

# Beste Vorgehensweisen zur Verwendung eines LC-Systems von Agilent

## Technischer Hinweis

Dieser technische Hinweis beschreibt beste Vorgehensweisen zur Verwendung eines LC-Systems von Agilent.

<b>Haushaltung</b>	<b>2</b>
<b>Tägliche/wöchentliche Aufgaben</b>	<b>5</b>
<b>Ein-/Ausschalten des Systems</b>	<b>6</b>
<b>Empfehlungen für Entgaser</b>	<b>8</b>
<b>Empfehlungen für Pumpen</b>	<b>9</b>
<b>Empfehlungen für Probennehmer</b>	<b>15</b>
<b>Empfehlungen für Pumpen und Probennehmer mit optionalem Inline-Filter</b>	<b>17</b>
<b>Empfehlungen für Säulen</b>	<b>18</b>
<b>Empfehlungen für Detektoren</b>	<b>19</b>
<b>Empfehlungen für biokompatible und bioinerte Systeme</b>	<b>20</b>
<b>Zusätzliche Informationen für 1290 Infinity- und 1290 Infinity II-Pumpen</b>	<b>22</b>

# Haushaltung

## Umgang mit Lösemitteln

- Verwenden Sie nur saubere Flaschen aus Borosilikatglas.
  - Spülen Sie die Flasche mit dem gewünschten Lösemittel aus, bevor Sie sie erneut befüllen.
  - Flaschen können durch Rückstände von Detergenzien aus der Spülmaschine verunreinigt werden.
- Verwenden Sie Lösemittleinlassfilter, um das System vor einem Partikeleintrag zu schützen.
- Wechseln Sie wasserlösliche Lösemittel täglich.
  - Algen- und Bakterienwachstum könnte den Entgaser oder Filter blockieren.
  - Der Niederschlag unlöslicher Salze könnte Filter oder Kapillaren blockieren.
- Bereiten Sie eine Lösemittelmenge vor, die innerhalb von 1–2 Tagen verbraucht wird.
- Verwenden Sie nur HPLC-taugliche Lösemittel und Wasser.
  - Alle vorbereiteten organischen Lösemittel, Mischungen und wässrigen Puffer müssen durch einen 0,2- $\mu$ m-Filter gefiltert werden.
  - Rückstände oder Verunreinigungen könnten Filter oder Kapillaren blockieren.
- Beschriften Sie die Flaschen korrekt mit dem Flascheninhalt, dem Fülldatum und dem Verfallsdatum.
- Verringern Sie das Risiko von Algenwachstum: Benutzen Sie für wässrige Lösemittel braune Flaschen, vermeiden Sie direktes Sonnenlicht oder wickeln Sie die Flaschen in Aluminiumfolie ein.

### Zusätzliche Maßnahmen für Acetonitril (ACN)

- ACN und andere organische Lösemittel können mithilfe einer 0,2- $\mu$ m-PTFE-Filtermembran (z. B. 5191-4339) gefiltert werden.

### HINWEIS

Das Filtern durch Nylonfilter wird für LCMS mit hoher Empfindlichkeit nicht empfohlen.

- Verwenden Sie braune Flaschen und füllen Sie diese mit der Menge an ACN, die innerhalb von 1–2 Tagen verbraucht wird, um photochemische Reaktionen und Oxidation zu vermeiden.

## Probenvorbereitung

### VORSICHT

#### Möglicher Probenniederschlag

- ✓ Stellen Sie sicher, dass die Probe sowohl im Probenverdünnungsmittel als auch in der mobilen Phase vollständig löslich ist.
  - ✓ Achten Sie auf größtmögliche Übereinstimmung zwischen dem Probenverdünnungsmittel und der initialen mobilen Phase, um Niederschläge, Druckspitzen und Lösemittelpeaks im Chromatogramm zu vermeiden.
- 
- Filtern durch 0,2- $\mu\text{m}$ -Filter ist die bevorzugte Methode zum Entfernen der unlöslichen Fraktion aus Proben und zur Vermeidung von Blockaden im System. Falls dies nicht möglich ist, zentrifugieren Sie die Proben kräftig und achten Sie darauf, den Überstand beim Abgießen oder Aspirieren nicht mit Niederschlägen zu kontaminieren.
  - Stellen Sie sicher, dass das Probenverdünnungsmittel auch frei von Partikeln ist.
  - Ungefilterte Proben verursachen eine Verstopfung und Kontamination des Flusswegs. Dies kann zu einem kontinuierlichen Anstieg des Systemrückdrucks und zu Druckanomalien wie Wellen oder einem plötzlichen Druckabfall führen. Druckänderungen können die Reproduzierbarkeit chromatographischer Ergebnisse beeinträchtigen.
  - Beispielsweise können ungefilterte Proteinproben zur Bildung eines Proteinfilms führen, der im Laufe der Zeit den Flussweg verstopfen und die Lebensdauer der Chromatographiesäulen erheblich verkürzen kann.

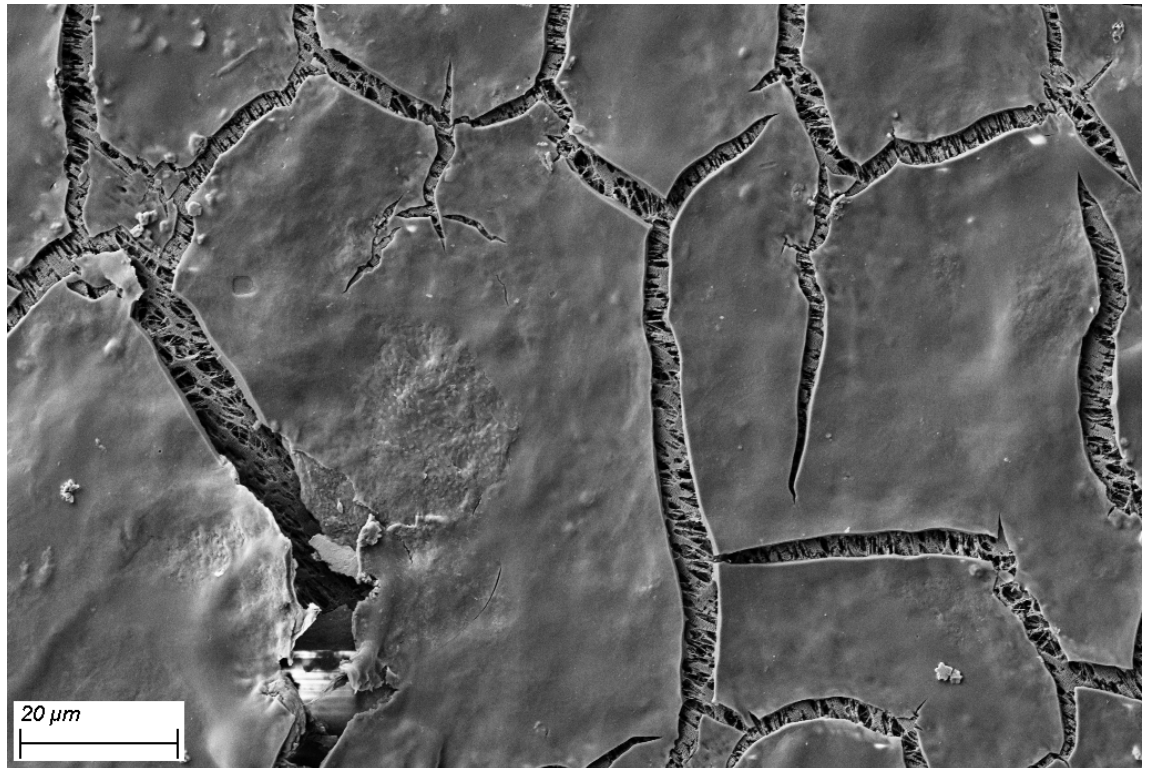


Abbildung 1 Auf der Oberfläche des PTFE-Trägers auf dem Inline-Filter gebildeter Proteinfilm (durch SEM EDX bestätigt)

- Daher wird die Verwendung von Inline-Filtern empfohlen, um zu verhindern, dass Partikelmaterial in den Flussweg gelangt und Ventile, Säulen und den Detektor beschädigt (siehe „Empfehlungen für Pumpen und Probennehmer mit optionalem Inline-Filter“ auf Seite 17).

