

Eine Moleküldynamikstudie zum Verteilungsmechanismus in der Hydrophilen Interaktionschromatographie

Sergey M. Melnikov, Alexandra Höltzel, Andreas Seidel-Morgenstern und Ulrich Tallarek*

Obwohl die Hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC) sich zur bedeutendsten flüssigkeitschromatographischen Trennmethode nach der Umkehrphasen-Chromatographie entwickelt hat, ist ihr Retentionsmechanismus noch weitgehend ungeklärt.^[1] Für HILIC verwendet man polare stationäre Phasen, im einfachsten Fall nichtmodifiziertes Kieselgel, und wässrig-organische mobile Phasen, für die sich Acetonitril (ACN) bewährt hat, um polare, hydrophile Analyten zu trennen. Somit können durch HILIC auch Substanzen getrennt werden, die auf Umkehrphasen nicht ausreichend retardiert werden, sich in den nichtwässrigen mobilen Phasen der Normalphasen-Chromatographie nicht lösen und nicht die für die Ionenaustausch-Chromatographie notwendigen Ladungen aufweisen. Typischerweise erfordert HILIC-Retention eine überwiegend organische mobile Phase, und oft wird ein sprunghafter Anstieg der Retention bei hohem ACN-Gehalt beobachtet. Als Retentionsprinzip wird – außer adsorptiven und elektrostatischen Wechselwirkungen der Analyten mit der stationären Phase – die Verteilung der polaren Analyten zwischen einer auf der stationären Phase quasi-immobilisierten Wasserschicht und der überwiegend organischen mobilen Phase postuliert (Verteilungsmechanismus).^[1,2] Die Oberflächenadsorption von Wasser auf Kieselgel-Phasen unter HILIC-Bedingungen wurde mit chromatographischen und spektroskopischen Methoden nachgewiesen;^[3] die experimentellen Daten ermöglichen aber keine Rückschlüsse auf Struktur und Dynamik der Wasserschicht auf molekularer Ebene.

Für die Umkehrphasen-Chromatographie haben Monte-Carlo- und Moleküldynamik(MD)-Simulationen ein detailliertes Bild von der chromatographischen Grenzregion zwischen stationärer und mobiler Phase gezeichnet, das entscheidend zum Verständnis des Retentionsmechanismus beigetragen hat.^[4] Wir übertragen nun diesen Ansatz auf das HILIC-System und studieren mithilfe von MD-Simulationen Zusammensetzung, Struktur und Dynamik von Wasser(W)/ACN-Gemischen in einer Kieselgelpore von 9 nm Durchmesser, die aus zwei benachbarten Flüssigkeitsreservoirs gespeist wird (Abbildung 1). Unser Modell bildet die Gege-

benheiten in einer Chromatographie-Säule nach, wo sich > 99 % der Kieselgeloberfläche in den Mesoporen (typische Durchmesser: 6–12 nm) des Festbetts befinden. Durch Variation der Zusammensetzung des W/ACN-Gemisches in den Reservoirs von 50:50 bis 1:99 (v/v) wird untersucht, wie sich ein steigender ACN-Gehalt der mobilen Phase auf die Verhältnisse in der Pore auswirkt.

Gemäß den radialen Anzahldichteprofilen der Sauerstoffatome der Wasser-Moleküle sind drei Regionen innerhalb der Pore zu unterscheiden (Abbildung 2): die unmittelbare Oberflächenregion (I, $R < 0.425$ nm), die fast ausschließlich Wasser-Moleküle enthält, sowie die sich anschließende Übergangsregion (II, $R = 0.425$ –1.5 nm), die zu Regi-

