

Prácticas recomendadas en la utilización de un sistema de LC de Agilent

Nota técnica

Esta nota técnica describe las prácticas recomendadas en la utilización de un sistema de LC de Agilent.

Organización	2
Tareas diarias/semanales	5
Encendido y apagado del sistema	6
Recomendaciones para los desgasificadores	8
Recomendaciones para las bombas	9
Recomendaciones para los muestreadores	14
Recomendaciones para bombas y muestreadores con filtro en línea opcional	16
Recomendaciones para las columnas	17
Recomendaciones para los detectores	18
Recomendaciones para sistemas biocompatibles y bioinertes	19
Más información acerca de las bombas 1290 Infinity y 1290 Infinity II	21

Organización

Cómo tratar los disolventes

- Utilice únicamente botellas de vidrio de borosilicato limpias.
 - Lave la botella con el disolvente deseado antes de rellenarla.
 - Las botellas pueden contaminarse con detergentes procedentes del lavavajillas.
- Utilice filtros de entrada de disolvente para proteger el sistema de partículas que puedan penetrar.
- Cambie a diario los disolventes acuosos.
 - El crecimiento de algas y bacterias puede obstruir el desgasificador o los filtros.
 - La precipitación de sales insolubles puede atascar los filtros o los capilares.
- Prepare el volumen de disolvente que se vaya a utilizar durante los próximos 1-2 días.
- Utilice únicamente disolventes y agua de calidad HPLC.
 - Todos los disolventes orgánicos, las mezclas y los tampones acuosos preparados deben filtrarse con un filtro de 0,2 μm .
 - La presencia de residuos o contaminantes puede atascar los filtros o los capilares.
- Etiquete las botellas de manera correcta con su contenido y sus fechas de llenado y de caducidad.
- Para reducir el riesgo de crecimiento de algas: utilice botellas marrones para disolventes acuosos y evite la luz solar directa o envuelva las botellas en papel de aluminio.

Medidas adicionales para el acetonitrilo (ACN)

- El ACN y otros disolventes orgánicos se pueden filtrar con una membrana filtrante de PTFE de 0,2 μm (p. ej., 5191-4339).

NOTA

No se recomienda la filtración con filtros de nailon para LCMS de alta sensibilidad.

- Utilice botellas marrones y llénelas con el volumen de acetonitrilo que vaya a utilizar durante los próximos 1-2 días para evitar que se produzcan reacciones fotoquímicas y oxidación.

Cómo preparar las muestras

PRECAUCIÓN

Posible precipitación de la muestra

- ✓ Asegúrese de que la muestra sea totalmente soluble tanto en el diluyente de la muestra como en la fase móvil.
 - ✓ Haga coincidir el diluyente de la muestra lo máximo posible con la fase móvil inicial para evitar la precipitación, los picos de presión y los picos de disolvente en el cromatograma.
-
- La filtración con filtros de 0,2 μm es el método recomendado para eliminar la fracción insoluble de las muestras y evitar obstrucciones en el sistema. Si no resulta posible, centrifugue las muestras vigorosamente y tenga cuidado de no contaminar el sobrenadante con los precipitados mientras lo decanta o aspira.
 - Asegúrese de que el diluyente de la muestra también esté libre de partículas.
 - Las muestras sin filtrar pueden provocar obstrucciones y contaminación de la ruta de flujo, lo que puede generar un aumento continuo de la retropresión en el sistema y producir anomalías en la presión, como fluctuaciones o caídas bruscas. Los cambios en la presión pueden afectar a la reproducibilidad de los resultados cromatográficos.
 - Por ejemplo, las muestras de proteínas sin filtrar pueden provocar la formación de una película de proteínas que, con el tiempo, puede obstruir la ruta de flujo y acortar sensiblemente la vida útil de las columnas cromatográficas.

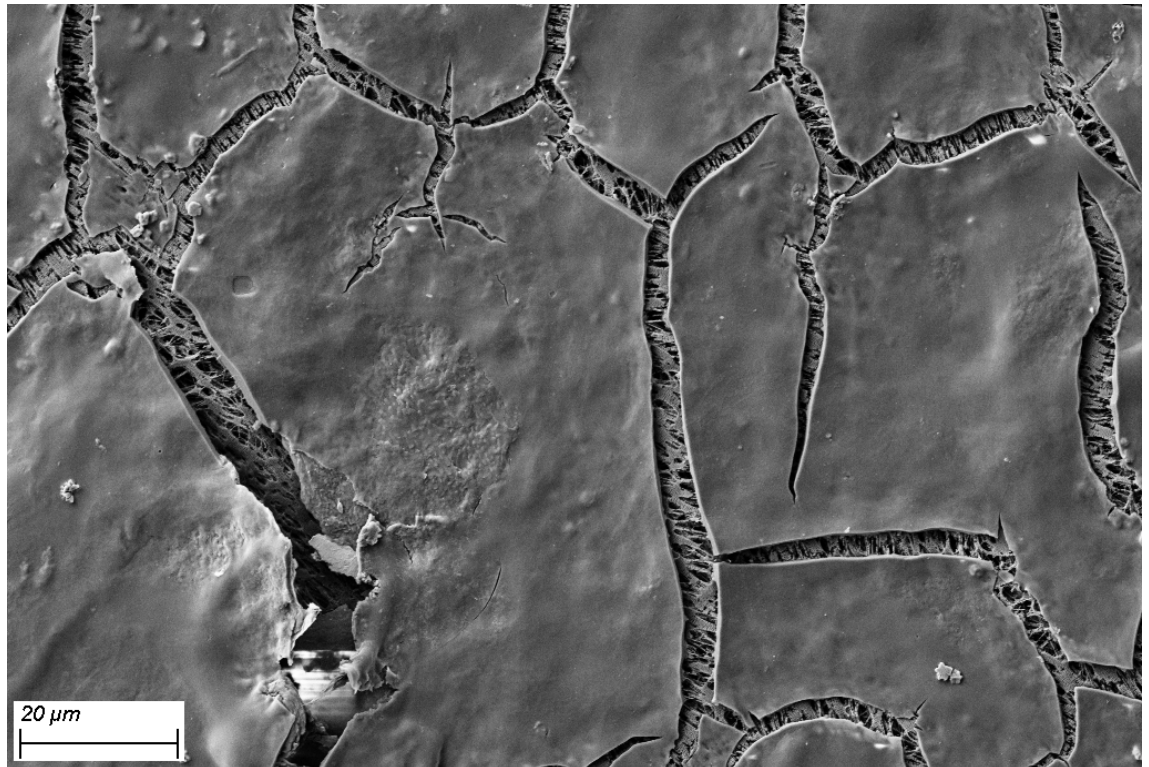


Figura 1 Película de proteínas formada sobre la superficie del soporte de PTFE situado encima del filtro en línea (confirmación mediante SEM-EDX)

- Se recomienda usar filtros en línea para evitar que entren partículas en la ruta de flujo y dañen las válvulas, las columnas y el detector; consulte [“Recomendaciones para bombas y muestreadores con filtro en línea opcional”](#) en la página 16.

