Anhäufung von silanophilen Phasen in den vorderen Plätzen. In Chr. 5.7.1. wird die Trennung Steroid C/B an drei Phasen demonstriert. Die unbekannt Verunreinigung C wird an hydrophoben, gut abgedeckten Phasen nicht abgetrennt (zwei oberen Chromatogramme), eine basislinie-Trennung wird dagegen am silanophilen Resolve beobachtet. Für beide Trennungen ist für eine gute Selektivität neben der Silanophilie der Phasen offensichtlich ein sterischer Effekt wichtig. 6 (7) Phasen haben einen Porendurchmesser von 80 Å (90 Å), Jupiter (300 Å) gehört in beiden Fällen dazu. Bezüglich Effektivität der Trennung (s. Abb. 5.7.7 bis 5.7.9) wären folgende Phasen zu nennen: Resolve, Zorbax ODS, YMC Pro C₁₈, Hypersil ODS, Purospher Star, XTerra MS, Synergi MAX RP.

Steroide 2

In den Tab. 5.7.4 bis 5.7.6 sind die chromatographischen Daten der Analyte beim Experiment „Steroide D,E“ enthalten. Abb. 5.7.10 bis 5.7.13 zeigen die entsprechenden Retentions- und Trennfaktoren.

Nachfolgend werden die Werte k-Steroid E sowie die α -Steroid E/D-Werte des oberen Drittels gezeigt.

k-Steroid E

Serie 1	Serie 2	Serie 3
Inertsil ODS 3	Prontosil ACE	Kromasil
Nucleosil 100	Nucleosil Nautilus	SynergiMAX RP
Luna 2	Symmetry Shield	
Prontosil AQ	Zorbax Bonus	
Repro-Sil AQ		
YMC AQ		
Prodigy		
TSK		
Prontosil		
Kromasil		
Repro-Sil		
LiChrospher		
Gromsil CP		
YMC C ₁₈		
Ultrasep ES		

α Steroid E/D

Serie 1	Serie 2	Serie 3
Nucleosil AB Jupiter Symmetry Kromasil Gromsil CP HyPURITY C ₁₈ Luna 2 Discovery C ₁₈ Hypersil ODS Zorbax ODS Prodigy Inertsil ODS 2 Nucleosil HD YMC Pro C ₁₈ Hypersil BDS	Zorbax Extend Nucleosil HD Purospher Star Serie 2 (α E/D) Zorbax Extend XTerra MS Serie 2 (α D/E) Chromolith Performance Purospher Star HyPURITY Advance	Resolve Spherisorb ODS 2 SynergiMAX

12 Phasen im oberen Drittel der Serie 1 befinden sich auch bei der Trennung 3-/4-Nitroanilin in oberen Drittel, bei der Trennung eines Analytpaars also, das auch als „polar“ zu bezeichnen ist. Entsprechend dem bereits formulierten Postulat befinden sich im vorderen Drittel hydrophobe, gut abgeschirmte Phasen. Es findet eine Elutionsumkehr (E, D statt D, E) bei folgenden Phasen statt:

Koelution :	Elutionsumkehr :
Supelcosil ABZ PLUS Spherisorb ODS 1 Platinum EPS HyPURITY Advance Purospher Star Chromolith Performance	Symmetry Shield Prontosil ACE Zorbax Bonus Nucleosil Nautilus

Bei den ersten vier Phasen der linken Spalte ist der polare Charakter bekannt und nachvollziehbar. Etwas überraschend ist in diesem Zusammenhang das Erscheinen der zwei letzten Phasen. Wie bereits erwähnt, könnten aktive polare Gruppen, die sich an der Oberfläche befinden für den polaren Charakter verantwortlich sein.

Auffallend ist schließlich – bei mangelnder Selektivität – die starke Affinität der „embedded phases“ für diese Steroide. Das wird in Chr. 5.7.2. demonstriert: Das obere Chromatogramm zeigt die Trennung an der „embedded phase“ XTerra und das untere an XTerra MS, ein Material mit einer klassischen Belegung.

Bezüglich Effektivität der Trennung (s. Abb. 5.7.14 und 5.7.15) wären folgende Phasen zu nennen: Discovery C₁₈, Nucleosil AB, HyPURITY C₁₈, Jupiter, Purospher Star, Chromolith Performance, Synergi MAX RP, Zorbax Extend, XTerra MS.

Abschließende Bemerkung:

Für die Trennung von diversen isomeren Verbindungen beschert eine polare Gruppe der Phase offensichtlich eine gute Selektivität. Je nach übrigem Srukturaufbau des Analytmoleküls wird weiterhin eine starke oder eine schwächere Hydrophobie der Phase für eine ausreichende Retention benötigt.

5.8. Tricyclische Antidepressiva

In den Tab. 5.8.1 und 5.8.2 sind die chromatographischen Daten der Analyte beim Experiment „Antidepressiva“ enthalten. In den Abb. 5.8.1 bis 5.8.4 sind die entsprechenden Retentions- und Trennfaktoren (Trimipramin/Amitryptilyl) abgebildet, in Abb. 5.8.5 und 5.8.6 die Korellation zwischen Retentions- und Trennfaktoren.

Organische Basen, die - bedingt durch einen langen Alkylrest oder ihre Größe - einen ausgeprägten organischen Charakter aufweisen, können mit sauren Puffern (pH \approx ca. 3) leicht getrennt werden. Sie verhalten sich in diesem Fall weitgehend wie neutrale Analyte. Bis auf sehr polare Phasen, die niedrige Selektivitäten aufweisen, zeigen fast alle Phasen nahezu ausreichende, identische α -Werte. Phasen, die nachweislich über völlig unterschiedliche Eigenschaften verfügen, befinden sich im Ranking unmittelbar nebeneinander. So variieren die Retentionsfaktoren in einem Bereich von 2-10, während die meistenTrennfaktoren nur zwischen 1,14 und 1,20 schwanken (Abb. 5.8.3). Werden also Puffer verwendet, so verlieren die Phasen quasi ihren

individuellen Charakter bezüglich der Selektivität; Konkret bedeutet das, dass die Polaritätsunterschiede in Anwesenheit von Puffern in den Hintergrund treten – was nicht verhindert, dass die Retentionsfaktoren recht unterschiedlich ausfallen.

Anmerkung:

Es wird üblicherweise vereinfacht zwischen „gepufferten“ und „ungepufferten“ Eluenten unterschieden. Der entscheidende Faktor jedoch ist der pH-Wert des Eluenten, die Anwesenheit von Puffern gewähren „nur“ seine Konstanz. Der pH-Wert steuert die Ladung und die Dissoziation von polaren Gruppen an der Phasenoberfläche und am Substanzmolekül.

Nur bei sehr silanophilen Phasen liegen sogar im Sauren noch Silanolgruppen dissoziiert vor, so dass als Folge ein starkes Tailing bei Basen entsteht. In Chr. 4.3.5 ist die Verbesserung der Peakform von Antidepressiva vom sehr silanophilen Zorbax ODS über das endcappte, dennoch recht silanophile Spherisorb ODS 2 bis hin zu dem sehr gut abgedeckten Luna 2 augenscheinlich.

Fazit:

Ist die Selektivität ausreichend, dann sind saure Puffer und moderne, gut abgedeckte Phasen für die Trennung organischer Basen die erste Wahl. Im Alkalischen wird in der Regel eine bessere Selektivität bei häufig längeren Retentionszeit und geringeren Peaksymmetrie festgestellt.

Es versteht sich von selbst, dass „embedded phases“ mit ihrem polaren Charakter hier ungeeignet sind, s. Chr. 5.8.2. unten und Chr.6.2.1, links: XTerra ist nicht selektiv für die Trennung des schwierigen Paares Amitryptilin/Trimipramin. Eine gute Trennung wird dagegen mit XTerra MS, einer RP-Phase mit einer klassischen Belegung erhalten (Chr. 6.2.1, rechts bzw. Chr. 5.8.2. oben).

5. 9 Metabolite von tricyclischen Antidepressiva

In den Tab. 5.9.4 und 5.9.5 sind die chromatographischen Daten der Analyte beim Experiment „Metabolite“ enthalten. In den Abb. 5.9.1 bis 5.9.6 sind die entsprechenden Retentions- und Trennfaktoren (Desmethyltrimipramin/Nortriptylin) abgebildet. In den Abb. 5.9.7 und 5.9.12 sind die Retentions- und Trennfaktoren bei der Trennung Desipramin/Desmethylmaprotylin zu sehen.

Bei der Trennung von tricyclischen Antidepressiva und deren Metabolite beobachtet man folgendes:

- Die Metabolite verhalten sich analog zu den Antidepressiva, so z.B. die große Bandbreite bei den Retentions- und die entsprechend geringe bei den Trennfaktoren, s. Abb. 5.9.1.
- Hydrophobe Phasen sind selektiv für die Trennung der „hydrophoben“ Antidepressiva und weniger polaren Metaboliten, polare Phasen für die Trennung von polaren Metaboliten.
So zeigen z.B. Supelcosil ABZ PLUS, Platinum EPS, Spherisorb ODS1, Discovery Amid und Zorbax SB C₈ eine sehr gute Selektivität für das schwierig zu trennende, polare Metabolitenpaar Desipramin/Desmaprotylin. Die hydrophoben Antidepressiva dagegen werden ungenügend abgetrennt. Etwas vereinfacht könnte man wie folgt festhalten: Man nehme polare Phasen für polare Analyte

(vorderen Peaks) und apolare, hydrophobe Phasen für apolare Analyte (hinteren Peaks). Dies soll an drei Chromatogrammen demonstriert werden: Das polare Zorbax SB C₈ Material vermag in Chr. 6.2.8 die polaren Verunreinigungen direkt nach der Durchflusszeit und bei 4,9 min. gut abzutrennen, die Hauptpeaks jedoch nicht so gut. Bei hydrophoberem Prodigy sind die Verhältnisse genau umgekehrt. LiChrospher Select B trennt die Verunreinigungen bei 3,49 min. immerhin an (linkes Chromatogramm in Chr. 6.2.9), das hydrophobe Discovery C₁₈ dagegen zeigt eine sehr gute Selektivität für die „späteren“ Peaks (rechtes Chromatogramm). An einer polaren CN-Phase schließlich (Chr. 6.2.10) befindet sich „vorne“ genügend „Platz“ für polare Komponenten, bereits schwach hydrophobe Analyte werden allerdings nur angetrennt. Diese Regel für gepufferte Systeme gilt auch analog für schwache und mittelstarke Säuren, s. Kap. 5.10 bis 5.12.

Einige Chromatogramme sollen diese Befunde demonstrieren, s. Chr. 5.9.1 bis Chr. 5.9.3. Die bessere Selektivität zeigt stets die „polare“ Version von Phasen auf Basis gleichen Kieselgels: In Chr. 5.9.1 (oben) ist es Zorbax SB C₈ gegenüber Zorbax SB C₁₈ (unten). In Chr. 5.9.2 ist das nicht so „gut“ abgedeckte Inertsil ODS 2 (unten) gegenüber dem moderneren Material Inertsil ODS 3 (oben). In Chr. 5.9.3 schließlich zeigt das nicht-endcappte Spherisorb ODS 1 gegenüber dem endcappten Spherisorb ODS 2 die bessere Selektivität. Ein weiterer Grund für eine gute Selektivität, scheint ein größerer Porendurchmesser zu sein, s. Chr. 5.9.4 und 5.9.5: Jupiter, rechtes Chromatogramm in Chr. 5.9.4 und oben rechts in Chr. 5.9.5 sowie HyPURITY C₁₈ (Chr.5.9.5 oben links) und Discovery C₁₈ (Chr.5.9.5 unten links) zeigen gute bis sehr gute Selektivitäten. Purospher, ein Material mit einer „gewissen“ Polarität aber einem Durchmesser von „nur“ 125, zeigt eine mittlere Selektivität, s. Chr. 5.9.6.

In Abb. 5.8.7 und Abb. 5.8.8 sind die Trennfaktoren Clomipramin/Desmethyldoxepin, dem „hydrophobesten“ Antidepressivum und dem polarsten Metaboliten aufgetragen. Ein großer Trennfaktor ist ein Maß für die Fähigkeit einer Phase Analyte unterschiedlicher Polarität, z.B. Wirkstoffe und deren Metabolite, zu trennen. Als selektiv erweisen sich hier hydrophobe Phasen, viele davon weisen allerdings aus unterschiedlichen Gründen auch einen polaren Charakter auf.

5.10 Schwache und starke aromatische Basen (Pyridin, Anilin, Benzylamin)

Das Verhalten der Phasen gegenüber Basen bei unterschiedlichen Bedingungen wurde ausführlich in Kap. 4.3.1 besprochen. Hier sei ein kurzes Resümee gezogen:

- Die beste Selektivität wird in ungepufferten Methanol/Wasser-, die beste Peaksymmetrie in Acetonitril/Puffer-Eluenten beobachtet.
- Auch in ungepufferten Eluenten wird an modernen Phasen („reines“ Kieselgel, gute Abdeckung der Oberfläche) eine hervorragende Peakform von Benzylamin und Propranolol festgestellt.
- Wird man sich wegen der Robustheit und der besseren Peaksymmetrie für einen Puffer und wegen der besseren Selektivität für den alkalischen Bereich entscheiden so scheint Acetonitril eher als Methanol geeignet zu sein. Die nicht-endcappten Phasen zeigen hier trotz Puffer zwar eine bessere Peakform im Vergleich zu den ungepufferten Eluenten - aber keine befriedigende. Eine solche

wird bei hydrophoben, gut abgedeckten Phasen, sowie „embedded phases“ beobachtet. An solchen Phasen („uniformierte“ Oberfläche) sehen die Chromatogramme recht ähnlich aus.

- Im sauren Bereich sind nur einige polare Phasen mit Methanol als organischem Lösungsmittel in der Lage, Basen zu trennen, in Acetonitril eluieren sie inert oder sogar ausgeschlossen.

Für die Praxis könnte folgendes Procedere vorteilhaft sein: Man trennt wie üblich mit Acetonitril/Phosphatpuffer oder/und Ionenpaar-Reagenzien basische Komponenten ab. Bei wichtigen (kritischen) Peaks kann fraktioniert werden und anschließend die Peakhomogenität mit Methanol/Wasser an einer polaren Phase überprüft werden. Für diese Zielsetzung wäre die (vermutlich schlechte) Peakform zweitrangig, die Sicherheit der Aussage allerdings steigt

5.11 Schwache, aromatische Säuren (Benzoe- und Hydroxybenzoesäuren)

In den Tab. 5.10.1 bis 5.10.3 sind die chromatographischen Daten der Analyte beim Experiment „Benzoesäuren, Methanol“ enthalten. In den Abb. 5.10.1 bis 5.10.6 sind die entsprechenden Retentions- und Trennfaktoren abgebildet. In den Tab. 5.10.4 bis 5.10.6 sind die chromatographischen Daten der Analyte beim Experiment „Benzoesäuren, Acetonitril“ enthalten, in den Abb. 5.10.7 bis 5.10.12 sind die entsprechenden Retentions- und Trennfaktoren abgebildet.

Die Trennung ionisierbarer Komponenten hängt stark von ihrem Dissoziationszustand ab. Der wiederum ist von dem pK_s/ pK_b -Wert der Säure/der Base und von dem aktuellen (!) pH-Wert des Eluenten abhängig. Darüber hinaus spielt die „Polarität“ der Substanz eine Rolle. Einen Hinweis liefert der LogP-Wert, wobei anzumerken ist, dass zum einen Stickstoff-haltige Komponenten einen auffallend kleinen LogP-Wert im Vergleich zu ähnlichen Strukturen ohne Stickstoff aufweisen, und zum anderen die „Polarität“ der Substanz von der Solvatisierung, d.h. letzten Endes vom Eluenten mitbestimmt wird.

Die Verhältnisse sind also recht komplex.

Entsprechend einem Vorschlag von Dr. Werner Krapp stellt der Ionisierungsgrad einer Säure/einer Base bei einem bestimmten pH-Wert eher als der pK_a - bzw. der LogP-Wert ein Maß für die „Stärke“/„Schwäche“ einer Säure/einer Base dar. Dieser kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$\% = 100 / (1 + 10 e^{pK - pH}).$$

Während die pK_a -Werte der hier verwendeten Säuren sich kaum unterscheiden, ergeben sich merkliche Unterschiede im Ionisierungsgrad:

Benzoessäure	: 3,1 %
4-Hydroxybenzoesäure	: 1,3%
3-Hydroxybenzoesäure	: 4%
Homovanilinsäure	: 2%
Isohomovanilinsäure	: 2,1%
Terephthalsäure	: 14%
Phthalsäure	: 36%

Bei den „schwächeren“ Säuren bleibt die Dissoziation, trotz saurem Puffer, deutlich unter 10%.

Die erste (einfache) Frage lautet also: „Liegt die Dissoziation meiner Säuren über oder unter 10%“? Bei Werten unter 10% verhalten sich die Säuren eher wie neutrale, organische Komponenten, es herrschen klassische RP-Verhältnisse vor. Die besten Selektivitäten zeigen hydrophobe, klassische RP-Phasen, s. Chr. 5.10.1: An Discovery C₁₆ Amid wird eine unzureichende Selektivität beobachtet (oberes Chromatogramm), an Discovery C₁₈ dagegen einer hervorragende (unteres Chromatogramm). Im für solche Trennungen üblichen sauren Puffer rücken die polare Unterschiede der Phasen in den Hintergrund (siehe oben) und deren Hydrophobie in den Vordergrund. Das ist hier der Fall, Benzoe- sowie 4-hydroxy- und 3-hydroxybenzoesäure liegen bei pH=2,7 weitgehendst undissoziiert vor. Umgekehrt heißt es, dass polare/“embedded phases“ hier nicht besonders selektiv sind. Es braucht nur kurz wiederholt zu werden, dass wie sonst häufig, auch hier Methanol gegenüber Acetonitril eine bessere Selektivität bei längerer Retentionszeit und geringeren Effizienz zeigt.

