

HILIC CHROMATOGRAFIE: PERSPEKTIVNÍ TECHNIKA SEPARACE POLÁRNÍCH LÁTEK NA POLÁRNÍCH STACIONÁRNÍCH FÁZÍCH VE VODNĚ-ORGANICKÝCH MOBILNÍCH FÁZÍCH

JANDERA P.

Katedra analytické chemie, Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Pavel.Jandera@upce.cz

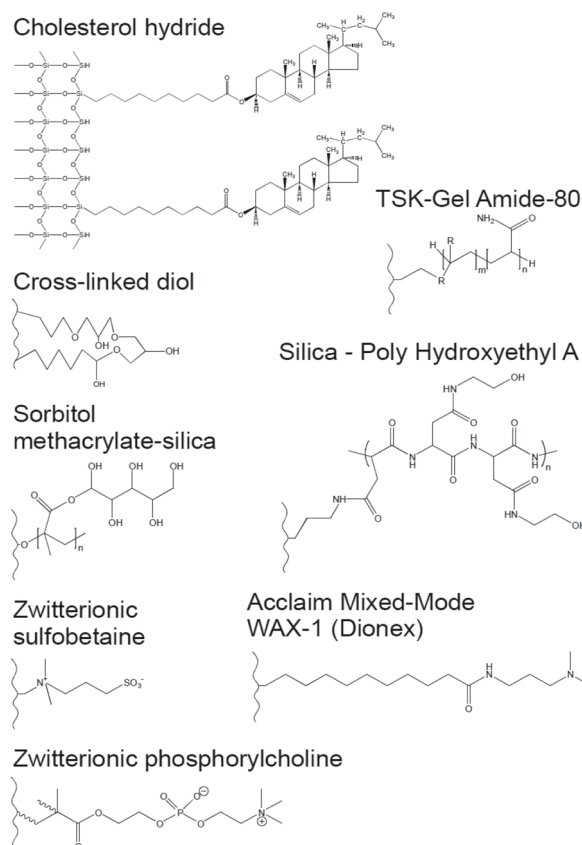
Vysokoučinná kapalinová chromatografie v posledních letech zaznamenala významný pokrok ve vývoji instrumentace a nových typů kolon, které umožňují výrazně zrychlit analýzu, zvýšit počet látek separovaných v jednom nástřiku vzorku a rozšířit spektrum analyzovaných látek. Na trh byly uvedeny přístroje a kolony se stacionárními fázemi na částicích s průměrem menším než 2 μm , které umožňují rutinní separace při vysokém pracovním tlaku, až do 150 MPa, za zlomek doby, potřebné k separaci konvenčními HPLC technikami. Značného urychlení separace lze dosáhnout i na "klasických" přístrojích s použitím povrchově pórovitých či monolitických náplní kolon a při teplotách až do 100–150 °C na nově zavedených teplotně odolných kolonách na bázi ZrO_2 nebo na hybridních kolonách s alkylovými skupinami inkorporovanými do silikagelové matrice. Významného pokroku bylo dosaženo i v rozvoji vícerozměrných HPLC technik, umožňujících výrazné zvýšení počtu látek, separovaných v jednom experimentu ve složitých vzorcích.