## Vorgehensweise zum Reinigen des Systems

- Wenn Anlass zu der Vermutung besteht, dass in dem System eine bakterielle Kontamination vorliegt, kann das folgende Verfahren angewendet werden, um das System zu reinigen.
  - Verwenden Sie die folgenden Lösungen nacheinander jeweils für mindestens 30 min bei einer moderaten Flussrate (0,5 – 1 mL/min):
    - a Wasser
    - b 0,1 M NaOH
    - c Wasser
    - d 0,13 M HCl
    - e Wasser
- Die Vermeidung der Bildung eines Biofilms ist besonders wichtig, wenn mit biokompatiblen Puffersystemen (z. B. Phosphat, Acetat) gearbeitet wird.
  - Sobald in allen Lösemittelkanälen, die für biokompatible Puffer verwendet werden, eine Abnahme der chromatographischen Reproduzierbarkeit beobachtet wird, muss das Verfahren zur Systemreinigung (zuvor beschrieben) durchgeführt werden.
- Bei der Durchführung eines Reinigungsvorgangs zur Reinigung des LC-Systems ist darauf zu achten, dass die Säule und der Detektor aus dem Flussweg ausgeschlossen sind.
- Chromatographische Säulen, die für Biomolekültrennungen wie Größenausschlusschromatographie oder Ionenaustauschchromatographie verwendet werden, sollten in Gegenwart von 0,02 % Natriumazid gelagert werden. Weitere Empfehlungen für Anwender von Bio LC-Säulen finden Sie auf <https://www.agilent.com/en/support/liquid-chromatography/kb005960>.

# Tägliche/wöchentliche Aufgaben

### Tägliche Aufgaben

- Ersetzen Sie Lösemittel und Lösemittelflaschen für mobile Phasen auf der Basis von Wasser/Puffer.
- Ersetzen Sie Lösemittel und Lösemittelflaschen für organische mobile Phasen mindestens jeden zweiten Tag.
- Überprüfen Sie, ob Lösemittel für die Kolbenhinterspülung vorhanden ist.
- Spülen Sie vor dem Betrieb jeden Kanal mit frischem Lösemittel bei 2,5 – 3 mL/min für 5 min.
- Äquilibrieren Sie das System mit der Zusammensetzung und Flussrate der nächsten Methode.

### Wöchentliche Aufgaben

- Wechseln Sie das Lösemittel für die Kolbenhinterspülung (10 % Isopropanol in Wasser) und die Flasche.
- Wenn Anwendungen mit Salzen verwendet wurden, spülen Sie alle Kanäle mit Wasser (Details siehe „Spülverfahren“ auf Seite 20) und entfernen Sie eventuelle Salzablagerungen manuell.
- Inspizieren Sie die Lösemittelfilter auf Schmutz oder Blockaden. Tauschen Sie sie aus, wenn aus der vom Entgasereinlass entfernten Lösemittelleitung kein Lösemittel fließt.

## VORSICHT

### Verunreinigung des Lösemittels der Kolbenhinterspülung

#### Schäden an Kolben und Dichtungen

- ✓ Führen Sie kein Recycling des Lösemittels für die Kolbenhinterspülung durch.
  - ✓ Wechseln Sie das Lösemittel für die Kolbenhinterspülung wöchentlich.
  - ✓ Typischer Lösemittelverbrauch: 0,5 L pro Woche.
  - ✓ Es wird dringend empfohlen, ein Aufsatzkit für Flasche mit Lösemittel für die Kolbenhinterspülung (5067-6131) zu verwenden.
-

# Ein-/Ausschalten des Systems

## Einschalten des Systems

- Stellen Sie sicher, dass sich alle Module in einer Umgebung mit stabiler Temperatur befinden und keinem direkten Sonnenlicht ausgesetzt sind.
- Schalten Sie alle Module an und fahren Sie fort, sie wie unten beschrieben vorzubereiten:

### Vorbereiten der Pumpe

- Verwenden Sie eine frische mobile Phase, je nach Bedarf die gleiche oder eine andere.
- Spülen Sie jeden Kanal mit 2,5 – 3 mL/min für 5 min. Öffnen Sie je nach Pumpentyp das manuelle Spülventil oder verwenden Sie den Spülbefehl.

### Vorbereiten des Probennehmers

- Vermeiden Sie bei Pufferanwendungen die Anwendung einer Nadelreinigung und eines Backflushs mit organischen Lösemitteln, da dies zum Niederschlag von Salz im Nadelsitz führen kann.
- Bei Anwendung von Nadelreinigung und/oder Backflush:
  - Verwenden Sie immer frische Lösemittel.
  - Methanol, ACN, Isopropanol, Wasser und deren Gemische sind gute Optionen.
  - Verwenden Sie keine nicht mischbaren oder niederschlagsbildenden Waschlösungen.
- Bei Verwendung eines Probenkühlers/Probenthermostats:
  - Stellen Sie den Kühler/Thermostat an und warten Sie, bis die Zieltemperatur erreicht ist und stabil bleibt.  
Dies kann während des Aufwärmens der Sensorlampe geschehen (siehe „Vorbereiten des Detektors“ auf Seite 6).
- Vergewissern Sie sich, dass die Probenflaschen genug Probenlösung für alle Injektionen enthalten.

### Vorbereiten des Detektors

- Wärmen Sie die Lampe mindestens 1 h lang auf, um die Stabilität der Basislinie zu gewährleisten.
- Nur für Brechungsindexdetektoren (RI): Schalten Sie die Heizung an und spülen Sie die Referenz- und die Probenseite mit dem frischen Lösemittel, das für die aktuelle Anwendung verwendet wird.

### Äquilibrieren des Systems

- Äquilibrieren Sie das System während des Aufwärmens der Detektorlampe (einschließlich Säule und Detektor). Verwenden Sie die Zusammensetzung Ihrer Anwendung für mindestens 15 min, bis der Druck und das Basisliniensignal stabil sind.

