

HILIC - Retention auf Pentafluorphenylphasen am Beispiel von 4-Methylimidazol

4-Methylimidazol entsteht unter anderem bei der Herstellung des verbreiteten Lebensmittelzusatzes „Zuckerulör“ und ist nicht unumstritten.

Analytisch gesehen ist es eine schwierige Substanz, da sie sehr polar ist und deshalb auf klassischen C18-Phasen zu wenig Retention zeigt.

→ In der LCMS besteht dadurch die Gefahr, dass die Substanz im Bereich starker Ionensuppression eluiert und die Signalstärke dadurch verfälscht wird, wenn nicht sogar ganz unterdrückt wird.

Aufgrund der geringen Hydrophobizität von 4-Methylimidazol (4-MEI) sind unpolare Wechselwirkungen nicht gut geeignet als Retentionsmechanismus. Aber es gibt ja noch alternative Selektivitäten, die andere Substanzeigenschaften nutzen.

Schauen wir uns das Molekül einmal genauer an:

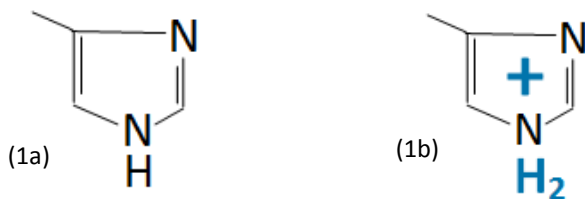


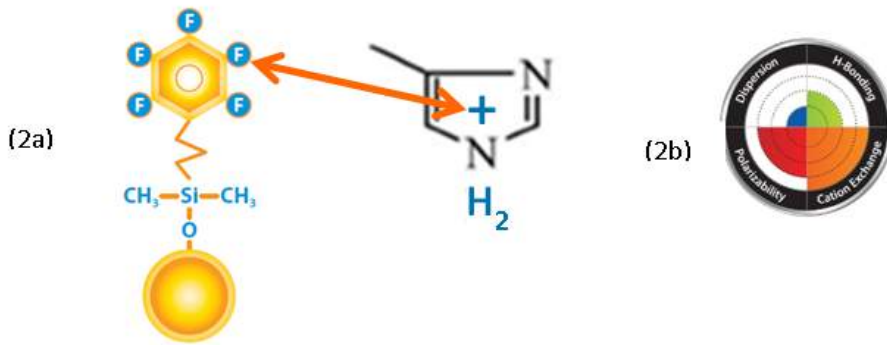
Abbildung 1: Formel von 4-Methylimidazol (4-MEI) im neutralen Zustand (1a) und im protonierten Zustand (1b)

- ✓ Der Log P von 0.23 (Quelle: Toxnet) bestätigt das Ergebnis der RP-Chromatografie, die Substanz ist sehr polar.
- ✓ Die Säurekonstante von ca. 7.5 (Quelle: Toxnet) besagt, dass im pH-Bereich < 5.5 die Substanz zu 100% protoniert vorliegt, während sie im Bereich > 9.5 zu 100% neutral vorliegt.

Na prima, das passt zum Retentionsmechanismus von Pentafluorphenylphasen!

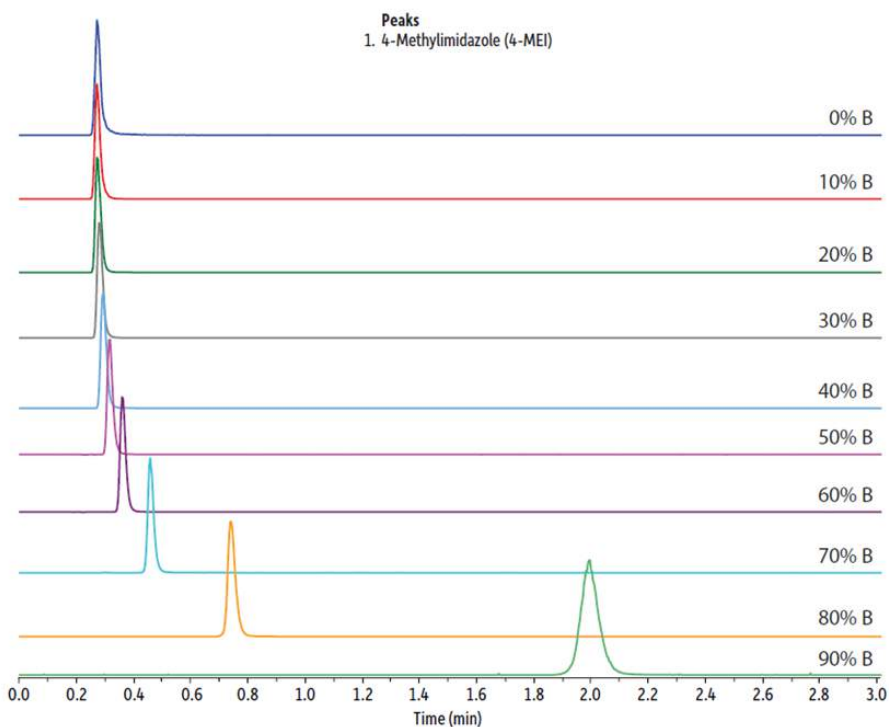
- ✓ Eine positive Ladung am Stickstoff (Elektronenmangel!) ermöglicht elektrostatische und Dipolwechselwirkungen mit der hohen Elektronendichte an den Fluoratomen (Abbildung 2).

