

COLUMN USER GUIDE

for Agilent Normal-Phase
and HILIC Columns



Säulenbenutzerhandbuch
für Agilent Normalphasen- und HILIC-Säulen

Guide d'utilisation des colonnes
pour les colonnes phase normale et les colonnes HILIC Agilent

Guía del usuario de columnas
para columnas de fase normal y de HILIC de Agilent

Manuale d'uso per colonne
Agilent a fase normale e HILIC

カラム ユーザーガイド
AGILENT 順相 および HILIC カラム

色谱柱用户指南
适用于 Agilent 正相 和 HILIC 色谱柱

Руководство пользователя
для колонок Agilent для нормально-фазовой
хроматографии и хроматографии гидрофильных
взаимодействий (HILIC)

Guia do usuário de colunas
para colunas Agilent de fase normal e colunas HILIC



Agilent Technologies



This booklet provides general information for all InfinityLab Poroshell 120, ZORBAX, Pursuit, and Polaris normal-phase and HILIC columns. Initial sections include information for both normal-phase and HILIC columns. Because some method parameters and column care instructions are different for HILIC versus normal phase, those sections are broken out separately in the last few pages. For additional information about your specific column or family,

see **www.agilent.com/chem/columnchoices**

Getting Started

A QC Column Performance Report, including a test chromatogram, comes with every Agilent column. The QC test instrument is modified (optimized) from a standard instrument to minimize extra column volume, so it may vary from the system used in your lab. This allows a better evaluation of the column and assures a more consistent product. An LC system, optimized for low volume columns, will generate similar results to the chromatogram on your QC Performance Report.

Installation

- The direction of flow is marked on the column.
- **1.8 μm columns (ZORBAX RRHT, ZORBAX RRHD) can only be operated in the flow direction marked on the column.**
- Poroshell 120 columns may be operated in the opposite flow direction when cleaning the column. The frit porosity on the outlet of Poroshell 120 columns is smaller than on the inlet and can plug more easily.
- Agilent recommends InfinityLab Quick Connect fittings (5067-5961 for 0.075 x 105 mm) or Quick Turn fittings (5067-5966) for a perfect column connection, every time. Polyketone fittings (5042-8957) can also be used for columns up to 600 bar.



*Polyketone fitting, p/n
5042-8957*



*Agilent 1200 bar removable fitting, p/n
5067-4733*

Important Safety Considerations for all LC Columns

- All connection points in LC systems are potential sources of leaks. Users should be aware of the toxicity or flammability of their mobile phases.
- Because of the small particle size, dry column packings are respirable. Columns should only be opened in a well-ventilated area.
- Adhere to operating pressure limits noted for each column (see chart on next page). Exceeding these limits will compromise chromatographic performance and could be unsafe.

Maximum Operating Pressures – Columns up to 9.4 mm id

Column Type	Particle Size	Pressure Limit
Poroshell 120	1.9 μm	1300 bar (19500 psi)
Poroshell 120	2.7 μm , 4 μm	600 bar (9000 psi)
ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD)	1.8 μm	1300 bar (19500 psi)
ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHT)	1.8 μm	600 bar (9000 psi)
All other ZORBAX, Pursuit, Polaris	3.0 μm , 3.5 μm , 5 μm , 10 μm	400 bar (6000 psi)

Column Usage Tips

- Modern columns are robust and are designed to operate for long periods under normal chromatographic conditions. You can maximize column lifetime by running it within specifications. Always review the specifications before putting in place a final method.
- While generally not harmful to the column, reverse flow should be avoided except to attempt to clear a clogged frit (see "Installation" for exceptions).
- Always use high purity reagents and chromatography grade solvents or better to prepare your mobile phase.
- Disassembling a column will degrade column performance.
- New columns contain a mixture of organic solvents. See your QC Performance Report for the solvent composition in your column. Initially, care should be taken not to pass any mobile phase through the column that may cause a precipitate or an emulsion to form.
- Agilent normal-phase columns are compatible with water and all common organic solvents.

- The use of a guard column is recommended to protect your column and increase its lifetime.
- Columns should not be maintained at high pH or elevated temperature when not in use.
- Avoid use of this column outside recommended pH range for column phase (see next page). Expect reduced lifetime when operating outside the recommended pH and temperature ranges.

Tips for Getting the Best Chromatographic Results

- Optimize your instrument by minimizing tubing lengths between components to reduce extra column volume and band broadening. Use 0.12 mm id red or 0.075 mm id black tubing for Fast LC/high efficiency columns. Learn about capillary options at www.agilent.com/chem/lccapillaries.
- When using normal-phase columns, ensure that your LC instrument's rotor seals, pump seals, tubing, and all other components are compatible with normal-phase solvents.
- Make sure your data collection rate is optimized for your column. Use a higher collection rate for Fast LC columns (Poroshell 120, RRHT and RRHD).
- Use Agilent certified lamps in your LC instruments for best performance.
- Use sample filtration or other sample prep as appropriate for your sample. Learn more at www.agilent.com/chem/sampleprep



*If you are using Poroshell 120 or ZORBAX RRHT or RRHD columns, use a **Fast Guard for UHPLC** to protect your analytical column. See www.agilent.com/chem/fastguards for more information.*

WORKING WITH NORMAL-PHASE COLUMNS

Every normal-phase column is tested before shipment and shipped in a normal-phase test eluent, with the exception of ZORBAX Eclipse XDB-CN and, Poroshell 120 EC-CN which are shipped in reversed-phase solvents and Poroshell 120 HILIC and ZORBAX HILIC Plus which are shipped in HILIC solvents. ZORBAX carbohydrate columns are shipped in acetonitrile. Care should be taken to make sure the column has been properly equilibrated prior to use. This will ensure reproducibility from analysis to analysis and help prevent retention time drifting.

Normal-Phase Column Operating Parameters: pH and Temperature

Phase	Recommended pH Range	Maximum Operating Temperature	Suggested Operating Temperature
Poroshell 120 EC-CN	pH 2.0 to 8.0	60 °C	30 °C
ZORBAX Eclipse XDB-CN	pH 1.0 to 9.0	60 °C	30 °C
ZORBAX CN	pH 2.0 to 8.0	60 °C	30 °C
ZORBAX Carbohydrate	pH 2.0 to 8.0	60 °C	30 °C
ZORBAX NH ₂	pH 2.0 to 7.0	60 °C	30 °C
Polaris NH ₂	pH 2.0 to 8.0	60 °C	30 °C
ZORBAX Rx-SIL, ZORBAX SIL	pH 1.0 to 8.0	Limited only by the temperature limits of the mobile phase	
Polaris Si-A	pH 2.0 to 8.0	60 °C	30 °C
Pursuit XRs Si	pH 2.0 to 8.0	60 °C	30 °C
Poroshell 120 HILIC, ZORBAX HILIC Plus	pH 1.0 to 8.0	Limited only by the temperature limits of the mobile phase	

Operating at extreme ends of pH and temperature ranges will have a significant impact on column lifetime.

Note: All silica-based packings have some solubility in pH >6 aqueous mobile phases. When using silica-based columns at pH >6, best column lifetime is obtained at lower temperatures (40 °C Max) using low buffer concentrations in the range of 0.01 to 0.02 M.

Normal-Phase Column Method Development Notes

The stationary phase is polar in nature and is best used with nonpolar mobile phases such as methylene chloride/hexane or isopropanol/hexane mixtures. Increasing the amount of the polar component in these mixtures typically reduces the retention time of the sample.

Column Type	Method Development Notes
ZORBAX NH ₂ Polaris NH ₂	Many column volumes of mobile phase are necessary for equilibration to occur after changes in mobile phase composition. The number of column volumes required depends on the system in use and can be as high as 50 to 100 column volumes.
ZORBAX Rx-SIL ZORBAX SIL Pursuit XRs Si Polaris Si-A	Unbonded silica columns are very sensitive to trace amounts of water in solvents and sample, so care must be taken to maintain consistency for method reproducibility. When gradient elution is employed, both primary and secondary solvents should be modified with alcohol or acetonitrile and at least 30 columns of solvent should be allowed to flow through the column after completion of each run. When switching between solvents, first rinse the column with a mutually miscible solvent such as isopropyl alcohol.
Poroshell 120 EC-CN ZORBAX Eclipse XDB-CN ZORBAX CN	Poroshell 120 EC-CN and ZORBAX Eclipse XDB-CN columns are shipped with reversed-phase solvents, but can also be used in normal-phase applications after flushing with isopropanol. Retention decreases as the polarity of the mobile phase increases. The rapid equilibration of this bonded phase with mobile phase often makes it more convenient to use this column than a silica column, especially for gradient elution.

Cleaning Your Column/Extending Column Life: Normal-phase Columns

For normal phase, we recommend use of organic solvents. Use at least 20 column volumes of each solvent, which is 50 mL if your column is the traditional analytical 4.6 x 250 mm. Try these solvents in order of increasing strength:

1. 50% methanol: 50% chloroform
2. 100% ethyl acetate

Cleaning a column used in normal-phase mode may depend on the sample type. If these solvents do not work, contact Agilent so we can recommend a solvent that may be more effective with your application and sample matrix.

Storage Recommendations: Normal-Phase Columns

Normal-phase columns can typically be stored in their own mobile phase for long periods. Before storing the column, the end-fittings should be tightly capped with end-plugs to prevent the packing from drying out.

WORKING WITH HILIC COLUMNS

HILIC is a method used for the separation of polar analytes inadequately retained on typical reversed-phase columns. Agilent ZORBAX HILIC Plus and Poroshell 120 HILIC columns are non-bonded silica columns, shipped in acetonitrile:water or acetonitrile and ready to use for HILIC separations. ZORBAX Carbohydrate columns are shipped in acetonitrile also ready for use in HILIC mode. Like normal-phase columns, HILIC columns require more equilibration than reversed-phase columns. Note that NH₂, unbonded silica and CN columns can also be used for HILIC applications. To change these columns to HILIC mode, flush first with isopropyl alcohol.

HILIC Column Operating Parameters

Column Name	pH Range	Maximum Temperature	Suggested Temperature
ZORBAX HILIC Plus Poroshell 120 HILIC	pH 1.0 to 8.0	40 °C	30 °C
ZORBAX Carbohydrate	pH 2.0 to 8.0	40 °C	30 °C

Operating at extreme ends of pH and temperature ranges will have a significant impact on column lifetime.

HILIC Method Development Notes

ZORBAX HILIC Plus Poroshell 120 HILIC	Most common HILIC applications are for the analysis of polar compounds that are unretained or poorly retained on reversed-phase columns. Best to equilibrate the column with 30-40% water in acetonitrile before use. Equilibration may require 20-50 column volumes. A typical mobile phase is acetonitrile:water with an acetate or formate buffer at 5-10 mM. Increasing buffer concentration can improve peak shape and retention. Decrease the aqueous/buffer component to increase retention.
--	---

As acetonitrile content of the mobile phase increases, the resolution of the sugars may improve, with an accompanying increase in analysis time. The typical range for the mobile phase is 60% to 75% acetonitrile. Resolution may be improved when column temperature is above room temperature. Operation at 30 °C or 35 °C may give better resolution of a carbohydrate mixture.

Operating Guidelines: HILIC

- Agilent HILIC columns are shipped containing acetonitrile:water or acetonitrile.
- Agilent HILIC columns are compatible with water and all common organic solvents.
- All silica has some solubility in pH >6 aqueous mobile phases. Solubility of the silica is also increased at elevated temperatures. Using the columns above pH 6 and 40 °C will reduce the column lifetime.

Cleaning Your Column/Extending Column Life: HILIC Columns

Samples should be filtered before injecting on the column. This is particularly important for the ZORBAX RRHD HILIC Plus column, as the column inlet frit is nominally 0.5 μm and samples should be filtered through a 0.2 μm sample filter. If solvent flow appears to be restricted (unusually high column backpressure), check first to see that solvent flow is unobstructed up to the column inlet. If the restriction is prior to the column, replace the appropriate piece of tubing or filter that is plugged. If the column is plugged, Poroshell 120 HILIC can be backflushed with 20-30 column volumes of mobile phase. The RRHD HILIC column cannot be backflushed. To remove strongly-retained materials from the column, flush the column with a strong solvent which in HILIC mode, is water.

Storage Recommendations: HILIC Columns

Acetonitrile:water (95:5) is recommended as the long-term storage solvent for HILIC columns. It may be necessary to flush the column with acetonitrile:water (60:40) to remove strongly-retained compounds prior to switching to the storage solvent. Before storing the column, tightly cap the end fittings with the end plugs to prevent the packing from drying out. Columns may be safely stored for short periods in most HILIC mobile phases. However, to protect equipment, it is best to remove salts from the instrument and column by purging the column with the same mobile phase without the buffer (for example, using 90:10 ACN:H₂O to remove a 90:10 ACN:0.01M formate buffered mobile phase). Re-equilibration is faster with the original mobile phase when using this approach, but several (3 to 6) injections should be made to verify column equilibration.

Diese Broschüre enthält allgemeine Informationen zu allen InfinityLab Poroshell 120-, ZORBAX-, Pursuit- und Polaris-Normalphasen- und HILIC-Säulen. Die einleitenden Abschnitte enthalten Informationen zu Normalphasen- und HILIC-Säulen. Da manche Methodenparameter und Säulenpflegeanweisungen für HILIC und Normalphase unterschiedlich sind, gibt es hierzu separate Abschnitte auf den letzten Seiten. Zusätzliche Informationen über Ihre spezifische Säule finden Sie unter

www.agilent.com/chem/columnchoices

Erste Schritte

Jeder Agilent Säule liegt ein QC-Säulentestreport mit Testchromatogramm bei. Bei dem QC-Testsystem handelt es sich um ein optimiertes Standardsystem, um das Totvolumen im System zu minimieren. Es kann also von dem in Ihrem Labor verwendeten System abweichen. Die Säule kann so besser evaluiert und eine konsistente Produktqualität sichergestellt werden. Ein für Säulen mit niedrigem Volumen optimiertes LC-System liefert ähnliche Ergebnisse wie das Chromatogramm in Ihrem QC-Testreport.

Installation

- Die Flussrichtung ist auf der Säule angegeben.
- **1,8- μ m-Säulen (ZORBAX RRH, ZORBAX RRHD) können nur in der auf der Säule angegebenen Flussrichtung verwendet werden.**
- InfinityLab Poroshell 120-Säulen können zur Reinigung der Säule mit umgekehrter Flussrichtung betrieben werden. Die Fritte am Auslass der InfinityLab Poroshell 120-Säulen hat eine niedrigere Porengröße als die Einlassfritte und kann leichter verstopfen.
- Agilent empfiehlt InfinityLab Quick Connect-Fittings (5067-5961 für 0,075 x 105 mm) oder Quick Turn-Fittings (5067-5966) für eine perfekte Säulenverbindung, jederzeit. Polyketon-Fittings (5042-8957) können bei bis zu 600 bar ebenfalls für die Säulen verwendet werden.



*Polyketon-Fitting,
Artikelnummer 5042-8957*



*Agilent austauschbares Fitting,
1200 bar, Artikelnummer
5067-4733*



*Agilent Quick Connect
Fitting, Artikelnummer
5067-5961*

Wichtige Sicherheitshinweise zu allen LC-Säulen

- Alle Anschlusspunkte in LC-Systemen sind potenzielle Quellen von Leckagen. Benutzer sollten daher die Toxizität bzw. Brennbarkeit ihrer mobilen Phasen kennen.
- Da aufgrund der kleinen Partikelgröße die Gefahr des Einatmens von Säulenpackungsmaterial besteht, sollten die Säulen nur in gut belüfteten Räumen geöffnet werden.
- Halten Sie die spezifischen Säulendruckgrenzwerte ein (siehe Diagramm auf nächster Seite). Eine Überschreitung dieser Werte beeinträchtigt die Chromatographieleistung und kann gefährlich sein.

Maximaler Druck – Säulen bis zu 9,4 mm ID

Säulentyp	Partikelgröße	Druckgrenzwert
InfinityLab Poroshell 120	1,9 µm	1300 bar (19 500 psi)
InfinityLab Poroshell 120	2,7 µm, 4 µm	600 bar (9000 psi)
ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD)	1,8 µm	1300 bar (19 500 psi)
ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHT)	1,8 µm	600 bar (9000 psi)
Alle anderen ZORBAX, Pursuit, Polaris	3,0 µm, 3,5 µm, 5 µm, 10 µm	400 bar (6000 psi)
Rx, Metasil, Monochrom, Microsorb	3,0 µm, 3,5 µm, 5 µm, 10 µm	400 bar (6000 psi)

Tipps zur Säulennutzung

- Moderne Säulen sind robust und für den langfristigen Einsatz unter normalen chromatographischen Bedingungen konzipiert. Die Lebensdauer der Säule kann durch Betrieb innerhalb der Spezifikationen maximiert werden. Beachten Sie stets die Spezifikationen, bevor Sie eine endgültige Methode wählen.
- Die Verwendung der Säule entgegen ihrer Flussrichtung sollte vermieden werden, außer bei dem Versuch, die verstopften Fritten zu säubern (Ausnahme siehe „Installation“).
- Verwenden Sie für die Vorbereitung der mobilen Phase immer Reagenzien mit hoher Reinheit und Lösungsmittel in Chromatographiequalität.
- Der Aufschrauben einer Säule kann zu einer Beeinträchtigung der Säulenleistung führen.
- Neue Säulen enthalten ein Gemisch organischer Lösungsmittel. Die Lösungsmittelzusammensetzung in Ihrer Säule finden Sie im QC-Testreport. Es sollte darauf geachtet werden, dass keine mobile Phase durch die Säule geleitet wird, die zu einer Niederschlagsbildung oder Emulsion führen kann.
- Agilent Normalphasensäulen sind mit Wasser und allen gängigen organischen Lösungsmitteln kompatibel.
- Die Verwendung einer Vorsäule wird zum Schutz der Säule und zur Verlängerung ihrer Lebensdauer empfohlen.

