

Migliori pratiche per utilizzare un sistema LC Agilent

Nota tecnica

Questa nota tecnica descrive le migliori pratiche per utilizzare un sistema LC Agilent.

Operazioni di routine 2

Attività giornaliere/settimanali 5

Accensione/spegnimento del sistema 6

Raccomandazioni per i sistemi di degasaggio 8

Raccomandazioni per le pompe 9

Raccomandazioni per i campionatori 14

Raccomandazioni per pompe e campionatori con filtro in linea opzionale 16

Raccomandazioni per le colonne 17

Raccomandazioni per i rivelatori 18

Raccomandazioni per sistemi biocompatibili e bio-inerti 19

Informazioni aggiuntive sulle pompe 1290 Infinity e 1290 Infinity II 21

Operazioni di routine

Gestione dei solventi

- Utilizzare solamente bottiglie pulite in vetro borosilicato.
 - Sciacquare le bottiglie con il solvente desiderato prima di riempirle.
 - Le bottiglie possono essere contaminate dai detergenti usati in lavastoviglie.
- Utilizzare filtri per i solventi per proteggere il sistema dall'ingresso di particelle.
- Cambiare i solventi a base acquosa ogni giorno.
 - La proliferazione di alghe e la crescita batterica possono ostruire il sistema di degasaggio o i filtri.
 - La precipitazione di sali insolubili può ostruire i filtri o i capillari.
- Preparare il volume di solvente da consumare entro 1-2 giorni.
- Utilizzare solo solventi ed acqua di grado HPLC.
 - Tutti i solventi organici, le miscele e i tamponi acquosi preparati devono essere filtrati attraverso un filtro da 0,2 μm .
 - I residui o le contaminazioni possono ostruire i filtri o i capillari.
- Annotare correttamente sulle etichette il contenuto delle bottiglie, la data di riempimento e la data di scadenza.
- Ridurre il rischio di proliferazione di alghe: utilizzare bottiglie marroni per solventi acquosi, evitare l'esposizione diretta alla luce del sole o avvolgere le bottiglie in fogli di alluminio.

Misure aggiuntive se si utilizza acetonitrile (ACN)

- L'acetonitrile e altri solventi organici possono essere filtrati utilizzando un filtro a membrana in PTFE da 0,2 μm (ad es. 5191-4339).

NOTA

L'utilizzo di filtri in nylon non è raccomandato in caso di LCMS ad alta sensibilità.

- Utilizzare bottiglie marroni e riempirle con la quantità di acetonitrile da consumare entro 1-2 giorni per evitare reazioni fotochimiche e ossidazione.

Preparazione dei campioni

AVVERTENZA

Possibile precipitazione del campione

- ✓ Assicurarsi che il campione sia completamente solubile sia nel diluente del campione che nella fase mobile.
- ✓ Fare in modo che il diluente del campione corrisponda il più possibile alla fase mobile iniziale per evitare precipitazione, picchi di pressione e picchi di solvente sul cromatogramma.

- La filtrazione mediante filtri da 0,2 μm è il metodo preferito per rimuovere la frazione insolubile dai campioni ed evitare ostruzioni nel sistema. Se non è possibile, centrifugare vigorosamente il campione e prestare attenzione a non contaminare con i precipitati il surnatante durante la sua decantazione o aspirazione.
- Assicurarsi che anche il diluente del campione sia privo di particolato.
- I campioni non filtrati causano ostruzione e contaminazione del percorso del flusso, che possono determinare un continuo aumento della contropressione del sistema e anomalie della pressione, per esempio oscillazioni o cali improvvisi. Le variazioni di pressione possono influire sulla riproducibilità dei risultati cromatografici.
- Per esempio, i campioni proteici non filtrati possono determinare la formazione di un film proteico che, con il passare del tempo, potrebbe ostruire il percorso del flusso e ridurre in maniera significativa la vita utile delle colonne per cromatografia.

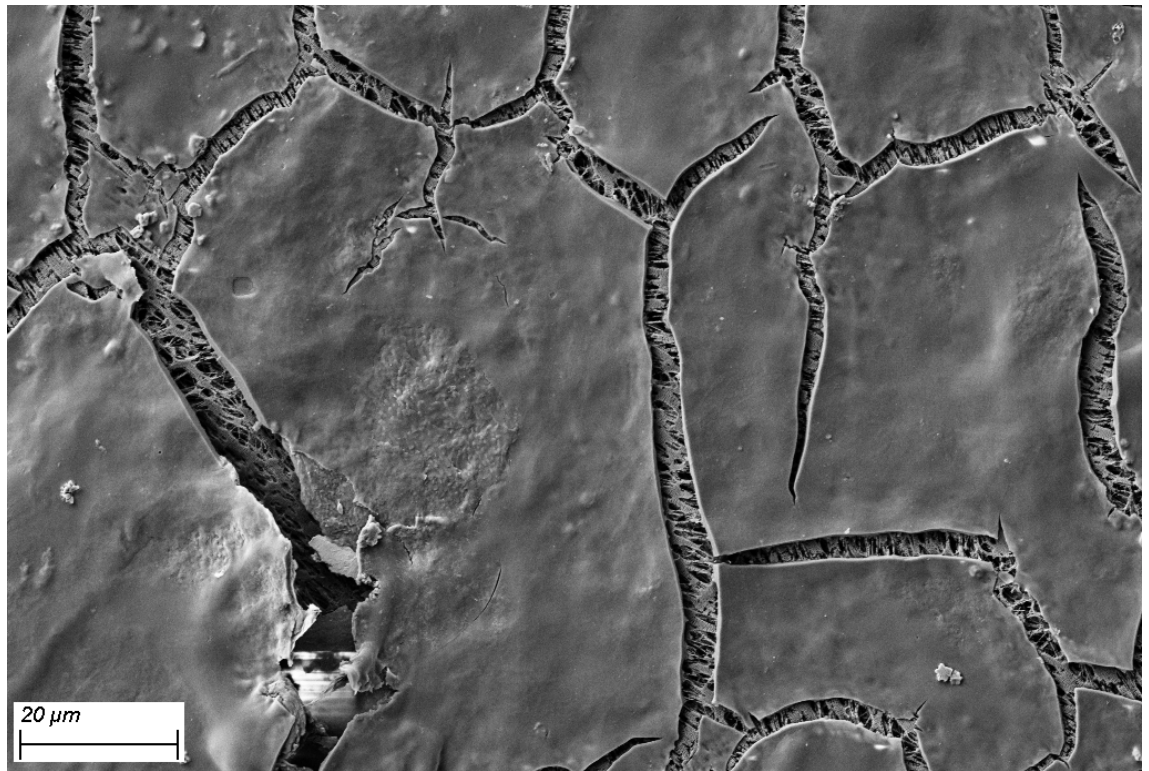


Figura 1 Film proteico formatosi sulla superficie del supporto in PTFE sul filtro in linea (confermato da SEM EDX)