V posledních letech rostou požadavky na separace silně polárních látek, zejména sacharidů, aminokyselin a peptidů. Na rozdíl od vzorků, obsahujících slabě či středně polární sloučeniny, které lze zpravidla dobře dělit v systémech s převrácenými fázemi (RP), je v těchto systémech retence silně polárních látek příliš nízká pro úspěšnou separaci, mnohdy i při použití vodných mobilních fází s velmi nízkým obsahem organických rozpouštědel. V systémech s normálními fázemi (NP) na polárních adsorbentech v čisté organických mobilních fázích se naopak některé polární látky často příliš zdržují. Třísoložkové mobilní fáze s nízkým obsahem vody se občas používaly k separacím na klasických adsorbentech již před mnoha lety [1]. Alpert [2] navrhl označení "chromatografie hydrofilních interakcí" (HILIC) pro chromatografii na kolonách typických pro systémy s normálními fázemi, které ale využívají vodně-organické mobilní fáze podobně jako RP systémy. Slovo "hydrofilní" charakterizuje afinitu k vodě, která se přidává do mobilních fází při HILIC separacích na polárních kolonách. HILIC technika našla nejprve uplatnění při separacích sacharidů, aminokyselin a peptidů [3], v posledních letech ale rychle roste počet nově vyvinutých nových kolon pro HILIC a aplikací pro separace v oblasti analýz životního prostředí, potravin, přírodních látek i syntetických léčiv, iontových i neiontových tenzidů. Významnou výhodou HILIC separací je zvýšená citlivost LC-MS analýz, díky zlepšené ionizaci elektrosprejem (ESI) v mobilních fázích s vysokým obsahem acetonitrilu [4].

K HILIC separacím lze použít různých typů polárních kolon s neiontovými i s iontovými skupinami na povrchu silikagelu nebo organických polymerních matric. Oblíbeným materiálem je nemodifikovaný silikagel se sníženou koncentrací povrchových silanolových skupin, případně hybridní kolony s alkylovými skupinami inkorporovanými do silikagelové matrice [5]. HILIC separace využívají i stacionární fáze s chemicky vázanými aminopropylými [6], amidovými, nitrilovými, karbamátovými, diolovými, polyethylenglykolovými či polyhydroxylovými (cyklodextranovými, sorbitolovými) a dalšími polárními skupinami [7]. Stacionární fáze na bázi polyimidu kyseliny jantarové (PolyGLYCOPLEX A, Poly Hydroxyethyl A, Poly CAT A a Poly Sulphoethyl A) byly vyvinuty speciálně pro HILIC chromatografii [2], stejně jako polymerní kolony s chemicky vázanými amidickými [8] či zwitteriontovými sulfobetainovými či fosforylcholinovými [9] skupinami, určenými přímo pro HILIC aplikace. Velmi perspektivním materiálem pro HILIC separace je silikagel typu C s hydrosilovaným povrchem [10], kde jsou silanolové skupiny (-Si-OH) nahrazeny hydridovými skupinami (-Si-H), případně modifikovaný méně polárními skupinami (C18, cholesterol, kyselina undekanová). Lze využít i monolitických HILIC kolon na bázi silikagelu či organických polymerů, v konvenčním i v kapilárním formátu. Obr. 1 ukazuje struktury některých

stacionárních fází využívaných pro HILIC separace.

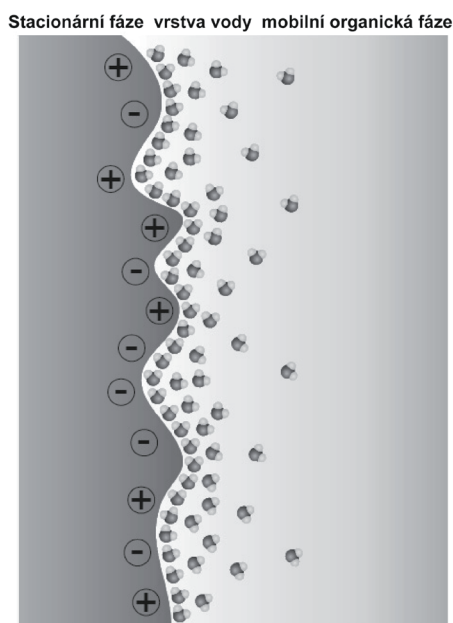
Obr. 1 – Struktury některých HILIC stacionárních fází



