

# Zuverlässige Analyse herausfordernder polarer Verbindungen

Agilent InfinityLab Poroshell 120, ZORBAX und Polaris Säulen  
für die hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC)



# Aufbau eines robusten und zuverlässigen HILIC-Arbeitsablaufs mit Agilent

Die hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC) gewinnt aufgrund ihrer Fähigkeit, kleine polare Analyten mit einem LC-Standardsystem und gängigen Umkehrphase-Lösemitteln zurückzuhalten und zu trennen, immer mehr an Beliebtheit. Zu den Vorteilen dieser Technik zählen bessere Retention von polaren Analyten im Vergleich zu Umkehrphase-Methoden sowie die Möglichkeit der Verwendung von MS-kompatiblen Lösemitteln in Kombination mit einer einfachen Methodeneinrichtung. Auf diese Weise können die Ionisation und Empfindlichkeit im MS-Modus verbessert werden.

1



Die Probenvorbereitung ist der richtige Ausgangspunkt für all Ihre Analysen. Ganz gleich, ob Sie einfache Filtration, Feststoff-Flüssigextraktion (SLE), Catch-and-Release-Aufreinigung, QuEChERS oder Festphasenextraktion (SPE) einsetzen: Agilent bietet hochwertige Produkte genau für Ihre Anforderungen an die Probenvorbereitung, vom preisgekrönten Agilent Captiva EMR-Lipid bis zu den bewährten Bond Elut SPE- und QuEChERS-Kits.

[www.agilent.com/chem/sampleprep](http://www.agilent.com/chem/sampleprep)

2



Von der Routineanalytik bis zur wegberreitenden Forschung bietet die InfinityLab LC-Serie das breiteste Portfolio von HPLC- und UHPLC-Lösungen für alle Applikationen und jedes Budget.

[www.agilent.com/chem/LC](http://www.agilent.com/chem/LC)

3



Mit Agilent InfinityLab Zubehör erhöhen Sie den Durchsatz und minimieren Sie die Ausfallzeiten der Geräte bei HILIC-Applikationen:

- Stay Safe Verschlusskappen verhindern die Verdampfung von gefährlichen Lösemitteln und halten die Zusammensetzung Ihrer mobilen Phasen konstant
- Quick Connect- und Quick Turn-Fittings für unkomplizierte und mühelose Verbindungen
- Filtrationseinheit und Inline-Filter für die Entfernung von Partikeln aus pufferhaltigen mobilen Phasen zur Verlängerung der Lebensdauer der Säule.
- Microtiterplatten für Applikationen mit hohem Probendurchsatz
- Intelligentes Zubehör wie mit RFID ausgestattete Säulenkenntmarken, Deuteriumlampen und Flusszellen unterstützen die Rückverfolgbarkeit und vereinfachen die Dokumentation

[www.agilent.com/chem/lc-supplies](http://www.agilent.com/chem/lc-supplies)

