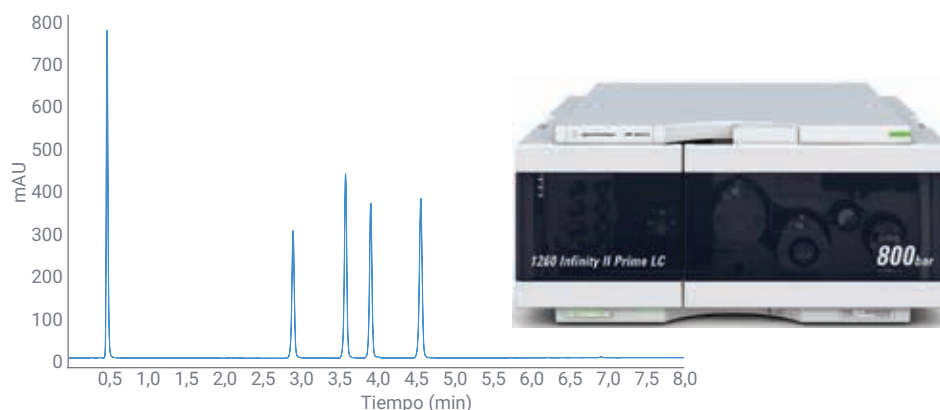


La bomba flexible 1260 Infinity II de Agilent

La referencia para todas las bombas de gradiente con mezcla a baja presión por su gran exactitud y precisión



Autores

Melanie Metzloff y
Patric Hörth
Agilent Technologies, Inc.

Resumen

La bomba flexible 1260 Infinity II de Agilent ofrece la mayor flexibilidad para aplicaciones convencionales en columnas de 4,6 mm o en análisis rápidos en columnas de 2,1 y 3 mm de d.i. sin comprometer la precisión ni la exactitud.

Este resumen técnico demuestra el extraordinario rendimiento de la bomba flexible 1260 Infinity II. Se evaluó la precisión de los tiempos de retención bajo condiciones exigentes, y se comparó con la de la bomba binaria 1260 Infinity II de Agilent. Además, se evaluó la precisión de la composición, el volumen de retardo y la precisión de flujo de ambas bombas mediante un gradiente de pasos.

Introducción

La bomba flexible 1260 Infinity II de Agilent es una bomba de gradiente con mezcla a baja presión, y es capaz de alcanzar una presión operativa de 800 bar. Su válvula integrada multiusos cuenta con varias funciones prácticas, como la purga automática, la conexión/desconexión de un mezclador adicional y un filtrado por retroflujo.

Para demostrar el excelente rendimiento de la bomba flexible 1260 Infinity II, se seleccionaron diferentes aplicaciones de gran exigencia. Se compararon los resultados de la bomba flexible 1260 Infinity II con los resultados obtenidos con la bomba binaria 1260 Infinity II de Agilent.

Experimento

Instrumentos

Para dichos experimentos se emplearon los siguientes módulos:

- Bomba flexible 1260 Infinity II de Agilent (G7104C)
- Bomba binaria 1260 Infinity II de Agilent (G7112B)
- Muestreador múltiple 1260 Infinity II de Agilent (G7167A), equipado con un refrigerador de muestras integrado (opción n.º 100)
- Termostato multicolumna 1260 Infinity II de Agilent (G7116A)
- Detector de diodo array 1260 Infinity II WR de Agilent (G7115A) con celda de flujo estándar: Camino óptico de 10 mm, volumen 13 µl

Software

Agilent OpenLAB CDS 2.2 (M8413A)

Productos químicos

Todos los disolventes eran de calidad LC. Se obtuvo agua ultrapura nueva a partir de un sistema integral Milli-Q equipado con un cartucho de membrana de 0,22 µm en el punto de consumo (Millipak). El acetonitrilo y la acetona

se compraron a Merck (Darmstadt, Alemania). El ácido trifluoroacético (TFA) y el ácido fórmico (FA) se compraron a Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

Métodos

Tabla 1. Condiciones cromatográficas para gradiente de pasos.