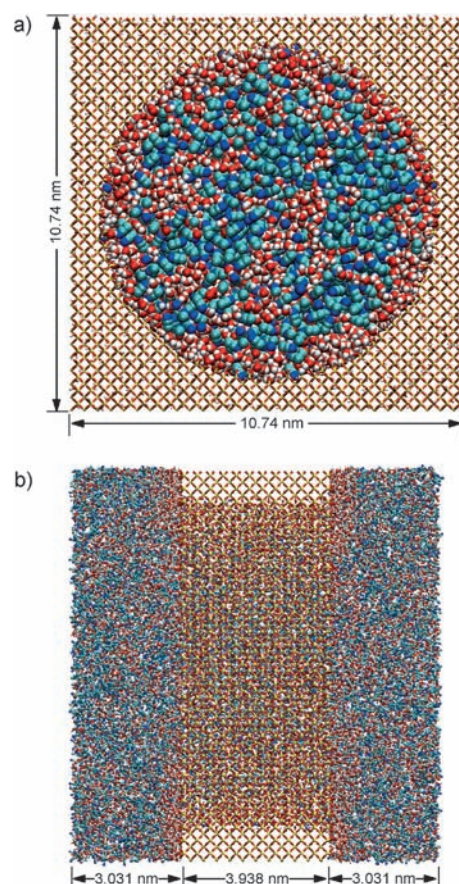


Abbildung 1. a) Aufsicht (Projektion) auf den Kieselgelblock mit flüssigkeitsgefüllter, zylindrischer Pore von 9 nm Durchmesser. b) Seitenansicht (Projektion) der Simulationsbox: Kieselgelblock mit Pore zwischen zwei Flüssigkeitsreservoirs. Systemzustand nach 30 ns Simulationszeit für W/ACN 30:70 (v/v) in den Reservoirs. Gelb: Si, rot: O, weiß: H, blau: N, cyan: zentrales Kohlenstoffatom und Methylgruppe von ACN.

[*] Dr. A. Höltzel, Prof. Dr. U. Tallarek
Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg
Hans-Meerwein-Straße, 35032 Marburg (Deutschland)
E-Mail: tallarek@staff.uni-marburg.de
Homepage: <http://www.uni-marburg.de/fb15/ag-tallarek>

Dr. S. M. Melnikov, Prof. Dr. A. Seidel-Morgenstern
Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme
Sandtorstraße 1, 39106 Magdeburg (Deutschland)

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201201096> zu finden.

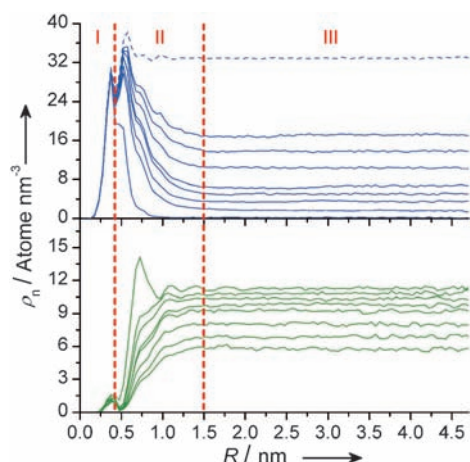


Abbildung 2. Radiale Verteilung von Wasser (blau, oben) und ACN (grün, unten) in der Kieselgelpore für W/ACN 100:0 (gestrichelt), 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, und 1:99 (v/v) in den Reservoirs. Aufgetragen ist die Anzahldichte ρ_n für das Sauerstoffatom von Wasser und das zentrale Kohlenstoffatom von ACN. Rote, vertikale Linien markieren die Grenzen zwischen der unmittelbaren Oberflächenregion (I), der Übergangsregion (II) und der oberflächenfernen Region (III).

on I hin noch von Wasser-Molekülen dominiert wird, bevor sie allmählich in die oberflächenferne Region (III, $R > 1.5$ nm) übergeht, deren radial konstante Anzahldichteprofile dem jeweiligen W/ACN-Verhältnis in den Reservoirs entsprechen.

