

iHILIC® - Fusion*

** Remplace avantageusement les colonnes HILIC Sequent*

**Séparations HILIC avancées
en HPLC & UHPLC**





Trois chimies de colonnes en une

- Colonnes HILIC de charge modulée hydroxyéthyle amide/amide
- Sélectivités complémentaires pour les analytes polaires / hydrophiles
- Excellente durabilité et ultra-faible relargage pour la LC-MS
- iHILIC®-Fusion et iHILIC®-Fusion+ : pH 2-8
- iHILIC®-Fusion(P): pH 1-10
- Disponible en 1,8, 3,5, 5 µm et 1,2, 1,3 et 4,6 mm de diamètre intérieur
- Egalement disponible en cartouches SPE (50µm)

iHILIC®-Fusion et iHILIC®-Fusion(+) Colonnes HPLC / UHPLC HILIC

Les colonnes **iHILIC** sont conçues pour la séparation et la purification des composés polaires et hydrophiles à l'aide de la chromatographie liquide d'interaction hydrophile (HILIC). Les phases stationnaires sont remplies de silice de charge modulée hydroxyéthyle amide qui sont liées de manière covalente avec des groupes fonctionnels hydrophiles neutres, charges positivement, et charges négativement. Par conséquent, le mécanisme de séparation des colonnes iHILIC est basé sur une combinaison d'interactions hydrophiles, de liaisons hydrogènes et d'interactions électrostatiques faibles. Elles ont une sélectivité de séparation unique et une grande efficacité de séparation. Les colonnes iHILIC sont disponibles en deux chimies de surface différentes, offrant une sélectivité complémentaire, comme illustré sur la figure 1.

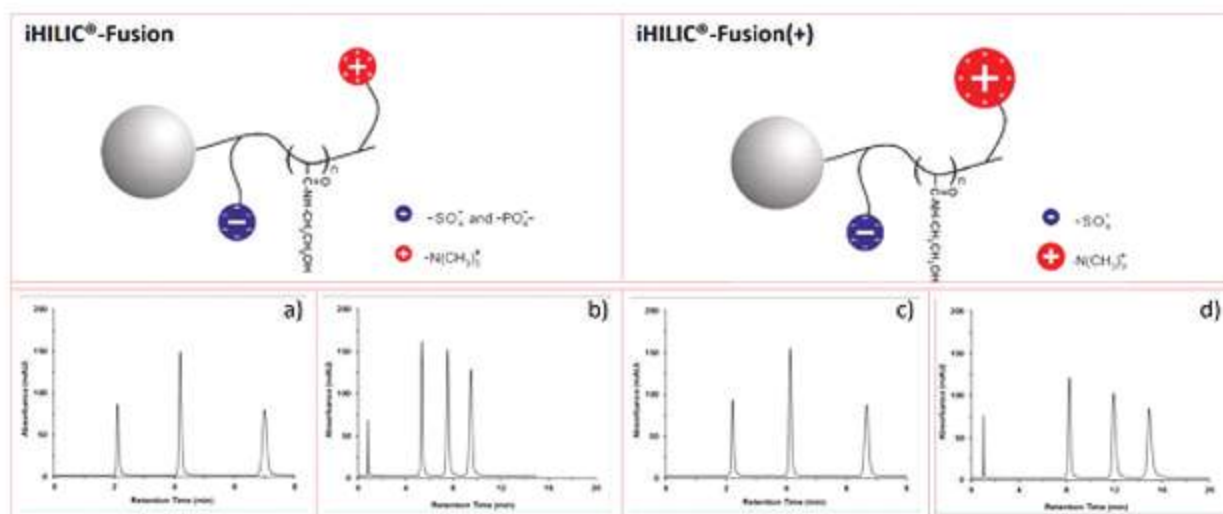


Figure 1 : a) et c) : Séparation de naphthalène, uracile, et cytosine. Phase mobile, 80/20(v/v) acétonitrile/acétate d'ammonium, 25mM, pH 6.8; Débit, 0.1ml/min; Colonne, 100x2.1mm; Détection, 254nm. b) and d): Séparation de naphthalène, AMP, ADP, et ATP. Phase mobile, 70/30(v/v) acétonitrile/formate d'ammonium, 100mM, pH 5.8; Débit, 0.2ml/min; Colonne, 100x2.1mm; Détection, 254nm.

