



## **COLUMN USER GUIDE**

# for Agilent Normal-Phase and HILIC Columns

Säulenbenutzerhandbuch  
für Agilent Normalphasen und HILIC-Säulen

Guide d'utilisation des colonnes  
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  
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 нормальной фазы и HILIC

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

This booklet provides general information for all Agilent ZORBAX, Agilent Pursuit, Agilent Polaris, and Agilent InfinityLab Poroshell 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 **[agilent.com/chem/columnchoices](https://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 results may vary from the system used in your lab. This allows a better evaluation of the column and assures a more consistent product.

## 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.**
- For removable, zero-dead volume column connections Agilent recommends the use of the InfinityLab Fittings. Choices are:

Maximum System Pressure	Recommended Fitting	Part Numbers
Up to 400 bar	InfinityLab Quick Turn Fitting (finger-tight)	Fitting: 5067-5966
Up to 800 bar	InfinityLab Quick Turn Fitting (with Mounting tool)	Fitting: 5067-5966 Mounting Tool: 5043-0915
Up to 1300 bar	InfinityLab Quick Connect Fitting	Fitting: 5067-5965

For more information and part numbers, please see to the Agilent InfinityLab Fitting Brochure (5991-5164EN).



*InfinityLab Quick Connect assembly, p/n 5067-5961*



*InfinityLab Quick Turn fitting, p/n 5067-5966*

Learn more at [www.agilent.com/chem/infinitylabfittings](http://www.agilent.com/chem/infinitylabfittings)

Additional care must be taken to avoid damage to PEEK or PEEK-lined columns during installation. Combined compression and rotation may cause damage, therefore fittings without ferrules such as PEEK Finger-tight Fittings are not recommended. Fittings should not be overtightened, and should be swaged to the correct depth to avoid damage.

## 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
InfinityLab Poroshell 120 HILIC	1.9 µm	1300 bar (19500 psi)
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN	2.7 µm	600 bar (9,000 psi)
InfinityLab Poroshell 120 HILIC		600 bar (9,000 psi)
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z		600 bar (9,000 psi)
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5		400 bar (6,000 psi)
ZORBAX NH2	5 µm, 7 µm	400 bar (6,000 psi)
Agilent 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	1,200 bar (17,000 psi)
ZORBAX RRHT Rx-Sil	1.8 µm	600 bar (9,000 psi)
Polaris NH2	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)

## 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.
- 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 tubing for normal operations. For narrow bore (2.1 mm or less) high resolution columns, such as InfinityLab Poroshell 120 or ZORBAX RRHD, use 0.075 mm id black tubing on UHPLC systems. Learn about capillary options at [agilent.com/chem/lccapillaries](https://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 (InfinityLab 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 [agilent.com/chem/sampleprep](https://www.agilent.com/chem/sampleprep).

## 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, InfinityLab Poroshell 120 EC-CN, InfinityLab Poroshell 120 HILIC, InfinityLab Poroshell HILIC-OH5, InfinityLab Poroshell HILIC-Z, and ZORBAX HILIC Plus columns which are shipped in reversed-phase solvents. 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
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN*	pH 2.0 to 8.0	60 °C	30 °C
ZORBAX NH2	pH 2.0 to 7.5	60 °C	30 °C
InfinityLab Poroshell 120 HILIC*† ZORBAX Rx-SIL ZORBAX SIL ZORBAX HILIC Plus*†	pH 1.0 to 8.0	Limited only by the temperature limits of the mobile phase	
ZORBAX CN	pH 2.0 to 8.0	60 °C	30 °C
ZORBAX Eclipse XDB-CN*	pH 2.0 to 9.0	60 °C	30 °C
Polaris NH2	pH 2.0 to 8.0	60 °C	30 °C
Polaris Si-A	pH 1.5 to 10.0	60 °C	30 °C
Pursuit XRs Si	pH 2.0 to 8.0	60 °C	30 °C

\* Shipped in reversed-phase solvents.

† See the *Working with HILIC* section for more information.

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 NH2 Polaris NH2	Retention decreases as the polarity of the mobile phase increases.  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.
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN ZORBAX Eclipse XDB-CN ZORBAX CN	Agilent InfinityLab 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 × 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 Rapid Resolution High Definition (RRHD) HILIC Plus columns and InfinityLab Poroshell 120 HILIC columns are non-bonded silica columns, shipped in acetonitrile:water or acetonitrile and ready to use for HILIC separations. InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 columns contain a polyhydroxy phase bonded onto superficially porous silica particles, and are shipped in acetonitrile. InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z columns contain a zwitterionic phase bonded onto superficially porous silica particles, and are shipped in acetonitrile:water. Like normal-phase columns, HILIC columns require more equilibration than reversed-phase columns. Note that ZORBAX Rx-Sil, ZORBAX Sil, and ZORBAX NH2 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
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5	1.0 to 8.0	45 °C	30 °C
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z	2.0 to 12	80 °C	30 °C
InfinityLab Poroshell 120 HILIC ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD) HILIC Plus ZORBAX HILIC Plus HPLC	0 to 8.0	60 °C	30 °C

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

### Operating Guidelines: HILIC

- Agilent HILIC columns are shipped containing acetonitrile:water or acetonitrile.
- Care should be taken not to exceed column pressure limits, especially when changing mobile phase compositions.
- Agilent HILIC columns are compatible with water and all common organic solvents.
- Buffer should be mixed in small amounts, and refreshed often to prevent microbial growth.
- Eluents containing volatile acids (formic, acetic) or bases (ammonia) should be sealed tightly.
- All silica has some solubility in pH >6 aqueous mobile phases. Solubility of the silica is also increased at elevated temperatures. Using the ZORBAX RRHD HILIC Plus or InfinityLab Poroshell 120 HILIC columns above pH 6 and 40 °C will reduce the column lifetime.

## HILIC Method Development Notes

Column	Notes
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, and HILIC-OH5	<p><b>Suggested initial screening conditions:</b></p> <p>A: 10 mM ammonium acetate            B: (Acetonitrile:100 mM ammonium acetate, 90:10)*</p> <p>or</p> <p>A: 10 mM ammonium formate            B: (Acetonitrile:100 mM ammonium formate, 90:10)*</p> <p>* For 10 mmol final concentration</p> <p>Adjust mobile phase pH as necessary</p> <p>Gradient: 90% B to <math>\geq 60\%</math> B over 10 minutes</p>
InfinityLab Poroshell 120 HILIC, HILIC-Z, and HILIC-OH5  ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD)  HILIC Plus	<p>Most common HILIC applications are for the analysis of polar compounds that are unretained or poorly retained on reversed-phase columns.</p> <p>It is best to equilibrate the column with 30-40% water in acetonitrile before use.</p> <p>Equilibration may require 20-50 column volumes.</p> <p>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.</p>

## **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  $\mu\text{m}$  and samples should be filtered through a 0.2  $\mu\text{m}$  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, InfinityLab 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.

InfinityLab Poroshell HILIC-OH5 columns may be regenerated by flushing with 50/50 acetonitrile:50 mM ammonium acetate at a low flow rate for at least 3 hours. Then equilibrate with mobile phase.

InfinityLab Poroshell HILIC-Z columns may be regenerated by flushing with 50/50 acetonitrile:10 mM ammonium acetate at 20% of normal operating flowrates for at least 3 hours. Then equilibrate with mobile phase.

### **Storage Recommendations: HILIC Columns**

Acetonitrile:water (90:10) is recommended as the long-term storage solvent for HILIC columns. 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:H<sub>2</sub>O 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.

## Use of Normal-Phase and HILIC columns in Supercritical Fluid Chromatography (SFC)

Agilent columns suitable for SFC are typically normal-phase or HILIC columns and are shipped in either normal-phase or HILIC mobile phases. Poroshell 120 EC-CN columns are shipped in reversed-phase solvent. Column pressure and pH limits remain valid in SFC. Please keep in mind that pH in SFC is not directly comparable with pH values of aqueous solutions. Therefore, the apparent pH in CO<sub>2</sub>/organic modifier might differ.

### Column Equilibration

Prior to use, flush column with 10-30 volumes of Methanol or isopropyl alcohol to completely flush out shipping solvents. Then, equilibrate column with approximately 10-20 column volumes of mobile phase at starting conditions.

### Column Storage

Make sure that you completely remove additives such as acids, bases or buffers to prevent damage to the column. Flush the column with 10–20 column volumes of methanol or isopropyl alcohol to remove all carbon dioxide. Do not store columns in a mixture of CO<sub>2</sub> and MeOH as CO<sub>2</sub> will evaporate and dry out the stationary phase. Properly seal with end plugs to prevent solvent evaporation.

Diese Broschüre enthält allgemeine Informationen zu allen Agilent ZORBAX-, Agilent Pursuit-, Agilent Polaris- und Agilent InfinityLab Poroshell Normalphasen- und HILIC-Säulen. Die einleitenden Abschnitte enthalten Informationen zu Normalphasen- und HILIC Säulen. Da einige Methodenparameter und Anweisungen zur Pflege der Säule bei HILIC-Säulen anders sind als bei Normalphasen-Säulen, enthalten die letzten Seiten nach Säulentyp getrennte Abschnitte. Weiterführende Hinweise über Ihre spezifische Säule oder Säulenfamilie finden Sie unter **[agilent.com/chem/columnchoices](https://www.agilent.com/chem/columnchoices)**

## Erste Schritte

Jede Säule von Agilent wird zusammen mit einem QC-Säulenleistungsprotokoll mit Testchromatogramm geliefert. Für die Tests zur Qualitätskontrolle wurde ein im Hinblick auf ein minimales Extrasäulenvolumen modifiziertes (optimiertes) Standardgerät verwendet. Daher sind die Ergebnisse dieses Geräts und des in Ihrem Labor verwendeten Systems eventuell etwas unterschiedlich. Dies ermöglicht eine bessere Bewertung der Säule und sichert eine gleichbleibende Produktqualität.

## Installation

- Die Flussrichtung ist auf der Säule angegeben.
- **1,8- $\mu$ m-Säulen (Agilent ZORBAX RRHT-, Agilent ZORBAX RRHD-Säulen) können nur in der auf der Säule gekennzeichneten Flussrichtung verwendet werden.**
- Agilent empfiehlt für abnehmbare Säulenanschlüsse ohne Totvolumen die Verwendung von InfinityLab Fittings. Sie haben die Wahl zwischen:

Maximaler Systemdruck	Empfohlenes Fitting	Bestellnummern
Bis 400 bar	InfinityLab Quick Turn Fitting (fingerfest)	Fitting: 5067-5966
Bis 800 bar	InfinityLab Quick Turn Fitting (mit Montagewerkzeug)	Fitting: 5067-5966 Montagewerkzeug: 5043-0915
Bis 1300 bar	InfinityLab Quick Connect Fitting	Fitting: 5067-5965

Weiterführende Informationen und Bestellnummern finden Sie in der Broschüre über Agilent InfinityLab Fittings (5991-5164EN).



*InfinityLab Quick Connect-Einheit,  
Bestell-Nr. 5067-5961*



*InfinityLab Quick Turn Fitting,  
Bestell-Nr. 5067-5966*

Weitere Informationen finden Sie unter  
[www.agilent.com/chem/infinitylabfittings](http://www.agilent.com/chem/infinitylabfittings)

Bei der Installation muss besonders darauf geachtet werden, PEEK- oder mit PEEK beschichtete Säulen nicht zu beschädigen. Eine Kombination von Zusammendrücken und Drehen kann Schäden verursachen, daher werden Fittings ohne Ferrulen (wie fingerfeste PEEK Fittings) nicht empfohlen. Die Fittings dürfen nicht zu fest angezogen werden und sollten in der korrekten Tiefe montiert werden, um Schäden zu vermeiden.

## Wichtige Sicherheitshinweise für alle LC-Säulen

- An allen Verbindungsstellen in LC-Systemen können Leckagen auftreten. Der Benutzer muss daher hinsichtlich der Toxizität oder Brennbarkeit der verwendeten mobilen Phasen geeignete Sicherheitsvorkehrungen treffen.
- Aufgrund der geringen Partikelgröße kann trockenes Säulenpackungsmaterial eingeatmet werden. Die Säulen dürfen nur in einem gut belüfteten Bereich geöffnet werden.
- Das für die einzelnen Säulen angegebene Drucklimit muss unbedingt eingehalten werden (siehe Tabelle auf der nächsten Seite). Ein Überschreiten dieser Grenzwerte beeinträchtigt die Chromatographieleistung und kann gefährlich sein.

## Maximale Betriebsdrücke – Säulen mit einem ID bis 9,4 mm

Säulentyp	Partikelgröße	Drucklimit
Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Säule	1,9 µm	1300 bar (19 500 psi)
Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-CN-Säule	2,7 µm	600 bar (9000 psi)
Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Säule		600 bar (9000 psi)
Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z-Säule		600 bar (9000 psi)
Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5-Säule		400 bar (6000 psi)
Agilent ZORBAX NH2-Säule	5 µm, 7 µm	400 bar (6000 psi)
Agilent ZORBAX HILIC Plus-Säule	3,5 µm	
Agilent ZORBAX Rx-SIL-Säule	5 µm	
Agilent ZORBAX SIL-Säule	5 µm, 7 µm	
Agilent ZORBAX CN-Säule	5 µm, 7 µm	
Agilent ZORBAX Eclipse XDB-CN-Säule	3,5 µm, 5 µm, 7 µm	
Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD) HILIC Plus-Säule	1,8 µm	1200 bar (17 000 psi)
Agilent ZORBAX RRHT Rx-Sil-Säule	1,8 µm	600 bar (9000 psi)
Agilent Polaris NH2-Säule	3 µm, 5 µm	400 bar (6000 psi)
Agilent Polaris Si-A-Säule	3 µm, 5 µm, 10 µm	400 bar (6000 psi)
Agilent Pursuit XRs-Si-Säule	3 µm, 5 µm, 10 µm	400 bar (6000 psi)



## Tipps zur Säulennutzung

- Moderne Säulen sind robust und für einen langen Betrieb bei normalen Chromatographiebedingungen ausgelegt. Durch Verwendung der Säule gemäß der Spezifikationen können Sie die Lebensdauer der Säule maximieren. Prüfen Sie daher vor der endgültigen Etablierung einer Methode stets die Säulenspezifikationen.
- Ein umgekehrter Fluss durch die Säule ist im Allgemeinen nicht schädlich, sollte aber vermieden werden.
- Verwenden Sie zur Herstellung der mobilen Phase stets hochreine Reagenzien und Lösemittel für die Chromatographie oder noch reinere Lösemittel.
- Die Zerlegung der Säule verschlechtert die Säulenleistung.
- Neue Säulen enthalten eine Mischung organischer Lösemittel. Die Lösemittel-Zusammensetzung in Ihrer Säule entnehmen Sie dem QC-Leistungsprotokoll. Stellen Sie zunächst sicher, dass die Säule nicht mit einer mobilen Phase beschickt wird, die einen Niederschlag bewirkt oder eine Emulsion bildet.
- Normalphasensäulen von Agilent sind mit Wasser und allen häufig verwendeten organischen Lösemitteln kompatibel.
- Es wird eine Vorsäule empfohlen, mit der Sie die Säule schützen und die Lebensdauer der Säule erhöhen.
- Säulen, die nicht in Gebrauch sind, sollten nicht bei hohen pH-Werten oder erhöhter Temperatur aufbewahrt werden.
- Vermeiden Sie den Betrieb dieser Säule außerhalb des empfohlenen pH-Bereichs für die Säulenphase (siehe nächste Seite). Bei Betrieb der Säule außerhalb der empfohlenen pH- und Temperaturbereiche müssen Sie mit einer verkürzten Lebensdauer rechnen.

## Tipps für optimale Chromatographieergebnisse

- Optimieren Sie Ihr Chromatographiesystem durch Minimierung der Leitungslängen zwischen den Komponenten. Dadurch verringern Sie das Extrasäulenvolumen und Bandenverbreiterungen. Für normale Aufgaben verwenden Sie rote Kapillaren (ID: 0,12 mm). Für hochauflösende Narrow-Bore-Säulen ( $\leq 2,1$  mm) wie die InfinityLab Poroshell 120-Säule oder Agilent ZORBAX RRHD-Säule verwenden Sie schwarze Kapillaren (ID: 0,075 mm) in UHPLC-Systemen. Weiterführende Informationen zu Kapillaren finden Sie unter **[agilent.com/chem/lccapillaries](https://www.agilent.com/chem/lccapillaries)**.
- Stellen Sie bei Normalphasensäulen sicher, dass die Rotor- und Pumpendichtungen, die Kapillaren und alle anderen Komponenten des LC-Systems mit den Lösemitteln der Normalphase 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-Säulen) eine höhere Datenerfassungsrate.
- Verwenden Sie nur zertifizierte Lampen von Agilent in Ihren LC-Geräten, um eine optimale Leistung sicherzustellen.
- Führen Sie eine Probenfiltration oder eine andere geeignete Methode der Probenvorbereitung durch. Weiterführende Informationen finden Sie unter **[agilent.com/chem/sampleprep](https://www.agilent.com/chem/sampleprep)**.

## Arbeiten mit Normalphasensäulen

Jede Normalphasensäule wird vor der Lieferung getestet und in einem Normalphasen-Testlösemittel versendet, ausgenommen Säulen der Typen Agilent ZORBAX Eclipse XDB-CN-, Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-CN-, Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-, Agilent InfinityLab Poroshell HILIC-OH5-, Agilent InfinityLab Poroshell HILIC-Z- und Agilent ZORBAX HILIC Plus-Säulen, die in Umkehrphasen-Lösemitteln verschickt werden. Vor dem Einsatz muss sorgfältig sichergestellt werden, dass die Säule ordnungsgemäß äquilibriert wurde. Dies sorgt für Reproduzierbarkeit von Analyse zu Analyse und vermeidet ein Driften der Retentionszeiten.

### Betriebsparameter für Normalphasensäulen: pH und Temperatur

Phase	Empfohlener pH-Bereich	Maximale Betriebstemperatur	Empfohlene Betriebstemperatur
Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-CN *	pH 2,0 bis 8,0	60 °C	30 °C
Agilent ZORBAX NH2	pH 2,0 bis 7,5	60 °C	30 °C
Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC *† Agilent ZORBAX Rx-SIL Agilent ZORBAX SIL Agilent ZORBAX HILIC Plus *†	pH 1,0 bis 8,0	Nur durch die Temperaturbegrenzungen der mobilen Phase eingeschränkt	
Agilent ZORBAX CN	pH 2,0 bis 8,0	60 °C	30 °C
Agilent ZORBAX Eclipse XDB-CN *	pH 2,0 bis 9,0	60 °C	30 °C
Agilent Polaris NH2	pH 2,0 bis 8,0	60 °C	30 °C
Agilent Polaris Si-A	pH 1,5 bis 10,0	60 °C	30 °C
Agilent Pursuit XRs Si	pH 2,0 bis 8,0	60 °C	30 °C

\* Werden in Umkehrphasen-Lösemitteln verschickt.

