

Boas práticas para usar um sistema de LC Agilent

Nota técnica

Esta nota técnica descreve as boas práticas para usar um sistema de LC Agilent.

Tarefas Comuns 2

Tarefas Diárias/Semanais 5

Inicializar/Desligar o Sistema 6

Recomendações para Desgaseificadores 8

Recomendações para Bombas 9

Recomendações para Amostradores 14

Recomendações para Bombas e Amostradores com Filtro em Linha Opcional 16

Recomendações para Colunas 17

Recomendações para Detectores 18

Recomendações para Sistemas Biocompatíveis e Bio-Inert 19

Informações adicionais para as bombas 1290 Infinity e 1290 Infinity II 20

Tarefas Comuns

Como lidar com solventes

- Use somente frascos de vidro de borossilicato limpos.
 - Enxague o frasco com o solvente desejado antes de voltar a enchê-lo.
 - Os frascos podem ficar contaminados com detergentes da lavadora de louça.
- Utilize filtros de entrada de solvente para proteger o sistema da entrada de partículas.
- Substitua diariamente os solventes de base aquosa.
 - O aparecimento de algas e bactérias pode bloquear o degaseificador ou os filtros.
 - A precipitação de sais insolúveis pode bloquear os filtros ou capilares.
- Prepare o volume de solvente que será utilizado em 1–2 dias.
- Use somente solventes e água de grau HPLC.
 - Todos os solventes orgânicos, misturas e buffers aquosos preparados devem ser filtrados em um filtro de 0,2 µm.
 - Os resíduos ou as contaminações podem bloquear os filtros ou capilares.
- Marque corretamente os frascos com o seu conteúdo, data de enchimento e data de vencimento.
- Reduza o risco de aparecimento de algas: use frascos castanhos para solventes aquosos, evite a exposição à luz solar ou embrulhe os frascos em papel alumínio.

Medidas extras com Acetonitrila (ACN)

- É possível filtrar a acetonitrila e outros solventes orgânicos usando uma membrana de filtro de PTFE de 0,2 µm (por ex., 5191–4339).

NOTA

A filtragem por meio de filtros de nylon não é recomendada para LCMS de alta sensibilidade.

- Use frascos âmbar e encha-os com o volume de acetonitrila que será usado em 1–2 dias para evitar reações fotoquímicas e oxidação.

Como preparar amostras

CUIDADO

Possível precipitação de amostra

- ✓ **Certifique-se de que a amostra seja completamente solúvel no diluente da amostra e na fase móvel.**
 - ✓ **Aproxime o máximo possível a correspondência entre o diluente da amostra e a fase móvel inicial para evitar precipitação, picos de pressão e picos de solvente no cromatograma.**
-
- A filtragem através de filtros de 0,2 μm é o método preferido para remover a fração insolúvel das amostras e evitar obstruções no sistema. Se não for possível, centrifugue as amostras vigorosamente e tenha cuidado para não contaminar o sobrenadante com precipitados ao decantá-lo ou aspirá-lo.
 - Certifique-se de que o diluente da amostra também não contenha partículas.
 - Amostras não filtradas causam a obstrução e a contaminação do caminho de fluxo, o que pode resultar em um aumento contínuo da contrapressão do sistema e anomalias de pressão, como ondulações ou quedas repentinas. Mudanças na pressão podem afetar a reprodutibilidade dos resultados cromatográficos.
 - Por exemplo, as amostras de proteína não filtradas podem causar a formação de filme de proteína, que pode ao longo do tempo, obstruir o caminho do fluxo e reduzir significativamente a vida útil das colunas cromatográficas.

