

Leitfaden für eine erfolgreiche HILIC-Trennung

François Vogel

[Novartis AG](#)

HILIC Geschichte

Die Geschichte der HILIC (Hydrophile Interaktionschromatografie) begann vor 22 Jahren. Mit der Publikation „Hydrophilic-Interaction Chromatography for the Separation of Peptides, Nucleic Acids and other Polar Compounds“ [1] zeigte Dr. Andrew Alpert die vielfältigen Möglichkeiten dieses Trennverfahrens für alle Typen von polaren Strukturen auf.

Mit dem Aufkommen der ersten speziell entwickelten HILIC-Phasen, wie der ZIC-HILIC [3], der modernisierte TSK Gel Amide80 sowie der XBridge HILIC und der Atlantis HILIC von Waters hat sich die Nachfrage aus der Industrie verstärkt. Heutzutage haben fast alle Säulenhersteller HILIC Säulen in Ihrem Portfolio. [9]

Die drei Hauptvorteile des HILIC-Mechanismus

1. HILIC ist geeignet für LC/MS Anwendungen.
2. Es kann mit dem bestehenden LC Maschinenpark gearbeitet werden.
3. Niedrige Rückdrücke aufgrund des hohen organischen Anteils erlauben hohe Flussraten.

Generell ist zu erwähnen, dass mit HILIC polare Verbindungen, die im Reversed Phase Modus unmöglich zu trennen waren, nun trennbar sind. Die wässrige Phase ist hier ausschlaggebend für eine Trennung von polaren, hydrophilen Verbindungen.

Leitfaden

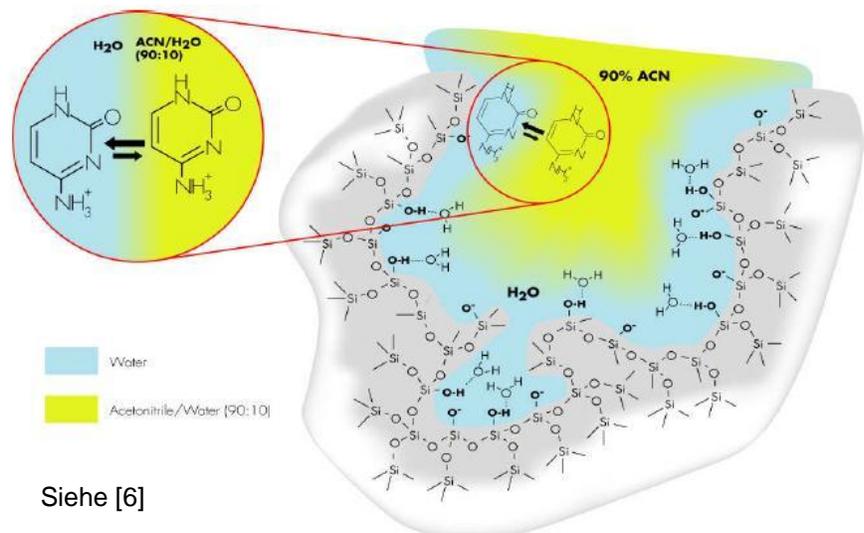
Die oben erwähnten Vorteile und erste praktische Erfahrungen [2] waren die Hauptmotivation einen HILIC-Leitfaden zu erstellen. Das primäre Ziel ist es, Erfahrungen an unerfahrene Kollegen weiterzugeben und eine generelle „first-to-use“ Versuchsanordnung anzubieten. Ein Säulenset ist in jedem Labor vorhanden. Der Leitfaden soll nach und nach ausgebaut und Neuerungen hinzugefügt werden, vor allem im Hinblick auf kommende Säulentests, ähnlich den Testreihen von Euerby und Petersson [4], um deren Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Dies wird dabei helfen, die besten Säulen im ständig wachsenden Angebot zu finden. Dadurch kann die „Trial-And-Error“-Quote niedrig gehalten werden.

Anwendungsfelder

- Genotoxische Verbindungen (GTI's) und deren Nachweis haben eine größere Nachfrage erfahren. Behördenseitig [5] werden mehr Untersuchungen der Wirkstoffe und deren Formulierungen verlangt, die belegen, dass keine genotoxischen Spaltprodukte oder Synthesestufen mehr vorhanden sind. Manche dieser Stoffe sind äußerst polar und somit im Reversed Phase Modus oft nur schwierig zu trennen.
- Im Rahmen von Syntheseentwicklungen kann die HILIC-Technologie vor allem für sehr polare Vor- und Zwischenstufen die Technik der Wahl darstellen.
- Nukleotide und Peptide, sofern sie im Reversed Phase Modus nicht erfolgreich getrennt werden können.