- Zurzeit nicht benutzte Säulen sollten nicht bei hohen pH-Werten oder erhöhten Temperaturen aufbewahrt werden.
- Vermeiden Sie die Nutzung einer Säule außerhalb des für die Säulenphase empfohlenen pH-Bereichs (siehe nächste Seite). Die Lebensdauer verkürzt sich, wenn die Säule außerhalb der empfohlenen pH- und Temperaturbereiche betrieben wird.

Tipps für beste chromatographische Ergebnisse

- Optimieren Sie Ihr LC-System, indem Sie die Längen der Kapillaren zwischen den Modulen minimieren, um Extrasäulenvolumen und Bandenverbreiterung zu reduzieren. Verwenden Sie rote Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 0,12 mm oder schwarze Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 0,075 mm für Fast-LC-/Hocheffizienzsäulen. Weitere Informationen zu Kapillaren erhalten Sie unter www.agilent.com/chem/lccapillaries.
- Achten Sie bei der Verwendung von Normalphasensäulen darauf, dass Rotordichtungen, Pumpendichtungen, Kapillaren und alle weiteren Komponenten des LC-Systems mit Normalphasen-Lösungsmitteln kompatibel sind.
- Stellen Sie sicher, dass die Datenerfassungsrate für Ihre Säule optimiert ist. Verwenden Sie für Fast-LC-Säulen (InfinityLab Poroshell 120, RRHT und RRHD) eine höhere Datenerfassungsrate.
- Verwenden Sie für eine optimale Leistung Agilent-zertifizierte Lampen in Ihren Flüssigkeits-Chromatographiegeräten.
- Filtrieren Sie Ihre Probe oder führen Sie eine für Ihre Probe geeignete andere Probenvorbereitung durch. Weitere Informationen finden Sie unter www.agilent.com/chem/sampleprep.



Wenn Sie InfinityLab Poroshell 120- oder ZORBAX RRHT- oder RRHD-Säulen einsetzen, verwenden Sie eine **Fast Guard-Vorsäule für UHPLC**, um Ihre analytische Säule zu schützen. Weitere Informationen finden Sie unter www.agilent.com/chem/fastguards.

ARBEITEN MIT NORMALPHASENSÄULEN

Jede Normalphasensäule wird vor der Lieferung getestet und in einem Normalphasen-Testeluent versandt, ausgenommen Säulen der Typen ZORBAX Eclipse XDB-CN und InfinityLab Poroshell 120 EC-CN, die in Umkehrphasen-Lösungsmitteln versendet werden, sowie InfinityLab Poroshell 120 HILIC und ZORBAX HILIC Plus, die in HILIC-Lösungsmitteln versendet werden. ZORBAX Carbohydrate-Säulen werden in Acetonitril versendet. Es muss unbedingt darauf geachtet werden, dass die Säule vor der Verwendung ordnungsgemäß äquilibriert wurde. Dies stellt die Reproduzierbarkeit von Analyse zu Analyse sicher und verhindert Abweichungen bei der Retentionszeit.

Betriebsparameter von Normalphasensäulen: pH-Wert und Temperatur

Phase	Empfohlener pH-Bereich	Maximale Betriebstemperatur	Vorgeschlagene Betriebstemperatur
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN	pH 2,0 bis 8,0	60 °C	30 °C
ZORBAX Eclipse XDB-CN	pH 1,0 bis 9,0	60 °C	30 °C
ZORBAX CN	pH 2,0 bis 8,0	60 °C	30 °C
ZORBAX Carbohydrate	pH 2,0 bis 8,0	60 °C	30 °C
ZORBAX NH ₂	pH 2,0 bis 7,0	60 °C	30 °C
ZORBAX Rx-SIL, ZORBAX SIL	pH 1,0 bis 8,0	Nur durch die Temperaturbegrenzungen der mobilen Phase eingeschränkt	
Pursuit, Polaris, Metasil, Monochrom, Microsorb	pH 2,0 bis 8,0	60 °C	30 °C
InfinityLab Poroshell 120 HILIC, ZORBAX HILIC Plus	pH 1,0 bis 8,0	Nur durch die Temperaturbegrenzungen der mobilen Phase eingeschränkt	

Der Betrieb der Säule im Bereich der pH- und Temperaturgrenzwerte hat signifikanten Einfluss auf die Lebensdauer der Säule.

Hinweis: Alle Packungen auf Kieselgel-Basis weisen in wässrigen mobilen Phasen mit einem pH-Wert >6 eine gewisse Löslichkeit auf. Falls Sie dennoch Säulen auf Kieselgel-Basis bei einem pH-Wert >6 verwenden, dann erhalten Sie eine längere Lebensdauer, wenn eine niedrigere Temperatur (max. 40 °C) und niedrigere Pufferkonzentrationen zwischen 0,01 bis 0,02 M verwendet werden.

Hinweise zur Methodenentwicklung für Normalphasensäulen

Die stationäre Phase ist polar und wird am besten mit nicht polaren mobilen Phasen wie Methylenchlorid/Hexan- oder Isopropanol/Hexan-Gemische verwendet. Ein höherer Anteil an der polaren Komponente in diesen Gemischen verkürzt normalerweise die Retentionszeit der Probe.

Säulentyp	Hinweise zur Methodenentwicklung
ZORBAX NH ₂ Polaris NH ₂	Zur Äquilibration sind nach dem Wechsel der Zusammensetzung der mobilen Phase einige Säulenvolumina notwendig. Die Anzahl der erforderlichen Säulenvolumina hängt vom verwendeten System ab und kann bis zu 50 bis 100 Säulenvolumina betragen.
ZORBAX Rx-SIL ZORBAX SIL Pursuit XRs Si Polaris Si-A Microsorb Si	Nicht gebundene Säulen auf Kieselgel-Basis reagieren sehr empfindlich auf Wasserspuren in Lösungsmitteln und der Probe. Dies sollte beachtet werden, damit die Reproduzierbarkeit der Methode beibehalten wird. Bei Einsatz einer Gradientenelution sollten sowohl primäre als auch sekundäre Lösungsmittel mit einem Alkohol oder Acetonitril modifiziert werden und mindestens 30 Säulenvolumina Lösungsmittel sollten nach Abschluss jeder Analyse durch die Säule fließen. Spülen Sie beim Wechsel der Lösungsmittel die Säule zuerst mit einem beidseitig mischbaren Lösungsmittel wie Isopropylalkohol.
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN ZORBAX Eclipse XDB-CN ZORBAX CN	InfinityLab Poroshell 120 EC-CN- und ZORBAX Eclipse XDB-CN-Säulen werden mit Umkehrphasen-Lösungsmitteln versandt, können nach dem Spülen mit Isopropanol aber auch in Normalphasenanwendungen verwendet werden. Die Retention nimmt in dem Maß ab, in dem die Polarität der mobilen Phase zunimmt. Die schnelle Äquilibration dieser gebundenen Phase mit der mobilen Phase macht es oft einfacher, diese Säule anstatt Säulen auf Kieselgel-Basis zu verwenden, speziell für Gradientenelution.

Reinigen Ihrer Säule/Erweitern der Säulenlebensdauer: Normalphasensäulen

Für die Normalphasensäulen empfehlen wir den Einsatz organischer Lösungsmittel. Verwenden Sie mindestens 20 Säulenvolumina jedes Lösungsmittels, zum Beispiel 50 ml für eine übliche analytische Säule mit den Dimensionen 4,6 x 250 mm. Versuchen Sie es mit diesen Lösungsmitteln:

1. 50 % Methanol: 50 % Chloroform
2. 100 % Ethylacetat

Das Reinigen einer im Normalphasenmodus verwendeten Säule kann vom Probentyp abhängen. Falls diese Lösungsmittel nicht funktionieren, wenden Sie sich an Agilent, sodass wir ein Lösungsmittel empfehlen können, das in Verbindung mit Ihrer Anwendung und Probenmatrix vielleicht wirksamer ist.

Empfehlung zur Lagerung: Normalphasensäulen

Normalphasensäulen können in der Regel langfristig in ihren eigenen mobilen Phasen gelagert werden. Vor der Lagerung der Säule sollten die Endverschraubungen fest mit Endverschlüssen verschlossen werden, um ein Austrocknen der Packung zu verhindern.

ARBEITEN MIT HILIC-SÄULEN

HILIC ist eine Methode zur Trennung polarer Analyten, für die typische Umkehrphasensäulen unzureichende Ergebnisse liefern. Agilent ZORBAX HILIC Plus und InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Säulen sind nicht gebundene Säulen auf Kieselgel-Basis, die in Acetonitril:Wasser oder Acetonitril versandt werden und zur Nutzung für HILIC-Trennungen bereit sind. ZORBAX Carbohydrate-Säulen werden in Acetonitril versandt und sind ebenfalls zur Verwendung für HILIC-Trennungen bereit. Wie Normalphasensäulen erfordern HILIC-Säulen mehr Äquilibration als Umkehrphasensäulen. Beachten Sie, dass NH_2 -, nicht gebundene Kieselgel- und CN-Säulen auch für HILIC-Anwendungen verwendet werden können. Um diese Säulen für den HILIC-Modus zu verändern, spülen Sie sie zuerst mit Isopropylalkohol.

HILIC-Säulenparameter

Säulenname	pH-Bereich	Maximale Temperatur	Vorgeschlagene Temperatur
ZORBAX HILIC Plus InfinityLab Poroshell 120 HILIC	pH 1,0 bis 8,0	40 °C	30 °C
ZORBAX Carbohydrate	pH 2,0 bis 8,0	40 °C	30 °C

Der Betrieb der Säule im Bereich der pH- und Temperaturgrenzwerte hat signifikanten Einfluss auf die Lebensdauer der Säule.

Hinweise zur HILIC-Methodenentwicklung

ZORBAX HILIC Plus InfinityLab Poroshell 120 HILIC	HILIC-Anwendungen werden vor allem zur Analyse polarer Verbindungen verwendet, die auf Umkehrphasensäulen unzureichende Ergebnisse erzielen. Äquilibrieren Sie vor der ersten Analyse Ihre Säule mit Acetonitril, das mit 30-40 % Wasser verdünnt wurde. Die Äquilibrierung kann 20-50 Säulenvolumen erfordern. Eine typische mobile Phase besteht aus Acetonitril:Wasser mit einem 5-10 mM Acetat- oder Formiatpuffer. Eine Erhöhung der Pufferkonzentration kann Peakformen und Retention verbessern. Setzen Sie die wässrige/ Pufferkomponente herab, um die Retention zu steigern.
---	--

Wird der Acetonitrilanteil der mobilen Phase erhöht, kann sich die Auflösung für Zucker verbessern, wobei auch die Analysedauer zunimmt. Der übliche Bereich für die mobile Phase liegt zwischen 60 % und 75 % Acetonitril. Die Auflösung kann sich verbessern, wenn die Säulentemperatur über der Raumtemperatur liegt. Werden die Säulen bei 30 °C oder 35 °C betrieben, kann dies zu einer besseren Auflösung von Kohlehydratgemischen führen.

Betriebsrichtlinien: HILIC

- Agilent HILIC-Säulen werden in Acetonitril:Wasser oder Acetonitril versandt.
- Agilent HILIC-Säulen sind mit Wasser und allen gängigen organischen Lösungsmitteln kompatibel.
- Alle Packungen auf Kieselgel-Basis sind in wässrigen mobilen Phasen mit einem pH-Wert >6 in gewissem Umfang löslich. Die Löslichkeit des Kieselgels wird auch durch erhöhte Temperaturen gesteigert. Bei Verwendung der Säule über pH 6 und über 40 °C wird die Lebensdauer der Säule reduziert.

Reinigen Ihrer Säule/Erweitern der Säulenlebensdauer: HILIC-Säulen

Proben sollten vor Injektion in die Säule gefiltert werden. Dies ist für die ZORBAX RRHD HILIC Plus-Säule besonders wichtig, da die Einlassfritte der Säule nominell 0,5 µm aufweist. Die Proben sollten daher durch einen 0,2-µm-Probenfilter gefiltert werden. Wenn der Lösungsmittelfluss anscheinend behindert wird (ungewöhnlich hoher Säulenrückdruck), überprüfen Sie zuerst, ob der Lösungsmittelfluss bis zum Säuleneinlass blockiert ist. Wenn die Blockade vor der Säule liegt, ersetzen Sie die entsprechende verstopfte Kapillare bzw. den Filter. Wenn die Säule verstopft ist, kann InfinityLab Poroshell 120 HILIC mit 20-30 Säulenvolumen der mobilen Phase rückgespült werden. Die RRHD HILIC-Säule kann nicht rückgespült werden. Um eventuelle Verunreinigungen aus der Säule zu entfernen, spülen Sie die Säule mit einem starken Lösungsmittel, im HILIC-Modus mit Wasser.

Empfehlung zur Lagerung: HILIC-Säulen

Acetonitril:Wasser (95:5) wird für HILIC-Säulen als Lösungsmittel zur langfristigen Lagerung empfohlen. Unter Umständen muss die Säule mit Acetonitril:Wasser (60:40) gespült werden, um vor dem Wechsel zum Lagerungslösungsmittel eventuelle Verunreinigungen zu entfernen. Vor der Lagerung der Säule sollten die Endverschraubungen fest mit Endverschlüssen verschlossen werden, um ein Austrocknen der Säulenpackung zu verhindern. Kurzfristig können Säulen in den meisten mobilen HILIC-Phasen gelagert werden. Zum Schutz sollten jedoch Salze aus Gerät und Säule entfernt werden, indem die Säule mit derselben mobilen Phase ohne Puffer gespült wird (z. B. durch Verwendung von 90:10 ACN:H₂O, um eine gepufferte mobile Phase 90:10 ACN:0,01M-Formiat zu entfernen). Bei Verwendung dieses Verfahrens ist die erneute Äquilibration mit der originalen mobilen Phase schneller, dennoch sollten 3-6 Injektionen zur Überprüfung der Säulenäquilibration durchgeführt werden.

Cette brochure contient des informations générales applicables à l'ensemble des colonnes phase normale et HILIC des gammes InfinityLab Poroshell 120, ZORBAX, Pursuit et Polaris. Les premières parties fournissent des informations communes aux colonnes phase normale et aux colonnes HILIC. Certains paramètres méthodologiques et certaines instructions d'entretien étant différents selon le type de colonne, ils sont décrits séparément dans les dernières pages de la brochure. Pour plus d'informations sur la colonne ou la série de colonnes que vous possédez, consultez le site [**www.agilent.com/chem/columnchoices**](http://www.agilent.com/chem/columnchoices)

Mise en route

Un rapport CQ sur les performances des colonnes, comprenant un chromatogramme test, accompagne chaque colonne Agilent. L'instrument de test CQ ayant été modifié (optimisé) par rapport à un instrument standard afin de minimiser les volumes morts, il peut être différent du système utilisé dans votre laboratoire. Cela permet une meilleure évaluation de la colonne et garantit une meilleure conformité du produit. Un système de LC optimisé pour les colonnes à faible volume générera des résultats similaires au chromatogramme présenté sur votre rapport CQ des performances.

Installation

- La direction du flux est indiquée sur la colonne.
- **Les colonnes de 1,8 μ m (ZORBAX RRHT, ZORBAX RRHD) ne peuvent être utilisées que dans la direction du flux indiquée sur la colonne.**
- Lors du nettoyage, il est possible d'inverser le flux dans les colonnes InfinityLab Poroshell 120. Le fritté de sortie des colonnes InfinityLab Poroshell 120 possède une porosité inférieure à celle du fritté d'entrée et par conséquent, peut se boucher plus facilement.
- Agilent recommande l'utilisation des raccords rapides Quick Connect (réf. 5067-5961 en 0,075 x 105 mm) ou des raccords rapides Quick Turn (réf. 5067-5966) pour un raccordement de colonne parfait, à chaque fois. Les raccords en polycétone (réf. 5042-8957) peuvent également être utilisés pour les colonnes jusqu'à 600 bars.



Raccord en polycétone,
réf. 5042-8957



Raccord amovible Agilent
1 200 bars, réf. 5067-4733



Agilent Quick Connect
fitting, réf. 5067-5961

Informations de sécurité importantes applicables à l'ensemble des colonnes de LC

- Tous les points de connexion dans les systèmes de LC sont des sources potentielles de fuite. Les utilisateurs doivent être informés de la toxicité et de l'inflammabilité des phases mobiles utilisées.
- Du fait de la petite taille des particules, le matériau à l'intérieur des colonnes peut être inhalé lorsqu'il est sec. Les colonnes ne doivent être ouvertes que dans une zone bien ventilée.
- Observez les limites de pression opérationnelle indiquées pour chaque colonne (voir le tableau à la page suivante). Le dépassement de ces limites peut compromettre les performances chromatographiques ainsi que la sécurité.

Pressions opérationnelles maximales - Colonnes de d.i. inférieur ou égal à 9,4 mm

Type de colonne	Taille des particules	Limite de pression
InfinityLab Poroshell 120	1,9 µm	1 300 bars (19 500 psi)
InfinityLab Poroshell 120	2,7 µm, 4 µm	600 bars (9 000 psi)
ZORBAX Résolution Rapide Haute Définition (RRHD)	1,8 µm	1 300 bars (19 500 psi)
ZORBAX Résolution Rapide Haut Débit (RRHT)	1,8 µm	600 bars (9 000 psi)
Toutes les autres colonnes ZORBAX, Pursuit, Polaris	3,0 µm, 3,5 µm, 5 µm, 10 µm	400 bars (6 000 psi)
Rx, Metasil, Monochrom, Microsorb	3 µm, 3,5 µm, 5 µm, 10 µm	400 bars (6 000 psi)

Conseils d'utilisation des colonnes

- Les colonnes modernes sont particulièrement robustes et sont conçues pour fonctionner sur de longues durées dans des conditions chromatographiques normales. Profitez pleinement des performances de votre colonne en l'utilisant conformément aux spécifications techniques. Prenez toujours le temps de vérifier les spécifications techniques avant de mettre en place une méthode définitivement.
- Bien que cela ne soit généralement pas dangereux pour la colonne, il est recommandé d'éviter d'inverser le flux, sauf pour déboucher un fritté (voir les exceptions dans la section « Installation »).
- Utilisez toujours des réactifs d'une grande pureté et du solvant de qualité chromatographique ou supérieure pour préparer votre phase mobile.
- Désassembler une colonne risque d'en diminuer les performances.
- Les colonnes neuves contiennent un mélange de solvants organiques. Voir le rapport CQ sur les performances pour connaître la composition du solvant dans votre colonne. Avant toute chose, il est recommandé de s'assurer qu'aucune phase mobile qui pourrait provoquer la formation d'un précipité ou d'une émulsion ne soit introduite dans la colonne.
- Les colonnes phase normale Agilent sont compatibles avec l'eau et avec tous les solvants organiques courants.