Abbildung 2: Restek's Raptor FluoroPhenyl (Pentafluorphenylpropylphase), Struktur (2a) und Wechselwirkungscharakteristik (2b)



- ✓ Diese Wechselwirkungen kommen im HILIC-Modus bei hohem Acetonitrilgehalt deutlich zum Vorschein, so dass man auf diese Art und Weise genügend Retention für 4-MEI erhalten kann. (Im Gegensatz zum RP-Modus bei hohem Wassergehalt, in dem hydrophobe Wechselwirkungen vorherrschen, die aber nicht ausreichen, um die Substanz zu retardieren.)

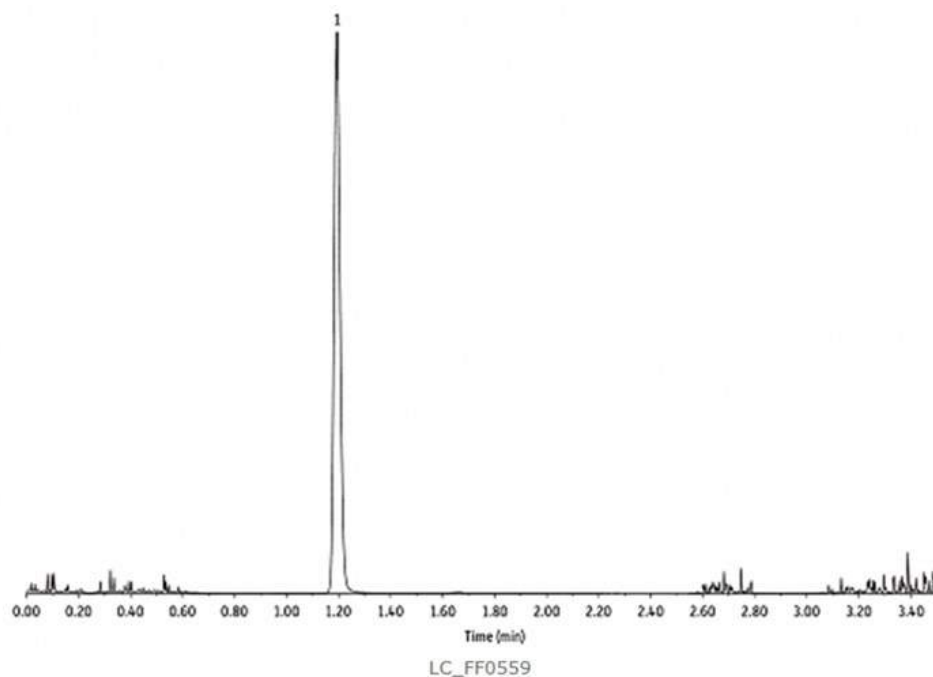
Abbildung 3 zeigt dies sehr anschaulich:



Säule: Raptor FluoroPhenyl 2.7µm 50x2.1mm (Art. Nr. 9319A52)
Temp.: 35 °C
Probe: 4-Methylimidazol in Acetonitril (100 ng/mL)
Inj. Vol.: 5µL
Mobile Phase:
 A: 0.1% Ameisensäure in Wasser
 B: 0.1% Ameisensäure in Acetonitril
Flussrate: 0.6 mL/min
Detektor: MS/MS
Ionisierungsmodus: ESI +
Modus: MRM
LC - Gerät: UHPLC