DESCRIPTION TECHNIQUE

Les colonnes iHILIC sont en poly(ether-ether-cétone)(PEEK) ou en acier inoxydable(SS). Les embouts de colonnes ont un filetage 10 - 32 UNF et un design de port Parker™. Le PEEK est un plastique technique. Il présente une excellente résistance chimique sur une large gamme de solvants organiques couramment utilisés dans les applications HILIC, par exemple, l'acétonitrile, l'acide formique ou les alcools.

Cependant, le gonflement du matériau PEEK se produit dans le THF, le chlorure de méthylène ou le DMSO, ils ne doivent donc pas être utilisés pour un système HPLC avec une colonne et des pièces PEEK. De plus, ne jamais utiliser de ferrules et accessoires SS pour les colonnes PEEK, puisque le métal va couper le filetage PEEK et endommager les embouts. Les colonnes iHILIC à base de silice, Fusion et Fusion(+), peuvent être utilisées entre pH 2 et 8, et la température maximale de fonctionnement est de 60°C.

CONTRE-PRESSION MAXIMALE DE LA COLONNE

- Colonnes HPLC PEEK remplies avec des particules de 3.5 et 5µm :
<350 bar à température ambiante.
- Colonnes HPLC SS remplies avec des particules de 3.5µm :
<450 bar à la température ambiante.
- Colonnes UHPLC SS remplies avec des particules de 1.8µm :
<650 bar à température ambiante.

SOLVANTS RECOMMANDÉS

Pour les séparations HILIC, l'eau et les solutions tampons sont des éluants puissants et les solvants organiques sont plus faibles. L'acétonitrile est le solvant le plus favorable. La force relative des solvants pour l'HILIC est :

THF < Acetone < Acetonitrile < Isopropanol < Ethanol < Methanol < Eau

Contrairement à la chromatographie en phase inverse, les composés polaires ont une rétention accrue lorsqu'on augmente la proportion de solvant organique en phase mobile.

TAMPONS ET ADDITIFS RECOMMANDÉS

Les solutions de formate d'ammonium et d'acétate d'ammonium à 2-50mM sont les meilleurs tampons pour l'HILIC avec la détection MS. Leur pH peut être ajusté en ajoutant de l'acide formique, de l'acide acétique ou de l'ammoniac. Les tampons phosphates doivent être utilisés avec précaution à de plus basses concentrations en raison de la plus faible solubilité du sodium, du potassium et du phosphate dans les phases mobiles HILIC qui contiennent de fortes concentrations de solvant organique.

Il est fortement recommandé de préparer des échantillons avec une phase mobile ou des solutions ayant une force ionique et une concentration de solvant organique similaires. Ceci permet d'obtenir de meilleures formes de pics. Plus de solvant organique dans la solution échantillon permettra d'affiner le pic en raison des effets de compression de pic.

Les réactifs TFA et de paires d'ions modifient la sélectivité des séparations HILIC et interfèrent souvent avec la détection MS. Ils doivent donc être évités ou utilisés consciemment pour réduire la polarité des amines et la protonation des groupes carboxyles dans un but spécifique (c'est-à-dire l'isolement des glycopeptides à partir des peptides digestes).

