



GPC/SEC

Column User Guide

カラムユーザーガイド

色谱柱用户指南

Manual do usuário
de colunas

Installation

Tubing and connectors

Stainless steel tubing of 1/16 in od and 0.12 mm id or 0.17 mm id is recommended for column connections of analytical columns, and 0.5 mm id for 25 mm preparative columns. Connecting tubing lengths between columns, detectors and injection volumes should be minimized to avoid excessive dead volume which will diminish system performance. Column connections should be made using Parker compatible 1/16 in nuts and ferrules. The compatibility of column connectors is illustrated in Figure 1.

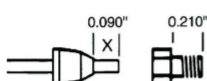


Figure 1. Compatible connectors

The distance "X" for the standard column end fitting is 0.090 in and a minimum male nut length of 0.210 in is required. Some fittings from other manufacturers may not be compatible, for example Waters and Rheodyne. If unsure, please contact Agilent Technologies.

Column connection

Connect the GPC column in the eluent flow direction indicated and tighten the 1/16 in nut and ferrule using wrenches on the 1/16 in nut and the actual end fitting.

It is recommended that several drops of eluent have been pumped before the column outlet is connected to another column or detector to clean out the end fitting of any particulate matter which may be present.

To avoid loosening the end fittings and causing leaks, wrenches must be used on the end fitting adjacent to the connecting nut and NOT on the column barrel or the opposite end fitting, see Figure 2.

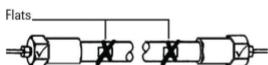


Figure 2. Do not use wrenches on the flats

Eluent Flow Rate

For conventional GPC columns using 7.5 and 7.8 mm id columns, 1.0 mL/min is an optimum flow rate for most separations. When column id is increased or decreased, the volumetric flow rate should be adjusted accordingly in order to give an equivalent linear velocity through the column.

The recommended flow rates are given in Table 1, however, in order to avoid excessively high pressures, higher viscosity eluents should be used at reduced flow rates or elevated temperature. Flow rates should be changed progressively and pressure pulses limited. At no time should the maximum operating pressure of the column be exceeded (see Table 4).

Table 1. Recommended flow rate

Column	Typical flow rates (mL/min)	Recommended flow rate (mL/min)
2.1 mm id	0.04 – 0.1	0.06
4.6 mm id	0.2 – 0.5	0.3
7.5 & 7.8 mm id	0.5 – 1.5	1.0
10 mm id	2.0 – 5.0	2.0
25 mm id	5.0 – 20.0	10.0

Sample Preparation and Injection

If maximum resolution and expected column lifetime are to be achieved, care must be taken in sample preparation.

To avoid blockage of the column frits, sample filtration is recommended (0.5 – 2.0 μm porosity depending on MW). A guard column will further protect the columns with little detrimental effect on performance.

Optimum sample volumes and concentrations are best determined for each type of analysis and are dependent on sample MW. Broad distribution polymer can generally be injected at higher concentrations than lower polydispersity samples. Overloading will not damage the column, but distorted peaks and therefore spurious results will be obtained.

Excessive injector loop volume can contribute to band broadening and reduce system performance, particularly with high efficiency or narrow bore columns. Agilent's injection volume recommendations are shown in Table 2.

Table 2. Injection volume recommendations

Column	Recommended concentration (%)	Recommended injection (μL) per column
2.1 mm id	0.01 – 0.2	0.2 – 2
4.6 mm id	0.01 – 0.2	1 – 20*
7.5 & 7.8 mm id	0.05 – 0.5	20 – 50**
10 mm id	0.05 – 0.5	20
25 mm id	0.5 – 5.0	500 – 2,000

* PL Multisolvant, MesoPore and ResiPore are 1 – 10 μL .

** PL Multisolvant, MesoPore and ResiPore are 10 – 20 μL , PL Rapide/PL Rapide Aqua are 20 μL .

Eluents

All eluents should be of high purity and should be filtered and degassed prior to use.

GPC columns can be transferred to other eluents. When transferring to another eluent, miscibility and viscosity of the new eluent are of primary consideration. See Figure 3 for 7.5 mm id columns. For other id columns, apply the flow rate shown in Table 1.

When heating or cooling columns in high viscosity eluents (for example, TCB, NMP, DMF) a low solvent flow rate must always be maintained. Typically, 0.2 mL/min for 7.5 mm id and 0.1 mL/min for 4.6 mm id should be used prior to raising the temperature, see Figure 3.

Organic

Organic GPC columns are compatible with an extensive range of organic solvents ranging in polarity from perfluoroalkanes to dimethylformamide. Mixed organic solvent systems can also be used, but water should not be used except at concentrations less than 10% by volume in a miscible organic eluent. Columns are normally supplied in ethylbenzene unless otherwise stated, and can be flushed directly from ethylbenzene to THF at 0.5 mL/min. Unstabilized THF (for example, HPLC grade) is not recommended as an eluent due to the attack of peroxide on the gels.

Aqueous and polar

Aqueous/polar GPC columns are normally supplied in water containing 0.02% sodium azide. Buffered eluent systems within the pH range 2 – 10 (of high and low ionic strength) may be used, with no detrimental effect on the column. When transferring from one eluent to another the compatibility and solubility of any salts or additives must be checked to prevent on-column precipitation which would irreversibly damage the column. PolarGel columns are compatible with an extensive range of organic solvents and with aqueous based eluents. Mixed organic solvent systems can be used, assuming full miscibility of the components. The only organic solvent which is recommended for use with the PL aquagel-OH and PL Rapide Aqua columns is methanol (up to 50% by volume).

PL Multisolvent

PL Multisolvent columns are supplied in stabilized THF, and may be transferred directly to organic solvents, or to pure water and then to buffer. Unstabilized THF (for example, HPLC grade) is not recommended as an eluent due to the attack of peroxide on the gels. Buffered eluents within the pH range 2 – 8.5 (of high and low ionic strength) may be used. When transferring from one eluent to another the compatibility and solubility of any salts or additives must be checked to prevent on-column precipitation which would irreversibly damage the column. Polar organic solvents, such as DMF, DMSO, or DMAc are not recommended as eluents.

Organic columns (PLgel; PlusPore; PL Rapide)

Column supplied in ethylbenzene

Transfer to low viscosity solvents e.g. THF, Chloroform, Dichloromethane	Transfer to medium viscosity solvents e.g. Toluene, DMF, DMSO, HFIP	Transfer to high viscosity solvents e.g. TCB, m-Cresol, NMP
Flush column with acetone at 0.5 mL/min for 2 column volumes	Flush column with acetone at 0.5 mL/min for 2 column volumes	Set column oven to 50 °C, flow at 0.1 mL/min
Flush with new eluent at 0.5 mL/min for 2 column volumes	Flush with new eluent at 0.2 mL/min for 2 column volumes	Flush column direct with new eluent** at 50 °C at 0.1 mL/min for 2 column volumes
Increase column temperature to 30 - 40 °C* as required for analysis at 1 °C/min	Increase column temperature to 50 - 80 °C* as required for analysis at 1 °C/min	Increase column temperature to 100 - 220 °C* as required for analysis at 1 °C/min
Operate column in new eluent at required flow rate	Operate column in new eluent at required flow rate	Operate column in new eluent at required flow rate

*Always ensure operating temperature is at least 10 °C below boiling point of solvent. **Always ensure miscibility. If unsure, use acetone at room temperature.

Aqueous & Polar columns (PolarGel, PL aquagel-OH, PL Rapide Aqua)

Column supplied in water containing 0.02% NaN₃

Transfer to aqueous e.g. Water, Buffer	Transfer to polar organic** e.g. DMSO, DMF	Transfer to mixed solvent systems e.g. Water/THF*, Water/methanol*
Flush column with pure water at 1.0 mL/min for 2 column volumes	Flush column with pure water at 1.0 mL/min for 2 column volumes	Flush column with pure water at 1.0 mL/min for 2 column volumes
Flush with new buffer at 1.0 mL/min for 2 column volumes	Flush with acetone at 0.5 mL/min for 2 column volumes	Flush with new, premixed eluent at 0.2 mL/min for 2 column volumes
Increase column temperature* as required for analysis at 1 °C/min	Flush with new eluent at 0.2 mL/min for 2 column volumes	Increase column temperature* as required for analysis at 1 °C/min
Operate column in new eluent at required flow rate	Increase column temperature to 50 - 80 °C* as required for analysis at 1 °C/min	Operate column in new eluent at required flow rate
	Operate column in new eluent at required flow rate	

*Always ensure operating temperature is at least 10 °C below boiling point of solvent. ** Polargel only

Multisolvent columns (PL Multisolvent)

Column supplied in THF containing 0.015% BHT

Transfer to aqueous e.g. Water, Buffer	Transfer to organic e.g. Chloroform* Dichloromethane**
Flush column with pure water at 1.0 mL/min for 2 column volumes	Flush with new eluent at 0.5 mL/min for 2 column volumes
Flush with new buffer at 1.0 mL/min for 2 column volumes	Increase column temperature as required for analysis at 1 °C/min
Increase column temperature as required for analysis at 1 °C/min	Operate column in new eluent at required flow rate
Operate column in new eluent at required flow rate	

*Always ensure operating temperature is at least 10 °C below boiling point of solvent

Figure 3. Eluent transfer guide

Column Testing and Specifications

Every column is supplied with a test certificate indicating the test conditions and the column performance. Measurements of column performance are described below:

Efficiency (1/2 ht) (Plates/m)	$N = 5.54 \left[\frac{t}{W_{1/2}} \right]^2 / L$
Efficiency (5σ) (Plates/m)	$N = 25 \left[\frac{t}{W_{5\sigma}} \right]^2 / L$
Symmetry	a/b

Where “t” is the peak elution time, “W1/2” is the peak width at half peak height, “W5σ” is the peak width at 4.4% of peak height, “L” is the column length in meters and “a” and “b” are the peak widths either side of the perpendicular measured at 10% of peak height.