4

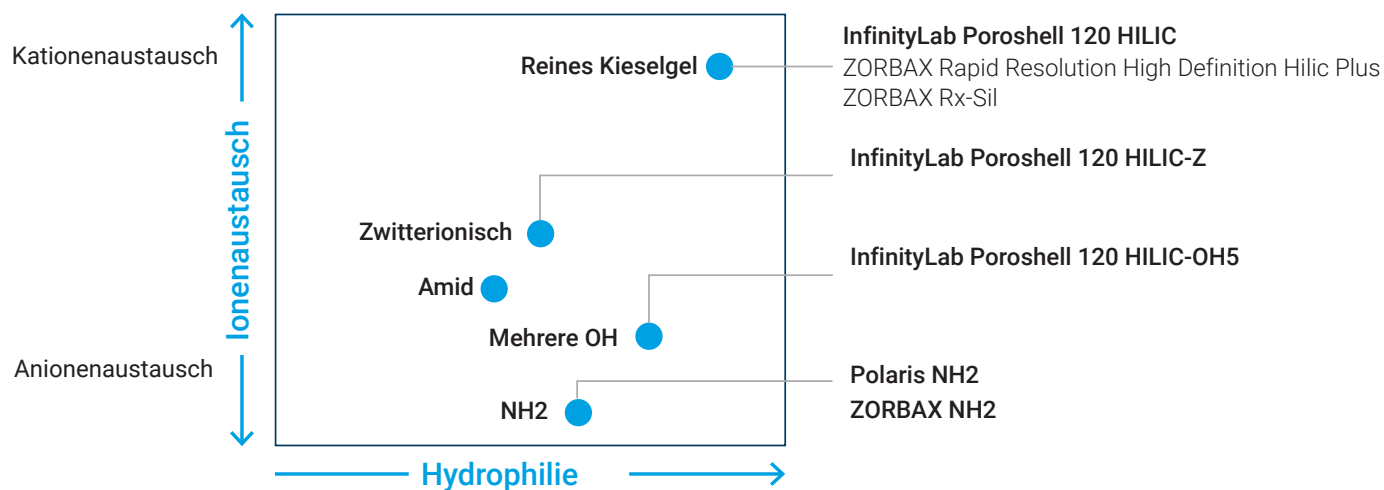


Das InfinityLab Poroshell 120 Portfolio bietet drei moderne HILIC-Phasen für höchste Trenneffizienz, Robustheit und reproduzierbare Chromatographie für Ihre LC/MS-Analysen polarer Analyten. Interagieren Ihre Analyte mit Metalloberflächen? Verwenden Sie den InfinityLab Deaktivator-Zusatzstoff von Agilent, um die Metalloberflächen in Ihrem System zu deaktivieren. Die ultrareinen LC/MS-Lösemittel von Agilent helfen bei der Minimierung des MS-Hintergrunds.

[www.agilent.com/chem/poroshell-HILIC](http://www.agilent.com/chem/poroshell-HILIC)

## Wie finde ich die richtige HILIC-Säule?

Agilent bietet ein umfangreiches Portfolio an Säulen für moderne HILIC-Trennungen. Retention und Trennung im HILIC-Modus beruhen auf drei wichtigen hydrophilen Interaktionen: ionischen Wechselwirkungen, hydrophilen Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen. Es wird empfohlen, mehrere stationäre Phasen zu testen, um die richtige stationäre Phase zu finden. Anhand der funktionellen Gruppen des Analyts und ihrer möglichen Interaktionen mit der Säule kann eine geeignete HILIC-Säule für als Startpunkt ermittelt werden.



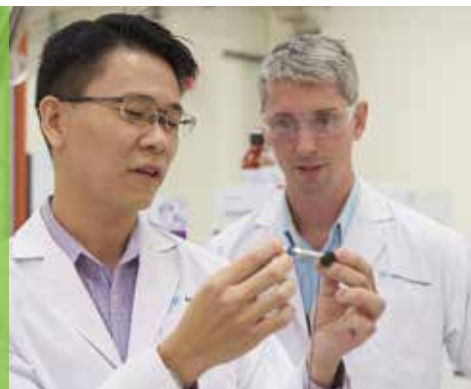
**Abbildung 1:** Qualitative Darstellung der hydrophilen und Ionenaustausch-Eigenschaften verschiedener HILIC-Säulen von Agilent. Datenmessung nach Ibrahim et al., J.Chrom.A, 1260, (2012).

## Welche ist die richtige mobile Phase für meine HILIC-Trennung?

Mobile Phasen sind der zweitwichtigste Faktor bei der Variation der HILIC-Selektivität. Wässrige, starke mobile Phasen sind oft gepuffert, um den Retentionsmechanismus genau einzustellen und zu kontrollieren, eine Peak-Verbreiterung zu vermeiden und Schwankungen der Selektivität durch kleine pH-Änderungen zu verhindern. Identisch gepuffertes Acetonitril dient oft als schwache, organische mobile Phase.

