

# COLUMN USER GUIDE for Agilent BioHPLC and AdvanceBio Columns



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

Agilent BioHPLC 和 AdvanceBio 色谱柱

Benutzerinformation zu Agilent BioHPLC- und  
AdvanceBio-Säulen

Guida utente per colonne BioHPLC e colonne  
AdvanceBio Agilent

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


The Measure of Confidence



ION-EXCHANGE



Agilent Technologies



This booklet provides general information for the Agilent BioHPLC and AdvanceBio ion-exchange columns. For additional detailed information about your specific phase or family, see:

**[agilent.com/chem/biocolumnchoices](https://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 **[agilent.com/chem/columnsupport](https://www.agilent.com/chem/columnsupport)**

## Using Your Column

### Installation

- The direction of flow is marked on the column.
- Agilent recommends using Polyketone fittings (p/n 5042-8957) for columns up to 600 bar, and 1200 bar removable fittings (p/n 5067-4733) for columns that will be operated at UHPLC pressures.



*Polyketone fitting,  
p/n 5042-8957*



*Agilent 1200 bar removable  
fitting, p/n 5067-4733*

### Column Conditioning

Every column is tested before shipment. For first use, the shipping solvent must be replaced with eluent, and the column conditioned with the correct counter ion. Take care that all components are miscible and soluble. Care should be taken to make sure the column has been properly equilibrated prior to use and before the start of each analysis in a sequence (see **Table 1**). This will ensure reproducibility and help prevent retention time drifting. When installing a column it is advisable to always start at a low flow rate, and as the pressure stabilizes, increase the flow rate to the operating flow rate that will be used for the analysis.

**Table 1. Instructions - before first use**

Column	Procedure
<p><b>Bio IEX and Bio MAb:</b> Flush out the shipping solution (20 mM phosphate buffer, pH 6.0) and condition with the required counter ion prior to use.</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Purge the column with 20 column volumes of the loading buffer (buffer A) at 0.1 mL/min. Gradually increase the flow rate until you reach your intended operating conditions and allow the baseline to flatten.</li> <li>2. If the baseline or column back pressure fluctuates, increase the flow for 3-5 min, keeping in mind the maximum pressure for each particle size.</li> <li>3. Once equilibrated and the baseline is stable, the column is ready for a sample injection.</li> </ol>
<p><b>PL-SAX and PL-SCX:</b> Flush out the shipping solution (0.1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 0.02% sodium azide) and condition with the required counter ion prior to use. The following procedure is recommended at 0.5 mL/min for a 4.6 mm column.</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Elute for 5 column volumes with the low ionic strength component of the mobile phase, buffer A.</li> <li>2. Exchange the counter ion by eluting with the high ionic strength component of the mobile phase, buffer B. Continue with this eluent until a stable baseline is achieved at the required sensitivity, a minimum of 5 column volumes.</li> <li>3. Equilibrate with buffer A for a minimum of 5 column volumes prior to use.</li> </ol>
<p><b>Bio-Monolith:</b> Flush out the shipping solution (20% ethanol) and condition with the required counter ion prior to use.</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Wash the column with at least 10 column volumes of the binding mobile phase (low ionic strength) at one-half of the working flow rate.</li> <li>2. Wash the column with at least 10 column volumes of the high ionic strength buffer (e.g. buffer with 1.0 or 2.0 M NaCl) at one-half of the working flow rate.</li> <li>3. Equilibrate with at least 10 column volumes (20 column volumes for the weak anion-exchange, DEAE, column) binding mobile phase (low ionic strength) at a working flow rate.</li> </ol>

## Important Safety Considerations

- All points of connection in liquid chromatographic systems are potential sources of leaks. Users should be aware of the toxicity or flammability of their mobile phases.
- Because of the small particle size, dry column packings are respirable. 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 2**). Exceeding these limits will compromise chromatographic performance and column lifetime, and could be unsafe.

**Table 2. Maximum operating parameters – columns up to 4.6 mm**

Column	pH stability	Maximum operating temperature	Maximum operating pressure
Bio MAb	2.0 – 12.0	80 °C	1.7 µm = 689 bar 3 µm = 551 bar 5 µm = 413 bar 10 µm = 275 bar
Bio IEX (SCX, WCX, SAX, WAX)	2.0 – 12.0	80 °C	1.7 µm = 689 bar 3 µm = 551 bar 5 µm = 413 bar 10 µm = 275 bar
PL-SAX, PL-SCX	1.0 – 14.0	80 °C	207 bar
Bio-Monolith (OA, DEAE, S03)	2.0 - 13.0	40 °C	150 bar

## Other Operating Tips

- While generally not harmful to the column, reverse flow should be avoided except to attempt removal of clogged frit (see “column care”).
- 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.
- If the column is used outside of recommended pH ranges for column phase (see **Table 2**), a reduced lifetime will result.
- An inline filter or guard column may be used to protect your column and increase its lifetime.
- Columns should not be maintained at elevated pH or elevated temperature when not in use.
- New columns may contain a mixture of organic solvents and water, which may contain buffer salts (see **Table 3**). 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.

**Table 3. Shipping solvents**

Column	Shipping solvents	Compatibility
<p><b>Cation-exchange</b> Agilent Bio WCX, Bio SCX, and Bio MAb</p> <p>Agilent PL-SCX</p>	<p>20 mM phosphate buffer, pH 6.0</p> <p>0.1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 0.02% sodium azide</p>	<p>All commonly used ion-exchange eluents, buffers and salts.</p> <p>Compatible with nonionic and zwitterionic detergents, but are NOT compatible with cationic detergents.</p>
<p><b>Anion-exchange</b> Agilent Bio SAX and Bio WAX</p> <p>Agilent PL-SAX</p>	<p>20 mM phosphate buffer, pH 6.0</p> <p>0.1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 0.02% sodium azide</p>	<p>All commonly used ion-exchange eluents, buffers and salts.</p> <p>Compatible with nonionic and zwitterionic detergents, but are NOT compatible with anionic detergents.</p>
<p><b>Agilent Bio-Monolith</b> QA, DEAE, SO<sub>3</sub></p>	<p>20% ethanol</p>	<p>All commonly used ion-exchange eluents, buffers and salts. Up to 2.0 M NaOH and 1.0 M HCl. Aqueous solutions of up to 30% 2-propanol, methanol, acetonitrile. Up to 50% acetic acid. Up to 70% ethanol. Enzymatic solutions like pepsin, trypsin, DNase.</p>

## Mobile Phase Selection and Operating Temperatures

Ion-exchange uses aqueous buffers to control pH, most commonly salt gradients for elution. Alternatively, a pH gradient can be used at constant ionic strength. The starting buffer pH should be at least one pH unit away from the isoelectric point for proteins and peptides.

## Column Care

Columns with a particle size of less than 2  $\mu\text{m}$  have a 0.5  $\mu\text{m}$  inlet frit. Particulates will block the column inlet frits and so should be removed before the sample is analyzed. Where this is not possible, an inline filter should be used to protect and increase the lifetime of the analytical column. It is recommended that samples are filtered before injecting them onto any column.

## Cleaning Your Column to Extend Column Lifetime

An increase in column back pressure is likely to occur over time. Absorption of protein to the packing material or on the inlet frit will cause this increase in pressure and will decrease column performance. Cleaning the column may decrease the back pressure and improve performance.

When using a guard column or precolumn filter, replace the guard or filter and remove the main column. To clean the column, flush the column in the reverse direction with the cleaning buffer for at least 15 column volumes at no more than 50% of the maximum particle pressure limit.



**Table 4. Cleaning instructions**

Column	Column Cleanup
Bio SCX, Bio WCX, and Bio MAb	50 mM phosphate buffer, 1 M NaCl, pH 10. For basic proteins, flush the column with a low pH salt cleaning buffer. For acidic proteins, flush the column with a higher pH salt containing cleaning buffer. Hydrophobic proteins can be removed using an organic containing cleaning buffer.
Bio SAX and Bio WAX	150 mM potassium nitrate in 75% acetonitrile, pH 2 (HCl adjusted).
PL-SAX and PL-SCX	1 M acid, e.g. acetic or hydrochloric and 1 M base, e.g. sodium hydroxide. If contamination is due to small hydrophobic molecules, e.g. fats, detergents and peptides, then the matrix should be washed with an organic alcohol. The addition of 0.1% trifluoroacetic acid to the organic may be advantageous. After each washing sequence a high salt elution should be carried out, and after thorough cleaning, the column should be conditioned as per instructions (see <b>Table 1</b> ).
Bio-Monolith (QA, DEAE, SO <sub>3</sub> )	Wash with at least 2 mL of a buffer containing 1 M NaCl at 0.5 to 1.0 mL/min. Recondition the column with 5 to 6 mL of the starting mobile phase at 1 mL/min. For best results, repeat these steps at the end of each chromatographic run.

## Storage Recommendations

Long-term storage of ion-exchange columns can be done safely (see **Table 5** for phase-specific instructions). Before storing, end-fittings should be tightly capped with end-plugs to prevent packing from drying out. Columns may be safely stored for 1 to several days in most mobile phases.

**Table 5. Storage Instructions**

Column	Flushing instructions before long-term storage
Bio SCX, Bio WCX and Bio MAb	Flush using 20 mM phosphate buffer (the shipping solution), with 0.1% $\text{NaN}_3$ (sodium azide) at pH 6.0. Flush for at least 15 column volumes.
Bio SAX and Bio WAX	Flush using 20 mM Tris with 0.1% $\text{NaN}_3$ (sodium azide) at pH 8.0. Flush for at least 15 column volumes.
PL-SAX and PL-SCX	Wash with 1 M sodium chloride. After flushing with water, the storage buffer of 0.1 M $\text{Na}_2\text{SO}_4$ containing 0.02% sodium azide can be introduced.
Bio-Monolith (QA, DEAE, $\text{SO}_3$ )	If the column will not be in use for more than two days, it should be washed with at least 1 mL of DI water and afterwards flushed with at least 2 mL of a 20% ethanol solution at the flow rate of 0.2 to 0.5 mL/min, sealed with column end-plugs, and stored appropriately 4 to 30 °C.

## Tips for Getting the Best Chromatographic Results

- Optimize your instrument by minimizing tubing lengths between components to reduce extra column volume and band broadening. Use 0.12 mm id red tubing for Fast LC/high efficiency columns. Learn about capillary options at [agilent.com/chem/lccapillaries](https://www.agilent.com/chem/lccapillaries)
- Ensure the data collection rate is optimized for your column.
- Use sample filtration or other sample prep as appropriate for your sample. Learn more at [agilent.com/chem/sampleprep](https://www.agilent.com/chem/sampleprep)
- Use certified lamps in your LC instruments for best performance.



Cette brochure fournit des informations générales relatives aux colonnes échangeuses d'ions BioHPLC et AdvanceBio d'Agilent. Pour obtenir des informations détaillées supplémentaires sur votre phase ou votre famille spécifique, consultez le site : **[agilent.com/chem/biocolumnchoices](https://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 **[agilent.com/chem/columnsupport](https://www.agilent.com/chem/columnsupport)**

## Utilisation de votre colonne

### Installation

- La direction du flux est 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 1 200 bars (réf. 5067-4733) pour les colonnes qui seront utilisées à des pressions CLUHP.



*Raccord en polycétone,  
réf. 5042-8957*



*Raccord amovible pour  
1 200 bars d'Agilent,  
réf. 5067-4733*

### Conditionnement des colonnes

Chaque colonne est testée avant expédition. Pour la première utilisation, le solvant d'expédition doit être remplacé par un éluant, et la colonne conditionnée avec le contre-ion approprié. Veillez à ce que l'ensemble des composants soient miscibles et solubles. Des précautions doivent être prises afin de s'assurer que la colonne a été correctement équilibrée avant utilisation et avant de démarrer chaque séquence d'analyse (voir **Tableau 1**). Ceci garantira la reproductibilité et préviendra la dérive des temps de rétention. Lorsqu'une colonne est installée, il est recommandé de toujours démarrer à un débit faible, puis de l'augmenter jusqu'au débit de fonctionnement qui sera utilisé pour l'analyse une fois la pression stabilisée.

**Tableau 1. Instructions - avant la première utilisation**

Colonne	Procédure
<p><b>Bio IEX et Bio MAb :</b> éliminez la solution d'expédition (tampon phosphate 20 mM, pH 6,0) et conditionnez la colonne avec le contre-ion requis avant utilisation.</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Purgez la colonne avec 20 volumes de colonne du tampon de chargement (tampon A) à 0,1 mL/min. Augmentez progressivement le débit jusqu'à atteindre vos conditions de fonctionnement souhaitées et laissez la ligne de base s'aplanir.</li> <li>2. Si la ligne de base ou la contrepression de la colonne fluctue, augmentez le débit pendant 3 à 5 min, en tenant compte de la pression maximale autorisée pour chaque granulométrie.</li> <li>3. Une fois équilibrée et la ligne de base stable, la colonne est prête à recevoir une injection d'échantillon.</li> </ol>
<p><b>PL-SAX et PL-SCX :</b> éliminez la solution d'expédition (<math>\text{Na}_2\text{SO}_4</math> 0,1 M et 0,02% d'azoture de sodium) et conditionnez la colonne avec le contre-ion requis avant utilisation. La procédure suivante est recommandée à 0,5 mL/min pour une colonne de 4,6 mm).</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Faites éluver 5 volumes de colonne avec le composant de faible force ionique de la phase mobile, le tampon A.</li> <li>2. Échangez le contre-ion en éluant avec le composant de force ionique élevée de la phase mobile, le tampon B. Continuez avec cet éluant, pendant 5 volumes de colonne minimum, jusqu'à obtenir une ligne de base stable à la sensibilité requise.</li> <li>3. Équilibrez avec au moins 5 volumes de colonne de tampon A avant utilisation.</li> </ol>
<p><b>Bio-Monolith :</b> éliminez la solution d'expédition (20% d'éthanol) et conditionnez la colonne avec le contre-ion requis avant utilisation.</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Rincez la colonne avec au moins 10 volumes de colonne de la phase mobile liante (faible force ionique) à un débit égal à la moitié du débit de fonctionnement.</li> <li>2. Rincez la colonne avec au moins 10 volumes de colonne du tampon de force ionique élevée (tampon contenant du NaCl 1,0 ou 2,0 M) à un débit égal à la moitié du débit de fonctionnement.</li> <li>3. Équilibrez avec au moins 10 volumes de colonne (20 volumes de colonne pour la colonne échangeuse d'anions faibles, DEAE) de la phase mobile liante (faible force ionique) à un débit de fonctionnement.</li> </ol>

## Mesures de sécurité importantes

- Tous les points de connexion dans les systèmes de chromatographie liquide représentent des sources de fuite potentielles. Les utilisatrices 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 présentent un risque d'inhalation. 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 2**). Dépasser ces limites compromettra les performances chromatographiques et la durée de vie de la colonne, et pourrait s'avérer dangereux.