- Si raccomanda l'uso di filtri in linea per evitare l'ingresso di particolato nel percorso del flusso, con conseguente danneggiamento di valvole, colonne e rivelatore. Vedere "Raccomandazioni per pompe e campionatori con filtro in linea opzionale", pagina 16.

Come pulire il sistema

- Se si sospetta una contaminazione batterica del sistema, è possibile ricorrere alla seguente procedura di purificazione.
 - Applicare le seguenti soluzioni una dopo l'altra a velocità di flusso moderata (0,5 – 1 mL/min) per almeno 30 min ciascuna:
 - a Acqua
 - b NaOH 0,1 M
 - c Acqua
 - d HCl 0,13 M
 - e Acqua
- Quando si lavora con sistemi che utilizzano tamponi biocompatibili (ad es. fosfato, acetato), occorre prestare particolare attenzione per prevenire la formazione di biofilm.
 - La procedura di pulizia del sistema (precedentemente descritta) deve essere eseguita quando si osserva un declino della riproducibilità dei risultati della cromatografia su tutte le linee del solvente utilizzate per le soluzioni tampone biocompatibili.
- Durante qualsiasi procedura di pulizia del sistema LC, accertarsi che la colonna e il rivelatore siano esclusi dal percorso del flusso.
- Le colonne per cromatografia utilizzate per la separazione delle biomolecole (ad es. cromatografia ad esclusione dimensionale o cromatografia a scambio ionico) devono essere conservate in azoturo di sodio allo 0,02 %. Per maggiori indicazioni sulle colonne per LC Bio, vedere <https://www.agilent.com/en/support/liquid-chromatography/kb005960>.

Attività giornaliere/settimanali

Attività giornaliere

- Sostituire i solventi e le bottiglie dei solventi per le fasi mobili a base di acqua/tampone.
- Sostituire i solventi e le bottiglie dei solventi per la fase mobile organica al massimo a giorni alterni.
- Controllare la presenza di solvente per il lavaggio delle guarnizioni.
- Spurgare ciascun canale con solvente fresco a 2,5 – 3 mL/min per 5 min prima della messa in funzione.
- Equilibrare il sistema con la composizione e la velocità di flusso del metodo successivo.

Attività settimanali

- Sostituire il solvente di lavaggio delle guarnizioni (10% di isopropanolo in acqua) e la bottiglia.
- Qualora siano state eseguite applicazioni con sali, lavare tutti i canali con acqua (per maggiori dettagli vedere "Procedura di lavaggio", pagina 19) e rimuovere manualmente eventuali depositi di sali.
- Verificare l'assenza di sporcizia e ostruzioni nei filtri del solvente. Procedere alla loro sostituzione se dalla linea del solvente non esce alcun flusso una volta rimossa dall'ingresso del sistema di degasaggio.

AVVERTENZA

Contaminazione del solvente di lavaggio delle guarnizioni

Danneggiamento di pistoni e guarnizioni

- ✓ **Non riciclare il solvente di lavaggio delle guarnizioni.**
- ✓ **Sostituire settimanalmente il solvente di lavaggio delle guarnizioni.**
- ✓ **Consumo tipico di solvente: 0,5 L alla settimana.**
- ✓ **Si raccomanda vivamente l'uso del Kit di lavaggio guarnizioni per testa bottiglia (5067-6131).**

Accensione/spengimento del sistema

Accensione del sistema

- Assicurarsi che tutti i moduli si trovino in un ambiente a temperatura stabile protetto dalla luce diretta del sole.
- Accendere tutti i moduli e procedere alla loro preparazione come descritto di seguito.

Preparare la pompa

- Utilizzare una fase mobile fresca o differente (come necessario).
- Spurgare ciascun canale con 2,5 – 3 mL/min per 5 min. Aprire la valvola di spurgo manuale oppure utilizzare il comando di spurgo a seconda del tipo di pompa.

Preparare il campionatore

- Evitare di utilizzare il lavaggio dell'ago e il backflush della sede con solventi organici in applicazioni con tamponi, in quanto ciò potrebbe provocare la precipitazione di sali nella sede dell'ago.
- Quando si utilizza il lavaggio dell'ago e/o il backflush della sede:
 - utilizzare sempre solventi freschi;
 - metanolo, acetonitrile, isopropanolo, acqua e loro miscele sono buone opzioni;
 - non utilizzare soluzioni di lavaggio non miscibili o che danno luogo a precipitazione.
- Quando si utilizza un refrigeratore del campione/termostato del campione:
 - accendere il refrigeratore/termostato e attendere che la temperatura desiderata sia stata raggiunta e sia stabile;
ciò può essere fatto mentre la lampada del rivelatore si riscalda (vedere "Preparare il rivelatore", pagina 6).
- Assicurarsi che i vial contengano una quantità sufficiente di soluzione del campione per tutte le iniezioni.

Preparare il rivelatore

- Riscaldare la lampada per almeno 1 h per garantire la stabilità della linea di base.
- Solo per i rivelatori a indice di rifrazione (RI): accendere il riscaldatore e lavare il lato per il riferimento e quello per il campione con solvente fresco usato per l'applicazione in corso.