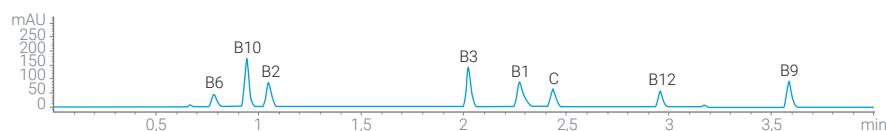
| Allgemeine Überlegungen                      | Typische Pufferkonzentrationen: 5-30 mM; am häufigsten: 10-20 mM<br>Phosphate sollten vermieden werden, da ihre Löslichkeit in mobilen Phasen mit hohem ACN-Anteil niedrig ist |  |
|--|--|--|
|  | Puffer und pH  | Geeignete stationäre Phase   |
| Basische Analyte                             | Ammoniumformiat, pH 3<br>Ammoniumacetat, pH 4-5  | Poroshell 120 HILIC-Z<br>Poroshell 120 HILIC-OH5<br>Poroshell 120 HILIC<br>ZORBAX Hilic Plus |
| Mischung aus sauren und basischen Substanzen | Ammoniumacetat, pH-Wert ~7   | Poroshell 120 HILIC-Z<br>Poroshell 120 HILIC-OH5<br>Poroshell 120 HILIC<br>ZORBAX Hilic Plus |
| Saure Analyte                                | Ammoniumformiat, pH 9-10   | Poroshell 120 HILIC-Z  |
| Zucker                                       | Ammoniumhydroxid, pH 10-11   | Poroshell 120 HILIC-Z  |

# Poroshell 120 HILIC-Säulen ermöglichen eine schnelle, zuverlässige und reproduzierbare Chromatographie

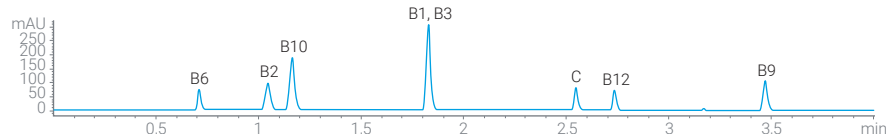


Lernen Sie die neuesten HILIC-Produkte kennen! Agilent bietet drei einzigartige, orthogonale HILIC-Phasen: reines Kieselgel (HILIC), Polyhydroxyfructan (HILIC-OH5) und zwitterionisch (HILIC-Z). Die Robustheit und Reproduzierbarkeit von HILIC-Trennungen auf InfinityLab Poroshell Säulen erleichtern die Umstellung von schwieriger, oft MS-inkompatibler Ionenpaarchromatographie und Normalphasen-Applikationen.

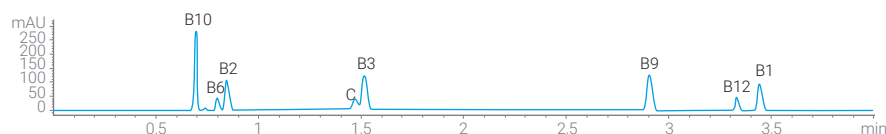
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 2,1 x 100 mm, 2,7 µm



InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z 2,1 x 100 mm, 2,7 µm



InfinityLab Poroshell 120 HILIC 2,1 x 100 mm, 2,7 µm



**Bedingungen:**

**Mobile Phase:** A: 100 mM Ammoniumacetat + 0,5 % Essigsäure (pH ~4,6) in H<sub>2</sub>O

B: CH<sub>3</sub>CN 0,5 ml/min, 87 % B für 1 min, 87–50 % B in 4 min, 3 min Stabilisierung

**Flussrate:** 1 µl Injektion, 40 °C

**Temperatur:** 40 °C

**Detektor:** UV-Detektion bei 260 nm, 80 Hz

**Probe:** wasserlösliche Vitamine

**Abbildung 2:** InfinityLab HILIC-Z- und HILIC-OH5-Säulen bieten einen weiten Bereich alternativer Selektivität für die Trennung polarer Analyte. Diese Trennung von wasserlöslichen Vitaminen zeigt die Selektivitätsunterschiede zwischen den HILIC-Phasen bei Verwendung derselben Methodenparameter. Durch Veränderung der Methodenparameter lassen sich die Trennungen auf jeder Säule optimieren.

