

manchmal bereits Spurenkonzentrationen relevant, die entweder aus den Pufferzusätzen stammen, oder aus der stationären Phase ausgeschwemmt bzw. mit den Proben eingetragen werden. Durch Zusatz eines starken Komplexbildners wie EDTA zum Eluenten werden diese jedoch maskiert und dadurch Selektivitäten und vor allem Peakformen solcher komplexbildenden Analyte günstig beeinflusst. Als Beispiel wäre der Zusatz von weniger als 0,1 % EDTA bei der Analyse von Isohumulonen zu nennen, den wichtigsten Bitterstoffen in Bier [7].

Chaotrope Additive haben im Wesentlichen die Eigenschaft, Wasserstoffbrückenbindungen aufzubrechen und verändern damit vor allem die Tertiärstruktur von Proteinen, wirken also ähnlich wie Acetonitril oder Methanol denaturierend. Sie sind somit insofern ein Spezialfall, dass sie auf die intramolekularen Wechselwirkungen des Analyten Einfluss nehmen, die direkt im Dreieck in Abb. 3.6 gar nicht berücksichtigt sind. Diese Eigenschaft kann in einigen Trennsystemen gezielt eingesetzt werden, ist aber nur für spezielle Fragestellungen relevant. Informationen dazu müssen der einschlägigen Literatur entnommen werden [8].

3.3.2

Die Rolle der Temperatur in der HPLC

Im vorherigen Abschnitt wurde erörtert, dass die Retention in der Chromatographie den Gesetzmäßigkeiten der Gleichgewichtsthermodynamik folgt. Somit lässt sich die Retentionszeit unter ansonsten unveränderten Bedingungen auch über die Säulentemperatur beeinflussen und die Temperatur kann damit ein Weg zur Selektivitätsoptimierung sein.

Den theoretischen Hintergrund des Erreichens der notwendigen Trennleistung in möglichst kurzer Zeit stellt hingegen die Kinetik der Chromatographie dar. Hier geht es im Wesentlichen um Diffusionsvorgänge, deren Geschwindigkeit ebenfalls eine Funktion der Temperatur ist. Besonders beim Bestreben Chromatographie zu beschleunigen, ist die Temperatur von Belang, denn mit erhöhter Temperatur geht eine schnellere Diffusion einher und diese ist für gute Trennleistung besonders bei hoher Lineargeschwindigkeit ausschlaggebend.

Also stellt die Temperatur eine wichtige Optimierungsvariable dar, deren Einfluss man sich vergegenwärtigen sollte. Die Bedeutung der Temperatur in der HPLC wird leider oft vernachlässigt, andererseits aber auch manchmal überschätzt.

3.3.2.1 Retention und Selektivitätskontrolle per Temperatur – Möglichkeiten und Grenzen

Der Einfluss der Temperatur auf die Retention in der Chromatographie kann grundsätzlich folgendermaßen verstanden werden: Damit Analytmoleküle eine Wechselwirkung mit der stationären Phase eingehen können, müssen sie aus ihrer recht ungeordneten freien Bewegung in der mobilen Phase in einen deutlich besser geordneten Zustand in der stationären Phase übertreten. Soll dieser mit einer sog. Entropieabnahme verbundene Prozess freiwillig ablaufen, schreibt die Thermodynamik vor, dass dabei Wärme frei werden muss. Dies bedingt aber nach

dem Le Chatelier Prinzip, bei einer Erhöhung der Temperatur das Gleichgewicht auf die Seite der mobilen Phase zu drängen, und somit nimmt die Retention dann mit steigender Temperatur ab (Ausnahmen bestätigen auch hier die Regel).

Als ein aussagekräftiges Beispiel für eine temperaturabhängige Trennung wollen wir uns nun den Säulentest nach Neue (auch Waters-Test genannt) [9] etwas genauer betrachten. Dieser Test ist gemäß Autor bei 23 °C durchzuführen. Interessant ist es aber, die Veränderung der zugehörigen Chromatogramme in einem für die HPLC-Praxis durchaus üblichen Temperaturbereich von 20–40 °C zu beobachten. In Abb. 3.9 sind die entsprechenden Trennungen bei 21 °C, 30 °C und 40 °C dargestellt. Neben der generellen Abnahme der Retention mit steigender Temperatur zeigen sich hier deutlich veränderte Selektivitäten. Es fällt auf, dass bei der Temperatur von 30 °C zwei Peaks komplett verschwunden sind. Hier kommt es nämlich zu einer Koelution von Butylparaben (3) und Dipropylphthalat (4) einerseits sowie Acenaphthen (6) und Amitriptylin (7) andererseits. Somit wäre diese Temperatur völlig ungeeignet, würde man die betreffenden Substanzen auf der vorliegenden Säule im gegebenen Eluenten auftrennen müssen. Folglich ändert sich hier also zwischen 21 °C und 40 °C die Elutionsreihenfolge dieser Substanzpaare. Dabei nähert sich mit zunehmender Temperatur weiterhin der Peak des Butylparaben (3) auch deutlich dem von Propranolol (2) an. Insgesamt ist die Trennung bei 40 °C um 5 min (20 %) kürzer und die Peaks sind etwas gleichmäßiger über das Chromatogramm verteilt. Wie können diese Selektivitätsänderungen verstanden werden und wie kann vor allem eine Optimierung der