**Tableau 2. Paramètres de fonctionnement maximaux – colonnes jusqu'à 4,6 mm**

Colonne	Stabilité du pH	Température de fonctionnement maximale	Pression de fonctionnement maximale
Bio MAb	2,0 – 12,0	80 °C	1,7 µm = 689 bars ; 3 µm = 551 bars ; 5 µm = 413 bars ; 10 µm = 275 bars
Bio IEX (SCX, WCX, SAX, WAX)	2,0-12,0	80 °C	1,7 µm = 689 bars ; 3 µm = 551 bars ; 5 µm = 413 bars ; 10 µm = 275 bars
PL-SAX, PL-SCX	1,0 – 14,0	80 °C	207 bars
Bio-Monolith (QA, DEAE, SO3)	2,0 – 13,0	40 °C	150 bars

## 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.
- 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.
- Un filtre en ligne ou une colonne de garde peuvent être utilisés pour protéger votre colonne et prolonger sa durée de vie.
- Les colonnes ne doivent pas être maintenues à un pH élevé ou à une température élevée lorsqu'elles ne sont pas utilisées.
- Il est possible que les colonnes neuves renferment un mélange de solvants organiques et d'eau pouvant contenir des sels tampon (voir **Tableau 3**). 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.

**Tableau 3. Solvants d'expédition**

Colonne	Solvant d'expédition	Compatibilité
<b>Échange de cations</b> Agilent Bio WCX, Bio SCX et Bio MAb  Agilent PL-SCX	Tampon phosphate 20 mM, pH 6,0  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 0,1 M et 0,02 % d'azoture de sodium	Ensemble des éluants, tampons et sels, généralement utilisés pour l'échange d'ions.  Compatible avec les détergents non ioniques et zwitterioniques, mais NON compatible avec les détergents cationiques.
<b>Échange d'anions</b> Agilent Bio SAX et Bio WAX,  Agilent PL-SAX	Tampon phosphate 20 mM, pH 6,0  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 0,1 M et 0,02 % d'azoture de sodium	Ensemble des éluants, tampons et sels, généralement utilisés pour l'échange d'ions.  Compatible avec les détergents non ioniques et zwitterioniques, mais NON compatible avec les détergents anioniques.
<b>Agilent Bio-Monolith</b> QA, DEAE, $\text{SO}_3$	20 % d'éthanol	Ensemble des éluants, tampons et sels, généralement utilisés pour l'échange d'ions. Jusqu'à 2,0 M de NaOH et 1,0 M d'HCl. Solutions aqueuses contenant jusqu'à 30 % de 2-propanol, méthanol, acétonitrile. Jusqu'à 50 % d'acide acétique. Jusqu'à 70 % d'éthanol. Solutions enzymatiques telles que pepsine, trypsine, DNase.



## Sélection de la phase mobile

L'échange d'ions requiert des tampons aqueux pour le contrôle du pH, et plus fréquemment des gradients de sels pour l'élution. Par ailleurs, un gradient de pH peut être utilisé à force ionique constante. Pour les protéines et les peptides, le pH initial du tampon doit être séparé du point isoélectrique par une unité de pH au minimum.

## Entretien des colonnes

Les colonnes présentant une granulométrie inférieure à 2  $\mu\text{m}$  possèdent un fritté d'entrée de 0,5  $\mu\text{m}$ . Les particules boucheront les frittés d'entrée des colonnes et doivent donc être retirées avant d'analyser l'échantillon. Lorsque cela n'est pas possible, un filtre en ligne doit être utilisé pour protéger et prolonger la durée de vie de la colonne analytique. Il est conseillé de filtrer les échantillons avant de les injecter sur une colonne.

## Nettoyer votre colonne pour prolonger sa durée de vie

Une augmentation de la contrepression de la colonne est susceptible de survenir au cours du temps. L'absorption de protéines sur le matériau de remplissage ou sur le fritté d'entrée provoquera cette augmentation de la pression et diminuera les performances de la colonne. Un nettoyage de la colonne peut diminuer la contrepression et améliorer ses performances.

Lorsqu'une colonne de garde ou un filtre de précolonne sont utilisés, remplacez la colonne de garde ou le filtre et retirez la colonne principale. Pour nettoyer la colonne, rincez-la dans la direction inverse avec le tampon de nettoyage pendant au moins 15 volumes de colonnes à une pression ne dépassant pas 50 % de la limite de pression maximale.

**Tableau 4. Instructions de nettoyage**

Colonne	Nettoyage des colonnes
Bio SCX, Bio WCX et Bio MAb	Tampon phosphate 50 mM, NaCl 1 M, pH 10. Pour les protéines basiques, rincez la colonne avec un tampon de nettoyage salin de faible pH. Pour les protéines acides, rincez la colonne avec un tampon de nettoyage salin de pH plus élevé. Les protéines hydrophobes peuvent être éliminées à l'aide d'un tampon de nettoyage contenant un solvant organique.
Bio SAX et Bio WAX	Nitrate de potassium 150 mM dans 75 % d'acétonitrile, pH 2 (ajusté au HCl).
PL-SAX et PL-SCX	Acide 1 M, par exemple de l'acide acétique ou chlorhydrique et base 1 M, par exemple de l'hydroxyde de sodium. Si la contamination est due à de petites particules hydrophobes, par exemple des graisses, des détergents et des peptides, la matrice doit alors être lavée avec un alcool organique. L'addition de 0,1 % d'acide trifluoroacétique à l'alcool organique peut être avantageuse. Après chaque séquence de lavage, une élution à teneur élevée en sels doit être effectuée, et après un nettoyage minutieux, la colonne doit être conditionnée suivant les instructions (voir <b>Tableau 1</b> ).
Bio-Monolith (QA, DEAE, SO <sub>3</sub> )	Lavez avec au moins 2 mL d'un tampon contenant du NaCl 1 M à un débit compris entre 0,5 et 1,0 mL/min. Reconditionnez la colonne avec 5 à 6 mL de la phase mobile initiale à un débit de 1 mL/min. Pour des résultats optimaux, répétez ces étapes à la fin de chaque analyse chromatographique.

## Recommandations pour le stockage

Le stockage à long terme des colonnes échangeuses d'ions peut être effectué en toute sécurité (voir **Tableau 5** pour les instructions spécifiques à chaque phase). Préalablement au stockage, les raccords doivent être soigneusement obturés par des bouchons afin d'empêcher l'assèchement du remplissage. Il est possible de stocker les colonnes en toute sécurité de un à plusieurs jours dans la plupart des phases mobiles.

**Tableau 5. Instructions de stockage**

Colonne	Instructions de rinçage avant un stockage à long terme
Bio SCX, Bio WCX et Bio MAb	Rincez à l'aide d'un tampon phosphate 20 mM (solution d'expédition) avec 0,1 % de $\text{NaN}_3$ (azoture de sodium) à pH 6,0. Rincez avec au moins 15 volumes de colonne.
Bio SAX et Bio WAX	Rincez à l'aide de Tris 20 mM avec 0,1 % de $\text{NaN}_3$ (azoture de sodium) à pH 8,0. Rincez avec au moins 15 volumes de colonne.
PL-SAX et PL-SCX	Lavez avec du chlorure de sodium 1 M. Après un rinçage avec de l'eau, le tampon de stockage de $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 0,1 M contenant 0,02 % d'azoture de sodium peut être ajouté.
Bio-Monolith (QA, DEAE, $\text{SO}_3$ )	Si la colonne reste inutilisée pendant plus de deux jours, elle doit être lavée avec au moins 1 mL d'eau déionisée puis rincée avec au moins 2 mL d'une solution d'éthanol à 20 % à un débit compris entre 0,2 et 0,5 mL/min, fermée avec des bouchons pour colonne, et stockée convenablement entre 4 et 30 °C.

## Conseils pour obtenir des résultats chromatographiques optimaux

- Optimisez votre instrument en minimisant les longueurs des connexions 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 [agilent.com/chem/lccapillaries](http://agilent.com/chem/lccapillaries)
- Assurez-vous que la fréquence de collecte des données est optimisée pour votre colonne.
- Utilisez la filtration ou d'autres techniques de préparation d'échantillons, selon le cas, pour votre échantillon. Pour en savoir plus, consultez le site [agilent.com/chem/sampleprep](http://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 离子交换色谱柱的基本信息。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：

**[agilent.com/chem/biocolumnchoices](https://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。质控测试系统是自标准系统优化而来，可以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

**[agilent.com/chem/columnsupport](https://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
- 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使用 1200 bar 可拆卸接头 (部件号 5067-4733)



聚酮接头, 部件号 5042-8957



安捷伦 1200 bar 可拆卸接头, 部件号 5067-4733

### 色谱柱平衡

安捷伦在装运色谱柱之前会对它们逐一进行测试。因此, 第一次使用时, 必须将储存溶剂更换为洗脱液, 并使用合适的对离子平衡色谱柱。确保所有组分都是可溶且互溶的。需要谨慎操作, 确保色谱柱在使用前和执行分析序列前已达到平衡 (请参见**表 1**)。这样可以保证重现性, 并且能防止保留时间漂移。安装色谱柱后, 建议先用低流速冲洗色谱柱, 待压力稳定后, 将流速提高至分析所需的流速。

表 1. 使用前说明

色谱柱	步骤
<p><b>BioIEX和BioMAb:</b> 使用前, 冲洗出储存溶剂 (20 mM 磷酸缓冲液, pH 6.0), 并使用对离子平衡色谱柱。</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 使用 20 倍柱体积的上样缓冲液 (缓冲液 A) 以 0.1 mL/min 的流速冲洗色谱柱, 慢慢提高流速直至预期的操作流速, 并冲洗至基线平稳</li> <li>2. 若基线或色谱柱反压出现波动, 可提高流速冲洗 3-5 min, 切记不要超过相应粒径色谱柱所能承受的最高压力</li> <li>3. 在色谱柱达到平衡且基线趋于稳定后, 即可以进行样分析</li> </ol>
<p><b>PL-SAX 和 PL-SCX:</b> 用前, 冲洗出储存溶剂 (0.1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和 0.02% 叠氮化钠), 并使用对离子平衡色谱柱。对于 4.6mm 色谱柱, 推荐在 0.5 mL/min 的条件下执行以下步骤。</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 使用 5 倍柱体积的低离子强度流动相缓冲液 A 冲洗色谱柱</li> <li>2. 使用高离子强度流动相缓冲液 B 冲洗色谱柱, 以置换对离子。继续使用至少 5 倍柱体积的缓冲液 B 冲洗色谱柱, 直至获得稳定的基线, 同时也确保能达到要求的灵敏度</li> <li>3. 使用前, 以至少 5 倍柱体积的缓冲液 A 平衡色谱柱</li> </ol>
<p><b>Bio-Monolith:</b> 使用前, 冲洗出储存溶剂 (20% 乙醇), 并使用对离子平衡色谱柱。</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 使用至少 10 倍柱体积的结合流动相 (低离子强度) 冲洗色谱柱, 推荐流速为工作流速的一半</li> <li>2. 其次, 使用至少 10 倍柱体积的高离子强度的缓冲液 (如 1.0 或 2.0 M 的 NaCl 溶液) 冲洗色谱柱, 流速为工作流速的一半</li> <li>3. 最后, 使用至少 10 倍柱体积的低离子强度结合流动相 (弱阴离子交换 DEAE 色谱柱则使用 20 倍柱体积流动相), 以工作流速平衡色谱柱</li> </ol>

## 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 2**）。超出这些值会降低色谱性能，缩短色谱柱的使用寿命，并且会有安全隐患

**表 2. 最大操作参数 – 色谱柱（内径高达 4.6 mm）**

色谱柱	pH 稳定性	最高操作温度	最大工作压力
Bio MAb	2.0 – 12.0	80 °C	1.7 µm = 689 bar; 3 µm = 551 bar; 5 µm = 413 bar; 10 µm = 275 bar
Bio IEX (SCX, WCX, SAX, WAX)	2.0 – 12.0	80 °C	1.7 µm = 689 bar; 3 µm = 551 bar; 5 µm = 413 bar; 10 µm = 275 bar
PL-SAX, PL-SCX	1.0 – 14.0	80 °C	207 bar
Bio-Monolith (QA, DEAE, SO <sub>3</sub> )	2.0 – 13.0	40 °C	150 bar

## 其他操作提示

- 虽然反向使用色谱柱通常对色谱柱没有危害，但也应该尽量避免出现此类情况，除非您要除去堵塞柱前滤芯的颗粒（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制备流动相。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
- 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
- 在线过滤器或保护柱能保护色谱柱，并延长其使用寿命
- 色谱柱在不使用时，不应将其放置在高 pH 值或高温环境中
- 新的色谱柱可能含有机溶剂和水的混合物，其中可能会有缓冲盐（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通过色谱柱