Parámetro	Valor
Columna	Capilar de restricción
Disolvente	A) 0,3 % Acetona en agua B) Agua
Gradiente	Entre 20 y 45 minutos en saltos del 1 % desde 100 hasta 94 %A Entre 45 y 55 minutos en saltos del 2 % desde 94 hasta 90 %A Entre 55 y 80 minutos en saltos del 10 % desde 90 hasta 51 %A Entre 80 y 90 minutos en saltos del 1 % desde 51 hasta 49 %A Entre 90,01 y 110 minutos en saltos del 10 % desde 40 hasta 10 %A Entre 110,01 y 135 minutos en saltos del 2 % desde 6 hasta 0 %A
Tiempo de parada	140 minutos
Flujo	1 ml/min
Temperatura de la columna	30 °C
Detector de diodo array	273/4 nm, ref. 360/100 nm, 10 Hz

Tabla 2. Condiciones cromatográficas para análisis en gradiente suave.

Parámetro	Valor
Compuestos	Mezcla polifenólica: Catequina, ácido cafeico, epicatequina (comprados a Sigma-Aldrich)
Columna	Columna Agilent ZORBAX StableBond C18, 2,1 × 50 mm, 1,8 µm (Ref. 857700-902)
Disolvente	A) FA al 0,1 % en agua B) FA al 0,1 % en acetonitrilo
Gradiente	0 minutos–6 %B 8 minutos–12 %B
Tiempo de parada	8 minutos
Tiempo posterior	3 minutos
Flujo	0,6 ml/min
Volumen de inyección	2 µl con tiempo de lavado de la aguja de 3 segundos (acetonitrilo al 60 % en agua)
Temperatura de la muestra	10 °C
Temperatura de la columna	30 °C
Detector de diodo array	280/4 nm, ref. 360/50 nm, 40 Hz

Tabla 3. Condiciones cromatográficas para análisis con porcentajes bajos de disolvente orgánico.

Parámetro	Valor
Compuestos	Sulfamidas: Sulfanilamida, sulfatiazol, sulfamerazina, sulfaclorpiridazina, sulfametacina (compradas a Sigma-Aldrich)
Columna	Columna Agilent ZORBAX StableBond C18, 2,1 × 50 mm, 1,8 µm (Ref: 857700-902)
Disolvente	A) ácido trifluoroacético al 0,1 % en agua B) ácido trifluoroacético al 0,1 % en acetonitrilo
Gradiente	0 minutos-1 %B 6 minutos-25 %B
Tiempo de parada	8 minutos
Tiempo posterior	3 minutos
Flujo	0,6 ml/min
Volumen de inyección	2 µl con tiempo de lavado de la aguja de 3 segundos (acetonitrilo al 60 % en agua)
Temperatura de la muestra	10 °C
Temperatura de la columna	45 °C
Detector de diodo array	254/4 nm, ref. 360/80 nm, 20 Hz

Resultados y comentarios

Experimento 1: Gradiente de pasos

Se utilizaron gradientes en pasos, incluido un trazador en el disolvente A, para determinar el volumen de retardo del sistema, la precisión de la composición, el ruido de mezcla y la precisión de flujo. Para la evaluación de la precisión de flujo, se utilizó un flujómetro de precisión (FAM).

Se aplicaron gradientes en pasos en idénticas condiciones a la bomba flexible 1260 Infinity II, con y sin el mezclador Agilent Jet Weaver, y a la bomba binaria 1260 Infinity II. La Figura 1 muestra una superposición de los tres gradientes en pasos que iban desde 100 % A (agua + trazador) hasta 0 % A (agua + trazador) en intervalos de 1, 2 y 10 %. Ambas bombas mostraron un rendimiento excelente a lo largo de todo el intervalo del gradiente. Los intervalos del gradiente se resolvieron perfectamente incluso en el caso de los intervalos de 1 % con un % bajo de disolvente B. Estos resultados demuestran claramente un rendimiento del gradiente de la bomba flexible 1260 Infinity II equivalente al de la bomba binaria 1260 Infinity II, incluso en unos intervalos tan exigentes como el que va del 1 al 5 %B.

Tabla 4. Condiciones cromatográficas para análisis con porcentajes altos de disolvente orgánico.

Parámetro	Valor
Compuestos	Mezcla de Sudán rojo: Sudán I, Sudán II, Sudán III, Sudán IV (comprados a Sigma-Aldrich)
Columna	Columna Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 3,0 × 50 mm, 1,8 µm (Ref: 959941-302)
Disolvente	A) Agua B) acetonitrilo al 95 % en agua
Gradiente	0 minutos-90 %B 4 minutos - 100 %B
Tiempo de parada	4 minutos
Tiempo posterior	2 minutos
Flujo	1 ml/min
Volumen de inyección	1 µl con tiempo de lavado de la aguja de 3 segundos (acetonitrilo)
Temperatura de la muestra	10 °C
Temperatura de la columna	40 °C
Detector de diodo array	490/20 nm, sin Ref., 20 Hz

Tabla 5. Condiciones cromatográficas para análisis en gradiente rápido.