5.12 Mittelstarke aromatische Säuren (Phthal-, Terephthalsäure)

In den Tab. 5.11.1 und 5.11.2. sind die chromatographischen Daten der Analyte beim Experiment „Phthal-/Terephthalsäure, Methanol“ enthalten. In den Abb. 5.11.1 bis 5.11.4 sind die entsprechenden Retentions- und Trennfaktoren abgebildet. In den Tab. 5.11.3 bis 5.11.5 sind die chromatographischen Daten der Analyte beim Experiment „Phthal-/Terephthalsäure, Acetonitril“ enthalten, in den Abb. 5.11.5 bis 5.11.10 sind die entsprechenden Retentions- und Trennfaktoren abgebildet.

Die Ergebnisse sind vergleichbar mit denen der Hydroxybenzoesäuren – nur entgegengesetzt: Discovery C₁₆ Amid zeigt eine hervorragende Selektivität (oberes Chromatogramm in Chr. 5.11.1.), Discovery C₁₈ eine gerade ausreichende (unteres Chromatogramm in Chr. 5.11.1.).

Beide Säuren liegen hier mit ihren pK_S-Werten von 2,95 und 3,49 weitgehend dissoziiert vor. Wie erwartet, zeigen polare Phasen eine gute, hydrophobe dagegen eine mittlere bis dürftige Selektivität, s. auch abschließende Kommentare zur Trennung von sauren Komponenten am Ende des Kap. 5.12.

5.13 Schwache und mittelstarke aromatische Säuren („diverse“ Säuren)

In den Tab. 5.12.1 bis 5.12.3. sind die chromatographischen Daten der Analyte beim Experiment „diverse aromatische Säuren, Methanol“ enthalten. In den Abb. 5.12.1 bis 5.12.9 sind die entsprechenden Retentions- und Trennfaktoren abgebildet. In den Tab. 5.12.4 bis 5.12.6 sind die chromatographischen Daten der Analyte beim Experiment „diverse aromatische Säuren, Acetonitril“ enthalten, in den Abb. 5.12.10 bis 5.12.14 sind die entsprechenden Retentions- und Trennfaktoren abgebildet.

Die drei Säuren IVS, HIES, und HVS werden problemlos an nahezu allen Säulen getrennt. Schwierigkeiten bereitet die Trennung von DOPAC und HIES, sie gelingt nur an polaren Phasen. „Polar“ heißt im hiesigen Zusammenhang tatsächlich eine hohe

Polarität der Phase, hervorgerufen durch polare Gruppen an der Oberfläche (z.B. SupelcosilABZ PLUS), oder an der Alkylborste („embedded phases“) durch eine kurze Alkylkette (z.B. Zorbax SB C₈), oder durch eine hohe Gesamtsilanolkonzentration. Die zwar stark aciden aber „wenigen“ Silanolgruppen bei Hypersil ODS und Zorbax ODS reichen nicht aus. Wie erwartet, ist die Selektivität in Acetonitril geringer als in Methanol.

Zusammenfassende Kommentare und Beispiele zu der Trennung von sauren Komponenten.

- Abb. 6.2.28 gibt die Trennfaktoren für die Trennung einmal der starken Säuren Terephthal-Phthalsäure und einmal der schwachen Säuren 3-hydroxy/4-hydroxybenzoesäure im sauren (pH = 2,7) Methanol/Phosphatpuffer wieder. Wie zu erwarten, zeigen polare Phasen eine gute Selektivität für die Trennung des dissoziiert vorliegenden Analytpaares "Terephthal-/Phthalsäure". Für die Trennung dagegen von 3-hydroxy/4-hydroxybenzoesäure, Substanzen, die bei pH = 2,7 undissoziiert (also als neutrale Moleküle) vorliegen, eignen sich eher apolare Phasen.
- Abb. 6.1.36 zeigt die Trennfaktoren für die Trennung des Analytpaares HVS /HIES, im sauren Methanol- bzw. Acetonitril/Phosphatpuffer.
 - a. Methanol ist für die Trennung von sauren Komponenten generell geeigneter als Acetonitril.
 - b. Je hydrophober die Phase, um so gravierender fällt diese Differenz aus vgl. dazu z.B. die hydrophoben Phasen Zorbax Extend, XTerra MS und Chromolith mit den polaren "embedded phases" Symmetry Shield, Zorbax Bonus und Nucleosil Nautilus.
- Die Eignung der Säule abhängig vom Säulen- und Analyttyp wird in Chr. 5.12.1 demonstriert.

Je hydrophober die Phase, um so selektiver ist sie für Säuren, die recht spät eluieren. Säuren ähnlicher Polarität dagegen vermag eine solche Säule nicht zu trennen. So zeigt Synergi MAX RP, eine der am stärksten hydrophoben RP-Phasen auf dem Markt, eine sehr gute Selektivität für das Analytpaar HVS/HIES. Auch kleine organische Verunreinigungen werden hervorragend abgetrennt (rechtes Chromatogramm). DOPAC dagegen koeluiert mit HIES. Auch das recht hydrophobe Zorbax Extend mit seiner Brückenbindung ist für DOPAC/HIES nicht selektiv, auch die organischen Verunreinigungen werden hier kaum abgetrennt (zweites Chromatogramm von rechts). Bei AQUA mit einem hydrophilen Endcapping hat man die "Ahnung" einer Trennung (zweites Chromatogramm von links). Das polare Symmetry Shield ("embedded phase") ermöglicht eine sehr gute Abtrennung von DOPAC bei einer akzeptablen Selektivität für HVS/HIES (linkes Chromatogramm). Ein analoges Beispiel wird in Chr. 5.12.2 gezeigt: Discovery C₁₆ Amid trennt „vorne“ sehr gut, Discovery C₁₈ dagegen „hinten“. Beim stark polaren Platinum EPS kommen die Peaks so früh, dass eine Trennung unmöglich ist. Das wenig belegte Inertsil ODS 3 zeigt eine gewisse Selektivität für die Trennung DOPAC/HIES, das höher belegte Inertsil ODS 2 überhaupt keine, s. Chr. 5.12.3.

6. Zusammenfassung der Ergebnisse

6.1 Zur Ähnlichkeit der Phasen

Zuordnungskriterien und deren Gewichtung

Als Kriterien für die Ähnlichkeit von Phasen eignen sich ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften sowie ihr chromatographisches Verhalten. Letzteres ist zweifelsohne das aussagekräftigere. Von den physikalisch-chemischen Daten sind die spezifische Oberfläche, der Porendurchmesser und der Kohlenstoffgehalt (genauer: der Bedeckungsgrad) die wichtigsten. Obschon auch die Packungsdichte und das Porenvolumen für einen differenzierten Vergleich unerlässlich sind – da daraus beispielsweise die absolute „Menge“ an stationärer Phase in einer Säule errechnet werden kann, von der wiederum die Retentionszeit abhängt – kann folgendes festgehalten werden: Weisen zwei Phasen vergleichbare Zahlenwerte für spezifische Oberfläche, Porendurchmesser und Bedeckungsgrad auf und gehören sie darüber hinaus zum gleichen Typus (z.B. endcapped / nicht endcapped, Metallionen-kontaminiert/Metallionen-arm), so kann man erwarten, dass sie recht ähnliche Eigenschaften aufweisen.

Die wichtigsten chromatographischen Kenngrößen, die das chromatographische Verhalten und damit die Ähnlichkeit von Phasen wiedergeben, sind der Retentions- und der Trennfaktor, wobei letzterer aus Anwendersicht der interessantere sein dürfte, siehe auch weiter unten. Für einen genauen Vergleich der Säulen bezüglich ihres Verhaltens gegenüber bestimmten Analyttypen und Eluenten wird auf die Ausführungen im Kap.5 verwiesen.

Über die Aussagekraft von Retentions- und Selektivitätsfaktoren

Die Hydrophobie einer Phase ist für die Retention von Analyten verantwortlich. Was die Selektivität jedoch betrifft, spielen hydrophobe Wechselwirkungen in der RP-Chromatographie in der Regel eine weitaus geringere Rolle. Bezüglich Selektivität sind ionische/polare Wechselwirkungen und sterische Aspekte die dominanteren Faktoren. Das ist auch der Grund warum eine Korrelation zwischen Retentions- und Selektivitätsfaktoren eher selten beobachtet wird, siehe weiter unten. Das kann allenfalls bei einheitlichem RP-Mechanismus erwartet werden, was jedoch selten vorkommt. Die zu analysierenden Moleküle verfügen meistens über Gruppierungen, die zu ionischen/polaren Wechselwirkungen befähigt sind. Sogar bei hydrophoben Aromaten haben wir mit induzierten Dipolen zu tun, durch Mesomerie kann sich desweiteren die Polarität erhöhen.

Auch unterscheiden sich sonst „ähnliche“ Moleküle in ihrer räumlichen Ausdehnung, deren sterische Eigenschaften beeinflussen ihr Diffusionsverhalten an der Phasenoberfläche. Als Beispiel kann man die Polarisierbarkeit von Molekülen aufgrund von Doppelbindungen oder die Starrheit bzw. Flexibilität in Abhängigkeit von der Lage der Substituenten am aromatischen Ring nennen.

Halten wir fest:

In einem RP-System sind hydrophobe Wechselwirkungen für die Retention zuständig – bei ionischen Analyten auch Ionenaustausch, sofern ein solcher möglich ist. Für die Selektivität dagegen sind polare/ionische Wechselwirkungen entscheidend. Das sind in erster Linie Ionenaustausch sowie Wasserstoffbrückenbindungen und Dipol-Dipol Wechselwirkungen. Weiterhin können auch sterische Aspekte eine wichtige Rolle spielen. Diese Feststellung wurde kurz vor Fertigstellung des vorliegenden Textes von Lloyd Snyder in einer persönlichen Mitteilung gegenüber dem Autor als konform mit seinen eigenen jüngsten Arbeiten bestätigt, einige Publikationen seien in Vorbereitung. Das heißt konkret, dass für das Studium der Selektivität eines RP-Systems neben den (unwichtigen!) RP-Wechselwirkungen folgende Merkmale einer Phase zu berücksichtigen sind:

- Wechselwirkung mit Silanol- und weiteren polaren Gruppen an der Oberfläche, Ionenaustauschkapazität im Sauren/Alkalischen, Wasserstoffbrückenbildung im protischen / aprotischen Lösungsmittel, $\pi\cdots\pi$ -Wechselwirkungen usw.
- Sterische Charakteristik, d.h. Differenzierung über die Diffusionsfähigkeit bestimmter Analyte bis an die funktionellen Gruppen der Oberfläche.

Der Hauptgrund für die Vielfalt der kommerziellen RP-Säulen liegt somit in ihrem unterschiedlichen polaren Charakter. Das bedeutet: In dem Maße, wie polare Wechselwirkungen möglich sind und in dem Maße, wie jene durch die Wahl des Eluenten ermöglicht werden, können vorhandene Unterschiede der Phasen zum Tragen kommen. Mit anderen Worten bedeutet das folgendes: Große Differenzen in den Selektivitäten werden bei großen Differenzen im ionischen Charakter der zu trennenden Komponenten festgestellt. Die Trennungen gestalten sich einfach, z.B. Trennung einer starken von einer schwachen Säure/Base. Analoges gilt für die Phasen: Eine Phase mit protonierten/polaren Gruppen auf der Oberfläche (z.B. Supelcosil ABZ PLUS, Platinum EPS) hat diametral andere Eigenschaften als eine gut abgedeckte, hydrophobe Phase (z.B. Luna 2, Gromsil CP). An zweiter Stelle gilt dies für die Unterschiede in ihren sterischen Eigenschaften. Folglich sollte man nicht – obwohl weit verbreitet und von manchen Herstellern übernommen – die Phasen wie folgt nach der(!) Hydrophobie/Silanophilie klassifizieren: Es werden x/y – Diagramme aufgestellt, bei denen z.B. auf der y-Achse als Maß für die Hydrophobie der k-Wert einer neutralen Komponente und auf der x-Achse der Asymmetriefaktor einer Base aufgetragen werden. D.h., die Phasen werden mit Hilfe von Größen verglichen, die unterschiedliche Merkmale einer Phase charakterisieren, nämlich der Asymmetriefaktor die Kinetik, der Retentionsfaktor die Thermodynamik. Eine derartige Klassifizierung von Phasen kann bestenfalls eine recht grobe sein („silanophil“ vs. „hydrophob“). Die Nicht-Differenzierung zwischen aciden und „milden“ Silanolgruppen, die Nicht-Berücksichtigung von (fast immer herrschenden) Mischmechanismen und die Verwendung von „harmlosen“ Basen führen zu fragwürdigen „Ähnlichkeiten“ unter den Phasen. Einige, nach diesen simplifizierten Kriterien als silanophil eingestufte Phasen finden sich in unmittelbarer Nähe einer ziemlich hydrophoben Phase wieder. Nach Auffassung des Autors bedarf es differenzierter Tests, sollen sie zu möglichst allgemeingültigen Aussagen führen.

6.1.1 Ähnlichkeit über die Hydrophobie/hydrophobe Selektivität

Unter „Hydrophobie“ wird der hydrophobe Charakter einer Phase verstanden, der lediglich die Affinität gegenüber hydrophoben Analyten zum Ausdruck bringt. Aussagen zur Ähnlichkeit der Phasen anhand ihrer – aussagekräftigeren! – hydrophoben Selektivität werden weiter unten gemacht. Unter Berücksichtigung der Retentionsfaktoren gegenüber den hydrophoben Analyten Toluol, Perylen und Isobutylmethylketon, der hydrophoben Selektivität (s. auch Kap. 4.4), sowie des Bedeckungsgrades können zwei Säulengruppen „die 15 stärker hydrophoben (erweitert: 20)“/bzw. „die 15 stärker polaren (erweitert: 20)“ definiert werden, s. Tab. 6.2.2. Die übrigen Phasen nehmen eine Mittelstellung ein.

Es soll hier auch aus einem weiteren Blickwinkel die Hydrophobie/hydrophobe Selektivität beleuchtet werden: Anhand der Werte aus Tab. 6.2.1 wird der Einfluss der Belegung auf das Trennverhalten verschiedener Phasen gezeigt, die auf Basis gleichen Kieselgels hergestellt wurden. In Tab. 6.2.1 sind die Retentions- und Trennfaktoren von mehreren Analyten aufgeführt. Bei den Phasen handelt es sich stets um eine hydrophobe und um eine polare Version:

Lange/kurze Alkylkette	Zorbax SB C ₁₈ /Zorbax SB C ₈
Endcapped/nicht-endcapped	Spherisorb ODS 2/Spherisorb ODS 1
Klassisches Endcapping/hydrophiles Endcapping	Reprosil Pur/Reprosil AQ
Klassische Belegung/„embedded phases“	XTerra MS/XTerra, Zorbax Extend/Zorbax Bonus
Klassische Belegung/„embedded phase“ plus kürzere Alkylkette	Discovery C ₁₈ /Discovery Amid C ₁₆

Ergebnisse:

- Retentionsfaktor

Bei einer „reinen“ RP-Trennung wie z.B. bei Ethylbenzol/Toluol ergibt sich an der hydrophoben Phase stets der größere Retentionsfaktor. Bei Zorbax SB C₁₈/Zorbax SB C₈ beträgt der Faktor ca. 2; bei Reprosil Pur/Reprosil AQ ist er nur unwesentlich größer. Die Differenz wird kleiner, wenn weitere Mechanismen relevant werden, s. z.B. bei Steroid C. Bei Steroid E schließlich zeigen die polaren Phasen – mit den „embedded phases“ an der Spitze – die größten Werten bei den Retentionsfaktoren.

Je größer das Verhältnis der Retentionsfaktoren „apolare Phase“ zu „polare Phase“ ist, um so eher kann man von „reinen“ RP-Wechselwirkungen sprechen. Ein kleiner Quotient zeugt von zusätzlichen, sekundären Wechselwirkungen.

- Trennfaktor

Bei „reinen“ RP-Wechselwirkungen (z.B. Unterscheidung nur in einer zusätzlichen CH₂-Gruppe) ist die stationäre Phase fast ohne Bedeutung: Die Säulenauswahl ist zweitrangig. Deswegen beobachtet man auch zwischen Zorbax Bonus und Zorbax Extend, zwei völlig unterschiedlichen Phasen, nur eine kleine Differenz bei den Trennfaktoren. Sobald die Analyte über polare Gruppierungen verfügen – wie z.B. bei den Hydroxybenzoaten – wird eine Differenzierung zwischen den Phasen eher möglich, die Trennfaktoren zeigen eine größere Bandbreite. Bei Triphenylen/o-

Terphenyl (zusätzlicher sterischer Effekt) ist die Bandbreite noch größer. Wenn die polare Phase ihre Fähigkeit zu polaren Wechselwirkungen „ausspielen“ kann wird stets eine bessere Selektivität beobachtet. Liegt der Unterschied lediglich in einer kürzeren Alkylkette wie z.B. bei Zorbax SB C₈, dann zeigen sich keine ausgeprägten positiven Einflüsse. Sind polare Wechselwirkungen für einen großen Retentionsfaktor verantwortlich, wie z.B. bei Seroid E an den polaren Phasen, erweisen sich umgekehrt hydrophobe Phasen als selektiver.

Für die Trennung von neutralen Molekülen in ungepufferten Eluenten ergeben sich folgende Gesetzmäßigkeiten, die selbstverständlich durch weitere Experimente zu verifizieren sind:

Charakter Analyt/Phase	Konsequenz
Apolar/polar	Ist der Retentionsfaktor an einer apolaren Phase groß, so verwendet man sinnvollerweise eine polare Phase für eine bessere Selektivität (z.B. bei Tri/o-Ter). Oder aber man erzielt bei gleicher Selektivität eine schnelle Trennung (z.B. bei EB/T).
Polar/apolar	Ist der Retentionsfaktor an einer polaren Phase groß, so verwendet man am besten eine apolare Phase für eine bessere Selektivität und eine schnelle Trennung (z.B. bei SteroidD/E).
Polar/apolar	Ist der Retentionsfaktor an einer apolaren Phase klein ist, so verwendet man weiterhin die apolare Phase (z.B. bei den Hydroxybenzoaten).
Polar/apolar	Ist der Retentionsfaktor an einer polaren Phase klein ist, so sollte man zu einer apolaren Phase wechseln (z.B. bei den Hydroxybenzoaten).

