



Agilent BioHPLC and AdvanceBio Reversed-Phase Columns User Guide

Guide d'utilisation des colonnes BioHPLC
et AdvanceBio d'Agilent

Agilent BioHPLC 和 AdvanceBio 反相色谱柱 用户指南

Benutzerinformationen zu Agilent BioHPLC und
AdvanceBio Umkehrphasensäulen

Guida all'uso per colonne a fase inversa
Agilent BioHPLC e AdvanceBio

Guia do usuário de colunas de fase reversa
Agilent BioHPLC e AdvanceBio

Agilent BioHPLC および AdvanceBio
逆相カラムユーザーガイド

Руководство пользователя колонок
для обращенно-фазовой хроматографии
Agilent BioHPLC и Agilent AdvanceBio

Guia do usuário de colunas de fase reversa
Agilent BioHPLC e AdvanceBio

This booklet provides general information on Agilent BioHPLC and AdvanceBio reversed-phase columns. For more detailed information about your specific phase or family, see:

www.agilent.com/chem/biocolumnchoices

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 efficiency and assures a more consistent product. An optimized LC system will generate similar results to the chromatogram on your QC performance report.

If you have specific questions, contact the Technical Support team at: **www.agilent.com/chem/columnsupport**.

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.

For removable, zero-dead volume column connections Agilent recommends the use of the InfinityLab Quick Connect and Quick Turn family. Choices are:

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

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



InfinityLab Quick Connect assembly, p/n 5067-5961



InfinityLab Quick Turn fitting, p/n 5067-5966

Learn more at: www.agilent.com/chem/infinitylabfittings

Column conditioning

Every column is tested before shipment. Before the first use, the shipping solvent must be replaced with eluent, taking care that all components are miscible and soluble. 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. Check that the column has been properly equilibrated before use. This will ensure reproducibility and help prevent retention time drifting. When using formic acid as a mobile phase additive, condition the column as recommended in the Column Conditioning Method Conditions for Formic Acid table.

Column Conditioning Method Conditions for Formic Acid					
Column id (mm)	Mobile Phase	Flow Rate (mL/min)	Column Temp. (°C)	Time (hrs)	After Conditioning
2.1	95/5 H ₂ O/CH ₃ CN + 0.1% formic acid	0.1	60	4	Flush and store in 100% CH ₃ CN
3.0	95/5 H ₂ O/CH ₃ CN + 0.1% formic acid	0.2	60	4	Flush and store in 100% CH ₃ CN
4.6	95/5 H ₂ O/CH ₃ CN + 0.1% formic acid	0.4	60	4	Flush and store in 100% CH ₃ CN

Note: Conditioning overnight, or up to 24 hours, may be beneficial, especially for longer columns or acidic analytes

Important safety considerations

- All connection points 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. Agilent does not recommend removing the column end fittings and exposing the media. Columns should only be opened by trained personnel in a well-ventilated area.
- Please adhere to operating pressure limits noted for each column (see Table 1). Exceeding these limits will compromise chromatographic performance and column lifetime, and could be unsafe.

Table 1. Maximum operating parameters – columns up to 4.6 mm.

Column	Particle Size	Pressure Limit
AdvanceBio Peptide Mapping	2.7 μm	600 bar
AdvanceBio Peptide Plus		
AdvanceBio EC-C18		
AdvanceBio Oligonucleotide		
AdvanceBio Amino Acid Analysis		
AdvanceBio RP-mAb	3.5 μm	400 bar
ZORBAX 300SB	3.5 μm , 5 μm , 7 μm	
Poroshell 300	5 μm	
ZORBAX RRHD	1.8 μm	1200 bar
PLRP-S	3 μm	275 bar
	5 μm , 8 μm , 10 μm	207 bar
	10 to 15 μm , 15 to 20 μm , 30 μm	103 bar

Other operating tips

- Reverse flow will not usually harm the column, but should be avoided except to attempt removal of a clogged frit (see “column care”).
- It is recommended that the flow rate is started at a reduced rate and then gently increased to the desired operating flow rate.
- 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.
- An inline filter or guard column may be used to protect your column and increase its lifetime.
- If the column is used outside of recommended pH ranges for column phase (see Table 2), a reduced lifetime will result.

- Columns should not be maintained at elevated pH or elevated temperature when not in use (see Table 2).
- New columns may contain a mixture of organic solvents and water, which may contain buffer salts. See Table 3 for details of the shipping solvents. Initially, care should be taken not to pass any mobile phase through the column that may cause a precipitate to form or may not be fully miscible.
- Agilent BioHPLC and AdvanceBio columns are compatible with all common eluents used for analysis of biomolecules.

Table 2. Column operating parameters – pH and temperature.

Column	Recommended pH Range	Maximum Operating Temperature
AdvanceBio Peptide Mapping	2.0 to 8.0	60 °C
AdvanceBio Peptide Plus		
AdvanceBio EC-C18		
ZORBAX RRHD	1.0 to 8.0	80 °C
ZORBAX 300SB-C8, C3, CN		
ZORBAX 300SB-C18	1.0 to 8.0	90 °C
AdvanceBio RP-mAb		
Poroshell 300		
Poroshell 300 Extend-C18	2.0 to 11.0	60 °C below pH 8, 40 °C above pH 8
AdvanceBio Oligonucleotide	3.0 to 11.0	65 °C
AdvanceBio Amino Acid Analysis		
PLRP-S	1.0 to 14.0	200 °C

Note: All silica-based packings have some solubility in pH >6 aqueous mobile phases. When using silicabased 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.

Table 3. Shipping solvents.

Column	Shipping Solvent	Compatibility
AdvanceBio Peptide Plus	100% acetonitrile	Water and all common organic solvents. Avoid tetrahydrofuran (THF).
AdvanceBio Peptide Mapping	Mixture of acetonitrile and water	
AdvanceBio EC-C18		
ZORBAX RRHD		
ZORBAX 300SB		
AdvanceBio RP-mAb	Mixture of acetonitrile and water	Water and all organic solvents, including N,N-dimethylformamide and dimethyl sulfoxide
Poroshell 300 and 300 Extend	Mixture of methanol and water	
AdvanceBio Oligonucleotide	Mixture of acetonitrile and water	Water and all common organic solvents. Modifiers including HFIP and TEAA
AdvanceBio Amino Acid Analysis		
PLRP-S	7:1 acetonitrile/water	Aqueous organic solvents including N,N-dimethylformamide and dimethyl sulfoxide. 100% aqueous is not recommended as it will reduce column performance and lifetime

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 reduces the retention time of the sample.

When the maximum temperature is used for prolonged periods this will reduce column lifetime.

Using 100% aqueous eluents with PLRP-S columns will significantly reduce the column lifetime and may result in a rapid deterioration in peak width and symmetry.

Recommended starting gradients

Separations of biological molecules typically use gradient conditions – increasing the amount of the organic component to achieve elution from the column. Separations of peptides, polypeptides, and proteins, are most commonly carried out using acidic eluents with trifluoroacetic acid (TFA) or formic acid (FA) used as the modifier for pH control and/or as an ion-pairing additive to achieve the desired retention and selectivity. Organics, such as acetonitrile, methanol, and ethanol, are used for elution, with acetonitrile being the most commonly used.

Additional information on peptide separations can be found in chapter 11, pages 497–508, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, Second Edition. L.R. Snyder and J. J. Kirkland, (John Wiley & Sons, 1979).

Column care

Columns with a particle size of 1.8 μm have a 0.5 μm inlet frit. Particulates will block the column inlet frits and should be removed before the sample is analyzed. Where this is not possible, an inline filter or guard column should be used to protect the analytical column, and increase the column lifetime. The AdvanceBio Peptide Mapping column has a 2 μm inlet frit. Samples that contain bio particulate matter larger than 2 μm will plug the inlet frit, so guard columns are recommended for use with these samples. It is best to filter your samples before injecting them onto any column. You should also check that all eluents are freshly prepared and filtered before use.

See **www.agilent.com/chem/guards** for more information about guard columns.

Cleaning your column/extending column life

For columns that can be backflushed (particles $>1.8\ \mu\text{m}$), clean the column in the reverse direction. 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 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, such as 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 mobile phase as it is not miscible with aqueous).

Aggressive cleanup cycles using 80% 1 M NaOH, or 1 M HCl with 20% organic, can be used with the PLRP-S columns.

For columns with $1.8\ \mu\text{m}$ particles, do not backflush the column – you can attempt the cleanup procedure as detailed above but maintain direction of flow.

Storage recommendations

In general, columns may be safely stored for short periods in most mobile phases. 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.

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 possibility of corrosion from the salts is eliminated.

Tips for the best chromatographic results

- Optimize your instrument by minimizing tubing lengths between components. This will reduce extracolumn volume and band broadening. Use 0.12 mm id red tubing for Fast LC/high efficiency columns. Learn about capillary options at **www.agilent.com/chem/lccapillaries**.
- Ensure that the data collection rate is optimized for your column. Use a higher collection rate for Fast LC columns (ZORBAX RRHD).
- Use sample filtration or other sample preparation techniques appropriate for your sample. Learn more at **www.agilent.com/chem/sampleprep**.
- Use certified lamps in your LC instruments for best performance.



Cette brochure contient des informations générales sur les colonnes à phase inverse BioHPLC et AdvanceBio d'Agilent. Pour des informations plus détaillées sur la phase que vous utilisez ou une famille de colonnes en particulier, rendez-vous sur :

www.agilent.com/chem/biocolumnchoices

Considérations initiales

Chaque colonne Agilent est livrée avec un rapport détaillant sa performance et comprenant un chromatogramme de test. Le système utilisé pour les tests de contrôle qualité est un système standard modifié afin de réduire au minimum le volume mort du système. Il peut donc être différent du système utilisé dans votre laboratoire. Cela permet de mieux évaluer l'efficacité de la colonne et de garantir un produit de qualité plus uniforme. Un système de LC optimisé doit générer des résultats similaires au chromatogramme inclus dans le rapport de contrôle qualité de la performance.

Si vous avez des questions particulières, contactez l'assistance technique à l'adresse : **www.agilent.com/chem/columnsupport**.

Utilisation de votre colonne

Installation

- Le sens de l'écoulement est indiqué sur la colonne.
- Les colonnes de 1,8 μm (ZORBAX RRHT, ZORBAX RRHD) ne peuvent être utilisées que dans le sens de l'écoulement indiqué sur la colonne.

Agilent recommande d'utiliser des raccords de colonne amovibles sans volume mort de la famille InfinityLab Quick Connect et Quick Turn. Les modèles adaptés sont les suivants :

Pression maximale du système	Raccord recommandé	Références
Jusqu'à 400 bars	Raccord rapide Quick Turn InfinityLab (serrage manuel)	Raccord : 5067-5966
Jusqu'à 800 bars	Raccord rapide Quick Turn InfinityLab (avec outil de montage)	Raccord : 5067-5966 Outil de montage : 5043-0915
Jusqu'à 1300 bars	Raccord rapide Quick Connect InfinityLab	Raccord : 5067-5965

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



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



Raccord rapide Quick Turn InfinityLab, réf. 5067-5966

Pour en savoir plus, rendez-vous sur : **www.agilent.com/chem/infinitylabfittings**

Stabilisation de la colonne

Chaque colonne est testée avant l'expédition. Avant toute utilisation, le solvant introduit pour l'envoi doit être remplacé par un éluant, en veillant à ce que tous les composants soient miscibles et solubles. En cas d'utilisation d'additifs de phase mobile (tampons ou réactifs d'appariement d'ions par exemple), il est conseillé de réaliser un rinçage intermédiaire avec une phase mobile de composition identique, mais sans additif de ce type. Un rinçage avec 10 à 20 volumes de colonne facilite en général la transition vers votre phase mobile. Vérifiez la bonne stabilisation de la colonne avant de l'utiliser. Cela permet de garantir la reproductibilité et d'éviter les dérives des temps de rétention. Si la phase mobile contient de l'acide formique en guise d'additif, stabilisez la colonne selon les recommandations figurant dans le tableau intitulé Conditions de stabilisation des colonnes contenant de l'acide formique.

Conditions de stabilisation des colonnes contenant de l'acide formique

D.i. de colonne (mm)	Phase mobile	Débit (mL/min)	Temp. de colonne (°C)	Temps (h)	Après stabilisation
2,1	H ₂ OCH ₃ CN 95/5 + acide formique 0,1 %	0,1	60	4	Rinçage et stockage dans du CH ₃ CN 100 %
3,0	H ₂ OCH ₃ CN 95/5 + acide formique 0,1 %	0,2	60	4	Rinçage et stockage dans du CH ₃ CN 100 %
4,6	H ₂ OCH ₃ CN 95/5 + acide formique 0,1 %	0,4	60	4	Rinçage et stockage dans du CH ₃ CN 100 %

Remarque : il peut être bénéfique de procéder à la stabilisation sur une nuit ou jusqu'à 24 heures, notamment pour les colonnes longues ou les composés acides

Consignes de sécurité importantes

- Tous les points de raccordement des systèmes de chromatographie liquide représentent des sources de fuites potentielles. Les utilisateurs doivent connaître le caractère toxique ou inflammable de leurs phases mobiles.
- En raison de leur granulométrie fine, les matériaux de remplissage secs des colonnes peuvent être inhalés. Agilent recommande de ne pas retirer les raccords situés aux extrémités de la colonne pour ne pas exposer leur remplissage. Les colonnes ne doivent être ouvertes que par du personnel dûment formé dans une zone bien ventilée.
- Veuillez respecter les limites de pression de fonctionnement indiquées pour chaque colonne (voir Tableau 1). Tout dépassement de ces limites peut compromettre la performance chromatographique et la durée de vie de la colonne, et pourrait représenter un danger pour l'utilisateur.

Tableau 1. Paramètres opérationnels maximaux pour les colonnes jusqu'à 4,6 mm.

Colonne	Granulométrie	Limite de pression
Cartographie des peptides AdvanceBio	2,7 µm	600 bars
AdvanceBio Peptide Plus		
AdvanceBio EC-C18		
AdvanceBio pour oligonucléotides		
AdvanceBio pour l'analyse des acides aminés		
AdvanceBio RP-mAb	3,5 µm	400 bars
ZORBAX 300SB	3,5 µm, 5 µm, 7 µm	
Poroshell 300	5 µm	
ZORBAX RRHD	1,8 µm	1 200 bars
PLRP-S	3 µm	275 bars
	5 µm, 8 µm, 10 µm	207 bars
	10 à 15 µm, 15 à 20 µm, 30 µm	103 bars

Autres conseils d'utilisation

- Une inversion du flux ne détériore généralement pas la colonne, mais il est préférable de l'éviter, excepté pour tenter de déboucher un fritté obstrué (voir la rubrique « Entretien des colonnes »).
- Il est recommandé de démarrer le flux à un débit réduit puis de l'augmenter doucement jusqu'au débit de fonctionnement souhaité.
- Utilisez toujours des réactifs de grande pureté et des solvants de qualité chromatographique pour préparer votre phase mobile. Dégazez et filtrez toute phase mobile avant utilisation.
- Le démontage d'une colonne entraîne une baisse de sa performance.
- Un filtre en ligne ou une colonne de garde peuvent être utilisés pour protéger votre colonne et prolonger sa durée de vie.
- Si la colonne est utilisée en dehors de la gamme de pH recommandée pour les différentes phases (voir Tableau 2), sa durée de vie s'en trouvera réduite.

