



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

“MANUAL DE OPERACION PARA EL MANEJO DEL
CROMATOGRAFO CLAR WATERS Y DEL
SOFTWARE MILLENIUM 2010 EN AMBIENTE
MULTIMEDIA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

MARTHA BERENICE HERNANDEZ SALDAÑA

ASESORES DE TESIS· DRA. RAQUEL LOPEZ ARELLANO
M. en C. PATRICIA RIVERA GARCIA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA H
MEXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos: La tesis:

Manual de Operación para el Manejo del Cromatógrafo CLAR
Waters y del Software Millenium 2010 en Ambiente Multimedia

que presenta la pasante: Hernández Saldaña Martha Berenice
con número de cuenta: 9111351-9 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 28 de Noviembre de 2000.

PRESIDENTE	Q.F.B. José A. Garduño Rosas	
VOCAL	Q.F.B. Guadalupe Rebollar Barrera	
SECRETARIO	M. en C. Patricia Rivera García	
PRIMER SUPLENTE	Q.F.B. Enrique Amador González	
SEGUNDO SUPLENTE	Q.B.P. Martha E. García Corrales	

AGRADECIMIENTOS

A TI SEÑOR QUE ERES LA PERSONA MÁS IMPORTANTE DE MI VIDA, TE DOY GRACIAS POR PERMITIRME REALIZAR UNA DE MIS METAS Y PORQUE SIEMPRE TE ENCUENTRAS A MI LADO.

A MI ESPOSO:

QUE SIEMPRE ME IMPULSÓ A SEGUIR A DELANTE, APOYÁNDOME EN TODO MOMENTO. TE OFREZCO ESTE TRIUNFO QUE SIN TU AYUDA NO HUBIERA PODIDO LOGRAR. TE AMO.

A MIS PADRES:

POR EL APOYO QUE ME HAN BRINDADO A LO LARGO DE MI VIDA. GRACIAS POR CREER SIEMPRE EN MÍ, ESTE LOGRO TAMBIÉN ES SUYO. LOS AMO

A MIS HERMANOS:

ELIZABETH Y GABRIEL, POR SU COMPAÑÍA Y COMPRENSIÓN, POR TODO LO QUE HEMOS COMPARTIDO JUNTOS, SIEMPRE PODRÁN CONTAR CONMIGO. LOS QUIERO MUCHO.

A MIS AMIGOS:

RUBÉN, CRISTIAN, Y ESTEBAN, POR SU COMPAÑÍA Y APOYO, QUE NUESTRA AMISTAD PERDURE POR SIEMPRE

A MIS COMPAÑEROS DE LA GENERACION 21 DE Q.F.B.

A MIS ASESORAS :

DRA. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO Y M. En C. PATRICIA RIVERA GARCÍA, POR AYUDARME A LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO. MUCHAS GRACIAS

INDICE GENERAL

	Páginas
INDICE GENERAL	I
RESUMEN	IV
INTRODUCCION	V
OBJETIVOS	VIII
CAPITULO 1. INTRODUCCION A LA CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (CLAR)	
1 1 QUE ES CLAR	2
1 1 1 HISTORIA DE LA CROMATOGRAFIA	2
1 1 2 BASES DE LA CROMATOGRAFIA	4
1 1.3 DEFINICIONES DE LA CROMATOGRAFIA	7
1 2 PARAMETROS CROMATOGRAFICOS	9
1 3 TIPOS DE CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS	17
1 3 1 CROMATOGRAFIA LIQUIDO-SOLIDO (CLS)	17
1 3 2. CROMATOGRAFIA LIQUIDO-LIQUIDO (CLL)	17
1.3 3 CROMATOGRAFIA DE FASE LIGADA (CFL)	18
1 3.4. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IÓNICO (CII)	19
1 3 5 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR (CEM)	19
CAPITULO 2. CARACTERISTICAS DEL EQUIPO CLAR WATERS	
2 1 SISTEMA CROMATOGRAFICO DE LIQUIDOS (CL) 616 WATERS	21
2 1 1 BOMBA 616	21
2 1 2 CONTROLADOR 600s	26
2 2 DETECTOR POR ARREGLO DE FOTODIODOS 996 WATERS	34
2 2 1 DESCRIPCION	35
2 2.2 ESPECIFICACIONES	37
2 3 AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS	38
2.3 1 DESCRIPCION	38
2 3 2 ESPECIFICACIONES	41
CAPITULO 3. PROCEDIMIENTOS PARA EL MANEJO DEL EQUIPO CLAR WATERS	
3 1 MANEJO DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO 616 WATERS	44
3 1 1 ENCENDER Y APAGAR EL SISTEMA	44
3 1 2 PURGAR LA BOMBA	45
3 1 3 DESGASIFICAR SOLVENTES	48
3 1 4 LAVAR EL SISTEMA	49
3 1 5 ESTABILIZAR EL SISTEMA	50
3 1 6 CONECTAR LA COLUMNA	51
3 1 7 CONFIGURAR UNA CORRIDA	54

	Páginas
3.2 MANEJO DEL DETECTOR (PDA) 996 WATERS	62
3.2.1 ENCENDER Y APAGAR EL SISTEMA	62
3.2.2 PRUEBAS DIAGNOSTICO	63
3.2.3 CALIBRACION DEL PDA	69
3.2.4 MILLENNIUM PDA	73
3.3 MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS	76
3.3.1 ENCENDER Y APAGAR EL SISTEMA	76
3.3.2 PURGAR EL AUTOMUESTREADOR	77
3.3.3 PREPARAR LAS MUESTRAS	79
3.3.4 LAVAR LA AGUJA	81
3.3.5 EJECUTAR UNA CORRIDA	82
3.3.6 MENSAJES DE ERROR	84
CAPITULO 4 MANEJO DEL SOFTWARE MILLENNIUM 2010	
4.1 CARACTERISTICAS DEL SOFTWARE MILLENNIUM	88
4.1.1 GENERALIDADES	89
4.1.2 VENTANAS DE MILLENNIUM	91
4.2 MANEJO DEL SOFTWARE MILLENNIUM 2010	117
4.2.1 ENCENDIDO DEL SOFTWARE MILLENNIUM	117
4.2.2 CONFIGURAR EL SISTEMA CROMATOGRÁFICO	118
4.2.3 CREACIÓN Y USO DE PROYECTOS	121
4.2.4 CREACION DEL METODO DE INSTRUMENTO	122
4.2.5 CREACION DEL CONJUNTO DE METODO	125
4.2.6 USAR LA VENTANA QUICK SET CONTROL	127
4.2.7 DESARROLLO DEL METODO DE PROCESO	129
CAPITULO 5 COLUMNAS Y SOLVENTES	
5.1 COLUMNAS	131
5.1.1 GENERALIDADES	132
5.1.2 CARACTERISTICAS DE LAS COLUMNAS	133
5.1.3 FASE ESTACIONARIA	139
5.1.4 COLUMNAS DE FASE REVERSA	141
5.1.5 COLUMNAS DE FASE NORMAL	143
5.1.6 SELECCIÓN DE LA COLUMNA	146
5.1.7 CUIDADOS Y MANTENIMIENTO DE LAS COLUMNAS	150
5.2 SOLVENTES	152
5.2.1 PROPIEDADES DE LOS SOLVENTES	152
5.2.2 ADITIVOS; SALES Y REACTIVOS	156
5.2.3 FASE MOVIL	157
5.2.4 SOLVENTES DE FASE NORMAL	158
5.2.5 SOLVENTES DE FASE REVERSA	160
5.2.6 PREPARACION DE LA FASE MOVIL	161
5.2.7 SELECCIÓN DE LA FASE MOVIL	163
CAPITULO 6 PREPARACION DE MUESTRAS	
6.1 GENERALIDADES	168
6.2 METODOS DE SEPARACION	170
6.3 TRATAMIENTO PREVIO	174
6.4 DERIVATIZACION	178

	Páginas
CAPITULO 7 PROBLEMAS MAS COMUNES ENCONTRADOS EN CLAR	
7 1 GENERALIDADES	181
7 2 PROBLEMAS INSTRUMENTALES	185
7 3 PROBLEMAS CROMATOGRAFICOS	196
CAPITULO 8 ASPECTOS COMPUTACIONALES	
8 1 EL USO DE LA COMPUTADORA EN LA EDUCACIÓN	210
8 1 1 VENTAJAS DE LAS COMPUTADORAS EN LA EDUCACIÓN	213
8 2 EL <i>SOFTWARE</i> EDUCATIVO	214
8 2 1 CARACTERÍSTICAS ESENCIALES DE LOS <i>SOFTWARE</i> EDUCATIVOS	215
8 3 SISTEMAS MULTIMEDIA	216
8 3 1 HIPERTEXTO, HIPERMEDIA Y MULTIMEDIA	217
8 3 2 CATEGORÍAS DE LOS SISTEMAS MULTIMEDIA	218
8 3 3 SELECCIÓN Y DESARROLLO DEL SISTEMA DE MULTIMEDIA	219
8 4 REQUERIMIENTOS DEL <i>HARDWARE</i> Y <i>SOFTWARE</i> PARA DESARROLLAR MACROMIL	221
8.4 1 LOS <i>AUTHORING</i>	221
8 5 <i>ASYMETRIX</i> MULTIMEDIA <i>TOOLBOOK</i>	222
8 6 DISEÑO PARA DESARROLLAR EL SISTEMA INFORMÁTICO MACROMIL EN AMBIENTE MULTIMEDIA	225
CAPITULO 9 RESULTADOS	
9 1 SISTEMA INFORMATICO MACROMIL	229
9 2 GUIA DE INSTALACION	232
9 3 PANTALLAS DEL SISTEMA INFORMATICO MACROMIL	236
DISCUSION	306
CONCLUSIONES	308
GLOSARIO DE TERMINOS	309
BIBLIOGRAFIA	316

RESUMEN

La extensa información que existe sobre cromatografía de líquidos y la necesidad de conocer el manejo del equipo cromatográfico, llevó a la realización de un Manual de Operación en un Sistema Multimedia denominado **MACROMIL**, el cual abarca información relacionada con aspectos cromatográficos, características y manejo del equipo cromatográfico de la marca Waters y del Software Millennium 2010. Este sistema está dirigido a la capacitación de los usuarios en el manejo del equipo cromatográfico del Laboratorio Experimental Multidisciplinario de Farmacia de la FES Cuautitlán y a todas aquellas instituciones que estén interesadas en conocer los aspectos cromatográficos.

Para desarrollar el sistema **MACROMIL** se hizo una recopilación de la información bibliográfica, de los manuales de operación y de la información obtenida por Internet, la cual fue traducida, organizada, depurada y sistematizada para después plasmarla tanto en el trabajo escrito como en el sistema multimedia. De la misma forma se recopiló el material gráfico, se digitalizaron imágenes, se editaron videos, se agregaron archivos de sonido y animaciones, que sirvieron como apoyo a la parte escrita, con la finalidad de obtener un sistema multimedia cuya capacidad presenta de manera fácil e interactiva un concepto que de otra forma sería difícil, complejo o simplemente aburrido.

El sistema **MACROMIL** se realizó con el *authoring Asymetrix Toolbook 5.0*, empleando otros programas de apoyo para la edición de imágenes, sonido, vídeo y animación, entre ellos; *Paint Shop Pro 6.0*, *Animation Shop*, *Director 7.0*, *Crystal 3D Impact*, *Wave Studio*, *IMS Shell*. **MACROMIL** consta de 507 pantallas, más de 200 imágenes, 23 archivos de sonido, 21 animaciones y 9 videos. Para su instalación requiere de una computadora con procesador desde 486 hasta pentium, en ambiente Windows.

MACROMIL aborda temas tales como; parámetros cromatográficos, las diferentes clasificaciones de la cromatografía de líquidos, características y descripción del equipo cromatográfico Waters y del Software Millennium 2010, características y uso de las columnas y solventes, preparación de muestras, problemas que se encuentran comúnmente en el equipo cromatográfico y un glosario de terminología. Con éste sistema multimedia se logró abarcar los aspectos de mayor importancia en la cromatografía y en el manejo del equipo cromatográfico

INTRODUCCION

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) ha tenido una creciente difusión desde comienzos de la década de los 70, y hoy representa una de las herramientas más empleadas en el laboratorio analítico moderno, porque se encuentra enfocado a la investigación básica o aplicada, industrial, biológica o bromatológica. CLAR representa el mayor mercado en el mundo del instrumental analítico. La popularidad de esta metodología se debe a su gran versatilidad (ya que cumple un amplio espectro de aplicaciones), excelente capacidad para el análisis de trazas, rapidez y adaptabilidad al análisis cuantitativo. La versatilidad de esta técnica hace que su campo de aplicación sea muy extenso. Se puede emplear para la determinación de aminoácidos, herbicidas, pesticidas, tensoactivos, metabolitos de productos tóxicos, azúcares, productos petroquímicos, fármacos, etc.¹

CLAR permite llegar a un nivel instrumental de alta precisión, compuesto por bombas para impulsar el solvente (fase móvil), un dispositivo para la inyección que permite la introducción de la muestra, una columna para llevar a cabo la separación y un detector para determinar la señal, que puede ser procesada por una computadora. El control del sistema cromatográfico puede realizarse mediante cables de sincronización que integran los módulos (bomba, detector, automuestreador). El sistema completo puede ser controlado desde una Estación de Datos como es el software Millennium 2010 que permite el procesamiento de datos y controlar las funciones del cromatógrafo de líquidos Waters.

Una de las mayores limitaciones de CLAR es la falta de operadores capacitados en el manejo del equipo y en el manejo de los parámetros cromatográficos que involucran un conocimiento global, esto se da tanto en las universidades como en la industria debido a varios factores; en la industria existen pocas personas que conocen de cromatografía de líquidos y su manejo, en la universidades se debe al alto costo del equipo y a que la gran mayoría de los profesores no tienen la oportunidad de obtener experiencia el manejo, por consiguiente los estudiantes no tienen acceso a equipos tan costosos, por lo cual el entrenamiento debe recaer o en el fabricante del instrumento o en el químico experimentado en la materia. Otro punto importante es el acceso a una amplia cantidad de información relacionada con la cromatografía de líquidos, que en su mayoría se encuentra en el idioma inglés lo cual no es fácil de manejar. Por ello se pretendió elaborar un manual de operación en un sistema informático computacional en ambiente multimedia de acuerdo a las características del cromatógrafo de líquidos Waters y del software Millennium 2010 con los que se trabaja en el Laboratorio Experimental Multidisciplinario de Farmacia de la FES Cuatitlán, así como todos aquellos parámetros y aspectos cromatográficos de importancia

El sistema informático denominado **MACROMIL** pretende convertirse en una herramienta útil para todas aquellas personas interesadas en conocer qué es la cromatografía de líquidos y el manejo del equipo cromatográfico de la marca Waters así como del Software Millennium. Este sistema presenta la información de una manera amena, fácil e interactiva, ya que contiene simulaciones en el manejo del equipo, videos que ilustran como se deben ejecutar ciertas funciones, animaciones para explicar aspectos cromatográficos que de otra manera serían difíciles de entender.

Para desarrollar **MACROMIL** fue necesario recopilar una gran cantidad de información que en su mayoría se encontraba en inglés, por lo que el paso siguiente fue traducirla, organizarla, depurarla y sistematizarla, así como todo el material gráfico. Se diseñó un diagrama de flujo para organizar la información por temas y darnos una idea del tipo de

navegación con el que iba a contar el sistema. Se agregaron imágenes, sonido, animaciones y vídeo al texto, los cuales se integraron mediante el uso del *authoring Asimetrix Toolbook 5.0* gracias a su fácil programación orientada a objetos. Todo esto involucró diferentes etapas: análisis, planificación, desarrollo, depuración y corrección.

Hoy se cuenta con cinco sistemas multimedia dirigidos al área farmacéutica, realizados por tesis de la carrera de Q.F.B. entre los cuales encontramos temas sobre mezclado realizado por Q.F.B. Rafael M. (1997), Buenas Prácticas de Manufactura por Jiménez D (1998), calidad para la industria farmacéutica por Ing. Ferrer S. (2000), disolución de polvos y tabletas por Narvaez A. (2000) y sobre sistemas de fluido. En el área de biología se tiene el desarrollo de una clave taxonómica realizado por M en C Rivera G. (1997), cuales son una de las bases importantes para seguir desarrollando cada vez más sistemas nuevos e innovadores.

La información presentada en **MACROMIL** es la misma que se presenta en éste trabajo escrito, sólo que en el sistema multimedia se aborda de una manera más amena, interactiva y sobre todo fácil. El presente trabajo consta de los siguientes capítulos:

Capítulo 1. Introducción a la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR). Muestra una breve historia de la cromatografía desde sus orígenes hasta el surgimiento de la cromatografía líquida de alta resolución, las bases y parámetros cromatográficos, algunas definiciones y como se clasifican los diferentes tipos de cromatografía de líquidos.

Capítulo 2. Características del Instrumental CLAR Waters. Aquí se abordan los temas relacionados con las características y descripción del equipo cromatográfico; controlador 600S, bomba 616, automuestreador plus 717 y detector 996. También se describe cual es la función que cumple cada parte del equipo.

Capítulo 3. Procedimientos para el Manejo del Instrumental CLAR Waters. Este capítulo muestra como manejar el equipo Waters, desde encenderlo hasta como programar ciertas funciones. Aborda temas como purgado de la bomba, lavado del sistema cromatográfico, programar tablas de gradiente, correr pruebas diagnóstico, ejecutar corridas cromatográficas, etc.

Capítulo 4. Manejo del Software Millennium 2010. Se muestra desde como acceder al programa, como se crean nuevos usuarios, proyectos, métodos de instrumento, conjunto de método, como configurar el sistema cromatográfico y un punto importante como usar la ventana *Quick Set Control*, desde donde se controla y ejecuta el equipo cromatográfico.

Capítulo 5. Columnas y Solventes. Explica algunas generalidades de las columnas, desde como seleccionar una columna, los cuidados que se debe tener, columnas de fase reversa y de fase normal. También muestra los diferentes tipos de solventes que se usan en cromatografía, como preparar y seleccionar la fase móvil.

Capítulo 6. Preparación de Muestras. Se abordan temas como; métodos de separación de muestras entre los que encontramos a la extracción, destilación, precipitación, etc. El tratamiento previo que se le da a las muestras y la derivatización.

Capítulo 7. Problemas más Comunes Encontrados en CLAR. Se mencionan los problemas tanto instrumentales como cromatográficos, se dan soluciones y se mencionan las causas que los pudieron originar.

Capítulo 8. Aspectos Computacionales. Se abordan las características de los sistemas multimedia y los requerimientos computacionales para realizar **MACROMIL**.

Capítulo 9. Resultados. Se muestra como está organizado el sistema computacional, por cuantos libros está conformado, cuales son sus pantallas y se da una guía de instalación.

Capítulo 10. Discusión. Se analiza si **MACROMIL** cumple con todas las características de un sistema multimedia y si es adecuado para la capacitación de todas aquellas personas que se encuentren interesadas en aprender aspectos cromatográficos y en el manejo del equipo.

Por último se dan la conclusiones y se muestran las referencias bibliográficas y las direcciones obtenidas por Internet

OBJETIVOS

GENERAL:

Elaborar un Manual de Operación en Ambiente Multimedia para el Manejo del Cromatógrafo de Líquidos CLAR Waters y del *Software Millennium 2.10*, para capacitar a los usuarios interesados en el aprendizaje de la cromatografía y en el manejo del equipo.

PARTICULARES:

- Recopilar, analizar, sintetizar, organizar y depurar la información necesaria relevante a la Cromatografía Líquida de Alta Resolución
- Diseñar y elaborar un diagrama de flujo del sistema computacional
- Diseñar la interface de usuario
- Capturar y editar el material gráfico a incluir en el sistema.
- Depurar el sistema computacional
- Elaborar el ejecutable y entregar a las instancias correspondientes

MARCO TEORICO
ASPECTOS CROMATOGRAFICOS

CAPITULO 1. INTRODUCCION A LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (CLAR)



1.1 QUE ES CLAR

1.1.1 HISTORIA DE LA CROMATOGRAFIA

1.1.2 BASES DE LA CROMATOGRAFIA

1.1.3 DEFINICIONES DE LA CROMATOGRAFIA

1.2 PARAMETROS CROMATOGRAFICOS

1.3 TIPOS DE CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS

1.3.1 CROMATOGRAFIA LIQUIDO -SOLIDO (CLS) O DE ADSORCION

1.3.2 CROMATOGRAFIA LIQUIDO -LIQUIDO (CLL) O DE PARTICION

1.3.3 CROMATOGRAFIA DE FASE LIGADA (CFL)

1.3.4 CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO (CII)

1.3.5 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR (CEM)

1.1 QUE ES CLAR

1.1.1 HISTORIA DE LA CROMATOGRAFÍA

Las primeras aplicaciones de la cromatografía, fueron las de los químicos de colorantes, quienes probaron sus mezclas de colorantes sumergiendo cuerdas o pedazos de tela o filtros de papel dentro de un tanque de colorante. La solución colorante ascendía en el material sumergido por capilaridad, los componentes de los colorantes producían bandas de diferente color. En el siglo XIX, varios químicos alemanes realizaron experimentos conducentes a explorar el fenómeno. Ellos observaron, por ejemplo, el desarrollo de anillos coloreados concéntricos al dejar gotear soluciones de iones de compuestos inorgánicos sobre el centro de un pedazo de papel filtro. Un tratado fue publicado en 1861 describiendo el método, al cual se le dio el nombre de "Análisis Capilar".

El descubrimiento de la cromatografía, es sin embargo, atribuido al botánico ruso Mikhail S. Tswett, puesto que reconoció las bases fisicoquímicas de la separación y la aplicó de una manera racional y organizada en la separación de pigmentos de plantas, particularmente los carotenos y las clorofilas.

El libro de Tswett, publicado en 1910, describió una técnica que es usada hoy día en la misma forma. El empaqué una columna vertical de vidrio y la relleno con un material adsorbtivo, tal como alúmina, sílica, o azúcar en polvo, le añadió una solución de los pigmentos de la planta a la parte superior de la columna, la lavó con un solvente orgánico para que los pigmentos salieran por el lado inferior de la columna. Los pigmentos se separaban en una serie de bandas coloreadas discretas dentro de la columna, divididos por regiones completamente libres de pigmentos. Ya que Tswett trabajó con sustancias coloreadas, el denominó al método "Cromatografía" (de las palabras griegas que significan escritura con color).

Tswett propuso que las moléculas se soluto se adsorbían al material de relleno, y que los componentes fuertemente adsorbidos descendían lentamente de la columna. Por su parte, los componentes adsorbidos con menor intensidad descendían a mayor velocidad, y la separación se lograba a causa de la diferencia de afinidad de los solutos entre el solvente (hoy llamado fase móvil) y el relleno (hoy fase estacionaria).

En 1931 la cromatografía emergió de su relativa obscuridad cuando el químico alemán Richard Kuhn y su estudiante, el químico francés Edgar Lederer, reportaron el uso de este método con un gran número de materiales biológicamente importantes. En 1941 dos químicos británicos, Archer J.P. Martin y Richard L.M. Synge, empezaron a estudiar la composición de los aminoácidos de la lana. Sus esfuerzos iniciales, en los cuales ellos utilizaron una técnica llamada distribución en contra corriente líquido-líquido, falló en darles la separación adecuada; por lo tanto ellos concibieron el uso de un método alterno, en el cual un líquido era firmemente enlazado a un sólido granulado, empaçado en un tubo de vidrio y un segundo líquido, inmiscible con el primero era percolado a través de él. La sílica gel sirvió como sólido granular, y Martin y Synge describieron el gel como agua enlazada fuertemente a los cristales de la sílica; la fase móvil fue cloroformo. Incluyeron el concepto de fase estacionaria líquida (agua) soportada sobre un sólido inerte (sílica), lo cual resulta en que las moléculas del soluto se particionaron entre la fase estacionaria líquida y una fase móvil líquida (cloroformo). La técnica se llamó desde entonces "Cromatografía de Partición".

El sistema de cromatografía por partición presentó muchas dificultades debido a la carencia de reproducibilidad en las propiedades de la sílica y a la carencia de uniformidad en el empaque de las columnas. Parcialmente por esta razón, Martin y sus colaboradores trabajaron en un nuevo procedimiento en el cual la fase estacionaria era una hoja de papel de filtro. El papel actúa como soporte del agua enlazada a la celulosa, ofreciendo otro método de partición. La técnica dio la reproducibilidad deseada, y a los comienzos de 1940 la cromatografía de papel encontró una amplia aplicación en el análisis de compuestos de importancia biológica, tales como aminoácidos, esteroides, carbohidratos, y pigmentos biliares. Este campo reemplazó, en una gran extensión, la técnica de columna iniciada Tswett.

Dos farmacéuticos Soviéticos, Nikolay A Izmaylov y María S Shrayber, distribuyeron el material de soporte como una película delgada sobre una placa de vidrio. La placa y el material de soporte podían ser manipulados de una manera similar a la cromatografía de papel. Los resultados de los estudios soviéticos fueron reportados en 1938, pero el potencial del método no se reconoció ampliamente hasta 1956, cuando el químico alemán Egon Stahl empezó una investigación intensiva en este campo. Este sistema llegaría a ser conocido como "**Cromatografía en Capa Delgada o Fina**" (CPD).

La cromatografía gaseosa, fue primero llevada a cabo en Austria en 1944 por la química Erika Cremer, quien usó una fase estacionaria líquida. La primera explotación extensiva del método fue hecha por Martin y James en 1952, cuando reportaron la elución por cromatografía gaseosa de ácidos orgánicos y aminas. En su trabajo, pequeñas partículas del material de soporte fueron recubiertas con un líquido no volátil y empacado en un tubo de vidrio calentado. Las mezclas se inyectaban a la entrada del tubo e impulsadas a través por un gas comprimido apareciendo como zonas bien separadas. Este desarrollo fue inmediatamente reconocido por los químicos del petróleo como un método simple y rápido para el análisis de mezclas complejas de hidrocarburos encontradas en sus productos. En 1959 Per Flodin y Jerker Porath en Suecia desarrollaron materiales celulósicos poliméricos que actuaban como tamices moleculares para sustancias dispersas en líquidos. Esto extendió el rango de pesos moleculares de la cromatografía a polipéptidos, proteínas y polímeros de alto peso molecular. El término genérico para tales separaciones es la "**Cromatografía de Exclusión por Tamaño**" (CET).

Una técnica exhibiendo gran selectividad, la cromatografía de afinidad, fue primero descrita por Pedro Cuatrecasas y sus colaboradores en 1968. En esas separaciones, una biomolécula tal como una enzima se enlaza a un sustrato atado a la fase sólida mientras otros componentes son eluidos. La molécula retenida puede ser subsecuentemente eluida cambiando las condiciones químicas de la separación.

El químico americano J. Calvin Giddings, refiriéndose a la teoría elaborada para la cromatografía gaseosa resumió las condiciones necesarias que podrían dar a la cromatografía líquida el poder de resolución alcanzado por la cromatografía de gases, tamaños de partícula muy pequeños con una película delgada de fase estacionaria en columnas de pequeño diámetro. El desarrollo de la técnica ahora denominada "**Cromatografía Líquida de Alta Resolución**" (CLAR) dependió de:

1. El desarrollo de las bombas que pudieran generar una corriente de líquido estable a altas presiones para forzar al líquido a fluir entre los estrechos canales intersticiales de la columna empacada, y

2. De los instrumentos capaces de detectar muestras pequeñas.

Al principio solo sólidos adsorptivos fueron usados como fases estacionarias, ya que las fases estacionarias líquidas eran barridas por la fase móvil.

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución se desarrolló a mediados de los 70's y rápidamente mejoró con el desarrollo de materiales de empaque para columna y la conveniencia adicional sobre una línea de detectores. A finales de los 70's, los nuevos métodos incluyendo la Cromatografía Líquida de Fase Reversa permitió una mejor separación entre compuestos muy similares. En 1980, CLAR se utilizó para la separación de compuestos químicos. Las nuevas técnicas mejoraron la separación, identificación, purificación y cuantificación de las técnicas anteriores. Las computadoras y la automatización complementaron la conveniencia del uso de CLAR.

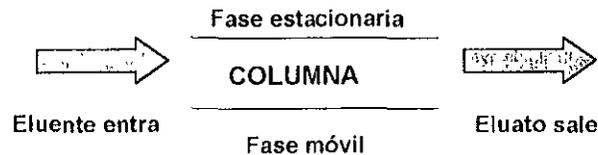
La idea de CLAR siglas que en inglés son HPLC, que se debieron a "*High Pressure Liquid Chromatography*" (Cromatografía Líquida de Alta Presión) debieron ser cambiadas cuando los cromatografistas se dieron cuenta de que la presión sólo constituía una herramienta que forzaba a la fase móvil a atravesar la columna, sin constituirse por sí en una variable del sistema. Sin embargo y ante la universalidad del término "HPLC", se decidió simplemente buscarle otro significado, resultando "*High Performance Liquid Chromatography*" (Cromatografía Líquida de Alta Resolución "CLAR").

1.1.2 BASES DE LA CROMATOGRAFÍA

Las técnicas cromatográficas se basan en la aplicación de la mezcla en un punto (Punto de Inyección o Aplicación) seguido de la influencia de la fase móvil

La base de la cromatografía es la migración diferencial de las moléculas, esto es, que su fluir desde el punto de aplicación se lleva a cabo con velocidades distintas para cada componente. La muestra que se debe analizar está en una fase móvil, líquida o gaseosa, y se le pasa a través de un medio estacionario que puede ser un sólido o un líquido contenido por un sólido. Puesto que cada uno de los componentes de la muestra pasa por el medio estacionario a velocidad diferente, puede ser separado de los demás en forma efectiva

Los componentes de una mezcla pueden presentar una diferente tendencia a permanecer en cualquiera de las fases involucradas. Mientras más veces los componentes viajen de una fase a la otra (partición) se obtendrá una mejor separación. La fase móvil se llama eluyente. Cuando emerge por la salida de la columna se denomina eluato:



El proceso que consiste en hacer pasar un líquido (o un gas) a lo largo de una columna de cromatografía se llama **elución**. En la cromatografía ocurren dos fenómenos muy importantes y que son prácticamente los rectores del proceso de separación: la adsorción y la absorción.

La **adsorción** es la retención de una especie química en los sitios activos de la superficie de un sólido, quedando delimitado el fenómeno a la superficie que separa las fases o superficie interfacial. Esta retención superficial puede ser física o química. La adsorción depende de la naturaleza de la sustancia adsorbida, de la temperatura, de la naturaleza y estado de subdivisión del adsorbente, y de la concentración

La **absorción** es la retención de una especie química por parte de una masa y depende de la tendencia que tiene ésta a formar una mezcla o reaccionar químicamente con la misma. Consiste en la penetración de una sustancia en el seno de otra (figura 1.1)

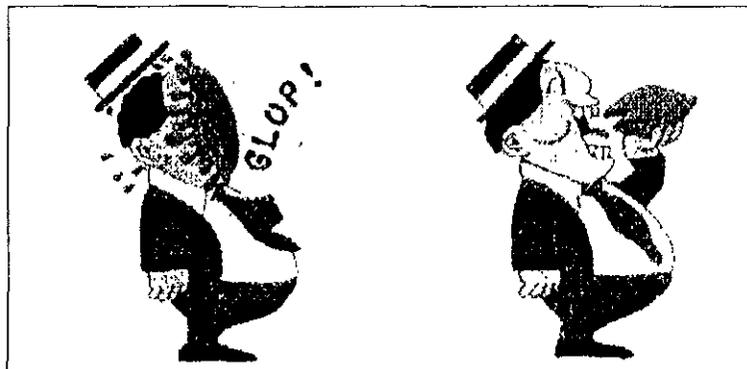


Figura 1.1. Simulación de un fenómeno de adsorción (izquierda) y de absorción (derecha)

Las técnicas cromatográficas se clasifican de acuerdo a los siguientes criterios

- A la Geometría del sistema
- Al modo de separación
- Al mecanismo de retención
- Las fases involucradas

A la Geometría del Sistema

Las fases móvil y estacionaria en un sistema cromatográfico están arregladas de tal forma que la migración se da a lo largo más que a lo ancho. Hay dos geometrías básicas: por **columna** y **planar**. En la **cromatografía de columna** la fase estacionaria está contenida en un tubo llamado columna. Una columna empacada contiene partículas que constituyen o soportan la fase estacionaria, y la fase móvil fluye a través de los canales de los espacios intersticiales.

La teoría ha mostrado que la eficiencia es incrementada si se utilizan tamaños de partícula muy pequeños, lo cual simultáneamente asegura la característica de que esos canales sean muy estrechos. En la medida en que el tamaño de partícula es reducido, el diámetro de la columna tiene también que ser reducido. Como resultado, la cantidad de fase estacionaria es menor y el tamaño de muestra tiene que ser reducido consecuentemente. Los métodos de detección deben por lo tanto responder a cantidades muy pequeñas de solutos, se requieren grandes presiones para forzar la fase móvil a pasar a través de la columna.

En la **cromatografía planar** la fase estacionaria esta configurada como una hoja delgada en dos dimensiones. En la **cromatografía de papel** una hoja o una tira delgada de papel sirve como fase estacionaria. En **cromatografía en capa delgada** (CCD) una película de capa delgada de partículas de un sólido se enlazan por la fuerza mecánica de un adherente, tal como sulfato de calcio, de tal forma que recubren una placa de vidrio u hoja de plástico.

Un borde de la placa es inmerso en el reservorio de la fase móvil, el cual, por capilaridad, se mueve de manera perpendicular a la superficie de la fase móvil. Este movimiento capilar es rápido comparado a la difusión del soluto en la fase móvil en ángulos rectos a la ruta de migración y así los solutos están confinados a una ruta estrecha.

Al modo de Separación

Se denominan así a los diferentes tipos de desarrollos cromatográficos utilizados para realizar la separación de los solutos de una mezcla, la cual siempre está basada en los distintos valores de las relaciones de distribución. Para un soluto determinado, la relación de distribución se define como la relación de concentraciones del mismo en la fase estacionaria y móvil, una vez alcanzado el equilibrio. La separación de los componentes de la mezcla puede ser alcanzada por una de las tres técnicas siguientes:

- Análisis Frontal
- Elución por Desplazamiento
- Desarrollo por Elución

Análisis Frontal

La mezcla líquida o gaseosa es introducida a la columna, la cual actúa como su propia fase móvil o portadora, y la separación depende de la habilidad con la cual cada componente en la mezcla llegue a adsorberse. Una vez que el empaque de la columna haya sido saturado (esto es, cuando no sea capaz de adsorber más componentes), la mezcla sigue fluyendo con su composición original. Los primeros usos de esta técnica incluyeron la medición del cambio en la concentración del frente que salía de la columna, de ahí el nombre de "análisis frontal". El componente menos adsorbido eluye primero y es el único componente en ser obtenido de manera pura.

Desarrollo por Desplazamiento

En esta técnica el desarrollador (o agente desplazador) está contenido en la fase móvil, el cual puede ser un líquido o un gas. Un requerimiento necesario es que la fase móvil sea más adsorbida que cualquiera de los componentes de la mezcla. Siempre se obtiene una banda pura única del primer componente en la muestra. Además, siempre se presenta una zona de solapamiento para cada componente que viene detrás, lo cual es una ventaja de esta técnica sobre el análisis frontal. La desventaja desde el punto de vista analítico, es que las bandas de los componentes no son separados por regiones de fase móvil pura.

Desarrollo por Elución

En esta técnica, los componentes de la muestra viajan a través de la columna a unas velocidades determinadas por sus características de retención sobre el empaque sólido. Si las diferencias en adsorción son suficientes o la columna es lo suficientemente larga será posible una completa separación de los componentes de la muestra. Una adición continua de eluyente causa la salida de bandas o zonas separadas desde la columna. Una desventaja de esta técnica es el largo intervalo de tiempo requerido para remover un soluto adsorbido fuertemente. Esto puede ser superado si se aumenta la temperatura (Cromatografía de Gases) o la fuerza de la fase móvil (Cromatografía de Líquidos) durante el proceso de separación.

□ Al mecanismo de Retención

La clasificación en términos del mecanismo de retención es una mezcla de fenómenos. Si el Coeficiente de Partición es constante en la medida en que la cantidad de soluto es variada, la separación es referida como "**Cromatografía Lineal**". Esta condición es altamente deseable ya que las zonas de soluto se aproximan a una distribución simétrica Gaussiana. Si el sistema es no lineal, las zonas de soluto son asimétricas. El caso asimétrico más común, es una zona "coleada". En la "**Cromatografía de Adsorción**" las moléculas del soluto se enlazan directamente a la superficie de la fase estacionaria. Las fases estacionarias pueden contener una gran variedad de sitios de adsorción que difieren en la tenacidad con la cual ellos enlazan las moléculas del soluto y en su relativa abundancia. El efecto neto determina la actividad del adsorbente.

La "**Cromatografía de Partición**" utiliza un material de soporte cubierto con una fase estacionaria líquida. Por ejemplo.

1. El agua enlazada a la celulosa papel o sílica o
2. Una película delgada que cubre o enlaza a un sólido.

La retención del soluto se debe a la solución del soluto en la fase estacionaria líquida.

La fase estacionaria en la **Cromatografía de Exclusión por Tamaño** consiste de moléculas de la fase móvil atrapadas en la estructura porosa de un sólido. Las moléculas del soluto son retenidas cuando ellas se difunden saliendo y entrando desde esos poros. El tiempo que ellas permanecen en los poros es una función de su tamaño, lo cual determina lo profundo de la penetración. Existe cierto tamaño molecular que representa el caso de "exclusión". Las moléculas de este tamaño y mayor son excluidas de los poros y no son separadas. Ellas aparecen primero en la cromatografía de elución. En el otro lado del espectro, existe un cierto tamaño para el cual todas las moléculas de esta magnitud y más pequeñas penetran todos los poros. Esas moléculas tampoco son separadas y eluyen al último. La **Cromatografía de Filtración en Gel**, CFG, (*Gel-Filtration Chromatography*, GFC) se refiere a los métodos de exclusión por tamaño que emplean agua como fase móvil y la **Cromatografía de Permeación en Gel**, CPG, (*Gel-Permeation Chromatography* GPC) cuando la fase es orgánica.

Las interacciones intermoleculares específicas, "candado-llave" son muy conocidas en bioquímica. Ejemplos incluyen enlaces enzima-proteína, antígeno-anticuerpo, y hormona-receptor. Una característica estructural de una enzima podría enlazarse a una proteína. La **Cromatografía de Afinidad** explota esta característica enlazando un ligando con la posibilidad interactiva deseada a un soporte tal como los que se usan en **Cromatografía de Filtración en Gel**. El Ligando retarda un soluto con las características estructurales mientras pasan todos los otros solutos en la mezcla. El soluto es luego eluído por un cambio en la fase móvil tal como la incorporación de un soluto competidor, cambiando la acidez o cambiando la fuerza iónica del eluyente.

1.1.3 DEFINICIONES DE LA CROMATOGRAFÍA

Según la definición de la IUPAC, "La cromatografía es un método, usado primariamente para la separación de los componentes de una muestra, en la cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras la otra se mueve. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido, retenido sobre un sólido o un gel. La fase estacionaria puede estar extendida como una capa o distribuida como una película, etc. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa".

Keulemans ha definido la cromatografía como un método físico de separación en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales constituye la fase estacionaria, de gran área superficial, y la otra es un fluido (fase móvil) que pasa a través o a lo largo de la fase estacionaria.

El proceso cromatográfico, aparentemente simple en práctica, es en realidad una compleja unión de fenómenos tales como hidrodinámica, cinética, termodinámica, química de superficie y difusión. En cromatografía los componentes químicos de una mezcla se desplazan mediante una fase estacionaria por la corriente de una fase móvil, gaseosa (Cromatografía de Gases) o líquida (Cromatografía Líquida). La separación en la cromatografía líquida es lograda por medio de diferencias entre las interacciones de los analitos con ambas fases, móvil y estacionaria. Para lograr una separación de los analitos por cromatografía líquida, se debe seleccionar ambas fases, estacionaria y móvil. Además se debe identificar las condiciones cromatográficas que se mantendrán durante el desarrollo.

La cromatografía líquida es en esencia un método separativo. Así, el lugar donde se produce la separación, la columna, puede considerarse el corazón del sistema cromatográfico, alrededor de la cual se monta un equipo de mayor o menor complejidad. En el caso más simple, el cromatógrafo de líquidos estará constituido por:

- Un reservorio de solvente que alimenta al sistema con la fase móvil
- Un sistema que permite la introducción de la muestra: el inyector
- Un sistema para forzar el pasaje de la muestra y la fase móvil a través de la columna: la bomba
- Un sistema de monitoreo: el detector
- Un sistema de registro de datos

La señal del detector puede ser utilizada tal cual por un registrador gráfico o por un integrador, o digitalizada, para que pueda ser interpretada y procesada por una computadora (figura 1.2).

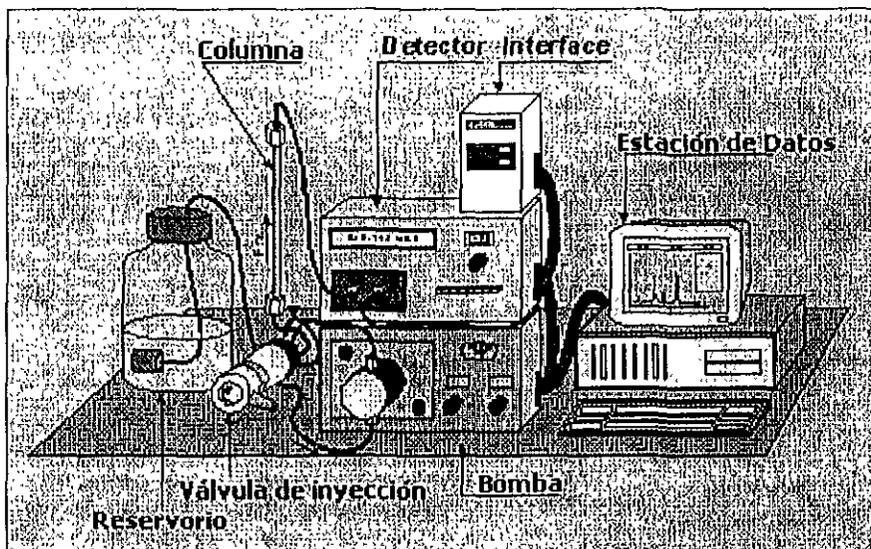


Figura 1.2. Esquema de un equipo CLAR

Básicamente, los equipos de CLAR se pueden clasificar en integrados y modulares:

Los **equipos integrados**, cada una de sus partes (reservorio de solventes, bomba, inyector y detector) están reunidas en un gabinete y su intercambio o conexión con otros componentes de la misma o diferente marca es difícil

Los **equipos modulares** son instrumentos individuales que permiten no sólo armar el equipo según la necesidad, sino aumentar su complejidad según esa necesidad varíe.

La base fundamental de CLAR consiste en pasar una mezcla del analito con un solvente a una presión alta (llamada fase móvil) a través de un tubo de acero (llamado columna) empaquetada con adsorbentes (llamada fase estacionaria). Como los analitos pasan mediante la columna estos interactúan recíprocamente entre las dos fases a diferentes velocidades.

La diferencia en la velocidad es primeramente debida a las diferentes polaridades de los analitos. Los analitos que tienen la menor cantidad de interacción con la fase estacionaria y la mayor cantidad de interacción con la fase móvil saldrán de la columna más rápido. Las interacciones repetidas a lo largo de la longitud de la columna efectúan una separación de los analitos. Las diversas mezclas de analitos pueden analizarse cambiando las polaridades de la fase estacionaria y la fase móvil.

CLAR ha tenido una creciente difusión desde comienzos de la década de los 70, y hoy representa una de las herramientas más empleadas en el laboratorio analítico moderno, ya sea éste dedicado a la investigación básica o aplicada, industrial, biológico o bromatológico.

CLAR, es en la actualidad una de las principales técnicas de separación de especies químicas estrechamente relacionadas. Se utiliza además para la identificación cualitativa y la cuantificación de las especies separadas. CLAR permite la separación de mezclas líquidas. La versatilidad de esta técnica hace que su campo de aplicación sea muy extenso. Se puede emplear para la determinación de aminoácidos, herbicidas, pesticidas, tensoactivos, metabolitos de productos tóxicos, azúcares, productos petroquímicos, fármacos, etc.

1.1 PARAMETROS CROMATOGRAFICOS

La cromatografía, tiene un lenguaje particular, su nomenclatura fue estandarizada por la *American Society for Testing and Materials*, ASTM y la *International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC. Se definirán algunos de los términos cromatográficos, para una mejor comprensión de éste manual, entre los cuales debemos incluir los siguientes

- ☛ Cromatograma
- ☛ Volumen de elución
- ☛ Volumen muerto
- ☛ Línea base
- ☛ Tiempo de retención
- ☛ Factor de capacidad
- ☛ Factor de separación
- ☛ Resolución
- ☛ Ancho de pico
- ☛ Platos teóricos
- ☛ Asimetría

Cromatograma

Es la representación de la respuesta o señal del sistema de detección en función del tiempo, volumen de eluyente o distancia en el lecho cromatográfico. El cromatograma puede tomar diversas formas: un registro gráfico proveniente de un registrador o *plotter*, una mancha en cromatografía plana, o un número determinado de datos tomados por un microcomputador. El cromatograma contiene la información analítica relativa a la muestra (complejidad, número de picos, detección cualitativa y/o cuantitativa de uno o varios componentes) o del funcionamiento del sistema cromatográfico.

El concepto de cromatograma, según IUPAC, es "un gráfico u otra representación de la respuesta del detector, concentración del eluato u otra cantidad usada como una medida de la concentración del eluato, contra el volumen de eluato o tiempo". Así, un cromatograma corresponde, por ejemplo, a la curva representada en la figura 1.3. Las abscisas corresponden al tiempo durante el cual se efectúa la medición. Si el volumen con respecto al tiempo es constante, la proporcionalidad entre tiempo y volumen de elución es directa. Las ordenadas corresponden a la señal analógica proveniente del detector y su significado dependerá del tipo de medición efectuada (absorción, índice de refracción, fluorescencia, etc.). La altura de la señal indica en cada momento la intensidad de la respuesta, en general proporcional a la concentración del soluto, la cual se evalúa por medición manual o electrónica (área bajo la curva o altura de pico). Idealmente el pico tiene distribución normal (gaussiana), aunque algunos fenómenos pueden provocar el alejamiento de esta condición y es frecuente encontrar asimetrías de mayor o menor intensidad.

Este alejamiento de la condición ideal es muchas veces inevitable, aunque se trata de minimizarlo ajustando las condiciones operativas ya que, como se puede suponer, la deformación del pico dificulta tanto la evaluación cuantitativa como la confiabilidad cualitativa. Otros tipos de inconvenientes en la interpretación del cromatograma pueden originarse en un método separativo ineficiente, separaciones pobres con superposición total o parcial de picos, en la calidad de la señal (ruidos, derivadas, etc.), en factores de diseño instrumental, errores operativos, etc.

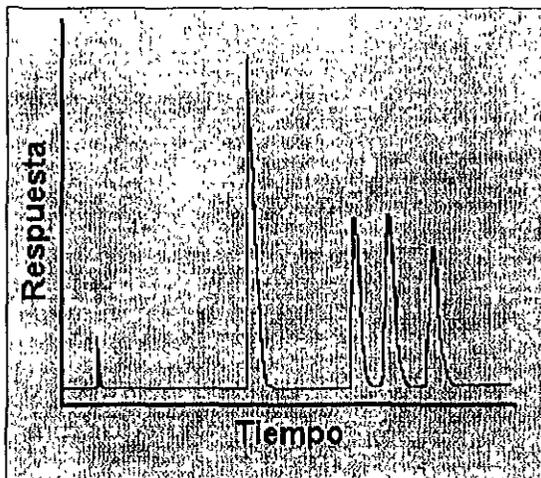


Figura 1.3. Cromatograma con distribución gaussiana.

Volumen de Elución (V_e)

El volumen de elución (V_e) o también conocido como volumen de retención (V_R); es el volumen de fase móvil eluida entre la inyección y la elución de la concentración máxima del soluto. A velocidad constante, el tiempo transcurrido entre dichos puntos corresponde al tiempo de elución o tiempo de retención.

También se define como el volumen de fase móvil necesario para que se produzca la elución de un soluto (realmente, para que aparezca el pico, ya que estrictamente en este instante, aproximadamente el 50% del mismo está todavía en el lecho cromatográfico), cuya fórmula nos indica como calcularlo :

$$V_R = t_R \times F \quad \dots \dots \dots (1)$$

t_R = Tiempo de retención

F = velocidad de flujo (expresado generalmente en ml/min)

Volumen muerto (V_0)

El volumen muerto (V_0); es el volumen total de fase móvil entre el punto de inyección y el de detección, exceptuando el correspondiente a las partículas de fase estacionaria. Comprende al volumen que la fase móvil puede ocupar entre las partículas, entre las partículas y la pared de la columna, en el interior de las tuberías, uniones, filtrados, etc

Evidentemente la solución atraviesa "limpiamente" estos espacios, sin participar en ningún proceso separativo. En el caso de que la solución inyectada contenga algún soluto que no se retenga en la fase estacionaria, su elución no será instantánea sino que corresponderá a un volumen de elución igual al volumen muerto. Este volumen corresponde, de trabajar a una velocidad de flujo constante, a un tiempo conocido como tiempo muerto (t_0) y se visualiza (no siempre) en el cromatograma como el primer pico o disturbio de la línea base. Sin embargo, como su valor se emplea frecuentemente en algunos cálculos cromatográficos, no se debe tomar este valor de los cromatogramas de cualquier ensayo, ya que se tiene la completa seguridad de que el primer pico, generalmente debido al solvente de disolución de la muestra o de alguna impureza desconocida, no se retenga en absoluto en el material de la fase estacionaria.

La comprensión de este parámetro nos permite llegar a una importante conclusión: no se debe evaluar ningún soluto cuyo tiempo de retención corresponda al volumen muerto. Es claro que en esas condiciones, el soluto no ha tenido oportunidad de separarse de ninguno de sus eventuales acompañantes en la solución. Por el contrario, su señal puede resultar modificada por la coelución de solvente de disolución o de impurezas agregadas.

Respecto del significado del término "volumen muerto" (*dead volume*), Este indica que en realidad corresponde a un espacio extracolumnar y propone modificar su denominación, ya que es accesible tanto a la fase móvil como al soluto, es responsable de ensanchamiento de banda y perturbaciones del velocidad de flujo y en realidad, no puede considerarse como "muerto". Términos más aceptables pueden ser volumen vacante o extracolumnar.

Línea Base

Es la proporción del cromatograma donde sólo se aprecia la elución de la fase móvil, sin señal debida al soluto.

Tiempo de retención (t_R)

El tiempo de retención (t_R) es el tiempo que toma un soluto en recorrer toda la columna. El tiempo de retención se asigna al correspondiente pico del soluto. El tiempo de retención es una medida de la cantidad de tiempo que el soluto gasta dentro de la columna: es la suma del tiempo que gasta en fase móvil y en la fase estacionaria.

También se define como el tiempo medido entre la inyección y la elución de la concentración máxima del soluto enésima (máxima señal). La distancia entre este máximo de la señal y la línea base es la altura del pico (h_n) en cuestión. Existe otros parámetros relacionados con el tiempo.

⇒ *Tiempo de Retención Neto o Relativo (t'_R)*

⇒ *Tiempo Muerto (t_0)*

⇒ *Tiempo de Retención Neto o Relativo (t'_R)*

Dado que el volumen extracolumnar depende de varios factores ajenos a la separación misma, es frecuente expresar el tiempo de retención neto de un pico determinado como diferencia entre su tiempo de retención y el tiempo muerto en lugar del tiempo de retención absoluto. Así, para el pico enésimo, tenemos la siguiente fórmula.

$$t'_R = t_R - t_0 \quad (2)$$

En ambos casos, el producto del tiempo de retención (absoluto o neto) y el velocidad de flujo (F) darán el volumen de retención (absoluto o relativo) como se muestra en la fórmula.

$$V_R = t_{R(\min)} \times F(\text{ml}/\text{min}) \quad (3)$$

⇒ *Tiempo Muerto (t_0)*

El tiempo de retención de un pico no retenido (t_M o t_0) es el tiempo requerido por un compuesto no retenido para viajar a través de toda la columna. Las moléculas de un soluto no retenido no penetran a la fase estacionaria, ellas viajan a la misma velocidad de flujo, todo el tiempo están en la fase móvil. Este es equivalente al tiempo que el soluto gasta en la fase móvil y que es el mismo para todos los solutos de la muestra en el mismo corrido cromatográfico. Este tiempo se obtiene al inyectar un compuesto no retenido y determinando su tiempo de retención.

Factor de capacidad

El **Factor de Capacidad** (k') conocido como **Factor de Retención** (k') es otra medida de la retención. Es la relación de tiempo que gasta el soluto en las fases estacionaria y móvil. Se define también como el cociente entre el número de moles de soluto en la fase estacionaria y el número de moles de soluto en la fase móvil y está relacionado con el coeficiente de distribución entre ambas fases.

$$K' = \frac{\text{Número de moles de soluto en la fase estacionaria}}{\text{Número de moles de soluto en la fase móvil}} \quad (4)$$

Puede demostrarse que k' es proporcional al tiempo de retención del soluto y se calcula para el pico enésimo como:

$$K' = \frac{(t_R - t_o)}{V_o} \quad (5)$$

$$K' = \frac{(V_R - V_o)}{t_o} \quad (6)$$

Evidentemente, surge de las dos ecuaciones anteriores que k' puede variar entre cero e infinito. Si el soluto no se retiene, su tiempo de elución será igual a t_o (o bien su volumen de elución igual a V_o) y si se retiene en forma irreversible, su tiempo (y su volumen) de elución será infinito. El factor de retención es una medida de la retención por la fase estacionaria. Es una medida relativa y lineal.

Por ejemplo, un soluto con un $k' = 6$ es doblemente retenido por la fase estacionaria (no la columna) comparado con un soluto con un $k' = 3$. El Factor de retención no da información sobre el tiempo de retención absoluto, solo sobre la retención relativa. Un soluto no retenido tiene un $k = 0$.

El valor de k' se puede ajustar modificando la fuerza de la fase móvil, por ejemplo:

- En Fase Reversa
 k' disminuye al aumentar la proporción del componente orgánico (MeOH, AcN, THF) y aumenta al aumentar la proporción de agua
- En Fase Normal
 k' disminuye al aumentar la proporción de solvente polar y aumenta al aumentar la proporción del no polar.
- En Cromatografía de Intercambio Iónico
 k' disminuye al aumentar la concentración del contraión (buffer o sal agregada), o la proporción de solvente orgánico. La variación del pH de la fase móvil puede aumentar o disminuir k' de acuerdo a las características ácido-base del analito

La medición de k' es una operación muy frecuente, ya que su valor se emplea tanto para evaluar la retención como para ajustar la separación. Así, el valor de k' se regula entre 2 y 10 para mezclas de pocos componentes, o entre 0.5 y 20 si fuera necesario "hacer lugar" en el cromatograma para alojar un gran número de picos.

Factor de separación (α)

El Factor de Separación (α) es una medida del tiempo o distancia entre el máximo de dos picos. Se calcula utilizando la siguiente ecuación. Si $\alpha = 1$, entonces los picos tienen el mismo tiempo de retención y co-eluyen.

$$\alpha = \frac{K'_2}{K'_1} \quad (7)$$

K_1' = factor de capacidad para el primer pico

K_2' = factor de capacidad para el segundo pico

Se puede definir también como el cociente entre los factores de capacidad (k') de un par de picos. Si no existe separación, α es igual a la unidad y su valor aumenta cuando aumenta la separación.

A diferencia de k , α no depende de la fuerza de elución de la fase móvil y de la columna. Así, una disminución de la fuerza de la fase móvil produce un aumento de la retención, que en general no se acompaña de cambios de selectividad. Es decir, el aumento será proporcional para todos los solutos y el cociente entre ellos se mantendrá aproximadamente constante (figura 1.4).

La variación de α puede lograrse de varios modos, pero lo que se intenta es, en definitiva, variar el tipo de interacción entre las variables del sistema, es decir, soluto-fase móvil-fase estacionaria. Las variaciones usuales son:

- Modificación del componente "activo" de la fase móvil (en fase reversa, MeOH por AcN o THF, en fase normal, cloroformo por cloruro de metileno o metil tercbutil éter)
- Modificación del pH de la fase móvil
- Empleo de aditivos (reactivos de apareamiento, complejantes, etc)
- Cambio de la fase estacionaria.

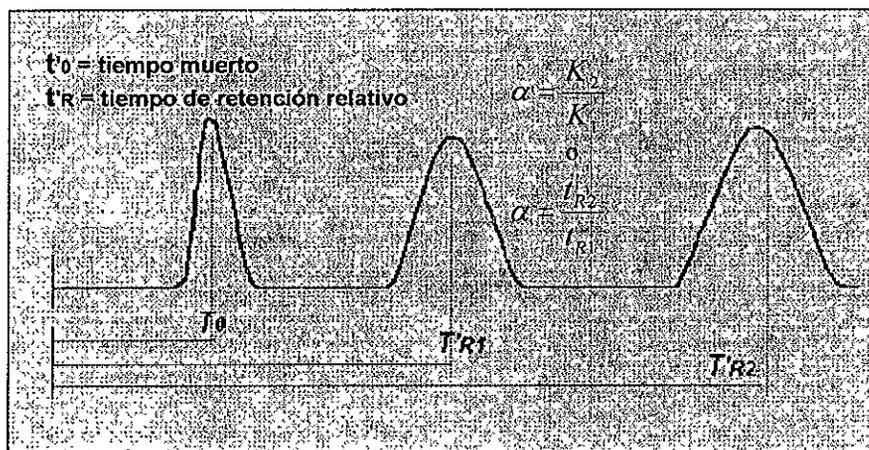


Figura 1.4. Cromatograma tipo y algunos parámetros de medición

Resolución

La resolución (R) es un parámetro importante, pues como se ha dicho, el objetivo de la cromatografía es la separación de los constituyentes de una muestra. Es natural, entonces, la necesidad de contar con una expresión cuantitativa de la calidad de la separación.

Entre mayor sea la resolución, menor será el solapamiento entre dos picos consecutivos. El factor de separación (α) es solo la distancia o el tiempo entre los máximos de dos picos. La resolución toma en cuenta tanto a α como el ancho de pico. Esta expresión, la resolución, se calcula por cada par de picos adyacentes con la siguiente fórmula:

$$R = \frac{(t_2 - t_1)}{\frac{1}{2}(w_2 + w_1)} \quad (7)$$

Donde t_2 y t_1 corresponden a los tiempos de retención de los picos 2 y 1, $w_2 + w_1$ a los anchos de pico medidos en su base (figura 1.5).

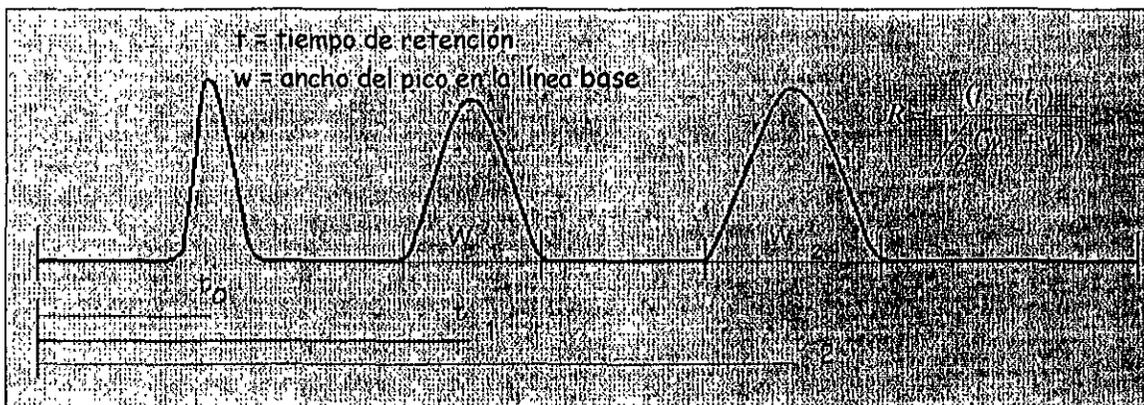


Figura 1.5. Picos cromatográficos medidos desde su base.

Ancho de pico (w)

Esta medición se puede efectuar con varios objetivos: para calcular la eficacia de la columna (platos teóricos), la resolución, para el cálculo manual del área de picos y en algunos integradores electrónicos se ingresa como dato de ajuste de integración. El ancho de pico se puede tomar en varias posiciones (a varias alturas) y si la señal fuera perfectamente gaussiana, las apreciaciones que resultan de esta medición serían equivalentes. (ver figura 1.5) Sin embargo, como esta condición raramente se cumple y se debe indicar cual es el método empleado.

En general el ancho de pico suele tomarse:

- Al 60-70% de la altura del pico (w_i). En este lugar se encuentran los puntos de inflexión y en una distribución normal, la sección horizontal de la curva corresponde a dos desviaciones estándar (2σ)
- Al 50% de la altura del pico (w_h ancho de pico a media onda).
- En la base del pico (w_{tan}). Este valor se obtiene prolongando la línea base por debajo del pico y midiendo el segmento de esta línea, delimitado por la extrapolación de las ramas ascendente del pico
- Para obtener un mayor reflejo de la asimetría sobre la medición, es frecuente encontrar medidas tomadas en otros sectores del pico

Platos Teóricos

El concepto de Plato Teórico (N) fue desarrollado en 1941 por Martin y Synge para la cromatografía de partición líquido-líquido (LLC) Para explicar el fenómeno separativo, compararon la LLC con un proceso de distribución en contracorriente, donde la extracción en las dos fases se repite varias veces en forma encadenada. La diferencia fundamental residía en que en la cromatografía, el proceso es continuo. Sin embargo, la columna se podía dividir en cortes o rodajas imaginarias donde se conseguía un equilibrio transitorio, antes de que la fase móvil avance hacia el siguiente. Cada corte se llamó "plato" y su espesor "altura equivalente del plato teórico" (H o HETP). Entonces, para una columna de longitud L, con N platos teóricos, la altura del plato resulta la siguiente fórmula:

$$H = L/N \quad \dots \quad (8)$$

La eficiencia de una columna cromatográfica y por lo tanto su "poder" separativo se mide en función de su número de platos teóricos. Para lograr la separación de dos componentes dados, no sólo deben eluir a distintos tiempos de retención, sino que el ancho de los picos debe ser tan bajo como sea posible. El número de platos teóricos se puede calcular en función del ancho del pico como se muestra en la fórmula.

$$N = 16(t_R/w_{tan})^2 \quad (9)$$

Donde t_R es el tiempo de retención del pico enésimo y w_{tan} su ancho, medido sobre la línea base y expresado en unidades de tiempo (el cálculo puede también expresarse en función del volumen de retención y el ancho del pico, en unidades de volumen). El número de platos teóricos es un concepto y no tiene nada de parecido con el concepto de platos de destilación o columna de destilación.

H (y consecuentemente N) depende no sólo el diámetro, morfología y calidad de la partícula sino también de la calidad del empaquetamiento, de su envejecimiento y eventuales vaciamientos o canales producidos por disolución o golpes. Por otra parte, no sólo la columna determina el valor de N. Como se verá más adelante, muchos factores instrumentales contribuyen al ensanchamiento de los picos (longitud y diámetro de tuberías, volumen y geometría de la celda del detector, etc). Otros factores determinantes de N y ajenos a la columna "física" corresponden a los procesos por los cuales la geometría del pico se aleja del ideal, es decir, de la curva normal o gaussiana.

Es benéfico tener columnas con alta eficiencia ya que facilita la separación completa de picos estrechos con valores del factor de separación (α) bajos. Sobre fases estacionarias en las cuales los α son altos no se necesitan columnas muy eficientes. Donde los α son pequeños se necesitan columnas muy eficientes. La eficiencia de la columna es una función de sus dimensiones (diámetro, longitud y espesor de película). Lamentablemente no existe un criterio unificado para la medición de la eficacia. Es decir, o existe una forma operativa, especificaciones instrumentales, solutos de referencia, ni tampoco forma de expresar el resultado (platos/m, platos/columna, etc).

Por esta razón, no puede compararse directamente la eficiencia reportada por distintos fabricantes de columnas para sus productos. Por otra parte, si se efectúan mediciones en un cromatograma que contiene más de un pico, puede observarse alguna ligera variación en el número de platos teóricos calculado para cada soluto. Esto significa que la eficiencia suele medirse en varias ocasiones, por ejemplo.

- Para comparar materiales (en particular columnas) y métodos, bajo las mismas condiciones experimentales
- Para optimizar un método analítico
- Para controlar que un método continúe siendo idóneo
- Para controlar el estado de una columna a lo largo de su vida útil

Se han analizado las modalidades empleadas para la determinación de N, de lo cual se concluye que tanto el cálculo basado en la medida del ancho de pico en la base, como la tomada a media altura de pico son poco exactas cuando el gráfico se aleja de la normalidad (ver tabla 1.1 y figura 1.6). Sin embargo, el método debe elegirse de acuerdo a las necesidades del analista, teniendo en cuenta, naturalmente, las limitaciones de cada modalidad.

$$N = a \left(\frac{t_r}{w} \right)^2 \quad (9)$$

W	a	MÉTODO	EXACTITUD
W _i	4	Inflexión	Baja
W ₁₁	5.54	Media onda	Baja
W ₃	9	3σ	-
W ₄	16	4σ	Media
W ₅	25	5σ	Alta
W _{tan}	16	Tangente	Baja

Tabla.1 Métodos para el cálculo de N. El factor "a" corresponde a la ecuación 9.

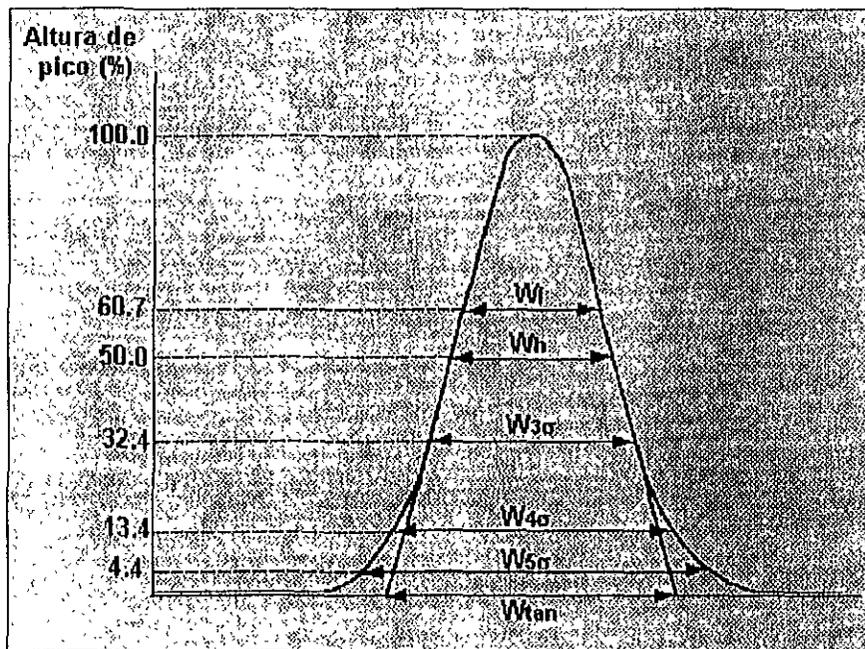


Figura 1.6. Anchos de picos empleados para el cálculo de N

Asimetría

La asimetría (*tailing*) es una de las formas más comunes de alejamiento de la curva gaussiana y su medición es importante puesto que puede llevar, de acuerdo a su magnitud, a errores considerables de cuantificación, e incluso a oscurecer picos adyacentes. Si bien no existe un criterio único para el cálculo de asimetría, las fórmulas empleadas con mayor frecuencia son:

$$As_{10\%} = \frac{b}{a} \quad (10) \quad As_{5\%} = \frac{b'}{a'} \quad (11)$$

donde a y b son las medidas entre la línea que une el máximo del pico con la línea base y los extremos anterior y posterior del pico, tomados al 10% de su altura. Por su parte, a' y b' son los mismos parámetros al 5% de dicha altura (figura 1.7)

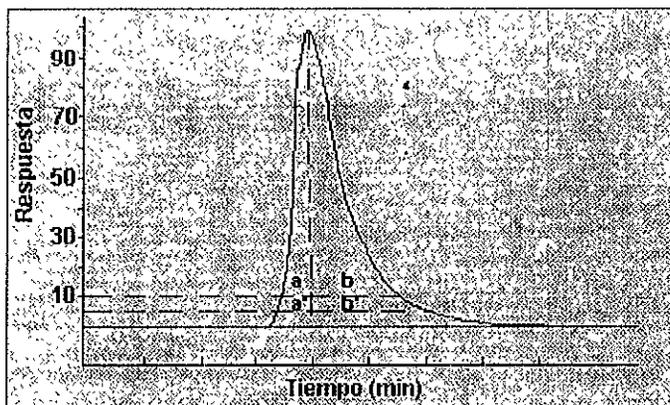
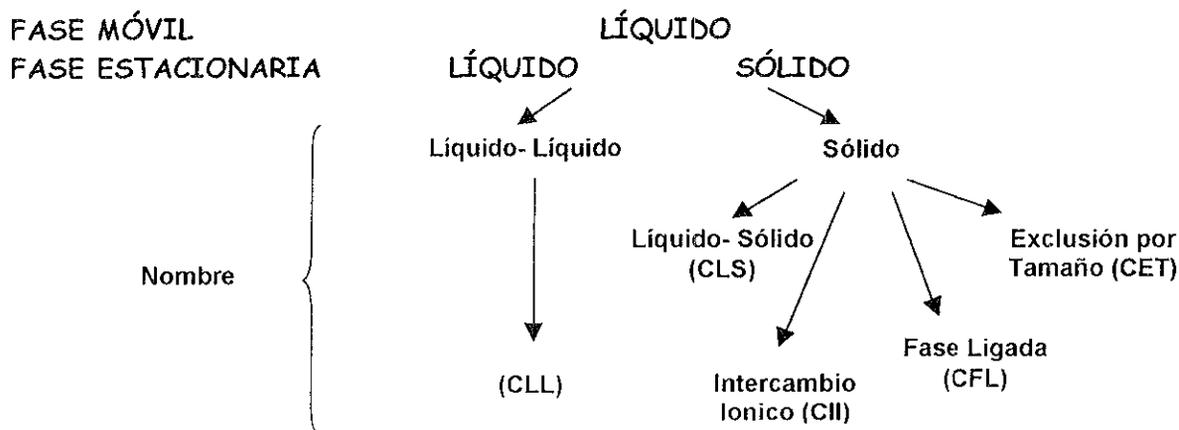


Figura 1.7. Representación de un pico asimétrico y las zonas de medición de asimetría.

1.3 TIPOS DE CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS

Podemos clasificar a la Cromatografía Líquida de la siguiente forma



1.3.1 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDO-SÓLIDO (CLS) O DE ADSORCIÓN

Es la forma más antigua de la cromatografía, en la cual se utiliza una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida o gaseosa. El soluto se puede adsorber en la superficie de las partículas sólidas. En cualquier fenómeno de adsorción influyen tres variables independientes. Estas son el adsorbente, el disolvente y las sustancias a analizar. La separación sobre adsorbente depende de la existencia del equilibrio entre las moléculas adsorbidas en la fase estacionaria y las que están libres en el disolvente, moviéndose las moléculas individuales entre las dos fases. Si las moléculas de un componente particular tienen una elevada afinidad por el adsorbente pasarán muy lentamente, mientras que otro componente con menos afinidad lo hará más rápido.

Este método emplea una fase estacionaria polar, típicamente silicagel y una fase móvil no polar, por ejemplo hexano. La separación se da entre dos series de pasos la adsorción/desorción.

1.3.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDO LÍQUIDO (CLL) O DE PARTICIÓN

En esta modalidad, las moléculas de soluto se distribuyen entre dos líquidos. uno es la fase móvil, y el otro la fase estacionaria, que se encuentra homogéneamente dispersa en un soporte sólido, *finamente dividido*. El analito se distribuye entre a fase estacionaria líquida inmiscible en la fase móvil y fijada mecánicamente a un soporte inerte (tierra de diatomeas, sílicagel irregular, de poros grandes y baja actividad, etc)

La separación se basa sobre la partición del soluto entre dos fases líquidas (móvil y estacionaria). Las técnicas más generales de la separación líquido-líquido se llevan a cabo sobre celulosa o gel de sílice húmeda, pudiendo realizarse en forma de tira de papel, capa fina o columna. El medio en cada caso actúa como soporte del agua, por lo que este tipo de cromatografía se emplea fundamentalmente para la separación de sustancias solubles en la misma

1.3.3. CROMATOGRAFÍA DE FASE LIGADA (CFL)

La cromatografía de fase ligada es llamada así porque reemplaza el tipo de unión de la fase estacionaria a su soporte, haciéndola *perdurable por medio de una unión química covalente (es decir un ligando)* La cromatografía de fase ligada se puede clasificar en Fase Normal (FN) y Fase Reversa (FR), de acuerdo a la polaridad relativa de la fase móvil y de los grupos funcionales químicamente ligados a la matriz

La partícula de fase ligada está compuesta por un material de base, sílicagel, alúmina, agarosa, etc , al que se une químicamente un compuesto que contiene un grupo funcional determinado. La *estructura químicamente interna y superficial*, su reactividad y pureza, le confieren características muy variadas y determinan profundas diferencias en el tipo de tratamiento

La **Cromatografía en Fase Normal (CFN)** emplea una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar La CFN se realiza sobre fases estacionarias hidrofílicas como la sílice o alúmina microporosas y con solventes de mediana a baja polaridad como fase móvil Es un método apropiado para la separación de solutos de polaridad mediana a alta y es de suma utilidad para la separación de isómeros posicionales con sustituyentes polares El mayor inconveniente de la CFN se debe a la alta actividad del material de relleno, que tiende a adsorber agua y solventes polares en su superficie. Como consecuencia, su comportamiento puede modificarse en una disminución de la reproducibilidad en los resultados

El agua adsorbida, que forma capas simples o múltiples alrededor de la partícula y llega a tapar sus poros, es responsable de la pérdida de actividad de la fase estacionaria, o al menos, conduce a mecanismos mixtos de retención: por una parte, fenómenos de adsorción debidos a los silanoles superficiales de la fase estacionaria y por otra, a mecanismos de partición entre la fase móvil y el agua retenida sobre la fase estacionaria

La adsorción se puede interpretar como una concentración de un analito en una columna cromatográfica respecto del solvente en el que está fluyendo. Ese enriquecimiento surge de las interacciones existentes entre los analitos y el material de relleno de la columna La retención se debe a la competencia que se establece entre:

Fase Móvil · Superficie Adsorbente
Analito · Superficie Adsorbente

La **Cromatografía en Fase Reversa (CFR)** emplea una fase estacionaria no polar y una fase móvil muy polar (en general mezcla de agua y un modificador orgánico, metanol, acetonitrilo ó tetrahidrofurano) Las ventajas de la CFR son

- Compuestos no iónicos, iónicos e ionizables pueden ser separados en la misma columna, con la misma fase móvil
- La fuerza de atracción superficie no polar· soluto es débil
- La adsorción irreversible, frecuente en sílicagel, raramente ocurre
- La fase móvil predominante es agua, abundante y económica
- El modificador orgánico predominante es el metanol
- El orden de elución es predecible, en función de la hidrofobicidad del analito
- Se necesita poco tiempo para el equilibrio del sistema luego de un cambio de fase móvil

La interacción entre las moléculas de soluto y de solvente es mucho más débil que la interacción de las moléculas de solvente entre sí. Como consecuencia el soluto es expulsado de la fase móvil y forzado a penetrar en la fase estacionaria, que actúa como receptor pasivo. La figura muestra como ejemplo la interacción de fenol con la fase ligada. En este caso, se puede asumir que el grupo polar se orienta hacia la fase móvil acuosa, mientras que su posición hidrofóbica lo hace hacia la superficie hidrocarbonada.

1.3.4. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO (CII)

En este tipo de cromatografía, los aniones (como SO_3^-) o cationes (como $\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$) se unen covalentemente a la fase estacionaria sólida. Los iones del soluto de carga opuesta a los de la fase estacionaria, son atraídos por esta última mediante una fuerza electrostática.

En los intercambiadores aniónicos, los grupos con carga positiva están unidos covalentemente a la fase estacionaria. Los aniones del soluto son atraídos hacia los sitios positivos de fase estacionaria. Los intercambiadores catiónicos contienen sitios con carga negativa, unidos covalentemente, los cuales retienen los cationes del soluto.

La Fase Estacionaria es una resina de Intercambio Iónico y tiene la propiedad de separar especies ionizadas (cationes o aniones). La fase móvil es generalmente una solución amortiguadora de pH.

La Cromatografía de Intercambio Iónico se emplea en la separación de sustancias iónicas, tanto orgánicas como inorgánicas, de polielectrólitos, como enzimas, proteínas, hormonas, virus, ácidos nucleicos y otras sustancias biológicamente importantes.

1.3.5. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO (CET)

La Cromatografía de Exclusión por Tamaño, es un tipo particular de cromatografía líquido-sólido, que se utiliza en la separación de sustancias que poseen volúmenes moleculares diferentes, en la cual las moléculas se separan por su tamaño, se utiliza ampliamente en bioquímica para separar moléculas grandes como proteínas y carbohidratos.

Esta técnica se introdujo con la creación del Sephadex^R, el cual se obtiene a partir de un polisacárido, y es utilizado como fase estacionaria, la cual está constituida de partículas altamente porosas que permiten la separación de los componentes en función del tamaño de las moléculas. A la Fase Estacionaria se le llama también Malla Molecular. El Cromatograma obtenido representa la distribución de Pesos Moleculares.

El término exclusión por tamaño, también se encuentra en la bibliografía con los nombres de: Filtración sobre Gel, Permeación sobre Gel, Tamizado Molecular y Exclusión Molecular.

CAPITULO 2. CARACTERISTICAS DEL INSTRUMENTAL CLAR WATERS

2.1 SISTEMA CROMATOGRAFO DE LIQUIDOS (CL) 616 WATERS

- 2.1.1 BOMBA 616
- 2.1.1.1 DESCRIPCIÓN
- 2.1.1.2 ESPECIFICACIONES

- 2.1.2 CONTROLADOR 600S
- 2.1.2.1 DESCRIPCIÓN
- 2.1.2.2 ESPECIFICACIONES

2.2 DETECTOR POR ARREGLO DE DIODOS 996 WATERS

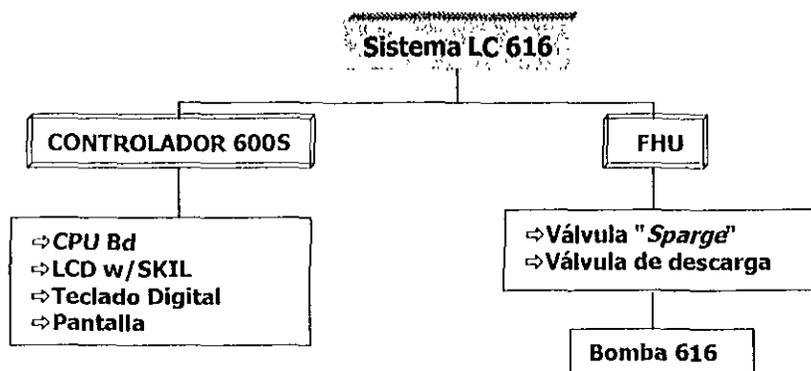
- 2.2.1 DESCRIPCIÓN
- 2.2.2 ESPECIFICACIONES

2.3 AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS

- 3.2.1 DESCRIPCIÓN
- 3.2.2 ESPECIFICACIONES

2.1 SISTEMA CROMATOGRAFO DE LIQUIDOS (CL) 616 WATERS

El Sistema Cromatógrafo de Líquidos (CL) 616 está diseñado de acuerdo a la tecnología de punta, este incluye una Unidad del Manejo Fluido (FHU) y un controlador 600S. El controlador 600S incluye el *software PowerLine* el cual es controlado directamente desde un teclado pequeño del controlador. El sistema CL 616 también puede controlarse a través del *Software Millennium 2010* por medio de una computadora. Los componentes del sistema CL 616 son.



2.1.1 bomba 616

Las bombas CLAR impulsan la fase móvil proveniente del reservorio de solvente hacia el inyector, y desde allí hacia la columna. Existen bombas capaces de entregar caudales muy pequeños, del orden de los microlitros/minuto para la cromatografía microbore, pasando a velocidad de flujo de unos pocos mililitros/minuto para la cromatografía analítica convencional hasta valores mucho mayores para las separaciones semipreparativas y preparativas (figura 2.1)

Básicamente existen dos tipos de bombas: las de pistón (bombas reciprocantes) y las de desplazamiento continuo (bombas jeringa). Las primeras son las de uso más difundido; son muy versátiles y fáciles de adaptar a la rutina del laboratorio. Las segundas no emiten pulsos en la entrega del solvente.

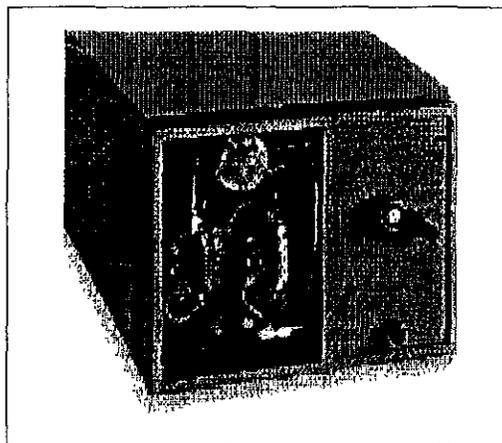


Figura 2.1. bomba reciprocante modelo 616 Waters

2.1.1.1 DESCRIPCIÓN

La bomba 616 Waters está construida de materiales resistentes tanto al ataque químico como al desgaste mecánico. Las tuberías son de acero inoxidable de 0.005 y 0.009 pulgadas de diámetro interno (ID) para perfeccionar el desempeño del sistema. Contiene los componentes requeridos para mezclar y distribuir solventes desde las botellas del reservorio al inyector.

Los pistones están contruidos de zafiro y las válvulas de retención (tanto las de entrada como las de salida de los cabezales de bombeo) por una pequeña esfera de rubí que apoya en un asiento de zafiro y una malla de acero inoxidable que retiene la esfera en sus movimientos.

La válvula de la bomba proporciona el gradiente de elución, que mezcla hasta cuatro solventes o buffers en cualquier combinación. El velocidad de flujo del flujo comienza desde los reservorios y pasa por la columna. La bomba 616 consta de una tablero delantero y un panel trasero (figura 2.2, 2.3 y tabla 2.1, 2.2)

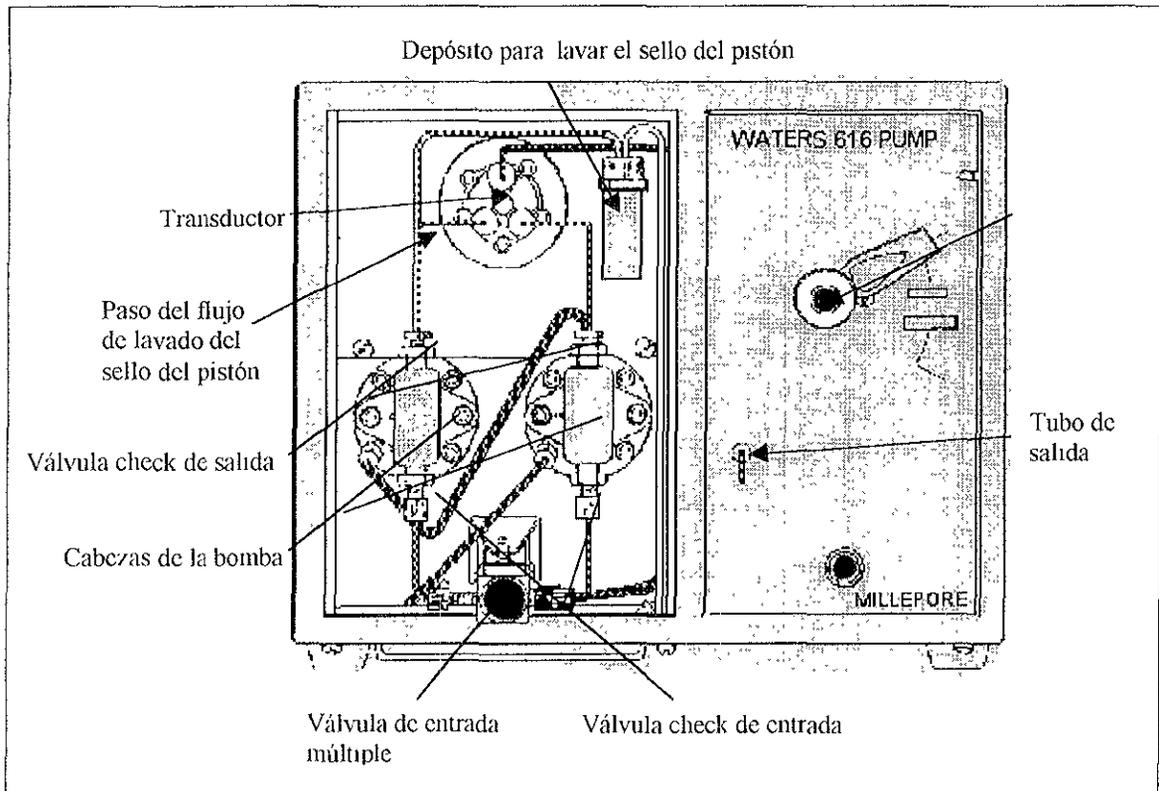


Figura 2.2. Esquema del tablero delantero de la bomba 616 Waters.

COMPONENTES	FUNCIÓN
Transductor	Los solventes fluyen desde las cabezas de la bomba e incluso en el transductor. Este mantiene la salida del solvente para que fluya a la válvula <i>check</i> de salida y al inyector.
Paso del flujo de lavado del sello del pistón	Provee un flujo continuo para purgar el reservorio desde el pistón.
Válvula <i>check</i> de salida	Mantiene la dirección del flujo abriendo en una sola dirección, el pistón se conecta al motor del equipo y en su movimiento hacia delante impulsa el solvente, abriendo de esta forma la válvula de salida y al mismo tiempo el solvente es impulsado hacia el sistema. Cuando el pistón retrocede por el mismo mecanismo inverso se cierra la válvula de salida y se abre la de entrada.
Cabezas de la bomba	Expulsa el solvente hacia dentro y hacia fuera de la bomba. Las cabezas son de acero inoxidable que bombean 50 μ l. Puede producir flujos de 10 μ l/min a 5 μ l/min.
Válvula de entrada múltiple	La entrada múltiple consta de tres posiciones: <i>INJ</i> , <i>RUN</i> y <i>DRAW</i> . El cambio de posición de <i>RUN</i> a <i>INJ</i> va en sentido de las manecillas del reloj, el cambio de <i>RUN</i> a <i>DRAW</i> va en sentido contrario a las manecillas del reloj. En la posición <i>INJ</i> la línea de entrada del solvente se bloquea y el flujo del solvente se dirige al puerto de las cabezas de la bomba. En la posición <i>DRAW</i> las cabezas de la bomba se bloquean y se conectan la línea de entrada del solvente y el puerto de la jeringa. En la posición del centro ó <i>RUN</i> el puerto de la jeringa se bloquea. El paso del flujo va de la línea de entrada del solvente a las cabezas de la bomba.
Válvula <i>check</i> de entrada	Permite que el solvente proveniente del reservorio llene la cámara del pistón y saque el solvente.
Tubo de Salida	Colecta el desecho de solvente proveniente de la bomba.
Válvula de Salida	La válvula de salida tiene dos posiciones: <i>VENT</i> y <i>SYSTEM</i> . La posición <i>VENT</i> de la válvula dirige el flujo hacia fuera del tubo de salida del tablero delantero de la bomba. La posición <i>VENT</i> se usa al purgar el sistema. En la posición <i>SYSTEM</i> el flujo del solvente se dirige a todo el sistema cromatográfico.
Depósito para lavar el sello del pistón	Contiene el solvente para lavar el sello del pistón. Una mezcla de solvente 10-20% metanol/ agua es recomendado para prevenir el crecimiento bacteriano. Esta solución se guarda en la botella que se encuentra en el frente de la bomba y debe cambiarse continuamente por lo menos una vez al mes.

Tabla 2.1. Funciones de las partes de la vista delantera, bomba 616 Waters

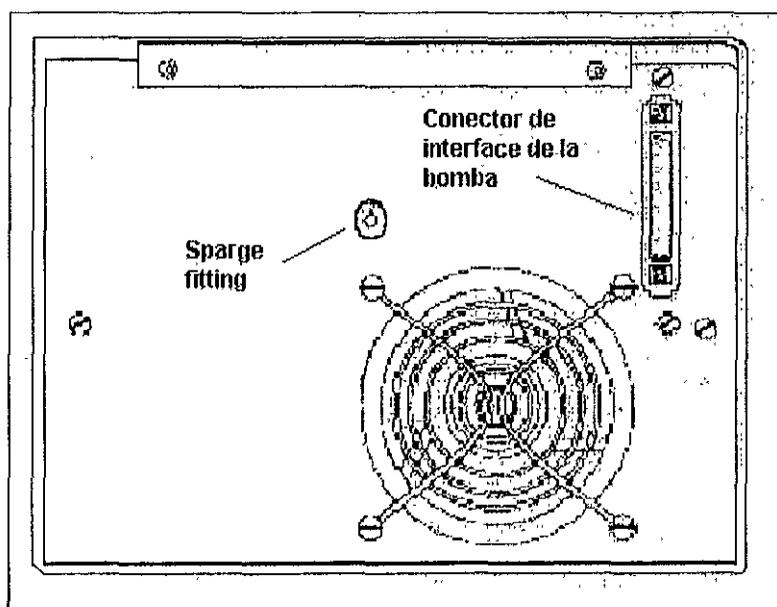


Figura 2.3. Panel trasero de la bomba 616 Waters

COMPONENTES	FUNCIÓN
Conector de interface de la bomba	El conector de interface de la bomba se conecta al tablero trasero del controlador 600S, para intercomunicarse
<i>Sparge Fitting</i>	La tubería del suministro del gas helio se conecta a la entrada del <i>Sparge Fitting</i> que se encuentre en el panel trasero de la bomba 616. Se debe regular el tanque de helio o fuente de suministro entre 50 y 90 psi (3.5 y 6.3 atm)

Tabla 2.2. Funciones de las partes del panel trasero, bomba 616 Waters.

La bomba 616 Waters es una bomba cuaternaria reciprocante de doble pistón, la cual proporciona un flujo constante y casi libre de pulsaciones. Las dos cámaras de la bomba son manejadas por el mismo motor a través de una leva excéntrica común; este manejo permite al pistón llenar su cámara mientras el otro entrega solvente, y cuando el primero entrega solvente, el segundo llena su cámara, de forma sincrónica. El volumen de la cámara del pistón es pequeño, éste volumen permite cambiar fácilmente la fase móvil, y disminuye el tiempo de demora para hacer efectivo un cambio de la composición de solvente durante un gradiente de elución.

La unión entre el cabezal de la bomba y el pistón se efectúa por medio de una junta de material inerte llamada sello, que facilita el desplazamiento del pistón y evita la pérdida de fase móvil. Las ventajas de esta bomba son el depósito de solvente ilimitado que permite a largo plazo el uso desatendido y el cambio rápido del solvente, el cual tiene la capacidad de limpiar la tubería de la bomba. Cada cabeza tiene dos válvulas de retención, la fiabilidad de la bomba depende de la limpieza de la fase móvil y la capacidad continua del sellado de las cuatro válvulas de retención en cada ciclo, con ciclos normalmente ocurriendo en varios tiempos por minuto.

La bomba requiere de cuatro reservorios (recipientes que contienen la fase móvil). Pueden ubicarse algunos centímetros sobre el nivel de la bomba para que la fuerza de gravedad dirija el solvente hacia ésta, manteniendo llenas las conexiones. Puede emplearse como reservorio cualquier frasco de laboratorio de buena calidad, con una tapa adecuada para prevenir el ingreso de partículas ambientales al sistema.

Cada reservorio tiene una tapa con tres orificios, uno para la entrada del gas inerte de desgasificación "sparge", otro para la salida del solvente y un tubo de ventilación, el cual permite tener una presión positiva del gas sobre el solvente venteadando el exceso.

Al extremo del tubo de salida de solvente se conecta un filtro difusor de acero (buzo) con 2 o 10 μm de porosidad que impide el ingreso de partículas a la bomba. El filtro difusor proporciona una ligera presión positiva al burbujear gas, ayudando a inhibir el flujo de aire en el reservorio mientras se retira el solvente.

La entrada del *sparge* de la bomba debe estar conectada a un suministro de un tanque de helio, a una presión entre 50 y 90 psi (3.5 y 6.3 atm). Se debe conectar un regulador de alta presión a la entrada del *sparge* del tanque de helio. El burbujeo de helio reduce el total de gas disuelto en los reservorios y mantiene esa condición durante toda la operación. La calidad de la pureza del tanque de helio es importante, ya que previene la contaminación de los solventes. Las especificaciones técnicas requeridas para la calidad del gas helio son:

- Nitrógeno menos de 5.0 Mppm (molar partes por millón)
- Oxígeno menos de 5.0 Mppm
- Agua total menos de 1.0 Mppm
- Hidrocarburo total menos de 0.5 Mppm

Se colocan cuatro tuberías de teflón para las líneas del solvente A, B, C, D, que se dirigen a la bomba. Cuatro tuberías de teflón para las líneas del *sparge* (burbujeo) A, B, C, D, que se dirigen a un tanque de helio. El burbujeo del gas helio se introduce en los solventes por medio de un filtro difusor que dispersa el flujo de helio en pequeñas burbujas de gas.

La fase móvil empleada debe circular por tuberías que conectan el reservorio de solvente con la bomba, la bomba con el inyector, éste a la columna y la columna al detector, para finalizar con una estación de datos y con un colector de fracciones.

2.1.1.2 ESPECIFICACIONES

ESPECIFICACIONES GENERALES	
Cabeza de la bomba 50 ml de volumen	
Mezcla cuatro solventes (cuaternaria).	
Produce presiones estables hasta 5000 psi (351.5 Kg/cm ²)	
Mantiene el flujo libre de pulsaciones	
Genera intervalos de velocidad de flujo de 0.01 a 5.0 ml/min.	
Control y reproducibilidad del flujo del solvente	
Los componentes de la bomba son resistentes a la corrosión	
Automáticamente desgasifica los solventes con un burbujeo de helio	
El conducto de la válvula facilita el cargado y purgado de las líneas así como el cambio de solventes	
Se puede controlar la bomba desde el software <i>Millemum</i> 2.10 o desde el controlador Waters 600S.	
Programación del solvente en modo isocrático o en gradiente de elución.	
CONDICIONES	ESPECIFICACIONES
Número de solventes	4
Métodos de operación	Isocrático, gradiente, programación de flujo
Rango programable del flujo	0.00-10.0 ml/min en incrementos de 0.010
Rango común de operación del flujo	0.00-5.00 ml/min en incrementos de 0.010
Volumen del sistema con mezclas	< 700 µl
sin mezclas	> 400 µl
Rango de composición	0 a 100%, en incrementos de 1% para los cuatro depósitos: A, B, C y D La composición total deben sumar 100%
Desgasificación de solventes	Burbujeo de helio, selección y rango programable del solvente, a una velocidad de flujo de 0-100 ml/min, en incrementos de 1 ml./min. La presión de entrada del gas oscila entre 50 a 150 psi (3.5 a 10.5 kg/cm ²).
Presión de operación	0-5000 psi (0-340 bar).
Estabilidad de la presión	< +/- 0.05% escala completa para una bomba que revoluciona a 1ml/min.
Sello de lavado del pistón	Aproximadamente 80 ml/min. intermitente y automático
Exactitud	+/- 0.5%
Precisión	+/- 0.15%
Compensación, compresibilidad	Automático
Rango control del flujo <i>SILK</i>	0.10-2.00 ml/min
Precisión del flujo	+/- 0.1% RDS, basado en el tiempo de retención
Mezclas	2x150 ml, estático, estándar
Temperatura	Rango de operación: 4 a 38 °C (39.3 a 100.4 °F)
Humedad	Rango de operación 20 a 90% de humedad relativa
Material de superficie	Acero inoxidable
Dimensiones de la bomba	Alto 9.625 pulgadas (24.4 cm.) Largo 20.5 pulgadas (52.1 cm.) Ancho 11.125 pulgadas (28.3 cm.) Peso: 60.2 lb (27.3 kg.)

CÓNDICIONES	ESPECIFICACIONES DE LA INTERFACE
Control de la bomba	Velocidad de flujo 0 a 10ml/min
Punto establecido del límite de alta presión	51 a 6000 psi
Punto establecido del límite de baja presión	0 a 5950 psi
Resolución establecida del flujo	0.01 ml/min
Fuente de poder del transductor de presión	15 VDC0
Salida del transductor de presión	0.5 -10.5 VDC, 0.5 VDC @ 0.0 psi
ESPECIFICACIONES DE LA VALVULA	
Control general	Proporciona 1 a 4 solventes para igualar el 100%
Límites proporción	Cualquier combinación de 1 a 4 solventes que sumen el 100%
Resolución	1%
ESPECIFICACIONES DE LA VALVULA DE BURBUJEO "SPARGE"	
Control general	Seleccionar la velocidad OFF/ON
Velocidad de burbujeo "Sparge"	0 a 100 ml/min
Resolución	1 ml/min
Número de líneas	4

2.1.2 CONTROLADOR 600S

El controlador Waters 600S es un instrumento fundamental para controlar las funciones de la bomba, el control de los solventes, la desgasificación de los mismos, etc. Provee de puertos de comunicación y terminales de conexiones para la operación y control de aparatos externos (figura 2.4)

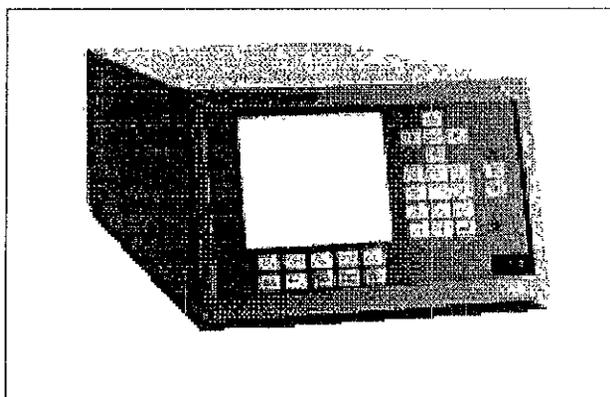


Figura 2.4. controlador de bombas 600S Waters

2.2.1.1 DESCRIPCIÓN

El controlador 600S Waters tiene un microprocesador integrado, el cual es fundamental para impulsar y controlar una Unidad de Manejo de Fluido (FHU) vía cable a una interface. El FHU es una bomba de alta presión que puede mezclar a 4 solventes a una presión baja. Actualmente el controlador, puede tener en su interface 2 modelos de Unidad de Manejo de Fluido. Los modelos que puede controlar son

- ⇒ bomba 616 con una cabeza de 50 ml
- ⇒ bomba 626 con una cabeza de 50 ml

El controlador 600S, controla automáticamente el gradiente de los solventes, el modo isocrático, la velocidad de flujo, el burbujeo de gas, el calentador de la columna, datos externos, etc.

Consta de un panel delantero (figura 2.5) y uno trasero (figura 2.7), el primero está formado por una pantalla de cristal líquido y un teclado digital, por medio de éstos se puede controlar, programar, configurar, almacenar tablas, etc. El segundo consta de puertos de comunicación y terminales de conexión para operar aparatos externos tales como; detector, bomba, automuestreador y un sistemas de datos

PANEL DELANTERO

El panel delantero consta de:

- ⇒ Un interruptor *On/Off*
- ⇒ Una pantalla de cristal líquido
- ⇒ Un teclado digital

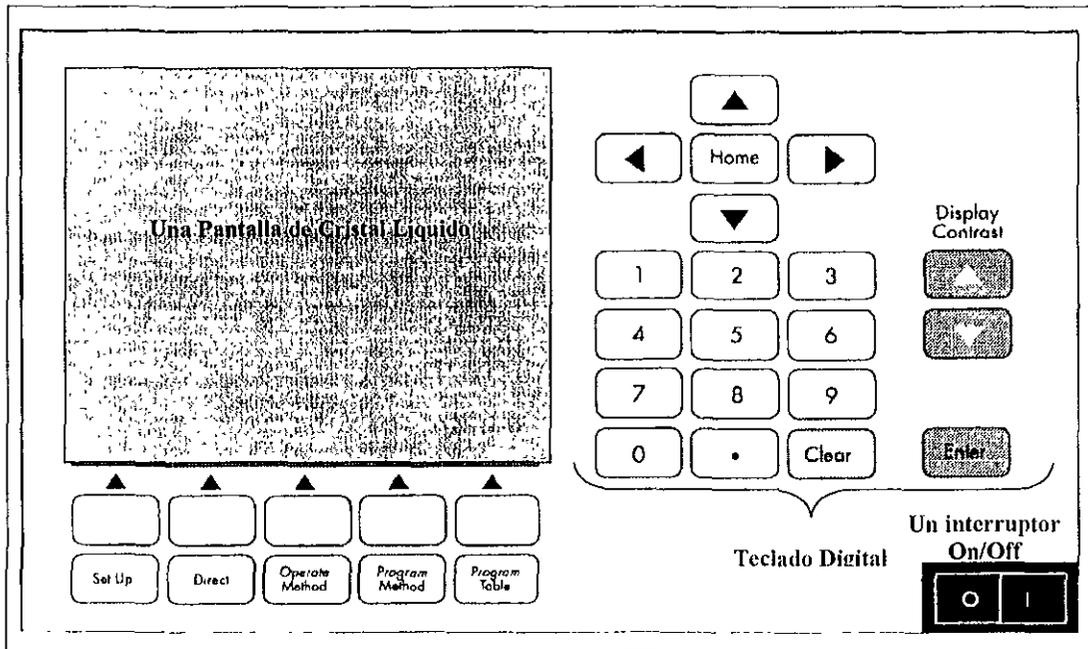


Figura 2.5 Panel Delantero del controlador Waters 600S

Teclado Digital

El teclado digital consta de las siguientes teclas (figura 2.5 y tabla 2.3):

- ⇒ inicio (*Home*)
- ⇒ movimiento del cursor
- ⇒ números
- ⇒ contraste
- ⇒ entrada (*Enter*)
- ⇒ borrado (*Clear*)

Además el teclado tiene dos secciones importantes (tabla 2.4):

- Teclas de función
- Teclas en pantalla

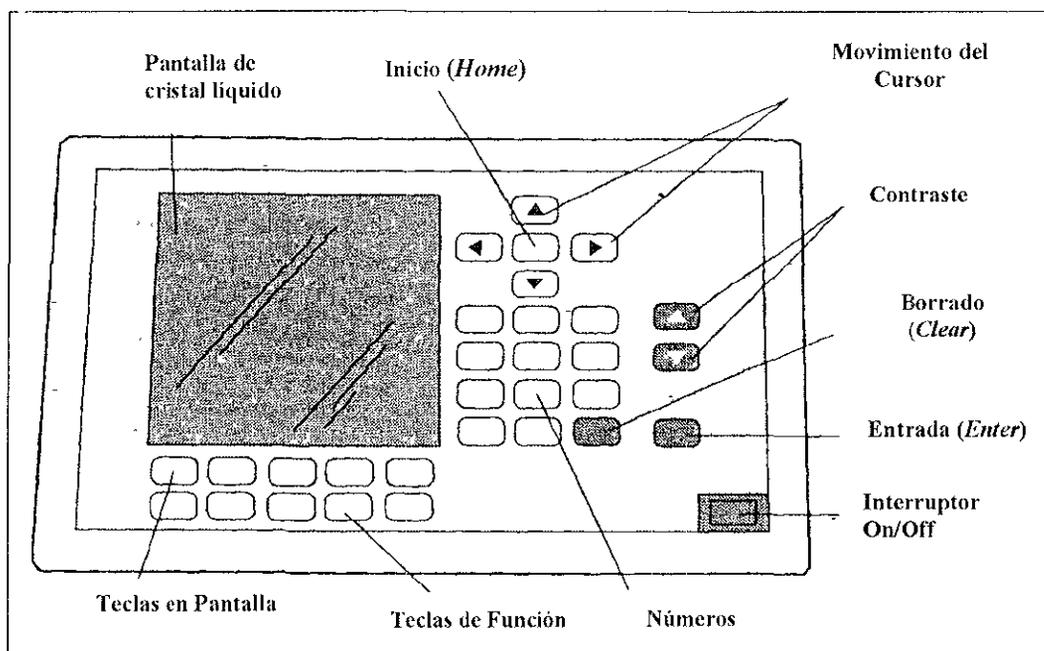


Figura 2.6. Teclado digital del controlador 600S Waters

TECLAS	FUNCIÓN
Inicio (<i>Home</i>)	Mueve el cursor al inicio ó a la primera entrada ubicada sobre la pantalla
Movimiento del cursor	Estas teclas mueven el cursor hacia arriba, abajo, izquierda y derecha
Números	Entran datos numéricos sobre la pantalla. Cuando se presionan estas teclas muestran los números 0 a 9 y un punto decimal.
Contraste	Ajustan el contraste (ligereza y obscuridad) de la pantalla para mejorar la legibilidad en diferentes situaciones de iluminación
Entrada (<i>Enter</i>)	Esta tecla borra los parámetros escritos en la pantalla.
Borrado (<i>Clear</i>)	Esta tecla borra los parámetros escritos en la pantalla.
Teclas de función	La fila de las teclas no marcadas están localizadas directamente más adelante de la pantalla. Las teclas de la pantalla varían de acuerdo a las diferentes pantallas usadas durante la operación
Teclas en pantalla	La fila de las teclas marcadas están localizadas adelante de la pantalla, cuyas modalidades dan el acceso a la operación del sistema

Tabla 2.3. Función del Teclado Digital.

TECLAS DE FUNCIÓN	FUNCIÓN
<i>Setup</i>	Accesa a la pantalla <i>Pump Setup</i> , cuya función es instalar el hardware de la bomba
<i>Direct</i>	Accesa a la pantalla <i>Isocratic</i> , tiene como función programar las condiciones para asistir la operación de equipo
<i>Operate Method</i>	Accesa a la pantalla <i>Operate Gradient</i> , su función es configurar las corridas en gradiente de solventes
<i>Program Method</i>	Accesa a la pantalla <i>Program Gradient</i> , su función es instalar, programar y almacenar las tablas de gradiente para la operación
<i>Program Table</i>	Accesa a la pantalla <i>Program Event</i> , tiene como función instalar, programar y almacenar tablas de eventos

Tabla 2.4. Teclas de Función.

PANEL TRASERO

El panel trasero del controlador 600S provee conexiones para controlar aparatos externos como, bombas, inyectoros, detectores, etc (figura 2 7)

El panel trasero del controlador 600S contiene las siguientes partes.

- ↪ Fusible de energía de la bomba
- ↪ Conexión de energía AC
- ↪ Fusible de energía auxiliar + 12V, 1.5 Amp
- ↪ Conector de Interface de la bomba
- ↪ Conector IEEE-488
- ↪ Conector RS-232
- ↪ Tira terminal

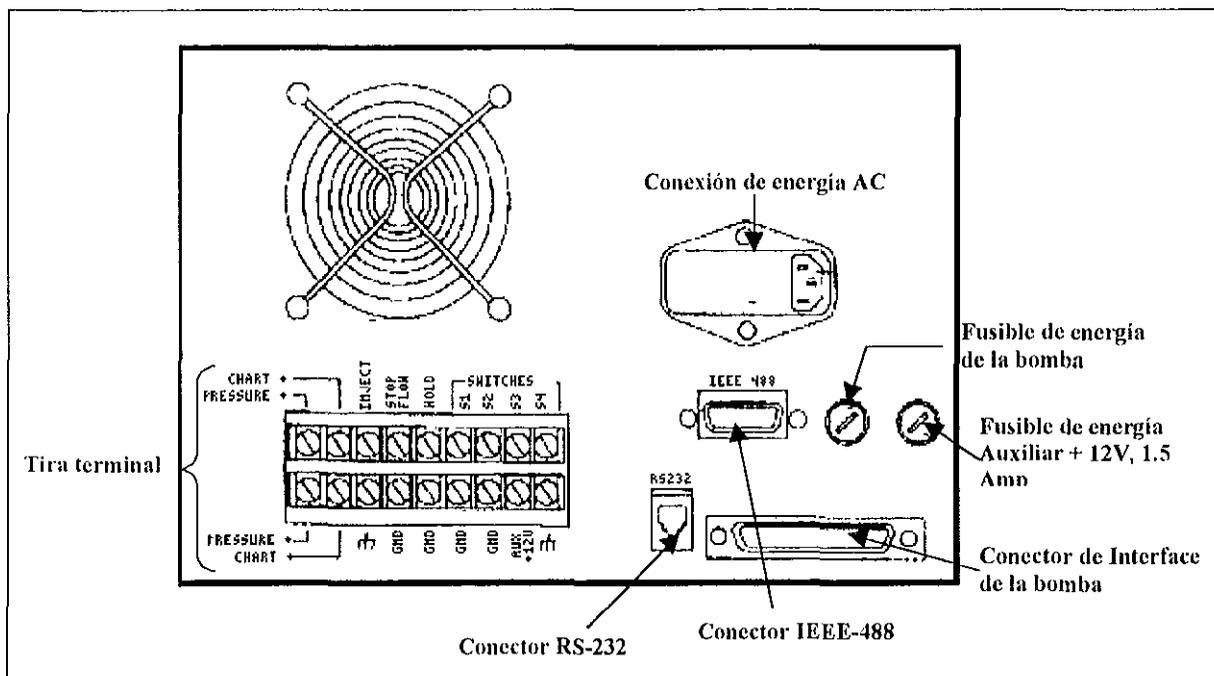


Figura 2.7. Panel Trasero del controlador 600S Waters

Algunas de las funciones del panel trasero son las siguientes.

- ☐ Conexión de energía AC: Proporciona las líneas de voltaje 100/120/230/240 VAC (+/- 10%) al Sistema Cromatográfico 616
- ☐ Conector de interface de la bomba: Permite comunicar entre sí al controlador 600S y a la bomba 616. El conector de interface de la bomba también le proporciona energía
- ☐ Conector IEEE-488: Permite al controlador 600S comunicarse con dispositivos externos. El uso de la interface IEEE-488 controla la bomba, el detector y el automuestrador desde un sistema de datos (*Software Millennium*).

□ Conector RS-232 Permite al controlador 600S comunicarse con un módulo de datos Waters. La interface RS-232 transmite órdenes y reportes de información al sistema 616 y al módulo de datos 746

□ Tira terminal. Consta de las siguientes terminales (figura 2.8)

Pressure / Chart: Funcionan como terminales de salida. Produce un voltaje DC cuya magnitud es proporcional al parámetro físico a ser controlado. El rango de voltaje de las salidas analógicas es de 0 a 10 mV en la escala completa. Produce los planos de la presión del sistema y el porcentaje de la composición del solvente, respectivamente, en cualquier registrador o integrador estándar.

La terminal *PRESSURE*: Transmite una representación del voltaje de la corriente al sistema 616 a una presión baja. Éste es un trazo de la presión directa del transductor de la bomba (0 a 4000 psi en la escala completa), donde 10 mV = 4000 psi.

Terminal *CHART*: Transmite un voltaje que es proporcional a la función del monitor *CHART* específicamente.

- ♦ En la composición del reservorio de los solventes (A, B, C, ó D)
- ♦ En la proporción de la velocidad de flujo
- ♦ En la temperatura del calentador de la columna (0 a 99°C)

Hold: La terminal *HOLD* es compatible con entradas TTL o entradas de cierres de contacto. Genera una señal que previene de un non-IEEE-488 del automuestreador en caso de un fallo de energía, de un cierre de presión, o al abortar la inyección.

El interruptor *Hold*, transmite una señal desde el controlador 600S a un aparato externo para detener la operación, cuando el controlador recibe una.

- ♦ Señal *Stop Flow*
- ♦ Señal de la tecla de la pantalla *Hold*
- ♦ Límite de error de la presión
- ♦ Error en la velocidad de flujo de la bomba

Switches S₁ a S₄: Controla conectores TTL compatibles (S₁ a S₄) sobre el panel trasero del controlador.

- ♦ Controla la columna, interruptores, válvulas, colectores de fracción del solvente ó aparatos externos.
- ♦ Opera manual o automáticamente mediante la pantalla del controlador 600S
- ♦ Funciona conjuntamente con una terminal incorporada a la fuente de alimentación auxiliar (aux +12V) para aparatos que requieren una fuente de poder externa.

Inject: Acepta la señal desde un inyector externo (automuestreador o un inyector manual) para iniciar una corrida cromatográfica. También la terminal *INJECT* proporciona una señal de salida para el Módulo de Datos Waters 746.

Se pueden conectar colectores de fracción de solventes, integradores u otros aparatos que requieren una señal de salida a la terminal *INJECT* para sincronizar la operación con el controlador 600S.

Aux+12V: Proporciona 1.2 A a una corriente de +12 VDC. La señal Aux +12 V se usa junto con las salidas switches S₁ a S₄ para impulsar las válvulas solenoides y otros accesorios de automatización.

Stop Flow: La terminal *STOP FLOW* acepta señales de varias salidas, incluso las señales TTL, salida del colector, o cierres de contacto.

El interruptor *Stop Flow*, permite detener el flujo de la bomba con una señal desde un aparato externo (controlador 600S).

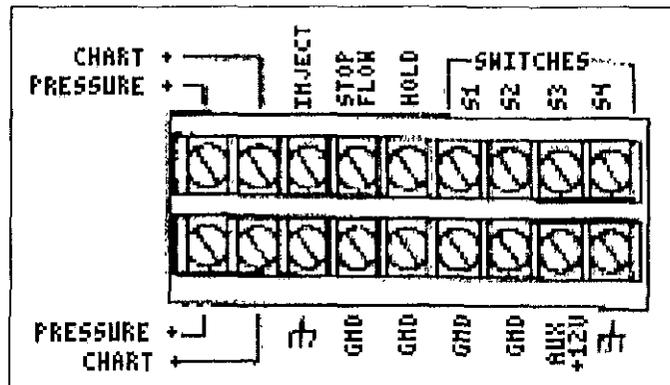


Figura 2.8 Tira terminal del Panel trasero del controlador.

El controlador 600S Waters se puede configurar como un controlador *Gradient* ó como un controlador *PowerLine*

Como un controlador *Gradient*, este puede operar como un instrumento independiente o como un instrumento dependiente controlados vía IEEE488. Como un instrumento independiente, el usuario controla el sistema de datos por medio de la interface del usuario, la cual consta de una pantalla de cristal líquido y un teclado digital

Como un instrumento dependiente, el usuario controla el sistema de datos por medio del *Software Millennium 2010* ó por una estación de datos 845/860 Waters. El controlador *Gradient* y el controlador *PowerLine* permiten programar en modo isocrático y en *Gradiente* de solventes

Cuando el controlador *Gradient* opera como un instrumento independiente, la interface del usuario utiliza la organización y el control de la bomba junto con otros instrumentos conectados al IEEE488 bus. El software actual permite controlar los siguientes instrumentos vía IEEE488 bus:

- Detector 410
- Detector 431
- Detector 484
- Detector 486
- Detector 490
- Automuestreador 712
- Automuestreador 715
- Automuestreador 717
- Disolutor 712

Se recomienda el uso del controlador *PowerLine* cuando se quiera controlar los aparatos externos (tales como, detectores, automuestreadores, e integradores) todos directamente desde la pantalla del controlador 600S, de la pantalla del detector y del automuestreador

Si se desea controlar los aparatos (detectores, automuestreadores e integradores) desde un sistema de datos (*Software Millennium 2010* ó 2030) se recomienda el uso del controlador *Gradient*

En este manual se maneja únicamente la configuración del controlador 600S en modo *Gradient*, usando así el sistema de datos *Millennium 2010* Siendo ésta configuración una de las más modernas y utilizadas por su gran versatilidad

2.1.2.2 ESPECIFICACIONES

CONDICIONES	ESPECIFICACIONES
Interface de usuario	Pantalla de cristal líquido integrado un teclado digital
Pantalla de cristal líquido	5 pulgadas (12.7 cm) de pantalla diagonal 16 líneas, 40 caracteres Tamaño 320 x 200 pixeles de resolución Color Texto azul sobre fondo blanco
Teclado digital	Acceso directo a la pantalla Número de teclas 30 Alarma audible 60 dB por 0.5s de duración
Tablas de programa	Velocidad de flujo, <i>Gradiente</i> de elución eventos calculados 15 tablas tiempo-base 15 tablas de capacidad
Tablas de método	Capacidad de tablas de multi-método, tiempo-base, incluyendo el enlace con tablas de programa
Sistema control	El software estándar <i>PowerLine</i> , proporciona sólo el mando del teclado del automuestreador Waters, de los detectores UV/VIS y de Conductibilidad, la documentación completa del método con el módulo de datos Waters, el control de la temperatura de la columna (control del calentador optativo)
Programa de almacenamiento	Memoria EEPROM, el almacenamiento indefinido puede perder o prolongar el cierre siguiente
Perfiles de <i>gradiente</i>	11 curvas de <i>Gradiente</i> , lineal (1), paso(2), cóncava (4), convexa (4) Incluye el método de Auto-Mezcla Waters para mezclar automáticamente de memoria, regulando hasta 80 segmentos de la curva que pueden ser marcados
Control de mezclado del solvente	El algoritmo de la Fase Aleatoria Sincronizada (FAS), regula automáticamente la válvula de retención, ajustando la composición del porcentaje del solvente y la velocidad de flujo
Eventos externos	Son cuatro a la vez o cierres del interruptor controlables por el operador, Dos salidas analógicas para la terminal <i>Chart Out</i> , y dos salidas analógicas para la terminal <i>Pressure</i>
Terminal <i>inject</i>	Recibe la señal desde el inyector externo para iniciar el método, también proporciona la señal al módulo de datos Waters.
Rango de operación de temperatura	4° -38°C (39° - 100°F)
Rango de operación de la humedad	20 -90% de Humedad relativa

CONDICIONES	ESPECIFICACIONES
Dimensiones del controlador	Altura: 7.19 pulgadas (18.26cm) Profundidad: 21.75 pulgadas (55.25cm) Ancho: 11.31 pulgadas (28.75cm) Peso: 33.1 libras (15Kg)
ESPECIFICACIONES DE LA INTERFAZ	
Frecuencia de entrada	47 Hz Mínima 63 Hz Máxima
Rango de voltaje de entrada	87 a 110 VAC usar 100 VAC para ajustar 110 a 132 VAC usar 120 VAC para ajustar 187 a 242 VAC usar 230 VAC para ajustar 242 a 264 VAC usar 240 VAC para ajustar
Requisitos del fusible	100/120 VAC ajustar para UL & CSA: 2.0 Amp 100/120 VAC ajustar para IEC: 1.6 Amp 230/240 VAC ajustar para UL & CSA: 1.0 Amp 230/240 VAC ajustar para IEC: 0.8 Amp
Tamaño del fusible	5 x 20 mm
Rango de voltaje del fusible	5 x 20 mm
Conector	Estilo IEC 320
ESPECIFICACIONES DE LA INTERFAZ IEEE 488	
Tipo de interfaz	Paralelo
Conector	24 pin estándar IEEE 488
Niveles lógicos	Voltaje de salida de alto nivel: 2.5V min Voltaje de salida de bajo nivel: 0.5V max Voltaje de entrada de alto nivel: 2.0V min Voltaje de entrada de bajo nivel: 0.8V max
Dirección	Ajusta la interfaz de usuario a través de la pantalla <i>PUMP CONFIG.</i>
Requerimiento de energía	Máxima 250 VA
Frecuencia: 47 to 63 Hz	Frecuencia: 47 to 63 Hz
ESPECIFICACIONES DE LA INTERFAZ RS-232	
Tipo de interfaz	Se encuentra la serie, EIA RS-232C y CCITT V.28 especificadas
Conector	Tipo Amp (amperio) 555225-1 Desplazamiento del enchufe modular
Niveles lógicos	Rango de voltaje de salida: +5.0V min, +9V típica Rango de voltaje de entrada: +30 V max.
Formato de datos	Proporción del baudio: 1200, 9600
Bits/Caracteres	7 o 8 <i>Stop</i>
Bits	1 o 2
ESPECIFICACIONES DE LA SALIDA CHART	
Tipo de conector	Bloque terminal
Salida <i>Chart "Chart Out"</i>	Rango: 0 - 10 mV
Funciones <i>"Chart Out"</i>	Composición Flujo Temperatura Resolución: 10 bit D/A Tiempo Constante: 117 msec
Salida <i>Pressure "Pressure Out"</i>	Rango: 0 - 10 mV, 0 - 6000 psi
Funciones <i>"Pressure Out"</i>	Resolución: 6 psi/LSB Tiempo constante: 50 msec Exactitud: +3%

CONDICIONES		SALIDAS SWITCH (S ₁ a S ₃)	
Tipo de conector		Bloque terminal	
Como salidas TTL (carga entre SWITCH y GND)		Voltaje bajo 0.4 max V @ 1.6 mA de fondo Voltaje alto 3.75 min V @ 0.1 mA de fuente	
Como interruptor de energía (montar entre AUX 12V y SWITCH)		Voltaje bajo 1.0 V max @ 1.0 A de fondo Voltaje alto 11.9 V min @ 1.0 A de fuente Fuerza inductiva 13 V	
Condición de los switch (S ₁ a S ₃)		Se controlan desde la página ISOCRATIC o de la tabla event. El switch S ₄ además de comportarse como un S ₁ a S ₃ , se apagará de ON a OFF siempre que la condición parar el flujo "stop flow" ocurra. Todos los switch de salida son controladas por el software	
ESPECIFICACIONES DE LA ENTRADA INJECT			
Tipo de conector		Bloque terminal	
Descripción		TTL o cierre de contacto para conectar a tierra, borde sensible decreciente	
Voltaje de entrada		+30 max de V	
Periodo Debounce		10 msec +20%	
Impedancia de entrada		4.7 K	
Salida de Bloqueo "Locked Out"		La entrada es inválida desde que se detectadas las entradas durante tres segundos después de detectar la inyección.	
ENTRADA STOP FLOW			
Tipo de conector		Bloque terminal	
Descripción		TTL o cierre de contacto para conectar a tierra, borde sensible decreciente	
Voltaje de entrada		+30 max de V	
Periodo Debounce		10 msec +20%	
SALIDA HOLD			
Tipo de conector		Bloque terminal	
Descripción		Salida TTL que se activa cuando una condición anormal ocurre (presión alta/baja, detener el flujo). La salida es controlada por el software Salida del voltaje bajo 0.6 Vmax @ 0.4 mA Salida del voltaje alto 3.75 V min @ 0.1 mA	

2.2 DETECTOR POR ARREGLO DE DIODOS 996 WATERS

El detector permite "ver" y ubicar el tiempo y espacio de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica (figura 2.9)

Los detectores se pueden clasificar en generales y selectivos

□ Los detectores generales miden el cambio de alguna propiedad física de la fase móvil que contiene al analito en comparación con la misma fase móvil pura

□ Los detectores selectivos son aquellos sensibles a alguna propiedad del soluto, por ejemplo el detector UV, que producirá una señal proporcional a la absorbancia del soluto a una longitud de onda dada

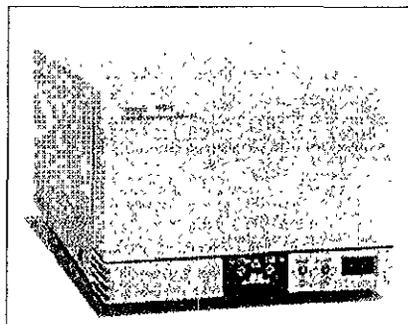


Figura 2.9. Detector por Arreglo de Diodos 996 Waters

2.2.1 DESCRIPCIÓN

El Detector por Arreglo de Diodos (DAD) 996 Waters ó también conocido como de Fotodiodos, es un detector UV/Vis de longitud de onda variable. Este emplea una lámpara de Deuterio de emisión continua, la cual exhibe una óptica que consiste de un arreglo de 512 diodos con un rango de longitud de onda de 190-800 nanómetros y el diseño de un estrecho haz invertido de la celda de flujo, mantiene la mejor resolución óptica 1.2 nm y la máxima sensibilidad cromatográfica.

Con el diseño de la óptica y rutinas de control avanzado, como el programa de optimización de la energía de la lámpara, se logran obtener excelentes resultados en el análisis de muestras. Posee buena sensibilidad y rango lineal, y permite detectar analitos en el orden de los nanogramos. Tiene una red de difracción que permite seleccionar libremente la longitud de onda de trabajo, de esta manera se puede escoger la longitud de onda de máxima absorción del analito.

El detector por arreglo de diodos, funciona mediante un diseño de doble haz de alta energía acoplado a una celda de flujo de baja dispersión, emplea un sistema óptico invertido, la celda se ilumina con luz "blanca", es decir, no monocromada y la luz emergente de la celda llega a la red de difracción y allí es dispersada hacia el elemento fotosensible. Se emplea un conjunto de fotocéldas o fotodiodos montados en un chip de silicio. De esta forma, se consigue medir no solo la luz transmitida a una longitud de onda, sino todo el espectro de absorción del eluido en tiempo real (figura 2.10)

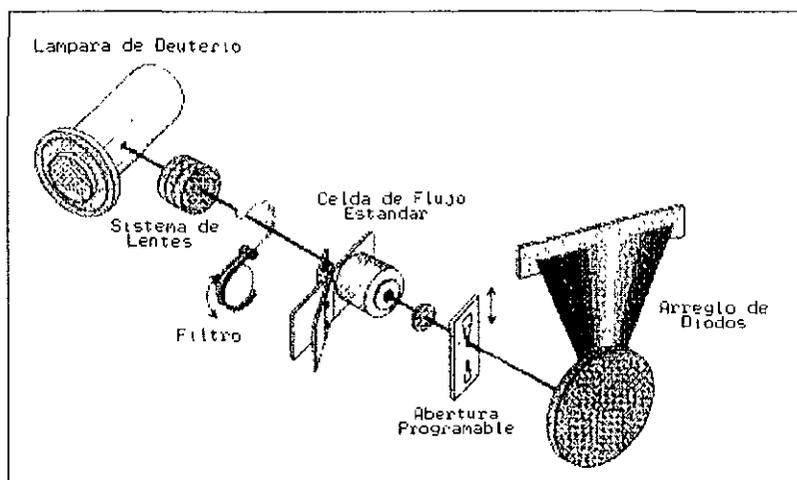


Figura 2.10. Esquema del funcionamiento de un Detector por Arreglo de Diodos

El sistema del detector está configurado a una computadora en una plataforma en ambiente Windows. DAD 996 proporciona un avance en la adquisición de datos y en el análisis como una opción integrada a la cromatografía de líquidos en un sistema Millennium. El detector DAD/Millennium consiste de una interface de comunicación IEEE-488, y una computadora.

El detector utiliza en el tratamiento de la información generada el software Millennium 2010, el cual integra la información espectral y cromatográfica en la misma rutina de trabajo de forma que le permite ver simultáneamente todos los resultados obtenidos en el análisis de una muestra: cantidad de cada compuesto, homogeneidad de cada pico cromatográfico y espectros análogos encontrados en las librerías espectrales del programa.

El detector consta de un panel delantero (figura 2 11) y un tablero trasero (figura 2 12)

PANEL DELANTERO

El panel delantero esta conformado por un indicador de la lámpara, un indicador *status*, un interruptor *On/Off*, una entrada para conectar la columna y una línea para la salida del solvente que se dirige a un colector de fracciones (figura 2 11)

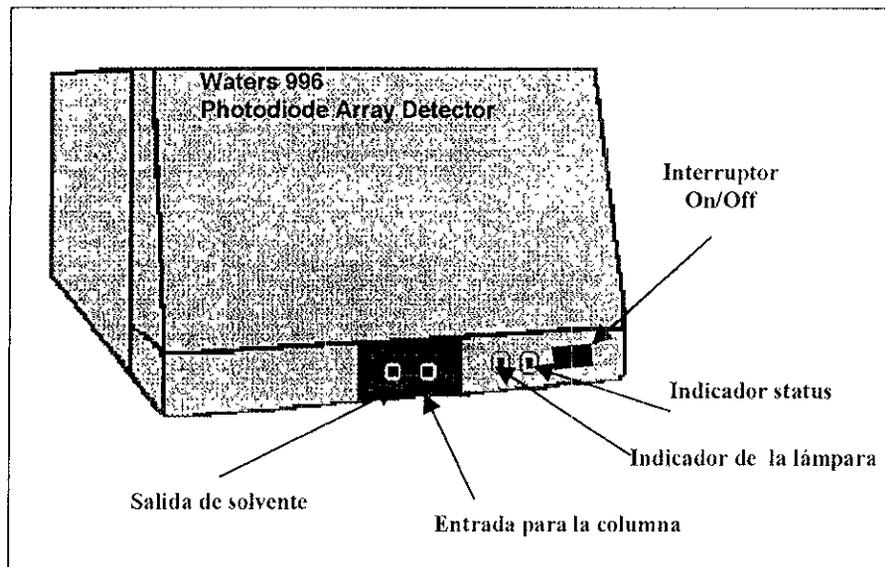


Figura 2.11. Panel delantero del Detector PDA 996 Waters

TABLERO TRASERO

El tablero trasero del detector 996 consta de un conector IEEE-488, de dos tiras terminales, una puede manejar dos terminales *Analog Out* (salidas analógicas) para conectar integradores, registradores gráficos, y otros componentes del sistema cromatográfico. La otra tira cuenta con cuatro conexiones *Event*, dos input (iniciar inyección) y dos output (tablas de evento programable) figura 2 12

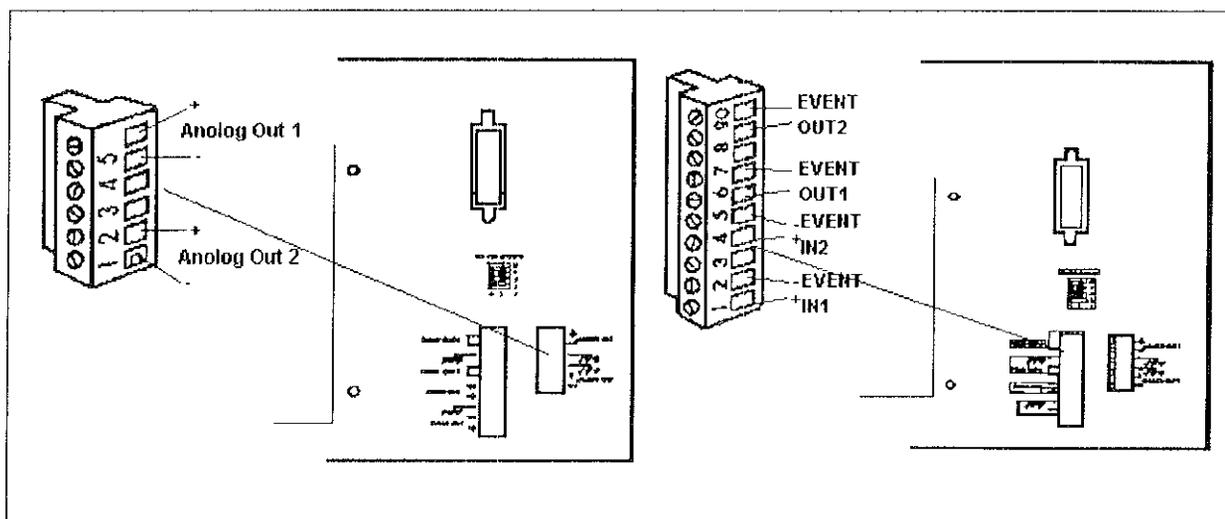


Figura 2.12. Tiras terminales del tablero trasero del Detector PDA 996. Derecha tira terminal *Event*, izquierda tira terminal *Analog*

Especificaciones de las terminales *Event Input*:

- ♦ TTL o cierre del interruptor
- ♦ Protegido a + 30V
- ♦ Disparador bajo <1.8 V
- ♦ Disparador bajo > 3.0 V
- ♦ Máxima corriente · 5 milliamps
- ♦ Anchura del pulso mínima · 30 milisegundos

Especificaciones de las terminales *Event Output*:

- ♦ Cierre de Contacto
- ♦ Energía máxima 10 watts
- ♦ Máxima corriente · 0.5 amps a 20 V
- ♦ Voltaje máximo · 24 V RMS

La utilización del detector 996, permite obtener en cada análisis la información cuantitativa cromatográfica y el espectro de absorbancia de cada punto del cromatograma. Los espectros de absorbancia dan información cualitativa sobre los componentes analizados:

- Permite verificar la homogeneidad del proceso cromatográfico y detectar coeluciones
- Permite identificar los componentes por comparación del espectro en el máximo de cada pico con una biblioteca de espectros
- El detector de arreglo de diodos 996 ofrece la máxima sensibilidad con la mejor resolución óptica
- El detector permite obtener simultáneamente cromatogramas con sensibilidad suficiente y espectros de calidad

2.2.1 ESPECIFICACIONES

CONDICIONES	ESPECIFICACIONES
Rango de longitud de onda	Longitud de la trayectoria
Fuente de luz	Lámpara de deuterio (2000 hr. vida)
Resolución espectral	1.2 nm por fotodiodo (512 diodos)
Exactitud de la longitud de onda	± 1 nm
Rango de linealidad	5% más de -0.1 a 2.0 AU
Ruido de la línea-base	± 1.5 X 10 ⁻⁵ cresta-a-cresta de AU, seque a 254 nm
Tendencia	1 X 10 ⁻³ AU/hora a 254 nm
Configuración del rango de sensibilidad	0.001-2.0 AUF'S (bajo el mando del software)
Configuración del rango del filtro	0 a 3 segundos (bajo el mando del software)
Diseño de la celda de flujo	TaperBeam® invertido
Longitud de la trayectoria	Corrección de Índice de Refracción
Volumen de la celda	10 mm (celda analítica normal)
Límite de presión	8 µL (celda analítica normal)
	1000 psi (celda analítica normal)

CONDICIONES	ESPECIFICACIONES
Celdas de flujo optativas	Semi-preparativa, merte (titanio), presión alta para CLMS, Microbore
Salidas	Dos salidas <i>Analog Out</i> Dos salidas <i>Event</i>
Entradas	Dos entradas <i>Inject Start</i>
Dmensiones	Ancho 11.5 pulgadas (29 cm) Altura 5 90 pulgadas (15 cm) Profundidad 22 pulgadas (56 cm)
Peso	34 libras (15.4 kg)
Temperatura de operación	+4 a 40°C (39 a 104°F) funcionamiento
Humedad de operación	20 a 80%, no-condensador
Requerimientos de energía	115 VAC (85-132 V), 50/60 Hz 230 VAC (190-264 V), 50/60 Hz
Frecuencia de la línea	50 Hz (47 a 53 Hz) 60 Hz (57 a 63 Hz)
Consumo de energía	100 VA (nominal)

2.3 AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS

El automuestreador es también conocido como inyector, el cual es un dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el velocidad de flujo de solvente a través del sistema. El inyector debe de ser fácil de operar, ser inerte al ataque químico y capaz de soportar altas presiones, debe de ser preciso en cuanto a la cantidad de muestra introducida en el sistema.

