

Sistema LC Agilent 1290 Infinity

Manual y guía de referencia
rápida del sistema



Agilent Technologies

Avisos

© Agilent Technologies, Inc. 2009-2011, 2012

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:

G4220-95301

Edición

05/2012

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.

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 sistema LC Agilent 1290 Infinity:

1 Introducción a la cromatografía líquida de rendimiento ultraalto

Este capítulo ofrece una introducción al sistema LC Agilent 1290 Infinity y a sus conceptos principales.

2 El sistema LC Agilent 1290 Infinity: descripción del producto

Este capítulo describe las funciones del sistema LC 1290 Infinity.

3 Optimización del sistema LC Agilent 1290 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 configuración de la torre de 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 1290 Infinity.

6 Apéndice

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

Contenido

1	Introducción a la cromatografía líquida de rendimiento ultraalto	7
	Teoría del uso de partículas pequeñas en la cromatografía líquida	8
	Beneficios de las columnas con partículas inferiores a 2 µm	14
	Calentamiento derivado de la fricción	18
2	El sistema LC Agilent 1290 Infinity: descripción del producto	21
	Nuevas funciones del sistema LC Agilent 1290 Infinity	22
	Componentes del sistema	26
3	Optimización del sistema LC Agilent 1290 Infinity	39
	Volumen de retardo y volumen de extracolumna	40
	Cómo configurar el volumen de retardo óptimo	42
	Cómo conseguir volúmenes de inyección más elevados	52
	Cómo conseguir un alto rendimiento	54
	Cómo conseguir una resolución más elevada	57
	Cómo conseguir una sensibilidad más elevada	60
	Cómo conseguir un arrastre de contaminantes mínimo	69
	Cómo evitar los bloqueos de columnas	71
4	Configuración e instalación del sistema	73
	Instalación del software	74
	Instalación del módulo	76
5	Guía de inicio rápida	93
	Sobre la guía de inicio rápida	94
	Preparación del sistema	95
	Adquisición de datos en la vista Control del método y el análisis	101
	Análisis de datos	108

6 Apéndice 115

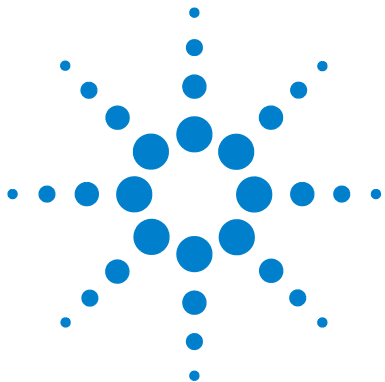
Información sobre seguridad 116

Información sobre disolventes 119

Agilent Technologies en Internet 120

Configuración de un método mediante la opción Edit Entire Method 121

Contenido



1

Introducción a la cromatografía líquida de rendimiento ultraalto

Teoría del uso de partículas pequeñas en la cromatografía líquida 8

Beneficios de las columnas con partículas inferiores a 2 μm 14

Calentamiento derivado de la fricción 18

Este capítulo ofrece una introducción al sistema LC Agilent 1290 Infinity y a sus conceptos principales.



Teoría del uso de partículas pequeñas en la cromatografía líquida

Introducción

En 2003, Agilent presentó las primeras columnas de silicio poroso disponibles comercializadas con partículas de 1,8 μm . Estas columnas fueron las primeras de una clase conocida como columnas "inferiores a 2 μm " o STM. Estos materiales de relleno se introdujeron en las columnas ZORBAX de Resolución Rápida y Alto Rendimiento capaces de soportar 600 bar de presión para su uso con el sistema LC de Resolución Rápida Agilent Serie 1200, presentado en 2006. En 2009, se amplió el rango para incluir columnas de Resolución Rápida y Alta Definición capaces de soportar usos rutinarios con 1200 bar de presión con el fin de admitir la introducción del sistema LC Agilent 1290 Infinity con su amplio rango operativo de hasta 1200 bar de presión y una velocidad de flujo de 5 ml/min.

Estas columnas de tamaño de partícula inferior a 2 μm (1,8 μm) se pueden utilizar 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 inferiores a 2 μm proporcionan una eficacia superior y, por tanto, una mayor resolución, necesaria para realizar la separación de muestras complejas. Una dispersión inferior también significa una menor dilución de los picos de analitos y las consiguientes ganancias de sensibilidad, particularmente para LC/MS.

La presión necesaria para conducir el disolvente por una columna que contenga partículas STM aumenta rápidamente a medida que la velocidad del flujo se eleva para realizar separaciones más rápidas, ya 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). Los sistemas LC de rendimiento ultraalto (o presión ultraalta) también ofrecen volúmenes de retardo bajos y la recogida de datos rápida necesaria para picos estrechos de la cromatografía de alta resolución o rápida. El sistema LC Agilent 1290 Infinity es la

referencia en UHPLC, ya que constituye el primer sistema que puede abarcar completamente todos los rangos de rendimiento de UHPLC ya existentes en el mercado, además de extenderse a todos ellos.

La teoría

La eficacia de separación en HPLC se puede describir mediante la ecuación de Van Deemter (Figura 1 en la página 9). Esto 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 1 en la página 9, donde la altura de plato se representa frente a la velocidad del 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.

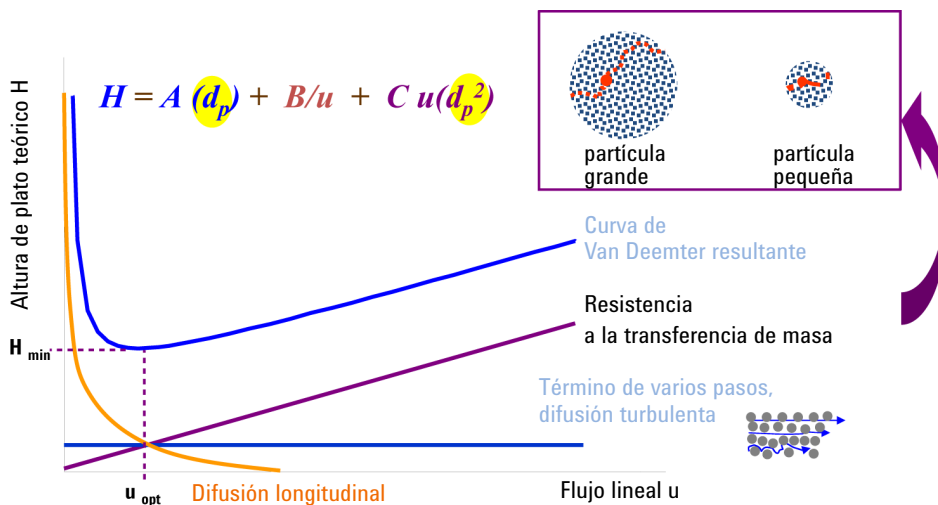


Figura 1 Una curva de Van Deemter hipotética

Las representaciones de Van Deemter en la [Figura 2](#) en la página 10 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.

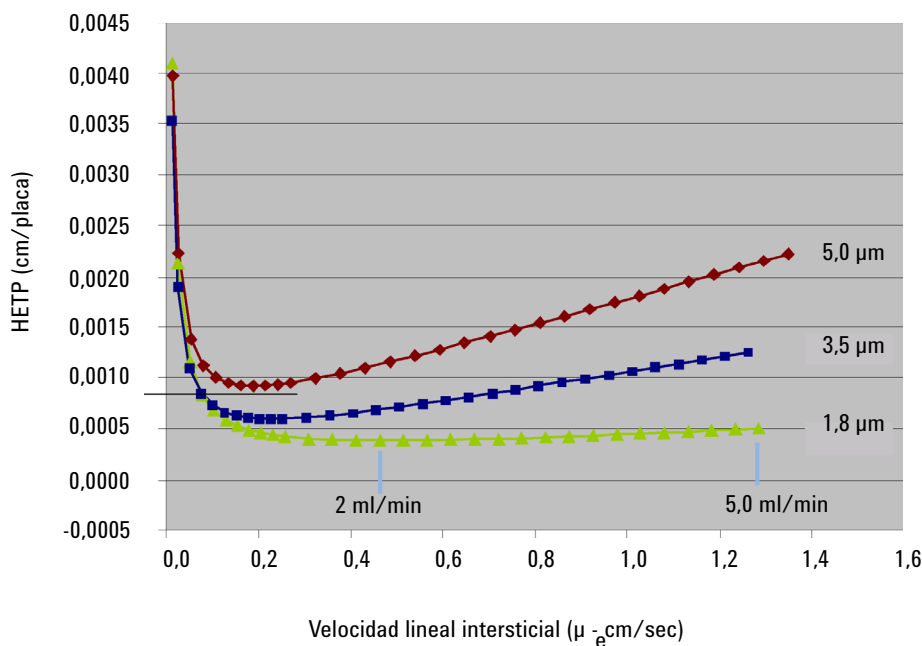


Figura 2 Curva de Van Deemter para diferentes tamaños de partículas

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.

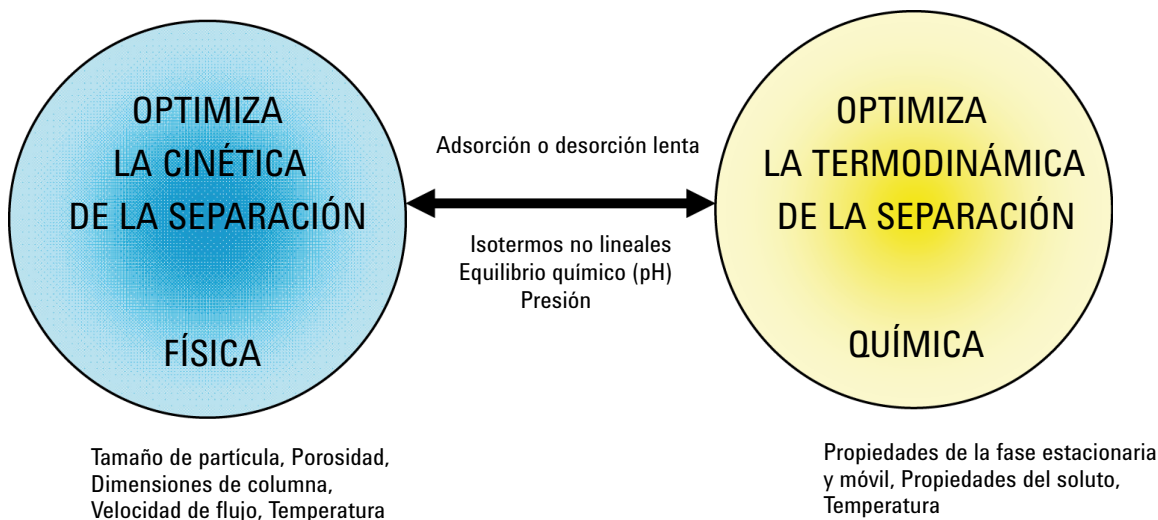


Figura 3 Selección de condiciones óptimas para HPLC

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 4 en la página 12), la selectividad posee el mayor impacto en la resolución (Figura 5 en la página 12). 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 4 Ecuación de resolución

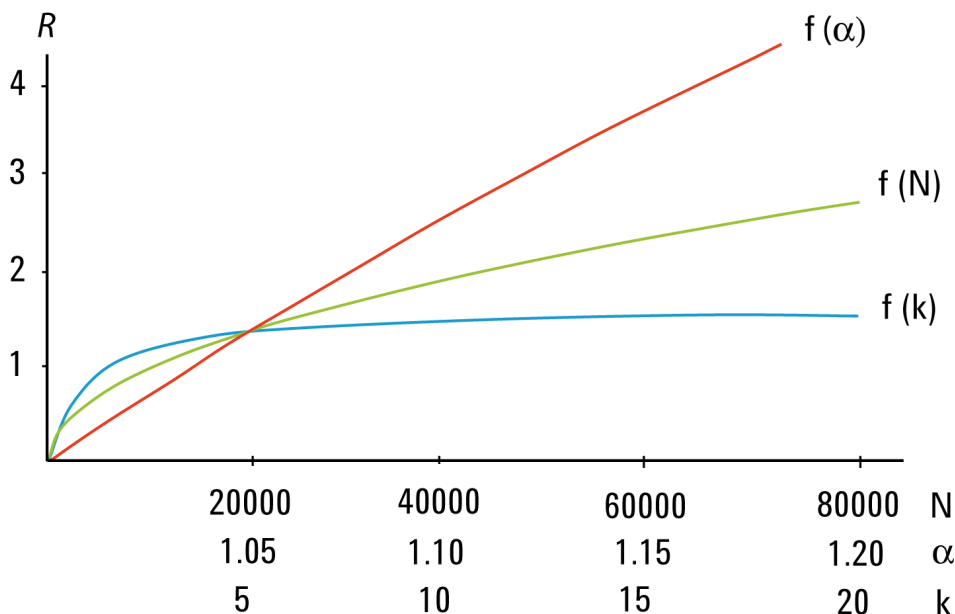


Figura 5 Efecto del número de plato, factor de separación y factor de retención en R

Independientemente de si el método de separación de resolución rápida 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 ya ofrecía más de 140 columnas ZORBAX 1,8 μm de Resolución Rápida y Alto Rendimiento (14 posibilidades de selectividad; de 15 a 150 mm de longitud; diámetros internos de 2,1, 3,0 y 4,6 mm). Con la presentación del sistema LC Agilent 1290 Infinity, la gama de STM se amplía hasta incluir las columnas de Resolución Rápida y Alta Definición (RRHD) de 1200 bar. Esto permite seleccionar la fase estacionaria óptima para maximizar la selectividad. La resolución, la velocidad del flujo y el tiempo de análisis se pueden optimizar mediante la selección de la longitud de columna y el diámetro adecuados. Ade-

más, el funcionamiento con columnas STM más largas se ha vuelto más accesible que nunca.

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. Agilent ofrece soluciones de desarrollo del método tanto para los sistemas LC Agilent 1290 Infinity como para la serie 1200. Estas soluciones ofrecen una automatización total de este largo proceso de selección, lo que facilita que el desarrollo y la transferencia de métodos se convierta en una tarea más sencilla y fiable.

Las columnas RRHD y RRHT de 1,8 μm de ZORBAX utilizan la misma química que las columnas de ZORBAX con partículas de 3,5 y 5 μm . Como resultado, para cualquier fase determinada de ZORBAX, las partículas de 5,0, 3,5 y 1,8 μm proporcionan una selectividad idéntica, lo que permite una transferencia de método bidireccional sencilla, rápida y segura entre el sistema LC convencional, el UHPLC y el LC preparativo.

Beneficios de las columnas con partículas inferiores a 2 µm

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 1 en la página 14).

Tabla 1 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 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.

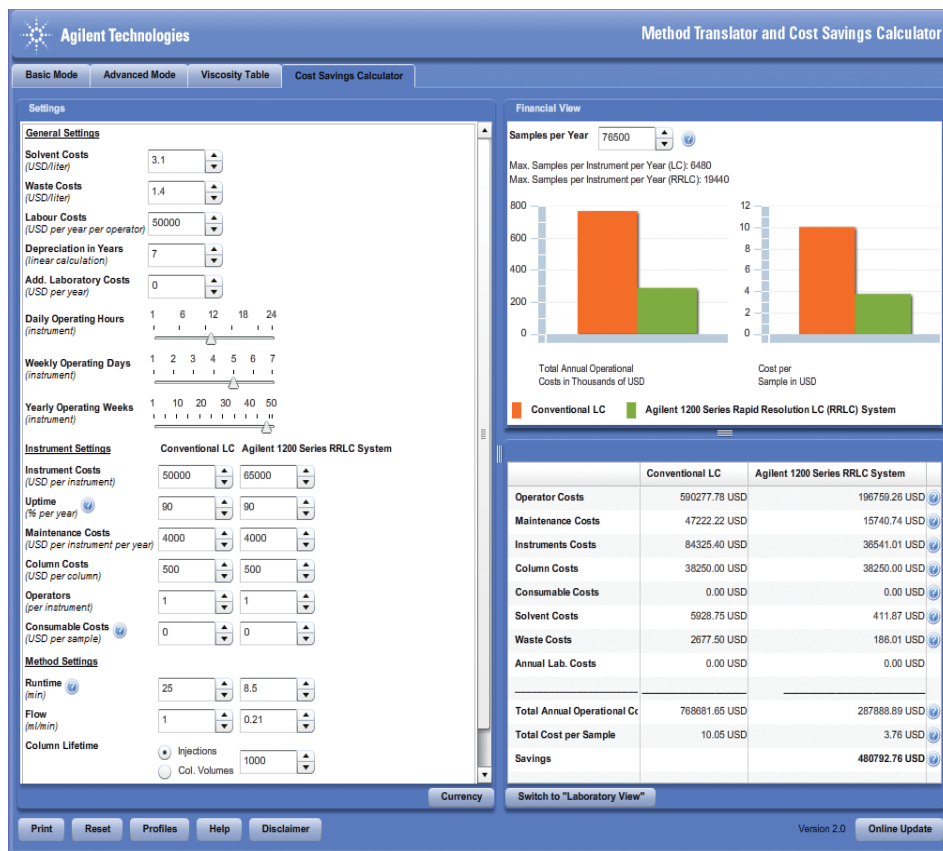


Figura 6 Calculadora de ahorro de costes

1 Introducción a la cromatografía líquida de rendimiento ultraalto

Beneficios de las columnas con partículas inferiores a 2 µm

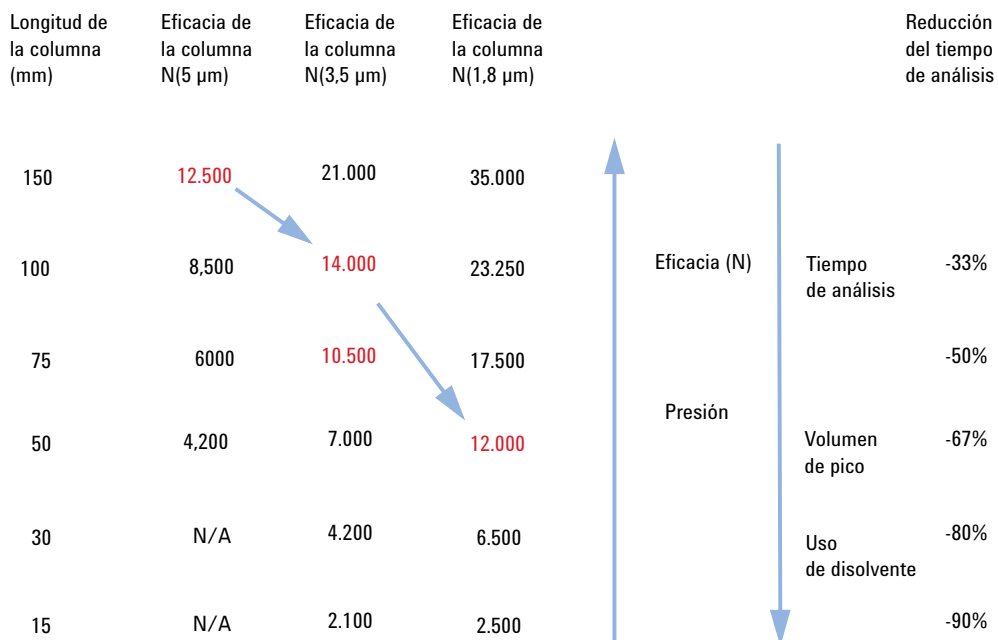


Figura 7 Relación entre el tamaño de partículas, la eficacia y el tiempo de análisis

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.

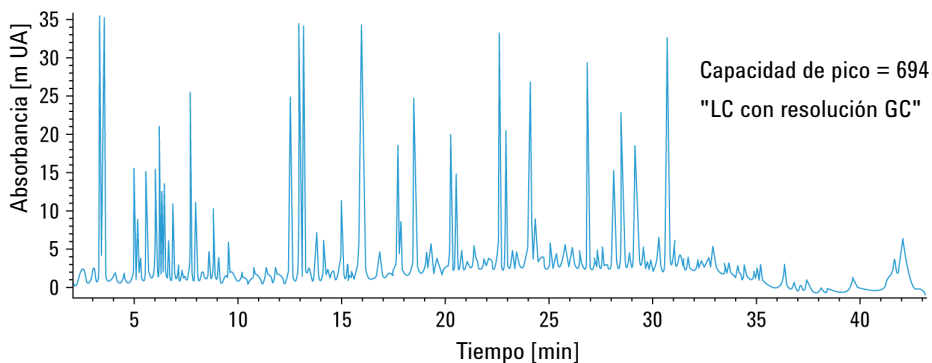


Figura 8 Se pueden obtener capacidades de pico de más de 700 mediante una columna ZORBAX RRHT SB-C18 (2,1 x 150 mm, 1,8 µm) para analizar una digestión triptica de BSA

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.

$$Power = F * p$$

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 inferiores 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.

Un ejemplo de una transferencia del método de gradiente a una columna STM de 2,1 mm de diámetro interno en la que la separación se ha acelerado se muestra en la [Figura 9](#) en la página 19. El análisis inicial en la columna de 2,1 mm se llevó a cabo a una velocidad de flujo de 0,22 ml/min, lo que generó 380 bar de presión a una temperatura ajustada en 37 °C con todos los picos separados en 12,5 min (no se muestra el cromatograma). El flujo se aumentó a 0,66 ml/min y los tiempos de gradiente se redujeron por un factor de tres, lo que generó 1020 bar de presión con todos los picos eluidos en 4,2 min (parte superior de la [Figura 9](#) en la página 19). Esto debería ofrecer la misma separación, pero se puede observar una pérdida de resolución entre los picos 7 y 8 y entre el pico 5 y el pico principal; esto se debe a que el calentamiento de la columna cambia la selectividad de estos componentes. Se ha demostrado que si se ejecuta el termostato de la columna a 5 °C menos, es suficiente para compensar el efecto del calentamiento dentro de la columna y restablecer la separación (parte inferior de la [Figura 9](#) en la página 19). La presión aumentó hasta 1070 bar, lo que también indica que la temperatura interior de la columna era inferior.

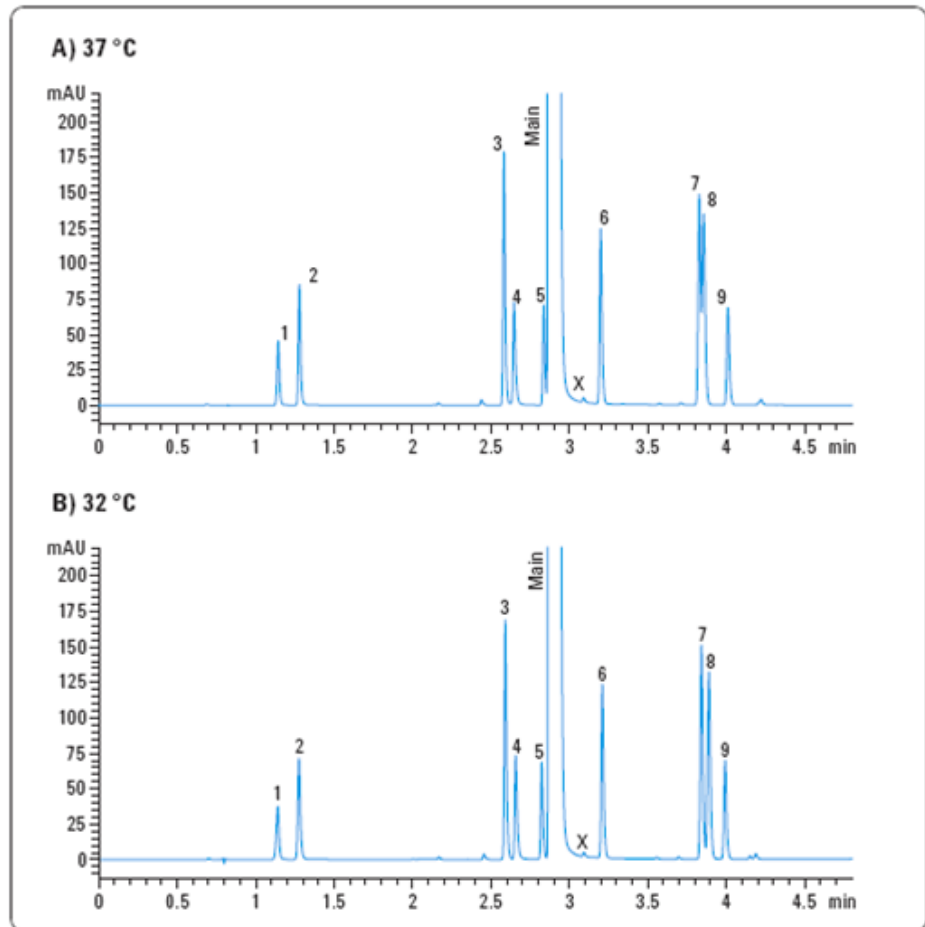


Figura 9 Influencia de la generación de calor por fricción sobre la selectividad y el efecto de la disminución de la temperatura de la columna

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. El sistema LC Agilent 1290 Infinity y las columnas RRHD aumentan el espacio de separación disponible y permiten conseguir un número mayor de estos beneficios. Las funciones del LC 1290 Infinity se tratan en [“El sistema LC Agilent 1290 Infinity: descripción del producto”](#) en la página 21; en [“Optimización del sistema LC Agilent 1290 Infinity”](#) en la página 39 se explica cómo aplicar la teoría y cómo utilizar estas funciones para desarrollar separaciones optimizadas.

1 **Introducción a la cromatografía líquida de rendimiento ultraalto**

Calentamiento derivado de la fricción



2 El sistema LC Agilent 1290 Infinity: descripción del producto

Nuevas funciones del sistema LC Agilent 1290 Infinity 22

Componentes del sistema 26

Este capítulo describe las funciones del sistema LC 1290 Infinity.



Nuevas funciones del sistema LC Agilent 1290 Infinity

El sistema LC Agilent 1290 Infinity está diseñado para ofrecer la mayor flexibilidad a la hora de realizar cromatografías líquidas analíticas mediante todos los tipos de tecnologías de columnas actuales y emergentes. El sistema LC 1290 Infinity posee la variedad más amplia de parámetros operativos, por lo que puede reproducir ajustes de métodos transferidos desde cualquier sistema HPLC o UHPLC analítico preexistente disponible por parte de cualquier proveedor. El sistema LC Agilent 1290 Infinity ofrece nuevos conceptos de diseño radicales para lograr este objetivo y, aún así, muestra claramente su origen de fiabilidad en la ingeniería que ha convertido a los sistemas Agilent HPLC en la línea de HPLC disponible más exitosa.

Este sistema ofrece:

- Velocidades de flujo de 0,05 ml/min a 5 ml/min para la cromatografía convencional o rápida con todos los diámetros de columna analítica de 1 a 5 mm de diámetro interno y todos los tipos de material de relleno de columna.
- Un rango de presión de hasta 1200 bar (>17400 psi) que permite la cromatografía rápida en columnas cortas, una alta resolución en columnas largas mediante material de relleno inferior a 2 μm y una selección mayor de la viscosidad en la fase móvil.
- Volúmenes de retardo ultrabajos para los gradientes más rápidos con detección espectrométrica de masa o detección ultravioleta/luz visible.
- La capacidad para utilizar cualquier método transferido de otro sistema analítico HPLC o UHPLC.
- Un control sofisticado de la bomba para ofrecer un ruido cromatográfico y ruido acústico muy bajos y obtener mejores resultados y un mejor entorno de trabajo.
- Un desgasificador y una válvula de purga automática integrada en el módulo de la bomba.
- Un inyector automático de volumen variable con volumen de retardo reducido, arrastre de contaminantes reducido y la opción de funcionar como un inyector automático de loop fijado.

- Un módulo nuevo de cubo flexible para agregar funcionalidades al inyector automático, como la limpieza posterior del asiento de la aguja y el funcionamiento del loop fijado.
- Un compartimento de columna termostatzado con una capacidad de uso mejorada y soluciones de válvulas integradas con un rango de presión de hasta 1200 bar (17400 psi).
- Un detector de diodos con una sensibilidad y una estabilidad de la línea base altamente mejoradas que utiliza un sistema de celdas de cartucho con guías de onda optofluídicas.
- Una velocidad de recopilación de datos de hasta 160 Hz con información espectral completa.
- Una gama nueva de columnas ZORBAX RRHD de tamaño de partícula inferior a 2 μm para el funcionamiento a presiones de hasta 1200 bar.
- Una ayuda para la mezcla para la amortiguación automática y la mezcla de aditivos en la bomba cuaternaria 1290 Infinity.