- L'utilisation d'une colonne de garde est recommandée pour protéger la colonne et augmenter sa durée de vie.
- Lorsqu'elles ne sont pas utilisées, ne laissez pas les colonnes à un pH ou à une température élevés.
- Évitez d'utiliser la colonne en dehors des gammes de pH recommandées pour la phase stationnaire en question (voir la page suivante). Une utilisation en dehors des gammes de pH et de température recommandées risque de réduire la durée de vie de la colonne.

Conseils pour optimiser vos résultats chromatographiques

- Optimisez votre instrument en minimisant la longueur des capillaires entre les modules afin de limiter les volumes morts et réduire l'élargissement des pics. Utilisez un capillaire rouge de 0,12 mm de d.i. ou un capillaire noir de 0,075 mm de d.i. pour les colonnes Fast LC/efficacité élevée. Pour en savoir plus sur les différents capillaires disponibles, consultez le site www.agilent.com/chem/lccapillaries.
- Si vous utilisez des colonnes phase normale, vérifiez que les joints du rotor et ceux de la pompe, les tubulures et tous les autres composants de votre instrument de LC sont compatibles avec les solvants phase normale.
- Vérifiez que la vitesse d'acquisition des données est optimisée pour votre colonne. Utilisez une vitesse supérieure pour les colonnes Fast LC (InfinityLab Poroshell 120, RRHT et RRHD).
- Utilisez les lampes certifiées Agilent dans vos instruments de LC pour obtenir de meilleures performances.
- Procédez à la filtration des échantillons ou à toute autre préparation adaptée à votre échantillon. Pour en savoir plus, consultez le site www.agilent.com/chem/sampleprep.



*Si vous utilisez une colonne InfinityLab Poroshell 120 ou ZORBAX RRHT ou RRHD, protégez-la avec à une colonne de garde **Fast Guard pour UHPLC**. Consultez le site www.agilent.com/chem/fastguards pour plus d'informations.*

UTILISATION DE COLONNES PHASE NORMALE

Chaque colonne phase normale est testée avant expédition et livrée dans un éluent de test phase normale, à l'exception des colonnes ZORBAX Eclipse XDB-CN et InfinityLab Poroshell EC-CN qui sont expédiées dans des solvants phase inverse, et des colonnes InfinityLab Poroshell 120 HILIC et ZORBAX HILIC Plus qui sont expédiées dans des solvants HILIC. Les colonnes ZORBAX Carbohydate sont expédiées dans de l'acétonitrile. Il est recommandé de s'assurer que la colonne a été correctement équilibrée avant utilisation, afin de garantir la reproductibilité d'une analyse à l'autre et d'éviter les déviations du temps de rétention.

Paramètres de fonctionnement des colonnes phase normale : pH et température

Phase	Gamme de pH recommandée	Température de fonctionnement maximum	Température de fonctionnement suggérée
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN	pH de 2,0 à 8,0	60 °C	30 °C
ZORBAX Eclipse XDB-CN	pH de 1,0 à 9,0	60 °C	30 °C
ZORBAX CN	pH de 2,0 à 8,0	60 °C	30 °C
ZORBAX Carbohydate	pH de 2,0 à 8,0	60 °C	30 °C
ZORBAX NH ₂	pH de 2,0 à 7,0	60 °C	30 °C
ZORBAX Rx-SIL, ZORBAX SIL	pH de 1,0 à 8,0	Restreint uniquement par les limites de température de la phase mobile	
Pursuit, Polaris, Metasil, Monochrom, Microsorb	pH de 2,0 à 8,0	60 °C	30 °C
InfinityLab Poroshell 120 HILIC, ZORBAX HILIC Plus	pH de 1,0 à 8,0	Restreint uniquement par les limites de température de la phase mobile	

Une utilisation aux limites de la gamme de pH et de température entraîne une réduction sensible de la durée de vie de la colonne.

Remarque : toutes les phases stationnaires à base de silice ont une solubilité dans les phases mobiles aqueuses à un pH >6. En cas d'utilisation de colonnes à base de silice à un pH >6, la durée de vie de la colonne sera plus longue à des températures plus basses (40 °C maximum) en utilisant des solutions tampons faiblement concentrées, dans la gamme 0,01 à 0,02 M.

Notes sur le développement de méthodes pour les colonnes phase normale

La phase stationnaire est par nature polaire. Il est recommandé de l'utiliser avec des phases mobiles non polaires telles que des mélanges dichlorométhane/hexane ou isopropanol/hexane. L'augmentation de la quantité du composant polaire dans le mélange réduit généralement le temps de rétention des composés analysés.

Type de colonne	Notes sur le développement de méthodes
ZORBAX NH ₂ Polaris NH ₂	Plusieurs volumes de colonne de phase mobile sont nécessaires pour effectuer l'équilibrage après une modification de composition de la phase mobile. Le nombre de volumes de colonne requis dépend du système utilisé et peut atteindre 50 à 100 volumes.
ZORBAX Rx-SIL ZORBAX SIL Pursuit XRs Si Polaris Si-A Microsorb Si	Les colonnes en silice non greffée sont extrêmement sensibles à des quantités infimes d'eau dans les solvants et l'échantillon. Il faut donc veiller à utiliser des produits uniformes pour garantir la reproductibilité de la méthode. En cas d'utilisation d'une élution par gradient, le solvant primaire et le solvant secondaire doivent tous deux être modifiés par un alcool ou de l'acétonitrile et au moins trente volumes de colonne de solvant doivent circuler dans la colonne après chaque analyse. Lors du passage d'un solvant à un autre, commencez par rincer la colonne avec un solvant mutuellement miscible, par exemple de l'isopropanol.
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN ZORBAX Eclipse XDB-CN ZORBAX CN	Les colonnes InfinityLab Poroshell 120 EC-CN et ZORBAX Eclipse XDB-CN sont livrées avec des solvants phase inverse, mais elles peuvent également être utilisées pour des applications en phase normale. Dans ce cas, commencez par les rincer avec de l'isopropanol. La rétention diminue à mesure que la polarité de la phase mobile augmente. La rapidité de l'équilibrage entre cette phase greffée et la phase mobile rend souvent cette colonne plus pratique à utiliser qu'une colonne en silice, notamment pour les éluions à gradient.

Nettoyage de la colonne et augmentation de la durée de vie : colonnes phase normale

En phase normale, nous vous recommandons d'utiliser des solvants organiques. Utilisez au minimum 20 volumes de colonne de chaque solvant, si vous employez une colonne analytique classique de 4,6 x 250 mm, 50 mL. Testez d'abord les solvants suivants dans l'ordre de la force éluante croissante :

1. 50 % de méthanol : 50 % de chloroforme
2. 100 % d'acétate d'éthyle

Le nettoyage d'une colonne utilisée en mode phase normale peut varier selon le type d'échantillon. Si ces solvants ne fonctionnent pas, contactez Agilent qui pourra vous recommander un solvant plus efficace pour votre application et votre matrice d'échantillon.

Recommandations relatives au stockage : colonnes phase normale

Les colonnes phase normale peuvent normalement être stockées sur de longues durées dans leur phase mobile. Avant le stockage d'une colonne, les extrémités de la colonnes doivent être refermées à l'aide de bouchons prévus à cet effet afin d'éviter le séchage.

UTILISATION DE COLONNES HILIC

La méthode HILIC est utilisée pour séparer des analytes polaires qui seraient incorrectement retenus sur des colonnes phase inverse classiques. Les colonnes Agilent ZORBAX HILIC Plus et InfinityLab Poroshell 120 HILIC sont des colonnes en silice non greffée, livrées dans un mélange acétonitrile:eau ou dans de l'acétonitrile et prêtes à être utilisées pour les séparations en mode HILIC. Les colonnes ZORBAX Carbohydrate sont expédiées dans de l'acétonitrile et sont également prêtes à être utilisées en mode HILIC. Comme les colonnes phase normale, les colonnes HILIC exigent un équilibrage plus précis que les colonnes phase inverse. Notez que les colonnes NH_2 , en silice non greffée et CN sont également utilisables pour les applications HILIC. Avant de placer ces colonnes en mode HILIC, rincez-les avec de l'isopropanol.

Paramètres de fonctionnement des colonnes HILIC

Nom de la colonne	Gamme de pH	Température maximum	Température suggérée
ZORBAX HILIC Plus InfinityLab Poroshell 120 HILIC	pH de 1,0 à 8,0	40 °C	30 °C
ZORBAX Carbohydate	pH de 2,0 à 8,0	40 °C	30 °C

Une utilisation aux limites de la gamme de pH et de température entraîne une réduction sensible de la durée de vie de la colonne.

Notes sur la mise au point de méthodes HILIC

ZORBAX HILIC Plus InfinityLab Poroshell 120 HILIC	Les applications HILIC les plus courantes concernent l'analyse de composés polaires peu ou pas retenus sur les colonnes phase inverse. Il est préférable d'équilibrer la colonne avec une solution de 30 à 40 % d'eau dans de l'acétonitrile avant utilisation. L'équilibrage peut prendre 20 à 50 volumes de colonne. La phase mobile est souvent constituée d'un mélange acétonitrile:eau tamponné à l'acétate ou au formiate à 5-10 mM. En augmentant la concentration du tampon, il est possible d'optimiser la forme des pics et la rétention. Réduisez le composant aqueux/tampon pour augmenter la rétention.
---	--

Lorsque la concentration en acétonitrile de la phase mobile augmente, une meilleure résolution des sucres peut être observée, mais pour une durée d'analyse plus longue. En règle générale, la phase mobile comporte 60 % à 75 % d'acétonitrile. La résolution peut être meilleure à une température supérieure à la température ambiante. Une utilisation à 30 °C ou 35 °C peut permettre une meilleure résolution du mélange de glucides.

Consignes d'utilisation : HILIC

- Les colonnes HILIC Agilent sont préremplies d'un mélange acétonitrile:eau ou d'acétonitrile.
- Les colonnes HILIC Agilent sont compatibles avec l'eau et avec tous les solvants organiques courants.
- La silice présente toujours une certaine solubilité dans les phases mobiles aqueuses de pH supérieur à 6. Cette solubilité augmente avec la température. Si des colonnes sont utilisées à un pH supérieur à 6 et à une température supérieure à 40 °C, leur durée de vie sera réduite.

Nettoyage de la colonne et augmentation de la durée de vie : colonnes HILIC

Les échantillons doivent être filtrés avant d'être injectés dans la colonne. Ce point est particulièrement important pour la colonne ZORBAX RRHD HILIC Plus, dont le fritté d'entrée a une porosité nominale de 0,5 µm. Les échantillons doivent être filtrés sur un filtre 0,2 µm. Si l'écoulement du solvant semble ralenti (contre-pression inhabituellement élevée dans la colonne), commencez par vérifier que la circulation de solvant n'est pas bloquée avant l'entrée de la colonne. En cas de blocage en amont de la colonne, remplacez le capillaire ou le filtre bouché. Si la colonne InfinityLab Poroshell 120 HILIC est bouchée, elle peut être rincée en sens inverse avec 20 à 30 volumes de colonne de phase mobile. La colonne RRHD HILIC, elle, ne peut pas être rincée en sens inverse. Pour éliminer les contaminants très fortement retenus dans la colonne, rincez celle-ci avec un solvant puissant (en mode HILIC, de l'eau).

Recommandations relatives au stockage : colonnes HILIC

Il est recommandé d'utiliser comme solvant un mélange acétonitrile:eau (95:5) pour le stockage longue durée des colonnes HILIC. Il peut être nécessaire de rincer la colonne avec un mélange acétonitrile:eau (60:40) pour éliminer les contaminants avant de passer au solvant de stockage. Avant le stockage d'une colonne, veillez à bien fermer les extrémités de la colonne afin d'éviter le séchage. Les colonnes peuvent être stockées en toute sécurité pour de courtes périodes dans la plupart des phases mobiles HILIC. Toutefois, afin de protéger l'équipement, il est préférable de retirer les sels de l'instrument et de la colonne. Pour cela, rincez la colonne en utilisant la même phase mobile, sans tampon (par exemple, utilisez un mélange à 90:10 d'ACN:H₂O pour éliminer une phase mobile tamponnée à 90:10 ACN:formiate 0,01M). Le rééquilibrage est plus rapide avec la phase mobile d'origine si l'on suit cette méthode, mais plusieurs (3 à 6) injections doivent être réalisées pour vérifier l'équilibrage de la colonne.

Este folleto proporciona información general para todas las columnas InfinityLab Poroshell 120, ZORBAX, Pursuit y Polaris de fase normal e HILIC. Las secciones incluyen información común tanto para columnas de fase normal como para columnas HILIC. Ya que algunos parámetros de método e instrucciones para el mantenimiento de la columna son diferentes para las columnas de HILIC y las columnas de fase normal, esas secciones se muestran por separado en las últimas páginas. Para obtener más información sobre su columna o gama específica, consulte

www.agilent.com/chem/columnchoices

Inicio

Todas las columnas Agilent vienen con un informe de Control de Calidad del rendimiento, incluyendo un cromatograma de prueba. El instrumento utilizado para la prueba de Control de Calidad está modificado (optimizado) para minimizar el volumen extra columna, por lo que puede variar dependiendo del equipo que utilice en su laboratorio. Esto permite una mejor evaluación de la columna y garantiza un producto más consistente. Un sistema de LC, optimizado para columnas de bajo volumen, generará resultados similares al cromatograma en su informe de Control de Calidad del rendimiento.

Instalación

- La dirección de flujo está marcada en la columna.
- **Las columnas de 1,8 μ m (ZORBAX RRHT, ZORBAX RRHD) solo pueden utilizarse en la dirección de flujo marcado en la columna.**
- Las columnas InfinityLab Poroshell 120 pueden utilizarse en la dirección de flujo opuesta al limpiar la columna. La porosidad de la frita de salida de las columnas InfinityLab Poroshell 120, es menor que la porosidad de la frita de entrada, y por tanto puede obstruirse más fácilmente.
- Agilent recomienda conectores de conexión rápida InfinityLab (5067-5961 para 0,075 x 105 mm) o conexiones de giro rápido (5067-5966) para conseguir conexiones de columnas perfectas en todo momento. También se pueden usar conexiones de policetona (5042-8957) para columnas de hasta 600 bares.



Conexión de policetona,
ref. 5042-8957



Conexión extraíble
Agilent de 1.200 bar,
ref. 5067-4733



Conectores de conexión
rápida Agilent
ref. 5067-5961

Consideraciones de seguridad importantes para todas las columnas de LC

- Todos los puntos de conexión de los sistemas de LC son posibles fuentes de fugas. Los usuarios deben ser conscientes de la toxicidad e inflamabilidad de sus fases móviles.
- Debido al reducido tamaño de las partículas, los empaquetados secos de las columnas son respirables. Las columnas solo deben abrirse en un área bien ventilada.
- Tenga en cuenta los límites de presión de operación indicados para cada columna (ver gráfico) en la página siguiente. Si se sobrepasan estos límites, el rendimiento cromatográfico se verá afectado y podría no ser seguro.

Presiones máximas de operación – Columnas de hasta 9,4 mm de di

Tipo de columna	Tamaño de partículas	Límite de presión
InfinityLab Poroshell 120	1,9 µm	1.300 bares (19.500 psi)
InfinityLab Poroshell 120	2,7 µm, 4 µm	600 bares (9.000 psi)
ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD)	1,8 µm	1.300 bares (19.500 psi)
ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHT)	1,8 µm	600 bares (9.000 psi)
Todas las demás ZORBAX, Pursuit, Polaris	3,0 µm, 3,5 µm, 5 µm, 10 µm	400 bares (6.000 psi)
Rx, Metasil, Monochrom, Microsorb	3,0 µm, 3,5 µm, 5 µm, 10 µm	400 bares (6.000 psi)

Consejos de uso de la columna

- Las columnas modernas son robustas y están diseñadas para funcionar durante largos periodos bajo condiciones cromatográficas normales. Puede maximizar la vida útil de la columna utilizándola según las especificaciones. Revise siempre las especificaciones antes de emplear un método final.
- Aunque, por lo general, no es perjudicial para la columna, se debería evitar el flujo inverso, excepto para intentar desobstruir una frita obstruida (ver “Instalación” para excepciones).
- Utilice siempre reactivos de gran pureza y disolventes de grado cromatográfico o superior para preparar su fase móvil.
- Desmontar una columna en sus partes reducirá el rendimiento de esta.
- Las nuevas columnas contienen una mezcla de disolventes orgánicos. Consulte el informe de Control de Calidad del rendimiento para conocer la composición de disolvente de la columna. Inicialmente, se debería tener cuidado de no pasar ninguna fase móvil a través de la columna que pueda provocar la formación de un precipitado o una emulsión.
- Las columnas de fase normal de Agilent son compatibles con agua y con todos los disolventes orgánicos comunes.