Los inyectores CLAR son válvulas que orientan el flujo de la fase móvil hacia la columna, pasando o no según su posición, a través de un *loop* en el cual se introduce la solución al inyectar. Las válvulas pueden accionarse manual o automáticamente (figura 2.13)

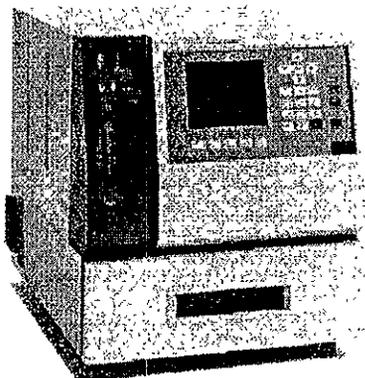


Figura 2.13. automuestreador 717 Waters

3.2.1 DESCRIPCIÓN

El automuestreador 717 Water es un microprocesador electrónico que controla de manera automática el módulo de inyección de muestras, capaz de tener un funcionamiento continuo de forma desatendida, es decir que no necesita la presencia del usuario. El automuestreador es totalmente automatizado, combina la automatización, la facilidad de uso, la fiabilidad, y es sumamente preciso, es versátil en una gran variedad de métodos.

Se puede usar en ambas posiciones como una unidad independiente o como un componente IEEE-488 basado en el sistema CLAR. El automuestreador puede ser controlado por el controlador *PowerLine* del sistema Waters ó por una estación de datos (*Millennium*). También tiene una línea de comunicación RS232 para enviar datos a un integrador, tal como el Waters 746. Consta de un módulo opcional *Heater/Cooler*, que puede conseguirse como un kit e instalarse fácilmente. El *Heater/Cooler* puede mantener la muestra en un compartimento a una temperatura constante entre el rango de 4°C a 40°C.

El automuestreador posee una gran capacidad para la preparación previa de las muestras. Este modelo presenta un diseño sencillo e inteligente permitiendo una operación fiable y libre de errores. Las inyecciones son de volumen variable, lo que permite tener una gran flexibilidad en los análisis, en relación con el tamaño de la muestra, además de mantener una gran reproducibilidad.

Las secuencias automáticas totalmente programables permiten la preparación e inyección de muestras de forma desatendida. El automuestreador 717 contiene un carrusel de 96 viales.

El Automuestreador consta de un tablero delantero (figura 2.14) y un tablero trasero (figura 2.15), el primero tiene una pantalla de cristal líquido y un teclado digital, el segundo tiene terminales IEEE-488, RS232, etc.

TABLERO DELANTERO

El tablero delantero consta de:

- Una pantalla de cristal líquido
- Un Teclado digital
- Un interruptor *On/Off*

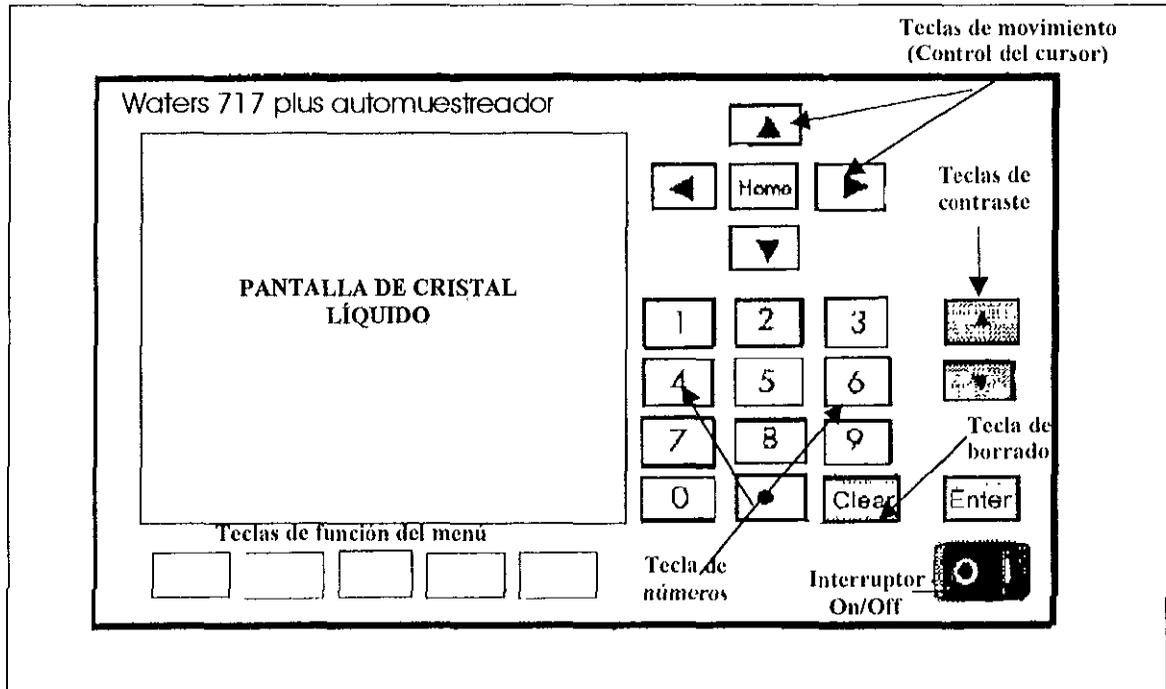


Figura 2.14. Tablero delantero del automuestreador 717 Plus Waters

TABLERO TRASERO

El tablero trasero consta de

- **Tira terminal:** La tira terminal esta localizada en el tablero trasero. Hay que dos terminales de entrada *HOLD*. Las terminales de salida son cierres de contacto y consisten de: dos terminales *INJECT START*, una *INJECT STOP* y una *PROG EVENT*.

- **Una terminal RS232.** Directamente debajo de la tira terminal esta el puerto RS-232 que se usa para mandar datos a un integrador como el Waters 746. El puerto RS-232 puede usarse para conectar cualquier dispositivo que pueda leer el código ASCII.

- **Una terminal IEEE-488.** Debajo del puerto RS-232 está el puerto de comunicaciones IEEE. Este puerto se usa para conectar el controlador al sistema externo, como el Waters 600S o un sistemas de los datos Waters 845 o 860 (a través de LAC/ETM).

- **Switche**

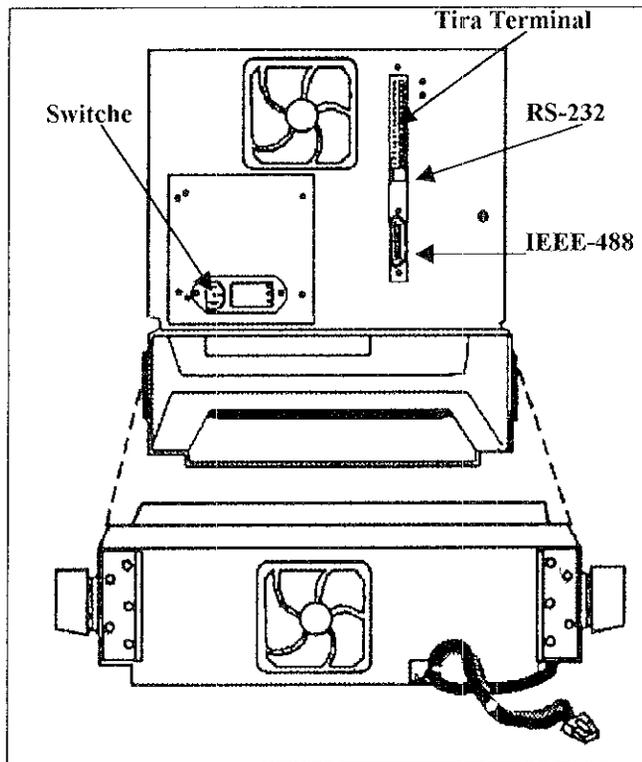


Figura 2.15. Tablero trasero del automuestreador 717 Plus Waters

El sistema de fluido del automuestreador contiene tres válvulas: V_1 , válvula de inyección, V_2 , válvula de la jeringa, y V_3 , válvula de desecho o desague. V_1 y V_2 son válvulas de alta presión motorizada y V_3 es una válvula de bobina rotatoria. V_1 y V_2 tienen tres puertos, dos puertos comunes y uno controlable (*open/closed*). La válvula de la bobina rotatoria tiene dos puertos, uno común y un puerto controlable.

Durante el arranque del automuestreador, los componentes del fluido, se dirigen y manda las siguientes posiciones:

V₁ - Abierto
 V₂ - cerrado
 V₃ - cerrado
 V₄ (válvula solenoide para el lavado de la aguja)
 Aguja cerrada
 Jeringa de flujo

En estas posiciones el automuestreador está listo para que el solvente pueda seguir una trayectoria de flujo normal

Las líneas de entrada y salida para el lavado de la aguja y la línea de desecho de la válvula 3, salen del tablero trasero del automuestreador 717. La entrada de la línea verde se coloca en una botella llena de 100% metanol para el lavado de la aguja

La línea azul del automuestreador se conecta a la salida de la bomba. Se coloca en la bomba, la entrada de la línea del solvente a un recipiente de 100% metanol que haya sido desgasificado con helio. La entrada de la línea amarilla se coloca en un recipiente de desecho. También se coloca la entrada de la línea roja dentro del recipiente de desecho. La salida de línea roja se conecta a la columna

El automuestreador 717 requiere de una mesa cuyo espacio sea aproximadamente de 21 x 23.5 pulgadas (53 x 72 cm). Este espacio debe de incluir un cuarto de ventilación apropiado: 2.5 pulgadas (6.3 cm) en los lados, y 3.5 pulgadas (8.75 cm) en la parte de atrás. La mesa debe estar nivelada para asegurar que el solvente de desecho sea el apropiado para las líneas A, B, C y D de los solventes.

3.2.2 ESPECIFICACIONES

CONDICIONES	ESPECIFICACIONES
Número de viales de la muestra	Auto-programa de adición
Precisión	<0.5% RSD (5 µL a 100 µL.)
Linealidad	>0.99 coeficiente de correlación
Remanente	<0.1% de la inyección anterior
Contaminación cruzada	<0.1% de la muestra anterior
Mando del tablero delantero	Encendido el despliegue de la pantalla de cristal líquido con el teclado numérico pequeño, el cursor codifica y facilita el uso de las ventanas del menú
Rango de la inyección	0.1 µL - 2000 µL. (en incrementos de 0.1 µL)
Pérdida del número de muestra	El sistema no exige a una muestra de exceso hace inyecciones exactas
Muestra mínima	7 µL (para hacer una 1 inyección de µL)
Replica de inyecciones	Programable por vial de 1-9
Auto-Programa estándar	Mínimiza el número de viales a ser usados para los estándares salvando el espacio en el carrusel de la muestra.
Auto-Programa de adición	Permite co-inyectar la muestra y el reactivo para la auto-derivatización o acabar con las rutinas automatizadas.
Auto-Programa de traslado	Permite seleccionar tres viales como viales del reactivo. Programa el volumen que se va transferir al vial del reactivo, a cada vial de la muestra para derivatización u otra reacción química.
Profundidad de la aguja programable	Selecciona una de las cuatro posiciones de toma diferentes dentro del vial de la muestra. Esto permite probar la miscibilidad del líquido contenido en los viales
Auto-Rutina de Stat	Permite interrumpir la corrida para procesar una muestra de alta prioridad.
Cierre del contacto programable	Maneja módulos externos como válvulas, detectores y colectores de fracción en base al tiempo

CONDICIONES	ESPECIFICACIONES
Interfaces de comunicación	IEEE-488 (para el manejo de un sistema controlador apropiado o una estación de datos) y RS232 (para la comunicación con un sistema de adquisición de datos)
Sistema de operación de la presión	4500 psi (310 Mpa) operando a una presión continua, 5000 psi (345 Mpa) para <30 segundos
Proporción de solvente	> 0.4ml por inyección
Número de inyecciones	Programable 1-99 inyecciones por vial
Solvente admisible	Todo solvente estándar grado cromatográfico
Tubería de entrada al inyector	0.040 ID (diámetro interno) de acero inoxidable
Tubería de salida al inyector	0.009 ID (diámetro interno) de acero inoxidable
Volumen de solvente interno	400ml
Dimensiones del automuestreador	Altura 16.0 pulgadas Profundidad 21.0 pulgadas Ancho 15 pulgadas
Peso	63 libras (28.6Kg)
Rango de operación de temperatura	4° -40°C
Humedad relativa	80%
Rango de temperatura de almacenamiento	-40°C a 70°C
Requerimientos de energía	85 - 130 VAC, 47 - 63 Hz. máximo 6 Amps, 185 - 265 VAC, 47 - 63 Hz, máximo 3 MPS

CAPITULO 3. PROCEDIMIENTOS PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAR WATERS

3.1 MANEJO EL SISTEMA CL 616 WATERS

3.1.1 ENCENDER Y APAGAR EL SISTEMA

3.1.2 PURGAR LA BOMBA

3.1.3 DESGASIFICAR SOLVENTES

3.1.4 LAVAR EL SISTEMA

3.1.5 ESTABILIZAR EL SISTEMA

3.1.6 MANEJO DEL DETECTOR DE COLUMNA

3.1.7 EJECUTAR UNA CORRIDA

3.2 MANEJO EL DETECTOR (PDA) 996 WATERS

3.2.1 ENCENDER Y APAGAR EL SISTEMA

3.2.2 PRUEBAS DIAGNOSTICO

3.2.3 CALIBRACION DEL PDA

3.2.4 MILLENNIUM PDA

3.3 MANEJO AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS

3.2.1 ENCENDER Y APAGAR EL SISTEMA

3.2.2 PURGAR EL AUTOMUESTREADOR

3.2.3 PREPARAR LAS MUESTRAS

3.2.4 LAVAR LA AGUJA

3.2.5 EJECUTAR UNA CORRIDA

3.2.6 MENSAJES DE ERROR

3.1 MANEJO EL SISTEMA CL 616 WATERS

3.1.1 ENCENDER Y APAGAR EL SISTEMA

Pasos para encender el sistema cromatógrafo de líquidos 616.

Encienda todos los aparatos conectados al *Millennium 2010* (Sistema CL 616, automuestreador y detector) antes de encender la computadora

Espere un momento para que las pruebas diagnóstico internas de cada módulo se ejecuten. Estas pruebas aseguran que cada módulo sea funcional y sirven para aislar errores

Pasos para encender el sistema:

1 Encienda primero el Sistema CL 616 (bomba y controlador), para establecer el flujo del solvente antes de encender el automuestreador y el detector

2 Presione el interruptor *On/Off* sobre el panel delantero del controlador 600S en la posición I (ON)

3 El encendido del controlador muestra en la pantalla la condición diagnóstica, la configuración del controlador, y el número de la versión del *software* (figura 3.1)

4 Durante el encendido, el controlador automáticamente corre rutinas de auto-diagnóstico y después muestra el encendido de la pantalla

Las rutinas auto diagnósticas son:

- ✓ Prueba del teclado
- ✓ Prueba de la pantalla de cristal líquido (PCL)
- ✓ Prueba de la entrada *Stop Flow*
- ✓ Prueba del inyector externo
- ✓ Prueba de las salidas *Switches* y *Hold*
- ✓ Prueba *Chart*
- ✓ Prueba de la Válvula *Sparge*
- ✓ Prueba de la bomba y de las válvulas de solventes
- ✓ Prueba del conector IEEE
- ✓ Prueba del conector RS-232
- ✓ Prueba de fallo 12V

5 Si todas la pruebas corren exitosamente, se indica "OK" en el campo *POWERUP DIAGNOSTIC STATUS* de la pantalla del controlador (figura 3.1)

Si falla alguna prueba diagnóstica, aparecerá un mensaje mostrando la falla y los datos erróneos

6 Si ocurre algún incidente, apague el equipo y vuelve a encenderlo. Si el diagnóstico falla una segunda vez, entre en contacto con el servicio técnico de Waters. Además del encendido auto-diagnóstico, el sistema CL 616 contiene rutinas de diagnóstico extendidos

7. Para iniciar el diagnóstico extendido, presione la tecla **punto decimal (.)** de la pantalla de encendido

Si no planea usar el sistema cromatográfico 616 por un largo período apáguelo. Antes de que apague el sistema, tome las siguientes precauciones.

- ▶ No deje buffers en las líneas de fluido mientras el sistema no este en uso
- ▶ Lave las líneas con agua de alta pureza previamente filtrada, seguida por una solución 10% metanol. Quite la columna si es incompatible con esta solución. El dejar agua o buffers en las líneas de fluido mientras el sistema no esta en uso, permita el crecimiento microbiano
- ▶ Apague el sistema presionando el interruptor en la posición O (*Off*) sobre el panel delantero del controlador

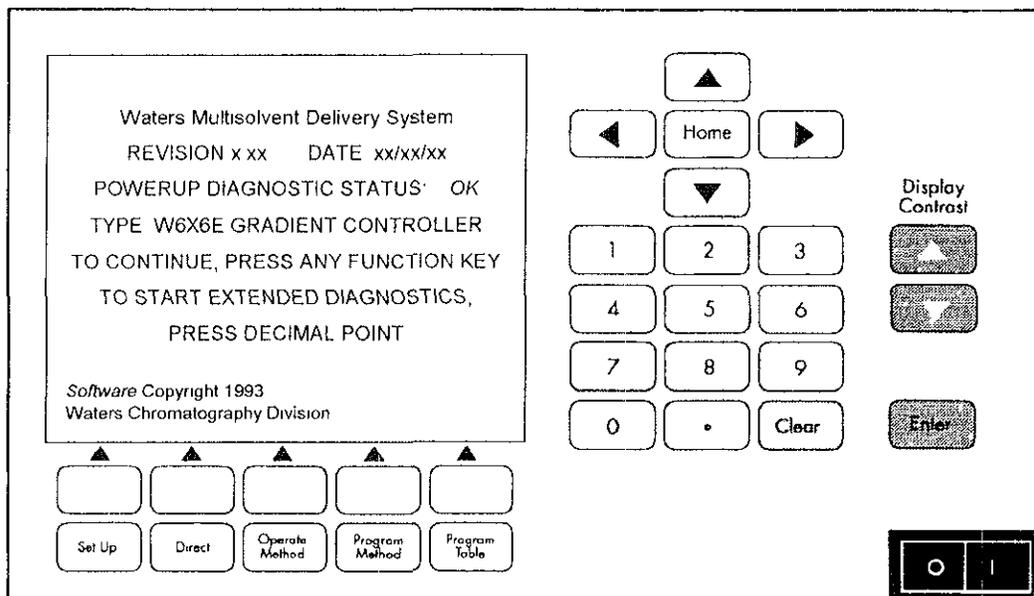


Figura 3.1. Pantalla del controlador, que muestra la versión del *software*.

3.1.2 PURGAR LA BOMBA

El purgado de la bomba involucra

- ▶ Iniciar el flujo
- ▶ Vaciar los solventes de la bomba
- ▶ Purgar

Purgar cuando.

- ▶ El sistema se encienda por primera vez
- ▶ Se agreguen solventes nuevos al sistema
- ▶ Se cambien solventes

Pasos para Iniciar el Flujo:

1. Antes de iniciar debe verificar que los reservorios se encuentren con suficiente solvente, estos deben estar previamente desgasificados y filtrados

2. Rote la manija de la válvula de entrada múltiple en la posición *RUN*, localizada sobre el frente de la bomba (figura 3.2)

3 Inutilice la función *SKIL*, para ello debe presionar la tecla *Set up* del controlador, aparecerá la pantalla *Pump Setup* (figura 3 3), escriba 0 en el campo *SKIL* y presione *Enter*

4 Coloque un frasco debajo del tubo de desecho para coleccionar el eluyente

5 Rote la manija de la válvula de salida que se encuentra en la bomba, a la posición *VENT*, para aislar la columna del flujo de solvente.

6 Presione la tecla *Direct*, aparecerá la pantalla *Isocratic* (figura 3 4). En el campo *FLOW RATE*, escriba la velocidad de flujo de 0 1 ml/min y presione *Enter* para introducir el valor (el gradiente que proporciona la válvula no se activa a 0 ml/min)

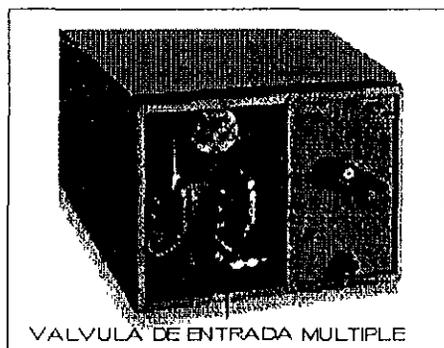


Figura 3.2. Manija de la válvula de entrada múltiple de la bomba 616 Waters

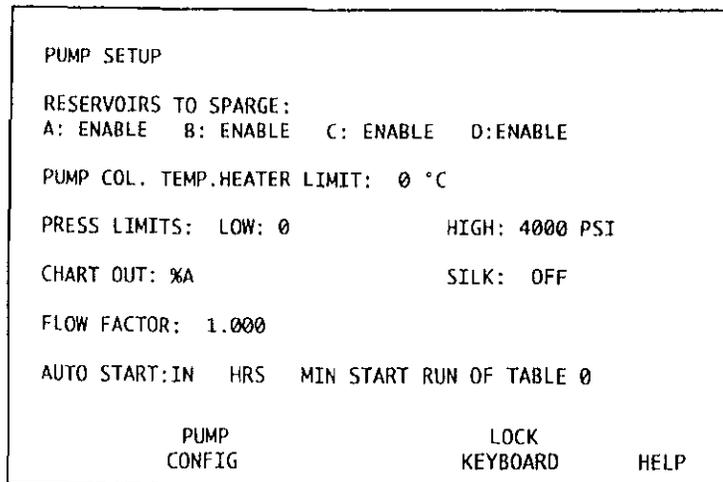


Figura 3.3. Pantalla *Pump Setup* del controlador 600S Waters.

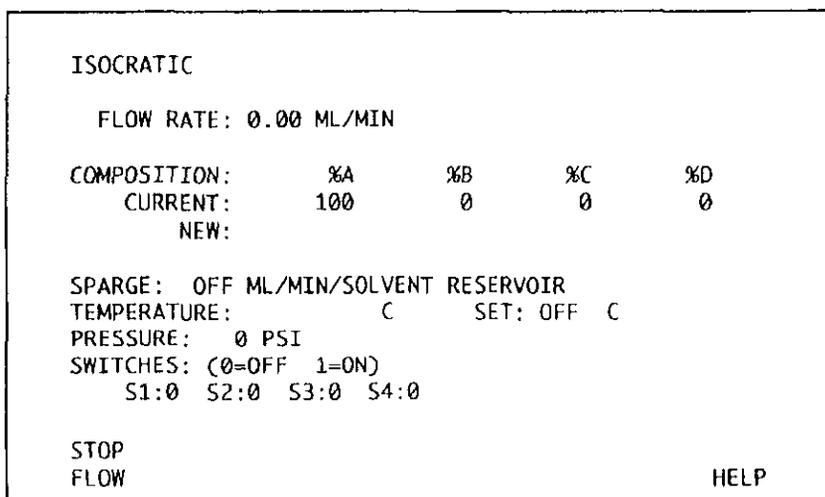


Figura 3.4 Pantalla *Isocratic*

Pasos para Purgar los Solventes de la bomba:

Una vez que ha iniciado el flujo, tiene que purgar los solventes que se encuentran en las cuatro líneas

7 Estando en la pantalla *Isocratic* (figura 3 4) Mueva el cursor al campo *NEW*, escriba 100 para el campo *A%* y 0 para los campos *B%*, *C%* y *D%*, presionando *Enter* para introducir los valores, se debe escuchar un ligero click el cual indica el cambio de línea de solvente

8 Después de escuchar el click detenga la velocidad de flujo escribiendo 0 en el campo *FLOW RATE* y presione *Enter*

9 Coloque la jeringa en el "Luer" que se adapta sobre la entrada de la válvula múltiple, localizada en la parte inferior de la bomba (figura 3 5)

10 Rote la manija de la válvula en sentido contrario a las manecillas del reloj de la posición *RUN* a la posición *DRAW*"vaciar" (figura 3 6)

11 Saque aproximadamente 10 ml de solvente, después rote la válvula a la posición *RUN* Retire la jeringa y desecha el solvente Repita esta operación hasta haber retirado aproximadamente unos 20 ml o hasta que no hayan burbujas de aire en el sistema.

12 Inserte nuevamente la jeringa en el "Luer", rote la manija de la válvula a la posición *DRAW* Retire aproximadamente 8 ml y vuelve a rotar la manija a la posición *RUN*, (debe dejar la jeringa llena con solvente)

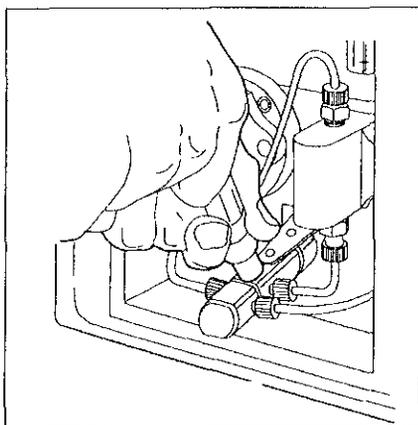


Figura 3.5. Manija de la válvula de entrada múltiple de la bomba 616.

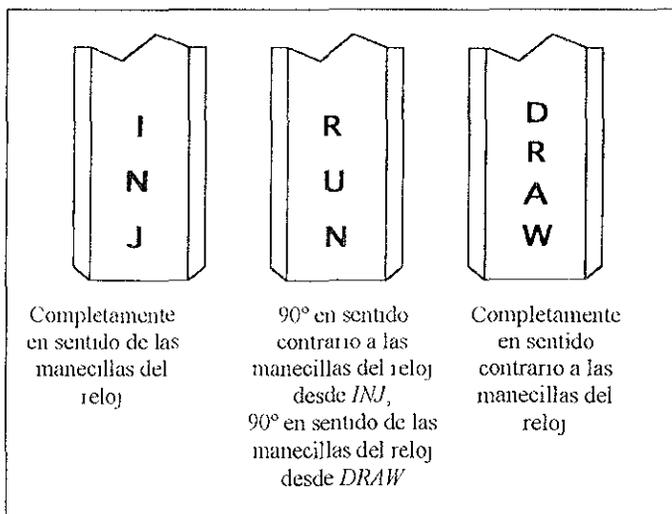


Figura 3.6. Posiciones de la manija de la válvula de entrada múltiple de la bomba

Pasos para Purgar:

13 Mueva el cursor al campo *FLOW RATE*, escriba la velocidad de flujo hasta llegar a 5 ml/min en incrementos de 1 ml/min y presione *Enter*. Esto coloca la velocidad de flujo a 5ml/min para el depósito A

Verifique que la presión y el goteo del tubo de desecho sean constantes al ir subiendo la velocidad de flujo

14 Rote la manija de la válvula a la posición *INJECT*, inyecte poco a poco el solvente que retiró dejando aproximadamente medio ml, verifique que la presión no varíe más del 5% - 10%.

15 Después de un minuto, o cuando el flujo de salida del tubo de desecho sea constante, rote la manija de la válvula a la posición *RUN*. Baje la velocidad de flujo de la misma manera en que la subió

16. Repita los pasos 6 al 15 para las líneas B, C y D

Una vez que haya realizado los pasos 6 al 15 para las líneas restantes, su bomba ya está lista para la operación.

3.1.3 DESGASIFICAR SOLVENTES

Para degasificar los depósitos de los solventes use un sistema de burbujeo de helio a una velocidad de flujo entre 0 y 100 ml/min

Antes de que comience a burbujear, le recomiendo que filtre al vacío la fase móvil que va a emplear

Desgasificar los Solventes Involucra:

- ▶ Preparar el burbujeo
- ▶ Habilitar el burbujeo
- ▶ Burbujear

Desgasificar Cuando:

- ▶ No se hayan burbujeados los depósitos por más de ocho horas
- ▶ Se agreguen solventes nuevos al sistema.

Pasos para Prepara el Burbujeo:

- 1 Ajuste el tanque de helio a una presión entre 50 y 90 psi (3.5 a 6.3 kg/cm²).
- 2 Confirme que la tubería del solvente este adecuadamente ensamblada y conectada para el burbujeo
- 3 Presione la tecla *Set up* del controlador, aparecerá la pantalla *Pump Setup* (figura 3 3)

Pasos para Habilitar el Burbujeo:

- 4 Mueva el cursor al campo *RESERVOIR TO SPARGE* para el primer depósito que contiene los solventes (A, B, C o D)
- 5 Escriba 1 y presione *Enter*. Esto habilita el depósito disponible

- 6 Repita los pasos 4 y 5 para cada depósito
- 7 Presione la función de la tecla *Direct* aparecerá la pantalla *Isocratic* (figura 3 4)
- 8 Determine la velocidad de flujo del burbujeo
 - ▶ Mueva el cursor al campo *SPARGE*
 - ▶ Escriba 100 y presione *Enter* para fijar inicialmente la velocidad de flujo de 100ml/min El flujo de gas comenzará en todos los depósitos
- 9 Mantenga el flujo de helio a 100ml/min por un mínimo de 15 minutos, repita el paso 8 y reduzca el flujo a 30ml/min

Con la finalidad de mantener el funcionamiento de la bomba e impedir la acumulación de aire disuelto en el solvente Se recomienda usar los siguientes tiempo para burbujear helio en los diferentes tipos de fase móvil.

- ▶ 10 a 15 ml/min para fases móviles acuosas
- ▶ 20 a 30 ml/min para fases móviles acuosas y acetonitrilo
- ▶ 50 ml/min para fases móviles acuosas y metanol

3.1.4 LAVAR EL SISTEMA

Para lavar el sistema, asegure que todo el solvente sea reemplazado con solvente nuevo antes de correr las muestras

Lavar involucra.

- ▶ Lavar las líneas del sistema cromatográfico
- ▶ Lavar el automuestreador
- ▶ Lavar el detector
- ▶ Conectar la columna después de lavar

Lavar cuando:

- ▶ Se agreguen solventes nuevos al sistema
- ▶ Se cambien solventes
- ▶ Se termine una jornada de trabajo
- ▶ Se cambie el sistema de la columna, tuberías o solventes
- ▶ Se requiera por circunstancias de trabajo

Antes de que lave el sistema tiene que realizar los siguientes pasos

✓ Verifique la miscibilidad entre el solvente que se utilizó durante el análisis de trabajo con la solución de lavado (10 90% metanol/agua)

Por ejemplo

✓ Cuando cambie de heptano (solución de trabajo) a una solución acuosa, metanol al 10% (solución de lavado), primero pase al sistema hexano, después acetona o isopropanol y finalmente metanol 10% en agua

✓ Purgue la bomba (ver tema purgar la bomba)

- ✓ Instale una unión en el lugar de la columna, durante el lavado del sistema
- ✓ Al final del lavado deje el sistema en una solución acuosa conteniendo 10% metanol u otro solvente miscible en agua y que tenga características antimicrobianas

Pasos para Lavar la Líneas del Sistema:

- 1 Presione la tecla *Direct*, aparecerá la pantalla *Isocratic* (figura 3 4)
- 2 Mueva el cursor al campo *FLOW RATE*, escriba la velocidad de flujo de 1.0 ml/min y presione *Enter*, también puede ir subiendo la velocidad de flujo de 0.1 ml/min hasta 1.0 ml/min. El solvente del sistema fluirá a 1.0 ml/min.

Pasos para Lavar el automuestreador:

3. Para lavar el automuestreador ver tema purgado del automuestreador

Pasos para Lavar el detector:

- 4 Para cualquier tipo de detector, lávelo junto con todas las líneas y déjelo en una disolución acuosa de metanol 10% al final de la jornada de trabajo para evitar crecimiento microbiano. Coloque tapones a la salida del detector, para evitar que la celda se seque.

Pasos para Conectar la Columna:

- 5 Presione la tecla *STOP FLOW*, de la pantalla *Isocratic*, para detener el flujo de la bomba. También puede ir disminuyendo de 0.1 ml/min hasta 0 ml/min
6. Quite la unión y reinstale la columna
- 7 Continúe con la estabilización del sistema para preparar las muestras

NOTA. TAMBIEN PUEDE LAVAR EL SISTEMA CON TODO Y COLUMNA, SOLO SI LA COLUMNA ES COMPATIBLE CON LA SOLUCION DE LAVADO

Generalmente cada columna tiene un manual del fabricante, revise las indicaciones de limpieza y almacenamiento. Le recomiendo que vea el Capítulo 6. Columnas y Solventes

Elimine cualquier solución amortiguadora de las columnas para evitar crecimiento microbiano. Al final de una jornada de trabajo enjuáguela con un solvente de alta fuerza de elución, el cual se elegirá dependiendo de la columna

Deje la columna en una solución acuosa conteniendo del 10% al 20% de metanol, acetonitrilo u otro solvente miscible en agua y que tenga características antimicrobianas. no olvide colocar los tapones en ambos lados de la columna, para evitar que se seque

3.1.5 ESTABILIZAR EL SISTEMA

Para estabilizar el sistema cromatográfico, se deben colocar los siguientes parámetros iniciales sobre la pantalla *Isocratic* (figura 3 4)

- ▶ Velocidad de flujo
- ▶ Composición del solvente
- ▶ Clasificación del burbujeo
- ▶ Sensibilidad

Se debe estabilizar cuando.

- ▶ El sistema se encienda por primera vez
- ▶ Se agreguen solventes nuevos al sistema
- ▶ Se cambien solventes
- ▶ Se cambie la composición de los solventes
- ▶ Después de un período inactivo.

Cuando se use un Sistema de Datos *Millennium* 2010, necesitará encender la computadora para estabilizar el sistema *Millennium* determinará si el sistema se encuentra en línea base, esto indica que esta estable y listo para las inyecciones

Cuando estabilice el sistema, tome en cuenta las siguientes indicaciones

- ▶ Mantenga suficiente solvente en la fase móvil y en el depósito de lavado del pistón para asegurar que los depósitos no se sequen mientras se este operando
- ▶ Estabilice el sistema con solventes a temperatura ambiente

Pasos para Estabilizar el Sistema:

- 1 Presione la tecla *Direct* para acceder a la pantalla *Isocratic*
 - 2 Mueva el cursor al campo *SPARGE*
 - 3 Escriba la velocidad de flujo 30ml/min y presione *Enter*
 - 4 Fije la composición inicial del solvente
 5. Mueva el cursor al campo *NEW A%*, escriba la composición del A% (0 a 100, sin decimales, en incrementos de 1%) y presione *Enter*
 - 6 Repita el paso 5 para los depósitos B, C y D. La suma de la composición de los cuatro % deben ser igual a 100% (por ejemplo: 25%A, 25%B, 25%D y 25%D) La composición de los solventes depende del método analítico que este empleando
- El sistema implementa los cambios después de escribir la composición del último reservorio (D%), al presionar *Enter*
- 7 Mueva el cursor al campo *FLOW RATE* y escriba la velocidad de flujo hasta llegar a 5ml/min en incremento de 1ml/min. Verifique que la variación de la presión no exceda del 5 10%

Puede aumentar la velocidad de flujo. Sin embargo a velocidades de flujo mayores de 5 ml/min ocasionan un paro de la bomba a causa de una alta presión generada en la tubería del sistema

Algunas columnas requieren un flujo mayor de 5 ml/min

Una vez que introdujo el valor de la velocidad de flujo deseado, la bomba inmediatamente comienza a operar al nuevo flujo y a las condiciones de composición del solvente. Una vez realizada la estabilización del sistema, está listo para inyectar las muestras

3.1.6 CONECTAR LA COLUMNA

Conectar la columna o el cartucho. Para conectar la columna se tiene dos opciones

1ª Puede conectarse colocándola dentro del cajón que se encuentra en panel delantero de la bomba (figura 3 7), ésta puede estar sola ó junto con un calentador de columna (figura 3 8)

2ª Se puede conectar colocando uniones sin necesidad de meterla en el cajón de la bomba, lo cual hace visible a la columna durante las jornadas de trabajo

De acuerdo a la primer opción; arrastre el cajón que se encuentra en el panel delantero de la bomba 616, esto coloca la columna dentro de la bomba, de tal manera que no sea visible durante el análisis

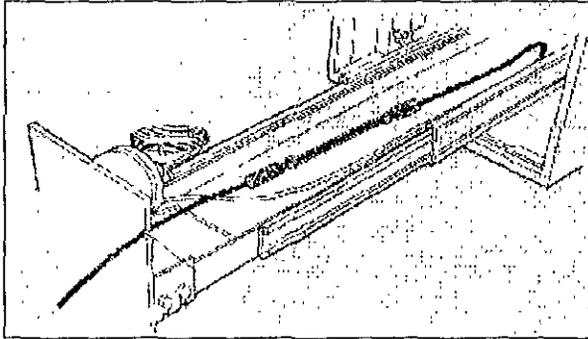


Figura 3.7. Cajón del panel delantero de la bomba 616

La columna y el cartucho pueden colocarse dentro de la bomba de acuerdo a las siguientes opciones de instalación

- ▶ Columna sola (hasta 30 cm de largo)
- ▶ Calentador de la columna con columna (hasta 30 cm de largo)
- ▶ RCM™ 8 x 10 cartucho de condensación radial y cartucho Radial-Pak

INSTALANDO LA COLUMNA SOLA

Pasos para instalar una columna en la bomba 616:

1 Gire el picaporte que se encuentra en el panel frontal de la bomba y jale arrastrando el cajón hacia fuera.

2 Desconecte la tubería. El cajón no se extenderá totalmente si no desconecta la tubería.

3 Coloque la columna en la bandeja tratando que la flecha que se encuentra en la etiqueta de la columna apunte hacia el sentido del flujo (frente del cajón). Permita que la columna quede dentro del cajón (figura 3 7).

4. Conecte la tubería de entrada y de salida a la columna. Siga las instrucciones de la columna para la dirección del flujo:

▶ **Entrada de la columna.** Conecte la tubería de 0.009 pulgada de Diámetro Interno (D I) del automuestreador a la entrada de la columna en la parte de atrás del cajón

▶ **Salida de la columna.** Conecte un pedazo de tubería de 0.009 pulgada D I a la salida de la columna en el frente del cajón

5 Pase la tubería de salida de la columna a través del corte del cajón de la bomba en el tablero delantero. Use tubería lo más corta posible de 0.009 pulgada D,I para conectar la salida de la columna a la entrada de la celda del detector.

6 Verifique que no haya escapes cuando se bombea solvente a través de la columna. Asegúrese de que no haya ninguna fuga en las conexiones de entrada o de salida

INSTALANDO EL CALENTADOR DE COLUMNA.

1 Gire el picaporte del frente de la bomba y jale arrastrando el cajón hacia fuera

2 Jale el cajón hacia usted y localice el receptáculo señalado en la parte de atrás del cajón Tape el cable del receptáculo señalado en el lado derecho del cajón El receptáculo se codifica para asegurar que quede correctamente alineado (figura 3 8)

3 Levante la tapa del calentador de la columna Coloque la columna (de 8 mm D I por 30 cm de largo) en el canal central de la bandeja del calentador señalando la etiqueta de columna hacia la frente del cajón (figura 3 9)

4 Conecte la tubería de entrada y salida a la columna Siga las instrucciones de la columna para la dirección del flujo:

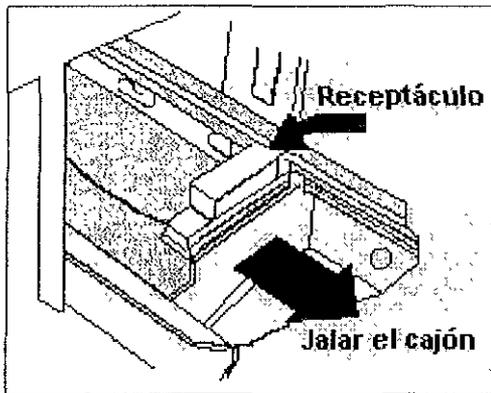


Figura 3.8. Receptáculo

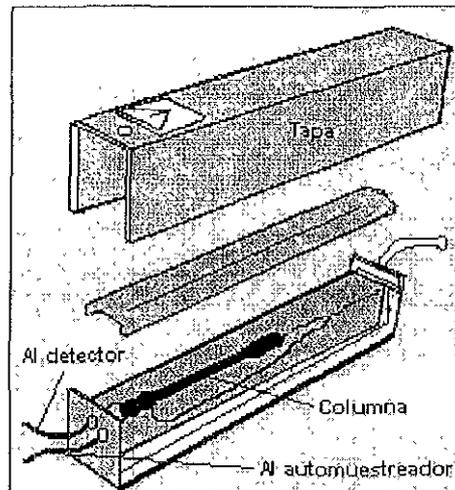


Figura 3.9. Tapa del calentador de la columna

► Entrada de la columna Pase un pedazo de tubería de 0 009 pulgada D I desde el automuestreador a través del puerto derecho del calentador de la columna y conecte la columna.

► Salida de la columna. Pase un pedazo de tubería de 0 009 pulgada D I a través del puerto izquierdo desde el calentador de la columna y conecte la columna

5 Coloque el calentador de la columna en el cajón de la bomba, con la tubería de entrada y salida de la columna hacia la frente del cajón Permita que el calentador de la columna quede completamente dentro (figura 3 10)

6 Pase la tubería de salida de la columna a través del corte del cajón de la bomba en el tablero delantero Use tubería lo más corta posible de 0 009 pulgada I D, para conectar la salida de la columna a la entrada de la celda del detector

7. Verifique que no haya escapes cuando se bombea solvente a través de la columna. Asegúrese que no haya ninguna fuga en las conexiones de entrada o de salida

8 Reemplace las tapas del calentador de la columna

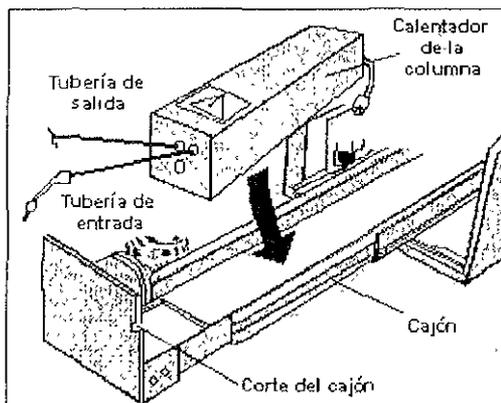


Figura 3.10. Calentador de la columna

3.1.7 CONFIGURAR UNA CORRIDA

El Sistema CL 616 se puede configurar para programar corridas cromatográficas, tanto en la modalidad isocrática como en la modalidad gradiente

Estos métodos también se pueden ejecutar, directamente desde el *software* Millennium 2010 o 3010

- Modalidad Isocrática
- Modalidad Gradiente

MODALIDAD ISOCRÁTICA

En ésta modalidad las condiciones experimentales permanecen constantes durante el proceso cromatográfico. El sistema isocrático, hace que la bomba mantenga constantes la composición de la fase móvil durante el análisis. En esta alternativa es preciso seleccionar la naturaleza de la fase móvil, el tipo de columna, la forma de inyección según las características de la muestra.

La operación en isocrático no permita cambiar la velocidad de flujo después de un tiempo transcurrido o la composición del solvente, así como otras condiciones dependientes del tiempo. Para cambiar la velocidad de flujo, la composición del solvente ó las condición del rendimiento, se deben programar manualmente los nuevos valores para no tomar en cuenta los parámetros de la configuración original. El sistema CL 616 aplica los cambios inmediatamente.

Para configurar una corrida cromatográfica en modo isocrático debe de acceder a la pantalla *Isocratic* del controlador, en la cual debe de:

- Estabilizar las condiciones de la corrida (velocidad de flujo, composición del solvente, velocidad de burbujeo, temperatura del calentador de columna "opcional")
- Determinar el tiempo de la corrida.
- Estabilizar el sistema
- Iniciar la corrida

En el diagrama 3.1 se ilustran los pasos que involucra usar la pantalla *Isocratic*, para configurar una corrida cromatográfica en modo isocrático

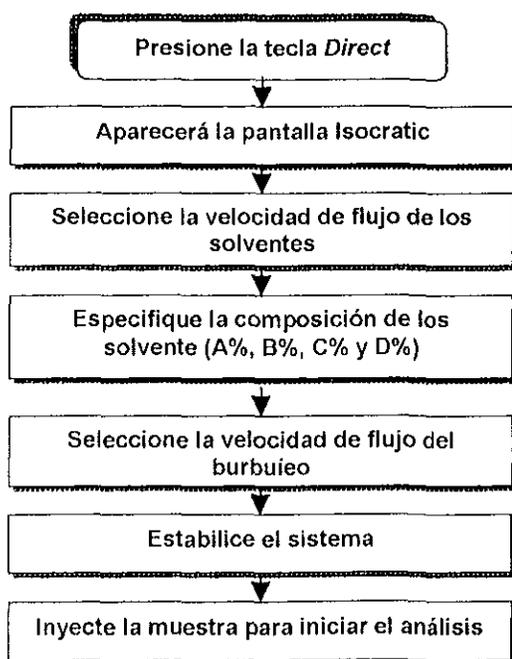


Diagrama 3.1. Configurar una corrida cromatográfica en modo isocrático

Pasos para Configurar una Corrida

1 Para acceder a la pantalla *Isocratic* (figura 3 4), presione la tecla *Direct* sobre el panel delantero del controlador (figura 3 1)

2 En la ésta pantalla puede hacer cambios en los parámetros originales de la bomba

Flujo de los Solventes:

3 Uno de éstos parámetros es la velocidad de flujo, para colocar la velocidad de flujo, si es necesario, mueva el cursor al campo *FLOW*

4 Escriba la velocidad de flujo del solvente en el campo *FLOWRATE* entre (0 00 a 5 00 ml/min) y presione *Enter*

Composición de los Solvente:

5 Para seleccionar la composición de los solventes, mueva el cursor al campo *NEW %A*

NOTA LA LÍNEA *CURRENT* INDICA LA COMPOSICIÓN ACTUAL DEL SOLVENTE EL SISTEMA COPIA LOS VALORES DESDE LA LÍNEA *CURRENT* CUANDO COLOCAS EL CURSOR EN LA LÍNEA *NEW*

6 Escriba la composición % para la fase móvil (0 a 100, no decimales, en incrementos de 1%) para el reservorio del solvente A Presione *Enter*

7 Repita los pasos 5 y 6 para los tres reservorios restantes La suma de los cuatro registros debe ser igual a 100%

8 Después de que registre la composición del solvente D, el sistema aplica el cambio de composición para todos los solventes cuando presiona *Enter* La línea *Current* refleja la nueva composición del solvente

Flujo del Burbujeo

9. Para determinar la velocidad del burbujeo, mueva el cursor al campo *SPARGE*

10 Escriba la velocidad del burbujeo (0 a 100 ml/min) y presione *Enter*

La velocidad del burbujeo se aplica para todos los reservorios, use inicialmente una velocidad alta 100 ml/min y después redúzcala a una velocidad de 30 ml/min La velocidad de burbujeo que use depende de tus requerimientos analíticos

Si cuenta con un calentador de columna en su equipo, éste le permitirá mantener y controlar la temperatura de operación de la columna

11 Para colocar el valor de la temperatura, mueva el cursor al campo *TEMP HEATER*, escriba la temperatura apropiada de acuerdo a tu método analítico Los valores válidos son de 0 a 99°C presione *Enter*

Si no cuenta con un calentador de columna instalado en su sistema CL 616, el campo *TEMP HEATER*, mostrará el valor None

Estabilizado del Sistema.

Para estabilizar el sistema (ver tema Estabilizar el Sistema)

Inyectar la Muestra

Para inyectar o iniciar una corrida con el automuestreador 717 Plus Waters.

12 Coloque los viales con la muestra en el carrusel del automuestreador

13 Programa e inicie la corrida con el automuestreador (ver tema Ejecutar una Corrida)

En el modo *isocrático*, no hay corridas cronometradas y ningún cambio en la composición del solvente. La corrida es continua hasta que decida parar la bomba.

14. Para parar la bomba presione la tecla *Stop Flow* ó escriba 0.0 en el campo *FLOW RATE* y presione *Enter*.

15 Para reanudar el flujo después de que haber parado la bomba, escriba el valor deseado de la velocidad de flujo, en el campo *FLOW RATE* y presione *Enter*

Estas acciones no afectan la composición de los porcentajes.

MODALIDAD GRADIENTE

En esta modalidad durante el proceso de *separación cromatográfica* se varía de manera gradual y estrictamente controlada la composición de la fase móvil durante el análisis. La evolución de la fase móvil con el tiempo puede ser lineal, cóncava, convexa y por etapas. Los cromatogramas mejoran sustancialmente respecto a la modalidad *isocrática*.

En esta modalidad se describirá como crear tablas tiempo-base (tablas de gradiente y de evento) para operaciones analíticas prolongadas, donde se requiere programar el sistema para una operación desatendida.

Las tablas de gradiente controlan la bomba 616, las tablas de evento controlan aparatos externos conectados al controlador 600S (automuestreador, detector, etc). Cada tabla tiempo-base tiene un número con el cual puede ser identificada.

Para llamar una tabla programada en el sistema, se debe ejecutar el número con el que fue asignada.

El Sistema CL 616 puede almacenar hasta 15 conjuntos de tablas que te permiten:

- Correr una serie de muestras
- Implementar el flujo y la composición en el gradiente de solventes
- Activar y desactivar aparatos externos

Una vez que ha creado cualquiera de estas tablas, puede correrlas en la modalidad gradiente.

Tablas de Gradiente

Crear una Tabla de Gradiente:

Para empezar, primero debe definir que información es la que quiere introducir en una tabla de gradiente antes de que la programe. Esto le ayudará a minimizar la necesidad de programar tablas posteriores.

Con el fin de ayudarle a definir y documentar la información que desea acceder a una tabla de gradiente, se le proporciona un plan de análisis y una hoja de archivo.

Sobre cada línea del plan de análisis y hoja de archivo, debe escribir:

⇒ El tiempo de cada gradiente (el tiempo es acumulativo desde la inyección)

- ⇒ La velocidad de flujo
- ⇒ La composición del solvente
- ⇒ El perfil de gradiente (curva cóncava, convexa y lineal)

Cada tabla de gradiente puede contener hasta 15 líneas. Puede crear una tabla de gradiente para incluir parámetros de la bomba en un método isocrático, pero ésta tabla sólo consiste de una línea para programarla.

Cuando los registros de la tabla estén completos, mantenga el plan de análisis y la hoja de archivo como un registro permanente en la tabla.

En el diagrama de flujo 3.2, se muestran los pasos que se requieren para crear una tabla de gradiente.

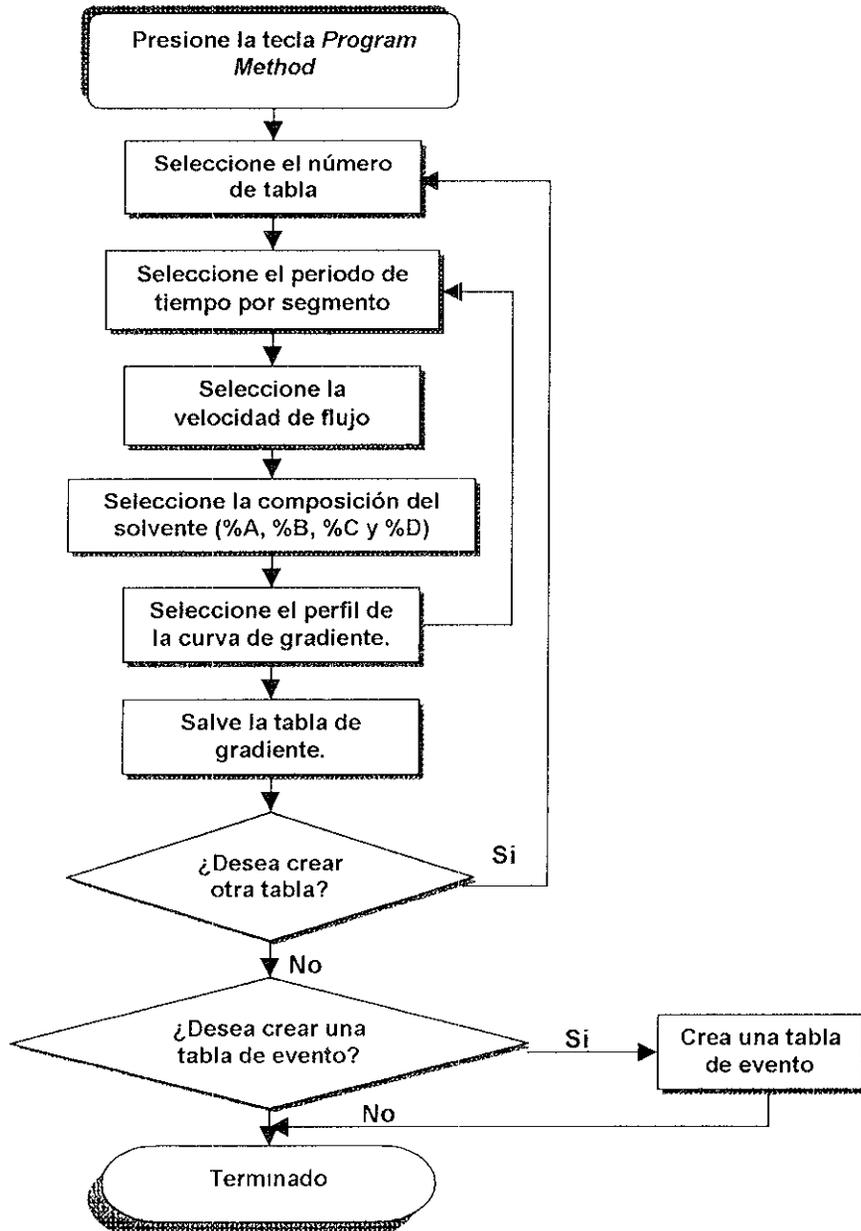


Diagrama 3.2 Crear una tabla de Gradiente

Pasos para Crear una Tabla de Gradiente

1 Para acceder a la pantalla *Program Gradient* (figura 3 11), presione la tecla *Program Method* sobre el panel delantero del controlador

PROGRAM GRADIENT					TABLE #: 1	
TIME	FLOW	%A	%B	%C	%D	CURVE
INITIAL	1.00	100	0	0	0	*
5.00	2.00	50	25	25	0	6

CLEAR	CLEAR	SAVE	HELP
LINE	TABLE		

Figura 3.11. Pantalla *Program Gradient*

2 Para registrar la tabla, mueva el cursor al campo *TABLE #*, escriba un número en la tabla entre 1 y 15, presione *Enter*

Si ya existe una tabla de gradiente con el número que registró, ésta aparecerá inmediatamente sobre la pantalla. Puede sobrescribir o editar esta tabla, ó registrarla con otro número

3 Escriba el tiempo de duración de la inyección (0 00 a 655 34 minutos) a que el segmento de gradiente está por iniciar o el segmento previo está por terminar, presione *Enter*. Cada valor de tiempo registrado en la tabla es único

4 En el campo *FLOW*, escriba el valor de la velocidad de flujo entre 0.00 y 5 00 ml/min. presione *Enter*

5 En el campo *%A*, escriba el porcentaje apropiado de la fase móvil (0 a 100, en incrementos de 1%, no decimales), presione *Enter*

6 Repita el paso 5 para los tres depósitos restantes. La suma de los cuatro porcentajes debe ser igual a 100%

Cuando registre información en las líneas subsiguientes de la tabla, registre el tiempo de duración para cada línea y presione *Enter*. Esta acción copia los valores desde la primer línea a la última

7 En el campo *CURVE*, escriba el número del perfil de la curva de gradiente para el segmento (1 a 11). La figura 3 12 muestra los perfiles de la curva de gradiente

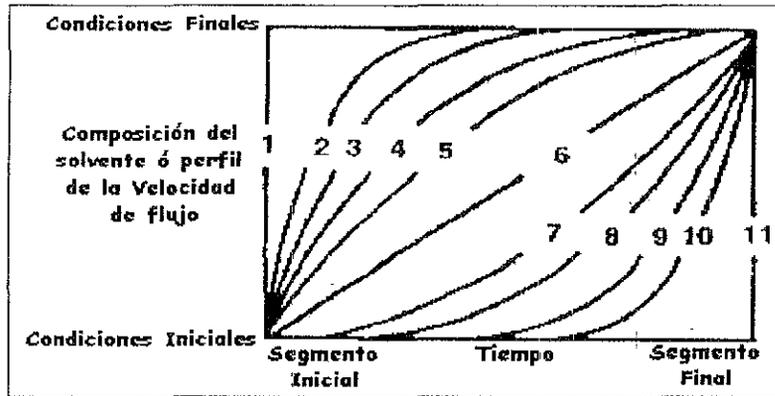


Figura 3.12. Perfiles de gradiente

8 Repita los pasos 3 al 7 para cada línea de la tabla de gradiente, hasta completar la tabla que desea programar de acuerdo a su método analítico. En la última línea debe de reducir la velocidad de flujo después de realizar la última inyección.

9 Debe de colocar la última línea por lo menos en un tiempo de 5 a 10 minutos de diferencia de las inyecciones programadas en la primeras líneas.

10 Escriba en la última línea la velocidad de flujo 0.00 ml/min, ó 0.1 ml/min.

11 En la última línea use la composición del solvente de la línea anterior.

12 Especifique la curva #11 para que la velocidad de flujo no disminuya hasta que la última línea se ejecute. Si una inyección ocurre antes de que ésta línea se ejecute, la velocidad de flujo no disminuirá.

13 Presione la tecla de la pantalla *SAVE* para salvar la tabla en la memoria. Tendrá que registrar la tabla con un número entre 1 y 15, para terminar presione *Enter* (Ejemplo de una tabla de gradiente Tabla 3.1).

Tiempo	Flujo	%A	%B	%C	%D	Curva
Inicial	1.00	10	10	0	80	*
30.00	1.00	10	10	80	0	6
35.00	1.00	10	10	0	80	6
50.00	0.00	10	10	0	80	11

Tabla 3.1. Tabla de gradiente.

14 Para borrar líneas individuales de la tabla, mueva el cursor a la línea que desea borrar, presione la tecla en pantalla *CLEAR LINE*. Inmediatamente limpia la línea que está sobre el cursor y mueva sucesivamente las líneas hacia arriba.

15 Para insertar líneas en la tabla, mueva el cursor al campo *TIME* y colóquelo después de la última línea.

16 Escriba el tiempo de la corrida para la nueva línea. La tabla automáticamente clasifica las líneas según el tiempo y introduce la nueva línea en la ubicación apropiada.

17 Registre los valores de los otros parámetros (velocidad de flujo, composición del solvente, etc) para la nueva línea.

18 Cuando cambia los parámetros de la tabla, debe salvarlos antes de que apague el sistema Para salvar una tabla después de que haya registrado los cambios, presione la tecla en pantalla *SAVE* La pantalla mostrará: **Enter Table Number (1-15)**

19 Escriba el número con el cual quiere salvar la tabla y presione *Enter* La pantalla mostrará: **Replace With New Table 1= Yes 0 = No**

Si registra la tabla que quiere salvar con un número que ya contiene información, inmediatamente la tabla existente aparecerá en la pantalla

20. Para sobrescribir en la tabla existente, escriba 1, esto borra todo el contenido de la tabla Si no quiere sobrescribirla, escriba 0, la pantalla le mostrará una vez más la tabla que creó

21 Para salvar la nueva tabla, repita los pasos 18 y 19, y asigne a la tabla un número diferente, si el número que asignó corresponde a otra tabla, continúe con éstos pasos hasta que encuentre una tabla vacía

El controlador puede almacenar un máximo de 15 tablas en la memoria permanente Una vez que ha salvado la tabla 15, debe de reemplazar una de estas tablas para salvar una nueva

22 Para reemplazar una tabla existente, mueva el cursor al campo *TABLE #*, escriba el número de la tabla que desea reemplazar y presione *Enter*

23 Si desea borrar todo lo que contiene la tabla, presione la tecla en pantalla *CLEAR TABLE*

24 Registre la nueva información, cuando haya terminado de registrarla, salva la tabla presionando la tecla en pantalla *SAVE* Esto reemplaza la tabla existente con la nueva tabla en la memoria permanente

25 Si desea sólo borrar alguna tabla existente, mueva el cursor al campo *TABLE #*, escriba el número de la tabla que desea borrar y presione *Enter*

26 Presione la tecla en pantalla *CLEAR TABLE* para borrar toda la tabla, después presione la tecla *SAVE*. La pantalla le mostrará un aviso **ENTER TABLE NUMBER (1-15)**, escriba el número de la tabla y presione *Enter* La tabla que deseas borrar aparece nuevamente en la pantalla, la cual le mostrará un aviso

REPLACE WITH NEW TABLE?, escriba 1 si su respuesta es "Sí" Esto borra la tabla desde la memoria

Tablas de Evento

Crear una Tabla de Evento

Cuando genere tablas de evento y gradiente, asegúrese que los cambios relacionados con el tiempo especifiquen ambas tablas, ya que estas trabajan conjuntamente

Para crear una tabla de evento debe definir la información que quiere antes de que la programe, esto minimizará la necesidad de programar tablas de evento posteriores Para ayudarle a definir la información y la documentación de una tabla, utilice un Plan de Análisis y Hoja de Archivo, ésta le ayudará a desarrollar la tabla, escribiendo los parámetros que vaya a programar

Sobre cada Plan de Análisis y Hoja de Archivo, escriba:

- ↪ Tiempo de evento
- ↪ Tipo de evento
- ↪ Acción o configuración del evento

Hay 10 tipos de eventos que puede seleccionar, como se describe en la tabla 3.2.

TIPO DE EVENTO	FUNCION
1 al 4	Interruptores de cierre sobre el panel trasero del controlador para la salida a dispositivos externos
5	Alarma interna (recordatorio para el usuario)
6	Temperatura del calentador de columna
7	Inicio las condiciones especificadas en la Tabla#
9	Comienza una corrida desde la Tabla # El método comienza inmediatamente con la ejecución del evento
10	Lámpara del detector <i>On/Off</i>

Tabla 3.2. Tipos de Evento

En el diagrama de flujo 3.3 se le muestra como programar una tabla de evento

Pasos para Crear una Tabla de Evento

1 Para acceder a la pantalla *Program Event* (figura 3.13), presione la tecla *Program Table* sobre el panel delantero del controlador, para salir de esta pantalla presione cualquier tecla y entrará a otra pantalla

2 Mueva el cursor al campo *TABLE #*, escriba un número entre 1 y 15 y presione *Enter*

3 Si una tabla de evento ha sido almacenada con el mismo número que insertó, ésta aparecerá sobre la pantalla, podrá editarla, borrarla o registrarla con otro número, si así lo desea

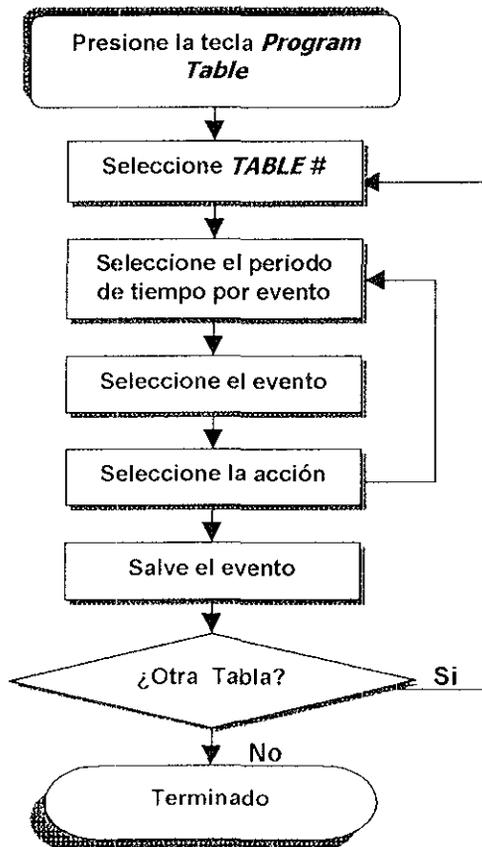


Diagrama 3.3. Programar tabla de evento

NOTA: LA TABLA DE EVENTO Y LA TABLA DE GRADIENTE SIEMPRE CORRE CONJUNTIAMENTE CON EL MISMO NUMERO

4 En el campo *EVENT*, escriba el tipo de evento 1 o 10 (como se muestra en la tabla 3 2), presione *Enter*

5 En el campo *ACTION*, escriba el valor apropiado para la acción requerida del evento

0 = *Off*

1 = *On*

2 = *Pulse*

y presione *Enter*.

6 Repita los pasos 3 al 5 para cada línea de la tabla de evento.

7. Presione la tecla de la pantalla *SAVE* para salvar la tabla en la memoria del controlador

PROGRAM EVENT			TABLE #: 1
TIME	EVENT	ACTION	CHOICE OF EVENTS:
INIT	ALRM	OFF	1-4 = SWITCHES 1-4
0.00	SPRG	50	5 = ALARM
2.00	ALRM	PUL	CHOICE OF ACTIONS:
2.00	SPRG	75	0=OFF 1=ON 2=PULSE
5.00	S1	ON	6 = SPARGE ML/MIN
5.50	S1	OFF	7 = TEMPERATURE C
5.50	S2	ON	8 = go to INITIAL
6.00	S3	PUL	of Tables #
6.00	SPRG	25	9 = start RUN of
6.50	S2	OFF	Tables
			10 = LAMP (0=OFF,1=ON)
			ACTION: ENTER VALUE
	CLEAR	CLEAR	
	LINE	TABLE	SAVE HELP

Figura 3.13. Pantalla *Program Event*

3.2 MANEJO EL DETECTOR (PDA) 996 WATERS

3.2.1 ENCENDER Y APAGAR EL SISTEMA

Encienda todos los aparatos conectados al *Millennium 2010* (Sistema CL 616, automuestreador y detector) antes de encender la computadora

Para encender el detector PDA 996, presione la tecla *O/1 (Off/On)* localizada en la parte inferior derecha del panel delantero

Durante el arranque, el detector PDA 996 corre una serie de diagnósticos internos. El indicador de estado enciende en el frente del detector mostrando los resultados de los diagnósticos internos. También puede correr diagnósticos internos desde el *Software Millennium*. (ver tema Pruebas Diagnóstico)

3.2.2 PRUEBAS DIAGNÓSTICO

Hay dos niveles disponibles para ejecutar las pruebas de diagnóstico

- Nivel Cliente Accesible a través de *Millennium*
- Nivel Servicio Accesible a través de *Windows*

En la actualidad las pruebas de diagnóstico son idénticas en ambos niveles, por ello ya que se cuenta con el *software Millennium* sólo se hará referencia al nivel cliente Existen dos formas de iniciar la prueba de diagnóstico para el detector PDA 996

➤ **Pruebas Internas** No requiere conexiones externas Ejecuta diagnósticos internos cuando el detector falla en el diagnóstico de arranque o cuando hay un cambio en la referencia del espectro.

➤ **Pruebas Interactivas** Requiere conexiones para probar el equipo o el flujo de la bomba Ejecuta diagnósticos de comunicación cuando los problemas de comunicación ocurren con dispositivos conectados a terminales *analog, event, event out* Ejecuta una prueba de ruido para documentar el ruido del detector.

Para comenzar a correr las pruebas de diagnóstico del detector 996 Waters, debe acceder a la ventana *PDA Internal Diagnostics*, para ello

- 1 Arranque el *software Millennium* y entre a la ventana *Session Manager* figura 3.14 (ver Capítulo 4 Manejo del *Software Millennium 2010*)

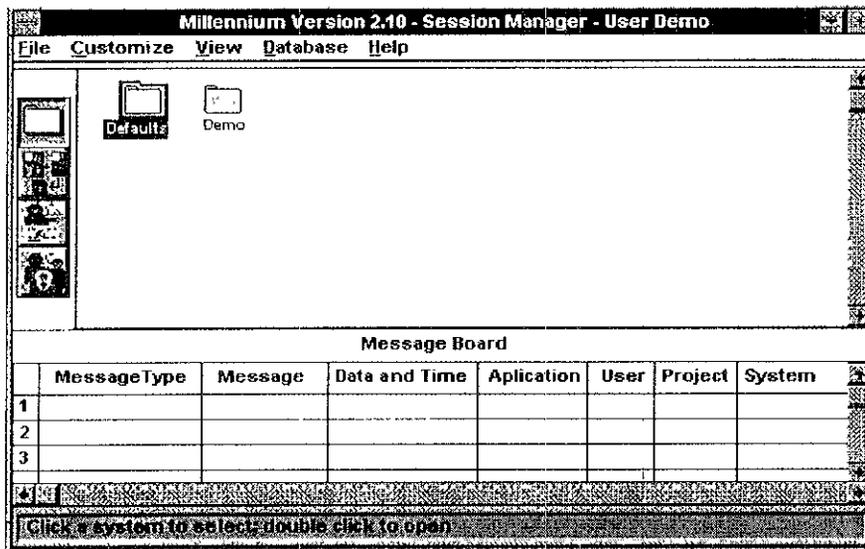
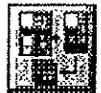


Figura 3.14. Ventana *Session Manager* del *Software Millennium*

- 2 Desde la ventana *Session Manager*, da un click sobre el icono *System View* Aparecerán los sistemas instrumentales (Figura 3 15)



- 3 De un doble "click" sobre el icono del sistema que contiene el detector PDA 996 para acceder a la ventana *Configure System* (Figura 3 16)

- 4 De un doble "click" sobre el icono del instrumento PDA 996 Aparecerá la caja de diálogo *Registrer Waters 996 on Bus LAC/IEEE Address* (Figura 3 17)

- 5 En la caja de diálogo, de un "click" en el botón *Diagnostics* Aparecerá la ventana *PDA Internal Diagnostics* (Figura 3 18)

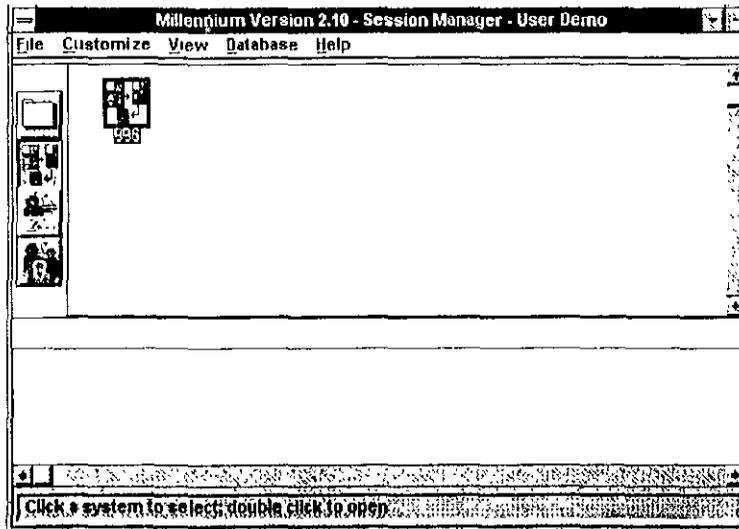


Figura 3.15. Sistemas instrumentales de la ventana *Session Manager*.

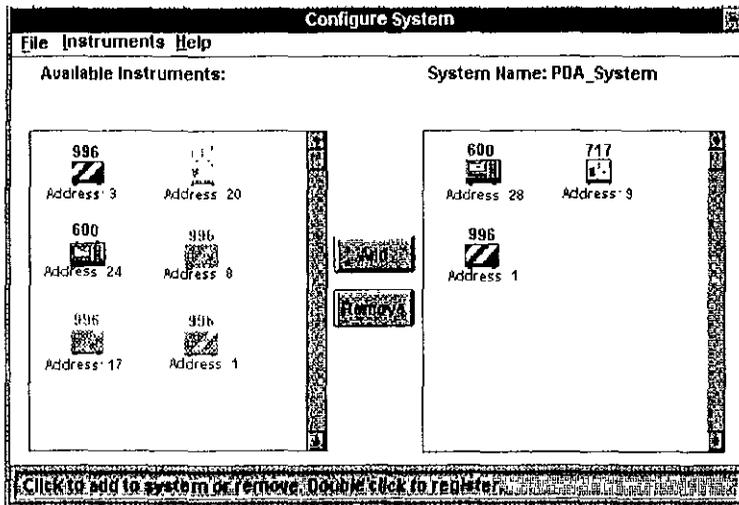


Figura 3.16. Ventana *Configure System*.

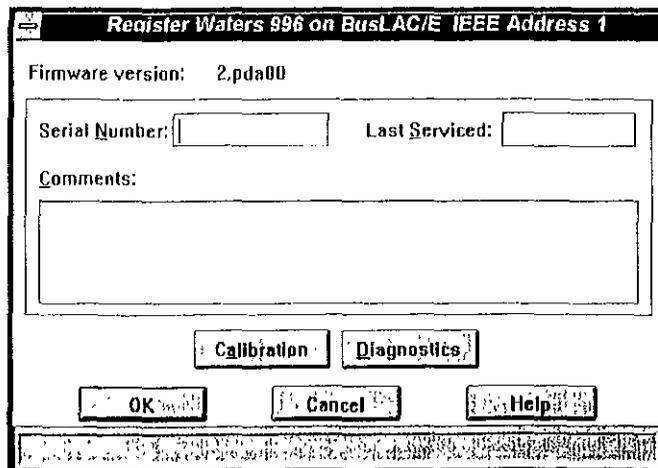


Figura 3.17. Caja de diálogo *Register Waters 996 on BusLAC/E*

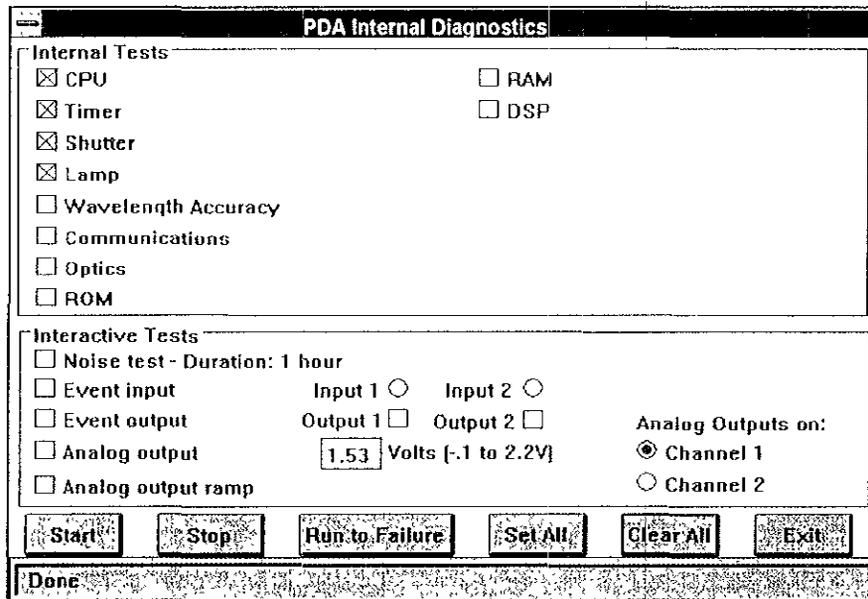


Figura 3.18. Ventana *PDA Internal Diagnostics*

La ventana *PDA Internal Diagnostics* incluye dos apartados.

- Pruebas Internas
- Pruebas Interactivas

PRUEBAS INTERNAS

La mayoría de las pruebas de diagnósticos internos también se realizan en la salida del detector PDA como parte de las pruebas de confianza del encendido. Si el detector enciende con éxito, entonces estas pruebas ya habrán pasado. Sin embargo, puede hacer uso de la ventana *PDA Internal Diagnostic* (Figura 3.18), para seleccionar y ejecutar cualquier de las pruebas individuales. Para ejecutar una prueba de diagnóstico interno, siga los pasos descritos a continuación.

- 1 Seleccione cada prueba que quiera correr dando un "click" en el botón apropiado de la caja de control
- 2 De un "click" en el botón *Start*. En la orilla inferior de la ventana se describe la prueba actual y su estado

Las otras opciones al final de la pantalla le permiten

Stop

- ✓ Parar la prueba que se está corriendo actualmente
- ✓ No seleccione *Stop* para interrumpir una serie de pruebas una vez la que la sucesión ha empezado
- ✓ El botón *Stop* sólo se debe usar para detener una sola prueba

Run to Failure

- ✓ Le permite ejecutar una prueba en particular repetidamente hasta que se encuentre una falla o se presione *Stop*. Si para la prueba al presionar *Stop* después de seleccionar *Run to Failure*, la comprobación continuará hasta que la selección en curso complete el tiempo de la prueba

Set All

- ✓ Le permite seleccionar todas las pruebas que comprenden las pruebas Internas e Interactivas

Clear All

✓ Le permite borrar o limpiar todas las pruebas que abarcan ambas pruebas Internas e Interactivas

Exit

✓ Sale de la ventana *PDA Diagnostics*

Los diagnósticos internos disponibles desde la caja de diálogo *PDA Internal Diagnostics* se describen a continuación.

➤ **CPU**

Rutina que prueba todos los registros internos y la mayoría de las direcciones y la funciones aritméticas del procesador 68000 en el detector PDA 996. Esta es una prueba de comunicación/fallo.

➤ **RAM**

Escriba cintas de datos en la memoria, después lee las cintas de los datos de cada localización de la memoria. Indica la dirección fallada, el ensayo de la cinta escrita, y la cinta errónea leída. Esta es una prueba de comunicación/fallo.

➤ **TIMER**

Genera señales periódicas de interruptores. Si un interruptor no es detectado por el CPU dentro de un número dado de ciclos de tiempo, aparecerá un mensaje de error. Esta es una prueba de comunicación/fallo.

➤ **DSP**

Verifique el funcionamiento apropiado entre el CPU y el TMS320 procesador de señal digital del sistema electrónico del detector PDA 996. Es una prueba de comunicación/fallo.

➤ **SHUTTER**

Cierra y abre cuatro veces el obturador, y verifique los espectros grabados en cada posición del obturador. Si el espectro de energía oscuro o ligero no se encuentran el criterio requerido, las pruebas fallan. La prueba del obturador indica si la prueba falló en el espectro de energía ligero o en el espectro oscuro.

➤ **LAMP**

Esta prueba enciende la lámpara D2 y verifique la energía de la lámpara y del espectro. Ocurre una falla si la lámpara no enciende ni el espectro de energía es inaceptable. También, si se especifica probando repetidamente, el detector 996 permitirá enfriar la lámpara por un minuto a lo largo del periodo entre las pruebas. Es una prueba de comunicación/fallo.

Si el indicador de la lámpara en el tablero delantero es ON y la lámpara falla la prueba, la energía que hay es insuficiente para alcanzar el arreglo del fotodiodo. Para corregir:

- 1 Limpie la celda de flujo
- 2 Si la prueba de la lámpara falla después de limpiar la celda de flujo, trate de verificar la lámpara. Si tienen menos de 1000 horas, quite y limpie celda de flujo. Si tiene más de 1000 horas, reemplace la lámpara y corra nuevamente el diagnóstico de la lámpara.

➤ **WAVELENGTH ACCURACY**

Mide la resolución óptica del detector PDA 996, la calibración de la longitud de onda probando la posición de la línea B Balmer 486 nm. La prueba calcula un error de diferencia en la longitud de onda entre la posición de la línea moderada, y la posición de la línea según la calibración actual.

Si la diferencia es mayor que 1.0 nm, falla la prueba. Después de cada prueba, la pantalla indica el error de la longitud de onda en nm, y si la prueba pasa o falla. Los dos mensajes son:

- = OK : 486 Wavelength error N.NN nm
- = BAD : 486 Wavelength error N.NN nm

Donde N NN es el error de la longitud de onda en nanómetros

➤ COMMUNICATIONS

Envía datos a través del cable IEEE-488 bus al detector y del detector retorna al cable. El mensaje del resultado es cualquiera de los siguientes

OK : IEEE Communication passes
BAD : IEEE Communication fails

➤ OPTICS

Realiza cinco diagnósticos en la parte óptica del detector PDA 996. Aparecen cualquiera de estos mensajes:

OK : Optics Test passes
BAD : Optics Test fails in phase n

Donde n representa el diagnóstico de la óptica particular que falló. Se describe a continuación:

Fase 1 Examina el valor de la lectura del sistema DSP con la lámpara apagada. El espectro debe ser consistente con un PDA no iluminado.

Fase 2 Encienda la lámpara D2 y examina el espectro del PDA. El espectro debe exceder el umbral de la intensidad mínima y debe registrarse apropiadamente en el detector.

Fase 3 Verifique la pérdida de luz. La intensidad extrema de la longitud de onda baja y alta debe mostrar una reducción al máximo del porcentaje de la intensidad.

Fase 4 Compromete el obturador y compara el espectro del PDA para registrar el espectro antes del encendido de la lámpara. Si los espectros son idénticos dentro de la tolerancia de comparación, pasa la prueba de fase.

Fase 5 Libera Descarga el obturador. El espectro del PDA debe retornar rápidamente al espectro iluminado registrado en la Fase 2.

➤ ROM

Realiza una prueba de verificación en el EPROM sumando todos los datos ubicados en la memoria y comparando la suma contra el valor acumulado.

PRUEBAS INTERACTIVAS

Las pruebas interactivas "*Interactive Tests*" exigen el uso de la bomba o conexiones con otros equipos para probar las tiras terminales.

Para seleccionar y ejecutar cualquiera de las pruebas interactivas, debe hacer uso de la ventana *PDA Internal Diagnostic* (Figura 3 18).

Seleccione cada prueba de diagnóstico que quiera correr dando un "click" en el botón apropiado de la caja de control.

Las pruebas interactivas que puede correr se mencionan a continuación

➤ NOISE TEST

Prueba de Ruido, le ayuda a medir el ruido y la tendencia de pico-a-pico de la señal de absorbancia a 254 nm.

Esta prueba exige una hora completa.

Para ejecutar la prueba de Ruido "*Noise test*"

1. Coloque la bomba a una velocidad de 1 m/min con metanol degasificado
2. En la caja de diálogo *PDA Internal Diagnostics*, de un "click" en el botón *Clear All tests*
3. De un "click" en la caja de control *Noise test* Aparecerá el siguiente mensaje.

OK : Noise @ 254 nm d dddd p dddd

donde los campos tiene el siguiente significado:

d.dddd Tendencia sobre un intervalo de 20 minutos

p.ppppp. Promedio del valor del ruido pico-a-pico sobre un intervalo de cada 30 segundos en un intervalo medido de 20 minutos

➤ EVENT INPUT READ

La prueba *Event input* lee el estado de las entradas del evento sobre el detector PDA 996. La prueba indica los resultados en los campos Input 1 e Input 2 (ON es alto).

Para correr la prueba *Event Input*:

1. Conecte un generador de señal a las terminales *Event input*.
2. Coloque el generador de señal para generar una señal de +5 V
3. En la caja de diálogo *PDA Internal Diagnostics*, de un "click" en el botón *Clear All tests*.
4. De un "click" en la caja de control *Event input read*
5. De un "click" en el botón *Start*. Los focos led destellan en un cierto tiempo para indicar que la prueba está activa. Si la prueba *Event Input 1* o *Event Input 2* pasan, el botón llenará la opción para indicar el cierre.

➤ EVENT OUTPUT SENT

Para la prueba *Event output sent*, escriba la configuración de las salidas del evento. La condición *Event output* debe ser observado por el usuario con un voltímetro conectado a la salida.

Para correr la prueba *Event output*:

1. Conecte un voltímetro o un osciloscopio a las terminales *Event output*
2. En la caja de diálogo *PDA Internal Diagnostics*, de un "click" en el botón *Clear All tests*.
3. De un "click" en la caja de control *Event output read*.
4. De un "click" en la caja de control *Output 1 y/o Outputs 2*.
5. De un "click" en el botón *Start*.
6. Use el voltímetro para verificar la señal *Event output*

➤ ANALOG OUTPUT

La prueba *Analog output* escriba los valores especificados en las salidas analógicas. Debe medir el voltaje de la salida y determinar si es adecuado. No hay ninguna respuesta del fallo de esta prueba.

Para correr la prueba *Analog output*:

1. Conecte un voltímetro o un osciloscopio a las terminales *Analog output*
2. En la caja de diálogo *PDA Internal Diagnostics*, de un "click" en el botón *Clear All tests*
3. De un "click" en la caja de control *Analog output*
4. Coloque el voltaje de la salida (rango -0.1 a +2.2 V)
5. De un "click" en el *Channel 1* o *Channel 2* en el campo *Analog output*
6. De un "click" en el botón *Start*
7. Use el voltímetro para verificar el voltaje de la terminal *Analog output*

➤ ANALOG OUTPUT RAMP

Para correr la prueba *Analog output*:

1. Conecte un voltímetro o un osciloscopio a las terminales *Analog output ramp*

- 2 En la caja de diálogo *PDA Internal Diagnostics*, de un "click" en el botón *Clear All tests*
- 3 De un "click" en la caja de control *Analog output ramp*
- 4 De un "click" en el *Channel 1* o *Channel 2* en el campo *Analog output*
- 5 De un "click" en el botón *Start*
- 6 Use el voltímetro para verificar el voltaje de la terminal *Analog output*. La prueba toma aproximadamente 10 segundos

3.2.3 CALIBRACION DEL PDA

La calibración diagnóstica del detector PDA 996 de la oportunidad de verificar la longitud de onda del instrumento además de examinar el espectro de energía del arco de la lámpara de Deuterio. El *software* valida la calibración localizando las dos líneas Balmer 486 y 656 nanómetros en el espectro de emisión de Deuterio.

Cuándo el *software* localice estas líneas, computa los nuevos valores de los parámetros de calibración para el Lambda 1 y Lambda 512. El usuario tiene la opción de aceptar estos nuevos parámetros de calibración computados. Si se aceptan, los valores nuevos se almacenarán en la memoria del detector PDA 996 y se usarán después de esto.

Antes de decidir a aceptar los nuevos parámetros de la calibración, considere los tres puntos siguientes:

- 1 En la mayoría de los casos la fábrica que fija la calibración es más exacta que una calibración basada en las dos líneas Balmer. La calibración de la línea Balmer use dos líneas en el visible.

- 2 El cálculo de la línea de Balmer no es absolutamente preciso y es influenciado ligeramente por la variación en la intensidad de la lámpara y en el contenido de la celda de flujo. Las pequeñas variaciones en los valores Lambda 1 y Lambda 512 pueden ser debidos a factores estadísticos o factores no relacionados con la geometría del espectrógrafo y con la calibración "verdadera".

3. Los cambios en los parámetros de calibración hacen más difícil el lograr la igualdad en la calidad, con los espectros de la biblioteca.

La calibración del detector PDA 996 implica ajustar el instrumento para que las lecturas de la longitud de onda sean exactas. Sólo se debe recalibrar el detector PDA 996 si falla la prueba de diagnóstico interno *WAVELENGTH ACCURACY*.

Asegúrese de verificar que la celda de flujo esté limpia para la calibración. Calibre el detector 996 desde la ventana *996 Calibration* del *software Millennium 2010*.

Para preparar la calibración:

- 1 Si ha estado usando buffers, limpie con agua calidad grado HPLC a una velocidad de 1 ml/min durante 10 minutos. Asegúrese que el solvente sea miscible con la fase móvil anterior.

- 2 Programe la bomba a una velocidad de flujo de 1 ml/min con metanol desgasificado.

3. Espere 10 minutos antes de verificar la calibración.

Para acceder a la ventana 996 Calibration:

- 1 Desde la ventana *Session Manager* (Figura 3 14), de un "click" en el icono *System View*. Aparecerá la ventana *Systems view*.

- 2 De un doble "click" sobre el icono del sistema que contiene el detector PDA 996 para acceder a la ventana *Configure System* (Figura 3 16).

3 De un doble "click" sobre el icono del instrumento 996 Waters Aparecerá la caja de diálogo *Registrar Waters 996 on Bus LAC/IEEE Address* (Figura 3 17)

4. En la caja de diálogo, de un "click" en el botón *Calibration* Aparecerá la ventana *996 Calibration* (Figura 3 19)

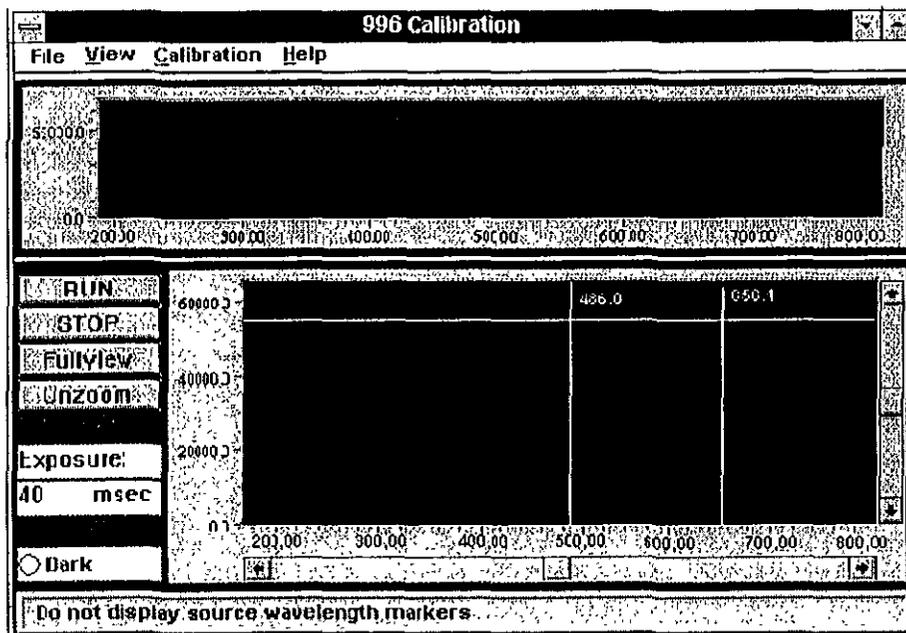


Figura 3.19. Ventana 996 Calibration

En la parte superior de la ventana *996 Calibration* se despliega el espectro completo de la lámpara de emisión de Deuterio desde 180 a 800 nm

En la parte inferior de la ventana de Calibración se despliegan los marcadores de la longitud de onda de deuterio para las líneas Balmer 486 0 y 656 1 nm.

La ventana *996 Calibration* le permite:

- Verificar la ubicación de la longitud de onda en el espectro de deuterio para las líneas Balmer (486.0 y 656.1 nm)
- Recalibrar para poner los picos a 486 nm a la longitud de onda apropiada

Examinando la Corriente Oscura

La corriente oscura es la cantidad de ruido electrónico leído por el arreglo de fotodiodo. El detector resta la corriente oscura de los valores ligeros transmitidos, registrados para ambos espectros el de la muestra y el de referencia

Ya que la corriente oscura se lee con el obturador cerrado, es conveniente examinala para determinar si el obturador está trabajando apropiadamente

Para examinar la corriente oscura

1. Seleccione el botón de la caja *Dark* que se encuentra el final de la pantalla
2. Seleccione *RUN* Se desplegará para determinar la corriente oscura (figura 3 20)

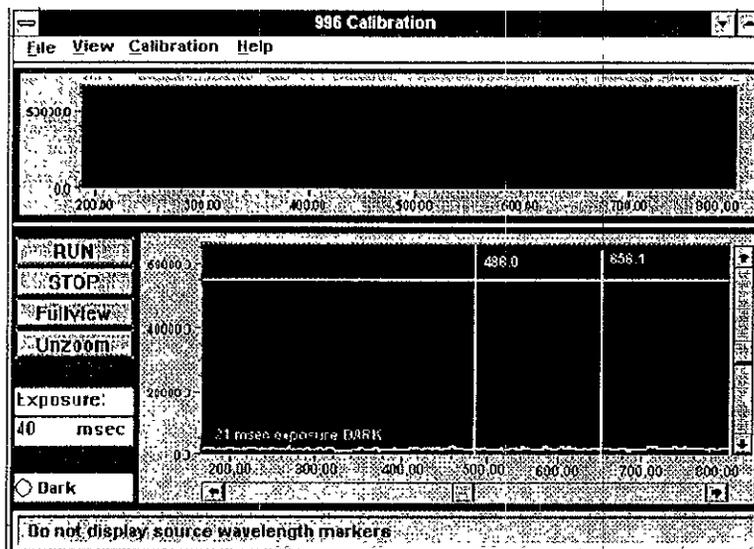


Figura 3.20. Corriente Oscura "DARK"

Examinar el Espectro de Referencia

El espectro de referencia es una medida de la intensidad de la lámpara y de la absorbancia de la fase de móvil sobre el intervalo especificado por el tiempo de exposición

Para desplegar el espectro de referencia

- 1 De un "click" en el botón *Dark* para apagar corriente oscura
- 2 De un "click" en el botón *RUN* y aparecerá el espectro de referencia (figura 3 21) La pantalla se actualiza continuamente hasta que se pulsa el botón *STOP*

El tiempo de exposición para el espectro actual aparece en la parte inferior de la esquina izquierda Ajuste el tiempo de exposición para que la región alrededor de los 230 nm se encuentre en un valor de energía de 30,000 y 40,000 No debe exceder a una energía de 55,000

3. Para terminar, de un "click" el botón *STOP*, si quiere puede hacer un zoom para resaltar o verificar la calibración

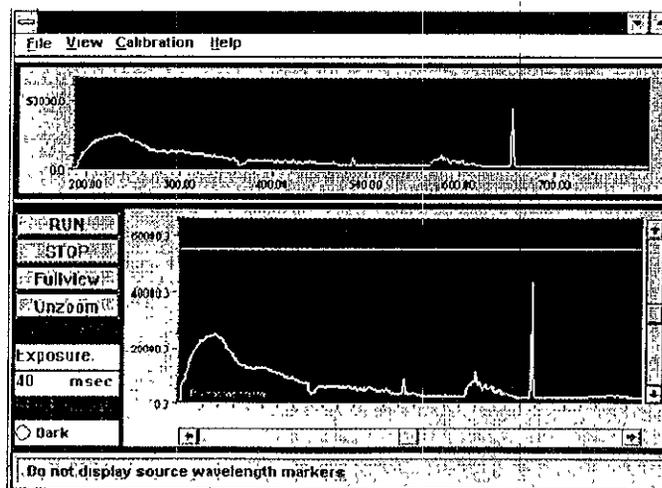


Figura 3.21. Espectro de Referencia

Para aumentar una área del espectro de referencia:

1 Dibuje un rectángulo (*zoom*) alrededor del área de interés sujetando el botón izquierdo del ratón. El área enfocada aparece en el fondo de la pantalla. Puede hacer un *zoom* varias veces para agrandar más una área del cromatograma.

2. Después de hacer un *zoom* seleccione:

- ◆ El botón *Fullview*. Aparece el espectro completo
- ◆ El botón *Unzoom*. Regresa al aumento anterior

Quite la ventana superior para seleccionar *View, Top Window*. La ventana *Calibration 996* reaparece sin la ventana superior.

Verificando la Calibración

1 Si los Marcadores de la Fuente de Deuterio no se despliegan, en la barra de menú seleccione *View, Deuterium Source Markers*.

2 En la barra de menú, seleccione *Calibration, Detect Lines*. La ventana actualiza con un marcador indicando el estrecho del pico máximo.

3 Para verificar la calibración, en la barra de menú seleccione *Calibration, Calibration Accuracy*. Se despliega la caja de diálogo *PDA Calibration Accuracy* (figura 3.22) que muestra el error de la calibración para los picos y si la calibración está fuera de la especificación de 1.0 nm. Entonces tiene la opción para recalibrar.

4 Para ver la ubicación de los picos en la línea Balmer (486.0 y 656.1 nm), use la caja *zoom* para aumentar los picos indicados por los marcadores de la fuente de deuterio.

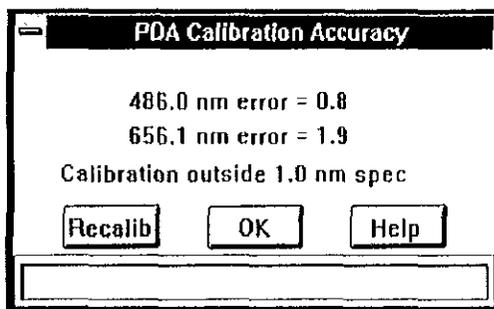


Figura 3.22. Caja de Diálogo *PDA Calibration Accuracy*

Recalibrando la longitud de onda del PDA

La recalibración sólo debe realizarse cuando las ópticas que se exhiben caen fuera de la especificación de la longitud de onda de 1 nm. No recalibre si la longitud de onda varía por menos de 1 nm.

1 Para comenzar la recalibración:

- a) Desde la caja de diálogo *PDA Calibration Accuracy*, de un "click" en el botón *Recalibrate*
- b) Desde la ventana *996 Calibration*, en la barra de menú seleccione *Calibration, Recalibrate*.

2. De un "click" en *OK* para confirmar que quiere recalibrar.

El software *Millennium* recalibra y guarda las nuevas ubicaciones del marcador del diodo en la memoria. Aparecerá la caja del diálogo (figura 3.23) que despliega los valores anteriores y los nuevos para Lambda 1 y Lambda 512.

- 3 De un "click" en el botón *RUN* para ver el espectro de referencia
- 4 Confirme la recalibración en la barra menú seleccionando *Calibration, Check Detect Lines*
- 5 En la barra de menú seleccione *Calibration, Calibration Accuracy* para verificar la recalibración

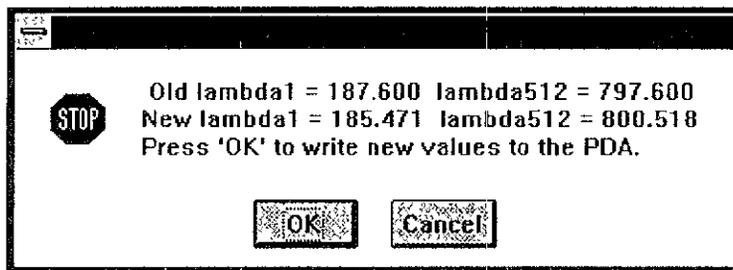


Figura 3.23. Caja de Diálogo con los valores de Lambda

Reglas para Recalibrar

Generalmente, no es una buena idea recalibrar frecuentemente el instrumento. Se recomienda que sólo se recalibre el instrumento bajo las circunstancias siguientes:

1. El detector falle la prueba de confianza de la exactitud de la longitud de onda (El estado del LED parpadea). Esto significa que el instrumento ya no se encuentra a 10 nanómetros de exactitud de la longitud de onda específica.

2. Se observe un cambio grande en el valor de Lambda 1 o Lambda 512 (> 0.5 nm) que puede tener una correlación con un cambio que afecta la óptica. Los posibles cambios incluyen cambiar la celda de flujo y cambiar la lámpara, o un choque mecánico significativo.

3. Es necesario que la longitud de onda dé valores exactos y se tienen los medios independientes para confirmar estos valores (como una solución de óxido de holmium). Recuerda que cada vez que el instrumento se recalibra puede ser necesario volver a medir los espectros de la biblioteca.

3.2.4 MILLENNIUM PDA

El detector de Arreglo de Fotodiodos 996 y el Administrador Cromatográfico *Millennium* proporcionan nuevas técnicas poderosas para grabar y analizar datos de una separación cromatográfica. Para usar apropiadamente las técnicas del procesamiento de datos del *Millennium PDA* debe entender el tipo de datos obtenidos por el detector 996. Las herramientas disponibles del software *Millennium PDA* nos ayudan a evaluar el procesamiento de datos del PDA.

El Administrador Cromatográfico *Millennium* controla el sistema cromatográfico y los resultados que pueden ser ajustados de acuerdo a los requisitos individuales. Se compone de:

- Una computadora para *Millennium* (incluido una tarjeta Bus LAC/E)
- Software *Millennium*
- Base de datos *Millennium*

Datos del Millennium PDA

Para comprender el tipo de datos que se obtienen del detector PDA (de onda variable), es necesario compararlo con un detector de onda fija.

Los datos obtenidos por el detector UV de onda fija de un solo canal, mide la absorbancia de la muestra a una sola longitud de onda de luz seleccionada usando una abertura en la placa y en el filtro. Los datos resultantes son dos planos dimensionales, o un cromatograma de absorbancia contra tiempo. Sólo esos picos que absorben a la longitud de onda particular aparecen en el cromatograma. Otros picos pueden estar presentes en la muestra pero no pueden ser detectados hasta que la longitud de onda de observación se cambie

El detector PDA, por otro lado, puede medir la absorbancia de la muestra por un rango de longitudes de onda entre 190 a 800 nanómetros que use un rallo de difracción y un arreglo de fotodiodos. A cada tiempo de la muestra, el espectro completo de absorbancia adquirido por el PDA se lee y se registra en el disco duro. La salida resultante es un bloque de datos de tres dimensiones ambos incluyen datos cromatográficos y espectrales. Estos datos se pueden marcar con tres ejes que corresponden el tiempo, la longitud de onda, y la absorbancia.

Podemos obtener un cromatograma, absorbancia contra tiempo, de este bloque de datos de tres dimensiones se extrae una parte de la longitud de onda seleccionada. Esta parte es equivalente a un cromatograma obtenido con un detector UV de onda fija adaptado a esa longitud de onda (figura 3 24)

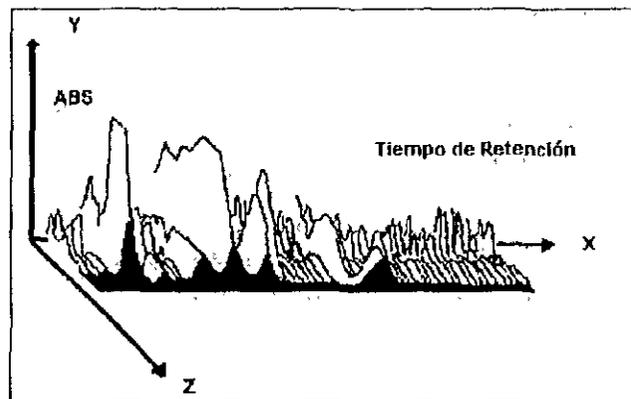


Figura 3.24. Cromatograma absorbancia contra tiempo

Podemos obtener un espectro de absorbancia, absorbancia contra la longitud de onda, de este bloque de datos de tres dimensiones, se extrae una parte en un tiempo seleccionado. Esta parte es equivalente a parar el flujo para analizar y medir la absorbancia a lo largo de la longitud de onda que vaya usando continuamente el detector UV de onda variable (figura 3 25).

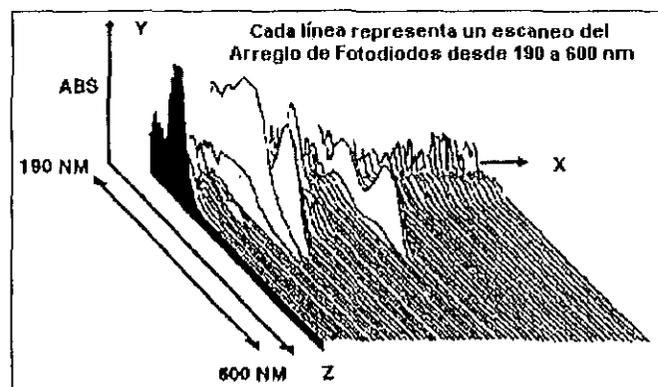


Figura 3.25. Cromatograma absorbancia contra longitud de onda

El detector de arreglo de fotodiodos es capaz de registrar muchos datos cromatográficos y datos espectrales sobre una muestra

Los datos cromatográficos que tienen muchas longitudes de ondas hacen fácil el localizar un pico perdido. Por ejemplo, si un pico esperado no aparece en un cromatograma a una longitud de onda, podemos extraer un cromatograma de ese compuesto a otra longitud de onda y ver si el pico aparece

Los espectros que se obtienen en muchos tiempos de la muestra no hacen posible confirmar si un pico es espectralmente puro. Para cada pico cromatográfico, se adquieren los espectros de absorbancia en cada tiempo de la muestra durante la elución del pico. Se pueden normalizar y sobreponer los espectros registrados desde subir la punta del pico y cola del pico, para comparar la forma espectral. Los espectros de un pico resuelto de línea de base contienen un solo compuesto que tiene la misma forma. Los espectros de un pico que contiene una coelución variarán en la forma

Finalmente, se puede usar estos datos en la identificación de picos. Se pueden sobreponer los espectros obtenidos de un pico desconocido con espectros obtenidos de un estándar puro para determinar si son del mismo compuesto. Espectros normalizados de dos compuestos idénticos deben tener la misma forma. Espectros que no se sobreponen probablemente no son del mismo compuesto. Las herramientas del *software Millennium* le permiten confirmar la identidad de cada compuesto comparando la forma espectral.

Características del software Millennium PDA

El *software Millennium PDA* apoya las siguientes funciones con el Administrador Cromatográfico *Millennium*:

Caja de Diálogo *Instrument PDA* Define los parámetros de control para el detector 996 Waters

3D *Blank Subtraction* Permite usar un conjunto de método para restar un cromatograma 3D (un blanco solvente) de un segundo cromatograma 3D (una muestra o estándar) y despliega la diferencia en la ventana *PDA Review*. Esta característica es útil para restar los efectos de la fase móvil que contiene componentes que absorben UV fuertemente.

PDA Review Permite extraer, integrar y procesar cromatogramas y espectros desde el perfil del plano.

Pantalla Data Acquisition PDA Traza los últimos espectros adquiridos y la longitud de onda hasta cuatro trazos individuales en la adquisición de datos en tiempo real.

Spectrum Index Plot Proporciona una vista general del espectro de un cromatograma extraído e integrado, y facilita la extracción de los espectros para *Spectrum Review*.

Spectrum Review Permite crear librerías, comparar espectros desde los archivos de datos y librerías, así como derivar espectros matemáticamente.

Spectral Libraries Almacene los espectros para la confirmación de los componentes en la ventana *Spectrum Review* y durante el procesamiento automático.

Peak Purity. Traza los datos espectrales de la pureza y el ruido contra un pico cromatográfico integrado. También permite realizar un reiterativo cálculo de la pureza del componente del pico para determinar si hay múltiples componentes (hasta cuatro) en un solo pico.

Spectrum Matching Permite de una forma interactiva y automatizada igualar los espectros comparándolos con las librerías espectrales.

□ *PDA Library View*. Despliega todas las librerías espectrales creadas en la ventana *Project/Library view*. Las librerías espectrales son universales en todos los proyectos dentro del Administrador Cromatográfico *Millennium*. El software *Millennium* permite respaldar, copiar, y restaurar las librerías en *Library view*.

3.3 MANEJO AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS

3.2.1 ENCENDER Y APAGAR EL SISTEMA

Enciende todos los aparatos conectados al *Millennium* 2010 (Sistema CL 616, automuestreador y detector) antes de encender la computadora

Espera un momento para que las pruebas diagnóstico internas de cada módulo se ejecuten. Estas pruebas aseguran que cada módulo sea funcional y sirven para aislar errores

Para encender el automuestreador 717 Plus, presione la tecla 0/1 (*Off/On*) localizada en la parte inferior derecha del panel delantero (figura 3.26)

Espera un momento para que inicie la secuencia completa y se despliegue la pantalla MENU. MAIN, (figura 3.26) aparece el mensaje IDLE en la parte superior izquierda

Si no planea usar el automuestreador por un largo período, apáguelo

Apague el sistema presionando el interruptor en la posición 0 (*Off*) sobre el panel delantero del automuestreador.

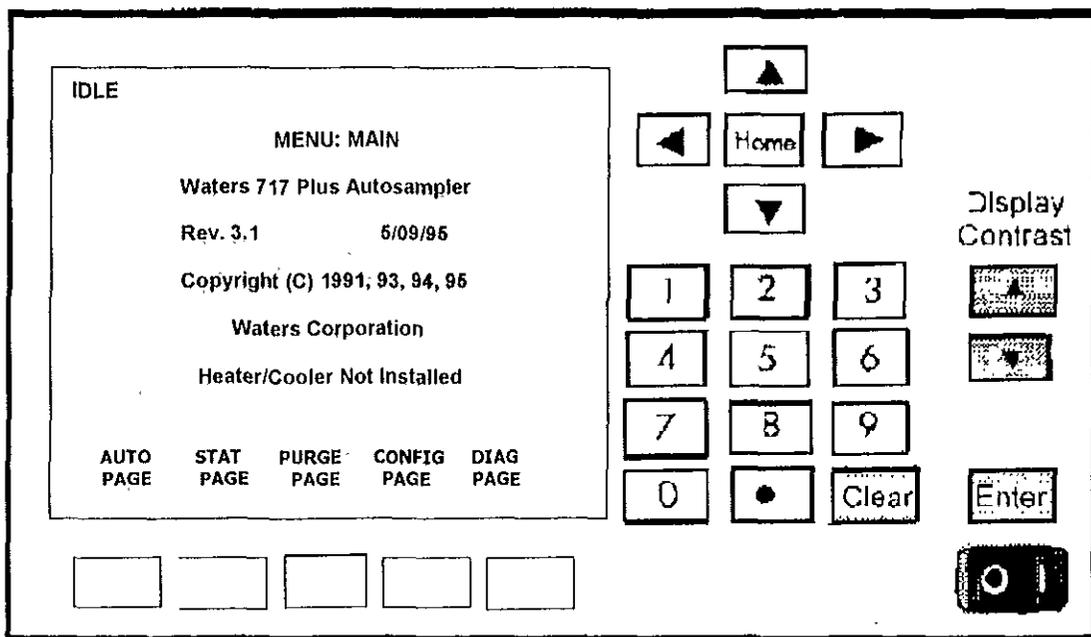


Figura 3.26. Panel delantero y Pantalla de encendido MENU: MAIN

3.2.2 PURGAR EL AUTOMUESTREADOR

Cuando lave o purgue el automuestreador, asegúrese que el solvente este apropiadamente desgasificado y sea miscible con la fase móvil utilizada

Pasos para Lavar

- 1 Coloque la línea roja en un recipiente de desecho para coleccionar el solvente
- 2 Configura la bomba desde la pantalla del controlador, a una velocidad de flujo de 1 ml/min, con una fase móvil de 100% metanol
- 3 Continúe con el bombeo de la fase móvil durante 10 minutos o hasta que todo el aire sea forzado a salir del automuestreador (ninguna burbuja debe aparecer en el recipiente de desecho)

Pasos para Purgar

1. Para ejecutar el purgado del automuestreador, asegúrese que la fase móvil sea reciente
- 2 Quite la tapa del montaje de la jeringa, para examinar que no tenga burbujas (figura 3.27).

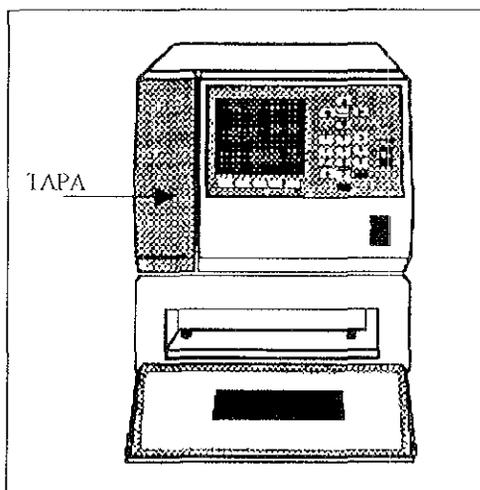


Figura 3.27 Tapa del montaje de la jeringa

3 Use una solución desgasificada de 100% metanol, configure la bomba desde la pantalla del controlador, a una velocidad de flujo de 1ml/min

4 Para realizar una purga, use los valores predeterminados mostrados en la pantalla *EDIT PURGE AND COMPRESSIBILITY* (figura 3.28)

5 Desde la pantalla *MENU MAIN* del automuestreador, presione la tecla *PURGE PAGE*, aparecerá la pantalla *EDIT PURGE AND COMPRESSIBILITY*, la cual muestra los parámetros con los valores predefinidos

6 Use el cursor para dirigirse al campo *Compression Check*, seleccione la opción No y presione *Enter*

7 El tiempo de purga, aparece como un valor predefinido, que es de 10 min

Cambie el tiempo de purga si, el sistema está a una velocidad de flujo menor de 1 ml/min o si se instala un loop auxiliar

```

IDLE

      EDIT: PURGE AND COMPRESSIBILITY

PURGE TIME (MIN):      1.0
COMPRESSION CHEK?     YES NO
COMPRESSION PRESSURE (PSI): 30
PRESSURE DECAY TIME (MIN): 0.2
COMPRESSION VOLUME (VL): 20

PRESSURE CHANGE (PSI)
COMPRESSION VOLUME (VL)

START PURGE                                MAIN PAGE
    
```

Figura 3.28. Pantalla *EDIT: PURGE AND COMPRESSIBILITY*

El tiempo de purga depende de la velocidad de flujo, de la fase móvil y del tamaño del loop de muestra

Debe calcular el tiempo de purga basándose en la velocidad de flujo y en el tamaño del loop de muestra. El tiempo debe ser suficiente para permitir cambiar tres veces el volumen del automuestreador. El loop de muestra y el volumen del automuestreador se muestran en la tabla 3.3.

LOOP DE MUESTRA	VOLUMEN DEL AUTOMUESTREADOR
Normal (200 µl)	836 µl
Auxiliar (2.4 ml)	3236 µl

Tabla 3.3. Volumen del automuestreador.

En la tabla 3.4 se mencionan los tiempos de purga, así como la velocidad de flujo, para dos loop de muestra

LOOP DE MUESTRA	VELOCIDAD DE FLUJO (ML/MIN)	TIEMPO DE PURGUE (MIN)
Normal	0.2	12.5
	0.5	5.0
	>1	2.5
Auxiliar	0.5	19.4
	1	9.7
	2	4.8

Tabla 3.4. Ejemplos de Tiempos de Purgue.

8 Para ejecutar la operación, presione la función de la tecla en pantalla *START PURGE*, inmediatamente se inicia la purga

3.2.3 PREPARAR LAS MUESTRAS

Para preparar y cargar la muestra dentro del automuestreador, considere lo siguiente

- ⇒ Preparar la muestra
- ⇒ Seleccionar y llenar los viales de muestra

Para preparar la muestra debe considerar lo siguiente

- ⇒ Disolverla en un solvente que sea compatible con la fase móvil y químicamente con la columna
- ⇒ Esté a una concentración que permite ser detectable el analito
- ⇒ Disolverla en una solución que se encuentre libre de partículas y sea homogénea

En el diagrama 3 4 se ilustran los procedimientos generales para preparar una muestra

Para seleccionar los viales de muestra debe de tomar en cuenta las siguientes consideraciones.

- ⇒ Características químicas de la muestra
- ⇒ Volumen de la muestra
- ⇒ Volumen de inyección
- ⇒ Número de inyecciones
- ⇒ Volatilidad de la muestra

De acuerdo a las características químicas de la muestra, seleccione:

- Vial de vidrio Uso general
- Vial de polipropileno Recomendado para cromatografía iónica
- Vial de vidrio ámbar Recomendado para muestras sensibles
- Vial de polimetilpenteno Recomendado para volúmenes pequeños en cromatografía iónica

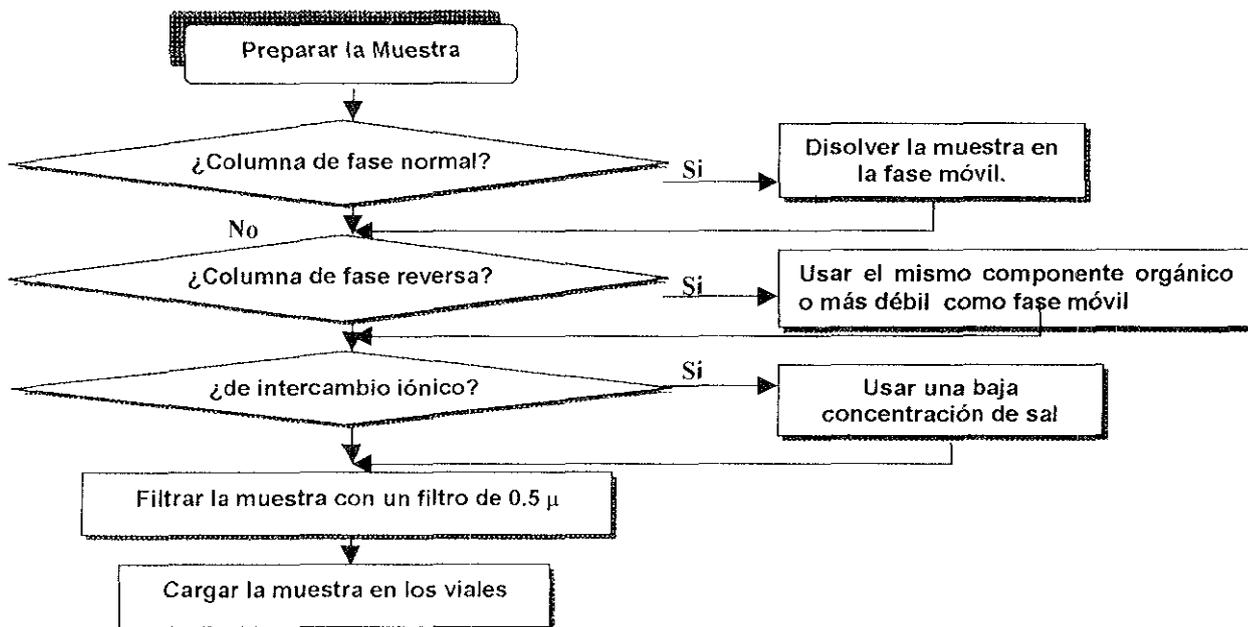


Diagrama 3.28. Preparación de la muestra

El automuestreador puede trabajar con dos tipos de carrusel, de 96 y de 48 para cargar los viales de muestra (figura 3 29)

Para determinar el mejor tamaño del vial de muestra y el volumen de inyección Le sugiero ver las tabla 3 5 y 3.6

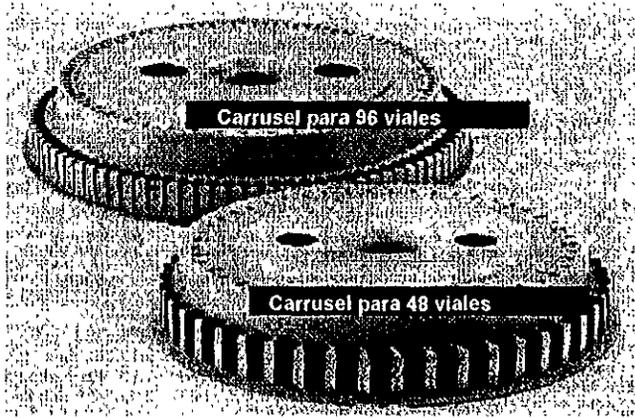


Figura 3.29. Carruseles para el automuestreador 717 Plus.

DESCRIPCIÓN DEL VIAL DE MUESTRA	CAPACIDAD TOTAL	INYECCIÓN MÁXIMA	MAXIMO VOLUMEN RESIDUAL
Vidrio con tapa de rosca	4.0 ml	2.4 ml	1.6 ml
Revestimiento de vidrio	4.0 ml	2.4 ml	1.6 ml
Revestimiento de plástico	4.0 ml	2.4 ml	1.6 ml
Vidrio ámbar con tapa de rosca	4.0 ml	2.4 ml	1.6 ml
Introducir un volumen pequeño (vial con tapa de rosca), vidrio, de punta de gancho.	250 µl	244 µl	6 µl
Introducir un volumen pequeño (vial con tapa de rosca), vidrio, de fondo redondo	250 µl	230 µl	20 µl
Introducir un volumen pequeño (vial con tapa de rosca), plástico, de fondo redondo	250 µl	230 µl	20 µl

Tabla 3.5. Viales de muestra para un carrusel de 48 viales

DESCRIPCIÓN DEL VIAL DE MUESTRA	CAPACIDAD TOTAL	INYECCIÓN MÁXIMA	MAXIMO VOLUMEN RESIDUAL
Revestimiento de vidrio	1.0 ml	600 µl	400 µl
Revestimiento de plástico	700 µl	650 µl	50 µl
Revestimiento de vidrio ámbar	1 ml	600 µl	400 µl
Inserte un volumen bajo (1 ml Revestimiento de vidrio)	150 µl	144 µl	6 µl

Tabla 3.6. Viales de muestra para un carrusel de 99 viales

Pasos para cargar los viales de muestra en el carrusel del automuestreador:

- 1 Abra la puerta del compartimento de la muestra, que esta localizado en la parte inferior del automuestreador. Si el sensor de la puerta esta habilitado (condición predeterminada), el automuestreador descarga el carrusel.

La descarga del carrusel no se activa cuando el automuestreador está realizando una purgue o inyecciones

2 Antes de cargar los viales de muestra en el carrusel, asegúrese que este limpio y no estén bloqueados los orificios

3 Coloque los viales de muestra agrupados en el carrusel fijándose en la localización El número de vial se localiza en el margen del carrusel

El uso de viales de muestra que no sean de la marca WatersTM, pueden producir daños en la aguja

4. Deslice el carrusel sobre el compartimento de la muestra hasta que alcance las dos posiciones, deteniéndose en el piso del compartimento

5 Cierre la puerta del compartimento de la muestra El carrusel en el automuestreador permanecerá en su lugar

3.2.4 LAVAR LA AGUJA

El lavado de la aguja previene la contaminación cruzada de muestras Para lavar la aguja, debe seleccionar un solvente basándose en la fase móvil de la muestra y en sus características químicas

Para lavar la aguja, coloque la línea verde en el depósito del solvente y éste al mismo nivel que el automuestreador Asegúrese que el suministro de solvente para lavar la aguja línea (verde), esté en la botella y la línea de desecho (amarilla) esté en un recipiente apropiado Desde la pantalla del automuestreador puede ejecutar el lavado de la aguja, como se muestra en el diagrama 3 5.

Si, después de 30 segundos, el solvente no fluye hacia la línea desecho, presione nuevamente la tecla *Start NdlWash*.

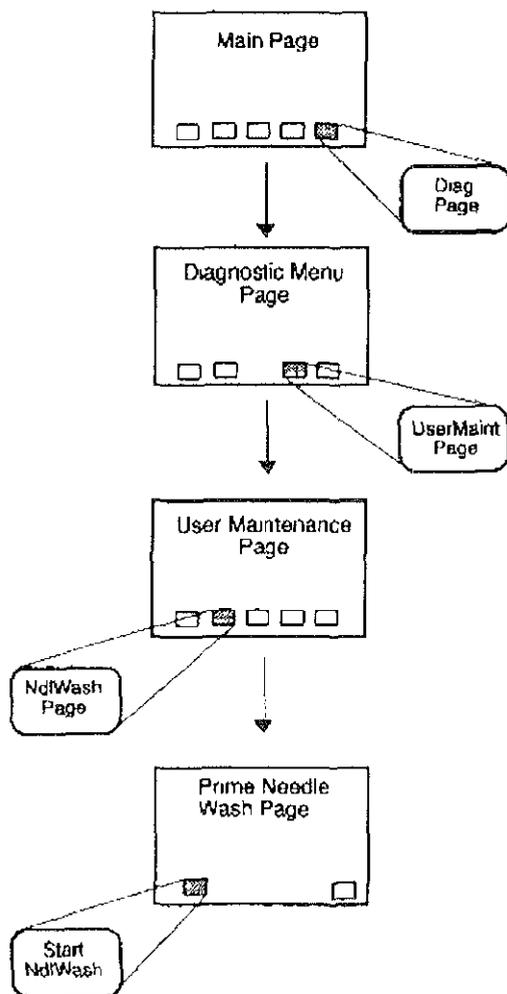


Diagrama 3.5
Lavado de la aguja

3.2.5 EJECUTAR UNA CORRIDA

Antes de iniciar una corrida, ejecute el purgado del automuestreador para asegurar que la fase móvil sea reciente

Use el modo *Auto Run* del automuestreador para programar corridas y monitorear las inyecciones de la muestra. Esto también puede ser ejecutado, desde el *software Millennium 2010 o 3010*

Pasos para Programar una Corrida

1. Para programar e iniciar el *Auto Run*, debe estar en la pantalla *EDIT. AUTO RUN* (figura 3.30) Para ello debe presionar la tecla *AUTO PAGE*, de la pantalla *MENU MAIN* (figura 3.26)

2. La pantalla *EDIT. AUTO RUN*, le permite programar los siguientes parámetros:

- 96 etapas ó pasos (*STEP*)
- Cantidad de viales (*FROM / TO VIAL*)
- Número de inyecciones (*# INJ*)
- Volumen de inyección (*INJ VOL*)
- Tiempo de corrida (*RUN TIME*)

IDLE					
EDIT: AUTO RUN					
STEP	FROM VIAL	TO VIAL	# INJ	INJ VOL	RUN TIME
1	2	4	1	15:0	1:0
2	5	7	1	15:0	1:0
3	8	10	1	15:0	1:0
4	11	13	1	15:0	1:0
END OF TABLE					
START	INSERT	DELETE	STEP	MAIN	
AUTO	LINE	OPTIONS	FUNTION	PAGE	

Figura 3.30. Pantalla *EDIT: AUTO RUN*

- 96 Etapas (*STEP*)

Puede programar hasta 96 etapas diferentes. El campo *STEP* comparte con el campo *FROM VIAL/TO VIAL*, el mismo número de inyecciones, volumen de inyección y el tiempo de corrida.

- Cantidad de viales (*FROM/TO VIAL*)

Puede registrar los valores predeterminados del número de vial sobre el campo *FROM VIAL/TO VIAL*. Los valores válidos son de 1 a 48 o de 1 a 96, dependiendo del tipo de carrusel que este empleando

Cuando inyecte un sólo vial, introduzca el mismo número en los campos *FROM VIAL* y *TO VIAL*. Cuando inyecte una secuencia de viales, introduzca el primer vial en el campo *FROM VIAL* y el último en el campo *TO VIAL*.

- Número de inyecciones (*# INJ*)

En el campo *# INJ*, coloque el número de inyecciones que va a efectuar por cada vial. Los valores válidos son 1 a 99

⇒ Volumen de inyección (*INJ VOL*)

En el campo *INJ VOL*, coloque el volumen de la inyección. El máximo volumen de inyección depende del tamaño del loop de muestra (Tabla 3.7)

TAMAÑO DEL LOOP DE MUESTRA	RANGO (µl)
Estándar	0 a 200
Auxiliar	0 a 2000

Tabla 3.7. Tamaños de Loop de Muestra

⇒ Tiempo de corrida (*RUN TIME*)

En el campo *RUN TIME*, coloque el tiempo de corrida en minutos que vaya a requerir. Las entradas válidas son 0 a 999.9

3 Para insertar líneas, mueva el cursor al campo *STEP* y colóquese donde desea que la nueva línea sea insertada

4 Presione la tecla *INSERT LINE*. El automuestreador duplica la línea previa y renumera todas las líneas subsecuentes

5 Para borrar líneas, mueva el cursor al campo *STEP* y colóquese en el número de la línea que quiere borrar

6 Presione la tecla *DELETE LINE*. El automuestreador remueve la línea y renumera todas las líneas subsecuentes.

7 Para borrar la tabla, presione la tecla *DELETE OPTIONS*, aparecerá la función de la tecla *Delete Table* y presione ésta tecla

Después de confirmar si la tabla será borrada, el automuestreador quita todos los datos de la pantalla

Una vez que haya programado los parámetros de la corrida, presione la tecla en pantalla *START AUTO*, aparecerá la pantalla *STATUS AUTO RUN* (figura 3.31)

La pantalla *STATUS AUTO RUN* despliega

- STEP AND VIAL NUMBER*. Aparece en la parte superior derecha, la cual indica la corrida que esta en marcha
- VIAL #*. Despliega el número de vial de muestra en curso.
- INJ*. Despliega la inyección en curso y el número de inyecciones por vial de muestra
- VOLUME*. Despliega el volumen inyectado
- RUNTIME*. Despliega el tiempo de la corrida programado por la inyección en curso
- TIME REMAINING*. Despliega el tiempo restante para la inyección en curso
- TOTAL RUNTIME*. Despliega el tiempo total de la corrida en curso y todas las inyecciones restantes

Si desea detener la corrida, presione la tecla *STOP RUN*, aparecerá un mensaje

Do you really want to stop the auto run?

Presione Yes para detener la corrida

AUTO		STEP 1 VIAL 1
STATUS: AUTO RUN		
VIAL #		1
INJ		1 of 2
VOLUMEN (µl)		10.0
RUNTIME (min)		12.0
TIME REMAINING (min)		8.6
TOTAL TIME (min)		20.6
AUTO PAGE	STAT RUN	STOP RUN

Figura 3.31. Pantalla STATUS: AUTO RUN

3.2.6 MENSAJES DE ERROR

Existen seis tipos de mensajes de error que proporcionan información acerca de los componentes y subsistemas del automuestreador (tabla 3.8).

