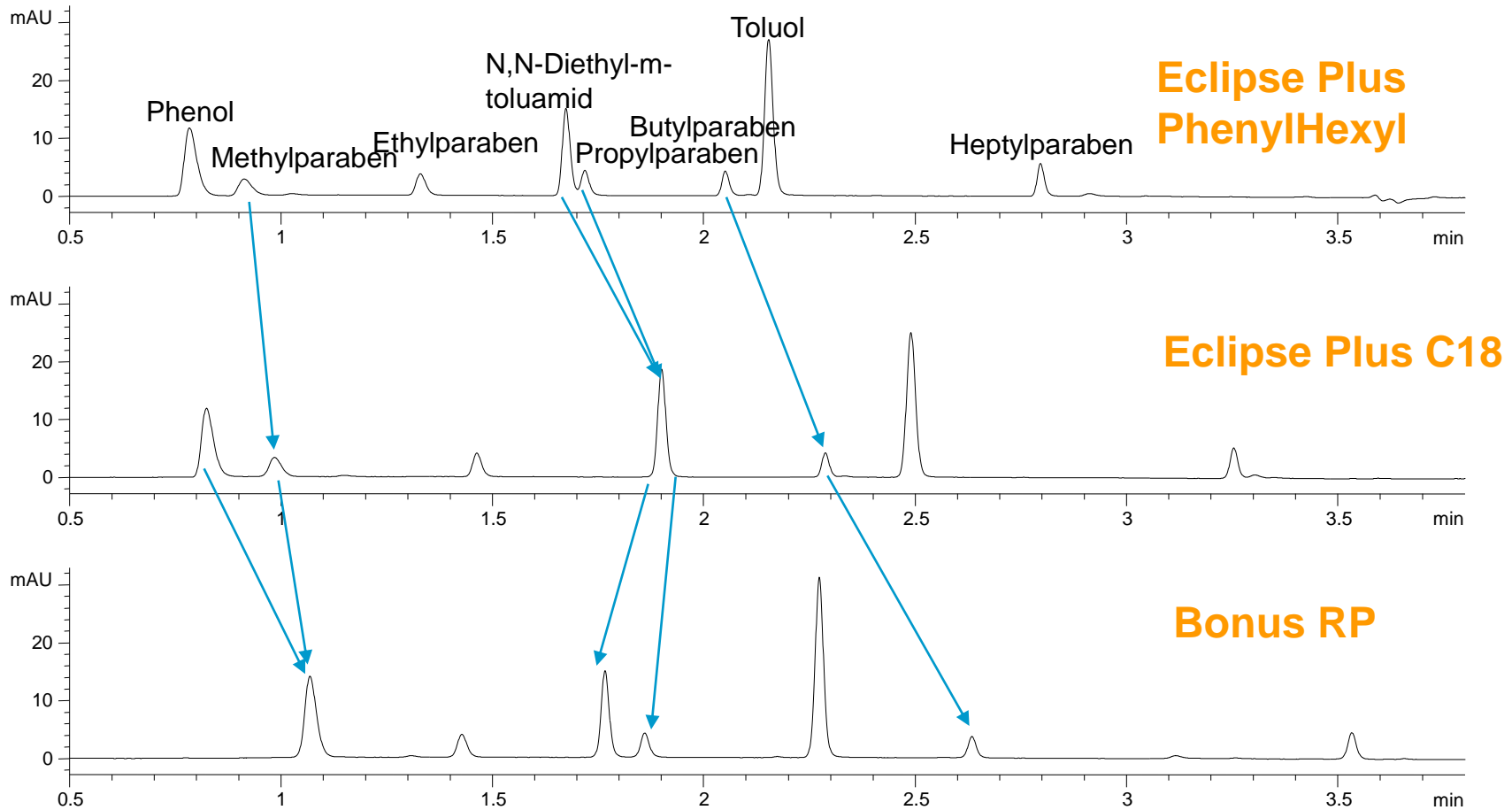


Alternative Phasen zu C18 und Ihre Anwendungen



Dr. Ulrike Jegle
Produktspezialistin Säulen

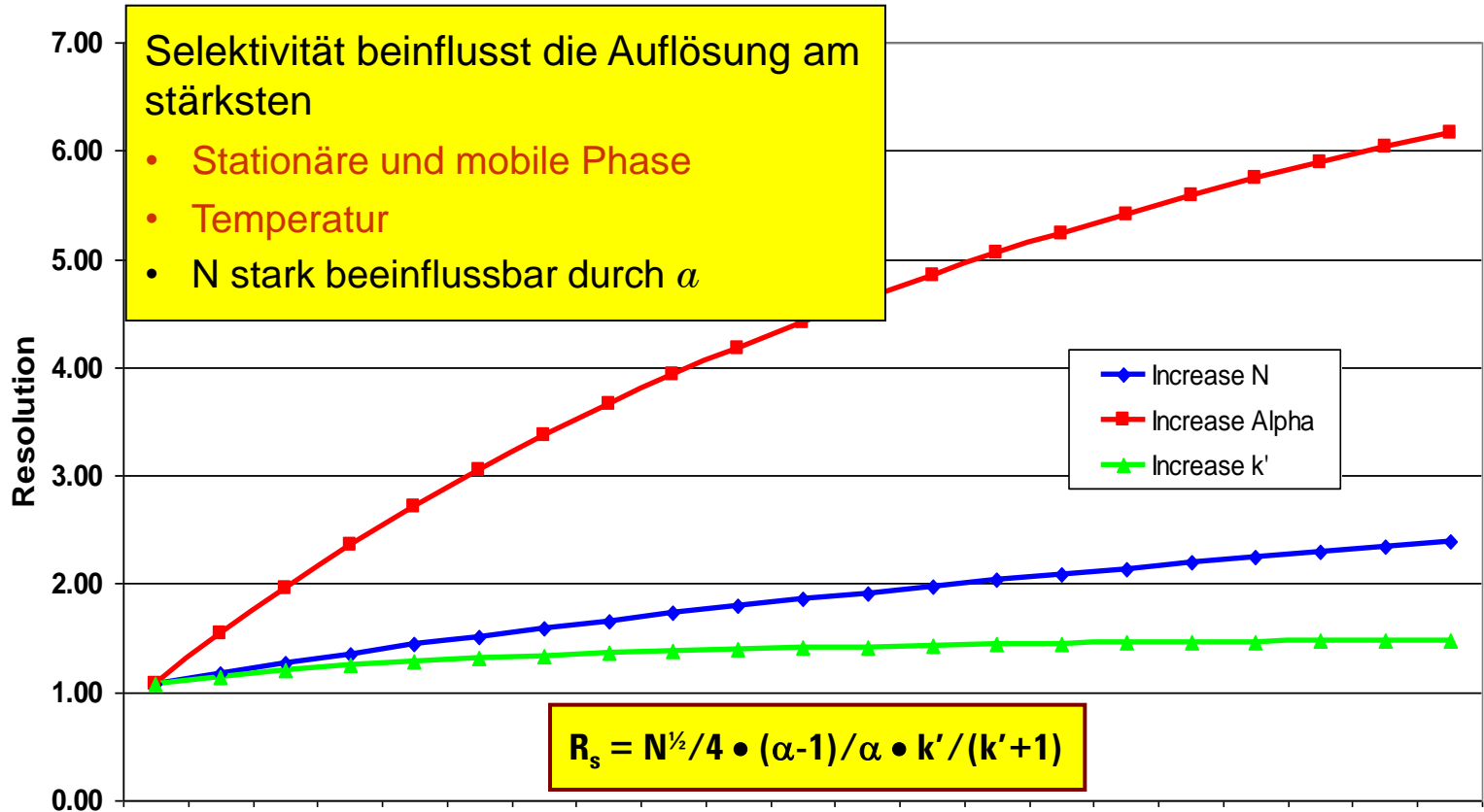
Warum brauchen wir Alternativen zu C18?



Flussrate: 0.5ml/min; Gradient::25 to 80%ACN in 3min, at 4min 90%ACN,at 4.5min 25%ACN, bei 6min25%ACN
Run time: 6min; Injektionsvol.: 3µl mit needle wash (Wasser/Methanol=50/50) für 6 s; T: 30°C (storage/run)
DAD: 254nm bw 10, ref. 360/100nm, 4nm slit, peak width 0.01min

Methodenentwicklung

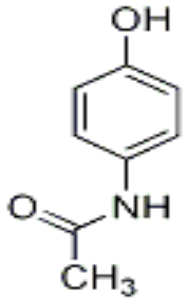
Einfluss der Selektivität, Trenneffizienz und Retention



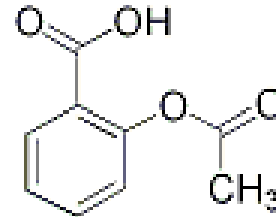
Böden:	5000	10000	15000	20000	25000
Alpha:	1.10	1.35	1.60	1.85	2.1
k':	2.0	4.5	7.0	9.5	12.0

Welche Substanzklassen sind „betroffen“?

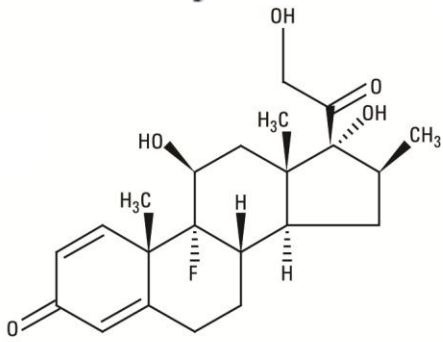
Säuren, Basen, polare Moleküle, aromatische/konjugierte Systeme



4-Acetamidophenol
pKa 9.71

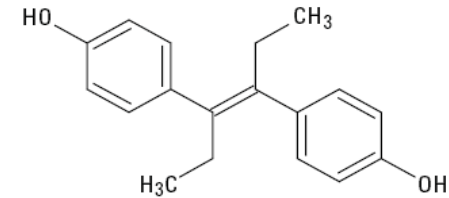
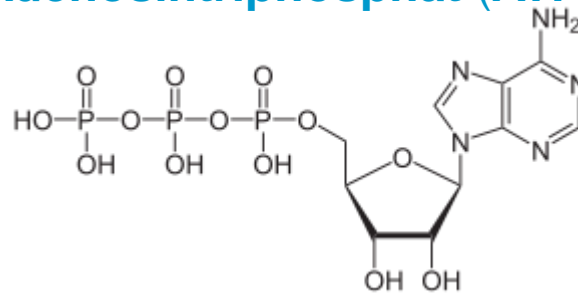


Acetylsalicylsäure
pKa = 3.5



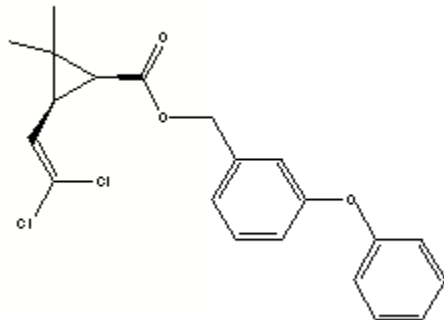
Dexamethasone

Adenosintriphosphat (ATP)

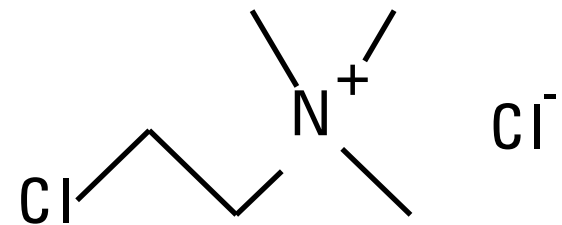


Diethylstilbestrol (DES)

cis-Permethrin



Chlormequat



Einfluss des pH-Wertes auf verschiedene Substanzklassen

unpolar
Naphthalin

polar
Benzylalkohol

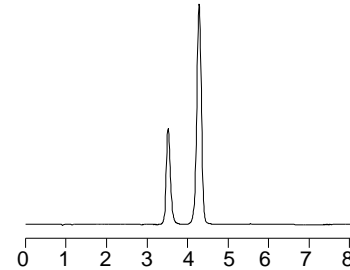
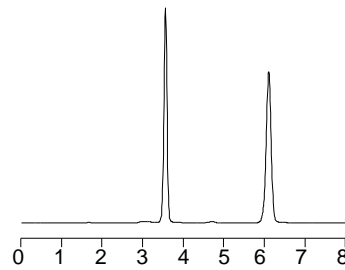
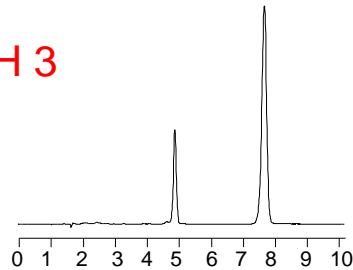
ionisierbar
Benzoessäure

Acenaphthen

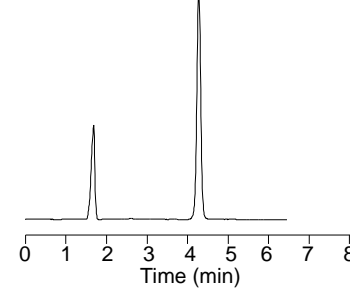
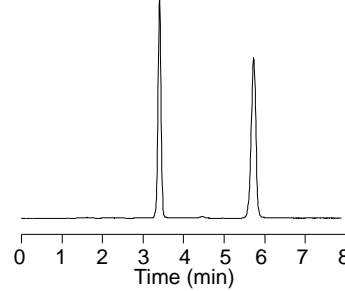
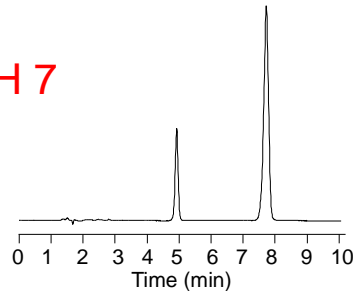
Nitrobenzol

Benzanilid

pH 3



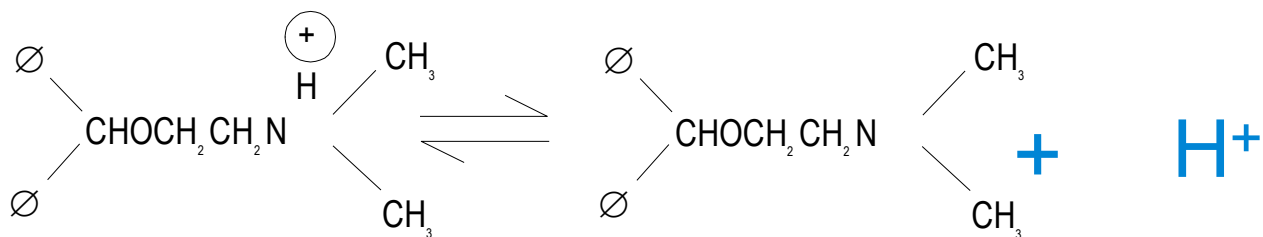
pH 7



pH, pKa und schwache Basen



Diphenhydramin



$$K_a = \frac{[R_3N][H^+]}{[R_3NH^+]}$$

$$K_a = 1 \times 10^{-9}$$

$$pK_a = 9$$

pH 9 – das Molekül liegt im Verhältnis von 1:1 protoniert und deprotoniert vor
Resultat: Peakform kann schlecht sein.