## System ausschalten

- Spülen Sie die Säule mit geeigneten Lösemitteln und lagern Sie sie entsprechend der Gebrauchsanweisung der Säule (stellen Sie sicher, dass das Spüllösemittel mit dem im System vorhandenen Lösemittel kompatibel ist, um Niederschläge zu vermeiden).
- Chromatographische Säulen, die für Biomolekültrennungen wie Größenausschlusschromatographie oder Ionenaustauschchromatographie verwendet werden, sollten in Gegenwart von 0,02 % Natriumazid gelagert werden. Weitere Empfehlungen für Anwender von Bio LC-Säulen finden Sie auf <https://www.agilent.com/en/support/liquid-chromatography/kb005960>.
- Installieren Sie eine Verbindungs- oder Widerstandskapillare und spülen Sie das System gründlich mit Wasser, insbesondere nach der Verwendung von Puffern. Einzelheiten finden Sie unter „Spülverfahren“ auf Seite 20.
- Spülen und lagern Sie das System in 50 % Methanol oder 50 % Isopropanol in Wasser ohne Zusätze.
- Entfernen Sie alle Proben aus dem Probengeber und lagern Sie sie im Einklang mit der guten Laborpraxis.
- Schalten Sie alle Module aus.

# Empfehlungen für Entgaser

### VORSICHT

#### Flüssigkeit im Entgaser

Falls ein Lösemittel mit niedrigem Siedepunkt kondensiert oder das System undicht ist, kann sich Flüssigkeit in den Entgaskammern ansammeln und dadurch die Leistung beeinträchtigen.

Spülen Sie in diesem Fall

- ✓ alle Lösemittelkanäle mit Isopropanol.
- ✓ Lassen Sie nicht verwendete Kanäle mit Isopropanol gefüllt.

- Überprüfen Sie die Kompatibilität der Lösemittel mit dem Entgaser und der Anwendung
  - Verwenden Sie die eigenständigen Standardentgaser (G1322A oder G7122A) für RI-Anwendungen, höhere Flussraten als 5 mL/min, Lösemittel mit niedrigem Siedepunkt (<60 °C) und mit Hexan, Tetrahydrofuran und halogenierten Lösemitteln.
  - Verwenden Sie für alle anderen Anwendungen einen integrierten oder eigenständigen Hochleistungsentgaser (G4225A).
- Falls nicht ausreichend Vakuum für die optimale Entgaserleistung erreicht oder aufrecht erhalten werden kann (angezeigt durch eine gelb oder rot leuchtende LED bei eigenständigen Entgasern bzw. spezifische Fehlermeldungen bei integrierten Entgasern), schalten Sie das Modul aus und wieder ein.
- Kann bei einem integrierten Entgaser auch nach dem Ein- und Ausschalten kein Vakuum erreicht oder aufrecht erhalten werden, verwenden Sie den im Gerätesteuerungsbildschirm des Agilent Lab Advisor verfügbaren **Evacuation Mode**.



Abbildung 2 Entgasersteuerung für interne Entgaser in Agilent Lab Advisor

### HINWEIS

Folgen Sie den auf dem Bildschirm angezeigten Anweisungen, nachdem Sie den **Evacuation Mode** gestartet haben.



### Empfehlungen für Pumpen

- Überprüfen Sie regelmäßig durch Kontrolle des Drucksignals die Pumpenleistung.
- Führen Sie die vorbeugende Wartung innerhalb der empfohlenen Zeitintervalle durch.
- Bereiten Sie die Pumpe gemäß den Angaben im Abschnitt zum Einschalten der Pumpe vor, um optimale Leistung und maximale Betriebsdauer zu gewährleisten.
- Stellen Sie beim Austausch von Lösemitteln sicher, dass das neue Lösemittel mit dem vorherigen Mittel mischbar ist (verwenden Sie, falls nötig, ein zusätzliches mischbares Lösemittel als Zwischenstufe).
- Verwenden Sie die Kolbenhinterspülfunktion entsprechend den Empfehlungen, um optimale Leistung und maximale Betriebsdauer zu gewährleisten, siehe „Kolbenhinterspülung (Durchführung obligatorisch, falls installiert)“ auf Seite 10.

### Empfehlungen für MCGV

Wählen Sie die Kanäle für das Mehrkanalgradientenventil (MCGV)

- Benutzen Sie für die Pufferlösungen die unteren Kanäle (A bzw. D).
- Spülen Sie alle MCGV-Kanäle regelmäßig mindestens 10 min lang bei 5 mL/min pro Kanal mit Wasser, um eventuelle Salzablagerungen zu entfernen.
- Prüfen Sie die Kompatibilität der Pufferlösungen und der organischen Lösemittel, um die Bildung von Niederschlägen in der Mischkammer des MCGV zu vermeiden.

#### HINWEIS

Wenn inkompatible Lösemittel gemischt werden, können beim Mischen Salze ausfallen und den nachfolgenden Flussweg blockieren und Komponenten beschädigen.

## Kolbenhinterspülung (Durchführung obligatorisch, falls installiert)

### Kolbenhinterspülung (G4204A, G4220A, alle Pumpen der Serie 1260)

#### VORSICHT

#### Verunreinigung des Lösemittels der Kolbenhinterspülung

#### Schäden an Kolben und Dichtungen

- ✓ Das Lösemittel für die Kolbenhinterspülung darf nicht wiederverwertet werden.
- ✓ Wechseln Sie das Lösemittel für die Kolbenhinterspülung wöchentlich.
- ✓ Typischer Lösemittelverbrauch: 0,5 L pro Woche.
- ✓ Es wird dringend empfohlen, ein Aufsatzkit für Flasche mit Lösemittel für die Kolbenhinterspülung (5067-6131) zu verwenden.

Die Verwendung der Kolbenhinterspülfunktion ist, falls installiert, bei der Verwendung von Puffern und anderen nicht flüchtigen Lösemitteln oder Zusätzen, die sich im Kolben oder in den Dichtungen ablagern könnten, obligatorisch. Die Kolbenhinterspülfunktion reinigt diese Teile regelmäßig automatisch.

#### Vorteile der Kolbenhinterspülung:

- Entfernung von Partikeln, Salzkristallen und anderen nicht flüchtigen Rückständen aus den Kolben und Dichtungen, die andernfalls den Kolben und die Kolbendichtungen beschädigen könnten.
- Schmierer der Kontaktstelle zwischen Dichtung und Kolben.
- Kühlung der Kolben.

#### Kolbenhinterspüldialog in Ihrem CDS

Der Dialog ist auf dem Steuerungsbildschirm zu finden. Es wird empfohlen, die in [Abbildung 3](#) auf Seite 12 gezeigten Einstellungen zu verwenden.

#### Zu beachten:

- Die Einstellungen der Kolbenhinterspülung sind KEINE Methodenparameter (als Einstellungen der Gerätesteuerung werden sie auf alle Methoden angewendet, die auf einem bestimmten Gerät laufen).
- Die Kolbenhinterspülung muss nochmals manuell gestartet werden:
  - Ein FEHLER wurde beseitigt.
  - Einschalten.

#### Betrieb der Kolbenhinterspülung:

- REGELMÄSSIGER Betrieb, z. B. 0,5 min alle 7 min.
  - Die Einstellung kann im Steuerungsbildschirm geändert werden (siehe [Abbildung 3](#) auf Seite 12).  
Die Einstellungen sind über das Kontextmenü zu sehen (siehe [Abbildung 5](#) auf Seite 12).
  - Der typische Lösemittelfluss beträgt 0,7 mL/min, was ungefähr einem Verbrauch von 3 mL/h bzw. 0,5 l/Woche bei konstantem Betrieb entspricht.