- Se recomienda el uso de un salvacolumna para proteger la columna y aumentar su vida útil.
- Las columnas no deben mantenerse a elevado pH o elevada temperatura cuando no estén en uso.
- Evite el uso de esta columna fuera del intervalo de pH recomendado para la fase de columna (ver siguiente página). La vida útil de la columna se verá reducida si se opera fuera de los intervalos recomendados de pH y de temperatura.

Consejos para obtener los mejores resultados cromatográficos

- Optimice el instrumento minimizando las longitudes de los capilares entre los componentes, para reducir así el volumen extra de la columna y el ensanchamiento de picos. Utilice capilares rojos de 0,12 mm de d.i. o negros de 0,075 mm de d.i. para columnas de LC rápida/alta eficiencia. Obtenga información sobre las opciones de capilares en www.agilent.com/chem/lccapillaries.
- Cuando utilice columnas de fase normal, asegúrese de que los sellos del rotor, los sellos de la bomba, los capilares y todos los demás componentes del instrumento de LC son compatibles con disolventes de fase normal.
- Asegúrese de que la velocidad de adquisición de datos para la columna está optimizada. Utilice una velocidad de adquisición más elevada para columnas de LC rápida (InfinityLab Poroshell 120, RRHT y RRHD).
- Utilice lámparas certificadas Agilent en los instrumentos de LC para un rendimiento óptimo.
- Utilice la filtración de muestra u otra preparación de muestra apropiada para la muestra. Obtenga más información en www.agilent.com/chem/sampleprep.



*Si utiliza columnas InfinityLab Poroshell 120 o ZORBAX RRHT o RRHD, use una **precolumna rápida para UHPLC** para proteger la columna analítica. Consulte www.agilent.com/chem/fastguards para obtener más información.*

TRABAJAR CON COLUMNAS DE FASE NORMAL

Todas las columnas de fase normal se prueban antes del envío y se envían en un eluyente de prueba de fase normal, a excepción de ZORBAX Eclipse XDB-CN e InfinityLab Poroshell 120 EC-CN, que se envían en disolventes de fase reversa y de InfinityLab Poroshell 120 HILIC y ZORBAX HILIC Plus, que se envían en disolventes HILIC. Debería asegurarse de que la columna ha sido equilibrada correctamente antes del uso. Así se garantizará la reproducibilidad entre los análisis y se evitará la deriva de los tiempos de retención.

Parámetros de operación de la columna de fase normal: pH y temperatura

Fase	Intervalo de pH recomendado	Temperatura máxima de operación	Temperatura recomendada de operación
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN	pH de 2,0 a 8,0	60 °C	30 °C
ZORBAX Eclipse XDB-CN	pH de 1,0 a 9,0	60 °C	30 °C
ZORBAX CN	pH de 2,0 a 8,0	60 °C	30 °C
ZORBAX Carbohydrate	pH de 2,0 a 8,0	60 °C	30 °C
ZORBAX NH ₂	pH de 2,0 a 7,0	60 °C	30 °C
ZORBAX Rx-SIL, ZORBAX SIL	pH de 1,0 a 8,0	Limitado solamente por los límites de temperatura de la fase móvil	
Pursuit, Polaris, Metasil, Monochrom, Microsorb	pH de 2,0 a 8,0	60 °C	30 °C
InfinityLab Poroshell 120 HILIC, ZORBAX HILIC Plus	pH de 1,0 a 8,0	Limitado solamente por los límites de temperatura de la fase móvil	

La operación en los límites extremos de los intervalos de pH y de temperatura tendrá un impacto significativo en la vida útil de la columna.

Nota: Todos los rellenos de sílice tienen cierta solubilidad en fases móviles acuosas a pH >6. Cuando se utilizan las columnas basadas en sílice a pH >6, se obtiene la mayor vida útil de la columna a temperaturas bajas (40 °C máx.) y utilizando bajas concentraciones de tampón en el intervalo de 0,01 a 0,02 M.

Notas sobre el desarrollo del método para la columna de fase normal

La fase estacionaria es de naturaleza polar y se utiliza de forma óptima con fases móviles no polares, tales como las mezclas de cloruro de metileno/hexano o isopropanol/hexano. El aumento de la cantidad de componente polar en estas mezclas suele reducir el tiempo de retención de la muestra.

Tipo de columna	Notas sobre el desarrollo del método
ZORBAX NH ₂ Polaris NH ₂	Se necesitan muchos volúmenes de columna de la fase móvil para que tenga lugar el equilibrio después de los cambios en la composición de la fase móvil. El número de volúmenes de columna necesarios depende del sistema en uso y puede llegar a ser de 50 a 100 volúmenes de columna.
ZORBAX Rx-SIL ZORBAX SIL Pursuit XRs Si Polaris Si-A Microsorb Si	Las columnas de sílice sin funcionalizar son muy sensibles a pequeñas cantidades de agua en disolventes y en la muestra, por lo que debe tenerse cuidado para mantener la reproducibilidad del método. Cuando se emplea elución por gradiente, se deberían modificar los disolventes principales y secundarios con alcohol o acetonitrilo y se debería permitir que fluyeran al menos 30 volúmenes de columna a través de la misma después de cada análisis. Cuando se cambia de disolvente, primero enjuague la columna con un disolvente mutuamente miscible, como el alcohol isopropílico.
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN ZORBAX Eclipse XDB-CN ZORBAX CN	Las columnas InfinityLab Poroshell 120 EC-CN y ZORBAX Eclipse XDB-CN se envían con disolventes de fase reversa, pero también se pueden utilizar en aplicaciones de fase normal después del lavado con isopropanol. La retención disminuye a medida que la polaridad de la fase móvil aumenta. El equilibrio rápido de esta fase ligada con fase móvil a menudo hace que sea más cómodo utilizar esta columna que una columna de sílice, especialmente para la elución por gradiente.

Limpieza de la columna/Ampliación de la vida útil de la columna: Columnas de fase normal

Para la fase normal, recomendamos el uso de disolventes orgánicos. Utilice al menos 20 volúmenes de columna de cada disolvente, es decir 50 ml para una columna analítica tradicional de 4,6 x 250 mm. Pruebe con estos disolventes para aumentar la fuerza:

1. 50 % metanol: 50 % cloroformo
2. 100 % acetato de etilo

La limpieza de una columna utilizada en modo de fase normal puede depender del tipo de muestra. Si estos disolventes no funcionan, póngase en contacto con Agilent para que podamos recomendarle un disolvente que pueda ser más eficiente para su aplicación y su matriz de muestra.

Recomendaciones de almacenamiento: Columnas de fase normal

Las columnas de fase normal se pueden almacenar en su propia fase móvil durante largos periodos. Antes de almacenar la columna, se deben tapar bien los extremos finales con tapones para evitar que el relleno se reseque.

TRABAJAR CON COLUMNAS HILIC

HILIC es un método usado para la separación de analitos polares retenidos de forma inadecuada en columnas típicas de fase reversa. Las columnas Agilent ZORBAX HILIC Plus e InfinityLab Poroshell 120 HILIC son columnas de sílice sin funcionalizar, enviadas en acetonitrilo: agua o acetonitrilo y preparadas para su uso para separaciones de HILIC. Las columnas de carbohidratos ZORBAX Carbohydrate se envían en acetonitrilo, también preparadas para su uso en modo HILIC. Al igual que las columnas de fase normal, las columnas HILIC requieren más equilibrado que las columnas de fase reversa. Tenga en cuenta que las columnas NH_2 , de sílice no ligada y CN también pueden utilizarse para aplicaciones de HILIC. Para cambiar estas columnas al modo HILIC, primero realice un lavado con alcohol isopropílico.

Parámetros de operación de la columna de HILIC

Nombre de la columna	Intervalo de pH	Temperatura máxima	Temperatura recomendada
ZORBAX HILIC Plus InfinityLab Poroshell 120 HILIC	pH de 1,0 a 8,0	40 °C	30 °C
ZORBAX Carbohydrate	pH de 2,0 a 8,0	40 °C	30 °C

La operación en los límites extremos de los intervalos de pH y de temperatura tendrá un impacto significativo en la vida útil de la columna.

Notas sobre el desarrollo del método de HILIC

ZORBAX HILIC Plus InfinityLab Poroshell 120 HILIC	Las aplicaciones de HILIC más comunes son para el análisis de compuestos polares que no se retienen o retienen poco en columnas de fase reversa. Lo mejor es equilibrar la columna con 30-40 % de agua en acetonitrilo antes del uso. El equilibrado puede necesitar 20-50 volúmenes de columna. Una fase móvil típica es acetonitrilo: agua con un tampón de acetato o formiato a 5-10 mM. Una mayor concentración de tampón puede mejorar la forma y la retención máximas. Disminuya el componente acuoso/tampón para aumentar la retención.
---	--

Si se aumenta el contenido en acetonitrilo de la fase móvil, la resolución de los azúcares podría mejorar, aumentando también el tiempo de análisis. El intervalo típico para la fase móvil es del 60 % al 75 % de acetonitrilo. La resolución puede mejorarse cuando la temperatura de la columna está por encima de la ambiente. Las operaciones a 30 °C o 35 °C podrían mejorar la resolución para una mezcla de carbohidratos.

Directrices de operación: HILIC

- Las columnas HILIC de Agilent se envían con acetonitrilo: agua o acetonitrilo.
- Las columnas HILIC de Agilent son compatibles con agua y con todos los disolventes orgánicos comunes.
- Todas las sílicas tienen alguna solubilidad en fases móviles acuosas a pH >6. La solubilidad de las sílicas también se ve aumentada a temperaturas elevadas. El uso de la columna por encima de pH 6 y 40 °C reducirá la vida útil de la columna.

Limpieza de la columna/Ampliación de la vida útil de la columna: Columnas de HILIC

Se deberían filtrar las muestras antes de inyectarlas en la columna. Esto es especialmente importante para la columna ZORBAX RRHD HILIC Plus, ya que la porosidad de la frita de entrada de la columna es nominalmente de $0,5\ \mu\text{m}$ y las muestras deberían filtrarse a través de un filtro de muestras de $0,2\ \mu\text{m}$. Si el flujo de disolvente parece estar restringido (una presión de columna anormalmente elevada), compruebe primero que ese flujo de disolvente está despejado hasta la entrada de la columna. Si la restricción es anterior a la columna, sustituya el trozo apropiado de los capilares o del filtro que esté obstruido. Si la columna está obstruida, puede purgarse con flujo reverso la InfinityLab Poroshell 120 HILIC con 20-30 volúmenes de columna de fase móvil. No puede realizarse el retroceso de flujo de la columna RRHD HILIC. Para eliminar materiales fuertemente retenidos de la columna, realice un lavado de la columna con un disolvente fuerte que en modo de HILIC es agua.

Recomendaciones de almacenamiento: Columnas de HILIC

Se recomienda acetonitrilo: agua (95:5) como el disolvente de almacenamiento a largo plazo para columnas de HILIC. Puede que sea necesario realizar un lavado de la columna con acetonitrilo: agua (60:40) para eliminar compuestos fuertemente retenidos antes de cambiar al disolvente de almacenamiento. Antes de almacenar la columna, se deben tapar bien los extremos finales con tapones para evitar que el relleno se reseque. Las columnas se deben almacenar de forma segura durante cortos periodos en la mayoría de las fases móviles de HILIC. Sin embargo, para proteger el equipo, lo mejor es eliminar las sales del instrumento y de la columna purgando la columna con la misma fase móvil, sin el tampón (por ejemplo, con ACN:H₂O 90:10) para eliminar una fase móvil con tampón con formiato de ACN:0,01 M 90:10. El reequilibrado es más rápido con la fase móvil original cuando se usa este enfoque, pero se deberían realizar varias inyecciones (de 3 a 6) para comprobar el equilibrado de la columna.

Questo manuale fornisce informazioni generali su tutte le colonne a fase normale e HILIC InfinityLab Poroshell 120, ZORBAX, Pursuit e Polaris. Nelle sezioni iniziali sono descritte le colonne a fase normale e HILIC. Alcuni parametri dei metodi e alcune istruzioni sulla cura delle colonne sono diversi a seconda che si tratti di una colonna HILIC o a fase normale. Pertanto nelle ultime pagine viene fatta distinzione a seconda del tipo di colonna. Per ulteriori informazioni su un tipo di colonna o famiglia, consultare

www.agilent.com/chem/columnchoices

Guida introduttiva

Insieme a tutte le colonne Agilent vengono forniti un certificato di analisi e un cromatogramma di prova. La procedura per il controllo qualità è stata modificata (ottimizzata) partendo da quella standard riducendo così al minimo il volume extra-colonna. È possibile che si verifichino delle variazioni rispetto al sistema utilizzato in laboratorio. In questo modo si può meglio valutare la colonna e garantire un prodotto più efficiente. Un sistema LC ottimizzato per colonne a basso volume darà risultati simili al cromatogramma nel report QC sulle prestazioni della colonna.

Installazione

- Sulla colonna è indicata la direzione del flusso.
- **Le colonne da 1,8 μm (ZORBAX RRHT, ZORBAX RRHD) possono essere utilizzate solo nella direzione di flusso indicata.**
- Le colonne InfinityLab Poroshell 120 possono essere utilizzate nella direzione di flusso inversa in fase di pulizia. Il frit all'uscita delle colonne InfinityLab Poroshell 120 è più piccolo rispetto a quello in entrata e pertanto può otturarsi più facilmente.
- Agilent raccomanda l'utilizzo di raccordi InfinityLab Quick Connect (5067-5961 per 0,075 x 105 mm) o raccordi Quick Turn (5067-5966) per un collegamento sempre perfetto della colonna; è possibile utilizzare anche raccordi in PEEK (5042-8957) per colonne fino a 600 bar.



Raccordo in PEEK,
codice 5042-8957



Raccordo rimovibile
Agilent da 1.200 bar,
codice 5067-4733



Raccordo Agilent Quick
Connect codice
5067-5961

Importanti considerazioni sulla sicurezza per tutte le colonne LC

- Tutti i raccordi dei sistemi LC sono potenziali punti di perdite. Prestare attenzione alla tossicità e all'inflammabilità delle fasi mobili.
- Data la piccola dimensione delle particelle di silice, è possibile respirare le sostanze che riempiono le colonne a secco. Si consiglia di aprire le colonne solo in locali ben ventilati.
- Rispettare i limiti di pressione operativa indicati per ciascuna colonna (vedere schema riportato nella pagina seguente). Superare tali limiti è pericoloso e si rischia di compromettere le prestazioni cromatografiche.

Valori massimi di pressione operativa – Colonne fino a 9,4 mm di id

Tipo colonna	Dimensione particella	Limite pressione
InfinityLab Poroshell 120	1,9 µm	1.300 bar (19.500 psi)
InfinityLab Poroshell 120	2,7 µm, 4 µm	600 bar (9.000 psi)
ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD)	1,8 µm	1.300 bar (19.500 psi)
ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHT)	1,8 µm	600 bar (9.000 psi)
Tutte le altre ZORBAX, Pursuit, Polaris	3,0 µm, 3,5 µm, 5 µm, 10 µm	400 bar (6.000 psi)
Rx, Metasil, Monochrom, Microsorb	3,0 µm, 3,5 µm, 5 µm, 10 µm	400 bar (6.000 psi)

Consigli sull'utilizzo delle colonne

- Le colonne moderne sono strumenti resistenti, studiate per durare a lungo in condizioni cromatografiche normali. La durata delle colonne può essere prolungata rispettando le specifiche. Prima di utilizzare un metodo, controllare sempre le specifiche.
- Il flusso inverso non è di per sé dannoso per la colonna, dovrebbe tuttavia essere evitato a meno che venga utilizzato per sbloccare un frit intasato (vedere la sezione "Installazione" per le eccezioni).
- Utilizzare sempre reagenti purissimi e solvente di qualità cromatografica o superiore per preparare la fase mobile.
- Le prestazioni della colonna vengono compromesse se la colonna viene smontata.
- Le colonne nuove contengono una miscela di solventi organici. Per informazioni sulla composizione del solvente nella colonna, leggere il report QC sulle prestazioni della colonna. Evitare innanzitutto che solventi non miscibili con questi attraversino la colonna per non causare la formazione di un precipitato o di un'emulsione.
- Le colonne a fase normale Agilent sono compatibili con l'acqua e con tutti i comuni solventi organici.
- Si consiglia l'utilizzo di una precolonna per proteggere la colonna e prolungarne la durata.

- Il pH e la temperatura non devono essere elevati quando le colonne non vengono utilizzate.
- Utilizzare ciascuna colonna ai livelli di pH consigliati per la fase contenuta nella colonna (vedere pagina successiva). PH e temperatura non conformi ai parametri consigliati possono contribuire a ridurre la durata della colonna.

Consigli per risultati cromatografici ottimali

- Ottimizzare lo strumento riducendo al minimo la lunghezza dei tubi in modo da diminuire il volume extra colonna e la larghezza di banda. Utilizzare tubi rossi da 0,12 mm o tubi neri da 0,075 mm per colonne Fast LC/elevata efficienza. Per ulteriori informazioni sulle soluzioni capillari, consultare il sito **www.agilent.com/chem/lccapillaries**.
- Se si utilizzano colonne a fase normale, controllare che le guarnizioni del rotore e della pompa, i tubi e tutti gli altri componenti dello strumento LC siano compatibili con i solventi per fase normale.
- Controllare che la velocità di raccolta dei dati sia ottimale per la colonna. Utilizzare una velocità di raccolta più alta per le colonne Fast LC (InfinityLab Poroshell 120, RRHT e RRHD).
- Insieme agli strumenti LC, utilizzare lampade certificate da Agilent per ottenere risultati migliori.
- Utilizzare procedure di filtrazione o di preparazione dei campioni adatte al campione. Per ulteriori informazioni, visitare il sito **www.agilent.com/chem/sampleprep**.



