

## Ende des Dornröschen-Schlafs - die Normalphasen-Chromatographie kehrt als HILIC zurück

**Dr. Volker Lorbach**

CS - Chromatographie Service GmbH, E-Mail: lorbach@cs-chromatographie.de

Der Zyklus eines Produktes oder einer Technologie ist in der Regel derart, dass nach einer Hochphase irgendwann ein Rückgang des Interesses und damit des Umsatzes zu verzeichnen ist. In wenigen Fällen schafft es ein Produkt aus unterschiedlichsten Gründen eine zweite Hochphase zu erreichen. Ein prominentes Beispiel dafür ist der allseits bekannte *Käfer* von Volkswagen. Als das erfolgreiche Modell seine besten Tage schon lange hinter sich hatte und im Prinzip schon von der Bildfläche verschwunden war, kamen die Verantwortlichen bei Volkswagen auf die Idee, das positive Image des Käfers noch einmal zu nutzen und schufen den *New Beetle*.

Eine ähnliche Entwicklung lässt sich aktuell in der HPLC bei der Normalphasen-Chromatographie (NP) beobachten, auch wenn die Zusammenhänge und Hintergründe sehr unterschiedlich sind. Beim *New Beetle* wurden fast ausschließlich Designelemente vom *Käfer* übernommen und die Technologie im Inneren wurde vollständig erneuert. Ausschlaggebend für das Comeback der Normalphasen-Chromatographie sind vor allem die neuen Anwendungsgebiete, die aber natürlich auf der Weiterentwicklung der eingesetzten stationären Phasen beruhen.

Vor einer genaueren Betrachtung der historischen und aktuellen Entwicklung der Normalphasen-Chromatographie, ist zunächst festzustellen, was unter dieser Art von Chromatographie zu verstehen ist. Leider ist dies nicht selbstverständlich und es gibt andauernde Diskussionen über die genaue Definition. Einigkeit herrscht darüber, dass Flüssigkeitschromatographie an einer polaren stationären Phase (z. B. Silica) unter Verwendung von überwiegend unpolarer mobiler Phase (z. B. Hexan mit wenigen Prozenten Isopropanol) als klassische NP bezeichnet werden kann. Etwas schwieriger wird es, sobald sich die mobile Phase ändert und Wasser mit ins Spiel kommt. Die Verwendung von wässrigen Eluenten (z. B. Acetonitril/Wasser) in Kombination mit polaren stationären Phasen wie Silica, ist lange bekannt. Für diese Variante der Normalphasen-Chromatographie werden die Begriffe ANP (*Aqueous Normal Phase*) und HILIC (*Hydrophilic Interaction Chromatography*) verwendet. Ob diese Begriffe, wie J. J. Pesek es vorschlägt [1], unterschieden werden sollen oder, wie es in vielen Fällen üblich ist, als Synonyme gebraucht werden können, soll an dieser Stelle nicht weiter vertieft werden. Die ursprüngliche Definition für HILIC von A. J. Alpert [2], die besagt, dass Wasser der stark eluierende Eluent ist und der Retentionsmechanismus auf Verteilung beruht, ist zutreffend und unabhängig von der Bezeichnung. Demnach ist HILIC ohne weiteres als eine Variante der Normalphasen-Chromatographie anzusehen und hat ihr zu einer neuen Blütezeit verholfen.

Ehe diese näher beleuchtet wird, soll noch einmal kurz auf die Eigenschaften der klassischen NP eingegangen werden, die für Jahrzehnte der bestimmende Trennmodus in der Flüssigkeits-

chromatographie war. In der klassischen NP findet die Trennung der Analyten an einer polaren stationären Phase mit Hilfe einer unpolaren mobilen Phase statt. Als Basismaterial hat sich überwiegend Silica (SiO<sub>2</sub>) durchgesetzt. Es ist leicht erhältlich, kostengünstig, chemisch inert und hat in poröser Form eine hohe Probenkapazität. "Nacktes" Silica, aber auch modifizierte Varianten wie Diol-, Cyano- oder Aminophasen, können als stationäre Phasen für die klassische NP dienen. Eluenten sind unpolare Solventien wie Alkane. Sollte die Elutionskraft eines Alkans nicht reichen, wird die Polarität der mobilen Phase durch die Zugabe von polarerer Lösungsmitteln erhöht.

Elutrope Reihe einiger Solventien in der "klassischen" NP-Chromatographie:

Hexan < Cyclohexan < Chloroform < Tetrahydrofuran < Acetonitril < Isopropanol < Ethanol << Wasser

Im Gegensatz zur Umkehrphasen-Chromatographie (RP) und zu HILIC, welche verteilungschromatographische Prozesse sind, beruht die klassische NP überwiegend auf Adsorption, zum Beispiel durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen. Damit ist auch das Einsatzgebiet abgesteckt. Die klassische NP eignet sich für Analyten mit polaren Bereichen, die die oben genannten Wechselwirkungen eingehen können. So sind die Erfolgsaussichten zur Trennung von Analyten, die sich nur durch Art oder Position von polaren funktionellen Gruppen unterscheiden, in der NP größer als in der RP. Eine generelle Einschränkung erfährt die Methode dadurch, dass die zum Teil sehr polaren Analyten noch in genügender Menge in der eingesetzten unpolaren mobilen Phase ausreichend löslich sein müssen. Traditionell hat die Anwendung der klassischen NP darunter gelitten, dass lange Equilibrierungszeiten, schlechte Reproduzierbarkeiten und unsymmetrische Peaks hinzunehmen waren. Viele dieser nachteiligen Eigenschaften konnten durch die Verbesserung der Qualität der stationären Phasen (z.B. durch höhere Reinheit des Silicas)