## Empfehlungen für Pumpen

- Verwenden Sie
  - 10 % Isopropanol in Wasser.
  - 100 % Isopropanol für Normalphasenanwendungen.
- Positionieren Sie die Flasche mit dem Waschlösemittel oberhalb und den Abfallbehälter unterhalb des Geräts.
- Füllen Sie die Flasche mit dem Lösemittel für die Kolbenhinterspülung *nicht* nach, sondern verwenden Sie immer korrekt gereinigte frische Flaschen.
- Verwenden Sie für Pumpen, die keinen Kolbenhinterspülungssensor enthalten, eine peristaltischen Pumpe.
  - Berühren Sie die peristaltische Pumpe mit Ihrem Finger, um zu überprüfen, ob sie arbeitet, oder vergewissern Sie sich, dass das Lösemittel für die Kolbenhinterspülung durch die Pumpe strömt, indem Sie nachsehen, ob es aus dem Schlauch heraus tropft.

## Empfehlungen für Pumpen

Tabelle 1 Dialog und Betrieb der Kolbenhinterspülung

G4204A, G4220A

alle Pumpen der 1260 Serie

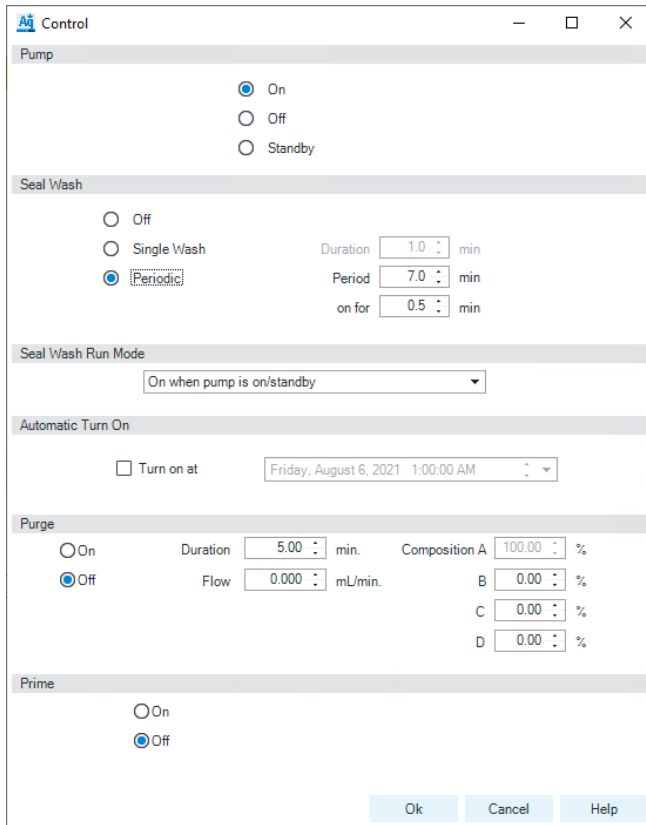


Abbildung 3 Einstellungen der Kolbenhinterspülung (1290 Infinity-Pumpen)

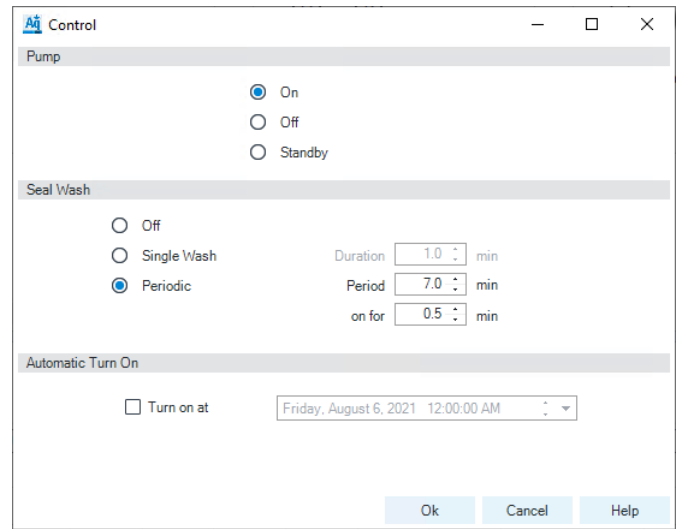


Abbildung 4 Einstellungen der Kolbenhinterspülung (alle Pumpen der 1260 Serie)

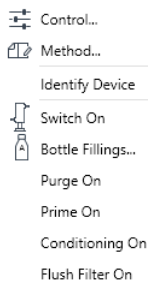


Abbildung 5 Kontextmenü (1290 Infinity-Pumpen)

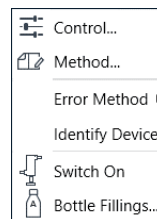


Abbildung 6 Kontextmenü (alle Pumpen der 1260 Serie)

### Kolbenhinterspülung (G7104A, G7104C, G7120A, G7131A, G7131C und G7132A)

#### VORSICHT

#### Verunreinigung des Lösemittels der Kolbenhinterspülung

#### Schäden an Kolben und Dichtungen

- ✓ Führen Sie kein Recycling des Lösemittels für die Kolbenhinterspülung durch.
- ✓ Wechseln Sie das Lösemittel für die Kolbenhinterspülung wöchentlich.
- ✓ Typischer Lösemittelverbrauch: 0,5 L pro Woche.
- ✓ Es wird dringend empfohlen, ein Aufsatzkit für Flasche mit Lösemittel für die Kolbenhinterspülung (5067-6131) zu verwenden.

Die Kolbenhinterspülungsfunktion entfernt automatisch regelmäßig Ablagerungen von Kolben und Dichtungen.

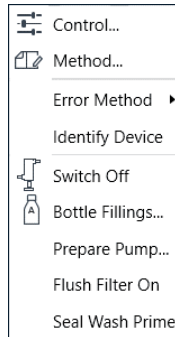
Der Sensor der Kolbenhinterspülung überprüft die Leistung des Kolbenhinterspülungssystems und warnt den Benutzer, wenn eine Störung festgestellt wird.

Betrieb der Kolbenhinterspülung:

- Das Zeitintervall für die Kolbenhinterspülung wird auf 30 s alle 7 min eingestellt.
- Der Durchfluss wird auf 500 µL/min eingestellt.
- Die Integrität des Kolbenhinterspülungssystems wird in regelmäßigen Abständen überprüft.
- Der typische Lösemittelverbrauch beträgt ungefähr 0,5 L pro Woche.
- Verwenden Sie
  - 10 % Isopropanol in Wasser.
  - 100 % Isopropanol für Normalphasenanwendungen.
- Positionieren Sie die Flasche mit dem Waschlösemittel oberhalb und den Abfallbehälter unterhalb des Geräts.
- Füllen Sie das Lösemittel für die Kolbenhinterspülung *NICHT* nach, sondern verwenden Sie immer korrekt gereinigte frische Flaschen.

## Empfehlungen für Pumpen

- Die Flaschen für das Lösemittel für die Kolbenhinterspülung dürfen NICHT wiederverwertet werden.
- Das EMF-Symbol wird gelb, sobald der Kolbenhinterspülungssensor der Pumpe eine Unregelmäßigkeit feststellt.
  - Wechseln Sie das Lösemittel für die Kolbenhinterspülung und starten Sie aus dem Kontextmenü die Funktion zum Initialisieren der Kolbenhinterspülung (siehe [Abbildung 7](#) auf Seite 14).