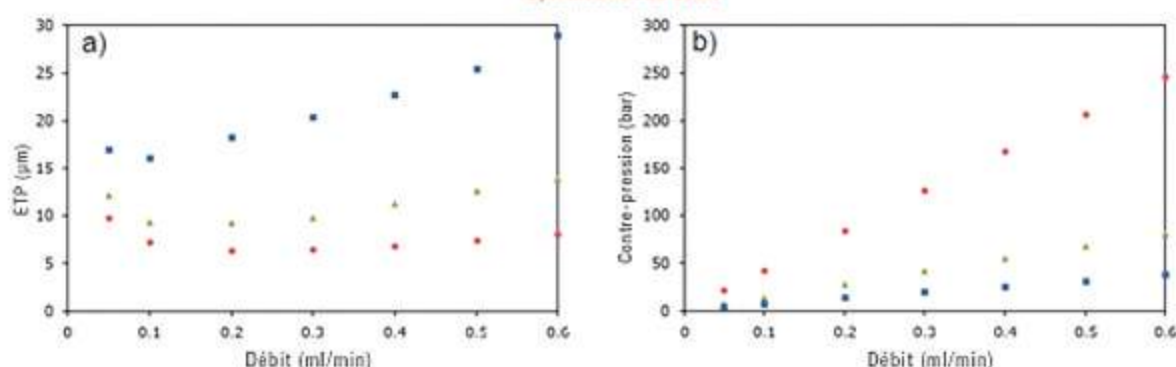
ÉCHANTILLONS

Les échantillons complexes tels que le plasma ou l'urine doivent être traités avec une forte proportion de solvant organique pour précipiter les protéines et les sels, et filtrés avec des filtres seringues de 0.45 ou 0.22µm compatibles avec les solvants organiques.

Conditions de départ recommandées pour le développement de la méthode

| | Élution isocratique | | Élution gradient | |
|-----------------------------|---|-------------------|---|------------------------|
| Phase mobile: | 80/20 (v/v) Acétonitrile/5-100 mM acétate d'ammonium, pH 6.8 | | A : Acétonitrile B : 5-100 mM Acétate d'ammonium, pH 6.8 Profil du gradient : 90% à 50% d'acétonitrile en 20 minutes (~2%/min) | |
| Equilibration de la colonne | - | | 4-10 minutes | |
| Diamètre interne colonne | 1 mm | 2.1 mm | 3 mm | 4.6 mm |
| Débit (ml/min) | 0.05-0.1 | 0.2-0.5 | 0.4-1.0 | 1.0-2.5 |
| Injection (µL) | 0.1-1 | 0.5-10 | 0.1-20 | 2-50 |
| Cellule détectrice | Nano, micro | Micro, semi-micro | Semi-micro, analytique | Semi-micro, analytique |

Optimisation du débit



Débit en fonction de l'HETP de la colonne a) et de la contre pression b). Phase mobile, 80/20(v/v) acétonitrile/acétate d'ammonium, 25 mM, pH 6.8; Échantillon, cytosine; Détection, 254 nm; Colonne iHILIC®-Fusion, 50x2.1 mm avec des particules de 1.8µm (●), 3.5µm (▲), et 5µm (■).

NETTOYAGE OU RÉGÉNÉRATION DES COLONNES

Si une augmentation de la contre-pression de la colonne ou un changement du temps de rétention est observé, la procédure suivante de lavage des colonnes peut être utile. Le débit recommandé pour le nettoyage est de 0.1-0.4 et 0.5-2 ml/min pour les colonnes de 2.1 et 4.6 mm, respectivement. Cependant, la contre-pression de la colonne ne doit jamais dépasser 150 bars lors du nettoyage.

1. 60 minutes d'eau désionisée
2. 60 minutes d'acétate d'ammonium 0,6 M
3. 60 minutes d'eau désionisée
4. 30 minutes de phase mobile pour la prochaine expérience

Si la colonne n'est pas complètement régénérée, un dernier essai est de régénérer la colonne selon les mêmes procédures que ci-dessus, mais en connectant la colonne dans la direction inverse. Sinon, il est temps d'acheter une nouvelle colonne.

PROTECTION DES COLONNES

Il est fortement recommandé d'utiliser une pré-colonne ou un préfiltre lorsque vous travaillez avec des échantillons complexes ou sales comme les lysats cellulaires, le plasma ou l'urine. Ils protègent les colonnes analytiques d'un colmatage potentiel par contamination et/ou de particules et prolongent la durée de vie des colonnes.