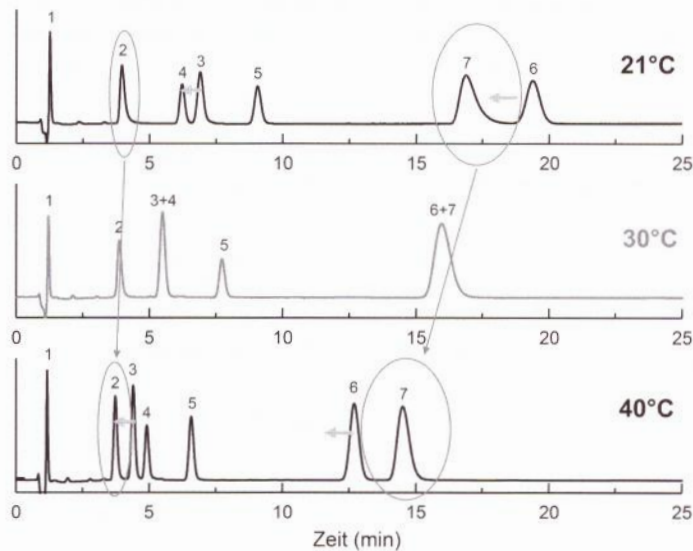


Abb. 3.9 Temperaturabhängigkeit beim Waters-Säulentest (nach Neue). Trennsäule: ProntoSIL C18 ACE EPS, 125 × 4 mm (Bischoff); Eluent: 35/65 v/v; Peaks: 1 Uracil, 2 Propranolol, 3 Butylparaben, 4 Dipropylphthalat, 5 Naphthalin, 6 Acenaphthen, 7 Amitriptylin
Phosphate buffer 20 mM, pH = 7, MeOH

Selektivität über die Temperatur systematisch vorgenommen werden? Um dies näher zu diskutieren, müssen wir einerseits die molekularen Strukturen der Analyten betrachten, andererseits den quantitativen Zusammenhang zwischen Retention und Temperatur. Wir wollen mit dem Letzteren beginnen.

Die Thermodynamik beschreibt die Abhängigkeit des Retentionsfaktors k von der Temperatur (Gl. 3.9), welche die Übertragung der Van't Hoff'schen Reaktionsisobare auf ein chromatographisches Gleichgewicht darstellt. Dabei ist R die allgemeine Gaskonstante, ΔH^0 die Wärmetönung beim Übergang des Analyten von der mobilen in die stationäre Phase, ΔS^0 die entsprechende Übergangsentropie und β das sog. Phasenverhältnis in der Säule. Die Formel mag zunächst etwas abschrecken, sie zeigt jedoch, dass die Auftragung von $\ln k$ gegen $1/T$ einen einfachen linearen Zusammenhang ergibt, der sehr bei der Methodenoptimierung hilft.

$$\ln k = \frac{-\Delta H^0}{R} \cdot 1/T + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \beta \quad (3.9)$$

Die entsprechende Auftragung dieses Van't-Hoff-Plots ist für die Chromatogramme aus Abb. 3.9 (und zusätzlich noch für die nicht gezeigten Messungen bei 25 °C und bei 35 °C) in Abb. 3.10 dargestellt. In dieser Auftragung lassen sich deutlich die unterschiedlichen Steigungen erkennen, die zu den veränderten Selektivitäten führen.

Eine Interpretation des unterschiedlichen Verhaltens lässt sich mithilfe der aus den molekularen Strukturen ableitbaren Retentionsmechanismen vornehmen. Naphthalin (5) und Acenaphthen (6) sind reine Kohlenwasserstoffe und können nur rein

