Recomendaciones Generales para uso de columnas en HPLC/UHPLC

Parte 2

En la newsletter anterior hablamos sobre recomendaciones para la instalación de la columna, su acondicionamiento y sobre aspectos relativos a la seguridad. A continuación, se muestran otras consideraciones importantes:

5. Presiones operativas máximas - columnas de hasta 9,4 mm de d.i.

Tipo de columna	Tamaño de partícula	Límite de presión
Columnas Poroshell 120	1,9 µm, 2,7 µm, 4 µm	1.300 bares (19.500 psi) 600 bares (9.000 psi)
Columnas Poroshell 300	5 µm	400 bares (6.000 psi)
ZORBAX de resolución rápida (RR)	3,5 µm	400 bares (6.000 psi)
ZORBAX de resolución rápida alto rendimiento (RRHT)	1,8 µm	600 bares (9.000 psi)
ZORBAX de alta definición y resolución rápida (RRHD)	1,8 µm	1.200 bares (17.000 psi)
Todas las columnas ZORBAX, Pursuit y Polaris, no indicadas como RRHT o RRHD y HC-C18(2), TC-C18(2)	3,0 µm, 3,5 µm, 5 µm	400 bares (6.000 psi) 200 bares (3.000 psi) (Megaguards)
Columna de retardo InfinityLab PFAS		1.200 bares (17.000 psi)

6. Selección de la fase móvil y temperaturas operativas

La fase estacionaria ligada es de naturaleza no polar y se usa mejor con fases móviles polares, como mezclas de metanol/agua o acetonitrilo/agua. Si se aumenta la cantidad del componente orgánico, normalmente se reduce el tiempo de retención de la muestra.

- Gradientes iniciales recomendados:

Fase estacionaria	Notas de uso
La mayoría de las columnas de fase reversa	5% metanol o acetonitrilo inicialmente y 100% metanol o acetonitrilo como disolvente final.
ZORBAX Eclipse PAH*	30 o 40% de acetonitrilo inicialmente, hasta 100% de acetonitrilo como disolvente final. Podría ser necesario enfriar la columna hasta 15 o 20 °C para mejorar la resolución.
ZORBAX Bonus-RP	Se precisa una concentración inferior del modificador de fase móvil orgánica para la elución de compuestos, en comparación con las tradicionales fases estacionarias alquílicas de cadena larga.

* La vida útil más prolongada de la columna se consigue a <40 °C.

7. Cuidado de la columna

La frita de entrada de las columnas con un tamaño de partícula de 2,7 µm o superior tiene una porosidad nominal de 2 µm. Las muestras que contienen materia particulada taponarán la frita de entrada de la columna. Con estas muestras, se recomienda el uso de columnas ZORBAX y precolumnas rápidas y kits de hardware (según sea necesario); en general, se recomiendan para su uso en todas las columnas.

- Limpieza de la columna/incremento de la vida útil de la columna

Para columnas en las que puede revertirse el flujo (columnas Poroshell 120 y columnas ZORBAX con partículas >1,8 µm y todas las columnas Pursuit y Polaris), comience con un disolvente más fuerte (menos polar).

- Desconecte la columna del detector y pase disolventes de lavado a una cubeta de precipitación.
- Inicie la fase móvil sin sales tampón (agua/orgánico). Lave la columna con entre 10 y 20 volúmenes de columna.
- A continuación, use 100 % orgánico (metanol o acetonitrilo).
- Verifique la presión para ver si ha vuelto a su valor normal; en caso negativo,
- Deseche la columna o considere unas condiciones más fuertes; por ejemplo, 75 % acetonitrilo/25 % isopropanol
- Aumente hasta 100 % isopropanol, 100 % cloruro de metileno o 100 % hexano (si usa cloruro de metileno o hexano, deberá lavar la columna con isopropanol antes de su uso y antes de volver a la fase móvil en fase reversa).

Para columnas con partículas <1,8 µm, no purgue la columna con retroflujo: cambie la columna.

- Recomendaciones para el almacenamiento

El almacenamiento a largo plazo de las columnas de fase ligada y basadas en sílice se debe efectuar con disolvente orgánico puro, como acetonitrilo. Si la columna se ha utilizado con anterioridad con una fase móvil que incluye una solución tampón, se debe extraer en primer lugar dicha solución tampón mediante el purgado de la columna. Para ello, deben emplearse entre 20 y 30 volúmenes de columna de una mezcla 50:50 de metanol o acetonitrilo y agua, seguidos de entre 20 y 30 volúmenes de columna del disolvente puro. Antes de su almacenamiento, los conectores de los extremos se deben cerrar herméticamente con tapones terminales para evitar que el relleno se reseque. Para proteger el equipo, conviene eliminar las sales del instrumento y de la columna mediante el purgado de la columna con la misma fase móvil sin la solución tampón (por ejemplo, con acetonitrilo/H2O 60:40 para eliminar una fase móvil de acetonitrilo/tampón fosfato 0,02 M 60:40). El reequilibrio con la fase móvil original es rápido si se utiliza este procedimiento y se elimina el peligro de corrosión debida a las sales.