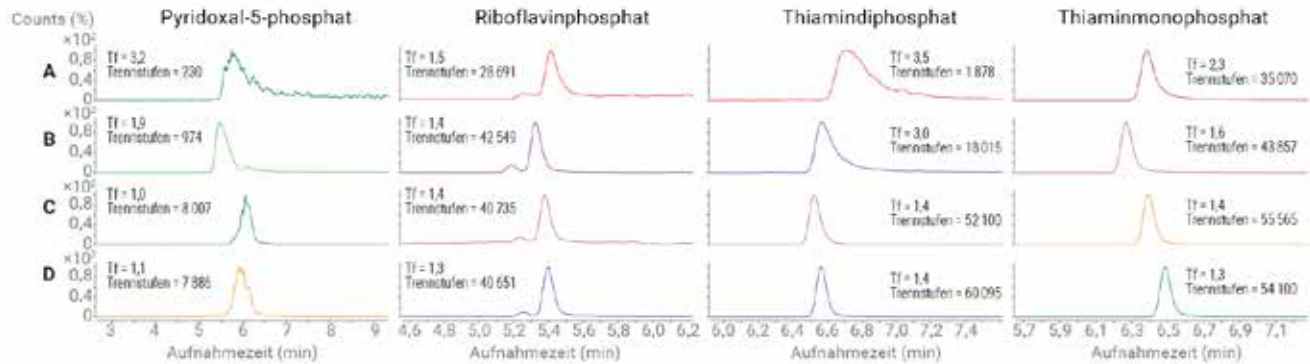
**Tabelle 1:** Ausgewählte Säulen des Poroshell 120 Portfolios, die für HILIC empfohlen werden.

| Säulentyp                           | Stationäre Phase         | Partikelgröße und -abmessungen  | Druckbereich                                | Empfohlene Anwendung  |
|-------------------------------------|--------------------------|---|---|---|
| InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z   | Zwitterionisch           | Partikelgröße: 1,9 µm, 2,7 µm, 4 µm<br>ID: 2,1 mm, 3 mm, 4,6 mm<br>Länge: 50 mm, 100 mm, 150 mm, 250 mm | 1300 bar (1,9 µm)<br>600 bar (2,7 µm, 4 µm) | Startpunkt für die Entwicklung einer HILIC-Methode. Hoher pH-Bereich. Version mit PEEK-Beschichtung erhältlich. |
| InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 | Polyhydroxyfructan-Phase | Partikelgröße: 2,7 µm<br>ID: 2,1 mm, 4,6 mm<br>Länge: 50 mm, 100 mm, 150 mm                             | 400 bar (2,7 µm)                            | Alternative Selektivität mit reduziertem Ionenaustausch, aber stark wasserstoffbrückenbindenden Eigenschaften.  |
| InfinityLab Poroshell 120 HILIC     | Reines Kieselgel         | Partikelgröße: 1,9 µm, 2,7 µm, 4 µm<br>ID: 2,1 mm, 3 mm, 4,6 mm<br>Länge: 50 mm, 100 mm, 150 mm, 250 mm | 1300 bar (1,9 µm)<br>600 bar (2,7 µm, 4 µm) | Einfache Proben, die keine ziemlich ähnliche Verbindungen enthalten. Extrem niedriges Säulenbluten.             |

## Retention und Trennung von stark geladenen Verbindungen

InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z Säulen verfügen über eine neuartige zwitterionische stationäre Phase, die an Poroshell 120-Partikel gebunden ist. Vorteile:

- PEEK-beschichtete Säule als Option für herausragende Peakform und Wiederfindung von schwierigen Verbindungen
- Stabilität bei hohem pH-Wert bis zu pH 12 bei 35 °C; Temperaturstabilität bis 80 °C bei pH 7
- Kompatibel mit MS-geeigneten Puffern (< 10 mM Salzgehalt)

