

Трудности анализа полярных соединений

Колонки Agilent InfinityLab Poroshell
120 HILIC

Dr. Ulrike Jegle

Специалист по расходным материалам



Трудности анализа полярных соединений

- Полярные соединения сложно анализировать, поскольку они слабо удерживаются на обычных обращеннофазных колонках
- Методами обращеннофазной ВЭЖХ можно решить лишь часть задач по повышению эффективности разделения и чувствительности при анализе полярных соединений
- Типичные методики определения полярных соединений включают анализ:
 - аминокислот, органических кислот, пестицидов, метаболитов, фармпрепаратов, нейромедиаторов, сахаров, витаминов и т.д.
- Для удерживания полярных соединений необходимы специальные подходы, каждый из которых обусловлен своими трудностями



Подходы для анализа полярных соединений

Ион-парная хроматография

- **Преимущества:** быстро. Подходят стандартные приборы и обращеннофазные колонки
- **Недостатки:** частые загрязнения системы, реагенты могут стать причиной ионной супрессии, приводящей к регистрации только в режиме положительных или отрицательных ионов масс-спектрометрического детектора

Ионная хроматография

- **Преимущества:** хорошо изученный механизм, исследуемый в течение 40 лет
- **Недостатки:** медленнее современной ВЭЖХ, дорогостоящее оборудование и расходные материалы, невозможно одновременное разделение анионов и катионов, трудно совместить с масс-спектрометрией

Ионнообменная хроматография

- **Преимущества:** надежное удерживание и разрешение
- **Недостатки:** медленнее современной ВЭЖХ, невозможно одновременное разделение анионов и катионов, трудно совместить с масс-спектрометрией

Хроматография на нормальной фазе

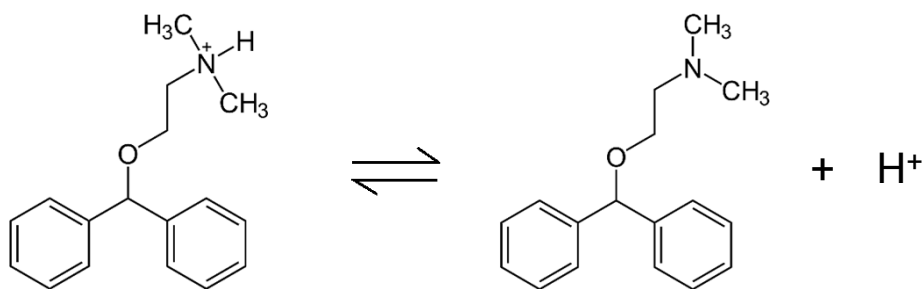
- **Преимущества:** быстро. Подходят стандартные приборы и обычные колонки.
- **Недостатки:** использование органических растворителей (отходы, совместимость), узкий выбор стационарных фаз, трудности с растворимостью образцов

Получение производных

- **Преимущества:** селективность, добавление метки
- **Недостатки:** сложная пробоподготовка, трудности с воспроизводимостью, сложный МС-спектр

Полярные соединения с изменяемым зарядом — кислые и основные

дифенилгидрамин



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

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

$$pK_s = 9$$

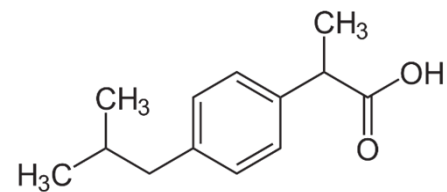
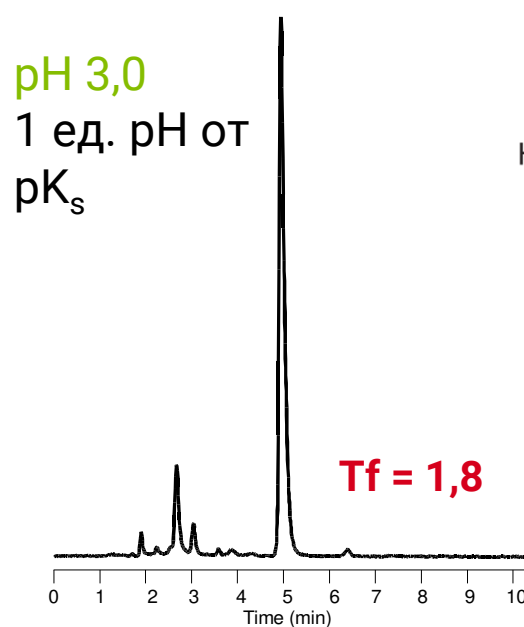
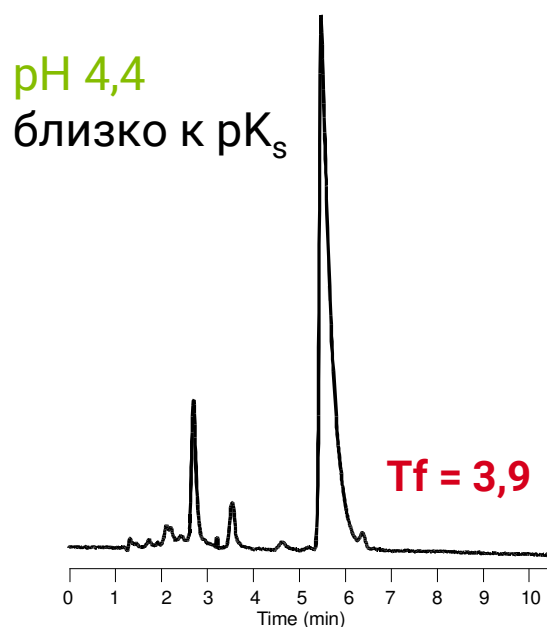
pH 8 91% молекул протонированы – заряд вызывает сдвиг к меньшим значениям K_s , что сокращает время удерживания

pH 9 соотношение протонированных и депротонированных молекул 1:1 – несимметричная форма пика

pH 10 91% молекулу депротонированы, т.е. не заряжены. Это усиливает связывание, что ведет к увеличению времени удерживания

От выбора pH мобильной фазы зависит форма пика

Ассиметричность пиков или нестабильное удерживание может появляться в случае, когда pH мобильной фазы слишком мало отличается от pK_s анализита.



ибупрофен
 $pK_s = 4,4$

Форма пика
полярных соединений

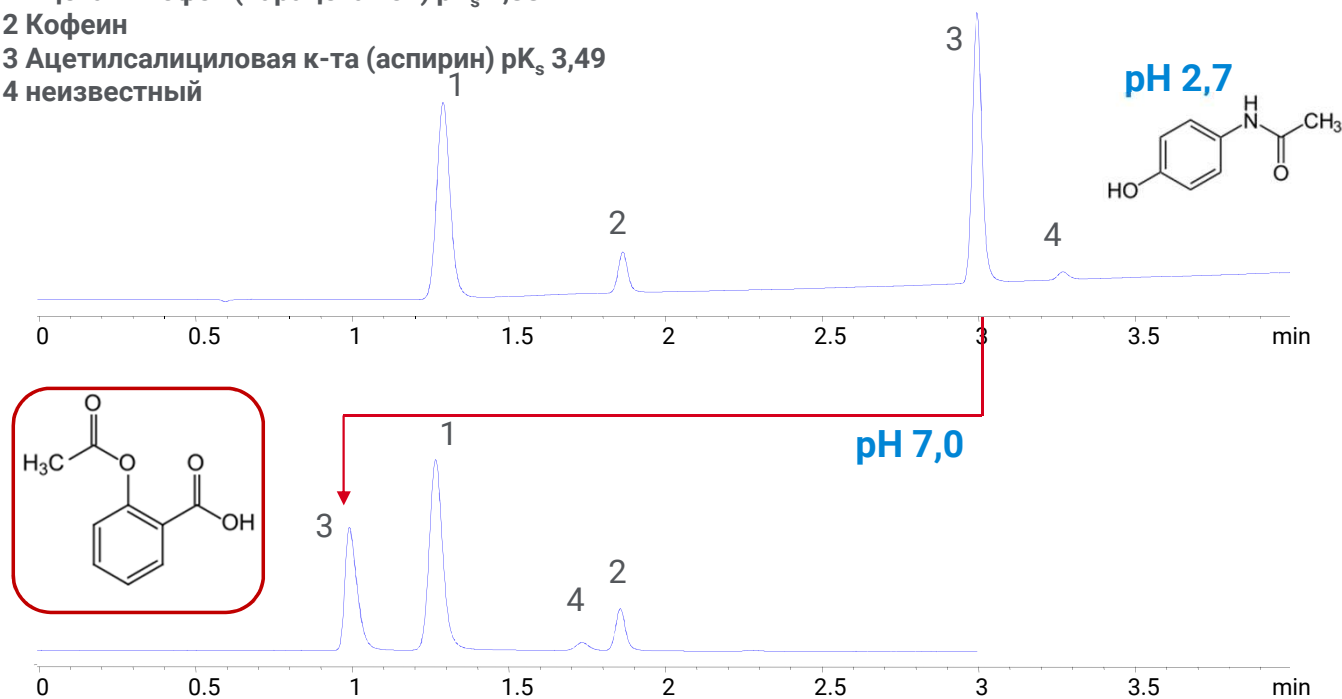
Колонка: ZORBAX SB-C8, 4,6 x 150 мм, 5 мкм

Мобильная фаза: 40% 5 мМ KH_2PO_4 ; 60% ацетонитрил; скорость потока: 1,0 мл/мин; Т: комнатная

В идеале: pH мобильной фазы на 1 единицу pH выше или ниже значения pK_s/pK_b компонентов образца.

Изменение селективности при pH 2 и pH 7 вызывает изменение порядка элюции на обратный

- 1 Ацетаминофен (парацетамол) pK_s 9,38
- 2 Кофеин
- 3 Ацетилсалициловая к-та (аспирин) pK_s 3,49
- 4 неизвестный