Column efficiency is dependent on many experimental factors (system dead volume, eluent, flow rate, test probe, temperature, and so forth) and test results may differ from those quoted on the column certificate due to variability in these parameters. Band broadening effects are more severe when using high efficiency and/or narrow bore GPC/SEC columns. It is vital to ensure that the system dispersion is minimized in order to obtain the full potential of Agilent columns.

We recommend measuring performance when a column set is first used and at regular intervals after that. Consider replacing columns when efficiency falls below 80% of the starting value.

Table 3. Column specifications

Column	Typical operating pressure psi (bar)	Maximum operating pressure psi (bar)	Maximum operating temp. °C ²
PLgel 3 μm	750 (50)	2,700 (180)	110
PLgel 5 μm	450 (30)	2,200 (150)	150
PLgel 9 & 10 μm	150 (10)	2,200 (150)	220
PLgel 20 μm	50 (3)	2,200 (150)	220
PLgel Olexis	90 (6)	2,250 (150)	220
PLgel Prep 10 μm	350 (25)	2,200 (150)	150
PolyPore	450 (30)	2,200 (150)	160
ResiPore	750 (50)	2,700 (180)	120
MesoPore	750 (50)	2,700 (180)	120
OligoPore	450 (30)	1,500 (100)	120
PL Rapide-F	350 (25)	1,500 (100)	150
PL Rapide-L	225 (15)	1,100 (75)	150
PL Rapide-M	75 (5)	1,100 (75)	220
PL Rapide-H	75 (5)	1,100 (75)	220
PolarGel	450 (30)	1,600 (112)	80
PL aquagel-OH 5 μm	900 (60)	1,600 (112)	90
PL aquagel-OH 8 μm	450 (30)	1,600 (112)	90
PL aquagel-OH 15 μm	150 (10)	1,600 (112)	90
PL Rapide Aqua	225 (15)	1,600 (112)	90
PL Multisolvant (Water)	1450 (100)	1,600 (112)	80
PL Multisolvant (Organic)	750 (50)	1,600 (112)	80

¹Based on THF (organic columns) or H₂O (aqueous columns) at 20 °C, 4.6 mm id at 0.3 mL/min, 7.5 mm id at 1.0 mL/min, 10 mm id at 1.8 mL/min (2 mL/min for PL Rapide 10 x 100 mm) and 25 x 300 mm at 10 mL/min.

²At very high temperatures, column lifetimes are likely to be reduced. OligoPore and PL Rapide-F may show deterioration to lifetimes at >80°C, while PL Multisolvant may degrade at > 50 °C. Amend flow rates and temperatures accordingly.

Storage

On removing the column from the system, the end plugs must be replaced to prevent the column from drying out by evaporation, since subsequent shrinkage of the gel and disruption of the packing will occur. The end plugs need only be applied finger-tight. All eluents mentioned previously are suitable for storage, but unstabilized THF and halogenated solvents should not be used.

For long term storage of aqueous columns, flush with water and store in water containing 0.02% sodium azide.

Warranty

The columns are covered by warranty for 90 days following delivery. For columns used at or above 170 °C, the warranty period is reduced to 30 days. Agilent Technologies cannot accept liability from improper handling and use of columns above their maximum operation temperature and pressure (see Table 3) and void the warranty. For a full warranty statement, please request Agilent's General Conditions of Sale.

Maintenance

Deterioration in column performance may occur as a result of damage to the packed bed or as a result of blockage in the column frits. In the case of frit blockage, the column can be reverse flushed for 1 minute at the recommended flow rate to remove loosely retained material. If a column blockage exists despite back flushing, then some column inlet frits can be replaced by following the procedure outlined below.

Frit replacement procedure

1. Seal the end fitting at the outlet end of the column. Clamp the column vertically with the inlet end uppermost. Undo the end fitting on the inlet end of the column and gently remove it. (For aqueous columns, flush eluent into water prior to this procedure.)
2. After removing any gel from the end fitting, remove the frit, seal and spreader with the frit removal tool, and wash all traces of gel from the end fitting. Then place a new frit, seal and spreader in the bottom of the end fitting and ensure that they are properly seated.
3. Some gel (up to 2 mm) may have expanded out of the column. Using a spatula, place a dome of repair gel onto the top of the column and add sufficient solvent to bind the gel particles together.
4. Hold the column at an angle of 45° pointing downwards and replace the end fitting complete with frit, seal and spreader onto the column. Tighten the end fitting one flat past finger-tight.
5. Back flush the column with eluent at 0.5 mL/min to remove trapped air. Check for gel particles in the eluent in case the frit has not seated correctly. Return the column to normal flow conditions and check the pressure drop and column efficiency.

Agilent recommends that preparative columns are returned to Agilent for fitment of replacement frits or repair, however, a similar procedure to the above can be applied if necessary. For further technical assistance, or to use the Column Repair Service, please contact Agilent Technologies.

取り付け

チューブとコネクタ

分析カラムのカラム接続には外径 1/16 インチ、内径 0.12 mm または 0.17 mm のステンレススチールチューブを、25 mm 分取カラムには内径 0.5 mm のステンレススチールチューブを推奨します。システムパフォーマンスの低下を招くデッドボリュームの増加を防ぐには、カラム、検出器、インジェクター間の接続チューブの長さをできるだけ短くする必要があります。カラム接続には、Parker 互換 1/16 インチナットとフェラルを使用します。図 1 に、カラムコネクタの互換性を示します。

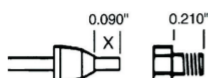


図 1. 互換コネクタ

標準カラムエンドフィッティングの距離“X”は 0.090 インチであるため、長さ 0.210 インチ以上のオスナットが必要です。Waters、Rheodyne など、他の製造元の一部のフィッティングは、使用できない可能性があります。ご不明の場合は、アジレント・テクノロジーにお問い合わせください。

カラム接続

溶離液が示された向きに流れるように GPC カラムを接続し、1/16 インチナットと実際のエンドフィッティング上でスパナを使って、1/16 インチナットとフェラルを締めます。

カラム出口を別のカラムまたは検出器に接続する前に、溶離液を数滴ポンプで送り、存在する可能性のある粒子状物質をエンドフィッティングから追い出すことを推奨します。

エンドフィッティングが緩んで漏れが生じるのを防ぐため、スパナは、カラムバレルや反対側のエンドフィッティング上ではなく、接続ナットに隣接するエンドフィッティング上で使用してください (図 2 を参照してください)。

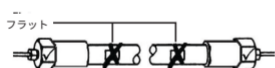


図 2. スパナをフラット上で使用しない

溶離液の流速

内径 7.5 mm または 7.8 mm のカラムを使用する従来の GPC カラムの場合、流速 1.0 mL/min がほとんどの分離に適しています。カラムの内径がそれより大きいか、小さいときには、カラムを通過する際に同等の線速度が得られるように、内径に合わせて流量を調整する必要があります。

表 1 に、推奨流速を示します。ただし、圧力が過剰に高くなるのを防ぐために、粘度の高い溶離液を使用する場合は、流速を遅くするか、昇温してください。流速を徐々に変化させ、脈流を抑えます。カラムの最大稼働圧を超えてはなりません (表 4 を参照してください)。

表 1. 推奨流速

カラム	代表流速 (mL/min)	推奨流速 (mL/min)
内径 2.1 mm	0.04 ~ 0.1	0.06
内径 4.6 mm	0.2 ~ 0.5	0.3
内径 7.5/7.8 mm	0.5 ~ 1.5	1.0
内径 10 mm	2.0 ~ 5.0	2.0
内径 25 mm	5.0 ~ 20.0	10.0

サンプル前処理と注入

最高の分離能と期待されるカラム寿命を達成するには、サンプルの前処理に注意を払う必要があります。

カラムフリットの目詰まりを防ぐため、サンプルのろ過を推奨します (MW に応じた 0.5 ~ 2.0 μm の多孔質フィルタ)。ガードカラムは、パフォーマンスへの悪影響がほとんどないため、カラムの保護に有効です。

分析のタイプごとに最適なサンプル量と濃度が決定されており、値はサンプルの MW に依存します。通常、分子量分布の広いポリマーは、多分散性の低いサンプルより高濃度で注入できます。過剰添加によってカラムが損傷を受けることはありませんが、ピークが歪むため、偽の結果が現れます。

インジェクターのループ容量が大きすぎると、特に高速高分離カラムやナローポアカラムで、バンドが広がり、システムパフォーマンスが低下する可能性があります。表 2 に、アジレントの推奨する注入量を示します。

表 2. 注入量の推奨値

カラム	推奨濃度 (%)	カラムあたりの推奨注入 (μL)
内径 2.1 mm	0.01 ~ 0.2	0.2 ~ 2
内径 4.6 mm	0.01 ~ 0.2	1 ~ 20*
内径 7.5/7.8 mm	0.05 ~ 0.5	20 ~ 50**
内径 10 mm	0.05 ~ 0.5	20
内径 25 mm	0.5 ~ 5.0	500 ~ 2,000

* PL Multisolvant、MesoPore と ResiPore は 1 ~ 10 μL .