Parámetro	Valor
Compuestos	Muestra de comprobación Agilent RRLC (Ref. 5188-6529)
Columna	Columna Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 3,0 × 50 mm, 1,8 µm (Ref: 959941-302)
Disolvente	A) Agua B) Acetonitrilo
Gradiente	0 minutos-30 %B 1 minutos-100 %B
Tiempo de parada	2 minutos
Tiempo posterior	1 minutos
Flujo	2 ml/min
Volumen de inyección	1 µl con tiempo de lavado de la aguja de 3 segundos (acetonitrilo al 60 % en agua)
Temperatura de la muestra	10 °C
Temperatura de la columna	60 °C
Detector de diodo array	254/4 nm, Ref. 360/60, 80 Hz

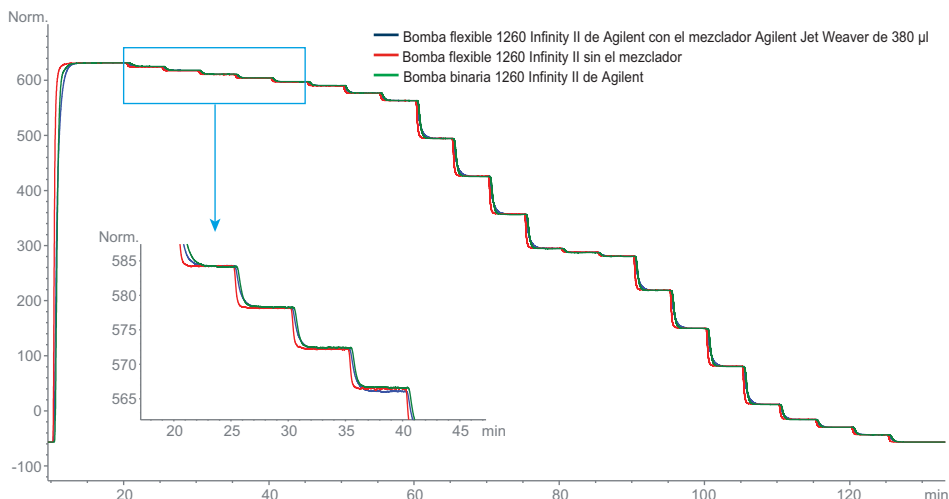


Figura 1. Gradientes en pasos desde 100 % hasta 0 % de trazador en una bomba flexible Agilent 1260 Infinity II con y sin mezclador, y en una bomba binaria Agilent 1260 Infinity II.

La precisión de la composición se calculó en ambas bombas en función de los gradientes en pasos. La Figura 2 muestra la precisión de la composición de la bomba flexible 1260 Infinity II (con y sin el mezclador Agilent Jet Weaver de 380 µl) y de la bomba binaria 1260 Infinity II. Las especificaciones para la precisión de la composición se definieron como el $\pm 0,35\%$ para la bomba binaria 1260 Infinity II, y como el $\pm 0,4\%$ para la bomba flexible 1260 Infinity II. La precisión de la composición de ambas bombas se mantuvo dentro del intervalo especificado.

La tabla 7 resume el volumen de retardo del sistema, el ruido de mezcla y la precisión de flujo. Tal y como se esperaba, la bomba flexible 1260 Infinity II sin el mezclador Agilent Jet Weaver presentó el menor volumen de retardo: aproximadamente 310 µl. Conectando el mezclador Agilent Jet Weaver de 380 µl a la ruta de flujo, se aumentó el volumen de retardo a solo 460 µl. Para la bomba binaria 1260 Infinity II, se calculó un volumen de retardo de 610 µl. Todos los volúmenes de retardo de las bombas incluyen el volumen de los capilares, el capilar de restricción y la celda del detector. El muestreador múltiple 1260 Infinity II no formaba parte de la ruta de flujo para estas medidas.