表 3. 运输储存溶剂

色谱柱	运输储存溶剂	兼容性
<b>阳离子交换</b> Agilent Bio WCX、 Bio SCX 和 Bio MAb  Agilent PL-SCX	20 mM 磷酸盐缓冲液, pH 6.0  0.1 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 和 0.02% 叠氮化钠	所有常用的离子交换洗脱液、缓冲液/盐。 与非离子型、两性离子型表面活性剂兼容, 与阴离子表面活性剂不兼容。
<b>阴离子交换</b> Agilent Bio SAX 和 Bio WAX  Agilent PL-SAX	20 mM 磷酸盐缓冲液, pH 6.0  0.1 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 和 0.02% 叠氮化钠	所有常用的离子交换洗脱液、缓冲液/盐。 与非离子型、两性离子型表面活性剂兼容, 与阴离子表面活性剂不兼容。
<b>Agilent Bio-Monolith</b> QA, DEAE, SO <sub>3</sub>	20% 乙醇	所有常用的离子交换洗脱液、缓冲液/盐。浓度最高达 2.0 M NaOH 和 1.0 M HCl。浓度最高达 30% 的异丙醇、甲醇和乙二醇水溶液。浓度高达 50% 的乙酸。浓度高达 70% 的乙醇。胃蛋白酶、胰蛋白酶和 DNase 的酶解溶液。

## 流动相的选择和操作温度

离子交换通常使用水缓冲液以调节 pH，多数情况下，使用盐溶液梯度洗脱。此外，也可以在等离子强度下使用 pH 梯度。起始缓冲液 pH 与蛋白质或多肽的等电点应至少相差 1 个 pH 单位。

## 色谱柱维护

填料粒径为 2  $\mu\text{m}$  以下的色谱柱配有 0.5  $\mu\text{m}$  的入口滤芯。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。建议在任何色谱柱上执行进样之前，对样品进行过滤。

## 清洗色谱柱，延长色谱柱使用寿命

随着使用时间的推移，色谱柱也可能出现柱压升高的情况。原因在于蛋白质吸附在填料上或是堵塞入口滤芯，会导致柱压升高和柱效降低。清洗色谱柱可以降低柱压并改善柱效。

如果使用了保护柱或柱前过滤器，则可以更换保护柱和过滤器，并卸下分析柱。清洗色谱柱时，使用至少 15 倍柱体积的清洗缓冲液反冲色谱柱，压力不要超过相应粒径色谱柱最大压力限值的一半。

表 4. 清洗说明

色谱柱	色谱柱纯化
Bio SCX, Bio WCX 和 Bio MAb	50 mM 磷酸盐缓冲液、1 M NaCl、pH 10。对于碱性蛋白质，使用低 pH 的含盐清洗缓冲液冲洗色谱柱。对于酸性蛋白质，则使用较高 pH 的含盐清洗缓冲液冲洗色谱柱。对于疏水蛋白质，则可以使用含有机溶剂的清洗缓冲液去除。
Bio SAX 和 Bio WAX	含有 150 mM 硝酸钾的 75% 乙腈溶液，用 HCl 调节 pH 至 2。
PL-SAX 和 PL-SCX	1 M 酸，如乙酸/盐酸；1 M 碱，如氢氧化钠。如果污染是由疏水性小分子化合物如脂肪、表面活性剂和多肽等造成的，则需要使用有机醇将其去除。较为有利的做法是向有机溶剂中加入 0.1% 三氟乙酸。在每一清洗序列后，使用高盐浓度洗脱液进行冲洗。执行彻底的清洗程序后，按使用说明平衡色谱柱（请参见表 1）。
Bio-Monolith (QA, DEAE, SO <sub>3</sub> )	使用至少 2 mL 含 1 M NaCl 的缓冲液冲洗色谱柱，流速为 0.5-1.0 mL/min。使用 5-6 mL 起始流动相重新平衡色谱柱，流速为 1 mL/min。为获得更好的分析结果，请在每一次色谱运行结束后重复上述步骤。

## 储存建议

可以安全地长期储存离子交换色谱柱（有关特定固定相色谱柱的说明请参见表 5）。储存之前将堵头拧紧，密封色谱柱，以免填料变干。色谱柱可以在一至几天内安全储存于大多数流动相中。

表 5. 储存说明

色谱柱	长期储存前的冲洗说明
Bio SCX、Bio WCX 和 Bio MAb	使用 pH 6.0 含 0.1% $\text{NaN}_3$ (叠氮化钠) 的 20 mM 磷酸盐缓冲液 (保护剂) 冲洗色谱柱。使用至少 15 倍柱体积的缓冲液进行冲洗。
Bio SAX 和 Bio WAX	使用 pH 8.0 含 0.1% $\text{NaN}_3$ (叠氮化钠) 的 20 mM Tris 溶液进行冲洗。使用至少 15 倍柱体积的缓冲液进行冲洗。
PL-SAX 和 PL-SCX	使用 1 M 氯化钠进行冲洗。用水冲洗完后, 将色谱柱保存在含 0.02% 叠氮化钠的 0.1 M $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 缓冲液中。
Bio-Monolith (QA, DEAE, $\text{SO}_3$ )	若色谱柱不使用的超过两天, 需使用至少 1 mL 的去离子水冲洗色谱柱, 然后使用至少 2 mL 的 20% 乙醇溶液以 0.2-0.5 mL/min 的流速进行冲洗。执行以上操作后, 使用端插头密封色谱柱, 保存温度为 4-30 °C。

## 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 [agilent.com/chem/lccapillaries](http://agilent.com/chem/lccapillaries)
- 确保数据采集速率适用于您的色谱柱
- 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 [agilent.com/chem/sampleprep](http://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-Ionen-austausch-Säulen. Weiterführende Informationen zu bestimmten Phasen oder Produktfamilien finden Sie unter:

**[agilent.com/chem/biocolumnchoices](https://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

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

## Verwendung der Säule

### Installation

- Die Flussrichtung ist auf der Säule angegeben.
- 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*



*Abnehmbare 1200-bar-Fittings von  
Agilent, Best.-Nr. 5067-4733*

### Säulenkonditionierung

Jede Säule wird vor dem Versand geprüft. Vor der ersten Verwendung müssen Sie das Transportlösungsmittel durch Ihren Eluenten ersetzen und die Säule mit dem richtigen Gegenion konditionieren. Achten Sie darauf, dass alle Komponenten mischbar und löslich sind. Stellen Sie sicher, dass die Säule vor dem Gebrauch und vor dem Start jeder Analyse in einer Sequenz richtig äquilibriert wurde (siehe **Tabelle 1**). Dadurch wird die Reproduzierbarkeit sichergestellt und eine Retentionszeitverschiebung vermieden. Bei der Installation einer Säule empfiehlt es sich, immer mit einer niedrigen Flussrate zu beginnen. Sobald sich der Druck stabilisiert, kann die Flussrate auf die Betriebsflussrate erhöht werden, die für die Analyse verwendet werden soll.

**Tabelle 1: Gebrauchshinweise – Vor der ersten Verwendung**

Säule	Verfahren
<p><b>Bio IEX und Bio MAb:</b> Spülen Sie die Transportlösung (20 mM Phosphatpuffer, pH 6,0) aus und konditionieren Sie die Säule vor der Verwendung mit dem benötigten Gegenion.</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Spülen Sie die Säule mit 20 Säulenvolumina des Beladungspuffers (Puffer A) bei 0,1 mL/min. Erhöhen Sie die Flussrate schrittweise, bis Sie Ihre gewünschten Betriebsbedingungen erreichen, und warten Sie, bis sich die Basislinie stabilisiert hat.</li> <li>2. Wenn die Basislinie oder der Säulendruck fluktuieren, erhöhen Sie die Flussrate für 3 bis 5 Minuten. Beachten Sie dabei den maximalen Druck für jede Partikelgröße.</li> <li>3. Nach der Äquilibration und Stabilisierung der Basislinie kann Probenmaterial injiziert werden.</li> </ol>
<p><b>PL-SAX und PL-SCX:</b> Spülen Sie die Transportlösung (0,1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 0,02 % Natriumazid) aus und konditionieren Sie die Säule vor der Verwendung mit dem benötigten Gegenion. Für Säulen mit 4,6 mm wird für das folgende Verfahren eine Rate von 0,5 mL/min empfohlen.</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Eluieren Sie 5 Säulenvolumina mit der Komponente mit niedriger Ionenstärke der mobilen Phase (Puffer A).</li> <li>2. Tauschen Sie das Gegenion aus, indem Sie mit der Komponente mit hoher Ionenstärke der mobilen Phase eluieren (Puffer B). Fahren Sie mit diesem Eluenten fort, bis eine stabile Basislinie mit der gewünschten Empfindlichkeit erreicht ist (mindestens 5 Säulenvolumina).</li> <li>3. Äquilbrieren Sie die Säule vor der Verwendung mit Puffer A (mindestens 5 Säulenvolumina).</li> </ol>
<p><b>Bio-Monolith:</b> Spülen Sie die Transportlösung (20 % Ethanol) aus und konditionieren Sie die Säule vor der Verwendung mit dem benötigten Gegenion.</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Spülen Sie die Säule mit mindestens 10 Säulenvolumina der bindenden mobilen Phase (niedrige Ionenstärke) bei halber Arbeitsflussrate.</li> <li>2. Spülen Sie die Säule mit mindestens 10 Säulenvolumina des Puffers mit hoher Ionenstärke (z. B. Puffer mit 1,0 oder 2,0 M NaCl) bei halber Arbeitsflussrate.</li> <li>3. Äquilbrieren Sie die Säule mit mindestens 10 Säulenvolumina der bindenden mobilen Phase (niedrige Ionenstärke) bei normaler Arbeitsflussrate (bzw. mit 20 Säulenvolumina für die DEAE-Säule mit schwachem Anionenaustausch).</li> </ol>

## 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 2**). Ein Überschreiten dieser Grenzwerte beeinträchtigt die Chromatographieleistung und Lebensdauer der Säule und kann gefährlich sein.

**Tabelle 2: Maximale Betriebsparameter – Säulen bis 4,6 mm**

Säule	pH-Stabilität	Maximale Betriebs-temperatur	Maximaler Betriebsdruck
Bio MAb	2,0 – 12,0	80 °C	1,7 µm = 689 bar; 3 µm = 551 bar; 5 µm = 413 bar; 10 µm = 275 bar
Bio IEX (SCX, WCX, SAX, WAX)	2,0 – 12,0	80 °C	1,7 µm = 689 bar; 3 µm = 551 bar; 5 µm = 413 bar; 10 µm = 275 bar
PL-SAX, PL-SCX	1,0 – 14,0	80 °C	207 bar
Bio-Monolith (QA, DEAE, SO3)	2,0 – 13,0	40 °C	150 bar



## Weitere Tipps zur Bedienung

- In der Regel schadet das Rückspülen der Säule nicht. Dennoch sollte Rückspülen vermieden werden, es sei denn, die Fritte ist verstopft und muss gereinigt werden (siehe „Pflege der Säule“).
- Es wird empfohlen, mit einer reduzierten Flussrate zu beginnen und diese allmählich auf die gewünschte Betriebsflussrate zu erhöhen.
- Verwenden Sie zur Herstellung der mobilen Phase stets hochreine Reagenzien und Chromatographie-Lösungsmittel. Entgasen und filtern Sie die mobile Phase vor dem Gebrauch.
- Das Zerlegen der Säule verschlechtert ihre Leistung.
- Wenn die Säule mit einer mobilen Phase außerhalb des empfohlenen pH-Bereichs betrieben wird (siehe **Tabelle 2**), verkürzt sich ihre Lebensdauer.
- Mit einem In-Line-Filter oder einer Vorsäule können Sie Ihre Säule schützen und die Lebensdauer erhöhen.
- Säulen, die nicht in Gebrauch sind, sollten nicht bei erhöhtem pH-Wert oder erhöhter Temperatur aufbewahrt werden.
- Neue Säulen können eine Mischung aus organischen Lösungsmitteln und Wasser enthalten, in der Puffersalze gelöst sind (siehe **Tabelle 3**). Achten Sie zunächst darauf, dass die Säule nicht mit einer mobilen Phase beschickt wird, die Ausfällungen bewirkt oder nicht vollständig mischbar ist.

**Tabelle 3: Transportlösungsmittel**

Säule	Transport- lösungsmittel	Kompatibilität
<b>Kationenaustausch</b> Agilent Bio WCX, Bio SCX und Bio MAb  Agilent PL-SCX	20 mM Phosphatpuffer, pH-Wert 6,0  0,1 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> und 0,02 % Natriumazid	Alle gebräuchlichen Ionenaustausch-Eluenten, Puffer und Salze. Kompatibel mit nichtionischen und zwitterionischen Detergenzien, jedoch NICHT kompatibel mit kationischen Detergenzien.
<b>Anionenaustausch</b> Agilent Bio SAX und Bio WAX  Agilent PL-SAX	20 mM Phosphatpuffer, pH-Wert 6,0  0,1 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> und 0,02 % Natriumazid	Alle gebräuchlichen Ionenaustausch-Eluenten, Puffer und Salze. Kompatibel mit nichtionischen und zwitterionischen Detergenzien, jedoch NICHT kompatibel mit anionischen Detergenzien.
<b>Agilent Bio-Monolith</b> QA, DEAE, SO <sub>3</sub>	20 % Ethanol	Alle gebräuchlichen Ionen- austausch-Eluenten, Puffer und Salze. Bis zu 2,0 M NaOH und 1,0 M HCl. Wässrige Lösungen mit bis zu 30 % 2-Propanol, Methanol, Acetonitril. Bis zu 50 % Essigsäure. Bis zu 70 % Ethanol. Enzymatische Lösungen wie Pepsin, Trypsin, DNase.