† Weiterführende Informationen siehe den Abschnitt *Arbeiten mit HILIC*.

Der Betrieb an den extremen Grenzen der pH- und Temperaturbereiche hat erhebliche Auswirkungen auf die Lebensdauer der Säule.

**Hinweis:** Alle auf Silica basierenden Packungen besitzen eine gewisse Löslichkeit in wässrigen mobilen Phasen mit einem pH-Wert über 6. Wenn Sie Silica-Säulen bei pH-Werten über 6 einsetzen, erreicht die Säule die höchste Lebensdauer bei tieferen Temperaturen (max. 40 °C) und niedrigen Pufferkonzentrationen im Bereich von 0,01 bis 0,02 M.

### Hinweise zur Methodenentwicklung für Normalphasensäulen

Die stationäre Phase ist polar und wird am besten mit unpolaren mobilen Phasen wie Methylenchlorid/Hexan- oder Isopropanol/Hexan-Mischungen verwendet. Eine Erhöhung der polaren Komponente in diesen Mischungen senkt typischerweise die Retentionszeit der Probe.

Säulentyp	Hinweise zur Methodenentwicklung
Agilent ZORBAX NH2 Agilent Polaris NH2	Mit zunehmender Polarität der mobilen Phase nimmt die Retention ab.  Nach einer Änderung der Zusammensetzung der mobilen Phase muss die Säule mit vielen Säulenvolumen der neuen mobilen Phase äquilibriert werden. Die Anzahl der Säulenvolumen hängt vom verwendeten System ab und kann bis zu 50 bis 100 betragen.
Agilent ZORBAX Rx-SIL Agilent ZORBAX SIL Agilent Pursuit XRs Si Agilent Polaris Si-A	Ungebundene Silica-Säulen reagieren sehr empfindlich auf Spuren Mengen von Wasser in Lösemitteln und Proben. Daher muss sorgfältig gearbeitet werden, um die Reproduzierbarkeit der Methoden sicherzustellen. Wird eine Gradientenelution verwendet, sollten sowohl primäre als auch sekundäre Lösemittel mit Alkohol oder Acetonitril modifiziert werden. Außerdem sollten nach Abschluss jedes Laufs mindestens 30 Säulenvolumen Lösemittel durch die Säule fließen.  Sollen Lösemittel ausgetauscht werden, spülen Sie die Säule erst mit einem Lösemittel, das sich sowohl mit dem alten als auch mit dem neuen Lösemittel mischt wie Isopropylalkohol.
Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-CN Agilent ZORBAX Eclipse XDB-CN Agilent ZORBAX CN	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-CN- und Agilent ZORBAX Eclipse XDB-CN-Säulen werden mit Umkehrphasen-Lösungsmitteln verschickt, können nach dem Spülen mit Isopropanol aber auch in Normalphasenanwendungen verwendet werden.  Mit zunehmender Polarität der mobilen Phase nimmt die Retention ab.  Wegen der schnellen Äquilibrierung dieser gebundenen Phase mit der mobilen Phase ist eine solche Säule oft praktischer als eine Silica-Säule, insbesondere für Gradientenelution.

## Reinigen der Säule/Verlängern der Lebensdauer der Säule: Normalphasensäulen

Wir empfehlen die Verwendung eines organischen Lösemittels für die Normalphase. Verwenden Sie mindestens 20 Säulenvolumen jedes Lösemittels, d. h. 50 ml, wenn es sich bei Ihrer Säule um eine traditionelle analytische Säule handelt (4,6 × 250 mm). Versuchen Sie diese Lösemittel in zunehmender Stärke:

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

Die Reinigung einer Säule im Normalphasen-Modus kann vom Probenotyp abhängen. Wenn diese Lösemittel nicht funktionieren, wenden Sie sich an Agilent. Wir empfehlen dann ein Lösemittel, das für Ihre Applikation und Ihre Probenmatrix möglicherweise effektiver ist.

## Empfehlungen zur Lagerung: Normalphasensäulen

Normalphasensäulen können normalerweise über lange Zeiträume in der eigenen mobilen Phase gelagert werden. Vor der Lagerung der Säule müssen die Endfittings fest mit Endstopfen verschlossen werden, um die Säulenpackung vor dem Austrocknen zu schützen.

## Arbeiten mit HILIC-Säulen

HILIC ist eine Methode zur Trennung von polaren Analyten, die von typischen Umkehrphasensäulen nicht ausreichend zurückgehalten werden. Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD) HILIC Plus- und Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Säulen sind Säulen mit ungebundenem Silica, die in Acetonitril:Wasser oder Acetonitril verschickt werden und für HILIC-Trennungen bereit sind. Bei Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5-Säulen ist eine Polyhydroxylphase auf Silica-Partikeln mit oberflächlichen Poren gebunden. Diese Säulen werden in Acetonitril versendet. Bei Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z-Säulen ist eine zwitterionische Phase auf Silica-Partikeln mit oberflächlichen Poren gebunden. Diese Säulen werden in Acetonitril:Wasser versendet. Wie Normalphasensäulen brauchen HILIC-Säulen mehr Äquilibrierung als Umkehrphasensäulen. Beachten Sie, dass Agilent ZORBAX Rx-Sil-, Agilent ZORBAX Sil- und Agilent ZORBAX NH<sub>2</sub>-Säulen auch für HILIC-Applikationen geeignet sind. Um diese Säulen auf den HILIC-Modus umzustellen, müssen Sie sie zuerst mit Isopropylalkohol spülen.

## Betriebsparameter für HILIC-Säulen

Säulenbezeichnung	pH-Bereich	Maximal-temperatur	Empfohlene Temperatur
Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5	1,0 bis 8,0	45 °C	30 °C
Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z	2,0 bis 12	80 °C	30 °C
Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD) HILIC Plus Agilent ZORBAX HILIC Plus HPLC	0 bis 8,0	60 °C	30 °C

Der Betrieb an den extremen Grenzen der pH- und Temperaturbereiche hat erhebliche Auswirkungen auf die Lebensdauer der Säule.

### Empfehlungen für den Betrieb: HILIC

- Agilent HILIC-Säulen werden in Acetonitril:Wasser oder Acetonitril verschickt.
- Insbesondere bei Änderung der Zusammensetzung der mobilen Phase muss darauf geachtet werden, die Grenzwerte für den Säulendruck nicht zu überschreiten.
- Agilent HILIC-Säulen sind mit Wasser und allen häufig verwendeten organischen Lösemitteln kompatibel.
- Puffer sollten in kleinen Mengen angesetzt und oft erneuert werden, um mikrobiologisches Wachstum zu vermeiden.
- Lösemittel, die flüchtige Säuren (Ameisensäure, Essigsäure) oder Basen (Ammoniak) enthalten, müssen dicht verschlossen werden.
- Silica besitzt immer eine gewisse Löslichkeit in wässrigen mobilen Phasen mit einem pH-Wert über 6. Die Löslichkeit von Silica steigt außerdem mit steigenden Temperaturen. Die Verwendung von Agilent ZORBAX RRHD HILIC Plus- oder Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Säulen bei über pH 6 und 40 °C senkt die Lebensdauer der Säule.

## Hinweise zur HILIC-Methodentwicklung

Säule	Hinweis
Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z und HILIC-OH5	<p><b>Empfohlene Anfangsbedingungen für das Screening:</b></p> <p>A: 10 mM Ammoniumacetat            B: (Acetonitril:100 mM Ammoniumacetat, 90:10)*            oder            A: 10 mM Ammoniumformiat            B: (Acetonitril:100 mM Ammoniumformiat, 90:10)*</p> <p>* Für eine Endkonzentration von 10 mmol</p> <p>Stellen Sie den pH-Wert der mobilen Phase je nach Bedarf ein</p> <p>Gradient: 90 % B nach <math>\geq</math> 60 % B in 10 Minuten</p>
Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC, HILIC-Z und HILIC-OH5 Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD) HILIC Plus	<p>Bei HILIC-Applikationen geht es meistens um die Analyse von polaren Verbindungen, die auf Umkehrphasensäulen nicht oder nur sehr wenig retardiert werden.</p> <p>Vor der Verwendung äquilibrieren Sie die Säule am besten mit 30-40 % Wasser in Acetonitril.</p> <p>Für die Äquilibrierung werden 20-50 Säulenvolumen benötigt.</p> <p>Eine typische mobile Phase ist Acetonitril:Wasser mit Acetat- oder Formiatpuffer in einer Konzentration von 5-10 mM. Durch eine höhere Pufferkonzentration können unter Umständen die Peakform und die Retention verbessert werden. Senken Sie den Anteil der wässrigen/Pufferkomponente, um die Retention zu erhöhen.</p>

## **Reinigen der Säule/Verlängern der Lebensdauer der Säule: HILIC-Säulen**

Die Proben sollten vor der Injektion auf die Säule gefiltert werden. Dies ist besonders bei der Agilent ZORBAX RRHD HILIC Plus-Säule wichtig, da die Einlassfritte der Säule den Nennwert  $0,5\ \mu\text{m}$  besitzt und die Proben durch einen  $0,2\text{-}\mu\text{m}$ -Probenfilter gefiltert werden sollten. Scheint der Lösemittelfluss beeinträchtigt zu sein (d. h. ungewöhnlich hoher Säulendruck), prüfen Sie zuerst, ob der Lösemittelfluss bis zum Säuleneinlass nicht behindert ist. Wird der Fluss vor der Säule behindert, ersetzen Sie das jeweilige verstopfte Kapillarenstück/den verstopften Filter. Wenn die Säule verstopft ist, kann die Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Säule mit 20-30 Säulenvolumen der mobilen Phase rückgespült werden. Eine Rückspülung der RRHD HILIC Säule ist nicht möglich. Um stark gebundene Materialien von der Säule zu entfernen, spülen Sie die Säule mit einem starken Lösemittel, d. h. Wasser im HILIC-Modus.

Agilent InfinityLab Poroshell HILIC-OH5-Säulen können durch Spülen mit 50/50 Acetonitril:50 mM Ammoniumacetat bei niedriger Flussrate über mindestens 3 Stunden regeneriert werden. Danach äquilibrieren Sie die Säule mit mobiler Phase. Agilent InfinityLab Poroshell HILIC-Z Säulen können durch Spülen mit 50/50 Acetonitril:10 mM Ammoniumacetat bei 20 % der normalen Flussrate über mindestens 3 Stunden regeneriert werden. Danach äquilibrieren Sie die Säule mit mobiler Phase.

### **Empfehlungen zur Lagerung: HILIC-Säulen**

Acetonitril:Wasser (90:10) wird als Lösemittel für die Langzeitlagerung von HILIC-Säulen empfohlen. Vor der Lagerung der Säule müssen die Endfittings fest mit Endstopfen verschlossen werden, um die Säulenpackung vor dem Austrocknen zu schützen. Säulen können in den meisten mobilen HILIC-Phasen für kurze Zeit sicher aufbewahrt werden. Zum Schutz Ihres Systems sollten jedoch Salze aus dem Gerät und aus der Säule entfernt werden. Dazu wird die Säule mit der gleichen mobilen Phase, jedoch ohne Puffer, gespült (z. B. mit 90:10 ACN/ $\text{H}_2\text{O}$ , um eine gepufferte mobile Phase mit 90:10 ACN/0,01 M Ammoniumformiat-Pufferlösung zu entfernen). Mit diesem Ansatz erfolgt eine erneute Äquilibrierung mit der ursprünglichen mobilen Phase schneller. Es sollten jedoch mehrere (3 bis 6) Injektionen durchgeführt werden, um die Säulenäquilibrierung zu verifizieren.



## Normalphasen- und HILIC-Säulen in der superkritischen Flüssigkeitschromatographie (SFC)

Die Agilent Säulen, die sich für die SFC eignen, sind normalerweise Normalphasen- oder HILIC-Säulen, die in der Normalphase oder mobilen HILIC-Phase verschickt werden. Agilent Poroshell 120 EC-CN-Säulen werden in Umkehrphasen-Lösemittel verschickt. Die Grenzwerte für Säulendruck und pH gelten auch für die SFC. Denken Sie daran, dass die pH-Werte bei der SFC nicht direkt mit den pH-Werten in wässrigen Lösungen vergleichbar sind. Daher kann der apparente pH-Wert in CO<sub>2</sub>/organischen Modifiern anders sein.

### Säulenäquilibration

Vor der Verwendung spülen Sie die Säule mit 10-30 Volumen Methanol oder Isopropylalkohol, um die Transportlösemittel vollständig zu entfernen. Dann äquilibrieren Sie die Säule mit ungefähr 10-20 Säulenvolumen der mobilen Phase bei Anfangsbedingungen.

### Lagerung von Säulen

Achten Sie darauf, Additive wie Säuren, Basen oder Puffer vollständig zu entfernen, um eine Beschädigung der Säule zu vermeiden. Spülen Sie die Säule mit 10-20 Volumen Methanol oder Isopropylalkohol, um das Kohlenstoffdioxid vollständig zu entfernen. Bewahren Sie Säulen nicht in einer Mischung aus CO<sub>2</sub> und MeOH auf, da das CO<sub>2</sub> im Laufe der Zeit verdampft und die stationäre Phase austrocknet. Verschließen Sie die Säule sorgfältig mit den Endstopfen, um eine Verdampfung der Lösemittel zu verhindern.

Cette brochure contient des informations générales applicables à l'ensemble des colonnes à phase normale et HILIC des gammes ZORBAX, Agilent Pursuit, Agilent Polaris et Agilent InfinityLab Poroshell. Les premières sections concernent les colonnes à phase normale et les colonnes HILIC. Comme certains paramètres de méthode et certaines instructions d'entretien de colonne diffèrent entre les colonnes HILIC et les colonnes à phase normale, ces sections sont divisées en deux parties dans les dernières pages. Pour des informations plus détaillées sur la colonne que vous utilisez ou une famille de colonnes en particulier, rendez-vous sur **[agilent.com/chem/columnchoices](https://www.agilent.com/chem/columnchoices)**

### Considérations initiales

Chaque colonne Agilent est livrée avec un rapport de contrôle-qualité, évaluant la performance de la colonne et comprenant un chromatogramme de test. L'instrument utilisé pour les tests de contrôle-qualité est un instrument standard modifié (optimisé) afin de réduire au minimum le volume extracolonne. Les résultats peuvent donc être différents de ceux obtenus sur le système utilisé dans votre laboratoire. Cela permet de mieux évaluer la colonne et d'assurer la qualité constante du produit.

## Installation

- Le sens de l'écoulement est indiqué sur la colonne.
- **Les colonnes de 1,8 µm (ZORBAX RRHT, ZORBAX RRHD) ne peuvent être utilisées que dans le sens de l'écoulement indiqué sur la colonne.**
- Agilent recommande d'utiliser des raccords de colonne amovibles sans volume mort de la famille InfinityLab. Les modèles adaptés sont les suivants :

Pression maximale du système	Raccord recommandé	Références
Jusqu'à 400 bars	Raccord rapide Quick Turn InfinityLab (serrage manuel)	Raccord : 5067-5966
Jusqu'à 800 bars	Raccord rapide Quick Turn InfinityLab (avec outil de montage)	Raccord : 5067-5966 Outil de montage : 5043-0915
Jusqu'à 1 300 bars	Raccord rapide Quick Connect InfinityLab	Raccord : 5067-5965

Pour en savoir plus et obtenir des numéros de référence, veuillez vous référer à la brochure des raccords Agilent InfinityLab (5991-5164EN).



*Ensemble raccord rapide Quick Connect InfinityLab, réf. 5067-5961*



*Raccord rapide Quick Turn InfinityLab, réf. 5067-5966*

Pour en savoir plus, rendez-vous sur [www.agilent.com/chem/infinitylabfittings](http://www.agilent.com/chem/infinitylabfittings)

Prenez soin de ne pas endommager les colonnes PEEK ou à revêtement PEEK lors de l'installation. Les compressions en rotation peuvent causer des dommages, c'est pourquoi il est recommandé de ne pas utiliser de raccords sans ferrule tels que les raccords PEEK à serrage manuel. Évitez de trop serrer les raccords, et sertissez-les à la bonne profondeur pour empêcher tout endommagement.

## Consignes de sécurité importantes applicables à toutes les colonnes LC

- Tous les points de raccordement dans les systèmes LC représentent des sources de fuites potentielles. Les utilisateurs doivent connaître le caractère toxique ou inflammable de leurs phases mobiles.
- En raison de leur granulométrie fine, les matériaux de remplissage secs des colonnes peuvent être inhalés. Les colonnes doivent être ouvertes uniquement dans une zone bien ventilée.
- Respectez les limites de pression de fonctionnement indiquées pour chaque colonne (reportez-vous au tableau à la page suivante). Tout dépassement de ces limites pourrait compromettre la performance chromatographique et représenter un danger pour l'utilisateur.

### Pressions de fonctionnement maximales pour les colonnes jusqu'à 9,4 mm de d.i.

Type de colonne	Granulométrie	Limite de pression
InfinityLab Poroshell 120 HILIC	1,9 µm	1 300 bars (19 500 psi)
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN	2,7 µm	600 bars (9 000 psi)
InfinityLab Poroshell 120 HILIC		600 bars (9 000 psi)
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z		600 bars (9 000 psi)
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5		400 bars (6 000 psi)
ZORBAX NH2	5 µm, 7 µm	400 bars (6 000 psi)
Agilent 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 Résolution Rapide Haute Définition (RRHD) HILIC Plus	1,8 µm	1 200 bars (17 000 psi)
ZORBAX RRHT Rx-Sil	1,8 µm	600 bars (9 000 psi)
Polaris NH2	3 µm, 5 µm	400 bars (6 000 psi)
Polaris Si-A	3 µm, 5 µm, 10 µm	400 bars (6 000 psi)
Pursuit XRs-Si	3 µm, 5 µm, 10 µm	400 bars (6 000 psi)

## Conseils sur l'utilisation des colonnes

- Les colonnes modernes sont robustes et conçues pour être utilisées pendant de longues périodes dans des conditions chromatographiques normales. Vous pouvez optimiser la durée de vie de votre colonne en respectant ses spécifications. Consultez toujours les spécifications avant la mise en œuvre finale d'une méthode.
- Bien qu'elle soit généralement sans risque pour la colonne, l'inversion du sens d'écoulement est à éviter.
- Utilisez toujours des réactifs de grande pureté et des solvants de qualité chromatographique ou supérieure pour préparer votre phase mobile.
- Le démontage d'une colonne entraîne une baisse de sa performance.
- Les nouvelles colonnes contiennent un mélange de solvants organiques. Reportez-vous au rapport de contrôle-qualité de la performance pour connaître la composition du solvant dans votre colonne. Évitez de faire circuler initialement dans la colonne une phase mobile pouvant entraîner la formation d'un précipité ou d'une émulsion.
- Les colonnes à phase normale Agilent sont compatibles avec l'eau et tous les solvants organiques courants.
- Nous vous recommandons d'utiliser une colonne de garde pour protéger votre colonne et prolonger sa durée de vie.
- Les colonnes ne doivent pas être maintenues à pH élevé ou à haute température lorsqu'elles ne sont pas utilisées.
- Évitez d'utiliser cette colonne en dehors des plages de pH recommandées pour la phase de la colonne (reportez-vous à la page suivante). Attendez-vous à ce que la durée de vie de la colonne soit réduite si vous l'utilisez en dehors des plages de pH et de température recommandées.