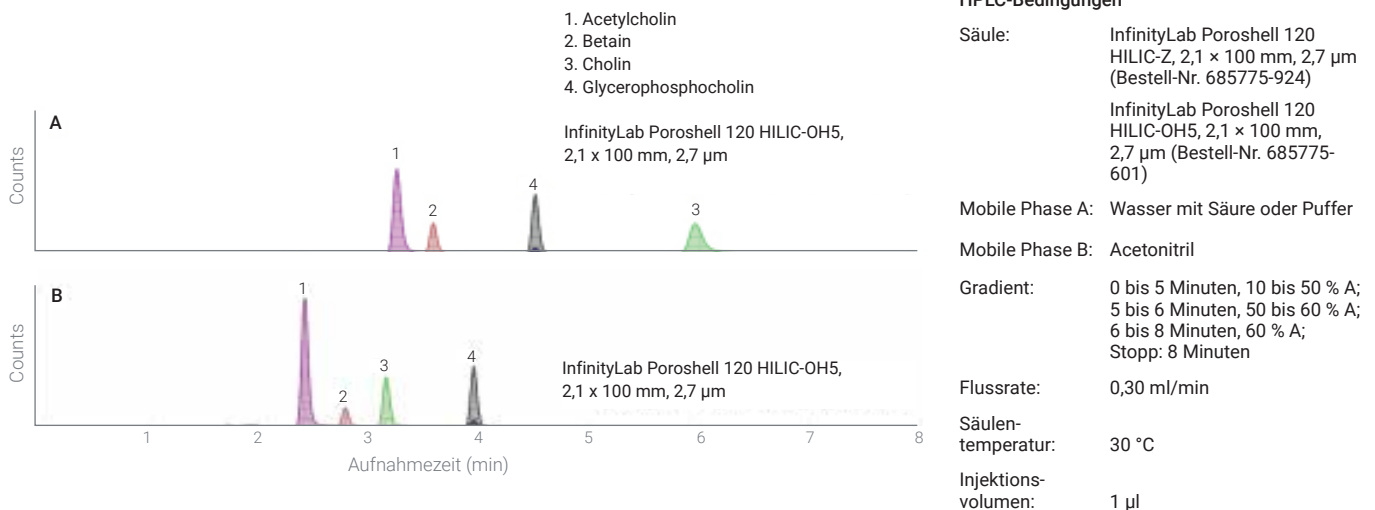


**Abbildung 3:** Interaktionen von phosphorylierten Metaboliten mit Stahl: vor und nach Spülung. A) vor der Systemspülung; B) nach der Systemspülung, HILIC-Z Säule; C) nach der Systemspülung, HILIC-Z Säule, mit Deaktivator; D) nach der Systemspülung, HILIC-Z Säule mit PEEK-Beschichtung, mit Deaktivator.

## Trennung polarer Verbindungen mit alternativer Selektivität

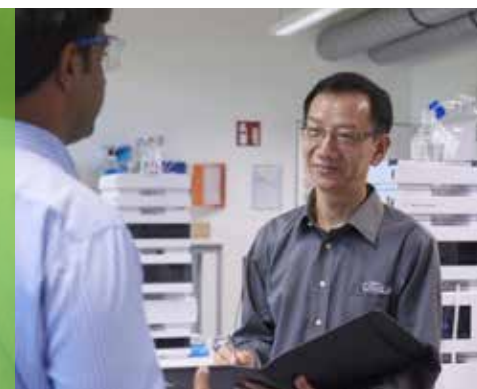
Trennung polarer Verbindungen mit alternativer Selektivität: InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5-Polyhydroxyfructan-Phase, gebunden an Poroshell 120-Partikel:

- Schnelle, hocheffiziente Trennungen mit hervorragender Retention polarer Verbindungen
- Bietet eine alternative Selektivität zu Poroshell 120 HILIC- und HILIC-Z-Phasen