** PL Multisolvant、MesoPore と ResiPore は 10 ~ 20 μL 、PL Rapide/PL Rapide Aqua は 20 μL

溶離液

すべての溶離液は、高純度であり、使用前にフィルタでろ過し、脱気する必要があります。

GPC カラムを別の溶離液に置き換えることができます。別の溶離液に置き換える際には、まず新しい溶離液の混和性と粘性を検討します。内径 7.5 mm のカラムの場合、図 3 を参照してください。その他の内径のカラムには、表 1 の流速を適用してください。

粘性の高い溶離液(たとえば、TCB、NMP、DMF)中でカラムを加熱または冷却する際には、低い溶媒の流速を常に保持する必要があります。通常、昇温前は、内径 7.5 mm には 0.2 mL/min、内径 4.6 mm には 0.1 mL/min を使用します(図 3 を参照してください)。

有機溶媒系

有機溶媒系 GPC カラムは、極性がパーフルオロアルカンからジメチルホルムアミドまでの広い範囲の有機溶媒で使用できます。水 / 有機溶媒混合系も使用できますが、水を使用する場合、水混和性有機溶離液中の水の濃度を 10 容量 % 未満にする必要があります。特に指定のない限り、PLgel カラムは、エチルベンゼン中に保存された状態で提供されます。0.5 mL/min でフラッシュして、エチルベンゼンから THF に直接置き換えることができます。PL Multisolvent カラムは、安定化した THF 中に保存された状態で提供されます。有機溶媒に直接置き換えることも、また純水に置き換えた後にバッファに置き換えることもできます。ゲル上の過酸化物の攻撃を受けるため、安定化されていない THF (たとえば、HPLC グレード) は溶離液として推奨しません。

水系と極性

水系 / 極性 GPC カラムは通常、0.02% アジ化ナトリウム水溶液で保存された状態で提供され、エンドキャップで完全に密閉されています。カラムをシステムに接続していないときには、エンドキャップを定位置に取り付けておく必要があります。pH 範囲 2 ~ 10 (高および低イオン強度) 内の溶離液緩衝系は、カラムへの悪影響なく使用することができます。ある溶離液から別の溶離液に置き換える場合、塩または添加剤の互換性と溶解度を確認して、カラムに不可逆的な損傷を与えるオンカラム沈殿を防ぐ必要があります。PolarGel カラムは、広範囲の有機溶媒、および水性溶離液で使用できます。成分が完全に混和する場合、有機溶媒混合系を使用できます。PL アクアゲル-OH および PL Rapide Aqua カラムに対する推奨有機溶媒は、メタノールのみです(最大 50 容量%)。

PL Multisolvent

PL Multisolvent カラムは、安定化した THF 中に保存された状態で提供されます。有機溶媒に直接置き換えることも、また純水に置き換えた後にバッファに置き換えることもできます。ゲル上の過酸化物の攻撃を受けるため、安定化されていない THF (たとえば、HPLC グレード) は溶離液として推奨しません。pH 範囲 2 ~ 8.5 (高および低イオン強度) 内の溶離液緩衝系は使用することができます。ある溶離液から別の溶離液に置き換える場合、塩または添加剤の互換性と溶解度を確認して、カラムに不可逆的な損傷を与えるオンカラム沈殿を防ぐ必要があります。DMF、DMSO、DMAc などの極性有機溶媒は溶離液として推奨しません。

有機溶媒系カラム (PLgel、PlusPore、PL Rapide)

カラムはエチルベンゼン中に保存された状態で提供されます

低粘性溶媒への置き換え例	中粘性溶媒への置き換え例	高粘性溶媒への置き換え例
THF クロロホルム ジクロロメタン	トルエン DMF DMSO, HFIP	TCB m-クレゾール NMP
カラムをアセトンで、0.5 mL/min で2カラム容量分フラッシュ	カラムをアセトンで、0.5 mL/min で2カラム容量分フラッシュ	カラムオープンをして50°C、流量を0.1 mL/min に設定
新しい溶離液で、0.5 mL/min で2カラム容量分フラッシュ	新しい溶離液で、0.2 mL/min で2カラム容量分フラッシュ	カラムを新しい溶離液で、**50°C、0.1 mL/min で2カラム容量分直接フラッシュ
カラム温度を30~40°C*(分析で要求される温度)に1°C/分で昇温	カラム温度を50~80°C*(分析で要求される温度)に1°C/分で昇温	カラム温度を100~220°C*(分析で要求される温度)に1°C/分で昇温
カラムを新しい溶離液中に必要な流速で操作	カラムを新しい溶離液中に必要な流速で操作	カラムを新しい溶離液中に必要な流速で操作

* 使用温度は、常に溶媒の沸点より10°C以上低い温度に保ちます。
** 混和性を保ちます。自信のない場合、アセトンを室温で使用します。

水系および極性カラム (PolarGel、PL aquagel-OH、PL Rapide Aqua)

カラムは0.02% NaN₃を含む水中に保存された状態で提供されます

水性溶媒への置き換え例	極性有機溶媒**への置き換え例	溶媒混合系への置き換え例
水 バッファ	DMSO DMF	水/THF* 水/メタノール*
カラムを純水で、1.0 mL/min で2カラム容量分フラッシュ	カラムを純水で、1.0 mL/min で2カラム容量分フラッシュ	カラムを純水で、1.0 mL/min で2カラム容量分フラッシュ
新しいバッファで、1.0 mL/min で2カラム容量分フラッシュ	アセトンで、0.5 mL/min で2カラム容量分フラッシュ	新しい事前混合溶離液で、0.2 mL/min で2カラム容量分フラッシュ
カラム温度*を(分析で要求される温度まで)1°C/分で昇温	新しい溶離液で、0.2 mL/min で2カラム容量分フラッシュ	カラム温度*を(分析で要求される温度まで)1°C/分で昇温
カラムを新しい溶離液中に必要な流速で操作	カラム温度を50~80°C*(分析で要求される温度)に1°C/分で昇温	カラムを新しい溶離液中に必要な流速で操作
	カラムを新しい溶離液中に必要な流速で操作	

* 使用温度は、常に溶媒の沸点より10°C以上低い温度に保ちます。
** PolarGelのみ

多溶媒カラム (PL Multisolvant)

カラムは0.015% BHTを含むTHFに保存された状態で提供されます

水性溶媒への置き換え例	有機溶媒への置き換え例
水 バッファ	クロロホルム* ジクロロメタン*
カラムを純水で、1.0 mL/min で2カラム容量分フラッシュ	新しい溶離液で、0.5 mL/min で2カラム容量分フラッシュ
新しいバッファで、1.0 mL/min で2カラム容量分フラッシュ	カラム温度を(分析で要求される温度まで)1°C/分で昇温
カラム温度を(分析で要求される温度まで)1°C/分で昇温	
カラムを新しい溶離液中に必要な流速で操作	カラムを新しい溶離液中に必要な流速で操作

* 有機溶媒は最大50%です。
** 使用温度は、常に溶媒の沸点より10°C以上低い温度に保ちます。

図3. 溶離液置き換えガイド

カラムのテストと仕様

すべてのカラムに、テスト条件とカラムパフォーマンスを記載したテスト証明書が添付されています。以下では、カラムパフォーマンスの測定結果について説明します。

$$\begin{array}{ll} \text{効率 (1/2 高さ) (理論段数/m)} & N = 5.54 \left[\frac{t}{W_{1/2}} \right]^2 / L \\ \text{効率 (5\sigma) (理論段数/m)} & N = 25 \left[\frac{t}{W_{5\sigma}} \right]^2 / L \\ \text{対称} & a/b \end{array}$$