Region I ist vollständig von der Kieselgeloberfläche bestimmt, deren Präferenz für Wasser auf der Möglichkeit zur Bildung eines ausgedehnten Netzwerks aus Wasserstoffbrücken (HBs) ausgehend von den Silanol-Gruppen (SiOH) der Oberfläche beruht. Nahezu alle Wasser-Moleküle in Region I sind über W-SiOH-HBs direkt an die Oberfläche gebunden (Abbildung 3a). In der Übergangsregion sinkt die Zahl der W-SiOH-HBs dann zugunsten von W-W-HBs (Abbildung 3b). Das Maximum der Koordination durch W-W-HBs wird bemerkenswerterweise direkt nach dem Abklingen der W-SiOH-HBs erreicht ($R \approx 0.7$ nm); sogar bei geringem Wasser-Gehalt (W/ACN 5:95 (v/v)) erreicht die Zahl der HBs pro Wasser-Molekül an dieser Stelle noch 80 % des Wertes von reinem Wasser. Zur Region III hin sinkt die Zahl der W-W-HBs und steigt die Zahl der W-ACN-HBs auf den dem W/ACN-Verhältnis in den Reservoirs entsprechenden Wert. Abbildung 3 belegt einen selektierenden Einfluss der Kieselgeloberfläche, der über die direkte Bindung von Wasser-Molekülen hinausgeht; die Präsenz von W-SiOH-HBs fördert in der angrenzenden Schicht die Bildung von W-W- gegenüber W-ACN-HBs, was zur Anreicherung von Wasser in der Übergangsregion führt. Die Mikroheterogenität von W/ACN-Gemischen,^[5] also die Neigung von Wasser- und ACN-Molekülen zur Koordination durch die eigene Spezies (in Abbildung 1 in Pore und Reservoirs erkennbar), dürfte diese Entwicklung begünstigen, was wiederum den Erfolg von ACN als organisches Lösungsmittel für HILIC erklärt. Abbildung 3 zeigt auch, dass die Koordination der Oberfläche durch Wasser-Moleküle Vorrang vor dem Aufbau der Wasserschicht in der Übergangsregion hat: Ein steigender ACN-

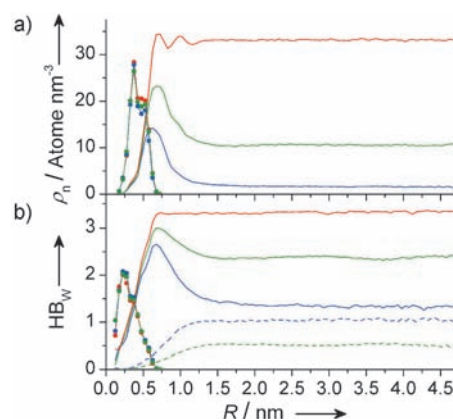


Abbildung 3. Radiale Projektion des Wasserstoffbrücken-Netzwerks in der Kieselgelpore für W/ACN 100:0 (rot), 30:70 (grün) und 5:95 (v/v) (blau) in den Reservoirs. a) Anzahldichte ρ_n der Sauerstoffatome für über W-SiOH-Wasserstoffbrücken direkt an die Porenoberfläche gebundene Wasser-Moleküle (dünne Linien mit Punkten) und für nicht direkt oberflächengebundene Wasser-Moleküle (dicke Linien). b) Durchschnittliche Zahl der Wasserstoffbrücken pro Wasser-Molekül HB_w für W-SiOH- (dünne Linien mit Punkten), W-W- (dicke Linien) und W-ACN-Wasserstoffbrücken (gestrichelt).

Gehalt in den Reservoirs wirkt sich auf die oberflächengebundenen Wasser-Moleküle kaum aus, sondern betrifft vor allem die nicht oberflächengebundenen Wasser-Moleküle; dabei sinkt deren Anzahldichte in der Übergangsregion ($R \approx 0.7$ nm) stärker als ihre Koordination.

