

Maximizar la eficiencia con las columnas Agilent InfinityLab Poroshell 120

100.000 platos en menos de 5 minutos con la tecnología de columnas en serie

Nota de aplicación

Industria alimentaria, Medio ambiente, Industria química, Industria farmacéutica

Autores

Angelika Gratzfeld-Hüsgen y
Edgar Naegele
Agilent Technologies
Waldbronn, Alemania

Resumen

Las columnas basadas en tecnologías superficialmente porosas son una alternativa a las columnas basadas en partículas de tamaño inferior a 2 μm . La combinación de estas columnas con el sistema LC Agilent 1290 Infinity produce separaciones de alta eficiencia. Las columnas Agilent InfinityLab Poroshell 120 ofrecen:

- Menor retropresión
- Mayor eficiencia
- Capacidad de volumen comparable



Agilent Technologies

Introducción

Recientemente, las columnas de partículas de tamaño inferior a 2 µm han atraído mucho interés debido a su elevada eficiencia. Pueden usarse con velocidades de flujo mayores que las evaluadas según la ecuación de Van Deemter. La pérdida en eficiencia con velocidades de flujo superiores es escasa en comparación con la eficiencia a la velocidad de flujo óptima. Los tiempos de análisis y las duraciones de los ciclos pueden reducirse para obtener resultados más rápidos.

El inconveniente de estas columnas es que se obtienen retropresiones significativamente más elevadas, debido a los pequeños tamaños de partícula. En numerosos casos, en especial para las columnas largas de menos de 2 µm, los instrumentos de LC deben permitir retropresiones > 400 bar.

La tecnología de partículas superficialmente porosas ofrece una alternativa para análisis de muy alta resolución¹, debido a que estas columnas muestran una retropresión significativamente inferior. La eficiencia de estas columnas es ligeramente inferior a la de las columnas de partículas de tamaño inferior a 2 µm. Se pueden obtener números de platos muy elevados acoplando columnas, debido a la reducción de la retropresión.

En esta nota de aplicación se demuestra que el acoplamiento de tres columnas largas Agilent InfinityLab Poroshell 120 origina eficiencias extremadamente altas. También se demuestra que la retropresión puede mantenerse por debajo de los 400 bar, a menos que esté disponible un equipo especial de LC. En tal caso, se pueden usar velocidades de flujo superiores para reducir los tiempos de análisis y de equilibrio. Finalmente, se ha realizado una comparación entre una columna con recubrimiento poroso de 2,7 µm y otra con tamaño de partícula inferior a 2 µm.

Experimento

Equipo

Para los experimentos se usó un sistema LC Agilent 1290 Infinity equipado con bomba binaria, muestreador automático, compartimento termostatzado de columna y detector de diodo array con celda de 10 mm de paso óptico.

Columnas

Se usó una columna Agilent ZORBAX de Resolución Rápida y Alto Rendimiento de 4,6 mm × 150 mm, 1,8 µm y una columna Agilent InfinityLab Poroshell 120, 4,6 mm × 150 mm, 2,7 µm. Estas columnas se pueden usar hasta 600 bar.

Software

Software Agilent ChemStation, versión B.04.02

Resultados y comentarios

Potenciales ventajas de las columnas superficialmente porosas

La tecnología de columna superficialmente porosa se basa en partículas con un núcleo sólido y un recubrimiento superficialmente poroso. Estas partículas poseen un núcleo sólido de 1,7 µm y un recubrimiento poroso de sílice de 0,5 µm. En total, el tamaño de la partícula es de aproximadamente 2,7 µm. Las partículas superficialmente porosas de 2,7 µm proporcionan unas retropresiones un 40–50 % inferiores y un 80–90 % de la eficiencia de las partículas completamente porosas de menos de 2 µm. Las partículas superficialmente porosas presentan una distribución del tamaño de partícula más estrecha que las partículas completamente porosas. La consecuencia es una columna más homogénea y con menor difusión. Al mismo tiempo, el reducido tamaño de partícula y el recubrimiento poroso ofrecen menor resistencia a la transferencia de masa. Ello origina una mayor velocidad de flujo sin pérdida de eficiencia^{1,2}.