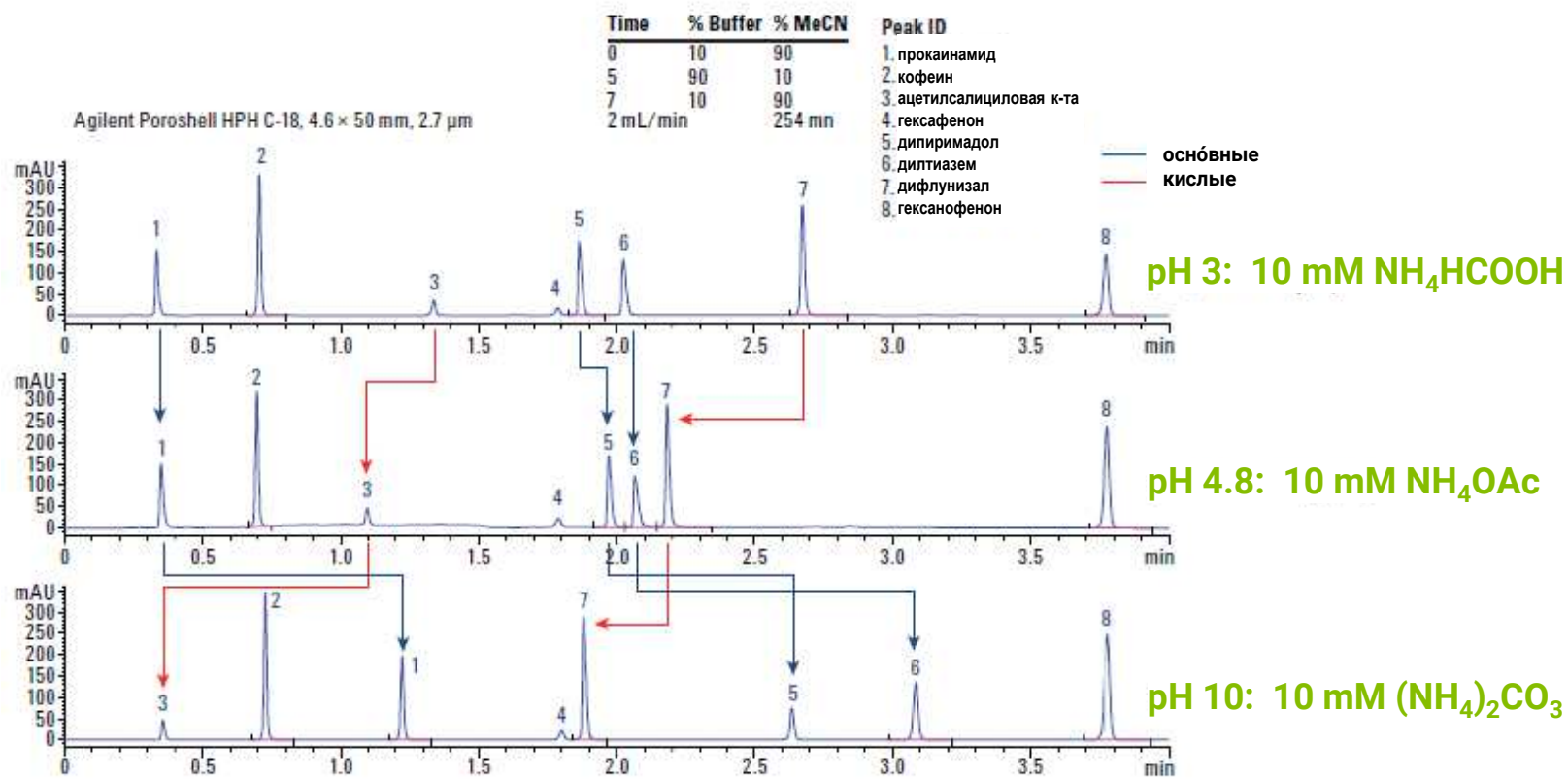


pH 2,7 ацетилсалициловая к-та не заряжена

pH 7,0 ацетилсалициловая к-та несет положительный заряд

Колонка: **Eclipse Plus C8, 4,6 x 50 мм, 5 мкм** PN 959946-906
Градиент: 10 — 60% В / 3 мин; образец: экседрин (таблетированный)
pH 2,7: А: 0,1% муравьиная к-та, В: 0,1% муравьиная к-та в ацетонитриле
pH 7,0: А: 20 мМ фосфат натрия, В: ацетонитрил

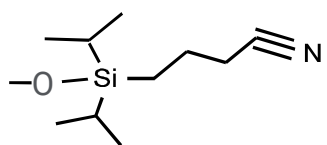
Влияние pH на селективность и разрешение заряженных соединений



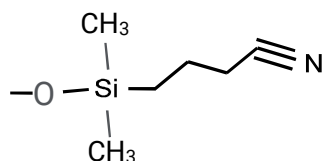
Колонка: **Poroshell 120 HPH C18**, 4,6 x 50 мм, 2,7 мкм; градиент: 10 – 90% 5 мин; скорость потока: 2 мл/мин; детектор: УФ 254 нм

Соединения средней полярности на «полярных» обращённых фазах

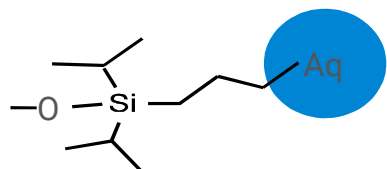
«встроенные» полярные группы



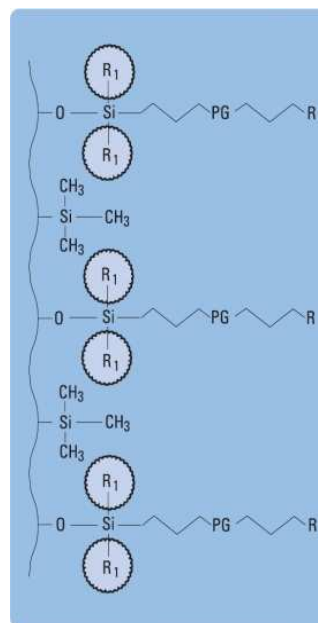
StableBond CN



Eclipse XDB CN



StableBond Aq

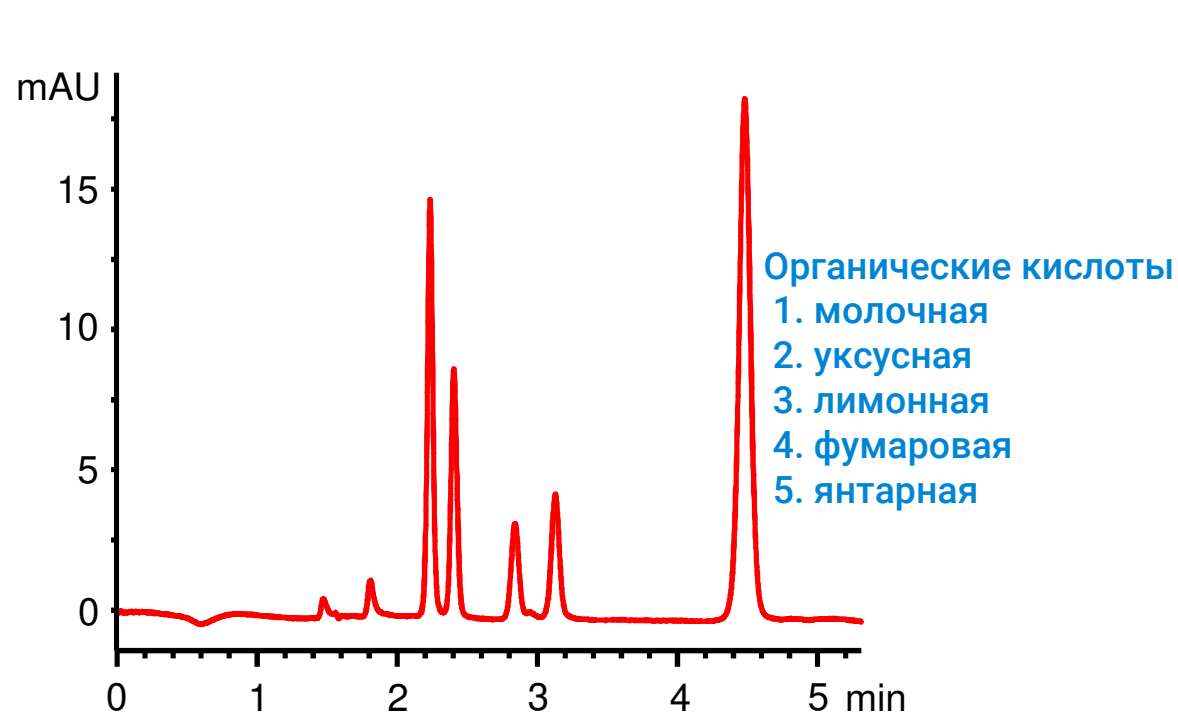


ZORBAX/ Poroshell
Bonus RP

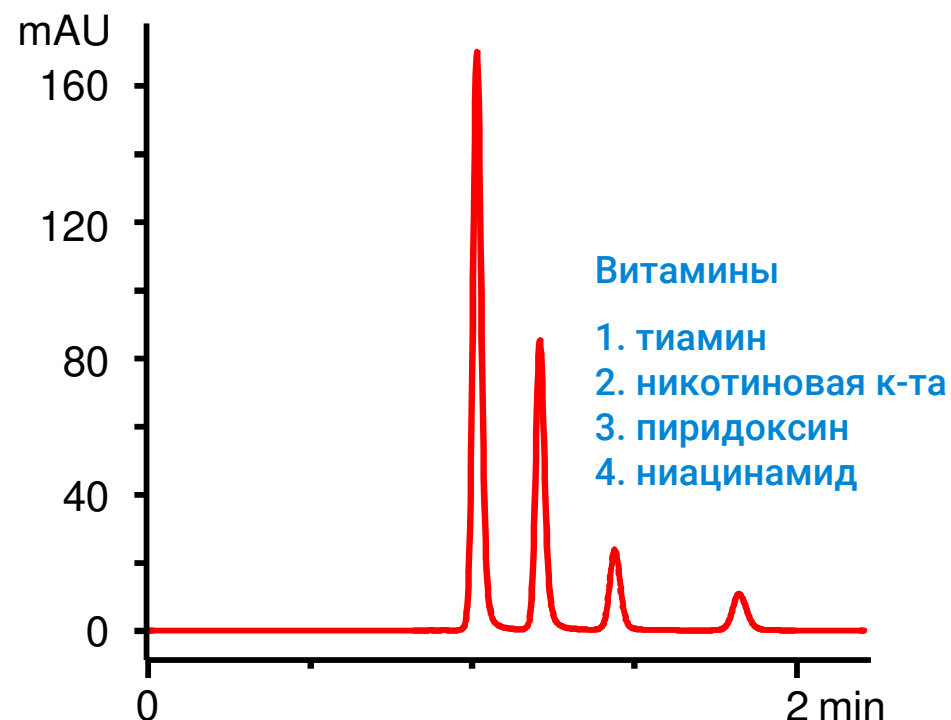
Polaris C18/ C8
Amid, Ether...

Все фазы можно использовать со 100% H₂O для элюции

StableBond Aq – «гидрофильная» обращённая фаза

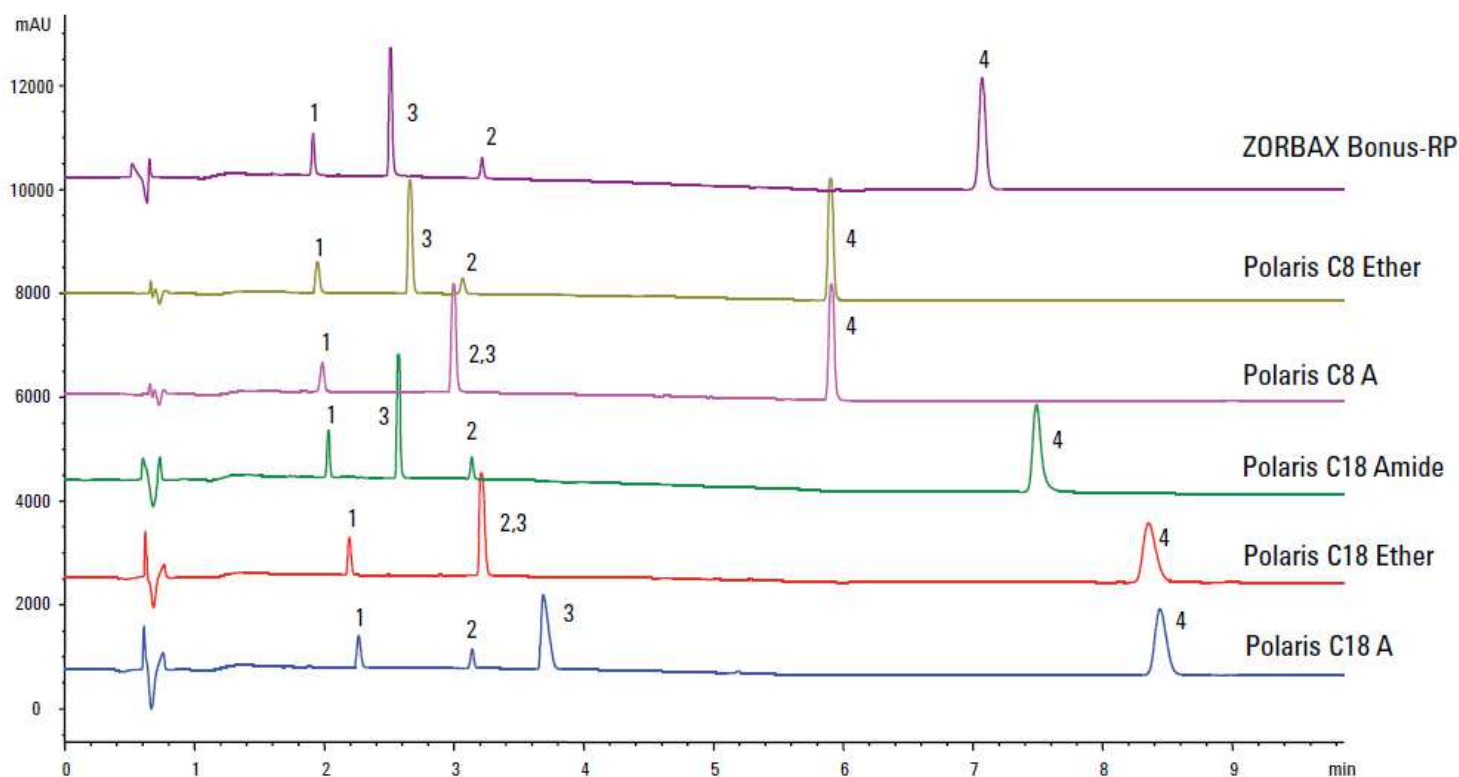


Колонка: ZORBAX SB-Aq, 4,6*150 мм (5 мкм)
Подвижная фаза: 99% 20 мМ NaHPO₄, pH 2, 1% ацетонитрил
Поток: 1 мл/мин
Детектор: УФ ДМД