Cómo limpiar el sistema

- Si se sospecha que existe contaminación bacteriana en el sistema, puede llevarse a cabo el siguiente procedimiento de limpieza del sistema.
 - Aplique las soluciones siguientes de forma secuencial y con un flujo moderado (0,5 – 1 mL/min) durante al menos 30 min cada una de ellas:
 - a Agua
 - b NaOH 0,1 M
 - c Agua
 - d HCl 0,13 M
 - e Agua
- Cuando utilice tampones biocompatibles (p. ej., fosfato o acetato), extreme las precauciones para prevenir la formación de biopelículas.
 - El procedimiento de limpieza del sistema (descrito anteriormente) debe llevarse a cabo cuando se observe una pérdida de reproducibilidad cromatográfica en todos los canales de disolvente utilizados para tampones biocompatibles.
- A la hora de ejecutar cualquier procedimiento de limpieza del sistema de LC, asegúrese de que la columna y el detector no formen parte de la ruta de flujo.
- Las columnas cromatográficas utilizadas para separación biomolecular, como las de cromatografía de exclusión por tamaño o cromatografía de intercambio iónico, deben almacenarse en presencia de azida de sodio al 0,02 %. Para acceder a más guías del usuario de columnas para Bio LC, consulte <https://www.agilent.com/en/support/liquid-chromatography/kb005960>.

Tareas diarias/semanales

Tareas diarias

- Sustituya los disolventes y las botellas de disolvente por fases móviles basadas en agua/tampón.
- Sustituya los disolventes y las botellas de disolvente por fases móviles orgánicas como muy tarde cada dos días.
- Compruebe la presencia del disolvente de lavado de sellos.
- Purgue cada canal con un flujo de 2,5 – 3 mL/min de disolvente nuevo durante 5 min antes del funcionamiento.
- Equilibre el sistema para la composición y el flujo del nuevo método.

Tareas semanales

- Cambie el disolvente de lavado de sellos (isopropanol al 10 % en agua) y la botella.
- Si se han llevado a cabo aplicaciones con sales, lave todos los canales con agua (para obtener más información, véase “Procedimiento de lavado” en la página 19) y retire manualmente los posibles depósitos de sal.
- Inspeccione los filtros de disolvente en busca de suciedad o atascos. Cámbielos si no sale disolvente de la línea de disolvente al retirarlos de la entrada al desgasificador.

PRECAUCIÓN

Contaminación del disolvente de lavado de sellos

Daños en pistones y sellos

- ✓ No recicle el disolvente de lavado de sellos.
- ✓ Cambie el disolvente de lavado de sellos semanalmente.
- ✓ Consumo típico de disolvente: 0,5 L a la semana.
- ✓ Se recomienda encarecidamente la utilización de Kit de cabeza de botella para lavado de sellos (5067-6131).

Encendido y apagado del sistema

Encendido del sistema

- Compruebe que todos los módulos estén en un entorno con una temperatura estable y protegidos de la luz solar directa.
- Encienda todos los módulos y prepárelos como se describe a continuación:

Preparación de la bomba

- Utilice una fase móvil nueva o diferente (según sea necesario).
- Purgue cada canal con un flujo de 2,5 – 3 mL/min durante 5 min. Abra la válvula de purga manual o use el comando de purga, en función del tipo de bomba.

Preparación del inyector

- Evite usar el lavado de la aguja y el retroflujo del asiento en aplicaciones con disolventes orgánicos con tampones, pues esto puede provocar la precipitación de sales en el asiento de la aguja.
- Cuando use el lavado de la aguja y/o el retroflujo del asiento:
 - Utilice en todo momento disolventes nuevos.
 - Algunas buenas opciones son las siguientes: metanol, ACN, isopropanol, agua y sus mezclas.
 - No utilice soluciones de lavado inmiscibles o que precipiten.
- Cuando use un refrigerador de muestras/termostato de muestras:
 - Encienda el refrigerador/termostato y espere hasta que se alcance la temperatura deseada y se estabilice.
Esto puede hacerse durante el calentamiento de la lámpara del detector (véase “Preparación del detector” en la página 6).
- Asegúrese de que los viales contienen suficiente solución de muestra para todas las inyecciones.

Preparación del detector

- Caliente la lámpara durante al menos 1 h para garantizar la estabilidad de la línea base.
- Solo en detectores de índice de refracción (RI): encienda el calentador y lave los lados de referencia y de la muestra con disolvente nuevo utilizado en la aplicación actual.

Equilibrado del sistema

- Mientras se calienta la lámpara del detector, equilibre el sistema (incluidos el detector y la columna) usando la composición de su aplicación durante al menos 15 min, hasta que la presión y la línea base del detector sean estables.

Apagado del sistema

- Lave la columna con los disolventes adecuados y guárdela según las instrucciones del manual de la columna (asegúrese de que el disolvente de lavado sea compatible con el disolvente presente en el sistema para evitar la precipitación).
- Las columnas cromatográficas utilizadas para separaciones de biomoléculas, como las de cromatografía de exclusión por tamaño o cromatografía de intercambio iónico, deben almacenarse en presencia de azida de sodio al 0,02 %. Para acceder a más guías del usuario de columnas para Bio LC, consulte <https://www.agilent.com/en/support/liquid-chromatography/kb005960>.
- Instale una unión o un capilar de restricción y lave el sistema abundantemente con agua, en especial después de usar tampones. Para obtener más información, consulte “Procedimiento de lavado” en la página 19.
- Lave y conserve el sistema en metanol al 50 % o isopropanol al 50 % en agua, sin aditivos.
- Extraiga todas las muestras del muestreador automático y consérvelas de acuerdo con las prácticas adecuadas de laboratorio.
- Apague todos los módulos.

