Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Kolony pro polární analyty

Martina Riesová

VIZE 2021, 23.11.2021 Hotel Hermitage Praha & stream

Agenda

- Polar molecules
- Chro r molecules
- Reversed phase: What works and what doesn't
- Mixed Mode: Overview, Retaining polar acidic molecules
- HILIC

Náplň příspěvku bude upravena

dle dotazníkového šetření

©2021 Waters Corporation

Nyní bych si dal/dala:

11:50

a) Oběd

b) Pivo

c) Povídání o Waters kolonách

©2021 Waters Corporation

Nyní bych si dal/dala:

11:50

a) Oběd

b) Pivo

c) Povídání o Waters kolonách

©2021 Waters Corporation

Vím už, co je MaxPeak HPS Premier technologie?

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

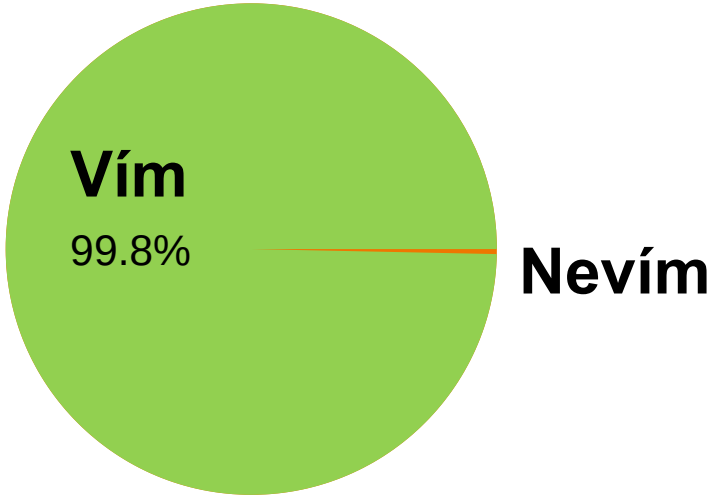
a) Vím

b) Nevím

©2021 Waters Corporation

Vím už, co je MaxPeak HPS Premier technologie?

a)	Vím
b)	Nevím



©2021 Waters Corporation

Pro své polární analyty bych volil/volila:

a) RP

b) Mixed-mode

c) HILIC

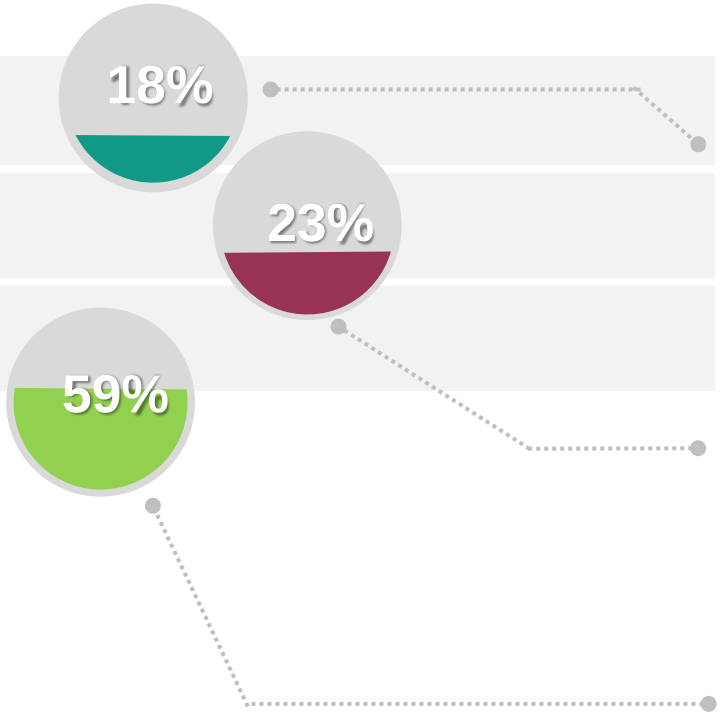
©2021 Waters Corporation

Pro své polární analyty bych volil/volila:

a) RP — 18%

b) Mixed-mode — 23%

c) HILIC — 59%



C18

- Vhodné parametry kolony
- Co funguje/nefunguje

C18 & aniontová výměna

- Polární kyselé látky
- Nové BEH 95 Å částice

Z-HILIC kolona

- Vlastnosti
- Co umí

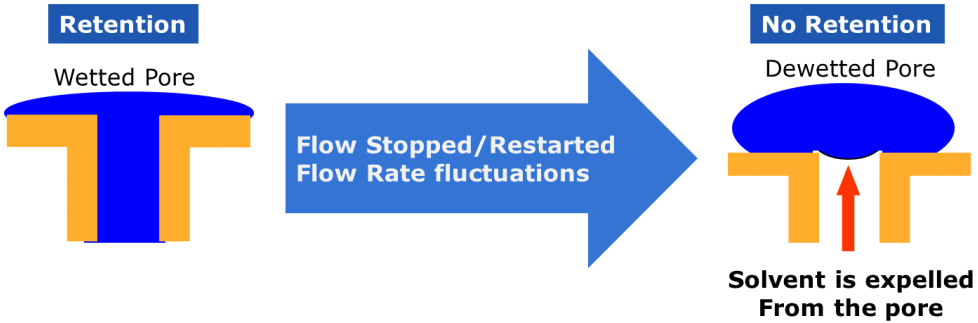
NEW

©2021 Waters Corporation

Retence polárních látek na RP (C18)

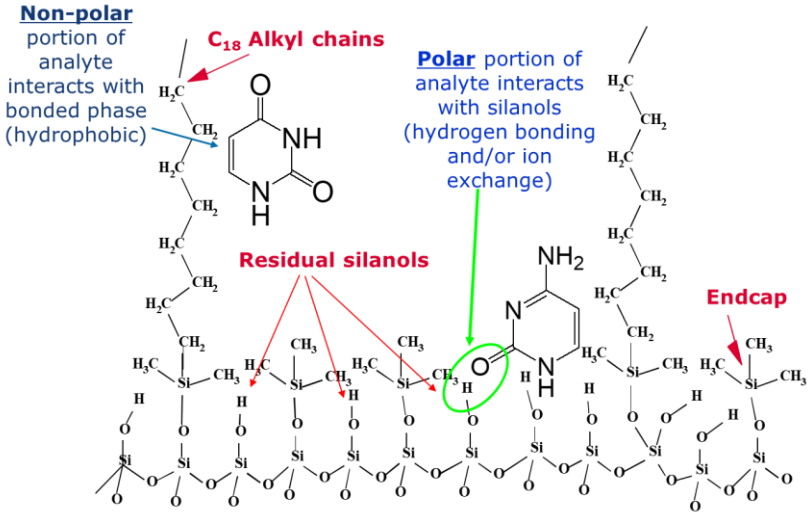
- K zadržení polární látky na nepolární stacionární fázi musíme snížit podíl organiky v MF