6.1.2 Ähnlichkeit über die Silanophilie

In Kap. 4 wurde dargelegt, dass es für eine differenzierte Betrachtung nicht ausreichend ist, von der Silanophilie zu sprechen. Dazu ein Beispiel: Zorbax ODS verfügt über sehr acide Silanolgruppen. Im Zusammenhang mit der Anwesenheit von Metallionen am Kieselgel liegen solche Silanolgruppen sogar in einem sauren Milieu dissoziiert vor. Ergebnis ist ein starkes Tailing von Basen. Auf der anderen Seite weist Zorbax ODS durch den relativ hohen Bedeckungsgrad gleichzeitig einen recht ausgeprägten hydrophoben Charakter auf. Dies wird in mehreren Experimenten klar ersichtlich. Es erscheint daher sinnvoll, mindestens folgende Unterscheidung zu machen, wenn es um eine Zuordnung von Phasen nach dem Kriterium „Silanophilie“ geht:

1. Hohe Konzentration an aciden Silanolgruppen; das sind solche, die sogar im Sauren dissoziiert vorliegen und mit protoniert vorliegenden Basen wechselwirken können

2. Hohe Gesamtkonzentration an Silanolgruppen und entgegengesetzt dazu:
3. „Gute“ Abschirmung der Oberfläche, d.h. geringe Gesamtsilanolgruppenaktivität.

6.1.3 Ähnlichkeit über Selektivitäten

Nach Auffassung des Autors ist dieses Kriterium möglicherweise das aussagekräftigste, obschon mit der Einschränkung, dass die Aussagen streng genommen nur für die betrachteten Analyte und die konkreten Trennbedingungen gelten.

- **Selektivitätsplots I**

Die Plots dienen in erster Linie dazu, ähnliche Phasen ausfindig zu machen und zwar über deren Selektivität gegenüber bestimmter Analyten bei definierten Bedingungen. Dazu werden die Trennfaktoren bei der Trennung unterschiedlicher Analyte gegeneinander aufgetragen. Phasen, die bei diesen Auftragungen in unmittelbarer Nähe zueinander stehen, sind bezüglich deren Selektivität für die betrachteten Analyttypen ähnlich. Nachfolgend werden einige „Ähnlichkeitscluster“ vorgestellt, wobei die Wahl auf bewusst „aussagekräftige“ Analyttypen gefallen ist. Je unterschiedlicher die Analytpaare sind, um so treffsicherer sollte die Ähnlichkeit der Phasen erkannt werden. Dieser und nachfolgenden Visualisierungsarten können viele Informationen entnommen werden. Zu jeder Grafik werden einige Kommentar/Hinweise gegeben.

Neutrale Moleküle, ungepufferte Eluenten

Abb. 6.1.3 und 6.1.4

y-Achse: Selektivität für einen hydrophoben/polaren Analyten, Selektivität für Analyte, die sich in ihrem polaren Charakter unterscheiden (Ethylbenzol/Fluorenon).

x-Achse: Selektivität für einen polaren/hydrophoben Analyten (Phenol/Toluol).

Die Säulen können grob drei Cluster zugeordnet werden:

- A: hydrophobe Phasen
Bei diesen Phasen dominiert der hydrophobe Charakter. Dieser kommt z.B. durch eine starke Belegung, eine Metallionen-arme Kieselgelmatrix oder eine Polymerschicht zustande.
- B: hydrophobe Phasen mit ausgeprägtem polaren Charakter (mittelpolare Phasen)
Der beobachtete polare Charakter dieser Phasen ergibt sich z.B. durch eine geringe Belegung, durch freie Silanolgruppen oder durch weitere polare Gruppierungen an der Oberfläche.
- C: polare Phasen
Der für diese Phasen charakteristisch stark polare Charakter rührt z.B. von kurzen Alkylketten, von polaren Gruppen an der Oberfläche oder von einer eingebauten polaren Gruppe in der Alkylkette her.

Abb. 6.1.5 und 6.1.6

y-Achse: Selektivität für einen hydrophoben/polaren Analyten, Selektivität für Analyte, die sich in ihrem polaren Charakter unterscheiden (Ethylbenzol/Fluorenon).

x-Achse: Selektivität für unsubstituierte Aromaten, Differenz in der Aromatizität (Perylen/Chrysen).

Ein großer α -Wert auf der x-Achse von Abb. 6.1.5 und 6.1.6 weist auf eine polare Phase, ein großer α -Wert auf der y-Achse auf eine apolare Phase hin. Hochbelegte Phasen mit einem zusätzlichen polaren Charakter wie MP-Gel, Purospher, Purospher Star, Superspher, Lichrospher, und teilweise Nucleosil 50 und Ultrasep ES erweisen sich in beiden Fällen als selektiv.

Neutrale Moleküle / ionische Moleküle, ungepufferte / gepufferte Eluenten

Abb. 6.1.7 und 6.1.8

y-Achse: Selektivität für planare / nicht planare Aromaten („shape selectivity“, sterische Selektivität, Triphenylen/o-Terphenyl)

x-Achse: Selektivität für mittelstarke, dissoziiert vorliegende, aromatische, isomere Säuren (Terephthal-/Phthalsäure).

Für beide Trennprobleme zeigen generell polare Phasen und Phasen mit einer Polymerschicht eine gute Selektivität.

Während jedoch Nucleosil AB, SMT OD – Phasen mit einer Polymerschicht – und Ultrasep ES, eine relativ hoch belegte Phase „aromatischen“ Typs, eine ausgezeichnete sterische Selektivität zeigen, ist deren Selektivität für dissoziiert liegenden Säuren eher gering. Die C₈-Phasen, LiChrospher - und Superspher Select B, sind für die Trennung von derartigen Säuren dagegen selektiv, deren sterische Selektivität ist jedoch gering. Einen guten Kompromiß stellen die zwei stark silanophilen Phasen Platinum EPS und Spherisorb ODS1, sowie die mit einer Polysiloxanschicht versehene Phase Gromsil CP dar. Für beide hier besprochenen Trennungen sind polare Wechselwirkungen wichtig. Wie soeben gezeigt ist aber „polar“ nicht gleich „polar“. Die hier verwendeten Selektivitätsplots sind gut geeignet, um zwischen Phasen zu unterscheiden, die zu polaren Wechselwirkungen neigen (Wasserstoffbrückenbindung, $\pi \dots \pi$) und/oder zu ionischen Wechselwirkungen in der Lage sind.

Neutrale, polare Moleküle / starke Säuren, ungepufferte / gepufferte Eluenten

Abb. 6.1.9 und 6.1.10

y-Achse: Selektivität für einen polaren Analyten/Heterocyclus, Wasserstoff-Donator (Phenol/Coffein).

x-Achse: Selektivität für mittelstarke, dissoziiert vorliegende, aromatische, isomere Säuren (Terephthal-/Phthalsäure).

In einer Darstellung wie in Abb. 6.1.9 können Unterschiede von stark polaren Phasen festgestellt und der Grund dafür erkannt werden: LiChrospher Select B und Superspher Select B liegen als identische Phasen (Differenz nur in der Korngröße) unmittelbar nah zueinander. Spherisorb ODS 1 ist etwas „hydrophober“ als Platinum EPS; die Tendenz zur Wasserbrückenbindung gegenüber Coffein ist verhältnismäßig größerer, es wird Elutionsumkehr beobachtet. In Abb. 6.1.10 ist der Unterschied zwischen einer „wirklich“ polaren Phase wie Platinum EPS und einer zwar hydrophil endcappten jedoch hydrophoben Phase wie AQUA klar erkennbar.

Basische / saure Komponenten, alkalischer / saurer Puffer

Abb. 6.1.11 und 6.1.12

y-Achse: Selektivität für mittelstarke, dissoziiert vorliegende, aromatische, isomere Säuren (Terephthal-/Phthalsäure).

x-Achse: Selektivität gegenüber tertiären und sekundären Aminen im Alkalischen (Pyridin/Benzylamin) .

In einem alkalischen Puffer liegen „alle“ Silanolgruppen dissoziiert vor. Dadurch werden die Unterschiede der Phasen, die sich im wesentlichen im polaren Charakter widerspiegeln, teilweise egalisiert – die Phasen werden einander ähnlich. Somit fällt die Selektivitätsbandbreite der Phasen im Vergleich zum sauren Puffer geringer aus. In letzterem kommen, ähnlich dem neutralen Milieu, die individuellen Unterschiede der Phasen zum Tragen, es wird eine größere Selektivitätsbandbreite beobachtet. Auf die Selektivität bei der Trennung von mittelstarken, aromatischen Säuren wurde weiter oben eingegangen. Für die Trennung der hier besprochenen Amine eignen sich hydrophobe Phasen wie Inertsil ODS 3, Purospher, Nucleosil AB und AQUA.

Polare und neutrale Aromaten

Abb. 6.1.13a, 6.1.13b und 6.1.14

y-Achse: Selektivität für polare und neutrale Aromaten (Phenol/Toluol)

x-Achse: Selektivität für einen polaren Analyten/Heterocyclus, Wasserstoff-Donator(Phenol/Coffein).

Entsprechend den Ausführungen weiter oben werden große Trennfaktoren in der y-Achse an polaren Phasen wie Fluofix, Platinum EPS usw. festgestellt. Die „polare Selektivität“ von hydrophoben Phasen (in dem eingezeichneten Kasten enthalten) ist erwartungsgemäß gering. Eindrucksvoll werden in dieser Darstellung die extremen Phasen bezüglich Polarität angezeigt: Hypercarb und Platinum EPS (Abb. 6.1.13a) bzw. In der kleineren Gruppe der Serie 2, HyPURITY Advance und AQUA (Abb. 6.1.14).

- **Selektivitätsplots II**

Zu ebenso interessanten Erkenntnissen führt das gegeneinander Auftragen von Trennfaktoren (α -Werte), die bei Trennungen mit vermeintlich ähnlichen Phasen ermittelt wurden. Je ähnlicher die Phasen sind, um so näher sollten sich die einzelnen Werte an die resultierende Winkelhalbierende anschmiegen. Hier wurden 68 unterschiedliche Analytpaare unter bewusst unterschiedlichen chromatographischen Bedingungen (9 unterschiedliche Eluenten) getrennt und die ermittelten α -Werte gegeneinander aufgetragen. Durch die große Anzahl der Werte und durch die unterschiedliche experimentellen Bedingungen gelangt man zu recht gesicherten Aussagen. Ein Beispiel für einen derartigen Plott stellt Abb. 6.1.15a und 6.1.15b dar, hier wird Symmetry C₁₈ und Purospher e miteinander verglichen.

Einige Kommentare

Aus dem kleinen Bild, das alle Werte enthält, kann entnommen werden, dass beide Säulen tatsächlich sehr ähnlich sind. Das ist auch zu erwarten, denn bei beiden handelt es sich um zwei hydrophobe C₁₈-Phasen mit klassischer, hoher Belegung und auf Basis hochreinen Kieselgels. Um eine differenziertere Betrachtung zu ermöglichen

wurde für die Darstellung der 64 α -Werte eine andere Skalierung gewählt (großes Bild).

Auffallend ist der "Ausreißer" 21. Der α -Wert entspricht der Trennung 2,2'-/4,4'-Bipyridyl nach einem Säulenbetrieb von 4 Wochen. Ein großer α -Wert ist der Hinweis auf das Vorhandensein von Schwermetallionen, denn 2,2'-Bipyridyl ist ein Komplexbildner, 4,4' dagegen nicht.

Im Laufe des Säulenbetriebes reichern sich offensichtlich im Kieselgelgerüst von Symmetry mehr Metallionen an (Metallfritte?), die Neigung zur Komplexbildung nimmt zu. Weiterhin fällt bei Symmetry der etwas höhere hydrophobe Charakter auf, s. Trennung "31": α Phenol/Pyridin, "64": α Fluoren/Fluorenon. Purospher dagegen zeigt eine etwas bessere Selektivität für die Trennung von organischen Säuren, hier HVS/HIES, "48", sein zusätzlich polarer Charakter macht sich bemerkbar. Nachdem nun auf den Hintergrund und auf die gewonnenen Erkenntnisse aus derartigen Selektivitätsplots eingegangen wurde, folgen in Abb. 6.1.16a bis 6.1.24 mehrere Selektivitätsplots, die kurz kommentiert werden.

- Man stellt generell folgendes fest: Unterschiede zwischen den Phasen sind besonders dann ersichtlich, wenn bei den betreffenden Komponenten ionische Wechselwirkungen mit den stationären Phasen möglich sind. Dies ist in allen Abbildungen klar zu erkennen.
Die Konsequenz daraus lautet: Zur „ehrlichen“ Überprüfung der Chargenreproduzierbarkeit einer Phase, der Überprüfung der Stabilität einer Säule im Routinebetrieb oder für den Vergleich zwei vermeintlich ähnlicher Säulen sollten polare (noch besser: ionische) Analyte verwendet werden. Die „Strenge“ des Tests – und damit verbunden die Relevanz der Aussage – nimmt zu, wenn darüber hinaus nicht gepufferte Methanol/Wasser-Eluenten eingesetzt werden.
- Nicht Spherisorb ODS 1 (Abb. 6.1.16a), sondern Spherisorb ODS 2 ähnelt Resolve stark (Abb. 6.1.16b).
- ProntoSIL und RepronSIL sind sehr ähnliche Phasen (Abb. 6.1.17).
- Obwohl auf der Basis unterschiedlicher Kieselgele und trotz unterschiedlicher Belegung verhalten sich Inertsil ODS 2 und Inertsil ODS 3 bei vielen Trennungen ähnlich (Abb. 6.1.18).
- Superspher und LiChrospher sind identisch (6.1.19).
- Hypersil ODS und Hypersil BDS verhalten sich vielfach ähnlich (Abb. 6.1.20). Die Deaktivierung der Phasenoberfläche bei Hypersil BDS (homogene Verteilung der Silanolgruppen) macht sich - bezüglich Peakform ! - „nur“ bei der Trennung von basischen Substanzen bemerkbar.
- Die hochbelegten Phasen Zorbax ODS und Hypersil BDS zeigen bei vielen Trennungen ähnliches Selektivitätsverhalten (Abb. 6.1.21). Die Konsequenzen nach einer Deaktivierung der Phasenoberfläche (Herabsetzung der Silanolgruppenaktivität) bei Hypersil BDS wird bei der Trennung von basischen

Substanzen klar ersichtlich.

- Hypersil ODS verfügt offensichtlich über „acidere“, „aggressivere“ Silanolgruppen als das (hoch belegte) Zorbax ODS-Material, die Wechselwirkung mit basischen Substanzen ist stärker (Abb. 6.1.22).
- Zorbax Bonus ist eine „hydrophobere“ „embedded phase“ als HyPURITY Advance (Abb. 6.1.23).
- Symmetry Shield und XTerra zeigen auf Grund der gemeinsamen Carbamatgruppe als „shield“-Funktion erwartungsgemäß ein vergleichbares Selektivitätsverhalten (Abb. 6.1.24). Der Unterschied in der Matrix, synthetisches Kieselgel bei Symmetry, Hybrid-Material bei XTerra macht sich – wo sonst? - bei polaren Analytpaaren bemerkbar: XTerra ist zwar ein niedrig belegtes Material, die „Aktivität“ dieser Matrix gegenüber Basen ist jedoch gering.

- **Selektivitäts-Hexagone**

Selektivitäts-Hexagone sind eine interessante Darstellungsweise, welche die Ähnlichkeit der Phasen untereinander auch rein optisch gut visualisiert. Es wurden mehrere solcher Hexagone für eine schnelle Entscheidung bezüglich der Eignung einer Phase für die Trennung einer bestimmten Substanzklasse, in einem bestimmten Eluenten (Methanol/Acetonitril) oder bei einem bestimmten pH-Wert (saurer/alkalischer Phosphatpuffer) erstellt. Weiterhin kann man der Darstellung leicht entnehmen, welche Säulen für eine bestimmte Zielsetzung und unter gegebenen Bedingungen gegenüber welcher anderen Säule ähnliche oder diametral andere Eigenschaften besitzt.

Dabei stellen normierte α -Werte, die bei der Trennung von bestimmten Analytpaaren ermittelt wurden, die Ecken von Hexagonen dar.

Betrachten wir als Beispiel sechs unterschiedliche Analytpaare, alle mit einem aromatischen Ring (Basen, Säuren, Isomere usw.), die bei unterschiedlichen Bedingungen (Methanol, Methanol/Wasser, Methanol/Puffer) getrennt wurden. Je symmetrischer ein Hexagon ist, um so eher ist die entsprechende Phase universell einsetzbar für die Trennung von aromatischen Verbindungen. Des weiteren kann leicht entschieden werden, welche Säule z.B. für die Trennung von mittelstarken aromatischen Säuren (Phthal-/Terephthalsäure), welche für schwache aromatische Säuren (3-hydroxy-/4-hydroxybenzoesäure) und welche für planare/nicht planare Aromaten (Triphenylen/o-Terphenyl) geeignet ist.

Schließlich wird durch die verdichtete Information die Ähnlichkeit von Phasen - ähnlich den Piktogrammen z.B. im Straßenverkehr - unmissverständlich erkannt, es ergeben sich charakteristische Bilder, siehe weiter unten.

Beispielhaft werden einige typische Hexagone für unterschiedliche Analytpaare und Eluenten gezeigt und mit kurzen Kommentaren bezüglich der Ähnlichkeiten der Säulen versehen.

1. Aromatische Analytpaare in ungepufferten Methanol/Wasser-Systemen, Abb. 6.1.25

Wie bereits erwähnt, liegt das wesentliche Unterscheidungsmerkmal der Phasen in ihrer Fähigkeit, polare/ionische Wechselwirkungen einzugehen. Fehlt jenes, wie es häufig bei neutralen Analyten und ungepufferten Eluenten der Fall ist, verhalten sich viele Phasen ähnlich. Hier rücken andere Eigenschaften der Phasen wie z.B. der Bedeckungsgrad in den Vordergrund.

