

## Capítulo 1

# 1.-Introducción y Consideraciones Prácticas en HPLC/UHPLC

## Objetivos:

- Introducción parámetros Test Idoneidad ("System Suitability").
- Buenas Prácticas para evitar problemas en U/HPLC.



Idea / Recomendación práctica.

TS

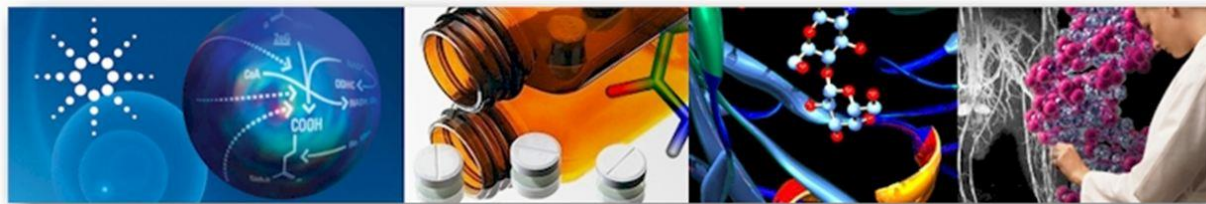
"Troubleshooting"

**Agilent, WTC-Barcelona**

Isidre Masana

Agilent Technologies

Especialista Productos UHPLC/MS



## U/HPLC MasterClass Orientado a Laboratorios de Control de Calidad.



**1220 Infinity**



**1260 Infinity**




**1290 Infinity**

## 1. Introducción y Consideraciones Prácticas en HPLC/UHPLC:

### 1.1.- Introducción teórica a los parámetros básicos en U/HPLC: cap. 1 pg. 3

- Ecuación de Van Deemter.
- Eficiencia en la separación, Resolución, Simetría, Factor de retención, Selectividad,...
- Conceptos volumen muerto del sistema, volumen de retardo.

### 1.2.- Consideraciones Prácticas y “Troubleshooting” en U/HPLC: cap. 1 pg. 22

- Preparación y Selección de la **Fase Móvil**.
- **Acondicionamiento** HPLC y Columna.
- Preparación de la **Muestra**. cap. 1 pg. 30
- Consideraciones en la **Inyección**.
- Precauciones con la Columna.  **Charla Julian Delamata** cap. 1 pg. 37
  - Procedimientos de lavado de columna.
  - Influencia de los capilares de conexión.
- Trabajo con **Gradientes de Concentración**. cap. 1 pg. 47



# Agenda Curso U/HPLC (1/3): Capítulo 1

## 1. Introducción y Consideraciones Prácticas en HPLC/UHPLC:

### 1.1.- Introducción teórica a los parámetros básicos en U/HPLC.

- Ecuación de Van Deemter.
- Eficiencia en la separación, Resolución, Simetría, Factor de retención, Selectividad,.
- Conceptos volumen muerto del sistema, volumen de retardo,....

### 1.2.- Consideraciones Prácticas y “Troubleshooting” en U/HPLC:

- Preparación y Selección de la Fase Móvil.
- Acondicionamiento HPLC y Columna.
- Preparación de la Muestra.
- Consideraciones en la Inyección.
- Precauciones con la Columna.
  - Procedimientos de lavado de columna.
  - Influencia de los capilares de conexión.
- Trabajo con Gradientes de Concentración.
- Consideraciones en la Detección.



Agilent 1200 Infinity Series

Infinitely better

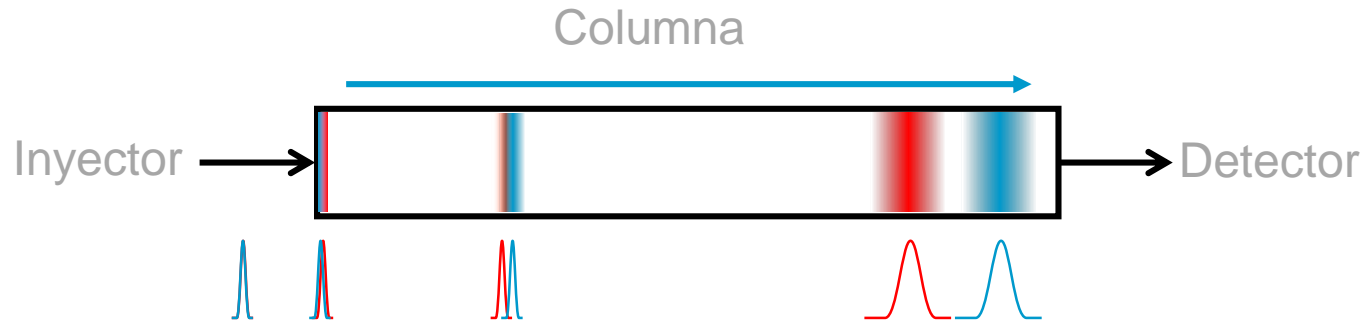


1220  
Infinity LC

1260  
Infinity LC

1290  
Infinity LC

# Introducción: el **Objetivo** de la Cromatografía



Conseguir separar todos los componentes de la muestra con la **mínima dispersión de la banda cromatográfica**, para conseguir la **máxima eficacia** y capacidad de separación de picos cromatográficos.

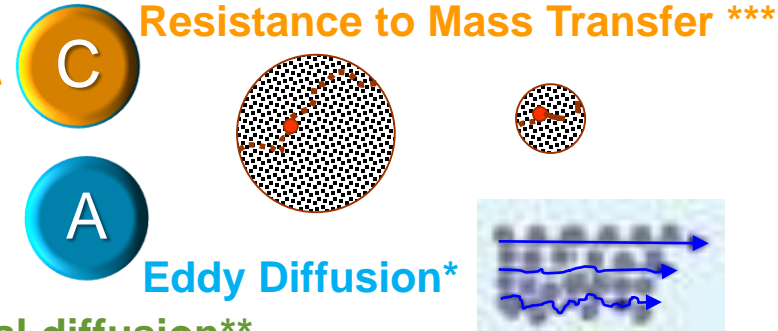
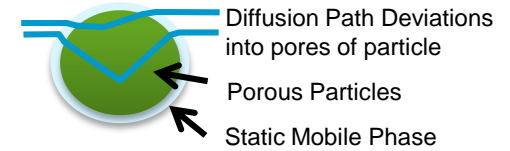
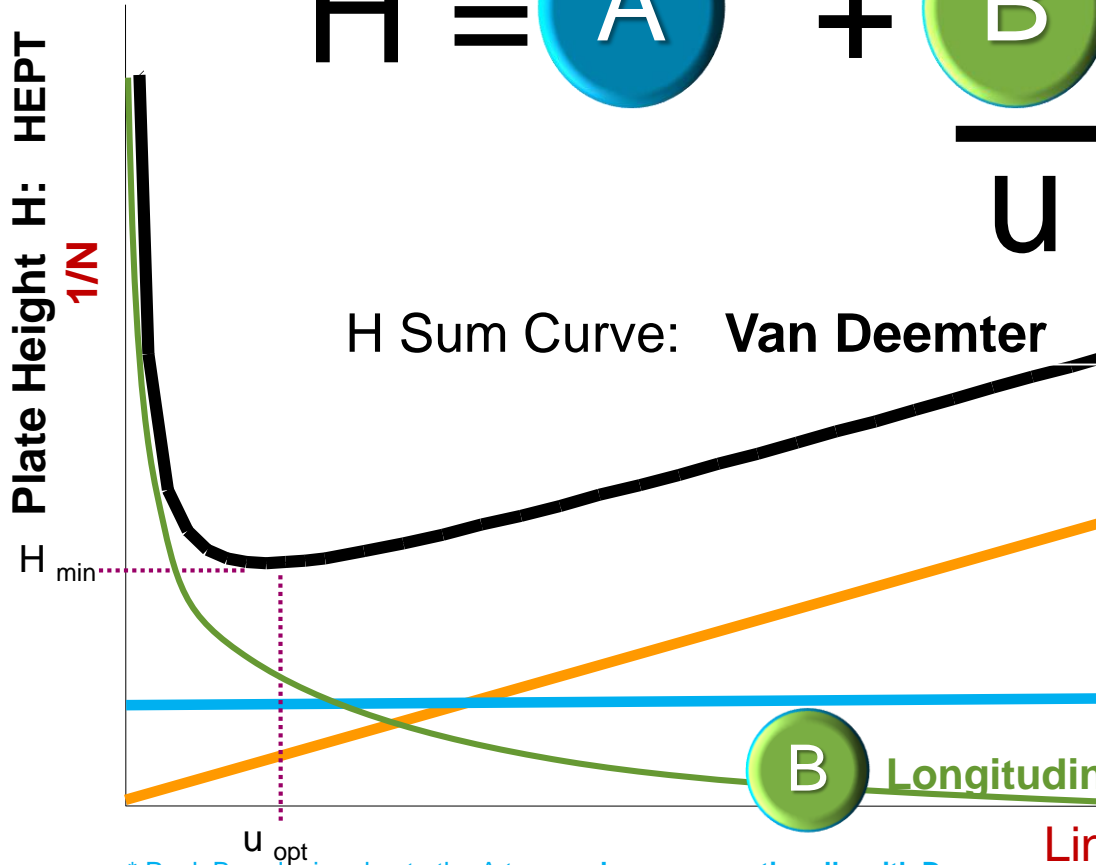
- La eficacia se mide en platos teóricos (“nº de saltos” del analito entre fase móvil y fase estacionaria).
- La eficacia de la columna está relacionado con el concepto de Altura Equivalente de Plato Teórico (HEPT o H):  $H_{mm} = L_{mm}/N$  (mm columna necesarios para 1 “salto” del analito entre fase móvil y fase estacionaria).

# Optimización del Flujo de Fase Móvil. Ecuación

## Van Deemter: Inverso Eficacia “ vs” Flujo

$$H = A + \frac{B}{u} + C u$$

H Sum Curve: Van Deemter



Different Paths, Particle Size Distribution, Packing Quality,...

\* Peak Broadening due to the A term reduces proportionally with  $D_p$

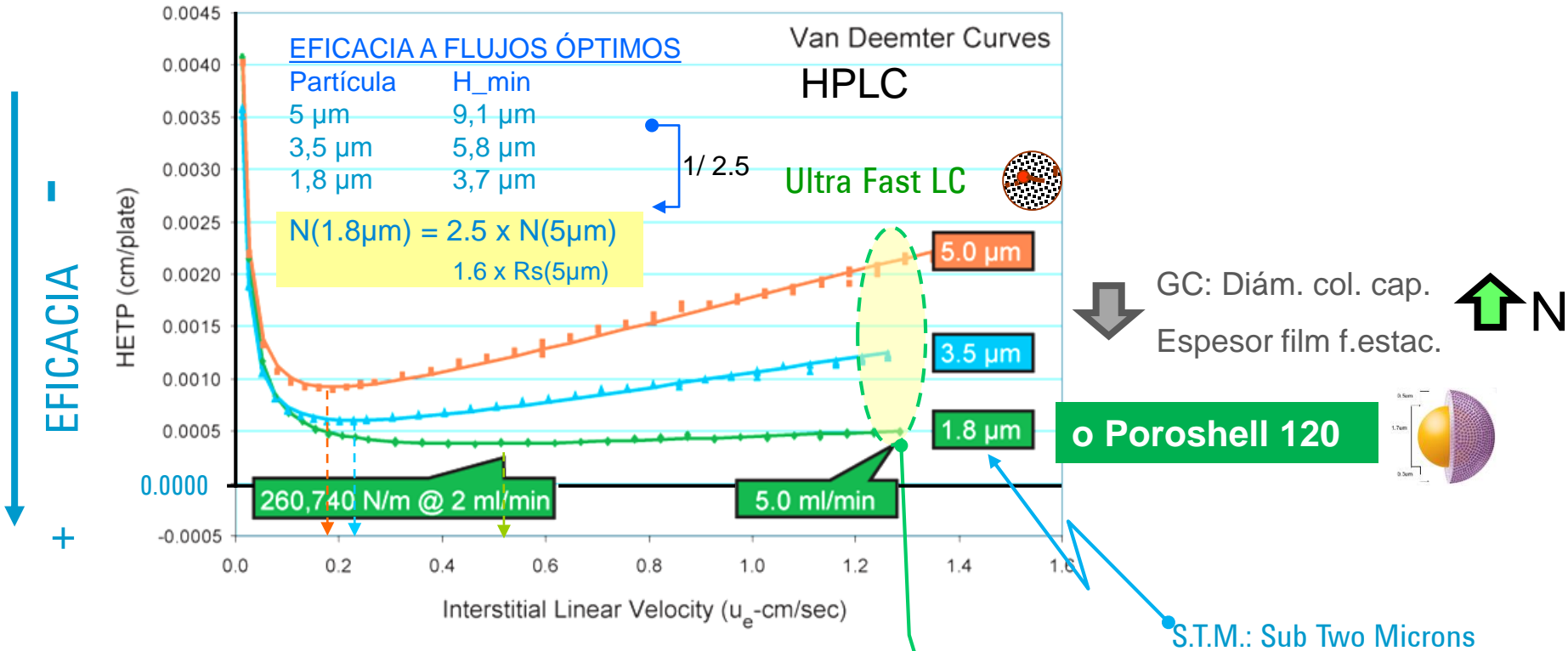
\*\* Peak Broadening due to the B: at low velocity, time in mobile phase is longer, diffusion decreases N, increasing H. **More concentrated band of sample diffuses more rapidly** than a less concentrated band under the same conditions

\*\*\* Peak Broadening due to the C term: 1.- at higher velocity, solutes undergo fewer transitions, N is smaller, H is larger  
2.- reduces proportionally with  $D_p^2$

# Efecto del Tamaño de Partícula en la Eficacia.

## HPLC vs UHPLC: Gráfico Van Deemter

/ Diámetro Columna & Espesor Film (GC)



Columnas: ZORBAX Eclipse XDB-C18  
Dimensiones: 4,6 x 50 mm (30 mm, 1,8 μm)  
Eluyente: 85:15 ACN: Agua - **ISOCRÁTICO**  
Velocidades de flujo: 0,05 – 5,0 mL/min  
Temp: 20°C  
Muestra: 1,0 μL octanofenona en eluyente

**HPLC:EFICACIA A FLUJOS ALTOS:**  
Partículas 1,8 μm a 5ml/min\* dan más eficacia

$N(1.8\mu m) = 2.5 \times N(3.5\mu m) = 4 \times N(5\mu m)$

\* 5ml/min con columnas 4.6mm - 1ml/min con columnas de 2.1mm D.I.