Колонка: ZORBAX SB-Aq, 4,6 x 150 мм (5 мкм)
Подвижная фаза: 5% метанол / 95% ТФУ к-та (0,1%)
Поток: 2,0 мл/мин
Температура: 35°C
Детектор: УФ (254 нм)

Сравнение селективности ZORBAX/Poroshell Bonus RP и Polaris Amid/Polaris Ether



Образец:

1 аспартам $\log P$ 2,1
2 кортизон $\log P$ 1,2
3 резерпин $\log P$ 3,7
4 диоктилфталат $\log P$ 8,7

Колонка: 4,6*50 мм

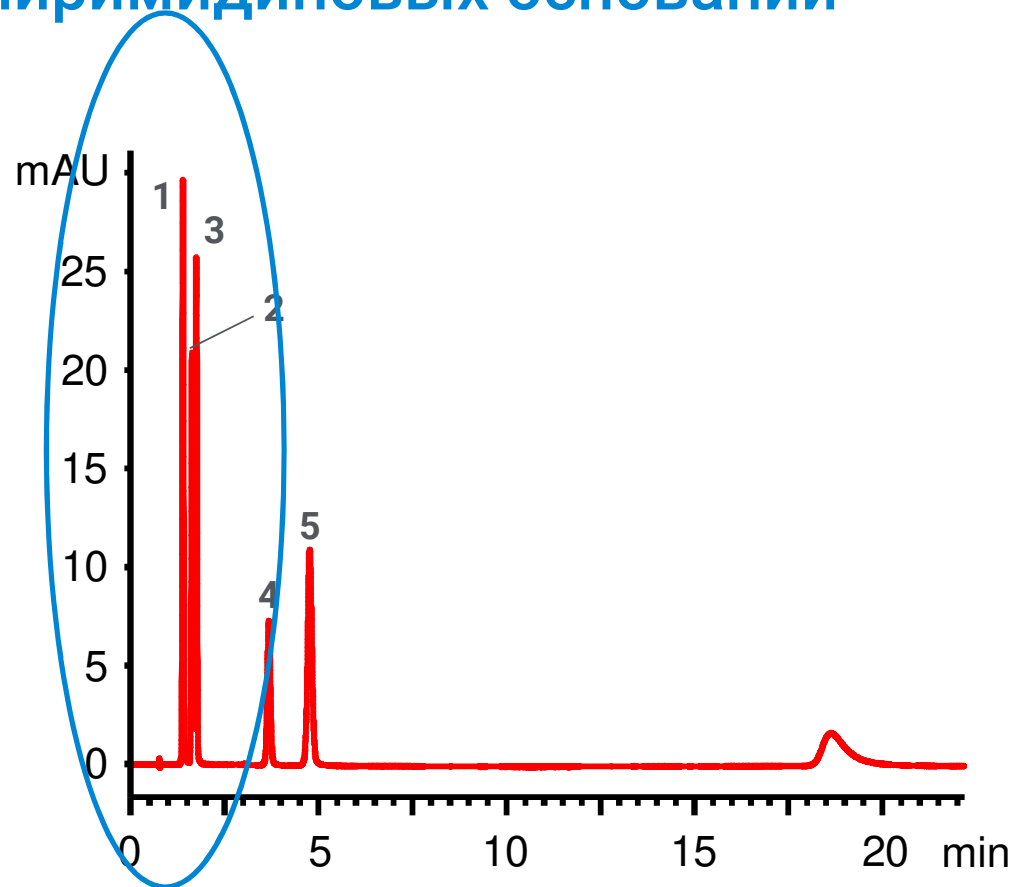
Подвижн. фаза А: 0,05% HCOOH в H₂O

Подвижн. фаза В: 0,05% HCOOH в ацетонитриле

Поток: 1,0 мл/мин

Градиент: 5 — 90% В за 5 мин, 90% В/6,2 мин

Сильно полярные соединения: разделение пуриновых и пиримидиновых оснований



1. цитозин
2. флуороцистеин
3. урацил
4. гуанин
5. тимин
6. аденин

Колонка: ZORBAX SB-Aq, 4,6 x 150 мм (5 мкм)
Подвижная фаза: 50 mM NaOAc, pH 4,6
Поток: 2,0 мл/мин
Температура: 35°C
Детектор: УФ (254 нм)

Что такое HILIC?

Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (хроматография гидрофильных взаимодействий)

- Подход в ВЭЖХ, не так часто использовавшийся в последние десятилетия
- Разделение на полярных стационарных фазах: силикагель, привитые аминокислоты, смешанные группы, цвиттерионы и т. п.
- Водорастворимые неполярные подвижные фазы с небольшим содержанием воды (не менее 3% по весу)
- Возможно использование летучих буферных растворителей для совместимости с масс-спектрометрией
- Дополняет обращеннофазную хроматографию: связывает гидрофильные соединения, часто меняя порядок элюции на обратный

Преимущества хроматографии гидрофильных взаимодействий HILIC

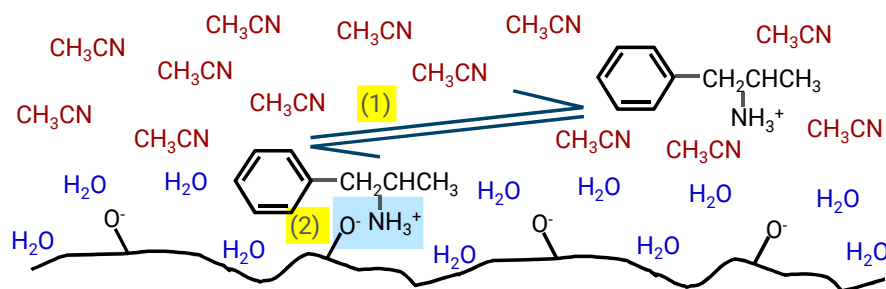
- Связывает полярные соединения, что невозможно в методах обращеннофазной хроматографии
- Обеспечивает альтернативную селективность по сравнению с методами обращеннофазной хроматографии
- Позволяет повысить симметричность формы пиков основных соединений
- Совместима со стандартными ВЭЖХ-системами и обычными растворами для обращеннофазной хроматографии
- Более высокие скорости потока и длинные колонки можно использовать вследствие низкой вязкости подвижных фаз, содержащих высокую долю органических растворителей, что повышает эффективность
- Позволяет упростить пробоподготовку
 - При ТФЭ, ЖЖЭ проба часто содержит высокую долю органических растворителей. Можно вносить образец без высушивания аликвот и перерастворения в водных растворах, как это требуется для обращеннофазной хроматографии
- Повышение чувствительности в методах с МС-детекцией в режимах как для положительно, так и для отрицательно заряженных ионов



Механизм HILIC

- Связывает соединения от средней до высокой полярности

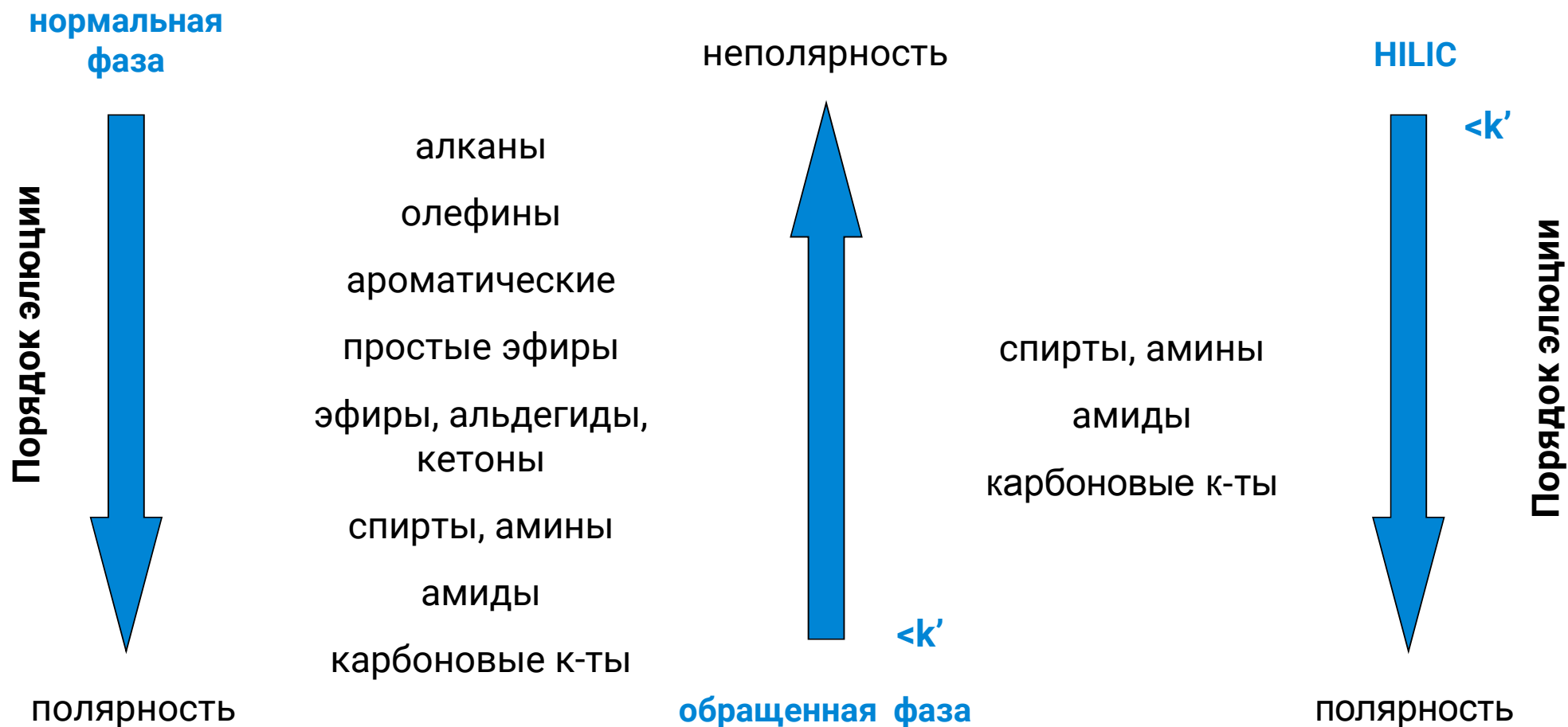
- Поверхность силикагеля гидратируется, создавая эффект жидкость-жидкостной экстракционной системы
- Полярные аналиты могут **разделяться, диффундируя в водный слой у поверхности сорбента и покидая его**, при этом более полярные взаимодействуют сильнее (1)
- Заряженные полярные соединения могут взаимодействовать и по **ионно-обменному механизму с поверхностью сорбента** (2)