Die Anreicherung von Wasser in den Regionen I und II bewirkt, dass sich mit steigendem ACN-Gehalt in den Reservoirs die lokale Zusammensetzung an und nahe der Kieselgeloberfläche zunehmend vom nominellen W/ACN-Verhältnis unterscheidet (Abbildung 4). Ein deutlicher Effekt setzt jedoch – ebenso wie die HILIC-Retention polarer Analyten – erst bei höherem ACN-Gehalt ein: Ein gegenüber

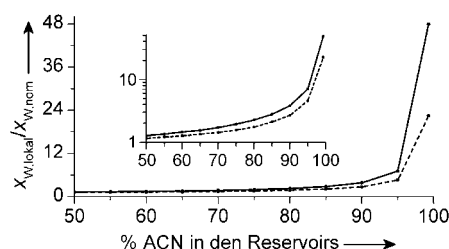


Abbildung 4. Verhältnis des lokalen Wasser-Molenbruchs im Poreninneren $x_{W,lokal}$ (dicke Linie: Region I, gestrichelte Linie: Regionen I und II) zum nominellen Wasser-Molenbruch in den Reservoirs $x_{W,nom}$ als Funktion des ACN-Gehalts (Volumenfraktion) in den Reservoirs; Einschub: logarithmische Auftragung.

dem der Reservoirs verdoppelter Wasser-Molenbruch ist für Region I bei 75 % ACN und für die Regionen I und II bei 85 % ACN erreicht. Zwischen 95 und 99 % ACN steigt das Verhältnis zwischen lokalem und nominellem Wasser-Molenbruch plötzlich steil an; der hier drastische Unterschied im Wasser-Gehalt zwischen den Regionen I und II und dem Rest des Systems erklärt die starke Retention hydrophiler Analy-

ten bei hohem ACN-Gehalt der mobilen Phase. Abbildung 4 erinnert stark an die HILIC-typische Retentionsdynamik, die sich durch einen zunächst flachen Anstieg der Retentionszeit von Analyten mit zunehmendem ACN-Gehalt der mobilen Phase auszeichnet, bevor die Kurve bei hohem ACN-Gehalt in einem Aufwärtsschwung endet.^[6]

Die zur Oberfläche hin zunehmende Koordination durch W-W- und W-SiOH-HBs (Abbildung 3b) verringert die radiale und axiale translatorische Beweglichkeit der Wasser- und ACN-Moleküle (Abbildung 5). Die Aufenthaltszeit für ein Molekül an einer bestimmten radialen Position (Abbildung 5a) steigt ab $R < 1$ nm auf sehr hohe Werte in Region I. Je geringer der Wasser-Gehalt in den Reservoirs, desto länger bleiben die Wasser-Moleküle an der Oberfläche. Während für W/ACN 100:0 (v/v) die Aufenthaltszeit von Wasser-Molekülen in Region I ca. 100-fach größer ist als in Region III, erhöht sich dieser Faktor auf jeweils 200, 400 und 600 für 30:70, 5:95 und 1:99 (v/v). Die wenigen ACN-Moleküle verharren noch länger als die Wasser-Moleküle an der Oberfläche, da sie erst durch eine wasserreiche Schicht wandern müssten, um in eine Region mit höherem ACN-Gehalt zu gelangen. Die Ein-

schränkung der Beweglichkeit parallel zur Porenoberfläche reicht weit in das Porenvolumen hinein (Abbildung 5b): Bereits etwa mit Eintritt in die Übergangsregion ($R < 1.5$ –2 nm) sinken die Diffusionskoeffizienten von Wasser und ACN bis auf nahezu null in Region I.

Angesichts der geringen Beweglichkeit sowie des vom W/ACN-Verhältnis in den Reservoirs unabhängig vernachlässigbaren ACN-Gehalts kann Region I als auf der Oberfläche quasi-immobilisierte Wasserschicht interpretiert werden. Dagegen ist die Übergangsregion eine wasserreiche Schicht eingeschränkter Beweglichkeit, die sowohl von der Oberfläche als auch vom nominellen W/ACN-Verhältnis in den Reservoirs beeinflusst wird. Die Situation erinnert an die elektrolitische Doppelschicht, und es liegt nahe, Region I als starre und Region II als diffuse Wasserschicht zu bezeichnen. Die diffuse Wasserschicht erweitert den räumlichen Bereich für die Retention polarer Analyten; in der vorliegenden Pore füllt die retentive Schicht (Regionen I und II) 56% des Volumens. Dabei dürfte die verringerte Beweglichkeit in dieser Schicht den Aufenthalt von Analyten verlängern und so die Retention synergistisch verstärken.