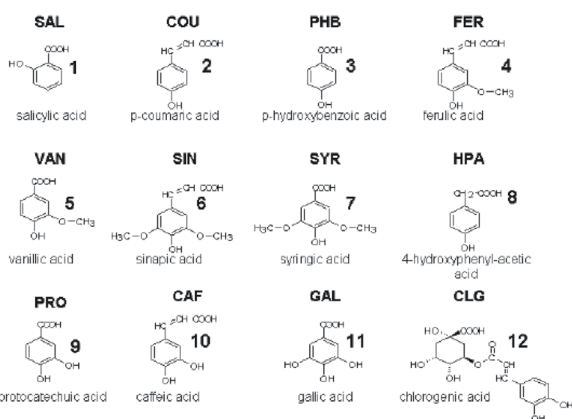
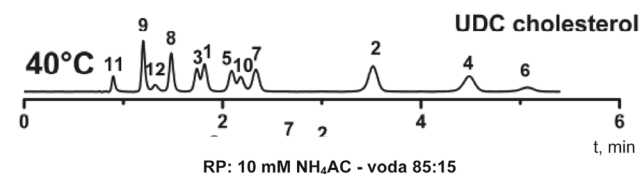
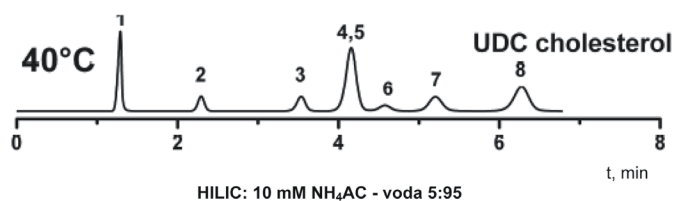
Hlavní hnací silou retence jsou hydrofilní proton donor-akceptorové a dipól-dipólové interakce jak s povrchem stacionární fáze, tak i s kapalinou okludovanou na jeho povrchu v difúzní vrstvě (obr. 2). U slabých kyselin a bází se mohou uplatnit i iontově-výměnné interakce. Mobilní fáze obsahují obvykle vysokou koncentraci acetonitrilu (50–99%) ve vodě, často s přísadou pufru. Typ stacionární fáze a složení mobilní fáze ovlivňují výsledný mechanismus separace, charakteristický pro systémy s normálními fázemi – retence látek se zvyšuje s jejich polaritou a klesá s rostoucí koncentrací vodné složky (polárnějšího rozpouštědla) v mobilních fázích s vysokým obsahem acetonitrilu.

Na mnoha typech polárních kolon se při nižších koncentracích ACN mění mechanismus retence a chromatografické chování

Obr. 2 – Difúzní vrstva vody na povrchu polárního sorbentu



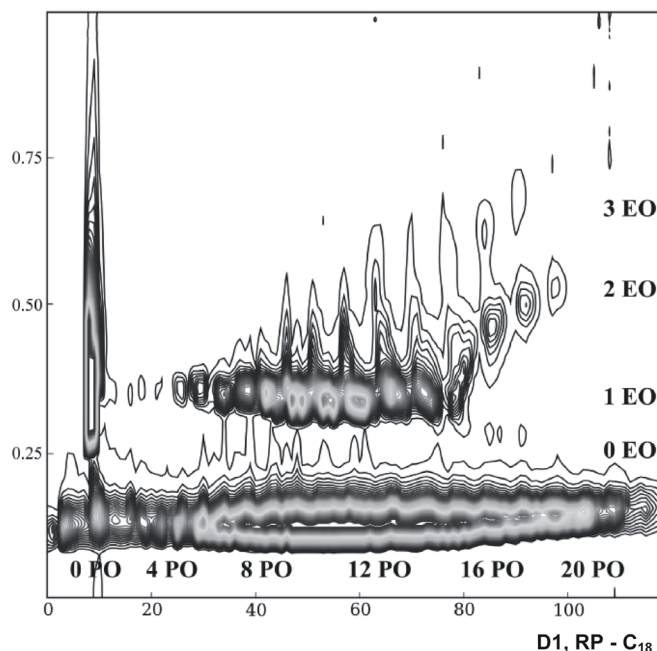
Obr. 3 – Separace fenolických kyselin na koloně hydrosilovaného silikagelu, modifikovaného cholesterolem, za HILIC a RP podmínek



