



Transfert de méthode d'une colonne de 3,5 ou 5 μm conventionnelle vers une colonne Poroshell 120 Agilent pour une amélioration de la vitesse et de la résolution analytiques

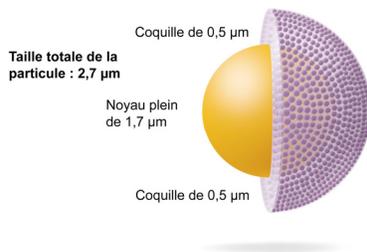
Ron Majors est un scientifique confirmé au département Columns and Supplies d'Agilent ; John Henderson est un scientifique spécialiste des applications Agilent.

Les limites de pression des appareils deviennent plus élevées pour bénéficier de l'évolution vers de nouvelles particules de plus petite taille, et de tous les avantages qu'elles offrent en termes de vitesse et de résolution. Une nouvelle instrumentation peut fournir un niveau de fonctionnalité et de sensibilité significatif pour l'amélioration des analyses. Pour en savoir plus sur les dernières avancées chez Agilent, visitez www.agilent.com/chem/infinity.

Cependant, si vous ne pouvez pas exécuter une mise à niveau immédiate de votre appareil, le transfert de vos méthodes depuis des colonnes de 3,5 ou 5 μm conventionnelles vers les nouvelles colonnes **Poroshell 120 Agilent** peut vous faire économiser du temps et de l'argent *maintenant*.

Qu'est-ce que Poroshell 120 ?

Les particules Poroshell 120 sont fabriquées par Agilent selon un procédé exclusif qui consiste à créer une coquille à surface poreuse autour d'un noyau plein. Ces particules diffèrent des particules d'une granulométrie inférieure à 2 μm .



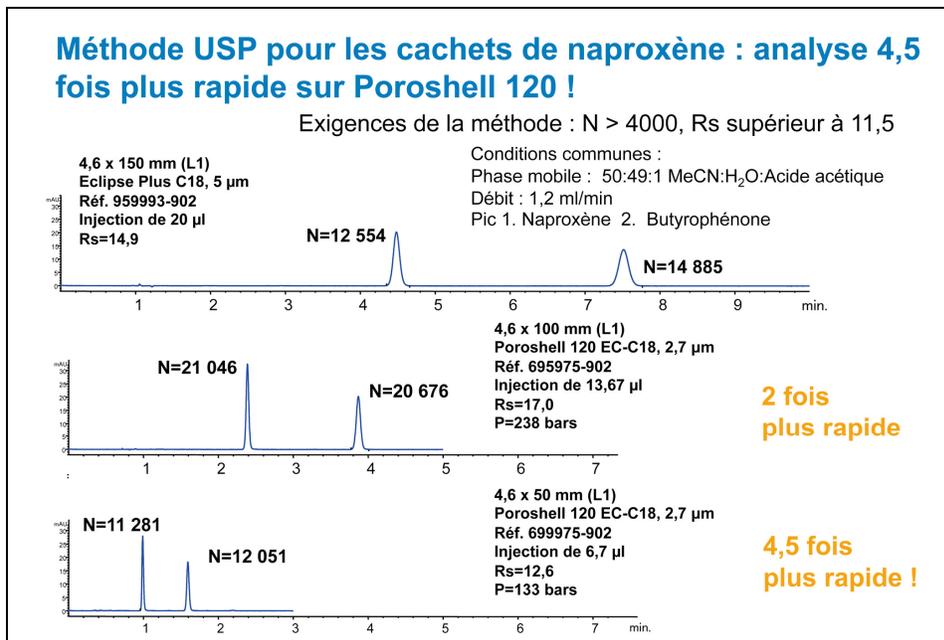
Les particules Poroshell 120 ont une taille totale de 2,7 μm , répartie entre un noyau plein de 1,7 μm et une coque externe poreuse de 0,5 μm . Elles fournissent les performances analytiques d'une particule de granulométrie inférieure à 2 μm , mais à la pression d'une particule de 2,7 μm , généralement inférieure à 400 bars.