Kompatibilita se 100% vodnou MF

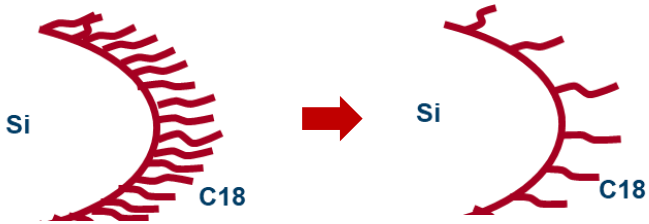


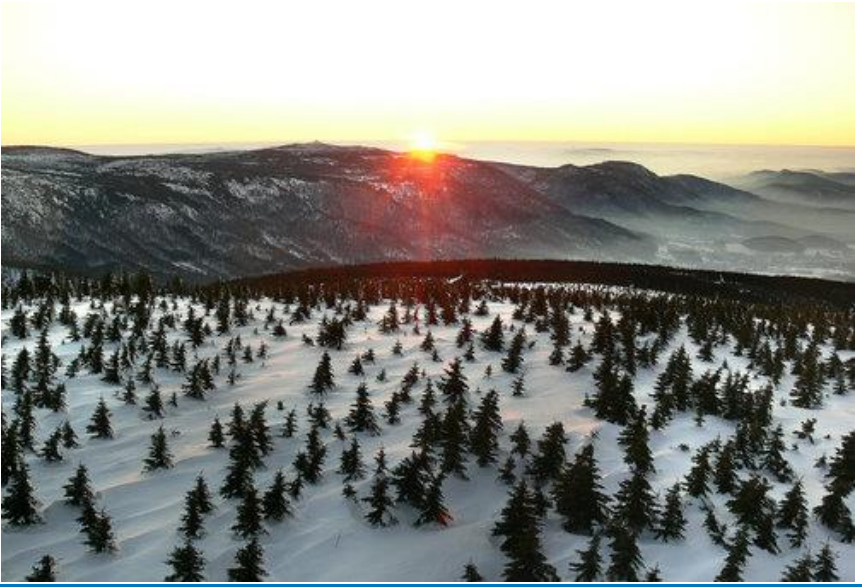
Interakce pro polární látky

silanolová aktivita



Vhodná nižší hustota ligandů



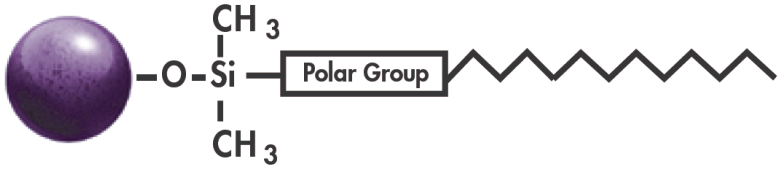


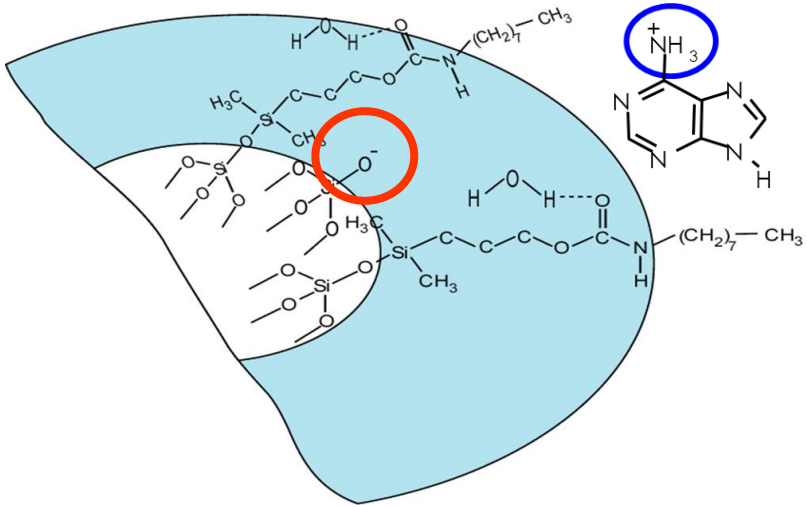
Atlantis	T3
Acquity HSS	T3
XSelect HSS	T3
Cortecs	T3

T3	C18	
1.6	3.2	µmol/m^2

©2021 Waters Corporation

Vložená polární skupina



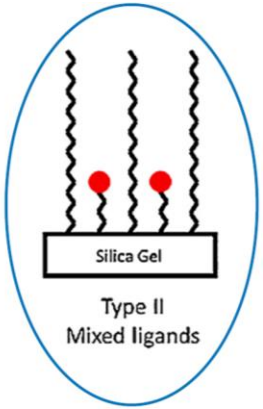


- Kompatibilní se 100% vodnou fází
- Vytvoří se vrstvička vody, která odstíní silanolové skupiny
- Navrženy pro zlepšení tvaru píků bazických látek
- Ligandy navázány hustě

Shield RP18

©2021 Waters Corporation

Vícemodální stacionární fáze



- polární látky – kyseliny
- C18 a kladný náboj

Důležité:

- Vybalancovat příspěvky jednotlivých módů, reprodukovatelnost
- MS kompatibilita – bleeding IEX skupiny – ovlivnění MS signálu
- pH rozmezí (silikagel vs BEH)

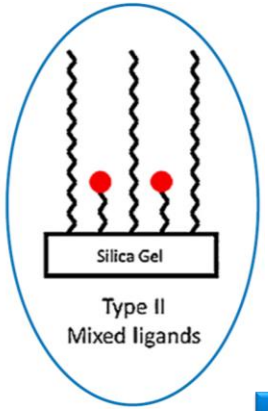
©2021 Waters Corporation

Vícemodální stacionární fáze

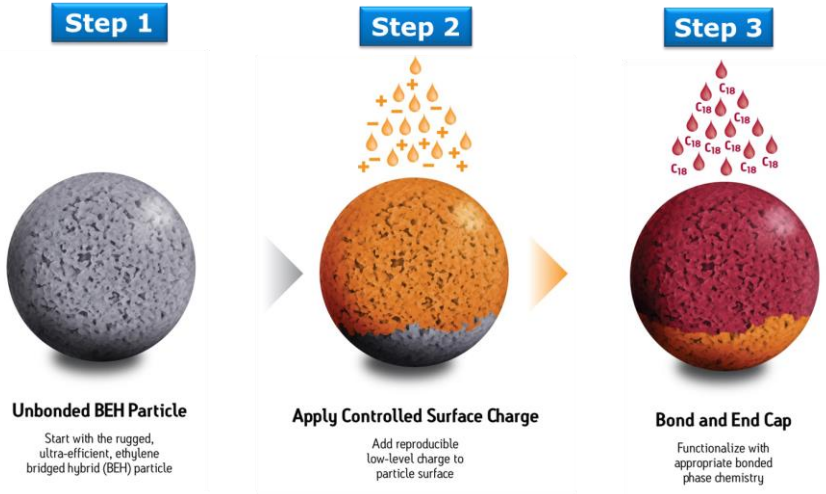
- polární látky – kyseliny
- C18 a kladný náboj

