



Agilent BioHPLC and AdvanceBio Reversed-Phase Columns User Guide

Guide d'utilisation de colonnes pour les colonnes
BioHPLC et AdvanceBio d'Agilent

Agilent BioHPLC 和 AdvanceBio 色谱柱 用户指南

BenutzerINFORMATION zu Agilent BioHPLC-und
AdvanceBio-Säulen

Guida ALL'USO per colonne Agilent BioHPLC e
AdvanceBio

Guía de usuario para columnas Agilent BioHPLC y
AdvanceBio

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

Руководство пользователя для колонок
Agilent BioHPLC и AdvanceBio

Guia do usuário de colunas para colunas
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	1200 bar
ZORBAX RRHD	1.8 μm	
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 fournit des informations générales relatives aux colonnes en phase inverse BioHPLC et AdvanceBio d'Agilent. Pour obtenir des informations détaillées supplémentaires sur votre phase ou votre famille spécifique, consultez le site:

www.agilent.com/chem/biocolumnchoices.

Mise en service

Un rapport de performance de CQ des colonnes, notamment un chromatogramme test, est joint à chaque colonne Agilent. Le système de tests de CQ a été conçu à partir d'un instrument standard modifié afin de minimiser les volumes morts ; celui-ci peut donc varier du système utilisé dans votre laboratoire. Ceci permet une meilleure évaluation de l'efficacité de la colonne et garantit une meilleure cohérence du produit. Un système de CPL optimisé générera des résultats similaires au chromatogramme fourni dans votre rapport de performance de CQ.

Si vous avez des questions spécifiques, contactez l'équipe d'assistance technique sur: **www.agilent.com/chem/columnsupport**.

Utilisation de votre colonne

Installation

- La direction du flux est indiquée sur la colonne.
- Les colonnes de granulométrie de 1.8 μm (ZORBAX RRHD) peuvent uniquement être utilisées dans la direction du flux indiquée sur la colonne.
- Agilent recommande d'utiliser des raccords en polycétone (réf. 5042-8957) pour les colonnes allant jusqu'à 600 bars et des raccords amovibles pour 1200 bars (réf. 5067-4733) pour les colonnes qui seront utilisées à des pressions CLUHP.



Raccord en polycétone
d'Agilent, réf. 5042-8957



Raccord amovible pour 1200 bars
d'Agilent, réf. 5067-4733

Conditionnement des colonnes

Chaque colonne est testée avant expédition. Par conséquent, pour la première utilisation, le solvant d'expédition doit être remplacé par un éluant, en veillant à ce que l'ensemble des composants soient miscibles et solubles. Si des additifs pour phase mobile sont utilisés (tels que des tampons ou des agents d'appariement d'ions), il est conseillé d'effectuer un rinçage intermédiaire avec une phase mobile de composition appropriée, mais exempte de ces additifs. Un rinçage avec 10 à 20 volumes de colonne devrait favoriser la transition vers votre phase mobile. Des précautions doivent être prises afin de s'assurer que la colonne a été correctement équilibrée avant utilisation. Ceci garantira la reproductibilité et préviendra la dérive des temps de rétention.

Mesures de sécurité importantes

- Tous les points de connexion dans les systèmes de chromatographie liquide représentent des sources de fuite potentielles. Les utilisateurs doivent avoir connaissance de la toxicité ou de l'inflammabilité de leurs phases mobiles.
- En raison de la petite taille des particules, les matériaux de remplissage secs des colonnes sont respirables. Agilent déconseille de retirer les raccords de colonne et d'exposer le support. Les colonnes doivent être ouvertes uniquement par un personnel formé dans une zone correctement ventilée.
- Veuillez respecter les limites de pression de fonctionnement notées pour chaque colonne (voir Tableau 1). Dépasser ces limites compromettra les performances chromatographiques et la durée de vie de la colonne, et pourrait s'avérer dangereux.

Autres conseils de fonctionnement

- Bien que généralement non dangereux pour la colonne, l'inversion de flux doit être évitée, 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 haute pureté et des solvants de qualité chromatographique pour préparer votre phase mobile. Dégazez et filtrez l'ensemble de la phase mobile avant utilisation.
- Désassembler une colonne dégradera ses performances.
- 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).
- Il est possible que les colonnes neuves renferment un mélange de solvants organiques et d'eau pouvant contenir des sels tampon. Voir Tableau 3 pour connaître les particularités des solvants d'expédition. Des précautions doivent être prises dès le départ afin qu'aucune phase mobile, risquant de provoquer la formation d'un précipité ou de ne pas être entièrement miscible, ne traverse la colonne.
- Les colonnes BioHPLC et AdvanceBio d'Agilent sont compatibles avec l'ensemble des éluants couramment utilisés pour l'analyse de biomolécules.

Tableau 1. Paramètres de fonctionnement maximaux – colonnes jusqu'à 4.6 mm.

Colonne	Taille des particules	Limite de pression
AdvanceBio Peptide Mapping	2.7 µm	600 bar
AdvanceBio Peptide Plus		
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

Tableau 2. Paramètres de fonctionnement des colonnes – pH et température.

Colonne	Gamme de pH recommandée	Température de fonctionnement maximale
AdvanceBio Peptide Mapping	2.0–8.0	60 °C
AdvanceBio Peptide Plus		
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	60 °C en-dessous de pH 8, 40 °C au-dessus de pH 8
AdvanceBio Oligonucleotide	3.0–11.0	65 °C
AdvanceBio Amino Acid Analysis		
PLRP-S	1.0–14.0	200 °C

Remarque : l'ensemble des remplissages à base de silice possède une certaine solubilité dans les phases mobiles aqueuses de pH >6. Lorsque des colonnes à base de silice sont utilisées à pH >6, la durée de vie optimale d'une colonne est obtenue à des températures plus basses (40 °C max.) en utilisant des concentrations de solutions tampons faibles comprises dans la gamme de 0.01 à 0.02 M.

Tableau 3. Solvants d'expédition.

Colonne	Solvant d'expédition	Compatibilité
AdvanceBio Peptide Mapping	Mélange d'acétonitrile et d'eau	Eau et tous les solvants organiques courants.
AdvanceBio Peptide Plus		
ZORBAX RRHD		
ZORBAX 300SB		
AdvanceBio RP-mAb	Mélange d'acétonitrile et d'eau	Eau et tous les solvants organiques courants, notamment le N,N-diméthylformamide et le diméthylsulfoxyde.
Poroshell 300 et 300 Extend	Mélange de méthanol et d'eau	
AdvanceBio Oligonucleotide	Mélange d'acétonitrile et d'eau	Eau et autres solvants organiques classiques. Adjuvants incluant le HFIP et la TEAA.
AdvanceBio Amino Acid Analysis		
PLRP-S	7:1 acétonitrile/eau	Solvants organiques aqueux, notamment le N,N-diméthylformamide et le diméthylsulfoxyde. L'utilisation d'un solvant 100 % aqueux n'est pas recommandée car les performances et la durée de vie de la colonne s'en trouveront réduites.

Sélection de la phase mobile et températures de fonctionnement

La phase stationnaire greffée est non polaire par nature et la plus efficace avec des phases mobiles polaires, telles que les mélanges méthanol/eau ou acétonitrile/eau. Augmenter la quantité du composant organique réduit le temps de rétention de l'échantillon.

Une utilisation de la température maximale pour des périodes prolongées réduira la durée de vie de la colonne.

Utiliser des éluants 100 % aqueux avec des colonnes PLRP-S réduira significativement la durée de vie de la colonne et pourra entraîner une détérioration rapide de la largeur et de la symétrie des pics.

Gradients de base recommandés

Les séparations de molécules biologiques utilisent généralement des conditions de gradient, augmenter la quantité du composant organique permet d'obtenir une élution de la colonne. Les séparations de peptides, de polypeptides et de protéines, sont le plus souvent effectuées à l'aide d'éluants acides, contenant de l'acide trifluoroacétique (TFA) ou de l'acide formique (FA), utilisés comme modificateurs pour le contrôle du pH et/ou comme additifs d'appariement d'ions afin d'obtenir le temps de rétention et la sélectivité souhaités. Les solvants organiques, tels que l'acétonitrile, le méthanol et l'éthanol, sont utilisés pour l'élution, l'acétonitrile étant le plus fréquemment utilisé.

Des informations supplémentaires sur les séparations de peptides peuvent être consultées au chapitre 11, pages 497-508, du livre « Introduction to Modern Liquid Chromatography », deuxième édition. L. R. Snyder et J. J. Kirkland, (John Wiley & Sons, 1979).

Entretien des colonnes

Les colonnes présentant une granulométrie de 1.8 μm possèdent un fritté d'entrée de 0.5 μm . Les particules boucheront les frittés d'entrée des colonnes et doivent être retirées avant d'analyser l'échantillon. Lorsque cela n'est pas possible, un filtre en ligne ou une colonne de garde doivent être utilisés pour protéger et prolonger la durée de vie de la colonne analytique. La colonne AdvanceBio Peptide Mapping possède un fritté d'entrée de 2 μm . Les échantillons contenant des bioparticules supérieures à 2 μm obstrueront le fritté d'entrée. Avec de tels échantillons, l'utilisation de colonnes de garde est recommandée. Il est conseillé de filtrer les échantillons avant de les injecter sur une colonne quelle qu'elle soit et d'utiliser des éluants fraîchement préparés et filtrés.