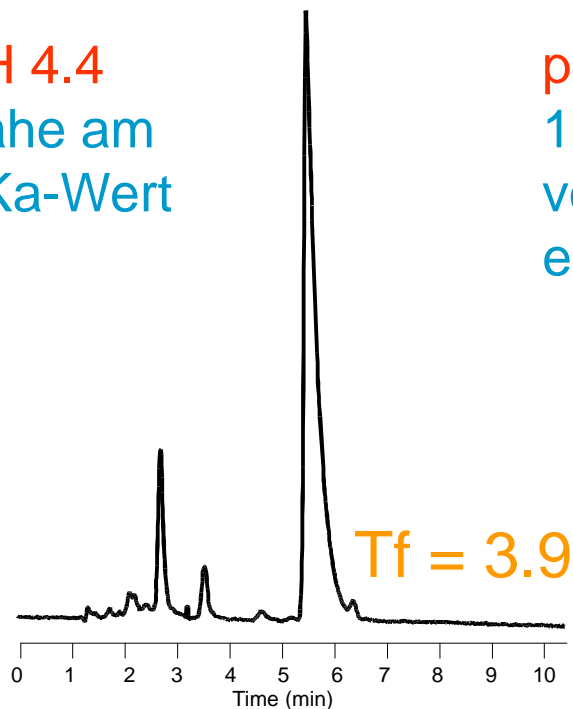
pH 10 – 91% der Moleküle liegen unprotoniert vor – keine Ladung – höhere Retardierung zu erwarten

pH 8 – 91% der Moleküle liegen protoniert vor – eindeutige Ladung verschiebt die Retention zu kleinen k' -Werten

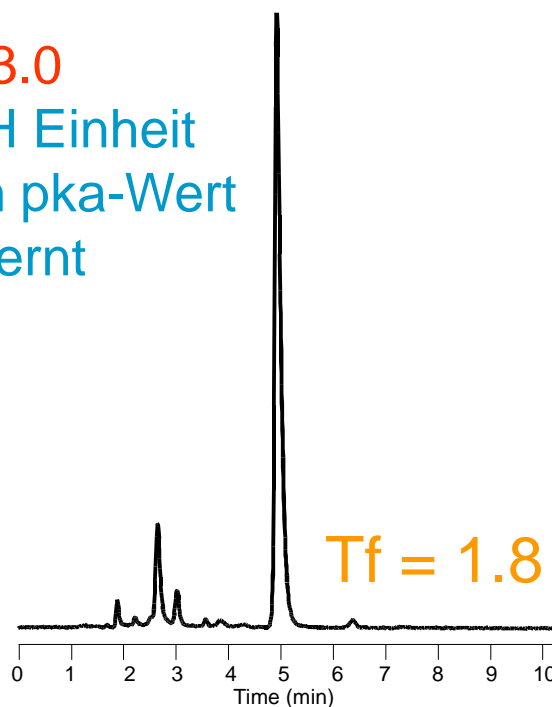
pH-Einfluss auf die Peakform

Peaktailings oder Retentionszeitinstabilitäten können auftreten, wenn zu nahe am pKa der zu untersuchenden Substanz gearbeitet wird => vermeiden

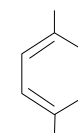
pH 4.4
nahe am
pKa-Wert



pH 3.0
1 pH Einheit
vom pKa-Wert
entfernt



CH₃CHCOOH

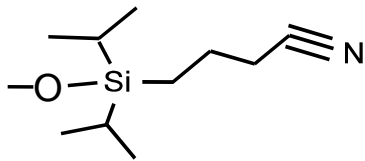


CH₂CH(CH₃)₂

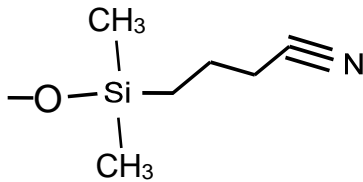
Ibuprofen
pK_a = 4.4

Säule: ZORBAX SB-C8 4.6 x 150 mm, 5 μm; Mobile Phase: 40% 5 mM KH₂PO₄: 60% ACN
Flussrate: 1.0 mL/min. Temperatur: RT

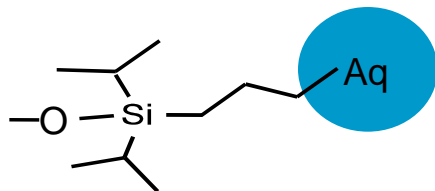
ZORBAX CN Phasen und StableBond Aq, ZORBAX Bonus RP, Polaris Amid und Polaris Ether für **polare Substanzklassen**



StableBond CN



Eclipse XDB CN



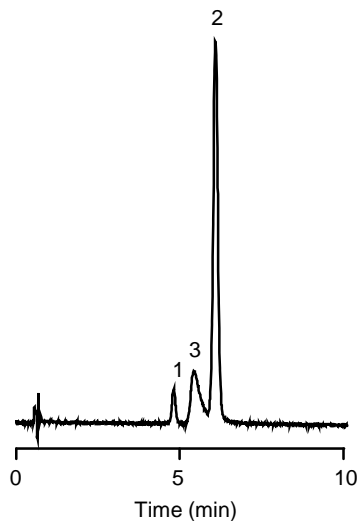
StableBond Aq

(Bonus RP und Polaris auch für starke Basen)

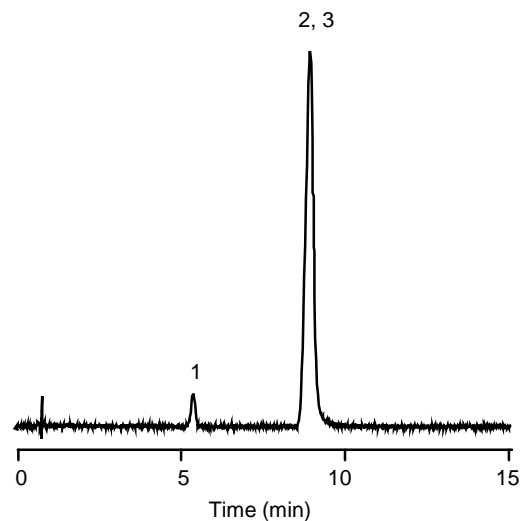
Trennung von Säure/Base Proben auf StableBond Phasen

Probe: 1. Barbital 2. Sulfamethoxazol 3. Koffein

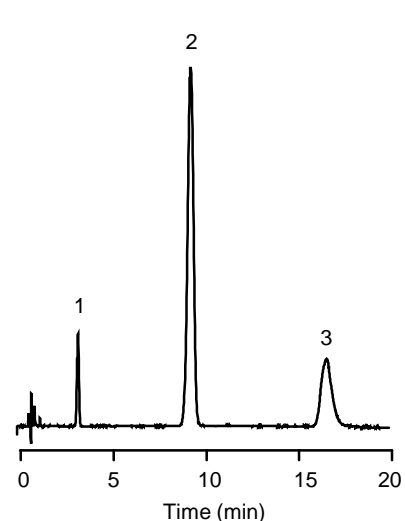
**StableBond
SB-C18**



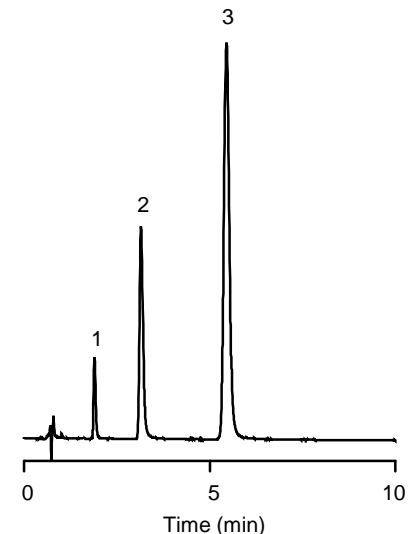
**StableBond
SB-C8**



**StableBond
SB-Phenyl**



**StableBond
SB-CN**



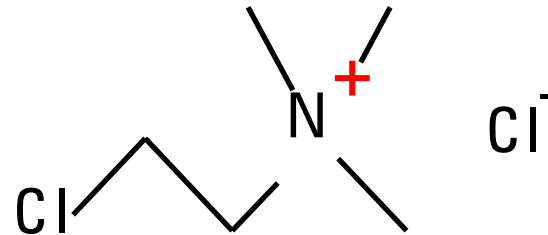
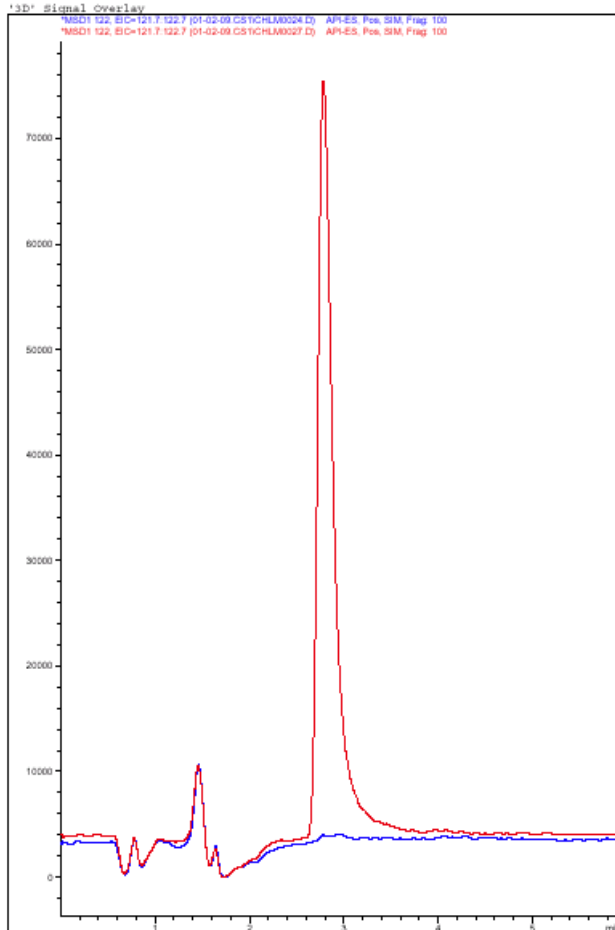
Säulen: 4.6 x 75 mm, 3.5 μm

Mobile Phase: 80% 25 mM NaH_2PO_4 , pH 3.0 : 20% MeOH
Temperatur: 35°C

Detektion: UV 254 nm

Flussrate: 1.0 mL/min

LC/MSD Analytik von Chlormequat



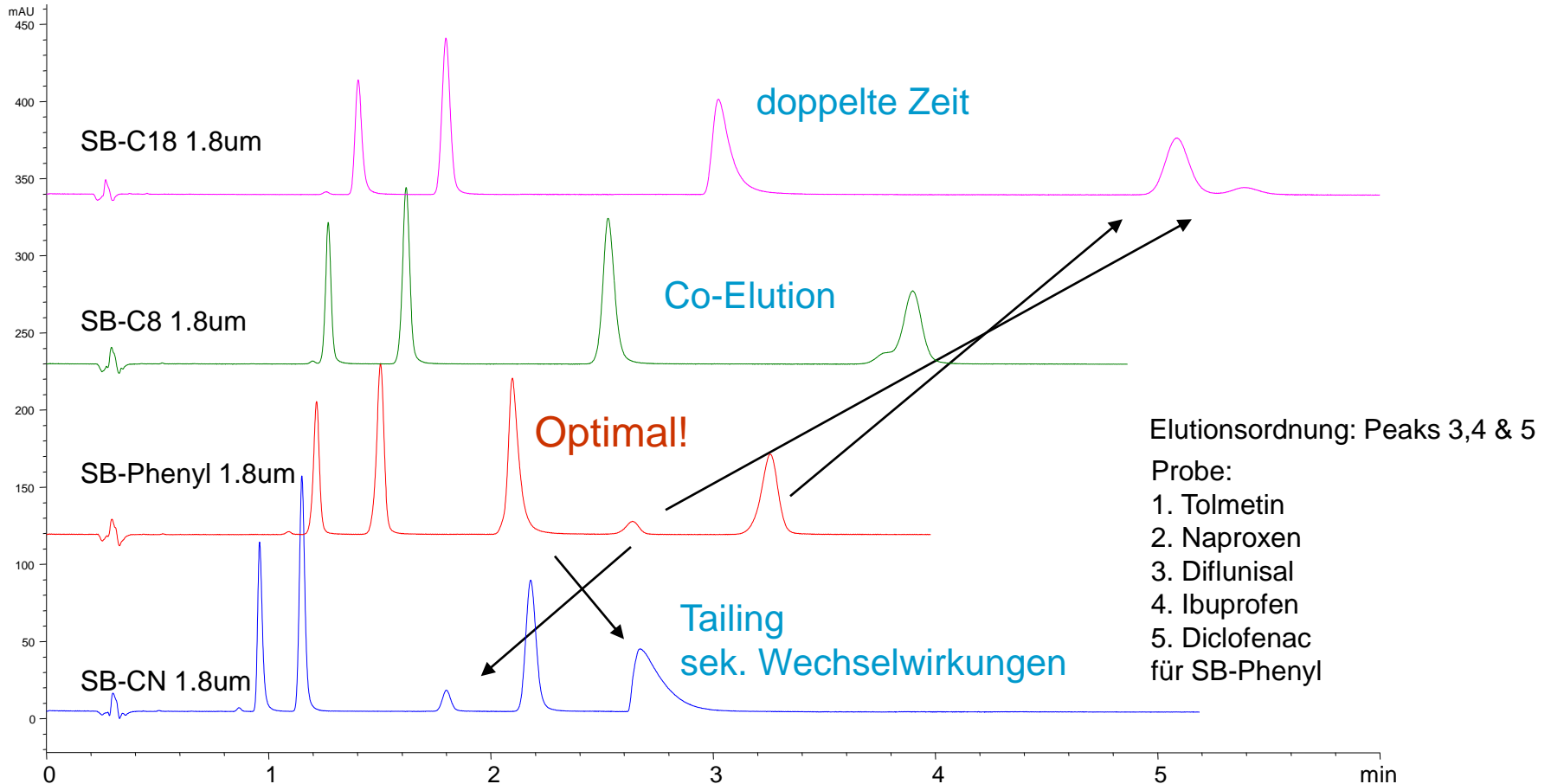
Säule: **ZORBAX SB-CN**, 150*2.1mm
Eluent: A 10mMol NH₄Ac (50%), B ACN (50%)
isokratisch
Fluss: 0.4 ml/min
InjVol: 5 ul
API-Modus: Electrospray positiv
Fragmentor: 100V
SIM-Ionen: m/z 122 und 124 (Qualifier)

Die polare stationäre Phase ermöglicht die Analyse hoch polarer Substanzen ohne Ionenpaarreagenz.