# Cálculo de la Eficacia (nº de Platos Columna)

Condiciones Isocráticas (o Isotermas en GC)

## Método a mitad de la altura

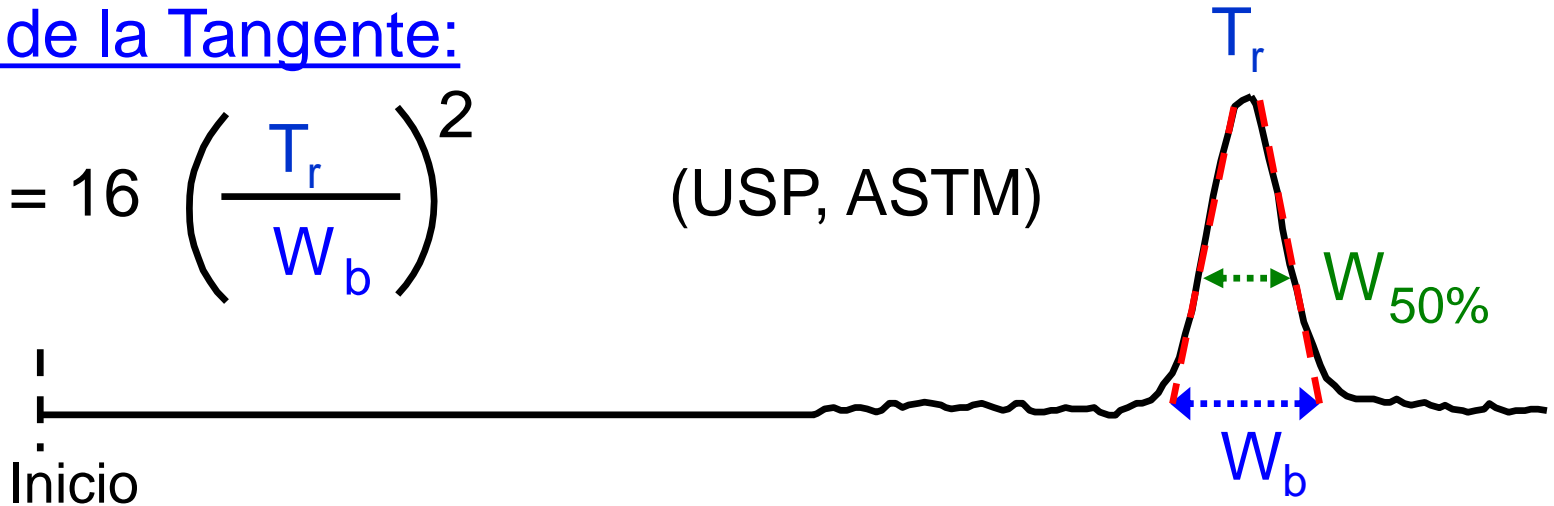
$$N = 5.545 \left( \frac{T_r}{W_{50\%}} \right)^2$$

European Pharmacopoeia (EUP)

## Método de la Tangente:

$$N = 16 \left( \frac{T_r}{W_b} \right)^2$$

(USP, ASTM)



**Picos +Finos** (menor difusión) → **+Eficacia**

# ¿Cómo se relaciona Resolución (R) y Eficacia (N)?

## ISOCRÁTICO:

$$R_s = 0.25 N^{1/2} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k}{k+1} \right)$$

OBJETIVO  $R_s > 1.5 (2)^*$   
 $1 < k < 10$

$$N = f(L / 2d_p)$$

**EFICACIA**  $\sqrt{\phantom{x}}$

- Tamaño Partícula del Relleno
- Longitud de la Columna
- Excesivos Volúmenes Muertos (-)
- Flujo

**SELECTIVIDAD**

- Fase Estacionaria y Soporte
- pH Fase Móvil (si pH próximo a pK)
- Modificador Orgánico y su %
- Aditivos Fase Móvil
- Temperatura

**RETENCIÓN**

Poder Eluotrópico Eluyente  
% modificador Orgánico

Para mejorar resolución de picos con  $k > 5$  mejor aumentar long. columna. Para  $k < 2$  reducir "poder eluotropico" del eluyente

| k'  | k'/k'+1 | T. análisis          |
|-----|---------|----------------------|
| 0,2 | 0,17    | 1.2 x T <sub>0</sub> |
| 0,5 | 0,33    | 1.5 x T <sub>0</sub> |
| 1   | 0,50    | 2 x T <sub>0</sub>   |
| 2   | 0,67    | 3 x T <sub>0</sub>   |
| 3   | 0,75    | 4 x T <sub>0</sub>   |
| 4   | 0,80    | 5 x T <sub>0</sub>   |
| 5   | 0,83    | 6 x T <sub>0</sub>   |
| 10  | 0,91    | 11 x T <sub>0</sub>  |
| 20  | 0,95    | 21 x T <sub>0</sub>  |

| Parámetro Modificado | % Mejora Resolución | Incremento Tiempo Análisis |
|----------------------|---------------------|----------------------------|
| Long. x 2            | 40%                 | x 2                        |
| k: 0.5 → 2           | 100%                | x 2                        |
| k: 5 → 10            | 10%                 | x 2                        |

El incrementar la retención por encima de  $K'=5$  apenas mejorará la resolución.

$$R_s = 2 (T_1 - T_2) / (W_{b1} + W_{b2}) \quad N = 5.54 (T_r / w_{50\%})^{1/2}$$

$$\alpha = (T_2 - T_0) / (T_1 - T_0) \quad k = (T_r - T_0) / T_0 \quad (\text{antiguamente } K')$$

\* Para picos de tamaños muy distintos se recomienda  $R_s > 2$

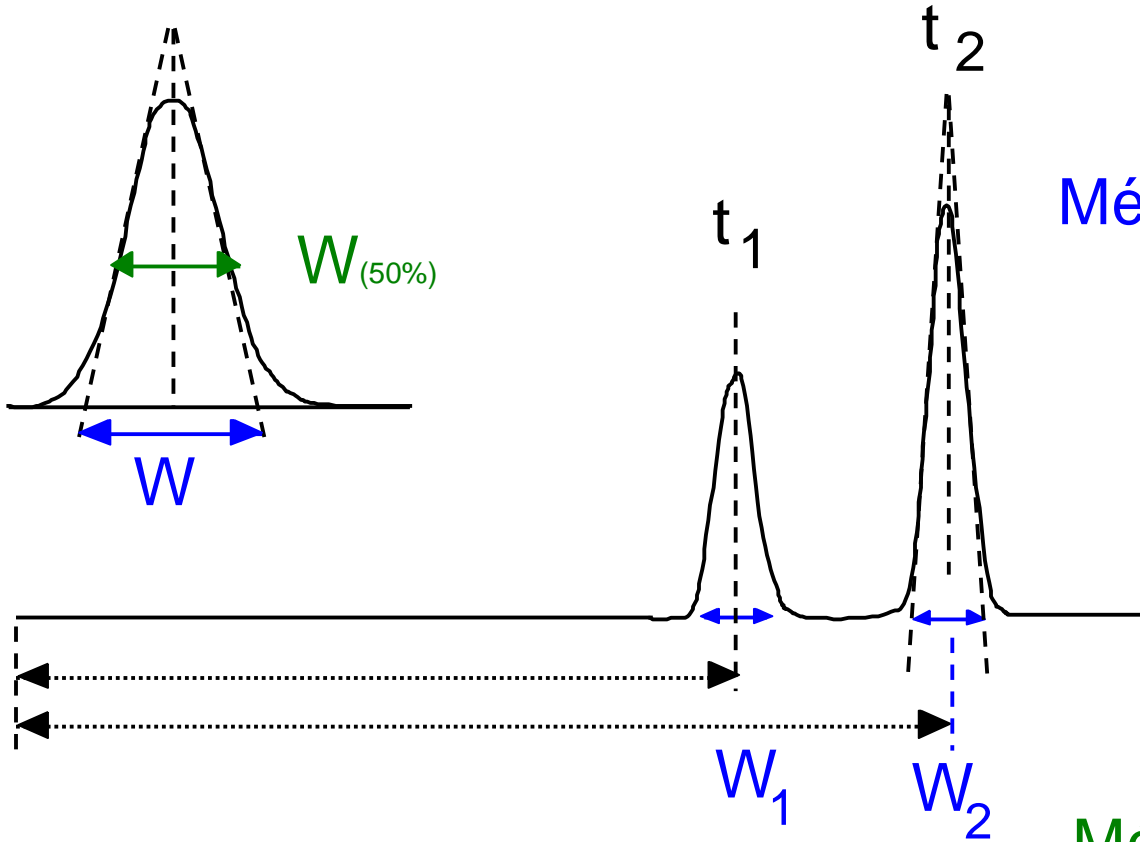
$$R_s = f(k / [k+1])$$



DISMINUCION 10% ORGANICO ==>  $k_2 = (2 \text{ ó } 3) \times k_1$   
 Log k = aprox  $f_{\text{lineal}}(\% \text{orgánico})$



# ¿Cómo se Calcula la Resolución?



Método de la tangente (USP)

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_2 + W_1}$$

Método a mitad altura (EUP):

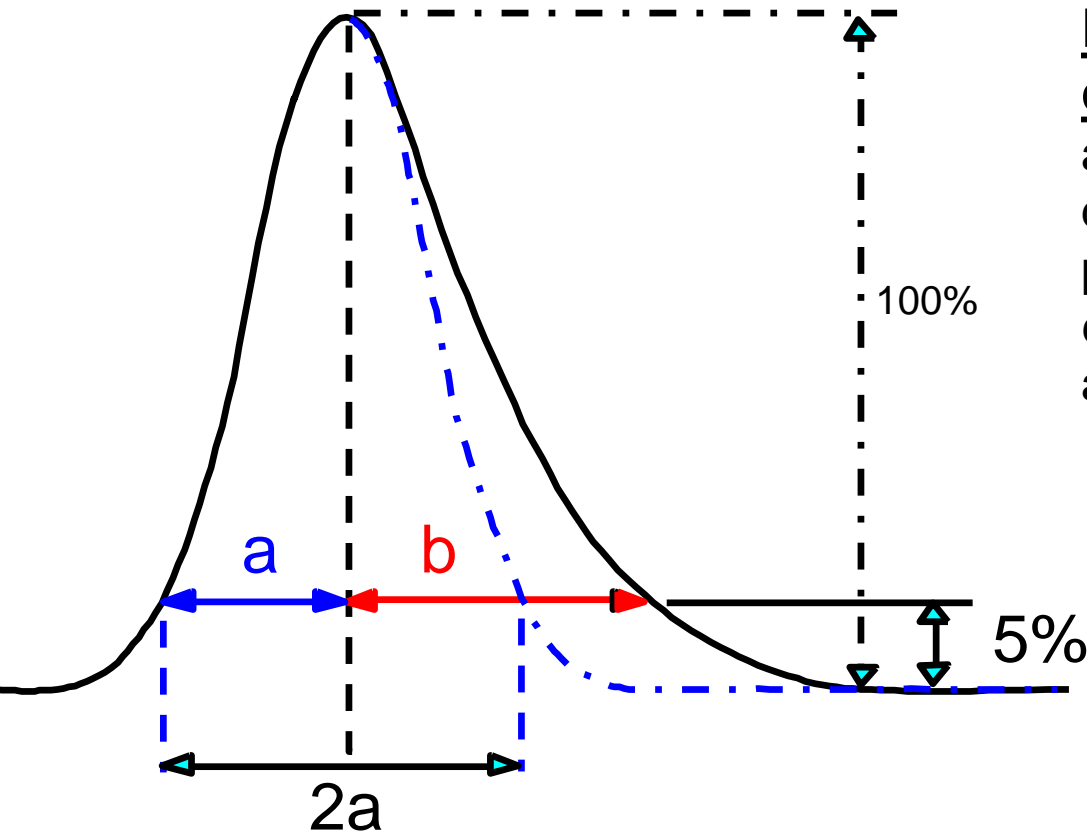
$$R_s = \frac{1.18(t_2 - t_1)}{W_{(50\%)}_1 + W_{(50\%)}_2}$$

$t$  = tiempo de elución

$W$  = anchura del pico en la base o al 50%

La resolución se mide como parte del test de idoneidad (USP)

# Otros Parámetros Cromatográficos: ¿Cómo se Calcula el Factor de Cola o Factor de Simetría?



**Factor de Cola (USP)/ Factor de Simetría (EUP)**: Relación de la anchura del pico, dividido por el doble de la distancia desde el máximo del pico hasta el extremo izquierdo de éste, todas ellas medidas a una altura del 5%

$$A_s = \frac{(a + b)_{5\%}}{2a}$$

- $A_s > 1.0 \rightarrow$  “tailing peak”
- $A_s < 1.0 \rightarrow$  “fronting peak”

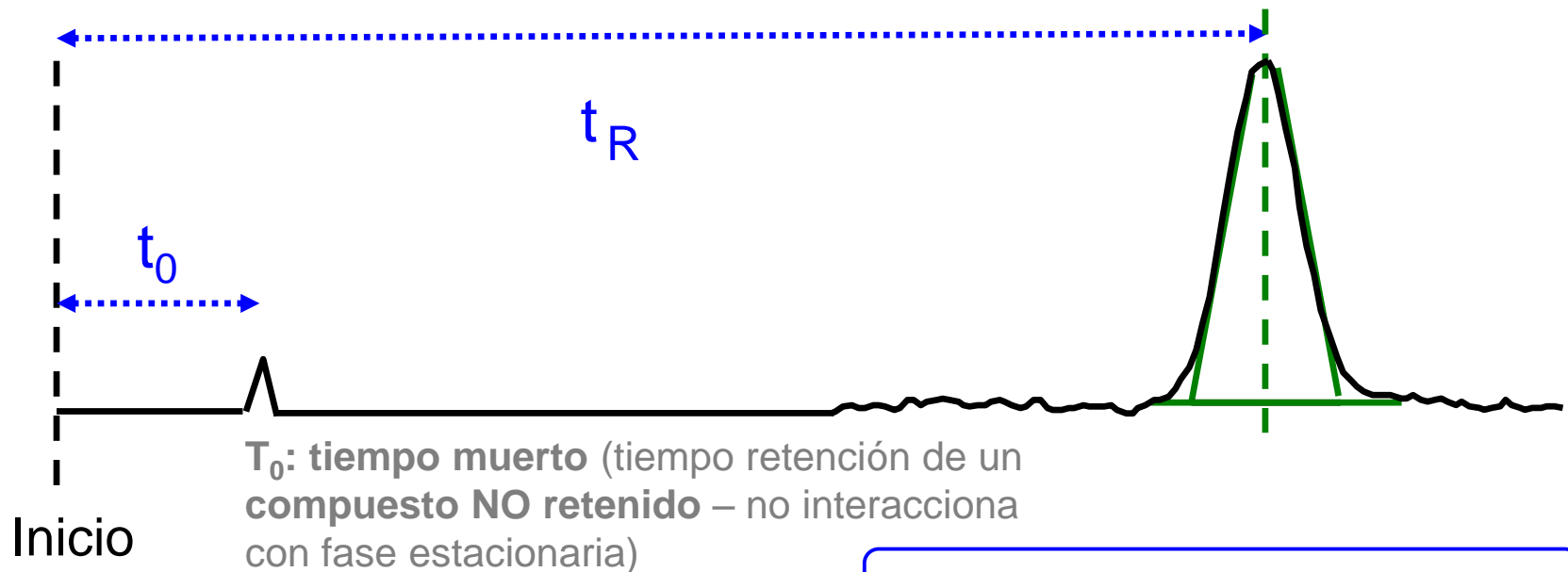
**“Factor de Asimetría”** (utilizado también en el pasado): Relación de la anchura frontal y trasera del pico, medidas a una altura del 5 o 10%

$$A = \frac{a}{b}$$

# Otros Parámetros Cromatográficos: ¿Cómo se Calcula el Factor de Retención $k$ (/Capacidad $K'$ )?

(EUP/USP/ASTM)

$$k = \frac{\text{Tiempo de analito en fase estacionaria}}{\text{Tiempo de analito en fase móvil}} = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$



