

COLUMN USER GUIDE for Agilent Reversed-Phase Columns



Agilent 反相色谱柱用户指南

Guide d'utilisation des colonnes pour les colonnes à phase inverse Agilent

Säulenbenutzerhandbuch für Agilent Umkehrphasensäulen

Manuale utenti per colonne a fase inversa Agilent

Guía de usuario de columna para columnas de fase reversa Agilent

Agilent 逆相カラム ユーザーガイド

Руководство пользователя по колонкам для проведения обращённо-фазной ВЭЖХ Agilent

Guia rápido para as colunas Agilent de fase reversa

The Measure of Confidence

ZORBAX reversed-phase / 反相 / à phase reversa / Umkehrphase / Fase inversa / Fase inversa / 逆相 / Fase reversa / обращённо-фазной

HPLC phases / 相 / Phases HPLC / Phasen / Fasi / Fases / カラム / Fases / фазной

Poroshell 120/300 / Pursuit / Polaris / HC-C18(2) / TC-C18(2)



Agilent Technologies

This booklet provides general information for all ZORBAX, Poroshell, Pursuit, and Polaris reversed-phase columns.

For additional detailed information about your specific phase or family, see: **[agilent.com/chem/columnchoices](https://www.agilent.com/chem/columnchoices)**

Getting Started

A QC Column Performance Report, including a test chromatogram, is enclosed with every Agilent column. The QC test system has been modified from a standard system to minimize system dead volume, so it may vary from the system used in your lab. This allows a better evaluation of the column and assures a more consistent product. A properly configured LC system will generate similar results to the chromatogram on your QC Performance Report.

Modern columns are robust and are designed to operate for long periods under normal chromatographic conditions. You can maximize column performance by running it within specifications. Always review the specifications before putting in place a final method.

Using Your Column

Installation

- The direction of flow is marked on the column.
- 1.8 μm columns (ZORBAX RRHT, ZORBAX RRHD) can only be operated in the direction flow marked on the column.
- Agilent recommends using Polyketone fittings (5042-8957) for columns up to 600 bar, and A-Line Quick Connect assembly (5067-5961 for 0.075 x 105 mm) or Quick Turn Fitting (5067-5966) for columns that will be operated at UHPLC pressures. Be sure to order the right capillary connection for your fitting.

Learn more at www.agilent.com/chem/a-linefittings.



*Polyketone fitting,
p/n 5042-8957*



*A-Line Quick Connect
assembly, p/n 5067-5961*



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

Column conditioning

Every column is tested before shipment and shipped in the test eluent. So, for first use, rinsing with water is not necessary. If mobile phase additives are used (such as buffers or ion-pair reagents) it is advisable to do an intermediate flush with a mobile phase of the correct composition, but without these additions. Flushing with 10 to 20 column volumes should help in transitioning to your mobile phase. For shorter chain chemistries (C8, Phenyl, CN, for example), care should be taken to make sure the column has been properly equilibrated prior to use. This will ensure reproducibility and help prevent retention time drifting.

Important safety considerations

- All points of connection in liquid chromatographic 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.
- Please adhere to operating pressure limits noted for each column (see chart). Exceeding these limits will compromise chromatographic performance and could be unsafe.

Other operating tips

- While generally not harmful to the column, reverse flow should be avoided except to attempt removal of clogged frit (see "column care").
- Always use high purity reagents and chromatography grade solvent to prepare your mobile phase. Degas and filter all mobile phase prior to use.
- Disassembling a column will degrade column performance.
- New columns contain a mixture of organic solvents and water. 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 to form.
- Agilent reversed-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 elevated pH or elevated temperature when not in use.
- Avoid use of this column outside of recommended pH ranges for column phase (see next page). Expect reduced lifetime when operating outside the recommended pH and temperature ranges.



*If you are using Poroshell 120 or ZORBAX RRHT or RRHD columns, 1.8 μ m, consider using a **Fast Guard for UHPLC** to protect your analytical column.*

See [agilent.com/chem/fastguards](https://www.agilent.com/chem/fastguards) for more information.

Column Operating Parameters: pH and Temperature

Phase	Recommended pH range	Maximum operating temperature
ZORBAX Eclipse Plus C18 and C8, Eclipse XDB-C8, XDB-C18, XDB-Phenyl, Poroshell 120 EC-C18 and EC-C8, ZORBAX Bonus-RP, HC-C18(2) and TC-C18(2)	pH 2.0 to 9.0	60 °C
Poroshell HPH	pH 2.0 to 11.0	60 °C
ZORBAX Extend C18	pH 2.0 to 11.5	60 °C (40 °C at high pH)
ZORBAX ODS, ZORBAX Phenyl, ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl, Poroshell 120 PFP, Poroshell 120 Phenyl-Hexyl, ZORBAX XDB-CN, ZORBAX Eclipse PAH, All Pursuit and Polaris bonded phases.	pH 2.0 to 8.0	60 °C
ZORBAX Eclipse PAH	pH 2.0 to 8.0	60 °C at pH <6.0
Poroshell 120 SB-C18, StableBond C18, ZORBAX Rx-C8, ZORBAX SB-Aq, ZORBAX SB-Phenyl, SB-C3, Poroshell 300, 300SB-C3	pH 1.0 to 8.0	90 °C (StableBond C18 and Poroshell 120 SB-C18) 80 °C (Rx-C8 and SB-Aq, SB-C3 and SB-Phenyl) 70 °C for pH <5.0; 40 °C for pH 5.0 to 8.0 (Poroshell 300 and 300SB-C3)
ZORBAX TMS	pH 2.0 to 7.0	60 °C

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

Maximum Operating Pressures – Columns up to 9.4 mm id

Column type	Particle size	Pressure limit
ZORBAX Rapid Resolution	3.5 μm	400 bar (6000 psi)
ZORBAX Rapid Resolution High Throughput (RRHT)	1.8 μm	600 bar (9000 psi)
ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD)	1.8 μm	1200 bar (17000 psi)
Poroshell 120, Poroshell HPH	2.7 μm , 4 μm (Poroshell 120)	600 bar (9000 psi)
Poroshell 300	5 μm	400 bar (6000 psi)
All ZORBAX, Pursuit, and Polaris columns, not noted as RRHT or RRHD, and HC-C18(2), TC-C18(2)	3.0 μm , 3.5 μm , 5 μm	400 bar (6000 psi)

Mobile Phase Selection and Operating Temperatures

The bonded stationary phase is nonpolar in nature and is best used with polar mobile phases such as methanol/water or acetonitrile/water mixtures. Increasing the amount of organic component typically reduces the retention time of the sample.

Recommended Starting Gradients

Stationary phase	Usage notes
Most reversed-phase columns	5% methanol or acetonitrile initially and 100% methanol or acetonitrile as the final solvent.
ZORBAX Eclipse PAH*	30 or 40% acetonitrile initially, to 100% acetonitrile as final solvent. It may be necessary to cool column to 15 to 20 °C for improved resolution.
ZORBAX Bonus-RP	Lower concentration of organic mobile phase modifier is required for compound elution, compared to traditional long-chain alkyl stationary phases.
Large molecule columns (e.g., Poroshell 300, ZORBAX 300SB columns)	Separations of polypeptides, proteins, DNA fragments, etc. often use trifluoroacetic or formic acid modifier for pH control and/or as an ion-pairing additive for desired retention and selectivity. Organic buffers such as TRIS are especially useful for intermediate pH applications.

*Best column lifetime is achieved at < 40 °C.

Column Care

The inlet frit on columns with a particle size of 2.7 μm or greater has a nominal porosity of 2 μm . Samples that contain particulate matter will plug the column inlet frit. ZORBAX and Fast Guard columns and hardware kits (as required) are recommended for use with such samples, and are generally recommended for all column use.

See [agilent.com/chem/fastguards](https://www.agilent.com/chem/fastguards) for more information about guard columns.

Cleaning Your Column/Extending Column Life

For columns that can be backflushed (Poroshell 120, ZORBAX columns with particles $>1.8 \mu\text{m}$ and all Pursuit and Polaris columns), start with a stronger (less polar) solvent.

1. Disconnect column from detector and run wash solvents into a beaker.
2. Start with your mobile phase without buffer salts (water/organic).
Run at 10 to 20 column volumes through.
3. Next, use 100% organic (methanol or acetonitrile).
4. Check pressure to see if it has returned to normal; if not, then,
5. Discard column or consider stronger conditions,
e.g., 75% acetonitrile/25% isopropanol
6. Increase to 100% isopropanol, 100% methylene chloride or 100% hexane (if you use methylene chloride or hexane, you will need to flush the column with isopropanol prior to use and before returning to your reversed-phase mobile phase).

For columns with particles $< 1.8 \mu\text{m}$, do not backflush the column - replace the column.

Storage Recommendations

Long-term storage of silica-based, bonded phase columns should be in a pure organic solvent. If the column has previously been used with a buffered mobile phase, the buffer should first be removed by purging the column with 20 to 30 column volumes of a 50:50 mixture of methanol or acetonitrile and water, followed by 20 to 30 column volumes of the pure solvent. Before storing, end-fittings should be tightly capped with end-plugs to prevent packing from drying out. Columns may be safely stored for short periods in most mobile phases. To protect equipment, it is desirable to remove salts from the instrument and column by purging the column with the same mobile phase without the buffer (e.g. using 60:40 ACN/H₂O to remove a 60:40 ACN/0.02 M phosphate buffered mobile phase). Re-equilibration is rapid with the original mobile phase when using this approach and any danger of corrosion from the salts is eliminated.

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 Fast LC/high efficiency columns. Learn about capillary options at [agilent.com/chem/lccapillaries](https://www.agilent.com/chem/lccapillaries)
- Ensure the data collection rate is optimized for your column. Use a higher collection rate for Fast LC columns (Poroshell 120, RRHT, RRHD).
- 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)
- Use Agilent certified lamps in your LC instruments for best performance.



本小册子提供适用于所有 ZORBAX, Poroshell, Pursuit, 和 Polaris 反相色谱柱的一般信息。

有关特定固定相或产品系列的详细信息，请访问：

agilent.com/chem/columnchoices

入门指南

每个 Agilent 色谱柱都附带一个 QC 色谱柱性能报告，该报告包含一个测试色谱图。QC 测试系统是在标准系统基础上改装而成的，它具有相对较低的系统死体积，因此，它与实验室中使用的系统不同。这样可以更好地评估色谱柱并确保获得更一致的产品。正确配置的 LC 系统将生成与 QC 性能报告中的色谱图相似的结果。

现代色谱柱都很耐用，在正常的色谱条件下，可以使用很长时间。在合适的条件下使用可以最大化色谱柱寿命。在应用方法之前请务必检阅色谱柱使用条件。

使用色谱柱

安装

- 在色谱柱上标明了流向。
- 只能按色谱柱上标记的流向操作 1.8 μm 色谱柱 (ZORBAX RRHT, ZORBAX RRHD)。
- 安捷伦建议对最高耐压为 600 bar 的色谱柱使用聚酮接头 (5042-8957), 对将在 UHPLC 压力下操作的色谱柱使用 A-Line Quick Connect 组件 (5067-5961, 0.075 x 105 mm) 或 Quick Turn Fitting 接头 (5067-5966). 请确保订购适用于相应接头的毛细管连接。如需了解更多信息, 请访问 www.agilent.com/chem/a-linefittings.



