

Parte 2: Cambio el diámetro interno de la columna con un flujo constante

Autor invitado: Dr. Jeff Layne

Bienvenido de nuevo a esta serie de artículos sobre los efectos de cambiar el diámetro interno de la columna en aplicaciones de [LC-MS](#). En este artículo, estamos usando una aplicación de LC-MS para ilustrar nuestra discusión, pero tengamos presente que los conceptos aquí ejemplificados sirven igualmente para aplicaciones de LC-UV.

Así pues, en el [último artículo](#) examinamos cómo incidiría el ***cambio del diámetro interno (DI) de la columna mientras se ajusta el flujo proporcionalmente a fin de mantener la misma velocidad lineal*** en la respuesta de altura de pico usando una aplicación simple de LC-MS en gradiente. En ese ejemplo, descubrimos que al cambiar el DI de 4,6 mm a 3,0 mm se producía casi el doble de la respuesta de altura del pico, lo que era estupendo en cuanto a lo que a sensibilidad de la señal se refiere. Sin embargo, al cambiar el DI de 3,0 mm a 2,1 mm, se obtuvo un aumento más modesto del 7 % en la respuesta de altura de pico. Esto podría deberse a los efectos del volumen muerto del sistema en el rendimiento de la columna con un DI de 2,1 mm o, tal vez, a la naturaleza de la ampliación de banda dentro del mismo espectrómetro de masas [MS] o, quizás simplemente, a un tamaño de muestra pequeño por lo que se hace necesario realizar más tests de prueba. Al ajustar nuestro flujo proporcionalmente, también mantenemos (relativamente) un tiempo de retención constante. Eso nos lleva al tema del artículo actual: **los efectos de cambiar el diámetro interno de la columna mientras se mantiene un flujo constante.**

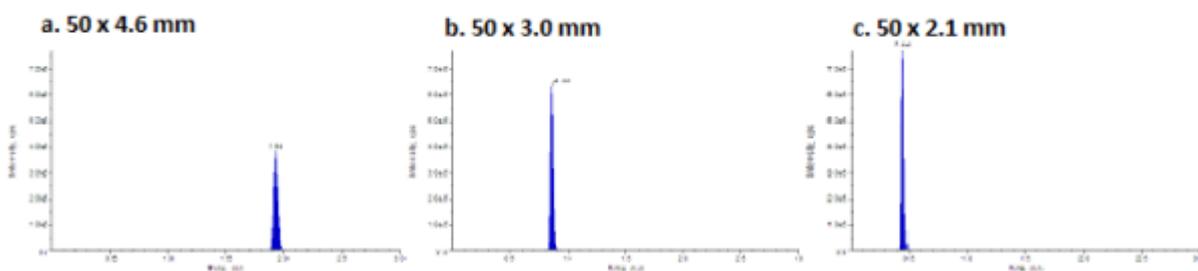
En el último artículo, aumentamos progresivamente el flujo para mantener una misma velocidad lineal a través del diámetro interno de cada columna, usando un flujo de 1 ml/min, 0,43 ml/min y 0,2 ml/min para las columnas de 4,6 mm, 3,0 mm y 2,1 mm, respectivamente.

Para este ejemplo, elegiremos un único flujo que se puede considerar como la media usada en muchos métodos de LC-MS: 0,5 ml/min. Este flujo está dentro del rango aceptable de casi cualquier fuente de MS moderna razonable y la velocidad lineal resultante no es demasiado rápida para la mayoría de las columnas con DI de 2,1 mm ni demasiado lenta para las de 4,6 mm. Estamos utilizando el mismo relleno ([Kinetex 2,6 µm C18](#)) con un gradiente de agua/acetoneitrilo/ácido fórmico al 0,1 % desde 5 – 95 % B durante 5 min. Nuestra molécula sonda es progesterona 17-alfa-OH y nuestro sistema es un Agilent 1200 LC (cromatógrafo de líquidos) acoplado a un [sistema API 4000™ MS \(SCIEX\)](#). Estamos pasando por alto el

bloque de calentamiento para minimizar el volumen muerto extra de la columna.

Los cromatogramas representativos se muestran en la **Figura 1** que aparece más abajo. Se puede observar que a medida que disminuye el DI de la columna, se obtiene un aumento progresivo en la respuesta de la altura de pico. Al pasar de la columna de 4,6 mm (**Figura 1.a**) a la columna de 3,0 mm (**Figura 1.b**), la altura de pico aumenta de $3,38e5$ a $6,36e5$, es decir, un aumento del 88 %. Luego, pasando de la columna de 3,0 mm a la de 2,1 mm (**Figura 1.c**), se observa que aumenta de $6,36e5$ a $7,76e5$, un aumento del 22 %. En general, estos datos son similares a los vistos en el ejemplo anterior cuando aumentamos progresivamente el flujo de manera proporcional, observándose el mayor beneficio al cambiar el diámetro interno de la columna de 4,6 mm a 3,0 mm y un aumento más modesto al cambiar el diámetro interno de la columna de 3,0 mm a la de 2,1 mm.

Figura 1: Efecto del cambio del DI de la columna manteniendo un flujo constante



La diferencia significativa es que ahora, sin aumentar progresivamente el flujo, se producen cambios sustanciales en los tiempos de retención y presiones a medida que nos movemos a diferentes DI de columna, mientras se mantiene un flujo constante de 0,5 ml/min (consulte la **Tabla 1**). Si el flujo se mantiene constante y se reduce el DI de la columna, la velocidad lineal de la fase móvil a través de la columna se eleva significativamente conduciendo a aumentos dramáticos en la presión (de 78 bares para la columna de 4,6 mm frente a 243 bares para la de 2,1 mm) y cambios marcados en cuanto al tiempo de retención (1,94 min para la columna de 4,6 mm frente a 0,44 min para la de 2,1 mm).

Tabla 1: Efecto del cambio de flujo en la respuesta de la altura de pico, la presión del sistema y el tiempo de retención

Gradiente con flujo constante a 0,5 ml/minuto	Altura	Presión	Tiempo de retención [RT] (minutos)
50 x 2,1 mm	7,76E+05	243	0,44
50 x 3,0 mm	6,36E+05	140	0,86
50 x 4,6 mm	3,83E+05	78	1,94

Asegúrese de consultar el siguiente artículo de esta serie, ya que tratamos de presentar un resumen de la información de los dos primeros artículos y de proporcionar una justificación razonable para ayudar así en la optimización de la columna y la fase móvil. Como se puede observar, será un equilibrio entre la respuesta de la altura de pico, el tiempo de retención y la presión.

Si se perdió el primer artículo, entonces revise: [“Cambio del diámetro interno de la columna mientras se ajusta el flujo”](#)

¿Está buscando mejorar su análisis de HPLC? Consulte la [Guía de resolución de problemas de HPLC](#) para obtener información sobre los consejos y trucos más recientes en análisis de LC.

[EFECTOS DE CAMBIAR EL DIÁMETRO INTERNO DE LA COLUMNA EN APLICACIONES DE LC-MS - PARTE 1](#)

<https://phenomenex.blog/2017/12/18/que-es-la-hplc/>

Share with friends and coworkers:

- [Click to share on LinkedIn \(Opens in new window\)](#)
- [Click to share on Facebook \(Opens in new window\)](#)
- [Click to share on Twitter \(Opens in new window\)](#)
- [Click to share on WhatsApp \(Opens in new window\)](#)
- [Click to email a link to a friend \(Opens in new window\)](#)