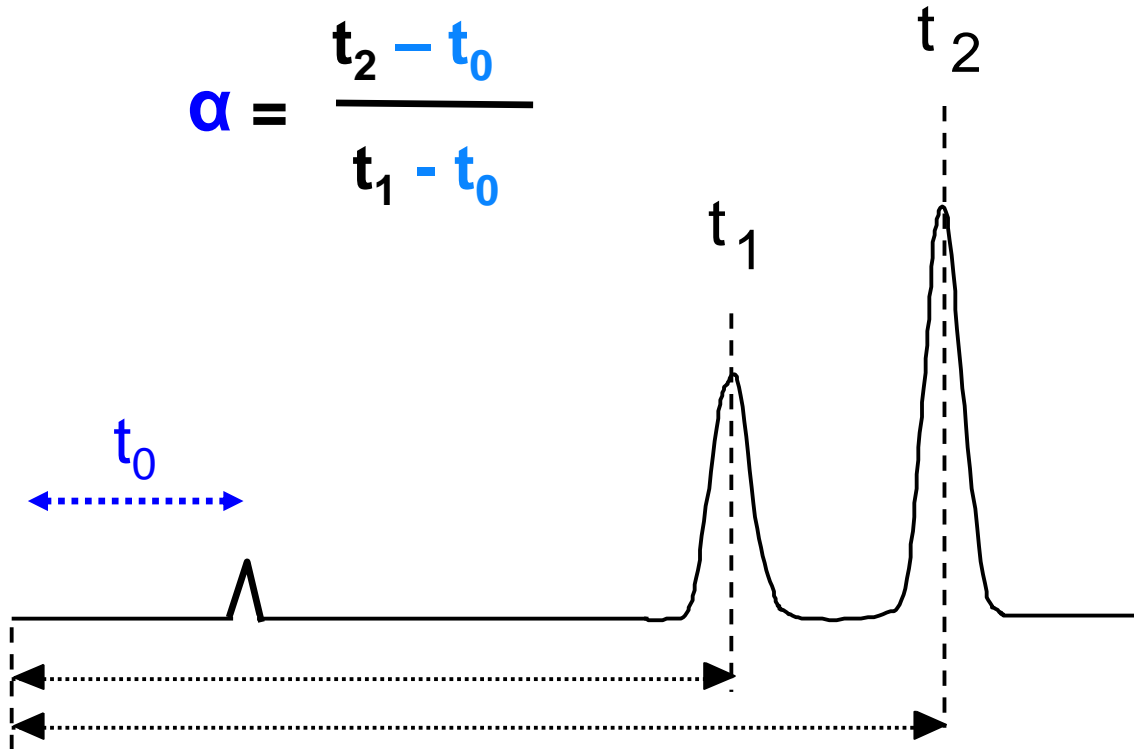
Factor Retención ( $k$ ) = antiguo Factor Capacidad ( $K'$ )

$$1 \text{ (0.5)} < k < 10\text{-}20$$

# Otros Parámetros Cromatográficos: ¿Cómo se Calcula la **Selectividad**?

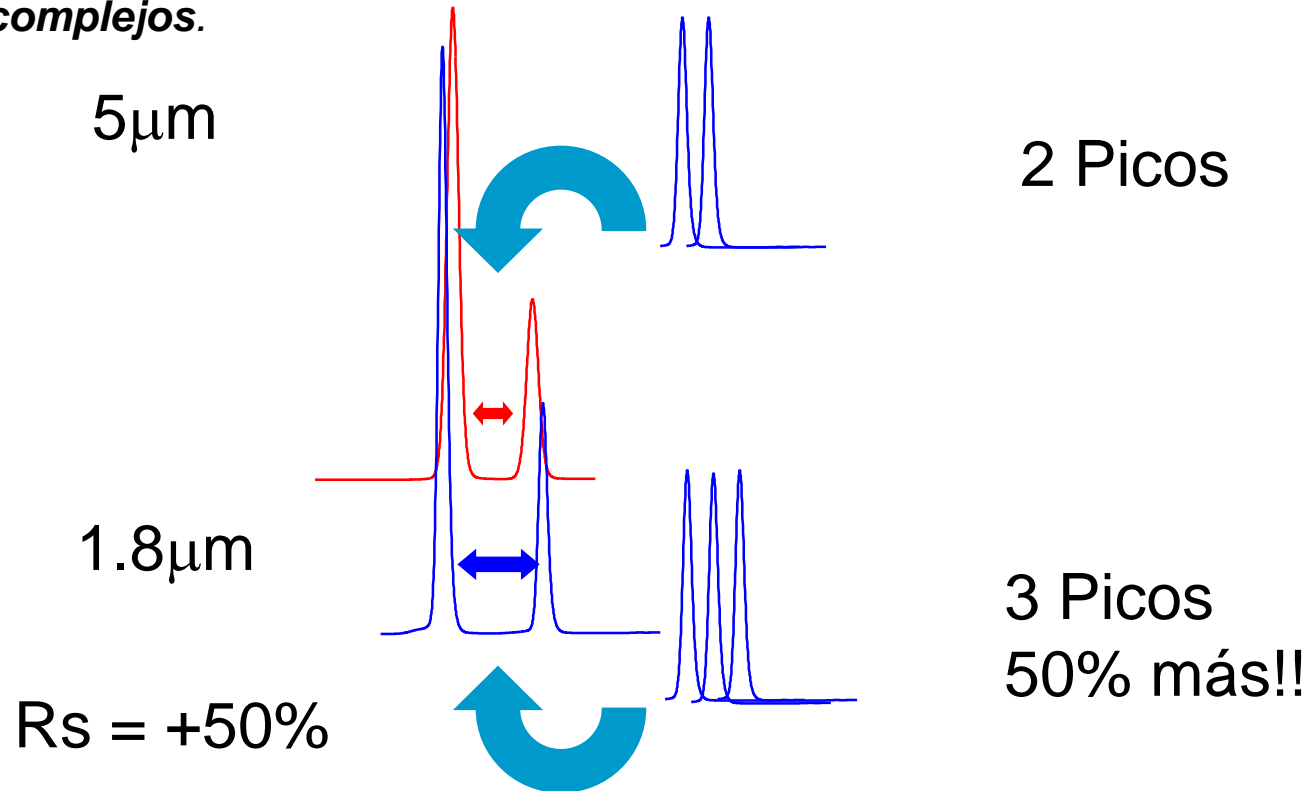
## Selectividad ( $\alpha$ )

$$\alpha = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0}$$



# “Peak Capacity”: Capacidad de Separación de Picos

- **Capacidad de pico es el número de picos que se pueden separar con una determinada resolución** (ejemplo:  $R = 1$ ), en un cierto período de tiempo para un sistema dado (longitud de columna y tamaño de partícula).
- **Capacidad pico es otra medida de la eficacia de separación y es especialmente útil para cromatogramas complejos.**



# Otros Parámetros Cromatográficos: **Cálculo de la Capacidad de Pico**

## Ecuación para **Elución Isocrática**

$$P_c = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4R_s} \ln[1+k_{last}]$$

|            |  |
|------------|--|
| $k_{last}$ | : Factor de retención para el último pico  |
| $N$        | : Eficacia   |
| $R_s$      | : Mínima Resolución Requerida<br>(Separación a línea de base $\rightarrow$ : $R_s = 1.5$ ) |
| $P_c$      | : Capacidad de Pico  |

## Ecuación para **Elución con Gradientes**

$$P_c = 1 + \frac{t_G}{\frac{1}{n} \sum_1^n w} = 1 + \frac{t_G}{W_{average}}$$

|       |                       |
|-------|-----------------------|
| $P_c$ | : Capacidad de Pico   |
| $t_G$ | : Tiempo de Gradiente |
| $w$   | : Ancho de Pico       |

*w está influenciado por N*

*N depende de la longitud de la Columna y su tamaño de partícula*

# Agenda Curso U/HPLC (1/3): Capítulo 1

## 1. Introducción y Consideraciones Prácticas en HPLC/UHPLC:

### 1.1.- Introducción teórica a los parámetros básicos en U/HPLC.

- Ecuación de Van Deemter.
- Eficiencia en la separación, Resolución, Simetría, Factor de retención, Simetría,.
- Conceptos volumen muerto del sistema, volumen de retardo,....

### 1.2.- Consideraciones Prácticas y “Troubleshooting” en U/HPLC:

- Preparación y Selección de la Fase Móvil.
- Acondicionamiento HPLC y Columna.
- Preparación de la Muestra.
- Consideraciones en la Inyección.
- Precauciones con la Columna.
  - Procedimientos de lavado de columna.
  - Influencia de los capilares de conexión.
- Trabajo con Gradientes de Concentración.
- Consideraciones en la Detección.



Agilent 1200 Infinity Series

Infinitely better



1220  
Infinity LC

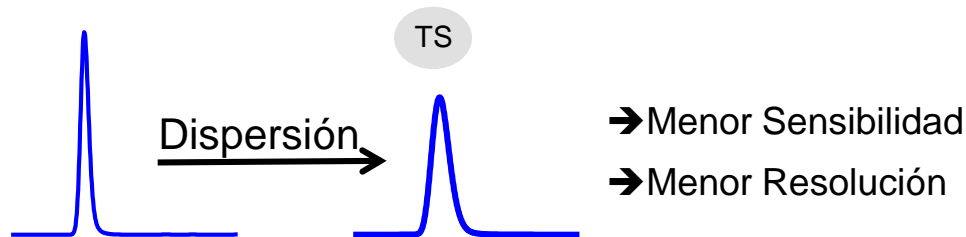
1260  
Infinity LC

1290  
Infinity LC

# Otros Parámetros Cromatográficos: **Volumen Muerto del Sistema**

## Volumen Muerto del sistema (“Dead volume”)

- Volumen /tiempo que una **muestra NO retenida** ha de recorrer **desde el inyector hasta llegar al detector**.
- $V_{0 \text{ sistema}} = V_{0 \text{ válvulas+conectores}} + V_{0 \text{ capilares}} + V_{0 \text{ columna}} + V_{0 \text{ celda detector}} (+ V_{\text{inyección}})$
- El volumen muerto contribuye a aumentar la dispersión/ensanchamiento de la banda cromatográfica → disminuirá la eficacia de la separación.
  - El volumen de inyección también contribuye a la dispersión de la muestra si el disolvente de la misma tiene poder eluotrópico (/de elución).



**Volumen muerto (conexiones + celda detector)  $\leq 0.02 \times V_{0 \text{ columna}} \leq 0.1 \times V_{\text{pico}}$**

Dispersión debida a un capilar de conexión  
Ecuación de Aris-Taylor Gleichung

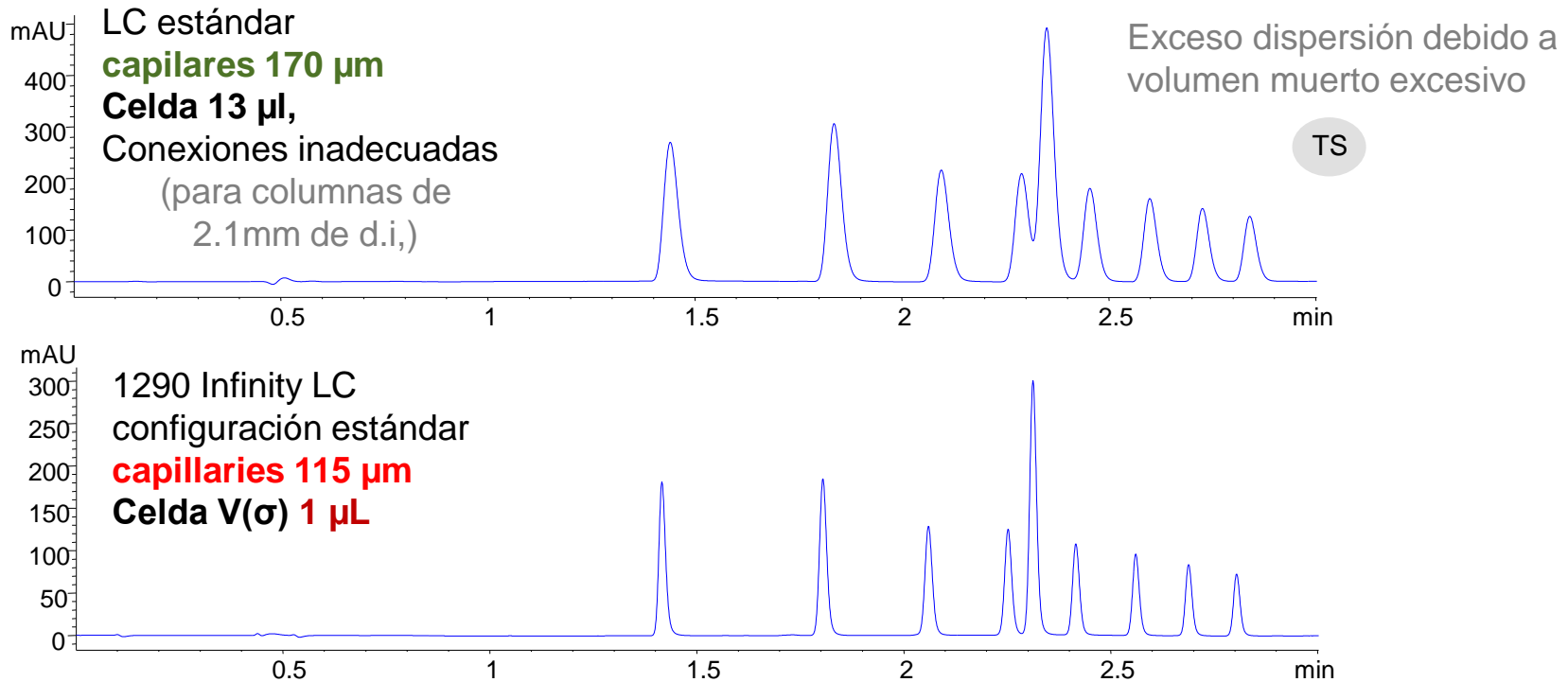
$$\sigma^2 = \frac{\pi \cdot r^4 \cdot F \cdot L}{24 \cdot D_m}$$