- Inertsil ODS 2 ist zu polaren Wechselwirkungen eher in der Lage als Inertsil ODS 3, siehe dazu die bessere Selektivität für das planare / nicht planare Analytpaar Triphenylen/o-Terphenyl.
- LiChrospher, Superspher und Purospher e zeigen aufgrund des ähnlich hohen Bedeckungsgrades und vorhandener polaren Gruppierungen an der Oberfläche vergleichbare Selektivitätsmuster. Die zweifelsohne vorhandenen Metallionen und freie Silanolgruppen an LiChrospher und Superspher machen sich hier nicht bemerkbar. So verhalten sich auch Symmetry und Zorbax ODS ähnlich, zwei Phasen, die sich bei einer Trennung von ionischen Analyten sehr stark unterscheiden.
- Bei folgenden hydrophoben Phasen ist eine Feindifferenzierung möglich; in folgender Reihenfolge nimmt der apolare Charakter zu:
 - HyPURITY C₁₈, Hypersil BDS = Inertsil ODS 3, Luna 2.
- Aus diversen Experimenten ist bekannt, dass Hypersil ODS und Zorbax ODS über sehr acide Silanolgruppen verfügen. Werden keine basische Analyte getrennt, so wird der hydrophobere Charakter von Zorbax ODS gegenüber Hypersil ODS offenkundig. Des Weiteren wird ebenfalls ersichtlich, dass beide Phasen zwar über acide Silanolgruppen verfügen, die Gesamtkonzentration jedoch an Silanolgruppen gering ist. Andere Phasen verfügen über eine wesentlich höhere Gesamtkonzentration an polaren Gruppierungen, z.B. LiChrospher, Superspher, Discovery Amid, Spherisorb ODS 1. Das macht sich in deren guter Selektivität bei der Trennung Triphenylen/o-Terphenyl bemerkbar.
- Die Ähnlichkeit der C₈-Phasen LiChrospher Select B, Superspher Select B und Zorbax SB C₈ ist klar erkennbar.
- Die beste Selektivität per se für aromatische Verbindungen, wie hier besprochen, zeigen Phasen mit einer Polymerschicht an der Oberfläche (SMT OD, Nucleosil AB) sowie an zweiter Stelle Ultrasep ES.
- Starke Ähnlichkeiten weisen die Phasen Bondapak, Gromsil AB und Platinum C₁₈ auf.
- XTerra MS ähnelt Purospher Star – bis auf die polaren Gruppierungen bei letzterer Phase. Diese sind ursächlich für die gute Selektivität bei der Trennung Triphenylen/o-Terphenyl.
- Klar ersichtlich ist die größere Hydrophobie von XTerra MS gegenüber XTerra.

- Die polarsten Phasen hier (und auch an anderer Stelle) stellen Nucleosil Protect 1, Spherisorb ODS 1 und Platinum EPS dar.
2. Unterschiedliche Analytpaare (Aromaten, Steroide, Isomere) in ungepufferten Tetrahydrofuran/, Methanol/, Acetonitril/Wasser-Systemen, Abb. 6.1.26
- Auch hier zeigen SMT OD, Nucleosil AB und Ultrasep ES die symmetrischsten Hexagone. Für solche Analyttypen wären das universell einsetzbare Phasen.
 - Steht die Trennung von planaren/nicht planaren Molekülen nicht im Vordergrund, so sind auch andere hydrophobe, gut abgedeckte Phasen wie Gromsil CP, Inertsil ODS 2, Kromasil, Nucleosil HD, YMC Pro C₁₈, Symmetry, Zorbax SB C₁₈, Zorbax Extend, XTerra MS eine gute Wahl. Ist man bereit, Kompromisse bezüglich maximaler Selektivität zu Gunsten der Universalität einzugehen, so stellen polare Phasen mit kleineren α -Werten aber symmetrischeren Hexagonen eine Alternative dar, z.B. LiChrospher, LiChrosorb, Nucleosil ABZ PLUS sowie die „embedded phases“ der Serie 2.
 - Chromolith Performance ähnelt bezüglich Selektivität Purospher Star.
3. Unterschiedliche aromatische Verbindungen in ungepufferten/gebufferten Eluenten, Abb. 6.1.27
- Das im Vergleich zu Prontosil C₁₈ hydrophilere Prontosil AQ trennt das polare Paar Phthal-/Terephthalsäure besser, ansonsten sind die zwei Phasen recht ähnlich.
 - Praktisch identische Phasen stellen Reprosil AQ und Prontosil AQ dar.
 - Das polare XTerra-Material ("embedded phase") trennt Triphenylen/o-Terphenyl und Phthal-/Terephthalsäure gut, während das apolare XTerra MS (klassische Belegung) für 3-/4-Nitroanilin und 3-hydroxy-/4-hydroxybenzoesäure selektiver ist.
 - LiChrospher ist bekanntlich identisch mit Superspher, der einzige Unterschied liegt in der Korngröße (5 μ m gegenüber 4 μ m), die Hexagone sind praktisch gleich. Ähnlich verhält sich LiChrospher Select B und Superspher Select B.
 - Bei den Zorbax SB-Materialien ist die Oberfläche durch die sperrige Diisopropylgruppe sehr gut abgedeckt. Sie zeigen damit eine geringe Selektivität für die Trennung Triphenylen/o-Terphenyl.
4. Polare Analyte im alkalischen Methanol/Phosphatpuffer I, Abb. 6.1.28
- Im Alkalischen liegen „alle“ Silanolgruppen dissoziiert vor. Ähnlich den neutralen Analyten in ungepufferten Eluenten entfällt auch hier ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal. Die Phasenoberflächen werden quasi „uniformiert“. Die Hexagone vieler Phasen zeigen dadurch eine große Ähnlichkeit. So z.B. die

Hexagone von ProntoSil AQ und YMC AQ, zwei Phasen, die unter anderen Eluentenbedingungen merkliche Unterschiede aufweisen.

- Nur dank des Basenpaares Pyridin/Anilin ergibt sich ein Unterschied im Aussehen der Hexagone von Hypersil ODS und von Hypersil BDS.
- Kleine Chargenunterschiede der „gleichen“ Materialien Superspher und LiChrospher werden ebenfalls erst beim Basenpaar Pyridin/Anilin sichtbar.
- Eine merkliche Differenz im Aussehen der Hexagone wird bei stark polaren Phasen festgestellt: Discovery Amid, Fluofix INW, Nucleosil Protect 1, Platinum EPS, Supelcosil ABZ PLUS, Spherisorb ODS 1.

5. Polare Analyte im alkalischen Methanol/Phosphatpuffer II

- Ähnlich der Beobachtung unter I sind die Hexagone von endcappten, hydrophoben Phasen recht ähnlich. Das deckt sich mit der mehrfach gemachten Feststellung, dass hydrophobe Phasen in alkalischen Puffern ein recht ähnliches Selektivitätsverhalten zeigen.
- Bei den Nucleosil-Materialien nimmt der apolare Charakter wie folgt zu: Nucleosil 50, Nucleosil 100, Nucleosil HD, Nucleosil AB.
- Analog zeigen polare Phasen ebenfalls ähnliche Muster, z.B. Bondapak, Platinum C₁₈, Resolve, Vydac, LiChrospher Select B.
- Konform den Ergebnissen aus mehreren Experimenten ist eine Feindifferenzierung der Phasen, wenn mit alkalischen Puffern gearbeitet wird, schwer möglich. Das gelingt hier nur bei der Verwendung von stark basischen Analyten.

6. Polare Analyte im sauren Acetonitril/Phosphatpuffer I, Abb. 6.1.29

- Ähnlich dem alkalischen Milieu werden auch im Sauren – bei Abwesenheit von ionischen Analyten – eher moderate Selektivitätsunterschiede unter den Phasen festgestellt. So z.B. bei XTerra und Symmetry Shield, zwei Phasen mit unterschiedlichem Basismaterial.
- Hydrophobe Phasen zeigen eine geringe Selektivität bei der Trennung der mittelstarken Säuren Terephthal- und Phthalsäure sowie der stark polaren Metaboliten Desipramin und Desmaprotylin.
- Stünde der Einsatz einer Säule als „Universalsäule“ für die Trennung von sauren Komponenten im sauren Phosphatpuffer im Raum, so würde man wohl auch hier auf polare Phasen zurückgreifen, z.B. Discovery Amid, Spherisorb ODS 1 und ODS 2, Superspher Select B, Platinum EPS.
- Abermals zeigt sich, dass lediglich hydrophiles Endcapping die Phase kaum

polar „macht“: AQUA ist nur unwesentlich polarer als Zorbax Extend und Nucleosil HD.

7. Polare Analyte im sauren Acetonitril/Phosphatpuffer II, Abb.6.1.30

Auch hier ähneln sich die Hexagone. Auffallend ist die gute Selektivität von polaren Phasen wie Spherisorb ODS 1 und ODS 2 sowie Superspher Select B und insbesondere von Synergi POLAR RP und Discovery Amid für die Trennung von Terephthal- und Phthalsäure. Die ebenfalls polaren „embedded phases“ allerdings zeigen hier keine besonders gute Selektivität. Eine eingebaute polare Gruppe am Alkylrest ist hier – im Gegensatz zu polaren Gruppen an der Oberfläche – nicht besonders hilfreich.

8. Selektivitätshexagon „universaler Charakter“, Abb. 6.1.31

Für die Erstellung dieses Hexagons wurden bewusst sowohl sich stark unterscheidende Analytpaare (z.B. hydrophob/polar) als auch stark verschiedene Eluenten (Methanol, Wasser/saurer Puffer) verwendet. Es soll so die Selektivität der Säulen für unterschiedliche Fragestellungen dargestellt werden, eben der Einsatz einer Säule als „Universalsäule“.

- Für eine gute Selektivität bei der Trennung von planaren / nicht planaren Molekülen werden polare Gruppierungen an der Oberfläche benötigt. Ein lediglich polarer Charakter der Phase, wie z.B. durch eine kurze C₈-Alkylkette der Fall ist, reicht nicht aus.
- Inertsil ODS 2 hat einen höheren Bedeckungsgrad, zeigt aber gleichzeitig auch einen polareren Charakter (polare Gruppen an der Oberfläche?) als Inertsil ODS 3 mit einer „besser“ abgedeckten jedoch niedriger belegten Oberfläche.
- Purospher e scheint die „polarste“ der hydrophoben Phasen zu sein, es verhält sich unwesentlich apolarer (bei Abwesenheit von Basen!) als LiChrospher / Superspher.
- ProntoSil AQ verhält sich – wenn nicht als Eluent mehr als ca. 90 % Wasser / Puffer verwendet wird – kaum polarer als ProntoSil, Reprisil AQ, kaum polarer als Reprisil. Diese Materialien sind – nach den Ergebnissen auch aus anderen Experimenten – untereinander als sehr ähnlich zu bezeichnen. ProntoSil ACE ist das mit Abstand polarste der „ProntoSil-Familie“. YMC AQ dagegen verhält sich anders als YMC Pro C₁₈. Das ist auch kein Wunder, handelt es sich doch um unterschiedliche Basiskieselgele.
- SynergiMAX RP und Luna 2 sind zwei der am stärksten hydrophoben RP-Materialien auf Kieselgelbasis auf dem Markt.
- Symmetry, ein klassisches Material auf Basis von Kieselgel, ist für die Trennung von Triphenylen/o-Terphenyl selektiver als das Hybrid-Material XTerra MS. Bei letzterem ist die Silanolgruppen-Dichte an der Oberfläche offensichtlich geringer.

- Symmetry Shield ist zwar hydrophober als das niedrigbelegte XTerra (siehe α -Werte von Isobutyl-/Isopropylmethylketon und 3-/4-Nitroanilin), verfügt aber offensichtlich genau wie Symmetry über mehr Oberflächensilanolgruppen als XTerra.
- Zorbax Bonus ist hydrophober als Nucleosil Nautilus, letzteres hydrophober als ProntoSIL ACE und als polarste „embedded phase“ mit einer langen Alkylkette kann Symmetry Shield mit Carbamat als eingebaute, polare Gruppe angesehen werden. Die polarsten embedded phases überhaupt sind solche mit noch kürzeren Alkylketten: HyPURITY ADVANCE und SynergiPOLAR RP.

Einige Hexagone aus Abb. 6.1.31 sind in Abb. 6.1.32 unmittelbar neben einander dargestellt. Auf der linken Spalte ist die erhöhte Hydrophobie von Discovery C₁₈ gegenüber Discovery C₁₆ klar erkennbar: Gute Selektivität bei der Trennung von schwächeren Säuren aber eine dürftige für stärker dissoziiert vorliegenden Säuren. Symmetry Shield, auf Basis von Kieselgel hergestellt, zeigt gegenüber Phenol eine höhere Affinität als das niedrig belegte Hybrid-Material XTerra (mittlere Spalte). Auf der rechten Spalte wird optisch der Übergang vom hydrophoben Inertsil ODS 2 – siehe Ähnlichkeit mit Discovery C₁₈ – über Superspher zu den recht polaren Spherisorb ODS-Phasen.

9. Polare und apolare Verbindungen in gepufferten und ungepufferten Eluenten, s. Abb. 6.1.32a

Klassische, hydrophobe, gut abgedeckte Phasen wie Hypersil BDS, Luna, Inertsil ODS 3, Zorbax Extend usw. zeigen bis auf die Trennung Triphenylen/oTerphenyl gute Selektivitäten. Kommt eine Polymerschicht wie bei SMT noch dazu, ist der „Universalcharakter“, auch für letzt-genanntes Trennproblem, nahezu perfekt.

Eine Universalität bei den „embedded phases“ für die hier besprochenen Trennungen zeigen analog die „hydrophoberen“ ProntoSIL ACE und Symmetry Shield.

Die Ähnlichkeit der zwei Select B-Materialien sowie von Supelcosil ABZ PLUS und Discovery Amid ist klar erkennbar.

Man kann nun die Phasen grob in folgende vier Typen einteilen („Piktogramme“), s. Abb. 6.1.32b:

- „Polymer“-Typ
- „Hydrophober“-Typ
- „Polarer“-Typ
- „Embedded-Phase“-Typ

Zum „Polymer“-Typ gehören Phasen mit einer Polymerschicht an der Oberfläche oder mit einem sehr hohen Bedeckungsgrad.

Der „hydrophobe“-Typ zeichnet sich aus durch einen hohen Bedeckungsgrad, verbunden mit einer guten Abdeckung und einer großen spezifischen Oberfläche.

Der „polare“-Typ zeigt die größte Bandbreite. Der polare Charakter wird durch polare Gruppierungen an der Oberfläche bzw. durch eine kurze Alkylkette hervorgerufen. So ist die einzige Gemeinsamkeit zwischen LiChrospher und Spherisorb ODS 1 das Vorhandensein von freien Silanolgruppen und Metallionen an der Phasenoberfläche. Der hohe Bedeckungsgrad von LiChrospher jedoch lässt sein Hexagon eine gewisse Ähnlichkeit mit denen der hydrophoben Phasen erscheinen. Beim wesentlich polareren, niedrig belegten Spherisorb ODS 1 wird sehr schön der Übergang zu Zorbax Bonus, dem am stärker „hydrophoben“ (genauer: durch den chemischen und sterischen Schutz am besten abgedeckte Oberfläche) der „embedded phases“ ersichtlich.

- **Chemometrische Analyse der chromatographischen Daten**

Chemometrische Tools sind Werkzeuge, die anhand charakteristischer Zahlen (Eigenschaften) die Ähnlichkeit von Objekten, hier Säulen, sichtbar machen. Ihre Stärke liegt in dem Handling von großen Datenmengen in einem mehrdimensionalen Raum. Darüber hinaus erlauben sie eine Gewichtung der Kriterien (Faktoren), die zur Überprüfung der Ähnlichkeit herangezogen werden. Es wurden hier Variablen verwendet, die die unterschiedlichen chromatographischen Eigenschaften der Phasen charakterisieren.

Eine kurze Erläuterung zu den verwendeten Tools in dieser Arbeit finden Sie auf der mitgelieferten CD unter „Chemometrie“ und in dem Zusatzordner. In diesem Programmpunkt der Software ist auch der Großteil der Grafiken, die im Rahmen dieser Arbeit erstellt wurden, enthalten. Für mehr Details über die Hintergründe der Chemometrie/multivariate Analyse wird auf die weiterführende Literatur verwiesen.

Zunächst wird kurz auf eine Datenanalyse, die freundlicherweise von Prof. Dr. Zwanziger erstellt wurde, eingegangen. Obwohl bei dieser Analyse die Daten nur eines Experiments („Hydrophobie 1“) berücksichtigt wurden, zeigen nachfolgende Befunde die Aussagekraft von chemometrischen Tools.

In Bild 1 wird die Clusterung von 24 Variablen für 30 Säulen dargestellt. Es sind zwei Cluster erkennbar. Im ersten Cluster („a“) befinden sich die k-Werte, sowie die Werte für die spezifische Oberfläche und der Kohlenstoffgehalt. Im zweiten Cluster („b“) sind die restlichen Variablen wie z.B. die Asymmetriefaktoren (AS), die Bodenzahlen (N) und der Porendurchmesser enthalten.

Erkenntnisse/Anmerkungen:

- Der k-Wert wird im wesentlichen von der spezifischen Oberfläche und dem Kohlenstoffgehalt bestimmt.
- Während nun spezifische Oberfläche und Kohlenstoffgehalt für das Retentionsverhalten zuständig sind, erweisen sich diese Eigenschaften der Phasen bezüglich Selektivität – sogar für „typische“ RP-Analyte wie Ethylbenzol/Toluol - nicht signifikant, für Triphenylen/o-Terphenyl („shape selectivity“) nicht einmal relevant.

- Der Porendurchmesser zeichnet verantwortlich für die Symmetrie von verdrillten Strukturen wie o-Terphenyl.
- Es herrscht keine zwangsläufige Korrelation zwischen Bodenzahl und Asymmetriefaktor.

Bild 2 zeigt die Ergebnisse der Cluster-Analyse für 30 Säulen.

- Wenn keine ionische Wechselwirkungen „im Spiel sind“ verhalten sich Hypersil BDS und Hypersil ODS ähnlich.
- Des weiteren ist die Ähnlichkeit zwischen Prontosil und Reprosil sowie Luna und Prodigy augenscheinlich.

In Bild 3 wird eine Faktoranalyse (scree plot) dargestellt. Wie man leicht erkennt, ist mit etwa sechs Faktoren zu rechnen. Diese Faktoren sollten ihrerseits Gruppen ähnlich aussagefähiger Variablen besonders wichten. Die dominanten Faktoren (Maß für die Ähnlichkeit der Säulen) sind die k-Werte sowie der Asymmetriefaktor und die Bodenzahl von o-Terphenyl. Erst durch einen „besonderen“ Analyten können Unterschiede zwischen den Phasen erkannt werden, „harmlose“ Analyte eignen sich für diese Fragenstellung nicht.