## Auswahl der mobilen Phase

Beim Ionenaustausch werden wässrige Puffer zur Steuerung des pH-Werts und in der Regel Salzgradienten für die Elution verwendet. Alternativ kann ein pH-Gradient mit konstanter Ionenstärke verwendet werden. Der Start-pH-Wert des Puffers sollte mindestens eine pH-Einheit vom isoelektrischen Punkt abweichen.

## Pflege der Säule

Säulen mit einer Partikelgröße von weniger als 2  $\mu\text{m}$  verfügen über eine 0,5- $\mu\text{m}$ -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 verwendet werden. Generell wird für alle Säulen empfohlen, Proben vor der Injektion zu filtern.

## Reinigung der Säule zur Verlängerung der Lebensdauer

Es ist wahrscheinlich, dass mit der Zeit ein Anstieg des Säulenrückdrucks auftritt. Durch Absorption von Protein am Packungsmaterial oder an der Einlassfritte entsteht ein Druckanstieg, der die Leistung der Säule beeinträchtigt. Durch Reinigung der Säule kann der Rückdruck gesenkt und die Leistung verbessert werden.

Bei Verwendung einer Vorsäule oder eines Vorsäulenfilters ersetzen Sie die Vorsäule oder den Filter und entfernen Sie die Hauptsäule.

Um die Säule zu reinigen, spülen Sie diese in umgekehrter Richtung mit dem Reinigungspuffer (mindestens 15 Säulenvolumina) bei höchstens 50 % des maximalen Drucks für die jeweilige Phase bzw. Partikelgröße.

**Tabelle 4: Reinigung**

Säule	Reinigen der Säule
Bio SCX, Bio WCX und Bio MAb	50 mM Phosphatpuffer, 1 M NaCl, pH-Wert 10. Für basische Proteine: Spülen Sie die Säule mit einem salzhaltigen Reinigungspuffer mit niedrigem pH-Wert. Für saure Proteine: Spülen Sie die Säule mit einem salzhaltigen Reinigungspuffer mit höherem pH-Wert. Hydrophobe Proteine können durch Verwendung einer organischen Lösung entfernt werden, die Reinigungspuffer enthält.
Bio SAX und Bio WAX	150 mM Kaliumnitrat in 75 % Acetonitril, pH-Wert 2 (mit HCl eingestellt).
PL-SAX und PL-SCX	1 M Säure, z. B. Essig- oder Salzsäure, und 1 M Base, z. B. Natriumhydroxid. Wenn die Kontamination auf kleine hydrophobe Moleküle zurückzuführen ist, z. B. Fette, Detergenzien und Peptide, sollte die Matrix mit einem organischen Alkohol gespült werden. Eine Zugabe von 0,1 % Trifluoressigsäure zum Alkohol kann vorteilhaft sein. Nach jeder Spülsequenz sollte eine Elution mit hohem Salzgehalt durchgeführt werden und nach gründlicher Reinigung sollte die Säule nach den Anweisungen konditioniert werden (siehe <b>Tabelle 1</b> ).
Bio-Monolith (QA, DEAE, SO <sub>3</sub> )	Mit mindestens 2 mL eines Puffers mit Zusatz von 1 M NaCl bei 0,5 bis 1,0 mL/min spülen. Rekonditionieren Sie die Säule mit 5 bis 6 mL der anfänglichen mobilen Phase bei 1 mL/min. Für beste Ergebnisse wiederholen Sie diese Schritte am Ende jedes Chromatographielaufs.

## Empfehlungen zur Aufbewahrung

Ionenaustausch-Säulen können über längere Zeit sicher gelagert werden (spezielle Anweisungen zu den einzelnen Phasen finden Sie in **Tabelle 5**). Vor der Lagerung müssen die Endfittings fest mit Endstopfen verschlossen werden, um die Säulenpackung vor dem Austrocknen zu schützen. Säulen können in den meisten mobilen Phasen für einen Zeitraum zwischen einem und mehreren Tagen sicher aufbewahrt werden.

**Tabelle 5: Hinweise zur Lagerung**

Säule	Hinweise zum Spülen vor der Langzeitlagerung
Bio SCX, Bio WCX und Bio MAb	Unter Verwendung von 20 mM Phosphatpuffer (Transportlösung) mit 0,1 % $\text{NaN}_3$ (Natriumazid) bei pH 6,0 spülen. Mindestens mit der 15fachen Menge des Säulenvolumens spülen.
Bio SAX und Bio WAX	Unter Verwendung von 20 mM Tris mit 0,1 % $\text{NaN}_3$ (Natriumazid) bei pH 8,0 spülen. Mindestens mit der 15fachen Menge des Säulenvolumens spülen.
PL-SAX und PL-SCX	Mit 1 M Natriumchlorid spülen. Nach Spülen mit Wasser kann der Aufbewahrungspuffer (0,1 M $\text{Na}_2\text{SO}_4$ mit 0,02 % Natriumazid) eingeführt werden.
Bio-Monolith (QA, DEAE, $\text{SO}_3$ )	Wenn die Säule länger als zwei Tage nicht verwendet wird, sollte diese mit mindestens 1 mL entionisiertem Wasser ausgespült und anschließend mit mindestens 2 mL einer 20%igen Ethanollösung mit einer Flussrate von 0,2 bis 0,5 mL/min gespült, mit Säulendstopfen versiegelt und bei 4 bis 30 °C gelagert werden.

## Tipps für optimale Chromatographiergebnisse

- 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-Säulen rote Kapillaren mit 0,12 mm Innendurchmesser. Weitere Informationen zu unseren Kapillaren finden Sie unter [agilent.com/chem/lccapillaries](http://agilent.com/chem/lccapillaries)
- Stellen Sie sicher, dass die Datenerfassungsrate für Ihre Säule optimiert ist.
- Führen Sie eine Probenfiltration oder eine andere geeignete Methode der Probenaufbereitung durch. Weitere Informationen finden Sie unter [agilent.com/chem/sampleprep](http://agilent.com/chem/sampleprep)
- Verwenden Sie nur zertifizierte Lampen in Ihren LC-Geräten, um eine optimale Leistung sicherzustellen.



Questo opuscolo fornisce informazioni generali sulla colonna a scambio ionico BioHPLC e AdvanceBio Agilent. Per altre informazioni dettagliate su questa fase specifica o famiglia di prodotti, vedi:

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

## **Introduzione**

A ogni nuova colonna Agilent è allegato un report sulle prestazioni QC della colonna, che include un cromatogramma di prova. Il sistema di prova QC è stato modificato partendo da un sistema standard, al fine di ridurre al minimo il volume morto del sistema, pertanto può differire dal sistema utilizzato 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 **[agilent.com/chem/columnsupport](https://www.agilent.com/chem/columnsupport)**

## Utilizzo della colonna

### Installazione

- La direzione del flusso è indicata sulla colonna.
- Agilent raccomanda di utilizzare raccordi in PEEK (cod. 5042-8957) per colonne fino a 600 bar e raccordi in acciaio 1200 bar (cod. 5067-4733) per colonne che saranno utilizzate a pressioni UHPLC.



*Raccordi in polichetone  
cod. 5042-8957*



*Raccordo in acciaio 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, e la colonna condizionata con il contro-ione corretto. Assicurarsi che tutti i componenti siano miscibili e solubili. Accertarsi che la colonna sia stata correttamente equilibrata prima di utilizzarla e prima dell'avvio di ogni analisi in una sequenza (vedi **Tabella 1**). Ciò garantirà la riproducibilità e aiuterà a prevenire la deriva del tempo di ritenzione. Quando si installa una colonna è sempre raccomandabile iniziare a condizionarla a flusso non elevato; una volta stabilizzata la pressione, aumentare il flusso fino al livello operativo che sarà utilizzato per l'analisi.

**Tabella 1. Istruzioni - prima di iniziare a utilizzare la colonna**

Colonna	Procedura
<p><b>Bio IEX e Bio MAB:</b> Eliminare con lavaggio la soluzione di trasporto (tampone fosfato 20 mM, pH 6,0) e condizionare la colonna con il contro-ione richiesto, prima di utilizzarla.</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Lavare la colonna con 20 volumi colonna del tampone di caricamento (tampone A) a 0,1 mL/min. Aumentare gradualmente il flusso fino a raggiungere le condizioni operative previste e ottenere una linea di base piatta.</li> <li>2. Se la linea di base o la contro-pressione della colonna fluttua, aumentare il flusso per 3-5min, tenendo presente il valore di pressione massima per ciascuna dimensione delle particelle.</li> <li>3. Una volta equilibrata e ottenuta la stabilità della linea di base, la colonna è pronta per l'iniezione del campione.</li> </ol>
<p><b>PL-SAX e PL-SCX:</b> Eliminare con lavaggio la soluzione di trasporto (0,1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e sodio azide 0,02%) e condizionare la colonna con il contro-ione richiesto prima di utilizzarla. Si raccomanda di eseguire la seguente procedura a una velocità di 0,5 mL/min per una colonna dal diametro interno di 4,6 mm.</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Eluire per 5 volumi colonna con il componente a bassa forza ionica della fase mobile, tampone A.</li> <li>2. Scambiare il contro-ione eluendo con il componente ad alta forza ionica della fase mobile, tampone B. Continuare con questo eluente fino ad avere una linea di base stabile alla sensibilità richiesta, un minimo di 5 volumi colonna.</li> <li>3. Equilibrare con tampone A per un minimo di 5 volumi colonna prima dell'utilizzo.</li> </ol>
<p><b>Bio-Monolith:</b> Eliminare con lavaggio la soluzione di trasporto (etanolo 20%) e condizionare la colonna con il contro-ione richiesto prima di utilizzarla.</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Lavare con almeno 10 volumi colonna della fase mobile legante (bassa forza ionica) a metà del flusso di lavoro.</li> <li>2. Lavare con almeno 10 volumi colonna del tampone ad alta forza ionica (per es. tampone con 1,0 o 2,0 M NaCl) a metà del flusso di lavoro.</li> <li>3. Equilibrare con almeno 10 volumi colonna (20 volumi colonna per la colonna, DEAE, a scambio anionico debole) di fase mobile legante (bassa forza ionica) a flusso di lavoro.</li> </ol>



## Importanti considerazioni sulla sicurezza

- Tutti i punti di collegamento nei sistemi di cromatografia liquida sono potenziali fonti di perdite. Gli utenti devono tenere conto della tossicità o infiammabilità delle fasi mobili.
- Poiché le particelle sono di piccole dimensioni, gli impaccamenti a secco delle colonne possono essere inalati. Agilent sconsiglia di smontare i raccordi terminali della colonna e di esporre all'aria la fase. 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 2**). Superare questi limiti influisce sulle prestazioni della cromatografia e sulla durata della colonna e inoltre potrebbe essere pericoloso.

**Tabella 2. Max. parametri operativi – colonne fino a 4,6 mm**

Colonna	Stabilità del pH	Massima temperatura operativa	Massima pressione operativa
Bio MAb	2,0 – 12,0	80 °C	1,7 µm = 689 bar; 3 µm = 551 bar; 5 µm = 413 bar; 10 µm = 275 bar
Bio IEX (SCX, WCX, SAX, WAX)	2,0 – 12,0	80 °C	1,7 µm = 689 bar; 3 µm = 551 bar; 5 µm = 413 bar; 10 µm = 275 bar
PL-SAX, PL-SCX	1,0 – 14,0	80 °C	207 bar
Bio-Monolith (OA, DEAE, S03)	2,0 – 13,0	40 °C	150 bar

## 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 ostruzioni dal frit (vedi "manutenzione colonna").
- Si raccomanda di iniziare il condizionamento con un flusso ridotto 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.
- Un utilizzo della colonna all'esterno degli intervalli di pH raccomandati per la fase della colonna (vedi **Tabella 2**) ridurrà la sua durata operativa.
- Per proteggere la colonna e aumentarne la durata operativa, si può utilizzare un filtro in linea o una precolonna.
- Le colonne non devono essere tenute a pH o temperatura elevata se non sono utilizzate.
- Le nuove colonne possono contenere una miscela di solventi organici e acqua, con l'eventuale presenza di sali tampone (vedi **Tabella 3**). Inizialmente, prestare attenzione alle fasi mobili da far passare nella colonna, poiché possono causare la formazione di un precipitato oppure potrebbero non essere completamente miscibili.

**Tabella 3. Solventi di trasporto**

Colonna	Solventi di trasporto	Compatibilità
<b>Scambio cationico</b> Bio WCX, Bio SCX, e Bio MAb Agilent  PL-SCX Agilent	20 mM di tampone fosfato, pH 6,0  0,1 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e sodio azide 0,02%	Tutti eluenti per scambio ionico, tamponi e sali comunemente utilizzati.  Compatibili con detergenti non-ionici e zwitterionici, ma NON compatibili con detergenti cationici.
<b>Scambio anionico</b> Bio SAX e Bio WAX Agilent  PL-SAX Agilent	20 mM di tampone fosfato, pH 6,0  0,1 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e sodio azide 0,02%	Tutti eluenti per scambio ionico, tamponi e sali comunemente utilizzati.  Compatibili con detergenti non-ionici e zwitterionici, ma NON compatibili con detergenti anionici.
<b>Bio-Monolith Agilent</b> QA, DEAE, SO <sub>3</sub>	Etanolo 20%	Tutti eluenti per scambio ionico, tamponi e sali comunemente utilizzati. Fino a 2,0 M NaOH e 1,0 M HCl. Soluzioni acquose fino al 30% di 2-propanolo, metanolo, acetonitrile. Fino al 50% di acido acetico. Fino al 70% di etanolo. Soluzioni enzimatiche come pepsina, tripsina, DNasi.