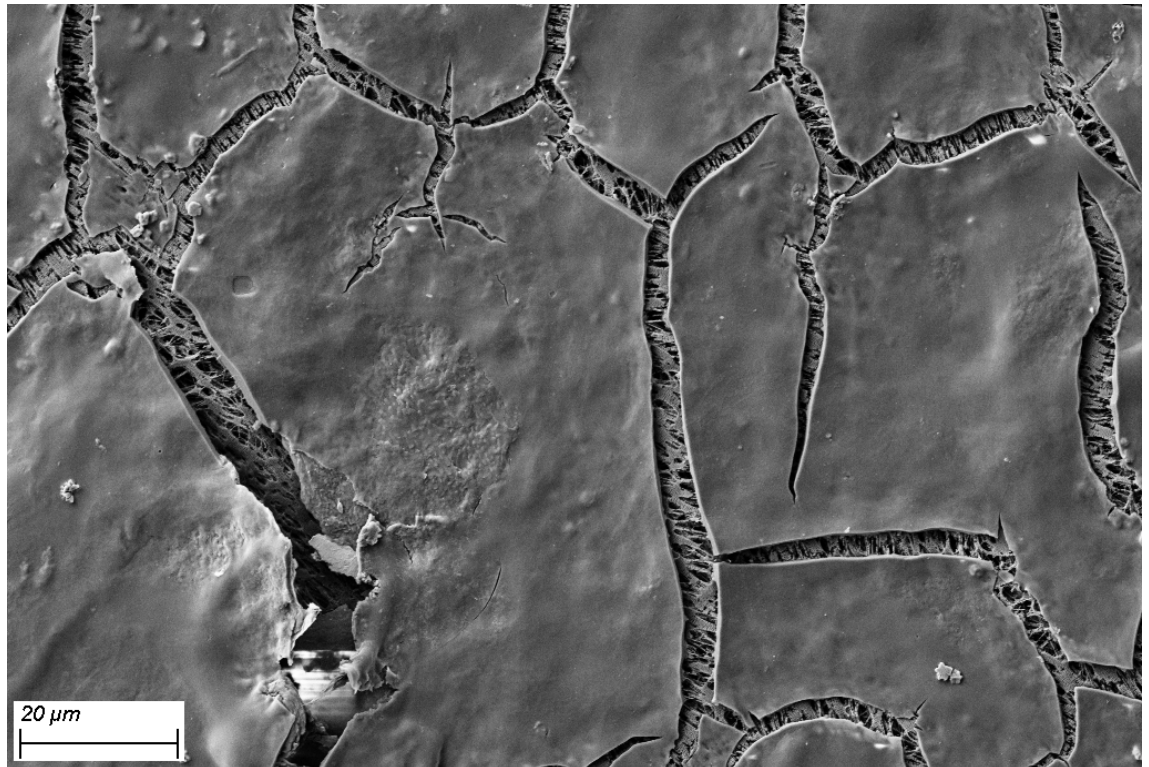


Figura 1 Filme de proteína formado na superfície do suporte de PTFE na parte superior do filtro em linha (confirmado por SEM EDX)

- O uso de filtros em linha é recomendado para evitar que material particulado entre no caminho do fluxo e danifique as válvulas, colunas e o detector, consulte "[Recomendações para Bombas e Amostradores com Filtro em Linha Opcional](#)" na página 16.

Como limpar o sistema

- Se houver suspeita de contaminação bacteriana do sistema, o procedimento de limpeza do sistema a seguir pode ser usado.
 - Aplique as seguintes soluções sequencialmente a uma taxa de fluxo moderada (0,5 – 1 mL/min) por pelo menos 30 min cada:
 - a Água
 - b 0,1 M NaOH
 - c Água
 - d 0,13 M HCl
 - e Água
- Ao trabalhar com sistemas de tampão biocompatíveis (por exemplo, fosfato, acetato), cuidados especiais devem ser tomados para evitar a formação de biofilme.
 - O procedimento de limpeza do sistema (descrito anteriormente) deve ser realizado, uma vez observada uma diminuição da reprodutibilidade da cromatografia em todos os canais de solvente que são usados para os tampões biocompatíveis.
- Ao executar qualquer procedimento de limpeza para limpar o sistema de LC, verifique se a coluna e o detector estão excluídos do caminho do fluxo.
- As colunas cromatográficas usadas para separações da biomolécula como a cromatografia por exclusão de tamanho ou a cromatografia de troca iônica, devem ser armazenadas na presença da azida sódica 0,02 %. Para obter mais guias do usuário da Coluna Bio LC, consulte <https://www.agilent.com/en/support/liquid-chromatography/kb005960>.

Tarefas Diárias/Semanais

Tarefas Diárias

- Substitua solventes e frascos de solvente para as fases móveis a base de água/tampão.
- Substitua os solventes e os frascos de solvente da fase móvel orgânica o mais tardar a cada dois dias.
- Verifique a presença de solvente de lavagem do selo.
- Purgue cada canal com solvente novo a 2,5 – 3 mL/min durante 5 min antes da operação.
- Equilibre o sistema com a composição e a taxa de fluxo do método subsequente.

Tarefas Semanais

- Altere o solvente de lavagem do selo (10 % de isopropanol em água) e o frasco.
- Se aplicações com sais tiverem sido usadas, lave todos os canais com água (para obter detalhes, consulte “Procedimento de Lavagem” na página 19) e remova possíveis depósitos de sal manualmente.
- Inspeccione os filtros de solvente quanto a sujeira ou bloqueios. Troque se nenhum fluxo estiver saindo da linha de solvente depois de remover da entrada do desgaseificador.

CUIDADO

Contaminação do solvente de lavagem do selo

Danos aos pistões e selos

- ✓ Não recicle o solvente de lavagem do selo.
- ✓ Substitua o solvente de lavagem do selo semanalmente.
- ✓ Consumo normal do solvente: 0,5 L por semana.
- ✓ O uso de Kit de cabeça do frasco de lavagem do selo (5067-6131) é altamente recomendado.

Inicializar/Desligar o Sistema

Inicializar o Sistema

- Certifique-se de que todos os módulos estejam em um ambiente com temperatura estável e protegidos da luz solar direta.
- Ligue todos os módulos e comece a prepará-los, tal como descrito a seguir:

Preparar a bomba

- Use uma fase móvel nova ou diferente (conforme necessário).
- Purgue cada canal com 2,5 – 3 mL/min durante 5 min. Abra a válvula de purga manual ou use o comando de purga, dependendo do tipo de bomba.

Preparar o Amostrador

- Evite usar a lavagem da agulha e o backflush do assento com solventes orgânicos em aplicações de buffer, pois isto pode resultar em precipitação de sal no assento da agulha.
- Ao usar lavagem e/ou backflush do assento da agulha:
 - Use sempre solventes novos.
 - Metanol, acetonitrila, isopropanol, água e as suas misturas são boas opções.
 - Não use soluções de lavagem que não sejam miscíveis ou precipitadas.
- Ao usar um resfriador de amostras/termostato da amostra:
 - Ligue o resfriador/termostato e aguarde até que a temperatura-alvo seja alcançada e se estabilize.
Isso pode ser realizado enquanto a lâmpada do detector está aquecendo (consulte “Preparar o Detector” na página 6).
- Certifique-se de que os vials contêm solução de amostra suficiente para todas as injeções.

