

Welche stationären Phasen kann man in der HILIC nutzen?

Dr. Giorgia Greco¹, Dr. Thomas Letzel²

¹Thermo Fischer Scientific, ²TU München

Eine allgemeine und sinnvolle Einteilung der stationären Phasen in der HILIC (Hydrophilic Interaction Chromatography) basiert auf der Art der funktionellen Gruppen an der Partikeloberfläche und deren Ladungszustand. Genau genommen kann man sie aber auch in ungebundene und gebundene Silicapartikel einordnen sowie Letztere zusätzlich in neutrale, geladene und zwitterionisch geladene Phasen.

Die Anzahl der auf dem Markt befindlichen stationären HILIC Phasen nimmt noch stetig zu, so dass die Auswahl der richtigen Säule für den jeweiligen Analyten nicht immer einfach ist.

Eine generelle Beschreibung der HILIC Phasen besagt jedoch, dass typische HILIC-Phasen mit ihrem ‚hydrophilen Charakter Wasser auf der Oberfläche anreichern können‘ (1). Allerdings sind hierfür nicht alle Phasen gleich gut geeignet. Zu allererst beeinflusst die unterschiedliche Hydrophilie der Materialien die Dicke der Wasserschicht in die die Analyten aus der mobilen Phase übergehen können (Partition(Verteilungs)-Mechanismus). Das hat selbstverständlich einen direkten Einfluss auf die Retention dieser Analyten.

Zusätzlich ermöglicht die Anwesenheit geladener und/oder polarer funktioneller Gruppen auf der Materialoberfläche elektrostatische Wechselwirkungen und/oder Wasserstoffbrückenbindungen mit entsprechenden Analyten. Aus diesem Grund ist es auch am zielführendsten, die stationäre Phase auf Basis der chemischen Eigenschaften des zu untersuchenden Analyten zu wählen.

Ein sehr hilfreicher Ansatz ist es (um diese Auswahl treffen zu können), dass man hinter dem jeweiligen Verkaufsnamen zunächst einmal den verwendeten Typ der stationären Phase erkennt bzw. zuordnet.

HILIC Phasen basieren meist auf Silicapartikel, können aber auch aus Polymerpartikel bestehen. Dabei werden – wie eingangs erwähnt – prinzipiell zwei Gruppen unterschieden: die unveränderten Silica-

