

Der HPLC-Tipp im März

HILIC und Co... oder: HILIC ist nicht gleich HILIC!

von Dr. Stavros Kromidas, Saarbrücken

Der Fall

Die Trennung von stark polaren Komponenten mittels HPLC stellt oft eine echte Herausforderung dar. Nachfolgend stichwortartig einige Möglichkeiten:

RP-Modus

- Wasseranteil sowie Salzkonzentration im Eluenten erhöhen (z.B. bis 90%, bei bestimmten stationären Phasen bis 95-100% Wasser/Puffer möglich). Dadurch wird der Eluent sehr polar und die Analyte – die ja stets eine erhöhte Hydrophobie im Vergleich zum polaren Eluenten aufweisen - werden zu hydrophoben Wechselwirkungen mit der stationären Phase „gezwungen“.
- PH-Wert verändern bzw. – wenn es denn unbedingt sein muss... - Ionenpaarreagenzien verwenden. Dadurch wird eine saure/basische Komponente neutralisiert bzw. maskiert, auch hier ist das Ergebnis die Verstärkung von neutralen/hydrophoben Wechselwirkungen.

Hilft das alles nicht, so sollte man sich drastischeren Möglichkeiten zuwenden, s. weiter unten:

HILIC

- Kieselgel plus klassischer RP-Eluent. Seien Sie ruhig etwas mutig, es ist manch eine interessante Trennung mit z.B. 40% Ammoniumphosphatpuffer/60% Acetonitril an Kieselgel möglich. Das ist eine seit langem bekannte Möglichkeit unter „alten Hasen“ – nur man hat sie früher nicht HILIC sondern wässrige Normal Phasen Chromatographie (ANPC, Aqueous Normal Phase Chromatography) genannt oder man hat dafür einfach keine extra Bezeichnung benutzt...Wie auch immer, man verwendet in der HILIC eine polare stationäre Phase und einen wässrigen RP-Eluenten. Im isokratischen Modus nimmt man z.B. ca. 70/30 Wasser/Acetonitril oder einen Formiat/Acetatpuffer/Acetonitril. Im Gradientenmodus startet man bei ca. 90% Acetonitril und endet bei ca. 40-50%, also genau umgekehrt als im klassischen RP-Modus. Welche Säulen kommen nun für den HILIC-Modus in Frage?
-

Die Lösung

Im Prinzip kann – und wird – von Anwendern und Säulenanbietern nahezu jede polare stationäre Phase als HILIC-Phase bezeichnet:

- **Kieselgel mit seinen unterschiedlichen Eigenschaften**

- **Polare Gruppe an der Oberfläche: CN, Diol, Amino, Harnstoff, Amid, Triazole**
- **Polare, geladene Gruppe(n) an einem Alkylrest, evtl. als Zwitterion**

Merke: Eine z.B. „HILIC-Diol“ ist nicht gleich einer „HILIC-Diol“!

- **Inertsil HILIC: Alkyl-Diol**
- **Luna HILIC: „Cross-linked“-Diol**
- **Acclaim Mixed-Mode HILIC -1: Alkyl-Diol (längere C-Kette)**

Das sollte man sich insofern vergegenwärtigen, als polare Wechselwirkungen wesentlich diffiziler sind als hydrophobe. Das bedeutet wiederum, Chromatogramme an verschiedenen HILIC-Säulen unterscheiden sich wesentlich stärker als im Falle von klassischen RP-Trennungen.

Beispiele von HILIC-Säulen mit Kieselgel als stationärer Phase:

Zorbax HILIC, Atlantis HILIC, Ascentis Express HILIC

Beispiele von HILIC-Säulen mit geladenen Gruppen am Alkylrest:

NUCLEODUR HILIC, Primesep N, Obelisc N, ZIC-HILIC

Das Fazit

Polare Wechselwirkungen sind nicht “ohne”... So sollte man im HILIC-Modus zu Gunsten der polaren Selektivität bereit sein, bzgl. Peakform, Equilibrierzeit und Analysenzeit Kompromisse einzugehen.

In der Zwischenzeit existieren recht umfangreiche Infos über HILIC, nachfolgend eine kleine Auswahl:

Print-Infos

- **Broschüren von allen Firmen, die auf diesem Gebiet aktiv sind, z.B. Phenomenex, TSK, YMC, Sequant**

Internet

- **Wikipedia unter „Hydrophilic Interaction Chromatography“**
- www.sach.ch
- www.infoagil.ch/hilic
- www.osun.org
- www.breuchbuehler.ch
- www.gc-lc.com
- www.hichrom.co.uk