## Conseils pour obtenir des résultats chromatographiques optimaux

- Optimisez votre instrument en réduisant au minimum la longueur des tubes entre les composants, ce qui diminue le volume extracolonne et favorise l'obtention de pics étroits. Utilisez un tube rouge de 0,12 mm de d.i. pour les opérations normales. Pour les colonnes à haute résolution de petit diamètre (2,1 mm ou moins) telles que les colonnes InfinityLab Poroshell 120 ou ZORBAX RRHD sur les systèmes UHPLC, utilisez un tube noir de 0,075 mm de d.i. Pour en savoir plus sur les choix de capillaires, rendez-vous sur **[agilent.com/chem/lccapillaries](https://www.agilent.com/chem/lccapillaries)**.
- Lorsque vous utilisez des colonnes à phase normale, vérifiez la compatibilité des joints de rotor, des joints de pompe, des tubes et de tous les autres composants de votre instrument LC avec les solvants de 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 des lampes certifiées Agilent pour vos instruments de LC afin de garantir une performance optimale.
- Selon le type de votre échantillon, filtrez-le ou suivez une autre méthode de préparation des échantillons. Pour en savoir plus, rendez-vous sur **[agilent.com/chem/sampleprep](https://www.agilent.com/chem/sampleprep)**.

## Travailler avec des colonnes à phase normale

Chaque colonne à phase normale est testée avant expédition et livrée dans un éluant de test de phase normale, à l'exception des colonnes ZORBAX Eclipse XDB-CN, InfinityLab Poroshell 120 EC-CN, InfinityLab Poroshell 120 HILIC, InfinityLab Poroshell HILIC-OH5, InfinityLab Poroshell HILIC-Z et ZORBAX HILIC Plus qui sont expédiées dans des solvants à phase inverse. Veillez à bien stabiliser la colonne avant de l'utiliser. Cela permet de garantir la reproductibilité d'une analyse à l'autre et d'éviter les dérives des temps de rétention.

### Paramètres opérationnels pour les colonnes à phase normale : pH et température

Phase	Plage de pH recommandée	Température de fonctionnement maximale	Température de fonctionnement suggérée
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN*	pH 2,0 à 8,0	60 °C	30 °C
ZORBAX NH2	pH 2,0 à 7,5	60 °C	30 °C
InfinityLab Poroshell 120 HILIC*† ZORBAX Rx-SIL ZORBAX SIL ZORBAX HILIC Plus*†	pH 1,0 à 8,0	Restreint uniquement par les limites de température de la phase mobile	
ZORBAX CN	pH 2,0 à 8,0	60 °C	30 °C
ZORBAX Eclipse XDB-CN*	pH 2,0 à 9,0	60 °C	30 °C
Polaris NH2	pH 2,0 à 8,0	60 °C	30 °C
Polaris Si-A	pH 1,5 à 10,0	60 °C	30 °C
Pursuit XRs Si	pH 2,0 à 8,0	60 °C	30 °C

\* Livrées dans des solvants à phase inverse.

† Consultez la section *Travailler avec des colonnes HILIC* pour en savoir plus.

L'utilisation à des pH et à des températures à la limite des plages recommandées peut avoir un effet significatif sur la durée de vie de la colonne.

**Remarque :** tous les matériaux de remplissage à base de silice présentent une certaine solubilité dans les phases mobiles aqueuses de pH > 6. En cas d'utilisation d'une colonne à base de silice à pH > 6, vous pouvez prolonger la durée de vie de la colonne en l'utilisant à des températures inférieures (40 °C maximum) et avec des concentrations de tampon faibles comprises entre 0,01 et 0,02 M.

## Notes concernant le développement de méthodes pour les colonnes à phase normale

La phase stationnaire est de nature polaire et convient plus particulièrement aux phases mobiles non polaires telles que les mélanges de chlorure de méthylène:hexane ou isopropanol/hexane. Augmenter la quantité du composant polaire dans ces mélanges revient typiquement à réduire le temps de rétention de l'échantillon.

Type de colonne	Développement de méthodes
ZORBAX NH2 Polaris NH2	La rétention diminue avec l'augmentation de la polarité de la phase mobile. De nombreux volumes de colonne de phase mobile sont nécessaires pour assurer la stabilisation après une modification de la composition de la phase mobile. Le nombre de volumes de colonne requis dépend du système utilisé et peut atteindre 50 à 100 volumes de colonne.
ZORBAX Rx-SIL ZORBAX SIL Pursuit XRs Si Polaris Si-A	Les colonnes à base de silice non greffées sont très sensibles aux traces d'eau dans les solvants et dans l'échantillon, il convient donc de maintenir des conditions uniformes pour assurer la reproductibilité de la méthode. Dans le cas d'un gradient d'élution, les solvants primaire et secondaire doivent être modifiés par un ajout d'alcool ou d'acétonitrile, et au moins 30 volumes de solvant doivent circuler dans la colonne à l'issue de chaque analyse. Lors du basculement d'un solvant à l'autre, commencez par rincer la colonne avec un solvant miscible dans les deux, tels que l'alcool isopropylique.
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN ZORBAX Eclipse XDB-CN ZORBAX CN	Les colonnes Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-CN et ZORBAX Eclipse XDB-CN sont livrées avec des solvants à 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 avec l'augmentation de la polarité de la phase mobile. Il est souvent plus pratique d'utiliser cette colonne plutôt qu'une colonne de silice, en particulier pour les gradients d'élution, du fait de la stabilisation rapide de cette phase greffée avec la phase mobile.



## **Nettoyage de votre colonne/Allongement de la durée de vie de votre colonne : colonne à phase normale**

En phase normale, nous recommandons l'utilisation de solvants organiques. Injectez au moins 20 volumes de colonne de chaque solvant, ce qui correspond à 50 mL si vous utilisez une colonne analytique traditionnelle de 4,6 × 250 mm. Essayez les solvants suivants par ordre de force croissants :

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

Le nettoyage d'une colonne fonctionnant en phase normale peut dépendre du type d'échantillon. Si ces solvants ne conviennent pas, contactez Agilent pour que nous puissions vous recommander un solvant potentiellement plus efficace pour votre application et votre matrice d'échantillon.

### **Recommandations de stockage : colonne à phase normale**

Les colonnes à phase normale peuvent généralement être stockées pendant de longues périodes dans leur propre phase mobile. Avant de procéder au stockage, les raccords aux extrémités de la colonne doivent être fermés hermétiquement avec des bouchons d'extrémité pour prévenir le dessèchement du remplissage.

## **Travailler avec des colonnes HILIC**

La chromatographie en phase liquide d'interactions hydrophiles (HILIC) est une méthode permettant de séparer les composés polaires mal retenus sur les colonnes à phase inverse habituelles. Les colonnes Agilent ZORBAX Résolution Rapide Haute Définition (RRHD) 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 InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 contiennent une phase polyhydroxylée greffée sur des particules de silice superficiellement poreuse, et sont livrées remplies d'acétonitrile. Les colonnes InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z contiennent une phase zwitterionique greffée sur des particules de silice superficiellement poreuse, et sont livrées remplies d'un mélange acétonitrile/eau. Tout comme les colonnes à phase normale, les colonnes HILIC nécessitent un temps de stabilisation plus long que les colonnes à phase inverse. Il est à noter que les colonnes ZORBAX Rx-Sil, ZORBAX Sil et ZORBAX NH2 peuvent également être utilisées pour les applications HILIC. Pour basculer ces colonnes en mode HILIC, commencez par les rincer avec de l'alcool isopropylique.

## Paramètres de fonctionnement des colonnes HILIC

Nom de la colonne	Plage de pH	Température maximale	Température suggérée
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5	1,0 à 8,0	45 °C	30 °C
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z	2,0 à 12	80 °C	30 °C
InfinityLab Poroshell 120 HILIC ZORBAX Résolution Rapide Haute Définition (RRHD) HILIC Plus ZORBAX HILIC Plus HPLC	0 à 8,0	60 °C	30 °C

L'utilisation à des pH et à des températures à la limite des plages recommandées peut avoir un effet significatif sur la durée de vie de la colonne.

### Recommandations d'utilisation : HILIC

- Les colonnes HILIC Agilent sont livrées remplies d'acétonitrile ou d'un mélange acétonitrile/eau.
- Veillez à ne pas dépasser les limites de pression de la colonne, notamment lors de la modification de la composition des phases mobiles.
- Les colonnes HILIC Agilent sont compatibles avec l'eau et tous les solvants organiques courants.
- Un tampon doit être ajouté en faible quantité et remplacé régulièrement pour éviter toute contamination microbienne.
- Les éluants contenant des acides volatils (acide formique, acide acétique) ou des bases volatiles (ammoniac) doivent être bouchés hermétiquement.
- Tous les matériaux de silice présentent une certaine solubilité dans les phases mobiles aqueuses de pH > 6. La solubilité de la silice augmente également à haute température. L'utilisation des colonnes ZORBAX RRHD HILIC Plus ou InfinityLab Poroshell 120 HILIC au-dessus de pH 6 et de 40 °C réduit leur durée de vie.

## Notes concernant le développement de méthodes HILIC

Colonne	Notes
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z et HILIC-OH5	<p><b>Conditions initiales de criblage suggérées :</b></p> <p>A : acétate d'ammonium 10 mM            B : (acétonitrile:acétate d'ammonium 100 mM, 90:10)*</p> <p>ou</p> <p>A : formiate d'ammonium 10 mM            B : (acétonitrile:formiate d'ammonium 100 mM, 90:10)*</p> <p>* Pour une concentration finale de 10 mmol</p> <p>Ajustez si nécessaire le pH de la phase mobile</p> <p>Gradient : de 90 % de B à ≥ 60 % de B en 10 minutes</p>
InfinityLab Poroshell 120 HILIC, HILIC-Z et HILIC-OH5  ZORBAX Résolution Rapide Haute Définition (RRHD) HILIC Plus	<p>La plupart des applications HILIC portent sur l'analyse de composés polaires qui sont mal retenus, voire pas du tout retenus sur les colonnes à phase inverse.</p> <p>Il est préférable de stabiliser la colonne avec 30 à 40 % d'eau dans de l'acétonitrile avant toute utilisation.</p> <p>La stabilisation peut nécessiter de 20 à 50 volumes de colonne.</p> <p>La phase mobile peut typiquement être un mélange acétonitrile/eau contenant un tampon d'acétate ou de formiate à 5 à 10 mM. Augmenter la concentration du tampon peut permettre d'améliorer la forme des pics et la rétention. Réduisez la quantité des composants aqueux/tampons pour augmenter la rétention.</p>

## **Nettoyage de votre colonne/Allongement de la durée de vie de votre colonne : colonnes HILIC**

Les échantillons doivent être filtrés avant d'être injectés dans la colonne. Ceci est particulièrement important pour la colonne ZORBAX RRHD HILIC Plus, car son fritté d'entrée a un diamètre nominal de  $0,5\ \mu\text{m}$  et les échantillons doivent être filtrés à travers un filtre pour échantillon de  $0,2\ \mu\text{m}$ . Si le débit du solvant semble limité (contrepression inhabituellement élevée), commencez par vérifier l'absence d'obstruction dans le circuit du solvant jusqu'à l'injecteur de la colonne. Si le problème se trouve avant la colonne, remplacez le tube ou le filtre qui est 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. Les colonnes HILIC RRHD ne peuvent pas être rétrobalayées. Pour retirer les substances fortement retenues sur la colonne, rincez la colonne à l'aide d'un solvant fort ; de l'eau en mode HILIC.

Les colonnes InfinityLab Poroshell HILIC-OH5 peuvent être régénérées par rinçage avec un mélange acétonitrile:acétate d'ammonium 50 mM 50:50 à faible débit pendant au moins 3 heures. Puis stabilisez avec la phase mobile. Les colonnes InfinityLab Poroshell HILIC-Z peuvent être régénérées par rinçage avec un mélange acétonitrile:acétate d'ammonium 10 mM 50:50 à 20 % des débits de fonctionnement habituels pendant au moins 3 heures. Puis stabilisez avec la phase mobile.

## **Recommandations de stockage : colonnes HILIC**

Le solvant recommandé pour un stockage à long terme des colonnes HILIC est l'acétonitrile:eau 90:10. Avant de procéder au stockage, fermez hermétiquement les raccords aux extrémités de la colonne avec des bouchons d'extrémité pour prévenir le dessèchement du remplissage. Les colonnes peuvent être stockées sans risque dans la plupart des phases mobiles HILIC pendant de courtes durées. Toutefois, pour protéger votre matériel, il est préférable d'éliminer les sels de l'instrument et de la colonne en purgeant celle-ci avec la même phase mobile sans tampon (par exemple, en utilisant un mélange ACN:H<sub>2</sub>O 90:10 pour retirer une phase mobile tamponnée d'ACN:formiate à 0,01 M 90:10). Cette approche permet une stabilisation plus rapide avec la phase mobile d'origine, mais plusieurs injections (3 à 6) doivent être réalisées pour vérifier la stabilisation de la colonne.

## Utilisation de colonnes à phase normale et HILIC pour la chromatographie en phase supercritique (SFC)

Les colonnes Agilent convenant à la chromatographie en phase supercritique (SFC) sont typiquement les colonnes à phase normale ou les colonnes HILIC ; elles sont livrées dans des phases mobiles à phase normale ou HILIC. Les colonnes Poroshell 120 EC-CN sont livrées dans un solvant à phase inverse. Les limites relatives à la pression de colonne et au pH s'appliquent également à la SFC. Sachez toutefois que le pH en SFC n'est pas directement comparable aux valeurs de pH des solutions aqueuses. Le pH apparent en mode CO<sub>2</sub>/agent modificateur peut donc différer.

### Stabilisation de la colonne

Avant d'utiliser la colonne, rincez-la avec 10 à 30 volumes de méthanol ou d'alcool isopropylique pour éliminer la totalité des solvants introduits pour l'expédition. Stabilisez-la ensuite en injectant environ 10 à 20 volumes de colonne de phase mobile dans les conditions de démarrage.

### Stockage de la colonne

Veillez à retirer toute trace d'additif tel que les acides, les bases ou les tampons afin de ne pas endommager la colonne. Rincez-la avec 10 à 20 volumes de colonne de méthanol ou d'alcool isopropylique pour retirer la totalité du dioxyde de carbone. Ne stockez pas la colonne dans un mélange de CO<sub>2</sub> et de MeOH car le CO<sub>2</sub> assèche la phase stationnaire en s'évaporant. Enfin, bouchez correctement les extrémités de la colonne pour empêcher le solvant de s'évaporer.

Este folleto ofrece información general para todas las columnas Agilent ZORBAX, Agilent Pursuit, Agilent Polaris y Agilent InfinityLab Poroshell de fase normal e HILIC. En las secciones iniciales se incluye información para las columnas tanto de fase normal como HILIC. Dado que algunos parámetros del método y las instrucciones sobre el cuidado de la columna son distintos para las columnas normales y las HILIC, dichas secciones están desglosadas por separado en las últimas hojas. Para obtener información adicional sobre su columna o familia específica, consulte **[agilent.com/chem/columnchoices](https://www.agilent.com/chem/columnchoices)**

## Primeros pasos

Con cada columna Agilent se adjunta un informe de Control de Calidad (QC) de el rendimiento de la columna, incluido un cromatograma de prueba. El instrumento de prueba para realizar el Control de Calidad (QC) se ha modificado (optimizado) a partir de un instrumento estándar a fin de minimizar el volumen extra de la columna y, por lo tanto, los resultados podrían variar con respecto al sistema usado en su laboratorio. De este modo, es posible una mejor evaluación de la columna y se garantiza un producto más uniforme.

## Instalación

- La dirección del flujo está marcada en la columna.
- **Las columnas de 1,8 µm (ZORBAX RRHT, ZORBAX RRHD) solo se pueden usar en la dirección del flujo marcada en la columna.**
- Para conexiones de columna sin volumen muerto, Agilent recomienda el uso de los conectores InfinityLab. Las opciones son:

Presión máxima del sistema	Conectores recomendados	Referencias
Hasta 400 bar	Conector de giro rápido InfinityLab (apriete a mano)	Conector: 5067-5966
Hasta 800 bar	Conector de giro rápido InfinityLab (con herramienta de montaje)	Conector: 5067-5966 Herramienta de montaje: 5043-0915
Hasta 1300 bar	Conector de conexión rápida InfinityLab	Conector: 5067-5965

Para obtener más información y referencias, consulte el folleto de Conectores Agilent InfinityLab (5991-5164EN).



*Conjunto de conexión rápida  
InfinityLab, ref. 5067-5961*



*Conector de giro rápido  
InfinityLab, ref. 5067-5966*

Si desea obtener más información, visite

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

Debe tenerse cuidado para evitar dañar las columnas de PEEK o revestidas de PEEK durante la instalación. La combinación de compresión y rotación podría provocar daños, por lo que no se recomiendan conectores sin férula tales como los de ajuste manual de PEEK. Los conectores no se deben apretar en exceso y se deben montar a la profundidad correcta con el fin de evitar daños.

## Consideraciones importantes sobre seguridad para todas las columnas LC

- Todos los puntos de conexión de los sistemas LC son posibles fuentes de fugas. Los usuarios deben tener en cuenta la toxicidad o inflamabilidad de las fases móviles.
- Debido al pequeño tamaño de las partículas, los rellenos de las columnas secas son inhalables. Solamente se deben abrir las columnas en una zona con buena ventilación.
- Aténgase a los límites de presión operativa designados para cada columna (consulte la gráfica en la página siguiente). Si se superan estos límites, el rendimiento cromatográfico se verá afectado, lo que podría resultar inseguro.