Recomendaciones para los desgasificadores

PRECAUCIÓN

Líquido dentro del desgasificador

En caso de condensación de un disolvente de bajo punto de ebullición o de fugas, puede acumularse líquido dentro de las cámaras del desgasificador, lo que afectará al rendimiento.

Si esto sucede:

- ✓ Purgue todos los canales de disolvente con isopropanol.
- ✓ Mantenga los canales sin usar llenos de isopropanol.

- Compruebe la compatibilidad de los disolventes con el desgasificador y la aplicación.
 - Use los desgasificadores independientes estándar (G1322A o G7122A) para aplicaciones de RI con flujos superiores a 5 mL/min de disolventes de bajo punto de ebullición (<60 °C) o de hexano, tetrahidrofurano o cualquier disolvente halogenado.
 - Use un desgasificador de alto rendimiento integrado o independiente (G4225A) para todas las demás aplicaciones.
- Si no se puede alcanzar o mantener el vacío necesario para conseguir un rendimiento de desgasificación óptimo (lo que vendrá indicado por el LED de estado amarillo o rojo en los desgasificadores independientes o por los mensajes de error específicos en los desgasificadores integrados), apague y vuelva a encender el módulo.
- Si, después del ciclo de apagado y encendido, sigue sin poder alcanzarse o mantenerse el vacío, use el **Evacuation Mode**, disponible en la pantalla de control instrumental de Agilent Lab Advisor.



Figura 2 Control de los desgasificadores internos en Agilent Lab Advisor

NOTA

Siga las instrucciones indicadas en pantalla al iniciar el **Evacuation Mode**.

Recomendaciones para las bombas

- Verifique periódicamente el rendimiento de las bombas; para ello, monitorice la señal de presión.
- Realice el mantenimiento preventivo dentro del intervalo de uso recomendado.
- Prepare la bomba tal y como se describe en la sección Encendido para garantizar un óptimo rendimiento y una larga vida útil.
- Al cambiar de disolvente, asegúrese de que el nuevo disolvente sea miscible con el anterior (si es necesario, utilice un disolvente intermedio adicional que sea miscible).
- Use la función de lavado de sellos tal y como se recomienda para garantizar un óptimo rendimiento y una larga vida útil; véase “Lavado de sellos (uso obligatorio si está instalado)” en la página 9.

Recomendaciones para la MCGV

Selección de canales para la válvula de gradiente multicanal (MCGV)

- Utilice los canales inferiores (A y/o D) para soluciones tampón.
- Para eliminar los posibles depósitos de sal, lave a menudo todos los canales de la MCGV con un flujo de agua de 5 mL/min durante al menos 10 min por canal.
- Compruebe la compatibilidad de los tampones y los disolventes orgánicos para evitar precipitaciones en la cámara de mezcla de la MCGV.

NOTA

Si se mezclan disolventes incompatibles, pueden precipitar sales en el punto de mezcla, obstruyendo la ruta de flujo aguas abajo y dañando componentes.

Lavado de sellos (uso obligatorio si está instalado)

Lavado de sellos (G4204A, G4220A y todas las bombas 1260)

PRECAUCIÓN

Contaminación del disolvente de lavado de sellos

Daños en pistones y sellos

- ✓ **No recicle el disolvente de lavado de sellos.**
- ✓ **Cambie el disolvente de lavado de sellos semanalmente.**
- ✓ **Consumo típico de disolvente: 0,5 L a la semana.**
- ✓ **Se recomienda encarecidamente la utilización de Kit de cabeza de botella para lavado de sellos (5067-6131).**

Es obligatorio el uso de la función de lavado de sellos si está instalada al utilizar tampones y otros disolventes o aditivos no volátiles que se puedan depositar en los pistones y sellos. La función de lavado de sellos limpia de forma periódica y automática estas piezas.

Recomendaciones para las bombas

Ventajas de la operación de lavado de sellos:

- Eliminación de partículas, cristales salinos y otros residuos no volátiles de los pistones y los sellos, que potencialmente podrían dañar el pistón y los sellos del pistón
- Lubricación de la interfaz sello/pistón
- Refrigeración de los pistones

Cuadro de diálogo Lavado de sellos en su CDS

El cuadro de diálogo se puede encontrar debajo de la pantalla de control; se recomienda utilizar los ajustes indicados en [Figura 3](#) en la página 11.

Tenga en cuenta que:

- Los ajustes del lavado de sellos NO son parámetros del método (como ajustes de control instrumental, se aplican a todos los métodos que se ejecutan en un instrumento determinado).
- El lavado de sellos deberá activarse manualmente de nuevo después de:
 - Haber resuelto un ERROR.
 - Encender el instrumento.

Operación de lavado de sellos:

- Operación PERIÓDICA; por ejemplo, durante 0,5 min cada 7 min.
 - El ajuste puede cambiarse en la pantalla de Control, véase la [Figura 3](#) en la página 11. Se puede acceder a los ajustes mediante el menú contextual, véase la [Figura 5](#) en la página 11.
 - El flujo típico de disolvente es de 0,7 mL/min, que corresponde a un consumo aproximado de 3 mL/h o de 0,5 l/semana con un funcionamiento constante.
- Utilice:
 - Isopropanol al 10 % en agua.
 - Isopropanol al 100 % para aplicaciones de fase normal.
- Coloque la botella de disolvente de lavado en la parte de arriba y la botella de residuos en la parte de abajo del instrumento.
- No rellene la botella de disolvente de lavado de sellos; utilice siempre botellas nuevas y debidamente limpias.
- Para aquellas bombas que no estén equipadas con el sensor de lavado de sellos, compruebe la bomba peristáltica.
 - Toque la bomba peristáltica con el dedo para comprobar que la bomba esté funcionando, o confirme el flujo de disolvente de lavado de sellos mirando si gotea por fuera de los tubos.

