

## Der HPLC-Tipp im Oktober

### Zusätze in der Probelösung

Dr. Stavros Kromidas, [www.kromidas.de](http://www.kromidas.de)

#### Der Fall

Additiva (Modifier) oder einfache Zusätze wie Salze in der mobilen Phase können die Trennung positiv beeinflussen, ihr Einsatz bewährt sich seit Jahrzehnten. So kann beispielsweise die Peaksymmetrie und dadurch indirekt die Empfindlichkeit durch Verwendung von etwa Di- oder Triethylamin, DEA/TEA, Di-Trifluoressigsäure, DFA/TFA, Ionenpaarreagenzien wie Heptan- oder Oktansulfonsäure erhöht werden. Das Problem dabei: Solche Additiva werden teilweise an der Oberfläche der stationären Phase (irreversibel) adsorbiert, was in der Routine vielleicht ein geringe(re)s Problem darstellt. In der Methodenentwicklung jedoch ist dies störend, weil ja nach jedem Experiment die Säule mühsam durch Spülen wieder in den ursprünglichen Zustand gebracht werden müsste. Das ist nicht gerade umweltfreundlich und es dauert... Was wäre die Alternative?

#### Die Lösung

Statt dem Eluenten können die Zusätze der Probelösung zugesetzt werden. Somit kann man schnell prüfen, ob jenes Modifier zur erhofften Verbesserung führt: Symmetrische Peaks bzw. Verstärkung von hydrophoben Wechselwirkungen im Falle von stark polaren Komponenten. Durch die geringe Konzentration gestaltet sich die anschließende Regenerierung der Säule schnell. Es zeigt sich, dass lediglich die „Manipulation“ der Probelösung als schneller Optimierungsschritt evtl. ausreicht oder aber man erfährt wenigstens, ob dies ein richtiger Weg sein kann. Wenn ja, kann *dieser* Modifier zukünftig der mobilen Phase zugesetzt werden. Nachfolgend finden Sie eine Auflistung von Zusätzen/Modifiern für die Probelösung für bestimmte Fragestellungen in der RP-HPLC inkl. kurzer Kommentierung.

Wann	Was	Kommentar
Verbesserung der Trennung von polaren Komponenten, die recht früh eluieren	Mit Wasser versetzen und mehr injizieren, oder: 100-200 mM NaCl oder KCl oder Puffer zugeben	Probelösung sollte „schwächer“, also polarer als der Eluent bzw. der Anfangsgradient sein; dadurch Anreicherung am Säulenkopf und folglich Verbesserung der Peakform
Stark polare bzw. ionisch vorliegende Komponenten	$\Delta$ pH-Wert	Durch Veränderung des pH-Wertes liegen die Komponenten nun in neutraler Form vor: Verbesserung der Peakform und Verstärkung von apolaren Wechselwirkungen
Stark basische Komponenten	TEA, DEA	Die zugesetzte Base (TEA, DEA) maskiert freie

		Silanolgruppen
Noch stärkere basische Komponenten	Methan-, Heptan-, Oktan, Dodecylsulfonsäure (SDS)	Durch Ionenpaarreagenzien werden starke Basen „maskiert“ und in nun neutraler Form an RP-Oberflächen retardiert
Stark saure Komponenten	Tetrabutylammonium-Hydroxyd oder - Chlorid	Analog oben, nur hier: Starke Säuren
Stark hydrophobe Komponenten	Tetrahydrofuran oder Methyl-t-butyl-Ether (MTBE)	Ein Ether fungiert wie ein „Lösevermittler“ für stark hydrophobe Komponenten, Verbesserung der Peakform
Falls der Eluent ein 0,1%TFA/ACN-Gemisch ist	Phosphorsäure	Verbesserung der Peakform
Unterschiedliche Komponenten (polare + apolare) und ACN als organisches Lösungsmittel	Methanol	Methanol <i>und</i> Acetonitril führen zu einer guten Trennung: Methanol ist „gut“ für polare, ACN „gut“ für apolare Komponenten

### Das Fazit

Einen möglichen Effekt von Zusätzen/Modifiern auf die Trennung kann man schnell ermitteln, indem die Probelösung mit solchen versetzt wird. Bemerkung: Es geht hier um das Herausfinden von Effekten, solche Systeme (Zusätze nur zur Probelösung) sind schwerlich robust und selten Routine-tauglich.