Důležité:

- Vybalancovat příspěvky jednotlivých módů, reprodukovatelnost
- MS kompatibilita
- pH rozmezí (silikagel vs BEH)



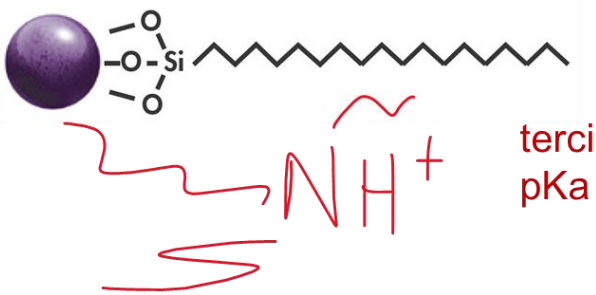
CSH Charged Surface Hybrid



©2021 Waters Corporation

Atlantis Premier BEH C18 AX

- BEH částice 95Å (větší retentivita)



100% vodná fáze MS kompatibilní

Material	BEH130	BEH95	HSS
Surface Area (m^2/g)	**185**	**270**	**236**
Pore Volume (cm^3/g)	0.70	0.72	0.73
Pore Diameter (Å)	130	95	100
Phase Ratio (m^2/cm^3)	**120**	**180**	**164**

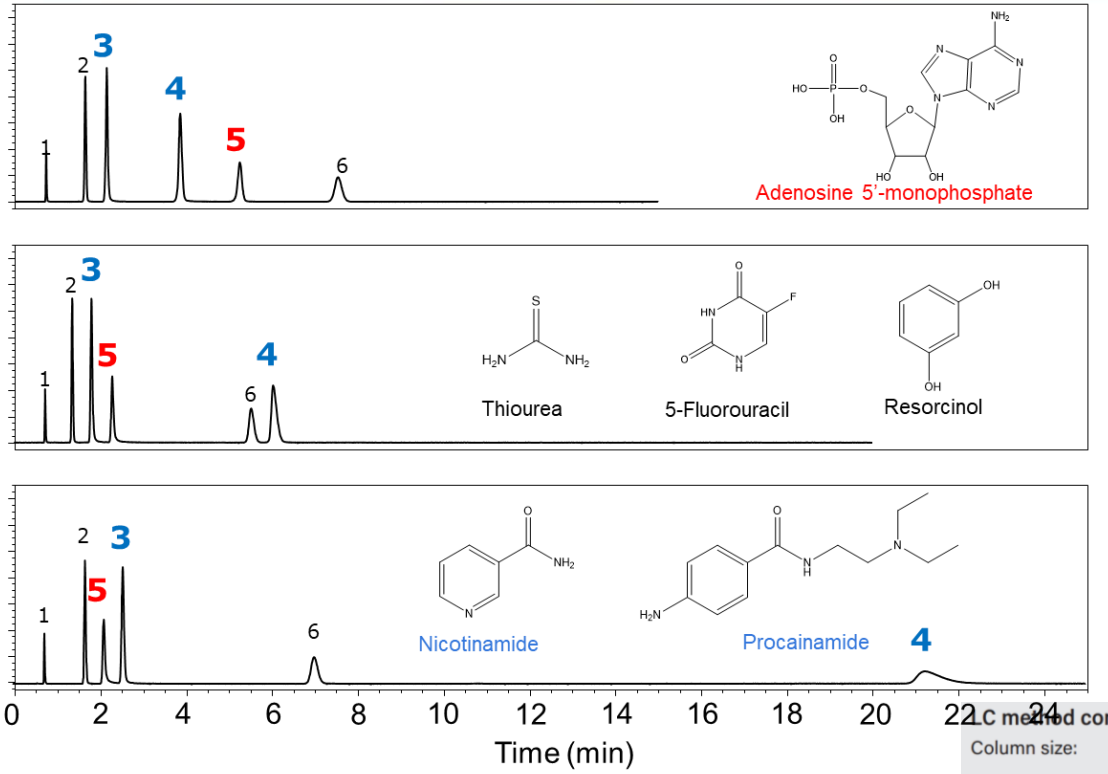
MAXPEAK™ HIGH PERFORMANCE SURFACES

PREMIER

Atlantis PREMIER BEH C_{18} AX 1.7 µm

ACQUITY UPLC CSH C_{18} 1.7 µm

ACQUITY UPLC HSS T3 1.8 µm



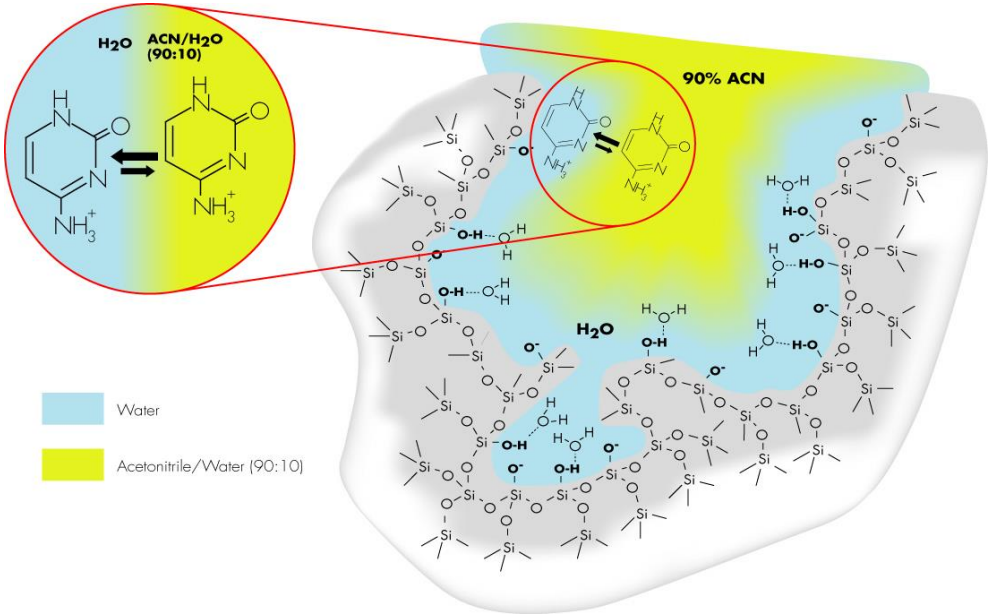
1)Thiourea
2)5-Fluorouracil
3)Nicotinamide
4)Procainamide
5)Adenosine 5'-monophosphate
6)Resorcinol