- Información
- Calibración
- Carrusel
- Calentador/Enfriador
- Inyector
- Jeringa

TIPO DE ERROR	PREFIJO	PROPOSITO
Información	Blank o Warning	Pone en sobre aviso al operador, de haber efectuado entradas inexactas de algún parámetro o de alguna operación
Calibración	Error CAL	Identifica los problemas con la calibración del sello pak del inyector
Carrusel	Error CAR	Identifica los problemas del carrusel, del lector del carrusel, o de la transmisión del carrusel
Calentador/Enfriador	Error H/C	Identifica los problemas con el módulo calentador/enfriador
Inyector	Error INJ	Identifica los problemas con los sensores de la posición de inyector
Jeringa	Error SYR	Identifica los problemas con los sensores de la posición de la jeringa

Tabla 3.8. Tipos de Mensajes de Error

INFORMACION

Estos mensajes de error, ponen en aviso al operador de haber introducido algún parámetro inexacto o de alguna operación errónea

MENSAJE DE ERROR	SOLUCIÓN
"Cannot prg (purge)" No puede purgar mientras está inicializando	Presione <i>CLEAR</i> , espere a que termine de iniciar.
"Cannot run stat while purging" No puede ejecutar stat mientras este purgando	Presione <i>CLEAR</i> , espere a que termine de purgar
"Inject volume exceeds loop vol" Excede el volumen de inyección del loop	Presione <i>CLEAR</i> , instala el loop auxiliar para volúmenes sobre los 200 µl
"Power fail interrupted run" La falta de energía interrumpe corrida	Presione <i>CLEAR</i> , y reprograma la tabla Auto Run
"Vial exceeds carousel size" El vial excede el tamaño del carrusel	Presione <i>CLEAR</i> , verifique el tamaño del carrusel y reinserta el número de viales

CALIBRACIÓN

Estos mensajes de error, aparecen durante la calibración del sello *pak*

MENSAJE DE ERROR	SOLUCIÓN
"CAL: Could not find bottom sensor" No puede encontrar el sensor del fondo	Recalibre, llame a los técnicos de Waters
"CAL: Could not find upper seal" No puede encontrar el sello superior	Recalibre, llame a los técnicos de Waters
"CAL: Pressure above 750 psi" Presión por arriba de los 750 psi	Baje la presión de la bomba (400 a 600 psi), recalibre
"CAL: Pressure below 400 psi" Presión por debajo de los 400 psi	Aumente la presión de la bomba (400 a 600 psi), recalibre
"CAL: Seal width too narrow" El ancho del sello es demasiado estrecho	Recalibre, llame a los técnicos de Waters
"CAL: Seal width too wide" El ancho del sello es demasiado ancho	Recalibre, llame a los técnicos de Waters
"CAL: Top sensor too high" El sensor de la cabeza es demasiado alto	Recalibre, llame a los técnicos de Waters
"CAL: Top sensor too low" El sensor de la cabeza es demasiado bajo	Recalibre, llame a los técnicos de Waters
"CAL: Transducer pressure too high" La presión del transductor es demasiado alta	Recalibre el transductor
"CAL: Transducer pressure too low" La presión del transductor es demasiado baja	Recalibre el transductor
"CAL: User aborted calibration" Usuario abortaste la calibración	Recalibre

CARRUSEL

Los errores del carrusel, pueden ser el resultado de usar un carrusel sucio o usar el carrusel en mal estado

Para quitar los mensajes de error:

- 1 Presione la tecla *CLEAR* de la pantalla del automuestreador
- 2 Abra la puerta del compartimento de la muestra y quite el carrusel
- 3 Limpie el carrusel

- 4 Inserte el carrusel limpio o use otro carrusel de la marca Waters
- 5 Si el carrusel continúa con errores, llama a los técnicos de Waters

ENSAJE DE ERROR	SOLUCIÓN
"CAR: Both carousel lift sensors on" Ambos sensores del carrusel se levantan	Re inicie el encendido del automuestreador Llame a los técnicos de Waters.
"CAR: Cannot run with door open" Puerta abierta, no puede efectuar una corrida	Cierre la puerta
"CAR: Carousel homing deviation" Cabeza del carrusel desviada	Siga los procedimientos sobre como borrar los errores del carrusel
"CAR: Could not engage carousel" No puede encajar el carrusel	Re inicie el encendido del automuestreador Llame a los técnicos de Waters.
"CAR: Could not maintain position" No puede mantener la posición	Siga los procedimientos sobre como borrar los errores del carrusel
"CAR: Could not position CAR (carousel)" No puede levantar la posición del carrusel	Re inicie el encendido del automuestreador Llame a los técnicos de Waters.
"CAR: Could not position carousel" No puede colocar el carrusel	Siga los procedimientos sobre como borrar los errores del carrusel
"CAR: Could not position to vial" No puede colocar los viales	Siga los procedimientos sobre como borrar los errores del carrusel
"CAR: Lift not active in purge mode" No levanta el modo activo de la purgue	Espere hasta que el ciclo del purgado se completa antes de intentar remover el carrusel.

CALENTADOR/ENFRIADOR

MENSAJE DE ERROR	SOLUCIÓN
"H/C: Door open time exceeded limit" Puerta abierta límite de tiempo excedido	Cierra la puerta y permite el equilibrio del compartimento de la muestra
"H/C: Hig temp limit exceeded" Temperatura alta límite excedido	Re inicie el encendido del automuestreador Llame a los técnicos de Waters.
"H/C: Internal fan failure" Falla del ventilador interior	Llama a los técnicos de Waters
"H/C: Low temp limit exceeded" Temperatura baja límite excedido	Re inicie el encendido del automuestreador Llame a los técnicos de Waters.
"H/C: Temp (temperature) control ha a fault" El control de la temperatura tiene un error	Llama a los técnicos de Waters
"H/C: User aborted defrost cycle" El usuario abortó el ciclo de descongelación	Mensaje de información, proceda con el muestreo

INYECTOR

MENSAJE DE ERROR	SOLUCIÓN
"INJ: Both injector sensor on" Ambos sensores del inyector	Resetea el automuestreador. llama a los técnicos de Waters.
"INJ: Bottom sensor active" Sensor activo	Resetea el automuestreador, llama a los técnicos de Waters.
"INJ: Compressibility exceeds limit" Excede los límites de compresibilidad	Desgasifica la fase móvil Si las pruebas de compresibilidad fallan en la fase de móvil desgasificada, realiza una prueba de fuga
"INJ: Could not find bottom sensor" No puede encontrar el sensor del fondo	Resetea el automuestreador, llama a los técnicos de Waters.
"INJ: Could not find top sensor" No puede encontrar el sensor de la cabeza	Resetea el automuestreador, llama a los técnicos de Waters.
"INJ: Could not position needle" No puede colocar la aguja	Resetea el automuestreador, llama a los técnicos de Waters
"INJ: Injector seals are not calibrated" El sello del inyector no está calibrado	Calibra el sello Pak
"INJ: Pressure inc. on comp check" Aumento de la presión ,verifique la compresión	Realiza una prueba de fuga
"INJ: Top sensor active" Sensor de la cabeza activo	Resetea el automuestreador, llama a los técnicos de Waters

JERINGA

MENSAJE DE ERROR	SOLUCIÓN
"SYR: Both syringe sensors on" Ambos sensores de la jeringa	Resetea el automuestreador, llama a los técnicos de Waters.
"SYR: Cannot move with v2 and v3 closed" No puede cerrar, mueva la v2 y v3	Abre las válvulas 2 y 3 antes de mover la jeringa
"SYR: Could not position syringe" No puede colocar la jeringa	Resetea el automuestreador. llama a los técnicos de Waters.
"SYR: Syringe at empty position" Inyectó una posición vacía	Resetea el automuestreador, llama a los técnicos de Waters.
"SYR: Syringe at full position" Inyectó una posición llena	Resetea el automuestreador, llama a los técnicos de Waters.

CAPITULO 4 MANEJO DEL SOFTWARE MILLENNIUM 2010

	File	GUI	View	Tools	Options	
	View					
	QuickStart					
		1	2	3	4	5
4.1	1	2	3	4	5	6
4.1.1	3	4	5	6		
4.1.2	4	5	6			
4.2	6					
4.2.1						
4.2.2						
4.2.3						
4.2.4						
4.2.5						
4.2.6						
4.2.7						

4.1 CARACTERISTICAS DE SOFTWARE MILLENNIUM

4.1.1 GENERALIDADES

4.1.2 VENTANAS DE MILLENNIUM

4.2 MANEJO DEL SOFTWARE MILLENNIUM 2010

4.2.1 ENCENDIDO DEL SOFTWARE MILLENNIUM

4.2.2 CONFIGURAR EL SISTEMA CROMATOGRAFICO

4.2.3 CREACION DE UN NUEVO PROYECTO

4.2.4 CREACION DEL METODO DE INSTRUMENTO

4.2.5 CREACION DEL METODO SET

4.2.6 USAR LA VENTANA QUICK SET CONTROL

4.2.7 DESARROLLO DEL METODO DE PROCESO

4.1 CARACTERISTICAS DE SOFTWARE MILLENNIUM

4.1.1 GENERALIDADES

El *software Millennium* es un programa que le permite trabajar en cualquier aplicación cromatográfica CLAR, PDA, CL-Masas, Cromatografía Iónica, Electroforesis Capilar, Cromatografía de Gases, etc. Contiene una base de datos integrada, cuyas ventajas son muchas, quizá las más evidentes son la posibilidad de recuperar la información cromatográfica utilizando cualquier campo asociado al cromatograma y la trazabilidad e integridad de los resultados por normativas de calidad e imposibles de conseguir en programas que almacenan la información en ficheros DOS

La base de datos con la que cuenta *Millennium* se puede utilizar para diferentes aplicaciones:

- ◆ Localizar cualquier resultado usando fácil y rápidamente identificaciones ajustándose a las necesidades (no sólo el nombre de la muestra)
- ◆ Personalizar la manera de buscar la información (usando vistas)
- ◆ Añadir campos de costumbre (identificaciones de la muestra, resultados, y cálculos inter-pico) a la base de datos
- ◆ Compartir los datos cromatográficos entre los usuarios y proyectos en una configuración del cliente/servidor.

El *software Millennium* le permite usar varios instrumentos cromatográficos juntos (como son la bomba, el detector, y el automuestreador Waters), puede usar estos instrumentos como un sistema en conjunto desde la ventada *Configure System*.

La potente combinación entre el detector Waters 996 de Fotodiodos con el *software Millennium* asegura una confianza completa en los resultados, permite adquirir, almacenar y recuperar cromatogramas a una sola longitud de onda, cromatogramas a varias longitudes de onda o un espectro completo, o los tres a la vez. Se puede comprobar la pureza del pico y ver los detalles espectrales. Todos los cálculos tienen lugar durante la adquisición de datos y se hallan disponibles en cualquier momento de la separación.

El Sistema Administrador Cromatográfico *Millennium 2010* le permite:

- ◆ Adaptar el funcionamiento del sistema *Millennium* para satisfacer tus necesidades (en el desarrollo de métodos, en la investigación, y en pruebas de control de calidad).
- ◆ Adquirir los datos y controlar los instrumentos locales.
- ◆ Procesar los datos de forma interactiva.
- ◆ Personalizar la generación y el diseño de reportes.
- ◆ Compartir los datos y métodos entre los usuarios
- ◆ Compartir la instrumentación y el desarrollo de los métodos entre los usuarios.

El programa se caracteriza por los siguientes aspectos importantes de estructura

- Organización de Información a través de Proyectos
- Elementos visuales intuitivos
- Secuencia lógica de análisis cromatográfico

La información que se genera dentro de *Millennium* puede ser de dos tipos y con diferentes categorías:

Métodos:
 Instrumento
 Proceso
 Reporte
 Conjunto de Métodos

Datos:

Canales

Resultados

Curvas de Calibración

Los recursos de *Millennium* para la manipulación y búsqueda de la información se denomina:

Proyectos (*Projects*): Area de almacenamiento de información agrupada con un objetivo particular

Vistas (*Views*): Ayuda visual para identificación de información

Filtros (*Filters*): Criterios de búsqueda de información dentro del Proyecto

Campos (*Fields*): Parámetros de Identificación de la Información

Herramientas (*Tools*): Ayuda visual para manejo de información (adquisición, cálculo, impresión, modificación)

La jerarquía de uso es una característica de *Millennium*, existen usuarios con diferentes privilegios.

Nivel 1: Administrador del Sistema

Nivel 2: Químico

Nivel 3: Analista

Nivel 4: Visitante

Todo usuario de *Millennium* deberá contar con un nombre de usuario (*User Name*) y clave de acceso (*Password*) para hacer uso del mismo

El sistema *Millennium*, se adapta a las necesidades particulares de cualquier usuario, permitiendo controlar el cromatógrafo y analizar los cromatogramas producidos desde la pantalla de la computadora. El sistema *Millennium* se acomoda con facilidad a la resolución de los problemas cromatográficos más complejos. La mayor parte del trabajo se realiza en la Ventana del Proyecto (*Project*), desde donde se inicia la inyección de muestras, se calculan los resultados y se generan los informes escritos. También desde esta ventana se accede a la función *Quickstart*, cuya función facilita el desarrollo de métodos.

4.1.2 VENTANAS DE MILLENNIUM

El programa *Millennium* tiene acceso a dos ventanas principales "*Session Manager* y *Project*", a partir de ellas se puede acceder a otras ventanas

- Ventana *Session Manager*
- Ventana *Project*

Ventana *Session Manager*

La ventana *Session Manager* (figura 4 1) es la que aparece cuando se accesa por primera vez a *Millennium*. Esta ventana está formada por las siguiente partes:

Barra de Menú (Menu Bar)

Incluye comandos para definir proyectos, define sistemas cromatográficos, y realiza tareas de la administración del sistema

Iconos de Vista (Views)

Controla el contenido del área de vista.

Area de vista (View Area)

Muestra la información correspondiente al icono de vista seleccionado. El área de vista contiene información accesible para registrar al usuario (tal como el proyecto o el sistema de *folders*).

Tabla de Mensaje (Message Board)

La tabla de mensaje del *software Millennium*, contiene información y mensajes de error que no requieren una atención inmediata

Ayuda Puntual (Prompt Help)

Despliega una línea de información sobre un artículo específico dentro de la ventana

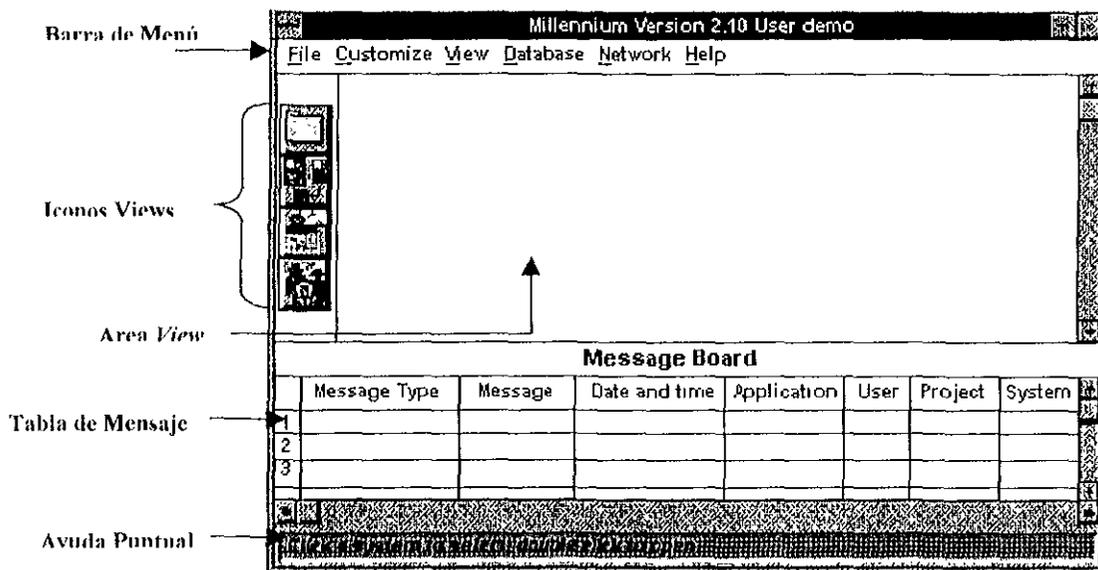


Figura 4.1. Ventana *Session Manager* del *Software Millennium 2010*

Descripción de la Barra de Menú de la Ventana *Session Manager*

El menú *File* incluye los siguientes comandos:

New: Crea un folder vacío para un nuevo proyecto, un nuevo sistema, un nuevo usuario, o un nuevo grupo de usuarios (el icono *View* de la ventana *Session Manager* especifica la función)

Open: Abre los proyectos, sistemas, usuarios y grupo de usuarios, en la barra de menú *View* seleccione la ventana que desea abrir (equivalente a dar un doble "click" en el folder del proyecto, del sistema o del usuario), de esta manera se accesa a la ventana apropiada o caja de diálogo para modificar arreglar u organizar los parámetros

Manager: Accesa al proyecto especificado en la función de la administración

Access: Define como puede acceder a un proyecto específico o sistema (propietario, grupo, universo) Además, cuando el usuario, cambia el orden de acceso o restablece la contraseña.

Delete: Remueve proyectos, sistemas, usuarios o grupos de usuarios (y sus contenidos) desde la base de datos.

Save Preferences: Salva los cambios que haya realizado en la ventana *Session Manager*, estos cambios se salvan en la base de datos de *Millennium*

Print Message: Instrucciones de la impresora para imprimir la información dentro de los límites de la tabla de mensaje

Clear Message: Borra todos los mensajes desplegados en la tabla de mensaje

Pause: Previene el acceso de otro usuario al *software Millennium* u otra ventana del programa cuando está siendo utilizada

Log Out: Sale del *software Millennium* y regresa a la caja de diálogo *Login*

El menú *Customize* incluye los siguientes comandos:

Login: Permite registrar automáticamente y colocar al usuario predefinido para el empleo del *Millennium 2010*

User Types: Despliega los derechos relacionado de los usuarios, permite cambiar los nombres relacionados con los tipos de usuarios, y también le permite cambiar los privilegios y restricciones asociadas con cada tipo del usuario

El menú *View* incluye los siguientes comandos:

Projects, Systems, Users, User Group: Accesa a la categoría *view* especificada (idéntico a utilizar los iconos de la ventana)

El menú *Database* incluye los siguientes comandos:

Backup Database: Instruye al *software Millennium* para respaldar el contenido total de la base de datos de *Millennium 2010*

Backup Project: Instruye al *software Millennium* para respaldar el contenido de un proyecto

Restore Database: Instruye al *software Millennium* para restaurar el contenido total de un proyecto

Restore Project: De instrucciones al *software Millennium* para restaurar el contenido total de la base de datos del *Millennium* respaldando la versión previa 2 1 por la del *software Millennium 2010*.

Restore Pre 2.1 Database: Instruye al *software Millennium* para restaurar el contenido total de la base de datos de *Millennium* previamente respaldado con la versión 2 1 del *software Millennium*.

Restore Pre 2.1 Project: Instruye al *software Millennium* para restaurar el contenido de un proyecto previamente respaldado con la versión 2 1 del *software Millennium*

Manager Space: Permite supervisar y asignar más espacio (si es necesario) para un sistema en particular en la tabla de espacio de la base de datos de *Millennium*

El menú **Network** incluye los siguientes comandos:

Setup Network: Permite meter información acerca de la tarjeta Bus LAC/E y de los módulos LAC/E en red.

Network Path: De instrucciones al *software Millennium* para anexar el nombre de un dispositivo específico en la red "network"

Descripción de los Iconos *Views* de la ventana *Session Manager*

Cada icono *view* define cómo aparecen los datos en la ventana *Session Manager*. Use estos iconos para seleccionar la categoría de datos que quiera desplegar. Para seleccionar cualquiera de los iconos (figura 4.2); puede dar un doble "click" sobre el icono seleccionado o usar la barra de menú *View*.

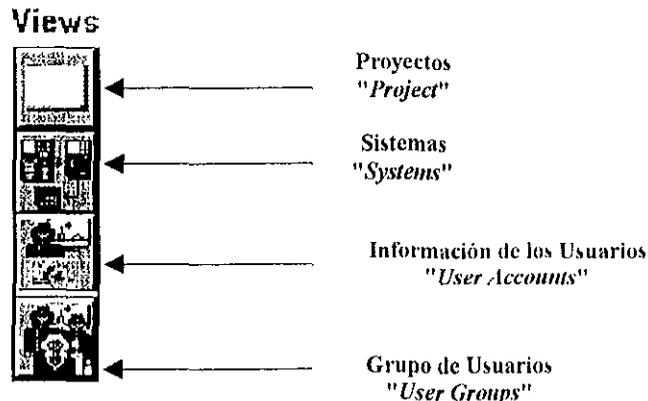


Figura 4.2. Iconos Views de la ventana *Session Manager*

Proyectos "Project view"

De un "click" en el icono *Project view* para desplegar las carpetas del proyecto (figura 4.3) que están disponibles para los usuarios (definido por el administrador del sistema). De un doble "click" sobre la carpeta del proyecto para abrir la ventana *Project* (figura 4 4)

Cada carpeta de proyecto contiene un grupo de información relacionada (tal como muestras, conjunto de muestras, métodos, datos y resultados). Puede usar un grupo de proyectos con información relacionada. El número de usuarios que puede acceder a cualquier proyecto, está definido por el sistema del *software Millennium*.

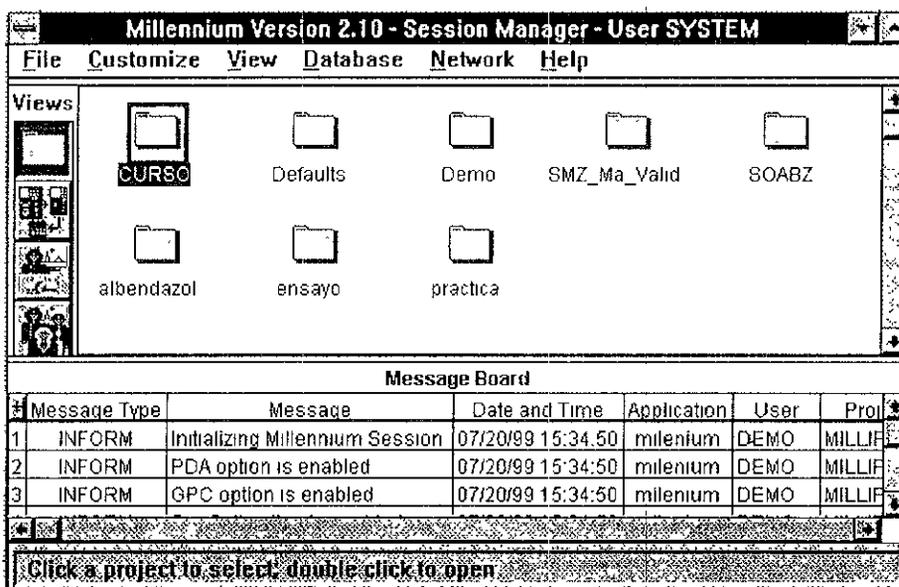


Figura 4.3. Carpetas de proyectos de la ventana *Session Manager*

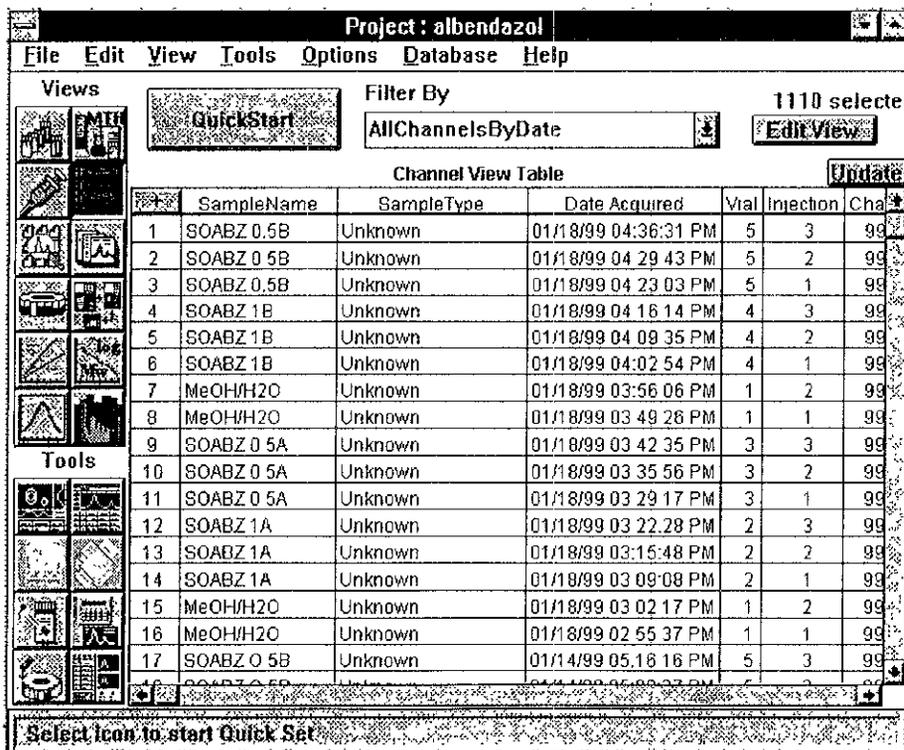


Figura 4.4. Ventana *Project*

Sistema "System view"

De un "click" en el icono *Systems view* para desplegar los sistemas cromatográficos (figura 4 5) que están disponibles para los usuarios (definido por el administrador del sistema).

Cada sistema desplegado en la ventana representa un sistema cromatográfico específico y consiste en instrumentos de la interface de la serie Waters IEEE-488. Puede configurar los sistemas a través de la ventana *Configure System* (figura 4.30)

El número de usuarios que puede acceder a cualquier sistema cromatográfico, es definido por el sistema del software *Millennium*

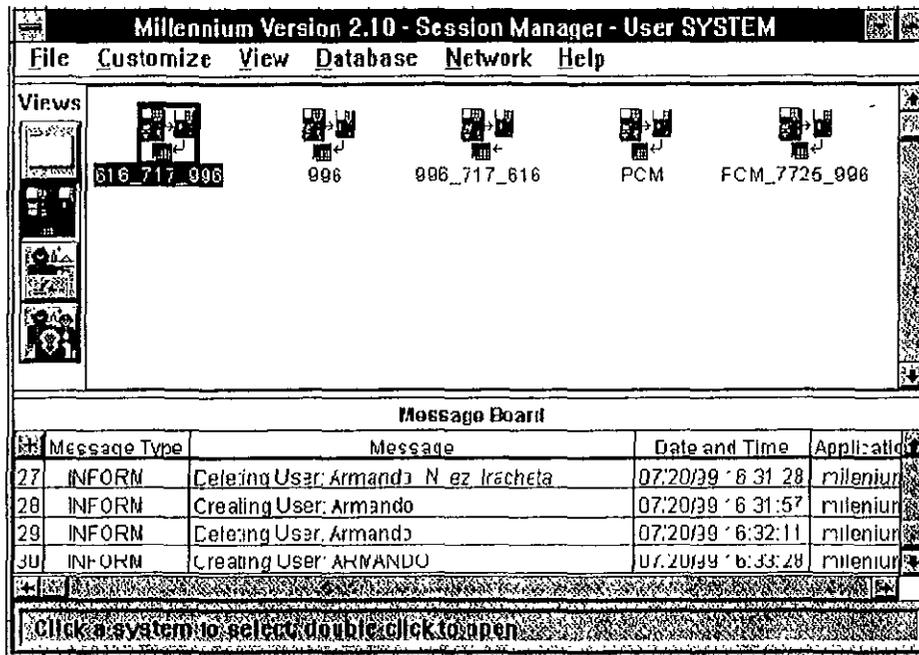


Figura 4.5. Sistemas cromatográficos de la ventana *Session Manager*

Usuarios "User Accounts view"

De un "click" en el icono *User Accounts view* para desplegar el sistema de usuarios (figura 4.6). La información que se muestra de cada usuario, esta definido por el sistema del software *Millennium*, éste considera al usuario y los privilegios de acceso a través de la caja de diálogo *Login* (figura 29)

Grupo de Usuarios "User Groups view"

De un "click" en el icono *User Groups view* para desplegar el sistema de grupo de usuarios (figura 4 7) Los grupos de usuarios representan a los miembros que tienen acceso a los mismos proyectos en el software *Millennium*. Puede crear grupos de usuarios a través de la caja de diálogo *User Group*.

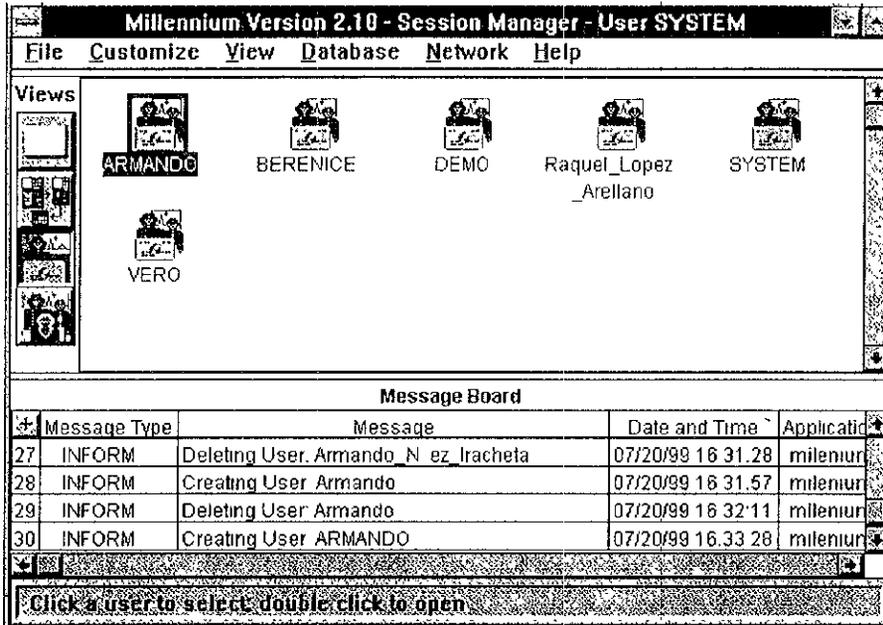


Figura 4.6. Usuarios de la ventana *Session Manager*

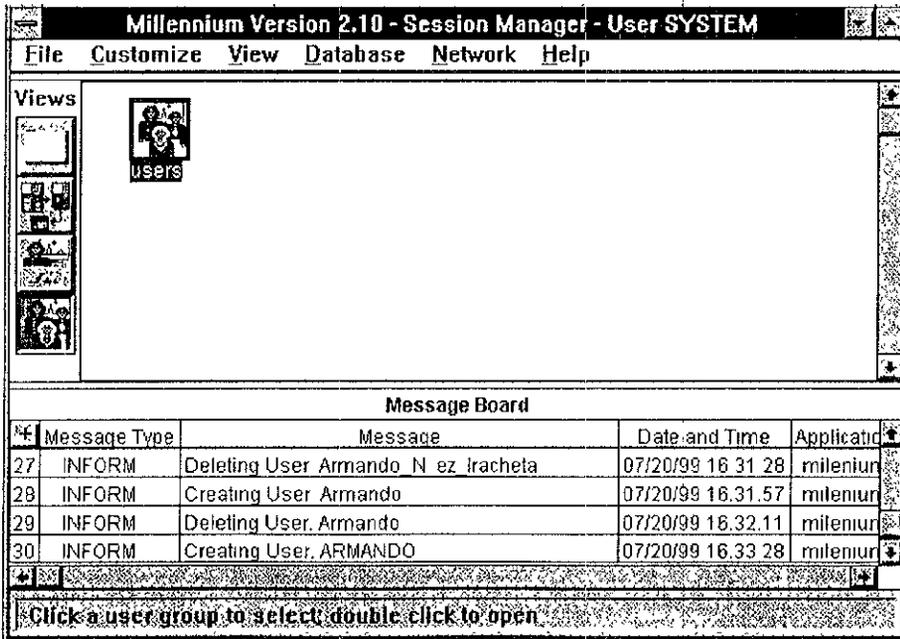


Figura 4.7. Grupo de usuarios de la ventana *Session Manager*

Descripción de la Tabla *Message Board* de la ventana *Session Manager*

La tabla *Message Board* consta de una área para 500 mensajes del sistema que son temporales (figura 4.8) Esta tabla despliega información, advertencias, y mensajes de error Todos los mensajes aparecen en la tabla *Message Board* en orden de ejecución y de forma cronometrada, con nuevos mensajes agregados al fondo de la tabla

Columnas de la tabla *Message Board*

Las columnas de la tabla *Message Board* incluyen:

Tipo de mensaje "Message Type". Identifica el tipo específico de mensaje desplegado.

Mensaje "Message". Despliega el texto del mensaje escrito que especifiques.

Fecha y Time "Date and Time" Despliega los formatos de la fecha mm/dd/yy o dd/mm/yy; despliega los formatos del tiempo hh:mm, hh:mm:ss, hh:mm am, o hh:mm:ss pm

Aplicación "Application" Despliega el nombre de la aplicación actual de *Millennium* que causó el mensaje

Usuario "User". Despliega el nombre del usuario actual

Proyecto "Project". Despliega el nombre del proyecto actual

Sistema "System" Despliega el nombre del sistema actual

Tipos de Mensajes

Los tipos del mensaje incluyen:

Errores "Errors". Indica las condiciones de error, como pureza del pico, comparación con la biblioteca espectral, etc

Advertencias "Warnings". Mantiene información como, no hay suficiente espacio en el disco actual Puede tomar acción correctiva considerando las advertencias

Errores irreparables "Irrecoverable Errors" Interfiere con el funcionamiento de la computadora y puede re iniciarla automáticamente.

Respaldo "Backup Log". Se genera durante un respaldo o durante la restauración de la información; útil para repasar e imprimir un respaldo y restaura la información

Adquisición "Acquisition Log". Se genera durante la adquisición, útil para repasar e imprimir la información de adquisición

Información "Information". Proporciona información general

Message Board						
#	Message Type	Message	Date and Time	Application	User	Proj
1	INFORM	Initializing Millennium Session	07/20/99 15:34:50	milennium	DEMO	MILLIF
2	INFORM	PDA option is enabled	07/20/99 15:34:50	milennium	DEMO	MILLIF
3	INFORM	GPC option is enabled	07/20/99 15:34:50	milennium	DEMO	MILLIF

click a project, select, double click to open

Figura 4.8. Tabla *Message Board* de la ventana *Session Manager*

Ventana *Project*

Si cuenta con un proyecto predefinido, la ventana *Project*, es la que aparece cuando accesa por primera vez a *Millennium* y la ventana *Session Manager* se minimiza automáticamente, desplegándose como un icono al fondo de la pantalla

Para acceder a la ventana *Project* (figura 4.9) desde la ventana *Session Manager*, puede hacerlo de dos formas:

- 1 De un doble "click" en el icono en forma de folder (*Project*)
- 2 De un "click" en el icono del proyecto, en la barra de menú seleccione *File, Open*

La ventana *Project* contiene las siguientes partes.

Barra de Menú (Menu Bar).

Incluye comandos que definen la operación seleccionada por el proyecto

Iconos de vista (View)

Controla el contenido del área de vista

Área de Vista (View Area).

Despliega información correspondiente al icono *view* seleccionado (ya sea en forma de tablas o de iconos)

Botón QuickStart

Permite al usuario (nuevo o experimentado) acceder al modo interactivo *QuickStart*, desde la ventana *Quick Set Control*.

Botón Selección de la Columna Oculta (Hidden Column Selection)

Accesa a la caja de diálogo *Hidden Column Selection*, le permite desplegar u oculta las columnas desplegadas en la tabla *View*

Herramientas (Tools)

Realiza una acción sobre un punto seleccionado en una vista

Filtros de Vista (View Filter)

Los filtros de vista limitan o seleccionan los tipos de datos desplegados por la categoría de vista

Ayuda Puntual (Prompt Help)

Despliega una línea de información sobre un punto específico dentro de la ventana

Descripción de la Barra de Menú de la Ventana *Project*

El menú *File* incluye los siguientes comandos:

New Sample Tray and Alter Sample Tray. Define las especificaciones del cajón de las muestras o modifica las especificaciones del cajón de las muestras

New XXX Method. Define las especificaciones de un nuevo método de instrumento, método de informe, método de procesamiento, conjunto de método, operación de procedimiento, método de exportación, o biblioteca espectral

Open: Abre una selección de puntos en la tabla *view* o en el área de vista (similar a hacer doble "click")

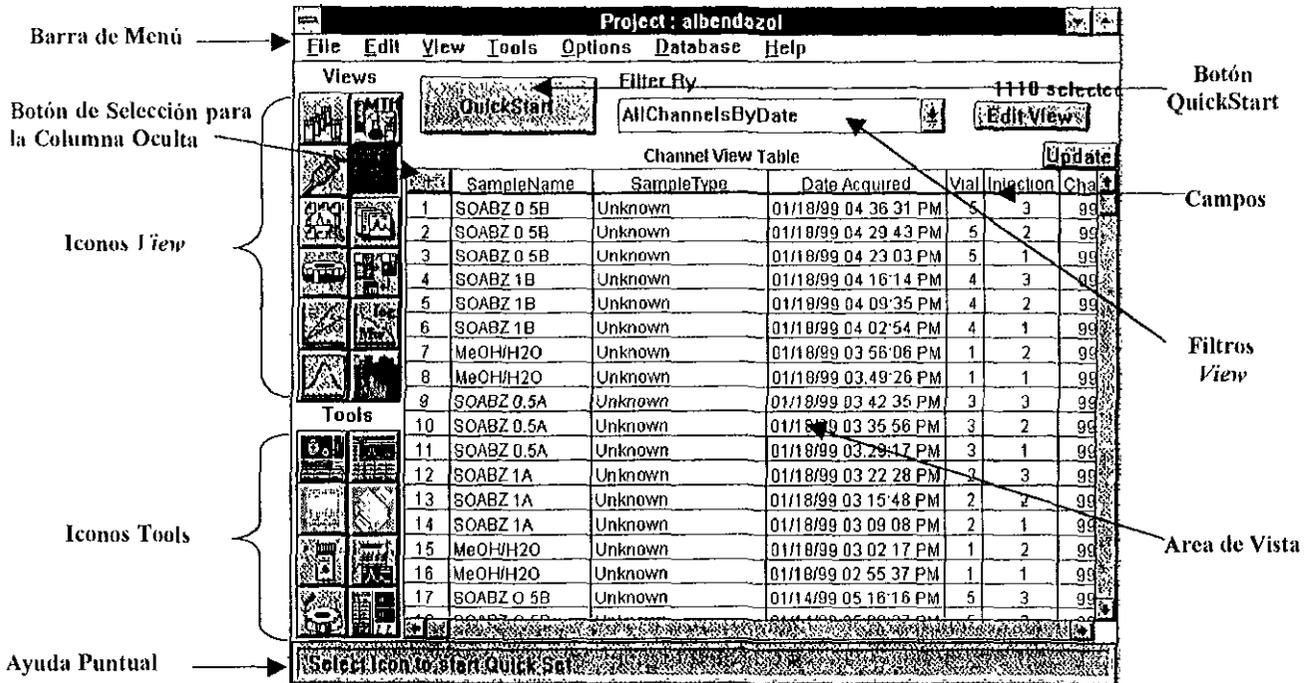


Figura 4.9. Partes de la Ventana Project.

Access: Permite restringir el acceso del usuario a métodos de procesamiento, métodos de instrumento, métodos de reporte, métodos de exportación, métodos fijos, y operación de procedimientos.

Print Table: Instrucciones de la impresora para imprimir la información dentro de los límites del área de vista.

Exit: Cierra la ventana Project y regresa a la ventana Session Manager

El menú **Edit** incluye los siguientes comandos:

Copy Graphics: Copia la información en pantalla de los gráficos a la ventana del portapapeles.

Copy Entire Table: Copia el contenido completo de la ventana del portapapeles o seleccione las filas desde la tabla de vista desplegada en la ventana Project

Copy Table With Headings: Copia el contenido completo de la ventana del portapapeles desde la tabla view desplegada en la ventana Project, incluyendo los títulos de la columna

Delete: Quita información seleccionada en la vista desde la base de datos (por ejemplo, un método o muestra fijo)

El menú **View** incluye los siguientes comandos:

Individual View Categories: Accede a una categoría view por medio del menú

Edit View Filter: Crea un nuevo filtro de vista o edita uno existente

Delete View Filter: Quita un filtro de vista existente desde la base de datos

El menú *Tools* incluye los siguientes comandos:

PDA/ MS Review: Accesa a la ventana *PDA Review* o a la ventana *MS Review* (dependiendo del tipo de datos seleccionados en el canal de la tabla de vista)

Review: Accesa a la ventana *Review*

Preview: Accesa a la ventana *Report Preview*

Print: Imprime directamente cualquier informe o datos que se encuentren en la ventana *Project*, o accesa a la caja de diálogo *Background Report Generator*

Alter Sample: Accesa a la ventana *Alter Sample*

Process: Accesa a la caja de diálogo *Process and Report Options*

Load Sample: Accesa a la ventana *Sample Loading*

Quick Set Control: Accesa a la ventana *Quick Set Control*

El menú *Options* incluye los siguientes comandos:

Edit Custom Field: Crea un campo de costumbre (identificaciones y base de datos de resultados)

Delete Custom Field: Quita campos de costumbre

Name Channel: Selecciona un canal (desde el visor *Channel*) y asigna un nombre específico a ese canal. Primeramente se use cuando se crea un canal derivado en un método fijo (para substraer la línea de base)

Delete Named Channel: Quita un nombre de canal existente

El menú *Database* incluye los siguientes comandos:

Copy to project: Transfiere la información del proyecto a otro proyecto dentro del *software Millennium*.

Copy to device: Transfiere la información del proyecto a otro dispositivo (disco, *floppy*, CD)

Copy from device: Recibe información del proyecto desde otro dispositivo (disco, *floppy*, CD)

Import Data: Recibe información cruda desde los *Softwares ExpertEase™ Maxima™ 820*, y *Waters 990/99*, o de bibliotecas dentro de la base de datos de *Millennium*

Export Data: Transmite los resultados de la base de datos de *Millennium* o resultados fijos como un archivo de datos ASCII o AIA.

Descripción de los Iconos *Views* de la ventana *Project*

El icono seleccionado define como aparecen los datos en la ventana *Project*. Use estos iconos para organizar datos del proyecto de manera diferente y útil, por ejemplo datos de la muestra, del canal, o del método.

Use los iconos de *view* que se encuentran en la parte superior izquierda de la ventana *Project* para acceder a las diferentes ventanas (figura 4 9)

Los iconos *view* de la ventana *Project* constan de dos partes:

Categorías *View*: Despliega los datos para:

- ◆ Conjunto de Muestras (*Sample Set*)
- ◆ Inyecciones (*Injections*)
- ◆ Canales (*Channels*)
- ◆ Métodos (*Methods*)
- ◆ Cajones (*Trays*)
- ◆ Conjunto de Resultados (*Results Sets*)
- ◆ Resultados (*Results*)
- ◆ Curvas de calibración (*Cal Curves*)
- ◆ Distribución de Peso Molecular (*Molecular Weight Distributions*)
- ◆ Sistemas (*Systems*)
- ◆ Biblioteca (*Libraries*)

Para acceder a la categoría *view* puede hacerlo presionando los iconos *View* (figura 4 10) o desde la barra de menú

Filtros *View*: Puede definir los filtros que limitan o seleccionan los tipos de datos desplegados para cada Categoría *View*

Puede acceder a los Filtros *View* desde la caja *Filter By* (figura 4 9).

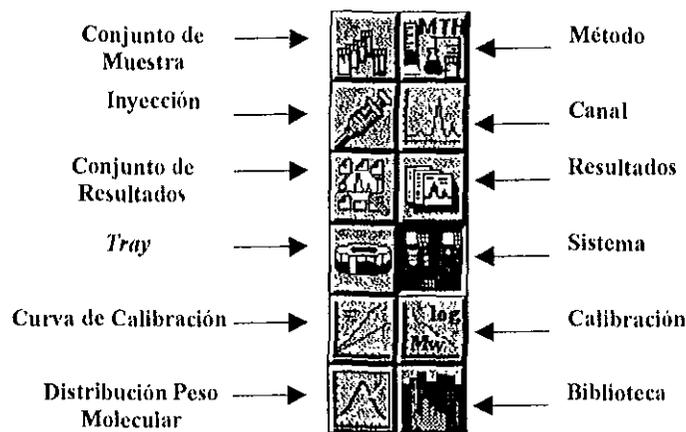


Figura 4.10. Iconos *views* de la ventana *Project*

Conjunto de Muestras " *Sample Set view* "

De un "click" en el icono *Sample Set view* para desplegar la tabla del conjunto de muestras. Esta tabla se despliega de acuerdo a la última selección realizada en la caja *Filter By* (figura 4 11)

De un doble "click" a una de las filas del conjunto de muestras que haya seleccionado para trabajar, inmediatamente aparece la tabla *Injection* (figura 4 12). Si desea salir de esta la tabla de un "click" en el icono *Sample Set*

Los campos que contiene la tabla *Sample Set View* son:

- Fecha
- Nombre del procedimiento de operación
- Nombre del Conjunto de Muestras
- Nombre del Sistema

	Set Name	Op Procedure	System	
1	MeOH_1_CH3CN_2_Triet_7_SymmCN	QuickSet	616_717_996	01/18/9
2	MeOH_1_CH3CN_2_Triet_7_SYMCN	QuickSet	616_717_996	01/14/9
3	MeOH_1_CH3CN_2_Triet_7_SymCN	QuickSet	616_717_996	12/10/9
4	MeOH_1_CH3CN_2_Triet_7_SymmPC	QuickSet	616_717_996	12/08/9
5	MeOH_1_CH3CN_2_Triet_7_SymmPC	QuickSet	616_717_996	12/08/9
6	MeOH_1_CH3CN_2_Triet_7_SymmC18	QuickSet	616_717_996	12/04/9
7	MeOH_1_CH3CN_2_Triet_7_SymmC18	QuickSet	616_717_996	12/04/9
8	MeOH_1_CH3CN_2_Triet_7_SymmC18	QuickSet	616_717_996	12/04/9
9	MeOH_1_CH3CN_2_Triet_7_SymmC18	QuickSet	616_717_996	12/04/9
10	Exact_Presic_Plasma_SymmC18	QuickSet	616_717_996	12/03/9
11	MeOH_1_CH3CN_2_Triet_7_SymmC18	QuickSet	616_717_996	11/30/9
12	MeOH_1_CH3CN_2_Triet_7_SymmC18	QuickSet	616_717_996	11/30/9
13	MeOH_1_CH3CN_2_Triet_7_SymmC18	QuickSet	616_717_996	11/30/9
14	MeOH_1_CH3CN_2_Triet_7_SymmC18	QuickSet	616_717_996	11/30/9
15	MeOH_1_CH3CN_2_Triet_7_SymmC18	QuickSet	616_717_996	11/30/9
16	MeOH_1_CH3CN_2_Triet_7_Symmet	QuickSet	616_717_996	11/27/9
17	MeOH_1_CH3CN_2_Triet_7_Symmet	QuickSet	616_717_996	11/27/9

Figura 4.11. Tabla *Sample Set view*

Inyecciones " *Injections view* "

De un "click" en el icono *Injection view* para desplegar la tabla de inyecciones. Cada una de las inyecciones mostradas en la lista, representan un proceso, adquisición de datos crudos (cromatogramas sin integrar, sin derivar, etc) incluyendo todos los canales desde una sola inyección. La tabla *Inject View* se despliega de acuerdo a la última selección realizada en la caja *Filter By* (figura 4 12).

De un doble "click" a la fila donde se encuentra la inyección que va analizar, e inmediatamente accesa a la tabla *Channel* (figura 4 13). Si desea salir de esta tabla, de un "click" en el icono *Injection*.

Los campos que contiene la tabla *Injection View* son:

- Identificaciones de la muestra
- Fecha
- Fecha de adquisición
- Dilución
- Inyección
- Nivel
- Procedimiento de Operación

- Nombre de la muestra
- Tipo de muestra
- Peso de la muestra
- Nombre del conjunto
- Sistema
- Número de vial
- Volumen (inyección)

Project : albandazol

File Edit View Tools Options Database Help

Views Filter By AllInjectionsByDate 1110 selected

Injection View Table

	SampleName	SampleType	Date Acquired	Vial	Injection
1	SOABZ 0 5B	Unknown	01/18/99 04 36 31 PM	5	3
2	SOABZ 0 5B	Unknown	01/18/99 04 29 43 PM	5	2
3	SOABZ 0 5B	Unknown	01/18/99 04 23 03 PM	5	1
4	SOABZ 1B	Unknown	01/18/99 04 16 14 PM	4	3
5	SOABZ 1B	Unknown	01/18/99 04 09 35 PM	4	2
6	SOABZ 1B	Unknown	01/18/99 04 02 54 PM	4	1
7	MeOH/H2O	Unknown	01/18/99 03 56 06 PM	1	2
8	MeOH/H2O	Unknown	01/18/99 03 49 26 PM	1	1
9	SOABZ 0.5A	Unknown	01/18/99 03 42 35 PM	3	3
10	SOABZ 0.5A	Unknown	01/18/99 03 35 56 PM	3	2
11	SOABZ 0.5A	Unknown	01/18/99 03 29 17 PM	3	1
12	SOABZ 1A	Unknown	01/18/99 03 22 28 PM	2	3
13	SOABZ 1A	Unknown	01/18/99 03 15 48 PM	2	2
14	SOABZ 1A	Unknown	01/18/99 03 09 08 PM	2	1
15	MeOH/H2O	Unknown	01/18/99 03 02 17 PM	1	2
16	MeOH/H2O	Unknown	01/18/99 02 55 37 PM	1	1
17	SOABZ 0 5B	Unknown	01/14/99 05 16 16 PM	5	3

Select icon to display Injections

Figura 4.12. Tabla *Inject view*

Canales "*Channel view*"

De un "click" en el icono *Channel view* para desplegar la tabla de información de los canales. Cada canal representa un proceso, adquisición de datos crudos. La tabla *Channel View* se despliega de acuerdo a la última selección realizada en la caja *Filter By* (figura 4.13)

De un doble "click" a la fila de la tabla *Channel* que desea analizar, inmediatamente accesa a la ventana *Review Data* (figura 4.21), con los datos procesados, se despliegan los cromatogramas. Para salir de ésta ventana y regresar a la tabla *Channel*, en la barra de menú seleccione *File, Exit*

Los campos que contiene la tabla *Channel View* son:

- Identificaciones de la muestra
- Adquisición del *Método Set*
- Adquirido por
- Canal
- Tipo de cromatograma (2D o 3D)
- Salida de datos
- Fecha de adquisición
- Unidades del detector
- Descripción

- Dilución
- Inyección
- Nivel
- Procedimiento de Operación
- Tiempo de corrida
- Nombre de la muestra
- Tipo de muestra
- Peso de la muestra
- Proporción de muestreo
- Fecha del conjunto
- Nombre del conjunto
- Sistema
- Unidad
- Número de vial
- Volumen (inyección)

Project: alhendazol

File Edit View Tools Options Database Help

Views Filter By 1110 selected
AllChannelsByDate

Channel View Table

	SampleName	SampleType	Date Acquired	Vial	Injection	Cha
1	SOABZ 0 5B	Unknown	01/18/99 04:36:31 PM	5	3	99
2	SOABZ 0 5B	Unknown	01/18/99 04:29:43 PM	5	2	99
3	SOABZ 0.5B	Unknown	01/18/99 04:23:03 PM	5	1	99
4	SOABZ 1B	Unknown	01/18/99 04:16:14 PM	4	3	99
5	SOABZ 1B	Unknown	01/18/99 04:09:35 PM	4	2	99
6	SOABZ 1B	Unknown	01/18/99 04:02:54 PM	4	1	99
7	MeOH/H2O	Unknown	01/18/99 03:56:06 PM	1	2	99
8	MeOH/H2O	Unknown	01/18/99 03:49:26 PM	1	1	99
9	SOABZ 0 5A	Unknown	01/18/99 03:42:35 PM	3	3	99
10	SOABZ 0 5A	Unknown	01/18/99 03:35:56 PM	3	2	99
11	SOABZ 0 5A	Unknown	01/18/99 03:29:17 PM	3	1	99
12	SOABZ 1A	Unknown	01/18/99 03:22:28 PM	2	3	99
13	SOABZ 1A	Unknown	01/18/99 03:15:48 PM	2	2	99
14	SOABZ 1A	Unknown	01/18/99 03:09:08 PM	2	1	99
15	MeOH/H2O	Unknown	01/18/99 03:02:17 PM	1	2	99
16	MeOH/H2O	Unknown	01/18/99 02:55:37 PM	1	1	99
17	SOABZ 0.5B	Unknown	01/14/99 05:16:16 PM	5	3	99
18	SOABZ 0.5B	Unknown	01/14/99 05:09:33 PM	5	2	99

Select icon to start Quick Set

Figura 4.13. Tabla Channel view

Método "Method view"

De un "click" en el icono *Method view* para desplegar los métodos instrumentales disponibles, métodos de procesamiento, métodos de reporte, procedimientos de operación y conjunto de métodos. Puede desplegar los métodos en forma de iconos o de tabla (figura 4 14)

Use el icono *Method* para acceder o crear un.

- Método
- Conjunto de método
- Procedimiento de operación

De un doble "click" en el icono del método que haya seleccionado para acceder a la información. Para salir de ésta ventana y regresar a la ventana *Method*, en la barra de menú seleccione *File, Exit*.

Los campos que contiene la tabla *Method View* (si selecciona fecha o tipo en la caja *Filter By*) son:

- Nombre
- Fecha
- Tipo de método
- Acceso
- Modificado por el usuario
- Bloqueado por el usuario

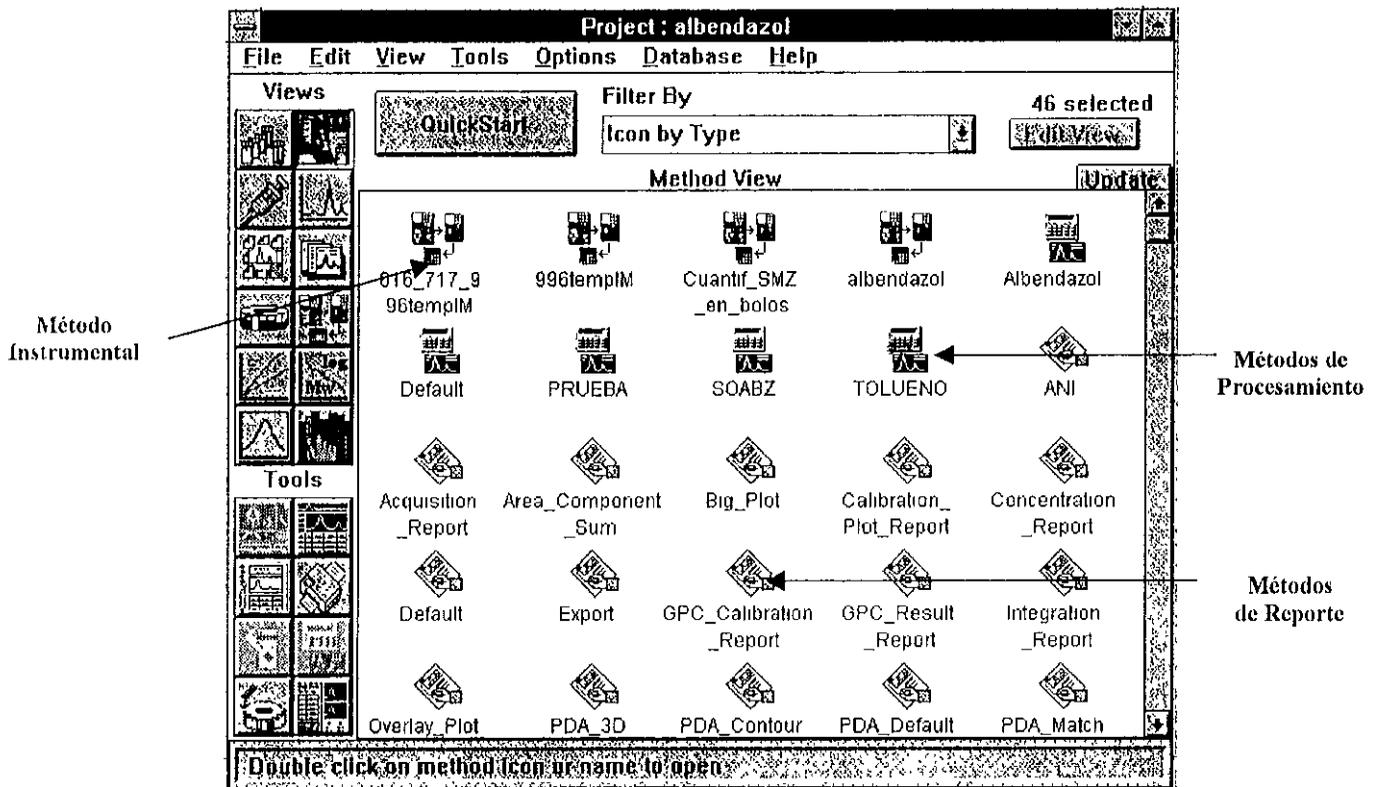


Figura 4.14. Ventana *Method view* (desplegado como iconos)

Cajón " *Tray view* "

De un "click" en el icono *Tray view* para desplegar los nombre de los cajones de las muestras. Cada nombre representa las muestras utilizadas para realizar la carga y crear conjuntos. Puede desplegar los cajones en forma de iconos o de tabla (figura 4 15)

Use el icono *Tray* para crear un nuevo cajón de muestra, modificar uno ya existente o acceder a la ventana *Sample Loading* (figura 4 26) Inmediatamente se despliegan los iconos después de crear y salvar un nuevo cajón de muestra

De un doble "click" al icono *Tray* para acceder a la ventana *Sample Loading*, para salir de esta ventana y regresar a la vista *Tray*, en la barra de menú seleccione *File, Exit*

Los campos que contiene la tabla *Tray View* (si selecciona fecha o tipo en la caja *Filter By*) son:

- Nombre
- Fecha

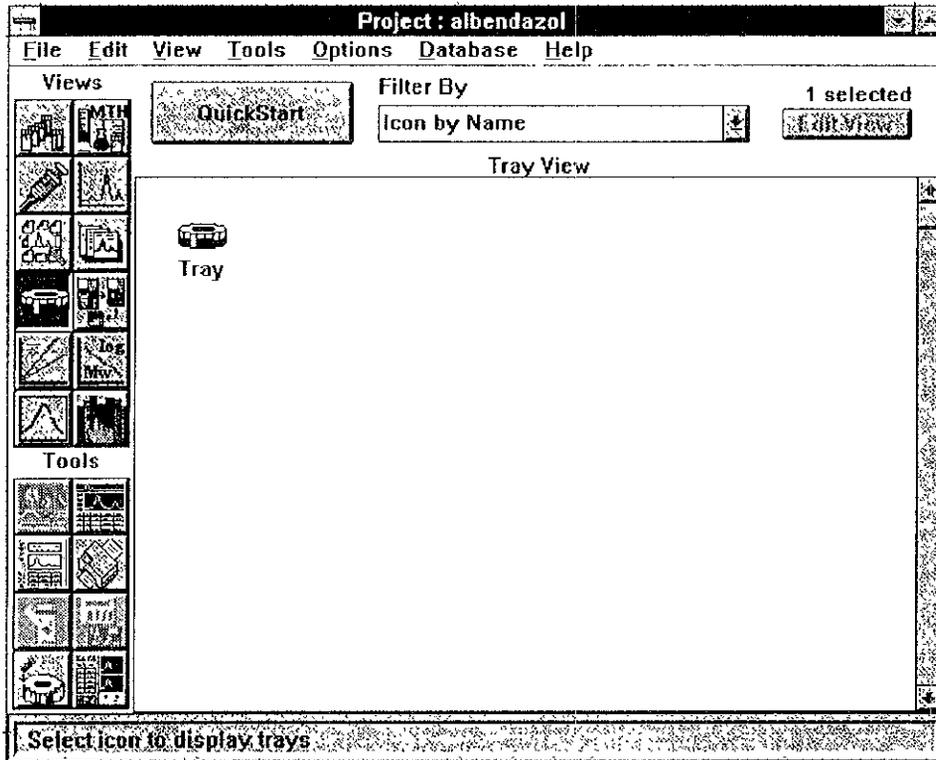


Figura 4.15. Ventana *Tray view* (desplegado como iconos)

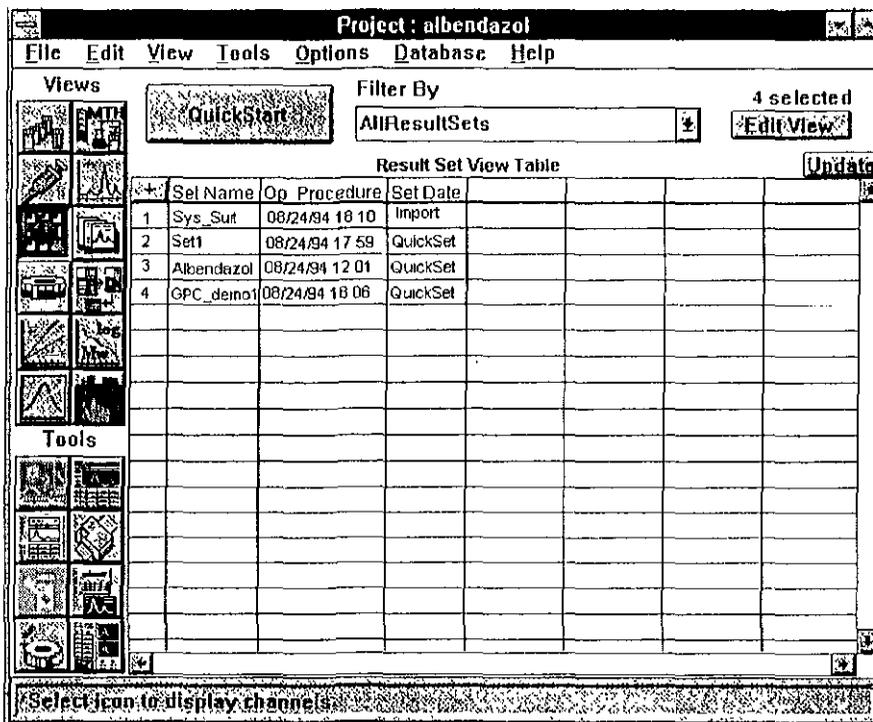
Conjunto de Resultados " *Result Set view* "

De un "click" en el icono *Result Set view* para desplegar la tabla del conjunto de resultados. A cada conjunto se le asigna un nombre que representa los resultados generados en el conjunto de muestras procesadas. La tabla *Result Set View* se despliega de acuerdo a la última selección realizada en la caja *Filter By* (figura 4 16)

De un doble "click" a una de las líneas de la tabla *Result Set view* para acceder a la vista *Result* (figura 4 17) Para salir de ésta tabla, de un "click" al icono *Result Set view*

Los campos que contiene la tabla *Result Set View* comprenden

- Fecha de procesamiento
- Nombre del procedimiento de operación
- Nombre del conjunto de muestras

Figura 4.16. Tabla *Result Set View*

Resultados "Result view"

De un "click" en el icono *Result view* para desplegar la tabla de resultados procesados. Cada resultado generado representa un proceso de datos crudos desde un canal de datos "Channel". La tabla de columnas *Result View* se despliega de acuerdo a la última selección realizada en la caja *Filter By* (figura 4.17).

De un doble "click" a la línea de la tabla *Result view* para desplegar el proceso de datos, inmediatamente accesa a la ventana *Review Data* (figura 4.21). Para salir de ésta ventana, en la barra de menú seleccione *File, Exit*.

Los campos que contiene la tabla *Result View* son:

- Identificaciones de la muestra
- Adquirido por
- Adquisición del *Método Set*
- Canal
- Descripción del canal
- Nombre del canal
- Tipo de cromatograma (2D o 3D)
- Salida de datos
- Fecha de adquisición
- Fecha de procesamiento
- Descripción
- Unidades del detector
- Dilución
- Defecto
- Inyección

- Nivel
- Manual
- Procedimiento de Operación
- Porcentaje desconocido
- Método de procesamiento
- Resultados
- Tipo de resultado
- Tiempo de corrida
- Nombre de la muestra
- Tipo de muestra
- Peso de la muestra
- Proporción de muestreo
- Fecha del conjunto
- Nombre del conjunto
- Señal de fecha *Off*
- Señal de usuario *Off*
- Canal de origen
- Sistema
- Area total
- Número de vial
- Volumen (inyección)

Project: albandazol

File Edit View Tools Options Database Help

Views **QuickStart** Filter By AllResults 222 selected Edit View

Result View Table Update

SampleName	SampleType	Faults	Vial	Injection	Channel Name	
1 SOABZ 0.5B	Unknown	No	5	3	223	01/1
2 SOABZ 0.5B	Unknown	No	5	2	223	01/1
3 SOABZ 1B	Unknown	No	4	3	223	01/1
4 SOABZ 0.5B	Unknown	No	5	1	223	01/1
5 SOABZ 1B	Unknown	No	4	2	223	01/1
6 SOABZ 1B	Unknown	No	4	1	223	01/1
7 SOABZ 0.5A	Unknown	No	3	3	223	01/1
8 SOABZ 0.5A	Unknown	No	3	2	223	01/1
9 SOABZ 0.5A	Unknown	No	3	1	223	01/1
10 SOABZ 1A	Unknown	No	2	3	223	01/1
11 SOABZ 1A	Unknown	No	2	2	223	01/1
12 SOABZ 1A	Unknown	No	2	1	223	01/1
13 SOABZ 0.5A	Unknown	No	3	1	223	01/1
14 SOABZ 0.5B	Unknown	No	5	2	223	01/1
15 SOABZ 0.5B	Unknown	No	5	3	223	01/1
16 SOABZ 0.5B	Unknown	No	5	3	223	01/1
17 SOABZ 0.5B	Unknown	No	5	2	223	01/1

Select icon to display results

Figura 4.17. Tabla Result View

Curvas de Calibración "*Calibration Curves view*"

De un "click" en el icono *Calibration Curves view* para desplegar la tabla de las curvas de calibración generadas. Cada curva de calibración representa una curva generada para un componente específico. La tabla *Calibration Curves view* se despliega de acuerdo a la última selección realizada en la caja *Filter By* (figura 4.18).

De un doble "click" a la línea de la tabla *Calibration Curves view* para acceder a la ventana *Compare Calibration Curve* (figura 4.) y comparar la curva de calibración desplegada. Para salir de ésta ventana, en la barra de menú seleccione *File, Exit*

Los campos que contiene la tabla *Calibration Curves view* son:

- A, B, C, D, E, F (coeficientes de calibración)
- Canal
- Fecha
- Nombre
- Orden
- Método de proceso
- R
- R²
- Tiempo de retención
- Error de estándar
- Sistema
- Tipo

	Name	Processing Method	System	Channel	Date	Type
1	Peak 1	Default	Satin2			
2	Peak 2	Default	Satin2			
3	Peak 3	Default	Satin2			
4	Peak 4	Default	Satin2			
5	Uracil	Albendazol	bench-2			
6	Ethyl	Albendazol	bench-2			
7	Propyl	Albendazol	bench-2			
8	4C6A	HCT	NoSyst			
9	246TA	HCT	NoSyst			
10	TAT	HCT	NoSyst			
11	HCT	HCT	NoSyst			
12	Peak1	Satin2Chan	Satin2			
13	Peak2	Satin2Chan	Satin2			
14	Peak3					

Figura 4.18. Tabla *Calibration Curve View*

Sistema "System view"

De un "click" en el icono *System view* para desplegar los sistemas cromatográficos. Cada icono del sistema se le asigna un nombre que representa al sistema cromatográfico creado en la ventana *Configure System*.

Puede desplegar los sistemas en forma de iconos (usando la caja *Filter By*) (figura 4 19)

De un doble "click" al icono del sistema para desplegar la ventana *Quick Set Control* (figura 4 27). Para salir de ésta ventana, en la barra de menú seleccione *File, Exit*.

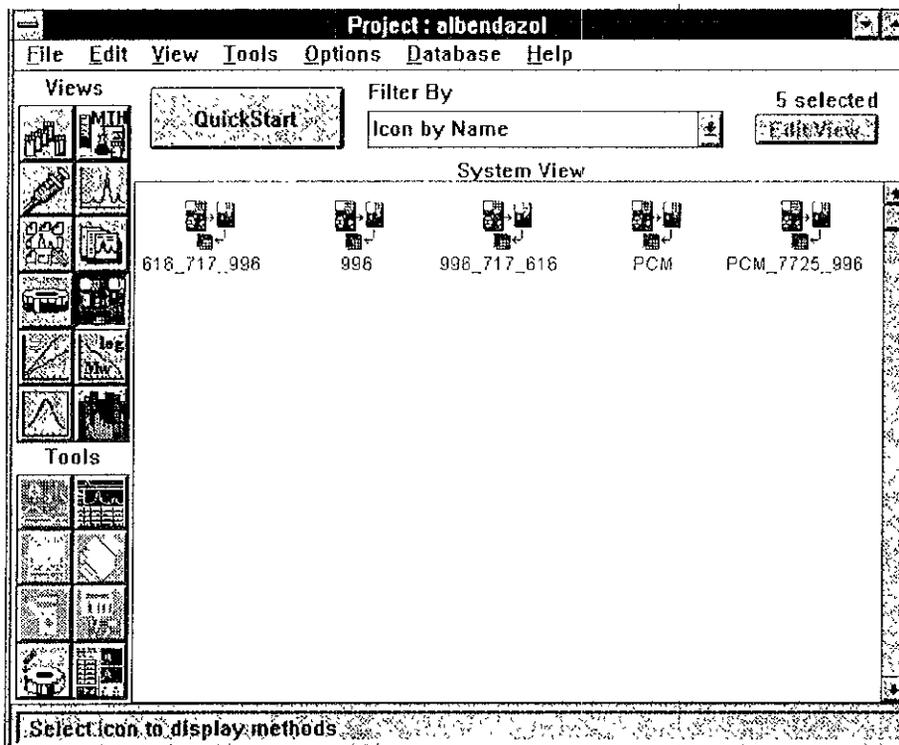


Figura 4.19. Tabla *System View* (desplegado como iconos)

Descripción de los Iconos *Tools* de la Ventana *Project*

Los iconos *Tools* se encuentran en la parte inferior izquierda de la ventana *Project* (figura 4 4). La figura 4 20 muestra los iconos *Tools* y las ventanas de acceso de operación al software *Millennium*.

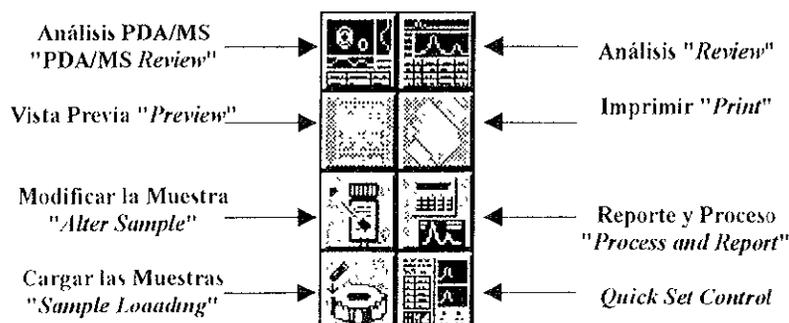


Figura 4 20. Herramientas "Tools"

Análisis "Review tools"

El ícono *Review* accesa a la ventana que lleva el mismo nombre (figura 4.21) Use ésta ventana para realizar el procesamiento, análisis de adquisición de datos y para:

- Ver cromatogramas que fueron colectados o son colectados en la ventana *Quick Set Control*.
- Ver interactivamente y desarrollar un método de procesamiento de datos (integrar, calibrar y cuantificar)
- Definir los parámetros de calibración
- Ver los datos de los resultados
- Ver y comparar múltiples cromatogramas
- Ver y comparar múltiples curvas de calibración
- Editar conjunto de métodos

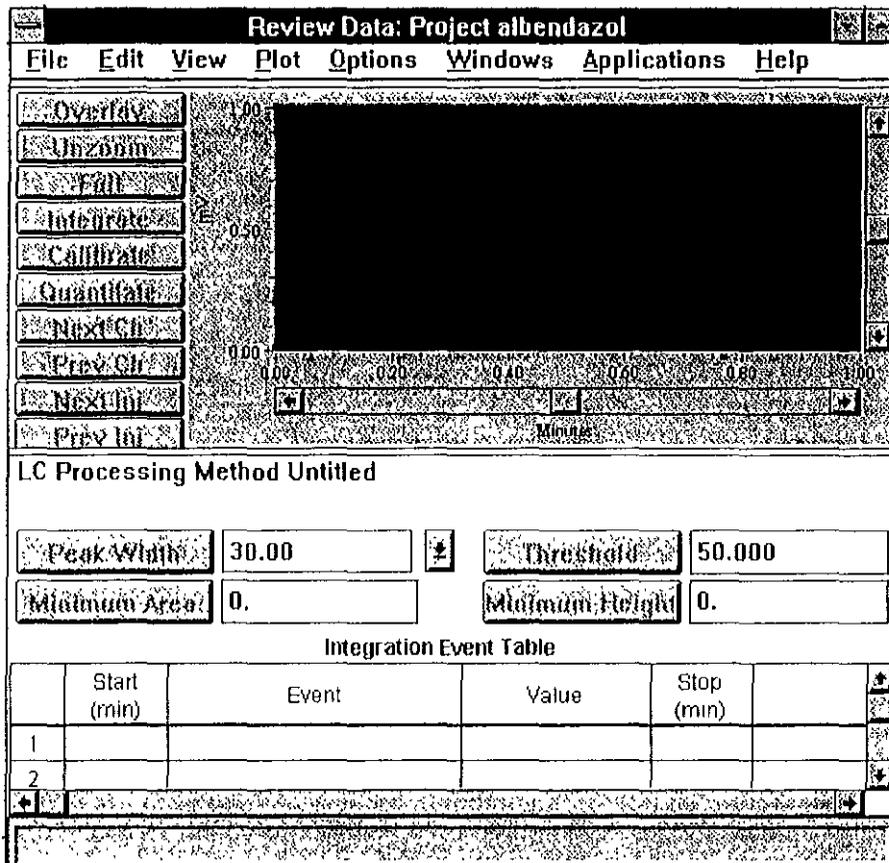


Figura 4.21. Ventana *Review*

Vista Previa "Preview tool"

El icono *Preview* accesa a la ventana *Report Preview* (figura 4.22) Use ésta ventana para:

- Examinar los reportes para seleccionar el procesamiento de resultados, conjunto de resultados, o curvas de calibración antes de imprimir
- Examinar los contenidos del método de procedimiento, método instrumental, conjunto de método, procedimiento de operación antes de imprimir
- Instruir a la impresora que imprima el reporte en curso
- Modificar simultáneamente el método de reporte para el o los resultados y observar los cambios en el reporte final

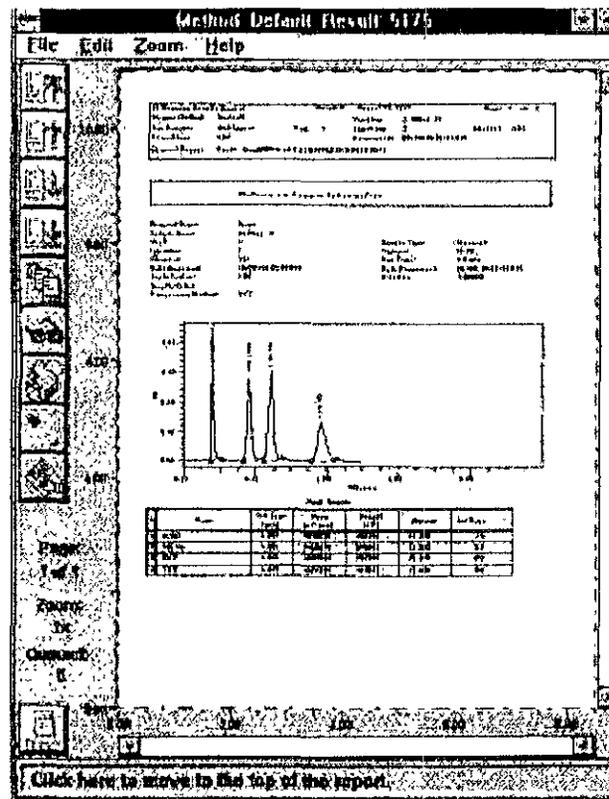


Figura 4.22 Ventana *Report Preview*

Imprimir "Print tool"

Use el icono *Print* para imprimir reportes o seleccionar datos de la ventana *Project*. Puede seleccionar e imprimir:

- Procesamiento de datos, conjunto de resultados o curvas de calibración
- Método de procedimiento, método instrumental, conjunto de método, procedimiento de operación

Para resultados o conjunto de resultados, la herramienta *Print* accesa a la caja de diálogo *Background Report Generator* (figura 4.23)

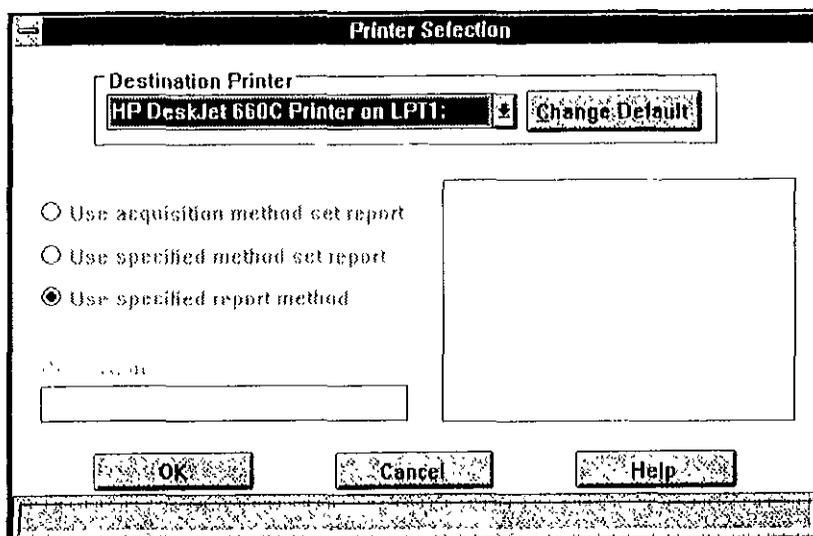


Figura 4.23. Caja de diálogo *Background Report Generator*

Modificar la Muestra "Alter Sample tool"

El icono *Alter Sample* accesa a la ventana que lleva el mismo nombre (figura 2.24), use ésta ventana para modificar la adquisición de muestras, canales o inyecciones, para corregir errores o identificar muestras ejecutadas durante la carga de muestras

Alter Sample Table							Amounts
Vial	SampleType	SampleName	Level	SampleWeight	Dilution		
1	Standard	Std5	1	1.00000	1.00000		
2	Standard	Std25	1	1.00000	1.00000		
3	Standard	Std50	1	1.00000	1.00000		
4	Unknown	Sample1		1.00000	1.00000		
5	Unknown	Sample2		1.00000	1.00000		
6	Unknown	Sample3		1.00000	1.00000		
7							
8							

Figura 4.24. Ventana *Alter Sample*

Reporte y Proceso "Process and Report"

El icono *Process and Report* accesa a la caja de diálogo *Process and Report Options* (figura 4 25) Use ésta caja de diálogo para

- Seleccionar la adquisición de datos procesados (o procesar datos que quiera reprocesar)
- Procesar datos seleccionados que usan un conjunto de método específico o un método de proceso
- Imprimir uno o más informes procesados de forma completa
- Exportar resultados o conjunto de resultados como archivos ASCII o AIA

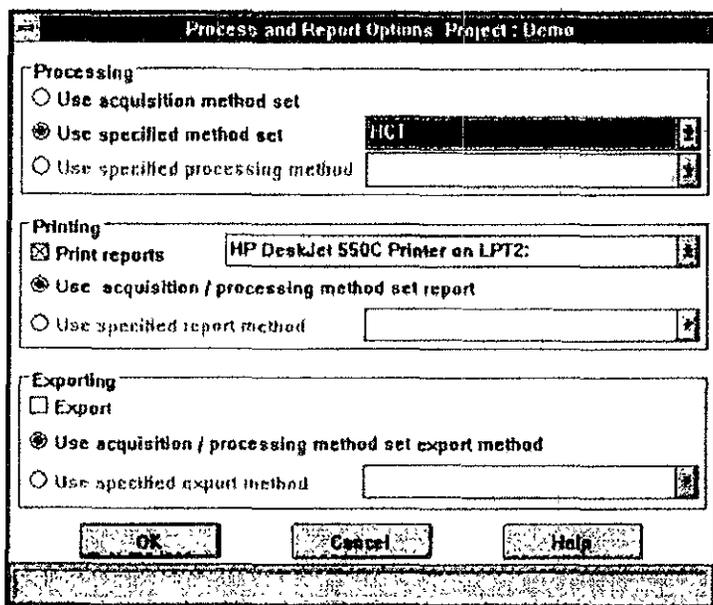
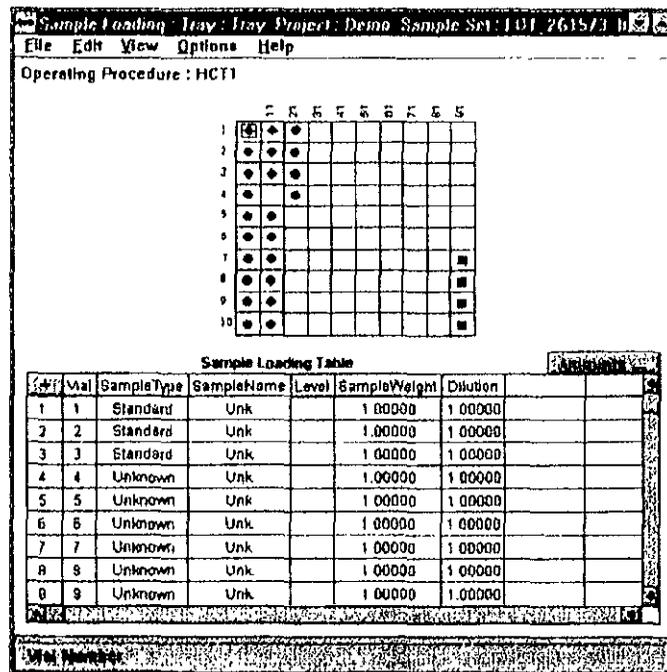


Figura 4.25. Caja de diálogo *Process and Report Options*

Cargar las Muestras "Sample Loading tool"

El icono *Sample Loading* accesa a la ventana que lleva el mismo nombre (figura 4 26) Esta ventana une la carga de la muestra/estándar en un cajón de muestra en el proceso de operación. Use la ventana *Sample Loading* para:

- Cargar un cajón al proceso de operación para definir un conjunto de muestra
- Modificar el contenido del conjunto de muestra
- Salvar la información como un conjunto demuestra

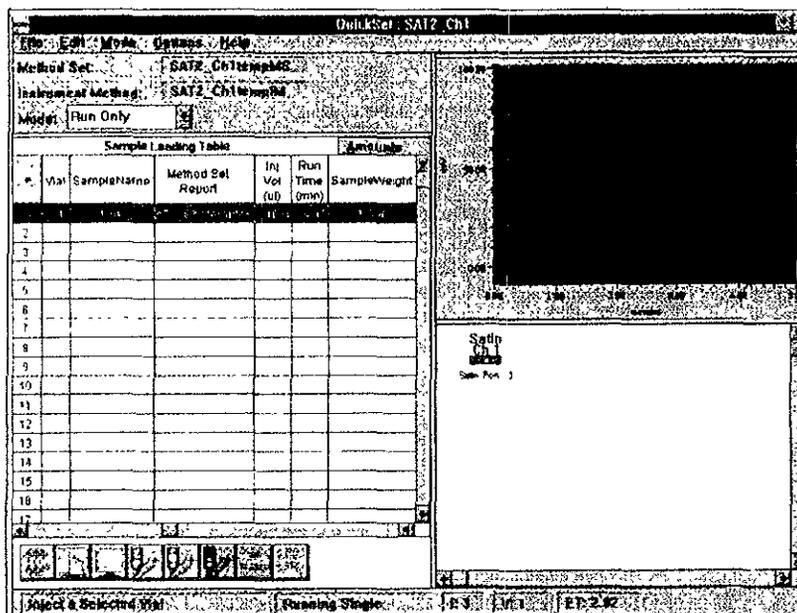
Figura 4.26. Ventana *Sample Loading*

Quick Set Control tool

El icono *Quick Set Control* accede a la ventana que lleva el mismo nombre (figura 4.27). Esta ventana proporciona un completo control sobre todo el instrumento dentro del sistema cromatográfico. Use la ventana *Quick Set Control* para:

- Adquirir datos de forma interactiva
- Crear, salvar, cargar y correr conjuntos de muestras directamente desde la ventana *Quick Set Control*
- Utilizar el modo *QuickStart* interactivamente a través del desarrollo del proceso de métodos para una sola inyección estándar
- Especificar diferentes modos de adquisición
- Modificar instrumentos incluyendo un conjunto de métodos específicos (partes del conjunto del método instrumental)
- Definir el contenido de la tabla *Sample Loading* para correr la información específica de forma interactiva
- Definir el contenido de la tabla *Component Loading* para correr la información específica de forma interactiva
- Transmitir los parámetros de control y regular los instrumentos de operación
- Monitorear el estado de equilibrio del instrumento o la adquisición de datos
- Especificar el control interactivo (para inyecciones únicas o conjunto de muestras), permite cambiar los parámetros de operación de la bomba durante la adquisición

- Especificar el sistema de conformidad "System suitability" usado durante la adquisición y procesamiento de datos

Figura 4.27. Ventana *Quick Set Control*

4.2 MANEJO DEL SOFTWARE MILLENNIUM 2010

4.2.1 ENCENDIDO DEL SOFTWARE *MILLENNIUM*

Encienda todos los instrumentos que estén conectados a *Millennium* Cuando éstos hayan terminado de correr las rutinas de calibración y diagnóstico, encienda la computadora.

En la ventana de *Millennium* da un doble "click" en el icono *Session Manager* (figura 4 28). El *software* empezará a comunicarse con el sistema CL 616, con el o los detectores y con el automuestreador

Al terminar aparecerá la ventana *Login Dialog Box* (figura 4 29) en la cual debe escribir un nombre de usuario "User Name", el cual puede ser *SYSTEM* y su contraseña la cual puede ser *MANAGER*, (el nombre de usuario y la contraseña son asignados por el encargado) inmediatamente presione el botón *Login* para poder acceder al *software Millennium 2010*.

Una de las siguientes ventanas que aparecen al presionar el botón *Login* (dependen de como están registradas el nombre de usuario y la contraseña en el sistema):

- Ventana *Session Manager* (figura 4 1)
- Ventana *Project* (figura 4 4) aparece cuando ya se tiene un proyecto específico por el usuario
- Ventana *Quick Set Control* (figura 4 27) aparece cuando se tienen un proyecto y un sistema específico por el usuario

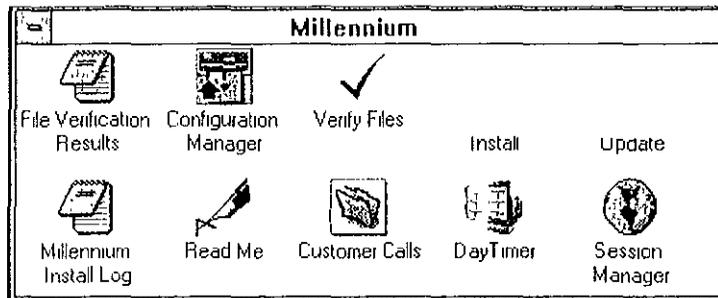


Figura 4.28. Iconos de la ventana *Millennium*

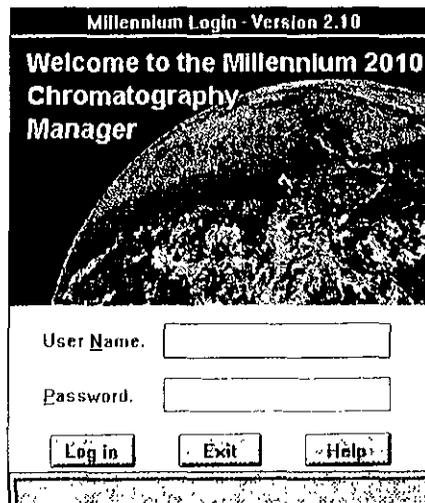


Figura 4.29. Ventana *Login Dialog Box*

4.2.2 CONFIGURAR EL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

El software *Millennium* le permite usar varios instrumentos cromatográficos juntos (tal como bomba, detector y automuestreador) Este grupo de instrumentos se configuran desde la ventana *Configure System* (figura 4 30)

Configurar un nuevo sistema cromatográfico involucra

- Accesar a la ventana *Configure System*
- Reconocer la serie de los instrumentos (bomba, detector, automuestreador)
- Agregar instrumentos al sistema
- Registrar el instrumento
- Salvar un sistema cromatográfico nuevo o uno ya existente

Antes de configurar un nuevo sistema cromatográfico, asegúrese de llevar a cabo lo siguiente.

- Destinar adecuadamente los instrumentos cromatográficos a la tarjeta *Bus LAC/E*
- Identificar todos los instrumentos cromatográficos destinados a la interface IEEE-488
- Inicialmente identificar la serie de instrumentos (conectados a la tarjeta *BUS LAC/E*) usando la caja de diálogo *Configure Bus LAC/E Serial Ports* (figura 4 31)
- Enciende todos los instrumentos Asegúrese que los instrumentos hayan completado las rutinas de calibración y diagnóstico Los instrumentos tienen que estar encendidos para desplegarse en la ventana *Configure System* como instrumentos disponibles.

Para configurar un nuevo sistema cromatográfico o uno ya existente, de un "click" en el icono *system* de la ventana *Session Manager* para desplegar los sistemas cromatográficos Si quiere crear uno nuevo, seleccione en la barra de menú *File, New*, se despliega el siguiente mensaje

Scanning for active devices. Please stand by. Inmediatamente aparece la ventana *Configure System* (figura 4 30)

Si quiere configurar un sistema cromatográfico ya existente de un doble "click" en el icono del sistema que vaya a modificar o seleccione en la barra de menú *File, Open*, aparecerá la ventana *Configure System* Esta ventana está dividida en dos paneles:

Instrumento disponible "*Available Instrument*" Despliega los iconos representando los instrumentos Waters IEEE-488 e instrumentos de la serie de interface

Nombre del Sistema "*System Name*" Despliega los instrumentos actualmente configurada como parte del sistema (este panel esta blanco cuando se configura un nuevo sistema)

El siguiente procedimiento es idéntico para ambos tipos de configuración

De un "click" en el botón *Add* para agregar un instrumento al sistema cromatográfico Si es necesario, en la barra de menú seleccione *Instrument, Configure LAC/E Serial Ports* para agregar la serie del instrumento al sistema Inmediatamente aparece la caja de diálogo *Configure LAC/E Serial Ports* (figura 4 31) Especifique la serie del instrumento y después presione *OK*

En la parte superior izquierda de la ventana *Configure System* de un doble "click" a cada icono del instrumento que desea agregar, y presione el botón *Add* El icono del instrumento seleccionado aparece en el panel derecho Para remover un instrumento desde el sistema, de un "click" en el icono del instrumento apropiado del panel derecho, después presione el botón *Remove* El icono del instrumento desaparece del panel derecho

Para registrar un instrumento, de un "click" al icono del instrumento del panel derecho de la ventana *Session Manager*, y en la barra de menú seleccione *Instrument, Register*, inmediatamente aparece la caja de diálogo *Register* (figura 4.32) Registre la información requerida para cada instrumento (número de serie, fecha del último mantenimiento, próxima fecha de mantenimiento y comentarios), y presione *OK*

Para salvar el nuevo sistema cromatográfico, en la barra de menú selección *File, Save As*, aparece la caja de diálogo *System Save As* (figura 4.33) y registre el nombre del nuevo sistema, presione *OK*. Para salir de la ventana seleccione *File, Exit* e inmediatamente regresará a la ventana *Session Manager* en la cual aparece el nuevo sistema cromatográfico en forma de icono.

Para salvar un sistema cromatográfico ya existente, en la barra de menú, seleccione *File, Save*, automáticamente salva los cambios realizados en el sistema cromatográfico, pero si quiere salvarlo con otro nombre seleccione *File, Save As*, registre el nombre del sistema, para salir seleccione *File, Exit*

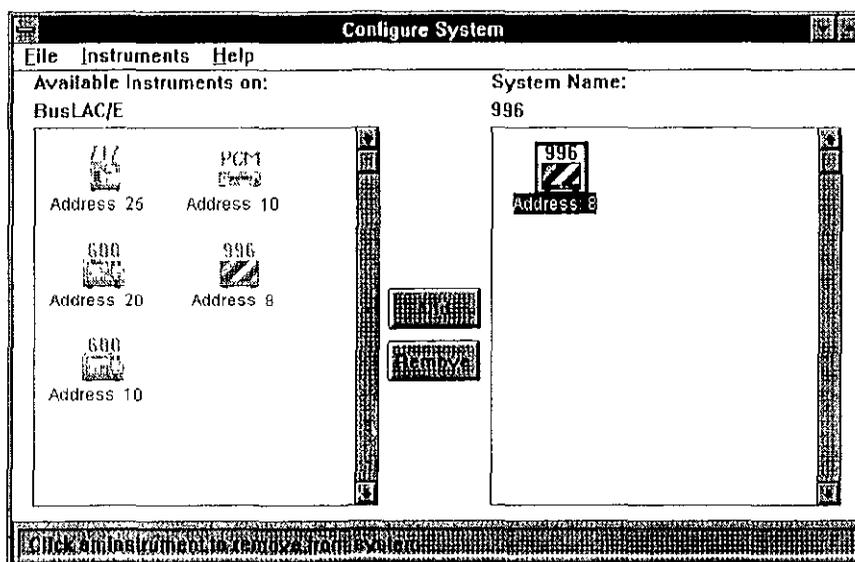


Figura 4.30. Ventana *Configure System*

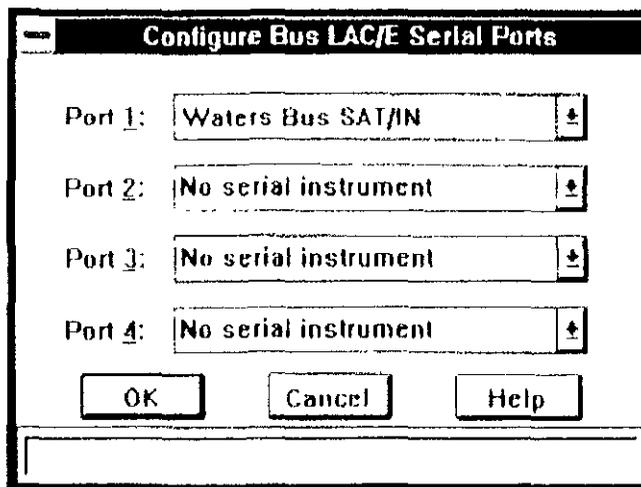


Figura 4.31. Caja de diálogo *Configure LAC/E Serial Ports Dialog Box*

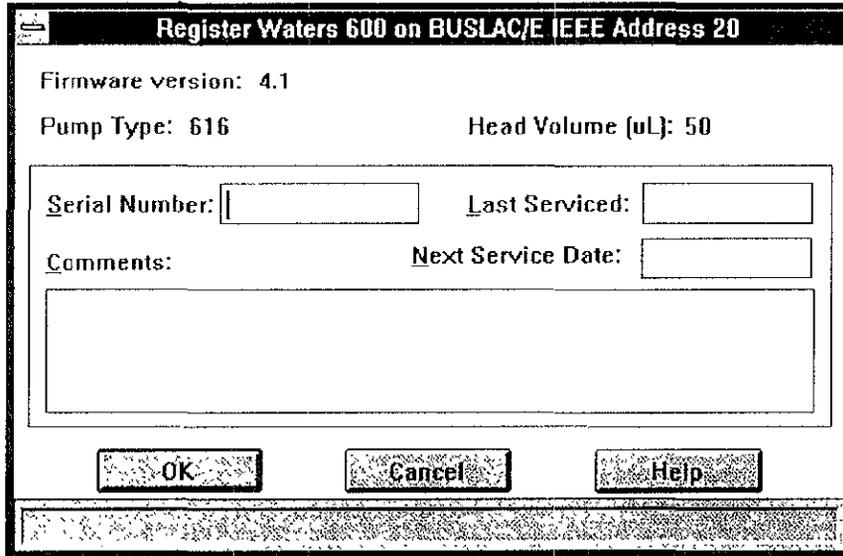


Figura 4.32. Caja de Diálogo Register

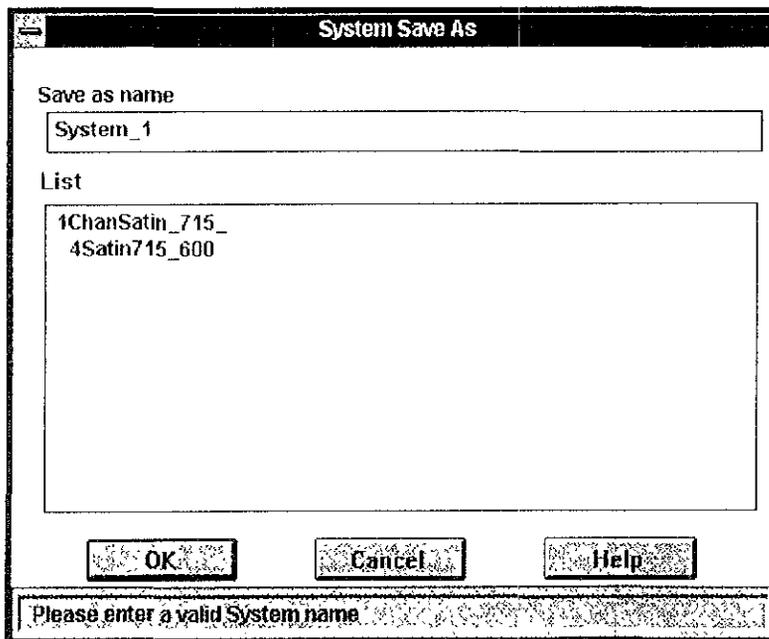


Figura 4.33. Caja de diálogo System Save As

4.2.3 CREACIÓN Y USO DE PROYECTOS

El proyecto es el criterio básico de orden de la información. Representa el espacio en el disco duro en el que serán localizadas los identificadores de la información. Es recomendable crear proyectos para incluir información que tiene sentido mantenerse agrupada.

Una adecuada administración del proyecto le permite mantener ordenada la información para una búsqueda rápida y segura. Todos los proyectos son iguales respecto a su capacidad de análisis, cada uno se distingue del resto por la información que incluye.

Cuando crea un nuevo proyecto, el *software Millennium* crea un folder vacío para desarrollar el proyecto en la ventana *Project*. Puede copiar información de un proyecto existente a uno nuevo, también crear cualquier número de proyectos en el sistema, cada proyecto ocupa aproximadamente un mínimo de 2 MB de espacio. Sólo el tamaño del disco duro limita el espacio y el número de proyectos que puede crear.

Crear un proyecto involucra:

- Accesar a la ventana *Session Manager*
- Accesar a la caja de diálogo *New Project*
- Registrar y salvar el proyecto

Para la creación de un proyecto, debe estar en la ventana *Session Manager*, en la barra de menú seleccione *File, New*, aparece la caja de diálogo *New Project* (figura 4.34), elija un nombre al proyecto, ya sea el nombre del producto o del activo.

En el campo *Allowed Acces*, de un "click" en botón *Owner, Group y World*, éste botón permite el acceso a cualquier usuario. En el campo *Group User Type*, puede seleccionar desde el nivel 1 al nivel 4, lo cual va a depender del nivel de autorización que quiera dar al proyecto:

- Nivel 1: Administrador del Sistema (*System Administrator*)
- Nivel 2: Químico (*Chemist*)
- Nivel 3: Analista (*Analyst*)
- Nivel 4: Visitante (*Visitor*)

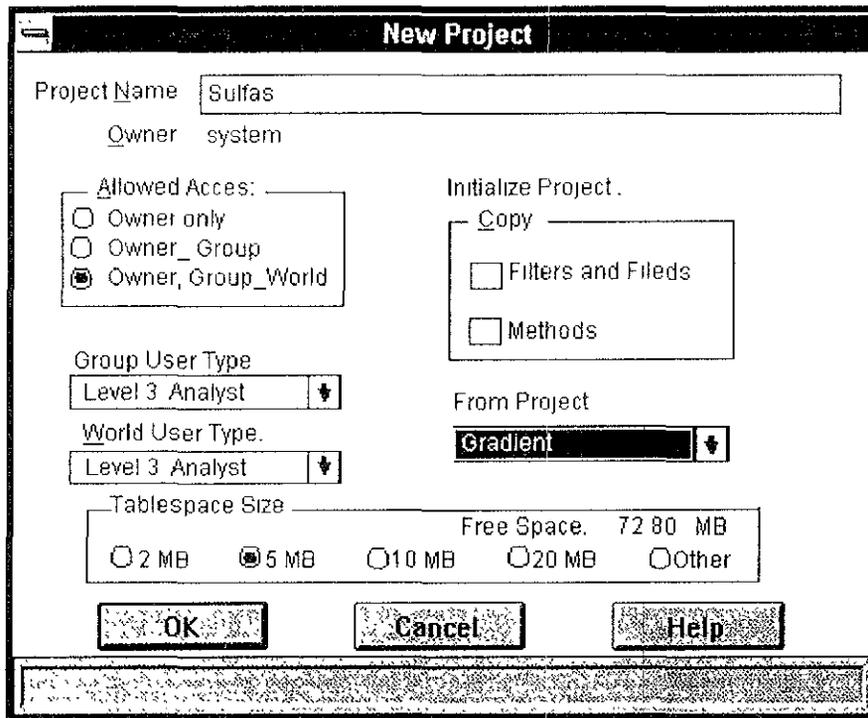
En el campo *Initialice Project*, seleccione los botones *Filters and Fields y Method*. Esta selección le permite copiar todos los filtros y métodos desde otro proyecto al nuevo proyecto.

En la caja *From Project*, activa la cascada y seleccione *Default*. Posteriormente en los botones del campo *Tablespace Size* seleccione la capacidad de memoria que desee para su proyecto, aunque lo recomendable es 5 MB y presione *OK*.

El espacio definido en el proyecto no incluye al que ocupará la información cruda. El espacio indicado se puede incrementar pero no disminuirse.

Para poder acceder al proyecto creado, da un doble "click" sobre la carpeta creada y aparecerá la ventana *Project* (figura 4.4).

Una vez en la ventana *Project*, será necesario crear un método instrumental, así como un conjunto de métodos de procesamiento y de reporte.

Figura 4.34. Ventana *New Project*

4.2.4 CREACIÓN DEL MÉTODO DE INSTRUMENTO

El Método de Instrumento proporciona a *Millennium* las instrucciones básicas para realizar tareas de control de módulos cromatográficos y adquisición de información

El desarrollo del Método de Instrumento involucra las siguientes etapas:

- Seleccionar el Sistema Cromatográfico
- Accesar a la ventana *Instrument Method*
- Abrir la caja de diálogo *Instrument*
- Editar las condiciones de trabajo para cada módulo que integra al Sistema
- Optimizar las condiciones de trabajo a través del Control Interactivo
- Salvar el nuevo Método de Instrumento
- Insertar el Método de Instrumento dentro del Conjunto de Método

Antes de crear un método de instrumento, asegúrese que se lleven a cabo los siguientes puntos:

- Los instrumentos cromatográficos estén conectar apropiadamente a la tarjeta *Bus LAC/E*
- El sistema identifique y reconozca todos los instrumentos cromatográficos. Si un instrumento en específico no aparece en forma de icono en la ventana *Instrument Method* (figura 4 35) , realice un escaneo a la tarjeta *Bus LAC/E*
- Todos los instrumentos estén encendidos, asegurando que hayan completado sus rutinas de calibración y de diagnóstico

Para desarrollar un Método de Instrumento se requiere haber configurado un sistema cromatográfico, haber encendido y reconocido previamente los módulos del Sistema (bomba, detector, automuestreador)

Para la creación del Método de Instrumento, en la ventana *Project*, de un "click" al icono MTH (*Method View*) para desplegar los métodos instrumentales (figura 4.14)

Posteriormente en la barra de menú seleccione *File, New Instrument Method* (o de un doble "click" en el icono del instrumento deseado) y aparecerá la caja de diálogo *System Open* (figura 4.36). Esta caja de diálogo sugiere el nombre del sistema para el nuevo método de instrumento que va a ser creado

De un "click" al nombre del sistema en la lista del directorio o teclea otro nombre al sistema El nombre del sistema aparece en la caja de texto *Open Name* Presiona el botón OK inmediatamente aparece la ventana *Instrument Method* (figura 4.35). Esta ventana está dividida en tres partes:

Barra de Menú: Incluye comandos utilizados para abrir un método de instrumento ya existente, salvar un método o regresar a la ventana *Project*, y revisar la información que proporciona la ayuda acerca de ésta ventana

Instrumentos: Contiene los iconos que representan a cada instrumento en la selección del sistema cromatográfico También contiene los botones de mando activados o desactivados de los instrumentos

Tabla de Canales Activos: Enumera los nombres de los canales activos y tipos de dispositivo. El usuario mete la informaciones de descripción también despliega en esta tabla.

Desde la ventana *Instrument Method* puede abrir la caja de diálogo *Instrument*, esta caja es diferente para cada instrumento seleccionado; bomba 616, automuestreador 717, detector 996, etc, para ello de un doble "click" en el icono del instrumento o de un doble "click" en la fila de la tabla de canales activos (para instrumentos que están asociados a los datos de los canales, tal como detectores, bombas de la serie 600)

Aparece la caja de diálogo del instrumento seleccionado. Realice todos los cambios en la configuración y organización del instrumento Especifique los parámetros de operación apropiados y presione el botón **OK** Repita lo anterior para cada instrumento que va a configurar

Para salvar el nuevo Método de Instrumento, seleccione *File, Save*, aparece la caja de diálogo *Save As* (figura 4.37), registre el nombre del nuevo Método de Instrumento en la caja de texto *Save As*, presione el botón **OK**, después seleccione *File, Exit* para regresar a la ventana *Project*

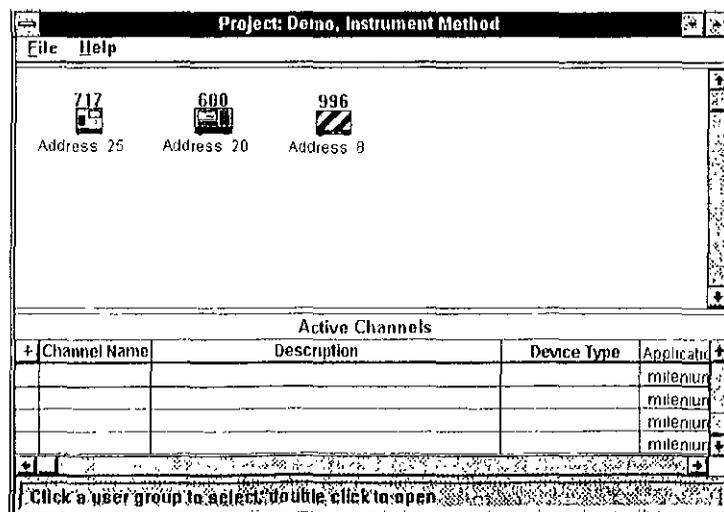
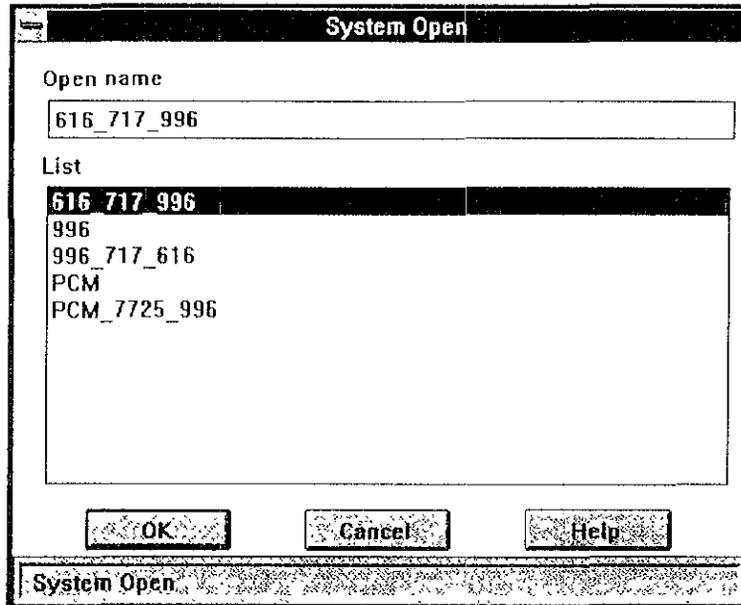
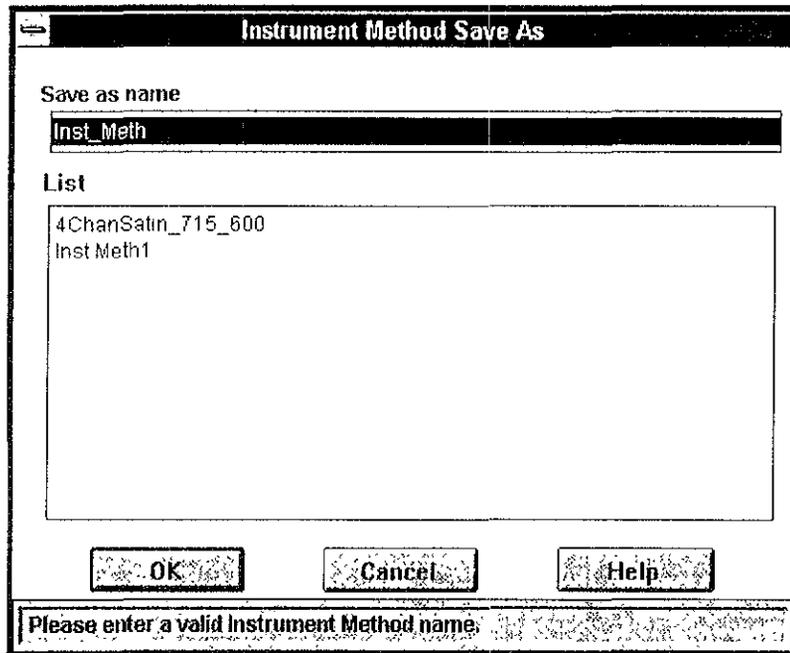


Figura 4.35. Ventana *Instrument Method*

Figura 4.36. Caja de diálogo *System Open*Figura 4.37. Caja de diálogo *Save As*

4.2.5 CREACIÓN DEL CONJUNTO DE MÉTODO

El Conjunto de Método o conocido como Método *Set*, le permite enlazar un método de instrumento, de proceso, de reporte y/o método de exportación para ejecutar operaciones específicas. Puede especificar un método de instrumento ya existente, un método de proceso, un método de reporte, y/o un método de exportación como parte de un conjunto de método. El cual es considerado como una colección de métodos y canales de datos, que le permite.

- Definir inicialmente las condiciones del instrumento
- Adquirir, procesar y/o reportar datos
- Exportar datos crudos o resultados en archivos de formato ASCII o AIA
- Crear canales derivados desde canales reales de la adquisición de datos
- Substraer cromatogramas en 3D

El conjunto de método puede contener diferente información, dependiendo de cómo se usen. Los métodos individuales que se usan dentro de un conjunto de método son los siguientes:

Método de Instrumento. Selecciona un método de instrumento si el conjunto de método se use para la obtención de resultados. Cuando selecciona un método de instrumento, todos los canales asociados con el método instrumental se despliegan en la lista del canal.

Método de Proceso. Selecciona un método de proceso si el conjunto de método es utilizado para procesar todos los canales de información.

Método de Reporte. Selecciona un método de reporte si el conjunto de método es utilizado para imprimir un reporte.

Método de Exportación. Selecciona un método de exportación si el conjunto de método es utilizado para exportar datos crudos o resultados en formato ASCII o AIA.

Puede crear un conjunto de método desde las siguientes ventanas del Software *Millennium*:

- Ventana *Project* (icono *Method view*)
- Ventana *Quick Set Control*
- Ventana *Review*

Para crear un conjunto de método desde la ventana *Project*, seleccione el icono *Method view*, en la barra de menú seleccione *File, New Method Set*, aparece la caja de diálogo *Method Set* (figura 4 38).

En cada una de las cajas *drop-down Instrument Method* y *Default Processing Method* (figura 4 38), elija los métodos disponibles (instrumento, proceso, reporte y exportación). Esta caja de diálogo muestra el conjunto de método incluyendo, método de instrumento, método proceso, método de reporte y método de exportación.

Para seleccionar un método de instrumento, en la caja *drop-down Instrument Method*, seleccione desde la lista un método de instrumento disponible. La opción del método aparece como una selección activada.

Para seleccionar un método de proceso, en la caja *drop-down Default Processing Method*, seleccione desde la lista un método de proceso disponible. La opción del método aparece como una selección activada.

Para seleccionar un método de reporte, en la caja *drop-down Report Method*, seleccione desde la lista un método de reporte disponible. La opción del método aparece como una selección activada.

Para seleccionar un método de exportación, en la caja *drop-down Export Method*, seleccione desde la lista un método de exportación disponible. La opción del método aparece como una selección activada.

Para salvar el conjunto de método, en la barra de menú seleccione *File, Save*, aparece la caja de diálogo *Method Set Save As* (figura 3.9) Escriba el nombre del conjunto de método en la caja de texto *Save As Name* para finalizar presione el botón *OK* El nuevo conjunto de método es agregado a la lista de la caja de diálogo Para salir de ésta caja de diálogo, seleccione *File, Exit* La ventana *Project* aparece con el nuevo conjunto de método en forma de icono (figura 4.40)

Method Set: Untitled

File Edit Help

Instrument Method PDA_Default_616_717

Default Processing Method parabens

Channel and Processing Method

Channel	Processing Method	

Report Method Calibration_Plot_Report

3D Blank Subtration

Export Method ExportDefault

Save Derived Channels and Delete 3D Channel

Figura 4.38. Caja de diálogo *Method Set*

Method Set Save As

Save as name

Meth_Set1

List

OK Cancel Help

Please enter valid Method Set name.

Figura 4.39. Caja de diálogo *Method Set Save As*

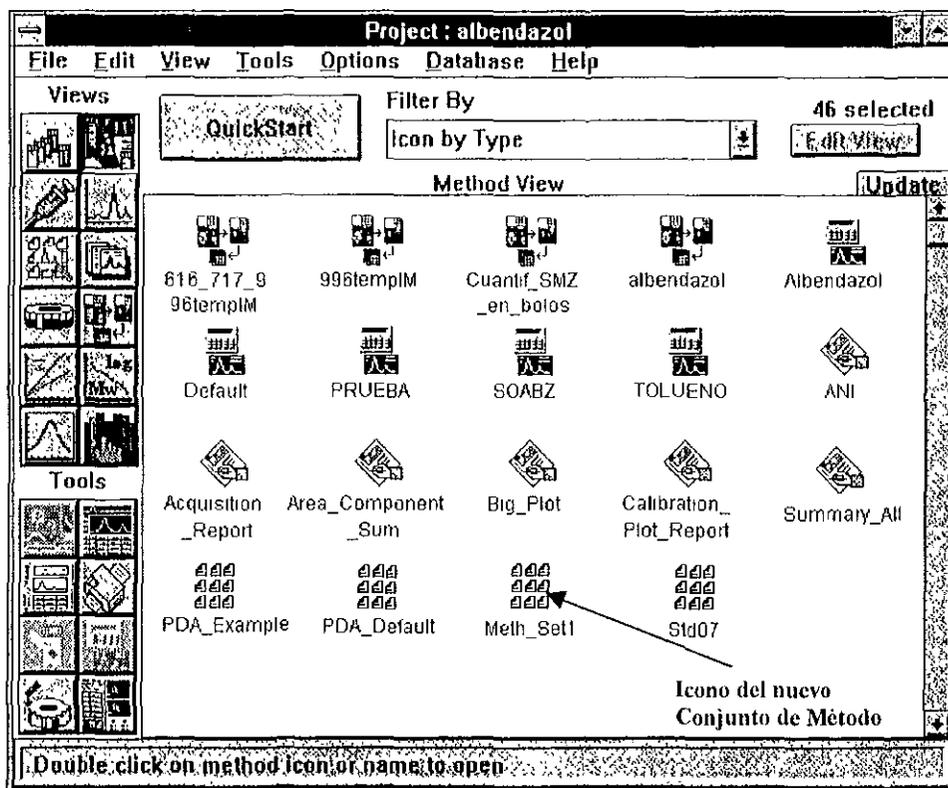


Figura 4.40. Ventana *Project* con el nuevo conjunto de método

4.2.6 USAR LA VENTANA QUICK SET CONTROL

La ventana *QuickSet Control*, le permite iniciar el análisis cromatográfico y por lo tanto obtener el reporte directamente. Así también el manejo de los instrumentos y su modificación del método.

Para acceder a la ventana *QuickSet Control* (figura 4.41), da un "click" en el icono *QuickStart* de la ventana *Project*, dicha ventana consiste de las siguientes partes:

- Menú principal
- Información de métodos
- Tabla de edición de muestras
- Cuadro de concentraciones
- Botón de control de instrumentos
- Información de estatus (mensajes y campos)
- Monitor
- Instrumentos

Para ejecutar las inyecciones seleccione el modo de *sample set mode*

Posteriormente llene la tabla de muestras con la siguiente información

- Número de vial
- Nombre de la muestra
- En *Function* el tipo de inyección (seleccione *Sample Set Mode*)
- Volumen de la muestra
- *Method Set* especificado
- El tiempo de corrida
- Peso de la muestra

Posteriormente con la flecha del cursor seleccione la primera línea de la tabla de muestras y está aparecerá enmarcado en negro. Dar un "click" en el icono *Method* que se encuentra en la parte inferior derecha de la tabla de muestras, seleccione en la ventana siguiente, dando un "click" en la cascada de métodos ya existentes y elija el método que va a utilizar. Posteriormente en la siguiente caja de diálogo de un "click" sobre *Setup Instrument* (el software te enviará un mensaje informando acerca del estado de su método)

Seleccione el icono de salir, para poder manejar su método desde la ventana interactiva de *Quick Set Control*

Una vez editada la tabla, podrá iniciar la corrida de las muestras, en el icono de *Run Tray/Run SampleSet* aparecerá un diálogo en donde se pregunta si corre el renglón seleccionado o el conjunto de muestras y presione el botón *Run SampleSet*

Una vez terminado el análisis cierre la ventana *Quick Set* seleccionando *File, Exit*

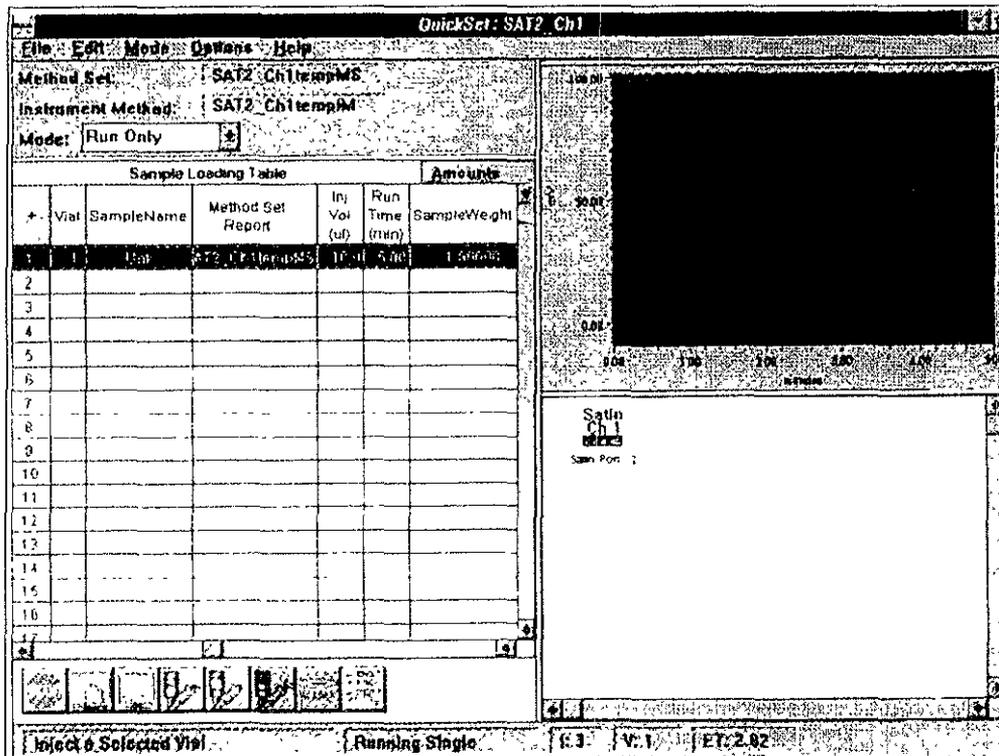


Figura 4.41 Ventana *Quick Set Control*

4.2.7 DESARROLLO DEL MÉTODO DE PROCESO

El método de procesamiento define la manera en la cual el *software Millennium* detecta e integra y cuantifica los datos adquiridos. Un método de procesamiento integra a un *Method Set* para instruir al *software Millennium* como procesar los datos, calibrar estándares, y cuantificar muestras desconocidas.

El desarrollo del Método de Proceso involucra las siguientes etapas:

- Integración de una muestra típica
- Identificación de los componentes de la muestra
- Definición de la base de cálculo, tipo de calibración y ajuste de la curva
- Inserción del Método de Proceso dentro del Método Set

Para desarrollar un Método de Proceso se requiere:

- Haber adquirido al menos una inyección representativa del método de análisis en la que se observe el pico más pequeño de interés y de ser posible, el más difícil de integrar (estándar o muestra)
- Contar con un Método de Instrumento optimizado y un Método Set

Para editar un Método de Proceso:

En la ventana del proyecto "*Project*" presione el icono de la herramienta *Review* para seleccionar la inyección deseada y los datos del canal (estándares y desconocidas), aparece la ventana *Review* (figura 4.42). En esta ventana seleccione *File, New Method*. Aparece la caja de diálogo *New Method*. Seleccione una opción de procesamiento apropiado para sus datos.

De un "click" en el icono *Channels View*, sombree el canal del cual desee extraer el cromatograma, de un "click" en el icono *PDA Review*.

Accese en *options* y seleccione *Extract Chromatogram*, y extraiga a la longitud de onda adecuada con ayuda del cursor bajando la línea horizontal. En *options*, seleccione *Set Processing Channel*, entree nuevamente en *options* y seleccione *Calculate Result*. En ésta ventana elija *File* y seleccione *Save Result*.

En la barra de menú seleccione *File, Save* y de un nombre al método de proceso. Seleccione nuevamente *File, Exit*.

En la ventana de proyecto "*Project*" seleccione el icono *Result View*, sombree el resultado recientemente adquirido, de un "click" en el icono *Review*. En esta ventana realice la integración de la siguiente manera.

Accese en *View*, seleccione *Integration Table*, de valores altos en el área mínima pero no mayor del pico de interés, seleccione el pico más agudo y de un "click" en el ancho del pico, mediante un acercamiento a nivel de línea base. Seleccione un intervalo de ésta donde no eluya nada y de un "click" en la evaluación del ruido (*threshold*).

De un "click" en el botón *Integrate*, y si no es adecuada la integración optimícela mediante el ancho del pico y ruido, recordando que a valores bajos, se pueden integrar picos debido al ruido; una vez que se tenga la integración adecuada, de un "click" en *Calibrate*.

Accese en *View*, seleccione *Component table*, después elija en *Options* y seleccione *Fill Table from Result*. En la tabla que aparece abajo, dar el nombre a los picos, la ventana, la manera que se va a llevar a cabo la cuantificación (área o altura), declarar el estándar interno (si aplica), en la columna se

Quant By, seleccione *Linear thru zero* que es el modo por el cuál se va a generar la curva de calibración con un solo estándar

Si se está trabajando con estándares de un "click" en *Calibrate*, si es una muestra de un "click" en *Quantitate*, para que aparezcan los nombres arriba de los picos. Accese en *Applications*, *Parameters* y de el tiempo de volumen muerto y seleccione *Calculate Suitability Results*, dar *OK*

De nuevamente, *Integrate* y *Calibrate*, para calcular éstos resultados De un "click" en *File*, seleccione *Save Method As*, y de un nombre al método de proceso (El cual es igual al del proyecto) Presione *File* y *Exit*

En la ventana de proyecto presione el icono *Method View*, para acceder a la vista *Method*, busque el *Method Set* creado y de un doble "click" en éste

Accese en *Edit*, *Derived Channel*, de un "click" en *Extract* e indique la longitud de onda seleccionada cuando se realizó la extracción del cromatograma

Selecciona *File*, *Save As* y de un nombre, indique la longitud de onda Selecciona *File*, *Exit*

En la ventana del *Method Set*, active la cascada *Default Processing Method* y seleccione el Método de Proceso creado, en la tabla introduzca el nombre del canal y el método de procesamiento Selecciona *File*, *Save*, y *File*, *Exit*

Así una vez creado el método de procesamiento, todos los subsecuentes análisis, podrán ser obtenidos en cromatogramas y cuantificando las muestras desconocidas. Por lo que en la ventana *Quick Set Control*, se eligirá en *Run Mode*, *Run and Report*

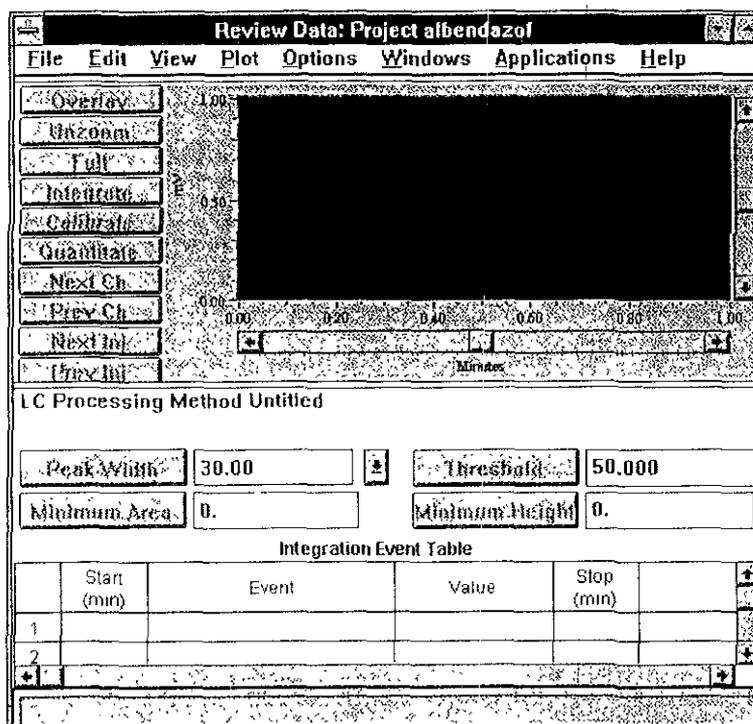


Figura 4.42. Ventana *Review*

CAPITULO 5. COLUMNAS Y SOLVENTES

5.1 COLUMNAS

- 5.1.1 GENERALIDADES
- 5.1.2 CARACTERISTICAS DE LAS COLUMNAS
- 5.1.3 FASE ESTACIONARIA
- 5.1.4 COLUMNAS DE FASE REVERSA
- 5.1.5 COLUMNAS DE FASE NORMAL
- 5.1.6 SELECCIÓN DE LA COLUMNA
- 5.1.7 CUIDADOS Y MANTENIMIENTO DE LAS COLUMNAS

5.2 SOLVENTES

- 5.2.1 PROPIEDADES DE UN SOLVENTE
- 5.2.2 ADITIVOS SALES Y REACTIVOS
- 5.2.3 FASE MOVIL
- 5.2.4 SOLVENTES DE FASE NORMAL
- 5.2.5 SOLVENTES DE FASE REVERSA
- 5.2.6 PREPARACION DE LA FASE MOVIL
- 5.2.7 SELECCIÓN DE LA FASE MOVIL

5.1 COLUMNAS

5.1.1 GENERALIDADES

En todo sistema cromatográfico, ya sea fase líquida o gaseosa, la columna es la base o "alma" del sistema, debido a que en ella se lleva a cabo la separación de los componentes de la muestra en estudio. Consiste en un segmento de tubo de algún material inerte, de diámetro uniforme y capaz de resistir presiones altas. El material más común es acero inoxidable. La capacidad de la columna depende de su longitud, diámetro y material de relleno.

La columna cromatográfica es la parte esencial del cromatógrafo de líquidos ya que en ella, a través de diferentes mecanismos (adsorción, partición, intercambio iónico, exclusión, etc.), tiene lugar la separación o discriminación entre analitos e interferentes.

El aumento de la eficacia de la CLAR respecto a la alternativa clásica se basa en una disminución del tamaño de partícula de la fase estacionaria, lo que implica un aumento de la presión de trabajo. Es condición indispensable para la reproducibilidad de los resultados una gran homogeneidad en la distribución de la fase estacionaria, lo que implica la necesidad de técnicas precisas y complejas de preparación de las columnas.

En la tabla 5.1 se muestran los tipos más importantes de columnas para CLAR. Se observa una distribución básica entre las convencionales y las microcolumnas (en relación con su diámetro).

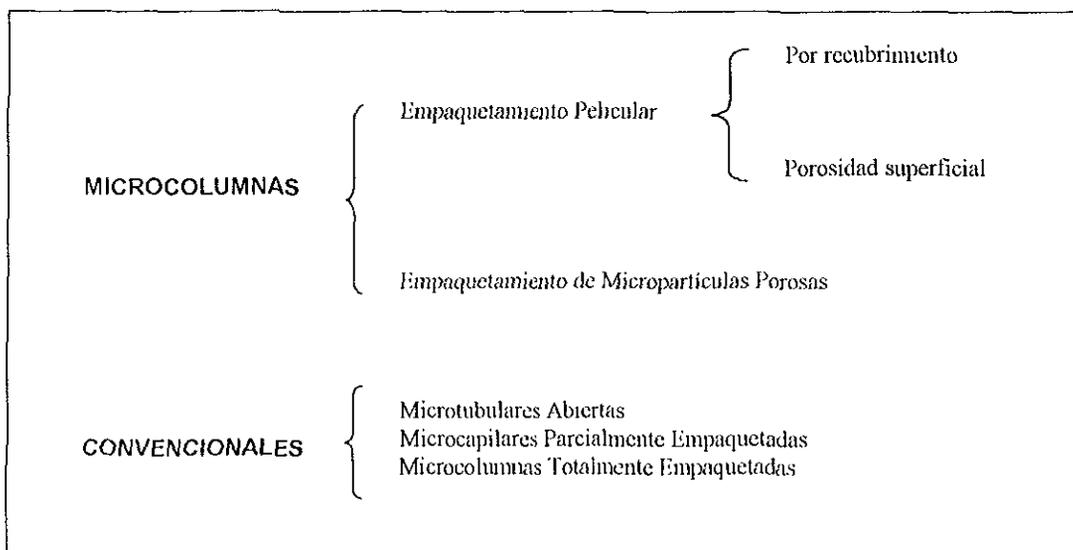


Tabla 5.1. Tipos de Columnas Cromatográficas para CLAR

En la tabla 5.2 se muestran las características geométricas de las columnas, y del material de relleno, así como de las condiciones hidrodinámicas de trabajo. Se han incluido las características de la cromatografía líquida a baja presión (clásica) a efectos comparativos.

CARACTERÍSTICAS GEOMÉTRICAS E HIDRODINÁMICAS	CROMATOGRAFIA LIQUIDA CLASICA	CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION		
		Empaquetamiento de Película	Micro-partícula	Micro-columnas
Columna:				
Diámetro (mm)	20-70	1-3	2-6	0.05-1
Longitud (cm)	20-100	50-100	10-50	$10^3-5 \times 10^3$
Partícula:				
Diámetro (mm)	150	30-70	5-10	5-30
Presión (atm)	1	30-50	100-200	150-250
Caudal (ml/min)	0.1	0.5-5	1-2	$10^{-4}-5 \times 10^{-2}$

Tabla 5.2. Características geométricas, material de relleno y condiciones hidrodinámicas de las columnas

Dentro de las columnas CLAR convencionales, las de empaquetamiento de película son las primeras que se usaron. El material (fase estacionaria) consiste de bolitas esféricas regulares (30 - 70 μm) de un sólido no poroso, generalmente vidrio, que están recubiertas de una capa (1 - 3 μm) de material activo cromatográfico poroso, de naturaleza polimérica. Debido a que la densidad de las mismas es elevada, el empaquetamiento uniforme no es técnicamente muy difícil.