# Influencia del Volumen Muerto del Sistema en la Resolución

**Columnas más pequeñas y más eficientes** (d.i., L,  $\mu\text{m}$  t.part.)  $\rightarrow$  picos con menor volumen  $\rightarrow$  requieren cromatógrafos con menor volumen muerto

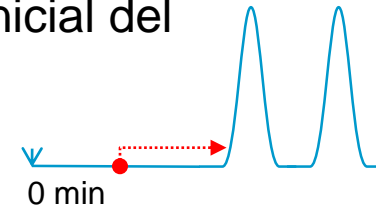
Ejemplo: **2.1 x 50 mm 1.8  $\mu\text{m}$**  (UHPLC)



# Otros Parámetros Cromatográficos: **Volumen de Retardo del Gradiente.**

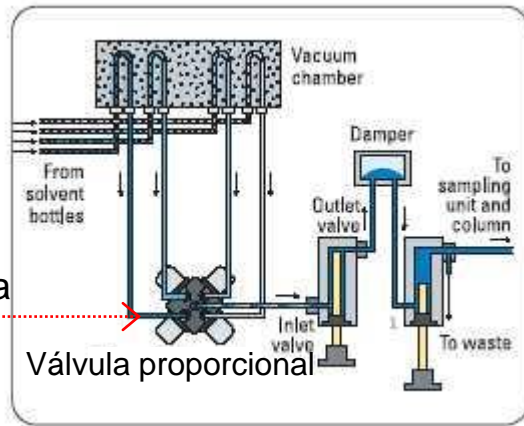
## Volumen/Tiempo de Retardo del Gradiente (“Dwell volume” or “Gradient Delay Volume”)

- Volumen /tiempo que **el gradiente** ha de recorrer **hasta llegar a la columna.**
- **Genera una etapa isocrática** (al %inicial) en la parte inicial del cromatograma (e incrementa el tiempo de análisis).
- Se recomienda **no sea superior al  $V_0$  de la columna** utilizada (como valor orientativo).



Bombas con **Mezclado a Baja Presión.**

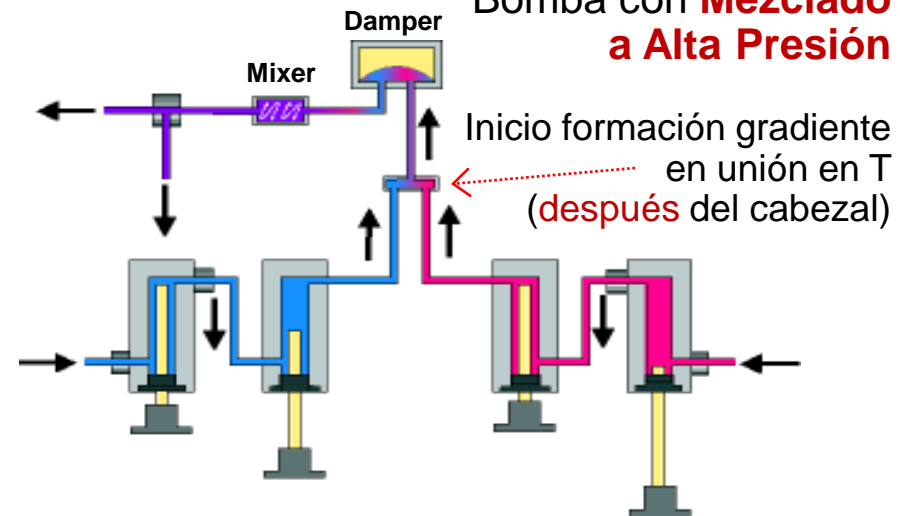
Inicio formación gradiente en válvula proporcional (antes del cabezal)



Mayor volumen de retardo – **NO configurable**

Ideal para columnas: d.i.  $\geq$  3-4.6mm

Bomba con **Mezclado a Alta Presión**



Menor volumen de retardo – **Configurable**

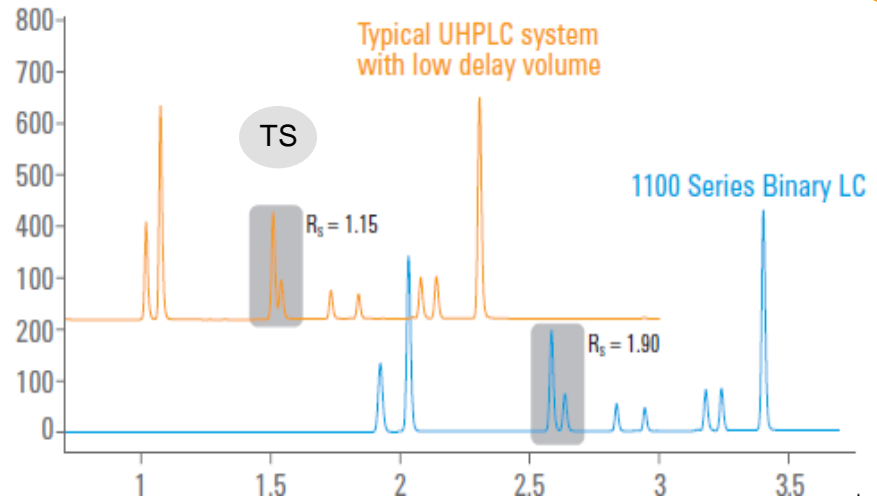
Ideal para columnas: d.i.  $\geq$  2.1-4.6mm d.i.

# Impacto del Volumen de Retardo del Gradiente en la Separación

- 1290 Intelligent System Emulation Technology (ISET)

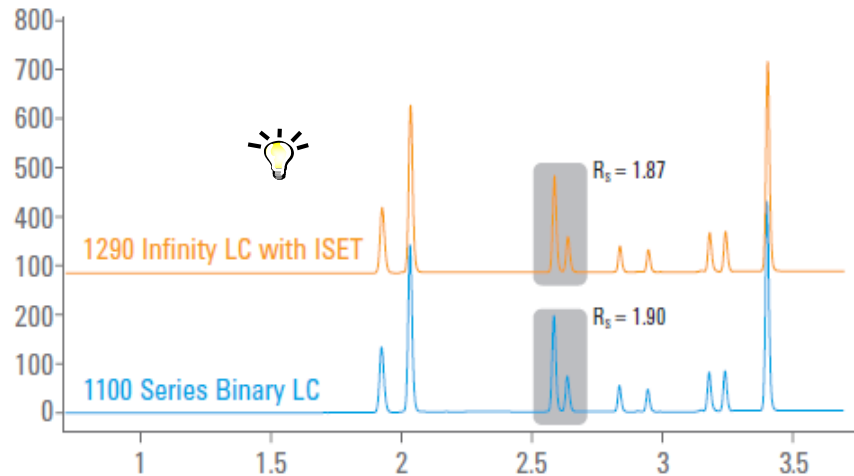
## Sin Emulación (ISET)

Tiempo de retención y resolución diferentes



## 1290 Con Emulación (ISET)

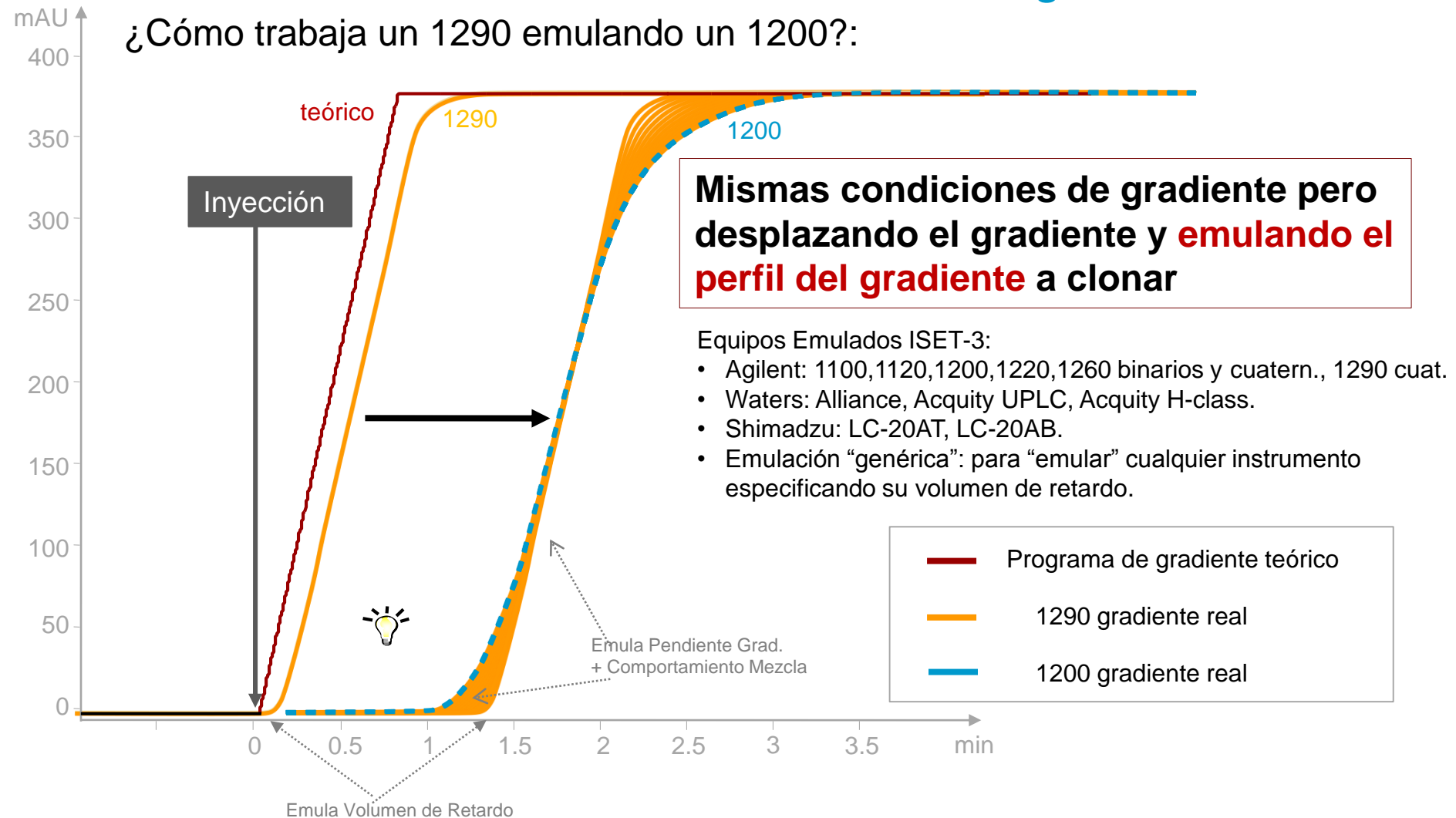
ISET permite a un 1290 emular otros Sistemas de U/HPLC para proporcionar tiempos de retención y resolución similares.



# ISET: Tecnología de Emulación Inteligente

Fruto de la mayor precisión del 1290 y su menor volumen de retardo del gradiente.

¿Cómo trabaja un 1290 emulando un 1200?:



# Conclusiones / Resumen

## Introducción Teórica a los Parámetros Básicos en U/HPLC

- **No se debe trabajar a flujos excesivamente bajos** → pérdida importante de eficacia (+incremento tiempo análisis).
- Especialmente con columnas de pequeño tamaño de partícula (<2µm / <3.5 µm) **se podrá subir el flujo sin/apenas perder eficacia** (y reduciendo tiempo de análisis).
- El **factor de retención (k)** deberá ser >1, y para una **buena resolución debería ser al menos de k >3-4**. En isocrático, **por encima de k >10 no se mejorará resolución** aumentando la retención (sólo se perderá tiempo); en este caso mejor doblar longitud de la columna, o mantenerla reduciendo su tamaño de partícula.
- Adaptar los volúmenes muertos a las dimensiones de la columna utilizada: **Volumen muerto** (conexiones + celda detector)  $\leq 0.02 \times V_{0 \text{ columna}}$

# Agenda Curso U/HPLC (1/4): Capítulo 1

## 1. Introducción y Consideraciones Prácticas en HPLC/UHPLC:

### 1.1.- Introducción teórica a los parámetros básicos en U/HPLC.

- Ecuación de Van Deemter.
- Eficiencia en la separación, Resolución, Simetría, Factor de retención, Simetría,....
- Conceptos volumen muerto del sistema, volumen de retardo..

### 1.2.- Consideraciones Prácticas y “Troubleshooting” en U/HPLC: **masterclass**

- Preparación y Selección de la **Fase Móvil**.
- **Acondicionamiento** HPLC y Columna.
- Preparación de la Muestra.
- Consideraciones en la Inyección.
- Precauciones con la Columna.
  - Procedimientos de lavado de columna.
  - Influencia de los capilares de conexión.
- Trabajo con Gradientes de Concentración.



