

Desplazamiento de los tiempos de retención

El desplazamiento de los picos de HPLC es un problema que muchos cromatógrafos experimentarán de vez en cuando. Si ve un cambio en el tiempo de retención de sus picos entre ejecuciones hay una serie de cosas que puede comprobar.

1. Flujo y proporciones del disolvente

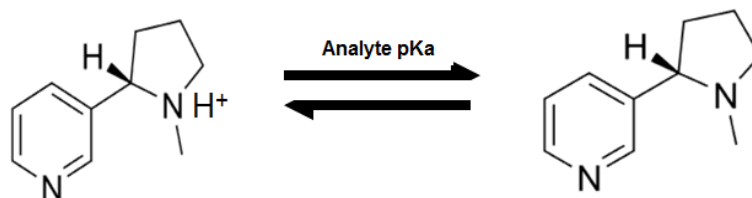
Si el marcador t_0 y el tiempo de retención de sus picos cambian es probable que sea un problema con el flujo y la bomba. Si el t_0 permanece constante pero sus picos se han movido puede indicar un cambio químico en el sistema de separación y necesita asegurar que el solvente ha sido mezclado correctamente o que el gradiente es el correcto. Si está utilizando disolventes volátiles, la proporción más volátil puede evaporarse a un ritmo más rápido, cambiando así las concentraciones relativas

2. Equilibrio incompleto de la fase estacionaria

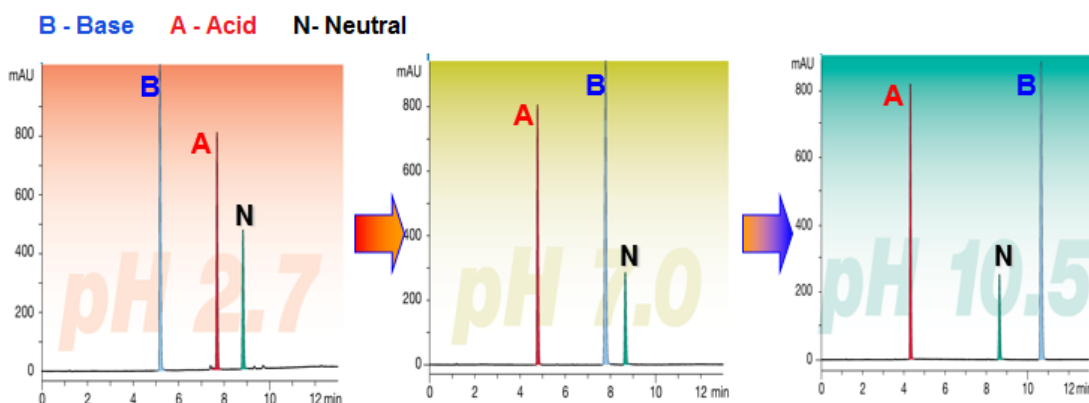
Si su separación se basa en el preacondicionamiento de cualquier naturaleza como cuando se utilizan fases HILIC o reactivos de pares de iones, debe asegurarse de que su columna está completamente equilibrada antes de cada ejecución. El equilibrio de una columna con un reactivo de pares iónicos puede tardar hasta 12 horas para asegurar que la equilibración está completa a través de toda la fase estacionaria. En gradiente, deberá asegurarse de que su columna se deja suficiente tiempo entre los programas para restablecer las condiciones iniciales de comienzo del gradiente antes de la inyección.

3. pKa de los compuestos con los que está trabajando y control de pH dentro de su fase móvil

Cuando se trabaja con analitos ionogénicos con un pKa cercano al pH de la fase móvil, está tratando con dos formas diferentes de su analito, cada una de las cuales tienen diferentes tiempos de retención y se manifiestan como 2 picos distintos en el cromatograma. Pequeñas variaciones en el pH de la fase móvil pueden cambiar la relación de ambas formas del analito y, por lo tanto, el tiempo de retención.

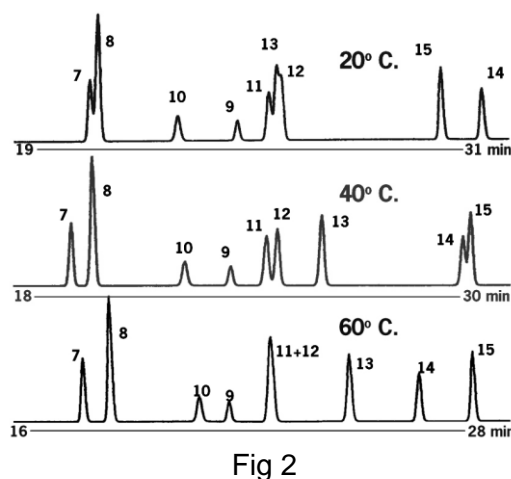
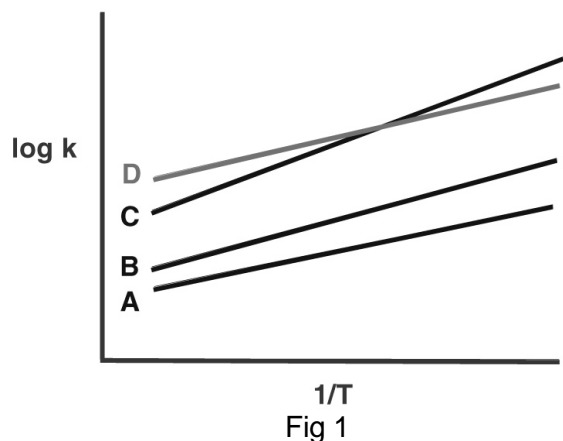


Los tiempos de retención de ácidos y bases se moverán con cambios en el pH mientras que a los componentes neutros esto no afectará.



4. Control de la temperatura en su método

La temperatura puede servir para cambiar la selectividad de los analitos, pero también la viscosidad de la fase móvil. Los compuestos ionizables son más susceptibles a esto que los neutros, sin embargo es una buena práctica mantener la temperatura constante de la columna mediante el uso de un horno de columna. Usando el log K como una medida del tiempo de retención podemos ver que algunos compuestos son más afectados por cambios en la temperatura (Fig. 1) lo que conduce a diferencias de resolución (Fig. 2)



5. Diluyente de la muestra

Si se utiliza un diluyente de muestra inadecuado puede conducir a tiempos de retención variables. Algunos ejemplos de estos son disolventes de inyección fuerte, diluyentes donde el pH no se ha ajustado para que coincida con las condiciones de fase móvil de partida y diluyentes que no contienen reactivos de pares de iones cuando se usan en métodos de pares de iones.

6. Contaminación de la fase estacionaria

Si se introduce un contaminante en una columna de HPLC que no se elimina durante el curso normal del análisis, el tiempo de más en la fase estacionaria puede acabar provocando una modificación. Con las columnas de fase reversa esto ocurre muy a menudo con contaminantes hidrófobos que no son eluidos y a su vez cambian la química superficial de la fase y dan como resultado cambios en los tiempos de retención del analito. Es importante que su perfil de fase móvil sea adecuado para eliminar todos los contaminantes en el transcurso del análisis para evitar que se acumulen.

Conclusión: La variación en los tiempos de retención pueden atribuirse a una amplia variedad de problemas; la investigación completa basada en los síntomas es fundamental para desarrollar un método robusto y reproducible con tiempos de retención consistentes en múltiples análisis y columnas.