- Les colonnes ne doivent pas être maintenues à un pH élevé ou à une température élevée lorsqu'elles ne sont pas utilisées (voir Tableau 2).
- Les nouvelles colonnes peuvent contenir un mélange constitué de solvants organiques et d'eau susceptible de contenir des sels de tampons. Voir le Tableau 3 pour en savoir plus sur les solvants introduits pour l'expédition. Évitez de faire circuler initialement dans la colonne une phase mobile pouvant entraîner la formation d'un précipité ou susceptible de ne pas être totalement miscible.
- Les colonnes BioHPLC et AdvanceBio d'Agilent sont compatibles avec tous les éluants habituellement employés pour l'analyse des biomolécules.

Tableau 2. Paramètres opérationnels de la colonne – pH et température.

Colonne	Plage de pH recommandée	Température de fonctionnement maximale
Cartographie des peptides AdvanceBio	2,0 à 8,0	60 °C
AdvanceBio Peptide Plus		
AdvanceBio EC-C18		
ZORBAX RRHD	1,0 à 8,0	80 °C
ZORBAX 300SB-C8, C3, CN		
ZORBAX 300SB-C18	1,0 à 8,0	90 °C
AdvanceBio RP-mAb		
Poroshell 300		
Poroshell 300 Extend-C18	2,0 à 11,0	60 °C en dessous de pH 8, 40 °C en dessus de pH 8
AdvanceBio pour oligonucléotides	3,0 à 11,0	65 °C
AdvanceBio pour l'analyse des acides aminés		
PLRP-S	1,0 à 14,0	200 °C

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

Tableau 3. Solvants introduits pour l'expédition.

Colonne	Solvant introduit pour l'expédition	Compatibilité
AdvanceBio Peptide Plus	100% d'acétonitrile	Eau et tous les solvants organiques courants. Éviter le tétrahydrofurane (THF).
Cartographie des peptides AdvanceBio	Mélange acétonitrile/ eau	
AdvanceBio EC-C18		
ZORBAX RRHD		
ZORBAX 300SB		
AdvanceBio RP-mAb	Mélange acétonitrile/ eau	Eau et tous les solvants organiques, y compris le N,N-diméthylformamide et le diméthylsulfoxyde.
Poroshell 300 et 300 Extend	Mélange méthanol/eau	
AdvanceBio pour oligonucléotides	Mélange acétonitrile/ eau	Eau et tous les solvants organiques courants. Modificateurs, notamment HFIP et TEAA.
AdvanceBio pour l'analyse des acides aminés		
PLRP-S	Acétonitrile/eau 7/1	Solvants organiques aqueux, y compris le N,N- diméthylformamide et le diméthylsulfoxyde. Il n'est pas recommandé d'utiliser une phase 100 % aqueuse car cela réduit la performance et la durée de vie de la colonne.

Sélection de la phase mobile et températures de fonctionnement

La phase stationnaire greffée est de nature non polaire et convient plus particulièrement aux phases mobiles polaires telles que les mélanges méthanol/eau ou acétonitrile/eau. Augmenter la quantité de composant organique revient à réduire le temps de rétention de l'échantillon.

Travailler à la température maximale sur de longues périodes raccourcit la durée de vie de la colonne.

L'utilisation d'éluants 100 % aqueux sur les colonnes PLRP-S réduit grandement leur durée de vie et peut détériorer rapidement la largeur ainsi que la symétrie des pics.

Gradients recommandés pour le démarrage

Les séparations de molécules biologiques se font généralement avec des gradients, l'augmentation de la quantité du composant organique faisant éluer l'échantillon dans la colonne. Les séparations de peptides, de polypeptides et de protéines se font le plus souvent avec des éluants acides contenant de l'acide trifluoroacétique (TFA) ou de l'acide formique (FA) en guise de régulateur de pH et/ou d'additif d'appariement d'ions pour obtenir la rétention et la sélectivité recherchées. Les solvants organiques, tels que l'acétonitrile, le méthanol et l'éthanol, sont aussi utilisés pour l'élution, l'acétonitrile étant le plus couramment employé.

Des informations complémentaires sur les séparations de peptides sont disponibles dans le chapitre 11, pages 497–508 de *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, seconde édition. L.R. Snyder et J. Kirkland, (John Wiley & Sons, 1979).

Entretien de la colonne

Les colonnes d'une granulométrie de 1,8 μm sont équipées d'un fritté d'entrée de 0,5 μm . Les particules colmatent les frittés d'entrée de colonne et doivent être retirées avant de procéder à l'analyse de l'échantillon. S'il n'est pas possible de les éliminer, un filtre en ligne ou une colonne de garde doivent être utilisés pour protéger la colonne analytique et prolonger sa durée de vie. La colonne de cartographie des peptides AdvanceBio comporte un fritté d'entrée de 2 μm . Les échantillons contenant des particules biologiques supérieures à 2 μm colmatent le fritté d'entrée, il est donc recommandé d'ajouter des colonnes de garde lors de leur analyse. Il est préférable de filtrer vos échantillons avant de les injecter dans la colonne. Il est également recommandé de vérifier que tous vos éluants ont été préparés et filtrés de frais avant utilisation.

Rendez-vous sur **www.agilent.com/chem/guards** pour en savoir plus sur les colonnes de garde.

Nettoyage de votre colonne/Allongement de la durée de vie de votre colonne

Les colonnes compatibles avec le rétrobalayage (particules > 1,8 μm) doivent être nettoyées en sens inverse. Démarrez avec un solvant fort (moins polaire).

1. Déconnectez la colonne du détecteur et faites passer des solvants de lavage dans un bécher.
2. Commencez par votre phase mobile exempte de sels de tampons (eau/solvant organique). Injectez 10 à 20 volumes de colonne.
3. Passez ensuite à un solvant 100 % organique (méthanol ou acétonitrile).
4. Contrôlez la pression pour vérifier si elle est revenue à la normale. Si ce n'est pas le cas :
5. Changez de colonne ou passez à des conditions plus fortes, par exemple 75 % d'acétonitrile/25 % d'isopropanol.
6. Montez à 100 % d'isopropanol, 100 % de chlorure de méthylène ou 100 % d'hexane ; en cas de chlorure de méthylène ou d'hexane, du fait de leur immiscibilité avec l'eau, vous aurez besoin de rincer la colonne à l'isopropanol avant de pouvoir l'utiliser et revenir à votre phase mobile.

Les colonnes PLRP-S peuvent supporter des cycles de nettoyage agressifs réalisés avec 80 % de NaOH 1 M, ou du HCl 1 M contenant 20 % de solvant organique.

Les colonnes avec des particules de 1,8 μm ne doivent pas subir de rétrobalayage. Vous pouvez essayer de les nettoyer avec le traitement indiqué ci-dessus mais en maintenant le flux dans le sens direct.

Recommandations de stockage

En général, les colonnes peuvent être stockées sans risque dans la plupart des phases mobiles pendant de courtes durées. Pour un stockage à long terme, les colonnes à phase greffée à base de silice doivent être remplies d'un solvant organique pur. Si la colonne a été utilisée avant le stockage avec une phase mobile tamponnée, éliminez d'abord ce tampon en purgeant la colonne avec 20 à 30 volumes de colonne d'un mélange 50/50 d'eau et de méthanol ou d'acétonitrile, puis continuez avec 20 à 30 volumes de colonne du solvant pur. Avant le stockage, les raccords aux extrémités de la colonne doivent être fermés hermétiquement avec des bouchons d'extrémité pour prévenir le dessèchement du remplissage.

Pour protéger votre matériel, il est souhaitable d'éliminer les sels de l'instrument et de la colonne en purgeant la colonne avec la même phase mobile sans tampon (par exemple, en utilisant un mélange ACN/H₂O 60/40 pour retirer une phase mobile tamponnée d'ACN/phosphate 0,02 M 60/40). Cette approche permet une stabilisation rapide avec la phase mobile d'origine et évite tout risque de corrosion due aux sels.

Conseils pour des résultats chromatographiques optimaux

- Optimisez votre instrument en réduisant au minimum les longueurs des capillaires entre les composants. Ceci permet de diminuer le volume extra-colonne et favorise l'obtention de pics étroits. Utilisez un capillaire rouge de 0,12 mm de d.i. pour les colonnes Fast LC/à haute efficacité. Pour en savoir plus sur les choix de capillaires, rendez-vous sur **www.agilent.com/chem/lccapillaries**.
- Vérifiez que le taux de collecte des données est optimisé pour votre colonne. Utilisez une vitesse supérieure pour les colonnes Fast LC (ZORBAX RRHD).
- Selon le type de votre échantillon, filtrez-le ou suivez une autre technique de préparation des échantillons. Pour en savoir plus, rendez-vous sur **www.agilent.com/chem/sampleprep**.
- Utilisez des lampes certifiées pour vos instruments de LC afin de garantir une performance optimale.



本手册包含了 Agilent BioHPLC 和 AdvanceBio 反相色谱柱的基本信息。有关特定固定相或其产品系列的详细信息，请访问我们的网站：
www.agilent.com/chem/biocolumnchoices。

入门指南

每根安捷伦色谱柱都附有包括测试色谱图在内的质控色谱柱性能报告。质控测试系统的标准系统已被修改优化，可使系统死体积降至最低，因此可能与您实验室的系统有所不同。借助质控测试系统可以对色谱柱的效率进行更加全面的评估，确保产品具有更高的一致性。经过优化的液相色谱系统可以生成与质控性能报告中色谱图相似的结果。

如果您有具体问题，请联系技术支持团队
www.agilent.com/chem/columnsupport。

色谱柱使用说明

安装

- 色谱柱上标明了液流方向
- 1.8 μm 色谱柱 (ZORBAX RRHT, ZORBAX RRHD) 只能按照色谱柱上标明的液流方向使用

为实现可拆卸的零死体积色谱柱连接，安捷伦推荐使用 InfinityLab Quick Connect 快速连接接头和 Quick Turn 接头系列产品。可选的接头包括：

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

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



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



InfinityLab Quick Turn
接头, 部件号 5067-5966

更多信息, 请访问: www.agilent.com/chem/infinitylabfittings

色谱柱条件

在装运色谱柱之前安捷伦都会对它们逐一进行测试。因此, 第一次使用时, 必须将保存溶剂更换为洗脱液, 并确保所有的组分都能互溶且可溶。如果使用了流动相添加剂 (如缓冲液或离子对试剂), 建议使用具有合适成分而不含此类添加剂的流动相执行过渡冲洗。用 10 到 20 倍柱体积冲洗有助于过渡到您所要使用的流动相。需要谨慎操作, 确保色谱柱在使用前已达到平衡。这样可以保证重现性, 并且能防止保留时间漂移。使用甲酸作为流动相添加剂时, 请按照“使用甲酸的色谱柱活化方法条件”表中的建议对色谱柱进行活化。

使用甲酸的色谱柱活化方法条件					
色谱柱内径 (mm)	流动相	流速 (mL/min)	柱温 (°C)	时间 (h)	活化后
2.1	95/5 H ₂ O/CH ₃ CN + 0.1% 甲酸	0.1	60	4	冲洗并保存在 100% CH ₃ CN 中
3.0	95/5 H ₂ O/CH ₃ CN + 0.1% 甲酸	0.2	60	4	冲洗并保存在 100% CH ₃ CN 中
4.6	95/5 H ₂ O/CH ₃ CN + 0.1% 甲酸	0.4	60	4	冲洗并保存在 100% CH ₃ CN 中

注意：过夜活化或活化长达 24 小时可能更好，尤其对于较长的色谱柱或酸性分析物

重要的安全注意事项

- 液相色谱系统中所有的连接点都是潜在的渗漏点。用户应当了解所使用流动相的毒性或易燃性
- 由于填料粒径较小，因此干态柱填料是可吸入的。安捷伦不建议拆卸色谱柱端接头，将填料暴露在外。色谱柱只能在通风良好的区域由经过培训的人员打开
- 请遵循每根色谱柱的操作压力上限（请参见表 1）。超出这些限制会降低色谱性能，缩短色谱柱的使用寿命，并且存在安全隐患

表 1. 最大操作参数 – 色谱柱内径高达 4.6 mm.

色谱柱	粒径	压力上限
AdvanceBio Peptide Mapping	2.7 μm	600 bar
AdvanceBio Peptide Plus		
AdvanceBio EC-C18		
AdvanceBio Oligonucleotide		
AdvanceBio Amino Acid Analysis		
AdvanceBio RP-mAb	3.5 μm	400 bar
ZORBAX 300SB	3.5 μm , 5 μm , 7 μm	
Poroshell 300	5 μm	
ZORBAX RRHD	1.8 μm	1200 bar
PLRP-S	3 μm	275 bar
	5 μm , 8 μm , 10 μm	207 bar
	10–15 μm , 15–20 μm , 30 μm	103 bar

其他操作提示

- 虽然液流反向流动通常对色谱柱没有危害，但也应该尽量避免出现此类情况，除非您要移除造成滤芯堵塞的颗粒（请参见“色谱柱维护”）
- 建议在开始冲洗时采用低流速，然后缓慢地提升到所需操作流速
- 始终使用高纯度试剂和色谱级溶剂作为流动相。使用前对所有的流动相进行脱气和过滤
- 拆卸色谱柱会降低其性能
- 在线过滤器或保护柱能保护色谱柱，并延长其使用寿命
- 如果未在色谱柱固定相推荐的 pH 范围内使用色谱柱（请参见表 2），则会缩短其使用寿命

- 在不使用色谱柱时，不应将其放置在高 pH 值或高温环境中(请参见表 2)
- 新的色谱柱可能含有机溶剂和水的混合物。有关保存溶剂的详细信息请参见表 3。首先应注意避免可能产生沉淀或不能完全互溶的流动相流过色谱柱
- Agilent BioHPLC 和 AdvanceBio 色谱柱可以兼容生物分子分析中所有常用的洗脱液流动相的选择和操作温度

表 2. 色谱柱操作参数 – pH 值和温度.

