

LC Binario Agilent 1260 Infinity

Guía de usuario del sistema



Agilent Technologies

Avisos

© Agilent Technologies, Inc. 2006, 2008-2011, 2013

No se permite la reproducción de parte alguna de este manual bajo cualquier forma ni por cualquier medio (incluyendo su almacenamiento y recuperación electrónicos y la traducción a idiomas extranjeros) sin el consentimiento previo por escrito de Agilent Technologies, Inc. según lo estipulado por las leyes de derechos de autor estadounidenses e internacionales.

Número de referencia del manual:

G1312-95303

Edición

02/2013

Impreso en Alemania

Agilent Technologies
Hewlett-Packard-Strasse 8
76337 Waldbronn

Este producto puede usarse como componente de un sistema de diagnóstico in vitro si dicho sistema está registrado ante las autoridades competentes y cumple la normativa aplicable. De lo contrario, únicamente está previsto para un uso general de laboratorio.

Versión del software

Esta guía es válida para la versión A.01.04 del software OpenLAB CDS Agilent.

Windows® es una marca registrada en EE.UU. de Microsoft Corporation.

Garantía

El material contenido en este documento se proporciona "tal como es" y está sujeto a modificaciones, sin previo aviso, en ediciones futuras. Además, hasta el máximo permitido por la ley aplicable, Agilent rechaza cualquier garantía, expresa o implícita, en relación con este manual y con cualquier información contenida en el mismo, incluyendo, pero no limitado a, las garantías implícitas de comercialización y adecuación a un fin determinado. En ningún caso Agilent será responsable de los errores o de los daños incidentales o consecuentes relacionados con el suministro, utilización o uso de este documento o de cualquier información contenida en el mismo. En el caso que Agilent y el usuario tengan un acuerdo escrito separado con condiciones de garantía que cubran el material de este documento y que estén en conflicto con estas condiciones, prevalecerán las condiciones de garantía del acuerdo separado.

Licencias sobre la tecnología

El hardware y/o software descritos en este documento se suministran bajo una licencia y pueden utilizarse o copiarse únicamente de acuerdo con las condiciones de tal licencia.

Avisos de seguridad

PRECAUCIÓN

Un aviso de **PRECAUCIÓN** indica un peligro. Llama la atención sobre un procedimiento de operación, una práctica o similar que, si no se realizan correctamente o no se ponen en práctica, pueden provocar daños en el producto o pérdida de datos importantes. No avance más allá de un aviso de **PRECAUCIÓN** hasta que se entiendan y se cumplan completamente las condiciones indicadas.

ADVERTENCIA

Un aviso de **ADVERTENCIA** indica un peligro. Llama la atención sobre un procedimiento de operación, una práctica o similar que, si no se realizan correctamente o no se ponen en práctica, pueden provocar daños personales o la muerte. No avance más allá de un aviso de **ADVERTENCIA** hasta que se entiendan y se cumplan completamente las condiciones indicadas.

En esta guía...

Este manual describe el LC Binario Agilent 1260 Infinity.

1 LC Binario Agilent 1260 Infinity: descripción del producto

Este capítulo describe las características del LC Binario 1260 Infinity.

2 Introducción

Este capítulo ofrece una introducción al sistema LC Binario Agilent 1260 Infinity y a sus conceptos principales.

3 Optimización del LC Binario Agilent 1260 Infinity

Este capítulo explica cómo aplicar la teoría y cómo usar las funciones del sistema LC para realizar separaciones optimizadas.

4 Configuración e instalación del sistema

Este capítulo incluye información sobre la instalación del software, la instalación de los módulos y la preparación del sistema para su funcionamiento.

5 Guía de inicio rápida

Este capítulo proporciona información sobre la adquisición de datos y su análisis con el sistema LC Binario 1260 Infinity.

6 Apéndice

Este capítulo proporciona información adicional sobre la seguridad, los aspectos legales, Internet y sobre cómo configurar un método.

Contenido

1 LC Binario Agilent 1260 Infinity: descripción del producto	7
Características del LC Binario Agilent 1260 Infinity	8
Componentes del sistema	10
Especificaciones	22
2 Introducción	27
Teoría del uso de partículas pequeñas en la cromatografía líquida	28
Ventajas de las columnas con partículas de pequeño tamaño	34
Calentamiento derivado de la fricción	37
3 Optimización del LC Binario Agilent 1260 Infinity	39
Cómo configurar el volumen de retardo óptimo	40
Cómo conseguir volúmenes de inyección más elevados	48
Cómo conseguir tiempos de ciclo más cortos	50
Cómo conseguir un arrastre de contaminantes mínimo	54
Cómo conseguir una resolución más elevada	56
Cómo conseguir una sensibilidad más elevada	65
Cómo evitar los bloqueos de columnas	70
4 Configuración e instalación del sistema	73
Instalación del software	74
Instalación de los módulos	76
5 Guía de inicio rápida	87
Sobre la guía de inicio rápida	88
Preparación del sistema	89
Adquisición de datos en la vista Control del método y el análisis	94
Análisis de datos	102

6 Apéndice 107

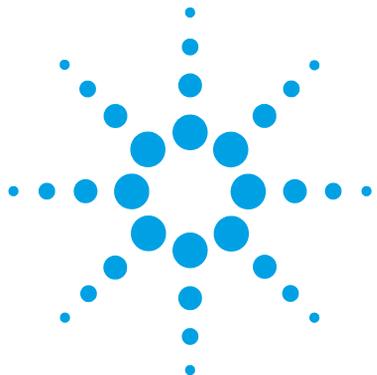
Información sobre seguridad 108

Información sobre disolventes 111

Agilent Technologies en Internet 116

Configuración de un método mediante la opción Editar método completo 117

Contenido



1

LC Binario Agilent 1260 Infinity: descripción del producto

Características del LC Binario Agilent 1260 Infinity	8
Componentes del sistema	10
Bomba binaria 1260 Infinity (G1312B)	11
Desgasificador de alto rendimiento 1260 Infinity (G4225A)	14
Inyector automático de alto rendimiento 1260 Infinity (G1367E)	15
Compartimento de columna termostatzado 1290 Infinity (G1316C)	17
Detector de diodos 1260 Infinity (G4212B)	19
Válvulas de cambio rápido de la serie 1200 Infinity	21
Especificaciones	22

Este capítulo describe las características del LC Binario 1260 Infinity.



Características del LC Binario Agilent 1260 Infinity

El concepto de diseño del LC Binario 1260 Infinity pretende poner a su disposición un cromatógrafo de líquidos con una capacidad de separación ultrarrápida y de alta resolución que, a la vez, conserve todas las funciones de las aplicaciones HPLC estándares. Gracias a esto, le ofrece una retrocompatibilidad total con los métodos de HPLC y UHPLC que tenga establecidos. El uso de partículas de tamaño inferior a 2 μm (STM) requiere un aporte de presión adicional para impulsar la fase móvil a través de la columna si se utilizan velocidades de flujo altas o columnas largas. El paso de flujo del LC Binario 1260 Infinity se ha optimizado para generar una retropresión mínima. Asimismo, el diseño de la distribución de tamaños de partícula de las columnas ZORBAX de Resolución Rápida y Alto Rendimiento está pensado para generar una retropresión significativamente menor que la que producen otras columnas con partículas de tamaño inferior a 2 μm .

A continuación se indican las características de diseño y ventajas del LC Binario Agilent 1260 Infinity:

- El volumen de retardo configurable de la bomba binaria 1260 Infinity, que puede reducirse hasta 120 μL , y el rango de velocidades de flujo desde 0,05 hasta 5 mL/min a presiones de hasta 600 bar lo convierten en un sistema de aplicación universal para columnas de diámetro estrecho (2,1 mm de d.i.) y diámetro estándar (4,6 mm de d.i.) que se adapta a las necesidades del LC y el LC/MS.
- La configuración de volumen estándar de retardo de la bomba binaria 1260 Infinity le permitirá utilizar tanto métodos de UHPLC como métodos de HPLC convencionales sin que eso afecte al rendimiento o altere los patrones cromatográficos.
- El diseño de última generación del flujo a través del inyector automático de alto rendimiento 1260 Infinity aporta una precisión máxima y posibilita una variedad amplia de volúmenes de inyección (desde 0,1 hasta 100 μL) sin modificar los loops de muestreo. Está diseñado para ofrecer una productividad elevada en lo que respecta a las muestras, un arrastre de contaminantes bajo y ciclos de inyección rápidos.
- La elevada temperatura (hasta 100 °C en determinadas columnas) ofrece una selectividad y flexibilidad mayores y reduce la viscosidad del disolvente, lo que posibilita una separación aún más rápida.

- En el compartimento de columna termostatizado 1290 Infinity pueden instalarse diferentes elementos calentadores (1,6 μL) y refrigerantes (1,5 μL) para reducir el volumen extracolumna. La temperatura puede ajustarse desde 10 °C por debajo de la temperatura ambiente hasta 100 °C.
- El nuevo diseño extraíble del accionamiento de la válvula y las válvulas de cambio rápido sustituibles por el usuario del compartimento de columna termostatizado 1290 Infinity aumentan enormemente la capacidad de uso y allanan el camino hacia soluciones de alta productividad, de métodos múltiples y de desarrollo de métodos automatizados.
- El kit de tubos de dispersión baja y las celdas de flujo de volumen pequeño minimizan la dispersión de los picos en las columnas de diámetro estrecho.
- Línea de base robusta y adquisición espectral rápida con velocidades de muestreo de hasta 80 Hz gracias al nuevo diseño óptico del detector de diodos 1260 Infinity .
- Existen distintas celdas de flujo para el detector UV que pueden utilizarse junto con columnas de 2,1 , 3,0 y 4,6 mm de diámetro interno, incluida la revolucionaria celda de flujo de cartucho Max-Light con una longitud de paso óptico de 60 mm (ruido típico: $<\pm 0,6 \mu\text{AU}/\text{cm}$) que posibilita una detección extraordinariamente sensible.

Pueden realizarse actualizaciones progresivas para pasar de un sistema de la serie 1100 o 1200 a un LC Binario Agilent 1260 Infinity; por ejemplo, puede utilizarse un detector de la serie 1100 o un compartimento de columna de la serie 1200 en combinación con una bomba binaria 1260 Infinity.

Componentes del sistema

El LC Binario 1260 Infinity posibilita numerosas configuraciones de sistema para poder adaptarlo a las necesidades de su aplicación específica. En este manual se describen de forma detallada algunas de esas configuraciones (consulte el capítulo “[Configuración e instalación del sistema](#)” en la página 73). Los módulos que se describen en las secciones siguientes son componentes típicos de un LC Binario 1260 Infinity. Aparte de dichos componentes básicos, también disponemos de soluciones concretas para aplicaciones específicas (algunas de las cuales se describen en el capítulo "Optimización").

Bomba binaria 1260 Infinity (G1312B)

La bomba binaria se compone de dos bombas idénticas integradas en una única carcasa. Los gradientes binarios se crean mediante una mezcla a alta presión. Se pueden desviar el amortiguador de pulsos y el mezclador para aplicaciones con una velocidad de flujo baja o cuando se desee un volumen transitorio mínimo. Las aplicaciones típicas son métodos de alto rendimiento con gradientes rápidos en las columnas de 2,1 mm de alta resolución. La bomba puede generar velocidades de flujo de 0,1 – 5 mL/min a presiones de hasta 600 bar. Una válvula de selección de disolventes (opcional) permite formar mezclas binarias (isocráticas o de gradiente) desde uno de los dos disolventes por canal. El lavado activo de sellos (opcional) puede utilizarse con soluciones tampón concentradas.

Principio de funcionamiento

La bomba binaria está basada en un diseño en serie de dos pistones y dos canales que abarca todas las funciones esenciales que debe cumplir cualquier sistema de flujo de disolventes. La medida y suministro de disolvente a la zona de alta presión se realiza mediante dos dispositivos que pueden generar hasta 600 bar de presión.

Cada canal consta de un dispositivo de bomba que incluye accionamiento, cabeza, válvula de entrada activa con cartucho reemplazable y válvula de salida. Los dos canales están conectados a una cámara de mezcla de poco volumen, que está conectada por una bobina capilar de restricción a una unidad de amortiguamiento y a un mezclador. Un sensor de presión monitoriza la presión de la bomba. Una válvula de purga con una frita de PTFE integrada está acoplada a la salida de la bomba para cebar adecuadamente el sistema de bombeo.

1 LC Binario Agilent 1260 Infinity: descripción del producto

Componentes del sistema

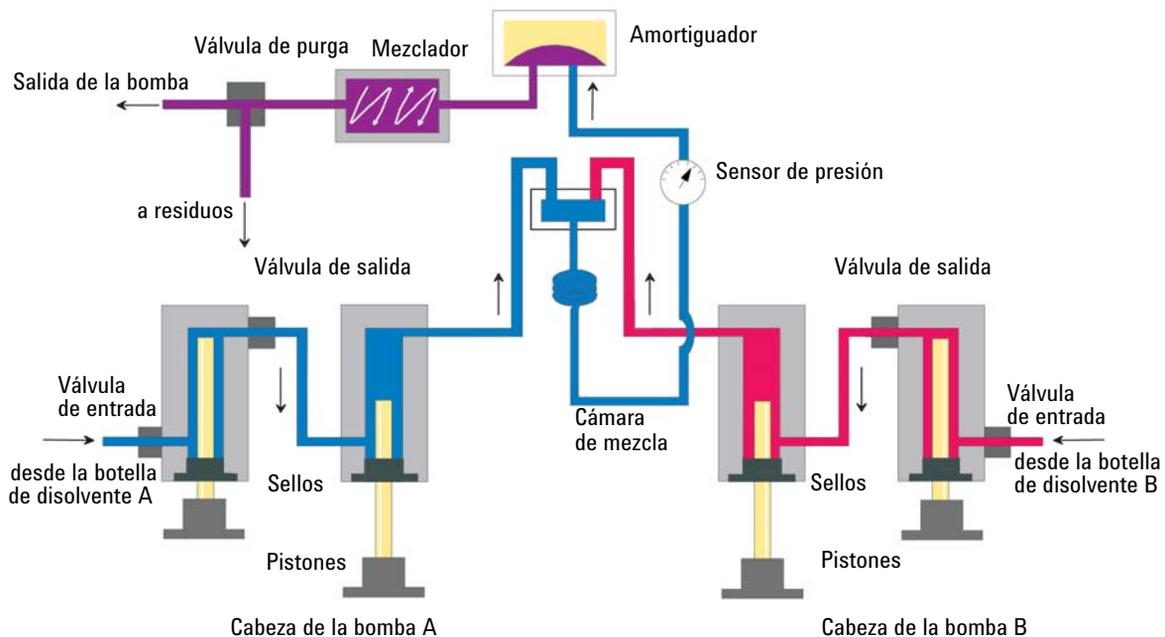


Figura 1 Paso hidráulico de la bomba binaria con el amortiguador y el mezclador

El amortiguador y el mezclador pueden desviarse para conseguir un volumen de retardo mínimo de la bomba binaria. Se recomienda esta configuración para aplicaciones con una velocidad de flujo baja con gradientes bruscos.

La Figura 2 en la página 13 muestra el paso de flujo en modo de volumen de retardo bajo. Para obtener instrucciones acerca de cómo cambiar de una configuración a la otra, consulte el manual de usuario de la bomba binaria G1312B.

NOTA

No se puede desviar el mezclador mientras el amortiguador permanece en línea, ya que puede provocar un comportamiento no deseado de la bomba binaria.

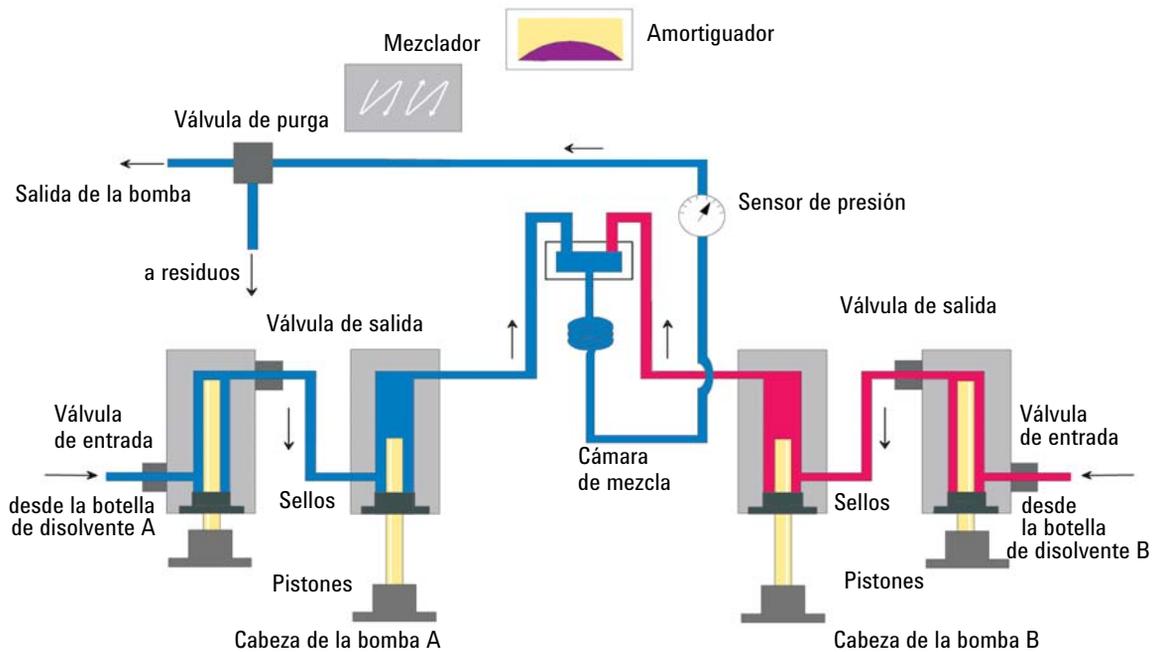


Figura 2 Paso hidráulico de la bomba binaria con el amortiguador y el mezclador desviados

Desgasificador de alto rendimiento 1260 Infinity (G4225A)

El desgasificador de alto rendimiento Agilent 1260 Infinity (modelo G4225A) comprende cuatro cámaras de vacío individuales con tubos semipermeables, una bomba de vacío y un dispositivo de control. Cuando el desgasificador de vacío se enciende, el dispositivo de control enciende la bomba de vacío, que genera una presión baja en las cámaras de vacío. La presión se mide a través de un sensor de presión. Una fuga controlada en el filtro de entrada de aire y una regulación de la bomba de vacío mediante el sensor de presión mantienen la presión baja del desgasificador de vacío.

La bomba LC extrae los disolventes de las botellas a través de los tubos semipermeables situados en las cámaras de vacío. Cuando los disolventes atraviesan las cámaras de vacío, cualquier gas disuelto en los disolventes penetra a través de los tubos en las cámaras de vacío. Al abandonar las salidas del desgasificador de vacío, los disolventes se desgasificarán.

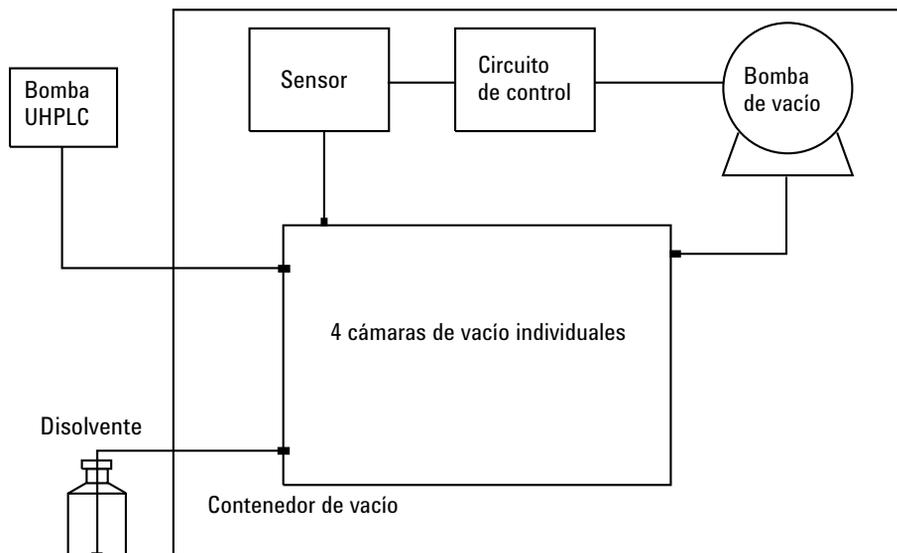


Figura 3 Descripción (sólo se muestra uno de los cuatro canales de disolvente)

Inyector automático de alto rendimiento 1260 Infinity (G1367E)

Características

El inyector automático de alto rendimiento 1260 Infinity presenta un mayor rango de presión (hasta 600 bar) que permite la utilización de la actual tecnología de columnas (columnas de diámetro estrecho con tamaños de partícula inferiores a dos micrones) con el LC Binario Agilent 1260 Infinity. Las nuevas piezas optimizadas proporcionan una mayor robustez y el diseño permite un funcionamiento a alta velocidad con el menor arrastre de contaminantes por flujo posible. La mayor velocidad de la inyección de muestras consigue una mayor productividad en cuanto a las muestras; dicha productividad también aumenta gracias al uso del modo de inyección solapada y a un manejo cómodo y flexible de las muestras con diferentes tipos de contenedores de muestras, como los viales y las placas de pocillos. El uso de las placas de 384 pocillos permite procesar automáticamente hasta 768 muestras.

Principio de funcionamiento del inyector automático

El procesador del inyector automático controla continuamente todos los movimientos de los componentes del inyector automático durante la secuencia de muestreo. Este procesador define los periodos y los rangos mecánicos específicos de cada movimiento. Si una etapa determinada de la secuencia de muestreo no finaliza satisfactoriamente, se genera un mensaje de error. La válvula de inyección desvía el disolvente desde el inyector automático durante la secuencia de muestreo. La aguja se desplaza hasta la posición de muestra deseada y desciende hacia el líquido de la muestra para permitir que el dispositivo de medida extraiga el volumen deseado con un movimiento hacia atrás del émbolo hasta una determinada distancia. A continuación, la aguja se eleva de nuevo y se desplaza hacia el asiento para cerrar el loop de muestreo. La muestra se aplica en la columna cuando la válvula de inyección vuelve a la posición de mainpass al final de la secuencia de muestreo.

La secuencia de muestreo estándar tiene lugar en el siguiente orden:

- 1 La válvula de inyección cambia a la posición de bypass.
- 2 El émbolo del dispositivo de medida se mueve a la posición de inicialización.
- 3 El cierre de la aguja se mueve hacia arriba.
- 4 La aguja se desplaza hacia la posición deseada del vial de muestra (o de la placa de pocillos).
- 5 La aguja desciende hacia el vial de muestra (o la placa de pocillos).

- 6 El dispositivo de medida extrae el volumen de muestra definido previamente.
- 7 La aguja se eleva y se aleja del vial de muestra (o de la placa de pocillos).
- 8 A continuación, la aguja se desplaza hacia el asiento para cerrar el loop de muestreo.
- 9 El cierre de la aguja se mueve hacia abajo.
- 10 El ciclo de inyección se completa cuando la válvula de inyección cambia a la posición de mainpass.

Si es necesario lavar la aguja, esta acción se realizará entre los pasos 7 y 8.

Secuencia de inyección

Antes de comenzar la secuencia de inyección y durante el análisis, la válvula de inyección está en la posición de mainpass. En esta posición, la fase móvil fluye a través del dispositivo de medida del inyector automático, del loop de muestreo y de la aguja. De este modo, se garantiza que todas las piezas que entran en contacto con la muestra se laven durante el análisis y se reduce el arrastre de contaminantes.

Cuando se inicia la secuencia de muestreo, la válvula cambia a la posición de bypass. El disolvente procedente de la bomba penetra en la válvula por el puerto 1 y fluye directamente hasta la columna a través del puerto 6.

El paso final de la secuencia de muestreo es el paso de "inyección y análisis". La válvula de seis puertos cambia a la posición de mainpass y conduce de nuevo el flujo a través del loop de muestreo, que ahora contiene una cantidad determinada de la muestra. El flujo de disolvente transporta la muestra a la columna y comienza el proceso de separación. Esto constituye el principio de un análisis que forma parte de un proceso de análisis. En esta fase, todo el hardware principal que influya en el rendimiento se lava internamente con el flujo de disolvente. En el caso de las aplicaciones estándares, no es necesario ningún procedimiento de lavado adicional.

Limpieza de la aguja

Antes de la inyección, y con el fin de reducir el arrastre de contaminantes y obtener análisis extremadamente precisos, se puede lavar el exterior de la aguja en un puerto de lavado ubicado en la unidad de muestreo, detrás del puerto de inyección. En cuanto la aguja se encuentra en el puerto de lavado, una bomba peristáltica suministra disolvente durante un tiempo definido para limpiar el exterior de la aguja. Cuando este proceso finaliza, la aguja vuelve al puerto de inyección.

Compartimento de columna termostatzado 1290 Infinity (G1316C)

El compartimento de columna termostatzado (TCC) Agilent 1290 Infinity controla la temperatura entre 10 °C por debajo de la temperatura ambiente y hasta 100 °C a 2,5 ml/min y 80 °C a 5 ml/min, respectivamente. La especificación de estabilidad de la temperatura es $\pm 0,05$ °C y la especificación de precisión $\pm 0,5$ °C (con calibración)¹. Esto se logra mediante una combinación de conducción desde el contacto con las aspas del termostato, la temperatura de aire inmóvil en el entorno de la columna y, lo más importante, mediante el calentamiento (o enfriamiento) previo de la fase móvil al pasar por un intercambiador de calor antes de entrar en la columna. Existen dos zonas de temperatura independientes en cada TCC que pueden funcionar conjuntamente para columnas largas de hasta 300 mm de longitud o funcionar a temperaturas diferentes para columnas cortas de 100 mm de longitud o menos.

El módulo dispone de un intercambiador de calor de dispersión baja de 1,6 μ l y cada kit de válvulas contiene intercambiadores de calor de dispersión baja adicionales para cada columna. Los intercambiadores de calor de dispersión baja, hasta 4, se pueden montar de forma flexible dentro del TCC. Para el funcionamiento del sistema HPLC convencional, también están disponibles intercambiadores de calor integrados de 3 μ l y 6 μ l.

Cada TCC puede albergar una unidad de válvula interna para facilitar aplicaciones de intercambio de la válvula, desde el intercambio simple entre dos columnas hasta la regeneración alterna de columnas, la preparación de muestras o la limpieza posterior de la columna. Cada cabeza de la válvula constituye un kit completo que contiene todos los capilares necesarios, intercambiadores de calor adicionales de dispersión baja y otras piezas.

Las válvulas de intercambio presentan una facilidad de uso y una flexibilidad excepcionales a la hora de realizar conexiones con la válvula: cuando se pulsa, la unidad de accionamiento de la válvula de cambio rápido se desplaza hacia delante para acceder fácilmente (consulte la [Figura 4](#) en la página 18 a la izquierda). El usuario puede intercambiar cabezas de las válvulas alternativas en el mecanismo de accionamiento para diferentes aplicaciones (consulte la [Figura 4](#) en la página 18 a la derecha). Tenga en cuenta la etiqueta RFID (identificación por radiofrecuencia) de la parte superior de la cabeza de la válvula.

¹ Todas las especificaciones son válidas para el agua destilada a temperatura ambiente de 25 °C, con un valor de 40 °C y un rango de flujo entre 0,2 y 5 mL/min.

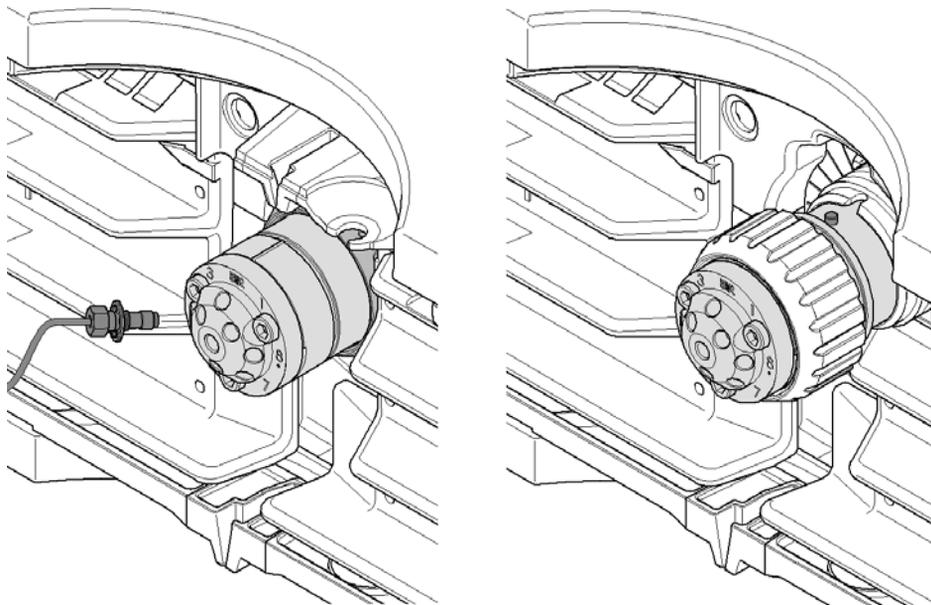


Figura 4 Válvula de cambio rápido en TCC

Se pueden "agrupar" hasta tres TCC para permitir aplicaciones avanzadas, como el intercambio entre ocho columnas para el desarrollo de métodos automatizados o para que haya más columnas disponibles para diferentes aplicaciones. Por tanto, la columna que se va a utilizar se convierte en un parámetro del método simple. Esto requiere dos cabezas de válvulas de 8 posiciones y 9 puertos, cada una en dos de los TCC. Los TCC agrupados se representan en el software como una única unidad con una interfaz para facilitar su funcionamiento.

Las mejoras adicionales en comparación con los diseños anteriores incluyen un mejor aislamiento térmico, mejores guías de capilares y un sensor de "puerta abierta" para que los métodos puedan definir que la puerta debe estar cerrada (lo que es especialmente útil para los métodos de temperaturas altas o bajas).

Detector de diodos 1260 Infinity (G4212B)

El detector de diodos (DAD) 1260 Infinity presenta un diseño óptico nuevo que utiliza una celda de cartucho con guías de onda optofluídicas con una gran sensibilidad y una dispersión baja, un amplio rango lineal y una línea base muy estable para las aplicaciones LC estándares o ultrarrápidas. La celda de cartucho Max-Light de Agilent aumenta drásticamente la transmisión de luz mediante el principio de la reflexión interna total junto con un capilar de cristal de sílice fundida sin recubrimiento y alcanza un nivel nuevo de sensibilidad sin sacrificar la resolución a través de los efectos de dispersión del volumen de la celda. Este diseño minimiza las perturbaciones de la línea base provocadas por el índice de refracción o los efectos térmicos y supone una integración más fiable de las áreas de pico.

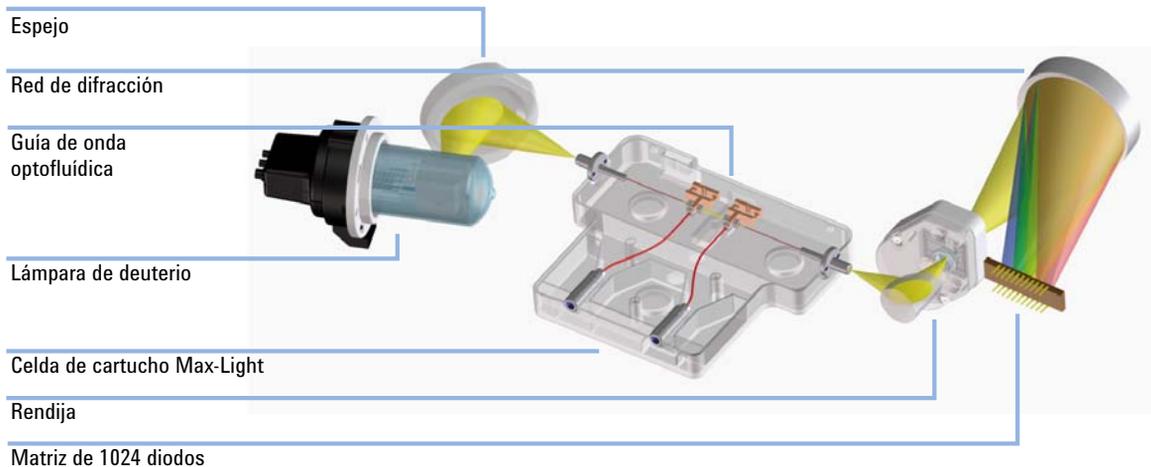


Figura 5 Trayectoria de la luz a través del DAD

El módulo también incluye un control electrónico de la temperatura para mejorar aún más la resistencia a los efectos de la temperatura ambiental. Aunque el volumen hidráulico de la celda de cartucho Max-Light es muy pequeño, la longitud de paso es de 10 mm. Sin embargo, para obtener una sensibilidad aún mayor existe otra celda de alta sensibilidad Max-Light de Agilent con una longitud de paso de 60 mm disponible. Las celdas se intercambian fácilmente al deslizarlas hacia dentro o hacia afuera del soporte de la celda y se alinean automáticamente en el banco óptico. La fuente de luz del DAD es una lámpara de deuterio y el rango operativo de longitud de onda cubierto es de entre 190 y 640 nm. Una matriz de 1024 diodos se encarga de la detección. La entrada al espectrógrafo se produce a través de una rendija óptica fija de 4 nm.