### Presiones operativas máximas - columnas de hasta 9,4 mm de d.i.

Tipo de columna	Tamaño de partícula	Límite de presión
InfinityLab Poroshell 120 HILIC	1,9 µm	1.300 bares (19.500 psi)
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN	2,7 µm	600 bares (9.000 psi)
InfinityLab Poroshell 120 HILIC		600 bares (9.000 psi)
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z		600 bares (9.000 psi)
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5		400 bares (6.000 psi)
ZORBAX NH2	5 µm, 7 µm	400 bares (6.000 psi)
Agilent 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 de alta definición y resolución rápida (RRHD) HILIC Plus	1,8 µm	1.200 bares (17.000 psi)
ZORBAX RRHT Rx-Sil	1,8 µm	600 bares (9.000 psi)
Polaris NH2	3 µm, 5 µm	400 bares (6.000 psi)
Polaris Si-A	3 µm, 5 µm, 10 µm	400 bares (6.000 psi)
Pursuit XRs-Si	3 µm, 5 µm, 10 µm	400 bares (6.000 psi)



## Sugerencias sobre el uso de las columnas

- Las columnas modernas son robustas y se han diseñado para funcionar durante períodos prolongados en condiciones cromatográficas normales. Puede maximizar la vida útil de la columna si la utiliza atendiendo a sus especificaciones. Revise siempre las especificaciones antes de poner en práctica un método final.
- Aunque, por lo general, no resulta dañino para la columna, se debe evitar el flujo invertido.
- Utilice siempre reactivos de gran pureza y disolventes de calidad cromatográfica o superior para preparar las fases móviles.
- Si se desmonta una columna, se reducirá el rendimiento de la columna.
- Las columnas nuevas contienen una mezcla de disolventes orgánicos. Consulte el informe de Control de Calidad (QC) de prestación para conocer la composición de los disolventes de la columna. Inicialmente, se deben tomar precauciones para que ninguna fase móvil pase a través de la columna, lo que podría originar la formación de un precipitado o de una emulsión.
- Las columnas de fase normal Agilent son compatibles con agua y con todos los disolventes orgánicos habituales.
- Se recomienda el uso de una precolumna para proteger la columna y aumentar su vida útil.
- Cuando las columnas no se utilicen, no se deben mantener con un pH alto ni a una temperatura elevada.
- Debe evitarse el uso de esta columna fuera del intervalo de pH recomendado para la fase de columna (véase la página siguiente). Es previsible que se reduzca la vida útil si se utiliza fuera de los intervalos recomendados de pH y temperatura.

## Consejos para obtener los mejores resultados cromatográficos

- Optimice el instrumento mediante la reducción de la longitud de los capilares entre los componentes; de esta forma, se disminuye el volumen de columna adicional y el ensanchamiento de la banda. Utilice capilares rojos con un diámetro interno de 0,12 mm para el uso normal. Para las columnas de diámetro estrecho (2,1 mm o menos) y de alta resolución, como InfinityLab Poroshell 120 o ZORBAX RRHD, use tubos negros de 0,075 mm de d.i. en sistemas UHPLC. Para obtener información acerca de las opciones de capilares, visite **[agilent.com/chem/lccapillaries](https://www.agilent.com/chem/lccapillaries)**.
- Si usa columnas de fase normal, asegúrese de que los sellos del rotor, los sellos de la bomba, los tubos y todos los demás componentes del instrumento LC sean 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 de Agilent con sus instrumentos LC para conseguir el máximo rendimiento.
- Utilice la filtración de muestras u otros procesos de preparación de muestras que sean apropiados para su muestra. Para obtener más información, visite **[agilent.com/chem/sampleprep](https://www.agilent.com/chem/sampleprep)**.

## Trabajo 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, InfinityLab Poroshell 120 EC-CN, InfinityLab Poroshell 120 HILIC, InfinityLab Poroshell HILIC-OH5, InfinityLab Poroshell HILIC-Z y ZORBAX HILIC Plus, que se envían en disolventes de fase reversa. Debe tenerse cuidado para asegurarse de que la columna se haya equilibrado de forma adecuada antes de su uso. De esta manera, se garantiza la reproducibilidad de un análisis a otro y se ayuda a prevenir la deriva en el tiempo de retención.

### Parámetros de funcionamiento de las columnas de fase normal: pH y temperatura

Fase	Intervalo de pH recomendado	Temperatura máxima de funcionamiento	Temperatura sugerida de funcionamiento
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN*	pH 2,0 a 8,0	60 °C	30 °C
ZORBAX NH2	pH 2,0 a 7,5	60 °C	30 °C
InfinityLab Poroshell 120 HILIC*† ZORBAX Rx-SIL ZORBAX SIL ZORBAX HILIC Plus*†	pH 1,0 a 8,0	Limitado solamente por los límites de temperatura de la fase móvil	
ZORBAX CN	pH 2,0 a 8,0	60 °C	30 °C
ZORBAX Eclipse XDB-CN*	pH 2,0 a 9,0	60 °C	30 °C
Polaris NH2	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

\* Se envían en disolventes de fase reversa.

† Consulte la sección *Trabajo con HILIC* para obtener más información.

Trabajar en los extremos de los intervalos de pH y temperatura afectará significativamente a la vida útil de la columna.

**Nota:** Todos los rellenos con sílice son algo solubles en fases móviles acuosas a pH >6. Si se usan columnas basadas en sílice con un pH >6, se consigue la máxima vida útil de la columna a temperaturas inferiores (40 °C máx.) con concentraciones del tampón bajas, entre 0,01 y 0,02 M.

### Notas sobre el desarrollo de métodos para columnas de fase normal

La fase estacionaria es de naturaleza polar y se usa mejor con fases móviles no polares, como mezclas de cloruro de metileno/hexano o isopropanol/hexano. Si se aumenta la cantidad de componente polar de estas mezclas, normalmente se reduce el tiempo de retención de la muestra.

Tipo de columna	Notas sobre el desarrollo de métodos
ZORBAX NH2 Polaris NH2	La retención decrece si crece la polaridad de la fase móvil.  Son necesarios muchos volúmenes de columna de fase móvil para que se produzca el equilibrio después de los cambios en la composición de la fase móvil. El número de volúmenes de columna necesario depende del sistema en uso y puede ser de hasta entre 50 y 100 volúmenes de columna.
ZORBAX Rx-SIL ZORBAX SIL Pursuit XRs Si Polaris Si-A	Las columnas de sílice no ligada son muy sensibles a las cantidades traza de agua en los disolventes y en la muestra, por lo que es necesario tener cuidado para mantener la uniformidad para la reproducibilidad del método. Cuando se utiliza la elución en gradiente, deben modificarse los disolventes tanto primario como secundario con alcohol o acetonitrilo y se debe permitir el flujo de al menos 30 columnas de disolvente por la columna tras la finalización de cada análisis.  Al cambiar de disolvente, primero hay que lavar la columna con un disolvente mutuamente miscible, como isopropanol.
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN ZORBAX Eclipse XDB-CN ZORBAX CN	Las columnas Agilent 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 decrece si crece la polaridad de la fase móvil.  El rápido equilibrio de esta fase ligada con la fase móvil con frecuencia hace a esta columna más práctica de usar que una de sílice, en especial para la elución en gradiente.

## **Limpieza de la columna/incremento de la vida útil de la columna: columnas de fase normal**

Para la fase normal, recomendamos el uso de disolventes orgánicos. Use al menos 20 volúmenes de columna de cada disolvente, es decir, 50 ml si la columna es la analítica tradicional de 4,6 × 250 mm. Pruebe estos disolventes en orden creciente de fuerza:

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

La limpieza de una columna usada en modo de fase normal puede depender del tipo de muestra. Si estos disolventes no funcionan, contacte con Agilent para que podamos recomendar un disolvente que sea más eficaz con su aplicación y con la matriz de la muestra.

## **Recomendaciones para el almacenamiento: columnas de fase normal**

Las columnas de fase normal habitualmente pueden almacenarse en su propia fase móvil durante períodos prolongados. Antes del almacenamiento de la columna, los conectores finales se deben cerrar herméticamente con tapones terminales para evitar que el relleno se reseque.

## **Trabajo con columnas HILIC**

El HILIC es un método usado para la separación de analitos polares retenidos indebidamente en las columnas de fase reversa típicas. Las columnas Agilent ZORBAX de alta definición y resolución rápida (RRHD) HILIC Plus e InfinityLab Poroshell 120 HILIC son columnas de sílice no ligada, enviadas en acetonitrilo: agua o acetonitrilo y preparadas para su uso para separaciones de HILIC. Las columnas InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 contienen una fase de polihidroxi ligada a partículas de sílice superficialmente porosas y se envían en acetonitrilo. Las columnas InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z contienen una fase zwitteriónica ligada a partículas de sílice superficialmente porosas y se envían en acetonitrilo:agua. Al igual que las columnas de fase normal, las columnas HILIC requieren más equilibrio que las columnas de fase reversa. Tenga en cuenta que las columnas ZORBAX Rx-Sil, ZORBAX Sil y ZORBAX NH2 también se pueden usar para las aplicaciones HILIC. Para cambiar estas columnas al modo HILIC, lávelas primero con isopropanol.

## Parámetros de funcionamiento de las columnas HILIC

Nombre de la columna	Rango de pH	Temperatura máxima	Temperatura sugerida
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5	1,0 a 8,0	45 °C	30 °C
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z	2,0 a 12	80 °C	30 °C
InfinityLab Poroshell 120 HILIC ZORBAX de alta definición y resolución rápida (RRHD) HILIC Plus ZORBAX HILIC Plus HPLC	0 a 8,0	60 °C	30 °C

Trabajar en los extremos de los intervalos de pH y temperatura afectará significativamente a la vida útil de la columna.

### Directrices de funcionamiento: HILIC

- Las columnas HILIC de Agilent se envían con acetonitrilo:agua o con acetonitrilo.
- Debe procurarse no superar los límites de presión de la columna, en especial al cambiar la composición de la fase móvil.
- Las columnas HILIC de Agilent son compatibles con agua y con todos los disolventes orgánicos habituales.
- El tampón debe mezclarse en pequeñas cantidades y cambiarse con frecuencia para evitar el crecimiento microbiano.
- Los eluyentes que contengan ácidos volátiles (como fórmico o acético) o bases (amoníaco) deben sellarse herméticamente.
- Todos los rellenos con sílice son algo solubles en fases móviles acuosas a pH >6. La solubilidad de la sílice también aumenta a temperaturas elevadas. El uso de las columnas ZORBAX RRHD HILIC Plus o InfinityLab Poroshell 120 HILIC por encima de pH 6 y 40 °C reducirá la vida útil de la columna.

## Notas sobre el desarrollo de métodos HILIC

Columna	Notas
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z e HILIC-OH5	<p><b>Condiciones sugeridas para el cribado inicial:</b></p> <p>A: Acetato amónico 10 mM            B: (Acetonitrilo:acetato de amonio 100 mM, 90:10)*            o bien</p> <p>A: Formiato amónico 10 mM            B: (Acetonitrilo:formiato amónico 100 mM, 90:10)*</p> <p>* Para una concentración final de 10 mmol</p> <p>Ajuste el pH de la fase móvil como sea necesario</p> <p>Gradiente: del 90 % B al <math>\geq 60</math> % B en 10 minutos</p>
InfinityLab Poroshell 120 HILIC, HILIC-Z e HILIC-OH5  ZORBAX de alta definición y resolución rápida (RRHD)  HILIC Plus	<p>La mayor parte de las aplicaciones de HILIC son para el análisis de compuestos polares no retenidos o poco retenidos en columnas de fase reversa.</p> <p>Lo mejor es equilibrar la columna con agua al 30-40 % en acetonitrilo antes de su uso.</p> <p>El equilibrio puede precisar de 20 a 50 volúmenes de columna.</p> <p>Una fase móvil típica es acetonitrilo: agua con un tampón de acetato o formiato 5-10 mM. Si se aumenta la concentración del tampón, se podría mejorar la forma de los picos y la retención. Reduzca el componente acuoso/tampón para aumentar la retención.</p>

## **Limpieza de la columna/incremento de la vida útil de la columna: columnas HILIC**

Es necesario filtrar las muestras antes de su inyección en la columna. Esto es particularmente importante para la columna ZORBAX RRHD HILIC Plus, pues la frita de entrada de la columna tiene un diámetro nominal de 0,5  $\mu\text{m}$  y las muestras deben filtrarse con un filtro de muestras de 0,2  $\mu\text{m}$ . Si parece que el flujo de disolvente está restringido (una retropresión de la columna inusualmente alta), verifique primero si el flujo de disolvente presenta obstrucciones hasta la entrada de la columna. Si la restricción está antes de la columna, cambie el trozo de tubo correspondiente o el filtro que esté obstruido. Si la columna está obstruida, la InfinityLab Poroshell 120 HILIC puede purgarse con retroflujo con 20-30 volúmenes de columna de fase móvil. La columna RRHD HILIC no puede purgarse con retroflujo. Para eliminar de la columna los materiales muy retenidos, lave la columna con un disolvente fuerte que, en modo HILIC, es el agua.

Las columnas InfinityLab Poroshell HILIC-OH5 pueden regenerarse lavando con acetonitrilo:acetato de amonio 50 mM 50/50 con flujo reducido durante al menos 3 horas. A continuación, equilibre con la fase móvil. Las columnas InfinityLab Poroshell HILIC-Z pueden regenerarse lavando con 50/50 acetonitrilo:acetato de amonio 10 mM con un flujo operativo del 20 % del normal durante al menos 3 horas. A continuación, equilibre con la fase móvil.

## **Recomendaciones para el almacenamiento: columnas HILIC**

Se recomienda acetonitrilo:agua (90:10) como disolvente de almacenamiento a largo plazo para columnas HILIC. Antes del almacenamiento de la columna, cierre herméticamente los conectores finales con tapones terminales para evitar que el relleno se reseque. Las columnas pueden almacenarse con seguridad durante periodos cortos en la mayoría de fases móviles de HILIC. Sin embargo, para proteger el equipo, lo mejor es eliminar las sales del instrumento y de la columna mediante el purgado de la columna con la misma fase móvil sin la solución tampón (por ejemplo, con acetonitrilo:H<sub>2</sub>O 90:10 para eliminar una fase móvil con acetonitrilo:tampón formiato 0,01 M 90:10). El reequilibrio es más rápido con la fase móvil original cuando se sigue este planteamiento, pero es necesario realizar varias inyecciones (de 3 a 6) para verificar el equilibrio de la columna.



## Uso de columnas de fase normal e HILIC en la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC)

Las columnas Agilent adecuadas para SFC son normalmente de fase normal o HILIC y se envían en fase normal o en fases móviles HILIC. Las columnas Poroshell 120 EC-CN se envían en disolventes de fase reversa. Los límites de presión y pH de la columna siguen siendo válidos para SFC. Recuerde que el pH en SFC no es directamente comparable con los valores de pH de las soluciones acuosas. En consecuencia, el pH aparente en el CO<sub>2</sub>/modificador orgánico podría ser diferente.

### Equilibrio de la columna

Antes de su uso, lave la columna con 10-30 volúmenes de metanol o isopropanol para eliminar por completo los disolventes del envío. A continuación, equilibre la columna con aproximadamente 10-20 volúmenes de columna de fase móvil en las condiciones iniciales.

### Almacenamiento de la columna

Asegúrese de que elimina totalmente los aditivos tales como ácidos, bases o tampones para evitar que dañen la columna. Lave la columna con 10–20 volúmenes de columna de metanol o isopropanol para eliminar todo el dióxido de carbono. No almacene las columnas con una mezcla de CO<sub>2</sub> y MeOH, pues el CO<sub>2</sub> se evaporará y resecará la fase estacionaria. Selle adecuadamente con tapones terminales para evitar la evaporación del disolvente.

Questo manuale fornisce informazioni generali su tutte le colonne Agilent a fase normale e HILIC ZORBAX, Pursuit, Polaris e InfinityLab Poroshell. Nelle sezioni iniziali sono incluse informazioni sia per le colonne a fase normale sia per le colonne HILIC. Poiché alcuni parametri dei metodi e alcune istruzioni sulla cura delle colonne differiscono tra le colonne HILIC e quelle a fase normale, le sezioni pertinenti sono trattate separatamente nelle ultime pagine. Per ulteriori informazioni su una particolare colonna o linea di colonne, consultare il sito **[agilent.com/chem/columnchoices](https://www.agilent.com/chem/columnchoices)**

### **Per iniziare**

A ogni nuova colonna Agilent è allegato un report sulle prestazioni QC della colonna, con incluso un cromatogramma di prova. Lo strumento impiegato per la prova QC è modificato (ottimizzato) partendo da uno strumento standard al fine di ridurre al minimo il volume extra-colonna; i risultati, pertanto, potrebbero differire da quelli ottenuti con il sistema in uso nel proprio laboratorio. Ciò consente una migliore valutazione della colonna e assicura una maggiore omogeneità del prodotto.

## Installazione

- La direzione del flusso è indicata sulla colonna.
- **Le colonne da 1,8 µm (ZORBAX RRHT, ZORBAX RRHD) possono essere utilizzate solo nella direzione di flusso indicata.**
- Per realizzare collegamenti rimovibili a volume morto nullo, Agilent consiglia l'uso di raccordi InfinityLab. Sono disponibili le seguenti opzioni:

Pressione massima del sistema	Raccordo consigliato	Codici
Fino a 400 bar	Raccordo Quick Turn InfinityLab (a chiusura manuale)	Raccordo: 5067-5966
Fino a 800 bar	Raccordo Quick Turn InfinityLab (con utensile di montaggio)	Raccordo: 5067-5966 Utensile di montaggio: 5043-0915
Fino a 1300 bar	Raccordo ad attacco rapido InfinityLab Quick Connect	Raccordo: 5067-5965

Per ottenere maggiori informazioni e i codici, consultare la brochure sui raccordi Agilent InfinityLab (5991-5164ITE).



*Gruppo InfinityLab Quick Connect, codice 5067-5961*



*Raccordo Quick Turn InfinityLab, codice 5067-5966*

Maggiori informazioni sono disponibili sul sito

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

Durante l'installazione è necessario prestare particolare attenzione per evitare danni alle colonne in PEEK o con rivestimento in PEEK. Compressione e rotazione combinate possono provocare danni; pertanto si sconsiglia di utilizzare raccordi senza ferrule quali i raccordi in PEEK a chiusura manuale. Non applicare un serraggio eccessivo ai raccordi; pressare i raccordi alla profondità corretta per evitare danni.