Polyketone fitting,
p/n 5042-8957



A-Line Quick Connect
assembly, p/n 5067-5961



Quick Turn fitting,
p/n 5067-5966

色谱柱老化

每个色谱柱在装运之前都经过了测试, 并放在测试洗脱液中运输。因此, 在首次使用时, 没有必要用水进行冲洗。如果使用流动相添加剂 (如缓冲液或离子对试剂), 建议使用含正确成分但不含这些添加剂的流动相进行中间过渡。使用 10 至 20 个色谱柱体积进行冲洗将有助于过渡到流动相。对于具有较短的化学链 (例如 C8、苯基、CN) 固定相的色谱柱, 应小心确保在使用色谱柱之前对其进行了彻底的平衡。这样可确保重复性, 并有助于防止保留时间漂移。

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。用户应注意流动相的毒性或易燃性。
- 柱填充物在干的情况下属于微小颗粒, 因此可能会被吸入呼吸道。只能在通风良好的区域打开色谱柱。
- 请遵照为每个色谱柱标明的操作压力限制进行操作 (参见图表)。超过这些限制会降低色谱性能, 而且很不安全。

其他操作提示:

- 虽然反冲一般不会损坏色谱柱，但还是应避免，除非是在尝试去除柱前筛板堵塞物时（请参见“色谱柱维护”）。
- 始终使用高纯度试剂和色谱级溶剂来准备流动相。在使用之前对所有流动相进行脱气和过滤。
- 打开色谱柱会降低色谱柱性能。
- 新色谱柱包含有机溶剂和水的混合物。请参见 QC 性能报告, 了解色谱柱中的溶剂成分。开始时，应小心不要让任何可能导致形成沉淀的流动相通过色谱柱。
- Agilent 反相色谱柱与水 and 所有常见的有机溶剂兼容
- 建议使用预柱来保护色谱柱并延长其使用寿命。
- 在不使用色谱柱时，不能在高的 pH 或高的温度条件下保存色谱柱。
- 避免在超出建议的色谱柱相应的 pH 范围的条件上使用此色谱柱（请参见下一页）。在超出建议的 pH 和温度范围条件下操作会缩短其使用寿命。



如果您正在使用 *Poroshell 120* 或者 *ZORBAX RRHT* 或 *RRHD* 色谱柱，请使用 **Fast Guard** 保护柱，访问 agilent.com/chem/fastguards 获取更多信息。

色谱柱操作温度: pH 和温度

键合相	建议的 pH 范围	最高操作温度
ZORBAX Eclipse Plus C18 和 C8, Eclipse XDB-C8, XDB-C18, XDB-Phenyl, Poroshell 120 EC-C18 和 EC-C8, ZORBAX Bonus-RP, HC-C18 (2), TC-C18(2)	pH 2.0 至 9.0	60 °C
Poroshell HPH	pH 2.0 至 11.0	60 °C
ZORBAX Extend C18	pH 2.0 至 11.5	60 °C (pH 较高时为 40 °C)
ZORBAX ODS, ZORBAX Phenyl, ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl, Poroshell 120 PFP, Poroshell 120 Phenyl-Hexyl, ZORBAX XDB-CN, ZORBAX Eclipse PAH, 所有 Pursuit 和 Polaris 键合相.	pH 2.0 至 8.0	60 °C
ZORBAX Eclipse PAH	pH 2.0 至 8.0	pH <6.0 时为 60 °C
Poroshell 120 SB-C18, StableBond C18, ZORBAX Rx-C8, ZORBAX SB-Aq, ZORBAX SB-Phenyl, SB-C3, Poroshell 300, 300SB-C3	pH 1.0 至 8.0	90 °C (StableBond C18 和 Poroshell 120 SB-C18) 80 °C (Rx-C8 和 SB-Aq, SB-C3 和 SB-Phenyl) pH <5.0 时为 70 °C; pH 5.0 至 8.0 时为 40 °C (Poroshell 300 和 300SB C3)
ZORBAX TMS	pH 2.0 至 7.0	60 °C

注意: 所有硅胶基质填充物在 pH >6 含水流动相中具有一定的可溶性。在 pH >6 的环境下使用硅胶基质色谱柱时, 应该使用范围在 0.01 至 0.02 M 的较低缓冲液浓度, 以及较低温度 (最高为 40 °C), 这样可获得最佳色谱柱使用寿命。在极端的 pH 或温度下操作会导致色谱柱 寿命的显著降低。

最大操作压力 — 内径最大为 9.4 毫米的色谱柱

色谱柱类型	颗粒尺寸	压力限制
ZORBAX 快速分离	3.5 μm	400 bar (6000 psi)
ZORBAX 快速分离高通量 (RRHT)	1.8 μm	600 bar (9000 psi)
ZORBAX 快速分离高分辨率 (RRHD)	1.8 μm	1200 bar (17000 psi)
Poroshell 120, Poroshell HPH	2.7 μm , 4 μm (Poroshell 120)	600 bar (9000 psi)
Poroshell 300	5 μm	400 bar (6000 psi)
所有 ZORBAX, Pursuit, 和 Polaris, 色谱柱, 未记录为 RRHT 或 RRHD, 以及 HC-C18(2), TC-C18(2)	3.0 μm , 3.5 μm , 5 μm	400 bar (6000 psi)

流动相选择和操作温度

键合固定相本质上是非极性的，最适合与极性流动相结合使用，如甲醇 / 水或乙腈 / 水混合物。增加有机相比比例通常会缩短样品的保留时间。

建议的梯度初始比例

固定相	用法说明
大多数反相色谱柱	最初为 5% 甲醇或乙腈, 100% 甲醇或乙腈作为最终溶剂。
ZORBAX Eclipse PAH*	最初为 30 或 40% 乙腈, 至 100% 乙腈作为最终溶剂。要提高分离度, 可能需要将色谱柱冷却至 15 至 20 °C。
ZORBAX Bonus-RP	与传统的长链烷基固定相相比, 化合物洗脱需要使用浓度较低的有机流动相改性剂。
大分子色谱柱 (如 Poroshell 300, ZORBAX 300SB 色谱柱)	多肽、蛋白质、DNA 片断等的分离通常使用三氟醋酸或甲酸改性剂以进行 pH 控制和 / 或作为离子对添加剂, 以获得所需的保留和选择性。有机缓冲液 (如 TRIS) 对于中间 pH 应用特别有帮助。

*在温度 < 40 °C 时色谱柱达到最佳使用寿命。

色谱柱维护

具有颗粒尺寸为 2.7 μm 或更大的色谱柱，它们的进口筛板的空隙是 2 μm 。样品中包含颗粒物将堵塞色谱柱进口筛板。要使用此类样品，建议使用 ZORBAX 和 Fast Guard 预柱（如果需要），在使用所有色谱柱时，通常也建议使用这些预柱。

有关保护色谱柱的详细信息，请访问

agilent.com/chem/fastguards

清洁您的色谱柱/延长色谱柱使用寿命

对于可以进行反冲的色谱柱（Poroshell 120、颗粒尺寸大于 1.8 μm 的 ZORBAX 色谱柱和所有 Pursuit 和 Polaris 色谱柱），请用强洗脱度，较小极性的溶剂开始清洗。

1. 断开色谱柱与检测器的连接，然后把柱后废液导入烧杯。
2. 从你所使用的流动相开始清洗（但必须去除缓冲盐）。按 10 到 20 色谱柱体积量注入。
3. 下一步，使用 100% 有机相（甲醇或乙腈）。
4. 检查压力，以查看压力是否返回到正常状态，如果没有返回到正常状态，则进行以下步骤。
5. 丢弃色谱柱或使用更强的条件，例如 75% 乙腈 / 25% 异丙醇。
6. 提高到 100% 异丙醇、100% 二氯甲烷或 100% 己烷（如果您使用二氯甲烷或己烷，则需要使用异丙醇冲洗色谱柱，然后才能使用并返回到反相移动相）。

对于填料颗粒尺寸小于 1.8 μm 的色谱柱，请勿反冲此色谱柱而是更换此色谱柱。

存放建议

硅胶基质键合相色谱柱应在纯有机溶剂中进行长期存放。如果色谱柱已使用了含缓冲盐的流动相，应首先使用甲醇或乙腈和水的 50:50 混合物对色谱柱进行 20 至 30 个色谱柱体积的冲洗，然后使用纯溶剂进行 20 至 30 个色谱柱体积的冲洗。在存放之前，应使用堵头堵住接头，以防止填充物变干。将色谱柱放在大多数流动相中可安全存放较短时间。为了保护设备，需要使用不含缓冲液的相同的流动相对色谱柱进行冲洗，以从仪器和色谱柱中去除盐分（例如，使用 60:40 ACN/H₂O 去除 60:40 ACN/0.02 M 磷酸盐缓冲的流动相）。在使用此方法时，可使用原始流动相快速进行重新平衡，并消除了被盐分腐蚀的危险。

获得最佳色谱结果的提示

- 尽可能缩短组件之间管线的长度，以减少柱外体积和谱带扩展，从而优化仪器。对快速 LC/高效色谱柱，请使用内径为 0.12 毫米的红色管线。有关毛细管选件，请访问 agilent.com/chem/lccapillaries
- 确保针对色谱柱优化数据采集速率。对快速 LC 色谱柱 (Poroshell 120, RRHT, RRHD) 使用较高的采集速率。
- 根据样品使用适当的样品过滤或其他样品准备方法。要了解详细信息，请访问 agilent.com/chem/sampleprep
- 在 LC 检测器中使用 Agilent 认证的紫外灯，以获得最佳性能。



Ce livret fournit des informations générales relatives à toutes les colonnes ZORBAX, Poroshell, Pursuit, et Polaris à phase inverse.

Pour obtenir des informations supplémentaires plus détaillées relatives à votre phase ou à votre famille en particulier, visitez le site :
agilent.com/chem/columnchoices

Mise en route

Un rapport sur les performances QC des colonnes, comprenant un chromatogramme-test, accompagne chaque colonne Agilent. Le système HPLC de test QC a été modifié par rapport à un système standard afin de minimiser les volumes morts dans le système, de sorte qu'il peut être différent du système utilisé dans votre laboratoire. Cela permet une meilleure évaluation de la colonne et garantit une meilleure conformité du produit. Un système LC correctement configuré générera des résultats similaires au chromatogramme sur votre rapport des performances QC.

Les colonnes modernes sont particulièrement robustes et sont conçues pour être utilisées sur de longues durées dans des conditions expérimentales normales. Profitez pleinement des performances de votre colonne en l'utilisant conformément aux spécifications techniques. Prenez toujours le temps de vérifier les spécifications techniques avant de mettre en place une méthode définitivement.

Utilisation de votre colonne

Installation

- La direction du flux est indiquée sur la colonne.
- les colonnes 1.8 μm (ZORBAX RRHT, ZORBAX RRHD) ne peuvent être utilisées que dans la direction du flux indiquée sur la colonne.
- Agilent recommande d'utiliser les raccords de colonne en polycétone (5042-8957) pour des pressions jusqu'à 600 bars, et un raccord rapide A-Line Quick Connect (5067-5961 pour 0,075 x 105 mm) ou un raccord rapide Quick Turn (5067-5966) pour les colonnes utilisées à des pressions UHPLC. Assurez-vous de commander le connecteur capillaire correspondant à votre raccord. Pour en savoir plus, rendez-vous sur : www.agilent.com/chem/a-linefittings.



*Polyketone fitting,
p/n 5042-8957*



*A-Line Quick Connect
assembly, p/n 5067-5961*



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

Conditionnement d'une colonne

Chaque colonne est testée avant expédition et expédiée dans l'éluant du test. Par conséquent, il n'est pas nécessaire de la rincer à l'eau pour la première utilisation. En cas d'utilisation d'additifs de phase mobile (tels que des tampons ou des réactifs de paires d'ions), il est conseillé de procéder à un rinçage intermédiaire avec une phase mobile de la composition correcte, mais sans les additifs. Le rinçage avec 10 à 20 volumes de colonne favorise la transition vers votre phase mobile. En ce qui concerne les greffons à chaîne plus courte (C8, Phényl, CN, par exemple), il est recommandé de s'assurer que la colonne a été correctement équilibrée avant utilisation. Ceci afin de garantir la reproductibilité et d'éviter la dérive du temps de rétention.

Considérations importantes relatives à la sécurité

- Tous les points de connexion dans les systèmes de chromatographie liquide sont des sources potentielles de fuite. Les utilisateurs doivent être informés de la toxicité et de l'inflammabilité de leurs phases mobiles.

- Du fait de la petite taille des particules, le matériau à l'intérieur des colonnes peut être inhalé lorsqu'il est sec. Les colonnes ne doivent être desserties que dans une zone bien ventilée
- Veuillez observer les limites de pression opérationnelle indiquées pour chaque colonne (voir le graphique). Le dépassement de ces limites peut compromettre les performances chromatographiques ainsi que la sécurité.

Autres conseils d'utilisation

- Bien que cela ne soit généralement pas dangereux pour la colonne, il est recommandé d'éviter d'inverser le flux, sauf pour déboucher un fritté (voir les exceptions dans la section « Installation »).
- Toujours utiliser des réactifs de grande pureté et du solvant de qualité chromatographique pour préparer votre phase mobile. Dégazer et filtrer toute phase mobile avant utilisation.
- Désassembler colonne risque de diminuer ses performances.
- Les colonnes neuves contiennent un mélange de solvants organiques et d'eau. Voir le rapport sur les performances QC pour la composition du solvant dans votre colonne. Avant toute chose, il est recommandé de s'assurer qu'aucune phase mobile qui pourrait provoquer la formation d'un précipité ou d'une émulsion ne soit introduite dans la colonne.
- Les colonnes à phase inverse Agilent sont compatibles avec l'eau et tous les solvants organiques communs.
- L'utilisation d'une colonne de garde est recommandée pour protéger la colonne et augmenter sa durée de vie.
- Les colonnes ne doivent pas être maintenues à un pH élevé ni à une température élevée lorsqu'elles ne sont pas utilisées.
- Éviter toute utilisation de cette colonne en dehors des gammes pH recommandées pour la phase des colonnes (voir page suivante). La durée de vie sera réduite en cas d'utilisation en dehors des gammes pH et température recommandées.