LC method conditions

Column size:	2.1 × 50 mm
Column temp.:	30 °C
Injection volume:	1.5 µL
Flow rate:	0.2 mL/min
Mobile phase:	10 mM ammonium formate pH 3.00 (aq)
UV detection:	254 nm

©2021 Waters Corporation

Vícemodální retenční mechanismus: HILIC



- **Rozdělovací rovnováha** Polární analyty přecházejí mezi mobilní fází a polární vodnou vrstvou znehybněnou na povrchu sorbentu
- **Iontová výměna** Elektrostatické interakce mezi povrchovými silanoly a/nebo funkčními skupinami s nabitým analytem
- **Vodíková vazby**

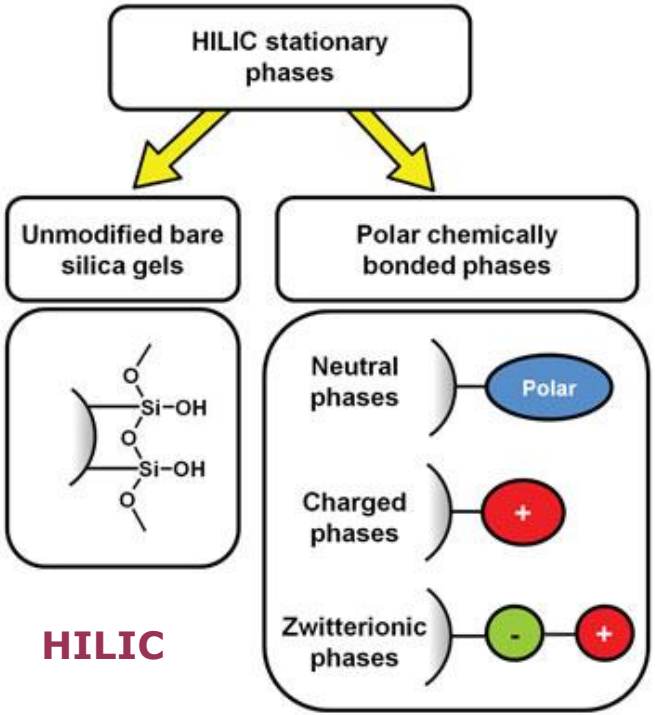
D.V. McCalley, U. D. Neue, *J. Chromatogr. A* 1192 (2008) 225-229

E.S. Grumbach, D.M. Diehl, U.D. Neue, *J. Sep. Sci.* 31 (2008), 1511-1518

A. Méndez, E. Bosch, M. Rosés, U. D. Neue, *J. Chromatogr. A* 986 (2003), 33-44

©2021 Waters Corporation COMPANY CONFIDENTIAL

HILIC stacionární fáze



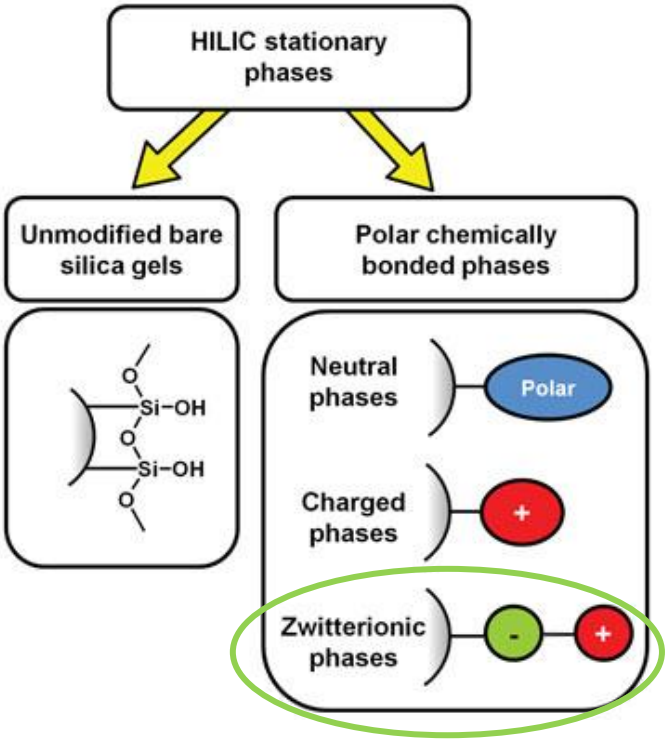
HILIC

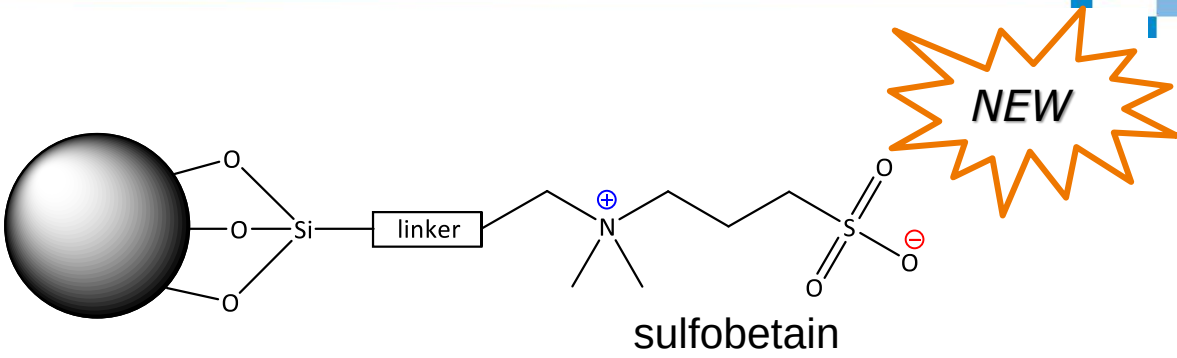
-CN

Amide

-NH2

HILIC stacionární fáze





Atlantis Premier BEH 95Å Z-HILIC

- Stabilita v bazickém pH
  - Silika 2-8, polymerní částice 2-10, **BEH 2-10**
- Nízká výtěžnost analytů citlivých na kov
  - PEEK, **MaxPeak HPS**
- Batch-to-Batch reprodukovatelnost, vázání ligandů