## Importanti considerazioni sulla sicurezza relative alle colonne per LC

- Tutti i punti di collegamento nei sistemi LC sono potenziali fonti di perdite. Gli utilizzatori devono tenere conto della tossicità o infiammabilità delle fasi mobili.
- Poiché le particelle sono di piccole dimensioni, le fasi impaccate ed essiccate delle colonne sono respirabili. Le colonne devono essere aperte solo in una zona ben aerata.
- Rispettare i limiti di pressione operativa riportati per ogni colonna (vedere la tabella alla pagina successiva). Superare questi limiti compromette le prestazioni cromatografiche e potrebbe essere pericoloso.

## Valori massimi della pressione operativa – colonne con d.i. fino a 9,4 mm

Tipo di colonna	Dimensioni delle particelle	Limite di pressione
InfinityLab Poroshell 120 HILIC	1,9 µm	1300 bar (19.500 psi)
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN	2,7 µm	600 bar (9.000 psi)
InfinityLab Poroshell 120 HILIC		600 bar (9.000 psi)
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z		600 bar (9.000 psi)
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5		400 bar (6.000 psi)
ZORBAX NH2	5 µm, 7 µm	400 bar (6.000 psi)
Agilent 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 NH2	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)

## Consigli per l'utilizzo delle colonne

- Le colonne moderne sono robuste e progettate per funzionare per lunghi periodi in condizioni cromatografiche standard. Per ottenere la massima durata della colonna, utilizzarla rispettandone le specifiche. Prima di considerare ottimizzato un metodo, verificare sempre le specifiche delle colonne.
- Anche se in genere non è dannoso per la colonna, si deve evitare di invertire il flusso.
- Per la preparazione della fase mobile, utilizzare sempre reagenti di purezza elevata e solventi per cromatografia o di grado superiore.
- Lo smontaggio di una colonna riduce le prestazioni della colonna stessa.
- Le colonne nuove contengono una miscela di solventi organici. Vedere il report sulle prestazioni QC per conoscere la composizione del solvente presente nella colonna. Inizialmente, prestare attenzione a non far passare nella colonna fasi mobili che potrebbero causare la formazione di un precipitato o di un'emulsione.
- Le colonne Agilent a fase normale sono compatibili con l'acqua e con tutti i solventi organici comuni.
- Si consiglia di utilizzare una precolonna per proteggere la colonna e prolungarne la durata.
- Le colonne non devono essere tenute a pH alto o a temperatura elevata mentre non sono in uso.
- Evitare di utilizzare la colonna al di fuori dell'intervallo di pH consigliato per la fase della colonna (vedere la pagina successiva). Quando si opera al di fuori degli intervalli consigliati di pH e temperatura ci si deve attendere una riduzione della durata della colonna.

## Consigli per ottenere i migliori risultati cromatografici

- Ottimizzare la strumentazione riducendo al minimo la lunghezza dei tubi tra i componenti per ridurre il volume extra-colonna e l'allargamento di banda. Usare tubi rossi da 0,12 mm d.i. per le normali attività. Nel caso delle colonne narrow-bore (fino a 2,1 mm) ad alta risoluzione, per esempio le InfinityLab Poroshell 120 o ZORBAX RRHD, usare tubi neri da 0,075 mm d.i. con i sistemi UHPLC. Per maggiori informazioni sui tubi capillari disponibili visitare il sito **[agilent.com/chem/lccapillaries](https://www.agilent.com/chem/lccapillaries)**.
- Se si utilizzano colonne a fase normale, assicurarsi che le guarnizioni del rotore, le guarnizioni 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).
- Utilizzare lampade certificate Agilent con gli strumenti LC per ottenere le migliori prestazioni.
- Filtrare il campione o sottoporlo ad altre procedure di preparazione adeguate. Maggiori informazioni sono disponibili sul sito **[agilent.com/chem/sampleprep](https://www.agilent.com/chem/sampleprep)**.

## Utilizzo delle colonne a fase normale

Tutte le colonne a fase normale vengono testate prima della spedizione e sono fornite in un eluente di prova per fase normale. Fanno eccezione le colonne ZORBAX Eclipse XDB-CN, InfinityLab Poroshell 120 EC-CN, InfinityLab Poroshell 120 HILIC, InfinityLab Poroshell HILIC-OH5, InfinityLab Poroshell HILIC-Z e ZORBAX HILIC Plus che vengono fornite in solventi per fase inversa. Assicurarsi che la colonna sia stata equilibrata adeguatamente prima dell'uso. Ciò garantirà la riproducibilità da analisi ad analisi e aiuterà a prevenire la deriva del tempo di ritenzione.

### Parametri operativi delle colonne a fase normale: pH e temperatura

Fase	Intervallo di pH consigliato	Temperatura operativa massima	Temperatura operativa consigliata
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN*	Da pH 2,0 a 8,0	60 °C	30 °C
ZORBAX NH2	Da pH 2,0 a 7,5	60 °C	30 °C
InfinityLab Poroshell 120 HILIC*† ZORBAX Rx-SIL ZORBAX SIL ZORBAX HILIC Plus*†	Da pH 1,0 a 8,0	Sulla base dei limiti di temperatura della fase mobile	
ZORBAX CN	Da pH 2,0 a 8,0	60 °C	30 °C
ZORBAX Eclipse XDB-CN*	Da pH 2,0 a 9,0	60 °C	30 °C
Polaris NH2	Da pH 2,0 a 8,0	60 °C	30 °C
Polaris Si-A	Da pH 1,5 a 10,0	60 °C	30 °C
Pursuit XRs Si	Da pH 2,0 a 8,0	60 °C	30 °C

\* Fornita in solventi per fase inversa.

† Vedere la sezione *Utilizzo delle colonne HILIC* per maggiori informazioni.

Il funzionamento ai valori estremi degli intervalli di pH e temperatura incide significativamente sulla durata della colonna.

**Nota:** tutti gli impaccamenti a base di silice hanno una certa solubilità nelle fasi mobili acquose a pH >6. Quando si utilizzano colonne a base di silice a pH >6, la durata ottimale delle colonne si ottiene a temperature più basse (40 °C max) e a basse concentrazioni di tampone (comprese nell'intervallo tra 0,01 e 0,02 M).

### Note sullo sviluppo metodi per colonne a fase normale

La fase stazionaria ha natura polare e l'uso ottimale si ottiene con fasi mobili non polari quali miscele cloruro di metilene/esano o isopropanolo/esano. Incrementando la quantità di componente polare nelle miscele, in genere si riduce il tempo di ritenzione del campione.

Tipo di colonna	Note sullo sviluppo metodi
ZORBAX NH2 Polaris NH2	La ritenzione diminuisce all'aumentare della polarità della fase mobile.  Sono necessari molti volumi di colonna di fase mobile per l'equilibratura in seguito a modifiche della composizione della fase mobile. Il numero di volumi di colonna necessari dipende dal sistema in uso e può raggiungere valori massimi compresi tra 50 e 100 volumi di colonna.
ZORBAX Rx-SIL ZORBAX SIL Pursuit XRs Si Polaris Si-A	Le colonne in silice non legata sono molto sensibili a tracce di acqua nei solventi e nei campioni; pertanto, è necessario assicurarsi di mantenere condizioni uniformi ai fini della riproducibilità del metodo. Se si impiega l'eluizione in gradiente, sia il solvente primario sia quello secondario dovrebbero essere modificati con alcol o acetonitrile e dopo il completamento di ogni analisi dovrebbero essere fatti fluire attraverso la colonna almeno 30 volumi di colonna di solvente.  Quando si passa da un solvente a un altro, lavare innanzitutto la colonna con un solvente miscibile in entrambi, per esempio isopropanolo.
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN ZORBAX Eclipse XDB-CN ZORBAX CN	Le colonne Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-CN e ZORBAX Eclipse XDB-CN sono fornite in solventi per fase inversa. Tuttavia, previo lavaggio con isopropanolo, è possibile utilizzarle anche per applicazioni in fase normale.  La ritenzione diminuisce all'aumentare della polarità della fase mobile.  La rapidità di equilibratura con fase mobile di questa fase legata spesso rende più pratico l'uso di questa colonna rispetto a una in silice, in particolare per l'eluizione in gradiente.



## **Pulizia della colonna/prolungamento della durata della colonna: colonne a fase normale**

Per la fase normale, si consiglia l'uso di solventi organici. Usare almeno 20 volumi di colonna di ciascun solvente, ossia 50 mL se la colonna in uso è quella analitica tradizionale da  $4,6 \times 250$  mm. Provare a usare i seguenti solventi in ordine crescente di forza:

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

La pulizia di una colonna impiegata in modalità a fase normale può dipendere dal tipo di campione. Se i solventi di cui sopra non sono efficaci, rivolgersi ad Agilent per consigli su un solvente che potrebbe essere più efficace per la specifica applicazione e la particolare matrice del campione.

### **Indicazioni per la conservazione: colonne a fase normale**

In genere le colonne a fase normale possono essere conservate per lunghi periodi nella rispettiva fase mobile. Prima di conservare la colonna, i raccordi terminali devono essere chiusi ermeticamente con tappi terminali per evitare che l'impaccamento si secchi.

## **Utilizzo delle colonne HILIC**

Il metodo HILIC è utilizzato per la separazione di analiti polari caratterizzati da una ritenzione inadeguata con le tipiche colonne a fase inversa.

Le colonne Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD) HILIC Plus e InfinityLab Poroshell 120 HILIC sono colonne in silice non legata, fornite in acetonitrile/acqua o in acetonitrile, subito pronte all'uso per le separazioni HILIC. Le colonne InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 contengono una fase poliidrossi legata a particelle in silice a superficie porosa e sono fornite in acetonitrile. Le colonne InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z contengono una fase zwitterionica legata a particelle in silice a superficie porosa e sono fornite in acetonitrile/acqua. Come le colonne a fase normale, le colonne HILIC richiedono tempi di equilibrizzazione più lunghi rispetto alle colonne a fase inversa. Tenere presente che per le applicazioni HILIC si possono impiegare anche le colonne ZORBAX Rx-Sil, ZORBAX Sil e ZORBAX NH2. Per passare alla modalità HILIC con queste colonne, eseguire innanzitutto un lavaggio con alcol isopropilico.

## Parametri operativi delle colonne HILIC

Nome della colonna	Intervallo pH	Temperatura massima	Temperatura consigliata
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5	Tra 1,0 e 8,0	45 °C	30 °C
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z	Tra 2,0 e 12	80 °C	30 °C
InfinityLab Poroshell 120 HILIC ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD) HILIC Plus ZORBAX HILIC Plus HPLC	Tra 0 e 8,0	60 °C	30 °C

Il funzionamento ai valori estremi degli intervalli di pH e temperatura incide significativamente sulla durata della colonna.

### Linee guida operative: HILIC

- Le colonne HILIC Agilent sono fornite in acetonitrile/acqua o in acetonitrile.
- Si raccomanda di prestare attenzione a non superare i limiti di pressione delle colonne, in particolare quando si cambia la composizione della fase mobile.
- Le colonne HILIC Agilent sono compatibili con l'acqua e con tutti i solventi organici comuni.
- Il tampone deve essere miscelato in piccole dosi e sostituito spesso con tampone fresco per prevenire la proliferazione microbica.
- Gli eluenti contenenti acidi (formico, acetico) o basi (ammoniaca) volatili devono essere chiusi ermeticamente.
- La silice ha una certa solubilità nelle fasi mobili acquose a pH >6. La solubilità della silice aumenta inoltre ad alte temperature. L'utilizzo delle colonne ZORBAX RRHD HILIC Plus o InfinityLab Poroshell 120 HILIC a valori di pH >6 e a temperature >40 °C ne riduce la durata.

## Note sullo sviluppo metodi HILIC

Colonna	Note
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z e HILIC-OH5	<p><b>Condizioni iniziali di screening suggerite:</b></p> <p>A: acetato di ammonio 10 mM            B: (acetonitrile/acetato di ammonio 100 mM, 90:10)*            oppure            A: formiato di ammonio 10 mM            B: (acetonitrile/formiato di ammonio 100 mM, 90:10)*</p> <p>* Per una concentrazione finale pari a 10 mmol</p> <p>Regolare il pH della fase mobile secondo necessità</p> <p>Gradiente: da 90% B a ≥60% B in 10 minuti</p>
InfinityLab Poroshell 120 HILIC, HILIC-Z e HILIC-OH5  ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD) HILIC Plus	<p>Le applicazioni HILIC più comuni riguardano l'analisi di composti polari non ritenuti o scarsamente ritenuti dalle colonne a fase inversa.</p> <p>La procedura ottimale prima dell'uso consiste nell'equilibrare la colonna con 30-40% di acqua in acetonitrile.</p> <p>L'equilibratura può richiedere 20-50 volumi di colonna.</p> <p>Una fase mobile tipica è la miscela acetonitrile/acqua in tampone acetato o formiato 5-10 mM. L'incremento della concentrazione del tampone può far migliorare la forma dei picchi e la ritenzione. Ridurre il componente acquoso/tampone per aumentare la ritenzione.</p>

## **Pulizia della colonna/prolungamento della durata della colonna: colonne HILIC**

Prima dell'iniezione in colonna i campioni andrebbero filtrati.

Questa operazione è particolarmente importante nel caso della colonna ZORBAX RRHD HILIC Plus sul cui ingresso è montato un frit con dimensioni nominali di 0,5 µm; in questo caso i campioni andrebbero filtrati attraverso un filtro da 0,2 µm. In presenza di restrizioni del flusso di solvente (contropressione della colonna insolitamente elevata), verificare innanzitutto che il flusso di solvente non sia ostruito fino all'ingresso della colonna.

Se la restrizione si trova a monte della colonna, sostituire il tratto di tubo o il filtro ostruito. Se la colonna è ostruita, è possibile invertire il flusso della colonna InfinityLab Poroshell 120 HILIC utilizzando 20-30 volumi di colonna di fase mobile. Non è possibile invertire il flusso della colonna HILIC RRHD. Per rimuovere dalla colonna materiali caratterizzati da una forte ritenzione, lavare la colonna con un solvente forte che, in modalità HILIC, è l'acqua.

Le colonne InfinityLab Poroshell HILIC-OH5 possono essere rigenerate tramite lavaggio in una miscela 50:50 di acetonitrile/acetato di ammonio 50 mM a bassa velocità di flusso per almeno 3 ore. Quindi equilibrare con la fase mobile. Le colonne InfinityLab Poroshell HILIC-Z possono essere rigenerate tramite lavaggio in una miscela 50:50 di acetonitrile/acetato di ammonio 10 mM al 20% della normale velocità di flusso operativa per almeno 3 ore. Quindi equilibrare con la fase mobile.

## **Indicazioni per la conservazione: colonne HILIC**

Per la conservazione a lungo termine delle colonne HILIC si consiglia di utilizzare la miscela acetonitrile/acqua (90:10). Prima di conservare la colonna, chiudere ermeticamente i raccordi terminali con tappi terminali per evitare che l'impaccamento si secchi. Le colonne possono essere conservate in modo sicuro per brevi periodi nella maggior parte delle fasi mobili HILIC. Tuttavia, per proteggere l'apparecchiatura, la procedura ottimale consiste nell'eliminare i sali dallo strumento e dalla colonna spurgando la colonna con la stessa fase mobile senza il tampone (per esempio usando una soluzione ACN:H<sub>2</sub>O 90:10 per eliminare una fase mobile tamponata ACN/formiato 0,01 M 90:10). Adottando questo approccio, la riequilibrio è più rapida con la fase mobile originale ma si dovrebbero eseguire varie iniezioni (da 3 a 6) per verificare l'equilibratura della colonna.

## Uso di colonne a fase normale e HILIC nella cromatografia liquida supercritica (SFC)

Le colonne Agilent indicate per la tecnica SFC sono in genere colonne a fase normale o HILIC fornite in fasi mobili per fase normale o per HILIC. Le colonne Poroshell 120 EC-CN sono fornite in solvente per fase inversa. I limiti relativi alla pressione in colonna e al pH rimangono invariati nel caso della tecnica SFC. Tenere presente che il pH nelle applicazioni SFC non è direttamente confrontabile con i valori di pH delle soluzioni acquose. Pertanto, il pH apparente in  $\text{CO}_2$ /modificatore organico potrebbe essere diverso.

### Equilibratura della colonna

Prima dell'uso, lavare la colonna con 10-30 volumi di metanolo o alcol isopropilico per rimuovere completamente i solventi in cui la colonna è fornita. Equilibrare quindi la colonna con circa 10-20 volumi di colonna di fase mobile alle condizioni iniziali.

### Conservazione della colonna

Assicurarsi di rimuovere completamente additivi quali acidi, basi o tamponi per prevenire danni alla colonna. Lavare la colonna con 10-20 volumi di colonna di metanolo o alcol isopropilico per rimuovere completamente il diossido di carbonio. Non conservare le colonne in una miscela di  $\text{CO}_2$  e MeOH in quanto la  $\text{CO}_2$  evapora e la fase stazionaria si secca. Chiudere adeguatamente con tappi terminali per prevenire l'evaporazione del solvente.