La distribución cromatográfica entre fase móvil y estacionaria es más accesible que si se tratara de partículas porosas de igual tamaño

No obstante, la capacidad y eficacia de las columnas con este tipo de empaquetamiento en CLAR aumenta considerablemente cuando se sustituye el recubrimiento posterior por un tratamiento especial de las bolitas de vidrio (30 - 60 μm) para que adquieran una microzona porosa externa (1 - 3 μm), también de vidrio, para que pueda actuar de sólido activo en cromatografía de adsorción, o bien como soporte de la fase estacionaria líquida (enlazada o no)

El volumen del poro en estas bolitas es muy pequeño, lo que origina una rápida difusión de los solutos en ambos sentidos, por lo que son adecuados para cuando se requiere una gran velocidad de determinación

Sin duda que la sustitución de las partículas con una gran zona inerte por otras porosas y de tamaño considerablemente menor (empaquetamiento microparticulado) tiene importantes ventajas: mayor capacidad y eficacia. No obstante, también conlleva un mayor grado de empaquetamiento, lo que implica un aumento de la presión de trabajo y una gran dificultad de empaquetamiento adecuado y homogéneo en el laboratorio, por lo que casi siempre se adquieren en el comercio

Al ser el área activa mucho mayor, éstas son aptas para separaciones cromatográficas difíciles y complejas (solutos de propiedades muy parecidas a un elevado número de solutos). Al reducir el tamaño de estas micropartículas porosas, disminuye la profundidad de los poros, por lo que se aumenta la eficacia

El concepto de microcolumna en CLAR puede ser engañoso. No se trata de reducir el tamaño de las columnas CLAR convencionales en todas sus dimensiones (longitud y diámetro), sino sólo de una reducción sustancial del diámetro de las mismas y un aumento considerable de la longitud. El término "columnas capilares" sería más correcto y además paralelo al empleado en Cromatografía de Gases

Son tres las ventajas que comporta el empleo de microcolumnas en CLAR:

- Aumento de la eficiencia: la Altura del Plato Teórico (AET) puede reducirse 10^2 a 10^5 veces, lo que las hace especialmente aptas para la separación de mezclas complejas y difíciles
- Reducción drástica del consumo de la fase móvil, cuyo precio es cada día más elevado.
- Aumento de la sensibilidad de ciertos detectores especialmente a caudales muy bajos.

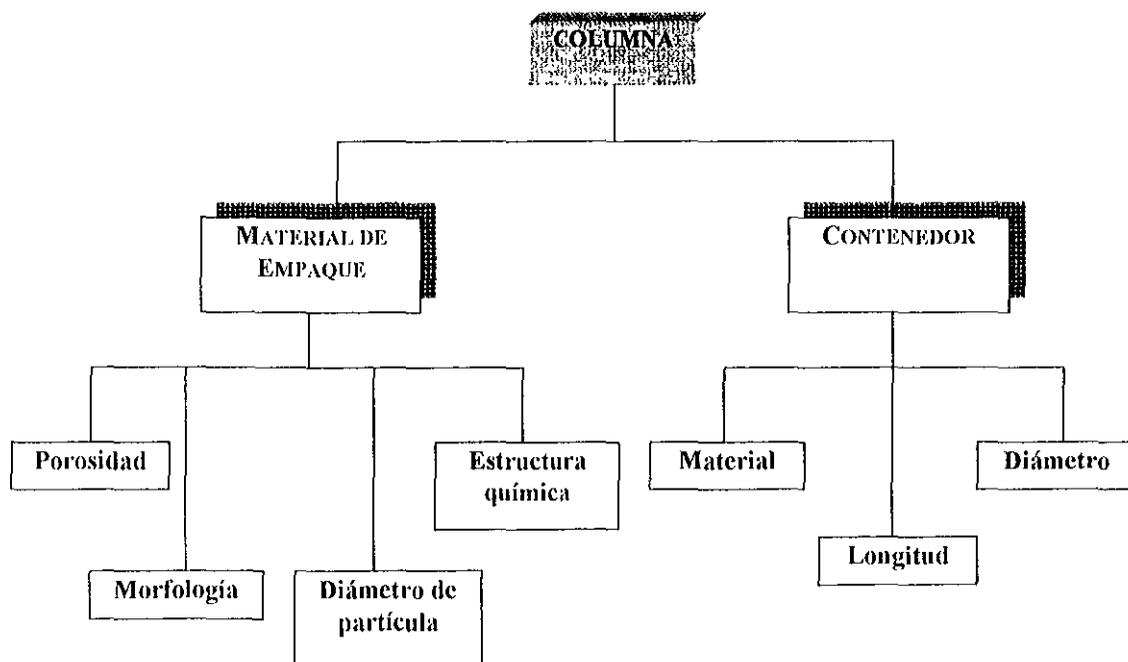
Desde el punto de vista instrumental, el empleo de microcolumnas en CLAR, implica una serie de requerimientos respecto a las características generales de un cromatógrafo de líquidos. Fundamentalmente el diseño del mismo debe adaptarse al uso de las microcolumnas y, por tanto reducirse drásticamente:

- 1) El volumen interno del sistema de inyección.
- 2) El volumen de la celda de flujo del detector
- 3) Los volúmenes muertos de las conexiones.

Además las condiciones técnicas son diferentes para cada tipo de microcolumna. Este aspecto ha dificultado el desarrollo y aplicación en CLAR.

5.1.2 CARACTERÍSTICAS DE LAS COLUMNAS

Las características más importantes de las columnas para CLAR se integran de dos elementos importantes que son: el material de empaque o de relleno, el cual está constituido por partículas definidas por una serie de características: morfología, tamaño, porosidad y estructura química de la partícula; y el contenedor que implica: longitud, diámetro y material de la columna, que junto con las propiedades de ambas se determina el desempeño de la misma.



MATERIAL DE EMPAQUE

Porosidad

La porosidad de la partícula es la relación entre el volumen interno de los poros y el volumen de la partícula. Los poros son cavidades, de mayor profundidad que diámetro, y de tamaño y morfología muy variada. Pueden ser "abiertos", cuando están comunicados con la superficie de la partícula, o cerrados, cuando no lo están.

Básicamente, se habla de microporos cuando su diámetro es menor que 20 Å, mesoporos cuando su diámetro está comprendido entre 20 y 500 Å y macroporos cuando es mayor de 500 Å.

La porosidad es responsable de los fenómenos de exclusión y de la velocidad de transferencia de masa de soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria.

El área superficial, parámetro que determina la capacidad de retención de la fase estacionaria, está compuesta por el área externa (superficial) de la partícula, con sus depresiones y prominencias y por el área de las paredes internas de los poros. Si el área superficial de las partículas está comprendida, según el tipo de material, entre 30 y 550 m²/g, es claro que, en general, mucho menos del 1% del área superficial está localizada en la superficie de la partícula y sólo las moléculas que penetran en los poros participarán de los procesos separativos.

En otras palabras, el diámetro del poro determina por un lado el área superficial y por otro, los fenómenos esféricos de exclusión. En general, a menor diámetro de poro corresponde mayor área superficial y consecuentemente, mayor retención.

Morfología de las Partículas

El material empleado puede adoptar básicamente dos formas, irregular o esférica, y un tamaño comprendido entre los 2 y 60 µm de diámetro, o mayor en cromatografía preparativa, con un estrecho rango de distribución de tamaño. Las columnas analíticas modernas se rellenan con partículas de entre 3 y 10 µm de diámetro.

Partículas Irregulares

Los empaques de formas irregulares están disponibles en tamaños grandes a diferencia de los empaques esféricos, pero no están disponibles generalmente menos de 5 micras de diámetro. Unos tienen áreas superficiales específicas más altas que aquéllos que se encontraron en partículas esféricas. En general, las partículas irregulares son más difíciles de empacar que las partículas esféricas. Columnas empacadas con partículas irregulares pequeñas pueden exhibir estabilidad en el empaque más pobre que aquéllos preparados con partículas esféricas del mismo tamaño. Sin embargo, el rango de tamaños de las partículas más grandes y áreas superficiales así como el precio es más bajo, por lo que hace a las partículas irregulares sean más atractivas para las aplicaciones preparativas.

Partículas Esféricas

La mayoría de los empaques analíticos actualmente disponibles son esféricos. Estos son más fáciles de empacar que los de forma irregular. Pueden lograr un buen desempeño, una buena estabilidad de la columna, una baja presión y reproducibilidad. Los materiales esféricos están disponibles en tamaños de partícula de 3 µm a más de 20 µm. El tamaño de partícula más popular para las columnas analíticas es de 5 µm, pero el uso en columnas cortas es de 3 µm, el cual va en aumento. Esto se debe al hecho de que en la preparación de columnas de 3 µm, la tecnología ha mejorado durante los últimos años. Hoy, las columnas cortas de 3 µm logran el mismo tiempo de vida media y desempeño como las columnas de 5 µm, pero proporciona el beneficio de tiempos del análisis más cortos.

Las estadísticas indican incluso una tendencia a emplear partículas esféricas, no por razones de resolución (si bien es probable que la partícula esférica pueda empaquetarse mejor, resultando indirectamente en una columna más eficiente), sino simplemente de "resistencia mecánica de la partícula", menos sensible al desgaste, y a la mayor "permeabilidad" de la columna al paso de la fase móvil, resultando en menores presiones y con ello a un menor "desgaste" del equipo. En cromatografía preparativa, en cambio, se emplean partículas mayores, de 10 a 200 μm de diámetro, que ofrecen mejor balance resolución-permeabilidad. La tabla 5.3 muestra la comparación entre partículas irregulares y esféricas.

PROPIEDADES	PARTICULA IRREGULAR	PARTICULA ESFERICA
Estabilidad	+	+++
Rango de Tamaño de Partícula	+++	++
Cromatografía Analítica	+	+++
Cromatografía Preparativa	+++	+

Tabla 5.3. Comparación entre partículas irregulares y esféricas

Diámetro de la Partícula

El tamaño de partícula del material de empaque tiene un efecto en dos parámetros. El primero es la presión de operación de la columna. La presión aumenta en función inversa al cuadrado del diámetro de la partícula. El segundo es la eficiencia de la separación. Las partículas más pequeñas dan eficiencias más altas a una longitud de columna constante, debido a la trayectoria más corta de difusión. Un buen empaque de columna de 3 μm dará una eficiencia de separación casi dos veces equivalente a una columna de 5 μm , pero la presión de operación es cuatro veces mayor a la misma longitud de la columna y a una velocidad lineal.

Actualmente, el tamaño del empaque más popular es de 5 μm . Partículas de este tamaño exhiben eficacias más altas que empaques de 10 μm en un momento de análisis dado, y con una presión razonable. Empaques de 3 μm en columnas cortas están siendo más populares. Los empaques anteriores utilizados en columnas con partículas de 3 μm sufrían una vida corta, pero hoy la tecnología ha mejorado de manera exitosa, para que pueden obtenerse eficiencias altas con empaques modernos de 3 a 3.5 μm sin comprometer vida de la columna.

Partículas de 3 μm . Si escoges un empaque de 3 μm de diámetro de partícula, puedes obtener análisis muy rápidos sin pérdida de la eficiencia o sin sacrificar la vida de la columna.

Partículas de 5 μm . Es la opción del tamaño de partícula para la mayoría de las columnas analíticas rutinarias, debido a la combinación en un alto desempeño de la separación y una presión de operación moderada.

Partículas de 10 μm . Es el tamaño de partícula normal para las aplicaciones analíticas, empaques de 10 μm tienen la habilidad de dar buena resolución con eficiencias moderadas, a una presión de operación baja, incluso con columnas largas.

Partículas mayores de 10 μm . Partículas mayores de 10 μm son principalmente aplicadas en cromatografía preparativa. Un rango creciente de material preparativo esférico está disponible hoy, pero con un límite de tamaño de 20 μm . Empaques mayores de 20 μm sólo están disponibles en partículas de formas irregulares.

Estructura Química

Debe hacerse una diferencia entre la estructura interna de la partícula y la estructura química superficial, ya que es esta última la responsable de los procesos de retención. Para que durante el proceso cromatográfico se produzca una diferenciación entre las moléculas del analito y las de la fase móvil, la superficie del adsorbente debe funcionar como un receptor de las moléculas del analito. La estructura química superficial es diferente de la interna y está constituida por grupos funcionales activos, naturales o producto de una modificación inducida y permanente.

CONTENEDOR

Material

La cromatografía líquida convencional usa columnas de plástico o de vidrio que pueden ir de unos centímetros a varios metros. Las longitudes más comunes son 10-100 cm, las columnas más largas se usan para las separaciones preparativas.

Las columnas para Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) son tubos de acero, típicamente de 10-30 cm de longitud y 3-5 mm el diámetro interno. Columnas analíticas cortas, rápidas, y guarda columnas que se ponen antes de una columna analítica para atrapar basura y prolongar la vida de la columna analítica por más tiempo son generalmente de acero inoxidable y de 3-10 cm de largo.

Longitud

La longitud de la columna influye en tres parámetros de mucha importancia. Ellos son la eficiencia, la retención (tiempo de análisis) y la presión del sistema. La eficiencia de la columna es proporcional a la longitud de la columna. Columnas más largas son usadas cuando la separación de picos es pequeña y se requiere una columna más eficiente (esto es, picos estrechos).

La retención del soluto es proporcional a la longitud de la columna. Cuando la eficiencia se aumenta incrementando la longitud, hay un incremento significativo en el tiempo de análisis. La figura 5.1 muestra las diferencias en resolución y en retención para tres longitudes de columna diferentes.

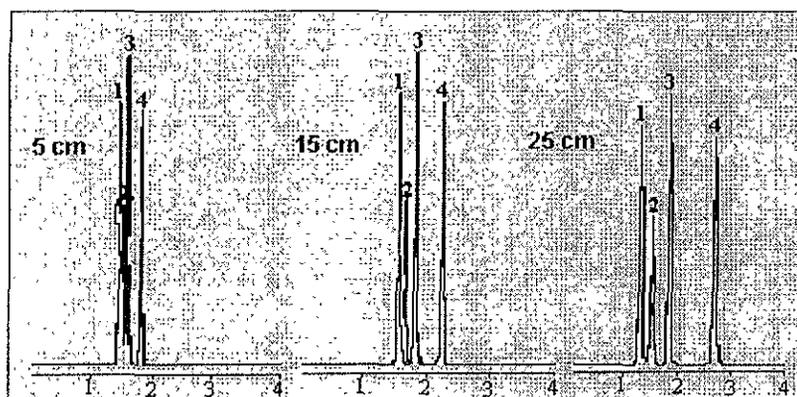


Figura 5.1. Longitud de Columna. Comparación de Resolución y Retención

La presión en la columna es casi proporcional a la longitud de la misma. Columnas largas con diámetro pequeño requieren presiones extremadamente altas, mientras que las cortas y de diámetro ancho requieren una presión muy baja. Ninguna de las dos situaciones es muy práctica y pueden ser un factor limitante.

El costo de las columnas está directamente ligado a la longitud de las mismas. Duplicando la longitud casi significa duplicar el precio de esta columna. Cuando se aumenta la eficiencia alargando la columna hay un incremento significativo en el costo de la columna.

Diámetro

El diámetro de la columna tiene influencia sobre cinco parámetros de mucha importancia. Ellos son la eficiencia, la retención, la velocidad de flujo, la capacidad de la columna y la presión del sistema.

Las columnas de menor diámetro interno (DI) empacadas con rellenos de alto rendimiento, permiten reducir el consumo de solvente (fase móvil). A su vez, la reducción en la dilución de la muestra aumenta la sensibilidad del análisis. Esto es de especial importancia cuando la cantidad de muestra es limitada. En base a una cierta longitud de columna y velocidad lineal, los valores en la tabla 5.4 muestran un aumento progresivo en el ahorro de solvente y sensibilidad a la muestra, a la vez que disminuye el DI de la columna.

DIMENSIONES DE LA COLUMNA (mm)	VOLUMEN INTERNO (ml)	VOLUMEN DEL PICO (µl)	COMPOSICIÓN DEL SOLVENTE (ml)	NÚMERO DE PLATOS TEÓRICOS	% AHORRO DE SOLVENTE
4,6 x 250	2,50	550	18,9	19,00	0
4,6 x 150	1,50	430	11,4	11,000	40
3,0 x 250	1,06	240	8,0	19,000	58
3,0 x 150	0,64	188	4,8	11,000	74
2,1 x 150	0,30	94	2,4	11,000	87

Tabla 5.4. Parámetros de las columnas

La eficiencia de la columna también es atribuido a su diámetro. Es decir que las columnas de diámetro más pequeño generalmente tiene una mayor eficiencia y se usan cuando no hay una buena separación y se requiere de una alta eficiencia (esto es, picos muy estrechos). La figura 5.2 muestra la diferencia en resolución entre dos columnas de diámetro diferente.

Las columnas podrían describirse en tres categorías:

- Medio - tamaño - 3,0 mm
- Calibre - estrecho - 2,1 mm
- Micro calibre - 1,0 mm o menos

Medio-tamaño

Esta columna realiza un desempeño casi óptimo en la mayoría de los equipos CLAR. Por consiguiente, puedes esperar usar un 58% menos de solvente en comparación con una columna de 4,6 mm I.D., esencialmente sin ninguna pérdida de la eficiencia, sobre todo en la retención con una $k' = 3$ o mayor.

Calibre - estrecho

Esta columna no funciona bien con la mayoría de los equipos CLAR existentes en el laboratorio. Requiere de un volumen interno bajo del sistema en el inyector, en la celda de flujo del detector, y en las conexiones. Esto verifica que el volumen extra columnar total del sistema sea efectivamente menor de 10 microlitros. Si es más de 10 microlitros, el desempeño de la columna se verá afectado. Incluso un volumen pequeño extra columnar de 50 microlitros causará una pérdida en la eficacia de la columna.

Micro - calibre

Las columnas de micro-calibre exigen un volumen sumamente pequeño en el sistema de la columna, significativamente debajo de lo que es práctico para la mayoría de los equipos CLAR. De modo que no intentes usar columnas de micro-calibre a menos que tengas el equipo apropiado. La mayoría de los fabricantes de columnas no han hecho todavía columnas de 1.0 mm disponibles en una base regular.

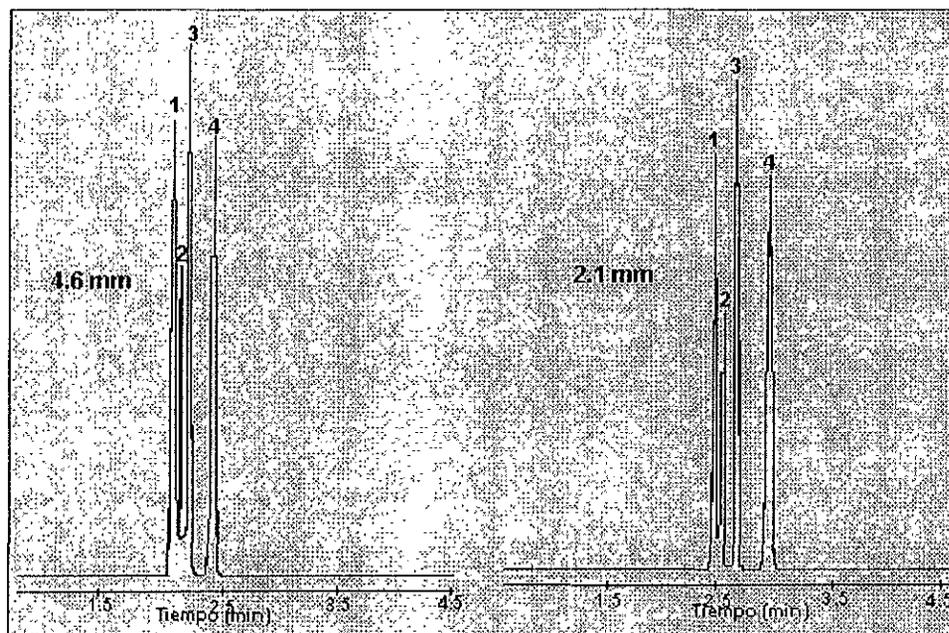


Figura 5.2. Diferencia en resolución entre dos columnas de diámetro diferente.

5.1.3 FASE ESTACIONARIA

Todos los tipos de cromatografía se pueden realizar en el modo de alta resolución, por lo que se dispone de fases estacionarias para todo mecanismo de separación común. Entre éstos se incluyen adsorción líquido-sólido, partición líquido-líquido, intercambio iónico, exclusión molecular, etc.

Un soporte común es el de partículas microporosas de sílice con diámetro de 5 a 10 μ m. Comparada con las partículas de forma irregular, la variedad esférica (más costosa) produce separaciones un tanto mejores (10 a 20% menor altura de plato), genera picos más simétricos, reduce en 10% el volumen de la fase móvil en la columna (volumen intersticial), se empaqueta de manera más estable, y requiere de 10 a 30% menos de presión para un gasto dado. Las partículas esféricas tienen excelentes características microporosas, de empaque y tienen menor resistencia al flujo del solvente, pero reduce la capacidad de muestra y la eficiencia de la separación. Las partículas microporosas son del todo permeables al solvente.

En CLAR también se utilizan soportes menos rígidos que los de sílice (como los de poliestireno), debido a sus tamaños de poro favorables para las separaciones por exclusión molecular.

La cromatografía de adsorción se realiza directamente en la superficie de las partículas de sílice. Sin embargo, más a menudo la cromatografía de partición líquido-líquido se realiza con una fase estacionaria unida covalentemente a grupos silanol en la superficie del sílice.

En cromatografía de fase ligada, la partícula base de sílicagel se modifica químicamente para reemplazar sus grupos funcionales activos, los silanoles, de características polares, o determinados grupos funcionales: octadecilsilano (frecuentemente llamado ODS o C18), octilsilano (C18), fenilo, ciano (CN), amino, diol, etc.

En algunos casos, la misma fase ligada puede ser empleada en fase normal o reversa según el tipo de fase móvil usada. Por ejemplo, un relleno ligado a grupos ciano funcionará en fase normal si la fase móvil es hidrófoba (por ejemplo isooctano) o en fase reversa, cuando se emplean mezclas hidroalcohólicas.

Cromatografía de Partición

La fase estacionaria está ligada a las partículas inertes de 3-10 µm de diámetro, con tamaños más pequeños, 3-5 µm, se usan en columnas analíticas, y las partículas más grandes se usan en escala preparativa CLAR. Los analitos se separan cuando ellos viajan a través de la columna debido a las diferencias de partición entre la fase móvil y la fase estacionaria.

Cromatografía de Adsorción

La fase estacionaria en cromatografía de adsorción es sílice o partículas de alúmina. Los analitos son separados debido a su variable grado de adsorción hacia las superficies sólidas. La ventaja principal de la cromatografía de adsorción está en la separación de isómeros que pueden tener características muy diferentes de fisisorción debido al efecto estérico en las moléculas.

Cromatografía de Exclusión Molecular

Las fases estacionarias de mayor empleo son los geles, existen tres tipos de geles; blandos, semirrígidos y rígidos. Los primeros no pueden utilizarse en CLAR porque el caudal y la alta presión generada provocan deformación de partículas y producen canales y grandes volúmenes muertos.

Los geles semirrígidos denominados también geles macroporosos, están constituidos por polímeros con un elevado grado de entrecruzamiento. Existen dos tipos de geles semirrígidos: los de poliestireno-divinilbenceno convencionales y los geles hidrofílicos. Los materiales de relleno rígido son materiales inorgánicos, típicamente vidrios porosos y sílica porosa que se asemejan más a vidrios que a geles, aunque por analogía con los anteriores se los continúa llamando geles.

Cromatografía de Intercambio Iónico

En la cromatografía de intercambio iónico, la fase estacionaria contiene grupos funcionales iónicos y retiene el soluto, de características iónicas pero de signo opuesto, intercambiándolo en un proceso reversible con iones de la fase móvil.

Los intercambiadores aniónicos contienen un grupo ionogénico fuertemente o débilmente ácido. Los intercambiadores catiónicos, por su parte, contienen grupos ionogénicos fuertemente o débilmente básicos.

Fases estacionarias Quirales

Las separaciones de mezclas enantioméricas son muy discutidas porque los isómeros ópticos son químicamente idénticos. Los analitos quirales pueden ser separados usando una fase estacionaria quiral. Un isómero óptico de una molécula quiral normalmente se une a un polímero que se cubre con un material de sílica condensada. Las separaciones ocurren porque los analitos quirales actúan recíprocamente con los isómeros de la fase estacionaria diferentemente.

5.1.4 COLUMNAS DE FASE REVERSA

Las columnas de fase reversa tienen el más amplio rango de aplicaciones de cualquier tipo de columna CLAR. Por tanto, al analizar una mezcla desconocida, es común usar primero una columna de fase reversa. La retención en CLAR de fase reversa está relacionada con la hidrofobicidad del analito y los compuestos más hidrofóbicos (menos polares) eluyen al último. Por lo regular, la fase móvil consiste de una mezcla de solventes orgánicos polares (metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano) con agua y buffers o sales añadidas para controlar el grado de ionización del analito.

Las fases estacionarias típicas son fases ligadas de sílica con hidrocarburos alifáticos como ligandos. Otro empaque para la cromatografía de fase reversa son, alúmina, polímeros como el metacrilato, el estireno-divinilbenceno, etc, al que se une químicamente un compuesto que contiene un grupo funcional determinado.

Silicagel

La sílicagel empleada en cromatografía, es un sólido amorfo y poroso, de gran área superficial (30 a más de $500 \text{ m}^2/\text{g}$), alto volumen de poro ($0.4 - 1.2 \text{ ml/g}$) y un diámetro de poro uniforme y comprendido entre 60 y 300 \AA , aunque pueden emplearse mayores diámetros de poro. Químicamente puede definirse como un óxido de silicato hidratado, de tipo $(\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O})_n$, en el cual sus átomos metálicos internos están ligados entre sí por átomos de oxígeno (puentes siloxano Si-O-Si) y los superficiales pueden ser de tipo "libre", "vecinal" o "geminal" y son los responsables de la actividad superficial (figura 5.3). La sílicagel es fuertemente higroscópica y el agua fijada por puentes de hidrógeno a los silanoles es responsable de su bloqueo y pérdida de actividad. La sílicagel es insoluble en solventes no polares, como los empleados en fase normal, pero es soluble en agua, hasta 100 ppm a temperatura ambiente y pH neutro y aumenta mucho a valores de pH mayores que 7.5.

El limitado rango de estabilidad a la disolución de la sílicagel en función del pH ha llevado al desarrollo de otros soportes, de base polimérica, como alternativa. Actualmente, la sílicagel sigue siendo el material de base de mayor empleo, pero los rellenos de base polimérica, que permiten trabajar en amplios rangos de pH (1 a 13) tienen una difusión creciente.

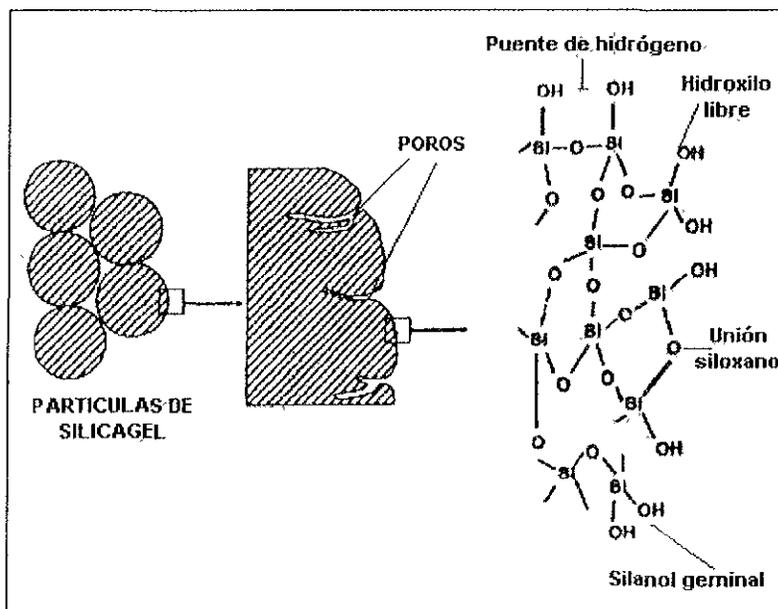


Figura 5.3. Estructura de la sílicagel, mostrando sus poros y la estructura química interna y externa.

La mayor parte del material disponible comercialmente está formado por sílicagel a la cual se ha unido un grupo funcional por unión covalente de tipo siloxano (Partícula-Si-O-R)

Las uniones del grupo funcional a la sílicagel son básicamente cuatro.

1 **Tipo éster (Si-OR)**. Este tipo de unión se forma entre los silanoles y un alcohol y es empleada en cromatografía de gases



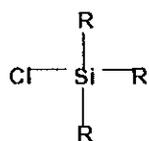
Part = partícula

2 **Tipo amino (Si-NR₂)**. Preparada por reacción de la sílicagel con cloruro de tionilo y el producto de ésta reacción con una amina. Esta fase estacionaria es más estable que la de tipo éster, pero sólo en el rango de pH comprendido entre 5 y 7.

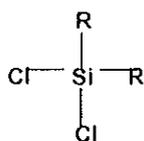


3 **Tipo carbono (Si-CR₃)**. Se prepara en dos etapas: una halogenación de la sílica con cloruro de tionilo similar a la que se efectúa para el tipo amino, seguida por una reacción con un reactivo de Grignard.

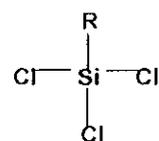
4 **Tipo siloxano (Si-O-SiR₃)**. Es la de mayor difusión (prácticamente total en rellenos de base sílica). Se sintetiza por reacción de los silanoles de la sílica con organo-n-halo-silanos (generalmente clorosilanos), que pueden ser (a) monofuncionales, (b) bifuncionales y (c) trifuncionales. Por ejemplo, para un clorosilano:



(a)



(b)



(c)

La mayor reactividad corresponde al triclorosilano y la menor al monoclorosilano.

En una separación de fase reversa, los silanoles superficiales que no llegaron a silanizarse, pueden dar lugar a mecanismos mixtos de retención, fuerte retención de solutos polares, picos asimétricos con solutos básicos (por su naturaleza acídica), adsorciones indeseadas e incluso disminuir la vida media de la columna, por ofrecer un blanco al ataque por agua a la sílicagel subyacente la fase ligada

Para eliminar o reducir el efecto de los silanoles superficiales, muchas veces se completa la silanización con moléculas grandes (que dan origen a rellenos de C18 y de C8) con una segunda silanización, pero con una molécula más chica, por ejemplo, trimetilclorosilano o hexametildisilazano. Este proceso, conocido como "end capping", puede completar la cobertura de la matriz, pero como se ha visto y como puede demostrarse por técnicas de intercambio isotópico, quedan aún grupos sin reaccionar. Es poco probable que los solutos que habitualmente se manejan en cromatografía de fase reversa puedan penetrar hasta zonas en las cuales no lo ha hecho el trimetilclorosilano. El tipo de sustituyente más empleado en fase reversa es de tipo alquílico, especialmente C18 y en menor proporción C8, con o sin end capping, con menor o mayor grado de cobertura (capa monomérica o polimérica).

En cromatografía de fase reversa, se observa que para igual carga de carbón, a mayor longitud de cadena corresponde mayor retención. La retención de una serie de solutos aumenta con la longitud de la cadena hidrocarbonada de la fase ligada. En primer lugar, se comprueba que a mayor hidrofobicidad del soluto corresponde mayor retención.

Al aumentar la longitud de la cadena hidrocarbonada de C1 a C22, la retención aumenta como máximo en un factor de 10, a diferencia de la variación de retención que puede obtenerse por adición de un modificador orgánico, en cuyo caso la retención se reduce en un factor de 2 a 3 por cada 10% de modificador agregado.

La influencia de la fase móvil sobre la selectividad en fase reversa es mucho mayor que la debida a la fase estacionaria. Aparentemente, la posición terminal de la cadena hidrocarbonada de la fase ligada es la que participa en el proceso de separación, como se puede ver en la figura. Si uno de ellos posee un grupo apolar de mayor tamaño, la superficie de contacto con la fase estacionaria será mayor y retendrá más. Si las cadenas fueran muy cortas, la diferenciación entre ambos solutos sería menor y si el soluto fuera de gran tamaño molecular, solo cadenas largas podrían separarlo eficientemente.

5.1.5 COLUMNAS DE FASE NORMAL

La cromatografía en fase normal (FN) se realiza sobre fases estacionarias hidrofílicas como la sílice o alúmina microporosas y con solventes de mediana a baja polaridad como fase móvil. Es un método apropiado para la separación de solutos de polaridad mediana a alta y es de suma utilidad para la separación de isómeros posicionales con sustituyentes polares.

El mayor inconveniente de la fase normal se debe a la alta actividad del material de relleno, que tiende a absorber agua y solventes polares en su superficie. Como consecuencia, su comportamiento puede modificarse en detrimento de la reproducibilidad de resultados.

La cromatografía en fase normal puede efectuarse sobre partículas totalmente porosas de sílice, alúmina o materiales de fase ligada cuyo comportamiento, según la naturaleza de la fase móvil, responde a esta modalidad. Es decir, dado que la polaridad de los rellenos de fase ligada no es tan alta como la de la sílica-gel o la de la alúmina, es posible utilizar, por ejemplo con una columna de grupos ciano, fases móviles de polaridad menor al del grupo CN con lo cual el comportamiento será el de la fase normal, o fases móviles de mayor polaridad que el grupo CN, resultando en fase reversa.

La funcionalidad de los rellenos de fase ligada utilizados para fase normal pueden responder a grupos diol, ciano, nitro y amino, en orden creciente de polaridad, como se muestran en la tabla 5.5.

EMPAQUE	APLICACIONES
Sílice	Es un adsorbente de propuesta general
Alúmina	Es un adsorbente de propuesta general, mayor retención que la sílice; separa grupos aromáticos
Diol	Menos polar que la sílice, de rápido equilibrio
CN	Adsorbente de menor retención en fase normal
NH ₂	Es el más polar de la fase ligada, diferente selectividad que la sílice, separa grupos de hidrocarburos aromáticos

Tabla 5.5. Rellenos de fase ligada utilizados para fase normal

La mayor ventaja de éstos sobre los rellenos tradicionales de sílicagel reside en la menor frecuencia de retenciones irreversibles, menor influencia del agua y en una respuesta mucho más rápida al cambio de solventes

Al igual que en fase reversa, estos materiales contienen grupos silanoles libres que pueden dar lugar a retenciones inespecíficas. El resultado es, como en aquel caso, tailing y picos mal definidos para solutos muy polares. La solución, también como en fase reversa, puede hallarse fácilmente agregando 0.5 - 1% de un ácido (fosfórico, acético) para solutos ácidos, o una base (trietilamina, propilamina) para solutos básicos

Sílice

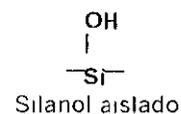
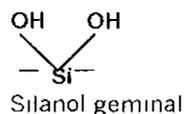
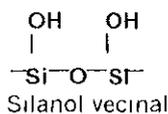
La sílice microporosa es, el material de relleno preferido para las separaciones en fase normal. Es un material de alto poder de adsorción, amorfo, de composición ($\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) que se utiliza en forma de xerogel de área superficial muy elevada (30 a $550 \text{ m}^2/\text{g}$), con tamaño de poro de 60 a 300 \AA y volúmenes de poro de 0.8 a 1.2 ml/g. La tabla resume algunas características de materiales comerciales

MATERIAL	dp (mm)	as. (m^2/g)	pd (A°)
LiChrosorb Si 60	5-7 - 10	500	60
LiChrosorb Si 100	5-7 - 10	300	100
LiChrospher Si 100	5-7 - 20	250	100
LiChrospher Si 300	10	250	300
LiChrospher Si 500	10	60	500
LiChrospher Si 1000	10	30	1000
LiChrospher Si 4000	10	10	4000

Tabla 5.6. Relación entre diámetro de poro y área superficial en partículas de sílicagel. Los términos dp, as y pd corresponden a diámetro de partícula, área superficial y diámetro de poro respectivamente.

Es claro que el área superficial de la sílice está estrechamente vinculado al tamaño de poro, y que la retención lo está con el área superficial. Así, a menor tamaño de poro corresponde mayor área superficial, y por ende, mayor retención del analito. Sin embargo, como el diámetro del poro se relaciona también con los fenómenos de exclusión por tamaño, no se emplean materiales de diámetro de poro menor a 60 \AA ya que se ha observado aún moléculas pequeñas tienen acceso restringido a poros más chicos.

El tamaño y la morfología de las partículas puede variar, pudiendo optarse por materiales de relleno esféricos o irregulares, con tamaños de partícula desde 3 hasta $10 \mu\text{m}$, siendo los más utilizados los de 5 y $10 \mu\text{m}$. Se admite que, en esta modalidad cromatográfica, el proceso de adsorción del analito está gobernado por los grupos hidroxilo (silano Si-OH) presentes en la superficie de la sílice. Existen tres tipos diferentes de grupos silanol: vecinal, geminal y aislado que interactúan con el analito por medio de enlaces de hidrógeno



La retención del analito depende de la concentración de grupos silanoles por unidad área superficial del material de relleno, cantidad variable según el tipo de sílice empleado, del método de obtención del material, de las condiciones de elaboración, y de las condiciones de almacenamiento. Es así comprensible que las propiedades de las diversas sílices comerciales varíen de fabricante en fabricante y aún entre distintos lotes de un mismo fabricante, debido a las diferentes condiciones de

elaboración o a las variables del proceso, aunque la variación es menor que la observada en los materiales de fase ligada

La presencia de agua en este tipo de material es muy importante ya que influye mucho en la retención de los solutos. El agua puede existir en la sílice de dos modos diferentes: como humedad adsorbida a los grupos activos o como agua de constitución, formando parte del material. La primera de ellas se elimina a temperaturas de hasta 150 °C, pero a temperaturas mayores a 200 °C comienza la condensación de los grupos silanol, que se deshidratan formando uniones siloxano. Por encima de 600 °C todo el agua se pierde y todos los grupos silanol se condensan para formar uniones siloxano.

Cuando se hidrata la silicagel, el agua adsorbida físicamente forma multicapas que van llenando los poros de las partículas. Cuando los poros están totalmente llenos de agua, la retención de los solutos ya no obedece a fenómenos de adsorción, sino a mecanismos de partición entre la fase móvil y el agua adsorbida en la superficie del material de relleno, que desde entonces deja de ser la fase estacionaria para convertirse en un simple soporte de la verdadera fase estacionaria, el agua. Por otra parte, la presencia de grupos silanol superficiales confieren a la sílice las características propias de los ácidos débiles. Por ese motivo los analitos de carácter básico serán retenidos más fuertemente que los que posean características neutras o ácidas. Los analitos ionizables suelen eluir muy lentamente y con un tailing pronunciado.

En estos casos, la cromatografía puede mejorarse con el agregado de tetrahidrofurano (o de aminas en general) a la fase móvil para la determinación de analitos básicos, y ácido acético (o de ácidos orgánicos en general) para los analitos ácidos. Si el tailing se debe a interacciones con los grupos silanol de fuerte adsorción, también es posible mejorar la separación inactivándolos. Para tal efecto la adición de pequeñas proporciones de alcoholes (metanol, isopropanol) o de agua a la fase móvil, tiene el efecto de neutralizar a los grupos muy activos y, por ende, mejorar el cromatograma.

El agregado de agua puede además ser importante en otros casos. Es conocido que la presencia de trazas de agua en materiales no modificados de fase normal produce efectos dramáticos en la retención de los solutos. Utilizando solventes no polares anhidros es posible que por efecto de la propia humedad ambiental se produzcan variaciones muy importantes en los tiempos de retención. En este caso es recomendable saturar los solventes a utilizar con agua, o bien agregar un modificador polar a la fase móvil (metanol, isopropanol).

Es también posible disminuir la heterogeneidad de la superficie regulando su carácter ácido con el agregado de buffers para acondicionar la columna y estandarizar su comportamiento. En todo caso, debe tenerse en cuenta que la silicagel es insoluble en los solventes no polares habituales en fase normal, pero es ligeramente soluble en agua, y que la solubilidad en agua aumenta cuando el pH es superior a 7.5.

Alúmina

La alúmina es un óxido de aluminio hidratado de fórmula $Al_2O_3 \cdot nH_2O$, donde n toma valores entre 0 y 3. La alúmina cromatográficamente activa contiene γ -alúmina como componente mayoritario y otros óxidos de aluminio denominados alúminas de transición. Esta γ -alúmina se obtiene por descomposición térmica de la gibbsita o boehmita $AlO(OH)$ a temperaturas comprendidas entre 400 y 700 °C. La alúmina así obtenida presenta una superficie específica de 50 a 200 m^2/g , con un volumen de poro de hasta 0.6 ml/g. El diámetro medio de poro es de 100 a 200 Å y la concentración de grupos hidroxilados está en el orden de los 3 mmoles/ m^2 .

Una suspensión de alúmina en agua puede presentar un pH cercano a 9. Esta alcalinidad se debe a la presencia de sodio, que se encuentra como óxido y como aluminato de sodio. Así, esta alúmina llamada "básica" puede ser empleada como intercambiador catiónico. Su neutralización y acidificación hace incluso posible su empleo como intercambiador aniónico. Este carácter anfotérico de la alúmina permite la determinación de solutos de carácter ácido y básico, pero deben evitarse los pHs extremos, que pueden llevar a la disolución de la fase estacionaria.

La superficie activa de la γ -alúmina presenta los mismos inconvenientes que la sílice respecto del agua adsorbida. Por este motivo deben tenerse en cuenta las mismas consideraciones descritas para la sílice, aunque las propiedades ácidas y básicas débiles de la γ -alúmina le confieren algunas interacciones adicionales que deben tenerse en cuenta.

También como con la silicagel, la retención obedece a mecanismos basados en puentes de hidrógeno, con la posibilidad adicional de que los solutos interactúen con una sustancia muy rica en electrones. A diferencia de la sílice, que pierde actividad al ser calentado por encima de los 200 °C, a mayor temperatura de tratamiento de la alúmina, al menos hasta 700 °C, corresponde mayor poder de retención.

La γ -alúmina es útil para la separación de sustancias orgánicas no saturadas, anillos bencénicos e isómeros de anillos condensados.

5.1.6 SELECCIÓN DE LA COLUMNA

La selección de la mejor columna cromatográfica para un análisis puede causar dudas y algunas veces es una tarea difícil. No existen técnicas infalibles, atajos, trucos o secretos para la selección de una columna, pero si existen algunas guías y conceptos que simplifican el proceso. Existen tres principales parámetros para seleccionar la columna:

- La Fase Estacionaria
- El Diámetro
- La Longitud

La Fase Estacionaria

Escoger la mejor fase estacionaria es la decisión más importante cuando se está seleccionando una columna. Desafortunadamente, también es la más ambigua y difícil.

El método más confiable es consultar la gran colección de aplicaciones disponibles con los proveedores y fabricantes de columnas (una posibilidad muy fácil de acceder a través del Internet con *Hewlett Packard, Quadrex, J & W, Chrompack, Supelco, SGE, Alltech*, etc), fabricantes de equipos y en la literatura especializada (bases de datos, las revistas sobre cromatografía y química analítica también disponibles en Internet). Suficiente información puede ser obtenida para simplificar la decisión o reducir el número de columnas potenciales. La situación más difícil es cuando no hay información previa disponible.

La selección de la fase estacionaria es mucho más fácil aún si solamente se tiene un cromatograma disponible para todos o la mayoría de los componentes de la muestra. Los conceptos de selectividad y polaridad de las fases estacionarias son muy útiles cuando se seleccionan fases estacionarias.

El uso de la polaridad y la selectividad como sinónimos no es exacto, pero sí es muy común. La selectividad es determinada por las interacciones fisicoquímicas de las moléculas del soluto con la fase estacionaria.

La polaridad está determinada por la estructura de la fase estacionaria. La polaridad tiene un efecto sobre la separación, sin embargo, es solamente una de las muchas propiedades de la fase estacionaria que influyen sobre la separación de los picos.

La selectividad puede ser concebida como la capacidad de la fase estacionaria para diferenciar entre dos moléculas de solutos por diferencias en sus propiedades físicas o químicas. La separación es obtenida si la interacción entre la fase estacionaria y los solutos es diferente.

Pasos para seleccionar la fase móvil de una columna cromatográfica

1 Con los distintos tipos de fases estacionarias para cromatografía, suele haber varias formas adecuadas de separar los componentes de una mezcla dada (ver tablas 5.7 y 5.8). Estos diagramas son el punto de partida para seleccionar una columna CLAR. En algunos casos, más de una columna es apropiada para un cierto análisis. Aunque existen ciertas reglas generales, es recomendable primero consultar la literatura técnica, metodología oficial o algunos proveedores en diferentes páginas de Internet.

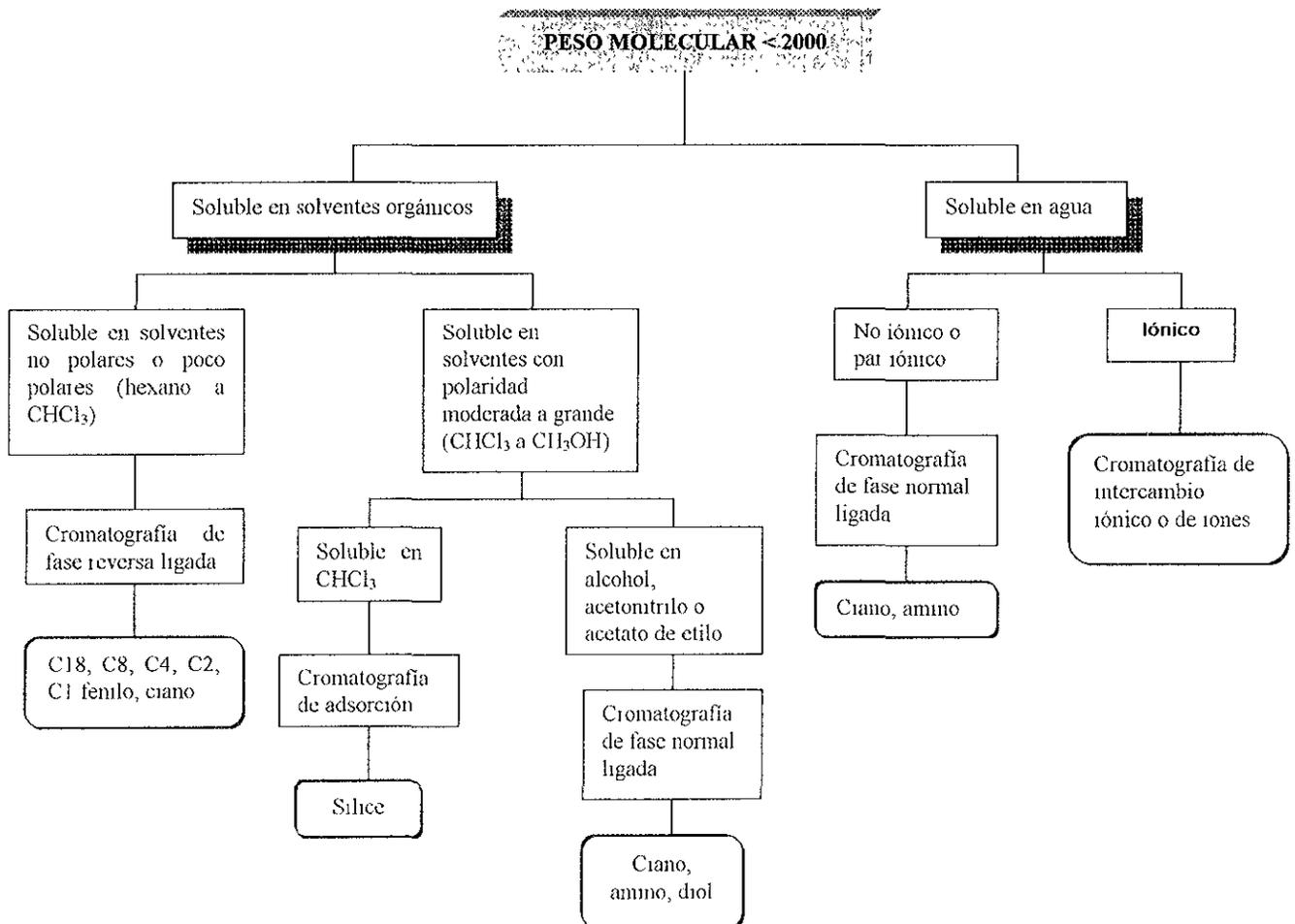


Tabla 5.7. Guía para la elección del tipo de CLAR

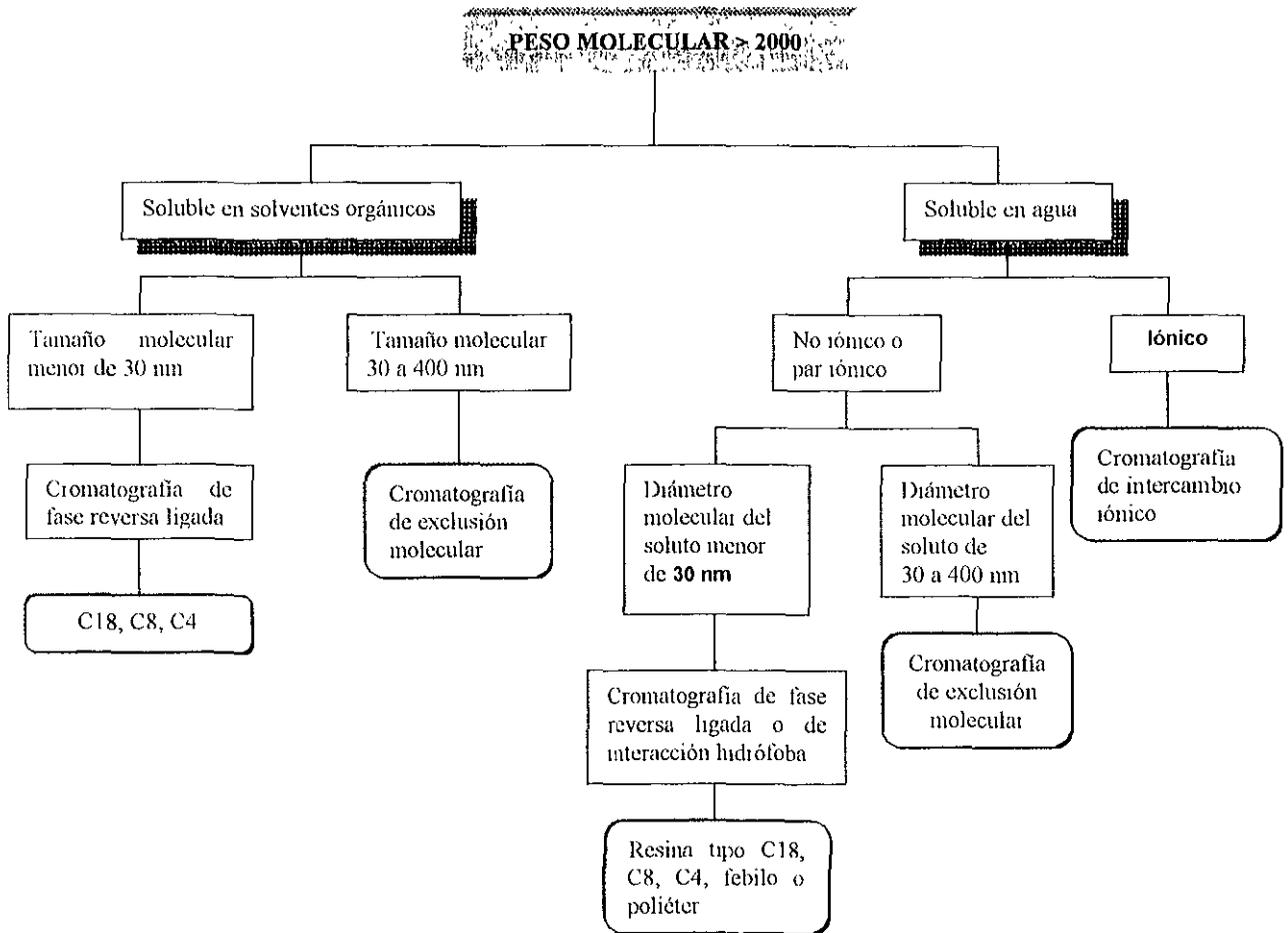


Tabla 5.8. Guía para la elección del tipo de CLAR

Un parámetro de gran importancia para la selección de la columna es la elección entre los tipos de fase ligada. En general, a mayor carga carbonada o a mayor lipofilicidad del sustituyente, corresponde mayor retención. Sin embargo, la elección entre columnas de similar selectividad, por ejemplo C18 y C8, no siempre es tan simple, debido a los factores responsables de la retención. La tabla 5.9 muestra los diferentes tipos de relleno de fase ligada.

2. Use la fase estacionaria menos polar que le suministre una resolución satisfactoria y tiempos de análisis cortos. Las fases estacionarias no polares tienen tiempos de vida superiores a las polares.

3. Use una fase estacionaria con una polaridad semejante a la de los solutos a separar. Trabaje esta aproximación la mayoría de las veces, sin embargo la mejor fase estacionaria no siempre se encuentra utilizando esta técnica.

4. Si es posible, evite usar fases estacionarias que contengan una funcionalidad que genere una gran respuesta con los detectores selectivos.

MODIFICACION	GRUPO LIGADO A SILICAGEL	APLICACIONES COMENTARIOS
C1	-CH ₃ metil	Fase Reversa (FR) para compuestos muy retenidos en C18
C2	-CH ₂ -CH ₃ etil	Análisis más rápidos que con C18
C4	-(CH ₂) ₃ -CH ₃ butil	Análisis de péptidos y proteínas
C6	-(CH ₂) ₅ -CH ₃ hexil	
C8	-(CH ₂) ₇ -CH ₃ octil	FR de empleo general Algo menos en cromatografía de par iónico Menos retentiva y más rápida que C18.
C18	-(CH ₂) ₁₇ -CH ₃ octildecil (ODS)	FR y Cromatografía de Par Iónico (CPI) Es el relleno más empleado en FR y en CLAR en general
Fenil (Phe)	-(CH ₂) ₃ -Phe fenilpropil	FR y CPI Para compuestos moderadamente polares Retención similar a C8, pero con mayor selectividad hacia compuestos aromáticos
Ciano (CN)	-(CH ₂) ₃ -CN cianopropil	FR (solventes polares) y FN (solventes no polares) Alternativa con ventajas a la silicagel no modificada en FN En FR, retención moderada, con selectividad hacia dobles enlaces y triples enlaces
Nitro (NO ₂)	-(CH ₂) ₃ -Phe-NO ₂ nitrofenilpropil	Separación de compuestos con dobles enlaces y aromáticos en FN
Amino (NH ₂)	-(CH ₂) ₃ -NH ₂ aminopropil	Material multipropósito en FN como alternativa de selectividad a CN, NO ₂ y silicagel, en FR muy empleada en análisis de carbohidratos, en cromatografía de intercambio iónico como intercambiador aniónico débil, con buffers como fase móvil Solvente y muestra deben estar libres de cetonas y aldehídos
Diol (OH)	-(CH ₂) ₃ -O-CH-CH ₂ OH OH Diol	FN, FR y CFM. Menos polar que la silicagel no modificada, pero más polar que CN Retención moderada en FR Menos estable
N(CH ₃) ₂	-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	Intercambiador aniónico débil
-SO ₃ Na	-(CH ₂) ₃ -Phe SO ₃ ⁻	Intercambiador catiónico fuerte
-N(CH ₃) ₃ ⁺	-(CH ₂) ₃ -Phe NMe ₃ ⁺	Intercambiador aniónico fuerte
-COONa	-COO ⁻	Intercambiador catiónico débil

Tabla 5.10. Tipos de relleno de Fase Ligada.

5 Las columnas n octildecil (C18) n-decil (C8), y grupos fenil (o sus equivalentes en otras marcas) cubren un amplio rango de selectividades, por lo tanto si cuentas con este conjunto de columnas en el laboratorio, tienes la herramienta necesaria para resolver un sin número de problemas analíticos

6 Las columnas quirales son usadas para separar compuestos enantioméricos, por ejemplo en síntesis orgánica

El Diámetro

Pasos para seleccionar el diámetro de una columna cromatográfica

1 Si hasta hace pocos años se hablaba de una columna "convencional" de 25-30 cm de longitud y 4 cm de diámetro interno (D I), rellena con partículas de 10 mm de diámetro, irregulares o esféricas, actualmente se tiende a emplear columnas de 25 cm o de 10-15 cm de longitud y 0.5 a 20 mm de D I, según la resolución requerida, y columnas de 3-6 cm de longitud con partículas de 3 μm en la denominada *High Speed* o *Fast LC*

2 Use columnas entre 0.5 a 3.0 mm de D I cuando requiera de altas eficiencias.

3. Use columnas de 3.9 a 7.8 mm de D I cuando requiera de una mayor capacidad de muestra. Estas a menudo proveen mejor resolución

La Longitud

Pasos para seleccionar la longitud de la columna:

1 Empiece con columnas entre 15 y 25 cm cuando desconozca la mejor longitud

2 Las columnas entre 5 y 10 cm son apropiadas para muestras que contengan solutos muy bien separados o para muy pocos solutos. Columnas más cortas son usadas con columnas de pequeño diámetro para reducir la presión de la columna

3 Las columnas entre 20 y 25 cm se usan cuando la resolución no puede ser mejorada por otros medios como: columnas de menor diámetro, diferente fase estacionaria. Son más apropiadas para muestras complejas que contengan un gran número de solutos. Las columnas más largas tienen largos tiempos de análisis y cuestan más

5.1.7 CUIDADOS Y MANTENIMIENTO DE LAS COLUMNAS

Los cuidados y el mantenimiento que debe tener cualquier columna cromatográfica en general, son los siguientes.

- Eficiencia
- Temperatura
- Conexión
- Contaminación
- Almacenamiento
- pH

Eficiencia

Siempre que se adquiera una columna nueva se deben evaluar los parámetros N, k', R y α con los que se puede llevar un control de vida de la columna. Es recomendable tener una carpeta de control o bitácora con el historial de cada columna.

Cuando se tenga pérdida en la eficiencia de la columna esta debe ser regenerada, reemplazar los filtros y comprobar su eficiencia caracterizándola (N, k', R y α)

Para prevenir o evitar que la columna se dañe, se debe seleccionar adecuadamente las condiciones de trabajo, en base a las indicaciones del proveedor

Evite disminuir o aumentar bruscamente el flujo cuando la columna esté conectada para evitar cambios bruscos de presión.

Evite solventes que reaccionen con la columna (que desgasten la columna)

Temperatura

Para evitar o prevenir variaciones en los tiempos de retención y afinidad entre analito y columna, se debe de controlar la temperatura con la mayor precisión posible dentro de los límites, puede ser con baño de agua u horno de resistencia eléctrica

Para evitar o prevenir disminución de la eficiencia de la columna por altas temperaturas, se deben seguir las indicaciones del proveedor, por ejemplo: columnas con base de sílica no se deben calentar por arriba de 60°C así como algunas columnas de tamaños de partículas pequeños debido a que pierden eficiencia (N) hasta en un 50% cuando se calienta a temperaturas altas, para tamaños de partícula de 3 mm se degradan con temperaturas por arriba de 40°C

Conexión

Siempre verifique que las tuercas estén bien apretadas, para evitar fugas

Verifique que el filtro sea el adecuado, que la columna no este tapada por objetos extraños, que el diámetro de las tuberías sea el correcto

Contaminación

Use filtros y guarda columnas en línea, filtre y limpie hasta donde sea posible muestras sucias, cambia los filtros frecuentemente. Lave la columna frecuentemente con un disolvente fuerte

Todo esto con el fin de evitar que las columnas se obstruyan, haya presiones altas, presencia de picos fantasma ó picos coleados

Almacenamiento

Almacene las columnas después de lavarlas, en disolución de algún disolvente orgánico con agua en una proporción 2:8, como por ejemplo metanol, acetonitrilo, etc. excepto para columnas de permeación en gel que se deben de almacenar en disoluciones amortiguadoras con 0.1% de azida. Es recomendable ver las indicaciones del fabricante

Asegúrese de colocar bien los tapones en los extremos de la columnas antes de almacenarlas. Todo con la finalidad de prevenir el crecimiento bacteriano

pH

Para prevenir o evitar cambios en la forma de los picos, degradación de columnas, disminución en el tiempo de retención de compuestos no básicos y aumento en el tiempo de retención para compuestos básicos, se recomienda para empaque de fase ligada donde la base es sílica, usar fases móviles con pH entre 2.5 y 7. Use precolumnas con el mismo empaque o de sílica

5.2 SOLVENTES

La fase móvil en CLAR cumple un papel fundamental, ya que puede por sí misma modificar completamente la selectividad de las separaciones en fase normal y es, a la vez, el verdadero "motor" de las separaciones en fase reversa. En CLAR es posible lograr un número muy grande de diferentes separaciones con una columna, tan sólo variando la composición de la fase móvil

5.2.1 PROPIEDADES DE LOS SOLVENTES

No todos los solventes son adecuados para trabajar en CLAR, ya que la condición de estado líquido no es suficiente por sí misma para que una sustancia se pueda emplear como fase móvil. Un solvente apropiado para CLAR debe cumplir con algunos requisitos:

- Alto poder solubilizante de las muestras
- Baja reactividad
- Compatibilidad con el detector utilizado
- Adecuado punto de ebullición
- Baja viscosidad
- Seguridad
- Alto grado de pureza
- Propiedades Químicas

Alto poder solubilizante de las muestras

En Cromatografía Líquida la muestra a inyectar debe estar completamente disuelta. Es conveniente que el solvente de disolución de la muestra sea la misma fase móvil.

Si esto no es posible, y de hecho muchas veces no lo es, se debe tener en cuenta tanto la miscibilidad entre el solvente de disolución y la fase móvil, como la posible precipitación de componentes de la muestra al estar en contacto con la fase móvil. Es así que, cuando se trabaja con muestras de origen biológico, se debe, en primera instancia, eliminar las proteínas, pues precipitan en contacto con los solventes orgánicos presentes en la fase móvil.

La insolubilidad de las muestras en la fase móvil pueden acarrear problemas como: precipitación de los compuestos menos solubles en la cabeza de la columna, lo que se visualiza por un aumento de la presión al cabo de varias inyecciones

El problema se puede agravar si la precipitación ocurre en un sector central de la columna, ya que si el caudal del solvente debe interrumpirse, o no puede restablecerse, la columna no podrá ser lavada ni recuperada

Otro inconveniente derivado del empleo de un solvente de muestra, diferente de la fase móvil está dado por la aparición de picos extraños al cromatograma verdadero, debidos a la señal del mismo solvente (en general en el volumen muerto), o bien a la elución de impurezas retenidas en la columna

Baja reactividad

Los solventes con un elevado grado de reactividad no se utilizan en CLAR, ya que pueden reaccionar con la muestra, la fase estacionaria, o los componentes del equipo cromatográfico. Así por ejemplo no se utilizan olefinas, nitrocompuestos, aldehídos ni cetonas

Los solventes con grupos cetónicos se deben evitar particularmente con columnas de fase ligada a grupos amino, dado que el producto de reacción, una base de *Schiff*, es estable y la degradación ocasionada es irreversible

Compatibilidad con el detector utilizado

El detector CLAR más difundido es el espectrofotométrico, es habitual elegir un solvente "transparente" a la longitud de onda de trabajo. Esa transparencia se puede evaluar por la longitud de onda de corte λ_c , es decir, la longitud de onda a la cual la absorbancia del solvente, en una celda de 10mm de paso óptico, es igual a 1 unidad de absorbancia empleando aire como referencia (ver tabla 5.11). Por ejemplo, si un solvente tiene su longitud de corte a 254 nm, no puede utilizarse a 230 nm pero sí a 280 nm. Solventes como el tolueno (λ_c : 258 nm) y acetona (λ_c : 330 nm) prácticamente no se emplean, ya que la señal de fondo que producen en un detector convencional (absorción de base, debida a la fase móvil) es tan alta que impide, no sólo la medición de los compuestos eluidos, sino incluso el ajuste de cero del instrumento. Como contrapartida, el metanol (λ_c : 205 nm) y el acetonitrilo (λ_c : 190 nm) son los solventes más empleados en CLAR.

Sin embargo, la longitud de onda de corte del solvente puro no es el único parámetro a considerar, ya que la presencia de impurezas puede aumentar considerablemente el valor tabulado. Por ejemplo, el hexano grado analítico normalmente está contaminado con trazas de benceno, y no puede utilizarse como fase móvil en CLAR a longitudes de onda menores a 250 nm.

SOLVENTE	LONGITUD DE ONDA DE CORTE (λ_c nm)
Agua	0
Acetona	330
Acetonitrilo	190
Ciclohexano	200
Ciclopentano	200
Clorofórmio	245
Cloruro de metilo	233
Dimetilsulfóxido	268
Dioxano	215
Etanol	210
n-Heptano	195
n-Hexano	190
Isooctano	197
Isopropanol	205
Metanol	205
n-Pentano	195
n-Propanol	240
Tetrahidrofurano	212
Tolueno	285

Tabla 5.11. Longitud de onda de corte (λ_c) de algunos solventes

Adecuado punto de ebullición

En general, se prefieren los solventes de punto de ebullición intermedio. Si el solvente tiene bajo punto de ebullición, su volatilidad es alta y la composición de la fase móvil puede variar durante la jornada de trabajo. Por otra parte, el ciclo de descompresión en una bomba recíproca puede llevar a la formación de burbujas, lo que se asocia con irregularidad del caudal, atascamiento de pistones, etc. Por el contrario, un alto punto de ebullición se correlaciona, por lo general, con alta viscosidad. Esto último es sinónimo de alta presión (con ello menor vida media de los componentes del instrumento) y baja eficiencia. Sin embargo, un solvente viscoso puede resultar muy útil para

modificar la selectividad del sistema, y puede ser apropiado si se emplea en baja proporción (ver tabla 5.12)

SOLVENTE	PUNTO DE EBULLICIÓN °C	VISCOSIDAD CPS A 25°C
Agua	100	0.89
Acetona	56	0.30
Acetonitrilo	82	0.34
Coclihexano	81	0.90
Ciclopentano	49	0.42
Cloroformo	61	0.53
Cloruro de metilo	40	0.41
Dimetilsulfóxido	189	2.00
Dioxano	101	1.20
Etanol	78	1.08
n-Heptano	98	0.40
n-Hexano	69	0.30
Isooctano	99	0.47
Isopropanol	82	1.90
Metanol	65	0.54
n-Pentano	36	0.22
n-Propanol	97	1.90
Tetrahidrofurano	66	0.46
Toluceno	100	0.55

Tabla 5.12. Propiedades de los solventes habituales en CLAR

Baja Viscosidad

La viscosidad (η) de los solventes está estrechamente relacionada con la presión del sistema. Con solventes viscosos, la eficiencia de la separación es menor debido a que el coeficiente de difusión de la muestra se reduce, y se dificulta la transferencia de masa del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria

El aumento de la viscosidad reduce la permeabilidad de la columna, y al mismo caudal la presión será mayor que la producida por un solvente de baja viscosidad. Por este motivo, se prefiere evitar el uso de solventes de alta viscosidad como el dimetilsulfóxido (η : 2.00 cps) o isopropanol (η : 1.90 cps).

En el caso de mezclas de solventes, la viscosidad de la mezcla, depende preferentemente de la viscosidad del solvente menos viscoso. Sin embargo, esto no se cumple en el caso de mezclas de solventes de fuerte asociación como las que habitualmente se utilizan en cromatografía líquida de fase reversa, donde la viscosidad de la mezcla resulta mucho más elevada que la de los componentes puros por ejemplo la viscosidad máxima de una mezcla metanol-agua se da para un 40% de metanol, y en la mezcla acetonitrilo-agua, para un 10% de acetonitrilo

Seguridad

Como en cualquier método analítico, en CLAR debe evitarse el empleo de solventes que por sus características (en particular inflamabilidad y toxicidad), representan un serio riesgo para el operador. En general, se recomienda no utilizar solventes de alto grado de toxicidad como el sulfuro de carbono, benceno o tetracloruro de carbono y tomar precauciones durante la manipulación de los otros solventes

Alto grado de pureza

Los solventes empleados en CLAR deben cumplir, como se ha visto, ciertos requisitos de calidad. La presencia de impurezas puede, por un lado, inducir modificaciones de la selectividad de la fase móvil, y por otro contribuir a una señal de base importante en el detector (absorbancia, reacciones de óxido-reducción, etc.)

La utilización de solventes de menor calidad sin posterior purificación puede parecer económicamente tentadora, pero los posibles problemas asociados resultan en general en mayores costos.

A veces no es posible obtener comercialmente un solvente de buena pureza. En estos casos pueden emplearse solventes de menor calidad, pero se recomienda una purificación previa.

Propiedades Químicas

La separación cromatográfica se produce por un balance de afinidades entre la muestra, la fase móvil y la fase estacionaria. Las propiedades químicas de la fase móvil son las que establecen el tipo y fuerza de interacción entre el solvente y la muestra, y en consecuencia, son determinantes de la separación. La tabla 5.13 representa una muestra del tipo y magnitud de estas propiedades para algunos solventes, que pueden definirse como:

Índice de polaridad. Es la resultante de todas las propiedades químicas e intenta medir cuantitativamente la "fuerza" de interacción de los solventes frente a solutos polares.

Fuerzas Dispersivas: Indica la polarizabilidad (facilidad de polarizarse) de una molécula y aumenta con el número de electrones de la misma y con la distancia de éstos al núcleo.

Capacidad Aceptora o Donadora de Protones: Es una medida de la capacidad de las moléculas a intercambiar protones. Las sustancias que aceptan protones se denominan bases de Lewis, y las que los donan, ácidos de Lewis.

Momento Dipolar. Se refiere a la capacidad de una molécula para formar dipolos permanentes y está estrechamente relacionado con la constante dieléctrica del solvente.

La selectividad de los solventes no resulta, como puede verse, de una única propiedad, sino de la suma de todas sus propiedades químicas. La contribución de cada tipo de interacción, en calidad y magnitud, sirven para agrupar los solventes de similar comportamiento en un diagrama triangular, de indudable utilidad para la elección de solventes en función de su selectividad.

SOLVENTE	INDICE DE POLARIDAD	FUERZA DISPERSIVA	DONADOR DE PROTONES	ACEPTOR DE PROTONES	MOMENTO DIPOLAR	GRUPO
Isooctano	-0.4	-0.10	0.00	0.00	0.00	-
n-Hexano	0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	-
Eter Isopropilico	2.2	-0.15	0.54	0.11	0.53	1
Tolueno	2.3	0.00	0.32	0.24	0.44	7
Eter Etilico	2.9	-0.22	0.55	0.11	0.34	1
Cloruro de Metilo	3.4	0.20	0.34	0.17	0.49	5
n-Butanol	3.9	-0.10	0.53	0.21	0.26	2
Isobutanol	3.9	-0.30	0.55	0.23	0.22	2
n-Propanol	4.1	-0.15	0.54	0.19	0.27	2
Tetrahidrofurano	4.2	-0.15	0.41	0.19	0.40	3
Acetato de Etilo	4.3	0.00	0.34	0.25	0.42	6
Isopropanol	4.3	-0.30	0.54	0.20	0.26	2
Cloroformo	4.3	-0.10	0.28	0.39	0.33	8
Metil Etil Cetona	4.5	0.00	0.36	0.17	0.44	6
Dioxano	4.8	0.08	0.38	0.21	0.41	6
Etanol	5.2	-0.23	0.51	0.21	0.28	2
Acetona	5.4	-0.10	0.36	0.24	0.40	6
Acetonitrilo	6.2	0.04	0.33	0.26	0.41	6
Metanol	6.6	0.03	0.51	0.19	0.30	2
Formamida	7.3		0.40	0.28	0.32	4
Agua	9.0		0.40	0.34	0.26	-

Tabla 5.13. Lista de propiedades de solventes habituales de CLAR.

5.2.2 ADITIVOS SALES Y REACTIVOS

Numerosos métodos cromatográficos requieren el uso de sales en la fase móvil, generalmente para el control y regulación del pH o de la fuerza iónica. Estos aditivos, al igual que los solventes, deberían tener un alto grado de pureza.

Los fosfatos son muy usados en cromatografía de fase reversa como sales de sodio o potasio debido a su baja absorción UV aún a longitudes de onda cortas. Los buffers de acetato o de citrato se utilizan en menor grado. El primero porque presenta una alta absorción al UV y el segundo porque se compleja con la sílice de las columnas reduciendo su vida útil.

Si se desea recuperar el analito separado por cromatografía de líquidos, es recomendable el uso de buffers de trifluoracetato debido a que es muy volátil y puede ser eliminado por aplicación de calor y vacío. Con este mismo fin se podría utilizar buffers de formiato pero su uso no es recomendado dado que ataca al acero inoxidable.

Las soluciones que contienen aditivos se deben preparar el día en que se van a utilizar, aunque algunas se pueden almacenar en soluciones concentradas. En este caso, se debe indicar la fecha de preparación en el rótulo del envase, y descartar si se observa alguna alteración. Los modificadores orgánicos (metanol, acetonitrilo, etc.) actúan como inhibidores del crecimiento bacteriano. Sin embargo, las fases móviles empleadas en cromatografía de intercambio iónico son, en general, soluciones acuosas con agregado de sales inorgánicas. Estas soluciones representan un buen medio para el crecimiento de microorganismos, y no se debe almacenar, ni dejar durante mucho tiempo estancadas en el equipo. En estos casos, el crecimiento bacteriano se puede inhibir por agregado de azida sódica al 0.005%.

No se recomienda el uso de sales de haluros y sus ácidos ya que atacan al acero inoxidable. Si el trabajo con este tipo de sales es habitual, se recomienda emplear equipos sin componentes de acero inoxidable, el que puede reemplazarse por titanio y politetrafluoretileno o teflón.

Las aminas se utilizan habitualmente para reducir el tailing de los picos de sustancias de carácter básico.

Las alquilaminas de uso más común son la trietilamina, dietilamina y dibutilamina, en bajas concentraciones (1-20 mM).

Los ácidos más utilizados son el acético y el fosfórico. Se emplean generalmente para controlar el pH en cromatografía de fase reversa. De éstos, es preferible el fosfórico por su baja absorción UV.

Otros aditivos corrientes son los reactivos de apareamiento iónico, empleados para el análisis de sustancias orgánicas iónicas o ionizables. Básicamente, existen dos tipos de reactivos de apareamiento iónico: las sales de tetraalquilamonio empleadas para el análisis de solutos ácidos y los alquilsulfonatos, para los solutos básicos. En ambos casos, se emplean en baja concentración, entre 1 y 20 mM. Tanto las sales de amonio cuaternario como los alquilsulfonatos pueden conseguirse comercialmente con buen grado de pureza. Se debe tener presente que al usar estos reactivos, las columnas quedan "marcadas" debido a que no se recomienda que las columnas utilizadas con estos aditivos no se empleen en la modalidad "regular" de cromatografía líquida en fase reversa, ya que el lavado es insuficiente para remover completamente el reactivo adsorbido al relleno, y la selectividad de estas columnas varíe en forma permanente.

El laurilsulfato de sodio merece un tratamiento debido a que, normalmente, está contaminado con homólogos de cadena más corta o más larga, alcoholes libres y electrolitos. Si debe emplearse con buffers de fosfatos, es preferible el uso de sales de sodio y no de potasio. Se ha reportado la precipitación de las impurezas del laurilsulfato de sodio en presencia de iones potasio provenientes del buffer de fosfatos en concentraciones tan bajas como 3.5 mM.

5.2.3 FASE MÓVIL

La naturaleza de la fase móvil es un factor clave para la discriminación entre solutos en CLAR. Además, la presión y el caudal de la misma son también factores de gran relevancia en el proceso separativo. Por ello, las características del suministro de la fase móvil son aspectos de especial interés en este tipo de cromatografía.

En CLAR se pueden distinguir dos tipos generales según sea la naturaleza de la fase móvil:

- **Cromatografía en Fase Normal;** en ella la fase móvil es de naturaleza no polar, mientras que la fase estacionaria es fundamentalmente polar. Se denomina así por ser modalidad que se desarrolló en primer lugar.
- **Cromatografía en Fase Reversa,** la fase móvil es polar y la estacionaria no polar. Es la que actualmente tiene mayor importancia pues más del 85% de las aplicaciones de CLAR se basan en esta alternativa.

Además, deben distinguirse varias alternativas respecto a la composición de la fase móvil:

- Composición constante durante el proceso cromatográfico (modalidad isocrática). Puede tratarse de un solvente puro, de una mezcla de dos o más solventes, de disoluciones de concentración fija de desplazantes iónicos o no iónicos, etc.
- Formación de un gradiente de composición de la fase móvil durante el proceso de separación (modalidad gradiente) que amplía enormemente la capacidad de discriminación de CLAR.

Existen dos grupos de propiedades básicas y complementarias, de una fase móvil, pura o no, para su uso en CLAR. Las características de mayor trascendencia cromatográfica son la "fuerza desplazante" y la selectividad. Así, para solventes no electrolíticos, la fuerza del solvente es sinónimo de polaridad.

La selectividad, que se refiere a la capacidad de una fase móvil para provocar una diferenciación en el comportamiento de varios solutos en el sistema cromatográfico: generalmente se consigue con una selección de su composición y si no es suficiente, es precisa una variación de su composición con el tiempo.

La fase móvil debe poseer, además, otras propiedades deseables para su uso en CLAR:

- Debe tener baja viscosidad, que origina una mayor difusividad mejorando así el funcionamiento de la columna
- Debe ser accesible en forma pura y evitar así su purificación previa en el laboratorio; dado el gran desarrollo de CLAR, existe una gran variedad de disolventes comercializados con fines cromatográficos.
- Baja inflamabilidad y toxicidad, requerimiento que no cumplen muchas de las fases móviles usadas; por ello es siempre recomendable una buena ventilación en el laboratorio
- Baja corrosividad
- Compatibilidad con el sistema de detección para evitar respuestas anómalas, fenómenos de saturación, etc. Este requisito es muy importante y limitante en la elección de la fase móvil.

Un requerimiento técnico importante de la fase móvil antes de su introducción al sistema cromatográfico es la ausencia de gases disueltos que pueden originar importantes perturbaciones:

- Reacciones indeseables entre los gases (oxígeno) y los componentes de la muestra
- Irregularidades en el flujo dentro de la columna. el gas puede ocupar una zona de la misma de forma temporal o semipermanente, reduciendo así la eficacia del sistema cromatográfico y su reproducibilidad
- Fluctuaciones en la respuesta del detector: cambio de línea de base, señales parásitas, etc., ya que pueden producirse burbujas por la reducción drástica de la presión a la salida del cromatógrafo.

La desgasificación de solventes, se trata en el tema Preparación de la Fase Móvil 5.2.6

5.2.3 SOLVENTES DE LA FASE NORMAL

En cromatografía de fase normal, donde se emplean solventes no polares, el problema más frecuente es la desactivación de la columna de sílice o alúmina por adsorción de agua. El agua adsorbida es responsable de los mecanismos mixtos de retención (partición y adsorción) y produce cambios profundos en la retención y selectividad. Los solventes no polares que se utilizan en fase normal suelen tener trazas de agua. Si bien, debido a la baja solubilidad, estas cantidades son muy pequeñas (por ejemplo 0.09% en cloroformo, 3.25% en acetato de etilo a saturación), el agua resulta ser muy afín a la columna y comienza a concentrarse en la superficie del material de relleno durante el transcurso del trabajo.

El proceso de adsorción del agua es, afortunadamente, reversible. Para eliminar el agua de los solventes, se puede utilizar un desecante como el sulfato de sodio anhidro, la alúmina básica o tamices moleculares de 4 Å^o.

Algunos de los solventes empleados en fase normal son los siguientes:

- Eteres
- Hidrocarburos halogenados
- Hidrocarburos alifáticos

Eteres

Los éteres etílico, propílico e isopropílico tienen una alta presión de vapor, y son altamente inflamables. Por otra parte, son susceptibles de formar peróxidos, especialmente cuando son anhidros. Su empleo está por ello muy limitado en CLAR, aunque la selectividad que aportan impide que sean descartados como solventes de elución. Una alternativa menos riesgosa consiste en emplear éter-metil-terbutílico.

Hidrocarburos Halogenados

Por lo general todos los compuestos pueden contener trazas de ácido clorhídrico o bromhídrico, muy reactivos frente al acero inoxidable. Estos contaminantes pueden eliminarse al pasarlos a través de una columna de alúmina.

Las mezclas de hidrocarburos halogenados con éteres y/o acetona son particularmente perjudiciales. Se ha reportado que tanto el tetracloruro de carbono como el cloroformo, en mezclas con tetrahydrofurano, acetona, dietiléter y alcohol isopropílico corroen al acero inoxidable, mientras que la corrosión no tiene lugar cuando se utilizan estos solventes en forma individual. El mecanismo de ataque podría deberse a los procesos autooxidativos de los éteres, formación de eteratos metálicos y radicales libres del tipo tetracloruro de carbono inducidos por la presencia de los peróxidos. Este tipo de mezclas deben evitarse y, en caso de necesidad, se prepararán en forma inmediata previo al uso y nunca se dejarán estancadas en el equipo.

El cloruro de metileno es uno de los hidrocarburos halogenados más estables. Su degradación térmica en aire seco se produce a temperaturas mayores a los 120°C con producción de ácido clorhídrico y trazas de fosgeno. La degradación se inhibe con trazas de compuestos fenólicos o amileno. El cloroformo se puede descomponer lentamente a la luz, en presencia o no de aire, formando fosgeno y ácido clorhídrico.

En fase normal la presencia de etanol modifica la polaridad y selectividad de la fase móvil, por lo que los cromatogramas obtenidos utilizando cloroformo con o sin estabilizador pueden diferir. Para eliminar el etanol, se lava el cloroformo con agua y se seca con sulfato de sodio anhidro, alúmina básica con tamices moleculares de 4 Å^o.

El tetracloruro de carbono prácticamente no se utiliza en CLAR, dado que es muy sensible a la ruptura oxidativa por exposición al aire, humedad o luz y, además, es un solvente sumamente tóxico. Se recomienda un nuevo solvente de fase normal, como alternativa a los alcanos, el 1,1,2-tricloro-1,2,2-trifluoretano (FC 113). Este solvente se caracteriza por su baja toxicidad, alto grado de pureza y buena transparencia UV (corte a 231 nm) con una fuerza de elución comparable a la del n-hexano.

Hidrocarburos Alifáticos

Los hidrocarburos alifáticos son solventes muy transparentes a bajas longitudes de onda y poco viscosos. Debido a estas propiedades son especialmente adecuados para trabajar en CLAR.

Desafortunadamente suelen contener trazas de olefinas o benceno los que dificultan su empleo por debajo de los 260 nm

5.2.5. SOLVENTES DE FASE REVERSA

Las fases móviles para la fase reversa están constituidas por mezclas de solventes polares, en general agua, y un modificador orgánico (metanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano), con o sin el agregado de aditivos (sales inorgánicas o reactivos de apareamiento iónico). A mayor proporción de modificador orgánico corresponde menor retención (menor k') y a mayor proporción de agua, mayor retención (mayor k'). El dioxano y el tetrahidrofurano se mezclan tanto con agua como son solventes no polares (cloroformo, hexano), y pueden considerarse tanto solventes de fase normal como de fase reversa.

Algunos de los solventes empleados en fase reversa son los siguientes:

- Agua
- Metanol
- Acetonitrilo
- Tetrahidrofurano
- Dioxano

Agua

El agua es, el solvente más utilizado en CLAR. Se puede adquirir comercialmente agua de calidad cromatográfica, o bien puede ser purificada por el mismo usuario.

El agua destilada y desionizada que, a los fines prácticos, es útil para muchas de las aplicaciones de laboratorio, puede encontrar serias limitaciones en CLAR. La razón de ello reside en la presencia de sustancias orgánicas (ftalatos, cloraminas, etc) que no se eliminan por el tratamiento aplicado.

Las columnas de fase reversa, muy hidrofóbicas, tienen afinidad por compuestos de baja polaridad. Como consecuencia, la operación con sistemas isocráticos con fases móviles polares, conduce a su retención en la fase estacionaria. En este caso las impurezas pueden actuar como verdaderos "recubrimientos líquidos" de la columna, modificando su selectividad. Si en ese momento la fase móvil se cambia por otra de menor polaridad, o si la muestra se inyecta con un solvente menos polar (por ejemplo, disuelta en metanol puro), las impurezas orgánicas eluyen como picos sucios, interfiriendo en el cromatograma.

Si se utilizan gradientes de elución, las impurezas quedan retenidas y luego, al aumentar la concentración del solvente orgánico, eluyen como picos sucios. La preparación de agua cromatográfica, completamente libre de sustancias orgánicas, no es sencilla. Algunos métodos son:

- Sistemas de purificación con cartuchos. Se parte de agua previamente tratada (desionizada o destilada), que se hace pasar, por medio de una pequeña bomba, a través de una serie de cartuchos que contienen carbón activado y resinas mixtas de intercambio iónico. Finalmente el agua se filtra por membrana de 0.2 μm . Estos sistemas producen agua de muy alta calidad que es controlada por la medida de su resistividad.
- Pasaje a través de columnas o cartuchos. Estos cartuchos o columnas, actúan reteniendo las sustancias orgánicas presentes en el agua y pueden estar rellenos de diversos materiales.
- Destilación doble con permanganato de potasio. Mediante este método se logra destruir completamente los compuestos orgánicos presentes.

Metanol

El metanol es el modificador orgánico más utilizado en fase reversa, en mezclas con agua o buffers. Por su mayor poder disolvente de sales y reactivos de apareamiento iónico, es recomendable mezclarlo con acetonitrilo en cromatografía iónica o cuando es necesario utilizar altas concentraciones salinas. Es poco tóxico y fácil de purificar industrialmente, siendo el solvente orgánico grado CLAR más barato. Sus principales desventajas con respecto al acetonitrilo son en que genera presiones algo mayores y tiene mayor afinidad por el oxígeno.

Acetonitrilo

El acetonitrilo tiene, por sus propiedades químicas, una selectividad muy diferente a la del metanol, y constituye, en general, la primera alternativa ensayada cuando se busca cambiar la misma. Se debe almacenar en un lugar oscuro y bien cerrado porque es muy higroscópico. Su baja longitud de onda de corte (190 nm) lo convierte en el solvente de elección cuando se debe trabajar a longitudes de onda cortas. Es un solvente caro por las dificultades que presenta su purificación. Se obtiene como subproducto de síntesis del acrilonitrilo, materia prima para la producción de cauchos sintéticos y plásticos.

Tetrahidrofurano

El tetrahidrofurano (THF), es un solvente que tiende a formar rápidamente peróxidos, por lo cual se suele comercializar con antioxidantes. Los antioxidantes más utilizados son el butilhidroxitolueno (BHT) y la hidroquinona. Estos compuestos tienen una elevada absorción UV por lo cual el THF estabilizado no debe utilizarse con el detector UV. Puede utilizarse con el detector de índice de refracción, teniendo en cuenta la posible modificación de la selectividad inducida por la presencia del conservador. La presentación habitual del THF grado CLAR no contiene estabilizantes. En este caso es preferible adquirir envases pequeños, que deben utilizarse inmediatamente luego de su apertura.

Si no se consume el contenido total del envase, se recomienda crear una cámara de nitrógeno antes de volver a cerrar. De esta manera, se evita que el oxígeno atmosférico oxide el resto de solvente.

Dioxano

El dioxano tiene una selectividad semejante al tetrahidrofurano, pero su alta viscosidad hace que habitualmente no se emplee en CLAR, salvo como aditivo en pequeñas proporciones.

5.2.6 PREPARACIÓN DE LA FASE MÓVIL

El trabajar con solventes de alto grado de pureza, implica el empleo de materiales volumétricos muy limpios. Un factor a tener en cuenta es la posible contracción de volumen, que se produce al mezclar solventes muy polares.

El caso de la mezcla de metanol y agua es clásico. Si se mezclan 50 ml de cada uno de ellos, se obtiene un volumen final de aproximadamente 98 ml. Por esta razón, si se debe preparar una mezcla de por ejemplo 50:50 Metanol:Agua no es correcto medir en probeta los 50 ml de agua y llevar a volumen con metanol, ya que la relación inicialmente prevista será distinta a la obtenida. Esta alteración en la composición de la fase móvil puede modificar los tiempos de retención de los analitos y, en casos críticos, superponer picos que en condiciones apropiadas serán separados.

El valor de pH de la fase móvil puede ser un parámetro crítico en la retención de solutos ionizables y en algunos casos, debe controlarse rigurosamente.

Así el pH de una solución acuosa aumenta cuando se incorpora un modificador orgánico. Por otra parte, a valores de pH mayores a 7.5 se disuelve la sílice de base de las columnas, y a pHs menores a 2 se hidroliza la unión entre la sílice y la fase enlazada. Se ha reportado que el uso de columnas de saturación (precolumnas) minimizan el proceso de solubilización de la sílice a pHs elevados, su valor debe ser controlado.

Dado que el pH está definido para soluciones acuosas, debería medirse en las soluciones buffer antes del agregado del modificador orgánico. Cualquier medida que se realice con posterioridad, tendrá un significado diferente, pero no menos importante. Para estos casos se ha considerado una magnitud, llamada pH aparente (pH*) para diferenciarlo del pH medido en soluciones acuosas. La fase móvil luego de ser preparada, debe ser filtrada y desgasificada.

Filtración

La filtración de las fases móviles se puede considerar como parte de un tratamiento preventivo para cuidar el adecuado funcionamiento del equipo CLAR.

Las partículas presentes en la fase móvil pueden bloquear los filtros y tuberías del instrumento, acelerar el desgaste de sellos y rotores del inyector, afectar el normal movimiento de las válvulas check de entrada y salida de las bombas, etc. Por otra parte, como el tamaño de las partículas que rellenan las columnas es muy pequeño, en general entre 3 y 10 μm , constituyen un filtro perfecto para la retención de todo material en suspensión que se introduzca con los fluidos, ya sea fase móvil o muestra en solución. El empleo de guardacolumnas, altamente recomendado, constituye un filtro final previo a la columna.

La filtración se efectúa por medio de membranas de 0.45 ó 0.22 μm de porosidad en equipos de filtración adecuados y es útil para eliminar tanto las partículas como las bacterias. La selección de la membrana, depende de su compatibilidad con los solventes (ver tabla 5.14). Es recomendable consultar los catálogos del fabricante a los efectos de verificar la compatibilidad membrana-solvente.

MEMBRANA	TIPO DE SOLVENTE		
	Acuoso	Ac/Org	Orgánico
Celulosa regenerada			R
Ester de celulosa	R	NR	NR
Nitrato de celulosa	R	*	NR
Fluoruro de polivinilideno	R	R	R
Nylon	R	R	R
Politetrafluoro etileno (PTFE)	NR	NR	R
Teflón	NR	NR	R

R = recomendable

NR = no recomendable

* = usar como máximo con 30% de solvente orgánico

Tabla 5.14. Compatibilidad de la membrana con los solventes (adaptado de los catálogos de Millipore, MFS y Gelman)

Al filtrar una fase móvil se recomienda descartar los primeros mililitros del filtrado, que suelen arrastrar componentes de las membranas (plastificantes y antioxidantes).

Las soluciones a inyectar también se deben filtrar, idealmente a través de membranas semejantes a las empleadas para la fase móvil. Existen para ello dispositivos más pequeños, en los cuales se intercambia el filtro, y otros desechables, que incluyen el filtro.

Desgasificación

Además de la filtración, la fase móvil debe desgasificarse. Los gases disueltos en la fase móvil pueden producir varios inconvenientes, entre ellos

- Liberación de burbujas en el cabezal de la bomba: En este caso, el caudal es irregular, y se producen variaciones en la línea de base y en los tiempos de retención. Si la cantidad de aire es importante, la bomba comenzará a trabajar en vacío, pudiéndose dañar tanto los sellos como los pistones.
- Liberación o formación de burbujas en la celda del detector: Por descompresión de la fase móvil. Se producen oscilaciones en la línea base y aparición de picos sucios. Para evitar este problema, a menudo se colocan restrictores a la salida del detector. Estos restrictores evitan la caída de presión e impiden la aparición de burbujas.
- El oxígeno disuelto: Puede presentar diversas dificultades dependiendo del sistema cromatográfico a utilizar. Algunas de ellas son:
 - ✦ Pérdida de la sensibilidad en los detectores de fluorescencia
 - ✦ Alta corriente residual en detectores electroquímicos
 - ✦ Oxidación de analitos.
 - ✦ Aumento en la línea base de los detectores UV

Métodos de Desgasificación

La cantidad de gas disuelto en un líquido depende de tres factores. Temperatura, Presión y Afinidad.

La temperatura puede favorecer o no la disolución del gas en el líquido. Si el proceso de disolución es exotérmico, el incremento de la temperatura disminuye la solubilidad, mientras que si es endotérmico, el incremento de la temperatura aumenta la solubilidad. Por ejemplo la solubilidad del nitrógeno en agua disminuye con el incremento de la temperatura pero aumenta en el benceno.

La solubilidad de un gas en un líquido es directamente proporcional a la presión parcial que ese gas ejerce sobre el líquido. Por ello, si por algún método efectivo, se reduce la presión, la cantidad de gas en solución disminuirá.

Por último, la cantidad de gas disuelto depende de su afinidad mutua. Por ejemplo, si tanto el gas como en el líquido las fuerzas predominantes son las de *Van der Waals*, la solubilidad será mayor que en aquellos líquidos en los que predomine otro tipo de fuerzas, por ejemplo puente de hidrógeno, dipolo-dipolo, etc. Es por ello que gases como el oxígeno o nitrógeno, son más solubles en solventes como el hexano, que en el agua. Todos estos conceptos nos sirven como base para comprender los métodos que habitualmente se emplean para la desgasificación de las fases móviles. Los métodos que comúnmente se emplean para desgasificar solventes son:

Reflujo: Consiste en el calentamiento o la ebullición a reflujo de la fase móvil con la ayuda de agitación durante unos 15 minutos. Por este procedimiento se eliminan prácticamente todos los gases disueltos. Habitualmente no se emplea, ya que se debe aplicar en forma continua para prevenir la redisolución de los gases atmosféricos y a que no puede emplearse en el caso de mezcla de solventes.

Burbujeo de un gas inerte: Se puede realizar en forma continua o por cortos períodos de tiempo. Se realiza a través de una pieza inoxidable ("buzo") con diámetro de poro de 2 a 10 μm , y a un caudal de unos 80-100 ml/min. De esta forma, se logra un efectivo desplazamiento de los gases. Alcanzado el equilibrio, se reduce el caudal para impedir el reingreso de gases atmosféricos.

Con el fin de reducir costos, ya que el helio es un gas bastante caro, es conveniente el uso de reservorios de solventes provistos de tapas con válvulas que permitan mantener una cierta presión sobre la fase móvil para evitar la redisolución de los gases y que permitan trabajar a un caudal constante de unos 50 ml/min. Se debe trabajar con buena ventilación ya que este burbujeo puede desplazar al ambiente al componente más volátil de la fase móvil.

Ultrasonido: El ultrasonido es una onda electromagnética, producida por la propagación de un choque mecánico generado por un cristal piezoeléctrico. Esa onda necesita un soporte material, no se propaga en el vacío y se caracteriza por la frecuencia. En los baños ultrasónicos de uso en el laboratorio se emplean equipos en el rango entre 20 y 50 KHz. La onda generada se propaga a más de 20000 ciclos por segundo y viaja a través del líquido como ondas alternas de compresión, dando lugar a la formación e implosión de microburbujas, fenómenos que se conoce como cavitación.

La aplicación inmediata de esta propiedad es la limpieza de materiales, especialmente los que presentan zonas de difícil acceso, o para la disolución de sólidos. Del mismo modo, aplicando a la desgasificación de un líquido, no reduce la solubilidad de un gas disuelto, y no puede expulsarlo sino cuando la solución está sobresaturada. Es así que se aplica para la desgasificación da los resultados más pobres, y en ocasiones puede aumentar el nivel de oxígeno disuelto.

Vacío: Es el método más frecuentemente empleado. En general se aplica al mismo tiempo que el proceso de filtración. Si se prepara fase móvil para más de un día de trabajo, debe filtrarse y desgasificarse a diario, como si se tratara de una solución recientemente preparada. Como medida de seguridad, durante la preparación de la fase móvil se debe emplear protección ocular y buena ventilación. En el caso de que la desgasificación se efectúe con una bomba de vacío, ésta debe ser a prueba de explosiones, ya que durante el uso, puede aspirar solventes volátiles de la fase móvil.

5.2.7. SELECCIÓN DE LA FASE MÓVIL

La fase móvil es el parámetro más importante en CLAR. El tipo de fase móvil usado puede tener un gran efecto en la retención. Puede promover o puede suprimir la ionización de las moléculas del analito, y también puede proteger los silanoles residuales accesibles o cualquier otra adsorción activa central en la superficie del adsorbente.

La selección apropiada de la fase móvil es el segundo paso más importante en el desarrollo del método de la separación (el primero es la selección del tipo del adsorbente "columna"). El requisito principal para la fase móvil es que tiene que disolver el analito a la concentración conveniente para la detección. La variación de la composición del solvente proporciona una gran flexibilidad de separaciones en CLAR.

Las características de la fase móvil son el aspecto que contribuye con mayor peso específico a la selectividad o discriminación cromatográfica en CLAR. La selectividad de la fase móvil depende del tipo de interacción de la misma con la muestra. Las interacciones pueden ser de tipo dispersivo, dipolar, por puente de hidrógeno, interacciones dieléctricas, o una combinación de ellas. No solo la "polaridad" sino la suma de todas estas propiedades es la que define la afinidad de la fase móvil por un analito dado, que tendrá a su vez determinadas características dipolares, aceptores o donadoras de protones. En la mayoría de las separaciones en CLAR los solventes empleados son binarios. Uno de los solventes es aparentemente inerte en las interacciones de la superficie.

En Cromatografía de Fase Reversa en CLAR uno de los componentes de la fase móvil es el agua, que no actúa recíprocamente con la superficie hidrófoba del adsorbente. Y no compite con el analito por el sitio de adsorción. Los solventes fuertes o polares eluyen rápidamente, solutos que tengan una gran tendencia a quedar retenidos.

En Cromatografía de Fase Normal en CLAR uno de los componentes de la fase móvil es normalmente hexano que no actúa recíprocamente con la superficie muy polar de sílice. La relación entre fuerza y polaridad de la fase móvil es inversa, así, el agua es un eluyente con mínimo poder de

elución y debe mezclarse con solventes menos polares para eluir solutos fuertemente retenidos por la fase estacionaria no polar

Otro componente de la fase móvil, es el llamado "modificador" porque puede actuar recíprocamente con la superficie del adsorbente y puede competir con moléculas del analito para los sitios de adsorción

La selectividad de la fase móvil es definida por *Snyder* como la capacidad para disolver selectivamente a un compuesto o soluto en contraste con otro, siendo no excesivamente diferentes las polaridades de ambos solutos. *Snyder* ha clasificado los solventes de acuerdo con sus dos propiedades básicas: (a) "fuerza de elución cromatográfica", es decir, polaridad, y (b) selectividad, relacionada con su capacidad de formar puentes de hidrógeno (dadora y aceptora) y de inducir dipolos, que permite clasificar los solventes en ocho grupos, de I a VIII

Para definir el comportamiento de un disolvente a través estas dos propiedades básicas, *Snyder* ha puesto el uso de tres solutos o estándares respecto a las fuerzas o interacciones indicadas.

ETANOL	-	ACEPTOR DE PROTONES
DIOXANO	-	DONADOR DE PROTONES
NITROMETANO	-	FUERZAS DIPOLARES

Es así que se clasifican a los solventes de uso habitual en CLAR en 8 grupos según el tipo y magnitud de estas interacciones y se disponen estos grupos en un diagrama triangular (figura 5.4).

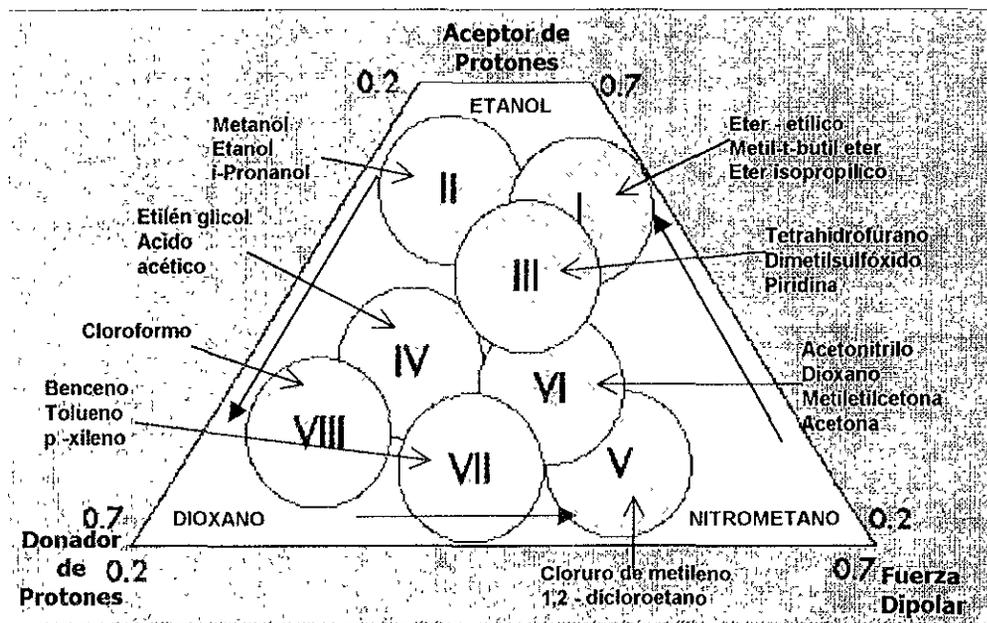


Figura 5.4. Triángulo de selectividad de solventes propuesto por *Snyder* según el tipo y magnitud de interacción.

El denominado triángulo de selectividad de los solventes es una representación esquemática de la selectividad relativa de estos ocho grupos. En cada vértice se representa uno de los solutos representativo del tipo de interacción. En cada lado aumenta, según el sentido indicado, cada uno de los parámetros de selectividad. La sustitución de un solvente por otro de su grupo no origina cambios significativos en la resolución cromatográfica; por el contrario, si el solvente es de otro grupo los cambios en el comportamiento del soluto serán más notorios cuanto más alejados están los grupos en el triángulo.

Visto de ese modo es claro que si la resolución con un determinado solvente es insuficiente, es poco el cambio que se conseguirá al cambiar ese solvente por otro del mismo grupo, ya que el tipo de interacción con la muestra será similar.

Así, los vértices del triángulo (solventes de mayor diferencia de selectividad) en fase reversa son MeOH, AcN y THF, empleando agua como solvente de soporte, mientras en fase normal son el éter (se prefiere el empleo de metil-isobutil éter y no éter etílico), cloroformo y cloruro de metileno en mezcla con hexano, o 1,1,2-tricloro-1,2,2-trifluoroetano), sugerido por su baja inflamabilidad, toxicidad y buena transparencia.

La mezcla de solventes se emplea con gran frecuencia en CLAR ya que de esta forma se puede seleccionar con mayor flexibilidad la "fuerza de elución" y la "selectividad" necesarias para una determinada separación cromatográfica.

El denominado solvente regulador de fuerza es generalmente un solvente con una baja selectividad; así se emplea el agua en cromatografía de fase reversa y el n-heptano o n-hexano para la modalidad normal. Para determinar la "fuerza de elución" de una mezcla binaria de solventes se emplea la fuerza de elución de cada solvente. En la tabla 5.15 se muestran las fuerzas de elución para una serie de solventes pertenecientes a diferentes grupos de selectividad para las modalidades normal y reversa. En el caso de la cromatografía de fase normal, la fuerza de elución coincide con el índice de polaridad. Como es lógico el agua tiene el valor más alto y el hexano el más bajo.

SOLVENTE	FUERZA DE ELUCION	
	FASE NORMAL	FASE REVERSA
Agua	10.2	0.0
Eter metil-t-butílico	2.5	
Eter etílico	2.8	
Metanol	5.1	2.6
Etanol		3.6
Isopropanol		4.2
Tetrahidrofurano	4.0	4.5
Cloruro de metileno	3.1	
Dioxano		3.5
Acetona		3.4
Acetonitrilo	5.8	3.2
Cloroformo	4.1	

Tabla 5.15. Contribución de cada solvente a la "fuerza" de fases móviles de composición binaria o ternaria.

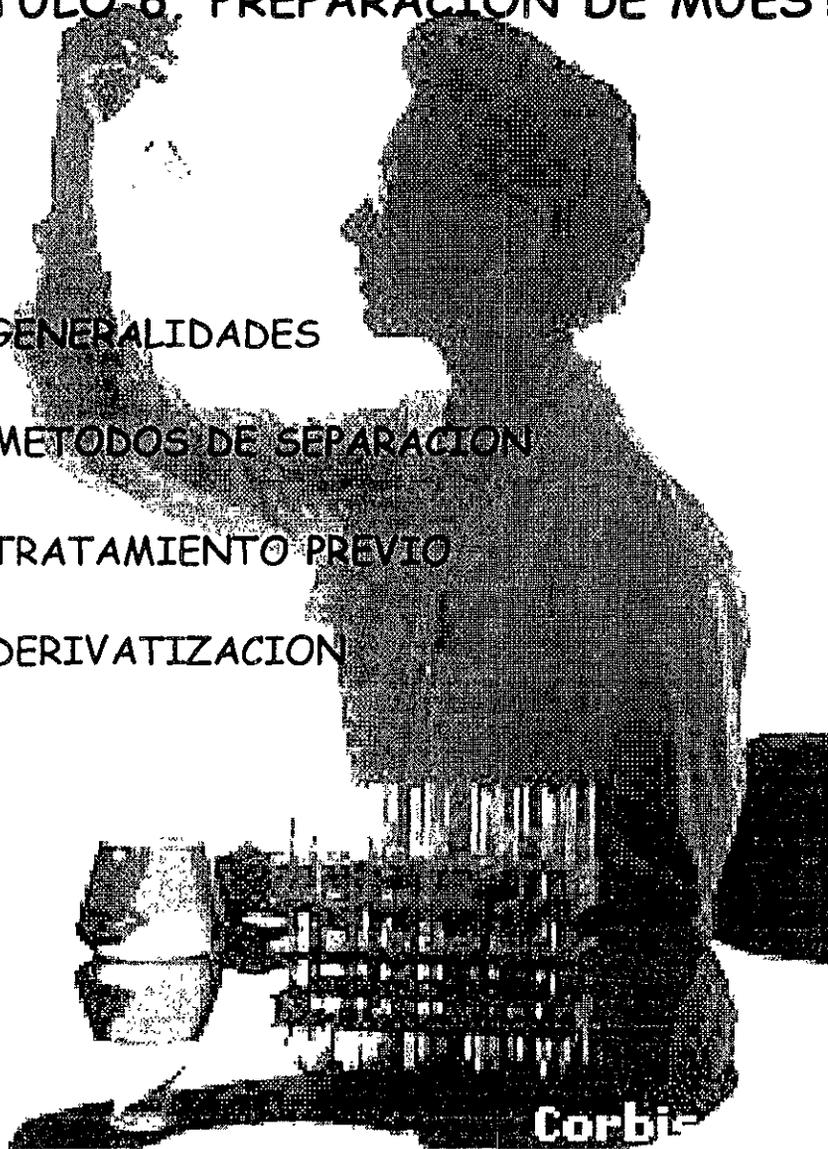
CAPITULO 6. PREPARACION DE MUESTRAS

6.1 GENERALIDADES

6.2 METODOS DE SEPARACION

6.3 TRATAMIENTO PREVIO

6.4 DERIVATIZACION



6.1 GENERALIDADES

Frecuentemente la muestra que es analizada, no se encuentra en forma tal que pueda inyectarse directamente en el equipo CLAR. El objetivo de la preparación de la muestra es quitar los interferentes y obtener los componentes de interés de la muestra en solución, que se encuentre en un solvente conveniente, a una concentración apropiada para la detección y medida. Quitar los interferentes puede aumentar al máximo la exactitud y puede reducir los tiempos del análisis (figura 6.1).

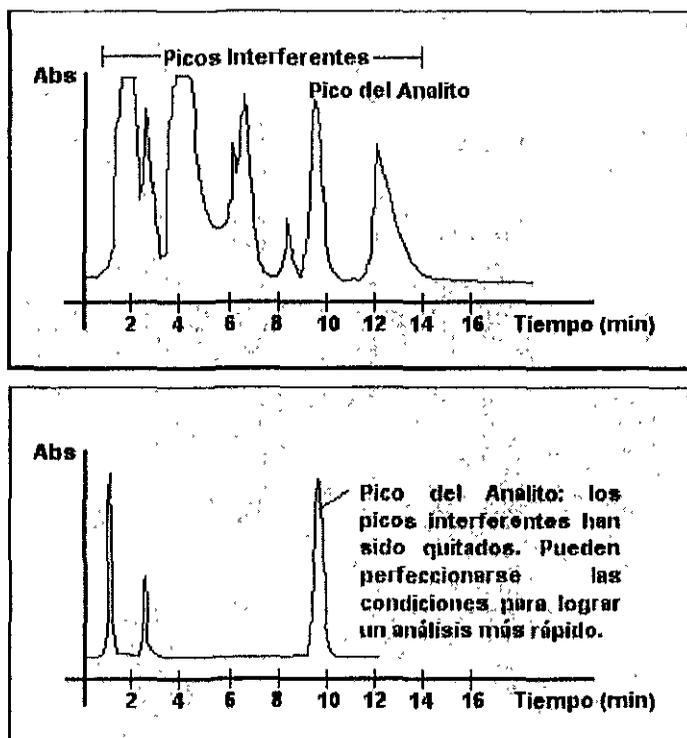


Figura 6.1. En la parte superior se muestra un cromatograma con interferentes y en la parte inferior el mismo cromatograma sin interferentes.

La importancia en la preparación de muestras tiene un gran interés en tres aspectos:

Concentración de la Muestra

Frecuentemente la composición de interés esta presente en bajos niveles de detección. La preparación de la muestra puede concentrar el componente necesario a niveles para poder medirla con exactitud y precisión

Contaminantes

La presencia de elementos interferentes en la matriz puede enmascarar o puede interferir con el análisis de los componentes de interés. La preparación de la muestra puede quitar el exceso de los contaminantes para producir cromatogramas limpios

En Solución

Para la mayoría de los análisis en CLAR, la muestra debe prepararse apropiadamente en solución para el análisis subsecuente

La preparación de las muestras es una etapa decisiva en todo método de análisis en especial en la determinación de micro componentes (trazas) y en los casos donde la matriz que rodea al analito es muy compleja. La elección del método más apropiado depende de muchos factores como son:

PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS DEL ANALITO

El conocimiento de algunas de las características fisicoquímicas del analito es esencial en el diseño de un método para la preparación de las muestras. Es conveniente conocer su estructura química, peso molecular, solubilidad, propiedades ácido base (pKa) y respuesta frente al tipo de detector seleccionado. Muchos analitos tienen respuestas bajas o directamente nulas frente a los detectores de uso más común como el detector UV y el de fluorescencia. En estos casos, especialmente si la concentración del analito es baja, encontramos sin lugar a dudas un problema de detección y consecuentemente, de cuantificación. Este problema puede resolverse derivatizando algunos de los grupos presentes en la molécula.

CONCENTRACION DEL ANALITO EN LA MUESTRA

Este factor tiene importancia decisiva. Para los analitos en altas concentraciones en general se requieren preparaciones de muestras sencillas como la solubilización y filtración. Analitos en bajas concentraciones, por su parte, pueden requerir metodologías más elaboradas que involucren numerosas operaciones para lograr una solución cuya concentración sea "aceptable" como para inyectarse en el cromatógrafo.

NATURALEZA DE LA MATRIZ DE LA MUESTRA

La remoción de los componentes de la matriz puede ser un paso crítico en los casos donde la concentración de analito en la muestra se detecta con dificultad o no se detecta, cuando existen impurezas cuyos picos interfieren el pico de analito en la muestra, o cuando existen sustancias que pueden dañar irreversiblemente los instrumentos o las columnas cromatográficas.

FORMA EN LA QUE SE PRESENTA EL ANALITO EN LA MUESTRA

Es necesario conocer el estado en el que se encuentra el analito en la muestra para poder diseñar un método apropiado de preparación. En muestras de origen biológico el analito puede no encontrarse como tal sino unido a proteínas transportadoras (análisis de fármacos en suero o plasma), metabolizado como éster, amida o éter de los ácidos sulfúrico o glucurónico (análisis de diversas sustancias en orina) o metabolizado a otra sustancia diferente. En estos casos sus propiedades químicas pueden cambiar radicalmente. Es así que una sustancia totalmente no polar e insoluble en agua puede presentarse como un glucurónido polar y soluble en la orina, pero vuelva a comportarse como tal después de una hidrólisis con la enzima β -glucuronidasa (esta enzima hidroliza la unión entre el analito y el ácido glucurónico).

COMPATIBILIDAD DE LOS MEDIOS DE SOLUBILIZACION Y EXTRACCION

En CLAR se requiere que la solución a inyectar sea compatible y miscible con la fase móvil. Es recomendable que el solvente de disolución de la muestra sea la misma fase móvil o, en su defecto, un solvente débil (por ejemplo agua en fase reversa). Teniendo en cuenta este hecho es posible que se eviten numerosos problemas. Si se disuelve la muestra en un solvente fuerte, es posible que algunas sustancias precipiten al entrar en contacto con fases móviles acuosas. Al efectuarse inyecciones posteriores es posible que esas sustancias, por la presencia del solvente fuerte, migren dentro de la columna volviendo a precipitar y a re-disolverse cíclicamente contaminando así el material de relleno de la columna en su totalidad. Además, la inyección de solventes más fuertes que la fase móvil puede producir deformaciones en los picos.

Muchos de los métodos que se utilizan para la preparación de las muestras involucran la extracción líquido-líquido del analito desde un medio acuoso hasta un medio orgánico ya sea por sus características no polares propias o adquiridas regulando el pH del medio. En estos casos la muestra final se encuentra disuelta en un solvente lipofílico (cloroformo, hexano, éter) por lo cual no resulta

conveniente inyectarlo en un sistema convencional de fase reversa que contiene mezclas de solventes orgánicos y agua como fase móvil

En este caso se puede evaporar el solvente hasta sequedad y disolver el residuo en fase móvil (con el consecuente error que esta operación acarrea) o inyectar en fase normal la solución resultante. Aún teniendo especial cuidado, en este punto suelen presentarse problemas.

Por ejemplo en el análisis de residuos de pesticidas se requiere, habitualmente, una extracción con solventes no polares seguida de una adsorción en alúmina, y una evaporación con solventes orgánico

TIPO DE DETECTOR

La sensibilidad y selectividad del detector tienen un papel muy importante en el diseño de los métodos para la preparación de las muestras. Los detectores poco selectivos como el detector de índice de refracción generalmente requieren muestras mucho más "limpias" que los detectores más selectivos como el de fluorescencia. Por su parte, los detectores más sensibles (fluorescencia, amperometría) requieren menos pasos de preconcentración que aquellos menos sensibles (índice de refracción)

COMPATIBILIDAD CON EL DETECTOR

En la selección de un medio para la solubilización del analito debe considerarse su compatibilidad con el detector a utilizar. No es conveniente utilizar solventes como la acetona o el tolueno si se ha de emplear un detector UV porque estos solventes poseen una elevada absorción de base, y puede producir picos espurios o señales importantes en el frente del solvente. Igualmente no resulta muy prudente utilizar fases móviles de elevada conductividad si se desea emplear un detector conductimétrico

6.2 METODOS DE SEPARACION

El primer paso para desarrollar una separación en CLAR, es recoger toda la información que sea posible sobre la muestra que se va analizar. Usa la literatura científica para averiguar si la separación, (o una similar) se ha efectuado antes, y qué conjunto de operaciones y técnicas aplicadas al análisis de la muestra fue utilizado. Una vez que hayas obtenido la información, el próximo paso es escoger qué método de separación es el más conveniente para tu análisis. Los Métodos de separación tienen la finalidad de separar los compuestos para eliminar las interferencias y facilitar las medidas

El primer paso es la toma y preparación de la muestra, medida (peso o volumen) de la misma, solubilidad, desarrollo de las reacciones analíticas y llevarla hacia el instrumento donde se llevará a cabo la medición (y transformación) de la señal analítica. Las señales procedentes del instrumento, transformadas o no, son recogidas y tratadas convenientemente para ofrecer los resultados

Cuando las muestras contienen especies con características semejantes a las del analito, o bien simplemente *perturban* en esta medición (efecto matriz), una etapa previa de separación es indispensable para aislar al analito de las especies interferentes

La remoción de los componentes de la matriz puede ser un paso crítico en los casos donde la concentración de analito en la muestra se detecta con dificultad o no se detecta, cuando existen impurezas cuyos picos interfieren el pico de analito en la muestra, o cuando existen sustancias que pueden dañar irreversiblemente los instrumentos o las columnas cromatográficas, en este caso, la aplicación de un método de separación conduce a la preconcentración indispensable para el uso del método disponible (figura 6 2)

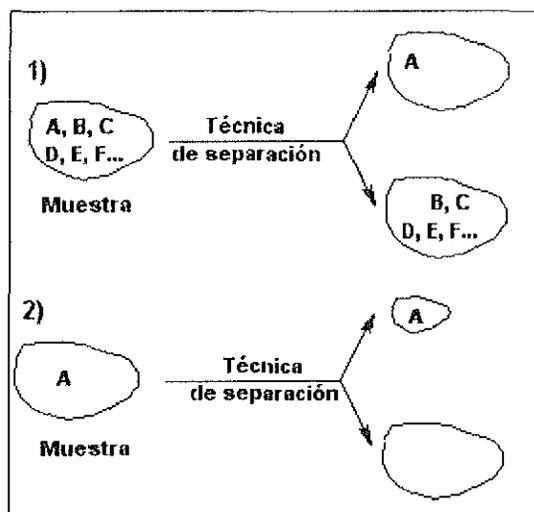


Figura 6.2. Objetivos principales de los procesos de separación: (1) mejorar la selectividad, (2) mejorar indirectamente la sensibilidad (preconcentración).

Existen numerosas clasificaciones de los procesos de separación:

Según las Fases Implicadas

Varias clasificaciones de los procesos de separación se basan en la naturaleza o tipo de las dos fases puestas en contacto. En la tabla 6.1 se muestran las diferentes técnicas, y además se incluye un esquema de separación de la mezcla de dos sustancias A y B, en cada técnica.

FASES	NOMBRE DE LA TÉCNICA	ESQUEMA DEL PROCESO DE SEPARACIÓN DE LA MEZCLA A+B
Sólido-Líquido	Precipitación Cristalización	$(A+B)_{\text{solución}} + \text{Reactivo prec}$ A (sólido) B (solución)
	Lixiviación	$(A+B)_{\text{sólido}} + \text{Solvente}$ A (solución) B (sólido)
	Cromatografía Líquida de Adsorción	$(A+B)_{\text{solución}} + \text{Sólido}$ A (solución) B (sólido)
	Cromatografía Intercambio Iónico	$(A+B)_{\text{solución}} + \text{Resina}$ A (resina) B (solución)
	Cromatografía de Exclusión	$(A+B)_{\text{solución}} + \text{Gel Poroso}$ A (gel) B (solución)
Sólido-Gas	Sublimación	$(A+B)_{\text{sólido}} + \text{Calor}$ A (sólido) B (gas)
Líquido-Líquido	Extracción	$(A+B)_{\text{solución1}} + \text{Solución2}$ A (solución1) B (solución2)
	Electrodeposición con cátodo de Hg	$(A+B)_{\text{solución}} + \text{Hg} + \text{Corr. Elect}$ A (amalgama) B (solución)
Líquido-Gas	Destilación	$(A+B)_{\text{solución}} + \text{Calor}$ A (gas) B (solución)
	Fraccionamiento espumante	$(A+B)_{\text{solución}} + \text{Formación espuma}$ A (espuma) B (solución)

Tabla 6.1. Clasificación de los procesos analíticos de separación basada en la naturaleza de las fases.

La existencia de las dos fases es indispensable para originar el proceso separativo. Normalmente, la fase que contiene a la muestra se denomina fase inicial. La segunda fase puede originarse de dos maneras:

(a) Directamente, es decir, mediante la provocación "*in situ*" de un fenómeno físico o químico que crea una segunda fase en la ya existente. Los ejemplos más característicos son la precipitación (adición de un reactivo disuelto que provoca la aparición de un precipitado) y la destilación (la elevación de la temperatura provoca la formación de la fase gaseosa)

(b) Indirectamente, mediante el uso de una fase externa al sistema inicial, que se incorpora al mismo (un líquido inmiscible: extracción, un sólido: cromatografía, cambio iónico)

En la tabla 6.2 se clasifican algunos procesos de separación según el criterio del origen de la segunda fase

SEGUNDA FASE FORMADA "IN SITU"	SEGUNDA FASE AÑADIDA
Precipitación	Extracción
Destilación	Cromatografía
Electrodeposición	Cambio iónico
Fusión por zonas	Electroforesis
Fraccionamiento espumante	Diálisis

Tabla 6.2. Clasificación de las técnicas de separación según el origen de la segunda fase.

Según las Fuerzas Puestas en Juego

Las técnicas de separación también pueden clasificarse según el tipo básico de proceso que facilita la separación, es decir, según el tipo de fuerzas puestas en juego, las cuales pueden ser mecánicas, físicas o químicas. En la tabla 6.3 se clasifican los procesos de separación que se basan en fenómenos mecánicos, físicos y químicos

Según el Control del Proceso

Esta clasificación es un poco especial pero muy significativa. Divide a las técnicas separativas según sea un fundamento termodinámico ó cinético el responsable de la separación. La tabla 6.4 muestra la clasificación de las técnicas de separación según el control del proceso

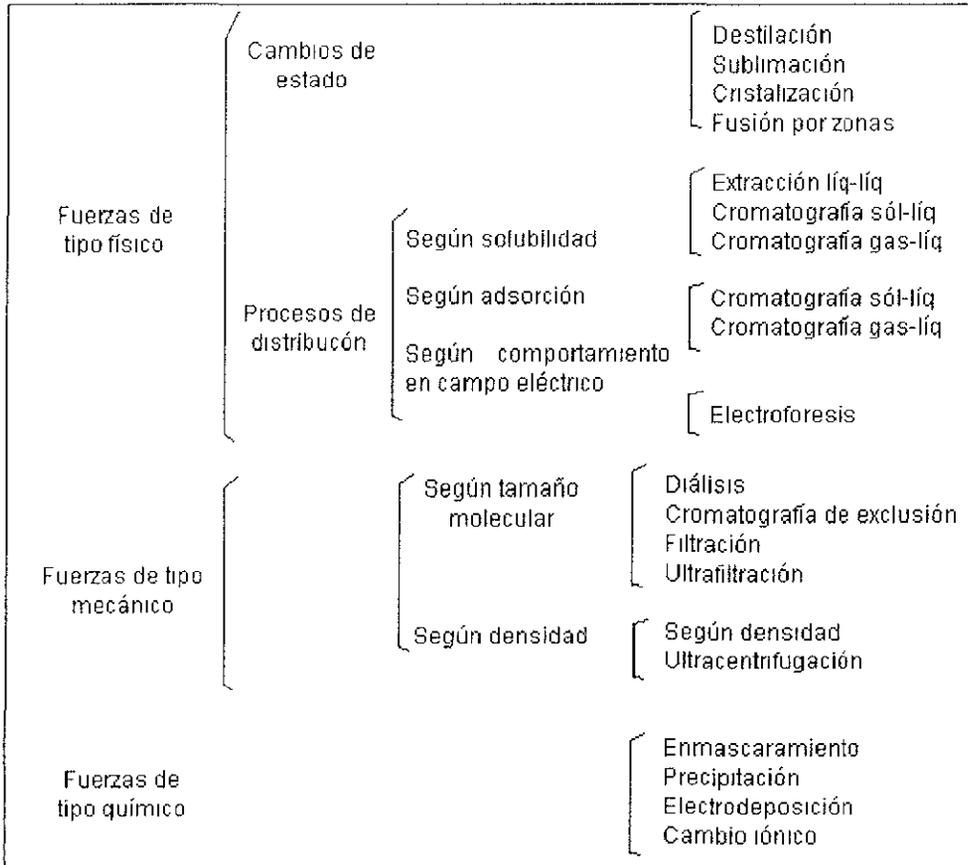


Tabla 6.3. Clasificación de las técnicas de separación según el tipo de fuerza puesta en juego en el proceso

CONTROL TERMODINÁMICO	CONTROL CINÉTICO	CONTROL CINÉTICO Y TERMODINÁMICO
Extracción	Diálisis	Cromatografía
Destilación	Electroforesis	Cambio iónico
Precipitación	Difusión térmica	
Sublimación	Centrifugación	
Fusión, por zonas	Ultracentrifugación	
Electrodeposición		

Tabla 6.4. Clasificación de las técnicas de separación según el control del proceso

6.3 TRATAMIENTO PREVIO

Para el tratamiento previo de las muestras, como para posteriores pasos de purificación pueden utilizarse todas las técnicas conocidas de la química analítica como: extracción, liofilización, evaporación, filtración, centrifugación, precipitación, solubilización, etc

DESPROTEINIZACIÓN

Las proteínas presentes en las matrices biológicas deben eliminarse antes de inyectar la muestra en el equipo de CLAR para evitar que precipiten dentro del equipo cromatográfico. Esta operación se denomina desproteínización

La desproteínización es una forma particular de la separación de sustancias por precipitación. Se realiza con el agregado de varios agentes, entre ellos: solventes orgánicos, sales, ácidos o cationes, o bien por ultrafiltración. Los solventes orgánicos como el metanol, acetonitrilo o etanol agregados a una solución acuosa de una proteína disminuyen su solubilidad y, en condiciones adecuadas, inducen a su precipitación. Cuanto menor sea la polaridad del solvente agregado mejor será su capacidad de desproteínización. El agregado de sales neutras, *salting in* disminuye la atracción de las moléculas de las proteínas y aumenta su solubilidad.

EXTRACCIÓN

La extracción usa dos fases inmiscibles para separar un soluto de una fase dentro de la otra. La distribución del soluto entre las dos fases es una condición de equilibrio descrita por teoría de partición

- Extracción Líquido-Sólido
- Extracción Líquido-Líquido
- Extracción Fase Sólida

Extracción Líquido-Sólido

La extracción líquido-sólido, también denominada lixiviación, comprende la solubilización del analito presente en una muestra sólida previamente molida con un solvente adecuado, con la ayuda de agitación. La muestra puede agitarse manualmente o con agitadores mecánicos o ultrasónicos. Las características del solvente de solubilización, la cantidad de extracciones, la velocidad y el tiempo de agitación dependerán tanto de las características del analito como de la matriz que lo rodea. Un tipo especial de extracción líquido-sólido emplea sistemas continuos con solventes calientes (*Soxhlet*) y se aplican a analitos poco solubles o a matrices muy complejas.

Extracción Líquido-Líquido

La extracción líquido-líquido es un método basado en la distribución (partición) relativa de un analito entre dos líquidos inmiscibles. La extracción se utiliza para; eliminar interferentes, concentrar especies para análisis previos, etc

Al tratar con especies acuosas, los solutos pueden existir en equilibrio en varias formas. A menudo, se extraen solutos desde una fase orgánica a una fase acuosa.

Fase orgánica	llamada fase 1
Fase acuosa	llamada fase 2

Las soluciones pueden variar de comportamiento ideal desde la salida o durante la extracción. Las posibles causas incluyen:

- ✦ disolución de una fase dentro de la otra
- ✦ saturación del soluto en la fase
- ✦ reacción del soluto en la fase
- ✦ alteración de las condiciones del pH durante la extracción

Extracción Fase Sólida

La extracción en fase sólida (EFS) es una modalidad de preparación de muestras, que consiste en una extracción líquido-sólido a través de una columna o cartucho. La extracción en fase sólida se lleva a cabo en pequeñas columnas o cartuchos de plástico, como se muestra en la figura 6.3 (usualmente polipropileno). Estas columnas se rellenan con distintos materiales similares a los empleados para el relleno de las columnas CLAR.

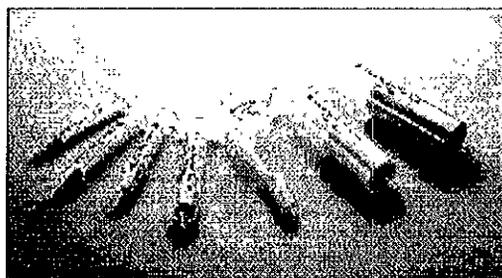


Figura 6.3. Cartuchos para extracción en fase sólida

La capacidad de retención de solutos de una columna de EFS depende del tipo de material de relleno, del tamaño de la columna, del tipo de analito y las condiciones de extracción. Estas columnas se utilizan para concentrar compuestos al nivel de trazas. Los materiales de relleno más comunes se detallan en la tabla 6.5.

TIPO DE RELLENO		CARACTERÍSTICAS
Diamino*	$-(CH_2)_3NHCH_2CH_2NH_2$	Intercambiador aniónico débil
Amonio cuaternario*	$-(CH_2)_3N(CH_3)_3Cl^-$	Intercambiador aniónico fuerte
Acido carboxílico*	$-(CH_2)_3COOH$	Intercambiador catiónico débil
Acido sulfónico*	$-C_6H_4-SO_2OH$	Intercambiador catiónico fuerte
Alúmina		Sorbente polar
Florisil	Silicato de magnesio activado	Sorbente polar
Silicagel		Sorbente polar
Hierro de diatomea		Sorbente polar
Ciano*	$-(CH_2)_3CN$	Sorbente de polaridad media
Amino*	$-(CH_2)_3NH_2$	Sorbente de polaridad media
Hexilo*	$-C_6H_{13}$	Sorbente no polar
Octilo*	$-C_8H_{17}$	Sorbente no polar

Tabla 6.5. Materiales de relleno de los cartuchos de extracción en fase sólida, los indicados con * representan fases ligadas

Metodología para la extracción

La elección de las condiciones óptimas para la extracción dependen de la naturaleza del analito y de la matriz que lo rodea. Para la preparación de las muestras se utilizan los siguiente pasos:

Lavado y activación de la columna

Esta operación tiene por objeto solvatar los grupos funcionales del material de relleno de la columna. Los analitos no pueden interactuar con el relleno de la columna si sus grupos no se encuentran totalmente "activados"

Se vacía sobre el cartucho o la columna un solvente orgánico para eliminar las impurezas que pudieran haber quedado retenidas en la columna. Para activarla se utiliza un solvente igual o similar al empleado como medio de disolución de las muestras

Aplicación de la muestra

La muestra se aplica en la columna o cartucho utilizando un caudal determinado (típicamente 1 a 10 ml/min), este paso debe efectuarse lentamente porque caudales demasiado rápidos pueden conducir a bajas recuperaciones del analito. Esta operación puede efectuarse de dos maneras:

1. Aplicación directa de la solución a inyectar, de manera tal, que se debe lograr la elución del analito y la retención de impurezas cuyo comportamiento sea muy afín a la columna o cartucho.

2. Retención del analito en la columna utilizando un solvente débil, en general seguido de un lavado con un solvente con el cual no eluye el analito y posterior elución con un solvente fuerte

Este método es el más habitual y puede utilizarse para la preconcentración de muestras pasando grandes volúmenes a través de la columna

Lavado de la Columna o Cartucho

Esta operación se refiere a la eliminación de impurezas retenidas en el paso anterior utilizando un solvente relativamente débil con el cual el analito no eluye. El lavado de la columna o cartucho no es indispensable, pero en general es recomendable porque produce muestras más "limpias", con menos sustancias que interfieren.