色谱柱	推荐 pH 范围	最高操作温度
AdvanceBio Peptide Mapping	2.0–8.0	60 °C
AdvanceBio Peptide Plus		
AdvanceBio EC-C18		
ZORBAX RRHD	1.0–8.0	80 °C
ZORBAX 300SB-C8, C3, CN		
ZORBAX 300SB-C18	1.0–8.0	90 °C
AdvanceBio RP-mAb		
Poroshell 300		
Poroshell 300 Extend-C18	2.0–11.0	pH 值低于 8 时, 60 °C pH 值高于 8 时, 40 °C
AdvanceBio Oligonucleotide	3.0–11.0	65 °C
AdvanceBio Amino Acid Analysis		
PLRP-S	1.0–14.0	200 °C

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

表 3. 出厂时的保存溶剂.

色谱柱	保护剂	相容性
AdvanceBio Peptide Plus	100% 乙腈	水和所有常见有机溶剂。 避免使用四氢呋喃 (THF)
AdvanceBio Peptide Mapping	乙腈和水的混合物	
AdvanceBio EC-C18		
ZORBAX RRHD		
ZORBAX 300SB		
AdvanceBio RP-mAb	乙腈和水的混合物	水和所有有机溶剂，包 括 N,N- 二甲基 甲酰胺和 二甲亚砜
Poroshell 300 和 300 Extend	甲醇和水的混合物	
AdvanceBio Oligonucleotide	乙腈和水的混合物	水和所有常见的有机溶 剂。包括六氟异丙醇和 三乙基铵醋酸盐改性剂
AdvanceBio Amino Acid Analysis		
PLRP-S	乙腈：水 = 7:1	水相有机溶剂包括 N,N- 二甲基甲酰胺和二甲亚 砜。不推荐使用 100% 水相，因为它会降低色 谱柱的性能，并缩短色 谱柱的使用寿命

流动相的选择和操作温度

键合固定相是非极性的，最好与极性流动相如甲醇/水或乙腈/水的混合物一起使用。有机成分含量的增加会缩短样品的保留时间。

采用最高温度长时间使用色谱柱会缩短其使用寿命。

PLRP-S 色谱柱使用 100% 水相洗脱液会显著缩短其使用寿命，并导致峰宽度和对称性变差。

推荐的初始梯度

生物分子的分离通常采用不同梯度条件 – 增加有机成分的含量以实现从柱上洗脱。通常采用三氟乙酸 (TFA) 或甲酸 (FA) 等酸性洗脱液分离肽、多肽和蛋白质，将这类酸性溶液作为控制 pH 值的改性剂和/或离子对添加剂，可以获得理想的保留和选择性。有机物如乙腈、甲醇和乙醇可用作洗脱剂，其中乙腈是最常用的洗脱剂。

有关肽分离的详细信息可以参见“chapter 11, pages 497-508, Introduction to Modern Liquid Chromatography, Second Edition. L.R. Snyder and J. J. Kirkland, (John Wiley & Sons, 1979)”。

色谱柱维护

填料粒径为 1.8 μm 的色谱柱配有 0.5 μm 入口滤芯。颗粒物会堵塞色谱柱入口滤芯，因此在样品分析开始前需要先将其除去。如果无法做到这一点，就要使用在线过滤器或保护柱加以防护并延长分析色谱柱的使用寿命。AdvanceBio Peptide Mapping 色谱柱配有 2 μm 入口滤芯。样品中粒径大于 2 μm 的生物颗粒将会堵塞入口滤芯。分析这类样品时推荐使用保护柱。同时建议将样品注入色谱柱前，先对样品过滤，并使用新鲜配制且过滤后的洗脱液。

有关保护柱的更多信息，请访问
www.agilent.com/chem/guards。

冲洗色谱柱/延长色谱柱的使用寿命

对于能够反冲的色谱柱（填料粒径大于 1.8 μm ），可采用反向冲洗对色谱柱进行清洗。首先采用更强（极性小）的溶剂。

1. 断开色谱柱与检测器的连接，将清洗溶液排入烧杯
2. 先使用不含缓冲盐的流动相（水/有机溶液）。用 10 到 20 倍柱体积冲洗
3. 接下来，采用 100% 有机溶剂（甲醇或乙腈）
4. 检查压力是否已经恢复正常，如果没有，则
5. 丢弃色谱柱或考虑采用更强极性的溶剂，如 75% 乙腈和 25% 异丙醇
6. 选用 100% 异丙醇、100% 二氯甲烷或 100% 己烷（如果您采用二氯甲烷或己烷，须在使用前用异丙醇冲洗色谱柱，并在没有与水互溶之前换成您所使用的流动相）

对于 PLRP-S 色谱柱，可以采用腐蚀性净化循环，采用 80% 1 M 的 NaOH 溶液或 1 M 的 HCl 溶液以及 20% 的有机溶液。

不要对填料粒径为 1.8 μm 的色谱柱进行反冲。可以尝试采用上述净化步骤，但须维持原有流向。

储存建议

般情况下，色谱柱都可以在短时间内安全储存于大多数流动相中。硅胶基键合相色谱柱应置于纯有机溶剂中进行长期储存。如果色谱柱之前使用过缓冲流动相，则应该首先采用 20 到 30 倍柱体积的 50:50 甲醇或乙腈与水的混合溶液冲洗色谱柱，然后使用 20 到 30 倍柱体积的纯溶剂对其进行冲洗，以实现除去缓冲液的目的。储存之前将两端接头紧紧拧上，以免填料变干。

为了保护仪器，可以通过采用无缓冲液的相同流动相冲洗色谱柱以除去仪器和色谱柱中的盐，例如采用 60:40 ACN/H₂O 除去 60:40 ACN/0.02 M 的磷酸盐缓冲液流动相。采用这种方法借助原始流动相可以很快的达到再平衡，并可以消除盐腐蚀的可能性。

获得最佳色谱结果的技巧

- 通过最大限度地减少组件间的管线长度对仪器进行优化，以减少柱外体积和峰展宽。对于快速液相/高效色谱柱应采用 0.12 mm 内径的红色管线。有关毛细管选件的信息，请访问 www.agilent.com/chem/lccapillaries
- 确保数据采集速率适用于您的色谱柱。为快速液相色谱柱 (ZORBAX RRHD) 选择更高的采集速率
- 针对样品进行样品过滤或其他合适的样品制备方法。要了解更多信息，请访问 www.agilent.com/chem/sampleprep
- 请在液相色谱仪器中使用经过认证的灯，以实现最佳性能



Diese Broschüre enthält allgemeine Informationen zu allen Agilent BioHPLC und AdvanceBio Umkehrphasensäulen. Weitere Informationen zu bestimmten Phasen oder Produktfamilien finden Sie unter:

www.agilent.com/chem/biocolumnchoices

Erste Schritte

Jeder Säule von Agilent liegt ein QC-Säulenleistungsprotokoll mit Testchromatogramm bei. Das für die Tests zur Qualitätskontrolle eingesetzte Chromatographiesystem ist ein im Hinblick auf minimales Totvolumen modifiziertes Standardsystem, kann also von dem in Ihrem Labor verwendeten System abweichen. Dies ermöglicht eine bessere Bewertung der Säuleneffizienz und sichert eine gleich bleibende Produktqualität. Mit einem optimierten LC-System können Sie jedoch vergleichbare Ergebnisse wie im Chromatogramm des QC-Leistungsprotokolls erzielen.

Bei spezifischen Fragen wenden Sie sich bitte an den technischen Support unter: **www.agilent.com/chem/columnsupport**.

Verwendung der Säule

Installation

- Die Flussrichtung ist auf der Säule angegeben.
- 1,8- μ m-Säulen (Agilent ZORBAX RRHT-, Agilent ZORBAX RRHD-Säulen) können nur in der auf der Säule gekennzeichneten Flussrichtung verwendet werden.

Agilent empfiehlt für abnehmbare Säulenanschlüsse ohne Totvolumen die Verwendung der InfinityLab Quick Connect und Quick Turn Produktfamilie. Sie haben die Wahl zwischen:

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

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



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



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

Weiterführende Informationen finden Sie unter **www.agilent.com/chem/infinitylabfittings**

Säulenkonditionierung

Jede Säule wird vor dem Versand getestet. Vor der ersten Verwendung muss das Transportlösemittel durch das Elutionslösemittel ersetzt werden. Dabei muss darauf geachtet werden, dass alle Bestandteile mischbar und löslich sind. Werden Additive für die mobile Phase benutzt (z. B. Puffer oder Ionenpaarreagenzien), sollte eine Zwischenspülung mit der mobilen Phase der korrekten Zusammensetzung, aber ohne Additive durchgeführt werden. Eine Spülung der Säule mit dem 10- bis 20-fachen Säulenvolumen sollte für den Übergang zu Ihrer mobilen Phase ausreichen. Vor der Verwendung muss geprüft werden, dass die Säule ordnungsgemäß äquilibriert ist. Dies sorgt für Reproduzierbarkeit und vermeidet schwankende Retentionszeiten. Wird Ameisensäure als Additiv für die mobile Phase verwendet, muss die Säule konditioniert werden, wie in der Tabelle „Säulenkonditionierungsmethode für Ameisensäure“ dargestellt.

Methoden für die Säulenkonditionierung für Ameisensäure

Säulen-ID (mm)	Mobile Phase	Flussrate (ml/min)	Säulen-temp. (°C)	Zeit (h)	Nach Konditionierung
2,1	95/5 H ₂ O/CH ₃ CN + 0,1 % Ameisensäure	0,1	60	4	Mit 100 % CH ₃ CN spülen und darin aufbewahren
3,0	95/5 H ₂ O/CH ₃ CN + 0,1 % Ameisensäure	0,2	60	4	Mit 100 % CH ₃ CN spülen und darin aufbewahren
4,6	95/5 H ₂ O/CH ₃ CN + 0,1 % Ameisensäure	0,4	60	4	Mit 100 % CH ₃ CN spülen und darin aufbewahren

Hinweis: Eine Konditionierung über Nacht bzw. bis zu 24 Stunden kann sinnvoll sein, insbesondere bei längeren Säulen oder sauren Analyten

Wichtige Sicherheitshinweise

- Alle Verbindungsstellen in Flüssigchromatographie-Systemen können undicht werden. Der Benutzer muss daher hinsichtlich der Toxizität oder Brennbarkeit der verwendeten mobilen Phasen geeignete Sicherheitsvorkehrungen treffen.
- Aufgrund der geringen Partikelgröße kann trockenes Säulenpackungsmaterial eingeatmet werden. Agilent empfiehlt, die Säulenanschlussfittings nicht zu entfernen, um keine Säulenmedien freizusetzen. Säulen dürfen nur von geschultem Personal in einem gut belüfteten Bereich geöffnet werden.
- Die für jede Säule angegebenen Druckgrenzwerte im Betrieb müssen unbedingt eingehalten werden (siehe Tabelle 1). Ein Überschreiten dieser Grenzwerte beeinträchtigt die Chromatographieleistung und die Lebensdauer der Säule und kann gefährlich sein.

Tabelle 1: Maximale Betriebsdrücke – Säulen bis 4,6 mm.

Säule	Partikelgröße	Grenzwert für den Druck
AdvanceBio Peptide Mapping	2,7 µm	600 bar
AdvanceBio Peptide Plus		
AdvanceBio EC-C18		
AdvanceBio Oligonucleotide		
AdvanceBio Amino Acid Analysis		
AdvanceBio RP-mAb	3,5 µm	400 bar
ZORBAX 300SB	3,5 µm, 5 µm, 7 µm	
Poroshell 300	5 µm	
ZORBAX RRHD	1,8 µm	1200 bar
PLRP-S	3 µm	275 bar
	5 µm, 8 µm, 10 µm	207 bar
	10 bis 15 µm, 15 bis 20 µm, 30 µm	103 bar

Weitere Tipps zur Säulennutzung

- Ein umgekehrter Fluss durch die Säule ist im Allgemeinen nicht schädlich, sollte aber vermieden werden, es sei denn, eine Fritte ist verstopft (siehe „Pflege der Säule“).
- Es wird empfohlen, mit einer niedrigeren Flussrate zu beginnen und die Rate vorsichtig bis zur gewünschten Betriebsflussrate zu erhöhen.
- Verwenden Sie zur Herstellung der mobilen Phase stets hochreine Reagenzien und Lösemittel für die Chromatographie. Entgasen und filtern Sie die mobile Phase vor dem Gebrauch.
- Die Zerlegung der Säule verschlechtert die Säulenleistung.
- Es wird ein Inline-Filter oder eine Vorsäule empfohlen, mit denen Sie die Säule schützen und die Lebensdauer der Säule erhöhen.
- Wird die Säule bei pH-Werten außerhalb des empfohlenen Bereichs für die Säulenphase (siehe Tabelle 2) eingesetzt, ist die Lebensdauer der Säule verkürzt.

- Säulen, die nicht in Gebrauch sind, dürfen nicht bei erhöhtem pH-Wert oder erhöhter Temperatur aufbewahrt werden (siehe Tabelle 2).
- Neue Säulen sind unter Umständen mit einer Mischung aus organischen Lösemitteln und Wasser gefüllt, die Puffersubstanzen enthalten kann. Weitere Hinweise zu den Transportlösemitteln siehe Tabelle 3. Achten Sie zunächst darauf, dass die Säule nicht mit einer mobilen Phase beschickt wird, die einen Niederschlag bewirkt bzw. nicht vollständig mischbar ist.
- Agilent BioHPLC und AdvanceBio Säulen sind mit allen, zur Analyse von Biomolekülen verwendeten Lösemitteln kompatibel.

Tabelle 2: Säulenbetriebsparameter: pH und Temperatur.

Säule	Empfohlener pH-Bereich	Maximale Betriebstemperatur
AdvanceBio Peptide Mapping	2,0 bis 8,0	60 °C
AdvanceBio Peptide Plus		
AdvanceBio EC-C18		
ZORBAX RRHD	1,0 bis 8,0	80 °C
ZORBAX 300SB-C8, C3, CN		
ZORBAX 300SB-C18	1,0 bis 8,0	90 °C
AdvanceBio RP-mAb		
Poroshell 300		
Poroshell 300 Extend-C18	2,0 bis 11,0	60 °C unter pH 8, 40 °C unter pH 8
AdvanceBio Oligonucleotide	3,0 bis 11,0	65 °C
AdvanceBio Amino Acid Analysis		
PLRP-S	1,0 bis 14,0	200 °C

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

Tabelle 3: Transportlösemittel.