**Abbildung 7** Kontextmenü

- Überprüfen Sie die Leitung und den Filter der Kolbenhinterspülung auf Knicke, Undichtigkeiten oder Blockaden.
- Überprüfen Sie den Abfallschlauch auf Blockaden und vergewissern Sie sich, dass der Lösemittelabfall ungehindert ablaufen kann:
  - Wenn sich Lösemittelabfall im Schlauch ansammelt, ist keine ordnungsgemäße Funktion des Sensors mehr möglich.

## Empfehlungen für Probennehmer

- Entfernen Sie vor dem Abschalten oder einem langen Standby immer
  - den Puffer mit HPLC-tauglichem Wasser (siehe „Spülverfahren“ auf Seite 20).
  - Spülen Sie den Probennehmer mindestens 15 min lang mit Wasser (sowohl externe Nadelreinigung als auch Backflush für Mehrfachwaschfunktion).
  - Führen Sie eine Sichtprüfung durch und entfernen Sie die Salzurückstände bei Bedarf manuell.
  - Entfernen Sie kontaminierende Stoffe mit einem starken Lösemittel, z. B. mit reinem ACN.
  - Verwenden Sie zum Spülen des Probennehmers die automatische Reinigungsfunktion und schalten Sie gleichzeitig das Injektionsventil vor und zurück.

Auto-clean Settings and Start

Injection Valve

Switch Injection Valve

Multi-Wash Property

Execute Wash

Step	Solvent	Time [s]	Seat Back Flush	Needle Wash
1	Off	0	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2	Off	0	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3	S1	30	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Flush Flow Pa

Flush Flow Path      Duration  s

Be sure to set the composition and the flow of your pump accordingly before the start of the action.

Start      Cancel

- Verwenden Sie für die Nadelreinigung oder den Backflush stets frisches Waschlösemittel.
- Stellen Sie das Waschlösemittel-Reservoir für die Nadelreinigung oder den Backflush in die Lösemittelwanne.
  - Verwenden Sie ein Lösemittel, das für die Probe und die mobile Phase geeignet ist.

### HINWEIS

Das Lösemittel für die Nadelreinigung sollte so zusammengesetzt sein, dass es einerseits so gut wie möglich löst, andererseits aber kompatibel ist (Ihr stärkstes Verdünnungsmittel). Die Wahl der Waschlösemittel ist Teil der Methodenentwicklung. Für viele Anwendungen ist ein Gemisch aus 50 – 100 % eines organischen Lösemittels in destilliertem Wasser eine gute Wahl.

- Überprüfen Sie, ob Ablauf des Waschanschlusses in einen Abfallbehälter geleitet wird.
- Befüllen Sie jede Probenflasche mit einer für alle Injektionen ausreichenden Menge an Probenlösung.
  - Verwenden Sie nur die von Agilent empfohlenen Probenflaschen.
  - Überfüllen Sie die Probenflaschen nicht, jede Probenflasche darf nur mit bis zu 90 % befüllt werden.
  - Verwenden Sie Septen mit Schlitz, wenn sie größere Mengen entnehmen oder mehrere Entnahmen aus derselben Probenflasche durchführen.

### HINWEIS

- Filtrieren, dekantieren oder zentrifugieren Sie die Probe, um unlösliche Feststoffe abzutrennen. Das Probenlösemittel sollte keine Partikel enthalten und möglichst immer gefiltert sein.

- Achten Sie darauf, dass Probenlösemittel und gewünschte mobile Phase so gut wie möglich aufeinander abgestimmt sind.

## Mehrfachwäsche

Die Mehrfachwaschfunktion hat zum Zweck, Verschleppungen gering zu halten, und kann auf jedem Agilent Mehrfachprobengeber installiert werden.

Diese Option reduziert eine Verschleppung bei kritischen Proben und ermöglicht Folgendes:

- Externe Nadelreinigung mit bis zu drei unterschiedlichen Lösemitteln
- Backflush mit bis zu drei unterschiedlichen Lösemitteln

Die Anwendung der Mehrfachwaschfunktion wird nicht für salzhaltige mobile Phasen empfohlen, da sonst Salz auf der Nadel und auf dem Nadelsitz auskristallisiert. Aufgrund des Flusswegs des hydraulischen Mehrfachwasch-Behälters tritt die mobile Phase aus der Nadelspitze aus, wenn sich das Messgerät vor der Injektion in die Ausgangsposition bewegt, und kann in den Sitz hineinfallen. Dieser Vorgang ist unabhängig von den Reinigungseinstellungen für den Injektionspfad zu erwarten und bedeutet keine Leckage.

Wird auf dem System eine Mehrfachwäsche mit salzhaltigen mobilen Phasen installiert, um Salzablagerungen auf der Nadel und dem Sitz zu vermeiden, wird empfohlen, den Mehrfachprobengeber täglich 15 min lang mit Wasser zu spülen und die Nadel und den Sitz durch Sichtprüfung zu kontrollieren. Verwenden Sie, falls nötig, ein fusselfreies Tuch mit destilliertem Wasser, um die Nadel, den Sitz und andere Teile, die noch Salzurückstände aufweisen, manuell zu reinigen.

Wann sollte die Mehrfachwaschfunktion verwendet werden?

- Wenn das System nur für Umkehrphasen-Anwendungen vorgesehen ist und die mobile Phase keine niederschlagsbildenden Bestandteile aufweist.
- Ist das System für Anwendungen mit salzhaltigen mobilen Phasen vorgesehen, wird die Mehrfachwaschfunktion nicht empfohlen. Ist diese Funktion jedoch installiert, kann es zum Auskristallisieren auf der Nadel und dem Sitz kommen. Folgende Maßnahmen sollten befolgt werden:
  - Spülen Sie täglich 15 min lang mit Wasser, um Salzreste zu entfernen.
  - Führen Sie eine externe Nadelreinigung und einen Backflush durch.
  - Kontrollieren Sie Nadel/Sitz/Waschanschluss durch Sichtprüfung auf Salzurückstände.
  - Reinigen Sie ggf. Nadel/Sitz/Waschanschluss manuell.

### HINWEIS

Wird dieses Verfahren nicht befolgt, führt dies zu Blockaden von Nadel und Sitz.

- Falls das System für wechselnde Anwendungen mit salzhaltigen mobilen Phasen UND Umkehrphasen-Anwendungen vorgesehen ist, wird die Mehrfachwaschfunktion nicht unterstützt. Es besteht ein hohes Risiko, dass kontinuierlich Salzreste freigesetzt werden, die die Umkehrphasen-Chromatographie stören oder sogar zu Verstopfen des Systems führen.



In den Leitungen der Flusswege für Mehrfachwaschvorgänge ist eine beträchtliche Menge Lösemittel vorhanden, das einer Alterung unterliegt, was bei hochempfindlichen UV- und MS-Messungen zu erhöhtem Hintergrund führen kann. Als Gegenmaßnahme wird empfohlen, Lösemittel in jeder für die Mehrfachwäsche verwendeten Leitung zum Waschanschluss sowie die Lösemittel in der S1-Leitung (anfängliche Chromatographiebedingung) zum Sitz mindestens 5 Minuten lang zu spülen, bevor die eigentliche LC-Analyse gestartet wird.