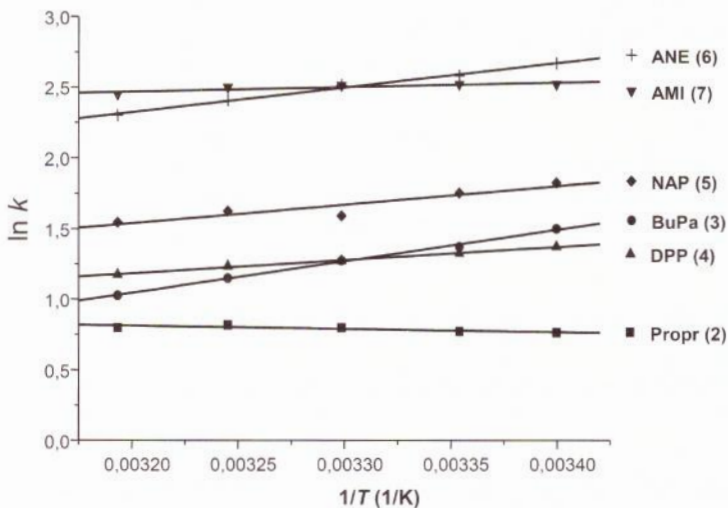


Abb. 3.10 van't-Hoff-Plot zur Darstellung der Temperaturabhängigkeit (21–40 °C) der Retention für die Substanzen des Säulentests nach Neue, chromatographische Bedingungen wie in Abb. 3.9

hydrophobe Wechselwirkung mit der stationären Phase eingehen. Die Wärmetönung ist negativ (exotherm) und damit lässt sich eine positive Steigung der Auftragung erklären, steht doch in Gl. 3.9 ein Minus als Vorzeichen vor ΔH^0 . Bei allen anderen Substanzen wird die Retention aber auch wesentlich über Sekundärwechselwirkungen beeinflusst. Dipropylphthalat (4) ist mit seinen beiden Estergruppen ein potenter Wasserstoffbrückenakzeptor, der mit den undissoziierten Restsilanolgruppen wechselwirken kann. Butylparaben kann mit seiner phenolischen OH-Gruppe auch eine solche Wechselwirkung eingehen, jedoch ist diese Gruppe auch ein sehr potenter Wasserstoffbrückendonator. Hier kommt nun zum Tragen, dass die verwendete stationäre Phase eine in die Alkylkette eingebettete Amidfunktion hat und diese als Akzeptor zu den phenolischen Wasserstoffen des Butylparabens fungieren. Eine sehr schwache Restsilanolaktivität ist weiterhin ein Charakteristikum dieser polar modifizierten und mit Endcapping versehenen Umkehrphase auf Basis eines ultra-reinen Kieselgels. Deshalb wird die Donorwechselwirkung des Parabens mit den Amidgruppen hier dominant zur Retention beitragen und der Retentionsmechanismus unterscheidet sich somit deutlich von dem des Dipropylphthalats. Dies erklärt die unterschiedliche Übergangswärme, die zu verschiedenen Steigungen und letztlich zu einer Umkehrung der Elutionsreihenfolge führt.

Die beiden Substanzen Propranolol (2) und Amitriptylin (7) sind als sekundäre Amine beide starke Basen, die bei pH = 7 weitgehend protoniert vorliegen, während gleichzeitig die (wenngleich gut abgeschirmten) Restsilanolgruppen der stationären Phase weitgehend dissoziiert vorliegen. Somit trägt Kationenaustausch hier als wesentlicher Sekundärmechanismus zur Retention bei. Dies bedeutet aber auch, dass die Temperaturabhängigkeit der oben beschriebenen Protolysegleichgewichte das jeweilige Ausmaß der Retention stark beeinflusst. Die Konsequenz lässt sich deutlich in Abb. 3.10 erkennen. Da eine Zunahme der Temperatur offensichtlich eine Zunahme der ionischen Wechselwirkungen nach sich zieht, ist hier sogar ein schwacher Trend zur Retentionszunahme mit zunehmender Temperatur, also schwach negative Steigung im Plot zu verzeichnen. Dies führt schließlich auch zur Elutionsumkehr zwischen Amitriptylin (7) und Acenaphthen (6). Es sei noch kurz angemerkt, dass dieses Beispiel nicht direkt mit jenem in Abb. 3.8 zu vergleichen ist. Liegt der pH-Wert so, dass eine geringe Änderung zu einer starken Retentionsänderung führt, dann lassen sich Säuren, Basen und Neutralsubstanzen normalerweise sowohl durch pH- als auch Temperaturänderung in eine bestimmte Anordnung im Chromatogramm schieben. Die starken Basen im vorliegenden Beispiel sind bei pH 7 ca. 4 pH-Einheiten vom pK-Wert entfernt nahezu vollständig protoniert und es liegen deutlich andere Verhältnisse vor als im steilen Bereich der Abhängigkeit der Dissoziation vom pH-Wert.

Für die Optimierung der Retention und Selektivität ergeben sich nun folgende Faustregeln:

- Eine Erhöhung der Temperatur um 1 °C erniedrigt den Retentionsfaktor bei normal über RP-Wechselwirkungen retardierten Substanzen um 2–3 %. Daraus errechnet sich eine Abnahme um 22–35 % bei 10 °C Erhöhung und um 50–80 % bei 20 °C.