Consultez le site www.agilent.com/chem/guards pour plus d'informations sur les colonnes de garde.

Nettoyer votre colonne/Prolonger la durée de vie de la colonne

Pour les colonnes pouvant être rétrobalayées (particules $>1.8 \mu\text{m}$), nettoyez la colonne dans la direction inverse. Démarrez avec un solvant plus fort (moins polaire).

1. Déconnectez la colonne du détecteur et faites passer des solvants de rinçage dans un bécher.
2. Démarrez avec votre phase mobile sans sels tampon (eau/solvant organique). Faites passer 10 à 20 volumes de colonne.
3. Ensuite, utilisez un solvant 100% organique (méthanolou acétonitrile).
4. Vérifiez que la pression est revenue à un niveau normal ; sinon, alors :
5. Mettez la colonne au rebut ou envisagez des conditions plus fortes, par ex. 75% acétonitrile:25% isopropanol.

6. Augmentez jusqu'à 100% d'isopropanol, 100% de chlorure de méthylène ou 100% d'hexane (si vous utilisez du chlorure de méthylène ou de l'hexane, vous devrez rincer la colonne avec de l'isopropanol avant utilisation et avant de revenir à votre phase mobile car ces solvants ne sont pas miscibles à l'eau).

Des cycles de nettoyage agressifs employant 80% de NaOH 1 M ou de HCl 1 M avec 20% de solvant organique peuvent être utilisés avec les colonnes PLRP-S.

Ne pas rétrobalayer les colonnes possédant une granulométrie de 1.8 μm , vous pouvez essayer d'appliquer la procédure de nettoyage décrite ci-dessus mais maintenez la direction du flux.

Recommandations pour le stockage

En général, il est possible de stocker les colonnes en toute sécurité pour de courtes périodes dans la plupart des phases mobiles. Pour un stockage à long terme, les colonnes à phase greffée, à base de silice, doivent être placées dans un solvant organique pur. Si la colonne a été préalablement utilisée avec une phase mobile tamponnée, le tampon doit d'abord être éliminé en purgeant la colonne avec 20 à 30 volumes de colonne d'un mélange 50:50 de méthanol ou d'acétonitrile et d'eau, suivis de 20 à 30 volumes de colonne du solvant pur. Préalablement au stockage, les raccords doivent être soigneusement obturés par des bouchons afin d'empêcher l'assèchement du remplissage.

Pour protéger l'équipement, il est conseillé d'éliminer les sels de l'instrument et de la colonne en purgeant la colonne avec la même phase mobile exempte de tampon (par ex. en utilisant un mélange 60:40 ACN/H₂O pour éliminer une phase mobile tamponnée avec un mélange 60:40 ACN/phosphate 0.02 M). Lorsque cette approche est utilisée, le rééquilibrage avec la phase mobile d'origine est rapide et tout risque de corrosion due aux sels est éliminé.

Conseils pour obtenir des résultats chromatographiques optimaux

- Optimisez votre instrument en minimisant les longueurs des connexions entre les composants afin de réduire le volume extra colonne ainsi que l'élargissement des bandes. Utilisez des capillaires rouges de d.i. 0.12 mm pour les colonnes de CPL rapide/haute efficacité. Pour en savoir plus sur les différents capillaires, consultez le site www.agilent.com/chem/lccapillaries.
- Assurez-vous que la fréquence de collecte des données est optimisée pour votre colonne. Utilisez une fréquence de collecte plus élevée pour les colonnes de CPL rapide (ZORBAX RRHD).
- Utilisez la filtration ou d'autres techniques de préparation d'échantillons, selon le cas, pour votre échantillon. Pour en savoir plus, consultez le site www.agilent.com/chem/sampleprep.
- Utilisez des lampes certifiées dans vos instruments de CPL pour bénéficier de performances optimales.



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 RRHD) 只能按照色谱柱上标明的液流方向使用
- 安捷伦推荐对在 600 bar 以下压力条件下操作的色谱柱使用聚酮接头 (部件号 5042-8957), 对在 UHPLC 压力条件下操作的色谱柱推荐使用 1200 bar 可拆卸接头 (部件号 5067-4733)



聚酮接头,
部件号 5042-8957



Agilent 1200 bar 可拆卸接头, 部件
号 5067-4733

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。

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

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 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 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

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		
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 Mapping	乙腈和水的混合物	水和所有常用有机溶剂。
AdvanceBio Peptide Plus		
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砷。
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砷。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

一般情况下, 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。

储存建议 (待续)

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/ H_2O 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



Dieser Leitfaden enthält allgemeine Informationen zu den Agilent BioHPLC- und AdvanceBio-Säulen für die Umkehrphasen-Chromatographie. Weiterführende Informationen zu bestimmten Phasen oder Produktfamilien finden Sie unter:

www.agilent.com/chem/biocolumnchoices.

Erste Schritte

Jeder Agilent Säule ist ein QC-Leistungsprotokoll mit Testchromatogramm beigelegt. Das für die QC-Tests 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 gleichbleibende Produktqualität. Mit einem optimierten LC-System erzielen Sie vergleichbare Ergebnisse wie im Chromatogramm des QC-Leistungsprotokolls.

Wenn Sie spezifische Fragen haben, wenden Sie sich bitte an das technische Supportteam von Agilent unter **www.agilent.com/chem/columnsupport**.

Verwendung der Säule

Installation

- Die Flussrichtung ist auf der Säule angegeben.
- 1.8- μm -Säulen (ZORBAX RRHD) können nur in der Flussrichtung betrieben werden, die auf der Säule angegeben ist.
- Agilent empfiehlt Polyketon-Fittings (Best.-Nr. 5042-8957) für Säulen bis zu 600 bar und abnehmbare 1200-bar-Fittings (Best.-Nr. 5067-4733) für Säulen, die bei UHPLC-Drücken betrieben werden.



Polyketon-Fitting,
Best.-Nr. 5042-8957



Abnehmbarer 1200-bar-Fitting von
Agilent, Best.-Nr. 5067-4733

Säulenconditionierung

Jede Säule wird vor dem Versand geprüft. Daher muss das Transportlösungsmittel vor dem ersten Einsatz durch Ihren Eluenten ersetzt werden. Achten Sie darauf, dass alle Komponenten mischbar und löslich sind. Wenn in der mobilen Phase Additive verwendet werden (z. B. Puffer oder Ionenpaarreagenzien), ist es ratsam, eine Zwischenspülung mit der mobilen Phase in der richtigen Zusammensetzung, jedoch ohne diese Zusätze, vorzunehmen. Eine Spülung der Säule mit dem 10- bis 20-fachen Säulenvolumen sollte für den Übergang zu Ihrer mobilen Phase ausreichen. Es muss sichergestellt sein, dass die Säule vor dem Gebrauch richtig äquilibriert wurde. Dadurch wird die Reproduzierbarkeit sichergestellt und eine Retentionszeitverschiebung vermieden.

Wichtige Sicherheitshinweise

- An allen Verbindungsstellen in Flüssigkeitschromatographie- Systemen können Leckagen auftreten. Der Benutzer muss daher hinsichtlich der Toxizität und Brennbarkeit der eingesetzten mobilen Phasen geeignete Sicherheitsvorkehrungen treffen.
- Aufgrund der geringen Partikelgröße bildet trockenes Packungsmaterial der Säulen einatembare Stäube. Agilent empfiehlt daher, die Endfittings nicht zu entfernen, damit das Packungsmaterial nicht freigesetzt werden kann. Die Säulen dürfen nur von geschultem Personal unter einem Abzug geöffnet werden.
- Der für die einzelnen Säulen angegebene maximale Betriebsdruck muss unbedingt eingehalten werden (siehe Tabelle 1). Ein Überschreiten dieser Grenzwerte beeinträchtigt die Chromatographieleistung und Lebensdauer der Säule und kann gefährlich sein.

Weitere Tipps zur Bedienung

- In der Regel schadet das Rückspülen der Säule zwar nicht, es sollte aber dennoch vermieden werden, es sei denn, die Fritte ist verstopft und muss gereinigt werden (siehe „Pflege der Säulen“).
- Es wird empfohlen, mit einer geringeren Flussrate zu beginnen und diese dann allmählich auf die gewünschte Flussrate zu steigern.
- Verwenden Sie für die Herstellung der mobilen Phase stets hochreine Reagenzien und Chromatographie-Lösungsmittel. Entgasen und filtern Sie die mobile Phase vor dem Gebrauch.
- Das Zerlegen einer Säule verschlechtert ihre Leistung.
- Mit einem In-Line-Filter oder einer Vorsäule können Sie Ihre Säule schützen und die Lebensdauer erhöhen.
- Wenn die Säule mit einer mobilen Phase außerhalb des empfohlenen pH-Bereichs betrieben wird (siehe Tabelle 2), verkürzt sich ihre Lebensdauer.