Es wurden insgesamt mehrere tausend Werte für die Berechnungen verwertet. Chem.1 bis Chem. 60 stellen eine Auswahl der erstellten Dendrogramme und Biplots dar. Ein Teil der aussagekräftigsten Grafiken befindet sich bei „Trennungen“ unter „Dendrogramme/Cluster“ auf der CD. Nach Auffassung des Autors sind von den verschiedenen Visualisierungsmöglichkeiten für eine schnelle Überprüfung die Dendrogramme am besten geeignet. Chem.-Liste enthält die Namen der Säulen und die in den Grafiken verwendeten Abkürzungen. Es folgen einige Anmerkungen in komprimierter Form.

- Es hat sich herausgestellt, dass die Ähnlichkeit der Säulen von dem zu Grunde liegenden Parameter abhängig ist. Werden beispielsweise die Säulen über das Kriterium „Ähnlichkeit im Retentionsverhalten“ verglichen (siehe Chem. 1, Retentionsfaktoren) so ergibt sich ein anderes Muster, als wenn das Kriterium „Ähnlichkeit in der Selektivität“ gilt (siehe Chem. 2 Trennfaktoren). Steht beispielsweise „nur“ das Selektivitätsverhalten im Vordergrund, so sollten Dendrogramme wie Chem. 2 in Betracht gezogen werden. Soll als Kriterium für die Ähnlichkeiten auch das Retentionsverhalten (Analysendauer) gelten, so sollten für einen Vergleich Dendrogramme wie Chem. 3 herangezogen werden.
- Im Alkalischen werden die Phasen bezogen auf die Selektivität „ähnlicher“. Es ergeben sich kleine Differenzen in den Trennfaktoren, die Verzweigung in den Dendrogrammen setzt verhältnismäßig früh an. Die Unterschiede der Phasen kommen dagegen im Neutralen und im Alkalischen (besonders mit Acetonitril als organischem Lösungsmittel, siehe weiter unten) zum Vorschein, es gilt: $\Delta\alpha_{\text{sauer}} > \Delta\alpha_{\text{neutral}} > \Delta\alpha_{\text{alkalisch}}$. Folglich spielt im alkalischen Puffer das Säulenmaterial eine untergeordnete Rolle, die Säulenauswahl ist zweitrangig. Betrachten wir dazu Chem. 6 und 10, Chem. 31 und 39, Chem 47 und 45 sowie 57 und 55. Nehmen wir als Beispiel Platinum EPS und HyPURITY Advance. Beide sind stark polare Phasen, dies bestätigte sich in vielen Experimenten. Ihre „Sonderstellung“ zeigt sich eindeutig in Chem. 4. Dort wird die Ähnlichkeit der Säulen unter Berücksichtigung aller Variablen demonstriert: Retentions- und Trennfaktoren im sauren/alkalischen-, Methanol/Acetonitril-Phosphatpuffer.

Wird jedoch nicht im Sauren sondern im Neutralen oder im Alkalischen gearbeitet, d.h. können die Phasen ihre „Individualität“ nicht entfalten, so verhalten sich die besprochenen Phasen ähnlich wie alle anderen, sie gehören nun der „Familie“, siehe Chem. 8. Im Übrigen ist eine Differenzierung zwischen HyPURITY Advance und Platinum EPS im Neutralen möglich, siehe Chem 16. Platinum EPS ist die einzige der in Chem. 16 aufgeführten Phasen, die über eine große Anzahl polarer Gruppen auf der Oberfläche verfügt, ihre „Außenseiterrolle“ ist offensichtlich. Chem. 12 (Ähnlichkeit im Sauren und im Neutralen) ähnelt stark Chem. 4. Dies ist ein weiterer Beweis, dass der alkalische Bereich keine Variabilität bietet, mit anderen Worten: Trennungen mit Puffern im neutralen/schwach alkalischen Bereich sind kaum geeignet, um zuverlässige Aussagen über die Ähnlichkeit von Phasen zu machen.

- In der Regel ist die Bandbreite der Selektivität in Methanol größer als in Acetonitril, vergleiche dazu Chem. 43 und 53. Das bedeutet folgendes: Ist man bestrebt, die maximale Selektivitätsbandbreite aus den Phasen „herauszuholen“, sollte man in Methanol/Wasser bzw. in Methanol/saurer Puffer arbeiten.

- Es sei noch ein mal betont: Es ergeben sich andere Ähnlichkeiten in Methanol vs. Acetonitril und im Sauren vs. Alkalischen. Dazu folgendes Beispiel: Nucleosil HD und XTerra MS verhalten sich im Sauren ähnlich, siehe Chem. 10. Im Neutralen dagegen zeigt Nucleosil HD eine starke Ähnlichkeit mit Zorbax Extend (Chem. 14). Die starke Ähnlichkeit zwischen Nucleosil HD und Zorbax Extend im Neutralen zeigt sich dadurch, dass jene sowohl unter Berücksichtigung nur der Trennfaktoren (Chem. 14) als auch der Trenn- und Retentionsfaktoren besteht (Chem. 15). Das bedeutet, dass wenn zwei Säulen beispielsweise sich im Neutralen ähnlich verhalten nicht unbedingt auch im sauren Puffer diese Ähnlichkeit zeigen. Für die Praxis könnte dies folgendes bedeuten:
Nehmen wir an, Säule A wird in Eluent A getestet und als ungeeignet befunden. Säule B eben so, eine „negative“ Ähnlichkeit ist also gegeben. Ändert man nun den Eluenten, z. B. jetzt neu, Eluent B (neutral oder sauer), so wäre es angebracht, *beide* Säulen mit dem neuen Eluenten zu testen. Ist eine Ähnlichkeit (als Kriterium gilt das Chromatogramm) auch im zweiten Eluenten festzustellen, so handelt es sich wahrlich um zwei sehr ähnliche Säulen. Daraus ergibt sich bezüglich Optimierung folgende Vorgehensweise: Man führe zunächst mit der Kombination Säule A und Eluent A (z.B. eine hydrophobe Phase und ein Methanol/Wasser- Eluent) eine Trennung durch. In einem zweiten Lauf verwendet man nun eine möglichst diametral andere Kombination – wobei „diametral“ nicht unbedingt die Verwendung einer Kieselgelsäule bedeuten muß- also sagen wir Säule B und Eluent B (z.B. eine polare Phase und ein Acetonitril/Wasser-Eluent). Bleibt die Anzahl der Peaks gleich, könnte man als Bestätigung 5% Acetonitril gegen 5% Tetrahydrofuran austauschen, bzw. in gepufferten Eluenten den pH-Wert um +/- 0,5 pH-Einheiten verschieben. Bleibt die Anzahl der Peaks weiterhin konstant, so liegt die Vermutung nahe, keine „versteckte“ Peaks übersehen zu haben.

- Biplots sind gut geeignet, um bei Ähnlichkeitsbetrachtungen von Objekten die Gewichtung einzelner Variablen zu ermitteln. In unserem Fall lautet die entsprechende Frage: „ Welches Analytpaar ist

besonders gut geeignet, um die Unterschiede zwischen den Phasen möglichst genau aufzuzeigen?“, siehe dazu Chem. 23.

Befunde:

1. Hypercarb und die zwei Fluofix-Säulen sondern sich auffallend von den übrigen Säulen ab, was kein Wunder ist, stellen diese Phasentypen doch keine klassische RP-Phasen dar.
2. Aussagekräftige Analytpaare sind Benzylamin/Pyridin, 4,4'-/2,2'-Bipyridyl und o-Terphenyl/Toluol.

Die Konsequenz lautet:

Für einen strengen Säulenvergleich, sollten solche Analyte verwendet werden, die spezifisch diejenigen Eigenschaften der Phasen ansprechen, welche besonders für die Unterschiede zwischen den Phasen verantwortlich sind. Solche Analyte wären beispielsweise Basen (Benzylamin/Pyridin), Komplexbildner (2,2'-Bipyridyl) oder auch ein Analytpaar, dessen Wechselwirkungen mit der stationären Phase einem unterschiedlichen Mechanismus zu Grunde liegt, z.B. Raumbesetzung/Van-der-Waals-Wechselwirkungen (o-Terphenyl/Ethylbenzol).

Im Anschluss werden einige Phasen vorgestellt, die sich bei unterschiedlichen Bedingungen immer wieder als recht ähnlich erweisen. Doch zunächst soll zu einer (erwarteten) Clusterung zweier unterschiedlicher Phasentypen Stellung genommen werden. In Chem. 53 sind zwei Cluster klar erkennbar. Im oberen Cluster, Symmetry Shield bis Nucleosil Nautilus, handelt es sich um „embedded phases“, im unteren, XTerraMS bis Chromolith Performance um Phasen mit einer klassischen Belegung.

Selbstverständlich beziehen sich die hier besprochenen Befunde zunächst nur auf die untersuchten Analytpaare und die experimentellen Bedingungen. Eine Übertragung der Aussagen auf andere Analyte und Eluenten ist mit Unsicherheiten verbunden.

Ähnliche Phasen:

- Nucleosil AB, Gromsil CP, zwei Phasen mit einer „Polymerschicht“ (Chem. 18 und 35).
- Symmetry, Purospher e (Chem. 41); Purospher zeigt darüber hinaus bei bestimmten Trennungen immer wieder Ähnlichkeit mit MP-Gel. Bei den zwei Letzteren handelt es sich um hochbelegte Phasen, weisen beide darüber hinaus noch einen polaren Charakter auf (Chem. 37).
- Ähnlichkeit unter einander (und teilweise zu Purospher und zu MP-Gel), sowie einen gewissen polaren Charakter zeigen Prodigy und Inertsil ODS 2.
- SMT, Ultrasep ES, zwei Phasen vom „Polymertyp“.
- Prontosil, Reprosil.
- Prontosil AQ, Reprosil AQ, in zweiter Linie auch YMC AQ.

- Zorbax ODS, Lichrospher, in zweiter Linie auch Ultrasep ES (Chem. 24 und 41); Es handelt sich um hochbelegte Phasen mit zusätzlich freien Silanolgruppen. Hypersil ODS, das ebenfalls über acide Silanolgruppen verfügt, kann auf Grund der geringen Belegung nicht zu dieser Gruppe dazu gerechnet werden.
- Gromsil AB, Bondapak, Platinum C₁₈, Vydac (Chem. 24 und 32).
- HyPURITY C18, Discovery C₁₈, Jupiter (Chem. 32). Die Ähnlichkeit basiert auf dem hydrophoben Charakter und auf dem verhältnismäßig großen Porendurchmesser. Wird im Neutralen gearbeitet, so nimmt die Bedeutung eines „extremen“ Porendurchmessers als ein besonderes Selektivitätsmerkmal offensichtlich zu, Novapak (60 Å) gesellt sich hier zu den drei oben genannten Säulen (Chem. 24).
- Zorbax Extend, Nucleosil HD, XTerra MS, Purospher Star (Chem. 53).
- „Sonderlinge“ sind: Hybercarb (Graphit), Nucleosil 50 (hoher Belegung in Verbindung mit einem kleinen Porendurchmesser), Fluofix INW und IEW (Kurze Alkylkette mit Fluoratomen).

6.1.4 Beeinflusst der pH-Wert, der Analyttyp und der Eluent die Ähnlichkeit von Phasen?

Wie bereits bekannt ist, stellen bezüglich der Selektivität ionische/polare Wechselwirkungen – so sie möglich sind – einen entscheidenden Faktor und gleichzeitig das wesentlichste Unterscheidungsmerkmal zwischen einzelnen RP-Phasen dar. Das bedeutet folgendes: Sind solche wirksam, so können die Phasen ihre Individualität „entfalten“. Hier zeigen sich die größten Selektivitätsunterschiede. Werden polare/ionische Wechselwirkungen unterdrückt (z.B. durch die Wahl des pH-Wertes oder des organischen Lösungsmittels), oder werden neutrale, organische Moleküle unter „idealen“ RP-Wechselwirkungen getrennt, so verhalten sich die Phasen recht ähnlich. Dazu nachfolgend zwei Beispiele:

1. In Abb. 6.1.32c sind die Trennfaktoren von ca. 50 Säulen für das Analytpaar Ethylbenzol/Toluol (EB/T) wiedergegeben. Diese Trennung stellt ein klassisches, in der Literatur häufig verwendetes Beispiel dar: Die zwei Analyten unterscheiden sich lediglich durch eine CH₂-Gruppe (Methylengruppenselektivität). Bis auf die geringe Selektivität von polaren Phasen (gemeint sind hier RP-Phasen, die neben C₁₈/C₈-Alkylketten über zusätzliche polare funktionellen Gruppen verfügen) zeigen fast alle Phasen ausreichende, ähnliche Selektivitäten. Der α -Wert liegt zwischen 1,35 und 1,45. Wie Abb. 5.4.1 zu entnehmen ist, ist für solche einfache Trennungen die Säulenwahl nahezu zweitrangig, fast alle Säulen verhalten sich ähnlich.
2. Basen, die - aufgrund eines langen Alkylrests - einen ausgeprägten organischen Charakter aufweisen, können mit sauren Puffern (pH \approx 3) leicht getrennt werden. Sie verhalten sich in diesem Fall weitgehend wie neutrale Analyte. In Abb. 5.8.1 wird der α -Wert für die Trennung der Antidepressiva

Amitriptylin/Trimipramin in einem sauren Acetonitril/Phosphatpuffer, pH = 2,7 wiedergegeben. Bis auf sehr polare Phasen, die niedrige Selektivitäten aufweisen, zeigen fast alle Phasen nahezu ausreichende, identische α -Werte. Phasen, die nachweislich über völlig unterschiedliche Eigenschaften verfügen (das erkennt man an den unterschiedlichen Retentionsfaktoren), befinden sich im Ranking unmittelbar nebeneinander. Werden Puffer verwendet, so verlieren die Phasen quasi ihren individuellen Charakter bezüglich der Selektivität. Folglich werden die Unterschiede in ihrem polaren Charakter geringer in Anwesenheit von Puffern, die Phasen werden einander ähnlich, s. dazu als ein weiteres Beispiel Chr. 6.2.6 und 6.2.7.

Nur bei sehr silanophilen Phasen liegt sogar im Sauren manche Silanolgruppe dissoziiert vor, die Folge ist bekanntlich ein starkes Tailing bei Basen. In Chr. 5.8.1 ist die Verbesserung der Peakform von Antidepressiva vom sehr silanophilen Zorbax ODS über das endcappte, dennoch recht silanophile Spherisorb ODS2 bis hin zu dem sehr gut abgedeckten Luna 2 augenscheinlich.

Halten wir folgendes fest:

- Silanophile Wechselwirkungen sind in - verglichen mit Acetonitril polarerem - Methanol stärker, in Methanol kann der polare Charakter eines Analyten eher hervortreten als in Acetonitril.
- Im sauren Puffer liegen außer den stark aciden die meisten Silanolgruppen undissoziiert vor, die Phasen werden „ähnlich“.

Fazit:

Die größten (Selektivitäts) Unterschiede bei den RP-Phasen werden in Methanol / Wasser bei der Trennung von ionischen Analyten festgestellt. Als zwei typische Beispiele können folgende genannt werden: zum einen die Chromatographie von starken Basen (Benzylamin, Propranolol) in ungepufferten Methanol/Wasser-Eluenten und zum Zweiten das Trennverhalten von Komplexbildnern (2,2'-Bipyridyl). Die Bandbreite reicht hier von irreversibler Sorption des Analyten auf der Phase bis hin zu seiner Elution mit einer hervorragenden Peaksymmetrie.

Geringe Unterschiede werden dagegen beispielsweise bei der Trennung von undissoziiert vorliegenden (schwachen) Basen in gepufferten Systemen festgestellt – hier geben auch „schlechte“ Phasen ein gutes Bild ab! Daraus wird ersichtlich, unter welchen Gesichtspunkten man Tests aus der Literatur und von Säulenherstellern als streng oder eher als „mild“ bezeichnen kann.

Im Folgenden werden anhand einiger Beispiele einmal der Unterschied „Methanol/Acetonitril“ und einmal „sauer/alkalisch“ diskutiert. Anschließend werden daraus Konsequenzen für die Praxis abgeleitet.

In Chr. 6.1.1. bis Chr. 6.1.5. sind mehrere Trennungen unterschiedlicher Analyte an unterschiedlichen Phasen in Acetonitril- bzw. Methanol-haltigen Eluenten gleicher Elutionskraft abgebildet. Die bessere Selektivität wird in dem Methanol-haltigen Eluenten festgestellt.

Abb. 6.1.33 bis Abb. 6.1.37 zeigen die Trennfaktoren von mehreren Analytpaaren in Methanol- und Acetonitril-haltigen Eluenten gleicher Elutionskraft.

Abb. 6.1.33 zeigt die Trennfaktoren 3-Nitroanilin/ 4-Nitroanilin für eine Reihe von Säulen in einem Methanol- und in einem Acetonitril-haltigen Eluenten. Es wurde folgende Beobachtung gemacht, die auf viele Substanzklassen zutrifft: Phasen mit hydrophobem Charakter zeigen eine bessere Selektivität in Methanol (hier Zorbax Extend bis Nucleosil HD), polare Phasen dagegen in Acetonitril (Platinum EPS bis HyPURITY Advance).

Die Konsequenz lautet: Entscheidet man sich aus bestimmten Gründen für den Einsatz einer polaren RP-Säule, so erzielt man die beste Selektivität bei der Verwendung von Acetonitril. Für eine hydrophobe Phase gilt natürlich genau das Gegenteil, man sollte Methanol wählen. An hydrophoben Phasen werden in Methanol stets größere Retentionsfaktoren als in Acetonitril festgestellt. Je „polarer“ eine C₁₈ ist, um so geringer sind die Differenzen. An ausgesprochen polaren Phasen sind die Retentionsfaktoren in Acetonitril größer.

Ähnliche Verhältnisse werden bei der Trennung Isobu/Isopro beobachtet (Abb. 6.1.34). Nur das polare LiChrosorb und noch eindeutiger Platinum EPS zeigen in Acetonitril eine bessere Selektivität.

Diese Gesetzmäßigkeit zeigt sich auch in sauren und in alkalischen Puffern (Abb. 6.1.35).