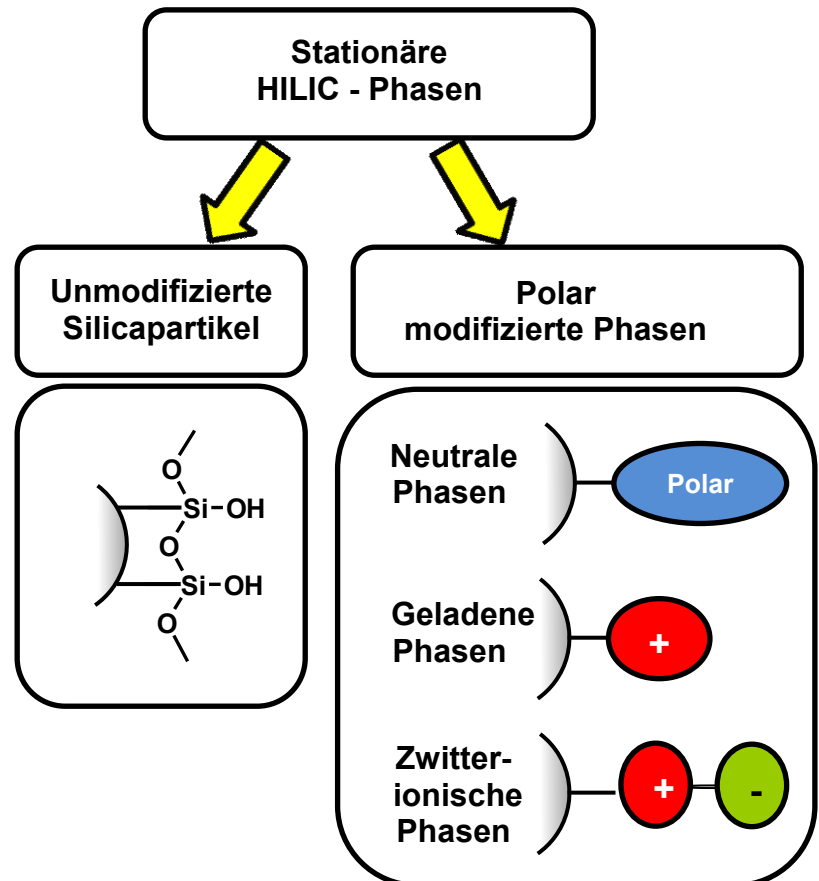


Abb. 1: Einordnung der stationären HILIC-Phasen.

partikel mit freien Silanolgruppen oder Silicapartikel mit daran chemisch gebundenen polaren funktionellen Gruppen. Ein prinzipielles Schema dieser Klassifizierung ist der Abbildung 1 zu entnehmen.

Die ersten Anwendungen konnten mit unmodifiziert vorliegenden Silicapartikel (Typ A und B) durchgeführt werden und Kieselgel ist auch heute noch eines der populärsten Materialien, speziell zur Trennung von Zuckern. Kieselgel-Materialien haben Silanolgruppen auf der Oberfläche, die bei einem pH-Wert über 4 bis 5 deprotoniert vorliegen und deshalb auch als Kationenaustauscher fungieren, so dass positiv geladene basische Analyten stark zurückgehalten werden. Beispiele für reine Silicapartikel sind den Namen

leider nicht immer direkt zu entnehmen, z. B. Ascentis Express HILIC, Atlantis HILIC, Kinetex HILIC, Zorbax HILIC. Unter einem pH-Wert 4 bis 5 sind alle Gruppen neutral und somit hat die Phase keine Kationenaustauschereigenschaften mehr. Dies ist ein erstes Beispiel, dass ein stabiler pH-Wert im HILIC sehr wichtig ist.

Fast alle Säulenhersteller und einige Forschergruppen haben in den letzten Jahren viel Ehrgeiz und Arbeit in die Entwicklung maßgeschneiderter polar gebundener chemischer Phasen gelegt.

Diese Phasen werden durch kovalente Anbindung der polaren funktionellen Gruppen an die entsprechenden Oberflächen (d. h.

Silica oder Polymer) hergestellt. Diese können dann auf Basis des Ladungszustands der funktionellen Gruppen in neutrale, geladene oder zwitterionische Phasen eingeteilt werden.

Neutrale stationäre Phasen enthalten polare funktionelle Gruppen, die im typischen HILIC-pH-Wert Bereich von 3 bis 8 in ihrer Neutralform vorliegen. Somit resultiert die Retention der Analyten dann überwiegend durch hydrophile Wechselwirkungen. Viele der stationären HILIC-Phasen gehören in diese Kategorie. Diese weisen eine sehr große Variabilität von funktionellen Gruppen auf, wie Amide (TSK gel Amide-80), Aspartamide (Poly-HYDROXYETHYL A), Diole (YMC-pack Diol), Alkyl-diole (Acclaim Mixed-Mode HILIC-1; Inertsil HILIC), Cross-linked diole (Luna HILIC), Cyano (Alltima Cyano) und Cyclodextrin (Nucleodex β -OH) Gruppen.

Einige davon und auch ihre Wechselwirkungseigenschaften werden in Abbildung 2 a gezeigt. Diese Phasen finden oftmals Anwendung in der Trennung von Oligosacchariden, Peptiden, Proteinen und Oligonucleotiden. Cyclodextrin Phasen werden zusätzlich auch in der chiralen HILIC eingesetzt, allerdings empfehlen wir hierfür eher die **Technik der SFC** einzusetzen.