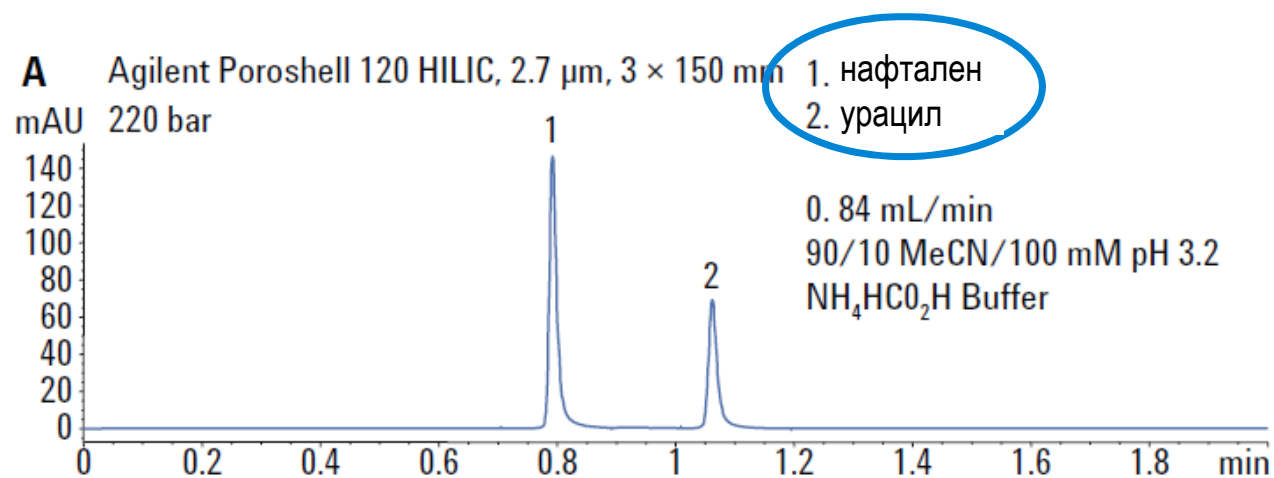
Важные моменты:

- Вода — сильный растворитель
- Элюция от менее полярных к более полярным анализам: в обратном порядке в сравнении с обращеннофазной хроматографией
- Градиенты начинаются от **высоко-гидрофобных к гидрофильным** (от 10% воды до 50% воды — часто применяемый градиент)
- Методы HILIC сходны с хроматографией на нормальной фазе, за исключением использования обращеннофазных растворителей (например, системы ацетонитрил: вода)
 - Метанол, этанол, изопропанол также используются
- Высокая концентрация буфера увеличивает силу растворителя, повышает симметричность пиков и может немного влиять на селективность

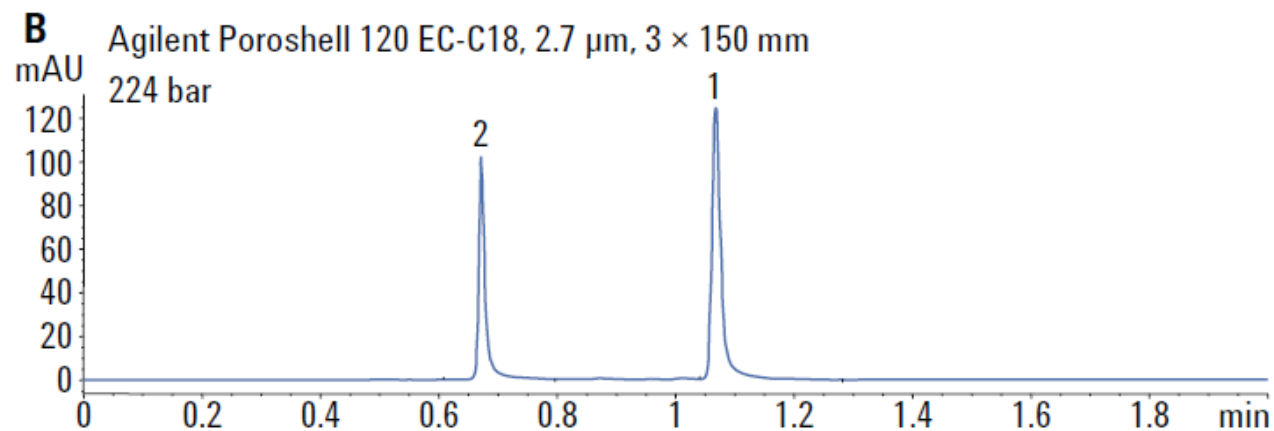
Порядок элюции соединений



Обратный порядок элюции



HILIC



обращеннофазная

5991-1242EN


Почему подход HILIC уникален для анализа полярных соединений?

- 1. Тоже оборудование и растворители, что и для обращеннофазной хроматографии — лишь заменить колонки**
 - просто осваивается в лабораториях, где используются методы обращеннофазной хроматографии
- 2. Удерживает катионы, анионы и полярные нейтральные соединения одновременно**
 - широкое применение для всех полярных аналитов
- 3. Совместимость с МС, как и обычные методы обращеннофазной хроматографии**
 - в режиме положительно и отрицательно заряженных ионов
 - подходит для низких концентраций буфера; обеспечивает высокую чувствительность



просто

Разделение сложных смесей полярных соединений: новое поколение фаз *InfinityLab Poroshell 120 HILIC*

InfinityLab Poroshell 120	EC	EC-C18		
		EC-C8		
		EC-CN		
	SB	SB-C18		
		SB-C8		
		SB-AQ		
	HPH	HPH-C18		
		HPH-C8		
	HILIC	HILIC-OH5		
		HILIC-Z		
		HILIC		
	Chiral	Chiral-V		
		Chiral-T		
		Chiral-CD		
		Chiral-CF		
	Phenyl Hexyl			
	Bonus-RP			
	PFP			



- новые связанные фазы HILIC: повышение эффективности и надежности
- три фазы с очень разными свойствами для разделения полярных соединений методом HILIC — все на основе высокоэффективной технологии поверхностно-пористых сорбентов Poroshell

Колонки InfinityLab Poroshell HILIC-Z и HILIC-OH5



- Быстрое высокоэффективное разделение с использованием **поверхностно-пористых сорбентов Poroshell**
- Связанные фазы HILIC характеризуются высокой надежностью и повышенным сроком работоспособности в сравнении с немодифицированной фазой HILIC (силикагелем)
- Совместимы с буферами для МС, где содержание соли <10 мМ

Фаза InfinityLab Poroshell HILIC-Z

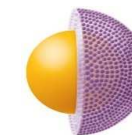
- Новая **цвиттерионная** неподвижная фаза на основе сорбента Poroshell 120
- **Симметричная форма пиков и отличное связывание всех полярных соединений**, сильнозаряженных включительно
- Гибридный способ прививания фазы повышает её химическую устойчивость
 - устойчивость при высоких значениях pH вплоть до pH 12 при 35°C. Устойчивость в условиях высокой температуры: до 80°C при pH 7.
- Нанесение на внутреннюю поверхность колонки слоя ПЭЭК (опционально) снижает взаимодействие с «липкими» соединениями, обеспечивая выход таких соединений и симметричность пиков

Фаза InfinityLab Poroshell HILIC-OH5

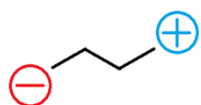
- Новая фаза на основе **полигидроксифруктана** привитого к Poroshell 120
- Уникальная фаза обеспечивает **селективность, альтернативную** фазам HILIC и HILIC-Z



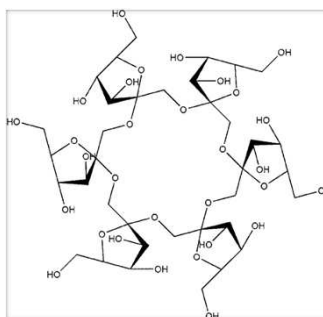
Характеристики колонок InfinityLab Poroshell 120 HILIC



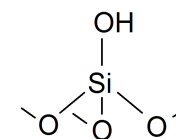
Колонки InfinityLab Poroshell	Привитая фаза	Сорбент	Размер частиц	Предельное давление	Размер пор	Предел температуры	pH диапазон	Размеры мм (вн. диаметр)	Размеры (длина, мм)	Метка колонки InfinityLab
HILIC-Z	патентованная цвиттерионная	гибридный Poroshell поверхностно пористый	2,7 мкм	600 бар	100 Å	80°C	2-12	2,1 3,0 4,6	5 (предколонка) 50 100 150	Да
								ПЭЭК нанесение (опция)		Да
HILIC-OH5	полигидрокси фруктан	Poroshell поверхностно пористый	2,7 мкм	400 бар	120 Å	45°C	1-7	2,1 3,0 4,6	50 100 150	Нет
HILIC	Нет (силикагель)	Poroshell поверхностно пористый	1,9 мкм 2,7 мкм 4 мкм	1300 бар (1,9) 600 бар (2,7) 600 бар (4)	120 Å	60°C	0-8	2,1 3,0 4,6	5 (предколонка) 50 100 150	Да – 1,9 мкм 2,7 и 4 мкм опционально



HILIC-Z
патентованная цвиттерионная фаза

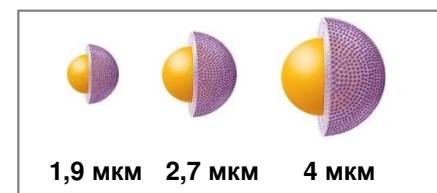


HILIC-OH5
привитый полигидроксифруктан

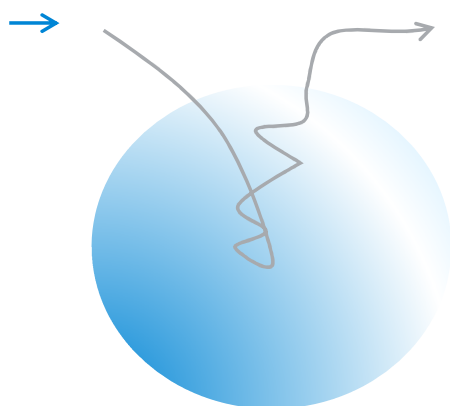


HILIC
силикагель

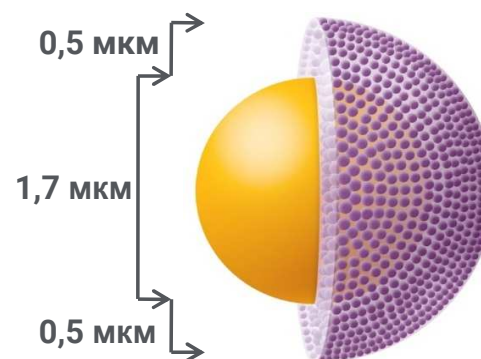
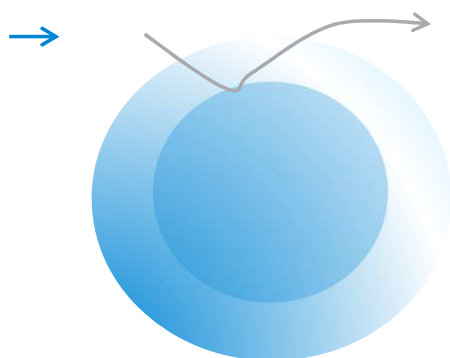
Сорбенты Agilent InfinityLab Poroshell идентичная платформа для фаз HILIC



Цельно-пористый сорбент (ЦПС)



Поверхностно-пористый сорбент (ППС)



пример: диаметр частиц сорбента 2,7 мкм

- эффективность 90% суб-2 мкм ЦПС сорбентов
- давление 50% суб-2 мкм ЦПС сорбентов
- быстро, эффективное разделение на системах ВЭЖХ и УВЭЖХ

Agilent InfinityLab Poroshell входит в семейство Agilent InfinityLab

Продукция Agilent InfinityLab разработана для обеспечения эффективности применения в методах ВЭЖХ во всех областях использования.