Paramètres opérationnels de la colonne : pH et température

Phase	Gamme pH recommandée	Température opération-nelle maximum
ZORBAX Eclipse Plus C18 et C8, Eclipse XDB-C8, XDB-C18, XDB-Phényl, Poroshell 120 EC-C18 et EC-C8, ZORBAX Bonus-RP, HC-C18(2), TC-C18(2)	pH 2.0 à 9.0	60 °C
Poroshell HPH	pH 2.0 à 11.0	60 °C
ZORBAX Extend C18	pH 2.0 à 11.5	60 °C (40 °C à pH élevé)
ZORBAX ODS, ZORBAX Phényl, ZORBAX Eclipse Plus Phényl-Héxyl, Poroshell 120 PFP, Poroshell 120 Phényl-Héxyl, ZORBAX XDB-CN, ZORBAX Eclipse PAH, Toutes les phases greffées Pursuit et Polaris	pH 2.0 à 8.0	60 °C
ZORBAX Eclipse PAH	pH 2.0 à 8.0	60 °C à un pH <6,0
Poroshell 120 SB-C18, StableBond C18, ZORBAX Rx-C8, ZORBAX SB-Aq, ZORBAX SB-Phényl, SB-C3, Poroshell 300, 300SB-C3	pH 1.0 à 8.0	90 °C (StableBond C18 et Poroshell 120 SB-C18) 80 °C (Rx-C8 et SB-Aq, SB-C3 et SB-Phényl) 70 °C pour un pH <5.0; 40 °C pour un pH de 5.0 à 8.0 (Poroshell 300 et 300SB C3)
ZORBAX TMS	pH 2.0 à 7.0	60 °C

Remarque: Toutes les phases stationnaires à base de silice ont une solubilité dans les phases mobiles aqueuses à un pH >6. En cas d'utilisation de colonnes à base de silice à un pH >6, la durée de vie de la colonne sera plus longue à des températures plus basses (40 °C maximum) et en utilisant des solutions tampons faiblement concentrées, dans la gamme 0.01 à 0.02 M. Une utilisation aux limites de la gamme de pH et de température entraîne une diminution sensible de la durée de vie de la colonne.

Pressions opérationnelles maximales – colonnes jusqu'à 9.4 mm de di

Type de colonnes	Taille des particules	Limite de pression
ZORBAX Résolution Rapide	3.5 µm	400 bar (6000 psi)
ZORBAX Résolution Rapide Haut Débit (RRHT)	1.8 µm	600 bar (9000 psi)
ZORBAX Résolution Rapide Haute Définition (RRHD)	1.8 µm	1200 bar (17000 psi)
Poroshell 120, Poroshell HPH	2.7 µm, 4 µm (Poroshell 120)	600 bar (9000 psi)
Poroshell 300	5 µm	400 bar (6000 psi)
Toutes les colonnes ZORBAX, Pursuit, et Polaris, non marquées comme RRHT ou RRHD et HC-C18(2), TC-C18(2)	3.0 µm, 3.5 µm, 5 µm	400 bar (6000 psi)

Sélection de la phase mobile et températures de fonctionnement

La phase stationnaire greffée est non polaire par nature. Il est recommandé de l'utiliser avec des phases mobiles polaires telles que des mélanges méthanol/eau ou acétonitrile/eau. L'augmentation du pourcentage de solvant organique réduit généralement le temps de rétention des composés.

Gradients de départ recommandés

Phase stationnaire	Remarques d'utilisation
La plupart des colonnes à phase inverse	D'abord 5% de méthanol ou d'acétonitrile puis 100% de méthanol ou d'acétonitrile comme solvant final.
ZORBAX Eclipse PAH*	D'abord 30 ou 40% d'acétonitrile, jusqu'à 100% d'acétonitrile comme solvant final. Il peut être nécessaire de refroidir la colonne à 15-20 °C pour obtenir une meilleure résolution.
ZORBAX Bonus-RP	Une proportion de solvant organique inférieure est requise pour l'élution du composé, par rapport aux phases stationnaires à longue chaîne alkyle traditionnelles.
Colonnes pour les biomolécules (par ex., les colonnes Poroshell 300, ZORBAX 300SB)	Les séparations de polypeptides, protéines, fragments d'ACN, etc. exigent généralement un modifiant tel que l'acide trifluoroacétique ou l'acide formique pour contrôler le pH et/ou comme additif de paires d'ions pour obtenir la rétention et la sélectivité désirées. Les tampons organiques tels que les TRIS sont spécialement utilisés pour les applications de pH intermédiaires.

*La plus longue durée de vie est obtenue à < 40 °C.



*Si vous utilisez une colonne Poroshell 120, ou ZORBAX RRHT ou RRHD 1.8 µm, pensez à la protéger grâce à une colonne de garde **Fast Guard pour UHPLC**. Consultez le site agilent.com/chem/fastguards pour plus d'informations.*

Maintenance des colonnes

Le fritté intérieur des colonnes dont la taille de particules est de 2.7 μm ou plus a une porosité nominale de 2 μm . Les échantillons qui contiennent des particules obturent le fritté d'entrée de colonne. Les colonnes de garde ZORBAX et Fast Guard avec leur support si nécessaire sont recommandées pour de tels échantillons et sont généralement recommandés pour toutes les colonnes.

Consultez le site [agilent.com/chem/fastguards](https://www.agilent.com/chem/fastguards) pour obtenir plus d'informations sur les colonnes de garde.

Nettoyage de votre colonne / Prolongement de la durée de vie des colonnes

Pour les colonnes qui peuvent rincées à l'envers (colonnes Poroshell 120, ZORBAX avec des particules de $>1.8 \mu\text{m}$ et toutes les colonnes Pursuit et Polaris), démarrez avec un solvant plus fort (moins polaire).

1. Débranchez la colonne du détecteur. La phase mobile sortant de la colonne sera récupérée dans un bécher.
2. Démarrez avec la phase mobile contenue dans la colonne mais sans sels ni tampons. Faites passer 10 à 20 volumes de colonne.
3. Puis, faites passer 100% de solvant organique (méthanol ou acétonitrile).
4. Vérifiez si la pression est revenue à la normale, dans le cas contraire.
5. Jetez la colonne ou essayez des conditions plus éluantes, par ex. 75% d'acétonitrile/25% d'isopropanol.
6. Augmentez à 100% d'isopropanol, 100% de chlorure de méthylène ou 100% d'hexane (en cas d'utilisation de chlorure de méthylène ou d'hexane, il sera nécessaire de rincer la colonne avec de l'isopropanol avant utilisation et avant de revenir à la phase mobile désirée).

Pour les colonnes avec particules $< 1.8 \mu\text{m}$, ne rincez pas la colonne à l'envers remplacez la colonne.

Recommandations de stockage

Le stockage à long terme des colonnes à phase greffée et à base de silice doit se faire dans un solvant organique pur. En cas d'utilisation préalable de la colonne avec une phase mobile tamponnée, le tampon doit d'abord être éliminé en rinçant la colonne avec 20 à 30 volumes de colonnes avec un mélange à 50:50 de méthanol ou d'acétonitrile et d'eau, suivi de 20 à 30 volumes de colonnes de solvant pur. Avant le stockage, veillez à bien fermer les extrémités de la colonne afin d'éviter le séchage. Les colonnes peuvent être stockées en toute sécurité pour de courtes périodes dans la plupart des phases mobiles. Afin de protéger l'équipement, il est souhaitable de retirer les sels de l'instrument et de la colonne en rinçant la colonne avec la même phase mobile sans le tampon (par ex. utilisation de 60:40 ACN/H₂O pour retirer une phase mobile tamponnée à 60:40 d'ACN/0.02 M de phosphate). Le rééquilibrage est rapide avec la phase mobile originale lors de l'utilisation de cette approche et tout risque de corrosion par les sels est éliminé.

Conseils d'obtention des meilleurs résultats chromatographiques

- Optimisez votre instrument en minimisant les longueurs de tubes entre les différents modules, afin de réduire les volumes "extra-colonne" et l'élargissement de la bande d'échantillon. Utilisez du tube PEEK rouge de 0.12 mm de di pour les colonnes en « Fast LC »/efficacité élevée. Pour en savoir plus sur les différents tubes capillaires disponibles, consultez le site **agilent.com/chem/lccapillaries**
- Vérifiez que la vitesse d'acquisition des données est optimisée pour votre colonne. Utilisez une vitesse d'acquisition des données plus importante pour les colonnes en « Fast LC » (Poroshell 120, RRHT, RRHD).
- Utilisez la filtration d'échantillons ou toute autre préparation d'échantillon adaptée à votre échantillon. Pour en savoir plus, consultez le site **agilent.com/chem/sampleprep**
- Utilisez les lampes certifiées Agilent dans vos instruments LC, pour obtenir de meilleures performances.



Dieses Handbuch enthält allgemeine Informationen zu allen ZORBAX-, Poroshell-, Pursuit- und Polaris-Umkehrphasensäulen.

Genauere Informationen über Ihre Säulenphase finden Sie unter:

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

Erste Schritte

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

Moderne Säulen sind robust und haben bei Verwendung unter normalen chromatographischen Bedingungen eine lange Lebensdauer. Sie können die Lebensdauer Ihrer Säule verlängern, wenn Sie diese innerhalb der Spezifikationen benutzen. Bitte beachten Sie besonders auch vor der Methodenentwicklung die Spezifikationen der Säule.

Verwenden Ihrer Säule

Installation

- Die Flussrichtung ist auf der Säule angegeben.
- 1.8- μ m-Säulen (ZORBAX RRHT, ZORBAX RRHD) können nur in der auf der Säule angegebene Flussrichtung verwendet werden.
- Agilent empfiehlt Polyketon-Fittings (5042-8957) für Säulen bis zu 600 bar und A-Line Quick Connect Einheiten (5067-5961 für 0,075 x 105 mm) oder Quick Turn Fittings (5067-5966) für Säulen, die bei UHPLC-Drücken betrieben werden. Achten Sie darauf, die richtige Kapillarverbindung für Ihr Fitting zu bestellen. Weitere Informationen finden Sie unter www.agilent.com/chem/a-linefittings.



*Polyketone fitting,
p/n 5042-8957*



*A-Line Quick Connect
assembly, p/n 5067-5961*



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

Konditionieren von Säulen

Jede Säule wird vor ihrem Versand getestet und im Testeluent versendet. Daher ist bei der ersten Verwendung das Spülen mit Wasser nicht erforderlich. Wenn Zusätze (z. B. Puffer oder Ionenpaarreagenzien) in der mobilen Phase verwendet werden, sollte zuerst die Säule mit der mobilen Phase ohne Zusätze gespült werden. Dieser Spülvorgang sollte für einen anschließenden problemlosen Wechsel zur mobilen Phase 10-20 Säulenvolumina umfassen. Bei kurzzeitigen Phasen (z. B. C8, Phenyl, CN) sollte darauf geachtet werden, dass die Säule vor der Verwendung ordnungsgemäß äquilibriert wurde. Dies stellt Reproduzierbarkeit sicher und verhindert Abweichungen bei der Retentionszeit.

Wichtige Sicherheitshinweise

- Alle Anschlußpunkte in LC-Systemen sind potentielle Quellen von Lecks. Benutzer sollten die Toxizität bzw. Brennbarkeit der mobilen Phase kennen.
- Die Säule sollte nur in gut belüfteten Säulen geöffnet werden, da die Gefahr des Einatmens von Säulenpackmaterial aufgrund der kleinen Partikelgröße besteht.

- Halten Sie die spezifischen Säulendruckgrenzwerte für jede Säule ein (siehe Diagramm). Eine Überschreitung dieser Werte beeinträchtigt die Chromatografieleistung und kann gefährlich werden.

Weitere Hinweise:

- Die Verwendung der Säule entgegen der Flußrichtung sollte vermieden werden, außer bei dem Versuch, verstopfte Fritten zu säubern (siehe "Säulenanwendungshinweise")
- Verwenden Sie für die Vorbereitung der mobilen Phase immer Reagenzien mit hoher Reinheit und Lösungsmittel in Chromatografiequalität. Entgasen und filtrieren Sie alle mobilen Phasen vor ihrer Verwendung.
- Das Aufschrauben einer Säule kann zu einer Beeinträchtigung der Säulenleistung führen.
- Die neuen Säulen enthalten ein Gemisch aus organischen Lösungsmitteln und Wasser. Die Lösungsmittelzusammensetzung in Ihrer Säule finden Sie im QC-Testreport. Es sollte darauf geachtet werden, dass keine mobile Phase durch die Säule läuft, die zu einer Niederschlagsbildung führen kann.
- Agilent Umkehrphasensäulen sind mit Wasser und allen gängigen organischen Lösungsmitteln kompatibel.
- Die Verwendung einer Vorsäule wird zum Schutz der Säule und zur Verlängerung ihrer Lebenszeit empfohlen.
- Zur Zeit nicht benutzte Säulen sollten keine erhöhten pH-Werte oder Temperaturen ausgesetzt werden.
- Vermeiden Sie die Verwendung dieser Säule außerhalb der empfohlenen pH-Bereiche für die Säulenphase (siehe nächste Seite). Die Lebenszeit verkürzt sich, wenn die Säule außerhalb der empfohlenen pH- und Temperaturbereiche betrieben wird.