Recomendaciones para las bombas

Tabla 1 Operación y cuadro de diálogo del lavado de sellos

G4204A, G4220A

Todas las bombas de la serie 1260

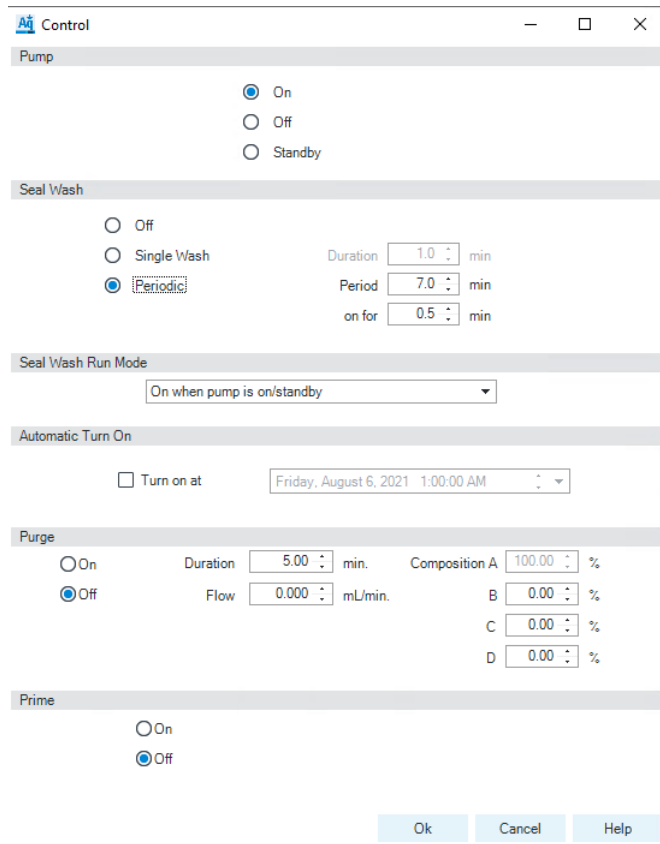


Figura 3 Ajustes del lavado de sellos (bombas 1290 Infinity)

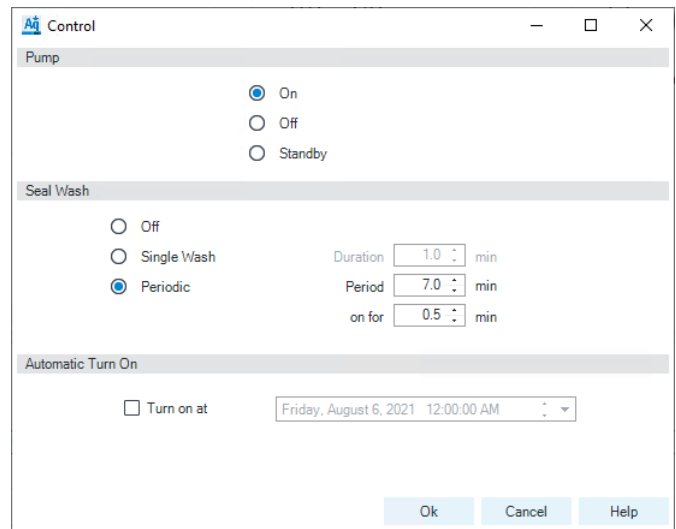


Figura 4 Ajustes del lavado de sellos (todas las bombas 1260)

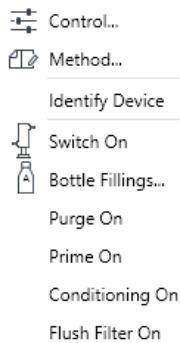


Figura 5 Menú contextual (bombas 1290 Infinity)

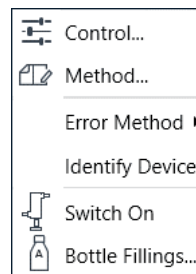


Figura 6 Menú contextual (todas las bombas 1260)

Lavado de sellos (G7104A, G7104C, G7120A, G7131A, G7131C y G7132A)

PRECAUCIÓN

Contaminación del disolvente de lavado de sellos

Daños en pistones y sellos

- ✓ No recicle el disolvente de lavado de sellos.
- ✓ Cambie el disolvente de lavado de sellos semanalmente.
- ✓ Consumo típico de disolvente: 0,5 L a la semana.
- ✓ Se recomienda encarecidamente la utilización de Kit de cabeza de botella para lavado de sellos (5067-6131).

La función de lavado de sellos limpia periódica y automáticamente los pistones y los sellos para evitar la formación de depósitos.

El sensor de lavado de sellos comprobará de forma constante el rendimiento del sistema de lavado de sellos y advertirá al usuario en caso de detección de alguna anomalía.

Operación de lavado de sellos:

- El intervalo de lavado de sellos se ajusta a 30 s cada 7 min.
- El flujo se ajusta a 500 µL/min.
- Se comprueba la integridad del sistema de lavado de sellos a intervalos regulares.
- El consumo de disolvente típico es de aproximadamente 0,5 L a la semana.
- Utilice:
 - Isopropanol al 10 % en agua.
 - Isopropanol al 100 % para aplicaciones de fase normal.
- Coloque la botella de disolvente de lavado en la parte de arriba y la botella de residuos en la parte de abajo del instrumento.
- *NO* rellene el disolvente de lavado de sellos; utilice siempre botellas nuevas y debidamente limpias.

Recomendaciones para las bombas

- *NO* recicle las botellas de disolvente de lavado de sellos.
- El símbolo EMF se pondrá amarillo una vez que el sensor de lavado de sellos de las bombas detecte una irregularidad.
 - Cambie el disolvente de lavado de sellos y active la función Cebado de lavado de sellos en el menú contextual (véase [Figura 7](#) en la página 13).