- Säulen, die nicht in Gebrauch sind, sollten nicht bei erhöhtem pH-Wert oder erhöhter Temperatur aufbewahrt werden (siehe Tabelle 2).
- Neue Säulen können eine Mischung aus organischen Lösungsmitteln und Wasser enthalten, in der Puffersalze gelöst sind. Einzelheiten zu den Transportlösungsmitteln finden Sie in Tabelle 3. Achten Sie zunächst darauf, dass die Säule nicht mit einer mobilen Phase beschickt wird, die Ausfällungen bewirkt oder nicht vollständig mischbar ist.
- Agilent BioHPLC- und AdvanceBio-Säulen sind mit allen gängigen Eluenten kompatibel, die für die Analyse von Biomolekülen geeignet sind.

Tabelle 1: Maximale Betriebsparameter – Säulen bis 4.6 mm.

Säule	Partikelgröße	Maximaler Druck
AdvanceBio Peptide Mapping	2.7 µm	600 bar
AdvanceBio Peptide Plus		
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

Tabelle 2: Säulen-Betriebsparameter – pH-Wert und Temperatur.

Säule	Empfohlener pH-Bereich	Maximale Betriebstemperatur
AdvanceBio Peptide Mapping	2.0 to 8.0	60 °C
AdvanceBio Peptide Plus		
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 unter pH 8, 40 °C über pH 8
AdvanceBio Oligonucleotide	3.0 to 11.0	65 °C
AdvanceBio Amino Acid Analysis		
PLRP-S	1.0 to 14.0	200 °C

Hinweis: Alle auf Kieselgel basierenden Packungen weisen eine gewisse Löslichkeit in wässrigen mobilen Phasen mit einem pH-Wert über 6 auf. Wenn Sie Kieselgel-basierte 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: Transportlösungsmittel.

Säule	Transportlösungsmittel	Kompatibilität
AdvanceBio Peptide Mapping	Mischung aus Acetonitril und Wasser	Wasser und alle gebräuchlichen organischen Lösungsmittel
AdvanceBio Peptide Plus		
ZORBAX RRHD		
ZORBAX 300SB		
AdvanceBio RP-mAb	Mischung aus Acetonitril und Wasser	Wasser und alle organischen Lösungsmittel 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 gebräuchlichen organischen Lösungsmittel. Modifikatoren beinhalten 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 Phasen werden nicht empfohlen, da sie die Leistung und Lebensdauer der Säule reduzieren.

Auswahl der mobilen Phase und Betriebstemperaturen

Gebundene stationäre Phasen sind unpolar und sind am besten in Kombination mit polaren mobilen Phasen wie z. B. Methanol/Wasser- oder Acetonitril/Wasser-Mischungen zu verwenden. Eine Erhöhung des organischen Anteils verkürzt die Retentionszeit der Probe.

Wenn Sie die Säule längere Zeit bei maximaler Temperatur einsetzen, verkürzt sich ihre Lebensdauer.

Die Verwendung von rein wässrigen Eluenten in PLRP-S-Säulen führt zu einer deutlichen Verkürzung der Lebensdauer und kann eine schnelle Verschlechterung der Peakbreite und -symmetrie bewirken.

Empfohlene Anfangsgradienten

Die Trennung von biologischen Molekülen erfolgt in der Regel mithilfe von Gradientenelution: Der Anteil der organischen Komponente wird dabei allmählich erhöht, um die Elution von der Säule zu erreichen. Trennungen von Peptiden, Polypeptiden und Proteinen werden meistens unter Verwendung saurer Eluenten mit Trifluor essigsäure (TFA) oder Ameisensäure (FA) als Modifizierungsmittel zur pH-Steuerung und/oder als Ionenpaar-Additiv durchgeführt, um die gewünschte Retention und Selektivität zu erzielen. Für die Elution werden organische Lösungsmittel wie Acetonitril, Methanol und Ethanol verwendet, am häufigsten Acetonitril.

Weiterführende Informationen über die Peptidtrennung finden Sie in Kapitel 11, S. 497 bis 508 des Buches „Introduction to Modern Liquid Chromatography, Second Edition“ von L.R. Snyder und J. J. Kirkland, (John Wiley & Sons, 1979).

Pflege der Säulen

Säulen mit einer Partikelgröße von 1.8 μm verfügen über eine 0.5- μm -Einlassfritte. Da Partikel die Säuleneinlassfritten blockieren, sollten sie vor der Analyse aus der Probe entfernt werden. Wenn dies nicht möglich ist, sollte zum Schutz der Säule und zur Erhöhung ihrer Lebensdauer ein In-Line-Filter oder eine Vorsäule verwendet werden. Die AdvanceBio

Peptide Mapping-Säule hat eine 2- μm -Einlassfritte. Proben, die Biopartikel mit einer Größe über 2 μm enthalten, verstopfen die Einlassfritte. Bei solchen Proben wird der Einsatz von Vorsäulen empfohlen. Für alle Säulen wird empfohlen, die Proben vor dem Injizieren zu filtern, alle Eluenten frisch anzusetzen und vor dem Gebrauch zu filtrieren.

Weiterführende Informationen über Vorsäulen finden Sie unter www.agilent.com/chem/guards.

Säule reinigen und Lebensdauer verlängern

Rückspülbare Säulen (Partikel > 1.8 μm) werden in umgekehrter Richtung gereinigt. Beginnen Sie mit einem stärkeren (weniger polaren) Lösungsmittel.

1. Trennen Sie die Säule vom Detektor und lassen Sie das Waschlösungsmittel in ein Becherglas laufen.
2. Beginnen Sie die Spülung mit Ihrer mobilen Phase ohne Puffersalze (Wasser/organisches Lösungsmittel). Lassen Sie das 10- bis 20-fache Säulenvolumen durchlaufen.
3. Als Nächstes verwenden Sie rein organisches Lösungsmittel (Methanol oder Acetonitril).
4. Prüfen Sie, ob sich der Druck wieder normalisiert hat. Wenn nicht, dann:
5. Verwerfen Sie die Säule, oder wählen Sie eine wirksamere Lösungsmittelmischung, 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 dem Gebrauch und vor dem Übergang zu Ihrer mobilen Phase mit Isopropanol spülen, da diese Lösungsmittel nicht mit wässrigen Lösungen mischbar sind).

Bei PLRP-S-Säulen können Sie auch aggressive Reinigungszyklen mit 80% 1 M NaOH oder 1 M HCl und 20 % organischem Lösungsmittel durchführen.

Bei Säulen mit 1.8- μm -Partikeln dürfen Sie keine Rückspülung durchführen. Führen Sie die Reinigung nach dem oben beschriebenen Verfahren durch, aber in Fließrichtung.

Empfehlungen zur Aufbewahrung

Im Allgemeinen können Säulen in den meisten mobilen Phasen für kurze Zeit sicher aufbewahrt werden. Bei der Langzeitlagerung von Säulen mit Kieselgel-basierten, gebundenen Phasen sollten diese mit rein organischem Lösungsmittel befüllt werden. Wenn die Säule zuvor mit einer gepufferten mobilen Phase verwendet wurde, muss das Puffersalz 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 Lösungsmittel nachgespült. Vor der Lagerung müssen die Endfittings fest mit Endstopfen verschlossen werden, um die Säulenpackung vor dem Austrocknen zu schützen.

Empfehlungen zur Aufbewahrung (Fortsetzung)

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 Acetonitril/Wasser 60:40, um eine gepufferte mobile Phase mit 60:40 Acetonitril/0,02 M Phosphatpufferlösung zu entfernen). Nach diesem Verfahren ist eine schnelle Re-Äquibrierung mit der ursprünglichen mobilen Phase möglich, und die Korrosionsgefahr durch Salze wird eliminiert.

Tipps für optimale Chromatographieergebnisse

- Optimieren Sie Ihr Chromatographiesystem durch Minimierung der Kapillarlängen zwischen den Komponenten. Dadurch verringern Sie das Totvolumen und die Bandenverbreiterung. Verwenden Sie für Fast LC/High Efficiency LC-Säulen rote Kapillaren (0.12 mm Innendurchmesser). Weitere Informationen zu unseren Kapillaren unter www.agilent.com/chem/lccapillaries.
- Optimieren Sie die Datenerfassungsrate für Ihre Säule. Verwenden Sie für Fast LC-Säulen (ZORBAX RRHD) eine höhere Erfassungsrate.
- Führen Sie eine Probenfiltration oder eine andere geeignete Methode der Probenaufbereitung durch. Weitere Informationen unter www.agilent.com/chem/sampleprep.
- Verwenden Sie nur zertifizierte Lampen in Ihren LC-Geräten, um eine optimale Leistung sicherzustellen.



Questo opuscolo fornisce informazioni generali sulle colonne a fase inversa BioHPLC e AdvanceBio Agilent. Per altre informazioni dettagliate su questa fase specifica o famiglia di prodotti, vedi: **www.agilent.com/chem/biocolumnchoices**.