Agilent 1200 Infinity Series

Infinitely better



1220  
Infinity LC

1260  
Infinity LC

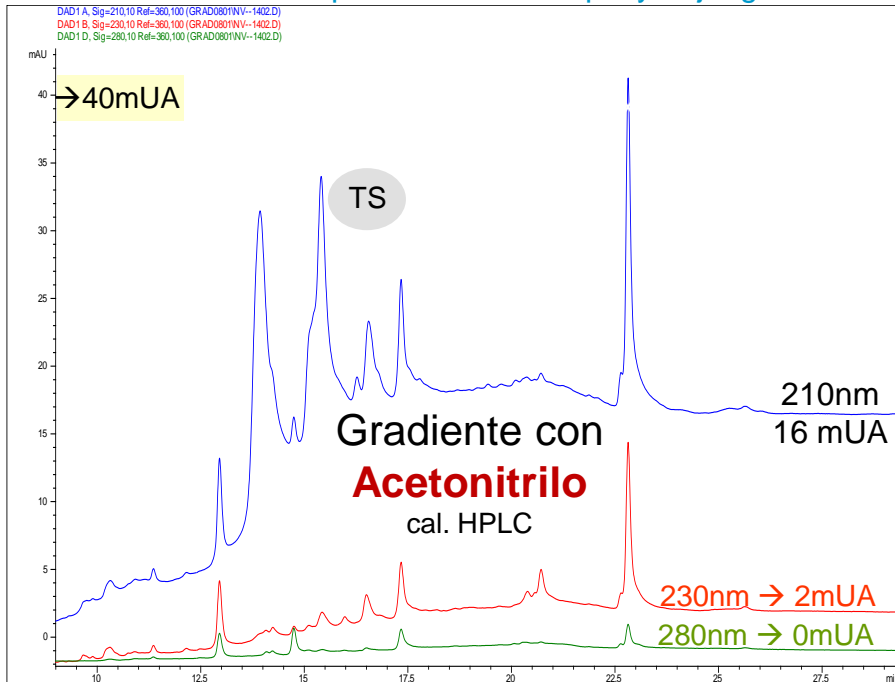
1290  
Infinity LC

10:15h. → 11:30h.

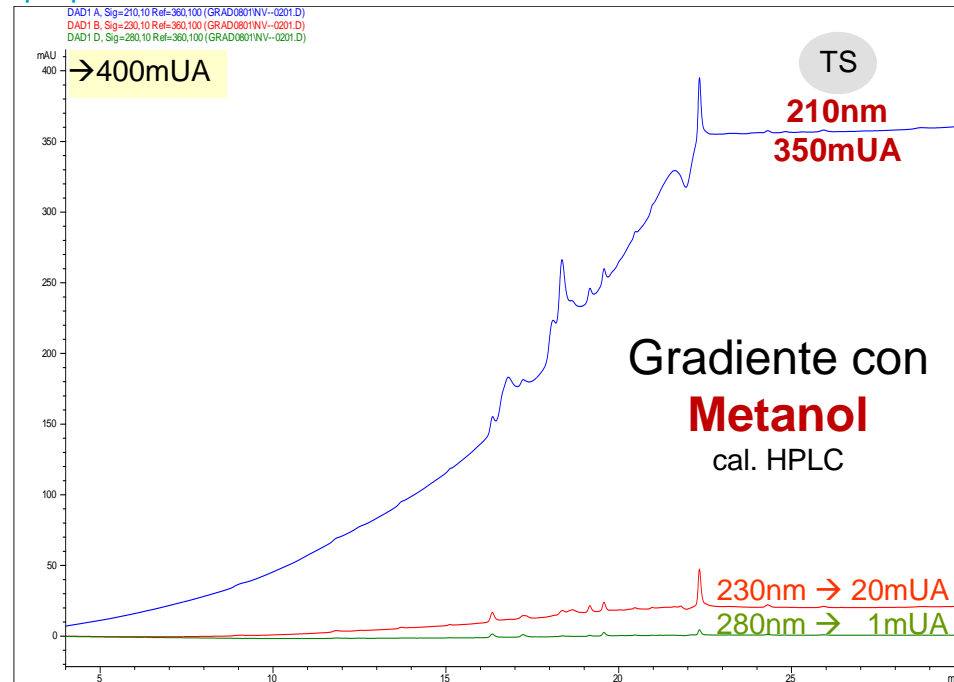
# Consideraciones Operatorias en la Preparación/Selección de la Fase Móvil (1)

- ▶ Emplear productos de elevada pureza\* (10 l. eluy. 0.01% impureza => 1gr.).  
Muy importante con gradientes de concentración (especialmente en análisis de trazas a bajas  $\lambda$  – (en estos casos utilizar disolventes calidad “HPLC para gradientes + “far UV”).

\*utilizar material perfectamente limpio y enjuagado con los propios disolventes.



Origen: impurezas presentes en la fase móvil; las debidas a eluyente inicial incrementan su área proporcionalmente al tiempo de equilibrado de la columna.



Deriva de línea de base producida por la distinta absorbancia de la fase móvil inicial y final. El  $\text{CH}_3\text{-CN}$  da menor deriva que  $\text{CH}_3\text{OH}$ .

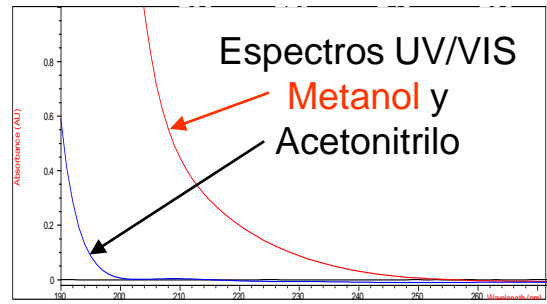
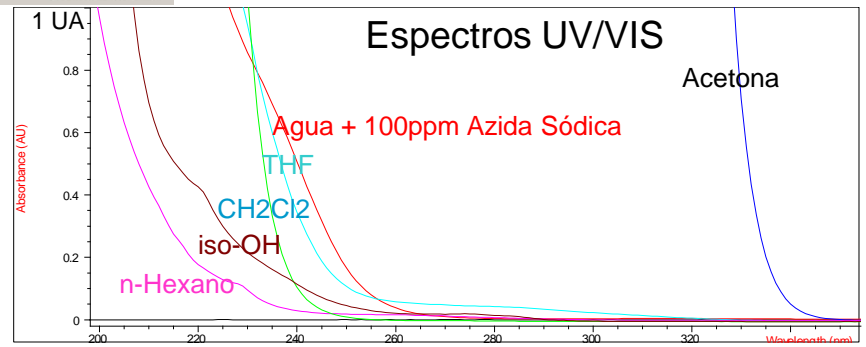
# Disolventes HPLC: Mínimas Longitudes de Onda de Trabajo

| Solvent              | UV Cutoff (nm) |
|----------------------|----------------|
| Acetonitrile         | 190            |
| Water                | 190            |
| Cyclohexane          | 195            |
| Hexane               | 200            |
| Methanol             | 210            |
| Ethanol              | 210            |
| Diethyl Ether        | 220            |
| Dichloromethane      | 220            |
| Chloroform           | 240            |
| Carbon Tetrachloride | 265            |
| Tetrahydrofuran      | 280 (210)      |
| Toluene              | 280            |

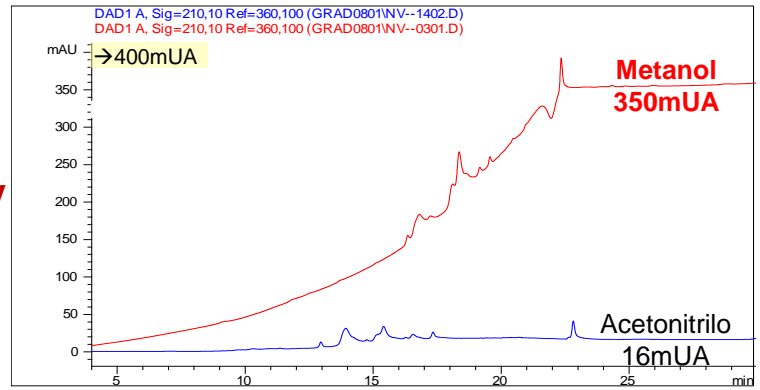
- Al acercarnos a la  $\lambda$  del "Cut-off" (absorbancia (eluyente)= 1 U.A.) **umentarán el ruido y la deriva de línea de base** en gradientes de concentración y **disminuirán la sensibilidad y rango de linealidad.**
- Al aumentar la diferencia de absorbancia entre los disolventes mezclados por la bomba, **aumentará el ruido de mezcla** obtenido.

Autobalance  
 Prerun  
 Postrun

Tomará como "blanco/cero" el espectro del eluyente de condiciones iniciales



Con **metanol** al trabajar a bajas longitudes de onda con gradientes de concentración se obtienen derivas de línea de base muy apreciables; con el acetonitrilo éstas son mucho menores.





# Consideraciones Operatorias en la Preparación de la Fase Móvil (2)

- ▶ **Medir volúmenes agua/orgánico por separado.**  
(los volúmenes NO son aditivos)
- ▶ **Microfiltrar fase móvil** (“a diario” en agua y en soluciones acuosas/ tampones).
  - ▶ El agua ultrapura (HPLC) y las soluciones acuosas son un excelente medio de cultivo para el crecimiento de algas y microorganismos que luego obstruirán los filtros del cromatógrafo y de la columna. **UHPLC exige microfiltrar por 0.2µm**
  - ▶ **Proteger a las soluciones acuosas de la luz** con botellas color topacio.
  - ▶ **Las soluciones acuosas NO deben dejarse varios días sin renovar en el interior de las botellas, conductos, desgasificadores on-line,...**
  - ▶ La adición de >30% de solvente orgánico al agua/tampón evita el crecimiento de algas y microorganismos. Cuando no se trabaja a bajas longitudes de onda también se puede adicionar azida sódica (p.e. 100ppm) para “estabilizar” las soluciones acuosas cuando se trabaja a  $\lambda > 260\text{nm}$ .
  - ▶ Si no se va a emplear más de un 70% de agua, el utilizar una mezcla con más del 30% de solvente orgánico en la botella (en lugar de 100% agua) evitará tener que renovarla muy frecuentemente.
  - ▶ Con **acetonitrilo** es preferible **utilizar fosfatos potásicos** en vez de sódicos (dada su mayor solubilidad).
- ▶ **Utilizar un tampón adecuado para el pH de trabajo ( $\text{pH} = \text{pKa}_{\text{tampón}} \pm 1$ ).**  
Para un buen control del grado de ionización del analito y obtener tiempos reproducibles.

TS



TS

## !!!! Problema nº 1\* en HPLC !!!! (en usuarios sin experiencia)

### Crecimiento de algas en los sistemas de HPLC

La presencia de algas en los sistemas de HPLC puede causar una gran variedad de problemas, que pueden ser diagnosticados erróneamente como problemas del instrumento o de aplicación. Las algas crecen en medios acuosos, preferiblemente en un rango de pH de 4-8. El crecimiento se acelera con tampones, por ejemplo, fosfato o acetato. Debido a que las algas crecen mediante la fotosíntesis, la luz estimulará también su crecimiento. Incluso en agua destilada crecen algas de pequeño tamaño después de un tiempo.

#### TS Problemas instrumentales asociados a las algas

Las algas crecen y se depositan dentro del sistema de HPLC causando:

- Depósitos en las válvulas de bolas, de entrada o salida, resultando en un flujo inestable o un fallo total de la bomba.
- Taponamiento de los filtros de entrada de disolventes (poro pequeño) resultando en un flujo inestable o un fallo total de la bomba.
- Taponamiento de los filtros para disolvente a presión alta y con poro pequeño, situados normalmente antes del inyector, causando una alta presión en el sistema.
- Taponamiento de los filtros de columna, causando una alta presión en el sistema
- Ensucianamiento de las ventanas de las celdas de flujo de los detectores, dando lugar a altos niveles de ruido (ya que el detector es el último módulo en el paso del flujo, este problema es menos común).

**Las soluciones acuosas NO deben dejarse varios días sin renovar en el interior de las botellas, conductos, desgasificadores on-line,...**

#### Síntomas observados en el HP 1100 Serie HPLC

En contraste con los sistemas de HPLC Serie HP 1090 y HP 1050, que utilizan desgasificador de helio, las algas tienen una mejor oportunidad para crecer en sistemas como el HP 1100, donde no se utiliza helio para desgasificar (la mayoría de las algas necesitan oxígeno y luz para su crecimiento).

La presencia de algas en el HP 1100 puede causar:

- Bloqueo de las fritas PTFE, referencia HP 01018-22707, (montaje de la válvula de purga) y del filtro de columna, resultando en un aumento de presión en el sistema. Las algas aparecen como depósitos blancos o amarillentos sobre los filtros. Las típicas partículas negras originadas por el desgaste de los sellos del pistón no bloquean las fritas PTFE a corto plazo. Consulte la sección "Cambio de la válvula de purga o de su frita" en su *Manual de referencia*.
- Corta duración de los filtros de disolventes (montaje de cabeza de botella). Un filtro de disolventes bloqueado en la botella, especialmente cuando está parcialmente bloqueado, es más difícil de identificar y puede presentarse como problemas de rendimiento del gradiente, fluctuaciones intermitentes del flujo, etc.
- El crecimiento de algas pueden también ser una fuente de fallos de las válvulas de bolas y otros componentes del paso de flujo.

#### Cómo evitar y/o reducir el problema de las algas

- ↳ Utilice siempre disolventes recién preparados y especialmente use agua desmineralizada que se haya filtrado a través de filtros de 0.2 µm.
- ↳ Nunca deje la fase móvil sin flujo en el instrumento durante varios días.
- ↳ Rechace siempre fases móviles "antiguas".
- ↳ Utilice la botella ambar de disolvente (referencia HP 9301-1450), suministrada con el instrumento, para su fase móvil acuosa.
- ↳ Si es posible, añada un poco (mg/l) de azida sódica o un porcentaje de disolvente orgánico a la fase móvil acuosa.



# Consideraciones Operatorias en la Desgasificación de la Fase Móvil (3):

- ▶ **La fase móvil se debe desgasificar** en continuo o justo antes de SU USO (siempre que la bomba se mezcle disolventes).
- ▶ **Hoy en día** se utiliza mayoritariamente desgasificación **en línea por vacío\*** (la más efectiva).
  - ▶ Antiguamente se utilizaban: burbujeo de Helio, o Ultrasonidos+Vacío (3-5 min.), o Calentamiento (recomendado en soluciones acuosas), o Vacío+Agitación.
    - ▶ Con mezclas de eluyentes, un burbujeo excesivo de helio o demasiado tiempo de vacío o calentamiento aumentará la proporción del componente menos volátil (p.e. agua).
- ▶ Al renovar eluyentes **NO olvidarse del volumen interior del “desgasificador”**; varía entre **1ml (microdegasser), 12 y 36 ml** (HP1050) según modelos.
  - ▶ **Si el desgasificador no se ha purgado bien, el “HPLC” tardará mucho en “equilibrarse”** y proporcionar tiempos de retención repetitivos.