この冊子には、すべての Agilent ZORBAX、Agilent Pursuit、Agilent Polaris、Agilent InfinityLab Poroshell 順相および 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。

## 概要

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、テスト結果は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。

## 据付

- フローの方向はカラム上に記載されています。
- **1.8 μm のカラム (ZORBAX RRHT、ZORBAX RRHD) は、カラムに記された方向のフローでのみ使用できます。**
- 取り外し可能でゼロデッドボリュームのカラム接続を実現するために、Agilent は InfinityLab フィッティングの使用を推奨しています。次の選択肢があります。

最大システム圧力	推奨フィッティング	部品番号
最大 400 bar	InfinityLab クイックターンフィッティング (フィンガータイト)	フィッティング: 5067-5966
最大 800 bar	InfinityLab クイックターンフィッティング (取り付けツール使用)	フィッティング: 5067-5966 取り付けツール: 5043-0915
最大 1300 bar	InfinityLab クイックコネクトフィッティング	フィッティング: 5067-5965

より詳細な情報および部品番号については、Agilent InfinityLab フィッティングのカタログ (5991-5164JAJP) を参照してください。



InfinityLab クイックコネクトアセ  
ンプリ、p/n 5067-5961



InfinityLab クイックターンフィッティ  
ング、p/n 5067-5966

詳細については、[www.agilent.com/chem/infinitylabfittings](http://www.agilent.com/chem/infinitylabfittings) をご覧ください

取り付け時は、PEEK または PEEK ライナ付きカラムを傷つけないように注意してください。圧力を加えながら回すと損傷の原因となる可能性があるため、PEEK フィンガータイトフィッティングのようなフェラルなしのフィッティングは推奨されません。フィッティングを絞め過ぎないでください。また、損傷を防ぐために適切な位置で固定してください。

## 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。カラムを分解する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（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、継手部分からの液漏れなど、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
InfinityLab Poroshell 120 HILIC	1.9 µm	1300 bar (19500 psi)
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN	2.7 µm	600 bar (9,000 psi)
InfinityLab Poroshell 120 HILIC		600 bar (9,000 psi)
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z		600 bar (9,000 psi)
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5		400 bar (6,000 psi)
ZORBAX NH2	5 µm、7 µm	400 bar (6,000 psi)
Agilent 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	1,200 bar (17,000 psi)
ZORBAX RRHT Rx-SIL	1.8 µm	600 bar (9,000 psi)
Polaris NH2	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)



## カラム使用のヒント

- 近年の LC カラムは堅牢性が高く、一般的なクロマトグラフィー条件下で長期間使用でき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。
- カラムを損傷することはありませんが、逆方向のフローは避けてください。
- 移動相の準備には、高純度の試薬と、クロマトグラフィー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。

## 最適なクロマトグラフィー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。通常は、内径 0.12 mm の赤い配管を使用します。InfinityLab Poroshell 120 や ZORBAX RRHD のようなナローポア (2.1 mm 以下) の高分離能カラムの場合、UHPLC システムで内径 0.075 mm の黒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 (InfinityLab 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。詳しくは [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、InfinityLab Poroshell 120 EC-CN、InfinityLab Poroshell 120 HILIC、InfinityLab Poroshell HILIC-OH5、InfinityLab Poroshell HILIC-Z、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

固相	推奨 pH 範囲	最大動作温度	推奨動作温度
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN*	pH 2.0 ~ 8.0	60 °C	30 °C
ZORBAX NH2	pH 2.0 ~ 7.5	60 °C	30 °C
InfinityLab Poroshell 120 HILIC*† ZORBAX Rx-SIL ZORBAX SIL 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 NH2	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

\* 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 範囲と温度範囲の上限や下限付近で使用すると、カラムの寿命に重大な影響を及ぼします。

**注:** シリカベースの充填剤は、pH > 6 の水性移動相で劣化が早まります。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 ~ 0.02 M の範囲の低濃度のバッファ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 NH2 Polaris NH2	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 倍が必要になる場合があります。
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。
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN ZORBAX Eclipse XDB-CN ZORBAX CN	Agilent InfinityLab 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。カラム体積の 20 倍以上の溶媒を使用します。カラムが一般的な分析用の 4.6 × 250 mm の場合、50 mL となります。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せん。カラムの保管の前に、充填剤の乾燥を避けるため、エンドフィッティングに終端プラグをしっかりと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 InfinityLab 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。InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 カラムには、ポリヒドロキシ相が表面多孔質シリカ粒子に結合されて入っており、アセトニトリルが封入された状態で出荷されます。InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムには、両性イオン型相が表面多孔質シリカ粒子に結合されて入っており、アセトニトリル / 水混合物が封入された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 NH<sub>2</sub> 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、最初に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	最高温度	推奨温度
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5	1.0 ~ 8.0	45 °C	30 °C
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z	2.0 ~ 12	80 °C	30 °C
InfinityLab Poroshell 120 HILIC	0 ~ 8.0	60 °C	30 °C
ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD) HILIC Plus			
ZORBAX HILIC Plus HPLC			

pH 範囲と温度範囲の上限や下限付近で使用すると、カラムの寿命に重大な影響を及ぼします。

### 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。
- 特に移動相の組成を変更する場合は、カラム圧力の上限を超えないように注意する必要があります。
- 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。
- バッファは少量ずつ混合し、頻繁に新しくして微生物の繁殖を防止する必要があります。
- 揮発性酸 (ギ酸、酢酸) または塩基性物質 (アンモニア) を含む溶出液は、確実に密閉する必要があります。
- シリカは、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 InfinityLab Poroshell 120 HILIC カラムを pH 6 および 40 °C 以上で使用すると、カラム寿命が短くなります。

## HILIC メソッド開発に関する注意

カラム	注意事項
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z、HILIC-OH5	<p><b>推奨される初期スクリーニング条件:</b></p> <p>A: 10 mM 酢酸アンモニウム            B: (アセトニトリル:100 mM 酢酸アンモニウム、90:10)*</p> <p>または</p> <p>A: 10 mM ギ酸アンモニウム            B: (アセトニトリル:100 mM ギ酸アンモニウム、90:10)*</p> <p>* 最終濃度が 10 mM の場合</p> <p>必要に応じて移動相の pH を調整</p> <p>グラジエント: 90 % B ~ ≥ 60 % B で 10 分間以上</p>
InfinityLab Poroshell 120 HILIC、HILIC-Z、 HILIC-OH5	<p>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です。</p>
ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD)	<p>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。</p>
HILIC Plus	<p>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。</p> <p>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。</p>

## 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ろ過してください。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ろ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、InfinityLab 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。

InfinityLab Poroshell HILIC-OH5 カラムは、50/50 のアセトニトリル:50 mM 酢酸アンモニウムを使用して、低流量で 3 時間以上フラッシュすることによって再生できます。次に、移動相で平衡化します。

InfinityLab Poroshell HILIC-Z カラムは、50/50 のアセトニトリル:10 mM 酢酸アンモニウムを使用して、通常動作流量の 20 % で 3 時間以上フラッシュすることによって再生できます。次に、移動相で平衡化します。

### 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 (90:10) を推奨します。カラムの保管の前に、充填剤の乾燥を避けるため、エンドフィッティングにプラグをしっかりと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 (例えば、90:10 の ACN:0.01 M ギ酸塩バッファー入り移動相を除去するには、90:10 の ACN:H<sub>2</sub>O 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。



## 超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) での 順相および HILIC カラムの使用

SFC に適した Agilent カラムは、一般的には順相または HILIC カラムで、順相または HILIC 移動相が封入された状態で出荷されます。Poroshell 120 EC-CN カラムは逆相溶剤が封入された状態で出荷されます。カラム圧力および pH の上限値は、SFC においても守る必要があります。ただし、SFC での pH は水溶液の pH 値と直接比較することはできません。このため、CO<sub>2</sub>/有機溶媒中の見かけの pH は異なることがあります。

### カラム平衡化

使用前に、10~30 倍の量のメタノールまたはイソプロピルアルコールを用いてカラムをフラッシュし、出荷時の溶媒を完全にフラッシュアウトします。その後、初期条件でカラム体積の約 10~20 倍の移動相を用いてカラムを平衡化します。

### カラムの保管

カラムの損傷を防ぐために、酸性物質、塩基性物質、バッファーなどの添加物が完全に取り除かれていることを確認します。カラム体積の 10 ~ 20 倍の量のメタノールまたはイソプロピルアルコールでカラムをフラッシュして、すべての二酸化炭素を除去します。カラムは、CO<sub>2</sub> と MeOH の混合物中に保管しないでください。CO<sub>2</sub> が蒸発して固体相が乾いてしまうためです。溶媒の蒸発を防ぐために、プラグで適切に密閉してください。

本手册提供关于所有 Agilent ZORBAX、Agilent Pursuit、Agilent Polaris 和 Agilent InfinityLab Poroshell 正相和 HILIC 色谱柱的基本信息。开始部分介绍了关于正相和 HILIC 色谱柱的信息。HILIC 与正相色谱柱的一些方法参数和色谱柱维护说明存在差异, 因此这些部分将在最后几页中分开独立说明。有关特定色谱柱或产品系列的更多信息, 请访问 [agilent.com/chem/columnchoices](https://www.agilent.com/chem/columnchoices)

## 入门指南

每根安捷伦色谱柱均附有包括测试色谱图在内的 QC 色谱柱性能报告。QC 测试仪器基于标准仪器改进 (优化) 而来, 可以使柱外体积降至最低, 因此结果可能与您实验室系统的结果有所不同。这套系统可以对色谱柱进行更加全面的评估, 确保产品具有更高的一致性。

## 安装

- 色谱柱上标明了液流方向。
- **1.8  $\mu\text{m}$  色谱柱 (ZORBAX RRHT, ZORBAX RRHD) 只能按照色谱柱上标明的液流方向使用。**
- 为实现可拆卸的零死体积色谱柱连接, 安捷伦推荐使用 InfinityLab 接头。可选的接头包括:

最大系统压力	建议的接头	部件号
最高 400 bar	InfinityLab Quick Turn 接头 (手紧接头)	接头: 5067-5966
最高 800 bar	InfinityLab Quick Turn 接头 (带有安装工具)	接头: 5067-5966 安装工具: 5043-0915
最高 1300 bar	InfinityLab Quick Connect 快速连接接头	接头: 5067-5965

如需了解更多信息和部件号, 请参见《Agilent InfinityLab 接头产品样本》(5991-5164CHCN)。



InfinityLab Quick Connect 快速连接组件, 部件号 5067-5961



InfinityLab Quick Turn 接头, 部件号 5067-5966

如需了解更多信息, 请访问 [www.agilent.com/chem/infinitylabfittings](http://www.agilent.com/chem/infinitylabfittings)

在安装过程中, 必须格外小心, 以免损坏 PEEK 或具有 PEEK 内衬的色谱柱。同时进行压紧和旋转可能会损坏色谱柱, 因此, 不建议使用不带密封垫圈的接头, 例如 PEEK 手紧接头。接头不应拧得过紧, 并且应拧至适当深度以避免损坏。

## 针对所有液相色谱柱的重要安全注意事项

- 液相色谱系统中的所有连接点都有可能成为泄漏源。用户应当了解所使用流动相的毒性或易燃性。
- 由于填料粒径较小，因此干燥的柱填料可被吸入体内。只能在通风良好的区域打开色谱柱。
- 请遵循每根色谱柱指明的操作压力上限（请参见下一页的图表）。超出这些限制会降低色谱性能，并会有安全隐患。

## 最大操作压力 – 内径最大为 9.4 mm 的色谱柱

色谱柱类型	填料粒径	压力限值
InfinityLab Poroshell 120 HILIC	1.9 $\mu\text{m}$	1300 bar (19500 psi)
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN	2.7 $\mu\text{m}$	600 bar (9000 psi)
InfinityLab Poroshell 120 HILIC		600 bar (9000 psi)
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z		600 bar (9000 psi)
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5		400 bar (6000 psi)
ZORBAX NH2	5 $\mu\text{m}$ , 7 $\mu\text{m}$	400 bar (6000 psi)
Agilent ZORBAX HILIC Plus	3.5 $\mu\text{m}$	
ZORBAX Rx-SIL	5 $\mu\text{m}$	
ZORBAX SIL	5 $\mu\text{m}$ , 7 $\mu\text{m}$	
ZORBAX CN	5 $\mu\text{m}$ , 7 $\mu\text{m}$	
ZORBAX Eclipse XDB-CN	3.5 $\mu\text{m}$ , 5 $\mu\text{m}$ , 7 $\mu\text{m}$	
ZORBAX 超高压快速高分离度 (RRHD) HILIC Plus	1.8 $\mu\text{m}$	1200 bar (17000 psi)
ZORBAX RRHT Rx-Sil	1.8 $\mu\text{m}$	600 bar (9000 psi)
Polaris NH2	3 $\mu\text{m}$ , 5 $\mu\text{m}$	400 bar (6000 psi)
Polaris Si-A	3 $\mu\text{m}$ , 5 $\mu\text{m}$ , 10 $\mu\text{m}$	400 bar (6000 psi)
Pursuit XRs-Si	3 $\mu\text{m}$ , 5 $\mu\text{m}$ , 10 $\mu\text{m}$	400 bar (6000 psi)

## 色谱柱使用提示

- 现代色谱柱稳定耐用，可在正常色谱条件下运行较长时间。在规格指标范围内运行色谱柱可最大程度延长色谱柱使用寿命。在确定最终方法前，请务必查看规格指标。
- 反向使用色谱柱通常不会对其造成危害，但也应该尽量避免。
- 始终使用高纯度试剂和色谱级溶剂（或更高级别）配制流动相。
- 拆卸色谱柱会降低其性能。
- 新色谱柱含有机溶剂混合物。请参见 QC 性能报告，了解色谱柱中的溶剂组成。开始使用时，应注意避免使可能产生沉淀或浑浊的流动相流过色谱柱。
- 安捷伦正相色谱柱可与水和所有常见有机溶剂兼容。
- 建议使用保护柱来保护色谱柱并延长后者的使用寿命。
- 在不使用色谱柱时，不应将其置于高 pH 值或高温环境中。
- 避免在色谱柱固定相的推荐 pH 范围外使用色谱柱（请参见下一页）。在推荐的 pH 和温度范围外运行可能会缩短使用寿命。

## 获得最佳色谱结果的注意事项

- 通过最大限度减少组件间的管线长度对仪器进行优化，以减少柱外体积和峰展宽。在正常操作中使用 0.12 mm 内径的红色管线。对于窄径 (2.1 mm 或更小) 高分离度色谱柱，例如 InfinityLab Poroshell 120 或 ZORBAX RRHD，请在 UHPLC 系统上使用 0.075 mm 内径的黑色管线。有关毛细管选件的信息，请访问 [agilent.com/chem/lccapillaries](https://www.agilent.com/chem/lccapillaries)。
- 使用正相色谱柱时，请确保液相色谱仪器的转子密封垫、泵密封垫、管线和所有其他组件均与正相溶剂兼容。
- 确保针对您的色谱柱对数据采集速率进行优化。为快速液相色谱柱 (InfinityLab Poroshell 120、RRHT 和 RRHD) 选择更高的采集速率。
- 请在液相色谱仪器中使用安捷伦认证灯以实现最佳性能。
- 采用与您的样品相适应的样品过滤或其他样品前处理方法。如需了解更多信息，请访问 [agilent.com/chem/sampleprep](https://www.agilent.com/chem/sampleprep)。

## 使用正相色谱柱

每根正相色谱柱在发货前均经过测试，并保存在正相测试洗脱液中运输，但 ZORBAX Eclipse XDB-CN、InfinityLab Poroshell 120 EC-CN、InfinityLab Poroshell 120 HILIC、InfinityLab Poroshell HILIC-OH5、InfinityLab Poroshell HILIC-Z 和 ZORBAX HILIC Plus 色谱柱除外，它们保存在反相溶剂中运输。需要谨慎操作，确保色谱柱在使用前已达到平衡。这样可以保证分析之间的重现性，并能防止保留时间漂移。

### 正相色谱柱操作参数： pH 和温度

固定相	推荐的 pH 范围	最高操作温度	建议的操作温度
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN*	pH 2.0–8.0	60 °C	30 °C
ZORBAX NH2	pH 2.0–7.5	60 °C	30 °C
InfinityLab Poroshell 120 HILIC*† ZORBAX Rx-SIL ZORBAX SIL ZORBAX HILIC Plus*†	pH 1.0–8.0	仅受限于流动相的温度限值	
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 NH2	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

\* 在反相溶剂中运输。

† 更多信息，请参见“使用 HILIC”一节。

在 pH 和温度范围的极端处运行会对色谱柱寿命产生重大影响。

**注:**所有硅胶基填料在 pH 值大于 6 的水相流动相中都有一定的溶解度。在 pH 值大于 6 的条件下使用硅胶基色谱柱时,采用较低柱温(最高 40 °C)和较低缓冲溶液浓度(0.01–0.02 mol/L)可获得最长的使用寿命。

## 正相色谱柱方法开发说明

固定相在性质上是极性的,最好与二氯甲烷/己烷或异丙醇/己烷的混合物等非极性流动相一起使用。这些混合物中极性成分含量的增加通常会缩短样品的保留时间。

色谱柱类型	方法开发说明
ZORBAX NH2 Polaris NH2	随着流动相极性的增加,保留能力相应减弱。更改流动相组成后,需要许多倍色谱柱体积的流动相才能达到平衡。所需的色谱柱体积倍数取决于所用系统,最高可达 50–100 倍色谱柱体积。
ZORBAX Rx-SIL ZORBAX SIL Pursuit XRs Si Polaris Si-A	非键合硅胶色谱柱对溶剂和样品中的痕量水非常敏感,因此必须小心维持方法的重现性和一致性。使用梯度洗脱时,主要溶剂和次要溶剂应使用乙醇或乙腈进行改性,且完成每次分析后应使用至少 30 倍柱体积的溶剂平衡色谱柱。 在溶剂之间进行切换时,首先使用彼此能互溶的溶剂(如异丙醇)冲洗色谱柱。
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN ZORBAX Eclipse XDB-CN ZORBAX CN	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-CN 和 ZORBAX Eclipse XDB-CN 色谱柱保存在反相溶剂中运输,但使用异丙醇冲洗后也可应用于正相应用。 随着流动相极性的增加,保留能力相应减弱。这种键合相可使用流动相快速达到平衡,用它比硅胶色谱柱来得更方便,尤其适用于梯度洗脱。



## 冲洗色谱柱/延长色谱柱的使用寿命：

### 正相色谱柱

对于正相色谱柱，我们建议使用有机溶剂。每种溶剂的用量至少为 20 倍色谱柱体积，即  $4.6 \times 250$  mm 传统分析色谱柱为 50 mL。按递增的溶剂强度依次尝试以下溶剂：

1. 50% 甲醇: 50% 氯仿
2. 100% 乙酸乙酯

在正相模式下使用的色谱柱是否需要冲洗可能取决于样品类型。如果这些溶剂不起作用，请联系安捷伦，我们将推荐对您的应用和样品基质效果更好的溶剂。

### 储存建议:正相色谱柱

正相色谱柱通常存储在默认流动相中，以便长期保存。储存色谱柱之前将堵头紧紧密封在柱端接头上，以免填料变干。

### 使用 HILIC 色谱柱

HILIC 是对常规反相色谱柱保留不足的极性分析物进行分离的方法。Agilent ZORBAX 超高压快速高分离度 (RRHD) HILIC Plus 色谱柱和 InfinityLab Poroshell 120 HILIC 色谱柱是非键合硅胶色谱柱，保存在乙腈:水或乙腈中运输，并可立即用于 HILIC 分离。InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 色谱柱包含键合到表面多孔硅胶颗粒上的聚羟基相，并保存在乙腈中运输。InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z 色谱柱包含键合到表面多孔硅胶颗粒上的两性离子相，并保存在乙腈:水中运输。与正相色谱柱相似，HILIC 色谱柱需要比反相色谱柱更长的平衡时间。请注意，ZORBAX Rx-Sil、ZORBAX Sil 和 ZORBAX NH2 色谱柱也可用于 HILIC 应用。如需将这些色谱柱切换到 HILIC 模式，需首先用异丙醇冲洗。