Introduzione

A ogni nuova colonna Agilent è allegato un report QC sulle prestazioni della colonna, che include un cromatogramma di prova. Il sistema di prova QC è stato modificato partendo da una configurazione standard, al fine di ridurre al minimo il volume morto pertanto può differire dal sistema utilizzato nel tuo laboratorio. Ciò consente una migliore valutazione dell'efficienza della colonna e assicura una maggiore affidabilità del prodotto. L'ottimizzazione del sistema LC porta a risultati simili a quelli del cromatogramma incluso nel report sulle prestazioni QC.

Per domande specifiche, contatta il team di supporto tecnico alla pagina **www.agilent.com/chem/columnsupport**.

Utilizzo della tua colonna

Installazione

- La direzione del flusso è indicata sulla colonna.
- Le colonne da 1.8 μm (ZORBAX RRHD) possono essere utilizzate solo nella direzione di flusso indicata sulla colonna.
- Agilent raccomanda di utilizzare raccordi in PEEK (cod. 5042-8957) per colonne fino a 600 bar e raccordi rimovibili 1200 bar (cod. 5067-4733) per colonne che saranno utilizzate a pressioni UHPLC.



Raccordi in PEEK
cod. 5042-8957



Raccordo rimovibile Agilent,
1200 bar, cod. 5067-4733

Condizionamento della colonna

Prima del trasporto, ogni colonna viene sottoposta a test. Quindi, per il primo utilizzo, il solvente di trasporto deve essere sostituito con eluente, avendo cura che tutti i componenti siano miscibili e solubili tra loro. Se sono utilizzati additivi per fase mobile (come tamponi o reagenti per coppia ionica), è consigliabile procedere a un lavaggio intermedio con una fase mobile della composizione corretta, ma senza questi reagenti. Il lavaggio con 10–20 volumi colonna dovrebbe consentire il passaggio alla fase mobile desiderata. Prima di utilizzare la colonna, accertarsi che sia stata equilibrata correttamente. Ciò garantirà la riproducibilità e aiuterà a prevenire la deriva del tempo di ritenzione.

Importanti considerazioni sulla sicurezza

- Tutte le connessioni nei sistemi per cromatografia liquida sono potenziali fonti di perdite. Gli utenti devono tenere conto della tossicità o infiammabilità delle fasi mobili utilizzate.
- Poiché le particelle sono di piccole dimensioni, il materiale di impaccamento delle colonne può essere inavvertitamente inalato. Agilent sconsiglia di smontare i raccordi terminali della colonna e di esporre all'aria il mezzo. Le colonne devono essere aperte solo da personale addestrato in zona ben aerata.
- Si raccomanda di rispettare i limiti di pressione operativa riportati per ogni colonna (vedi Tabella 1). Superare questi limiti influisce sulle prestazioni cromatografiche e sulla durata della colonna e inoltre potrebbe essere pericoloso.

Altri consigli operativi

- Anche se il flusso inverso generalmente non è dannoso per la colonna, dovrebbe tuttavia essere evitato, se non nel tentativo di rimuovere del particolato da un frit ostruito (vedi "manutenzione colonna").
- Si raccomanda di avviare il flusso a una portata ridotta e quindi aumentarlo lentamente fino alla portata operativa desiderata.
- 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.
- Smontando la colonna si riducono le prestazioni della colonna stessa.
- Per proteggere la colonna e aumentarne la durata operativa, si può utilizzare un filtro in linea o una precolonna.
- Un utilizzo della colonna all'esterno degli intervalli di pH raccomandati per quella colonna (vedi Tabella 2) ridurrà la sua durata operativa.

- Le colonne non devono essere tenute a pH o temperatura elevata se non sono utilizzate (vedi Tabella 2).
- Le nuove colonne possono contenere una miscela di solventi organici e acqua, con l'eventuale presenza di sali tampone. Vedi Tabella 3 per i dettagli sui solventi di trasporto. Inizialmente, prestare attenzione all'uso di fasi mobili adeguate per evitare la formazione di un precipitato oppure potrebbero non essere completamente miscibili tra loro.
- Le colonne BioHPLC e AdvanceBio Agilent sono compatibili con tutti i comuni eluenti utilizzati per l'analisi delle biomolecole.

Tabella 1. Max. parametri operativi – colonne fino a 4.6 mm.

Colonna	Dimensione particelle	Limite di pressione
AdvanceBio Peptide Mapping	2.7 μm	600 bar
AdvanceBio Peptide Plus		
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

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

Colonna	Intervallo di pH consigliato	Massima temperatura operativa
AdvanceBio Peptide Mapping	2.0–8.0	60 °C
AdvanceBio Peptide Plus		
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	60 °C, pH inf. a 8, 40 °C, pH sup. a 8
AdvanceBio Oligonucleotide	3.0–11.0	65 °C
AdvanceBio Amino Acid Analysis		
PLRP-S	1.0–14.0	200 °C

Nota: Tutti gli impaccamenti a base di silice hanno una certa solubilità nelle fasi mobili acquose con pH >6. Quando si utilizzano colonne a base di silice con un pH >6, per ottimizzare la durata della colonna sono necessarie temperature più basse (40 °C max.) e basse concentrazioni tampone, con un intervallo da 0.01 a 0.02 M.

Tabella 3. Solventi di trasporto.

Colonna	Solvente di trasporto	Compatibilità
AdvanceBio Peptide Mapping	Miscela di acetonitrile e acqua	Acqua e tutti i comuni solventi organici.
AdvanceBio Peptide Plus		
ZORBAX RRHD		
ZORBAX 300SB		
AdvanceBio RP-mAb	Miscela di acetonitrile e acqua	Acqua e tutti i solventi organici, inclusa la N,N-dimetilformammide e il dimetilsolfossido.
Poroshell 300 e 300 Extend	Miscela di methanol e acqua	
AdvanceBio Oligonucleotide	Miscela di acetonitrile e acqua	Acqua e tutti i comuni solventi organici. Modificatori organici inclusi l'HFIP e il TEAA.
AdvanceBio Amino Acid Analysis		
PLRP-S	Acqua/acetonitrile 7:1	Acqua e tutti i solventi organici, inclusa la N,N-dimetilformammide e il dimetilsolfossido. Un solvente acquoso al 100% non è raccomandato, poiché riduce le prestazioni della colonna e la sua durata.

Selezione della fase mobile e temperature operative

La fase stazionaria legata è per sua natura "non polare" ed è utilizzata al meglio con fasi mobili polari, come miscele metanolo/acqua o acetonitrile/acqua. Aumentare la quantità di componente organico riduce il tempo di ritenzione del campione.

In caso di utilizzo a temperature massime per periodi prolungati, la durata della colonna sarà ridotta.

Impiegando eluenti acquosi al 100% con colonne PLRP-S, la durata operativa della colonna sarà drasticamente ridotta, il che può causare un rapido degrado dell'ampiezza e della simmetria del picco.

Gradienti di avvio raccomandati

Per la separazione di molecole biologiche sono generalmente usate condizioni di gradiente: aumentare la quantità di componente organico per ottenere eluizione dalla colonna. Le separazioni di peptidi, polipeptidi e proteine sono quelle più comunemente eseguite utilizzando eluenti acidi con acido trifluoroacetico (TFA) o acido formico (FA), impiegati come modificatori per il controllo del pH e/o come additivo in coppia ionica per ottenere la ritenzione e la selettività desiderate. Per l'eluizione sono impiegati composti organici, come acetonitrile, metanolo e etanolo. L'acetonitrile è il solvente di uso più comune.

Ulteriori informazioni sulle separazioni dei peptidi si possono trovare al capitolo 11, pagine 497-508, del libro *Introduction to Modern Liquid Chromatography, Second Edition*. L.R. Snyder e J. J. Kirkland, (John Wiley & Sons, 1979).

Manutenzione della colonna

Colonne con particelle della dimensione di 1.8 μm hanno un frit di ingresso di 0.5 μm . Il particolato blocca i frit di ingresso della colonna e deve essere eliminato prima di procedere all'analisi del campione. Se ciò non è possibile, si consiglia di utilizzare un filtro in linea o una precolonna per proteggere la colonna analitica e aumentarne la durata operativa. La colonna per mappatura di peptidi AdvanceBio dispone di un frit di ingresso da 2 μm . Campioni contenenti del bio-particolato, con dimensioni maggiori di 2 μm , ostruiranno il frit di ingresso. Con tali campioni, si raccomanda l'impiego di precolonne. Si raccomanda inoltre di filtrare i campioni, prima di iniettarli nella colonna e verificare che tutti gli eluenti siano preparati di fresco e filtrati prima dell'utilizzo.

Per ulteriori informazioni sulle precolonne vai alla pagina www.agilent.com/chem/guards.

Pulizia della colonna/estensione della durata della colonna

Per colonne che possono essere sottoposte a backflush (particelle >1.8 μm), pulire la colonna in direzione inversa. Iniziare con un solvente più forte (meno polare).

1. Scollegare la colonna dal rivelatore e versare i solventi di lavaggio in un beaker.
2. Avviare con la fase mobile senza sali tampone (acqua/solvente organico). Usare da 10 a 20 volumi colonna.
3. Poi, utilizzare un solvente organico al 100% (metanolo o acetonitrile).
4. Verificare la pressione per vedere se è ritornata a condizioni normali; in caso contrario:
5. Eliminare la colonna oppure considerare condizioni più estreme, per es. 75% acetonitrile:25% isopropanolo.