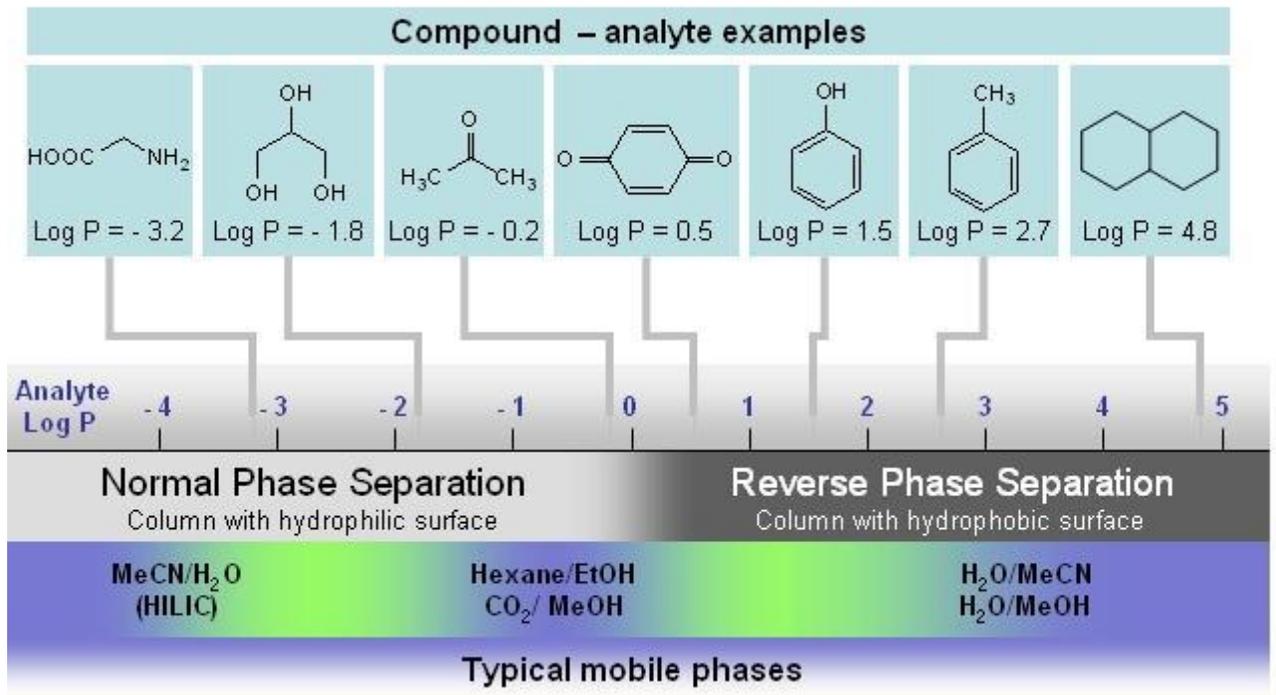
Wie wirkt HILIC?

Das Trennprinzip beruht auf dem Aufbau einer Wasser- bzw. Pufferschicht auf der jeweiligen stationären Phase und einer Verteilungschromatografie der zu trennenden Substanzen zwischen der extrem polaren Phase und der weniger polaren mobilen Phase. Dabei werden polare Verbindungen aller Art aufgrund der Migration in die polare stationäre Phase retardiert, wie z. B. Uracil, das als Totzeitmarker in der RP-Chromatografie verwendet wird. Unpolare Verbindungen wie z. B. Toluol erfahren keinerlei Retention und können als Totzeitmarker für die HILIC dienen. Somit wirkt HILIC orthogonal zur RP-Chromatografie.



Startinformation

Zu Beginn der Methodenentwicklung sollten einige Informationen gesammelt werden, um das Potenzial für HILIC korrekt einzuschätzen und um zielorientiert in die Methodenentwicklung einzusteigen.