El avance más significativo es el rango de presiones y velocidades de flujo que puede utilizar el sistema. Esta condición operativa se puede describir como el rango de potencia (flujo x presión) del instrumento y se entiende más fácilmente de forma gráfica (**Figura 10** en la página 24). Como se puede ver en el diagrama, el rango de potencia de la bomba 1290 Infinity permite un funcionamiento a 1200 bar con un flujo de hasta 2 ml/min, que se reduce a 800 bar a medida que el flujo aumenta hasta 5 ml/min. Esto abarca las condiciones del rango operativo de todos los sistemas UHPLC existentes en el mercado y posibilita la transferencia directa de los métodos de cualquiera de estos sistemas al sistema 1290 Infinity.

2 El sistema LC Agilent 1290 Infinity: descripción del producto

Nuevas funciones del sistema LC Agilent 1290 Infinity

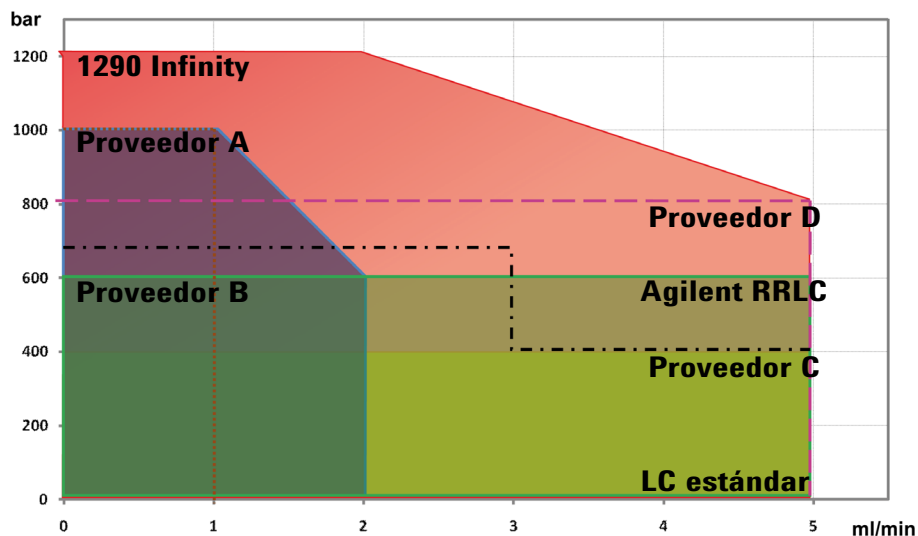


Figura 10 Rango de potencia de los sistemas UHPLC (presión x espacio operativo de la velocidad del flujo)

El rango de presión ofrece la capacidad de trabajar con las últimas partículas inferiores a 2 μm en columnas largas para obtener una resolución elevada y en columnas cortas para obtener una separación rápida a velocidades de flujo aumentadas. El rango de velocidades del flujo no solo permite utilizar los métodos tradicionales, sino también materiales de relleno porosos (o películas) por la superficie (por ejemplo, Poroshell) a velocidades de flujo elevadas. Estos tipos de relleno han ganado interés recientemente como alternativa al material inferior a 2 μm para las separaciones de eficacia elevada. El rango de velocidades de flujo permite seleccionar la columna de diámetro más adecuada para la separación, ya sea 2 mm para aplicaciones de flujo bajo como las requeridas por algunos sistemas MS o hasta 5 mm de diámetro interno (normalmente 4,6 mm) para sistemas LC más tradicionales o una mayor capacidad de carga. El rango de velocidades de flujo admite los últimos descubrimientos en investigación que muestran los beneficios del uso de velocidades de flujo máximas para aumentar la eficacia en separaciones de gradiente. (Consulte *Petersson et al., J.Sep.Sci, 31, 2346-2357, 2008, Maximizing peak capacity and separation speed in liquid chromatography*).

El nuevo detector de diodos ofrece niveles nuevos de sensibilidad combinados con unas características de línea de base extraordinarias y una gran facilidad de uso gracias a su diseño de celdas innovador.

El inyector automático presenta el conocido diseño de flujo de Agilent para la inyección de volúmenes variables con un arrastre de contaminantes bajo actualizado para una mayor presión y unas aplicaciones de volumen inferior. Se puede agregar un módulo completamente nuevo (el Cubo Flexible) en el inyector automático para ofrecer la inyección de loop fijado y, así, obtener el volumen de retardo más bajo y otras mejoras de rendimiento, como la limpieza posterior del asiento de la aguja.

Componentes del sistema

La Bomba binaria Agilent 1290 Infinity

La Bomba binaria Agilent 1290 Infinity contiene nuevas tecnologías para solventar los problemas de bombeo de los disolventes LC a presión ultraalta y a velocidades de flujo elevadas: motores de accionamiento potentes en los pistones; nuevo material en los propios pistones para soportar la carga de trabajo y transferir de forma activa el calor de los sellos; intercambiadores de calor microfluídicos y el Jet Weaver, un dispositivo de mezclado microfluídico. La bomba puede suministrar flujo en el intervalo de 0,05 – 5 mL/min a presiones de hasta 1200 bar.

El módulo de la Bomba binaria Agilent 1290 Infinity contiene dos bombas idénticas de alta presión (1200 bar), un desgasificador de disolventes de dos canales, una válvula de entrada de selección de disolvente con cuatro canales, una válvula de purga automática y un dispositivo de mezcla de bajo volumen (el Jet Weaver) integrado en una carcasa individual. El desgasificador aumenta la estabilidad del flujo, especialmente a velocidades de flujo bajas, y la sensibilidad del detector.

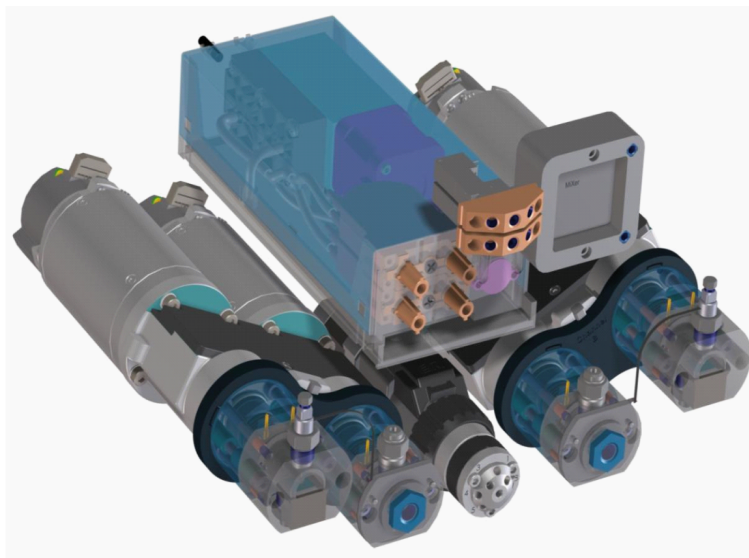


Figura 11 La Bomba binaria Agilent 1290 Infinity

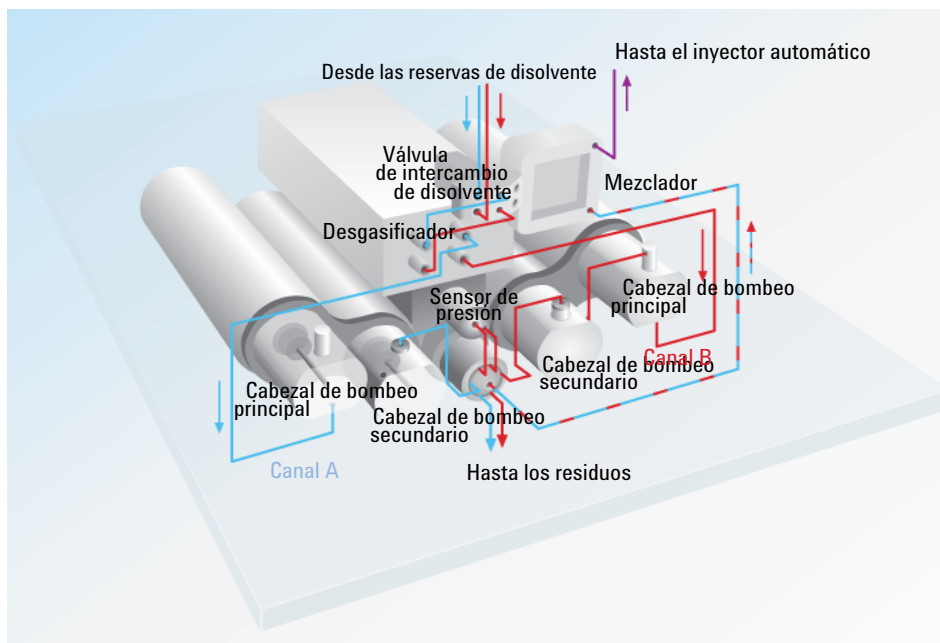


Figura 12 Identificación de las piezas y esquema de la Bomba binaria 1290 Infinity

Cada cabeza de la bomba es un pistón doble diseñado en serie que utiliza un control del firmware nuevo y un material del pistón nuevo, el carburo de silicio, que elimina de forma eficaz el calor de la bomba. El capilar que une los pistones principal y secundario posee un intercambiador de calor integrado para eliminar el calor generado a una presión y un flujo elevados. Cada cabeza de la bomba posee una válvula de entrada pasiva y una válvula de salida pasiva en la cámara del pistón principal. Cada pistón está accionado de forma independiente y precisa por un motor de 65000 pasos que ofrece 300 una desviación de picolitros por paso.

El movimiento de los pistones está controlado de forma inteligente mediante un loop de realimentación para garantizar que esta amortiguación activa del pulso de presión cree un flujo sin ondas. El accionamiento del pistón se ajusta solo según las características de compresibilidad del disolvente y las características hidráulicas del sistema para mantener el estado sin ondas. Esto, junto con el control de movimiento suave, que reduce el pulso de presión provocado por el movimiento del pistón, y la mezcla eficiente de bajo volumen garantizan que el ruido de la bomba en las trazas UV sea lo más bajo posible. Un microprocesador especializado en la bomba se encarga del control de movimiento

2 El sistema LC Agilent 1290 Infinity: descripción del producto

Componentes del sistema

suave y de la optimización del movimiento de los pistones para una optimización en tiempo real según los parámetros estáticos y dinámicos. Además del rendimiento cromatográfico, estas funciones permiten que la bomba funcione de forma muy silenciosa.

Cuando se utilizan soluciones tampón concentradas como fase móvil, la opción de lavado activo de sellos está disponible para aumentar la vida útil de los sellos de la bomba.

Una válvula de selección de disolventes permite formar mezclas binarias (isocráticas o de gradiente) a partir de uno de los dos disolventes por canal. Los gradientes binarios se crean en la válvula de purga mediante mezclas a gran presión de disolventes de las bombas A y B. La válvula de purga permite cambiar el flujo mediante el control del software hacia los residuos para purgar disolventes nuevos a través de la cabeza de la bomba. Un sensor conectado a la válvula de purga sirve para monitorizar la presión del sistema.

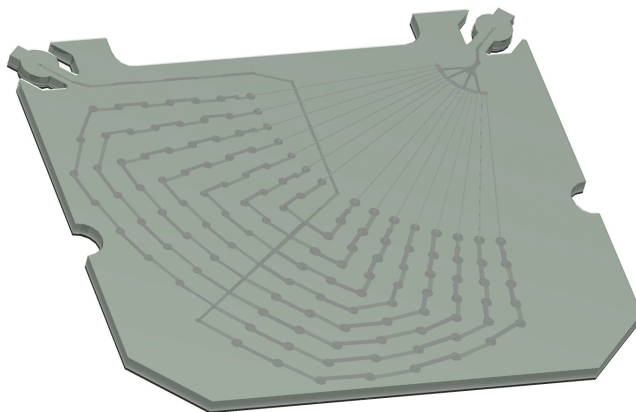


Figura 13 El mezclador Jet Weaver

El paso del flujo de la bomba se ha optimizado para obtener un retraso mínimo de gradientes e incorpora un sistema de mezcla innovador que emplea la tecnología de microfluidos. El dispositivo de mezcla, conocido como Jet Weaver, utiliza una red de canales microfluídicos de varias capas ($120\ \mu\text{m} \times 120\ \mu\text{m}$) para asegurarse de que el flujo se mezcle completamente. El Jet Weaver presenta dos volúmenes estándar: $35\ \mu\text{L}$ para aplicaciones de detección UV normales y $100\ \mu\text{L}$ para situaciones más complejas como el uso de ácido trifluoroacético en la detección UV. También está disponible un Jet Weaver de $380\ \mu\text{L}$ para obtener un ruido de línea base extremadamente bajo en estas aplicaciones complejas. Para la detección MS, a menudo es posible trabajar sin

el Jet Weaver y obtener el mezclado suficiente utilizando únicamente el volumen de base de 10 µl del paso de flujo de la bomba. Las aplicaciones típicas son métodos de alto rendimiento con gradientes rápidos en las columnas de 2,1 mm de alta resolución.

La Bomba binaria 1290 Infinity está preparada para admitir el montaje de raíles de válvula adicionales en los lados derecho o izquierdo de la bomba. En estos raíles se pueden agregar hasta dos válvulas adicionales de selección de 12 disolventes. De esta forma se permite utilizar un máximo de 26 disolventes de gradientes binarios para el desarrollo de métodos analíticos. Existe disponible un "accionamiento por grupos" especial que hace que las válvulas de selección de disolvente externas formen parte de la interfaz de usuario de la bomba y que permite realizar una selección sencilla de los disolventes por sus nombres.

La Bomba cuaternaria 1290 Infinity

En comparación, la Bomba cuaternaria 1290 Infinity sólo está equipada con una cabeza de la bomba y una válvula de gradiente de varios canales adicional (MCGV) para repartir los eluyentes según el gradiente programado. Según esté principio de mezclado a baja presión, los disolventes se encuentran en el mezclador de entrada y, por tanto, se mezclan antes en la cabeza de la bomba.

La cabeza de la bomba es la misma que en la Bomba binaria 1290 Infinity y, por tanto, presenta los mismos valores de rendimiento y detalles técnicos. También se puede equipar con un lavado de sellos activo para aumentar la vida útil de los sellos de la bomba cuando se utilicen soluciones tampón concentradas.

Un sensor de presión controla la presión durante el análisis antes de que los disolventes entren en la válvula multiusos, un selector de corriente de cuatro canales que permite las diferentes funcionalidades que se muestran en las figuras siguientes. La válvula multiusos está equipada con un filtro en línea, que siempre se utilizará durante un análisis, un mezclador Jet Weaver opcional de 380 µL, que garantiza la mejor mezcla posible de disolventes y se puede instalar fácilmente, un capilar de restricción opcional y una conexión al sistema de residuos.

Tabla 2 Funcionalidades de la válvula

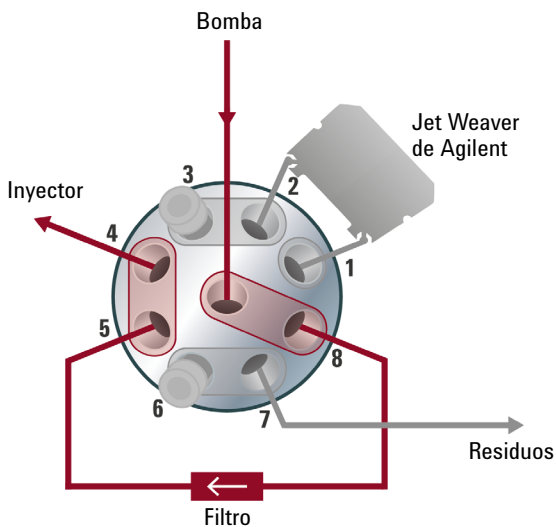


Figura 14 Aplicación estándar

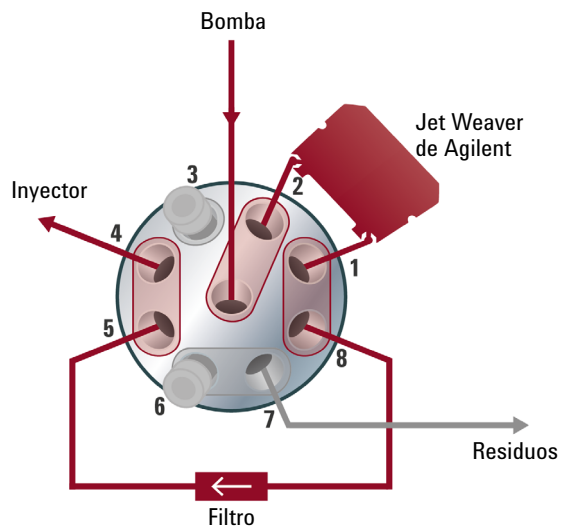


Figura 15 Configuración de volumen de mezcla extra

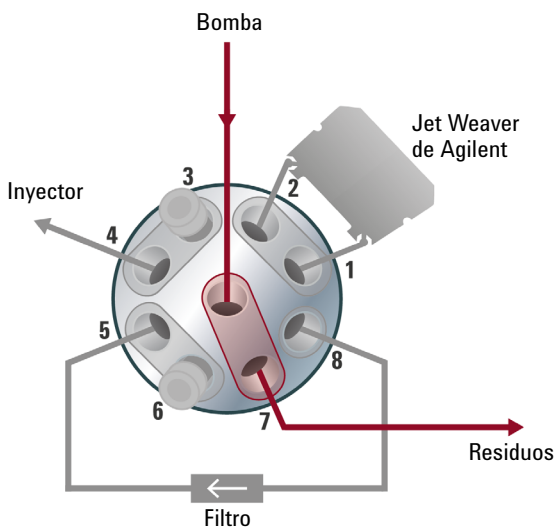


Figura 16 Función de purga automática

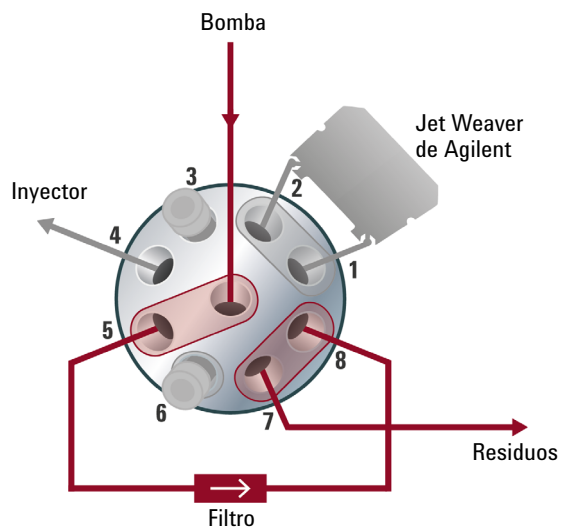


Figura 17 Limpieza posterior del filtro en línea

2 El sistema LC Agilent 1290 Infinity: descripción del producto

Componentes del sistema

La aplicación estándar (1) se utiliza para la mayoría de los análisis, mientras que la configuración de volumen de mezcla extra (2) se utiliza en cualquier tipo de aplicación de línea base crítica en la que el rendimiento de la mezcla y la línea base UV dependiente se pueden mejorar de forma significativa mediante el uso del mezclador Jet Weaver de Agilent. Posee una función de purga automática (3) instalada, así como la posibilidad de realizar la limpieza posterior del filtro en línea (4). De esta forma puede limpiar el filtro y aumentar su vida útil.

El Inyector automático Agilent 1290 Infinity

El Inyector automático Agilent 1290 Infinity ofrece el conocido diseño de flujo de Agilent con inyección de volumen variable y lo lleva a un nuevo nivel de rendimiento. Los nuevos materiales inertes en el asiento de la aguja y en el sello del dispositivo de medición ayudan a obtener un arrastre de contaminantes extremadamente bajo. El volumen hidráulico reducido del paso del flujo es adecuado para gradientes más rápidos. Además, la capacidad de utilizar inyecciones solapadas y la reducción automática del volumen de retardo (ADVR) contribuyen a obtener tiempos de ciclo más breves y suministros de gradiente aún más rápidos a la columna. El sistema extrae exactamente el volumen configurado de la solución de muestra sin residuos y logra una gran reproducibilidad en todo el rango desde un volumen de inyección submicrolitro hasta un máximo de 40 μl . El capilar de inyección estándar instalado permite inyecciones de 20 μl .

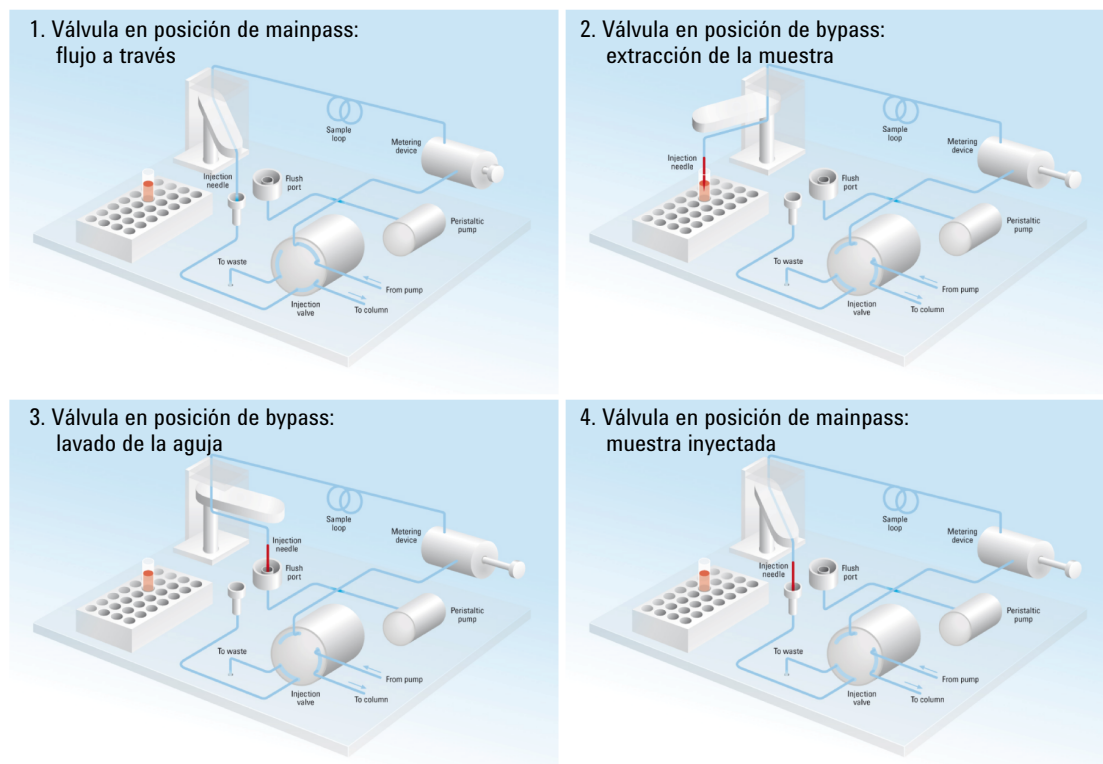


Figura 18 Esquema de los pasos de inyección en el Inyector automático 1290 Infinity

2 El sistema LC Agilent 1290 Infinity: descripción del producto

Componentes del sistema

Un módulo añadido opcional totalmente nuevo, el Cubo flexible, funciona a la perfección con el inyector automático para proporcionar capacidades adicionales. Con la incorporación del nuevo módulo de Cubo flexible, que se compone de una bomba de jeringa de 500 µl, una válvula de presión baja y dos válvulas de intercambio de presión alta, son posibles más opciones. Por ejemplo, el sistema de inyección de flujo a través se puede sustituir por un loop de inyección fijo mediante la bomba de jeringa y el sistema de válvulas del Cubo flexible con el fin de llenar el loop de muestra. La ventaja de esta configuración es que elimina el volumen de retardo del inyector automático y, por tanto, puede ser la opción preferida en algunas situaciones de alta productividad y gradiente rápido. La desventaja es que la flexibilidad de las inyecciones de volumen variable está desactivada y se desecha una parte de la muestra al limpiar el loop. Otras tareas, como la limpieza posterior automática del asiento de la aguja de inyección tras la inyección son posibles con el Cubo flexible, lo que otorga más confianza ya que se puede evitar el arrastre de contaminantes de compuestos difíciles o los bloqueos provocados por las muestras sucias.

El estante de muestras del inyector automático posee 10 posiciones fijas para los viales de 2 ml y dos bandejas extraíbles, que pueden ser idénticas o no, seleccionadas de:

- una bandeja para viales de 2 ml con 54 posiciones,
- una placa de microtitulación con 96 pocillos (configurable en varias alturas),
- una placa de microtitulación con 384 pocillos (configurable en varias alturas).

Si es necesario, el inyector automático se puede termostatar de 4 °C a 40 °C si se añade el módulo de control de la temperatura del inyector automático.

El Compartimento de columnas termostatzado Agilent 1290 Infinity

El Compartimento de columnas 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 automática 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 19](#) en la página 36 a la izquierda). El usuario puede intercambiar cabezas de las válvulas alternativas en el mecanismo de accionamiento para diferentes aplicaciones (consulte la [Figura 19](#) en la página 36 a la derecha). Tenga en cuenta la etiqueta RFID (identificación por radiofrecuencia) en 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.

2 El sistema LC Agilent 1290 Infinity: descripción del producto

Componentes del sistema

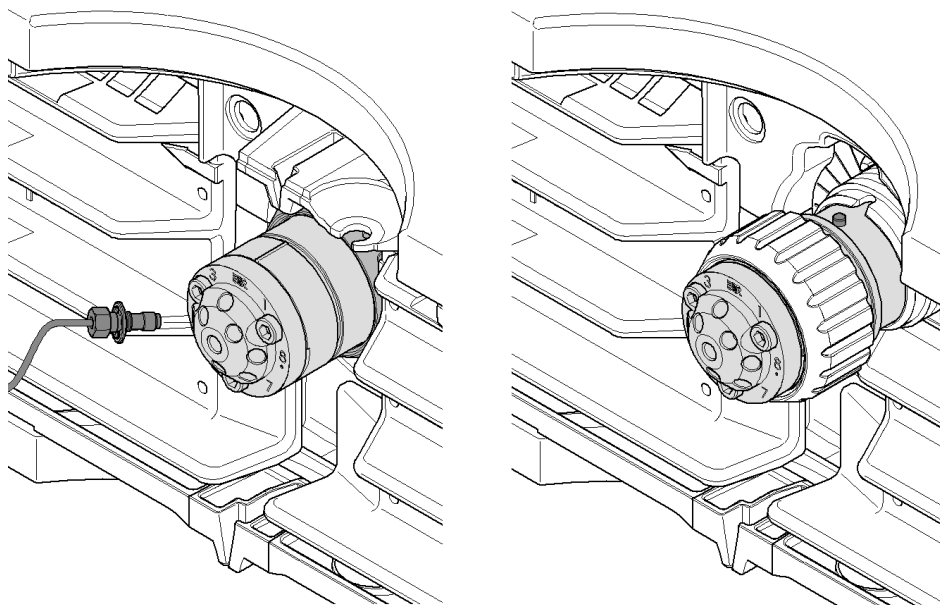


Figura 19 Válvula de cambio rápido en TCC

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).

El Detector de diodos 1290 Infinity

El Detector de diodos 1290 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.