Säule	Transportlösemittel	Kompatibilität
AdvanceBio Peptide Plus	100 % Acetonitril	Wasser und alle häufig verwendeten organischen Lösemittel. Tetrahydrofuran (THF) vermeiden.
AdvanceBio Peptide Mapping	Mischung aus Acetonitril und Wasser	
AdvanceBio EC-C18		
ZORBAX RRHD		
ZORBAX 300SB		
AdvanceBio RP-mAb	Mischung aus Acetonitril und Wasser	Wasser und alle organischen Lösemittel einschließlich N,N-Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid
Poroshell 300 und 300 Extend	Mischung aus Methanol und Wasser	
AdvanceBio Oligonucleotide	Mischung aus Acetonitril und Wasser	Wasser und alle häufig verwendeten organischen Lösemittel. Modifier einschl. HFIP und TEAA
AdvanceBio Amino Acid Analysis		
PLRP-S	Acetonitril/Wasser 7:1	Mischungen aus Wasser und organischen Lösungsmitteln einschließlich N,N-Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid. 100 % wässrige Phase wird nicht empfohlen, da dies die Säulenleistung und -lebensdauer beeinträchtigt

Auswahl der mobilen Phase und Betriebstemperaturen

Die gebundene stationäre Phase ist unpolar, und es werden am besten polare mobile Phasen wie Methanol/Wasser- oder Acetonitril/Wasser-Mischungen verwendet. Durch Erhöhung der organischen Komponente in diesen Mischungen können die Retentionszeiten der Probesubstanzen gesenkt werden.

Wird die Säule über längere Zeiten der Höchsttemperatur ausgesetzt, ist die Lebensdauer der Säule verkürzt.

Die Verwendung von 100 % wässrigen Eluenten bei PLRP-S-Säulen senkt die Lebensdauer der Säule erheblich und kann die Peakbreite und -symmetrie schnell beeinträchtigen.

Empfohlene Startgradienten

Zur Trennung von biologischen Molekülen werden gewöhnlich Gradienten verwendet, d. h. die Konzentration der organischen Komponente wird graduell erhöht, um eine Elution von der Säule zu erzielen. Peptide, Polypeptide und Proteine werden gewöhnlich mit säurehaltigen Lösemitteln getrennt. Dabei dienen Trifluoressigsäure (TFA) oder Ameisensäure (FA) als Modifier für die pH-Kontrolle und/oder als Ionenpaarreagenz, um die gewünschte Retention und Selektivität zu erzielen. Organische Lösemittel wie Acetonitril, Methanol und Ethanol dienen als Elutionslösemittel, wobei Acetonitril am häufigsten eingesetzt wird.

Weitere Hinweise zu Peptidtrennungen siehe Kapitel 11, Seite 497–508, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, zweite Auflage. L.R. Snyder and J. J. Kirkland, (John Wiley & Sons, 1979).

Pflege der Säule

Säulen mit einer Partikelgröße von 1,8 μm sind mit einer 0,5- μm -Einlassfritte ausgestattet. Partikel in Proben verstopfen die Einlassfritten der Säule und sollten vor der Probenanalyse entfernt werden. Wo dies nicht möglich ist, muss ein Inline-Filter oder eine Vorsäule verwendet werden, um die Analysensäule zu schützen und die Lebensdauer der Säule zu verlängern. Die AdvanceBio Peptid-Mapping Säule besitzt eine 2- μm -Einlassfritte. Proben mit biologischen Partikeln, die größer sind als 2 μm , verstopfen die Einlassfritte. Daher werden für solche Proben Vorsäulen empfohlen. Vor der Injektion in eine Säule sollten die Proben am besten gefiltert werden. Stellen Sie außerdem vor Beginn sicher, dass alle Lösemittel frisch zubereitet und gefiltert worden sind.

Weiterführende Informationen zu Vorsäulen siehe **www.agilent.com/chem/guards**.

Reinigen der Säule/Verlängern der Lebensdauer der Säule

Ist ein Backflush bei der Säule möglich (Partikel $> 1,8 \mu\text{m}$), reinigen Sie sie durch einen Fluss in umgekehrter Richtung. Beginnen Sie mit einem stärkeren (weniger polaren) Lösemittel.

1. Trennen Sie die Säule vom Detektor ab und lassen Sie das Spüllösungsmittel in ein Becherglas laufen.
2. Beginnen Sie mit Ihrer mobilen Phase ohne Puffersalze (Wasser/organisch). Lassen Sie 10 bis 20 Säulenvolumen durchlaufen.
3. Anschließend verwenden Sie 100 % organisches Lösemittel (Methanol oder Acetonitril).
4. Prüfen Sie, ob der Druck wieder normal ist. Falls nicht:
5. Entsorgen Sie die Säule oder erwägen Sie drastischere Bedingungen 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 der Verwendung zuerst mit Isopropanol spülen, da diese mobile Phase nicht mit Wasser mischbar ist. Erst dann können Sie zu Ihrer mobilen Phase zurückkehren).

Bei PLRP-S-Säulen können aggressive Reinigungszyklen mit 80 % 1 M NaOH oder 1 M HCl mit 20 % organischem Anteil verwendet werden.

Bei Säulen mit $1,8\text{-}\mu\text{m}$ -Partikeln dürfen Sie keinen Säulen-Backflush durchführen – probieren Sie ein Verfahren zur Aufreinigung wie oben beschrieben, kehren Sie den Säulenfluss jedoch nicht um.

Empfehlungen zur Lagerung

Säulen können normalerweise in den meisten mobilen Phasen für kurze Zeit sicher aufbewahrt werden. Zur Langzeitlagerung sollten Säulen mit an Silica gebundenen Phasen mit einem reinen organischen Lösemittel befüllt werden. Wenn die Säule zuvor mit einer gepufferten mobilen Phase verwendet wurde, müssen die Puffersalze zuerst mit dem 20- bis 30-fachen Säulenvolumen einer 50:50-Mischung aus Methanol oder Acetonitril und Wasser aus der Säule gespült werden. Anschließend wird mit dem 20- bis 30-fachen Säulenvolumen mit reinem Lösemittel nachgespült. Vor der Lagerung müssen die Endfittings fest mit Endstopfen verschlossen werden, um die Säulenpackung vor dem Austrocknen zu schützen.

Zum Schutz Ihres Systems sollten Salze aus dem Gerät und aus der Säule entfernt werden. Dazu wird die Säule mit der gleichen mobilen Phase, jedoch ohne Puffer, gespült (z. B. mit 60:40 ACN/H₂O, um eine gepufferte mobile Phase mit 60:40 ACN/0,02 M Phosphatpuffer zu entfernen). Mit dieser Strategie ist eine schnelle erneute Äquilibrierung mit der ursprünglichen mobilen Phase möglich, und die Korrosionsgefahr durch Salze wird eliminiert.

Tipps für optimale Chromatographieergebnisse

- Optimieren Sie das Gerät durch möglichst kurze Leitungen zwischen den Komponenten. Auf diese Weise werden das Extrasäulenvolumen und die damit verbundene Bandenverbreiterung reduziert. Verwenden Sie für Fast LC/High Efficiency-Säulen rote Kapillaren mit 0,12 mm Innendurchmesser. Weiterführende Informationen zu Kapillaren finden Sie unter **www.agilent.com/chem/lccapillaries**.
- Stellen Sie sicher, dass die Datenerfassungsrate für Ihre Säule optimiert ist. Verwenden Sie für Fast-LC-Säulen (ZORBAX RRHD) eine höhere Datenerfassungsrate.
- Führen Sie eine Probenfiltration oder eine andere geeignete Methode der Probenvorbereitung durch. Weitere Informationen finden Sie unter **www.agilent.com/chem/sampleprep**
- Verwenden Sie nur zertifizierte Lampen in Ihren LC-Geräten, um die Leistung zu optimieren.



Questo opuscolo fornisce informazioni generali sulle colonne a fase inversa Agilent BioHPLC e AdvanceBio.

Per altre informazioni dettagliate su una specifica fase o linea di prodotti, consultare il sito:

www.agilent.com/chem/biocolumnchoices

Per iniziare

A ogni colonna Agilent è allegato un report sulle prestazioni QC della stessa, con incluso un cromatogramma di prova. Il sistema di prova QC è stato modificato partendo da un sistema standard al fine di ridurre al minimo il volume morto del sistema; pertanto può differire dal sistema utilizzato in uno specifico laboratorio. Ciò consente una migliore valutazione dell'efficienza della colonna e assicura una maggiore omogeneità del prodotto. Un sistema LC ottimizzato porta a risultati simili a quelli del cromatogramma incluso nel report sulle prestazioni QC

In caso di domande specifiche, contattare il team dell'assistenza tecnica alla pagina: **www.agilent.com/chem/columnsupport**.

Utilizzo della colonna

Installazione

- La direzione del flusso è indicata sulla colonna.
- Le colonne da 1,8 μm (ZORBAX RRHT, ZORBAX RRHD) possono essere utilizzate solo nella direzione di flusso indicata.

Per realizzare collegamenti rimovibili con volume morto nullo, Agilent consiglia l'uso della linea di raccordi ad attacco rapido InfinityLab Quick Connect e Quick Turn. Sono disponibili le seguenti opzioni:

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

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



Gruppo InfinityLab Quick Connect, codice 5067-5961



Raccordo Quick Turn InfinityLab, codice 5067-5966

Maggiori informazioni sono disponibili all'indirizzo:

www.agilent.com/chem/infinitylabfittings

Condizionamento della colonna

Ogni colonna è sottoposta a test prima della spedizione. Prima di utilizzarla per la prima volta, è necessario sostituire con eluente il solvente in cui la colonna è fornita, assicurandosi che tutti i componenti siano miscibili e solubili. Se si aggiungono additivi alla fase mobile (per esempio tamponi o reagenti per coppia ionica), è consigliabile effettuare un lavaggio intermedio con una fase mobile avente la composizione corretta, ma senza gli additivi. Il lavaggio con 10-20 volumi di colonna dovrebbe essere di aiuto nella transizione alla specifica fase mobile.

Assicurarsi che la colonna sia stata equilibrata adeguatamente prima dell'uso. Ciò garantirà la riproducibilità e aiuterà a prevenire la deriva del tempo di ritenzione. Se si utilizza acido formico come additivo alla fase mobile, condizionare la colonna attenendosi alle indicazioni riportate nella tabella Condizioni del metodo di condizionamento della colonna per l'acido formico.

Condizioni del metodo di condizionamento della colonna per l'acido formico					
D.i. della colonna (mm)	Fase mobile	Velocità di flusso (mL/min)	Temp. della colonna (°C)	Tempo (ore)	Dopo il condizionamento
2,1	95/5 H ₂ O/CH ₃ CN + acido formico 0,1%	0,1	60	4	Lavare e conservare in CH ₃ CN 100%
3,0	95/5 H ₂ O/CH ₃ CN + acido formico 0,1%	0,2	60	4	Lavare e conservare in CH ₃ CN 100%
4,6	95/5 H ₂ O/CH ₃ CN + acido formico 0,1%	0,4	60	4	Lavare e conservare in CH ₃ CN 100%

Nota: il condizionamento durante le ore notturne, o per un massimo di 24 ore, può essere vantaggioso, in particolare per le colonne di maggiore lunghezza o per gli analiti acidi

Importanti considerazioni sulla sicurezza

- Tutti i punti di collegamento nei sistemi per cromatografia liquida sono potenziali fonti di perdite. Gli utilizzatori devono tenere conto della tossicità o infiammabilità delle fasi mobili.
- Poiché le particelle sono di piccole dimensioni, le fasi impaccate ed essiccate delle colonne sono respirabili. Agilent non consiglia di rimuovere i raccordi terminali delle colonne esponendo in tal modo i mezzi. Le colonne devono essere aperte solo da personale qualificato in una zona ben aerata.
- Si consiglia di rispettare i limiti di pressione operativa riportati per ogni colonna (vedere la Tabella 1). Il superamento di questi limiti compromette le prestazioni cromatografiche e la durata della colonna e potrebbe essere pericoloso.

Tabella 1. Valori massimi dei parametri operativi per colonne fino a 4,6 mm.

Colonna	Dimensioni delle particelle	Limite di pressione
AdvanceBio Peptide Mapping	2,7 µm	600 bar
AdvanceBio Peptide Plus		
AdvanceBio EC-C18		
AdvanceBio Oligonucleotide		
AdvanceBio Amino Acid Analysis		
AdvanceBio RP-mAb	3,5 µm	400 bar
ZORBAX 300SB	3,5 µm, 5 µm, 7 µm	
Poroshell 300	5 µm	
ZORBAX RRHD	1,8 µm	1200 bar
PLRP-S	3 µm	275 bar
	5 µm, 8 µm, 10 µm	207 bar
	Da 10 a 15 µm, da 15 a 20 µm, 30 µm	103 bar

Altri consigli operativi

- L'inversione del flusso in genere non danneggia la colonna ma deve essere evitata eccetto per tentare di rimuovere un frit ostruito (vedere la sezione "Cura della colonna").
- Si consiglia di iniziare con un valore ridotto della velocità di flusso per poi incrementarla gradualmente fino a raggiungere il valore operativo desiderato.
- Per la preparazione della fase mobile utilizzare sempre reagenti di purezza elevata e solvente per cromatografia. Prima dell'utilizzo procedere a degasaggio e filtrazione di tutta la fase mobile.
- Lo smontaggio di una colonna riduce le prestazioni della colonna stessa.
- Per proteggere la colonna e prolungarne la durata è possibile utilizzare un filtro in linea o una precolonna.
- L'uso della colonna al di fuori degli intervalli di pH consigliati per la fase della colonna (vedere la Tabella 2) ne riduce la durata.

- Le colonne non devono essere tenute a pH o temperatura elevati mentre non sono in uso (vedere la Tabella 2).
- Le colonne nuove possono contenere una miscela di solventi organici e acqua, che può contenere sali tampone. Vedere la Tabella 3 per informazioni dettagliate sui solventi in cui sono fornite le colonne. Inizialmente prestare attenzione a non far passare attraverso la colonna fasi mobili che potrebbero causare la formazione di precipitati o che potrebbero non essere completamente miscibili.
- Le colonne Agilent BioHPLC e AdvanceBio sono compatibili con tutti gli eluenti comunemente impiegati per l'analisi di biomolecole.

Tabella 2. Parametri operativi della colonna: pH e temperatura.

Colonna	Intervallo di pH consigliato	Temperatura operativa massima
AdvanceBio Peptide Mapping	Tra 2,0 e 8,0	60 °C
AdvanceBio Peptide Plus		
AdvanceBio EC-C18		
ZORBAX RRHD	Tra 1,0 e 8,0	80 °C
ZORBAX 300SB-C8, C3, CN		
ZORBAX 300SB-C18	Tra 1,0 e 8,0	90 °C
AdvanceBio RP-mAb		
Poroshell 300		
Poroshell 300 Extend-C18	Tra 2,0 e 11,0	60 °C al di sotto di pH 8, 40 °C al di sopra di pH 8
AdvanceBio Oligonucleotide	Tra 3,0 e 11,0	65 °C
AdvanceBio Amino Acid Analysis		
PLRP-S	Tra 1,0 e 14,0	200 °C

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

Tabella 3. Solventi in cui sono fornite le colonne.