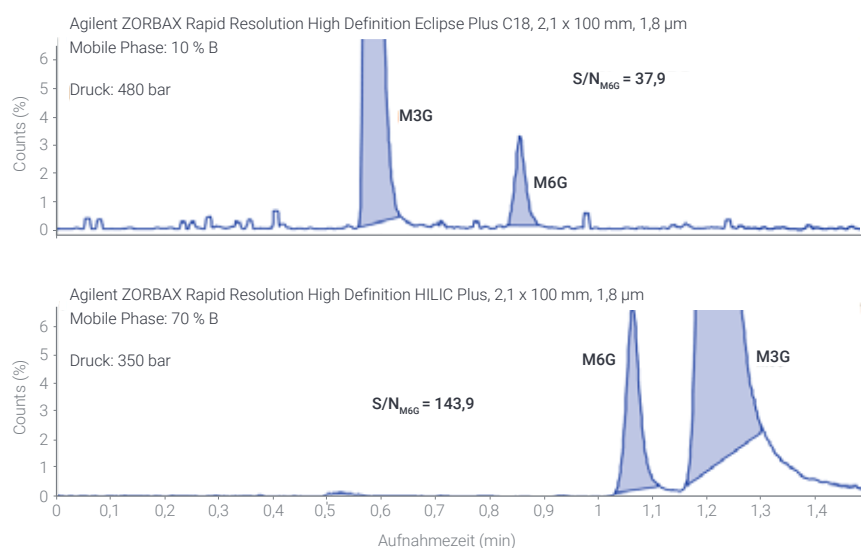


**Abbildung 4:** Analyse von Cholin-Metaboliten auf einer Poroshell 120 HILIC-OH 5 und HILIC-Z mit LC/MS/MS.

# Zuverlässige, vollständig poröse Materialien für Ihre HILIC-Trennungen



Agilent ZORBAX- und Polaris HILIC-Säulen wurden für die hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC) entwickelt und stellen eine herkömmliche, vollständig poröse Alternative für Ihre HILIC-Methodenentwicklung dar. Sie haben die Wahl zwischen herkömmlichen reinen Kieselgelphasen (Hilic Plus und Rx-Sil) und einer robusten, zuverlässigen Aminophase (Polaris NH2).



#### Bedingungen:

**Mobile Phase:** A: 10 mM Ammoniumformat pH 3,2 in Wasser  
B: Acetonitril/100 mM Ammoniumformat pH 3,2 in Wasser (9:1)

**Flussrate:** 0,4 ml/min

**Elution:** isokratisch

**Injektion:** je 2 µl von 1 µl/ml Morphin-3-β-D-glucuronid und Morphin-6-β-D-glucuronid

**Säulen:** 2,1 x 100 mm, 1,8 µm

**Temperatur:** 25 °C

**MS-Quelle:** ESI+, 200 V, 250 °C, 11 l/min, 30 psi, 4000 V

**SIM:** 462, Frag 170 V

Agilent Publikationsnummer 5991-0245

**Abbildung 5:** Vergleich von RP- und HILIC-Modus bei Verwendung von ZORBAX RHHD HILIC Plus. Der HILIC-Modus ermöglicht im Vergleich zu RPLC eine effizientere Zerstäubung und Desolvation in der ESI-MS-Quelle. Daraus resultieren weniger Basislinienrauschen, eine höhere MS-Signalintensität und eine bessere Empfindlichkeit.

**Tabelle 2:** Auswahl von ZORBAX- und Polaris-Säulen, die für den HILIC-Modus empfohlen werden.

| Säulentyp         | Stationäre Phase | Partikelgröße und -abmessungen   | Druckbereich                          | Applikationen   |
|-------------------|------------------|--|---------------------------------------|---|
| ZORBAX HILIC Plus | Reines Kieselgel | Partikelgröße: 1,8 µm, 3,5 µm<br>ID: 2,1 mm, 4,6 mm<br>Länge: 50 mm, 100 mm                | 1200 bar (1,8 µm)<br>400 bar (3,5 µm) | Universelles, reines Kieselgelmaterial für Proben mit geringer Komplexität.             |
| ZORBAX Rx-Sil     | Reines Kieselgel | Partikelgröße: 1,8 µm, 5 µm<br>ID: 2,1 mm, 3 mm, 4,6 mm<br>Länge: verschiedene (50–250 mm) | 600 bar (1,8 µm)<br>400 bar (5 µm)    | Reines Kieselgelmaterial mit höherer Retention und unterschiedlicher Selektivität.      |
| Polaris NH2       | Amino            | Partikelgröße: 3 µm, 5 µm<br>ID: 2,1 mm; 4,6 mm<br>Länge: 50 mm, 150 mm, 250 mm            | 400 bar (3 µm)<br>400 bar (5 µm)      | Alternative Selektivität mit starken Anionenaustauschigenschaften für saure Substanzen. |

„Bevor wir die Poroshell 120 HILIC-Z hatten, gab es oft Probleme mit einem Vorgängermodell von einem anderen Hersteller. Schlechte Peakformen und RT-Verschiebungen waren nicht selten. Nach der Entwicklung unserer eigenen Methoden mit HILIC-Z haben sich die Peakformen schnell verbessert und die Retentionszeiten stabilisiert. Außerdem konnten wir eine bessere Quantifizierungsgrenze etablieren, da die Peaks scharf sind und die Analyte besser von Matrixinterferenzen getrennt werden können. Die Analyse von polaren Pestiziden mit dieser Säule gibt den Analytikern ein so großes Gefühl des Vertrauens und der Sicherheit wie nie zuvor.“