Säulenbetriebsparameter: pH- und Temperaturbereiche

Phase	Empfohlener pH-Bereich	Maximale Betriebs-temperatur
ZORBAX Eclipse Plus C18 und C8, Eclipse XDB-C8, XDB-C18, XDB-Phenyl, Poroshell 120 EC-C18 und EC-C8, ZORBAX Bonus-RP, HC-C18(2), TC-C18(2)	pH 2.0 bis 9.0	60 °C
Poroshell HPH	pH 2.0 bis 11.0	60 °C
ZORBAX Extend C18	pH 2.0 bis 11.5	60 °C (40 °C bei hohem pH-Wert)
ZORBAX ODS, ZORBAX Phenyl, ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl, Poroshell 120 PFP, Poroshell 120 Phenyl-Hexyl, ZORBAX XDB-CN, ZORBAX Eclipse PAH, alle Pursuit- und Polarisgebundenen Phasen	pH 2.0 bis 8.0	60 °C
ZORBAX Eclipse PAH	pH 2.0 bis 8.0	60 °C bei pH-Werten < 6.0
Poroshell 120 SB-C18, StableBond C18, ZORBAX Rx-C8, ZORBAX SB-Aq, ZORBAX SB-Phenyl, SB-C3, Poroshell 300, 300SB-C3	pH 1.0 bis 8.0	90 °C (StableBond C18 und Poroshell 120 SB-C18) 80 °C (Rx-C8 und SB-Aq, SB-C3 und SB-Phenyl) 70 °C bei pH-Werten < 5.0; 40 °C für pH-Werte 5.0 bis 8.0 (Poroshell 300 und 300SB-C3)
ZORBAX TMS	pH 2.0 bis 7.0	60 °C

Hinweis: Alle Packungen auf Silikabasis sind in wässrigen mobilen Phasen mit einem pH-Wert > 6 löslich. Falls Sie dennoch Säulen auf Silikabasis bei einem pH-Wert > 6 verwenden, dann erhalten Sie eine längere Lebensdauer, wenn Sie niedrigere Temperaturen (40 °C max.) und niedrigere Pufferkonzentrationen zwischen 0.01 bis 0.02 M verwendet werden. Wird die Säule außerhalb der spezifizierten pH- und Temperaturgrenzwerten betrieben, kann dies einen signifikant negativen Einfluß auf die Lebensdauer der Säule haben.

Maximaler Druck: Säulen bis zu 9.4 mm id

Säulentyp	Partikelgröße	Druckgrenzwert
ZORBAX Rapid Resolution	3.5 µm	400 bar (6000 psi)
ZORBAX Rapid Resolution High Throughput (RRHT)	1.8 µm	600 bar (9000 psi)
ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD)	1.8 µm	1200 bar (17000 psi)
Poroshell 120, Poroshell HPH	2.7 µm, 4 µm (Poroshell 120)	600 bar (9000 psi)
Poroshell 300	5 µm	400 bar (6000 psi)
Alle ZORBAX-, Pursuit-, und Polaris-Säulen ohne RRHT oder RRHD sowie HC-C18(2), TC-C18(2)	3.0 µm, 3.5 µm, 5 µm	400 bar (6000 psi)

Mobile Phasen – Auswahl und Betriebstemperaturen

Die gebundene stationäre Phase ist unpolar und wird am besten mit polaren mobilen Phasen wie Methanol/Wasser- oder Acetonitril/Wasser-Gemischen verwendet. Ein höherer Anteil an organischen Komponenten verkürzt normalerweise die Retentionszeit der Probe.

Empfohlene Anfangsgradienten

Stationäre Phase	Verwendungshinweise
Die meisten Umkehrphasensäulen	Am Anfang 5% Methanol oder Acetonitril und 100% Methanol oder Acetonitril als Endlösungsmittel.
ZORBAX Eclipse PAH*	Am Anfang 30 oder 40% Acetonitril, bis 100% Acetonitril als Endlösungsmittel. Für eine bessere Auflösung muss die Säule ggf. auf 15 bis 20 °C heruntergekühlt werden.
ZORBAX Bonus-RP	Verglichen mit herkömmlichen langkettigen stationären Alkylphasen ist für die Elution von chemischen Verbindungen eine niedrigere Konzentration des organischen Modifikators der mobilen Phase erforderlich.
Säulen für große Moleküle (z. B. Poroshell 300-, ZORBAX 300SB-Säulen)	Für die Trennung von Polypeptiden, Proteinen, DNA-Fragmenten usw. werden oft Trifluoressig- oder Ameisensäure als Modifizier zur pH-Wertsteuerung und/oder als Ionenpaarzusatz verwendet, um die gewünschte Retention und Selektivität zu erreichen. Organische Puffer wie TRIS sind ideal für Applikationen im mittleren pH Bereich geeignet.

*Die optimale Lebensdauer der Säule wird bei < 40 °C erreicht.



Beim Arbeiten mit Poroshell 120, ZORBAX RRHT oder RRHD Säule mit 1.8 μm sollten immer **UHPLC Vorsäulen** verwendet werden, um Ihre analytische Säule zu schützen. Für weitere Informationen besuchen Sie bitte: agilent.com/chem/fastguards

Säulenanwendungshinweise

Die Einlassfritte von Säulen mit einer Partikelgröße von mindestens 2.7 µm hat eine nominale Durchlässigkeit von 2 µm. Proben, die Schwebstoffe enthalten, verstopfen die Einlassfritte der Säule. Für die Verwendung dieser Proben und allgemein werden ZORBAX- und Fast Guard-Vorsäulen sowie Hardwarekits (nach Bedarf) empfohlen.

Weitere Informationen zu Vorsäulen erhalten Sie unter **[agilent.com/chem/fastguards](https://www.agilent.com/chem/fastguards)**

Reinigen Ihrer Säule/Verlängern der Säulenlebenszeit

Für Säulen, bei denen Rückspülungen durchgeführt werden können (Poroshell 120-, ZORBAX-Säulen mit Partikeln > 1.8 µm sowie alle Pursuit- und Polaris-Säulen), sollte anfangs ein stärkeres (weniger polares) Lösungsmittel verwendet werden.

1. Trennen Sie die Säule vom Detektor und füllen Sie die Lösungsmittel in ein Becherglas
2. Beginnen Sie mit der mobilen Phase ohne Puffersalze (Wasser/organische Lösungsmittel). Lassen Sie 10 bis 20 Säulenvolumina durchlaufen
3. Verwenden Sie als nächstes 100% organisches Lösungsmittel (Methanol oder Acetonitril)
4. Prüfen Sie, ob der Druck wieder normal ist; wenn nicht,
5. Entsorgen Sie die Säule oder verwenden Sie stärkere Lösungsmittel, z. B. 75% Acetonitril/25% Isopropanol
6. Erhöhen Sie auf 100% Isopropanol, 100% Methylenchlorid oder 100% Hexan (wenn Sie Methylenchlorid oder Hexan verwenden, müssen Sie die Säule vor ihrer Verwendung und vor der Verwendung der mobilen Umkehrphase mit Isopropanol spülen)

Für Säulen mit Partikeln $< 1.8 \mu\text{m}$ sollten Sie keine Rückspülung durchführen, sondern die Säule austauschen.

Empfehlungen zur Lagerung

Langfristig sollten Säulen auf Silikabasis mit gebundenen Phasen in einem reinen organischen Lösungsmittel gelagert werden. Wurde die Säule zuvor mit einer mobilen Pufferphase verwendet, sollte der Puffer entfernt werden, indem die Säule mit 20 bis 30 Säulenvolumina eines 50:50-Gemischs aus Methanol oder Acetonitril und Wasser und danach mit 20 bis 30 Säulenvolumina reinem Lösungsmittel gespült wird. Vor der Lagerung sollten die Endverschraubungen fest mit Endverschlüssen verschlossen werden, um ein Austrocknen der Packung zu verhindern. Kurzfristig können Säulen in den meisten mobilen Phasen gelagert werden. Um das Instrument zu schützen, sollten Sie Salze vom Instrument und der Säule entfernen, indem Sie die Säule mit der gleichen mobilen Phase ohne Puffer spülen (z. B. mit 60:40 ACN/H₂O, um eine 60:40 ACN/0.02 M Phosphat-gepufferte mobile Phase zu entfernen). Mit diesem Ansatz stellen Sie eine schnelle Reäquilibration mit der ursprünglichen mobilen Phase sicher und eliminieren das Korrosionsrisiko bei Salzen.

Tipps für optimale Chromatografieergebnisse

- Optimieren Sie Ihr Instrument, indem Sie die Längen der Kapillaren zwischen den Komponenten minimieren, um zusätzliches Säulenvolumen und Bandenverbreiterung zu reduzieren. Verwenden Sie rote Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 0.12 mm für Fast-LC-/Hocheffizienzsäulen. Weitere Informationen zu Kapillaroptionen erhalten Sie unter **[agilent.com/chem/lccapillaries](https://www.agilent.com/chem/lccapillaries)**
- Stellen Sie sicher, dass die Datenerfassungsrate für Ihre Säule optimiert ist. Verwenden Sie eine höhere Datenerfassungsrate für Fast-LC-Säulen (Poroshell 120, RRHT, RRHD).
- Filtrieren Sie Ihre Probe oder führen Sie eine für Ihre Probe geeignete andere Probenvorbereitung durch. Weitere Informationen finden Sie unter **[agilent.com/chem/sampleprep](https://www.agilent.com/chem/sampleprep)**
- Verwenden Sie für eine optimale Leistung Agilent zertifizierte Lampen in Ihren Flüssigkeitschromatografiegeräten.



Questo manuale fornisce informazioni generali sulle colonne a fase inversa ZORBAX, Poroshell, Pursuit, e Polaris.

Per informazioni più dettagliate su una fase specifica o su una serie di prodotti, consultare il sito:

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

Guida introduttiva

Insieme a tutte le colonne Agilent vengono forniti un certificato di controllo qualità sulle prestazioni della colonna e un cromatogramma di prova. Il sistema HPLC per il controllo qualità è stato modificato partendo da un sistema standard riducendo così al minimo il volume morto del sistema. È possibile assistere a delle variazioni rispetto al sistema utilizzato in laboratorio. In questo modo si può meglio valutare la colonna e garantire un prodotto più efficiente. Se il sistema HPLC è stato configurato correttamente, si otterranno risultati simili a quelli indicati sul cromatogramma fornito di controllo qualità delle prestazioni della colonna.

Le colonne moderne sono robuste e concepite per operare per lunghi periodi in normali condizioni cromatografiche. Potrai ottenere il massimo delle prestazioni utilizzandole nelle specifiche indicate. Controlla le specifiche ogni qualvolta utilizzi le colonne per un metodo analitico.

Utilizzo della colonna

Installazione

- Sulla colonna è indicata la direzione del flusso.
- Le colonne da 1.8 μm (ZORBAX RRHT, ZORBAX RRHD) possono essere utilizzate solo nella direzione del flusso indicata.
- Agilent raccomanda di utilizzare raccordi in polichetone (cod. 5042-8957) per colonne fino a 600 bar, un gruppo Quick Connect A-Line (cod. 5067-5961 per colonne da 0,075 x 105 mm) o un raccordo Quick Turn (cod 5067-5966) per colonne che saranno utilizzate a pressioni UHPLC. Assicurati di ordinare il connettore capillare corretto per il tuo raccordo.

Maggiori informazioni su www.agilent.com/chem/a-linefittings.



*Polyketone fitting,
p/n 5042-8957*



*A-Line Quick Connect
assembly, p/n 5067-5961*



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

Condizionamento della colonna

Tutte le colonne vengono sottoposte a test prima della consegna e vengono spedite nell'eluente di prova. Al primo utilizzo, non è pertanto necessario pulire con acqua. Se si utilizzano additivi (ad esempio tamponi o reagenti per coppia ionica) è preferibile introdurre una fase mobile della composizione corretta priva di tali additivi. L'introduzione di 10-20 volumi di colonna favorisce il passaggio alla fase mobile. In caso di composizioni a catena più corta (come C8, Phenyl, CN), è importante che, prima di essere utilizzata, la colonna sia stata equilibrata correttamente per garantire riproducibilità e prevenire variazioni nel tempo di ritenzione.

Importanti considerazioni sulla sicurezza

- Tutti i punti di giunzione dei sistemi cromatografici per liquidi possono presentare delle perdite. Prestare attenzione alla tossicità e all'infiammabilità delle fasi mobili.
- Data la piccola dimensione delle particelle, è possibile respirare i riempimenti delle colonne a secco. Si consiglia di aprire le colonne solo in locali ben ventilati.

- Rispettare i limiti di pressione operativa indicati per ciascuna colonna (v. schema). Superare tali limiti è pericoloso e si rischia di compromettere le prestazioni cromatografiche.

Altri consigli per l'utilizzo

- Il flusso inverso non è di per sé dannoso per la colonna, dovrebbe tuttavia essere evitato a meno che venga utilizzato per rimuovere un frit intasato (v. "Cura della colonna").
- Utilizzare sempre reagenti purissimi e solvente di qualità cromatografica per preparare la fase mobile. Degassare e filtrare la fase mobile prima dell'uso.
- Le prestazioni della colonna vengono compromesse se la colonna viene smontata.
- Le nuove colonne contengono una miscela di solventi organici e acqua. Per informazioni sulla composizione del solvente della colonna, leggere il report di controllo qualità della colonna. Evitare che la fase mobile attraversi la colonna per non causare la formazione di un precipitato.
- Le colonne a fase inversa Agilent sono compatibili con l'acqua e con tutti i comuni solventi organici.
- Si consiglia l'utilizzo di una precolonna per proteggere la colonna e prolungarne la durata.
- Il pH e la temperatura non devono essere elevati quando le colonne non vengono utilizzate.
- Utilizzare questa colonna ai livelli di pH consigliati per la fase della colonna (v. pagina successiva). pH e temperatura non conformi ai parametri consigliati possono contribuire a ridurre la durata della colonna.