Abbildung 4 zeigt eine schnelle Gradientenmethode zur Bestimmung von 4-Methylimidazol:

Peaks	t _R (min)	Precursor Ion	Product Ion
1. 1-Methylimidazol (4-MEI)	1.19	83	56



Säule: Raptor FluoroPhenyl 2.7µm 50x2.1mm (Art. Nr. 9319A52)
Temp.: 35 °C
Probe: 4-Methylimidazol in Acetonitril (100 ng/mL)
Mobile Phase:
A: 0.1% Ameisensäure in Wasser
B: 0.1% Ameisensäure in Acetonitril
Flussrate: 0.6 mL/min
Gradient: 0 min 95% B
2 min 30% B
2.01 min 95% B
3.50 min 95% B
Detektor: MS/MS
Ionisierungsmodus: ESI +
Modus: MRM
LC - Gerät: UHPLC

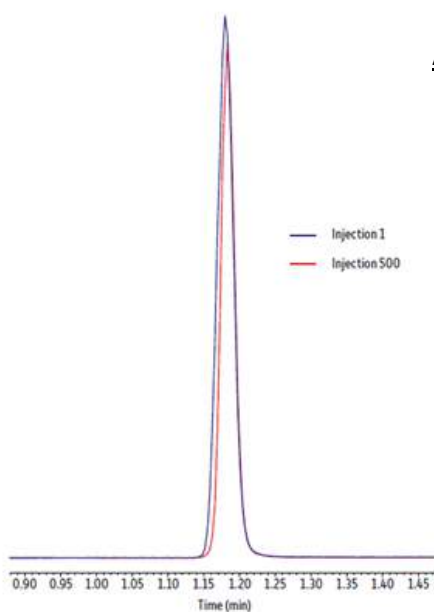
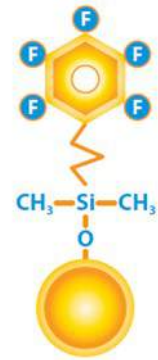


Abbildung 5 zeigt die sehr gute Retentionszeitstabilität der Raptor FluoroPhenyl Säule:

Bedingungen siehe Abbildung 4

Fast Facts zur Raptor™ FluoroPhenyl Core-Shell Säule - stark in RP und HILIC

- Pentafluorphenylpropyl- Phase (PFPP), USP L43
- Wechselwirkungen:
 - ✓ Elektrostatische Anziehung von Kationen
 - ✓ Dipolwechselwirkungen
 - ✓ π - π -Wechselwirkungen
- Besondere sterische Selektivität
- Zielanalyten:
 - ✓ sehr ähnliche Substanzen (z.B. Isomere), die polare Gruppen enthalten
 - * z.B. 3- und 15-Acetyldeoxynivalenol, Taxane, Hydroxy-Vitamin D2/D3 (Epimeren-Trennung!) – hier kommt die besondere sterische Selektivität zum Tragen
 - ✓ polare Substanzen, die auf C18 nicht gut genug getrennt oder zu wenig retardiert werden
 - * z.B. die Adrenalin- und Noradrenalin-Metaboliten Metanephrin und Normetanephrin, 4-Methylimidazol
 - ✓ generell basische Substanzen
- Die Säule kann im RP-Modus (auch mit 100% wässriger mobiler Phase) UND im HILIC-Modus betrieben werden - ideal zur Steigerung der Empfindlichkeit und Selektivität in der LC/MS.
- Sie basiert auf den bewährten Raptor™ Core-Shell Partikeln (2.7 und 5 μ m), die bekannt sind für ihre schmalen Peaks und ihre Robustheit.
- Testen Sie eine Raptor™ FluoroPhenyl LC Säule, wenn Sie mehr Retention und Selektivität für basische, polare und sehr ähnliche Substanzen benötigen!



Zu allen Bestellinformationen und weiteren Applikationen auf der Raptor FluoroPhenyl Core-Shell Säule gelangen Sie [HIER](#).

**Haben Sie Fragen zu dieser Problematik oder benötigen Sie weitere Informationen dazu?
Kontaktieren Sie uns!**

Dr. Ute Beyer, Tel. 06172/2797-42, Email ute.beyer@restekgmbh.de