Overlay: Blindprobe und 1 ppb Chlormequat

Optimale Selektivität für ultra-schnelle Trennungen

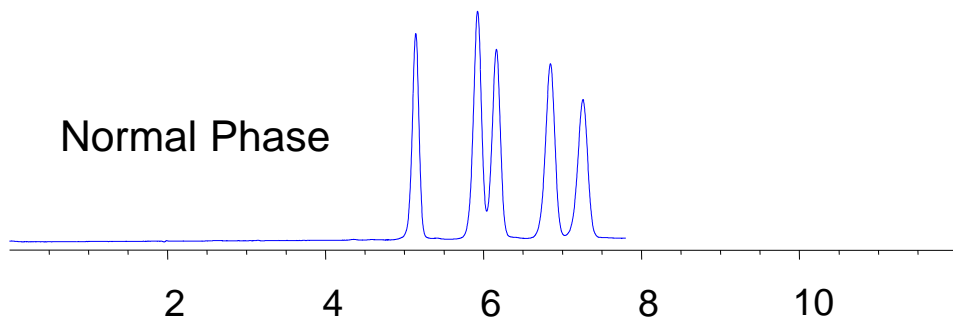
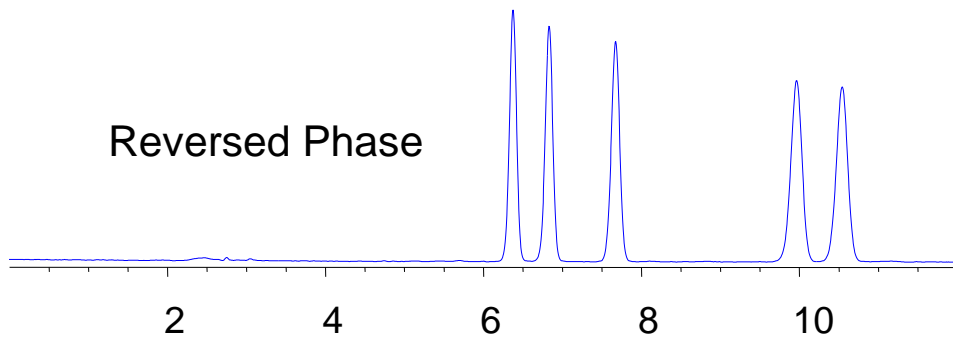
RRHT SB-Phenyl: schnellste Selektivität!



Säule: RRHT 4.6 x 50mm, 1.8um Mobile Phase: Acetonitril (40%):Puffer 60% pH=2.4 25mM NaH₂PO₄
Flussrate: 1.85 mL/min Detektion: DAD, 254 nm LC: Agilent 1200 RR LC Injektionsvol. 1 uL

Eclipse XDB CN: Steroid Mix

Reversed und Normal Phase Bedingungen



Probe (0.1 mg/ml)

- 1 Deoxycorticosterone
- 2 Hydrocortisone Acetate
- 3 Corticosterone
- 4 Hydrocortisone
- 5 Cortisone

Reversed Phase

Mobile Phase: Wasser/Acetonitril
60/40

Normal Phase

Mobile Phase: Hexan/Methanol/CH₂Cl₂
75/20/5

Säule: 4.6 mm x 150 mm, 5 µm

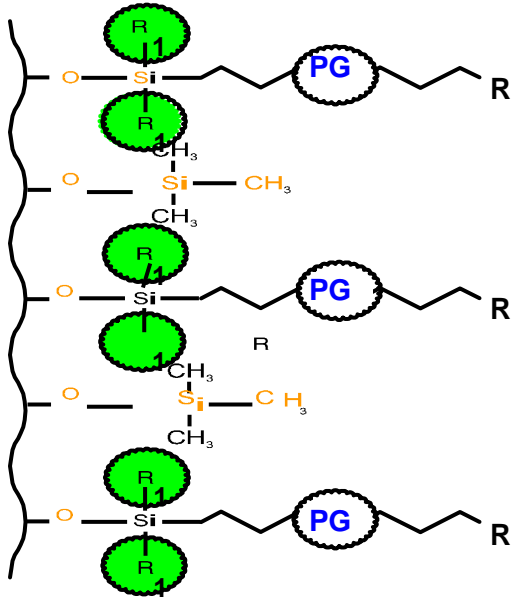
Flussrate: 0.6 ml/min

Temperatur: RT (23°C)

Injektion: 2 µl

Detektor: DAD, 254 nm

ZORBAX: Bonus RP



- ultra-reines Kieselgel Zorbax RxSil
- monofunktionelle Silane
- eingebettete polare Amidgruppe
- sterisch anspruchsvolle Seitenketten
- dreifaches EndCapping

Vorteile:

Analyse hochpolarer Substanzen auch mit 100% Wasser als Eluent
„rechtwinklige“ Selektivität

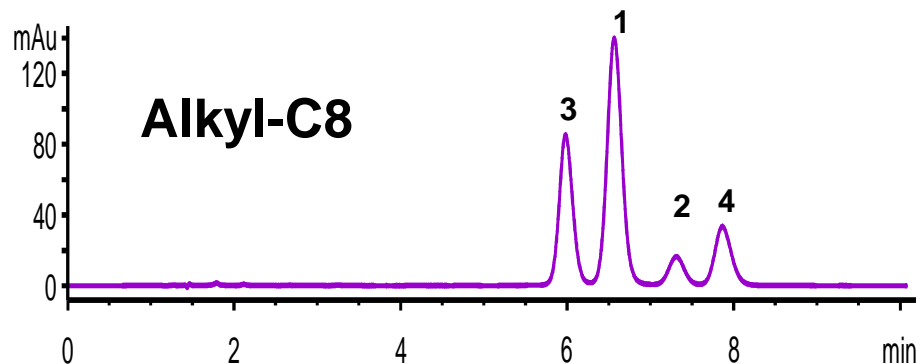
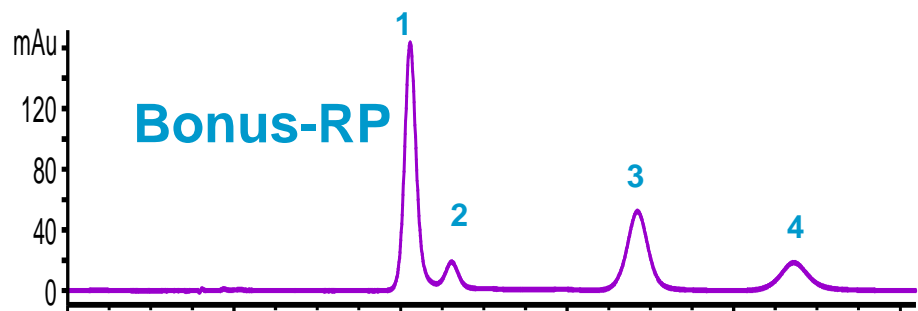
pH-Bereich: 2 - 9

Temperaturbereich: bis 60°C

Partikelgrößen: 1.8, 3.6, 5, 7 µm

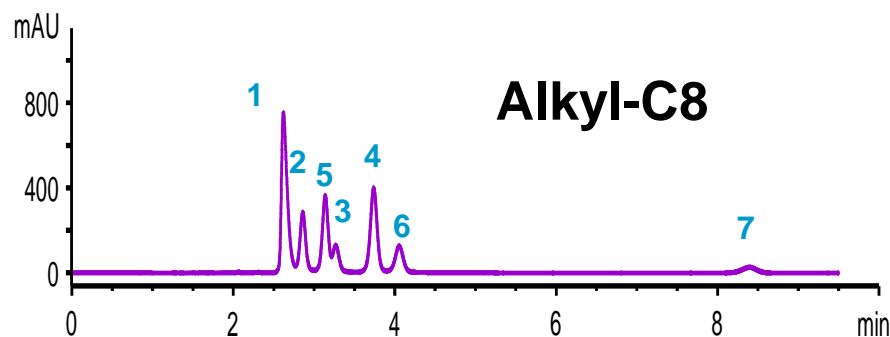
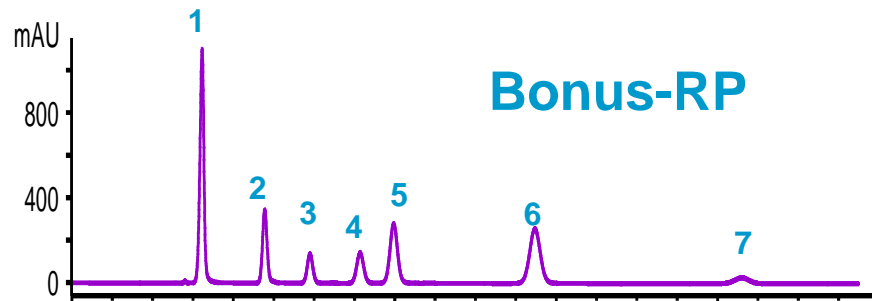
“Rechtwinklige” Selektivität der Bonus RP

Cephalosporine



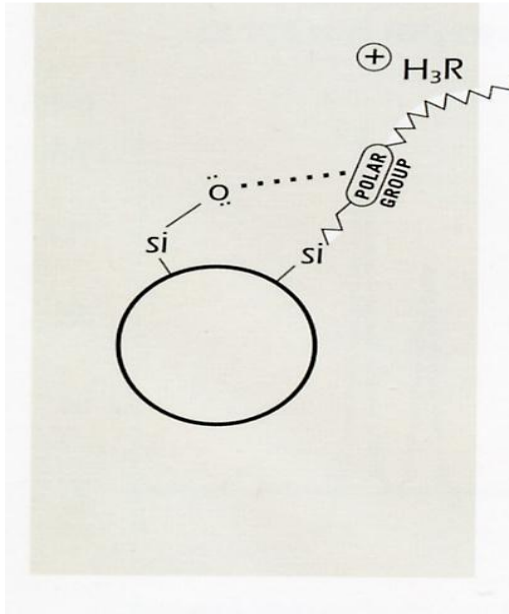
Säulen: 4.6 x 150 mm, mobile Phase: 25 mM NaCitrat, pH 6 MeOH, 75/25, Flussrate: 1 mL / min., Detektion: 254 nm
Injektionvol: 3 µL Probe: Cephalosporine (1 Cephalexin, 3 Cephuroxim, 2 Cephaclor, 4 Cephoxitin)

Pestizide



Säulen: 4.6 x 150 mm, mobile Phase: MeOH:0.1% TFA (70:30) Flussrate: 1 mL/min., Temperatur: RT, Inj.: 2 µL, Detektion: 254 nm, Probe: Triazinpestizide (1. Prometry, 2. Tebuthion, 3. Atrazin, 4. Propazin, 5. Diuron, 6. Propanill, 7. Dacthal)

Polaris Amid und Polaris Ether



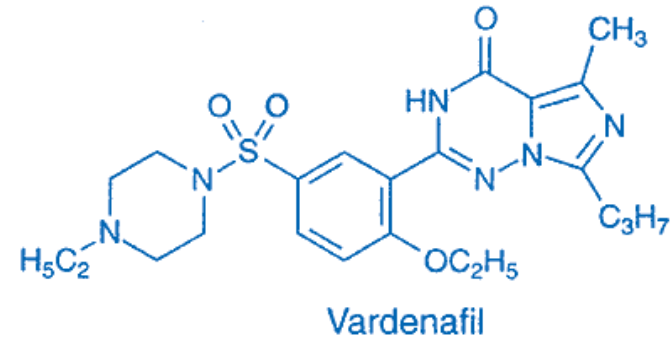
Polaris C18/C8-A und Ether Phasen delokalisieren die Elektronendichte und minimieren damit sekundäre Wechselwirkungen mit nicht abgesättigten, freien restlichen Silanolgruppen