- Der LogP ist ein wichtiger Faktor zur Entscheidung, ob HILIC eine gute Möglichkeit zur Lösung des Trennproblems ist. Ist dieser nahe Null oder kleiner, ist ein Erfolg wahrscheinlich.
- Der pK_s: Ob ein Molekül bzw. eine funktionelle Gruppe Protonen aufnimmt oder abgibt, hängt vom pK_s-Wert und dem pH-Wert der Lösung ab. Anhand des pK_s-Werts kann schnell entschieden werden, welche stationäre Phase den größten Erfolg verspricht.
- Löslichkeit des Analyten, UV-Maxima, u.a.

Lösungsmittel

Als Startlösemittel hat sich ein aus Acetonitril und Wasser im Verhältnis von 3:1 bewährt. 0.2% Ameisensäure oder Ammoniak als Zusatz können zu einer besseren Peakform führen. Das Lösungsmittel hat eine relative große Bedeutung für das Gelingen einer HILIC-Methode und für die Peakform des Analyten.

Säulenwahl

XBridge HILIC

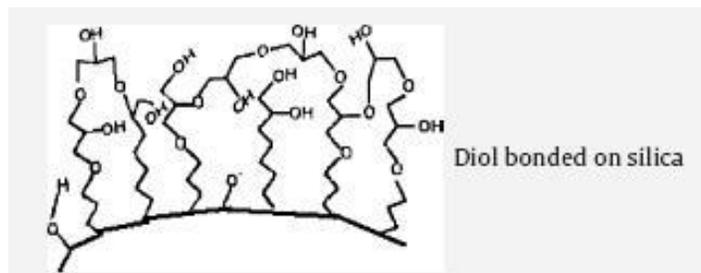
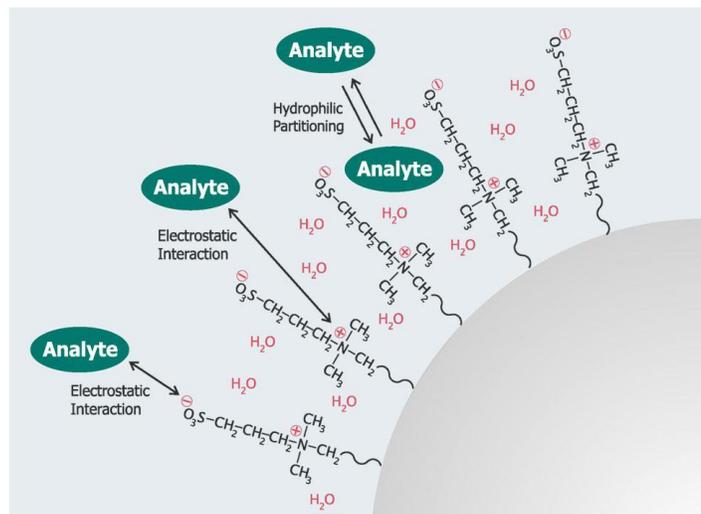
ist eine stationäre Phase mit einem Kieselgelkern. Sie ist negativ geladen mit einer sauren Oberfläche, die Interaktionen mit Kationen und Repulsion von Anionen ermöglicht. Für eine robuste Trennung ist ein Puffer erforderlich. [6]

ZIC-HILIC

beinhaltet stark basische (quartäre Ammoniumverbindungen) und stark saure (Sulfonsäure) Gruppen in einem molaren Verhältnis von 1:1. [3]

Luna HILIC

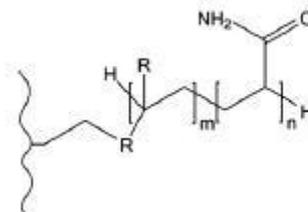
Die HPLC-Säule bildet an der Oberfläche des Kieselgels eine wasserangereicherte Schicht, die die Wechselwirkungen von polaren Verbindungen mit der stationären Phase erleichtert und somit zu einer besseren Retention führt. Die Luna HILIC ist eine quervernetzte, gebundene Diol-Phase, die außergewöhnlich gut reproduzierbare Ergebnisse liefert. [6,9]



TSK Gel Amide 80

Amide erleichtern die Retention von sauren Analyten aufgrund der Natur des Amids und dessen funktioneller Gruppe (Wasserstoffbrücken-Akzeptor und -Donor). Vor allem bei mittleren pH-Werten liegen basische Analyten in ihrer geladenen Form vor und interagieren mit den Silanolen. [9]

i. TSK-Gel Amide-80



Ascentis Express HILIC

ist als Core-Shell-Phase eine gute Ergänzung mit Fast-LC Potenzial für 400bar LC-Anlagen.