El ruido de mezcla se calculó en cada etapa del gradiente en su totalidad. La Tabla 7 compara los valores en tres etapas diferentes: 95 %, 49 % y 4 % de trazador. La bomba flexible 1260 Infinity II y la bomba binaria 1260 Infinity II mostraron unos resultados similares. Sin embargo, la bomba flexible 1260 Infinity II con el mezclador Agilent Jet Weaver de 380 µl ofreció los mejores resultados respecto al ruido de mezcla. Con el mezclador adicional, el volumen de retardo de la bomba flexible 1260 Infinity II aumentó ligeramente, pero facilitó una señal UV más

estable gracias a un mejor rendimiento de mezclado. Estos resultados demuestran claramente el extraordinario rendimiento del mezclador Agilent Jet Weaver con un mezclado eficiente y un diseño elegante, que mantiene el volumen de retardo lo más bajo posible.

Al añadir un FAM a la configuración del sistema modular del LC, se monitorizó el flujo real en función del gradiente

de pasos. Para la bomba flexible 1260 Infinity II, el flujo real (0,998 ml/min) resultó ligeramente inferior al valor programado de 1 ml/min. El flujo real para la bomba binaria 1260 Infinity II mostró unos valores ligeramente más altos, de 1,003 ml/min. Sin embargo, ambas bombas tuvieron un rendimiento excelente, y se situaron dentro del intervalo especificado de $\pm 1\%$.

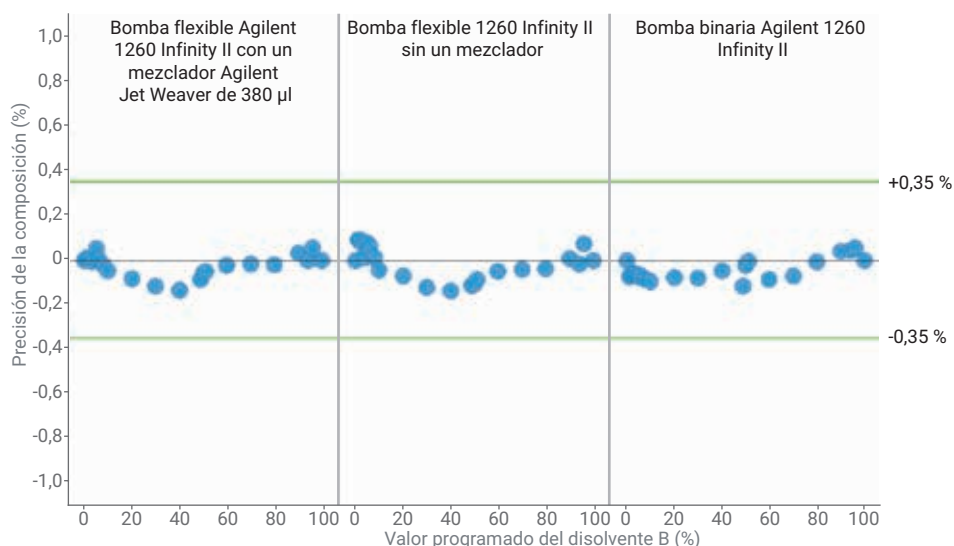


Figura 2. Precisión de la composición para la bomba flexible Agilent 1260 Infinity II con y sin mezclador, y para la bomba binaria 1260 Infinity II de Agilent.

Tabla 7. Resultados de los gradientes en pasos.

	Bomba flexible 1260 Infinity II de Agilent con el mezclador Agilent Jet Weaver de 380 µl	Bomba flexible Agilent 1260 Infinity II	Bomba binaria 1260 Infinity II de Agilent
Volumen de retardo	~460 µl	~310 µl	~610 µl
Ruido de mezcla con 95 %A	0,015 %	0,048 %	0,023 %
Ruido de mezcla con 49 %A	0,024 %	0,040 %	0,045 %
Ruido de mezcla con 4 %A	0,013 %	0,034 %	0,012 %
Flujo medio (ml/min)	0,998	0,998	1,003
Δ flujo medio (%)	-0,164	-0,155	0,270

Experimento 2: Precisión del tiempo de retención para gradientes suaves

Para determinar la precisión del tiempo de retención bajo condiciones de gradiente suave, se analizó una mezcla de cuatro compuestos polifenólicos. El gradiente variaba desde un 6 %B hasta un 12 %B en ocho minutos, lo que representa un cambio en el disolvente B de un 0,75 % por minuto. La Figura 3 muestra una superposición de dos cromatogramas, uno obtenido con la bomba flexible 1260 Infinity II (sin mezclador adicional) y el otro con la bomba binaria 1260 Infinity II. Las precisiones de los tiempos de retención (Tabla 8) para los cuatro compuestos polifenólicos fue similar en ambas bombas. Este experimento demuestra la gran precisión de mezclado de la bomba flexible 1260 Infinity II bajo condiciones de gradiente suave, en las que es preferible una bomba binaria.