“t” はピーク溶出時間、“W1/2” は 1/2 ピーク高さにおけるピーク幅、“W5σ” はピーク高さの 4.4% におけるピーク幅、“L” はカラム長さ (メートル単位)、“a” と “b” はピーク高さの 10% で測定される垂線の両側のピーク幅です。

カラム効率は、多数の実験的要因 (システムのデッドボリューム、溶離液、流速、テスト試薬、温度など) に依存します。これらのパラメータの変動性により、テスト結果は、カラム証明書に記載されたものと異なる可能性があります。バンドの広がりの影響は、高速高分離またはナローボア GPC/SEC カラムを使用する場合により重大です。Agilent カラムの潜在能力を最大限に引き出すには、システムにおける拡散を最小限に抑えることが重要です。

パフォーマンスは、カラムセットの初回使用時に測定後、定期的に測定することを推奨します。カラムの効率が初期値の 80% 未満になったら、カラムの交換を検討してください。

表 3. カラム仕様

カラム	代表動作 圧力 psi (bar) ¹	最大動作圧 力 psi (bar)	最大使用 温度°C ²
PLgel 3 µm	750 (50)	2,700 (180)	110
PLgel 5 µm	450 (30)	2,200 (150)	150
PLgel 9 & 10 µm	150 (10)	2,200 (150)	220
PLgel 20 µm	50 (3)	2,200 (150)	220
PLgel Olexis	90 (6)	2,250 (150)	220
PLgel Prep 10 µm	350 (25)	2,200 (150)	150
PolyPore	450 (30)	2,200 (150)	160
ResiPore	750 (50)	2,700 (180)	120
MesoPore	750 (50)	2,700 (180)	120
OligoPore	450 (30)	1,500 (100)	120
PL Rapide-F	350 (25)	1,500 (100)	150
PL Rapide-L	225 (15)	1,100 (75)	150
PL Rapide-M	75 (5)	1,100 (75)	220
PL Rapide-H	75 (5)	1,100 (75)	220
PolarGel	450 (30)	1,600 (112)	80
PL aquagel-OH 5 µm	900 (60)	1,600 (112)	90
PL aquagel-OH 8 µm	450 (30)	1,600 (112)	90
PL aquagel-OH 15 µm	150 (10)	1,600 (112)	90
PL Rapide Aqua	225 (15)	1,600 (112)	90
PL Multisolvent (水)	1450 (100)	1,600 (112)	80
PL Multisolvent (溶媒)	750 (50)	1,600 (112)	80

¹THF (有機溶媒系カラム) または H₂O (水系カラム)、20 °C、内径 4.6 mm で 0.3 mL/min、内径 7.5 mm で 1.0 mL/min、内径 10 mm で 1.8 mL/min (PL Rapide 10 x 100 mm の場合 2 mL/min、25 x 300 mm で 10 mL/min の条件に基づいた結果です。

²非常に高い温度では、カラム寿命が短くなる可能性があります。OligoPore と PL Rapide-F では 80 °C を超えると寿命に対する悪影響が現れる可能性があります。また、PL Multisolvent では 50 °C を超えると劣化することがあります。このため、状況に応じて流速と温度を修正します。

保管

システムからカラムを取り外したらすぐに、蒸発によるカラムの乾燥を防ぐため、エンドプラグを元の位置に戻します。戻さないと、ゲルの収縮や充填剤の崩壊が発生することがあります。エンドプラグは、指で締めます。これまでに説明した溶離液はすべて、保管に適していますが、安定化されていないTHFとハロゲン化溶剤は使用しないでください。

水系カラムを長期間保管する場合、水でフラッシュし、0.02% アジ化ナトリウム水溶液で保管します。

保証

カラムには、出荷日から90日間の保証が付いています。カラムを170℃以上で使用する場合、保証期間は30日に短縮されます。アジレント・テクノロジーは、不適切な処理および最大使用温度と圧力(表3を参照)を超えたカラムの使用の結果生じた損害に対して責任を負わないものとし、保証は無効となります。保証の全文については、アジレントの一般販売条件をご請求ください。

メンテナンス

充填ベッドの損傷や、カラムフリットの目詰まりの結果、カラムパフォーマンスが低下する可能性があります。フリットの目詰まりの場合、カラムを推奨流速で1分間逆方向にフラッシュすると、ゆるく結合している残存物質を除去できます。バックフラッシュを行ってもカラムの目詰まりが存在する場合、カラムインレットフリットを以下の手順で交換することができます。

フリット交換手順

1. カラムの出口端のエンドフィッティングを密封します。注入口端の最上部でカラムをクランプで垂直に固定します。カラムの注入口端のエンドフィッティングをゆるめて、静かに取り外します(水系カラムの場合、この手順の前に、フラッシュにより溶離液を水に置き換えます)。
2. エンドフィッティングからゲルを除去した後、フリット、シール、スプレッタをフリット除去ツールで取り外し、エンドフィッティングからゲルのすべての痕跡を洗い流します。次に新しいフリット、シール、スプレッタをエンドフィッティングの底に置き、正しく装着されていることを確認します。
3. 一部のゲル(2 mm まで)がカラムからはみ出している可能性があります。スパチュラを使用して、カラムの一番上にリペアゲルをドーム形にのせ、十分な量の溶媒を加えて、ゲル粒子同士を結合させます。
4. カラムを45°の角度で下を向けて持ち、フリット、シール、スプレッタをすべて装着したエンドフィッティングに戻します。エンドフィッティングを1フラット通り越して手で締めます。
5. カラムを0.5 mL/minで溶離液でバックフラッシュし、閉じ込められた空気を除去します。フリットが正しく装着されていない場合、溶離液中にゲル粒子がないか確認します。カラムを通常フロー条件に戻し、圧力降下とカラム効率を確認します。

アジレントでは、分取カラムをアジレントに戻して、交換フリットまたはリペアの取り付けを確認してもらうことを推奨しますが、必要に応じて、上記と同様の手順を適用できます。さらにテクニカルサポートが必要な場合、またはカラム修理サービスを利用する場合は、アジレント・テクノロジーにお問い合わせください。

安装

管路和接头

对于分析柱,建议使用外径为 1/16 英寸、内径为 0.12 mm 或 0.17 mm 的不锈钢管路进行连接,对于 25 mm 的制备柱则使用内径为 0.5 mm 的管路。应尽量缩短色谱柱、检测器之间的管路长度,并减小进样量,以避免因死体积过大而导致系统性能下降。应使用 Parker 兼容的 1/16 英寸螺帽和密封垫圈进行色谱柱连接。图 1 介绍了色谱柱接头的兼容性。

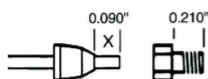


图 1. 兼容的接头

标准色谱柱端接头的距离“X”是 0.090 英寸,需要长度至少为 0.210 英寸的外螺纹螺帽。其他制造商提供的某些接头可能不兼容,例如 Waters 和 Rheodyne。如果不确定,请联系安捷伦科技公司。

色谱柱连接

按照标注的洗脱液流向连接 GPC 色谱柱,并用扳手夹住 1/16 英寸螺帽和实际的端接头,将螺帽和密封垫圈拧紧。

建议在将色谱柱出口连接到其他色谱柱或检测器之前先泵出几滴洗脱液,以清除出口接头中可能存在的任何颗粒物。

为了避免两端接头变松导致漏液,必须在靠近 连接螺帽的端接头上使用扳手,而不是在色谱柱管凹槽平面或另一端的接头位置上使用 扳手,见图 2。

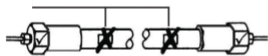


图 2. 不要在柱管凹槽平面上使用扳手

洗脱液流速

传统 GPC 色谱柱使用内径为 7.5 和 7.8 mm 的色谱柱, 大多数分离使用的最佳流速为 1.0 mL/min。当色谱柱内径增加或减少时, 应对体积流速做出相应调整, 以使通过色谱柱时具有相同的线速度。

建议流速如表 1 所示, 但是, 为了避免过高的压力, 较高粘度的洗脱液应在较低的流速和较高洗脱温度下使用。应逐渐改变流速并限制压力脉冲。在任何时候都不应超过色谱柱的最大操作压力 (见表 4)。

表 1. 建议流速

色谱柱	典型流速 (mL/min)	建议流速 (mL/min)
2.1 mm 内径	0.04-0.1	0.06
4.6 mm 内径	0.2-0.5	0.3
7.5 与 7.8 mm 内径	0.5-1.5	1.0
10 mm 内径	2.0-5.0	2.0
25 mm 内径	5.0-20.0	10.0

样品前处理和进样

如果要达到最大分离度和预期的色谱柱寿命, 进行样品前处理时需要格外注意。

为了避免色谱柱滤芯堵塞, 建议进行样品过滤 (根据分子量选择 0.5-2.0 μm 的孔隙率)。保护柱将进一步保护色谱柱, 而几乎不对色谱柱性能产生不利影响。

根据样品的分子量, 为每种类型的分析确定最佳样品体积和浓度。较宽分布的聚合物通常以高于低多分散度样品的浓度进样。过载不会损坏色谱柱, 但会使峰发生变形, 从而获得虚假结果。