*Se utilizzi le colonne InfinityLab Poroshell 120 o ZORBAX RRHT o RRHD, utilizza le pre-colonne **Fast Guard UHPLC** per proteggere le tue colonne analitiche. Consulta il sito **www.agilent.com/chem/fastguards** per maggiori informazioni.*

UTILIZZO DELLE COLONNE A FASE NORMALE

Tutte le colonne a fase normale vengono testate prima della consegna e sono fornite con eluente di prova per fase normale. Fanno eccezione le colonne ZORBAX Eclipse XDB-CN e InfinityLab Poroshell 120 EC-CN che vengono fornite con solventi per fase inversa e le colonne InfinityLab Poroshell 120 HILIC e ZORBAX HILIC Plus che vengono fornite con solventi HILIC. Le colonne ZORBAX Carbohydrate vengono fornite in acetonitrile. Prima dell'uso, è importante verificare che la colonna sia stata equilibrata correttamente per garantire riproducibilità da analisi ad analisi e prevenire variazioni nel tempo di ritenzione.

Parametri operativi per le colonne a fase normale: pH e temperatura

Fase	Parametro pH consigliato	Temperatura operativa max	Temperatura operativa consigliata
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN	da pH 2,0 a 8,0	60 °C	30 °C
ZORBAX Eclipse XDB-CN	da pH 1,0 a 9,0	60 °C	30 °C
ZORBAX CN	da pH 2,0 a 8,0	60 °C	30 °C
ZORBAX Carbohydrate	da pH 2,0 a 8,0	60 °C	30 °C
ZORBAX NH ₂	da pH 2,0 a 7,0	60 °C	30 °C
ZORBAX Rx-SIL, ZORBAX SIL	da pH 1,0 a 8,0	Sulla base dei limiti di temperatura della fase mobile	
Pursuit, Polaris, Metasil, Monochrom, Microsorb	da pH 2,0 a 8,0	60 °C	30 °C
InfinityLab Poroshell 120 HILIC, ZORBAX HILIC Plus	da pH 1,0 a 8,0	Sulla base dei limiti di temperatura della fase mobile	

Utilizzare le colonne ai valori limite di pH e temperatura può comprometterne la durata.

Nota: tutti i riempimenti in silice sono solubili in fasi mobili acquose a pH >6. Se si utilizzano colonne in silice a pH >6, è preferibile impostare temperature più basse (40 °C max) per prolungare la durata della colonna e utilizzare basse concentrazioni di tamponi (da 0,01 a 0,02 M).

Note sullo sviluppo dei metodi per colonne a fase normale

La fase stazionaria è in origine polare ed è pertanto preferibile utilizzarla con fasi mobili apolari, ad esempio miscele di cloruro di metilene/esano o isopropanolo/esano. Aumentare il quantitativo di componente polare in queste miscele riduce generalmente il tempo di ritenzione del campione.

Tipo colonna	Note sullo sviluppo del metodo
ZORBAX NH ₂ Polaris NH ₂	Sono necessari molti volumi di fase mobile per equilibrare la colonna dopo aver modificato la composizione della fase mobile. Il numero dei volumi di colonna necessari dipende dal sistema utilizzato. Possono essere richiesti da 50 a 100 volumi.
ZORBAX Rx-SIL ZORBAX SIL Pursuit XRs Si Polaris Si-A Microsorb Si	Le colonne in silice non legata sono tanto sensibili da riconoscere la presenza di acqua nei solventi e nel campione. È quindi importante mantenere uniformità al fine di garantire la riproducibilità del metodo. Se si utilizza l'eluizione a gradiente, è necessario variare i solventi primari e secondari con alcool o acetonitrile. Inoltre, almeno 30 volumi colonna di solvente devono fluire nella colonna al termine di ciascuna analisi. Quando si passa da un solvente a un altro, pulire innanzitutto la colonna utilizzando un solvente reciprocamente miscibile (ad es. alcool isopropilico).
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN ZORBAX Eclipse XDB-CN ZORBAX CN	Le colonne InfinityLab Poroshell 120 EC-CN e ZORBAX Eclipse XDB-CN sono fornite con solventi per fase inversa. Tuttavia, previa introduzione di isopropanolo, è possibile utilizzarle anche per fasi normali. La ritenzione diminuisce all'aumentare della polarità della fase mobile. Dati i veloci tempi di equilibrio di questa fase legata con la fase mobile, è spesso preferibile utilizzare questa colonna al posto di quella in silice, soprattutto se si opera con eluizione a gradiente.

Pulizia della colonna e prolungamento della durata: colonne a fase normale

Per la fase normale, si consiglia di utilizzare solventi organici. Utilizzare almeno 20 volumi di ciascun solvente nel caso di colonna analitica tradizionale (4,6 x 250 mm, 50 mL). Utilizzare questi solventi con forza crescente:

1. 50% metanolo: 50% cloroformio
2. 100% etilacetato

La pulizia di una colonna a fase normale può variare a seconda del tipo di campione. Se questi solventi non bastano, rivolgersi ad Agilent che consiglierà un solvente più efficace per l'applicazione e la matrice del campione specifici.

Consigli sulla conservazione: colonne a fase normale

In genere, le colonne a fase normale possono essere conservate a lungo nella propria fase mobile. Per evitare che il riempimento si asciughi, tappare bene le estremità prima di sistemare la colonna.

UTILIZZO DELLE COLONNE HILIC

HILIC è una tecnica utilizzata per la separazione degli analiti polari trattenuti inadeguatamente sulle colonne tipiche a fase inversa. Le colonne Agilent ZORBAX HILIC Plus e InfinityLab Poroshell 120 HILIC sono colonne in silice non legata, fornite con miscela di acetonitrile/acqua o acetonitrile, e possono essere da subito utilizzate per le separazioni HILIC. Le colonne ZORBAX Carbohydrate vengono fornite in acetonitrile e possono essere da subito utilizzate per la modalità HILIC. Come per le colonne a fase normale, le colonne HILIC richiedono tempi di equilibrio maggiori rispetto alle colonne a fase inversa. Ricordare che anche le colonne NH_2 , in silice non legata e CN possono essere utilizzate per applicazioni HILIC.

Per utilizzare tali colonne in modalità HILIC, introdurre prima l'alcool isopropilico.

Parametri operativi per le colonne HILIC

Nome colonna	Intervallo pH	Temperatura massima	Temperatura consigliata
ZORBAX HILIC Plus InfinityLab Poroshell 120 HILIC	da pH 1,0 a 8,0	40 °C	30 °C
ZORBAX Carbohydrate	da pH 2,0 a 8,0	40 °C	30 °C

Utilizzare le colonne ai valori limite di pH e temperatura può comprometterne la durata.

Note sullo sviluppo del metodo HILIC

ZORBAX HILIC Plus InfinityLab Poroshell 120 HILIC	Nella maggior parte dei casi, il metodo HILIC serve all'analisi di composti polari non trattenuti o trattenuti solo parzialmente sulle colonne a fase inversa. Equilibrare la colonna con il 30/40% di acqua in acetonitrile prima dell'uso. Per l'equilibratura possono servire da 20 a 50 volumi colonna. Una tipica fase mobile è rappresentata da una miscela di acetonitrile/acqua con tampone acetato o formiato 5-10 mM. Aumentando la concentrazione del tampone è possibile migliorare la forma del picco e la ritenzione. Diminuendo la percentuale di fase acquosa tamponata si aumenta la ritenzione.
---	---

All'aumentare del contenuto di acetonitrile della fase mobile, la risoluzione degli zuccheri può migliorare con un parallelo aumento del tempo di analisi. L'intervallo tipico per la fase mobile è compreso tra 60% e 75% di acetonitrile. La risoluzione può essere migliorata se la temperatura della colonna è superiore alla temperatura ambiente. Il funzionamento a 30 °C o 35 °C può migliorare la risoluzione di una miscela di carboidrati.

Indicazioni sul funzionamento: HILIC

- Le colonne HILIC Agilent sono fornite con una miscela di acetonitrile/acqua o acetonitrile.
- Le colonne HILIC Agilent sono compatibili con l'acqua e con tutti i comuni solventi organici.
- Tutte le colonne in silice sono solubili in fasi mobili acquose a pH >6. La silice è più solubile ad alte temperature. L'utilizzo delle colonne con pH >6 e temperatura superiore a 40 °C ne riduce la durata.

Pulizia della colonna e prolungamento della durata: colonne HILIC

Prima di effettuare l'iniezione nella colonna, è necessario filtrare i campioni. Questa procedura è fondamentale per la colonna ZORBAX RRHD HILIC, poiché il frit in entrata è nominalmente di $0,5\text{ }\mu\text{m}$ e i campioni devono essere filtrati utilizzando un filtro da $0,2\text{ }\mu\text{m}$. Se il flusso del solvente sembra ostacolato (raramente si hanno alti valori di contropressione), verificare che ad ostruire il flusso del solvente non vi siano ostruzioni fino all'ingresso della colonna. Se l'ostruzione è prima della colonna, sostituire la parte di tubo o di filtro ostruita. Se la colonna è ostruita, è possibile invertire il flusso della colonna InfinityLab Poroshell 120 HILIC utilizzando 20-30 volumi colonna di fase mobile. Il flusso della colonna RRHD HILIC non può invece essere invertito. Per rimuovere materiali ostruenti dalla colonna, spurgare utilizzando un solvente più forte, che in modalità HILIC è l'acqua.

Consigli sulla conservazione: colonne HILIC

Per conservare a lungo le colonne HILIC si consiglia di utilizzare acetonitrile/acqua come solvente (95:5). Prima di passare al solvente per la conservazione, è necessario pulire la colonna utilizzando la miscela di acetonitrile/acqua (60:40) e rimuovere i composti ostruenti. Per evitare che il riempimento si asciughi,appare bene le estremità prima di sistemare la colonna. Le colonne possono essere conservate nelle maggior parte della fasi mobili HILIC per brevi periodi. Tuttavia, per proteggere il materiale, è preferibile rimuovere i sali dallo strumento e dalla colonna spurgando la colonna con la stessa fase mobile senza tampone utilizzando ad esempio 90:10 ACN:H₂O per rimuovere una fase mobile con tampone formiato 90:10 ACN:0,01M. Il processo di riequilibrio è più veloce con la fase mobile originale se si utilizza questa soluzione, tuttavia sono necessarie varie iniezioni (da 3 a 6) per controllare che la colonna sia ben equilibrata.

この冊子には、すべての ZORBAX、Pursuit、Polaris 順相カラムおよび HILIC カラムに関する一般情報が記載されています。最初の部分には、順相カラムと HILIC カラムの両方に当てはまる情報が記載されています。一部のメソッドパラメータとカラムのメンテナンス手順は、HILIC カラムと順相カラムで異なるため、これらの情報は最後の部分に別に記載されています。お使いのカラムまたはファミリーに関する追加情報については、[agilent.com/chem/columnchoices](https://www.agilent.com/chem/columnchoices) を参照してください。

はじめに

Agilent のすべてのカラムには、QC カラムパフォーマンスレポート（テストクロマトグラムを含む）が付属しています。QC テスト機器は、余分のカラム体積を最小化するように標準のシステムから変更（最適化）されているため、現在お使いのシステムとは異なる可能性があります。これは、カラムの評価を精密化することで、製品の一貫性を向上させるためです。LC システムは小体積のカラムに最適化されており、QC パフォーマンスレポートのクロマトグラムと同様の結果を生成します。

据付

- フローの方向はカラム上に記載されています。
- **HPLC** のカラムは、カラムに記されたフロー方向でのみ使用できます。
- Poroshell 120 カラムは、カラムのクリーニングの際に逆のフロー方向で使用できます。Poroshell 120 カラムの出口のフリットサイズは注入口側より小さいため、目詰まりが起こりやすくなっています。
- Agilent では、600 bar までのカラムに対してポリケトンフィッティング（部品番号 5067-8957）の使用を推奨しています。1200 bar 耐圧フィッティング（部品番号 5067-4733）は、低圧から 1200 bar の UHPLC 圧力までのすべてのアプリケーションに使用できます。

すべての LC カラムに関する重要な安全上の注意点

- LC システムでは、すべての接続部で漏れが生じる可能性があります。このため、移動相の毒性や可燃性に注意が必要です。
- カラム充填剤は微粒子のため、エンドフィッティングを外すと吸い込むおそれがあります。カラムを開く作業は換気のよい場所で行ってください（お勧めしません）。
- 各カラムに指定された動作圧力の制限値を必ず守ってください（次ページのチャートを参照）。制限値を超えると、カラムが劣化します。また、継手部分からの液もれ等、危険が生じたりするおそれがあります。

最大動作圧力 - 内径 9.4 mm 以下のカラム

カラムタイプ	粒子径	圧力上限
ZORBAX NH ₂	5 μm、7 μm	400 bar (6,000 psi)
ZORBAX HILIC Plus	3.5 μm	
ZORBAX Rx-SIL	5 μm	
ZORBAX SIL	5 μm、7 μm	
ZORBAX CN	5 μm、7 μm	
ZORBAX Eclipse XDB-CN	3.5 μm、5 μm、7 μm	
ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD) HILIC Plus	1.8 μm	1200 bar (17,000 psi)
ZORBAX RRHT Rx-Sil	1.8 μm	600 bar (9,000 psi)
Polaris NH ₂	3 μm、5 μm	400 bar (6,000 psi)
Polaris Si-A	3 μm、5 μm、10 μm	400 bar (6,000 psi)
Pursuit XRs-Si	3 μm、5 μm、10 μm	400 bar (6,000 psi)
Poroshell 120 EC-CN Poroshell 120 HILIC	2.7 μm	600 bar (9,000 psi)

カラム使用のヒント

- 最近のカラムは堅牢であり、通常のクロマトグラフ条件で長期間動作するように設計されています。カラムの寿命を最大化するには、仕様の範囲内で使用するようにします。最終的なメソッドを適用する前に、必ず仕様を確認してください。
- 逆方向のフローは、カラムを損傷することは通常ありませんが、フリットの詰まりを解消する場合を除いて避けることをお勧めします（例外については「据付」を参照）。
- 移動相の準備には、高純度の試薬と、クロマトグラフィグレード以上の溶媒を必ず使用してください。
- カラムを分解するとカラムの性能が低下します。

- 新品のカラムには、有機溶媒の混合物が入っています。お使いのカラムの溶媒組成については、QC パフォーマンスレポートを参照してください。初めて使用する際には、沈殿や乳濁を生じるおそれがある移動相をカラムに通さないように注意してください。
- Agilent 順相カラムは、水および一般的な有機溶媒が使用できます。
- カラムを保護し、カラムの寿命を延ばすため、ガードカラムの使用を推奨します。
- カラムを保管する際には、高 pH および高温の環境を避けてください。
- このカラムは、必ず推奨されているカラム相 pH 範囲内で使用してください（次ページを参照）。推奨される pH 範囲および温度範囲の外で使用した場合、寿命が短くなるおそれがあります。

最善のクロマトグラフィ結果を得るためのヒント

- 機器を最適化するため、コンポーネントの間の配管をできるだけ短くして、余分なカラム体積を減らし、バンドの拡大を避けます。高速 LC / 高効率カラムには、内径 0.12 mm の赤い配管を使用します。キャピラリーオプションについては、[agilent.com/chem/lccapillaries](https://www.agilent.com/chem/lccapillaries) を参照してください。
- 順相カラムを使用する際には、LC 機器のローターシール、ポンプシール、配管、および他のすべてのコンポーネントが順相溶媒に対応していることを確認してください。
- 使用するカラムに合わせてデータサンプリングレートを最適化します。高速 LC カラム（Poroshell 120、RRHT、RRHD）の場合は、データサンプリングレートを高くします。
- LC 機器の性能を最大化するため、Agilent 認定のランプを使用します。
- サンプルに応じて、サンプル濾過やその他の適切なサンプル前処理を行います。詳細については、[agilent.com/chem/sampleprep](https://www.agilent.com/chem/sampleprep) を参照してください。

順相カラムでの作業

順相カラムはすべて出荷前にテストされており、順相テスト移動相が封入された状態で出荷されます。ただし、ZORBAX Eclipse XDB-CN、Poroshell 120 EC-CN、Poroshell 120 HILIC、ZORBAX HILIC Plus の各カラムは、逆相溶媒が封入された状態で出荷されます。使用前にカラムの適切な平衡化を行うことが必要です。これにより、分析間の再現性が高まり、リテンションタイムのドリフトを防ぐことができます。

順相カラムの動作パラメータ： pH および温度

相	推奨 pH 範囲	最大動作温度	推奨動作温度
ZORBAX NH ₂	pH 2.0 ~ 7.5	60 °C	30 °C
ZORBAX Rx-SIL ZORBAX SIL Poroshell 120 HILIC*† ZORBAX HILIC Plus*†	pH 1.0 ~ 8.0	移動相の温度 制限のみに依 存	
ZORBAX CN	pH 2.0 ~ 8.0	60 °C	30 °C
ZORBAX Eclipse XDB-CN*	pH 2.0 ~ 9.0	60 °C	30 °C
Polaris NH ₂	pH 2.0 ~ 8.0	60 °C	30 °C
Polaris Si-A	pH 1.5 ~ 10.0	60 °C	30 °C
Pursuit XRs Si	pH 2.0 ~ 8.0	60 °C	30 °C
Poroshell 120 EC-CN*	pH 2.0 ~ 8.0	60 °C	30 °C

* 逆相溶媒が封入された状態で出荷。

† 詳細については「HILICでの作業」を参照。

pH および温度範囲の両端付近での動作は、カラムの寿命を大幅に縮める原因となります。

注意：シリカベースの充填剤は、 $\text{pH} > 6$ の水性移動相で劣化が早まります。 $\text{pH} > 6$ でシリカベースのカラムを使用する場合、カラムの寿命を最大化するには、低温（ 40°C 以下）で、 $0.01 \sim 0.02 \text{ M}$ の範囲の低濃度のバッファーを使用してください。