©2021 Waters Corporation

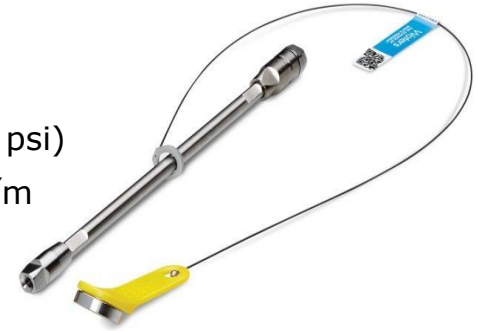
Atlantis Premier BEH 95Å Z-HILIC

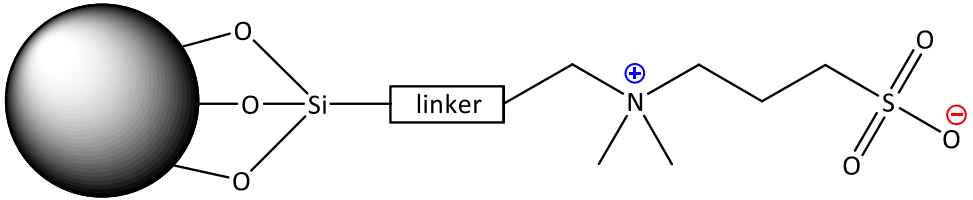
Vlastnosti

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

BEH 95Å částice

- pH i mechanická stabilita (2-10; 18 tis. psi)
- větší retentivita oproti BEH 130Å částicím
- **1.7µm** **2.5µm** **5µm**





Sulfobetainový ligand

- Pozitivní i negativní náboj 1:1
- Celkově neutrální a velmi hydrofilní povrch
- Vytváří "silnou" vodnou vrstvu na povrchu
- Zvýšení retence neutrálních polárních látek *vs* amidové a "HILIC"
- Alternativní selektivita

MaxPeak HPS

- lepší výtěžnost, tvary píků a citlivost díky minimalizaci interakcí kov-analyt

VanGuard FIT formát

- Zabudovaný držák na ochranné cartridge
- Formáty FIT nebo "column"

©2021 Waters Corporation

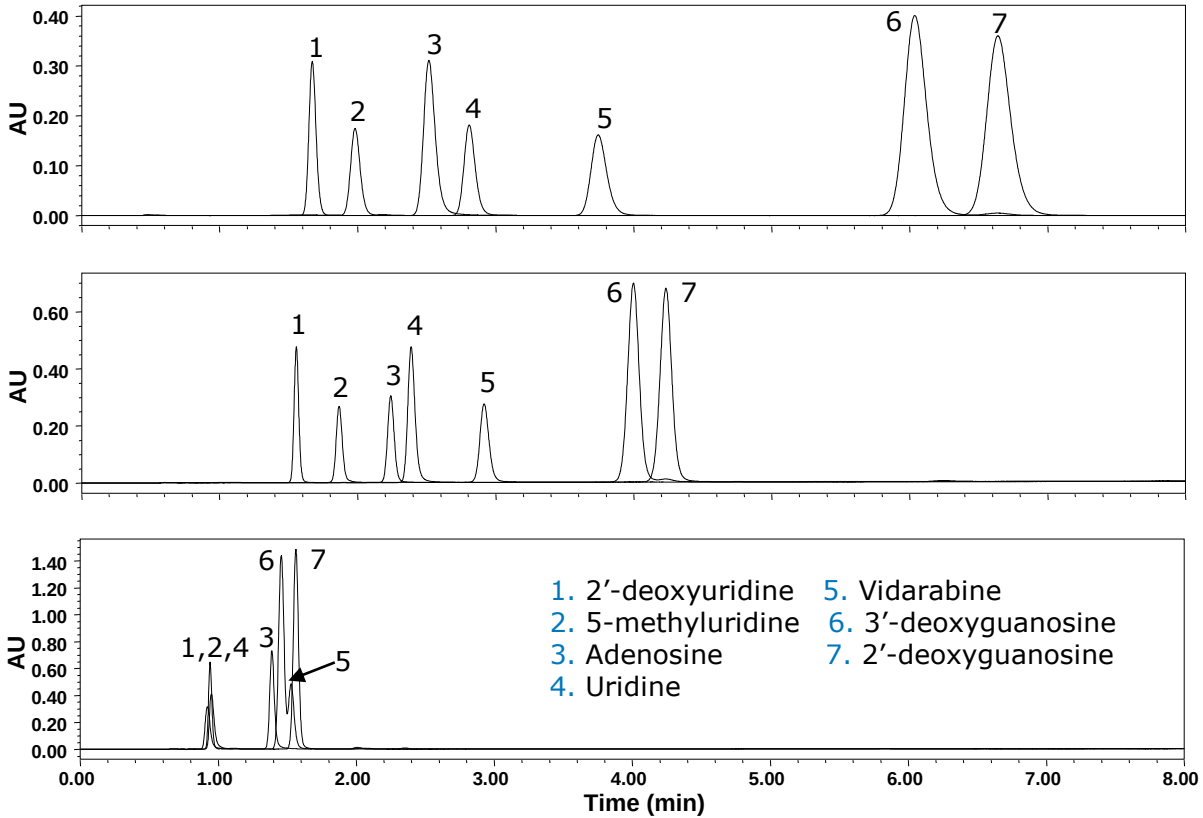
Z-HILIC *vs* HILIC *vs* Amide

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Atlantis Premier BEH Z-HILIC