Methanol ist für die Trennung von sauren Komponenten generell geeigneter als Acetonitril. Je hydrophober die Phase, um so gravierender fällt diese Differenz aus, vgl. dazu z.B. in Abb. 6.1.36 die hydrophoben Phasen Zorbax Extend, XTerra MS und Chromolith Performance mit den polaren „embedded phases“ Symmetry Shield, Zorbax Bonus und Nucleosil Nautilus.

Organische Basen wie tricyclische Antidepressiva (Abb. 6.1. 37, links) und deren Metabolite (Abb. 6.1.37, rechts) sind in Acetonitril selektiver zu trennen; Stark polare Metabolite zeigen dagegen (Abb. 6.1.37, Mitte) in Methanol die bessere Selektivität.

In Abb. 6.1.38 bis Abb. 6.1.41 sind Trennfaktoren bei diversen Trennungen im Sauren und im Alkalischen aufgeführt.

Kommentare

Die Selektivität für die Trennung 3-/4-Nitroanilin ist im Sauren besser. In der Regel fällt der Unterschied bei polaren Phasen geringer aus als bei hydrophoben (Abb. 6.1.38).

Die Selektivität für Analyte, die relativ große Polaritätsunterschiede aufweisen, ist im Sauren häufig besser. Polare Analyte dagegen lassen sich in der Regel im Alkalischen selektiver trennen. Je hydrophober die Phase ist, um so ausgeprägter ist die Differenz der Selektivitäten zu Gunsten des sauren Puffers. Je polarer die Phase ist, um so geringer fällt die Differenz aus, siehe Nucleosil Nautilus und Platinum EPS in Abb. 6.1.39. Beim stark polaren HyPURITY Advance schließlich ist die Selektivität im Alkalischen besser.

Mit Methanol als organischem Lösungsmittel ist zwar die Selektivität im Alkalischen besser, die Differenz jedoch ist gering, bei polaren Phasen besonders gering, siehe Abb. 6.1.40.

Bei der Trennung von 3-/4-Nitroanilin werden die kleinsten Trennfaktoren – bis auf sehr polaren Phasen – im Sauren beobachtet.

Empfehlungen:

- In Methanol wird im Vergleich zu Acetonitril (Eluenten gleicher Elutionskraft!) im allgemeinen eine bessere Selektivität bei allerdings erhöhter Analysendauer und schlechterer Peaksymmetrie festgestellt. Die schlechte Peakform – was etwas vereinfacht mit langsamer Kinetik gleich zu setzen ist – ist zunächst das Ergebnis der höheren Viskosität von Methanol. Bei ionischen Substanzen kommt speziell die Begünstigung von ionischen Wechselwirkungen hinzu, was schließlich auch eine Verlangsamung der Kinetik bei der Desorption des Analyten von der Phasenoberfläche bedeutet.
- Für ungepufferte Eluenten gilt: Je ausgeprägter der polare Charakter einer Phase ist, um so eher nimmt die Selektivität in Methanol ab, um so günstiger wird sie in Acetonitril. D.h. der Selektivitätsunterschied in Methanol / Acetonitril nimmt ab. Apolare, hydrophobe Phasen (Luna 2, Hypersil BDS usw.) sollten besser mit methanolischen Eluenten betrieben werden. Für polare Phasen (Nicht-endcappte, „embedded phases“) scheint Acetonitril vorteilhafter zu sein. Diese Feststellung untermauert folgende These: Maximale Selektivität kann in ungepufferten Eluenten dann erreicht werden, wenn zwischen Analyt und Phase maximale Differenz in der Polarität herrscht: So sind beispielsweise für ein hydrophobes Analytpaar polare Phasen selektiv (z.B. Chrysen / Perylen und Supelcosil ABZ PLUS), für ein „polares“ Analytpaar dagegen sind hydrophobe Phasen selektiv (z.B. 3-/4- Nitroanilin und Luna 2). Das bedeutet folgendes: Wenn man sich schon für eine polare Phase entscheidet, sollte man sich auch für Acetonitril entscheiden, weil dort polare Eigenschaften unterdrückt werden, Acetonitril macht polare Phasen „apolarer“. Das RP-Modell bezieht sich lediglich auf die Wechselwirkungen. Stark vereinfacht bedeutet es wie folgt: RP- (apolare) Wechselwirkungen sind für die Retention, ionische Wechselwirkungen – und sterische Effekte – für die Selektivität verantwortlich (sekundäre Effekte).
- Acetonitril sorgt bei hydrophoben Phasen für eine stärkere Retention (Zunahme des Retentionsfaktors), Methanol für eine bessere Selektivität (Zunahme des Trennfaktors). Methanol sorgt bei polaren Phasen für einen erhöhten Retentionsfaktor, Acetonitril für einen erhöhten Trennfaktor: Man verwende somit Acetonitril bei polaren Phasen (wenn die Selektivität ausreichend ist!) und Methanol bei apolaren Phasen.
- Es gilt, „Ähnliches“ mit „Ähnlichem“ für die Retention. Es gilt, „Ähnliches“ mit „Gegensätzlichem“ für eine gute Selektivität in ungepufferten Eluenten, jedoch „Ähnliches“ mit „Ähnlichem“ für eine gute Selektivität in gepufferten Eluenten. Das bedeutet folgendes:
Man verwende polare Phasen in ungepufferten Eluenten für apolare Analytpaare und in gepufferten Eluenten für ionische Analytpaare.
Man verwende apolare Phasen in ungepufferten Eluenten für polare Analytpaare bzw. für ein polares/apolares Analytpaar und in gepufferten Eluenten für apolare Analytpaare – wenn für letztgenannten Fall die Selektivität ausreichend ist.

- Es gilt auch: Hervorragende Selektivität wird – besonders in ungepufferten Systemen – häufig mit mangelnder Robustheit „bezahlt“.
- Je Methanol- bzw. Acetonitril-haltiger der Eluent ist, um so eher dominieren bezüglich Selektivität polare Wechselwirkungen, um so „besser“ sind polare Phasen.
- Methanol ist besonders selektiv für Säuren und starke Basen sowie polare Metabolite, Acetonitril für organische (schwache) Basen.
- Stark basische Substanzen zeigen im sauren Acetonitril/Puffer bei geringer Selektivität eine bessere Peakform, im sauren Methanol/Puffer zwar eine schlechte Peakform aber eine bessere Selektivität.
- Mit Methanol als Eluenten sind im Alkalischen hydrophobe Phasen selektiver, polare Phasen sind dagegen im Sauren selektiver.

6. 2 Zur Säulenauswahl

Entscheidungskriterien und deren Gewichtung

Für eine erfolgreiche Säulenauswahl könnte man folgende vier Fragen zur Grundlage nehmen. In den Klammern werden die dazugehörigen Kenngrößen/Merkmale angegeben.

- Ist bei *diesen* Bedingungen Selektivität überhaupt gegeben? (Trennfaktor $\alpha > 1$?)
- Ist auch die Retentionszeit akzeptabel? (Retentionsfaktoren für die interessierenden Peaks bei isokratischen Trennungen ca. $k \approx 2-8$, bei Gradiententrennungen kann die Retentionszeit weitgehendst über das Gradientenvolumen gesteuert werden)
- Wie ist die Peaksymmetrie? (Bodenzahl, Asymmetriefaktor, Metallionenkontamination)
- Ist die Säule Routine-tauglich? (normierter/absoluter Druckabfall, zeitabhängige Veränderung von chromatographischen Kenngrößen wie Retentions- und Trennfaktor, Bodenzahl)

Zur Beantwortung der zwei letzten Kriterien mit statistischer Signifikanz ist ein beträchtliches Zahlenmaterial notwendig. Ein solches stand im Rahmen dieser Studie nur bedingt zur Verfügung. Somit wird hier auf die Aussagen in Kapitel. 3 verwiesen.

Nachfolgend wird an einigen Beispielen die Relevanz der Asymmetriefaktoren und der Bodenzahlen für eine Trennung vorgestellt und diskutiert.

In Abb. 6.2.1 und 6.2.2 sind Asymmetriefaktoren, in Abb. 6.2.3 Asymmetrie-zusammen mit Retentions- und Trennfaktoren aufgetragen.

Kommentare

Der Asymmetriefaktor wird auch für nicht-ionisierbare Analyte vom pH-Wert beeinflusst, s Abb. 6.2.1. Legt man großen Wert auf eine gute Symmetrie so kann die Peakform auch von nicht-ionisierbaren Analyten über den pH-Wert stark verbessert werden.

Eine starke Wechselwirkung (z.B. Uracil an polaren Phasen) oder eine sterisch anspruchsvolle Struktur (z.B. Perylen an Jupiter und Nucleosil 50) „bescheren“ den betreffenden Analyten ein Tailing oder ein Fronting (Abb. 6.2.2). Dieses „besondere“ Merkmal einer Phase führt jedoch nicht immer zu einem besseren Trennfaktor (Abb. 6.2.3). So werden an mehreren Phasen gute Selektivitäten bei gleichzeitig guten Symmetrien festgestellt, siehe Abb. 6.2.4, 6.2.7, und 6.2.10.

An drei Beispielen wird nun die Korrelation von Asymmetriefaktoren, von normierten Bodenzahlen und von normierten Drücken zu den Trennfaktoren demonstriert (Abb. 6.2.5 bis Abb. 6.2.11).

Kommentare

Wie erwartet, besteht kein Zusammenhang zwischen einer „guten“ (normierten) Bodenzahl und dem Trennfaktor, siehe Abb. 6.2.5, 6.2.8 und 6.2.11. Selbstverständlich ist eine bestimmte Säule einer anderen mit ähnlichem Trennfaktor aber geringeren Bodenzahl vorzuziehen, vgl. Jupiter und YMC Pro in Abb. 6.2.11.

Das gilt auch für vergleichbaren Trennfaktor aber geringeren (normierten) Druckabfall, siehe Abb. 6.2.6 und 6.2.9.

In Abb. 6.2.12 bis Abb. 6.2.21 sind Asymmetriefaktoren von basischen Komponenten sowie Korrelationen zwischen Asymmetriefaktoren und Retentions-/Trennfaktoren zu sehen.

Kommentare

Pyridin, eine „milde“ Base (tertiäres Amin) ist als Indikator für acide Silanolgruppen auf der Phasenoberfläche weniger gut geeignet: Nur wenige Phasen zeigen eine unbefriedigende Symmetrie. Benzylamin, das über einen weiten pH-Wert-Bereich protoniert vorliegt, scheint für diese Fragestellung geeigneter zu sein, siehe Abb. 6.2.12 und Abb. 6.2.13. Nur gut abgedeckte Phasen zeigen für beide Amine vergleichbare Asymmetriefaktoren. Die Differenz der zwei Balken in Abb. 6.2.12 und Abb. 6.2.13 könnte als qualitatives Maß für Silanophilie angesehen werden.

Im Alkalischen ist die Peaksymmetrie von Basen (wenn nicht gerade in der Nähe des pK_s -Wertes gemessen wird) besser.

Ähnlich gelagert sind die Verhältnisse bei Phenol und Benzylamin, s. Abb. 6.2.14: Während Phenol an nahezu allen Phasen eine zufriedenstellende Symmetrie zeigt, fällt die geringe Peaksymmetrie von Benzylamin an polaren Phasen auf.

Nur an Resolve und Spherisorb ODS 1 (bei Hypercarb liegt ein anderer als der übliche RP-Mechanismus vor) zeigt im Alkalischen das „milde“ Anilin eine unzureichende Peaksymmetrie. Der Asymmetriefaktor an den übrigen Phasen beträgt ca. 1, siehe Abb. 6.2.15. Ein erhöhter Asymmetriefaktor bei Coffein (Wasserstoffbrückenbindung) ist als Hinweis für eine hohe Gesamt-Silanolgruppenkonzentration der betreffenden Phase zu deuten.

Eine erhöhte Silanophilie (Kriterium: Asymmetriefaktor von Benzylamin) ist nicht unbedingt gleichbedeutend mit einem insgesamt erhöhten polaren Charakter der Phase (Kriterium: geringer Retentionsfaktor von Toluol). Das ist sicherlich häufig der Fall, siehe Novapak und Nucleosil Protect 1 in Abb. 6.2.16, eine generelle Korrelation jedoch lässt sich nicht ableiten.

In Abb. 6.2.17 sind die Asymmetriefaktoren von Benzylamin und die Trennfaktoren bei der Trennung Phthal-/Terephthalsäure aufgetragen.

Kommentar

An den Phasen LiChrospher Select B bis Supelcosil ABZ PLUS wird Benzylamin irreversibel sorbiert, deswegen fehlen die Werte für die Asymmetriefaktoren. Von LiChrospher Select B bis etwa LiChrospher befinden sich Phasen, die offensichtlich mit den dissoziiert vorliegenden Analyten selektiv wechselwirken können. Als Ergebnis werden gute Trennfaktoren erhalten. Von Zorbax ODS bis Supelcosil ABZ PLUS befinden sich Phasen, die zwar Benzylamin irreversibel sorbieren, deren gesamtionische Charakter allerdings wohl nicht sehr ausgeprägt ist. Optimal, d.h. geeignet für die Trennung von Basen **und** mittelstarken Säuren sind natürlich Phasen, die bei einer guten Peaksymmetrie von Benzylamin auch einen guten Trennfaktor für Phthal/Tere zeigen. Das sind die Phasen von Reprosil bis Prodigy.

In Abb. 6.2.18 sind die Trennfaktoren Phenol/Pyridin („apolare/polare“ Selektivität) und der Retentionsfaktor von Toluol (Hydrophobie) aufgetragen.

Kommentar

Je besser abgedeckt die Oberfläche ist, um so früher eluiert Pyridin, um so größer ist der Trennfaktor. Phasen wie Discovery C₁₈, HyPURITY, Hypersil BDS und Jupiter zeigen bei einer geringen Hydrophobie eine gute „apolare/polare“ Selektivität. Ihre Phasenoberfläche ist offensichtlich gut abgedeckt. Übrigens, das sind just die Phasen mit den größten Porendurchmessern. Phasen, wie Luna, Symmetry, Reprosil und von ProntoSil bis Nucleosil HD muß man als hochbelegte, hydrophobe Phasen mit einer gut abgedeckten Oberfläche einordnen. Dagegen haben ebenfalls hochbelegte Phasen wie SMT, Nucleosil 50, LiChrospher, Zorbax ODS und Ultrasep ES zwar einen hydrophoben Charakter, verhalten sich jedoch gegenüber Pyridin nicht „inert“. Superspher Select B und Superspher zeigen eine ähnliche Affinität gegenüber Pyridin, Superspher ist jedoch wesentlich hydrophober. Purospher ist ähnlich hydrophob wie Symmetry, weist allerdings noch einen polaren Charakter auf.

Wie bereits weiter oben ausgeführt, geht eine starke Wechselwirkung der Phasenoberfläche mit Benzylamin nicht unbedingt mit einer gleichzeitig guten polaren Selektivität einher, s. Abb. 6.2.19.

Metallionen-haltige Phasen zeigen auch nicht unbedingt eine gute polare Selektivität, s. Abb. 6.2.20.

Die Ursache für einen großen Asymmetriefaktor bei Benzylamin liegt nicht immer in einem ausgeübten $-I$ -Effekt von evt. vorhandenen Metallionen auf die freien Silanolgruppen. So handelt es sich bei SMT, Nucleosil Protect 1, Symmetry und Jupiter offenkundig um Metallionen-armen Phasen, an denen allerdings Benzylamin mit einem großen Asymmetriefaktor eluiert. Phasen von Purospher bis Prodigy sind Metallionen-arme Phasen, die eine geringe Silanolgruppenaktivität zeigen.

In Abb. 6.2.22 bis Abb. 6.2.30 sind die Trennfaktoren von je zwei unterschiedliche Analytpaare aufgetragen.

Kommentare

Hydrophobe Phasen zeigen erwartungsgemäß eine geringe Selektivität für die Trennung von basischen Komponenten und vice versa, s. Abb. 6.2.22.

Phasen mit einem polaren Charakter (z.B. kurze Alkylkette, Silanol- und weitere polare Gruppen an der Phasenoberfläche oder in der Alkylkette) zeigen eine gute Selektivität bei der Trennung von mittelstarken, aromatischen Säuren, s. Abb. 6.2.23.

Liegen dagegen schwache Säuren - wie z.B. Hydroxybenzoesäuren – weitgehend undissoziiert vor, dann herrschen wie bei der Trennung Ethylbenzol/Toluol „ideale“ RP-Bedingungen. Die Trennfaktoren nahezu aller Phasen sind recht ähnlich. Wenn man von den „embedded phases“, - die eine starke Wechselwirkung mit Phenol eingehen - im oberen Drittel absieht, so könnte man die Säulen, anhand der Selektivität grob in drei Blöcke einteilen:

- Von Discovery C₁₈ bis etwa YMC AQ handelt es sich um hydrophobe Phasen
- Von Nucleosil AB bis etwa SMT handelt es sich um Phasen mit einem hydrophoben und einem polaren Charakter
- Ab ca. Bondapak bis Discovery Amid C₁₆ überwiegt der polare Charakter

Ein kleiner Trennfaktor Benzylamin/Pyridin ist als indirekter Beweis für eine geringe Wechselwirkung der Phasenoberfläche gegenüber Benzylamin zu deuten. Interessanterweise zeigen sowohl einige hydrophobe Phasen wie Reprosil, Prontosil und SMT als auch manche polare Phase wie Superspher, Nucleosil Protect 1 und Supelcosil ABZ PLUS einen guten Trennfaktor. Die hydrophil endcappte Version der zwei erst genannten Phasen reiht sich in die Gruppe der hydrophoben Phasen.

Das Ranking der Phasen bleibt erhalten, unabhängig davon, ob die Trennfaktoren im Neutralen oder im Alkalischen verglichen werden, s. Abb. 6.2.25a.

Der polare Charakter der Phasen manifestiert sich auch in einen großen Trennfaktor Pyridin/Anilin, s. Abb. 6.2.26

In Abb 6.2.27 ist der polare Charakter der Phasen durch einen großen Trennfaktor Phenol/Toluol sehr schön ersichtlich: Polare Phasen können mit dem polaren Phenol, nicht aber mit dem apolaren Toluol eine starke Wechselwirkung eingehen. So zeigen die immer wieder als stark polar „entlarvten“ Phasen Fluofix IEW/INW, Platinum EPS, Spherisorb ODS 1 sowie die zwei Select B-Materialien große Trennfaktoren. Der polare Block erstreckt sich von Fluofix IEW bis etwa Bondapak, s. Abb. 6.2.27a.