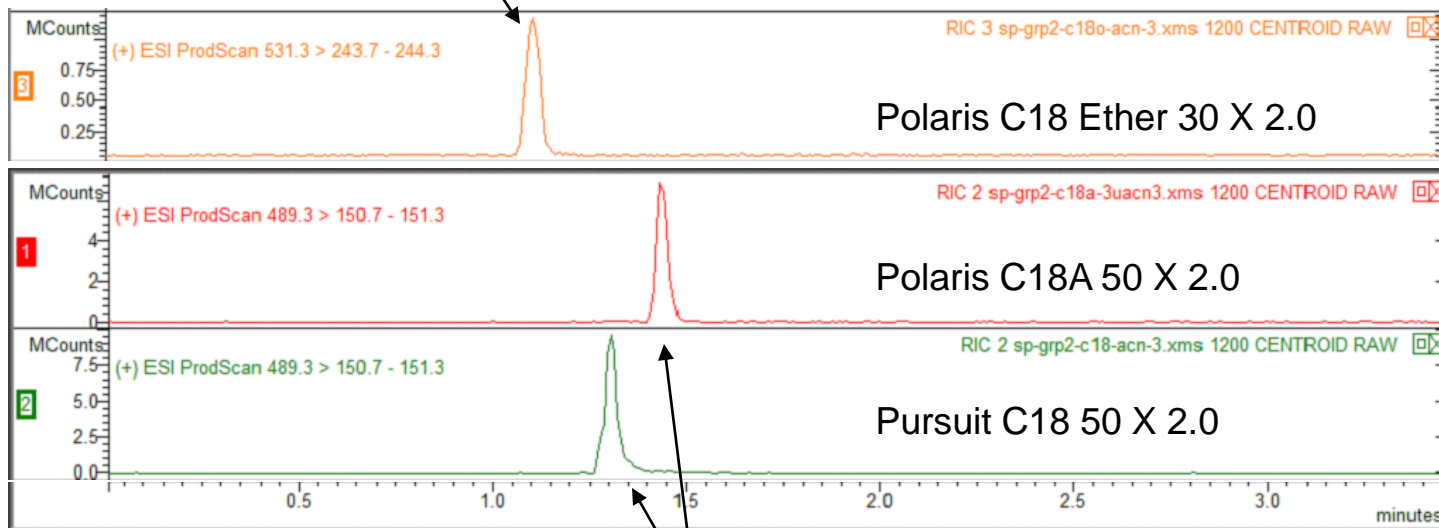
Optimierung der Peaksymmetrie

Partikelgrößen: 5 und 3 μm

Polaris Phasen optimieren Peakform und Retardierung



Optimierung der Peakform



Verstärkung der Retention

Methodenentwicklung mit polaren Phasen unterschiedlicher Selektivität

ZORBAX Bonus RP

Polaris Amid und Ether

- Alkylphase mit polarer Amidgruppe und intensivstem Endcapping

=> für die Analyse polarer Verbindungen

=> für bis zu 100% Wasseranteil in Eluenten

für den mittleren pH-Bereich

StableBond-Aq

- Polare Umkehrphase mit sterisch anspruchsvollen Seitenketten

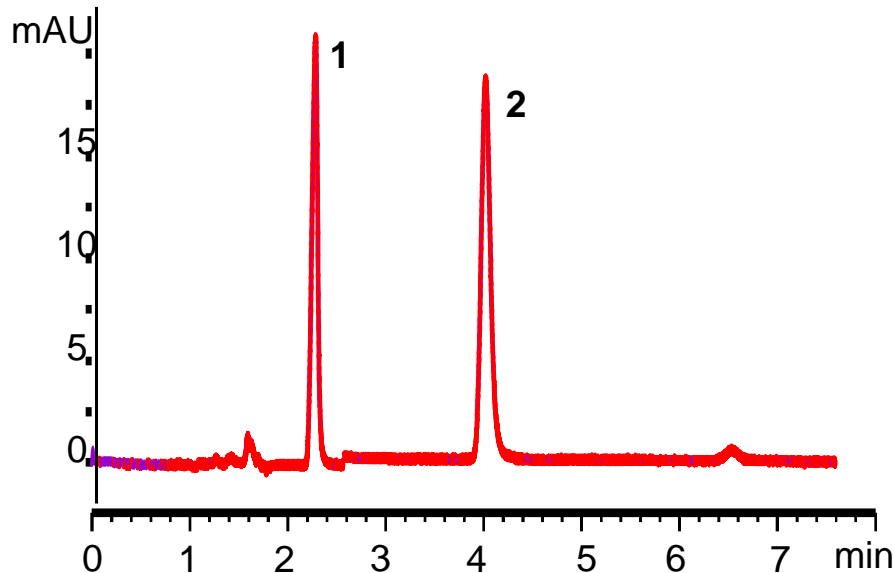
=> für die Analyse polarer Verbindungen

=> für bis zu 100% Wasseranteil in Eluenten

für den sauren pH-Bereich und hohe Temperaturen

Methodenentwicklung mit polaren Phasen unterschiedlicher Selektivität

Bonus-RP

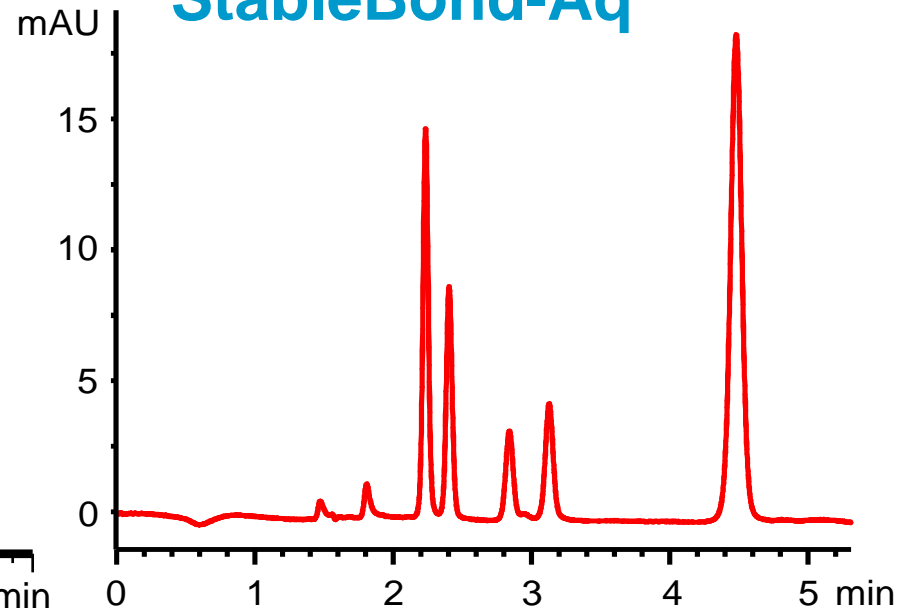


Säulendimension: 4.6 x 150, 5 μm
mobile Phase: (25 mM Kphos, pH7.2)/(MeOH: ACN, 50:50), 45:55

**Probe: Appetitzügler: "Fen-phen",
sek. Amine**

1. Phentermin pK_a 10.1
2. Fenfluramin pK_a 9.1

StableBond-Aq



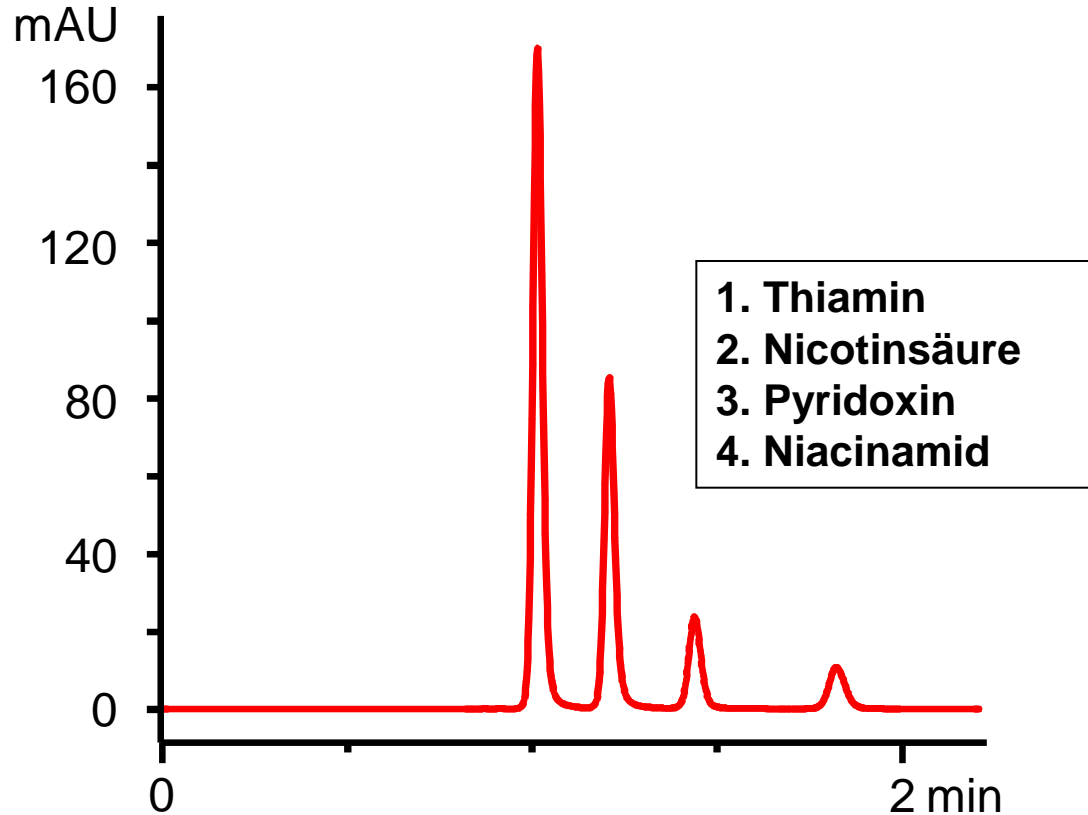
Säulendimension: 4.6*150 mm (5 μm)
Mobile Phase: 99% 20 mM NaHPO₄, pH2, 1% ACN

Probe: organische Säuren

1. Milchsäure
2. Essigsäure
3. Zitronensäure
4. Fumarsäure
5. Bernsteinsäure

Wasserlösliche Vitamine ohne Ionenpaarreagenzien

ZORBAX SB-Aq



Bedingungen:

Säule: ZORBAX SB-Aq, 4.6 x 150 mm (5µm)

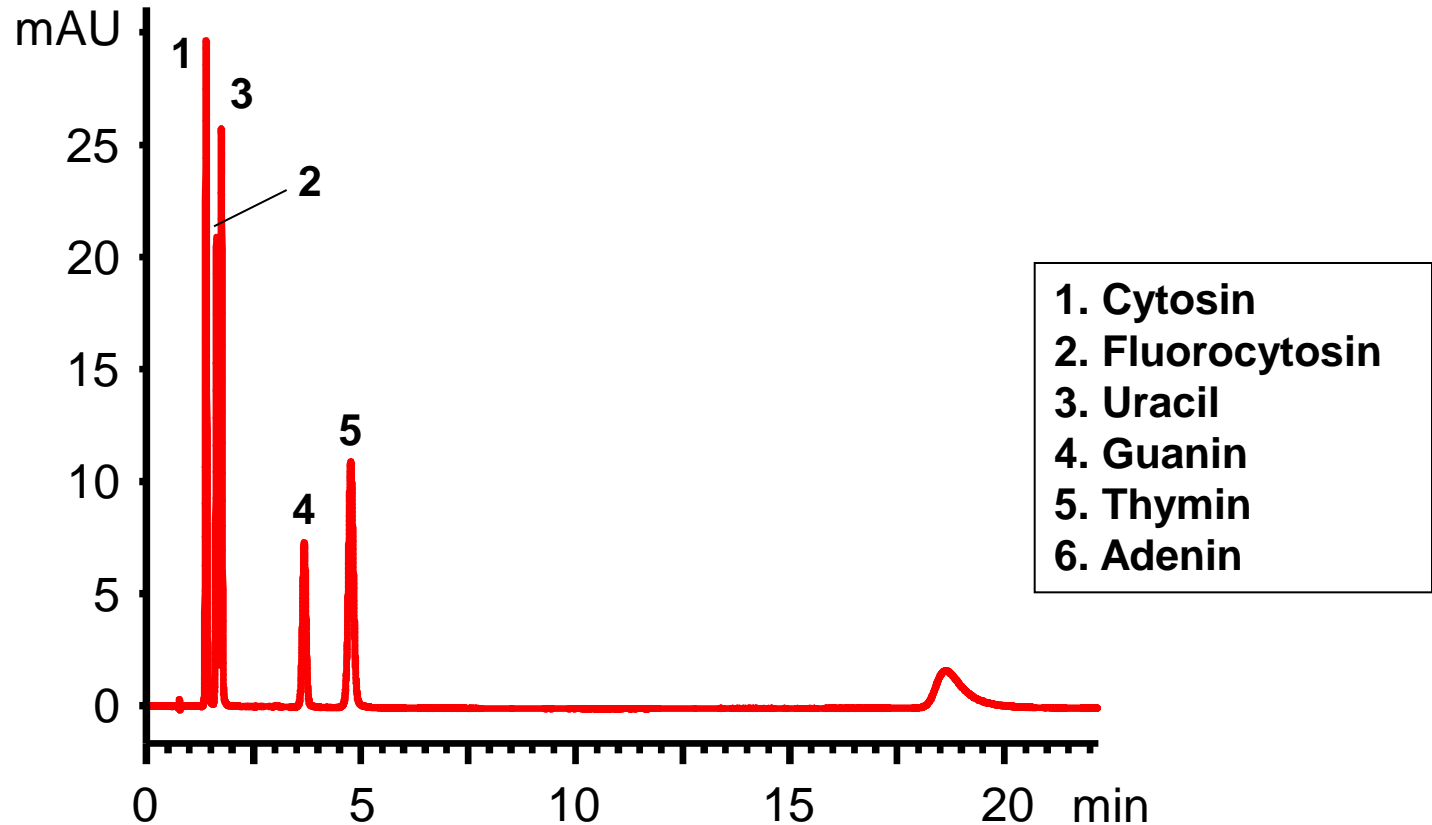
Mobile Phase: 5% MeOH / 95% TFA (0.1%)

Flussrate: 2.0 mL / min

Temperatur: 35°C

Detektor: UV (254 nm)

Trennung von hydrophilen Purinen / Pyrimidinen



Säule: ZORBAX SB-Aq, 4.6 x 150 mm (5µm)

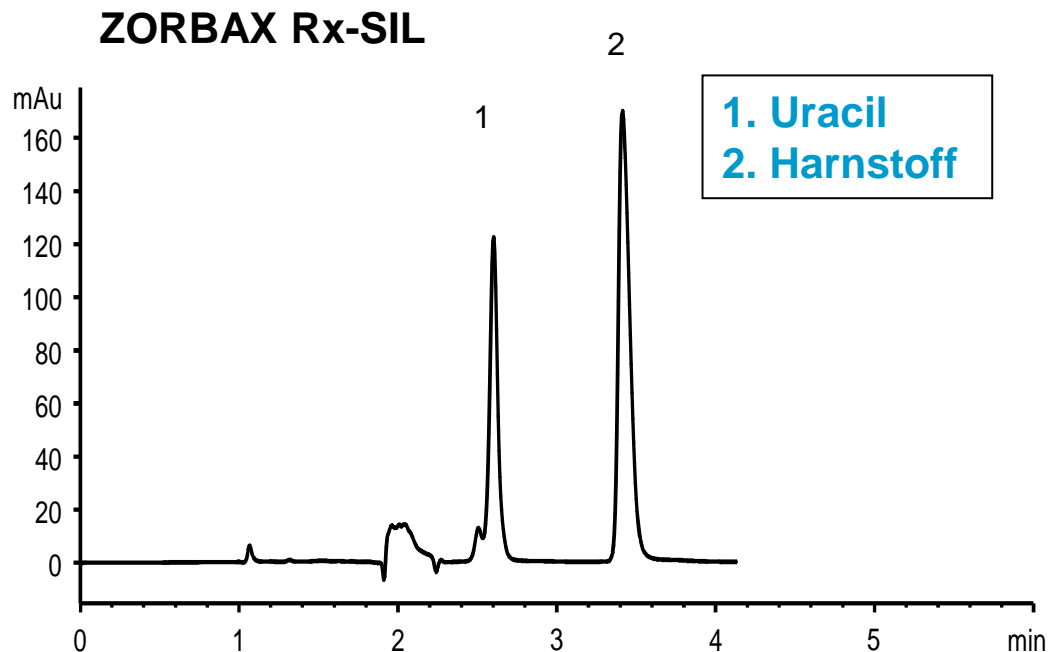
Mobile Phase: 50 mM NaOAc, pH4.6

Flussrate: 2.0 mL / min

Temperatur: 35°C

Detektor: UV (254 nm)

Trennung von Uracil und Harnstoff via HILIC auf ZORBAX RxSIL



HPLC System: HP1090

Säule: ZORBAX Rx-SIL, 4.6 x 150 mm

Bestellnr.: 883975-901

Mobile Phase: isokratisch - 90/10

ACN: K_2HPO_4 , 20 mM pH 7.2

Detektion: UV 210 nm

Flussrate: 1 mL/ min.

Temperatur: RT

Achtung: Rx-SIL Säulen werden momentan noch in NormalPhasen-Solvent (Hexan) versandt. Sie müssen deshalb auf HILIC-Bedingungen umgespült werden – Spülprozedur verfügbar

HILIC - Hydrophilic Interaction Chromatography

Substanzklasse:

Hochpolare Moleküle, die in RP nicht retardieren

Stationäre Phase:

Kieselgel Rx Sil, Amino, Diol, Cyano und Spezialphasen (zwitterionisch)

Mobile Phase:

>50-60 Acetonitril gemischt mit wässrig/polarem Anteil Ameisensäure, Formiat, Acetat, kein Phosphatpuffer! (Niederschlag bei 100% ACN)

Gradient:

100% ACN nach 50%ACN

Wasser ist das stärkere Solvent

Detektion:

UV und MS-ESI

der hohe organische Anteil sorgt für gute Sensitivität im MS

Typische Analyte für HILIC

Aminosäuren

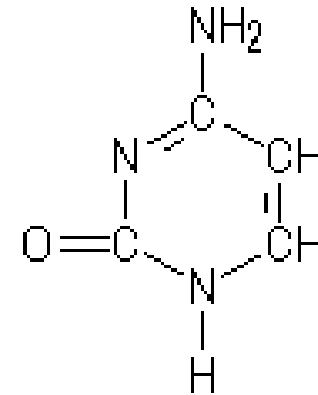
Basen (Pyrimidinbasen in DNA etc.)