Die vorliegende MD-Studie erklärt auf molekularer Ebene die Voraussetzungen für die HILIC-Retention polarer Analyten durch Verteilung zwischen einer ACN-reichen mobilen Phase und einer auf der Oberfläche der stationären Phase präsenten Wasserschicht:

1. Ein von den Silanol-Gruppen der Kieselgeloberfläche ausgehendes Netzwerk aus Wasserstoffbrücken ist die Ursache dafür, dass zur Oberfläche hin über eine Distanz von ca. 1.5 nm der Wasser-Gehalt steigt und die translatorische Beweglichkeit sinkt.
2. Die Wasser-Anreicherung an und nahe der Oberfläche sorgt dafür, dass sich mit steigendem ACN-Gehalt der mobilen Phase Wasserschicht und mobile Phase zunehmend voneinander unterscheiden. Das Verhältnis von lokalem und nominellem Wasser-Molenbruch wächst nichtlinear mit dem ACN-Anteil der mobilen Phase und endet mit einem drastischen Sprung. Dieses Verhalten spiegelt die HILIC-Retentionsdynamik vieler polarer Analyten wider.
3. Die Wasserschicht besteht aus einem starren und einem diffusen Teil und ist damit sowohl komplexer als auch ausgedehnter als bislang angenommen. Der Schlüssel zu Entstehung und Eigenschaften der Wasserschicht liegt in den jeweiligen Fähigkeiten von Wasser, ACN und der Kieselgeloberfläche zur Bildung von Wasserstoffbrücken.

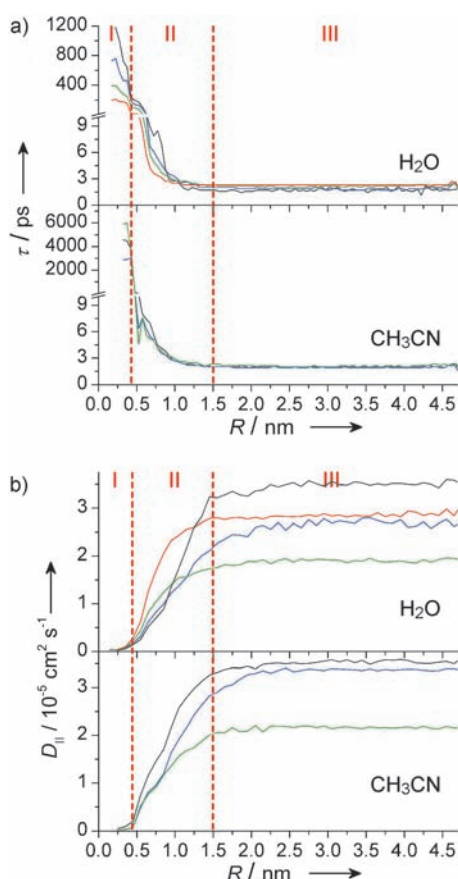


Abbildung 5. Radiale Abhängigkeit der translatorischen Beweglichkeit von Wasser- und ACN-Molekülen in der Kieselgelpore für W/ACN 100:0 (rot), 30:70 (grün), 5:95 (blau) und 1:99 (v/v) (schwarz) in den Reservoirs. a) Aufenthaltszeit τ an einer bestimmten Position senkrecht zur Porenoberfläche. b) Diffusionskoeffizient parallel zur Porenoberfläche ($D_{||}$). Rote, vertikale Linien markieren die Grenzen zwischen der unmittelbaren Oberflächenregion (I), der Übergangsregion (II) und der oberflächenfernen Region (III).