Preparar o Detector

- Aqueça a lâmpada por pelo menos 1 h para garantir a estabilidade da linha de base.
- Apenas para detectores de índice refrativo (RI): ligue o aquecedor e limpe os lados da amostra e de referência com um novo solvente próprio para a aplicação atual.

Equilibrar o Sistema

- Enquanto a lâmpada do detector estiver aquecendo, equilibre o seu sistema (incluindo a coluna e o detector) usando a composição da aplicação durante pelo menos 15 min, até que os sinais da linha de base da pressão e do detector estejam estáveis.

Desligar o Sistema

- Lave a coluna com os solventes adequados e armazene-a de acordo com o manual de instruções da coluna (certifique-se de que o solvente de lavagem seja compatível com o solvente presente no sistema para evitar precipitação).
- As colunas cromatográficas usadas para separações da biomolécula como a cromatografia por exclusão de tamanho ou a cromatografia de troca iônica, devem ser armazenadas na presença da azida sódica 0,02 %. Para obter mais guias do usuário da Coluna Bio LC, consulte <https://www.agilent.com/en/support/liquid-chromatography/kb005960>.
- Instale um capilar de união ou de restrição e lave o sistema extensivamente com água, especialmente após usar buffers. Para obter detalhes, consulte "Procedimento de Lavagem" na página 19.
- Lave e armazene o sistema em 50 % de metanol ou 50 % de isopropanol em água, sem aditivos.
- Remova todas as amostras do amostrador automático e armazene-as de acordo com as boas práticas de laboratório.
- Desligue todos os módulos.

Recomendações para Desgaseificadores

CUIDADO

Líquido dentro do desgaseificador

Caso um solvente com ponto de ebulição baixo condense ou se houver um vazamento, é possível que ocorra o acúmulo de líquido dentro das câmaras do desgaseificador e isto comprometerá o seu desempenho.

Se isso ocorrer,

- ✓ Purgue todos os canais de solventes com isopropanol.
- ✓ Mantenha os canais não usados cheios com isopropanol.

- Verifique a compatibilidade de solventes com o desgaseificador e a aplicação
 - Use os desgaseificadores autônomos ou padrão (G1322A ou G7122A) para aplicações de RI, vazões maiores que 5 mL/min para solventes com ponto de ebulição baixo (<60 °C) e com hexano, tetra-hidrofurano e quaisquer solventes halogenados.
 - Para todas as outras aplicações, use um desgaseificador integrado ou autônomo de alto desempenho (G4225A).
- Se não for possível alcançar ou manter um vácuo suficiente para o desempenho ideal de degaseificação (tal como indicado pelo LED de status amarelo ou vermelho em desgaseificadores autônomos, ou por mensagens de erro específicas em desgaseificadores integrados), desligue e ligue o módulo.
- Se, após ligar e desligar o módulo, o vácuo ainda não puder ser alcançado ou mantido em desgaseificadores integrados, use o **Modo de Evacuação**, disponível na tela de controle de instrumentos do Agilent Lab Advisor.



Figura 2 Controle de desgaseificador para desgaseificadores internos no Agilent Lab Advisor

NOTA

Siga as instruções na tela quando iniciar o **Modo de Evacuação**.

Recomendações para Bombas

- Verifique o desempenho da bomba regularmente monitorando o sinal de pressão.
- Realize a manutenção preventiva dentro do intervalo de uso recomendado.
- Prepare a bomba tal como descrito na seção de inicialização, para garantir o melhor desempenho e o melhor tempo de vida útil.
- Ao trocar solventes, certifique-se de que o novo solvente seja miscível com o anterior (se necessário, use um solvente miscível adicional como intermediário).
- Use a função de lavagem do selo conforme recomendado para garantir o melhor desempenho e o melhor tempo de vida útil; consulte “Lavagem do selo (uso obrigatório quando instalada)” na página 10.

Recomendações para MCGV

Selecione os canais para a Válvula de gradiente multicanal (MCGV)

- Utilize os canais inferiores (A e/ou D) para soluções com tampão/buffer.
- Para remover possíveis depósitos de sal, lave regularmente todos os canais MCGV com água a 5 mL/min por pelo menos 10 min por canal.
- Verifique a compatibilidade dos tampões e solventes orgânicos para evitar precipitação na câmara de mistura da MCGV.

NOTA

Ao misturar solventes incompatíveis, os sais podem precipitar-se ao ponto de a mistura bloquear o caminho de fluxo a jusante e danificar as peças.

Lavagem do selo (uso obrigatório quando instalada)

Lavagem do selo (G4204A, G4220A, todas as bombas 1260)

CUIDADO

Contaminação do solvente de lavagem do selo

Danos aos pistões e selos

- ✓ Não recicle o solvente de lavagem do selo.
- ✓ Substitua o solvente de lavagem do selo semanalmente.
- ✓ Consumo normal do solvente: 0,5 L por semana.
- ✓ O uso de Kit de cabeça do frasco de lavagem do selo (5067-6131) é altamente recomendado.

O uso da função de lavagem do selo é obrigatório quando instalada e ao usar buffers e outros solventes não voláteis ou aditivos que poderiam depositar-se nos pistões e selos. A função de lavagem do selo limpa regularmente essas peças de forma automática.