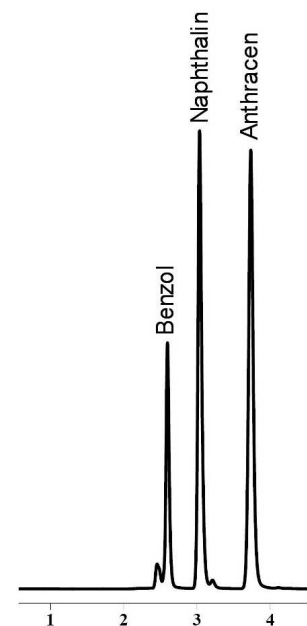


Abbildung 1:  
Aromatentrennung per  
klassischer NP  
(Multospher®-APS-HP)  
Eluent: Heptan

minimiert werden, so dass auch die klassische NP heute wieder an Stellenwert zugenommen hat. Sicherlich einen größeren Einfluss hat aber die wässrige Normalphase (ANP) bzw. HILIC eingenommen. Lange haben viele Anwender die Umkehrphasenchromatographie für die einzig glücklich machende Methode gehalten. Dies hatte zur Folge, dass andere Methoden aus dem Blickfeld verschwanden obwohl sie bekannt waren. Bereits Mitte der 70er Jahre wurden Zuckertrennungen auf wässrigen Normalphasen beschrieben [3]. Neue Herausforderungen in der HPLC, zusammen mit verbesserten Produkten, haben HILIC in den letzten Jahren zurück in den Blickpunkt der Analytiker gebracht. Viele interessante pharmakologisch wirksame Substanzen sind sehr polar und durch die Metabolisierung im Körper oder in der Umwelt entstehen noch polarere Verbindungen, die mit der RP-Chromatographie aufgrund mangelnder Retention kaum bestimmt werden können.

Hier bietet HILIC eine ideale Ergänzung. Gleiches gilt im Übrigen für viele Anwendungsgebiete. Vor allem im Bereich biologischer, biotechnologischer oder medizinischer Aufgabenstellungen in denen sehr polare Verbindungen häufig vorkommen, findet die wässrige Normalphasen-Chromatographie Anwendung. Die Anzahl der Veröffentlichungen unter dem Suchbegriff HILIC, stiegen von weniger als zehn im Jahr 2000 auf weit über hundert im Jahr 2008 [4].

Der Mechanismus dieses Trennmodus ist komplex und konnte bis heute nicht vollständig geklärt werden [5]. Die aktuelle Theorie besagt, dass sich auf der polaren Oberfläche eine wässrige bzw. wasserreiche Schicht bildet, in welcher Verteilungschromatographie stattfindet (Abbildung 2).

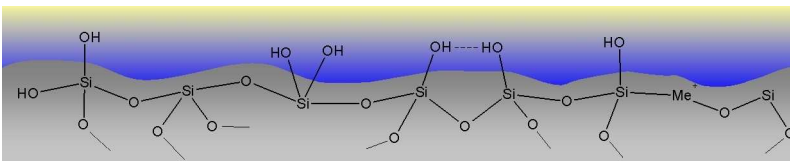


Abbildung 2: Wasserreiche Schicht auf der polaren Oberfläche einer HILIC-Phase

Da weitere Effekte und Wechselwirkungen anscheinend von Bedeutung sind, lässt sich nachvollziehen, dass die unterschiedlichen stationären HILIC-

Phasen in der Praxis auch zu

recht unterschiedlichen Ergebnissen führen. An den verschiedenen stationären Phasen haben die unterschiedlichen Wechselwirkungen auch jeweils unterschiedlich starken Einfluss auf den jeweiligen Analyten. Die ersten HILIC-Phasen waren "nackte" Silicaphasen. Diese einfache und traditionelle Variante ist bis heute von großer Bedeutung. An der Oberfläche befindliche Si-OH-Gruppen bieten alle Voraussetzungen für eine gute HILIC-Phase. Hinzu kommt, dass ein Bluten von gebundenen funktionellen Gruppen nicht auftreten kann und die Stabilitätseigenschaften von SiO<sub>2</sub> allgemein bekannt sind, auch wenn gebundene Phasen durch ihre abschirmende Wirkung zum Teil höhere pH-Stabilitäten aufweisen. Entscheidende Verbesserungen wurden seit den ersten HILIC-Anwendungen durch die Erhöhung der Reinheit der Silicaphasen vor allem in Bezug auf Restmetallionen erreicht. Dadurch sind SiO<sub>2</sub>-HILIC-Phasen heute eine gern gewählte stationäre Phase, auch und besonders wenn es um LC-MS-Anwendungen geht.