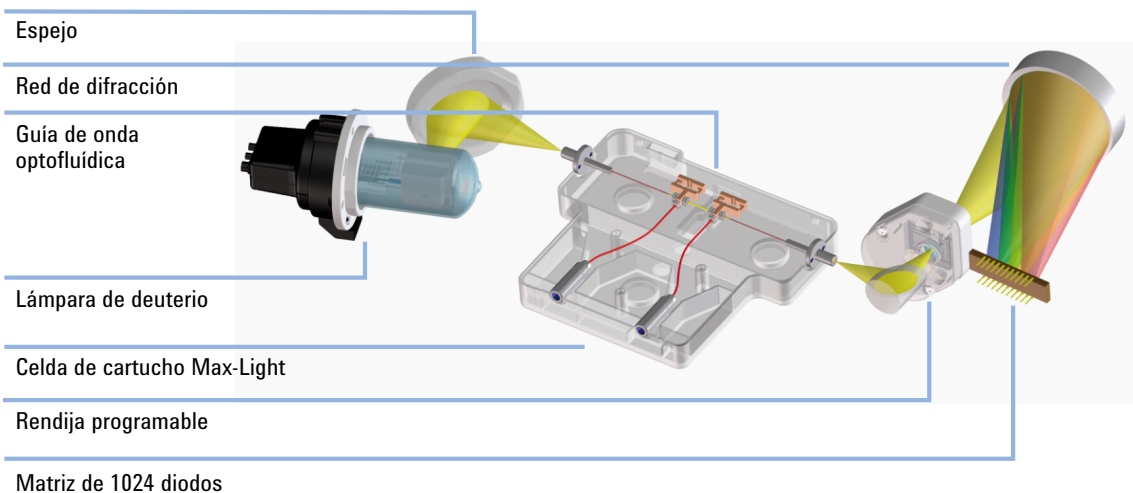


Figura 20 El paso de luz a través del Detector de diodos 1290 Infinity

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

2 El sistema LC Agilent 1290 Infinity: descripción del producto

Componentes del sistema

640 nm. Una matriz de 1024 diodos se encarga de la detección. La entrada al espectrograma se realiza mediante una rendija óptica programable que ofrece una resolución espectral de 1 a 8 nm. Esto se lleva a cabo normalmente en el centro del rango, pero se puede reducir a 1 nm para optimizarlo y obtener una resolución espectral alta (no se suele ser necesario en los espectros UV de fase líquida), o abrir hasta 8 nm para obtener una transmisión de luz máxima y un ruido mínimo en la señal.

Las señales cromatográficas se extraen de los datos de los diodos dentro del firmware del módulo. Se pueden definir hasta 8 señales individuales, cada una con una longitud de onda de la 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 160 Hz (160 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 160 Hz.

Para los laboratorios regulados, es importante que todos los parámetros de los métodos estén registrados. El DAD 1290 Infinity no solo 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.



3 Optimización del sistema LC Agilent 1290 Infinity

Volumen de retardo y volumen de extracolumna	40
Volumen de retardo	40
Volumen de extracolumna	41
Cómo configurar el volumen de retardo óptimo	42
Cómo conseguir volúmenes de inyección más elevados	52
Cómo conseguir un alto rendimiento	54
Cómo conseguir una resolución más elevada	57
Cómo conseguir una sensibilidad más elevada	60
Cómo conseguir un arrastre de contaminantes mínimo	69
Cómo evitar los bloqueos de columnas	71

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



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 separaciones de gradiente, este volumen provoca un retardo entre el cambio de la mezcla en la bomba y la llegada del 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 es indicado en términos de ajustes de mezcla en 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 volúmenes de columna pequeños y puede afectar significativamente a la transferabilidad de los métodos de gradiente. Por lo tanto, para las separaciones de gradiente rápidas es importante tener volúmenes de retardo pequeños, especialmente en columnas de diámetro estrecho (por ejemplo, de 2,1 mm de d.i.) como las que se suelen utilizar en la detección espectrométrica de masas.

El volumen de retardo de un sistema incluye el volumen en la bomba desde el punto de mezcla, las conexiones entre la bomba y el inyector automático, el volumen del paso de flujo a través del inyector automático y las conexiones entre éste y la columna.

Como ejemplo, en los métodos HPLC con material empaquetado de 5 μm se suelen utilizar velocidades de flujo de 1 ml/min en una columna de 4,6 mm de d.i. y aproximadamente 0,2 ml/min en una columna 2,1 mm de d.i. (misma velocidad lineal en la columna). En un sistema con un volumen de retardo típico de 1000 μl y utilizando una columna de 2,1 mm, se generaría un segmento isocrático “oculto” de 5 min mientras que en un sistema con 600 μl el volumen de retardo sería de 3 min. Estos volúmenes de retardo serían demasiado altos para tiempos de análisis de uno o dos minutos. Con empaquetados de subdos

um la velocidad de flujo óptima (a partir de la Curva de Van Deemter) es un poco más alta, por lo que la cromatografía rápida puede utilizar de tres a cinco veces estas velocidades de flujo que generarán 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. Esto se consigue con el sistema LC de Agilent 1290 Infinity debido al volumen de retardo bajo del paso de flujo de la bomba, al volumen bajo del mezclador Jet Weaver 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 debe minimizarse. Las columnas con diámetro más reducido requieren volúmenes extracolumna proporcionalmente más pequeños para limitar 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; y del volumen de la celda de flujo del detector. El volumen extracolumna se ha minimizado en el Sistema LC Agilent 1290 Infinity mediante los tubos de diámetro estrecho (0,12 mm de d.i.), los intercambiadores de calor de volumen bajo en el compartimento de la columna y la celda de cartucho Max-Light en el detector.

Cómo configurar el volumen de retardo óptimo

La [Tabla 3](#) en la página 42 y la [Tabla 4](#) en la página 43 muestran los volúmenes de componente que contribuyen al volumen de retardo del sistema en el sistema LC Agilent 1290 Infinity. En la configuración estándar con la Bomba binaria Agilent 1290 Infinity, el mezclador Jet Weaver, el Inyector automático Agilent 1290 Infinity y el Compartimento de columnas termostatzado, el volumen de retardo del sistema es de aproximadamente 125 μl . Este volumen de retardo estándar es adecuado para la mayoría de las aplicaciones. Por ejemplo, una separación rápida en una columna de 50 mm x 2,1 mm rellena con partículas inferiores a 2 μm a una velocidad de flujo moderada de 0,6 ml/min dará lugar a un tiempo de retardo típico de gradiente de aproximadamente 0,2 min, que por lo general es aceptable con tiempos de gradiente de dos a tres minutos (consulte [Tabla 6](#) en la página 44). Resulta útil a menudo considerar la velocidad de flujo en términos de volúmenes de columna y se puede ver en la [Tabla 7](#) en la página 45 que con esta columna a 0,6 ml/min fluyen a través del sistema aproximadamente 6 volúmenes de columna por minuto y que el volumen de retardo es de aproximadamente 1,2 veces el volumen de la columna.

Una configuración con la Bomba cuaternaria Agilent 1290 Infinity, el Inyector automático 1290 Infinity y el Compartimento termostatzado de columna presenta un volumen de retardo de 430 μL , lo que da lugar a un tiempo de retardo de 0,7 min. Este es el límite de aceptación de los tiempos de gradiente de 3 min.

Tabla 3 Volúmenes de retardo de los módulos LC 1290 Infinity

Componentes	Volumen de retardo (μl)
Bomba binaria	10
Mezclador Jet Weaver (estándar)	35
Bomba binaria + Jet Weaver	45
Bomba cuaternaria	350
Bomba cuaternaria + Jet Weaver V380	500
Inyector automático (loop fijado de 5 μl)	5
Inyector automático (volumen variable, estándar)	80

Tabla 3 Volúmenes de retardo de los módulos LC 1290 Infinity

Componentes	Volumen de retardo (µl)
Intercambiador de calor de dispersión baja del compartimento de columna	1.6
Tubos de conexión, 0,12 mm de d.i., por 100 mm	1.1

Tabla 4 Volúmenes de retardo de las configuraciones del sistema LC binario 1290 Infinity

Configuraciones del sistema ¹	Volumen de retardo (µl)
Bomba binaria + Inyector automático de loop fijado (MS solamente)	20
Bomba binaria + Jet Weaver + Loop fijado	55
Bomba binaria + Inyector automático estándar (MS solamente)	90
Bomba binaria + Jet Weaver + Inyector automático	125

¹ 5 µl agregados para permitir conexiones en las configuraciones del sistema

Tabla 5 Volúmenes de retardo de las configuraciones del sistema LC cuaternario 1290 Infinity

Configuraciones del sistema ¹	Volumen de retardo (µl)
Bomba cuaternaria + Inyector automático de loop fijado (MS solamente)	360
Bomba cuaternaria + Inyector automático estándar (MS solamente)	430
Bomba cuaternaria + Jet Weaver V380 + Loop fijado	510
Bomba cuaternaria + Jet Weaver V380 + Inyector automático	580

¹ 5 µl agregados para permitir conexiones en las configuraciones del sistema

3 Optimización del sistema LC Agilent 1290 Infinity

Cómo configurar el volumen de retardo óptimo

Tabla 6 Tiempos de retardo del sistema para que el gradiente alcance la cabeza de la columna

Velocidad de flujo (ml/min)	Volumen de retardo del sistema (microlitros)							
	20	55	90	125	360	395	430	465
	Tiempos de retardo (minutos)							
0.2	0.10	0.28	0.43	0.60	1.80	2.15	2.55	2.90
0.4	0.05	0.14	0.21	0.30	0.90	1.08	1.28	1.45
0.6	0.03	0.09	0.14	0.20	0.60	0.72	0.85	0.97
0.8	0.03	0.07	0.11	0.15	0.45	0.54	0.64	0.73
1.0	0.02	0.06	0.09	0.12	0.36	0.43	0.51	0.58
1.5	0.01	0.04	0.06	0.08	0.24	0.29	0.34	0.39
2.0	0.01	0.03	0.04	0.06	0.18	0.22	0.26	0.29
3.0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.12	0.14	0.17	0.19
4.0	0.01	0.01	0.02	0.03	0.09	0.11	0.13	0.15
5.0	0.00	0.01	0.02	0.02	0.07	0.09	0.10	0.12

Tabla 7 Volumen aproximado del líquido en dimensiones de columna típicas asumiendo porosidad de 0,6

Diámetro de la columna (mm)	Longitud de la columna (mm)				
	30	50	100	150	250
	Volumen de la columna - Fase líquida (microlitros)				
2.1	62	104	208	312	520
3.0	127	212	424	636	1060
4.0	226	377	754	1131	1885
4.6	299	499	997	1496	2493

Para gradientes muy rápidos de más de 0,5 min, que solo se pueden lograr con el sistema LC binario Agilent 1290 Infinity, el volumen de retardo del sistema se puede reducir fácilmente sin cambiar la configuración física del sistema. Este cambio se alcanza variando el comportamiento del inyector automático.

El volumen de retardo de 80 µl del Inyector automático Agilent 1290 Infinity se produce por el paso de flujo de la válvula de inyección a través del dispositivo de medida, la aguja, el asiento de la aguja y los capilares de conexión de vuelta a la válvula de inyección (consulte [Figura 18](#) en la página 33). Para realizar una inyección, la válvula cambia de la posición de mainpass a la posición de bypass de forma que el dispositivo de medida pueda suministrar la muestra al capilar de la aguja. La inyección se realiza cuando la válvula regresa a la posición de mainpass y la muestra se evacua en la columna. La válvula permanece en esta posición durante el análisis de forma que el inyector automático evacue continuamente y, por lo tanto, el gradiente fluya a través de este volumen de retardo para alcanzar la columna. Este proceso se puede eliminar si se cambia la válvula de inyección de la posición de mainpass a la posición de bypass tras haber realizado la inyección y haber evacuado la muestra inyectada en la columna. En la práctica, esta operación se puede realizar pocos segundos después de la inyección y se activa al seleccionar la función "Reducción automática del volumen de retardo" (ADVR) en el menú de configuración del inyector automático. El factor de evacuación (normalmente, 5 veces el volumen de inyección) garantiza que transcurra el tiempo suficiente para evacuar la muestra del inyector antes de cambiar a la posición de bypass. Esto reduce eficazmente el volumen de retardo del sistema de 125 µl a 50 µl.

Cuando se utiliza la función ADVR, se ha de tener presente que el gradiente ya se ha iniciado en la bomba en el momento de la inyección. Cabría preguntarse si el gradiente ya ha alcanzado el inyector automático, en cuyo caso daría lugar a un pequeño paso en el gradiente. Esto ocurre cuando el volumen de retardo es inferior al volumen de evacuación y no plantea necesariamente un problema, pero es un factor que debe considerarse en una transferencia del método. Con un factor de evacuación de 5 y un volumen de inyección de 10 μl , el inyector automático permitirá el paso de 50 μl antes de cambiar a la posición de bypass, con un volumen de retardo de 50 μl , lo que significa que el gradiente acaba de alcanzar la válvula de inyección. Los volúmenes de inyección más pequeños no tendrán ningún efecto. Sin embargo, en el caso de volúmenes de inyección más grandes, se producirá un pequeño paso en el gradiente. La velocidad de flujo utilizada también afectará a la decisión de utilizar o no la función ADVR. A 0,2 ml/min, el tiempo de retardo que se ahorra es de 21 segundos, mientras que a 1,0 ml/min, es de 4 segundos.

Probablemente la función ADVR no es adecuada en el caso de aplicaciones con compuestos conocidos, ya que generan problemas de arrastre de contaminantes.

Para minimizar la dispersión de picos y el volumen de retardo en el compartimento termostatzado de columna, ha de instalarse el intercambiador de calor de dispersión baja. El intercambiador de calor de dispersión baja se incluye en los kit de capilar recomendados para las aplicaciones de dispersión baja. El kit de capilar común incluye también capilares estrechos de 0,12 mm de d.i. Se suministran los intercambiadores de calor incorporados de 3 μl y 6 μl para garantizar la retrocompatibilidad y sólo deberían utilizarse en caso de que se necesite ejecutar un método convencional, aunque en este caso también sería posible utilizar el intercambiador de dispersión baja.

Para mantener la resolución en el Detector de diodos Agilent 1290 Infinity, la celda de cartucho Max-Light posee un volumen de dispersión bajo (σ volumen 1,0 μl) y no se necesita ninguna optimización de volumen adicional. Cuando se utilice la celda de sensibilidad alta Agilent Max-Light alternativa para obtener un sensibilidad más elevada, el volumen de la celda se optimiza para su utilización con columnas de diámetro interno de 3 mm y 4,6 mm.

Para operar con la bomba se recomienda fijar el disolvente correcto en la pantalla de configuración de la bomba. Incluso a pesar de que el control inteligente ajusta automáticamente la onda de presión a un mínimo, la compresibilidad del disolvente puede influir en el mantenimiento de la velocidad de flujo absolutamente correcta a alta presión. Esto garantiza la aplicación en todo momento de valores de compresibilidad correctos para las fases

móviles utilizadas. Las funciones de calibración están disponibles para las Bombas binarias y cuaternarias Agilent 1290 Infinity.

En la Bomba binaria 1290 Infinity, el volumen de retardo físico de la bomba depende principalmente de la utilización del mezclador Jet Weaver. Para la detección UV, debería utilizarse siempre el Jet Weaver. Sin embargo, para la detección espectrométrica de masas, el usuario puede decidir si ignorar el Jet Weaver mediante la retirada de 35 µl del volumen de retardo. Esto sólo tiene sentido para la operación de gradiente ultrarrápida (menos de 0,5 min) o para su utilización con columnas de volumen muy pequeñas. Consulte la [Tabla 6](#) en la página 44 para obtener información del efecto sobre el tiempo de retardo en el sistema. Si se ignora el Jet Weaver, los tubos de conexión al inyector automático se dirigirán directamente desde la válvula de purga. Asegúrese de que el Jet Weaver se ha lavado con disolvente sin tampones u otros aditivos antes de desconectarlo.

En ocasiones puede resultar aconsejable aumentar el volumen de retardo en la bomba. Especialmente cuando se utiliza la detección UV y se ha agregado un compuesto de absorción UV fuerte a la fase móvil. En estos casos, es posible que se acentúe cualquier ruido de la bomba; la utilización de ácido trifluoroacético (TFA) en el análisis de proteínas y péptidos constituye el ejemplo más común. El efecto puede mitigarse aumentando el volumen del mezclador. El mezclador Jet Weaver tiene dos volúmenes alternativos en la misma unidad. El cambio del volumen bajo, 35 µl, al volumen alto, 100 µl, se realiza desinstalándolo, dándole la vuelta y volviendo a instalarlo. El volumen de mezcla (y por tanto el volumen de retardo) aumenta 65 µl y mejora el funcionamiento de la línea base con aditivos como el TFA. La configuración del Jet Weaver se registra automáticamente mediante una etiqueta RFID. Para aplicaciones complejas con el ruido de línea base UV más bajo posible, está disponible un mezclador Jet Weaver de 380 µL, que se instala de forma análoga al mezclador Jet Weaver estándar.

El procedimiento para sustituir un Jet Weaver en la Bomba binaria 1290 Infinity se ilustra en [“Sustitución del Jet Weaver en la Bomba binaria 1290 Infinity”](#) en la página 49.

Debido a la configuración y al principio de mezcla diferente de la Bomba cuaternaria Agilent 1290 Infinity, el volumen de retardo físico es mucho mayor y en las aplicaciones estándares no es necesario un mezclador Jet Weaver adicional. Aún así, es posible instalar un mezclador Jet Weaver opcional de 380 µL para las aplicaciones críticas de línea base, como las aplicaciones de TFA. El mezclador Jet Weaver opcional posee una carcasa diferente, que se adapta al diseño de la Bomba cuaternaria 1290 Infinity.

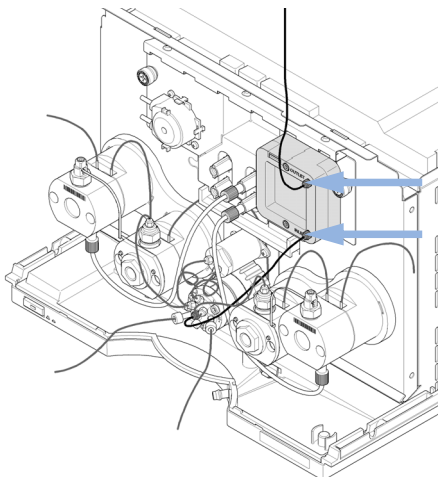
3 Optimización del sistema LC Agilent 1290 Infinity

Cómo configurar el volumen de retardo óptimo

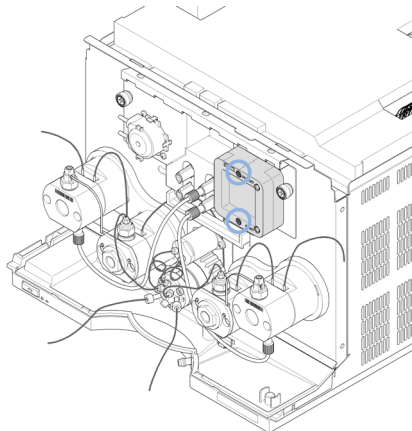
El procedimiento para instalar un Jet Weaver en la Bomba cuaternaria 1290 Infinity se ilustra en “[Instalación del Jet Weaver V380 en la Bomba cuaternaria 1290 Infinity](#)” en la página 50.

Sustitución del Jet Weaver en la Bomba binaria 1290 Infinity

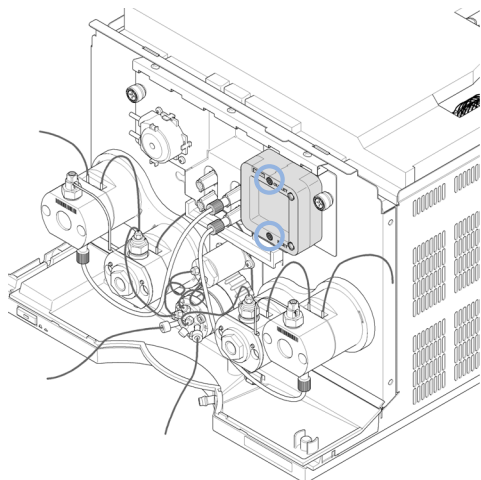
1 Extraiga las conexiones de los capilares del Jet Weaver.



2 Extraiga los tornillos hexagonales que fijan el Jet Weaver a la carcasa de la bomba.



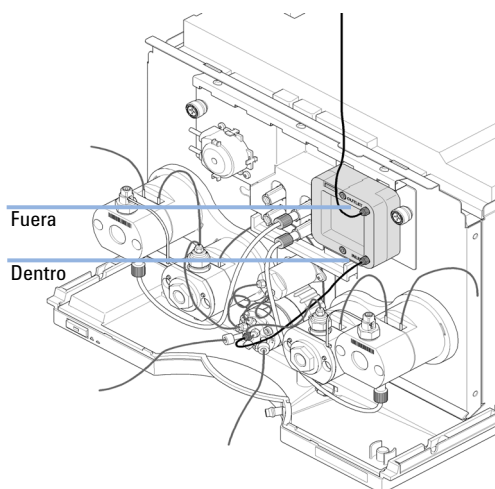
3 Instale el nuevo Jet Weaver.



NOTA

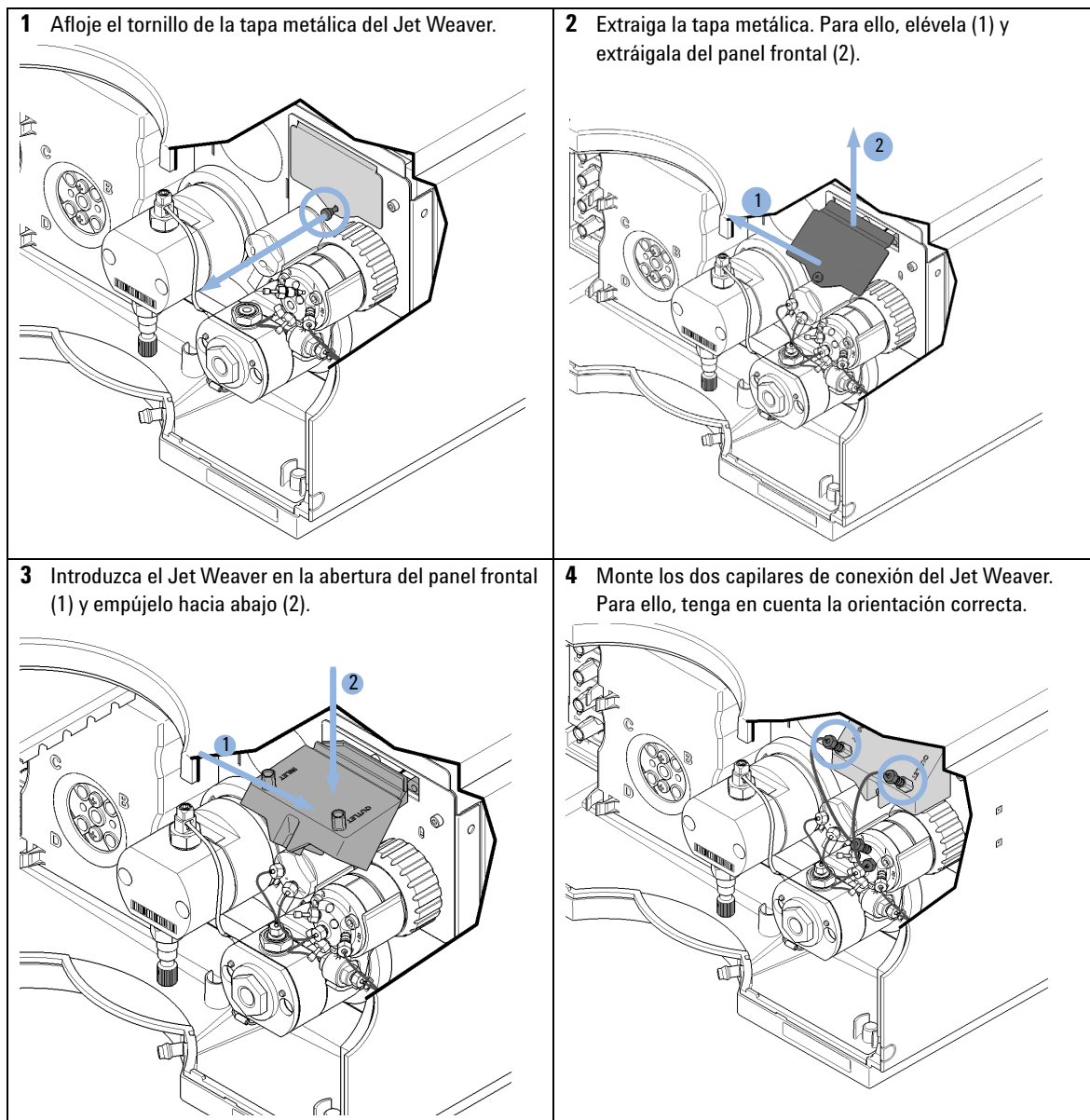
El Jet Weaver tiene una parte frontal y otra posterior con volúmenes internos diferentes (35 / 100 μ l) que se optimizan para obtener un volumen de retardo bajo o el mejor rendimiento de mezcla.

4 Vuelva a instalar las conexiones de los capilares.



La entrada situada en la parte inferior del Jet Weaver está conectada al puerto central de la válvula de la bomba a través de un capilar (longitud 300 mm, 0,17 mm de d.i.). La salida situada en la parte superior está conectada a un inyector automático.

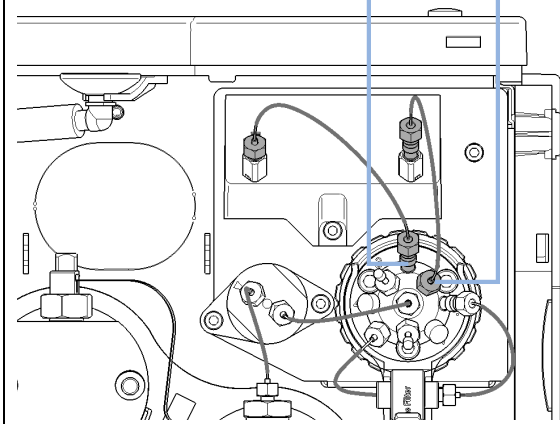
Instalación del Jet Weaver V380 en la Bomba cuaternaria 1290 Infinity



- 5 Conecte el capilar de entrada entre el Jet Weaver y el puerto 2 de la válvula multiuso. Conecte el capilar de salida al puerto 1.

Puerto 1

Puerto 2



Cómo conseguir volúmenes de inyección más elevados

En la configuración estándar del inyector automático Agilent 1290 Infinity se incluye un loop de muestra de volumen variable para hasta 20 µl inyecciones. El dispositivo de medición puede inyectar un volumen máximo de 40 µl y el cartucho de loop de muestra puede cambiarse para este fin (consulte el *manual del inyector automático 1290 Infinity* para obtener información). El volumen de retardo del sistema aumentará por lo tanto debido al inyector automático.

Siempre que un método disminuya de una columna grande a una más pequeña, es importante que la conversión del método acepte la reducción del volumen de inyección en relación al volumen de la columna para mantener el rendimiento del método. De este modo, el volumen de la inyección se mantendrá al mismo porcentaje con respecto a la columna. Esto es particularmente importante si el disolvente de la inyección es más fuerte (más eluotrópico) que la fase móvil de inicio y cualquier aumento afectará la separación, especialmente de los primeros picos (factor de retención bajo). En algunos casos es la causa de la distorsión de los picos y la norma general es mantener el mismo disolvente de inyección o aplicar uno más suave que la composición del gradiente de inicio. Esto tiene que ver con si, o en qué medida, puede aumentarse el volumen de inyección y el usuario debería buscar señales de aumento de dispersión (picos más anchos o más torcidos y una resolución de pico reducida) con el fin de aumentar el tamaño de la inyección. Si se realiza una inyección en un disolvente débil, el volumen podrá probablemente aumentar más ya que el efecto será la concentración del analito en la cabeza de la columna al inicio del gradiente. Por el contrario, si la inyección se encuentra en un disolvente más fuerte que la fase móvil de inicio, el volumen de inyección aumentado esparcirá la banda del analito por la columna del gradiente, dando como resultado la dispersión de los picos y la pérdida de la resolución.

Puede que la consideración principal para determinar el volumen de inyección sea el diámetro de la columna, puesto que esto tendrá un gran impacto en la dispersión de los picos. La altura de los picos puede ser superior en una columna estrecha que con una inyección más larga en una columna más ancha, ya que hay menos dispersión de picos. Con columnas de d.i. de 2,1 mm los volúmenes habituales de inyección podrían ir de 5 a 10 µl pero depende bastante, como se comentaba anteriormente, de la química del analito y de la fase móvil. Una guía aproximada para el volumen de inyección máximo puede

obtenerse mirando el volumen de la columna (consulte) – en volúmenes de inyección de separación en gradiente de aproximadamente 5 % del volumen de la columna podría alcanzarse al mismo tiempo que se mantiene una buena resolución y la dispersión de los picos.