Colonna	Solvente in cui è fornita la colonna	Compatibilità
AdvanceBio Peptide Plus	100% acetonitrile	Acqua e tutti i solventi organici comuni. Evitare il tetraidrofurano (THF).
AdvanceBio Peptide Mapping	Miscela di acetonitrile e acqua	
AdvanceBio EC-C18		
ZORBAX RRHD		
ZORBAX 300SB		
AdvanceBio RP-mAb	Miscela di acetonitrile e acqua	Acqua e tutti i solventi organici, inclusi N,N-dimetilformammide e dimetilsolfossido
Poroshell 300 e 300 Extend	Miscela di metanolo e acqua	
AdvanceBio Oligonucleotide	Miscela di acetonitrile e acqua	Acqua e tutti i solventi organici comuni. Modificatori inclusi HFIP e TEAA
AdvanceBio Amino Acid Analysis		
PLRP-S	7:1 acetonitrile/acqua	Solventi organici acquosi inclusi N,N-dimetilformammide e dimetilsolfossido. Si sconsiglia una fase acquosa al 100% in quanto riduce le prestazioni e la durata della colonna

Selezione della fase mobile e temperature operative

La fase stazionaria legata ha natura non polare e l'uso ottimale si ottiene con fasi mobili polari quali miscele metanolo/acqua o acetonitrile/acqua. Incrementando la quantità di componente organico si riduce il tempo di ritenzione del campione.

Se si opera alla temperatura massima per periodi prolungati, la durata della colonna si riduce.

L'uso di eluenti acquosi al 100% con le colonne PLRP-S riduce in misura significativa la durata della colonna e potrebbe comportare un rapido deterioramento della larghezza e della simmetria dei picchi.

Gradienti iniziali consigliati

Le separazioni di molecole biologiche in genere sono eseguite in condizioni di gradiente incrementando la quantità di componente organico per ottenere l'eluizione dalla colonna. Nella maggior parte dei casi le separazioni di peptidi, polipeptidi e proteine sono effettuate con eluenti acidi impiegando acido trifluoroacetico (TFA) o acido formico (FA) come modificatore per il controllo del pH e/o come additivo per coppia ionica per ottenere la ritenzione e la selettività desiderate. Per l'eluizione si usano sostanze organiche come l'acetonitrile, il metanolo e l'etanolo; l'acetonitrile è quella impiegata più frequentemente.

Ulteriori informazioni sulle separazioni di peptidi sono reperibili nel capitolo 11, pagine 497-508 del testo *Introduction to Modern Liquid Chromatography, Second Edition*. L.R. Snyder and J. J. Kirkland, (John Wiley & Sons, 1979).

Cura della colonna

Le colonne con particelle di dimensioni pari a 1,8 μm sono dotate di frit di ingresso da 0,5 μm . I particolati ostruiscono i frit di ingresso delle colonne e devono essere rimossi prima di procedere all'analisi del campione. Qualora ciò non sia possibile, si deve utilizzare un filtro in linea o una precolonna per proteggere la colonna analitica e prolungarne la durata. La colonna AdvanceBio Peptide Mapping è dotata di frit di ingresso da 2 μm . I campioni che contengono bio-particolato di dimensioni superiori a 2 μm ostruiscono il frit di ingresso; si consiglia pertanto l'uso di precolonne con questi campioni. La procedura ottimale prevede la filtrazione dei campioni prima della loro iniezione in qualsiasi colonna. Inoltre, è opportuno verificare che tutti gli eluenti siano stati preparati recentemente e filtrati prima dell'uso.

Visitare il sito **www.agilent.com/chem/guards** per maggiori informazioni sulle precolonne.

Pulizia della colonna/prolungamento della durata della colonna

Pulire nella direzione inversa le colonne che possono essere sottoposte a backflush (particelle $>1,8\ \mu\text{m}$). Iniziare utilizzando un solvente più forte (meno polare).

1. Scollegare la colonna dal rivelatore e far fluire i solventi di lavaggio in un becher.
2. Iniziare con la fase mobile senza sali tampone (acqua/organica). Far fluire attraverso la colonna da 10 a 20 volumi di colonna.
3. Utilizzare quindi 100% di solvente organico (metanolo o acetonitrile).
4. Controllare se la pressione è tornata a valori normali. In caso contrario, procedere come segue:
5. Smaltire la colonna o impiegare condizioni più forti, per esempio 75% acetonitrile / 25% isopropanolo.
6. Aumentare fino a isopropanolo 100%, cloruro di metilene 100% o esano 100% (se si utilizza cloruro di metilene o esano è necessario lavare la colonna con isopropanolo prima dell'uso e prima di tornare alla specifica fase mobile in quanto non sono miscibili con fasi acquose).

Nel caso delle colonne PLRP-S è possibile impiegare cicli di pulizia aggressiva con NaOH 1 M o HCl 1 M all'80% con 20% di contenuto organico.

Non sottoporre a backflush le colonne con particelle da $1,8\ \mu\text{m}$; è possibile provare a impiegare la procedura di purificazione di cui sopra mantenendo però la direzione del flusso.

Indicazioni per la conservazione

In genere le colonne possono essere conservate in modo sicuro per brevi periodi nella maggior parte delle fasi mobili. La conservazione a lungo termine di colonne a fase legata a base di silice deve avvenire in un solvente organico puro. Se la colonna è già stata utilizzata con una fase mobile tamponata, eliminare dapprima il tampone, spurgando la colonna con 20 o 30 volumi di una miscela 50:50 di metanolo o acetonitrile e acqua, seguita da 20 a 30 volumi di solvente puro. Prima della conservazione i raccordi terminali devono essere chiusi ermeticamente con tappi terminali per evitare che l'impaccamento si secchi.

Per proteggere l'apparecchiatura si consiglia di eliminare i sali dallo strumento e dalla colonna spurgando la colonna con la stessa fase mobile senza il tampone (per esempio usando una soluzione ACN/H₂O 60:40 per eliminare una fase mobile tamponata ACN/fosfato 0,02 M 60:40). Quando si adotta questo approccio la successiva riequilibrio con la fase mobile originale è rapida e si evita qualsiasi possibilità di corrosione causata da sali.

Consigli per ottenere i migliori risultati cromatografici

- Ottimizzare la strumentazione riducendo al minimo la lunghezza dei tubi tra i componenti. Ciò riduce il volume extra-colonna e l'allargamento di banda. Utilizzare tubi rossi da 0,12 mm d.i. per colonne Fast LC/ad alta efficienza. Maggiori informazioni sui tubi capillari sono disponibili all'indirizzo **www.agilent.com/chem/lccapillaries**.
- Verificare che la velocità di raccolta dei dati sia ottimizzata per la colonna. Utilizzare una velocità di raccolta più alta per le colonne Fast LC (ZORBAX RRHD).
- Filtrare il campione o eseguire altre procedure di preparazione adeguate per lo specifico campione. Maggiori informazioni sono disponibili all'indirizzo **www.agilent.com/chem/sampleprep**.
- Utilizzare lampade certificate con gli strumenti LC per ottenere le migliori prestazioni.



Este folleto proporciona información general sobre las columnas Agilent BioHPLC y AdvanceBio de fase reversa. Si desea obtener información adicional acerca de una fase o una familia determinada, consulte: **www.agilent.com/chem/biocolumnchoices**

Primeros pasos

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

Si tiene alguna duda, puede contactar con el equipo de soporte técnico en: **www.agilent.com/chem/columnsupport**.

Uso de la columna

Instalación

- La dirección del flujo está marcada en la columna.
- Las columnas de 1,8 μm (ZORBAX RRHT, ZORBAX RRHD) solo se pueden usar en la dirección del flujo marcada en la columna.

Para conexiones de columna sin volumen muerto, Agilent recomienda el uso de la familia de conectores de conexión rápida y de giro rápido InfinityLab. Las opciones son:

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

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



Conjunto de conexión rápida
InfinityLab, ref. 5067-5961



Conector de giro rápido
InfinityLab, ref. 5067-5966

Si desea obtener más información, visite:

www.agilent.com/chem/infinitylabfittings

Acondicionamiento de la columna

Cada columna se prueba antes de su envío. Antes del primer uso, es necesario sustituir los disolventes del envío por eluyente, comprobando que todos los componentes sean miscibles y solubles. Si se utilizan aditivos de fase móvil (como tampones o reactivos de emparejamiento iónico), se recomienda realizar un lavado intermedio con una fase móvil de la composición correcta, pero sin estos aditivos. Un lavado con entre 10 y 20 volúmenes de columna debería servir para la transición con su fase móvil. Verifique que la columna se haya equilibrado de forma adecuada antes de su uso. De esta manera, se garantiza la reproducibilidad y se ayuda a prevenir la variabilidad en el tiempo de retención. Si se utiliza ácido fórmico como aditivo de fase móvil, acondicione la columna como se recomienda en la tabla Condiciones del método de acondicionamiento de la columna para ácido fórmico.

Condiciones del método de acondicionamiento de la columna para ácido fórmico					
D.i. de columna (mm)	Fase móvil	Flujo (ml/min)	Temp. columna (°C)	Tiempo (horas)	Después de acondicionar
2,1	95/5 H ₂ O/CH ₃ CN + ácido fórmico al 0,1 %	0,1	60	4	Lavar y guardar en 100% CH ₃ CN
3,0	95/5 H ₂ O/CH ₃ CN + ácido fórmico al 0,1 %	0,2	60	4	Lavar y guardar en 100% CH ₃ CN
4,6	95/5 H ₂ O/CH ₃ CN + ácido fórmico al 0,1 %	0,4	60	4	Lavar y guardar en 100% CH ₃ CN

Nota: El acondicionamiento durante toda la noche, o hasta 24 horas, podría ser beneficioso, en particular para las columnas de mayor tamaño o para analitos ácidos

Consideraciones importantes sobre seguridad

- Todos los puntos de conexión de los sistemas de cromatografía líquida son posibles fuentes de fugas. Los usuarios deben tener en cuenta la toxicidad o inflamabilidad de las fases móviles.
- Debido al pequeño tamaño de las partículas, los rellenos de las columnas secas son inhalables. Agilent no recomienda la retirada de los conectores del extremo de la columna y la exposición de los medios. Las columnas solo deben ser abiertas por personal formado y en una zona con buena ventilación.
- Aténgase a los límites de presión operativa designados para cada columna (consulte la Tabla 1). Si se superan estos límites, el rendimiento cromatográfico y la vida útil de la columna se verán afectados, lo que podría resultar inseguro.

Tabla 1. Parámetros de operación máximos: columnas de hasta 4,6 mm.

Columna	Tamaño de partícula	Límite de presión
AdvanceBio Peptide Mapping	2,7 μm	600 bar
AdvanceBio Peptide Plus		
AdvanceBio EC-C18		
AdvanceBio Oligonucleotide		
Análisis con una columna AdvanceBio Amino Acid Analysis		
AdvanceBio RP-mAb	3,5 μm	400 bar
ZORBAX 300SB	3,5 μm , 5 μm , 7 μm	
Columnas Poroshell 300	5 μm	
ZORBAX RRHD	1,8 μm	1200 bar
PLRP-S	3 μm	275 bar
	5 μm , 8 μm , 10 μm	207 bar
	10 a 15 μm , 15 a 20 μm , 30 μm	103 bar

Otros consejos de uso

- El flujo invertido, por lo general, no resulta dañino para la columna, pero se debe evitar, salvo para tratar de eliminar obstrucciones en la frita (consulte “Cuidado de la columna”).
- Se recomienda iniciar el flujo a una velocidad reducida y, posteriormente, incrementarlo con suavidad hasta llegar al flujo operativo deseado.
- Utilice siempre reactivos de gran pureza y disolventes de calidad cromatográfica para preparar las fases móviles. Antes de su uso, desgasifique y filtre todas las fases móviles.
- Si se desmonta una columna, se reducirá el rendimiento de la columna.
- Se puede usar un filtro en línea o una precolumna para proteger la columna y aumentar su vida útil.
- Si la columna se usa fuera de los intervalos de pH recomendados para la fase de la columna (consulte la Tabla 2), se reducirá su vida útil.

- Cuando las columnas no se utilicen, no se deben mantener con un pH elevado ni a una temperatura elevada (consulte la Tabla 2).
- Las columnas nuevas podrían contener una mezcla de disolventes orgánicos y agua, que podría contener sales de tampón. Consulte la Tabla 3 para conocer los detalles de los disolventes del envío. Inicialmente, se deben tomar precauciones para que no pase a través de la columna ninguna fase móvil que pueda originar la formación de un precipitado o que pueda no ser totalmente miscible.
- Las columnas Agilent BioHPLC y AdvanceBio son compatibles con todos los eluyentes más usados para el análisis de biomoléculas.

Tabla 2. Parámetros de operación de las columnas: pH y temperatura.

Columna	Intervalo de pH recomendado	Temperatura máxima de funcionamiento
AdvanceBio Peptide Mapping	2,0 a 8,0	60 °C
AdvanceBio Peptide Plus		
AdvanceBio EC-C18		
ZORBAX RRHD	1,0 a 8,0	80 °C
ZORBAX 300SB-C8, C3, CN		
ZORBAX 300SB-C18	1,0 a 8,0	90 °C
AdvanceBio RP-mAb		
Columnas Poroshell 300		
Poroshell 300 Extend-C18	2,0 a 11,0	60 °C por debajo de pH 8, 40 °C por encima de pH 8
AdvanceBio Oligonucleotide	3,0 a 11,0	65 °C
Análisis con una columna AdvanceBio Amino Acid Analysis		
PLRP-S	1,0 a 14,0	200 °C

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

Tabla 3. Disolventes del envío.

Columna	Disolvente del envío	Compatibilidad
AdvanceBio Peptide Plus	100 % acetonitrilo	Agua y todos los disolventes orgánicos habituales. Evítese el tetrahidrofurano (THF).
AdvanceBio Peptide Mapping	Mezcla de acetonitrilo y agua	
AdvanceBio EC-C18		
ZORBAX RRHD		
ZORBAX 300SB		
AdvanceBio RP-mAb	Mezcla de acetonitrilo y agua	Agua y todos los disolvente orgánicos, incluidos N,N-dimetilformamida y dimetilsulfóxido
Poroshell 300 y 300 Extend	Mezcla de metanol y agua	
AdvanceBio Oligonucleotide	Mezcla de acetonitrilo y agua	Agua y todos los disolventes orgánicos habituales. Modificadores, incluidos HFIP y TEAA
Análisis con una columna AdvanceBio Amino Acid Analysis		
PLRP-S	Acetonitrilo/agua 7:1	Disolventes orgánicos acuosos, incluidos N,N-dimetilformamida y dimetilsulfóxido. No se recomiendan los disolventes 100 % acuosos, pues se reducirían la prestación y la vida útil de la columna

Selección de la fase móvil y temperaturas operativas

La fase estacionaria ligada es de naturaleza no polar y se usa mejor con fases móviles polares, como mezclas de metanol/agua o acetonitrilo/agua. Si se aumenta la cantidad del componente orgánico se reduce el tiempo de retención de la muestra.