Elución del analito

Finalmente el analito se eluye con un solvente tal que posea la fuerza de elución apropiada utilizando para ello desde 5 hasta 20 de columna o cartucho

Dependiendo del diseño de las columnas y de las necesidades del usuario, el solvente a pasar puede impulsarse con la ayuda de una jeringa o aspirarse con vacío. Durante la operación de aplicación de la muestra y en los sucesivos pasajes de solvente, lavado y elución, las columnas deben mantenerse húmedas y no dejar que se sequen para obtener una buena recuperación

Si la cantidad de muestra a procesar es muy grande la preparación puede resultar larga y tediosa. Por ello se han diseñado dispositivos que pueden efectuar automáticamente todas las operaciones citadas. En estos dispositivos se colocan varias columnas juntas de manera tal que es posible procesar varias muestras en forma simultánea

DESTILACIÓN

Este método consiste en separar los componentes de las mezclas basándose en las diferencias en los puntos de ebullición de dichos componentes. Un compuesto de punto de ebullición bajo se considera "volátil" en relación con los otros componentes de puntos de ebullición mayor. Los compuestos con una presión de vapor baja tendrán puntos de ebullición altos y los que tengan una presión de vapor alta tendrán puntos de ebullición bajos

Los tipos de Destilación más comunes son

- ◆ *Destilación Simple*
- ◆ *Destilación Fraccionada*
- ◆ *Destilación por Arrastre con Vapor.*

Destilación Simple

En la Destilación Simple, el proceso se lleva a cabo por medio de una sola etapa, es decir, que se evapora el líquido de punto de ebullición más bajo (mayor presión de vapor) y se condensa por medio de un refrigerante

Destilación Fraccionada

En la Destilación fraccionada el proceso se realiza en multi-etapas por medio de una columna de destilación en la cual, se llevan a cabo continuamente numerosas evaporaciones y condensaciones. Al ir avanzando a lo largo de la columna, la composición del vapor es más concentrada en el componente más volátil y la concentración del líquido que condensa es más rica en el componente menos volátil. Cabe mencionar que este tipo de destilación es mucho más eficiente que una destilación simple y que mientras más etapas involucre, mejor separación se obtiene de los componentes.

Destilación por Arrastre con Vapor

En la Destilación por Arrastre con Vapor se hace pasar una corriente de vapor a través de la mezcla de reacción y los componentes que son solubles en el vapor son separados. Entre las sustancias que se pueden separar por esta técnica se pueden citar los Aceites Esenciales.

PRECIPITACIÓN

La precipitación es una técnica de separación en la que las fases implicadas son sólido-líquido. Una de las cuales se forma indirectamente "*in situ*" y las fuerzas puestas en juego son fundamentalmente de tipo químico.

La incorporación de una sustancia ajena a la disolución de la muestra o la alteración de ésta, provocan la precipitación del analito (o mezcla de los mismos), lográndose así los objetivos de las técnicas de separación: se aíslan las especies a determinar de otras potencialmente interferentes y se puede preconcentrar si el precipitado se redissuelve en un volumen notablemente inferior (de 5 a 100 veces) del de la disolución original.

Un factor importante a considerar en las separaciones por precipitación es el tamaño de las partículas del precipitado, ya que cuanto mayor sea éste, mejor se realizará la separación.

6.4 DERIVATIZACION

La derivatización se refiere a la reacción química que se produce entre el analito y un reactivo determinado ya sea dentro o fuera del equipo cromatográfico. Si se efectúa antes de inyectar la muestra dentro del cromatógrafo, la derivatización se denomina pre-columna y los derivados ya formados se separan en la columna cromatográfica. También puede realizarse después de inyectar la muestra, en cuyo caso se denomina post-columna. Esta última se efectúa separando al analito en la columna y luego mezclando el eluyente de la columna con un reactivo apropiado en la misma línea del cromatógrafo, antes de efectuarse la detección (figura 6.4)

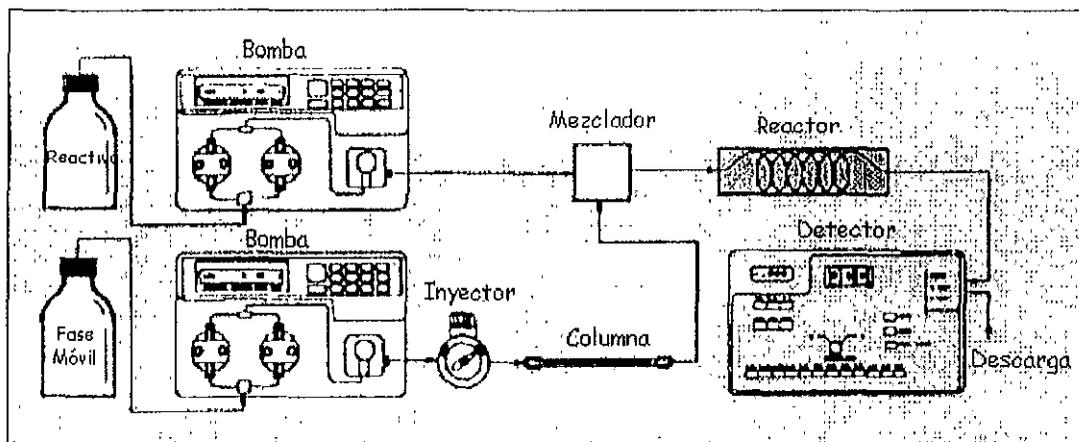


Figura 6.4. Esquema de un equipo CLAR para operar con derivatización post-columna

La selección de un método de derivatización pre o post columna depende principalmente de la velocidad de la reacción y de la compatibilidad de la reacción (y los reactivos) con la fase móvil empleada. En general, existen varios motivos para derivatizar los diferentes analitos, como ser:

Mejorar la detección Esta es la causa más importante por la cual se producen derivatizaciones químicas en CLAR. Se origina en la falta de detectores universales que posean la sensibilidad adecuada. El detector de índice de refracción es universal pero no es lo suficientemente sensible, mientras que tanto el detector UV como el de fluorescencia son sensibles pero no universales. Por lo cual muchos compuestos que no poseen grupos cromóforos o fluoróforos no pueden ser detectados. Así, por ejemplo existen sustancias de gran interés analítico que no absorben al UV como los ácidos grasos (los ácidos carboxílicos en general) y los aminoácidos. Estas sustancias deben derivatizarse para poder detectarse por CLAR.

Mejorar la selectividad En este caso la derivatización se utiliza para separar compuestos que, de otra manera, o bien no se pueden separar o bien la separación resulta muy compleja. La derivatización para mejorar la selectividad es muy rara en CLAR, dado que una adecuada combinación de fases estacionaria y móvil puede resolver sin dificultades la mayoría de las separaciones.

Un caso especial se refiere a la separación de isómeros ópticos. Como los enantiómeros no poseen propiedades diferentes entre sí, salvo las que se refieren a su comportamiento frente a la luz polarizada, difícilmente puedan separarse por algún sistema cromatográfico. En este caso, y para lograr la separación, los enantiómeros se derivatizan con reactivos estereoespecíficos para formar los correspondientes diastereoisómeros, siendo estos últimos sustancias más simples de ser separadas.

Permitir la cromatografía El último argumento a favor de la derivatización se relaciona con CLAR, y resulta ser el de mayor importancia en cromatografía de gases.

DERIVATIZACIÓN PRE-COLUMNNA

Una de las mayores ventajas de la derivatización pre-columna reside en el hecho que no existen limitaciones en cuanto a la cinética de la reacción. Es decir, que puede esperarse todo el tiempo que sea necesario como para completar la reacción sin ningún detrimento en el resultado cromatográfico. Adicionalmente, puede utilizarse un gran exceso de reactivo, y no es imprescindible que el reactivo no interfiera en la detección de la sustancia porque puede eliminarse en un paso previo o separarse en la misma corrida cromatográfica.

La última ventaja de estos sistemas reside en que no existen limitaciones en cuanto a la selección de los solventes que componen la fase móvil. El agua, por ejemplo, suele retardar reacciones o hidrolizar reactivos, por lo cual no puede utilizarse como componente de las fases móviles de ciertas metodologías post-columna. En cambio puede utilizarse para separar los mismos derivados, si éstos se han preparado mediante una derivatización pre-columna.

La mayor desventaja de los sistemas pre-columna reside en la posible aparición de picos espurios provenientes de derivados no deseados, varios derivados de una sola sustancia, o en la descomposición química de los derivados ya formados. Esto conduce a la aparición de uno o más picos para una sola sustancia a analizarse por lo cual se complica enormemente el sistema cromatográfico.

DERIVATIZACIÓN POST-COLUMNA

La derivatización post-columna comprende la reacción química del analito en el mismo equipo de CLAR. Esta reacción se realiza después de la separación cromatográfica en dispositivos denominados detectores de reacción o simplemente reactores. En la figura 6.4 se esquematiza un equipo CLAR para operar con derivatización post-columna.

Este instrumento consta de los módulos habituales de un cromatógrafo convencional (bomba, inyector, columna y detector), conjuntamente con los módulos necesarios para realizar la reacción de derivatización en la línea del instrumento. En primer lugar se necesita una bomba de caudal constante y preferentemente libre de pulsos para bombear el reactivo hacia el eluyente de la columna. Esta bomba opera en la zona de baja presión del instrumento por lo cual no necesita ser de alta presión. En segundo lugar se necesita un dispositivo en el cual pueda mezclarse íntima y rápidamente el líquido eluyente de la columna, este dispositivo se denomina mezclador. Finalmente, se necesita un reactor donde los analitos puedan reaccionar a temperatura controlada con el reactivo derivatizante.

La derivatización post-columna es un método muy rápido y simple de realizar en las determinaciones de rutina pero exige una dedicación especial durante el desarrollo analítico. Sus principales ventajas residen en que no es necesario completar la reacción y que tanto la posible descomposición de los derivados como la formación de derivados extremos no tienen incidencia sobre la eficiencia de la metodología utilizada. Además puede aplicarse cuando los derivados, por sus características, son difíciles de analizar por cromatografía.

Si bien resulta un método muy apropiado para un gran número de determinaciones sus principales desventajas reside en la falta de compatibilidad que poseen muchas reacciones (o reactivos) con los solventes utilizados para preparar la fase móvil, y que no puede aplicarse a reacciones lentas. Otra de sus desventajas, seguramente tan limitante como las dos anteriores, es que el reactivo no debe presentar una señal de base apreciable en el sistema seleccionado para detectar al derivado.

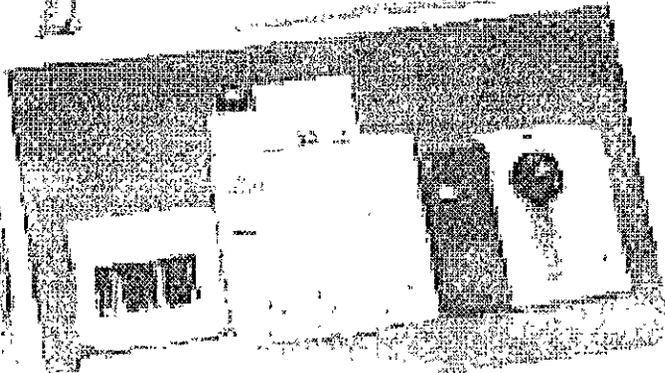


CAPITULO 7. PROBLEMAS MAS COMUNES ENCONTRADOS EN CLAR

7.1 GENERALIDADES

7.2 PROBLEMAS INSTRUMENTALES

7.3 PROBLEMAS CROMATOGRÁFICOS



7.1 GENERALIDADES

La resolución de los problemas (*troubleshooting*) fue definida por Merril como "la identificación de un problema que ocurre durante un proceso dado y su resolución con la menor interrupción posible. Los equipos de CLAR sufren, desafortunadamente, un desgaste mecánico importante debido a las altas presiones con las cuales operan por lo cual necesitan mantenimientos mayores que los requeridos por los equipos habituales de un laboratorio analítico. El primer paso en cualquier esfuerzo por solucionar un problema en CLAR es regresar paso a paso y evaluar la situación. Apresurarse en la solución de un problema resulta muy a menudo en que una pieza crítica e importante sea sobre estimada o ignorada. Además del problema, observa cualquier otro cambio o diferencia en el cromatograma.

Muchos problemas están acompañados por otros síntomas. Desplazamientos en los tiempos de retención, línea de base alterada, ruido, deriva o el cambio en la forma de los picos, son solo unas pocas claves de las que señalan o reducen la lista de las posibles causas. Finalmente, toma nota sobre cualquier cambio o diferencia incluyendo la muestra. Los solventes, viales, pipetas, condiciones de almacenamiento, tiempo de la muestra, la técnica de preparación o extracción, también cualquier otro factor que influya en el ambiente de la muestra pueden ser responsables del problema.

Cuando un problema ocurre, primero realiza una verificación visual del sistema. Busca fugas, tuberías desconectadas, cables desconectados, monturas del instrumento cambiadas, y así sucesivamente, verificar todos los sistemas de fluido y las conexiones eléctricas. En la tabla 7.1 se resumen las áreas que deben verificarse, ya que son las causas más comunes que afectan el funcionamiento del sistema cromatográfico. Para la resolución de los problemas del sistema Cromatográfico, es recomendable que tomes en cuenta los siguientes puntos:

➤ Estrategias para arreglar el sistema cromatográfico

Incluye cinco procesos principales:

- Identificar los síntomas
- Entender las posibles causas del síntoma.
- Aislar las posibles causas exactas del problema
- Resolver el problema y reasumir el funcionamiento o avisar al personal de Waters
- Arreglar el problema. Este proceso consiste en:
 - ◆ Verificar primero las cosas simples.
 - ◆ Comparar el sistema de funcionamiento con las referencias establecidas
 - ◆ Identificar las posibles causas
 - ◆ Conseguir ayuda

➤ Obtener los datos

Antes de arreglar el problema, debes obtener todos los datos posibles. Los datos que se recogen en la fase de sistema, es el primero paso más importante que determina el mal funcionamiento del sistema.

Reunir los datos generales

Cuando se cree inicialmente que hay un problema con el funcionamiento del sistema cromatográfico, se debe considerar lo siguiente:

- ¿Qué te hace pensar que algo está funcionando mal?

- ¿Cuál es la evidencia (picos anchos, ningún pico, derivas de la línea base)?
- El sistema se observa algo diferente comparado con el funcionamiento establecido (documentado en un registro)?
- ¿Podría cambiar alguien algo en el sistema (como sensibilidad del detector)?
- ¿Estás forzando al sistema hacer algo que puede estar más allá de sus capacidades?
- ¿Ha ocurrido el problema antes alguna vez?
- ¿Ocurre este problema en cualquier momento particular del día o cuándo otro instrumento ha sido encendido y apagado?

➤ **Verificar primero las Cosas Simples**

Cuando estés seguro de que algo está afectando el funcionamiento del sistema, siempre verifica las cosas simples. Es un forma fácil de encontrar la solución que ahorra tiempo y esfuerzo. Has una inspección visual del sistema, realiza anotaciones e investiga:

- ¿Se activaron las alarmas de algún componente?
- ¿Hay fugas?
- ¿La lectura de la presión de la bomba es normal?
- ¿Se insertó el cable de energía en la salida del tablero trasero del instrumento?
- ¿Es el interruptor de energía?
- ¿Los fusibles están fundidos?
- ¿Hay suficiente solvente en los depósitos?
- ¿Están conectados los cables eléctricos entre los dispositivos? ¿Son las conexiones correctas?
- ¿Se cambiaron las monturas del instrumento o se colocaron incorrectamente?
- ¿Existen fugas de solvente en el detector a la tubería de desecho?
- ¿La columna es la correcta?

Si la inspección visual no revela nada obvio, compara el funcionamiento del sistema actual con el funcionamiento del sistema establecido

➤ **Comparar el Funcionamiento del Sistema con las Referencias Establecidas**

Los siguiente puntos ayudan a identificar las condiciones del funcionamiento normal del sistema cromatográfico:

- Grabar un mapa del sistema cromatográfico
- Mantener un registro
- Ejecutar cromatogramas de prueba regularmente

Estas tres prácticas permiten comparar el funcionamiento del sistema presente con el funcionamiento del sistema establecido

Grabar un Mapa del Sistema

Una vez instalado el sistema cromatográfico (bomba, detector, automuestreador, computadora, tuberías, cables), se recomienda esbozar un mapa general de la líneas de fluido y la configuración

eléctrica Etiquetar individualmente las conexiones. Usa este mapa para repasar líneas de fluido y las conexiones eléctricas y reconfigurar cuando sea necesario

Mantener un registro

Registra las condiciones de operación (presión, velocidad de flujo, etc) en una bitácora. Cuando se tienen problemas con el sistema, se debe usar la bitácora para comparar la información del sistema, como:

- ◆ Situación del instrumento
- ◆ Partes y/o componentes recientemente reemplazadas (número de serie del fabricante y fecha del cambio cuando fue realizado).
- ◆ Procedimientos de mantenimiento (cuando y donde)
- ◆ Número de muestras corridas (por medio del sistema).
- ◆ Muestras, estándares y fase móvil para cada método.
- ◆ Pruebas cromatográficas, incluyendo condiciones específicas de operación (columna, velocidad de flujo, fase móvil, baja presión, y así sucesivamente) para cada columna usada

Ejecutar cromatogramas de prueba regularmente

Siempre ejecuta un cromatograma de prueba cuando:

- ◆ Se instale un nuevo sistema
- ◆ Se reemplace o se agregue un instrumento
- ◆ Se reemplace o se agregue una columna
- ◆ Se prepare una fase móvil nueva.

Cuando se corra un estándar, establece las condiciones normales. Colecta los datos y registra los siguientes parámetros:

- ◆ Presión
- ◆ Resolución (R_s)
- ◆ Factor de capacidad (k')
- ◆ Selectividad (?)
- ◆ Eficacia de la columna (N)

Guarda el cromatograma de prueba y los parámetros en la bitácora Cuando creas que haya un problema, compara los resultados establecidos con los obtenidos

➤ **Identificar Posibles Causas del problema**

Para reducir las posibles causas del problema dentro del sistema, identifica sigue los puntos:

- Identificar todos los síntomas
- Comparar los síntomas con las posibles causas potenciales

Identificar los Síntomas

Realiza un estudio del sistema cromatográfico para determinar donde pudo originarse los síntomas Algunos síntomas son.

- ◆ La presión del sistema es variable o rara (alta, ninguna, errática)
- ◆ Ruido o derivas de la línea base
- ◆ Cambios en los tiempos de retención
- ◆ Forma del pico (ancho, tempranos, distorsionados, fantasma)
- ◆ Resultados cualitativos/cuantitativos incorrectos (demasiados picos, mala respuesta)

COMPONENTE	VERIFICAR
Flujo del solvente/Bomba	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Velocidad flujo adecuada ➤ Reservorios de solvente vacíos ➤ Solvente no desgasificado ➤ Obstrucción en la tubería ➤ Diámetro interno de la tubería adecuado ➤ Tubería cortada inadecuadamente ➤ Incorrecto ajuste en los tornillos ➤ Filtro de la tubería tapado ➤ Filtro de la entrada del solvente tapado ➤ Aire en las líneas de entrada de la bomba o cabezas de la bomba ➤ Fuga en sello del pistón ➤ Fuga en los montajes ➤ Mal funcionamiento en la válvula check de salida/entrada ➤ Presión del transductor fuera de calibración ➤ Depósitos del solvente se encuentran en una posición inadecuada a la entrada de la bomba
Automuestreador	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Aire en la jeringa ➤ Muestra insuficiente en el vial ➤ Posición del vial de muestra apropiada ➤ Uniones incorrectas o inapropiadas ➤ Fuga en los sellos ➤ Falla en la válvula ➤ No hay presión o ésta es baja ➤ Tamaño de la jeringa equivocado
Detector	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Fuente de la lámpara defectuosa ➤ Monturas incorrectas o inapropiadas (sensibilidad, atenuación, longitud de onda, tiempo constante) Tiempo insuficiente para estabilizar la lámpara ➤ Filtro óptico incorrecto ➤ Lámpara incorrecta ➤ Celda de flujo sucia ➤ Burbujas de aire en la celda de flujo ➤ Electrodo de referencia sucio ➤ Electrodo de funcionamiento sucio ➤ Fuga en la celda de flujo
Computadora	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Tiempo de muestreo erróneo ➤ Salida de voltaje apropiada del detector ➤ Atenuación impropia, ancho del pico, desecho del área, parámetros de rechazo de ruido, ➤ Pobre integración del pico ➤ Calibración incorrecta o tabla de la muestra

Tabla 7.1. Problemas más comunes que se presentan en el sistema cromatográfico.

7.2 PROBLEMAS INSTRUMENTALES

Los problemas instrumentales se refieren a las fallas que se originan en el equipo cromatográfico. Las cuales pueden clasificarse en tres partes de acuerdo a los síntomas que presente. La primera trata de las pérdidas del solvente (ver tabla 7.2), la segunda de las anomalías en la presión (ver tabla 7.3) y la última de los otros problemas que pueden relacionarse a fallas en el instrumento (ver tabla 7.4)

Pérdidas del solvente
Anomalías en la presión
Problemas en las partes del equipo CLAR Waters

SINTOMA	CAUSA PROBABLE	SOLUCION
1) Uniones que pierden solvente	a) Unión floja	Ajusta la unión hasta que se verifique la ausencia de pérdidas
	b) Férula o tornillo deformados	Reemplaza tanto la férula como el tornillo.
	c) Unión demasiado ajustada	Afloja y ajusta nuevamente primero a mano y luego con las herramientas si la pérdida continua, reemplaza tanto la férula como el tornillo
	d) Unión sucia	Limpia la unión y proceder según 1-c.
	e) Uniones no compatibles	Utiliza uniones de un mismo fabricante o conectores de tipo universal.
2) Pérdidas en los conectores de la columna	a) Uniones flojas	Ve el punto 1-a
	b) Material de relleno de la columna depositado sobre la unión	Ve el punto 1-d.
3) Pérdidas en el automuestreador	a) Jeringa con aguja de punta defectuosa, de diámetro o longitud inadecuada	Cambia la aguja de la jeringa. Verifica que esta corresponda a lo especificado en el manual del automuestreador
	b) Sellos del automuestreador o del rotor flojos o defectuosos	Ajustar o reemplazar los sellos o rotor
	c) Loop de muestra bloqueado	Desbloquéalo o bien en contracorriente con la ayuda de la bomba a su máxima capacidad, o bien fluyendo HNO ₃ entre el 10 y el 50 % V/V.
	d) Línea de descarga bloqueada o haciendo sifón	Desbloquéala según 3-c o utilizar un tubo más fino que produzca una mayor resistencia.
4) Pérdidas en el detector	a) Ventanas de la celda rotas	Reemplázalas.
	b) Uniones que pierden solvente	Ve el punto 1.
	c) Celda sucia o gastada	Límpiala con etanol o reemplazarla.
	d) Línea de descarga bloqueada o haciendo sifón.	Desbloquéala según 3-c o cámbiala tratando de que genere cierta resistencia
5) Pérdidas en la bomba	a) Uniones que pierden solvente	Ve el punto 1.
	b) Válvulas que pierden solvente	Ve el punto 1.
	c) Válvulas sucias	Con la ayuda de una jeringa o de la bomba circula HNO ₃ como se indicó en 3-c. Si este tratamiento no diera el resultado esperado desarma las partes y sonicarlas en HNO ₃ al 50 % V/V.
	d) Sellos del pistón	Cambia los sellos defectuosos
	e) Sellos del mezclador	Cambia los sellos defectuosos.
	f) Mezclador de solventes sucio	Procede según lo indicado en 5-c.
	g) Válvula de purga floja	Ajústala según 1-a
	h) Válvula de purga sucia o defectuosa	Cambia los filtros o la válvula.

Tabla 7.2 . Problemas Instrumentales: Pérdidas

SINTOMA	CAUSA-PROBABLE	SOLUCION	
6) Alta Presión constante	a) Taponamiento en la bomba	Aísla la zona que se ha bloqueado y destápala según 3-c	
	b) Taponamiento en el inyector	Ve el punto 6-a.	
	c) Taponamiento en el filtro de entrada de la columna o guarda columna		Invierte la columna o la guarda columna. Si el filtro bloqueado es el de la columna antes de hacerlo verifica la ausencia de espacios vacíos en la cabeza de la columna. De lo contrario el relleno puede acomodarse dañando irreversiblemente la columna. Durante esta operación asegúrate que la salida de líquido vaya hacia una descarga y no hacia otro componente del instrumento pues puede bloquearlo.
			Reemplaza el filtro
	d) Taponamiento en el material de relleno de la columna		Lava la columna utilizando solvente que disuelvan la sustancia precipitada. Si ésta no se conoce, utiliza el sistema de lavado general sugerido por el fabricante.
			Con una punta de espátula mueve la porción inicial de material de relleno y reemplázalo por uno nuevo. Reemplaza la columna
	e) Taponamiento en las tuberías		Desbloquéalas según lo indicado en 3-c
			Reemplázalas
f) Fase móvil precipitada o sucia		Filtrarla por membrana de 0.22 ó 0.45 µm	
		Prepara una nueva fase móvil	
g) Temperatura baja		Controla y ajusta el controlador de temperatura	
h) Medidor de presión descalibrado		Calibra o repara.	
7) Presión en ascenso	a) Véase punto 6 "Alta Presión constante"		
	b) Durante el cambio de solventes:		
	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Puede ser normal ◆ Sales que precipitan en la entrada de la bomba ◆ Sales que precipitan en la entrada de la columna 	<p>Verifica si el incremento en la presión es el esperado teniendo en cuenta la viscosidad de las mezclas de solvente</p> <p>Remueve la columna y lava rápidamente la bomba con unos 30 ml de ácido nítrico entre el 10 y 50 % V/V</p> <p>Invierte la columna como se indicó en 6-c pasando agua caliente a través de la misma</p>	

Tabla 7.3 . Problemas Instrumentales: Anomalías en la presión

SINTOMA	CAUSA PROBABLE	SOLUCION
8) Baja Presión Constante	a) Aire atrapado en los cabezales de bombeo	Purga con la ayuda de una jeringa. En esta operación el MeOH y EtOH remueven mejor el aire que el agua. Si el aire persiste, mejora la desgasificación del solvente
	b) Pistón roto	Cambia el pistón.
	c) Filtro de entrada de solvente sucio o tapado	Sonicar con HNO ₃ , entre el 10 y el 50% V/V. Cámbialo
	d) Válvula de purga sucia o tapada	Ve 8-c.
	e) Válvulas de los cabezales de bombeo sucias o tapadas	Ve 5-c.
	f) Válvulas de los cabezales de bombeo defectuosos	Cambia las válvulas
	g) Medidor de presión descalibrado	Cámbialo o repáralo
	h) Selector de caudal descalibrado	Calíbralo o repáralo
	i) Temperatura alta	Ajusta el controlador de temperaturas
	j) Pérdidas en el sistema	Ve la tabla 7.1
9) Presión en descenso	a) Ve el punto 8: "Baja Presión Constante"	
	b) Ve los puntos 10 y 11: "No hay presión, no hay caudal" y "No hay presión, caudal normal".	
10) No hay presión no hay caudal	a) Aire atrapado en los cabezales de la bomba	Purga la bomba con ayuda de una jeringa.
	b) Aire atrapado en la entrada de la bomba o en las tuberías de líquido	Purga la bomba con la ayuda de una jeringa. Verifica el estado de los filtros de entrada del solvente y de la válvula de purga.
	c) Válvulas de los cabezales de bombeo sucias o tapadas	Ve el punto 5-c.
	d) Pistón sucio	Ve el punto 8-b.
	e) La bomba no funciona	Verifica el encendido y el estado de los fusibles.
		Verifica los cortes por alta y baja presión. Revisa el motor y/o sistema eléctrico.
11) No hay presión caudal normal	a) Medidor de presión descalibrado o defectuoso.	Calibra o repáralo
12) Presión constante	a) Aire atrapado en los cabezales de bombeo	Ve el punto 8-a
	b) Aire atrapado en la entrada de la bomba o en las tuberías de bombeo	Ve el punto 10-b
	c) Pistón roto	Cambia el pistón
	d) Durante el cambio de solventes: ♦ Puede ser normal ♦ Sales precipitadas en las tuberías ♦ Sales precipitadas en la cabeza de la columna	Ve el punto 7-b
	e) Pérdidas en el sistema	Ve la tabla 7.1 "Pérdidas".

Tabla 7.3 . (Continuación) Problemas Instrumentales: Anomalías en la presión

SINTOMA	CAUSA PROBABLE	SOLUCION
13) Manecilla del inyector difícil de mover	a) Rotor demasiado ajustado	Aflójalo
	b) Rotor dañado	Reemplázalo
14) Operación de inyección de muestra difícil	a) Jeringa tapada o sucia	Limpia la jeringa o la punta de la jeringa. Si se está utilizando una jeringa con la punta renovable, cambia la punta de la jeringa
	b) Loop de muestra bloqueado	Ve el punto 3-c
15) Irreproducibilidad en la cuantificación	a) Pérdidas en el sistema	Ve la tabla 7.1 "Perdidas"
	b) Separación deficiente	Mejora la separación
	c) Interacción del analito con la fase móvil	Cambia el sistema cromatográfico
	d) Integración deficiente	Utiliza los parámetros de integración adecuados para la separación
	e) Analito inestable	Determina la estabilidad del analito en la fase móvil y en las soluciones muestra y testigo
	f) Loop de muestra mal cargado	Carga como mínimo 5 veces el volumen nominal del loop

Tabla 7.4. Problemas Instrumentales: Otros

PROBLEMAS EN LAS PARTES DEL EQUIPO CLAR WATERS

- ☛ Bomba
- ☛ Automuestreador (ver tabla 7 6)
- ☛ Detector (ver tabla 7 7)

BOMBA

El buen funcionamiento de la bomba es indispensable para obtener separaciones reproducibles por lo cual resulta conveniente controlar su estado periódicamente. El control del estado de la bomba debe incluir la medición de la exactitud en el caudal (midiendo el volumen de líquido que efuye de la bomba por unidad de tiempo), y el control de pérdidas. La ausencia de pérdidas debe verificarse diariamente simplemente pasando un papel absorbente por las uniones y detrás de los cabezales de la bomba y periódicamente llevando la bomba hasta su máximo valor de presión. Muchos de los problemas de las bombas se detectan simplemente observando el cromatograma o el medidor de presión. Los problemas que se presentan con mayor frecuencia en las bombas se resumen en la tabla 7 5

SINTOMA	CAUSA PROBABLE	SOLUCION
La bomba no enciende (ventilador y las luces del tablero delantero están apagadas)	La bomba no está conectada	Asegúrate que el cable de energía este conectado a la bomba apropiadamente
	Ningún salida de energía	Verifica que la toma de corriente esté conectada a otra unidad eléctrica y verificar si la unidad opera. Si esa unidad no trabaja, localiza otra toma de corriente eléctrica y observa si funciona la bomba
	Fusible fundido	Reemplaza el fusible
La bomba no entrega solvente	Fusible fundido	Reemplaza el fusible
	Límite de presión bajo, coloca un valor más alto en la presión de operación	Coloca el límite de presión correcto
	Solventes inmiscibles en la cabeza de la bomba	Purga la bomba con solventes apropiados. Verifica la miscibilidad de los solventes

Figura 7.5. Problemas comunes encontrados en la Bomba 616 Waters.

SINTOMA	CAUSA PROBABLE	SOLUCION
La bomba no entrega solvente	La bomba no está conectada al controlado 600S	Asegúrate que el cable esté conectado apropiadamente al controlador de la bomba. Verifica que la direcciones IEEE-488 (si IEEE-488 comunicación está en uso) estén colocadas apropiadamente. Si está conectada apropiadamente y las direcciones IEEE-488 son correctas, apaga la bomba y el controlador y desconecta el cable. Enciende la bomba y verifica las operaciones.
	La proporción de flujo puso para poner a cero	Aumenta la proporción del flujo de la bomba
	Presión del transductor fuera de ajuste o defectuosa	Coloca el flujo a cero, ajusta el transductor de presión para ponerlo a cero. Si el problema continúa, repara o reemplaza el transductor de presión.
	La bomba no esta purgada	Purga la bomba para la operación
	Válvula abierta <i>draw-off</i> o existe fuga	Cierra la válvula <i>draw-off</i> . Si el solvente todavía gotea, reemplaza la válvula.
	Solventes inmiscibles en la cabeza de la bomba	Purga la bomba con solventes apropiados. Verifica la miscibilidad de los solventes.
	Mal funcionamiento en la entrada o salida de la válvula check o la válvula está sucia	Aísla la cabeza de la bomba defectuosa para determinar si este síntoma es debido a un problema en la entrada o salida de la válvula check
	Sello del pistón dañado	Verifica si el solvente está goteando desde la cabeza trasera de la bomba o si se forman cristales de sal alrededor de la cabeza trasera de la bomba. Éste es un indicador de que el <i>sello del pistón está dañado</i> . Verifica si las dos las cabezas de la bomba pueden mantener la presión como constante. Si se detecta un problema, reemplaza el sello del pistón
Cavitación en la cabeza de la bomba (presión alta)	Verifica si el problema es debido a: <ul style="list-style-type: none"> ▪ La posición de los depósitos del solvente <ul style="list-style-type: none"> - Si los depósitos del solventes se encuentran arriba de la bomba ▪ Verifica si la tubería esta floja, torcida, o bloqueada la entrada a la bomba - Aprieta, endereza, o reemplaza la tubería ▪ Desgasificación del solvente inapropiado <ul style="list-style-type: none"> - Burbuja gas helio a los solventes para prevenir cavitaciones ▪ El filtro de la entrada del depósito de solvente está sucio - Remueve y limpia con ácido nítrico 6N, agua (enjuague 3 veces), seguido por metanol ▪ Los solventes se volatilizan en la cabeza de la bomba - Purga la bomba ▪ El diámetro interno de la tubería es demasiado pequeña para la entrada de solvente - Usa la tubería correcta 	

Figura 7.5. (Continuación) Problemas comunes encontrados en la Bomba 616 Waters.

SINTOMA	CAUSA PROBABLE	SOLUCION
La Bomba no Entrega Solvente	Ruptura en el pulso del amortiguador / presión alta	Verifica las fugas, reemplaza el pulso del amortiguador o el filtro de presión alta
	Fallo en la proporción de solvente en la válvula del mezclador en-línea	Vacía la válvula proporcionando solvente Si el problema continúa, reemplace el componente
	Motor de la bomba defectuoso	Contacta al servicio técnico de Waters
	Tabla del circuito defectuoso	Contacta al servicio técnico de Waters
Fuga en las Cabezas de la Bomba	Sellos de pistón de la bomba usados	Reemplaza el sello del pistón defectuoso.
	Pistón usado	Repara o reemplaza el pistón
	Cabeza de la bomba floja	Aprieta los dos tornillos de la cabeza de la bomba Asegúrate que aprietan igual ambos tornillos
	Entrada o salida de la válvula check floja	Aprieta la válvulas check flojas No aprietes por encima Verifica los montajes y las férulas que estén flojos Reemplázalos si es necesario.
Fuga en la válvula <i>draw-off</i>	Válvula <i>Draw-off</i> abierta o rota	Cierra la válvula <i>draw-off</i> Si el solvente todavía gotea, reemplaza el sello de la válvula defectuosa
	Línea de solvente dañada	Reemplaza la línea de entrada.
Pulsaciones/velocidad de flujo de la bomba erráticas	Inadecuada desgasificación de la fase móvil	Desgasifica los solventes y re-equilibra el sistema
	La bomba no está purgada	Purga la bomba. Nota. Si usas solventes volátiles (como hexane o éter), purga la bomba con un solvente miscible, menos volátil como THF y metanol Asegúrate que la columna este desconectada para evitar romper el equilibrio
	Poco solvente en el depósito	Verifica el nivel de solvente en los depósitos Si están fuera de nivel, llénalos con solvente (desgasifica y burbujea con helio los solvente)
	Burbujas de aire en la cabeza de la bomba	Purga la bomba para quitar las burbujas de aire Asegúrate que no haya ninguna burbuja de aire en las líneas de entrada de los solventes Desgasifica o burbujea helio a los solventes
	Válvulas check sucias o mal funcionamiento	Para determinar si este síntoma es debido a un problema con la entrada o salida de la válvula check. Limpia las válvulas check
	Solvente en el filtro de entrada o líneas de entrada bloqueada	Asegúrate que el solvente esté filtrado para prevenir cualquier tipo de precipitación Nota La precipitación de buffers en la válvula check puede ocurrir al correr una mezcla de agua y un solvente orgánico en una concentración de 50% o más alto El grado de precipitación puede variar y depender del solvente orgánico y del buffer utilizado

Figura 7.5. (Continuación) Problemas comunes encontrados en la Bomba 616 Waters.

SINTOMA	CAUSA PROBABLE	SOLUCION
Pulsaciones/velocidad de flujo de la bomba erráticas	Filtro de entrada del solvente o líneas de entrada bloqueados.	Verifica la líneas obstruidas Reemplaza si es necesario. Limpia el filtro de la entrada del solvente por sonicación usa ácido nítrico 6N, agua (repita 3 veces), seguido por metanol.
	Bloqueo de la válvula que proporciona el solvente en la línea del mezclador	Vacía el solvente que proporcionan la válvula o mezclador en-línea. Si el problema continúa, reemplaza el componente.
	Fuga en el sello del pistón de la bomba (bajo la cabeza de la bomba)	Reemplaza el sello del pistón de la bomba
	Pistón de la bomba desgastado	Reemplaza el pistón.
	Solventes inmiscibles en la cabeza de la bomba	Ve el punto "Bomba no entrega solvente"
	Cavitación en la cabeza de la bomba Falla electrónica de la bomba	Contacta al servicio técnico de Waters
Inadecuada mezcla de solventes (sistema de gradiente)	Solventes inmiscibles en la cabeza de la bomba	
	Bloqueo de la válvula que proporciona el solvente en la línea del mezclador	Vacía el solvente que proporcionan la válvula o mezclador en-línea. Si el problema continúa, reemplaza el componente
	Mal funcionamiento del bombeo	
Presión del sistema alta debido a la bomba	Demasiado alto la velocidad de flujo de la bomba	Coloca la velocidad de flujo de operación correcta.
	Presión del transductor fuera de ajuste o defectuosa	Coloca la velocidad de flujo a cero y ajuste el transductor de presión para ponerlo a cero. Si el problema continúa, repáralo o reemplaza el transductor de presión.

Figura 7.5. (Continuación) Problemas comunes encontrados en la Bomba 616 Waters.

AUTOMUESTREADOR

SINTOMA	CAUSA PROBABLE	SOLUCION
El Automuestreador no enciende (ventilador y las luces del tablero delantero están apagadas)	El Automuestreador no esta conectado a la fuente de energía	Asegúrate que el cable de energía esté conectado a una fuente de energía y al automuestreador apropiadamente.
	Ningún salida de energía	Verifica que la toma de corriente esté conectada a otra unidad eléctrica y verificar si la unidad opera Si esa unidad no trabaja, localiza otra toma de corriente eléctrica y observa si funciona el automuestreador.
	Fusible fundido	Reemplaza el fusible
	El automuestreador no está conectado al controlado 600S	Asegúrate que el cable esté conectado apropiadamente del controlador al automuestreador Verifica que la direcciones IEEE-488 (si IEEE-488 comunicación está en uso) estén colocadas apropiadamente Si está conectada apropiadamente y las direcciones IEEE-488 son correctas, apaga el automuestreador y el controlador y desconecta el cable Enciende el automuestreador y verifica las operaciones.

Figura 7.6. Problemas comunes encontrados en el Automuestreador 717 Waters.

SINTOMA	CAUSA PROBABLE	SOLUCION
El Automuestreador no enciende (ventilador y las luces del tablero delantero están apagadas)	Problema de la presión (aire en el automuestreador)	Verifica que la línea de la presión este unida al automuestreador Verifica el regulador de la presión para colocar el rango de operación apropiado Ajusta si es necesario
	Falta de energía	Restaura el automuestreador y continua con la operación
	Puerta abierta en el compartimento de la muestra	Abre y cierra la puerta del compartimento de la muestra Si el problema continúa, contacta al servicio técnico de Waters.
	Error en el carrusel de muestras	Contacta al servicio técnico de Waters
	Tarjeta del circuito defectuosa	Contacta al servicio técnico de Waters
Fugas en el sistema de flujo (jeringa, inyector, sello del empaque, empaque de fluido)	Montaje de compresión flojo o apretado	Verifica los montajes y las férula apretadas y desgastadas. Reemplaza si es necesario
	Sellos de la válvula defectuosos	Reemplaza los sellos
	Sello del empaque defectuoso	Reemplaza los sello de empaque
	Sello de fluido defectuoso	Reemplaza los sellos de fluido
	Aguja dañada	Purga el automuestreador para desconectar la aguja Si el problema continúa, reemplaza el armazón de la aguja y el sello de empaque.
	Jeringa bloqueado o dañada	Reemplaza jeringa
Fugas en el sistema del lavado de la aguja	Montaje de compresión flojo o apretado	Verifica los montajes y las férula apretadas y desgastadas. Reemplaza si es necesario
	Válvula de fluido defectuosa	Reemplaza la válvula
	Bomba defectuosa para lavar la aguja	Reemplaza la bomba del lavado de la aguja
	Depósito del solvente para el lavado de la aguja del automuestreador vacío	Llena el depósito de solvente para el lavado de la aguja
Prueba en la inyección de la muestra (no se inyecta la muestra, la forma del pico es anormal)	Válvula de la inyección defectuosa	Purga el automuestreador Si el problema continúa, repara / reemplaza la válvula
	Aguja bloqueada debido a las partículas de la muestra	Purga el automuestreador para desconectar la aguja Asegúrate que los solventes y las muestras estén apropiadamente filtrados para prevenir obstrucciones Si el problema continúa, reemplaza el montaje de la aguja
	Burbujas de aire en la jeringa o en el montaje del loop de muestra	Purga el automuestreador Si las burbujas de aire están siendo continuamente arrastradas, verifica que no se esté creando vacío cuando se inyecta la aguja en el vial (indica que el sello está demasiado apretado alrededor de la aguja) Inyecta la muestra del vial sin poner la tapa
	Inyección del vial de la muestra vacío	Compara la entrada del vial de muestra y la posición del vial Entre el número de vial de muestra correcto
	Muestra insuficiente en el vial	Asegúrate que el mínimo volumen de muestra requerido este en el vial
	La tapa esta demasiada apretada (se crea un vacío)	Afloja la tapa
	Muestra demasiada viscosa	Diluye la muestra o disminuye la velocidad de flujo de la jeringa

Figura 7.6. (Continuación). Problemas comunes encontrados en el Automuestreador 717 Waters.

SINTOMA	CAUSA PROBABLE	SOLUCION
Problema en la inyección de la muestra (no se inyecta la muestra, la forma del pico es anormal)	La jeringa no agujerea el tapón del vial	Inyecta nuevamente la muestra sin tapar el vial. Inspecciona si el inyector está haciendo el agujero en el tapón del vial. Si no hace ningún agujero, se tiene un problema con el la aguja del inyector, reemplázala o contacta al servicio técnico de Waters.
	Problema de la presión (aire en el automuestreador)	
	Sellos del inyector defectuosos	Reemplaza los sellos del automuestreador
Ningún flujo solvente a través del inyector	El automuestreador no está conectado a la bomba	Une las líneas de fluido para bombear
	La válvula de inyección está en mala posición.	Reiniciar el funcionamiento para recalibrar la válvula. Si el problema continúa, reemplaza o repara la válvula.
	La válvula de inyección está bloqueada	Vacía el solvente del automuestreador. Si el problema continúa, reemplaza o repara la válvula de inyección.
	Fugas dentro del automuestreador	Verifica las fugas. Aprieta los montajes flojos. Si las fugas continúan, verifica montajes y la férulas desgastadas del automuestreador. Reemplaza si es necesario.
Presión del sistema alta debido al automuestreador	Aguja bloqueada debido a las partículas en la muestra	Purga el automuestreador para desconectar la aguja. Asegúrate que los solventes y las muestras estén apropiadamente filtrados para prevenir obstrucciones. Si el problema continúa, reemplaza el montaje de la aguja.
	Válvula de inyección bloqueada	Purga el automuestreador. Si el problema continúa, reemplaza el montaje de la aguja.
	Tubería bloqueada entre automuestreador y la columna	Verifica las conexiones de la tubería. Reemplaza cualquiera tubería bloqueada.
	Muestra no miscible con fase móvil	Verifica la solubilidad de la muestra y de la fase móvil probándola en un vaso y observar si la muestra se disuelve. Si es necesario, diluye la muestra o cambia la fase móvil.
	Filtros del automuestreador bloqueados	Limpia o reemplaza los filtros
La muestra se dirige a otro lado	Volumen de inyección demasiado grande.	Reduce el volumen de inyección o instala un loop de muestra más grande.
	Problema con la inyección de la muestra	Para verificar el problema, prueba con inyecciones blanco de solvente después de una inyección de la muestra. Si el problema persiste después de una inyección de la muestra, esto puede deberse a un problema con el sistema del lavado de la aguja (ver abajo).
	Problemas con el sistema de lavado de la aguja (debido a la pérdida de empuje, depósito de solvente vacío, los filtros contaminados, o el bombeo del lavado de la aguja es defectuoso)	Verifica el problema potencial en estas áreas y realiza lo siguiente: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Depósito del solvente vacío - Cambia el depósito del lavado de la aguja ▪ Pérdida de empuje - Rempuja al sistema de lavado de la aguja ▪ Filtros contaminados - Reemplaza los filtros.

Figura 7.6. (Continuación). Problemas comunes encontrados en el Automuestreador 717 Waters.

SINTOMA	CAUSA-PROBABLE	SOLUCION
Mala inyección de la muestra vial	El número de vial de muestra incorrecto	Compara la entrada del vial de muestra y la posición del vial Mete el número de vial de muestra correcto en el automuestreador
	Vial de muestra mal etiquetado	Verifica la información sobre el vial de la muestra. Retiqueta si es necesario
Incorrecta inyección de la muestra	Volumen de inyección incorrecto	Compara el volumen de inyección y la posición del vial Mete el valor correcto del volumen de inyección en el automuestreador
	Tamaño incorrecto en el loop de muestra o de la jeringa instalados en el sistema del fluido	Reemplaza el tamaño del loop de muestra apropiada o el tamaño de la jeringa
	Tamaño de jeringa incorrecto	Compara el tamaño de la jeringa y la jeringa instalada. Mete el valor del tamaño correcto de la jeringa en el automuestreador
	Muestra insuficiente en vial	Asegura el mínimo volumen de muestra requerido en el vial
	Fuga en la jeringa	Reemplaza /repara la jeringa.
	Muestra demasiado viscosa	Diluye la muestra o disminuye la velocidad de flujo
	Se crea vacío en el vial	Haz inyecciones sin tapa, quita el exceso de muestra del vial, o afloja la tapa

Figura 7.6. (Continuación). Problemas comunes encontrados en el Automuestreador 717 Waters.

DETECTOR DE ARREGLO DE DIODOS 996

SINTOMA	CAUSA-PROBABLE	SOLUCION
No enciende el detector	El detector no está conectada	Asegúrate que el cable de energía este conectado al detector apropiadamente
	Ningún salida de energía	Verifica que la toma de corriente esté conectada a otra unidad eléctrica y verificar si la unidad opera. Si esa unidad no trabaja, localiza otra toma de corriente eléctrica y observa si funciona el detector
	Fusible fundido	Reemplaza el fusible
	Falta de energía	Restaura el automuestreador y continua con la operación
	Tarjeta del circuito defectuosa	Contacta al servicio técnico de Waters
La fuente de la lámpara no enciende (o falla la energía de referencia)	Fusibles fundidos	Reemplaza el fusible fundido
	Lámpara defectuosa	Reemplaza la lámpara
	Los focos led de la lámpara no están conectados	Conecta los focos led a la lámpara
	Lámpara en estado de espera	Conduce el modo de reserva
	Mal colocado el interruptor de la lámpara	Verifica el montaje del interruptor, cambia la lámpara para corregirlo
	El voltaje de la lámpara a cero	Cambia el voltaje de la lámpara.
	Energía de la lámpara defectuoso	Contacta el servicio técnico de Waters
Celda de referencia contaminada	Para limpiar la celda de referencia Lava la celda de referencia con un solvente miscible, segundo por metanol.	

Figura 7.7. Problemas comunes encontrados en el Detector 996 Waters.

SINTOMA	CAUSA PROBABLE	SOLUCION
El detector no responde (línea base estrechos, ningún pico)	Lámpara quemada	Reemplaza la lámpara
	Parámetros del detector incorrectos (como longitud de onda, o sensibilidad)	Verifica y ajusta cualquier parámetro incorrecto del detector
	Cable inadecuadamente conectado entre el detector y el sistema de datos (computadora, integrador, o registrador gráfico).	Verifica que la señal de salida del detector esté correctamente conectada al dispositivo del manejo de datos. Asegúrate que cualquier salida del interruptor esté relacionada con la posición apropiada. Use la señal del cable para proteger y une sólo el dispositivo.
	Salida del detector no esta colocada a cero	Coloca la línea base del detector a cero
	Fotodiodo defectuoso o incorrecto	Reemplaza el fotodiodo
	Celda de flujo sucia o contaminada	Para limpiar la celda flujo 1. Remueve la columna y la unión 2. Para buffers, lava el detector con 100% agua, 100% metanol (si el solvente es miscible con el último solvente en la celda de flujo), de nuevo seguido por 100% agua. 3 Para los solventes no-polares, vacía el detector con una mezcla 50/50 de THF y agua (si el solvente es miscible con el último solvente en la celda de flujo), seguido por 100% de THF Si el problema continúa, lave con una solución más fuerte.
	Ventana de la celda de flujo sucia	Limpia la ventana. Si el problema persiste reemplázala.
Fugas de solvente en la celda de flujo	Repara o reemplaza la celda de flujo.	
Tarjeta del circuito defectuosa	Contacta al servicio técnico de Waters	
Detector sobre calentado	Filtros de ventilación sucios	Limpia los filtros de are
	Mal funcionamiento en el sistema de ventilación	Reemplaza el montaje de ventilación.
Fugas en los montajes	Montaje de compresión apretado o flojo	Verifica montajes y férula que estén apretadas y desgastadas Reemplaza si necesario.
Fugas en la celda de flujo	Empaque de la celda de flujo del detector	Reemplaza el empaque. Si persiste la fuga reemplaza la celda de flujo.
	Celda de flujo bloqueada o dañada	Cuidadosamente lava la celda de flujo del detector Si la celda de flujo está dañada o rota, repárala o reemplázala.
Presión alta en el sistema cromatográfico debido al detector	Tubería de entrada y salida del detector bloqueada	
	Celda de flujo bloqueada o dañada	Lava cuidadosamente la celda de flujo de detector para quitar cualquier obstáculo Si la celda de flujo está dañada o rota, repárala o reemplázala

Figura 7.7. (Continuación) Problemas comunes encontrados en el Detector 996 Waters.

7.3 PROBLEMAS CROMATOGRÁFICOS

En éste tema nos dedicaremos específicamente al cromatograma, indicando las dificultades y los problemas que con él pueden presentarse de manera tal de ofrecer al usuario una guía de ayuda para resolverlos en el futuro

Nos dedicaremos, especialmente, a los problemas que redundan en la deformación de los picos cromatográficos y a las anomalías referidas al cromatograma (aparición de picos extraños, ruido o deriva de la línea de base)

La deformación del pico cromatográfico es un hecho muy importante porque habitualmente se traduce en pérdidas de resolución o defectos en la cuantificación. La identificación de este problema puede resultar de la aparición visual del pico en el cromatograma, de la medición del tailing, o de la eficiencia tanto durante el control periódico de las columnas como en los análisis de rutina. La aparición de estos fenómenos durante el desarrollo de un nuevo método de análisis es una condición necesaria y suficiente para que la nueva metodología deba replantearse y eventualmente, descartarse.

Algunos de los problemas cromatográficos más comunes que suelen presentarse son los siguientes:

- Línea Base
- Ruido
- Tiempos de Retención
- Picos

Línea Base

El ruido en la línea base se relaciona con la fase móvil, bomba, columna, detector. El ruido en la línea base se caracteriza como:

- Ruido en la línea base no-cíclico (irregular)
- Ruido en la línea base cíclico (corto o a largo plazo)
- Derivas de la línea base

Las derivas, conjuntamente con el ruido relacionado con la línea base, y las causas más comunes que las originan se encuentran detalladas, junto con sus soluciones, en la tabla 7.8. La aparición de derivas dificulta la definición de la base del pico resultando, así, en errores más o menos severos en la cuantificación.

Defectos en la desgasificación o presencia de impurezas en las fases móviles son las causas, relacionadas con los solventes, que producen derivas y ruido en la línea base. Otra de las causas, que la producen se refiere al lento equilibrio de la columna cromatográfica.

Los problemas en la línea base pueden originarse, además, cuando la columna libera componentes excesivos retenidos. Estos componentes suelen eluir como bandas muy anchas que se confunden con las variaciones propias de la línea base y pueden provenir de la muestra o de la misma columna cromatográfica. En el primer caso es posible esperar la elución del pico tardío antes de inyectar una segunda muestra o, preferentemente, diseñar algún procedimiento de preparación que aisle al componente excesivamente retenido. En el segundo caso se trata de columnas en las cuales han quedado retenidas impurezas presentes tanto en los solventes como en la muestra que eluyen lentamente. Este último problema puede evitarse lavando diariamente la columna (o cuando se inyectan muestras muy "sucias") con un solvente fuerte (metanol, acetonitrilo).

SINTOMA	CAUSA PROBABLE	SOLUCION
<p>Ruido en la línea base no-cíclico (irregular)</p>	<p>Burbujas de aire atrapadas en la celda del detector</p>	<p>Purga la celda desde flujo del detector o aplica una ligera presión en la salida del detector</p> <p>Para prevenir la formación de burbujas de aire en la celda de flujo, añade a la tubería de salida del detector de 1 a 3 pie (30 a 90 cm) de longitud de 0.009 -pulgada (0.23 mm) de diámetro interno (DI), 1/16 -pulgada (1.58 mm) DI. Esta tubería funciona como un restrictor de flujo para aumentar presión. Un pedazo de tubería de 3 pie (90 cm) proporciona una presión de 30 a 50 psi (2 a 3 atm) con una velocidad de flujo de 1 ml/min en agua</p>
	<p>Pequeñas burbujas de aire viajando a través del sistema de fluido</p>	<p>Purga la bomba para remover el aire. Para prevenir burbujas de aire adicionales, asegúrate que la fase móvil esté apropiadamente desgasificada o burbujeada con helio</p>
	<p>Sistema no estabilizado o químicamente equilibrado</p>	<p>Permite a todos los componentes del sistema (como la columna y el detector) el tiempo suficiente para estabilizar y equilibrar químicamente.</p> <p>Si se corren automáticamente métodos de gradiente, asegúrate que los tiempos de equilibrio sean suficientes y reproducibles entre las inyecciones</p> <p>Nota: Si usas reactivos iónicos apareados, asegúrate que la primera vez que uses la columna proporcione un tiempo suficiente y volumen de solvente adecuadamente equilibrado para columna (por ejemplo, correrla a un volumen total de 100 ml de una solución de 5 mM a 1 ml/min)</p>
	<p>Fase móvil contaminada</p>	<p>Desecha la fase móvil contaminada y</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Limpia el depósito de solvente. Limpia o reemplaza el filtro de entrada del solvente. Para limpiar el filtro, quitalo y soncar con ácido nítrico 6N, agua (repetir 3 veces), seguido por metanol ▪ Prepara y filtra solvente fresco usando reactivos de alta calidad sólo solvente grado CLAR ▪ Purga y re-equilibra el sistema

Figura 7.8. Problemas Cromatográficos (línea base)

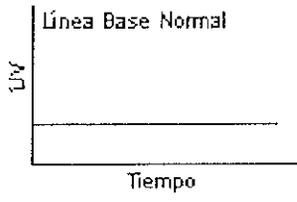
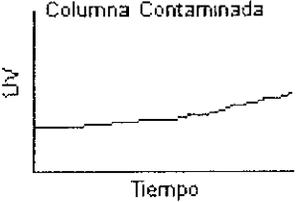
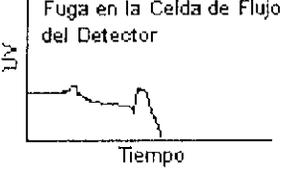
SINTOMA	CAUSA PROBABLE	SOLUCION
<p>Ruido en la línea base no-cíclico (irregular)</p>  <p>Línea Base Normal</p>	<p>Fuga en la celda de flujo del Detector</p>	<p>Remueve la tapa del detector y verifica las fugas. Si las fugas no son visibles, realiza lo siguiente:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Purga el detector con un solvente miscible no-bufferado, seguido por metanol. 2. Une la fuente de nitrógeno o helio a la entrada del detector. Despacio seca la celda de flujo. 3. Monitorea la línea base para el ruido. Si el ruido desaparece, hay una fuga dentro de la celda de flujo de detector. <p>Repara /reemplaza la celda de flujo del detector</p>
 <p>Columna Contaminada</p>  <p>Fuga en la Celda de Flujo del Detector</p>	<p>Columna contaminada</p>	<p>Para verificar este problema como una posible causa, reemplaza todas las columnas del sistema con una unión (o con una buena columna conocida del mismo tipo). Regresa la fase móvil, y monitorea la línea base.</p> <p>Nota: Si requieres adicionar presión al sistema durante esta comprobación, usa un pedazo de tubería de 0.009 -pulgada (0.23 mm) DI (o el restrictor conveniente) en lugar de la unión.</p> <p>Si el problema continúa, limpia o reemplaza la columna contaminada como se menciona en el manual de operación de la columna.</p> <p>Si el problema continúa, esto podría ser debido a:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Las propiedades de los solventes como miscibilidad ▪ Fase móvil contaminada ▪ Guarda columna contaminada en la línea de filtro (limpia o reemplázala)

Figura 7.8. (Continuación) Problemas Cromatográficos (línea base)

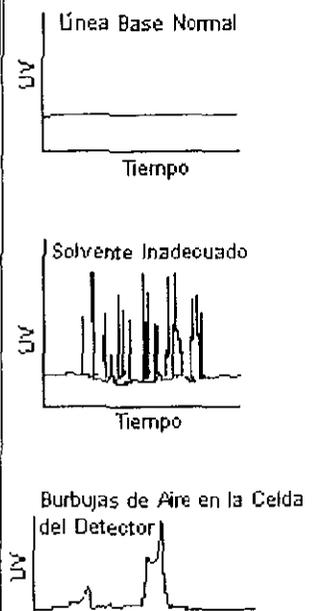
SINTOMA	CAUSA PROBABLE	SOLUCION
<p>Ruido en la línea base ciclo a corto plazo (segundos o minutos)</p> 	<p>Solvente Inadecuado</p>	<p>Para confirmar una mezcla problema:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Con la columna en-línea, se bombea 5-10 volúmenes de la columna de 100% de un solvente y se monitorea la línea base. Esto proporciona una composición constante y un volumen suficiente para equilibrar la columna y alcanzar la celda de flujo del detector. 2. La bomba pre-mezcla varios solventes (por ejemplo, 50/50, 95/5, 70/30, o corre la mezcla) y se monitorea la línea base. Si la línea base es aceptable con 100% de un solvente, pero si se presenta ruido en la línea base cuando se corren las mezclas, hay un problema de mezclado. 3. Usa solventes inmiscibles. Verifica la miscibilidad de los solventes y cambia a los solventes más miscibles. El mal funcionamiento en la bomba, de la válvula de la bomba, la proporciona la mezcla del solvente, o la alta presión. 4. Solventes inadecuados desvían la bomba. La solución es agregar mezclas adicionales. Sin embargo, la mezcla requerida depende de la gravedad del problema. Verifica y corrige lo siguiente: 5. La mezcla incrementa el flujo laminar y demora el tiempo. Añade de 6 a 12 pulgadas (150 a 300 mm) de largo, 0.040-pulgadas (1.0 mm) de diámetro interno de tubería entre la salida de la bomba y el automuestreador (inyector). La longitud de la tubería agrega sólo una pequeña demora en el sistema. En volumen y la forma no distorsionan el gradiente de solventes. 6. Si la tubería no resuelve el problema, agregue una mezcla de volumen más grande por una mezcla más fuerte. Agrega una o más mezclas de agua en flujos de gradiente entre la salida de la bomba y el inyector. La mezcla cambia la proporción de solvente que consiste en una mezcla con un volumen mínimo y un gradiente de distorsión.
	<p>Tubería de entrada de la bomba, floja, doblada o bloqueada</p>	<p>Verifica la tubería. Si esta floja, apriétala. Si está torcida, enderezarla. Si está bloqueada, reemplázala.</p>
	<p>Burbuja de aire en la celda de flujo del detector</p>	<p>Purga la celda desde flujo del detector o aplica una ligera presión en la salida del detector.</p> <p>Para prevenir la formación de burbujas de aire en la celda de flujo, añade a la tubería de salida del detector de 1 a 3 pie (30 a 90 cm) de longitud de 0.009 - pulgada (0.23 mm) de diámetro interno (DI), 1/16 - pulgada (1.58 mm) DI. Esta tubería funciona como un restrictor de flujo para aumentar presión. Un pedazo de tubería de 3 pie (90 cm) proporciona una presión de 30 a 50 psi (2 a 3 atm) con una velocidad de flujo de 1ml./min en agua.</p>

Figura 7.8. (Continuación) Problemas Cromatográficos (línea base)

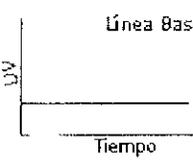
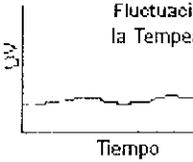
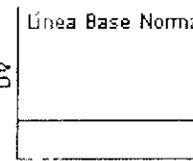
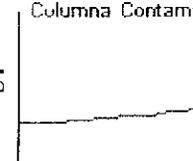
SINTOMA	CAUSA PROBABLE	SOLUCION
<p>Ruido en la línea base cíclico a largo plazo (minutos o horas)</p>  <p>Línea Base Normal</p>  <p>Fluctuaciones en la Temperatura</p>	Variación en la temperatura	<p>Estabiliza la temperatura Si el problema continúa</p> <ul style="list-style-type: none"> Usa un calentador de columna (corre a 5°, Celsius sobre la temperatura ambiente). Cambia el sistema o la columna a un ambiente termodinámicamente estable. Evita colocar el sistema directamente a la luz del sol
	El solvente está reciclándose desde la salida de desecho del detector a través del sistema Cromatográfico	A menos que se completamente necesario, no recicles el solvente a través del sistema cromatográfico. Sólo usa solvente reciente y filtrado para su aplicación
<p>Derivas de la Línea Base</p>  <p>Línea Base Normal</p>  <p>Columna Contaminada</p>  <p>Fuga en la Celda de Flujo del Detector</p>	Sistema no estabilizado o químicamente equilibrado	Referirse a la acción correctiva ya mencionada " Ruido en la línea base no-cíclico (irregular)"
	Variación en la temperatura	Referirse a la acción correctiva ya mencionada " Ruido en la línea base cíclico a largo"
	Fase móvil contaminada (o descompuesta)	Referirse a la acción correctiva ya mencionada " Ruido en la línea base no-cíclico (irregular)"
	Fase móvil inapropiadamente desgasificada o burbujead con helio	<p>Desgasifica o burbujea con helio los solventes y re-equilibrar el sistema</p> <p>Nota Asegúrete que el límite de solvente para el burbujeo de helio sea el adecuado, evitando vaciar los componentes de la fase móvil</p>
	Fuga en la celda de flujo del Detector	Referirse a la acción correctiva ya mencionada " Ruido en la línea base no-cíclico (irregular)"
	Columna contaminada	Referirse a la acción correctiva ya mencionada " Ruido en la línea base no-cíclico (irregular)"
	El solvente está reciclándose desde la salida de desecho del detector a través del sistema Cromatográfico	A menos que se completamente necesario, no recicles el solvente a través del sistema cromatográfico. Sólo usa solvente reciente y filtrado para su aplicación
Fugas en el sistema	Verifica todas las fugas del montaje. Si hay fugas en el montaje, aprétalas Si la fuga continúa, reemplaza el montaje y la férula	

Figura 7.8. (Continuación) Problemas Cromatográficos (línea base)

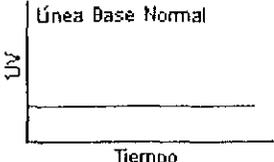
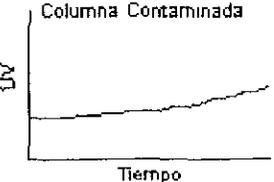
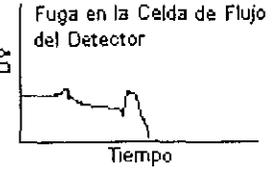
SINTOMA	CAUSA PROBABLE	SOLUCION
<p>Derivas de la Línea Base</p>  <p>UV</p> <p>Tiempo</p>	Sangrado de la fase estacionaria	<p>Para verificar este problema, reemplaza todas las columnas en el sistema con una unión. Corre la fase móvil y monitorea la línea base</p> <p>Nota: Si requieres adicionar presión al sistema durante esta comprobación, utiliza un pedazo de tubería de 0.009 -pulgada (0.23 mm) de diámetro interno (ID) en lugar de una unión.</p> <p>Asegura que se sean convenientes las condiciones de operación para la columna (por ejemplo, la compatibilidad solvente, el rango del pH, y así sucesivamente). Si las condiciones de operación afectan a la columna.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Selecciona una fase móvil diferente • Selecciona una columna diferente <p>Consultar el manual de operación de la columna para más información</p>
<p>Columna Contaminada</p>  <p>UV</p> <p>Tiempo</p>	Longitud de onda incorrecta para el solvente	<p>Verifica la absorbancia de origen de la fase móvil usando un espectrofotómetro. Si el origen es alto (el detector es incapaz de colocar a cero la línea base), la fase móvil contiene un compuesto que absorbe el UV causando una tendencia en la línea base</p> <p>Realiza la operación a una longitud de onda de corte que esté sobre el UV de la fase móvil o cambia de solventes.</p>
<p>Fuga en la Celda de Flujo del Detector</p>  <p>UV</p> <p>Tiempo</p>	Impurezas que emergen de la columna luego de una inyección	<p>Espera la elución del pico tardío</p> <p>Mejorar el sistema de preparación de las muestras de manera tal de aislar la sustancia que eluye tardíamente</p>
	Impurezas que emergen de la columna sin la inyección de muestra	<p>Estas impurezas son sustancias muy retenidas que provienen de muestras "sucias" en columnas deficientemente lavadas después de cada día de trabajo</p> <p>Para eliminarlas habitualmente basta con esperar que la fase móvil alcance el equilibrio. Si el equilibrio tarda demasiado tiempo en alcanzarse es recomendable lavar la columna con algún solvente que remueva las sustancias muy retenidas o con el sistema de lavado general de las columnas</p>
	Pérdidas en el sistema	Ver tabla 7.1 "Pérdidas"
	Falta de equilibrio en la lámpara	Espera a que se alcance el equilibrio
	Lámpara del detector	Reemplaza la lámpara defectuosa
	Celda de flujo del detector sucia	Limpia circulando isopropilamina o HNO ₃ al 10 % con la ayuda de una jeringa o bien desárrnala y limpia las ventanas con isopropilamina.

Figura 7.8. (Continuación) Problemas Cromatográficos (línea base)

Ruido

El ruido es otro de los problemas que afectan a la cuantificación porque dificulta la definición de la base del pico. En CLAR el ruido, como la deriva, puede provenir de orígenes sumamente diversos. En primera aproximación cualquier factor que atenta contra la estabilidad en el caudal de la fase móvil o contra la energía en la detección será un factor que contribuya a la aparición de ruido en el instrumento. Las causas que originan el ruido conjuntamente con sus posibles soluciones se detallan en la tabla 7.9.

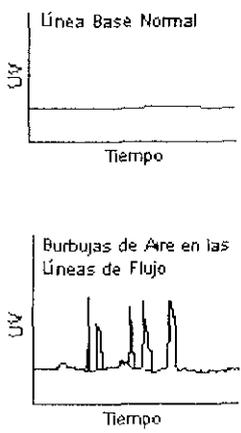
SINTOMA	CAUSA PROBABLE	SOLUCION
<p>18) Ruido</p> 	Lámpara agotada o con baja energía	Reemplaza la lámpara
	Burbuja de aire atrapado en la bomba	Purga la bomba con la ayuda de una jeringa. En esta operación el metanol y etanol remueven mejor las burbujas de aire que el agua. Si persisten las burbujas de aire mejorar la desgasificación del solvente.
	Filtro de salida de la columna eliminando partículas hacia el detector	Reemplaza el filtro
	Burbujas de aire en la celda del detector	Limpia la desgasificación del solvente
	Celda de flujo del detector sucia	Limpia la celda según lo indicado circulando isopropilamina o HNO ₃ al 10% con la ayuda de una jeringa o bien desarmarla y limpiar las ventanas con isopropilamina.
	Falta de conexión a tierra (estática)	Conecta el instrumento a tierra con una lanza
	Pérdidas en el sistema	Ve la tabla 7.1 "Pérdidas"
	Electrónica ruidosa	Contacta al servicio técnico de Waters

Tabla 7.9. Problemas Cromatográficos (Ruido)

Tiempo de Retención

El tiempo de Retención (t_R) es el tiempo que toma un soluto en recorrer toda la columna. El tiempo de retención se define como el tiempo medido entre la inyección y la elución de la concentración máxima del soluto (máxima señal). La distancia entre este máximo de la señal y la línea base es la altura del pico en cuestión. Los problemas más comunes se presentan en la tabla 7.10.

La estabilidad del tiempo de retención es afectado por.

El Sistema cromatográfico

La fase Móvil (composición, preparación, desgasificación inapropiada, estabilidad)

Columna

Temperatura de operación

Desempeño de la bomba (velocidad de flujo, presión, pérdida de presión)

SINTOMA	CAUSA PROBABLE	SOLUCION
Derivas en los tiempos de retención	Falta equilibrio en la fase móvil	Equilibra la columna hasta obtener una línea de base plana (como mínimo 20 volúmenes de columna, y algo más que ese valor en Cromatografía de Intercambio Iónico).
	Cambios en la fase móvil	Evita la evaporación del componente más volátil En fase normal. Para evitar los cambios de retención generados por la absorción de agua del ambiente, agrega isopropilamina a la fase móvil o saturarla con agua.
	Cambios en la temperatura	Coloca el equipo de CLAR en zonas del laboratorio donde existan gradientes de temperatura
Tiempos de retención más cortos que los esperados	Pérdidas de los grupos C18 de la columna	En alguna medida es normal. Se debe a la hidrólisis de las cadenas alquílicas en medios acuosos. Si los picos hallados son simétricos y la columna no ha perdido su capacidad separativa ($R \geq 1.5$), no es conveniente reemplazarla sino que se suele adecuar el sistema modificando la proporción de agua:solvente orgánico. La disminución de los t_R detecta en los solutos que no interactúan con los grupos silanol de la columna mientras que los solutos silanofílicos suelen aumentar sus t_R .
	Material de relleno de la columna contaminado	Lava la columna con un solvente capaz de remover las sustancias que la han contaminado. Si éstas no se conocen utilizar el sistema general de lavado.
		No utilices columnas que se han usado con reactivos de Cromatografía de Intercambio Iónico para otras aplicaciones. Estos reactivos se unen irreversiblemente a la columna y la modifican.
		Reemplaza la columna.
	Fase móvil inadecuada	Prepararla nuevamente.
	Temperatura errónea	Controla y ajusta el controlador de temperaturas.
	Caudal de la fase móvil inadecuado	Calibra o reemplaza.
Columna sobrecargada	Inyecta concentraciones menores.	

Tabla 7.10. Problemas Cromatográficos (Tiempos de Retención)

SINTOMA	CAUSA PROBABLE	SOLUCION
Tiempos de retención más largos que lo esperado	Material de relleno de la columna contaminado	En alguna medida es normal. Se debe a la hidrólisis de las cadenas alquílicas en medios acuosos. Si los picos hallados son simétricos y la columna no ha perdido su capacidad separativa ($R \geq 1.5$), no es conveniente reemplazarla sino que se suele adecuar el sistema modificando la proporción de agua solvente orgánico. La disminución de los t_r detecta en los solutos que no interactúan con los grupos silanol de la columna mientras que los solutos silanofílicos suelen aumentar sus t_r
		Lava la columna con un solvente capaz de remover las sustancias que la han contaminado. Si éstas no se conocen utilizar el sistema general de lavado
		No utilices columnas que se han usado con reactivos de Cromatografía de Intercambio Iónico para otras aplicaciones. Estos reactivos se unen irreversiblemente a la columna y la modifican
		Reemplaza la columna
	Fase móvil inadecuada	Prepararla nuevamente
	Temperatura errónea	Controla y ajusta el controlador de temperaturas
Caudal inadecuado	Calibra o reemplaza	
Cambios en los tiempos de retención	Pocas inyecciones -sitios activos	Inyecta una muestra de mayor concentración en la columna.
	Mezcla incoherente de la fase móvil en línea	Asegúrate que el sistema de gradiente esté entregando una composición constante; compara con la fase móvil preparada.
	Evaporación selectiva del componente de la móvil-fase	Tapa los depósitos de los solventes, usa helio para desgastificar, prepare la fase móvil reciente
	Variación en la Temperatura de la columna	Termostatiza o aísla la columna, asegúrate que la temperatura del laboratorio sea constante.
	Columna contaminada	Para verificar este problema como una posible causa, reemplaza la columna con una buena columna conocida del mismo tipo. Regresa al análisis y observa si tiempos de la retención se estabilizan. Si el problema se detiene, limpia o reemplaza la columna, de acuerdo al manual de operación de la columna. <ul style="list-style-type: none"> ▪ Si el tiempo de la retención continúa siendo irregular, esto podría ser debido a ▪ Las propiedades de solventes como miscibilidad ▪ Fase móvil contaminada ▪ Guarda columna o filtro en-línea contaminado (limpia o reemplaza de acuerdo al manual de operación)

Tabla 7.10. (Continuación) Problemas Cromatográficos (Tiempos de Retención)

Picos

Para obtener resultados cuantitativamente válidos es necesario trabajar sobre "buenos" cromatogramas. Es decir, sobre picos simétricos (Gaussianos) bien separados ($R \geq 1.5$) Cualquier factor que atenta o bien contra la simetría de los picos, o bien contra su separación desfavorecerá, sin lugar a dudas, su cuantificación. Los tipos más comunes de deformaciones y asimetrías en los picos se ejemplifican en la figura 7.1.

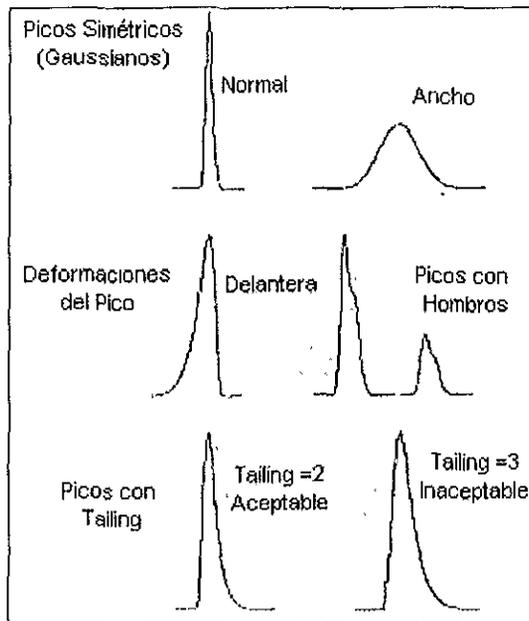


Figura 7.1. Pico simétrico y deformaciones habituales de los picos cromatográficos.

El tailing es una de las deformaciones del pico más frecuentes. Es interesante destacar que los picos con tailing son difíciles para integrar aún con los instrumentos más modernos y sofisticados, y que la presencia de tailing reduce sustancialmente la resolución.

Por otro lado, la completa ausencia de asimetrías es un hecho poco habitual. Las causas más comunes que originan tailing se detallan en la tabla 7.11.

1. Defectos en la columna cromatografía Volúmenes muertos Contaminación Química
2. Efectos extracolumnares Celda del detector demasiado grande Tuberías con diámetro interno o longitudes inadecuadas Volumen de inyección demasiado grande
3. Efectos de solvente
4. Sobrecarga de la columna
5. Mecanismos mixtos de retención
6. Sitios heterogéneos de retención
7. Sistemas no bufferados

Tabla 7.11. Causas más comunes que producen tailing en los picos

La presencia de picos anchos es, al igual que el tailing, un fenómeno que se origina en algún problema de índole cromatográfica. Estos picos pueden ser perfectamente simétricos, por lo cual no presentan demasiados problemas de integración, pero debido a la extensión de su base, pueden presentar problemas de resolución si se encuentran relativamente próximos.

Las mismas causas que originan picos con tailing pueden generar picos anchos. Cuando se observa un pico ancho también debe considerarse la posible existencia de algún pico no resuelto completamente. La presencia de picos anchos o de picos con tailing en Cromatografía de Exclusión Molecular dificilmente se relaciona con la existencia de un problema pues, en este modo cromatográfico, la dispersión de la banda (y su asimetría) se refiere a la dispersión (o asimetrías en la dispersión) de pesos moleculares del polímero en cuestión.

La eficiencia de la columna debe medirse cada vez que se efectúe un análisis sobre la misma muestra que se desea cuantificar. Si se determina que los picos tienen un ancho fuera de lo normal (es decir que la eficiencia de la columna ha disminuido) es conveniente replantear la metodología en función de la resolución obtenida y la resolución mínima requerida para una buena cuantificación. De esta manera es posible dilucidar si se puede analizar las muestras con la misma columna o si es necesario cambiarla (tabla 7.12).

SINTOMA	CAUSA PROBABLE	SOLUCION
Algunos picos presentan tailing, dan dobles picos o se distorsionan	Disociaciones parciales, más de un mecanismo de retención o heterogeneidad de sitios	En fase normal Agrega <ul style="list-style-type: none"> ◆ Trietilamina para analitos básicos ◆ Acido acético para analitos ácidos ◆ Agua o isopropilamina para compuestos polares
		En fase reversa Suprime la disociación o el mecanismo adicional utilizando los aditivos recomendados
		En Cromatografía de Intercambio Iónico Modifica el pH para favorecer la disociación del analito y aumentar la concentración de apareante
	Efectos del solvente	Inyecta una solución del analito en fase móvil y comparar la forma que presenta el pico
Picos tempranos presentan tailing más pronunciado que picos tardíos	Efectos extracolumnares	Utiliza celdas del detector de menores volúmenes
		Utiliza tuberías de menor diámetro interno y longitud
		Utiliza una constante de tiempo baja
Todos los picos presentan tailing o se distorsionan	Espacio vacío en la cabeza de la columna	Tápalo utilizando material de relleno
	Tuberías sucias	Limpia las tuberías con HNO ₃ entre el 10 y 50 % V/V
	Columna sobrecargada	Inyecta menores concentraciones de analito
	Volumen de inyección demasiado grande	Disminuye el volumen de inyección
	Guardacolumnas deteriorada	Cambia el material de relleno de la guarda columna

Tabla 7.12 . Problemas Cromatográficos (Picos)

SINTOMA	CAUSA PROBABLE	SOLUCION
Picos "fantasma"	Otros componentes de la muestra que son muy retenidos en la columna	Espera la elución del pico tardío
		Mejora el sistema de preparación de muestras de manera tal de aislar la sustancia que eluye tardíamente
Los picos se ensanchan al aumentar el tiempo de retención	Es normal Ver la siguiente ecuación: $N = 16 \left(\frac{t_n^2}{W_{tan}} \right)^2$	
La eficiencia no es constante a lo largo del cromatograma	En alguna medida es normal. Se debe fundamentalmente a los efectos extracolumnares	
Picos anchos	Columna con baja eficiencia	En alguna medida es normal Se debe a la hidrólisis de las cadenas alquílicas en medios acuosos. Si los picos hallados son simétricos y la columna no ha perdido su capacidad separativa ($R \geq 1.5$), no es conveniente reemplazarla sino que se suele adecuar el sistema modificando la proporción de agua-solvente orgánico. La disminución de los tr detecta en los solutos que no interactúan con los grupos silanol de la columna mientras que los solutos silanofílicos suelen aumentar sus tr
		Lava la columna con un solvente capaz de remover las sustancias que la han contaminado. Si éstas no se conocen utilizar el sistema general de lavado
		No utilices columnas que se han usado con reactivos de Cromatografía de Intercambio Iónico para otras aplicaciones. Estos reactivos se unen irreversiblemente a la columna y la modifican
		Reemplaza la columna
	Constante de tiempo del detector demasiado elevada	Disminuye su valor
	En ciertos integradores, valor de ancho de pico demasiado elevado	Disminuye su valor
	En Cromatografía de Permeación por Gel puede no ser normal porque el ancho del pico se relaciona con la distribución de pesos moleculares de los polímeros	
Picos negativos	Alta absorción proveniente de la fase móvil	Cambia la fase móvil Utilizar solventes con baja absorción UV, u cuya calidad sea reconocida
	En el volumen muerto Alteración debida a la diferencia entre los índices de refracción de la fase móvil y el solvente de disolución de las muestras	

Tabla 7.12. (Continuación) Problemas Cromatográficos (Picos)

Hasta aquí se ha dado un panorama de una manera completa sobre cromatografía de líquidos, la manera de cómo operar el equipo cromatográfico CLAR de la marca Waters y del software Millennium 2010, información relacionada con las columnas y los solventes, preparación de muestras y uno de los temas con los que se encuentra frecuentemente el usuario; problemas más comunes encontrados en CLAR

Todos estos temas engloban un trabajo final, los cuales fueron plasmados en un sistema informático computacional realizado en ambiente multimedia denominado MACROMIL

MACROMIL es un sistema multimedia cuya finalidad fue abarcar todos los aspectos más importantes de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución

En el siguiente capítulo se habla sobre el uso de la computadora en la educación, sistemas multimedia, como desarrollar un sistema multimedia, requerimientos del *hardware* y *software* para desarrollar MACROMIL, que son los *authoring*

ASPECTOS COMPUTACIONALES

CAPITULO 8. ASPECTOS COMPUTACIONALES

8.1 EL USO DE LA COMPUTADORA EN LA EDUCACIÓN

8.1.1 VENTAJAS DE LAS COMPUTADORAS EN LA EDUCACIÓN

8.2 EL *SOFTWARE* EDUCATIVO

8.2.1 CARACTERÍSTICAS ESENCIALES DE LOS *SOFTWARE* EDUCATIVOS

8.3 SISTEMAS MULTIMEDIA

8.3.1 HIPERTEXTO, HIPERMEDIA Y MULTIMEDIA

8.3.2 CATEGORÍAS DE LOS SISTEMAS MULTIMEDIA

8.3.3 SELECCIÓN Y DESARROLLO DEL SISTEMA DE MULTIMEDIA

8.4 REQUERIMIENTOS DEL *HADWARE* Y *SOFTWARE* PARA DESARROLLAR MACROMIL

8.4.1 LOS *AUTHORING*

8.5 *ASYMETRIX* MULTIMEDIA *TOOLBOOK*

8.6 DISEÑO PARA DESARROLLAR EL SISTEMA INFORMÁTICO MACROMIL EN AMBIENTE MULTIMEDIA

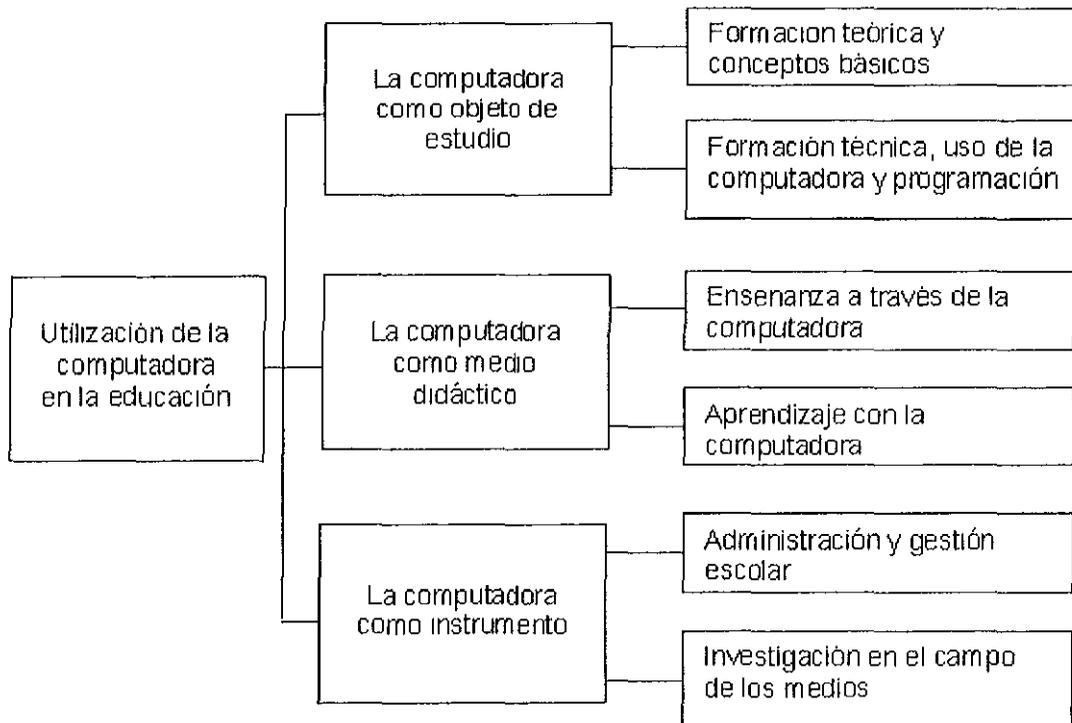
8.1 EL USO DE LA COMPUTADORA EN LA EDUCACIÓN

La computadora en la educación, está en pleno crecimiento, no sólo por el interés y las múltiples aplicaciones que se han destinado en las escuelas, universidades, instituciones, empresas, centros de investigación, etc., sino porque ha permitido incorporar el tratamiento de la información al proceso educativo. Esta incorporación de las computadoras al ámbito educativo, es considerada como un instrumento o herramienta de enseñanza para llegar a la educación, al aprendizaje y al crecimiento intelectual de las personas (como lo indica Rivera, 1997).

A través de la historia el acercamiento de la computadora a la práctica educativa se ha dado en tres vías:

- Como objeto de estudio
- Como medio didáctico, que abarcaría todas las experiencias que suponen aprender a través de ó con la computadora.
- Como medio de comunicación; cómo instrumento en manos del profesor o del alumno

Las distintas posibilidades del uso de la computadora en la educación se esquematizan en el siguiente cuadro.



La clasificación en torno a la utilización de la computadora en la educación, es muy variada ya que unos autores se centran en el papel que desempeña la computadora, mientras otros explican ejemplos asociados a su utilización y hay quienes optan por establecer relación entre las diferentes teorías del aprendizaje y el cómputo educativo.

En el año 1980, Taylor establece una de las primeras clasificaciones, presentándonos la computadora vista como tutora, como herramienta y como aprendiz. En la primera de estas categorías se incluyen todas las instancias en que la computadora toma el papel temporal de maestro o tutor del usuario; la segunda incluye los usos de la computadora como herramienta de trabajo del usuario y la tercera incluye los casos en donde los usuarios programan la computadora.

Alfred Bork (1986) nos explica los siguientes sistemas de utilización de la computadora, aprender a programar, familiarización con la computadora, herramientas intelectuales, aprendizaje basado en la computadora y sistemas de gestión.

Gros (1987) presenta una nueva clasificación, intentando recoger las propuestas anteriores, en la que la utilización de la informática se contempla como fin (aprender sobre la computadora), como medio (aprender de la computadora y aprender con la computadora) y como herramienta (para el profesor y para el alumno).

Jonassen (1996) plantea tres modalidades de uso de la computadora en la educación: el aprendizaje sobre la computadora, desde la computadora y con la computadora. El primero se refiere a una educación sobre las características físicas y funcionales de la computadora, el segundo se refiere al uso de la computadora como instrumento autónomo poseedor y transmisor del contenido y la tercera modalidad confirma el uso de la computadora como un recurso didáctico para el proceso de aprendizaje.

Se darán algunos aspectos del uso de la computadora en la educación, de acuerdo a la clasificación de Taylor.

La computadora como tutora

Como esta categoría es muy similar a la de Enseñanza Asistida por Computadora (EAC), aquí se clasifican también los tutoriales, la modalidad de ejercitación y práctica, los juegos educativos y las simulaciones.

Un tutorial es un material computadorizado que pretende enseñar algo nuevo al usuario. Los tutoriales intentan simular un diálogo entre un tutor humano y su estudiante mediante la presentación de material educativo a través de uno o varios elementos audiovisuales, seguido de ejercicios y preguntas para verificar lo aprendido por el estudiante. Mientras más interacción exista en el tutorial el estudiante aprenderá y retendrá mejor lo estudiado.

La modalidad de Ejercitación y Práctica trata de que los usuarios adquieran una habilidad sobre algo realizando ejercicios únicamente, es decir no se propone una teoría o explicación sobre el contenido de lo que se está haciendo, bajo el supuesto que esto ya se conoce (o se dio en clase) y que con esta modalidad lo que se hace es la labor de reforzamiento de lo aprendido y el adquirir o mejorar una habilidad (por ejemplo en la resolución de ejercicios aritméticos)

Los juegos educativos son aquellos programas en que emplean algún recurso divertido y cuya finalidad aparente es el entretenimiento, desafío o diversión y cuya finalidad escondida es que el usuario o jugador aprenda algo, practique algo o desarrolle alguna habilidad. Para lograr jugar o participar en el mismo hay que conocer, practicar, o desarrollar conocimientos, habilidades etc. Sin duda alguna, ésta es la modalidad más

difícil de describir y de realizar, puesto que se trabaja en dos planos simultáneamente el del entretenimiento y el del aprendizaje.

Las simulaciones, al igual que los juegos y los tutoriales suelen requerir de un tiempo considerable de planificación y desarrollo. Estas tratan de reproducir un ambiente real o imaginario en donde el usuario debe tomar continuamente decisiones. Los ejemplos clásicos de este tipo simulan ambientes educativos donde se utilizaría equipo muy costoso o peligroso como lo es un simulador de vuelo o una simulación sobre reacciones de compuestos químicos.

La computadora como herramienta

Las computadoras como herramientas, son paquetes o aplicaciones pre-programadas, o cualquier recurso de cómputo, que sirve de auxiliar a las tareas educativas o de enseñanza, pero cuya finalidad no es enseñar algo, sino realizar algo. Así por ejemplo un procesador de textos (*Word*), permite escribir textos y actualmente todo lo asociado a la escritura, que va desde el diseñar un bosquejo, verificar la ortografía y la gramática hasta incorporar dibujos y preparar una publicación. Aquí la enseñanza consiste en aprender lo sofisticado que puede ser una aplicación, el aprender a utilizar el paquete mismo y entender las relaciones en la información propia de la aplicación. Los más conocidos de estas herramientas son: procesadores de texto, hojas de cálculo, manejadores de bases de datos y paquetes gráficos. Sin embargo hay muchos otros ejemplos de uso. Estos van desde paquetes estadísticos, hasta programas matemáticos y generadores de ideas. En un sentido amplio de la palabra, la programación es también una herramienta (Rivera, 1997).

La computadora como aprendiz

Cualquier persona que programe la computadora en el ámbito escolar está dándole uso a la computadora como si ésta fuera un aprendiz. Por parte de los estudiantes, esto sucede cuando toman cursos de programación de computadoras. Por parte de la facultad y administradores escolares la computadora es usada como aprendiz cuando éstas se programan para realizar tareas administrativas de toda índole o cuando los maestros crean módulos educativos computadorizados. Este modo de utilización requiere el desarrollo de un mayor conocimiento técnico y permite un mayor grado de interacción entre el usuario y la computadora (Caraballo, 1997).

Los usos educativos de la red Internet, especialmente en la forma del *Word Wide Web* (WWW) puede usarse en la educación en cada una de las tres categorías mencionadas anteriormente.

Usos de la Internet en la educación

Como tutora podemos considerar el que en el *Web* podemos aprender de la rica información visual a la cual podemos tener acceso. Por lo general, esta información está compuesta de elementos de multimedios como lo son el texto, las gráficas quietas y animadas y los sonidos. También se hace uso del hipertexto, mediante el cual el usuario puede interactuar con el material presentado haciendo enlaces con otra información provista por el mismo autor de la página que hayamos accedido o por cualquier otro autor a través del mundo. Para usos educativos también existe la posibilidad de que los usuarios puedan demostrar lo aprendido mediante el uso de formularios interactivos en donde aparezcan preguntas sobre el material estudiado. Las páginas donde aparecen estos

formularios pueden recoger a través del mismo *Web* las contestaciones que los usuarios ofrezcan a las preguntas planteadas.

La Internet puede ser una excelente tutora al combinar elementos visuales motivantes y elementos interactivos como el uso de hipertexto y los formularios. Los formularios también nos proveen una forma de evaluar lo aprendido por los usuarios. Por estas razones es que en la Internet tenemos un medio ideal para realizar y complementar experiencias educativas de aprendizaje a distancia.

La Internet también puede considerarse como una herramienta de comunicación y de búsqueda de información. A través de esta red nos podemos comunicar con cualquier otra persona en el mundo que tenga acceso a la Internet. Además, podemos buscar información sobre prácticamente cualquier tema en una forma amena y motivadora, aunque esta información a veces no sea totalmente certera o exacta.

Cuando se es autor de páginas en el *Web*, en realidad se está programando la computadora para facilitar la búsqueda de información a los usuarios. De esta forma podemos considerar que la actividad de crear páginas educativas en el *Web* es un ejemplo del uso de la computadora como aprendiz. La computadora "aprende" cómo desplegar la información en una forma amena y cómo enlazarse a otros documentos o datos accesibles a través de la red Internet (Citado por Caraballo, 1997).

8.1.1 VENTAJAS DE LAS COMPUTADORAS EN LA EDUCACIÓN

La ventaja de introducir la computadora en la educación, tiene muchas finalidades el de reforzamiento y práctica, lo que permite multiplicar el esfuerzo de los estudiantes. Es también importante su aplicación en los cursos de entrenamiento o capacitación profesional en las empresas, donde el dar un curso de forma convencional lleva mucho tiempo, sale costoso y va dirigido a sólo un mínimo del personal. Finalmente, en mejorar la calidad de la educación, mayor retención, mejor aprovechamiento, disminución de la reprobación etc. Estos puntos fueron claves, para llevarnos a la realización del sistema computacional MACROMIL, del cual hablaremos más adelante.

El problema fundamental en la incorporación de las computadoras en el ámbito educativo, es el hacerlas reales, que se empleen y tenga un impacto significativo. Para que se éstas sean empleadas, deben de:

- estar accesibles (lo que en algunos casos significa que sean baratas),
- que se puedan adaptar a la enseñanza y
- finalmente que existan recursos humanos preparados para utilizarlas y aprovecharlas.

Las computadoras comienzan a estar accesibles en los países industrializados o del primer mundo. Sin embargo en los países pobres, esta infraestructura es todavía un sueño.

Que las computadoras sean adaptables a la enseñanza, significa el hacer participar a los maestros y educadores en el contenido y no solamente dejarlos como usuarios.

Finalmente el tener recursos humanos preparados y entusiastas, esto implica tener personas motivadas e interesadas en mejorar el sistema educativo. Aunado a lo anterior es necesario que el material educativo sea interactivo, fácil de utilizar (para poder concentrarse en el contenido y no en la forma). (Rivera, 1997)

Las ventajas que menciona Angel Manuel Estrada¹ sobre el uso de computadoras en la educación:

- Permite la personalización del aprendizaje.
- Favorecer el trabajo grupal y el intercambio de idea y experiencias entre pares.
- Amplían la atención activa del maestro.
- Proponer un trabajo interactivo.
- Son una gran fuente de motivación.
- Aumenta el grado y el tiempo de atención.
- Ahorran tiempo de trabajo rutinario.

Por todo ello, la computadora puede ser un poderoso auxiliar para que el profesor cumpla adecuadamente su nuevo papel en la enseñanza. Asimismo para aplicar adecuadamente la tecnología computacional en la educación, es necesario contar con una estrategia adecuada de su uso. Para lograrlo se requiere contar con materiales adecuados, *software* y actividades especiales. En este aspecto, el llamado *software educativo* ha demostrado ser útil para los docentes en material de enseñanza (citado por Navaez, 2000: 133).

8.2 EL *SOFTWARE* EDUCATIVO

El papel de la computadora como instrumento de ayuda para la adquisición de determinados conocimientos, implica la utilización de un *software* previamente elaborado y que es ofrecido al alumno para alcanzar un objetivo determinado. El éxito dependerá, fundamentalmente, de la calidad del *software*. Los *software* educativos son programas para computadora creados con la finalidad específica de ser utilizados como medio didáctico, es decir, para facilitar los procesos de enseñanza y de aprendizaje². Esta definición engloba todos los programas que han estado elaborados con fines didácticos, desde los tradicionales programas basados en los modelos conductistas de la enseñanza, los programas de Enseñanza Asistida por Computadora (EAC) o también CAL, (*Computer Assisted Learning*) en su versión inglesa, o CAI (*Computer Assisted Instruction*) para los estadounidenses, hasta los aun programas experimentales de Enseñanza Inteligente Asistida por Computadora (EIAC), que, utilizando técnicas propias del campo de los Sistemas Expertos y de la Inteligencia Artificial (citado por Marqués P, 1996)

La enseñanza asistida por computadora (la tradicional CAI) representa el uso más generalizado, hasta el punto que se le identifica con el uso de la computadora en el aula. Abarca sistemas que van desde los clásicos materiales programados de estímulo-respuesta, de corte directivo, hasta sistemas basados en la resolución de problemas de tipo no directivo.

¹ Citado por Navaez, A. Elaboración de un Sistema Computacional Multimedia sobre Disolución de Polvos y Tabletas; Tesis de Licenciatura, UNAM; México, D.F., 2000, p 132

² El proceso de enseñanza aprendizaje es de gran importancia en el desenvolvimiento de la actividad social del hombre. A través de él, adquiere los conocimientos acumulados por la humanidad y se prepara como profesional y como persona a servir a ésta (Rivera, 1997, 50)
El aprendizaje es la facultad de adaptarse al mundo exterior, por lo tanto exige memoria, el recordar situaciones, hechos, etc. La enseñanza presupone, la comunicación entre personas, por medio de la cuál alguien transmite un conocimiento a otros (Rivera, 1997)

Entre las ventajas que la EAC aporta a la enseñanza podemos señalar:

- Introduce cierto grado de interacción entre el alumno y el programa.
- La computadora puede ser programada para tomar decisiones respecto a la estrategia de aprendizaje más adecuada a las necesidades e intereses de cada alumno.
- Liberaliza al docente de las tareas más repetitivas.
- Disponibilidad y accesibilidad.

Los inconvenientes y problemas que trae consigo y que ha hecho que se abandone, o al menos se replantee, en muchos casos, el uso de la EAC y sobre todo los sistemas más directivos, podemos describirlos así:

- Imposibilidad para el planteamiento de cuestiones, dudas, secuencias del desarrollo del proceso, etc.
- El desarrollo secuencial de los contenidos se realiza de acuerdo a reglas fijas previamente programadas, no siendo posible tratar adecuadamente respuestas no previstas.
- La comunicación usuario-computadora no permite utilizar el lenguaje natural. Las respuestas de los alumnos se dan, generalmente, mediante elección múltiple, palabras y frases cortas.
- El alumno no puede, en muchos casos, acceder al proceso seguido de la resolución de problemas, lo que hace que desconozca los mecanismos de desarrollo en el aprendizaje.
- La mayoría del *software* existente no permite la elección de la estrategia adecuada a los intereses y necesidades. La estrategia es única e invariable.

Los programas de EAC, salvo excepciones, se reducen a meros procesos de enseñanza programada, más o menos encubiertos con estrategias integradas. De esta manera la EAC, que en un principio despertó grandes esperanzas, las desalentó, en parte, por falta de materiales adecuados que fueran accesibles y de lenguajes bien adaptados a las necesidades de los docentes.³

8.2.1 CARACTERÍSTICAS ESENCIALES DE LOS *SOFTWARE* EDUCATIVOS

Los *software* educativos abordan diferentes temas y materias (matemáticas, idiomas, la vida animal, química, medicina, etc.), de formas muy diversas; a partir de cuestionarios, facilitando la información, mediante la simulación de fenómenos, etc., y ofrecer un entorno de trabajo interactivo; pero todos comparten cinco características esenciales:

- ☛ Son materiales elaborados con una finalidad didáctica.
- ☛ Utilizan la computadora como soporte en el que se realizan las actividades.

³ Citado en la página <http://www.sep.gob.mx/cete/Lccion22.htm>

- Son interactivos, contestan inmediatamente las acciones y permiten un diálogo y un intercambio de informaciones entre la computadora y los usuarios.
- Individualizan el trabajo de los usuarios, ya que se adaptan al ritmo de trabajo de cada uno y pueden adaptar sus actividades.
- Son fáciles de usar.

Durante los últimos años se han creado una gran cantidad de software educativos en todos los niveles. Dentro de este podemos considerar a la denominada multimedia interactiva, cuyo uso ha sido extendido a partir de la década de los ochenta hasta la década de los noventa.

8.3 SISTEMAS MULTIMEDIA

Los sistemas multimedia han venido a revolucionar el concepto de la educación y su enfoque. La utilización de esta moderna tecnología en los procesos educativos se hace cada vez más frecuente y puede ser una pieza clave de los sistemas pedagógicos debido a que son ideales para una mejor comunicación.

El uso de la tecnología en la información y la comunicación para la docencia, investigación, industria, etc., está en constante aumento. Hoy en día la formación y la capacitación del personal se han convertido en elementos imprescindibles en la educación y en el desarrollo de la industria. La utilización de los medios tradicionales es totalmente compatible con la utilización de las técnicas multimedia aplicadas al campo de la formación y la capacitación. Sin embargo el uso de sistemas multimedia, tienen la opción de ser empleados por una infinidad de usuarios sin importar el factor tiempo, lo que ayuda a facilitar un sin número de actividades que de otra forma serían difíciles o tediosas por medios comunes y que sólo van dirigidos a cierto número de usuarios.

Cuando se utilizan los medios tradicionales para la formación y la capacitación, se llega a solamente un mínimo de la audiencia, ya que cada individuo tiene modos diferentes de asimilar la información y aprender o relacionarse con un concepto o idea. Los sistemas multimedia apelan a todos los sentidos y mantienen la atención de la audiencia, ayudándolos a retener más de la información que se presenta. Los sistemas multimedia tienen la capacidad de presentar fácil y efectivamente un concepto que de otra forma sería difícil, complejo o simplemente aburrido. Los sistemas multimedia pueden convertir lo poco interesante en fascinante e impactante.

Los beneficios de los sistemas multimedia para la formación tanto universitaria como industrial son considerables. Hasta hace poco, los usuarios se limitaban a comunicarse con las computadoras a través de una simple interface basado en texto y gráficos estáticos. Los sistemas multimedia han introducido una amplia gama de maneras de intercambiar información entre el hombre y el computadora, incluyendo sonido de alta fidelidad, gráficos de calidad, animación y vídeo

La capacidad de los sistemas multimedia y el aumento de recursos y materiales, permite que se puedan explorar nuevas estrategias de enseñanza, produciendo sistemas instructivos innovadores que ofrecen a los usuarios más opciones para su formación. La incorporación de vídeo, gráficos, texto, sonido y animación en un sistema puede ser una gran ayuda para el usuario para recibir, procesar y actuar sobre la gran cantidad de información presentada.

Existen muchas formas de definir lo que es multimedia. PCMANIA (1995) define el término multimedia como la capacidad de manipular el texto, fotografías, animación, sonido y hasta vídeo en un ambiente interactivo que se puede utilizar para enseñar, persuadir y promover. Heidi. W. (1994), define a multimedia como la acción de transferir información entre la computadora o red y el ser humano a través de voz, datos y vídeo

El término multimedia se refiere a una integración o agrupación de diferentes medios audiovisuales (fotografía, vídeo, animación, sonido, texto e interactividad) convirtiéndose así en un entorno de aprendizaje que combina las posibilidades educativas que ofrecen diferentes medios de comunicación interconectados y controlados a través de la computadora. Con una computadora es posible crear un modelo de información con flexibilidad y más o menos complejo, en función de las características que se vayan añadiendo (citado por Urzúa S.).

De acuerdo a lo anterior, se puede definir a multimedia como una combinación e integración de medios (texto, dibujos, gráficos, fotografías, animación (2D y 3D), vídeo, música y sonido), que son procesados por un sistema de control (computadora personal).

Multimedia presenta la información, comparte ideas, despierta el interés, también permite observar, escuchar y entender ideas. Los sonidos, ilustraciones e imágenes animadas facilitan el aprendizaje, se sabe que las imágenes valen más que mil palabras (pues suelen aclarar conceptos, visualizar relaciones y mantener despierto al usuario).

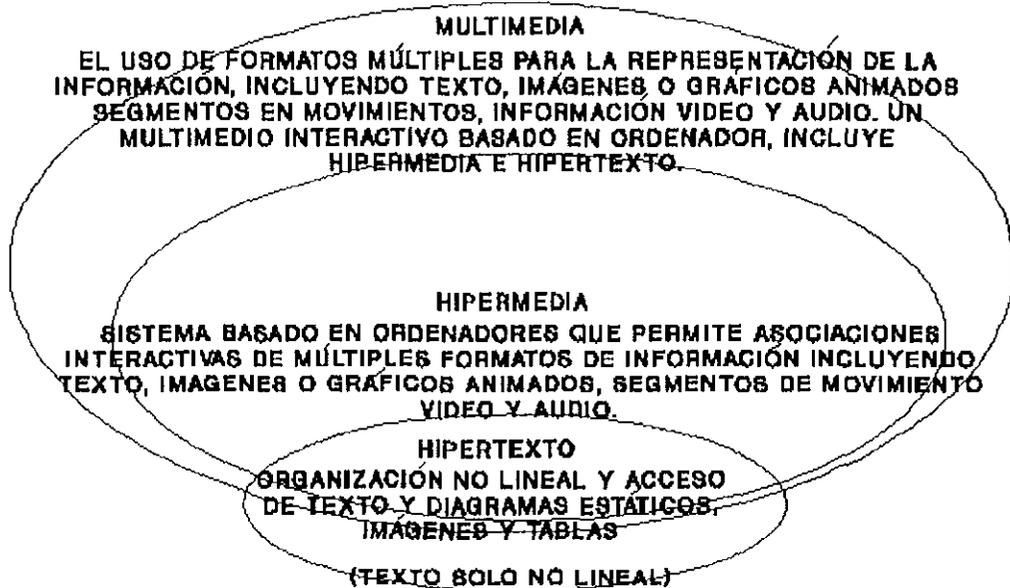
8.3.1 HIPERTEXTO, HIPERMEDIA Y MULTIMEDIA

El hipertexto, la hipermedia y la multimedia son tres herramientas actuales de la información, las cuales se pueden utilizar en la elaboración de un producto informático computacional

Tolhurst (1995) ha realizado una aportación, que persigue el objetivo de especificar las relaciones y diferencias que se pueden establecer entre hipertextos, hipermedias y multimedias. Diferenciando a los tres en los siguientes términos:

- los **hipertextos** como una organización no lineal de acceso a la información textual;
- los **hipermedios** como uniones interactivas de información que está presentado en múltiples formas que incluyen texto, imágenes y múltiples formatos que incluyen o gráficos animados, segmentos en movimientos, sonidos y música;
- y los **multimedias** referidos a los múltiples formatos de medios para la presentación de la información.

Tales relaciones las expresa de forma gráfica mediante la siguiente representación:



8.3.2 CATEGORÍAS DE LOS SISTEMAS MULTIMEDIA

Con base en la complejidad de su desarrollo y el estilo de uso de los sistemas, podemos dividir sus aplicaciones en la educación en cuatro categorías principales.

- Sistemas de referencia
- Sistemas de apoyo a la enseñanza
- Sistemas de apoyo al aprendizaje
- Ambientes de aprendizaje

A continuación se describen los principales elementos que caracterizan a cada uno de ellos:

Sistemas de referencia

Los sistemas de referencia se refieren a los volúmenes de información que se transfieren de un medio a otro. Entre las aplicaciones que encontramos en esta categoría están la variedad de sistemas que básicamente han cambiado su paradigma de distribución o publicación del medio impreso al medio digital. Por lo general, encontramos que la mayoría de las aplicaciones de este tipo se distribuye en CD-ROM dado que almacena hasta 640 MB de información digital. Entre los productos de este tipo están la Enciclopedia, Diccionario así como publicaciones especiales para multimedios.

Las ventajas de este tipo de sistemas radican en tres factores relevantes:

- Se sustituye un conjunto de volúmenes, en donde cada uno puede ser de hasta más de 500 páginas, como en el caso de una enciclopedia, por un solo disco compacto.

-
- Se enriquece la información mediante simulaciones animadas, sonidos y vídeo digital.
 - Se incorpora un sistema que funcionalmente da a estas obras un valor agregado importante: mecanismos de acceso, búsqueda y localización de información que no es posible ofrecer en los medios impresos.

Sistemas de apoyo a la enseñanza

Estas aplicaciones comprenden todos aquellos sistemas que utiliza un maestro o instructor para apoyar su exposición o presentación.

Sistemas de apoyo al aprendizaje

Bajo esta categoría están todos los sistemas que se diseñan y desarrollan siguiendo un modelo pedagógico. En general, los sistemas de apoyo al aprendizaje presentan objetivos, la exposición de un tema y ejercicios de autoevaluación.

Este tipo de aplicaciones son desarrolladas por los mismos maestros y, en su mayoría, por empresas especializadas en el desarrollo o comercialización de material educativo.

Ambientes de aprendizaje

Las aplicaciones más interesantes son las que integran o facilitan el acceso a sistemas de las tres categorías anteriores mediante una interface común y que además ofrecen elementos mediante los cuales el estudiante puede hacer anotaciones, dejar marcados los temas y los medios que ya consultó antes, facilidad para enriquecer el material con sus propias contribuciones, sistemas para acceder tutores virtuales que responderán a las preguntas más comunes, correo electrónico para comunicarse con otros estudiantes y con los maestros, y hasta utilizar las mismas herramientas para diseñar y desarrollar su propio material.

Gracias a las tecnologías de la información la multimedia ha hecho posible que el alumno no necesita desplazarse físicamente para consultar un texto, puesto que a través de su computadora podrá acceder a cualquier clase de información, sin importar el lugar en que esté. La característica principal de los sistemas multimedia, además de su gran flexibilidad, es la alta interactividad, pues permiten un aprendizaje autoguiado y autoiniciado, en el cual cada persona va construyendo su conocimiento, dejando de ser la parte pasiva, participando activamente en el proceso de aprendizaje generando una mejor asimilación, bien sea de manera individual o colectiva (Moral, 1997).

8.3.3 SELECCIÓN Y DESARROLLO DEL SISTEMA DE MULTIMEDIA

Para seleccionar un buen sistema de multimedia hay que tomar en cuenta los siguientes elementos:

- Digitalización y tratamiento digital de imágenes y fotografías.
- Producción y digitalización original de efectos de sonido.
- Digitalización de locuciones.
- Producción de Vídeo en sistemas Hi 8 ó DV Digital.
- Digitalización de Vídeo y Captura de secuencias.

- Programación multimedia.
- Realización y diseño de ilustraciones.
- Animaciones 2D y 3D.
- Efectos visuales interactivos

Fases del proceso de desarrollo de un sistema multimedia:

1 Diseño del Proyecto

Contenido del proyecto
Estrategia Educativa a utilizar

2 Desarrollo del Concepto

Objetivo Principal del proyecto
Características de los usuarios

3 Diseño del Prototipo

Diagrama de navegación
Materiales y equipo

4 Planeación

División del proyecto en tareas sencillas

5 Producción

Preproducción (definir interface del sistema y contenido)
Producción
Desarrollo de materiales (texto, vídeo, imágenes, animación y sonido)
Captura de materiales (texto, vídeo, imágenes y sonido)
Postproducción (integración de materiales)

6 Prueba Piloto

7 Implantación y Distribución

8 Seguimiento

Estas fases para desarrollar un sistema multimedia, fueron tomadas de la página de Internet <http://www.gda.itesm.mx>

8.4. REQUERIMIENTOS DEL HARDWARE Y SOFTWARE PARA DESARROLLAR MACROMIL

Hardware

El equipo de computo adecuado para desarrollar aplicaciones multimedia, de acuerdo a Rivera y colaboradores, debe tener las siguientes características:

- ☐ Computadora personal con procesador 486 o Pentium con velocidad de 33 MH o superior.
- ☐ 8 MB de memoria RAM o superior
- ☐ Unidad de disco duro con capacidad de 200 MB o superior
- ☐ Unidad lectora de CD-ROM u otro dispositivo de almacenamiento óptico
- ☐ Tarjeta de sonido
- ☐ Tarjeta aceleradora de gráficos
- ☐ Tarjeta de vídeo (dependiendo de las necesidades de desarrollo)
- ☐ Tarjeta digitalizadora de imágenes para conexión con el escáner

Software

Además de contar con el *Hardware*, el desarrollo de aplicaciones Multimedia cuenta con el *Software*, que es una herramienta que facilita la integración de tareas para creadores y desarrolladores de sistemas multimedia el cual incluye técnicas de compresión, lenguajes y ambientes de programación orientada a objetos, bases de datos orientadas a objetos, Sistemas de integración de medios (*authoring*), éste último facilita la creación de aplicaciones multimedia, aún para quienes poseen pocos conocimientos de programación (Jiménez, 1998: 88).

A nivel de *Software*, lo más importante son los *Authoring*, que son herramientas que permiten crear aplicaciones multimedia sin utilizar la programación convencional. Estos sistemas incluyen elementos de programación orientada a objetos y manejo de pantallas o *frames* donde se pueden incorporar varios objetos como texto, gráficos, animación, audio y secuencia de vídeo, de manera rápida y fácil.

8.4.1 LOS *AUTHORING*

Los *authoring* son herramientas integradores de medios, que nos sirven para desarrollar aplicaciones multimedia, sin utilizar necesariamente la programación convencional. Los *authoring* son sistemas de desarrollo orientado a objetos que con frecuencia hacen uso de una interface gráfica (iconos, menús, cajas de diálogo, etc), lo cual facilita el desarrollo de un sistema multimedia. Manejan pantallas individuales o cuadros, que pueden contener texto gráficos, figuras, animación, audio y secuencia de vídeo. Estas herramientas de desarrollo se dividen basándose en la presentación que utilizan para dar una secuencia y organizar los elementos y eventos en:

- Herramientas basadas en tarjetas o páginas (*Hypercard, Supercard, Asymetrix ToolBook y Visual Basic*).
- Herramientas basadas en iconos controlados por eventos (*Autoware Profesional, Icon Author, HSC Interactive*).

- Herramientas basadas en tiempo y presentación (*Action y Animation Works Interactive*).

8.5 ASYMETRIX MULTIMEDIA TOOLBOOK

Asymetrix Multimedia ToolBook, es un *Authoring* de aplicación Multimedia basada en un lenguaje orientado a objetos llamado *Open Script*, desarrollado en 1985 por una compañía norteamericana llamada *Asymetrix*, que tiene la facilidad de integrar medios tales como texto, sonido, imágenes, vídeo, y animaciones (2D y 3D) de una manera muy sencilla. Ofrece una interface gráfica Windows y un ambiente de programación orientada a objetos.

ToolBook es un software que puede desarrollarse con aplicaciones Windows. Una aplicación de *ToolBook* tiene todas las características de las aplicaciones Windows; interface de usuario gráfica, manejo de eventos de programación, y la habilidad de actuar recíprocamente con otras aplicaciones Windows.

Se puede crear con *ToolBook* aplicaciones para casi cualquier propósito, especialmente en aplicaciones que benefician la interface de usuario. Ejemplos de aplicaciones creadas con *ToolBook*:

- Aplicaciones como son las enciclopedias en línea.
- Aplicaciones interactivas, como son los tutoriales o los kioscos informativos.
- Aplicaciones de base de datos, incluso en bibliotecas.
- Juegos que usan elementos gráficos, como son los juegos de tablero, juegos de tarjeta, o juegos con animación.
- Computadora basada en ambientes de aprendizaje.

Con las herramientas de *ToolBook* se pueden dibujar objetos para crear una interface visual de cada aplicación, estos pueden ser gráficos, botones, iconos, campos, etc. Para definir cómo se comportan los elementos en la aplicación, *ToolBook* usa un lenguaje de programación llamado *Open Script*. Este es un lenguaje muy poderoso y fácil de usar, porque su sintaxis es muy sencilla (parecida al inglés), tiene un amplio rango de comandos y una naturaleza orientada a objetos.

Con la programación *Open Scrip* se puede:

- Definir la apariencia de los objetos
- Definir el comportamiento de los objetos
- Ejecutar las tareas interactivas y de programación
- Tener enlace de tipo dinámico (DDLs). Los DDLs *Dinamic Link Library* (Bibliotecas de enlace dinámico) son códigos de programación que se cargan y descargan de la memoria RAM de acuerdo a la aplicación que se está utilizando.
- Tener acceso desde dentro de *Open Scrit* al MCI (*Media Control Interface*) de *Windows* para controlar dispositivos externos como CD-ROM (tanto para datos digitales como para audio), reproductores de disco láser, programas de animación, tarjetas de audio de forma de onda, tarjetas de vídeo superpuesto y secuenciadores MIDI (*Musical Instrument Digital Interface*).
- Utilizar el teclado, *mouse* o pantalla de contacto (*Touch Screen*) para interactuar con los diferentes medios y controlar el aspecto y secuencia del sistema.

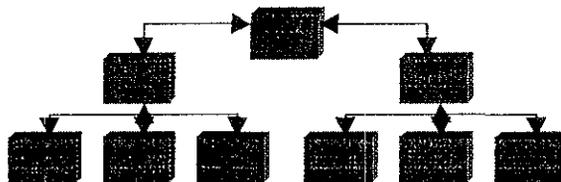
Este tipo de herramientas permite tener aplicaciones con diferentes tipos de navegación, lo cual da como resultado tener aplicaciones interactivas y pasivas.

Aplicaciones Pasivas; están caracterizadas por un tipo de navegación lineal, en donde el usuario navega secuencialmente, de un cuadro o fragmento de información a otro. Como puede observarse, el usuario no tiene control sobre la secuencia de la presentación.

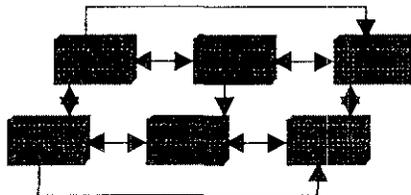


Aplicaciones Interactivas; en las cuales el usuario, puede elegir la secuencia de la información dentro de un marco estructurado predefinido, el cual puede estar basado en los siguientes tipos de navegación.

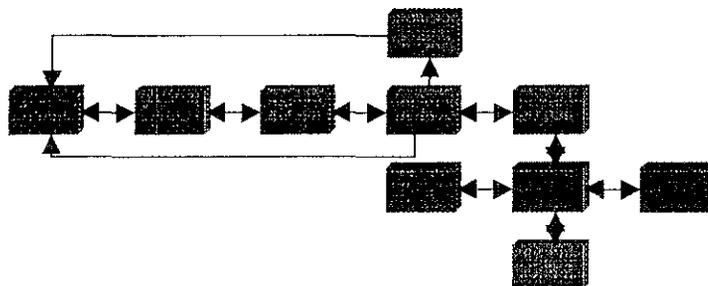
- a) **Jerárquica.** Navegación a través de ramas de la estructura de árbol que se forma dada la lógica natural del contenido.



- b) **No lineal.** Navegación a través del contenido sin limitarse a vías determinadas.



- c) **Compuesta.** Navegación en forma libre y en algunos casos limitada por una organización con más lógica.



ToolBook utiliza una metáfora computacional de un libro para manejar las aplicaciones; así denomina libro a la aplicación creada y le llama página a cada pantalla que contiene datos; un libro está compuesto por páginas en donde el usuario almacena y distribuye la información. Una aplicación realizada en *ToolBook* puede constar de uno o más archivos o libros, que son fácilmente enlazados. Las páginas constituyen el primer objeto con el que se construye la aplicación, sobre la cual se adicionan los objetos y esta formada por dos capas:

- ◆ El *Foreground* que corresponde al frente de la pantalla, y puede contener gráficos, textos, botones, imágenes, vídeo, animación y hotwords.
- ◆ El *Background* que corresponde al fondo de la pantalla y que puede ser compartido por más de una página; puede contener además de los objetos del *Foreground* campos de registro, campos de texto, etc.

Las páginas pueden contener campos, botones, gráficos, etc.; estos elementos se llaman objetos en *ToolBook*. Cada página puede tener objetos diferentes, o puede compartir objetos poniéndolos en un fondo común. Cada objeto tiene propiedades que definen su apariencia y comportamiento.

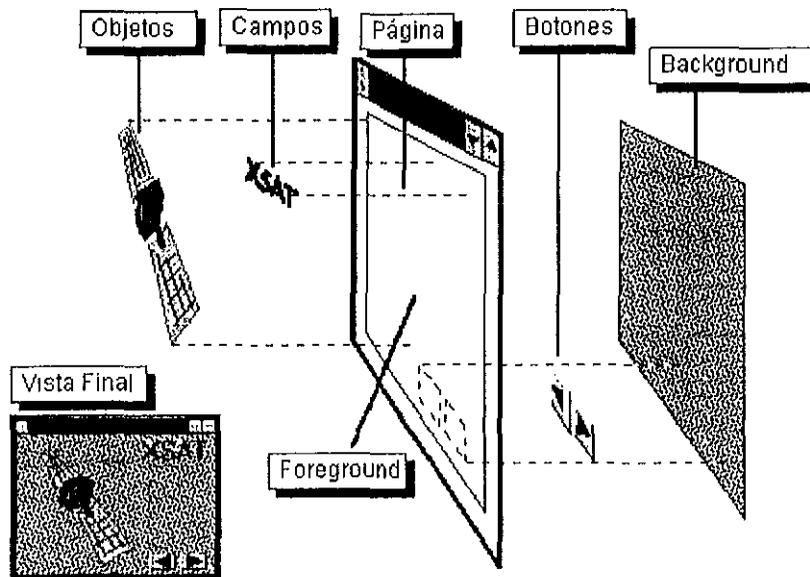


Figura 8.1. Objetos de un libro en Toolbook

ToolBook tiene dos niveles de trabajo: autor y lector.

En el modo autor; puede crear libros nuevos crear y modificar objetos en páginas, y escribir los programas en *Open Script*, donde se podrá agregar textos, vínculos, controles y elementos multimedia. Para extender el trabajo, también es posible incluir páginas extra. Además, se podrá definir algunas propiedades de fondo para mantener la uniformidad en todas las páginas del libro.

El modo lector; permite observar el trabajo, es decir, ejecutar la aplicación desarrollada, para depurar los posibles errores cometidos en el nivel autor.

8.6 DISEÑO PARA DESARROLLAR EL SISTEMA INFORMÁTICO MACROMIL EN AMBIENTE MULTIMEDIA

Para el diseño MACROMIL se consideraron los sistemas multimedia ya elaborados, entre ellos "Proyecto Mezclado", "FLUIDIZA", "BUPRAMA", DISPOLTAB y MACALI.

Existen diversas etapas o fases para la elaboración de sistemas multimedia las cuales varían de acuerdo a cada autor. Para el desarrollo de MACROMIL se establecieron etapas particulares, basándose en una combinación mencionadas por los autores Marton, 1992 y Riquelme, 1995.

ETAPAS

1. ANÁLISIS

Es la etapa donde se toman las primeras decisiones, se determina el contenido a tratar y se define a quien va ir dirigido el programa

En ésta etapa se analizó la importancia que tenía el elaborar un sistema multimedia del manual de operación para el manejo del cromatógrafo de la marca *Waters* y del *software Millennium 2010* con los que se cuenta en el Laboratorio Experimental Multidisciplinario de Farmacia, ya que existe la necesidad de conocer su manejo para el desarrollo de nuevos proyectos. Otro punto que se analizó, fue la importancia que tiene el conocimiento y uso de los parámetros cromatográficos, la selección de las columnas cromatográficas, así como de los solventes, la preparación de muestras y los problemas a los que se puede encontrar en el manejo del equipo. Todos éstos temas engloban un conocimiento sobre cromatografía de líquidos

Se analizó a quien iba ir dirigido el sistema, cuyo propósito es capacitar a todos aquellas personas interesadas en aprender el manejo del equipo cromatográfico y de la cromatografía líquida en general .

2. PLANIFICACIÓN

En esta etapa se consideraron los recursos humanos y materiales para la realización de MACROMIL. Entre los recursos humanos se contó con la ayuda de un asesor en el manejo del Cromatógrafo y del software Millennium 2010, así como la asesoría en el aprendizaje de los programas utilizados para la realización de MACROMIL (*ToolBook II*, Macromedia Director, Lotus ScreeCam, etc). Los recursos materiales empleados fueron; equipo de computo, scanner, dispositivo de vídeo, unidad regrabable de CD-ROM, y videograbadora

Se planteó el tiempo disponible para la realización de MACROMIL, realizando un cronograma. Se plantearon los objetivos, los cuales nos ayudaron a de limitar los temas del programa. Se determinó el contenido a tratar, es decir temas, subtemas. Se comenzó con una revisión bibliográfica de los temas, así como el uso de Internet para buscar información. Se recurrió a los manuales de operación del Cromatógrafo CLAR Waters y del Software Millennium 2010. Con la ayuda del texto y el contenido de los temas a tratar se elaboró un diagrama de flujo, en donde se determinó la relación entre temas, subtemas y subsubtemas, este diagrama sirvió como base para el desarrollo de los enlaces entre las diferentes pantalla y libros de MACROMIL (diagrama de flujo 8.1)

3. CONCEPCIÓN

En esta etapa se elaboró el diseño, en la cual se consideraron los siguientes puntos para darle formato a MACROMIL:

1. Tener un libro para cada uno de los temas
2. Elegir un mismo fondo (*background*) pero de diferentes colores para cada tema.
3. Contar con letras de diferentes tamaños y colores en 2D y 3D
4. Colocar botones que nos permitan navegar entre páginas y libros.
5. Contar con una primer página de presentación la cual nos enlace a un menú principal.
6. Elegir iconos que nos ayuden a desplegar imágenes, vídeo, animación, sonido, etc.

Una vez considerado estos puntos, se junto toda la información obtenida en la fase anterior, se hizo uso de las imágenes, diagramas y animaciones para así tener un texto final el cual abarcará los aspectos de la cromatografía de líquidos.

También se realizó el diseño de las pantallas, tomando como punto de partida el *background* elegido, colocando los botones de navegación, títulos, temas y el menú en un lugar fijo de la pantalla, para después colocar el texto, imágenes, animaciones y video, de acuerdo a la información capturada para cada pantalla. Se dio el mismo formato para todos los libros que formaron parte de MACROMIL, es decir el mismo *background*, la misma colocación de los botones, títulos, temas y el menú principal.

Finalmente se realizó una selección del material de apoyo a la información escrita (imágenes, sonido, animaciones y video), haciendo uso de estas en donde los temas lo requería o cuando se consideraba que realmente iba a dar un soporte a la información. Por ejemplo para los capítulos Procedimientos para el Manejo del Instrumental CLAR *Waters* y Manejo del *Software Millennium 2010*, se tienen videos que explican algunos procedimientos en el manejo.

4. DESARROLLO

Se prosiguió a capturar la información que iba a formar parte de MACROMIL, se realizaron los enlaces entre pantallas, textos, diagramas y libros. Se elaboraron los *hotwords*, en aquellas palabras que requerían su definición, mayor información o bien de alguna imagen. Se anexaron las imágenes, animaciones, videos y archivos de sonido .

5. PRUEBAS

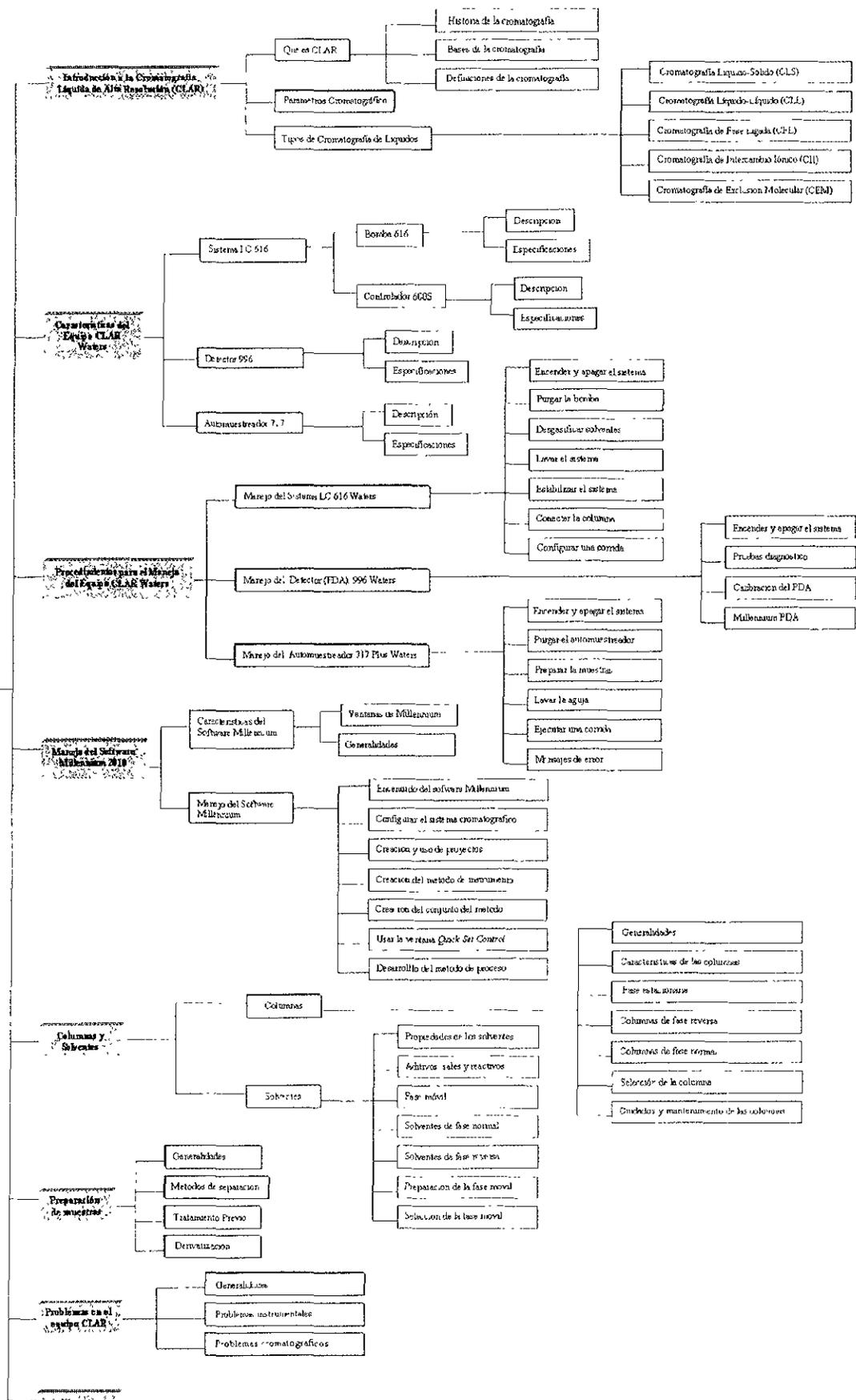
Después de elaborar el sistema se realizó una prueba piloto, este se evaluó durante y después de su uso.

6. CORRECCIÓN

En esta etapa se realizaron los ajustes y las correcciones estipulados en la etapa de prueba. Una vez realizadas las correcciones, nuevamente se probó el programa para verificar que el funcionamiento sea el correcto.