Für die Trennung von mittelstarken, aromatischen Säuren eignen sich polare, für die Trennung von schwachen, undissoziiert vorliegenden, aromatischen Säuren hydrophobe Phasen, siehe Abb. 6.2.28. Im letzteren Fall werden geringe Selektivitätsunterschiede zwischen den Phasen festgestellt.

Ist bei organischen Basen auf Grund des Ionisierungszustandes oder/und der Molekülgröße der hydrophobe Charakter ebenso ausgeprägt, so werden auch in diesem Fall – ähnlich wie bei den schwachen Säuren – geringe Selektivitätsunterschiede festgestellt. In Abb. 6.2.29 werden die Trennfaktoren von Antidepressiva und deren Metabolite dargestellt. Nur bei ausgesprochen polaren Phasen wie Spherisorb ODS 1 bis Nucleosil Protect 1 wird ein geringer Trennfaktor bei den Antidepressiva festgestellt. An polaren Phasen beobachtet man eine merkliche Differenz in den Trennfaktoren zwischen Antidepressiva und den Metaboliten – zu Gunsten der polaren Phasen.

Es sei noch einmal wiederholt: Bei einem dominanten hydrophoben Charakter der Analyte werden geringe Selektivitätsunterschiede festgestellt. Wird dagegen ein stark polarer Metabolit wie Desmethyldoxepin chromatographiert, so ergeben sich in diesem Fall doch merkliche Unterschiede in dem Selektivitätsverhalten der Phasen, s. Abb. 6.2.30. Je größer die Differenz im polaren Charakter der zwei zu trennenden Analyte ist, um so vorteilhafter erweisen sich hydrophobe Phasen.

Halten wir fest:

Die Analyten können entweder durch den pH-Wert des Eluenten (z.B. Hydroxybenzoesäuren) „apolar“ gemacht werden oder sie sind es einfach durch einen organischen Rest (z.B. tricyclische Antidepressiva).

In den Abb. 6.2.31 bis Abb. 6.2.37 wird die Korrelation zwischen den Retentions- und den Trennfaktoren für eine Reihe von Trennungen dargestellt.

Kommentar

Wie erwartet, besteht keine eindeutige Korrelation zwischen den Retentions- und den Trennfaktoren: Eine starke Wechselwirkung führt nicht per se zu einer guten Selektivität. Auch bei „einfachen“, typischen RP-Trennungen sind die dominanten Faktoren für Retention und Selektivität nicht stets deckungsgleich.

Ionische Wechselwirkungen sind eine wichtige Ursache für eine große Selektivitätsbandbreite. Das soll an zwei Beispielen demonstriert werden, s. Abb. 6.2.34 und Abb. 6.2.35. Bei den zwei Plots wurde für einen besseren Vergleich die gleiche Skalierung gewählt. Bei der Trennung von ionisch vorliegenden Analyten, wird bei einer geringen Bandbreite der Retentionsfaktoren eine entsprechend große der Trennfaktoren beobachtet, s. Abb. 6.2.34. Polare Wechselwirkungen, die kaum zur Retention beitragen, bestimmen die Selektivität. Umgekehrt wird bei neutralen oder

durch den pH-Wert des Eluenten neutralisierten Analyten eine geringe Selektivitätsbandbreite bei einer entsprechend großen der Retentionsfaktoren festgestellt; Hydrophobe Wechselwirkungen, die zu einer starken Retention beitragen, führen nicht zu einer besseren Selektivität, s. Abb. 6.2.35.

Die Konsequenz lautet:

Wird bei Trennungen, wie in Abb. 6.2.35 beschrieben, mit einer bestimmten Säule nicht die gewünschte Selektivität erzielt, so erscheint als erfolgsversprechender, nächster Schritt der Wechsel des Eluenten. Umgekehrt kann nach einem misslungenen Trennversuch von ionisiert vorliegenden Analyten der Wechsel zu einem anderen Phasentyp – nach zuerst erfolgten Versuchen bei einem anderen pH-Wert – die erhoffte Selektivitätsverbesserung mit sich bringen.

Das am Anfang des Kapitels 6.2 erwähnte zweite Kriterium (akzeptable Retentionzeit) zur Säulenauswahl darf als sekundär angesehen werden: Es ist in der Regel einfach, z.B. über die Elutionskraft des Eluenten oder die Temperatur für „vernünftige“ Wechselwirkungen zu sorgen. In den meisten Fällen ist die Frage, ob nämlich eine gegebene Säule für ein bestimmtes Trennproblem die gewünschte Selektivität zeigt, bei der Säulenauswahl die ausschlaggebende.

6.2.1 Für welche Substanzklassen eignen sich polare RP-Phasen? (siehe auch Kap. 5)

Der polare Charakter von C₁₈-Alkylphasen nimmt in folgender Reihenfolge ab:

- Polare Gruppierungen an der Oberfläche, z.B. Supelcosil ABZ PLUS, Platinum EPS
- Hohe Gesamt-Silanolgruppenkonzentration. Z.B. Resolve, Spherisorb ODS1
- “embedded phases” (C₁₈ bis C₃)
- Endcappte, dennoch silanophile, Metallionen-haltige Phasen, z.B. Bondapak
- AQ-Phasen

Das ist nur eine grobe Einteilung von C₁₈ Phasen. So ist eine C₈-Phase wie z.B. Zorbax C₈ bis auf zwei-drei (applikationsabhängige) Ausnahmen selbstverständlich polarer als C₁₈-Phasen.

Des Weiteren führen Kombinationen wie eine kurze Alkylkette, eine dort eingebaute polare (Ether-) Gruppe, eine polare Endgruppe der Alkylkette und noch ein hydrophiles Endcapping dazu, dass SynergiPOLAR RP in die Nähe einer CN- oder gar Kieselgelsäule rückt. Auf der anderen Seite haben wir mit SMT oder Hypercarb eine nahezu absolut hydrophobe Oberfläche. Kommerzielle „RP“-Säulen weisen heute eine beträchtliche Bandbreite bezüglich ihres polaren/hydrophoben Charakters auf – zum Vor- und gleichzeitigem Nachteil der Anwender.

Eignung polarer Phasen:

1. Ungepufferte Eluenten

- Hydrophobe, unsubstituierte „große“ Aromaten
- Planare / nicht planare Aromaten
- Isomere (Stellungs-, Doppelbindungsisomere)

2. Gepufferte Eluenten

- Basische Substanzen; die gute Selektivität rückt jedoch durch die häufig schlechte Peakform in den Hintergrund
- Mittelstarke (dissoziiert vorliegende) Säuren
- Stark polare Metabolite

6.2.2 Für welche Substanzklassen eignen sich hydrophobe RP-Phasen?

1. Ungepufferte Eluenten

- polare bis apolare, kleine, neutrale organische Moleküle (Aldehyde, Hydroxybenzoate, einkernige Aromaten)
- Analyte unterschiedlicher Polarität; die Differenz im polaren Charakter kann hervorgerufen sein, sowohl durch eine Gruppe (C = O, CH₂ usw.) als auch durch Isomerie.

2. Gepufferte Eluenten

- schwache Säuren (undissoziiert vorliegend)
- organische Basen (Chr. 6.2.1. und Chr. 6.2.2.)

Es haben sich folgende Gesetzmäßigkeiten herauskristallisiert, die selbstverständlich für weitere Substanzklassen verifiziert werden sollten. Diese Gesetzmäßigkeiten beziehen sich ausschließlich auf die Selektivität, nicht auf die Peaksymmetrie.

Analytpaar	Unterschied im Charakter von stationärer Phase und Analyt(en)	Eluent	Phasentyp	Beispiele von Substanzklassen
polar/polar (evtl. ionisch)	gering	saurer (evtl. alkalischer) Puffer	polar	Starke Basen mittelstarke Säuren (hoher Ionisierungsgrad) polare Metabolite polare, isomere Aromaten
apolar/apolar	gering	saurer Puffer	apolar	schwache Säuren, organische Basen,

				schwach polare, isomere Aromaten
polar/polar	merklich	neutral (kein Puffer)	apolar	Polare, organische einkernige Aromaten, polare Isomere
apolar/apolar	merklich	neutral (kein Puffer)	Polar	Planare/verdrillte Strukturen, Differenz in der Aromatizität, Steroide
apolar/polar	gering	neutral (kein Puffer)	apolar	Aromaten mit unterschiedlichen Substituenten, Ketone

Folgende Regeln könnten aufgestellt werden:

Apolare Analytpaare können im ungepufferten Eluenten an polaren Phasen gut getrennt werden. Je kleiner die Retentionsfaktoren der Analyte sind (das bedeutet, die Analyte werden polarer), z.B. von Triphenylen über Ethylbenzol bis hin zu den Hydroxybenzoaten, um so eher werden apolare Phasen benötigt. Polare Analytpaare können dann in ungepufferten Eluenten an apolaren Phasen gut getrennt werden. Das gilt auch für solche, die durch Isomerie oder durch einen Substituenten eine Differenz in ihrem polaren Charakter aufweisen, z.B.: OH bzw. H vs. CH₃ oder CH₂ vs. C=O.

Polare Analyte werden in gepufferten Eluenten an polaren, apolare Analyte an apolaren Phasen gut getrennt. Für eine gute Selektivität wird im ungepufferten Eluenten Gegensätzlichkeit, in gepufferten Eluenten Gleichheit zwischen Analyt und Phase benötigt.

6.2.3 Die selektivsten Phasen für ausgesuchte Analytpaare

Die selektivsten Säulen für mehrere Analytpaare und unter unterschiedlichen Bedingungen werden in Abb. 6.2.38 und Abb. 6.2.39 dargestellt. Beachten Sie bitte bei den einzelnen Rankings auch die absoluten Werte für die Trennfaktoren. So sollte bei besonders kleinen Differenzen in den Trennfaktoren (z.B. EB/T) das Ranking der Säulen nicht überbewertet werden.

6.2.4 Korrelation zwischen Log P und Retentions- und Trennfaktoren

Seit ca. 30 Jahren beschäftigt man sich mit der Frage, ob zwischen Substanzeigenschaften und ihrem chromatographischen Verhalten Korrelationen hergestellt werden können. Mancher Ansatz findet sich in Optimierungsprogrammen

wieder. Das Ziel dabei ist, anhand von bestimmten Substanzeigenschaften eine Vorhersage bezüglich chromatographischen Verhaltens (k , α -Wert) der betreffenden Substanz an einer Phase treffen zu können. Eine systematische Literaturrecherche des Autors führte zu folgender – sicherlich sehr persönlichen - Einschätzung:

Obschon manche Korrelation herzustellen ist, existiert zur Zeit (!) bis auf die Relation $\text{Log } P = f(k)$, (P = Verteilungskoeffizient Oktanol/Wasser) keine weitere allgemeingültige und akzeptierte Abhängigkeit. Einige neuere Ergebnisse von Anfang 2002 [10] allerdings lassen die Hoffnung zu, dass zwischen k -/ α -Wert und Donator/Acceptor-Eigenschaften, sowie Ionenaustauschkapazität und Struktur der Substanz doch eine mathematisch „saubere“ Korrelation hergestellt werden kann - wenn auch vorerst nur für bestimmte Analyten unter bestimmten Bedingungen. Zur Zeit wird daran gearbeitet, diese Annahme zu bestätigen – oder zu widerlegen [11].

Parallel zu diesen aufwendigeren Ansätzen wurde mit Hilfe der Messdaten aus der Studie überprüft, ob zwischen k und den Substanzeigenschaften der verwendeten Analyte eine lineare/quadratische Korrelation besteht. Es wurden alle auf der CD unter „Analyteigenschaften“ aufgeführten Substanzdaten überprüft. Das Ergebnis lautet: Bis auf $\text{Log } P = f(k)$ konnte keine Korrelation mit einem akzeptablen Korrelationskoeffizienten festgestellt werden. Daraufhin wurden für diese Korrelationen von Dr. Werner Krapp Makros erstellt, die auf der mitgelieferten CD zu finden sind.

Es sind folgende:

- Ein Makro für neutrale Komponenten in 60/40 Methanol/Wasser
- Ein Makro für ionische Komponenten in 32/68 Acetonitril/20mmol Phosphatpuffer

Vorgehensweise (Für Details, siehe Hilfetext auf der CD):

Man gibt die $\text{Log } P$ von interessierenden Substanzen ein, es werden die errechneten k - bzw. α -Werte an den einzelnen Säulen in betreffendem Eluenten angezeigt. Auch wenn man nicht exakt die oben angegebenen Eluenten verwendet, mag diese grobe Information im Vorfeld einer Methodenentwicklung hilfreich sein, wenn anhand z.B. der errechneten/erwarteten α -Werte eine Vorauswahl bzw. eine Eingrenzung von in Frage kommenden Säulen getroffen werden kann.

6.2.4 „Universalsäule?“ – abschließende Bemerkungen

Selbstverständlich gibt es *die* „Universalsäule“ nicht – vermutlich auch in der Zukunft nicht. Dennoch wurde überprüft, welche Säulen bei möglichst unterschiedlichen Trennungen gute Selektivitäten zeigen. Es hat sich gezeigt, dass einen breiten Einsatzbereich solche Phasen zeigen, die zwar einen eindeutig hydrophoben Charakter aber auch eine „Spur“ Polarität aufweisen, z.B. Inertsil ODS 2, Kromasil Hypersil BDS, Zorbax Extend, Prodigy und aus der Gruppe der „embedded phases“ Prontosil ACE. Letztendlich wurde die Tabelle „Selektivitätsmatrix“ und die entsprechende Grafik erstellt, s.Tab. 6.2.3 und Abb. 6.2.40. Diese Tabelle/Grafik ermöglicht einen groben Überblick über das Selektivitätsverhalten der Säulen gegenüber 19 ausgesuchten Analytpaaren mit unterschiedlichen Eigenschaften. Die

Säulen sind in 5 Gruppen eingeteilt: „5“ steht für einen großen, „1“ für einen kleinen α -Wert dieser Säule bezogen auf dieses Analytpaar und im Verhältnis zu den übrigen Säulen. Dabei kann eine Säule aus der „1“-Gruppe immer noch eine durchaus ausreichende Selektivität ausweisen! Eine (normierte) große Gesamtsumme zeugt von einer guten Selektivität der betreffenden Säule für möglichst viele, unterschiedliche Analyttypen. Als Universalsäulen – bezüglich Selektivität! – eignen sich offensichtlich solche mit einer gut abgedeckten Oberfläche. Letzteres kann mittels einer Polymerschicht (z.B. SMT, Nucleosil AB, Gromsil CP) oder durch einen relativ hohen Bedeckungsgrad/effektive Bindung erreicht werden, z.B. Symmetry, Luna, Zorbax Extend, Kromasil. Solche Phasen sind lediglich für ausgesprochen polare Analyte, z.B. starke Säuren oder sehr polare Metabolite denkbar ungeeignet. Für letzteren Fall eignen sich polare Phasen, z.B. nicht-endcappede Phasen wie Spherisorb ODS 1, Phasen mit polaren Gruppen an der Oberfläche (z.B. Supelcosil ABZ PLUS) oder „embedded phases“ (z.B. Discovery Amid). Damit wird ersichtlich, welcher Säulentyp abhängig von der analytischen Fragestellung in die enge Wahl kommen sollte.

Welche Eigenschaften sollte nun eine fiktiv-ideale Säule mit einer universalen Selektivität besitzen?

- Einen mittlerer Bedeckungsgrad von ca. $2,5 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ - um eine ausreichende Retention zu gewährleisten
- Polare Gruppierungen enthalten – um auch polare Analyte selektiv „ansprechen“ zu können
- Einen kleinen (z.B. 50\AA bis 80\AA) oder einen großen (z.B. 180\AA bis 300\AA) Porendurchmesser aufweisen – um einem evtl. notwendigen sterischen Aspekt gerecht zu werden.

Bei einer derartig „designten“ Säule wären nahezu alle relevanten Selektivitätsfaktoren bezüglich stationärer Phase berücksichtigt. Die Feinjustierung könnte gegebenenfalls über den Eluenten (z.B. +/- 5% Tetrahydrofuran bei neutralen Komponenten bzw. +/- 0.5 pH-Einheiten bei ionischen Komponenten) oder/und der Temperatur erfolgen.

Man kann heute bei der Säulenwahl auf eine sehr breite Palette von RP-Phasentypen zurückgreifen, s. weiter unten – wobei die noch polareren wie eine Amino-, Nitro-, Phenyl- oder Diolphase hier außer Acht gelassen wurden.

Hinweis:

Die nachfolgend aufgeführten Säulen sind nicht als Empfehlung zu verstehen, sie stellen vielmehr Beispiele für den jeweiligen Phasentyp dar.

Hydrophobe Phasen	z.B. Symmetry, Hypersil BDS, Zorbax Extend usw. (AQUA, Purospher)
Hochbelegte Phasen mit polarer Funktionalität	z.B. LiChrospher, Zorbax ODS (Platinum C ₁₈ , "embedded phases")
Polare Phasen	z.B. SynergiPOLAR RP, Platinum EPS, Spherisorb ODS 1

Man kann sich nun je nach Charakter der Probe für einen Phasentyp entscheiden. Nach einem missglückten ersten Test käme eine Säule aus einer anderen Gruppe in Frage. Die drei genannten Haupttypen stellen natürlich eine Vereinfachung dar, die Übergänge sind fließend.

Beispiele:

- Phasen wie AQUA und Purospher stellen wegen ihrer „gewissen“ Polarität eine Art Zwischenstufe dar
- Ähnlich das niedrig belegte Platinum C₁₈ und die „embedded phases“, die natürlich polarer sind als z.B. Zorbax ODS aber sicherlich „hydrophober“ als z.B. Platinum EPS
- Noch hydrophober als die genannten „hydrophoben“ Phasen ist zweifelsohne Hypercarb, die polymere Phase Supelcogel TRP 1 oder Nucleosil AB mit einer Polymerschicht usw.