	Min./max. Aqueous part in mob phase	pH						max pres. bar	Temp max
		PH1-2	PH 3	PH 4	pH 7	pH 8	pH 9		
1, X Bridge HILIC	2-5%/ 50%							400	45
2, LUNA HILIC	5%/45%	A						400+	40-50
3, ZIC-HILIC	3%/60%							150	70
4, TSK Gel amide 80	2%/50%								40
5, Ascentis Express HILIC	2%/50%								60, >pH6 40C

Die verwendeten Daten und Informationen wurden größtenteils von den Herstellern übernommen.

Mit dieser Kombination von stationären Phasen sind die meisten potenziellen Trennungserfolge möglich. [9,11] Unsere Favoriten aufgrund der bisherigen Versuche sind die XBridge HILIC und die Luna HILIC.

Mobile Phasen erster Wahl

Aus Publikationen und eigenen Erfahrungen haben sich die folgenden drei mobilen Phasen bewährt:

- 10mM Ammoniumformiat + 0.125% Ameisensäure pH3
- 10mM Ammoniumacetat + 0.02% Essigsäure pH5
- 10mM Ammoniumacetat pH6.9

Weitere häufig verwendete mobile Phasen: Ameisensäure 0.05%, Essigsäure 0.05%, 10mM Ammoniumacetat + 0.04% Ammoniak pH9 sowie 10mM Ammoniumsulfat etwa pH7.5.

Methodenentwicklung, Screening

Mit den drei mobilen Phasen erster Wahl [9], die auch in verschiedenen Publikationen bevorzugt werden, kann dies auf einem quaternären System in einem Schritt durchlaufen werden, sofern man eine Anlage mit einem Säulenschaltventil besitzt.

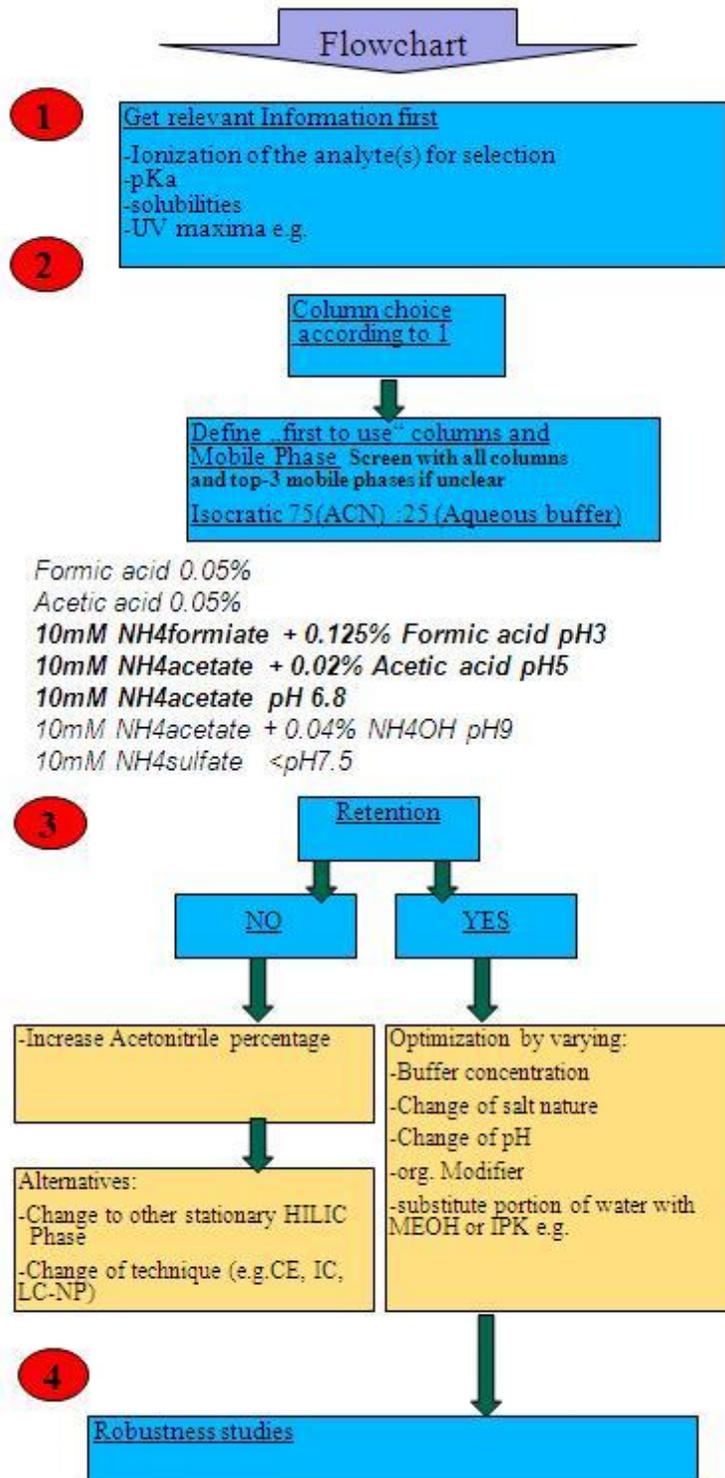
Eine noch bequemere Möglichkeit ist das Screening mit ChromSword® [7]. ChromSwordAuto® ist ein automatisches chromatografisches Methodenentwicklungssystem, das eine schnelle Entwicklung von Trennmethode in der HILIC mit einem minimalen experimentellen Aufwand ermöglicht. Im Zusammenspiel mit dem HPLC-Instrument und der HPLC-Software kann man mit ChromSword unter anderem Screenings durchführen, wobei man am Ende praktische und übersichtliche Reports der Versuche erhält.