过大的进样器定量环体积可能导致谱带展宽并降低系统性能, 对高效或窄径色谱柱尤其如此。安捷伦进样量建议如表 2 所示。

表 2. 进样量建议

色谱柱	建议浓度 (%)	每根色谱柱的建议进样量 (μL)
2.1 mm 内径	0.01-0.2	0.2-2
4.6 mm 内径	0.01-0.2	1-20*
7.5 与 7.8 mm 内径	0.05-0.5	20-50**
10 mm 内径	0.05-0.5	20
25 mm 内径	0.5-5.0	500-2000

* PL 多溶剂色谱柱、MesoPore 和 ResiPore 为 1-10 μL 。 ** PL 多溶剂色谱柱、MesoPore 和 ResiPore 为 10-20 μL , PL Rapide/PL Rapide Aqua 为 20 μL

洗脱液

所有洗脱液必须是高纯的, 在使用之前应当过滤和脱气。

GPC 色谱柱可切换到其他洗脱液。在切换到其他洗脱液时, 应重点考虑新洗脱液的兼容性和粘度。图 3 列出了 7.5 mm 内径色谱柱的流动相切换方法。对于其他内径的色谱柱, 可参考使用表 1 列出的流速。

如果使用高粘度洗脱液(如 TCB、NMP、DMF), 在加热或冷却的色谱柱时, 应始终保持较低的流速。通常, 在升温之前, 7.5 mm 内径色谱柱使用的流速是 0.2 mL/min, 4.6 mm 内径色谱柱使用的流速是 0.1 mL/min, 见图 3。

有机柱

有机 GPC 色谱柱与极性介于全氟烷烃到二甲基甲酰胺之间的各种有机溶剂兼容。混合有机溶剂系统也可以使用, 但不应使用水, 除非水在互溶的有机洗脱液中体积浓度小于 10%。除非另行说明, 色谱柱在出厂时通常保存在乙苯中, 可以使用 0.5 mL/min 的流速将色谱柱从乙苯直接过渡到 THF 中。不建议使用不稳定的 THF (如 HPLC 级) 作为洗脱液, 因为过氧化物会侵蚀凝胶。

水性和极性柱

水性/极性 GPC 色谱柱出厂时通常保存在含有 0.02% 叠氮化钠的水溶液中, 在未将色谱柱连接到系统时, 应使用堵头将其完全密封。可以使用 pH 2-10 (高或低离子强度) 范围的缓冲液系统, 不会对色谱柱带来不利影响。在从一种洗脱液切换到另一种洗脱液时, 必须检查任何盐或添加剂的兼容性和溶解度, 以避免在色谱柱上析出, 从而对色谱柱造成无法挽回的损坏。PolarGel 色谱柱能与各种有机溶剂及水溶液洗脱液相兼容。如果组分可以完全混合的话, 可以使用混合有机溶剂。对于 PL aquagel-OH 和 PL Rapide Aqua 色谱柱, 唯一建议使用的有机溶剂是甲醇(最大为其体积的 50%)。

PL 多溶剂色谱柱

PL 多溶剂色谱柱保存在经稳定的 THF 中, 可直接切换为有机溶剂, 也可依次切换为纯水和缓冲溶液。不建议使用未经稳定的 THF (例如 HPLC 级) 作为洗脱液, 因为它会受到凝胶上过氧化物的影响。可以使用 pH 范围为 2-8.5 (高和低离子强度) 的缓冲洗脱液。在从一种洗脱液切换为另一种洗脱液时, 必须检查所有盐或添加剂的兼容性和溶解度, 以防产生会对色谱柱造成不可逆损坏的柱内沉淀。不建议使用 DMF、DMSO 或 DMAc 等极性有机溶剂作为洗脱液。

有机色谱柱 (PLgel; PlusPore; PL Rapide)

在乙苯中保存的色谱柱

切换到低粘度溶剂 例如 THF 氯仿 二氯甲	切换到中粘度溶剂 例如 甲苯 DMF DMSO, HFIP	切换到高粘度溶剂 例如 TCB 间甲酚 NMP
使用丙酮冲洗色谱柱, 流速为0.5 mL/min, 冲洗 2 个色谱柱体积	使用丙酮冲洗色谱柱, 流速为0.5 mL/min, 冲洗 2 个色谱柱体积	将柱温箱设置为 50 °C, 流速为 0.1 mL/min
使用新洗脱液冲洗, 流速为 0.5 mL/min, 冲洗 2 个色谱柱体积	使用新洗脱液冲洗, 流速为 0.2 mL/min, 冲洗 2 个色谱柱体积	使用新洗脱液直接冲洗色谱柱** 温度为 50 °C, 流速为 0.1 mL/min, 冲洗 2 个色谱柱体积
根据分析需要将色谱柱温度提高至 30-40 °C*, 增量为 1 °C/min	根据分析需要将色谱柱温度提高至 50-80 °C*, 增量为 1 °C/min	根据分析需要将色谱柱温度提高至 100-220 °C*, 增量为 1 °C/min
在新洗脱液中以所需流速操作色谱柱	在新洗脱液中以所需流速操作色谱柱	在新洗脱液中以所需流速操作色谱柱

* 始终确保操作温度为低于溶剂沸点至少 10 °C。 ** 始终确保可混合性。如果不确定, 请在室温条件下使用丙酮。

水性与极性色谱柱 (PolarGel、PL aquagel-OH、PL Rapide Aqua)

在含有 0.02% NaN 的水中保存色谱柱³

切换到水性溶剂, 例如 水 缓冲液	切换到极性有机溶剂**, 例如 DMSO DMF	切换到混合溶剂系统, 例如 水/THF* 水/甲醇*
使用纯水冲洗色谱柱, 流速为 1.0 mL/min, 冲洗 2 个色谱柱体积	使用纯水冲洗色谱柱, 流速为 1.0 mL/min, 冲洗 2 个色谱柱体积	使用纯水冲洗色谱柱, 流速为 1.0 mL/min, 冲洗 2 个色谱柱体积
使用新缓冲液冲洗, 流速为 1.0 mL/min, 冲洗 2 个色谱柱体积	使用丙酮冲洗, 流速为 0.5 mL/min, 冲洗 2 个色谱柱体积	使用新的预混合洗脱液冲洗, 流速为 0.2 mL/min, 冲洗 2 个色谱柱体积
在新洗脱液中使用所需流速操作色谱柱, 最高温度为 50 °C	使用新洗脱液冲洗, 流速为 0.2 mL/min, 冲洗 2 个色谱柱体积	根据分析需要提高色谱柱温度*, 增量为 1 °C/分钟
在新洗脱液中以所需流速操作色谱柱	根据分析需要将色谱柱温度提高至 50-80 °C*, 增量为 1 °C/min	在新洗脱液中以所需流速操作色谱柱
	在新洗脱液中以所需流速操作色谱柱	

* 始终确保操作温度至少比溶剂沸点低 10 °C

多溶剂色谱柱 (PL 多溶剂色谱柱)

色谱柱保存在含 0.015% BHT 的 THF 中

切换到水性溶剂, 例如 水, 缓冲液	切换到混合溶剂系统, 例如 水/甲醇*
使用 2 倍色谱柱体积的纯水以 1.0 mL/min 的流速冲洗色谱柱	使用 2 倍色谱柱体积的新洗脱液以 0.5 mL/min 的流速冲洗色谱柱
使用 2 倍色谱柱体积的新缓冲液以 1.0 mL/min 的流速冲洗色谱柱	根据分析需求以 1 °C/min 的速率升高柱温
根据分析需求以 1 °C/min 的速率升高柱温	使用新洗脱液以所需的流速流过色谱柱
使用新洗脱液以所需的流速流过色谱柱	

*最大 50% 有机溶剂。

** 始终确保操作温度至少比溶剂沸点低 10 °C

图 3 洗脱液切换指南

色谱柱测试和规格

每根色谱柱都附测试证书, 标明测试条件和色谱柱性能。色谱柱性能的测量公式如下:

$$\begin{aligned} \text{柱效 (1/2 ht) (塔板数/m)} & \quad N = 5.54 \left[\frac{t}{W_{1/2}} \right]^2 / L \\ \text{柱效 (5\sigma) (塔板数/m)} & \quad N = 25 \left[\frac{t}{W_{5\sigma}} \right]^2 / L \\ \text{对称因子} & \quad a/b \end{aligned}$$

其中“t”是峰值洗脱时间, “W1/2”是半峰高处的峰宽, “W5σ”是 4.4% 峰高处的峰宽, “L”是以米为单位表示的色谱柱长度, “a”和“b”是在 10% 峰高处测量的峰顶点两侧的峰宽。