Les colonnes Poroshell 120 sont compatibles avec quasiment tous les appareils de CLHP, et vous permettent de mettre à niveau vos méthodes de colonnes de 3 ou 5 μm conventionnelles avec seulement quelques modifications mineures de votre appareil.

Aujourd'hui, vous pouvez acquérir des colonnes Poroshell 120 avec une phase EC-C18 postsilanisée et une phase SB-C18 StableBond non postsilanisée. La sélectivité est la même ou est très similaire à celle de votre colonne C18 actuelle. D'autres phases seront disponibles prochainement.

Des économies de temps avec Poroshell 120

Voyez ci-dessous des exemples de comparaison d'une analyse de naproxène utilisant une colonne de 5 µm conventionnelle, avec deux colonnes Poroshell 120 distinctes. Au final, le temps gagné sur cette analyse était de l'ordre de 450 % ! Notez également une autre économie : 77 % de réduction du solvant utilisé.



Transfert de votre méthode vers Poroshell 120

Il est important de veiller particulièrement à la configuration de l'appareil et aux paramètres de la méthode pour obtenir les meilleurs résultats.

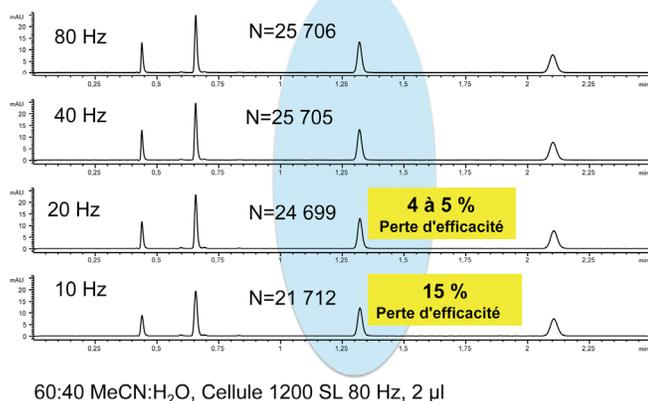
Les paramètres clés pour obtenir des performances optimales de l'appareil avec des colonnes Poroshell 120 sont les suivants :

- 1) Temps de réponse du détecteur/Fréquence de collecte des données
- 2) Volume de la cellule de flux
- 3) Volume du capillaire d'acheminement de l'échantillon
- 4) Raccords du circuit d'acheminement
- 5) Débit.

Réglage d'une fréquence adéquate de collecte des données

Réglez la collecte des données sur la fréquence la plus rapide de façon que le rapport signal-bruit (S/B) ne soit pas affecté. Il est possible que ce ne soit pas le réglage le plus rapide du détecteur mais il doit en être proche. Si vous utilisez de petites colonnes, les meilleurs résultats sont obtenus à une fréquence de 40 Hz ou plus. Les détecteurs Agilent les plus récents offrent des fréquences de collecte de données allant jusqu'à 80 ou 160 Hz qui conviennent également aux colonnes Poroshell 120. Une fréquence de collecte de données plus lente est pratique lorsque les analytes ont un temps de rétention plus long (p. ex., $k' > 4$).

Comparaison de l'efficacité du pic sur la colonne Poroshell 120 EC-C18 4,6 x 100 mm avec des fréquences différentes de collecte de données



Cette comparaison de plusieurs chromatogrammes illustre comment la fréquence de collecte des données influe sur les résultats. Si la fréquence de collecte est trop lente, une perte d'efficacité se produit et des différences de formes de pic peuvent être observées.

À partir de critères différents, le tableau ci-dessous illustre le même point.