6. Aumentare le concentrazioni: 100% isopropanolo, 100% cloruro di metilene oppure 100% esano (se si usa il cloruro di metilene o l'esano, sarà necessario lavare la colonna con isopropanolo prima di utilizzarla e prima di tornare alla fase mobile contenente acqua, poiché non è miscibile con campioni acquosi).

Con le colonne PLRP-S, possono essere utilizzati cicli di pulizia aggressivi con NaOH 1 M oppure HCl 1 M all'80% con solventi organici al 20%.

Nel caso di colonne con particelle di 1.8 μm , non procedere al backflush della colonna; si può tentare la procedura di purificazione come precedentemente illustrato in dettaglio, ma mantenendo la direzione del flusso.

Raccomandazioni di conservazione

In generale, 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 dello stoccaggio, i raccordi terminali devono essere chiusi ermeticamente con tappi terminali per evitare che l'impaccamento si asciughi e di 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 (es. usando una soluzione ACN/H₂O 60:40 per eliminare una fase mobile tampone fosfato ACN/0.02 M 60:40). Quando si usa questo approccio, la nuova equilibratura è rapida con la fase mobile originale e viene eliminata qualsiasi possibilità di corrosione causata dai sali.

Consigli per avere i migliori risultati cromatografici

- Ottimizza la tua strumentazione riducendo al minimo la lunghezza dei tubi tra i componenti del sistema per ridurre il volume extra colonna e l'estensione di banda. Utilizza tubi rossi da 0.12 mm d.i. per colonne ad alta efficienza/ Fast LC. Per saperne di più sulle opzioni dei capillari vai alla pagina **www.agilent.com/chem/lccapillaries**.
- Verifica che la velocità di acquisizione dei dati sia ottimizzata per la tua colonna. Utilizza una velocità di acquisizione più elevata per le colonne Fast LC (ZORBAX RRHD).
- Impiega la filtrazione del campione o altre preparazioni, secondo necessità, per il campione considerato. Per saperne di più, visita la pagina del sito: **www.agilent.com/chem/sampleprep**.
- Utilizza lampade certificate sugli strumenti LC per avere migliori prestazioni.



Esta guía ofrece información general de las columnas de fase reversa Agilent BioHPLC y AdvanceBio. Si desea obtener más información acerca de su fase o una familia determinadas, consulte: **www.agilent.com/chem/biocolumnchoices**.

Introducción

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 eficacia de la columna y se garantiza un producto más coherente. Un sistema LC optimizado generará resultados similares al cromatograma de su informe de rendimiento de QC.

Si tiene alguna pregunta concreta, póngase en contacto con el equipo de asistencia técnica mediante **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 RRHD) solamente pueden funcionar en la dirección del flujo marcada en la columna.
- Agilent recomienda el uso de conexiones de policetona (ref. 5042-8957) en el caso de las columnas de hasta 600 bar y de conexiones extraíbles de 1200 bar (ref. 5067-4733) en el caso de las columnas que funcionarán a presiones UHPLC.



Conexión de policetona,
ref. 5042-8957



Conexión extraíble Agilent de
1200 bar, ref. 5067-4733

Acondicionamiento de la columna

Todas las columnas se prueban antes de su envío. Por lo tanto, para el primer uso, se debe reemplazar el disolvente de transporte con el eluyente, para lo que es necesario tener en cuenta que todos los componentes son miscibles y solubles. Si se usan aditivos de fase móvil, como soluciones tampón o reactivos de par iónico, se aconseja efectuar un lavado intermedio con una fase móvil de la composición correcta, pero sin dichas adiciones. Un lavado con entre 10 y 20 volúmenes de columna debería servir para realizar la transición hacia la fase móvil. Conviene asegurarse de que la columna se ha equilibrado de forma adecuada antes de su uso. De esta manera, se garantiza la reproducibilidad y se ayuda a prevenir la deriva del tiempo de retención.

Consideraciones importantes sobre la 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 envases de las columnas secas son inhalables. Agilent recomienda no extraer los terminales de conexión de las columnas ni exponer su interior. Solamente el personal preparado puede abrir las columnas, lo que debe efectuarse en una zona con buena ventilación.
- Aténgase a los límites de presión operativos anotados para cada columna (consulte la Tabla 1). Si se exceden estos límites, el rendimiento cromatográfico y la vida útil de la columna se verán afectados, lo que podría ser inseguro.

Otros consejos operativos

- Aunque, por lo general, no resulta dañino para la columna, se debe evitar el flujo inverso, excepto si se intenta eliminar las partículas de una frita obstruida (consulte la sección "cuidado de la columna").
- Se recomienda iniciar la velocidad de flujo a una velocidad reducida para, a continuación, ir aumentándola progresivamente hasta alcanzar la velocidad de flujo operativa deseada.
- 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 degradará su rendimiento.
- Es posible usar un filtro en línea o una precolumna para proteger la columna y aumentar su vida útil.

- Si se usa la columna fuera de los rangos 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 a una temperatura elevada ni con un pH elevado (consulte la Tabla 2).
- Las nuevas columnas pueden incluir una mezcla de disolventes orgánicos y agua, lo que puede contener sales de la solución tampón. Consulte la Tabla 3 para obtener más información acerca de los disolventes de transporte. Inicialmente, se deben tomar precauciones para que ninguna fase móvil pase a través de la columna, lo que podría original la formación de un precipitado que no sea completamente miscible.
- Las columnas Agilent BioHPLC y AdvanceBio son compatibles con todos los eluyentes habituales usados para el análisis de biomoléculas.

Tabla 1. Parámetros operativos 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 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

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

Columna	Rango de pH recomendado	Temperatura operativa máxima
AdvanceBio Peptide Mapping	2.0–8.0	60 °C
AdvanceBio Peptide Plus		
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	60 °C por debajo de un pH de 8, 40 °C por encima de un pH de 8
AdvanceBio Oligonucleotide	3.0–11.0	65 °C
AdvanceBio Amino Acid Analysis		
PLRP-S	1.0–14.0	200 °C

Nota: todos los envases basados en sílice son algo solubles con fases móviles acuosas de pH > 6. Si se usan columnas basadas en sílice con un pH > 6, se obtiene la mejor vida útil de las columnas a temperaturas inferiores (40 °C máx.) y con concentraciones bajas de las soluciones tampón, es decir, entre 0.01 y 0.02 M.

Tabla 3. Disolventes de transporte.

Columna	Disolvente de transporte	Compatibilidad
AdvanceBio Peptide Mapping	Mezcla de acetonitrilo y agua	Agua y todos los disolventes orgánicos habituales
AdvanceBio Peptide Plus		
ZORBAX RRHD		
ZORBAX 300SB		
AdvanceBio RP-mAb	Mezcla de acetonitrilo y agua	Agua y todos los disolventes 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 comunes. Modificadores como el HFIP y el TEAA
AdvanceBio Amino Acid Analysis		
PLRP-S	Acetonitrilo y agua (7:1)	Disolventes orgánicos acuosos, incluidos N,N-dimetilformamida y dimetilsulfóxido No se recomiendan disolventes completamente acuosos, ya que se reduciría el rendimiento y la vida útil de la columna

Selección de la fase móvil y temperaturas operativas

La fase estacionaria ligada es de naturaleza apolar y su mejor rendimiento se consigue con fases móviles polares como, por ejemplo, mezclas de metanol y agua o acetonitrilo y agua. El aumento de la cantidad de componente orgánico reduce el tiempo de retención de la muestra.

Si se utiliza la temperatura máxima durante periodos prolongados, se reducirá la vida útil de la columna.

El uso de eluyentes completamente acuosos con columnas PLRP-S reducirá significativamente la vida útil de la columna y es posible que se produzca un rápido deterioro de la anchura de pico y de la simetría.

Gradientes iniciales recomendados

Las separaciones de moléculas biológicas usan, por lo general, condiciones de gradiente, es decir, se aumenta la cantidad de componente orgánico para alcanzar la elución en la columna. La forma más habitual de realizar las separaciones de péptidos, polipéptidos y proteínas es mediante eluyentes ácidos con ácido trifluoroacético (TFA) o ácido fórmico (FA), que se emplean como modificadores para controlar el pH o como aditivos de par iónico a fin de conseguir la retención y la selectividad deseadas. Los compuestos orgánicos, como el acetonitrilo, el metanol y el etanol, se utilizan para conseguir la elución. De entre estos compuestos, el acetonitrilo es el más usado.

Para obtener más información sobre las separaciones de péptidos, consulte el capítulo 11, páginas 497–508, de *Introduction to Modern Liquid Chromatography* (segunda edición), por L. R. Snyder y J. J. Kirkland (John Wiley y Sons, 1979).