Configuración del sistema

En los siguientes experimentos se evaluó el rendimiento de las columnas Agilent InfinityLab Poroshell 120. Todas las columnas usadas tenían un diámetro interno de 4,6 mm y una longitud de 150 mm.

- Evaluación del número de platos de una sola columna a 1,5 ml/min
- Evaluación del número de platos para tres columnas acopladas a 1,5 ml/min
- Evaluación del número de platos para tres columnas acopladas a velocidades de flujo mayores
- Precisión de los tiempos de retención usando condiciones isocráticas y en gradiente
- Comparación entre una columna con recubrimiento poroso y otra con partículas de menos de 2 µm

La eficiencia de la columna (número de platos) se suele medir en condiciones isocráticas. En los picos simétricos, el número de platos (N) se calcula según la siguiente ecuación:

$$N = 5,54 (TR/W)^2$$

TR es el tiempo de retención; W es la anchura de pico a la mitad de la altura.

Evaluación del número de platos para una sola columna

Para evaluar el número de platos en una sola columna, se usaron los siguientes compuestos: uracilo, acetofenona, benceno y tolueno.

En la Figura 1 se muestra el cromatograma resultante y el número de platos evaluado.

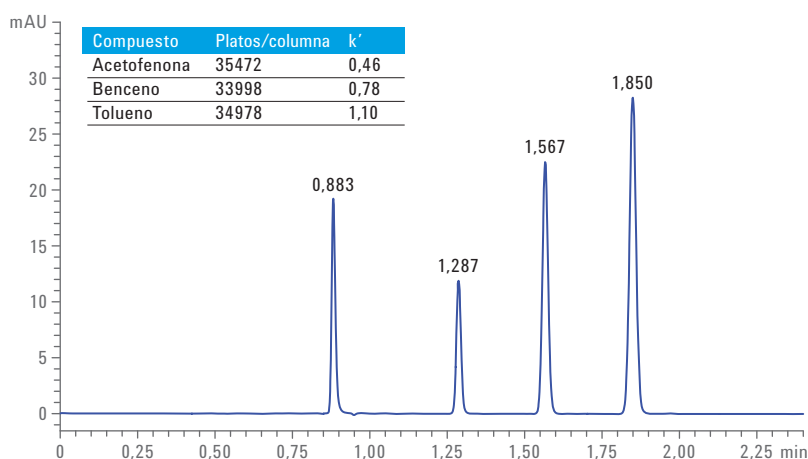
El resultado fue de aproximadamente 35.000 platos/columna para tolueno en las condiciones cromatográficas especificadas.

Evaluación del número de platos para tres columnas acopladas

El número de platos para una columna es de aproximadamente 35.000. Se espera que las tres columnas proporcionen 105.000 platos. El acoplamiento de columnas se realizó utilizando capilares de acero inoxidable, 90 × 0,12 mm. Se evaluó el número de platos para diferentes velocidades de flujo.

Los cromatogramas resultantes se muestran en la Figura 2. Si se utiliza un sistema LC de 400 bar, se pueden obtener unos 80.000 platos con una velocidad de flujo de 1 ml/min. Sin embargo, con este sistema LC se pueden obtener mayores velocidades de flujo y mejores eficiencias, lo que permite presiones de hasta 1.200 bar.