Benefícios da operação de lavagem do selo:

- Remoção de partículas, cristais de sal e outros resíduos não voláteis dos pistões e selos, que têm potencial para danificar o pistão e os respectivos selos
- Lubrificação da interface selo/pistão
- Resfriamento dos pistões

Caixa de Diálogo de Lavagem do selo no CDS

A caixa de diálogo pode ser encontrada na tela de controle, sendo recomendado usar as configurações exibidas na [Figura 3](#) na página 11.

Esteja ciente de que:

- As configurações da lavagem do selo NÃO são parâmetros do método (como configurações de Controle do instrumento, elas são aplicadas a todos os métodos executados em um instrumento específico).
- A lavagem do selo tem de ser ativada de novo manualmente após:
 - A eliminação de um ERRO.
 - Ao ligar.

Operação de Lavagem do Selo:

- Operação PERIÓDICA, por exemplo, 0,5 min a cada 7 min.
 - Essa configuração pode ser alterada na tela de Controle; consulte a [Figura 3](#) na página 11. As configurações estão disponíveis por meio do menu de contexto; consulte a [Figura 5](#) na página 11.
 - O fluxo de solvente típico é 0,7 mL/min, o que corresponde a um consumo aproximado de 3 mL/h ou 0,5 L/semana em operação constante.
- Utilizar
 - 10 % de isopropanol em água.
 - 100 % de isopropanol para aplicações de fase normal.

Recomendações para Bombas

- Posicione o frasco de solvente de lavagem acima e a garrafa de descarte abaixo do instrumento.
- Não encha novamente o frasco do solvente de lavagem do selo, use sempre frascos novos e devidamente limpos.
- Para as bombas que não têm o sensor de lavagem do selo equipado, teste a bomba peristáltica.
 - Toque na bomba peristáltica com o dedo para verificar se a bomba está funcionando, ou confirme o fluxo de solvente de lavagem do selo observando se o solvente de lavagem do selo está saindo da tubulação.

Tabela 1 Caixa de diálogo de lavagem do selo e operação

G4204A, G4220A	Todas as bombas 1260

Figura 3 Configurações de lavagem do selo (bombas 1290 Infinity)

Figura 4 Configurações de lavagem do selo (todas as bombas 1260)

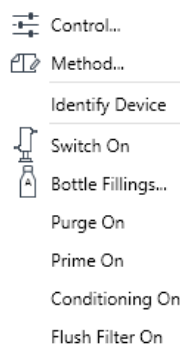


Figura 5 Menu de contexto (bombas 1290 Infinity)

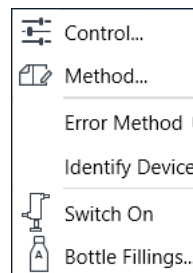


Figura 6 Menu de contexto (todas as bombas 1260)

Lavagem do selo (G7104A, G7104C, G7120A, G7131A, G7131C e G7132A)

CUIDADO

Contaminação do solvente de lavagem do selo

Danos aos pistões e selos

- ✓ Não recicle o solvente de lavagem do selo.
- ✓ Substitua o solvente de lavagem do selo semanalmente.
- ✓ Consumo normal do solvente: 0,5 L por semana.
- ✓ O uso de Kit de cabeça do frasco de lavagem do selo (5067-6131) é altamente recomendado.

A função de lavagem do selo limpa regular e automaticamente os depósitos dos pistões e selos.

O sensor de lavagem do selo verificará constantemente o desempenho do sistema de lavagem do selo e avisará o usuário caso uma anomalia tenha sido detectada.

Operação de Lavagem do Selo:

- O intervalo de lavagem do selo está definido para 30 s a cada 7 min.
- O fluxo está definido para 500 µL/min.
- A integridade do sistema de lavagem do selo é verificada em intervalos regulares.
- O uso típico de solvente é de cerca de 0,5 L por semana.
- Utilizar
 - 10 % de isopropanol em água.
 - 100 % de isopropanol para aplicações de fase normal.
- Posicione o frasco de solvente de lavagem acima e a garrafa de descarte abaixo do instrumento.
- **NÃO** encha novamente com solvente de lavagem do selo, use sempre frascos novos e devidamente limpos.

Recomendações para Bombas

- **NÃO** recicle os frascos de solvente de lavagem do selo.
- O símbolo EMF ficará amarelo quando o sensor de lavagem do selo da bomba detectar uma irregularidade.
 - Altere o solvente de lavagem do selo e acione a função Prime de Lavagem do Selo no menu de contexto (consulte a [Figura 7](#) na página 13).

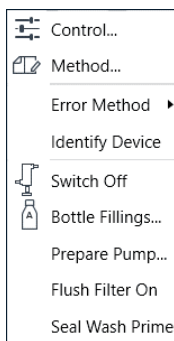


Figura 7 Menu de contexto

- Verifique a tubulação de lavagem do selo e o filtro quanto a torções, vazamentos ou bloqueios.
- Verifique a existência de bloqueios nas tubulações de descarte, certificando-se de que os resíduos de solvente são drenados livremente:
 - Se houver acúmulo de descarte de solvente no tubo, o sensor não funcionará corretamente.