TS

## ACONDICIONADO HPLC: **ANTES DE BOMBEAR POR COLUMNA (crítico en UHPLC).**

Purgar bien todos los canales a utilizar de la bomba (con válvula de purga abierta) para renovar el agua, tampones (con recientemente microfiltrados) **Y los orgánicos. No hay que olvidarse del  $V_0$  de los desgasificadores en línea.** Si la composición de fase móvil cambia apreciablemente se deberá purgar con un mayor volumen de la nueva fase.

- **¡ No pasar seguidos eluyentes inmiscibles !**

LAVADO INICIAL DE LA COLUMNA: si se va a trabajar con gradientes de concentración, lavar la columna con el eluyente final de la separación (u otro de aún mayor poder eluotrópico).

- **Tiempo lavado:  $(10-20) \times T_0$**  (tiempo muerto al flujo utilizado).

ACONDICIONADO (/EQUILIBRADO) COLUMNA: dejar acondicionar la columna con el eluyente de condiciones iniciales.

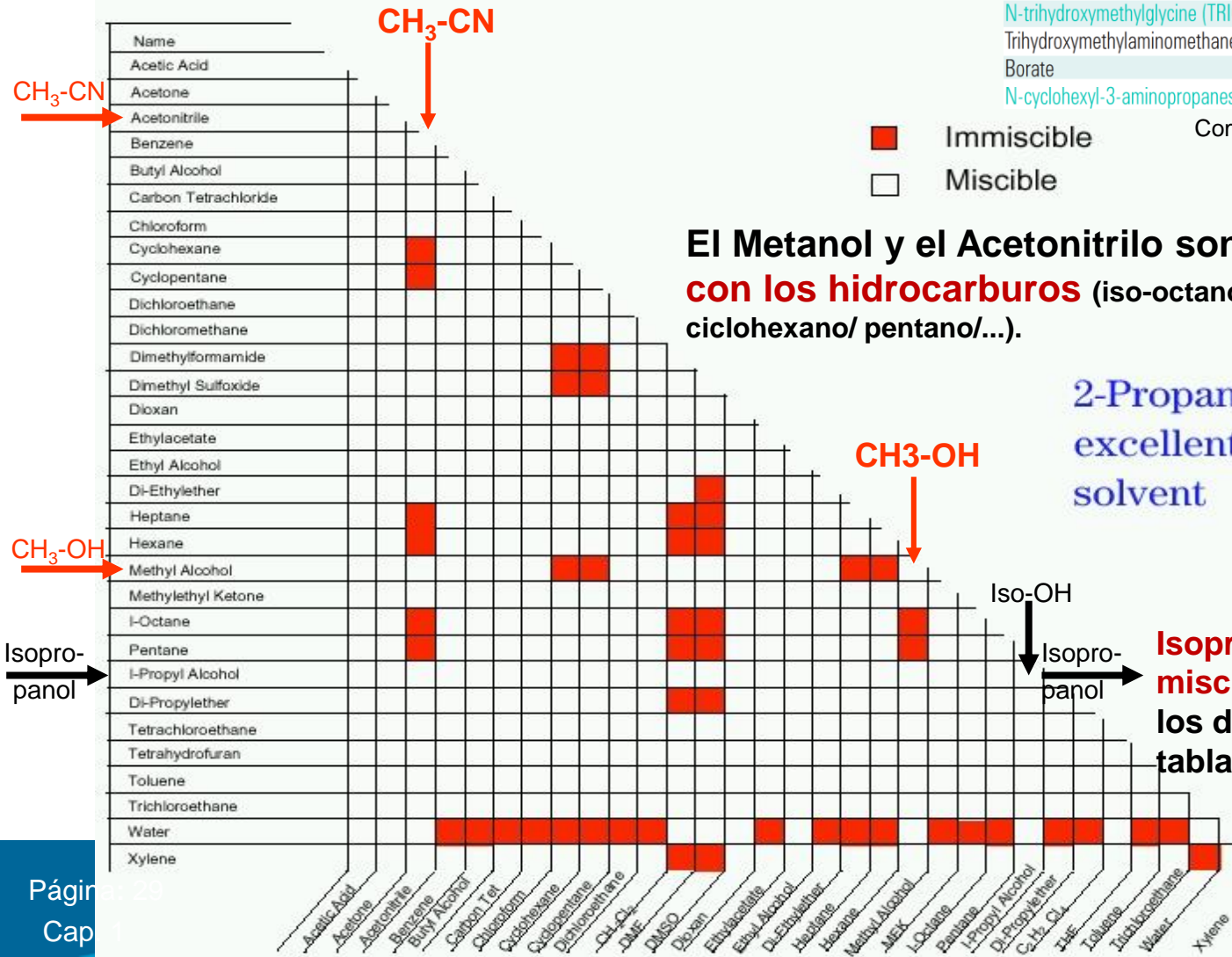
- Tiempo acondicionado SIN inyector automático:  $15 \times T_0$  (tiempo muerto al flujo utilizado).
- **Tiempo acondicionado CON inyector automático:  $(3-6) \times T_0$** 
  - Si se trabaja con inyector automático el tiempo de equilibrado se puede reducir a  $\frac{1}{2}$  ( ó  $\frac{1}{3}$ ) si se mantiene constante entre inyecciones (incluyendo la 1ª !!!)
    - $V_0$  columna **4.6 mm. D.I. ~ 1ml / 10cm col.**
    - $V_0$  columna **4.0 mm. D.I. ~ 0.75ml / 10cm col.**
    - $V_0$  columna **2.1 mm. D.I. ~ 0.2ml / 10cm col.**



# Tabla Miscibilidad Disolventes y Rango pH Tampones.

| Buffer  | pH range   | UV-vis transparent above (nm) |
|---|------------|-------------------------------|
| Phosphate   | 1.1 – 3.1  | 195                           |
| Formate   | 2.7 – 4.8  | 200                           |
| Acetate   | 3.8 – 5.8  | 200                           |
| Citrate   | 3.8 – 4.8  | 200                           |
| 2-(N-)morpholino-ethanesulfonic acid <sup>1</sup>               | 5.1 – 7.1  | 230                           |
| Citrate   | 5.4 – 7.4  | 200                           |
| Piperazine-N,N-bis(2-ethanesulfonic acid) <sup>2</sup>          | 5.8 – 7.8  | 215                           |
| Phosphate   | 6.2 – 8.2  | 195                           |
| 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid <sup>3</sup> | 6.5 – 8.5  | 230                           |
| N-trihydroxymethylglycine (TRICINE)                             | 7.1 – 9.1  | 230                           |
| Trihydroxymethylaminomethane (Tris)                             | 7.3 – 9.3  | 220                           |
| Borate  | 8.1 – 10.1 | 180                           |
| N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid <sup>4</sup>           | 9.7 – 11.1 | 220                           |

## Solvent Miscibility



■ Immiscible  
 Miscible

Common buffers for CE. Abbreviations: 1MES, 2PIPES, 3HEPES, 4CAPS. In green: zwitterionic buffers.

**El Metanol y el Acetonitrilo son inmiscibles con los hidrocarburos (iso-octano /heptano /hexano /ciclohexano/ pentano/...).**

2-Propanol is an excellent intermediate solvent

**Isopropanol: es miscible con todos los disolventes de la tabla.**

# Agenda Curso U/HPLC (1/4): Capítulo 1

## 1. Introducción y Consideraciones Prácticas en HPLC/UHPLC:

### 1.1.- Introducción teórica a los parámetros básicos en U/HPLC.

- Ecuación de Van Deemter.
- Eficiencia en la separación, Resolución, Simetría, Factor de retención, Simetría,....
- Conceptos volumen muerto del sistema, volumen de retardo..

### 1.2.- Consideraciones Prácticas en U/HPLC:

- Preparación y Selección de la Fase Móvil.
- Acondicionamiento HPLC y Columna.
- Preparación de la **Muestra**.
- Consideraciones en la **Inyección**.
- Precauciones con la Columna.
  - Procedimientos de lavado de columna.
  - Influencia de los capilares de conexión.
- Trabajo con Gradientes de Concentración.



Agilent 1200 Infinity Series

Infinitely better

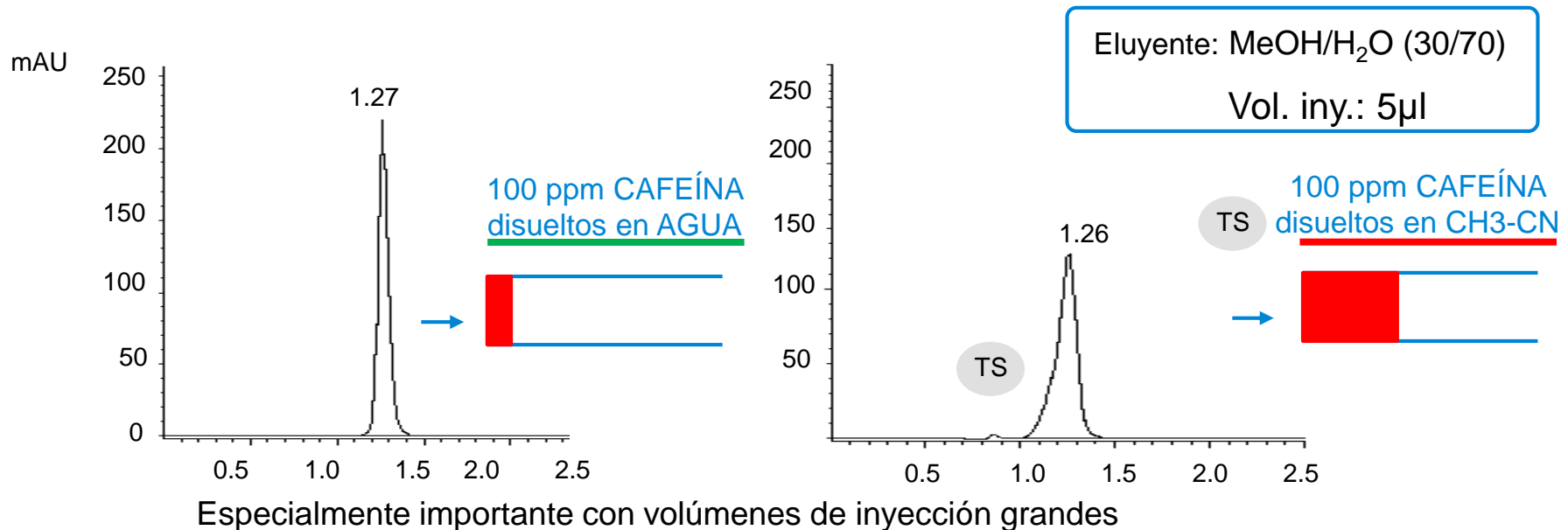
1220  
Infinity LC

1260  
Infinity LC

1290  
Infinity LC

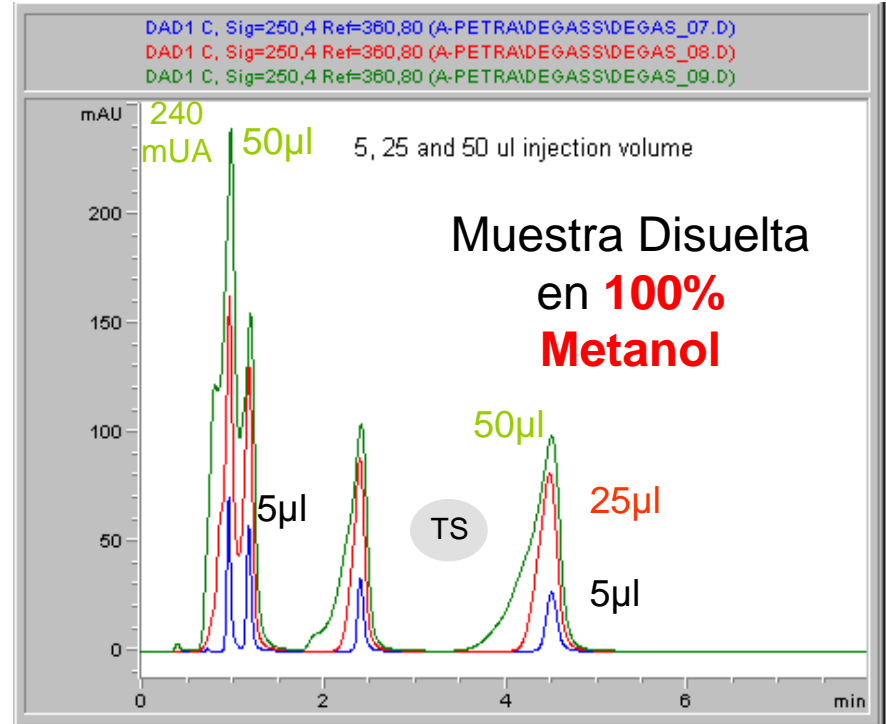
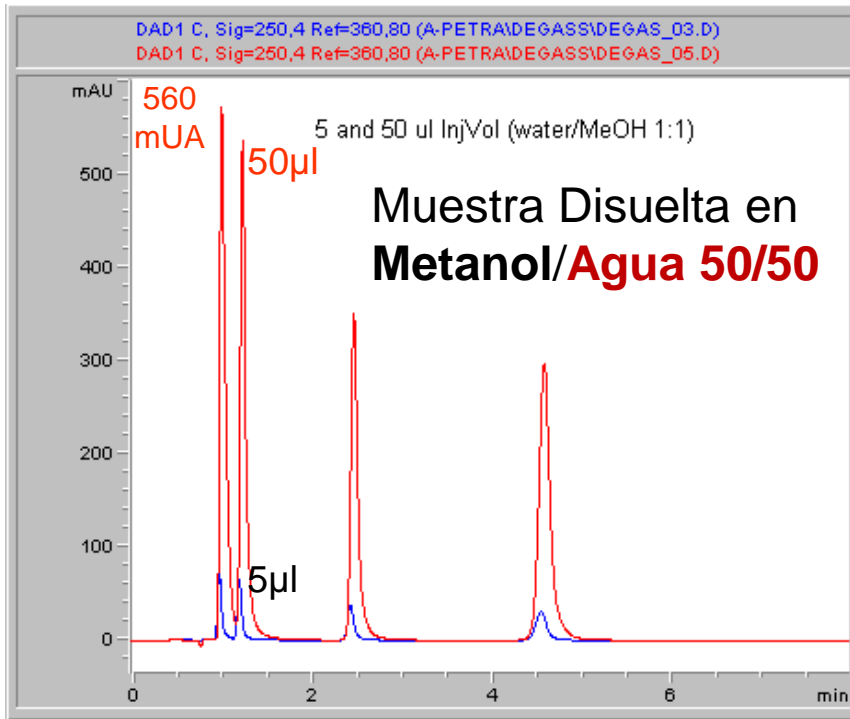
# Consideraciones Operatorias en la Preparación de la Muestra

- ▶ Emplear disolvente adecuado (solubilidad – con poco poder elutrópico).