## Empfehlungen für Pumpen und Probennehmer mit optionalem Inline-Filter

Die Lebensdauer von UHPLC-Säulen wird gewöhnlich durch hohen Rückdruck begrenzt. Partikelstoffe in der Probe werden an der Einlassfritte der Säule gesammelt, was den Rückdruck ansteigen lässt, bis der Druckgrenzwert des Systems erreicht ist. Die Verwendung des Inline-Filters wird empfohlen, um eine Verstopfung der Säulenfritte zu verhindern, insbesondere wenn die Proben im Vorfeld nicht gefiltert werden können oder die Probe Niederschläge bilden könnte.

Die folgenden Module können mit einem zusätzlichen Inline-Filter versehen werden:

- Quaternäre Pumpen (G7104A, G7104C, G4204A, G7131A, G7131C):
  - Material der Inline-Filtereinheit: Edelstahl (5067-5407)
  - Inline-Filtereinheit, biokompatibel (5720-0003)
- Agilent 1290 Infinity- und 1290 Infinity II automatischer Probengeber (mit Ausnahme von G5668A):
  - 1290 Infinity II Inline-Filterkit (5067-6189)
  - 1290 Infinity II Bio Inline-Filterkit (5720-0020)

Diese Inline-Filter mit einer nominalen Filterporengröße von 0,3 µm schützen die UHPLC-Säule durch Filtern von Partikeln aus Proben oder dem UHPLC-System vor dem Verstopfen.

Vorteile des Inline-Filters:

- Sehr geringes Innenvolumen
  - Totvolumen bei starrer Kapillare 1,3 µL
  - Totvolumen bei flexibler Kapillare 1,6 µL
- Spezifiziert für den Betrieb bei hohen Drücken (max. Betriebsdruck 1300 bar).

In den folgenden Fällen wird eine Installation des Inline-Filters in die Pumpen empfohlen, um das nachgeschaltete System vor Blockaden zu schützen:

- Wenn Lösemittelkombinationen verwendet werden, bei denen nach dem Mischen Niederschläge auftreten können,
- Wenn Anwendungen mit Puffern oder Zusätzen laufen, während Säulen mit kleinen Partikelgrößen verwendet werden

Allgemeine Hinweise zur wirksamen Verwendung von Inline-Filtern:

- Filtern Sie Lösemittel vor der Verwendung.
- Befolgen Sie die besten Vorgehensweisen.
- Führen Sie bei G4204A-, G7104A/C- und G7131A/C-Pumpen einmal wöchentlich einen Backflush des Filters in der Pumpe durch (mithilfe des Befehls „Filter spülen“ aus dem Kontextmenü).

### VORSICHT

#### Schäden am Ventil

- ✓ **Verwenden Sie den Filterspülmodus nur, wenn der Inlinefilter installiert ist. Andernfalls könnte der Druckpuls das Mehrzweckventil beschädigen.**

- Wechseln Sie bei auf dem Probengeber installierten Inline-Filtern die Filterfritte (Fritte 0,3 µm für Inlinefilter, 5 St./Packung (5023-0271) oder Fritte 0,3 µm für Inline-Filter, biokompatibel, 5 St./Packung (5320-0022)) nach jeweils 1000 Injektionen, oder wenn der Rückdruck um 15 % ansteigt.

### HINWEIS

Weitere Informationen finden Sie im *technischen Hinweis G7167-90130*.

## Empfehlungen für Säulen

- Verwenden Sie Säulen nur in der **gekennzeichneten** Richtung.
- Verwenden Sie für die jeweilige Säule stets geeignete Fittings.
  - Säulen unterschiedlicher Hersteller erfordern unterschiedlich große Fittings.
  - Die Verwendung eines ungeeigneten Fittings kann zu einer Peakdispersion oder sogar zur Schäden der Säule führen.
  - Agilent empfiehlt die Verwendung von InfinityLab Fittings, um etwaige Fitting-Inkompatibilitäten beim Gebrauch von Säulen von unterschiedlichen Hersteller zu umgehen.
- Halten Sie sich stets an die Betriebs- und Anwendungsgrenzwerte, wie sie in der Benutzerinformation für die Säule angegeben sind.
- Äquilibrieren Sie die Säule vor dem Gebrauch mit 10 – 20 Säulenvolumen.
  - Es ist ratsam, vor dem Äquilibrieren auf das endgültige Lösemittel mit Zusätzen eine Zwischenspülung mit einer mobilen Phase der korrekten Zusammensetzung ohne Zusätze durchzuführen.
- Es wird empfohlen, eine Vorsäule zu verwenden, um Ihre Säule zu schützen und ihre Lebensdauer zu erhöhen.

### HINWEIS

Säulen sollten langfristig immer in einem für die Lagerung geeigneten Lösemittel aufbewahrt werden. Weitere Details zum Säulenbetrieb sind der Benutzerinformation zu entnehmen, die der Säulenpackung beiliegt.

# Empfehlungen für Detektoren

### VORSICHT

#### Häufiges Ein- und Ausschalten der Lampe

#### Reduzierte Lebensdauer der Lampe

- ✓ **Vermeiden Sie unnötiges Ein-/Ausschalten der Lampe.**

### HINWEIS

Eine Lampe kann nach dem Ausschalten erst nach Ablauf eines Sicherheitszeitraums bzw. einer Wartezeit wieder gezündet werden.

- Lassen Sie die Lampe mindestens 1 h aufwärmen.
- Sorgen Sie für alle Module für eine stabile Umgebungs- und Raumtemperatur, insbesondere für den Detektor.
  - Setzen Sie den Detektor nicht dem direkten Sonnenlicht aus.
  - Setzen Sie den Detektor keinem starken Luftstrom aus der Klimaanlage aus.
- Installieren Sie beim Anschluss eines zweiten Detektors nach der Max-Light Kartuschenzelle ein Druckbegrenzungsventil (Best.-Nr.: G4212-68001, wenn Sie die Diodenarray-Detektoren G4212A/B und G7117A/B/C verwenden oder Best.-Nr. 0100-3150, wenn Sie FLD-Detektoren verwenden).
- Verwenden Sie für jeden Detektortyp die empfohlene Abfalleitung. Achten Sie darauf, die Abfalleitung nach dem Zellenausgang nicht zusammenzudrücken.
- Stellen Sie beim Spülen mit Isopropanol oder anderen organischen Lösemitteln sicher, dass in der Detektordurchflusszelle keine Luftblasen vorhanden sind, bis eine stabile Basislinie erreicht ist.
- Nur für Brechungsindexdetektoren: Spülen Sie die Referenz- und die Probenseite mit dem frischen Lösemittel, das für die aktuelle Anwendung verwendet wird.
- Spülen Sie die Durchflusszelle nach dem Gebrauch.
  - Verwenden Sie zur Entfernung von Salzen HPLC-taugliches Wasser.
  - Verwenden Sie zur Entfernung organischer Lösemittel Isopropanol.
- Bevor Sie eine Durchflusszelle herausnehmen, um sie zu lagern, füllen Sie sie mit Isopropanol, um Algenwachstum vorzubeugen.