Nucleoside (Uracil, Cytosin)

Alkaloide

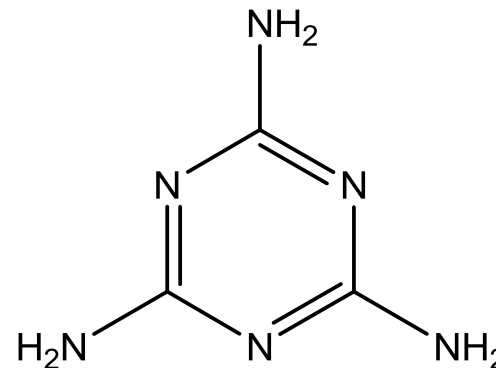
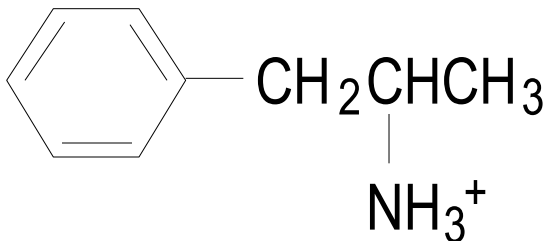
Kohlenhydrate

Acrylamide



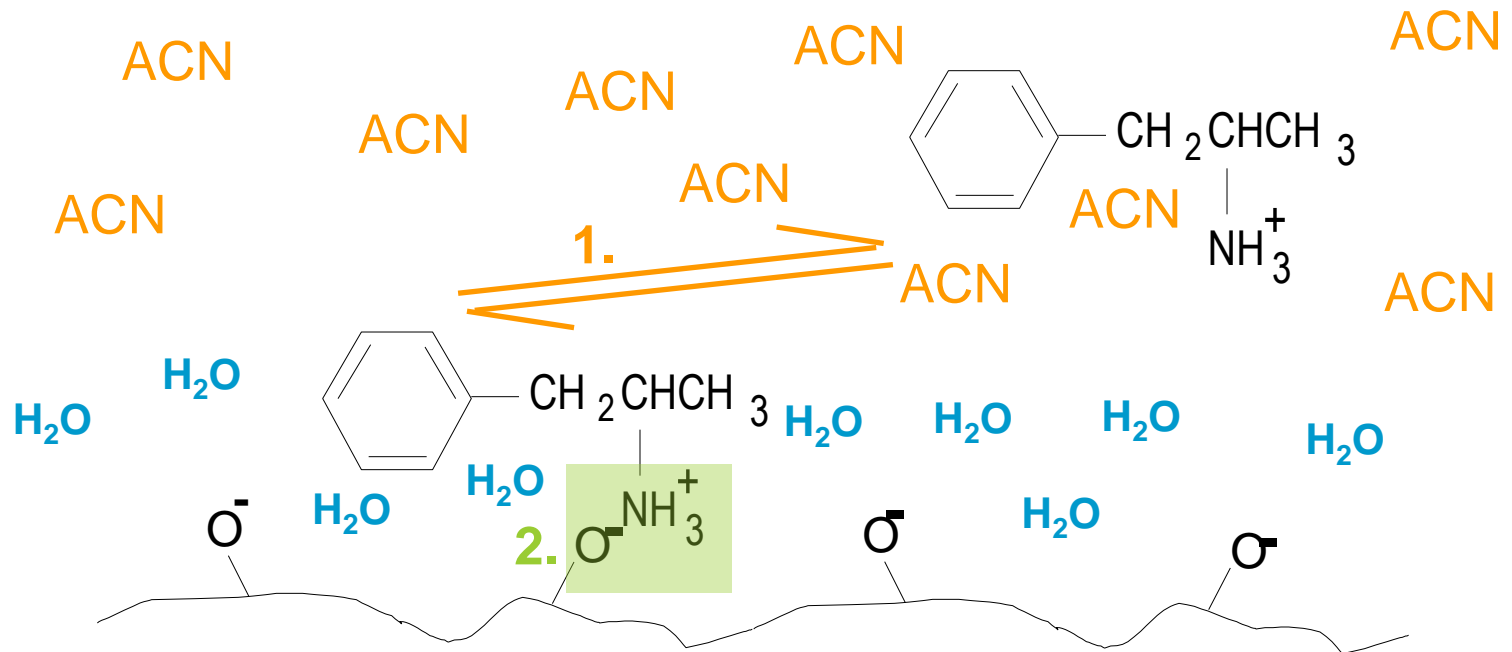
Cytosin

Amphetamin



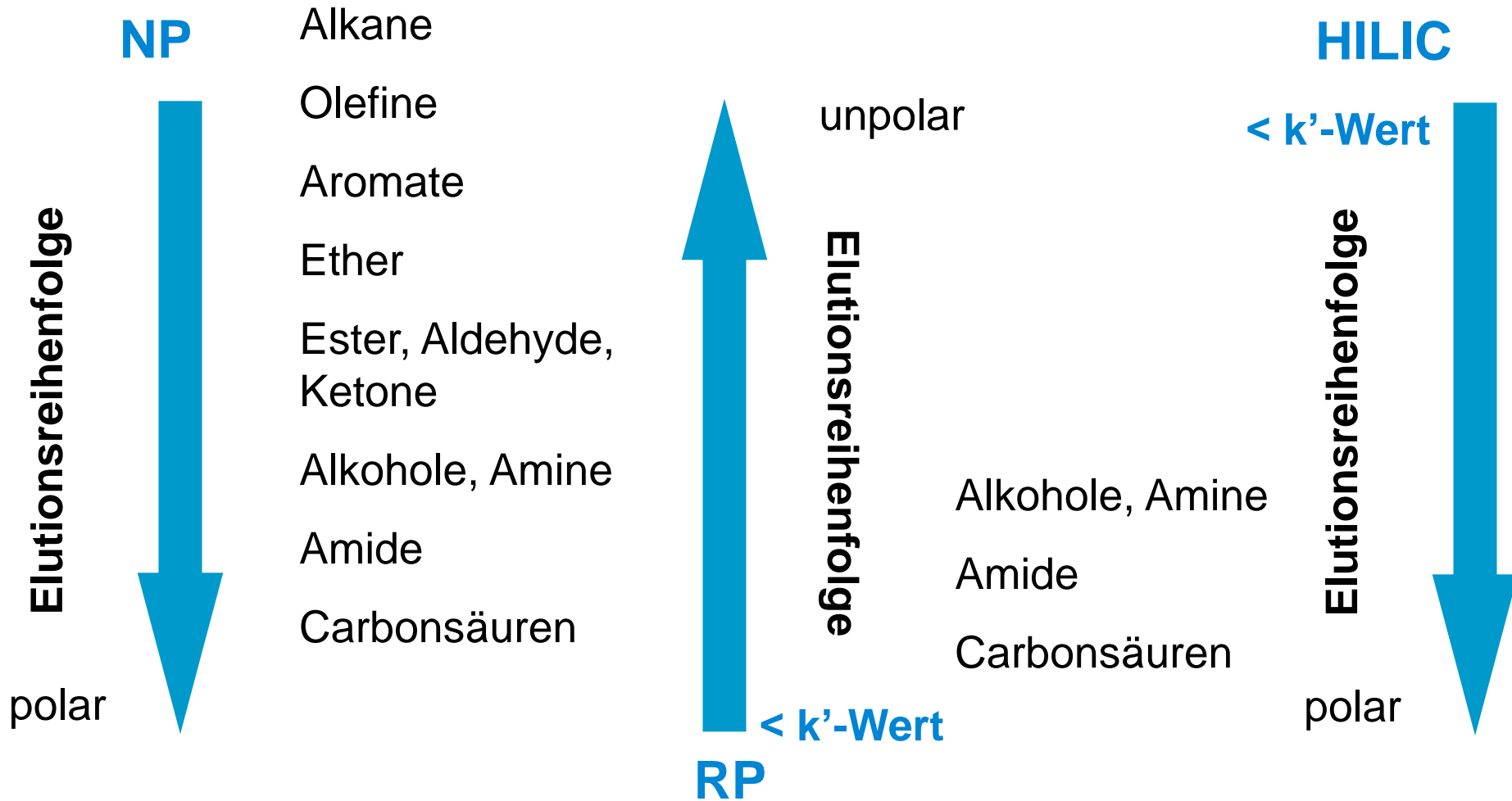
Melamin

HILIC – Mechanismus auf Kieselgel



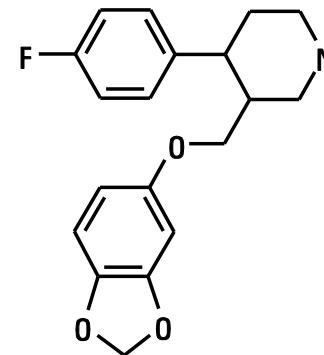
1. Verteilungschromatographie in und aus der adsorbierten Wasserschicht
2. Ionenaustausch mit den Silanolgruppen

Elutionsreihenfolge der Probenkomponenten

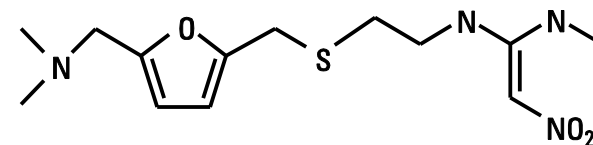


Basische Pharmazeutika via HILIC Trennung auf ZORBAX RxSil aus Serum

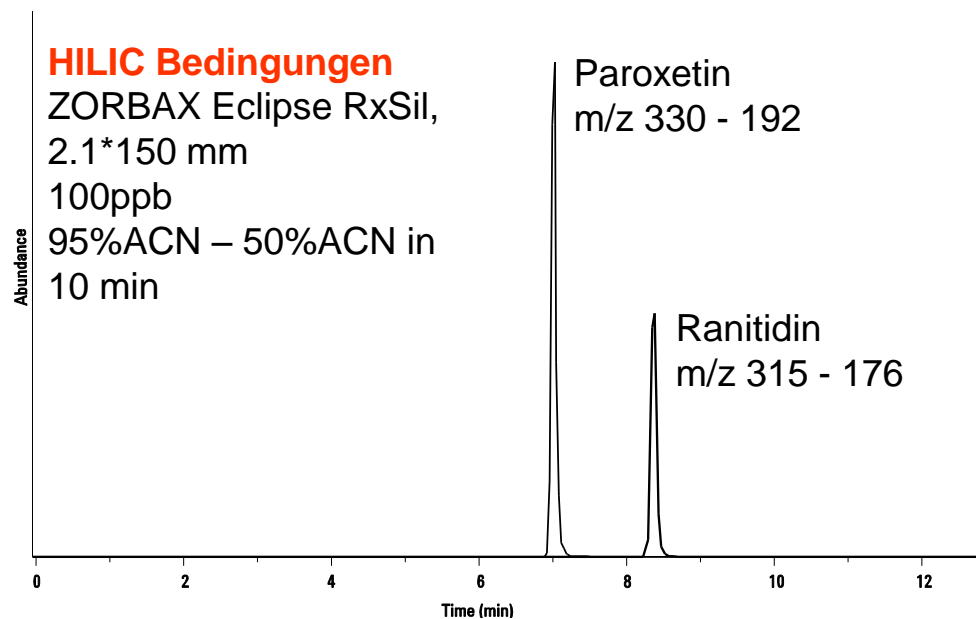
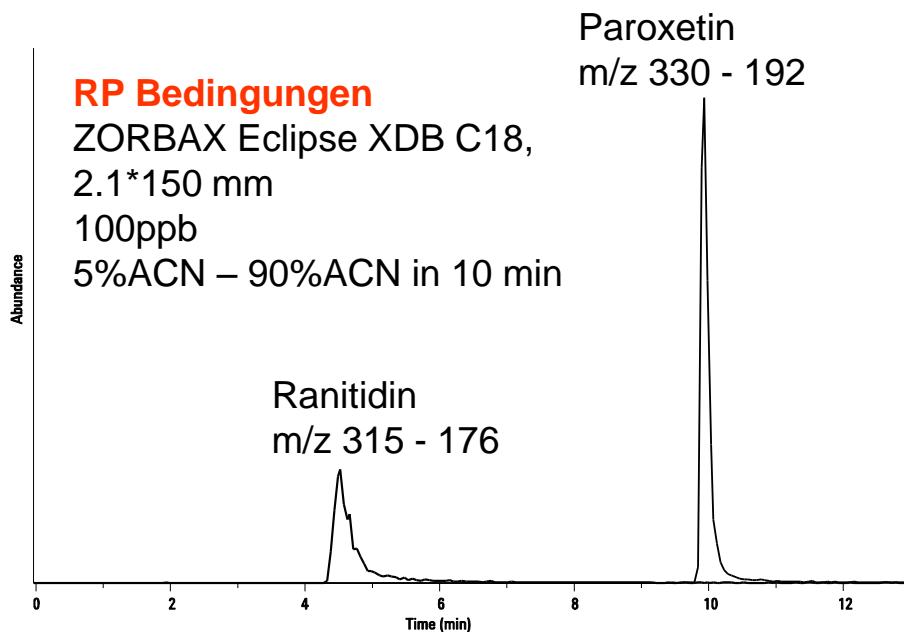
Appl.Note 5989-3761EN



a) Paroxetine
Antidepressant
MW 329.36



b) Ranitidine
Antiulcerative
MW 314.41



Vorteile von HILIC

Gute Retention hochpolarer Verbindungen, die im RP Modus nicht retardiert würden.

Unterschiedliche Selektivität zu RP und NP LC

- kein Umspülen der LC-Systeme erforderlich wie bei NP

Bessere Sensitivität in LC/MS

- Hoher organischer Anteil führt zu besseren S/N in ESI-MS

Probenvorbereitung oft einfacher: Aufgabe mit höherem org. Anteil

- SPE, liquid/liquid Extraktion hinterlässt Proben oft in einer Matrix mit hohem organischem Anteil
- Eindampfen und in Matrices mit hohem wässrigen Anteil wieder aufnehmen ist nicht mehr nötig
- Kann Löslichkeitsprobleme der Probe minimieren

HILIC - Was ist zu beachten?

Kieselgel stellt oft langsam das Gleichgewicht ein

- Intensives Equilibrieren ist Voraussetzung für reproduzierbare Resultate
- Einsatz von Formiat/Acetat + Salz (Ammonium etc.) zur Erhöhung der Ionenstärke und besserer Kontrolle der Peakform bzw Wechselwirkungen
- Beste Resulte oft im isokratischen Modus erzielbar
- Gradienten in eingeschränktem Bereich: ACN > 50% von 100% auf 50% gefahren

Trennungen sind sehr pH sensitiv – pH genaustens einstellen

- pH-Wert so wählen, damit maximale Wechselwirkung mit dem Kieselgel eingegangen werden kann.
- **Peak Splitting**
- Ursache: konkurrierender Ionenpaar- Mechanismus einstellbar oft via Ionenstärke = Salz/Puffer-Konzentration

Trennung der “Gruppe 4” Analyten der EPA 1694: HILIC mit ZORBAX HILIC Plus aus Abwasser

Appl.Note 5989-3761EN

HILIC Bedingungen

ZORBAX Eclipse HILIC Plus,
2.1*150 mm, 3.5 µm

100ppb

98%ACN – 70%ACN in 12
min

Temperatur: 25C

Flussrate:0.25 ml/min

Pos ESI Ionisierung

Sensitivität: unterer ppb-
Bereich (o.1 ppb)