Inicio
Manual de Operación
del CLAR y del
Software Millennium

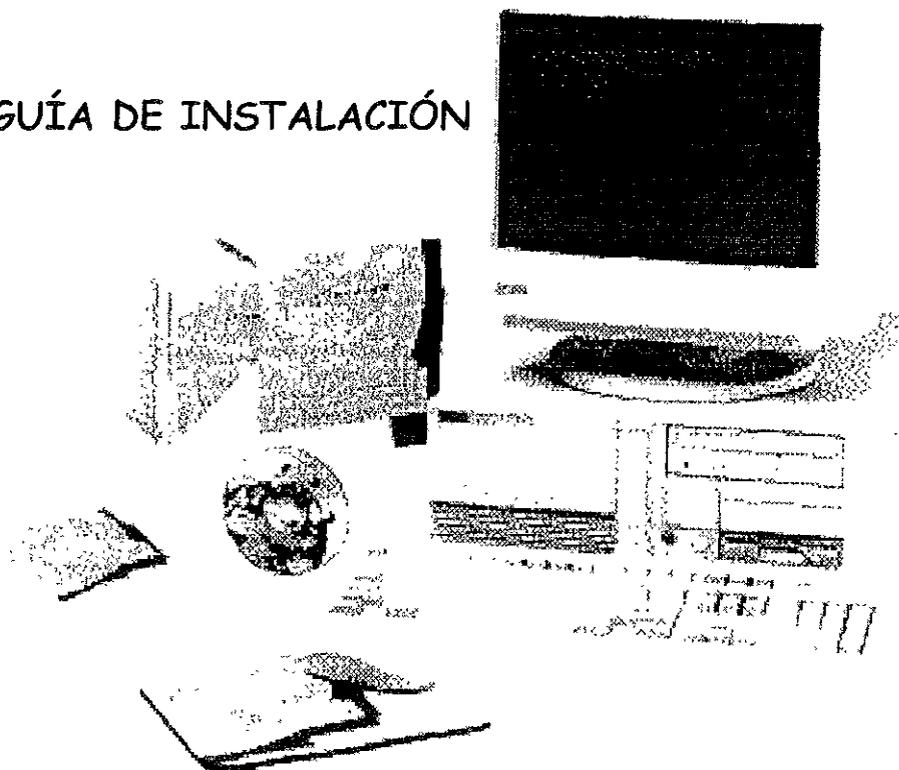
**Manú
Principál**



9. RESULTADOS

9.1 SISTEMA INFORMATICO MACROMIL

9.2 GUÍA DE INSTALACIÓN



9.1 SISTEMA INFORMÁTICO MACROMIL

MACROMIL esta conformado por 9 libros con un total de 507 pantallas, todas con el mismo fondo (background) pero cada libro con un diferente color, los cuales están conformados de la siguiente forma

- Libro 1: Bienvenida, con acceso al menú principal
- Libro 2: Introducción a la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)
- Libro 3: Características del Instrumental CLAR Waters
- Libro 4: Procedimientos para el Manejo del Instrumental CLAR Waters
- Libro 5: Manejo del Software Millennium 2010
- Libro 6: Columnas y Solventes
- Libro 7: Preparación de Muestras
- Libro 8: Problemas más Comunes Encontrados en CLAR
- Libro 9: Glosario de Terminología

El Sistema Informático **MACROMIL** esta constituido por:

Pantallas: Son semejantes a las páginas de un libro, que además de contener texto, a éstas se les puede anexar imágenes, animaciones, vídeo, sonido, diagramas

Cuadros de Texto: En ellos se menciona de manera resumida toda la información relacionada con el manejo del cromatógrafo CLAR y del Software Millennium

Imágenes: Se cuenta con imágenes en todo el sistema, las cuales sirven como complemento a la información escrita

Hotwords: Se cuenta con palabras clave que sirven para dar más información, definir un término o mostrar una imagen

Botones: Los cuales nos sirven para obtener más información dentro de una pantalla, para navegar, para desplegar imágenes, sonido, animaciones o vídeo, gracias a los iconos que pueden incluirse en él

Animaciones: Se cuenta con animaciones, las cuales sirven para comprender con mayor claridad la información que se presenta en los campos de texto

Vídeo: Se cuenta con vídeos, los cuales hacen referencia al manejo del equipo CLAR Waters, del Software Millennium

Audio: Cada libro está relacionado a un archivo de sonido, cuando se accesa a cualquier libro se escucha un sonido en particular

Al entrar al programa **MACROMIL** aparece una pantalla en donde le da la bienvenida e inmediatamente se despliega la siguiente página donde se muestra el menú principal, a partir de ésta página se puede tener acceso a todos los libros



Los libros que forman parte de **MACROMIL** son:

Libro 1. MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL MANEJO DE CROMATÓGRAFO CLAR WATERS Y DEL SOFTWARE MILLENNIUM 2010 Es el primer libro al que se tiene acceso y por medio de él se puede entrar a los demás libros. Al abrir el libro se ejecuta una animación y un vídeo de bienvenida, posteriormente se pasa al menú principal.

Libro 2. INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR) Este libro aborda los temas relacionados con las bases cromatográficas, un poco de historia, términos, definiciones, parámetros cromatográficos y la clasificación de la Cromatografía Líquida.

Libro 3. CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTAL CLAR WATERS Se describen las características y especificaciones del equipo cromatográfico Waters, el cual consta de un sistema conformado por un Controlador 600S, Bomba 616, Detector de Arreglo de Fotodiodos (PDA) 996 y un Automuestreador 717 Plus.

Libro 4. PROCEDIMIENTOS PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAR WATERS Aquí se describe desde como encender y apagar el sistema cromatográfico hasta como programar ciertas funciones, por ejemplo; programar tablas de gradiente desde el Controlador 600S para el flujo de la Bomba. Este libro presenta videos de cómo se maneja el Controlador, la Bomba, el Detector y el Automuestreador. Uno de los puntos importantes, es la aplicación de simulaciones con las cuales el usuario podrá practicar el manejo del equipo sin necesidad de estar enfrente de él.

Libro 5. MANEJO DEL SOFTWARE MILLENNIUM 2010. Se describen las características generales del Software, se presentan los diferentes iconos, ventanas de acceso y el manejo en general, desde como crear una carpeta de proyecto hasta la creación de todo un conjunto de métodos.

Libro 6. COLUMNAS Y SOLVENTES Se mencionan las diferentes columnas y solventes que pueden ser empleados en CLAR. Las características que presentan, la selección de la columna, preparación de la fase móvil, etc.

Libro 7. PREPARACIÓN DE MUESTRAS Se abordan los métodos de separación, el tratamiento previo que se le da a las muestras, la derivatización y el análisis cuantitativo.

Libro 8. PROBLEMAS MÁS COMUNES ENCONTRADOS EN CLAR. Este libro abarca los problemas instrumentales y cromatográficos que se presentan con mayor frecuencia en la Cromatografía Líquida de Alta Resolución, con las posibles soluciones y las fuentes que los causan.

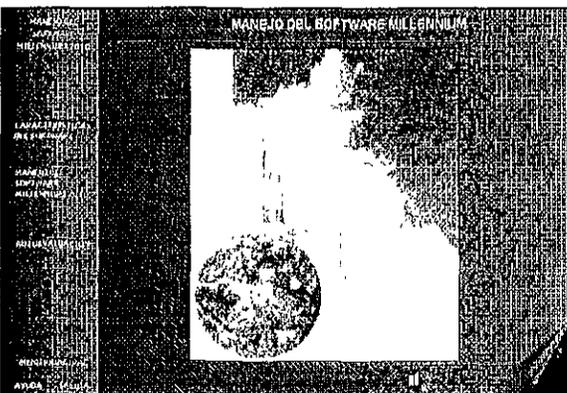
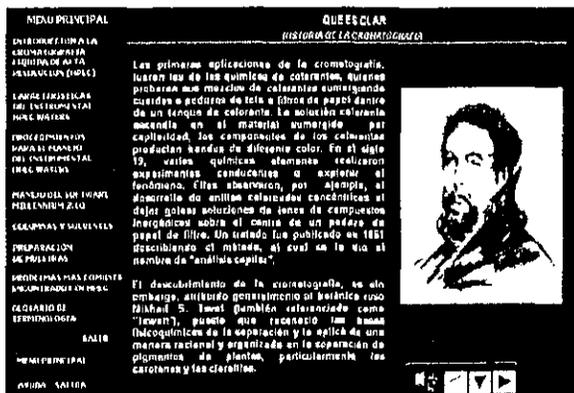
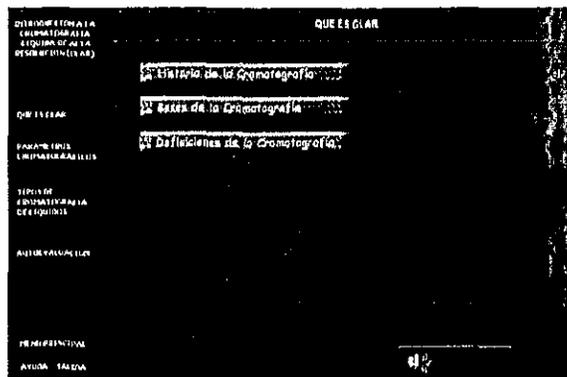
Libro 9. GLOSARIO DE TERMINOLOGÍA Aquí solo se hace referencia a las palabras poco comunes y a las de mayor interés en la cromatográfica.

Todos los libros están organizados de la siguiente forma:

- Tienen una barra lateral izquierda, la cual contiene el nombre del libro, botones para acceder a los diferentes temas, un menú principal, ayuda y salida del sistema.
- En la parte inferior derecha de todas las pantallas están localizados un botón de audio y tres botones de navegación, regresar al tema (V), página anterior(<) y siguiente página (>).
- En la parte superior se despliega el nombre del libro o del tema que se está consultando.
- Cuando los temas contienen subtemas, se puede acceder a éstos por medio de botones que sólo se encuentran en la pantalla del tema seleccionado.
- Contienen iconos que despliegan imágenes, fotografías, vídeo, animación, audio.

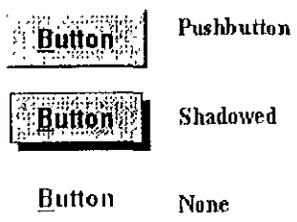
Cuando se ingresa a cualquier libro, el nombre se indica en la parte superior de la página y en la barra lateral. Los temas a tratar se encuentran localizados en la barra del lado izquierdo, éstos permanecen fijos en todo el libro y podrá acceder a ellos desde cualquier pantalla. Algunos temas contienen subtemas, a los cuales puede ingresar por medio de botones que se encuentran en la pantalla del tema seleccionado, sólo podrá tener acceso a esos subtemas desde esa pantalla. Para ir a otro libro, tiene que acceder al Menú Principal, el cual está disponible en todos los libros y podrá navegar sin necesidad de salir de donde se encuentre.

Todos los libros cuentan con una ayuda, la cual puede ser desplegada en cualquier pantalla del libro sin necesidad de salir de él y ésta elaborado como una especie de *hotwords* la cual incluye un breve vídeo que indica la forma de utilizar todos los objetos dentro de **MACROMIL**.



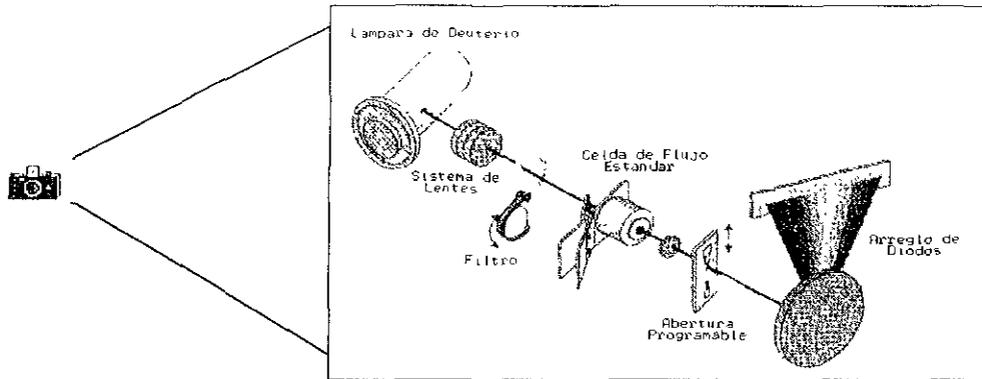
Los cuadros de texto son la parte más importante del sistema, en ellos se presenta la información resumida en donde además se encuentran botones y/o *hotwords*, los cuales sirven para ampliar y dar más claridad a la información.

Los botones empleados en el sistema son diferentes ya que cada uno está indicado para un tipo de función diferente. Los tipos de botones se distinguen por el tipo de borde que poseen; *Pushbutton*, *Shadowed*, *None*. Este botones con dar un "click" sobre ellos mostrarán más información, diagramas, dibujos, audio o dan el inicio a una animación.



9.1. Diferentes tipos de botones

Cuando se asigna un gráfico a un botón denominado icono, éste está seleccionado de acuerdo a la función que desempeña, por ejemplo si el icono es una cámara fotográfica, al presionar el botón aparecerá una imagen



9.2. Función de los iconos dentro del sistema MACROMIL

Los *hotwords* son palabras clave que se diferencian del resto del texto para que el usuario sea capaz de identificarlas rápidamente, las cuales sirven para crear enlaces de forma automática y también para dar más información, comportamientos parecidos al de un botón

Además del sistema informático **MACROMIL**, se cuenta con un escrito en papel, el cual abarca los mismos temas del sistema, pero carece de algunas imágenes de apoyo

9.2 GUÍA DE INSTALACIÓN

Para instalar el sistema informático **MACROMIL** se requiere del ambiente Windows 95 o superior, al menos 32 MB de memoria RAM y capacidad en el disco duro de al menos 200 Megabytes. **MACROMIL** consta de 9 archivos, con un tamaño aproximado de 120 Megabytes, almacenados en un CD-ROM

Para ejecutar la instalación del programa desde Windows, inserte el CD-ROM en la unidad lectora, abra la carpeta Mi PC, seleccione la unidad lectora de CD-ROM, de un click en el icono *Setup.exe*.

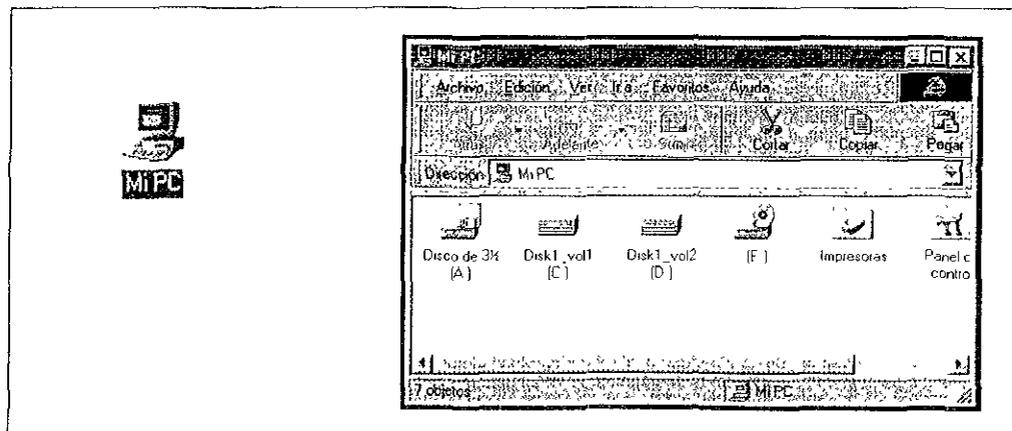
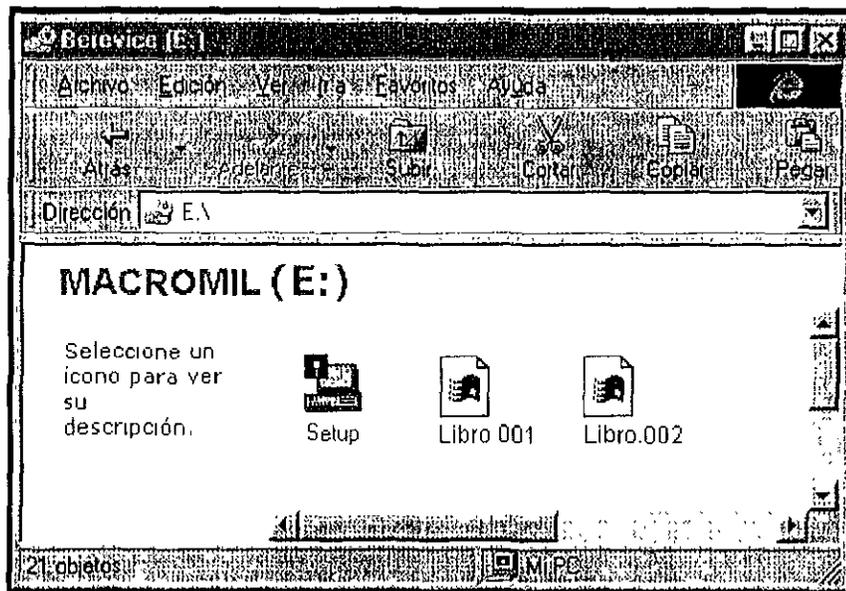


Figura 9.3. Icono y carpeta Mi PC



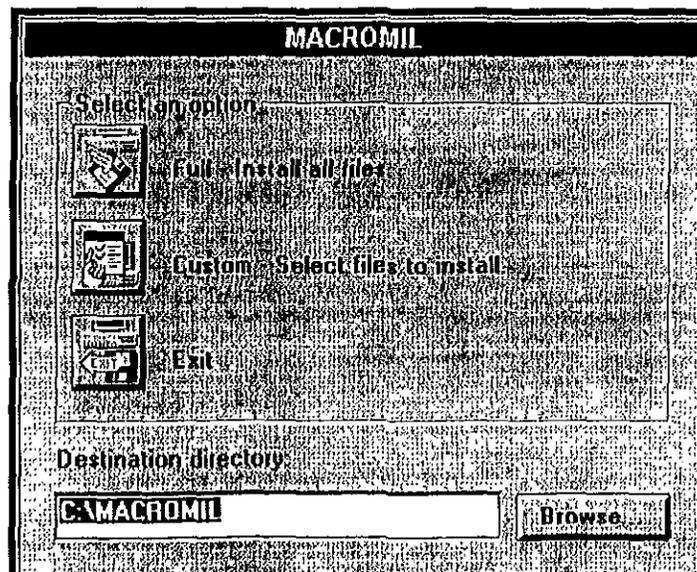
Debido a que el empaquetamiento del programa se realizó con una utilería en inglés, la mayoría de los mensajes aparecen en este idioma.

Una vez que se ha dado un click en el icono *Setup.exe*, se despliega el siguiente mensaje:

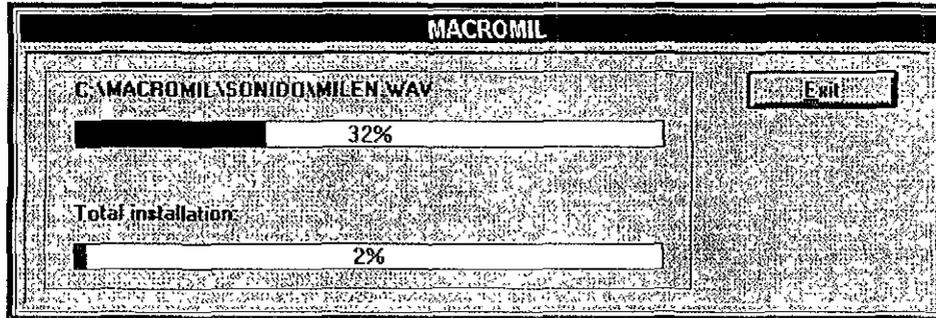
Please wait.
Copying files temporary directory

Que indica el inicio de la instalación

Aparece la pantalla de instalación que muestra al usuario el nombre del programa y la forma en que se desea instalar. Presione el botón *Full- Install all files* (instalación completa). Esta opción copia en el subdirectorio C:\MACROMIL todos los archivos del sistema e inmediatamente se inicia la instalación.



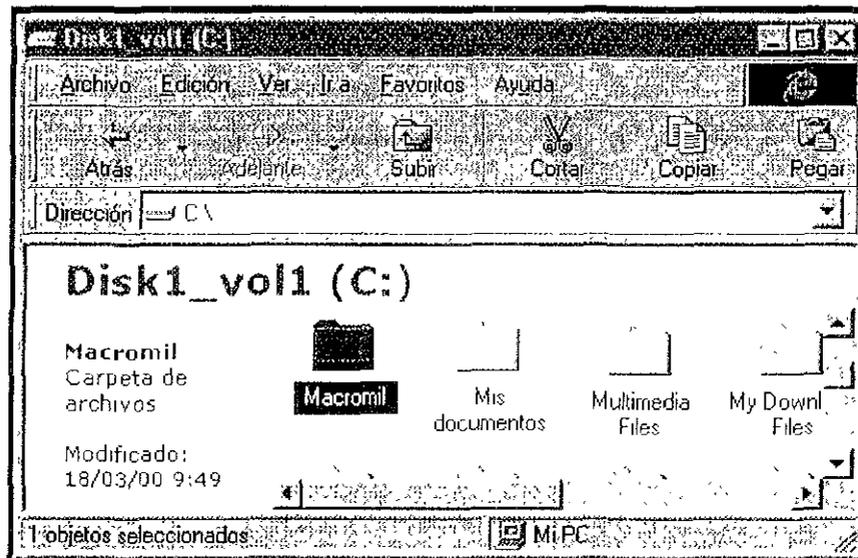
Se muestra una caja de información donde se indica el archivo que se está instalando y su porcentaje de copiado, así como el porcentaje total de la instalación



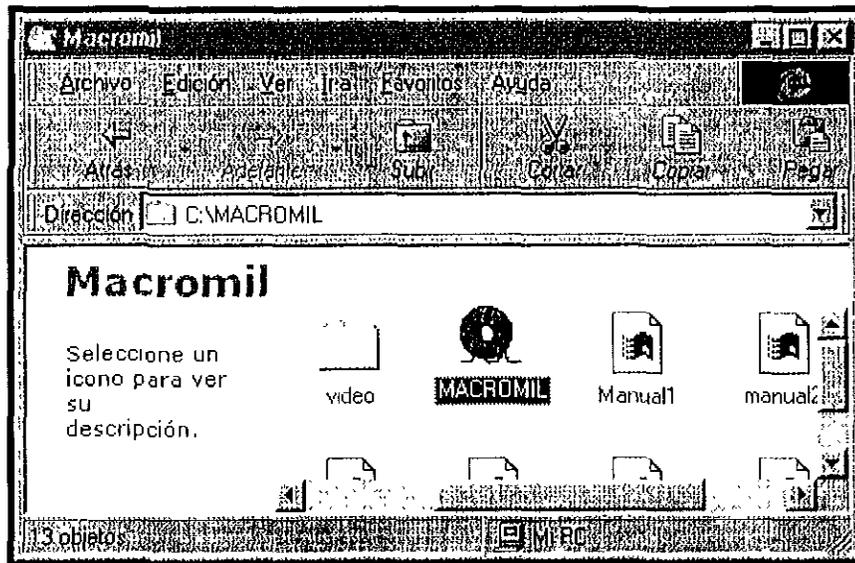
Una vez terminada la instalación, se despliega un mensaje que indica el final de la instalación y un mensaje de bienvenida



Automáticamente se crea la carpeta **MACROMIL**, para después ejecutar el programa



Abra la carpeta **MACROMIL**, seleccione el icono **MACROMIL**, y se desplegará la primer pantalla del programa, por medio de ella podrá tener acceso a todos los libros que constituyen al sistema multimedia



Las pantallas que forman **MACROMIL** se muestran en las siguientes páginas

PANTALLAS DEL SISTEMA INFORMATICO MACROMIL



**MANUAL DE OPERACION PARA EL MANEJO DE CROMATOGRFO
HPLC WATERS Y DEL SOFTWARE MILLENNIUM 2010**

MENU PRINCIPAL

INTRODUCCION A LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)

GLOSARIO DE TERMINOLOGIA

CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTAL HPLC WATERS

PROBLEMAS MAS COMUNES ENCONTRADOS EN HPLC

PROCEDIMIENTOS PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL HPLC WATERS

PREPARACION DE MUESTRAS

COLUMNAS Y SOLVENTES

MANEJO DEL SOFTWARE MILLENNIUM 2.10

AYUDA

SALIDA

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

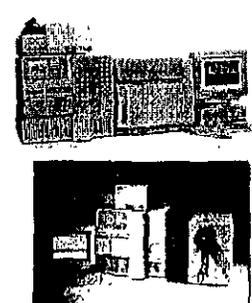
QUE ES UN

PARÁMETRO

TIPUS DE CROMATOGRAFÍA

VENTAJAS E INCONVENIENTES

ACTIVA VALIDA



INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

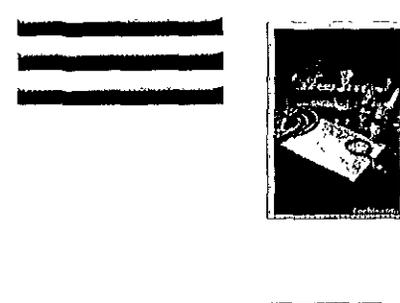
QUE ES UN

PARÁMETRO

TIPUS DE CROMATOGRAFÍA

VENTAJAS E INCONVENIENTES

ACTIVA VALIDA



INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

QUE ES UN

PARÁMETRO

TIPUS DE CROMATOGRAFÍA

VENTAJAS E INCONVENIENTES

ACTIVA VALIDA

Las primeras aplicaciones de la cromatografía fueron las de los químicos de colorantes, quienes probaron sus mezclas sumergiendo cuerdas o pedacitos de tela o trozos de papel dentro de un tanque de colorante. La solución ascendió en el material sumergido por capilaridad, los componentes de los colorantes produjeron bandas de diferente color.

El descubrimiento de la cromatografía, es sin embargo, atribuido generalmente al botánico ruso Mikhail S. Tswett puesto que reconoció las bases físico-químicas de la separación.



INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

QUE ES UN

PARÁMETRO

TIPUS DE CROMATOGRAFÍA

VENTAJAS E INCONVENIENTES

ACTIVA VALIDA

Tswett empacó una columna vertical de vidrio y la relleno con un material adsorbtivo, le añadió una solución de los pigmentos de la planta a la parte superior de la columna, la lavó con un solvente orgánico para que los pigmentos salieran por el lado inferior de la columna.

Los pigmentos se separaban en una serie de bandas coloreadas discretas dentro de la columna, divididas por regiones completamente libres de pigmentos. Ya que Tswett trabajó con sustancias coloreadas al denominar al método "cromatografía" (de las palabras griegas que significan escritura con color).

Tswett propuso que las moléculas de soluto se adsorbían al material de relleno, y que los componentes más fuertemente adsorbidos se disolvían con dificultad, descendiendo más lentamente de la columna. Por su parte, los componentes más débiles con menor intensidad eran transportados a mayor velocidad, y la separación se lograba a causa de la diferencia de afinidad de los solutos entre la fase móvil y la fase estacionaria.



INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

QUE ES UN

PARÁMETRO

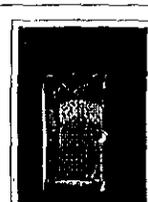
TIPUS DE CROMATOGRAFÍA

VENTAJAS E INCONVENIENTES

ACTIVA VALIDA

En 1921 dos químicos británicos, Martin y Synge, utilizaron una técnica llamada cromatografía de partición.

Dos farmacólogos Soviéticos, Nikolay A. Izmaylov y Alekséi S. Stavitskiy, distribuyeron el material de soporte como una película delgada sobre una placa de vidrio. La película y el material de soporte podían ser manipulados de una manera similar a la cromatografía de papel. Este sistema llegó a ser conocido como "Cromatografía en Capa Delgada" (CCD).



INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

QUE ES UN

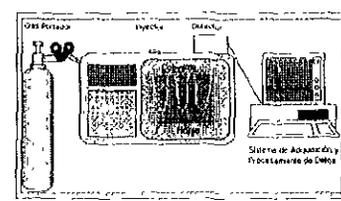
PARÁMETRO

TIPUS DE CROMATOGRAFÍA

VENTAJAS E INCONVENIENTES

ACTIVA VALIDA

La cromatografía gaseosa fue aplicada por Martin y James en 1952. En su trabajo, pequeñas partículas del material de soporte fueron recubiertas con un líquido no volátil y empacado en un tubo de vidrio calentado. Las mezclas se inyectaban a la entrada de la columna e impulsadas a través por un gas comprimido apareciendo como zonas bien separadas. Este desarrollo fue inmediatamente reconocido por los químicos del petróleo como un método simple y rápido para el análisis de la mezcla compleja de hidrocarburos encontrados en sus productos.



INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

QUE ES UN

PARÁMETRO

TIPUS DE CROMATOGRAFÍA

VENTAJAS E INCONVENIENTES

ACTIVA VALIDA

En 1969 Per Flodin y Jerker Porath en Suecia desarrollaron matrices celulósicas poliméricas que actuaban como tamices moleculares para sustancias disueltas en líquidos. El término genérico para estas separaciones es la "Cromatografía de Exclusión por Tamaño" (CET).

Una técnica exhibiendo gran selectividad la cromatografía de afinidad, fue primero descrita por Pedro Cuatrecasas y sus colaboradores en 1968. En esas separaciones, una biomolécula tal como una enzima se unió a un sustrato sólido a la fase sólida mientras otros componentes son lavados. La molécula retenida puede ser subsecuentemente eluida cambiando las condiciones químicas de la separación.



INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

QUE ES UN

PARÁMETRO

TIPUS DE CROMATOGRAFÍA

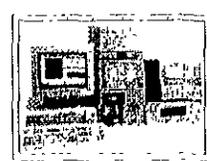
VENTAJAS E INCONVENIENTES

ACTIVA VALIDA

En 1964 el químico americano J. Calvin Geddings referendó a la técnica elaborada para la cromatografía gaseosa resumió las condiciones necesarias que podían dar a la cromatografía líquida ahora denominada "Cromatografía Líquida de Alta Resolución" (CLAR) dependiendo de:

1. El desarrollo de las bombas que pudieran entregar una corriente de líquido estable a altas presiones para forzar el líquido a fluir entre los estrechos canales intersticiales de la columna empacada y
2. de los detectores que pudieran detectar muestras pequeñas.

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución se desarrolló a mediados de los 70's y rápidamente mejoró con el desarrollo de materiales de empaque para columna y la correspondencia adicional sobre una línea de detectores. En 1980 CLAR se utilizó para la separación de compuestos químicos.



INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFIA
 TIPO DE ALTA RESOLUCIÓN (ELAR)

QUE ES ELAR

PARÁMETROS

TIPO DE CROMATOGRAFIA DE

VENTAJAS PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

Las técnicas cromatográficas se basan en la aplicación de la mezcla en un punto (Punto de Inyección o Aplicación) seguido de la influencia de la fase móvil. La base de la cromatografía es la migración diferencial de las moléculas, esto es que su flujo desde el punto de aplicación se hace con velocidades distintas para cada componente. La muestra que debe analizarse está en una fase móvil líquida o gaseosa, y se la pasa a través de un medio estacionario (columna) que puede ser un sólido o un líquido contenido por un sólido. Puesto que cada uno de los componentes de la muestra pasa por el medio estacionario a velocidad diferente



INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFIA
 TIPO DE ALTA RESOLUCIÓN (ELAR)

QUE ES ELAR

PARÁMETROS

TIPO DE CROMATOGRAFIA DE

VENTAJAS PRINCIPAL

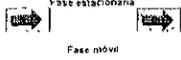
AYUDA SALIDA

Los componentes de una mezcla pueden presentar una diferente tendencia a permanecer en cualquiera de las fases involucradas. Mientras más vacas los componentes viajan de una fase a la otra (partición) se obtendrá una mejor separación. La fase móvil se llama eluyente. Cuando emerge por la salida de la columna se denomina eluido.

Fase estacionaria

Fase móvil

El proceso que consiste en hacer pasar un líquido (o un gas) a lo largo de una



INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFIA
 TIPO DE ALTA RESOLUCIÓN (ELAR)

QUE ES ELAR

PARÁMETROS

TIPO DE CROMATOGRAFIA DE

VENTAJAS PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

En la cromatografía ocurren dos fenómenos muy importantes:

La adsorción es la retención de una especie química en los sitios activos de la superficie de un sólido, quedando adsorbido al fenómeno a la superficie que separa las fases o superficie interfacial. Esta retención superficial puede ser física o química. La adsorción depende de la naturaleza de la especie química por parte del adsorbente y de la temperatura de la mezcla. La adsorción depende de la naturaleza de la especie química por parte del adsorbente y de la temperatura de la mezcla. Consiste en la penetración de una sustancia en el seno de otra.



INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFIA
 TIPO DE ALTA RESOLUCIÓN (ELAR)

QUE ES ELAR

PARÁMETROS

TIPO DE CROMATOGRAFIA DE

VENTAJAS PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

Los métodos cromatográficos se clasifican de acuerdo a los siguientes criterios:

- A la Geometría del sistema
- Al modo de separación
- Los fases involucradas



INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFIA
 TIPO DE ALTA RESOLUCIÓN (ELAR)

QUE ES ELAR

PARÁMETROS

TIPO DE CROMATOGRAFIA DE

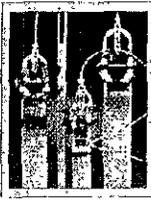
VENTAJAS PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

A la Geometría del Sistema

Las fases móvil y estacionaria en un sistema cromatográfico están arregladas de tal forma que la migración se da a lo largo más que a lo ancho. Hay dos geometrías básicas por columna y plato.

En la cromatografía de columna la fase estacionaria está empacada con partículas que soportan la fase estacionaria y la fase móvil fluye a través de los canales de los espacios intersticiales. La teoría ha mostrado que la eficiencia es mayor si se utilizan tamaños de partícula muy pequeñas, lo cual simultáneamente asegura la característica de que esos canales sean muy estrechos.



INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFIA
 TIPO DE ALTA RESOLUCIÓN (ELAR)

QUE ES ELAR

PARÁMETROS

TIPO DE CROMATOGRAFIA DE

VENTAJAS PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

A la Geometría del Sistema

En la cromatografía planar la fase estacionaria está configurada como una hoja delgada en dos dimensiones. En la cromatografía de papel una hoja o una tira delgada de papel sirve como fase estacionaria. En Cromatografía en Capa Delgada (CCD) una película de capa delgada de partículas de un sólido se utilizan por la fuerza mecánica de un adherente de tal forma que recubren una placa de vidrio u hoja de plástico.

Un borde de la placa es sumergido en el reservorio de la fase móvil, el cual, por capilaridad, se mueve de manera perpendicular a la superficie de la fase móvil.



INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFIA
 TIPO DE ALTA RESOLUCIÓN (ELAR)

QUE ES ELAR

PARÁMETROS

TIPO DE CROMATOGRAFIA DE

VENTAJAS PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

Al Modo de Separación

Los modos de separación de los componentes de la mezcla puede ser lavado acabo por una de las tres técnicas siguientes:

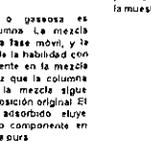
- Adsorción Frontal
- Elución por Desplazamiento
- Desorción por Elución

Desarrollo por Desplazamiento

En esta técnica el agente desplazador está contenido en la fase móvil, el cual puede ser un líquido o un gas. Un requerimiento necesario es que la fase móvil sea más adsorbida que cualquiera de los componentes de la mezcla. Siempre se obtiene una banda pura única del primer componente en la muestra.

Adsorción Frontal

La mezcla líquida o gaseosa es alimentada a la columna. La mezcla actúa como su propia fase móvil, y la separación depende de la habilidad con la cual cada componente en la mezcla es adsorbido. Una vez que la columna haya sido saturada la mezcla sigue fluyendo con su composición original. El componente menos adsorbido eluye primero y es el único componente en ser obtenido de manera pura.



INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFIA
 TIPO DE ALTA RESOLUCIÓN (ELAR)

QUE ES ELAR

PARÁMETROS

TIPO DE CROMATOGRAFIA DE

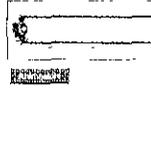
VENTAJAS PRINCIPAL

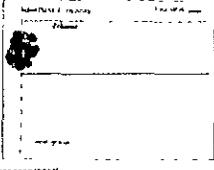
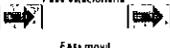
AYUDA SALIDA

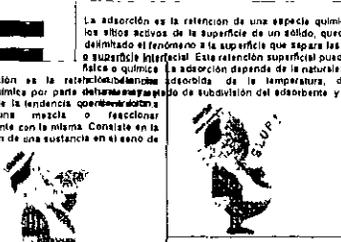
Al Modo de Separación

Desarrollo por Elución

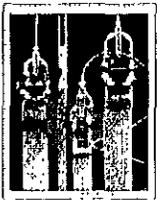
En esta técnica, los componentes de la muestra viajan a través de la columna a unas velocidades determinadas por sus características de retención sobre el empaque sólido.

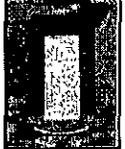


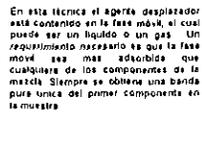
<p>INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA (LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC))</p> <p>QUE ES CLAR</p> <p>PARÁMETROS</p> <p>TÍTULO DE CROMATOGRAMA (H)</p> <p>MEMORIA PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>Las técnicas cromatográficas se basan en la aplicación de la mezcla en un punto (Punto de Inyección o Aplicación) seguido de la influencia de la fase móvil. La base de la cromatografía es la migración diferencial de las moléculas, esto es que su flujo desde el punto de aplicación se hace con velocidades distintas para cada componente. La muestra que debe analizarse está en una fase móvil, líquida o gaseosa, y se la pasa a través de un medio estacionario (columna) que puede ser un sólido o un líquido contenido por un soporte. Puesto que cada uno de los componentes de la muestra pasa por el medio estacionario a velocidad diferente</p> 	<p>INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA (LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC))</p> <p>QUE ES CLAR</p> <p>PARÁMETROS</p> <p>TÍTULO DE CROMATOGRAMA (H)</p> <p>MEMORIA PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>Los componentes de una mezcla pueden presentar una diferente tendencia a permanecer en cualquiera de las fases involucradas. Mientras más veces los componentes viajan de una fase a la otra (partición) se obtendrá una mejor separación. La fase móvil se llama eluyente. Cuando emerge por la salida de la columna se denomina efuente.</p> <p>Fase estacionaria</p> <p>Fase móvil</p> <p>El proceso que consiste en hacer pasar un líquido (o un gas) a lo largo de una</p> 
--	---	--	--

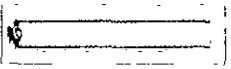
<p>INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA (LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC))</p> <p>QUE ES CLAR</p> <p>PARÁMETROS</p> <p>TÍTULO DE CROMATOGRAMA (H)</p> <p>MEMORIA PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>En la cromatografía ocurren dos fenómenos muy</p> <p>La adsorción es la retención de una especie química en los sitios activos de la superficie de un sólido, quedando disminuido el fenómeno a la superficie que separa las fases o suzurdia interfacial. Este retención superficial puede ser física o química. La adsorción depende de la naturaleza de la especie química por parte del adsorbente y de la adsorbida, de la tendencia que el adsorbente a formar una película o reacción química con la misma. Consiste en la penetración de una sustancia en el seno de otra.</p> 
--	---

<p>INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA (LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC))</p> <p>QUE ES CLAR</p> <p>PARÁMETROS</p> <p>TÍTULO DE CROMATOGRAMA (H)</p> <p>MEMORIA PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>Los métodos cromatográficos se clasifican de acuerdo a los siguientes criterios:</p> <ul style="list-style-type: none"> • A la Geometría del sistema • Al modo de separación • Los Fases involucradas 
--	---

<p>INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA (LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC))</p> <p>QUE ES CLAR</p> <p>PARÁMETROS</p> <p>TÍTULO DE CROMATOGRAMA (H)</p> <p>MEMORIA PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>A la Geometría del Sistema</p> <p>Las fases móvil y estacionaria en un sistema cromatográfico están arregladas de tal forma que la migración se da a lo largo más que a lo ancho. Hay dos geometrías básicas por columna y planar.</p> <p>En la cromatografía de columna la fase estacionaria está empaquetada con partículas que soportan la fase estacionaria y la fase móvil fluye a través de los canales de los espacios intersticiales. La foto ha mostrado que la eficiencia es mayor si se utilizan tamaños de partícula muy pequeñas lo cual simultáneamente asegura la característica de que esos canales sean muy estrechos.</p> 
--	--

<p>INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA (LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC))</p> <p>QUE ES CLAR</p> <p>PARÁMETROS</p> <p>TÍTULO DE CROMATOGRAMA (H)</p> <p>MEMORIA PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>A la Geometría del Sistema</p> <p>En la cromatografía planar la fase estacionaria está configurada como una hoja delgada de papel una hoja o una tira delgada de papel sirve como fase estacionaria. En Cromatografía en Capa Delgada (CCD) una película de capa delgada de partículas de un sólido se adhieren por la fuerza mecánica de un soporte, de tal forma que recubren una placa de vidrio u hoja de plástico.</p> <p>Un borde de la placa se inserta en el reservorio de la fase móvil, el cual, por capilaridad, se mueve de manera perpendicular a la superficie de la fase móvil.</p> 
--	---

<p>INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA (LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC))</p> <p>QUE ES CLAR</p> <p>PARÁMETROS</p> <p>TÍTULO DE CROMATOGRAMA (H)</p> <p>MEMORIA PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>Al Modo de Separación</p> <p>Los modos de separación de los componentes de la mezcla puede ser llevada cabo por una de las tres técnicas siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Adscripción • Elución por Desplazamiento • Desarrollo por Elución <p>Desarrollo por Desplazamiento</p> <p>En esta técnica el agente desplazador está contenido en la fase móvil, el cual puede ser un líquido o un gas. Un requisito necesario es que la fase móvil sea más adsorbida que cualquiera de los componentes de la mezcla. Siempre se obtiene una banda pura única del primer componente en la muestra.</p> <p>Analisis Frontal</p> <p>La mezcla líquida o gaseosa es alimentada a la columna. La mezcla avanza como su propia fase móvil y la separación depende de la habilidad con la cual cada componente en la mezcla es adsorbido una vez que la columna haya sido saturada la mezcla sigue fluyendo con su composición original. El componente menos adsorbido fluye primero y es el único componente en ser obtenido de manera pura.</p> 
--	---

<p>INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA (LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC))</p> <p>QUE ES CLAR</p> <p>PARÁMETROS</p> <p>TÍTULO DE CROMATOGRAMA (H)</p> <p>MEMORIA PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>Al Modo de Separación</p> <p>Desarrollo por Elución</p> <p>En esta técnica, los componentes de la muestra viajan a través de la columna a una velocidad determinada por sus características de retención sobre el empaque sólido.</p> 
--	---

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

Los Fases Involucradas

Según el fundamento teórico de la separación, los distintos tipos de cromatografías pueden clasificarse atendiendo a las fases involucradas, ya sea estacionaria o móvil.

Naturaleza de la Fase Estacionaria

- Sólido
- Líquido

Naturaleza de la Fase Móvil

- Gas
- Líquido

QUE ES CLAR

PARÁMETROS

TIPUS DE CROMATOGRAFÍA

MEMORIA PRINCIPAL

AYUDA - SALIDA

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

Según la definición de la IUPAC, la cromatografía es un método usado principalmente para la separación de los componentes de una muestra en la cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria mientras la otra se mueve. La fase estacionaria puede ser un sólido o un gel. La fase estacionaria puede estar extendida como una capa o disuuelta como una película etc. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa.

Keulemans ha definido la cromatografía como un método físico de separación en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales constituye la fase estacionaria de gran área superficial, y la otra es un fluido (fase móvil) que pasa a través o a lo largo de la fase estacionaria.

QUE ES CLAR

PARÁMETROS

TIPUS DE CROMATOGRAFÍA

MEMORIA PRINCIPAL

AYUDA - SALIDA

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución es en esencia, como todos los métodos cromatográficos, un método separativo. Así, el lugar donde se produce la separación, la columna, puede considerarse el corazón del sistema cromatográfico, alrededor de la cual se monta un equipo de mayor o menor complejidad. En el caso más simple, el cromatógrafo de líquidos estará constituido por:

- Un reservorio de solvente que alimenta al sistema con la fase móvil.
- Un sistema que permite la introducción de la muestra y el inyector.
- Un sistema para forzar el pasaje de la muestra y la fase móvil a través de la columna: la bomba.
- Un sistema de monitoreo y detector.
- Un sistema de registro de datos (computadora).

La base fundamental de CLAR consiste en pasar una mezcla del análisis con

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

QUE ES CLAR

PARÁMETROS

TIPUS DE CROMATOGRAFÍA

MEMORIA PRINCIPAL

AYUDA - SALIDA

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

Básicamente los equipos de CLAR pueden clasificarse en integrales y modulares.

Los equipos integrales, cada uno de sus partes (reservorio de solventes, bomba inyector y detector) están reunidas en un gabinete y su ensamblaje o conexión con otros componentes de la misma o diferente marca es difícil.

Los equipos modulares son instrumentos individuales que permiten no solo armar el equipo según la necesidad, sino aumentar su complejidad según esa necesidad varie.

QUE ES CLAR

PARÁMETROS

TIPUS DE CROMATOGRAFÍA

MEMORIA PRINCIPAL

AYUDA - SALIDA

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

CLAR ha tenido una creciente difusión desde comienzos de la década de los 70 y hoy representa una de las herramientas más empleadas en el laboratorio analítico moderno ya sea éste dedicado a la investigación básica o aplicada industrial, biológica o biomédica.

CLAR es en la actualidad una de las principales técnicas de separación de

QUE ES CLAR

PARÁMETROS

TIPUS DE CROMATOGRAFÍA

MEMORIA PRINCIPAL

AYUDA - SALIDA

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

La cromatografía tiene un lenguaje particular, su nomenclatura fue estandarizada por la American Society for Testing and Materials, ASTM y la International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC.

Se definen algunos de los términos cromatográficos, para una mejor comprensión de este manual, entre los cuales debemos incluir los siguientes:

Tiempo de Retención

QUE ES CLAR

PARÁMETROS

TIPUS DE CROMATOGRAFÍA

MEMORIA PRINCIPAL

AYUDA - SALIDA

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

Es la representación de la respuesta o señal del sistema de detección en función del tiempo, volumen de eluyente o distancia en el tubo cromatográfico. El cromatograma puede tomar diversas formas: un registro en la cinta de un registrador o plotter, una mancha en cromatografía plana, o un número determinado de datos tomados por un microcomputador. El cromatograma contiene la información analítica relativa a la muestra (complejidad, número de picos, detección cualitativa y/o cuantitativa de uno o varios componentes) y del funcionamiento del sistema cromatográfico. El concepto de cromatograma según IUPAC, es "un gráfico o otra representación de la respuesta del detector, concentración del eluyente u otra cantidad usada como una medida de la concentración del eluyente contra el volumen de eluyente o tiempo". Así un cromatograma corresponde por ejemplo, a la curva representada en la figura. Las abscisas corresponden al tiempo durante el cual se efectúa la medición.

QUE ES CLAR

PARÁMETROS

TIPUS DE CROMATOGRAFÍA

MEMORIA PRINCIPAL

AYUDA - SALIDA

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

CROMATOGRAMA

En un cromatograma las ordenadas corresponden a la señal analógica proveniente del detector (respuesta) y su significado dependerá del tipo de medición efectuada (absorción, índice de refracción, fluorescencia, etc.). La altura de la señal indica en cada momento la velocidad de la respuesta, en general, proporcional a la concentración del soluto, la cual se evalúa por medición manual o electrónica (lea bajo la curva o altura de pico). Normalmente el pico tiene distribución normal (gausiana), aunque algunos fenómenos pueden provocar el alejamiento de esta condición y no es infrecuente encontrar anomalías de mayor o menor intensidad.

QUE ES CLAR

PARÁMETROS

TIPUS DE CROMATOGRAFÍA

MEMORIA PRINCIPAL

AYUDA - SALIDA

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA (LECCIÓN DE ALTA RESOLUCIÓN (1A))

El volumen de elución (V_e) o también conocido como volumen de retención (V_R), es el volumen de fase móvil eluida entre la inyección y la elución de la concentración máxima del soluto. A caudal constante el tiempo transcurrido entre dichos puntos corresponde al tiempo de elución o tiempo de retención.

También se define como el volumen de fase móvil necesario para que se produzca la elución de un soluto (realmente, para que aparezca el pico, ya que estrictamente en este instante, aproximadamente el 50% del mismo está todavía en el tubo cromatográfico).

UNIDADES

PARÁMETROS

TIPO DE CROMATOGRAFÍA

RENTIMIENTO (A)

ABRIR / SALIDA

$V_e = t_R \cdot F$

t_R = Tiempo de retención
 F = Caudal (expresado generalmente en ml/min)

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA (LECCIÓN DE ALTA RESOLUCIÓN (1A))

El volumen muerto (V_0), es el volumen total de solvente entre el punto de inyección y el de detección, excluyendo el correspondiente a las partículas de fase estacionaria. Comprende al volumen que la fase móvil puede ocupar entre las partículas, entre las partículas y la pared de la columna, en el interior de las tuberías, uniones, etc.

En el caso de que la solución inyectada contenga algún soluto que no se retenga en la fase estacionaria, su elución no será instantánea sino que corresponderá a un volumen de elución igual al volumen muerto. Sin embargo, como su valor se emplea frecuentemente en algunos cálculos cromatográficos, no debe tomarse este valor de los cromatogramas de cualquier ensayo, ya que se tiene la completa seguridad de que el primer pico, generalmente debido al solvente de disolución de la muestra o a alguna impureza desconocida, no se retiene en absoluto en el material de la fase estacionaria.

UNIDADES

PARÁMETROS

TIPO DE CROMATOGRAFÍA

RENTIMIENTO (A)

ABRIR / SALIDA

TIEMPO DE RETENCIÓN

El tiempo de Retención (t_R) es el tiempo que toma un soluto en recorrer toda la columna. También se define como el tiempo medido entre la inyección y la elución de la concentración máxima del soluto (máxima señal). La distancia entre este máximo de la señal y la línea base es la altura del pico (h) en cuestión.

Existe otros parámetros relacionados con el tiempo:

- Tiempo de Retención Neto o Relativo (t'_R)
- Tiempo Muerto (t_0)

UNIDADES

PARÁMETROS

TIPO DE CROMATOGRAFÍA

RENTIMIENTO (A)

ABRIR / SALIDA

TIEMPO DE RETENCIÓN

- Tiempo de Retención Neto o Relativo (t'_R)

Dado que el volumen extracolumnar depende de varios factores, ajenos a la separación misma, es frecuente expresar el tiempo de retención neto de un pico determinado como diferencia entre su tiempo de retención y el tiempo muerto en lugar del tiempo de retención absoluto. Así, para el pico en análisis:

- Tiempo Muerto (t_0)

El tiempo de retención de un pico no retenido (t_0 o t_M) es el tiempo requerido por un compuesto no retenido para viajar a través de toda la columna. Las moléculas de un soluto no retenido no pasan en la fase estacionaria, ellas viajan a la misma velocidad de flujo, todo el tiempo están en la fase móvil. Este es equivalente al tiempo que el soluto gasta en la fase móvil y que es el mismo para todos los solutos de la muestra en el mismo corrido cromatográfico. Este tiempo se obtiene al inyectar un compuesto no retenido y determinando su tiempo de retención (absoluto o neto) y al caudal (F) darán el volumen de retención (absoluto o relativo):

$V_0 = t_0(\text{min}) \cdot F(\text{ml/min})$

UNIDADES

PARÁMETROS

TIPO DE CROMATOGRAFÍA

RENTIMIENTO (A)

ABRIR / SALIDA

FACTOR DE CAPACIDAD

El Factor de Capacidad (k') conocido como Factor de Retención (k) es una medida de la retención. Es la relación de tiempo que gasta el soluto en las fases estacionaria y móvil.

k' proporciona información importante sobre la calidad de una separación. Cuando el k' es pequeño, la resolución es pobre. Si k' es muy grande, el tiempo del análisis puede ser demasiado largo, o cualquier aumento en la resolución puede suprimir ensanchamiento del pico. Idealmente, los k' deben estar entre 2 y 10. En práctica, $k' < 20$ es satisfactorio. El valor de k' puede ajustarse modificando la fuerza de la fase móvil por ejemplo:

UNIDADES

PARÁMETROS

TIPO DE CROMATOGRAFÍA

RENTIMIENTO (A)

ABRIR / SALIDA

FACTOR DE CAPACIDAD

En Fase Reversa k' disminuye al aumentar la proporción del componente orgánico (MeOH, AcN, THF).

En Fase Normal k' disminuye al aumentar la proporción de solvente polar.

El ejemplo muestra cromatogramas para 4 compuestos orgánicos en una columna C18 que usa 90% metanol. Aprieta los botones para ver el efecto en la separación y el valor de k' cuando se cambia la fuerza de la fase móvil.

90% metanol/10% agua
 70% metanol/30% agua
 50% metanol/50% agua
 40% metanol/60% agua

UNIDADES

PARÁMETROS

TIPO DE CROMATOGRAFÍA

RENTIMIENTO (A)

ABRIR / SALIDA

FACTOR DE SEPARACIÓN

El Factor de Separación (α) es una medida del tiempo o distancia entre el máximo de dos picos. Se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$\alpha = \frac{k'_2 + 1}{k'_1 + 1}$

k'_1 = Factor de capacidad para el primer pico
 k'_2 = Factor de capacidad para el segundo pico

Si no existe separación α es igual a la unidad y su valor aumenta cuando aumenta la separación.

A distancia de k' o n no depende de la fuerza de elución de la fase móvil o de la columna. Así, una disminución de la fuerza de la fase móvil produce un aumento de la retención, que en general no se acompaña de cambios de selectividad. Es decir, el aumento será proporcional para todos los solutos y el cociente entre ellos se mantendrá aproximadamente constante.

UNIDADES

PARÁMETROS

TIPO DE CROMATOGRAFÍA

RENTIMIENTO (A)

ABRIR / SALIDA

FACTOR DE SEPARACIÓN

La variación de n puede lograrse de varios modos son:

- Modificación del componente activo de la fase móvil (en fase reversa MeOH por AcN o THF, en fase normal, dióxido de carbono por metilano o metil terbutilo éter).
- Modificación del pH de la fase móvil.
- Empleo de solutos (reactivos de aprieteamiento, complejantes, etc.).
- Cambio de la fase estacionaria.

El cromatograma muestra una separación de una mezcla de cuatro compuestos orgánicos en una columna C18 que usa varias mezclas de acetonitrilo/agua. Pulsa los botones para ver el efecto en la separación y el valor de n , cuando se cambia la fuerza de la fase móvil.

10% acetonitrilo/90% agua
 30% acetonitrilo/70% agua
 50% acetonitrilo/50% agua
 80% acetonitrilo/20% agua

UNIDADES

PARÁMETROS

TIPO DE CROMATOGRAFÍA

RENTIMIENTO (A)

ABRIR / SALIDA

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

El volumen de elución (V_e) también conocido como volumen de retención (V_R) es el volumen de fase móvil eluido entre la inyección y la elución de la concentración máxima del soluto. A caudal constante, el tiempo transcurrido entre dichos puntos corresponde al tiempo de elución o tiempo de retención.

También se define como el volumen de fase móvil necesario para que se produzca la elución de un soluto (normalmente, para que aparezca el pico) ya que estrictamente en ese instante aproximadamente el 50% del mismo está todavía en el tubo cromatográfico.

$V_e = t_R \times F$

t_R = Tiempo de retención
 F = Caudal (expresado generalmente en ml/min)

QUE ES CLAR

PARÁMETROS

TIPUS DE CROMATOGRAFIA DE

MEJORA PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

El volumen muerto (V_0) es el volumen total de solvente entre el punto de inyección y el de detección, excluyendo el correspondiente a las partículas de fase estacionaria. Comprende al volumen que la fase móvil puede ocupar entre las partículas, entre las partículas y la pared de la columna, en el interior de las tuberías, uniones, etc.

En el caso de que la solución inyectada contenga algún soluto que no se retenga en la fase estacionaria su elución no será instantánea sino que corresponderá a un volumen de elución igual al volumen muerto. Sin embargo, como su valor se emplea frecuentemente en algunos cálculos cromatográficos, no debe tomarse este valor de los cromatogramas de cualquier ensayo ya que se tiene la completa seguridad de que el primer pico generalmente debido al solvente de disolución de la muestra o a alguna impureza desconocida no se retenga en absoluto en el material de la fase estacionaria.

QUE ES CLAR

PARÁMETROS

TIPUS DE CROMATOGRAFIA DE

MEJORA PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

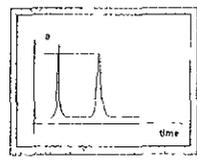
INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

TIEMPO DE RETENCIÓN

El tiempo de Retención (t_R) es el tiempo que toma un soluto en recorrer toda la columna. También se define como el tiempo medido entre la inyección y la elución de la concentración máxima del soluto (máxima señal). La distancia entre este máximo de la señal y la línea base es la altura del pico (h) en cuestión.

Existe otros parámetros relacionados con el tiempo.

t_R = Tiempo de Retención Neto o Relativo (t'_R)
 t_M = Tiempo Muerto (t_0)



QUE ES CLAR

PARÁMETROS

TIPUS DE CROMATOGRAFIA DE

MEJORA PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

TIEMPO DE RETENCIÓN

t_R = Tiempo de Retención Neto o Relativo (t'_R)

Dado que el volumen extracolumnar depende de varios factores ajenos a la separación misma, es frecuente expresar el tiempo de retención neto de un pico determinado como diferencia entre su tiempo de retención y el tiempo muerto en lugar del tiempo de retención absoluto. Así para el pico enésimo

$t'_R = t_R - t_0$

t_0 = Tiempo Muerto (t_0)

El tiempo de retención de un pico no retenido (t_0 o t_M) es el tiempo requerido por un compuesto no retenido para viajar a través de toda la columna. Las moléculas de un soluto no retenido no penetran a la fase estacionaria ellas viajan a la misma velocidad de flujo, todo el tiempo están en la fase móvil y que es el mismo para todos los solutos de la muestra en el mismo corriento cromatográfico. Este tiempo se obtiene al inyectar un compuesto no retenido y determinando su tiempo de retención.

En ambos casos, el producto del tiempo de retención (absoluto o neto) y el caudal (F) darán el volumen de retención (absoluto o relativo).

$V_e = t_R(\text{min}) \times F(\text{ml/min})$

QUE ES CLAR

PARÁMETROS

TIPUS DE CROMATOGRAFIA DE

MEJORA PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

FACTOR DE CAPACIDAD

El Factor de Capacidad (k') conocido como Factor de Retención (k) es otra medida de la retención. Es la relación de tiempo que gasta el soluto en las fases estacionaria y móvil.

k' proporciona información importante sobre la calidad de una separación. Cuando el k es pequeño, la resolución es pobre. Si k es grande, el tiempo del análisis puede ser demasiado largo, o cualquier aumento en la resolución puede suprimir ensanchamiento del pico. Idealmente, los k' deben estar entre 2 y 10. En práctica $1 < k < 20$ es satisfactorio. El valor de k puede ajustarse modificando la fuerza de la fase móvil por ejemplo.

QUE ES CLAR

PARÁMETROS

TIPUS DE CROMATOGRAFIA DE

MEJORA PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

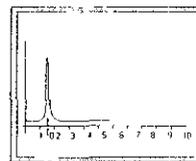
INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

FACTOR DE CAPACIDAD

En Fase Reversa k disminuye al aumentar la proporción del componente orgánico (MeOH, AcN, THF)

En Fase Normal k disminuye al aumentar la proporción de solvente polar.

El ejemplo muestra un cromatograma para 4 compuestos orgánicos en una columna C18 que usa 90% metanol. Aprieta los botones para ver el efecto en la separación, y el valor de k cuando se cambie la fuerza de la fase móvil.



QUE ES CLAR

PARÁMETROS

TIPUS DE CROMATOGRAFIA DE

MEJORA PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

FACTOR DE SEPARACIÓN

El Factor de Separación (α) es una medida del tiempo o distancia entre el máximo de dos picos. Se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$\alpha = \frac{k'_2 + 1}{k'_1 + 1}$

k'_1 = factor de capacidad para el primer pico
 k'_2 = factor de capacidad para el segundo pico

Si no existe separación α es igual a la unidad y su valor aumenta cuando aumenta la separación.

A diferencia de k α no depende de la fuerza de elución de la fase móvil y de la columna. Así una disminución de la fuerza de la fase móvil produce un aumento de la retención, que en general no se acompaña de cambios de selectividad. Es decir, el aumento será proporcional para todos los solutos y el cociente entre ellos se mantendrá aproximadamente constante.



QUE ES CLAR

PARÁMETROS

TIPUS DE CROMATOGRAFIA DE

MEJORA PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

FACTOR DE SEPARACIÓN

La variación de α puede lograrse de varios modos son:

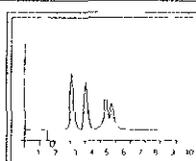
Modificación del componente activo de la fase móvil (en fase reversa MeOH por AcN o THF en fase normal cloroformo por cloruro de metileno o metil terbutil éter)

Modificación del pH de la fase móvil

Empleo de aditivos (reactivos de apareamiento, complejantes, etc)

Cambio de la fase estacionaria

El cromatograma muestra una separación de una mezcla de cuatro compuestos orgánicos en una columna C18 que usa varias mezclas de solventes orgánicos. Púta los botones para ver el efecto en la separación y el valor de α cuando se cambia la fuerza de la fase móvil.



QUE ES CLAR

PARÁMETROS

TIPUS DE CROMATOGRAFIA DE

MEJORA PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (LHAR)

La resolución (R) es un parámetro de la separación de los constituyentes de una muestra

Entre mayor sea la resolución menor será el solapamiento entre dos picos consecutivos. El factor de Separación (α) es solo la distancia o el tiempo entre los máximos de dos picos. La Resolución toma en cuenta tanto a α como al ancho de pico. Esta expresión, la resolución, se calcula por cada par de picos adyacentes como:

$$R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{0.5(w_1 + w_2)}$$

Donde b y h corresponden a los tiempos de retención de los picos 2 y 1 $w_1 + w_2$ a los anchos de pico medidos en su base

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (LHAR)

ANCHO DE PICO

Ancho de Pico (W): esta medición se puede efectuar con varios objetivos, para calcular la eficiencia de la columna (platos teóricos), la resolución para el cálculo manual del área de picos

El ancho de pico puede tomarse en varias posiciones (a varias alturas) y si la señal fuera perfectamente gaussiana, las apreciaciones que resultan de esta medición serían equivalentes. Sin embargo como esta condición raramente se cumple debe indicarse cuál es el método empleado

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (LHAR)

ANCHO DE PICO

En general el ancho de pico suele tomarse

- Al 80.7% de la altura del pico (w)
- Al 60% de la altura del pico (Wn ancho de pico a media onda)
- En la base del pico (mw)

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (LHAR)

ANCHO DE PICO

El concepto de Plato Teórico (N) explicar al fenómeno separativo, la columna se divide en cortes donde se consigue un equilibrio transitorio, antes de que la fase móvil avance hacia el siguiente. Cada corte se llama "plato" y su espesor altura equivalente del plato teórico (H o HETP). Entonces, para una columna de longitud L, con N platos teóricos la altura del plato resulta

$$N = \frac{L}{H}$$

La eficiencia de una columna cromatográfica por lo tanto su poder separativo se mide en función de su número de platos teóricos. Para lograr la separación de dos componentes dados no sólo deben estar a distintos tiempos de retención sino que el ancho de los picos debe ser tan bajo como sea posible

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (LHAR)

ANCHO DE PICO

El concepto de Plato Teórico (N) explicar al fenómeno separativo, la columna se divide en cortes donde se consigue un equilibrio transitorio, antes de que la fase móvil avance hacia el siguiente. Cada corte se llama "plato" y su espesor altura equivalente del plato teórico (H o HETP). Entonces, para una columna de longitud L, con N platos teóricos la altura del plato resulta

$$N = \frac{L}{H}$$

El número de platos teóricos puede calcularse en función del ancho del pico como

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2$$

La eficiencia de una columna cromatográfica por lo tanto su poder separativo se mide en función de su número de platos teóricos. Para lograr la separación de dos componentes dados no sólo deben estar a distintos tiempos de retención sino que el ancho de los picos debe ser tan bajo como sea posible

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (LHAR)

La eficiencia de la columna es una función de sus dimensiones (diámetro longitud y espesor de película) y su relación con la resolución por la siguiente ecuación

$$R = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right)^2 \left(\frac{N}{4} \right)$$

Resolución de Ejemplo

La resolución puede ser alterada por conseguirse cambiando las condiciones experimentales que varían en uno o más de los parámetros N, α, o k

El cromatograma muestra dos picos que no están resueltos. Pulse el botón para ver el efecto en la resolución incrementando N, α, o k

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (LHAR)

La asimetría (Asym) es una de las formas más comunes de alejamiento de la curva gaussiana y su medición es importante puesto que puede llevar, de acuerdo a su magnitud, a errores considerables de cuantificación, e incluso a ocultar picos adyacentes. Las fórmulas empleadas son

$$A_{s,b} = \frac{b}{a} \quad A_{s,a} = \frac{a}{b}$$

donde a y b son las medidas entre la línea que une el máximo del pico con la línea de base y los extremos anterior y posterior del pico, tomados al 10% de su altura. Por su parte a' y b' son los mismos parámetros al 6% de octava altura

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (LHAR)

Podemos clasificar a la Cromatografía Líquida de la siguiente forma

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (LHAR)

Podemos clasificar a la Cromatografía Líquida de la siguiente forma

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (LHAR)

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA SÓLIDO (LCS) O DE ADSORCIÓN

Es la forma más antigua de la cromatografía en la cual se utiliza una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida o gaseosa. El soluto puede adsorberse en la superficie de las partículas sólidas. En cualquier fenómeno de adsorción influyen

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

CROMATOGRAFÍA LIQUIDO-SÓLIDO (CLS) O DE ADSORCIÓN

Si las moléculas de un componente particular tienen una elevada afinidad por el adsorbente pasarán muy lentamente mientras que otro componente con menos afinidad lo hará más rápido



¿QUÉ ES CLS?

PARÁMETROS

TIPUS DE CROMATOGRAFÍA DE

MEMORIA PRINCIPAL

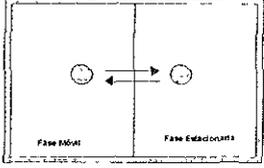
AYUDA SALIDA

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

CROMATOGRAFÍA LIQUIDO-LÍQUIDO (CLL) O DE PARTICIÓN

En esta modalidad las moléculas de soluto se distribuyen entre dos líquidos: uno es la fase móvil, y el otro la fase estacionaria que se encuentra homogéneamente dispersa en un soporte sólido, finamente dividido. El analito se distribuye entre la fase estacionaria líquida inmiscible en la fase móvil y fijada mecánicamente a un soporte inerte (barra de dióxido de silicio, sílice, papel, etc.).

La separación se basa sobre la partición del soluto entre dos fases líquidas (móvil y estacionaria)



¿QUÉ ES CLL?

PARÁMETROS

TIPUS DE CROMATOGRAFÍA DE

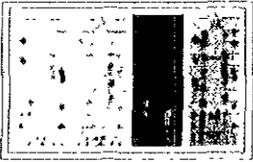
MEMORIA PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

CROMATOGRAFÍA LIQUIDO-LÍQUIDO (CLL) O DE PARTICIÓN

Las técnicas más generales de la separación líquido-líquido se llevan a cabo sobre células o gel de sílice húmeda pudiendo realizarse en forma de tira de papel capa fina o columna. El medio en cada caso actúa como soporte del agua por lo que este tipo de cromatografía se emplea fundamentalmente para la separación de sustancias solubles en la misma.



¿QUÉ ES CLL?

PARÁMETROS

TIPUS DE CROMATOGRAFÍA DE

MEMORIA PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

CROMATOGRAFÍA DE FASE LIGADA (CFL)

La cromatografía de fase ligada es llamada así porque reemplaza el tipo de unión de la fase estacionaria a su soporte, haciéndola perdurable por medio de una unión química

¿QUÉ ES CLL?

PARÁMETROS

TIPUS DE CROMATOGRAFÍA DE

MEMORIA PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

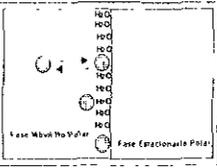
INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

CROMATOGRAFÍA DE FASE LIGADA (CFL)

Cromatografía en Fase Normal

La Cromatografía en FN se realiza sobre fases estacionarias hidrofílicas como la sílice o aluminas microporosas y con solventes de mediana a baja polaridad como fase móvil. Es un método apropiado para la separación de solutos de polaridad mediana a alta y es de suma utilidad para la separación de isómeros posicionales con sustituyentes polares.

El mayor inconveniente de FN se debe a la alta actividad del material de relleno que tiende a adsorber agua y solventes polares en su superficie. Como consecuencia su comportamiento puede modificarse en una disminución de la reproducibilidad en los resultados.



¿QUÉ ES CLL?

PARÁMETROS

TIPUS DE CROMATOGRAFÍA DE

MEMORIA PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

CROMATOGRAFÍA DE FASE LIGADA (CFL)

El agua adsorbida, que forma capas simples o múltiples alrededor de la partícula y llega a bpar sus poros, es responsable de la pérdida de actividad de la fase estacionaria, o al menos, conduce a mecanismos mixtos de retención por una parte, fenómenos de adsorción debidos a los sitios superficiales de la fase estacionaria y por otra a mecanismos de partición entre la fase móvil y el agua retenida sobre la fase estacionaria.

La adsorción puede interpretarse como una concentración de un analito en una columna cromatográfica respecto del solvente en el que está fluyendo. Ese enriquecimiento surge de las interacciones violentas entre los analitos y el material de relleno de la columna. La retención se debe a la competencia que se establece entre:

Fase Móvil Superficie Adsorbente
Analito Superficie Adsorbente

¿QUÉ ES CLL?

PARÁMETROS

TIPUS DE CROMATOGRAFÍA DE

MEMORIA PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

CROMATOGRAFÍA DE FASE LIGADA (CFL)

Cromatografía en Fase Inversa

En Cromatografía de FR la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es muy polar (en general mezcla de agua y un modificador orgánico metanol, acetonitrilo ó tetrahidrotureno). Las ventajas de la cromatografía en FR son:

- (1) Compuestos no iónicos, iónicos e ionizables pueden ser separados en la misma columna, con la misma fase móvil.
- (2) La fuerza de atracción superficial no polar soluto es débil.
- (3) La adsorción irreversible frecuente en sílice, raramente ocurre.
- (4) La fase móvil predominante es agua abundante y económica.
- (5) El modificador orgánico predominante es el metanol.
- (6) El orden de elución es predecible en función de la hidrofobicidad del analito.
- (7) Se necesita poco tiempo para el equilibrio del sistema luego de un cambio de fase móvil.



¿QUÉ ES CLL?

PARÁMETROS

TIPUS DE CROMATOGRAFÍA DE

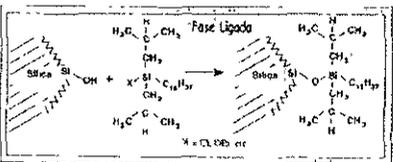
MEMORIA PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

CROMATOGRAFÍA DE FASE LIGADA (CFL)

La interacción entre las moléculas de soluto y de solvente es mucho más débil que la interacción de las moléculas de solvente entre sí. Como consecuencia el soluto es expulsado de la fase móvil y forzado a penetrar en la fase estacionaria que actúa como receptor pasivo. La figura muestra como ejemplo la interacción de fenol con la fase ligada. En este caso, puede asumirse que el grupo polar se orienta hacia la fase móvil acuosa mientras que su posición hidrofóbica lo hace hacia la superficie hidrocarbonada.



¿QUÉ ES CLL?

PARÁMETROS

TIPUS DE CROMATOGRAFÍA DE

MEMORIA PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

CROMATOGRÁFIA DE INTERCAMBIO IÓNICO (CII)

En este tipo de cromatografía los aniones (como SO_4) o cationes (como NH_4^+) se unen covalentemente a la fase estacionaria sólida. Los iones del soluto de carga opuesta a los de la fase estacionaria son atraídos por esta última mediante una fuerza electrostática.

Fase Móvil Fase Estacionaria

UNIVERSIDAD PARÁMETROS TIPO DE CROMATOGRÁFICA MENÚ PRINCIPAL AYUDA SALIDA

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

CROMATOGRÁFIA DE INTERCAMBIO IÓNICO (CII)

La Fase Estacionaria es una resina de intercambio iónico y tiene la propiedad de separar especies ionizadas (Cationes o Aniones). La Fase Móvil es generalmente una Solución Amortiguadora de pH.

Fase Móvil Fase Estacionaria

UNIVERSIDAD PARÁMETROS TIPO DE CROMATOGRÁFICA MENÚ PRINCIPAL AYUDA SALIDA

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

CROMATOGRÁFIA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO (CET)

La Cromatografía de Exclusión por Tamaño es un tipo particular de cromatografía líquido sólido, que se utiliza en la separación de sustancias que poseen volúmenes moleculares diferentes. En la cual las moléculas se separan por su tamaño. Se utiliza ampliamente en bioquímica para separar moléculas grandes como proteínas y carbohidratos.

Fase Móvil Fase Estacionaria

UNIVERSIDAD PARÁMETROS TIPO DE CROMATOGRÁFICA MENÚ PRINCIPAL AYUDA SALIDA

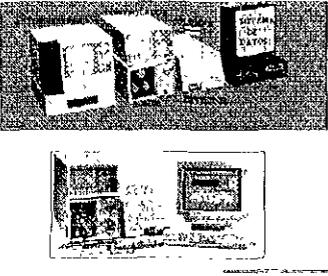
INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

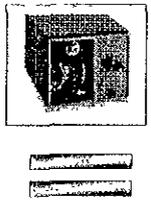
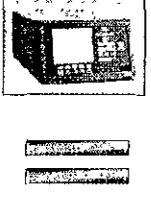
CROMATOGRÁFIA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO (CET)

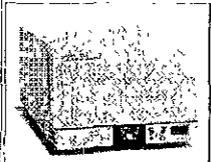
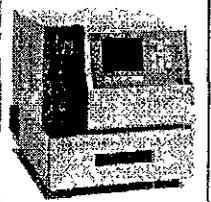
El término exclusión por tamaño también se encuentra en la bibliografía con los nombres de: Filtración sobre Gel, Permeación sobre Gel, Tamizado Molecular y

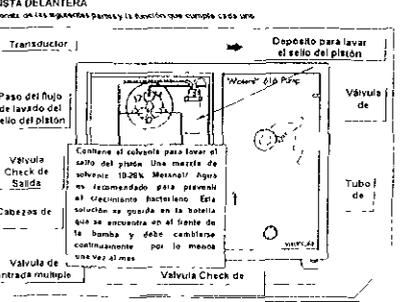
Fase Móvil Fase Estacionaria

UNIVERSIDAD PARÁMETROS TIPO DE CROMATOGRÁFICA MENÚ PRINCIPAL AYUDA SALIDA

<p>CARACTERÍSTICAS O EL INSTRUMENTAL CLAR WATERS</p> <p>SISTEMA CROMATOGRAFICO DE LIQUIDOS (CL) 616 WATERS</p> <p>DETECCION POR ABSORCION UV 996 WATERS</p> <p>AUTOMATIZADOR 717 PLUS WATERS</p> <p>MENU PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>		<p>CARACTERÍSTICAS O EL INSTRUMENTAL CLAR WATERS</p> <p>SISTEMA CROMATOGRAFICO DE LIQUIDOS (CL) 616 WATERS</p> <p>DETECCION POR ABSORCION UV 996 WATERS</p> <p>AUTOMATIZADOR 717 PLUS WATERS</p> <p>MENU PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>El Sistema Cromatógrafo de Líquidos (CL) 616 está diseñado para hacer uso de la última tecnología. Este incluye una Unidad de Manejo Fluido (FHU) y un Controlador 600S. El Controlador 600S incluye un software PowerLine el cual es controlado directamente desde un teclado pequeño del Controlador. El Sistema LC 616 también puede controlarse a través del Software Millennium 2.10 por medio de una computadora.</p> <p>Los componentes del Sistema LC 616 son:</p> <ul style="list-style-type: none"> Controlador 600S Unidad de Manejo Fluido (FHU) Detector UV 996 Automatizador 717 Plus Bomba 616 
--	---	--	--

<p>CARACTERÍSTICAS O EL INSTRUMENTAL CLAR WATERS</p> <p>SISTEMA CROMATOGRAFICO DE LIQUIDOS (CL) 616 WATERS</p> <p>DETECCION POR ABSORCION UV 996 WATERS</p> <p>AUTOMATIZADOR 717 PLUS WATERS</p> <p>MENU PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>Las bombas CLAR impulsan la fase móvil proveniente del reservorio de solvente hacia el inyector, y desde ahí hacia la columna. Existen bombas capaces de entregar caudales muy pequeños, del orden de los microlitros para la cromatografía microbica, pasando a caudales de unos pocos mililitros para la cromatografía analítica convencional hasta valores mucho mayores para las separaciones semipreparativas y preparativas.</p> <p>Básicamente existen dos tipos de bombas: las de pistón (bombas reciprocantes) y las de desplazamiento continuo (bombas peristalticas). Las primeras son las de uso más difundido, son muy versátiles y fáciles de adaptar a la rutina del laboratorio. Las segundas no emiten pulsos en la entrega del solvente.</p> 	<p>CARACTERÍSTICAS O EL INSTRUMENTAL CLAR WATERS</p> <p>SISTEMA CROMATOGRAFICO DE LIQUIDOS (CL) 616 WATERS</p> <p>DETECCION POR ABSORCION UV 996 WATERS</p> <p>AUTOMATIZADOR 717 PLUS WATERS</p> <p>MENU PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>El Controlador Waters 600S es un instrumento fundamental para controlar las funciones de la bomba, el control de los solventes, la desgasificación de los mismos, etc.</p> <p>Provee de puertos de comunicación y terminales de conexiones para la operación y control de aparatos externos.</p> 
--	---	--	---

<p>CARACTERÍSTICAS O EL INSTRUMENTAL CLAR WATERS</p> <p>SISTEMA CROMATOGRAFICO DE LIQUIDOS (CL) 616 WATERS</p> <p>DETECCION POR ABSORCION UV 996 WATERS</p> <p>AUTOMATIZADOR 717 PLUS WATERS</p> <p>MENU PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>El detector permite ver y ubicar el tiempo y espacio de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica.</p> <p>Los detectores pueden clasificarse en generales y selectivos.</p> <ul style="list-style-type: none"> Los detectores generales miden el cambio de alguna propiedad física de la fase móvil que contiene el analito en comparación con la misma fase móvil pura. Los detectores selectivos son aquellos sensibles a alguna propiedad del soluto, por ejemplo el detector UV que produce una señal proporcional a la absorbancia del soluto a una longitud de onda dada. 	<p>CARACTERÍSTICAS O EL INSTRUMENTAL CLAR WATERS</p> <p>SISTEMA CROMATOGRAFICO DE LIQUIDOS (CL) 616 WATERS</p> <p>DETECCION POR ABSORCION UV 996 WATERS</p> <p>AUTOMATIZADOR 717 PLUS WATERS</p> <p>MENU PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>El automatizador es también conocido como inyector, el cual es un dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el caudal de solvente a través del sistema.</p> <p>El inyector debe de ser fácil de operar, ser fuerte al ataque químico y capaz de soportar altas presiones, debe de ser preciso en cuanto a la cantidad de muestra introducida en el sistema.</p> <p>Los inyectores CLAR son válvulas que controlan el caudal hacia la columna pasando o no según su posición, a través de un loop en el cual se introduce la solución al inyector. Las válvulas pueden accionarse manual o automáticamente.</p> 
--	--	--	---

<p>CARACTERÍSTICAS O EL INSTRUMENTAL CLAR WATERS</p> <p>SISTEMA CROMATOGRAFICO DE LIQUIDOS (CL) 616 WATERS</p> <p>DETECCION POR ABSORCION UV 996 WATERS</p> <p>AUTOMATIZADOR 717 PLUS WATERS</p> <p>MENU PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>La Bomba 616 Waters está construida de materiales resistentes tanto al ataque químico como al desgaste mecánico. Las tuberías son de acero inoxidable de 0.006 y 0.008 pulgadas de diámetro interno (ID) para perfeccionar el desempeño del sistema.</p> <p>Contiene los componentes requeridos para mezclar y distribuir solventes desde las botellas del reservorio al inyector.</p> <p>Los pistones están contruidos de zafiro y las válvulas de retención (tanto las de entrada como las de salida de los cabezales de bomba) por una pequeña esfera de rubí que apoyan en un asiento de zafiro y una malla o retención de acero inoxidable que retiene la esfera en sus movimientos.</p> <p>La válvula de la bomba proporciona el gradiente de elución que mezcla hasta cuatro solventes o buffers en cualquier combinación. El caudal del flujo comienza desde los reservorios y pasa por la columna.</p> <p>La bomba 616 consta de una vista delantera y un panel trasero.</p> 	<p>CARACTERÍSTICAS O EL INSTRUMENTAL CLAR WATERS</p> <p>SISTEMA CROMATOGRAFICO DE LIQUIDOS (CL) 616 WATERS</p> <p>DETECCION POR ABSORCION UV 996 WATERS</p> <p>AUTOMATIZADOR 717 PLUS WATERS</p> <p>MENU PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>VISTA DELANTERA Contiene de las siguientes partes y la función que cumple cada una:</p>  <ul style="list-style-type: none"> Transductor: Depósito para lavar el sello del pistón. Paso del flujo de lavado del sello del pistón: Contiene el solvente para lavar el sello del pistón. Una mezcla de solvente 10:90 Metanol: Agua es recomendada para prevenir el crecimiento bacteriano. Esta solución se guarda en la botella que se encuentra en el fondo de la bomba y debe cambiarse continuamente por lo menos una vez al mes. Válvula de Salida: Válvula Check de. Cabezas de: Válvula de entrada múltiple. Válvula de entrada múltiple: Válvula Check de. Tubo de: Válvula de.
--	--	--	---

CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTAL (EAG WATERS)

SISTEMA
PROGRAMACIÓN DE EJECUCIONES (E) 816 WATERS

DETECTOR POR
ANÁLISIS DE OXÍGENO (O) 996 WATERS

ALTERNATIVAS/ACCESORIOS
737 PLUS WATERS

MEMORIA PRINCIPAL

AYUDA **SALIDA**

PANEL TRASERO
Consta de un conector de interfaz y del Sparg Fitting

El conector de interfaz de la bomba se conecta al tablero trasero del Controlador 8005 para interconexión.

CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTAL (EAG WATERS)

SISTEMA
PROGRAMACIÓN DE EJECUCIONES (E) 816 WATERS

DETECTOR POR
ANÁLISIS DE OXÍGENO (O) 996 WATERS

ALTERNATIVAS/ACCESORIOS
737 PLUS WATERS

MEMORIA PRINCIPAL

AYUDA **SALIDA**

La bomba 616 Waters es una bomba cuadrifase que proporciona un flujo constante y estable de pulsaciones en las cuatro cámaras de la bomba. Los flujos por el tubo de salida de la cámara móvil se controlan independientemente al programar el pistón. El segundo flujo su cámara se llama "anuncio". El volumen de la cámara del pistón se puede ajustar para permitir cambiar fácilmente el "fase móvil" y disminuir el tiempo de demora para hacer efectivo un cambio de la composición de solvente durante un "gradiente de elución".

Las ventajas de esta bomba son el depósito de solvente limitado que permite a largo plazo el uso restringido y el cambio rápido del solvente al cual tiene la capacidad de limpiar la tubería de la bomba. Cada cámara tiene dos válvulas de retención, la habilidad de la bomba depende de la limpieza de la fase móvil y la capacidad continua del método de las cuatro válvulas de retención en cada ciclo, con ciclos normalmente ocurriendo en varios tiempos por minuto.

La unión entre el cabezal de la bomba y el pistón se efectúa por medio de una junta de material inerte llamada sello, que facilita el desplazamiento del pistón y evita la pérdida de fase móvil.

CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTAL (EAG WATERS)

SISTEMA
PROGRAMACIÓN DE EJECUCIONES (E) 816 WATERS

DETECTOR POR
ANÁLISIS DE OXÍGENO (O) 996 WATERS

ALTERNATIVAS/ACCESORIOS
737 PLUS WATERS

MEMORIA PRINCIPAL

AYUDA **SALIDA**

La bomba requiere de cuatro reservorios (recipientes que contienen la fase móvil) pueden ubicarse algunos centímetros sobre el nivel de la bomba para que la fuerza de gravedad ayude al solvente hacia esta, manteniendo limpias las conexiones. Puede emplearse como reservorio cualquier frasco de laboratorio de buena calidad, con una tapa adecuada para prevenir el ingreso de partículas ambientales al sistema.

Cada reservorio tiene una tapa con tres orificios, uno para la entrada del gas inerte de degasificación "sparge", otro para la salida del solvente y un tubo de ventilación al cual permite tener una presión positiva del gas sobre el solvente ventando el exceso.

Al estirar del tubo de salida de solvente se conecta un filtro difusor de acero (buzo) con 2 o 10 µm de porosidad que impide el ingreso de partículas a la bomba. El filtro difusor proporciona una ligera presión positiva al burbujear gas, ayudando a inhibir el flujo de aire en el reservorio mientras se retira el solvente.

CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTAL (EAG WATERS)

SISTEMA
PROGRAMACIÓN DE EJECUCIONES (E) 816 WATERS

DETECTOR POR
ANÁLISIS DE OXÍGENO (O) 996 WATERS

ALTERNATIVAS/ACCESORIOS
737 PLUS WATERS

MEMORIA PRINCIPAL

AYUDA **SALIDA**

La entrada del sparge de la bomba debe estar conectada a un suministro de un tanque de helio, a una presión entre 60 y 90 psi (4.1 y 6.3 atm). Se debe conectar un regulador de alta presión a la entrada del sparge del tanque de helio. El burbujeo de helio reduce el total de gas disueltos en los reservorios y mantiene esa condición durante toda la operación. La calidad del tanque de helio es importante ya que previene la contaminación de los solventes.

Las especificaciones técnicas requeridas para la calidad del gas helio son:

- Nitrogeno menos de 50 Mppm (mil partes por millón)
- Oxígeno menos de 5.0 Mppm
- Agua total menos de 1.0 Mppm
- Hidrocarburo total menos de 0.6 Mppm

CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTAL (EAG WATERS)

SISTEMA
PROGRAMACIÓN DE EJECUCIONES (E) 816 WATERS

DETECTOR POR
ANÁLISIS DE OXÍGENO (O) 996 WATERS

ALTERNATIVAS/ACCESORIOS
737 PLUS WATERS

MEMORIA PRINCIPAL

AYUDA **SALIDA**

Se colocan cuatro tuberías de teflón para las líneas del solvente A, B, C, D, que se dirigen a la bomba. Cuatro tuberías de teflón para las líneas del Sparge (Burbujeo) A, B, C, D que se dirigen a un tanque de helio. El burbujeo del gas helio se introduce en las tuberías por medio de un filtro difusor que dispersa el flujo de helio en pequeñas burbujas de gas.

La fase móvil empleada debe circular por tuberías que conectan el reservorio de solvente con la bomba, la bomba con el inyector, y el inyector a la columna y la columna al detector, para finalizar con una estación de datos y con un conector de fracciones.

CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTAL (EAG WATERS)

SISTEMA
PROGRAMACIÓN DE EJECUCIONES (E) 816 WATERS

DETECTOR POR
ANÁLISIS DE OXÍGENO (O) 996 WATERS

ALTERNATIVAS/ACCESORIOS
737 PLUS WATERS

MEMORIA PRINCIPAL

AYUDA **SALIDA**

ESPECIFICACIONES GENERALES

El sistema de control de la bomba es un sistema de control de flujo de fase móvil que permite la programación de la composición de la fase móvil y el control de la presión de la fase móvil.

Los componentes de la bomba son:

- Cabezal de la bomba
- Pistón
- Válvulas de retención
- Líneas de solvente
- Líneas de sparge
- Líneas de helio
- Líneas de salida

El control de la fase móvil se realiza mediante la programación de la composición de la fase móvil y el control de la presión de la fase móvil.

CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTAL (EAG WATERS)

SISTEMA
PROGRAMACIÓN DE EJECUCIONES (E) 816 WATERS

DETECTOR POR
ANÁLISIS DE OXÍGENO (O) 996 WATERS

ALTERNATIVAS/ACCESORIOS
737 PLUS WATERS

MEMORIA PRINCIPAL

AYUDA **SALIDA**

Reserva de solventes	4 x 100 ml
Reserva de Oxígeno	1 litro
Rango Programable del flujo	0.100 a 1.000 ml/min (por cámara de flujo)
Rango Común de Operación del flujo	0.200 a 0.600 ml/min (por cámara de flujo)
Volumen del solvente con el sistema	4.700 ml
Rango de Composición	0.100 a 1.000 (por cámara de flujo)
Dispersión de solventes	Burbujas de helio, selección y rango programable del solvente, a una velocidad de flujo de 0.100 ml/min, se incrementa de 3.000 ml/min.
Prueba de repetición	0.100 ml (0.200 ml)
Estabilidad de la presión	± 0.015, escala completa para una bomba que fluctúa a 1.000 ml/min.

CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTAL (EAG WATERS)

SISTEMA
PROGRAMACIÓN DE EJECUCIONES (E) 816 WATERS

DETECTOR POR
ANÁLISIS DE OXÍGENO (O) 996 WATERS

ALTERNATIVAS/ACCESORIOS
737 PLUS WATERS

MEMORIA PRINCIPAL

AYUDA **SALIDA**

Flujo de helio del sparge	Controlado por el sistema de control de flujo de fase móvil.
Flujo de solvente	Controlado por el sistema de control de flujo de fase móvil.
Composición de la fase móvil	Controlada por el sistema de control de flujo de fase móvil.
Rango Común del flujo	0.100 a 1.000 ml/min
Flujo de helio	Controlado por el sistema de control de flujo de fase móvil.
Flujo de solvente	Controlado por el sistema de control de flujo de fase móvil.
Rango de Composición	Controlado por el sistema de control de flujo de fase móvil.
Reserva de solventes	4 x 100 ml
Reserva de Oxígeno	1 litro
Dispersión de solventes	Burbujas de helio, selección y rango programable del solvente, a una velocidad de flujo de 0.100 ml/min, se incrementa de 3.000 ml/min.

CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTAL ELAB WATER'S

SISTEMA COMPUTARIZADO DE EQUIPOS (ECL) ELAB WATER'S

DETECTOR POR ARRIBADO DE DIÓXIDO DE YODO (DIOX) 996 WATER'S

AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATER'S

MEMORIA PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

Velocidad de flujo de la bomba	3 l a 6000 µl
Punto Establecido del Límite de Flujo	0 a 9999 µl
Punto Establecido del Límite de Flujo de Flujo	0 a 9999 µl
Resolución Inyectada del Límite	0.01 µl/mín
Flujo de Flujo del Transductor	15.000
Velocidad de Flujo	0.5-99.5 VOLS. 0.3 VDC @ 0.1 µl
Salida del Transductor de Flujo	0.5-99.5 VOLS. 0.3 VDC @ 0.1 µl

Control general	Propiedades y Estructura para Operar
Límite Presetado	0 a 10000
Resolución	0.01 µl/mín

CONDICIONES	ESPECIFICACIONES DE LA VALVULA
Control General	Substrato de la valvula OPTION 51
Velocidad de Bombeo "Charge"	0 a 999 ml/mín
Resolución	0.01 ml/mín
Flujo de Líneas	0.1 ml/mín

CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTAL ELAB WATER'S

SISTEMA COMPUTARIZADO DE EQUIPOS (ECL) ELAB WATER'S

DETECTOR POR ARRIBADO DE DIÓXIDO DE YODO (DIOX) 996 WATER'S

AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATER'S

MEMORIA PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

El Controlador 600S Waters tiene un microprocesador integrado el cual es fundamental para impulsar y controlar una Unidad de Manejo de Flujo (FHM) via cable a una interfaz. El FHM es una bomba de alta presión que puede mezclar a 4 solventes a una presión baja. Actualmente el Controlador puede tener en su interfaz 2 modelos de Unidad de Manejo de Flujo. Los modelos que puede controlar son:

- Bomba 616 con una cabeza de 50 µl
- Bomba 626 con una cabeza de 50 µl

El Controlador 600S controla automáticamente el gradiente de los solventes en modo isocrático, la velocidad de flujo, el burbujeo de gas, el calentador de la columna de fase estacionaria, etc.

Consta de un tablero delantero y uno trasero, el primero está formado por una Pantalla de Cristal Líquido y un teclado digital, por medio de estos se puede controlar, programar, configurar, almacenar (tablas) etc. El segundo consta de puertos de comunicación y terminales de conexión para operar aparatos externos tales como, detector, bomba automuestreador y un sistema de datos.

CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTAL ELAB WATER'S

SISTEMA COMPUTARIZADO DE EQUIPOS (ECL) ELAB WATER'S

DETECTOR POR ARRIBADO DE DIÓXIDO DE YODO (DIOX) 996 WATER'S

AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATER'S

MEMORIA PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

TABLERO DEL ANTERO

Consta de:

- Un Interruptor On/Off
- Una Pantalla de Cristal Líquido
- Un Teclado Digital

CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTAL ELAB WATER'S

SISTEMA COMPUTARIZADO DE EQUIPOS (ECL) ELAB WATER'S

DETECTOR POR ARRIBADO DE DIÓXIDO DE YODO (DIOX) 996 WATER'S

AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATER'S

MEMORIA PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

TECLADO DIGITAL

Consta de las siguientes teclas:

- movimiento del cursor
- contraste
- entrada (Enter)
- Inicio (Home)
- borrado (Clear)

Además el teclado tiene dos secciones importantes:

- Teclas de función
- Teclas en pantalla

CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTAL ELAB WATER'S

SISTEMA COMPUTARIZADO DE EQUIPOS (ECL) ELAB WATER'S

DETECTOR POR ARRIBADO DE DIÓXIDO DE YODO (DIOX) 996 WATER'S

AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATER'S

MEMORIA PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

TRABAJERO TRASERO

El tablero trasero del Controlador 600S provee conexiones para controlar aparatos externos como bombas, inyectores, detectores, etc.

CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTAL ELAB WATER'S

SISTEMA COMPUTARIZADO DE EQUIPOS (ECL) ELAB WATER'S

DETECTOR POR ARRIBADO DE DIÓXIDO DE YODO (DIOX) 996 WATER'S

AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATER'S

MEMORIA PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

SCREW TERMINALS

Consta de las siguientes terminales:

- Pressure
- Inject
- IN Hold
- IN Switches S1 a S4
- MAux+12v

Estas terminales de conexión protegen en primer lugar la señal del cable analógico, como usar las señales de la salida analógicas PRESSURE ó CHART. Conecta estas terminales al chasis interno de la plancha metálica del Controlador 600S.

CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTAL ELAB WATER'S

SISTEMA COMPUTARIZADO DE EQUIPOS (ECL) ELAB WATER'S

DETECTOR POR ARRIBADO DE DIÓXIDO DE YODO (DIOX) 996 WATER'S

AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATER'S

MEMORIA PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

El Controlador 600S Waters puede configurarse como un Controlador Gradient ó como un Controlador PowerLine.

Como un Controlador Gradient, este puede operar como un instrumento independiente o como un instrumento dependiente controlado vía IEEE488. Como un instrumento independiente, el usuario controla el Sistema de Datos (MDS) por medio de la interfaz del usuario la cual consta de una Pantalla de Cristal Líquido (LCD) y un teclado digital.

Como un instrumento dependiente el usuario controla el Sistema de Datos por medio del Software Millennium 2010 ó por una Estación de Datos BMS600 Waters. El Controlador Gradient y el Controlador PowerLine permiten programar en modo isocrático y en gradiente de solventes.

Cuando el Controlador Gradient opera como un instrumento independiente la interfaz del usuario utiliza la organización y el control de la bomba junto con otros instrumentos conectados al IEEE488 bus. El software actual permite controlar los siguientes instrumentos vía IEEE488 bus:

- *Detector 410
- *Detector 431
- *Detector 404
- *Detector 486
- *Detector 490
- *Automuestreador 712
- *Automuestreador 716
- *Automuestreador 717
- *Disolutor 712

CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTAL ELAB WATER'S

SISTEMA COMPUTARIZADO DE EQUIPOS (ECL) ELAB WATER'S

DETECTOR POR ARRIBADO DE DIÓXIDO DE YODO (DIOX) 996 WATER'S

AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATER'S

MEMORIA PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

Se recomienda el uso del Controlador PowerLine cuando se quiera controlar los aparatos externos (tales como, detectores, automuestreadores e integradores) todos directamente desde la pantalla del Controlador 600S, de la pantalla del Detector ó del Automuestreador.

Si se desea controlar los aparatos (detectores, automuestreadores e integradores) desde un Sistema de Datos (Software Millennium 2010 ó 2030) se recomienda el uso del Controlador Gradient.

En este manual se maneja únicamente la configuración del Controlador 600S en modo Gradient usando así el Sistema de Datos Millennium 2010. Siendo esta configuración una de las más modernas y utilizadas por su gran versatilidad.

CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTO
CLAR WATER

<p>1. Inlet de 40 litros 2. Inlet de 20 litros 3. Inlet de 10 litros 4. Inlet de 5 litros 5. Inlet de 2.5 litros 6. Inlet de 1.25 litros 7. Inlet de 0.625 litros 8. Inlet de 0.3125 litros 9. Inlet de 0.15625 litros 10. Inlet de 0.078125 litros</p>	<p>1. Capacidad de 40 litros 2. Capacidad de 20 litros 3. Capacidad de 10 litros 4. Capacidad de 5 litros 5. Capacidad de 2.5 litros 6. Capacidad de 1.25 litros 7. Capacidad de 0.625 litros 8. Capacidad de 0.3125 litros 9. Capacidad de 0.15625 litros 10. Capacidad de 0.078125 litros</p>
---	---

SISTEMA OPERATIVO DE LIQUIDOS (L) 616 WATER

DETECTOR POR ARREGLO DE DIODOS 996 WATER

AMPLIFICADOR 717 PUL WATER

PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTO
CLAR WATER

CONDICIONES	ESPECIFICACIONES
1. Temperatura de Operación	1. Temperatura de Operación: 10°C a 30°C
2. Humedad Relativa	2. Humedad Relativa: 20% a 80%
3. Fuente de Alimentación	3. Fuente de Alimentación: 220V AC, 50/60 Hz
4. Consumo de Energía	4. Consumo de Energía: 100W
5. Dimensiones	5. Dimensiones: 400mm x 300mm x 150mm
6. Peso	6. Peso: 10kg
7. Vida Útil	7. Vida Útil: 10 años
8. Garantía	8. Garantía: 1 año
9. Mantenimiento	9. Mantenimiento: Fácil
10. Seguridad	10. Seguridad: Protección contra sobrecalentamiento

SISTEMA OPERATIVO DE LIQUIDOS (L) 616 WATER

DETECTOR POR ARREGLO DE DIODOS 996 WATER

AMPLIFICADOR 717 PUL WATER

PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTO
CLAR WATER

CONDICIONES	ESPECIFICACIONES
1. Temperatura de Operación	1. Temperatura de Operación: 10°C a 30°C
2. Humedad Relativa	2. Humedad Relativa: 20% a 80%
3. Fuente de Alimentación	3. Fuente de Alimentación: 220V AC, 50/60 Hz
4. Consumo de Energía	4. Consumo de Energía: 100W
5. Dimensiones	5. Dimensiones: 400mm x 300mm x 150mm
6. Peso	6. Peso: 10kg
7. Vida Útil	7. Vida Útil: 10 años
8. Garantía	8. Garantía: 1 año
9. Mantenimiento	9. Mantenimiento: Fácil
10. Seguridad	10. Seguridad: Protección contra sobrecalentamiento

SISTEMA OPERATIVO DE LIQUIDOS (L) 616 WATER

DETECTOR POR ARREGLO DE DIODOS 996 WATER

AMPLIFICADOR 717 PUL WATER

PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTO
CLAR WATER

CONDICIONES	ESPECIFICACIONES
1. Temperatura de Operación	1. Temperatura de Operación: 10°C a 30°C
2. Humedad Relativa	2. Humedad Relativa: 20% a 80%
3. Fuente de Alimentación	3. Fuente de Alimentación: 220V AC, 50/60 Hz
4. Consumo de Energía	4. Consumo de Energía: 100W
5. Dimensiones	5. Dimensiones: 400mm x 300mm x 150mm
6. Peso	6. Peso: 10kg
7. Vida Útil	7. Vida Útil: 10 años
8. Garantía	8. Garantía: 1 año
9. Mantenimiento	9. Mantenimiento: Fácil
10. Seguridad	10. Seguridad: Protección contra sobrecalentamiento

SISTEMA OPERATIVO DE LIQUIDOS (L) 616 WATER

DETECTOR POR ARREGLO DE DIODOS 996 WATER

AMPLIFICADOR 717 PUL WATER

PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTO
CLAR WATER

CONDICIONES	ESPECIFICACIONES
1. Temperatura de Operación	1. Temperatura de Operación: 10°C a 30°C
2. Humedad Relativa	2. Humedad Relativa: 20% a 80%
3. Fuente de Alimentación	3. Fuente de Alimentación: 220V AC, 50/60 Hz
4. Consumo de Energía	4. Consumo de Energía: 100W
5. Dimensiones	5. Dimensiones: 400mm x 300mm x 150mm
6. Peso	6. Peso: 10kg
7. Vida Útil	7. Vida Útil: 10 años
8. Garantía	8. Garantía: 1 año
9. Mantenimiento	9. Mantenimiento: Fácil
10. Seguridad	10. Seguridad: Protección contra sobrecalentamiento

SISTEMA OPERATIVO DE LIQUIDOS (L) 616 WATER

DETECTOR POR ARREGLO DE DIODOS 996 WATER

AMPLIFICADOR 717 PUL WATER

PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTO
CLAR WATER

CONDICIONES	ESPECIFICACIONES
1. Temperatura de Operación	1. Temperatura de Operación: 10°C a 30°C
2. Humedad Relativa	2. Humedad Relativa: 20% a 80%
3. Fuente de Alimentación	3. Fuente de Alimentación: 220V AC, 50/60 Hz
4. Consumo de Energía	4. Consumo de Energía: 100W
5. Dimensiones	5. Dimensiones: 400mm x 300mm x 150mm
6. Peso	6. Peso: 10kg
7. Vida Útil	7. Vida Útil: 10 años
8. Garantía	8. Garantía: 1 año
9. Mantenimiento	9. Mantenimiento: Fácil
10. Seguridad	10. Seguridad: Protección contra sobrecalentamiento

SISTEMA OPERATIVO DE LIQUIDOS (L) 616 WATER

DETECTOR POR ARREGLO DE DIODOS 996 WATER

AMPLIFICADOR 717 PUL WATER

PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTO
CLAR WATER

El Detector por Arreglo de Diodos (996) Water a también conocido como de Foto diodo, es un detector UV-VIS de longitud de onda variable. Este emplea una lámpara de emisión continua de Deuterio, es una opción que consiste de un arreglo de 812 diodos con un rango de longitud de onda de 190-900 nanómetros y al escape de un Extracto que invierte de la celda de flujo mandone la mejor resolución óptica 1.2 nm y la máxima sensibilidad cromatográfica.

Como opción de 812 diodos y rubros de control avanzado, como el programa de optimización de la energía de la lámpara, se logran excelentes resultados en el análisis de muestras. Posee buena sensibilidad y rango lineal y permite detectar análisis en el orden de los nanogramos. Tiene una red de detección que permite seleccionar la longitud de onda de trabajo, de esta manera se puede escoger la longitud de onda óptima para el análisis.

El Detector por Arreglo de Diodos (996) Water funciona mediante un diseño de doble haz de alta energía acoplado a un haz de flujo de flujo dispersión sobre un sistema óptico invertido, el haz de flujo con luz blanca, es decir no monocromática y la luz emitida por la celda de flujo a la red de detección y allí es dispersada hacia el elemento fotosensible. Se muestra un conjunto de fotocélulas o fotodiodos montados en un chip de silicio. De esta forma se consigue medir no solo la luz transmitida a una longitud de onda sino todo el espectro de absorción del eluico en tiempo real.

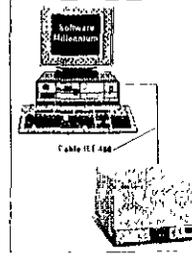
PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTO
CLAR WATER

El sistema del Detector está configurado a una computadora en una plataforma en ambiente Windows. PDA 996 proporciona un avance en la adquisición de datos y en el análisis como una opción integrada a la Cromatografía de Líquidos en un Software Millennium. El detector PDA Millennium consiste de una interfase de comunicación IEEE 488, y una computadora.

El Detector 996 utiliza en el tratamiento de la información generada el software Millennium 2010 el cual logra la información espacial y cromatográfica en la misma rutina de trabajo de forma que le permite visualizar simultáneamente todos los resultados obtenidos en el análisis de una muestra cantidad de cada compuesto homogeneidad de cada pico cromatográfico y respectivos analitos encontrados en las librerías espectrales del programa.



PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTAL CLAR WATER

El Detector consta de un panel delantero y un tablero trasero

El delantero esta conformado por un indicador de la lámpara un indicador status un interruptor On/Off, una entrada para conectar la columna y una línea para la salida del solvente que se dirige a un colector de fracciones

SISTEMA OPERACIONAL DE LIQUIDOS (L)
916 WATERS

DETECTOR POR ARRIBA DE DIODOS
996 WATERS

AUTOMUESTREADOR
717 PULS WATERS

MANIPULACION

AYUDA SALIDA

CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTAL CLAR WATER

SISTEMA OPERACIONAL DE LIQUIDOS (L)
916 WATERS

DETECTOR POR ARRIBA DE DIODOS
996 WATERS

AUTOMUESTREADOR
717 PULS WATERS

MANIPULACION

AYUDA SALIDA

TABLERO TRASERO

El tablero trasero del detector 996 consta de:

- Enchufe para cable de energía
- Conexión del cable IEEE 488
- Interruptor de dirección IEEE 488
- Dos tres terminales

Una puede manejar dos terminales Analog Out (salidas analógicas) para conectar integradores registradores gráficos, y otros componentes del sistema cromatográfico

La otra tira cuenta con cuatro conexiones Event, dos input (inicio inyección) y dos output (tablas de evento programable)

CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTAL CLAR WATER

SISTEMA OPERACIONAL DE LIQUIDOS (L)
916 WATERS

DETECTOR POR ARRIBA DE DIODOS
996 WATERS

AUTOMUESTREADOR
717 PULS WATERS

MANIPULACION

AYUDA SALIDA

Tira Terminal

Especificaciones de las terminales Event Input

- TTL o cierre del interruptor
- Protegido a +50V
- Disparador bajo +18 V
- Disparador bajo -30 V
- Corriente máxima -5 miliamperios
- Pulso mínimo -30 milisegundos

Especificaciones de las terminales Event Output

- Cierre de Contacto
- Energía máxima 10 watts
- Corriente máxima 0.6 amperios a 20V
- Voltaje máximo 24 V RMS

CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTAL CLAR WATER

SISTEMA OPERACIONAL DE LIQUIDOS (L)
916 WATERS

DETECTOR POR ARRIBA DE DIODOS
996 WATERS

AUTOMUESTREADOR
717 PULS WATERS

MANIPULACION

AYUDA SALIDA

La utilización del Detector 996, permite obtener en cada análisis la información cuantitativa cromatográfica y el espectro de absorbancia de cada punto del cromatograma. Los espectros de absorbancia dan información cualitativa sobre los componentes analizados

- Permite verificar la homogeneidad del proceso cromatográfico y detectar condiciones
- Permite identificar los componentes por comparación del espectro en el máximo de cada pico con una biblioteca de espectros
- El Detector de Arreglo de Diodos 996 ofrece la máxima sensibilidad con la mejor resolución óptica
- El Detector permite obtener simultáneamente Cromatogramas con sensibilidad suficiente y espectros de canales

CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTAL CLAR WATER

SISTEMA OPERACIONAL DE LIQUIDOS (L)
916 WATERS

DETECTOR POR ARRIBA DE DIODOS
996 WATERS

AUTOMUESTREADOR
717 PULS WATERS

MANIPULACION

AYUDA SALIDA

Rango de Longitud de Onda	190-800 nm
Punto de Corte	210 nm
Resolución espectral	1.2 nm por intervalo 0.12 nm
Exposición de la longitud de onda	1.5 nm
Rango de Longitud de Onda	18 nm de 4.1 a 2.0 AU
Radio de la Lente	1.5 x 1.5 cm plano convexo de Au, agua
Temperatura	1.5 - 10.0 grados a 2.0 AU
Configuración del Rango de Longitud de Onda	0.012 a 0.015 nm en pasos de 0.001 nm
Configuración del Rango de Frecuencia	0 a 2.14 x 10^14 Hz en pasos de 0.001 Hz
Radio de la Celda de Agua	Controlado por software
Longitud de la Lente	Controlado por software
Volumen de la Celda	30 mm por 4 mm óptica plana
Límite de la celda	3.54, 3.54, 3.54 mm
Código de Fuente	1000 por (cada canal) óptica plana
	Serie preparativa: Quartz, Quartz, y sílice
	250 y 750 LPS, Microport

CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTAL CLAR WATER

SISTEMA OPERACIONAL DE LIQUIDOS (L)
916 WATERS

DETECTOR POR ARRIBA DE DIODOS
996 WATERS

AUTOMUESTREADOR
717 PULS WATERS

MANIPULACION

AYUDA SALIDA

Wavelength	190 - 800 nm
Resolution	1.2 nm per interval 0.12 nm
Exposure	1.5 nm
Wavelength Range	18 nm from 4.1 to 2.0 AU
Cell Volume	30 mm x 4 mm optical flat
Cell Limit	3.54, 3.54, 3.54 mm
Source Code	1000 per (each channel) optical flat
	Series preparative: Quartz, Quartz, and silica
	250 and 750 LPS, Microport

CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTAL CLAR WATER

SISTEMA OPERACIONAL DE LIQUIDOS (L)
916 WATERS

DETECTOR POR ARRIBA DE DIODOS
996 WATERS

AUTOMUESTREADOR
717 PULS WATERS

MANIPULACION

AYUDA SALIDA

El automuestreador 717 Water es un microprocesador electrónico que controla de manera automática al módulo de inyección de muestras capaz de tener un funcionamiento continuo de forma desatendida. El automuestreador es totalmente automatizado, cambia la automatización, la facilidad de uso, la estabilidad, y es sumamente preciso, es versátil en una gran variedad de métodos

Puede usarse en ambas posiciones como una unidad independiente o como un componente IEEE 488 basado en el sistema CLAR. El automuestreador puede ser controlado por el Controlador PowerLine del Sistema Waters o por una Estación de Datos (Millenium). También tiene una línea de comunicación RS232 para enviar datos a un integrador tal como el Waters 746

Consta de un módulo opcional WaterCooler, que puede conseguirse como un kit e instalarse fácilmente. El WaterCooler puede mantener la muestra en un compartimento a una temperatura constante entre el rango de 4°C a 40°C

CARACTERÍSTICAS DEL INSTRUMENTAL CLAR WATER

SISTEMA OPERACIONAL DE LIQUIDOS (L)
916 WATERS

DETECTOR POR ARRIBA DE DIODOS
996 WATERS

AUTOMUESTREADOR
717 PULS WATERS

MANIPULACION

AYUDA SALIDA

El Automuestreador posee una gran capacidad para la preparación previa de las muestras. Este modelo presenta un diseño sencillo e inteligente permitiendo una operación fiable y libre de errores

Las inyecciones son de volumen variable lo que permite tener una gran flexibilidad en los análisis en relación con el tamaño de la muestra, además de mantener una gran reproducibilidad

Las secuencias automáticas totalmente programables permiten la preparación e inyección de muestras de forma desatendida

El Automuestreador 717 contiene un carrusel de 99 vials. El carrusel es de color gris, este carrusel puede usarse en otros Automuestreadores Waters pero no se pueden usar los carruseles de color blanco o castaño en el Automuestreador 717

El Automuestreador consta de un tablero delantero y un tablero trasero. El primero tiene una Pantalla de Cristal Líquido y un Teclado Digital el segundo tiene terminales IEEE 488, RS232, etc

El tablero delantero consta de:

- Una Pantalla de Cristal Líquido
- Un Teclado digital
- Un Interruptor On/Off

El tablero trasero consta de una tira terminal:

- Terminales de entrada
- Termostata de agua
- Terminales INJECT START
- Terminales HOLD
- Terminales End Run
- Una terminal RS232
- Una terminal IEEE 488

PRECONDICIONADO PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAR

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

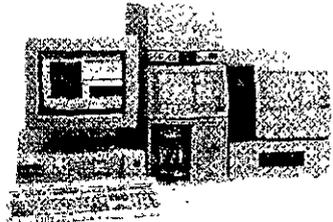
MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

MANEJO PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

Te recomiendo que visites el libro Características del Instrumental CLAR Waters antes de continuar con este libro



PRECONDICIONADO PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAR

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

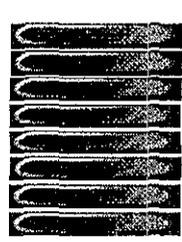
MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

MANEJO PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

PRECONDICIONADO PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAR

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

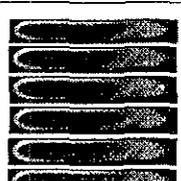
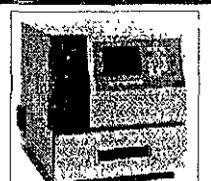
MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

MANEJO PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS

PRECONDICIONADO PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAR

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS

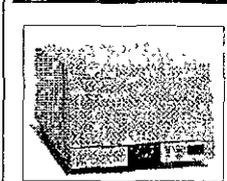
MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

MANEJO PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS





PRECONDICIONADO PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAR

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

ENCENDIDO Y APAGADO DEL SISTEMA LC 616

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

MANEJO PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

Encendido del Sistema LC 616, cuando se activa un sistema de datos (Millennium 2 10)

Al encender el sistema, el Controlador 600S debe estar configurado como un controlador Gradient y no como un controlador PowerLine

Para empezar

Encienda todos los aparatos conectados al Millennium 2 10 (Sistema LC 616, Automuestreador y Detector) antes de encender la computadora

Espera un momento para que las pruebas diagnóstico internas de cada módulo se ejecuten. Estas pruebas aseguran que cada módulo sea funcional y sirven para detectar errores

Realiza los siguientes pasos para encender el sistema

- 1 Enciende primero el Sistema LC 616 (Bomba y Controlador), para establecer el flujo del solvente antes de encender el automuestreador y el detector
- 2 Presta atención al interruptor On/Off sobre el panel delantero del controlador 600S en la posición I (ON)
- 3 El encendido del controlador muestra en la pantalla la condición diagnóstica, la configuración del Controlador (Gradient o PowerLine) y el número de la versión del software
- 4 Durante el encendido el Controlador automáticamente corre rutinas de auto-diagnóstico y después se muestra el encendido de la pantalla

PRECONDICIONADO PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAR

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

ENCENDIDO Y APAGADO DEL SISTEMA LC 616

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

MANEJO PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

Las rutinas de auto diagnóstico son

- Prueba del teclado
- Prueba del LCD
- Prueba de la entrada Stop Flow
- Prueba del inyector externo
- Prueba de las salidas Switches y Hold
- Prueba Chart
- Prueba de la Válvula Spurge
- Prueba de la bomba y de las válvulas de solventes
- Prueba del IEEE
- Prueba del RS-232
- Prueba de fallo 12V

Si falla alguna prueba diagnóstica, aparecerá un mensaje de fallo mostrando los datos erróneos.

6 Si ocurre algún incidente, apaga el equipo y vuelve a encenderlo. Si el diagnóstico falla una segunda vez entra en contacto con el servicio técnico de Waters

Además del encendido auto diagnóstico el sistema LC 616 contiene rutinas de diagnóstico extendidos

7 Para iniciar el diagnóstico extendido, presiona la tecla punto decimal (/) de la pantalla de encendido

PRECONDICIONADO PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAR

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

ENCENDIDO Y APAGADO DEL SISTEMA LC 616

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

MANEJO PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

Si no planes usar el sistema cromatográfico 616 por un largo periodo apágalo

Antes de que apagues el sistema, toma las siguientes precauciones

- No dejes buffers en las líneas de fluido mientras el sistema no este en uso
- Lava las líneas con agua de alta pureza previamente filtrada seguida por una solución 10% metanol. Quita la columna si es incompatible con esta solución.
- El dejar agua o buffers en las líneas de fluido mientras el sistema no este en uso permite el crecimiento microbiano
- Apaga el sistema presionando el interruptor en la posición O (Off) sobre el panel delantero del Controlador

En la siguiente página aparece simulada la pantalla del controlador para que enciendas el sistema teniendo acceso a todas las pantallas presionando las teclas correspondientes y corras el diagnóstico extendido de acuerdo a los pasos ya descritos

PRECONDICIONADO PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAR

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

ENCENDIDO Y APAGADO DEL SISTEMA LC 616

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS

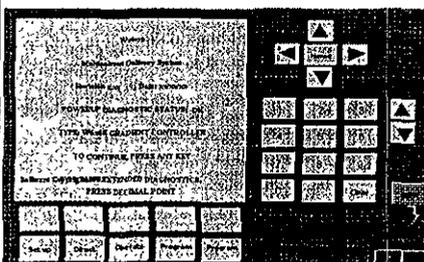
MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

MANEJO PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

ENCENDIDO Y APAGADO DEL SISTEMA LC 616



MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS DESGASIFICAR SOLVENTES

LC 616 usa un sistema de burbujeo de helio para desgaseificar los depósitos de los solventes a una velocidad de flujo entre 0 y 100 ml/min.

Antes de que comience a burbujear le recomendamos que filtre el vacío si fase móvil que va a emplear.

Desgasificar los Solventes Involucra

- Preparar el burbujeo
- Stabilizar el burbujeo
- Burbujear

Desgasificar Cuando

- No se hayan burbujeado los depósitos por más de ocho horas
- Se agreguen solventes nuevos al sistema

Pasos para Preparar el Burbujeo

- Ajuste el tanque de helio a una presión entre 60 y 90 psi (3.5 a 6.3 kg/cm²).
- Confirme que la tubería del solvente esté adecuadamente ensamblada y conectada para el burbujeo.
- Presione la tecla Set up del controlador; aparecerá la pantalla Pump Setup.

Pasos para Habilitar el Burbujeo

- Mueva el cursor al campo MESSROCK en SPARK para el primer depósito que contiene los solventes (A, B o C).

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS DESGASIFICAR SOLVENTES

Con la finalidad de mantener el funcionamiento de la bomba e impedir la acumulación de aire disuelto en el solvente.

Se recomienda usar los siguientes tiempos para burbujear helio en los diferentes tipos de fase móvil:

- +10 a 15 minutos para fases móviles acuosas
- +20 a 30 minutos para fases móviles acuosas y acetonitrilo
- +60 minutos para fases móviles acuosas y metanol

Pasos para Habilitar el Burbujeo

- Presione la función de la tecla Direct aparecerá la pantalla Isoocratic.
- Determina la velocidad de flujo del burbujeo
- Mueve el cursor al campo SPARK
- Escribe 100 y presiona Enter para fijar inicialmente la velocidad de flujo de 100ml/min. El flujo del que comenzará en todos los depósitos.
- Mantén el flujo de helio a 100ml/min por un mínimo de 15 minutos repite el paso 8 y reduce el flujo a 30ml/min

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS DESGASIFICAR SOLVENTES

Pasos para Desgasificar los Solventes

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS CONECTAR LA COLUMNA

Conectar la columna o el cartucho

Para conectar la columna se tiene dos opciones:

- Puede conectarse colocándola dentro del cajón que se encuentra en el panel delantero de la bomba. Esta puede estar sola o junto con un calentador de columna.
- Puede conectarse colocando uniones sin necesidad de meterla en el cajón de la bomba, lo cual hace viable a la columna durante las jornadas de trabajo.

De acuerdo a la primer opción abra el cajón que se encuentra en el panel delantero de la bomba 616, esto coloca la columna dentro de la bomba de tal manera que no sea visible durante el análisis.

La columna y el cartucho pueden colocarse dentro de la bomba de acuerdo a las siguientes opciones de instalación:

- Columna sola (hasta 30 cm de largo)
- Calentador de la columna con columna (hasta 30 cm de largo)
- RCM™ 6 o 10 cartucho de condensación radial y cartucho Radial Pak

Instalando la Columna Sola

Para instalar una columna en la bomba 616:

- Gira el picaporte que se encuentra en el panel frontal de la bomba y jalá arrastrando el cajón hacia fuera.

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS CONECTAR LA COLUMNA

- Desconecte la tubería. El cajón no se extenderá totalmente si no desconecta la tubería.
- Coloca la columna en la bandeja tratando que la flecha que se encuentra en la etiqueta de la columna apunte hacia el sentido del flujo frente del cajón. Permite que la columna quede dentro del cajón.
- Conecta la tubería de entrada y de salida a la columna. Sigue las instrucciones de la columna para la dirección del flujo.
- Entrada de la columna. Conecta la tubería de 0.009 pulgadas de Diámetro Interno (DI) del automuestreador a la entrada de la columna en la parte de atrás del cajón.
- Salida de la columna. Conecta un pedazo de tubería de 0.009 pulgadas DI a la salida de la columna en el frente del cajón.
- Passa la tubería de salida de la columna a través del corte del cajón de la bomba en el tablero delantero. Usa tubería lo más corta posible de 0.009 pulgadas DI para conectar la salida de la columna a la entrada de la celda del detector.
- Verifica que no haya escapes cuando se bombea solvente a través de la columna. Asegure que no haya ninguna fuga en las conexiones de entrada o de salida.
- Verifica que no haya escapes cuando se bombea solvente a través de la columna. Asegure que no haya ninguna fuga en las conexiones de entrada o de salida.
- Reemplaza las tapas del calentador de la columna.

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS CONECTAR LA COLUMNA

Instalado el Calentador de Columna

- Gira el picaporte del frente de la bomba y jalá arrastrando el cajón hacia fuera.
- Jala el cajón hacia ti y localiza el receptáculo señalado en la parte de atrás del cajón. Tapa el cable del receptáculo señalado en el lado derecho del cajón. El receptáculo se codifica para asegurar que quede correctamente alineado.
- Levanta la tapa del calentador de la columna. Coloca la columna (de 8 mm DI por 30 cm de largo) en el canal central de la bandeja del calentador señalando la etiqueta de columna hacia el frente del cajón.
- Conecta la tubería de entrada y salida a la columna. Sigue las instrucciones de la columna para la dirección del flujo.
- Entrada de la columna. Passa un pedazo de tubería de 0.009 pulgadas DI desde el automuestreador a través del puerto derecho del calentador de la columna y conecta la columna.
- Salida de la columna. Passa un pedazo de tubería de 0.009 pulgadas DI a través del puerto izquierdo desde el calentador de la columna y conecta la columna.

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS CONECTAR LA COLUMNA

- Coloca el calentador de la columna en el cajón de la bombacón la tubería de entrada y salida de la columna hacia el frente del cajón. Permite que el calentador de la columna quede completamente dentro.
- Verifica que no haya escapes cuando se bombea solvente a través de la columna. Asegure que no haya ninguna fuga en las conexiones de entrada o de salida.
- Reemplaza las tapas del calentador de la columna.
- Passa la tubería de salida de la columna a través del corte del cajón de la bomba en el tablero delantero. Usa tubería lo más corta posible de 0.009 pulgadas DI para conectar la salida de la columna a la entrada de la celda del detector.

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

Para establecer el sistema cromatográfico se deben colocar los siguientes parámetros iniciales sobre la pantalla Isoocratic:

- Velocidad de flujo
- Composición del solvente
- Clasificación del Burbujeo
- Sensibilidad

Establecer cuando:

- El sistema se enciende por primera vez
- Se agreguen solventes nuevos al sistema
- Se cambien solventes
- Se cambie la composición de los solventes
- Después de un periodo inactivo

Cuando se usa un Sistema de Datos Millennium 2010 necesitará encender la computadora para establecer el sistema. Millennium determinará si el sistema se encuentra en línea base esto indica que está estable y listo para las inyecciones.

Cuando establece el sistema toma en cuenta las siguientes indicaciones:

- Mantén suficiente solvente en la fase móvil y en el depósito de lavado del pistón para asegurar que los depósitos no se sequen mientras se este operando
- Estabiliza el sistema con solventes a temperatura ambiente

Pasos para Establecer el Sistema

- Presiona la tecla Direct para acceder a la pantalla Isoocratic
- Para determinar la velocidad de burbujeo mueve el cursor al campo SPARK
- Escribe la velocidad de burbujeo (30ml/min) y presiona Enter

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

PROCESAMIENTO PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAR

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 17 PLUS WATERS

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

MANEJO PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

4. Fija la composición inicial del solvente

5. Mueve el cursor al campo new %A, escribe la composición del %A (0 a 100 sin decimales, en incrementos de 1%) y presiona Enter

6. Repite el paso 6 para los depósitos B, C y D. La suma de la composición de los cuatro % deben ser igual a 100% (por ejemplo 20%A, 20%B, 20%C y 20%D). La composición de los solventes depende del método analítico que estás utilizando

El sistema implementa los cambios después de escribir la composición del último reservorio (D), al presionar Enter

7. Mueve el cursor al campo flow rate y escribe la velocidad de flujo deseada en incremento de 1ml/min. Verifica que la variación de la presión no excede del 5 10%

A velocidades de flujo mayores de 5 ml/min ocasionan un paro de la bomba a causa de una alta presión generada en la tubería del sistema. NOTA VISCOSIDAD

Algunas columnas requieren un flujo mayor de 5 ml/min

Una vez que metiste el valor de la velocidad de flujo deseado, la bomba inmediatamente comienza a operar al nuevo flujo y a las condiciones de composición del solvente

Una vez realizada la estabilización del sistema está listo para inyectar las muestras

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

PROCESAMIENTO PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAR

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 17 PLUS WATERS

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

MANEJO PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 17 PLUS WATERS

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

MANEJO PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

Pasos para Estabilizar el Sistema

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

PROCESAMIENTO PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAR

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 17 PLUS WATERS

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

MANEJO PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

CONFIGURAR UNA CORRIENTE

El Sistema LC 616 puede configurarse para programar y ejecutar corrientes cromatográficas, tanto en la modalidad isocrática como en la modalidad gradiente

Estos métodos pueden ser programados y ajustados también, directamente desde el software Millennium 2010 o 3010

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

PROCESAMIENTO PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAR

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 17 PLUS WATERS

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

MANEJO PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

CONFIGURAR UNA CORRIENTE

En esta modalidad las condiciones experimentales permanecen constantes durante el proceso cromatográfico. El sistema isocrático hace que la bomba mantenga constantes la composición de la fase móvil durante el análisis. En esta alternativa es preciso seleccionar la naturaleza de la fase móvil, el tipo de columna, la forma de inyección según las características de la muestra

La operación en isocrático no permite cambiar la velocidad de flujo después de un tiempo transcurrido o la composición del solvente, así como otras condiciones dependientes del tiempo. Para cambiar la velocidad de flujo, la composición del solvente o las condiciones del rendimiento, se deben programar mutuamente los nuevos valores para no tomar en cuenta los parámetros de la configuración original. El sistema LC 616 aplica los cambios inmediatamente

Para configurar una corriente cromatográfica en modo isocrático debes de acceder a la pantalla Isocratic del Controlador, en la cual debes de:

- Establecer las condiciones de la corrida (velocidad de flujo, composición del solvente, velocidad de burbujeo, temperatura del calentador de columna opcional)
- Determinar el tiempo de la corrida
- Estabilizar el sistema
- Iniciar la corrida

En el siguiente diagrama se ilustran los pasos que involucra usar la pantalla Isocratic para configurar una

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

PROCESAMIENTO PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAR

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 17 PLUS WATERS

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

MANEJO PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

CONFIGURAR UNA CORRIENTE

Pasos para Configurar una Corriente

- Para acceder a la pantalla isocrática, presiona la tecla Direct sobre el panel delantero del Controlador
- En esta pantalla puedes hacer cambios en los parámetros originales de la bomba

Flujo de los Solventes

- Uno de estos parámetros es la velocidad de flujo, para colocar la velocidad de flujo, al es necesario mueve el cursor al campo flow
- Escribe la velocidad de flujo del solvente en el campo flow rate entre (0.00 a 5.00 ml/min) y presiona Enter

Composición de los Solventes

- Para seleccionar la composición de los solventes mueve el cursor al campo new %A

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

PROCESAMIENTO PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAR

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 17 PLUS WATERS

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

MANEJO PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

CONFIGURAR UNA CORRIENTE

MIRA LA LÍNEA CORRIENTE LÍNEA LA COMPOSICIÓN ACTUAL DEL SOLVENTE. EL SISTEMA COPIA LOS VALORES DE LA LÍNEA FLECHA CUANDO LLEGAS AL CÍRCULO EN LA LÍNEA NEW

- Escribe la composición % para la fase móvil (0 a 100, no decimales, en incrementos de 1%) para el reservorio del solvente A. Presiona Enter
- Repite los pasos 6 y 5 para los tres reservorios restantes. La suma de los cuatro registros debe ser igual a 100%
- Después de que registras la composición del solvente O, el sistema aplica el cambio de composición para todos los solventes cuando presionas Enter. La línea Corriente refleja la nueva composición del solvente
- Para determinar la velocidad del burbujeo mueve el cursor al campo SPARGE
- Escribe la velocidad del burbujeo (0 a 1000ml/min) y presiona Enter
- La velocidad del burbujeo se aplica para todos los reservorios, usa inicialmente una velocidad alta 100ml/min y después reducirla a una velocidad baja 30 ml/min. La velocidad de burbujeo que usas depende de tus requerimientos analíticos
- Si cuentas con un calentador de columna en tu equipo, este te permitirá mantener y controlar la temperatura de operación de la columna
- Para colocar el valor de la temperatura mueve el cursor al campo HOTT SETPOINT, escribe la temperatura apropiada de acuerdo a tu método analítico. Los valores

Flujo del Burbujeo

- Para determinar la velocidad del burbujeo mueve el cursor al campo SPARGE

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

PROCESAMIENTO PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAR

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 17 PLUS WATERS

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

MANEJO PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

CONFIGURAR UNA CORRIENTE

Si no cuentas con un calentador de columna instalado en tu sistema LC 616, el campo HOTT SETPOINT, mostrará un valor N/A

Estabilizar el Sistema

Para estabilizar el sistema (ver tema Estabilizar el Sistema)

Después de la Muestra

Para inyectar o iniciar una corrida con el Automuestreador 1717 Plus Waters

- Coloca los vials con la muestra en el carrusel del automuestreador
- Programa e inicia la corrida con el automuestreador (ver tema Ejecutar una Corriente)

En el modo isocrático, no hay corridas cronometradas y ningún cambio en la composición del solvente. La corrida es continua hasta que decidas parar la

14. Para parar la bomba presiona la tecla Stop Flow o escribe 0.0 en el campo Stop Flow y presiona Enter

15. Para reanudar el flujo después de que habes parado la bomba, escribe el valor deseado de la velocidad de flujo en el campo flow rate y presiona Enter

Estas acciones no afectan la composición de los porcentajes

En la siguiente página aparece la pantalla del controlador, para que puedas seguir los pasos ya descritos

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

PROCESAMIENTO PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAR

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 17 PLUS WATERS

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

MANEJO PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS

CONFIGURAR UNA CORRIENTE

Pasos para Configurar una Corriente Cromatográfica

- Para acceder a la pantalla isocrática presiona la tecla Direct sobre el panel delantero del Controlador

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS
CONFIGURAR UNA CORRIDA

En esta modalidad durante el proceso de separación cromatográfica se varía de manera gradual y estrictamente controlada la composición de la fase móvil durante el análisis. La evolución de la fase móvil con el tiempo puede ser lineal, cóncava convexa y por etapas. Los cromatogramas mejoran sustancialmente respecto a la modalidad isocrática.

En esta modalidad se describe como crear tablas tiempo-basa, tablas de gradiente y de sucesos para operaciones analíticas prolongadas, donde se requiere programar el sistema para una operación desatendida.

Las tablas de gradiente controlan la Bomba 616, las tablas de suceso controlan aparatos externos conectados al Controlador 600S (Automuestreador, Detector, etc). Cada tabla tiempo-basa tiene un número con el cual puede ser identificada.

Para llamar una tabla programada en el sistema se debe ejecutar el número con el que fue asignada.

El Sistema LC 616 puede almacenar hasta 16 conjuntos de tablas que le permitan:

- Crear una serie de muestras
- Implementar el flujo y la composición en el gradiente de solventes
- Activar y desactivar aparatos externos

Una vez que has creado cualquiera de estas tablas, puedes correrlas en la modalidad gradiente.