1 LC Binario Agilent 1260 Infinity: descripción del producto

Componentes del sistema

Las señales cromatográficas se extraen de los datos de los diodos dentro del firmware del módulo. Se pueden definir hasta ocho señales individuales. Cada una de ellas consta de una longitud de onda de señal, una anchura de banda de agrupamiento de diodos y, en caso necesario, una longitud de onda y una anchura de banda de referencia. Las señales se pueden emitir a un máximo de 80 Hz (80 puntos de datos/segundo) para registrar de forma precisa los picos cromatográficos más rápidos (más estrechos). Al mismo tiempo, el módulo también puede emitir espectros de rango completo al sistema de datos a la misma velocidad de 80 Hz.

Para los laboratorios regulados, es importante que todos los parámetros de los métodos estén registrados. El DAD 1260 Infinity no sólo registra los valores del instrumento, sino también las etiquetas RFID (etiquetas de identificación de radiofrecuencia) incorporadas en la lámpara y el cartucho de la celda de flujo, a fin de que el sistema también registre la identidad y las variables de estos componentes importantes.

Válvulas de cambio rápido de la serie 1200 Infinity

Las válvulas de cambio rápido Agilent 1200 Infinity pueden utilizarse para diversas aplicaciones complejas con válvulas. Cada cabeza de la válvula constituye un kit completo que contiene todos los capilares necesarios, intercambiadores de calor adicionales de dispersión baja y otras piezas.

Algunas de las aplicaciones típicas de las válvulas de cambio rápido son las siguientes:

- Selección de columna dual
- Enriquecimiento de muestras
- Limpieza de muestras
- Regeneración alterna de columnas
- Aplicaciones especiales, como el desarrollo de métodos o la 2D-LC

Si desea obtener una descripción detallada de dichas aplicaciones, consulte la guía de usuario de soluciones de válvulas.

Especificaciones

El diseño modular del LC Binario 1260 Infinity le permitirá configurar un sistema que se adapte a la perfección a los requisitos específicos de sus aplicaciones. Dicha configuración puede ser distinta de la configuración estándar que se describe en esta guía de usuario del sistema.

A continuación se indican las especificaciones físicas y de rendimiento de la bomba binaria 1260 Infinity . Puede encontrar información acerca de las especificaciones del resto de módulos de su sistema en los manuales de usuario de dichos módulos.

Especificaciones físicas de la bomba binaria 1260 Infinity (G1312B)

Tabla 1 Especificaciones físicas

Tipo	Especificación	Comentarios
Peso	15,5 kg	
Dimensiones (altura × anchura × profundidad)	180 x 345 x 435 mm	
Voltaje de línea	100 – 240 VAC, ± 10 %	Capacidad de rango amplio
Frecuencia de línea	50 o 60 Hz, ± 5 %	
Consumo de corriente	220 VA, 74 W / 253 BTU	Máximo
Temperatura ambiente operativa	4–55 °C	
Temperatura ambiente no operativa	-40 – 70 °C	
Humedad	< 95 % de humedad relativa a 40 °C	Sin condensación
Altitud operativa	Hasta 2000 m	
Altitud no operativa	Hasta 4600 m	Para guardar el módulo
Estándares de seguridad: IEC, CSA, UL	Categoría de instalación II, grado de contaminación 2	Sólo para su utilización en interiores

Especificaciones de rendimiento

Tabla 2 Especificaciones de rendimiento de la bomba binaria Agilent 1260 Infinity (G1312B)

Tipo	Especificación	Comentarios
Sistema hidráulico	Dos bombas con pistón doble en serie con motor de embolada variable servocontrolado, transmisión de potencia mediante engranajes y husillos de bolas y pistones pivotantes	
Rango de flujo ajustable	Ajuste de valores entre 0,001 – 5 mL/min, con incrementos de 0,001 mL/min	
Rango de flujo	0,05 – 5,0 mL/min	
Precisión del flujo	≤0,07 % RSD o ≤0,02 min SD, lo que sea mayor	Basado en el tiempo de retención a temperatura ambiente constante
Exactitud del flujo	± 1 % o 10 µL/min, lo que sea mayor	Bombeo de H ₂ O desgasificada a 10 MPa (100 bar)
Rango operativo de presión	Rango operativo 0 – 60 MPa (0 – 600 bar, 0 – 8700 psi) hasta 5 mL/min	
Pulso de presión	< 2 % de amplitud (normalmente < 1,3 %) o < 0,3 MPa (3 bar), lo que sea mayor, con un flujo de 1 mL/min de isopropanol, a todas las presiones > 1 MPa (10 bar, 147 psi) <i>Configuración de volumen de retardo bajo:</i> < 5 % amplitud (normalmente < 2 %)	
Compensación de la compresibilidad	Predefinida, basada en la compresibilidad de la fase móvil	
Rango de pH recomendado	1,0 – 12,5, los disolventes con pH < 2,3 no deberían contener ácidos que ataquen al acero inoxidable	
Formación de gradiente	Mezcla binaria de alta presión	

Tabla 2 Especificaciones de rendimiento de la bomba binaria Agilent 1260 Infinity (G1312B)

Tipo	Especificación	Comentarios
Volumen de retardo	<i>Configuración de volumen estándar de retardo:</i> 600 – 800 µL (incluye mezclador de 400 µL), en función de la retropresión <i>Configuración de volumen de retardo bajo:</i> 120 µL	Medición con un flujo de agua de 1 mL/min (agua/cafeína como indicador)
Rango de composición	Rango ajustable: 0 – 100 % Rango recomendado: 1 – 99 % o 5 µL/min por canal, lo que sea mayor	
Precisión de la composición	< 0,15 % RSD o < 0,04 min SD, lo que sea mayor	A 0,2 y 1 mL/min; basado en el tiempo de retención a temperatura ambiente constante
Exactitud de la composición	± 0,35 % absoluto, a 2 mL/min y 10 MPa (100 bar)	Agua/cafeína como indicador
Control	Software de control Agilent (por ejemplo, ChemStation, EZChrom, OL o MassHunter)	
Control local	Agilent Instant Pilot	Versión B.02.00 o superior
Salida analógica	Para control de la presión, 1,33 mV/bar, una salida	
Comunicaciones	Red de área del controlador (CAN), RS-232C, APG remoto: señales de preparado, inicio, parada y apagado; LAN opcional	

1 LC Binario Agilent 1260 Infinity: descripción del producto

Especificaciones

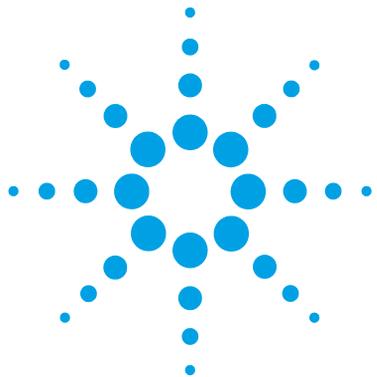
Tabla 2 Especificaciones de rendimiento de la bomba binaria Agilent 1260 Infinity (G1312B)

Tipo	Especificación	Comentarios
Seguridad y mantenimiento	Dispone de un apoyo amplio para la resolución de problemas y el mantenimiento a través de Instant Pilot, Agilent Lab Advisor y el sistema de datos cromatográfico (CDS). Las funciones asociadas a la seguridad son las siguientes: detección de fugas, tratamiento seguro de fugas, señal de salida de fugas para apagar el sistema de bombeo y tensiones bajas en las áreas de mantenimiento principales.	
Características de GLP	Mantenimiento preventivo asistido (EMF) para realizar un seguimiento continuo del uso del instrumento en cuanto al desgaste de los sellos y al volumen de la fase móvil bombeada; con límites predefinidos y configurables por el usuario y mensajes informativos. Registros electrónicos de las tareas de mantenimiento y los errores.	
Carcasa	Todos los materiales son reciclables.	

NOTA

Es necesario utilizar un desgasificador de vacío para velocidades de flujo inferiores a 500 µl/min o cuando no se utiliza un amortiguador ni un mezclador.

Todas las medidas de especificación se llevan a cabo con disolventes desgasificados.



2 Introducción

Teoría del uso de partículas pequeñas en la cromatografía líquida 28

Ventajas de las columnas con partículas de pequeño tamaño 34

Calentamiento derivado de la fricción 37

Este capítulo ofrece una introducción al sistema LC Binario Agilent 1260 Infinity y a sus conceptos principales.



Teoría del uso de partículas pequeñas en la cromatografía líquida

Introducción

En 2003, Agilent presentó las primeras columnas comerciales de sílice totalmente porosa con partículas de 1,8 μm .

Estas columnas con partículas de tamaño inferior a 2 μm (1,8 μm) se pueden utilizar en combinación con el LC Binario Agilent 1260 para alcanzar dos objetivos principales:

1 Una cromatografía más rápida

Las columnas cortas con partículas inferiores a 2 μm ofrecen la oportunidad de reducir drásticamente el tiempo de análisis mediante el aumento de la velocidad del flujo sin perder la eficacia de separación.

2 Una resolución más elevada

Las columnas largas con partículas de tamaño inferior a 2 μm proporcionan una eficacia superior y, por tanto, una mayor resolución, necesaria para realizar la separación de muestras complejas.

La presión necesaria para conducir el disolvente por una columna que contenga partículas STM (de tamaño inferior a 2 μm) aumenta rápidamente a medida que la velocidad de flujo se eleva para realizar separaciones más rápidas y muy rápidamente a medida que la longitud de la columna aumenta para obtener más resolución. Por tanto, la aceptación de las columnas STM se ha producido al mismo tiempo que el desarrollo de los sistemas UHPLC (sistemas HPLC que ofrecen presiones superiores a la normativa de 400 bar existente desde la aparición de la HPLC).

En la actualidad, Agilent pone a su disposición el LC 1290 Infinity, que da respuesta a los requisitos de UHPLC más exigentes con presiones de hasta 1200 bar.

La teoría

La eficacia de separación en HPLC se puede describir mediante la ecuación de van Deemter (Figura 6 en la página 29). Dicha ecuación se obtiene a partir del modelo de altura de plato utilizado para medir la dispersión de los analitos a medida que descienden por la columna. H es la altura equivalente a un plato teórico (a veces denominada HETP), d_p es el tamaño de partícula del material de relleno de la columna, u_0 es la velocidad lineal de la fase móvil y A , B y C son las constantes relacionadas con las diferentes fuerzas dispersoras. El término A está relacionado con la difusión turbulenta o con varios pasos de flujo por la columna; B está relacionado con la difusión molecular por todo el eje de la columna (longitudinal); C está relacionado con la transferencia de masa de los analitos entre la fase móvil y la estacionaria. La separación alcanza su eficacia máxima cuando H está al mínimo. El efecto de cada término individual y la ecuación combinada se muestran en la Figura 6 en la página 29, donde la altura de plato se representa frente a la velocidad de flujo lineal en la columna. Este tipo de gráfica se conoce como la curva de Van Deemter y se utiliza para determinar la velocidad del flujo óptima (punto mínimo de la curva) y obtener la mayor eficacia en la separación de una columna.

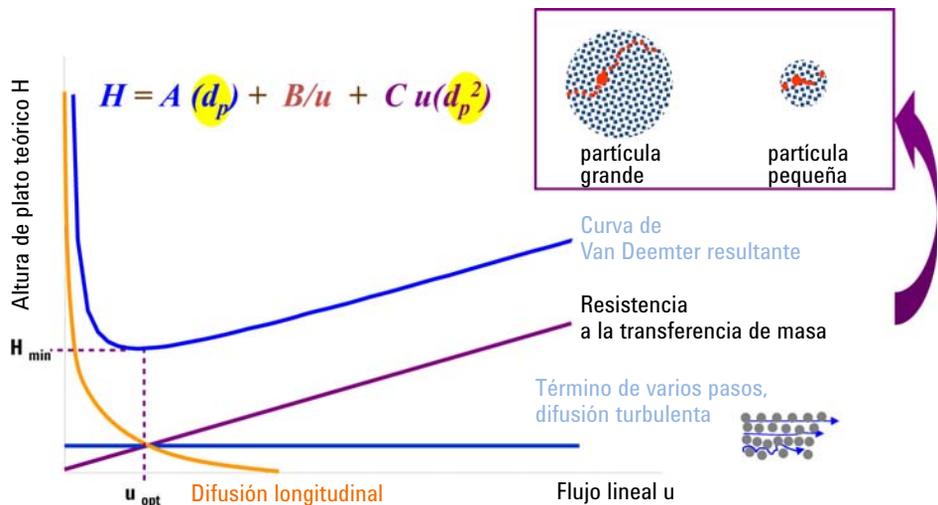


Figura 6 Una curva de Van Deemter hipotética

Las representaciones de Van Deemter en la [Figura 7](#) en la página 30 muestran que la reducción del tamaño de las partículas aumenta la eficacia. El cambio de los tamaños de partículas más utilizados de 3,5 μm y 5,0 μm a partículas de 1,8 μm ofrece una mejoras de rendimiento significativas. Las partículas de 1,8 μm ofrecen valores de altura de plato dos o tres veces más bajos y eficacias proporcionalmente superiores. Esto permite utilizar columnas más cortas sin sacrificar la resolución y, por tanto, también se reduce el tiempo del análisis a la mitad o a una tercera parte. La eficacia aumentada se obtiene en gran medida de la reducción en varios pasos de flujo como resultado del menor tamaño de las partículas; esto lleva a un término A más pequeño (difusión turbulenta). Además, unas partículas más pequeñas significan tiempos de transferencia de masas más breves, lo que reduce el término C, y se puede observar que el efecto general es una pérdida de eficacia muy reducida a medida que la velocidad del flujo aumenta (la pendiente de la línea se reduce). Esto quiere decir que la separación en partículas más pequeñas se puede acelerar aún más mediante el aumento de las velocidades del flujo y sin reducir la eficacia de una manera significativa.

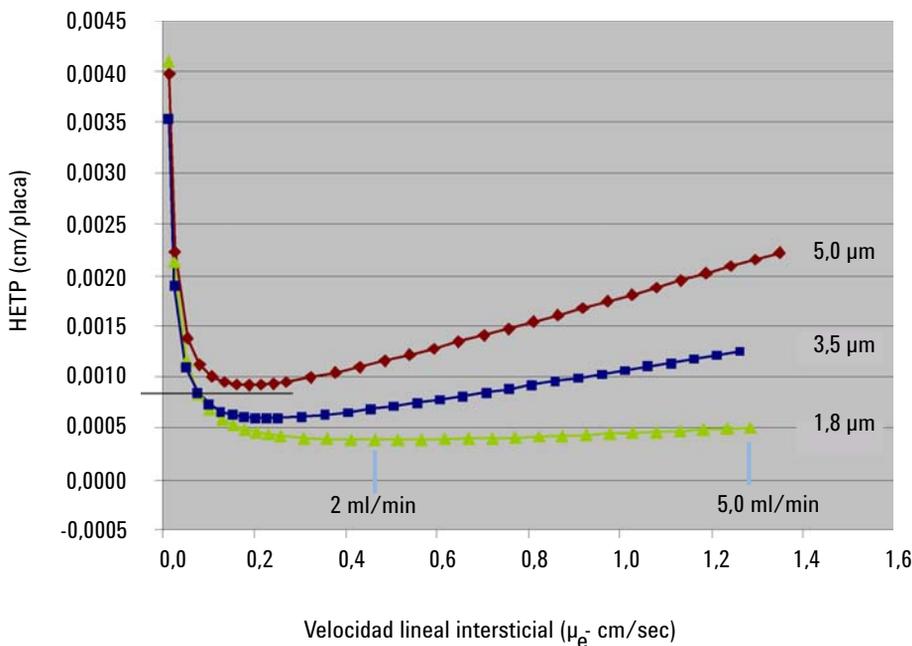


Figura 7 Curva de Van Deemter para diferentes tamaños de partículas

Una separación cromatográfica se puede optimizar en función de parámetros físicos de la columna HPLC como el tamaño de la partícula, el tamaño del poro, la morfología de las partículas, la longitud y el diámetro de la columna, la velocidad del disolvente y la temperatura. Además, se puede considerar la termodinámica de una separación y se pueden manipular las propiedades del soluto y las fases estacionaria y móvil (porcentaje de disolvente orgánico, fuerza iónica y pH) para lograr la retención más corta posible y la mayor selectividad.

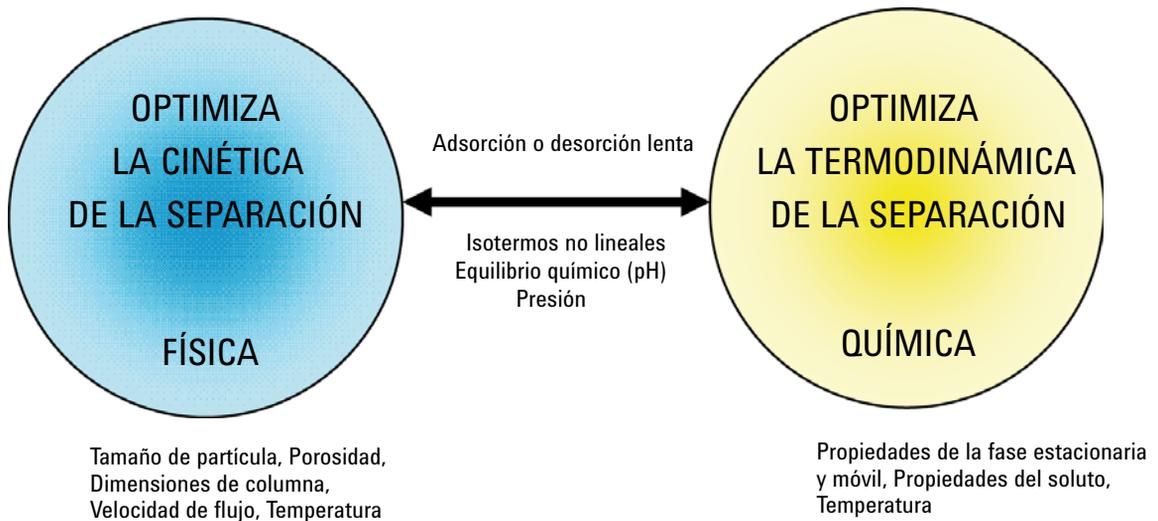


Figura 8 Selección de condiciones óptimas para HPLC

2 Introducción

Teoría del uso de partículas pequeñas en la cromatografía líquida

La resolución se puede describir como una función de tres parámetros:

- eficacia de la columna o platos teóricos (N),
- selectividad (α),
- factor de retención (k).

Según la ecuación de resolución (Figura 9 en la página 32), la selectividad posee el mayor impacto sobre la resolución (Figura 10 en la página 32). Esto significa que la selección de las propiedades y la temperatura adecuadas de las fases móvil y estacionaria es muy importante a fin de lograr una separación correcta.

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left[\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right] \cdot \left[\frac{k_2'}{k_2' + 1} \right]$$

Figura 9 Ecuación de resolución

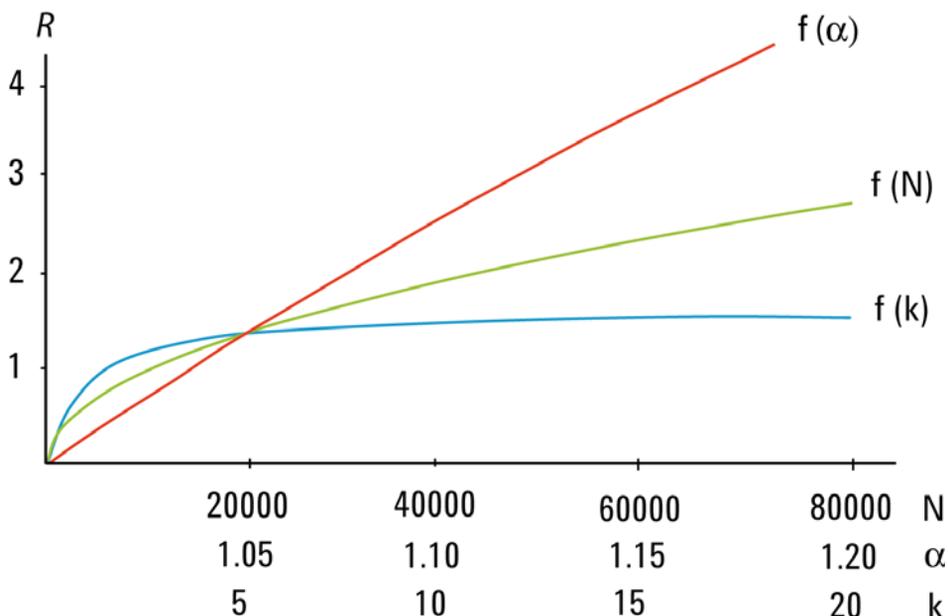


Figura 10 Efecto del número de plato, factor de separación y factor de retención en R

Independientemente de si el método de separación UHPLC se ha creado recientemente o se ha transferido de un método convencional existente, es claramente beneficioso disponer de una variedad amplia de agentes químicos de fase estacionaria en una gama de formatos de columna.

Agilent pone a su disposición más de 140 columnas ZORBAX 1,8 μm de Resolución Rápida y Alto Rendimiento (RRHT), con 14 posibilidades de selectividad, de 15 a 150 mm de longitud y diámetros internos de 2,1 , 3,0 y 4,6 mm.

Además de las columnas ZORBAX, también le ofrecemos columnas PoroShell con nueve posibilidades de selectividad que puede utilizar con el LC Binario Agilent 1260 Infinity.

Esto permite seleccionar la fase estacionaria óptima para maximizar la selectividad. La resolución, la velocidad de flujo y el tiempo de análisis se pueden optimizar mediante la selección de la longitud de columna y el diámetro adecuados. Además, el funcionamiento con columnas STM más largas se ha vuelto más accesible que nunca.

Las columnas PoroShell reciben la denominación de columnas con partículas superficialmente porosas (SPP). A diferencia de las columnas de sílice completamente porosa, las partículas de las columnas SPP presentan un núcleo macizo (de 1,7 μm de diámetro) recubierto por una capa de sílice porosa (de 0,5 μm de espesor). La velocidad y la resolución de las columnas PoroShell son comparables a las de las columnas con partículas de tamaño inferior a 2 μm con una retropresión hasta un 50 % inferior. Las columnas PoroShell han experimentado un reciente resurgimiento gracias al uso de tamaños de partícula más pequeños que los de las columnas con partículas "peliculares" más antiguas. El interés actual por esta tecnología viene impulsado por la utilización de partículas de tamaños más pequeños (como los tamaños inferiores a 3 μm), que permiten aplicarla a separaciones convencionales de moléculas pequeñas en fase inversa.

Muchos laboratorios llevan a cabo un proceso de análisis minucioso para seleccionar la mejor combinación de la fase estacionaria, la fase móvil y la temperatura para sus separaciones. La solución de desarrollo de métodos múltiples de la serie Agilent 1200 Infinity facilita la automatización completa de este proceso laborioso de selección (consiguiendo que las tareas de desarrollo y transferencia de métodos resulten sencillas y fiables).

Las columnas ZORBAX de Resolución Rápida y Alto Rendimiento (RRHT) de 1,8 μm utilizan la misma química que las columnas ZORBAX con partículas de 3,5 y 5 μm . Como resultado, para cualquier fase determinada ZORBAX, las partículas de 5,0 , 3,5 y 1,8 μm proporcionan una selectividad idéntica, lo que permite una transferencia de métodos bidireccional sencilla, rápida y segura entre un sistema LC convencional y un sistema UHPLC.

Ventajas de las columnas con partículas de pequeño tamaño

Una cromatografía más rápida

Existen muchas ventajas al disponer de tiempos de análisis más cortos. Los laboratorios de alto rendimiento poseen una mayor capacidad y pueden analizar más muestras en menos tiempo. Más muestras en menos tiempo también significa menos costes. Por ejemplo, si se reduce el tiempo de análisis de 20 min por muestra a 5 min, el coste de 700 muestras se reduce un 79 % (Tabla 3 en la página 34).

Tabla 3 Ahorro de tiempo y costes en 700 análisis

Tiempo del ciclo	Tiempo del ciclo de 20 min	Tiempo del ciclo de 5 min
Análisis	700	700
Coste aprox. por análisis ¹	\$ 10,58	\$ 2,24
Coste aprox. por 700 análisis ¹	\$ 7400	\$ 1570
Ahorro de costes	-	\$ 5830
Tiempo ²	10 días	2,5 días

¹ disolventes = 27 \$/l, desechos = 2 \$/l, trabajo = 30 \$/h

² 24 horas/día

La calculadora de ahorro de costes de Agilent ofrece una forma sencilla de calcular el ahorro de costes que se obtiene con el cambio de HPLC convencional a UHPLC con columnas de tamaño de partículas de 1,8 µm. Esta calculadora está disponible en el sitio Web de Agilent Technologies junto con una calculadora de transferencia de métodos (www.chem.agilent.com). Los resultados se presentan en un gráfico y en forma de tabla.

Unos tiempos de análisis más cortos también ofrecen respuestas más rápidas. Esto es importante en el control de procesos y en las pruebas de liberación rápida. Ahora en lugar de esperar horas para liberar un único lote de un fármaco, toda la adecuación, calibración y análisis de muestras del sistema se puede llevar a cabo en menos de una hora. Las respuestas rápidas también

Ventajas de las columnas con partículas de pequeño tamaño

son importantes para los químicos sintéticos que utilizan sistemas LC/MS de libre acceso para la confirmación del compuesto y el control de la reacción. Los tiempos de análisis más cortos también aceleran el proceso de desarrollo del método de forma significativa.

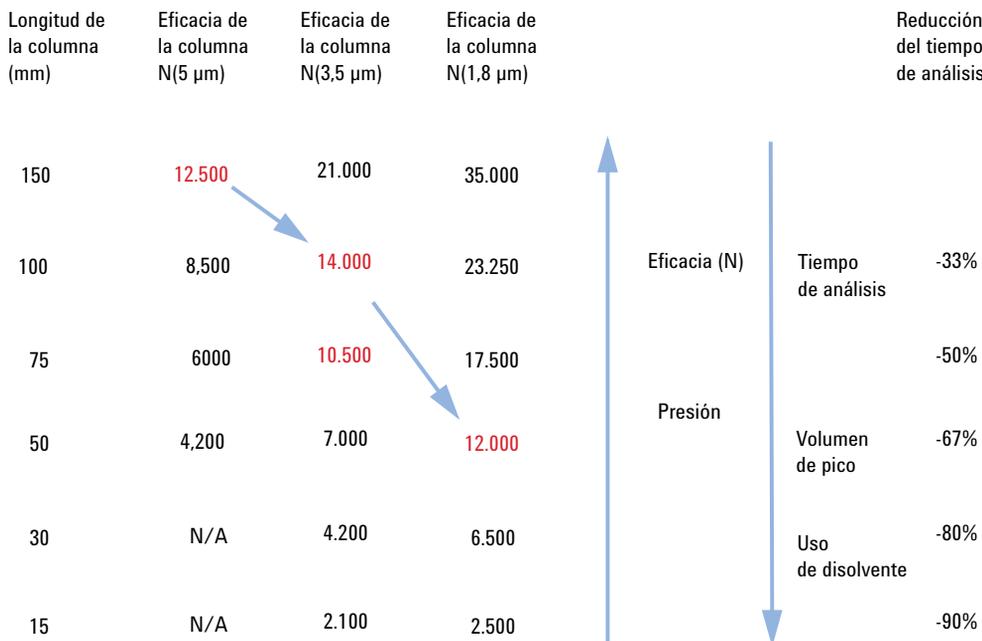


Figura 11 Relación entre el tamaño de partículas, la eficacia y el tiempo de análisis

El tiempo de análisis puede reducirse mediante la optimización del tamaño de partícula y la presión, sin que eso afecte a la eficacia de la columna.

Una resolución más elevada

Las columnas largas con partículas más pequeñas generan una eficacia y una resolución más elevadas. Esto es importante para el análisis de muestras complejas procedentes de estudios metabolómicos y proteómicos. Además, las aplicaciones como la determinación del perfil de impurezas pueden beneficiarse de una potencia de separación mayor. Incluso los análisis LC/MS de fármacos en fluidos biológicos se pueden beneficiar de la capacidad de picos superior, gracias a la interferencia reducida por la supresión de iones. En general, una potencia de separación mayor ofrece más confianza en los resultados analíticos.

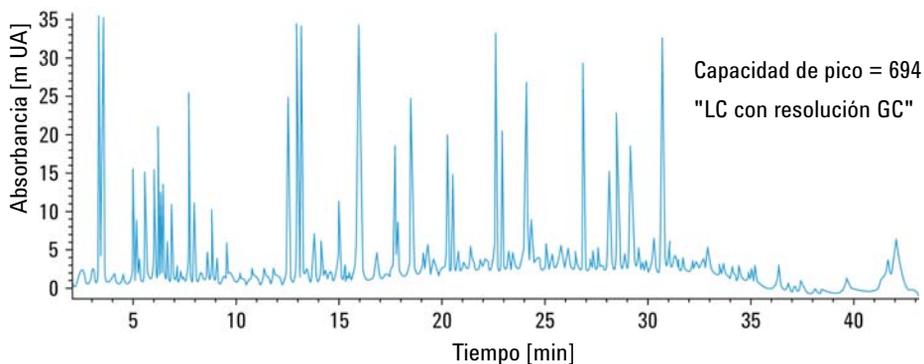


Figura 12 Se pueden obtener capacidades de pico de más de 700 mediante una columna ZORBAX RRHT SB-C18 (2,1 x 150 mm, 1,8 μ m) para analizar una digestión triptica de BSA

Calentamiento derivado de la fricción

Si se fuerza la fase móvil por la columna a una gran presión y a una velocidad de flujo elevada, se genera calor. Los gradientes de temperatura resultantes (radiales y longitudinales) pueden tener un impacto en la eficacia de la columna.

$$\text{Power} = F * p$$

donde F es la velocidad del flujo y p es la presión.

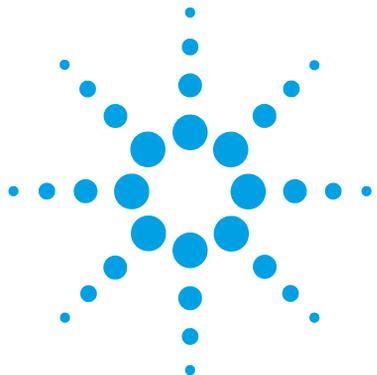
La termostatación potente de la columna (por ejemplo, mediante un baño de agua) genera un gradiente de temperatura radial fuerte, lo que provoca una pérdida significativa de la eficacia de la columna. La termostatación de la columna de aire inmóvil reduce el gradiente de temperatura radial y, por tanto, reduce la pérdida de eficacia. No obstante, se debe aceptar una temperatura de salida de la columna más elevada. La temperatura elevada puede afectar a la selectividad. Con una retropresión inferior se minimizan las pérdidas de rendimiento debido al calor por fricción, de forma que las columnas con partículas de tamaño inferior a 2 µm con un diámetro interno de 4,6 o 3 mm ofrecen eficacias superiores en comparación con las respectivas columnas de 2,1 mm de diámetro interno.

En resumen, el uso de un material de relleno inferior a 2 µm ofrece una mayor eficacia, una resolución más elevada y separaciones más rápidas.