順相カラムのメソッド開発に関する注意

固定相はその性質上極性があり、極性のない移動相（塩化メチレン／ヘキサン混合物、イソプロパノール／ヘキサン混合物など）と組み合わせて使用するのが最善です。一般的に、混合物の極性成分が増えると、サンプルのリテンションタイムは短くなります。

カラムタイプ	メソッド開発に関する注意
ZORBAX NH_2 Polaris NH_2	移動相の極性が高いほどリテンションは減少します。 移動相の組成を変更した場合、平衡化を達成するにはカラム体積の何倍もの移動相が必要です。必要な量は使用しているシステムによって異なりますが、最大でカラム体積の 50 ～ 100 倍に達することがあります。
ZORBAX Rx-SIL ZORBAX SIL Pursuit XRs Si Polaris Si-A	非結合シリカカラムは溶媒やサンプル中の微量の水にもきわめて敏感なので、メソッドの再現性を高めるには一貫性を維持するよう注意が必要です。グラジェント溶出を使用する場合、プライマリとセカンダリの両方の溶媒をアルコールまたはアセトニトリルで調整し、1 回の実行が終了するたびにカラムの 30 倍以上の溶媒をカラムに通す必要があります。 溶媒を切り替える場合、先にイソプロピルアルコールなどの相互に混和性のある溶媒でカラムをすすぐ必要があります。
Poroshell 120 EC-CN ZORBAX Eclipse XDB-CN ZORBAX CN	Poroshell 120 EC-CN および ZORBAX Eclipse XDB-CN カラムは逆相溶媒入りで出荷されていますが、イソプロパノールでフラッシュすることにより、順相アプリケーションにも使用できます。 移動相の極性が高いほどリテンションは減少します。 この結合相は移動相と短時間で平衡化するため、このカラムは、特にグラジェント溶出の場合、シリカカラムよりも便利です。

カラムのクリーニング／カラム寿命の向上： 順相カラム

順相の場合、有機溶媒の使用を推奨します。カラムが一般的な分析用 4.6×250 mm、50 mL の場合、カラム体積の 20 倍以上の溶媒を使用します。溶媒は、次のように強度が低いものから順に試します。

1. 50% メタノール : 50% クロロフォルム
2. 100% エチルアセテート

順相モードで使用するカラムのクリーニングは、サンプルタイプによって異なる可能性があります。これらの溶媒でうまく行かない場合は、Agilent にお問い合わせいただければ、アプリケーションとサンプルマトリックスに応じてより効果的な溶媒を提案いたします。

保管に関する注意事項：順相カラム

順相カラムを長期間保管する場合は、移動相それ自体を保管に使用します。カラムの保管の前に、充填剤の乾燥を避けるため、終端フィッティングに終端プラグをしっかりとはめ込む必要があります。

HILIC カラムでの作業

HILIC は、通常の逆相カラムでは保持が不十分な極性検体の分離に使用される方法です。Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD) HILIC Plus カラムおよび Poroshell 120 HILIC カラムは、非結合シリカカラムで、アセトニトリル／水混合物またはアセトニトリルが封入され、HILIC 分離にすぐに使用できる状態で出荷されます。順相カラムと同様、HILIC カラムは逆相カラムよりも平衡化に時間がかかります。ZORBAX Rx-Sil、ZORBAX Sil、ZORBAX NH₂ カラムは、HILIC アプリケーションにも使用できます。これらのカラムを HILIC モードに切り替えるには、イソプロピルアルコールでフラッシュします。

HILIC カラムの動作パラメータ：

カラム名	pH 範囲	最大温度	推奨温度
ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD) HILIC Plus ZORBAX HILIC Plus HPLC Poroshell 120 HILIC	pH 1.0 ~ 8.0	40 °C	30 °C

pH および温度範囲の両端付近での動作は、カラムの寿命を大幅に縮める原因となります。

HILIC メソッド開発に関する注意：

ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD) HILIC Plus Poroshell 120 HILIC	最も一般的な HILIC アプリケーションは、逆相カラムでは保持が不可能または不十分な極性化合物の分析用です。 アセトニトリルに 30 ~ 40% の水を混合したもので使用前にカラムを平衡化するのが最善です。 平衡化にはカラム体積の 20 ~ 50 倍が必要な場合があります。 一般的な移動相としては、アセトニトリル／水混合物に 5 ~ 10 mM のアセテートまたはギ酸塩バッファーを加えたものが用いられます。バッファー濃度を上げると、ピーク形状とリテンションが改善される可能性があります。リテンションを増やすには、水／バッファー成分を減らします。
---	---

動作の指針：HILIC

- Agilent HILIC カラムは、アセトニトリル／水混合物またはアセトニトリルが封入された状態で出荷されます。
- Agilent HILIC カラムは、水および一般的な有機溶媒が使用できます。
- シリカは、 $\text{pH} > 6$ の水性移動相で劣化が早まります。また、シリカは高温でも劣化が早まります。ZORBAX RRHD HILIC Plus または Poroshell 120 HILIC カラムを pH 6 および 40 °C 以上で使用すると、カラムの寿命が短くなります。

カラムのクリーニング／カラム寿命の向上： HILIC カラム

サンプルはカラムに注入する前に濾過してください。これは特に ZORBAX RRHD HILIC Plus カラムに対して重要です。カラム注入口フリットが公称 $0.5\ \mu\text{m}$ なので、サンプルは $0.2\ \mu\text{m}$ のサンプルフィルターで濾過する必要があります。溶媒フローが制限されているように見える（カラムのバック圧力が異常に高い）場合、カラム注入口までの溶媒フローに障害がないことをまず確認してください。カラムの前で制限が生じている場合は、配管またはフィルターの詰まっている部品を交換します。カラムが詰まっている場合、Poroshell 120 HILIC はカラム体積の 20 ～ 30 倍の移動相でバックフラッシュできます。RRHD HILIC カラムはバックフラッシュできません。カラムに強固に付着している物質を除去するには、強力な溶媒（HILIC モードでは水）でカラムをフラッシュします。

保管に関する注意事項：HILIC カラム

HILIC カラムの長期保管用溶媒には、アセトニトリル／水混合物（95:5）を推奨します。強固に付着している物質がある場合は、保管用溶媒に切り替える前に、アセトニトリル／水混合物（60:40）でカラムをフラッシュして取り除きます。カラムの保管の前に、充填剤の乾燥を避けるため、終端フィッティングに終端プラグをしっかりとはめ込む必要があります。短期間であれば、カラムはほとんどの HILIC 移動相の中で安全に保管できます。ただし、機器を保護するため、バッファーを含まない同じ移動相でカラムをパージして、機器とカラムから塩を除去することをお勧めします（たとえば、90:10 の ACN:0.01 M ギ酸塩バッファ入り移動相を除去するには、90:10 の ACN:H₂O を使用します）。この方法では、同じ移動相により再平衡化時間を短縮できますが、カラムの平衡化を確認するため、複数回（3 ～ 6 回）の注入を行う必要があります。

本小册子提供适用于所有 ZORBAX、Pursuit 和 Polaris 正相和 HILIC 色谱柱的一般信息。开始部分介绍有关正相和 HILIC 色谱柱的信息。因为某些方法参数和色谱柱维护说明对于 HILIC 和正相色谱柱而言是不同的，所以在最后几页里将分别介绍这些部分。有关特定色谱柱或系列的其他信息，请参见

[agilent.com/chem/columnchoices](https://www.agilent.com/chem/columnchoices)

入门指南

每个 Agilent 色谱柱都附带一个 QC 色谱柱性能报告，该报告包含一个测试色谱图。QC 测试仪器是在标准仪器基础上改装（优化）而成的，它极大减少了柱外体积，因此，它与实验室中使用的系统不同。这样可以更好地评估色谱柱并确保获得更一致的产品。优化液相系统的柱外体积并使其尽可能小，将生成与 QC 性能报告中的色谱图相似的结果。

安装

- 在色谱柱上标明了流向。
- 只能按色谱柱上标记的流向操作 1.8 μm 色谱柱（ZORBAX RRHT、ZORBAX RRHD）。
- 在清洗色谱柱时，可在反向流向上操作 Poroshell 120 色谱柱。Poroshell 120 色谱柱出口处的滤芯比入口处的滤芯小，可以容易地塞进去。
- Agilent 建议对最高耐压为 600 bar 的色谱柱使用聚酮接头（部件号 5042-8957）。最高耐压为 1200bar 的可拆卸接头（部件号 5067-4733）可适合于所有的应用，不论使用低压还是最高为 1200 bar 的 UHPLC 压力。

所有 LC 色谱柱的重要安全注意事项

- LC 系统中的所有连接点都有可能成为泄漏源。用户应注意流动相的毒性和可燃性。
- 柱填充物在干的情况下属于微小颗粒，因此可能会被吸入呼吸道。只能在通风良好的区域打开色谱柱。
- 请遵照为每个色谱柱标明的操作压力限制进行操作（请参见下一页表格）。超过这些限制会降低色谱性能，而且很不安全。

最大操作压力 – 内径最大为 9.4 毫米的色谱柱

色谱柱类型	颗粒尺寸	压力限制
ZORBAX NH ₂	5 µm、7 µm	400 bar (6,000 psi)
ZORBAX HILIC Plus	3.5 µm	
ZORBAX Rx-SIL	5 µm	
ZORBAX SIL	5 µm、7 µm	
ZORBAX CN	5 µm、7 µm	
ZORBAX Eclipse XDB-CN	3.5 µm、5 µm、7 µm	
Zorbax RRHD HILIC Plus	1.8 µm	1200 bar (17,000 psi)
ZORBAX RRHT Rx-Sil	1.8 µm	600 bar (9,000 psi)
Polaris NH ₂	3 µm、5 µm	400 bar (6,000 psi)
Polaris Si-A	3 µm、5 µm、10 µm	400 bar (6,000 psi)
Pursuit XRs-Si	3 µm、5 µm、10 µm	400 bar (6,000 psi)
Poroshell 120 EC-CN Poroshell 120 HILIC	2.7 µm	600 bar (9,000 psi)

色谱柱用法提示

- 现今色谱柱结实耐用，可在正常色谱条件下工作较长时间。在色谱柱参数范围内运行可使其达到最长使用寿命。在最终方法中使用时应注意查看柱参数。
- 虽然反冲一般不会损坏色谱柱，但还是应避免，除非是在尝试取出堵住的塞板时（请参见“安装”以了解例外情况）。
- 始终使用高纯度试剂和色谱级或更高级别的溶剂来作为流动相。
- 拆卸色谱柱会降低色谱柱性能。

- 新色谱柱包含有机溶剂混合物。请参见QC性能报告，了解色谱柱中的溶剂成分。开始时，应小心不要让任何可能导致形成沉淀或胶状的流动相通过色谱柱。
- Agilent 正相色谱柱与水 and 所有常见的有机溶剂兼容。
- 建议使用保护柱来保护色谱柱并延长其使用寿命。
- 在不使用色谱柱时，不能在 pH 值较高或升高的温度条件下保存色谱柱。
- 避免在超出建议的色谱柱相位的 pH 值范围的条件下使用此色谱柱（请参见下一页）。在超出建议的 pH 值和温度范围条件下操作会缩短其使用寿命。

获得最佳色谱结果的提示

- 尽可能缩短组件之间管线的长度，以减少柱外体积和谱带扩展，从而优化仪器。对快速 LC/高效色谱柱，请使用内径为 0.12 毫米的红色管线。有关毛细管选件，请访问 agilent.com/chem/lccapillaries。
- 使用正相色谱柱时，应确保 LC 仪器的转子密封垫、泵密封垫、管线以及所有其他组件都与正相溶剂兼容。
- 确保针对色谱柱优化了数据采集速率。对快速 LC 色谱柱（Poroshell 120、RRHT 和 RRHD）使用较高的采集速率。
- 在 LC 仪器中使用 Agilent 认证的灯，以获得最佳性能。
- 根据样品使用适当的样品过滤或其他样品准备方法。要了解详细信息，请访问 agilent.com/chem/sampleprep

使用正相色谱柱

每个正相色谱柱在装运之前都经过了测试，并放在正相测试洗脱液中运输，但 ZORBAX Eclipse XDB-CN、Poroshell 120 EC-CN、Poroshell 120 HILIC 和 ZORBAX HILIC Plus 色谱柱除外，这些色谱柱放在反相溶剂中运输。应小心确保在使用色谱柱之前对其进行了彻底的平衡。这样可确保分析的重复性，并有助于防止保留时间漂移。

正相色谱柱操作参数：pH 值和温度

相位	建议的 pH 值范围	最高操作温度	建议的操作温度
ZORBAX NH ₂	pH 2.0 至 7.5	60 °C	30 °C
ZORBAX Rx-SIL ZORBAX SIL Poroshell 120 HILIC*† ZORBAX HILIC Plus*†	pH 1.0 至 8.0	仅受流动相温度限值的限制	
ZORBAX CN	pH 2.0 至 8.0	60 °C	30 °C
ZORBAX Eclipse XDB-CN*	pH 2.0 至 9.0	60 °C	30 °C
Polaris NH ₂	pH 2.0 至 8.0	60 °C	30 °C
Polaris Si-A	pH 1.5 至 10.0	60 °C	30 °C
Pursuit XRs Si	pH 2.0 至 8.0	60 °C	30 °C
Poroshell 120 EC-CN*	pH 2.0 至 8.0	60 °C	30 °C

*在反相溶剂中运输。

†要了解更多信息，请参见“使用 HILIC”部分。

在 pH 值和温度的极端条件下操作会对色谱柱的使用寿命产生重大影响。

注意：所有硅胶基质填料在 $\text{pH} > 6$ 含水流动相中具有一定的可溶性。在 $\text{pH} > 6$ 的环境下使用硅基色谱柱时，应该使用范围在 0.01 至 0.02 M 的较低缓冲液浓度，以及较低温度下（最高为 40 °C），这样可获得最佳色谱柱使用寿命。

正相色谱柱方法开发说明

固定相本质上是有极性的，最适合与非极性流动相结合使用，如二氯甲烷/己烷或异丙醇/己烷混合物。增加这些混合物的相比比例通常会缩短样品的保留时间。

色谱柱类型	方法开发说明
ZORBAX NH_2 Polaris NH_2	保留时间随着流动相极性的增大而缩短。 在流动相成份发生变化后，需要许多个色谱柱体积的流动相才能达到平衡。所需的色谱柱体积数量取决于所使用的系统，最高为 50 至 100 个色谱柱体积。
ZORBAX Rx-SIL ZORBAX SIL Pursuit XRs Si Polaris Si-A	非键合硅胶基质色谱柱对溶剂和样品中痕量的水非常敏感，因此在使用时必须小心，这样才能保持方法重复性的一致性。在使用梯度洗脱时，应使用酒精或乙腈对主要溶剂和辅助溶剂进行改性，并且在每次运行完成后，应至少允许 30 个色谱柱的溶剂流过色谱柱。 在溶剂之间转换时，首先使用互溶溶剂冲洗色谱柱，如异丙醇。
Poroshell 120 EC-CN ZORBAX Eclipse XDB-CN ZORBAX CN	Poroshell 120 EC-CN 和 ZORBAX Eclipse XDB-CN 色谱柱是放在反相溶剂中运输的，在使用异丙醇冲洗之后，也可以在正相应用中使用它们。 保留时间随着流动相极性的增大而缩短。 该键合相能够与流动相进行快速平衡，因此使用此色谱柱通常比硅胶基质色谱柱更方便，尤其是在进行梯度洗脱时。

清洁您的色谱柱/延长色谱柱使用寿命：正相色谱柱

对于正相，我们建议使用有机溶剂。至少使用每种溶剂的 20 个色谱柱体积，假设色谱柱为典型的分析柱，体积为 4.6 x 250 mm，50 mL。按浓度增加的顺序尝试使用下列溶剂：

1. 50% 甲醇：50% 氯仿
2. 100% 乙酸乙酯

是否清洗在正相模式中使用的色谱柱取决于样品类型。如果这些溶剂不起作用，请与 Agilent 联系，我们将推荐对您的应用和样品基质更有效的溶剂。

存放建议：正相色谱柱

将正相色谱柱放在自己的流动相中通常可存放较长时间。在存放色谱柱之前，应使用堵头盖住端接头，以防止填充物变干。

使用 HILIC 色谱柱

HILIC 是用于分离在典型反向色谱柱上留下的不足的极性分析物的方法。Agilent ZORBAX 快速分离高分辨率 (RRHD) HILIC Plus 色谱柱和 Poroshell 120 HILIC 色谱柱是非键合硅胶基质色谱柱，它们放在乙腈和水的混合物或乙腈中进行运输，可用于进行 HILIC 分离。与正相色谱柱相同，HILIC 色谱柱比反向色谱柱需要更长时间的平衡。请注意，ZORBAX Rx-Sil、ZORBAX Sil 和 ZORBAX NH₂ 色谱柱也可以用于 HILIC 应用。要将这些色谱柱改为 HILIC 模式，应首先使用异丙醇对其进行冲洗。

HILIC 色谱柱操作参数

色谱柱名称	pH 值范围	最高温度	建议的温度
ZORBAX 快速分离高分辨率 (RRHD) HILIC Plus ZORBAX HILIC Plus Poroshell 120 HILIC	pH 1.0 至 8.0	40 °C	30 °C

在 pH 值和温度的极端范围条件下操作会对色谱柱的缩短色谱柱的使用寿命。

HILIC 方法开发说明

ZORBAX 快速分离高分辨率 (RRHD) HILIC Plus Poroshell 120 HILIC	大多数常见的 HILIC 应用适用于对反相色谱柱上未保留或保留较小的极性化合物进行分析。 在使用色谱柱之前，最好使用含水量为 30-40% 的乙腈对色谱柱进行平衡。 平衡需要 20-50 个色谱柱体积。 典型的流动相是含 5-10 mM 醋酸盐或甲酸盐缓冲液的乙腈和水的混合物。增加缓冲液浓度可改善峰形，延长保留时间。降低水/缓冲液成份浓度可延长保留时间。
--	--