# Empfehlungen für biokompatible und bioinerte Systeme

- Stellen Sie sicher, dass alle Verbrauchsmaterialien (Fittings, Kapillaren, Inline-Filter, Säulen usw.) bioinert/biokompatibel sind.
  - Beachten Sie, dass einige Säulen für biologische Anwendungen ein Edelstahlgehäuse haben und Eisen oder andere Metallionen in den Flussweg einführen können. Dies kann zur Adsorption anfälliger Proben, wie phosphorylierten Nukleotiden, führen. Verwenden Sie in diesem Fall PEEK-beschichtete Säulen.
- Spülen Sie das System nach der Verwendung von hohen Salzkonzentrationen gründlich mit Wasser, um Blockaden durch Salzkristalle zu vermeiden.
- Falls der Druck unter 20 bar fällt, kann kein zuverlässiger Betrieb von Pumpen der Serie 1290 während der Analyse gewährleistet werden. Für optimale Ergebnisse sollte der Druck kontinuierlich bei mindestens 50 bar liegen. Wenn Sie Säulen verwenden, die zu geringem Rückdruck führen (<50 bar, z. B. SEC-Säulen mit 1290 LC-Systemen), sollten Sie daher eine Restriktions-Kapillare MP35N 0,12 mm x 2 m (5005-0046) zwischen der Pumpe und dem Probengeber installieren, um einen Wert von mindestens 50 bar zu erzielen.
- Spülen Sie den Mehrfachprobengeber täglich mit Wasser, wenn die Mehrfachwaschfunktion installiert ist (siehe „Mehrfachwäsche“ auf Seite 16).
- Befolgen Sie für alle quaternären Pumpen die Empfehlungen zur Erhaltung eines salzkristallfreien MCGV, siehe „Empfehlungen für MCGV“ auf Seite 9.

### VORSICHT

**Bioinerte und Bio LC-Systeme von Agilent sollten keinen Passivierungs- oder ähnlichen Verfahren unterzogen werden**

**Dies kann zu irreversiblen Schäden an den inneren Oberflächen des Systems führen**

- ✓ **Führen Sie keine Passivierungs- oder ähnlichen Verfahren auf bioinerten und biokompatiblen Systemen durch.**

### Spülverfahren

- ✓ Dieses Verfahren sollte angewendet werden, wenn salzhaltige mobile Phasen verwendet werden. Es sollte regelmäßig (mindestens einmal pro Woche) oder vor einem langen Standby- oder Ausschaltzeitraum durchgeführt werden, um Salzablagerungen aus dem Flussweg und von den im Kontakt mit den Lösemitteln stehenden Oberflächen zu entfernen. Unter „[System ausschalten](#)“ auf Seite 7 finden Sie Informationen, wie Sie das System auf das Ausschalten vorbereiten.
- ✓ Das Verfahren ist obligatorisch, wenn von Anwendungen mit salzhaltiger mobiler Phase auf Umkehrphasen-Anwendungen (oder Anwendungen mit hohem organischen Anteil), bei denen Salz ausfallen kann, gewechselt wird.
- Spülen Sie die Säule mit dem empfohlenen Lösemittel für die Lagerung und stellen Sie sicher, dass dieses Lösemittel mit der aktuellen mobilen Phase kompatibel ist und keinen Niederschlag verursachen kann.
- Ersetzen Sie die Säule durch eine Verbindung, tauschen Sie die salzhaltige Lösemittelflasche mit einer neuen Flasche HPLC-tauglichem Wasser mit Raumtemperatur aus.
- Reinigen Sie die Flaschenaufsatzeinheit mit fusselfreien Tüchern, um eine Verschleppung der restlichen Salzlösung in die neue Wasserflasche zu minimieren.

## Empfehlungen für biokompatible und bioinerte Systeme

- Probennehmer: Spülen Sie mindestens 15 min mit Wasser, um Salzreste aus allen Leitungen zu entfernen. Führen Sie bei Mehrfachwaschfunktion sowohl eine Nadelspülung als auch einen Backflush durch, kontrollieren Sie Nadel/Sitz/Waschanschluss auf Salzreste und reinigen Sie Nadel/Sitz/Waschanschluss bei Bedarf manuell.
- Spülen Sie alle Pumpenkanäle, in denen Puffer gepumpt wurde, einzeln für mindestens 10 min bei 5 mL/min.
- Spülen Sie alle Flusswege im System mindestens 10 min bei 2 mL/min mit Wasser. Wechseln Sie während dieses Schrittes alle 1 min die Position des Injektionsventils und des Säulenauswahlventils (falls installiert) und wiederholen Sie diesen Vorgang, bis jede Position mindestens 5-mal ausgewählt wurde.
- Ersetzen Sie das Wasser zur Vermeidung einer Salzverschleppung mit frischen Lösemittelflaschen.

## Zusätzliche Informationen für 1290 Infinity- und 1290 Infinity II-Pumpen

### Vorbereitung der Pumpe

Die Agilent 1290 Infinity- und 1290 Infinity II-Pumpen von Agilent sind mit automatischen Spülventilen ausgestattet. Dadurch können verschiedene Zusatzfunktionen ausgeführt werden, die in Agilent-Pumpen mit manuellen Spülventilen nicht zur Verfügung stehen. Es ist möglich, die Pumpe (Einstellung von Parametern und Starten der Funktionen **Purge**, **Condition** oder **Prime**) mit der Software vorzubereiten.

#### Spülen

Benutzen Sie die Spülfunktion für folgende Zwecke:

- Um das System mit frischem oder einem anderen Lösemittel zu füllen.
  - Achten Sie darauf, dass das neue Lösemittel mit dem vorhergehenden Lösemittel mischbar ist.
  - Beugen Sie einer Beschädigung des Entgasers oder der Pumpe vor, indem Sie gegebenenfalls einen Zwischenschritt mit einem ebenfalls mischbaren Lösemittel durchführen.
- Um Luftblasen in Leitungen und Pumpenköpfen zu entfernen.
  - Wenn die Pumpe einige Stunden oder länger nicht in Betrieb war (möglicherweise ist Luft in die Lösemittleitungen hineindiffundiert).

Sobald das Spülverfahren vorbei ist, schaltet das Modul automatisch wieder auf Analysebedingungen um.

#### Konditionieren

Falls sich weiterhin kleinste Blasen im Pumpenkopf befinden, kann die Pumpenleistung beeinträchtigt und die Genauigkeit/Präzision negativ beeinflusst werden. Dies kann sich in Form von erhöhtem Druck und/oder Schwankungen der Basislinie des Detektors äußern. Ein zuverlässiger Indikator einer derartigen Situation ist ein stark negativer (unter -1), jedoch langsam steigender Wert des Tuning-Signals. Zum wirksamen Entfernen der Luftblasen kann die Konditionierungsfunktion verwendet werden. Beim Konditionieren transportiert die Pumpe Flüssigkeit in das System (die Säule), wobei die zuletzt verwendeten Methodeneinstellungen wie Durchfluss, Zusammensetzung und Maximaldruck verwendet werden. Während des Konditionierens können keine Probenanalysen durchgeführt werden.

Verwenden Sie angemessene Einstellungen für die Durchflussrate (zum Beispiel 1,5 mL/min), die Zusammensetzung (zum Beispiel A: 50 % B: 50 %) und den Rückdruck (> 200 bar), um sicherzustellen, dass Luftblasen aus allen Pumpenköpfen effektiv entfernt werden.

Konditionieren Sie die Pumpe, wenn Ihnen Folgendes auffällt:

- Starke Druckschwankungen.
- Starke Schwankungen in der Lösemittelzusammensetzung (Basislinienrauschen/mischerbedingtes Rauschen – Veränderungen des Rauschniveaus mit der Zusammensetzung), wenn Sie sicher sind, dass der Lösemitteltyp korrekt eingestellt ist und keine Hinweise auf eine Leckage in der Pumpe vorliegen.