Recomendações para Amostradores

- Antes do desligamento ou de um longo período de espera, sempre
 - Remova o buffer com água para HPLC (consulte “Procedimento de Lavagem” na página 19).
 - Lave o amostrador com água por pelo menos 15 minutos (tanto lavagem externa quanto backflush do assento da agulha para a opção de Multilavagem).
 - Realize uma verificação visual e, se necessário, limpe os resíduos de sal manualmente.
 - Remova substâncias contaminantes com um solvente forte, por exemplo, acetonitrila pura.
 - Use a função de limpeza automática para limpar o amostrador alternando a válvula de injeção repetidamente ao mesmo tempo.

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 Path

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

- Use sempre solvente de lavagem novo para a função de backflush da agulha ou do assento.
- Coloque o reservatório de solvente de lavagem para lavagem da agulha ou backflush do assento da agulha no gabinete de solventes.
 - Use um solvente adequado com base na amostra e nas propriedades de fase móvel.

NOTA

A composição do solvente de lavagem da agulha deve ser o solvente mais compatível em termos de solubilização (o diluente mais forte). A seleção de solventes de lavagem faz parte do desenvolvimento do método. Uma mistura de 50 – 100 % de solvente orgânico em água destilada é uma boa escolha para muitas aplicações.

- Verifique o trajeto de drenagem da saída da porta de lavagem para um recipiente de descarte.
- Encha cada vial com solução de amostra suficiente para todas as injeções.
 - Use somente frascos recomendados pela Agilent.
 - Não encha muito os vials, encha cada vial somente até 90 %.
 - Use septos já com fendas ao retirar grandes volumes ou várias vezes do mesmo vial.
- Filtre, decante ou centrifugue a amostra para separar de sólidos insolúveis.

NOTA

O solvente de amostra não deve conter partículas e, preferencialmente, deve ser sempre filtrado.

- Tome cuidado para que os solventes de amostra correspondam o máximo possível à fase móvel proposta.

Multilavagem

A opção de Multilavagem foi projetada para baixo carryover e pode ser instalada em qualquer Multisampler da Agilent.

Esta opção reduz o carryover para amostras críticas, permitindo:

- A lavagem da agulha externa com até três solventes diferentes
- O backflush do assento com até três solventes diferentes

O uso da opção de Multilavagem não é recomendado com fases móveis que contêm sal, pois o sal se cristalizará na agulha e no assento da agulha. Devido ao caminho de fluxo da caixa hidráulica da Multilavagem, quando o instrumento de medição se mover para a posição inicial antes da injeção, a fase móvel sairá da ponteira da agulha e poderá cair no assento. Este comportamento é esperado, independentemente das configurações de Limpeza do Caminho da Injeção e não indica um vazamento.

Se a Multilavagem estiver instalada no sistema com fases móveis contendo sal, para evitar o acúmulo de sal na agulha e no assento, recomenda-se lavar o Multisampler diariamente com água por 15 minutos e inspecionar visualmente a agulha e o assento. Se necessário, use um pano sem fiapos com água destilada para limpar manualmente a agulha, o assento e outras partes que ainda contenham resíduos de sal.

Quando a opção de Multilavagem deve ser usada?

- Se o sistema se destinar somente a aplicações de fase reversa e nenhum composto precipitante estiver presente na fase móvel.
- Se o sistema se destinar a aplicações com fases móveis que contêm sal, a opção de Multilavagem não é recomendada. Se, contudo, a opção estiver instalada, é possível que ocorra cristalização na agulha e no assento. As práticas a seguir devem ser seguidas:
 - Realize diariamente uma lavagem de 15 minutos com água para remover resíduos de sal.
 - Realize a lavagem externa da agulha e o backflush do assento.
 - Controle a ocorrência de resíduos de sal visualmente na agulha/assento/porta de lavagem.
 - Se necessário, limpe a agulha/assento/porta de lavagem manualmente.

NOTA

Se estes procedimentos não forem seguidos, ocorrerão bloqueios na agulha e no assento.

- Se o sistema se destinar a ser alternado entre fases móveis que contêm sal e aplicações de fase reversa, a opção de Multilavagem não é suportada. Existe um alto risco de que os resíduos de sal sejam continuamente liberados, podendo interferir com a cromatografia de fase reversa ou até causar o entupimento do sistema.

Uma quantidade considerável de solvente está envelhecendo nas linhas dos caminhos de fluxo de Multilavagem, o que poderia levar a um background elevado em medições de UV e MS altamente sensíveis. Para mitigar isso, é recomendado purgar solventes em cada linha de Multilavagem em uso na porta de lavagem e na linha S1 (condição cromatográfica inicial) para o assento por pelo menos 5 minutos antes do início da análise de LC real.

Recomendações para Bombas e Amostradores com Filtro em Linha Opcional

Geralmente, o fator limitante da vida útil para colunas UHPLC é a alta contrapressão. Material particulado da amostra é coletado no frit da entrada da coluna, o que provoca um aumento da contrapressão até atingir o limite de pressão do sistema. É recomendado o uso do filtro em linha para evitar obstruções no frit da coluna, especialmente quando a preparação da amostra não permitir a filtragem ou for possível a formação de precipitado na amostra.

Os módulos a seguir podem ser equipados com um filtro em linha adicional:

- Bombas quaternárias (G7104A, G7104C, G4204A, G7131A, G7131C):
 - Conjunto do filtro em linha, material: aço inoxidável (5067-5407)
 - Conjuntos de filtros em linha, Biocompatíveis (5720-0003)
- Amostradores automáticos Agilent 1290 Infinity e 1290 Infinity II (exceto G5668A):
 - Kit de filtro em linha do 1290 Infinity II (5067-6189)
 - Kit de filtro em linha do 1290 Infinity II Bio (5720-0020)

Estes filtros em linha com um tamanho de poro nominal de 0,3 µm protegem a coluna UHPLC contra entupimentos filtrando o material particulado das amostras ou do sistema UHPLC.