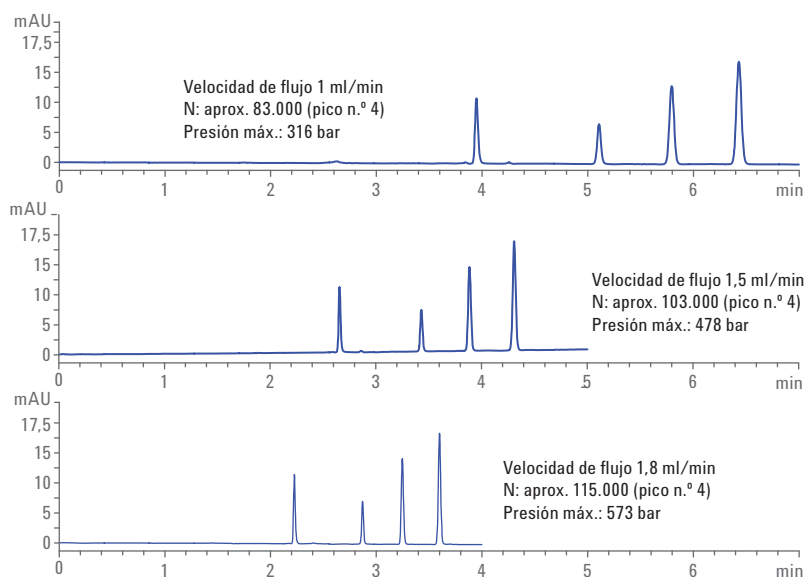
Con una velocidad de flujo de 1,5 ml/min, el número de platos obtenido (aproximadamente 103.000 platos) está próximo al valor esperado.



Condiciones cromatográficas

Parámetro	Valor
Columna	Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 mm × 4,6 mm, 2,7 μm
Muestra	Tiourea, acetofenona, benceno, tolueno
Fase móvil	Agua:ACN = 30:70
Velocidad de flujo	1,5 ml/min
Volumen de inyección	1 μl
Temperatura de la columna	50 °C
Detector	DAD 254 nm/10, Ref. 360/100 nm, 20 Hz, celda estándar

Figura 1. Cromatograma para evaluar N para la columna Agilent InfinityLab Poroshell 120, 4,6 × 150 mm.



Condiciones cromatográficas

Parámetro	Valor
Muestra	Tiourea, acetofenona, benceno, tolueno
Columna	Tres columnas Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 mm × 4,6 mm, 2,7 μm acopladas
Fase móvil	Agua:ACN = 20:80
Velocidad de flujo	1, 1,5, 1,8 ml/min
Volumen de inyección	1 μl
Temperatura de la columna	60 °C
Detector	DAD 254 nm/10, Ref. 360/100 nm, 20 Hz, celda estándar

Figura 2. Dos cromatogramas para evaluar N para tres columnas Agilent InfinityLab Poroshell 120, 150 mm × 4,6 mm con diferentes velocidades de flujo.

El mejor resultado para el tolueno, con aproximadamente 115.000 platos, se obtuvo a 1,8 ml/min, con un tiempo de retención <5 minutos (Tabla 1).

Tabla 1. Número de platos con una velocidad de flujo de 1,8 ml/min.

Compuesto	Platos	k'
Acetofenona	114.120	0,29
Benceno	109.931	0,46
Tolueno	114.800	0,62

Para valores de k' más altos, se obtuvieron buenos resultados utilizando tres columnas acopladas. Se usó una velocidad de flujo de 1,2 ml/min. (Figura 3)