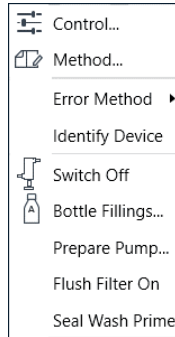


Figura 7 Menú contextual

- Compruebe los tubos y el filtro de lavado de sellos en busca de retorcimientos, fugas u obstrucciones.
- Compruebe si hay obstrucciones en los tubos de residuos, asegúrese de que el disolvente puede drenar libremente:
 - Si los residuos de disolvente se acumulan en el tubo, el sensor no funcionará correctamente.

Recomendaciones para los muestreadores

- Antes de apagar el instrumento o de un tiempo en espera prolongado, siempre:
 - Elimine la solución tampón con agua de calidad HPLC (véase “Procedimiento de lavado” en la página 19).
 - Lave durante al menos 15 minutos el muestreador con agua (lavado externo de la aguja y lavado por retroflujo del asiento para la opción de multilavado).
 - Realice una comprobación visual y, si es necesario, limpie los residuos de sales manualmente.
 - Elimine las sustancias contaminantes con un disolvente fuerte; por ejemplo, con ACN puro.
 - Utilice la función de limpieza automática para lavar el muestreador mientras mueve la válvula de inyección hacia delante y hacia atrás.

Auto-clean Settings and Start

Injection Valve

Switch Injection Valve

Multi-Wash Property

Execute Wash

Step	Solvent	Time [s]	Seat Back Flush	Needle Wash
1	Off	0	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2	Off	0	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3	S1	30	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Flush Flow Pa

Flush Flow Path Duration s

Be sure to set the composition and the flow of your pump accordingly before the start of the action.

Start Cancel

- Utilice siempre disolvente de lavado nuevo para la aguja y la función de retroflujo del asiento.
- Coloque el depósito de disolvente de lavado de la aguja o de lavado por retroflujo del asiento dentro de la cabina de disolventes.
 - Utilice un disolvente apropiado basado en las propiedades de la muestra y de la fase móvil.

NOTA

La composición del disolvente de lavado de la aguja deberá ser la del disolvente compatible más solubilizante (el diluyente más fuerte que tenga). La selección de disolventes de lavado forma parte del desarrollo del método. Una buena elección para muchas de las aplicaciones será una mezcla del 50 – 100 % de disolvente orgánico en agua destilada.

- Compruebe el recorrido del drenaje de la salida del puerto de lavado hacia el contenedor de residuos.
- Rellene cada vial con suficiente solución de muestra para todas las inyecciones.
 - Utilice solamente los viales recomendados por Agilent.
 - No llene los viales hasta que rebosen; llénelos solo hasta un 90 %.
 - Utilice septa con preapertura cuando extraiga grandes volúmenes del mismo vial o lo haga en repetidas ocasiones.

NOTA

- Filtre, decante o centrifugue la muestra para separarla del sólido insoluble.

Los disolventes de la muestra deberán estar libres de partículas; preferentemente, se filtrarán siempre.

- Preste atención a que los disolventes de la muestra coincidan con la fase móvil propuesta en la mayor medida posible.

Multilavado

La opción de multilavado se ha diseñado para conseguir un bajo arrastre y puede instalarse en cualquier muestreador múltiple de Agilent.

Esta opción reduce el arrastre para las muestras críticas, ya que permite:

- El lavado externo de la aguja con hasta tres disolventes diferentes.
- El lavado por retroflujo del asiento con hasta tres disolventes diferentes.

La opción de multilavado no se recomienda para fases móviles que contengan sales, pues la sal cristalizará en la aguja y en el asiento de la aguja. Debido a la ruta de flujo del módulo hidráulico de multilavado, cuando el dispositivo de dosificación se mueva a la posición inicial antes de la inyección, la fase móvil saldrá por la punta de la aguja y podría caer en el asiento. Este es el comportamiento esperado, independientemente de los ajustes de limpieza de la ruta de inyección, y no indica que haya fugas.

Si el multilavado está instalado en el sistema y se usan fases móviles que contengan sales, para evitar la acumulación de sales en la aguja y en el asiento se recomienda lavar el muestreador múltiple a diario con agua durante 15 minutos e inspeccionar visualmente la aguja y el asiento. Si es necesario, use un paño que no deje pelusa con agua destilada para limpiar manualmente la aguja, el asiento y otras piezas que aún contengan residuos de sales.

¿Cuándo se debe usar la opción de multilavado?

- Si el sistema está destinado solamente a aplicaciones de fase reversa y no hay presentes compuestos precipitantes en la fase móvil.
- Si el sistema está destinado a aplicaciones con fases móviles que contengan sales, no se recomienda la opción de multilavado. Sin embargo, si dicha opción está instalada, puede producirse cristalización en la aguja y en el asiento. Siga las prácticas indicadas a continuación:
 - Realice un lavado diario durante 15 min con agua para eliminar los residuos de sales.
 - Realice un lavado de la parte externa de la aguja y un lavado por retroflujo del asiento.
 - Controle visualmente la aguja, el asiento y el puerto de lavado para ver si hay residuos de sales.
 - Si es necesario, limpie manualmente la aguja, el asiento o el puerto de lavado.

NOTA

Si no se siguen estos procedimientos, se producirán obstrucciones de la aguja y del asiento.

- Si el sistema está destinado a aplicaciones alternativas con fases móviles que contengan sales Y aplicaciones en fase reversa, no se admitirá la opción de multilavado. Existe un elevado riesgo de que se liberen continuamente residuos de sales e interfieran con la cromatografía de fase reversa o incluso produzcan obstrucciones del sistema.

Habrá una cantidad considerable de disolvente estancado en las líneas de las rutas de flujo de multilavado, lo que puede generar un ruido de fondo elevado en las medidas UV y de MS de alta sensibilidad. Para mitigar este problema, se recomienda cebar con disolventes cada línea de multilavado que se est  utilizando a través del puerto de lavado y la línea S1 (condiciones cromatográficas iniciales) hasta llegar al asiento durante al menos 5 minutos antes del inicio del análisis por LC propiamente dicho.

Recomendaciones para bombas y muestreadores con filtro en línea opcional

Habitualmente, el factor limitante de la vida útil de las columnas para UHPLC es la elevada retropresión. La materia particulada de la muestra se recoge en la frita de entrada de la columna, lo que genera un aumento de la retropresión hasta que se alcanza el límite de presión del sistema. Se recomienda el uso de un filtro en línea para prevenir obstrucciones en la frita de la columna, especialmente cuando la preparación de muestras no permite la filtración o cuando la muestra puede formar precipitados.