Las características del LC Binario Agilent 1260 Infinity se tratan en el capítulo *Descripción del producto*. Asimismo, en el capítulo *Optimización* se indica cómo debe aplicarse la teoría y deben utilizarse dichas características para optimizar las separaciones.

2 **Introducción**

Calentamiento derivado de la fricción



3 Optimización del LC Binario Agilent 1260 Infinity

Cómo configurar el volumen de retardo óptimo	40
Volumen de retardo y volumen de extracolumna	40
Volúmenes de retardo del LC Binario Agilent 1260 Infinity	42
Configuración óptima del instrumento para columnas de 2,1 mm de d.i.	43
Configuración óptima del instrumento para columnas de 3 y 4,6 mm de d.i.	46
Cómo conseguir volúmenes de inyección más elevados	48
Cómo conseguir tiempos de ciclo más cortos	50
Cómo conseguir un alto rendimiento	53
Cómo conseguir un arrastre de contaminantes mínimo	54
Cómo conseguir una resolución más elevada	56
Configuración óptima del instrumento para conseguir una alta resolución	60
Cómo conseguir una sensibilidad más elevada	65
Configuración óptima del instrumento para conseguir una sensibilidad elevada	66
Elección de la celda de flujo	68
Cómo evitar los bloqueos de columnas	70

Este capítulo explica cómo aplicar la teoría y cómo usar las funciones del sistema LC para realizar separaciones optimizadas.



Cómo configurar el volumen de retardo óptimo

Volumen de retardo y volumen de extracolumna

El *volumen de retardo* se define como el volumen del sistema entre el punto de mezcla en la bomba y la parte superior de la columna.

El *volumen extracolumna* se define como el volumen entre el punto de inyección y el punto de detección, excluyendo el volumen en la columna.

Volumen de retardo

En las separaciones de gradiente, este volumen provoca un retardo entre el cambio de la mezcla en la bomba y la llegada de dicho cambio a la columna. El retardo depende de la velocidad de flujo y del volumen de retardo del sistema. En realidad, esto significa que, en cada sistema HPLC, existe un segmento isocrático adicional en el perfil de gradiente al inicio de cada análisis. Por regla general, el perfil de gradiente se indica en términos de los ajustes de mezcla de la bomba y el volumen de retardo no se cita aunque afectará a la cromatografía. El efecto será más significativo a velocidades de flujo bajas y a volúmenes de columna pequeños. Asimismo, puede afectar significativamente a la transferibilidad de los métodos de gradiente. Por lo tanto, para las separaciones de gradiente rápidas es importante tener volúmenes de retardo pequeños, especialmente en el caso de las columnas de diámetro estrecho (es decir, con un diámetro interno de 2,1 mm) que se suelen utilizar en la detección espectrométrica de masas.

Como ejemplo, en métodos de HPLC que emplean material de relleno de 5 μm , se suelen utilizar velocidades de flujo de 1 ml/min en una columna con un diámetro interno de 4,6 mm y de aproximadamente 0,2 ml/min en una columna con un diámetro interno de 2,1 mm (misma velocidad lineal en la columna). En un sistema con un volumen de retardo típico de 1000 μl y con una columna de 2,1 mm de diámetro interno, se generaría un segmento isocrático inicial "oculto" de 5 min, mientras que en un sistema con un volumen de retardo de 600 μl , el retardo sería de 3 min. Estos volúmenes de retardo serían demasiado altos para los tiempos de análisis de uno o dos minutos. Con materiales de relleno de tamaño inferior a 2 μm , la velocidad de flujo óptima (obtenida a partir de la curva de van Deemter) es un poco más alta, por lo que la cromatografía rápida puede utilizar velocidades de flujo que son entre tres y

cinco veces superiores. De esta forma, se generan tiempos de retardo de aproximadamente un minuto. Sin embargo, el volumen de retardo debe reducirse más para conseguir tiempos de retardo correspondientes a una fracción del tiempo de análisis deseado. El LC Binario Agilent 1260 Infinity permite conseguir esto gracias al volumen de retardo bajo del paso de flujo de la bomba y al volumen bajo del paso de flujo a través del inyector automático.

Volumen de extracolumna

El volumen extracolumna es una fuente de dispersión de picos que reducirá la resolución de la separación y, por lo tanto, debería minimizarse. Las columnas con diámetro más reducido requieren volúmenes extracolumna proporcionalmente más pequeños para mantener al mínimo la dispersión de picos.

En un cromatógrafo de líquidos, el volumen extracolumna dependerá de los tubos que conecten el inyector automático, la columna y el detector, así como del volumen de la celda de flujo del detector. El volumen extracolumna se ha minimizado en el LC Binario Agilent 1260 Infinity gracias a los tubos de diámetro estrecho (0,12 mm de diámetro interno), a los intercambiadores de calor de volumen bajo del compartimento de columna y a la celda de cartucho Max-Light del detector.

Volúmenes de retardo del LC Binario Agilent 1260 Infinity

Tabla 4 en la página 42 y la Tabla 5 en la página 42 muestran los volúmenes de componentes que contribuyen al volumen de retardo en el sistema LC Binario Agilent 1260 Infinity .

Tabla 4 Volúmenes de retardo de los módulos del LC Binario 1260 Infinity

Componentes	Volumen de retardo (µl)
Bomba binaria ¹	120
Bomba binaria ²	600 – 800
Mezclador de volumen bajo	200
Mezclador	400
Inyector automático	270
Intercambiador de calor de dispersión baja	1,6
Intercambiador de calor incorporado	3 y 6

¹ En la configuración de volumen de retardo bajo, con derivaciones con respecto al amortiguador y al mezclador.

² En la configuración de volumen estándar de retardo.

Tabla 5 Volúmenes de retardo de las configuraciones del LC Binario 1260 Infinity

Configuraciones del sistema	Volumen de retardo (µl)
Configuración de volumen de retardo bajo	Bomba: 120 Inyector automático:
Configuración de volumen de retardo medio	Bomba: 320
Configuración de volumen estándar de retardo	Bomba: 600 – 800

Los cambios de configuración pueden realizarse de dos formas:

- manualmente, mediante la desconexión y posterior conexión de los capilares,
- automáticamente, utilizando una válvula 2PS/6PT de 600 bar (opcional).

Configuración óptima del instrumento para columnas de 2,1 mm de d.i.

Configuración de volumen de retardo bajo para conseguir un retardo de gradiente mínimo que posibilite unas separaciones de gradiente ultrarrápidas

En la configuración de volumen de retardo bajo de la bomba binaria Agilent 1260 Infinity se realiza una derivación con respecto al amortiguador y al mezclador para reducir el volumen de retardo de la bomba hasta aproximadamente 120 μL . En la [Figura 13](#) en la página 44 se muestran las conexiones de paso de flujo asociadas a esta configuración. Esto consigue un retardo de gradiente mínimo y posibilita unas separaciones de gradiente ultrarrápidas. Para poder aprovechar todas las ventajas del control de amortiguación electrónico, que sustituye a la amortiguación de volumen físico, resulta importante seleccionar la función **Enhanced Solvent Compressibility** en el submenú auxiliar del menú de la bomba.

Para conseguir minimizar la dispersión de los picos debe instalarse el kit de dispersión baja (Kit de dispersión baja (G1316-68744)). Este kit incluye capilares cortos de 0,12 mm de d.i. e intercambiadores de calor de dispersión baja (de 1,6 μL y 1,5 μL) para el compartimento de columna termostatzado. Para mantener la resolución en el detector UV se debería utilizar una celda de flujo de volumen bajo. Consulte el apartado “[Elección de la celda de flujo](#)” en la página 68 para conocer las recomendaciones acerca de las celdas de flujo.

3 Optimización del LC Binario Agilent 1260 Infinity Cómo configurar el volumen de retardo óptimo

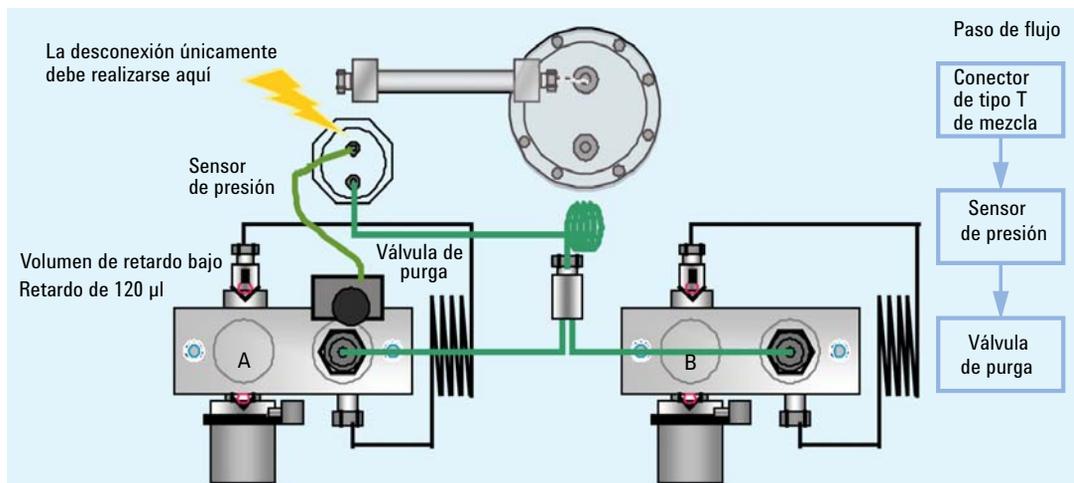


Figura 13 Configuración de retardo bajo para columnas de 2,1 mm de diámetro interno

Es importante acordarse de ajustar el parámetro correcto en el submenú auxiliar de la bomba. Esto garantiza la aplicación en todo momento de valores de compresibilidad correctos para las fases móviles utilizadas. Existen curvas de calibración para los disolventes más comunes.

Configuración de volumen de retardo medio para conseguir una sensibilidad UV máxima

Para aplicaciones que requieran una sensibilidad UV alta, puede instalarse un mezclador adicional de 200 μL (Mezclador de volumen bajo (200 μL) (5067-1565)) para reducir el ruido de mezcla residual. Este mezclador de pequeño tamaño ofrece la línea base de ruido UV más baja posible incluso en condiciones de gradiente extremas. Consulte la [Figura 14](#) en la página 45.

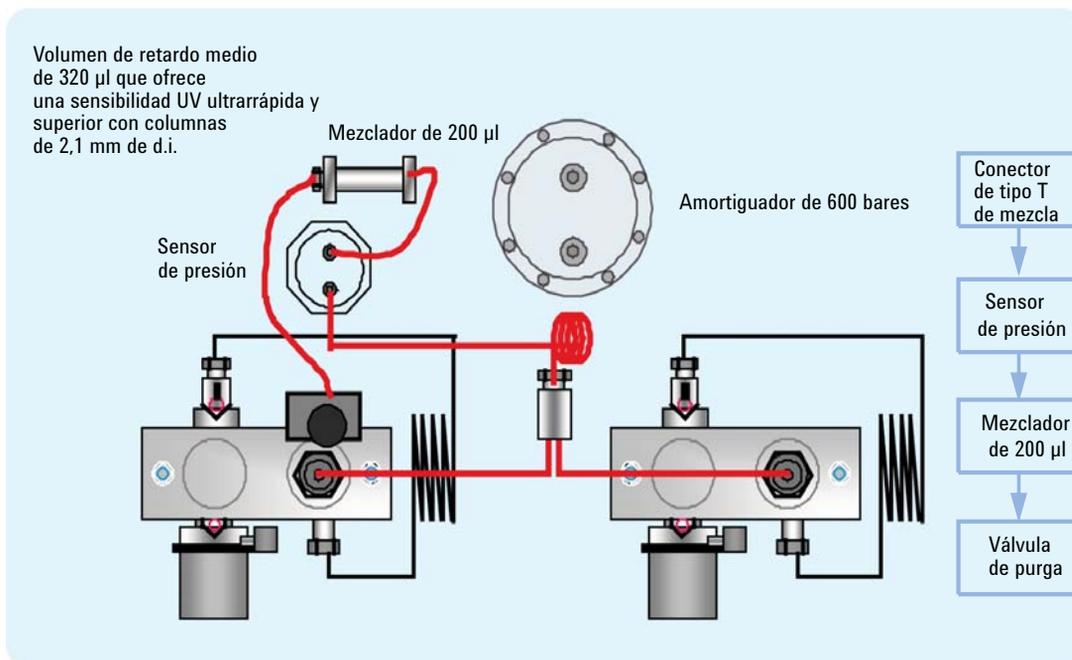


Figura 14 Configuración de volumen de retardo medio para columnas de 2,1 mm de d.i. para conseguir una sensibilidad UV máxima

Configuración óptima del instrumento para columnas de 3 y 4,6 mm de d.i.

Configuración de volumen estándar de retardo para conseguir una sensibilidad UV máxima y una transferibilidad de métodos directa

Los volúmenes de columna relativos de las columnas de 3 mm y 4,6 mm de diámetro interno son entre dos y cinco veces mayores, respectivamente, que los de las columnas de idéntica longitud y 2,1 mm de diámetro interno, por lo que las velocidades de flujo utilizadas también son proporcionalmente mayores. Por tanto, el volumen estándar de retardo de la bomba binaria no generará un retardo de gradiente significativamente mayor.

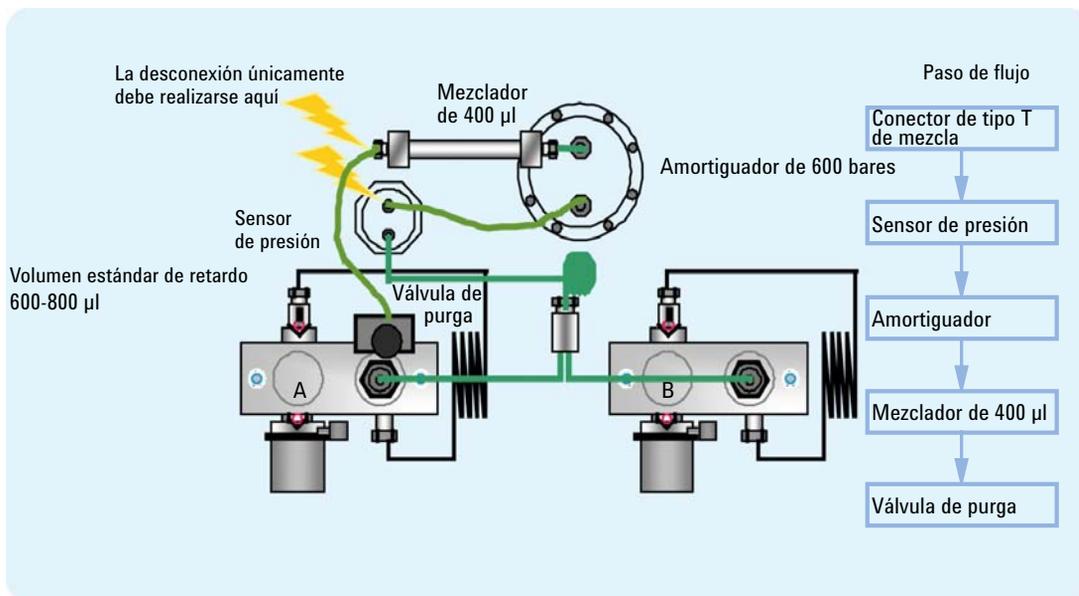


Figura 15 Configuración de volumen estándar de retardo para columnas de 3 y 4,6 mm de d.i. con una sensibilidad UV máxima

La configuración de volumen estándar de retardo también permite una transferibilidad de métodos directa desde los sistemas LC de las series Agilent 1100 y 1200 al sistema LC Binario 1260 Infinity o viceversa. En la [Figura 16](#) en la página 47 se muestran dos cromatogramas superpuestos de un método de análisis del paracetamol y las impurezas asociadas a este. El método se transfirió desde un sistema LC de la serie Agilent 1200 a un sistema LC Binario Agilent 1260 Infinity y las condiciones cromatográficas (columna, fase móvil, configuración de la bomba, volumen de inyección, temperatura de la columna y configuración del detector) no se modificaron. Tal como puede observarse, se trata de un método que permite una transferencia perfecta.

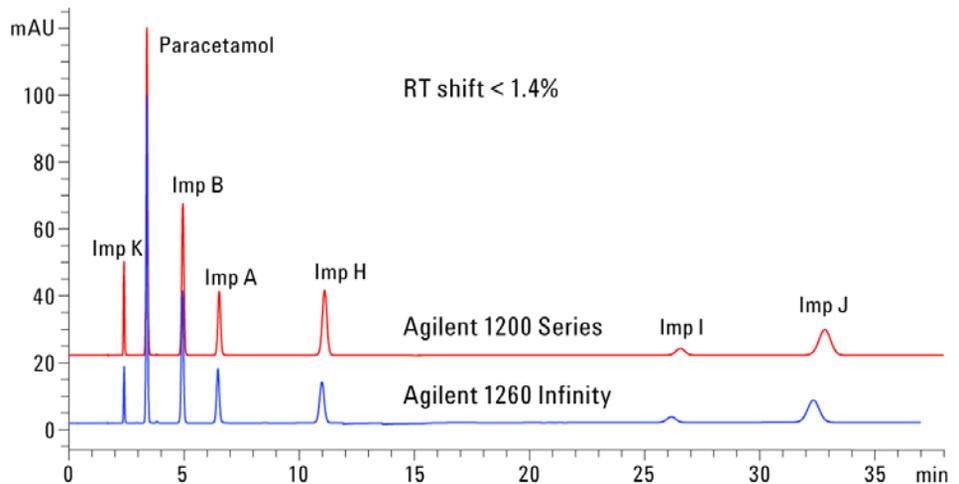


Figura 16 Comparación entre un sistema de la serie Agilent 1200 y otro sistema LC Agilent 1260 Infinity con la misma configuración

Cómo conseguir volúmenes de inyección más elevados

La configuración estándar del inyector automático Agilent 1260 Infinity permite inyectar un volumen máximo de 100 μL con el capilar del loop estándar. Para aumentar el volumen de inyección se puede instalar el Kit de actualización de extracción múltiple (G1313-68711). Con este kit puede añadir un máximo de 400 μL o 1400 μL al volumen de inyección de su inyector. En ese caso, el volumen total ascenderá a 500 μL o 1500 μL en el caso del inyector automático 1260 Infinity con la cabeza analítica de 100 μL . Tenga en cuenta que el volumen de retardo del inyector automático aumenta cuando se utilizan los capilares de asiento extendidos del kit de extracción múltiple. Cuando calcule el volumen de retardo del inyector automático, deberá doblar el volumen de los capilares extendidos. El volumen de retardo del sistema debido al inyector automático aumentará en consecuencia.

Cada vez que se reduzca un método de una columna mayor a una columna menor, es importante que la traslación del método prevea la reducción del volumen de inyección en proporción al volumen de la columna con el fin de mantener el rendimiento del método. El objetivo es mantener el volumen de la inyección al mismo volumen de porcentaje con respecto a la columna. Esto es especialmente importante si el disolvente de inyección es más fuerte (más eluotrópico) que la fase móvil inicial y cualquier incremento afectará a la separación, especialmente en los primeros picos del análisis (factor de retención bajo). En algunos casos, puede generar la distorsión de los picos y la regla general es mantener el disolvente de inyección sin variación o más débil que la composición de gradiente inicial. Esto influye en la decisión de si puede incrementarse el volumen de inyección y en qué medida. El usuario debe comprobar si hay signos de mayor dispersión (picos más anchos o sesgados y una resolución reducida del pico) al intentar incrementar el tamaño de la inyección. Si la inyección se realiza en un disolvente débil, es probable que el volumen pueda incrementarse porque el efecto consistirá en concentrar el analito en la cabeza de la columna al inicio del gradiente. Por el contrario, si la inyección se realiza en un disolvente más fuerte que la fase móvil inicial y se incrementa el volumen de inyección, la banda del analito se extenderá hacia la parte inferior de la columna antes que el gradiente, lo que dará lugar a una dispersión de los picos y una pérdida de resolución.

Quizás la principal consideración a la hora de determinar el volumen de inyección sea el diámetro de la columna, ya que este afectará en gran medida a la

dispersión de los picos. Las alturas de los picos pueden ser más elevadas en una columna estrecha que con una inyección mayor en una columna más ancha. Esto se debe a que la dispersión de los picos es menor. En el caso de columnas típicas con un diámetro interno de 2,1 mm, los volúmenes de inyección típicos podrían oscilar entre 5 y 10 μl , pero depende en gran medida de la química del analito y de la fase móvil, tal como se indicó anteriormente. En una separación de gradiente, se podrían alcanzar volúmenes de inyección de aproximadamente un 5 % del volumen de la columna manteniendo una resolución y una dispersión de los picos buenas.

Cómo conseguir tiempos de ciclo más cortos

Pueden conseguirse tiempos de ciclo más cortos mediante la selección de una columna corta con buena selectividad. Las dimensiones de la columna también vienen determinadas por el sistema de detección que se utilice. Las columnas de 3,0 mm de diámetro interno resultan idóneas para la detección UV, ya que son las que permiten obtener velocidades lineales más altas. Con las columnas de 4,6 mm de diámetro interno también pueden obtenerse velocidades lineales altas, pero la velocidad de flujo máxima queda limitada a 5 mL/min.

Para las columnas de 4,6 mm y 3,0 mm de diámetro interno debería utilizarse la configuración de volumen estándar de retardo de la bomba (consulte la [Figura 13](#) en la página 44). Por otra parte, para las columnas de 2,1 mm de diámetro interno debería emplearse la configuración de volumen de retardo bajo. Asimismo, cuando se utilicen columnas de 2,1 mm de diámetro interno debería instalarse el kit de dispersión baja, para aportar el mayor volumen extracolumna posible. Para conseguir una sensibilidad UV máxima, se recomienda utilizar también el mezclador corto (Mezclador de volumen bajo (200 µL) (5067-1565)).

Las condiciones cromatográficas dependen enormemente de los compuestos que vayan a analizarse; no obstante, pueden aplicarse algunas reglas generales para conseguir tiempos de análisis cortos:

- Las velocidades de flujo deberían ser tan altas como sea posible, en función de la resolución requerida, la retropresión y el sistema de detección utilizado.
- Deberían utilizarse gradientes pronunciados.
- Le recomendamos utilizar temperaturas elevadas en la columna para permitir velocidades de flujo altas que permitan reducir aún más el tiempo de análisis. Pueden utilizarse columnas ZORBAX SB a temperaturas de hasta 90 °C con valores de pH bajos.

Regeneración alterna de columnas

Pueden obtenerse tiempos de análisis aún más cortos utilizando una válvula de regeneración de columnas combinada con una bomba de regeneración. Esta configuración posibilita regenerar la columna previamente usada mientras se

realiza el análisis en la segunda columna. Con esto se reducen notablemente los tiempos de ciclo.

La utilización de dos columnas, dos bombas y una válvula de 2 posiciones y 10 puertos permite cambiar de columna y minimizar los tiempos de ciclo mínimos entre inyecciones. Habitualmente, las columnas con la misma química y del mismo lote ofrecen una precisión en lo que respecta al tiempo de retención que posibilita procesar los datos utilizando una misma tabla de calibración.

Consulte la guía de usuario de soluciones de válvulas para obtener más detalles acerca de la regeneración alterna de columnas.

Reducción automática del volumen de retardo (ADVR)

El inyector automático de alto rendimiento Agilent 1260 Infinity ofrece la posibilidad de realizar inyecciones solapadas (OI) y/o conseguir una reducción automática del volumen de retardo (ADVR). Esto significa que la válvula de inyección se desconecta del paso de flujo una vez que la muestra ha alcanzado la parte superior de la columna. Con esto se reduce notablemente el volumen de retardo (consulte la [Figura 17](#) en la página 52).

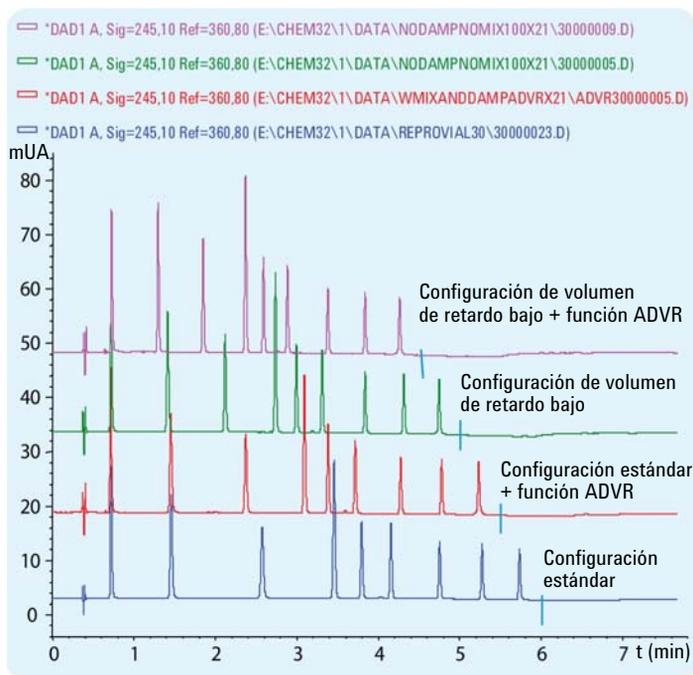


Figura 17 Reducción del volumen de retardo

Cuanto menor sea la velocidad de flujo, mayores serán los efectos negativos que pueda ejercer el volumen de retardo. En la [Figura 17](#) en la página 52 se utilizó una columna de 2,1 mm de diámetro interno con una velocidad de flujo de 0,6 mL/min. El volumen de retardo se redujo paso a paso desde la línea más baja hasta la línea más alta. La influencia sobre el tiempo de análisis total y los efectos que genera (en especial sobre la anchura y la altura de los primeros picos) resultan evidentes.

El inconveniente de la inyección solapada y la reducción automática del volumen de retardo es que el inyector automático no permanece en el paso de flujo

durante todo el tiempo de análisis. En el caso de los compuestos muy pegajosos, esto podría dar lugar a un arrastre de contaminantes y/o una discriminación de compuestos mayores.

El arrastre de contaminantes es el porcentaje del compuesto que queda en las piezas del instrumento que entran en contacto con la muestra y no se introduce en la columna para su análisis. Esto también implica que dicho porcentaje se pierde para la medición cuantitativa (es decir, que se produce una discriminación). El arrastre de contaminantes puede medirse inyectando disolvente puro tras la finalización del análisis de la muestra. La discriminación y el arrastre de contaminantes adquieren una importancia aún mayor si los compuestos del analito son apolares y en la parte inicial del gradiente se utiliza un elevado porcentaje de agua. En el caso más desfavorable, se producirá la precipitación del compuesto apolar sobre la superficie de contacto. La colocación de pequeños tapones (por ejemplo, de dimetilsulfóxido) antes y después del tapón de la muestra puede ayudar a minimizar este problema.

En la inyección solapada o la reducción automática del volumen de retardo, el tiempo que debe transcurrir antes de que la válvula de inyección cambie al modo de bypass debe aumentarse elevando el valor del factor de lavado hasta 20. De esta forma, se incrementa el tiempo durante el cual el volumen de retardo del inyector automático se lava con fase móvil.

Cómo conseguir un alto rendimiento

La inyección se puede optimizar en términos de velocidad recordando que dibujar la muestra demasiado deprisa puede reducir la reproducibilidad. Se pueden obtener ganancias marginales en este sentido, ya que los volúmenes de muestra utilizados tienden hacia el extremo más pequeño del rango en todo caso. Los movimientos de la aguja desde el vial hasta el puerto de lavado consumen una parte significativa del tiempo de inyección. Estas manipulaciones se pueden efectuar mientras se lleva a cabo la separación previa. Esto es lo que se conoce como "inyección solapada" y puede activarse fácilmente desde la pantalla de configuración del inyector automático en el software de control. Se puede indicar al inyector automático que cambie el flujo a través suyo a bypass una vez que se haya realizado la inyección y seguidamente tras, por ejemplo, 3 minutos en un análisis de 4 minutos, para que inicie el proceso de aspiración de la siguiente muestra y la preparación de la inyección. Esta estrategia puede ahorrar entre 0,5 y 1 minuto por inyección.

Cómo conseguir un arrastre de contaminantes mínimo

El arrastre de contaminantes se mide cuando los picos residuales de una inyección de activos anterior se muestran en una inyección de disolvente en blanco posterior. El arrastre de contaminantes entre las inyecciones de activos puede producir resultados erróneos. El nivel de arrastre de contaminantes se representa como el área del pico en la solución en blanco y se expresa como un porcentaje del área en la inyección de activos anterior. El inyector automático Agilent 1260 Infinity se ha optimizado para conseguir un arrastre de contaminantes mínimo gracias al cuidado diseño del paso de flujo y al uso de materiales en los que se minimiza la adsorción de la muestra. Se debería poder alcanzar un nivel de arrastre de contaminantes de 0,002 %, incluso si el detector es un espectrómetro de masas de cuadrupolo triple. Los ajustes de funcionamiento del inyector automático permiten al usuario definir los parámetros adecuados para minimizar el arrastre de contaminantes en cualquier aplicación que utilice compuestos que se puedan adherir fácilmente al sistema.

Las siguientes funciones del inyector automático se pueden utilizar para minimizar el arrastre de contaminantes:

- Lavado interno de la aguja
- Lavado externo de la aguja
- Retrolimpieza del asiento de la aguja
- Limpieza de la válvula de inyección

El paso de flujo, incluido el interior de la aguja, se lava continuamente durante el funcionamiento normal, lo que proporciona una buena eliminación del arrastre de contaminantes en la mayoría de las situaciones. La reducción automática del volumen de retardo (ADVR) reducirá el volumen de retardo, pero también disminuirá el lavado del inyector automático, por lo que no se debería utilizar con analitos para los que el arrastre de contaminantes pudiera suponer un problema.

Para garantizar un arrastre de contaminantes mínimo, aplique las recomendaciones siguientes:

- Utilice siempre el inyector automático con la válvula de inyección en la posición de mainpass.
- Lave el exterior de la aguja con un disolvente adecuado en el puerto de lavado. El tiempo de lavado debería ser como mínimo de 10 s.

- Si es posible, reduzca la velocidad de extracción a 10 $\mu\text{L}/\text{min}$.
- Utilice los viales tapados de 2 mL de Agilent (Tornillo del vial del capilar, 2 mL (5182-0556)).
- Si el asiento está contaminado, lleve a cabo un procedimiento de lavado del asiento adecuado.
- Emplee disolventes de lavado que puedan disolver los componentes de la muestra.
- Utilice fases móviles ácidas para los compuestos básicos.

Lavado y limpieza del inyector automático para conseguir un arrastre de contaminantes prácticamente nulo

Durante la rutina de inyección, el loop de la muestra, el interior de la aguja, el capilar del asiento y el canal principal de la válvula de inyección estarán en el paso de flujo y permanecerán en este a lo largo de la duración íntegra del análisis. Esto quiere decir que dichos componentes se ven sometidos a un lavado continuo con fase móvil durante toda la duración del análisis. La válvula de inyección únicamente se desconecta del paso de flujo durante la aspiración de la muestra. En esta posición, el efluente de la bomba se dirige directamente hacia la columna. Antes de la inyección, la superficie exterior de la aguja se lava con disolvente limpio. Para ello se utiliza el puerto de lavado del inyector automático, lo que evita la contaminación del asiento de la aguja. El puerto de lavado del inyector automático se rellena con disolvente limpio por medio de una bomba peristáltica instalada en la carcasa de dicho inyector. El puerto de lavado tiene un volumen aproximado de 680 μL , mientras que la bomba produce un flujo de 6 mL/min. Al ajustar el tiempo de lavado a 10 s, el volumen del puerto de lavado se rellena más de una vez con disolvente limpio, lo que resulta suficiente para limpiar el exterior de la aguja en la mayoría de los casos.

Cómo conseguir una resolución más elevada

Una separación con una resolución más elevada mejorará el análisis cuantitativo y cualitativo de los datos, permitirá separar un número mayor de picos u ofrecerá un alcance mayor para acelerar el proceso de separación. Este apartado explica el modo en el que se puede aumentar la resolución y tiene en cuenta los siguientes puntos:

- Optimización de la selectividad
- Relleno con partículas de menor tamaño
- Columnas más largas
- Gradientes menos pronunciados, flujo más rápido
- Volumen extracolumna mínimo
- Optimización del disolvente y el volumen de inyección
- Recogida de datos suficientemente rápida

La siguiente ecuación de resolución describe la resolución entre dos picos:

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \frac{(\alpha - 1)(k_2 + 1)}{\alpha k_2}$$

donde:

- R_s = resolución,
- N = recuento de placas (medida de la eficacia de la columna),
- α = selectividad (entre dos picos),
- k_2 = factor de retención del segundo pico (anteriormente denominado "factor de capacidad").