Vantagens do filtro em linha:

- Volume interno muito pequeno
 - Volume de atraso com capilar rígido de 1,3 µL
 - Volume de atraso com capilar flexível de 1,6 µL
- Especificado para trabalhar a pressões elevadas (pressão operacional máx. de 1300 bar)

É recomendado instalar o filtro em linha nas bombas para proteger o sistema a jusante de bloqueios nos seguintes casos:

- Quando as combinações de solvente usadas podem formar precipitados depois da mistura,
- Ao executar aplicações com buffers ou aditivos usando colunas com partículas de tamanhos pequenos

Dicas gerais para uso efetivo do filtro em linha:

- Filtrar os solventes antes de usar.
- Seguir as melhores práticas.
- Para as bombas G4204A, G7104A/C e G7131A/C, aplique o backflush no filtro da bomba semanalmente (iniciar o Purgar o Filtro a partir do menu de contexto).

CUIDADO

Danos à válvula

- ✓ **Use o modo de lavagem do filtro somente se o filtro em linha estiver instalado, caso contrário o pulso de pressão poderá danificar a válvula multiuso.**

- Para os filtros em linha instalados no amostrador, troque o frit de filtro (Frit 0,3 µm para filtro em linha, pct. c/5 (5023-0271) ou Frit 0.3 µm para filtro em linha, biocompatíveis, 5/pac. (5320-0022)) a cada 1000 injeções ou quando a pressão resultante aumentar em 15 %.

NOTA

Consulte a *Nota técnica G7167-90130* como referência adicional.

Recomendações para Colunas

- Use as colunas apenas na direção marcada.
- Use sempre conexões adequadas para a coluna específica.
 - Colunas de fornecedores diferentes requerem conexões de dimensões diferentes.
 - Usar uma conexão incorreta pode resultar em dispersão de pico ou até mesmo danos à coluna.
 - A Agilent recomenda o uso de conexões InfinityLab para superar as incompatibilidades de adaptação ao usar colunas de fornecedores diferentes.
- Sempre respeite os limites operacionais e de aplicação, conforme estabelecido no guia de usuário da coluna.
- Equilibre a coluna com 10 – 20 volumes de coluna antes de usar.
 - É aconselhável fazer uma limpeza intermediária com a fase móvel da composição correta sem aditivos antes de equilibrar de acordo com o solvente final com aditivos.
- É recomendado o uso de uma coluna de proteção para proteger sua coluna e aumentar sua vida útil.

NOTA

O armazenamento de longo prazo de colunas deve sempre ser com o solvente de armazenamento adequado. Para obter mais detalhes sobre a coluna em uso, consulte o Guia de Usuário incluído no pacote da coluna.

Recomendações para Detectores

CUIDADO

Ligar e desligar a lâmpada frequentemente

Vida útil da lâmpada reduzida

- ✓ Evite ligar/desligar a lâmpada desnecessariamente.

NOTA

Existe um período de segurança/tempo de espera até que uma lâmpada possa ser acesa novamente depois de ter sido desligada.

- Aqueça a lâmpada durante, pelo menos, 1 h.
- Mantenha o ambiente e a temperatura ambiente estáveis para todos os módulos, especialmente para o detector.
 - Não exponha o detector à luz solar direta.
 - Não exponha o detector a muita corrente de ar do HVAC.
- Instale uma válvula de alívio de pressão (n/p G4212-68001, ao usar detectores DAD G4212A/B e G7117A/B/C ou n/p 0100-3150, ao usar detectores FLD) ao conectar um segundo detector após a célula cartucho Max-Light.
- Use as linhas de descarte recomendadas para cada tipo de detector. Evite apertar o tubo de descarte depois da saída da célula.
- Certifique-se de que a célula de fluxo do detector não contenha bolhas lavando-a com isopropanol ou outro solvente orgânico até que uma linha de base estável seja alcançada.
- Apenas para detectores RI: limpe os lados de amostra e referência com novo solvente próprio para a aplicação atual.
- Limpe a célula de fluxo após usar.
 - Use água para HPLC para remover sais.
 - Use isopropanol para remover solventes orgânicos.
- Antes de remover uma célula de fluxo para armazenamento, encha-a com isopropanol para evitar o aparecimento de algas.

Recomendações para Sistemas Biocompatíveis e Bio-Inert

- Certifique-se de que todos os consumíveis (conexões, capilares, filtros em linha, colunas etc.) são bio-inert/biocompatíveis.
 - Esteja ciente de que algumas colunas para aplicações relacionadas com produtos biológicos possuem uma caixa de aço inoxidável e podem introduzir ferro e outros íons de metal no caminho de fluxo. Isso pode levar à adsorção de amostras suscetíveis, como nucleotídeos fosforilados. Neste caso, use colunas com revestimento PEEK.
- Após usar o sistema com altas concentrações de sal, lave-o extensivamente com água para evitar obstruções causados pelos cristais de sal.
- Não é possível garantir a operação confiável das bombas 1290 durante a análise se a pressão cair abaixo de 20 bar. Para obter os melhores resultados, a pressão deve estar constantemente a pelo menos 50 bar. Portanto, ao usar colunas que criam uma pressão resultante fraca (<50 bar, tal como colunas SEC com sistemas LC 1290), instale uma Restrição Capilar MP35N, 0.12 mm x 2 m (5005-0046) entre a bomba e o amostrador, para alcançar pelo menos 50 bar.
- Se a opção de Multilavagem estiver instalada, realize a lavagem diária do Multisampler com água (consulte “Multilavagem” na página 15).
- Para todas as bombas quaternárias, siga as recomendações para manter as MCGV livres de cristais de sal, consulte “Recomendações para MCGV” na página 9