Temps de réponse :	Hz	Uracile	Phénol	4-Chloronitrobenzène	Naphtalène
		Larg. de pic 0,008	Larg. de pic 0,011	Larg. de pic 0,021	Larg. de pic 0,031
0,02	80	16,240	21,641	25,706	25,061
0,1	40	15,414	22,028	25,705	25,080
0,2	20	12,755	18,647	24,699	24,506
0,5	10	6,965	12,658	21,712	23,872

Colonne : Poroshell 120 EC-C18, 4,6 x 100 mm. Appareil : Cellule de flux 1200 SL 2µm. Débit : 2,00 ml/min.
Échantillon : injection de 2 µl. Phase mobile : 60:40 MeCN : Eau

Pour des colonnes d'un diamètre interne inférieur à 2,1 mm, les mêmes principes s'appliquent. De nouveau, vous verrez que les données doivent être collectées à une fréquence de 40 Hz au moins. Une collecte de données plus lente est pratique lorsque les analytes ont un temps de rétention plus long ($k' > 4$).

Choix de la cellule de flux

Les volumes de colonne supplémentaires (ECV, Extra column volumes) peuvent réduire l'efficacité observée des colonnes Poroshell 120 en termes de circuit d'acheminement de l'échantillon. Le volume de la cellule de flux fait partie de ces ECV. Des cellules de flux d'un volume réduit comme la semi-microcellule (6 mm/5 µl) ou la microcellule (3 mm/2 µl) sont recommandées pour obtenir les meilleures performances.

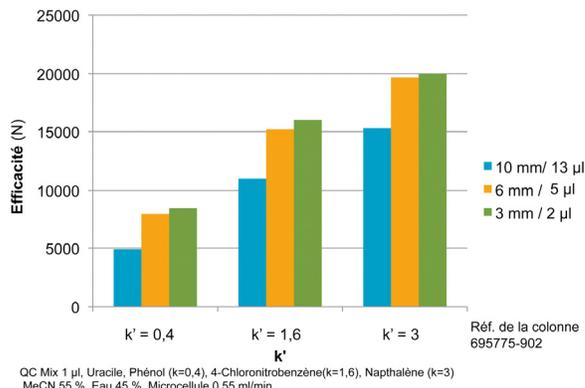
Avec des colonnes de 2,1 mm, il convient d'utiliser la microcellule de 3 mm.

- Cellule standard (avec badge IDRF) : 10 mm, réf. G1315-60022
- Semi-microcellule (avec badge IDRF) : 6 mm, réf. G1315-60025
- Microcellule (avec badge IDRF) : 3 mm, réf. G1315-60024

De nombreuses cellules de flux différentes sont disponibles, et vos besoins peuvent varier en fonction de l'appareil que vous utilisez, un Agilent 1100 ou 1200. Pour plus d'informations, consultez le *catalogue général de fournitures et de chromatographie Agilent*, sous CPL et CPL/SM, Détecteurs. Pour obtenir de l'aide, contactez l'assistance technique Agilent (lc-column-support@agilent.com). Un

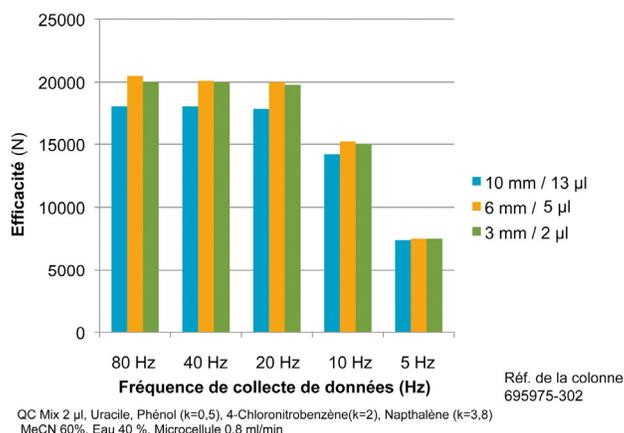
catalogue est disponible sur simple demande à l'adresse www.agilent.com/chem/getguides.

Évaluation des choix de cellule avec une colonne Poroshell 120 EC-C18 2,1 x 100 mm



Une perte d'efficacité de 30 % est observée avec une cellule standard de 10 mm (13 µl). Avec les colonnes d'un d.i. de 2,1 mm, il est recommandé d'utiliser une microcellule de 3 mm (2 µl).