Parametri per il funzionamento della colonna: pH e temperatura

Fase	Parametro pH consigliato	Max temperatura operativa
ZORBAX Eclipse Plus C18 e C8, Eclipse XDB-C8, XDB-C18, XDB-Phenyl, Poroshell 120 EC-C18 e EC-C8, ZORBAX Bonus-RP, HC-C18(2), TC-C18(2)	da pH 2.0 a 9.0	60 °C
Poroshell HPH	da pH 2.0 a 11.0	60 °C
ZORBAX Extend C18	da pH 2.0 a 11.5	60 °C (40 °C a pH elevato)
ZORBAX ODS, ZORBAX Phenyl, ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl, Poroshell 120 PFP, Poroshell 120 Phenyl-Hexyl, ZORBAX XDB-CN, ZORBAX Eclipse PAH, Tutte le fasi legate Pursuit e Polaris	da pH 2.0 a 8.0	60 °C
ZORBAX Eclipse PAH	da pH 2.0 a 8.0	60 °C a pH <6.0
Poroshell 120 SB-C18, StableBond C18, ZORBAX Rx-C8, ZORBAX SB-Aq, ZORBAX SB-Phenyl, SB-C3, Poroshell 300, 300SB-C3	da pH 1.0 a 8.0	90 °C (StableBond C18 e Poroshell 120 SB-C18) 80 °C (Rx-C8 e SB-Aq, SB-C3 e SB-Phenyl) 70 °C a pH <5.0; 40 °C a pH da 5.0 a 8.0 (Poroshell 300 e 300SB-C3)
ZORBAX TMS	da pH 2.0 a 7.0	60 °C

Note: tutti i riempimenti in silice sono solubili in fasi mobili acquose a pH >6. Se si utilizzano colonne in silice a pH >6, è preferibile impostare temperature più basse (40 °C max) per prolungare la durata della colonna e utilizzare basse concentrazioni di tamponi (da 0.01 a 0.02 M). L'utilizzo agli estremi dell'intervallo consentito di pH e temperatura può avere un impatto significativo sulla durata di vita delle colonne.

Pressioni operative massime – Colonne fino a 9,4 mm di id

Tipo di colonna	Dimensione particella	Limite pressione
ZORBAX rapida risoluzione	3.5 µm	400 bar (6000 psi)
ZORBAX rapida risoluzione elevato rendimento (RRHT)	1.8 µm	600 bar (9000 psi)
ZORBAX rapida risoluzione elevata definizione (RRHD)	1.8 µm	1200 bar (17000 psi)
Poroshell 120, Poroshell HPH	2.7 µm, 4 µm (Poroshell 120)	600 bar (9000 psi)
Poroshell 300	5 µm	400 bar (6000 psi)
Tutte le colonne ZORBAX, Pursuit, e Polaris non specificate come RRHT o RRHD e HC-C18(2), TC-C18(2)	3.0 µm, 3.5 µm, 5 µm	400 bar (6000 psi)

Selezione della fase mobile e temperature operative

La fase stazionaria legata è in origine apolare ed è pertanto preferibile utilizzarla con fasi mobili polari, ad esempio miscele di metano/acqua o acetonitrile/acqua. Aumentare il quantitativo di componente organico riduce generalmente il tempo di ritenzione del campione.

Gradienti iniziali consigliati

Fase stazionaria	Note di utilizzo
Maggior parte delle colonne a fase inversa	inizialmente 5% metanolo o acetonitrile e 100% metanolo o acetonitrile come solvente finale.
ZORBAX Eclipse PAH*	inizialmente 30 o 40% di acetonitrile, fino a 100% di acetonitrile come solvente finale. Per migliorare la risoluzione potrebbe essere necessario raffreddare la colonna ad una temperatura compresa tra i 15 e i 20 °C.
ZORBAX Bonus-RP	Rispetto alle fasi stazionarie con lunghe catene alchiliche, per l'eluizione del composto è necessario utilizzare una concentrazione più bassa del modificatore della fase mobile.
Colonne per grandi molecole (es, colonne Poroshell 300, ZORBAX 300SB)	Le separazioni di polipeptidi, proteine, frammenti di DNA utilizzano spesso come modificatore l'acido trifluoroacetico o l'acido formico per controllare il pH, e/o un additivo per coppia ionica per ottenere la ritenzione e la selettività necessaria. I tamponi organici, ad esempio TRIS, sono utili soprattutto per applicazioni a pH intermedio.

*Durata massima della colonna a < 40 °C.



Se utilizzi colonne Poroshell 120, ZORBAX RRHT o RRHD da 1.8 μm , prendi in considerazione le pre-colonne **'Fast Guard UHPLC'** per proteggere le tue colonne analitiche. Consulta il sito agilent.com/chem/fastguards per ulteriori informazioni.

Cura della colonna

Il frit dell'iniettore sulle colonne con 2.7 μm o più di dimensione della particella ha una porosità nominale di 2 μm . I campioni contenenti particolati vanno ad ostruire il frit dell'iniettore della colonna. Si consiglia l'utilizzo delle precolonne e dei kit specifici ZORBAX e Fast Guard se si impiegano campioni di questo genere. Sono tuttavia consigliate con tutti i tipi di colonna.

Per ulteriori informazioni sulle precolonne, visitare il sito [agilent.com/chem/fastguards](https://www.agilent.com/chem/fastguards)

Pulizia della colonna e prolungamento della durata

In caso di colonna con possibilità di inversione del flusso (colonne Poroshell 120, ZORBAX con particelle $>1.8 \mu\text{m}$ e tutte le colonne Pursuit e Polaris), iniziare utilizzando un solvente più forte (o meno polare).

1. Scollegare la colonna dal rivelatore e versare i solventi per il lavaggio in un bicchiere.
2. Iniziare con la fase mobile senza utilizzare sali tampone (acqua/organico). Far passare 10-20 volumi di colonna.
3. Dopodiché utilizzare 100% di organico (metanolo o acetonitrile).
4. Controllare che la pressione sia tornata ai valori normali, diversamente
5. Scaricare la colonna o considerare condizioni più forti, es., 75% di acetonitrile/25% di isopropanolo
6. Passare al 100% di isopropanolo, al 100% di cloruro di metilene o al 100% di esano (se si utilizza il cloruro di metilene o l'esano, sarà necessario introdurre nella colonna l'isopropanolo prima dell'uso e prima di tornare alla fase mobile a fase inversa).

In caso di colonne con particelle $< 1.8 \mu\text{m}$, la colonna non deve essere degassata ma sostituita.

Consigli per lo stoccaggio

Si consiglia di conservare le colonne in silice e a fase legata in un solvente organico puro se si intende non utilizzarle a lungo. Se la colonna è stata precedentemente utilizzata con una fase mobile con tampone, rimuovere innanzitutto il tampone spurgando la colonna con 20-30 volumi di una miscela 50:50 di metanolo o acetonitrile e acqua, e poi con 20-30 volumi di solvente puro. Per evitare che il riempimento si asciughi, tappare bene le estremità prima dello stoccaggio. Le colonne possono restare stoccate nelle maggior parte della fasi mobili per brevi periodi. Per conservare l'attrezzatura, è preferibile rimuovere i sali dallo strumento e dalla colonna spurgando la colonna con la stessa fase mobile senza tampone, utilizzando ad esempio 60:40 ACN/H₂O per rimuovere una fase mobile con tampone fosfato 60:40 ACN/0.02 M). Questa soluzione consente di raggiungere rapidamente la riequilibrio con la fase mobile originale e di eliminare il rischio di corrosione causata dai sali.

Consigli per risultati cromatografici eccellenti

- Ottimizzare lo strumento riducendo al minimo la lunghezza dei tubi dei componenti in modo da diminuire il volume extra-colonna e la larghezza di banda. Utilizzare tubi rossi da 0.12 mm di id per colonne Fast LC/elevata efficienza. Per ulteriori informazioni sulle soluzioni capillari, consultare il sito **agilent.com/chem/lccapillaries**
- Controllare che la velocità di raccolta dei dati sia ottimale per la colonna. Utilizzare una velocità più alta in caso di colonne Fast LC (Poroshell 120, RRHT, RRHD).
- Utilizzare una filtrazione e una preparazione dei campioni adatte al campione. Per ulteriori informazioni, consultare il sito **agilent.com/chem/sampleprep**
- Insieme agli strumenti LC, utilizzare lampade certificate da Agilent per ottenere risultati migliori.



Este folleto ofrece información general para todas las columnas de fase reversa Poroshell, Pursuit, y Polaris.

Para obtener más información detallada sobre su fase o familia específica, consulte:

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

Procedimientos iniciales

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

Las columnas modernas son robustas y están diseñadas para operar por largos periodos de tiempo en condiciones cromatográficas normales. Puede maximizar el rendimiento de su columna trabajando dentro de especificaciones. Revise siempre las especificaciones antes de poner en marcha un método final.

Utilización de su columna

Instalación

- La dirección de flujo está marcada en la columna.
- Las columnas de 1.8 μm (ZORBAX RRHT, ZORBAX RRHD) solo pueden utilizarse en la dirección de flujo marcado en la columna.
- Agilent recomienda usar conectores de policetona (5042-8957) para columnas de hasta 600 bar y un conector de conexión rápida A-Line (5067-5961, para el tamaño de 0,075 x 105 mm) o un conector de giro rápido (5067-5966) para aquellas columnas que vayan a funcionar a presiones de UHPLC. Asegúrese de pedir la conexión capilar adecuada para su conector. Si desea obtener más información, visite www.agilent.com/chem/a-linefittings.



*Polyketone fitting,
p/n 5042-8957*



*A-Line Quick Connect
assembly, p/n 5067-5961*



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

Acondicionamiento de las columnas

Todas las columnas son probadas antes de su envío y enviadas en el eluyente de prueba. Por lo tanto, no es necesario lavarlas con agua la primera que se utilicen. Si se utilizan aditivos de fase móvil (como tampones o reactivos de par iónico), es aconsejable realizar un lavado intermedio con una fase móvil de la composición correcta, pero sin estas adiciones. El lavado con 10 a 20 volúmenes de columna puede ayudar en la transición a su fase móvil. Para rellenos químicos de cadenas más cortas (por ejemplo, C8, Fenilo y CN), se debe estar seguro de que la columna se ha equilibrado correctamente antes del uso. Así se garantizará la reproducibilidad y se evitará la deriva del tiempo de retención.

Importantes consideraciones de seguridad

- Todos los puntos de conexión en los sistemas cromatográficos líquidos son potenciales fuentes de fugas. Los usuarios deben ser conscientes de la toxicidad e inflamabilidad de sus fases móviles.
- Debido al reducido tamaño de las partículas, los rellenos secos de las columnas son respirables. Las columnas solo deben abrirse en un área bien ventilada.

- Tenga en cuenta los límites de presión de operación indicados para cada columna (ver tabla más adelante). Si se sobrepasan estos límites, el rendimiento cromatográfico se verá afectado y podría no ser seguro.

Otros consejos de operación

- Aunque por lo general no es perjudicial para la columna, se debería evitar el flujo inverso, excepto para intentar desobstruir una frita obstruida (ver "mantenimiento de la columna").
- Utilice siempre reactivos de gran pureza y disolventes de grado cromatográfico para preparar su fase móvil. Desgasifique y filtre toda la fase móvil antes del uso.
- Desmontar una columna en sus partes reducirá el rendimiento de esta.
- Las columnas nuevas contienen una mezcla de disolventes orgánicos y agua. Consulte el informe de Control de Calidad del rendimiento para conocer la composición de disolvente de la columna. Inicialmente, se debería tener cuidado de no pasar ninguna fase móvil a través de la columna que pueda provocar la formación de un precipitado.
- Las columnas de fase reversa Agilent son compatibles con agua y con todos los disolventes orgánicos comunes.
- Se recomienda el uso de una salvacolumna para proteger la columna y aumentar su vida útil.
- Las columnas no deben mantenerse a elevado pH o elevada temperatura cuando no estén en uso.
- Evite el uso de esta columna fuera de los intervalos de pH recomendados para la fase de columna (ver página siguiente). La vida útil de la columna se verá reducida si se opera fuera de los intervalos recomendados de pH y de temperatura.

Parámetros de operación de la columna: pH y temperatura

Fase	Intervalo de pH recomendado	Temperatura máxima de operación
ZORBAX Eclipse Plus C18 y C8, Eclipse XDB-C8, XDB-C18, XDB-Phenyl, Poroshell 120 EC-C18 y EC-C8, ZORBAX Bonus-RP, HC-C18(2), TC-C18(2)	pH 2.0 a 9.0	60 °C
Poroshell HPH	pH 2.0 a 11.0	60 °C
ZORBAX Extend C18	pH 2.0 a 11.5	60 °C (40 °C a elevado pH)
ZORBAX ODS, ZORBAX Phenyl, ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl, Poroshell 120 PFP, Poroshell 120 Phenyl-Hexyl, ZORBAX XDB-CN, ZORBAX Eclipse PAH, Todas las fases ligadas de Pursuit y Polaris	pH 2.0 a 8.0	60 °C
ZORBAX Eclipse PAH	pH 2.0 a 8.0	60 °C a pH <6.0
Poroshell 120 SB-C18, StableBond C18, ZORBAX Rx-C8, ZORBAX SB-Aq, ZORBAX SB-Phenyl, SB-C3, Poroshell 300, 300SB-C3	pH 1.0 a 8.0	90 °C (StableBond C18 y Poroshell 120 SB-C18) 80 °C (Rx-C8 y SB-Aq, SB-C3 y SB-Phenyl) 70 °C para pH <5.0; 40 °C para pH 5.0 a 8.0 (Poroshell 300 and 300SB-C3)
ZORBAX TMS	pH 2.0 a 7.0	60 °C

Nota: Todos los rellenos basados en sílice tienen cierta solubilidad en fases móviles acuosas de pH >6. Cuando se utilizan las columnas basadas en sílice a pH >6, se obtiene la mayor vida útil de la columna a temperaturas bajas (40 °C máx.) y utilizando bajas concentraciones de tampón en el intervalo de 0.01 a 0.02 M. Trabajar en los valores extremos de los rangos de pH y temperatura tendrá un impacto significativo en la vida de la columna.