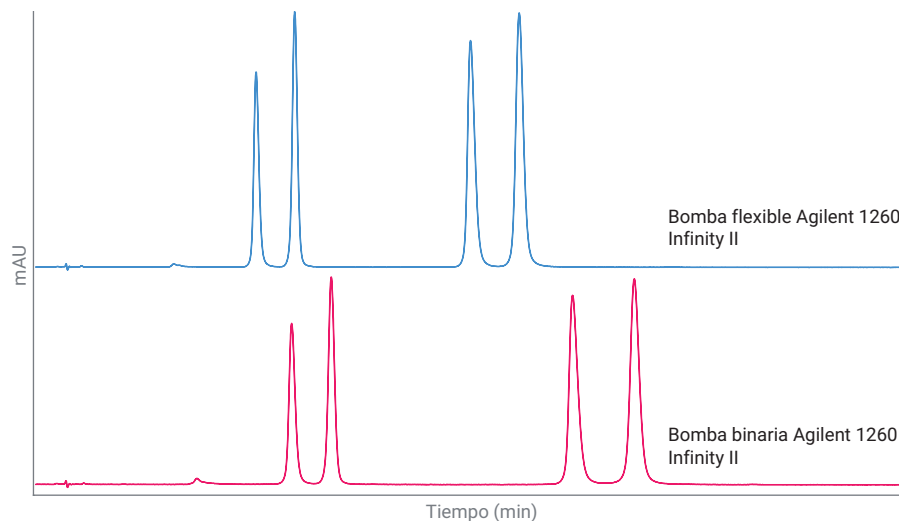


Figura 3. Análisis de compuestos polifenólicos utilizando un gradiente suave. Orden de elución: catequina, ácido cafeico, epicatequina y, a continuación, epigallocatequina.

Experimento 3: Precisión del tiempo de retención para un porcentaje bajo de disolvente orgánico

Se analizó una mezcla de cinco sulfamidas, introduciendo un gradiente del 1 al 25 % de disolvente orgánico (Figura 4). Para intervalos bajos de disolvente orgánico como este, resulta más ventajosa una bomba binaria. La bomba flexible 1260 Infinity II está específicamente diseñada para un intervalo de composición del 0 al 100 %. Para evaluar el rendimiento en un intervalo tan bajo de disolvente orgánico con ambos tipos de bomba, se calculó la precisión del tiempo de retención mediante ocho ensayos consecutivos (Tabla 9).

Ambas bombas demostraron un rendimiento excelente en cuanto a la precisión del tiempo de retención. Para los dos compuestos de elución inicial, la sulfamida y el sulfatiazol, la bomba flexible 1260 Infinity II tuvo un rendimiento aún mejor que la bomba binaria 1260 Infinity II.

Tabla 8. Precisión del tiempo de retención para el análisis de compuestos polifenólicos. Se hicieron ocho ensayos consecutivos para el cálculo.

Bomba flexible Agilent 1260 Infinity				
	Catequina	Ácido cafeico	Epicatequina	Epigallocatequina
TR medio (min)	2,019	2,372	3,979	4,426
Desviación estándar del TR	0,0018	0,0015	0,0042	0,0036
DER del TR	0,087	0,061	0,106	0,081
Bomba binaria 1260 Infinity II de Agilent				
	Catequina	Ácido cafeico	Epicatequina	Epigallocatequina
TR medio (min)	2,348	2,710	4,927	5,491
Desviación estándar del TR	0,0035	0,0023	0,0032	0,0033
DER del TR	0,151	0,085	0,066	0,060