Si se usa la temperatura máxima durante períodos prolongados, se reduce la vida útil de la columna.

El uso de eluyentes 100 % acuosos con columnas PLRP-S reduce significativamente la vida útil de la columna y puede suponer el rápido deterioro de la anchura y simetría de los picos.

Gradientes iniciales recomendados

En las separaciones de moléculas biológicas normalmente se emplean condiciones de gradiente (aumentando la cantidad del componente orgánico para conseguir la elución en la columna). Las separaciones de péptidos, polipéptidos y proteínas suelen llevarse a cabo con eluyentes ácidos, usando ácido trifluoroacético (TFA) o ácido fórmico (FA) como modificador para el control del pH o como aditivo de emparejamiento iónico para conseguir la retención y la selectividad deseadas. Para la elución se utilizan compuestos orgánicos como el acetonitrilo, el metanol y el etanol, siendo el primero el más usado.

Se puede encontrar información adicional: sobre las separaciones de péptidos en el capítulo 11, páginas 497–508, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, segunda edición. L.R. Snyder y J. J. Kirkland, (John Wiley & Sons, 1979).

Cuidado de la columna

Las columnas con un tamaño de partícula de 1,8 μm tienen una fritas de entrada de 0,5 μm . Las partículas bloquearán las fritas de entrada de la columna y deben retirarse antes de analizar la muestra. Si esto no es posible, deberá utilizarse un filtro en línea o una precolumna para proteger la columna analítica y aumentar la vida útil de la columna. La columna de mapeo de péptidos AdvanceBio tiene una fritas de entrada de 2 μm . Las muestras que contengan materia biológica particulada de más de 2 μm obstruirán la fritas de entrada, por lo que se recomienda el uso de precolumnas con estas muestras. Lo mejor es filtrar las muestras antes de inyectarlas en cualquier columna. También deberá comprobar que todos los eluyentes se preparan y filtran justo antes de su uso.

Consulte **www.agilent.com/chem/guards** para obtener más información sobre las precolumnas.

Limpieza de la columna/incremento de la vida útil de la columna

Para el caso de las columnas en las que se puede aplicar un retroflujo (partículas $>1,8\ \mu\text{m}$), limpie las columnas en dirección inversa. Comience con un disolvente más fuerte (menos polar).

1. Desconecte la columna del detector y pase disolventes de lavado a una cubeta de precipitación.
2. Comience con la fase móvil sin sales tampón (agua/orgánico). Pase de 10 a 20 volúmenes de columna.
3. A continuación, use 100 % orgánico (metanol o acetonitrilo).
4. Verifique la presión para ver si ha vuelto a su valor normal. En caso negativo:
5. Deseche la columna o considere unas condiciones más fuertes; por ejemplo, 75 % acetonitrilo: 25 % isopropanol.
6. Aumente hasta 100 % isopropanol, 100 % cloruro de metileno o 100 % hexano (si usa cloruro de metileno o hexano, deberá lavar la columna con isopropanol antes de su uso y antes de volver a su fase móvil, pues no es miscible con fases acuosas).

Con las columnas PLRP-S, se pueden usar ciclos de limpieza agresivos con 80 % NaOH 1 M o HCl 1 M con 20 % orgánico.

Para el caso de las columnas con partículas de $1,8\ \mu\text{m}$, no realice el retroflujo en la columna; puede probar el procedimiento de limpieza como se ha descrito anteriormente, pero manteniendo la dirección del flujo.

Recomendaciones para el almacenamiento

En general, las columnas pueden almacenarse con seguridad durante periodos cortos en la mayoría de fases móviles. El almacenamiento a largo plazo de las columnas de fase ligada y basadas en sílice se debe efectuar con disolvente orgánico puro. Si la columna se ha utilizado con anterioridad con una fase móvil que incluye una solución tampón, se debe extraer en primer lugar dicha solución tampón mediante el purgado de la columna. Para ello, deben emplearse entre 20 y 30 volúmenes de columna de una mezcla 50:50 de metanol o acetonitrilo y agua, seguidos de entre 20 y 30 volúmenes de columna del disolvente puro. Antes de su almacenamiento, los conectores de los extremos se deben cerrar herméticamente con tapones terminales para evitar que el relleno se reseque.

Para proteger el equipo, conviene eliminar las sales del instrumento y de la columna mediante el purgado de la columna con la misma fase móvil sin la solución tampón (p. ej., con acetonitrilo/H₂O 60:40 para eliminar una fase móvil de acetonitrilo/tampón fosfato 0,02 M 60:40). El reequilibrio con la fase móvil original es rápido si se utiliza este procedimiento y se elimina el riesgo de corrosión debida a las sales.

Consejos para obtener los mejores resultados cromatográficos

- Optimice el instrumento mediante la reducción de la longitud de los capilares entre los componentes. De esta forma, se disminuye el volumen de columna adicional y el ensanchamiento de la banda. Con las columnas LC rápidas o de alta eficiencia, utilice capilares rojos con un diámetro interno de 0,12 mm. Para obtener información acerca de las opciones de capilares, visite **agilent.com/chem/lccapillaries**.
- Asegúrese de optimizar la velocidad de adquisición de datos para la columna. Utilice una velocidad de adquisición más elevada para columnas para LC rápida (ZORBAX de alta definición y resolución rápida).
- Utilice la filtración de muestras u otras técnicas de preparación de muestras que sean apropiados para su muestra. Si desea obtener más información, visite **www.agilent.com/chem/sampleprep**
- Utilice lámparas certificadas con sus instrumentos LC para conseguir el máximo rendimiento.



この冊子では、Agilent BioHPLC および AdvanceBio 逆相カラムに関する一般的な情報をご提供します。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。

www.agilent.com/chem/biocolumnchoices

始めましょう

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。このシステムにより、カラム効率をさらに適切に評価し、より一貫した結果を得ることができます。また、最適化された LC システムを使用して、QC 性能レポートのクロマトグラムと同様の結果を生成することができます。

詳細は、テクニカルサポートチームにお尋ねください。

www.agilent.com/chem/columnsupport

カラムの使用法

取り付け

- フローの方向はカラム上に記載されています。
- 1.8 μm のカラム (ZORBAX RRHT, ZORBAX RRHD) は、カラムに記された方向のフローでのみ使用できます。

取り外し可能でゼロデッドボリュームのカラム接続を実現するために Agilent は InfinityLab クイックコネクトおよびクイックターンファミリ製品の使用を推奨しています。次の選択肢があります。

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

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



InfinityLab クイックコネク
アセンブリ、p/n 5067-5961



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

詳細については、www.agilent.com/chem/infinitylabfittings をご覧ください。

カラムのコンディショニング

カラムはすべて出荷前に検査を行っています。したがって、初めて使用する前に出荷時の溶媒を移動相と入れ替えなければなりません。その際、すべての成分が相互に混ざり合い、溶け合うようにしてください。移動相に添加物（緩衝液、イオンペア試薬など）を使用している場合は、ときどき添加物を含まない正しい組成の移動相でフラッシングすることをお勧めします。カラム体積の 10 ～ 20 倍の量でフラッシュすれば、移動相への移行には十分なはずで、使用する前に、カラムが適切に平衡化されていることを確認してください。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。移動相添加物としてギ酸を使用する場合、ギ酸に関するカラムコンディショニングメソッド条件の表で推奨されているとおりに、カラムをコンディショニングします。

ギ酸に関するカラムコンディショニングメソッド条件					
カラム内径 (mm)	移動相	流量 (mL/min)	カラム温度 (°C)	時間 (H)	コンディショニング後
2.1	95/5 H ₂ O/CH ₃ CN + 0.1% ギ酸	0.1	60	4	フラッシングし、100 % CH ₃ CN で保管
3.0	95/5 H ₂ O/CH ₃ CN + 0.1% ギ酸	0.2	60	4	フラッシングし、100 % CH ₃ CN で保管
4.6	95/5 H ₂ O/CH ₃ CN + 0.1% ギ酸	0.4	60	4	フラッシングし、100 % CH ₃ CN で保管

注:特に、長いカラムや酸性分析対象物については、一晩または最大 24 時間のコンディショニングが有効な場合があります。

重要な安全上の注意点

- 液体クロマトグラフシステムでは、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。カラムのエンドフィッティングを取り外したり、充填剤を露出させたりすることはお勧めしません。カラムは、訓練を受けた人が換気の良いところで開放してください。
- 各カラムの圧力上限を遵守してください(表 1 参照)。記載の限界値を超えるとクロマトグラフィー性能が低下したり、カラムの寿命が短くなったり、あるいは安全が確保できなくなったりします。

表 1.動作パラメータ上限 - 4.6 mm までのカラム

カラム	粒子径	圧力上限
AdvanceBio ペプチドマッピング	2.7 μm	600 bar
AdvanceBio ペプチドプラス		
AdvanceBio EC-C18		
AdvanceBio オリゴヌクレオチド		
AdvanceBio アミノ酸分析		
AdvanceBio RP-mAb	3.5 μm	400 bar
ZORBAX 300SB	3.5 μm 、5 μm 、7 μm	
Poroshell 300	5 μm	
ZORBAX RRHD	1.8 μm	1200 bar
PLRP-S	3 μm	275 bar
	5 μm 、8 μm 、10 μm	207 bar
	10 ~ 15 μm 、 15 ~ 20 μm 、30 μm	103 bar

操作に関するその他のヒント

- 通常、逆向きの使用によりカラムが損傷することはありませんが、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）。
- 低めの流量で使用し始めて、次第に使用流量まで増やすことをおすすめします。
- 移動相の準備には、高純度の試薬と、クロマトグラフィーグレード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。
- インラインフィルタやガードカラムを使用してカラムを保護し、寿命を延ばすことができます。
- カラムは、pH の推奨範囲を超えて使用すると（表 2 参照）、カラムの寿命が短くなります。

- カラムを使用しないときは、高 pH 下または高温下で保管しないでください(表 2 参照)。
- 新品のカラムには、緩衝塩を含む可能性のある有機溶媒と水の混合液が含まれていることがあります。出荷時の溶媒については、表 3 を参照してください。初めに、カラムに移動相を通さないように注意します。沈殿が生成したり、十分混和されない恐れがあります。
- Agilent BioHPLC カラムと AdvanceBio カラムでは、生体分子の分析に用いられる一般的な移動相を用いることができます。

表 2.カラム操作パラメータ - pH および温度

カラム	推奨 pH 範囲	最大動作温度
AdvanceBio ペプチドマップング	2.0 ~ 8.0	60 °C
AdvanceBio ペプチドプラス		
AdvanceBio EC-C18		
ZORBAX RRHD	1.0 ~ 8.0	80 °C
ZORBAX 300SB-C8、C3、CN		
ZORBAX 300SB-C18	1.0 ~ 8.0	90 °C
AdvanceBio RP-mAb		
Poroshell 300		
Poroshell 300 Extend-C18	2.0 ~ 11.0	pH 8 未満 60 °C、 pH 8 以上 40 °C
AdvanceBio オリゴヌクレオチド	3.0 ~ 11.0	65 °C
AdvanceBio アミノ酸分析		
PLRP-S	1.0 ~ 14.0	200 °C

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

表 3.出荷時の溶媒

カラム	出荷時の溶媒	互換性
AdvanceBio ペプチドプラス	100 % アセトニトリル	水および一般的な有機溶媒すべて。テトラヒドロフラン (THF) を避ける。
AdvanceBio ペプチドマッピング	アセトニトリル/水混合物	
AdvanceBio EC-C18		
ZORBAX RRHD		
ZORBAX 300SB		
AdvanceBio RP-mAb	アセトニトリル/水混合物	水および N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドなどを含むすべての有機溶媒
Poroshell 300 および 300 Extend	メタノール/水混合物	
AdvanceBio オリゴヌクレオチド	アセトニトリル/水混合物	水および一般的な有機溶媒すべて。HFIP や TEAA などの変性剤
AdvanceBio アミノ酸分析		
PLRP-S	7:1 アセトニトリル/水	N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドなどを含む水溶性有機溶媒。カラムの性能が低下したり、寿命が短くなったりするため、水 100 % はおすすめしません。

移動相の選択および動作温度

化学結合型固定相は、性質上無極性で、メタノール/水混合物またはアセトニトリル/水混合物のような極性移動相とともに使用するのが最も好ましい方法です。有機成分の量を増やすと、サンプルの保持時間が短くなります。

長時間、最高使用温度で使用すると、カラムの寿命が短くなります。

水 100 % の移動相を PLRP-S カラムに使用するとカラムの寿命が著しく短くなります。また、ピーク幅およびピーク対称性に悪影響を及ぼすことがあります。

移動相のグラジエントについて

生体分子を分離する際は、通常グラジエント条件を用います。すなわち、有機成分の量を増やしてカラムから溶出させます。ペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質の分離では、最も一般的にはトリフルオロ酢酸 (TFA) やギ酸 (FA) を含む酸性移動相が用いられます。これらは pH 調節剤として、またはイオン対試薬として使用されており、必要な保持力および選択性を得ることができます。溶出には、アセトニトリル、メタノール、エタノールなどの有機化合物を使用し、最も一般的にはアセトニトリルを用います。

ペプチドの分離についての詳細は、次の文献に記載されています。L.R.Snyder and J. J. Kirkland, (John Wiley & Sons, 1979)。

カラムのメンテナンス

粒子径が 1.8 μm のカラムには、0.5 μm のフリットがあります。微粒子はカラムのフリットを詰まらせるので、サンプルを分析する前に取り除く必要があります。微粒子を除去できない場合、インラインフィルタまたはガードカラムを用いて分析カラムを保護し、寿命を延ばす必要があります。AdvanceBio ペプチドマッピングカラムには、2 μm のフリットがあります。サンプルに、2 μm 以上の生物粒状物質が含まれる場合、注入口フリットが詰まるため、これらのサンプルにはガードカラムの使用をおすすめします。サンプルは、カラムに注入する前にろ過するのが最善です。また、使用前に、移動相が新しく調製され、ろ過されていることを確認する必要もあります。

ガードカラムの詳細については、www.agilent.com/chem/guards 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

バックフラッシュが可能なカラム (粒子径 $>1.8\ \mu\text{m}$) の場合、逆向きに溶媒を流して洗浄します。まず (極性の小さい) 強溶媒で始めます。

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。通液量は、カラムの体積の 10 ~ 20 倍です。
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。戻っていない場合、次に進みます。
5. 4 までの手順で圧力が正常に戻らない場合は、より強い条件を検討します。
(例 75 % アセトニトリル: 25 % イソプロパノール)
6. 100 % イソプロパノール、100 % 塩化メチレン、または 100 % ヘキサンに変更します (塩化メチレンまたはヘキサンを使用する場合、これらの溶媒は水と混じり合わないのので、カラムを使用する前、かつ移動相に戻る前にイソプロパノールを流す必要があります)。