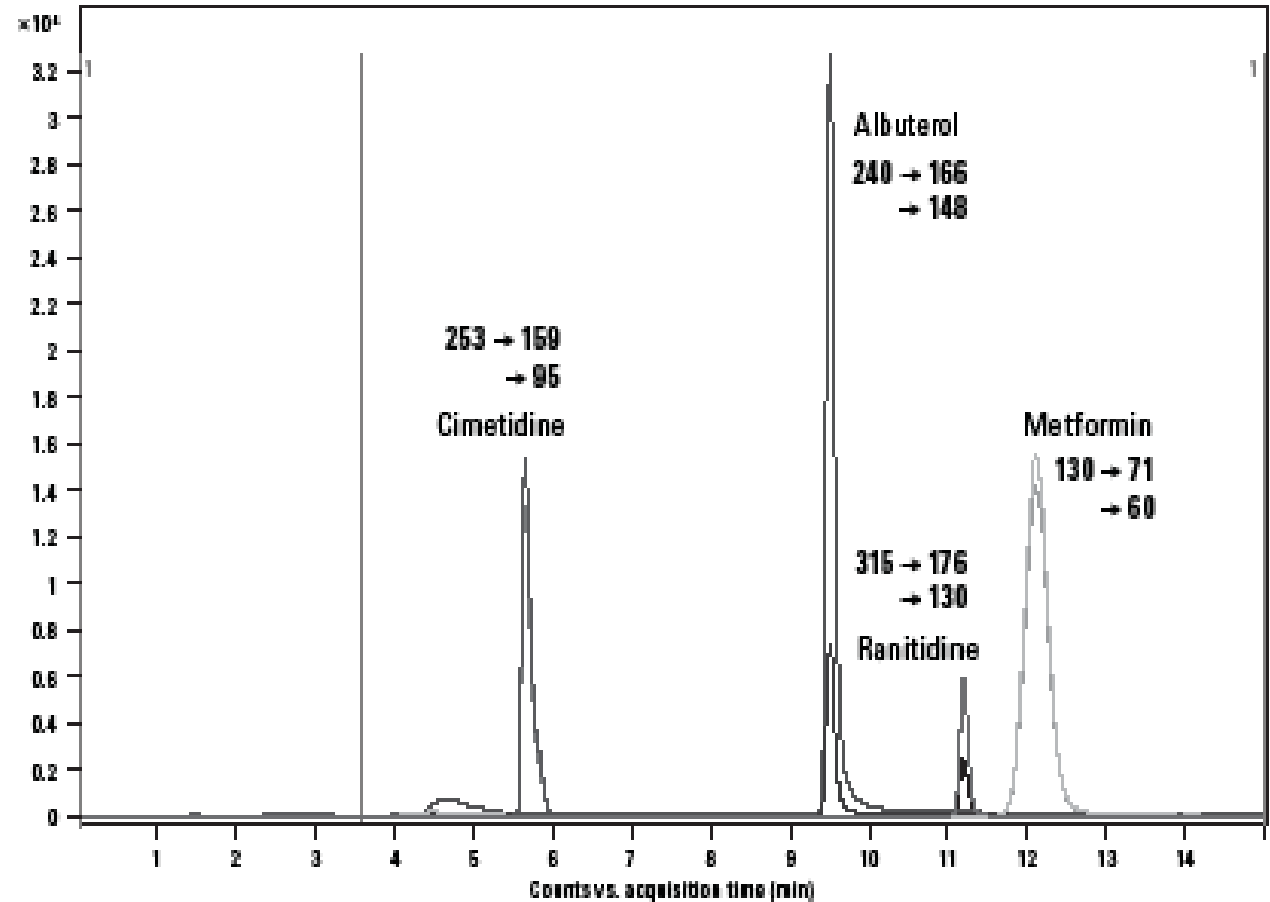
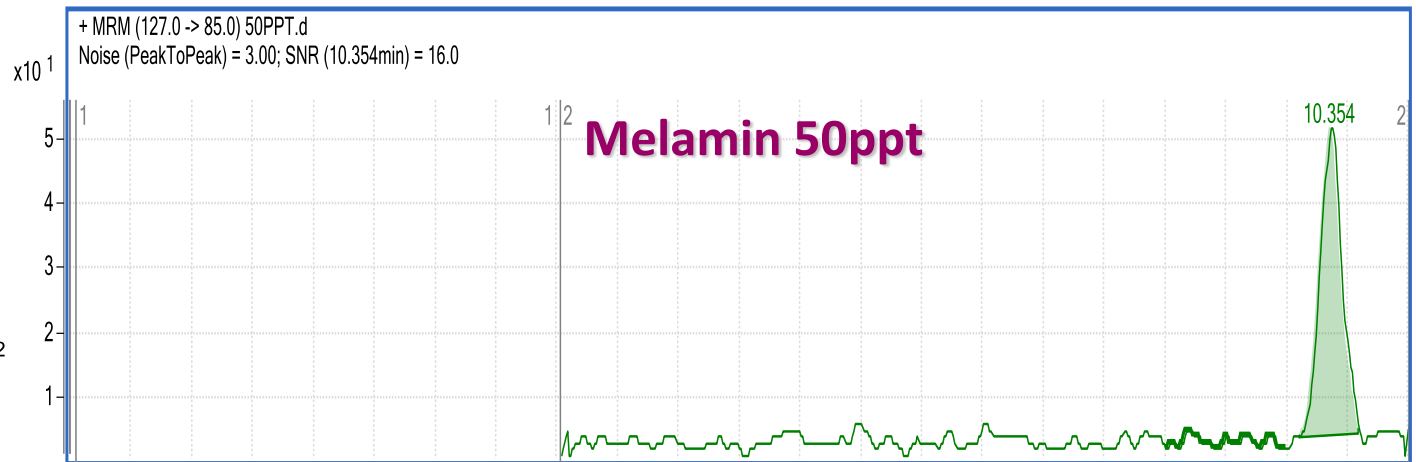
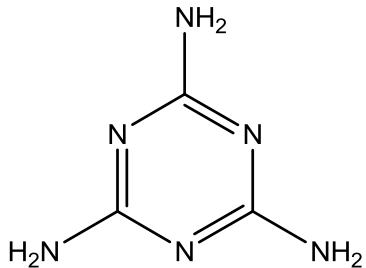


Figure 10. MRM extracted chromatogram for pharmaceuticals in Group 4.

HILIC – MS Trennung: Analyse von Melamin

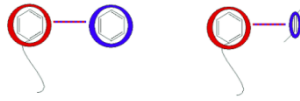
HILIC Trennung: ZORBAX Rx-Sil



HPLC system	: Agilent 1200 RRLC
Säule	: Agilent ZORBAX Rx-Sil, 2.1 × 150 mm, 5 µm
Injektionsvolumen	: 10 µL
Temp.	: 40C
Flussrate	: 0.2 mL/min
Mobile Phase	: A - 5 mM Ammoniumacetat in Wasser
	: B - 5 mM Ammoniumacetat in ACN
Isokratisch	: 95%B

ZORBAX Phenylphasen

Pursuit DiPhenyl

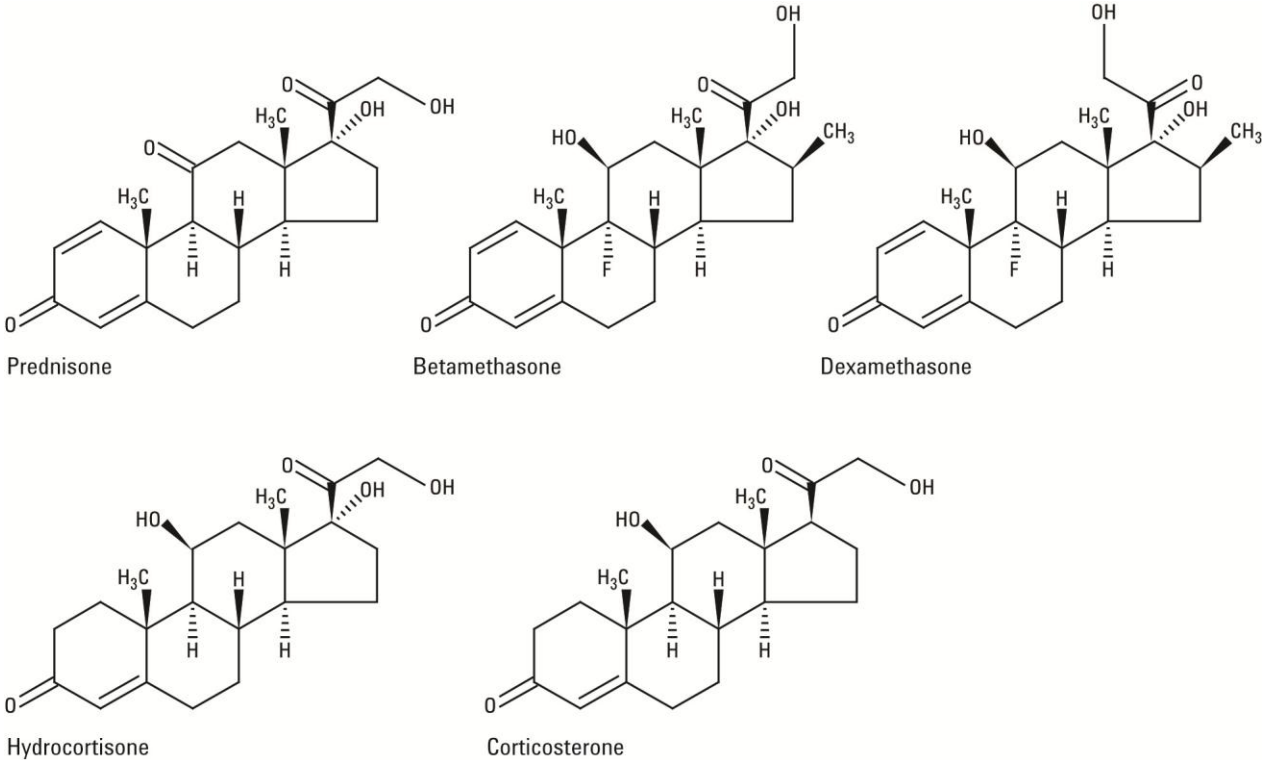


weitere Selektivitätsoption

ZORBAX Phenyl Phasen	Endcap	Silica Typ	Agilent Säule	Unterschiede
Phenylhexyl	ja	B	Eclipse Plus Phenyl	optimiertes Kieselgel längerer Hexylspacer addiert Hydrophobizität zur gebundenen Phase
Phenylethyl	ja	B	Eclipse XDB Phenyl	Original Typ B Silica Phenyl-Wechselwirkung
Phenylpropyl	nein	B	SB Phenyl	kein Chem. EndCapping erhöht Hydrophilie & Silanol- wechselwirkungen
Phenylethyl	ja	A	ZORBAX Phenyl	Original Phenyl Typ A Silica weitere Selektivitätsoption

Molekularformeln der Steroidhormone

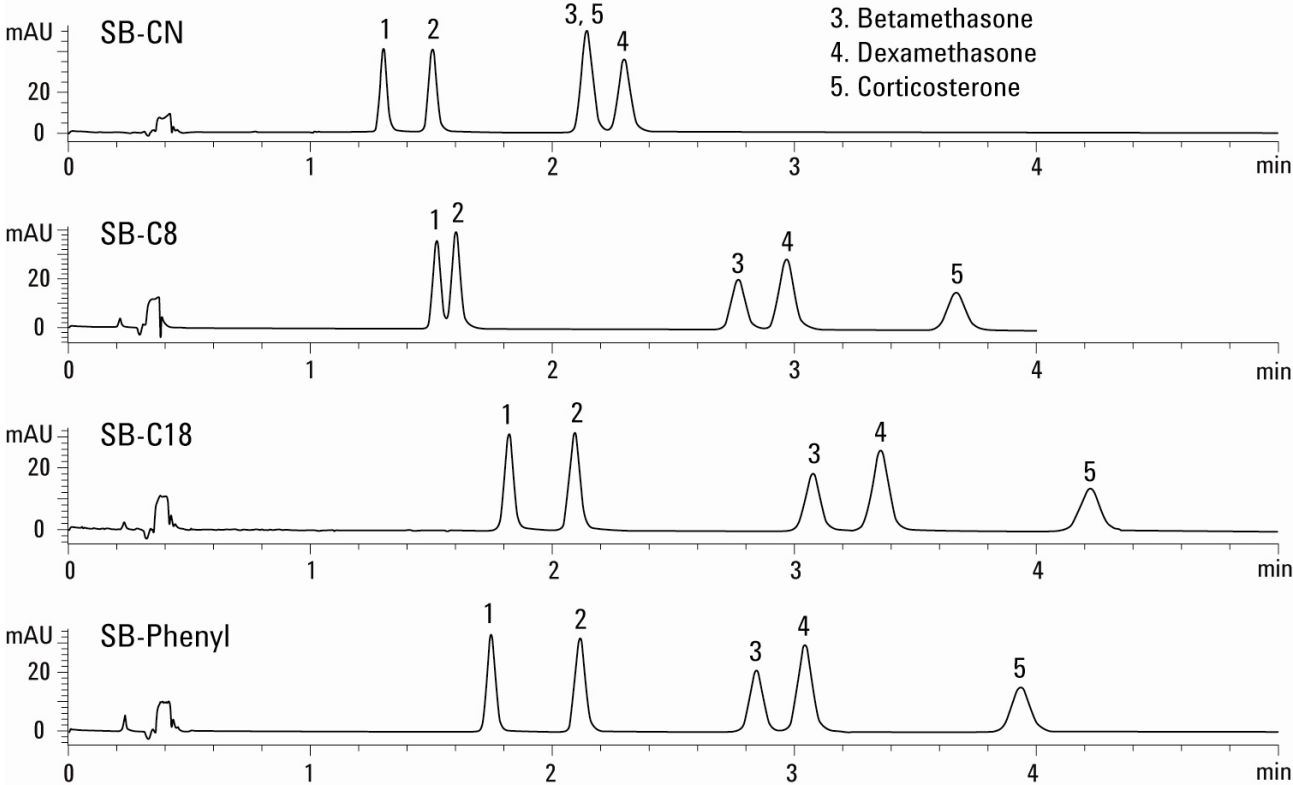
wenig konjugierte Systeme



Steroide – Phenyl-Phasen und ACN

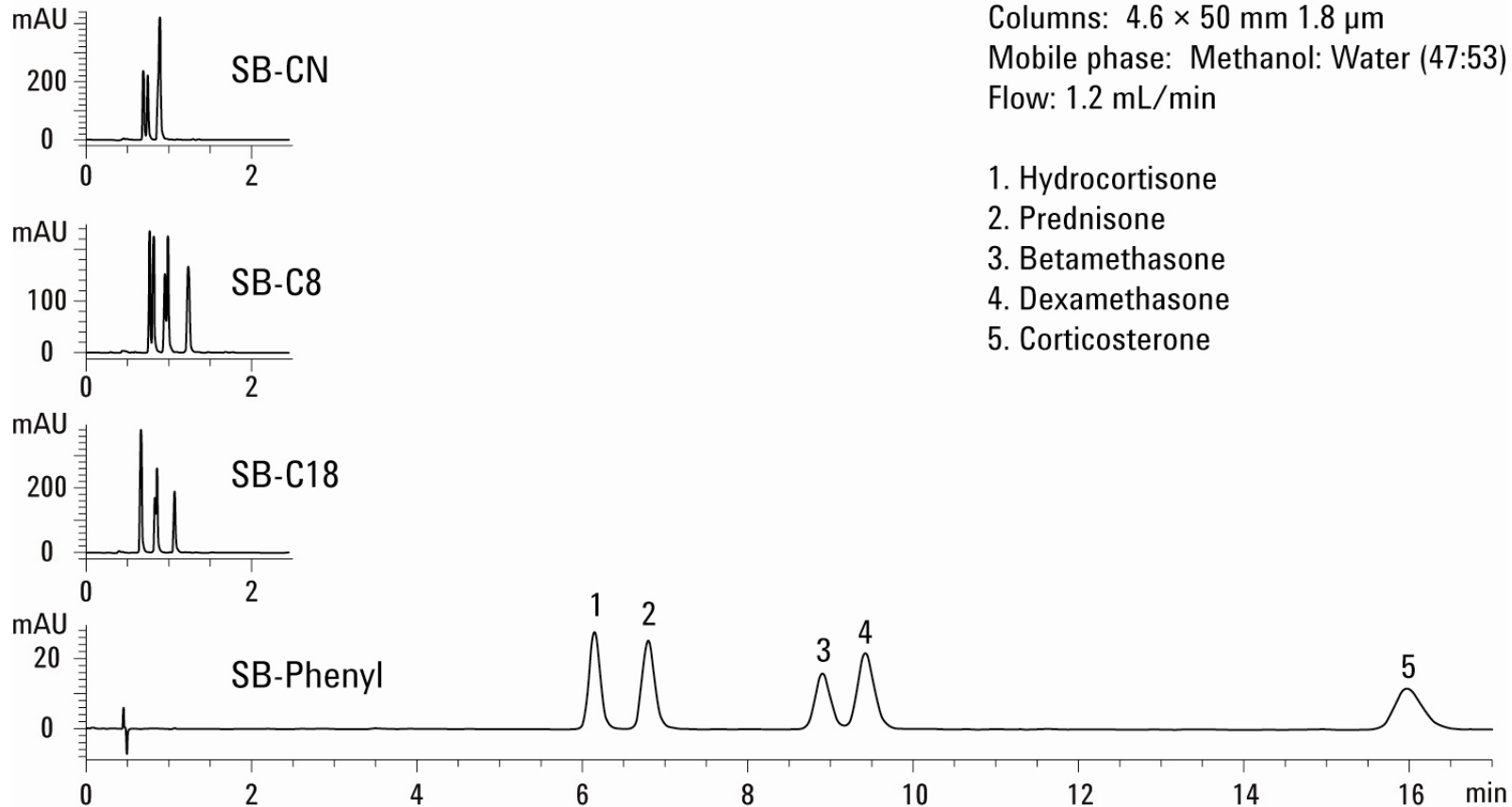
Columns: 4.6 × 50 mm 1.8 μm
Mobile phase: acetonitrile: Water (30:70)
Flow: 1.5 mL/min