Cuidado de la columna

Las columnas con un tamaño de partícula de 1.8 μm cuentan con una fritas de entrada de 0.5 μm . Las partículas bloquearán las fritas de entrada de la columna, por lo que se deben extraer antes de analizar la muestra. En caso de que esto no sea posible, se debe usar un filtro en línea o una precolumna para proteger la columna analítica e incrementar su vida útil. La columna de mapa de péptidos AdvanceBio incluye una fritas de entrada de 2 μm . Las muestras que contengan materia bioparticulada mayor de 2 μm obstruirán la fritas de entrada. Es recomendable el uso de precolumnas con estas muestras. Asimismo, se recomienda que se filtren las muestras antes de inyectarlas sobre cualquier columna y que todos los eluyentes estén recién preparados y se filtren antes de usarlos.

Consulte www.agilent.com/chem/guards para obtener más información acerca de las precolumnas.

Limpieza de la columna y prolongación de su vida útil

En el caso de las columnas que permitan retroflujo (partículas > 1.8 μm), efectúe la limpieza en la dirección inversa. Empiece con un disolvente más potente (menos polar).

1. Desconecte la columna del detector y vierta los disolventes de lavado dentro de un vaso de precipitados.
2. Empiece con la fase móvil sin sales de la solución tampón (agua o compuestos orgánicos). Haga pasar entre 10 y 20 volúmenes de columna.
3. A continuación, use componentes orgánicos al 100 % (metanol o acetonitrilo).
4. Compruebe si la presión vuelve a ser normal; si no es así:
5. Descarte la columna o tenga en cuenta condiciones más fuertes, por ejemplo, acetonitrilo al 75%:isopropanol al 25%.

6. Aumente a isopropanol al 100%, cloruro de metileno al 100% o hexano al 100% (si utiliza cloruro de metileno o hexano, deberá lavar la columna con isopropanol antes de usarla y antes de volver a la fase móvil dado que no es miscible con componentes acuosos).

Con las columnas PLRP-S, se pueden utilizar ciclos de limpieza agresivos con 1 M de NaOH al 80% o 1 M de HCl con componentes orgánicos al 20%.

No utilice el retroflujo en el caso de las columnas con partículas de 1.8 μm ; puede intentar el procedimiento de limpieza detallado con anterioridad si mantiene la dirección del flujo.

Recomendaciones para el almacenamiento

Por lo general, las columnas se pueden almacenar con seguridad durante periodos breves en la mayoría de las fases móviles. El almacenamiento a largo plazo de las columnas de fase ligada y basadas en sílice se debe efectuar en un 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 terminales de conexión se deben tapar firmemente con tapones terminales para evitar que el empaquetado 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 (por ejemplo, con 60:40 ACN/H₂O para eliminar una fase móvil con una solución tampón de 0.02 M de fosfato/60:40 ACN). El nuevo equilibrio con la fase móvil original es rápido si se utiliza este enfoque y se elimina cualquier posibilidad de corrosión debida a las sales.

Consejos para obtener los mejores resultados cromatográficos

- Optimice el instrumento mediante la reducción de la longitud de los tubos entre los componentes; de esta forma, se disminuye el volumen de columna adicional y el ensanchamiento de banda. Con las columnas LC rápidas o de alta eficacia, utilice tubos rojos con un diámetro interno de 0.12 mm. Para obtener información acerca de las opciones de capilares, visite www.agilent.com/chem/lccapillaries.
- Asegúrese de optimizar la velocidad de adquisición de datos para la columna. Utilice una velocidad de adquisición mayor para las columnas LC rápidas (ZORBAX RRHD).
- Utilice el filtrado de muestras u otros procesos de preparación de muestras que sean apropiados para su muestra. Para obtener más información, visite www.agilent.com/chem/sampleprep.
- Utilice lámparas certificadas con sus instrumentos LC para conseguir un mejor 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。お手元の相または製品ファミリーに関するさらに詳しい情報については、以下にアクセスください。**www.agilent.com/chem/biocolumnchoices**。

始めましょう

QC カラムパフォーマンスレポートは、テストクロマトグラムとともに、すべての Agilent カラムに同梱しています。QC 試験用のシステムは標準システムを改良してシステムのデッドボリュームを最小限に抑えています。したがってお客様のシステムとは仕様が異なることがあります。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 カラムパフォーマンスレポートのクロマトグラムと同様の結果を生成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。

カラムの使用方法

取り付け

- 流れ方向はカラムに表示されています。
- 1.8 μm カラム (ZORBAX RRHD) は、カラムに表示している流れ方向でのみ使用できます。
- 耐圧 600 bar までのカラムではポリケトン製フィッティング (p/n 5042-8957) を、UHPLC レベルの圧力のカラムには、1200 bar 耐圧フィッティング (p/n 5067-4733) をおすすめします。



ポリケトン製フィッティング、p/n 5042-8957



Agilent 1200 bar 耐圧フィッティング、p/n 5067-4733

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、初めて使用する際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。移動相に添加剤 (緩衝液、イオンペア試薬など) を使用している場合は、ときどき添加剤を含まない組成の移動相でフラッシングすることをおすすめします。お使いの移動相への移行には、カラムの体積の 10~20 倍でフラッシングするとよいでしょう。使用前に、カラムが平衡状態になっていることを確認してください。そうすることで再現性を確保し、リテンションタイムのドリフトを防ぐことができます。

重要な安全上の注意点

- 液体クロマトグラフィシステムでは、接続部がリークの原因になる可能性があります。使用する移動相の毒性や可燃性に注意しなければなりません。

- カラムの充填剤は粒子径が小さいので、乾燥すると吸入する恐れがあります。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すすめしません。カラムは、経験のある人が換気の良いところで開放してください。
- 各カラムの使用圧力限界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。

操作のヒント

- フリットの詰まりを取り除く場合を除き、逆向きに使用するの
は避けてください (「カラムのお手入れ」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。
- 必ず高純度試薬およびクロマトグラフィグレード溶媒を使用
して移動相を調製します。使用前に移動相はすべて脱気し
てお過します。
- カラムを分解すると性能が低下します。
- 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 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	圧力限界
AdvanceBio Peptide Mapping	2.7 μm	600 bar
AdvanceBio Peptide Plus		
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

表 2. カラム操作パラメータ – pH および温度。

カラム	出荷時の溶媒	適合性
AdvanceBio Peptide Mapping	2.0–8.0	60 °C
AdvanceBio Peptide Plus		
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 Oligonucleotide	3.0–11.0	65 °C
AdvanceBio Amino Acid Analysis		
PLRP-S	1.0–14.0	200 °C

注：シリカベースの充填剤はすべて、pH >6 の水系移動相にある程度溶解します。シリカベースのカラムを pH >6 で使用する場合、カラムの寿命を最大限に伸ばすには、低温 (40 °C 以下) で、0.01~0.02 M の範囲の低濃度緩衝液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	適合性
AdvanceBio Peptide Mapping	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
AdvanceBio Peptide Plus		
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 Oligonucleotide	アセトニトリル/水混合物	水または一般的な有機溶媒。添加剤には HFIP (ヘキサフルオロイソプロピルアルコール) と TEAA (トリエチルアミン酢酸) が含まれます。
AdvanceBio Amino Acid Analysis		
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すべての水溶性有機溶媒。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使用温度

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。

初期グラジエントの推奨

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, Introduction to Modern Liquid Chromatography, Second Edition, Chapter 11, pages 497-508. (John Wiley & Sons, 1979).

カラムのお手入れ

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ー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 以上の粒状物質が含まれる場合、フリットが詰まります。そのようなサンプルについて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し、また移動相は使用ごとに新しく調製して、使用前にろ過することをおすすめします。

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

カラムのクリーニング/カラムの長寿命化

バックフラッシュが可能なカラム (粒子径 > 1.8 μm) 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取り外し、洗浄溶媒を流してビーカーで受け取ります。
2. まず緩衝塩を含まない移動相 (水/有機) を使用します。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. 圧力が正常値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. カラムを廃棄するか、またはさらに強力な条件を検討します。例えば、75% アセトニトリル: 25% イソプロパノールなど。
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ため、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 μm 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。シリカベースの結合相カラムを長期保管する場合は、純粋な有機溶媒を入れておく必要があります。カラムに、緩衝液を加えた移動相を用いて使用した場合は、カラムをパージして緩衝液を除く必要があります。まず、カラムの体積に対して 20~30 倍の 50:50 メタノールまたはアセトニトリル/水混合物を通液し、さらにカラムの体積に対し 20~30 倍の純粋な溶媒で洗浄します。保管する前に、エンドフィッティングをエンドプラグでしっかりふたをして、充填剤が乾燥しないようにする必要があります。

保管に関する注意事項 (続き)

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/ H_2O 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。

最善のクロマトグラフィの結果を得るためのヒント

- 構成部品間のチューブの長さを短くして余分な流路の体積を減らし、バンド幅の拡がりを抑えることで機器を最適化します。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。キャピラリー・オプションについては、www.agilent.com/chem を参照してください。
- データ取込速度が、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。
- サンプルの内容に応じてろ過したり、その他の方法でサンプルを適切に前処理します。詳しくはwww.agilent.com/chem 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 этой брошюре рассмотрены общие сведения о колонках обращенной фазы Agilent BioHPLC и AdvanceBio. Подробнее: www.agilent.com/chem/biocolumnchoices.