Equilibrare il sistema

- Mentre la lampada del rivelatore si sta riscaldando, equilibrare il sistema (colonna e rivelatore inclusi) utilizzando la composizione della propria applicazione per almeno 15 min, fino a quando la pressione e il segnale della linea di base del rivelatore sono stabili.

Spegnimento del sistema

- Lavare la colonna con i solventi adeguati e conservarla come indicato nel manuale di istruzioni della colonna (assicurarsi che il solvente di lavaggio sia compatibile con il solvente presente nel sistema per evitare la precipitazione).
- Le colonne per cromatografia utilizzate per la separazione delle biomolecole (ad es. cromatografia ad esclusione dimensionale o cromatografia a scambio ionico) devono essere conservate in azoturo di sodio allo 0,02 %. Per maggiori indicazioni sulle colonne per LC Bio, vedere <https://www.agilent.com/en/support/liquid-chromatography/kb005960>.
- Installare un raccordo o un capillare di restrizione e lavare accuratamente il sistema con acqua, in particolare dopo l'uso di tamponi. Per informazioni dettagliate vedere "Procedura di lavaggio", pagina 19.
- Lavare e conservare il sistema in metanolo al 50% o isopropanolo al 50% in acqua, senza additivi.
- Rimuovere tutti i campioni dall'autocampionatore e conservarli attenendosi alle buone pratiche di laboratorio.
- Spegnere tutti i moduli.

Raccomandazioni per i sistemi di degasaggio

AVVERTENZA

Liquido all'interno del sistema di degasaggio

Se un solvente a basso punto di ebollizione condensa o se vi è una perdita, può accumularsi del liquido all'interno delle camere del sistema di degasaggio, compromettendone le prestazioni.

Quando ciò si verifica,

- ✓ spurgare tutti i canali del solvente con isopropanolo;
- ✓ mantenere i canali inutilizzati pieni di isopropanolo.

- Verificare la compatibilità dei solventi con il sistema di degasaggio e l'applicazione
 - Utilizzare i sistemi di degasaggio standard indipendenti (G1322A o G7122A) per le applicazioni RI, velocità di flusso superiori a 5 mL/min, con solventi a basso punto di ebollizione (<60 °C) e con esano, tetraidrofurano e qualsiasi solvente alogenato.
 - Utilizzare un sistema di degasaggio integrato o indipendente ad alte prestazioni (G4225A) per tutte le altre applicazioni.
- Se non è possibile raggiungere o mantenere un livello di vuoto sufficiente per prestazioni di degasaggio ottimali (come indicato dal LED di stato giallo o rosso nei sistemi di degasaggio indipendenti o da messaggi di errore specifici sui sistemi di degasaggio integrati), spegnere e riaccendere il modulo.
- Se, dopo lo spegnimento e la riaccensione, non è ancora possibile raggiungere o mantenere il livello di vuoto sui sistemi di degasaggio integrati, utilizzare la **Evacuation Mode**, disponibile nella schermata di controllo dello strumento di Agilent Lab Advisor.

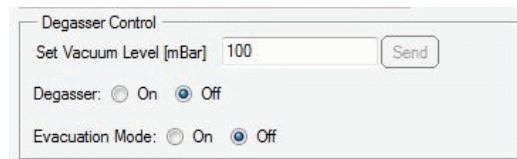


Figura 2 Controllo del sistema di degasaggio per sistemi di degasaggio interni in Agilent Lab Advisor

NOTA

Quando si avvia la **Evacuation Mode** seguire le istruzioni riportate sullo schermo.

Raccomandazioni per le pompe

- Verificare con regolarità le prestazioni delle pompe monitorando il segnale di pressione.
- Effettuare la manutenzione preventiva secondo gli intervalli di utilizzo raccomandati.
- Preparare la pompa come descritto nella sezione relativa all'accensione per garantire prestazioni e durata ottimali.
- Quando si sostituiscono i solventi, assicurarsi che il nuovo solvente sia miscibile con quello precedente (se necessario, utilizzare un solvente miscibile aggiuntivo come solvente intermedio).
- Utilizzare la funzione di lavaggio delle guarnizioni come raccomandato per garantire prestazioni e durata ottimali (vedere "Lavaggio delle guarnizioni (uso obbligatorio se installato)", pagina 10).

Consigli per MCGV

Selezione dei canali per la valvola multicanale del gradiente (MCGV)

- Utilizzare i canali in basso (A e/o D) per le soluzioni tampone.
- Per rimuovere i possibili depositi salini, lavare con regolarità tutti i canali MCGV con acqua a 5 mL/min per almeno 10 min per canale.
- Verificare la compatibilità di tamponi e solventi organici per evitare il rischio di precipitazione nella camera di miscelazione delle MCGV.

NOTA

Quando si mescolano solventi incompatibili, i sali possono precipitare in corrispondenza del punto di miscelazione bloccando il percorso del flusso a valle e danneggiando le parti.

Lavaggio delle guarnizioni (uso obbligatorio se installato)

Lavaggio delle guarnizioni (G4204A, G4220A, tutte le pompe 1260)

AVVERTENZA

Contaminazione del solvente di lavaggio delle guarnizioni

Danneggiamento di pistoni e guarnizioni

- ✓ Non riciclare il solvente di lavaggio delle guarnizioni.
- ✓ Sostituire settimanalmente il solvente di lavaggio delle guarnizioni.
- ✓ Consumo tipico di solvente: 0,5 L alla settimana.
- ✓ Si raccomanda vivamente l'uso del Kit di lavaggio guarnizioni per testa bottiglia (5067-6131).

L'uso della funzione di lavaggio delle guarnizioni è obbligatorio quando essa è installata e quando si usano tamponi e altri solventi o additivi non volatili che potrebbero depositarsi su pistoni e guarnizioni. La funzione di lavaggio delle guarnizioni pulisce con regolarità queste parti in modo automatico.

Vantaggi del lavaggio delle guarnizioni:

- Rimozione di particolato, cristalli salini e altri residui non volatili dai pistoni e dalle guarnizioni, che potrebbero altrimenti essere danneggiati
- Lubrificazione dell'interfaccia guarnizione/pistone
- Raffreddamento dei pistoni

Finestra di dialogo del lavaggio delle guarnizioni nel CDS

La finestra di dialogo è inclusa nella schermata di controllo; si raccomanda di utilizzare le impostazioni visualizzate nella [Figura 3](#), pagina 11.