PLRP-S カラムについては、1 M 水酸化ナトリウム水溶液、または 1 M 塩酸 80 % に有機溶媒 20 % を加えたもので強力に洗浄することができます。

粒子径が $1.8\ \mu\text{m}$ のカラムについては、カラムをバックフラッシュしないでください。先に詳述したクリーンアップ手順を試すことができますが、通液方向は変えないでください。

保管に関する注意事項

一般に短期間であれば、カラムはほとんどの移動相において安全に保管することができます。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、最初にカラム体積の 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。

機器およびカラムの保護のため、塩を除去することをおすすめします。そのために緩衝液を含まない同一種の移動相でカラムをパージします (例えば、60:40 ACN/H₂O を使用して、リン酸塩緩衝液を加えた 60:40 ACN/0.02 M 移動相を取り除く)。この方法を用いると、同じ移動相なので再び平衡状態に達する時間が短く、また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ー結果のためのヒント

- コンポーネント間のチューブ長さを最短にし、機器を最適化します。これにより、カラム外ボリュームが減少し、バンドの拡散が抑制されます。高速高分離カラムには、内径 0.12 mm の赤色チューブを使用します。キャピラリオプションについては、www.agilent.com/chem/lccapillaries を参照してください。
- データ採取レートが、使用しているカラムに適しているか確認します。高速 LC カラム (ZORBAX RRHD) を使用している場合は、データ取込速度を速く設定します。
- サンプルに応じて、サンプルろ過やその他の適切なサンプル前処理手法を行います。詳細については、www.agilent.com/chem/sampleprep を参照してください。
- LC 機器の性能を最大限に活かすために認定ランプをお使いください。



В этом буклете приведены общие сведения обо всех колонках семейств Agilent BioHPLC и Agilent AdvanceBio для обращенно-фазовой хроматографии. Больше информации о конкретной привитой фазе или семействе колонок можно найти по адресу **www.agilent.com/chem/biocolumnchoices**

Начало работы

Все колонки Agilent поставляются с сертификатом контроля качества, который содержит данные проверки рабочих характеристик колонки, включая тестовую хроматограмму. Тестовая система, применяемая при контроле качества, оптимизирована по сравнению со стандартной, чтобы свести к минимуму мертвый объем. Поэтому она может отличаться от используемой в вашей лаборатории. Это позволяет лучше аттестовать эффективность колонки и гарантирует более стабильное качество продукции. Результаты, выдаваемые оптимизированной системой жидкостной хроматографии, будут аналогичны данным хроматограммы из сертификата контроля качества.

По всем техническим вопросам обращайтесь в отдел технической поддержки по адресу **www.agilent.com/chem/columnsupport**.

Использование колонки

Установка

- Направление потока указано на колонке.
- Колонки с размером частиц сорбента 1,8 мкм (ZORBAX RRHT, ZORBAX RRHD) запрещается эксплуатировать с обратным направлением потока.

Для подключения колонки компания Agilent рекомендует быстроразъемные фитинги линеек InfinityLab Quick Connect и Quick Turn с нулевым мертвым объемом. Рекомендуемые фитинги:

Максимальное давление системы	Рекомендуемый фитинг	Каталожные номера
До 400 бар	Фитинг InfinityLab Quick Turn (затягиваемый пальцами)	Фитинг: 5067-5966
До 800 бар	Фитинг InfinityLab Quick Turn (с инструментом для установки)	Фитинг: 5067-5966 Инструмент для установки: 5043-0915
До 1300 бар	Фитинг Agilent InfinityLab Quick Connect	Фитинг: 5067-5965

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



Узел InfinityLab Quick Connect, p/n 5067-5961



Фитинг InfinityLab Quick Turn, p/n 5067-5966

Узнать подробнее: www.agilent.com/chem/infinitylabfittings

Кондиционирование колонок

Перед отправкой покупателю каждая колонка проверяется. Перед началом эксплуатации колонки растворитель, которым она заполнена, надо заменить подвижной фазой. Имейте в виду, что при этом все компоненты должны полностью смешиваться друг с другом. Если используется подвижная фаза с добавками (например, буферные растворы или ион-парные реагенты), рекомендуется предварительно промыть колонку подвижной фазой нужного состава, но без добавок. При смене подвижной фазы рекомендуется выполнить промывку с расходом 10–20 объемов колонки. Перед использованием убедитесь в том, что колонка надлежащим образом уравновешена. Это обеспечивает воспроизводимость результатов анализа и предотвращает дрейф времен удерживания анализируемых веществ. Если подвижная фаза содержит муравьиную кислоту, колонка кондиционируется в соответствии с рекомендациями таблицы «Условия кондиционирования колонки при использовании муравьиной кислоты».

Условия кондиционирования колонки при использовании муравьиной кислоты.

Внутренний диаметр (мм)	Подвижная фаза	Скорость потока (мл/мин)	Температура колонки (°C)	Время (ч)	После кондиционирования
2,1	95/5 H ₂ O/ацетонитрил + 0,1% муравьиной кислоты	0,1	60	4	Промыть и хранить в чистом ацетонитриле
3,0	95/5 H ₂ O/ацетонитрил + 0,1% муравьиной кислоты	0,2	60	4	Промыть и хранить в чистом ацетонитриле
4,6	95/5 H ₂ O/ацетонитрил + 0,1% муравьиной кислоты	0,4	60	4	Промыть и хранить в чистом ацетонитриле

Примечание. Длинные колонки и колонки, применяемые для анализа кислых соединений, иногда может быть полезным кондиционировать на протяжении ночи или в течение до 24 ч.

Важные советы по безопасности

- Все места соединений в системах жидкостной хроматографии являются потенциальными источниками утечек. Пользователи должны быть осведомлены о токсичных или огнеопасных свойствах используемых ими подвижных фаз.
- Существует опасность вдыхания мелких частиц сухого наполнителя колонок. Компания Agilent не рекомендует снимать концевые фитинги колонки и открывать заполняющую ее неподвижную фазу. Открывать колонки разрешается только обученному персоналу в хорошо проветриваемом помещении.
- Не превышайте рабочее давление, указанное для каждой колонки (см. табл. 1). Превышение этих ограничений приведет к ухудшению хроматографической эффективности и срока службы колонки и может иметь опасные последствия.

Таблица 1. Максимальные рабочие параметры: колонки с внутренним диаметром до 4,6 мм.

Колонка	Размер частиц	Предельное давление
Колонки Agilent AdvanceBio Peptide Mapping	2,7 мкм	600 бар
AdvanceBio Peptide Plus		
AdvanceBio EC-C18		
AdvanceBio Oligonucleotide		
AdvanceBio Amino Acid Analysis		
AdvanceBio RP-mAb	3,5 мкм	400 бар
Колонки Agilent ZORBAX 300SB	3,5 мкм, 5 мкм, 7 мкм	
Poroshell 300	5 мкм	
ZORBAX RRHD	1,8 мкм	1200 бар
PLRP-S	3 мкм	275 бар
	5 мкм, 8 мкм, 10 мкм	207 бар
	10–15 мкм, 15–20 мкм, 30 мкм	103 бар

Другие практические советы

- Хотя обратная промывка колонки как правило не вредит, ее следует избегать за исключением случаев засорения фритты на входе (см. раздел «Обслуживание колонки»).
- Рекомендуются начинать работу на сниженной скорости потока и повышать ее до рабочей постепенно.
- Всегда используйте для приготовления подвижной фазы реагенты высшей степени очистки и растворители хроматографической степени чистоты. Перед использованием проводите фильтрацию и дегазацию всего объема подвижной фазы.
- Разборка колонки приводит к ухудшению ее характеристик.
- Для защиты колонки и повышения ее срока службы рекомендуется пользоваться встроенным фильтром или защитной предколонкой.
- Эксплуатация колонки вне рекомендованного для ее неподвижной фазы диапазона значений pH (см. табл. 2) приводит к снижению срока службы колонки.

- В перерыве между использованием не следует хранить колонки в среде с высокими значениями pH или в условиях повышенной температуры (см. табл. 2).
- Новая колонка может быть заполнена смесью органических растворителей и воды, которая иногда может содержать и буферные соли. Подробную информацию о растворителях, которыми заполняются поставляемые колонки, можно найти в табл. 3. В начале использования следует избегать пропускания через колонку такой подвижной фазы, которая может вызвать выпадение осадка или не полностью смешиваться с заполняющим ее растворителем.
- Колонки Agilent BioHPLC и Agilent AdvanceBio совместимы со всеми распространенными растворителями, которые применяются для анализа биомолекул.

Таблица 2. Рабочие параметры колонок: значения pH и температуры.

Колонка	Рекомендованный диапазон pH	Максимальная рабочая температура
Колонки Agilent AdvanceBio Peptide Mapping	От 2,0 до 8,0	60 °C
AdvanceBio Peptide Plus		
AdvanceBio EC-C18		
ZORBAX RRHD	От 1,0 до 8,0	80 °C
ZORBAX 300SB-C8, C3, CN		
ZORBAX 300SB-C18	От 1,0 до 8,0	90 °C
AdvanceBio RP-mAb		
Poroshell 300		
Poroshell 300 Extend-C18	От 2,0 до 11,0	60 °C ниже pH 8, 40 °C выше pH 8
AdvanceBio Oligonucleotide	От 3,0 до 11,0	65 °C
AdvanceBio Amino Acid Analysis		
PLRP-S	От 1,0 до 14,0	200 °C

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

Таблица 3. Растворители, которыми заполняются поставляемые колонки.

Колонка	Растворитель, которым заполняется поставляемая колонка	Совместимость
AdvanceBio Peptide Plus	100% ацетонитрил	Вода и все распространенные органические растворители Избегать смешивания с тетрагидрофураном (ТГФ).
Колонки Agilent AdvanceBio Peptide Mapping	Смесь ацетонитрила с водой	
AdvanceBio EC-C18		
ZORBAX RRHD		
Колонки Agilent ZORBAX 300SB		
AdvanceBio RP-mAb	Смесь ацетонитрила с водой	Вода и все органические растворители, в том числе N,N-диметилформамид и диметилсульфоксид.
Poroshell 300 и 300 Extend	Смесь метанола с водой	
AdvanceBio Oligonucleotide	Смесь ацетонитрила с водой	Вода и все распространенные органические растворители Добавки, в том числе гексафторизопропанол (ГФИП) и триэтаноламин (ТЭА)
AdvanceBio Amino Acid Analysis		
PLRP-S	ацетонитрил : вода 7:1	Смеси воды и органических растворителей, в том числе N,N-диметилформамида и диметилсульфоксида. Использовать воду без органических растворителей не рекомендуется, так как это ухудшает эффективность колонки и сокращает ее срок службы

Выбор подвижной фазы и рабочие температуры

Привитая неподвижная фаза таких колонок по своей природе неполярна, поэтому с ней лучше использовать полярные подвижные фазы, например смеси метанола или ацетонитрила с водой. Увеличение содержания органического компонента приводит к снижению времени удерживания компонентов пробы.

Продолжительная эксплуатация колонки при максимальной разрешенной температуре снижает срок ее службы.

Использование колонки PLRP-S с подвижными фазами, состоящими только из воды, без добавления органических растворителей, снижает срок ее службы и может привести к быстрому уширению пиков и ухудшению их симметричности.

Рекомендуемые начальные градиенты

Для разделения биомолекул как правило применяется градиентный режим — постепенное повышение содержания органического компонента, чтобы полностью вымыть из колонки все компоненты пробы. Разделение пептидов, полипептидов и белков чаще всего выполняется с использованием кислых растворителей, в которых для регулировки значения pH и/или в качестве ион-парного реагента для достижения нужного удерживания и селективности применяется трифторуксусная или муравьиная кислота. В качестве органического растворителя применяются ацетонитрил, метанол или этанол, из которых наиболее распространенным является ацетонитрил.

Больше информации о разделении пептидов можно найти в главе 11 книги «Введение в современную жидкостную хроматографию», стр. 497–508 (Introduction to Modern Liquid Chromatography, Second Edition. L.R. Snyder and J. J. Kirkland, John Wiley & Sons, 1979)

Обслуживание колонки

Колонки с размером частиц 1,8 мкм оснащаются входной фриттой с размером пор 0,5 мкм. Любые твердые частицы приведут к ее засорению, поэтому их следует удалить из пробы перед анализом. Если сделать это невозможно, систему следует оснастить встроенным фильтром или защитной предколонкой. Это позволит защитить аналитическую колонку и повысить срок ее службы. Колонка Agilent AdvanceBio Peptide Mapping имеет входную фритту с размером пор 2 мкм. Пробы с твердыми частицами биологического происхождения размером больше 2 мкм приведут к засорению входной фритты, поэтому при анализе таких проб рекомендуется использовать защитную предколонку. В любом случае независимо от используемой колонки пробы перед анализом рекомендуется фильтровать. Все растворители должны быть свежеприготовленными и профильтрованными перед использованием.

Больше информации про предколонки можно найти по адресу **www.agilent.com/chem/fastguards**.

Промывка колонки. Как увеличить срок службы колонки

Колонки, которые можно продувать обратным потоком (с размером частиц более 1,8 мкм), рекомендуется промывать именно таким образом. Начинайте промывку с более сильного (менее полярного) растворителя.

1. Отключите колонку от детектора и направьте поток промывного растворителя в стакан.
2. Начните с подвижной фазы без буферного раствора (вода / органический растворитель). Пропустите через колонку растворитель в количестве 10–20 ее объемов.
3. Затем промойте колонку чистым органическим растворителем (метанолом или ацетонитрилом).
4. Проверьте давление и убедитесь, что оно вернулось к нормальному значению. Если нет, то:
5. Выбросьте колонку или попробуйте промыть ее более сильным растворителем, например смесью ацетонитрила с изопропанолом 75:25.
6. Затем промойте ее чистым изопропанолом, метиленхлоридом или гексаном (при промывке дихлорметаном или гексаном до и после их использования колонку необходимо промыть изопропанолом, так как они не смешиваются с водой).

Для колонок PLRP-S можно использовать более агрессивную промывку смесью раствора 1 моль/л NaOH или 1 моль/л HCl с органическим растворителем в соотношении 80:20.

Колонки с размером частиц 1,8 мкм продувать обратным потоком запрещается. Для них вышеописанную процедуру промывки следует выполнять в прямом направлении.

Рекомендации по хранению

Как правило кратковременно колонки можно безопасно хранить в большинстве подвижных фаз. Для долговременного хранения колонок на основе силикагеля с привитой фазой следует использовать чистый органический растворитель. Если ранее колонка использовалась с забуференной подвижной фазой, сначала следует удалить буферный раствор с помощью промывки смесью метанола или ацетонитрила с водой (50:50) в количестве 20–30 объемов колонки, а затем промывки чистым растворителем в количестве 20–30 объемов колонки. Перед направлением колонки на хранение концевые фитинги должны быть тщательно закрыты заглушками для предотвращения высыхания сорбента.