Надежное взаимодействие оборудования Agilent InfinityLab, колонок и приспособлений обеспечивается при разработке таким образом, чтобы каждый компонент подходил к другому без дополнительных усилий. Это позволяет снизить трудозатраты, позволяя значительно повысить эффективность утилизации времени и оборудования в ежедневной работе.

InfinityLab приспособления



Колонки InfinityLab



Серия оборудования InfinityLab



Серия ВЭЖХ-МС InfinityLab



InfinityLab аксессуары



Идентификационная метка колонок InfinityLab

Удобство, отслеживание и безопасность

Колонки InfinityLab Poroshell 120 можно заказать с запрограммированной индивидуальной идентификационной меткой (Column ID)



- **удобство**
 - просто найти характеристики колонки
- **отслеживание**
 - всегда известно какая колонка установлена (была установлена)
- **безопасность**
 - защита от несовместимости метода и колонки

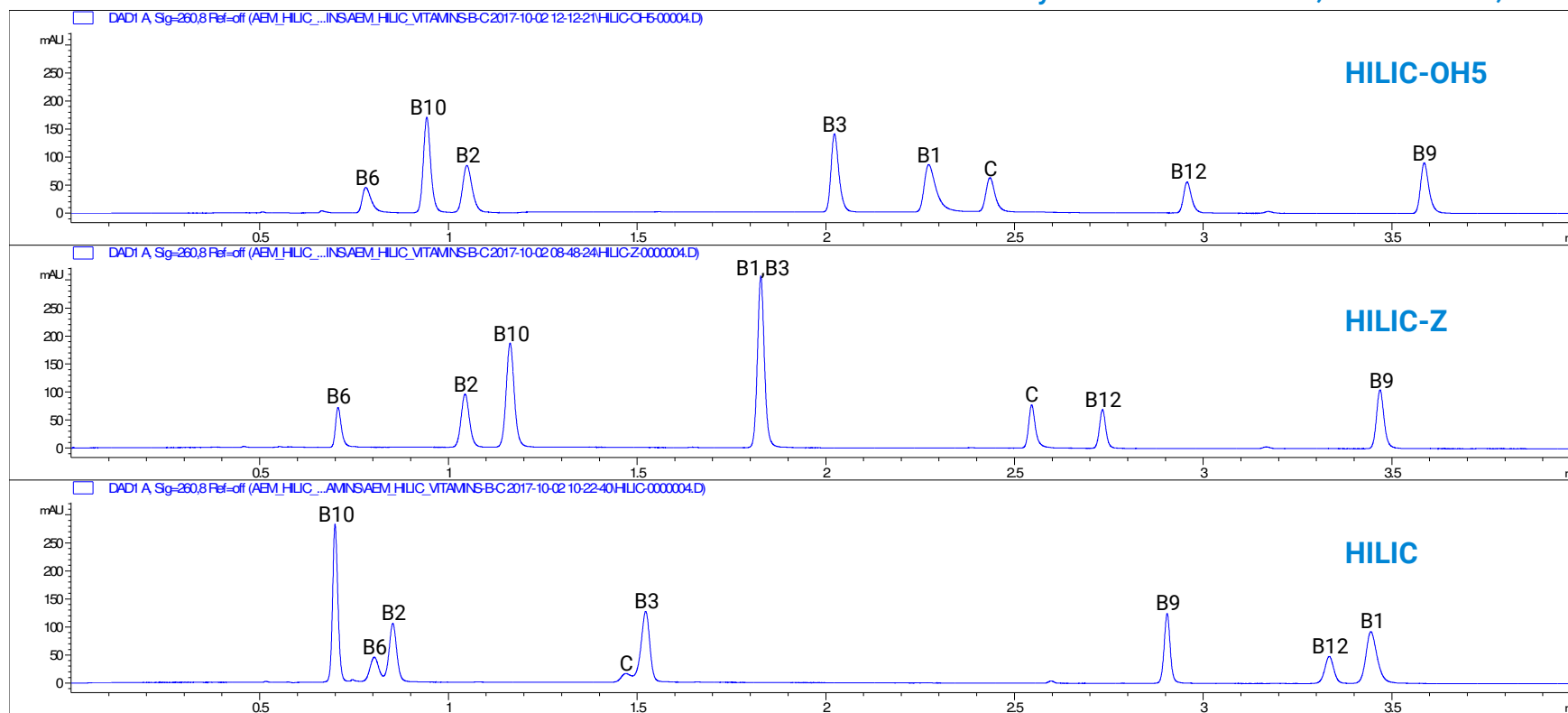
ИМ в
считыва-
теле



5067-5917 идентификационная метка колонки

Возможности различных фаз HILIC – разная селективность

Колонка InfinityLab Poroshell 120 2,1 x 100 мм 2,7 мкм



водорастворимые витамины (В и С)
Тиамин (B1)
Рибофлавин (B2)
Ниацин/никотиновая к-та (B3)
Пиридоксин/пиридоксинол (B6)
Фолаты/фолиевая к-та (B9)
4-аминобензойная к-та (B10)
Цианокобаламин (B12)
Аскорбиновая к-та (C)

A: 100 mM ацетат аммония +
0,5% уксусная к-та (pH ~4,6) в
H₂O, B: CH₃CN

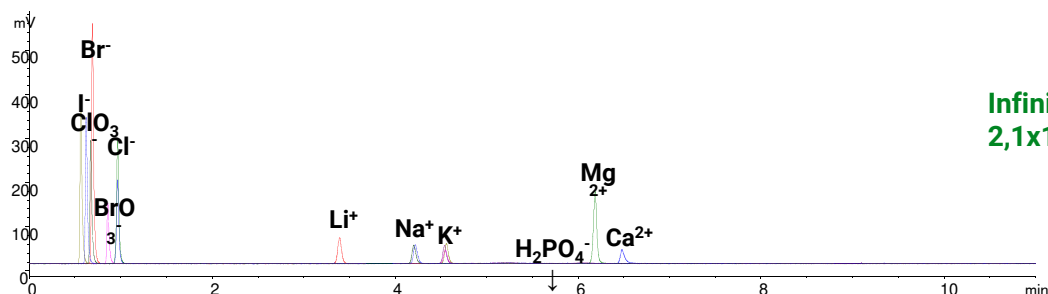
поток: 0,5 мл/мин
градиент: 87% B 1 мин, 87 –
50% B 4 мин, 3 мин
уравновешивание

Проба 1 мкл, 40 °C, УФ 260 нм,
80 Гц

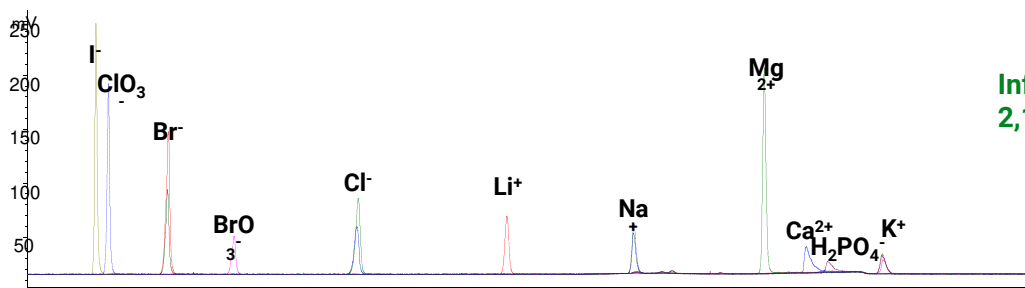
Демонстрация **альтернативной селективности** фаз HILIC в одинаковых условиях. Разделение можно оптимизировать, подбирая условия для каждой фазы.

Разделение неорганических ионов на InfinityLab Poroshell HILIC

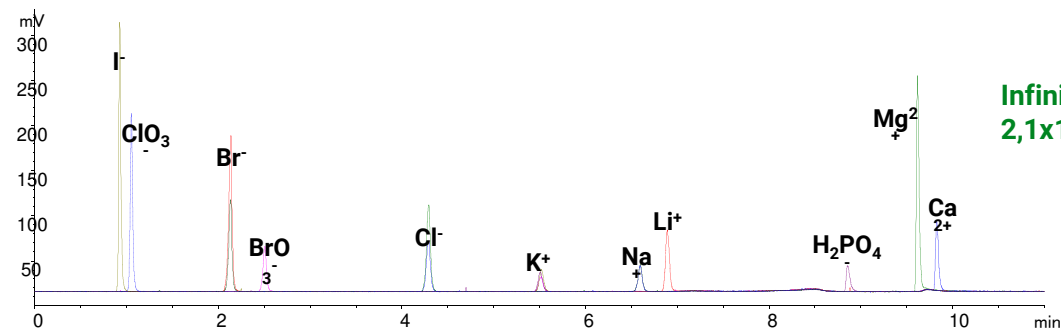
анионы и катионы одновременно



InfinityLab Poroshell 120 HILIC
2,1x100 мм 2,7 мкм



InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5
2,1x100 мм 2,7 мкм



InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z
2,1x100 мм 2,7 мкм

[Хлорид кальция](#)

[Бромид лития](#)

[Хлорид магния](#)

[Бромат калия](#)

[Йодид калия](#)

[Фосфат калия](#)

[Бромид натрия](#)