- ▶ Eliminar **componentes que puedan quedar muy retenidos** en la columna. Extracción en fase sólida (part./adsor./exclusión) o Líquido/líquido. Desproteización..
- ▶ **Microfiltrarla** (la extr. fase sólida no sustituye a la microfiltración) **por  $\leq 0.2\mu\text{m}$  en UHPLC.**
- ▶ Adicionar patrón interno si existe tratamiento de purificación/ concentración.
- ▶ Tener en cuenta el blanco de la muestra (sobre todo con trazas y a bajas  $\lambda$ ).

# Influencia del Volumen y Poder Eluotrópico del Disolvente de la Muestra



**Fase móvil: Metanol/ Agua 80/20**

El utilizar disolventes de la muestra con **menor poder de elución** que la fase móvil utilizada, **permitirá inyectar mayores volúmenes de muestra** sin deformación de la forma del pico ni pérdida apreciable de resolución.

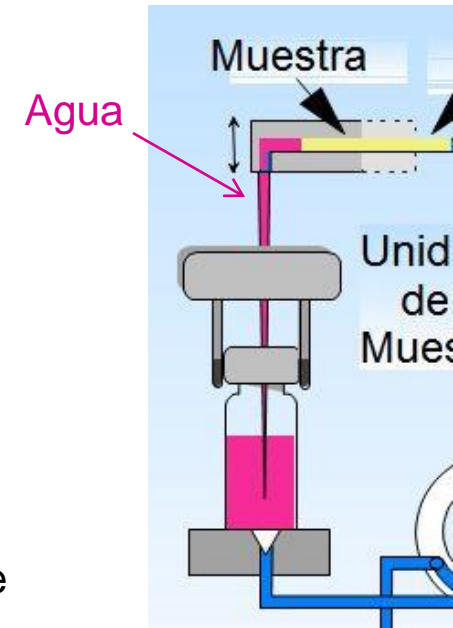


# Programación Inyector para Reducir el Impacto del Exceso de Poder Eluotrópico del Disolvente de la Muestra

El inyectar la muestra entre un **pequeño “bolo/tapón” de un disolvente SIN poder de elución**, ayuda a “contener la dispersión” de la banda cromatográfica al entrar en columna, cuando la muestra está disuelta con un disolvente con exceso de poder eluotrópico (p.e. acetonitrilo en fase reversa).

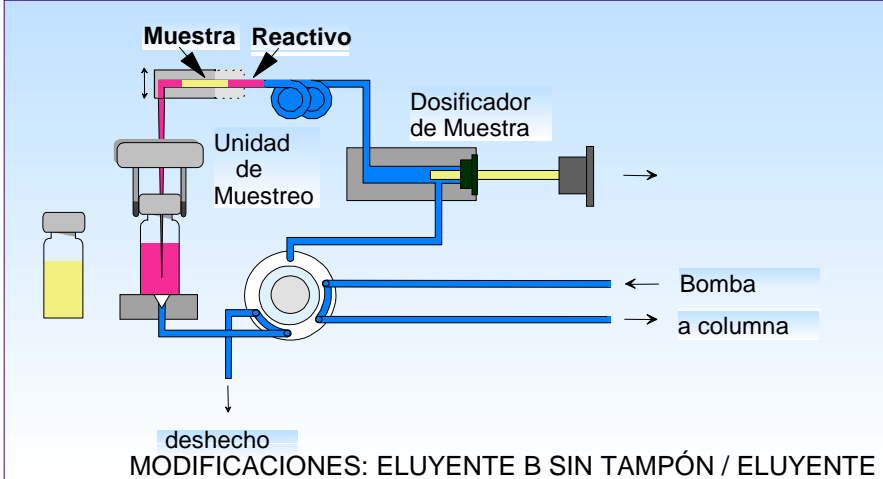
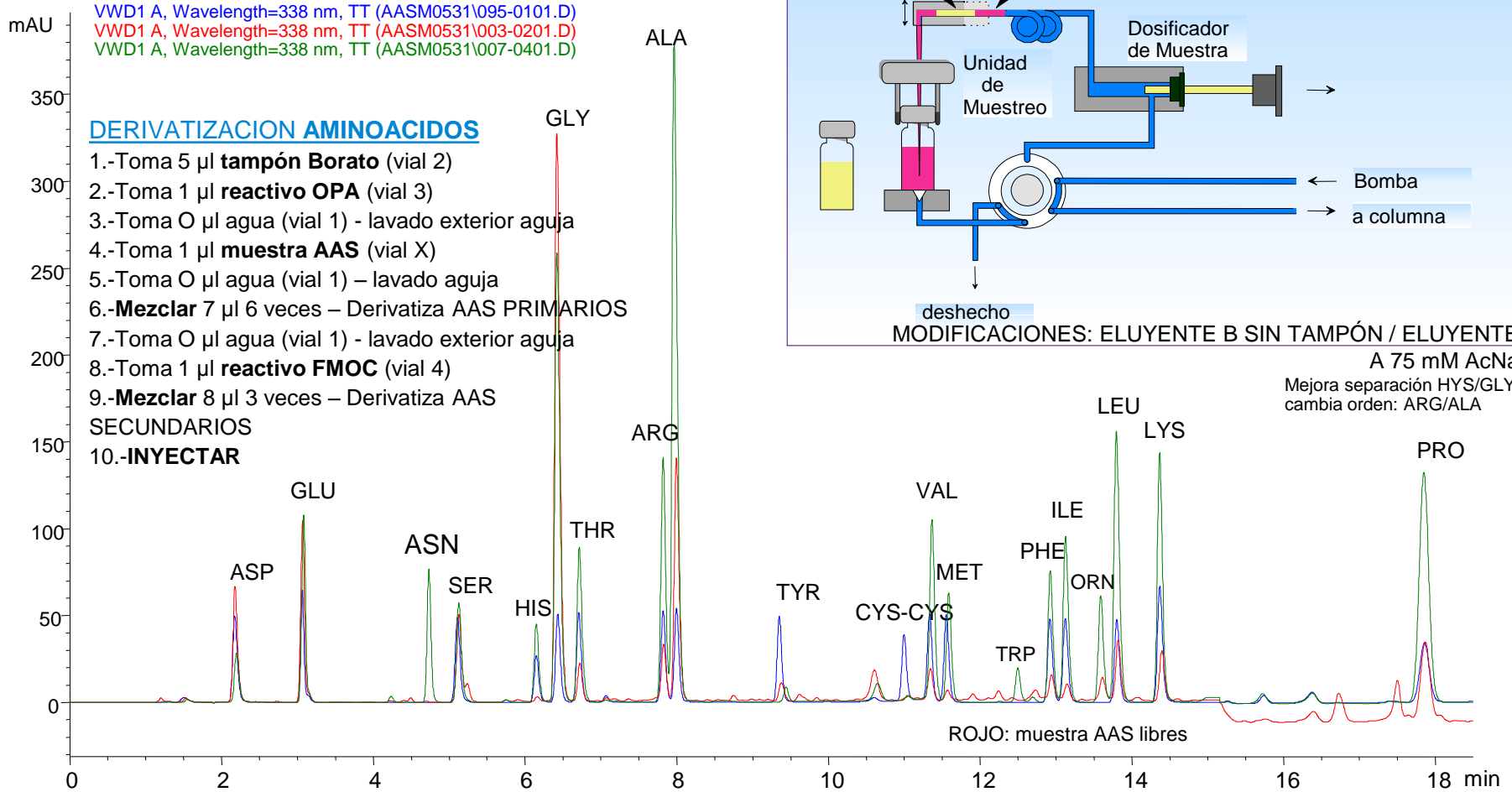
## Ejemplo para Columnas Fase Reversa: Activar y Editar el “Injector Program” en el método del inyector automático

- Opción que viene por defecto en todos los inyectores Agilent: 1290/1260/1200/1120/1100/1050/1090.
- Programar p.e. para una inyección de 10 $\mu$ L de muestra
  - **DRAW 10 $\mu$ l Sample** (tomará 10 $\mu$ L del vial de muestra que indique la secuencia)
  - **NEEDLE WASH in vial 2 x 3 times** (limpia aguja externamente con un vial n<sup>o</sup> 2 con un disolvente de lavado –sin septum- y lo repite 3 veces). En inyectores de pocillos utilizar el “Needle Wash in Flushport”
  - **DRAW 2.5  $\mu$ l vial 1** (toma 2.5  $\mu$ L del **vial 1 = agua**)
  - **INJECT** (inyecta)



# Ejemplo de Programación para Derivatización precolumna:

Ejemplo 20 Aminoácidos con OPA y FMOC (18 min Agilent Series 1100)

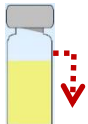


También es útil para mezclar patrones durante la puesta a punto de métodos o p.e. para automatizar la derivatización con FMOC en el análisis de Glifosato y AMPA por LC/MS

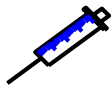
# Tipos de Filtros de Muestra

- Nylon - hydrophilic nature works with aqueous and solvent based samples, autoclavable to 121°C, pH range 3-12, no concentrated acids
- PTFE- a hydrophobic membrane which is highly resistant to solvents, acids, and alkalis. This filter is generally used for non-aqueous samples. pH range 1-14.
- Cellulose Acetate- good filter for aqueous biological samples with very low protein retention. pH range 4-8.
- PVDF- highly resistant to most solvents, exhibits low protein binding. pH 2-12.
- Ultrafilter Membranes- molecular weight cut-off filters for biological samples.
- Nitrocellulose- exhibits high protein retention.
- Solid Phase Extraction. **NO** sustituye a la microfiltración

# Consideraciones Operatorias en la Inyección

- ▶ Antes de inyectar la **columna debe estar equilibrada**.  
Tiempo acondicionado:  $15 \times T_0$  (tiempo muerto al flujo utilizado). Se puede reducir a  $3-6 \times T_0$  con autoinyector.
- ▶ Después de sucesivas inyecciones conviene comprobar que **no se incrementa** apreciablemente la **presión** de trabajo.
- ▶ Los **viales de muestra NO se deben llenar más de  $\sim 3/4$** . 
- ▶ Los viales con **disolvente para lavado** del exterior de la aguja **deben llenarse al 100% y NO debe llevar septa**.

## Inyección Manual



- ▶ Volumen de muestra  $> 5$  ó  $< 0.5 \times$  Volumen "loop".
- ▶ Introducir jeringa hasta 2º tope y no extraer hasta después inyección.
- ▶ Girar la válvula deprisa (en ambos sentidos).
- ▶ Dejar en posición "Inject" hasta justo antes de inyectar la siguiente muestra.



Opción: mediante la utilización de válvulas adicionales se puede automatizar procesos de preconcentración/ limpieza de muestra/ selección de columnas/ back flush (entre otras opciones).


# Agenda Curso U/HPLC (1/4): Capítulo 1

## 1. Introducción y Consideraciones Prácticas en HPLC/UHPLC:

### 1.1.- Introducción teórica a los parámetros básicos en U/HPLC.

- Ecuación de Van Deemter.
- Eficiencia en la separación, Resolución, Simetría, Factor de retención, Simetría,....
- Conceptos volumen muerto del sistema, volumen de retardo..

### 1.2.- Consideraciones Prácticas en U/HPLC:

- Preparación y Selección de la Fase Móvil.
- Acondicionamiento HPLC y Columna.
- Preparación de la Muestra.
- Consideraciones en la Inyección.
- Precauciones con la **Columna**.  **Charla** Julian Delamata
  - Procedimientos de lavado de columna.
  - Influencia de los capilares de conexión.
- Trabajo con Gradientes de Concentración.



Agilent 1200 Infinity Series

Infinitely better



1220  
Infinity LC

1260  
Infinity LC

1290  
Infinity LC

# Agenda Curso U/HPLC (1/4): Capítulo 1

## 1. Introducción y Consideraciones Prácticas en HPLC/UHPLC:

### 1.1.- Introducción teórica a los parámetros básicos en U/HPLC.

- Ecuación de Van Deemter.
- Eficiencia en la separación, Resolución, Simetría, Factor de retención, Simetría,....
- Conceptos volumen muerto del sistema, volumen de retardo..

### 1.2.- Consideraciones Prácticas en U/HPLC:

- Preparación y Selección de la Fase Móvil.
- Acondicionamiento HPLC y Columna.
- Preparación de la Muestra.
- Consideraciones en la Inyección.
- Precauciones con la Columna.
  - Procedimientos de lavado de columna.
  - Influencia de los capilares de conexión.
- Trabajo con **Gradientes de Concentración**.