## HILIC 色谱柱操作参数

色谱柱名称	pH 范围	最高温度	建议温度
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5	1.0–8.0	45 °C	30 °C
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z	2.0–12	80 °C	30 °C
InfinityLab Poroshell 120 HILIC ZORBAX 超高压快速高分离度 (RRHD) HILIC Plus ZORBAX HILIC Plus HPLC	0–8.0	60 °C	30 °C

在 pH 和温度范围的极端处运行会对色谱柱寿命产生重大影响。

### 操作指南:HILIC

- 安捷伦 HILIC 色谱柱保存在乙腈:水或乙腈中运输。
- 应注意避免超出色谱柱压力上限,在改变流动相组成时尤其需要注意。
- 安捷伦 HILIC 色谱柱可与水和所有常见有机溶剂兼容。
- 缓冲液应少量混合,并经常更换以防止微生物生长。
- 包含挥发性酸(甲酸、乙酸)或碱(氨水)的洗脱液应紧密密封。
- 所有硅胶在 pH 值大于 6 的水相流动相中均有一定的溶解度。硅胶的溶解度在高温下也会增加。在 pH 高于 6 和温度高于 40 °C 的条件下使用 ZORBAX RRHD HILIC Plus 或 InfinityLab Poroshell 120 HILIC 色谱柱会缩短色谱柱寿命。

## HILIC 方法开发说明

色谱柱	备注
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z 和 HILIC-OH5	<p><b>建议的初始筛选条件:</b></p> <p>A: 10 mmol/L 乙酸铵</p> <p>B: (乙腈:100 mmol/L 乙酸铵, 90:10)*</p> <p>或</p> <p>A: 10 mmol/L 甲酸铵</p> <p>B: (乙腈:100 mmol/L 甲酸铵, 90:10)*</p> <p>* 对于 10 mmol 最终浓度</p> <p>必要时调整流动相 pH</p> <p>梯度: 在 10 min 内, B 由 90% 降至 <math>\geq 60\%</math></p>
InfinityLab Poroshell 120 HILIC、HILIC-Z 和 HILIC-OH5	<p>大多数常规 HILIC 应用于分析反相色谱柱上不能保留或保留较差的极性化合物。</p> <p>使用前, 最好使用含 30%–40% 水的乙腈平衡该色谱柱。</p>
ZORBAX 超高压快速高分离度 (RRHD)	<p>平衡可能需要 20–50 倍色谱柱体积。</p>
HILIC Plus	<p>常用流动相是乙腈:水, 其中含 5–10 mmol/L 乙酸盐或甲酸盐缓冲液。增加缓冲盐浓度可改善峰形和保留效果。降低水性/缓冲盐组分可增强保留。</p>

## 冲洗色谱柱/延长色谱柱的使用寿命：

### HILIC 色谱柱

在进样到色谱柱前应先对样品进行过滤。这对于 ZORBAX RRHD HILIC Plus 色谱柱而言尤其重要，因为这种色谱柱的入口筛板通常为 0.5  $\mu\text{m}$ ，而样品应使用 0.2  $\mu\text{m}$  的样品过滤器进行过滤。如果溶剂流动受阻（色谱柱反压异常偏高），应首先检查色谱柱入口前的溶剂流是否畅通。如果堵塞出现在色谱柱之前，应更换相应一段管线或受堵的过滤器。如果色谱柱发生堵塞，InfinityLab Poroshell 120 HILIC 柱可用 20–30 倍柱体积的流动相进行反冲。RRHD HILIC 色谱柱不能反冲。如需去除色谱柱上的强保留物质，应使用强溶剂冲洗色谱柱，在 HILIC 模式下，强溶剂是水。

用 50/50 乙腈:50 mmol/L 乙酸铵在低流速下冲洗至少 3 小时，可对 InfinityLab Poroshell HILIC-OH5 色谱柱进行再生。然后用流动相进行平衡。用 50/50 乙腈:10 mmol/L 乙酸铵以正常运行流速的 20% 冲洗至少 3 小时，可对 InfinityLab Poroshell HILIC-Z 色谱柱进行再生。然后用流动相进行平衡。

### 储存建议:HILIC 色谱柱

推荐使用乙腈:水 (90:10) 对 HILIC 色谱柱进行长期保存。储存色谱柱之前将堵头紧紧密封在柱端接头上，以免填料变干。色谱柱可以在短时间内安全储存于大多数 HILIC 流动相中。然而，为了保护仪器，最好采用无缓冲液的不同流动相冲洗色谱柱以除去仪器和色谱柱中的盐（例如采用 90:10 乙腈/水除去 90:10 乙腈:0.01 mol/L 甲酸盐缓冲液流动相）。使用该方法时，用原始流动相则再平衡的速度更快，但应进行数次 (3 至 6 次) 进样来验证色谱柱是否达到平衡。

## 在超临界流体色谱 (SFC) 中使用正相和 HILIC 色谱柱

适用于 SFC 的安捷伦色谱柱通常为正相或 HILIC 色谱柱, 并保存在正相或 HILIC 流动相中运输。Poroshell 120 EC-CN 色谱柱保存在反相溶剂中运输。色谱柱压力和 pH 限值在 SFC 中仍然有效。请牢记: SFC 中的 pH 值与水溶液的 pH 值无法直接比较。因此, CO<sub>2</sub>/有机改性剂中的表观 pH 值可能有所不同。

### 色谱柱平衡

使用前, 用 10–30 倍体积的甲醇或异丙醇冲洗色谱柱, 以完全冲掉运输溶剂。然后, 在起始条件下, 用大约 10–20 倍柱体积的流动相平衡色谱柱。

### 色谱柱的保存

确保已完全除去添加剂 (例如酸、碱或缓冲液), 以免损坏色谱柱。用 10–20 倍柱体积的甲醇或异丙醇冲洗色谱柱, 以除去所有二氧化碳。不得将色谱柱储存在 CO<sub>2</sub> 和甲醇的混合物中, 因为 CO<sub>2</sub> 会蒸发, 使固定相变干。用堵头正确密封色谱柱, 以免溶剂蒸发。

В данном буклете содержится информация, общая для всех нормально-фазовых и HILIC колонок Agilent ZORBAX, Agilent Pursuit, Agilent Polaris и Agilent InfinityLab Poroshell. В первых разделах содержится информация, общая для нормально-фазовых и HILIC колонок. Так как некоторые параметры методов и инструкции по уходу за нормально-фазовыми колонками отличаются от таких же для колонок HILIC, соответствующая информация приведена на последних страницах в отдельных разделах. Дополнительную информацию об отдельных типах и семействах колонок можно найти по адресу **[agilent.com/chem/columnchoices](https://www.agilent.com/chem/columnchoices)**

## Начало работы

Все колонки Agilent поставляются с сертификатом контроля качества, который содержит данные проверки рабочих характеристик колонки, включающие тестовую хроматограмму. Прибор, применяемый при контроле качества, оптимизирован по сравнению со стандартным, чтобы свести к минимуму мертвый объем. Поэтому результаты контроля качества могут отличаться от результатов системы, используемой в вашей лаборатории. Это позволяет лучше аттестовать рабочие характеристики колонки и гарантирует более стабильное качество продукции.

## Установка

- Направление потока указано на колонке.
- **Колонки с размером частиц сорбента 1,8 мкм (ZORBAX RRHT, ZORBAX RRHD) запрещается эксплуатировать с обратным направлением потока.**
- Для подключения колонки компания Agilent рекомендует быстроразъемные фитинги InfinityLab с нулевым мертвым объемом. Рекомендуемые фитинги:

Максимальное давление системы	Рекомендуемый фитинг	Каталожные номера
До 400 бар	Фитинг InfinityLab Quick Turn (затягиваемый пальцами)	Фитинг: 5067-5966
До 800 бар	Фитинг InfinityLab Quick Turn (с инструментом для установки)	Фитинг: 5067-5966 Инструмент для установки: 5043-0915
До 1 300 бар	Фитинг Agilent InfinityLab Quick Connect	Фитинг: 5067-5965

Больше информации и каталожные номера можно найти в брошюре Agilent InfinityLab Fitting («Фитинги Agilent InfinityLab») (5991-5164RU).



*Узел InfinityLab Quick Connect,  
кат. № 5067-5961*



*Фитинг InfinityLab Quick Turn,  
кат. № 5067-5966*

Узнать подробнее: [www.agilent.com/chem/infinitylabfittings](http://www.agilent.com/chem/infinitylabfittings)

Во избежание повреждения колонок, изготовленных из ПЭЭК или покрытых им, при их установке следует соблюдать особую осторожность. Одновременный нажим и вращение могут повредить их, поэтому с ними не рекомендуется использовать фитинги без феррул, такие как затягиваемые пальцами фитинги из ПЭЭК. Во избежание повреждения фитинги должны быть обжаты на нужную глубину. Запрещается перетягивать фитинги.

## Важные правила техники безопасности для всех ВЭЖХ-колонок

- Все места соединений в системах ВЭЖХ являются потенциальными источниками утечек. Пользователи должны быть осведомлены о токсичных или огнеопасных свойствах используемых ими 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 приведет к ухудшению характеристик хроматографического разделения и может иметь опасные последствия.

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

Тип колонки	Размер частиц сорбента	Предельное давление
InfinityLab Poroshell 120 HILIC	1,9	1 300 бар (19 500 psi)
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN	2,7 мкм	600 бар (9 000 psi)
InfinityLab Poroshell 120 HILIC		600 бар (9 000 psi)
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z		600 бар (9 000 psi)
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5		400 бар (6 000 psi)
ZORBAX NH2	5 мкм, 7 мкм	400 бар (6 000 psi)
Agilent ZORBAX HILIC Plus	3,5 мкм	
ZORBAX Rx-SIL	5 мкм	
ZORBAX SIL	5 мкм, 7 мкм	
ZORBAX CN	5 мкм, 7 мкм	
ZORBAX Eclipse XDB-CN	3,5 мкм, 5 мкм, 7 мкм	
ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD) HILIC Plus	1,8 мкм	1 200 бар (17 000 psi)
ZORBAX RRHT Rx-Sil	1,8 мкм	600 бар (9 000 psi)
Polaris NH2	3 мкм, 5 мкм	400 бар (6 000 psi)
Polaris Si-A	3 мкм, 5 мкм, 10 мкм	400 бар (6 000 psi)
Pursuit XRs-Si	3 мкм, 5 мкм, 10 мкм	400 бар (6 000 psi)



## Советы по работе с колонкой

- Современные колонки надежны и разработаны для длительного использования в нормальных условиях хроматографического анализа. Эксплуатация колонки в условиях, соответствующих инструкции по эксплуатации, позволяет повысить ее срок службы. Перед постановкой окончательной методики обязательно перечитайте инструкцию по эксплуатации колонки.
- Избегайте обратного потока, хотя обычно он и не опасен для колонки.
- Всегда используйте для приготовления подвижной фазы реагенты высшей степени очистки и растворители хроматографической степени чистоты или выше.
- Разборка колонки приводит к ухудшению ее характеристик.
- Новые колонки заполнены смесью органических растворителей. Состав растворителя указан в сертификате контроля качества колонки. В начале использования 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 распространенными органическими растворителями.
- Для защиты колонки и повышения ее срока службы рекомендуется пользоваться защитной предколонкой.
- В перерыве между использованием не следует хранить колонки в среде с высокими значениями pH или в условиях повышенной температуры.
- Не используйте колонку за пределами рекомендованного для привитой фазы колонки диапазона pH (см. следующую страницу). Эксплуатация колонки за пределами рекомендованных диапазонов значений pH и температуры может привести к сокращению срока ее службы.

## Советы для получения наилучших хроматографических результатов

- Оптимизируйте систему, максимально сократив длины соединительных капилляров между компонентами хроматографического тракта, чтобы уменьшить внеколоночный объем системы и размытие хроматографических зон. Для нормальной работы пользуйтесь капиллярами с внутренним диаметром 0,12 мм. Для колонок высокого разрешения с малым внутренним диаметром (2,1 мм и меньше), например InfinityLab Poroshell 120 или ZORBAX RRHD, на УВЭЖХ системах пользуйтесь черными капиллярами с внутренним диаметром 0,075 мм. Подробнее о различных вариантах капилляров:

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

- При работе с нормально-фазовыми колонками убедитесь в том, что уплотнения роторов и насосов, трубки и другие детали жидкостного хроматографа совместимы с растворителями нормально-фазовой хроматографии.
- Убедитесь, что частота сбора данных оптимально подобрана для используемой колонки. Установите повышенную частоту сбора данных при использовании колонок для скоростной ВЭЖХ (InfinityLab Poroshell 120, RRHT и RRHD).
- Для лучших рабочих характеристик используйте в системах ВЭЖХ сертифицированные лампы Agilent.
- Фильтруйте пробы или используйте другие подходящие для ваших проб методы пробоподготовки. Узнать подробнее:

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

## Работа с колонками для нормально-фазовой хроматографии

Все нормально-фазовые колонки испытываются перед поставкой и доставляются потребителю заполненными растворителем, который использовался для испытаний в нормально-фазовом режиме. Исключения составляют колонки ZORBAX Eclipse XDB-CN, InfinityLab Poroshell 120 EC-CN, InfinityLab Poroshell 120 HILIC, InfinityLab Poroshell HILIC-OH5, InfinityLab Poroshell HILIC-Z и ZORBAX HILIC Plus, которые поставляются заполненными растворителем для обращенно-фазовой хроматографии. Перед использованием колонку следует тщательно уравновесить. Это обеспечит воспроизводимость результатов между анализами и предотвратит дрейф времен удерживания анализируемых веществ.

### Условия эксплуатации нормально-фазовых колонок: значение pH и температура

Неподвижная фаза	Рекомендованный диапазон pH	Максимальная рабочая температура	Рекомендуемая рабочая температура
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN *	pH от 2,0 до 8,0	60 °C	30 °C
ZORBAX NH2	pH от 2,0 до 7,5	60 °C	30 °C
InfinityLab Poroshell 120 HILIC *† ZORBAX Rx-SIL ZORBAX SIL ZORBAX HILIC Plus *†	pH от 1,0 до 8,0	Ограничивается только температурными пределами подвижной фазы	
ZORBAX CN	pH от 2,0 до 8,0	60 °C	30 °C
ZORBAX Eclipse XDB-CN *	pH от 2,0 до 9,0	60 °C	30 °C
Polaris NH2	pH от 2,0 до 8,0	60 °C	30 °C
Polaris Si-A	pH от 1,5 до 10,0	60 °C	30 °C
Pursuit XRs Si	pH от 2,0 до 8,0	60 °C	30 °C

\* Поставляются заполненными растворителями для обратно-фазовой хроматографии.

† Больше информации можно найти в разделе *Работа с колонками для хроматографии гидрофильных взаимодействий (HILIC)*.

Эксплуатация колонки при близких к предельным значениям pH и температуры сильно снижает срок службы колонки.

**Примечание.** Все сорбенты на основе силикагеля растворимы в определенной степени при значениях pH > 6 в подвижных фазах на водной основе. При использовании колонок на основе силикагеля в среде со значениями pH > 6 наибольший срок службы обеспечивается при пониженных температурах (не более 40 °С) и использовании низких концентраций буфера в диапазоне от 0,01 до 0,02 моль/л.

### Советы по разработке методик для нормально-фазовых колонок

Неподвижная фаза таких колонок по своей природе полярна, поэтому с ней лучше использовать неполярные подвижные фазы, например, смеси дихлорметана или изопропанола с гексаном. Увеличение содержания полярного компонента в этих смесях, как правило, приводит к снижению времени удерживания компонентов пробы.

Тип колонки	Советы по разработке методик
ZORBAX NH2 Polaris NH2	Время удерживания уменьшается при увеличении полярности подвижной фазы.  После смены состава подвижной фазы для уравнивания через колонку надо пропустить значительный объем подвижной фазы. Объем подвижной фазы, нужной для уравнивания колонки, зависит от используемой системы и может достигать 50–100 объемов колонки.
ZORBAX Rx-SIL ZORBAX SIL Pursuit XRs Si Polaris Si-A	Колонки, заполненные силикагелем без привитой фазы, очень чувствительны к следовым количествам воды в растворителях и пробе, поэтому для хорошей воспроизводимости методики следует постараться не допускать попадания воды в систему. При работе в градиентном режиме и первичный, и вторичный растворители должны быть модифицированы спиртом или ацетонитрилом, а после каждого анализа через колонку следует пропустить не менее 30 ее объемов растворителя.  Для смены растворителя сначала промойте колонку растворителем, который смешивается с обоими из них, например, изопропанолом.
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN ZORBAX Eclipse XDB-CN ZORBAX CN	Колонки Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-CN и ZORBAX Eclipse XDB-CN поставляются заполненными растворителем для обращенно-фазовой хроматографии, но после промывки изопропанолом могут применяться и в нормально-фазовом режиме.  Время удерживания уменьшается при увеличении полярности подвижной фазы.  Быстрое уравнивание привитой неподвижной фазы при пропуске через нее подвижной фазы зачастую делает их лучшим выбором по сравнению с колонками, заполненными силикагелем, особенно при работе в градиентном режиме

## **Промывка колонки. Как увеличить срок службы колонки: нормально-фазовые колонки**

Колонки для нормально-фазовой хроматографии рекомендуется промывать органическими растворителями. Пропустите через колонку как минимум по 20 ее объемов каждого из растворителей. Для традиционной аналитической колонки размером 4,6 × 250 мм это 50 мл. Попробуйте промыть колонку следующими растворителями в порядке увеличения их силы:

1. Метанол 50% : хлороформ 50%.
2. Этилацетат 100%.

Промывка колонки, работающей в нормально-фазовом режиме, может зависеть от типа пробы. Если рекомендованные выше растворители не помогают, обратитесь в компанию Agilent за рекомендацией, какой растворитель лучше подходит для вашей методики и матрицы пробы.

## **Рекомендации по хранению: нормально-фазовые колонки**

Нормально-фазовые колонки, как правило, можно продолжительное время хранить в их 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 (HILIC) используется для разделения полярных соединений, которые недостаточно хорошо удерживаются на обычных колонках для обратно-фазовой хроматографии. Колонки Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD) HILIC Plus и InfinityLab Poroshell 120 HILIC являются колонками на основе немодифицированного силикагеля; они поставляются заполненными смесью ацетонитрила и воды или ацетонитрилом и готовы для использования в режиме HILIC. Колонки InfinityLab Poroshell 120 HILIC-ON5 содержат полигидроксильную неподвижную фазу, привитую на поверхностно-пористые частицы силикагеля, и поставляются заполненными ацетонитрилом. Колонки InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z содержат цвиттер-ионную неподвижную фазу, привитую на поверхностно-пористые частицы силикагеля, и поставляются заполненными смесью ацетонитрила и воды. Как и колонки для нормально-фазовой хроматографии, колонки HILIC уравниваются дольше, чем обратно-фазовые колонки. Колонки ZORBAX Rx-Sil, ZORBAX Sil и ZORBAX NH2 также можно использовать в методиках HILIC. Чтобы перевести эти колонки в режим HILIC, промойте их сначала изопропанолом.