Prestare attenzione al fatto che:

- le impostazioni del lavaggio delle guarnizioni NON sono parametri del metodo (come impostazioni del controllo dello strumento, esse si applicano a tutti i metodi eseguiti in un particolare strumento);
- il lavaggio delle guarnizioni deve essere riavviato manualmente dopo:
 - la cancellazione di un ERRORE;
 - l'accensione.

Lavaggio delle guarnizioni:

- Operazione PERIODICA, per esempio 0,5 min ogni 7 min.
 - Le impostazioni possono essere modificate nella schermata di controllo, vedere la [Figura 3](#), pagina 11.
Le impostazioni sono disponibili attraverso il menu contestuale, vedere la [Figura 5](#), pagina 11.
 - Il flusso di solvente tipico è 0,7 mL/min, che corrisponde a un consumo approssimativo di 3 mL/h o di 0,5 L/settimana con funzionamento costante.
- Utilizzare
 - isopropanolo al 10% in acqua.
 - isopropanolo al 100% per le applicazioni in fase normale.

Raccomandazioni per le pompe

- Collocare la bottiglia del solvente di lavaggio al di sopra dello strumento e la bottiglia di scarico sotto di esso.
- *Non* riempire nuovamente le bottiglie di solvente di lavaggio delle guarnizioni; usare sempre bottiglie fresche e ben pulite.
- Per le pompe non equipaggiate con sensore di lavaggio delle guarnizioni, testare la pompa peristaltica.
 - Toccare la pompa peristaltica con un dito per verificare che sia in funzione o verificare la presenza di un flusso di solvente di lavaggio delle guarnizioni osservando il gocciolamento del solvente di lavaggio delle guarnizioni dal tubo.

Tabella 1 Finestra di dialogo sul lavaggio delle guarnizioni e funzionamento

G4204A, G4220A	tutte le pompe 1260
<p>Figura 3 Impostazioni del lavaggio delle guarnizioni (pompe 1290 Infinity)</p>	<p>Figura 4 Impostazioni del lavaggio delle guarnizioni (tutte le pompe 1260)</p>

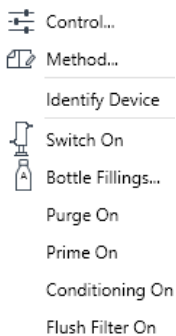


Figura 5 Menu contestuale (pompe 1290 Infinity)

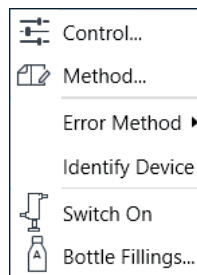


Figura 6 Menu contestuale (tutte le pompe 1260)

Lavaggio delle guarnizioni (G7104A, G7104C, G7120A, G7131A, G7131C e G7132A)

AVVERTENZA

Contaminazione del solvente di lavaggio delle guarnizioni

Danneggiamento di pistoni e guarnizioni

- ✓ Non riciclare il solvente di lavaggio delle guarnizioni.
- ✓ Sostituire settimanalmente il solvente di lavaggio delle guarnizioni.
- ✓ Consumo tipico di solvente: 0,5 L alla settimana.
- ✓ Si raccomanda vivamente l'uso del Kit di lavaggio guarnizioni per testa bottiglia (5067-6131).

La funzione di lavaggio delle guarnizioni pulisce con regolarità in modo automatico pistoni e guarnizioni da depositi.

Il sensore del lavaggio delle guarnizioni controlla costantemente le prestazioni del sistema di lavaggio delle guarnizioni e avvisa l'utilizzatore nel caso in cui rilevi un'anomalia.

Lavaggio delle guarnizioni:

- L'intervallo tra i lavaggi delle guarnizioni è impostato su 30 s ogni 7 min.
- Il flusso è impostato su 500 µL/min.
- L'integrità del sistema di lavaggio delle guarnizioni viene verificata a intervalli regolari.
- Il consumo tipico di solvente è di circa 0,5 L alla settimana.
- Utilizzare
 - isopropanolo al 10% in acqua.
 - isopropanolo al 100% per le applicazioni in fase normale.
- Collocare la bottiglia del solvente di lavaggio al di sopra dello strumento e la bottiglia di scarico sotto di esso.
- *NON* riempire nuovamente le bottiglie con solvente di lavaggio delle guarnizioni; usare sempre bottiglie fresche e pulite.

Raccomandazioni per le pompe

- **NON** riciclare le bottiglie di solvente di lavaggio delle guarnizioni.
- Il simbolo dell'avviso di manutenzione preventiva (EMF) diventa giallo quando il sensore di lavaggio delle guarnizioni delle pompe rileva un'irregolarità.
 - Sostituire il solvente di lavaggio delle guarnizioni e avviare la funzione di adescamento del lavaggio delle guarnizioni dal menu contestuale (vedere la [Figura 7](#), pagina 13).

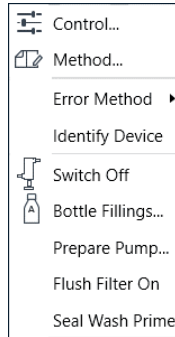


Figura 7 Menu contestuale

- Verificare l'assenza di pieghe, perdite oppure ostruzioni nei tubi e nel filtro di lavaggio delle guarnizioni.
- Verificare l'assenza di ostruzioni nei tubi di scarico; assicurarsi che il solvente sia scaricato liberamente:
 - Se il solvente refluo si accumula nel tubo, il sensore non funziona correttamente.

Raccomandazioni per i campionatori

- Prima dello spegnimento o di un lungo periodo di standby, effettuare sempre le seguenti operazioni.
 - Rimuovere il tampone con acqua di grado HPLC (vedere “Procedura di lavaggio”, pagina 19).
 - Effettuare un lavaggio del campionatore con acqua per almeno 15 minuti (sia lavaggio esterno dell'ago che backflush della sede per l'opzione multi-lavaggio).
 - Effettuare una verifica visiva e, se necessario, pulire manualmente i residui di sali.
 - Rimuovere le sostanze contaminanti con un solvente forte, ad esempio acetonitrile puro.
 - Utilizzare la funzione di lavaggio automatico per lavare il campionatore mentre si commuta la valvola di iniezione avanti e indietro.