## Selezione della fase mobile e temperature operative

Lo scambio ionico utilizza tamponi acquosi per controllare il pH, più comunemente gradienti salini per eluizione. In alternativa, può essere utilizzato un gradiente di pH a forza ionica costante. Il pH del tampone di avvio dovrebbe scostarsi di almeno una unità di pH dal punto isoelettrico per proteine e peptidi.

## Manutenzione della colonna

Colonne con particelle a dimensione minore di 2  $\mu\text{m}$  hanno un frit di ingresso di 0,5  $\mu\text{m}$ . 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 per proteggere la colonna analitica e aumentarne la durata operativa. Si raccomanda inoltre di filtrare i campioni, prima di iniettarli in colonna.

## Lavare la colonna per una maggiore durata operativa

E' probabile che col tempo si verifichi un aumento di contropressione della colonna. L'assorbimento di proteine al materiale di impaccamento o sul frit di ingresso è causa di questo aumento in pressione e ridurrà anche le prestazioni della colonna. Lavare la colonna può abbassare il valore di contropressione e migliorare la prestazione.

È possibile utilizzare una precolonna o filtro precolonna, sostituire la protezione o il filtro ed smontare la colonna principale. Per pulire la colonna, lavarla in direzione inversa con il tampone di pulizia per almeno 15 volumi colonna a non oltre il 50% del limite massimo di pressione delle particelle.

**Tabella 4. Istruzioni per la pulizia**

Colonna	Lavaggio della colonna
Bio SCX, Bio WCX e Bio MAb	Tampone fosfato 50 mM, 1 M NaCl, pH 10. Per proteine basiche, lavare la colonna con un tampone di lavaggio salino a basso pH. Per proteine acide, lavare la colonna con un tampone di lavaggio salino a pH più alto. Le proteine idrofobiche possono essere eliminate utilizzando un tampone di lavaggio contenente solvente organico.
Bio SAX e Bio WAX	150 mM potassio nitrato in acetonitrile al 75%, pH 2 (regolato con HCl).
PL-SAX e PL-SCX	11 M acido, per es. acetico o cloridrico e 1 M base, per es. idrossido di sodio. Se la contaminazione è dovuta a piccole molecole idrofobiche, per es. grassi, detergenti e peptidi, allora la matrice dovrebbe essere lavata con un alcool organico. L'aggiunta di acido trifluoroacetico allo 0,1% al prodotto organico può essere vantaggioso. Dopo ogni sequenza di lavaggio, dovrebbe essere eseguita una eluizione ad alta salinità, e dopo ogni pulizia completa, la colonna dovrebbe essere condizionata secondo le istruzioni (vedi <b>Tabella 1</b> ).
Bio-Monolith (QA, DEAE, SO <sub>3</sub> )	Lavare con almeno 2 mL di un tampone contenente 1 M di NaCl a flusso da 0,5 a 1,0 mL/min. Ricondizionare la colonna con 5 o 6 mL della fase mobile iniziale a 1 mL/min. Per avere i migliori risultati, ripetere questi passaggi al termine di ogni ciclo cromatografico.

## Raccomandazioni di magazzinaggio

La conservazione a lungo termine di colonne a scambio ionico può essere eseguito in modo sicuro (vedi **Tabella 5** per istruzioni specifiche di fase). Prima di riporla, i raccordi terminali devono essere chiusi ermeticamente con tappi terminali per evitare che l'impaccamento si secchi. Le colonne possono essere conservate da 1 a parecchi giorni nella maggior parte delle fasi mobili.

**Tabella 5. Istruzioni di stoccaggio**

Colonna	Istruzioni di lavaggio prima dello stoccaggio a lungo termine
Bio SCX, Bio WCX e Bio MAb	Lavare usando un tampone fosfato da 20 mM (la soluzione di trasporto), con 0,1% $\text{NaN}_3$ (sodio azide) a pH 6,0. Eseguire un lavaggio con almeno 15 volumi colonna.
Bio SAX e Bio WAX	Lavare utilizzando 20 mM Tris con 0,1% $\text{NaN}_3$ (sodio azide) a pH 8,0. Eseguire un lavaggio con almeno 15 volumi colonna.
PL-SAX e PL-SCX	Lavaggio con 1 M di cloruro di sodio. Dopo il lavaggio ad acqua, può essere introdotto il tampone di stoccaggio 0,1 M $\text{Na}_2\text{SO}_4$ contenente sodio azide 0,02%.
Bio-Monolith (OA, DEAE, $\text{SO}_3$ )	Se la colonna non sarà utilizzata per più di due giorni, lavarla con almeno 1 mL di acqua DI e quindi eseguire un lavaggio con almeno 2 mL di una soluzione al 20% di etanolo ad un flusso da 0,2 a 0,5 mL/min; quindi chiuderla ermeticamente con tappi terminali da colonna, e conservarla adeguatamente ad una temperatura tra i 4 e i 30 °C.

## Consigli per avere i migliori risultati cromatografici

- Ottimizza la tua strumentazione riducendo al minimo la lunghezza dei tubi tra i componenti per ridurre il volume extra colonna e l'allargamento della 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 [agilent.com/chem/lccapillaries](http://agilent.com/chem/lccapillaries)
- Verifica che la velocità di acquisizione dei dati sia ottimizzata per la tua colonna.
- Per ogni campione, a seconda della matrice, utilizzare adeguate procedure di preparazione, come la filtrazione. Per saperne di più, visita la pagina del sito [agilent.com/chem/sampleprep](http://agilent.com/chem/sampleprep)
- Utilizza lampade certificate sugli strumenti LC per avere migliori prestazioni.



En este folleto se ofrece información general sobre las columnas de intercambio iónico Agilent BioHPLC y AdvanceBio. Si desea obtener más información acerca de una fase o una familia determinadas, consulte:

**[agilent.com/chem/biocolumnchoices](https://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 Control de Calidad (QC) de rendimiento.

Si desea hacer alguna pregunta concreta, póngase en contacto con el equipo de asistencia técnica mediante

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

## Uso de la columna

### Instalación

- La dirección del flujo está 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. Para el primer uso, se debe reemplazar el disolvente de transporte por el eluyente, así como acondicionar la columna con el contraión adecuado. Compruebe que todos los componentes se puedan mezclar y disolver. Conviene asegurarse de que la columna se ha equilibrado de forma adecuada antes de su uso y antes del inicio de cada análisis en una secuencia (consulte la **Tabla 1**). De esta manera, se garantiza la reproducibilidad y se ayuda a prevenir la deriva del tiempo de retención. Cuando se instala una columna, es aconsejable comenzar siempre con una velocidad de flujo baja y, a medida que la presión se estabiliza, aumentar la velocidad de flujo hasta alcanzar la velocidad de flujo operativa que se usará para realizar el análisis.



**Tabla 1. Instrucciones: antes del primer uso**

Columna	Procedimiento
<p><b>Bio IEX y Bio MAb:</b> lavar la solución de transporte (tampón de 20 mM de fosfato, pH 6,0) y acondicionar con el contraíón necesario antes de su uso.</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Purgue la columna con 20 volúmenes de columna del tampón de carga (tampón A) a 0,1 mL/min. Aumente gradualmente la velocidad de flujo hasta que alcance las condiciones de funcionamiento adecuadas y deje que se establezca la línea de base.</li> <li>2. Si la línea de base o la retropresión de la columna fluctúan, aumente el flujo durante 3-5 min, sin olvidar la presión máxima para cada tamaño de partícula.</li> <li>3. Una vez que se haya equilibrado y la línea de base sea estable, la columna está lista para una inyección de muestra.</li> </ol>
<p><b>PL-SAX y PL-SCX:</b> lavar la solución de transporte (<math>\text{Na}_2\text{SO}_4</math> de 0,1 M y azida sódica al 0,02%) y acondicionar con el contraíón necesario antes de su uso. Se recomienda realizar el siguiente procedimiento a 0,5 mL/min para una columna de 4,6 mm.</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Eluya con 5 volúmenes de columna con el componente de fuerza iónica baja de la fase móvil, tampón A.</li> <li>2. Intercambie el contraíón mediante elución con el componente de fuerza iónica alta de la fase móvil, tampón B. Continúe con este eluyente hasta que se consiga una línea de base estable con la sensibilidad necesaria, un mínimo de 5 volúmenes de columna.</li> <li>3. Equilibre con el tampón A con un mínimo de 5 volúmenes de columna antes de su uso.</li> </ol>
<p><b>Bio-Monolith:</b> lavar la solución de transporte (etanol al 20%) y acondicionar con el contraíón necesario antes de su uso.</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Lave la columna con al menos 10 volúmenes de columna de la fase móvil de unión (fuerza iónica baja) a la mitad de la velocidad de flujo operativa.</li> <li>2. Lave la columna con al menos 10 volúmenes de columna del tampón de fuerza iónica alta (por ejemplo, tampón con NaCl de 1,0 o 2,0 M) a la mitad de la velocidad de flujo operativa.</li> <li>3. Equilibre con al menos 10 volúmenes de columna (20 volúmenes de columna para columna de intercambio aniónico débil de DEAE) de la fase móvil de unión (fuerza iónica baja) a una velocidad de flujo operativa.</li> </ol>

## 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.
- Atégase a los límites de presión operativos anotados para cada columna (consulte la **Tabla 2**). Si se exceden estos límites, el rendimiento cromatográfico y la vida útil de la columna se verán afectados, lo que podría ser inseguro.

**Tabla 2. Parámetros operativos máximos: columnas de hasta 4,6 mm**

Columna	Estabilidad de pH	Temperatura operativa máxima	Presión operativa máxima
Bio MAb	2,0 – 12,0	80 °C	1,7 µm = 689 bar; 3 µm = 551 bar; 5 µm = 413 bar; 10 µm = 275 bar
Bio IEX (SCX, WCX, SAX, WAX)	2,0 – 12,0	80 °C	1,7 µm = 689 bar; 3 µm = 551 bar; 5 µm = 413 bar; 10 µm = 275 bar
PL-SAX, PL-SCX	1,0 – 14,0	80 °C	207 bar
Bio-Monolith (OA, DEAE, SO <sub>3</sub> )	2,0 – 13,0	40 °C	150 bar

## Otros consejos operativos

- Aunque, por lo general, no resulta dañino para la columna, se debe evitar el flujo inverso, excepto si se intenta extraer 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.
- 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.
- Es posible usar un filtro en línea o una precolumna para proteger la columna y aumentar su vida útil.
- Cuando las columnas no se utilicen, no se deben mantener con un pH elevado ni a una temperatura elevada.
- Las columnas nuevas pueden incluir una mezcla de disolventes orgánicos y agua, lo que puede contener sales de la solución tampón (consulte la **Tabla 3**). Inicialmente, se deben tomar precauciones para que ninguna fase móvil pase a través de la columna, lo que podría originar la formación de un precipitado o que no sea completamente miscible.

**Tabla 3. Disolventes de transporte**

Columna	Disolventes de transporte	Compatibilidad
<p><b>Intercambio catiónico</b> Agilent Bio WCX, Bio SCX y Bio MAb</p> <p>Agilent PL-SCX</p>	<p>Tampón de 20 mM de fosfato, pH 6,0</p> <p><math>\text{Na}_2\text{SO}_4</math> de 0,1 M y azida sódica al 0,02%</p>	<p>Todos los tampones, sales y eluyentes de intercambio iónico que se usan con frecuencia.</p> <p>Compatibles con detergentes no iónicos y zwitteriónicos, pero NO son compatibles con detergentes catiónicos.</p>
<p><b>Intercambio aniónico</b> Agilent Bio SAX y Bio WAX</p> <p>Agilent PL-SAX</p>	<p>Tampón de 20 mM de fosfato, pH 6,0</p> <p><math>\text{Na}_2\text{SO}_4</math> de 0,1 M y azida sódica al 0,02%</p>	<p>Todos los tampones, sales y eluyentes de intercambio iónico que se usan con frecuencia.</p> <p>Compatibles con detergentes no iónicos y zwitteriónicos, pero NO son compatibles con detergentes aniónicos.</p>
<p><b>Agilent Bio-Monolith</b> QA, DEAE, <math>\text{SO}_3</math></p>	<p>Etanol al 20 %</p>	<p>Todos los tampones, sales y eluyentes de intercambio iónico que se usan con frecuencia. NaOH de hasta 2,0 M y HCl de 1,0 M. Soluciones acuosas con hasta un 30% de 2-propanol, metanol y acetonitrilo. Hasta un 50% de ácido acético. Hasta un 70 % de etanol. Soluciones enzimáticas como pepsina, tripsina, DNasa.</p>

## Selección de la fase móvil y temperaturas operativas

El intercambio iónico utiliza tampones acuosos para controlar el pH, con mayor frecuencia gradientes de sal para elución. De forma alternativa, puede usarse un gradiente de pH con una fuerza iónica constante. El pH de tampón inicial debe estar al menos a una unidad de pH del punto isoelectrico para proteínas y péptidos.

## Cuidado de la columna

Las columnas con un tamaño de partícula inferior a 2  $\mu\text{m}$  cuentan con una frita de entrada de 0,5  $\mu\text{m}$ . Las partículas bloquearán las fritas de entrada de la columna, por lo que se deben extraer antes de analizar la muestra. Cuando esto no sea posible, debe usarse un filtro en línea para proteger la columna analítica e incrementar su vida útil. Se recomienda filtrar las muestras antes de inyectarlas sobre cualquier columna.

## Limpieza de su columna para incrementar su vida útil

Es probable que con el tiempo se produzca un aumento de la retropresión de la columna. La absorción de proteínas en el material de empaquetado o en la frita de entrada provocará este aumento de presión, lo que hará que disminuya el rendimiento de la columna. La limpieza de la columna puede hacer que disminuya la retropresión y mejore el rendimiento.