La selectividad (α) es el elemento que tiene un efecto más significativo sobre la resolución y, en la práctica, la variación de este elemento implica un cambio en el tipo de fase estacionaria (C18, C8, fenil, nitrilo, etc.), en la fase móvil y en la temperatura con el objetivo de maximizar las diferencias de selectividad entre los solutos que se desee separar. Esto constituye una parte importante del trabajo y se realiza mejor con un sistema automatizado de desarrollo del método, el cual permite un amplio abanico de condiciones en lo que respecta a columnas y fases móviles diferentes para su evaluación en un protocolo orde-

nado de exploración. En este apartado se describe la manera de obtener una mayor resolución con cualquier fase móvil o estacionaria seleccionada. Si se emplea un sistema automatizado de desarrollo del método para adoptar la decisión sobre las fases, es probable que se utilicen columnas cortas para un análisis rápido en cada paso de la exploración.

La ecuación de resolución muestra que el número de platos o la eficiencia (N) es el segundo elemento más importante. Este elemento se puede optimizar de diferentes maneras. N es inversamente proporcional al tamaño de las partículas y directamente proporcional a la longitud de una columna; por lo tanto, un tamaño pequeño de las partículas y una columna más larga darán lugar a un número de placas más elevado. La presión aumenta con el inverso del cuadrado del tamaño de las partículas y, de una manera proporcional, con la longitud de la columna. La resolución aumenta con la raíz cuadrada de N ; por lo tanto, si se dobla la longitud de la columna, la resolución aumentará en un factor de 1,4. El resultado obtenido depende de la viscosidad de la fase móvil, ya que está directamente relacionado con la presión. Las mezclas de metanol generarán una retropresión mayor que las mezclas de acetonitrilo. A menudo se prefiere el acetonitrilo, ya que las formas de los picos son mejores y más estrechas, además de contar con una baja viscosidad; no obstante, el metanol produce, por lo general, una selectividad mejor (en el caso de moléculas pequeñas de menos de 500 Da). Se puede reducir la viscosidad si se aumenta la temperatura, pero se debe tener en cuenta que este aumento puede modificar la selectividad de la separación. El experimento mostrará si esto causa un aumento o un descenso de la selectividad. A medida que el flujo y la presión aumentan, se debe tener en cuenta que el calentamiento dentro de la columna como consecuencia de la fricción aumentará. Como consecuencia, se podría originar un ligero aumento en la dispersión, además de un cambio pequeño en la selectividad (ambos efectos podrían considerarse como una reducción de la resolución). La reducción de la temperatura del termostato en unos pocos grados podría compensar este último efecto. De nuevo, los resultados se revelarían de nuevo tras el experimento.

La curva de Van Deemter muestra que la velocidad de flujo óptima a través de una columna inferior a dos micrones es mayor que para las partículas más grandes y que es bastante plana a medida que la velocidad de flujo aumenta. Por lo general, las velocidades de flujo más óptimas para las columnas inferiores a dos micrones son: 2 ml/min para columnas con un diámetro interno de 4,6 mm y 0,4 ml/min para columnas con un diámetro interno de 2,1 mm.

3 Optimización del LC Binario Agilent 1260 Infinity

Cómo conseguir una resolución más elevada

En las separaciones isocráticas, el aumento del factor de retención (k) tiene como resultado una mejor resolución, ya que se retiene el soluto durante un periodo mayor. En las separaciones de gradiente, la retención se describe mediante k^* en la siguiente ecuación:

$$k^* = \frac{t_G}{\Delta\%B} \cdot \frac{F}{V_m} \cdot \frac{100}{S}$$

donde:

- k^* = valor k medio,
- t_G = duración del gradiente (o segmento del gradiente) (min),
- F = flujo (mL/min),
- V_m = volumen de retardo de la columna,
- $\Delta\%B$ = cambio en la fracción del disolvente B durante el gradiente,
- S = constante (alrededor de 4 o 5 en el caso de moléculas pequeñas).

Esto muestra que k y, en consecuencia, la resolución, pueden aumentar si se tiene un gradiente menos pronunciado (un cambio de 2 a 5 %/min constituye una referencia), una velocidad de flujo mayor y una columna de volumen menor. Además, la ecuación muestra cómo se puede acelerar un gradiente existente: si se dobla el flujo, pero el tiempo del gradiente se reduce a la mitad, k^* permanece constante y la separación presenta el mismo aspecto aunque ocurra en la mitad de tiempo.

Una reducción del volumen extracolumna disminuirá la dispersión y ofrecerá una mejor resolución. Esto ya se ha optimizado en el sistema LC Binario 1260 Infinity mediante los capilares de diámetro estrecho (diámetro interno de 0,12 mm; compruebe que la longitud más corta se utilice entre la columna y el detector) y la celda de flujo de cartucho Max-Light.

Finalmente, se deben mantener las ganancias en la resolución mediante una recopilación de datos que sea lo suficientemente rápida para perfilar picos estrechos con precisión.

En resumen, para aumentar la resolución deberían tenerse en cuenta los siguientes pasos:

- El primer paso para mejorar la resolución siempre debe ser la realización de pruebas con distintas fases estacionarias y la selección de la columna que ofrezca una mejor separación. Este es el parámetro más importante asociado a la resolución.

- El segundo paso es utilizar columnas largas o incluso columnas acopladas para aumentar el número de platos.
- El tercer paso sería desplazar los picos hacia factores de retención más altos. Para valores de k entre 5 y 10, el efecto es significativo. Para valores de k más elevados, el efecto es muy bajo.

En la práctica, esto se traduce en que el uso de columnas más largas con una selectividad apropiada mejora la resolución.

Configuración óptima del instrumento para conseguir una alta resolución

Compartimento de las columnas

La versión estándar del compartimento de las columnas puede utilizarse para columnas de 4,6 mm de diámetro interno. Con velocidades de flujo mayores de 2 mL/min y temperaturas superiores a 60 °C, el efluente de la columna debería refrigerarse hasta alcanzar la temperatura del detector utilizando el enfriador/calentador de 1,5 µL del compartimento de las columnas. Con esto se garantiza un nivel de ruido mínimo cuando se usen detectores UV, incluso con una velocidad de flujo de 5 mL/min y una temperatura de 80 °C (consulte la Figura 18 en la página 60).

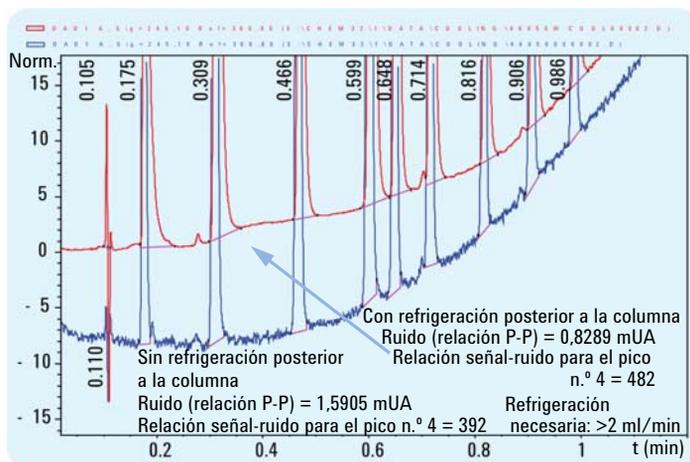


Figura 18 Influencia de la refrigeración posterior a la columna (PCC) sobre el ruido de la línea base

Si se utilizan columnas de 2,1 mm de diámetro interno con velocidades de flujo bajas, se debería utilizar el dispositivo calentador pequeño para minimizar el volumen extracolumna.

Volumen extracolumna

Para que la columna pueda mantener una resolución alta, el volumen extracolumna (en especial después de la columna) debería ser tan bajo como resulte posible.

- Para las columnas de 4,6 mm de diámetro interno debería utilizarse la configuración estándar de retardo para la bomba (consulte la [Figura 15](#) en la página 46).
- Para las columnas de 2,1 mm de diámetro interno, debería utilizarse la configuración de retardo bajo para la bomba y debería instalarse el kit de dispersión baja en el compartimento de las columnas. Para obtener una sensibilidad UV máxima se recomienda utilizar también el mezclador corto (consulte la [Figura 13](#) en la página 44 y la [Figura 14](#) en la página 45).
- El volumen de inyección también es importante, en especial si la muestra se encuentra disuelta en un disolvente orgánico. En ese caso, el gradiente debería comenzar con un porcentaje bajo de fase orgánica para concentrar los componentes en la parte superior de la columna. Esto evitará la dispersión de los picos a causa de la inyección.
- La celda de cartucho Max-Light de 10 mm presenta un volumen de dispersión bajo (σ del volumen = 1,0 μL) y no requiere ningún tipo de optimización adicional del volumen.
- Cuando se utilice la celda de sensibilidad alta Max-Light alternativa de 60 mm para obtener una sensibilidad más elevada, el volumen de la celda se optimizará de forma que pueda usarse con columnas de 3 mm y 4,6 mm de diámetro interno.

Velocidad de muestreo

El valor de la velocidad de muestreo del detector UV debe seleccionarse correctamente. Si se selecciona una velocidad de muestreo demasiado baja, se producirá un aumento de la anchura de los picos y se reducirá la resolución (consulte la [Figura 19](#) en la página 62).

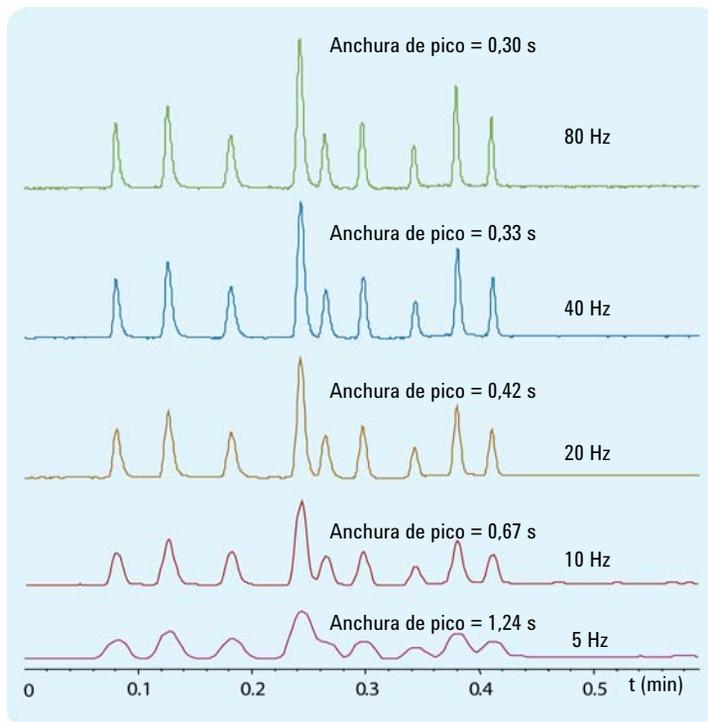


Figura 19 Representación de la anchura de pico frente a la velocidad de muestreo UV

La [Tabla 6](#) en la página 63 muestra la dependencia de la anchura de los picos, la resolución y la capacidad de picos con respecto a la velocidad de muestreo. Para conseguir una LC rápida o ultrarrápida deben utilizarse velocidades de muestreo altas; de lo contrario, la separación que se consigue en la columna se perderá en el detector.

Tabla 6 Relación entre la velocidad de muestreo y el rendimiento cromatográfico

Velocidad de muestreo	Anchura de pico	Resolución	Capacidad de picos
80 Hz	0,300	2,25	60
40 Hz	0,329	2,05	55
20 Hz	0,416	1,71	45
10 Hz	0,666	1,17	29
5 Hz	1,236	0,67	16

Al comparar la velocidad de muestreo de 80 Hz con la de 20 Hz se observan mejoras en los aspectos siguientes:

- Anchura de pico:
 - 30 %
- Resolución:
 - + 30 %
- Capacidad de picos:
 - + 40 %
- Eficacia aparente de la columna:
 - + 70 %

Condiciones cromatográficas

Tal como se indicó previamente, las condiciones cromatográficas dependen de los compuestos que deban analizarse. No obstante, en este caso también existen algunas reglas generales:

- Deberían utilizarse velocidades de flujo moderadas; sin embargo, algunos experimentos realizados recientemente han demostrado que las velocidades de flujo altas también pueden resultar ventajosas para mejorar la separación. Para columnas de 4,6 mm de diámetro interno rellenas con partículas de tamaño inferior a 2 μm , se recomienda utilizar una velocidad de flujo inicial de 2 mL/min. Para columnas de 2,1 mm de diámetro interno con partículas de tamaño inferior a 2 μm , una velocidad de flujo de 0,4 mL/min podría ser un buen punto de partida.
- Deberían utilizarse gradientes moderados; por ejemplo, un cambio de gradiente del 2 – 5 % por minuto.

3 Optimización del LC Binario Agilent 1260 Infinity

Cómo conseguir una resolución más elevada

- La temperatura de la columna es otro parámetro adicional de optimización. La temperatura puede influir sobre la separación, por lo que es un factor que no debería pasarse por alto.

Cómo conseguir una sensibilidad más elevada

La sensibilidad de un método de separación va ligada a la elección de las fases estacionaria y móvil, ya que se desea una buena separación con picos estrechos y una línea base estable con un ruido mínimo. La elección de la configuración del instrumento tendrá un efecto directo, mientras que la configuración del detector es esencial.

Configuración óptima del instrumento para conseguir una sensibilidad elevada

Consideraciones generales

- Para conseguir una línea base de ruido lo más baja posible, se recomienda utilizar la configuración de volumen estándar de retardo para la bomba binaria 1260 Infinity .
- De nuevo, el volumen de inyección y el disolvente utilizado para disolver las muestras son factores importantes. Es importante que los compuestos se enfoquen en la parte superior de la columna, para evitar la dispersión de picos debido a la inyección, que reduciría la altura de los picos. Para ello, la muestra debería disolverse en un disolvente cuya composición presente una fuerza de elución más baja que la de la fase móvil.
- La temperatura de la columna no debería ser demasiado baja, para evitar una retención prolongada de los picos en la columna. Eso daría lugar a picos dispersos y de menor altura.
- La velocidad de muestreo del detector UV debería seleccionarse en función de la anchura de pico real. No deberían utilizarse velocidades de muestreo más altas de lo necesario, ya que generarían mayores niveles de ruido.
- Los detectores UV disponibles son el detector de diodos Agilent 1260 Infinity (G4212B) y el detector de longitud de onda variable Agilent 1260 Infinity (G1314F), con unas velocidades de muestreo de 80 Hz y unos niveles de ruido y deriva significativamente más bajos.
- En el apartado “[Elección de la celda de flujo](#)” en la página 68 se incluye un resumen de las celdas de flujo disponibles para el detector de diodos (DAD) G4212B . Para obtener información acerca de las celdas de flujo utilizadas con el detector G1314F , consulte el manual de usuario del detector de longitud de onda variable Agilent 1260 Infinity .

Condiciones cromatográficas

Para conseguir una relación señal-ruido óptima, resulta ventajoso que los picos se eluyan rápidamente.

- Para conseguir eluir los picos con valores de k bajos deberían utilizarse velocidades de flujo altas.
- También pueden utilizarse gradientes más rápidos para eluir los picos con valores de k bajos.

Columnas

La sensibilidad se especifica como una relación señal-ruido, de ahí la necesidad de maximizar la altura de los picos y de minimizar el ruido de la línea base. Cualquier reducción en la dispersión de los picos contribuirá a mantener la altura de los picos. Por lo tanto, el volumen extracolumna se debería minimizar mediante el empleo de un diámetro interno estrecho y corto, de capilares de conexión y de conexiones instaladas correctamente. El uso de columnas con un diámetro interno más pequeño debería dar lugar a una altura mayor de los picos y, por consiguiente, sería perfecto en el caso de aplicaciones con cantidades de muestra limitadas. Si se puede inyectar la misma cantidad de muestra en una columna con un diámetro interno más pequeña, la dilución debida al diámetro de la columna será menor y la sensibilidad aumentará. Por ejemplo, si se reduce el diámetro interno de la columna de 4,6 mm a 2,1 mm, se obtendrá una ganancia teórica en la altura de los picos de 4,7 veces como consecuencia de la menor dilución de la columna. En el caso de un detector espectrométrico de masas, las velocidades de flujo menores de las columnas estrechas pueden producir eficacias de ionización más elevadas y, por tanto, una mayor sensibilidad.

Parámetros del detector

El detector dispone de varios parámetros que se utilizan para optimizar su rendimiento. Los siguientes apartados describen cómo afectan los parámetros del detector a las características de rendimiento:

- La celda de flujo afecta a la sensibilidad.
- La longitud de onda y la anchura de banda afectan a la sensibilidad, la selectividad y la linealidad.
- La anchura de rendija afecta a la sensibilidad, la resolución espectral y la linealidad.
- La anchura de pico afecta a la sensibilidad y la resolución.

Elección de la celda de flujo

Existen varios tipos de celdas de flujo de cartucho Max-Light disponibles (consulte la [Tabla 7](#) en la página 68).

Tabla 7	Especificaciones de las celdas de flujo de cartucho Max-Light
Celdas de cartucho	<ul style="list-style-type: none">• Celda de cartucho Max-Light (10 mm, V(s) 1,0 µL) (G4212-60008)• Celda de cartucho Max-Light bioinerte (10 mm, V(s) 1,0 µL) (G5615-60018)• Celda de cartucho Max-Light (60 mm, V(s) 4,0 µL) (G4212-60007)• Celda de cartucho Max-Light bioinerte (60 mm, V(s) 4,0 µL) (G5615-60017)• Celda de cartucho Max-Light HDR (3,7 mm, V(s) 0,4 µL) (G4212-60032)• Celda de cartucho Max-Light ULD (10 mm, V(s) 0,6 µL) (G4212-60038)• Celda de test de cartucho Max-Light (G4212-60011)
Presión máxima	Presión de funcionamiento máxima (MOP) de 70 bar (1015 psi) ¹ Presión incidental máxima (MIP) de 150 bar (2175 psi) ²
Rango de pH	1,0-12,5 (en función del disolvente)

¹ Presión de funcionamiento máxima (MOP): presión máxima a la que el sistema puede funcionar de forma continua en condiciones normales.

² Presión incidental máxima (MIP): presión máxima que puede soportar el sistema durante un período de tiempo breve.

Aplicaciones normales

También se puede acceder a la Celda de cartucho Max-Light (10 mm, V(s) 1,0 µL) (G4212-60008) abarca una amplia gama de aplicaciones:

- columnas de todos los diámetros, de hasta 2,1 mm ID o incluso inferiores,
- aplicaciones con una dispersión de pico (anchura de pico x flujo) de hasta ~2 µL (ejemplo: una anchura de pico de 0,04 min con un flujo de 0,1 mL/min da lugar a una dispersión de pico de 0,04 min x 0,1 mL/min = 0,004 mL = 4 µL).

Sensibilidad alta

Si se necesita una sensibilidad superior, se puede utilizar la Celda de cartucho Max-Light (60 mm, V(s) 4,0 µL) (G4212-60007) . Esta celda mejora el rendimiento del detector al reducir el límite de detección (LOD) en un factor aproximadamente igual a tres (según la aplicación).

Dispersión ultrabaja (ULD)

La celda de cartucho Max-Light ULD se puede utilizar con los detectores de diodos G4212A y G4212B . Esta celda es un requisito de la solución del kit de dispersión ultrabaja que actualmente existe como Kit de dispersión ultrabaja 1290 Infinity (5067-5189). La celda debe formar parte de la solución de dispersión ultrabaja.

Rango dinámico elevado (HDR)

La celda de cartucho Max-Light HDR se puede utilizar con los detectores de diodos G4212A y G4212B . La celda es un requisito para la solución de rango dinámico elevado (HDR) que se presentará en marzo o abril de 2013.

NOTA

Para proteger la celda de flujo frente a la sobrepresión (p. ej., en sistemas con LC/MS), instale Kit de válvulas de liberación de presión en línea (G4212-68001); consulte el manual del *detector de diodos Agilent Serie 1200 Infinity*.

Cómo evitar los bloqueos de columnas

Las columnas rellenas con partículas inferiores a 2 μm también necesitan fritas con un tamaño de poro pequeño para evitar que el material de relleno se arrastre. Esto aumenta inmediatamente el riesgo de bloqueo de las fritas con partículas de la muestra, de la fase móvil y/o del propio instrumento. Para proteger la columna, pueden instalarse filtros pequeños adicionales (Figura 20 en la página 71) en la parte frontal de esta. También resulta recomendable filtrar la muestra a conciencia y/o centrifugarla, así como evitar la presencia de material particulado en las fases móviles.

Para garantizar unos resultados óptimos, cumpla estas simples directrices de uso:

- 1** Instale y ejecute la columna únicamente en la dirección de flujo indicada en la columna.
- 2** Utilice únicamente disolventes de gran calidad y grado cromatográfico.
- 3** Filtre todos los tampones acuosos y todas las muestras con un filtro adecuado de 0,2 μm antes de utilizarlos.
- 4** Sustituya las botellas de disolución tampón de la fase móvil cada 24 – 48 h (no añada fase móvil a la botella; utilice siempre una botella nueva).
- 5** No utilice una fase móvil con sal de tampones elevada (> 50 mM) junto con concentraciones de acetonitrilo elevadas, ya que existe el riesgo de producirse una precipitación.
- 6** Se recomienda utilizar un filtro en línea para atrapar las partículas y aumentar la vida útil de la columna. Utilice el filtro en línea 1260 Infinity más adecuado para su columna: Filtro en línea LC 1260 Infinity, 2,1 mm, tamaño de poro de 0,2 μm , presión máx. de 600 bar, capilar de conexión de acero inoxidable de 70 x 0,12 mm (5067-1551) para columnas de 2,1 de d.i., Filtro en línea LC 1260 Infinity, 4,6 mm, tamaño de poro de 0,2 μm , presión máx. de 600 bar, capilar de conexión de acero inoxidable de 90 x 0,17 mm (5067-1553) para columnas de 4,6 mm o 3,0 mm de d.i. Cambie el filtro cuando la presión aumente un 10 %.
- 7** Purgue las bombas (las conexiones hasta la columna) de cualquier tampón que contenga fases móviles y lávelas con 5 mL de disolvente antes de conectar la columna al instrumento.

- 8 Lave la columna con una fase móvil compatible, utilizando inicialmente una velocidad de flujo lenta de 0,1 mL/min si se trata de una columna de 2,1 mm de diámetro interno, 0,2 mL/min si se trata de una columna de 3,0 mm de diámetro interno y 0,4 mL/min si se trata de una columna de 4,6 mm de diámetro interno. Aumente la velocidad del flujo durante 5 minutos hasta el flujo deseado.
- 9 Una vez estabilizada la presión, conecte la columna al detector.
- 10 Equilibre la columna y el detector con volúmenes de fase móvil equivalentes a 10 columnas antes de su uso (1 – 5 mL en función del tamaño de la columna).
- 11 Evite la sobrepresión. Compruebe el rango de presión del gradiente (que puede ser de 100 – 130 bar o mayor) antes de iniciar una secuencia.

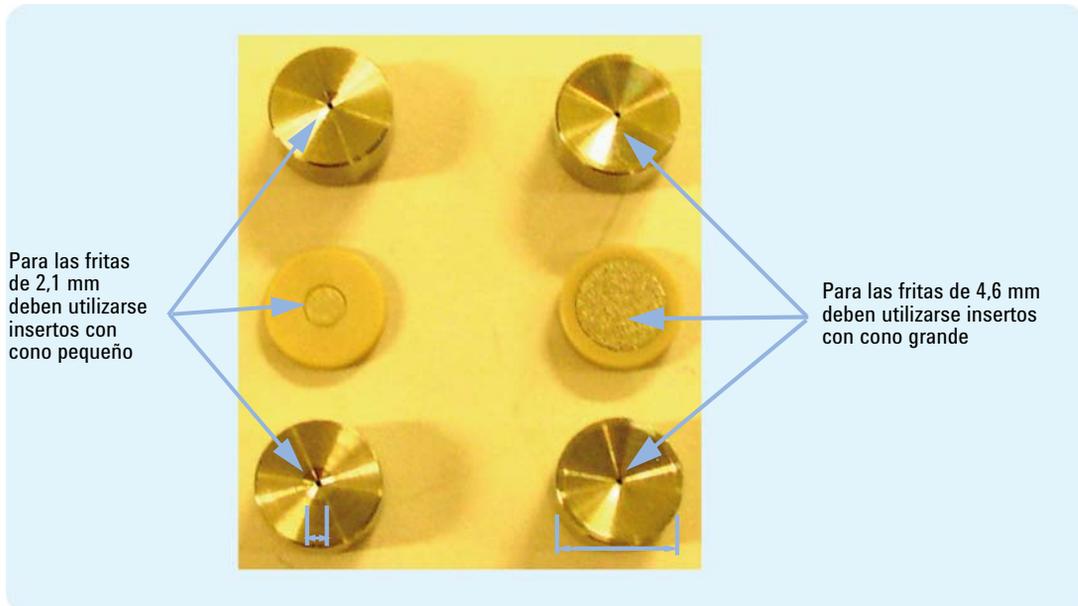
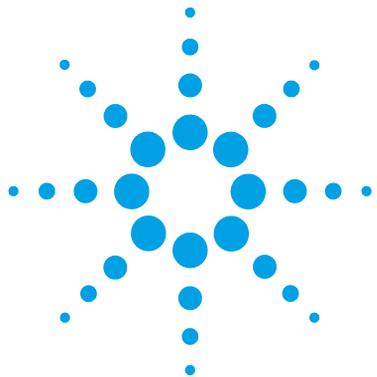


Figura 20 Protección para columnas de 4,6 y 2,1 mm de d.i. rellenas con partículas de 1,8 μm , con una frita de entrada con un tamaño de poro de 0,2 μm

3 Optimización del LC Binario Agilent 1260 Infinity Cómo evitar los bloqueos de columnas



4 Configuración e instalación del sistema

Instalación del software	74
Instalación de los módulos	76
Instalación de los módulos del sistema	76
Integración en la red	76
Conexiones de los capilares y los tubos en el paso de flujo	77
Cebado del sistema	82

Este capítulo incluye información sobre la instalación del software, la instalación de los módulos y la preparación del sistema para su funcionamiento.



Instalación del software

Instalación del controlador del software y el sistema de datos

Para obtener más información sobre los procedimientos de instalación del software, consulte el manual del detector y los manuales del software.

Instalación del software Agilent Lab Advisor

Para obtener más información sobre los procedimientos de instalación del software Agilent Lab Advisor, consulte la documentación del software en el DVD de Lab Advisor.

Agilent Lab Advisor sustituye y amplía las funciones de diagnóstico que sólo se encontraban disponibles previamente en el software ChemStation.

Agilent Lab Advisor es una aplicación basada en Windows que supervisa de forma continua los instrumentos del laboratorio en tiempo real y aumenta la productividad mediante la notificación automática de la necesidad de realizar el mantenimiento o el servicio a través del uso de contadores avanzados. Esto permite arreglar un problema antes de que este influya en los resultados. El software incluye un conjunto extenso de información y documentación del usuario, un conjunto de calculadoras y herramientas para ayudar durante la configuración, la calibración y el mantenimiento del instrumento, y pruebas y diagnósticos periódicos para verificar el funcionamiento adecuado. Agilent Lab Advisor también proporciona comentarios y soluciones para cualquier error que pueda surgir en el instrumento. El software funcionará con o sin los sistemas de datos de Agilent.

El software controla:

- el estado del módulo LC,
- el mantenimiento preventivo asistido (para estimar la necesidad de realizar una actualización o sustitución).

Además, el software:

- automatiza pruebas útiles,
- intenta identificar instrumentos basados en LAN compatibles que estén encendidos y conectados al PC o a la red del laboratorio,
- sugiere automáticamente piezas de sustitución y tareas de resolución de problemas para algunos problemas comunes del instrumento.

Instalación de los módulos

Instalación de los módulos del sistema

Para obtener más información sobre los procedimientos de instalación de los módulos, consulte los manuales de los módulos individuales. Estos manuales también contienen información sobre las especificaciones, el mantenimiento y las piezas.

Integración en la red

Para integrar el sistema en la red, consulte los manuales de usuario de los módulos (capítulo *Configuración LAN*).

Conexiones de los capilares y los tubos en el paso de flujo

En función de la configuración del sistema, se utilizarán capilares de diferentes longitudes y diámetros. Dichos elementos se describen a continuación.

Consulte los manuales de los módulos para obtener más información acerca de las conexiones internas de los capilares y tubos de estos.

Conexiones para la configuración de volumen estándar de retardo

En la [Figura 21](#) en la página 78 se muestran las conexiones de los capilares y tubos en el paso de flujo para la configuración de volumen estándar de retardo del LC Binario 1260 Infinity.

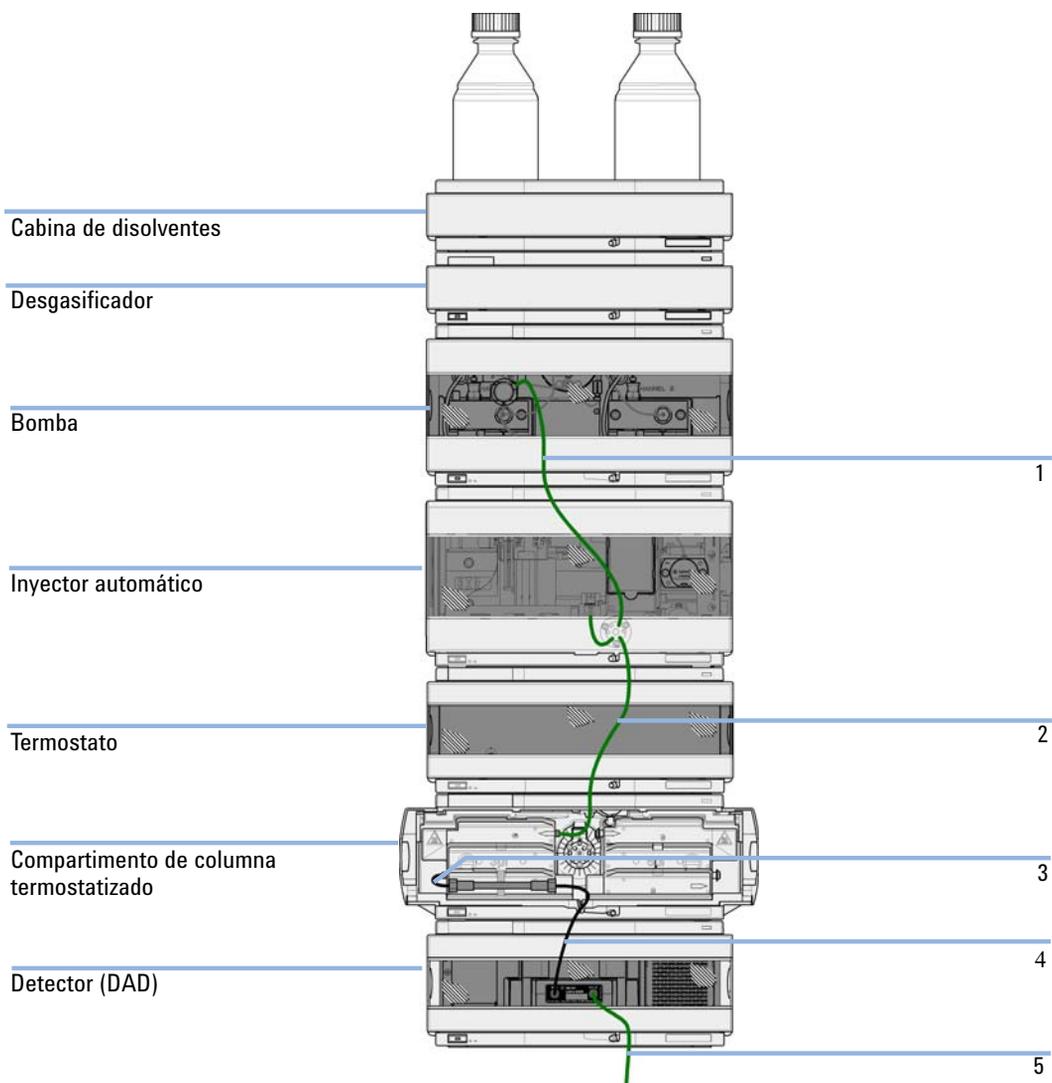


Figura 21 Conexiones de los capilares y tubos en el paso de flujo (configuración de volumen estándar de retardo)

Elemento	Referencia	Descripción
1	G1312-87303	Capilar de acero inoxidable, 0,17 mm x 400 mm (entre la bomba y el inyector automático)
1	G1312-87304	Capilar de acero inoxidable, 0,17 mm x 700 mm (entre la bomba y el inyector automático refrigerado)
2	G1367-87304	Capilar de acero inoxidable, 0,17 mm x 250 mm (entre el inyector automático y el TCC)
2	01090-87306	Capilar de acero inoxidable, 0,17 mm x 380 mm (entre el inyector automático refrigerado y el TCC)
3	G1316-87300	Capilar de acero inoxidable, 0,17 x 90 mm (entre el TCC y la columna)
4	G1315-87311	Capilar de acero inoxidable, 0,17 mm x 380 mm (entre la columna y el detector DAD)
5	5062-2462	Tubo de PTFE, 0,8 mm x 2 m, pedido: 5 m (entre el detector DAD y el sistema de residuos)
5	5062-8535	Kit de accesorios para residuos (entre el detector VWD y el sistema de residuos)

4 Configuración e instalación del sistema

Instalación de los módulos

Conexiones para las configuraciones de volumen de retardo medio y bajo

En la [Figura 22](#) en la página 80 se muestran las conexiones de los capilares y tubos en el paso de flujo para las configuraciones de volumen de retardo medio y bajo del LC Binario 1260 Infinity.