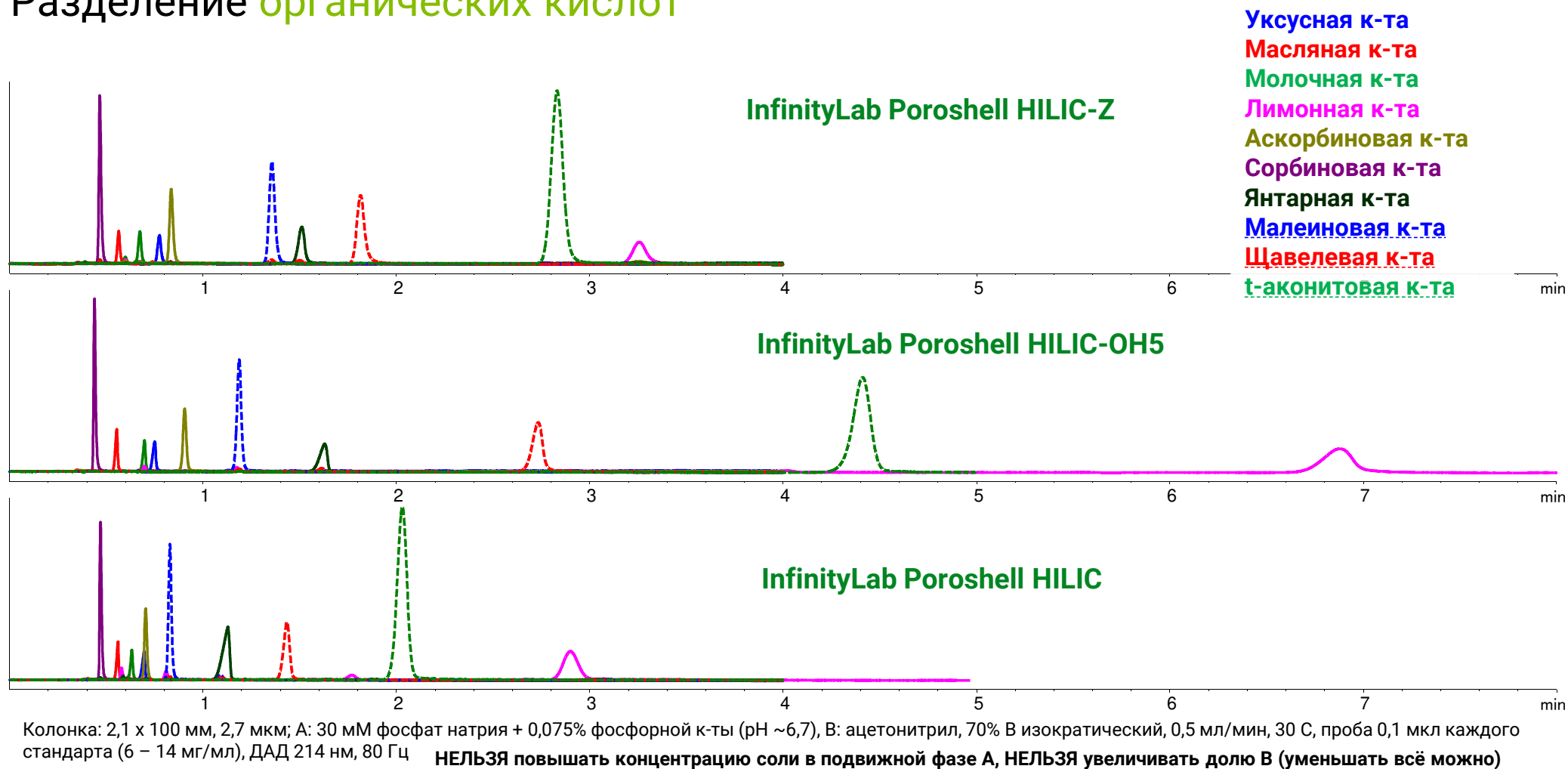
[Хлорат натрия](#)

Условия метода:

А: 100 мМ формат аммония pH 3, В: ацетонитрил, 91% В 1 мин, 91 – 60% В 10 мин, 3 мин уравнивание, 0,4 мл/мин, 30° С, проба 1 мкл, ELSD 40С / 3,5 psi /30 Гц

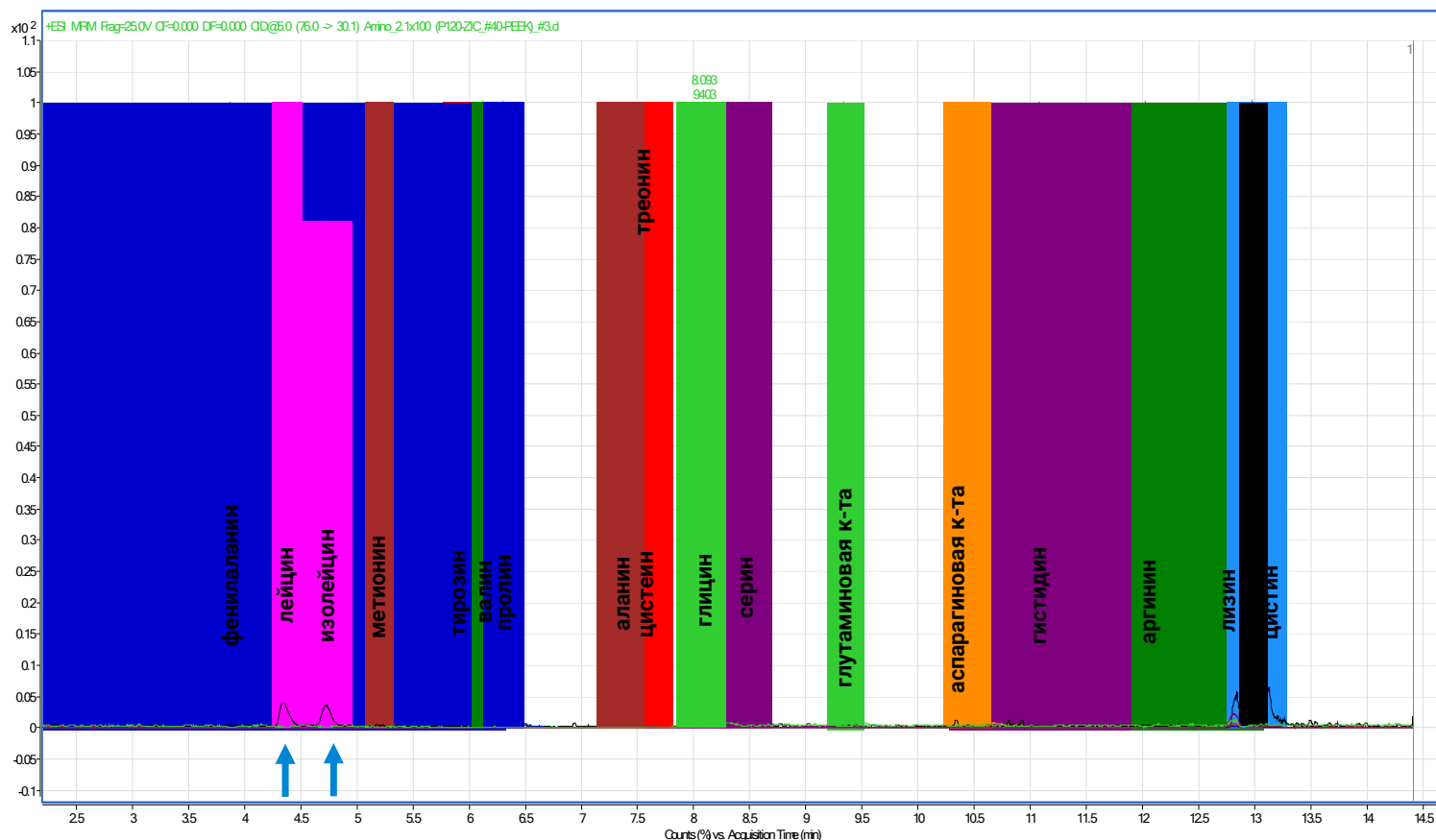
Изменение селективности и порядка элюции на колонках Poroshell HILIC

Разделение органических кислот



HILIC-Z: отличное связывание, форма пиков и чувствительность

ВЭЖХ-МС: немодифицированные аминокислоты



InfinityLab Poroshell HILIC-Z 2,1 x 100 мм, 2,7 мкм

A: 20 mM формат аммония в H₂O, pH 3
B: 9:1 ацетонитрил: 20 mM формат аммония, pH 3

Градиент: 100% — 70% B 10 мин, возврат к 100% B
Поток: 0,8 мл/мин
Температура: 30° C
МСД: Agilent MC-QQQ, режим MS2 SIM

Разделение лейцина и
изолейцина

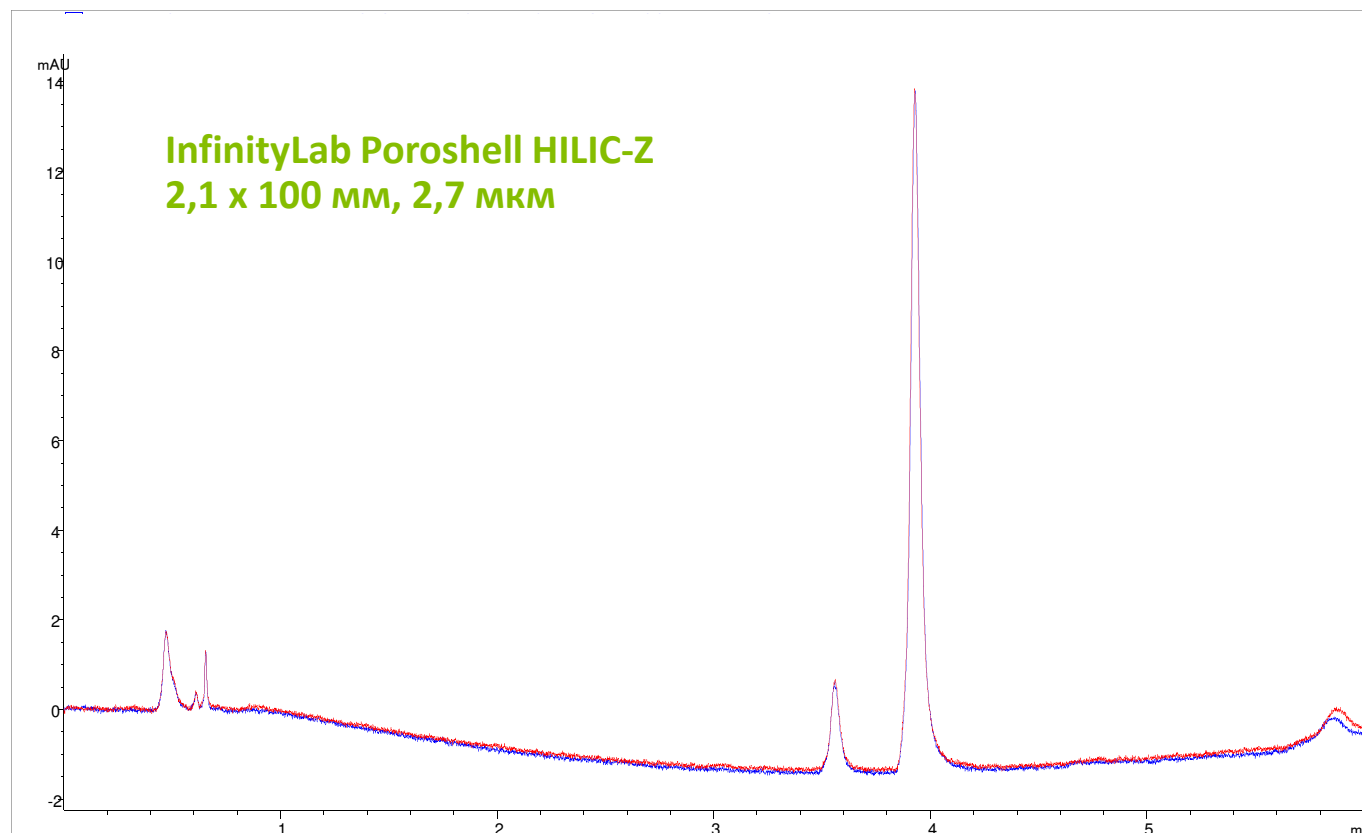
Быстрое восстановление равновесия и симметричные пики полярных пестицидов

Разделение диквата и параквата

Образец	дикват, паракват
Градиент	6 мин
Уравновешивание	4 мин
Всего времени	10 мин