An gebundenen Phasen können, genau wie bei der klassischen NP, Cyano-, Diol- und Aminophasen eingesetzt werden. Letztere haben ihren Stellenwert für die Zuckanalytik bis heute behalten. Zucker existieren in zwei anomeren Formen, die bei saurem oder neutralem pH langsam ineinander konvertieren können. Bei hohem pH-Wert, wie er in den Poren einer Aminophase herrscht, geschieht der Wechsel zwischen den anomeren Formen sehr schnell und im Chromatogramm ist nur ein scharfer Peak zu sehen (Abbildung 3). Zu beachten ist bei Aminophasen allerdings

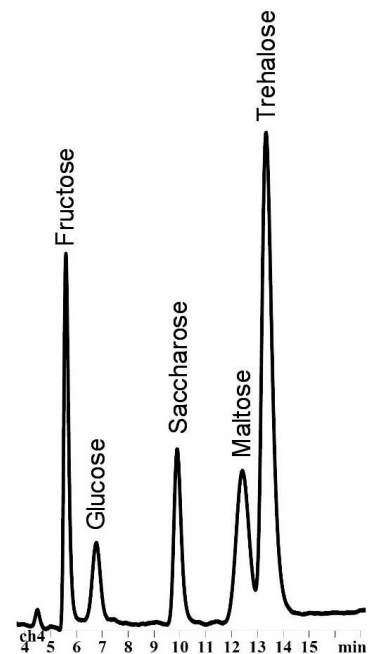


Abbildung 3: Zuckertrennung auf einer modernen Aminophase (Multospher®-APS-HP-Hilic)  
Eluent: Acetonitril : Wasser (75 : 25)

immer die Reaktivität der funktionellen Gruppen. Aldehyde und Ketone können mit der  $\text{NH}_2$ -Gruppe Schiff'sche Basen bilden und somit die Phase beschädigen oder zerstören.

Neue stationäre Phasen versuchen, die unzweifelhaft vorhandenen Beiträge ionischer Wechselwirkungen, zum Beispiel durch gezielte Anbindung von zwitterionischen Resten, verstärkt zu nutzen. Auch, wenn die Gefahr besteht, dass nah beieinander liegende Gruppen gegensätzlicher Ladung sich überwiegend selbst kompensieren, bleibt die polare Natur der Gruppen erhalten und sie unterscheiden sich in ihrer Selektivität gegenüber  $\text{SiO}_2$ -Phasen.

Durch die Unterschiedlichkeit der funktionellen Gruppen der stationären Phasen für HILIC und die Vielfalt der Wechselwirkungen, welche zur Trennung beitragen, lässt sich gut nachvollziehen, dass die Unterschiede im chromatographischen Verhalten der Phasen deutlich größer sind als die von unterschiedlich langen C-Ketten in der RP-Chromatographie. Daher lohnt es sich bei HILIC eher verschiedene Phasen zu testen, als dies bei RP der Fall ist.

Die für HILIC verwendeten mobilen Phasen sind vergleichbar mit denen der RP-Chromatographie, allerdings ist die Elutionsstärke in der Regel umgekehrt. Verbreitet sind Eluenten aus Acetonitril-Wasser-Gemischen, wobei der Wassergehalt meist zwischen 2,5 und 40 Prozent liegt. Anstatt Acetonitril können andere mit Wasser mischbare organische Lösemittel wie Tetrahydrofuran, Isopropanol oder Methanol eingesetzt werden. Als Zusätze für ionisierbare Analyten können Puffer (z. B. Phosphatpuffer) oder Säuren (Ameisensäure, Essigsäure), wie aus der RP-Chromatographie bekannt, verwendet werden. Für MS-Anwendungen hat sich der Einsatz von Ammoniumacetat-Puffern vielfach bewährt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Normalphasen-Chromatographie aus ihrem Dornröschen-Schlaf erwacht ist und die Anwender mehr und mehr feststellen, welche hervorragende und vielseitige Methode ihnen zur Verfügung steht. Dabei stellt die klassische NP durch verbesserte Phasen weiterhin eine gute Ergänzung zur RP-Chromatographie dar. Die wässrige Normalphasen-Chromatographie (HILIC) schafft es, den Anwendungsbereich zwischen beiden Methoden ideal auszufüllen.

### Literatur:

- [1] J.J. Pesek and M.T. Matyska, *LCGC* **24** (3), 296-303 (2006).
- [2] A.J. Alpert, *J. Chromatography* **499**, 177-196 (1990).
- [3] J.K. Palmer, *Anal. Lett.* **8**, 215-224 (1975); J.C. Linden, C.L. Lawhead, *J. Chromatogr.* **105**, 125-133 (1975)
- [4] Berücksichtigt wurden Veröffentlichungen, die bei PubMed unter dem Suchbegriff HILIC gelistet sind.
- [5] P. Hemström, K. Irgum, *J. Sep. Sci.* **29**, 1784-1821 (2006); T. Yoshida, *J. Biochem. Biophys. Meth.* **60**, 265-280 (2004).