Начало работы

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

На вопросы ответят в отделе технической поддержки: www.agilent.com/chem/columnsupport.

Использование колонки

Установка

- Направление потока указано на колонке.
- При работе с колонками с размером частиц 1.8 мкм (ZORBAX RRHT и ZORBAX RRHD) направление потока должно совпадать с указанным на колонке.
- Agilent рекомендует для колонок на 600 бар использовать поликетоновые фитинги (кат. № 5042-8957), а также съемные фитинги на 1200 бар (кат. № 5067-4733), которые можно применять в системах ВЭЖХ сверхвысокого давления (UHPLC).

Уравновешивание колонок



Поликетоновый фитинг,
кат. № 5042-8957



Съемный фитинг Agilent на
1200 бар, кат. № 5067-4733

Каждая колонка испытывается перед поставкой. Перед началом использования растворитель, в котором она поставляется, необходимо заменить на элюент, обращая внимание на смешиваемость и растворимость всех компонентов. Если используются добавки к подвижной фазе (например, буферы или ионогенные вещества), рекомендуется проводить промежуточную промывку подвижной фазой необходимого состава, но без таких добавок. При смене подвижной фазы рекомендуется выполнить промывку с расходом 10-20 объемов колонки. Перед использованием колонки необходимо обязательно убедиться, что она уравновешена надлежащим образом. Это обеспечивает воспроизводимость результатов анализа и предотвращает изменение времени удерживания анализируемых веществ.

Важные сведения по безопасности

- Все места соединений в системах ВЭЖХ являются потенциальными источниками утечек. Необходимо ознакомить пользователей с токсичными и огнеопасными свойствами подвижных фаз.
- Существует опасность вдыхания мелких частиц сухого наполнителя колонок. Agilent рекомендует не снимать концевые фитинги колонок и избегать воздействия окружающей среды на носитель. Вскрытие колонок должен проводить обученный специалист в хорошо вентилируемой зоне.
- Не превышайте рабочее давление, указанное для каждой колонки (см. Табл. 1). Превышение этих ограничений снижает качество хроматографии и срок службы колонок, а также может быть опасным.

Практические советы

- Хотя обычно метод обратной продувки не опасен для колонок, избегайте его применения за исключением очистки засора порис того вкладыша (см. раздел «Обслуживание колонок»).
- Рекомендуется начинать метод с пониженной скорости потока, плавно увеличивая ее до требуемой рабочей скорости.
- Всегда используйте для приготовления подвижной фазы реагенты высшей степени очистки и растворитель хроматографической степени чистоты. Перед использованием проводите фильтрацию и дега за цию всего объема подвижной фазы.
- Разборка колонки приведет к снижению ее характеристик.
- Для защиты колонки и продления срока ее службы рекомендуется использовать внутрипотоковый фильтр или предколонку.
- Работа колонки за рамками рекомендованных для фазы колонки диапазонов pH (см. Табл. 2) приведет к сокращению срока службы.

- Не следует хранить неиспользуемые колонки в среде с высокими значениями pH или в условиях повышенной температуры (см. Табл. 2).
- Новые колонки могут быть заполнены смесью органических растворителей и воды, в которой могут содержаться буферные соли. Подробные сведения о транспортировочных растворителях см. в Табл. 3. На начальной стадии метода следует избегать пропускания через колонку подвижной фазы, которая может вызвать выпадение осадка или быть не полностью растворимой.
- Колонки Agilent BioHPLC и AdvanceBio совместимы со всеми элюентами, применяемыми для биомолекулярного анализа.

Табл. 1. Максимальное рабочее давление – колонки с внутренним диаметром до 4.6 мм.

Колонка	Размер частиц	Предельное давление
AdvanceBio Peptide Mapping	2.7 мкм	600 бар
AdvanceBio Peptide Plus		
AdvanceBio Oligonucleotide		
AdvanceBio Amino Acid Analysis		
AdvanceBio RP-mAb	3.5 мкм	400 бар
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

Табл. 2. Рабочие параметры колонок – pH и температура.

Колонка	Рекомендованный диапазон pH	Максимальная рабочая температура
AdvanceBio Peptide Mapping	2.0–8.0	60 °C
AdvanceBio Peptide Plus		
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	60 °C при pH менее 8, 40 °C при pH более 8
AdvanceBio Oligonucleotide	3.0–11.0	65 °C
AdvanceBio Amino Acid Analysis		
PLRP-S	1.0–14.0	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 буферных концентраций в диапазоне от 0.01 до 0.02 М.

Табл. 3. Транспортировочные растворители.

Колонка	Транспортировочный растворитель	Совместимость
AdvanceBio Peptide Mapping	Смесь ацетонитрила с водой	Вода и все распространенные органические растворители.
AdvanceBio Peptide Plus		
ZORBAX RRHD		
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 обычные органические растворители. Модификаторы, включая гексафтор-2-пропанол и ацетат триэтиламмония.
AdvanceBio Amino Acid Analysis		
PLRP-S	Ацетонитрил с водой (7:1)	Органические растворители на водной основе, в том числе N,N-диметилформамид и диметилсульфоксид. Не рекомендуется использовать чистую (100%) воду, так как это снизит качество колонки и сократит срок ее службы.

Выбор подвижной фазы и рабочих температур

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

Длительная работа при максимальной температуре сокращает срок службы колонки.

Использование элюентов на основе чистой воды с колонками PLRP-S значительно сокращает срок службы колонки и может привести к быстрому размыванию пиков по ширине и асимметрии.

Рекомендованные начальные градиенты

При разделении биологических молекул для улучшения элюции из колонки обычно используются градиентные условия – увеличение количества органической составляющей. Разделение пептидов, поли-пептидов и белков чаще производится с помощью кислых элюентов с использованием трифторуксусной кислоты (TFA) или муравьиной кислоты (FA) в качестве модификатора для изменения pH и (или) в качестве ионогенной добавки для получения требуемой степени удерживания и селективности. Для элюирования используются органические растворители, такие как ацетонитрил (чаще всего), метанол и этанол.

С дополнительными сведениями о разделении пептидов можно ознакомиться в части 11 (стр. 497–508) книги *Introduction to Modern Liquid Chromatography, Second Edition*. L.R. Snyder, J. J. Kirkland (John Wiley & Sons, 1979).

Обслуживание колонок

В колонки с размером частиц 1.8 мкм устанавливается входной вкладыш с порами 0.5 мкм. Микрочастицы, содержащиеся в пробе, могут закупоривать входной пористый вкладыш колонки; перед проведением анализа образца их следует удалить. Если это невозможно, необходимо использовать внутривиточный фильтр или предколонку для защиты аналитической колонки и продления ее срока службы. В колонки AdvanceBio Peptide Mapping устанавливается входной вкладыш с порами 2 мкм. Образцы, содержащие биологические микро частицы размером более 2 мкм, могут закупоривать входной пористый вкладыш. Для таких образцов рекомендуется использовать пред колонки. Рекомендуется выполнять фильтрацию образцов перед их вводом в колонку, а также использовать свежеприготовленные и фильтрованные перед работой элюенты.

Подробнее о предколонках: www.agilent.com/chem/guards.

Промывка и увеличение срока службы колонки

Колонки, подлежащие обратной промывке (с размером частиц более 1.8 мкм), промываются в обратном направлении. Следует начать промывку более сильным (менее полярным) растворителем.

1. Отсоединить колонку от детектора и направить промывочные растворители в лабораторный стакан.
2. Следует начинать промывку с рабочей подвижной фазы без буферных солей (водной или органической). Пропустить от 10 до 20 объемов колонки.
3. Промыть 100% органическим растворителем (метанолом или ацетонитрилом).
4. Убедиться, что восстановилось рабочее давление; если этого не произошло, выполнить следующие действия:

5. Забраковать колонку или использовать более сильные растворители, например ацетонитрил с изопропанолом (75:25).
6. Увеличить концентрацию до 100% изопропанола, 100% дихлорметана или 100% гексана (дихлорметан и гексан нерастворимы в воде, в случае их использования необходимо тщательно промыть колонку изопропанолом перед последующим использованием до перехода к рабочей подвижной фазе).

Для колонок PLRP-S можно применять агрессивные циклы очистки с помощью смеси 80% 1 М NaOH или 1 М HCl с 20% органического растворителя.

Не следует проводить обратную промывку колонок с размером частиц 1.8 мкм. Для них можно использовать описанную выше процедуру с сохранением направления потока.

Рекомендации по хранению

Кратковременно хранить колонки можно в большинстве подвижных фаз. Для долговременного хранения колонок с привитой фазой на основе силикагеля следует использовать чистый органический растворитель. Если ранее колонка использовалась с буферной подвижной фазой, сначала следует удалить буфер промывкой смесью метанола или ацетонитрила с водой (50:50) с расходом 20-30 объемов колонки, а затем промыть ее 20-30 объемами колонки чистого растворителя. 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 путем промывки колонки той же подвижной фазой без буфера (например, используя смесь ацетонитрил:Н₂О (60:40) для удаления подвижной фазы 60:40 ацетонитрила с 0,02 М фосфатного буфера). Этот подход позволяет быстрее проводить повторное

уравновешивание при использовании исходной подвижной фазы и устраняет возможность возникновения коррозии, вызываемой наличием соли.