Los siguientes módulos pueden equiparse con un filtro en línea adicional:

- Bombas cuaternarias (G7104A, G7104C, G4204A, G7131A y G7131C):
 - Conjunto de filtro en línea; material: acero inoxidable (5067-5407)
 - Conjunto de filtro en línea, biocompatible (5720-0003)
- Muestreadores automáticos Agilent 1290 Infinity y 1290 Infinity II (excepto el G5668A):
 - Kit del filtro en línea 1290 Infinity II (5067-6189)
 - Kit de filtro en línea 1290 Infinity II Bio (5720-0020)

Estos filtros en línea, con un tamaño de poro nominal de 0,3 μm , protegen a la columna para UHPLC de obstrucciones filtrando la materia particulada procedente de las muestras o del sistema de UHPLC.

Ventajas del filtro en línea:

- Volumen interno muy pequeño
 - Volumen de retardo con capilar rígido 1,3 μL
 - Volumen de retardo con capilar flexible 1,6 μL
- Especificado para trabajar con altas presiones (presión máx. operativa: 1300 bar)

Se recomienda la instalación de un filtro en línea en la bomba para proteger los sistemas situados aguas abajo de obstrucciones en los siguientes casos:

- Cuando se utilicen combinaciones de disolventes que puedan formar precipitados después de su mezcla.
- Cuando se realicen aplicaciones con tampones o aditivos y se usen columnas con tamaños de partícula pequeños.

Sugerencias generales para un uso eficaz del filtro en línea:

- Filtre los disolventes antes de su uso.
- Siga las prácticas recomendadas.
- Para las bombas G4204A, G7104A/C y G7131A/C, realice semanalmente un lavado por retroflujo del filtro de la bomba (inicie Lavar filtro en el menú contextual).

PRECAUCIÓN

Daños en la válvula

- ✓ Use el modo de lavado del filtro únicamente si está instalado el filtro en línea; de lo contrario, el pulso de presión podría dañar la válvula multifuncional.

- Para los filtros en línea instalados en el muestreador, sustituya la frita de filtro (Frita 0,3 µm para filtro en línea, 5/paq. (5023-0271) o Frita de 0,3 µm para filtro en línea, biocompatible, 5/paq. (5320-0022)) cada 1000 inyecciones o cuando la retropresión ascienda un 15 %.

NOTA

Consulte la *Nota técnica G7167-90130* para obtener más información.

Recomendaciones para las columnas

- Utilice las columnas sólo en la dirección indicada.
- Utilice siempre las conexiones adecuadas para la columna específica.
 - Las columnas de distintos fabricantes precisan conectores de diferentes dimensiones.
 - El uso de una conexión inadecuada podría dar como resultado una dispersión de picos o incluso daños en la columna.
 - Agilent recomienda el uso de conexiones InfinityLab para solucionar incompatibilidades en las conexiones al utilizar columnas de diferentes proveedores.
- Respete siempre los límites de operación y aplicación, tal como se propone en la guía del usuario de la columna.
- Equilibre la columna con 10 – 20 volúmenes de columna antes de su utilización.
 - Se recomienda realizar un lavado intermedio con una fase móvil con la composición adecuada sin aditivos antes de equilibrar con el disolvente final y sus aditivos.
- Se recomienda el uso de una precolumna para proteger su columna y aumentar su vida útil.

NOTA

El almacenamiento de larga duración de las columnas debería llevarse a cabo siempre en el disolvente apropiado, consulte la Guía del usuario incluida en el embalaje de la columna para conocer más detalles.

Recomendaciones para los detectores

PRECAUCIÓN

Encendido y apagado frecuente de la lámpara

Acortamiento de la vida útil de la lámpara

- ✓ Evite encendidos/apagados innecesarios de la lámpara.

NOTA

Existe un periodo de seguridad/tiempo de espera antes de que pueda encenderse una lámpara una vez ha sido apagada.

- Caliente la lámpara durante al menos 1 h.
- Mantenga el entorno y la temperatura ambiente estables para todos los módulos, en especial para el detector.
 - No exponga el detector a la luz solar directa.
 - No exponga demasiado el detector a corrientes de aire procedentes del aire acondicionado.
- Instale la válvula de alivio de presión (ref. G4212-68001 si se usan los detectores DAD G4212A/B y G7117A/B/C; o ref. 0100-3150 si se usan detectores FLD) al conectar un segundo detector a continuación de la celda de cartucho Max-Light.
- Utilice las líneas de residuos recomendadas para cada tipo de detector. Evite estrangular el tubo de residuos a continuación de la salida de la celda.
- Asegúrese de que la celda de flujo del detector no tenga burbujas; para ello, lávela con isopropanol u otro disolvente orgánico hasta conseguir una línea base estable.
- Solo en detectores de índice de refracción (RI): lave los lados de referencia y de la muestra con disolvente nuevo utilizado en la aplicación actual.
- Lave la celda de flujo después de su utilización.
 - Utilice agua de calidad HPLC para eliminar las sales.
 - Utilice isopropanol para eliminar los disolventes orgánicos.
- Antes de retirar una celda de flujo para su almacenamiento, llénela con isopropanol para evitar que crezcan algas.

Recomendaciones para sistemas biocompatibles y bioinertes

- Asegúrese de que todos los consumibles (conectores, capilares, filtros en línea, columnas, etc.) sean bioinertes/biocompatibles.
 - Tenga en cuenta que algunas columnas para aplicaciones relacionadas con las biociencias tienen una funda de acero inoxidable y pueden introducir hierro y otros iones metálicos en la ruta de flujo. Esto puede provocar la adsorción de muestras susceptibles, como nucleótidos fosforilados. En ese caso, utilice columnas con revestimiento de PEEK.
- Después de usar el sistema con altas concentraciones salinas, lávelo abundantemente con agua para evitar obstrucciones producidas por cristales de sal.
- No se puede garantizar el funcionamiento fiable de las bombas 1290 durante el análisis si la presión cae por debajo de 20 bar. Para conseguir unos resultados óptimos, la presión debe ser de al menos 50 bar continuamente. En consecuencia, cuando utilice columnas que creen una baja retropresión (<50 bar, como columnas para SEC en sistemas de LC 1290), instale un capilar de restricción Capilar MP35N de 0,12 mm x 2 m (5005-0046) entre la bomba y el muestreador para conseguir al menos 50 bar.
- Realice el lavado diario del muestreador múltiple con agua si la opción de multilavado está instalada (véase "Multilavado" en la página 15).
- Para todas las bombas cuaternarias, siga las recomendaciones para mantener la MCGV libre de cristales de sales; véase "Recomendaciones para la MCGV" en la página 9.