Cuando se utilice un filtro de precolumna, sustituya la precolumna o el filtro, y extraiga la columna principal. Para limpiar la columna, lávela en la dirección inversa con el tampón de limpieza con al menos 15 volúmenes de columna, y a no más del 50 % del límite máximo de presión de partículas.

**Tabla 4. Instrucciones de limpieza**

Columna	Limpieza de la columna
Bio SCX, Bio WCX y Bio MAb	Tampón de 50 mM de fosfato, NaCl de 1 M, pH 10. En el caso de proteínas básicas, lave la columna con un tampón de limpieza salino con un pH bajo. En el caso de proteínas ácidas, lave la columna con un tampón de limpieza que contenga sal con un pH más alto. Las proteínas hidrófobas pueden eliminarse con un tampón de limpieza que contenga disolventes orgánicos.
Bio SAX y Bio WAX	Nitrato de potasio de 150 mM en acetonitrilo al 75%, pH 2 (HCl ajustado).
PL-SAX y PL-SCX	Ácido de 1 M, por ejemplo acético o hidroc্লórico, y base de 1 M, como hidróxido sódico. Si la contaminación se debe a moléculas hidrófobas pequeñas como grasas, detergentes y péptidos, debe lavarse la matriz con un alcohol orgánico. Puede resultar útil añadir ácido trifluoroacético al 0,1% al alcohol orgánico. Después de cada secuencia de lavado debe realizarse una elución alta de sal y después de la limpieza, la columna debe acondicionarse según las instrucciones (consulte la <b>Tabla 1</b> ).
Bio-Monolith (QA, DEAE, SO <sub>3</sub> )	Lave con un mínimo de 2 mL de un tampón que contenga NaCl de 1 M a 0,5 y 1,0 mL/min. Reacondicione la columna con entre 5 mL y 6 mL de la fase móvil inicial a 1 mL/min. Para obtener los mejores resultados, repita estos pasos al final de cada análisis cromatográfico.

## Recomendaciones para el almacenamiento

El almacenamiento durante un prolongado periodo de tiempo de columnas de intercambio iónico puede realizarse con seguridad (consulte la **Tabla 5** para conocer las instrucciones específicas de fase). Antes de su almacenamiento, los terminales de conexión se deben tapar firmemente con tapones terminales para evitar que el envase se reseque. Las columnas pueden almacenarse con seguridad entre uno y varios días en la mayoría de fases móviles.

**Tabla 5. Instrucciones de almacenamiento**

Columna	Instrucciones de lavado antes del almacenamiento durante un prolongado periodo de tiempo
Bio SCX, Bio WCX y Bio MAb	Lave con tampón de 20 mM de fosfato (solución de transporte) con $\text{NaN}_3$ (azida sódica) al 0,1% con un pH de 6,0. Lave con al menos 15 volúmenes de columna.
Bio SAX y Bio WAX	Lave con Tris de 20 mM con $\text{NaN}_3$ (azida sódica) al 0,1% con un pH de 8,0. Lave con al menos 15 volúmenes de columna.
PL-SAX y PL-SCX	Lave con cloruro sódico de 1 M. Después del lavado con agua, puede introducirse el tampón de almacenamiento de $\text{Na}_2\text{SO}_4$ de 0,1 M que contiene azida sódica al 0,02%.
Bio-Monolith (QA, DEAE, $\text{SO}_3$ )	Si la columna no se va a utilizar en más de dos días, debe lavarse con al menos 1 mL de agua desionizada y, después, debe lavarse con al menos 2 mL de una solución de etanol al 20% a una velocidad de flujo de entre 0,2 y 0,5 mL/min, sellarse con tapones terminales de columna y almacenarse entre 4 °C y 30 °C.

## Consejos para obtener los mejores resultados cromatográficos

- Optimice el instrumento mediante la reducción de la longitud de los capilares de conexión 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 capilares de conexión rojos con un diámetro interno de 0,12 mm. Para obtener información acerca de las opciones de capilares, visite [agilent.com/chem/lccapillaries](http://agilent.com/chem/lccapillaries)
- Asegúrese de optimizar la velocidad de adquisición de datos para la columna.
- Utilice el filtrado de muestras u otros procesos de preparación de muestras que sean apropiados para su muestra. Para obtener más información, visite [agilent.com/chem/sampleprep](http://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 イオン交換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詳細については、以下をご覧ください。[agilent.com/chem/jp](https://www.agilent.com/chem/jp)

## 始めましょう

QC カラム性能レポートは、製品検査クロマトグラムとともに、すべての Agilent カラムに付属しています。QC 試験システムは、システムのデッドボリュームを最小限に抑えられるように、標準システムを改良したものです。したがってお客様のシステムとは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 性能レポートのクロマトグラムと同様の結果を生成することができます。

詳細については、テクニカルサポートチームにお問い合わせください。[agilent.com/chem/jp](https://www.agilent.com/chem/jp)



## カラムの使用方法

### 取り付け

- 流れの方向はカラムに表示しています。
- 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。最初に使用する際には、出荷時の溶媒を適切な溶媒に替え、適切な対イオンでカラムをコンディショニングする必要があります。混和および溶解が可能な成分のみを使用するように注意してください。カラムの使用前や各シーケンス分析の開始前には、カラムが適切に平衡化されているように注意してください (図 1 参照)。それにより再現性を確保し、リテンションタイムのドリフトを防ぐことができます。カラム取り付け時には、常に低流量から始め、圧力が安定してから、分析に用いる流量まで上げることを推奨します。

表 1. 説明 - 最初の使用前に

カラム	手順
<p><b>Bio IEX</b> および <b>Bio MAb</b>: 出荷時の溶液 (20 mM リン酸バッファ、pH 6.0) をフラッシュアウトし、使用前に適切な対イオンでコンディショニングしてください。</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. ローディングバッファ (バッファ A) 20 カラム分を用いて、0.1 mL/min でカラムをパージします。流量を徐々に上げ、予定される分析条件の流量にし、ベースラインを安定させます。</li> <li>2. ベースラインやカラム背圧が変動する場合は、3~5 分にわたって流量を増やします。その際は、各粒子サイズの圧力上限に留意してください。</li> <li>3. 平衡が達成され、ベースラインが安定したら、カラムにサンプルを注入できます。</li> </ol>
<p><b>PL-SAX</b> および <b>PL-SCX</b>: 出荷時の溶液 (0.1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> および 0.02% アジ化ナトリウム) をフラッシュアウトし、使用前に適切な対イオンでコンディショニングしてください。4.6 mm カラムでは、以下の手順を 0.5 mL/min で実施することを推奨します。</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 低イオン強度成分の移動相 (バッファ A) を用いて、5 カラム分を溶出します。</li> <li>2. 高イオン強度成分の移動相 (バッファ B) で溶出し、対イオンを交換します。必要な感度でベースラインが安定するまで、少なくとも 5 カラム分以上、この溶媒を流します。</li> <li>3. 使用前に、5 カラム分以上のバッファ A で平衡化します。</li> </ol>
<p>バイオモノリス: 出荷時の溶液 (20% エタノール) をフラッシュアウトし、使用前に適切な対イオンでコンディショニングしてください。</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 10 カラム分以上の結合移動相 (低イオン強度) を用いて、分析用流量の半分の流量でカラムを洗浄します。</li> <li>2. 10 カラム分以上の高イオン強度バッファ (1.0 または 2.0 M NaCl バッファなど) を用いて、分析用流量の半分の流量でカラムを洗浄します。</li> <li>3. 10 カラム分 (弱アニオン交換 DEAE カラムの場合は 20 カラム分) 以上の結合移動相 (低イオン強度) を用いて、分析用流量で平衡化します。</li> </ol>

## 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、乾燥すると吸いこむ恐れがあります。カラムのエンドフィッティングを取り外したり、充てん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、訓練を受けた人が換気の良いところで開放してください。
- ・ 各カラムの圧力上限を遵守してください（表 2 参照）。記載の上限値を超えると、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、安全が確保できなくなったりします。

表 2. 動作パラメータ上限 - 4.6 mm までのカラム

カラム	pH 安定性	最高使用温度	最大動作圧力
Bio MAb	2.0~12.0	80 °C	1.7 μm = 689 bar 3 μm = 551 bar 5 μm = 413 bar 10 μm = 275 bar
Bio IEX (SCX, WCX, SAX, WAX)	2.0~12.0	80 °C	1.7 μm = 689 bar 3 μm = 551 bar 5 μm = 413 bar 10 μm = 275 bar
PL-SAX, PL-SCX	1.0~14.0	80 °C	207 bar
バイオモノリス (QA, DEAE, SO <sub>3</sub> )	2.0~13.0	40 °C	150 bar

## 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を避けてください（「カラムのお手入れ」を参照）。ただし、一般的にはそれでカラムが損傷することはありません。
- ・ 低めの流量で使用し始めて、次第に使用流量まで増やすことをおすすめします。
- ・ 移動相の調製には、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ください。使用前に移動相はすべて脱気してろ過します。
- ・ カラムを分解すると性能が低下します。
- ・ 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。
- ・ 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。
- ・ カラムを使用していないときは、高 pH 下または高温下で保管しないでください。
- ・ 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（表 3 参照）。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。

表 3. 出荷時の溶媒

カラム	出荷時の溶媒	適合性
陽イオン交換 Agilent Bio WCX, Bio SCX, Bio MAb Agilent PL-SCX	20 mM リン酸 バッファ、pH 6.0  0.1 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> および 0.02% アジ化ナトリウム	一般的に用いられるすべての イオン交換溶媒、バッファ、塩 非イオン性および両イオン性 洗浄剤に適合。ただし、陽イ オン性洗浄剤には適合せず。
陰イオン交換 Agilent Bio SAX, Bio WAX, Agilent PL-SAX	20 mM リン酸 バッファ、pH 6.0  0.1 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> および 0.02% アジ化ナトリウム	一般的に用いられるすべての イオン交換溶媒、バッファ、塩。 非イオン性および両イオン性 洗浄剤に適合。ただし、陰イ オン性洗浄剤には適合せず。
アジレントバイオ モノリス QA、DEAE、SO <sub>3</sub>	20% エタノール	一般的に用いられるすべての イオン交換溶媒、バッファ、塩。 2.0 M までの NaOH および 1.0 M までの HCl、2-プロパ ノール、メタノール、アセトニ トリル 30% までの水性溶液。 50% までの酢酸、70% までの エタノール。ペプシン、トリプ シン、DNase などの酵素溶液。

## 移動相の選択および使用温度

イオン交換では、水性バッファを用いて pH をコントロールします。溶出には一般的に、塩グラジエントが用いられます。または、一定のイオン強度で pH グラジエントが用いられることもあります。開始時のバッファ pH は、タンパク質およびペプチドの等電点から 1 pH 単位以上離れていなければなりません。

## カラムのお手入れ

粒子径が 2  $\mu\text{m}$  未満のカラムには、0.5  $\mu\text{m}$  の注入口フリットがあります。微粒子はカラムの注入口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。サンプルは、カラムに注入する前

## カラムの寿命を延ばすクリーニング方法

カラムの背圧は、使用するにつれて高くなる可能性があります。充てん剤や注入口フリットにタンパク質が吸着すると、そうした背圧の上昇が生じ、カラムの性能が低下します。カラムをクリーニングすれば、背圧を低下させ、性能を向上させることができます。

ガードカラムやプレカラムフィルタを使っている場合は、ガードやフィルタを交換し、メインカラムを取り外します。カラムのクリーニングの際には、15 カラム分以上の洗浄用バッファをカラムに逆流させます。粒子の圧力上限の 50% を超えないようにしてください。

表 4. クリーニングに関する説明

カラム	カラムのクリーンアップ
Bio SCX, Bio WCX, Bio MAb	50 mM リン酸バッファ、1 M NaCl, pH 10。塩基性タンパク質の場合、低 pH 塩洗浄用バッファでカラムを洗浄。酸性タンパク質の場合、それよりも pH の高い塩を含む洗浄用バッファでカラムを洗浄。 有機含有洗浄用バッファを使えば、疎水性タンパク質を除去することができます。
Bio SAX, Bio WAX	75% アセトニトリル中の 150 mM 硝酸カリウム、pH 2 (HCl で調整)。
PL-SAX, PL-SCX	1 M 酸 (酢酸、塩酸など) および 1 M 塩基 (水酸化ナトリウムなど)。汚染が脂質、洗剤、ペプチドなどの小型疎水性分子に起因する場合は、有機アルコールでマトリックスを洗浄する必要があります。有機剤に 0.1 % トリフルオロ酢酸を添加すると、効果が上がる場合があります。各洗浄シーケンス後、高塩溶出を実施する必要があります。また、徹底的なクリーニング後は、カラムを指示どおりにコンディショニングする必要があります (表 1 参照)。
バイオモノリス (QA, DEAE, SO <sub>3</sub> )	1 M NaCl を含む 2 mL 以上のバッファを用いて、0.5~1.0 mL/min の流量で洗浄。5~6 mL の開始移動相を用いて、1 mL/min でカラムを再コンディショニング。最良の結果を得るためには、各クロマトグラフィ分析の終了時にこの手順を繰り返してください。

## 保管に関する注意事項

イオン交換カラムは、長期間にわたって安全に保管することができます (特定の相についての説明は表 5 を参照)。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。1 日から数日であれば、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。

表 5. 保管に関する説明

カラム	長期保管前の洗浄について
Bio SCX, Bio WCX, Bio MAb	20 mM リン酸バッファ（出荷時の溶媒）と 0.1% $\text{NaN}_3$ （アジ化ナトリウム）を用いて、pH 6.0 で洗浄。少なくとも 15 カラム分の容積で洗浄。
Bio SAX, Bio WAX	20 mM トリスと 0.1% $\text{NaN}_3$ （アジ化ナトリウム）を用いて、pH 8.0 で洗浄。少なくとも 15 カラム分の容積で洗浄。
PL-SAX, PL-SCX	1 M 塩化ナトリウムで洗浄。水による洗浄後、0.02% アジ化ナトリウムを含む 0.1 M $\text{Na}_2\text{SO}_4$ の保管用バッファを導入できます。
バイオモノリス (QA, DEAE, $\text{SO}_3$ )	カラムを 2 日以上使用しない場合、1 mL 以上の脱イオン水で洗浄したのち、2 mL 以上の 20% エタノール溶液を用いて、流量 0.2~0.5 mL/min で洗浄し、カラムエンドプラグで密閉し、4~30 °C で保管します。

## 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 LC/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、[agilent.com/chem/jp](http://agilent.com/chem/jp) を参照してください。
- ・ データコレクションレートが、使用しているカラムに適しているか確認します。
- ・ 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 [agilent.com/chem/jp](http://agilent.com/chem/jp) 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 об ионообменных колонках Agilent BioHPLC и AdvanceBio. Подробнее:

**[agilent.com/chem/biocolumnchoices](https://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 оценивать 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.