В целях защиты оборудования рекомендуется удалить соли из колонки и оборудования, промыв колонку той же подвижной фазой без буферного раствора (например, использовать смесь ацетонитрил/ H_2O 60:40 для удаления забуференной подвижной фазы состава ацетонитрил : раствор 0,02 моль/л формиата аммония 60:40). Этот подход позволяет быстрее повторно уравнивать колонку при использовании исходной подвижной фазы, устраняя при этом возможность возникновения коррозии, вызываемой солями.

Советы для получения наилучших хроматографических результатов

- Трубки, соединяющие компоненты хроматографической системы, должны быть как можно короче. Это позволит уменьшить внеколоночный объем системы и уширение пиков. Используйте капилляры с красной маркировкой с внутренним диаметром 0,12 мм для колонок для скоростной ВЭЖХ и ВЭЖХ. Подробнее о различных вариантах капилляров: **www.agilent.com/chem/lccapillaries**.
- Убедитесь в том, что скорость сбора данных оптимальна для используемой колонки. Установите повышенную частоту сбора данных при использовании колонок для скоростной ВЭЖХ (ZORBAX RRHD).
- Фильтруйте свои пробы или используйте другие подходящие для них техники пробоподготовки. Узнать подробнее: **www.agilent.com/chem/sampleprep**.
- Для лучших рабочих характеристик используйте в системах ВЭЖХ сертифицированные лампы.



Este guia oferece informações gerais sobre as colunas de fase reversa Agilent BioHPLC e AdvanceBio. Para obter mais informações sobre uma fase ou linha específica, acesse: **www.agilent.com/chem/biocolumnchoices**

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 pode variar do sistema usado em seu laboratório. Isso permite avaliar melhor a eficiência da coluna e garantir uma maior consistência do produto. Um sistema de LC otimizado irá gerar resultados semelhantes aos do cromatograma no relatório de controle de qualidade do desempenho.

Caso tenha perguntas específicas, entre em contato com a equipe de Suporte Técnico em:

www.agilent.com/chem/columnsupport.

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.

Para conexões de coluna removíveis e sem volume morto, a Agilent recomenda o uso da linha InfinityLab Quick Connect e Quick Turn. As opções são:

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

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



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



Conexão InfinityLab Quick
Turn, p/n 5067-5966

Saiba mais em: www.agilent.com/chem/infinitylabfittings

Condicionamento da coluna

Cada coluna é testada antes do envio. Antes da primeira utilização, o solvente de transporte deve ser substituído pelo eluente, com cuidado para que todos os componentes sejam miscíveis e solúveis. Caso utilize aditivos na fase móvel (como tampões ou reagentes de par iônico), recomenda-se fazer uma limpeza intermediária com uma fase móvel do composto correto, mas sem estas adições. A limpeza com volumes de 10 a 20 vezes o volume da coluna deve ajudar na transição para a fase móvel. Verifique se a coluna foi devidamente equilibrada antes de usar. Isso garantirá a reprodutibilidade e evitará desvios do tempo de retenção. Ao usar ácido fórmico como aditivo de fase móvel, condicione a coluna conforme recomendado na tabela Condições do método de condicionamento da coluna para ácido fórmico.

Condições do método de condicionamento da coluna para ácido fórmico					
DI da coluna (mm)	Fase móvel	Vazão (mL/min)	Temp. da coluna (°C)	Tempo (h)	Pós-condicionamento
2,1	95/5 de H_2O/CH_3CN + 0,1% de ácido fórmico	0,1	60	4	Lavar e armazenar em 100% de CH_3CN
3,0	95/5 de H_2O/CH_3CN + 0,1% de ácido fórmico	0,2	60	4	Lavar e armazenar em 100% de CH_3CN
4,6	95/5 de H_2O/CH_3CN + 0,1% de ácido fórmico	0,4	60	4	Lavar e armazenar em 100% de CH_3CN

Observação: O condicionamento durante a noite, ou de até 24 horas, pode ser benéfico, especialmente para colunas mais longas ou analitos ácidos

Considerações de segurança importantes

- Todos os pontos de conexão em sistemas de cromatografia líquida são possíveis fontes de vazamentos. Os usuários devem estar atentos à toxicidade ou à inflamabilidade das fases móveis.
- Devido ao pequeno tamanho de partícula, os empacotamentos de coluna seca são inaláveis. A Agilent não recomenda remover as conexões da extremidade da coluna e expor o meio. As colunas só devem ser abertas por pessoal treinado em uma área bem ventilada.
- Respeite os limites operacionais de pressão indicados para cada coluna (consulte a Tabela 1). Exceder esses limites compromete o desempenho cromatográfico e a vida útil da coluna, além da possibilidade de não ser seguro.

Tabela 1. Parâmetros operacionais máximos – Colunas de até 4,6 mm.

Coluna	Tamanho de partícula	Limite de pressão
AdvanceBio Peptide Mapping	2,7 µm	600 bar
AdvanceBio Peptide Plus		
AdvanceBio EC-C18		
AdvanceBio Oligonucleotide		
AdvanceBio Amino Acid Analysis		
AdvanceBio RP-mAb	3,5 µm	400 bar
ZORBAX 300SB	3,5 µm, 5 µm, 7 µm	
Poroshell 300	5 µm	
ZORBAX RRHD	1,8 µm	1200 bar
PLRP-S	3 µm	275 bar
	5 µm, 8 µm, 10 µm	207 bar
	10 a 15 µm, 15 a 20 µm, 30 µm	103 bar

Outras dicas operacionais

- Embora o fluxo reverso geralmente não seja prejudicial à coluna, ele deve ser evitado, exceto ao tentar remover uma fritada entupida (consulte Cuidados com a coluna).
- Recomenda-se que a vazão seja iniciada com uma taxa reduzida e, em seguida, aumentada gradualmente até a vazão operacional desejada.
- Sempre utilize reagentes de alta pureza e solventes de cromatografia de boa qualidade para preparar a fase móvel. Desgaseifique e filtre toda a fase móvel antes da utilização.
- A desmontagem de uma coluna prejudica seu desempenho.
- Um filtro em linha ou coluna de guarda podem ser usados para proteger a coluna e aumentar sua vida útil.
- Se a coluna for usada fora da faixa de pH recomendada para a fase da coluna (consulte a Tabela 2), o resultado será uma vida útil reduzida.

- As colunas não devem ser mantidas a temperatura ou pH elevados quando não estiverem em uso (consulte a Tabela 2).
- Novas colunas podem conter uma mistura de solventes orgânicos e água, que pode conter sais de tampão. Consulte a Tabela 3 para obter detalhes sobre os solventes de transporte. Em primeiro lugar, deve-se tomar cuidado para não passar pela coluna qualquer fase móvel que possa formar um precipitado ou que possa não ser totalmente miscível.
- As colunas Agilent BioHPLC e AdvanceBio são compatíveis com todos os eluentes comuns usados para análise de biomoléculas.

Tabela 2. Parâmetros operacionais da coluna – pH e temperatura.

Coluna	Faixa de pH recomendada	Temperatura operacional máxima
AdvanceBio Peptide Mapping	2,0 a 8,0	60 °C
AdvanceBio Peptide Plus		
AdvanceBio EC-C18		
ZORBAX RRHD	1,0 a 8,0	80 °C
ZORBAX 300SB-C8, C3, CN		
ZORBAX 300SB-C18	1,0 a 8,0	90 °C
AdvanceBio RP-mAb		
Poroshell 300		
Poroshell 300 Extend-C18	2,0 a 11,0	60 °C abaixo de pH 8, 40 °C acima de pH 8
AdvanceBio Oligonucleotide	3,0 a 11,0	65 °C
AdvanceBio Amino Acid Analysis		
PLRP-S	1,0 a 14,0	200 °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 >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.

Tabela 3. Solventes de transporte.

Coluna	Solvente de transporte	Compatibilidade
AdvanceBio Peptide Plus	100% de acetonitrila	Água e todos os solventes orgânicos comuns. Evite tetrahidrofurano (THF).
AdvanceBio Peptide Mapping	Mistura de acetonitrila e água	
AdvanceBio EC-C18		
ZORBAX RRHD		
ZORBAX 300SB		
AdvanceBio RP-mAb	Mistura de acetonitrila e água	Água e todos os solventes orgânicos, incluindo N,N-dimetilformamida e dimetilsulfóxido
Poroshell 300 e 300 Extend	Mistura de metanol e água	
AdvanceBio Oligonucleotide	Mistura de acetonitrila e água	Água e todos os solventes orgânicos comuns. Modificadores incluindo HFIP e TEAA
AdvanceBio Amino Acid Analysis		
PLRP-S	7:1 de acetonitrila/água	Solventes orgânicos aquosos, incluindo N,N- dimetilformamida e dimetilsulfóxido. 100% aquoso não é recomendado, pois reduzirá o desempenho e a vida útil da coluna

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 reduz o tempo de retenção da amostra.

Quando a temperatura máxima é usada por períodos prolongados, isso reduzirá a vida útil da coluna.

O uso de eluentes 100% aquosos com colunas PLRP-S reduzirá significativamente a vida útil da coluna e poderá resultar em uma rápida deterioração na largura e simetria do pico.

Gradientes iniciais recomendados

As separações de biomoléculas normalmente usam condições de gradiente, aumentando a quantidade do componente orgânico para obter a eluição na coluna. As separações de peptídeos, polipeptídeos e proteínas são mais comumente realizadas usando eluentes ácidos com ácido trifluoroacético (TFA) ou ácido fórmico (FA) usado como o modificador para controlar o pH e/ou como um aditivo de pareamento iônico para alcançar a retenção e seletividade desejadas. Produtos orgânicos, como acetonitrila, metanol e etanol, são usados para eluição, sendo a acetonitrila o mais comumente utilizado.

Informações adicionais sobre separações de peptídeos podem ser encontradas no capítulo 11, páginas 497–508, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, segunda edição. L.R. Snyder e J. J. Kirkland, (John Wiley & Sons, 1979).

Cuidados com a coluna

As colunas com tamanho de partícula de 1,8 μm têm uma frita de entrada de 0,5 μm . Os particulados irão bloquear as fritas de entrada da coluna e devem ser removidos antes da análise da amostra. Quando isso não for possível, um filtro em linha ou coluna de guarda deve ser usado para proteger a coluna analítica e aumentar a vida útil da coluna. A coluna AdvanceBio Peptide Mapping tem uma frita de entrada de 2 μm . As amostras que contêm material biológicos particulados maiores que 2 μm , irão obstruir a frita de entrada, portanto, é recomendado o uso de colunas de guarda com esse tipo de amostras. É melhor filtrar suas amostras antes de injetá-las em qualquer coluna. Você também deve verificar se todos os eluentes foram preparados e filtrados antes do uso.

Consulte **www.agilent.com/chem/guards** para obter mais informações sobre colunas de guarda.

Limpeza da coluna/Prolongamento da vida útil da coluna

Para colunas que podem ser submetidas a backflush (partículas $>1,8\ \mu\text{m}$), limpe a coluna de forma reversa. Comece 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 tampão (água/orgânico). Realize corridas com 10 a 20 volumes de coluna.
3. Depois, use o componente 100% orgânico (metanol ou acetonitrila).
4. Verifique a pressão para ver se ela voltou ao normal. Se não, então:
5. Descarte a coluna ou considere condições mais fortes, por exemplo, 75% de acetonitrila: 25% de 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, pois ele não é miscível com solução aquosa).

Ciclos de limpeza agressivos usando 80% de 1 M de NaOH ou 1 M de HCl com 20% de orgânico podem ser usados com as colunas PLRP-S.

Para colunas com partículas de $1,8\ \mu\text{m}$, não faça backflush da coluna. Você pode tentar o procedimento de limpeza conforme detalhado acima, mas mantenha a direção do fluxo.

Recomendações de armazenamento

Em geral, as colunas podem ser armazenadas de forma segura por períodos curtos na maioria das fases móveis. O armazenamento a longo prazo de colunas de fase ligada à base de sílica deve estar em um solvente orgânico puro. Se a coluna tiver sido usada anteriormente com uma fase móvel tamponada, o tampão deverá ser removido primeiro purgando a coluna com 20 a 30 volumes de uma mistura 50:50 de metanol ou acetonitrila e água, seguido de 20 a 30 volumes de coluna do solvente puro. Antes de armazenar, os adaptadores de extremidade devem ser bem fechados com plugues para evitar que o empacotamento seque.

Para proteger o equipamento, recomenda-se remover os sais do instrumento e da coluna, purgando a coluna com a mesma fase móvel sem o tampão (por exemplo, utilizando 60:40 de ACN/H₂O para remover uma fase móvel de 60:40 de ACN/0,02 M de tampão de fosfato). O reequilíbrio é rápido com a fase móvel original ao usar esta abordagem e qualquer possibilidade de corrosão devido aos sais é eliminado.

Dicas para os melhores resultados cromatográficos

- Otimize seu instrumento minimizando o comprimento dos tubos entre os componentes. Isso reduzirá o volume extracoluna e o alargamento 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 **www.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 (ZORBAX RRHD).
- Utilize filtração ou outras técnicas de preparo adequadas para sua amostra. Saiba mais em **www.agilent.com/chem/sampleprep**.
- Utilize lâmpadas certificadas em seus instrumentos de LC para obter o melhor desempenho.



Agilent AdvanceBio columns

For faster, more consistent biopharmaceutical analysis

Agilent AdvanceBio is a family of state-of-the-art biocolumns designed to deliver consistent, exceptional performance for the separation and characterization of peptides and proteins. The science behind AdvanceBio columns helps advance accuracy, provide greater productivity, and eliminate interferences that can impede progress. AdvanceBio columns are rigorously tested by Agilent to ensure great results and are backed by Agilent's 60-day full satisfaction warranty.



Find the right column for your separation

Try the LC Column and Sample Prep Navigator



Get started now at www.agilent.com/chem/navigator.

Agilent ordering information

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

For technical support or to place an order,
visit **www.agilent.com/chem/columnsupport**

To place an order,
visit **www.agilent.com/en-us/contact-us/wheretobuy**

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

To find parts and supplies to support high-performance
bioseparation, such as stainless steel-coated PEEK capillaries
for high-pressure bio-inertness and robustness, visit
www.agilent.com/chem/lcsupplies

To receive a copy of the Infinity Supplies catalog, and other
key resources, visit **www.agilent.com/chem/getguides**

DE.3423263889

This information is subject to change without notice.

Agilent Technologies, Inc. 2018, 2020

Printed in USA, August 25, 2020

820000-997