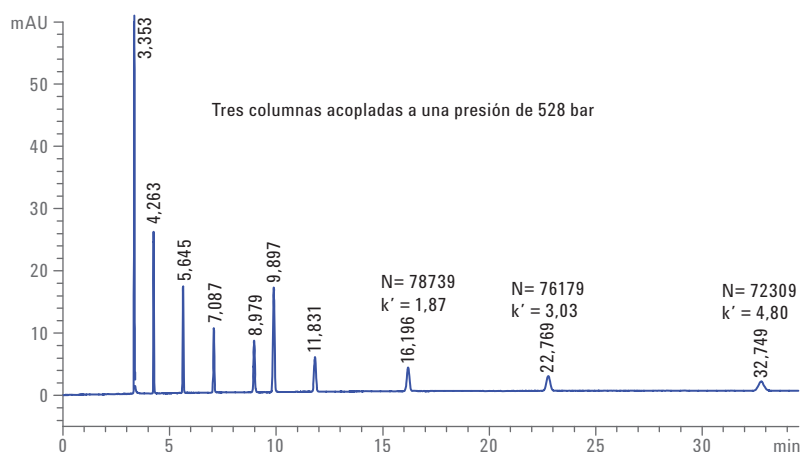


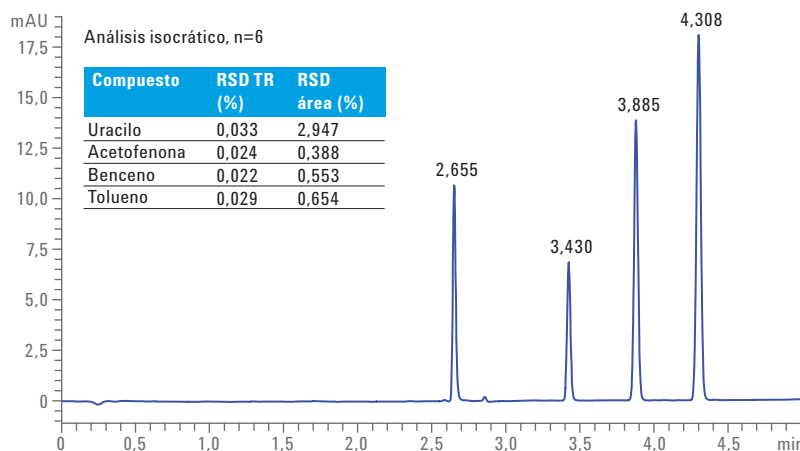
Figura 3. Número de platos con mayores valores de k' para tres columnas acopladas a 528 bar y una velocidad de flujo de 1,2 ml/min.

Precisión de los tiempos de retención usando condiciones isocráticas

Se evaluó la precisión de las condiciones isocráticas a 1,5 ml/min; los resultados se muestran en la Figura 4, junto con una superposición de seis análisis consecutivos. La precisión de los tiempos de retención fue <0,034 % RSD; la precisión de las áreas fue <0,66 % RSD, salvo para uracilo.

Condiciones cromatográficas

Parámetro	Valor
Muestra	Tiourea + muestra de prueba: Conjunto de nueve compuestos, cada uno de 100 ng/μl, disueltos en agua/ACN (65/35) 1. Acetanilida, 2. Acetofenona, 3. Propiofenona, 4. Butirofenona (200 ng/μl), 5. Benzofenona, 6. Valerofenona, 7. Hexanofenona, 8. Heptanofenona, 9. Octanofenona
Columna	Tres columnas Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 mm × 4,6 mm, 2,7 μm acopladas
Fase móvil	Agua/ACN 60/40
Temperatura de la columna	60 °C
Velocidad de flujo	1,2 ml/min
Detector	DAD 254 nm/10 nm, ref. 360/100 nm, 20 Hz, celda estándar



Condiciones cromatográficas

Parámetro	Valor
Muestra	Uracilo, acetofenona, benceno, tolueno
Columna	Tres columnas Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 mm × 4,6 mm, 2,7 μm acopladas
Fase móvil	Agua:ACN = 20:80
Velocidad de flujo	1,5 ml/min
Volumen de inyección	1 μl
Temperatura de la columna	60 °C
Detector	DAD 254 nm/10, Ref. 360/100 nm, 20 Hz, celda estándar

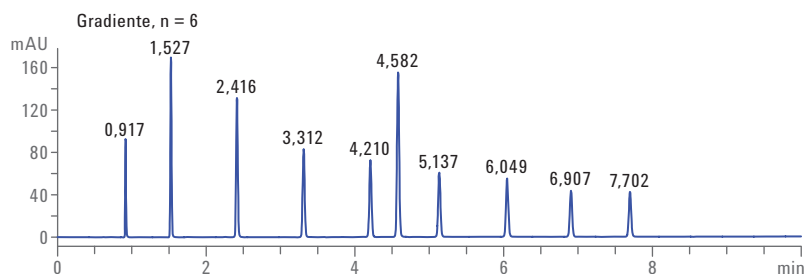
Figura 4. Superposición de seis análisis consecutivos utilizando condiciones isocráticas y datos de precisión para tiempos de retención y áreas.