látek odpovídá separacím v systémech s převrácenými fázemi (RP) – retence roste s rostoucím obsahem vody v mobilní fázi. Při separacích na jedné koloně v různých mobilních fázích lze dosáhnout velmi odlišné selektivity separace a vzájemně se doplňující informace o složení vzorku, jak ilustruje příklad na obr. 3. Podobně lze získat doplňkové informace o vzorku i při kombinaci HILIC separace se separací v RP systémech, jak ukazuje příklad separace EO-PO tenzidu na obr. 4, kde se jednotlivé ko-oligomery separují podle počtu oxypropylenových jednotek (PO) na koloně C18 gradientem acetonitrilu ve vodě v první (RP) dimenzi a podle počtu oxyethylenových jednotek (EO) na aminopropylsilikagelové koloně v organické mobilní fázi s nízkým obsahem vody ve druhé (HILIC) dimenzi [11].

Obr. 4 – Difúzní vrstva vody na povrchu polárního sorbentu

D2, HILIC, Aminopropyl silikagel



Podrobnější přehled možností HILIC separací lze nalézt v nedávno uveřejněných přehledných referátech [12–15] a ve zvláštních vydáních časopisu *Journal of Separation Science* (Vol. 31, č. 9, 2008 a Vol. 33, č. 6–7, 2010).

Literatura

- [1] Huber, J.F.K, Pawlowska, M., Markl, P., *Chromatographia*, 1984, 19, 19–28.
- [2] Alpert, A.J., *J. Chromatogr.* 1990, 449, 177–196.
- [3] Strege, M.A., *Anal. Chem.*, 1998 70, 2439–2445.
- [4] Brown, S.D., White, C.A., Bartlett, M.G., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2002, 16, 1871–1876.
- [5] McCalley, D.V., *J. Chromatogr. A*, 2007, 1171, 46–55.
- [6] Olsen, B.A., *J. Chromatogr. A*, 2001, 913, 112–122.
- [7] Risley, D.S., Strege, M.A., *Anal. Chem.*, 2000, 72, 1736–1739.
- [8] Karlsson, G., Winge, S., Sandberg, H., *J. Chromatogr. A*, 2005, 1092, 246–249.
- [9] Jiang, W., Irgum, K., *Anal. Chem.*, 2002, 74, 1993–2003.
- [10] Peseck, J.J., Matyska, M.T., *LC GC*, 2006, 24, 296–303.
- [11] Jandera, P., Fischer, J., Lahovská, H., Novotná, K., Česla, P., Kolářová, L., *J. Chromatogr. A*, 2006, 1119, 3–10.
- [12] Jandera, P., *J. Sep. Sci.*, 2008, 31, 1421–1437.
- [13] Hemström, P., Irgum, K., *J. Sep. Sci.*, 2006, 29, 1784–1821.
- [14] Iwasaki, Y., Ishii, Y., Ito, R., Saito, K., Nakazawa, H., *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.* 2007, 30, 2117–2126.
- [15] Yoshida, T., *J. Biochem. Biophys. Met.*, 2004, 60, 265–280.

Abstract

HILIC CHROMATOGRAPHY: A PERSPECTIVE SEPARATION TECHNIQUE FOR POLAR COMPOUNDS ON POLAR STATIONARY PHASES IN AQUEOUS-ORGANIC MOBILE PHASES

Summary: Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) can be characterized as normal-phase chromatography on polar columns in aqueous-organic mobile phases rich in organic solvents (usually acetonitrile), sometimes combined with ionic interactions. HILIC offers separation selectivity complementary to reversed-phase LC separations of peptides, proteins, oligosaccharides, drugs, metabolites and various natural compounds on bare silica gel, silica-based amino-, amido-, cyano-, carbamate-, diol-, polyol-, zwitterionic sulfobetaine, or poly(2-sulphoethyl aspartamide) and other chemically bonded polar stationary phases. Highly organic HILIC mobile phases enhance ionization in the electrospray ion source and improve the sensitivity of LC-MS separations.

Keywords: HILIC, Stationary phases, Mixed-mode separations Two-dimensional separations