Máximas presiones de operación – columnas de hasta 9,4 mm de di

Tipo de columna	Tamaño de partículas	Límite de presión
ZORBAX de resolución rápida	3.5 μm	400 bares (6000 psi)
ZORBAX de resolución rápida alto rendimiento (RRHT)	1.8 μm	600 bares (9000 psi)
ZORBAX de resolución rápida alta definición (RRHD)	1.8 μm	1200 bares (17000 psi)
Poroshell 120, Poroshell HPH	2.7 μm , 4 μm (Poroshell 120)	600 bares (9000 psi)
Poroshell 300	5 μm	400 bares (6000 psi)
Todas las columnas ZORBAX, Pursuit, y Polaris, no indicadas como RRHT o RRHD, y HC-C18(2), TC-C18(2)	3.0 μm , 3.5 μm , 5 μm	400 bares (6000 psi)

Selección de fase móvil y temperaturas de operación

La fase estacionaria ligada es de naturaleza no polar y se utiliza de forma óptima con fases móviles polares como mezclas de metanol/agua o acetonitrilo/agua. El aumento de la cantidad de componente orgánico suele reducir el tiempo de retención de la muestra.

Gradientes de inicio recomendados

Fase estacionaria	Notas de uso
Mayoría de las columnas de fase reversa	5% de metanol o acetonitrilo inicialmente y 100% de metanol o acetonitrilo como disolvente final.
ZORBAX Eclipse PAH*	30 o 40% de acetonitrilo inicialmente, hasta 100% de acetonitrilo como disolvente final. Puede que sea necesario enfriar la columna de 15 a 20 °C para mayor resolución.
ZORBAX Bonus-RP	Se requiere menor concentración de como modificador el fase móvil orgánico para elución del compuesto, en comparación con las fases estacionarias alquílicas de cadena larga tradicionales.
Columnas de moléculas grandes (por ejemplo, columnas Poroshell 300, ZORBAX 300SB)	Las separaciones de polipéptidos, proteínas, fragmentos de DNA, etc. a menudo utilizan modificador de ácido trifluoroacético o fórmico para el control de pH y/o como aditivo de par iónico para obtener la retención y la selectividad deseadas. Los tampones orgánicos como TRIS son especialmente útiles para las aplicaciones a pH intermedio.

*La vida útil óptima de la columna se alcanza a < 40 °C.



Si está usando columna Poroshell 120 ó columnas ZORBAX RRHT ó RRHD de 1.8 μ m, considere usar una **Fast Guard para UHPLC** para proteger su columna analítica. Visite agilent.com/chem/fastguards para mas información.

Mantenimiento de la columna

La fritada de entrada en las columnas con un tamaño de partículas de 2.7 μm o superior tiene una porosidad nominal de 2 μm . Las muestras que contienen materia particulada obstruirán la fritada de entrada de la columna. Se recomiendan precolumnas ZORBAX y Fast Guard y soportes de precolumnas (según sea necesario) para el uso con estas muestras, y se recomiendan en general para todas las columnas.

Consulte [agilent.com/chem/fastguards](https://www.agilent.com/chem/fastguards) para obtener más información sobre precolumnas.

Limpieza de la columna/extensión de la vida útil de la columna

Para columnas en las que puede revertirse el flujo (columnas Poroshell 120, y columnas ZORBAX con partículas $>1.8 \mu\text{m}$ y todas las columnas Pursuit y Polaris), comience con un disolvente más fuerte (menos polar).

1. Desconecte la columna del detector y eche los disolventes de lavado en un vaso.
2. Comience con la fase móvil sin sales de tampón (agua/orgánico).
3. Pase de 10 a 20 volúmenes de columna de fase móvil.
4. A continuación, utilice orgánico 100% (metanol o acetonitrilo).
5. Compruebe la presión para ver si ha vuelto al estado normal, si no es así.
6. Deseche la columna o considere condiciones más fuertes, por ejemplo, 75% acetonitrilo/25% isopropanol
7. Aumente hasta 100% isopropanol, 100% cloruro de metileno o 100% hexano (si utiliza cloruro de metileno o hexano, tendrá que lavar la columna con isopropanol antes del uso normal y antes de volver a la fase móvil de fase reversa).

Para columnas con partículas < 1.8 μm , no invierta el de flujo de la columna, sustituya la columna.

Recomendaciones de almacenamiento

El almacenamiento a largo plazo de las columnas de fase ligada basadas en sílice debe realizarse en un disolvente orgánico puro. Si la columna se ha utilizado previamente con una fase móvil con tampón, primero debe extraerse el búfer purgando la columna con 20 a 30 volúmenes de columna de una mezcla 50:50 de metanol o acetonitrilo y agua, seguido de 20 a 30 volúmenes de columna del disolvente puro. Antes del almacenamiento, se deben tapar bien las conexiones finales con tapones para evitar que el relleno se reseque. Las columnas se pueden almacenar de forma segura durante cortos periodos en la mayoría de las fases móviles. Para proteger el equipo, es conveniente eliminar las sales del instrumento y de la columna purgando la columna con la misma fase móvil sin el tampón (por ejemplo, con 60:40 ACN/H₂O para extraer una fase móvil con tampón fosfato 60:40 ACN/0,02 M). El re-equilibrado es rápido con la fase móvil original cuando se utiliza este método y se elimina cualquier peligro de corrosión por las sales.

Consejos para obtener los mejores resultados cromatográficos

- Optimice el instrumento minimizando las longitudes de los tubos entre los componentes, para reducir así el volumen extra de la columna y el ensanchamiento de la banda. Utilice tubos rojos de 0.12 mm de di para columnas de LC rápida/alta eficiencia. Obtenga información sobre las opciones de capilares en **agilent.com/chem/lccapillaries**
- 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 (Poroshell 120, RRHT, RRHD).
- Utilice la filtración de muestra u otra preparación de muestra apropiada para la muestra. Obtenga más información en **agilent.com/chem/sampleprep**
- Utilice lámparas certificadas Agilent en los instrumentos LC para un rendimiento óptimo.



この冊子には、すべての ZORBAX、Poroshell、Pursuit、Polaris 逆相カラムに関する一般情報が記載されています。

お使いの相またはファミリの具体的な詳細については、下記を参照してください：

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

入門

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 テストシステムは、システムのデッドボリュームを最小化するために標準のシステムから変更されているため、現在お使いのシステムとは異なる可能性があります。これは、カラムの評価を精密化することで、製品の一貫性を向上させるためです。正しくコンフィギュレーションされた LC システムは、QC パフォーマンスレポートのクロマトグラムと同様の結果を生成します。

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。お客様は、カラムを仕様の範囲内で使用することで、カラムのパフォーマンスを最大にすることが可能です。分析メソッドを最終決定する前に、カラム仕様を必ず確認してください。

カラムの使用

据付

- ・ フローの方向はカラム上に記載されています。
- ・ HPLC カラムは、カラムに記された方向のフローでのみ使用できます。
- ・ アジレントでは、60 MPa (600 bar) までの圧力で使用するカラムにはポリケトンフィッティング (5042-8957) の使用を推奨します。また、UHPLC の圧力下で使用されるカラムには A-Line クイックコネクトアセンブリ (0.075 x 105 mm 用 5067-5961) またはクイックターンフィッティング (5067-5966) の使用を推奨します。お使いのフィッティングに適したキャピラリー接続を使用してください。詳しくはホームページをご覧ください。

www.agilent.com/chem/a-linefittings



Polyketone fitting,
p/n 5042-8957



A-Line Quick Connect
assembly, p/n 5067-5961



Quick Turn fitting,
p/n 5067-5966

カラムのコンディショニング

カラムはすべて出荷前にテストされており、テスト時の移動相が封入された状態で出荷されます。移動相添加剤（バッファーやイオン対試薬など）を使用する場合、これらの添加剤を含まない組成の移動相を使用して、フラッシュすることを推奨します。カラム体積の 10 ~ 20 倍の量でフラッシュすれば、移動相への移行に十分なはずですが、短鎖の化合物（C8、フェニル、CN など）の場合、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、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。

重要な安全上の注意点

- ・ 液体クロマトグラフィシステムでは、すべての接続部で漏れが生じるおそれがあります。このため、移動相の毒性や可燃性に注意が必要です。
- ・ カラム充填剤は微粒子のため、エンドフィッティングを外すと吸い込むおそれがあります。カラムを開く作業は換気のよい場所で行ってください（推奨しません）。

- ・ 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等、危険が生じたりするおそれがあります。

操作に関するその他のヒント

- ・ 逆方向のフローは、カラムを損傷することは通常ありませんが、フリットの詰まりを取り除く場合を除いて避けることをお勧めします（「カラムのメンテナンス」を参照）。
- ・ 移動相の準備には、高純度の試薬と、クロマトグラフィグレードの溶媒を必ず使用してください。使用前に必ず移動相の脱気と濾過を行ってください。
- ・ 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、有機溶媒と水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 逆相カラムは、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。

Poroshell 120、ZORBAX RRHTまたは 1.8 μm のRRHDカラムを使用している場合、分析カラムを保護するために、**Fast Guard ガードカラム**を使用することをご検討ください。詳細は、agilent.com/chem/fastguardsを参照してください。

カラムの動作パラメータ: pH および温度

相	推奨 pH 範囲	最高使用温度
ZORBAX Eclipse Plus C18 および C8、Eclipse XDB-C8 XDB-C18、XDB-Phenyl、 Poroshell 120 EC-C18 および EC-C8、 ZORBAX Bonus-RP、 HC-C18(2)、TC-C18(2)	pH 2.0 ~ 9.0	60 °C
Poroshell HPH	pH 2.0 ~ 11.0	60 °C
ZORBAX Extend C18	pH 2.0 ~ 11.5	60 °C (高 pH では 40 °C)
ZORBAX ODS、ZORBAX Phenyl、ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、 Poroshell 120 PFP、 Poroshell 120 Phenyl-Hexyl、 ZORBAX XDB-CN、ZORBAX Eclipse PAH、 Pursuit、Polaris	pH 2.0 ~ 8.0	60 °C
ZORBAX Eclipse PAH	pH 2.0 ~ 8.0	60 °C (pH <6.0)
Poroshell 120 SB-C18、 StableBond C18、ZORBAX Rx-C8、ZORBAX SB-Aq、 ZORBAX SB-Phényl、 SB-C3、Poroshell 300、 300SB-C3	pH 1.0 ~ 8.0	90 °C (StableBond C18 および Poroshell 120 SB-C18) 80 °C (Rx-C8 および SB-Aq、SB-C3 および SB-Phényl) 70 °C (pH <5.0)、40 °C (pH 5.0 ~ 8.0) (Poroshell 300 および 300SB C3)
ZORBAX TMS	pH 2.0 ~ 7.0	60 °C

注意: 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ーを使用してください。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。

最大動作圧カー 内径 9.4 mm 以下のカラム

カラムタイプ	粒子径	圧力上限
ZORBAX Rapid Resolution	3.5 μm	400 bar (6000 psi)
ZORBAX Rapid Resolution High Throughput (RRHT)	1.8 μm	600 bar (9000 psi)
ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD)	1.8 μm	1200 bar (17000 psi)
Poroshell 120 、 Poroshell HPH	2.7 μm 、 4 μm (Poroshell 120)	600 bar (9000 psi)
Poroshell 300	5 μm	400 bar (6000 psi)
すべての ZORBAX、Pursuit、Polaris カラム (RRHT または RRHD が付くもの以外)、HC-C18 (2)、TC-C18 (2)	3.0 μm 、3.5 μm 、 5 μm	400 bar (6000 psi)

移動相の選択と動作温度

固定相はその性質上無極性であり、極性のある移動相（メタノール／水混合物、アセトニトリル／水混合物など）と組み合わせる使用するのが最善です。一般的に、有機溶媒が増えると、サンプルのリテンションタイムは早くなります。