Precisión de los tiempos de retención y las áreas usando condiciones en gradiente

Se evaluó la precisión para el análisis en gradiente utilizando un gradiente del 35 al 95 % en 10 minutos. En la Figura 5 se muestran los resultados y la superposición de seis análisis consecutivos.

Se consiguió una excelente precisión para los tiempos de retención de todos los compuestos (RSD < 0,04 %), salvo para tiourea (Figura 5).

Las RSDs para las áreas de los picos de todos los compuestos fue inferior al 0,38 % para una inyección de 1 µl.



Pico	RSD TR (%)	RSD área (%)
Tiourea	0,092	0,372
1	0,020	0,238
2	0,038	0,255
3	0,033	0,211
4	0,029	0,186
5	0,027	0,227
6	0,023	0,194
7	0,018	0,183
8	0,017	0,251
9	0,017	0,167

Condiciones cromatográficas

Parámetro	Valor
Muestra	Tiourea + muestra de prueba: Conjunto de nueve compuestos, cada uno de 100 ng/µl, disueltos en agua/ACN (65/35) 1. Acetanilida, 2. Acetofenona, 3. Propiofenona, 4. Butirofenona (200 ng/µl), 5. Benzofenona, 6. Valerofenona, 7. Hexanofenona, 8. Heptanofenona, 9. Octanofenona
Columna	Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 mm × 4,6 mm, 2,7 µm
Fase móvil	Agua y ACN
Gradiente	A 0 minutos un 35 % ACN, a 10 minutos un 95 % ACN
Velocidad de flujo	1,5 ml/min
Volumen de inyección	1 µl
Temperatura de la columna	60 °C
Detector	DAD 245/10 nm, ref. 400/100 nm, 20 Hz, celda estándar

Figura 5. Superposición de 10 análisis en gradiente consecutivos y datos de precisión para tiempos de retención y áreas.

Comparación de la capacidad de picos entre una columna con recubrimiento poroso y otra con partículas de menos de 2 µm

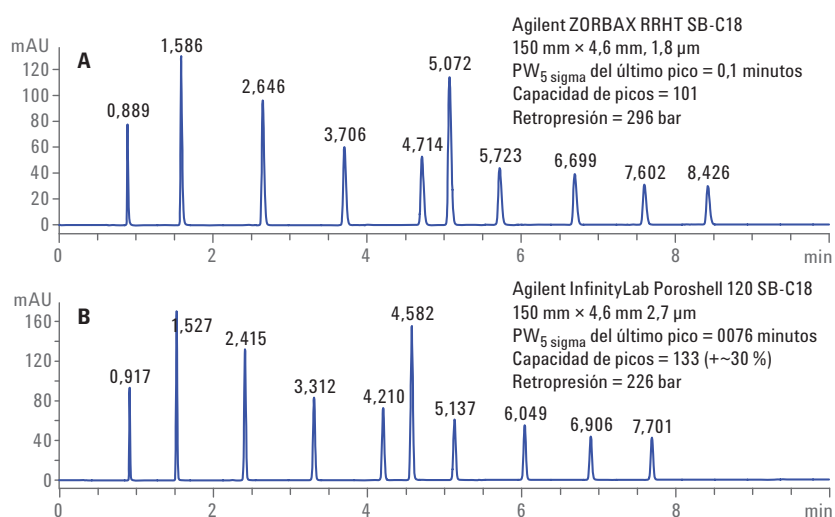
Para ilustrar la diferencia entre las columnas con recubrimiento poroso y de menos de 2 µm, se compararon dos columnas de 150 × 4,6 mm de d.i. analizando un conjunto de 10 compuestos (Figura 6).

La columna Agilent InfinityLab Poroshell 120 muestra menores tiempos de elución y menor anchura de pico, lo que origina mayor capacidad de picos para la columna con recubrimiento poroso. La columna InfinityLab Poroshell 120 muestra 133 picos con una mayor capacidad de picos que la columna de menos de 2 µm, con una capacidad de 101 picos. Esto muestra una eficiencia un 30 % superior para la columna InfinityLab Poroshell 120 que para la columna de menos de 2 µm en las condiciones usadas.