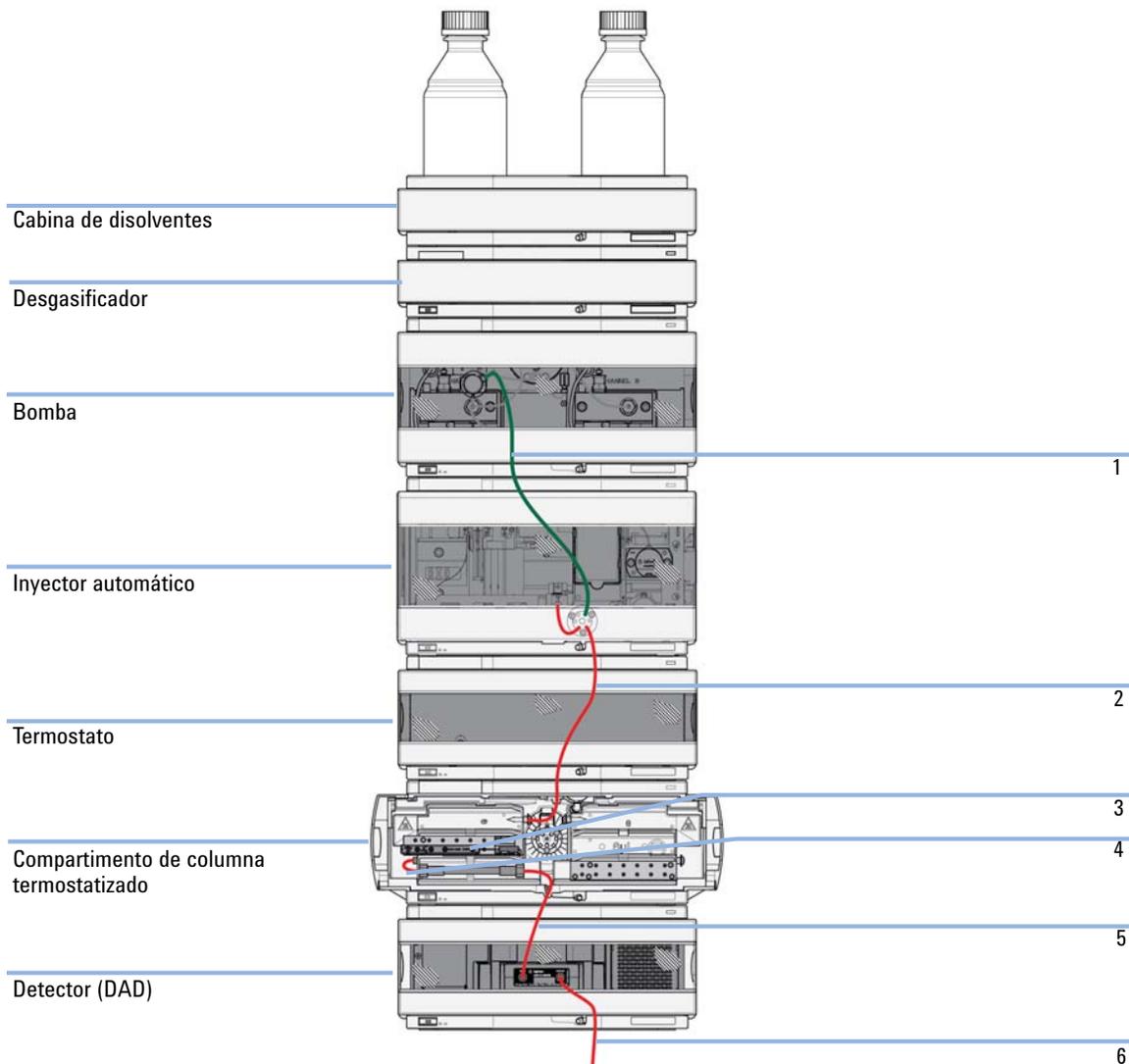


Figura 22 Conexiones de los capilares y tubos en el paso de flujo (configuraciones de volumen de retardo medio y bajo)

Elemento	Referencia	Descripción
1	G1312-87303	Capilar de acero inoxidable, 0,17 mm x 400 mm (entre la bomba y el inyector automático)
1	G1312-87304	Capilar de acero inoxidable, 0,17 mm x 700 mm (entre la bomba y el inyector automático refrigerado)
2	G1313-87304	Capilar de acero inoxidable, 0,12 mm x 180 mm (entre el inyector automático y el TCC)
2	01090-87610	Capilar de acero inoxidable, 0,12 mm x 280 mm (entre el inyector automático refrigerado y el TCC o el elemento n.º 3, si está instalado)
3	G1316-80002	Longitud hacia arriba del calentador (0,12 mm de d.i. 1,6 µL de volumen interno)
3	G1316-80003	Longitud hacia abajo del calentador (0,12 mm de d.i. 1,6 µL de volumen interno)
4	01090-87611	Capilar de acero inoxidable, 0,12 mm x 105 mm (entre el TCC y la columna; no es necesario si está instalado el elemento n.º 3)
5	G1315-87312	Capilar de acero inoxidable, 0,12 mm x 150 mm (entre la columna y el detector DAD)
6	5062-2462	Tubo de PTFE, 0,8 mm x 2 m, pedido: 5 m (entre el detector DAD y el sistema de residuos)

Cebado del sistema

Cebado inicial

Cuándo Antes de poder utilizar un desgasificador o los tubos de disolvente, es necesario cebar el sistema. Se recomienda usar isopropanol como disolvente de cebado dada su miscibilidad con prácticamente todos los disolventes del sistema HPLC y sus excelentes propiedades humectantes.

Piezas necesarias	Número	Descripción
	1	Isopropanol

Preparaciones Conecte todos los módulos hidráulicamente según se describe en los diferentes manuales de los módulos.
Rellene cada botella de disolvente con 100 mL de isopropanol.
Encienda el sistema

ADVERTENCIA Al abrir las conexiones capilares o tubulares, puede derramarse parte del disolvente.

El tratamiento de disolventes y reactivos tóxicos y peligrosos puede entrañar riesgos para la salud.

→ Siga los procedimientos de seguridad adecuados (lleve gafas, guantes y ropa protectora) descritos en las especificaciones sobre el tratamiento de materiales y normas de seguridad que suministra el proveedor del disolvente, especialmente cuando se utilicen productos tóxicos o peligrosos.

NOTA

Se puede utilizar la herramienta de purga de Lab Advisor para purgar la bomba automáticamente.

NOTA

Si la bomba no puede aspirar el disolvente de las botellas, utilice una jeringa para trasladar el disolvente de forma manual a través de los tubos y el desgasificador.

NOTA

Cuando se ceba el desgasificador de vacío con una jeringa, el disolvente pasa muy deprisa a través de sus tubos. Por lo tanto, el disolvente a la salida del desgasificador no estará completamente desgasificado. Bombee durante 10 minutos aproximadamente a la velocidad de flujo deseada, antes de empezar cualquier análisis. Esto permitirá que el desgasificador de vacío desgasifique apropiadamente el disolvente en sus tubos.

- 1 Abra la válvula de purga de la bomba
- 2 Establezca la velocidad de flujo en 5 mL/min.
- 3 Seleccione el canal A1
- 4 Restablezca el flujo
- 5 Observe si el disolvente está avanzando a través de los tubos desde el canal A1 hacia la bomba. Si no es así, desconecte los tubos del disolvente de la válvula de selección del disolvente, coloque la jeringa con su adaptador y haga pasar el líquido a través del desgasificador. Vuelva a colocar los tubos en la válvula de selección del disolvente.
- 6 Bombee 30 mL de isopropanol para eliminar las burbujas de aire residuales.
- 7 Conecte al siguiente canal de disolvente y repita los pasos 5 y 6 hasta que se hayan purgado todos los canales.
- 8 Cierre el flujo y la válvula de purga.

4 Configuración e instalación del sistema

Instalación de los módulos

Cebado regular

Cuándo Cuando el sistema de bombeo se mantiene apagado durante cierto tiempo (por ejemplo, una noche), el aire se redifunde en el canal de disolvente entre el desgasificador de vacío y la bomba. Si los disolventes que contienen componentes volátiles se dejan en el desgasificador sin flujo durante un largo periodo de tiempo, se producirá una ligera pérdida de estos componentes volátiles.

Preparaciones Encienda el sistema

NOTA

Se puede utilizar la herramienta de purga de Lab Advisor para purgar la bomba automáticamente.

- 1 Abra la válvula de purga de la bomba girándola en el sentido contrario a las agujas del reloj y fije la velocidad de flujo a 5 mL/min.
- 2 Limpie el desgasificador de vacío y todos los tubos con 10 mL de disolvente, como mínimo.
- 3 Repita los pasos 1 y 2 para otro(s) canal(es) de la bomba.
- 4 Fije la composición y la velocidad de flujo necesarias para la aplicación y cierre la válvula de purga.
- 5 Bombee durante 10 minutos aproximadamente antes de comenzar la aplicación.

Cambio de disolventes

Cuándo Cuando se deba sustituir el disolvente de un canal por otro disolvente que no es compatible (los disolventes son inmiscibles o un disolvente contiene un tampón), es necesario seguir el procedimiento que aparece a continuación para evitar la obstrucción de la bomba debido a la precipitación de sal o a las gotas de líquido residuales en algunas partes del sistema.

Piezas necesarias	Número	Referencia	Descripción
	1		Purgado de disolventes, consulte Tabla 8 en la página 86
	1	5022-2184	Unión ZDV

Preparaciones Desmonte la columna y sustitúyala por una conexión ZDV.
 Prepare las botellas con disolventes intermedios adecuados (consulte [Tabla 8](#) en la página 86)

- 1 Si el canal no se llena con el tampón, lleve a cabo el paso 4.
- 2 Coloque el filtro de recogida de disolvente en una botella de agua.
- 3 Limpie el canal a una velocidad de flujo adecuada para los tubos instalados (normalmente 3 – 5 mL/min) durante 10 min.
- 4 Modifique el paso de flujo de su sistema tal como se requiere para su aplicación.

PRECAUCIÓN

La sal de los tampones acuosos se puede precipitar en isopropanol residual.

La precipitación de sal puede obstruir los capilares y el filtro.

- Limpie las líneas de disolvente que contengan una alta concentración de sales con agua antes de introducir el disolvente orgánico.
- No realice los pasos del 5 al 7 para los canales que utilicen tampones acuosos como disolvente.

- 5 Sustituya la botella de disolvente por una botella de isopropanol.
- 6 Limpie el canal a una velocidad de flujo adecuada para los tubos instalados (normalmente 3 – 5 mL/min) durante 5 min.
- 7 Cambie la botella de isopropanol por una botella de disolvente para su aplicación.
- 8 Repita los pasos del 1 al 7 en el resto de canales de la bomba.

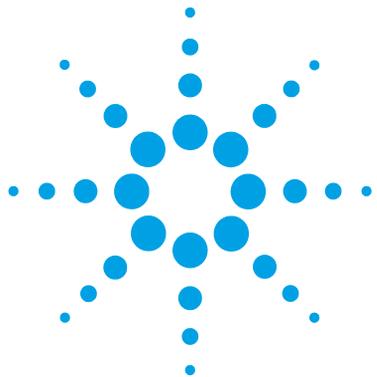
4 Configuración e instalación del sistema

Instalación de los módulos

- 9 Instale la columna deseada, ajuste la composición necesaria y la velocidad de flujo de su aplicación y equilibre el sistema durante aproximadamente 10 minutos antes de iniciar un análisis.

Tabla 8 Opción de disolventes de cebado para distintos propósitos

Actividad	Disolvente	Comentarios
Después de una instalación	Isopropanol	El mejor disolvente para extraer el aire del sistema
Cuando se cambia entre la fase reversa y la fase normal (en ambas ocasiones)	Isopropanol	Miscible con prácticamente todos los disolventes
Después de una instalación	Etanol o metanol	Opción alternativa al isopropanol (segunda elección) si no se dispone de isopropanol
Para limpiar el sistema cuando se utilizan soluciones tampón	Agua de grado HPLC	El mejor disolvente para redissolver los cristales de las soluciones tampón
Después de cambiar disolventes acuosos	Agua de grado HPLC	El mejor disolvente para redissolver los cristales de las soluciones tampón
Después de la instalación de los sellos de la fase normal (Sellos de PE (paquete de 2) (0905-1420))	Hexano + 5 % de isopropanol	Propiedades humectantes óptimas



5 Guía de inicio rápida

Sobre la guía de inicio rápida	88
Preparación del sistema	89
Encendido del sistema	89
Carga del método predeterminado	90
Configuración del gráfico en línea	91
Purga de la bomba	93
Adquisición de datos en la vista Control del método y el análisis	94
Parámetros del método para la comprobación del sistema con una muestra de comprobación isocrática	94
Configuración del método	98
Ejecución del método para una inyección individual	100
Análisis de datos	102
Vista Análisis de datos	103
Integración de una señal	104
Especificación del informe	105

Este capítulo proporciona información sobre la adquisición de datos y su análisis con el sistema LC Binario 1260 Infinity.



Sobre la guía de inicio rápida

Este capítulo proporciona información sobre la utilización del sistema LC Binario Agilent 1260 Infinity. Se puede utilizar como guía para llevar a cabo un primer análisis rápidamente tras la instalación, de manera que sirve tanto de ejemplo de tutorial como de una comprobación del funcionamiento general del sistema. También incluye información más detallada sobre los parámetros del método.

Este ejemplo muestra cómo configurar y realizar un análisis utilizando las columnas y la muestra de comprobación suministradas con el sistema LC Binario Agilent 1260 Infinity. El ejemplo hace referencia a los menús y los comandos de OpenLAB CDS ChemStation Edition, pero también existen funciones idénticas disponibles en las opciones de control alternativas, como OpenLAB CDS EZChrom Edition y el software MassHunter.

En adelante, los términos ChemStation y EZChrom harán referencia en todos los casos a las herramientas Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition y Agilent OpenLAB CDS EZChrom Edition, respectivamente.

NOTA

Como punto de partida, se asume que el sistema se ha instalado, encendido y cebado una primera vez (consulte “[Cebado inicial](#)” en la página 82). La lámpara UV debe estar encendida al menos 30 minutos antes de iniciar cualquier trabajo cuantitativo.

Preparación del sistema

Encendido del sistema

Si el sistema no está completamente encendido y el software no muestra el estado Preparado, siga estos pasos:

- 1 Encienda el sistema informático y espere a que aparezca el escritorio de Windows.
- 2 Active la alimentación eléctrica de los módulos LC mediante el botón de la parte inferior izquierda de cada módulo.

Se mostrará una luz verde de encendido en el centro del botón.

- 3 Para iniciar el software de control en el ordenador, haga clic sobre el icono (si está configurado). O bien, puede seleccionar **Start > All Programs > Agilent Technologies > OpenLAB > OpenLAB Control Panel**. Seleccione el instrumento correspondiente en el panel de navegación bajo **Instruments** y haga clic sobre **Launch online**.

El software ChemStation aparece en la vista **Method and Run Control**. Inicialmente, los módulos están en modo de espera y en el estado No preparado, excepto el inyector automático, que se inicia inmediatamente con el estado Preparado.

- 4 Para encender cada módulo de forma individual, haga clic con el botón derecho del ratón en el icono correspondiente y seleccione **Switch [module name] on** en el menú contextual.

También puede encender todos los módulos de forma simultánea en el sistema si hace clic sobre el botón **System On/Off** en la parte inferior derecha del diagrama del sistema. El estado del sistema cambia de *No preparado* (en amarillo) a *Preparado* (en verde) tras un breve periodo durante el cual se obtienen los valores.

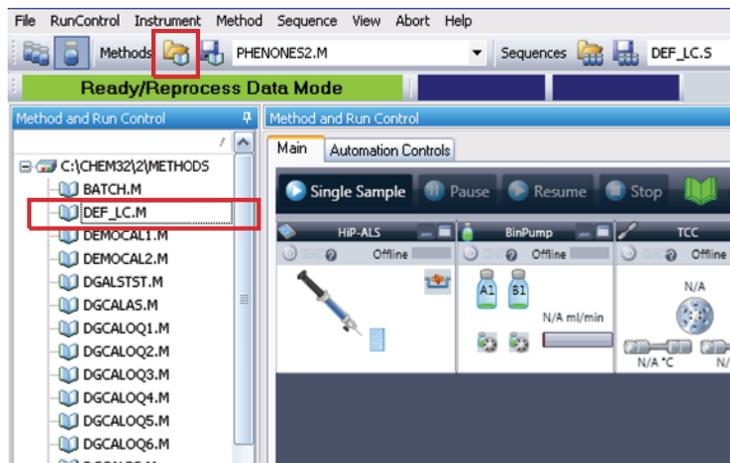
Carga del método predeterminado

ChemStation posee un método predeterminado llamado **DEF_LC.M** que se carga en la primera ejecución o siempre que sea necesaria una nueva plantilla de método en blanco. Contiene los ajustes predeterminados para todos los módulos.

Puede cargar el método **DEF_LC.M** con el procedimiento siguiente. Puede utilizarlo para configurar todos los parámetros según los ajustes predeterminados o para obtener una plantilla de método en blanco antes de configurar un nuevo método.

- 1 Acceda a la vista **Method and Run Control** de ChemStation.
- 2 En la barra de menú, seleccione **Method > New Method...** y seleccione **DEF_LC.M** en el menú contextual.

O bien, puede utilizar el icono **Load Method**  situado bajo la barra de menú o puede hacer doble clic en el nombre del método **DEF_LC.M** en la pestaña **Methods** del panel de navegación.



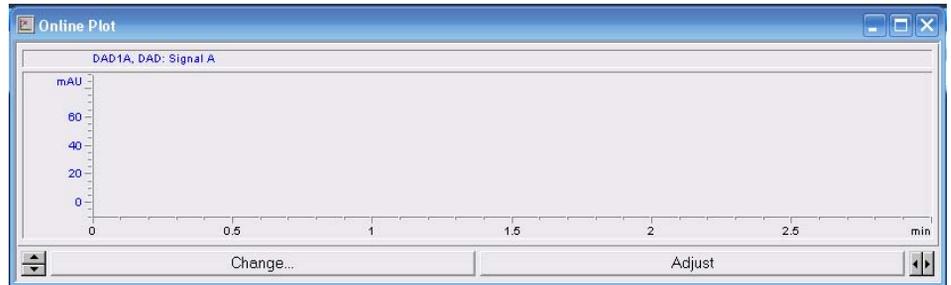
El método predeterminado (**DEF_LC.M**) posee un conjunto de parámetros predeterminados que pueden modificarse para crear un nuevo método. Por ejemplo, la velocidad de flujo está establecida en cero y los campos **Method Information** e **Method History** están en blanco.

NOTA

Tenga en cuenta que este método no se puede sobrescribir con nuevos parámetros. Por tanto, si hace clic en **Save** accederá a la función **Save As...**, por lo que deberá introducir un nombre de método diferente.

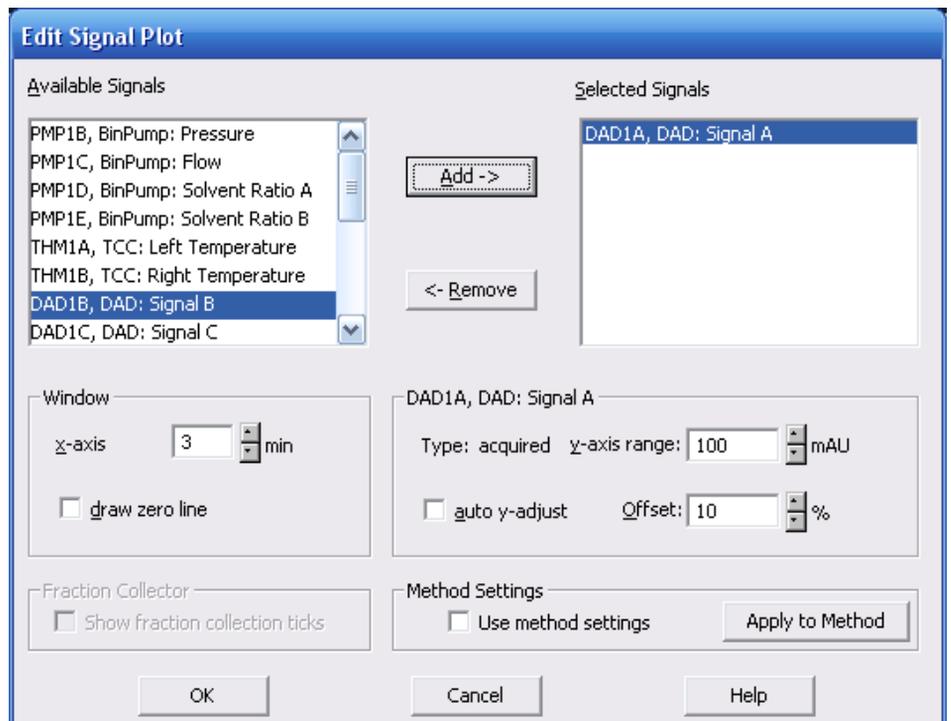
Configuración del gráfico en línea

- 1 Si la ventana **Online Plot** no está visible: haga clic en **View > Online Signals > Signal Window 1** para mostrar la ventana.



- 2 Para configurar las señales deseadas en la ventana **Online Plot**, haga clic en **Change....**

Se abre la página **Edit Signal Plot**.



The screenshot shows the 'Edit Signal Plot' dialog box. It is divided into several sections:

- Available Signals:** A list of signals including PMP1B, BinPump: Pressure; PMP1C, BinPump: Flow; PMP1D, BinPump: Solvent Ratio A; PMP1E, BinPump: Solvent Ratio B; THM1A, TCC: Left Temperature; THM1B, TCC: Right Temperature; DAD1B, DAD: Signal B (highlighted); and DAD1C, DAD: Signal C.
- Selected Signals:** A list containing 'DAD1A, DAD: Signal A'.
- Buttons:** 'Add ->', '<- Remove', 'OK', 'Cancel', and 'Help'.
- Window:** 'x-axis' is set to 3 min. There is a checkbox for 'draw zero line'.
- DAD1A, DAD: Signal A:** 'Type: acquired', 'y-axis range: 100 mAU', 'auto y-adjust' checkbox, and 'Offset: 10 %'.
- Fraction Collector:** A checkbox for 'Show fraction collection ticks'.
- Method Settings:** A checkbox for 'Use method settings' and an 'Apply to Method' button.

- 3 En el cuadro **Available Signals**, destaque las señales necesarias y haga clic en **Add** para moverlas al cuadro **Selected Signals**.
- 4 Para configurar los ajustes individuales de cada señal, destaque la señal en el cuadro **Selected Signal** y establezca los valores necesarios en la mitad inferior de la página.

NOTA

Además de las señales del detector, también se pueden mostrar cómo gráfico las trazas de parámetros como la temperatura y la presión. Con **Apply to Method**, se pueden almacenar los ajustes de esta página en el método.

La ventana **Online Plot** funciona como cualquier editor de gráficos electrónico y registra continuamente la salida del detector y otros parámetros de salida. Las señales se dibujan en la parte derecha de la ventana y se desplazan hacia la izquierda. Se puede acceder hasta un máximo de 90 min de datos antiguos. Esto es útil para comprobar la línea base y consultar inyecciones previas. Las escalas de los ejes X e Y se pueden ajustar directamente con los botones arriba/abajo de cada eje.

El botón **Adjust** de la ventana **Online Plot** mueve el punto actual de la señal seleccionada a la línea cero. La señal seleccionada está indicada por el color de las etiquetas del eje Y. Puede seleccionar una señal determinada si hace clic sobre la señal o sobre la descripción de la señal correspondiente en la parte superior del gráfico.

Al pulsar el botón **Balance** se ponen a cero todos los detectores.

NOTA

Los cambios realizados en la página **Online Plot** no afectan de ningún modo a los datos almacenados en los ficheros de datos individuales.

Purga de la bomba

Purgue la bomba si...

- La bomba se ha cebado por primera vez.
- La bomba se va a purgar con disolvente nuevo antes de utilizar el sistema o cuando se va a cambiar el disolvente por otro.
- La bomba ha estado inactiva durante una hora o más tiempo (se recomienda realizar la purga, ya que puede haber entrado aire en las líneas de disolvente).
- Los depósitos de disolvente se vuelven a llenar y la bomba requiere que se realice la purga para llenar el sistema con disolvente nuevo. Si se van a utilizar disolventes diferentes, asegúrese de que el nuevo disolvente se pueda mezclar con el disolvente anterior y, si es necesario, utilice un paso intermedio con un disolvente miscible conjuntamente (el isopropanol suele ser una buena opción; consulte la tabla de miscibilidad de disolventes).

Para obtener información sobre el procedimiento de purga, consulte [“Cebado regular”](#) en la página 84.

Adquisición de datos en la vista Control del método y el análisis

Parámetros del método para la comprobación del sistema con una muestra de comprobación isocrática

Para realizar la comprobación del LC Binario 1260 Infinity se llevará a cabo un análisis de prueba con una mezcla de prueba isocrática (Muestra de verificación isocrática de Agilent (01080-68704)), utilizando para ello la columna pedida y suministrada junto con su sistema.

Muestra de verificación isocrática de Agilent (01080-68704) contiene los siguientes componentes disueltos en metanol:

- dimetilftalato,
- dietilftalato,
- bifenilo,
- o-terfenilo.

Los parámetros del método de separación de esta mezcla de prueba se resumen en la [Tabla 9](#) en la página 95 (para la configuración de volumen estándar de retardo) y la [Tabla 10](#) en la página 96 (para la configuración de volumen de retardo bajo).

Tabla 9 Parámetros del método para el primer análisis de separación (configuración de volumen estándar de retardo)

Módulo	Parámetro	Configuración
Bomba	Disolvente A	Agua
	Disolvente B	Acetonitrilo
	Velocidad de flujo	4,0 mL/min
	Composición del disolvente	40 % A, 60 % B
	Tiempo de parada	1 min (tiempo de post-análisis: 1 min)
Inyector automático	Inyección	1 µL
Compartimento de las columnas	Columna	<ul style="list-style-type: none"> • Columna Eclipse Plus C18, 4,6 x 100 mm, 3,5 µm (959961-902) • Columna Poroshell 120 EC-C18, 3,0 x 50 mm, 2,7 µm (699975-302) • Columna Poroshell 120 EC-C18, 4,6 x 50 mm, 2,7 µm (699975-902)
	Temperatura	40 °C
Detector	Señal A	Longitud de onda: 250 nm; anchura de banda: 4 nm Longitud de onda de referencia: 360 nm; anchura de banda de referencia: 100 nm

5 Guía de inicio rápida

Adquisición de datos en la vista Control del método y el análisis

Tabla 10 Parámetros del método para el primer análisis de separación (configuración de volumen de retardo bajo)

Módulo	Parámetro	Valores y componentes a utilizar
Bomba	Disolvente A	Agua
	Disolvente B	Acetonitrilo
	Velocidad de flujo	0,75 mL/min
	Composición del disolvente	40 % A, 60 % B
	Tiempo de parada	1,2 min (tiempo de post-análisis: 1 min)
Inyector automático	Inyección	1 µL
Compartimento de las columnas	Columna	Columna: SB-C18, 4,6x 50 mm, 1,8 µm, 600 bar (827975-902)
	Temperatura	40 °C
Detector	Señal	Longitud de onda: 250 nm; anchura de banda: 4 nm Longitud de onda de referencia: 360 nm; anchura de banda de referencia: 100 nm

Especificaciones de la comprobación:

- En el cromatograma deben observarse cuatro picos.
- **Intensity Test:** aprobado.
- **Wavelength Calibration** ±1 nm.

Preparación de la comprobación

- 1 Llene la botella del disolvente A con agua de calidad HPLC. Llene la botella del disolvente B con acetonitrilo de calidad HPLC.
- 2 Si se ha instalado el desgasificador en línea, purgue cada canal de este utilizando la jeringa suministrada.
- 3 Abra la válvula de purga de la bomba y purgue cada canal utilizando una velocidad de flujo de 5 mL/min.
Esto debería bastar para eliminar el aire existente en el sistema.
- 4 Instale la columna suministrada en el compartimento de las columnas.
- 5 Lave la celda de flujo con agua de calidad HPLC durante 5 min.
- 6 Realice una calibración de la longitud de onda y un test de intensidad, si procede.
- 7 Deje que el sistema alcance la situación de equilibrio (de acuerdo con las condiciones de comprobación especificadas en la [Tabla 9](#) en la página 95 y la [Tabla 10](#) en la página 96) durante 10 min.
- 8 Prepare un vial de la muestra de comprobación isocrática.

Configuración del método

Esta sección muestra cómo configurar rápidamente las condiciones del método para un análisis.

Requisitos

El método predeterminado **DEF_LC.M** se ha cargado y está listo para preparar el nuevo método. Ahora se pueden editar los parámetros principales para crear el nuevo método.

- 1 Para acceder rápidamente a la página **Method** para cada módulo, haga clic con el botón derecho del ratón en el gráfico del sistema del módulo y seleccione **Method...** en el menú contextual.

Cada uno de los módulos se configurará de esta forma.

- 2 Haga clic con el botón derecho del ratón en la zona de la bomba y seleccione **Method...** en el menú contextual.

a En la página **Method** de la **1260 Infinity Binary Pump**, introduzca los siguientes parámetros:

- Velocidad de flujo: 4,0 ml/min
- Disolvente A: seleccione **Water** de la lista desplegable de compresibilidad.
- Disolvente B: seleccione la casilla para activar el Disolvente B.
- Ajuste el valor "% B" al 60 %.
- Tiempo de parada: 1 min
- Tiempo de post-análisis: 1 min

b El resto de los parámetros pueden permanecer en sus ajustes predeterminados. Haga clic en **OK** para salir de la ventana.

Los cambios se envían al módulo de la bomba.

- 3 Haga clic con el botón derecho del ratón en la zona del inyector automático y seleccione **Method...** en el menú contextual.

a En la página **Method** del **1260 Infinity Autosampler**, introduzca los siguientes parámetros:

- Volumen de inyección: 1,0 µl
- Inyección con lavado de aguja
- Modo Puerto de lavado, tiempo: 6 s

b El resto de los parámetros pueden permanecer en sus ajustes predeterminados. Haga clic en **OK** para salir de la ventana.

Los cambios se envían al módulo del inyector automático.

- 4 Haga clic con el botón derecho del ratón en la zona del Compartimento termostatzado de columna (TCC) y seleccione **Method...** en el menú contextual.
 - a En la página **Method** del **1290 Infinity TCC**, introduzca los siguientes parámetros:
 - Temperatura de la izquierda a 40 °C
 - Temperatura de la derecha combinada
 - b El resto de los parámetros pueden permanecer en sus ajustes predeterminados. Haga clic en **OK** para salir de la ventana.