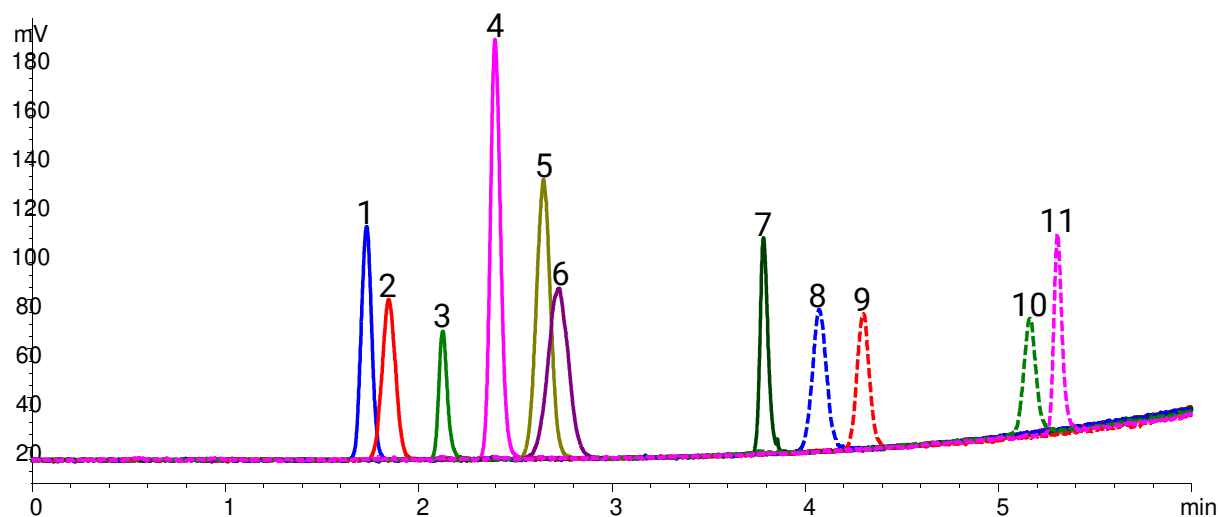
Повторный ввод (с наложением)

Отличная воспроизводимость базовой линии при уравновешивании за 1,5 мин. между повторами



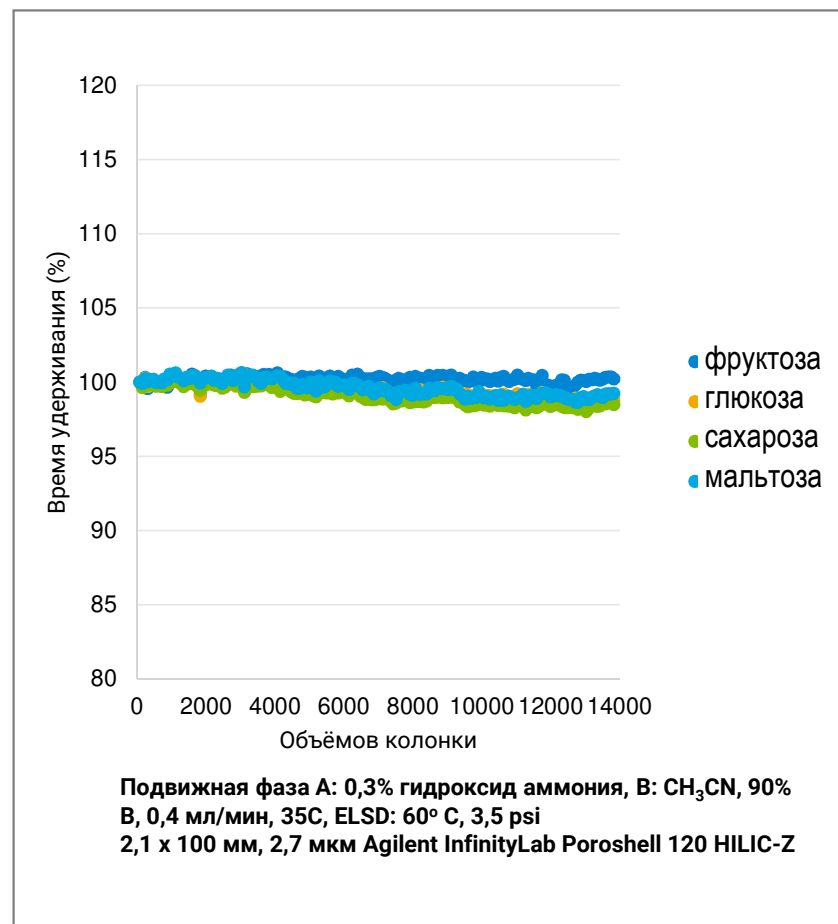
Разделение сахаров при высоком pH и сравнение работоспособности колонки

Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z
2,1 x 100 мм, 2,7 мкм



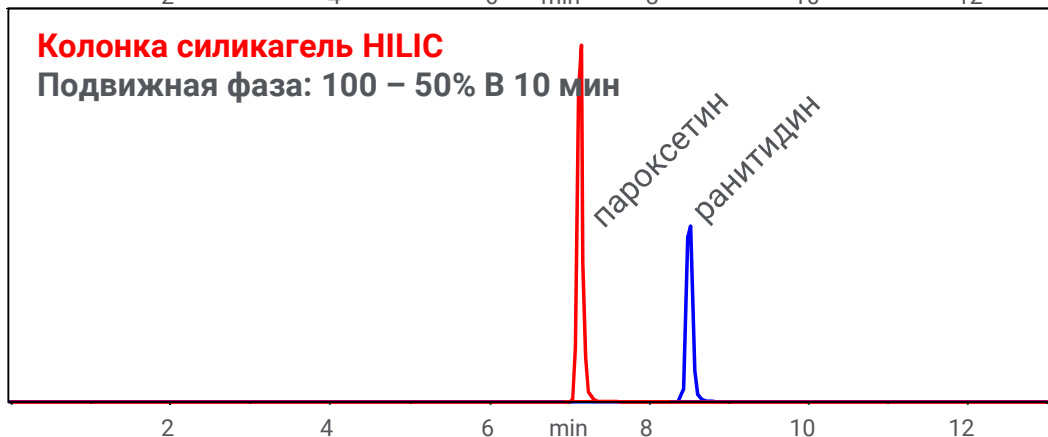
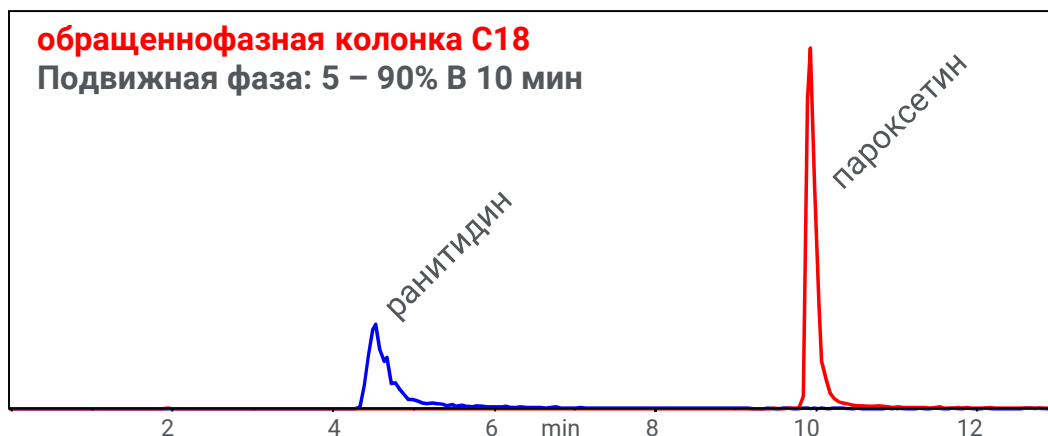
A: 0,3% гидроксид аммония в H₂O
B: 0,3% гидроксид аммония в CH₃CN,
85 – 60% B 6 мин, 0,4 мл/мин, 35°C, ELSD: 60°C, 3,5 psi
2,1 x 100 мм, 2,7 мкм Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z

- | | |
|--------------|------------------|
| 1. ксилоза | 7. сахароза |
| 2. арабиноза | 8. мальтоза |
| 3. фруктоза | 9. лактоза |
| 4. манноза | 10. мальтотриоза |
| 5. глюкоза | 11. рафиноза |
| 6. галактоза | |

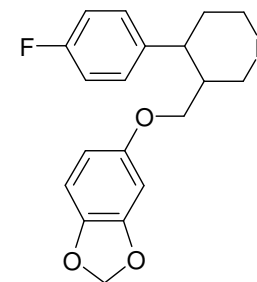


HILIC: повышение симметричности пиков и удерживания основных соединений

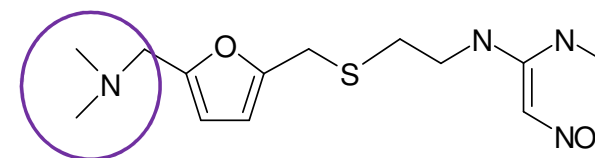
ВЭЖХ-МС/МС: разделение пароксетина и ранитидина



пароксетин
антидепрессант
MW 329.36



ранитидин
противоязвенный
MW 314.41



Основная группа в молекуле
влияет на удерживание на фазе
HILIC

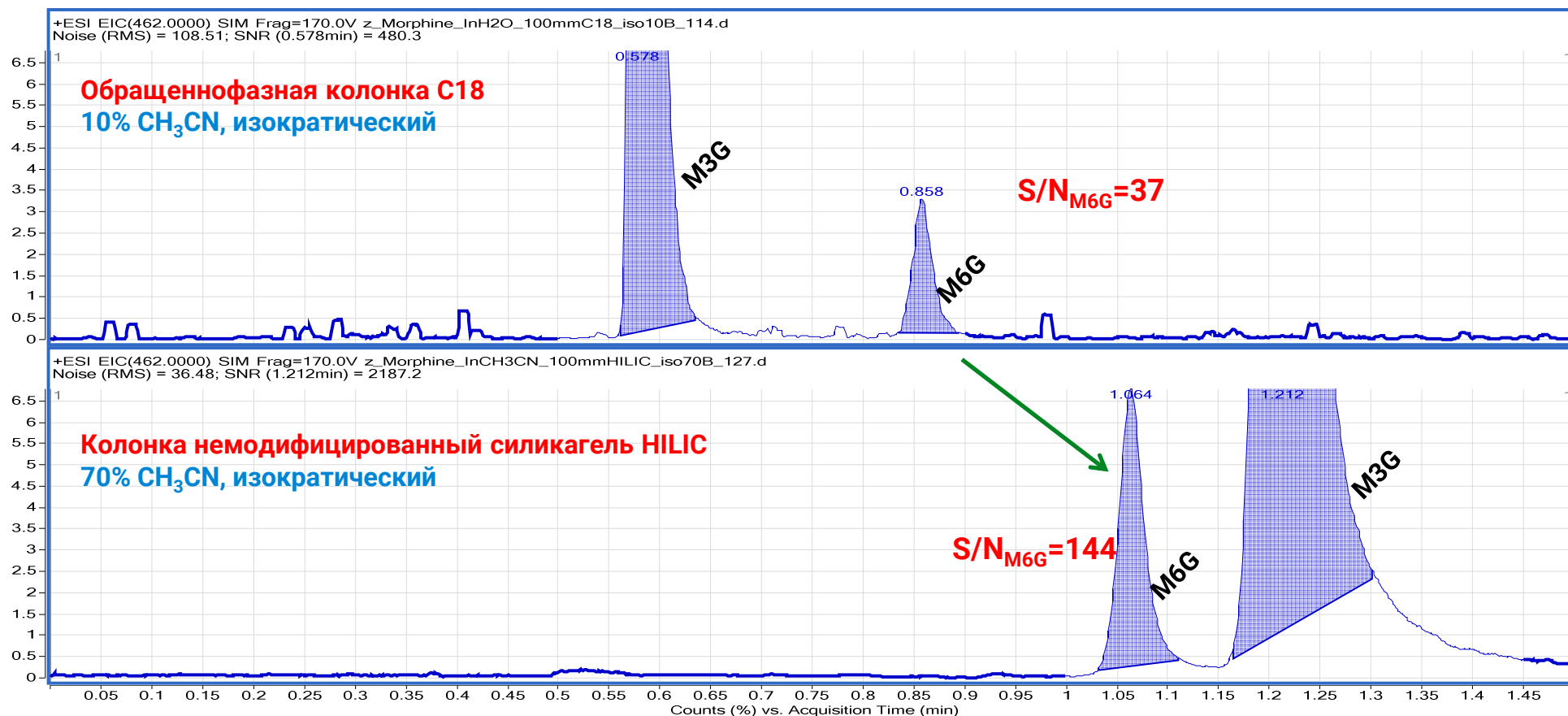
Колонки: 2,1 x 150 мм, 5 мкм (ZORBAX XDB-C18 (вверху), (ZORBAX Rx-Sil (внизу)); A: 8 мМ формат аммония, B: 8 мМ формат аммония в ацетонитрил/вода (95/5), градиентная элюция, 0,3 мл/мин, 40 °C, проба 5 мкл 100 ppb стандарта, MS: ESI+, MRM, 350 °C, 10 л/мин, 45 psi, образец: пароксетин, m/z 330 → 192, ранитидин, m/z 315 → 176