Methoden

Die quaderförmige Simulationsbox (mit Dimensionen wie in Abbildung 1 gezeigt) enthielt einen zentralen Block aus β -Cristobalit- SiO_2 mit einer zylindrischen Pore von 9 nm Durchmesser. Die Kieselgeloberflächen wurden präpariert wie in einer früheren Arbeit beschrieben;^[7] der Hydroxylierungsgrad (8.0 – $8.5 \mu\text{mol m}^{-2}$) entspricht dem typischer Kieselgel-Phasen.^[8] MD-Simulationen wurden für ein kanonisches NVT-Ensemble bei 300 K mit Gromacs 4.5.2^[9] durchgeführt. Für Kieselgelatome wurden die Kraftfeld-Parameter von Gulmen und Thompson, für Wasser wurde das SPC/E-Modell und für ACN das TraPPE-UA-Kraftfeld verwendet.^[10] Ein Simulationslauf

dauerte 30 ns, wovon die letzten 6 ns zur Datenanalyse genutzt wurden. Weitere Details in den Hintergrundinformationen.

Eingegangen am 9. Februar 2012,

veränderte Fassung am 9. März 2012

Online veröffentlicht am 8. Mai 2012

Stichwörter: Analytische Methoden · Flüssigkeitschromatographie · Moleküldynamik · Retention · Verteilungsmechanismus

-
- [1] a) A. Alpert, *J. Chromatogr. A* **1990**, 499, 177–196; b) P. Hemström, K. Irgum, *J. Sep. Sci.* **2006**, 29, 1784–1821; c) M. Lämmerhofer, *J. Sep. Sci.* **2010**, 33, 679–680; d) Y. Guo, S. Gaiki, *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218, 5920–5938.
- [2] a) W. Bicker, J. Wu, H. Yeman, K. Albert, W. Lindner, *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218, 882–895; b) N. P. Dinh, T. Jonsson, K. Irgum, *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218, 5880–5891.
- [3] a) D. V. McCalley, U. D. Neue, *J. Chromatogr. A* **2008**, 1192, 225–229; b) F. Gritti, A. dos Santos Pereira, P. Sandra, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216, 8496–8504; c) J. L. Gasser-Ramirez, J. M. Harris, *Anal. Chem.* **2009**, 81, 2869–2876; d) E. Wikberg, T. Sparrman, C. Viklund, T. Jonsson, K. Irgum, *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218, 6630–6638.
- [4] a) J. L. Rafferty, J. I. Siepmann, M. R. Schure, *Adv. Chromatogr.* **2010**, 48, 1–55; b) S. M. Melnikov, A. Hölzel, A. Seidel-Morgenstern, U. Tallarek, *J. Phys. Chem. C* **2009**, 113, 9230–9238.
- [5] R. D. Mountain, *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 16460–16464.
- [6] Der exakte Kurvenverlauf hängt vom Analyten und den genauen experimentellen Bedingungen ab. Siehe z.B.: a) Abbildung 2 in E. S. Grumbach, D. M. Diehl, U. D. Neue, *J. Sep. Sci.* **2008**, 31, 1511–1518; b) Abbildung 2 in F. Gritti, A. dos Santos Pereira, P. Sandra, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217, 683–688; c) Abbildung 1 in A. E. Karatapanis, Y. C. Fiamegos, C. D. Stalikas, *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218, 2871–2879.
- [7] S. M. Melnikov, A. Hölzel, A. Seidel-Morgenstern, U. Tallarek, *Anal. Chem.* **2011**, 83, 2569–2575.
- [8] U. D. Neue, *HPLC Columns: Theory, Technology, and Practice*, Wiley-VCH, Weinheim, **1997**, S. 110.
- [9] D. van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark, H. J. C. Berendsen, *J. Comput. Chem.* **2005**, 26, 1701–1718.
- [10] a) T. S. Gulmen, W. H. Thompson, *Langmuir* **2006**, 22, 10919–10923; b) H. J. C. Berendsen, J. R. Grigera, T. P. Straatsma, *J. Phys. Chem.* **1987**, 91, 6269–6271; c) C. D. Wick, J. M. Stubbs, N. Rai, J. I. Siepmann, *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 18974–18982.
-