ACQUITY Premier BEH Amide

ACQUITY BEH HILIC



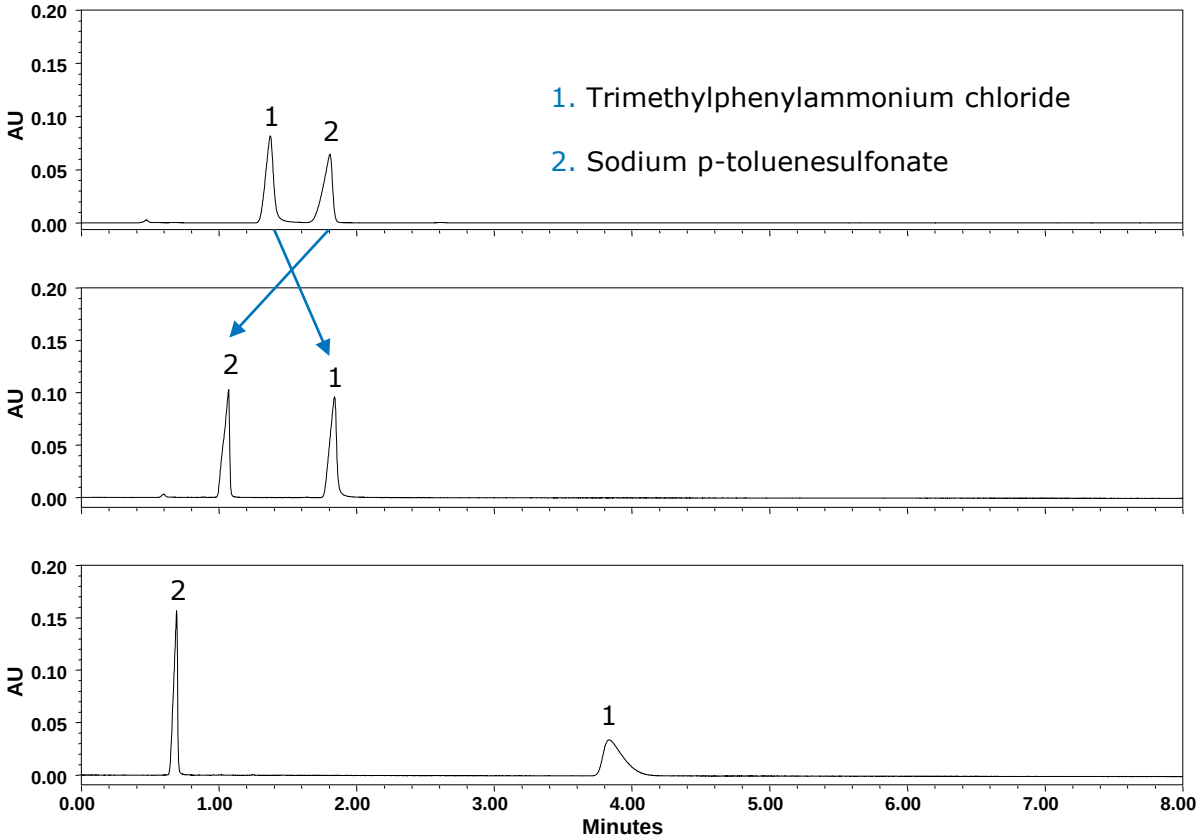
Z-HILIC *vs* HILIC *vs* Amide

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Atlantis Premier BEH Z-HILIC

ACQUITY Premier BEH Amide

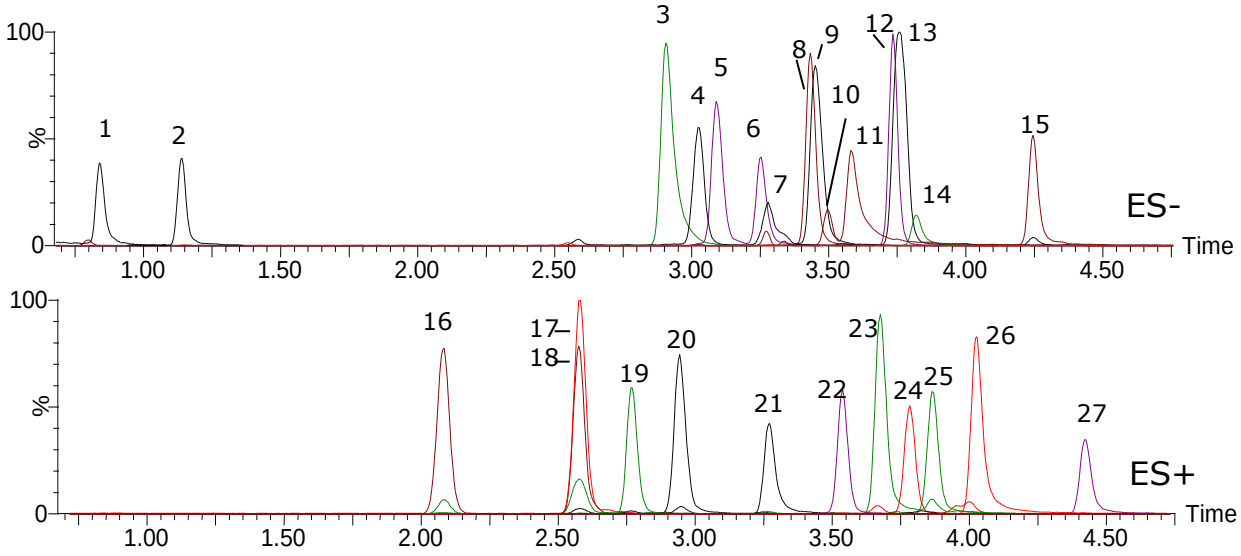
ACQUITY BEH HILIC



©2021 Waters Corporation

Metabolomika

Pentózofosfátový cyklus, Glykolýza and Energetické Metabolity



Representative separation of analyte standards in 50/50 ACN/water

1	Pyruvic acid
2	Lactic acid
3	Deoxyribose 5-phosphate (DeR5P)
4	Dihydroxyacetone phosphate (DHAP)
5	Ribulose 5-phosphate/Xylulose 5-phosp
6	Ribose 5-phosphate (R5P)
7	Glyceraldehyde 3-phosphate (G3P)
8	Sedoheptulose 7-phosphate (S7P)
9	Fructose 6-phosphate (F6P)
10	2-Phosphoglyceric acid (2PG)
11	3-Phosphoglyceric acid (3PG)
12	Phosphoenolpyruvic acid (PEP)
13	Glucose 6-phosphate (G6P)
14	6-Phosphogluconic acid (6PG)
15	Fructose 1,6-Bisphosphate (FBP)
16	Flavin Adenine Dinucleotide (FAD)
17	Acetyl Coenzyme A (Acetyl CoA)
18	Dihydronicotinamide Adenine Dinucleoti
19	Adenosine Monophosphate (AMP)
20	Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD
21	Adenosine Diphosphate (ADP)
22	Guanosine Monophosphate (GMP)
23	Adenosine Triphosphate (ATP)
24	Dihydronicotinamide Adenine Dinucleoti
25	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phos
26	Guanosine Diphosphate (GDP)
27	Guanosine Triphosphate (GTP)