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

- Utilizzare sempre solvente di lavaggio fresco per la funzione di backflush dell'ago o della sede.
- Collocare nel comparto solventi il contenitore del solvente di lavaggio per il lavaggio dell'ago o il backflush della sede.
 - Utilizzare un solvente appropriato in base alle proprietà del campione e della fase mobile.

NOTA

Il solvente di lavaggio dell'ago deve avere una composizione compatibile e presentare il massimo effetto solubilizzante (il diluente più forte a disposizione). La scelta dei solventi di lavaggio fa parte dello sviluppo del metodo. Per molte applicazioni, una buona scelta è rappresentata da una miscela di solvente organico al 50 – 100% in acqua distillata.

- Verificare che l'uscita della porta di lavaggio drena nel contenitore di scarico.
- Riempire i vial con una quantità di soluzione del campione sufficiente per tutte le iniezioni.
 - Utilizzare solo i vial raccomandati da Agilent.
 - Non riempire eccessivamente i vial: riempirli solo fino al 90%.
 - Utilizzare setti pre-tagliati quando si prelevano volumi elevati o si preleva più volte dallo stesso vial.
- Filtrare, lasciare decantare o centrifugare il campione per separarlo dai solidi insolubili.

NOTA

Il solvente del campione deve essere privo di particolato e preferibilmente sempre filtrato.

- Prestare attenzione affinché i solventi del campione corrispondano il più possibile alla fase mobile proposta.

Multi-lavaggio

L'opzione multi-lavaggio è progettata per ottenere un basso effetto memoria e può essere installata in qualsiasi multicampionatore Agilent.

Questa opzione riduce l'effetto memoria per campioni problematici consentendo:

- il lavaggio esterno dell'ago usando fino a tre solventi differenti
- il backflush della sede usando fino a tre solventi differenti

L'uso della funzione multi-lavaggio non è raccomandato con fasi mobili contenenti sali, in quanto i sali cristallizzerebbero sull'ago e sulla sede dell'ago. A causa del percorso di flusso della scatola idraulica dell'opzione multi-lavaggio, quando il dispositivo di dosaggio si porta nella posizione di partenza prima dell'iniezione, la fase mobile esce dalla punta dell'ago e potrebbe cadere nella sede. Si tratta di un comportamento atteso, indipendente dalle impostazioni di pulizia del percorso di iniezione, che non è indice della presenza di perdite.

Se l'opzione multi-lavaggio è installata su un sistema con fasi mobili contenenti sali, per evitare l'accumulo di sali sull'ago e sulla sede, si raccomanda di lavare il multicampionatore quotidianamente per 15 minuti con acqua e di ispezionare visivamente l'ago e la sede. Se necessario, utilizzare un panno che non lascia pelucchi con acqua distillata per pulire manualmente l'ago, la sede e altre parti che contengono ancora residui di sali.

Quando deve essere usata l'opzione multi-lavaggio?

- Se si intende utilizzare il sistema solo per applicazioni a fase inversa e nella fase mobile non sono presenti composti che danno luogo a precipitazione.
- Se si intende utilizzare il sistema per applicazioni con fasi mobili contenenti sali, l'opzione multi-lavaggio è sconsigliata. Se tuttavia l'opzione è installata, può verificarsi cristallizzazione sull'ago e sulla sede. È necessario attenersi alle seguenti pratiche:
 - effettuare quotidianamente un lavaggio con acqua per 15 minuti per rimuovere i residui salini;
 - effettuare il lavaggio esterno dell'ago e il backflush della sede;
 - verificare visivamente l'eventuale presenza di residui di sali su ago/sede/porta di lavaggio;
 - se necessario, pulire manualmente ago/sede/porta di lavaggio.

NOTA

La mancata esecuzione di queste procedure conduce all'ostruzione dell'ago e della sede.

- Se si intende utilizzare il sistema alternando applicazioni con fasi mobili contenenti sali e applicazioni a fase inversa, l'opzione multi-lavaggio non è supportata. Sussiste un elevato rischio che residui di sali vengano continuamente rilasciati e interferiscano con la cromatografia a fase inversa o addirittura provochino ostruzioni nel sistema.

Una quantità considerevole di solvente invecchia nelle linee dei percorsi di flusso per il multi-lavaggio, il che potrebbe causare un fondo elevato nelle analisi UV e MS altamente sensibili. Per ridurre questo rischio, si raccomanda di adescare i solventi in ogni linea del multi-lavaggio in uso alla porta di lavaggio e alla linea S1 (condizione cromatografica iniziale) verso la sede per almeno 5 minuti prima dell'inizio dell'analisi LC.

Raccomandazioni per pompe e campionatori con filtro in linea opzionale

In genere, il fattore che limita la durata delle colonne UHPLC è l'elevata contropressione. Il particolato presente nel campione si raccoglie sul frit di ingresso della colonna, causando un aumento della contropressione fino a raggiungere il limite di pressione della colonna. L'uso di un filtro in linea è raccomandato per impedire ostruzioni del frit della colonna, in particolare quando la preparazione del campione non permette il filtraggio o quando il campione potrebbe formare un precipitato.

I seguenti moduli possono essere dotati di un filtro in linea aggiuntivo:

- pompe quaternarie (G7104A, G7104C, G4204A, G7131A, G7131C):
 - Gruppo del filtro in linea, materiale: acciaio inossidabile (5067-5407)
 - Gruppo del filtro in linea, biocompatibile (5720-0003)
- autocampionatori Agilent 1290 Infinity e 1290 Infinity II (eccetto G5668A):
 - Kit del filtro in linea 1290 Infinity II (5067-6189)
 - Kit del filtro in linea 1290 Infinity II Bio (5720-0020)

Questi filtri in linea con dimensione nominale dei pori di 0,3 µm proteggono la colonna per UHPLC dall'ostruzione filtrando il particolato proveniente dai campioni o dal sistema UHPLC.