操作原则：HILIC

- Agilent HILIC 色谱柱一般存放乙腈和水的混合物或乙腈进行运输。
- Agilent HILIC 色谱柱与水 and 所有常见的有机溶剂兼容。
- 所有硅胶基质填料在 pH>6 含水流动相中具有一定的可溶性。硅胶基质填料的可溶性还会随着温度的升高而增大。如果在 pH 值大于 6，温度超过 40 °C 的条件下使用 ZORBAX RRHD HILIC Plus 或 Poroshell 120 HILIC 色谱柱，则会缩短色谱柱使用寿命。

清洁您的色谱柱/延长色谱柱使用寿命: HILIC 色谱柱

在将样品注入色谱柱之前必须对其进行过滤。这对 ZORBAX RRHD HILIC Plus 色谱柱尤其重要, 因为色谱柱入口筛板孔径通常为 $0.5\ \mu\text{m}$, 应使用 $0.2\ \mu\text{m}$ 的样品过滤器对样品进行过滤。如果溶剂流看起来受到限制 (色谱柱反压异常高), 应首先检查到色谱柱入口的溶剂是否畅通。如果在到达色谱柱之前受到限制, 则应更换被阻塞的管线段或过滤器。如果色谱柱被阻塞, 可使用 20-30 个色谱柱体积的流动相对 Poroshell 120 HILIC 进行反冲。不能对 RRHD HILIC 色谱柱进行反冲。要去除色谱柱中留下的顽固物质, 应使用强溶剂冲洗色谱柱, 在 HILIC 模式下, 就是使用水。

存放建议: HILIC 色谱柱

建议使用乙腈和水 (95:5) 的混合物作为长期存放 HILIC 色谱柱的溶剂。在转换到存放溶剂之前, 需要使用乙腈和水 (60:40) 的混合物冲洗色谱柱, 以去除留下的强保留化合物。在存放色谱柱之前, 应使用堵头堵住接头, 以防止填料变干。将色谱柱放在大多数 HILIC 流动相中可安全存放较短时间。然而, 为了保护设备, 应使用不含缓冲液的相同比例的流动相对色谱柱进行冲洗, 以从仪器和色谱柱中去除盐分 (例如, 使用 90:10 ACN:H₂O 去除 90:10 ACN:0.01M 含缓冲甲酸盐的流动相)。使用此方法时, 对原始流动相进行重新平衡的速度会加快, 但应进行多次 (3 至 6 次) 进样以确保色谱柱平衡。

В этом буклете приведены общие сведения обо всех колонках семейств ZORBAX, InfinityLab Poroshell 120, Pursuit и Polaris для нормально-фазовой хроматографии и хроматографии гидрофильных взаимодействий (HILIC). Вводная часть содержит сведения для колонок обоих типов: нормально-фазовых и HILIC. Некоторые параметры методик и инструкции по уходу за колонками HILIC отличаются от таковых для нормально-фазовых колонок. Поэтому соответствующие разделы, приведенные на нескольких последних страницах, разбиты по типам колонок. Подробная информация о конкретной колонке или семействе колонок: www.agilent.com/chem/columnchoices

Начало работы

Все колонки Agilent поставляются с сертификатом качества и рабочих характеристик, содержащим тестовую хроматограмму. Тестовое оборудование, применяемое при контроле качества, оптимизировано относительно стандартного оборудования путем сведения к минимуму внеколоночного объема, поэтому оно может отличаться от используемых в вашей лаборатории систем. Это позволяет лучше оценивать качество колонки и гарантирует изготовление колонок с более единообразными характеристиками. Результаты, выдаваемые системой жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), оптимизированной для работы с колонками малого объема, будут аналогичны приведенным на хроматограмме сертификата качества.

Установка

- Направление потока указано на колонке.
- При работе с колонками с размером частиц сорбента **1,8 мкм (ZORBAX RRHT и ZORBAX RRHD)** направление потока **обязательно должно совпадать с указанным на колонке.**
- При промывке колонок InfinityLab Poroshell 120 направление потока может быть противоположным. В колонках InfinityLab Poroshell 120 размер пор выходного пористого вкладыша меньше, чем у входного, поэтому они проще засоряются.
- Agilent рекомендует фитинги InfinityLab Quick Connect (5067-5961 для капилляров размером 0,075 x 105 мм) или фитинги Quick Turn (5067-5966) для обеспечения неизменно надежного соединения с колонкой. Для колонок, рассчитанных на давления до 600 бар, также могут использоваться поликетоновые фитинги (5042-8957).



Поликетоновый фитинг,
кат. № 5042-8957



Съемный фитинг Agilent,
рассчитанный на
давления до 1 200 бар,
кат. № 5067-4733



Фитинг Agilent Quick
Connect, кат. №
5067-5961

Важные сведения по безопасности для всех колонок для ЖХ

- Все точки соединений в системах ВЭЖХ являются потенциальными источниками утечек. Необходимо ознакомить пользователей с токсичными или огнеопасными свойствами подвижных фаз.
- Существует опасность вдыхания мелких частиц сухого наполнителя колонок. Открывайте колонки только в хорошо вентилируемой зоне.
- Не превышайте рабочее давление, указанное для каждой колонки (см. таблицу на следующей странице). Превышение этих ограничений снижает хроматографические характеристики и может быть опасным.

Максимальное рабочее давление: колонок с внутренним диаметром до 9,4 мм

Тип колонки	Размер частиц	Предельное давление
InfinityLab Poroshell 120	1,9 мкм	1 300 бар (19 500 фунтов на кв. дюйм)
InfinityLab Poroshell 120	2,7 мкм, 4 мкм	600 бар (9 000 фунтов на кв. дюйм)
ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD)	1,8 мкм	1 300 бар (19 500 фунтов на кв. дюйм)
ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHT)	1,8 мкм	600 бар (9 000 фунтов на кв. дюйм)
Все остальные колонки ZORBAX, Pursuit, Polaris	3 мкм, 3,5 мкм, 5 мкм, 10 мкм	400 бар (6 000 фунтов на кв. дюйм)
Rx, Metasil, Monochrom, Microsorb	3 мкм, 3,5 мкм, 5 мкм, 10 мкм	400 бар (6 000 фунтов на кв. дюйм)

Рекомендации по использованию колонок

- Современные колонки надежны и предназначены для длительного использования при нормальных условиях хроматографического эксперимента. Эксплуатация колонок в рамках указанных характеристик максимально продлевает срок их службы. Перед задействованием окончательной методики обязательно сверьтесь с характеристиками колонок.
- Хотя обычно обращение потока не опасно для колонок, избегайте его применения за исключением очистки засора пористого вкладыша (исключения см. в разделе «Установка»).
- Всегда используйте для приготовления подвижной фазы реагенты высшей степени очистки и растворители хроматографической степени чистоты или более чистые.
- Разборка колонки приведет к снижению ее рабочих характеристик.
- Новые колонки поставляются наполненными смесью органических растворителей. Состав растворителя указан в сертификате качества колонки. Приступая к использованию, следует избегать пропускания через колонку такой подвижной фазы, которая может вызвать выпадение осадка или образование эмульсии.
- Нормально-фазовые колонки Agilent совместимы с водой и всеми обычными органическими растворителями.

- Для защиты и увеличения срока службы аналитической колонки рекомендуется использовать предколонку.
- Не храните неиспользуемые колонки в среде с высокими значениями pH или в условиях повышенной температуры.
- Не используйте колонку за пределами рекомендованного для неподвижной фазы колонки диапазона pH (см. следующую страницу). Эксплуатация колонок при pH и температуре за пределами рекомендованных диапазонов может привести к сокращению их срока службы.

Советы для получения наилучших хроматографических результатов

- Оптимизируйте прибор путем максимального сокращения длины соединительных капилляров между компонентами хроматографического тракта. Это уменьшит внеколоночный объем и уширение пиков. Используйте капилляры с красной маркировкой с внутренним диаметром 0,12 мм или с черной маркировкой с внутренним диаметром 0,075 мм для колонок для скоростной ЖХ/ВЭЖХ. Подробнее об ассортименте капилляров: www.agilent.com/chem/lccapillaries.
- При использовании нормально-фазовых колонок убедитесь, что применяемые в установке ВЭЖХ роторные уплотнения, уплотнения насоса, капилляры и другие компоненты можно использовать с растворителями, применяемыми в нормально-фазовых методиках.
- Убедитесь, что частота сбора данных оптимально подобрана для используемой колонки. Установите повышенную частоту сбора данных при использовании колонок для скоростной ЖХ (InfinityLab Poroshell 120, RRHT и RRHD).
- В оборудовании для ВЭЖХ используйте сертифицированные лампы Agilent, обеспечивающие Оптимальные рабочие характеристики.
- Используйте подходящие для вашей пробы процедуры фильтрации или иные процедуры пробоподготовки. Подробнее: www.agilent.com/chem/sampleprep.



При использовании колонок InfinityLab Poroshell 120 или ZORBAX RRHT или RRHD используйте предколонки **Fast Guard для у ВЭЖХ** для защиты аналитической колонки. Для получения дополнительной информации см. www.agilent.com/chem/fastguards.

РАБОТА С НОРМАЛЬНО-ФАЗОВЫМИ КОЛОНКАМИ

Все нормально-фазовые колонки испытываются перед поставкой и доставляются потребителю в элюенте, который использовался для испытаний в нормально-фазовом режиме. Исключение составляют колонки ZORBAX Eclipse XDB-CN и InfinityLab Poroshell 120 EC-CN, которые поставляются в растворителях для обращенно-фазовой хроматографии, и колонки InfinityLab Poroshell 120 HILIC и ZORBAX HILIC Plus, которые поставляются в растворителях для хроматографии гидрофильных взаимодействий (HILIC). Колонки ZORBAX для анализа углеводов поставляются в ацетонитриле. Перед использованием колонки необходимо обязательно убедиться, что она уравновешена надлежащим образом. Это обеспечивает воспроизводимость результатов анализа и предотвращает дрейф времен удерживания.

Рабочие параметры нормально-фазовых колонок: диапазон pH и температура

Неподвижная фаза	Рекомендованный диапазон pH	Максимальная рабочая температура	Рекомендованная рабочая температура
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN	pH от 2,0 до 8,0	60 °C	30 °C
ZORBAX Eclipse XDB-CN	pH от 1,0 до 9,0	60 °C	30 °C
ZORBAX CN	pH от 2,0 до 8,0	60 °C	30 °C
ZORBAX Carbohydrate	pH от 2,0 до 8,0	60 °C	30 °C
ZORBAX NH ₂	pH от 2,0 до 7,0	60 °C	30 °C
ZORBAX Rx-SIL, ZORBAX SIL	pH от 1,0 до 8,0	Ограничивается только температурными пределами подвижной фазы	
Pursuit, Polaris, Metasil, Monochrom, Microsorb	pH от 2,0 до 8,0	60 °C	30 °C
InfinityLab Poroshell 120 HILIC, ZORBAX HILIC Plus	pH от 1,0 до 8,0	Ограничивается только температурными пределами подвижной фазы	

Работа при предельных значениях pH и температуры значительно сокращает срок службы колонки.

Примечание. Все сорбенты на основе силикагеля растворимы в определенной степени в водных подвижных фазах с pH >6. При использовании колонок на основе силикагеля в среде со значениями pH >6 наибольший срок службы обеспечивается при пониженных температурах (не более 40 °C) и использовании низких концентраций буферных веществ в диапазоне от 0,01 до 0,02 М.

Советы по разработке методик анализа для нормально-фазовых колонок

Неподвижная фаза по своей природе является полярной, и ее лучше всего использовать с неполярными подвижными фазами, такими как смеси гексана с дихлорметаном или гексана с изопропанолом. Увеличение доли полярного компонента в этих смесях обычно уменьшает время удерживания компонентов пробы.

Тип колонки	Советы по разработке методик
ZORBAX NH ₂ Polaris NH ₂	Для уравнивания, необходимого после изменения состава подвижной фазы, требуется промывка подвижной фазой в количестве, многократно превосходящем объем колонки. Число расходуемых объемов колонки зависит от используемой системы и может достигать 50-100.
ZORBAX Rx-SIL ZORBAX SIL Pursuit XRs Si Polaris Si-A Microsorb Si	Колонки на основе непривитого силикагеля очень чувствительны к следовым количествам воды в растворителях и пробе, поэтому для обеспечения воспроизводимости результатов необходимо тщательно следить за постоянством состава. При использовании градиентного элюирования как исходный, так и конечный растворитель необходимо модифицировать спиртом или ацетонитрилом. После выполнения каждого анализа следует пропустить через колонку растворитель в количестве не менее 30 объемов колонки. При смене растворителей сначала следует промыть колонку растворителем, который смешивается с ними обоими, таким как изопропиловый спирт.
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN ZORBAX Eclipse XDB-CN ZORBAX CN	Колонки InfinityLab Poroshell 120 EC-CN и ZORBAX Eclipse XDB-CN поставляются в растворителях для обращенно-фазовой хроматографии, но после промывки изопропанолом могут применяться и в нормально-фазовом режиме. Время удерживания уменьшается при возрастании полярности подвижной фазы. За счет быстрого уравнивания этой привитой фазы с подвижной фазой такие колонки часто более удобны в использовании, чем колонки с непривитым силикагелем, особенно при градиентном элюировании.

Промывка и продление срока службы колонок: нормально-фазовые колонки

Для нормально-фазовых колонок рекомендуется использовать органические растворители. Для каждого растворителя используйте не менее 20 объемов колонки (50 мл для обычной аналитической колонки размерами 4,6 x 250 мм). Рекомендуются следующие растворители в порядке увеличения элюирующей силы:

1. метанол/хлороформ (50:50)
2. этилацетат (100%)

Способ промывки колонки, используемой в нормально-фазовом, зависит от типа пробы. Если указанные растворители не работают, обратитесь в Agilent за рекомендациями по растворителям, которые могут быть более эффективными для задачи и конкретных проб.

Рекомендации по хранению: нормально-фазовые колонки

Нормально-фазовые колонки обычно могут длительное время храниться в собственной подвижной фазе. Перед направлением колонки на хранение концевые фитинги должны быть тщательно закрыты заглушками для предотвращения высыхания сорбента.

Работа с колонками для хроматографии гидрофильных взаимодействий (HILIC)

Хроматография гидрофильных взаимодействий — это способ разделения полярных аналитов, недостаточно удерживаемых на обычных обращенно-фазовых колонках. Колонки Agilent ZORBAX HILIC Plus и InfinityLab Poroshell 120 HILIC являются колонками на основе непривитого силикагеля; они поставляются в смеси ацетонитрила и воды или в ацетонитриле и готовы для разделения в режиме хроматографии гидрофильных взаимодействий. Колонки ZORBAX для анализа углеводов поставляются в ацетонитриле и также готовы для использования в режиме хроматографии гидрофильных взаимодействий. Как и нормально-фазовые колонки, колонки HILIC требуют более тщательного уравнивания по сравнению с обращенно-фазовыми колонками. Колонки на основе аминной привитой фазы, непривитого силикагеля и нитрильной привитой фазы также можно использовать в методиках хроматографии гидрофильных взаимодействий. Для перевода этих колонок в режим хроматографии гидрофильных взаимодействий их сначала следует промыть изопропиловым спиртом.

Рабочие параметры колонок HILIC

Наименование колонки	Диапазон pH	Максимальная температура	Рекомендованная температура
ZORBAX HILIC Plus InfinityLab Poroshell 120 HILIC	pH от 1,0 до 8,0	40 °C	30 °C
ZORBAX Carbohydrate	pH от 2,0 до 8,0	40 °C	30 °C

Работа при предельных значениях pH и температуры значительно сокращает срок службы колонки.

Советы по разработке методик в режиме хроматографии гидрофильных взаимодействий

ZORBAX HILIC Plus InfinityLab Poroshell 120 HILIC	Чаще всего методики хроматографии гидрофильных взаимодействий применяются для анализа полярных соединений, которые не удерживаются или плохо удерживаются на обращенно-фазных колонках. Уравновешивание колонок перед использованием лучше всего выполнять 30-40% раствором воды в ацетонитриле. Для уравновешивания может потребоваться от 20 до 50 объемов колонки. Обычной подвижной фазой является смесь ацетонитрила с ацетатным или формиатным буфером концентрацией 5-10 мМ. Повышение концентрации буфера может улучшить форму пика и характеристики удерживания. Уменьшение доли водного буферного раствора в элюенте приводит к усилению удерживания.
---	---

По мере повышения содержания ацетонитрила в подвижной фазе может улучшиться разрешение сахаров, что сопряжено с увеличением времени анализа. Стандартным диапазоном составов подвижной фазы является содержание 60-75% ацетонитрила. Улучшение разрешения может быть достигнуто при температуре колонки выше комнатной. Работа при 30 °C или 35 °C может обеспечить лучшее разрешение смеси углеводов.

Руководство по работе: HILIC

- Колонки Agilent HILIC поставляются заполненными ацетонитрилом или смесью ацетонитрила с водой.
- Колонки Agilent HILIC совместимы с водой и всеми обычными органическими растворителями.
- Все силикагели растворимы в определенной степени в водных подвижных фазах с pH >6. Растворимость силикагеля также возрастает при повышении температуры. Использование колонок при pH более 6 и температуре выше 40 °C сокращает срок службы колонок.

Промывка и продление срока службы колонок: колонки HILIC

Пробы до введения в колонку должны быть профильтрованы. Это особенно важно для колонок ZORBAX RRHD HILIC Plus с входным пористым вкладышем с пористостью 0,5 мкм, то есть образцы следует пропустить через фильтр с порами 0,2 мкм. В случае ограничения потока растворителя (по причине повышения обратного давления) в первую очередь следует убедиться в беспрепятственном прохождении потока растворителя вплоть до входа в колонку. Если засоренный участок расположен до колонки, замените соответствующий засоренный капилляр или фильтр. Если засорена колонка, можно выполнить обратную промывку колонки InfinityLab Poroshell 120 HILIC подвижной фазой с расходом 20-30 объемов колонки. Колонки RRHD HILIC обратной промывке не подлежат. Чтобы удалить из колонки сильно удерживаемые вещества, промойте ее водой, которая для режима HILIC является сильным растворителем.