Los cambios se envían al módulo TCC.

- 5 Haga clic con el botón derecho del ratón en la zona del Detector de diodos y seleccione **Method...** en el menú contextual.
 - a En la página **Method** del **1260 Infinity DAD**, introduzca los siguientes parámetros:
 - **Use Signal:** desmarque las casillas para apagar todas las señales, excepto la **Signal A**.
 - Señal A: 254 nm, 4 nm de anchura de banda, ref. 550 nm, 100 nm de anchura de banda
 - Anchura de pico: 0,02
 - b En la sección **Advanced**, ajuste **Spectrum Store** en **All**.
 - c El resto de los parámetros pueden permanecer en sus ajustes predeterminados. Haga clic en **OK** para salir de la ventana.

Los cambios se envían al módulo del DAD.

- 6 Ya se han introducido todos los parámetros del módulo necesarios. Seleccione **Method > Save Method As...** e introduzca **ISO-1.M** para guardar el método con un nombre nuevo.

ChemStation no permite guardar el método como **DEF_LC.M** para evitar que se modifique la plantilla del método predeterminado.
- 7 Permita que el sistema se equilibre durante al menos 10 min y compruebe que la línea base del **Online Plot** sea estable antes de iniciar el análisis.

Ejecución del método para una inyección individual

Esta sección muestra cómo ejecutar una inyección individual de la mezcla de comprobación isocrática con las condiciones introducidas en la sección anterior.

Los análisis en ChemStation se pueden realizar de dos maneras:

- **Run Method:** inyecciones individuales, por ejemplo, en el desarrollo del método interactivo, mediante los ajustes de parámetros actuales en ese momento.
- **Run Sequence:** series automatizadas de inyecciones desde varios viales, posiblemente con varios métodos. Para obtener más información, consulte los manuales de ChemStation.

- 1 Haga clic en el icono **Select Run Method Task** .
- 2 Si las condiciones del método necesarias no están cargadas en ese momento, seleccione **Method > Load Method** o el icono  situado bajo la barra de menú para cargarlas.

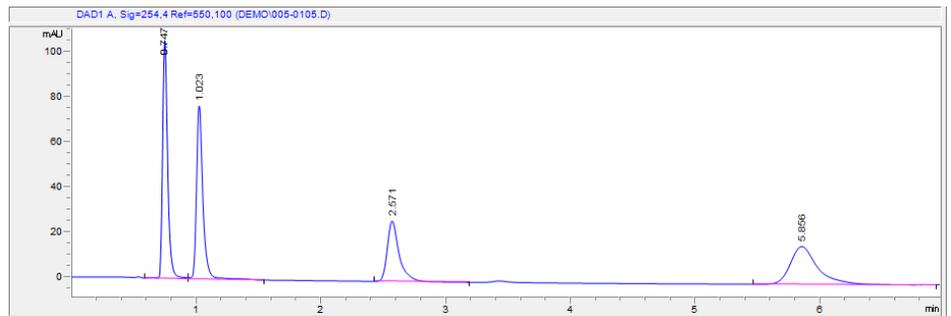
NOTA

Si se han realizado cambios en un método cargado y todavía no se han guardado, esto se indica mediante un asterisco amarillo en el icono de estado del método. La inyección se puede realizar sin haber guardado primero los cambios de los parámetros. ChemStation siempre almacena una copia de los parámetros de adquisición en el fichero de datos como ACQ.TXT para garantizar la conservación de los parámetros del método originales.

- 3 Coloque el vial de muestra en la posición 1 (esta es la posición frontal de las posiciones de los viales 10 x 2 ml situados en el lado derecho de la bandeja de muestras).
- 4 Seleccione **Run Control > Sample Info** e introduzca los parámetros necesarios de la muestra.
Por ejemplo:
 - **Subdirectory** (opcional)
 - **Name Pattern**
 - **Vial/Location**
 - **Sample name**
 - **Comment**

- 5 Si el sistema ya está equilibrado y la línea base es estable, haga clic en **Run Method** en la página **Sample Info** para iniciar la inyección. También puede hacer clic en **OK** y, cuando esté listo, seleccionar **Run Control > Run Method**. El elemento se añadirá a la **Run Queue** y, a continuación, se ejecutará automáticamente desde esta.
- 6 Se realiza la inyección y el cromatograma aparece en el **Online Plot**. La adquisición de datos se detendrá cuando se alcance el **Stop Time**.

El cromatograma debería tener un aspecto similar al que se incluye a continuación:



Análisis de datos

Un método en ChemStation contiene todos los parámetros para la adquisición de datos (control del sistema) y el análisis de datos (procesamiento de los datos para ofrecer resultados cuantitativos y cualitativos). Esta sección trata brevemente la integración y los informes del análisis de datos para que las separaciones realizadas anteriormente en este capítulo se puedan integrar e imprimir. Para obtener más información sobre el análisis de datos y el uso de la calibración para la cuantificación, consulte el manual de ChemStation.

The screenshot shows the ChemStation software interface with several red boxes highlighting specific areas:

- Fuente del método:** Points to the 'Method' menu in the top toolbar.
- Tabla de navegación:** Points to the 'Navigation' menu in the top toolbar.
- Tarea de integración:** Points to the 'Integration' menu in the top toolbar.
- Tarea del espectro:** Points to the 'Spectrum' menu in the top toolbar.
- Panel de navegación:** Points to the left-hand navigation pane.

The main window displays a chromatogram with peaks and a table of integration events. The table below is a reproduction of the data shown in the screenshot:

Time	Integration Events	Value
0.747	Area	0.042
0.747	Peak	0.042
0.747	Area Report	0.042
0.747	Height Report	0.042
0.747	Width Report	0.042
0.747	Integration	0.042

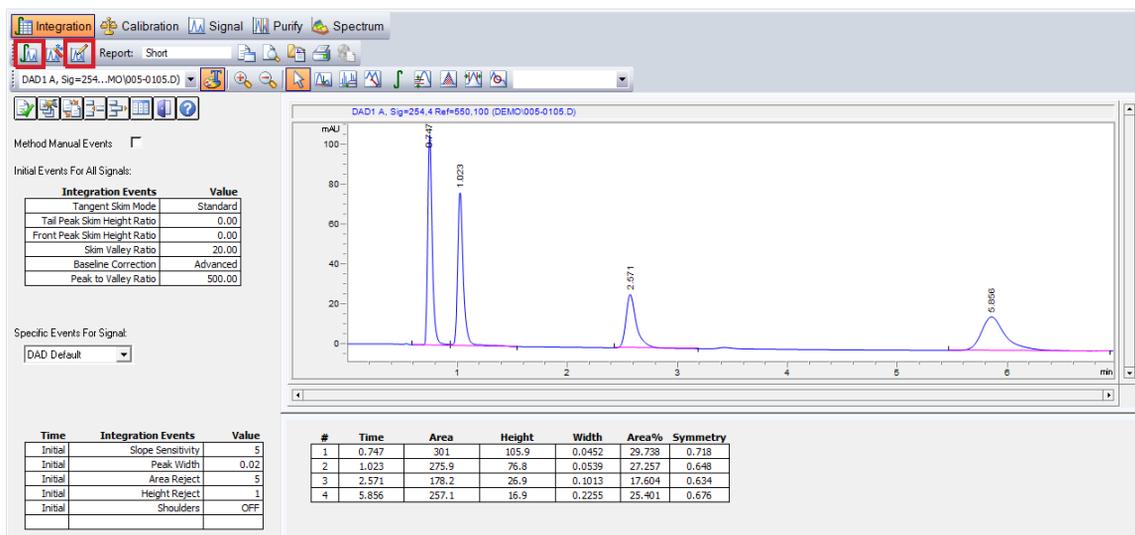
Vista Análisis de datos

Para abrir un cromatograma en la vista **Data Analysis**:

- 1 Inicie ChemStation sin conexión.
- 2 Haga clic en **Data Analysis** en la parte inferior izquierda de la pantalla.
- 3 En el panel de navegación, busque el directorio de datos que contenga los ficheros de datos. Todas las inyecciones individuales de datos están representadas como un subgrupo denominado **Single Runs**. Haga doble clic en **Single Runs** para cargar estos ficheros de datos en la tabla de navegación.
- 4 Seleccione un fichero en la tabla de navegación y haga doble clic sobre él para cargar el cromatograma en el visor.

Integración de una señal

- 1 Seleccione la herramienta de tareas de integración (consulte la figura que aparece a continuación). El icono **Integrate** y el icono **Set Integration Events Table** están destacados en la figura que se muestra a continuación.



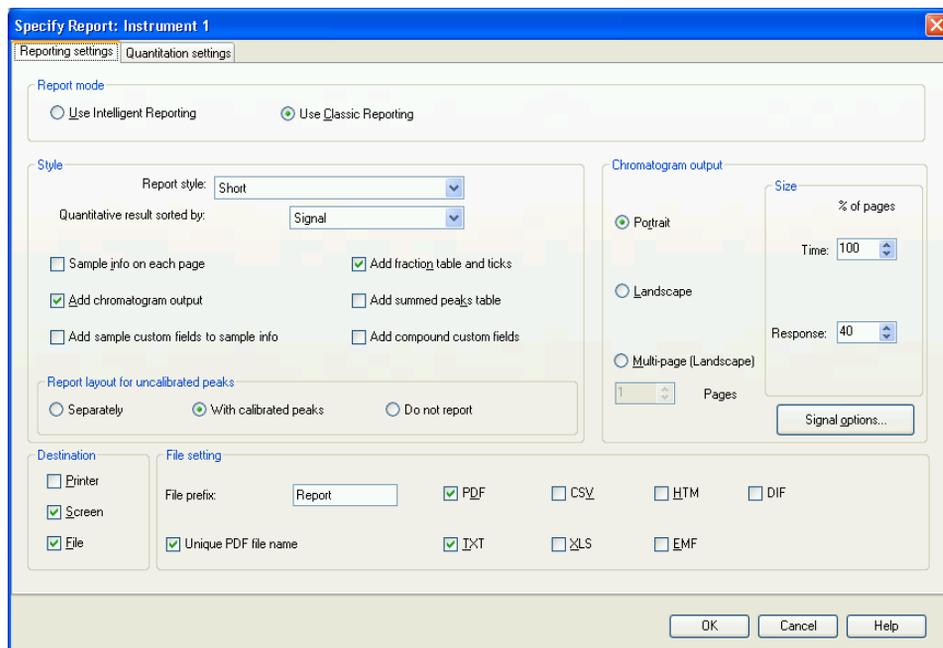
- 2 Haga clic en el icono **Set Integration Events Table**  para abrir la tabla.
- 3 Ajuste **Baseline Correction** a **Advanced** para los análisis de gradientes.
- 4 Ajuste el valor de la **Slope Sensitivity** a 5 .

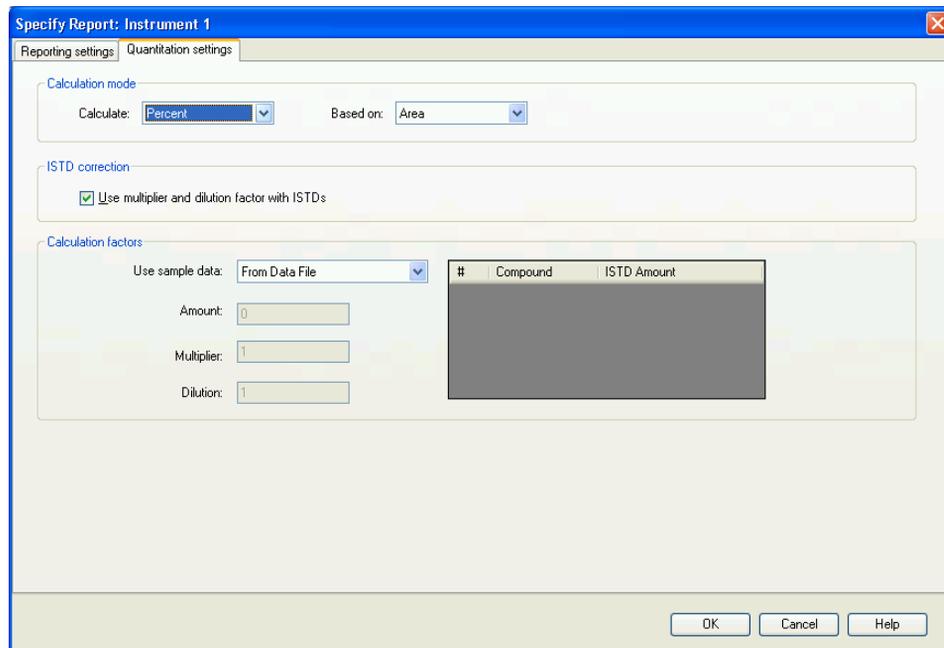
Los valores más elevados integrarán los picos más pronunciados e ignorarán los picos menos pronunciados.

- 5 Configure el valor **Peak Width** al pico de interés más estrecho (aproximadamente 0,02 en este caso).
- 6 **Area Reject** y **Height Reject** se pueden configurar para rechazar los picos más pequeños.
- 7 Haga clic en el icono **Integrate**  para actualizar los resultados con estos nuevos ajustes.
- 8 Salga de la tabla de **Integration Events** empleando el icono con la marca verde .

Especificación del informe

- 1 En la barra del menú, haga clic en **Report > Specify Report** para mostrar la ventana que aparece en la figura siguiente.

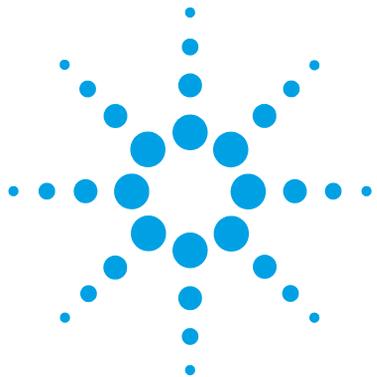




- 2 Con los ajustes de ejemplo que se muestran en las figuras anteriores, puede crear un informe de porcentaje de área en la pantalla.
- 3 En la sección **Destination**, seleccione **Printer** para obtener una copia en papel y seleccione **File** y **PDF** para obtener un fichero PDF del informe y almacenarlo en un fichero de datos (el fichero de datos con el sufijo .D es un directorio. El fichero del informe se puede visualizar directamente en ChemStation o se puede encontrar en el directorio utilizando el explorador de ficheros habitual de Windows).
- 4 Guarde el método de nuevo para garantizar que la configuración de informes se almacene y para que el método la utilice en el futuro.

Cuando el método se vuelva a utilizar, estos parámetros de integración y la configuración de informe se utilizarán para crear el informe.

Con esta sección se finaliza el apartado sobre el análisis de datos del software ChemStation. Consulte los manuales de ChemStation y el sistema de ayuda en línea para obtener más información sobre las funciones potentes de ChemStation.



6 Apéndice

Información sobre seguridad	108
Información sobre disolventes	111
Información sobre materiales	111
Agilent Technologies en Internet	116
Configuración de un método mediante la opción Editar método completo	117
Información del método	119
Instrumento/Adquisición	120
Análisis de datos	135
Lista de comprobación del tiempo de análisis	142

Este capítulo proporciona información adicional sobre la seguridad, los aspectos legales, Internet y sobre cómo configurar un método.



Información sobre seguridad

Información de seguridad

Las siguientes precauciones generales deben aplicarse durante el funcionamiento, mantenimiento o reparación de este instrumento. Si no se cumplen estas normas o los avisos específicos que aparecen en diversas partes de este manual, se invalidan los estándares de seguridad de diseño, fabricación y utilización de este instrumento. Agilent Technologies no se responsabiliza del incumplimiento de estos requisitos por parte del usuario.

ADVERTENCIA Asegurarse de que el equipo se utiliza correctamente.

La protección proporcionada por este equipo puede verse perjudicada.

→ El operario de este instrumento tiene que utilizar el equipo tal y como se describe en este manual.

Estándares de seguridad

Éste es un instrumento de seguridad de Primera Clase (dotado de un terminal de toma de tierra) y ha sido fabricado y comprobado de acuerdo con las normas internacionales de seguridad.

Funcionamiento

Antes de conectar el instrumento a la red, siga atentamente las instrucciones de la sección de instalación. Además, debe tener en cuenta lo siguiente.

No retire las cubiertas del instrumento mientras esté funcionando. Antes de encender el instrumento, todos los terminales protegidos con toma a tierra, los alargadores, los autotransformadores y los dispositivos conectados a él se deben conectar a un enchufe con toma a tierra. Cualquier interrupción de la toma a tierra de protección supondrá un riesgo potencial de descarga que puede provocar lesiones personales graves. Siempre que exista la posibilidad

de que la protección no funcione, se debe apagar el instrumento y evitar cualquier funcionamiento previsto.

Asegúrese de utilizar como recambio solo fusibles con la corriente nominal necesaria y del tipo especificado (fusión normal, fusión retardada, etc.). Se debe evitar el uso de fusibles reparados y de portafusibles con cortocircuitos.

Algunos de los ajustes descritos en este manual deben hacerse con el instrumento conectado a la red y con alguna de las cubiertas de protección abierta. El alto voltaje existente en algunos puntos puede producir daños personales si llegan a tocarse estos puntos.

Siempre que sea posible, debe evitarse cualquier ajuste, mantenimiento o reparación del instrumento abierto y conectado a la red. Si no lo es, debe realizarlo el personal especializado consciente del riesgo existente. No intente llevar a cabo este tipo de trabajo si no está presente otra persona capaz de proporcionarle primeros auxilios, en caso necesario. No cambie ningún componente con el cable de red conectado.

No ponga en marcha el instrumento en presencia de gases o vapores inflamables. El encendido de cualquier instrumento eléctrico en estas circunstancias, constituye un riesgo para la seguridad.

No instale componentes que no correspondan al instrumento, ni realice modificaciones no autorizadas.

Los condensadores que contiene el aparato pueden mantener su carga aunque el equipo haya sido desconectado de la red. El instrumento posee voltajes peligrosos, capaces de producir daños personales. Extreme las precauciones cuando proceda al ajuste, comprobación o manejo de este equipo.

Cuando se trabaje con disolventes, se deben observar los procedimientos de seguridad (por ejemplo, gafas, guantes y ropa protectora) descritos en la información sobre tratamiento de material y datos de seguridad, suministrada por el vendedor de disolventes, especialmente cuando se utilicen productos tóxicos o peligrosos.

Símbolos de seguridad

Tabla 11 Símbolos de seguridad

Símbolo	Descripción
	El aparato incluye este símbolo cuando el usuario debe consultar el manual de instrucciones para evitar cualquier riesgo de lesión al operario y proteger al aparato de los daños.
	Indica voltajes peligrosos.
	Indica un terminal de conexión a tierra protegido.
	Pueden producirse daños oculares al mirar directamente la luz de la lámpara de deuterio utilizada en este equipo.
	El aparato incluye este símbolo cuando el usuario está expuesto a superficies calientes que no deben tocarse cuando estén a gran temperatura.

ADVERTENCIA

Un AVISO

advierte de situaciones que podrían causar daños personales o la muerte.

- No continuar tras un aviso, hasta haber entendido y cumplido totalmente las condiciones indicadas.

PRECAUCIÓN

Una PRECAUCIÓN

advierte de situaciones que podrían causar una pérdida de datos o dañar el equipo.

- No continuar tras un mensaje de este tipo hasta haber comprendido y cumplido totalmente las condiciones indicadas.

Información sobre disolventes

Siga las siguientes recomendaciones en la utilización de disolventes.

- Siga las recomendaciones para evitar el crecimiento de algas, consulte los manuales de la bomba.
- Las pequeñas partículas pueden bloquear permanentemente los capilares y las válvulas. Por tanto, filtre siempre los disolventes a través de filtros de 0,4 µm.
- Evite o minimice el uso de disolventes que puedan corroer algunas partes del paso de flujo. Tenga en cuenta las especificaciones del rango de pH determinado por diferentes materiales como las celdas de flujo, los materiales de las válvulas, etc. y las recomendaciones de los apartados siguientes.

Información sobre materiales

Los materiales que se encuentran en el paso de flujo se seleccionan cuidadosamente a partir de la experiencia de Agilent, obtenida a lo largo de varias décadas, en el desarrollo de instrumentos de gran calidad destinados al análisis de HPLC. Estos materiales muestran una robustez excelente en las condiciones de HPLC habituales. En el caso de condiciones especiales, consulte el apartado de información sobre los materiales o póngase en contacto con Agilent.

Descargo de responsabilidad

Los siguientes datos se han recopilado de fuentes externas y solo deben considerarse como referencia. Agilent no garantiza que dicha información sea correcta ni que esté completa. Los datos se basan en bibliotecas de compatibilidad que no son específicas para estimar la duración a largo plazo y en condiciones determinadas pero muy variables de los sistemas UHPLC, los disolventes, las mezclas de disolventes y las muestras. La información no se puede generalizar debido a los efectos catalíticos de las impurezas, como los iones metálicos, los ligandos, el oxígeno, etc. Aparte de la corrosión química pura, se deben tener en cuenta otros efectos, como la corrosión eléctrica, la carga electrostática (especialmente en el caso de disolventes orgánicos no conductores), la expansión de las piezas de polímeros, etc. La mayoría de los

datos disponibles hacen referencia a la temperatura ambiente (normalmente, 20 – 25 °C, 68 – 77 °F). Si es posible que aparezca corrosión, se suele acelerar a temperaturas más altas. En caso de duda, consulte la documentación técnica sobre la compatibilidad química de los materiales.

PEEK

El PEEK (polieteretercetona) posee unas propiedades excelentes con respecto a la resistencia química y la estabilidad mecánica y térmica. Es estable en un rango de pH entre 1 y 12,5 y es inerte a un gran número de disolventes comunes. Existen ciertas incompatibilidades conocidas con agentes químicos como el cloroformo, el cloruro de metileno, THF, DMSO > 1 %, los ácidos fuertes (ácido nítrico > 10 %, ácido sulfúrico > 10 %, ácido tricloroacético, ácidos sulfónicos), los halógenos o las disoluciones halógenas acuosas y el fenol y sus derivados (cresoles, ácido salicílico, etc.). Cuando se utiliza por encima de la temperatura ambiente, el PEEK es sensible a las bases y a varios disolventes orgánicos que causan que se expanda.

Poliimida

Agilent utiliza poliimida semicristalina en los sellos de los rotores de las válvulas y en los asientos de las agujas de los inyectores automáticos. Uno de los proveedores de poliimida es DuPont, cuya marca de poliimida es Vespel. Agilent utiliza esta marca.

La poliimida es estable en un rango de pH entre 1 y 10 y en la mayoría de los disolventes orgánicos. No es compatible con los ácidos minerales concentrados (por ejemplo, el ácido sulfúrico), el ácido acético glacial, DMSO y THF. Sustancias nucleofílicas como el amoníaco (por ejemplo, las sales amónicas en condiciones básicas) o los acetatos pueden degradarlo.

Polietileno (PE)

Agilent utiliza mezclas de PTFE/PE de peso molecular ultraalto (UHMW) para los pistones amarillos y los sellos de lavado, que se utilizan en las bombas 1290 Infinity y en las aplicaciones de fase normal de las bombas 1260 Infinity.

El polietileno posee una buena estabilidad en los disolventes orgánicos más comunes, como los ácidos y las bases en un rango de pH entre 1 y 12,5. Es compatible con muchos disolventes orgánicos utilizados en sistemas cromatográficos, como el metanol, el acetonitrilo y el isopropanol. Tiene una estabilidad limitada con los hidrocarburos alifáticos, aromáticos y halogenados, con

THF, con el fenol y sus derivados y con los ácidos y las bases concentrados. En las aplicaciones de fase normal, la presión máxima debe estar limitada a 200 bar.

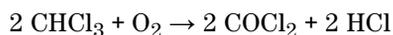
Tantalio (Ta)

El tantalio es inerte a los disolventes de HPLC más comunes y a casi todos los ácidos, excepto el ácido fluorhídrico y los ácidos con trióxido de azufre libre. Las bases fuertes (por ejemplo, disoluciones de hidróxido > 10 %, dietilamina) pueden corroerlo. No se recomienda su uso con ácido fluorhídrico y fluoruros.

Acero inoxidable

El acero inoxidable es inerte a algunos de los disolventes más comunes. Es estable en presencia de ácidos y bases en un rango de pH entre 1 y 12,5. Los ácidos con un pH inferior a 2,3 lo pueden corroer. Los siguientes disolventes también pueden corroerlo:

- Disoluciones de halógenos alcalinos y sus respectivos ácidos (por ejemplo, yoduro de litio, cloruro de potasio, etc.) y disoluciones acuosas de halógenos.
- Altas concentraciones de ácidos inorgánicos como ácido nítrico o sulfúrico y de disolventes orgánicos, especialmente a temperaturas elevadas (sustituirlos, si el método cromatográfico lo permite, por ácido fosfórico o una solución tampón de fosfato, que son menos corrosivos para el acero inoxidable).
- Disolventes o mezclas halogenados que formen radicales y/o ácidos, por ejemplo:



Esta reacción, en la que el acero inoxidable probablemente actúa como catalizador, ocurre rápidamente con cloroformo seco si el proceso de secado elimina el alcohol estabilizante.

- Éteres de calidad cromatográfica que puedan contener peróxidos (por ejemplo, THF, dioxano, diisopropiléter). Estos éteres deben filtrarse con óxido de aluminio seco, ya que adsorbe los peróxidos.
- Disoluciones de ácidos orgánicos (ácido acético, ácido fórmico, etc.) en disolventes orgánicos. Por ejemplo, una disolución del 1 % de ácido acético en metanol atacaría el acero.

- Disoluciones que contengan ligandos fuertes (por ejemplo, EDTA, etilendiaminotetraacético).
- Mezclas de tetracloruro de carbono con 2-propanol o THF.

Carbono tipo diamante (DLC)

El carbono tipo diamante es inerte a casi todos los ácidos, las bases y los disolventes comunes. En el caso de las aplicaciones de HPLC, no existe ninguna incompatibilidad documentada.

Sílice fundida y cuarzo (SiO₂)

La sílice fundida se utiliza en las celdas de flujo y los capilares del sistema 1290 Infinity. El cuarzo se utiliza en las ventanas de las celdas de flujo clásicas. Es inerte a todos los disolventes y los ácidos comunes, excepto el ácido fluorhídrico y los disolventes ácidos que contengan fluoruros. Las bases fuertes lo corroen y no se debe utilizar a temperatura ambiente con un pH mayor que 12. La corrosión de las ventanas de las celdas de flujo puede afectar negativamente a los resultados de medición. En el caso de un pH mayor que 12, se recomienda el uso de celdas de flujo con ventanas de zafiro.

Oro

El oro es inerte a todos los disolventes, los ácidos y las bases comunes de HPLC en el rango de pH especificado. Los cianuros que actúan como ligandos y los ácidos concentrados, como el agua regia, lo pueden corroer.

Óxido de circonio (ZrO₂)

El óxido de circonio es inerte a casi todos los ácidos, las bases y los disolventes comunes. En el caso de las aplicaciones de HPLC, no existe ninguna incompatibilidad documentada.

Platino/iridio

El platino/iridio es inerte a casi todos los ácidos, las bases y los disolventes comunes. En el caso de las aplicaciones de HPLC, no existe ninguna incompatibilidad documentada.

Polímeros fluorados (PTFE, PFA, FEP y FFKM)

Los polímeros fluorados como el PTFE (politetrafluoroetileno), el PFA (perfluoroalcoxi) y el FEP (propileno-etileno fluorado) son inertes a casi todos los ácidos, las bases y los disolventes comunes. El FFKM es una goma perfluorada que también es resistente a la mayoría de los productos químicos. Al tratarse de un elastómero, puede expandirse en algunos disolventes orgánicos, como los hidrocarburos halogenados.

Los tubos de copolímero de TFE/PDD, que se utilizan en todos los desgasificadores Agilent excepto en el modelo G1322A, no son compatibles con los disolventes fluorados (p. ej., Freon, Fluorinert o Vertrel). Presentan una vida útil limitada en presencia de hexafluoroisopropanol (HFIP). Para garantizar una vida útil lo más extensa posible cuando se utilice HFIP, la solución más adecuada es dedicar una cámara específica a este disolvente, no cambiar de disolvente y no permitir que la cámara se seque. Para optimizar la vida útil del sensor de presión, no deje HFIP en el interior de la cámara tras apagar la unidad.

Zafiro, rubí y cerámica con base de Al_2O_3

El zafiro, el rubí y la cerámica con base de óxido de aluminio Al_2O_3 son inertes a casi todos los ácidos, las bases y los disolventes comunes. En el caso de las aplicaciones de HPLC, no existe ninguna incompatibilidad documentada.

Agilent Technologies en Internet

Para conocer las novedades más recientes sobre nuestros productos y servicios, visite nuestro sitio web en la dirección de Internet:

<http://www.agilent.com>

Configuración de un método mediante la opción Editar método completo

Un método en ChemStation contiene todos los parámetros para la adquisición de datos (control del sistema) y el análisis de datos (procesamiento de los datos para ofrecer resultados cuantitativos y cualitativos). Se puede acceder a estos parámetros a través de una serie de pantallas que se centran en un módulo o función. Puede acceder a estas pantallas si hace clic en un icono de la interfaz gráfica de usuario (GUI) o mediante la barra de menú con sus menús desplegables. Se puede crear un método nuevo cargando y editando un método existente, o se puede crear cargando y editando el método de plantilla vacía **DEF_LC.M**.

Para cambiar sólo unos pocos parámetros, puede acceder directamente a las páginas de configuración correspondientes para modificarlos. Puede que a los usuarios con menos experiencia les resulte más fácil utilizar la función **Edit Entire Method**, ya que de esta forma se pasa automáticamente por las páginas. Se puede acceder a esta función a través del menú **Method > Edit Entire Method**, lo que lleva a abrir el cuadro de diálogo **Check Method Sections to Edit**:



Figura 23 Marque las sección del método que desee editar.

Este cuadro de diálogo resume las secciones que se van a ver y ofrece una oportunidad para omitir ciertas secciones al desmarcarlas.

En función de los apartados seleccionados, la función mostrará varias pantallas de forma secuencial:

- **Method Information** contiene una descripción textual sobre el método.
- **Instrument/Acquisition** contiene:
 - parámetros del inyector,
 - parámetros de la bomba,
 - parámetros del horno,
 - parámetros del detector y
 - curvas del instrumento.
- **Data Analysis** contiene:
 - detalles de la señal,
 - parámetros de integración y
 - parámetros de creación de informes.
- **Run Time Checklist** contiene las partes del método que se van a ejecutar.

NOTA

Durante **Edit Entire Method**, si hace clic en **OK** se cerrará la pantalla de introducción actual y se pasará a la siguiente pantalla. Es un proceso de una única dirección.

Si ha pulsado **OK** sin darse cuenta antes de haber realizado todas las entradas, utilice **Cancel** y reinicie **Edit Entire Method**. O bien, continúe y vuelva a la pantalla incompleta del final. Si hace clic en el botón **Cancel**, aparecerá un botón para **Skip** las pantallas restantes.

Información del método

También se puede acceder a la pantalla **Method Information** a través del menú **Method > Method Information** o haciendo clic con el botón derecho del ratón en la interfaz gráfica del usuario.

En este cuadro se puede introducir información sobre el método. Esta información se mostrará sobre el diagrama del sistema en la pantalla **Method and Run Control** siempre que se cargue el método y esté guardado en la memoria.

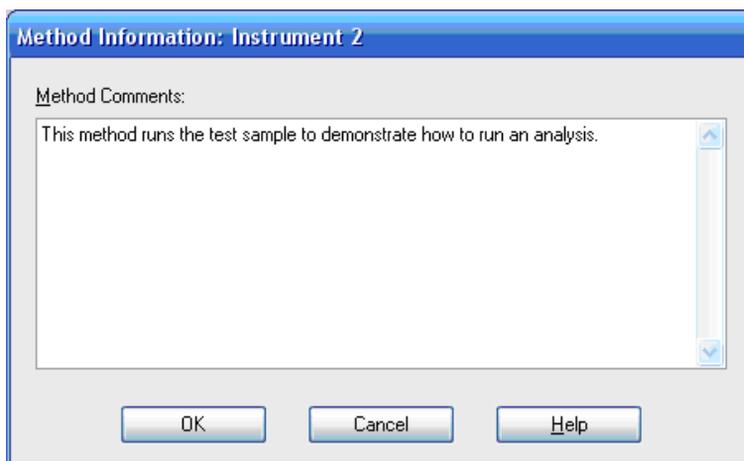


Figura 24 Información del método

Instrumento/Adquisición

Método de instrumento de configuración

Se puede acceder directamente a la pantalla **Setup Method** a través del menú **Instrument > Setup Instrument Method...** o haciendo clic con el botón derecho del ratón sobre cualquier icono de la interfaz gráfica del usuario y, a continuación, seleccionando **Method...** en el menú contextual. Esta etapa siguiente en **Edit Entire Method** es la pantalla **Setup Method** con seis pestañas divisorias para los diferentes módulos o funciones.