Vantaggi del filtro in linea:

- Volume interno molto basso
 - Volume di ritardo con capillare rigido 1,3 µL
 - Volume di ritardo con capillare flessibile 1,6 µL
- Indicato per lavorare a pressioni elevate (pressione operativa max. 1300 bar)

L'installazione del filtro in linea sulla pompa è raccomandata per proteggere il sistema a valle da ostruzioni nei seguenti casi:

- quando si utilizzano combinazioni di solventi che possono formare precipitati dopo la miscelazione;
- quando si eseguono applicazioni con tamponi o additivi utilizzando colonne con particelle di piccole dimensioni.

Suggerimenti di ordine generale per un uso efficace del filtro in linea:

- filtrare i solventi prima dell'uso;
- attenersi alle migliori pratiche di laboratorio;
- per le pompe G4204A, G7104A/C e G7131A/C, effettuare settimanalmente il backflush del filtro della pompa (avviare Lava filtro dal menu contestuale).

AVVERTENZA

Danneggiamento della valvola

- ✓ **Utilizzare la modalità di lavaggio del filtro solamente se il filtro in linea è installato, altrimenti l'impulso di pressione potrebbe danneggiare la valvola multifunzione.**

- Per filtri in linea installati sul campionatore, sostituire il frit del filtro (Setto poroso da 0,3 µm per filtro in linea, 5/confezione (5023-0271) o Frit 0,3 µm per filtro in linea, biocompatibile, 5/confezione (5320-0022)) ogni 1000 iniezioni o quando la contropressione sale del 15%.

NOTA

Per ulteriori riferimenti, consultare la *Nota tecnica G7167-90130*.

Raccomandazioni per le colonne

- Utilizzare le colonne solo nella direzione indicata.
- Utilizzare sempre raccordi adatti alla specifica colonna.
 - Colonne di fornitori differenti richiedono raccordi di dimensioni differenti.
 - L'uso di un raccordo non adeguato può causare dispersione dei picchi o danni irreversibili alla colonna.
 - Agilent raccomanda l'uso di raccordi InfinityLab per evitare problemi di incompatibilità dei raccordi quando si usano colonne di fornitori differenti.
- Attenersi sempre ai limiti operativi e delle applicazioni, riportati nella guida all'utilizzo della colonna.
- Prima dell'uso, equilibrare la colonna con volumi pari a 10 – 20 colonne
 - Si consiglia di effettuare un lavaggio intermedio con una fase mobile della composizione corretta e priva di additivi prima di equilibrare con il solvente finale con additivi.
- L'uso di una precolonna è raccomandato per proteggere la colonna e aumentarne la durata.

NOTA

Lo stoccaggio prolungato delle colonne deve sempre avvenire nel solvente di stoccaggio appropriato; per maggiori dettagli sulla colonna utilizzata, vedere il manuale per l'utente accluso alla confezione della colonna.

Raccomandazioni per i rivelatori

AVVERTENZA

Accensione e spegnimento frequenti della lampada

Riduzione della durata della lampada

- ✓ Evitare di accendere/spegnere la lampada se non è necessario.

NOTA

Prima che una lampada possa essere riaccesa dopo averla spenta è necessario attendere un determinato periodo di sicurezza.

- Riscaldare la lampada per almeno 1 h.
- Mantenere stabile la temperatura ambientale per tutti i moduli, in particolare per il rivelatore.
 - Non esporre il rivelatore alla luce solare diretta.
 - Non esporre il rivelatore a una corrente d'aria troppo elevata proveniente dal HVAC.
- Installare una valvola limitatrice della pressione (codice G4212-68001 se si utilizzano rivelatori DAD G4212A/B e G7117A/B/C oppure codice 0100-3150 se si utilizzano rivelatori FLD) quando si collega un secondo rivelatore dopo la cella a cartuccia Max-Light.
- Utilizzare le linee di scarico raccomandate per ogni tipo di rivelatore. Evitare di pizzicare il tubo di scarico dopo l'uscita dalla cella.
- Assicurarsi che la cella di flusso del rivelatore sia priva di bolle effettuando un lavaggio con isopropanolo o un altro solvente organico fino a ottenere una linea di base stabile.
- Solo per i rivelatori a indice di rifrazione (RI): lavare il lato per il riferimento e quello per il campione con solvente fresco usato per l'applicazione in corso.
- Lavare la cella di flusso dopo l'uso.
 - Utilizzare acqua di grado HPLC per rimuovere i sali.
 - Utilizzare isopropanolo per rimuovere i solventi organici.
- Prima di rimuovere una cella di flusso per il suo stoccaggio, riempirla con isopropanolo per impedire la proliferazione di alghe.

Raccomandazioni per sistemi biocompatibili e bio-inerti

- Assicurarsi che tutti i prodotti di consumo (raccordi, capillari, filtri in linea, colonne, ecc.) siano bio-inerti/biocompatibili.
 - Tenere conto del fatto che alcune colonne per applicazioni in ambito biologico sono dotate di custodie in acciaio inossidabile che potrebbero introdurre ferro e altri ioni metallici nel percorso del flusso. Ciò potrebbe provocare l'adsorbimento di campioni suscettibili come i nucleotidi fosforilati. In questo caso, utilizzare colonne con rivestimento in PEEK.
- Se si è utilizzato il sistema con sostanze ad alta concentrazione salina, lavarlo abbondantemente con acqua per prevenire ostruzioni causate dai cristalli di sale.
- Non è possibile garantire che le pompe 1290 funzionino in modo affidabile durante l'analisi se la pressione scende al di sotto di 20 bar. Per ottenere risultati ottimali, la pressione deve essere di almeno 50 bar in modo continuo. Pertanto, quando si utilizzano colonne che creano una bassa contropressione (<50 bar, come le colonne SEC con i sistemi LC 1290), installare un capillare di restrizione MP35N da 0,12 mm x 2 m (5005-0046) tra la pompa e il campionatore per ottenere almeno 50 bar.
- Se è installata la funzione multi-lavaggio, effettuare quotidianamente il lavaggio del multicampionatore con acqua (vedere "Multi-lavaggio", pagina 15).
- Per tutte le pompe quaternarie, seguire le indicazioni per mantenere l'MCGV priva di cristalli di sali; vedere "Consigli per MCGV", pagina 9

AVVERTENZA

I sistemi LC Agilent Bio-Inert e Bio non devono essere sottoposti a passivazione o procedure simili.