Évaluation des choix de cellule avec une colonne Poroshell 120 EC-C18 3,0 x 100 mm



Des cellules de plus grande taille, utilisées à des vitesses élevées de collecte des données, peuvent être utilisées avec de grandes colonnes, comme illustré avec cette colonne de 3 x 100 mm Poroshell 120 EC-C18.

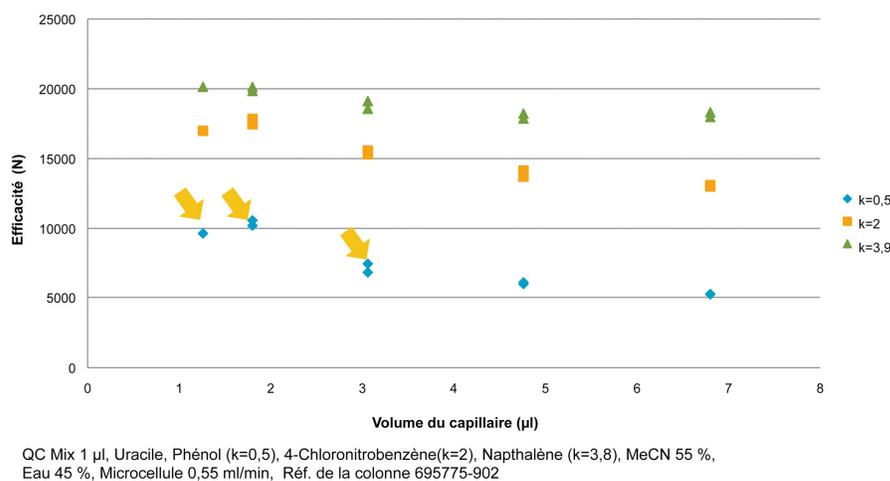
Réduction du volume supplémentaire du capillaire

Un autre ECV qui peut réduire l'efficacité de la colonne est celui des capillaires de raccordement. Pour tous les raccordements, utilisez la longueur de capillaire la plus courte possible. Utilisez un capillaire rouge (d. i. de 0,12 mm) au lieu d'un vert (d. i. de 0,17 mm) car son volume est moitié moins grand que celui du capillaire vert ayant le plus grand diamètre interne.

Une fois que vous avez optimisé le débit du CPL avec le capillaire de plus petit volume, vous n'avez pas besoin de le changer pour des colonnes de plus grand volume.

Consultez, dans le *catalogue général de fournitures et de chromatographie Agilent*, les tableaux qui indiquent les capillaires appropriés pour les raccordements du CPL.

Effets de colonne suppl. sur les colonnes Poroshell 120 2,1 x 100 mm



Cet exemple d'une colonne de 2,1 x 100 mm Poroshell 120 montre que des éluptions précoces ($k' < 3$) sont affectées plus sévèrement par un élargissement supplémentaire de la colonne.

Le montage de l'aiguille de l'échantillonneur automatique est une part importante du circuit d'acheminement dont le volume peut être réduit.

Il est facile de le faire vous-même :

- 1) Si vous utilisez le logiciel Lab Advisor, sélectionnez votre appareil depuis le menu d'ouverture et choisissez "Tools" (Outils).
- 2) Sélectionnez le module d'échantillonnage automatique. Une fenêtre apparaît qui contient l'option d'installation de l'aiguille. Passez à l'étape 5.
- 3) Pour des appareils anciens utilisant ChemStation, accédez à la vue Method & Run Control (Méthode et commande d'analyse), puis à la vue "Diagnosis" (Diagnostics) en utilisant les onglets du haut.
- 4) Dans le menu Maintenance, faites défiler jusqu'à Wellplate Sampler (WPS) puis accédez à "WPS Maintenance Positions" (Positions de maintenance du WPS).
- 5) Sélectionnez "Start" (Démarrer) sous "Change needle seat" (Changer le siège d'aiguille). L'aiguille de l'injecteur se déplace alors vers l'extérieur.
- 6) Dévissez le siège de l'injecteur à l'aide d'un petit tournevis. Ne dévissez pas l'anneau situé en haut du siège de l'injecteur.
- 7) Changez le capillaire en le tirant hors de son logement puis mettez en place le siège de la nouvelle aiguille. Resserrez le raccord du capillaire à l'aide d'une petite clé.
- 8) Fermez le volet et sélectionnez "End" (Terminé) dans la fenêtre ChemStation. L'aiguille reprend sa position.