STOCKAGE

Une nouvelle colonne iHILIC est livrée avec de l'acétonitrile 80/20(v/v) /acétate d'ammonium 25 mM, pH 6,8, qui est également la solution recommandée pour le stockage à long terme à une température inférieure à la température ambiante. Les bouchons d'extrémités de la colonne doivent être serrés avec précaution.

INFORMATIONS DE COMMANDE

| P/N 1.8 µm | Colonnes iHILIC®-Fusion UHPLC HILIC, SS |
|---------------|--|
| 110.052.0110 | Colonne iHILIC®-Fusion HILIC, SS, 50x2.1 mm, 1.8 µm, 100Å |
| 110.102.0110 | Colonne iHILIC®-Fusion HILIC, SS, 100x2.1 mm, 1.8 µm, 100Å |
| 110.152.0110 | Colonne iHILIC®-Fusion HILIC, SS, 150x2.1 mm, 1.8 µm, 100Å |
| 110.053.0110 | Colonne iHILIC®-Fusion HILIC, SS, 50x3.0 mm, 1.8 µm, 100Å |
| 110.103.0110 | Colonne iHILIC®-Fusion HILIC, SS, 100x3.0 mm, 1.8 µm, 100Å |
| 110.153.0110 | Colonne iHILIC®-Fusion HILIC, SS, 150x3.0 mm, 1.8 µm, 100Å |

| P/N 3.5 µm | Colonnes iHILIC®-Fusion HPLC HILIC, PEEK |
|---------------|---|
| 110.022.0310 | Colonne iHILIC®-Fusion HILIC, PEEK, 20x2.1 mm, 3.5 µm, 100Å |
| 110.052.0310 | Colonne iHILIC®-Fusion HILIC, PEEK, 50x2.1 mm, 3.5 µm, 100Å |
| 110.102.0310 | Colonne iHILIC®-Fusion HILIC, PEEK, 100x2.1 mm, 3.5 µm, 100Å |
| 110.152.0310 | Colonne iHILIC®-Fusion HILIC, PEEK, 150x2.1 mm, 3.5 µm, 100Å |
| 110.054.0310 | Colonne iHILIC®-Fusion HILIC, PEEK, 50x4.6 mm, 3.5 µm, 100Å |
| 110.104.0310 | Colonne iHILIC®-Fusion HILIC, PEEK, 100x4.6 mm, 3.5 µm, 100Å |
| 110.154.0310 | Colonne iHILIC®-Fusion HILIC, PEEK, 150x4.6 mm, 3.5 µm, 100Å |
| 5 µm | |
| 110.022.0510 | Colonne iHILIC®-Fusion HILIC, PEEK, 20x2.1 mm, 5 µm, 100Å |
| 110.052.0510 | Colonne iHILIC®-Fusion HILIC, PEEK, 50x2.1 mm, 5 µm, 100Å |
| 110.102.0510 | Colonne iHILIC®-Fusion HILIC, PEEK, 100x2.1 mm, 5 µm, 100Å |
| 110.152.0510 | Colonne iHILIC®-Fusion HILIC, PEEK, 150x2.1 mm, 5 µm, 100Å |
| 110.252.0510 | Colonne iHILIC®-Fusion HILIC, PEEK, 250x2.1 mm, 5 µm, 100Å |
| 110.054.0510 | Colonne iHILIC®-Fusion HILIC, PEEK, 50x4.6 mm, 5 µm, 100Å |
| 110.104.0510 | Colonne iHILIC®-Fusion HILIC, PEEK, 100x4.6 mm, 5 µm, 100Å |
| 110.154.0510 | Colonne iHILIC®-Fusion HILIC, PEEK, 150x4.6 mm, 5 µm, 100Å |
| 110.254.0510 | Colonne iHILIC®-Fusion HILIC, PEEK, 250x4.6 mm, 5 µm, 100Å |
| Pré-colonne | |
| 111.122.0510 | Pré-colonne iHILIC®-Fusion HILIC, PEEK, 20x2.1 mm, 5 µm, 100Å, 1 pk |
| 111.322.0510 | Pré-colonne iHILIC®-Fusion HILIC, PEEK, 20x2.1 mm, 5 µm, 100Å, 3 pk |