色谱柱柱效由诸多试验因素(如系统死体积、洗脱液、流速、测试试剂、温度等)决定, 由于这些参数的变化, 测试结果可能与色谱柱证书上标示的结果不同。在使用高效和/或窄径 GPC/SEC 色谱柱时, 峰展宽的影响尤为严重。至关重要, 为了发挥安捷伦色谱柱的全部潜能, 必须确保系统的扩散最小化。

我们建议在首次使用色谱柱组时检测其性能, 并在之后定期检测。在柱效低于初始值的 80% 时, 考虑更换色谱柱。

表 3. 色谱柱规格

色谱柱	典型操作压力 psi (bar) ¹	最大操作压力 psi (bar)	最高操作温度 °C ²
PLgel 3 μm	750 (50)	2,700 (180)	110
PLgel 5 μm	450 (30)	2,200 (150)	150
PLgel 9 & 10 μm	150 (10)	2,200 (150)	220
PLgel 20 μm	50 (3)	2,200 (150)	220
PLgel Olexis	90 (6)	2,250 (150)	220
PLgel Prep 10 μm	350 (25)	2,200 (150)	150
PolyPore	450 (30)	2,200 (150)	160
ResiPore	750 (50)	2,700 (180)	120
MesoPore	750 (50)	2,700 (180)	120
OligoPore	450 (30)	1,500 (100)	120
PL Rapide-F	350 (25)	1,500 (100)	150
PL Rapide-L	225 (15)	1,100 (75)	150
PL Rapide-M	75 (5)	1,100 (75)	220
PL Rapide-H	75 (5)	1,100 (75)	220
PolarGel	450 (30)	1,600 (112)	80
PL aquagel-OH 5 μm	900 (60)	1,600 (112)	90
PL aquagel-OH 8 μm	450 (30)	1,600 (112)	90
PL aquagel-OH 15 μm	150 (10)	1,600 (112)	90
PL Rapide Aqua	225 (15)	1,600 (112)	90
PL多溶剂 (水)	1450 (100)	1,600 (112)	80
多溶剂 (有机)	750 (50)	1,600 (112)	80

¹基于 THF(有机色谱柱)或 H₂O(水性柱), 20 °C, 4.6 mm 内径流速为 0.3 mL/min, 7.5 mm 内径流速为 1.0 mL/min, 10 mm 内径流速为 1.8 mL/min (2 mL/min 用于 PL Rapide 10 × 100 mm) 和 25 × 300 mm, 流速为 10 mL/min。

²在极高温下, 色谱柱使用寿命可能会缩短。OligoPore 和 PL Rapide-F 在温度超过 80 °C 时使用寿命会缩短, 而 PL 多溶剂色谱柱在超过 50 °C 时会发生降解。应对流速和温度进行相应的调整。

存放

色谱柱从系统上拆下来后,必须重新装上堵头,以防止色谱柱由于溶剂蒸发而变干,否则凝胶会收缩,填充柱床会被破坏。只需用手指拧紧堵头即可。上面提到的所有洗脱液都适合于保存色谱柱,但不能使用不稳定的 THF 和卤化溶剂。

若要长期存放水性柱,应用水冲洗,并将其保存在含 0.02% 叠氮化钠的水中。

保修

色谱柱的保修期为交付之日起 90 天。对于在 170 °C 或更高温度条件下使用的色谱柱,保修期缩短为 30 天。安捷伦科技公司对于操作不当以及在超过最高操作温度和压力(见表 3)使用的色谱柱不承担任何责任,并且保修无效。要了解完整的保修声明,请申请安捷伦的通用销售条件。

维护

色谱柱性能可能会由于填充柱床损坏或色谱柱筛板阻塞而降低。如果筛板发生堵塞,可以以建议流速对色谱柱反冲 1 分钟,以去除松散的残留物。如果在色谱柱反冲后堵塞依然存在,则可以按照下面说明的步骤更换色谱柱入口筛板。

筛板更换过程

1. 将色谱柱出口端用堵头密封。垂直夹住色谱柱,入口端在最上面。松开色谱柱入口的端接头,将其轻轻取下。(对于水性柱,在此过程之前将洗脱液切换成水。)
2. 去掉端接头的凝胶后,使用筛板拆卸工具取下筛板、密封垫和扩张器,将端接头上的所有残留的凝胶洗掉。然后将新筛板、密封垫和扩张器放在端接头底部,确保它们位置正确。
3. 有些凝胶(最多 2 毫米)可能会从色谱柱溢出。使用刮刀将修补凝胶顶压在色谱柱顶端,使用足够的溶剂将凝胶颗粒凝结在一起。
4. 以向下 45° 的角度拿住色谱柱,将装有筛板、密封垫和扩张器的端接头重新装到色谱柱上。用手指拧紧端接头。
5. 以 0.5 mL/min 的流速反向冲洗色谱柱以去除滞留的空气。如果筛板位置不正确,则检查流出液中是否有凝胶颗粒。将色谱柱恢复到正常流向和流速条件,检查压力降和色谱柱柱效。

安捷伦建议将制备柱返回到安捷伦进行筛板更换或修理,然而,如果必要,可以按上述步骤进行处理。要获得更多技术帮助或使用色谱柱的维修服务,请联系安捷伦科技公司。

Instalação

Tubulação e conectores

É recomendável usar tubulação de aço inoxidável de 1/16 pol. de diâmetro externo e de 0,12 mm de diâmetro interno ou de 0,17 mm de diâmetro interno nas conexões de coluna das colunas analíticas e de 0,5 mm de diâmetro interno para colunas preparativas de 25 mm. A conexão de tubulações entre colunas, detectores e injeções deve ser minimizada para evitar volume morto excessivo, que reduz o desempenho do sistema. As conexões das colunas devem ser feitas com porcas e anilhas Parker compatíveis de 1/16 polegadas. A compatibilidade dos conectores de coluna é ilustrada na Figura 1.

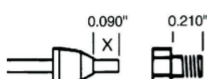


Figura 1. Conectores compatíveis

A distância "X" da conexão terminal padrão da coluna é de 0,090 pol. e é necessário usar uma porca macho de, no mínimo, 0,210 polegadas. Algumas conexões de outros fabricantes podem não ser compatíveis, por exemplo, da Waters ou Rheodyne. Em caso de dúvidas, fale com a Agilent Technologies.

Conexão da coluna

Conecte a coluna GPC na direção de fluxo do eluente indicada e aperte a anilha e a porca de 1/16 pol. usando chaves inglesas na porca de 1/16 pol. e na conexão terminal real.

É recomendável bombear gotas de eluente antes de a saída da coluna ser conectada a outra coluna ou detector para limpeza da conexão terminal, que remove os materiais particulados presentes.

Para evitar que as conexões terminais fiquem soltas e causem vazamento, as chaves inglesas deverão ser usadas na conexão terminal adjacente à porca de conexão e NÃO no cilindro da coluna ou conexão terminal oposta, veja a Figura 2.

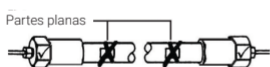


Figura 2. Não use chave inglesa na parte plana

Vazão de eluentes

Em colunas GPC convencionais, que usam colunas de 7,5 e 7,8 mm, 1,0 ml/min é a vazão ideal para a maior parte das separações. Quando o diâmetro interno da coluna é aumentado ou reduzido, a vazão volumétrica é ajustada de forma correspondente para que seja concedida velocidade linear equivalente na coluna.

As vazões recomendadas são fornecidas na Tabela 1, no entanto, para evitar pressões excessivamente altas, eluentes de viscosidade mais alta devem ser usados em vazões reduzidas ou temperaturas elevadas. As vazões devem ser alteradas de forma progressiva, e os pulsos de pressão deve ser limitados. A pressão operacional máxima da coluna não deve ser excedida em nenhum momento (veja a Tabela 4).

Tabela 1. Vazão recomendada

Coluna Diâmetro interno	Vazão típica (ml/min)	Vazão recomendada (ml/min)
4,6 mm	0,2 – 0,5	0,3
7,5 e 7,8 mm	0,5 – 1,5	1,0
10 mm	2,0 – 5,0	2,0
25 mm	5,0 – 20,0	10,0

Preparação de amostra e injeção

Se houver previsão de que a resolução máxima e o tempo de vida útil da coluna serão atingidos, deve-se tomar cuidado na preparação das amostras.

Para evitar o bloqueio das fritas da coluna, é recomendável filtrar a amostra (0,5 – 2,0 µm de porosidade, dependendo do MW). Uma coluna protetora protegerá então as colunas com poucos efeitos prejudiciais no desempenho.

As concentrações e volumes ideais das amostras são mais bem determinados para cada tipo de análise e dependem do MW da amostra. Geralmente, polímeros de distribuição mais amplos podem ser injetados em concentrações mais altas do que as amostras de polidispersão inferiores. A sobrecarga não danificará a coluna, mas picos distorcidos e, portanto, resultados espúrios serão obtidos.