– **Elisa Platjouw**,  
wissenschaftliche Analytikerin, Eurofins, Niederlande



## Ausgewählte Applikationen für HILIC-Säulen von Agilent

| Applikation  | Anwendungsgebiete          | Verwendete Säule  | Titel der Application Note  | Publikationsnummer                         |
|--|----------------------------|---|---|--|
| Vergleich von RP-LC und HILIC                              | Alle Anwendungsgebiete     | Mehrere   | Retaining and separating Polar Molecules—a detailed investigation of when to use HILIC versus a reversed-phase LC column. | <a href="#">5994-1137EN</a>                |
| Leitfaden für Einsteiger für die HILIC-Methodenentwicklung | Alle Anwendungsgebiete     | Poroshell 120 HILIC<br>Poroshell 120 HILIC-OH5<br>Poroshell 120 HILIC-Z     | Hydrophilic interaction. Chromatography method. Development and troubleshooting.  | <a href="#">5991-9271EN</a>                |
| Überblick über HILIC bei LC/MS/MS-Analysen                 | Alle Anwendungsgebiete     | Poroshell 120 HILIC-Z<br>ZORBAX Rapid Resolution High Definition HILIC Plus | Application of Novel HILIC Column configurations to improve LC/ESI/MS sensitivity of metabolites.                         | ASMS 2018 Poster<br><a href="#">WP-536</a> |
| Nicht derivatisierte Aminosäuren in einer komplexen Matrix | Lebensmittel & Agrarsektor | Poroshell 120 HILIC-Z   | Analysis of amino acids in animal feed matrices using the Ultivo Triple Quadrupole LC/MS System.                          | <a href="#">5994-0586EN</a>                |
| Wasserlösliche Vitamine                                    | Lebensmittel & Agrarsektor | Poroshell 120 HILIC-OH5   | Analysis of water-soluble vitamins on an Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 Column.                              | <a href="#">5991-8780EN</a>                |
| Trennung von Nukleotiden                                   | Biopharmazie               | Poroshell 120 HILIC-Z (PEEK-beschichtet)                                    | HPLC-DAD analysis of nucleotides using a fully inert flow path.   | <a href="#">5994-0680EN</a>                |

Weitere Application Notes finden Sie im [Agilent LC Application Finder](#).

## Zuverlässig, effizient, immer innovativ für Ihr bestes Ergebnis

Sie können sich auf die robuste Qualität und die zuverlässigen Analyseergebnisse der Agilent InfinityLab LC-Geräte, -Säulen und -Zubehörteile verlassen.

Doch unser Versprechen geht noch weiter. Alle Komponenten der Agilent InfinityLab LC-Produktfamilie ergänzen sich und sind so konzipiert, dass sie zusammenarbeiten. So können Sie Ihren Arbeitsablauf kontinuierlich verbessern, um Effizienzsteigerungen für ein größeres Arbeitspensum zu erzielen und die Betriebskosten zu senken.

Weiterführende Hinweise zum InfinityLab Poroshell Portfolio finden Sie unter

**[www.agilent.com/chem/Poroshell-HILIC](http://www.agilent.com/chem/Poroshell-HILIC)**

Online-Store:

**[www.agilent.com/chem/store](http://www.agilent.com/chem/store)**

Erhalten Sie Antworten auf Ihre technischen Fragen und greifen Sie auf Ressourcen in der Agilent Community zu:

**[community.agilent.com](http://community.agilent.com)**

Deutschland

**0800-603 1000**

**[CustomerCare\\_Germany@agilent.com](mailto:CustomerCare_Germany@agilent.com)**

Europa

**[info\\_agilent@agilent.com](mailto:info_agilent@agilent.com)**

Asien und Pazifik

**[inquiry\\_lsca@agilent.com](mailto:inquiry_lsca@agilent.com)**

DE.1032986111

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2020  
Gedruckt in den USA, Dienstag, 8. Dezember 2020  
5994-2798DEE