| P/N | Colonnes iHILIC®-Fusion(+) HPLC HILIC, PEEK |
|--------------------|--|
| 3.5 µm | |
| 100.022.0310 | Colonne iHILIC®-Fusion(+) HILIC, PEEK, 20x2.1 mm, 3.5 µm, 100Å |
| 100.052.0310 | Colonne iHILIC®-Fusion(+) HILIC, PEEK, 50x2.1 mm, 3.5 µm, 100Å |
| 100.102.0310 | Colonne iHILIC®-Fusion(+) HILIC, PEEK, 100x2.1 mm, 3.5 µm, 100Å |
| 100.152.0310 | Colonne iHILIC®-Fusion(+) HILIC, PEEK, 150x2.1 mm, 3.5 µm, 100Å |
| 100.054.0310 | Colonne iHILIC®-Fusion(+) HILIC, PEEK, 50x4.6 mm, 3.5 µm, 100Å |
| 100.104.0310 | Colonne iHILIC®-Fusion(+) HILIC, PEEK, 100x4.6 mm, 3.5 µm, 100Å |
| 100.154.0310 | Colonne iHILIC®-Fusion(+) HILIC, PEEK, 150x4.6 mm, 3.5 µm, 100Å |
| 5 µm | |
| 100.022.0510 | Colonne iHILIC®-Fusion(+) HILIC, PEEK, 20x2.1 mm, 5 µm, 100Å |
| 100.052.0510 | Colonne iHILIC®-Fusion(+) HILIC, PEEK, 50x2.1 mm, 5 µm, 100Å |
| 100.102.0510 | Colonne iHILIC®-Fusion(+) HILIC, PEEK, 100x2.1 mm, 5 µm, 100Å |
| 100.152.0510 | Colonne iHILIC®-Fusion(+) HILIC, PEEK, 150x2.1 mm, 5 µm, 100Å |
| 100.252.0510 | Colonne iHILIC®-Fusion(+) HILIC, PEEK, 250x2.1 mm, 5 µm, 100Å |
| 100.054.0510 | Colonne iHILIC®-Fusion(+) HILIC, PEEK, 50x4.6 mm, 5 µm, 100Å |
| 100.104.0510 | Colonne iHILIC®-Fusion(+) HILIC, PEEK, 100x4.6 mm, 5 µm, 100Å |
| 100.154.0510 | Colonne iHILIC®-Fusion(+) HILIC, PEEK, 150x4.6 mm, 5 µm, 100Å |
| 100.254.0510 | Colonne iHILIC®-Fusion(+) HILIC, PEEK, 250x4.6 mm, 5 µm, 100Å |
| Pré-colonne | |
| 101.122.0510 | Pré-colonne iHILIC®-Fusion(+) HILIC, PEEK, 20x2.1 mm, 5 µm, 100Å, 1 pk |
| 101.322.0510 | Pré-colonne iHILIC®-Fusion(+) HILIC, PEEK, 20x2.1 mm, 5 µm, 100Å, 3 pk |

| P/N | Colonnes iHILIC®-Fusion(P) HPLC HILIC, PEEK |
|--------------|--|
| 5 µm | |
| 130.052.0520 | Colonne iHILIC®-Fusion HILIC, PEEK, 50x2.1 mm, 5µm, 200Å |
| 130.102.0520 | Colonne iHILIC®-Fusion HILIC, PEEK, 100x2.1 mm, 5µm, 200Å |
| 130.152.0520 | Colonne iHILIC®-Fusion HILIC, PEEK, 150x2.1 mm, 5µm, 200Å |
| 130.054.0520 | Colonne iHILIC®-Fusion HILIC, PEEK, 50x4.6 mm, 5µm, 200Å |
| 130.104.0520 | Colonne iHILIC®-Fusion HILIC, PEEK, 100x4.6 mm, 5µm, 200Å |
| 130.154.0520 | Colonne iHILIC®-Fusion HILIC, PEEK, 150x4.6 mm, 5µm, 200Å |
| 131.122.0520 | Colonne iHILIC®-Fusion HILIC, PEEK, 20x2.1 mm, 5µm, 200Å, 1 pk |