- 1. Hydrocortisone
- 2. Prednisone
- 3. Betamethasone
- 4. Dexamethasone
- 5. Corticosterone



ACN fördert eher die Trennung nach Hydrophobizität

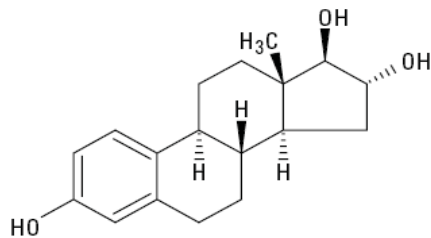
Steroide – Phenyl-Phasen und MeOH



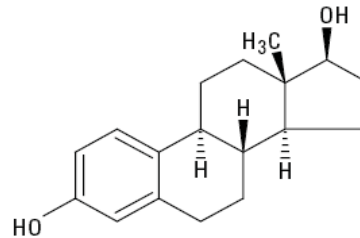
MeOH fördert eher die Trennung nach Aromatizität/pi-Elektronen

Molekularformeln der Steroidhormone: Östrogene

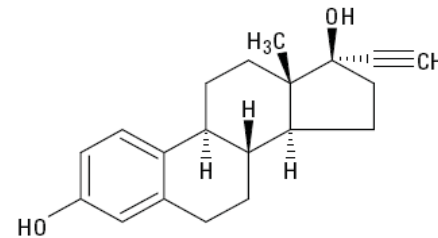
hoch konjugierte, aromatische Systeme



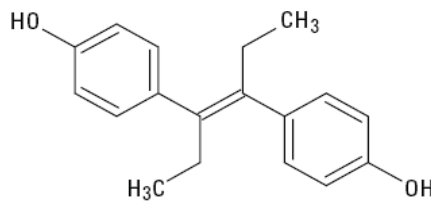
Estriol



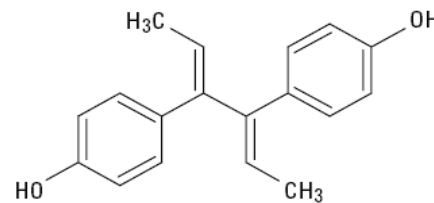
Estradiol



Ethynylestradiol

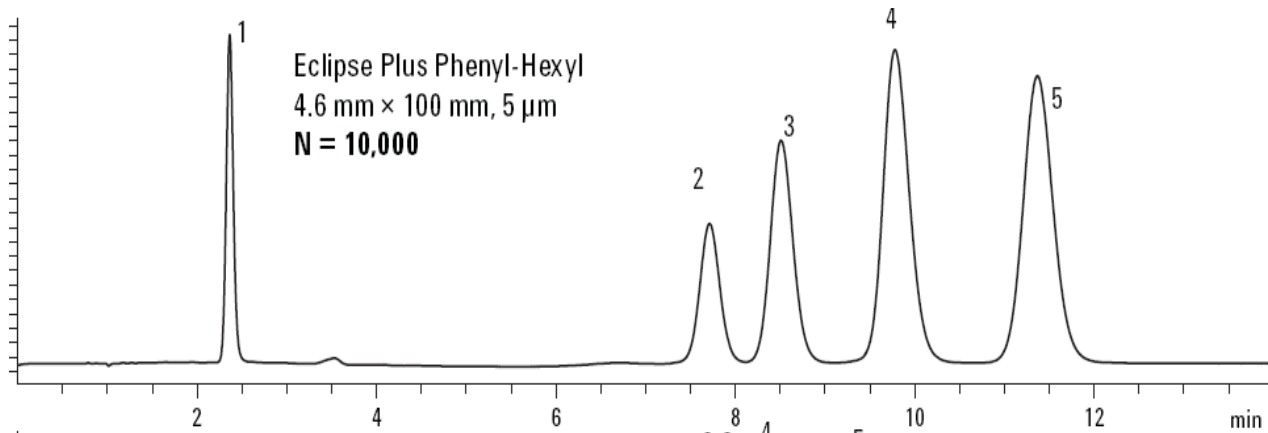


Diethylstilbestrol (DES)

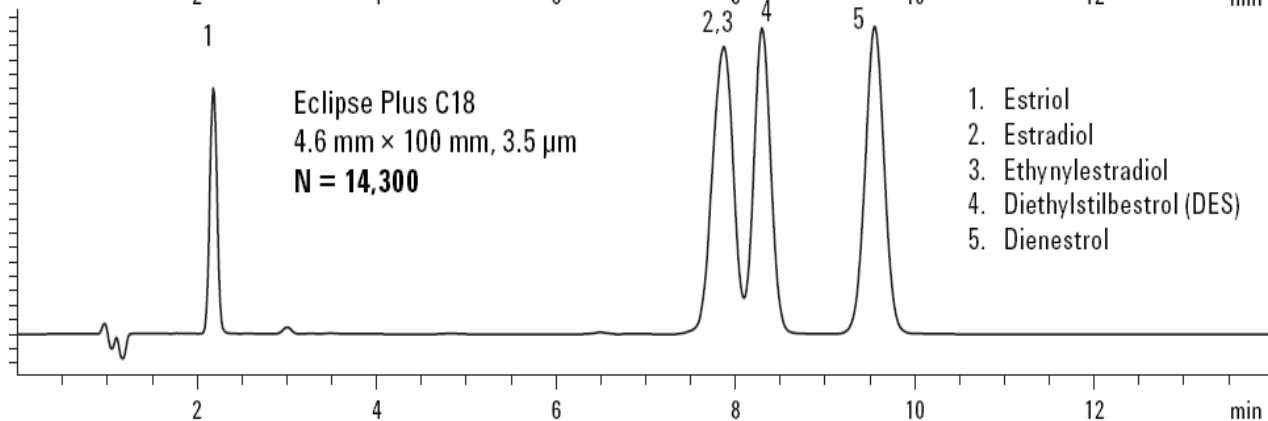


Dienestrol

Östrogene: ZORBAX Eclipse Plus C18/PhenylHexyl Selektivitätsunterschiede



N = 10000

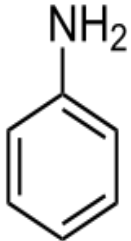


N = 14300
ca 30% höhere Effizienz

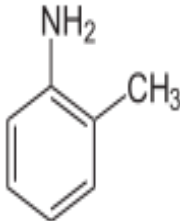
Isokratische Bedingungen:

mobilePhase: 60% MeOH/40% Wasser, Flussrate: 1ml/min, Injektionsvolumen: 3µl, Temperatur: 25C, Detektion: 220nm
5989-9130EN

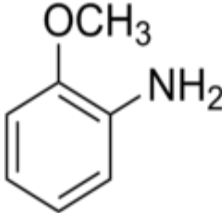
Strukturen der Azofarbstoffe



Aniline



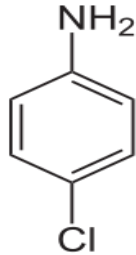
o-toluidine



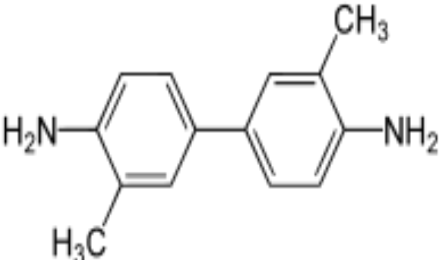
Methoxyaniline



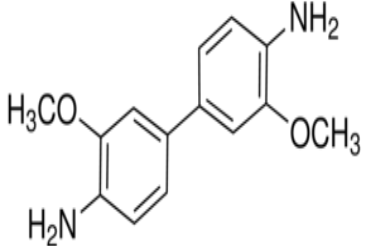
Benzidine



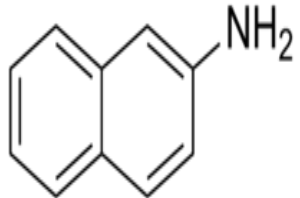
Chloroaniline



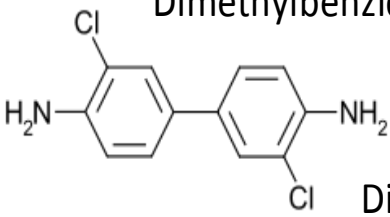
Dimethylbenzidine



3,3'-Dimethoxybenzidine

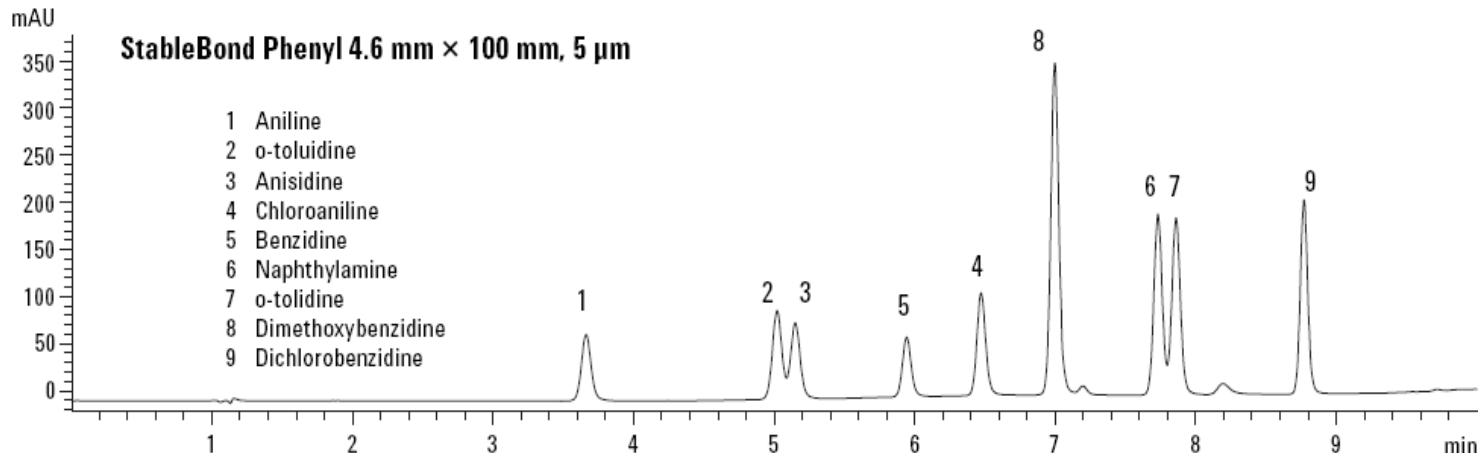
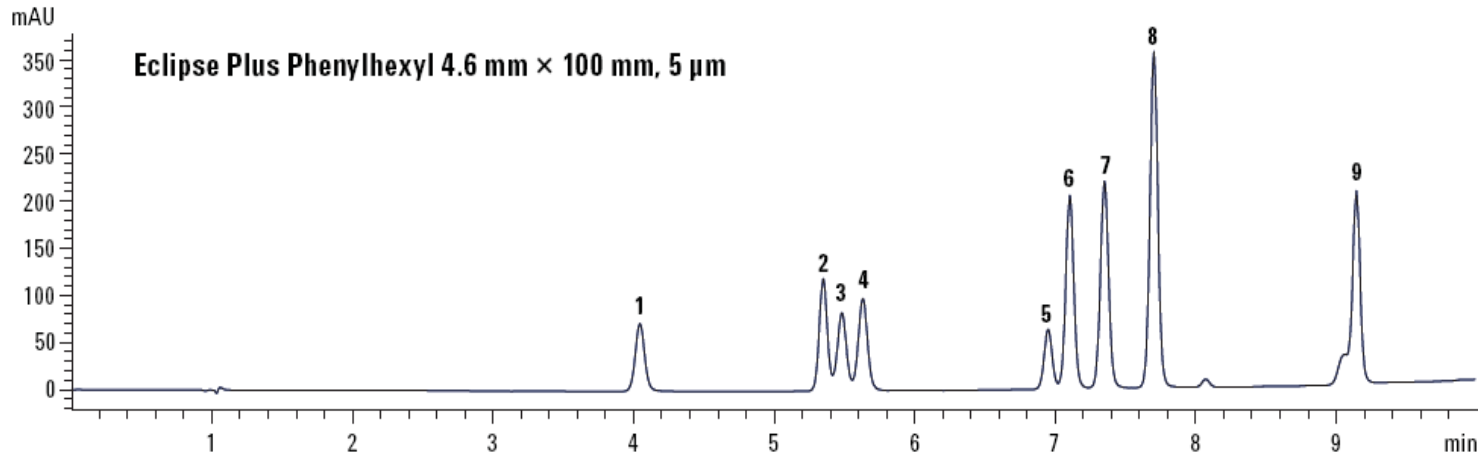


Napthalamine



Dichlorbenzidine

Azofarbstoffe und ihre Zerfallsprodukte auf unterschiedlichen ZORBAX Phenyl-Phasen



