Recomendaciones Generales para uso de columnas en HPLC/UHPLC

Parte 1

Este resumen, que se muestra a continuación, proporciona información general para todas las columnas ZORBAX, Poroshell, Pursuit y Polaris de fase reversa. Tenga en cuenta que puede maximizar el rendimiento de su columna si la utiliza atendiendo a sus especificaciones. Por ello, le recomendamos que revise siempre las especificaciones antes de poner en práctica un método final.

1. Instalación

• La dirección del flujo está marcada en la columna.

• Las columnas de 1,8 µm (ZORBAX RRHT, ZORBAX RRHD) solo puedenser operadas en la dirección de flujo marcada en la columna.

Para conexiones de columna sin volumen muerto, Agilent recomienda el uso de InfinityLab Quick Connect (conectores de conexión rápida) y la familia Quick Turn (conectores de giro rápido). Las opciones son:

Presión máxima del sistema	Conectores recomendados	Referencias
Hasta 400 bar	Conector de giro rápido InfinityLab (apriete a mano)	Conector: 5067-5966
Hasta 800 bar	Conector de giro rápido InfinityLab (con herramienta de montaje)	Conector: 5067-5966 Herramienta de montaje: 5043-0915
Hasta 1300 bar	Conector de conexión rápida InfinityLab	Conector: 5067-5965

*para más información consultar el catálogo 5991-5164EN



InfinityLab Quick Connect assembly, p/n 5067-5961



InfinityLab Quick Turn fitting, p/n 5067-5966

2. Acondicionamiento de columna

Todas las columnas se prueban antes del envío y se envían en el eluyente de prueba. Por lo tanto, para el primer uso, no es necesario lavar con agua.

Si se utilizan aditivos de fase móvil (como tampones o reactivos de emparejamiento iónico), se recomienda realizar un lavado intermedio con una fase móvil de la composición correcta, pero sin estos aditivos. Un lavado con entre 10 y 20 volúmenes de columna debería servir para la transición hasta su fase móvil.

En el caso de fases de cadena más corta (por ejemplo, C8, fenil, CN), debe tenerse cuidado para asegurarse de que la columna se haya equilibrado de forma adecuada antes de su uso. De esta manera, se garantiza la reproducibilidad y se ayuda a prevenir la variabilidad en el tiempo de retención.

Si se utiliza ácido fórmico como aditivo de fase móvil, acondicione la columna como se recomienda en la tabla:

Condiciones del método de acondicionamiento de la columna para ácido fórmico

D.i. de columna (mm)	Fase móvil	Flujo (ml/min)	Temp. columna (°C)	Tiempo (horas)	Después de acondicionar
2,1	95/5 H_2O/ CH_3CN + ácido fórmico al 0,1%	0,1	60	4	Lavar y guardar en 100% CH_3CN
3,0	95/5 H_2O/ CH_3CN + ácido fórmico al 0,1%	0,2	60	4	Lavar y guardar en 100% CH_3CN
4,6	95/5 H_2O/ CH_3CN + ácido fórmico al 0,1%	0,4	60	4	Lavar y guardar en 100% CH_3CN

Nota: El acondicionamiento durante toda la noche, o hasta 24 horas, podría ser beneficioso, en particular para las columnas de mayor tamaño o para analitos ácidos

3. Consideraciones importantes sobre seguridad

• Todos los puntos de conexión de los sistemas de cromatografía líquida son posibles fuentes de fuga. Los usuarios deben tener en cuenta la toxicidad o inflamabilidad de las fases móviles.

• Debido al pequeño tamaño de las partículas, los rellenos de las columnas secas son inhalables. Solamente se deben abrir las columnas en una zona con buena ventilación.

• Aténgase a los límites de presión operativa designados para cada columna. Si se superan estos límites, el rendimiento cromatográfico se verá afectado, lo que podría resultar inseguro.

4. Otros consejos de uso

• Aunque, por lo general, no resulta dañino para la columna, se debe evitar el flujo invertido, salvo para tratar de eliminar obstrucciones en la frita.

• Utilice siempre reactivos de gran pureza y disolventes de calidad cromatográfica para preparar las fases móviles. Antes de su uso, desgasifique y filtre todas las fases móviles.

• Si se desmonta una columna, se reducirá el rendimiento de la columna.

• Las columnas nuevas contienen una mezcla de disolventes orgánicos y agua. Consulte el informe de Control de Calidad (QC) de prestación para conocer la composición de los disolventes de la columna. Inicialmente, se deben tomar precauciones para que ninguna fase móvil pase a través de la columna, lo que podría originar la formación de un precipitado.

• Las columnas de fase reversa Agilent son compatibles con agua y con todos los disolventes orgánicos habituales.

• Se recomienda el uso de una precolumna para proteger la columna y aumentar su vida útil.

• Cuando las columnas no se utilicen, no se deben mantener con un pH elevado ni a una temperatura elevada.

• Debe evitarse el uso de esta columna fuera de los intervalos de pH recomendados para la fase de columna. Es previsible que se reduzca la vida útil si se utiliza fuera de los intervalos recomendados de pH y temperatura.

Parámetros de operación de las columnas: pH y temperatura

Fase	Intervalo de pH recomendado	Temperatura máxima de funcionamiento
Poroshell 120 CS-C18	pH 1,0 a 11,0	90 °C
Columnas Poroshell HPH	pH 2,0 a 11,0	60 °C
Poroshell 120 SB-C18, StableBond C18, ZORBAX Rx-C8, ZORBAX SB-Aq, ZORBAX SB-fenil, SB-C3, Poroshell 300, 300SB-C3	pH 1,0 a 8,0	90 °C (StableBond C18 y Poroshell 120 SB-C18) 80 °C (Rx-C8 y SB-Aq, SB-C3 y SB-fenil) 70 °C para pH <5,0; 40 °C para pH 5,0 a 8,0 (Poroshell 300 y 300SB-C3)
ZORBAX Eclipse Plus C18 y C8, Eclipse XDB-C8, XDB-C18, XDB-fenil, Poroshell 120 Bonus-RP, Poroshell 120 EC-C18 y EC-C8, ZORBAX Bonus-RP, HC-C18(2) y TC-C18(2)	pH 2,0 a 9,0	60 °C
ZORBAX Extend C18	pH 2,0 a 11,5	60 °C (40 °C a pH elevado)
Poroshell 120 PFP, Poroshell 120 fenil-hexil, ZORBAX ODS, ZORBAX Phenyl, ZORBAX Eclipse Plus fenil-hexil, ZORBAX XDB-CN, ZORBAX Eclipse PAH, todas las fases ligadas Pursuit y Polaris	pH 2,0 a 8,0	60 °C
ZORBAX Eclipse PAH	pH 2,0 a 8,0	60 °C a pH <6,0
ZORBAX TMS	pH 2,0 a 7,0	60 °C
Columna de retardo InfinityLab PFAS	pH 2,0 a 9,0	60 °C

Nota: Todos los rellenos con sílice son algo solubles en fases móviles acuosas a pH >6. Si se usan columnas basadas en sílice con un pH >6, se consigue la máxima vida útil de la columna a temperaturas inferiores (40 °C máx.) con concentraciones del tampón bajas, entre 0,01 y 0,02 M. El uso en los valores extremos de los intervalos de pH y temperatura afectará significativamente a la vida útil de la columna.

En la próxima newsletter recordaremos cuales son las presiones máximas de trabajo, como hacer la selección de la fase móvil y el gradiente y otras consideraciones sobre el cuidado de la columna.