CARTOUCHES iSPE®-HILIC

Les colonnes iSPE-HILIC sont conçues pour la purification de composés polaires et hydrophiles à l'aide de la chromatographie liquide à interactions hydrophiles (HILIC). Des groupements hydroxyéthyle amide greffés à la silice sont liés par covalence à des groupes fonctionnels hydrophiles neutres, positifs et négatifs.

Le mécanisme de séparation des cartouches iSPE repose sur une combinaison d'interactions hydrophiles, de liaisons hydrogènes et d'interactions électrostatiques faibles. Les colonnes iSPE-HILIC peuvent être utilisées pour la purification des glycopeptides, des glycanes, des toxines PSP, et de nombreux autres composés polaires.



Groupe fonctionnel : hydroxyéthyle amide
Porosité : 60Å
Fritté : Polypropylène 20µm
Surface spécifique : 250 m²/g

SUGGESTION DE PROTOCOLE D'UTILISATION

CARTOUCHE iSPE-HILIC (1mL, cartouche 50mg, P/N 200.001.050)

- **Conditionnement / Equilibrage :**

- Laver la cartouche avec 0.2-0.5 mL d'eau ou un tampon adapté (ex : acétate/formiate d'ammonium)
- Laver la cartouche avec 0.5-1 mL de solvant organique (ex : acétonitrile)

- **Préparation de l'échantillon :**

Dissoudre préalablement l'échantillon dans une solution contenant 50-95% (v/v) d'acétonitrile ou un autre solvant organique

Déposer l'échantillon (<0.2mL) dans la cartouche SPE et laisser poser 1 minute

Evacuer la solution par vide ou pression extérieure à une fréquence de 1-2 gouttes par seconde

- **Lavage :**

Déposer le sorbant avec 0.5-1 mL d'acétonitrile ou une solution tampon/d'acétonitrile adaptée

Eliminer la solution de lavage par vide ou pression extérieure

- **Elution :**

Eluer les composés polaires avec un petit volume d'eau ou une solution contenant de l'acétonitrile ou un autre solvant organique

- **Préparation de l'échantillon final :**

- Reconstituer l'éluat SPE final avant la séparation. En utilisant HILIC il est important de faire en sorte que l'échantillon injecté ait le plus possible de solvant organique afin d'obtenir une efficacité maximale en raison du principe de compression de pic.

| Référence | Description | pk |
|--------------|--|-----|
| 200.001.0025 | Colonne iSPE-HILIC, 1 mL, 25 mg, 50 µm particle | 100 |
| 200.001.0050 | Colonne iSPE-HILIC, 1 mL, 50 mg, 50 µm particle | 100 |
| 200.001.0100 | Colonne iSPE-HILIC, 1 mL, 100 mg, 50 µm particle | 100 |
| 200.003.0100 | Colonne iSPE-HILIC, 3 mL, 100 mg, 50 µm particle | 50 |
| 200.003.0200 | Colonne iSPE-HILIC, 3 mL, 200 mg, 50 µm particle | 50 |
| 200.003.0500 | Colonne iSPE-HILIC, 3 mL, 500 mg, 50 µm particle | 50 |
| 200.006.0500 | Colonne iSPE-HILIC, 6 mL, 500 mg, 50 µm particle | 25 |
| 200.006.1000 | Colonne iSPE-HILIC, 6 mL, 1 g, 50 µm particle | 25 |



A.I.T. France
117, Rue de Stalingrad
78 800 Houilles - FR

Tél : +33(0)1.34.93.10.80
Mail : aitfrance@aitfrance.fr

www.aitfrance.fr