Ciò potrebbe provocare danni irreversibili alle superfici interne del sistema.

- ✓ **Non eseguire passivazione o procedure simili su sistemi bio-inerti e biocompatibili.**

Procedura di lavaggio

- ✓ Questa procedura deve essere impiegata quando si utilizzano fasi mobili contenenti sali. Deve essere effettuata con regolarità, almeno una volta alla settimana o prima di un lungo periodo di standby o spegnimento, per rimuovere i depositi di sali dal percorso del flusso e dalle superfici a contatto con i solventi. Per informazioni su come preparare il sistema per lo spegnimento, vedere "Spegnimento del sistema", pagina 7.
- ✓ Questa procedura è obbligatoria per passare da applicazioni con fasi mobili contenenti sali ad applicazioni a fase inversa (o a qualsiasi applicazione con alto contenuto di sostanze organiche), in cui può avere luogo la precipitazione di sali.
- Effettuare il lavaggio della colonna con il solvente raccomandato per la conservazione, assicurandosi che tale solvente sia compatibile con la fase mobile attualmente in uso e che non possa dare luogo a precipitazione.
- Sostituire la colonna con un raccordo e sostituire la bottiglia di solvente contenente i sali con una nuova bottiglia di acqua di grado HPLC a temperatura ambiente.
- Pulire il gruppo della testa della bottiglia utilizzando salviette che non lasciano pelucchi per ridurre al minimo l'effetto memoria della restante soluzione salina nella nuova bottiglia di acqua.
- Autocampionatore: eseguire almeno 15 min di spurgo con acqua per rimuovere i residui di sali da tutte le linee, eseguire sia il lavaggio dell'ago che il backflush della sede per l'opzione multi-lavaggio, verificare visivamente l'eventuale presenza di residui di sali su ago/sede/porta di lavaggio e, se necessario, pulire manualmente ago/sede/porta di lavaggio.

Raccomandazioni per sistemi biocompatibili e bio-inerti

- Spurgare separatamente ciascun canale della pompa che abbia pompato tampone per almeno 10 min a 5 mL/min.
- Lavare l'intero percorso del flusso del sistema con acqua per almeno 10 min a 2 mL/min. Durante questa fase, commutare la posizione della valvola di iniezione e della valvola di selezione della colonna (se installata) a intervalli di 1 min, ripetendo fino a quando ogni posizione è stata selezionata almeno 5 volte.
- Sostituire l'acqua con bottiglie di solvente fresco per ridurre al minimo l'effetto memoria dovuto ai sali.

Informazioni aggiuntive sulle pompe 1290 Infinity e 1290 Infinity II

Preparazione della pompa

Le pompe 1290 Infinity e 1290 Infinity II sono dotate di valvole di spurgo automatiche. Ciò permette l'utilizzo di svariate funzioni aggiuntive non disponibili sulle pompe Agilent con valvole di spurgo manuali. È possibile preparare la pompa (impostare i parametri e avviare le funzioni **Purge**, **Condition** o **Prime**) attraverso il software.

Spurgo

Utilizzare la funzione Spurgo per:

- Riempire il sistema con un solvente fresco o diverso.
 - Assicurarsi che il nuovo solvente sia miscibile con quello precedente.
 - Prevenire danni al sistema di degasaggio o alla pompa utilizzando un passaggio intermedio con un solvente miscibile, se necessario.
- Rimuovere le bolle d'aria presenti nei tubi e nelle teste della pompa.
 - Se la pompa è rimasta inattiva per poche ore o più (può essersi diffusa aria nelle linee dei solventi).

Non appena la procedura di spurgo è terminata, il modulo ritorna automaticamente alle condizioni analitiche.

Condizionamento

Se nella testa della pompa persistono micro bolle d'aria, le prestazioni complessive della pompa potrebbero essere compromesse e l'accuratezza/precisione del flusso potrebbe essere influenzata negativamente. Ciò può manifestarsi con un aumento della pressione e/o un'ondulazione della linea di base del rivelatore. Un indicatore affidabile di tale condizione è un valore del segnale di calibrazione negativo ma lentamente crescente (inferiore a -1). Per rimuovere efficacemente l'aria, si può utilizzare la funzione Condizionamento. Durante il condizionamento, la pompa eroga flusso nel sistema (colonna) e vengono utilizzate le impostazioni, come flusso, composizione e pressione massima, dell'ultimo metodo impiegato. Non è possibile effettuare l'analisi del campione durante il condizionamento.

Utilizzare un flusso (ad esempio 1,5 mL/min), una composizione (ad esempio A: 50% B: 50%) e una contropressione (>200 bar) ragionevoli per garantire una rimozione efficiente delle bolle d'aria da tutte le teste della pompa.

Condizionare la pompa se si osserva:

- Un'ondulazione eccessiva della pressione.
- Un'ondulazione eccessiva della composizione (rumore della linea di base/rumore di miscelazione - il livello di rumore cambia con la composizione) quando si è certi che il tipo di solvente è impostato correttamente e non vi è evidenza di perdite nella pompa.

Il condizionamento può essere necessario:

- Dopo un lungo periodo di standby
- Quando finisce il solvente
- Dopo una manutenzione o una riparazione

AVVERTENZA

**Riempimento di linee del solvente vuote
Danneggiamento delle guarnizioni**

- ✓ Utilizzare una siringa o la funzione Purge per riempire le linee del solvente vuote.
- ✓ Non utilizzare la procedura di Prime per riempire le linee del solvente vuote.