Agilent 1200 Infinity Series

Infinitely better

1220  
Infinity LC

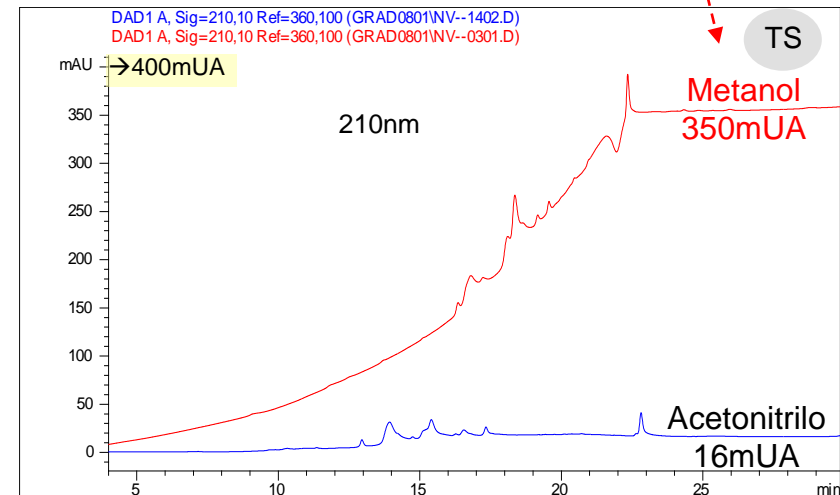
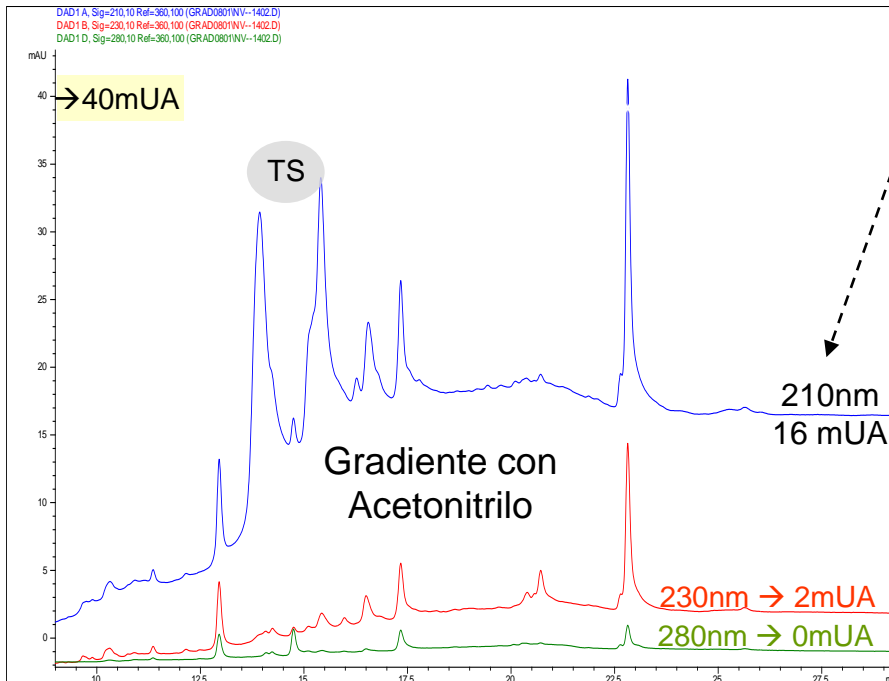
1260  
Infinity LC

1290  
Infinity LC

# Consideraciones Operatorias en Gradientes de Concentración (1)

## Tener en cuenta:

- ▶ La miscibilidad de los eluyentes, tampones y muestra.
- ▶ La **compatibilidad del detector** con la técnica de gradientes.
- ▶ Los distintos "**Backgrounds**" de los eluyentes ==> deriva línea de base.  
En gradientes a bajas  $\lambda$  mejor emplear acetonitrilo que metanol
- ▶ **El blanco del gradiente** (sobre todo a bajas  $\lambda$  y alta sensibilidad).



# Consideraciones Operatorias en Gradientes de Concentración (2)



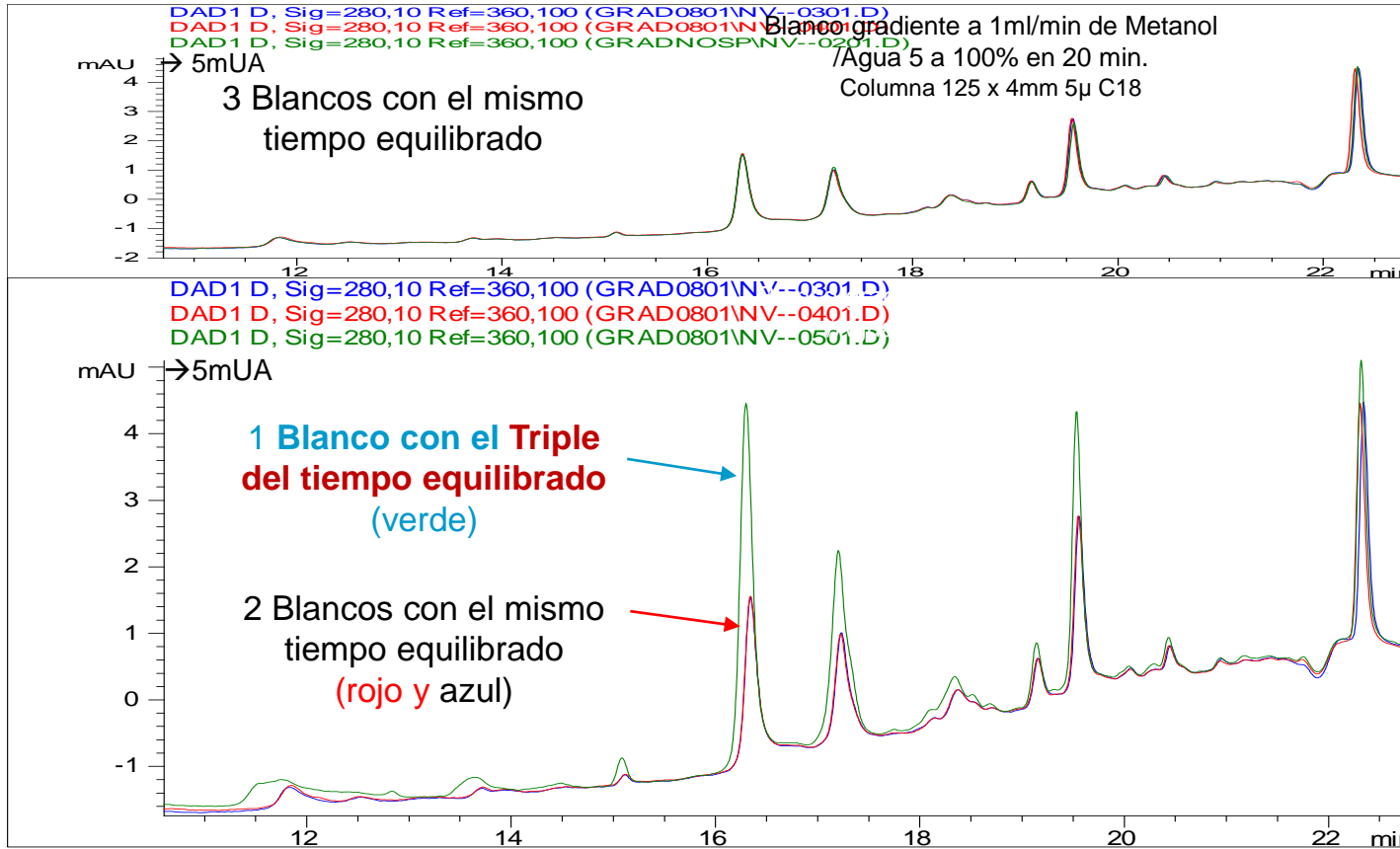
## Tener en cuenta:

- ▶ Si se requiere una **etapa de lavado de la columna al final del gradiente**.  
Mejor repetitividad al disminuir la alteración de la línea de base por aparición de "artefactos".
- ▶ Para reproducir condiciones de otros equipos tener en cuenta los flujos mínimos de las bombas y sus **diferentes volúmenes muertos**.  
Ejemplos: Vol. muerto: 0.8 ml => a 0.5 ml/min el gradiente tardará 1.6 min en llegar al inyector.  
Vol. muerto: 2 ml => a 0.5 ml/min el gradiente tardará 4.0 min en llegar al inyector.  
El tiempo de retraso habrá que tenerlo en cuenta para definir correctamente el "Stop time" a la hora de reproducir gradientes obtenidos con otros equipos.
- ▶ **Renovar diariamente canal acuoso** o trabajar con mezclas con disolvente orgánico.  
Solvente orgánico (>30%) evita crecimiento bacteriano, algas...
- ▶ El tiempo de **equilibrado de la columna** al volver a condiciones iniciales.  
Tiempo de estabilización aprox. =  $0.15 \times T_o \times (\text{Dif. } \%)$  (se puede reducir a  $\frac{1}{2}$ - $\frac{1}{3}$  con autoinyector).
- ▶ **Si el blanco da picos** que se solapan con picos de interés, **emplear siempre los mismos tiempos de equilibrado** de columna.  
El área de los picos correspondientes a impurezas del eluyente inicial depende del tiempo de equilibrado.



# Influencia del Tiempo de Equilibrado en la Repetibilidad del Perfil del Cromatograma

- ▶ Para obtener blancos reproducibles se deberán reproducir los tiempos de equilibrado



Para efectuar un blanco sin inyectar ni mover la válvula de inyección, **dejar en blanco la casilla de nº de vial.**

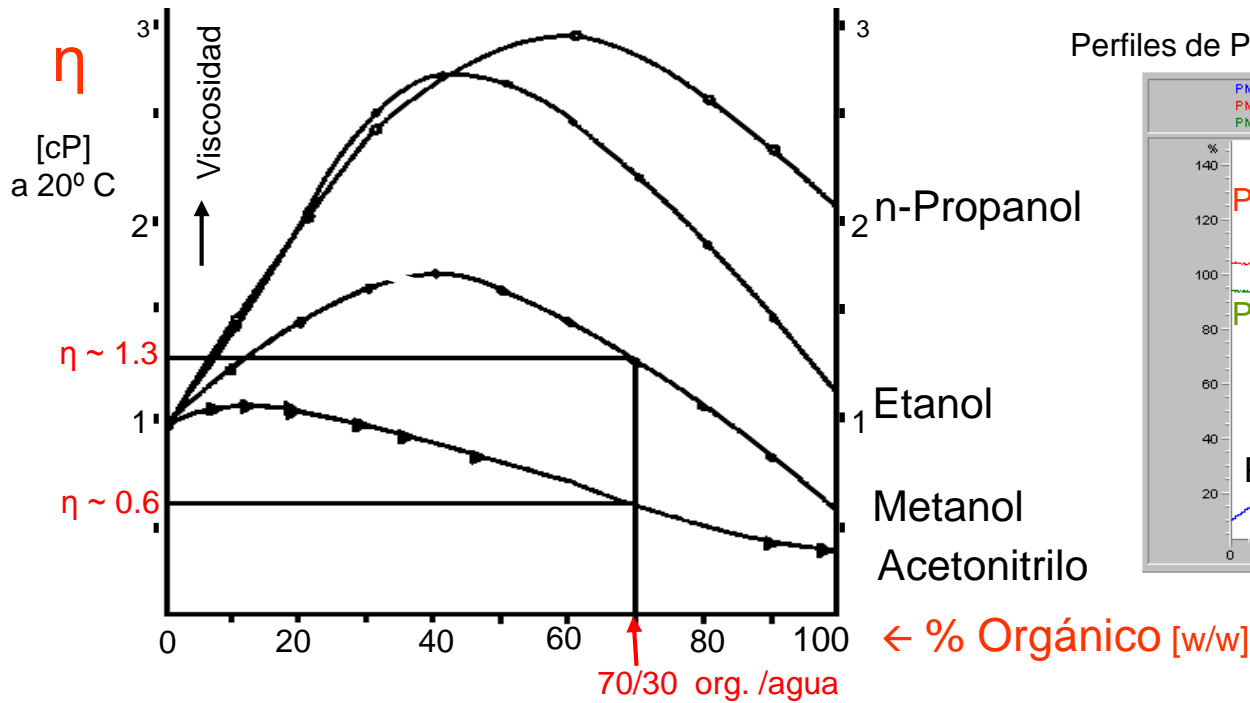


Origen: impurezas presentes en la fase móvil; las debidas a **eluyente inicial incrementan su área proporcionalmente al tiempo de equilibrado** de la columna (en fase reversa suelen ser los picos menos retenidos)

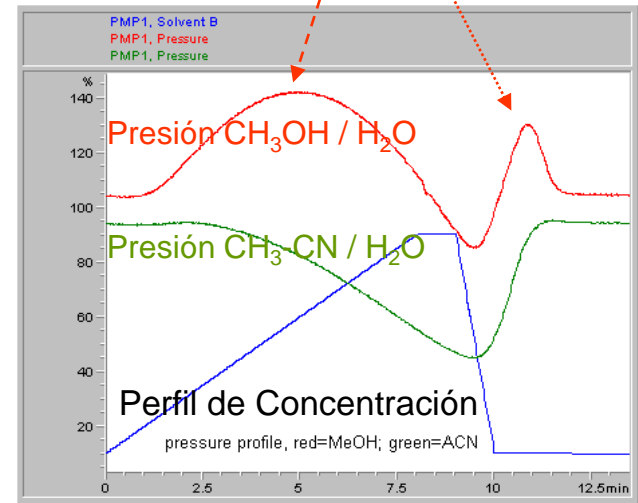
# Consideraciones Operatorias en Gradientes de Concentración (3)

Tener en cuenta:

- ▶ La alta viscosidad de las mezclas **metanol/agua** (máximo a **40/60**)



Perfiles de Presión con Gradientes Concentración



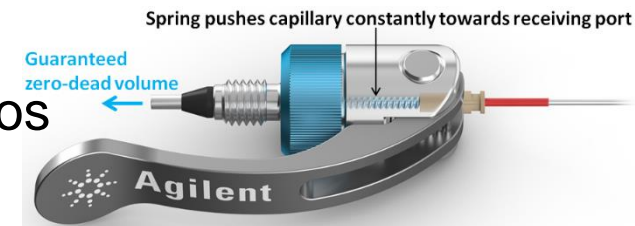
Este gráfico es útil para poder calcular relaciones aproximadas de viscosidad entre distintas composiciones de eluyentes y poder calcular presiones equivalentes:

p.e. 100 bars con  $\text{CH}_3\text{-CN}/\text{H}_2\text{O}$  70/30 equivalen a  $100 \times (1.3/0.6) = 217$  bars con  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  70/30

# Conclusiones / Resumen

## Consideraciones Prácticas en U/HPLC

- **Emplear productos de calidad HPLC adecuada** para minimizar los picos que aparecen en el blanco cuando se trabaja con gradientes de concentración. Utilizar un **disolvente adecuado a la longitud de onda** de trabajo.
- **Microfiltrar “a diario” soluciones acuosas** y no dejarlas durante varios días en el interior del HPLC sin utilizar.
- **Purgar bien todos los canales cada día antes de bombear por columna** (crítico en UHPLC)
- Para **disolver la muestra** mirar de utilizar **disolventes que tengan un bajo poder de elución**.
- Al cambiar columnas utilizar conectores adecuados para evitar volúmenes muertos innecesarios.
- Con gradientes de concentración utilizar **tiempos de equilibrado adecuados** e iguales.



11:30h.- Café

# ¿Preguntas?



THE UHPLC  
DEBATE  
IS OVER.



11:30 Café



Estamos a su disposición en  
tel.: 901.11.6890  
customercare\_spain@agilent.com

isidre\_masana@agilent.com  
www.agilent.com/chem