За подробной информацией обращайтесь в отдел технической поддержки по адресу:

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

## Использование колонки

### Установка

- Направление потока указано на колонке.
- Agilent рекомендует для колонок на 600 бар использовать поликетоновые фитинги (№ 5042-8957), а также съемные фитинги на 1200 бар (№ 5067-4733), которые можно применять в системах ВЭЖХ сверхвысокого давления (UHPLC).



*Поликетоновый фитинг,  
кат. № 5042-8957*



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

### Уравновешивание колонок

Каждая колонка испытывается перед поставкой. Для первого использования транспортировочный растворитель необходимо заменить элюентом и выполнить уравновешивание колонки с надлежащим противоионом. Следите за тем, чтобы все компоненты были смешиваемыми и растворимыми. Необходимо обратить особое внимание на правильное уравновешивание колонки перед использованием и перед началом каждого анализа в последовательности (см. **таблицу 1**). Это обеспечивает воспроизводимость результатов анализа и предотвращает дрейф времени удерживания. При установке колонки мы рекомендуем всегда начинать с низкой скорости потока и по мере стабилизации давления увеличивать ее до рабочего значения, используемого при анализе.

**Таблица 1. Операции перед первым использованием**

Колонка	Процедура
<p><b>Био IEX и Био МАб.</b> Удалить транспортировочный растворитель (20 мМ фосфатный буфер, рН 6,0) и выполнить уравнивание раствором с надлежащим противоионом.</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Промыть колонку загрузочным буфером (буфером А) с расходом 20 объемов колонки и скоростью 0,1 мл/мин. Постепенно повышать скорость потока до достижения нужных рабочих условий и выравнивания базовой линии.</li> <li>2. Если базовая линия или противодавление колонки колеблются, увеличить скорость потока на 3-5 минут. Не забывайте при этом о максимальном давлении для каждого размера частиц.</li> <li>3. После уравнивания и стабилизации базовой линии колонка готова к вводу пробы.</li> </ol>
<p><b>PL-SAX и PL-SCX.</b> Удалить транспортировочный растворитель (0,1 М Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и 0,02% азид натрия) и выполнить уравнивание раствором с надлежащим противоионом перед использованием. Следующую процедуру рекомендуется проводить при скорости 0,5 мл/мин для колонки с внутренним диаметром 4,6 мм.</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Промыть (5 объемов) раствором компонента подвижной фазы с низкой ионной силой, буфер А.</li> <li>2. Обеспечить обмен противоиона посредством промывки раствором компонента подвижной фазы с более высокой ионной силой, буфер В. Продолжать процесс со вторым элюентом до получения стабильной базовой линии при нужной чувствительности (минимум 5 объемов колонки).</li> <li>3. Перед использованием уравновесить с помощью буфера А (минимум 5 объемов колонки).</li> </ol>
<p><b>Био-Monolith.</b> Удалить транспортировочный растворитель (20% этанол) и выполнить уравнивание с надлежащим противоионом.</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Промыть колонку связывающей подвижной фазой (с низкой ионной силой) с расходом минимум 10 объемов колонки на скорости потока, равной половине рабочей.</li> <li>2. Промыть колонку буфером с высокой ионной силой и расходом минимум 10 объемов колонки (например, буфером с 1,0 или 2,0 М NaCl) на скорости потока, равной половине рабочей.</li> <li>3. Уравновесить связывающей подвижной фазой с низкой ионной силой с расходом минимум 10 объемов колонки (20 объемов колонки для колонки со слабым анионным обменом, DEAE) на рабочей скорости потока.</li> </ol>

## Важные сведения по безопасности

- Все места соединений в системах ВЭЖХ являются потенциальными источниками утечек. Необходимо ознакомить пользователей с токсичными или огнеопасными свойствами подвижных фаз.
- Существует опасность вдыхания мелких частиц сухого наполнителя колонок. 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. **таблицу 2**). Превышение этих ограничений ухудшает качество хроматографии и срок службы колонок, а также может быть опасным.

**Таблица 2. Максимальные рабочие параметры — колонки с внутренним диаметром до 4,6 мм**

Колонка	Стабильность pH	Максимальная рабочая температура	Максимальное рабочее давление
Bio MAb	2,0–12,0	80 °C	1,7 мкм = 689 бар 3 мкм = 551 бар 5 мкм = 413 бар 10 мкм = 275 бар
Bio IEX (SCX, WCX, SAX, WAX)	2,0–12,0	80 °C	1,7 мкм = 689 бар 3 мкм = 551 бар 5 мкм = 413 бар 10 мкм = 275 бар
PL-SAX, PL-SCX	1,0–14,0	80 °C	207 бар
Bio-Monolith (QA, DEAE, SO <sub>3</sub> )	2,0–13,0	40 °C	150 бар

## Практические советы

- Хотя обычно метод обратной промывки не опасен для колонок, избегайте его применения, за исключением очистки засора входного пористого вкладыша (см. раздел «Обслуживание колонок»).
- Рекомендуется начинать 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 дегазацию всего объема подвижной фазы.
- Разборка колонки приведет к снижению ее характеристик.
- Работа колонки за рамками рекомендованных для фазы колонки диапазонов pH (см. **таблицу 2**) приведет к сокращению срока службы.
- Для защиты колонки и продления срока ее службы рекомендуется использовать внутрипотоковый фильтр или предколонку.
- Не следует хранить неиспользуемые колонки в среде с высокими значениями pH или в условиях повышенной температуры.
- Новые колонки могут быть заполнены смесью органических растворителей и воды, в которой могут содержаться буферные соли (см. **таблицу 3**). На начальной стадии метода следует избегать пропускания через колонку подвижной фазы, которая может вызвать выпадение осадка или быть не полностью растворимой.

**Таблица 3. Транспортировочные растворители**

Колонка	Транспортировочные растворители	Совместимость
<p><b>Катионный обмен</b> Agilent Bio WCX, Bio SCX и Bio MAb</p> <p>Agilent PL-SCX</p>	<p>20 мМ фосфатный буфер, pH 6,0</p> <p>0,1 М Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и 0,02% азид натрия</p>	<p>Все стандартные ионообменные элюенты, буферы и соли.</p> <p>Совместимы с неионными и цвиттер-ионными чистящими средствами, но НЕ совместимы с катионными чистящими средствами.</p>
<p><b>Анионный обмен</b> Agilent Bio SAX и Bio WAX</p> <p>Agilent PL-SAX</p>	<p>20 мМ фосфатный буфер, pH 6,0</p> <p>0,1 М Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и 0,02% азид натрия</p>	<p>Все стандартные ионообменные элюенты, буферы и соли.</p> <p>Совместимы с неионными и цвиттер-ионными чистящими средствами, но НЕ совместимы с анионными чистящими средствами.</p>
<p><b>Agilent Bio-Monolith</b> QA, DEAE, SO<sub>3</sub></p>	<p>20% этанол</p>	<p>Все стандартные ионообменные элюенты, буферы и соли. До 2,0 М NaOH и 1,0 М HCl. Водные растворы, содержащие до 30% изопропанола, метанола, ацетонитрила. До 50% уксусной кислоты. До 70% этанола. Растворы ферментов, таких как пепсин, трипсин, дезоксирибонуклеаза.</p>

## Выбор подвижной фазы и рабочих температур

Ионный обмен использует водные буферы для контроля pH, чаще всего солевые градиенты для элюции. В качестве альтернативы можно использовать градиент pH при постоянной ионной силе. Начальный pH буфера должен отличаться от изоэлектрической точки для белков и пептидов минимум на единицу pH.

## Обслуживание колонок

В колонки с размером частиц менее 2 мкм устанавливается входной вкладыш с порами 0,5 мкм. Микрочастицы могут закупоривать пористый вкладыш испарителя колонки, поэтому перед проведением анализа пробы их следует удалить. Если это невозможно, необходимо использовать встроенный фильтр для защиты аналитической колонки и продления ее срока службы. Перед вводом в любую колонку пробы следует фильтровать.

## Очистка колонки для увеличения срока ее службы

Со временем вероятно увеличение противодавления колонки. Накопления белка, связанного на сорбенте или на входном вкладыше, вызывают увеличение давления и снижают производительность колонки. Очистка колонки может снизить противодавление и увеличить производительность.

При использовании предколонки или установленного перед колонкой фильтра замените предколонку или фильтр и снимите основную колонку. Чтобы очистить колонку, промывайте ее обратным потоком очищающего буфера с расходом минимум 15 объемов колонки при давлении, не превышающем 50% максимального для конкретного размера частиц.

**Таблица 4. Руководство по очистке**

Колонка	Процедура промывки
Bio SCX, Bio WCX и Bio MAb	50 мМ фосфатный буфер, 1 М NaCl, pH 10. В случае основных белков промыть колонку очищающим солевым буфером с низким pH. В случае кислых белков промыть колонку очищающим солевым буфером с более высоким pH. Гидрофобные белки можно удалить с помощью очищающего буфера с органическим растворителем.
Bio SAX и Bio WAX	150 мМ нитрат калия в 75% ацетонитриле, pH 2 (доводить HCl).
PL-SAX и PL-SCX	1 М кислота, например уксусная или соляная, и 1 М щелочь, например гидроксид натрия. Если источником загрязнения являются небольшие гидрофобные молекулы, например жиры, детергенты и пептиды, сорбент следует промыть спиртом. К органическому растворителю для усиления эффекта можно добавить 0,1%-ную трифторуксусную кислоту. После каждой последовательности промывки необходимо проводить промывку раствором с высокой концентрацией соли, после тщательной очистки необходимо выполнить уравнивание колонки согласно инструкции (см. <b>таблицу 1</b> ).
Bio-Monolith (QA, DEAE, SO <sub>3</sub> )	Промыть буфером, содержащим 1 М NaCl в объеме минимум 2 мл, на скорости 0,5–1,0 мл/мин. Повторно выполните уравнивание колонки начальной подвижной фазой объемом 5-6 мл со скоростью 1 мл/мин. Для получения наилучших результатов повторяйте эти процедуры в конце каждого цикла хроматографии.

## Рекомендации по хранению

Обеспечение сохранности ионообменных колонок при длительном хранении (см. инструкции для конкретных фаз в **таблице 5**). Перед направлением колонки на хранение концевые фитинги необходимо тщательно закрыть заглушками для предотвращения высыхания сорбента. Колонки можно хранить в большинстве подвижных фаз от 1 до нескольких дней.



Таблица 5. Инструкции по хранению

Колонка	Инструкции по промывке перед длительным хранением
Bio SCX, Bio WCX и Bio MAb	Промыть фосфатным буфером (транспортным раствором) объемом 20 мМ с 0,1% $\text{NaN}_3$ (азидом натрия) при рН 6,0. Минимум 15 объемов колонки.
Bio SAX и Bio WAX	Промыть раствором Tris 20 мМ, 0,1% $\text{NaN}_3$ (азид натрия), рН 8,0. Минимум 15 объемов колонки.
PL-SAX и PL-SCX	Промыть 1 М р-ром хлорида натрия. После промывки водой оставить в буфере для хранения 0,1 М $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 0,02% азид натрия.
Bio-Monolith (QA, DEAE, $\text{SO}_3$ )	Если колонка не будет использоваться более двух дней, ее необходимо промыть деионизированной водой объемом минимум 1 мл, а затем 20%-ным раствором этанола объемом минимум 2 мл на скорости потока 0,2-0,5 мл/мин, закрыть заглушкой и хранить в надлежащих условиях при температуре от 4 до 30 °С.

## Рекомендации для получения лучших результатов при хроматографии

- Оптимизация установки путем максимального сокращения длины соединительных трубок между частями оборудования, чтобы уменьшить мертвый объем колонки и размывание пиков. Используйте соединительные трубки красной маркировки с внутренним диаметром 0,12 мм для колонок ВЭЖХ. Подробнее о различных капиллярных трубках: [agilent.com/chem/lccapillaries](http://agilent.com/chem/lccapillaries)
- Обеспечение оптимального темпа сбора фракций для используемой колонки.
- Использование для исследуемых образцов фильтрации и других методов подготовки. Подробнее: [agilent.com/chem/sampleprep](http://agilent.com/chem/sampleprep)
- Использование в установках ВЭЖХ сертифицированных ламп, обеспечивающих лучшее качество.



Esse guia oferece informações gerais sobre as colunas de troca iônica Agilent BioHPLC e AdvanceBio. Para obter informações mais detalhadas, acesse:

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

## Introdução

Cada coluna Agilent traz um relatório de controle de qualidade do desempenho da coluna, incluindo um cromatograma de teste. O sistema utilizado para este teste de controle de qualidade é uma versão do sistema padrão modificada com o objetivo de minimizar o volume morto, por isso o resultado do teste deve diferir do que pode ser obtido no seu sistema. Isso permite avaliar melhor a eficácia da coluna e garantir uma maior consistência do produto. Um sistema de LC otimizado gera resultados semelhantes aos do cromatograma no relatório de controle de qualidade do desempenho da coluna.