PRECAUCIÓN

Los sistemas LC bioinertes y biocompatibles de Agilent no deben someterse a pasivación u otros tratamientos similares.

Estos procedimientos pueden provocar daños irreversibles en las superficies internas del sistema.

- ✓ **No lleve a cabo procedimientos de pasivación u otras operaciones similares en sistemas bioinertes y biocompatibles.**

Procedimiento de lavado

- ✓ Este procedimiento debe realizarse cuando se empleen fases móviles que contengan sales. Debe llevarse a cabo periódicamente, al menos una vez por semana, o antes de un período prolongado de espera o apagado, con el fin de eliminar los depósitos de sales de la ruta de flujo y de las superficies en contacto con los disolventes. Para preparar el sistema para el apagado, véase "Apagado del sistema" en la página 7.
- ✓ El procedimiento es obligatorio para cambiar de una fase móvil que contenga sales a aplicaciones de fase reversa (o a otras aplicaciones con un alto contenido de compuestos orgánicos), donde puede producirse la precipitación de sales.
- Lave la columna con el disolvente de almacenamiento recomendado; asegúrese de que este disolvente sea compatible con la fase móvil actual y no pueda producir precipitación.
- Cambie la columna por una unión y sustituya la botella de disolvente que contenga sales por una botella nueva de agua de calidad para HPLC a temperatura ambiente.
- Limpie el conjunto de la cabeza de la botella con paños que no dejen pelusa para minimizar el arrastre de la solución salina restante a la nueva botella de agua.

Recomendaciones para sistemas biocompatibles y bioinertes

- Muestreador automático: realice una purga con agua durante al menos 15 min para eliminar los residuos de sales de todas las líneas, tanto la línea de lavado de la aguja como la de lavado por retroflujo del asiento para la opción de multilavado, y controle visualmente la aguja, el asiento y el puerto de lavado para ver si hay residuos de sales; si es necesario, limpie manualmente la aguja, el asiento o el puerto de lavado.
- Purgue cada canal de la bomba que haya bombeado tampón de manera independiente, durante al menos 10 min con un flujo de 5 mL/min.
- Lave toda la ruta de flujo del sistema con agua durante al menos 10 min con un flujo de 2 mL/min. Durante este paso, cambie la posición de la válvula de inyección y de la válvula de selección de columna (si está instalada) cada 1 min, y repita esta operación hasta que se haya seleccionado cada posición al menos cinco veces.
- Sustituya el agua por botellas de disolvente nuevo para minimizar el arrastre de sales.

Más información acerca de las bombas 1290 Infinity y 1290 Infinity II

Preparación de la bomba

Las bombas 1290 Infinity y 1290 Infinity II de Agilent están equipadas con válvulas de purga automáticas. Esto posibilita una gran variedad de funciones adicionales que no están disponibles en las bombas de Agilent con válvulas de purga manuales. Es posible preparar la bomba (ajustar los parámetros y activar las funciones **Purge**, **Condition**, o **Prime**) por medio del software.

Purga

Utilice la función de purga para:

- Llenar el sistema con disolvente nuevo o distinto.
 - Asegurarse de que el nuevo disolvente es miscible con el disolvente anterior.
 - Evitar daños en el desgasificador o en la bomba usando un paso intermedio con un disolvente miscible conjuntamente con ambos, si fuera necesario.
- Elimine burbujas de aire en los tubos y en los cabezales de bombeo.
 - Una vez la bomba haya estado inactiva durante una hora o más tiempo (puede haber entrado aire en las líneas de disolvente).

Tan pronto como finalice el procedimiento de purga, el módulo cambiará de nuevo automáticamente a las condiciones analíticas.

Acondicionamiento

Si persisten las microburbujas de aire en el cabezal de bombeo, el rendimiento total de la bomba podría reducirse y la exactitud y la precisión del flujo podrían verse afectadas negativamente. Esto podría manifestarse en forma de un aumento de la presión o de fluctuación en la línea base del detector. Un indicador fiable de esta situación es un valor de la señal de sintonización muy negativo pero en lento incremento (por debajo de -1). Para eliminar de forma eficiente el aire, se puede utilizar la función Acondicionamiento. Durante el acondicionamiento, la bomba aporta un flujo al sistema (columna) y se emplean los ajustes seleccionados en el último método utilizado, como el flujo, la composición y la presión máxima. No es posible llevar a cabo el análisis de muestras mientras se realiza el acondicionamiento.

Utilice unos valores razonables de flujo (por ejemplo, 1,5 mL/min), ajustes de composición (por ejemplo A: 50 % B: 50 %) y retropresión (>200 bar) para garantizar una eliminación eficiente de las burbujas de aire de todos los cabezales de bombeo.

Acondicione la bomba si observa:

- Fluctuación de presión excesiva.
- Fluctuación de composición excesiva (ruido de la línea de base/ruido de mezcla, con cambios en el nivel de ruido con la composición), cuando esté seguro de que se ha seleccionado el disolvente adecuado y no haya evidencia de fugas en la bomba.

El acondicionamiento puede ser necesario:

- Tras un largo periodo en estado de espera
- Tras quedarse sin disolvente
- Tras el mantenimiento o la reparación

PRECAUCIÓN

Llenado de líneas de disolvente vacías

Daños en los sellos

- ✓ Utilice una jeringa o la función Purge para llenar las líneas de disolvente vacías.
- ✓ No utilice el procedimiento de Prime para llenar líneas de disolvente vacías.

