



## Dicas dos nossos Mestres Zen em Separação de Proteínas

# Capacidade de carga para Exclusão por Tamanho (SEC) e Fase Reversa



**Chad Eichman, Ph.D.**  
Gerente de Marketing Global BioPharma



### Como determino a capacidade de uma coluna de Exclusão por Tamanho (SEC)?

Para Exclusão por Tamanhos, há duas considerações: volume de Amostra e concentração da Amostra.

Em regra geral, não carregue mais de 5% do volume da coluna. Teoricamente uma coluna de 300 x 4,6 mm com um volume de coluna de 5 mL limitaria o volume de injeção em 200 µL. Na prática, são comuns volumes de 10 a 30 µL.

Outra consideração importante é a Concentração da Amostra; quanto mais alta for a concentração de Proteínas maior será a viscosidade da Amostra e essa diferença de viscosidade pode levar a uma distorção do Formato do Pico (seja pelos efeitos de Exclusão, seja pela interface com um Solvente, chamado de “dedilhamento viscoso” (viscous fingering em inglês, ou instabilidade de Saffman–Taylor). Um bom ponto de partida é 1 mg/mL, embora as concentrações ideais deve ser determinadas experimentalmente.

### Qual é a capacidade de carga das colunas bioZen Intact e Peptide?

Para as colunas bioZen Peptide, podem ser usadas cargas similares às de outras colunas para Cromatografia de Fase Reversa: 5~20 µg de mistura digestiva ou de Peptídeos em uma coluna de Diâmetro Interno de 4,6 mm que dará uma boa Sensibilidade (especialmente para HPLC/MS) para Separação de Peptídeos. Pode-se carregar até 50 µg de um digestivo sem aumentar de forma muito severa a largura do Pico. Para colunas com um Diâmetro Interno de 2,1 mm, a carga deve ser escalonada de acordo.

Para as colunas bioZen Intact, devido à sua superfície de contato mais baixa, o carregamento pode afetar drasticamente o Formato do Pico, e deve se determinar experimentalmente para se obter os melhores resultados. Para Diâmetro Interno de 4,6 mm, 5 µg é um bom ponto de partida. Para Diâmetro Interno de 2,1 mm, 1 µg é um bom ponto de partida. Um aumento da carga pode aumentar significativamente a cauda e a largura do Pico.