移動相のグラジエントについて

固定相	使用上の注意
ほとんどの 逆相カラム	最初は 5% メタノールまたはアセトニトリル、最終溶媒は 100% メタノールまたはアセトニトリル。
ZORBAX Eclipse PAH*	最初は 30% または 40% アセトニトリル、最終溶媒は 100% アセトニトリル。分解能を向上させるには、必要に応じてカラムを 15 ~ 20 °C に冷却。
ZORBAX Bonus-RP	化合物の溶離が ^g 、従来の長鎖アルキル固定相に比べて、より低濃度の有機溶媒で可能な場合もある。
ペプチド、タンパク分析用カラム (Poroshell 300、ZORBAX 300SB カラムなど)	ポリペプチド、タンパク質、DNA 断片などの分離には、必要なリテンションと選択度を得るため、pH 制御剤またはイオン対添加剤として、トリフルオロ酢酸またはギ酸が用いられることがある。中程度の pH の用途には、TRIS などが有効。

* カラム寿命を最大化するには 40 °C 未満で使用。

カラムのメンテナンス

サンプルに粒子状の物質が含まれる場合、カラムフリットが詰まることがあります。このようなサンプルの場合はガードカラムおよびハードウェアキット（必要な場合）の使用が推奨されます。これは上記の場合に限らずすべてのカラム使用において推奨されます。

ガードカラムの詳細については、[agilent.com/chem/fastguards](https://www.agilent.com/chem/fastguards)を参照してください。

カラムのクリーニング／カラム寿命の向上

バックフラッシュ可能なカラムの場合、強い（極性の小さい）溶媒を最初に使用します。

1. カラムを検出器から外し、ビーカーに洗浄溶媒を入れます。
2. バッファー塩を含まない移動相（水／有機溶媒）を最初に使用します。カラム体積の 10 ～ 20 倍の量を通します。
3. 次に、100% の有機溶媒（メタノールまたはアセトニトリル）を使用します。
4. 圧力が正常に戻ったかどうかを確認し、ます。
5. 4までの手順で圧力が正常に戻らない場合は、カラムを破棄して新しいカラムを使用します。

粒子径 1.8 μm カラムの場合、カラムのバックフラッシュは行わず、カラムを交換してください。

保管に関する注意事項

シリカベースのカラムを長期間保管するには、純粋な有機溶媒を入れておく必要があります。カラムをバッファー入りの移動相で使用した場合は、バッファーを除去するためにカラムをパージする必要があります。このためには、最初にかラム体積の 20 ~ 30 倍の量のメタノールまたはアセトニトリルと水の 50:50 の混合液を使用し、次にカラム体積の 20 ~ 30 倍の量の溶媒を使用します。保管の前に、充填剤の乾燥を避けるため、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。機器を保護するため、バッファーを含まない同じ移動相でカラムをパージして、機器とカラムから塩を除去することをお勧めします（たとえば、60:40 の ACN/0.02 M リン酸塩バッファー入り移動相を除去するには、60:40 の ACN/H₂O を使用します）。この方法では、同じ移動相により再平衡化時間を短縮でき、塩による腐食も防ぐことができます。

最適なクロマトグラフィ結果を得るためのヒント

- ・ 機器を最適化するため、コンポーネントの間の配管をできるだけ短くして、余分なカラム体積を減らし、バンドの拡大を避けます。高速高分離カラムには、内径 0.12 mm の赤い配管を使用します。キャピラリーオプションについては、[agilent.com/chem/lccapillaries](https://www.agilent.com/chem/lccapillaries) を参照してください。
- ・ 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。高速高分離カラム (Poroshell 120、RRHT、RRHD) の場合は、サンプリングレートを速くします。
- ・ サンプルに応じて、サンプル濾過やその他の適切なサンプル前処理を行います。詳細については、[agilent.com/chem/sampleprep](https://www.agilent.com/chem/sampleprep) を参照してください。
- ・ 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。



В этом буклете приведены общие сведения обо всех колонках обращенной фазы ZORBAX, Pursuit и Polaris.

Подробные сведения о применяемой фазе или семействе см. на веб-странице **agilent.com/chem/columnchoices**

Начало работы

Все колонки Agilent поставляются с сертификатом качества, содержащим тестовую хроматограмму. Тестовое оборудование, применяемое при контроле качества, оптимизировано относительно стандартного оборудования, чтобы свести к минимуму мертвый объем системы. Поэтому оно может отличаться от используемых в лаборатории систем. Это позволяет лучше оценивать качество колонки и гарантирует получение более стабильного продукта. Результаты, выдаваемые правильно настроенной системой жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), будут аналогичны указанным на хроматограмме сертификата качества.

Современные колонки надежны и разработаны для длительного использования в нормальных условиях хроматографических систем. Эксплуатация колонок в рамках указанных характеристик максимально продлевает срок их службы. Перед применением методики обязательно ознакомьтесь с характеристиками колонок.

Использование колонки

Установка

- Направление потока указано на колонке.
- При работе с колонками на 1.8 мкм (ZORBAX RRHT и ZORBAX RRHD) направление потока должно совпадать с указанным на колонке.
- Для колонок с давлением до 600 бар Agilent рекомендует использовать поликетоновые фитинги (кат. № 5042-8957), а для колонок, которые будут применяться в системах УВЭЖХ, использовать комплект A-Line Quick Connect в сборе (кат. № 5067-5961 для размера 0,075 x 105 мм) или фитинг Quick Turn (кат. № 5067-5966). Убедитесь в том, что выбранное капиллярное соединение соответствует вашему фитингу. Подробнее: www.agilent.com/chem/a-linefittings.



Поликетоновый фитинг,
кат. № 5042-8957



A-Line Quick Connect
assembly, № 5067-5961



Quick Turn fitting,
№ 5067-5966

Уравновешивание колонок

Каждая колонка перед поставкой проходит испытания и поставляется в тестовом элюенте, поэтому промывка водой перед началом использования не требуется. Если используются добавки к подвижной фазе (например, буферы или ионные вещества), рекомендуется проводить промежуточную промывку подвижной фазой необходимого состава, но без таких добавок. При смене подвижной фазы рекомендуется выполнить промывку с расходом 10-20 объемов колонки. Для сорбентов с более короткой цепью (например, C8, CN или фенила) перед использованием необходимо убедиться в тщательном уравновешивании колонки. Это обеспечивает воспроизводимость результатов анализа и предотвращает изменение времени удерживания.

Важные сведения по безопасности

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

Практические советы

- Хотя обычно метод обратной продувки не опасен для колонок, избегайте его применения за исключением очистки закупоренного пористого вкладыша (см. раздел «Обслуживание колонок»).
- Всегда используйте для приготовления подвижной фазы реагенты высшей степени очистки и растворитель хроматографической степени чистоты. Перед использованием проводите фильтрацию и дегазацию всего объема подвижной фазы.
- Разборка колонки приведет к снижению ее характеристик.
- В новых колонках содержится смесь органических растворителей и воды. Состав растворителя указан в сертификате качества применяемой колонки. В начальной стадии метода следует избегать пропускания через колонку подвижной фазы, которая может вызвать выпадение осадка.
- Колонки обращенной фазы Agilent могут работать с водой и всеми обычными органическими растворителями.
- Для защиты колонки и увеличения ее срока службы рекомендуется использовать внутривиточный фильтр или предколонку.
- Не следует хранить неиспользуемые колонки в среде с высокими значениями pH или в условиях повышенной температуры.
- Не используйте колонку за пределами рекомендованного диапазона pH для фазы колонки (см. следующую страницу). Эксплуатация за пределами рекомендованных диапазонов pH и температуры может привести к сокращению срока службы.



При использовании аналитических колонок Poroshell 120 или ZORBAX RRHT или RRHD с размером частиц 1,8 мкм рекомендуется для их защиты использовать предколонки **Fast Guard для ВЭЖХ сверхвысокого давления (UHPLC)**. Дополнительные сведения: agilent.com/chem/fastguards.

Рабочие параметры колонок: значения pH и температуры

Фаза	Рекомендованный диапазон pH	Максимальная рабочая температура
ZORBAX Eclipse Plus C18 и C8, Eclipse XDB-C8, XDB-C18, XDB-Phenyl, Poroshell 120 EC-C18 и EC-C8, ZORBAX Bonus-RP, HC-C18(2) и TC-C18(2)	pH от 2.0 до 9.0	60 °C
Poroshell HPH	pH от 2.0 до 11.0	60 °C
ZORBAX Extend C18	pH от 2.0 до 11.5	60 °C (40 °C при высоких pH)
ZORBAX ODS, ZORBAX Phenyl, ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl, Poroshell 120 PFP, Poroshell 120 Phenyl-Hexyl, ZORBAX XDB-CN, ZORBAX Eclipse PAH, все колонки Pursuit и Polaris для привитых фаз.	pH от 2.0 до 8.0	60 °C
ZORBAX Eclipse PAH	pH от 2.0 до 8.0	60 °C при pH менее 6.0
Poroshell 120 SB-C18, StableBond C18, ZORBAX Rx-C8, ZORBAX SB-Aq, ZORBAX SB-Phenyl, SB-C3, Poroshell 300, 300SB-C3	pH от 1.0 до 8.0	90 °C (StableBond C18 и Poroshell 120 SB-C18) 80 °C (Rx-C8 и SB-Aq, SB-C3 и SB-Phenyl) 70 °C для pH менее 5.0; 40 °C для pH от 5.0 до 8.0 (Poroshell 300 и 300SB-C3)
ZORBAX TMS	pH от 2.0 до 7.0	60 °C

Примечание. Все сорбенты на основе силикагеля имеют некоторую растворимость при значениях pH > 6 для подвижных фаз на основе воды. При использовании колонок на основе силикагеля в среде со значениями pH > 6 наибольший срок службы обеспечивается при пониженных температурах (не более 40 °C) и использовании низких буферных концентраций в диапазоне от 0,01 до 0,02 М.

Работа при предельных значениях pH и температуре значительно снижает срок службы колонки.

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

Тип колонки	Размер частиц	Предельное давление
ZORBAX Rapid Resolution	3.5 мкм	400 бар (6000 psi)
ZORBAX Rapid Resolution High Throughput (RRHT)	1.8 мкм	600 бар (9000 psi)
ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD)	1.8 мкм	1200 бар (17 000 psi)
Poroshell 120, Poroshell HPH	2.7 мкм, 4 мкм (Poroshell 120)	600 бар (9000 psi)
Poroshell 300	5 мкм	400 бар (6000 psi)
Все колонки ZORBAX, Pursuit и Polaris, не упомянутые как RRHT или RRHD, а также HC-C18(2), TC-C18(2)	3.0 мкм, 3.5 мкм, 5 мкм	400 бар (6000 psi)

Выбор подвижной фазы и рабочих температур

Привитая неподвижная фаза по своей природе является неполярной и чаще всего используется с полярными подвижными фазами, такими как смеси метанола с водой или ацетонитрила с водой. Увеличение доли органического компонента обычно уменьшает время удерживания проб.

Рекомендованные начальные градиенты

Неподвижная фаза	Рекомендации по использованию
Большинство колонок обращенной фазы	5-процентный метанол или ацетонитрил сначала и 100-процентный метанол или ацетонитрил как окончательный растворитель.
ZORBAX Eclipse PAH*	30- или 40-процентный ацетонитрил сначала и 100-процентный ацетонитрил как окончательный растворитель. Для улучшения разрешения может потребоваться охлаждение колонки до температуры от 15 до 20 °С.
ZORBAX Bonus-RP	По сравнению с обычными алкильными стационарными фазами с длинной цепью для элюции смесей может потребоваться более низкая концентрация органического модификатора подвижной фазы.
Колонки для больших молекул (например, колонки Poroshell 300 и ZORBAX 300SB)	Разделение полипептидов, протеинов, фрагментов ДНК и т. д. часто производится с использованием трифторуксусной или муравьиной кислоты в качестве модификатора для управления рН и (или) в качестве ионной добавки для получения требуемого удерживания и селективности. Органические буферы, такие как TRIS, особенно удобны для методик со средними значениями рН.

* Наибольший срок службы колонок обеспечивается при температуре менее 40 °С.

Обслуживание колонок

В колонках с размером частиц не менее 2.7 мкм используются входные вкладыши с порами 2 мкм. Пробы, содержащие микрочастицы, могут засорять входные пористые вкладыши. С такими пробами рекомендуется использовать колонки ZORBAX и Fast Guard, а также специальные наборы (при необходимости); все эти меры предосторожности рекомендуются в целом для всех колонок.

Подробнее о предколонках: [agilent.com/chem/fastguards](https://www.agilent.com/chem/fastguards).

Очистка и увеличение срока службы колонки

Промывку колонок, для которых предусмотрена обратная промывка (Poroshell 120, колонки ZORBAX с размером частиц более 1.8 мкм, а также все колонки Pursuit и Polaris), начинайте с более сильного (менее полярного) растворителя.

1. Отсоедините колонку от детектора и направьте промывочные растворители в лабораторный стакан.
2. Начните промывку с рабочей подвижной фазы без буферных солей (водной или органической).
Пропустите от 10 до 20 объемов колонки.
3. Далее используйте 100-процентный органический растворитель (метанол или ацетонитрил).
4. Убедитесь, что восстановилось рабочее давление; если этого не произошло, выполните следующие действия.
5. Забракуйте колонку или используйте более сильные растворители, например ацетонитрил с изопропанолом (75:25).
6. Увеличить концентрацию до 100% изопропанола, 100% дихлорметана или 100% гексана (в случае использования дихлорметана или гексана необходимо промыть колонку изопропанолом перед ее использованием и до перехода к рабочей обращенной подвижной фазе).