Comparación de la capacidad de volumen

Para probar si las columnas con recubrimiento poroso tienen una capacidad igual o menor que las columnas empaquetadas con partículas de 1,8 µm, se inyectó una muestra muy concentrada. El volumen de inyección fue de 10 µl, mientras que la concentración fue de aproximadamente 20 µg en 10 µl (Figura 7).

No se observaron diferencias significativas para el mismo pico usando las condiciones seleccionadas. La anchura de pico para la columna InfinityLab Poroshell 120 fue algo inferior, pues en este caso el pico eluyó antes. La anchura de pico es típicamente más pequeña.



Condiciones cromatográficas

Parámetro	Valor
Muestra	Tiourea + muestra de prueba: Conjunto de nueve compuestos, cada uno de 100 ng/µl, disueltos en agua/ACN (65/35) 1. Acetanilida, 2. Acetofenona, 3. Propiofenona, 4. Butirofenona (200 ng/µl), 5. Benzofenona, 6. Valerofenona, 7. Hexanofenona, 8. Heptanofenona, 9. Octanofenona
Columna	Agilent ZORBAX RRHT SB-C18, 150 mm × 4,6 mm, 1,8 µm Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 mm × 4,6 mm, 2,7 µm
Fase móvil	Agua y ACN
Gradiente	A 0 minutos un 35 % ACN, a 10 minutos un 95 % ACN
Velocidad de flujo	1,5 ml/min
Volumen de inyección	1 µl
Temperatura de la columna	60 °C
Detector	DAD 245/10 nm, ref. 400/100 nm, 20 Hz, celda estándar

Figura 6. Cromatogramas de una mezcla de fenonas analizadas en columnas con recubrimiento poroso y con partículas de menos de 2 µm.

Comparación de la relación señal-ruido

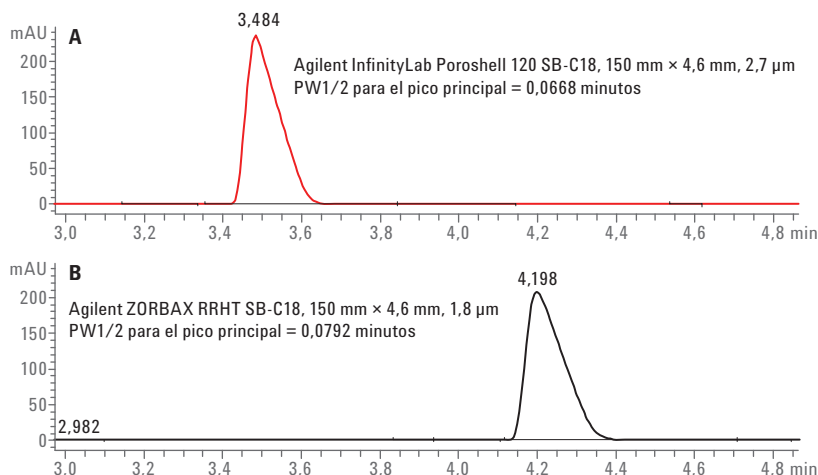
Se analizaron las impurezas en un fármaco para evaluar la relación señal-ruido (S/N). Las impurezas estuvieron presentes en un rango del 0,02–0,03 por ciento. En la Figura 7 se indican las condiciones cromatográficas.

En la Figura 8 se muestra la superposición de una sección de los cromatogramas completos. La traza roja representa el cromatograma de InfinityLab Poroshell 120; la negra, el de menos de 2 μm .

En la tabla 2 aparecen combinados los cálculos S/N para ambas columnas. Las impurezas 1 y 2 se analizaron en la columna InfinityLab Poroshell 120 y en la de menos de 2 μm .

Tabla 2. Comparación de la relación señal-ruido para recubrimiento poroso y columnas de partículas de menos de 1,8 μm .