## Условия эксплуатации колонок HILIC

Название колонки	Диапазон pH	Максимальная температура	Рекомендуемая рабочая температура
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-0H5	От 1,0 до 8,0	45 °C	30 °C
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z	От 2,0 до 12	80 °C	30 °C
InfinityLab Poroshell 120 HILIC ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD) HILIC Plus ZORBAX HILIC Plus HPLC	От 0 до 8,0	60 °C	30 °C

Эксплуатация колонки при близких к предельным значениям pH и температуры сильно снижает срок службы колонки.

### Руководство по эксплуатации: хроматография гидрофильных взаимодействий (HILIC)

- Колонки HILIC компании Agilent поставляются заполненными ацетонитрилом или смесью ацетонитрила и воды.
- Будьте внимательны и не превышайте предельное давление колонки, особенно при смене состава подвижной фазы.
- Колонки HILIC компании Agilent совместимы с водой и всеми распространенными органическими растворителями.
- Буферные растворы должны добавляться в подвижную фазу в небольших количествах и часто заменяться во избежание роста микроорганизмов.
- Растворители, содержащие летучие кислоты (муравьиную, уксусную) или основания (аммиак), должны быть плотно закрыты.
- Все сорбенты на основе силикагеля растворимы в определенной степени при значениях pH > 6 в подвижных фазах на водной основе. Растворимость силикагеля также возрастает при увеличении температуры. Эксплуатация колонок ZORBAX RRHD HILIC Plus и InfinityLab Poroshell 120 HILIC при значениях pH выше 6 или температуре выше 40 °C снижает их срок службы.

## Советы по разработке методик HILIC

Колонка	Примечания
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z и HILIC-OH5	<p><b>Рекомендуемые начальные условия скрининга</b></p> <p>А: р-р 10 ммоль/л ацетата аммония            В: (ацетонитрил : р-р 100 ммоль/л ацетата аммония 90:10) *</p> <p>или</p> <p>А: р-р 10 ммоль/л формиата аммония            В: (ацетонитрил : р-р 100 ммоль/л формиата аммония 90:10) *</p> <p>* Для получения буферного раствора с концентрацией 10 ммоль/л.</p> <p>Значение pH подвижной фазы регулируется по необходимости.</p> <p>Градиент: от 90% В до не менее 60% В за 10 минут.</p>
InfinityLab Poroshell 120 HILIC, HILIC-Z и HILIC-OH5 ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD) HILIC Plus	<p>Чаще всего HILIC применяется для анализа полярных соединений, которые плохо или совсем не удерживаются на колонках для обращенно-фазовой хроматографии.</p> <p>Перед использованием такие колонки лучше всего уравновесить раствором 30–40% воды в ацетонитриле.</p> <p>Для уравнивания может потребоваться пропустить через колонку 20–50 ее объемов подвижной фазы.</p> <p>Типичная подвижная фаза HILIC — это смесь ацетонитрила и воды с ацетатным или формиатным буфером в концентрации 5–10 ммоль/л. Увеличение концентрации буфера может помочь улучшить удерживание и форму пиков. Снижение количества воды или буфера увеличивает удерживание.</p>

## **Промывка колонки. Как увеличить срок службы колонки: колонки HILIC**

Все пробы необходимо фильтровать перед вводом в колонку. Это особенно важно для колонок ZORBAX RRHD HILIC Plus, так как фритта на входе колонки имеет номинальный размер пор 0,5 мкм, поэтому пробы следует фильтровать через фильтр с порами 0,2 мкм. Если течение растворителя затруднено (необычно высокое обратное давление колонки), убедитесь для начала в том, что это не происходит до входа колонки. Если помеха расположена до колонки, замените засорившийся 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 промывать обратным потоком нельзя. Чтобы очистить колонку от сильно удерживаемых соединений, промойте ее сильным растворителем, в случае HILIC это вода.

Для регенерации колонки InfinityLab Poroshell HILIC-OH5 промойте ее смесью равных объемов ацетонитрила и раствора 50 ммоль/л ацетата аммония при низком расходе в течение не менее 3 часов. Затем приведите в равновесие с подвижной фазой. Для регенерации колонки InfinityLab Poroshell HILIC-Z промойте ее смесью равных объемов ацетонитрила и раствора 10 ммоль/л ацетата аммония при расходе в 20% от нормального в течение не менее 3 часов. Затем приведите в равновесие с подвижной фазой.

## **Рекомендации по хранению: колонки HILIC**

Для длительного хранения колонок HILIC рекомендуется заполнять их смесью ацетонитрила и воды 90:10. Перед направлением колонки на хранение концевые фитинги должны быть тщательно закрыты заглушками для предотвращения высыхания сорбента. Кратковременно колонки можно безопасно хранить в большинстве подвижных фаз HILIC. Однако в целях защиты оборудования рекомендуется вымыть из колонки и оборудования соли, промыв колонку той же подвижной фазой без буфера (например, использовать смесь 90:10 ацетонитрил : H<sub>2</sub>O для удаления забуференной подвижной фазы состава 90:10 ацетонитрил:раствор 10 ммоль/л формиата аммония). При таком подходе повторное уравнивание колонки происходит быстрее, однако для того, чтобы убедиться в том, что колонка уравновешена, следует выполнить несколько (3–6) анализов.



## Использование нормально-фазовых и HILIC колонок для сверхкритической флюидной хроматографии (СФХ)

Из колонок Agilent для СФХ подходят, как правило, нормально-фазовые и HILIC колонки, которые поставляются заполненными, соответственно, нормально-фазовой или HILIC подвижной фазой. Колонки Poroshell 120 EC-CN поставляются заполненными обратно-фазовым растворителем. Ограничения по давлению колонки и значению pH для СФХ сохраняются. Имейте в виду, что значения pH в СФХ нельзя напрямую сравнивать со значениями pH в водных растворах. Поэтому кажущееся значение pH в смеси CO<sub>2</sub> и органического модификатора может отличаться.

### Уравновешивание колонки

Перед использованием промойте колонку 10–30 ее объемами метанола или изопропанола, чтобы полностью вымыть растворитель, с которым она поставляется. Затем уравновесьте колонку 10–20 ее объемами подвижной фазы при начальных условиях хроматографии.

### Хранение колонки

Чтобы предотвратить деградацию, колонки убедитесь в том, что перед помещением на хранение в ней не осталось добавок, таких как кислоты, основания или буферы. Чтобы вымыть диоксид углерода, промойте колонку 10–20 ее объемами метанола или изопропанола. Не храните колонку, заполнив ее смесью CO<sub>2</sub> и метанола, так как CO<sub>2</sub> испарится и неподвижная фаза высохнет. Чтобы избежать высыхания растворителя, плотно закрывайте концевые фитинги заглушками.

Este guia oferece informações gerais para todas as colunas de fase normal e colunas HILIC Agilent ZORBAX, Agilent Pursuit, Agilent Polaris e Agilent InfinityLab Poroshell. As seções iniciais incluem informações para as colunas de fase normal e para as colunas HILIC. Como alguns parâmetros de método e instruções de cuidados com a coluna são diferentes entre HILIC e de fase normal, essas seções são apresentadas separadamente nas últimas páginas. Para obter mais informações sobre uma coluna ou linha específica, acesse **[agilent.com/chem/columnchoices](https://www.agilent.com/chem/columnchoices)**

## Introdução

Cada coluna Agilent traz um relatório de controle de qualidade do desempenho da coluna, incluindo um cromatograma de teste. O instrumento de teste de controle de qualidade é modificado (otimizado) a partir de um instrumento padrão para minimizar o volume extracoluna; portanto, os resultados podem variar do sistema usado em seu laboratório. Isso permite avaliar melhor a coluna e garantir uma maior consistência do produto.

## Instalação

- A direção do fluxo é indicada na coluna.
- **As colunas de 1,8 µm (ZORBAX RRHT, ZORBAX RRHD) só podem ser operadas na direção do fluxo indicada na coluna.**
- Para conexões de coluna removíveis e sem volume morto, a Agilent recomenda o uso das conexões InfinityLab. As opções são:

Pressão máxima do sistema	Conexão recomendada	Part Numbers
Até 400 bar	Conexão InfinityLab Quick Turn (aperto manual)	Conexão: 5067-5966
Até 800 bar	Conexão InfinityLab Quick Turn (com ferramenta de montagem)	Conexão: 5067-5966 Ferramenta de montagem: 5043-0915
Até 1300 bar	Conexão InfinityLab Quick Connect	Conexão: 5067-5965

Para obter mais informações e part numbers, consulte a Brochura de conexões Agilent InfinityLab (5991-5164EN).



*Conjunto de troca rápida  
InfinityLab, p/n 5067-5961*



*Conexão InfinityLab Quick  
Turn, p/n 5067-5966*

Saiba mais em [www.agilent.com/chem/infinitylabfittings](http://www.agilent.com/chem/infinitylabfittings)

Devem ser tomados cuidados adicionais para evitar danos às colunas PEEK ou com revestimento PEEK durante a instalação. A compressão e a rotação combinadas podem causar danos; portanto, não são recomendadas conexões sem anilha, como as conexões de aperto manual PEEK. As conexões não devem ser apertadas demais e devem ser instaladas na profundidade correta para evitar danos.

## 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 empacotamentos 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
InfinityLab Poroshell 120 HILIC	1,9 µm	1300 bar (19.500 psi)
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN	2,7 µm	600 bar (9000 psi)
InfinityLab Poroshell 120 HILIC		600 bar (9000 psi)
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z		600 bar (9000 psi)
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5		400 bar (6000 psi)
ZORBAX NH2	5 µm, 7 µm	400 bar (6000 psi)
Agilent 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	
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 (9000 psi)
Polaris NH2	3 µm, 5 µm	400 bar (6000 psi)
Polaris Si-A	3 µm, 5 µm, 10 µm	400 bar (6000 psi)
Pursuit XRs-Si	3 µm, 5 µm, 10 µm	400 bar (6000 psi)

## Dicas de utilização da coluna

- As colunas modernas são robustas e foram 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 geralmente não seja prejudicial à coluna, deve-se evitar o fluxo reverso.
- 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 controle de qualidade do 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 com 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 cromatográficos

- Para otimizar o instrumento diminua o comprimento da tubulação entre os componentes para reduzir o volume extracolumna e o alargamento da banda. Use tubulação vermelha com 0,12 mm de diâmetro interno para operações normais. Para colunas de tubo estreito (2,1 mm ou menos) de alta resolução, como InfinityLab Poroshell 120 ou ZORBAX RRHD, use tubulações pretas com 0,075 mm de diâmetro interno nos sistemas de UHPLC. Obtenha mais informações sobre opções de capilar em **[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 (InfinityLab Poroshell 120, RRHT e RRHD).
- Utilize lâmpadas certificadas da Agilent nos seus instrumentos de LC para obter o melhor desempenho.
- Utilize filtração ou outro método de preparo adequado para sua amostra. Saiba mais em **[agilent.com/chem/sampleprep](https://www.agilent.com/chem/sampleprep)**.

## Trabalhar com colunas de fase normal

Todas as colunas de fase normal são testadas antes do envio e são enviadas com um eluente de teste de fase normal, exceto as colunas ZORBAX Eclipse XDB-CN, InfinityLab Poroshell 120 EC-CN, InfinityLab Poroshell 120 HILIC, InfinityLab Poroshell HILIC-OH5, InfinityLab Poroshell HILIC-Z e ZORBAX HILIC Plus, que são enviadas com solventes de fase reversa. Deve-se tomar cuidado para garantir que a coluna seja condicionada 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	Temperatura operacional máxima	Temperatura operacional sugerida
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN*	pH 2,0 a 8,0	60°C	30°C
ZORBAX NH2	pH 2,0 a 7,5	60°C	30°C
InfinityLab Poroshell 120 HILIC*† ZORBAX Rx-SIL ZORBAX SIL ZORBAX HILIC Plus*†	pH 1,0 a 8,0	Definido apenas pelos limites de temperatura da fase móvel	
ZORBAX CN	pH 2,0 a 8,0	60°C	30°C
ZORBAX Eclipse XDB-CN*	pH 2,0 a 9,0	60°C	30°C
Polaris NH2	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

\* 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 > 6. Ao utilizar colunas à base de sílica em pH >6, uma melhor vida útil da coluna é obtida em temperaturas mais baixas (máx. 40°C) usando concentrações baixas para o 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 NH2 Polaris NH2	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.
InfinityLab Poroshell 120 EC-CN ZORBAX Eclipse XDB-CN ZORBAX CN	As colunas Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-CN e ZORBAX Eclipse XDB-CN são enviadas 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 × 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 de alta definição de resolução rápida Agilent ZORBAX (RRHD) HILIC Plus e InfinityLab Poroshell 120 HILIC são colunas de sílica não ligada, enviada com acetonitrila:água ou acetonitrila e prontas para usar em separações HILIC. As colunas InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 contêm uma fase polihidroxilada ligada a partículas de sílica superficialmente porosa e são enviadas com acetonitrila. As colunas InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z contêm uma fase zwitteriônica ligada a partículas de sílica superficialmente porosa e são enviadas com acetonitrila:água. 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 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
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5	1,0 a 8,0	45°C	30°C
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z	2,0 a 12	80°C	30°C
InfinityLab Poroshell 120 HILIC	0 a 8,0	60°C	30°C
Alta definição de resolução rápida ZORBAX (RRHD) HILIC Plus ZORBAX HILIC Plus HPLC			

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

### Diretrizes operacionais: HILIC

- As colunas Agilent HILIC são enviadas com acetonitrila:água ou acetonitrila.
- Deve-se tomar cuidado para não exceder os limites de pressão da coluna, especialmente ao fazer mudanças de composições de fase móvel.
- As colunas Agilent HILIC são compatíveis com água e com solventes orgânicos comuns.
- O tampão deve ser misturado em pequenas quantidades e atualizado com frequência para impedir o crescimento microbiano.
- Os eluentes que contêm ácidos voláteis (fórmico, acético) ou bases (amônia) devem ser selados firmemente.
- 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 InfinityLab Poroshell 120 HILIC com pH maior que 6 e em temperaturas superiores a 40°C reduzirá a vida útil da coluna.

## Observações para o desenvolvimento de métodos HILIC

Coluna	Observações
InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z e HILIC-OH5	<p><b>Condições iniciais de verificação sugeridas:</b></p> <p>A: 10 mM de acetato de amônio            B: (Acetonitrila: 100 mM de acetato de amônio 90:10)*</p> <p>ou</p> <p>A: 10 mM de formiato de amônio            B: (Acetonitrila: 100 mM de formiato de amônio, 90:10)*</p> <p>* Para uma concentração final de 10 mmol</p> <p>Ajuste o pH da fase móvel conforme necessário</p> <p>Gradiente: 90% B para ≥60% B por 10 minutos</p>
InfinityLab Poroshell 120 HILIC, HILIC-Z e HILIC-OH5 Alta definição de resolução rápida ZORBAX (RRHD) HILIC Plus	<p>As aplicações HILIC mais comuns são para a análise de componentes polares que são pouco retidos ou não retidos em colunas de fase reversa.</p> <p>Recomenda-se equilibrar a coluna com 30 a 40% de água em acetonitrila antes da utilização.</p> <p>O equilíbrio pode exigir de 20 a 50 volumes de coluna.</p> <p>Uma fase móvel típica é composta de acetonitrila:água com um tampão de acetato ou formiato a 5–10 mM. O aumento da concentração de tampão pode melhorar o formato e a retenção do pico. Diminua o componente aquoso/tampão para aumentar a retenção.</p>

## **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 a frita de entrada da coluna é teoricamente 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 reversa da 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 InfinityLab Poroshell 120 HILIC pode ser submetida ao processo de backflush com 20 a 30 volumes de coluna da fase móvel. A coluna RRHD HILIC não pode ser submetida ao processo de backflush. Para remover materiais fortemente retidos da coluna, limpe-a com um solvente forte; no modo HILIC, este solvente é a água.

As colunas InfinityLab Poroshell HILIC-OH5 podem ser regeneradas através da lavagem com 50/50 de acetonitrila:50 mM de acetato de amônio a uma taxa de fluxo baixa por pelo menos 3 horas. Em seguida, equilibre com a fase móvel. As colunas InfinityLab Poroshell HILIC-Z podem ser regeneradas através da lavagem com 50/50 de acetonitrila:10 mM de acetato de amônio a uma taxa de fluxo de 20% da operação normal por pelo menos 3 horas. Em seguida, equilibre com a fase móvel.

## **Recomendações de armazenamento: colunas HILIC**

Para armazenar colunas HILIC por longos períodos recomenda-se utilizar a mistura acetonitrila:água (90:10) como solvente. 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 90:10 de ACN:H<sub>2</sub>O para remover uma fase móvel de 90:10 de ACN:0,01 M de tampão de formiato). 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.

## Uso de colunas de fase normal e colunas HILIC na cromatografia de fluidos supercríticos (SFC)

As colunas Agilent adequadas para SFC são tipicamente colunas de fase normal ou HILIC e são enviadas nas fases móveis de fase normal ou HILIC. As colunas Poroshell 120 EC-CN são enviadas com solvente de fase reversa. A pressão da coluna e os limites de pH permanecem válidos na SFC. Lembre-se de que o pH na SFC não é diretamente comparável aos valores de pH das soluções aquosas. Portanto, o pH aparente em CO<sub>2</sub>/modificador orgânico pode ser diferente.

### Equilíbrio da coluna

Antes do uso, lave a coluna com 10 a 30 volumes de metanol ou álcool isopropílico para remover completamente o solvente da coluna. Em seguida, equilibre a coluna com aproximadamente 10 a 20 volumes da fase móvel nas condições iniciais.

### Armazenamento da coluna

Certifique-se de remover completamente aditivos como ácidos, bases ou tampões para evitar danos à coluna. Lave a coluna com 10 a 20 volumes de metanol ou álcool isopropílico para remover todo o dióxido de carbono. Não armazene colunas em uma mistura de CO<sub>2</sub> e MeOH, pois o CO<sub>2</sub> evapora e seca a fase estacionária. Sele adequadamente com os plugues nas extremidades para evitar a evaporação do solvente.

## 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. 2014, 2018, 2019

Printed in Canada, October 8, 2019

820000-998