Die geladene Amino-Phase (siehe Abbildung 2 b) ist eine in der HILIC oft genutzte stationäre Phase. Die funktionelle Gruppe besteht aus einem Aminopropylrest mit einer primären Aminogruppe, welche permanent positiv geladen vorliegt. Sie zeigt eine hohe Affinität für anionische sowie saure Analyten, die oftmals auch irreversibel an die Phase adsorbieren können. In diesem Fall basiert die Trennung der geladenen Analyten stark auf einem Anionenaustauschmechanismus. Aminophasen können allerdings auch sehr erfolgreich für die Trennung neutraler polarer Moleküle verwendet werden, die aufgrund der hohen Hydrophilie dieser Phasen (und somit der ausgeprägten Wasserschicht auf ihrer Oberfläche) stark auf dem Material zurückgehalten werden.

Zwitterionische stationäre HILIC-Phasen sind schon in verschiedenen Versionen erhältlich (siehe auch Abbildung 2 c) und können als universellste aller HILIC-Phasen eingesetzt werden. Einige zwitterionische Phasen sind kommerziell unter den Markennamen KSPolyMPC, NUCLEODUR HILIC, Obelisc N, Obelisc R, Primesep N, ZIC-chILIC und ZIC-HILIC erhältlich. Zwitterionische Reste enthalten sowohl eine permanent positive als auch eine permanente negative Ladung. Diese Phasen sind teilweise sehr hydrophil, beinhalten gleichzeitig aber auch moderate Ionenaustauscher-Eigenschaften. Aus diesem Grund können diese Phasen sowohl für die Trennung von neutralen, sauren und basischen Molekülen als auch für anorganische Ionen herangezogen werden.

Eine gute Regel um die bestgeeignetste HILIC Phase auszuwählen ist, zu berücksichtigen, dass neutrale Analyten in der Regel weniger hydrophil sind als geladene. Somit sind für die neutralen Moleküle Amidphasen, sowie geladene bzw. zwitterionische Phasen entsprechend gut geeignet. Auf der anderen Seite sind geladene Moleküle durch deren elektrostatische Anziehungskräfte mit der entgegengesetzten geladenen Phase von HILIC Materialien oft so stark retardiert, dass auch hier neutrale und zwitterionische Phasen ein besseres Ergebnis bringen können.

Literatur

- (1) G. Greco and T. Letzel: *Main interactions and influences of the chromatographic parameters in HILIC separations*. *Journal of Chromatographic Science*, 2013, 51 (7), 684-693.

a) Beispiele für neutrale Phasen mit Grundstruktur, Namen und Wechselwirkungen

Verteilung	Elektrost. Wechselwirkungen	Adsorption	
Amid TSK gel Amide-80			
Diol Europher II Diol KNALZER			
Cross-linked Diol Luna HILIC Phenomenex			

Wasserstoff Donor und Akzeptor

b) Beispiele für geladene Phasen mit Grundstruktur, Namen und Wechselwirkungen

Verteilung	Elektrost. Wechselwirkungen	Adsorption	
Aminopropyl Luna HILIC Phenomenex		Anionen Austausch	Wasserstoff Donor
Silica Europher II S1 KNALZER		pH < 4/5	Wasserstoff Donor und Akzeptor
		pH > 4/5	Wasserstoff Akzeptor

Kationen Austausch

c) Beispiele für zwitterionisch geladene Phasen mit Grundstruktur, Namen und Wechselwirkungen

Verteilung	Elektrost. Wechselwirkungen	Adsorption	
Sulfobetain (ZIC-HILIC) Europher II HILIC KNALZER			
Phosphorylcholin (ZIC-chILIC) ZIC-HILIC Dionex			

schwach

Abb. 2: Beispiele für a) neutrale, b) geladene und c) zwitterionische Phasen mit Grundstruktur, Namen und Wechselwirkungen.