Adescamento

La funzione Adescamento è utile se dell'aria si è infiltrata nelle teste della pompa e non è stato possibile rimuoverla con un condizionamento di 15 minuti. Il modulo aspira il solvente, ad alta velocità e simultaneamente con tutte le pompe, e lo eroga alla posizione di scarico della valvola di spurgo automatica. Questa operazione viene effettuata 20 volte e sottopone a sollecitazioni la valvola e la guarnizione del rotore. Di conseguenza dovrebbe essere effettuata solamente come ultima risorsa prima di riempire forzatamente le teste della pompa con una siringa o di tentare di riparare le teste della pompa.

Utilizzare la funzione Adescamento per:

- liberare una valvola potenzialmente bloccata.

Le funzioni descritte possono essere attivate dall'interfaccia del driver:

- 1290 Infinity e 1290 Infinity II

NOTA

Per impostare i parametri, vedere la [Figura 3](#), pagina 11.

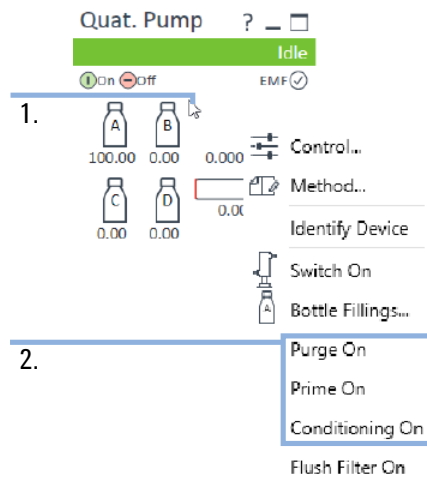


Figura 8 Preparazione della pompa (1290 Infinity).

1. Fare clic con il pulsante destro del mouse sulla dashboard del modulo
2. Selezionare la funzione appropriata per avviare la procedura

Informazioni aggiuntive sulle pompe 1290 Infinity e 1290 Infinity II

Il menu contestuale ottimizzato dall'utente Prepara pompa sostituisce il menu classico:

- Pompe 1290 Infinity II

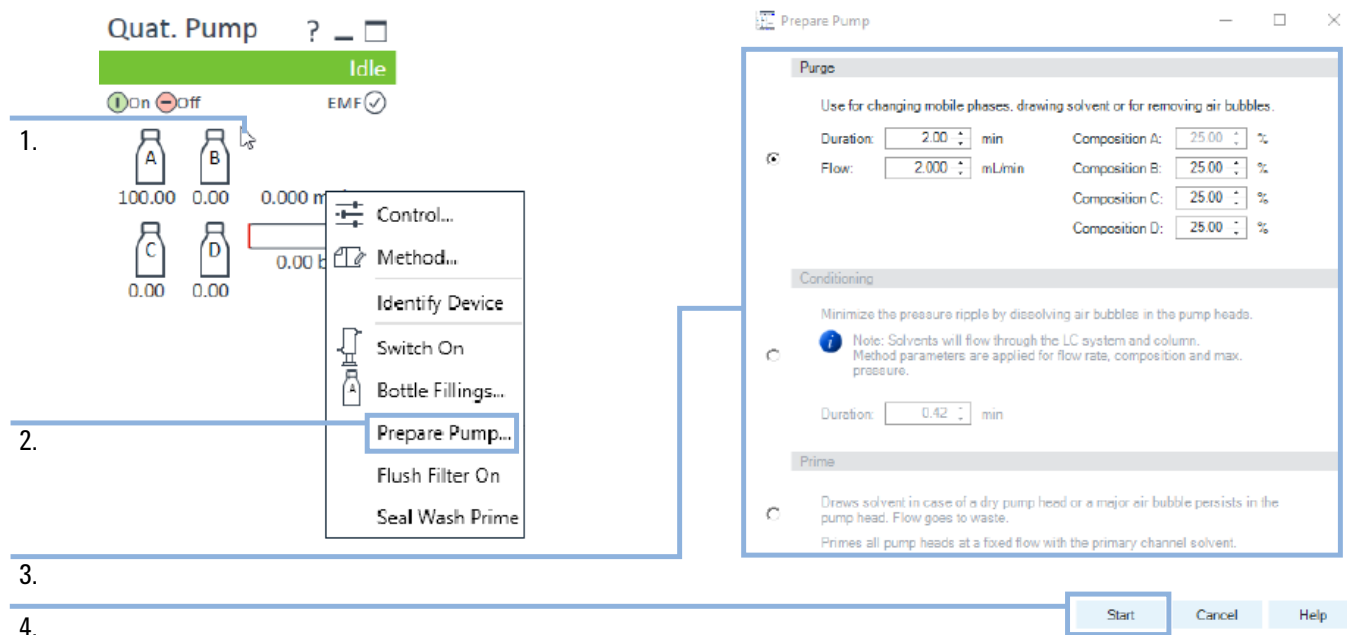


Figura 9 Preparazione della pompa (pompe 1290 Infinity II)

1. Fare clic con il pulsante destro del mouse sulla dashboard del modulo
2. Selezionare **Prepare Pump...**
3. Selezionare la procedura e inserire i parametri adeguati
4. Fare clic su **Start** per eseguire la procedura selezionata

Applicazione HPLC Advisor Agilent InfinityLab

L'applicazione HPLC Advisor Agilent InfinityLab offre un pacchetto di strumenti utili per il lavoro quotidiano con l'HPLC, indipendentemente dalla presenza o meno di un operatore in prossimità dello strumento. Questo pacchetto funziona con tutti gli strumenti per HPLC, di qualsiasi marca o modello.

È possibile scaricarlo dal telefono cellulare in uno dei modi indicati di seguito:

- Cercando direttamente "HPLC Advisor" nel Google Play Store o nell'Apple Store
- Aprendo i link di seguito
 - *Google Play*: <https://play.google.com/store/apps/details?id=com.agilent.hplcadvisor>
 - *Apple App Store*: <https://apps.apple.com/app/hplc-advisor/id1566882318>
- Scansionando il seguente codice QR (funziona sia per Android sia per iOS)



Glossario-IU

C

Condition

Condizionamento

E

Evacuation Mode

Modalità evacuazione

P

Prepare Pump...

Prepara pompa...

Prime

Adescamento

Purge

Spurgo

S

Start

Avvia