Optimierung

Aufgrund der Tatsache, dass den drei Faktoren Puffer-Konzentration, pH-Änderung und organischem Lösungsmittel der größte Optimierungserfolg beschieden ist, werden diese drei zunächst auf die besten Trennergebnisse aus dem Screening angewendet. Weitere Möglichkeiten wären ein anderes Puffersalz zu verwenden oder die Temperatur zu ändern. [8]

Ein Versuch mit einer Pufferkonzentration von 50mM bei gleichen pH-Wert ist der beste Ansatz, des weiteren kann eine pH-Änderung von 0.5 Einheiten höher beziehungsweise tiefer ausprobiert werden.

Die Änderung des organischen Lösungsmittels oder Substitution von Teilen der Wasserphase durch Methanol in (5-10% Schritten) kann große Änderungen hin zu einem besseren Trennergebnis bringen. [10]



Darüber hinaus wurde eine einstündige Schulung konzipiert, um Anfänger in dieser Technik und in den effizienten Gebrauch des Leitfadens zu unterweisen.

Zusammenfassung

Ein guter erster Leitfaden in vier Schritten mit weiterführenden Informationen ist gegeben. Der Schritt 4 wurde bewusst offen für Anpassungen gehalten. Die ICH Guidelines [10] spielen hier ebenso eine große Rolle. Feedbacks der Kolleginnen und Kollegen und eine stete Weiterentwicklung des Leitfadens wird eine lohnende Aufgabe für die HILIC-Thematik sein.

Literatur:

- [1] A. J. Alpert, *Hydrophilic-Interaction Chromatography for the Separation of Peptides, Nucleic Acids and other Polar Compounds*, J. Chromatogr. A.. 499 (1990), 177-196
- [2] F. Vogel et. al., *S+T day 2012, HILIC-LC for Polar Genotoxic Compounds*, Int. Poster,(2012)
- [3] *A Practical Guide to HILIC*, ISBN 978-91-631-8370-6 Merck, Sequant
- [4] M. R. Euerby, P. Petersson, *Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns using principal component analysis*, J. Chromatogr. A.. 994 (2003) 13-36
- [5] *EMA Guideline on the limits of genotoxic impurities (2006)*
- [6] E. S. Grumbach, K. J. Fountain, *Comprehensive Guide to HILIC*, Waters 2010929310, (2010)
- [7] http://www.chromsword.com/en/about_us/about_us/
- [8] A. E. Karatapanis et. al, *A revisit to the retention mechanism of HILIC using model organic compound*. J. Chromatogr. A. 1218 (2011) 2871-2879
- [9] P. Jandera, *Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review*, Analytica Chimica Acta, 692 (2011) 1-25
- [10] ICH Guideline Q8, Q9 and Q10
- [11] R.-I. Chirita et. al *Approach to HILIC column selection: Application to neurotransmitters analysis*. J. Chromatogr. A. 1217 (2010) 3091-3104