Una forma de lograr mayores inyecciones es utilizar una columna de retención seleccionada mediante una válvula de intercambio para capturar y concentrar la inyección antes de intercambiarla, por ejemplo, inyectándola, en una columna analítica, consulte. La válvula puede colocarse según sea necesario en el compartimento termostatzado de columna.

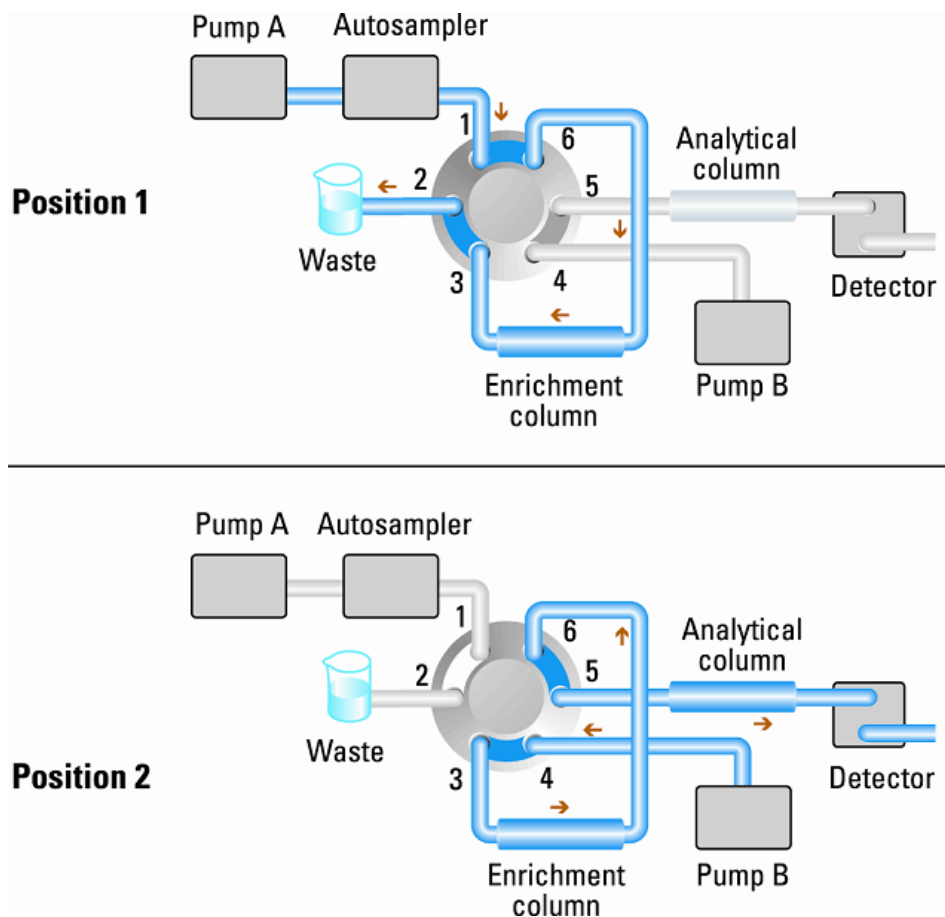


Figura 21 Enriquecimiento de muestras

Cómo conseguir un alto rendimiento

Algunos laboratorios operan en entornos de alta productividad (HT) en los que la carga requiere la aplicación de secuencias de cientos o incluso miles de inyecciones para completar un trabajo. En estos casos, es muy conveniente minimizar los ciclos de tiempo, ya que ahorrar incluso unos pocos segundos por inyección reducirá el tiempo necesario para completar el trabajo en una cantidad significativa y útil. Los pasos fundamentales para obtener tiempos de ciclo rápidos y operaciones de alta productividad son:

- Utilizar separaciones rápidas
- Solapar inyecciones
- Minimizar el tiempo de equilibrado
- Regeneración alternada de la columna

El primer paso para obtener una operación de alta productividad es asegurarse de que los métodos utilizados tienen tiempos de ciclo cortos, es decir, que son métodos de cromatografía rápida. El uso de columnas cortas con empaquetado de tamaño de partícula de 1,8 µm es ideal para este propósito debido a la alta eficiencia disponible en una columna corta. Si los métodos implican separación isocrática, se conseguirán los tiempos de ciclo más rápidos, al no ser necesario equilibrar las columnas entre análisis. Sin embargo, lo más habitual es emplear métodos de gradiente debido al rango o complejidad de las muestras. Al desarrollar el método el rango de gradiente debe mantenerse al mínimo requerido para obtener la separación. En muchos sistemas de “acceso abierto” se utilizan gradientes con disolventes orgánicos del 5 % al 95 % para obtener la mayor flexibilidad a la hora de tratar con un rango de compuestos desconocidos. En situaciones de alta productividad debe considerarse si será suficiente un rango más corto sobre la base de que se reduce el rango esperado de compuestos para análisis y esto no sólo permitirá reducir los tiempos de análisis sino también los tiempos de equilibrado entre operaciones.

El tiempo de ciclo se compone de varios elementos: Tiempo de ciclo = inyección + separación + equilibrado + procesamiento de datos.

Con un número grande de muestras que procesar, incluso una pequeña reducción del tiempo de ciclo puede dar lugar a una gran reducción del tiempo necesario para completar el trabajo. Por esta razón el procesamiento de datos

puede realizarse fuera de línea de forma que el sistema se centre en analizar las muestras y en recopilar los datos.

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. Una parte significativa del tiempo de inyección es consumida por los movimientos de la aguja desde el vial hasta el puerto de lavado. 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 ChemStation. Se puede indicar al inyector automático que cambie el flujo a través del inyector automático 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. Para compuestos pegajosos se recomienda seguir este procedimiento durante el equilibrado de columna, cuando el inyector automático haya observado las condiciones de partida del siguiente análisis de gradiente.

El paso del equilibrado de columna puede consumir una parte significativa del tiempo de ciclo. Por regla general, la columna necesita lavarse con tres a cinco veces el volumen de columna antes de quedar estabilizada para la siguiente inyección y este proceso puede suponer el 50 % o más del tiempo de separación en algunas aplicaciones. Se trata de un proceso esencial, pero puede excluirse del tiempo de ciclo si se utiliza la regeneración alternada automática de la columna. Para ello, se necesita una cabeza de válvula de dos posiciones y diez puertos, 1200 bares, en el compartimento de columna; una segunda columna analítica, idéntica a la primera; y una segunda bomba. Mientras una columna se utiliza para el análisis de separación, la otra se lava con el composición inicial del gradiente de la fase móvil; para iniciar la siguiente inyección la columna recién reequilibrada se cambia al paso de flujo analítico. Las dos columnas alternan de esta forma durante la secuencia completa de inyecciones. La segunda bomba sólo es necesaria para lavar una mezcla isocrática a través de la columna, por lo que puede utilizarse una bomba más sencilla que las bombas 1290 Infinity. Por ejemplo, una bomba isocrática 1200 Series sería suficiente para realizar la tarea. La configuración se ilustra en [Figura 22](#) en la página 56.

3 Optimización del sistema LC Agilent 1290 Infinity Cómo conseguir un alto rendimiento

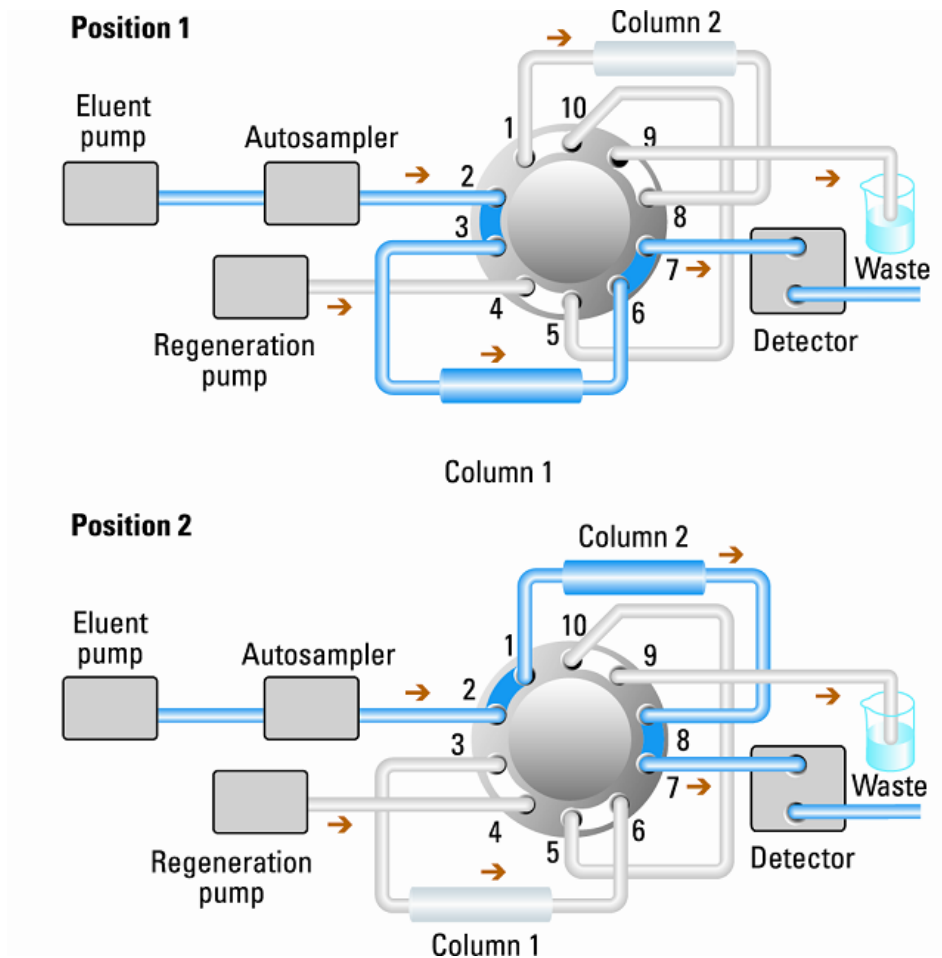


Figura 22 Regeneración alternada de la columna

Cómo conseguir una resolución más elevada

Una resolución mayor en una separación mejorará los análisis de los datos cualitativos y cuantitativos, permitirá la separación de más picos u ofrecerá un mayor ámbito para acelerar la separación. En esta sección analiza cómo puede aumentarse la resolución examinando los dos puntos siguientes:

- Optimizar la selectividad
- Embalaje de partículas de menor tamaño
- Columnas más largas
- Gradientes poco profundos, flujo más rápido
- Volumen de columna extra mínimo
- Optimizar el disolvente y el volumen de inyección
- Recopilación de datos suficientemente rápida

La ecuación de resolución describe la resolución entre dos picos:

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

donde

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

El término que tiene el efecto más importante en la resolución es la selectividad, α , y en la práctica la variación de este término supone el cambio del tipo de la fase estacionaria (C18, C8, fenil, nitrilo, etc.), la fase móvil y la temperatura para maximizar las diferencias de selectividad entre los solutos que se van a separar. Este es un trabajo importante que se hace mejor con un sistema de desarrollo de método automatizado que permita la evaluación de una amplia gama de condiciones en diferentes columnas y fases móviles en un protocolo de reconocimiento ordenado. Esta sección considera cómo conseguir una resolución más alta con cualquier fase estacionaria y móvil elegida. Si se

ha utilizado un sistema de desarrollo de método automatizado en la decisión sobre las fases, es probable que se utilicen columnas cortas para un análisis rápido en cada paso del reconocimiento.

La ecuación de la resolución muestra que el siguiente término más importante es el recuento de placa o eficacia, N , y que éste puede optimizarse de distintas maneras. N es inversamente proporcional al tamaño de la partícula y directamente proporcional a la longitud de una columna y por lo tanto, una partícula de menor tamaño y una columna más larga dará un número de placa superior. La presión se eleva con el cuadrado inverso del tamaño de la partícula y proporcionalmente con la longitud de la columna. Éste es el motivo de que el sistema LC 1290 Infinity esté diseñado para trabajar a 1200 bar de manera que pueda ejecutar partículas de subdosmicrones y la longitud de la columna pueda aumentarse hasta 100 mm ó 150 mm. Hay incluso ejemplos de columnas de 100 mm y 150 mm unidas para tener una longitud de 250 mm. La resolución aumenta con la raíz cuadrada de N por lo que duplicar la longitud de la columna aumentará la resolución en un factor de 1,4. Lo que se puede conseguir depende de la viscosidad de la fase móvil ya que esto está directamente relacionado con la presión. Las mezclas de metanol generarán más retropresión que las mezclas de acetonitrilo. El acetonitrilo es preferible a menudo porque las formas de los picos son mejores y más estrechas sumado a la viscosidad más baja aunque el metanol generalmente permite una selectividad mejor (definitivamente para moléculas pequeñas inferiores a 500 Da). La viscosidad puede reducirse incrementando la temperatura pero debería recordarse que esto puede cambiar la selectividad de la separación. El experimento mostrará si esto supone un incremento o descenso de la selectividad. A medida que aumenta el flujo y la presión, debería tenerse en cuenta que el calor por fricción del interior de la columna aumentará y que ello puede causar una mayor dispersión y posiblemente un pequeño cambio en la selectividad; ambos podrían verse como una reducción de la resolución. El último caso podría compensarse reduciendo la temperatura del termostato en varios grados y de nuevo el experimento revelará la respuesta.

La curva van Deemter muestra que la velocidad de flujo óptima a través de una columna STM es superior para las partículas más grandes y es bastante plana a medida que aumenta la velocidad de flujo. Generalmente, las velocidades casi óptimas para las columnas STM son: 2 ml/min para columnas de 4,6 mm de d.i.; y 0,4 ml/min para columnas de 2,1 mm de d.i.

En separaciones isocráticas, aumentar el factor de retención, k , da como resultado una mejor resolución porque el soluto se retiene durante más tiempo. En

separaciones de gradientes, la retención se describe por k^* en la ecuación siguiente:

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

donde:

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

Esto muestra que k y de ahí la resolución puede aumentarse teniendo un gradiente menos profundo (el cambio de 2 hasta 5 %/min es una guía), una velocidad de flujo más alta y una columna de volumen más baja. Esta ecuación también muestra cómo acelerar un gradiente existente; si se duplica el flujo pero el tiempo del gradiente se divide por la mitad, k^* permanece constante y la separación parece igual pero se produce en la mitad de tiempo. Una investigación publicada recientemente ha demostrado cómo una columna STM más corta (a temperaturas por encima de 40 °C) pueden generar una capacidad de picos superior que una columna STM más larga debido a un funcionamiento más rápido. (Consulte *Petersson et al., J.Sep.Sci, 31, 2346-2357, 2008, Maximizing peak capacity and separation speed in liquid chromatography*).

Cualquier reducción en el volumen de la columna extra reducirá la dispersión y dará una resolución mejor. Esto ya se ha optimizado en el sistema LC 1290 Infinity con capilares de diámetro más estrecho (0,12 mm de d.i.) (compruebe que se utiliza la longitud más corta entre la columna y el detector) y la celda de flujo de portador Max-light.

Finalmente, cualquier ganancia en la resolución deberá preservarse mediante una recopilación de datos que sea lo suficientemente rápida para crear un perfil preciso de los picos estrechos.

Cómo conseguir una sensibilidad más elevada

Cómo conseguir una mayor sensibilidad

La sensibilidad de un método de separación está relacionado con la elección de fases estáticas y móviles como buena separación con picos estrechos y se busca una línea base estable con un ruido mínimo. La elección de la configuración del instrumento tendrá una consecuencia y la configuración del detector será un gran impacto. Esta sección analiza en qué medida la sensibilidad se ve afectada por:

- Volumen del mezclador de la bomba
- Columnas más estrechas
- Celdas de flujo del detector
- Parámetros del detector

Además, el análisis de los parámetros del detector también hace referencia a los temas relacionados de la selectividad y la linealidad.

Volumen del mezclador de la bomba

Para lograr un menor ruido de línea base con detección de UV, se recomienda la configuración estándar del volumen de retardo con el Jet Weaver 35 µl para el módulo de bomba 1290 Infinity. Esto es aplicable para casi todas las aplicaciones pero si se utiliza TFA en la fase móvil, o en otras situaciones que requieran más mezcla, debería utilizarse la sección de mayor volumen del mezclador Jet Weaver para minimizar el ruido de mezcla.

Columnas

La sensibilidad se especifica como una relación señal/ruido y de ahí la necesidad de ampliar la altura de los picos y minimizar el ruido de la línea base. Toda reducción en la dispersión de picos ayudará a mantener la altura de los mismos y el volumen de columna extra debería reducirse mediante capilares de conexión cortos, de diámetro interno reducido y conexiones correctamente instaladas. El uso de columnas de diámetro inferior debería dar como resultado una mayor altura de picos y es, por tanto, ideal para aplicaciones con muestras limitadas. Si la misma cantidad de muestra puede inyectarse en una

columna de d.i. menor, la dilución debida al diámetro de la columna será menor y la sensibilidad aumentará. Por ejemplo, si se disminuye el d.i. de la columna de 4,6 mm a 2,1 mm se obtendrá un aumento teórico de la altura de los picos de 4,7 veces debido a la disminución de la dilución de la columna. En el caso de detectores de espectrometría de masas, las velocidades de flujo inferiores de columnas estrechas darán como resultado una mayor eficacia de la ionización y, por tanto, una mayor sensibilidad.

Cómo conseguir una sensibilidad más elevada para el detector

El detector dispone de varios parámetros que se utilizan para optimizar su rendimiento. Los siguientes apartados describen cómo los parámetros del detector afectan 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, a la selectividad y a la linealidad.
- La anchura de rendija afecta a la sensibilidad, a la resolución espectral y a la linealidad.
- La anchura de pico afecta a la sensibilidad y a la resolución.

Celda de flujo

La celda de flujo de cartucho Max-Light tiene una longitud de paso estándar de 10 mm y está optimizada para un volumen y una dispersión mínimos (volumen σ de 1,0 μL). Tiene una transmisión de luz elevada que reduce el ruido generado por las guías de onda optofluídicas. Puede utilizarse con una amplia variedad de columnas analíticas, desde columnas cortas de diámetro estrecho a columnas largas estándar (4,6 mm). Generalmente, el volumen de dispersión de los picos (calculado a partir de la anchura de pico x la velocidad de flujo) debería ser superior a aproximadamente 2 μL en el caso de esta celda (por ejemplo, 0,02 min x 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ = 4 μL).

La celda de sensibilidad elevada Max-Light tiene una longitud de paso de 60 mm, con lo que se genera un aumento de entre tres y cinco veces de los valores de señal/ruido en función de las condiciones de la aplicación. El volumen de dispersión se incrementa fraccionadamente en comparación con la celda estándar.

Longitud de onda y anchura de banda

El detector mide simultáneamente la absorbancia a longitudes de onda desde 190 nm a 640 nm. Para ello, utiliza la detección de diodos. Una lámpara UV proporciona una buena sensibilidad en el rango completo de longitudes de onda. El detector de diodos (DAD) puede calcular y enviar simultáneamente al sistema de datos hasta ocho señales cromatográficas, así como los espectros de rango completo en todos los puntos de tiempo.

Una señal o un cromatograma UV es una representación de datos de la absorbancia con respecto al tiempo y se define por su longitud de onda y su anchura de banda.

- La longitud de onda indica el centro de la banda de detección.
- La anchura de banda define el rango de longitud de onda sobre el que se promedian los valores de absorbancia para generar el resultado en cada punto de tiempo.

Por ejemplo, una señal a una longitud de onda de 250 nm y con una anchura de banda de 16 nm tendrá una absorbancia media de 242 nm a 258 nm. Además, se puede definir una longitud de onda y una anchura de banda de referencia para cada señal. La absorbancia media de la anchura de banda de referencia, centrada en la longitud de onda de referencia, se restará de su valor equivalente en la longitud de onda de la señal para generar el cromatograma de salida.

Es posible seleccionar la anchura de banda y la longitud de onda de la señal de forma que estén optimizadas para:

- la detección universal de banda ancha,
- la detección selectiva de banda estrecha,
- la sensibilidad para un analito específico.

La detección universal o de banda ancha funciona con una anchura de banda amplia para detectar cualquier especie con absorbancia en dicho rango. Por ejemplo, para detectar todas las moléculas absorbentes entre 200 nm y 300 nm, fije una señal a 250 nm con una anchura de banda de 100 nm. La desventaja es que la sensibilidad no será óptima para ninguna de estas moléculas. La detección selectiva o de banda estrecha se utiliza con mucha más frecuencia. Se examina el espectro UV correspondiente a una molécula concreta y se selecciona un máximo de absorbancia adecuado. Si es posible, se debe evitar el rango en el que los disolventes absorban de forma acusada (por debajo de 220 nm en el caso del metanol y por debajo de 210 nm en el caso del acetonitrilo). Por ejemplo, en la [Figura 23](#) en la página 65, el ácido anísico tiene un máximo de absorbancia adecuado a 252 nm. Una anchura de banda estrecha de entre 4 nm y 12 nm ofrece generalmente una buena sensibilidad y es específica para la absorbancia en un rango estrecho.

En el caso de una molécula concreta, es posible optimizar la banda estrecha en términos de la sensibilidad. Al aumentar la anchura de banda, no solo se reduce la señal, sino también el ruido, con lo existirá un punto óptimo para alcanzar la mejor señal/ruido. Como guía aproximada, este punto óptimo suele

situarse cerca de la anchura de banda natural a media altura de la banda de absorción en el espectro UV. En el ejemplo del ácido anísico, es 30 nm.

La longitud de onda analítica suele fijarse generalmente en un máximo de la longitud de onda para aumentar la sensibilidad correspondiente a dicha molécula. El detector es lineal hasta 2 AU y más allá en el caso de muchas aplicaciones. Esto ofrece un rango lineal amplio para la concentración. En los análisis de concentración elevada, el rango de concentración lineal puede ampliarse si se fija una longitud de onda con una baja absorbancia como un mínimo de la longitud de onda o se utiliza una anchura de banda más amplia, lo que generalmente incluye valores de absorbancia más bajos. La utilización de mínimos y máximos de la longitud de onda para la cuantificación se remonta a los detectores UV convencionales, los cuales necesitaban evitar pendientes acusadas en el espectro debido a las tolerancias mecánicas que se generaban al mover las redes de difracción. Los detectores basados en diodos no presentan esta limitación. Sin embargo, por convención, se escogen los máximos y mínimos con preferencia a otras partes del espectro.

La anchura de banda de referencia se suele establecer en una región del espectro UV en la que el analito no tenga absorbancia. Esto se ilustra en el espectro del ácido anísico que se muestra en la [Figura 23](#) en la página 65. Este espectro es típico de muchas moléculas pequeñas que contienen un cromóforo UV. Para obtener los mejores resultados, se ha fijado la referencia en una banda amplia lo más próxima posible a la longitud de onda de la señal, pero en una región con absorbancia cero. Se suelen utilizar anchuras de banda de referencia de entre 60 nm y 100 nm. La referencia predeterminada es 360 nm con una anchura de banda de 100 nm. Se utiliza una anchura de banda amplia porque se reduce el ruido de la señal de referencia (según la teoría estadística, el error, es decir, el ruido en este caso, se reduce por la raíz cuadrada del número de determinaciones). Es importante que la anchura de banda de referencia no se amplíe a una parte del espectro que tenga absorbancia, ya que entonces se reduciría la señal resultante, así como la sensibilidad. La utilización de una longitud de onda de referencia puede ayudar a reducir la deriva o la desviación en el cromatograma que se originan como consecuencia de los cambios en el índice de refracción. Estos cambios se deben a la fluctuación de la temperatura ambiente o a la operación de gradiente. Es posible probar fácilmente el efecto de una señal de referencia. Para ello, es necesario configurar dos señales idénticas, una con una señal de referencia y otra sin una señal de referencia. Si ninguna parte del espectro presenta absorbancia cero, convendría apagar la señal de referencia.

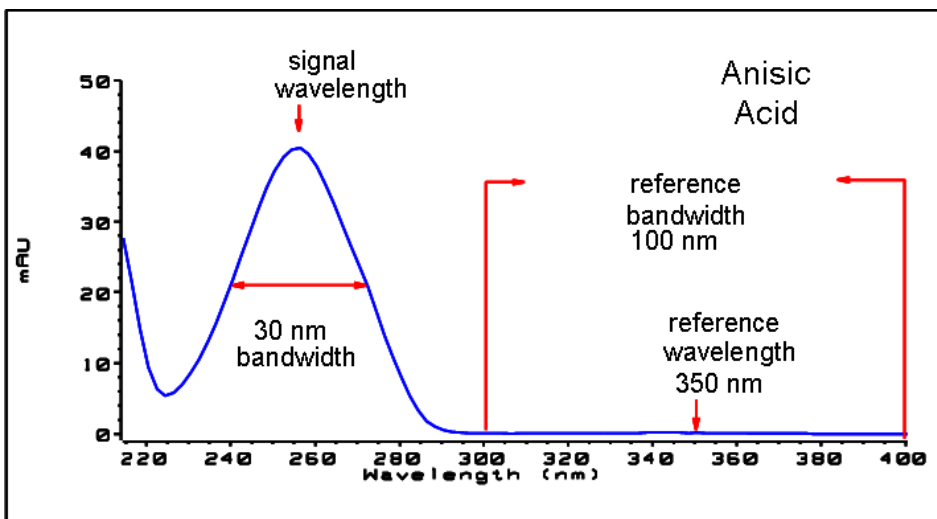


Figura 23 Espectro del ácido anísico

Anchura de rendija (solo para G4212A)

La transmisión de luz dentro del espectrógrafo y la anchura de banda óptica se controlan mediante la rendija de entrada de apertura variable. El ajuste predefinido correspondiente a la anchura de rendija es de 4 nm, que es adecuado para la mayoría de las aplicaciones dado que ofrece un buen rendimiento general. Las características de rendimiento afectadas son la sensibilidad, la resolución espectral y la linealidad. Si se considera una longitud de onda concreta que entra en el espectrógrafo, su luz llegará eficazmente a una banda pequeña de diodos cuya anchura es proporcional a la de la rendija de entrada. La descripción de la rendija como de 4 nm define este comportamiento: la luz llega a los diodos que detectan una anchura de banda de 4 nm. Se deduce que la resolución óptica mínima será de 4 nm y, por tanto, la anchura de banda de los diodos (o la anchura de banda digital) debería fijarse en 4 nm o en un valor superior. Para optimizar la sensibilidad, el ajuste en 8 nm permitirá la entrada de más luz y minimizará el ruido, pero la resolución espectral estará en su punto más bajo. Generalmente, esto no suele plantear problemas con los espectros UV, ya que sus anchuras de banda naturales suelen ser superiores a 25 nm sin ninguna estructura fina. La anchura de banda óptica de 8 nm reduce el rango de linealidad en comparación con la rendija de 4 nm, por lo que es importante que un método validado emplee siempre la anchura de rendija utilizada en la validación. Para obtener una resolución espectral óptima, el mejor ajuste es 1 nm. Este valor permitirá resolver estruc-

3 Optimización del sistema LC Agilent 1290 Infinity

Cómo conseguir una sensibilidad más elevada

turas finas como las del espectro del benceno (consulte [Figura 24](#) en la página 66). Muy pocos componentes muestran detalles tan finos en los espectros de solución. El nivel de luz será más bajo, por lo que la señal tendrá más ruido. Los niveles de ruido dependen de la longitud de onda y de los disolventes de la fase móvil que se hayan utilizado.