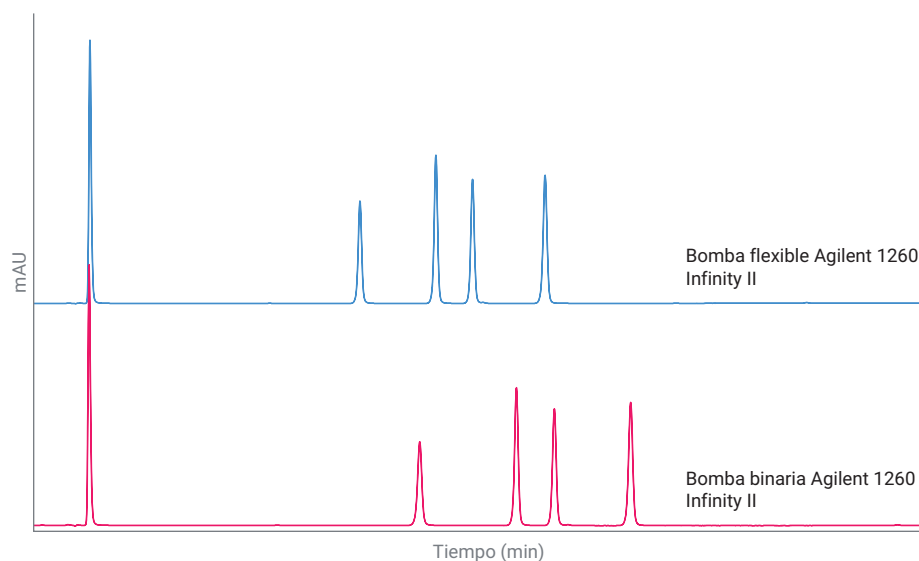


Figura 4. Análisis de sulfamidas con bajo porcentaje orgánico. Orden de elución: sulfanilamida, sulfatiazol, sulfamerazina, sulfacoloropiridazina y, a continuación, sulfametacina.

Experimento 4: Precisión del tiempo de retención para un porcentaje alto de disolvente orgánico

Para este experimento, se analizó Sudán rojo I, II, III y IV empleando un gradiente entre 90 y 100 % de disolvente orgánico (Figura 5 y Tabla 10). Los resultados mostraron que la bomba flexible 1260 Infinity II es adecuada para este tipo de aplicación, y tiene mayor rendimiento que la bomba binaria 1260 Infinity II.

Tabla 9. Precisión del tiempo de retención para el análisis de sulfamidas.

Bomba flexible Agilent 1260 Infinity					
	Sulfanilamida	Sulfatiazol	Sulfamerazina	Sulfacloropiridazina	Sulfametacina
TR medio (min)	0,505	2,926	3,607	3,935	4,586
Desviación estándar del TR	0,0005	0,0009	0,0012	0,0013	0,0005
DER del TR	0,092	0,032	0,033	0,033	0,010
Bomba binaria 1260 Infinity II de Agilent					
TR medio (min)	0,499	3,468	4,331	4,671	5,355
Desviación estándar del TR	0,0009	0,0044	0,0022	0,0022	0,0024
DER del TR	0,174	0,127	0,050	0,047	0,045

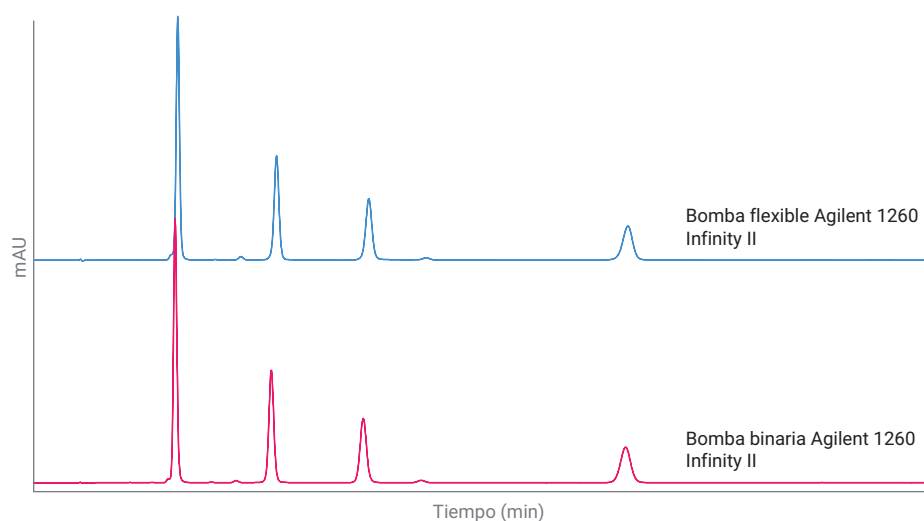


Figura 5. Análisis de una mezcla de compuestos de Sudán rojo con alto porcentaje de disolvente orgánico. Orden de elución: Sudán rojo I, Sudán rojo II, Sudán rojo III y, a continuación, Sudán rojo IV.