Eine Konditionierung ist möglicherweise auch in den folgenden Fällen erforderlich:

- Nach längerem Standby.
- Wenn das Lösemittel zu Ende gegangen ist.
- Nach dem Kundendienst bzw. nach einer Reparatur.

### VORSICHT

**Beim Befüllen leerer Lösemittelleitungen.**

**Schäden an den Dichtungen**

- ✓ **Verwenden Sie zum Füllen leerer Lösemittelleitungen eine Spritze oder die Funktion Purge.**
- ✓ **Verwenden Sie nicht den Prime-Prozess, um leere Lösemittelleitungen zu füllen.**

Initialisieren

Die Initialisierungsfunktion ist nützlich, wenn Luft in die Pumpenköpfe eingedrungen ist und diese durch eine 15-minütige Konditionierung nicht entfernt werden kann. Das Modul saugt mit hoher Geschwindigkeit und mit allen Pumpenantrieben gleichzeitig Lösemittel an und gibt es an die Abfallposition des automatischen Spülventils ab. Dies wird 20-mal durchgeführt und belastet das Ventil und die Rotordichtung sehr. Daher sollte es nur als letztes Mittel durchgeführt werden, ehe die Pumpenköpfe mit Gewalt mit einer Spritze gefüllt werden oder versucht wird, die Pumpenköpfe zu reparieren.

Benutzen Sie die Initialisierungsfunktion für folgende Zwecke:

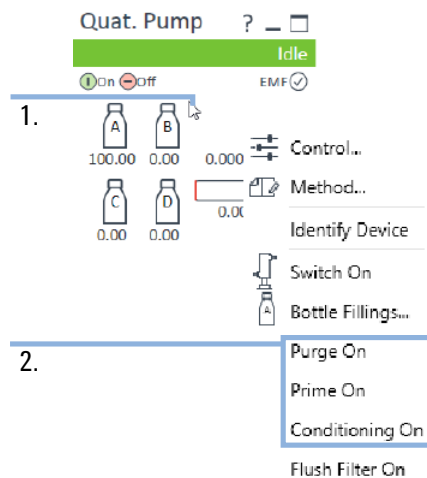
- Zum Befreien eines blockierten Ventils.

Die beschriebenen Funktion lassen sich von der Benutzeroberfläche des Treibers aus aufrufen:

- 1290 Infinity und 1290 Infinity II

### HINWEIS

Bzgl. der Parametereinstellungen siehe [Abbildung 3](#) auf Seite 12.



**Abbildung 8** Zum Vorbereiten der Pumpe (1290 Infinity).

1. Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf das Instrumentenfeld des Moduls.
2. Wählen Sie die geeignete Funktion, um den Prozess zu starten.

## Zusätzliche Informationen für 1290 Infinity- und 1290 Infinity II-Pumpen

Anstelle des klassischen Menüs gibt es das benutzeroptimierte Kontextmenü zur Pumpenvorbereitung:

- 1290 Infinity II-Pumpen

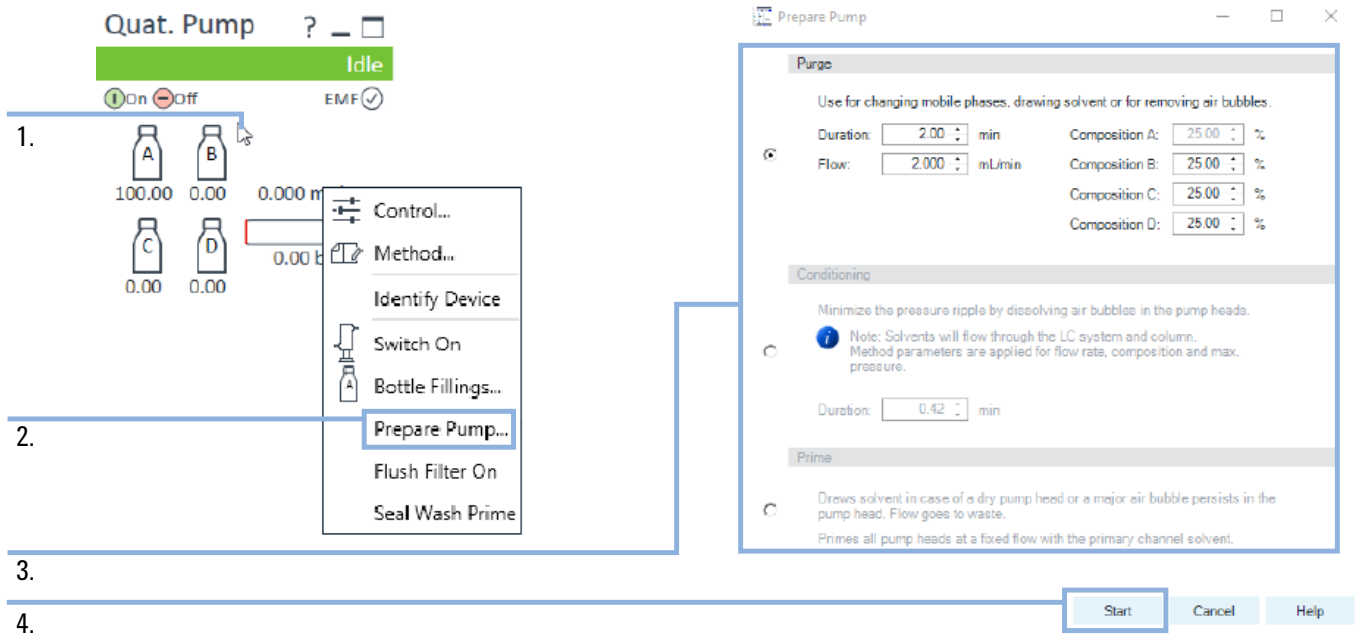


Abbildung 9 Bereiten Sie die Pumpe vor (1290 Infinity II-Pumpen).

1. Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf das Instrumentenfeld des Moduls.
2. Wählen Sie **Prepare Pump...**
3. Wählen Sie das Verfahren und nehmen Sie die entsprechenden Einstellungen vor.
4. Klicken Sie auf **Start**, um den ausgewählten Prozess zu starten.



## Agilent InfinityLab HPLC Advisor-App

Die Agilent InfinityLab HPLC Advisor-App enthält ein Paket nützlicher Tools, die Sie bei Ihrer täglichen Arbeit an HPLC-Systemen unterstützen, egal ob Sie sich direkt am Gerät befinden oder nicht. Diese Tools sind auf alle HPLC-Geräte anwendbar, unabhängig von Marke und Modell.

Die App kann auf folgende Weise auf das Smartphone heruntergeladen werden:

- Durch Suche in Google Play oder im Apple Store nach „HPLC Advisor“
- Durch Öffnen der folgenden Links
  - *Google Play*: <https://play.google.com/store/apps/details?id=com.agilent.hplcadvisor>
  - *Apple App Store*: <https://apps.apple.com/app/hplc-advisor/id1566882318>
- Durch Scannen des folgenden QR-Codes (funktioniert auf Android und iOS)



# Software-Vokabular

## C

### **Condition**

Konditionieren

## E

### **Evacuation Mode**

Evakuierungsmodus

## P

### **Prepare Pump...**

Pumpe vorbereiten...

### **Prime**

Initialisieren

### **Purge**

Spülen