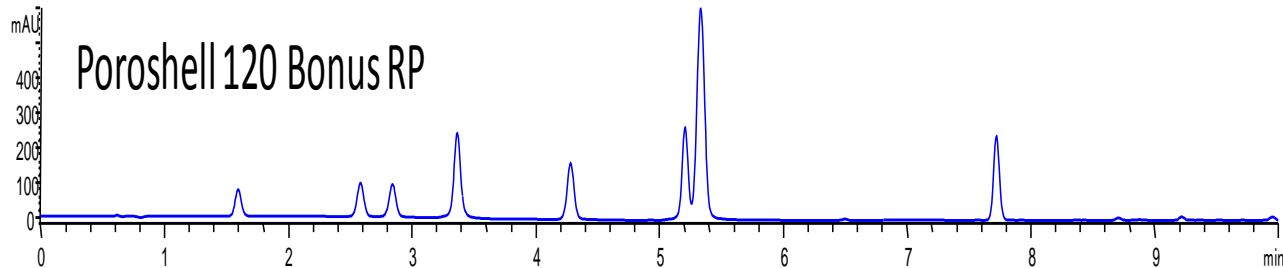
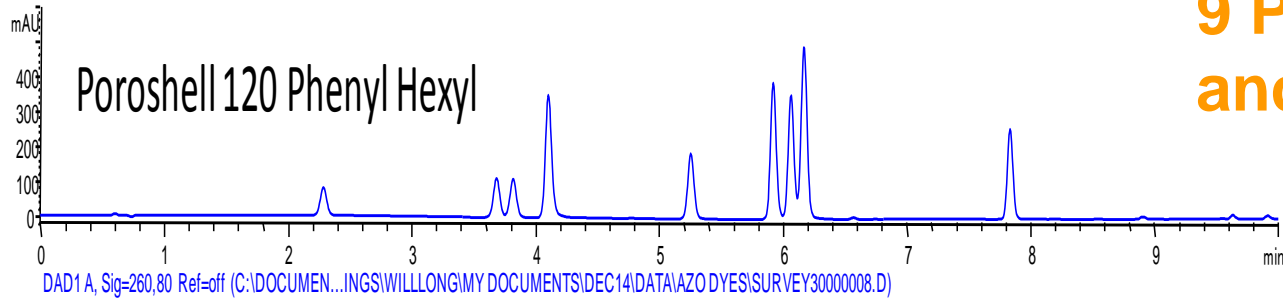
Bedingungen:

mobilePhase A:10mM Ammoniumacetat, B: MeOH, Gradient: 25%B->90%B in 9 min, Flussrate: 1ml/min, Injektionsvolumen: 2ul, Temperatur: 25C, Detektion: 220nm

Azofarbstoffe und ihre Zerfallsprodukte auf unterschiedlichen Poroshell 120 Phasen



**9 Peaks
andere Selektivität**



Bedingungen:

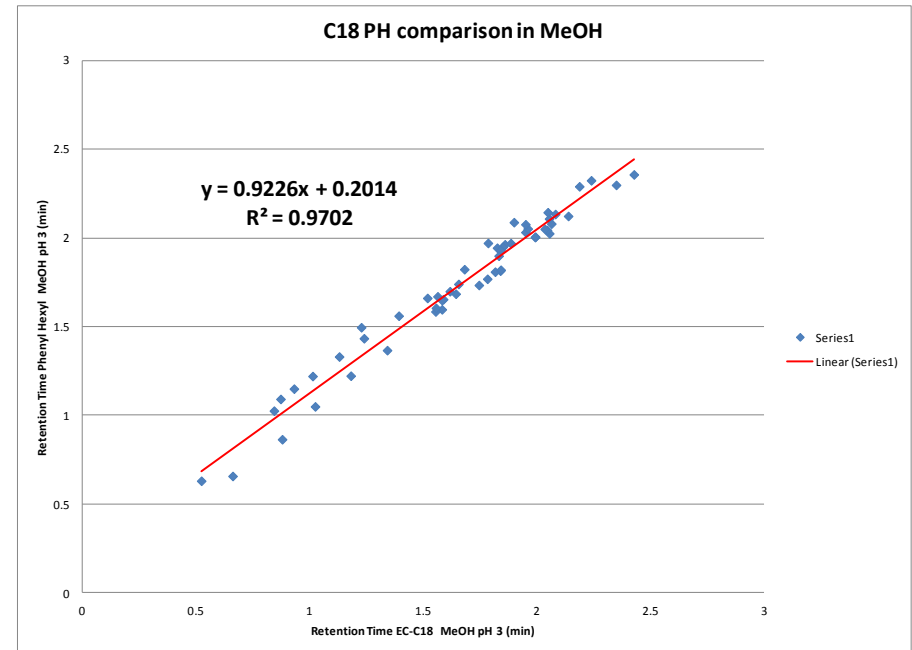
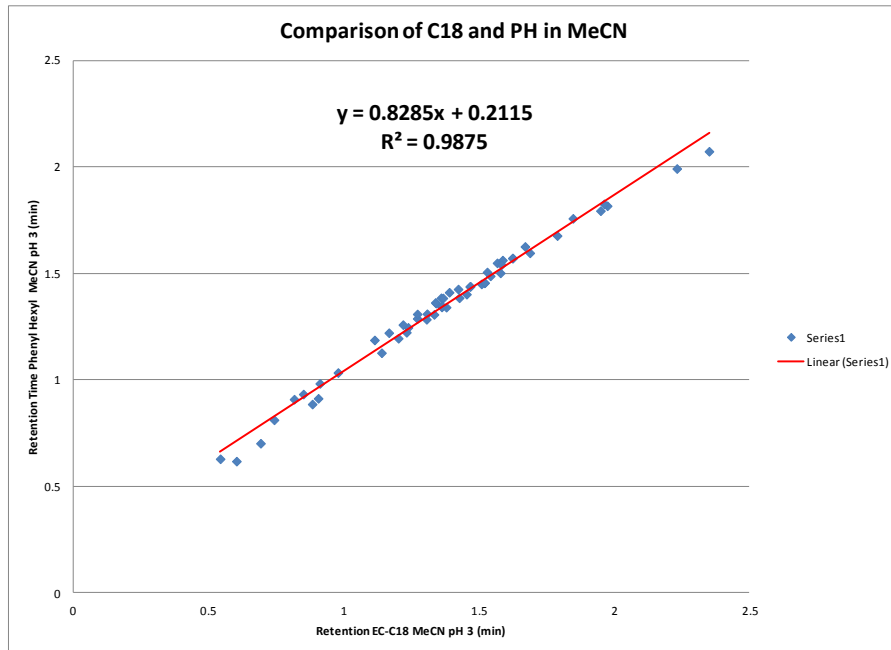
mobilePhase A:10mM Ammoniumacetat, B: MeOH, Gradient: 25%B->90%B in 9 min, Flussrate: 1ml/min, Injektionsvolumen: 2ul, Temperatur: 25C, Detektion: 220nm

*Bonus-RP im Sommer/Herbst 2012 auf den Markt kommen

Lösungsmittleffekte: MeOH / ACN

Selektivität von Phenyl Hexyl Phasen

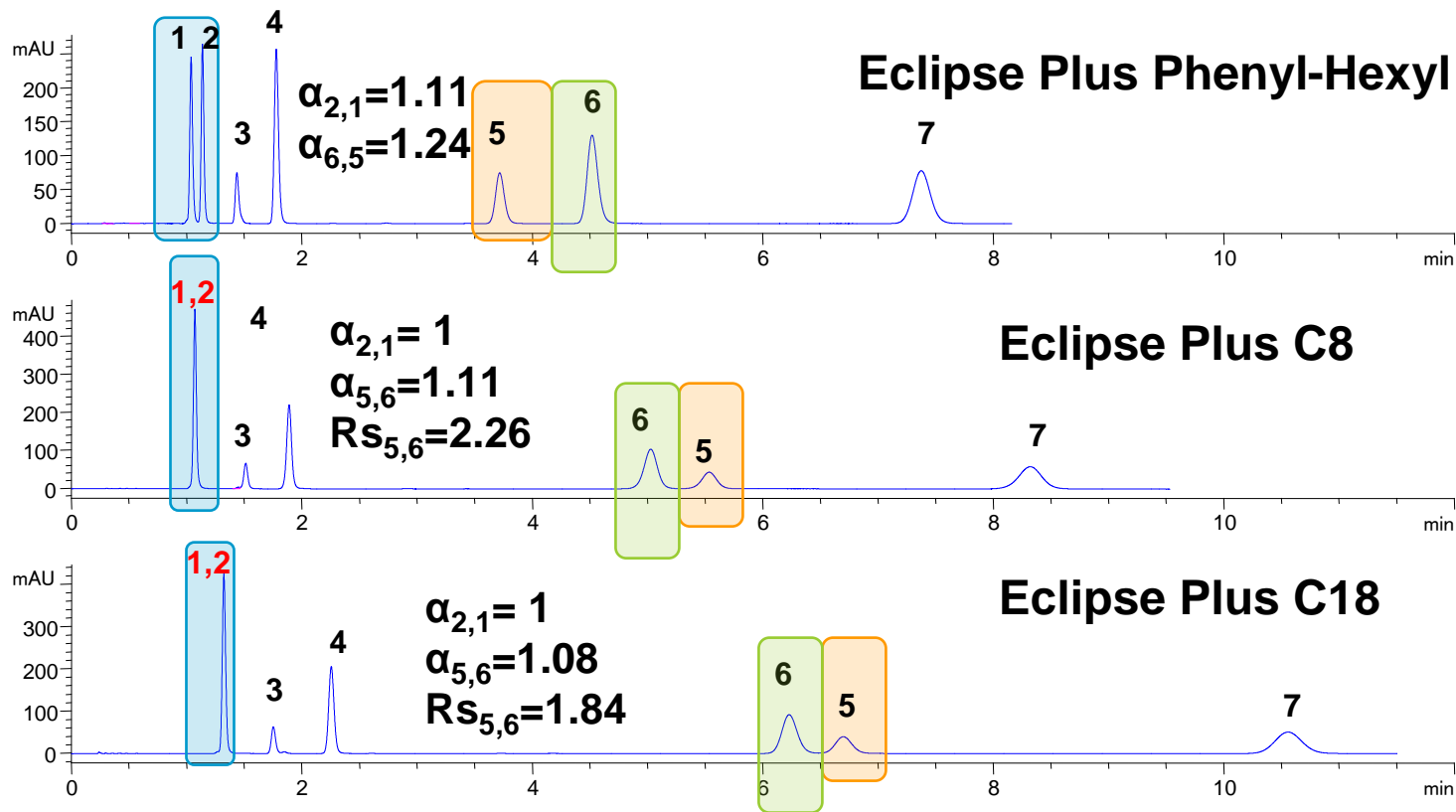
Alternative selectivity to alkyl bonded phases, recommended for aromatic Groups, particularly pi active compounds in Methanol. Compatible with highly aqueous mobile for the separation of polar compounds.



A: 10 mM Puffer B: organischer Anteil (MeOH or ACN) Gradient: 5% B bei t_0 , auf 95% B in 2 min, hold 95% B für 1 min
Flussrate: 2 mL/min Probee: 1 μ L von 1 mg/mL Standard in H₂O oder H₂O/ACN

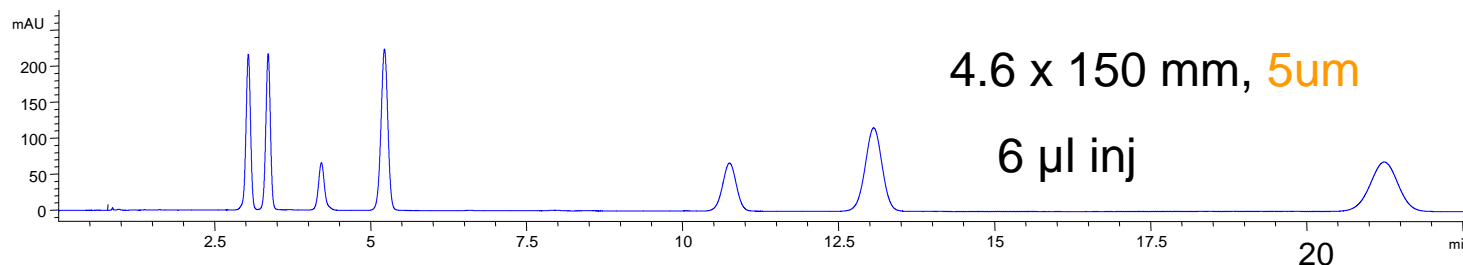
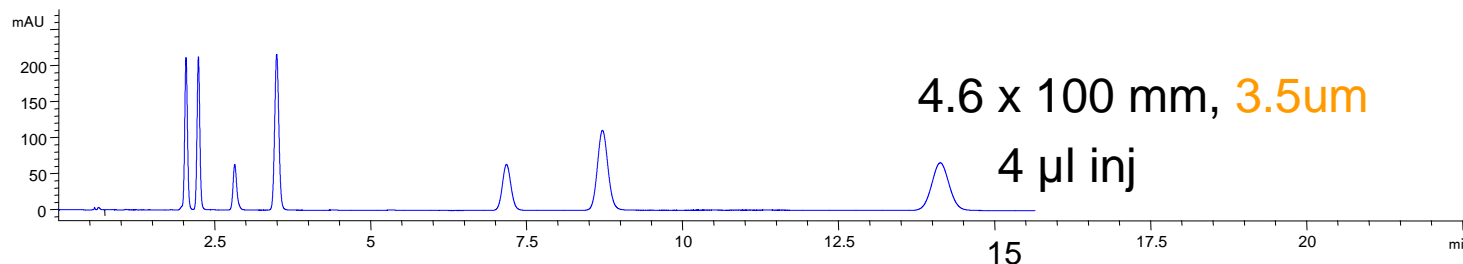
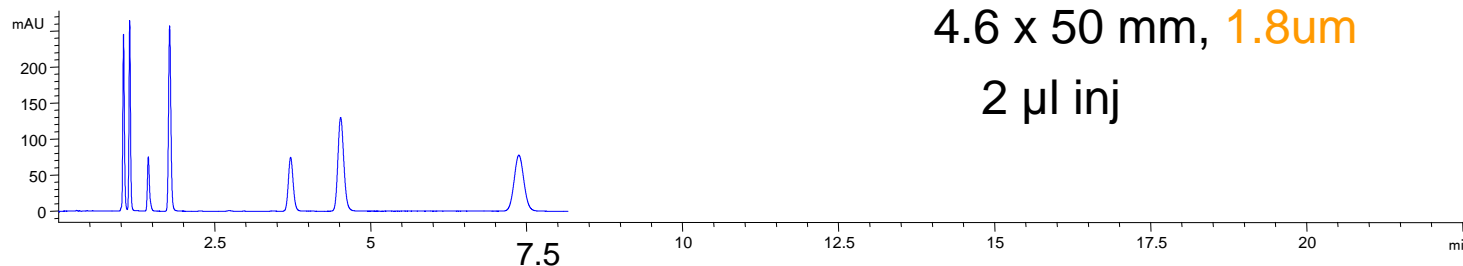
Eclipse Plus - Selektivität abhängig von der funktionellen Gruppe

nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR)



Mobile Phase 40 % ACN 60 % 25 mM Sodium Phosphate Buffer pH= 2.4 Flow Rate= 1.5 ml/min 4.6 x 50mm UV 210 nm 2µl Elution order for Eclipse Plus Phenyl Hexyl: (1) Piroxicam, (2) Sulindac,(3) Tolmetin, (4) Naproxen, (5) Ibuprofen, (6) Diclofenac, (7) Celebrex (equal portions of approximately 1 mg/ml solutions)

Eclipse Plus Phenylhexyl – Selektivität unabhängig von der Partikelgrösse nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR)



Mobile Phase 40 % ACN 60 % 25 mM Na Phosphatpuffer pH= 2.4 Flussrate= 1.5 ml/min Detektion: UV 210 nm 2
Probe: (1) Piroxicam , (2) Sulindac,(3) Tolmetin, (4) Naproxen, (5) Ibuprofen, (6) Diclofenac, (7) Celebrex (je1 mg/ml)



Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit