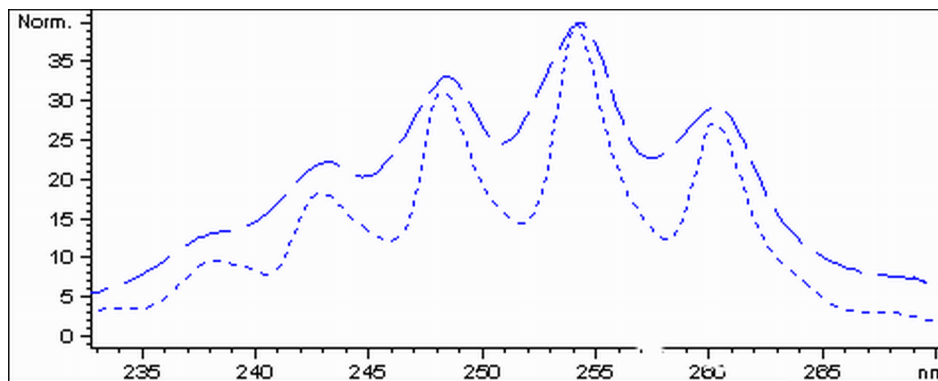


Figura 24 Benceno a anchura de rendija de 1 y 4 nm (principio)

El volumen de inyección y el disolvente de la disolución de muestra son importantes para controlar la dispersión. Es importante que los compuestos se enfoquen en la parte superior de la columna. De esta forma, se evita la dispersión de los picos como consecuencia de la inyección, lo que reduciría la altura de los picos. Para ello, la muestra debería disolverse en un compuesto de disolventes con una fuerza de elución más baja que la fase móvil. Es posible aumentar el volumen de inyección para obtener una concentración mayor de analito en la columna y, por tanto, una altura de pico mayor.

Consulte los comentarios en [“Cómo conseguir volúmenes de inyección más elevados”](#) en la página 52.

Anchura de pico, tiempo de respuesta, velocidad de recopilación de datos

El ajuste de la anchura de pico, el tiempo de respuesta y la velocidad de muestreo del detector están vinculados. Los ajustes disponibles se muestran en la . Es importante fijar estos parámetros correctamente para optimizar la sensibilidad y preservar la resolución alcanzada en la separación.

El detector adquiere internamente los puntos de datos más rápidamente de lo que necesita un cromatógrafo y los procesa para generar la señal vista por el sistema de datos. Parte del procesamiento reduce los datos a una velocidad de

muestreo adecuada que permite dibujar con precisión los picos cromatográficos. Como ocurre con la mayor parte de las determinaciones analíticas, los grupos de lecturas se promedian eficazmente para reducir los errores en el resultado. El detector agrupa los puntos de datos iniciales y genera los datos de la señal de salida a la velocidad de recopilación de datos requerida mediante un proceso de filtrado electrónico. Si la velocidad de muestreo resultante es demasiado lenta (sobre el filtrado), las alturas de los picos se reducirán, así como la resolución entre ellos; si es demasiado rápida, los datos registrarán más ruido del necesario para generar picos estrechos con precisión.

El ajuste de la *anchura de pico* del detector permite al usuario fijar correctamente estos parámetros con solo observar los resultados de integración del cromatograma y comprobar la anchura de los picos. El ajuste de la anchura de pico debería fijarse en la anchura de pico más estrecha observada en el cromatograma. Si se asigna un valor demasiado ancho, se generarán picos más bajos y anchos (y, posiblemente, con menos resolución); en cambio, si se asigna un valor demasiado estrecho, se aumentará innecesariamente el ruido de la línea base. En esencia, el software utiliza este valor para fijar la *velocidad de recopilación de datos* que le permita recopilar suficientes puntos de datos sobre los picos más estrechos. Su objetivo es de entre 15 y 25 puntos a través del pico. Si fuera necesario, el detector de diodos 1290 Infinity podría recopilar datos a una velocidad máxima de 160 Hz, lo que permitiría recopilar suficientes puntos de datos sobre un pico con una anchura de tan solo 0,1 s. El ajuste del *tiempo de respuesta* es otra forma de indicar cómo se configura este filtro. Se mide en segundos y es, aproximadamente, un tercio del valor de la anchura de pico (que se mide en minutos). Muestra eficazmente la rapidez con la que la señal trazada responde a un cambio de paso en la señal de entrada.

3 Optimización del sistema LC Agilent 1290 Infinity

Cómo conseguir una sensibilidad más elevada

Tabla 8 Anchura de pico, tiempo de respuesta y velocidad de muestreo

Anchura de pico a media altura [min] ¹	Respuesta [s]	Velocidad de muestreo de la señal [Hz]
< 0,0015625	0,015625	160
> 0,0015625	0,03125	160
> 0,003125	0,0625	80
> 0,00625	0,125	40
> 0,0125	0,25	20
> 0,025	0,5	10
> 0,05	1,0	5
> 0,10	2,0	2,5
> 0,20	4,0	1,25
> 0,40	8,0	0,625
> 0,85	16,0	0,3125

¹ Es posible redondear los valores de la interfaz de usuario.

Cómo conseguir un arrastre de contaminantes mínimo

El efecto memoria se mide cuando los picos residuales de una inyección anterior con activos aparecen en una inyección de blanco con disolvente posterior. Se dará un efecto memoria entre las inyecciones activas, lo cual podrá derivar en resultados erróneos. El nivel de efecto memoria aparece como el área del pico en la solución de blanco, expresado como un porcentaje del área en la inyección activa anterior. El inyector automático Agilent 1290 Infinity se ha optimizado para obtener el menor efecto memoria, por medio de un diseño cuidadoso del paso del flujo y el uso de materiales en los que la absorción de muestras se minimiza. Se conseguirá un efecto memoria de 0,002 % incluso cuando el detector sea el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo. Los ajustes de funcionamiento del inyector automático permiten al usuario establecer los parámetros adecuados para minimizar el efecto memoria en cualquier aplicación con compuestos fiables para incrustarlos en el sistema.

Se pueden utilizar las siguientes funciones del inyector automático para minimizar el efecto memoria:

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

El paso de flujo, incluido el interior de la aguja, se limpia continuamente en funcionamiento normal, ofreciendo una buena eliminación del efecto memoria en la mayoría de las situaciones. La reducción automática del volumen de retardo (ADVR) reducirá el volumen de retardo, así como el lavado del inyector automático, y no deberá utilizarse con analitos en los que el efecto memoria pueda suponer un problema.

La parte exterior de la aguja se puede lavar con un vial de lavado en una ubicación específica, o bien la aguja se podrá lavar por medio del puerto de lavado. Si se elige un vial de lavado en una ubicación de bandeja que ha especificado el usuario, este vial no contará con un septum y deberá tener un disolvente adecuado para lavar la muestra desde la aguja. El septum no se utiliza para evitar retirar la contaminación de la aguja hacia abajo y volver a aplicarla hacia arriba. La aguja se puede sumergir en el vial muchas veces. Este procedimiento es eficaz para eliminar una pequeña cantidad de efecto memoria, pero

3 Optimización del sistema LC Agilent 1290 Infinity

Cómo conseguir un arrastre de contaminantes mínimo

para lavar de forma más eficaz el exterior de la aguja, utilice el puerto de lavado.

El puerto de lavado se encuentra encima y detrás del asiento de la aguja y una bomba peristáltica proporciona el disolvente de lavado. Cuenta con un volumen de 0,68 ml y la bomba peristáltica proporciona 6 ml/min, lo que supone que el volumen del puerto de lavado se rellena completamente con disolvente nuevo en 7 s. Si se selecciona el puerto de lavado, el usuario podrá configurar el tiempo que se lavará la aguja con disolvente nuevo. Este periodo puede durar dos o tres segundos en situaciones rutinarias en las que el efecto memoria no es un gran problema, y de 10 a 20 s para un lavado más completo. Se recomienda que el lavado del exterior de la aguja del puerto de lavado sea un procedimiento estándar para evitar contaminar el asiento de la aguja. Si se contamina el asiento de la aguja, esta se tendrá que volver a lavar de forma manual cambiando las conexiones de flujo. Esta tarea se puede automatizar utilizando el módulo de cubo flexible.

Para el puerto de lavado y su disolvente, la bomba de suministro y los tubos se deben lavar de forma habitual para garantizar el menor efecto memoria posible. Por ejemplo, antes de usar el sistema cada día, debe lavar la bomba de lavado durante tres minutos con un disolvente adecuado.

Si otras medidas no han podido eliminar el efecto memoria, es posible que el analito esté atascado en el interior de la válvula de inyector. La válvula de inyector se puede configurar para realizar movimientos de cambio adicionales para limpiar el paso de flujo de la válvula si surgen problemas con el efecto memoria. Si los compuestos con problemas requieren un alto porcentaje de fase orgánica para la elución, se recomienda cambiar la válvula de inyección con el porcentaje alto de fase orgánica tras haber eluido el último pico. Asimismo, se recomienda volver a cambiar la válvula de inyección una vez se hayan estabilizado las condiciones iniciales para fase móvil. Así se garantiza que la muesca del bypass en el sello del rotor de la válvula cuenta con las condiciones iniciales de gradiente, algo especialmente importante para las velocidades de flujo por debajo de 0,5 ml/min.

Para las muestras en las que el exterior de la aguja no se puede limpiar adecuadamente con agua o alcohol desde la bomba de lavado, utilice viales de lavado con un disolvente adecuado. Con un programa de inyector se pueden utilizar varios viales de lavado.

Cómo evitar los bloqueos de columnas

Al igual que con cualquier sistema HPLC, se deben tomar precauciones para evitar que se bloquee parcial o completamente la columna o el sistema de tubos debido a un uso inadecuado. Los problemas causados por el material introducido en el sistema se pueden evitar normalmente tomando las siguientes medidas:

- filtrar los disolventes,
- filtrar las muestras,
- sustituir las fases móviles periódicamente,
- lavar las sales de los tampones del sistema.

El propio sistema es una fuente inevitable de partículas. Al igual que con cualquier sistema HPLC, los sellos desprenderán material que se quedará atrapado en las fritas, por lo que será necesaria la sustitución periódica de dichas fritas. 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 del propio instrumento.

Para garantizar los mejores resultados, 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 del tampón de la fase móvil cada uno o dos días. No añada la 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** Utilice la opción de lavado de sellos con una alta concentración de fases móviles de tampón.

3 Optimización del sistema LC Agilent 1290 Infinity

Cómo evitar los bloqueos de columnas

- 7 Se recomienda utilizar un filtro en línea (filtro en línea 1290 Infinity, 2 mm de diámetro, referencia: 5067-4638) para atrapar las partículas y aumentar la vida útil de la columna.
- 8 Cambie el filtro cuando la presión aumente un 10 %.
- 9 Purgue las bombas (las conexiones hasta la columna) de cualquier tampón que contenga fases móviles y límpielas con 5 ml de disolvente antes de conectar la columna al instrumento.
- 10 Limpie la columna con una fase móvil compatible inicialmente a 0,1 ml/min para una columna de 2,1 mm de diámetro interno, a 0,2 ml/min para una columna de 3,0 mm de diámetro interno y a 0,4 ml/min para una con 4,6 mm de diámetro interno. Aumente la velocidad del flujo durante 5 minutos hasta el flujo deseado.
- 11 Una vez estabilizada la presión, conecte la columna al detector.
- 12 Equilibre la columna y el detector con volúmenes de 10 columnas de la fase móvil antes de su uso (consulte la [Tabla 7](#) en la página 45 para obtener los volúmenes de las columnas).
- 13 Evite la sobrepresión. Compruebe el rango de presión del gradiente antes de iniciar una secuencia.
- 14 Si las muestras se disuelven en contenido orgánico alto considere el uso de un programa de inyección para agregar un tapón de disolvente más débil antes y después de la parte alícuota de la muestra para reducir el riesgo de precipitación en la fase móvil del tampón de alta concentración.



4 Configuración e instalación del sistema

Instalación del software 74

Instalación del módulo 76

Optimización de la configuración de la torre de módulos (sistema LC binario) 76

Optimización de la configuración de la torre de módulos (sistema LC cuaternario) 81

Cebado de la bomba 86

Purga de la bomba 88

Conexiones de flujo entre módulos 91

Integración en la red 91

Este capítulo incluye información sobre la instalación del software, la configuración de la torre de 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 de usuario del Detector de Diodos Agilent 1290 Infinity* 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 previamente se encontraban sólo 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 del módulo

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.

Optimización de la configuración de la torre de módulos (sistema LC binario)

Configuración de una torre de módulos

Para garantizar un rendimiento óptimo, instale los módulos del sistema LC binario Agilent 1290 Infinity en la siguiente configuración (consulte la [Figura 25](#) en la página 77 y la [Figura 26](#) en la página 78). Esta configuración optimiza el paso de flujo para reducir el volumen de retardo y el espacio necesario en el banco.

La Bomba binaria Agilent 1290 Infinity se debe instalar siempre en la base de la torre de módulos.

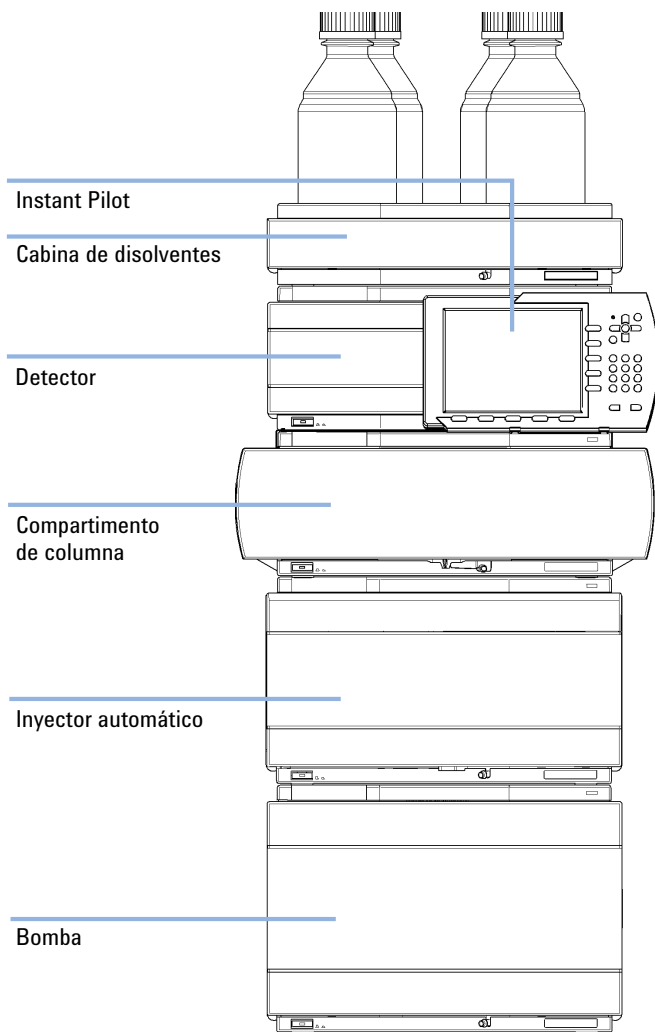


Figura 25 Configuración recomendada de la torre de módulos para el sistema 1290 Infinity con bomba binaria (vista frontal)

4 Configuración e instalación del sistema

Instalación del módulo

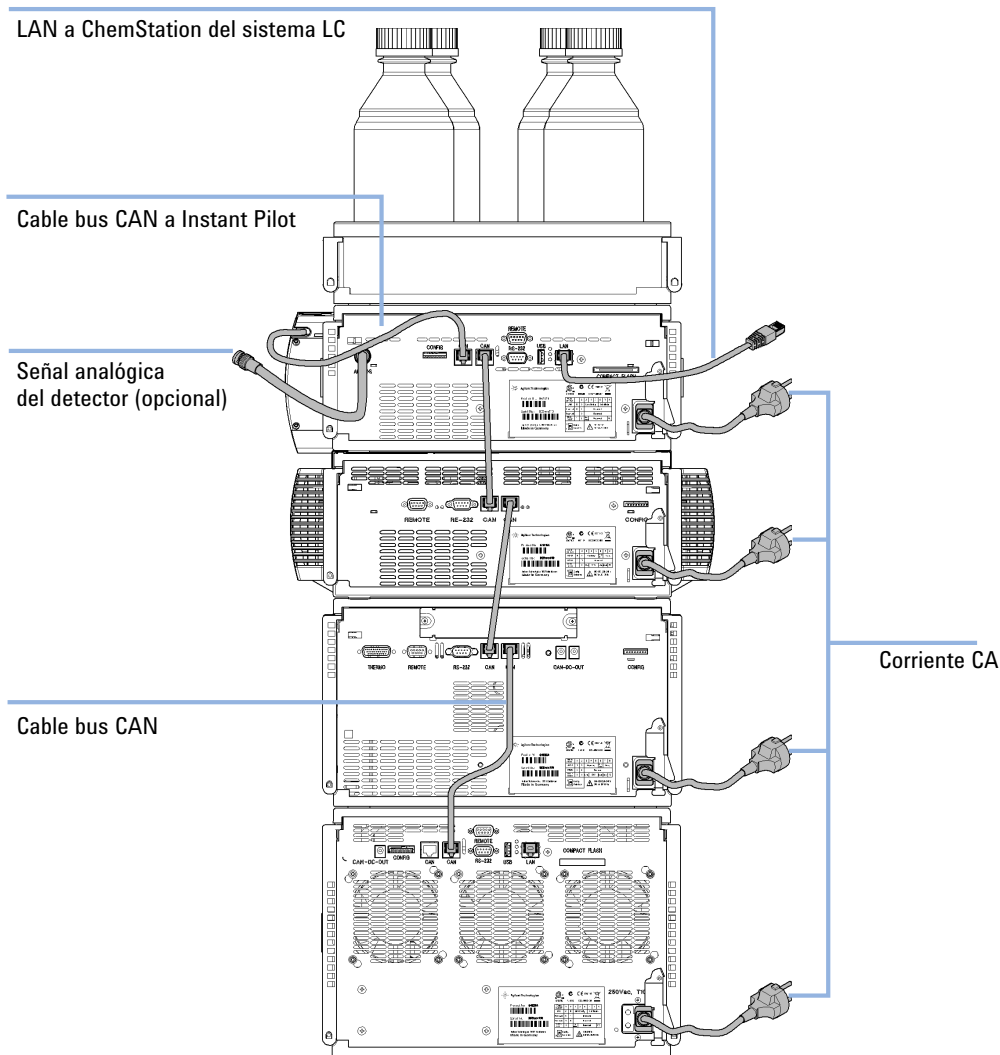


Figura 26 Configuración recomendada de la torre de módulos para el sistema 1290 Infinity con bomba binaria (vista posterior)

Configuración de dos torres de módulos

En caso de que el termostato del inyector automático esté incorporado en el sistema, se recomienda una configuración de dos torres de módulos. De esta forma, los dos módulos pesados (la bomba 1290 Infinity y el termostato) se colocan en la base de cada torre y se evita crear una torre alta. Algunos usuarios prefieren la menor altura de esta distribución, incluso sin el termostato del inyector automático. Se necesita un capilar ligeramente más largo entre la bomba y el inyector automático. (Consulte la [Figura 27](#) en la página 79 y la [Figura 28](#) en la página 80).

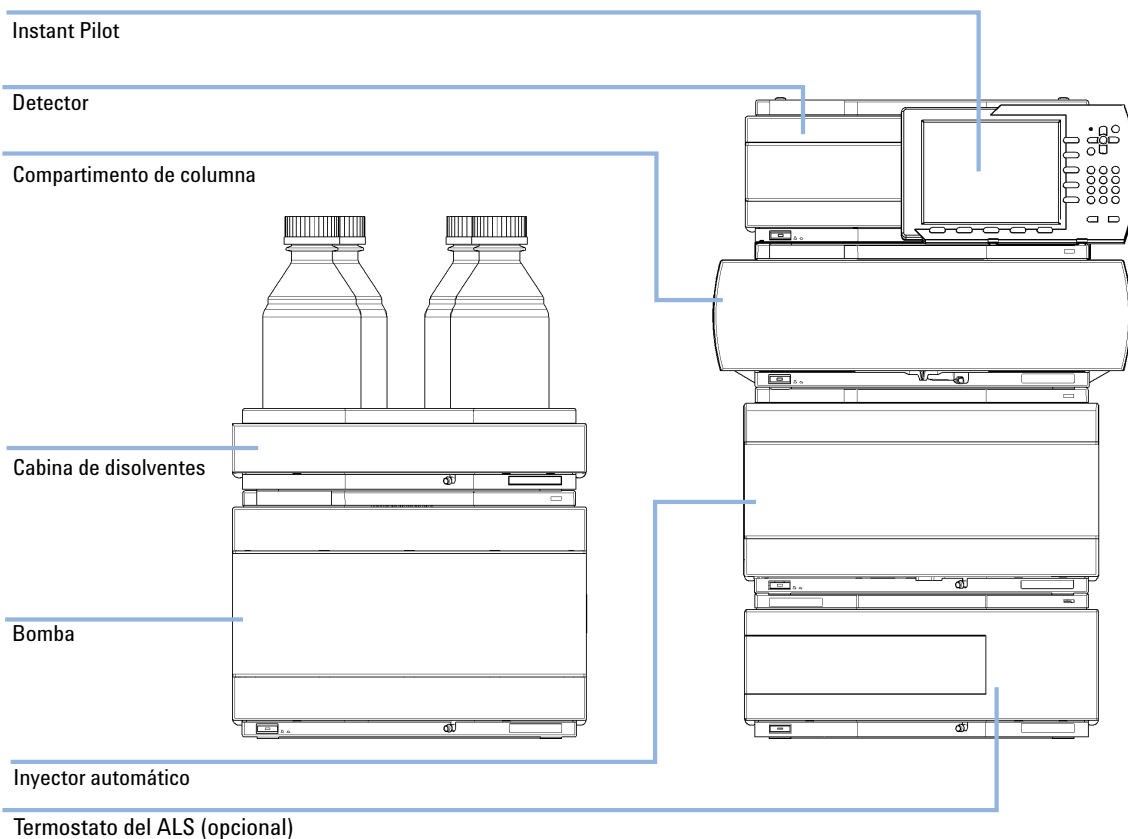


Figura 27 Configuración recomendada de dos torres de módulos para el sistema 1290 Infinity con bomba binaria (vista frontal)

4 Configuración e instalación del sistema

Instalación del módulo

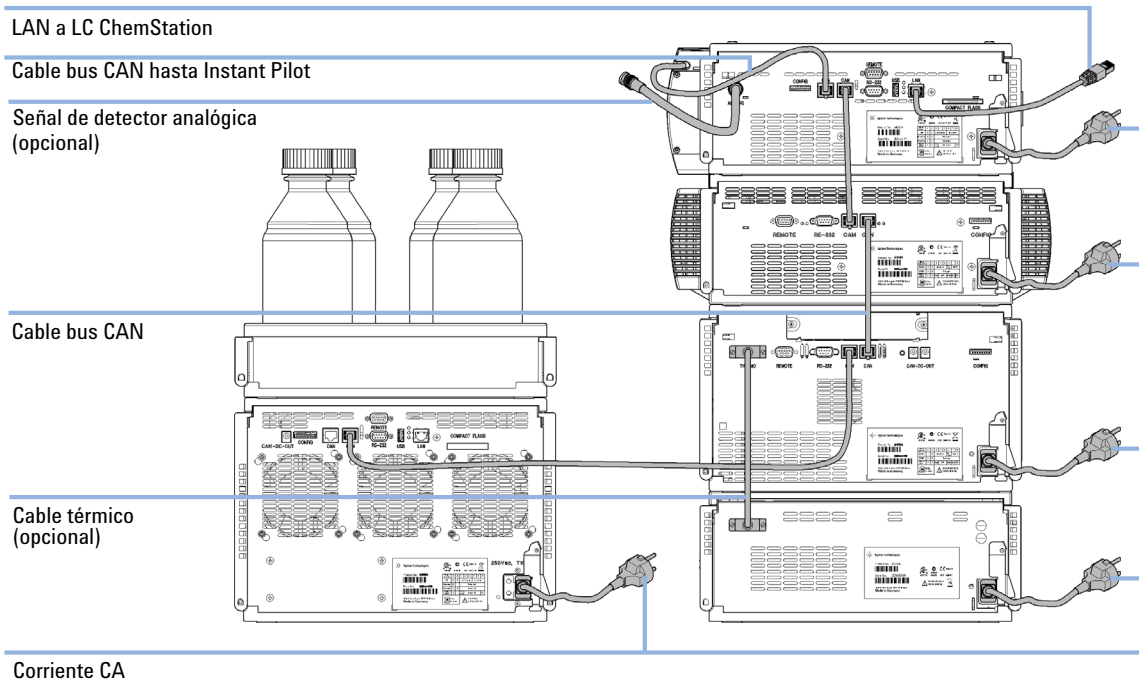


Figura 28 Configuración recomendada de dos torres de módulos para el sistema 1290 Infinity con bomba binaria (vista posterior)

Optimización de la configuración de la torre de módulos (sistema LC cuaternario)

Configuración de una pila

Para garantizar un rendimiento óptimo, instale los módulos del sistema LC cuaternario Agilent 1290 Infinity en la siguiente configuración (consulte [Figura 29](#) en la página 82 y [Figura 30](#) en la página 83). Esta configuración optimiza el paso de flujo y reduce tanto el volumen de retardo como el espacio necesario en el banco.

La bomba cuaternaria Agilent 1290 Infinity se debe instalar siempre en la base de la torre de módulos.

4 Configuración e instalación del sistema

Instalación del módulo

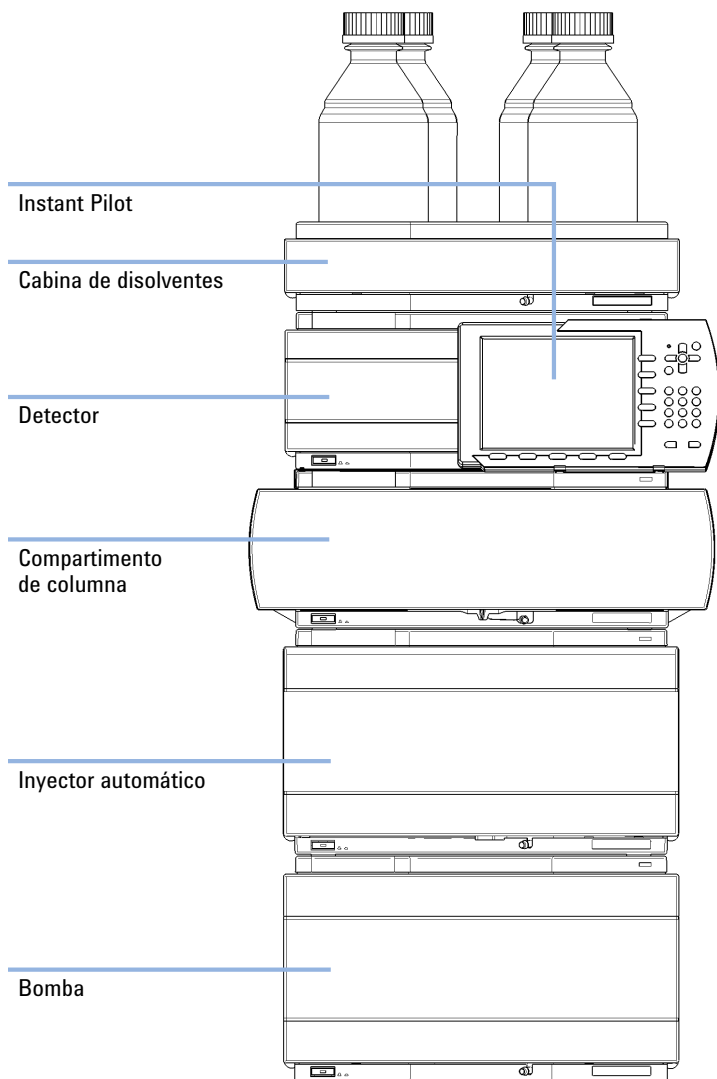


Figura 29 Configuración recomendada de la torre de módulos para el sistema 1290 Infinity con bomba cuaternaria (vista frontal)

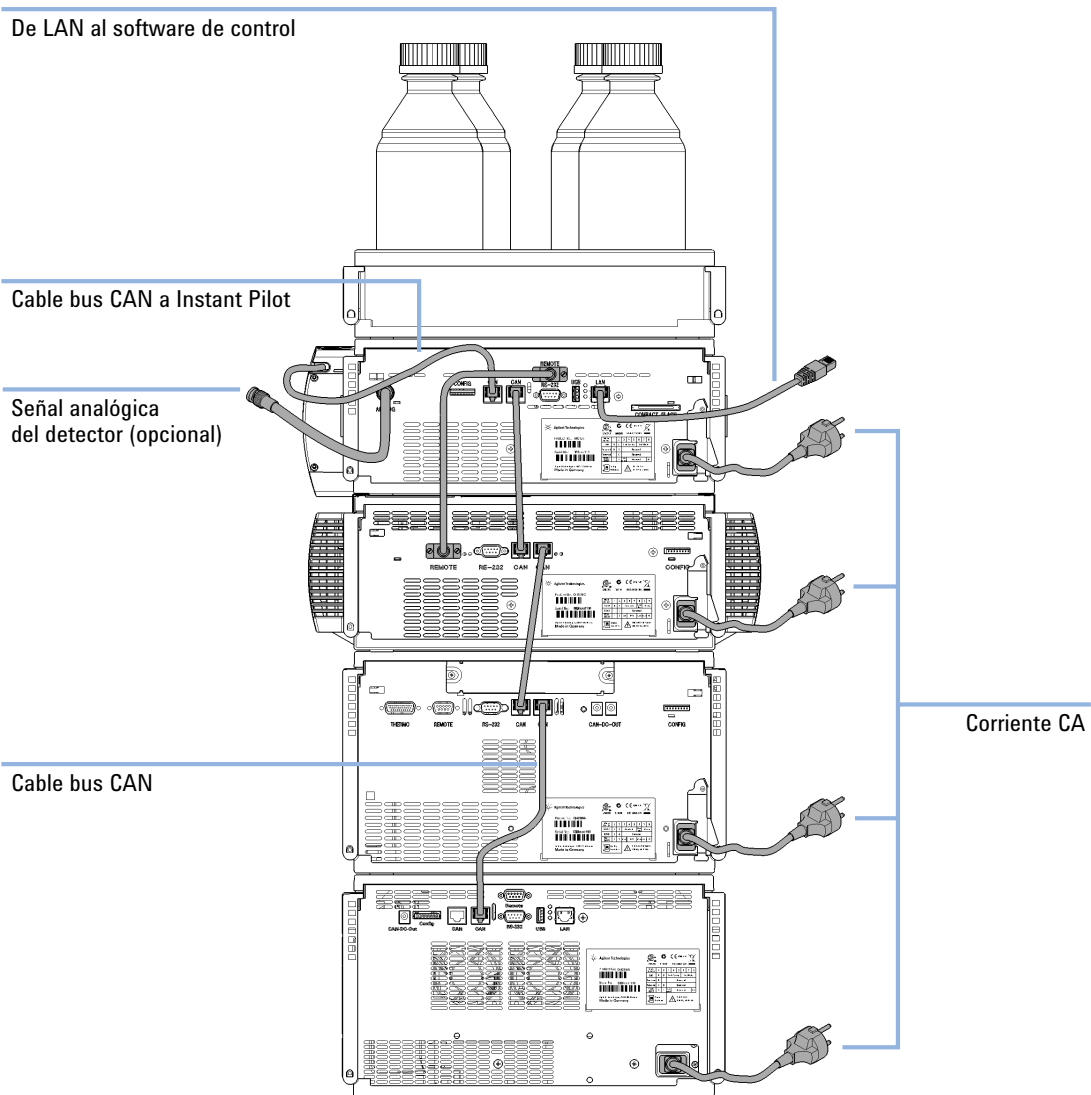


Figura 30 Configuración recomendada de la torre de módulos para el sistema 1290 Infinity con bomba cuaternaria (vista posterior)

4 Configuración e instalación del sistema

Instalación del módulo

Configuración de dos pilas

En caso de que el termostato del inyector automático esté incorporado en el sistema, se recomienda una configuración de dos torres de módulos. De esta forma, los dos módulos pesados (la bomba 1290 Infinity y el termostato) se colocan en la base de cada torre y se evita crear una torre alta. Algunos usuarios prefieren la menor altura de esta distribución, incluso sin el termostato del inyector automático. Se necesita un capilar ligeramente más largo entre la bomba y el inyector automático. (Consulte [Figura 31](#) en la página 84 y [Figura 32](#) en la página 85).

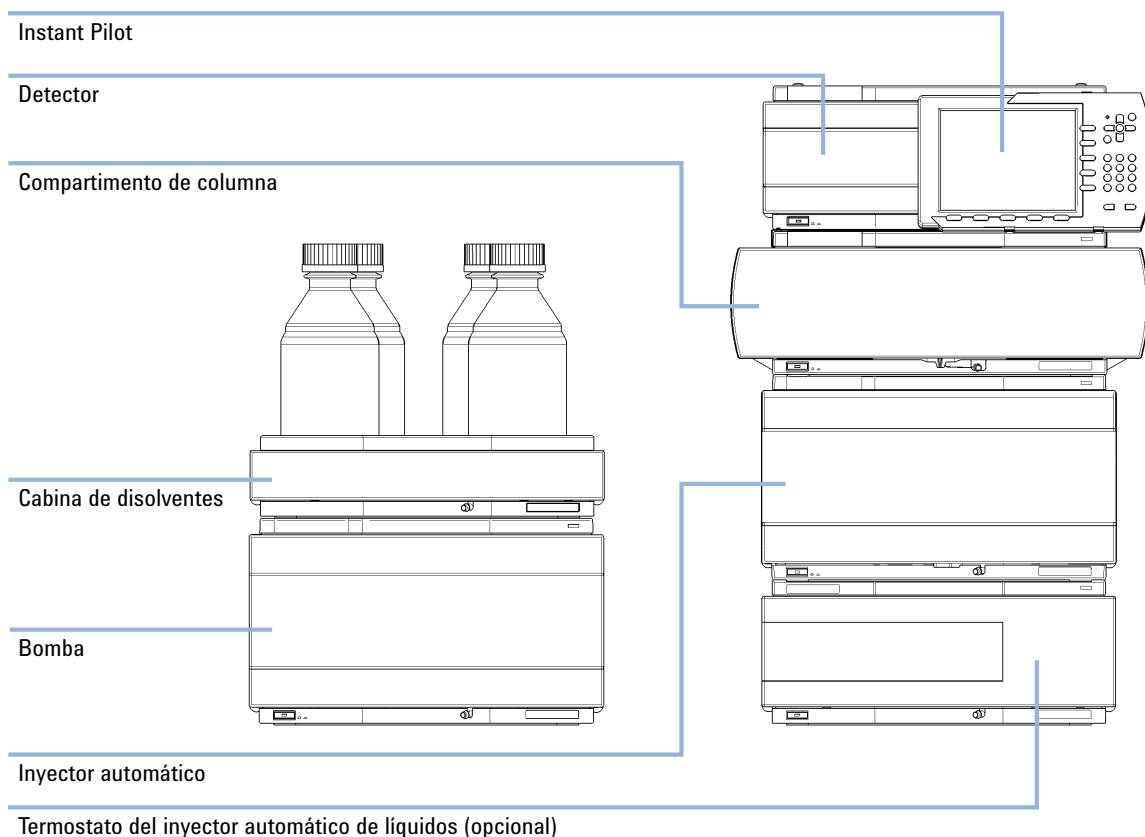


Figura 31 Configuración recomendada de dos torres de módulos para el sistema 1290 Infinity con bomba cuaternaria (vista frontal)

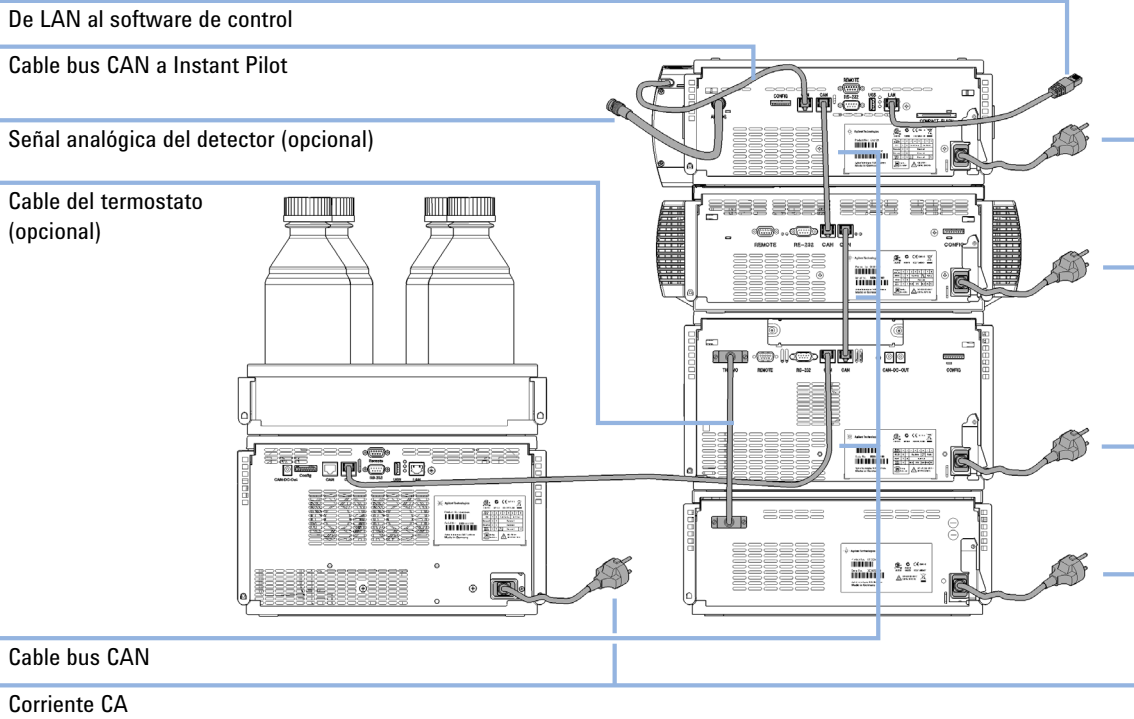


Figura 32 Configuración recomendada de dos torres de módulos para el sistema 1290 Infinity con bomba cuaternaria (vista posterior)

Cebado de la bomba

Este procedimiento sólo es necesario si...

- la bomba se utiliza por primera vez,
- uno o varios de los tubos de entrada contienen espacios de aire o están secos por otros motivos.

El objetivo del cebado es eliminar las burbujas de aire de la bomba y de los tubos de entrada.

El propan-2-ol (también denominado isopropanol, alcohol isopropílico, IPA) es el mejor disolvente para cebar la bomba seca y tiene la ventaja de poderse mezclar con la mayoría de disolventes de fase normal o fase inversa (consulte una tabla de miscibilidad de disolventes si no está seguro).

ADVERTENCIA

Disolventes, muestras y reactivos tóxicos, inflamables y peligrosos

La manipulación de disolventes, muestras y reactivos puede suponer riesgos para la salud y la seguridad.

- Cuando se trabaje con esas sustancias, se deben observar los procedimientos de seguridad (por ejemplo, llevar gafas, guantes y ropa protectora) descritos en la información sobre tratamiento de material y datos de seguridad, suministrada por el vendedor y se debe seguir una buena práctica de laboratorio.
- El volumen de sustancias se debe reducir al mínimo requerido para el análisis.
- No manipule el instrumento en un ambiente explosivo.

NOTA

Evite que los depósitos de disolvente se vacíen mediante el monitor Llenado de botellas. Utilice una jeringa para llenar los tubos de disolvente, la bomba no bombeará aire.

NOTA

Antes de iniciar el procedimiento asegúrese de que todas las líneas de disolvente estén conectadas a la bomba como se detalla en el manual de instalación de la bomba y de que los tubos de residuos estén colocados de forma segura en un contenedor adecuado para residuos de disolvente. Asegúrese de que la bomba esté controlada por un software informático o por el controlador Instant Pilot, y de que la velocidad del flujo esté configurada a cero.

- 1 Prepare el canal A y la cabeza de la bomba A para el cebado:
 - a Llene parcialmente cada depósito de disolvente con aproximadamente 150 ml de propan-2-ol de grado HPLC para cebar la bomba y coloque los extremos del filtro de cristal sinterizado del tubo de disolvente en los depósitos.
 - b Desconecte el tubo introduciendo la válvula de comprobación de entrada de la cabeza de la bomba A. Este es el tubo de salida del canal A del desgasificador de vacío.
 - c Conecte la jeringa de cebado con el adaptador roscado al tubo.
 - d Extraiga lentamente el disolvente por el tubo hasta que se hayan eliminado todas las burbujas.
 - e Extraiga rápidamente la jeringa y el adaptador del tubo y conecte el tubo a la válvula de comprobación de entrada de la cabeza de la bomba A.
- 2 Repita el paso anterior para el canal de disolvente B y la cabeza de la bomba B.
- 3 Si hay una válvula de selección de disolvente (SSV) instalada en la bomba, lleve a cabo los siguientes pasos para cada uno de los tubos de disolvente vacíos restantes:
 - a Desconecte el tubo vacío de la válvula de selección de disolvente. Conecte la jeringa de cebado con el adaptador roscado al tubo.
 - b Extraiga lentamente el disolvente por el tubo hasta que se hayan eliminado todas las burbujas.
 - c Extraiga rápidamente la jeringa y el adaptador del tubo y vuelva a conectar el tubo a la válvula de selección de disolvente.
- 4 En el software ChemStation, haga clic con el botón derecho del ratón sobre la sección de la bomba del diagrama del sistema y, a continuación, seleccione **Prime On** en el menú contextual (no lo confunda con el comando **Purge On**). Otros controladores tienen una función similar.

La válvula de purga cambiará los pasos de flujo A y B a la posición de residuos y cebará de forma simultánea ambos canales. El módulo extrae el disolvente a gran velocidad con los cuatro accionamientos de la bomba simultáneamente y, posteriormente, lo envía a la posición de residuos de la válvula de purga automática. Esta acción se repite 20 veces y, a continuación, finaliza el proceso de cebado. La válvula de purga cambia el paso del flujo de vuelta al sistema.

Se recomienda purgar cada canal con 30 ml de propan-2-ol. Siga el procedimiento descrito en “[Purga de la bomba](#)” en la página 88.

Purga de la bomba

El procedimiento de purga aquí descrito corresponde a la Bomba binaria 1290 Infinity. Se puede ejecutar del mismo modo para la Bomba cuaternaria 1290 Infinity.

- Tras haber cebado la bomba por primera vez.
- Cuando la bomba se va a purgar con disolvente nuevo antes de utilizar el sistema o cuando se va a cambiar el disolvente por otro.
- Si 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).
- Si 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).

Los tubos de entrada de la bomba ya deberían estar llenos de disolvente. Si los tubos de entrada están parcial o totalmente secos, siga el procedimiento de cebado completo (consulte “[Cebado de la bomba](#)” en la página 86).

La válvula de purga permite conectar ambas cabezas de la bomba a los residuos al mismo tiempo y realizar la purga a una velocidad de flujo máxima individual de 5 ml/min, lo que da lugar a un flujo de purga total de 10 ml/min con una composición 50/50.

ADVERTENCIA

Disolventes, muestras y reactivos tóxicos, inflamables y peligrosos

La manipulación de disolventes, muestras y reactivos puede suponer riesgos para la salud y la seguridad.

- Cuando se trabaje con esas sustancias, se deben observar los procedimientos de seguridad (por ejemplo, llevar gafas, guantes y ropa protectora) descritos en la información sobre tratamiento de material y datos de seguridad, suministrada por el vendedor y se debe seguir una buena práctica de laboratorio.
- El volumen de sustancias se debe reducir al mínimo requerido para el análisis.
- No manipule el instrumento en un ambiente explosivo.

- 1 Para acceder a la página de configuración y controlar desde allí la válvula de purga, haga clic con el botón derecho del ratón sobre la sección de la bomba y seleccione **Control** en el menú contextual.
O bien, puede seleccionar **Instrumento > Más Bomba bin. 1290 Infinity > Control**.

Control

Pump

On

Off

Standby

Seal Wash

Off

Single Wash

Periodic

Duration 1.0 min

Period 2.0 min

on for 0.2 min

Automatic Turn On

Turn on at Monday, July 06, 2009 11:00:00

Purge

On

Off

Duration 1.00 min

Flow 0.000 mL/min

Composition A 100.00 % B 0.00 %

Prime

On

Off

Ok Cancel Help

4 Configuración e instalación del sistema

Instalación del módulo

2 En la sección **Purge**, configure los parámetros siguientes:

- **Duration:** 6 min
- **Flow:** 10 ml/min
- **Composition B:** 50 %

Composition A se establecerá automáticamente en 50 %. Deje el botón Encendido/Apagado en **Off**. Haga clic en **OK** para salir.

3 Haga clic con el botón derecho del ratón en la sección de la bomba y selección **Purge On** en el menú contextual.

NOTA

No confunda **Purge On** con el siguiente elemento **Prime On**.

La válvula de purga cambiará el paso del flujo a la posición de purga y purgará de forma simultánea ambos canales hacia los residuos a 5 ml/min cada uno durante 6 minutos de duración. Tras la duración establecida, el flujo de purga se apagará, la válvula cambiará el paso del flujo de vuelta al sistema y la velocidad del flujo y la composición establecida actualmente en el método se reanudarán. En este ejemplo, el flujo del método todavía está establecido en cero. Los ajustes de la purga en la página **Control** de los pasos 1 y 2 permanecen configurados de forma que si se necesita realizar el proceso de purga de nuevo, se pueda iniciar a partir del paso 3.

Cuando la bomba se haya cebado inicialmente y se haya purgado con propan-2-ol, los disolventes se pueden intercambiar para los disolventes de la fase móvil como el agua y el metanol. El procedimiento de purga se repite siempre que se intercambie un disolvente. Inmediatamente después de la purga, el disolvente de la bomba no se ha desmasificado y, por tanto, el sistema debe funcionar durante al menos 10 min para que el disolvente se desgasifique.

Conexiones de flujo entre módulos

Cuando conecte los módulos, limpie siempre los capilares y la columna con disolvente antes de conectarlos con el siguiente componente del paso de flujo.

- 1 Conecte la salida del mezclador Jet Weaver al inyector automático mediante un capilar flexible de acero inoxidable de 0,12 mm de diámetro interno (la etiqueta del código de color es roja). Este debería estar conectado al puerto 1 de la válvula de inyección del inyector automático.
- 2 Conecte un capilar flexible de acero inoxidable de 0,12 mm de diámetro interno desde el puerto 6 de la válvula de inyección del inyector automático al compartimento termostatzado de columna. Conecte el capilar directamente al intercambiador de calor de volumen de dispersión baja para obtener un volumen de retardo mínimo o a la válvula de intercambio si está instalada.
- 3 Conecte la salida de la columna a la entrada (marcada como CELL-IN, conexión del lado izquierdo) de la celda de cartucho Max-Light en el detector 1290 Infinity.
- 4 Conecte el tubo de residuos a la salida (marcada como CELL-OUT, conexión de la derecha) de la celda de cartucho Max-Light en el detector 1290 Infinity y coloque la salida en un contenedor de recogida de residuos adecuado.

Integración en la red

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

4 Configuración e instalación del sistema

Instalación del módulo



5 Guía de inicio rápida

Sobre la guía de inicio rápida	94
Preparación del sistema	95
Encendido del sistema	95
Carga del método predeterminado	96
Configuración del gráfico en línea	98
Purga de la bomba	100
Adquisición de datos en la vista Control del método y el análisis	101
Parámetros del método para la mezcla de prueba y la columna RRHD de ZORBAX	101
Configuración del método	103
Ejecución del método para una inyección individual	105
Ejecución más rápida del método	106
Análisis de datos	108
Vista Análisis de datos	109
Integración de una señal	110
Especificación del informe	112

Este capítulo proporciona información sobre la adquisición de datos y su análisis con el sistema LC 1290 Infinity.



Sobre la guía de inicio rápida

Este capítulo proporciona información sobre la utilización del sistema LC Agilent 1290 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 mediante la columna y la muestra de comprobación proporcionada con el sistema LC Agilent 1290 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, incluidos OpenLAB CDS EZChrom Edition, el controlador Instant Pilot y el software MassHunter.

NOTA

El punto de inicio asume que el sistema se ha instalado, encendido y cebado una primera vez (consulte [“Cebado de la bomba”](#) en la página 86). 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 **Inicio > Todos los programas > Agilent Technologies > OpenLAB > Panel de control de OpenLAB**. 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.

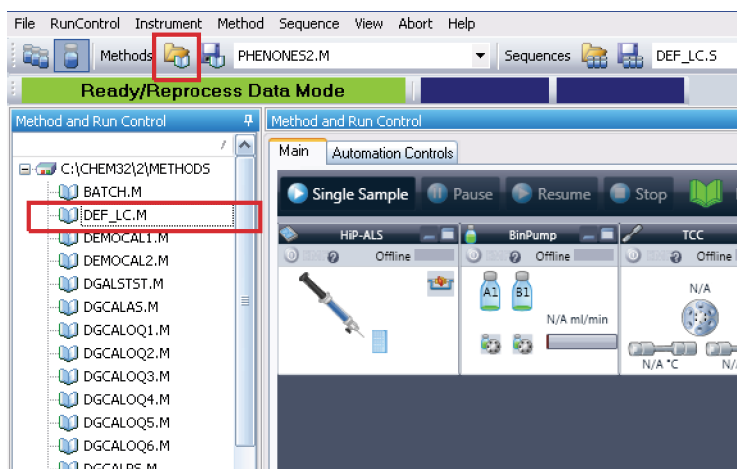
Carga del método predeterminado

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 **Método > Nuevo método...** 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 **Métodos** del panel de navegación.



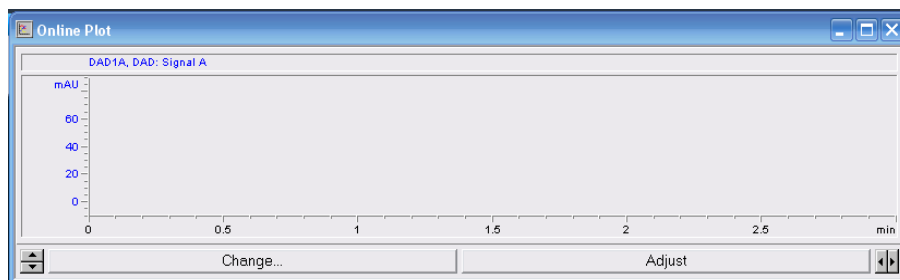
El método predeterminado (**DEF_LC.M**) posee un conjunto de parámetros predeterminados que pueden modificarse para crear un nuevo método. Por ejemplo, la velocidad de flujo está establecida en cero y los campos **Method Information** e **Method History** están en blanco.

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.

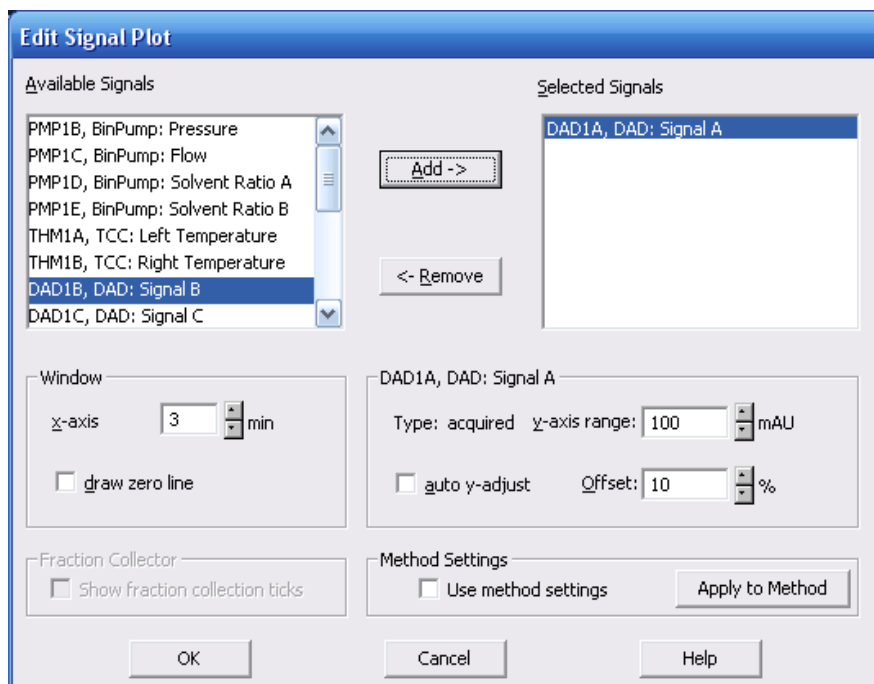
Configuración del gráfico en línea

- 1 Si la ventana **Online Plot** no está visible: haga clic en **Vista > Señales en línea > Ventana de señal 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**.



- 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 [“Purga de la bomba”](#) en la página 88.

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

Todos los procedimientos y las configuraciones del método se describen para la Bomba binaria 1290 Infinity. Se pueden ejecutar del mismo modo para la Bomba cuaternaria 1290 Infinity.

Parámetros del método para la mezcla de prueba y la columna RRHD de ZORBAX

El sistema LC 1290 Infinity se suministra con una columna RRHD Eclipse Plus C18 de 1,8 μm , 2,1 mm x 50 mm de ZORBAX y una mezcla de prueba que contiene fenonas para su uso con este procedimiento de ejemplo.

La Mezcla de prueba de fenonas (n.º de referencia 5188-6529) contiene 100 ng/ μl cada una de los nueve componentes disueltos en agua/acetonitrilo (65/35). Los nueve componentes son:

- Acetanilida
- Acetofenona
- Propiofenona
- Butirofenona
- Benzofenona
- Valerofenona
- Hexanofenona
- Heptanofenona
- Octanofenona

Los parámetros del método para la separación de esta mezcla de prueba se resumen en la [Tabla 9](#) en la página 102.

5 Guía de inicio rápida

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

Tabla 9 Parámetros del método para la primera separación

Módulo	Parámetro	Configuración
Bomba	Disolvente A	Agua
	Disolvente B	Acetonitrilo
	Velocidad de flujo	0,4 ml/min
	Composición inicial	60 % A, 40 % B
	Tabla de tiempos del gradiente	A 4 minutos 20 % A, 80 % B
	Tiempo de parada	5 minutos
Inyector automático	Inyección	1 µl
	Lavado de la aguja	Puerto de lavado, 6 s
TCC	Columna	ZORBAX Eclipse Plus C18 1,8 µm, 2,1 mm x 50 mm de diámetro interno
	Temperatura	40 °C
Detector	Señal A	250 nm, 100 nm de anchura de banda, ref. 360 nm, 100 nm de anchura de banda
	Anchura de pico	0,025 min (10 Hz)
	Almacenar espectros	Todos

Configuración del método

Esta sección muestra cómo configurar rápidamente las condiciones del método para realizar un análisis con las condiciones de la mezcla de prueba. Para obtener una explicación más detallada de todos los parámetros disponibles, consulte el apéndice “[Configuración de un método mediante la opción Edit Entire Method](#)” en la página 121.

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. Para realizar la separación de ejemplo que se explica aquí, configure las condiciones enumeradas en la [Tabla 9](#) en la página 102.

- 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 **1290 Infinity Binary Pump**, introduzca los siguientes parámetros:
 - Velocidad de flujo: 0,4 ml/min
 - Disolvente A: seleccione **Water** de la lista desplegable de compresibilidad.
 - Disolvente B: seleccione la casilla para activar el Disolvente B.
 - %B: valor inicial al 40 %
 - Tiempo de parada: 5 min
 - Límite máximo de presión: 1200 bar
 - b Haga clic en el signo + para abrir la **Timetable**.
 - c Añada una línea, seleccione **Change Solvent Composition** y ajuste %B en 80 %.
 - d Otros 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 **1290 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 Otros 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 termostático 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 Otros 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 **1290 Infinity DAD**, introduzca los siguientes parámetros:
 - **Use Signal:** desmarque las casillas para apagar todas las señales, excepto la **Signal A**.
 - Señal A: 250 nm, 100 nm de anchura de banda, ref. 360 nm, 100 nm de anchura de banda
 - Anchura de pico: 0,012 min (respuesta en 0,25 s, 20 Hz)
 - b En la sección **Advanced**, ajuste **Spectrum Store** en **All**.
 - c Otros 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 **Método > Guardar método como...** 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 como ejecutar una inyección individual de la mezcla de prueba 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 **Método > Cargar método** 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 **Control de análisis > Información de muestra** e introduzca un nombre de **Subdirectory** (opcional), **Filename**, **Location** (**via 1**), **Sample Name** y un **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. O bien, haga clic en **OK** y, cuando esté preparado, haga clic en el botón **Start Single Sample** situado sobre el diagrama del sistema.
- 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 debe ser similar a la [Figura 33](#) en la página 107 (no obstante, el eje del tiempo será superior, ya que se ejecutó en condiciones cuatro veces más rápidas en la sección siguiente).

Ejecución más rápida del método

El primer ejercicio se llevó a cabo a una presión que se puede alcanzar en un sistema estándar. Ahora, la velocidad del flujo se ha aumentado y el gradiente se ha ajustado para obtener una separación más rápida.

- 1 Edite las condiciones del método del mismo modo que en la sección anterior para realizar los cambios siguientes:
 - Velocidad de flujo: 1,6 ml/min
 - Gradiente: cambie el gradiente para que la pendiente del gradiente no cambie su volumen en comparación con la primera ejecución. El flujo se ha aumentado 4 veces, por tanto, reduzca el tiempo del gradiente por 4; ajuste el tiempo de gradiente a 1 min.
 - Tiempo de parada: 1,25 min
- 2 Guarde el método con un nombre nuevo.
- 3 Asegúrese de que se ha utilizando un nombre nuevo de fichero en **Sample Info**.
- 4 Cuando la línea base esté estable y equilibrada, inicie la ejecución con el botón **Start Single Sample**.

El cromatograma debería ser parecido al que se muestra a continuación, con un tiempo de ejecución de aproximadamente 1 min.

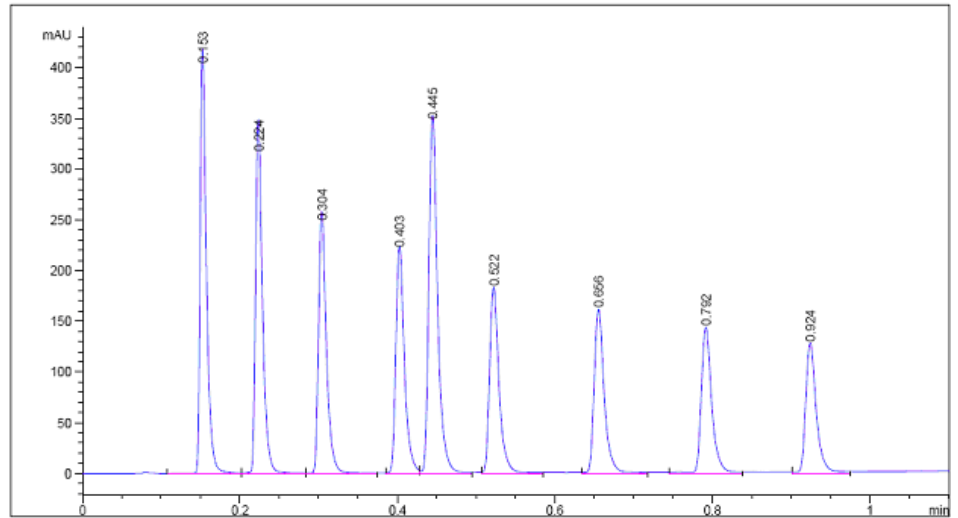


Figura 33 Ejemplo de cromatograma de la mezcla de prueba de fenonas utilizando las condiciones de inicio rápido

Esta separación no está optimizada realmente con estas condiciones y puede que el usuario prefiera obtener más experiencia en la utilización del sistema intentando optimizar aún más el método. Algunos cambios que pueden ayudar son:

- reducir la concentración de la muestra mediante una dilución 1:10,
- aumentar el rango del gradiente,
- aumentar la temperatura,
- examinar los espectros de los picos y seleccionar la detección de banda estrecha adecuada,

Para obtener más información sobre la optimización, consulte “[Optimización del sistema LC Agilent 1290 Infinity](#)” en la página 39.

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.

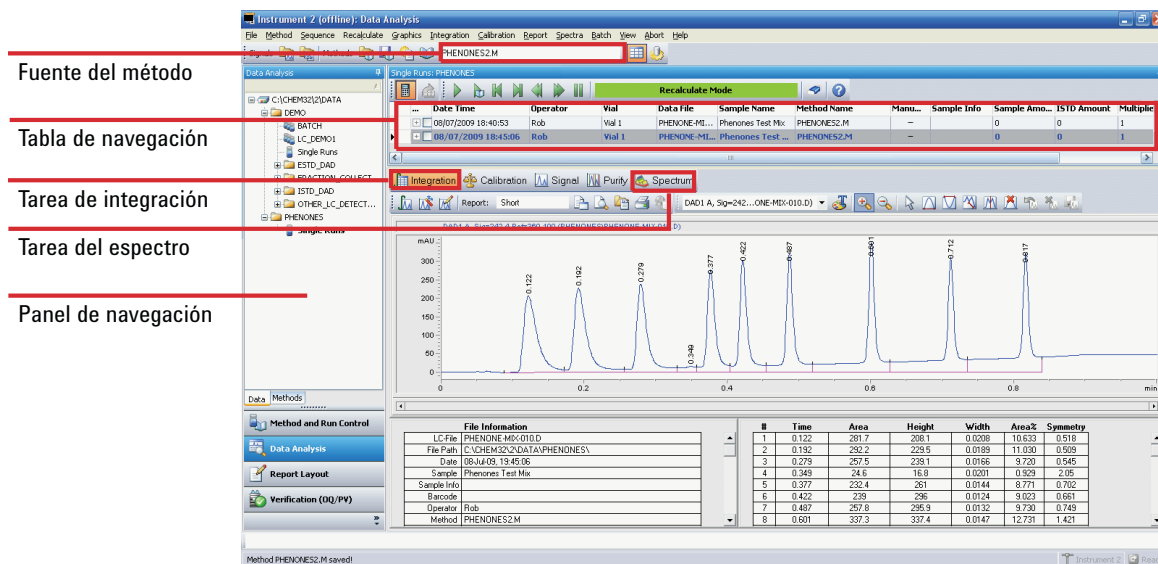


Figura 34 Vista Análisis de datos

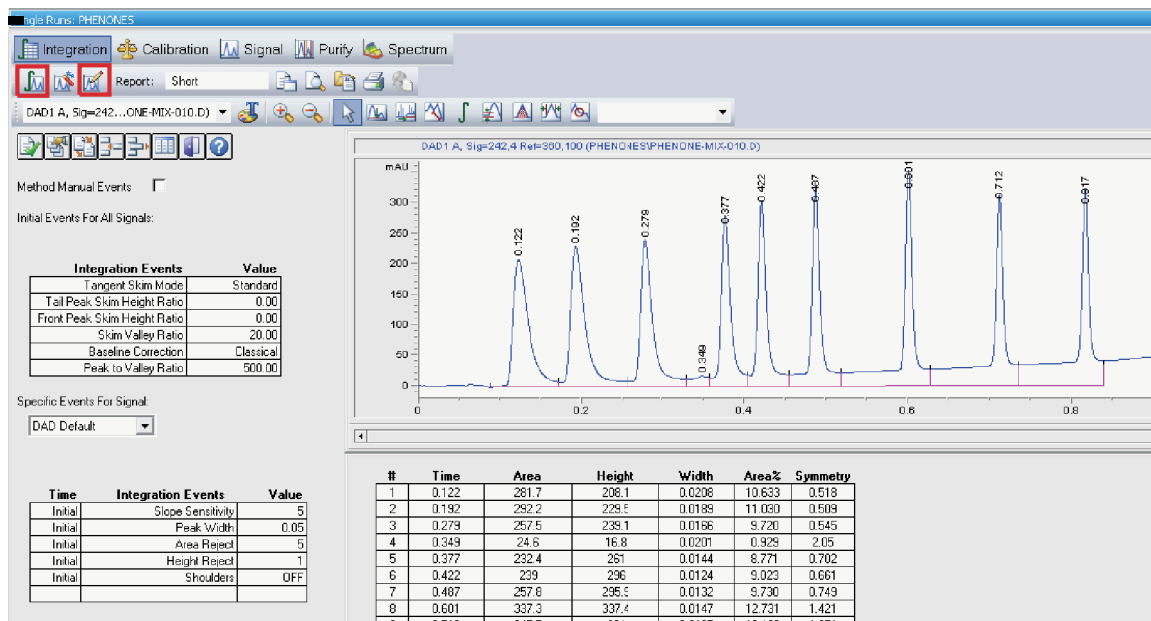
Vista Análisis de datos

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

- 1 Inicie ChemStation sin conexión.
- 2 Haga clic en Análisis de datos en la parte inferior izquierda de la pantalla (consulte la [Figura 34](#) en la página 108).
- 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.

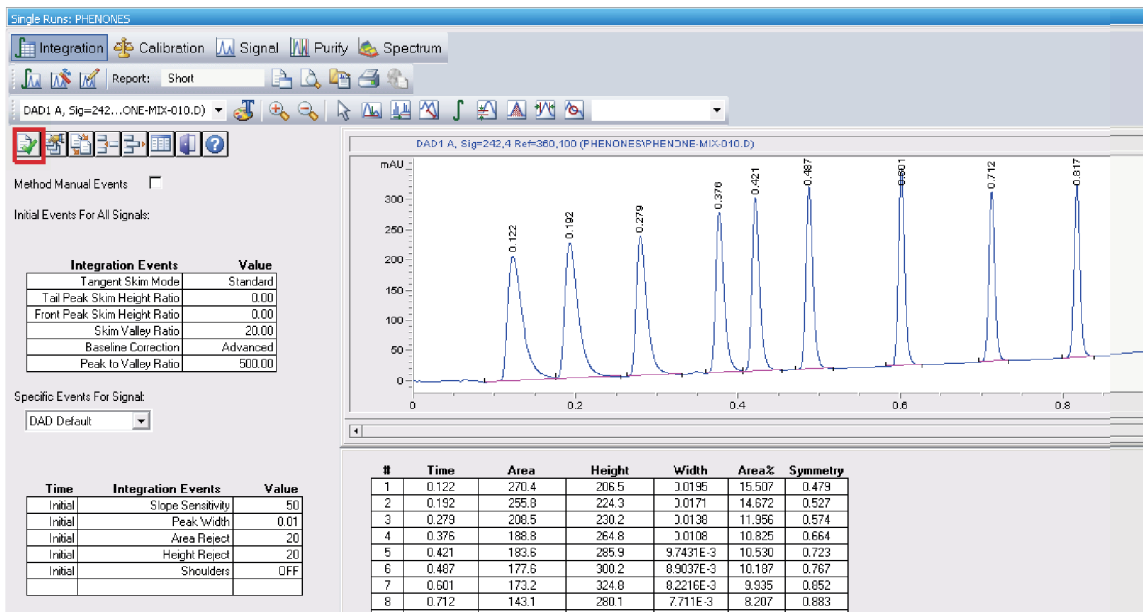
Integración de una señal

- 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.



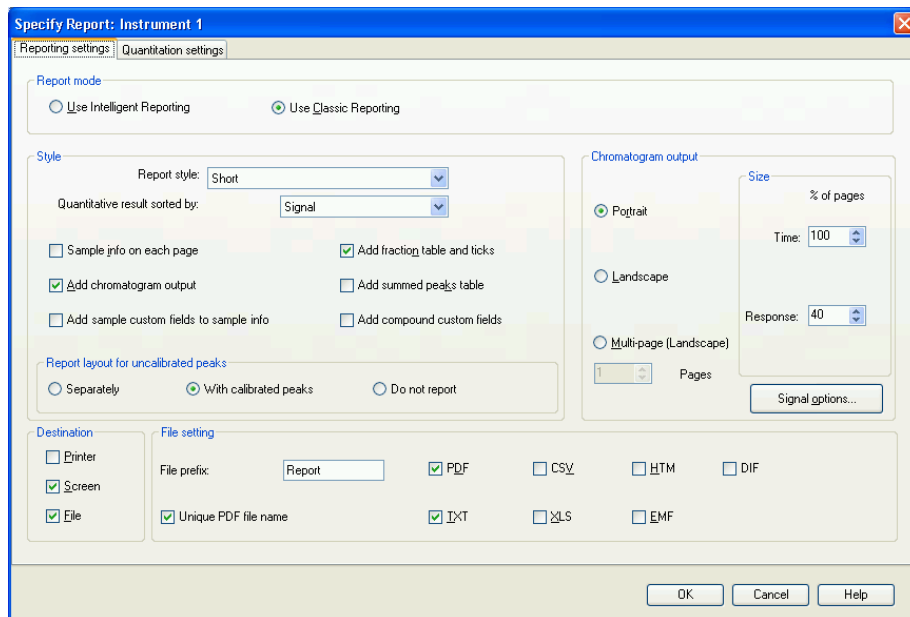
- 2 Haga clic en el icono **Set Integration Events Table** para abrir la tabla.
- 3 Ajuste **Baseline Correction** a **Advanced** para los análisis de gradientes.
- 4 Ajuste la **Slope Sensitivity** a 50. Un valor superior integrará picos más pronunciados e ignorará los picos menos pronunciados.
- 5 Configure el valor **Peak Width** al pico de interés más estrecho, aproximadamente 0,01 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.

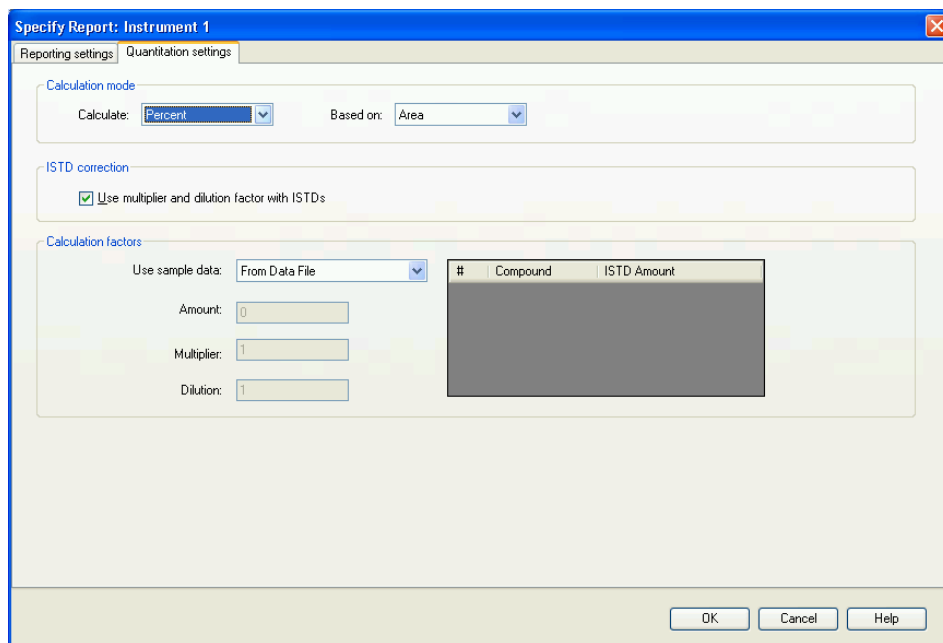
- 8 Salga de la tabla de eventos mediante el icono con la marca verde (consulte la figura que aparece a continuación).



Especificación del informe

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



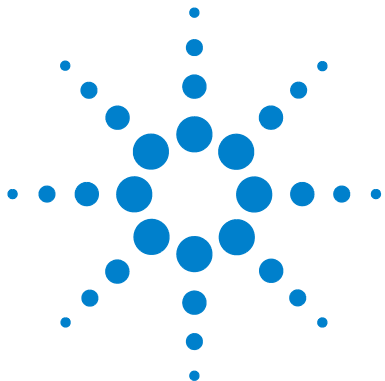


- 2 Con los ajustes de ejemplo que se muestran en las figuras anteriores, puede crear un informe de porcentaje de área en la pantalla.
- 3 En la sección **Destination**, seleccione **Printer** para obtener una copia en papel y seleccione **File** y **PDF** para obtener un fichero PDF del informe y almacenarlo 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.

Quando 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.

5 **Guía de inicio rápida**
Análisis de datos



6 Apéndice

Información sobre seguridad	116
Información sobre disolventes	119
Agilent Technologies en Internet	120
Configuración de un método mediante la opción Edit Entire Method	121
Información del método	123
Instrumento/Adquisición	124
Análisis de datos	139
Lista de comprobación del tiempo de análisis	146

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 10 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

Celda de flujo

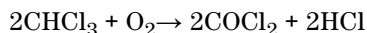
Para proteger la funcionalidad óptima de su celda de flujo:

- Evite la utilización de soluciones alcalinas (pH > 9,5) que ataquen al cuarzo y puedan deteriorar las propiedades ópticas de la celda de flujo.

Utilización de disolventes

Siga estas recomendaciones cuando utilice los disolventes.

- El vidrio de color marrón puede evitar el crecimiento de algas.
- Evite la utilización de los siguientes disolventes corrosivos del acero:
 - Disoluciones de halógenos alcalinos y sus ácidos respectivos (por ejemplo, yoduro de litio, cloruro potásico, etc.).
 - Altas concentraciones de ácidos inorgánicos como ácido sulfúrico y ácido nítrico, especialmente a temperaturas elevadas (si el método cromatográfico lo permite, sustitúyalos por ácido fosfórico o tampón de fosfato, que son menos corrosivos frente al 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 el 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, que adsorbe los peróxidos.
- Disolventes que contengan fuertes agentes complejos (por ejemplo, EDTA).
- Mezclas de tetracloruro de carbono con 2-propanol o THF.

Agilent Technologies en Internet

Para obtener la información más reciente sobre productos y servicios, visítanos en World Wide Web en:

<http://www.agilent.com>

Seleccione Products/Chemical Analysis

Incluye también el último firmware de los módulos de la Serie Agilent 1200 para su descarga.

Configuración de un método mediante la opción Edit Entire Method

Todos los procedimientos y las configuraciones del método se describen para la Bomba binaria 1290 Infinity. Se pueden ejecutar del mismo modo para la Bomba cuaternaria 1290 Infinity.

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 desplegados. 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 **Editar método completo**, ya que de esta forma se pasa automáticamente por las páginas. Se puede acceder a esta función a través del menú **Método > Editar método completo**, lo que lleva a abrir el cuadro de diálogo **Check Method Sections to Edit**:

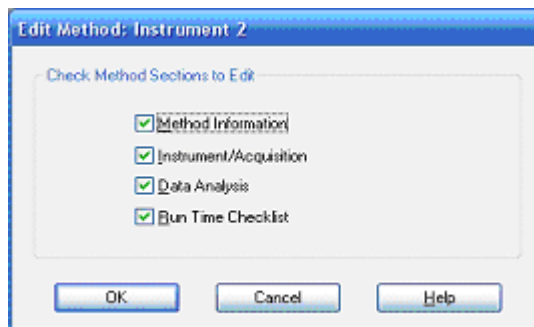


Figura 35 Marque las sección del método que desee editar.

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 **Método > Información del método** 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.

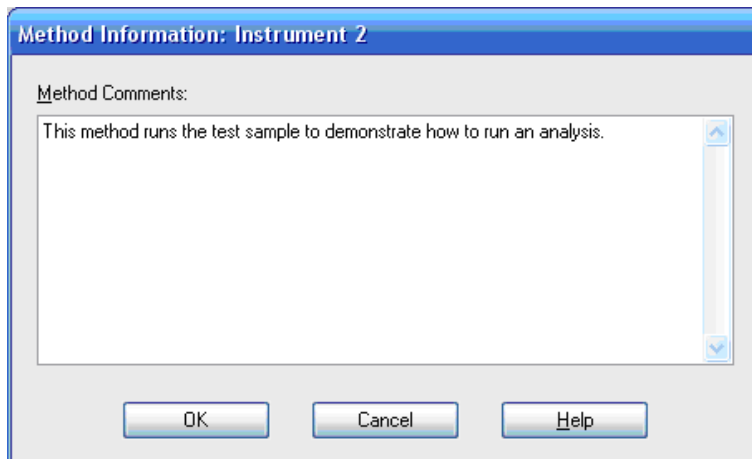


Figura 36 Información del método

Instrumento/Adquisición

Método de instrumento de configuración

Se puede acceder directamente a la pantalla **Setup Method** a través del menú **Instrumento > Método de instrumento de configuración...** 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 del inyector automático (HiP-ALS)

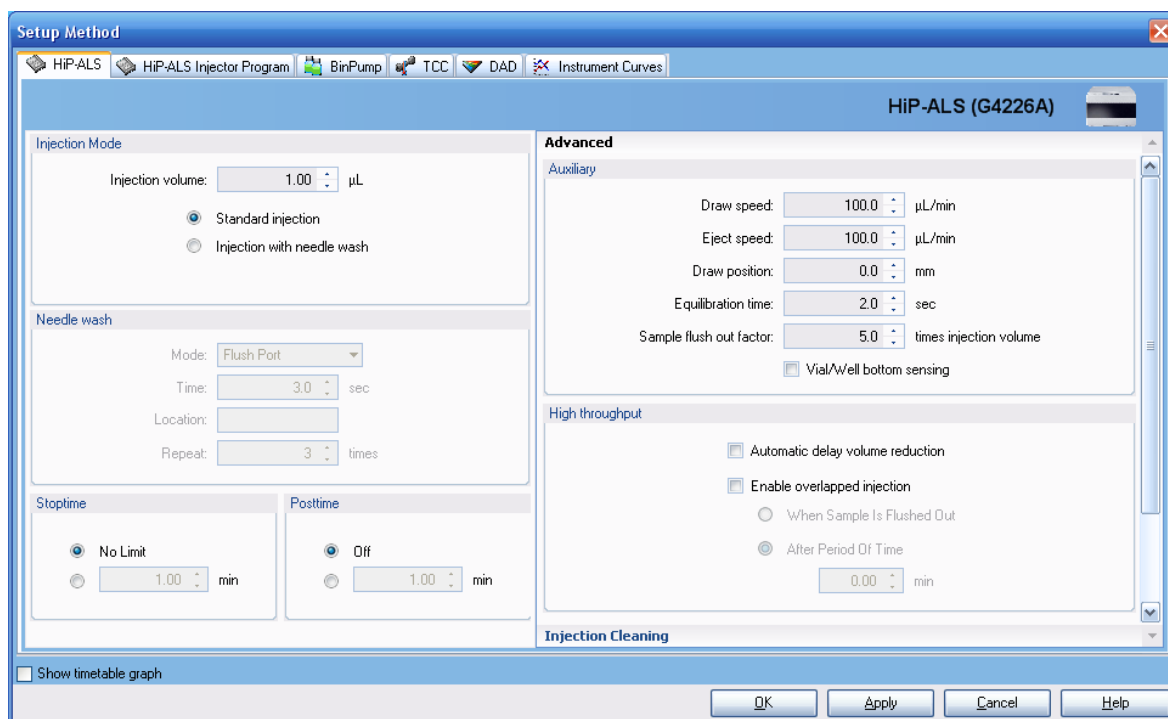


Figura 37 Pantalla Método de configuración: pestaña Inyector automático de alto rendimiento

- **Injection Mode**
 - **Injection volume** ajusta el volumen que se va a inyectar (ejemplo de 3 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 $\mu\text{L}/\text{min}$. Se debe ralentizar para muestras viscosas o para obtener una mayor precisión con volúmenes de muestra pequeños ($<2 \mu\text{L}$).
 - **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 (Hip_ALS Injector Program)

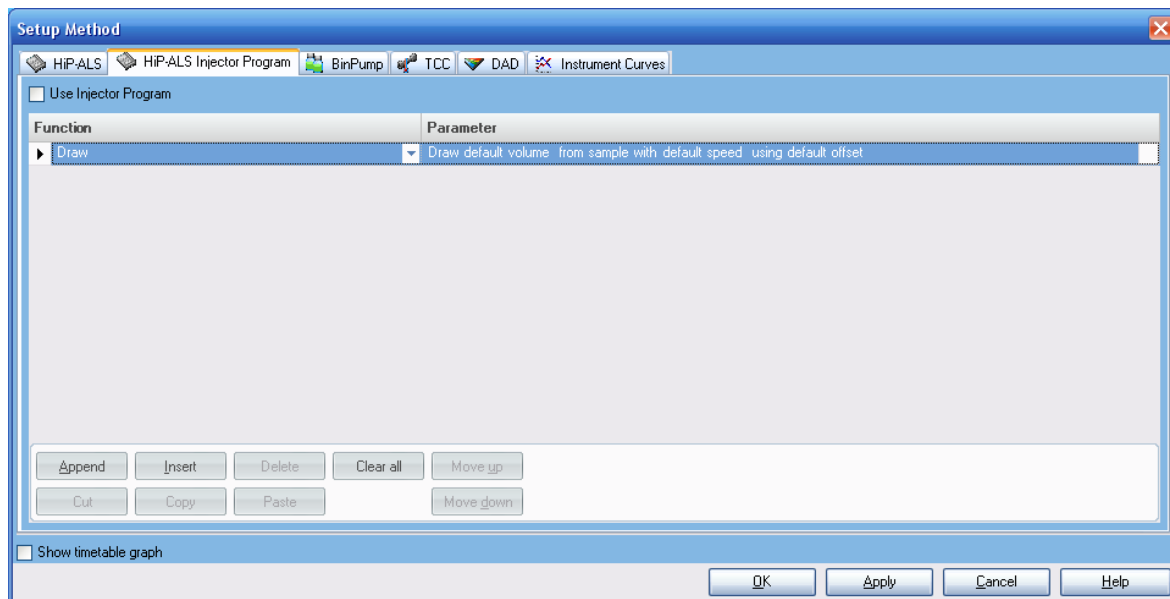


Figura 38 Pantalla Método de configuración: pestaña Programa del Inyector automático HiP

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 Agilent 1290 Infinity*.

Pestaña Bomba binaria (BinPump)

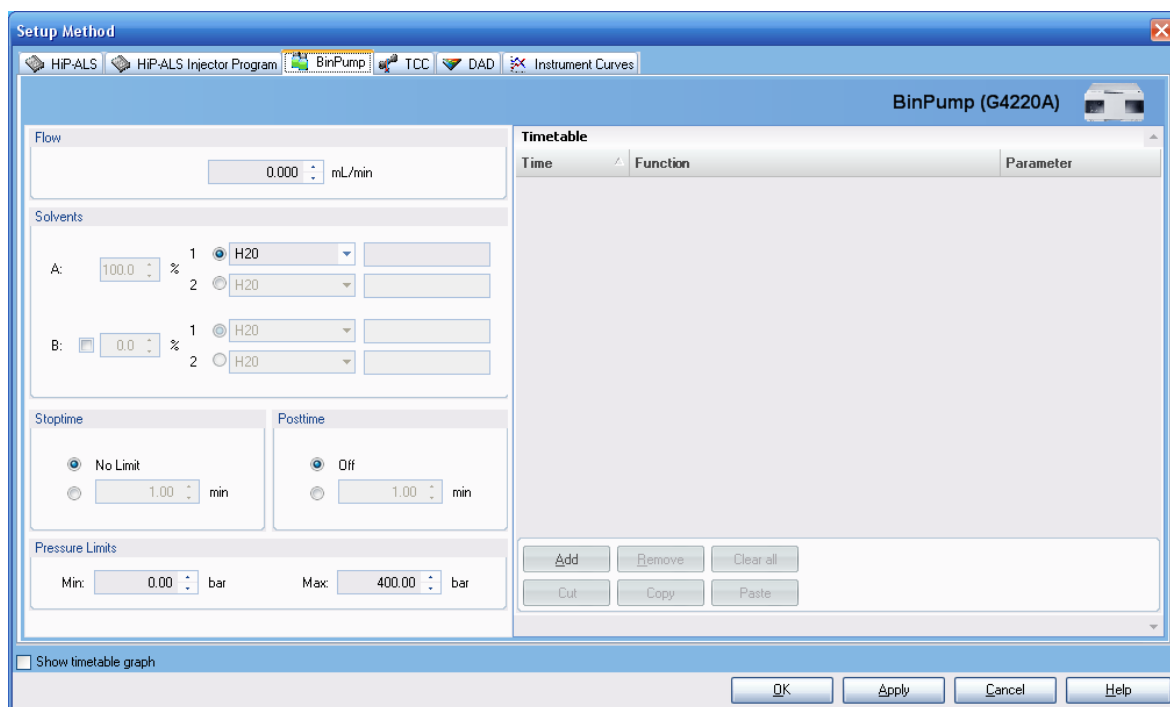


Figura 39 Pantalla Método de configuración: pestaña Bomba binaria

- **Flow** ajusta la velocidad del flujo hasta 5 ml/min. Para la separación del ejemplo se utiliza un valor de 0,4 ml/min. Si la retropresión alcanza brevemente la presión máxima, el flujo se reducirá durante unos segundos para disminuir la presión, pero si la presión sigue limitándose de esta forma, 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 “[Cómo configurar el volumen de retardo óptimo](#)” en la página 42. 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 selecciona 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 definen las condiciones de inicio de un método de gradiente y las condiciones de equilibrio entre los análisis de gradiente. Únicamente se introduce el valor de B, A se actualizará para mostrar el 100% menos el valor de B cuando se mueva el cursor. Para la separación del ejemplo, ajuste A en agua y B en metanol al 50 %. El valor de A será de 50 %.

- **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 agregar una línea en la tabla de tiempos; introduzca el tiempo del valor, seleccione el tipo de entrada de la lista desplegable (composición, flujo, 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 reordenan automáticamente según el tiempo. Las líneas de la tabla de tiempo 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 para la separación del ejemplo, en primer lugar vacíe la tabla de tiempo mediante el botón **Clear all** si todavía no está vacía y añada una línea de 4,00 min para cambiar la composición al 90 %. El gráfico mostrará un gradiente lineal del 50 % B al 90 % B durante 4 min. 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 eludir rápidamente los picos fuertemente retenidos de una columna hacia al final de un análisis mediante el aumento del disolvente más potente y/o la velocidad del 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 intro-

ducir los nuevos ajustes en la tabla de tiempos y los valores en la sección Disolventes 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 general para la separación o el análisis y algunos usuarios se refieren a él como el "Tiempo del análisis". Este es el tiempo, que se cuenta en minutos desde la inyección, en que finaliza el análisis, lo que significa que la adquisición de datos se detendrá, el flujo, la composición y otros 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. Mientras todos los módulos del sistema tienen parámetros de Tiempo de parada, el Tiempo de parada en 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 necesitará tiempo para el volumen de retraso del sistema, además de limpiar al menos entre tres y cinco volúmenes de columna mediante el sistema.
- **Pressure Limits** controlan el comportamiento de la bomba en lo que respecta a la presión. La presión máxima de la bomba 1290 Infinity es de 1200 bar, pero algunas columnas solo pueden soportar una presión inferior y si se configura este valor se protege la columna. La bomba generará un estado de error si se alcanza esta presión, se detendrá cualquier análisis en marcha y la bomba cambiará al modo de espera sin flujo. Se proporciona información sobre la presión máxima para una columna determinada con la columna. Las columnas ZORBAX RRHD de Agilent son adecuadas para funcionar a 1200 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 un valor de entre 10 y 20 bar.

Pestaña Compartimento termostatzado de columna (TCC)

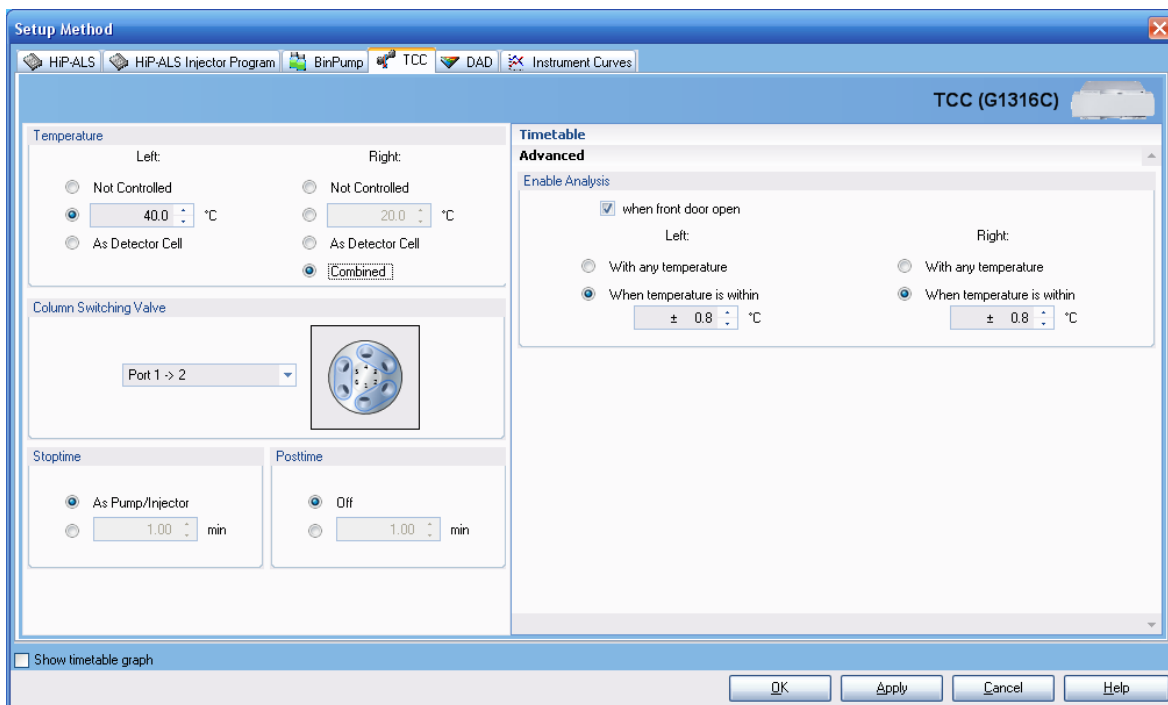


Figura 40 Pantalla Método de configuración: pestaña Compartimento termostatzado de columna

- **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 pueden 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 1290 Infinity.

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 RRHD y 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 (DAD)

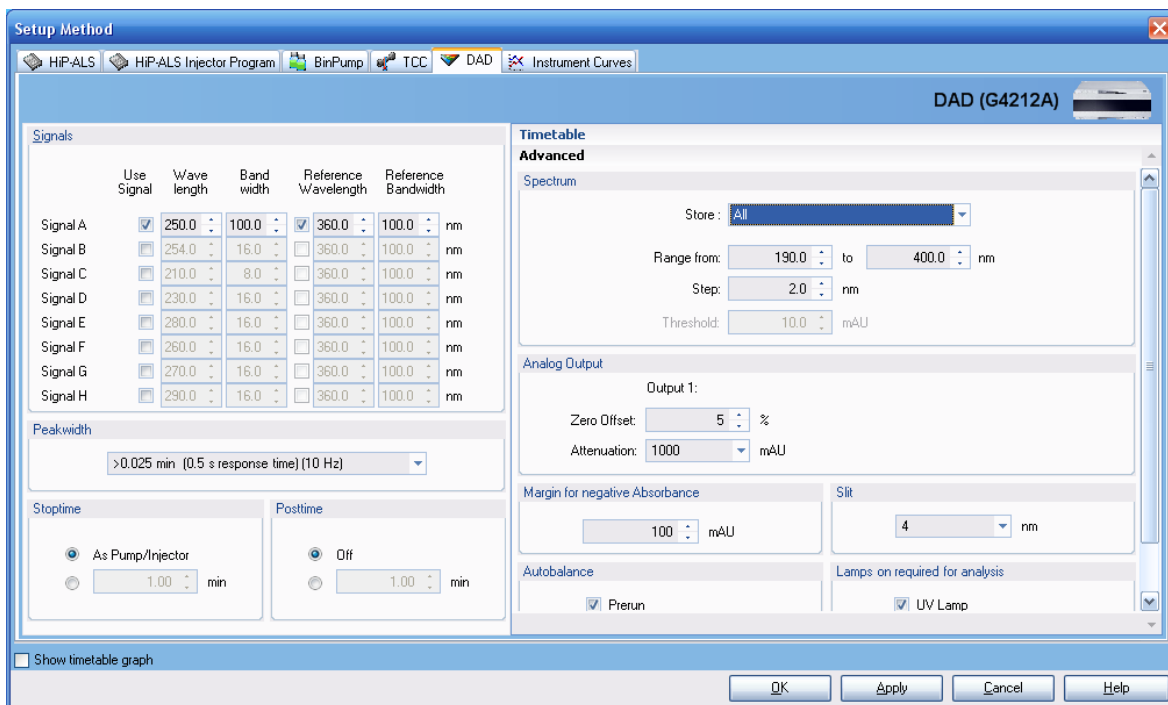


Figura 41 Pantalla Método de configuración: pestaña Detector de diodos

- **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.
- **Stop Time/Post Time** se establecen como **No Limit / Off** y estos valores se ajustan generalmente en la pestaña **Pump**. Sin embargo, el módulo del detector Tiempo de parada puede ser diferente del Tiempo de parada de la bomba si

es necesario detener el análisis de datos antes del final del análisis 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, %B puede elevarse hasta el 95 % en 10 min y se espera que todos los picos se hayan diluido de la columna, por lo que el análisis está básicamente en el final, pero se añade un segmento de gradiente extra que hace que %B vuelva al valor inicial durante dos minutos para iniciar el reequilibrio 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 y la recogida de datos se detiene mientras el Tiempo de parada de la bomba sea 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 de la misma forma que lo haría un tiempo de parada anterior en cualquier otro módulo, de ahí el inconveniente de establecer el tiempo de parada **As Pump**.

- **Timetable** funciona de la misma forma que otros módulos, es decir, añada una línea, seleccione la función que desee cambiar e introduzca los nuevos valores para esa función. Los cambios del detector tendrán lugar inmediatamente en el tiempo especificado. Las siguientes funciones se pueden cambiar durante el análisis:
 - Equilibrio
 - Cambiar señal
 - Cambiar umbral
 - Cambiar pico (detector de anchura de pico)
 - Cambiar modo de adquisición de espectros
 - Cambiar contactos
- **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 está determinada por el ajuste **Peakwidth** y se toman ocho

espectros en el tiempo especificado en **Peakwidth**. 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:

Ninguno: no se almacenan espectros.

Máximo+Líneas base: se toman 3 espectros al inicio, en el máximo y al final del pico.

Máximo+Pendientes+Líneas base: se toman 5 espectros al inicio, en la pendiente ascendente, en el máximo, en la pendiente descendente y al final del pico.

Todos en el pico: se almacenan todos los espectros disponibles en un pico.

Todos: se almacenan todos los espectros durante el análisis.

Cada 2.º espectro: almacena únicamente espectros alternos adquiridos durante el análisis.

- **Range:** los espectros se pueden guardar por 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 detector 1290 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 absorbancia 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 - Slit**

La rendija de entrada al espectrograma controla la resolución espectral e influye en el ruido y la sensibilidad de la línea base. El valor predeterminado es 4 nm, que es adecuado para la mayoría de aplicaciones. Consulte [“Cómo conseguir una mayor sensibilidad”](#) en la página 60 para obtener más información sobre este parámetro.

- **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 equilibrio al final del análisis tras finalizarse 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 analysis:** el DAD o MWD 1290 Infinity posee una lámpara de deuterio que debe estar encendida para realizar el análisis, por lo que esta casilla debe estar marcada.

Pestaña Instrument Curves

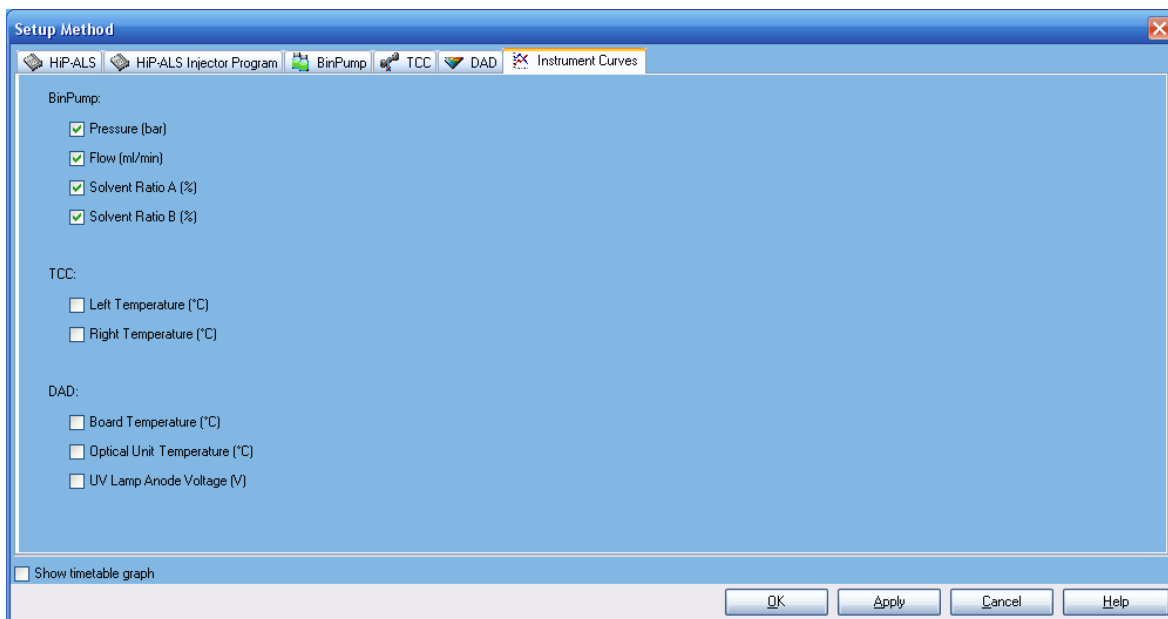


Figura 42 Pantalla Método de configuración: pestaña Curvas del instrumento

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 **Calibración > Detalles de la señal**.

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 Edit Entire Method

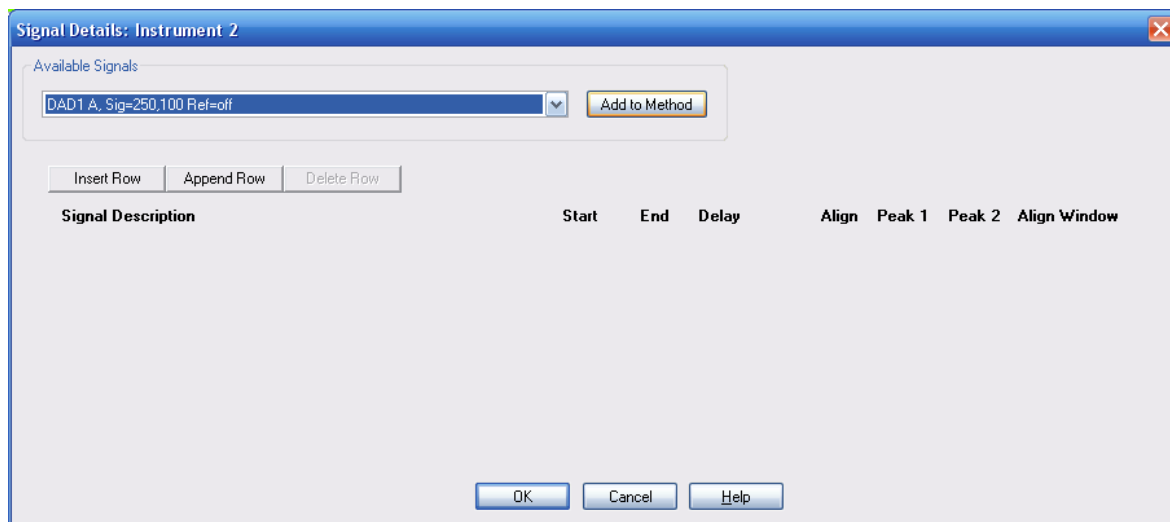


Figura 43 Detalles de la señal

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 **Integración > Parámetros de integración...** o el icono **Edit Integration Events**.

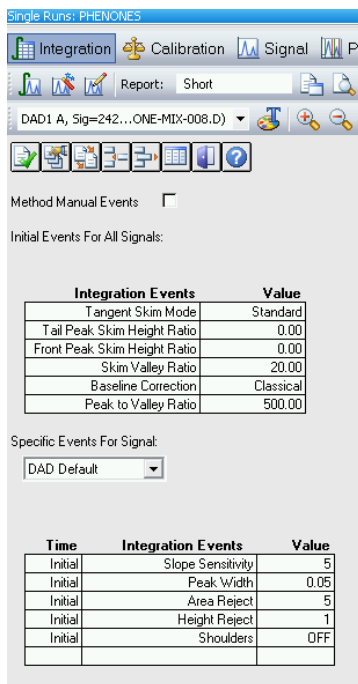


Figura 44 Pantalla Editar parámetros de integración

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 **Informe > Especificar informe** o el icono Especificar informe.

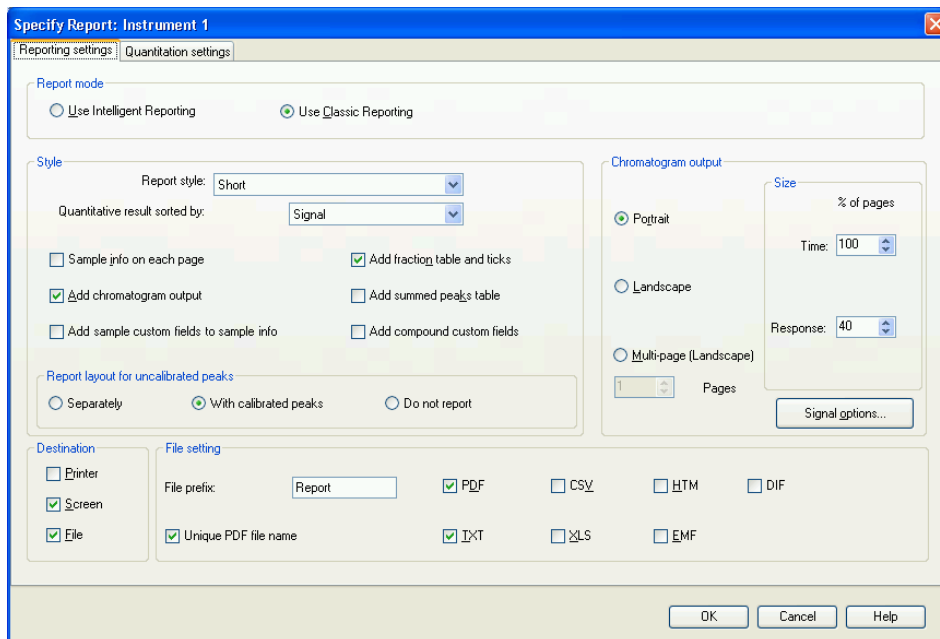


Figura 45 Pantalla Especificar informe

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

6 Apéndice

Configuración de un método mediante la opción Edit Entire Method

- **Add Chromatogram Output:** Marcado
- **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

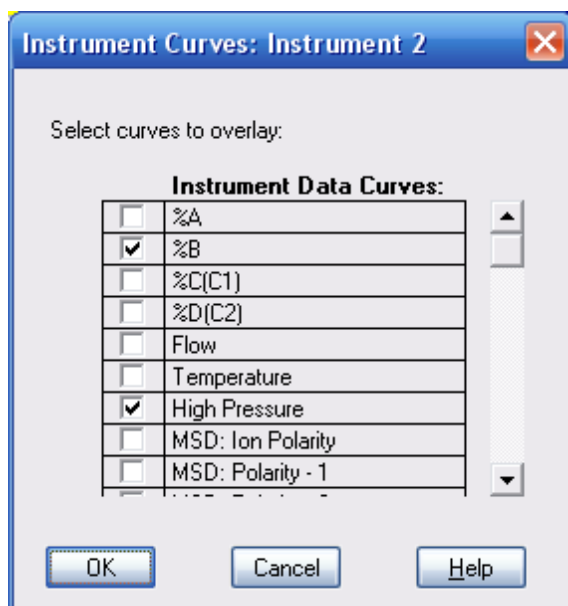


Figura 46 Pantalla Curvas del instrumento

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 **Método > Lista de comprobación del tiempo de análisis...** o haciendo clic en el icono **Run Time Checklist** situado en la parte superior derecha de la pantalla.

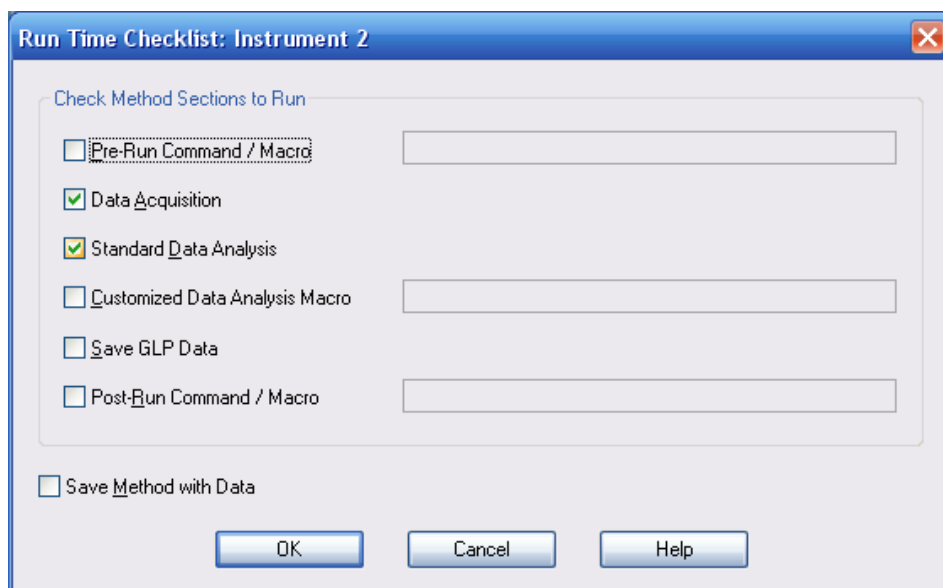


Figura 47 Pantalla Lista de comprobación del tiempo de análisis

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 **Fichero > Guardar como > Método** o **Menú de método > Guardar método como**.

Glosario UI

1

1290 Infinity Autosampler
 Inyector automático 1290 Infinity
 1290 Infinity Binary Pump
 Bomba binaria 1290 Infinity
 1290 Infinity DAD
 DAD 1290 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 analoga
 Advanced - Autobalance
 Avanzado - Autoequilibrio
 Advanced - Auxiliary
 Avanzado - Auxiliar
 Advanced - High Throughput
 Avanzado - Alto rendimiento
 Advanced - Lamps on required for analysis
 Avanzado - Lámparas encendidas
 requeridas para el análisis

Advanced - Margin for Negative Absorbance
 Avanzado - Margen para la absorbencia negativa
 Advanced - Slit
 Avanzado - Rendija
 Advanced - Spectrum
 Avanzado- Espectro
 All
 Todo
 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
 Como bomba
 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 Solvent Composition
 Cambiar composición del disolvente
 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
 Composition A
 Composición A

Composition B
Composición B

Customized Data Analysis Macro
Macro del análisis de datos personal-
izado

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

Duration
Duración

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

Equilibration time
Tiempo de equilibrio

F

File
Fichero

File Setting
Opciones de fichero

Filename
Nombre de fichero

Flow
Flujo

Flush Port
Puerto de lavado

H

Height Reject
Rechazo de altura

Hip_ALS Injector Program
Programa del Inyector Hip_ALS

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 Curves
Curvas del instrumento

Instrument/Acquisition
Instrumento/Adquisición

Instruments
Instrumentos

Integrate
Integrar

Integration OFF/ON
Apagar/Encender integración

L

Launch online
Iniciar en línea

Load Method
Cargar método

Location
Ubicación de la muestra

M

Method
Método

Method and Run Control
Control del método y el análisis

Method History
Historial del método

Method Information
Información del método

Method...
Método...

Mode
Modo

N

Needle Wash
Lavado de aguja

No Limit
Sin límites

No Limit / Off
Sin límite/Desconectado

Glosario UI

O

Off
Apagado
OK
Aceptar
Online Plot
Gráfico en línea

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
Prerun
Pre-análisis
Pre-Run Command / Macro
Comando pre-análisis/Macro
Pressure Limits
Límites de presión
Prime On
Encender el cebado
Printer
Impresora
Pump
Bomba
Purge
Purga

Purge On
Encender la purga

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 mode
Modo de informe
Report Style
Estilo de informe
Reporting settings
Opciones de informe
Response
Respuesta
Run Method
Ejecutar método
Run Sequence
Ejecutar secuencia
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 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 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
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 Single Sample
Iniciar muestra individual

Step
Paso

Stop Time
Tiempo de parada

Stop Time / Post Time
Tiempo de parada/Tiempo posterior

Store
Almacenar

Style
Estilo

Subdirectory
Subdirectorío

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/Well bottom sensing
Percepción del final del vial/pocillo

W

Wash Vial
Vial de lavado

Water
Agua

Wavelength
Longitud de onda

Z

Zero Offset
Compensación cero

Índice

A

- Agilent
 - en Internet 120
- algas 119
- alta productividad
 - Optimización 54
- análisis de datos 122
- análisis
 - datos 108
- anchura de banda 64
- anchura de pico 66
- anchura de rendija 65

B

- bloqueo de columna
 - directrices de uso 71
- Bomba binaria
 - descripción 26
- bomba de purga 88

C

- calculadora
 - costes 14
- calentamiento derivado de la fricción 18
- carga
 - predeterminado 96
- celda de flujo
 - celda de flujo de cartucho
 - Max-Light 62
 - celda de sensibilidad elevada
 - Max-Light 62
 - información sobre disolventes 119
- columna
 - temperatura 18

termostatación 18

- columnas
 - Partículas inferiores a 2 µm 14
- Compartimento termostataado de columna
 - descripción 35
- componentes del sistema
 - bomba binaria 26
 - compartimento termostataado de columna 35
 - detector de diodos 37
 - inyector automático 33
- configuración e instalación del sistema
 - integración en la red 91
- Configuración
 - dos torres de módulos 79, 84
 - gráfico en línea 98
 - una torre de módulos 76, 81
 - vista frontal de las dos torres de módulos 79, 84
 - vista posterior de las dos torres de módulos 80, 85
- cromatografía líquida
 - uso de partículas más pequeñas 8

D

- datos
 - análisis 108
- DEF_LC.M 121
- Detector de diodos
 - descripción 37
- detector
 - obtener una sensibilidad más elevada 62
- disolventes 119

E

- Ecuación de Van Deemter 9
- efecto memoria 69

F

- factor de retención 11

G

- gráfico en línea
 - configuración 98
- guía de inicio rápida
 - introducción 94

I

- información del método 122, 123
- información sobre disolventes 119
- informe
 - especificación 112
- Instrumento/Adquisición 122
- integración en la red 91
- integración 110
 - señal 110
- Internet 120
- Inyector automático Infinity
 - descripción 33

J

- Jet Weaver
 - retire las conexiones de los capilares 49

L

Lista de comprobación del tiempo de análisis 122
 longitud de onda de la señal 64
 longitud de onda y anchura de banda optimización 62

M

método de instrumento de configuración 124
 método
 configuración 103
 editar método completo 121
 ejecución más rápida 106
 inyección individual 105
 predeterminado 121

O

optimización
 anchura de rendija 65
 condiciones de HPLC 11
 conseguir alta productividad 54
 conseguir el menor efecto memoria 69
 longitud de onda y anchura de banda 62
 obtención de una mayor sensibilidad 60
 obtención de una resolución más alta 57
 prevención de los bloqueos de columnas 71
 sensibilidad del detector 62
 separación cromatográfica 11
 uso de la columna 60
 volumen del mezclador de la bomba 60
 volúmenes de inyección 52

P

parámetros del método 101
 partículas inferiores a 2 µm 14
 platos teóricos 11

R

reducción automática del volumen de retardo 69
 resolución 11, 17
 Optimización 57

S

seguridad de primera clase 116
 seguridad
 información general 116
 símbolos 118
 señal
 integración 110
 sensibilidad
 optimización 60
 Sistema LC Agilent 1290 Infinity
 Componentes del sistema 26
 nuevas funciones 22
 rango de potencia 22
 sistema
 encendido 95

T

tabla de parámetros de integración 110
 tiempo de respuesta 66

V

velocidad de recopilación de datos 66
 volumen de inyección
 obtención de mayores volúmenes 52
 volumen de retardo
 descripción 40

ejemplo 40

volumen del mezclador de la bomba 60
 volumen extracolumna
 descripción 41

www.agilent.com

En este manual

Este manual incluye información de referencia técnica sobre el sistema LC Agilent 1290 Infinity.

En este manual se describe lo siguiente:

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

© Agilent Technologies 2009-2011, 2012

Printed in Germany
05/2012



G4220-95301