НИЛИС: повышение эффективности использования в методах с электроаэрозольной ионизацией для масс-спектрометрии

- элюент распыляется в мелкий аэрозоль
- образование ионов происходит с испарением
- необходимы летучие подвижные фазы
 - ацетонитрил метанол
- компоненты, увеличивающие проводимость, часто добавляют к подвижной фазе
 - они тоже должны быть легко летучими (форматы, ацетаты, и т.п.)
- **НИЛИС — хороший выбор для методов с электроаэрозольной ионизацией для масс-спектрометрии**
 - обычно используются летучие подвижные фазы с высоким содержанием органических растворителей

HILIC: чувствительность ВЭЖХ-МС выше, чем с обращеннофазным методом

Метаболиты морфина на C18 и HILIC



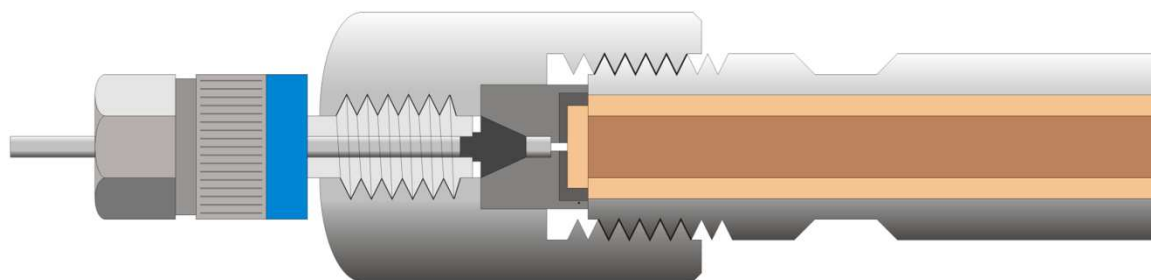
Колонки: 2,1 x 100 мм 1,8 мкм (вверху: ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18; внизу: ZORBAX RRHD HILIC Plus); A: 10 мМ формат аммония в воде pH 3,2, B: ацетонитрил/100 мМ формат аммония в воде pH 3,2 (9:1), изократическая элюция, 0,4 мл/мин, проба 2 мкл 1 мкг/мл каждого морфин-3-β-D-глюкоронида и морфин-6-β-D-глюкоронида; 25 °C, источник MC: ESI+, 200 V, 250 °C, 11 л/мин., 30 psi, 4000 V; SIM: 462, Frag 170 V

Колонки с внутренней выстилкой ПЭЭК слоем: повышение чувствительности

- Слой ПЭЭК на внутренней поверхности колонки снижает взаимодействие с **сильно заряженными** или **т.н. «липкими» полярными соединениями**
- Увеличивается симметричность пиков и чувствительность
- ПЭЭК-колонки можно заказать только InfinityLab Poroshell HILIC-Z

В идеале использование решений биоинертной InfinityLab системы

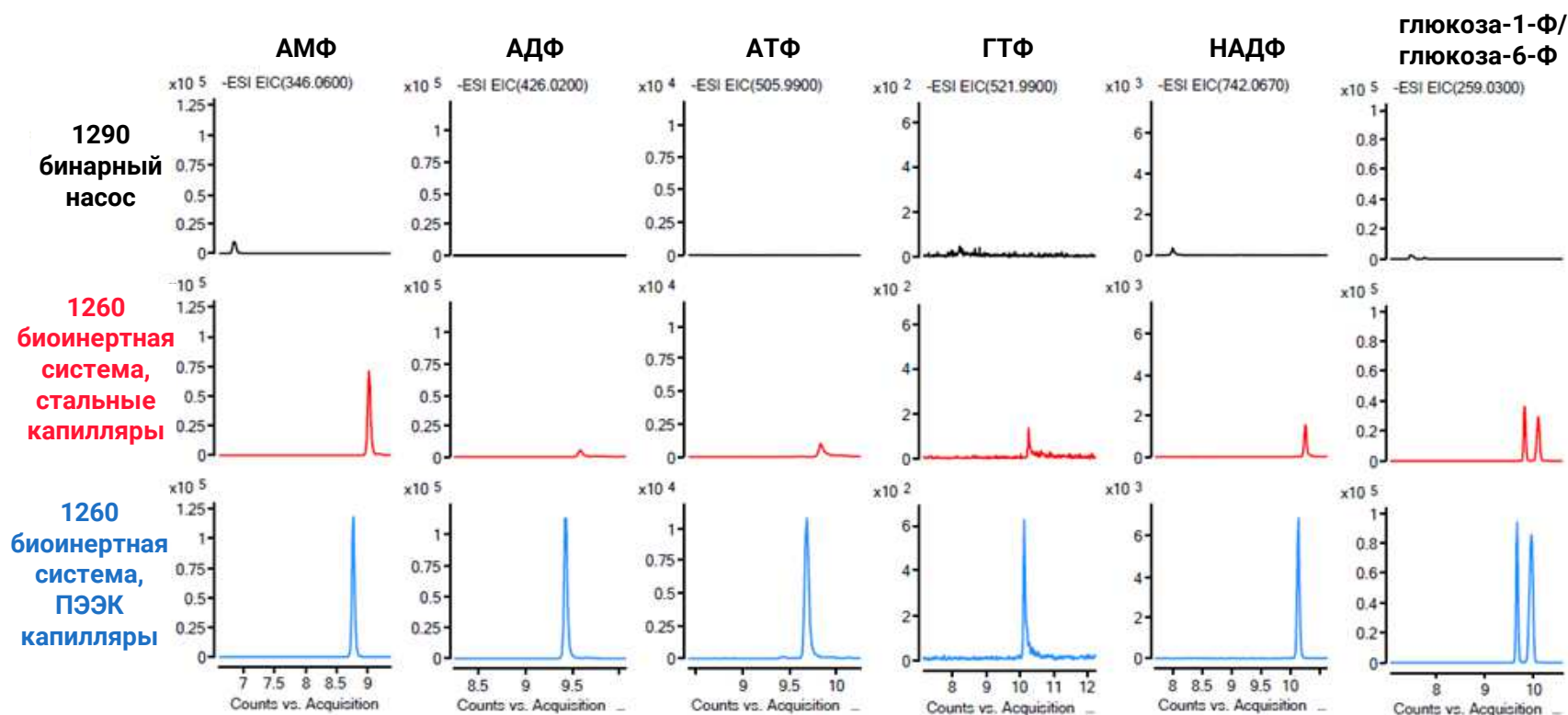
- InfinityLab биоинертная система ВЭЖХ
- Биоинертные соединения Quick Connect теплообменник, арт. G7116-60009
- Биоинертные капилляры Agilent PEEK/SST с фиттингами Quick Turn (5067-5966) или UHP-FF (5067-5695)



ПЭЭК-нерж. сталь + ПЭЭК титановые фриты

Колонки с ПЭЭК слоем и биоинертная ВЭЖХ система: повышение чувствительности

ПЭЭК Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z: фосфаты нуклеотидов



Колонки: 2,1 x 100 мм, 2,7 мкм Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z (ПЭЭК на нерж. сталь); А: 10 мМ формат аммония в воде pH 6,8, В: ацетонитрил + 10 мМ формат аммония pH 6,8, 95 – 30% В 10 мин, 0,25 мл/мин, проба 0,2 мкл (5 нг каждого), источник MS: ESI-, m/z 191.02, 346.06, 426.02, 505.99, 521.99, 742.067, 743.067, 259.03

Известные недостатки HILIC

- Механизм HILIC не полностью изучен, представляет собой смешение механизмов
- **Превышение ёмкости** колонки может вызвать затруднения
 - сходно с силанольным превышением ёмкости при обращеннофазной хроматографии
 - превышение ёмкости в пиках вызывает фронтальную асимметричность пиков
- Невозможно введение **сильных растворителей** (H_2O , CH_3OH) без искажения пиков
- **Время уравнивания** может быть длительным для некоторых типов фаз
 - в частности, для немодифицированного силикагеля – начальный период уравнивания занимает больше времени, также в случаях изменения подвижной фазы для создания градиентов или при разработке метода

Рекомендации: решение часто возникающих сложностей в методах HILIC

Медленное уравнивание

- Часто встречается
- **Решение:**
 - Подвижная фаза *должна* содержать достаточную долю воды для восстановления поверхностного слоя

Воспроизводимость

- Вторая по частоте встречаемости
- **Решение:**
 - Совместимые растворители в пробе и объем пробы
 - Убедиться в достаточном времени для уравнивания
 - Промыть 0,5% фосфорной к-той, в случае связывания аналитов к стальным поверхностям системы
 - Использовать инертные компоненты оборудования в случаях сильно взаимодействующих аналитов

Растворимость пробы

- Зависит от образца
- **Решение:**
 - Использовать подвижную фазу в качестве растворителя образца
 - Подобрать объем пробы в зависимости от силы растворителя

Симметрия пиков

- Зависит от образца
- **Решение:**
 - Использовать более новые привитые фазы: вторичное удерживание обычно проявляется в случае немодифицированного силикагеля
 - Промыть 0,5% фосфорной к-той, в случае связывания аналитов к стальным поверхностям системы
 - Использовать инертные компоненты оборудования в случаях сильно взаимодействующих аналитов

Разработка методов HILIC: соображения и рекомендации

Типы неподвижной фазы

- Подбор механизма удерживания и селективности
- Три фазы Agilent InfinityLab Poroshell 120
 - HILIC-Z, HILIC-OH5, HILIC

pH подвижной фазы

- Контроль ионизации фазы (силикагеля) и аналитов
- Соединения сильнее связываются, когда заряжены
 - кислые при высоком pH, основные при низком pH

Температура

- Увеличение температуры ослабляет связывание
- Увеличение температуры повышает эффективность
- Снижение температуры может повысить селективность

Рекомендации для разработки методов HILIC в вебинарах



Improving the Analysis of Polar Analytes with Novel HILIC Phases on Superficially Porous Particle LC Columns

Thursday, February 8, 2018 – 16:00 UTC
8am PST | 11am EST | 4pm GMT (UK) | 5pm CET

[Click here to check the time in your own country >>>](#)

www.separationsNOW.com/HILIC

Выводы

- Метод HILIC становится популярным для анализа полярных соединений вследствие простоты в использовании знакомого оборудования и подвижных фаз
- Новые привитые фазы HILIC, в том числе колонки Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z и HILIC-OH5 обладают широким спектром селективности, увеличивая симметричность пиков и долговременность использования колонок
- Поверхностно-пористые сорбенты Poroshell обеспечивают высокую эффективность разделения и скорость протекания методов
- HILIC хороший выбор для ВЭЖХ-МС методов
- Для сильно заряженных или сильно взаимодействующих с нержавеющей сталью «липких» соединений рекомендуется использовать колонки InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z с ПЭЭК слоем
- Рекомендации по оптимизации методов HILIC, чтобы избежать лишних сложностей можно найти по ссылке www.agilent.com/chem/discoverporoshell