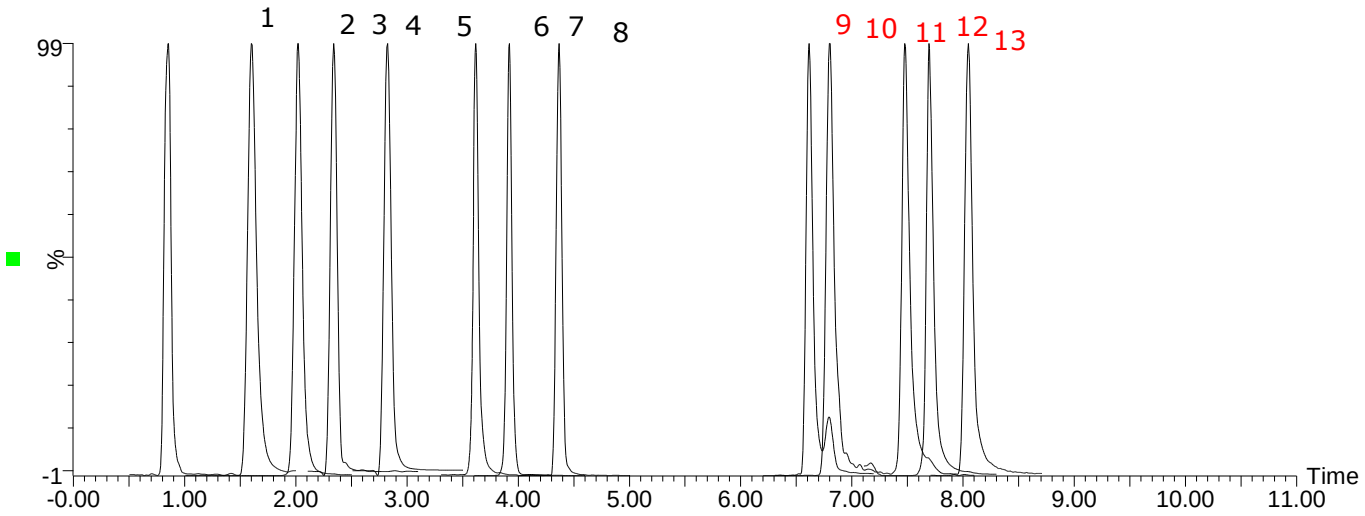
- Cílená UPLC/MS/MS metoda pro 27 metabolitů, separace isobarických látek, ostré a symetrické píky
- Optimální pH 9 – BEH částice
- MaxPeak High Performance Surfaces technology

AN: 720007411

©2021 Waters Corporation

BioPharma

Separace RNA nukleotidů, nukleosidů a nukleových bazí



1. Uracil
2. Adenine
3. Adenosine
4. Uridine
5. Cytosine
6. Guanine
7. Cytidine
8. Guanosine
9. Adenosine Monophosphate
10. Uridine monophosphate
11. Ribose phosphate
12. Cytidine Monophosphate
13. Guanosine Monophosphate

Lepší rozlišení a tvary píků

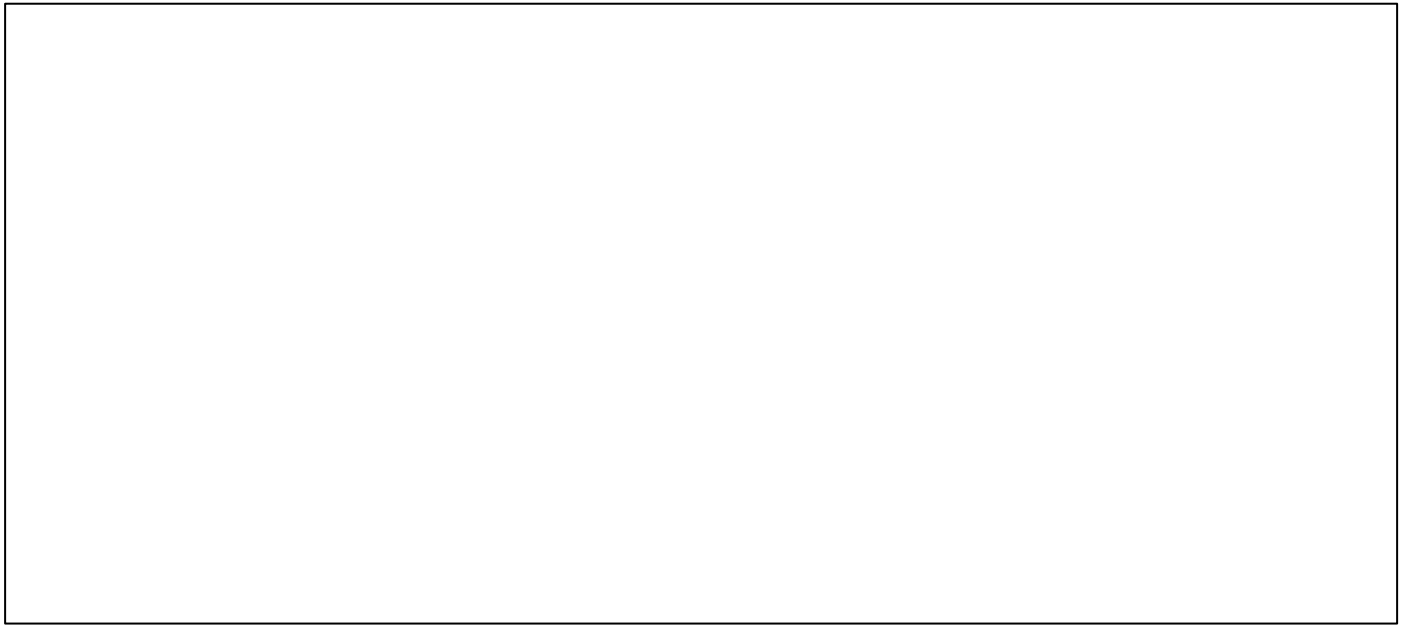
- Vylepšená separace 13 biologicky relevantních a strukturně podobných RNA komponent
- MaxPeak High Performance Surface poskytuje lepší tvary píků fosforylovaných nukleotidů
- Rychlá analýza

AN: 720007324

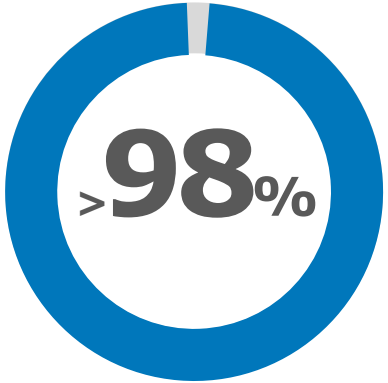
©2021 Waters Corporation

Click to add title

- Click to add text



“Covid” statistika **Spotřební materiál**



TOP 50 PN#

Dalších 400 PN#

Dostupnost ?