Las pestañas son:

- Inyector automático de alto rendimiento (**HiP-ALS**)
- **HiP-ALS Injector Program**
- Bomba binaria (**BinPump**)
- Compartimento termostatzado de columna (**TCC**)
- Detector de diodos (**DAD**)
- **Instrument Curves**

Para cambiar de pestaña, haga clic sobre el nombre de la pestaña en la parte superior de la pantalla. Cuando se hayan introducido los cambios de parámetros, se pueden enviar inmediatamente al instrumento haciendo clic en **Apply**; cuando todas las pestañas se hayan rellenado, si se hace clic en **OK** se enviarán todos los parámetros a los módulos, se cerrará la pantalla y se continuará con la siguiente etapa.

Las pestañas de introducción de parámetros son parecidas en todos los programas de control (ChemStation, EZChrom, MassHunter, etc.) debido al concepto de Agilent de controladores RC.Net comunes para los módulos de los instrumentos.

Para ejecutar la separación del ejemplo, como con la mayoría de los métodos, no es necesario cambiar todos los parámetros disponibles, pero se describen en las siguientes secciones para ofrecer una información completa.

Pestaña Inyector automático

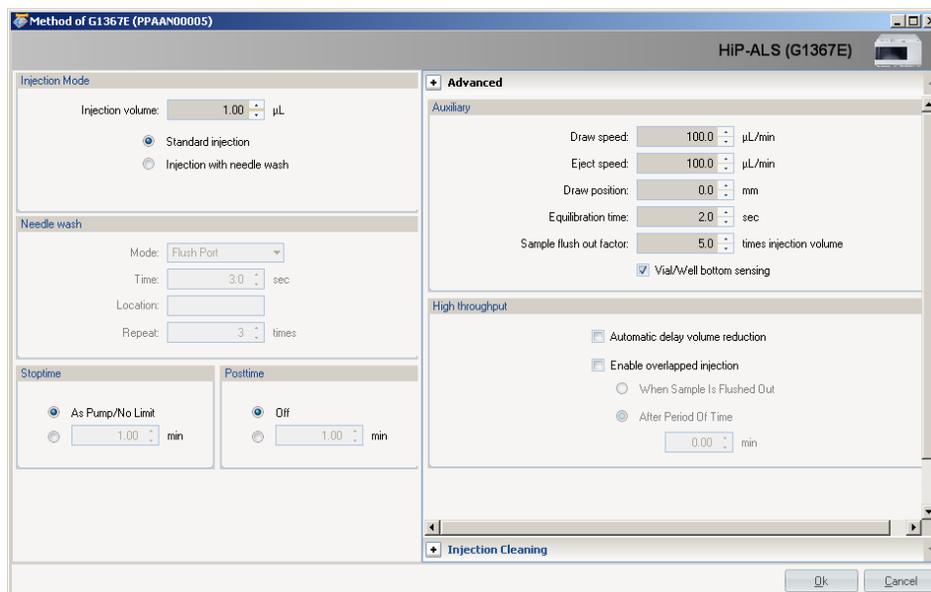


Figura 25 Pantalla Método de configuración: pestaña Inyector automático de alto rendimiento

- **Injection Mode**
 - **Injection volume** ajusta el volumen que se va a inyectar (por ejemplo, 1 µL).
 - **Standard injection** indica que no se ha realizado ningún lavado de aguja externo.
 - **Injection with needle wash** se utiliza para reducir el posible arrastre de contaminantes. Esta es la opción recomendada y se configura en la entrada siguiente.
- **Needle Wash** (si se ha seleccionado anteriormente).
 - **Mode** determina la forma en que se enjuagará la parte exterior de la aguja: ya sea de forma activa en el **Flush Port** o introduciéndola en un **Wash Vial** específico.
 - **Time** en segundos durante el que la bomba peristáltica conectada al puerto de lavado bombeará el disolvente de lavado. A continuación, bombea durante 15 s más para limpiar el puerto de lavado.

- **Location** determina qué vial o placa de pocillos se utilizará, si se ha seleccionado **Wash Vial**.

NOTA

Los viales no deben disponer de un tabique, es decir, deben estar abiertos para evitar transferir el material arrastrado al tabique.

- **Repeat** determina el número de veces que la aguja se introduce en el vial (predeterminado 3, máximo 5), si se ha seleccionado la opción Vial de lavado.
- **Stop Time / Post Time** se establecen como **No Limit / Off** (estos valores se ajustan en la pestaña de la bomba).
- **Advanced - Auxiliary**
 - **Draw speed** es la velocidad a la que la muestra se introduce en la aguja. El valor predeterminado es 100 µl/min. Se debe ralentizar para muestras viscosas o para obtener una mayor precisión con volúmenes de muestra pequeños (<2 µL).
 - **Eject speed** es la velocidad de suministro desde la aguja.
 - **Draw position** es la compensación vertical de la posición de inyección nominal de 10 mm sobre la parte inferior del vial. Esto es poco más de la mitad de un vial de 2 ml, así que se debe proporcionar una compensación negativa para tomar la muestra de cerca de la parte inferior del vial, por ejemplo, un valor de -7 mm colocaría la punta de la aguja 3 mm por encima de la parte inferior del vial.
 - **Equilibration time** es un tiempo de retardo entre la extracción de la muestra y el movimiento de la aguja.
 - **Sample flush out factor** determina el tiempo que el inyector automático esperaría tras la inyección antes de permitir que la válvula volviera a la posición de bypass. Esto garantiza que la aguja, el asiento y la válvula de inyección se han alejado de la zona de la muestra. El valor predeterminado es 5.
 - **Vial/Well bottom sensing** es una opción alternativa al uso de la compensación de la posición de extracción. La aguja desciende lentamente hasta que toca la parte inferior del vial o pocillo y, a continuación, se eleva 1 mm. Esta es una forma versátil de garantizar que la aguja esté cerca de la parte inferior del vial, pero tarda un poco más en realizar la inyección y no se debe utilizar si hay partículas en el fondo del vial, ya que pueden bloquear la aguja.

- **Advanced - High Throughput**
 - **Automatic delay volume reduction (ADVR)** cambia la válvula de inyección de la posición de mainpass a la de bypass tras haber realizado la inyección y después de que un volumen definido por el factor de evacuación de la muestra haya pasado por el inyector. Esto reduce el volumen de retardo del sistema aproximadamente 70 μ l y permite que los cambios de gradiente lleguen a la columna antes.
 - **Enable overlapped injection** también cambia la válvula de inyección de la posición de mainpass a la de bypass después de que la inyección se haya realizado y tras evacuar la muestra del inyector o en un momento posterior determinado en el análisis. El inyector aspirará a continuación la muestra siguiente preparada para la próxima inyección y, por tanto, reduce el tiempo de ciclo general y aumenta la productividad de la muestra.
- **Injection Valve Cleaning**
 - **Injector Cleaning** permite limpiar el sistema de inyección con el disolvente.
 - **Injection Valve Cleaning** permite cambiar la válvula a los valores programados durante el análisis para minimizar el arrastre de contaminantes cuando se inyectan componentes problemáticos.

Pestaña Inyector automático de alto rendimiento (gama de inyector HiP-ALS)

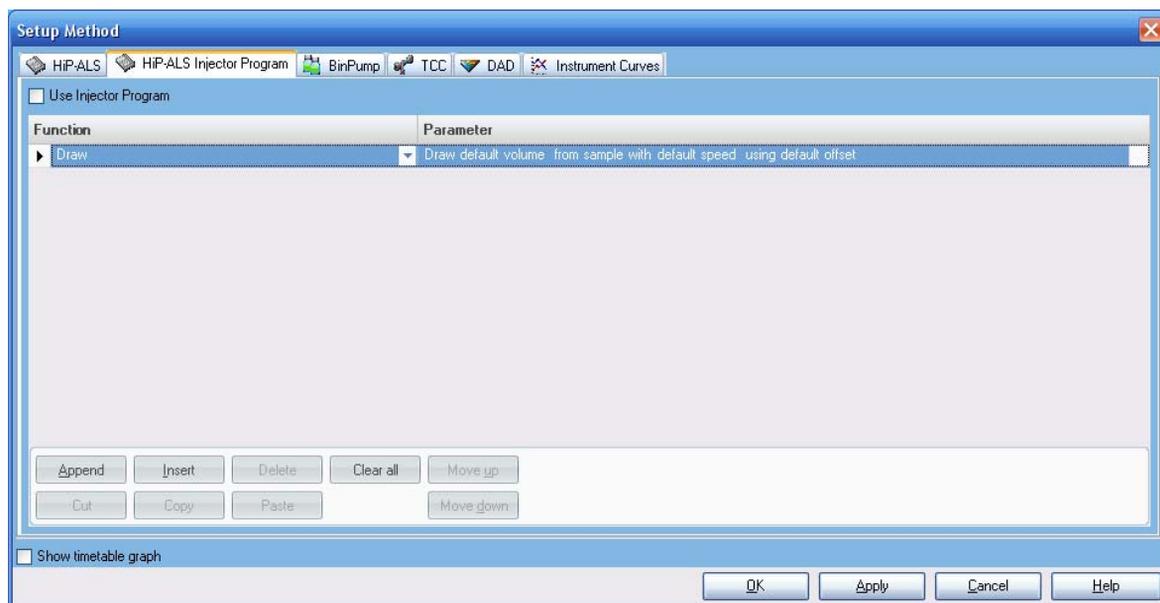


Figura 26 Pantalla Método de configuración: pestaña Programa del Inyector automático HiP

Esto permite crear procedimiento de inyección especializados que implican la manipulación de partes alícuotas de varios viales como, por ejemplo, la derivatización previa a la columna. Los reactivos químicos se mezclan automáticamente con la muestra para mejorar la detectabilidad o la sensibilidad. Un ejemplo utilizado habitualmente es la derivatización de aminoácidos con reactivos OPA y FMOC. Para obtener más información, consulte el *manual del inyector automático de alto rendimiento Agilent 1260 Infinity*.

Pestaña Bomba binaria

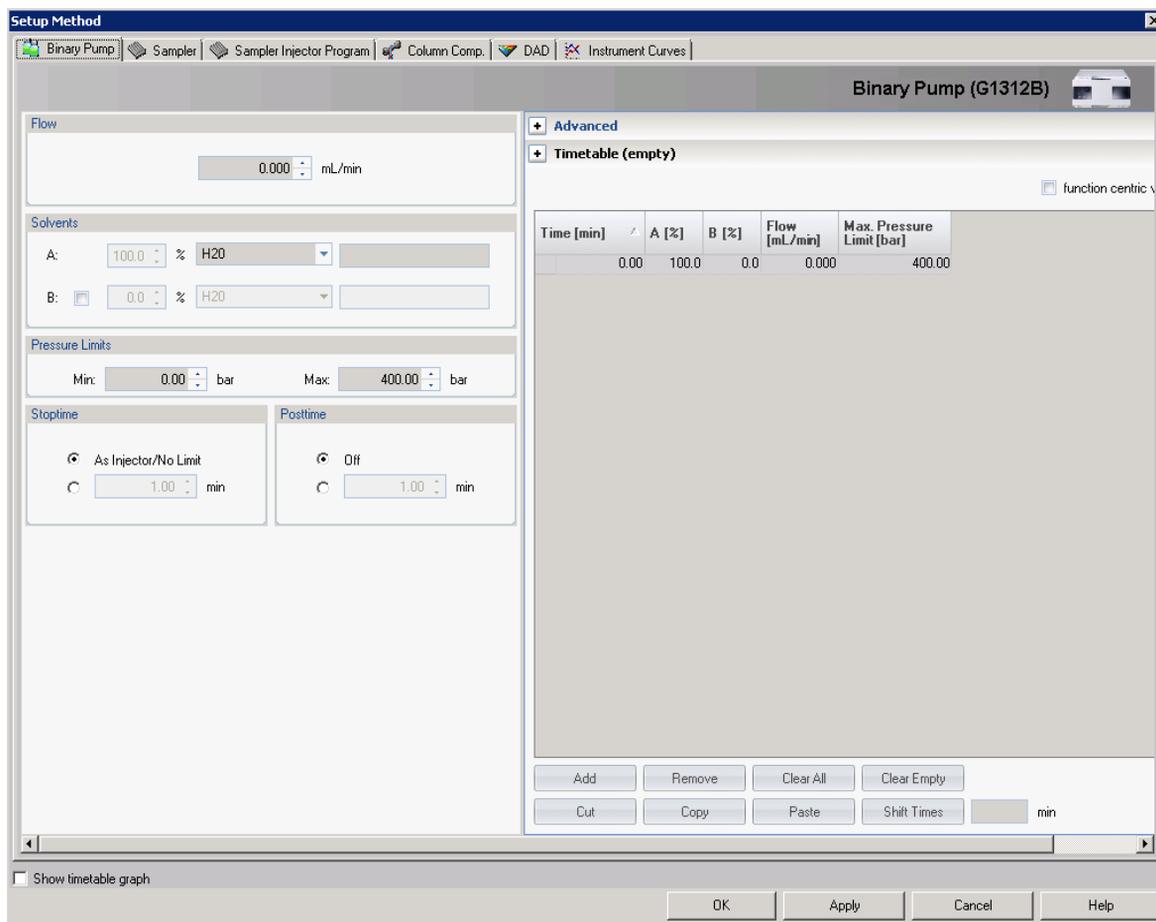


Figura 27 Pantalla Método de configuración: pestaña Bomba binaria

- **Flow** ajusta la velocidad del flujo hasta 5 mL/min. Para la separación del ejemplo se utiliza un valor de 4 mL/min. Si la retropresión alcanza brevemente la presión máxima, el flujo disminuirá durante unos segundos para reducir la presión. Si esta limitación de la presión persiste, se generará un error y el flujo se detendrá.
- **Solvents** define las fases móviles disponibles y las proporciones porcentuales bombeadas en los dos canales (A y B). En cada canal, un cuadro desplegable permite seleccionar un disolvente de una lista para que el control de

la bomba utilice los ajustes de compresibilidad óptimos. Esto optimizará las características del flujo tal y como se describe en “[Configuración óptima del instrumento para columnas de 2,1 mm de d.i.](#)” en la página 43. Un segundo cuadro de texto permite introducir una descripción de la fase móvil. Si la válvula de selección de disolvente está instalada en la bomba, cada canal tendrá dos opciones de disolventes y la opción correcta para el método se seleccionará con la casilla de la parte izquierda de la descripción del disolvente. La bomba formará mezclas binarias de los canales A y B seleccionados, por ejemplo A2 y B1. No es posible mezclar A1 con A2 o B1 con B2. El valor introducido para las proporciones de A y B define la composición de un método isocrático o las condiciones de inicio de un método de gradiente y las condiciones de equilibrio entre los análisis de gradiente. Únicamente se debe introducir el valor de B (el valor de A se actualizará acto seguido, indicando la diferencia entre el 100 % y el valor de B al mover el cursor). Para la separación del ejemplo, seleccione el agua como disolvente A y el acetonitrilo como disolvente B, indicando un porcentaje del 60 % para este último. El valor de A será del 40 %.

- **Timetable** indica los cambios que pueden ocurrir durante el análisis en la composición del porcentaje de A y B en la fase móvil o, si es necesario, en la velocidad del flujo y la presión máxima permitida. La tabla de tiempos realiza cambios lineales en los parámetros entre los valores proporcionados. Los ajustes realizados en otros puntos de esta pantalla actúan como las condiciones iniciales y sólo cambiarán si se realiza una entrada en la tabla de tiempos. Por ejemplo, si el flujo es constante durante el análisis, no hay por qué realizar una entrada sobre el flujo en la tabla de tiempos. Para realizar una entrada en la tabla de tiempos, haga clic en el botón **Add** para añadir una línea en la tabla de tiempos; introduzca el tiempo del valor, seleccione el tipo de entrada de la lista desplegable (composición, flujo o presión) y haga clic en el cuadro **Parameter** para visualizar el cuadro de entrada del valor. Si las entradas de la tabla de tiempos se realizan en una secuencia lógica, estas se reordenarán automáticamente según el tiempo. Las líneas de la tabla de tiempos se pueden editar directamente y los botones **Cut**, **Paste** y **Remove** se pueden utilizar para agregar o eliminar líneas. Se pueden agregar varias líneas para ofrecer segmentos de gradiente lineales y crear perfiles de gradiente. Para configurar un gradiente simple, vacíe en primer lugar la tabla de tiempos utilizando el botón **Clear all** si aún no está vacía; a continuación, añada una línea e introduzca el tiempo y la composición del disolvente requeridos. Si se necesita un gradiente de paso, se puede crear realizando dos entradas con los ajustes "antes del paso" y "después del paso" separados por 0,01 min. Esto se utiliza habitualmente para eluir rápidamente los picos fuertemente retenidos de una columna hacia al final de

un análisis mediante el aumento del disolvente más fuerte y/o la velocidad de flujo en un gradiente de paso; por ejemplo, el % B puede pasar del 75 % al 95 %. No es necesario introducir el ajuste para el tiempo 0,00 min en la tabla de tiempos, estos valores se obtienen de otros valores en esta pantalla. Sin embargo, algunos usuarios quieren ver una lista "completa" en la tabla de tiempos y crean una entrada para 0,00 min. Esto no supone ningún problema. No obstante, si las condiciones iniciales se cambian, se deben introducir los nuevos ajustes en la tabla de tiempos y los valores en la sección **Solvents** de la pantalla.

- **Show timetable graph** muestra los cambios en la tabla de tiempos de forma gráfica cuando se selecciona la casilla.
- **Stop Time** define el tiempo total de la separación o el análisis y algunos usuarios se refieren a él como "tiempo de análisis". Este es el tiempo (que se cuenta en minutos desde el momento de la inyección) en el que finaliza el análisis, lo que significa que la adquisición de datos se detendrá, el flujo, la composición y el resto de ajustes del sistema volverán a los valores iniciales para el método y el sistema estará disponible para realizar la siguiente inyección. Siempre debería tener la misma duración que la última entrada en la tabla de tiempos o, de lo contrario, el análisis se detendrá y volverá a las condiciones iniciales antes de que finalicen los eventos de la tabla de tiempos. **Stop Time** se puede establecer como **No Limit** en cuyo caso el usuario debe detener manualmente el análisis. Aunque todos los módulos del sistema tienen parámetros de **Stop Time**, el **Stop Time** de la bomba se considera el modelo y el resto de módulos suelen configurarse para que sigan este valor.
- **Post Time** define un periodo de cuenta atrás tras el final de un análisis durante el cual se evita la siguiente inyección. Proporciona tiempo al sistema para que se vuelva a equilibrar tras un análisis de gradiente. Para un método isocrático se puede establecer en **Off**. Para un método de gradiente, el valor se puede determinar de forma experimental observando el comportamiento de la línea base, pero normalmente requerirá tiempo para el volumen de retardo del sistema y para lavar este haciendo pasar a través de él un volumen de entre tres y cinco veces el volumen de la columna.
- **Pressure Limits** controlan el comportamiento de la bomba en lo que respecta a la presión. La presión máxima de la bomba binaria 1260 Infinity es de 600 bar, pero algunas columnas sólo son capaces de soportar una presión inferior, por lo que al configurar este valor se protege la columna. La bomba generará un error si esta presión se supera. Todo análisis en curso se detendrá y la bomba pasará al modo de espera sin que exista flujo alguno. Se proporciona información sobre la presión máxima para una columna

determinada con la columna. Las columnas ZORBAX RRHT de Agilent resultan adecuadas para aplicaciones a 600 bar. El límite de presión inferior está "Desconectado" cuando el valor es cero, pero con cualquier otro valor la bomba generará un error si la presión cae por debajo de este valor durante el funcionamiento. Esto se utiliza como prevención alternativa cuando la columna no se encuentra dentro de un módulo con un sensor de fugas o en caso de que el sistema se bombee en seco. Es habitual seleccionar un valor de entre 10 y 20 bar como límite inferior de presión.

Pestaña Compartimento termostatzado de columna (TCC)

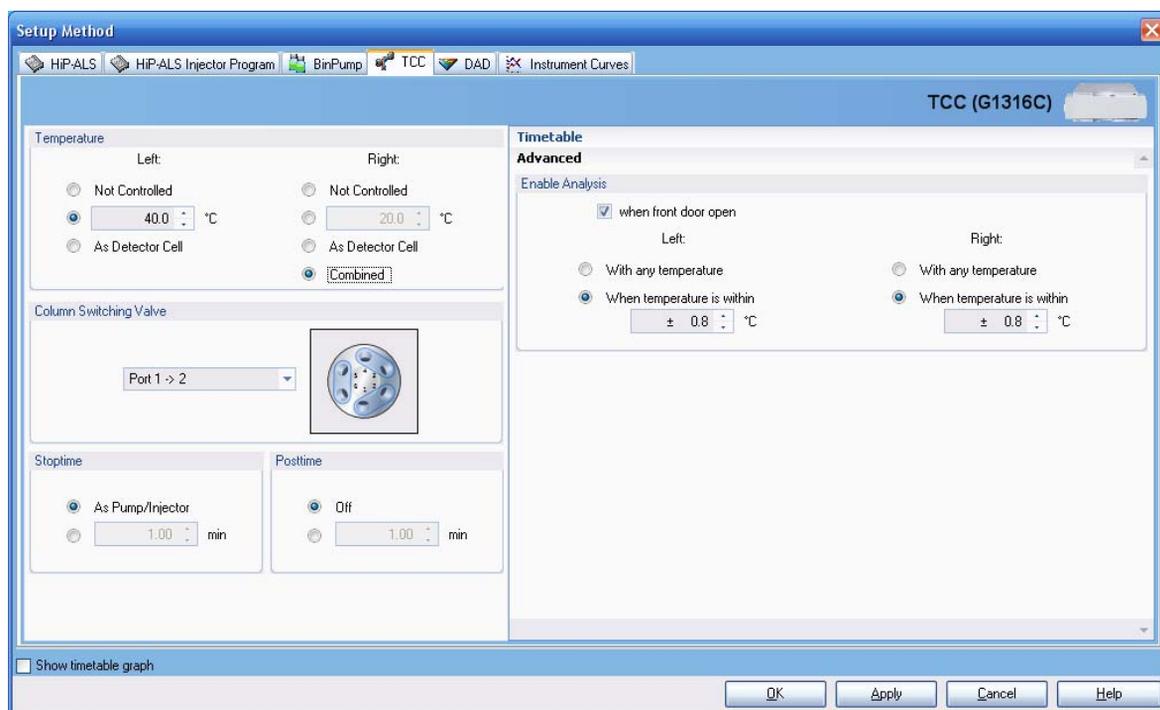


Figura 28 Pantalla Método de configuración: pestaña Compartimento termostatzado de columna

- **Temperature** define la temperatura de los soportes de columna izquierdos y derechos que se pueden controlar de forma independiente o unir marcando la casilla **Combined**. Cuando estén combinados, los ajustes del lado izquierdo controlarán ambas secciones y esto es necesario cuando la columna tiene más de 15 cm y necesita el apoyo de ambas secciones. Los dos lados se pue-

den manejar de forma separada cuando sea necesario tener dos columnas funcionando a temperaturas diferentes (esto se puede implementar cuando esté instalada también una válvula de intercambio de columna para cambiar entre las dos). Otro uso de las zonas de temperatura individuales está destinado al momento en el que la columna se maneja a gran temperatura (p. ej., por encima de los 60 °C) en un lado y el intercambiador de calor del otro lado se utiliza para enfriar el eluyente antes de que se introduzca en el detector, lo que reduce así el ruido debido a los efectos térmicos de la celda de flujo. Si selecciona la opción **As Detector Cell**, se leerá automáticamente la temperatura de la celda en el detector.

La temperatura de cada zona se puede ajustar de -5 °C a 100 °C y el usuario debería comprobar que la columna es adecuada para funcionar a esa temperatura. (Las fases ZORBAX RRHT StableBond de Agilent se pueden utilizar en el extremo más elevado del rango). La temperatura se controla de $\pm 0,15$ °C a 10 °C por debajo de la temperatura ambiente, aunque debe tener en cuenta que existen muy pocas aplicaciones que funcionen por debajo de los 12-15 °C. Evite el uso del TCC a una temperatura tan baja en la que se produzca condensación de agua debido al aire húmedo, ya que esto activaría el sensor de fugas.

- **Column Switching Valve** constituye una opción activa únicamente cuando existe una válvula entre los soportes de columna. Existen tres tipos de válvulas disponibles:
 - De 2 posiciones y 6 puertos: se utilizan para el cambio entre dos columnas.
 - De 2 posiciones y 10 puertos: se utilizan para alternar la regeneración de columna.
 - De 8 posiciones y 9 puertos: se utilizan para la selección de varias columnas en MDS.

Pestaña Detector de diodos

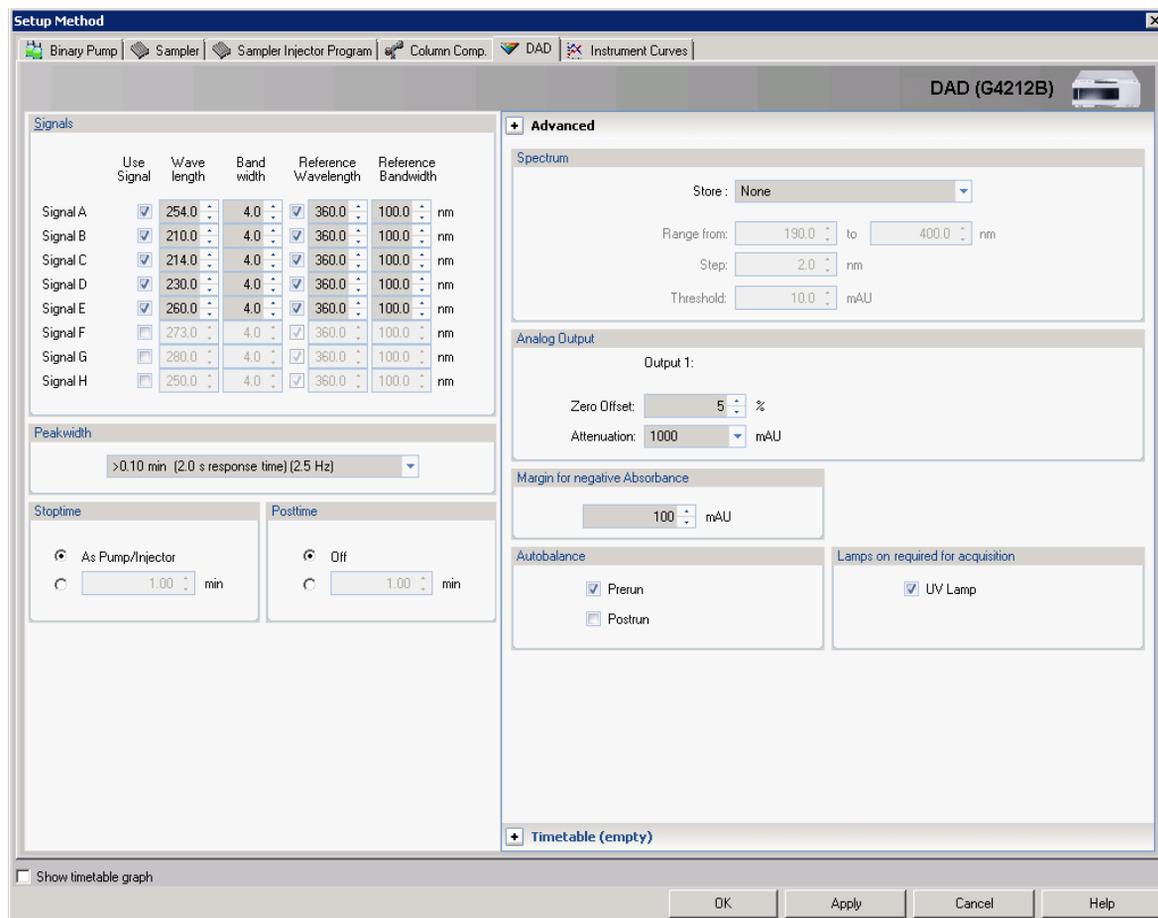


Figura 29 Pantalla Método de configuración: pestaña Detector de diodos

- **Signals:** se pueden grabar hasta 8 señales (cromatogramas) diferentes. Para marcar una señal para su recogida, marque la casilla **Use Signal** para la señal relevante, defina la longitud de onda y la anchura de banda y, si se necesita una señal de referencia, marque y defina esa casilla.
 - **Wavelength** define la longitud de onda central (nm) de la señal.
 - **Bandwidth** define el ancho (nm) de la señal.

- **Reference Wavelength** define la longitud de onda central (nm) de la banda de referencia que se sustrae de la señal analítica.
- **Reference Bandwidth** define el ancho (nm) de la banda de referencia.
- **Peakwidth** define la velocidad de recogida de datos y el filtrado de la señal.
- Para los parámetros **Stoptime** y **Posttime** se seleccionan las opciones **As Pump/Injector** y **Off**, respectivamente; dichos valores se ajustan habitualmente a través de la pestaña **Pump**. Sin embargo, si fuese necesario, puede configurarse un tiempo de parada del detector distinto del tiempo de parada de la bomba; esto permite detener el análisis de datos antes de que se alcance el final del análisis según se haya definido en la bomba. Este puede ser el caso cuando se ha determinado una rampa de equilibrado de gradiente al final del gradiente. Por ejemplo, el valor del % B puede aumentar hasta el 95 % a los 10 min, momento en el que se prevé que todos los picos se hayan eluido de la columna. El análisis básicamente habrá finalizado, pero puede añadirse un segmento de gradiente adicional que haga que el % B vuelva a su valor inicial a lo largo de dos minutos, con el fin de iniciar el reequilibrado de la columna suavemente. No se esperan datos útiles durante esta rampa descendente, por lo que el tiempo de parada del detector se ajusta en 10 min (tras lo cual la recogida de datos se detiene), mientras que el tiempo de parada de la bomba será de 12 min para permitir que finalice la rampa descendente. Esto se trata de una elección del usuario y algunos aceptan que los minutos finales del cromatograma no contengan datos útiles, pero permiten que se registren igualmente para evitar el inconveniente de tener un tiempo de parada diferente para el detector. El tiempo de parada del detector no anula la bomba y provoca que el análisis finalice, tal como haría un tiempo de parada más corto en cualquier otro módulo; de ahí la comodidad de seleccionar para el tiempo de parada la opción **As Pump/Injector**.
- **Timetable** funciona igual que en el resto de módulos: puede añadir una línea, seleccionar la función que desee modificar e introducir los nuevos valores para dicha función. Los cambios del detector tendrán lugar inmediatamente en el tiempo especificado. Las siguientes funciones se pueden cambiar durante el análisis:
 - **Balance**
 - **Change Signal**
 - **Change Threshold**
 - **Change Peak –detector Peakwidth**
 - **Change Spectra Acquisition Mode**

- **Change Contacts**

- **Advanced - Spectrum**

Se pueden guardar los espectros durante el análisis de forma continua o controlada por picos (esto se aplica al software ChemStation. Algunos paquetes de software, p. ej. EZChrom, sólo admiten la recogida continua de todos los espectros y no aparecen las opciones de control de picos). La recogida de espectros y de señales son operaciones independientes realizadas por el detector de firmware y no dependen del software informático de extracción de datos de la matriz de datos 3D. La velocidad a la que se toman los espectros viene determinada por el ajuste **Peakwidth**; en el tiempo especificado en **Peakwidth** se toman ocho espectros. El firmware realiza la detección de picos en la señal A para determinar cuando se deberían guardar los espectros controlados por picos. Para varias señales, puede ser necesario definir la señal A como un detector de banda ancha para garantizar que los espectros de picos estén disponibles para todas las señales de longitud de onda diferentes.

- **Store** controla el modo de recogida de espectros con las siguientes opciones:

None: no se almacenan espectros.