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS
CONFIGURAR UNA CORRIDA

Crear una Tabla de Gradiente

Para empezar, primero debes definir que información es la que quieres meter en una tabla de gradiente antes de que la programes. Esto te ayudará a minimizar la necesidad de programar tablas posteriores.

Con el fin de ayudarte a definir y documentar la información que deseas acceder a una tabla de gradiente, se te proporciona un plan de análisis y una hoja de archivo.

Sobre cada línea del plan de análisis y hoja de archivo, debes escribir:

- Si el tiempo de cada gradiente (el tiempo es acumulativo desde la inyección)
- La velocidad de flujo
- La composición del solvente
- El perfil de gradiente (curva cóncava convexa lineal)

Cada tabla de gradiente puede contener hasta 15 líneas. Puedes crear una tabla de gradiente para incluir parámetros de la bomba en un método isocrático pero esta tabla sólo consiste de una línea para programarla.

Cuando los registros de la tabla estén completos mantén el plan de análisis y la hoja de archivo como un registro permanente en la tabla.

En el siguiente diagrama de flujo se muestran los pasos que se requieren para crear una tabla de gradiente.

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS
CONFIGURAR UNA CORRIDA

Pasos para Crear una Tabla de Gradiente

- Para acceder a la pantalla Program Gradient, presiona la tecla Program Method sobre el panel del controlador.
- Para registrar la tabla, mueve el cursor al campo TABLE y escribe un número en la tabla entre 1 y 16 presiona Enter.

Si ya existe una tabla de gradiente con el número que registraste esta aparecerá inmediatamente sobre la pantalla. Puedes sobrescribir o existir esta tabla o registrarla con otro número.

Presiona la tecla Enter o Method.

Selecciona el número de tabla.

Selecciona el punto de inicio.

Selecciona la velocidad de flujo.

Selecciona la composición del.

Selecciona el perfil de la curva de gradiente.

Guarda la tabla de gradiente.

¿Quieres crear otra tabla?

¿Quieres crear una tabla de suceso?

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS
CONFIGURAR UNA CORRIDA

- 3 Escribe el tiempo de duración de la inyección (0.00 a 655.34 minutos) a que el segmento de gradiente está por iniciar o el segmento previo está por terminar, presiona Enter. Cada valor de tiempo registrado en la tabla es único.
- 4 En el campo flow, escribe el valor de la velocidad de flujo entre 0.00 y 5.00 ml/min presiona Enter.
- 5 En el campo %A, escribe el porcentaje apropiado de la fase móvil 0 a 100 en incrementos de 1% no decimales presiona Enter.
- 6 Repite el paso 5 para los tres depósitos restantes. La suma de los cuatro porcentajes debe ser igual a 100%.
- 7 En el campo curve escribe el número del perfil de la curva de gradiente para el segmento (1 a 11). La figura muestra los perfiles de la curva de gradiente.

Cuando registres información en las líneas subsiguientes de la tabla, registra el tiempo de duración para cada línea y presiona Enter. Esta acción copia los valores desde la línea anterior a la última.

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS
CONFIGURAR UNA CORRIDA

- 8 Repite los pasos 3 al 7 para cada línea de la tabla de gradiente hasta completar la tabla que deseas programar de acuerdo a tu método analítico. En la última línea debes de reducir la velocidad de flujo después de realizar la última inyección.
- 9 Debes de colocar la última línea por lo menos en un tiempo de 5 a 10 minutos de diferencia de las inyecciones programadas en las primeras líneas.
- 10 Escribe en la última línea la velocidad de flujo 0.00 ml/min ó 0.1 ml/min.
- 11 En la última línea usa la composición del solvente de la línea anterior.
- 12 Especifica la curva #11 para que la velocidad de flujo no disminuya hasta que la última línea se ejecute. Si una inyección ocurre antes de que esta línea se ejecute la velocidad de flujo no
- 13 Presiona la tecla de la pantalla save para salvar la tabla en la memoria. Tendrás que registrar la tabla con un número entre 1 y 16 para terminar presiona Enter.

Time	Flow	%A	%B	%C	%D	Curve
0.00	1.00	10	10	10	10	1
1.00	1.00	10	10	10	10	1
2.00	1.00	10	10	10	10	1
3.00	1.00	10	10	10	10	1
4.00	1.00	10	10	10	10	1
5.00	1.00	10	10	10	10	1

Ejemplo de una tabla de gradiente.

14 Para borrar líneas individuales de la tabla, mueve el cursor a la línea que deseas borrar presiona la tecla en pantalla CLEAR. Una inmediatamente limpia la línea que está sobre el cursor y nivela sucesivamente las líneas hacia arriba.

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS
CONFIGURAR UNA CORRIDA

- 15 Para insertar líneas en la tabla mueve el cursor al campo line# y colócalo después de la última línea.
- 16 Escribe el tiempo de la corrida para la nueva línea (la tabla automáticamente clasifica las líneas según el tiempo y mete la nueva línea en la ubicación apropiada).
- 17 Registra los valores de los otros parámetros (velocidad de flujo, composición del solvente, etc) para la nueva línea.
- 18 Cuando cambias los parámetros de la tabla debes salvarlos antes de que apague el sistema. Para salvar una tabla después de que hayas registrado los cambios presiona la tecla en pantalla save. La pantalla mostrará Enter Table Number (1-15).
- 18 Escribe el número con el cual quieres salvar la tabla y presiona Enter. La pantalla mostrará Replace With New Table? 1= Yes 0= No.
- 19 Si registras la tabla que quieres salvar con un número que ya contiene información, inmediatamente la tabla existente aparecerá en la pantalla.
- 20 Para sobrescribir en la tabla existente, escribe 1. Esto borra todo el contenido de la tabla. Si no quieres sobrescribirla escribe 0, la pantalla le mostrará una vez más la tabla que creaste.
- 21 Para salvar la nueva tabla, repite los pasos 16 y 19 y asigna a la tabla un número diferente al el número que asignaste correspondiente a otra tabla.

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS
CONFIGURAR UNA CORRIDA

El Controlador puede almacenar un máximo de 16 tablas en la memoria permanente. Una vez que has salvado la tabla debes de reemplazar una de estas tablas para salvar una nueva.

22 Para reemplazar una tabla existente, mueve el cursor al campo TABLE y escribe el número de la tabla que deseas reemplazar y presiona Enter.

23 Si deseas borrar todo lo que contiene la tabla presiona la tecla en pantalla CLEAR TABLE.

24 Registra la nueva información, cuando hayas terminado de registrarla salva la tabla presionando la tecla en pantalla save. Esto reemplaza la tabla existente con la nueva tabla en la memoria permanente.

25 Si deseas solo borrar alguna tabla existente mueve el cursor al campo TABLE y escribe el número de la tabla que deseas borrar y presiona Enter.

26 Presiona la tecla en pantalla CLEAR TABLE para borrar toda la tabla después presiona la tecla save. La pantalla le mostrará un aviso ENTER TABLE NUMBER (1-15) escribe el número de la tabla y presiona Enter. La tabla que quieres borrar aparece nuevamente en la pantalla la cual te mostrará un aviso.

ENTER TABLE NUMBER?

En la siguiente página aparece el pantalla del controlador para que puedas simular los pasos ya descritos.

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS
CONFIGURAR UNA CORRIDA

1 Para acceder a la pantalla Program Gradient presiona la tecla Program Method sobre el panel del controlador.

PROGRAM GRADIENT TABLE 1

TIME	FLOW	%A	%B	%C	%D	CURVE
0.00	1.00	10	10	10	10	1

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS
CONFIGURAR UNA CORRIDA

Hay 10 horas de sucesos que puedes seleccionar como se describe en la tabla.

Crear una Tabla de Suceso
Cuando creas tablas de suceso y gradientes, asegúrate que los cambios relacionados con el tiempo especifiques ambas tablas, ya que estas trabajen conjuntamente.

Para crear una tabla de suceso debes definir la información que quieras antes de que el programa. Esto minimizará la necesidad de programar tablas de suceso posteriores.

Para ayudarte a definir la información y la documentación de una tabla, utiliza un Plan de Análisis y Hoja de Archivo, así la ayudaré a desarrollar la tabla, escribiendo los parámetros que voy a programar.

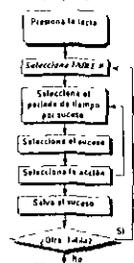
Sobre cada Plan de Análisis y Hoja de Archivo escribe:

- Tiempo de suceso
- Tipo de suceso
- Acción o configuración del suceso



MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS
CONFIGURAR UNA CORRIDA

En el siguiente diagrama de flujo se te muestra cómo programar una tabla de suceso.



Pases para Crear una Tabla de Suceso

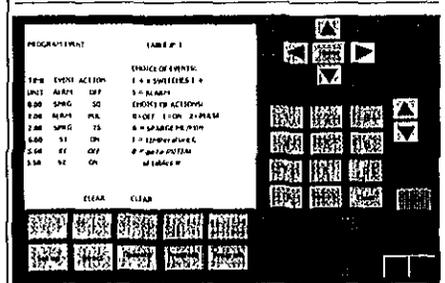
- 1 Para acceder a la pantalla Program Event, presiona la tecla Program Table sobre el panel delantero del Controlador, para salir de esta pantalla presiona cualquier tecla y presiona otra pantalla.
- 2 Mueve el cursor al campo TABLE y escribe un número entre 1 y 10 y presiona Enter.
- 3 Si una tabla de Suceso ha sido alterada con el número que intentaste, esta aparecerá sobre la pantalla, podrás editarla borrando o reemplazando con otro número si así lo deseas.

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS
CONFIGURAR UNA CORRIDA

NOTA: LA TABLA DE SUCESOS Y LA TABLA DE GRADIENTES SIEMPRE TRABAJAN CONJUNTAMENTE (EN EL MISMO NÚMERO).

- 4 En el campo Event, escribe el tipo de suceso: 1 ó 10 (como se mostró en la tabla), presiona Enter.
- 5 En el campo Action escribe el valor apropiado para la acción requerida del suceso:
0 = Off
1 = On
2 = Pulse
y presiona Enter.
- 6 Repite los pasos 3 al 5 para cada línea de la tabla de suceso.
- 7 Presiona la tecla de la pantalla Save para guardar la tabla en la memoria del Controlador.

MANEJO DEL SISTEMA LC 616 WATERS
CONFIGURAR UNA CORRIDA



MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS
ENCENDIDO Y APAGADO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS

Encendido del Automuestreador 717 Plus, cuando se utilice un sistema de datos (Millennium 2.10)

Si no planes usar el Automuestreador por un largo periodo, apágalo.

• Apaga el sistema presionando el interruptor en la posición D (OFF) sobre el panel delantero del Automuestreador.

Si deseas conocer todas las pantallas a las cuales tienes acceso desde el Automuestreador presiona el siguiente icono:

En la siguiente página aparece simulada la pantalla del Automuestreador, para que enciendas el sistema, teniendo acceso a todas las pantallas presionando la función de las teclas correspondientes.

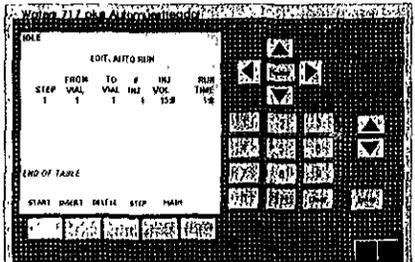
Enciende todos los aparatos conectados al Millennium 2.10 (Sistema LC 616 Automuestreador y Detector) antes de encender la computadora.

Espera un momento para que las pruebas diagnósticas internas de cada módulo se ejecuten. Estas pruebas aseguran que cada módulo sea funcional y sirven para ajustar errores.

Para encender el Automuestreador 717 Plus, presiona la tecla ON (OFF) localizada en la parte inferior derecha del panel delantero.

Espera un momento para que inicie la secuencia completa y aparezca el mensaje IDLE en la parte superior izquierda.

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS
ENCENDIDO Y APAGADO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS



MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS
PURGAR EL AUTOMUESTREADOR

Quando lavas o purgas el automuestreador, asegúrate que el solvente este apropiadamente degasificado y sea miscible con la fase móvil utilizada.

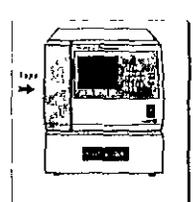
Pases para Lavar

- 1 Coloca la línea roja en un recipiente de desecho para coleccionar el solvente.
- 2 Configura la bomba desde la pantalla del controlador, a una velocidad de flujo de 1ml/min con una fase móvil de 100% metanol.
- 3 Continúa con el bombeo de la fase móvil durante 10 minutos o hasta que todo el aire sea forzado a salir del automuestreador (ninguna burbuja debe aparecer en el recollector de desecho).

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS
PURGAR EL AUTOMUESTREADOR

Pases para Purgar

- 1 Para ejecutar el purgado del automuestreador, asegúrate que la fase móvil sea reciente.
- 2 Quite la tapa del montaje de la jeringa para examinar que no tenga burbujas.
- 3 Usa una solución degasificada de 100% metanol, configure la bomba desde la pantalla del controlador, a una velocidad de flujo de 1ml/min.
- 4 Para realizar una purga, usa los valores predefinidos mostrados en la pantalla EDIT PUMP AND COMPRESSIVITY.
- 5 Desde la pantalla AGU ADV del automuestreador presiona la tecla MAIN PAU, aparecerá la pantalla EDIT PUMP AND COMPRESSIVITY. La configuración de los parámetros con los valores predefinidos.
- 6 Usa el cursor para dirigirse al campo Compressor Check seleccione la opción No y presiona Enter.



MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS
PURGAR EL AUTOMUESTREADOR

7 El tiempo de purga aparece como un valor predefinido que es de 10 min.

Cambia el tiempo de purga si el sistema está a una velocidad de flujo menor de 1 ml/min o si se instala un loop auxiliar.

El tiempo de Purga depende de la velocidad de flujo de la fase móvil y del tamaño del loop de muestra.

Debe calcular el tiempo de purga basándose en la velocidad de flujo y en el tamaño del loop de muestra. El tiempo debe ser suficiente para permitir cambiar tres veces el volumen del automuestreador. El loop de muestra y el volumen del automuestreador se muestran en la tabla.

Loop de Muestra	Volumen del Automuestreador
1000 µl	250 µl
2000 µl	500 µl

8 Para ejecutar la operación presiona la función de la tecla en pantalla para que pueda inmediatamente se inicia la purga.

9 Si el purgado no quita las burbujas de la jeringa realiza una purga manual.

MANEJO DEL SISTEMA DE SIS WATERS
MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS
MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

MANEJO PRINCIPAL
AYUDA SALIDA

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS
PURGAR EL AUTOMUESTREADOR

MANEJO DEL SISTEMA DE SIS WATERS
MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS
MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

MANEJO PRINCIPAL
AYUDA SALIDA

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS
PURGAR EL AUTOMUESTREADOR

Si los pasos ya descritos para purgar el automuestreador, no quitaron el aire de la jeringa realiza una purga manual.

Pasos para una Purga Manual

- 1 En la pantalla MENU MAIN, presiona la tecla DIAG PAGE, aparecerá la pantalla DIAGNOSTIC, en esta pantalla se desplegarán diferentes funciones de las teclas.
- 2 Presiona la tecla USERMAIN PAGE, aparecerá la pantalla MENU USER MAIN, presiona la tecla VALVE AND MOTOR OPERATIONS, en esta pantalla se desplegarán diferentes funciones de las teclas.
- 3 Coloca las posiciones de las válvulas y de la jeringa como se muestra en la figura.
- 4 Desde el controlador 6005 pon el flujo del sistema a 1 ml/min.

MANEJO DEL SISTEMA DE SIS WATERS
MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS
MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

MANEJO PRINCIPAL
AYUDA SALIDA

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS
PURGAR EL AUTOMUESTREADOR

- 5 Quita la tapa del montaje de la jeringa
- 6 Remueve la nuez del knurled
- 7 Empuja el pistón hasta que cubra el cuerpo de la jeringa
- 8 Sacca parcialmente el pistón hacia abajo
- 9 Repite pasos 7 y 8 tres veces
- 10 Una vez terminando, mueve el cursor de la pantalla DIAGNOSTIC VALVE AND MOTOR OPERATIONS, al campo TO EXECUTE NORMAL STATE PRESS ENTER.

Para que te familiarices con las pantallas, en la siguiente página podrá simular los pasos descritos

MANEJO DEL SISTEMA DE SIS WATERS
MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS
MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

MANEJO PRINCIPAL
AYUDA SALIDA

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS
PURGAR EL AUTOMUESTREADOR

MANEJO DEL SISTEMA DE SIS WATERS
MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS
MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

MANEJO PRINCIPAL
AYUDA SALIDA

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS
PREPARAR LAS MUESTRAS

Para preparar y cargar la muestra dentro del Automuestreador considere lo siguiente:

- Preparar la muestra
- Seleccionar y llenar los vials de muestra
- Disolver la muestra en la fase móvil
- Usar el mismo componente orgánico o más étil
- Disolverla en un solvente que sea compatible con la fase móvil y químicamente con la columna
- Esté a una concentración que permita ser detectable el análisis
- Disolverla en una solución que se encuentre libre de partículas y sea homogénea

En el siguiente diagrama se ilustran los procedimientos generales para preparar una muestra.

MANEJO DEL SISTEMA DE SIS WATERS
MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS
MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

MANEJO PRINCIPAL
AYUDA SALIDA

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS
PREPARAR LAS MUESTRAS

Para seleccionar los vials de muestra toma en cuenta las siguientes consideraciones:

- Características químicas de la muestra
- Volumen de inyección
- Número de inyecciones
- Volatilidad de la muestra

De acuerdo a las características químicas de la muestra selecciona:

- Vial de vidrio** - Uso general
- Vial de polipropileno** - Recomendado para cromatografía iónica
- Vial de vidrio ámbar** - Recomendado para muestras sensibles
- Vial de polimetilacrilato** - Recomendado para volúmenes pequeños en cromatografía iónica

MANEJO DEL SISTEMA DE SIS WATERS
MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS
MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

MANEJO PRINCIPAL
AYUDA SALIDA

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS
PREPARAR LAS MUESTRAS

El automuestreador puede trabajar con dos tipos de carrusel de 96 y de 48 para cargar los vials de muestra.

Para determinar el mejor tamaño del vial de muestra y el volumen de inyección Te sugiero ver la siguiente tabla:

MANEJO DEL SISTEMA DE SIS WATERS
MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS
MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

MANEJO PRINCIPAL
AYUDA SALIDA

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS
PREPARAR LAS MUESTRAS

El uso de viales de muestra que no sean de la marca Waters™ pueden producir daños en la aguja

4 Realiza el carrusel sobre el compartimiento de la muestra hasta que alcance las dos posiciones deteniéndose en el piso del compartimiento

5 Cierra la puerta del compartimiento de la muestra. El carrusel en el automuestreador permanecerá en su lugar

1 Pase para cargar los viales de muestra en el carrusel del automuestreador

2 Antes de cargar los viales de muestra en el carrusel, asegúrate que está limpio y no están bloqueados los orificios

3 Coloca los viales de muestra agrupados en el carrusel fijados en la localización. El número de vial se localiza en el margen del carrusel

La descarga del carrusel no se activa cuando el automuestreador está realizando una purga o inyección

1 Abre la puerta del compartimiento de la muestra, que está localizado en la parte inferior del automuestreador. Si el sensor de la puerta está habilitado (condición predeterminada), el automuestreador descarga el carrusel

PRESELECCIONES PARA EL MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS

MANEJO DEL SISTEMA DE AGUA WATERS

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS

MANEJO DEL SELECTOR POR VIAL WATERS

MANEJO PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS

El lavado de la aguja previene la contaminación cruzada de muestras. Para lavar la aguja, debes seleccionar un solvente basándote en la fase móvil de la muestra y en sus características químicas

La siguiente tabla muestra algunas sugerencias de los solventes que puedes utilizar para lavar la aguja del automuestreador. Las altas concentraciones de la muestra pueden requerir solventes más fuertes

Para lavar la aguja, coloca la línea verde en el depósito del solvente y sate al mismo nivel que el automuestreador

Asegúrate que el suministro de solvente para lavar la aguja (verde), está en la botella y la línea de desecho (amarilla) está en un recipiente apropiado

Desde la pantalla del automuestreador, puedes ejecutar el lavado de la aguja, como se muestra en el diagrama

Si después de 30 segundos, el solvente no fluye hacia la línea de desecho, presiona nuevamente la tecla Start NotWash

En la siguiente página aparece la pantalla del automuestreador, para que puedas simular los pasos descritos en el diagrama

PRESELECCIONES PARA EL MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS

MANEJO DEL SISTEMA DE AGUA WATERS

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS

MANEJO DEL SELECTOR POR VIAL WATERS

MANEJO PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS

Water 717 Plus Autopampler
Run, 1.1 500.95
Copyright © 1993, 95, 96, 99
Waters Corporation
Hewlett-Packard Technologies

AUTO STAT PURGE CONTR DIAG

Pasos para Purgar el Automuestreador

PRESELECCIONES PARA EL MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS

MANEJO DEL SISTEMA DE AGUA WATERS

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS

MANEJO DEL SELECTOR POR VIAL WATERS

MANEJO PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS
EJECUTAR UNA CORRIDA

Antes de iniciar una corrida, ejecuta una purga para asegurar que la fase móvil en el automuestreador sea reciente

Usa el modo Auto Run del automuestreador para programar corridas y monitorear las inyecciones de la muestra. También puede ser controlado y ejecutado, desde el software Millennium 2010 o 3010

Pasos para Programar una Corrida

- Para programar e iniciar el Auto Run, debe estar en la pantalla EDIT AUTO RUN. Para ello debes posicionar la tecla AUTO PAGE, de la pantalla MAIN MENU
- La pantalla EDIT AUTO RUN, te permite programar los siguientes parámetros:

- = 96 etapas (STEP)
- = Cantidad de viales (FROM TO)
- = Número de inyecciones (I INJ)
- = Volumen de inyección (INJ VOL)
- = Tiempo de corrida (RUN TIME)

STEP	FROM VIAL	TO VIAL	I INJ	INJ VOL	RUN TIME
1	2	4	1	150	10
2	5	7	1	150	10
3	8	10	1	150	10
4	11	13	1	150	10

END OF TABLE
START POINT DELETE STOP MAIN

PRESELECCIONES PARA EL MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS

MANEJO DEL SISTEMA DE AGUA WATERS

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS

MANEJO DEL SELECTOR POR VIAL WATERS

MANEJO PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS
EJECUTAR UNA CORRIDA

= 96 Etapas (STEP)
Puedes programar hasta 96 etapas (STEP) diferentes. El campo STEP compara con el campo FROM VIAL TO VIAL, el mismo número de inyecciones, volumen de inyección y el tiempo de corrida

= Cantidad de viales (FROM TO VIAL)
Puedes registrar los valores predeterminados del número de vial sobre el campo FROM VIAL TO VIAL, el mismo número de inyecciones, volumen de inyección y el tiempo de corrida que estás empleando

Cuando inyectes un solo vial, mete el mismo número en los campos FROM VIAL y TO VIAL. Cuando inyectes una secuencia de viales, mete el primer vial en el campo FROM VIAL y el último en el campo TO VIAL

= Número de inyecciones (I INJ)
En el campo I INJ, coloca el número de inyecciones que vas a efectuar por cada vial. Los valores válidos son 1 a 99

= Volumen de inyección (INJ VOL)
En el campo INJ VOL, coloca el volumen de inyección dependiente del tamaño del loop de muestra

= Tiempo de corrida (RUN TIME)
En el campo RUN TIME, coloca el tiempo de corrida en minutos que vas a requerir. Las entradas válidas son 0 a 9999

PRESELECCIONES PARA EL MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS

MANEJO DEL SISTEMA DE AGUA WATERS

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS

MANEJO DEL SELECTOR POR VIAL WATERS

MANEJO PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS
EJECUTAR UNA CORRIDA

3 Para iniciar (más, mueve el cursor al campo STEP y colócalo donde quieras que la nueva línea sea insertada

4 Presiona la tecla INJECT LINE. El Automuestreador duplica la línea previa y renombra todas las líneas subsiguientes

5 Para borrar líneas, mueve el cursor al campo STEP y colócalo en el número de la línea que quieras borrar

6 Presiona la tecla DELETE LINE. El Automuestreador remueve la línea y renombra todas las líneas subsiguientes

7 Para borrar la tabla, presiona la tecla DELETE TABLE y presiona esta tecla

Después de confirmar el tecla será donde, el automuestreador quite todos los datos de la pantalla

Una vez que hayas programado los parámetros de la corrida, presiona la tecla en pantalla START AUTO RUN, aparecerá la pantalla STATUS AUTO RUN

STATUS AUTO RUN	
VIAL #	1
INJ	1 INJ
VOLUMEN INJ	150
RUNTIME (min)	10
TIME REMAINING (min)	8.8
TOTAL TIME (min)	2.88
AUTO STAT	STOP

PRESELECCIONES PARA EL MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS

MANEJO DEL SISTEMA DE AGUA WATERS

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS

MANEJO DEL SELECTOR POR VIAL WATERS

MANEJO PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS
EJECUTAR UNA CORRIDA

La pantalla STATUS AUTO RUN despliega

IT STEP AND VIAL NUMBER. Aparece en la parte superior derecha la cual indica la corrida que está en marcha

IT VIAL #. Despliega el número de vial de muestra en curso

IT INJ. Despliega la inyección en curso y el número de inyecciones por vial de muestra

IT VOLUME. Despliega el volumen inyectado

IT RUNTIME. Despliega el tiempo de la corrida programado por la inyección en curso

IT TIME REMAINING. Despliega el tiempo restante para la inyección en curso

IT TOTAL RUNTIME. Despliega el tiempo total de la corrida en curso y todas las inyecciones restantes

Si deseas parar la corrida, presiona la tecla STOP, aparecerá un mensaje: Do you really want to stop the auto run? Presiona Yes para parar la corrida

PRESELECCIONES PARA EL MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS

MANEJO DEL SISTEMA DE AGUA WATERS

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS

MANEJO DEL SELECTOR POR VIAL WATERS

MANEJO PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS
EJECUTAR UNA CORRIDA

Water 717 Plus Autopampler
VIAL # Run, 3.1 500.95
INJ 1 INJ
VOLUMEN INJ (µl) 150, 150, 95
RUNTIME (min) 10.3
TIME REMAINING (min) 8.88
TOTAL TIME (min) 20.6
Hewlett-Packard Technologies

AUTO STAT PURGE CONTR DIAG

Pasos para Programar una Corrida

PRESELECCIONES PARA EL MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS

MANEJO DEL SISTEMA DE AGUA WATERS

MANEJO DEL AUTOMUESTREADOR 717 PLUS WATERS

MANEJO DEL SELECTOR POR VIAL WATERS

MANEJO PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS
MILLENNIUM PDA

El Detector de Arreglo de Fotodiodos 996 y el Administrador Cromatográfico Millennium proporcionan nuevas técnicas poderosas para grabar y analizar datos de una separación cromatográfica. Para usar apropiadamente las técnicas del procesamiento de datos del Millennium PDA, debe entender el tipo de datos obtenidos por el detector 996. Las herramientas disponibles del software Millennium PDA nos ayudan a evaluar el procesamiento de datos del PDA.

El Administrador Cromatográfico Millennium controla el sistema cromatográfico y los resultados que pueden ser ajustados de acuerdo a los requisitos individuales. Se compone de:

- Una computadora para Millennium (incluido una tarjeta Bus LACE)
- Software Millennium
- Base de datos Millennium

PRINCIPALES PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAR

MANEJO DEL SISTEMA DE 16 BIT WATERS

MANEJO DEL AUTOMATIZACION Y 17 PLUS WATERS

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

MANEJO DEL SISTEMA DE 16 BIT WATERS

MANEJO DEL AUTOMATIZACION Y 17 PLUS WATERS

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

PRINCIPALES

AYUDA SALIDA

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS
MILLENNIUM PDA

Datos del Millennium PDA

Para comprender el tipo de datos que se obtienen del detector PDA (de onda variable) es necesario compararlo con un detector de onda fija.

Los datos obtenidos por el detector UV de onda fija de un solo canal, mide la absorbancia de la muestra a una sola longitud de onda de luz seleccionada usando una abertura en la placa y en el filtro. Los datos resultantes son dos planos dimensionales, o un cromatograma de absorbancia contra tiempo. Solo esos picos que absorben a la longitud de onda particular aparecen en el cromatograma. Otros picos pueden estar presentes en la muestra pero no pueden ser detectados hasta que la longitud de onda de observación se cambia.

El detector PDA, por otro lado, puede medir la absorbancia de la muestra por un rango de longitudes de onda entre 190 a 800 nanómetros que usa un rango de difracción y un arreglo de fotodiodos. A cada tiempo de la muestra, el espectro completo de absorbancia adquirido por el PDA se lee y se registra en el disco duro. La salida resultante es un bloque de datos de tres dimensiones ambos incluyen datos cromatográficos y espectrales. Estos datos se pueden marcar con tres ejes que corresponden al tiempo, la longitud de onda, y la absorbancia.

PRINCIPALES PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAR

MANEJO DEL SISTEMA DE 16 BIT WATERS

MANEJO DEL AUTOMATIZACION Y 17 PLUS WATERS

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

MANEJO DEL SISTEMA DE 16 BIT WATERS

MANEJO DEL AUTOMATIZACION Y 17 PLUS WATERS

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

PRINCIPALES

AYUDA SALIDA

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS
MILLENNIUM PDA

Podemos obtener un cromatograma absorbancia contra tiempo de este bloque de datos de tres dimensiones se extrae una parte de la longitud de onda seleccionada. Esta parte es equivalente a un cromatograma obtenido con un detector UV de onda fija adaptado a esa longitud de onda.

Podemos obtener un espectro de absorbancia absorbancia contra la longitud de onda de este bloque de datos de tres dimensiones, se extrae una parte en un tiempo seleccionado. Este parte es equivalente a pasar el flujo para analizar y medir la absorbancia a lo largo de la longitud de onda que vaya usando continuamente el detector UV de onda variable.

El detector de arreglo de fotodiodos es capaz de registrar muchos datos cromatográficos y datos espectrales sobre una muestra.

Los datos cromatográficos que tienen muchas longitudes de onda hacen fácil el localizar un pico perdido. Por ejemplo, si un pico esperado no aparece en un cromatograma a una longitud de onda, podemos extraer un cromatograma de esa compuesto a otra longitud de onda y ver si el pico aparece.

PRINCIPALES PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAR

MANEJO DEL SISTEMA DE 16 BIT WATERS

MANEJO DEL AUTOMATIZACION Y 17 PLUS WATERS

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

MANEJO DEL SISTEMA DE 16 BIT WATERS

MANEJO DEL AUTOMATIZACION Y 17 PLUS WATERS

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

PRINCIPALES

AYUDA SALIDA

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS
MILLENNIUM PDA

Los espectros que se obtienen en muchos tiempos de la muestra no hacen posible confirmar si un pico es espectralmente puro. Para cada pico cromatográfico se adquieren los espectros de absorbancia en cada tiempo de la muestra durante la elución del pico. Se pueden normalizar y sobrepone los espectros registrados desde sobre la punta del pico y cola del pico, para comparar la forma espectral. Los espectros de un pico resulto de línea de base contienen un solo compuesto que tiene la misma forma. Los espectros de un pico que contiene una coelución varían en la forma.

Finalmente, podemos usar estos datos en la identificación de picos. Podemos sobrepone los espectros obtenidos de un estándar puro para determinar si son del mismo compuesto. Espectros normalizados de dos compuestos idénticos deben tener la misma forma. Espectros que no se sobrepone probablemente no son del mismo compuesto. Las herramientas del software Millennium le permiten confirmar la identidad de cada compuesto, comparando la forma espectral.

PRINCIPALES PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAR

MANEJO DEL SISTEMA DE 16 BIT WATERS

MANEJO DEL AUTOMATIZACION Y 17 PLUS WATERS

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

MANEJO DEL SISTEMA DE 16 BIT WATERS

MANEJO DEL AUTOMATIZACION Y 17 PLUS WATERS

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

PRINCIPALES

AYUDA SALIDA

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS
MILLENNIUM PDA

Características del software Millennium PDA

El software Millennium PDA apoya las siguientes funciones con el Administrador Cromatográfico Millennium:

- El Caja de Diálogo Instrumental PDA** Define los parámetros de control para el detector 996 Waters.
- 3D Blank Subtraction** Permite usar un conjunto de método para restar un cromatograma 3D (un blanco solvente) de un segundo cromatograma 3D (una muestra o estándar) y despliega la diferencia en la ventana PDA Review. Esta característica se usó para restar los efectos de la fase móvil que contiene componentes que absorben UV fuertemente.
- PDA Review** Permite extraer, registrar y procesar cromatogramas y espectros desde el perfil del blanco.
- Peak Data Acquisition PDA** Traza los últimos espectros adquiridos y la longitud de onda hasta cuatro veces individuales en la adquisición de datos en tiempo real.
- Spectrum Index Plot** Proporciona una vista general del espectro de un cromatograma extraído e integrado y facilita la extracción de los espectros para Spectrum Review.
- Spectrum Review** Permite crear librerías, comparar espectros desde los archivos de datos y librerías así como derivar espectros matemáticamente.
- Spectral Libraries** Almacena los espectros para la conformar de los componentes en la ventana Spectrum Review y durante el procesamiento automático.

PRINCIPALES PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAR

MANEJO DEL SISTEMA DE 16 BIT WATERS

MANEJO DEL AUTOMATIZACION Y 17 PLUS WATERS

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

MANEJO DEL SISTEMA DE 16 BIT WATERS

MANEJO DEL AUTOMATIZACION Y 17 PLUS WATERS

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

PRINCIPALES

AYUDA SALIDA

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS
MILLENNIUM PDA

Peak Purity Traza los datos espectrales de la pureza y el ruido contra un pico cromatográfico integrado. También permite realizar un refinado cálculo de la pureza del componente del pico para determinar si hay múltiples compuestos (hasta cuatro) en un solo pico.

Spectrum Matching Permite de una forma interactiva y automática igualar los espectros comparándolos con las librerías espectrales.

PDA Library View Despliega todas las librerías espectrales creadas en la ventana Project Library view. Las librerías espectrales son universales en todos los proyectos dentro del Administrador Cromatográfico Millennium. El software Millennium permite respaldar, copiar, y restaurar las librerías en Library view.

Herramientas de Millennium PDA

Las herramientas específicas proporcionadas en el software Millennium PDA le permiten crear y manipular. Todas las herramientas forman parte de, o son accesibles desde la ventana PDA Review. En todos los casos, nosotros usamos el Estándar A y la Combinación Descartable, que proporciona el sistema para demostrar el software.

PRINCIPALES PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAR

MANEJO DEL SISTEMA DE 16 BIT WATERS

MANEJO DEL AUTOMATIZACION Y 17 PLUS WATERS

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

MANEJO DEL SISTEMA DE 16 BIT WATERS

MANEJO DEL AUTOMATIZACION Y 17 PLUS WATERS

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

PRINCIPALES

AYUDA SALIDA

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS
PRUEBAS DIAGNOSTICO

Hay dos niveles disponibles para ejecutar las pruebas de diagnóstico:

- Nivel Cliente** Accesible a través de Millennium
- Nivel Servicio** Accesible a través de Windows

En la actualidad las pruebas de diagnóstico son idénticas en ambos niveles por eso va que conformes con el software Millennium solo se hará referencia al nivel cliente.

Existen dos formas de iniciar las pruebas de diagnóstico para el detector PDA 996:

- Pruebas Interactivas** No requiere conexiones externas. Ejecuta diagnósticos internos cuando el detector falla en el diagnóstico de arranque o cuando hay un cambio en la referencia del espectro.
- Pruebas Interactivas** Requiere conexiones para probar el equipo o el flujo de la bomba. Ejecuta diagnósticos de comunicación cuando los problemas de comunicación ocurren con dispositivos conectados a terminales anillo, event, event, etc. Ejecuta una prueba de ruido para documentar el ruido del detector.

Para comenzar a correr las pruebas de diagnóstico del detector 996 Waters, debe acceder a la ventana PDA Internal Diagnostic para ello:

- Avance el software Millennium y acceda a la ventana Session Manager (ver tema del menú principal Manejo del Software Millennium 2.10)

PRINCIPALES PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAR

MANEJO DEL SISTEMA DE 16 BIT WATERS

MANEJO DEL AUTOMATIZACION Y 17 PLUS WATERS

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

MANEJO DEL SISTEMA DE 16 BIT WATERS

MANEJO DEL AUTOMATIZACION Y 17 PLUS WATERS

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

PRINCIPALES

AYUDA SALIDA

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS
PRUEBAS DIAGNOSTICO

- Desde la ventana Session Manager un clic sobre el icono System View Aparecerá los sistemas instrumentales.
- Da un doble clic sobre el icono del sistema que contiene el detector PDA 996 para acceder a la ventana Configure System.
- Da un doble clic sobre el icono del instrumento PDA 996. Aparecerá la caja de diálogo Register Waters 996 on Bus LACE Address.
- En la caja de diálogo da un clic en el botón Diagnostics. Aparecerá la ventana PDA Internal Diagnostics.

Esta ventana incluye dos apartados:

- Pruebas Interactivas**
- Pruebas Interactivas**

PRINCIPALES PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAR

MANEJO DEL SISTEMA DE 16 BIT WATERS

MANEJO DEL AUTOMATIZACION Y 17 PLUS WATERS

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

MANEJO DEL SISTEMA DE 16 BIT WATERS

MANEJO DEL AUTOMATIZACION Y 17 PLUS WATERS

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS

PRINCIPALES

AYUDA SALIDA

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS
PRUEBAS DIAGNOSTICO

La mayoría de las pruebas de diagnósticos internos también se realizan en la salida del Detector PDA como parte de las pruebas de confianza del encendido. Si el detector enciende con éxito entonces estas pruebas ya habrán pasado. Sin embargo puedes hacer uso de la ventana PDA Internal Diagnostic para seleccionar y ejecutar cualquier de las pruebas individuales. Para ejecutar una prueba de diagnóstico interno sigue los pasos descritos a continuación.

STOP

1. Selecciona cada prueba que quieras correr dando un click en el botón apropiado de la caja de control.
2. Da un click en el botón Start. En la pantalla inferior de la ventana emitirá la prueba y el estado.

Las otras opciones al final de la pantalla te permiten:

Stop
✓ Para la prueba que se esté corriendo actualmente.
✓ No selecciones Stop para interrumpir una serie de pruebas una vez que la sucesión ha empezado.
✓ El botón Stop sólo debe usarse para detener una sola prueba.

Run to Failure
✓ Te permite ejecutar una prueba en particular repetidamente hasta que se encuentre una falla o se presione Stop. Si para la prueba al presionar Stop después de seleccionar Run to Failure la comprobación continuará hasta que la selección en curso complete el tiempo de la prueba.

Menú Principal
Ayuda Salida

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS
PRUEBAS DIAGNOSTICO

SOIAR
✓ Te permite seleccionar todas las pruebas que comprenden las pruebas internas e interactivas.

Clear All
✓ Te permite borrar o limpiar todas las pruebas que abarcan ambas pruebas internas e interactivas.

Exit
✓ Sale de la ventana PDA Diagnostics.

Los diagnósticos internos disponibles desde la caja de diálogo PDA Internal Diagnostics se describen a continuación.

CPU
Runna que prueba todos los registros internos y la mayoría de las direcciones y la funciones automáticas del procesador 85000 en el detector PDA 996. Esta es una prueba de:

PAA
Escribe cinco de datos en la memoria después de las cinco de los datos de cada localización de la memoria indica la dirección fallada, el ensayo de la cinta escrita, y la cinta errónea leída. Esta es una prueba de comunicación/fallo.

TIAMR
Genera señales periódicas de interruptores. Si un interruptor no es detectado por el CPU dentro de un número dado de ciclos de tiempo, aparecerá un mensaje de error. Este es una prueba de comunicación/fallo.

DSF
Verifica el funcionamiento apropiado entre el CPU y el TMS520 procesador de señal digital del sistema electrónico del detector PDA 996. Es una prueba de comunicación/fallo.

Menú Principal
Ayuda Salida

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS
PRUEBAS DIAGNOSTICO

SHUTTER
Cierra y abre cuatro veces el obturador, y verifica los espectros girados en cada posición del obturador. Si el espectro de energía oscuro o ligero no se encuentran el criterio requerido, las pruebas fallan. La prueba del obturador indica si la prueba falló en el espectro de energía ligero o en el espectro oscuro.

LAMP
Esta prueba enciende la lámpara D2 y verifica la energía de la lámpara y del espectro. Ocurre una falla si la lámpara no enciende ni el espectro de energía es inaceptable. También se se especifica probando repetidamente el detector 996 permite enfriar la lámpara por un minuto a lo largo del período entre las pruebas. Es una prueba de comunicación/fallo.

Si el indicador de la lámpara en el tablero del detector es ON y la lámpara falla la prueba la energía que hay es insuficiente para alcanzar el arreglo del fotodiodo. Para corregir:

1. Limpia la caída de flujo.
2. Si la prueba de la lámpara falla después de limpiar la caída de flujo, trata de verificar la lámpara. Si tienen menos de 1000 horas quítele y límpiala caída de flujo. Si tiene más de 1000 horas, reemplaza la lámpara y corre nuevamente el diagnóstico de la lámpara.

Menú Principal
Ayuda Salida

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS
PRUEBAS DIAGNOSTICO

WAVELENGTH ACCURACY
Mide la resolución óptica del detector PDA 996 la calibración de la longitud de onda probando la posición de la línea B Balmer 486 nm. La prueba calcula un error de diferencia en la longitud de onda entre la posición de la línea medida y la posición de la línea según la calibración actual.

Si la diferencia es mayor que 1.0 nm, falla la prueba. Después de cada prueba, la pantalla indica el error de la longitud de onda en nm, y si la prueba pasa o falla. Los dos mensajes son:

- * COK 486 Wavelength error NNN nm
- * BAD 486 Wavelength error NNN nm

Donde NNN es el error de la longitud de onda en nanómetros.

COMMUNICATIONS
Escribe datos a través del cable IEEE-488 bus al detector y el detector retorna al cable. El mensaje del resultado es cualquiera de los siguientes:

- OK IEEE Communication pass
- BAD IEEE Communication fails

OPTICS
Realiza cinco diagnósticos en la parte óptica del detector PDA 996. Aparecen cualquiera de estos mensajes:

- OK Optics Test passes
- BAD Optics Test fails in Phase n

Donde n representa el diagnóstico de la óptica particular que falló. Se describe a continuación.

Menú Principal
Ayuda Salida

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS
PRUEBAS DIAGNOSTICO

Fase 1 Examina el valor de la lectura del sistema DSP con la lámpara apagada. El espectro debe ser consistente con un PDA no iluminado.

Fase 2 Enciende la lámpara D2 y examina el espectro del PDA. El espectro debe estar en el umbral de la intensidad mínima y debe registrarse apropiadamente en el detector.

Fase 3 Verifica la pérdida de luz. La intensidad extrema de la longitud de onda baja y alta debe mostrar una reducción al máximo del porcentaje de la intensidad.

Fase 4 Compruébale el obturador y compara el espectro del PDA para registrar el espectro antes del encendido de la lámpara. Si los espectros son idénticos dentro de la tolerancia de comparación pasa la prueba de fase.

ROM
Realiza una prueba de verificación en el EPROM sumando todos los datos ubicados en la memoria y comparando la suma contra el valor acumulado.

Menú Principal
Ayuda Salida

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS
PRUEBAS DIAGNOSTICO

Las pruebas interactivas "Interactive Tests" exigen el uso de la bomba o condiciones con otros equipos para probar las áreas sensibles.

Para seleccionar y ejecutar cualquiera de las pruebas interactivas, debes hacer uso de la ventana PDA Internal Diagnostic.

NOISE TEST
Prueba de Ruido, te ayuda a medir el ruido y la tendencia del pico a pico de la señal de absorberencia a 264 nm.

Esta prueba exige una hora completa.

Para ejecutar la prueba del Ruido "Noise test"

1. Coloca la bomba a una velocidad de 1000 con motor desahogado.
2. En la caja de diálogo PDA Internal Diagnostics, da un click en el botón Clear All tests.
3. Da un click en la caja de control Noise test. Aparecerá el siguiente mensaje:

OK Noise @ 264 nm dddd p. dddd

donde los campos bane el siguiente significado:

- d.ddd Tendencia sobre un intervalo de 20 minutos.
- p.p.p.p.p. Promedio del valor del ruido pico-a-pico sobre un intervalo de cada 30 segundos en un intervalo medido de 20 minutos.

Menú Principal
Ayuda Salida

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS
PRUEBAS DIAGNOSTICO

EVENT INPUT READ
La prueba Event Input lee el estado de las entradas del evento sobre el detector PDA 996. La prueba indica los resultados en los campos Input 1 o Input 2 (ON es alto).

Para correr la prueba Event Input

1. Conecta un generador de señal a las terminales Event Input.
2. Conecta el generador de señal para generar una señal de +5V.
3. En la caja de diálogo PDA Internal Diagnostics, da un click en el botón Clear All tests.
4. Da un click en la caja de control Event Input read.
5. Da un click en el botón Start. Los campos LEIDOS destellan cierto tiempo para indicar que la prueba está activa.
6. Si la prueba Event Input 1 o Event Input 2 pesan, el botón llenará la opción para indicar el cierre.

EVENT OUTPUT SENT
La prueba Event output sent escribe la configuración de las salidas del evento. La condición Event output debe ser observado por el usuario con un voltímetro conectado a la salida.

Para correr la prueba Event output

1. Conecta un voltímetro o un osciloscopio a las terminales Event output.
2. En la caja de diálogo PDA Internal Diagnostics, da un click en el botón Clear All tests.
3. Da un click en la caja de control Event output read.
4. Da un click en la caja de control Output 1 y Output 2.
5. Da un click en el botón Start.
6. Usa el voltímetro para verificar la señal Event output.

Menú Principal
Ayuda Salida

MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS
PRUEBAS DIAGNOSTICO

ANALOG OUTPUT
La prueba Analog output escribe los valores especificados en las salidas analógicas. Debes medir el voltaje de la salida y determinar si es adecuado. No hay ninguna respuesta del fallo de esta prueba.

Para correr la prueba Analog output

1. Conecta un voltímetro o un osciloscopio a las terminales Analog output.
2. En la caja de diálogo PDA Internal Diagnostics, da un click en el botón Clear All tests.
3. Da un click en la caja de control Analog output.
4. Coloca el voltaje de la salida (rango 0.1 a +2.2V).
5. Da un click en el Channel 1 o Channel 2 en el campo Analog output.
6. Da un click en el botón Start.
7. Usa el voltímetro para verificar el voltaje de la terminal Analog output.

ANALOG OUTPUT RAHP
Para correr la prueba Analog output

1. Conecta un voltímetro o un osciloscopio a las terminales Analog output ramp.
2. En la caja de diálogo PDA Internal Diagnostics, da un click en el botón Clear All tests.
3. Da un click en la caja de control Analog output ramp.
4. Da un click en el Channel 1 o Channel 2 en el campo Analog output.
6. Usa el voltímetro para verificar el voltaje de la terminal Analog output. La prueba toma aproximadamente 10 segundos.

Menú Principal
Ayuda Salida

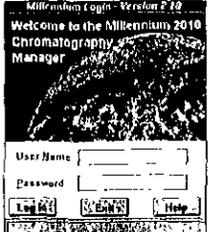
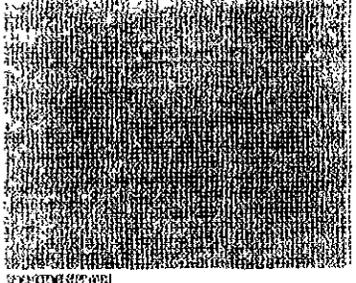
<p>PROCEDEMIENTO PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAS</p> <p>MANEJO DEL SISTEMA CLAS WATERS</p> <p>MANEJO DEL AUTOPRESTACION 7 17 PLUS WATERS</p> <p>MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS</p> <p>MANEJO PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS CALIBRACION DEL PDA</p> <p>La calibración diagnóstica del detector PDA 996 de la oportunidad de verificar la longitud de onda del instrumento además de examinar el espectro de energía del arco de la lámpara de Deuterio. El software valida la calibración focalizando las dos líneas Balmer 486 y 666 nanómetros en el espectro de emisión de Deuterio.</p> <p>Cuando el software localiza estas líneas, computa los nuevos valores de los parámetros de calibración para el Lambda 1 y Lambda 512. El usuario tiene la opción de aceptar estos nuevos parámetros de calibración computados. Si se accept, los valores nuevos se almacenarán en la memoria del detector PDA 996 y se usarán después de esto.</p> <p>Antes de decidir a aceptar los nuevos parámetros de la calibración considere los tres puntos siguientes:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 En la mayoría de los casos la fábrica que fue la calibración es más exacta que una calibración basada en las dos líneas Balmer. La calibración de la línea Balmer usa dos líneas en el vidrio. 2 El cálculo de la línea de Balmer no es absolutamente preciso y se influenciado ligeramente por la variación en la intensidad de la lámpara y en el contenido de la celda de flujo. Las pequeñas variaciones en los valores Lambda 1 y Lambda 512 pueden ser debidos a factores estadísticos factores no relacionados con la geometría del espectrográfico y con la calibración verdadera. 3 Los cambios en los parámetros de calibración hacen más difícil el lograr la igualdad en la calidad con los aspectos de la biblioteca. 	<p>PROCEDEMIENTO PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAS</p> <p>MANEJO DEL SISTEMA CLAS WATERS</p> <p>MANEJO DEL AUTOPRESTACION 1 17 PLUS WATERS</p> <p>MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS</p> <p>MANEJO PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS CALIBRACION DEL PDA</p> <p>La calibración del detector PDA 996 implica ajustar el instrumento para que las lecturas de la longitud de onda sean exactas. Sólo se debe recalibrar el detector PDA 996 si falla la prueba de diagnóstico interna wavelength accuracy asegure de verificar que la celda de flujo está limpia para la calibración. Calbra el detector 996 desde la ventana 996 Calibration del software Millennium 2.10.</p> <p>Para preparar la calibración:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 Si has estado usando buffers, limpia con agua calidad grado HPLC a una velocidad de 1 millón durante 10 minutos. Asegurate que el solvente sea metilcel con fase móvil anterior. 2 Programa la bomba a una velocidad de flujo de 1 ml/min con metanol desgasificado. 3 Espere 10 minutos antes de verificar la calibración. <p>Para acceder a la ventana 99 Calibration</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 Desde la ventana Sesión Manager de un click en el icono System View. Aparecerá los sistemas instrumentales. 2 Da un doble-click sobre el icono del sistema que contiene al detector PD 996 para acceder a la ventana Configure System. 3 Da un doble click sobre el icono del instrumento 996 Waters. Aparecerá la caja de diálogo Register Waters 996 o Bus LACREEE Address. 
---	---	---	--

<p>PROCEDEMIENTO PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAS</p> <p>MANEJO DEL SISTEMA CLAS WATERS</p> <p>MANEJO DEL AUTOPRESTACION 1 17 PLUS WATERS</p> <p>MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS</p> <p>MANEJO PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS CALIBRACION DEL PDA</p> <p>4 En la caja de dialogo, de un click en el botón Calibration. Aparecerá la ventana 996 Calibration.</p> <p>En la parte superior de la ventana 996 Calibration se despliega el espectro completo de la lámpara de emisión de Deuterio desde 100 a 900 nm.</p> <p>En la parte inferior de la ventana de Calibración se despliegan los marcadores de la longitud de onda de deuterio para las líneas Balmer 486.0 y 666.1 nm.</p> <p>La ventana 996 Calibration permite:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Verificar la ubicación de la longitud de onda en el espectro de deuterio para las líneas Balmer (486.0 y 666.1 nm) • Recalibrar para poner los picos a 486 nm a la longitud de onda apropiada. <p>Examine la Corriente Oscura</p> <p>La corriente oscura es la cantidad de ruido electrónico leído por el arreglo de fotodiodo. El detector testa la corriente oscura de los valores hechos transmidos registrados para ambos espectros al de la muestra y el de referencia.</p> <p>Ya que la corriente oscura se lee con el obturador cerrado, es conveniente examinarla para determinar si el obturador está trabajando apropiadamente.</p> <p>Para examinar la corriente oscura:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 Seleccione el botón de la caja Dark que se encuentra al final de la pantalla. 2 Seleccione RUN. Se desplegará para las líneas Balmer (486.0 y 666.1 nm). 	<p>PROCEDEMIENTO PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAS</p> <p>MANEJO DEL SISTEMA CLAS WATERS</p> <p>MANEJO DEL AUTOPRESTACION 1 17 PLUS WATERS</p> <p>MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS</p> <p>MANEJO PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS CALIBRACION DEL PDA</p> <p>Examine el Espectro de Referencia</p> <p>El espectro de referencia es una medida de la intensidad de la lámpara y de la absorbancia de la fase de móvil sobre el intervalo especificado por el tiempo de exposición.</p> <p>Para desplegar el espectro de referencia:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 Da un click en el botón Dark para apagar corriente oscura. 2 Da un click en el botón Run y aparecerá el espectro de referencia. La pantalla se actualiza continuamente hasta que se pulse el botón stop. <p>El tiempo de exposición para el espectro actual aparece en la parte inferior de la pantalla. Ajusta el tiempo de exposición para que la región alrededor de los 230 nm se encuentre en un valor de energía de 30,000 y 40,000. No debe exceder a una energía de 66,000.</p> <ol style="list-style-type: none"> 3 Para terminar, da un click al botón stop, si quieres puedas hacer un zoom para recalibrar o verificar la calibración. <p>Para aumentar una área del espectro de referencia:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Dibuja un rectángulo (caja zoom) alrededor del área de interés sujetando el botón izquierdo del ratón. El enfoque del área aparece en la cara del fondo. Puedes hacer un zoom varias veces para agudizar más aún una área del cromatograma. 2 Después de hacer un zoom selección. 3 El botón FullView Aparece el espectro completo. 
---	--	---	--

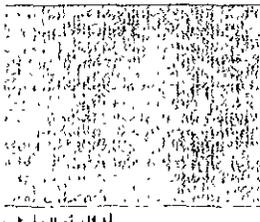
<p>PROCEDEMIENTO PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAS</p> <p>MANEJO DEL SISTEMA CLAS WATERS</p> <p>MANEJO DEL AUTOPRESTACION 7 17 PLUS WATERS</p> <p>MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS</p> <p>MANEJO PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS CALIBRACION DEL PDA</p> <p>Quite la ventana superior para seleccionar View, Top Window. La ventana Calibration 996 reaparece sin la ventana superior.</p> <p>Verificando la Calibración</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 Si los Marcadores de la Fuente de Deuterio no se despliegan, en la barra de menú selecciona View, Deuterium Source Markers. 2 En la barra de menú selecciona Calibration, Detect Lines. La ventana actualiza con un marcador indicando el ancho del pico máximo. 3 Para verificar la calibración, en la barra de menú selecciona Calibration Accuracy. Se despliega la caja de dialogo PDA Calibration Accuracy que muestra el error de la calibración para los picos y si la calibración esta fuera de la especificación de 1.0 nm. Entonces tienes la opción para Recalibrar. <div data-bbox="497 1128 712 1260"> </div> <p>4 Para ver la ubicación de los picos en la línea Balmer (486.0 y 666.1 nm), use la caja zoom para aumentar los picos indicados por los marcadores de la fuente de deuterio.</p> 	<p>PROCEDEMIENTO PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAS</p> <p>MANEJO DEL SISTEMA CLAS WATERS</p> <p>MANEJO DEL AUTOPRESTACION 7 17 PLUS WATERS</p> <p>MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS</p> <p>MANEJO PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS CALIBRACION DEL PDA</p> <p>Recalibrando la longitud de onda del PDA</p> <p>La Recalibración sólo debe realizarse cuando las ópticas que se exhiben sean fuera de la especificación de la longitud de onda de 3 nm. No recalibrar si la longitud de onda varía por menos de 3 nm.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 Para comenzar la recalibración: a) Desde la caja de dialogo PDA Calibration Accuracy has un click en el botón Recalibrate. b) Desde la ventana 996 Calibration en la barra de menú selecciona Calibration, Recalibrate. 2 Da un click en OK para confirmar que quieres recalibrar. <p>El software Millennium recalibra y guarda las nuevas ubicaciones del marcador del diodo en la memoria. Aparecerá la caja del dialogo que despliega los valores anteriores y los nuevos para Lambda 1 y Lambda 512.</p> <ol style="list-style-type: none"> 3 Da un click en el botón RUN para ver el espectro de referencia. 4 Confirma la recalibración en la barra de menú seleccionando Calibration, Check Detect Lines. 5 En la barra de menú selecciona Calibration, Calibration Accuracy para verificar la recalibración. 
---	--	---	--

<p>PROCEDEMIENTO PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAS</p> <p>MANEJO DEL SISTEMA CLAS WATERS</p> <p>MANEJO DEL AUTOPRESTACION 7 17 PLUS WATERS</p> <p>MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS</p> <p>MANEJO PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS CALIBRACION DEL PDA</p> <p>Reglas para Recalibrar</p> <p>Generalmente no es una buena idea recalibrar. Recientemente al instrumento se recomienda que solo se recalibre al instrumento bajo las circunstancias siguientes:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 El detector falle la prueba de confianza de la exactitud de la longitud de onda (El estado del LED parpadea). Esto significa que el instrumento ya no se encuentra a 1.0 nanómetros de exactitud de la longitud de onda específica. 2 Se observe un cambio grande en el valor de Lambda 1 o Lambda 512 (0.05 nm) que pueda tener una correlación con un cambio que afecte la óptica. Los posibles cambios incluyen cambiar la celda de flujo y cambiar la lámpara o un choque mecánico significativo. 3 Es necesario que la longitud de onda de valores exactos y se tienen los medios independientes para confirmar estos valores (como una solución de onda de hidrógeno). Recuerda que cada vez que el instrumento se recalibra puede ser necesario volver a medir los aspectos de la biblioteca. 	<p>PROCEDEMIENTO PARA EL MANEJO DEL INSTRUMENTAL CLAS</p> <p>MANEJO DEL SISTEMA CLAS WATERS</p> <p>MANEJO DEL AUTOPRESTACION 7 17 PLUS WATERS</p> <p>MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS</p> <p>MANEJO PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>MANEJO DEL DETECTOR PDA 996 WATERS CALIBRACION DEL PDA</p> <p>Reglas para Recalibrar</p> <p>Generalmente no es una buena idea recalibrar. Recientemente al instrumento se recomienda que solo se recalibre al instrumento bajo las circunstancias siguientes:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 El detector falle la prueba de confianza de la exactitud de la longitud de onda (El estado del LED parpadea). Esto significa que el instrumento ya no se encuentra a 1.0 nanómetros de exactitud de la longitud de onda específica. 2 Se observe un cambio grande en el valor de Lambda 1 o Lambda 512 (0.05 nm) que pueda tener una correlación con un cambio que afecte la óptica. Los posibles cambios incluyen cambiar la celda de flujo y cambiar la lámpara o un choque mecánico significativo. 3 Es necesario que la longitud de onda de valores exactos y se tienen los medios independientes para confirmar estos valores (como una solución de onda de hidrógeno). Recuerda que cada vez que el instrumento se recalibra puede ser necesario volver a medir los aspectos de la biblioteca. 
---	--	---	--

<p>MANEJO DEL</p> <p>CARACTERÍSTICAS DE</p> <p>MANEJO DEL SOFTWARE MILLENNIUM 2010</p> <p>MANEJO PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>		<p>MANEJO DEL</p> <p>CARACTERÍSTICAS DE</p> <p>MANEJO DEL SOFTWARE MILLENNIUM 2010</p> <p>MANEJO PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA DE MANEJO</p> <p>OPERAR EL SISTEMA CROMATOGRÁFICO</p> <p>CREACIÓN Y USO DE PROYECTOS</p> <p>CONEXIÓN DEL SISTEMA DE INSTRUMENTACIÓN</p> <p>DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA DE MANEJO</p> <p>MANEJO DEL SISTEMA DE MANEJO</p> <p>MANEJO Y PROYECTO DE MANEJO</p> 
--	---	--	--

<p>MANEJO DEL</p> <p>CARACTERÍSTICAS DE</p> <p>MANEJO DEL SOFTWARE MILLENNIUM 2010</p> <p>MANEJO PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>DESCRIPCIÓN DEL SOFTWARE MILLENNIUM</p> <p>Para entrar al Software Millennium 2010, basta que estar en Windows, selecciona haciendo doble clic sobre la ventana de Millennium y presiona el icono Session Manager. El software empezará a comunicarse con el sistema cromatográfico B18, con el o los detectores y con el automuestreador.</p> <p>Al terminar aparecerá la caja de diálogo Login en la cual debes escribir un nombre de usuario "User Name", el cual puede ser SYSTEM y tu Password el cual puede ser MANAGER. Inmediatamente presiona el botón Log In para entrar a la primer ventana de Millennium "Session Manager". En esta ventana se crean y se accesan a los proyectos, se configura el sistema cromatográfico, restaura y respalda proyectos, y realiza las tareas de la administración del sistema.</p> 	<p>MANEJO DEL</p> <p>CARACTERÍSTICAS DE</p> <p>MANEJO DEL SOFTWARE MILLENNIUM 2010</p> <p>MANEJO PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>DESCRIPCIÓN DEL SOFTWARE MILLENNIUM</p> 
--	---	--	---

<p>MANEJO DEL</p> <p>CARACTERÍSTICAS DE</p> <p>MANEJO DEL SOFTWARE MILLENNIUM 2010</p> <p>MANEJO PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>CONFIGURAR EL SISTEMA CROMATOGRÁFICO</p> <p>El software Millennium te permite usar varios instrumentos cromatográficos juntos (tal como bomba, detector y automuestreador). Este grupo de instrumentos se configuran desde la ventana Configure System. Configurar un nuevo sistema cromatográfico involucra:</p> 	<p>MANEJO DEL</p> <p>CARACTERÍSTICAS DE</p> <p>MANEJO DEL SOFTWARE MILLENNIUM 2010</p> <p>MANEJO PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>CONFIGURAR EL SISTEMA CROMATOGRÁFICO</p> <p>Para configurar un sistema cromatográfico, da un click en el icono system de la ventana Session Manager. Si quieres crear uno nuevo, selecciónalo en la barra de menú File, New. Si quieres configurar uno ya existente da un doble click en el icono del sistema que vas a modificar o selecciónalo en la barra de menú File, Open y aparecerá la ventana Configure System. En la parte superior izquierda de la ventana da un doble click a cada icono del instrumento que deseas agregar, y presiona el botón Add. El icono del instrumento seleccionado aparece en el panel derecho. En la barra de menú selecciona Instrument, configure LACIE Serial Ports para agregar la serie del instrumento al sistema. Inmediatamente aparece la caja de diálogo Configure LACIE Serial Ports. Espéctale la serie del instrumento y después presiona OK. Para remover un instrumento, da un click en el icono del instrumento apropiado del panel derecho y presiona el botón Remove.</p> <p>Para registrar un instrumento, da un click al icono del instrumento y en la barra de menú selecciona Instrument, Register, inmediatamente aparece la caja de diálogo Register. Registra la información requerida para cada instrumento y presiona OK. Para salvar el sistema, en la barra de menú selección File, Save As, aparece la caja de diálogo System Save As y registra el nombre del nuevo sistema, presiona OK. Para salir de la ventana selección File, Exit e inmediatamente regresará a la ventana Session Manager en la cual aparece el nuevo sistema cromatográfico en forma de icono.</p>
--	--	--	---

<p>MANEJO DEL</p> <p>CARACTERÍSTICAS DE</p> <p>MANEJO DEL SOFTWARE MILLENNIUM 2010</p> <p>MANEJO PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>CONFIGURAR EL SISTEMA CROMATOGRÁFICO</p> 	<p>MANEJO DEL</p> <p>CARACTERÍSTICAS DE</p> <p>MANEJO DEL SOFTWARE MILLENNIUM 2010</p> <p>MANEJO PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>CREACIÓN Y USO DE PROYECTOS</p> <p>El proyecto es el criterio básico de orden de la información. Representa el espacio en el disco duro en el que serán localizadas los identificadores de la información. Es recomendable crear proyectos para incluir información que tiene sentido mantenerse agrupada. Una adecuada administración del proyecto te permite mantener organizada la información para una búsqueda rápida y segura. Todos los proyectos son iguales respecto a su capacidad de análisis, cada uno se distingue del resto por la información que incluye.</p> <p>Crear un proyecto involucra:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Accesar a la ventana Session Manager • Accesar a la caja de diálogo New Project • Registrar y salvar el proyecto <p>Cuando creas un nuevo proyecto el software Millennium crea un folder vacío para desarrollar el proyecto en la ventana Project. Puedes copiar información de un proyecto existente a uno nuevo, también crear cualquier número de proyectos en el sistema. Cada proyecto ocupa aproximadamente un mínimo de 2 MB de espacio. Sólo el tamaño del disco duro limita al espacio y el número de proyectos que puedes crear.</p>
--	---	--	---

MANEJO DEL SOFTWARE MILLENNIUM 2010

CREACION DEL METODO SET

El conjunto de método puede contener diferente información, dependiendo de cómo se usen. Los métodos individuales que se usan dentro de un conjunto de método son los siguientes:

Método de Instrumento Selecciona un método de instrumento si el conjunto de método se usa para la obtención de resultados. Cuando seleccionas un método de instrumento, todos los canales asociados con el método instrumental se despliegan en la lista del canal.

Método de Proceso Selecciona un método de proceso si el conjunto de método es utilizado para procesar todos los canales de información.

Método de Reporte Selecciona un método de reporte si el conjunto de método es utilizado para imprimir un reporte.

Método de Exportación Selecciona un método de exportación si el conjunto de método es utilizado para exportar datos crudos o resultados en formato ASCII o AIA.

Menú Principal: Ayuda, Salida

MANEJO DEL SOFTWARE MILLENNIUM 2010

CREACION DEL METODO SET

Puedes crear un conjunto de método desde las siguientes ventanas del Software Millennium:

- Ventana Project (ícono Method view)
- Ventana Quick Set Control
- Ventana Review

Para crear un conjunto de método desde la ventana Project selecciona el ícono Method view en la barra de menú selecciona File New Method Set, aparece la caja de diálogo Method Set. En cada una de las cajas drop-down Instrument Method y Default Processing Method, escoge los métodos disponibles (instrumento, proceso, reporte y exportación). Esta caja de diálogo muestra el conjunto de método incluyendo método de instrumento, método proceso, método de reporte y método de exportación.

Para seleccionar un método de instrumento, en la caja drop-down Instrument Method, selecciona desde la lista un método de instrumento disponible. La opción del método aparece como una selección activada.

Menú Principal: Ayuda, Salida

MANEJO DEL SOFTWARE MILLENNIUM 2010

CREACION DEL METODO SET

Para seleccionar un método de proceso, en la caja drop-down Default Processing Method, selecciona desde la lista un método de proceso disponible. La opción del método aparece como una selección activada.

Para seleccionar un método de reporte en la caja drop-down Report Method selecciona desde la lista un método de reporte disponible. La opción del método aparece como una selección activada.

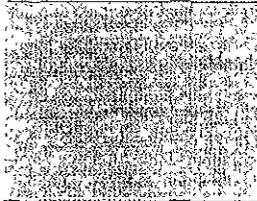
Para seleccionar un método de exportación, en la caja drop-down Export Method selecciona desde la lista un método de exportación disponible. La opción del método aparece como una selección activada.

Para salvar el conjunto de método, en la barra de selección File, Save aparece la caja de diálogo Method Set Save As. Escribe el nombre del conjunto de método en la caja de texto Save As Name para finalizar. Presiona el botón OK. El nuevo conjunto de método es agregado a la lista de la caja de diálogo. Para salir de esta caja de diálogo selecciona File Exit. La ventana Project aparece con el nuevo conjunto de método en forma de ícono.

Menú Principal: Ayuda, Salida

MANEJO DEL SOFTWARE MILLENNIUM 2010

CREACION DEL METODO SET



Menú Principal: Ayuda, Salida

MANEJO DEL SOFTWARE MILLENNIUM 2010

USAR EL MODO QUICKSTART

La ventana QuickSet Control te permite iniciar el análisis cromatográfico y por lo tanto obtener el reporte directamente. Así también el manejo de los instrumentos y su modificación del método.

Para acceder a la ventana QuickSet Control, da un click en el ícono QuickStart de la ventana Project, dicha ventana consiste de las siguientes partes:

- Menú principal
- Información de métodos
- Tabla de edición de muestras
- Cuadro de concentraciones
- Botón de control de instrumentos
- Información de estatus (mensajes y campos)
- Monitores
- Instrumentos

Menú Principal: Ayuda, Salida

MANEJO DEL SOFTWARE MILLENNIUM 2010

USAR EL MODO QUICKSTART

Para ejecutar las inyecciones selecciona el modo de sample set mode. Posteriormente debes que llenar la tabla de muestras con la siguiente información:

- Número de vial
- Nombre de la muestra
- En Función el tipo de inyección (selecciona Sample Set Mode)
- Volumen de la muestra
- Method Set especificado
- El tiempo de corrida
- Peso de la muestra

Posteriormente con la flecha del cursor selecciona la primera línea de la tabla de muestras y este aparecerá marcado en negro. Dar un click en el ícono Method que se encuentra en la parte inferior derecha de la tabla de muestras, selecciona en la ventana siguiente, dando un click en la cascada de métodos ya existentes y elige el método que vas a usar. Posteriormente en la siguiente caja de diálogo has click sobre Setup Instrument (si) software te mandará un mensaje informándote acerca del estado de tu método.

Menú Principal: Ayuda, Salida

MANEJO DEL SOFTWARE MILLENNIUM 2010

USAR EL MODO QUICKSTART

Selecciona el ícono de salir, para poder manejar tu método desde la ventana interactiva de Quick Set Control.

Una vez editada la tabla, podrás iniciar la corrida de las muestras en el ícono de Run Tray/Run SampleSet aparecerá un diálogo en donde te preguntará al core el renglón seleccionado, o el conjunto de muestras y presiona el botón Run SampleSet.

Una vez terminado el análisis sal de la ventana Quick Set seleccionando File, Exit.

Menú Principal: Ayuda, Salida

MANEJO DEL SOFTWARE MILLENNIUM 2010

USAR EL MODO QUICKSTART



Menú Principal: Ayuda, Salida

DESARROLLO DEL METODO DE PROCESO

El metodo de procesamiento define la manera en la cual el software Millennium detecta e integra y cuantifica los datos adquiridos. Un metodo de procesamiento integra a un Method Set para instruir al software Millennium como procesar los datos calibrar estándares y cuantificar muestras desconocidas.

El desarrollo del Metodo de Proceso involucra las siguientes etapas:

- Integración de una muestra típica
- Identificación de los componentes de la muestra
- Definición de la base de cálculo tipo de calibración y ajuste de la curva
- Integración del Metodo de Proceso dentro del Metodo Set

Para desarrollar un Metodo de Proceso se requiere:

- Haber adquirido al menos una inyección representativa del método de análisis en la que se observe el pico más pequeño de interés y de ser posible, el más difícil de integrar (estándar o muestra)
- Contar con un Metodo de Instrumento optimizado y un Metodo Set.

PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

DESARROLLO DEL METODO DE PROCESO

Para editar un Metodo de Proceso

En la ventana del proyecto "Project" presiona el icono de la herramienta Review para seleccionar la inyección deseada y los datos del canal (estándares y desconocidos), aparece la ventana Review. En esta ventana selecciona File, New Method. Aparece la caja de dialogo New Method. Selecciona una opción de procesamiento apropiada para los datos.

De un click en el icono Channel View, sople el canal del cual quieras extraer el cromatograma. da un click en el icono PDA Review. Accesa en options y selecciona Extract Chromatogram, y extrae a la longitud de onda deseada con ayuda del cursor bajando la línea horizontal. En options, selecciona Set Processing Channel, entra nuevamente en options y selecciona Calculate Result. En esta ventana selecciona File y Save Result. En la barra de comandos selecciona File, Save y da un nombre al método de proceso. Selecciona nuevamente File, Exit.

PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

DESARROLLO DEL METODO DE PROCESO

En la ventana de proyecto "Project" selecciona el icono Result View, sople el resultado recientemente adquirido, da un click en el icono Review. En esta ventana realiza la integración de la siguiente manera:

Accesa en View, selecciona Integración Table, da valores altos en el área mínima pero no mayor del pico de interés selecciona el pico más agudo y da un click en el ancho del pico, mediante un acercamiento a nivel de línea base. Selecciona un intervalo de área donde no haya ruido y da un click en la evaluación del ruido (threshold).

Da un click en el botón Integrate, y si no es adecuada la integración optimízala mediante el ancho del pico y ruido, recordando que a valores bajos, se pueden integrar picos debido al ruido, una vez que se tenga la integración adecuada, da un click en Calibrate.

Accesa en View, selecciona Component table, despues entra en Options y selecciona Fill Table from Result. En la tabla que aparece abajo, da el nombre a los picos, la ventana, la muestra que se va a llevar a cabo la cuantificación (area o altura), declarar el estándar interno (si aplica), en la columna de Quant By, selecciona Linear thru zero que es el modo por el cual se va a generar la curva de calibración con un solo estándar.

PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

DESARROLLO DEL METODO DE PROCESO

Si se está trabajando con estándares dar click en Calibrate, si es una muestra dar click en Quantate, para que aparezcan los nombres arriba de los picos. Accesa en Applications, Parameters y da el tiempo de columna muerto y selecciona Calculate Suitability Results, dar OK. Da nuevamente, Integrate y Calibrate, para calcular estos resultados. Da click en File, selecciona Save Method As, y da un nombre al método de proceso (El cual se guardará al proyecto) Da File, Exit.

En la ventana de proyecto presiona el icono Method View, para acceder a la vista Method, busca el Method Set creado y da doble click en éste. Accesa en Edit, Derived Channel da un click en Extract e indica la longitud de onda seleccionada cuando se realizó la extracción del cromatograma. Selecciona File, Save As y da un nombre, indica la longitud de onda. Selecciona File, Exit.

En la ventana del Method Set, activa la casaca Default Processing Method y selecciona el Método de Proceso creado, en la tabla introduce el nombre del canal y el método de procesamiento. Selecciona File, Save, y File, Exit.

Así una vez creado el método de procesamiento todos los subsecuentes análisis, podrán ser obtenidos en cromatogramas y cuantificando las muestras desconocidas. Por lo que en la ventana Quick Set Control, se dirige en Run Mode, Run and Report.

PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

DESARROLLO DEL METODO DE PROCESO

PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

CARACTERISTICAS DEL SOFTWARE

Para que te familiarices con el Software Millennium 2010, es importante que tengas una idea general del programa, conozcas las ventanas que forman parte del sistema, así como de los iconos y

PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

CARACTERISTICAS DEL SOFTWARE

GENERALIDADES

El software Millennium es un programa que te permite trabajar en cualquier aplicación cromatográfica. Cromatografía Líquida de Alta Resolución, Cromatografía Iónica Electroforética Capilar, Cromatografía de Gases, etc. Combina una base de datos integrada cuyos formatos son muchos, quizá las más evidentes son la posibilidad de recuperar la información cromatográfica copiando cualquier campo asociado al cromatograma y la posibilidad de integrar los resultados por normativas de calidad e imposibles de conseguir en programas que almacenan la información en Archivos ODS.

La base de datos con la que cuenta Millennium te puede utilizar para diferentes aplicaciones:

- Localizar cualquier resultado usando fácil y rápidamente identificaciones ajustándose a las necesidades (no solo el nombre de la
- Personalizar la manera de buscar la información (usando vistas)
- Añadir campos (identificaciones de la muestra, resultados, y cálculos de interés) a la base de datos
- Comparar los datos cromatográficos entre los usuarios y proyectos en una configuración del cliente/servidor.

El software Millennium te permite usar varios instrumentos cromatográficos juntos (como son la bomba, el detector, y el automuestreador Waters). Puedes usar estos instrumentos como un sistema en conjunto desde la ventana

PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

CARACTERISTICAS DEL SOFTWARE

GENERALIDADES

La potente combinación entre el Detector Waters 996 de Fotodiodos con el software Millennium asegura una confianza completa en sus resultados, permite adquirir, almacenar y recuperar cromatogramas a una sola longitud de onda, cromatogramas a varias longitudes de onda o un espectro completo, o los tres a la vez. Se puede comprobar la pureza de pico y ver los detalles espectrales. Todos los cálculos tienen lugar durante la adquisición de datos y se hallan disponibles en cualquier momento de la separación.

PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

CARACTERÍSTICAS DEL SOFTWARE
GENERALIDADES

El Sistema Administrador Cromatográfico Millennium 2010 te permite:

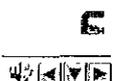
- Adaptar el funcionamiento del sistema Millennium para satisfacer tus necesidades (en el desarrollo de métodos en la investigación y en pruebas de control de calidad).
- Adquirir los datos y controlar los instrumentos locales.
- Procesar los datos de forma interactiva.
- Personalizar la generación y el diseño de reportes.
- Compartir los datos y métodos entre los usuarios.
- Compartir la instrumentación y el desarrollo de los métodos.

El programa se caracteriza por los siguientes aspectos importantes de estructura:

- Organización de Información a través de Proyectos.
- Elementos visuales intuitivos.
- Secuencia lógica de análisis cromatográfico.

La información que se genera dentro de Millennium puede ser de dos tipos y con diferentes categorías:

Métodos
Instrumento
Proceso
Reporte
Conjunto de Métodos



CARACTERÍSTICAS DEL SOFTWARE
GENERALIDADES

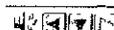
Los recursos de Millennium para la manipulación y búsquedas de la información se denominan:

- Proyectos (Projects)** Área de almacenamiento de información agrupada con un objetivo particular.
- Vistas (Views)** Ayuda visual para identificación de información.
- Filtros (Filters)** Criterios de búsqueda de información dentro del Proyecto.
- Campos (Fields)** Parámetros de identificación de la información.
- Herramientas (Tools)** Ayuda visual para manejo de información (adquisición, cálculo, impresión, modificación).

La jerarquía de uso es una característica de Millennium, existen usuarios con diferentes privilegios:

- Nivel 1 Administrador del Sistema
- Nivel 2 Químico
- Nivel 3 Analista
- Nivel 4 Visitante

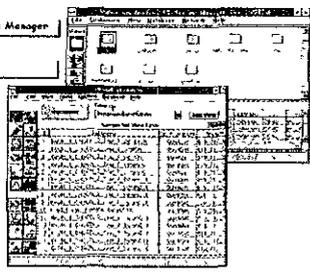
Todo usuario de Millennium deberá contar con un nombre de usuario (User Name) y clave de acceso (Password) para hacer uso del mismo.



CARACTERÍSTICAS DEL SOFTWARE
VENTANAS DE MILENNIUM

El programa Millennium tiene acceso a dos ventanas principales: **Session Manager** y **Project**. A partir de ellas se puede acceder a otras ventanas:

- Ventana Session Manager**
- Ventana Project**



CARACTERÍSTICAS DEL SOFTWARE
VENTANAS DE MILENNIUM

Ventana Session Manager

Si no cuentas con un proyecto predefinido la ventana Session Manager es la que aparece después de introducir el nombre de usuario y el password en la caja de diálogo, cuando accedes por primera vez a Millennium. Esta ventana está formada por las siguiente partes:

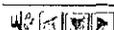
- Barra de Menú** Incluye comandos para definir proyectos, define sistemas cromatográficos, y realiza tareas de la administración del sistema.
- Iconos Views** Controla el contenido del área de vista "view".
- Área View** Muestra la información correspondiente a la vista "view" seleccionada. El área de vista contiene información accesible para registrar al usuario (tal como el proyecto o el sistema de folders).

Tabla de Mensaje

La tabla de mensaje del software Millennium contiene información y mensajes de error que no requieren una atención inmediata.

Ayuda Puntual

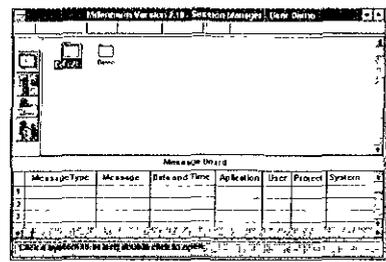
Despliega una línea de información sobre un artículo específico dentro de la ventana.



CARACTERÍSTICAS DEL SOFTWARE
VENTANAS DE MILENNIUM

Ventana Session Manager

En esta ventana puedes presionar los botones de la barra de menú e iconos y se desplegará su contenido:

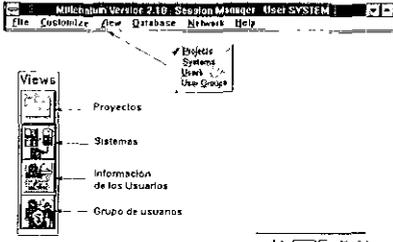


CARACTERÍSTICAS DEL SOFTWARE
VENTANAS DE MILENNIUM

Ventana Session Manager

Descripción de los Iconos de Vista "Views" de la ventana Session Manager

Para seleccionar cualquiera de los iconos Views, puedes dar un doble click sobre el icono seleccionado o usar la barra de menú:

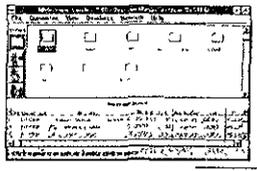


CARACTERÍSTICAS DEL SOFTWARE
VENTANAS DE MILENNIUM

Ventana Session Manager

Project

De un click en el icono view **Project** para desplegar las carpetas del proyecto que están disponibles para el usuario (definido por el administrador del sistema). De un doble click sobre la carpeta del proyecto para abrir la ventana Project. Cada carpeta de proyecto contiene un grupo de información relacionada (tal como muestras, métodos, datos y resultados). Puedes usar un grupo de proyectos con información relacionada. Para crear proyectos usa la barra de menú selecciona **File, New**. Puede haber un número de usuarios para cualquier proyecto definido por el sistema del software Millennium.

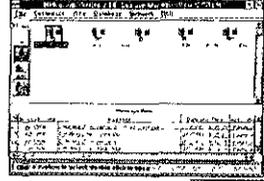


CARACTERÍSTICAS DEL SOFTWARE
VENTANAS DE MILENNIUM

Ventana Session Manager

System

De un click en el icono view **Systems** para desplegar los sistemas cromatográficos que están disponibles registrados para el usuario (definido por el administrador del sistema). Cada sistema desplegado en la vista representa un sistema cromatográfico específico y consiste en instrumentos de la interfase de la serie Waters IEE-498. Puedes configurar los sistemas a través de la ventana **Configure System**. Puede haber un número de usuarios para cualquier sistema cromatográfico, definido por el sistema del software Millennium.

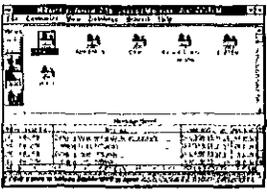


CARACTERÍSTICAS DEL SOFTWARE
 VENTANAS DE MILENINIUM

Windows Session Manager

User Accounts

De un click en el icono **View User Accounts** para desplegar a todos los usuarios del sistema definidos por el administrador del sistema. Cada informe del usuario que se despliega es definido por el sistema del software Millennium, este considera al usuario y los privilegios de acceso a través de la caja de diálogo.



NAME: J001
 SOFTWARE: MILLENNIUM.PPI.2010

PRINCIPIAL: MENÚ PRINCIPAL

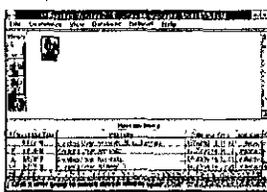
AYUDA: SALIDA

CARACTERÍSTICAS DEL SOFTWARE
 VENTANAS DE MILENINIUM

Windows Session Manager

User Groups

De un click en el icono **View User Groups** para desplegar todos los sistemas de grupos de usuarios definidos por el administrador del sistema. Cada grupo de usuarios desplegado representan a los miembros que tienen acceso a los mismos proyectos en el software Millennium. Puedes crear grupos de usuarios a través de la caja de diálogo User Group.



NAME: J001
 SOFTWARE: MILLENNIUM.PPI.2010

PRINCIPIAL: MENÚ PRINCIPAL

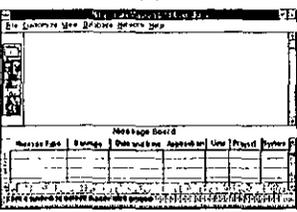
AYUDA: SALIDA

CARACTERÍSTICAS DEL SOFTWARE
 VENTANAS DE MILENINIUM

Windows Session Manager

Descripción de la Tabla de Mensajes 'Message Board'

La tabla Message Board consta de una área para 500 mensajes temporales del sistema. Esta tabla despliega información, advertencias y mensajes de error. Todos los mensajes aparecen en la tabla Message Board en orden de aparición y de forma cronológica, con nuevos mensajes agregados al fondo de la tabla.



NAME: J001
 SOFTWARE: MILLENNIUM.PPI.2010

PRINCIPIAL: MENÚ PRINCIPAL

AYUDA: SALIDA

CARACTERÍSTICAS DEL SOFTWARE
 VENTANAS DE MILENINIUM

Windows Session Manager

Tipos de Mensajes

Error "Error": Indica las condiciones de error, como Puzza del Pico y errores en igualar la Biblioteca (con la opción del PDA).

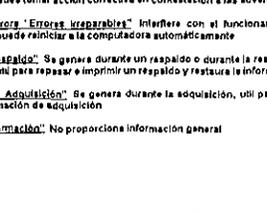
Warning "Advertencia": Mantiene información como No suficiente espacio en el disco actual. Puedes tomar acción correctiva en consistencia a las advertencias.

Irrecoverable Error "Error irreparable": Interfiere con el funcionamiento de la computadora y puede reiniciar a la computadora automáticamente.

Backup Log "Respaldo": Se genera durante un respaldo o durante la restauración de la información, útil para repasar e imprimir un respaldo y restaura la información.

Acquisition Log "Adquisición": Se genera durante la adquisición, útil para repasar e imprimir la información de adquisición.

Information "Información": No proporciona información general.



NAME: J001
 SOFTWARE: MILLENNIUM.PPI.2010

PRINCIPIAL: MENÚ PRINCIPAL

AYUDA: SALIDA

CARACTERÍSTICAS DEL SOFTWARE
 VENTANAS DE MILENINIUM

Windows Project

Si cuentas con un proyecto predefinido la ventana Project, es la que aparece cuando accedamos por primera vez a Millennium y la ventana Session Manager se minimiza automáticamente, desplegándose como un icono al fondo de la pantalla.

Para acceder a la ventana **Project** desde la ventana Session Manager, puedes hacerlo de dos formas:

- 1 Hacer doble click en el icono en forma de folder (project) de la ventana Session Manager.
- 2 Da un click en el icono del proyecto, en la barra de menú de la ventana Session Manager, selecciona **File Open**.

La ventana **Project** contiene las siguientes partes:

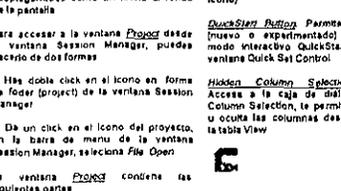
View Icons: Controla el contenido del área 'view'.

View Area: Despliega información correspondiente a la vista 'view' seleccionada (en forma de tabla o icono).

QuickStart Buttons: Permite al usuario (museo o experimentado) acceder a la ventana Quick Set Control.

Hidden Column Selection Button: Accede a la caja de diálogo Hidden Column Selection, te permite desplegar u ocultar las columnas desplegadas en la tabla View.

Menu Bar: Incluye comandos que definen la operación seleccionada del proyecto.



NAME: J001
 SOFTWARE: MILLENNIUM.PPI.2010

PRINCIPIAL: MENÚ PRINCIPAL

AYUDA: SALIDA

CARACTERÍSTICAS DEL SOFTWARE
 VENTANAS DE MILENINIUM

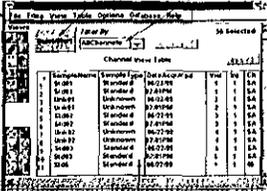
Windows Project

Tools: Realiza una acción sobre un punto seleccionado en una 'view'.

Project Help: Despliega una línea de información sobre un punto específico dentro de la ventana.

Botón

Filtros view



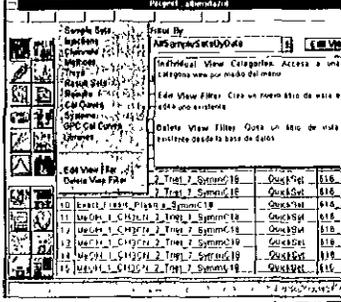
NAME: J001
 SOFTWARE: MILLENNIUM.PPI.2010

PRINCIPIAL: MENÚ PRINCIPAL

AYUDA: SALIDA

CARACTERÍSTICAS DEL SOFTWARE
 VENTANAS DE MILENINIUM

Windows Project



NAME: J001
 SOFTWARE: MILLENNIUM.PPI.2010

PRINCIPIAL: MENÚ PRINCIPAL

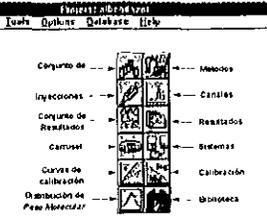
AYUDA: SALIDA

CARACTERÍSTICAS DEL SOFTWARE
 VENTANAS DE MILENINIUM

Windows Project

Descripción de los Iconos de Vista "Views" de la ventana Project

Para seleccionar cualquier de los Iconos View, puedes dar un doble click sobre el icono seleccionado u utilizar la barra de menú View.



NAME: J001
 SOFTWARE: MILLENNIUM.PPI.2010

PRINCIPIAL: MENÚ PRINCIPAL

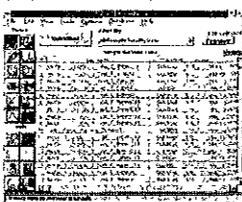
AYUDA: SALIDA

CARACTERÍSTICAS DEL SOFTWARE
VENTANAS DE MUESTREO

Ventana Project
Conjunto de Muestras "Sample Set"

De un click en el icono **Sample Set** para desplegar la tabla del conjunto de muestras. Selecciona una de la lista y de un doble click al conjunto de muestras para trabajar inmediatamente aparece la tabla **Injection**. Si deseas salir de esta tabla da un click en el icono **Sample Set**. Los campos que contiene la tabla **Sample Set** son:

- > Fecha
- > Nombre del procedimiento de operación
- > Nombre del Conjunto de Muestras
- > Nombre del Sistema



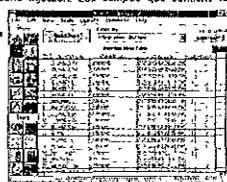
Nombre del Software: MILENIO 2010
 Nombre Principal: ATENA SALIDA

CARACTERÍSTICAS DEL SOFTWARE
VENTANAS DE MUESTREO

Ventana Project
Inyecciones "Injections"

De un click en el icono **Injection** para desplegar la tabla de inyecciones. Cada una de las inyecciones mostradas en la lista, representan un proceso, adquisición de datos crudos (cromatogramas sin integrar, sin derivar, etc.) incluyendo todos los canales desde una sola inyección. De un doble click a la fila donde se encuentra la inyección que vas analizar, e inmediatamente accesa a la tabla **Channel**. Si deseas salir de esta tabla, de un click en el icono **Injection**. Los campos que contiene la tabla **Injection** son:

- > Identificaciones de la muestra
- > Fecha
- > Fecha de adquisición
- > Dilución
- > Inyección
- > Nivel
- > Procedimiento de Operación
- > Nombre de la muestra
- > Tipo de muestra
- > Peso de la muestra
- > Nombre del conjunto
- > Sistema
- > Número de vial
- > Volumen (inyección)



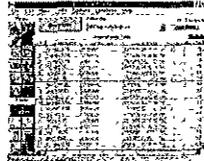
Nombre del Software: MILENIO 2010
 Nombre Principal: ATENA SALIDA

CARACTERÍSTICAS DEL SOFTWARE
VENTANAS DE MUESTREO

Ventana Project
Canales "Channel"

De un click en el icono **Channel** para desplegar la tabla de información de los canales. Cada canal representa un proceso, adquisición de datos crudos. De un doble click a la fila de la tabla **Channel** que deseas analizar, inmediatamente accesa a la ventana **Review Data** con los datos procesados, se despliegan los cromatogramas. Para salir de esta ventana y regresar a la tabla **Channel**, en la barra de menú selecciona **File, Exit**. Los campos que contiene la tabla **Channel** son:

- > Identificaciones de la muestra
- > Adquisición del Método Set
- > Adquirido por
- > Canal
- > Tipo de cromatograma (2D o 3D)
- > Salida de datos
- > Fecha de adquisición
- > Unidades del detector
- > Descripción
- > Dilución
- > Inyección
- > Nivel
- > Procedimiento de Operación
- > Tiempo de corte
- > Nombre de la muestra
- > Tipo de muestra



Nombre del Software: MILENIO 2010
 Nombre Principal: ATENA SALIDA

CARACTERÍSTICAS DEL SOFTWARE
VENTANAS DE MUESTREO

Ventana Project
Método "Method"

De un click en el icono **Method** para desplegar los métodos instrumentales disponibles, métodos de procesamiento, métodos de reporte, procedimientos de operación y conjunto de métodos. Puedes desplegar los métodos en forma de iconos o de tabla. De un doble click en el icono del método que hayas seleccionado para acceder a la información. Para salir de esta ventana y regresar a la ventana **Method** en la barra de menú selecciona **File, Exit**. Los campos que contiene la tabla **Method** son:

- > Nombre
- > Fecha
- > Tipo de método
- > Acceso
- > Modificado por el usuario
- > Bloqueado por el usuario



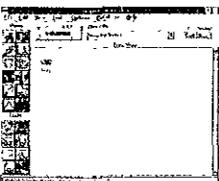
Nombre del Software: MILENIO 2010
 Nombre Principal: ATENA SALIDA

CARACTERÍSTICAS DEL SOFTWARE
VENTANAS DE MUESTREO

Ventana Project
Cajón "Tray"

De un click en el icono **Tray** para desplegar el nombre de los cajones de las muestras. Cada nombre representa las muestras utilizadas para realizar la carga y crear conjuntos de muestras. Puedes desplegar los cajones en forma de iconos o de tabla. Usa el icono **Tray** para crear un nuevo cajón de muestra, modificar uno ya existente o acceder a la ventana **Sample Loading** inmediatamente se despliegan los iconos después de crear y salvar un nuevo cajón de muestra. Los campos que contiene la tabla **Tray** son:

- > Nombre
- > Fecha



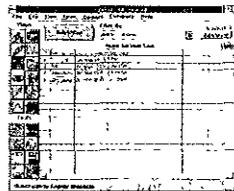
Nombre del Software: MILENIO 2010
 Nombre Principal: ATENA SALIDA

CARACTERÍSTICAS DEL SOFTWARE
VENTANAS DE MUESTREO

Ventana Project
Conjunto de Resultados "Result Set"

De un click en el icono **Result Set** para desplegar la tabla del conjunto de resultados. A cada conjunto se le asigna un nombre que representan los resultados generados en el conjunto de muestras procesadas. De un doble click a una de las líneas de la tabla **Result Set** para acceder a la ventana **Result**. Para salir de esta tabla, de un click al icono **Result Set**. Los campos que contiene la tabla **Result Set** comprenden:

- > Fecha de procesamiento
- > Nombre del procedimiento de operación
- > Nombre del conjunto de muestras



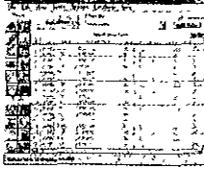
Nombre del Software: MILENIO 2010
 Nombre Principal: ATENA SALIDA

CARACTERÍSTICAS DEL SOFTWARE
VENTANAS DE MUESTREO

Ventana Project
Resultados "Result"

De un click en el icono **Result** para desplegar la tabla de resultados procesados. Cada resultado generado representa un proceso de datos crudos desde un canal de datos "Channel". De un doble click a la línea de la tabla **Result** para desplegar el proceso de datos, inmediatamente accesa a la ventana **Review Data**. Para salir de esta ventana en la barra de menú selecciona **File, Exit**. Los campos que contiene la tabla **Result** son:

- > Identificaciones de la muestra
- > Adquirido por
- > Adquisición del Método Set
- > Canal
- > Nombre del canal
- > Tipo de cromatograma (2D o 3D)
- > Salida de datos
- > Fecha de adquisición
- > Fecha de procesamiento
- > Descripción
- > Unidades del detector
- > Dilución
- > Defecto
- > Inyección
- > Nivel



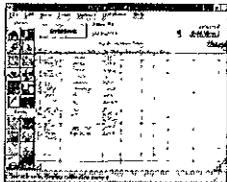
Nombre del Software: MILENIO 2010
 Nombre Principal: ATENA SALIDA

CARACTERÍSTICAS DEL SOFTWARE
VENTANAS DE MUESTREO

Ventana Project
Curvas de Calibración "Calibration Curves"

De un click en el icono **Calibration Curves** para desplegar la tabla de las curvas de calibración generadas. Cada curva de calibración representa una curva generada para un componente específico. De un doble click a la línea de la tabla **Calibration Curves** para acceder a la ventana **Compare Calibration Curve** y comparar la curva de calibración desplegada. Para salir de esta ventana, en la barra de menú selecciona **File, Exit**. Los campos que contiene la tabla **Calibration Curves** son:

- > A, B, C, D, E, F (coeficientes de calibración)
- > Canal
- > Fecha
- > Nombre
- > Origen
- > Método de proceso
- > R²
- > Tiempo de retención
- > Error de estándar
- > Sistema
- > Tipo

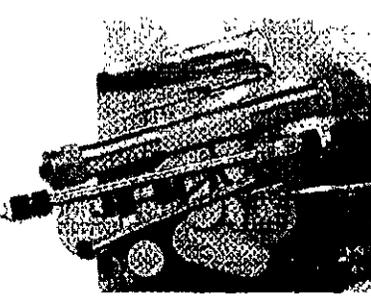


Nombre del Software: MILENIO 2010
 Nombre Principal: ATENA SALIDA

CELEBRAS Y

COLUMNAS

SUBVENCIONES



PRINCIPAL

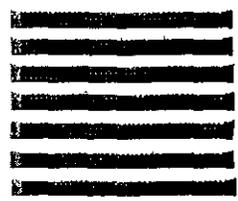
ARTIDA SALIDA

CELEBRAS Y

COLUMNAS

SUBVENCIONES

En todo sistema cromatográfico ya sea fase líquida o gaseosa, la columna es la base o "alma" del sistema, debido a que en ella se lleva a cabo la separación de los componentes de la muestra en estudio. Consiste en un segmento de tubo de algún material inerte, de diámetro uniforme y capaz de soportar presiones altas. El material más común es acero inoxidable. La capacidad de la columna depende de su longitud, diámetro y material de relleno.



PRINCIPAL

ARTIDA SALIDA

CELEBRAS Y

COLUMNAS

SUBVENCIONES

Las características más importantes de las columnas para CLAR se integran de dos elementos importantes que son: el material de empaque o de relleno, el cual está constituido por partículas definidas por una serie de características: morfología, tamaño, porosidad y estructura química de la partícula, y el contenedor que implica longitud, diámetro y material de la columna, que junto con las propiedades de ambas se determina el desempeño de la misma.

COLUMNA

```

    graph TD
      C[COLUMNA] --- M[MATERIAL DE EMPAQUE]
      C --- CO[CONTENEDOR]
      M --- MOR[MORFOLOGÍA]
      M --- POR[POROSIDAD]
      MOR --- DIA[DIAMETRO DE]
      MOR --- E[ESTRUCTURA QUÍMICA]
      CO --- MAT[MATERIA]
      CO --- L[LONGITUD]
      CO --- DI[DIAMETRO]
    
```

PRINCIPAL

ARTIDA SALIDA

CELEBRAS Y

COLUMNAS

SUBVENCIONES

Morfología de las Partículas

Partículas Irregulares

Los empaques de formas irregulares están disponibles en tamaños grandes a diferencia de los empaques esféricos, pero no están disponibles generalmente menos de 5 micras de diámetro. Llanos bien áreas superficiales específicas más altas que aquellos que se encuentran en partículas esféricas. En general, las partículas irregulares son más difíciles de condensar que las partículas esféricas. Columnas condensadas con partículas irregulares pequeñas pueden exhibir estabilidad en el empaque más pobre que aquellos preparados con partículas esféricas del mismo tamaño. Sin embargo, el rango de tamaños de las partículas más grandes y áreas superficiales así como el precio es más bajo, por lo que hace a las partículas irregulares tan más atractivas para las aplicaciones preparativas.



PRINCIPAL

ARTIDA SALIDA

CELEBRAS Y

COLUMNAS

SUBVENCIONES

Morfología de las Partículas

Partículas Esféricas

La mayoría de los empaques analíticos actualmente disponibles son esféricos. Estos son más fáciles de empaquetar que los de forma irregular. Pueden lograr un buen desempeño, una buena estabilidad de la columna, una baja presión y reproducibilidad. Los materiales esféricos están disponibles en tamaños de partícula de 3 µm a más de 20 µm. El tamaño de partícula más popular para las columnas analíticas es de 5 µm, pero el uso en columnas cortas es de 3 µm, el cual es un aumento. Esto se debe al hecho de que en la preparación de columnas de 3 µm la tecnología ha mejorado durante los últimos años. Hoy, las columnas cortas de 3 µm logran el mismo tiempo de vida media y desempeño como las columnas de 5 µm pero proporcionan el beneficio de tiempos del análisis más cortos.



PRINCIPAL

ARTIDA SALIDA

CELEBRAS Y

COLUMNAS

SUBVENCIONES

Morfología de las Partículas

Las estadísticas indican fuertemente a emplear partículas esféricas, no por razones de resolución (al bien es probable que la partícula esférica pueda empaquetarse mejor, resultando indirectamente en una columna más eficiente), sino simplemente de resistencia mecánica de la partícula, menos sensible al desgaste, y a la mayor permeabilidad de la columna al paso de la fase móvil resultando en menores presiones y con esto a un menor "ruido" del equipo. En cromatografía preparativa, en cambio, se emplean partículas mayores de 10 a 200 µm de diámetro, que ofrecen mejor balance resolución-permeabilidad.

La siguiente tabla muestra la comparación entre partículas irregulares y esféricas.

PROPIEDADES	PARTÍCULA IRREGULAR	PARTÍCULA ESFÉRICA
Resolución	Alta	Alta
Permeabilidad	Baja	Alta
Presión	Alta	Baja
Capacidad	Baja	Alta
Costo	Alto	Bajo
Estabilidad	Baja	Alta
Reproducibilidad	Baja	Alta
Disponibilidad	Baja	Alta
Aplicaciones	Preparativas	Análisis

PRINCIPAL

ARTIDA SALIDA

CELEBRAS Y

COLUMNAS

SUBVENCIONES

Dimensiones de Partículas

El tamaño de partícula del material de empaque tiene un efecto en dos parámetros. El primero es la presión de operación de la columna. La presión aumenta en función inversa al cuadrado del diámetro de la partícula. El segundo es la eficiencia de la separación. Las partículas más pequeñas dan eficiencias más altas a una longitud de columna constante, debido a la trayectoria más corta de difusión. Un buen empaque de columna de 3 µm dará una eficiencia de separación casi dos veces equivalente a una columna de 6 µm, pero cuesta cuatro veces la presión de operación a la misma longitud de la columna y a una velocidad.

Afortunadamente, el tamaño del empaque más popular es de 6 µm. Partículas de este tamaño exhiben eficiencias más altas que empaques de 10 µm en un momento de análisis dado, y con una presión razonable. Empaques de 3 µm en columnas cortas están siendo más populares. Los empaques anteriores utilizados en columnas con partículas de 3 µm sufren una vida corta, pero hoy la tecnología ha mejorado de manera exitosa para que puedan obtenerse eficiencias altas con empaques modernos de 3 a 35 µm sin comprometer vida de la columna.

PRINCIPAL

ARTIDA SALIDA

CELEBRAS Y

COLUMNAS

SUBVENCIONES

Dimensiones de Partículas

Empaques de 3 µm Si eliges un empaque de 3 µm de diámetro de partícula, puedes obtener análisis más rápidos sin pérdida de la eficiencia o sin sacrificar la vida de la columna.

Empaques de 5 µm Es la opción del tamaño de partícula para la mayoría de las columnas analíticas rutinarias, debido a la combinación en un alto desempeño de la separación y una presión de operación moderada.

Empaques de 10 µm Es el tamaño de partícula normal para las aplicaciones analíticas, empaques de 10 µm tienen a habilidad de dar buena resolución con eficiencias moderadas, a una presión de operación baja, incluso con columnas largas.

Partículas mayores de 10 µm Partículas mayores de 10 µm son principalmente aplicadas en cromatografía preparativa. Un rango creciente de material preparativo esférico está disponible hoy, pero con un límite de tamaño de 20 µm. Empaques mayores de 20 µm sólo están disponibles en partículas de formas irregulares.

PRINCIPAL

ARTIDA SALIDA

Porosidad

La porosidad es responsable de los fenómenos de exclusión y de la velocidad de transferencia de masa de soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria.

El área superficial parámetro que determina la capacidad de retención de la fase estacionaria está compuesta por el área externa (superficial) de la

En otras palabras el diámetro del poro determina por un lado el área superficial y por otro los fenómenos esféricos de exclusión. En general a menor diámetro de poro corresponde mayor área superficial y consecuentemente mayor retención.

HEMIPRINCIPAL
AYUDA SALIDA

Material

La cromatografía líquida convencional usa columnas de plástico o de vidrio que pueden ir de unos centímetros a varios metros. Las longitudes más comunes son 10-100 cm, las columnas más largas se usan para las separaciones preparativas.

Las columnas para Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) son tubos de



HEMIPRINCIPAL
AYUDA SALIDA

Diámetro de la Columna

El diámetro de la columna tiene influencia sobre cinco parámetros de mucha importancia. Ellos son la eficiencia, la retención, la velocidad de flujo, la capacidad de la columna y la presión del sistema.

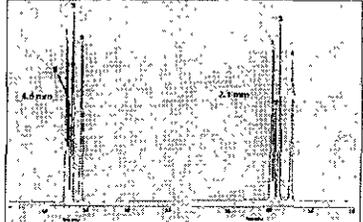
Las columnas de menor diámetro interno (DI) empacadas con rellenos de alto rendimiento, permiten reducir el consumo de solvente (fase móvil). A su vez la

Diámetro de la Columna (mm)	Volumen Interno (ml)	Longitud del tubo (cm)	Composición del sistema (µm)	Número de Platos teóricos	Viscosidad del Solvente
0.25	0.001	100	5	10000	0.5
0.32	0.002	100	5	10000	0.5
0.40	0.004	100	5	10000	0.5
0.50	0.006	100	5	10000	0.5
0.63	0.009	100	5	10000	0.5
0.75	0.012	100	5	10000	0.5
0.90	0.016	100	5	10000	0.5
1.00	0.020	100	5	10000	0.5

HEMIPRINCIPAL
AYUDA SALIDA

Diámetro de la Columna

La eficiencia de la columna es inversamente



HEMIPRINCIPAL
AYUDA SALIDA

Diámetro de la Columna

Las columnas podrían describirse en tres categorías:

- Medio tamaño - 3.0 mm
- Calibre

Si es más de 10 microlitros el desempeño de la columna sufrirá. Incluso un volumen pequeño extra columnar de 50 microlitros causará una pérdida en la eficacia de la columna.

→ **Alto - calibre**
Las columnas de micro-calibre exigen un volumen sumamente pequeño en el sistema de la columna significativamente debajo de lo que es práctico para la mayoría de los equipos CLAR. De modo que no ententes usar columnas de micro calibre a menos que tengas el equipo apropiado. La mayoría de los fabricantes de columnas no han hecho todavía columnas de 10 mm disponibles en una base regular.

HEMIPRINCIPAL
AYUDA SALIDA

Longitud de la Columna

La longitud de la columna influye en tres parámetros de mucha importancia. Ellos son la eficiencia, la retención, tiempo de análisis y la presión del sistema. La eficiencia de la columna es proporcional a la longitud de la columna. Columnas más largas son usadas cuando la separación de picos es pequeña y se requiere una columna más

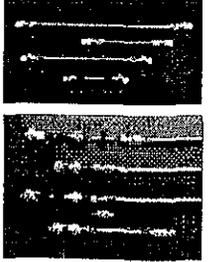


HEMIPRINCIPAL
AYUDA SALIDA

Longitud de la Columna

La presión en la columna es casi proporcional a la longitud de la misma. Columnas largas con diámetro pequeño requieren presiones extremadamente altas mientras que las cortas y de diámetro ancho requieren una presión muy baja. Ninguna de las dos situaciones es muy práctica y pueden ser un factor limitante.

El costo de las columnas está



HEMIPRINCIPAL
AYUDA SALIDA

Todos los tipos de cromatografía pueden realizarse en el modo de alta resolución por lo que se dispone de fases estacionarias para todo mecanismo de separación común. Entre éstos se incluyen adsorción líquido-sólido, partición líquido-líquido, intercambio iónico, sustrato molecular, etc.

Un reporte común es el de partículas microporosas de sílice con diámetro de 5 a 10 µm. Comparado con las partículas de forma irregular, la variedad esférica (más costosa) produce separaciones un tanto mejores (10 a 20% menos altura de plato), genera picos más simétricos, reduce en 10% el volumen de la fase móvil en la columna (volumen inercial), se empaqa de manera más estable y requiere de 10 a 30% menos de presión para un grado dado. Las partículas esféricas tienen excelentes características microporosas de empaque y mejor resistencia al flujo del solvente, pero reduce la capacidad de muestra y la eficiencia de la separación. Las partículas microporosas son del todo permeables al solvente.

HEMIPRINCIPAL
AYUDA SALIDA

ESCRIPINAS Y

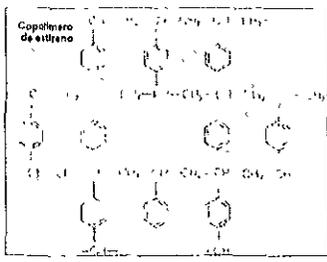
En CLAR también se utilizan soportes menos rígidos que los de sílice (como los de poliestireno) debido a sus tamaños de poro favorables para las separaciones por exclusión molecular.

ESCRIPINAS

SEVENTES

TRINUPRENCIPAL

AVIDA SALIDA



Copolímero de estireno

ESCRIPINAS Y

La cromatografía de adsorción se realiza directamente en la superficie de las partículas de sílice. Sin embargo, más a menudo la cromatografía de partición líquido-líquido se realiza con una fase estacionaria unida covalentemente a grupos silanol en la superficie del sílice.

ESCRIPINAS

SEVENTES

En cromatografía de fase ligada, la partícula base de silicagel se modifica químicamente para reemplazar sus grupos funcionales activos, los silanoles, de características polares, o determinados grupos funcionales oclodisipiano (frecuentemente llamado ODS o C18), octilano (C18), fenilo, cloro (CM) metilo, diol etc.

TRINUPRENCIPAL

AVIDA SALIDA

En algunos casos, la misma fase ligada puede ser empleada en fase normal o reversa según el tipo de fase móvil usada. Por ejemplo, un relleno ligado a grupos cloro funcionará en fase normal si la fase móvil es hidrofóbica (por ejemplo isooctano) o en fase reversa cuando se emplean mezclas hidroalcohólicas.



ESCRIPINAS Y

Cromatografía de Exclusión Molecular

Las fases estacionarias de mayor empleo son los geles, existen tres tipos de geles, blandos, semirígidos y rígidos. Los primeros no pueden utilizarse en CLAR porque el caudal y la alta presión generada provocan deformación de partículas y producen canales y grandes volúmenes muertos.

ESCRIPINAS

SEVENTES

Los geles semirígidos denominados también geles macroporos, están constituidos por polímeros con un elevado grado de entrecruzamiento. Existen dos tipos de geles semirígidos: los de poliestireno-divinilbenzénico convencionales y los geles hidrofílicos.

Los materiales de relleno rígido son materiales inorgánicos, típicamente vídrios porosos y sílice porosa que se asemejan más a vídrios que a geles, aunque por analogía con los anteriores se los continúa llamando geles.

TRINUPRENCIPAL

AVIDA SALIDA

ESCRIPINAS Y

Cromatografía de Intercambio Iónico

En la cromatografía de intercambio iónico, la fase estacionaria contiene grupos funcionales iónicos y retiene el soluto, de características iónicas pero de signo opuesto, intercambiándolo por un proceso reversible con iones de la fase móvil.

ESCRIPINAS

SEVENTES

Los intercambiadores aniónicos contienen un grupo ionogénico fuertemente o débilmente ácido (frecuentemente llamado S&W o WAX). Los intercambiadores catiónicos, por su parte, contienen grupos ionogénicos fuertemente o débilmente básicos (SCX o WCX).

TRINUPRENCIPAL

AVIDA SALIDA

ESCRIPINAS Y

Fases estacionarias Quirales

Las separaciones de mezclas enantioméricas son muy difíciles porque los isómeros ópticos son químicamente idénticos. Los análisis quirales pueden ser separados usando una fase estacionaria quiral. Un isómero óptico de una molécula quiral normalmente se une a un polímero que se cubre con un material de sílice condensada. Las separaciones ocurren porque los analitos quirales actúan recíprocamente con los isómeros de la fase estacionaria diferentemente.

ESCRIPINAS

SEVENTES

TRINUPRENCIPAL

AVIDA SALIDA

ESCRIPINAS Y

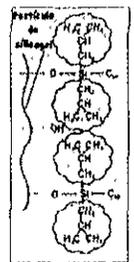
Las columnas de fase reversa llenan el más amplio rango de aplicaciones de cualquier tipo de columna CLAR. Por tanto al analizar una mezcla desconocida es común usar primero una columna de fase reversa. La retención en CLAR de fase reversa está relacionada con la hidrofobicidad del analito y los compuestos más hidrofóbicos (menos polares) eluyen al último. Por lo regular, la fase móvil consiste de una mezcla de solventes orgánicos polares (metanol).

ESCRIPINAS

SEVENTES

TRINUPRENCIPAL

AVIDA SALIDA



Partícuo de silicagel

ESCRIPINAS Y

Silicagel

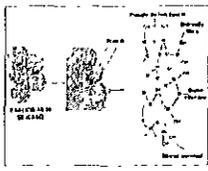
La silicagel empleada en cromatografía, es un sólido amorfo y poroso, de gran área superficial.

ESCRIPINAS

SEVENTES

TRINUPRENCIPAL

AVIDA SALIDA



ESCRIPINAS Y

La silicagel 1. es insoluble Este tipo en solventes de unión se no polares, forma entre como los los empleados en silanoles y fase normal, un alcohol pero es y es soluble en empleada en agua, hasta 100 ppm a temperatura

ESCRIPINAS

SEVENTES

TRINUPRENCIPAL

AVIDA SALIDA

3. Tipo carbón (SI 63) La mayor Se prepara reactividad en dos etapas: una al halogenación triclorosila de la sílica no y la con cloruro menor al de tionilo monoclorosil similar a la ano. que Cl-Si-R se efectúa para el tipo

Para eliminar o reducir el efecto de los silanoles superficiales, muchas veces se completa la silanización con

En cromatografía de fase reversa, se observa que para igual carga de carbón, a mayor longitud

La influencia de la fase móvil sobre la selectividad en fase reversa es mucho mayor

La cromatografía en fase normal (FN) se realiza sobre fases estacionarias hidrofóbicas como la sílice o alumina microporosa y con solventes de mediana a baja polaridad como fase móvil. Es un método apropiado para la separación de solutos de polaridad mediana a alta y es de suma utilidad para la separación de isómeros posicionales con

La cromatografía en fase normal puede efectuarse sobre partículas totalmente porosas de sílice, alumina o materiales de fase ligada cuyo comportamiento según la naturaleza de la fase móvil, responde a esta modalidad. Es decir, dado que la polaridad de los rellenos de fase ligada no es tan alta como la de la sílice o la de la alumina, es posible utilizar, por ejemplo con una columna de grupos ciano fase

Enpaque	Aplicaciones
Sílice	En la cromatografía de fracciones porosas
Alumina	En la cromatografía de fracciones porosas (normal, fase reversa) y en la separación de grupos isoméricos
Ciano	Moléculas polares que se separan de fracciones porosas
OH	Adaptados para la separación de fracciones porosas
HN	En la fase móvil de la fase ligada, responde a esta modalidad con la sílice, alumina y grupos de hidroxilo, ciano, etc.

Sílice

La sílice microporosa es el material de relleno preferido para las separaciones en

Modelo	Ø (mm)	Ø (µ)	µ (Å)
Lichrosorb SI 80	5, 7, 10	500	80
Lichrosorb SI 100	5, 7, 10	300	100
Lichrospher SI 100	5, 7, 10	250	100
Lichrospher SI 300	10	250	300
Lichrospher SI 600	10	160	600
Lichrospher SI 1000	10	30	1000
Lichrospher SI 4000	10	10	4000

Partículas entre diámetro de 5 µm y 10 µm, con superficies en partículas de tamaño 100, 300, 600, 1000 y 4000 Å, con porosidad de 200, 300, 600, 1000 y 4000 Å, respectivamente.

Es claro que el área superficial de la sílice está estrechamente vinculado al tamaño de poro, y que la retención lo está con el área superficial. Así, a menor tamaño de poro corresponde mayor área superficial, y por ende, mayor retención del analito. Sin embargo, como el diámetro del poro se relaciona también con los fenómenos de exclusión por tamaño, no se emplean materiales de diámetro de poro menor a 60 Å ya que se ha observado que moléculas pequeñas tienen acceso restringido a poros más chicos.

Se admite que en esta modalidad cromatográfica el proceso de adsorción del analito está gobernado por los grupos hidroxilo (Si-OH) presentes en la superficie de la sílice. Existen tres tipos diferentes de grupos silanol: vecinal y aislado que interactúan con el analito por medio de enlaces de hidrógeno.

El tamaño y la morfología de las partículas puede variar, pudiendo optarse por materiales de relleno esféricos o irregulares, con tamaños de partícula desde 5 hasta 10 µm, siendo los más utilizados los de 5 y 10 µm.

CELULOSAS Y

La retención del analito depende de la concentración de grupos silíceos por unidad área superficial del material de relleno, cantidad variable según el tipo de silicagelado del método de obtención de material, de las condiciones de elaboración, y de las condiciones de almacenamiento. Es así comprensible que las propiedades de las diversas sílices comerciales varían de fabricante en fabricante y aun entre distintos lotes de un mismo fabricante, debido a las diferentes condiciones de elaboración o a las variadas del proceso, aunque la variación es mayor que la observada en los materiales de fase ligada.

La presencia de agua en este tipo de material es muy importante ya que influye mucho en la retención de los ácidos. El agua puede estar en la sílice de dos modos diferentes como humedad adsorbida a los grupos activos o como agua de constitución, formando parte del material.

CELULOSAS

La primera de ellas se elimina a temperaturas de hasta 150 °C, pero a temperatura mayor a 200 °C comienza la condensación de los grupos silíceos, que se deshidrata formando siloxenos silíceos. Por encima de 600 °C todo el agua se pierde y todos los grupos silíceos se condensan para formar uniones silíceas.

SILICIAS

Cuando se hidrata la silicagel, el agua adsorbida físicamente forma multicapas que van llenando los poros de las partículas. Cuando los poros están totalmente llenos de agua, la retención de los sólidos ya no obedece a fenómenos de adsorción, sino a mecanismos de partición entre la fase móvil y el agua adsorbida en la superficie del material de relleno que desde entonces deja de ser la fase estacionaria para convertirse en un simple soporte de la verdadera fase estacionaria, el agua.

PRINCIPAL

ATICA SALIDA

CELULOSAS Y

Cuando se hidrata la silicagel el agua adsorbida físicamente forma multicapas que van llenando los poros de las partículas. Cuando los poros están totalmente llenos de agua, la retención de los sólidos ya no obedece a fenómenos de adsorción, sino a mecanismos de partición entre la fase móvil y el agua adsorbida en la superficie del material de relleno que desde entonces deja de ser la fase estacionaria para convertirse en un simple soporte de la verdadera fase estacionaria, el agua.

CELULOSAS

Por otra parte, la presencia de grupos silíceos superficiales confiere a la sílice las características propias de los ácidos débiles. Por esa razón los análisis de carácter básico serán retardados más fuertemente que los que posean características neutras o ácidas. Los análisis ionizables suelen salir muy lentamente y con un tailing pronunciado.

SILICIAS

En estos casos, la cromatografía puede mejorarse con el agregado de TEA (o de otras no general) a la fase móvil para la determinación de ácidos orgánicos, y ácido acético (o de ácidos orgánicos) general para los análisis ácidos. Si el efecto, desde entonces deja de ser la fase estacionaria para convertirse en un simple soporte de la verdadera fase estacionaria, el agua.

PRINCIPAL

ATICA SALIDA

CELULOSAS Y

El agregado de agua puede además ser importante en otros casos. Es conocido que la presencia de bridas de agua en materiales no modificados de fase normal produce efectos dramáticos en la retención de los sólidos.

CELULOSAS

Utilizando solventes no polares anhidros es posible que por efecto de la propia humedad ambiental se produzcan variaciones muy importantes en los tiempos de retención. En este caso es recomendable usar los solventes a utilizar con agua, o bien agregar un modificador polar a la fase móvil (metanol, isopropanol).

SILICIAS

Es también posible disminuir la inhomogeneidad de la superficie regulando su carácter ácido con el agregado de sulfato para acondicionar la columna y estandarizar su comportamiento. En todo caso, debe tenerse en cuenta que la silicagel es insoluble en los solventes no polares habituales en fase normal, pero es ligeramente soluble en agua, y que la solubilidad en agua aumenta cuando el pH es superior a 7.5.

PRINCIPAL

ATICA SALIDA

CELULOSAS Y

Alúmina

La alúmina es un óxido de aluminio hidratado de fórmula $Al_2O_3 \cdot nH_2O$, donde n forma valores entre 0 y 3. La alúmina cromatográficamente activa contiene γ alúmina como componente mayoritario y otros óxidos de aluminio denominados alúminas de transición. Esta γ alúmina se obtiene por descomposición térmica de la gibbsita o bostonia $Al(OH)_3$ a temperaturas comprendidas entre 400 y 700 °C. La alúmina así obtenida presenta una superficie específica de 60 a 200 m²/g, con un volumen de poro de hasta 0.6 ml/g. El diámetro medio de poro es de 100 a 200 Å y la concentración de grupos hidroxilados está en el orden de los 3 μ mol/m².

CELULOSAS

Una suspensión de alúmina en agua puede presentar un pH cercano a 9. Esta alcalinidad se debe a la presencia de sodio, que se encuentra como óxido y como aluminato de sodio. Así esta alúmina llamada "básica" puede ser empleada como intercambiador aniónico. Su neutralización y acidificación hace incluso posible su empleo como intercambiador aniónico. Esta carácter anfótero de la alúmina permite la determinación de solutos de carácter ácido y básico, pero deben evitarse los pHs extremos, que pueden llevar a la disolución de la fase estacionaria.

SILICIAS

PRINCIPAL

ATICA SALIDA

CELULOSAS Y

La superficie activa de la γ alúmina presenta los mismos inconvenientes que la sílice respecto del agua adsorbida. Por este motivo deben tenerse en cuenta las mismas consideraciones descritas para la sílice aunque las propiedades ácidas y básicas débiles de la γ alúmina le confieren algunas interacciones adicionales que deben tenerse en cuenta.

CELULOSAS

También como con la silicagel, la retención obedece a mecanismos basados en puntos de hidrógeno, con la posibilidad adicional de que los ácidos interactúen con una sustancia muy rica en electrones. A diferencia de la sílice, que pierde actividad al ser calentado por encima de los 200 °C, a mayor temperatura de tratamiento de la alúmina, al menos hasta 700 °C, corresponde mayor poder de retención.

SILICIAS

La γ alúmina es útil para la separación de sustancias orgánicas no saturadas anillos bencénicos e isómeros de anillos condensados.

PRINCIPAL

ATICA SALIDA

CELULOSAS Y

La selección de la mejor columna cromatográfica para un análisis puede causar incertidumbre y algunas veces es una tarea difícil. No existen técnicas infalibles, atajos trucos o secretos para la selección de una columna, pero sí existen algunas guías y conceptos que simplifican el proceso. Existen tres principales parámetros para seleccionar la columna:

- La longitud

CELULOSAS

SILICIAS

PRINCIPAL

ATICA SALIDA

CELULOSAS Y

Para Bababourb

Escoger la mejor fase estacionaria es la decisión más importante cuando se está seleccionando una columna. Desafortunadamente también es la más ambigua y difícil.

CELULOSAS

El método más confiable es consultar la gran colección de aplicaciones disponibles con los proveedores y fabricantes de columnas (una posibilidad muy fácil de acceder a través del internet con Hewlett Packard, Químicos J. & W. Chrompack, Supelco, GGE, Alltech, etc.) fabricantes de equipos y en la literatura especializada (bases de datos, las revistas sobre cromatografía y química analítica también disponibles en internet).

SILICIAS

Suficiente información puede ser obtenida para simplificar la decisión o reducir el número de columnas potenciales. La situación más difícil es cuando no hay información previa disponible.

CELULOSAS

La selección de la fase estacionaria es mucho más fácil aun si solamente se tiene un cromatograma disponible para todos o la mayoría de los componentes de la muestra.

SILICIAS

Los conceptos de selectividad y polaridad de las fases estacionarias son muy útiles cuando se seleccionan fases estacionarias.

PRINCIPAL

ATICA SALIDA

CELULOSAS Y

Para Bababourb

El uso de la polaridad y la selectividad como alúminas no es exacto, pero es muy común. La selectividad es determinada por las interacciones fisicoquímicas de las moléculas del soluto con la fase estacionaria.

CELULOSAS

La polaridad está determinada por la naturaleza de la fase estacionaria. La polaridad tiene un efecto sobre la separación, sin embargo es solamente una de las muchas propiedades de la fase estacionaria que influyen sobre la separación de los picos.

SILICIAS

La selectividad puede ser pensada como la habilidad de la fase estacionaria para diferenciar entre dos moléculas de soluto por diferencias en sus propiedades físicas o químicas. La separación es obtenida si la interacción entre la fase estacionaria y los solutos es diferente.

PRINCIPAL

ATICA SALIDA

COLUMNAS Y SOLVENTES

Fase Estacionaria

Pasos para seleccionar la fase móvil de una columna cromatográfica

1 Con los distintos tipos de fases estacionarias para cromatografía, suele haber varias formas adecuadas de separar los componentes de una mezcla dada. Estos diagramas son el punto de partida para seleccionar una columna CLAR. En algunos casos más de una columna es apropiada para un cierto análisis. Aunque existen ciertas reglas generales es recomendable primero consultar la literatura técnica, metodología oficial o algunos proveedores en diferentes páginas de Internet.

PRINCIPAL AYUDA SALIDA

COLUMNAS Y SOLVENTES

Fase Estacionaria

Un parámetro de gran importancia para la selección de la columna es la relación entre los tipos de fase ligada. En general a mayor carga carbonada o a mayor lipofilia del sustituyente, corresponde mayor relación. Sin embargo la selección entre columnas de similar selectividad, por ejemplo C18 y C8, no siempre es tan simple, debido a los factores responsables la relación. La tabla muestra los diferentes tipos de relleno de fase ligada.

MODIFICACION	Grupo ligado	Aplicaciones, Comentarios
C18	Alc. C ₁₈	Fase reversa (RP) para separación de compuestos en C ₁₈ . Es el más utilizado para separación de compuestos orgánicos.
C8	Alc. C ₈	Fase reversa (RP) para separación de compuestos orgánicos. Menos retención y más especificidad.
C4	Alc. C ₄	RP de amplio rango. Usar preferentemente para separación de compuestos orgánicos. Menos retención y más especificidad.
C18	Alc. C ₁₈	RP y normal fase. Se emplea para separación de compuestos orgánicos. Menos retención y más especificidad.
Phen	Alc. C ₁₈	RP y normal fase. Se emplea para separación de compuestos orgánicos. Menos retención y más especificidad.
Phen	Alc. C ₁₈	RP y normal fase. Se emplea para separación de compuestos orgánicos. Menos retención y más especificidad.

PRINCIPAL AYUDA SALIDA

COLUMNAS Y SOLVENTES

Fase Estacionaria

2 Usa la fase estacionaria menos polar que te suministre una resolución satisfactoria y tiempos de análisis cortos. Las fases estacionarias no polares tienen tiempos de vida superiores a las polares.

3 Usa una fase estacionaria con una polaridad semejante a la de los solutos a separar. Trabaja esta aproximación la mayoría de las veces, sin embargo la mejor fase estacionaria no siempre se encuentra utilizando esta técnica.

4 Si es posible evita usar fases estacionarias que contengan una funcionalidad que genere una gran respuesta con los detectores selectivos.

5 Las columnas n-octildecil (C18) n-decil (C8), y grupos fenil (o sus equivalentes en otros matices) cubren un amplio rango de selectividades, por lo tanto si cuentas con este set de columnas en el laboratorio, tienes la herramienta necesaria para resolver un sin número de problemas analíticos.

6 Las columnas que se usan para separar compuestos aromáticos, por ejemplo en síntesis orgánica.

PRINCIPAL AYUDA SALIDA

COLUMNAS Y SOLVENTES

Fase Estacionaria

Pasos para seleccionar el diámetro de una columna cromatográfica

1 Si hasta hace pocos años se hablaba de una columna convencional de 25-30 cm de longitud y 4 cm de diámetro interno (DI), ahora con partículas de 10 µm de diámetro irregular o esféricas, actualmente se tiende a emplear columnas de 26 cm o de 10-15 cm de longitud y 0.6 a 20 mm de DI, según la resolución requerida, y columnas de 3-6 cm de longitud con partículas de 3 µm en la denominada High Speed o Fast LC.

2 Usa columnas entre 0.6 a 30 mm de DI cuando requieras de altas eficiencias.

3 Usa columnas de 3.9 a 7.8 mm de DI cuando requieras de una mayor capacidad de muestra. Estas a menudo proveen mejor resolución.



PRINCIPAL AYUDA SALIDA

COLUMNAS Y SOLVENTES

Los cuidados y el mantenimiento que debe tener cualquier columna cromatográfica en general son los siguientes:

- Eficiencia
- Temperatura
- Conexión
- Contaminación
- Almacenamiento
- pH



PRINCIPAL AYUDA SALIDA

COLUMNAS Y SOLVENTES

→ Eficiencia

Siempre que se adquiere una columna nueva se deben evaluar los parámetros N, K', R y α con los que se puede llevar un control de vida de la columna.

Es recomendable tener una carpeta de control o bitácora con el historial de cada columna.

Cuando se tenga pérdida en la eficiencia de la columna esta debe ser regenerada, reemplazar los filtros y comprobar su eficiencia caracterizándola (N, K', R y α).

Para prevenir o evitar que la columna se dañe, se debe seleccionar adecuadamente las condiciones de trabajo, en base a las indicaciones del proveedor.

Evita disminuir o aumentar bruscamente el flujo cuando la columna está conectada para evitar cambios bruscos de presión.

Evita solventes que reaccionen con la columna (que sangren la columna).

PRINCIPAL AYUDA SALIDA

COLUMNAS Y SOLVENTES

→ Temperatura

Para evitar o prevenir variaciones en los tiempos de retención y afinidad sobre análisis y columna se debe de controlar la temperatura con la mayor precisión posible dentro de los límites puede ser con baño regulador de agua u horno de resistencia eléctrica.

Para evitar o prevenir disminución de la eficiencia de la columna por altas temperaturas, se deben seguir las indicaciones del proveedor por ejemplo columnas con base de sílice no se deben calentar por arriba de 60°C así como algunas columnas de tamaños de partículas pequeños debido a que pierden eficiencia (R) hasta en un 50% cuando se calienta a temperaturas altas para tamaños de partícula de 3 µm se degradan con temperaturas por arriba de 80°C.

→ Conexión

Siempre verifica que las tuercas o ferrul no estén muy apretadas, para evitar fugas.

Verifica que el filtro sea el adecuado que la columna no este tapada por objetos extraños que el diámetro de las buberías sea el correcto.

→ Contaminación

Usa filtros y guarda columnas en línea filtra y limpia hasta donde sea posible.

frecuentemente lava la columna frecuentemente con un disolvente fuerte.

Todo esto con el fin de evitar que las columnas se obstruyan haya presiones altas presencia de picos fantasma o picos colapsados.