Рекомендации по хранению: колонки HILIC

В качестве раствора для длительного хранения колонок HILIC рекомендуется смесь ацетонитрила с водой в пропорции 95:5. Для удаления сильно удерживаемых соединений перед помещением колонок в раствор для хранения может потребоваться промывка колонок смесью ацетонитрила с водой в пропорции 60:40. Для предотвращения высыхания сорбента перед направлением колонок на хранение тщательно закройте концевые фитинги заглушками. Кратковременно хранить колонки можно в большинстве подвижных фаз для режима хроматографии гидрофильных взаимодействий. В целях защиты оборудования все же рекомендуется удалить соли из колонки и оборудования, промыв колонку той же подвижной фазой без буфера (например, используя смесь ацетонитрил: вода 90:10 для удаления подвижной фазы состава ацетонитрил:0,01 М формиатный буферный раствор 90:10. Этот подход позволяет быстрее проводить повторное уравнивание с исходной подвижной фазой, но для подтверждения уравнивания колонки следует сделать несколько вводов пробы (от 3 до 6).

Este folheto oferece informações gerais para todas as colunas ZORBAX, PURSUIT e Polaris de fase normal e HILIC. As seções iniciais incluem informações sobre as colunas de fase normal e HILIC. Como alguns parâmetros de método e instruções de cuidado são diferentes para as colunas HILIC e para as colunas de fase normal, essas seções são separadas nas últimas páginas. Para obter mais informações sobre uma linha ou uma coluna específica, acesse [**agilent.com/chem/columnchoices**](https://www.agilent.com/chem/columnchoices)

Início

Cada coluna Agilent vem com um relatório de QC do desempenho da coluna, que inclui um cromatograma de teste. Um instrumento padrão foi modificado (otimizado) para gerar um instrumento de teste de QC que minimiza o volume extracoluna, portanto ele pode diferir do sistema utilizado em seu laboratório. Isso permite avaliar melhor a coluna e garantir uma maior consistência do produto. Um sistema de LC, otimizado para colunas de baixo volume, irá gerar resultados semelhantes aos do cromatograma do relatório de QC de desempenho.

Instalação

- A direção do fluxo é indicada na coluna.
- **As colunas de 1.8 μ m (ZORBAX RRHT, ZORBAX RRHD) só podem ser operadas na direção do fluxo indicada na coluna.**
- As colunas Poroshell 120 podem ser operadas na direção de fluxo oposta ao limpar a coluna. A porosidade do frit na saída das colunas Poroshell 120 é menor do que no injetor e pode ser conectada mais facilmente.
- A Agilent recomenda o uso de conexões de policetona (p/n 5067-8957) para colunas de até 600 bar. As conexões removíveis para colunas de 1200 bar (p/n 5067-4733) podem ser usadas para todas as aplicações, seja utilizando baixa pressão ou pressões de UHPLC de até 1200 bar.

Considerações de segurança importantes para todas as colunas de LC

- Todos os pontos de conexão em sistemas de LC são possíveis fontes de vazamentos. Os usuários devem estar atentos à toxicidade ou à inflamabilidade das fases móveis.
- Devido ao pequeno tamanho de partícula, os pacotes de coluna seca são inaláveis. As colunas só devem ser abertas em uma área bem ventilada.
- Respeite os limites operacionais de pressão indicados para cada coluna (consulte o gráfico na próxima página). Exceder esses limites compromete o desempenho cromatográfico e pode não ser seguro.

Pressões operacionais máximas: colunas de até 9,4 mm de DI

Tipo de coluna	Tamanho de partícula	Limite de pressão
ZORBAX NH ₂ ZORBAX HILIC Plus ZORBAX Rx-SIL ZORBAX SIL ZORBAX CN Eclipse ZORBAX XDB-CN	5 µm, 7 µm 3.5 µm 5 µm 5 µm, 7 µm 5 µm, 7 µm 3.5 µm, 5 µm, 7 µm	400 bar (6.000 psi)
Alta definição de resolução rápida ZORBAX (RRHD) HILIC Plus	1.8 µm	1200 bar (17.000 psi)
ZORBAX RRHT Rx-Sil	1.8 µm	600 bar (9.000 psi)
Polaris NH ₂	3 µm, 5 µm	400 bar (6.000 psi)
Polaris Si-A	3 µm, 5 µm, 10 µm	400 bar (6.000 psi)
Pursuit XRs-Si	3 µm, 5 µm, 10 µm	400 bar (6.000 psi)
Poroshell 120 EC-CN Poroshell 120 HILIC	2.7 µm	600 bar (9.000 psi)

Dicas de utilização da coluna

- As colunas modernas são robustas e projetadas para operar por longos períodos sob condições cromatográficas normais. É possível maximizar a vida útil da coluna executando-a conforme as especificações. Sempre revise as especificações antes de colocar em prática um método final.
- Embora o fluxo reverso geralmente não seja prejudicial à coluna, ele deve ser evitado, exceto ao tentar desobstruir um frit entupido (consulte as exceções na seção "Instalação").
- Sempre utilize reagentes de alta pureza e solventes de cromatografia de boa qualidade para preparar a fase móvel.
- A desmontagem de uma coluna prejudica seu desempenho.

- As colunas novas contêm uma mistura de solventes orgânicos. Consulte o relatório de QC de desempenho para saber qual é a composição do solvente na coluna. Em primeiro lugar, deve-se tomar cuidado para não passar pela coluna qualquer fase móvel que possa formar um precipitado ou uma emulsão.
- As colunas Agilent de fase normal são compatíveis com água e solventes orgânicos comuns.
- Recomenda-se utilizar uma coluna de guarda para proteger a coluna e aumentar sua vida útil.
- As colunas não devem ser mantidas a temperatura ou pH elevados quando não estiverem em uso.
- Evite utilizar a coluna fora da faixa de pH indicada para a fase da coluna (consulte a próxima página). Operar fora das faixas recomendadas de pH e temperatura provocará a redução da vida útil da coluna.

Dicas para obter os melhores resultados de cromatografia

- Para otimizar o instrumento, diminua o comprimento da tubulação entre os componentes para reduzir o volume extracoluna e o alargamento da banda. Utilize tubulação vermelha com 0.12 mm de DI para colunas de LC rápidas/de alta eficiência. Conheça as opções de capilar no site [agilent.com/chem/lccapillaries](https://www.agilent.com/chem/lccapillaries).
- Ao utilizar colunas de fase normal, verifique se o selo para rotor, os selos da bomba, a tubulação e os demais componentes do instrumento de LC são compatíveis com os solventes da fase normal.
- Assegure-se de que a taxa de coleta de dados esteja otimizada para a sua coluna. Utilize uma taxa de coleta mais alta para colunas de LC rápidas (Poroshell 120, RRHT e RRHD).
- Utilize lâmpadas certificadas da Agilent nos instrumentos de LC para obter o melhor desempenho.
- Utilize filtração ou outro método de preparo adequado para sua amostra. Obtenha mais informações em [agilent.com/chem/sampleprep](https://www.agilent.com/chem/sampleprep)

TRABALHAR COM COLUNAS DE FASE NORMAL

Toda coluna de fase normal é testada antes do envio e vem com um eluente de teste de fase normal, exceto as colunas Eclipse ZORBAX XDB-CN, Poroshell 120 EC-CN, Poroshell 120 HILIC e ZORBAX HILIC Plus, que vêm com solventes de fase reversa. Deve-se tomar cuidado para garantir que a coluna seja equilibrada adequadamente antes da utilização. Isso garantirá a reprodutibilidade de análise para análise e evitará desvios do tempo de retenção.

Parâmetros operacionais da coluna de fase normal: pH e temperatura

Fase	Faixa de pH recomendada	Máxima temperatura operacional	Temperatura operacional sugerida
ZORBAX NH ₂	pH 2.0 a 7.5	60 °C	30 °C
ZORBAX Rx-SIL ZORBAX SIL Poroshell 120 HILIC*† ZORBAX HILIC Plus*†	pH 1.0 a 8.0	Limitada apenas pelos limites de temperatura da fase móvel	
ZORBAX CN	pH 2.0 a 8.0	60 °C	30 °C
Eclipse ZORBAX XDB-CN*	pH 2.0 a 9.0	60 °C	30 °C
Polaris NH ₂	pH 2.0 a 8.0	60 °C	30 °C
Polaris Si-A	pH 1.5 a 10.0	60 °C	30 °C
Pursuit XRs Si	pH 2.0 a 8.0	60 °C	30 °C
Poroshell 120 EC-CN*	pH 2.0 a 8.0	60 °C	30 °C

*Enviada com solventes de fase reversa.

† Consulte a seção "Trabalhar com colunas HILIC" para obter mais informações.

Operar em faixas extremas de pH e temperatura causará um grande impacto na vida útil da coluna.

Observação: todos os empacotamentos à base de sílica têm alguma solubilidade em fases móveis aquosas com pH maior que 6. Ao utilizar colunas à base de sílica em pH maior que 6, uma melhor vida útil da coluna é obtida em temperaturas mais baixas (máx. 40 °C) usando concentrações menores de tampão na faixa de 0.01 a 0.02 M.

Observações para o desenvolvimento de métodos da coluna de fase normal

A fase estacionária é polar por natureza e é melhor utilizada com fases móveis não polares, como misturas de cloreto de metileno/hexano ou isopropanol/hexano. O aumento da quantidade de componentes polares nessas misturas geralmente reduz o tempo de retenção da amostra.

Tipo de coluna	Observações para o desenvolvimento de métodos
ZORBAX NH ₂ Polaris NH ₂	A retenção diminui conforme a polaridade da fase móvel aumenta. Muitos volumes de coluna de fase móvel são necessários para atingir o equilíbrio após alterações na composição da fase móvel. A quantidade necessária de volumes de coluna depende do sistema utilizado e pode variar de 50 a 100 volumes de coluna.
ZORBAX Rx-SIL ZORBAX SIL Pursuit XRs Si Polaris Si-A	As colunas de sílica não ligadas são muito sensíveis a quantidades em nível de traços de água nos solventes e na amostra, portanto deve-se tomar cuidado para manter a consistência e garantir a reprodutibilidade do método. Ao utilizar eluição de gradiente, os solventes primários e secundários devem ser modificados com álcool ou acetonitrila, e ao menos 30 colunas de solvente devem poder fluir pela coluna após finalizar cada execução. Ao alternar entre solventes, primeiro deve-se enxaguar a coluna com um solvente mutuamente miscível, como o álcool isopropílico.
Poroshell 120 EC-CN Eclipse ZORBAX XDB-CN ZORBAX CN	As colunas Poroshell 120 EC-CN e Eclipse ZORBAX XDB-CN vêm com solventes de fase reversa, mas também podem ser utilizadas em aplicações de fase normal após a limpeza com isopropanol. A retenção diminui conforme a polaridade da fase móvel aumenta. O rápido equilíbrio desta fase ligada com a fase móvel geralmente faz com que a utilização dessa coluna seja mais prática do que a de uma coluna de sílica, principalmente para eluição de gradiente.

Limpeza da coluna/Prolongamento da vida útil da coluna: colunas de fase normal

Para fase normal, recomendamos a utilização de solventes orgânicos. Utilize pelo menos 20 volumes de coluna de cada solvente, que representam 50 mL caso utilize a coluna analítica comum de 4.6 x 250 mm. Experimente estes solventes para aumentar a força:

1. 50% de metanol: 50% de clorofórmio
2. 100% de acetato de etila

A limpeza de uma coluna usada em modo de fase normal pode variar segundo o tipo de amostra. Se esses solventes não funcionarem, entre em contato com a Agilent para que possamos recomendar um solvente que pode ser mais eficaz para sua aplicação e matriz de amostras.

Recomendações de armazenamento: colunas de fase normal

As colunas de fase normal geralmente podem ser armazenadas em suas próprias fases móveis por longos períodos. Antes de armazenar a coluna, os adaptadores de extremidade devem ser bem fechados com plugues para evitar que o empacotamento seque.

TRABALHAR COM COLUNAS HILIC

HILIC é um método usado para a separação de analitos polares retidos de modo inadequado em colunas de fase reversa comuns. As colunas Agilent de alta definição de resolução rápida ZORBAX (RRHD) HILIC Plus e as colunas Poroshell 120 HILIC são colunas de sílica não ligadas, que vêm com acetonitrila:água ou acetonitrila e prontas para usar em separações HILIC. Assim como as colunas de fase normal, as colunas HILIC exigem mais equilíbrio do que as colunas de fase reversa. Observe que as colunas ZORBAX Rx-Sil, ZORBAX Sil e ZORBAX NH₂ também podem ser utilizadas para aplicações de HILIC. Para alterar essas colunas para o modo HILIC, lave-as primeiro com álcool isopropílico.

Parâmetros operacionais da coluna HILIC

Nome da coluna	Faixa de pH	Temperatura máxima	Temperatura sugerida
Alta definição de resolução rápida ZORBAX (RRHD) HILIC Plus ZORBAX HILIC Plus HPLC Poroshell 120 HILIC	pH 1.0 a 8.0	40 °C	30 °C

Operar em faixas extremas de pH e temperatura causará um grande impacto na vida útil da coluna.

Observações para o desenvolvimento de métodos HILIC

Alta definição de resolução rápida ZORBAX (RRHD) HILIC Plus Poroshell 120 HILIC	As aplicações HILIC mais comuns são para a análise de componentes polares que são pouco retidos ou não retidos em colunas de fase reversa. Recomenda-se equilibrar a coluna com 30% a 40% de água em acetonitrila antes da utilização. O equilíbrio pode exigir de 20 a 50 volumes de coluna. Uma fase móvel típica é composta de acetonitrila:água com um tampão de acetato ou formiato a 5-10 mM. O aumento da concentração do tampão pode melhorar o formato do pico e a retenção. Diminua o componente aquoso/tampão para aumentar a retenção.
--	--

Diretrizes operacionais: HILIC

- As colunas Agilent HILIC vêm com acetonitrila:água ou acetonitrila.
- As colunas Agilent HILIC são compatíveis com água e com solventes orgânicos comuns.
- Todos os empacotamentos à base de sílica têm alguma solubilidade em fases móveis aquosas com pH maior que 6. A solubilidade da sílica também é aumentada a temperaturas elevadas. A utilização de colunas ZORBAX RRHD HILIC Plus ou Poroshell 120 HILIC com pH maior que 6 e a temperaturas superiores a 40 °C reduzirá a vida útil da coluna.

Limpeza da coluna/Prolongamento da vida útil da coluna: colunas HILIC

É necessário filtrar as amostras antes de injetá-las na coluna. Isso é especialmente importante para as colunas ZORBAX RRHD HILIC Plus, pois o frit da entrada da coluna é de 0.5 µm e as amostras devem ser filtradas com um filtro de 0.2 µm. Se o fluxo de solvente parecer restrito (pressão resultante de coluna excepcionalmente alta), verifique primeiro se o fluxo do solvente está desobstruído até a entrada da coluna. Se a restrição for antes da coluna, substitua o pedaço de tubulação ou filtro que está obstruído. Se a coluna estiver obstruída, a Poroshell 120 HILIC pode ser submetida ao processo de backflushing com 20 a 30 volumes de coluna de fase móvel. A coluna RRHD HILIC não pode ser submetida ao processo de backflushing. Para remover materiais fortemente retidos da coluna, limpe-a com um solvente forte — no modo HILIC, este solvente é a água.

Recomendações de armazenamento: colunas HILIC

Para armazenar colunas HILIC por longos períodos recomenda-se utilizar a mistura acetonitrila:água (95:5) como solvente. Pode ser necessário lavar a coluna com acetonitrila:água (60:40) para remover componentes fortemente retidos antes de passar para o solvente de armazenamento. Antes de armazenar a coluna, os adaptadores de extremidade devem ser bem fechados com plugues para evitar que o empacotamento seque. As colunas podem ser armazenadas de forma segura por períodos curtos na maioria das fases móveis de HILIC. No entanto, para proteger o equipamento, recomenda-se remover os sais do instrumento e da coluna, purgando a coluna com a mesma fase móvel sem o tampão (por exemplo, utilizando ACN:H₂O a 90:10 para remover uma fase móvel de ACN:0.01M de tampão de formiato a 90:10). Ao usar esta abordagem, o equilíbrio é restabelecido mais rapidamente com a fase móvel original, mas várias (3 a 6) injeções devem ser realizadas para verificar o equilíbrio da coluna.

LC Column and Sample Prep NAVIGATOR



Find the Right Column for Your Separation

Try the LC Columns Navigator

With just a few mouse clicks, you can:

- Explore columns based on method parameters, compound, and USP method
- Find sample prep guidance and method optimization tips
- Get selection assistance from Agilent chromatography experts
- Obtain technical support contact information

Best of all, you can access the LC Columns Navigator anywhere – in your lab or in the field – from your smart phone or tablet

Get started now at [**agilent.com/chem/navigator**](http://agilent.com/chem/navigator)

Agilent Ordering Information

For more information on our products and services,
visit our web site at **agilent.com**

For technical support and local information,
visit **agilent.com/chem/columnsupport**

To place an order, visit **agilent.com/chem/wheretobuy**

Agilent offers a complete line of sample preparation products
to support LC and LC/MS applications.

The Agilent Bond Elut SPE and Captiva Filtration Sample Prep
family of products offer the widest range of solutions for
every level of sample cleanliness to help you increase
throughput and enhance the quality of your data.
Learn more at **agilent.com/chem/sampleprep**



This information is subject to change without notice.

©Agilent Technologies, Inc. 2016
Published in USA, November 1, 2016
820000-998



Agilent Technologies