Für Anwender, die häufig Methodenentwicklungen durchführen, ist ein Säulenschaltventil eine lohnenswerte Investition. Ein 12-Wege Ventil stellt das „Non Plus Ultra“ dar, manchmal kann jedoch die Übersicht durch die Anzahl der zu testenden Säulen leiden. Das wesentlich günstigere 6-Wege Ventil dürfte in vielen Fällen ausreichend sein. Ein Säulenschaltventil schafft hohe Flexibilität, die zu enormer Zeitersparnis bei der Methodenentwicklung führen kann. Bevor auf seinen Einsatz kurz eingegangen wird, werden nachfolgend in Tab. 6.2.4 beispielhaft vier 6er-Gruppen unterschiedlicher Phasentypen vorgestellt. In der ersten Spalte sind in den Klammern Säulen aufgeführt, die zum gleichen Phasentyp gehören. Bei Bedarf könnten diese alternativ verwendet werden.

Tab. 6. 2. 4 Unterschiedliche RP-Phasentypen I

Luna (Inertsil ODS 3, Kromasil)	Purospher	Spherisorb ODS 2	HyPURITY Advance
SMT (Gromsil CP, Nucleosil HD)	MP-Gel	Platinum C ₁₈	SynergiPOLAR RP
SynergiMAX RP (Zorbax Extend, XTerraMS)	Ultrasep ES	Nucleosil Nautilus	Spherisorb ODS 1
Nucleosil 50 (Nova-Pak)	Zorbax ODS	Symmetry Shield	Supelcosil ABZ PLUS
Jupiter	Reprosil AQ	Zorbax Bonus	Fluofix INW
Discovery C ₁₈ (YMC Pro, Hypersil BDS)	LiChrospher	Prontosil ACE	Platinum EPS
Hydrophobe Phasen plus sterischer Aspekt	"Polare" Phasen aus der Gruppe der Hydrophoben	"Hydrophobe" Phasen aus der Gruppe der Polaren	Polare Phasen

Beispielhafte Vorgehensweise bei der Methodenentwicklung mit Hilfe eines Säulenschaltventils, einer bestimmten Säulenauswahl und ggf. eines Optimierungsprogramms.

Man könnte bei einer völlig unbekanntem Probe 6 verschiedene Phasentypen aus der Tab. 6.2.4 über Nacht mit einem „Universalgradienten“ testen. Hier stehen der Kreativität keine Grenzen entgegen:

So kann beispielsweise die Position „6“ mit einer „exotischen“ Säule wie Hypercarb, C₁ oder C₃₀ bestückt werden. In einem zweiten Test (zweite Nacht!) können dann 5 Phasen getestet werden, die der „besten“ Säule aus dem ersten Experiment ähnlich sind, usw.

Wenn es sich bei der Probe um basische Komponenten handelt, würde man möglicherweise gleich beim ersten Experiment 5 hydrophobe Phasen (und eine polare Phase zur Überprüfung der Selektivität) testen, usw.

Eine weitere Möglichkeit wäre folgende: An vier darauffolgenden Nächten werden je 6 Vertreter von je einem Phasentyp getestet. Da ja diese Tests über Nacht laufen, hält sich der Aufwand in Grenzen, sie laufen quasi parallel zum Tagesgeschehen.

Nachdem nun die „selektivste“ Säule/der „selektivste“ Phasentyp ermittelt wurde, erfolgt jetzt die Feinoptimierung. An diesem Zeitpunkt können Optimierungsprogramme gute Dienste leisten oder aber man geht, wie oben skizziert, klassisch-systematisch vor: Zugabe von Modifiern wie THF, Änderung des pH-Wertes usw.

Hat man nicht die Möglichkeit, 24 unterschiedliche Säulen auf Lager zu halten, so sollte wenigstens von jedem Haupttyp je ein Vertreter vorhanden sein. Auch für ein derartig „abgespecktes“ Säulen-Portfolio seien nachfolgend einige Säulen beispielhaft genannt, s. Tab. 6.2.5

Tab. 6.2.5 Unterschiedliche RP-Phasentypen II

Selektivitätsmerkmal	Beispiele von Säulen	Charakteristik der betreffenden Säule
Sterischer Aspekt	Jupiter Nucleosil 50	Großer Porendurchmesser Kleiner Porendurchmesser
Hydrophobe Oberfläche	Luna Gromsil CP	Klassische Belegung Polysiloxanschicht
Freie Silanolgruppen	Spherisorb ODS 1 Zorbax ODS	Acide Silanolgruppen und geringe Belegung Acide Silanolgruppen und hohe Belegung
Polare Gruppe am Alkylrest („embedded phases“)	HyPURITY Advance Prontosil ACE	„polare“ „embedded phase“ „hydrophobe“ „embedded phase“
Stark polare Oberfläche	SynergiPOLAR RP Platinum EPS	Kurze Alkylkette, eingebaute polare Gruppe, polare Endgruppe, hydrophiles Endcapping Polare Gruppen auf der Oberfläche
Freie Auswahl nach Bedarf	z.B. Hypercarb Fluofix IEW/INW XTerra MS usw.	Sehr hydrophob Sehr polar, Fluoratome Hybridmaterial usw.

Die Zusammenstellung eines „Säulen-Portfolios“ hängt naturgemäß von der konkreten Aufgabenstellung des Labors ab. So kann beispielsweise die Zahl der polaren Phasen in obiger Tabelle zu Gunsten zusätzlicher hydrophober Phasen herabgesetzt werden, usw.

Vorschlag für einen Säulentest

Hintergrund:

Es ist ein Anliegen des Autors, dass diese Arbeit nicht von vornherein als eine abgeschlossene Sache ausgelegt ist, die nach dem Studium „ad acta“ gelegt wird. Jedenfalls sollten die Bezieher der Studie die Möglichkeit bekommen, Säulen, die zukünftig auf den Markt kommen, entsprechend den hier gemachten Erfahrungen zu charakterisieren und ggf. zu den bereits getesteten einzuordnen. Vor diesem Hintergrund wird nachfolgend eine Testprozedur vorgeschlagen, die gleichsam von Anwendern und Säulenherstellern verwendet werden könnte.

Wie bereits erwähnt, sind folgende drei Hauptaspekte für die Selektivität in der RP-Chromatographie relevant:

- Sterik
- Hydrophobe Wechselwirkungen
- Polare Wechselwirkungen
 - $\pi\cdots\pi$ -Wechselwirkungen
 - Ionenaustauschkapazität
 - Wasserstoff-Brückenbindungen

Nach Ansicht des Autors sollte ein Säulentest allen drei Aspekten gerecht werden, hätte er den Anspruch, eine Phase umfassend charakterisieren zu können. Das hängt damit zusammen, dass die Relevanz dieser drei Selektivitätsmerkmale für eine weitgehendst unbekannte Probe nicht von vornherein ausgeschlossen werden kann. Anhand der Erfahrungen aus dieser Arbeit wird nachfolgend eine Testprozedur vorgeschlagen, mit der bei Bedarf eine oder mehrere neue Säule charakterisiert werden können. Werden weiterhin Vertreter der einzelnen Phasentypen, wie in der Studie vorgestellt, quasi als „interne Standards“ mitgetestet, so können die „Neuen“ anschliessend den übrigen 64 Säulen zugeordnet werden. Man könnte sich nun vorstellen, dass bei Bedarf neue Säulen „gesammelt“ werden und 1 bis 2 Mal im Jahr diese Charakterisierung unter standardisierten Bedingungen durchführt. Stehen keinerlei Informationen über die Eigenschaften der neuen Säulen zur Verfügung – was eher die Ausnahme sein dürfte - , dann kämen als „interner Standard“ Säulen unterschiedlichen Phasentyps wie in Tab. 6.2.4 und Tab. 6.2.5 aufgeführt in Frage, die mit dem Ziel der Zuordnung zu den übrigen Säulen mitgetestet werden sollten. Ist jedoch bekannt, dass die neue Säule(n) beispielsweise dem „embedded phase“-Typ angehört, so würde man nur „embedded phases“ mittesten. Oder ist bekannt, dass die neue Säule(n) endcapped ist/sind, so kann z.B. auf Spherisorb ODS 1 als „internen Standard“ verzichtet werden, usw. Der Test ist modular aufgebaut; er kann entsprechend den eigenen Bedürfnissen gekürzt oder ergänzt werden. In der empfohlenen Standardversion werden vier Eluenten verwendet, die Gesamtdauer des Tests inklusive Spülzeiten beträgt ca. 1 ¹/₂ bis 2 Stunden. Mit Hilfe von 5 bis 6 Injektionen werden 8 (Selektivitäts) Kriterien ermittelt. Möchte man die neuen Säulen entsprechend ihren Eigenschaften den Anderen zuordnen – was erst den Aufwand für diesen Test zur Charakterisierung der Säulen eigentlich rechtfertigen würde - , so empfiehlt sich folgendes: Man erstellt für die getesteten Säulen, alt wie neu, die Selektivitätshexagone für die Trennungen aus dem Test. Die anschließende Zuordnung an Hand der erhaltenen Muster dürfte ohne Probleme möglich sein. Die Testprozedur wird in Tab. 6.2.6 zusammengefasst. Die experimentellen Bedingungen für die Tests sind der „Einführung“ zu entnehmen. Die Temperatur für alle Tests betrug 40 °C, die Trennung von Chryden/Perylen 35 °C. Vermutlich kann aber auch dieser Test bei 40 C durchgeführt werden. Die angegebenen Retentionszeiten sind die maximal angenommenen. Das sind die größten Werte, die in der Studie gemessen wurden. Ein „}“ bedeutet, dass die betreffenden Analyte zusammen injiziert werden können.

Eluent	Test-Substanzen	Maximal erwarteter Zeitaufwand (Retentionszeit in Min.)	Erkenntnis	Aussage	Eignung der Säule für... ?	
MeOH/H ₂ O (80/20, v/v)	2,2´Bipyridyl	5	Metallionen-kontaminati-on?	Neigung zur Komplex-bildung	Komplex-bildende Substanzen	
	Ethylbenzol/ Fluorenon	12	Hydrophober Charakter?	Hydrophobe Selektivität	Analyte unterschiedlicher Polarität	
	Triphenylen/ o-Terphenyl		Polarer Charakter, sterischer Aspekt?	Sterische Selektivität	Planare/ nicht planare Moleküle	
MeOH/H ₂ O (40/60, v/v)	Phenol/Pyri-din/Benzyl-amin	10	Acide Silanolgrup-pen vorhanden?	Ionenaus-tauschkapa-zität	Primäre und tertiäre Amine, starke Basen	
	Phenol/Cof-fein	10	Wasserstoff-Brücken-Bindungen möglich?	Gesamt-Silanolgrup-penkonzentration	Polare, nicht-ionische Analyte	
MeOH/20 mmol Phosphatpuffer, pH=2,7 (40/60, v/v)	Phthal-/ Terephthal-säure	6	Polare/ionische Gruppen vorhanden?	Polarer Charakter	Mittelstarke aromatische Säuren	
	ACN/20 mmol Phosphatpuffer, pH=2,7 (32/68, v/v)	Amitriptylin/ Trimipramin Desipramin/ Desmethyl-maprotylin	10	Acide Silanolgrup-pen vorhanden?	Ionenaus-tauschkapa-zität im Sauren	Organische Basen Polare Metaboliten
		Pyridin/ Benzylamin	5	s.o.	s.o.	Primäre und tertiäre Amine, starke Basen

Erläuterungen, Kommentare zum Test

Gemäß den Erkenntnissen aus der Studie könnten aus den Testergebnissen weitere Rückschlüsse gezogen werden. Dazu zwei Beispiele:

- Ein großer Trennfaktor Ethylbenzol/Fluorenon liesse vermuten, dass betroffene Säule schwache Säuren (undissoziiert vorliegend) ebenso selektiv würde trennen können.

- Eine gute Selektivität für Triphenylen/o-Terphenyl wäre ein Hinweis für eine ebenso gute aromatische Selektivität.

Wird andererseits eine neue Säule vor dem Einsatz als erstes sowieso mit Methanol gespült, kann am Ende des Spülvorgangs Chrysen/Perylen injiziert werden – ein Aufwand, der unter Umständen zu vertreten wäre – und zwar dann nämlich, wenn aromatische Selektivität für diese Säule eine wichtige Forderung wäre.

Der Test kann selbstverständlich den eigenen Bedürfnissen angepasst werden. Nachfolgend einige Beispiele:

- Kommen im eigenen „Probenrepertoire“ keine Komplexbildner vor, so kann – obwohl er nur ein Paar Minuten dauert – auf den 2,2'-Bipyridyl-Test verzichtet werden.
- Knüpft man hohe Anforderungen an die „Basentauglichkeit“ der zu testenden Säule, so kann – bei einem vertretbaren Aufwand von ebenfalls ein Paar Minuten – zusätzlich der „Propranolol-Test“ bei gleichen Bedingungen wie der „Phenol/Pyridin/Benzylamin-Test“ durchgeführt werden. Damit wäre die Eignung der Phase für eine große Bandbreite von basischen Substanzen überprüft: Von „kleinen“ primären Aminen bis hin zu „großen“ organischen Basen.
- Möchte man bei einer anstehenden Trennung von stärkeren sauren Komponenten aus bestimmten Gründen mit Acetonitril-haltigen Eluenten arbeiten, so kann die Phthal-/Terephthalsäure-Trennung mit dem sauren Acetonitril/Puffer durchgeführt werden, usw.

Es seien zum Schluß noch einmal einige Empfehlungen wiederholt:

- Für neutrale bzw. über den pH-Wert neutralisierte Moleküle oder für Moleküle, die durch unterschiedliche Substituenten oder Isomerie eine Differenz im polaren Charakter aufweisen, eignen sich hydrophobe Phasen.
- Ebenfalls hydrophobe Phasen eignen sich für die Trennung basischer Komponenten. Hier kann in jedem Falle eine gute Peaksymmetrie erwartet werden, häufig erhält man bei organischen Basen auch eine ausreichende Selektivität. Liegen basische Komponenten im Eluenten protoniert vor und handelt es sich darüber hinaus um „kleine“ Moleküle wie einkernige Amine, so sind polare Phasen selektiver – bei allerdings geringer Peaksymmetrie.
- Liegen die zu trennenden Analyte ionisch vor, sind Phasen, die über polare/ionisierbare Gruppierungen verfügen, besonders selektiv; so kommen z.B. für saure Komponenten mit einem hohen Ionisierungsgrad eher polare Phasen in Frage.
- Es ist ratsam, stets den sterischen Aspekt zu berücksichtigen. Man teste dazu z.B. eine hydrophobe Phase mit einem großen Porendurchmesser (Jupiter, Discovery C₁₈, Hypersil BDS) und auch eine Phase mit hydrophoben oder/und polaren Eigenschaften und einem kleinen Porendurchmesser, z.B. Nucleosil 50, Novapak, Spherisorb ODS 1.

- Sind für die Trennung polare und apolare Wechselwirkungen notwendig (z.B. Komponenten mit aminischen und sauren Gruppen) so kämen Phasen in Frage, die zwar eine ausreichende Hydrophobie aufweisen, aber über polare Gruppen auch zu polaren Wechselwirkungen in der Lage sind, z.B. Spherisorb ODS 2, LiChrospher, Zorbax ODS, AQUA, Purospher e, MP-Gel, Ultrasep ES. Die „Feinjustierung“ für eine bessere Selektivität erfolgt hier am besten über den pH-Wert des Eluenten. Eine ggf. mangelnde Robustheit der Methode müsste bei solchen Systemen in Kauf genommen werden.

7.1 Stichwortverzeichnis

Amine	29
Analyte, verwendete	10
Analytpaare	13
Antidepressiva, tricyclische	76
Aromaten, einkernige	58
Aromaten, hydrophobe, Kapazität	52
Aromaten, Isomere	65
Aromaten, planare/nicht planare Kapazität, Selektivität	55
Aromaten, Selektivität	52, 57
Aromatische Basen	78
Aromatische Säuren (mittelstarke)	80
Aromatische Säuren (schwache)	79
Asymmetrie ff.	22, 105
Biplots	99
Bodenzahl ff.	15
Chemometrische Analyse ff.	97
Dendrogramme	98
Doppelbindungs-, Positionsisomere	73
Druckabfall ff.	20
Elutionsumkehr, Isomere, Aromaten	70
Elutionsumkehr, Steroide	75
Hydrophobe Phasen	84
Hydrophobie, Prüfung auf ff.	38
Hydroxybenzoesäuren	79
Ionenaustauschkapazität	31
Metabolite von tricyclischen Antidepressiva	72
Metallionen-kontamination, Komplexbildung	28
Methylengruppenselektivität	44, 60
Oberfläche, Homogenität der	50
Packungsqualität ff.	15
Phasen, physikalische Eigenschaften	14
Selektivität, hydrophobe	40
Selektivität, sterische	55
Selektivitätshexagone	91
Selektivitätsplots	86, 89

Silanophilie, Prüfung auf ff.	28
Stabilität im Routinebetrieb	24
Steroide	72
„Universal“-Säule	113

7.2 Literatur

- [1] Berechnungen: Werner Krapp, Neustadt
- [2] H. Engelhardt et al.: A Chromatographic Test Procedure For Reversed-Phase HPLC Column Evaluation, LC GC International, December 1997
- [3] David V. McCalley et al. : High-performance liquid chromatography of basic compounds, Problems, possible solutions and tests of reversed-phase columns J. Chromatogr. A 828 (1998) 407-420
- [4] Melvin R. Euerby, Patrik Petersson, : A Classification of Commercially Available RPLC Columns – A Tool for Rational Selection, LC GC Europe, September 2000
- [5] Rosa Berges et al.: Modelling retention in liquid chromatography as a function of solvent composition and pH of the mobile phase J. Chromatogr. A 869 (2000) 27-39
- [6] R.G. Wolcott et al.: Computer simulation for the convenient optimization of isocratic reversed-phase liquid chromatography separation by varying temperature and mobile phase strength J. Chromatogr. A 869 (2000) 3-25
- [7] David V. McCalley : Comparison of the performance of conventional C 18 phases with others of alternative functionality for the analysis of basic compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography J. Chromatogr. A. 844 (1999) 23-38
- [8] Lloyd Snyder in print
- [9] R. LoBrutto, Y. Kazakevich, Retention of Ionizable Components in Reversed-Phase HPLC, in: Stavros Kromidas, “Practical Problem Solving in HPLC”, WILEY-VCH, 2000
- [10] Lloyd Snyder, persönliche Mitteilung
- [11] S. Kromidas, unveröffentlichte Ergebnisse