Tabla 10. Precisión del tiempo de retención para el análisis de compuestos de Sudán rojo. Se hicieron ocho ensayos consecutivos para el cálculo.

Bomba flexible Agilent 1260 Infinity				
	Sudán I	Sudán II	Sudán III	Sudán IV
TR medio (min)	0,643	1,085	1,497	2,656
Desviación estándar del TR	0,0004	0,0008	0,0007	0,0014
DER del TR	0,055	0,070	0,047	0,053
Bomba binaria 1260 Infinity II de Agilent				
TR medio (min)	0,630	1,058	1,468	2,640
Desviación estándar del TR	0,0009	0,0018	0,0027	0,0044
DER del TR	0,147	0,173	0,187	0,166

Experimento 5: Precisión del tiempo de retención para análisis rápidos

Para facilitar unos análisis más rápidos, se aplicó un flujo alto de 2 ml/min. El tiempo de gradiente se ajustó en un minuto, e iba desde 30 hasta 100 % orgánico (Figura 6). Para la bomba binaria 1260 Infinity II, se ensayaron la configuración estándar y la configuración de retardo bajo. Para la configuración de retardo bajo, se quitaron del circuito el amortiguador y el mezclador. La bomba flexible 1260 Infinity II se usó con y sin el mezclador. La presión para todas las configuraciones del sistema fue de aproximadamente 540 bar.

La bomba binaria 1260 Infinity II con la configuración de retardo bajo proporcionó el tiempo de análisis más bajo, seguida de la bomba flexible 1260 Infinity II con la configuración estándar.

Para demostrar la precisión del tiempo de retención en estos ensayos cromatográficos rápidos (Tabla 11), se seleccionaron tres picos representativos. Incluso bajo unas condiciones tan exigentes, la precisión del tiempo de retención para ambas bombas y su correspondiente configuración mostraron unos valores excelentes, con una DER < 0,09 %.

En un experimento adicional, se aumentó el flujo desde 2 ml/min hasta 2,6 ml/min, y la presión del sistema resultante fue de aproximadamente 750 bar. Para este experimento, solo se utilizó la bomba flexible 1260 Infinity II con la configuración estándar, dado que esta bomba tiene un intervalo de presiones operativas de hasta 800 bar, mientras que la presión de la bomba binaria 1260 Infinity II está limitada a 600 bar.

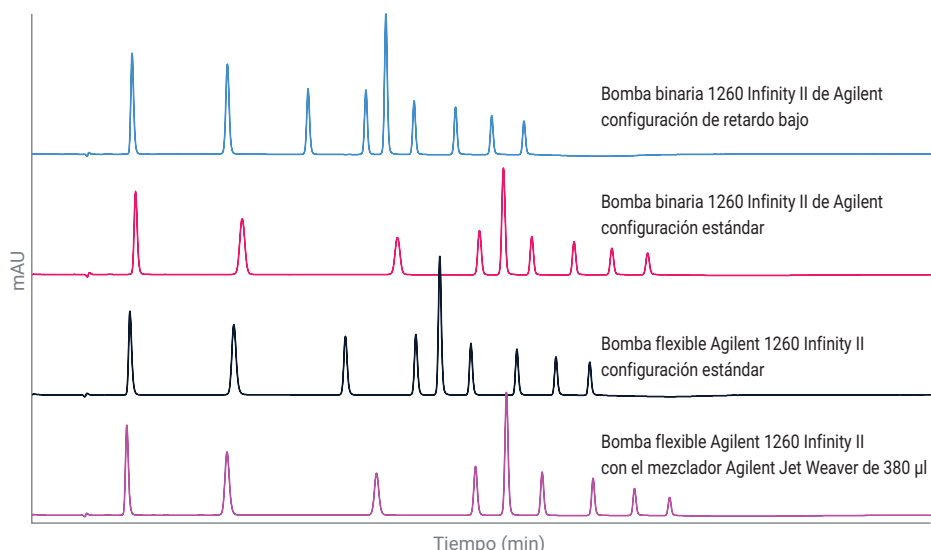


Figura 6. Análisis de la muestra de comprobación RRLC empleando un flujo alto.

Tabla 11. Precisión del tiempo de retención para el análisis de la muestra de comprobación RRLC. Se seleccionaron tres picos representativos. Se hicieron ocho ensayos consecutivos para el cálculo.