- Plastová platíčka
- QuanRecovery
- Filtry (Pall)

©2021 Waters Corporation

Děkuji Vám za pozornost

©2021 Waters Corporation

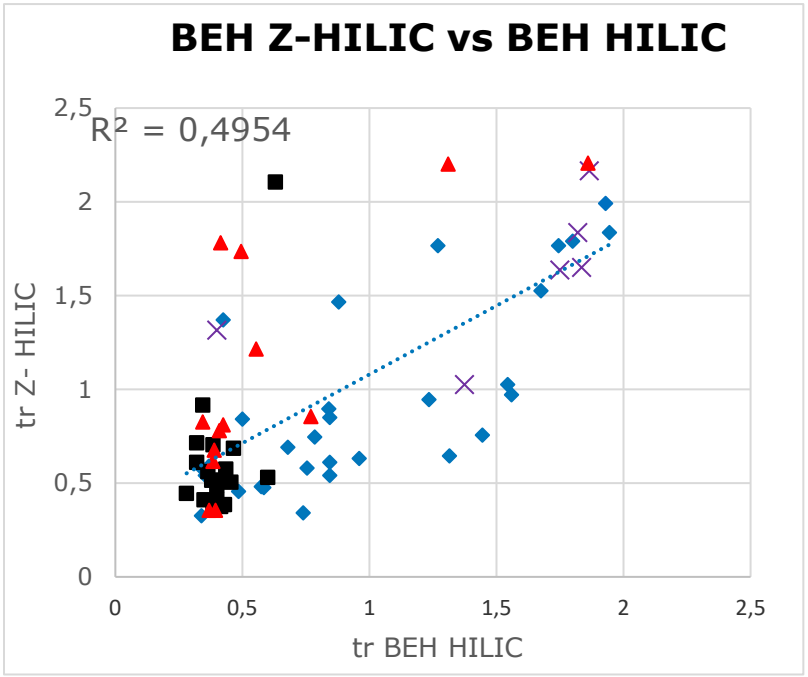
Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

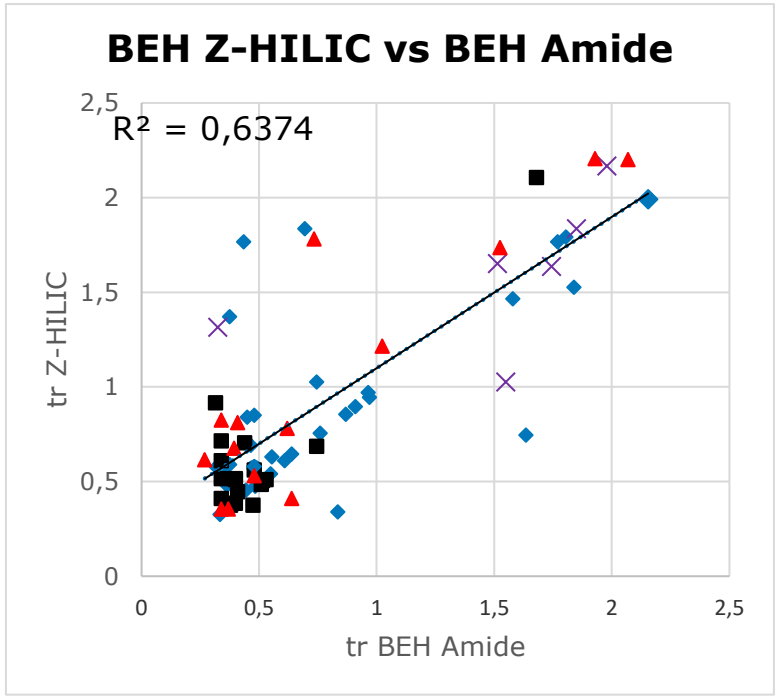
Column Selectivity Comparison

82 Small Molecule Pharmaceutical Compounds

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™



$$S = 100 * \sqrt{1 - R^2} = 71$$



$$S = 60$$

bases/cations
zwitterions
acids/anions
uncharged

©2021 Waters Corporation
COMPANY CONFIDENTIAL

Competitive Sulfobetaine Columns Comparison

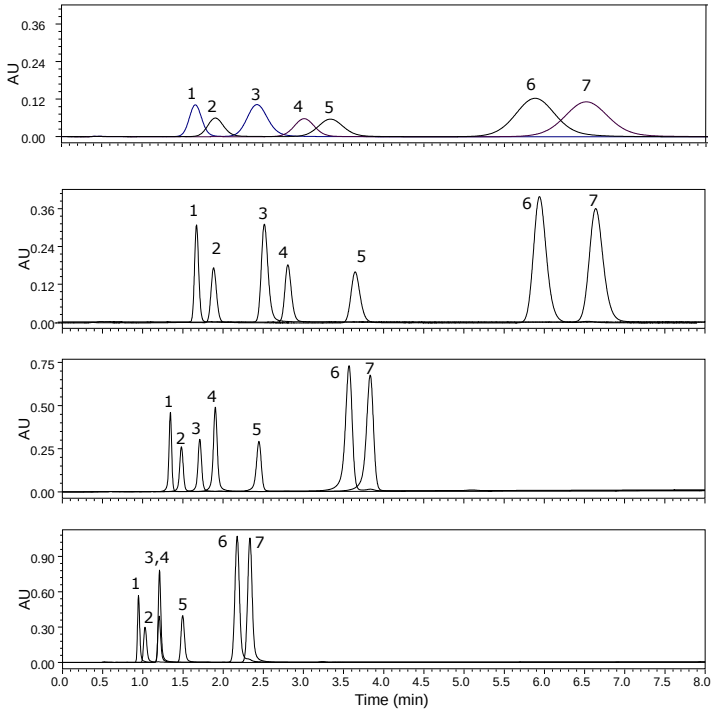
Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Merck
ZIC-pHILIC
5 µm

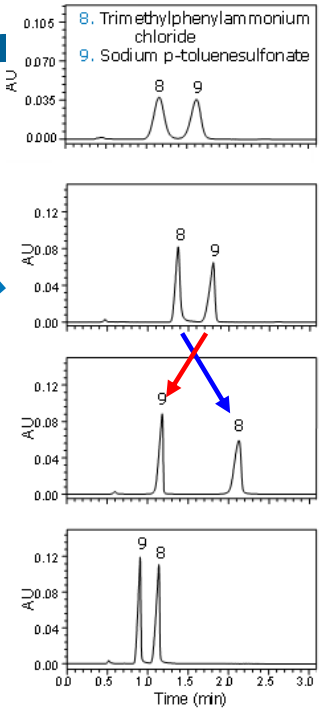
Waters
Atlantis Premier
BEH Z-HILIC
1.7 µm

Thermo
Syncronis HILIC
1.7 µm

Agilent
POROSHELL
HILIC-Z
1.9 µm



Similar retention and selectivity



1. 2'-deoxyuridine
2. 5-methyluridine
3. Adenosine
4. Uridine
5. Vidarabine
6. 3'-deoxyguanosine
7. 2'-deoxyguanosine