Volume excessivo no loop do injetor pode contribuir com o alargamento de banda e reduzir o desempenho do sistema, principalmente com alta eficiência ou colunas com diâmetro interno reduzido. As recomendações de volume de injeção da Agilent são mostradas na Tabela 2.

Tabela 2. Recomendações de volume de injeção

Coluna Diâmetro interno	Concentração recomendada (%)	Injeção recomendada (µL) por coluna
2,1 mm id	0,01 – 0,2	0,2 – 2
4,6 mm	0,01 – 0,2	1 – 20*
7,5 e 7,8	0,05 – 0,5	20 – 50**
10 mm	0,05 – 0,5	20
25 mm	0,5 – 5,0	500 – 2.000

* PL Multisolvant, MesoPore e ResiPore são 1 – 10 µLL

** PL Multisolvant, MesoPore e ResiPore são 10 – 20 µL, PL Rapide/PL Rapide Aqua são 20 µL

Eluentes

Todos os eluentes devem ser de alta pureza e filtrados e desgaseificados antes do uso.

As colunas GPC podem ser transferidas para outros eluentes. Ao fazer a transferência para outro eluente, a miscibilidade e a viscosidade do novo eluente são as principais considerações. Veja a Figura 3 para colunas de diâmetro interno de 7,5 mm. Para colunas com outros diâmetros internos, aplique a vazão mostrada na Tabela 1.

Ao aquecer ou resfriar colunas em eluentes de alta viscosidade (por exemplo, TCB, NMP, DMF), deve-se sempre manter vazão baixa de solvente. Geralmente, 0,2 ml/min para diâmetro interno de 7,5 mm e 0,1 ml/min para diâmetro interno de 4,6 mm devem ser usados antes de elevar a temperatura, veja a Figura 3.

Orgânicas

As colunas GPC orgânicas são compatíveis com uma ampla gama de solventes orgânicos que variam em polaridade de perfluoroalcanos até dimetilformamida. Os sistemas de solventes orgânicos misturados também podem ser usados, porém não se deve usar água, exceto em concentrações inferiores a 10% por volume em um eluente orgânico miscível. As colunas normalmente são fornecidas em etilbenzeno, exceto se de outra forma especificado, e podem ser lavadas diretamente do etilbenzeno ao THF a 0,5 ml/min. Não é recomendável usar THF não estabilizado (por exemplo, de grau HPLC) como eluente devido ao ataque de peróxido nos géis.

Aquosas e polares

Colunas GPC aquosas/polares geralmente são fornecidas em água com 0,02% de azida de sódio e completamente seladas com tampa de proteção, que deve estar sempre bem encaixada quando a coluna não estiver conectada a um sistema. Sistemas de eluentes tamponados que estejam dentro da escala de pH de 2 – 10 (de força iônica alta e baixa) podem ser usados, sem que haja efeitos prejudiciais à coluna. Ao fazer a transferência de um eluente para outro, a compatibilidade e a solubilidade dos sais e aditivos devem ser verificados para evitar precipitação na coluna, que poderia causar danos irreversíveis a ela. As colunas PolarGel são compatíveis com diversos solventes orgânicos e eluentes aquosos. Os sistemas de solventes orgânicos misturados podem ser usados, assumindo-se total miscibilidade dos componentes. O único solvente orgânico recomendável para uso com as colunas PL aquagel-OH e PL Rapide Aqua é o metanol (até 50% por volume).

PL Multisolvant

As colunas do PL Multisolvant são fornecidas em tetra-hidrofurano estabilizado e podem ser transferidas diretamente a solventes orgânicos, ou água pura, e finalmente ao tampão. O tetra-hidrofurano instabilizado (por exemplo, para cromatografia líquida de alto desempenho) não é recomendado como eluente devido ao ataque do peróxido nos géis. Os eluentes tamponados na faixa de pH de 2 – 8,5 (de força iônica alta e baixa) podem ser usados. Ao transferir de um eluente a outro, a compatibilidade e a solubilidade dos sais ou aditivos devem ser verificadas para evitar a precipitação on-column, o que danificaria a coluna de forma irreversível. Os solventes orgânicos polares, como dimetilformamida, dimetilsulfóxido ou acetamida dimetil não são recomendados como eluentes.

Colunas orgânicas (PLgel; PlusPore; PL Rapide)

Coluna fornecida em etilbenzeno

Transferência para solventes de baixa viscosidade p. ex., THF, Clorofórmio, Diclorometano	Transferência para solventes de viscosidade média p. ex., Tolueno, DMF, DMSO, HFIP	Transferência para solventes de alta viscosidade p. ex., TCB, m-Cresol, NMP
Lavar coluna com acetona a 0,5 ml/min para 2 volumes de coluna	Lavar coluna com acetona a 0,5 ml/min para 2 volumes de coluna	Configurar o forno da coluna com fluxo de 50 °C a 0,1 ml/min
Lavar o novo eluente a 0,5 ml/min para 2 volumes de coluna	Lavar o novo eluente a 0,2 ml/min para 2 volumes de coluna	Lavar a coluna diretamente com o novo eluente** a 50 °C a 0,1 ml/min para 2 volumes de coluna
Aumentar a temperatura da coluna para 30 - 40 °C* conforme a análise exigir a 1 °C/min	Aumentar a temperatura da coluna para 50 - 80 °C* conforme a análise exigir a 1 °C/min	Aumentar a temperatura da coluna para 100 - 220 °C* conforme a análise exigir a 1 °C/min
Operar a coluna em novo eluente na vazão requerida	Operar a coluna em novo eluente na vazão requerida	Operar a coluna em novo eluente na vazão requerida

*Sempre verifique se a temperatura operacional está, no mínimo, 10 °C abaixo do ponto de ebulição do solvente. **Sempre verifique a miscibilidade. Se não tiver certeza, use acetona em temperatura ambiente.

Colunas polares e aquosas (PolarGel, PL aquagel-OH, PL Rapide Aqua)

Coluna fornecida em água contendo 0,02% NaN₃

Transferência para aquosa p. ex., Água, Tampão	Transferência para orgânica polar** p. ex., DMSO, DMF	Transferência para sistemas de solventes mistos p. ex., Água/THF*, Água/metanol*
Lavar coluna com água pura a 1,0 ml/min para 2 volumes de coluna	Lavar coluna com água pura a 1,0 ml/min para 2 volumes de coluna	Lavar coluna com água pura a 1,0 ml/min para 2 volumes de coluna
Lavar com novo tampão a 1,0 ml/min para 2 volumes de coluna	Lavar com acetona a 0,5 ml/min para 2 volumes de coluna	Lavar com novo eluente pré-misturado a 0,2 ml/min para 2 volumes de coluna
Operar a coluna em novo eluente a um máximo de 50 °C, usando a vazão requerida	Lavar o novo eluente a 0,2 ml/min para 2 volumes de coluna	Aumentar a temperatura* da coluna conforme a análise exigir a 1 °C/min
Operar a coluna em novo eluente na vazão requerida	Aumentar a temperatura da coluna para 50 - 80 °C* conforme a análise exigir a 1 °C/min	Operar a coluna em novo eluente na vazão requerida
	Operar a coluna em novo eluente na vazão requerida	

*Sempre verifique se a temperatura operacional está, no mínimo, 10 °C abaixo do ponto de ebulição do solvente. ** Somente Polargel

Colunas de múltiplos solventes (PL Multisolvant)

Coluna fornecida em tetra-hidrofurano contendo 0,015% BHT

Transferência para aquosa p. ex., Água, Tampão	Transferência para orgânica p. ex., Clorofórmio*, Diclorometano*
Lavar coluna com água pura a 1,0 ml/min para 2 volumes de coluna	Lavar com novo eluente a 0,5 mL/min para 2 volumes de coluna
Lavar com novo tampão a 1,0 ml/min para 2 volumes de coluna	Aumentar a temperatura da coluna conforme a análise exigir a 1 °C/min
Aumentar a temperatura da coluna conforme a análise exigir a 1 °C/min	Operar a coluna em novo eluente usando a vazão requerida
Operar a coluna em novo eluente usando a vazão requerida	

*Garanta sempre que a temperatura de operação esteja, no mínimo, 10 °C abaixo do ponto de ebulição do solvente.

Figura 3. Guia de transferência de eluente

Especificações e testes de colunas

Cada coluna é fornecida com certificado de teste que indica as condições do teste e o desempenho da coluna. As medições de desempenho da coluna estão descritas abaixo:

Eficiência (1/2 ht) (pratos/m)	N = 5,54	$\left[\frac{t}{W_{1/2}} \right]^2 / L$
Eficiência (5σ) (pratos/m)	N = 25	$\left[\frac{t}{W_{5\sigma}} \right]^2 / L$
Simetria	a/b	

“t” é o tempo de eluição de pico, “W1/2” é a largura (width) de pico a altura de meio pico, “W5σ” é a largura (width) de pico a 4,4% da altura de pico, “L” é o comprimento (length) da coluna em metros e “a” e “b” são as larguras de pico das laterais perpendiculares medidas a 10% da altura de pico.