Caso tenha dúvidas específicas, entre em contato com a equipe de suporte técnico em **[agilent.com/chem/columnsupport](https://www.agilent.com/chem/columnsupport)**

## Utilização da coluna

### Instalação

- A direção do fluxo é indicada na coluna.
- A Agilent recomenda a utilização de conexões de policetona (p/n 5042-8957) para colunas de até 600 bar e conexões removíveis de 1.200 bar (p/n 5067-4733) para colunas que serão operadas a pressões UHPLC.



*Conexão de policetona,  
p/n 5042-8957*



*Conexão removível de 1.200 bar  
Agilent, p/n 5067-4733*

### Condicionamento da coluna

Todas as colunas são testadas antes do envio. Para usá-las pela primeira vez é necessário substituir o solvente de envio por eluente, e a coluna deve ser condicionada com o contraíon adequado. Assegure-se de que todos os componentes sejam miscíveis e solúveis. Deve-se tomar cuidado para garantir que a coluna seja condicionada adequadamente antes da utilização e do início de cada análise em uma sequência (consulte a **Tabela 1**). Isso garantirá a reprodutibilidade e evitará desvios do tempo de retenção. Recomenda-se fazer a instalação de uma coluna a uma taxa de fluxo baixa e, à medida que a pressão estabilizar, aumentar a taxa de fluxo até a taxa operacional que será usada para a análise.

**Tabela 1. Instruções: antes da primeira utilização**

Coluna	Procedimento
<p><b>Bio IEX e Bio MAB:</b> lave a solução de envio (20 mM de tampão fosfato, pH 6) e condicione com o contraíon adequado antes da utilização.</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Lave a coluna com 20 volumes de coluna do tampão de carga (tampão A) a 0,1 mL/min. Aumente gradualmente a taxa de fluxo até alcançar as condições operacionais desejadas e estabilizar a linha de base.</li> <li>2. Se a pressão resultante da linha de base ou da coluna oscilar, aumente o fluxo por 3 a 5 minutos, levando em consideração a pressão máxima para cada tamanho de partícula.</li> <li>3. A coluna está pronta para uma injeção de amostra assim que for equilibrada e que a linha de base estiver estabilizada.</li> </ol>
<p><b>PL-SAX e PL-SCX:</b> lave a solução de envio (0,1 M de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 0,02% de azida de sódio) e condicione com o contraíon adequado antes da utilização. O procedimento é recomendado a 0,5 mL/min para uma coluna de DI de 4,6 mm.</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Faça a eluição de 5 volumes de coluna com o componente de baixa força iônica da fase móvel, tampão A.</li> <li>2. Troque o contraíon fazendo a eluição com o componente de alta força iônica da fase móvel, tampão B. Continue com este eluente até atingir uma linha de base estável com a sensibilidade necessária, um mínimo de 5 volumes de coluna.</li> <li>3. Equilibre com o tampão A para um mínimo de 5 volumes de coluna antes da utilização.</li> </ol>
<p><b>Bio-Monolith:</b> lave a solução de envio (20% de etanol) e condicione com o contraíon adequado antes da utilização.</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Lave a coluna com pelo menos 10 volumes de coluna da fase móvel de ligação (baixa força iônica) na metade da taxa de fluxo de funcionamento.</li> <li>2. Lave a coluna com pelo menos 10 volumes de coluna do tampão de alta força iônica (ex.: tampão com 1,0 ou 2,0 M de NaCl) na metade da taxa de fluxo de funcionamento.</li> <li>3. Equilibre com pelo menos 10 volumes de coluna (20 volumes de coluna para a troca aniônica fraca, DEAE, coluna) da fase móvel de ligação (baixa força iônica) na taxa de fluxo de funcionamento.</li> </ol>

## Considerações de segurança importantes

- Todos os pontos de conexão em sistemas de cromatografia líquida são considerados potenciais pontos de vazamentos. Os usuários devem estar atentos à toxicidade ou à inflamabilidade das fases móveis.
- Devido ao pequeno tamanho de partícula, os empacotamentos de coluna seca são inaláveis. A Agilent não recomenda a remoção dos adaptadores da extremidade da coluna e a exposição do seu interior. 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 2**). Exceder esses limites compromete o desempenho cromatográfico e a vida útil da coluna.

**Tabela 2. Parâmetros operacionais máximos: colunas de até 4,6 mm**

Coluna	Estabilidade de pH	Máxima temperatura operacional	Máxima pressão operacional
Bio MAb	2.0 – 12.0	80 °C	1,7 µm = 689 bar; 3 µm = 551 bar; 5 µm = 413 bar; 10 µm = 275 bar
Bio IEX (SCX, WCX, SAX, WAX)	2.0 – 12.0	80 °C	1,7 µm = 689 bar; 3 µm = 551 bar; 5 µm = 413 bar; 10 µm = 275 bar
PL-SAX, PL-SCX	1.0 – 14.0	80 °C	207 bar
Bio-Monolith (OA, DEAE, SO <sub>3</sub> )	2.0 - 13.0	40 °C	150 bar

## Outras dicas operacionais

- Embora o fluxo reverso geralmente não seja prejudicial à coluna, ele deve ser evitado, exceto ao tentar remover um frit entupido (consulte "Cuidados com a coluna").
- Recomenda-se iniciar a taxa de fluxo a uma taxa reduzida e aumentá-la gradativamente até a taxa de fluxo operacional desejada.
- Utilize somente reagentes de alta pureza e solventes de cromatografia de boa qualidade para preparar a fase móvel. Degaseifique e filtre toda a fase móvel antes da utilização.
- A desmontagem de uma coluna prejudica seu desempenho.
- 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.
- É possível usar um filtro em linha ou uma coluna de guarda para proteger a coluna e aumentar sua vida útil.
- As colunas não devem ser mantidas a temperatura ou pH elevados quando não estiverem em uso.
- As colunas novas podem conter uma mistura de solventes orgânicos e água, que pode conter sais tampões (consulte a **Tabela 3**). Em primeiro lugar, deve-se tomar cuidado para não passar na coluna qualquer fase móvel que possa formar um precipitado ou não ser completamente miscível.

**Tabela 3. Solventes de envio**

Coluna	Solventes de envio	Compatibilidade
<b>Troca catiônica</b> Agilent Bio WCX, Bio SCX e Bio MAb  Agilent PL-SCX	20 mM de tampão fosfato, pH 6  0,1 M de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e 0,02% de azida de sódio	Todos os eluentes, tampões e sais de troca iônica geralmente utilizados.  Compatibilidade com detergentes não iônicos e zwitteriônicos; INCOMPATÍVEL com detergentes aniônicos.
<b>Troca aniônica</b> Agilent Bio SAX e Bio WAX  Agilent PL-SAX	20 mM de tampão fosfato, pH 6  0,1 M de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e 0,02% de azida de sódio	Todos os eluentes, tampões e sais de troca iônica geralmente utilizados.  Compatibilidade com detergentes não iônicos e zwitteriônicos; INCOMPATÍVEL com detergentes aniônicos.
<b>Agilent Bio-Monolith</b> QA, DEAE, SO <sub>3</sub>	20% de etanol	Todos os eluentes, tampões e sais de troca iônica geralmente utilizados. Até 2,0 M de NaOH e 1,0 M de HCl. Soluções aquosas de até 30% de 2-propanol, metanol, acetonitrila. Até 50% de ácido acético. Até 70% de etanol. Soluções enzimáticas como pepsina, tripsina e DNase.

## **Escolha de fase móvel e temperaturas operacionais**

A troca iônica utiliza tampões aquosos para controlar o pH, mais frequentemente gradientes de sal para eluição. Como alternativa, um gradiente de pH pode ser usado a uma força iônica constante. O pH do tampão inicial deve estar pelo menos a uma unidade de pH de distância do ponto isoelétrico de proteínas e peptídeos.

## **Cuidados com a coluna**

Colunas com um tamanho de partícula inferior a 2  $\mu\text{m}$  têm um frit de injetor de 0,5  $\mu\text{m}$ . As partículas bloqueiam os frits da entrada da coluna e devem ser removidas antes de analisar a amostra. Se isso não for possível, deve-se usar um filtro em linha para proteger a coluna analítica e aumentar sua vida útil. Recomenda-se filtrar as amostras antes de injetá-las em uma coluna.

## **Limpeza da coluna para aumentar sua vida útil**

Com o passar do tempo, é possível que a pressão resultante da coluna aumente. A absorção de proteína no material de empacotamento ou no frit da entrada causará o aumento da pressão e diminuirá o desempenho da coluna. A limpeza da coluna pode diminuir a pressão resultante e melhorar o desempenho.

Ao utilizar uma coluna de guarda ou filtro de pré-coluna, substitua a guarda ou o filtro e remova a coluna principal. Para limpar a coluna, lave-a na direção reversa com o tampão de limpeza com pelo menos 15 volumes de coluna a não mais do que 50% do limite máximo de pressão de partícula.



**Tabela 4. Instruções de limpeza**

Coluna	Limpeza da coluna
Bio SCX, Bio WCX e Bio MAb	50 mM de tampão fosfato, 1 M de NaCl, pH 10. Para proteínas básicas, lave a coluna com um tampão de limpeza com um sal de pH baixo. Para proteínas ácidas, lave a coluna com um tampão de limpeza com um sal de pH mais alto. Proteínas hidrofóbicas podem ser removidas com a utilização de um tampão de limpeza que contenha um composto orgânico.
Bio SAX e Bio WAX	150 mM de nitrato de potássio em 75% de acetonitrila, pH 2 (HCl ajustado).
PL-SAX e PL-SCX	1 M de ácido, por exemplo, acético ou hidrocloreídrico e 1 M de base, como o hidróxido de sódio. Se ocorrer contaminação devido a pequenas moléculas hidrofóbicas, como gorduras, detergentes e peptídeos, a matriz deve ser lavada com um álcool orgânico. A adição de 0,1% de ácido trifluoroacético ao composto orgânico pode trazer vantagens. Após cada sequência de lavagem deve-se realizar uma eluição com alta concentração de sal, e após uma limpeza completa, a coluna deve ser condicionada de acordo com as instruções (consulte a <b>Tabela 1</b> ).
Bio-Monolith (QA, DEAE, SO <sub>3</sub> )	Lave com pelo menos 2 mL de um tampão com 1 M de NaCl a 0,5 a 1,0 mL/min. Recondicione a coluna com 5 a 6 mL da fase móvel inicial a 1 mL/min. Para obter melhores resultados, repita estes procedimentos após cada análise cromatográfica.

## Recomendações de armazenamento

O armazenamento a longo prazo de colunas de troca iônica pode ser feito de maneira segura (consulte a **Tabela 5** para obter instruções específicas para a fase). Antes do armazenamento, os adaptadores de extremidade devem ser bem fechados com plugues para evitar que o empacotamento seque. As colunas podem ser armazenadas de forma segura por 1 ou vários dias na maioria das fases móveis.

**Tabela 5. Instruções de armazenamento**

Coluna	Instruções de lavagem antes do armazenamento a longo prazo
Bio SCX, Bio WCX e Bio MAb	Faça a lavagem usando 20 mM de tampão fosfato (solução de envio), com 0,1% de $\text{NaN}_3$ (azida de sódio) com pH 6. Lave com pelo menos 15 volumes de coluna.
Bio SAX e Bio WAX	Faça a lavagem usando 20 mM de Tris com 0,1% de $\text{NaN}_3$ (azida de sódio) com pH 8. Lave com pelo menos 15 volumes de coluna.
PL-SAX e PL-SCX	Lave com 1 M de cloreto de sódio. Após a lavagem com água, o tampão de armazenamento de 0,1 M de $\text{Na}_2\text{SO}_4$ com 0,02% de zida de sódio pode ser adicionado.
Bio-Monolith (QA, DEAE, $\text{SO}_3$ )	Se a coluna não for utilizada por mais de dois dias, ela deve ser lavada com pelo menos 1 mL de água deionizada e depois com pelo menos 2 mL de uma solução de 20% de etanol a uma taxa de fluxo de 0,2 a 0,5 mL/min, vedada com plugues e armazenada de maneira adequada a uma temperatura de 4 a 30°C.

## Dicas para obter os melhores resultados cromatográficos

- Para otimizar o instrumento, diminua o comprimento 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. Obtenha mais informações sobre opções de capilar em [agilent.com/chem/lccapillaries](http://agilent.com/chem/lccapillaries)
- Assegure-se de que a taxa de coleta de dados esteja otimizada para a sua coluna.
- Utilize filtração ou outro método de preparo adequado para sua amostra. Obtenha mais informações em [agilent.com/chem/sampleprep](http://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 [agilent.com/chem/navigator](http://agilent.com/chem/navigator)

## Agilent Ordering Information

For more information on our products and services,  
visit our web site at [agilent.com](http://agilent.com)

For technical support or to place an order,  
visit [agilent.com/chem/columnsupport](http://agilent.com/chem/columnsupport)

To place an order, visit [agilent.com/chem/wheretobuy](http://agilent.com/chem/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  
bioseparations, such as stainless steel-coated PEEK  
capillaries for high-pressure bio-inertness and robustness, visit  
[agilent.com/chem/LCsupplies](http://agilent.com/chem/LCsupplies)

To receive a copy of the Infinity Supplies catalog, and other key  
resources, visit [agilent.com/chem/GetGuides](http://agilent.com/chem/GetGuides)



This information is subject to change without notice.

©Agilent Technologies, Inc. 2014  
Printed in Canada. January 29, 2014  
820000-996



**Agilent Technologies**