Apex+Baselines: se toman 3 espectros al inicio, en el máximo y al final del pico.

Apex+Slopes+Baselines: se toman 5 espectros al inicio, en la pendiente ascendente, en el máximo, en la pendiente descendente y al final del pico.

All in Peak: se almacenan todos los espectros disponibles en un pico.

All: se almacenan todos los espectros durante el análisis.

Every 2nd Spectrum: se almacenan únicamente espectros alternos adquiridos durante el análisis.

- **Range:** los espectros se pueden guardar en todo el rango del detector, de 190 nm a 640 nm, o en un rango reducido que el usuario considere adecuado. (Esto también reduce el número de datos que se van a almacenar).
- **Step:** controla el intervalo (nm) de datos almacenados en un espectro y, por tanto, afecta a la resolución espectral. El valor predeterminado de 2 nm es una buena elección para la mayoría de aplicaciones.
- **Threshold:** determina que los espectros no se almacenen para alturas de pico por debajo de este valor (mAU).

- **Advanced - Analog Output**

El DAD 1260 Infinity posee un conector de señal analógica de salida para utilizarlo con sistemas de datos que no acepten una entrada digital. Se debe configurar lo siguiente:

- **Zero Offset** coloca el nivel cero en un porcentaje definido de la señal de salida y, por tanto, permite un alcance de deriva negativa.
- **Attenuation** reduce la absorbencia definida a la salida total.

- **Advanced - Margin for Negative Absorbance**

El ajuste predeterminado es 100 mAU, lo que significa que el detector posee un rango dinámico suficiente, teniendo en cuenta el punto en el que se estableció el nivel cero, para realizar la medición según este valor. Para medir picos negativos mayores o seguir una línea base con una gran deriva negativa, el valor se debe ajustar a la baja para evitar obtener una señal plana al final del rango. Sin embargo, no se debe cambiar sin una buena razón, ya que si se hace más negativo aumentará el ruido de la línea base y reducirá el rango disponible para medir picos positivos.

- **Advanced - Autobalance** define el nivel de absorbencia a cero en todas las longitudes de onda (es decir, equilibra todos los puntos en el espectro a cero) y, por tanto, también pone a cero la señal de la línea base. **Prerun** está seleccionado para realizar el equilibrio justo antes del inicio del análisis, que es la situación habitual. A veces se selecciona **Postrun** de forma alternativa para realizar el equilibrado al final del análisis, una vez concluido el tiempo de post-análisis. Por ejemplo, si la señal siempre muestra una deriva negativa y el usuario prefiere que el análisis finalice en absorbencia cero, se establecerá el nivel cero correcto para el siguiente análisis. No cambiará a posteriori el análisis al final del cual realizó el equilibrio.

- **Advanced - Lamps on required for acquisition:** el DAD 1260 Infinity posee una lámpara UV que debe estar encendida para realizar el análisis, por lo que esta casilla debe estar marcada.

Pestaña Instrument Curves

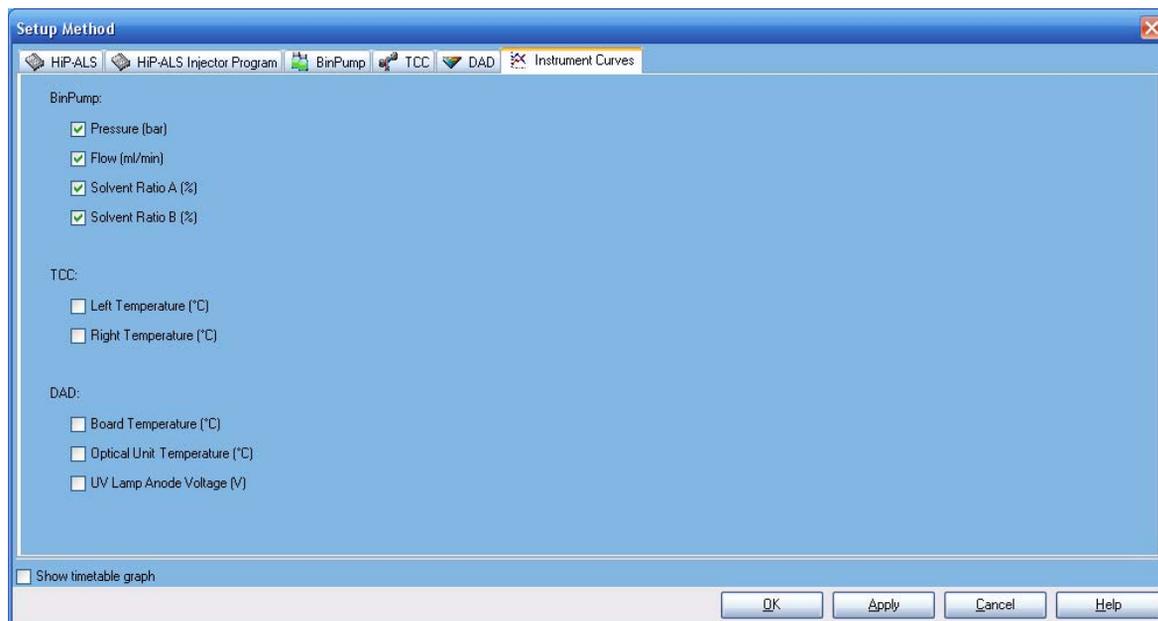


Figura 30 Pantalla Método de configuración: pestaña Curvas del instrumento

La pestaña Curvas del instrumento permite almacenar con los datos corrientes de datos monitorizadas distintas a las señales del detector mediante la casilla correspondiente. Principalmente se utilizan con propósitos de diagnóstico. Son:

- Bomba:
 - Presión
 - Flujo
 - Composición A/B: puede ser útil para superponer el perfil del gradiente en un cromatograma.
- Compartimento termostatzado de columna:
 - Temperatura izquierda/derecha
- Detector:
 - Temperatura de la placa
 - Temperatura de la unidad óptica
 - Voltaje anódico de la lámpara UV

Análisis de datos

Detalles de la señal

También se puede acceder directamente a la pantalla **Signal Details** en la vista **Method and Run Control**: haga clic con el botón derecho del ratón sobre el icono **Calibration** de la interfaz gráfica de usuario y, a continuación, seleccione **Signal Details** en el menú contextual. En la vista Análisis de datos, se puede acceder mediante el menú **Calibration > Signal Details**.

La pantalla **Signal Details** es el siguiente paso en **Edit Entire Method** y le dice al análisis de datos qué señal adquirida debe procesar. El cuadro desplegable enumera las señales disponibles, incluidas las señales analíticas definidas en los ajustes del detector y los parámetros registrados como la temperatura, el flujo, la composición, la presión y las trazas de diagnóstico. Seleccione una señal y haga clic en **Add to Method** para transferirla a la tabla **Signal Details** que se muestra en la parte inferior de la pantalla. Puede seleccionar una o todas las señales del detector adquiridas para el procesamiento. Si no se selecciona ninguna señal, la tabla está vacía; en esta situación ChemStation procesará de forma predeterminada todas las señales del detector adquiridas.

A menudo, el usuario edita un método existente para crear un nuevo método y se encuentra con un error de **Parameter Mismatch** cuando intenta ejecutar el método. Lo que sucede es que, en el método antiguo, los **Signal Details** contenían una señal específica, por ejemplo 250 nm con 8 nm de anchura de banda, y esto cambia en el nuevo método a 254 nm/12 nm, por ejemplo. La tabla **Signal Details** todavía contiene los detalles originales y se le solicita que procese una señal que no se ha adquirido. El problema se corrige destacando la señal antigua en la tabla y utilizando el botón **Delete Row**.

Si un sistema utiliza varios detectores como el detector de diodos y un espectrómetro de masas, las líneas **Signal Description** permiten introducir tiempos de retardo para el detector en la dirección del flujo de forma que el software pueda alinear los picos de los diferentes detectores.

6 Apéndice

Configuración de un método mediante la opción Editar método completo



Figura 31 Detalles de la señal

Edición de los parámetros de integración

También se puede acceder a la pantalla **Edit Integration Events** en la vista **Method and Run Control** haciendo clic con el botón derecho del ratón en el icono Parámetros de integración de la interfaz gráfica del usuario y, a continuación, haciendo clic en **Edit Integration Events** en el menú contextual. En la vista **Data Analysis**, se puede acceder a ella mediante el menú **Integration > Integration Events...** o el icono **Edit Integration Events**.

Method Manual Events

Initial Events For All Signals:

Integration Events	Value
Tangent Skim Mode	Standard
Tail Peak Skim Height Ratio	0.00
Front Peak Skim Height Ratio	0.00
Skim Valley Ratio	20.00
Baseline Correction	Classical
Peak to Valley Ratio	500.00

Specific Events For Signal:

DAD Default

Time	Integration Events	Value
Initial	Slope Sensitivity	5
Initial	Peak Width	0.05
Initial	Area Reject	5
Initial	Height Reject	1
Initial	Shoulders	OFF

Figura 32 Pantalla Editar parámetros de integración

Integración, calibración y creación de informes forman parte del análisis de datos del método. Los parámetros de integración y la tabla de calibración son más fáciles de configurar una vez se hayan adquirido los datos y se estén revisando en la vista Análisis de datos. Los parámetros de integración se pueden optimizar en ese momento y los ajustes predeterminados se suelen utilizar para los análisis de adquisición iniciales.

La pantalla **Edit Integration Events** tiene dos tablas:

- **Initial Events For All Signals** contiene parámetros (parámetros de integración) que se aplican a todas las señales adquiridas con el método.
- **Specific Events For Signal** contiene parámetros que son específicos para un tipo de detector o específicos para diferentes señales del mismo detector.

Los parámetros clave de esta tabla son:

- **Slope Sensitivity** representa la pendiente y la curvatura de la línea base necesaria para marcar el inicio y el final de un pico.
- **Peak Width**: se debe introducir la anchura a media altura del pico de interés más estrecho. Esto ayuda al integrador a distinguir entre ruido y picos muy pequeños.
- Los valores **Area Reject / Height Reject** que controlan el rechazo de los resultados de los picos cuya área o altura están por debajo de estos valores.
- **Integration OFF/ON** suprime la integración entre los límites establecidos. Casi siempre se utiliza para inhibir la integración en la región desde la inyección hasta la parte frontal del disolvente o el marcador del pico no retenido.

Se añaden líneas como **Integration OFF/ON** a la tabla mediante los iconos de la parte superior de la ventana.

Haga clic en **OK** para salir y se abrirá la siguiente pantalla en el proceso Editar método completo.

Especificación de informes

También se puede acceder directamente a la pantalla **Specify Report** en la vista **Method and Run Control** haciendo clic con el botón derecho del ratón en el icono Informe de la interfaz gráfica del usuario y, a continuación, seleccionando **Specify Report** en el menú contextual. En la vista **Data Analysis** se puede acceder mediante el menú **Report > Specify Report** o el icono Especificar informe.

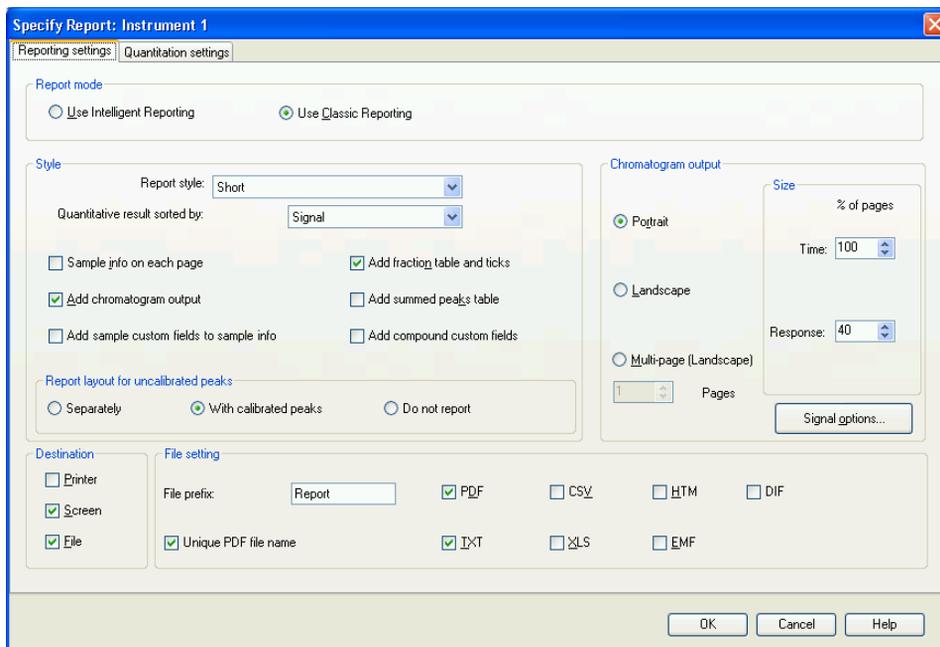


Figura 33 Pantalla Especificar informe

Para configurar informe con un porcentaje de área simple con el Creador de informes clásico, que imprime informes en una impresora o en un fichero PDF, introduzca los siguientes ajustes en estas secciones de la pantalla Especificar informe:

En la pestaña **Reporting settings**:

- **Report mode:** Usar creador de informes clásico
- **Style**
 - **Report Style:** Corto
 - **Quantitative results sorted by:** Señal
 - **Add Chromatogram Output:** Marcado

6 Apéndice

Configuración de un método mediante la opción Editar método completo

- **Chromatogram Output:** Retrato
- **Size:**
 - Eje **Time** el 100 % de la página
 - Eje **Response** el 40 % de la página
- **Destination**
 - **Printer:** Marcado
 - **Screen:** Sin marcar
 - **File:** Marcado
- **File Setting:**
 - **PDF:** Marcado
 - **Unique PDF file name:** Marcado

En la pestaña **Quantitation settings:**

- **Calculation mode**
 - **Calculate:** Porcentaje
 - **Based on:** Área

Haga clic en **OK** para salir y se abrirá la siguiente pantalla en el proceso Editar método completo.

Curvas del instrumento

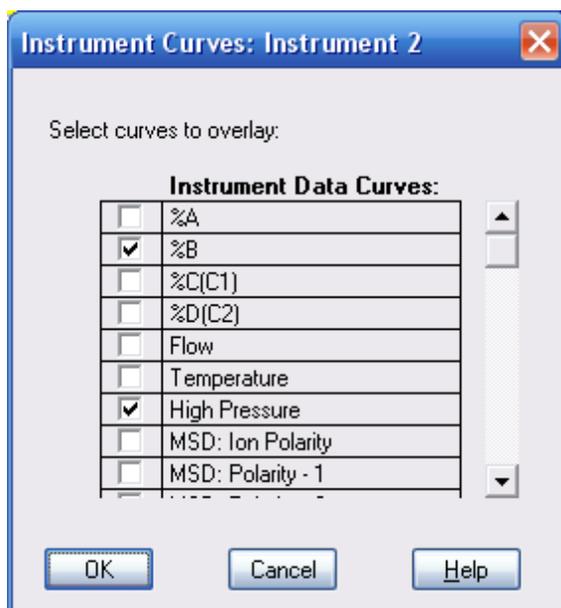


Figura 34 Pantalla Curvas del instrumento

Las casillas de verificación de **Instrument Curves** permiten que estos parámetros registrados se superpongan como un gráfico en el cromatograma.

Lista de comprobación del tiempo de análisis

También se puede acceder directamente a la **Run Time Checklist** mediante el menú **Method > Run Time Checklist...** o haciendo clic en el icono **Run Time Checklist** situado en la parte superior derecha de la pantalla.

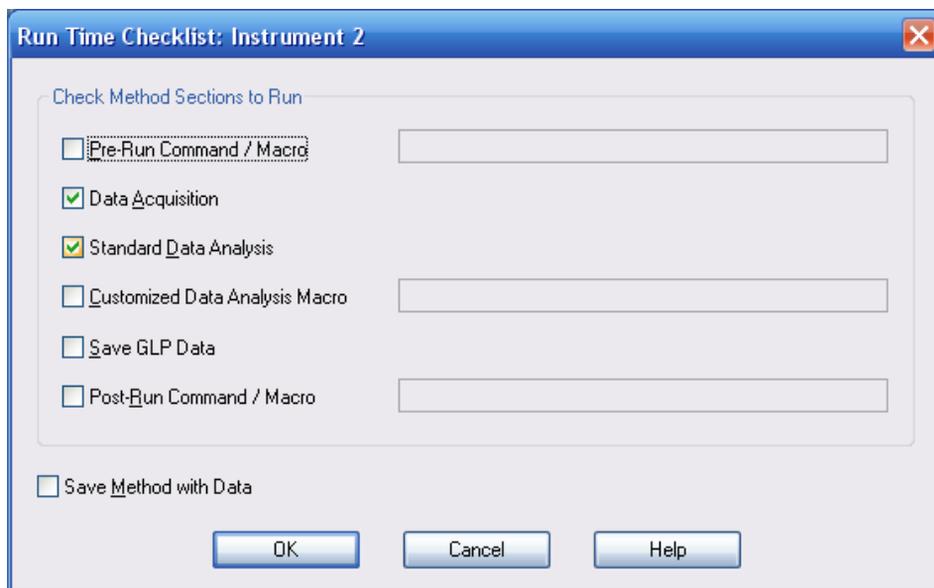


Figura 35 Pantalla Lista de comprobación del tiempo de análisis

La **Run Time Checklist** selecciona si el método debería ejecutar tanto la adquisición de datos como el análisis de datos, además de ofrecer una oportunidad para enlazar los comandos de macros o los programas en el flujo de trabajo en varios puntos. En la mayoría de los casos, se marcan las casillas de verificación **Data Acquisition** y **Standard Data Analysis**. Si no es necesario analizar los datos, por ejemplo, en una serie de análisis del desarrollo del método, se puede desmarcar la opción **Standard Data Analysis** para que no se creen informes y los datos se puedan evaluar visualmente más tarde en la vista **Data Analysis**.

Para enlazar un programa de macros a uno de los puntos de acceso, se marca la casilla correspondiente y se escribe el nombre de la macro en el cuadro de texto de la derecha. El software busca la macro en el directorio C:\Chem32\Core; incluya la ruta si está ubicado en otro lugar.

Los puntos de acceso en el flujo de trabajo del método son:

- **Pre-Run Command / Macro**
- **Customized Data Analysis Macro**
- **Post-Run Command / Macro**

Save Method with Data guarda una copia del método en el fichero de datos y le pone el nombre RUN.M. Esto no es necesario si se utiliza ChemStation con la configuración habitual, ya que el software siempre guarda el método en el fichero de datos (en todas las versiones desde B.02.01). Esta opción sólo será relevante si ChemStation se ha configurado de forma que la opción **Unique Sequence Folder Creation** esté desactivada y, por tanto, los métodos no se copien de forma rutinaria en el fichero de datos.

Puesto que esta es la pantalla final del proceso, si hace clic en **OK** saldrá de la **Run Time Checklist** y del proceso **Edit Entire Method**. El método se debería guardar en el directorio de métodos modelo (el predeterminado es C:\Chem32\1\Methods) mediante **File > Save As > Method** o **Method Menu > Save Method As**.

Glosario UI

1

1260 Infinity Autosampler
inyector automático 1260 Infinity

1260 Infinity Binary Pump
bomba binaria 1260 Infinity

1260 Infinity DAD
DAD 1260 Infinity

1290 Infinity TCC
TCC 1290 Infinity

A

Add
Agregar

Add Chromatogram Output
Agregar salida cromatográfica

Add to Method
Agregar al método

Adjust
Ajustar

Advanced
Avanzado

Advanced - Analog Output
Avanzado - Salida analógica

Advanced - Autobalance
Avanzado - Autoequilibrio

Advanced - Auxiliary
Avanzado - Auxiliar

Advanced - High Throughput
Avanzado - Alto rendimiento

Advanced - Lamps on required for acquisition
Avanzado - Lámparas encendidas requeridas para la adquisición

Advanced - Margin for Negative Absorbance
Avanzado - Margen para la absorbencia negativa

Advanced - Spectrum
Avanzado- Espectro

All
Todo

All in Peak
Todos en el pico

All Programs
Todos los programas

Apex+Baselines
Máximo+líneas base

Apex+Slopes+Baselines
Máximo+pendientes+líneas base

Apply
Aplicar

Apply to Method
Aplicar al método

Area Reject
Rechazo de área

Area Reject / Height Reject
Rechazo de área/Rechazo de altura

As Detector Cell
Como la celda del detector

As Pump/Injector
Como bomba/injector

Attenuation
Atenuación

Automatic delay volume reduction
Reducción automática del volumen de retardo

Available Signals
Señales disponibles

B

Balance
Equilibrio

Bandwidth
Anchura de banda

Based on
Basado en

Baseline Correction
Corrección de línea base

BinPump
Bomba bin.

C

Calculate
Cálculo

Calculation mode
Modo de cálculo

Calibration
Calibración

Cancel
Cancelar

Change Contacts
Cambiar contactos

Change Peak –detector Peakwidth
Cambiar pico (detector de anchura de pico)

Change Signal
Cambiar señal

Change Spectra Acquisition Mode
Cambiar modo de adquisición de espectros

Change Threshold
Cambiar umbral

Change...
Cambiar...

Check Method Sections to Edit
Comprobar las secciones de método para editar

Chromatogram Output
Salida cromatográfica

Clear all
Borrar todo

Column Switching Valve
Válvula de intercambio de columnas

Combined
Combinado

Comment
Comentario

Customized Data Analysis Macro
Macro del análisis de datos personalizado

Cut
Cortar

D

Data Acquisition
Adquisición de datos

Data Analysis
Análisis de datos

Delete Row
Borrar fila

Destination
Destino

Draw position
Posición de extracción

Draw speed
Velocidad de extracción

E

Edit Entire Method
Editar método completo

Edit Integration Events
Editar parámetros de integración

Edit Signal Plot
Editar gráfico de señal

Eject speed
Velocidad de eyección

Enable overlapped injection
Habilitar inyección solapada

Enhanced Solvent Compressibility
Compresibilidad del disolvente mejorada

Equilibration time
Tiempo de equilibrio

Every 2nd Spectrum
Cada 2.º espectro

F

File
Fichero

File Setting
Opciones de fichero

Flow
Flujo

Flush Port
Puerto de lavado

H

Height Reject
Rechazo de altura

HiP-ALS Injector Program
Programa del Inyector HiP-ALS

I

Initial Events For All Signals
Parámetros iniciales para todas las señales

Injection Mode
Modo de inyección

Injection Valve Cleaning
Limpieza de la válvula de inyección

Injection volume
Volumen de inyección

Injection with needle wash
Inyección con lavado de aguja

Injector Cleaning
Limpieza del inyector

Instrument
Instrumento

Instrument Curves
Curvas del instrumento

Instrument/Acquisition
Instrumento/Adquisición

Instruments
Instrumentos

Integrate
Integrar

Integration
Integración

Integration Events
Parámetros de integración

Integration Events...
Parámetros de integración...

Integration OFF/ON
Apagar/Encender integración

Intensity Test
Test de intensidad

L

Launch online
Iniciar en línea

Load Method
Cargar método

Location
Ubicación

Glosario UI

M

- Method
 - Método
- Method and Run Control
 - Control del método y el análisis
- Method History
 - Historial del método
- Method Information
 - Información del método
- Method Menu
 - Menú de método
- Method...
 - Método...
- Methods
 - Métodos
- Mode
 - Modo

N

- Name Pattern
 - Patrón de nombre
- Needle Wash
 - Lavado de aguja
- New Method...
 - Nuevo método...
- No Limit
 - Sin límites
- No Limit / Off
 - Sin límite/Desconectado
- None
 - Ninguno

O

- Off
 - Desconectado
- OK
 - Aceptar
- Online Plot
 - Gráfico en línea

- Online Signals
 - Señales en línea
- OpenLAB Control Panel
 - Panel de control de OpenLAB

P

- Parameter
 - Parámetro
- Parameter Mismatch
 - Parámetro incorrecto
- Paste
 - Pegar
- Peak Width
 - Anchura de pico
- Peakwidth
 - Anchura de pico
- Post Time
 - Tiempo posterior
- Postrun
 - Post-análisis
- Post-Run Command / Macro
 - Comando post-análisis/Macro
- Posttime
 - Tiempo de post-análisis
- Prerun
 - Pre-análisis
- Pre-Run Command / Macro
 - Comando pre-análisis/Macro
- Pressure Limits
 - Límites de presión
- Printer
 - Impresora
- Pump
 - Bomba

Q

- Quantitation settings
 - Opciones de cuantificación

- Quantitative results sorted by
 - Resultados cuantitativos ordenados por

R

- Range
 - Rango
- Reference Bandwidth
 - Anchura de banda de referencia
- Reference Wavelength
 - Longitud de onda de referencia
- Remove
 - Eliminar
- Repeat
 - Repetir
- Report
 - Informe
- Report mode
 - Modo de informe
- Report Style
 - Estilo de informe
- Reporting settings
 - Opciones de informe
- Response
 - Respuesta
- Run Control
 - Control del análisis
- Run Method
 - Ejecutar método
- Run Queue
 - Lista de espera de análisis
- Run Sequence
 - Ejecutar secuencia
- Run Time Checklist
 - Lista de comprobación del tiempo de análisis
- Run Time Checklist...
 - Lista de comprobación del tiempo de análisis...

S

Sample flush out factor
Factor de evacuación de la muestra

Sample Info
Información de la muestra

Sample name
Nombre de la muestra

Save
Guardar

Save As
Guardar como

Save As...
Guardar como...

Save Method As
Guardar método como

Save Method As...
Guardar método como...

Save Method with Data
Guardar método con datos

Screen
Pantalla

Select Run Method Task
Seleccionar la tarea Ejecutar método

Selected Signal
Señal seleccionada

Selected Signals
Señales seleccionadas

Set Integration Events Table
Configurar la tabla de parámetros de integración

Setup Instrument Method...
Método de instrumento de configuración...

Setup Method
Método de configuración

Show timetable graph
Mostrar gráfico de la tabla de tiempos

Signal A
Señal A

Signal Description
Descripción de la señal

Signal Details
Detalles de la señal

Signal Window 1
Ventana de señal 1

Signals
Señales

Single Runs
Análisis individuales

Size
Tamaño

Skip
Omitir

Slope Sensitivity
Sensibilidad de pendiente

Solvents
Disolventes

Specific Events For Signal
Parámetros específicos para la señal

Specify Report
Especificar informe

Spectrum Store
Almacén del espectro

Standard Data Analysis
Análisis de datos estándar

Standard injection
Inyección estándar

Start
Inicio

Step
Paso

Stop Time
Tiempo de parada

Stop Time / Post Time
Tiempo de parada/Tiempo posterior

Stoptime
Tiempo de parada

Store
Almacenar

Style
Estilo

Subdirectory
Subdirectorio

Switch [module name] on
Encender [nombre del módulo]

System On/Off
Encender/apagar el sistema

T

TCC)
TCC

Temperature
Temperatura

Threshold
Umbral

Time
Tiempo

Timetable
Tabla de tiempos

U

Unique PDF file name
Nombre de fichero PDF único

Unique Sequence Folder Creation
Creación de carpeta de secuencia única

Use Signal
Usar señal

V

Vial/Location
Vial/posición

Vial/Well bottom sensing
Percepción del final del vial/pocillo

View
Vista

Glosario UI

W

Wash Vial

Vial de lavado

Water

Agua

Wavelength

Longitud de onda

Wavelength Calibration

Calibración de la longitud de onda:

Z

Zero Offset

Compensación cero

Índice

A

ADVR 52
 Agilent
 en Internet 116
 altitud no operativa 23
 altitud operativa 23
 análisis de datos 118
 análisis
 datos 102
 arrastre de contaminantes 53, 54

B

bloqueos de columnas
 evitar 70
 bomba binaria 11
 bomba de vacío 14

C

calculadora
 costes 34
 calentamiento derivado de la fricción 37
 cambio de disolventes 85
 carga
 predeterminado 90
 cebado
 con una bomba 84
 celda de flujo 68
 columna
 temperatura 37
 termostatación 37
 columnas
 Partículas inferiores a 2 µm 34
 Compartimento termostatzado de columna

 descripción 17
 compensación de la compresibilidad 24
 compensación, compresibilidad 24
 componentes del sistema
 compartimento termostatzado de columna 17
 detector de diodos 19
 configuración de volumen de retardo bajo 43
 configuración de volumen de retardo medio 45
 configuración de volumen estándar de retardo 46
 configuración e instalación del sistema
 integración en la red 76
 configuración óptima
 columnas de 2,1 mm de d.i. 43
 columnas de 3 y 4 mm de d.i. 46
 configuración
 gráfico en línea 91
 volumen de retardo bajo 43
 volumen de retardo medio 45
 volumen estándar de retardo 46
 consumo de corriente 23
 control y evaluación de datos 25

D

datos
 análisis 102
 DEF_LC.M 117
 desgasificador de vacío 26
 detector de diodos
 descripción 19
 detector

 conseguir una sensibilidad más elevada 67
 dimensiones 23
 diseño de dos pistones en serie 11
 diseño 11
 disolventes, cambio 85
 dispositivo de control 14

E

Ecuación de Van Deemter 29
 especificaciones físicas 23
 especificaciones
 comunicaciones 25
 control y evaluación de datos 25
 de rendimiento 24
 físicas 23
 salida de señal analógica 25
 evaluación de datos y control 25
 exactitud de la composición 25
 exactitud del flujo 24

F

factor de retención 32
 formación de gradiente 24
 frecuencia de línea 23

G

gráfico en línea
 configuración 91
 guía de inicio rápida
 introducción 88

H

humedad 23

Índice

I

- Información del método 118, 119
- informe
 - especificación 105
- instalación
 - controlador del software 74
 - Lab Advisor 75
 - sistema de datos 74
- Instrumento/Adquisición 118
- integración en la red 76
- integración 104
- Internet 116
- introducción al desgasificador 14
- inyecciones solapadas 52

L

- lavado activo de sellos 11
- Lista de comprobación del tiempo de análisis 118

M

- método de instrumento de configuración 120
- método
 - configuración 98
 - editar método completo 117
 - inyección individual 100
 - predeterminado 117
- mezcla a alta presión 11
- mezclador 11

O

- optimización de la resolución
 - compartimento de las columnas 60
 - condiciones cromatográficas 63
 - velocidad de muestreo 62
 - volumen extracolumna 61
- optimización

- celda de flujo 68
- condiciones de HPLC 31
- conseguir una resolución más elevada 56
- conseguir una sensibilidad más elevada 65
- sensibilidad del detector 67
- separación cromatográfica 31
- uso de columnas 67
- volumenes de inyección 48

P

- partículas inferiores a 2 µm 34
- peso 23
- platos teóricos 32
- precisión de la composición 25
- precisión del flujo 24
- presión
 - pulso 24
 - rango operativo 24
- principio de funcionamiento 14
- purga 93

R

- rango de composición 25
- rango de flujo ajustable 24
- rango de flujo
 - ajustable 24
 - operativo 24
- rango de frecuencia 23
- rango de pH recomendado 24
- rango de pH 24
- rango de voltaje 23
- reducción automática del volumen de retardo 52
- regeneración alterna de columnas 50
- rendimiento
 - especificaciones 24
- resolución

- aumento 56
- Optimización 56

S

- salida de señal analógica 25
- seguridad de primera clase 108
- seguridad
 - estándares 23
 - información general 108
 - símbolos 110
- sensibilidad
 - configuración del instrumento 66
 - optimización 65
- sensor de presión 14
- sistema hidráulico 24
- sistema
 - encendido 89
- soluciones tampón 11

T

- tabla de parámetros de integración 104
- temperatura ambiente no operativa 23
- temperatura ambiente operativa 23
- temperatura no operativa 23
- temperatura operativa 23
- tiempo de ciclo
 - configuración del instrumento 50

V

- válvula de selección de disolvente 11
- voltaje de línea 23
- volumen de inyección
 - obtener volúmenes más altos 48
- volumen de retardo
 - cambio automático 42
 - descripción 40
 - ejemplo 40
- volumen extracolumna
 - descripción 41

www.agilent.com

En este manual

En este manual se incluye información acerca del LC Binario Agilent 1260 Infinity.

En este manual se describe lo siguiente:

- descripción del producto,
- introducción,
- especificaciones,
- optimización del sistema,
- configuración e instalación del sistema,
- guía de inicio rápido.

© Agilent Technologies 2006, 2008-2011, 2013

Printed in Germany
02/2013



G1312-95303



Agilent Technologies