Рекомендации для получения лучших результатов при хроматографии

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



Esse folheto oferece informações gerais sobre as colunas de fase reversa Agilent BioHPLC e AdvanceBio. Para obter informações mais detalhadas sobre uma fase ou linha específica, acesse:

www.agilent.com/chem/biocolumnchoices.

Início

Cada coluna Agilent vem com um relatório de QC do desempenho da coluna, incluindo um cromatograma de teste. Um sistema padrão foi modificado para gerar o sistema de teste de QC que minimiza volume morto, que pode diferir do sistema utilizado em seu laboratório. Este sistema permite avaliar melhor a eficácia da coluna e garantir uma maior consistência do produto. Um sistema de LC otimizado irá gerar resultados semelhantes ao do cromatograma no relatório de QC do desempenho.

Caso tenha dúvidas específicas, entre em contato com a equipe de suporte técnico pelo site **www.agilent.com/chem/columnsupport**.

Utilização da coluna

Instalação

- A direção do fluxo é marcada na coluna.
- Colunas de 1.8 μm (ZORBAX RRHD) só podem ser operadas na direção do fluxo marcada na coluna.
- A Agilent recomenda o uso de conexões de policetona (p/n 5042-8957) para colunas de até 600 bar, e conexões removíveis de 1200 bar (p/n 5067-4733) para colunas que serão operadas a pressões de UHPLC.

Condicionamento da coluna



Conexão de policetona,
p/n 5042-8957



Conexão removível de 1200 bar
Agilent, p/n 5067-4733

Todas as colunas são testadas antes do envio. Portanto, para a primeira utilização, o solvente de envio deve ser substituído por um eluente, assegurando que todos os componentes se misturem e se dissolvam. 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 colunas devem ajudar na transição para a fase móvel. Deve-se tomar cuidado para garantir que a coluna seja equilibrada adequadamente antes da utilização. Isso garantirá a reprodutibilidade e evitará desvios do tempo de retenção.

Considerações de segurança importantes

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

Outras dicas operacionais

- Embora geralmente não seja prejudicial à coluna, deve-se evitar o fluxo reverso, exceto para tentar remover o frit entupido (consulte a seção “Cuidados com a coluna”).
- Recomenda-se iniciar a taxa de fluxo a uma taxa reduzida e depois aumentá-la levemente até a taxa de fluxo operacional desejada.
- Sempre use reagentes de alta pureza e solvente de cromatografia de boa qualidade para preparar a fase móvel. Degaseifique e filtre toda a fase móvel antes da utilização.
- A desmontagem de uma coluna prejudica seu desempenho.
- É possível usar um filtro em linha ou uma coluna de guarda para proteger a coluna e aumentar sua vida útil.
- Se a coluna for usada fora das faixas de pH recomendadas para a fase da coluna (consulte a Tabela 2) sua vida útil será reduzida.

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

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 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	1200 bar
ZORBAX RRHD	1.8 µm	
PLRP-S	3 µm	275 bar
	5 µm, 8 µm, 10 µm	207 bar
	10–15 µm, 15–20 µm, 30 µm	103 bar

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

Coluna	Faixa de pH recomendada	Máxima temperatura operacional
AdvanceBio Peptide Mapping	2.0–8.0	60 °C
AdvanceBio Peptide Plus		
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	60 °C abaixo de pH 8, 40 °C acima de pH 8
AdvanceBio Oligonucleotide	3.0–11.0	65 °C
AdvanceBio Amino Acid Analysis		
PLRP-S	1.0–14.0	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 maior que 6, uma melhor vida útil da coluna é obtida em temperaturas mais baixas (máx. 40 °C) usando concentrações menores de tampão na faixa de 0.01 a 0.02 M.

Tabela 3. Solventes de envio.

Coluna	Solvente de envio	Compatibilidade
AdvanceBio Peptide Mapping	Mistura de acetonitrila e água	Água e todos os solventes orgânicos comuns.
AdvanceBio Peptide Plus		
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	Acetonitrila/água 7:1	Solventes orgânicos aquosos, incluindo N,N-dimetilformamida e dimetilsulfóxido. Solventes 100% aquosos não são recomendados, pois reduzem 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.

A vida útil da coluna será reduzida se a temperatura máxima for usada em períodos prolongados.

A utilização de eluentes 100% aquosos com colunas PLRP-S reduzirá consideravelmente a vida útil da coluna e poderá provocar uma rápida deterioração da largura e da simetria do pico.

Gradientes iniciais recomendados

A separação de moléculas biológicas geralmente emprega condições de gradiente, aumentando a quantidade do componente orgânico para obter a eluição da coluna. As separações de peptídeos, polipeptídios e proteínas são realizadas mais frequentemente com a utilização de eluentes com ácido trifluoroacético (TFS) ou ácido fórmico (FA), usados como modificadores para o controle de pH e/ou como aditivos de pareamento iônico para obter a retenção e a seletividade desejadas. Os componentes orgânicos – como a acetonitrila, o metanol e o etanol – são usados para a eluição (a acetonitrila é o componente usado com mais frequência).

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

Cuidados com a coluna

Colunas com um tamanho de partícula de 1.8 µm têm um frit de injetor de 0,5 µm. As partículas bloqueiam os frits do injetor da coluna e devem ser removidas antes de analisar a amostra. Se isso não for possível, deve-se usar um filtro em linha ou uma coluna de guarda para proteger a coluna analítica e aumentar sua vida útil. A coluna de mapeamento de peptídeos AdvanceBio tem um frit de injetor de 2 µm. As amostras que contêm matéria bioparticulada maior que 2 µm obstruirão o frit do injetor. Recomenda-se utilizar colunas de guarda com essas amostras. Também recomenda-se filtrar as amostras antes de injetá-las em qualquer coluna, e preparar e filtrar todos os eluentes momentos antes da utilização.

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

Limpeza da coluna/Prolongamento da vida útil da coluna

Limpe na direção reversa as colunas que podem ser submetidas ao processo de backflushing (partículas maiores que 1.8 µm). 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 a fase móvel sem sais tampões (água/orgânico). Execute volumes de 10 a 20 colunas.
3. Depois, use o componente 100% orgânico (metanol ou acetonitrila).
4. Verifique se a pressão voltou ao valor normal; em caso negativo:
5. Descarte a coluna ou considere condições mais, como por exemplo, 75% de acetonitrila:25% de isopropanol.

6. Aumente para 100% de isopropanol, 100% de cloreto de metileno ou 100% de hexano (caso utilize cloreto de metileno ou hexano, será necessário lavar a coluna com isopropanol antes de usá-la e antes de retornar à fase móvel, pois eles não são miscíveis com soluções aquosas).

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

Não submeta colunas com partículas de 1.8 μm ao processo de backflush; é possível utilizar o procedimento de limpeza detalhado acima, mas mantendo 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 por longos períodos de colunas à base de sílica ou com fase ligada deve ser realizado em um solvente orgânico puro. Se a coluna foi usada anteriormente com uma fase móvel tamponada, primeiro o tampão deve ser removido purgando a coluna com volumes de 20 a 30 colunas com uma mistura de metanol ou acetonitrila e água a 50:50, seguido de volumes de 20 a 30 colunas de solvente puro. Antes do armazenamento, os adaptadores de extremidade devem ser bem fechados com plugues para evitar que o empacotamento seque.

Para proteger o equipamento, recomenda-se remover os sais do instrumento e da coluna, purgando a coluna com a mesma fase móvel sem o tampão (ex: utilizando ACN/ H_2O a 60:40 para remover uma fase móvel de tampão fosfato ACN/0.02 M a 60:40). Esta abordagem possibilita um rápido reequilíbrio com a fase móvel original, e qualquer possibilidade de corrosão por causa dos sais é eliminada.

Dicas para obter os melhores resultados de cromatografia

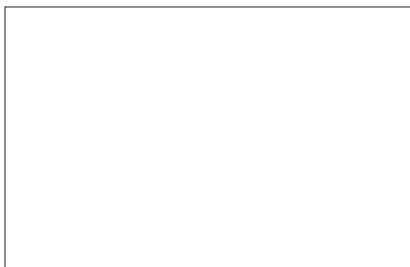
- Otimize o desempenho do instrumento minimizando os comprimentos da tubulação entre os componentes para reduzir o volume extracoluna e o alargamento da banda. Use a tubulação vermelha com 0.12 mm de diâmetro interno para colunas de LC rápidas/de alta eficiência. Conheça as opções de capilar no site www.agilent.com/chem/lccapillaries.
- Assegure-se de que a taxa de coleta de dados esteja otimizada para a sua coluna. Use uma taxa de coleta mais alta para colunas de LC rápidas (ZORBAX RRHD).
- Utilize filtração ou outro método de preparo adequado para sua amostra. Obtenha mais informações em www.agilent.com/chem/sampleprep.
- Use lâmpadas certificadas nos 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