Pico	S/N en Agilent InfinityLab	
	Poroshell 120	S/N en 1,8 μm
1	14	13,6
2	12,8	12



Condiciones cromatográficas

Parámetro	Valor
Muestra de prueba	Tramadol 2,022 ml/ml con impurezas
Columna	Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 mm × 4,6 mm, 2,7 μm
Bomba	
Disolvente A	Agua + 0,2 % TFA
Disolvente B	ACN + 0,16 % TFA
Gradiente	17 a 45 % B en 5 minutos, tiempo de parada: 7 minutos, tiempo posterior: 3 minutos
Velocidad de flujo	1,5 ml/min
Muestreador automático	
Volumen de inyección	10 μl
Tiempo de lavado	10 s
Compartimento termostatzado de columna	
Temperatura	30 °C
DAD	1290 270/10 nm, Ref. 360/100 nm, 20 Hz, Celda de flujo estándar con paso óptico de 10 mm

Figura 7. Comparación de capacidad de columnas con recubrimiento poroso y de menos de 2 μm ; volumen de inyección 10 μl = 20 μg .

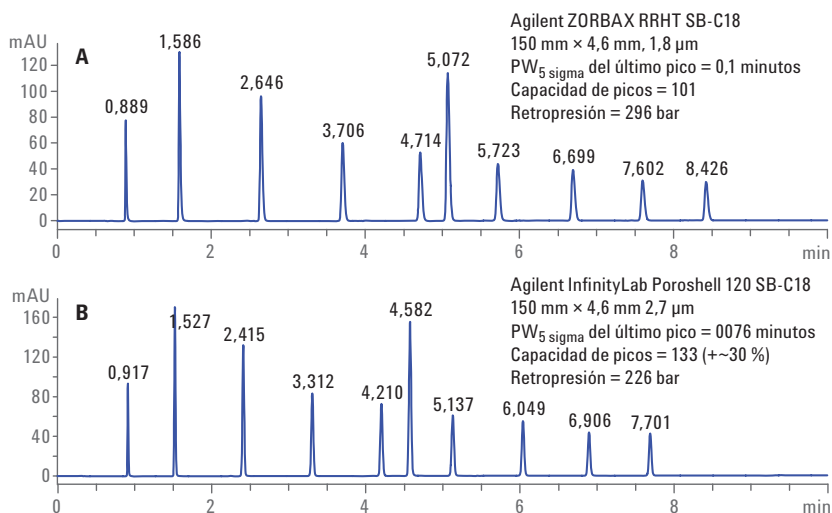


Figura 8. Comparación de la relación señal-ruido; la traza roja representa la columna con recubrimiento poroso y la negra, la columna con partículas de menos de 1,8 μm . Se usó TFA como modificador.

Conclusión

Las columnas con recubrimiento poroso representan una alternativa real a las columnas de menos de 2 μm . La menor retropresión permite velocidades de flujo de 1 ml/min para una columna de 4,6 \times 150 mm, 2,7 μm sin superar el límite de 400 bar. En este caso, se pueden conseguir 35.000 platos o más de 235.000 platos/metro.

El acoplamiento de tres columnas de 4,6 \times 150 mm produce 100.000 platos en menos de 5 minutos, sin superar el límite de 600 bar.

Las columnas Agilent InfinityLab Poroshell 120 muestran excelentes datos de precisión para el análisis isocrático y en gradiente.

Normalmente, para las columnas InfinityLab Poroshell 120 se pueden esperar menores tiempos de elución que para columnas similares de fase ligada de menos de 2 μm en las mismas condiciones cromatográficas. Los tiempos de elución más cortos originan menores anchuras de pico y, en consecuencia, mayores capacidades de picos.

Referencias

1. Cunliffe, J. M.; Maloney, T. D. Fused-core particle technology as an alternative to sub-2- μm particles to achieve high separation efficiency with low backpressure. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 3104-3109.
2. Griiti, F.; *et al.* Comparison between the efficiencies of columns packed with fully and partially porous C18-bonded silica materials. *J. of Chromatog. A* **2007**, *1157*, 289-303.

www.agilent.com/chem

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc., 2016
Publicado en EE.UU., 1 de junio de 2016
5990-5602ES



Agilent Technologies