Des kits de capillaires sont disponibles, conditionnés avec un assortiment de tailles utiles. Pour une optimisation RRHT, utilisez l'un des kits suivants :

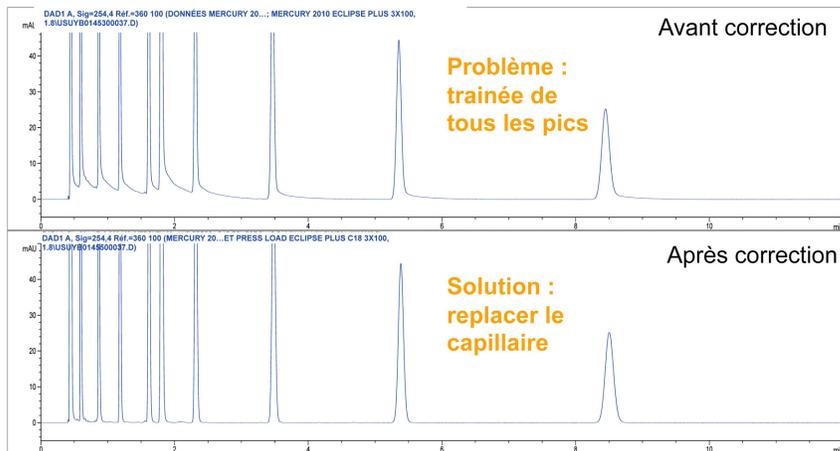
Pour le système 1100, utilisez le kit de capillaires réf. 5065-9947. Pour le système 1200, utilisez le kit de capillaires réf. G1316-68716.

Pour visualiser les kits, suivez ce lien : www.agilent.com/chem/capillarykits

Raccordements adéquats

Des raccordements mal installés peuvent conduire à des résultats de chromatographie médiocres, en raison des ECV et de volumes morts non balayés, comme le montre l'exemple suivant :

Correction LC : forme de pic médiocre, sertissage inapproprié du capillaire

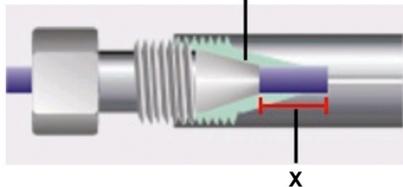


Cause : la colonne et le raccord ALS du capillaire étaient improprement sertis sur l'embout ALS (la ferrule était de niveau avec l'extrémité du capillaire, provoquant un vide).

Assurez-vous que le capillaire n'est pas trop long ni trop court dans la ferrule.

Erreur ... trop long

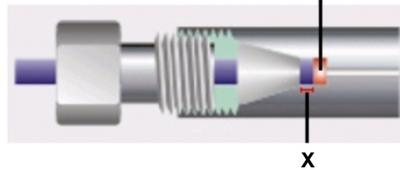
La ferrule ne se place pas correctement



Si la dimension X est trop longue, des fuites se produisent

Erreur ... trop court

Chambre de mélange



Si la dimension X est trop courte, il se produit un volume mort, ou chambre de mélange

Vous pouvez aussi utiliser des raccords à serrage manuel, plus pratiques, afin de régler les raccords de sortie correctement sans clé de serrage.



Utilisez des raccords en polyketone pour les raccordements des colonnes Poroshell 120 (Réf. 5042-8957). Les raccords en polyketone et les colonnes Poroshell 120 peuvent supporter des pressions de 600 bars.

Notez que les raccords PEEK supportent des pressions de 400 bars au maximum.

Optimisation du débit

Optimisez le débit afin d'obtenir l'efficacité (N) ou l'amplitude de pic (Pc) voulues.