Bomba flexible 1260 Infinity II de Agilent – configuración estándar			
	Pico 3	Pico 6	Pico 8
Media	0,697	0,977	1,166
Desviación estándar	0,0004	0,0005	0,0005
DER	0,051	0,047	0,040
Bomba flexible Agilent 1260 Infinity II con un mezclador Agilent Jet Weaver de 380 µl			
Media	0,766	1,135	1,341
Desviación estándar	0,0005	0,0004	0,0000
DER	0,060	0,031	0,003
Bomba binaria 1260 Infinity II de Agilent – configuración estándar			
Media	0,813	1,112	1,290
Desviación estándar	0,0005	0,0005	0,0006
DER	0,066	0,048	0,050
Bomba binaria 1260 Infinity II de Agilent con configuración de retardo bajo			
Media	0,614	0,850	1,023
Desviación estándar	0,0005	0,0006	0,0005
DER	0,084	0,074	0,047

Al incrementar el flujo a 2,6 ml/min, el tiempo de análisis en gradiente se redujo de 1 a 0,77 minutos (Figura 7). Todos los picos eluyeron en menos de un minuto, con una extraordinaria precisión de los tiempos de retención, por debajo de la especificación de DER del 0,15 %. El último compuesto eluyó antes (0,967 minutos) con la bomba flexible 1260 Infinity II que con la bomba binaria 1260 Infinity II (1,095 minutos), con un flujo de 2 ml/min con configuración de retardo bajo.

Conclusión

La bomba flexible 1260 Infinity II de Agilent proporcionó un rendimiento excelente en cuanto a precisión del tiempo de retención en diversas aplicaciones de LC de alta exigencia. Los gradientes en pasos aplicados mostraron una precisión de la composición y un ruido de mezcla excelentes para la bomba flexible 1260 Infinity II y la bomba binaria 1260 Infinity II de Agilent. Se midieron flujos en tiempo real, y se monitorizaron en ambas bombas, y se mostró que la precisión de flujo siempre estaba por debajo del 0,3 %.

El volumen de retardo del sistema en la bomba flexible 1260 Infinity II es de aproximadamente 310 μ l, y de 460 μ l con el mezclador Agilent Jet Weaver de 380 μ l. Para la bomba binaria 1260 Infinity II, el volumen de retardo del sistema asciende a 610 μ l.

Este resumen técnico indica que ambas bombas han demostrado tener un rendimiento excelente. Además, la bomba flexible 1260 Infinity II mostró unos resultados excelentes en aplicaciones exigentes en las que la bomba binaria suele tener ventaja.

Compuesto	TR medio (min)	DER del TR (%)
1. Acetanilida	0,171	0,103
2. Acetofenona	0,351	0,071
3. Propiofenona	0,546	0,037
4. Butirofenona	0,668	0,021
5. Valerofenona	0,710	0,019
6. Hexanofenona	0,763	0,025
7. Heptanofenona	0,842	0,025
8. Octanofenona	0,909	0,024
9. Benzofenona	0,967	0,024

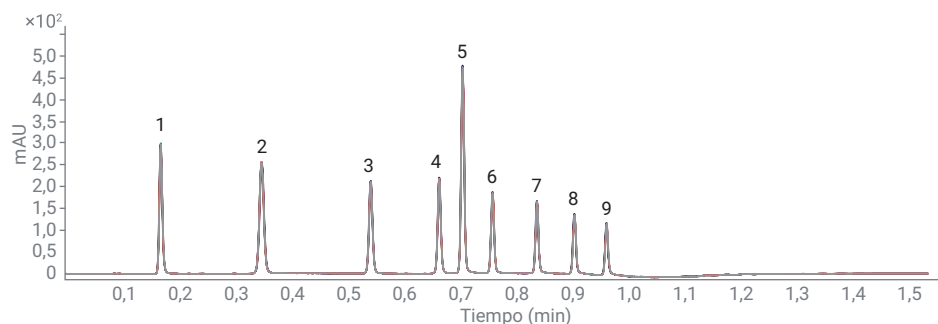


Figura 7. Superposición de ocho cromatogramas aplicando un flujo de 2,6 ml/min con una retropresión de 750 bar.

www.agilent.com/chem

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
Impreso en EE. UU., jueves, 1 de marzo de 2018
5991-9031ES