CUIDADO

Os sistemas LC Bio-inert e Bio da Agilent não devem estar sujeitos à passivação ou outros procedimentos similares

Eles podem causar danos irreversíveis às superfícies internas do sistema

- ✓ **Não realize a passivação ou processos similares em sistemas bio-inert e biocompatíveis.**

Procedimento de Lavagem

- ✓ Este procedimento deve ser usado quando fases móveis que contêm sal são usadas. Ele deve ser realizado regularmente, pelo menos uma vez por semana, ou antes de um longo período de espera ou desligamento, para remover os depósitos de sal do caminho de fluxo e de superfícies em contato com os solventes. Como preparar o sistema para desligamento, consulte “Desligar o Sistema” na página 7.
- ✓ O procedimento é obrigatório para alternar de uma fase móvel que contém sal para aplicações de fase reversa (ou quaisquer aplicações sendo executadas com alto teor orgânico), onde a precipitação de sal pode ocorrer.
- Lave a coluna com o solvente de armazenamento recomendado, certificando-se de que ele seja compatível com a fase móvel atual e que não causará precipitação.
- Substitua a coluna por uma união, substitua o frasco de solvente que contém sal por um novo frasco de água para HPLC à temperatura ambiente.
- Limpe o conjunto da parte superior do frasco usando panos sem fiapos para minimizar o carryover da solução salina restante para o novo frasco de água.
- Amostrador automático: realize pelo menos 15 min de purga com água para remover todos os resíduos de sal de todas as linhas, tanto da lavagem da agulha quanto do backflush do assento para a opção de Multilavagem, controle a ocorrência de resíduos de sal visualmente na agulha/assento/porta de lavagem e, se necessário, limpe manualmente a agulha/assento/porta de lavagem.

- Purgue todos os canais que bombearam buffer separadamente por pelo menos 10 min a 5 mL/min.
- Lave todo o caminho de fluxo do sistema com água por pelo menos 10 min a 2 mL/min. Durante esta etapa, alterne a posição da válvula de injeção e da válvula de seleção da coluna (se instalada) a cada 1 min e repita este processo até que todas as posições tenham sido selecionadas pelo menos 5 vezes.
- Substitua a água por novos frascos de solvente para minimizar o carryover de sal.

Informações adicionais para as bombas 1290 Infinity e 1290 Infinity II

Preparar a Bomba

As bombas Agilent 1290 Infinity e 1290 Infinity II estão equipadas com válvulas de purga automática. Isso habilita várias funções adicionais que não estão disponíveis nas bombas Agilent com válvulas de purga manual. É possível preparar a bomba (definir parâmetros e iniciar as funções **Purga**, **Condição** ou **Prime**) com o software.

Purgar

Utilize a função Purgar para:

- Encher o sistema com um solvente novo ou diferente.
 - Certifique-se de que o novo solvente é miscível com o solvente anterior.
 - Evite danos ao desgaseificador ou à bomba usando uma etapa intermédia com um solvente comiscível, se necessário.
- Remover bolhas de ar nos tubos e cabeças de bomba.
 - Após a bomba ter estado inativada durante algumas horas ou mais (o ar pode se ter difundido pelas linhas de solvente).

Assim que o procedimento de purga terminar o módulo voltará automaticamente para condições analíticas.

Condição

Se microbolhas de ar persistirem na cabeça da bomba, o desempenho da bomba poderá ser comprometido e a exatidão/precisão de fluxo negativamente afetada. Isso pode ser visível como um aumento na pressão e/ou na variação da linha de base do detector. Um indicador confiável dessa situação é um valor do sinal de ajuste muito negativo, mas de crescimento lento (abaixo de -1). Para remover o ar de forma eficiente, pode ser usada a função Condicionar. Durante o condicionamento, a bomba fornece fluxo ao sistema (coluna) e são usadas as configurações de método usadas por último, como o fluxo, a composição e a pressão máxima. Não é possível realizar a análise da amostra durante o condicionamento.

Use uma taxa de fluxo (por exemplo, 1,5 mL/min), uma configuração de composição (por exemplo, A: 50 % B: 50 %) e pressão resultante (> 200 bar) razoáveis para garantir uma remoção eficaz das bolhas de todas as cabeças da bomba.

Condicione a bomba caso você verifique:

- Variação excessiva da pressão.
- Variação excessiva da composição (ruído da linha de base/ruído de mistura – alterações do nível de ruído com a composição), quando você estiver certo de que o tipo de solvente está definido corretamente e de que não há evidências de vazamento na bomba.

O condicionamento pode ser necessário:

- Após um longo período de espera
- Após ficar sem solvente
- Após manutenção ou uma reparação

CUIDADO

Encher linhas de solvente vazias

Danos aos selos

- ✓ Use uma seringa ou a função Purgar para encher linhas de solvente vazias.
- ✓ Não use o procedimento Prime para encher linhas de solvente vazias.