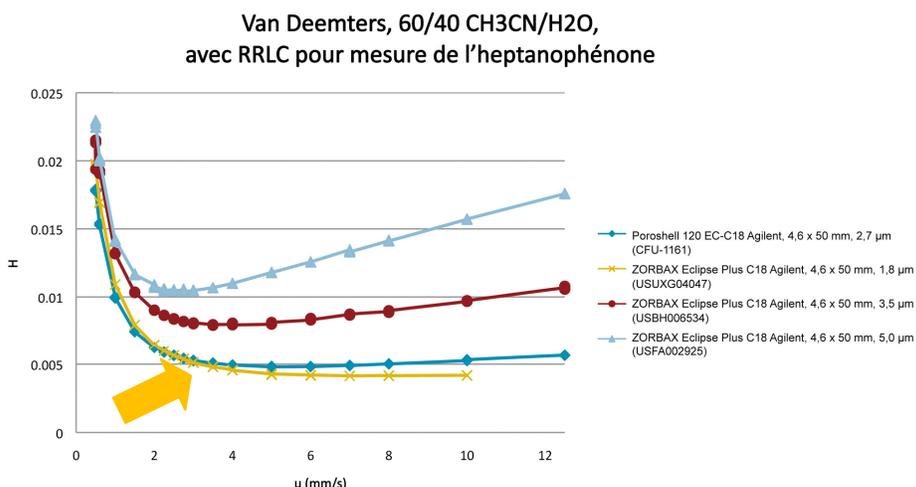
Les débits de démarrage conseillés pour les colonnes Poroshell 120 sont les suivants :

D.I. de 2,1 mm : démarrer à 0,42 ml/min.

D.I. de 3,0 mm : démarrer à 0,85 ml/min.

D.I. de 4,6 mm : démarrer à 2,00 ml/min.

Vous pouvez obtenir un débit plus élevé avec les colonnes Poroshell 120. Augmentez le débit (F) de 10 % et comparez son efficacité (N) avec celle du débit de démarrage. Si elle a augmenté, continuez à augmenter F et comparez l'efficacité N pour déterminer le meilleur débit.



Comme illustré par cette courbe de Van Deemter, le débit optimal des colonnes Poroshell 120 est plus rapide que celui des colonnes de 5 ou 3,5 µm qu'elles remplacent.

Autres considérations chromatographiques

Mettez soigneusement à niveau les conditions de gradient et le volume d'injection pour tenir compte du petit volume de la nouvelle colonne, afin de transférer rapidement la méthode et éviter la surcharge.

Assurez-vous de minimiser la dispersion de l'échantillon dans la colonne. Pour ce faire :

- Utilisez un solvant d'injection plus faible que la phase mobile, en particulier si vous employez une méthode isocratique.
- Les gradients peuvent minimiser la dispersion mais soyez attentif aux effets possibles. Les colonnes Poroshell 120 peuvent atteindre des niveaux d'efficacité similaires à ceux des colonnes d'une granulométrie inférieure à 2 µm avec substantiellement moins de pression.

D'excellents résultats sont obtenus sur les systèmes Agilent 1200 RRLC ou 1290 Infinity.

Récapitulatif

Pour atteindre de meilleures performances :

- Optimisez la fréquence de collecte des données (détecteur 40 Hz avec temps de réponse rapide)
- Utilisez la plus petite cellule de flux disponible (la microcellule de 3 mm fonctionne mieux avec les colonnes d'un d.i. de 2,1 mm).

3. Minimisez le volume de colonne supplémentaire : la cellule de flux et les capillaires de raccordement sont les plus grands responsables, mais le siège de l'aiguille doit être remplacé par un siège de moindre volume. Le capillaire rouge occupe moitié moins de volume que le capillaire vert.

4. Vérifiez que les raccordements du circuit d'acheminement sont corrects.

5. Optimisez les débits pour obtenir de meilleures performances. Démarrez avec un débit de 2,00 ml/min sur une colonne de 4,6 mm de d.i., 0,85ml/min sur une colonne de 3,0 mm de d.i., ou 0,42 ml/min sur une colonne de 2,1 mm de d.i.

Pour obtenir de l'aide, contactez l'assistance technique Agilent (lc-column-support@agilent.com).