Cebado

La función Cebado es útil si ha entrado aire en los cabezales de bombeo y no se puede eliminar mediante el acondicionamiento durante 15 minutos. El módulo extrae el disolvente a gran velocidad con todos los accionamientos de la bomba simultáneamente y, posteriormente, lo envía a la posición de residuos de la válvula de purga automática. Esto se repite veinte veces y genera tensiones en la válvula y el sello del rotor. En consecuencia, solo debe realizarse como último recurso, antes de llenar los cabezales de bombeo a la fuerza con una jeringa o de tratar de repararlos.

Utilice la función de Cebado para:

- Liberar una válvula potencialmente atascada.

Las funciones descritas pueden activarse desde la interfaz del controlador:

- 1290 Infinity y 1290 Infinity II.

NOTA

Para ajustar los parámetros, véase [Figura 3](#) en la página 11.

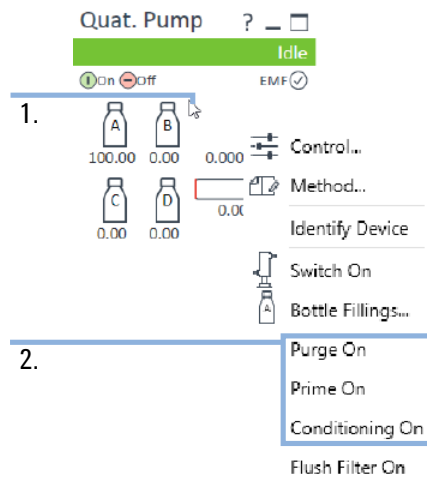


Figura 8 Preparación de la bomba (1290 Infinity)

1. Haga clic con el botón secundario del ratón en el panel de módulos
2. Seleccione la función adecuada para comenzar el procedimiento

Más información acerca de las bombas 1290 Infinity y 1290 Infinity II

El menú contextual optimizado Preparar la bomba sustituye al menú clásico:

- Bombas 1290 Infinity II

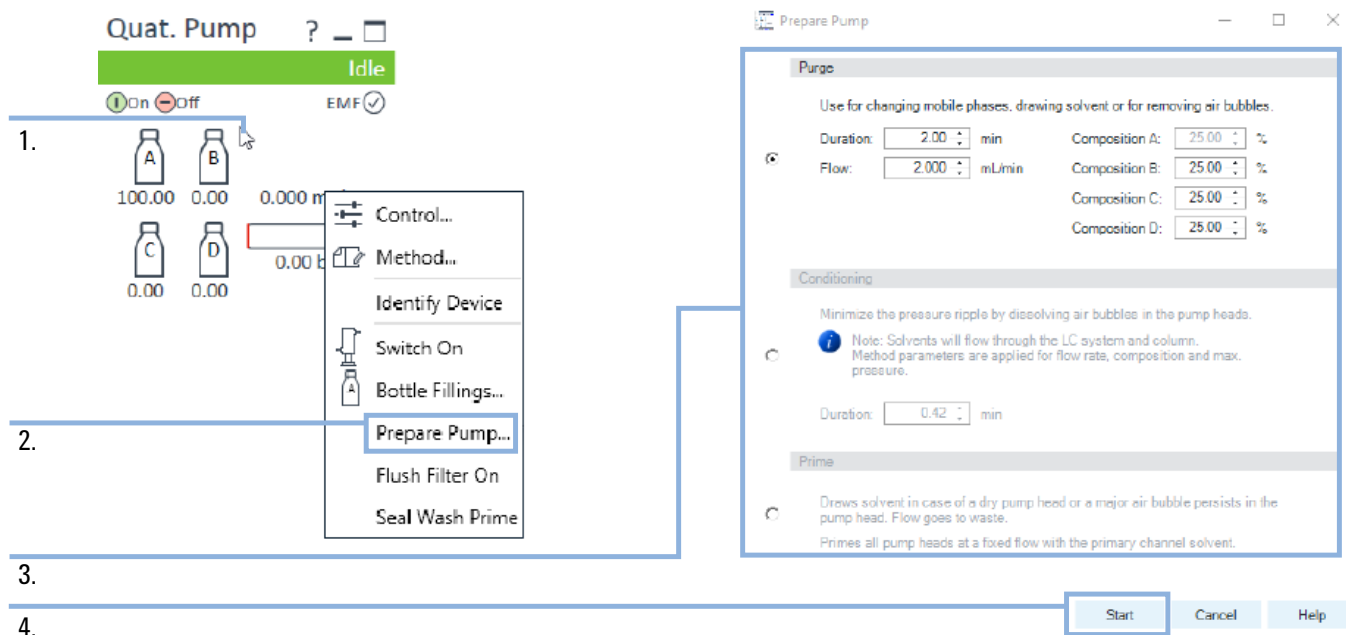


Figura 9 Preparación de la bomba (bombas 1290 Infinity II)

1. Haga clic con el botón secundario del ratón en el panel de módulos
2. Seleccione **Prepare Pump...**
3. Seleccione el procedimiento e introduzca los parámetros adecuados
4. Haga clic en el botón **Start** para comenzar con el procedimiento seleccionado

Aplicación Agilent InfinityLab HPLC Advisor

La aplicación Agilent InfinityLab HPLC Advisor ofrece un conjunto de herramientas útiles que facilitarán su trabajo cotidiano con los sistemas de HPLC, ya esté junto a los instrumentos o lejos de ellos. Estas herramientas son compatibles con todos los instrumentos de HPLC, independientemente del fabricante y el modelo.

Puede descargarla con su teléfono móvil de cualquiera de las siguientes maneras:

- Buscando “HPLC Advisor” directamente en Google Play o el Apple Store.
- Abriendo los enlaces siguientes:
 - *Google Play*: <https://play.google.com/store/apps/details?id=com.agilent.hplcadvisor>.
 - *App Store de Apple*: <https://apps.apple.com/app/hplc-advisor/id1566882318>.
- Escaneando el código QR incluido a continuación (válido para Android e iOS).



Glosario UI

C

Condition

Acondicionamiento

E

Evacuation Mode

Modo de evacuación

P

Prepare Pump...

Preparación de la bomba...

Prime

Cebado

Purge

Purga

S

Start

Inicio