Колонки с размером частиц менее 1.8 мкм не подлежат промывке — замените такую колонку.

Рекомендации по хранению

Для долговременного хранения колонок с привитой фазой на основе силикагеля следует использовать чистый органический растворитель. Если ранее колонка использовалась с буферной подвижной фазой, сначала следует удалить буфер промывкой смесью метанола или ацетонитрила с водой (50:50) с расходом 20-30 объемов колонки, а затем промыть ее 20-30 объемами чистого растворителя. Перед направлением колонки на хранение концевые фитинги должны быть тщательно закрыты заглушками для предотвращения высыхания сорбента. Кратковременно хранить колонки можно в большинстве подвижных фаз. В целях защиты оборудования рекомендуется удалить соли из колонки и оборудования, промыв колонку той же подвижной фазой без буфера (например, используя смесь ацетонитрил: H_2O (60:40) для удаления подвижной фазы 60:40 ацетонитрила с 0.02 М фосфатного буфера). Этот подход позволяет быстрее проводить повторное уравнивание при использовании исходной подвижной фазы и устраняет возможность возникновения коррозии, вследствие присутствия соли.

Советы для получения лучших результатов хроматографии

- Оптимизация установки путем максимального сокращения длины соединительных трубок между частями оборудования, чтобы уменьшить дополнительный объем колонки и размывание пиков. Используйте соединительные трубки красной маркировки с внутренним диаметром 0.12 мм для колонок ВЭЖХ. Подробнее о различных капиллярных трубках: [agilent.com/chem/lccapillaries](https://www.agilent.com/chem/lccapillaries).
- Обеспечение оптимального темпа сбора фракций для используемой колонки. Примените большую частоту фракционирования для колонок ВЭЖХ (Poroshell 120, RRHT и RRHD).
- Использование для исследуемых образцов фильтрации и других методов подготовки. Подробнее: [agilent.com/chem/sampleprep](https://www.agilent.com/chem/sampleprep)
- Используйте в установках ВЭЖХ сертифицированные лампы Agilent, обеспечивающие лучшее качество.



Este guia oferece informações gerais para todas as colunas de fase reversa ZORBAX, Poroshell, Pursuit e Polaris.

Para obter informações mais detalhadas sobre uma fase ou família 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 sistema utilizado para este teste de controle de qualidade é uma versão do sistema padrão modificada com o objetivo de minimizar o volume morto, por isso o resultado do teste deve diferir do que pode ser obtido no seu sistema. Isso permite avaliar melhor a coluna e garantir uma maior consistência do produto. Um sistema de LC configurado adequadamente vai gerar resultados semelhantes aos do cromatograma no relatório de controle de qualidade da coluna.

As colunas modernas são robustas e foram projetadas para operar por longos períodos sob condições cromatográficas normais. É possível maximizar o desempenho da coluna utilizando-a conforme as especificações. Sempre revise as especificações antes de colocar um método em prática.

Utilização da coluna

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.
- Agilent recomenda a utilização de conexões de policetona (5042-8957) para colunas de até 600 bar e conexões A-Line Quick Connect (5067-5961 para 0,075 x 105 mm) ou Quick Turn Fitting (5067-5966) para colunas que serão operadas a pressões UHPLC. Assegure-se de pedir o capilar correto para a sua conexão.
Saiba mais acessando www.agilent.com/chem/a-linefittings.



Conexão de policetona,
p/n 5042-8957



A-Line Quick Connect
assembly, p/n 5067-5961



Quick Turn fitting,
p/n 5067-5966

Condicionamento da coluna

Todas as colunas são testadas antes do envio e são enviadas com o eluente de teste. Portanto, não é necessário enxaguá-las com água antes da primeira utilização. Caso utilize aditivos na fase móvel (como tampões ou reagentes de par iônico), recomenda-se fazer uma limpeza intermediária com uma fase móvel da composição correta, mas sem os aditivos. A limpeza com volumes de 10 a 20 vezes o volume da coluna deve ajudar na transição para a fase móvel. Para substâncias químicas com cadeia mais curta (como C8, fenil e CN), deve-se tomar cuidado para garantir que a coluna seja equilibrada adequadamente antes da utilização. Isso garantirá a reprodutibilidade e evitará desvios do tempo de retenção.

Considerações de segurança importantes

- Todos os pontos de conexão em sistemas de cromatografia líquida são considerados como potenciais pontos 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 de pressão de operação indicados para cada coluna (consulte o gráfico). Exceder esses limites compromete o desempenho cromatográfico e pode não ser seguro.

Outras dicas operacionais

- Embora o fluxo reverso geralmente não seja prejudicial à coluna, ele deve ser evitado, exceto ao tentar remover um frit entupido (consulte as exceções na seção "Cuidados com a coluna").
- Sempre utilize reagentes de alta pureza e solventes de cromatografia de boa qualidade para preparar a fase móvel. Degaseifique e filtre toda a fase móvel antes da utilização.
- A desmontagem de uma coluna prejudica seu desempenho.
- As colunas novas contêm uma mistura de solventes orgânicos e água. 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.
- As colunas Agilent de fase reversa 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 um pH elevado ou a altas temperaturas 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.



*Caso utilize colunas Poroshell 120, ZORBAX RRHT ou RRHD de 1.8 μ m, considere o uso de uma **Fast Guard para UHPLC** para proteger a coluna analítica. Acesse [agilent.com/chem/fastguards](https://www.agilent.com/chem/fastguards) para obter mais informações.*

Parâmetros operacionais da coluna: pH e temperatura

Fase	Faixa de pH recomendada	Máxima temperatura operacional
ZORBAX Eclipse Plus C18 e C8, Eclipse XDB-C8, XDB-C18, XDB-Phenyl, Poroshell 120 EC-C18 e EC-C8, ZORBAX Bonus-RP, HC-C18(2) e TC-C18(2)	pH 2.0 a 9.0	60 °C
Poroshell HPH	pH 2.0 a 11.0	60 °C
ZORBAX Extend-C18	pH 2.0 a 11.5	60 °C (40 °C em pH elevado)
ZORBAX ODS, ZORBAX Phenyl, ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl, Poroshell 120 PFP, Poroshell 120 Phenyl-Hexyl, ZORBAX XDB-CN, ZORBAX Eclipse PAH, todas as Pursuit e Polaris de fases ligadas.	pH 2.0 a 8.0	60 °C
ZORBAX Eclipse PAH	pH 2.0 a 8.0	60 °C em pH maior que 6.0
Poroshell 120 SB-C18, StableBond C18, ZORBAX Rx-C8, ZORBAX SB-Aq, ZORBAX SB-Phenyl, SB-C3, Poroshell 300, 300SB-C3	pH 1.0 a 8.0	90 °C (StableBond C18 e Poroshell 120 SB-C18) 80 °C (Rx-C8 e SB-Aq, SB-C3 e SB-Phenyl) 70 °C para pH menor que 5.0; 40 °C para pH de 5.0 a 8.0 (Poroshell 300 e 300SB-C3)
ZORBAX TMS	pH 2.0 a 7.0	60 °C

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

Máxima pressão operacional: colunas de até 9,4 mm de DI

Tipo de coluna	Tamanho de partícula	Limite de pressão
Colunas de resolução rápida ZORBAX	3.5 µm	400 bar (6.000 psi)
Alto rendimento de resolução rápida ZORBAX (RRHT)	1.8 µm	600 bar (9.000 psi)
Alta definição de resolução rápida ZORBAX (RRHD)	1.8 µm	1.200 bar (17.000 psi)
Poroshell 120, Poroshell HPH	2.7 µm, 4 µm (Poroshell 120)	600 bar (9.000 psi)
Poroshell 300	5 µm	400 bar (6.000 psi)
Todas as colunas ZORBAX, Pursuit e Polaris não indicadas como RRHT ou RRHD e HC-C18(2), TC-C18(2)	3.0 µm, 3.5 µm 5 µm	400 bar (6.000 psi)

Escolha de fase móvel e temperaturas operacionais

A fase estacionária ligada é não polar por natureza e é melhor usada com fases móveis polares, como misturas de metanol/água ou acetonitrila/água. Aumentar a quantidade de componente orgânico costuma reduzir o tempo de retenção da amostra.

Gradientes iniciais recomendados

Fase estacionária	Observações de uso
A maioria das colunas de fase reversa	Inicialmente 5% de metanol ou acetonitrila e 100% de metanol ou acetonitrila como solvente final.
ZORBAX Eclipse PAH*	30% ou 40% de acetonitrila inicialmente até 100% de acetonitrila como solvente final. Pode ser necessário resfriar a coluna para 15 °C a 20 °C para obter uma melhor resolução.
ZORBAX Bonus-RP	Para a eluição do composto é necessário um modificador da fase móvel orgânica com concentração mais baixa em comparação com as fases estacionárias tradicionais de cadeias longas do grupo alquila.
Colunas de molécula grande (ex.: colunas Poroshell 300, ZORBAX 300SB)	As separações de polipeptídios, proteínas, fragmentos de DNA, etc., costumam usar ácido trifluoroacético ou fórmico como modificador para controlar o pH e/ou como aditivo de pareamento iônico para obter a retenção e a seletividade desejadas. Os tampões orgânicos, como TRIS, são úteis principalmente para aplicações de pH intermediário.

*A melhor vida útil da coluna é alcançada a temperaturas inferiores a 40 °C.

Cuidados com a coluna

O frit de entrada em colunas com um tamanho de partícula de 2.7 µm ou maior tem uma porosidade nominal de 2 µm. As amostras que contêm material particulado obstruirão o frit da entrada da coluna. Com essas amostras, recomenda-se utilizar as colunas ZORBAX e Fast Guard e os kits de hardware (conforme necessário), que também são recomendáveis para uso com todas as colunas.

Acesse [agilent.com/chem/fastguards](https://www.agilent.com/chem/fastguards) para obter mais informações sobre colunas de guarda.

Limpeza da coluna/Prolongamento da vida útil da coluna

Para colunas que podem ser submetidas ao processo de backflush (colunas Poroshell 120, ZORBAX com partículas maiores que 1.8 µm e todas as colunas Pursuit e Polaris), inicie o procedimento com um solvente mais forte (menos polar).

1. Desconecte a coluna do detector e coloque os solventes de lavagem em um béquer.
2. Inicie com sua fase móvel sem sais de buffer (água/orgânico). Realize corridas com 10 a 20 volumens de coluna.
3. Depois, use o componente 100% orgânico (metanol ou acetonitrila).
4. Verifique se a pressão voltou ao normal; em caso negativo,
5. Descarte a coluna ou considere condições mais fortes, como 75% acetonitrila/25% isopropanol.
6. Aumente para 100% de isopropanol, 100% de cloreto de metileno ou 100% de hexano (se você usar cloreto de metileno ou hexano, será necessário lavar a coluna com isopropanol antes da utilização e antes de retornar à fase móvel reversa).

Não submeta colunas com partículas de 1.8 µm ao processo de backflush; substitua a coluna.

Recomendações de armazenamento

O armazenamento por longos períodos de colunas à base de sílica ou com fase ligada deve ser realizado em um solvente orgânico puro. Se a coluna foi usada anteriormente com uma fase móvel tamponada, primeiro o tampão deve ser removido purgando a coluna com volumes de 20 a 30 colunas com uma mistura de metanol ou acetonitrila e água a 50:50, seguido de volumes de 20 a 30 colunas de solvente puro. Antes do armazenamento, 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. 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 (ex: utilizando ACN/H₂O a 60:40 para remover uma fase móvel de tampão fosfato ACN/0.02 M a 60:40). Esta abordagem possibilita um rápido reequilíbrio com a fase móvel original, e qualquer risco de corrosão por causa dos sais é eliminado.

Dicas para obter os melhores resultados de cromatografia

- Otimize o desempenho do instrumento minimizando os comprimentos da tubulação entre os componentes para reduzir o volume extracoluna e a ampliação da banda. Use a tubulação vermelha com 0.12 mm de diâmetro interno para colunas de LC rápidas/de alta eficiência. Obtenha mais informações sobre opções de capilar em **agilent.com/chem/lccapillaries**
- Assegure-se de que a taxa de coleta de dados esteja otimizada para a sua coluna. Utilize uma taxa de coleta mais alta para colunas de LC rápidas (Poroshell 120, RRHT e RRHD).
- Utilize filtração ou outro método de preparo adequado para sua amostra. Obtenha mais informações em **agilent.com/chem/sampleprep**
- Utilize lâmpadas certificadas da Agilent nos instrumentos de LC para obter o melhor desempenho.



Further Information

For help choosing the right column, request the LC Column Selection Guide or the BioHPLC Column Selection Guide

agilent.com/chem/getguides



The LC Column and Sample Prep Navigator is a web-based tool that can help you find the right column for your method, based on your input. Consult **agilent.com/chem/navigator**



Agilent Ordering Information

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

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

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

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

The Agilent Bond Elut SPE and Captiva Filtration Sample Prep
family of products offer the widest range of solutions for
every level of sample cleanliness to help you increase
throughput and enhance the quality of your data.

Learn more at **agilent.com/chem/sampleprep**



This information is subject to change without notice.

© Agilent Technologies, Inc. 2014

Printed in Canada, October 6, 2014

820000-999