A eficiência da coluna depende de muitos fatores experimentais (volume morto do sistema, eluentes, vazão, ponta de teste, temperatura e assim por diante), e os resultados do teste podem diferir daqueles citados no certificado da coluna, devido à variabilidade nesses parâmetros. Os efeitos do alargamento de banda são mais severos quando se utiliza colunas GPC/SEC com diâmetro interno reduzido e/ou de alta eficiência. É essencial garantir que a dispersão do sistema seja minimizada para que a potência máxima das colunas Agilent seja obtida.

Recomendamos medir o desempenho quando o conjunto de colunas for utilizado pela primeira vez e em intervalos regulares posteriormente. Considere substituir as colunas quando a eficiência cair para menos de 80% do valor inicial.

Tabela 3. Especificações de coluna

Coluna	Pressão operacional típica psi (bar) ¹	Pressão operacional máxima psi (bar)	Temperatura operacional máxima °C ²
PLgel 3 µm	750 (50)	2.700 (180)	110
PLgel 5 µm	450 (30)	2.200 (150)	150
PLgel 9 & 10 µm	150 (10)	2.200 (150)	220
PLgel 20 µm	50 (3)	2.200 (150)	220
PLgel Olexis	90 (6)	2.250 (150)	220
PLgel Prep 10 µm	350 (25)	2.200 (150)	150
PolyPore	450 (30)	2.200 (150)	160
ResiPore	750 (50)	2.700 (180)	120
MesoPore	750 (50)	2.700 (180)	120
OligoPore	450 (30)	1.500 (100)	120
PL Rapide-F	350 (25)	1.500 (100)	150
PL Rapide-L	225 (15)	1.100 (75)	150
PL Rapide-M	75 (5)	1.100 (75)	220
PL Rapide-H	75 (5)	1.100 (75)	220
PolarGel	450 (30)	1.600 (112)	80
PL aquagel-OH 5 µm	900 (60)	1.600 (112)	90
PL aquagel-OH 8 µm	450 (30)	1.600 (112)	90
PL aquagel-OH 15 µm	150 (10)	1.600 (112)	90
PL Rapide Aqua	225 (15)	1.600 (112)	90
PL Multisolvant (Água)	1450 (100)	1.600 (112)	80
PL Multisolvant (Orgânica)	750 (50)	1.600 (112)	80

¹Com base em THF (colunas orgânicas) ou H₂O (colunas aquosas) a 20 °C, 4,6 mm de diâmetro interno a 0,3 ml/min, 7,5 mm de diâmetro interno a 1,0 ml/min, 10 mm de diâmetro interno a 1,8 ml/min (2 ml/min para PL Rapide 10 x 100 mm) e 25 x 300 mm a 10 ml/min.

²Em temperaturas muito altas, é provável que a vida útil da coluna seja reduzida. OligoPore e PL Rapide-F podem mostrar deterioração da vida útil em >80 °C, enquanto que PL Multisolvant pode degradar a > 50 °C. Altere as vazões e temperaturas de forma correspondente.

Armazenamento

Ao remover a coluna do sistema, os conectores terminais deverão ser substituídos para evitar que a coluna seque com a evaporação, uma vez que é possível que ocorra encolhimento subsequente do gel e ruptura do pacote. Os conectores terminais precisam ser apertados apenas manualmente. Todos os eluentes mencionados anteriormente são apropriados para armazenamento, mas os solventes halogenados e o THF não estabilizado não devem ser usados.

Para armazenamento de colunas aquosas a longo prazo, lave-as com água e armazene-as em água contendo 0,02% de azida de sódio.

Garantia

As colunas são cobertas por garantia de 90 dias após a entrega. Para colunas usadas a ou acima de 170 °C, o período de garantia é reduzido para 30 dias. A Agilent Technologies não se responsabiliza por manuseios inapropriados e por uso de colunas acima de pressão e temperatura operacionais máximas (veja a Tabela 3) e anula a garantia. Para ler a declaração completa de garantia, solicite as Condições Gerais de Venda da Agilent.

Manutenção

Pode ocorrer redução no desempenho da coluna como resultado de danos ao leito empacotado ou como resultado de obstruções nas fritas da coluna. No caso de obstruções na frita, a coluna pode ser submetida a retrolavagem por 1 minuto na vazão recomendada para que seja removido o material solto. Se ainda houver obstruções na coluna mesmo após a retrolavagem, a frita na entrada da coluna poderá ser substituída de acordo com o procedimento abaixo.

Procedimento de substituição da frita

1. Vede a conexão terminal na saída da coluna. Fixe a coluna verticalmente com a extremidade de entrada na parte mais elevada. Desrosqueie a conexão terminal na entrada da coluna e remova-a com cuidado. (Para colunas aquosas, lave o eluente com água antes do procedimento.)
2. Após remover os géis da conexão terminal, remova a frita, a vedação e o espalhador com a ferramenta de remoção de fritas e lave a conexão terminal para remover todos os traços de gel. Em seguida, coloque a frita, a vedação e o espalhador novos na parte inferior da conexão terminal e verifique se estão encaixados adequadamente.
3. Pode ser que um pouco de gel (até 2 mm) se espalhe pela coluna. Usando uma espátula, coloque uma quantidade pequena de gel de reparo no topo da coluna e adicione solvente suficiente para unir as partículas de gel.
4. Segure a coluna em um ângulo de 45°, apontando-a para baixo, e recoloque toda a conexão terminal, frita, vedação e espalhador, de volta na coluna. Dê uma volta na conexão terminal para apertá-la manualmente.
5. Faça a retrolavagem da coluna com eluente a 0,5 ml/min para remover o ar preso. Verifique a presença de partículas de gel no eluente caso a frita não se encaixa corretamente. Restaure as condições de fluxo normal da coluna e verifique queda de pressão e eficiência da coluna.

A Agilent recomenda que as colunas de preparação sejam devolvidas à Agilent para instalação de fritas de substituição ou reparos, contudo, um procedimento similar ao mencionado acima pode ser aplicado, se necessário. Para obter assistência técnica ou para usar o serviço de reparo de colunas, entre em contato com a Agilent Technologies.

Agilent Ordering Information

For more information on our products, visit our website at www.agilent.com/chem/gpcsec

For technical support, visit www.agilent.com/chem/techsupport

For your nearest Agilent office or distributor, visit www.agilent.com/chem/contactus

To place an order, visit www.agilent.com/chem/store

Agilent offers a complete line of sample preparation products to support LC and LC/MS applications.

The Agilent Bond Elut and Captiva Sample Prep family of products offer the largest choice of formats and widest range of solutions available in the market today.

Learn more at www.agilent.com/chem/sampleprep

Agilent オーダー情報

製品の詳細については、次の Web サイトを参照してください。
www.agilent.com/chem/gpcsec

テクニカルサポートについては、次を参照してください。
www.agilent.com/chem/techsupport

最寄りの Agilent 営業所または代理店については、次を参照してください。
www.agilent.com/chem/contactus

発注については、次を参照してください。
www.agilent.com/chem/store

アジレントでは、LC および LC/MS アプリケーションに対応したサンプル前処理製品を幅広く提供しています。

Agilent Bond Elut および Captiva Sample Prep ファミリー製品には、現在、市場で最も広範なフォーマットが用意されており、さまざまなソリューションを利用することができます。

詳細については、
www.agilent.com/chem/sampleprep を参照してください。

安捷伦订购信息

如需了解有关产品的更多信息, 请访问
www.agilent.com/chem/gpcsec

如需获得技术支持, 请访问
www.agilent.com/chem/techsupport

如需查找当地的安捷伦客户服务中心, 请访问
www.agilent.com/chem/contactus

如需订购, 请访问
www.agilent.com/chem/store

安捷伦提供支持 LC 和 LC/MS 应用的完整样品前处理产品系列。

Agilent Bond Elut 和 Captiva 样品前处理产品系列提供当今市场上选择最多的产品种类和应用范围最广的解决方案。

如需了解详情, 请访问
www.agilent.com/chem/sampleprep

Informações sobre pedidos à Agilent

Para mais informações sobre nossos produtos, visite o site www.agilent.com/chem/gpcsec

Para suporte técnico, visite www.agilent.com/chem/techsupport

Para saber qual é o escritório ou distribuidor Agilent mais próximo, visite www.agilent.com/chem/contactus

Para fazer pedidos, visite www.agilent.com/chem/contactus

A Agilent oferece uma linha completa de produtos de preparação de amostras que dão suporte às aplicações em LC e LC/MS.

A linha de produtos Agilent de preparação de amostras Bond Elut e Captiva oferece uma ampla gama de opções de formatos e as mais diversificadas soluções disponíveis no mercado hoje.

Saiba mais em www.agilent.com/chem/sampleprep



© Agilent Technologies, Inc. 2017, 2018
Published in the UK, August 3, 2018
Publication Number: 5991-3792EN
Part Number: 5971-6578