Prime

A função Prime é útil se tiver entrado ar nas cabeças da bomba e o ar não puder ser removido condicionando por 15 minutos. O módulo extrai o solvente a alta velocidade com todas as unidades de bomba simultaneamente e deixa-o na posição de descarte da válvula de purga automática. Isso é realizado 20 vezes e é desgastante para a válvula e para o selo do rotor. Portanto, isso deve ser realizado somente como último recurso antes de forçar o enchimento das cabeças da bomba com uma seringa ou tentar consertar as cabeças da bomba.

Use a função Prime para:

- Liberar uma válvula potencialmente bloqueada.

As funções descritas podem ser acionadas a partir da interface de driver:

- 1290 Infinity e 1290 Infinity II

NOTA

Para as configurações de parâmetros, consulte a [Figura 3](#) na página 11.

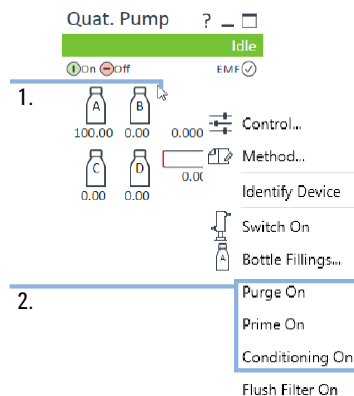


Figura 8 Preparar a bomba (1290 Infinity).

1. Clique com o botão direito no painel do módulo
2. Selecione a função apropriada para iniciar o procedimento

Informações adicionais para as bombas 1290 Infinity e 1290 Infinity II

O menu de contexto Preparar Bomba, otimizado pelo usuário, substitui o menu clássico:

- Bombas 1290 Infinity II

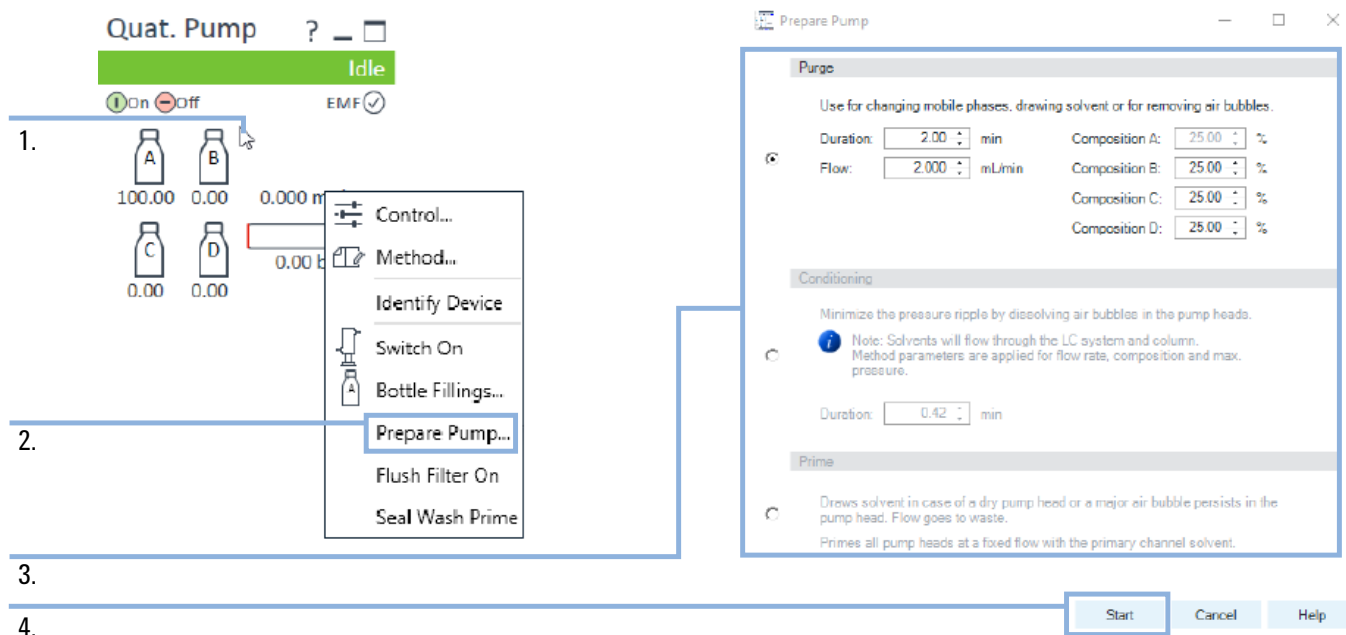


Figura 9 Preparar a bomba (bombas 1290 Infinity II)

1. Clique com o botão direito no painel do módulo
2. Selecione **Preparar Bomba...**
3. Selecione o procedimento e preencha os parâmetros adequados
4. Clique em **Iniciar** para executar o procedimento selecionado

Aplicativo InfinityLab HPLC Advisor Agilent

O aplicativo InfinityLab HPLC Advisor Agilent oferece um pacote de ferramentas úteis para ajudar na sua rotina de trabalho em HPLCs, não importa se você está próximo ou longe do instrumento. Essas ferramentas funcionam para todos os instrumentos HPLC, independentemente da marca e do modelo.

É possível baixá-lo com seu celular de uma das seguintes maneiras:

- Ao procurar por "HPLC Advisor" diretamente no Google Play ou Apple Store
- Abrindo os seguintes 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>
- Digitalizar o seguinte código QR (funciona tanto para Android quanto para iOS)