PRINCIPAL AYUDA SALIDA

COLUMNAS Y SOLVENTES

→ Almacenamiento

Almacena las columnas después de lavarlas, en disolución de algún disolvente orgánico con agua en una proporción 2:9 como por ejemplo metanol, acetonitrilo, etc. excepto para columnas de permeación en gel que se deben almacenar en disoluciones amortiguadoras con 0.1% de ácido. Es recomendable ver las indicaciones del fabricante.

Asegúrate de colocar bien los tapones en los extremos de la columna antes de almacenarla. Todo con la finalidad de prevenir el crecimiento bacteriano.

→ pH

Para prevenir o evitar cambios en la forma de los picos, degradación de columnas de retención en el tiempo de retención en compuestos no básicos y aumento en el tiempo de retención para compuestos básicos.

Se recomienda para empaque de fase ligada donde la base es sílice, usar fases móviles con pH entre 2.5 y 7. Usa precolumnas con el mismo empaque o de sílice.

PRINCIPAL AYUDA SALIDA

CELEBRAS Y

La columna cromatográfica es la parte esencial del cromatógrafo de líquidos ya que en ella se llevan a cabo diferentes fenómenos (adsorción, partición, intercambio iónico, exclusión, etc.) tiene lugar la separación o discriminación entre analitos e interferentes.

CELEBRAS

SOLVENTES

El aumento de la eficacia de la CLAR respecto a la alternativa clásica se basa en una disminución del tamaño de partícula de la fase estacionaria, lo que implica un aumento de la presión de trabajo. Es conocida indispensable para la reproducibilidad de los resultados una gran homogeneidad en la distribución de la fase estacionaria, lo que implica la necesidad de técnicas precisas y complejas de preparación de las columnas.

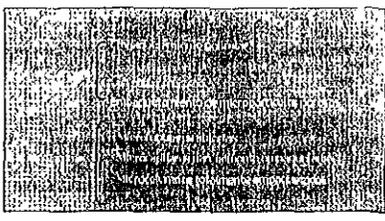


PRINCIPAL

AVIDA SALIDA

CELEBRAS Y

En la siguiente tabla se muestran los tipos más importantes de columnas para CLAR. Se observa una distribución básica entre las convencionales y las microcolumnas (en relación con su diámetro).



CELEBRAS

SOLVENTES

PRINCIPAL

AVIDA SALIDA

CELEBRAS Y

En la tabla se muestran las características geométricas de las columnas y del material de relleno, así como de las condiciones hidroclimáticas de trabajo. Se han incluido las características de la cromatografía líquida a baja presión (clásica) a efectos comparativos.

Características Geométricas e Hidroclimáticas	Columnas de Líquido Clásico	Columnas de Alto Rendimiento (menor partícula)	Alta Resolución (Microcolumnas)
Diámetro interno	4.6 mm	4.6 mm	2.1 mm
Longitud	250 cm	250 cm	150 cm
Partícula	10 µm	5 µm	3 µm
Porosidad	400-600 Å	300-400 Å	100-200 Å
Flujo	1 ml/min	1 ml/min	0.2 ml/min
Presión	1000 psi	1000 psi	1000 psi
Temperatura	30°C	30°C	30°C
Resolución	1000	1000	1000

CELEBRAS

SOLVENTES

PRINCIPAL

AVIDA SALIDA

CELEBRAS Y

Dentro de las columnas CLAR convencionales las de empacamiento de sílice son las primeras que se usaron. El material (fase estacionaria) consiste en bolitas esféricas regulares (20 - 70 µm) de un sólido no poroso, generalmente vidrio, que están recubiertas de una capa (1-3 µm) de material activo cromatográfico poroso de naturaleza polimérica. Debido a que la densidad de las mismas es elevada, el empacamiento uniforme no es técnicamente muy difícil.

No obstante, la capacidad y eficacia de las columnas con este tipo de empacamiento en CLAR aumenta considerablemente cuando se sustituye el recubrimiento posterior por un tratamiento especial de las bolitas de vidrio (30 - 60 µm) para que adquiera una microzona porosa externa (1-3 µm), también de vidrio, para que pueda actuar de sólido activo en cromatografía de adsorción, o bien, como soporte de la fase estacionaria líquida (entrecada).

La distribución cromatográfica entre fase móvil y estacionaria es más accesible que si se trata de partículas porosas de igual tamaño.

El volumen del poro en estas bolitas es muy pequeño, lo que origina una rápida difusión de los solutos en ambos sentidos, por lo que son adecuados para cuando se requiere una gran velocidad de determinación.

CELEBRAS

SOLVENTES

PRINCIPAL

AVIDA SALIDA

CELEBRAS Y

Sin duda que la sustitución de las partículas con una gran zona leerte por otras porosas y de tamaño considerablemente menor (empacamiento microparticulado) tiene importantes ventajas: mayor capacidad y eficacia. No obstante, también conlleva un mayor grado de empacamiento, lo que implica un aumento de la presión de trabajo y una gran dificultad de empacamiento adecuado y homogéneo en el laboratorio, por lo que casi siempre se adquieren en el comercio.

Al ser el área activa mucho mayor, éstas son aptas para separaciones cromatográficas difíciles y complejas (solutos de propiedades muy parecidas y un elevado número de solutos). Al reducir el tamaño de estas micropartículas porosas, disminuye la profundidad de los poros, por lo que se aumenta la eficacia.

CELEBRAS

SOLVENTES

PRINCIPAL

AVIDA SALIDA

CELEBRAS Y

Reducción drástica del consumo de la fase móvil cuyo precio es cada día más elevado.

Aumento de la sensibilidad de ciertos detectores especialmente a caudales muy bajos.

Desde el punto de vista instrumental, el empleo de microcolumnas en CLAR, implica una serie de requerimientos respecto a las características generales de un cromatógrafo de líquidos. Fundamentalmente el diseño del mismo debe adaptarse al uso de las microcolumnas y, por tanto, reducirse drásticamente.

- 1) El volumen interno del sistema de inyección.
- 2) El volumen de la celda de flujo del detector.
- 3) Los volúmenes muertos de las conexiones.

Además las condiciones técnicas son diferentes para cada tipo de microcolumna. Este aspecto ha dificultado el desarrollo y aplicación en CLAR.

CELEBRAS

SOLVENTES

PRINCIPAL

AVIDA SALIDA

CELEBRAS Y

La fase móvil en HPLC cumple un rol fundamental ya que puede por sí misma modificar completamente la selectividad de las separaciones en fase normal y es, a la vez, el verdadero "motor" de las separaciones en fase reversa. En HPLC es posible lograr un número muy grande de diferentes separaciones con una columna, tan solo variando la composición de la fase móvil.



CELEBRAS

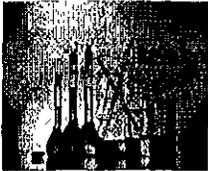
SOLVENTES

PRINCIPAL

AVIDA SALIDA

CELEBRAS Y

No todos los solventes son adecuados para trabajar en HPLC ya que la condición de estado líquido no es suficiente por sí misma para que una sustancia se pueda emplear como fase móvil. Un solvente apropiado para HPLC debe cumplir con algunos requisitos:



CELEBRAS

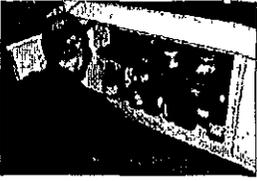
SOLVENTES

PRINCIPAL

AVIDA SALIDA

Seguridad

Como en cualquier método analítico, en HPLC debe evitarse el empleo de solventes que por sus características (en particular inflamabilidad y toxicidad), representen un serio riesgo para el operador. En general se recomienda no utilizar solventes de alto grado de toxicidad como el sulfuro de carbono, benceno o tetracloruro de carbono y tomar precauciones durante la manipulación de los otros solventes.



El uso de solventes de menor calidad sin posterior purificación puede parecer económicamente tentador, pero los posibles problemas asociados resultan en general en mayores costos.

A veces no es posible obtener comercialmente un solvente de buena pureza. En estos casos pueden emplearse solventes de menor calidad, pero se recomienda una purificación previa.

Alta Calidad de Puros

Los solventes empleados en HPLC deben cumplir como se ha visto ciertos requisitos de calidad. La presencia de impurezas puede, por un lado, inducir modificaciones de la selectividad de la fase móvil, y por otro contribuir a una señal de base importante en el detector (absorbancia, reacciones de óxido-reducción etc.).

La utilización de solventes de menor calidad sin posterior purificación puede parecer económicamente tentador, pero los posibles problemas asociados resultan en general en mayores costos.

A veces no es posible obtener comercialmente un solvente de buena pureza. En estos casos pueden emplearse solventes de menor calidad, pero se recomienda una purificación previa.



Propiedades Químicas

La separación cromatográfica se produce por un balance de afinidades entre la muestra, la fase móvil y la fase estacionaria. Las propiedades químicas de la fase móvil son las que establecen el tipo y fuerza de interacción entre el solvente y la muestra, y en consecuencia, son determinantes de la separación. Las propiedades de algunos solventes pueden definirse como:

Índice de polaridad Es el resultado de todas las propiedades químicas e interacción cuantitativamente la "fuerza" de interacción de los solventes frente a solutos puros.

Fuerza de elución Indica la polarizabilidad (facilidad de polarizarse) de una molécula y aumenta con el número de electrones de la misma y con la distancia de

Capacidad Acuosa o Capacidad de Retención Es una medida de la capacidad de las moléculas a intercambiar protones. Las sustancias que aceptan protones se denominan bases de Lewis, y las que los donan, ácidos de Lewis.

Átomos de Donador Se refiere a la capacidad de una molécula para formar dipolos permanentes y está estrechamente relacionado con la constante dieléctrica del solvente.

La selectividad de los solventes no resulta, como puede verse, de una única propiedad, sino de la suma de todas sus propiedades químicas. La contribución de cada tipo de interacción, en calidad y magnitud, sirven para agrupar los solventes de similar comportamiento en un diagrama triangular, de indudable utilidad para la selección de solventes en función de su selectividad.

SOLVENTE	ÍNDICE DE POLARIDAD	PIEZA DE ENTRENAMIENTO	FORMACIÓN DE PROTONES	ACEPTACIÓN DE PROTONES	NUMERO DE ELECTRONES	ÍNDICE DE POLARIDAD
Hexano	0.1				10	0.1
Cloroformo	0.2				10	0.2
Acetato de etilo	0.4				10	0.4
Acetona	0.5				10	0.5
Metanol	0.6				10	0.6
Etanol	0.7				10	0.7
Acetonitrilo	0.8				10	0.8
Acetato de n-butilo	0.9				10	0.9
Acetato de n-pentilo	1.0				10	1.0
Acetato de n-hexilo	1.1				10	1.1
Acetato de n-heptilo	1.2				10	1.2
Acetato de n-octilo	1.3				10	1.3
Acetato de n-nono	1.4				10	1.4
Acetato de n-decilo	1.5				10	1.5
Acetato de n-undecilo	1.6				10	1.6
Acetato de n-dodecilo	1.7				10	1.7
Acetato de n-tridecilo	1.8				10	1.8
Acetato de n-tetradecilo	1.9				10	1.9
Acetato de n-pentadecilo	2.0				10	2.0
Acetato de n-hexadecilo	2.1				10	2.1
Acetato de n-heptadecilo	2.2				10	2.2
Acetato de n-octadecilo	2.3				10	2.3
Acetato de n-novecilo	2.4				10	2.4
Acetato de n-decilo	2.5				10	2.5
Acetato de n-undecilo	2.6				10	2.6
Acetato de n-dodecilo	2.7				10	2.7
Acetato de n-tridecilo	2.8				10	2.8
Acetato de n-tetradecilo	2.9				10	2.9
Acetato de n-pentadecilo	3.0				10	3.0
Acetato de n-hexadecilo	3.1				10	3.1
Acetato de n-heptadecilo	3.2				10	3.2
Acetato de n-octadecilo	3.3				10	3.3
Acetato de n-novecilo	3.4				10	3.4
Acetato de n-decilo	3.5				10	3.5
Acetato de n-undecilo	3.6				10	3.6
Acetato de n-dodecilo	3.7				10	3.7
Acetato de n-tridecilo	3.8				10	3.8
Acetato de n-tetradecilo	3.9				10	3.9
Acetato de n-pentadecilo	4.0				10	4.0
Acetato de n-hexadecilo	4.1				10	4.1
Acetato de n-heptadecilo	4.2				10	4.2
Acetato de n-octadecilo	4.3				10	4.3
Acetato de n-novecilo	4.4				10	4.4
Acetato de n-decilo	4.5				10	4.5
Acetato de n-undecilo	4.6				10	4.6
Acetato de n-dodecilo	4.7				10	4.7
Acetato de n-tridecilo	4.8				10	4.8
Acetato de n-tetradecilo	4.9				10	4.9
Acetato de n-pentadecilo	5.0				10	5.0
Acetato de n-hexadecilo	5.1				10	5.1
Acetato de n-heptadecilo	5.2				10	5.2
Acetato de n-octadecilo	5.3				10	5.3
Acetato de n-novecilo	5.4				10	5.4
Acetato de n-decilo	5.5				10	5.5
Acetato de n-undecilo	5.6				10	5.6
Acetato de n-dodecilo	5.7				10	5.7
Acetato de n-tridecilo	5.8				10	5.8
Acetato de n-tetradecilo	5.9				10	5.9
Acetato de n-pentadecilo	6.0				10	6.0
Acetato de n-hexadecilo	6.1				10	6.1
Acetato de n-heptadecilo	6.2				10	6.2
Acetato de n-octadecilo	6.3				10	6.3
Acetato de n-novecilo	6.4				10	6.4
Acetato de n-decilo	6.5				10	6.5
Acetato de n-undecilo	6.6				10	6.6
Acetato de n-dodecilo	6.7				10	6.7
Acetato de n-tridecilo	6.8				10	6.8
Acetato de n-tetradecilo	6.9				10	6.9
Acetato de n-pentadecilo	7.0				10	7.0
Acetato de n-hexadecilo	7.1				10	7.1
Acetato de n-heptadecilo	7.2				10	7.2
Acetato de n-octadecilo	7.3				10	7.3
Acetato de n-novecilo	7.4				10	7.4
Acetato de n-decilo	7.5				10	7.5
Acetato de n-undecilo	7.6				10	7.6
Acetato de n-dodecilo	7.7				10	7.7
Acetato de n-tridecilo	7.8				10	7.8
Acetato de n-tetradecilo	7.9				10	7.9
Acetato de n-pentadecilo	8.0				10	8.0
Acetato de n-hexadecilo	8.1				10	8.1
Acetato de n-heptadecilo	8.2				10	8.2
Acetato de n-octadecilo	8.3				10	8.3
Acetato de n-novecilo	8.4				10	8.4
Acetato de n-decilo	8.5				10	8.5
Acetato de n-undecilo	8.6				10	8.6
Acetato de n-dodecilo	8.7				10	8.7
Acetato de n-tridecilo	8.8				10	8.8
Acetato de n-tetradecilo	8.9				10	8.9
Acetato de n-pentadecilo	9.0				10	9.0
Acetato de n-hexadecilo	9.1				10	9.1
Acetato de n-heptadecilo	9.2				10	9.2
Acetato de n-octadecilo	9.3				10	9.3
Acetato de n-novecilo	9.4				10	9.4
Acetato de n-decilo	9.5				10	9.5
Acetato de n-undecilo	9.6				10	9.6
Acetato de n-dodecilo	9.7				10	9.7
Acetato de n-tridecilo	9.8				10	9.8
Acetato de n-tetradecilo	9.9				10	9.9
Acetato de n-pentadecilo	10.0				10	10.0

Numerosos métodos cromatográficos requieren el uso de sales en la fase móvil, generalmente para el control y regulación del pH o de la fuerza iónica. Estos aditivos, al igual que los solventes, deberían tener un alto grado de pureza.

Los fosfatos son muy usados en cromatografía de fase reversa como sales de sodio o potasio debido a su baja absorción UV sin a longitudes de onda cortas. Los buffers de acetato o de citrato se utilizan en menor grado. El primero porque presenta una alta absorción al UV y el segundo porque se compleja con la silice de las columnas reduciendo su vida útil.

Si se desea recuperar el análisis separado por cromatografía de líquidos, se recomienda el uso de buffers de trifluoroacetato debido a que es muy volátil y puede ser eliminado por aplicación de calor y vacío. Con este mismo fin se podría utilizar buffers de

Las soluciones que contienen aditivos deben prepararse el día de uso aunque algunas puedan almacenarse en soluciones concentradas. En este caso, debe indicarse la fecha de preparación en el folio del ensayo y descartarse si se observa alguna

Los modificadores orgánicos (metanol, acetonitrilo, etc.) actúan como inhibidores del crecimiento bacteriano. Sin embargo las fases móviles empleadas en cromatografía de intercambio iónico son en general soluciones acuosas con agregado de sales inorgánicas. Estas soluciones representan un buen medio para el crecimiento de microorganismos, y no deben almacenarse, ni dejarse durante mucho tiempo almacenadas en el equipo. En estos casos el crecimiento bacteriano puede inhibirse por agregado de ácido yódico al 0.005%.

No se recomienda el uso de sales de haluros y sus ácidos ya que atacan al acero inoxidable. Si el trabajo con este tipo de sales es habitual, se recomienda emplear equipos sin componentes de acero inoxidable, al que puede remplazarse por titanio y PTFE.

Los ácidos más utilizados son el acético y el fósfórico. Se emplean generalmente para controlar el pH en cromatografía de fase reversa. De éstos, es preferible el fósfórico por su baja absorción UV.

Otros aditivos comunes son los reactivos de apuramiento iónico, empleados para el análisis de sustancias orgánicas iónicas o ionizables.

Las aminas se utilizan habitualmente

Basicamente, existen dos tipos de reactivos de apuramiento iónico: las sales de tetraquilonio, empleadas para el análisis de solutos ácidos y los alquilamonios para los solutos básicos. En ambos casos se emplean en baja concentración entre 1 y 20 mM. Tanto las sales de amonio cuaternario como los alquilamonios pueden conseguirse comercialmente con buena grado de pureza. Se debe tener presente que al usar estos reactivos las columnas quedan "marcadas" debido a que no se recomienda que las columnas utilizadas con estos aditivos no se empleen en la modalidad "regular" de cromatografía líquida en fase reversa, ya que el lavado es insuficiente para remover completamente el reactivo adsorbido al relleno, y la selectividad de estas columnas varía en forma permanente.

El heptasulfato de sodio merece un tratamiento debido a que, normalmente está contaminado con homólogos de

La naturaleza de la fase móvil es un factor clave para la discriminación entre solutos en CLAR. Además, la presión y el caudal de la misma son también factores de gran relevancia en el proceso separativo. Por ello, las características del suministro de la fase móvil son aspectos de especial interés en este tipo de cromatografía.

En CLAR pueden distinguirse dos tipos generales según sea la naturaleza de la fase móvil:

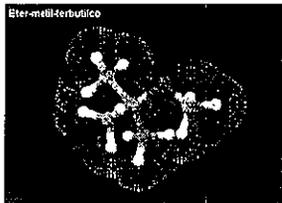
I) Cromatografía en Fase Normal, en esta la fase móvil es de naturaleza no polar mientras que la fase estacionaria es fundamentalmente polar. Se denomina así por ser modalidad que se desarrolló en primer lugar.

II) Cromatografía en Fase Reversa, la fase móvil es polar y la estacionaria no polar. Se la que actualmente tiene mayor importancia pues más del 85% de las aplicaciones de CLAR se hacen en esta alternativa.

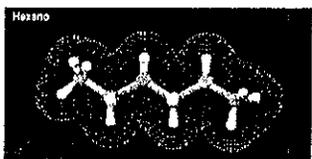
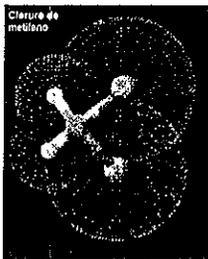
<p>CELEBRINAS Y</p> <p>CELEBRINAS</p> <p>SOLVENTES</p> <p>PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>Además, deben distinguirse estas alternativas respecto a la composición de la fase móvil</p> <p>→ Composición constante durante el proceso cromatográfico (modalidad isocrática) Puede tratarse de un solvente puro, de una mezcla de dos o más solventes, de diluciones de concentración fija de desplazantes iónicos o no iónicos, etc</p> <p>→ Formación de un gradiente de composición de la fase móvil durante el proceso de separación (modalidad gradiente) que simplifica enormemente la capacidad de discriminación de CLAR</p> <p>Existen dos grupos de propiedades básicas y complementarias de una fase móvil, pura o no, para su uso en CLAR. Las características de mayor trascendencia cromatográfica son la "fuerza desplazante" y la selectividad. Así, para solventes no electrolíticos, la fuerza del solvente es sinónimo de polaridad</p>	<p>La selectividad que se refiere a la capacidad de una fase móvil para provocar una diferenciación en el comportamiento de varios solutos en el sistema cromatográfico generalmente se consigue con una selección de su composición y si no es suficiente es preciso una variación de su composición con el tiempo</p>	<p>CELEBRINAS Y</p> <p>CELEBRINAS</p> <p>SOLVENTES</p> <p>PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>La fase móvil debe poseer, además otras propiedades deseables para su uso en CLAR</p> <p>✓ Debe tener baja viscosidad que origine una mayor difusividad mejorando así el funcionamiento de la columna</p> <p>✓ Debe ser accesible en forma pura y evitar así su purificación previa en el laboratorio dado el gran desarrollo de CLAR, existe una gran variedad de disolventes comercializados con fines cromatográficos</p> <p>✓ Baja inflamabilidad y toxicidad, requerimiento que no cumplen muchas de las fases móviles usadas por ello es siempre recomendable una buena ventilación en el laboratorio</p> <p>✓ Baja corrosividad</p> <p>✓ Compatibilidad con el sistema de detección para evitar respuestas anómalas fenómenos de saturación etc. Este requisito es muy importante y limitante en la selección de la fase móvil</p>
---	---	---	---	--

<p>CELEBRINAS Y</p> <p>CELEBRINAS</p> <p>SOLVENTES</p> <p>PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>Un requerimiento técnico importante de la fase móvil antes de su introducción al sistema cromatográfico es la ausencia de gases disueltos que puedan originar importantes perturbaciones</p> <p>→ Reacciones indeseables entre los gases (oxígeno) y los componentes de la muestra</p> <p>→ Irregularidades en el flujo dentro de la columna el gas puede ocupar una zona de la misma de forma temporal o permanente, reduciendo así la eficacia del sistema cromatográfico y su reproducibilidad</p> <p>→ Fluctuaciones en la respuesta del detector cambio de línea de base, señales parásitas, etc ya que pueden producirse burbujas por la reducción drástica de la presión a la salida del cromatográfico</p>	<p>La desgasificación de solventes se trata en el tema Preparación de la Fase Móvil</p>	<p>CELEBRINAS Y</p> <p>CELEBRINAS</p> <p>SOLVENTES</p> <p>PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>En cromatografía de fase normal, donde se emplean solventes no polares, el problema más frecuente es la desactivación de la columna de sílice o alúmina por adsorción de agua. El agua adsorbida es responsable de los mecanismos malos de retención (partición y adsorción) y produce cambios bruscos en la retención y selectividad. Los solventes no polares que se utilizan en fase normal suelen tener trazas de agua. Si bien debido a la baja solubilidad estas cantidades son muy pequeñas (por ejemplo 0.05% en cloroformo, 3.25% en acetato de etilo a saturación), el agua resulta ser muy afín a la columna y comienza a concentrarse en la superficie del material de relleno durante el transcurso del trabajo</p> <p>El proceso de adsorción del agua es,afortunadamente reversible. Para eliminar el agua de los solventes, se puede utilizar un desecante como el sulfato de sodio anhidro la alúmina</p> <p>Algunos de los solventes empleados en fase normal son los siguientes</p> <ul style="list-style-type: none"> - Eteres - Hidrocarburos halogenados - Hidrocarburos alifáticos 
---	---	---	---	---

<p>CELEBRINAS Y</p> <p>CELEBRINAS</p> <p>SOLVENTES</p> <p>PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>= Eteres</p> <p>Los éteres alílico propílico e isopropílico tienen una alta presión de vapor y son altamente inflamables. Por otra parte, son susceptibles de formar peróxidos especialmente cuando son oxidados. Su empleo está por esto muy limitado en HPLC aunque la selectividad que aportan impide que sean descartados como solventes de elución. Una alternativa inmensa riesgosa consiste en emplear éter-metil-terbutílico</p>	<p>CELEBRINAS Y</p> <p>CELEBRINAS</p> <p>SOLVENTES</p> <p>PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>= Hidrocarburos Halogenados</p> <p>Por lo general todos los compuestos pueden contener trazas de ácido clorhídrico o bromhídrico, muy reactivos frente al acero inoxidable. Estos contaminantes pueden eliminarse al pasados a través de una columna de alúmina</p> <p>Las mezclas de hidrocarburos halogenados con éteres y/o acetona son particularmente perjudiciales. Se ha reportado que tanto el tetracloruro de carbono como el cloroformo en mezclas con tetrahidrofurano, acetona, dietiléter y alcohol isopropílico corrompen al acero inoxidable, mientras que la corrosión no tiene lugar cuando se utilizan estos solventes en forma individual. El mecanismo de ataque podría deberse a los procesos autooxidativos de los éteres, formación de ésteros metálicos y radicales libres del tipo tetracloruro de carbono inducidos por la presencia de los peróxidos</p> <p>Este tipo de mezclas deben evitarse y en caso de necesidad, se prepararán en forma inmediata previo al uso y nunca se dejarán estancadas en el equipo</p> <p>El cloroformo de metileno es uno de los hidrocarburos halogenados más estables. Su degradación térmica en aire seco se produce a temperaturas mayores a los 120°C con producción de ácido clorhídrico y trazas de fosgeno. La degradación se inhibe con trazas de compuestos fosgenos o amileno</p> <p>El cloroformo se puede descomponer lentamente a la luz, en presencia o no de aire, formando fosgeno y ácido clorhídrico</p>
---	---	---	---



<p>CELEBRINAS Y</p> <p>CELEBRINAS</p> <p>SOLVENTES</p> <p>PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>En fase normal la presencia de etanol modifica la polaridad y selectividad de la fase móvil, por lo que los cromatogramas obtenidos utilizando cloroformo con o sin estabilizador pueden diferir. Para eliminar el etanol, se lava el cloroformo con agua y se seca con sulfato de sodio anhidro, alúmina básica con técnicas moleculares de 4'A</p> <p>El tetracloruro de carbono prácticamente no se utiliza en HPLC, dado que es muy sensible a la ruptura oxidativa por exposición al aire, humedad o luz y, además es un solvente sumamente tóxico</p> <p>Se recomienda un nuevo solvente de fase normal como alternativa a los alcanos, el 1,1,2-tricloro-1,2,2-tetrafluoroetano (FC 113). Este solvente se caracteriza por su baja toxicidad, alto grado de pureza y buena transparencia UV (corte a 231 nm) con una fuerza de elución comparable a la del n-hexano</p>	<p>CELEBRINAS Y</p> <p>CELEBRINAS</p> <p>SOLVENTES</p> <p>PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>	<p>= Hidrocarburos Alifáticos</p> <p>Los hidrocarburos alifáticos son solventes muy transparentes a bajas longitudes de onda y poco viscosos. Debido a estas propiedades son especialmente adecuados para trabajar en HPLC. Desafortunadamente suelen contener trazas de oleanos o bencenos que dificultan su empleo por debajo de los 260 nm</p>
---	---	---	---



CELULOSAS Y

Las fases móviles para la fase reversa están constituidas por mezclas de solventes polares, en general agua, y un modificador orgánico (metanol, acetoniitrilo, tetrahidrofurano), con o sin el agregado de aditivos (sales inorgánicas o reactivos de apareamiento iónico). A mayor proporción de modificador orgánico corresponde menor retención (menor k') y a mayor proporción de agua, mayor retención (mayor k'). El dióxano y el tetrahidrofurano se mezclan tanto con agua como son solventes no polares (cloroformo, hexano), y pueden considerarse tanto solventes de fase normal como de fase reversa.

Algunos de los solventes empleados en fase reversa son los siguientes:

- Agua
- Metanol
- Acetoniitrilo
- Tetrahidrofurano
- Dióxano

CELULOSAS

VALORES



PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

CELULOSAS Y

- Agua

El agua es el solvente más utilizado en HPLC. Puede adquirirse comercialmente agua de calidad cromatográfica, o bien puede ser purificada por el mismo usuario.

El agua destilada y desionizada que a los fines prácticos, es útil para muchas de las aplicaciones de laboratorio, puede encontrar varias limitaciones en HPLC. La razón de esto reside en la presencia de sustancias orgánicas (fosfatos, cloraminas, etc) que no se eliminan por el tratamiento típico.

CELULOSAS

VALORES



PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

CELULOSAS Y

Las columnas de fase reversa muy hidrofóbicas, tienen afinidad por compuestos de baja polaridad. Como consecuencia, la operación con sistemas isocráticos con fases móviles polares, conduce a su retención en la fase estacionaria. En este caso las impurezas pueden actuar como verdaderos "recubrimientos líquidos" de la columna, modificando su selectividad. Si en ese momento la fase móvil se cambia por otra de menor polaridad, o si la muestra se inyecta con un solvente menos polar (por ejemplo, dióxano en metanol puro), las impurezas orgánicas eluyen como picos espurios, interfiriendo en el cromatograma.

Si se utilizan gradientes de elución, las impurezas quedan retenidas y luego, al aumentar la concentración del solvente orgánico, eluyen como picos espurios.

CELULOSAS

VALORES

PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

CELULOSAS Y

La preparación de agua cromatográfica, completamente libre de sustancias orgánicas no es sencilla. Algunos métodos son:

- **Destilación doble con hervido prolongado de agua.** Mediante este método se logra destilar completamente los compuestos orgánicos presentes.
- **Sistemas de purificación en cartuchos.** Se parte de agua previamente tratada (desionizada o destilada), que se hace pasar por medio de una pequeña bomba a través de una serie de cartuchos que contienen carbón activado y resinas mixtas de intercambio iónico. Finalmente el agua se filtra por membranas de 0.2 µm. Estos sistemas producen agua de muy alta calidad que es controlada por la medida de su resistividad.
- **Resinas a través de columnas y cartuchos.** Estos cartuchos o columnas, actúan reteniendo las sustancias orgánicas presentes en el agua y pueden estar rellenos de diversos materiales.

CELULOSAS

VALORES

PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

CELULOSAS Y

- Metanol

El metanol es el modificador orgánico más utilizado en fase reversa, en mezcla con agua o buffers. Por su mayor poder disolvente de sales y reactivos de apareamiento iónico, es lo preferido frente al acetoniitrilo en cromatografía iónica o cuando es necesario utilizar altas concentraciones salinas. Es poco tóxico y fácil de purificar industrialmente, siendo el solvente orgánico grado HPLC más barato. Sus principales desventajas con respecto al acetoniitrilo son en que genera presiones algo mayores y tiene mayor viscosidad por el oxígeno.

CELULOSAS

VALORES



PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

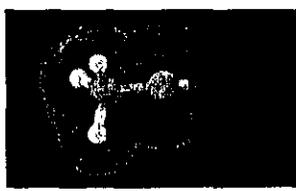
CELULOSAS Y

- Acetoniitrilo

El acetoniitrilo tiene, por sus propiedades químicas, una estabilidad muy diferente a la del metanol, y conviene, en general, la primera alternativa ensayada cuando se busca cambiar la mezcla. Se debe almacenar en un lugar oscuro y bien cerrado porque es muy higroscópico. Su baja longitud de onda de corte (190 nm) lo convierte en el solvente de elección cuando se debe trabajar a longitudes de onda cortas. Es un solvente caro por las dificultades que presenta su purificación. Se obtiene como subproducto de síntesis del acetoniitrilo, materia prima para la producción de cauchos sintéticos y plásticos.

CELULOSAS

VALORES



PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

CELULOSAS Y

- Tetrahidrofurano

El tetrahidrofurano (THF), es un solvente que tiende a formar rápidamente peróxidos, por lo cual se suele comercializar con antioxidantes. Los antioxidantes más utilizados son el butilhidroxitolueno (BHT) y la hidroquinona. Estos compuestos tienen una elevada absorción UV por lo cual el THF estabilizado no debe utilizarse con el detector UV. Puede utilizarse con el detector de índice de refracción, teniendo en cuenta la posible modificación de la selectividad inducida por la presencia del compensador. La presentación habitual del THF grado HPLC no contiene estabilizantes. En este caso es preferible adquirir envases pequeños, que deben utilizarse inmediatamente luego de su apertura.

Si no se consume el contenido total del envase, se recomienda crear una cámara de nitrógeno antes de volver a cerrar. De esta manera, se evita que el oxígeno atmosférico oxide el resto de solvente.

CELULOSAS

VALORES



PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

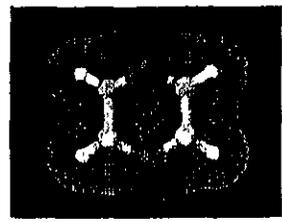
CELULOSAS Y

- Dióxano

El dióxano tiene una selectividad semejante al tetrahidrofurano pero su alta viscosidad hace que habitualmente no se emplee en HPLC salvo como aditivo en pequeñas proporciones.

CELULOSAS

VALORES



PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

OBJETIVOS Y

El trabajar con solventes de alto grado de pureza, implica el empleo de materiales volumétricos muy limpios. Un factor a tener en cuenta es la posible contracción de volumen que se produce al mezclar solventes muy polares.

CONTEXTO

El caso de la mezcla de metanol y agua es clásico. Si se mezclan 50 ml de cada uno de ellos se obtiene un volumen final de aproximadamente 96 ml. Por esta razón, si se debe preparar una mezcla de por ejemplo 50/50 Metanol Agua no es correcto medir en probeta los 50 ml de agua y llevar a volumen con metanol, ya que la relación inicialmente prevista será distinta a la obtenida. Esta alteración en la composición de la fase móvil puede modificar los tiempos de retención de los analitos y en casos críticos, suspensiones que en condiciones apropiadas serán separados.

MECANISMOS

El valor de pH de la fase móvil puede ser un parámetro crítico en la retención de solutos ionizables y en algunos casos debe controlarse rigurosamente.



MECANISMOS

MECANISMOS

AYUDA SALIDA

OBJETIVOS Y

Así el pH de una solución acuosa aumenta cuando se incorpora un modificador orgánico. Por otra parte a valores de pH mayores a 7.5 se disuelve la sílice de base de las columnas, y a pHs menores a 2 se hidroliza la unión entre la sílice y la fase enlazada. Se ha reportado que el uso de columnas de saturación (precolumnas) minimizan el proceso de solubilización de la sílice a pHs elevados, su valor debe ser controlado.

CONTEXTO

Dado que el pH está definido para soluciones acuosas, debena medirse en las soluciones buffer antes del agregado del modificador orgánico. Cualquier medida que se realice con posterioridad, tendrá un significado diferente pero no menos importante. Para estos casos se ha considerado una magnitud, llamada pH aparente (pH_a) para diferenciarlo del pH medido en soluciones acuosas.

MECANISMOS

La fase móvil luego de ser preparada debe ser filtrada y desgasificada.

CONTEXTO

Filtración

La filtración de las fases móviles se puede considerar como parte de un tratamiento preventivo para cuidar el adecuado funcionamiento del equipo HPLC.

Las partículas presentes en la fase móvil pueden bloquear los filtros y tubantes del instrumento, acelerar el desgaste de sellos y rotores del inyector, afectar el normal movimiento de las válvulas check de entrada y salida de las bombas, etc. Por otra parte, como el tamaño de las partículas que rellenan las columnas es muy pequeño, en general entre 3 y 10 µm, constituyen un filtro perfecto para la retención de todo material en suspensión que se introduzca con los fluidos, ya sea fase móvil o muestra en solución.

MECANISMOS

AYUDA SALIDA

OBJETIVOS Y

El empleo de guardacolumnas, altamente recomendado constituye un filtro final previo a la columna.

La filtración se efectúa por medio de membranas de 0.45 ó 0.22 µm de porosidad en equipos de filtración adecuados y es útil para eliminar tanto las partículas como las bacterias. La selección de la membrana, depende de su compatibilidad con los solventes. Es recomendable consultar los catálogos del fabricante a los efectos de verificar la compatibilidad membrana solvente.

CONTEXTO

TIPO DE SOLVENTE

MEMBRANA	AQUO	ALCOH	ORGANICO
Cellulosa microcrisital	R	NR	R
Membrana de celulosa	R	NR	NR
Membrana de celulosa	R	R	NR
Membrana de celulosa	R	R	R
Membrana de celulosa	R	R	R
Polimetilmetacrilato (PTM)	NR	NR	R
Teflón	NR	NR	R

Compatibilidad de la membrana con los solventes (catálogo de Millipore, MFS y Gelman)

R = recomendable
NR = no recomendable

MECANISMOS

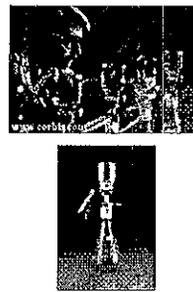
AYUDA SALIDA

OBJETIVOS Y

Al filtrar una fase móvil se recomienda descartar los primeros mililitros del filtrado, que suelen arrastrar componente de las membranas (plastificantes y antioxidantes).

CONTEXTO

Las soluciones a inyectar también deben filtrarse, idealmente a través de membranas semejantes a las empleadas para la fase móvil. Existen para ello dispositivos más pequeños, en los cuales se intercambia al filtro, y otros descartables, que incluyen el filtro.



MECANISMOS

AYUDA SALIDA

OBJETIVOS Y

Desgasificación

Además de la filtración, la fase móvil debe desgasificarse. Los gases disueltos en la fase móvil pueden producir diversos inconvenientes entre ellos:

- **Libración de burbujas en el rebajado de la bomba:** En este caso, el caudal es irregular, y se producen variaciones en la línea de base y en los tiempos de retención. Si la cantidad de aire es importante, la bomba comenzará a trabajar en vacío, pudiéndose dañar tanto los sellos como los pistones.
- **Libración y formación de burbujas en la celda del detector:** Por descompresión de la fase móvil se producen oscilaciones en la línea base y aparición de picos espurios. Para evitar este problema a menudo se colocan restrictores a la salida del detector. Estos restrictores evitan la caída de presión e impiden la aparición de burbujas.

• **El oxígeno disuelto:** Puede presentar diversas dificultades dependiendo del sistema cromatográfico a utilizar. Algunas de ellas son:

- Pérdida de la sensibilidad en los detectores de fluorescencia.
- Alta corriente residual en detectores electroquímicos.
- Ostrucción de analitos.
- Aumento en la línea base de los detectores UV.

CONTEXTO

MECANISMOS

AYUDA SALIDA

OBJETIVOS Y

Métodos de Desgasificación

La cantidad de gas disuelto en un líquido depende de tres factores: Temperatura, Presión y Afinidad.

La temperatura puede favorecer o no la disolución del gas en el líquido. Si el proceso de disolución es exotérmico el incremento de la temperatura disminuye la solubilidad, mientras que si es endotérmico, el incremento de la temperatura aumenta la solubilidad. Por ejemplo la solubilidad del nitrógeno en agua disminuye con el incremento de la temperatura pero aumenta en el benceno.

La solubilidad de un gas en un líquido es directamente proporcional a la presión parcial que ese gas ejerce sobre el líquido. Por ello, si por algún método efectivo se reduce la presión, la cantidad de gas en solución disminuirá.

Por último, la cantidad de gas disuelto depende de su afinidad mutua. Por ejemplo si tanto el gas como en el líquido las fuerzas predominantes son las de Van der Waals, la solubilidad será mayor que en aquellos líquidos en los que predomine otro tipo de fuerzas, por ejemplo puente de hidrógeno, dipolo-dipolo, etc. Es por ello que gases como el oxígeno o nitrógeno, son más solubles en solventes como el hexano que en el agua. Todos estos conceptos nos sirven como base para comprender los métodos que habitualmente se emplean para la desgasificación de las fases móviles.

Los métodos que comúnmente se emplean para desgasificar solventes son:

- Reflujo
- Burbujeo de un gas inerte
- Ultrasonido

CONTEXTO

MECANISMOS

AYUDA SALIDA

OBJETIVOS Y

Reflujo

Consiste en el calentamiento o la ebullición a reflujo de la fase móvil con la ayuda de agitación durante unos 15 minutos. Por este procedimiento se eliminan prácticamente todos los gases disueltos. Habitualmente no se emplea ya que se debe aplicar en forma continua para prevenir la rehidratación de los gases atmosféricos y a que no pueda emplearse en el caso de mezcla de solventes.

CONTEXTO

Burbujeo de un Gas Inerte

Se puede realizar en forma continua o por cortos periodos de tiempo. Se realiza a través de una pieza inoxidable esterilizada (buzo) con diámetro de poro de 2 a 10 µm y un caudal de unos 80-100 ml/min. De esta forma se logra un efectivo desplazamiento de los gases. Alcanzado el equilibrio se reduce el caudal para impedir el retroceso de gases atmosféricos.

Con el fin de reducir costos, ya que el helio es un gas bastante caro es conveniente el uso de restrictores de solventes provistos de tapas con válvulas que permitan mantener una cierta presión sobre la fase móvil para evitar la rehidratación de los gases y que permitan trabajar a un caudal constante de unos 50 ml/min.

MECANISMOS

AYUDA SALIDA

OBJETIVOS Y

Se debe trabajar con buena ventilación ya que este burbujeo puede desplazar al ambiente al componente más volátil de la fase móvil.

CONTEXTO

Ultrasonido

El ultrasonido es una onda electromagnética producida por la propagación de un choque mecánico generado por un cristal piezoeléctrico. Esta onda necesita un soporte material, no se propaga en el vacío y se caracteriza por la frecuencia. En los baños ultrasónicos de uso en el laboratorio se emplean equipos en el rango entre 20 y 50 KHz. La onda generada se propaga a más de 20000 ciclos por segundo y a través del líquido como ondas laterales de compresión, dando lugar a la formación e implosión de microburbujas, fenómenos que se conoce como cavitación.

MECANISMOS

AYUDA SALIDA

OBJETIVOS Y

La aplicación inmediata de esta propiedad es la limpieza de metales, especialmente los que presentan zonas de difícil acceso, o para la disolución de sólidos. Del mismo modo aplicando a la desgasificación de un líquido, no reduce la solubilidad de un gas disuelto, y no puede espumarse sino cuando la solución está sobresaturada. Es así que se aplican para la desgasificación de los resultados más pobres, y en ocasiones puede aumentar el nivel de oxígeno disuelto.

PROCEDIMIENTO

ATENCIÓN SALIDA

OBJETIVOS Y

Las características de la fase móvil son el aspecto que contribuye con mayor peso específico a la selectividad o discriminación cromatográfica en CLAR.

En cromatografía de fase normal los solventes fuertes o polares eluyen rápidamente los que tengan una gran tendencia a quedar retenidos.

En cromatografía de fase reversa, la relación entre fuerza y polaridad de la fase móvil es inversa, así, el agua es un eluyente con mínimo poder de elución y debe mezclarse con solventes menos polares para eluir sólidos fuertemente retenidos por la fase estacionaria no polar.

La selectividad de la fase móvil depende del tipo de interacción de la misma con la muestra. Las interacciones pueden ser de tipo dispersivo, dipolar por puente de hidrógeno, interacciones dipolares, o una combinación de ellas. No solo la "polaridad" sino la suma de todas estas propiedades es la que define la selectividad de la fase móvil por un analito dado que tendrá a su vez determinadas características dipolares,ceptoras o donadoras de protones.

Son dos las propiedades básicas de la fase líquida móvil, la fuerza de elución o capacidad de desplazamiento y la selectividad, la fuerza de elución es equivalente a la polaridad en el caso de solventes no aproticos.

PROCEDIMIENTO

ATENCIÓN SALIDA

OBJETIVOS Y

Según Poole, la estrategia general en las separaciones cromatográficas consiste en:

- 1) Ajustar la fuerza de la fase móvil a un nivel constante para que los factores de capacidad (k') oscilen entre 1 y 10, es decir, para que el tiempo de permanencia sea el adecuado para no atarjar excesivamente al cromatograma y evitar la dispersión de los solutos.
- 2) Modificar la composición de la fase móvil hasta conseguir la selectividad necesaria para lograr la resolución requerida.

Snyder ha clasificado los solventes de acuerdo con sus dos propiedades básicas (a) fuerza de elución cromatográfica, es decir, polaridad, y (b) selectividad, relacionada con su capacidad de formar puentes de hidrógeno (dadora y aceptora) y de inducir dipolos, que permite clasificar los

Para definir el comportamiento de un disolvente a través estas dos propiedades básicas Snyder ha puesto al uso de tres estándares o estándares respecto a las fuerzas o interacciones indicadas:

ESTANOL - ACEPTOR DE PROTONES
 DIBENCENO - DONADOR DE PROTONES
 METILFORMAMIDA - FUERZAS DE POLARIDAD

PROCEDIMIENTO

ATENCIÓN SALIDA

OBJETIVOS Y

Es así que se clasifican a los solventes de uso habitual en HPLC en 8 grupos según el tipo y magnitud de estas interacciones y se disponen estos grupos en un diagrama triangular.

PROCEDIMIENTO

ATENCIÓN SALIDA

OBJETIVOS Y

El denominado triángulo de selectividad de los solventes es una representación esquemática de la selectividad relativa de estos ocho grupos. En cada vértice se representa uno de los solventes más representativos del tipo de interacción. En cada lado aumenta, según el sentido indicado, cada uno de los parámetros de selectividad. La sustitución de un solvente por otro de su grupo no origina cambios significativos en la resolución cromatográfica, por el contrario, si el solvente es de otro grupo los cambios en el comportamiento del soluto serán más notorios cuanto más alejados estén los grupos en el triángulo.

Visto de ese modo es claro que si la resolución con un determinado solvente es insuficiente, es poco el cambio que se conseguirá al cambiar ese solvente por otro del mismo grupo, ya que el tipo de interacción con la muestra será similar.

Así, los vértices del triángulo (solventes de mayor diferencia de selectividad) en fase reversa son MetOH, AcN y THF, empleando agua como solvente de soporte mientras en fase normal son el éter (se prefiere el empleo de metil-t-butil éter y no éter etílico), cloroformo y cloruro de metileno en mezcla con hexano o 1,1,2-tetrcloro-1,2,2-trifluoroetano), sugerido por su baja inflamabilidad, toxicidad y buena transparencia.

La mezcla de solventes se emplea con gran frecuencia en CLAR ya que de esta forma se puede seleccionar con mayor flexibilidad la "fuerza de elución" y la "selectividad" necesarias para una determinada separación cromatográfica.

PROCEDIMIENTO

ATENCIÓN SALIDA

OBJETIVOS Y

El denominado solvente regulador de fuerza se generalmente un solvente con una baja selectividad, así se emplea el agua en cromatografía de fase reversa y el n-hexano o n-hexano para la modalidad normal. Para determinar la "fuerza de elución" de una mezcla binaria de solventes se emplea la fuerza de elución de cada solvente. En la tabla se muestran las fuerzas de elución para una serie de solventes pertenecientes a diferentes grupos de selectividad para las modalidades normal y reversa. En el caso de la cromatografía de fase normal, la fuerza de elución coincide con el índice de polaridad. Como es lógico el agua tiene el valor más alto y el hexano el más bajo.

Solvente	Fuerza de Elución
Agua	100
Metanol	95
Etol	90
1-Propanol	85
2-Propanol	80
Tetra hidr. fur.	75
Acet. n-butílico	70
Acet. n-butílico	65
Acet. n-butílico	60
Acet. n-butílico	55
Acet. n-butílico	50
Acet. n-butílico	45
Acet. n-butílico	40
Acet. n-butílico	35
Acet. n-butílico	30
Acet. n-butílico	25
Acet. n-butílico	20
Acet. n-butílico	15
Acet. n-butílico	10
Acet. n-butílico	5
Acet. n-butílico	0

PROCEDIMIENTO

ATENCIÓN SALIDA

OBJETIVOS Y

En general, "la fuerza de elución total" de una mezcla de solventes puede calcularse mediante la siguiente expresión:

$$S_t = S_{1b} + S_{2b} + \dots = \sum S_{ib}$$

PROCEDIMIENTO

ATENCIÓN SALIDA

OBJETIVOS Y

La mezcla adecuada para una determinada problemática en una modalidad CLAR puede descubrirse en el triángulo cromatográfico anteriormente descrito. Para obtener las máximas diferencias en selectividad, los solventes se seleccionan entre los diferentes grupos que se encuentran cerca de los vértices del triángulo. Tal como puede observarse en la figura.

Existen dos situaciones diferentes según la modalidad cromatográfica. En la normal se seleccionan tres solventes poco polares (éter metil-butílico (I), cloroformo (VI) y cloruro de metileno (V)) que se mezclan con n-hexano y en la reversa se utilizan otros tres de carácter polar (metanol (I), acetofenilo (VI) y tetrahidrofuran (II)) que se mezclan con agua.

PROCEDIMIENTO

ATENCIÓN SALIDA

LETRAS Y	<p>Para poder seleccionar un disolvente isoelectrónico o debe manejar la proporción de la mezcla así como los pasos específicos. Así, si se desea mejorar la selectividad obtenida con la mezcla 50:40 metanol:agua con una fuerza de elución 1.56 hay que sustituir el metanol (grupo II) por otro como el acetoniitrilo (grupo VI) de S (fuerza de elución 3.2, o el tetrahidrofurano (grupo III) de SI 4.5. La proporción en que deben mezclarse estos con el agua se determina a través de la fórmula anteriormente expuesta</p> <p>acetoniitrilo - agua $S1 = 1.66 = 3.2 \times D_{mix} + O_{mix}$ $D_{mix} = 1.66/3.2 = 0.49$</p> <p>tetrahidrofurano - agua $S1 = 1.56 = 4.5 \times O_{mix} + O_{mix}$ $O_{mix} = 1.66/4.5 = 0.34$</p> <p>Por lo tanto las mezclas isoelectrónicas con la de 60:40 metanol:agua de diferente selectividad son 49:51 acetoniitrilo:agua y 64:86 tetrahidrofurano:agua</p> <p>Pese a los cambios de selectividad que pueden lograrse con mezclas binarias con un control estricto de la capacidad de elución (fuerza) de la fase móvil, con frecuencia no son suficientes para lograr la discriminación cromatográfica entre los solutos sobre todo cuando son mezclas complejas o cuando presentan características muy similares</p>	LETRAS Y	<p>Para lograr una mayor selectividad caben dos alternativas</p> <p>a) Empleo de gradiente de elución variando la composición de la fase móvil durante el proceso cromatográfico, generalmente aumentando la proporción de solvente con mayor fuerza. Un ejemplo característico se encuentra en la figura</p> <p>b) Un sistema más simple consiste en el empleo de mezclas ternarias y cuaternarias de fase móvil isoelectrónicas para lograr los objetivos cromatográficos propuestos. En la figura se muestra un ejemplo ilustrativo que consiste en la separación de una mezcla sintética de compuestos orgánicos por cromatografía en fase reversa utilizando tres fases móviles isoelectrónicas. Cuando se emplea metanol:agua (50:50) no se discrimina entre alcohol bencílico y fenol (pico 1 cromatograma A). Si se emplea una mezcla THF:agua (55:55) el alcohol bencílico pasa ya como pico aislado, pero el fenol no se discrimina del 3-fenilpropanol (picos 2 y 3 del cromatograma B). Por el contrario si se utiliza una mezcla metanol:THF (55:10:55) se consigue una excelente resolución (cromatograma C). Es interesante hacer constar que la fuerza total de los tres tipos de fase móvil es igual, como lo demuestran la dirección de los tres cromatogramas que es prácticamente análoga</p>
CURVAS		CURVAS	
SERIES		SERIES	
MEMORIA		MEMORIA	
AYUDA SALIDA		AYUDA SALIDA	

LETRAS Y	<p>En general, la selección de la fase móvil adecuada se hace empíricamente utilizando las orientaciones expuestas. Recientemente se han descrito técnicas informáticas que aplican el concepto del triángulo de selectividad de Snyder para optimizar racionalmente la composición de la fase móvil, tanto en configuración off line (suministrando manualmente datos al microordenador) como on-line (con un microprocesador que recibe los datos del detector y reprograma el suministro de fase móvil)</p> <p>Todo lo indicado hasta aquí es aplicable directamente a la cromatografía de partición líquido-líquido, para la cromatografía de adsorción líquido-sólido en sus modalidades normal y reversa. En la cromatografía de exclusión molecular y también en la cromatografía de intercambio iónico etc</p>
CURVAS	
SERIES	
MEMORIA	
AYUDA SALIDA	

PREPARACION

GENERALIDADES

METODOS DE SEPARACION

TRATAMIENTO PREVIO

DERIVATIZACION

ANALISIS CUANTITATIVO

SEMIPREPARADA

AYUDA SALIDA




PREPARACION

GENERALIDADES

METODOS DE SEPARACION

TRATAMIENTO PREVIO

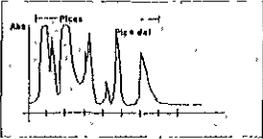
DERIVATIZACION

ANALISIS CUANTITATIVO

SEMIPREPARADA

AYUDA SALIDA

Frecuentemente la muestra que se analiza no se proporciona en forma tal que puede inyectarse directamente en el equipo CLAR. El objetivo de la preparación de la muestra es quitar los interferentes y obtener los componentes de interés de la muestra en solución, que se encuentren en un solvente conveniente, a una concentración apropiada para la detección y medida. Quitar los interferentes puede aumentar el máximo de la exactitud y puede reducir los tiempos del análisis. El cromatograma muestra un ejemplo de interferentes de elución en el componente de interés y cómo se ve quitando los interferentes.



PREPARACION

GENERALIDADES

METODOS DE SEPARACION

TRATAMIENTO PREVIO

DERIVATIZACION

ANALISIS CUANTITATIVO

SEMIPREPARADA

AYUDA SALIDA

La importancia en la preparación de muestras tiene un gran interés en tres aspectos:

Concentración de la Muestra
Frecuentemente la concentración de interés está presente en bajos niveles de detección. La preparación de la muestra puede concentrar el componente necesario a niveles para poder medirlos con exactitud y precisión.

Contaminantes
La presencia de elementos interferentes en la matriz puede enmascarar o puede interferir con el análisis de los componentes de interés. La preparación de la muestra puede quitar el exceso de los contaminantes para producir cromatogramas limpios.

En Solución
Para la mayoría de los análisis en CLAR, la muestra debe prepararse apropiadamente en solución para el análisis subsiguiente.



PREPARACION

GENERALIDADES

METODOS DE SEPARACION

TRATAMIENTO PREVIO

DERIVATIZACION

ANALISIS CUANTITATIVO

SEMIPREPARADA

AYUDA SALIDA

La preparación de las muestras es una etapa decisiva en todo método de análisis en especial en la determinación de microcomponentes (traza) y en los casos donde la matriz que rodea al analito es muy compleja. La elección del método más apropiado depende de muchos factores como son:

1. **Propiedades Físicas y Químicas del Analito**
2. **Forma en la que se Presenta el Analito en la Muestra**
3. **Concentración del Analito en la Muestra**
4. **Compatibilidad de los Medios de Solubilización y Extracción**

PREPARACION

GENERALIDADES

METODOS DE SEPARACION

TRATAMIENTO PREVIO

DERIVATIZACION

ANALISIS CUANTITATIVO

SEMIPREPARADA

AYUDA SALIDA

PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS DEL ANALITO

El conocimiento de algunas de las características físico-químicas del analito es esencial en el diseño de un método para la preparación de las muestras. Es conveniente conocer su estructura química, peso molecular, solubilidad, propiedades ácido base (pKa) y respuesta frente al tipo de detector seleccionado. Muchos analitos tienen respuestas bajas o directamente nulas frente a los detectores de uso más común como el detector UV y el de fluorescencia. En estos casos, especialmente si la concentración del analito es baja, encontramos sin lugar a dudas un problema de detección y consecuentemente, de cuantificación. Este problema puede resolverse derivando algunos de los grupos presentes en la molécula.



PREPARACION

GENERALIDADES

METODOS DE SEPARACION

TRATAMIENTO PREVIO

DERIVATIZACION

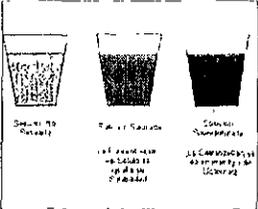
ANALISIS CUANTITATIVO

SEMIPREPARADA

AYUDA SALIDA

CONCENTRACION DEL ANALITO EN LA MUESTRA

Este factor tiene importancia decisiva. Para los análisis en altas concentraciones en general se requieren preparaciones de muestras sencillas como la solubilización y filtración. Analitos en bajas concentraciones, por su parte, pueden requerir metodologías más elaboradas que involucran numerosas operaciones para lograr una solución cuya concentración sea "aceptable" como para inyectarse en el cromatógrafo.



PREPARACION

GENERALIDADES

METODOS DE SEPARACION

TRATAMIENTO PREVIO

DERIVATIZACION

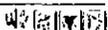
ANALISIS CUANTITATIVO

SEMIPREPARADA

AYUDA SALIDA

FORMA EN LA QUE SE PRESENTA EL ANALITO EN LA MUESTRA

Es necesario conocer el estado en el que se encuentra el analito en la muestra para poder diseñar un método apropiado de preparación. En muestras de origen biológico el analito puede no encontrarse como tal sino unido a proteínas transportadoras (análisis de fármacos en suero o plasma), metabolizado como Ácido, amido o éter de los ácidos sulfúrico o glucurónico (análisis de diversas sustancias en orina) o metabolizado a otra sustancia diferente. En estos casos sus propiedades químicas pueden cambiar radicalmente. En tal que una sustancia totalmente no polar e insoluble en agua puede presentarse como un glucosido polar y soluble en la orina, pero vuelve a comportarse como tal después de una hidrólisis con la enzima β -glucuronidasa (esta enzima hidroliza la unión entre el analito y el ácido glucurónico).



PREPARACION

GENERALIDADES

METODOS DE SEPARACION

TRATAMIENTO PREVIO

DERIVATIZACION

ANALISIS CUANTITATIVO

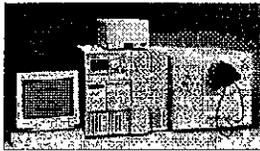
SEMIPREPARADA

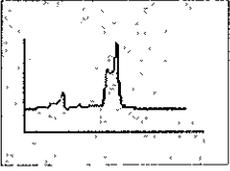
AYUDA SALIDA

En CLAR se requiere que la solución a inyectar sea compatible y miscible con la fase móvil. Es recomendable que el solvente de disolución de la muestra sea la misma fase móvil o, en su defecto, un solvente débil (por ejemplo agua en fase reversa). Teniendo en cuenta este hecho es posible que se eleven numéricos problemas. Si se disuelve la muestra en un solvente fuerte, es posible que algunas sustancias precipiten al entrar en contacto con fases móviles acuosas. Al efectuarse inyecciones posteriores es posible que esas sustancias, por la presencia del solvente fuerte migren dentro de la columna evitando a precipitar y a redispersarse cíclicamente contaminando así el material de relleno de la columna en su totalidad. Además, la inyección de solventes más fuertes que la fase móvil puede producir deformaciones en los picos.



PREPARACION	<p>Muchos de los métodos que se utilizan para la preparación de las muestras involucran la extracción líquido-líquido del analito desde un medio acuoso hasta un medio orgánico ya sea por sus características no polares propias o adquiridas regulando el pH del medio.</p> <p>En estos casos la muestra final se encuentra disuelta en un solvente lipofílico (cloroformo, hexano, éter) por lo cual no resulta conveniente inyectarlo en un sistema convencional de fase reversa que contiene mezclas de solventes orgánicos y agua como fase móvil.</p> <p>En este caso se puede evaporar el solvente hasta sequedad y disolver el residuo en fase móvil (con el consecuente error que esta operación conlleva) o inyectar en fase normal la solución resultante. Aún teniendo especial cuidado, en este punto suelen presentarse problemas.</p>	<p>Por ejemplo en el análisis de residuos de pesticidas se requiere habitualmente, una extracción con solventes no polares seguida de una adsorción en Florisil o Alumina y una evaporación con solventes orgánicos.</p> <p>Se ha reportado que al disolver el residuo en una fase móvil acuosa es posible que se presenten problemas si el material de partida contiene aceites o grasas y si se intenta disolver el residuo con solventes puros como metanol o acetoneo, es posible que se obtengan picos distorsionados debido a los efectos del solvente.</p>
GENERALIDADES		
MÉTODOS DE SEPARACION		
TRATAMIENTO PREVIO		
DERIVATIZACION		
ANÁLISIS CUANTITATIVO		
PRINCIPAL		
AYUDA SALIDA		

PREPARACION	<p>La sensibilidad y selectividad del detector tienen un rol muy importante en el diseño de los métodos para la preparación de las muestras. Los detectores poco selectivos como el detector de índice de refracción generalmente requieren muestras mucho más limpias que los detectores más selectivos como el de fluorescencia. Por su parte los detectores más sensibles (fluorescencia amperométrica) requieren menos pasos de preconcentración que aquellos menos sensibles (índice de refracción).</p>	<p>TIPO DE DETECTOR</p> 
GENERALIDADES		
MÉTODOS DE SEPARACION		
TRATAMIENTO PREVIO		
DERIVATIZACION		
ANÁLISIS CUANTITATIVO		
PRINCIPAL		
AYUDA SALIDA		

PREPARACION	<p>COMPATIBILIDAD CON EL DETECTOR</p> <p>En la selección de un medio para la solubilización del analito debe considerarse su compatibilidad con el detector a utilizar. No es conveniente utilizar solventes como la acetona o el tolueno si se ha de emplear un detector UV porque estos solventes poseen una elevada absorción de base, y puede producir picos espurios o señales importantes en el frente del solvente. Igualmente no resulta muy prudente utilizar fases móviles de elevada conductividad si se desea emplear un detector conductimétrico.</p>	
GENERALIDADES		
MÉTODOS DE SEPARACION		
TRATAMIENTO PREVIO		
DERIVATIZACION		
ANÁLISIS CUANTITATIVO		
PRINCIPAL		
AYUDA SALIDA		

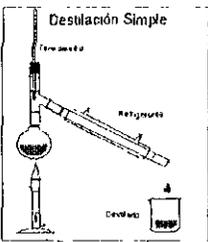
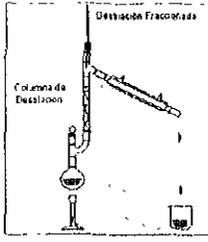
PREPARACION	<p>Para el tratamiento previo de las muestras como para posteriores pasos de purificación pueden utilizarse todas las técnicas conocidas de la química analítica como extracción, liofilización, evaporación, filtración, centrifugación, precipitación, solubilización, etc.</p>	<p> <input type="checkbox"/> Liofilización <input type="checkbox"/> Extracción <input type="checkbox"/> Centrifugación <input type="checkbox"/> Evaporación <input type="checkbox"/> Filtración <input type="checkbox"/> Precipitación <input type="checkbox"/> Solubilización </p>
GENERALIDADES		
MÉTODOS DE SEPARACION		
TRATAMIENTO PREVIO		
DERIVATIZACION		
ANÁLISIS CUANTITATIVO		
PRINCIPAL		
AYUDA SALIDA		

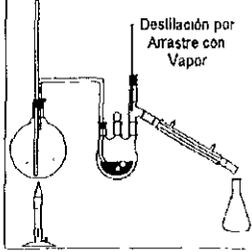
PREPARACION	<p>LIOfILIZACION</p> <p>La liofilización consiste en sacar el agua a una sustancia congelada calentando el paraje por el estado líquido. Se congela una solución acuosa de la sustancia química que deseamos liofilizar y a esa baja temperatura que implica cambios químicos de deterioro, se le somete a un alto vacío que hace pasar el agua del estado sólido al estado gaseoso, sin pasar por el estado líquido. Es una forma de secar un producto químico a temperaturas bajas, sin el deterioro que produciría el calentamiento.</p> <p>La liofilización permite una deshidratación completa sin el aumento de temperatura que puede hacer variar la composición química y la actividad terapéutica del producto final. Se usa generalmente en la preparación comercial de antibióticos de algunas vacunas y de muchos productos vegetales alimenticios y saborizantes. La liofilización es un proceso de congelación-desecación.</p>	
GENERALIDADES		
MÉTODOS DE SEPARACION		
TRATAMIENTO PREVIO		
DERIVATIZACION		
ANÁLISIS CUANTITATIVO		
PRINCIPAL		
AYUDA SALIDA		

PREPARACION	<p>CRISTALIZACION</p> <p>Para efectuar la cristalización de un sólido hay que partir de una solución <u>Sobre Saturada</u>. Existen varias formas de Sobre Saturar una solución, una de ellas es el enfriamiento de la solución, otra consiste en eliminar parte del disolvente (por ejemplo por evaporación) a fin de aumentar la concentración del soluto, otra forma consiste en añadir un tercer componente que tenga una mayor solubilidad que el componente que se desea cristalizar.</p> <p>La rapidez del enfriamiento define el tamaño de los cristales resultantes. Un enfriamiento rápido producirá cristales pequeños, mientras que un enfriamiento lento producirá cristales grandes. Para acelerar la cristalización puede hacerse una "siembra" raspando las paredes del recipiente.</p>	
GENERALIDADES		
MÉTODOS DE SEPARACION		
TRATAMIENTO PREVIO		
DERIVATIZACION		
ANÁLISIS CUANTITATIVO		
PRINCIPAL		
AYUDA SALIDA		

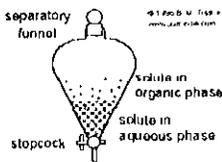
PREPARACION	<p>PRECIPITACION</p> <p>La precipitación es una técnica de separación en la que las fases implicadas son sólido-líquido. Una de las cuales se forma indirectamente in situ y las fuerzas puestas en juego son fundamentalmente de tipo químico.</p> <p>La incorporación de una sustancia ajena a la disolución de la muestra o la alteración de esta, provocan la precipitación del analito (o mezcla de los mismos) lográndose así los objetivos de las técnicas de separación. Se añaden las especies a determinar de otras potencialmente interferentes y se puede preconcentrar si el precipitado se redissuelve en un volumen notablemente inferior (de 5 a 100 veces) del de la disolución original.</p>	
GENERALIDADES		
MÉTODOS DE SEPARACION		
TRATAMIENTO PREVIO		
DERIVATIZACION		
ANÁLISIS CUANTITATIVO		
PRINCIPAL		
AYUDA SALIDA		

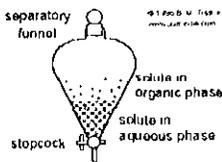
PREPARACION	<p>DESTILACION</p> <p>Este método consiste en separar los componentes de las mezclas basándose en las diferencias en los puntos de ebullición de dichos componentes. Un compuesto de punto de ebullición bajo se considera "volátil" en relación con los otros componentes de puntos de ebullición mayor. Los compuestos con una presión de vapor baja tendrán puntos de ebullición altos y los que tengan una presión de vapor alta tendrán puntos de ebullición bajos.</p> <p>Los tipos de Destilación más comunes son:</p> <ul style="list-style-type: none"> Destilación Simple Destilación Fraccionada Destilación por Arrastre con Vapor 	
GENERALIDADES		
MÉTODOS DE SEPARACION		
TRATAMIENTO PREVIO		
DERIVATIZACION		
ANÁLISIS CUANTITATIVO		
PRINCIPAL		
AYUDA SALIDA		

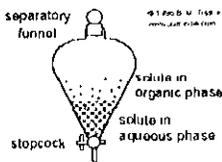
PREPARACION	<p>DESTILACION</p> <p>• Destilación Simple</p> <p>En la Destilación Simple, el proceso se lleva a cabo por medio de una sola etapa, es decir, que al evaporar el líquido de punto de ebullición más bajo (mayor presión de vapor) se condensa por medio de un refrigerante.</p>  <p>Destilación Simple</p>	<p>PREPARACION</p>	<p>DESTILACION</p> <p>• Destilación Fraccionada</p> <p>En la Destilación fraccionada el proceso se realiza en multi etapas por medio de una columna de destilación en la cual se llevan a cabo continuamente numerosas evaporaciones y condensaciones. Al avanzar a lo largo de la columna, la composición del vapor es más concentrada en el componente más volátil y la concentración del líquido que condensa es más rica en el componente menos volátil. Cabe mencionar que este tipo de destilación es mucho más eficiente que una destilación simple y que mientras más etapas involucra, mejor separación se obtiene de los componentes.</p>  <p>Destilación Fraccionada</p>	<p>GENERALIDADES</p> <p>MÉTODOS DE SEPARACION</p> <p>ESTABLECIMIENTO PREVIO</p> <p>DERIVATIZACION</p> <p>ANALISIS CUANTITATIVO</p> <p>PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>
-------------	--	--------------------	---	---

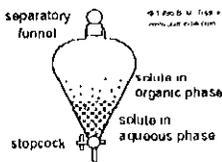
PREPARACION	<p>DESTILACION</p> <p>• Destilación por Arrastre con Vapor</p> <p>En la Destilación por Arrastre con Vapor se hace pasar una corriente de vapor a través de la mezcla de reacción y los componentes que son solubles en el vapor son separados. Entre las sustancias que se pueden separar por esta técnica se pueden citar los Aceites Esenciales.</p>  <p>Destilación por Arrastre con Vapor</p>	<p>PREPARACION</p>	<p>EXTRACCION</p> <p>La extracción usa dos fases inmiscibles para separar un soluto de una fase dentro de la otra.</p> <ul style="list-style-type: none"> Extracción Líquido Sólido Extracción Líquido Líquido Extracción Fase Sólida 	<p>GENERALIDADES</p> <p>MÉTODOS DE SEPARACION</p> <p>ESTABLECIMIENTO PREVIO</p> <p>DERIVATIZACION</p> <p>ANALISIS CUANTITATIVO</p> <p>PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>
-------------	--	--------------------	---	---

PREPARACION	<p>DEPROTEINIZACION</p> <p>Las proteínas presentes en las matrices biológicas deben eliminarse antes de inyectar la muestra en el equipo de CLAE para evitar que precipiten dentro del equipo cromatográfico. Esta operación se denomina desproteinización.</p> <p>La desproteinización es una forma particular de la separación de sustancias por precipitación. Se realiza con el agregado de varios agentes, entre ellos: solventes orgánicos, sales, ácidos o bases, o bien por ultrafiltración. Los solventes orgánicos como el metanol, acetoniolo o etanol agregados a una solución acuosa de una proteína disminuyen su solubilidad y en condiciones adecuadas, inducen a su precipitación. Cuanto menor sea la polaridad del solvente agregado mejor será su capacidad de desproteinización. El agregado de sales neutras, <i>salt-in</i> disminuye la extracción de las moléculas de las proteínas y aumenta su solubilidad.</p>	<p>PREPARACION</p>	<p>EXTRACCION</p> <p>La extracción líquido-sólido, también denominada lixiviación, comprende la solubilización del analito presente en una muestra sólida previamente molido con un solvente adecuado, con la ayuda de agitación. La muestra puede agitarse manualmente o con agitadores mecánicos o ultrasónicos. Las características del solvente de solubilización, la cantidad de extracción, la viscosidad y el tiempo de agitación dependerán tanto de las características del analito como de la matriz que lo rodea. Un tipo especial de extracción líquido-sólido emplea sistemas continuos con solventes calientes (Soxhlet) y se aplican a análisis poco solubles o a matrices muy complejas.</p> 	<p>GENERALIDADES</p> <p>MÉTODOS DE SEPARACION</p> <p>ESTABLECIMIENTO PREVIO</p> <p>DERIVATIZACION</p> <p>ANALISIS CUANTITATIVO</p> <p>PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>
-------------	---	--------------------	---	---

PREPARACION	<p>EXTRACCION</p> <p>La extracción líquido-líquido es un método basado en la distribución (partición) relativa de un analito entre dos líquidos inmiscibles. La extracción se utiliza para:</p> <ul style="list-style-type: none"> Eliminar interferentes Concentrar especies para análisis previo <p>Al tratar con especies acuosas, los solutos pueden estar en equilibrio en varias formas. A menudo, se extraen solutos desde una fase orgánica a una fase acuosa.</p> <table border="1" data-bbox="296 1612 563 1693"> <tr> <td>Fase orgánica densidad > 1.00 g/ml</td> <td>llamada fase 1</td> </tr> <tr> <td>Fase acuosa densidad < 1.00 g/ml</td> <td>llamada fase 2</td> </tr> </table> <p>Las soluciones pueden variar de comportamiento ideal desde la salida o durante la extracción. Las posibles causas incluyen:</p> <ul style="list-style-type: none"> disolución de una fase dentro de la otra saturación del soluto en la fase reacción del soluto en la fase alteración de las condiciones del pH durante la extracción 	Fase orgánica densidad > 1.00 g/ml	llamada fase 1	Fase acuosa densidad < 1.00 g/ml	llamada fase 2	<p>PREPARACION</p>	<p>EXTRACCION</p> <p>La extracción convencional líquido-líquido es una operación lenta y tediosa muy dependiente de la habilidad del operador y que está expuesta a numerosos problemas (formación de emulsiones, manipulación de grandes cantidades de solvente tóxico e inflamables, peligro en evaporaciones, flujos, etc.). Adicionalmente, en el análisis de trazas debe considerarse que los solventes de extracción pueden agregar nuevos compuestos a la muestra a analizar (sus propias impurezas) y que estos compuestos pueden interferir en la determinación del analito.</p> 	<p>GENERALIDADES</p> <p>MÉTODOS DE SEPARACION</p> <p>ESTABLECIMIENTO PREVIO</p> <p>DERIVATIZACION</p> <p>ANALISIS CUANTITATIVO</p> <p>PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>
Fase orgánica densidad > 1.00 g/ml	llamada fase 1							
Fase acuosa densidad < 1.00 g/ml	llamada fase 2							

PREPARACION	<p>EXTRACCION</p> <p>La extracción líquido-líquido es un método basado en la distribución (partición) relativa de un analito entre dos líquidos inmiscibles. La extracción se utiliza para:</p> <ul style="list-style-type: none"> Eliminar interferentes Concentrar especies para análisis previo <p>Al tratar con especies acuosas, los solutos pueden estar en equilibrio en varias formas. A menudo, se extraen solutos desde una fase orgánica a una fase acuosa.</p> <table border="1" data-bbox="296 1612 563 1693"> <tr> <td>Fase orgánica densidad > 1.00 g/ml</td> <td>llamada fase 1</td> </tr> <tr> <td>Fase acuosa densidad < 1.00 g/ml</td> <td>llamada fase 2</td> </tr> </table> <p>Las soluciones pueden variar de comportamiento ideal desde la salida o durante la extracción. Las posibles causas incluyen:</p> <ul style="list-style-type: none"> disolución de una fase dentro de la otra saturación del soluto en la fase reacción del soluto en la fase alteración de las condiciones del pH durante la extracción 	Fase orgánica densidad > 1.00 g/ml	llamada fase 1	Fase acuosa densidad < 1.00 g/ml	llamada fase 2	<p>PREPARACION</p>	<p>EXTRACCION</p> <p>La extracción convencional líquido-líquido es una operación lenta y tediosa muy dependiente de la habilidad del operador y que está expuesta a numerosos problemas (formación de emulsiones, manipulación de grandes cantidades de solvente tóxico e inflamables, peligro en evaporaciones, flujos, etc.). Adicionalmente, en el análisis de trazas debe considerarse que los solventes de extracción pueden agregar nuevos compuestos a la muestra a analizar (sus propias impurezas) y que estos compuestos pueden interferir en la determinación del analito.</p> 	<p>GENERALIDADES</p> <p>MÉTODOS DE SEPARACION</p> <p>ESTABLECIMIENTO PREVIO</p> <p>DERIVATIZACION</p> <p>ANALISIS CUANTITATIVO</p> <p>PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>
Fase orgánica densidad > 1.00 g/ml	llamada fase 1							
Fase acuosa densidad < 1.00 g/ml	llamada fase 2							

PREPARACION	<p>EXTRACCION</p> <p>La extracción líquido-líquido es un método basado en la distribución (partición) relativa de un analito entre dos líquidos inmiscibles. La extracción se utiliza para:</p> <ul style="list-style-type: none"> Eliminar interferentes Concentrar especies para análisis previo <p>Al tratar con especies acuosas, los solutos pueden estar en equilibrio en varias formas. A menudo, se extraen solutos desde una fase orgánica a una fase acuosa.</p> <table border="1" data-bbox="296 1612 563 1693"> <tr> <td>Fase orgánica densidad > 1.00 g/ml</td> <td>llamada fase 1</td> </tr> <tr> <td>Fase acuosa densidad < 1.00 g/ml</td> <td>llamada fase 2</td> </tr> </table> <p>Las soluciones pueden variar de comportamiento ideal desde la salida o durante la extracción. Las posibles causas incluyen:</p> <ul style="list-style-type: none"> disolución de una fase dentro de la otra saturación del soluto en la fase reacción del soluto en la fase alteración de las condiciones del pH durante la extracción 	Fase orgánica densidad > 1.00 g/ml	llamada fase 1	Fase acuosa densidad < 1.00 g/ml	llamada fase 2	<p>PREPARACION</p>	<p>EXTRACCION</p> <p>La extracción convencional líquido-líquido es una operación lenta y tediosa muy dependiente de la habilidad del operador y que está expuesta a numerosos problemas (formación de emulsiones, manipulación de grandes cantidades de solvente tóxico e inflamables, peligro en evaporaciones, flujos, etc.). Adicionalmente, en el análisis de trazas debe considerarse que los solventes de extracción pueden agregar nuevos compuestos a la muestra a analizar (sus propias impurezas) y que estos compuestos pueden interferir en la determinación del analito.</p> 	<p>GENERALIDADES</p> <p>MÉTODOS DE SEPARACION</p> <p>ESTABLECIMIENTO PREVIO</p> <p>DERIVATIZACION</p> <p>ANALISIS CUANTITATIVO</p> <p>PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>
Fase orgánica densidad > 1.00 g/ml	llamada fase 1							
Fase acuosa densidad < 1.00 g/ml	llamada fase 2							

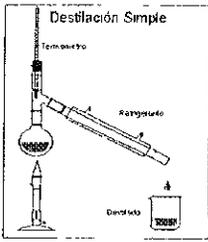
PREPARACION	<p>EXTRACCION</p> <p>La extracción líquido-líquido es un método basado en la distribución (partición) relativa de un analito entre dos líquidos inmiscibles. La extracción se utiliza para:</p> <ul style="list-style-type: none"> Eliminar interferentes Concentrar especies para análisis previo <p>Al tratar con especies acuosas, los solutos pueden estar en equilibrio en varias formas. A menudo, se extraen solutos desde una fase orgánica a una fase acuosa.</p> <table border="1" data-bbox="296 1612 563 1693"> <tr> <td>Fase orgánica densidad > 1.00 g/ml</td> <td>llamada fase 1</td> </tr> <tr> <td>Fase acuosa densidad < 1.00 g/ml</td> <td>llamada fase 2</td> </tr> </table> <p>Las soluciones pueden variar de comportamiento ideal desde la salida o durante la extracción. Las posibles causas incluyen:</p> <ul style="list-style-type: none"> disolución de una fase dentro de la otra saturación del soluto en la fase reacción del soluto en la fase alteración de las condiciones del pH durante la extracción 	Fase orgánica densidad > 1.00 g/ml	llamada fase 1	Fase acuosa densidad < 1.00 g/ml	llamada fase 2	<p>PREPARACION</p>	<p>EXTRACCION</p> <p>La extracción convencional líquido-líquido es una operación lenta y tediosa muy dependiente de la habilidad del operador y que está expuesta a numerosos problemas (formación de emulsiones, manipulación de grandes cantidades de solvente tóxico e inflamables, peligro en evaporaciones, flujos, etc.). Adicionalmente, en el análisis de trazas debe considerarse que los solventes de extracción pueden agregar nuevos compuestos a la muestra a analizar (sus propias impurezas) y que estos compuestos pueden interferir en la determinación del analito.</p> 	<p>GENERALIDADES</p> <p>MÉTODOS DE SEPARACION</p> <p>ESTABLECIMIENTO PREVIO</p> <p>DERIVATIZACION</p> <p>ANALISIS CUANTITATIVO</p> <p>PRINCIPAL</p> <p>AYUDA SALIDA</p>
Fase orgánica densidad > 1.00 g/ml	llamada fase 1							
Fase acuosa densidad < 1.00 g/ml	llamada fase 2							

PREPARACION

DESTILACION

Destilación Simple

En la Destilación Simple, el proceso se lleva a cabo por medio de una sola etapa es decir, que se evapora el líquido de punto de ebullición más bajo (mayor presión de vapor) y se condensa por medio de un refrigerante



GENERALIDADES

MÉTODOS DE SEPARACION

TRATAMIENTO PREVIO

DERIVATIZACION

ANÁLISIS CUANTITATIVO

PRINCIPAL

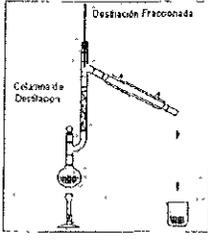
AYUDA SALIDA

PREPARACION

DESTILACION

Destilación Fraccionada

En la Destilación fraccionada el proceso se realiza en multi-etapas por medio de una columna de destilación en la cual, se llevan a cabo continuamente numerosas evaporaciones y condensaciones. Al ir avanzando a lo largo de la columna, la composición del vapor se va haciendo más concentrada en el componente más volátil y la concentración del líquido que condensa se va haciendo más rica en el componente menos volátil. Cabe mencionar que este tipo de destilación es mucho más eficiente que una destilación simple y que mientras más etapas involucra, mejor separación se obtiene de los componentes



GENERALIDADES

MÉTODOS DE SEPARACION

TRATAMIENTO PREVIO

DERIVATIZACION

ANÁLISIS CUANTITATIVO

PRINCIPAL

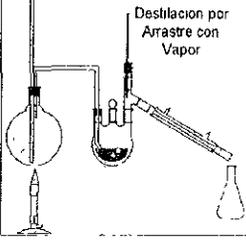
AYUDA SALIDA

PREPARACION

DESTILACION

Destilación por Arrastre con Vapor

En la Destilación por Arrastre con Vapor se hace pasar una corriente de vapor a través de la mezcla de reacción y los componentes que son volátiles en el vapor son separados. Entre las sustancias que se pueden separar por esta técnica se pueden citar los Aceites Esenciales



GENERALIDADES

MÉTODOS DE SEPARACION

TRATAMIENTO PREVIO

DERIVATIZACION

ANÁLISIS CUANTITATIVO

PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

PREPARACION

EXTRACCION

La extracción usa dos fases inmiscibles para separar un soluto de una fase dentro de la otra

- Extracción Líquido-Sólido
- Extracción Líquido-Líquido
- Extracción Fase Sólida



GENERALIDADES

MÉTODOS DE SEPARACION

TRATAMIENTO PREVIO

DERIVATIZACION

ANÁLISIS CUANTITATIVO

PRINCIPAL

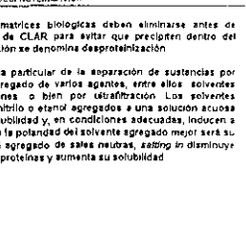
AYUDA SALIDA

PREPARACION

DESPROTEINIZACION

Las proteínas presentes en las matrices biológicas deben eliminarse antes de inyectar la muestra en el equipo de CLAR para evitar que precipiten dentro del equipo cromatográfico. Esta operación se denomina desproteinización

La desproteinización es una forma particular de la separación de sustancias por precipitación. Se realiza con el agregado de varios agentes, entre ellos solventes orgánicos, sales ácidas o básicas o bien por isotización. Los solventes orgánicos como el metanol, acetoneo o etanol agregados a una solución acuosa de una proteína disminuyen su solubilidad y, en condiciones adecuadas, inducen a su precipitación. Cuanto menor sea la polaridad del solvente agregado mejor será su capacidad de desproteinización. El agregado de sales neutras, así como disminuye la atracción de las moléculas de las proteínas y aumenta su solubilidad.



GENERALIDADES

MÉTODOS DE SEPARACION

TRATAMIENTO PREVIO

DERIVATIZACION

ANÁLISIS CUANTITATIVO

PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

PREPARACION

EXTRACCION

La extracción líquido sólido, también denominada lixiviación, comprende la solubilización del analito presente en una muestra sólida previamente molida con un solvente adecuado con la ayuda de agitación. La muestra puede agitarse manualmente o con agitadores mecánicos o ultrasónicos. Las características del solvente de solubilización, la cantidad de extracciones, la velocidad y el tiempo de agitación dependerán tanto de las características del analito como de la matriz que lo rodea. Un tipo especial de extracción líquido sólido emplea sistemas continuos con solventes calientes (Soxhlet) y se aplican a analitos poco solubles o a matrices muy complejas



GENERALIDADES

MÉTODOS DE SEPARACION

TRATAMIENTO PREVIO

DERIVATIZACION

ANÁLISIS CUANTITATIVO

PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

PREPARACION

EXTRACCION

La extracción líquido-líquido es un método basado en la distribución (partición) relativa de un analito entre dos líquidos inmiscibles. La extracción se utiliza para:

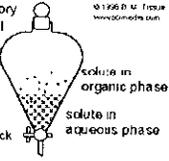
- Eliminar interferentes
- Concentrar especies para análisis previos

Al tratar con especies acuosas los solutos pueden existir en equilibrio en varias formas. A menudo, se extraen solutos desde una fase orgánica a una fase acuosa

Fase orgánica densidad > 1.00 g/ml	Remada fase 1
Fase acuosa densidad < 1.00 g/ml	Remada fase 2

Las soluciones pueden variar de comportamiento ideal desde la salida o durante la extracción. Las posibles causas incluyen:

- disolución de una fase dentro de la otra
- saluración del soluto en la fase
- reacción del soluto en la fase
- alteración de las condiciones del pH durante la extracción



GENERALIDADES

MÉTODOS DE SEPARACION

TRATAMIENTO PREVIO

DERIVATIZACION

ANÁLISIS CUANTITATIVO

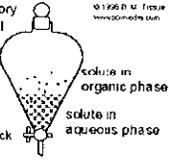
PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

PREPARACION

EXTRACCION

La extracción convencional líquido-líquido es una operación lenta y tediosa, muy dependiente de la habilidad del operador y que está sujeta a numerosos problemas (formación de emulsiones, manipulación de grandes cantidades de solventes tóxicos e inflamables, peligro en evaporaciones finales, etc.). Adicionalmente, en el análisis de trazas debe considerarse que los solventes de extracción pueden agregar nuevos compuestos a la muestra a analizar (sus propias impurezas) y que estos compuestos pueden interferir en la determinación del analito



GENERALIDADES

MÉTODOS DE SEPARACION

TRATAMIENTO PREVIO

DERIVATIZACION

ANÁLISIS CUANTITATIVO

PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

DERIVATIZACION

PREPARACION

GENERALIDADES

PERIODO DE SEPARACION

TRATAMIENTO PREVIO

DERIVATIZACION

ANALISIS CUANTITATIVO

PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

DERIVATIZACION

PREPARACION

GENERALIDADES

PERIODO DE SEPARACION

TRATAMIENTO PREVIO

DERIVATIZACION

ANALISIS CUANTITATIVO

PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

DERIVATIZACION

DERIVATIZACION PRE-COLUMNA

PREPARACION

GENERALIDADES

PERIODO DE SEPARACION

TRATAMIENTO PREVIO

DERIVATIZACION

ANALISIS CUANTITATIVO

PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

DERIVATIZACION

DERIVATIZACION POST-COLUMNA

PREPARACION

GENERALIDADES

PERIODO DE SEPARACION

TRATAMIENTO PREVIO

DERIVATIZACION

ANALISIS CUANTITATIVO

PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

Es parte de un equipo de CLAR para operar con derivatización post columna.

DERIVATIZACION

PREPARACION

GENERALIDADES

PERIODO DE SEPARACION

TRATAMIENTO PREVIO

DERIVATIZACION

ANALISIS CUANTITATIVO

PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

DERIVATIZACION

PREPARACION

GENERALIDADES

PERIODO DE SEPARACION

TRATAMIENTO PREVIO

DERIVATIZACION

ANALISIS CUANTITATIVO

PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

APLICACIONES

La derivatización en CLAR tiene innumerables aplicaciones, principalmente en el área bioquímica con el análisis de péptidos, aminoácidos y aminas biológicas. En la tabla se encuentran las derivatizaciones de uso más común, en función del grupo de la molécula que se derivatiza.

Grupo Funcional	Derivatizante	Tipo	Detección
Aminoácidos	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100
Péptidos
Aminas biológicas

PROBLEMAS

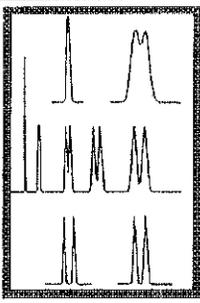
GENERALIDADES

PROBLEMAS INSTRUMENTALES

PROBLEMAS CROMATOGRAFICOS

MENU PRINCIPAL

AYUDA SALIDA



PROBLEMAS

GENERALIDADES

PROBLEMAS INSTRUMENTALES

PROBLEMAS CROMATOGRAFICOS

MENU PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

La resolución de los problemas (troubleshooting) fue definida por Merril como "la identificación de un problema que ocurre durante un proceso dado y su resolución con la menor interrupción posible. Los equipos de CLAR sufren, desafortunadamente un desgaste mecánico importante debido a las altas presiones con las cuales operan por lo cual necesitan mantenimientos mayores que los requeridos por los equipos habituales de un laboratorio analítico. Es necesario, entonces, que el usuario se encuentre familiarizado tanto con la metodología de mantenimiento preventivo de los instrumentos como con los procedimientos para resolver los problemas habituales



PROBLEMAS

GENERALIDADES

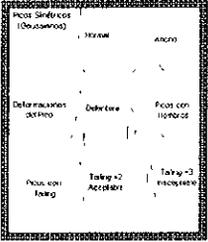
PROBLEMAS INSTRUMENTALES

PROBLEMAS CROMATOGRAFICOS

MENU PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

Muchos problemas están acompañados por otros síntomas desplazamientos en los tiempos de retención, línea base alterada, ruido, deriva o el cambio en la forma de los picos son solo unas pocas claves de las que señalan o estrechan la lista de las posibles causas. Los solventes, válvas, pipetas, condiciones de sincronización, tiempo de la muestra, la técnica de preparación o extracción también cualquier otro factor que influya en el ambiente de la muestra pueden ser responsables del problema.



PROBLEMAS

GENERALIDADES

PROBLEMAS INSTRUMENTALES

PROBLEMAS CROMATOGRAFICOS

MENU PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

Cuando un problema ocurre, primero realice una verificación visual del sistema. Busca fugas tuberías desconectadas, cables desconectados, notadores del instrumento cambiados, y así sucesivamente, verificar todos los sistemas de fluido y las conexiones eléctricas. En la tabla se resumen las áreas que deben verificarse, ya que son las causas más comunes que afectan el funcionamiento del sistema cromatográfico. Para la resolución de los problemas tome encuenta los siguientes puntos:

- Identificar los síntomas
- Entender las posibles causas del síntoma
- Aislar las posibles causas exactas del problema
- Resolver el problema y resumir el funcionamiento o avisar al personal de Waters
- Agregar el problema. Este proceso continen en

- Verificar primero las cosas simples.
- Comparar el sistema de funcionamiento con los referencias establecidas.
- Identificar las posibles causas.
- Usar un arreglo sistemático aproximado.
- Conseguir ayuda.

PROBLEMAS

GENERALIDADES

PROBLEMAS INSTRUMENTALES

PROBLEMAS CROMATOGRAFICOS

MENU PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

PROBLEMAS INSTRUMENTALES

Los problemas instrumentales se refieren a las fallas que se originan en el equipo cromatográfico. Las cuales pueden clasificarse en tres partes, de acuerdo a los síntomas que presente. La primera trata de las pérdidas de solvente la segunda de las anomalías en la presión y la última de los problemas que pueden relacionarse a fallas en el instrumento.

También se tratará individualmente cada parte del equipo, los problemas habituales y los modos de resolverlos.



PROBLEMAS

GENERALIDADES

PROBLEMAS INSTRUMENTALES

PROBLEMAS CROMATOGRAFICOS

MENU PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

PROBLEMAS INSTRUMENTALES

Los problemas del Instrumental CLAR serán tratados de forma individual y la manera de como resolverlos, así como puntos de importancia.



PROBLEMAS

GENERALIDADES

PROBLEMAS INSTRUMENTALES

PROBLEMAS CROMATOGRAFICOS

MENU PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

PROBLEMAS INSTRUMENTALES

En general se emplean sólo dos tipos de materiales para confeccionar las tuberías del equipo CLAR las de acero inoxidable y las de plástico (teflón, polietileno, polipropileno o polietileno) dado que las tuberías están en contacto permanente con las soluciones y solventes constituyen de por sí una fuente de problemas. Los problemas más significativos que suelen presentarse en las tuberías son:



-
-
-
-

PROBLEMAS

GENERALIDADES

PROBLEMAS INSTRUMENTALES

PROBLEMAS CROMATOGRAFICOS

MENU PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

PROBLEMAS INSTRUMENTALES

Ataque químico

Afortunadamente al ataque químico es un fenómeno poco frecuente en CLAR tanto de las tuberías de acero como las de plástico. Las tuberías de acero son las que más se utilizan por su resistencia a las presiones y al desgaste mecánico, pero son las más infrecuentes sufrir corrosión en presencia de determinadas sustancias.

Por ello, es aconsejable evitar el uso de fases móviles conteniendo compuestos como los haluros que atacan al acero inoxidable. En los casos donde es necesario utilizarlos, las partes del instrumento en contacto con la fase móvil se pueden pasivar con ácido nítrico entre el 20 y 60% V/V. Existen igualmente otras sustancias o mezclas de sustancias que resultan nocivas para el equipo de CLAR.

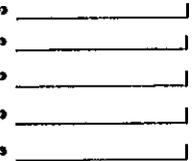


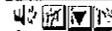
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	
PROBLEMAS	<p>3 Corte deficiente</p> <p>El corte deficiente de las tuberías es una de las fallas más frecuentes en CLAR. Los tubos plásticos pueden cortarse fácilmente, pero en el corte de los tubos de metal aparecen habitualmente rebabas, superficies deformadas y taponeamientos debidos a la liberación de virutas de acero. En esta operación resulta más conveniente adquirir precortados de diversas longitudes en lugar de varios metros de tubo sin cortar aunque su costo es, evidentemente, superior.</p> <p>Por tanto cada vez que se corte un tubo se lo debe conectar a la bomba en uno de sus extremos dejando el otro extremo libre luego pasar a través de él algunos ml de fase móvil con la ayuda de la bomba con el objeto de eliminar las virutas de acero que pueden haber quedado en el interior del mismo. Esta operación impide que, al conectarlo, se produzca el taponeamiento del componente siguiente en el instrumento.</p>
GENERALIDADES	<p>Tuberías mal contadas pueden generar alta presión en el sistema por el taponeamiento de la punta del tubo con virutas, pérdidas debido al corte deficiente de las uniones o ensanchamientos extracolumnares por el aumento en el volumen muerto de las mismas.</p>
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	
PROBLEMAS OPERACIONALES	
PROBLEMAS DE SEGURIDAD	
PROBLEMAS DE MANTENIMIENTO	
PROBLEMAS DE CALIDAD	

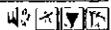
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	
PROBLEMAS	<p>3 Taponeamiento</p> <p>El taponeamiento de las tuberías puede originarse por factores bastante comunes:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de sales • Partículas presentes en la fase móvil o la muestra • Liberación de partículas
GENERALIDADES	<p>Este fenómeno puede ocurrir cuando en el equipo de CLAR se interrumpe el caudal de una fase móvil conteniendo sales durante un período medianamente prolongado de tiempo o si se juntan en la entrada de la bomba fases móviles no compatibles entre sí como una fase móvil conteniendo alta concentración de solvente orgánico con otra conteniendo altas concentraciones de sales.</p> <p>La precipitación de sales presentes en la fase móvil se previene lavando el equipo con agua (no menos que 20 volúmenes de columna) o mezclas de agua con</p>
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	<p>La liberación de partículas desde la columna analítica, la columna de saturación o la guardacolumna es un hecho bastante habitual en CLAR que no puede evitarse completamente. La mejor manera de minimizarlo es evaluar cambios bruscos de la presión (es decir modificaciones bruscas en el caudal) que pudieran favorecer esa liberación.</p>
PROBLEMAS OPERACIONALES	
PROBLEMAS DE SEGURIDAD	
PROBLEMAS DE MANTENIMIENTO	
PROBLEMAS DE CALIDAD	

PROBLEMAS INSTRUMENTALES	
PROBLEMAS	<p>• Presencia de virutas de acero</p> <p>La aparición de virutas de acero provenientes de cortes de las tuberías puede generar como se ha indicado, taponeamientos de las tuberías.</p> <p>El taponeamiento de una tubería puede detectarse por el incremento de la presión del sistema cromatográfico y, antes de efectuarse alguna acción con respecto, es necesario aislar la zona que se ha tapado. Para ello es conveniente recordar que las tuberías de diámetro interno más pequeño se tapan con mayor facilidad que las que poseen un diámetro interno más grande. Como punto de referencia debe considerarse que la presión normal debida a las tuberías con sus respectivas uniones debe ser prácticamente cero en los caudales habituales de operación del instrumento.</p>
GENERALIDADES	<p>Es necesario controlar periódicamente la presión debida a todo el sistema cromatográfico: las columnas precolumnas, guardacolumnas de saturación las cuales para realizar el ensayo, se reemplazan por una unión de presión. Este ensayo, denominado Ensayo de presión del sistema cromatográfico, se utiliza para reconocer si existen zonas bloqueadas que contribuyen a un exceso de presión en el instrumento. Para ello se registra la presión ejercida por un solvente determinado (sigue metanol) a una velocidad de flujo definida (2 a 6 ml/min). Es necesario controlar que durante esta operación la presión no exceda al valor máximo que soporta la celda del detector, porque puede romperse.</p>
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	
PROBLEMAS OPERACIONALES	
PROBLEMAS DE SEGURIDAD	
PROBLEMAS DE MANTENIMIENTO	
PROBLEMAS DE CALIDAD	

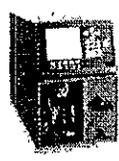
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	
PROBLEMAS	<p>3 Diámetro + longitud inadecuados</p> <p>La utilización de tubos de diámetro o longitud inadecuados es el último problema que puede asociarse a las tuberías. Existen diversos tipos de tuberías cuyos diámetros internos oscilan entre 0.18 y 0.60 mm (0.007 y 0.020 pulgadas). Para minimizar el fenómeno de ensanchamiento de banda la tubería más delgada se utiliza en las zonas del cromatógrafo por donde circula la muestra antes de ser detectada. Es muy difícil distinguir entre cada tipo de tubería por simple apreciación visual, por lo cual, para evitar confusiones es recomendable separarlas y rotularlas adecuadamente. La longitud se debe determinar para minimizar los ensanchamientos de banda extracolumnares. Esta longitud puede tener una gran influencia en la eficiencia del sistema.</p>
GENERALIDADES	
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	
PROBLEMAS OPERACIONALES	
PROBLEMAS DE SEGURIDAD	
PROBLEMAS DE MANTENIMIENTO	
PROBLEMAS DE CALIDAD	

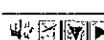
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	
PROBLEMAS	<p>Las uniones que se utilizan en los instrumentos CLAR son de bajo volumen muerto y deben ser resistentes tanto a las altas presiones como a los solventes que se utilizan. Existen básicamente dos tipos de uniones: las de acero inoxidable convencionales y las uniones universales. Las primeras tienen una gran resistencia a las presiones, mientras que las segundas, de desarrollo posterior, utilizan un tornillo de acero y una <i>ferula de teflón</i> y son muy cómodas pues pueden ajustarse manualmente. Los problemas habituales que con las uniones suelen presentarse se describen a continuación:</p>
GENERALIDADES	
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	
PROBLEMAS OPERACIONALES	
PROBLEMAS DE SEGURIDAD	
PROBLEMAS DE MANTENIMIENTO	
PROBLEMAS DE CALIDAD	

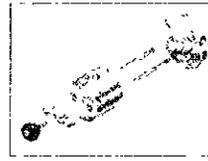
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	
PROBLEMAS	<p>3 Desgaste mecánico</p> <p>Las uniones, especialmente aquellas que se encuentran antes de la cabeza de la columna (la zona de mayor presión del instrumento) sufren un desgaste mecánico importante. Su hermeticidad está dada por la ferula encargada de sellarlas. Cada vez que la unión se cierra se necesita más presión para lograr hermeticidad y, consecuentemente, la ferula se deforma un poco más. Este proceso continúa hasta que, finalmente, la ferula se deforma tanto que deja de efectuar el cierre. En ese momento la unión comienza a perder líquido. Así es posible deducir que el desgaste mecánico de las uniones es un proceso normal en CLAR y que, por lo tanto, no puede eliminarse completamente aunque sí puede minimizarse. La mejor manera de hacerlo consiste en mantenerlas limpias, evitar su ajuste excesivo o no mezclar las uniones de diferentes fabricantes.</p>
GENERALIDADES	
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	
PROBLEMAS OPERACIONALES	
PROBLEMAS DE SEGURIDAD	
PROBLEMAS DE MANTENIMIENTO	
PROBLEMAS DE CALIDAD	

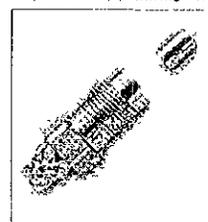
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	
PROBLEMAS	<p>3 Ajuste excesivo o deficiente</p> <p>La vida útil de las uniones puede prolongarse si se evita ajustarse excesivamente. En primera instancia, el tornillo se debe enroscar con la mano hasta que la ferula ejercida sea suficiente y recién entonces debe recurrirse al uso de herramientas ajustando no más de 3/4 de vuelta. Para realizar esta operación es conveniente utilizar llaves de las denominadas "flex" en lugar de las ajustables debido a que estas últimas pueden dañar las cabezas de los tornillos de las uniones. Además, es conveniente utilizar las herramientas provistas con el mismo instrumento u otras similares ya que si se reemplazan las llaves flex por otras más largas, la fuerza de torsión (palanca) será mayor y el cuello del tornillo puede romperse.</p> <p>El hecho de no poder ajustar las uniones con la mano indica, necesariamente, la presencia de un problema.</p>
GENERALIDADES	<p>Este puede ser sencillo, como que el tornillo no ha encajado mal en la hembra correspondiente, o puede ser más complejo. Si en esos casos, se recurre al uso de herramientas se corre el peligro de deformar irrevocablemente un tornillo y tener que reemplazar la unión en forma preventiva.</p> <p>El problema de ajuste deficiente de las uniones se soluciona, simplemente, ajustándolas. El ajuste deficiente y el ajuste excesivo son problemas que pueden aparecer tanto en las uniones convencionales de acero como en las universales. Ambos problemas presentan, de hecho, los mismos síntomas: pérdidas de solvente.</p>
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	
PROBLEMAS OPERACIONALES	
PROBLEMAS DE SEGURIDAD	
PROBLEMAS DE MANTENIMIENTO	
PROBLEMAS DE CALIDAD	

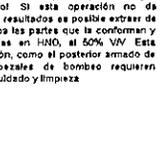
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	
PROBLEMAS	<p>3 Incompatibilidad</p> <p>El último problema a tratar es la incompatibilidad que existe entre las uniones de diferentes fabricantes. De hecho este problema es muy común y pocos analistas lo tienen realmente en cuenta.</p> <p>Las ferulas tornillos y uniones hembra de diversos fabricantes no son equivalentes entre sí por lo cual, estrictamente hablando, no deberían intercambiarse. Las diferencias en algunos casos son mínimas y, por consiguiente, muchos analistas acostumbrados a mezclarlas. Las partes de las uniones y las uniones ya fijadas deben considerarse por separado estableciendo las partes que pueden intercambiarse antes de fijar la ferula o la hembra debido a que las ferulas de algunos fabricantes son semejantes entre sí y que, si flexas, adoptan la forma del conector hembra que se utiliza en la operación.</p>
GENERALIDADES	<p>En contrapartida, una vez que ésta ha sido fijada (y deformada) de acuerdo a un conector dado, el cambio por un conector de otro fabricante con una superficie interna diferente puede producir pérdidas o volúmenes muertos. Adicionalmente la longitud libre del tubo después de la ferula y la longitud de los tornillos no paramétricos que también difieren de fabricante en fabricante. Los problemas más serios suelen presentarse cuando se intercambian las partes de los fabricantes que tienen las mayores diferencias entre sí, cuando se requieren bajos volúmenes muertos como en la cromatografía de alta velocidad o la cromatografía microrobor.</p>
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	
PROBLEMAS OPERACIONALES	
PROBLEMAS DE SEGURIDAD	
PROBLEMAS DE MANTENIMIENTO	
PROBLEMAS DE CALIDAD	

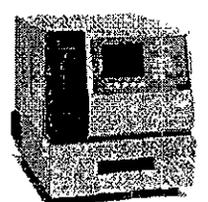
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	
PROBLEMAS	
GENERALIDADES	<p>Bomba</p> <p>Muchos de los problemas de las bombas se detectan simplemente observando el cromatograma o el medidor de presión. Los problemas que se presentan más frecuentemente en las bombas están relacionados con:</p>
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	<p>1</p> <p>2</p> <p>3</p> <p>4</p>
PROBLEMAS CROMATOGRÁFICOS	
MANEJO PRINCIPAL	
AYUDA	<p>SAÍDA</p>

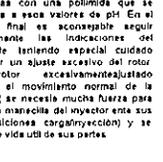
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	
PROBLEMAS	
GENERALIDADES	<p>Bomba</p> <p>El suministro de solventes, dependiendo del fabricante del instrumento, pueda formar parte del equipo CLAR o pueda ser externo. En el último caso se utilizan habitualmente solventes vítreos que se conectan a la bomba del equipo CLAR por medio de una tubería de teflón. En ambos casos pueden presentarse los siguientes inconvenientes:</p>
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	<p>1</p> <p>2</p> <p>3</p>
PROBLEMAS CROMATOGRÁFICOS	<p>• Taposamiento del filtro de solvente</p> <p>Un filtro conduce a un fenómeno denominado cavitación en la línea de entrada de la bomba, cuyo resultado es la aparición de burbujas de aire en los cabezales de bombeo con lo cual se desestabiliza el caudal a la salida de la bomba. Para confirmar la existencia de este problema se puede sacar el filtro y observar si las anomalías en el caudal (y la presión) persisten.</p>
MANEJO PRINCIPAL	
AYUDA	<p>SAÍDA</p>

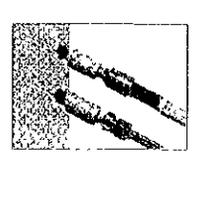
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	
PROBLEMAS	
GENERALIDADES	<p>Bomba</p> <p>• El sistema de bombas</p> <p>El sistema de bombeo está formado por los pistones, sus sellos, las cámaras de bombeo, los cabezales de las bombas y las válvulas de entrada y salida de los cabezales. Los problemas asociados al sistema de bombeo giran alrededor de anomalías en la presión y el caudal y eventualmente, pérdidas en la bomba.</p>
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	<p>1</p> <p>2</p> <p>3</p>
PROBLEMAS CROMATOGRÁFICOS	<p>• Pistones</p> <p>Si las sales que se utilizan en las fases móviles no se remueven adecuadamente del instrumento es posible que se depositen en la superficie de los sellos de los pistones. Este depósito de sales puede desgastarlos por abrasión y, en el peor de los casos impedir su movimiento.</p>
MANEJO PRINCIPAL	
AYUDA	<p>SAÍDA</p>

PROBLEMAS INSTRUMENTALES	
PROBLEMAS	
GENERALIDADES	<p>Bomba</p> <p>• Sellos de los pistones</p> <p>Los sellos tienen la función de evitar la aspiración de los pistones por el acero inoxidable de los cabezales de bombeo y, al mismo tiempo, impedir las pérdidas de solvente a través del pistón. El desgaste mecánico habitual que sufre es muy importante por lo cual se recomienda cambiarlos regularmente sin esperar que fallen. Este desgaste, se ve incrementado si no se renuevan adecuadamente las sales del instrumento y si se utilizan solventes como el tetrahidrofurano que los deterioran prematuramente.</p>
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	<p>1</p> <p>2</p> <p>3</p>
PROBLEMAS CROMATOGRÁFICOS	<p>Oscilaciones de la velocidad de flujo (y de la presión), con pérdidas de solvente en los cabezales de bombeo e incapacidad de la bomba para alcanzar altas presiones son los síntomas habituales que indican el deterioro de los sellos.</p>
MANEJO PRINCIPAL	
AYUDA	<p>SAÍDA</p>

PROBLEMAS INSTRUMENTALES	
PROBLEMAS	
GENERALIDADES	<p>Bomba</p> <p>• Válvulas</p> <p>Las válvulas de los cabezales de bombeo tienen la función de regular la dirección del movimiento del solvente impidiendo el movimiento en la dirección contraria. Existen básicamente dos problemas asociados a las válvulas: la presencia de burbujas de aire y la contaminación con partículas.</p>
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	<p>1</p> <p>2</p> <p>3</p>
PROBLEMAS CROMATOGRÁFICOS	<p>La aparición de burbujas de aire es uno de los problemas más comunes en CLAR. Las burbujas de aire quedan 'atrapadas' en las válvulas de los cabezales que actúan como centros de nucleación impidiendo el pasaje de solvente a través de las mismas. Una vez que el aire ha sido atrapado en alguna de las válvulas es posible eliminarlo o bien disolviéndolo, o bien forzando su pasaje a través de la bomba con la ayuda de una jeringa.</p>
MANEJO PRINCIPAL	
AYUDA	<p>SAÍDA</p>

PROBLEMAS INSTRUMENTALES	
PROBLEMAS	
GENERALIDADES	<p>Inyectores</p> <p>La instrumentación de un control periódico del inyector no tiene demasiado sentido dado que, o bien la falta es muy evidente (por ejemplo), o bien se supone que el inyector se controla a diario durante el ensayo de precisión del sistema con estándares. En este ensayo se inyectan varias veces (típicamente 3 o 5 veces) la solución estándar y se determina el error entre inyecciones.</p>
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	<p>1</p> <p>2</p> <p>3</p>
PROBLEMAS CROMATOGRÁFICOS	<p>Los problemas más frecuentes de los inyectores se relacionan con:</p>
MANEJO PRINCIPAL	
AYUDA	<p>SAÍDA</p>

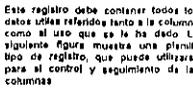
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	
PROBLEMAS	
GENERALIDADES	<p>Inyectores</p> <p>• La válvula de inyección</p> <p>Los problemas asociados a la válvula de inyección se refieren en especial al desgaste mecánico, taposamiento, pérdidas, u otras dificultades en la operación normal del rotor. Todos los componentes del equipo de CLAR sufren el desgaste mecánico en particular aquellos que están sometidos a las mayores presiones como bomba e inyector. Por esta razón es aconsejable operar con las menores presiones posibles para prolongar su vida útil.</p>
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	<p>1</p> <p>2</p> <p>3</p>
PROBLEMAS CROMATOGRÁFICOS	<p>La impresión de una zona tapada suele realizarse fluyendo en contracorriente con la ayuda de la bomba. Si esto no da el resultado adecuado (HNO₃ al 10% V/V, diclorometano, o detergente). Es recomendable no utilizar solventes cuyo pH sea mayor que 9 debido a que ciertos inyectores poseen piezas contraincendio con una polimera que se solubiliza a esos valores de pH. En el armado final es aconsejable seguir estrictamente las indicaciones del fabricante intentando especial cuidado en evitar un ajuste excesivo del rotor. Un rotor excesivamente ajustado dificulta el movimiento normal de la válvula (se necesita mucha fuerza para mover la manija del inyector entre sus dos posiciones carga/inyección) y se reduce la vida útil de sus partes.</p>
MANEJO PRINCIPAL	
AYUDA	<p>SAÍDA</p>

PROBLEMAS INSTRUMENTALES	
PROBLEMAS	
GENERALIDADES	<p>La columna de CLAR puede considerarse como el corazón del sistema cromatográfico, pues en ella tiene lugar la separación de los componentes presentes en las muestras. Por ello, se debe considerar que las fallas en la columna conducen inevitablemente a pobres separaciones, independientemente del estado del instrumento.</p>
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	<p>1</p> <p>2</p> <p>3</p>
PROBLEMAS CROMATOGRÁFICOS	<p>Desafortunadamente el material de relleno de la columna no es tan resistente como el acero que lo rodea por lo que las columnas deben utilizarse apropiadamente, teniendo especial cuidado en su uso y mantenimiento. La vida útil de una columna depende de muchos factores (tipo y naturaleza de las muestras, tipo y naturaleza del solvente, temperatura de trabajo) y puede variar desde unas pocas inyecciones hasta algunas miles.</p>
MANEJO PRINCIPAL	
AYUDA	<p>SAÍDA</p>

PROBLEMAS INSTRUMENTALES

De hecho, una columna que se emplea sólo para un tipo de muestras tiene, en general, mayor vida útil que aquella que se emplea sólo para un tipo de muestras tanto, en general, mayor vida útil que aquella que se emplea "para todo uso". Ningún analista puede contentarse con una corta vida útil y hacer un deterioro manifiesto de la columna. Largo de algunas inyecciones debe replantearse tanto el método cromatográfico como el de preparación de la muestra.

Para evaluar los efectos de cada fase móvil y tipo de muestra sobre la columna cromatográfica, de manera tal de poder replantear las metodologías más nocivas y establecer la "Historia" de cada columna, es necesario designar una columna para cada tipo de muestra a analizar en el laboratorio y llevar un registro de las mismas.



PROBLEMAS INSTRUMENTALES

Los problemas más frecuentes encontrados en las columnas son:



PROBLEMAS INSTRUMENTALES

▲ Aumento de la presión

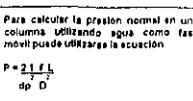
Uno de los problemas más comunes en CLAR es el aumento en la presión de una columna. Este aumento puede deberse al taponamiento del filtro o a la contaminación química del material de relleno. Antes de intentar la solución de cualquiera de estos dos problemas es necesario verificar:

- si el efectivamente existe alta presión en el sistema.
- si la alta presión se debe a la columna o a otro componente del instrumento.

El punto al que debe verificarse porque muchas veces un aumento de presión en el sistema que hace sospechar, en primer instancia, un taponamiento de la columna puede deberse a la utilización de un solvente o una mezcla de solventes muy viscosos.

$$P = \frac{2 \cdot l \cdot f \cdot \eta}{d \cdot D}$$

donde P es la presión medida en atmósferas que se obtiene con agua a una velocidad de flujo de 1 ml/min en un factor que vale 1000 para columnas de acero, l es la longitud de la columna medida en cm, η es el tamaño de las partículas expresado en μm y D es el diámetro interno de la columna medido en mm.



PROBLEMAS INSTRUMENTALES

Dicha ecuación determina la presión en cualquier otro sistema de solventes basta con relacionar la viscosidad del solvente o de la mezcla con la del agua y multiplicarla por la presión resultante.

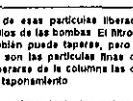
Las causas más comunes que originan un aumento en la presión del sistema cromatográfico debido a la columna son:

- **Taponamientos de los filtros**

Las columnas suelen tener filtros tanto a la entrada como a la salida de, habitualmente uno 2 μm . Estos filtros pueden taparse y, consecuentemente, aumentar la presión del sistema. El filtro que se tapa con mayor facilidad es, naturalmente, el de entrada, al filtro de salida únicamente llegan partículas desde el exterior debido a que el material de relleno de la columna actúa, igualmente como un filtro.

El origen de esas partículas liberadas por los sellos de las bombas. El filtro de salida también puede taparse, pero en este caso son las partículas finas que pueden liberarse de la columna las que originan el taponamiento.

El hecho de filtrar tanto los solventes como las muestras evita en gran medida el taponamiento de estos filtros pero esta acción no resulta, por sí sola, suficiente. Resulta conveniente, además, agregar ciertos dispositivos para retener las partículas que, eventualmente, pueden "liberarse" de los filtros y para aquellas, como las partículas de los sellos de las bombas que se originan en el mismo instrumento cromatográfico. Estos dispositivos se denominan *filtros en línea* (filtro precolumna), *guardacolumna* o *columna de saturación*.



PROBLEMAS INSTRUMENTALES

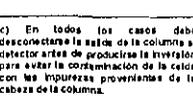
El filtro precolumna es únicamente un selector mecánico de las partículas mientras que los otros dos, además de su función mecánica tienen otras funciones químicas.

Para desbloquear un filtro tapado muchos analistas suelen colocar la columna en el sentido inverso. Esta operación es perfectamente válida pero antes de realizarla se debe considerar los siguientes puntos:

- Facilidad de inversión (consultar la información provista por el fabricante de la columna).
- Ausencia de volúmenes muertos (espacios vacíos) en la cabeza de la columna, pues si invertida pueden generar disturbios en el lecto de la misma.

c) En todos los casos debe desconectarse la salida de la columna al detector antes de producirse la inversión para evitar la contaminación de la celda con las impurezas provenientes de la cabeza de la columna.

Los filtros de las columnas pueden limpiarse sondeándolos con HNO₃, pero la experiencia indica que son difíciles de desbloquear y que los filtros recuperados suelen taparse nuevamente si el caso de poco tiempo. Por este motivo, y dado su bajo costo resulta más sencillo y conveniente reemplazar los filtros tapados por nuevos en lugar de intentar limpiarlos.



PROBLEMAS INSTRUMENTALES

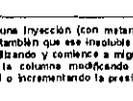
• Taponamientos de los filtros

El aumento de presión es uno de los diversos síntomas que puede producir la contaminación química del material de relleno de la columna. Este aumento de presión normalmente se relaciona con la precipitación de sustancias dentro de la columna debido a su incompatibilidad con la fase móvil.

Para evitarlo, es necesario determinar la miscibilidad entre fases móviles antes de mezclarlas en el equipo cromatográfico y disolver las muestras en la misma fase móvil. Si la fase móvil es, por ejemplo metanol agua, y la muestra se disuelve en un solvente más fuerte, por ejemplo metanol puro, es posible que algún componente de la muestra sea insoluble en metanol agua y precipite a la entrada de la columna.

Luego de una inyección (con metanol) es posible también que ese insoluble se vaya solidizando y comience a migrar dentro de la columna modificando la selectividad o incrementando la presión del sistema.

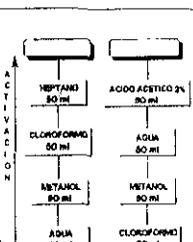
Todos los componentes de la muestra deben ser compatibles con la fase móvil (no sólo el analito), en caso contrario resulta muy conveniente utilizar procedimientos de preparación de las muestras que separen al analito de las sustancias que pueden permanecer en contacto con la fase móvil o la fase estacionaria. Por ejemplo las proteínas deben eliminarse completamente de las muestras e inyectar, debido a que precipitan al entrar en contacto con los solventes que se utilizan habitualmente en fase reversa (metanol, acetonitrilo).



PROBLEMAS INSTRUMENTALES

Resulta conveniente, además emplear "filtros" químicos que retengan a las sustancias que puedan dañar al material de relleno de la columna. Estos filtros químicos se denominan "guardacolumnas", contienen un material de relleno similar a la columna y actúan como barreras químicas. Asimismo tienen filtros mecánicos capaces de retener partículas.

La contaminación química del material de relleno de la columna puede eliminarse lavándola con un solvente tal que disuelva el material precipitado. Si se desconoce la identidad de la sustancia que ha producido el bloqueo puede recurrirse a algún sistema general de lavado como el indicado por el fabricante de las columnas o como el que se detalla en la figura.



PROBLEMAS INSTRUMENTALES

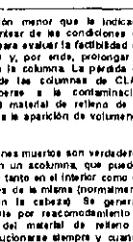
▲ Pérdida de eficiencia

La pérdida de eficiencia de las columnas CLAR es una consecuencia de su uso y, de por sí, puede no constituir un problema. El factor que debe considerarse para definirlo es el tiempo (o bien cantidad de inyecciones) transcurridos antes de que la pérdida de eficiencia sea notable.

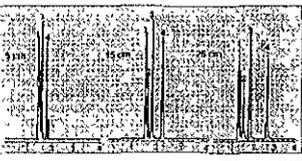
Habitualmente las columnas deben descartarse luego de una 2000 o 3000 inyecciones. Esta regla es muy general y depende fundamentalmente del tipo de separación requerida, la naturaleza y "limpieza" de las muestras, del tipo de fase móvil empleada y del mantenimiento que se haga de la columna. Una pérdida abrupta de eficiencia constituye, sin lugar a dudas un problema debido tal vez a la aparición de volúmenes muertos en el relleno de la columna o a la inyección de muestras con sustancias que lo

Una duración menor que la indicada exige replantear de las condiciones de operación que evalúe la factibilidad de modificarlas por ende, prolongar la vida útil de la columna. La pérdida de eficiencia de las columnas de CLAR puede deberse a la contaminación química del material de relleno de la columna o a la aparición de volúmenes muertos.

Los volúmenes muertos son verdaderos espacios en un acolumna, que pueden presentarse tanto en el interior como en los extremos de la misma. Inherentemente aparecen en la cabeza. Se generan habitualmente por reacondicionamiento o dilución del material de relleno y pueden solucionarse siempre y cuando se encuentren al alcance del muestra, es decir, que estén ubicados en alguno de los extremos de la columna.



PROBLEMAS	PROBLEMAS INSTRUMENTALES	PROBLEMAS	PROBLEMAS INSTRUMENTALES
GENERALIDADES	<p>Para hacerlo basta con abrir al extremo y rellenarlo (con la ayuda de una espátula) con algún material semejante al que contiene la columna. Si se utilizan partículas mayores a 20µm es posible rellenarlo con el material en seco (típicamente material particulado de unos 50 µm). En cambio si se utilizan materiales menores a 20 µm es necesario suspenderlo en fase móvil y reparar el volumen muerto con una pasta dejándolo decantar después de cada agregado. Si el volumen muerto es muy importante se debe rellenarlo y luego circular fase móvil con la ayuda de la bomba varias veces hasta la desparición total del mismo. Si al abrir la cabeza de una columna se encuentra que el material de relleno está muy contaminado (oscuro) este puede removerse y rellenarse con material de relleno nuevo como se indicó anteriormente.</p>	GENERALIDADES	<p>Cambios bruscos en la presión pueden producir reacomodamientos en el material de relleno de la columna, y consecuentemente volúmenes muertos. Este efecto resulta más marcado en las columnas cuyos materiales de relleno tienen menores diámetros de partícula porque generan mayores presiones. Por ese motivo no se debe poner en funcionamiento la bomba a la velocidad de flujo de trabajo sino que se debe llegar lentamente hasta el mismo en pasos de no más de 0.5 ml por vez.</p>
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	<p>En general las columnas recuperadas de este modo no tienen su eficiencia original pero aun pueden ser útiles durante un período sobre. Como el estado de la cabeza de la columna es crucial para la separación es conveniente utilizarla en el sentido inverso después de repararla. Los volúmenes muertos pueden originarse por alguno de los siguientes motivos:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Cambios bruscos en la presión ● Disolución del material de relleno de la columna 	PROBLEMAS INSTRUMENTALES	<p>La disolución del material de relleno de la cabeza de la columna a la solubilización es otra de las causas que originan volúmenes muertos. Este fenómeno se debe a la solubilización de la sílice (soporte de base de la mayoría de las columnas de uso corriente) en fases móviles acuosas. Se han hecho estudios de este fenómeno, hallando que se disuelven 36 µg/ml de sílice en agua pura y que ese valor se incrementa hasta 100 µg/ml a 60 °C. Además encontraron que la solubilización se incrementa al aumentar la velocidad lineal del solvente (y su caudal) y se ve altamente favorecida a valores de pH mayores que 7.6 o altas fuerzas iónicas.</p>
PROBLEMAS FOTOMETRÁFICOS		PROBLEMAS FOTOMETRÁFICOS	
MEMORIA PRINCIPAL		MEMORIA PRINCIPAL	
AYUDA SALIDA		AYUDA SALIDA	

PROBLEMAS	PROBLEMAS INSTRUMENTALES
GENERALIDADES	<p>→ Modificación de la retención o resolución</p> <p>La modificación de la retención de los picos es el último problema que puede relacionarse a las columnas. Esta modificación puede manifestarse como una variación en los tiempos de retención de todos los picos en el cromatograma, en tal caso la resolución puede no verse demasiado afectada, o puede verificarse en algunos picos y no en otros. En el último caso la separación entre bandes puede cambiar mejorando o empeorando la resolución. Este problema debe enfrentarse de diferente manera ya sea que se manifieste en una misma columna (o instrumento) o que ocurra al cambiar la columna por otra supuestamente equivalente.</p>
PROBLEMAS FOTOMETRÁFICOS	
MEMORIA PRINCIPAL	
AYUDA SALIDA	

PROBLEMAS	PROBLEMAS INSTRUMENTALES
GENERALIDADES	<p>Asimismo debe considerarse el la variación en la constante (efectiva) alcanzando o no un valor constante, o si producen cambios drásticos de retención. A continuación analizaremos las causas más comunes que pueden originar la modificación de la retención o la resolución.</p>
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	<ul style="list-style-type: none"> ● Cambios en la composición de la fase móvil ● Cambios en la temperatura
PROBLEMAS FOTOMETRÁFICOS	<p>Los cambios de composición por evaporación del componente más volátil, producen variaciones importantes en los tiempos de retención de todos los picos en el cromatograma. Para evitar este problema basta con mantener los reservorios para fases móviles adecuadamente cerrados.</p> <p>Las variaciones de temperatura de la distribución de los solutos en la fase móvil y la fase estacionaria es un equilibrio que depende de la temperatura, por lo cual variaciones en la misma llevan a modificaciones en los tiempos de retención. Las variaciones tienen gran influencia en las mediciones de la altura de pico, pero tienen un mínimo efecto en las mediciones por área.</p>
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	<ul style="list-style-type: none"> ● Problemas en el funcionamiento de la bomba ● Daños en la preparación de la fase móvil ● Cambios en la composición de la fase móvil ● Variaciones de temperatura ● Falta de equilibrio de la fase móvil ● Cambios en la superficie activa de la columna ● Variabilidad en las columnas
MEMORIA PRINCIPAL	
AYUDA SALIDA	

PROBLEMAS	PROBLEMAS INSTRUMENTALES
GENERALIDADES	<p>Por ese motivo resulta deseable no colocar el instrumento de CLAR en las zonas del laboratorio donde existan gradientes importantes de temperatura. Si este último no es factible la columna debe termostataarse.</p>
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	<ul style="list-style-type: none"> ● Falta de equilibrio de la fase móvil <p>La falta de equilibrio de la fase móvil conduce a derivas en los tiempos de retención de los picos en el cromatograma. Habitualmente se requieren unos 20 volúmenes de columna (unos 50 ml para columnas de 260 x 4 mm de diámetro interno) para alcanzar el equilibrio aunque existen fases móviles que requieren volúmenes mayores. Tal es el caso de las fases móviles que contienen aparatos iónicos o aniónicos (dióxido de titanio, óxido de aluminio, dimetiloxisilina, octileno dimetiloxisilina, trimetoxisilina).</p>
PROBLEMAS FOTOMETRÁFICOS	<p>La contaminación química del relleno puede producir una superficie de selectividad diferente. Un tipo especial de contaminación puede producirse por la retención de los aparatos de cadena larga a la superficie no polar de la columna. Estos aparatos no pueden removerse completamente al lavarla utilizando solventes muy fuertes razón por la cual debe destintarse una columna especialmente para ese tipo de separaciones. En particular, debe cuidarse de no emplear una columna modificada para destintarlo un nuevo método de análisis. En ese caso se corre el riesgo de no poder reproducir esa separación tal cual se la ha definido.</p>
MEMORIA PRINCIPAL	
AYUDA SALIDA	

PROBLEMAS	PROBLEMAS INSTRUMENTALES
GENERALIDADES	<p>Otro cambio frecuente en la superficie del material de relleno de la columna es la hidrólisis de las cadenas alquílicas unidas a los grupos silanol de la sílice. Esta hidrólisis de las cadenas alquílicas reduce la capacidad de adsorción en fase reversa, y aumenta la proporción de grupos silanoles libres. En consecuencia los tiempos de retención de las sustancias básicas suelen aumentar (por la interacción con los silanoles) mientras que los correspondientes a las sustancias ácidas o neutras suelen disminuir. Un modo de subsanar este problema es adecuar la fase móvil cada vez que se la utiliza, es decir modificar la concentración de solvente orgánico hasta conseguir la retención deseada. Con esta operación puede compararse la pérdida de fase ligada pero no el aumento de los grupos silanoles libres en la superficie.</p>
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	<ul style="list-style-type: none"> ● Otro tipo especial de modificación de las columnas de fase reversa ha sido reportada que se produce una transición irreversible de las cadenas alquílicas si se remueve el metalol abruptamente con agua y la columna se calienta seguidamente a 75°C.
PROBLEMAS FOTOMETRÁFICOS	<p>En fase normal la diferencia en la retención o la selectividad puede generarse en el corrimiento de agua de los solventes, pues el agua desactiva los grupos ácidos de la columna y modifica la separación. Una alternativa es trabajar en medio totalmente anhidro y remover el agua de la columna de sílice con el solvente 2,2 dimetilpropanol y la otra, es saturar con agua los solventes.</p>
MEMORIA PRINCIPAL	
AYUDA SALIDA	

PROBLEMAS	PROBLEMAS INSTRUMENTALES
GENERALIDADES	<ul style="list-style-type: none"> ● Variabilidad en las columnas <p>La variabilidad entre columnas conduce a la irreproducibilidad en la retención de los diversos solutos y se origina por las diferencias existentes en el tipo y características de la sílice que se utiliza como base del material de relleno, las condiciones en el tratamiento y el tipo de muestra a analizar. Fundamentalmente esas diferencias se deben a los silanoles libres presentes en el material de relleno y suelen ser muy marcadas de fabricante en fabricante. Se han reportado diferencias importantes en la retención de los solutos utilizando columna de diferentes marcas.</p> <p>Dependiendo del tipo de muestra a analizar y al grado con el cual esta interactúa con los grupos silanol de la columna, la variabilidad en la retención puede aparecer también en diferentes lotes de columnas de un mismo fabricante.</p>
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	<p>Esta situación puede resolverse fácilmente utilizando sistemas cromatográficos donde los silanoles no modifican sensiblemente a la retención (en Cromatografía de Intercambio Iónico se han reportado ambas a la fase móvil, utilizando altas concentraciones de buffer que suprimen la disolución de los silanoles, etc) y utilizando al menos las columnas de un mismo fabricante (entre las cuales se debe incluir una nueva y una usada) para definir las condiciones cromatográficas para realizar un ensayo.</p> <p>La selectividad en las columnas contenidas grupos amino suele ser muy diferente de fabricante en fabricante. Este hecho se fundamenta en que estas columnas pueden tener su función amino pirridina, sacarina o terciaria.</p>
PROBLEMAS FOTOMETRÁFICOS	
MEMORIA PRINCIPAL	
AYUDA SALIDA	

PROBLEMAS	PROBLEMAS INSTRUMENTALES
GENERALIDADES	<p>Para calcular la eficiencia exactamente se debe seleccionar una zona constante de tiempo corto, o bien operar en una zona del cromatograma donde el efecto de la constante de tiempo en la dispersión de la banda sea mínima (a. 5.6). El control de las columnas debe realizarse cuidadosamente utilizando la muestra para la cual la columna ha sido diseñada con el fin de disminuir la dispersión obtenida es adecuada para la cuantificación (ensayo de adecuación Cromatográfica), y periódicamente con alguna separación tipo. Para comparar el comportamiento de columnas similares.</p>
PROBLEMAS INSTRUMENTALES	<p>● Control de las Columnas CLAR</p> <p>Resulta una buena práctica cromatográfica destinar una columna determinada para cada separación y controlar las columnas periódicamente. El control de las columnas debe contener mediciones de eficiencia tailing y la resolución. La eficiencia puede medirse como el número de platos teóricos de la columna (N), la altura de plato H, o como la altura de plato reducida h. La altura de plato reducida es un parámetro independiente de la longitud de la columna y de la granulometría del material de relleno.</p> <p>El valor de la eficiencia de una columna depende de la constante de tiempo (t) del detector, siendo el tiempo requerido para que la señal alcance al 63.2% su valor final (1/e del tiempo de respuesta).</p>
PROBLEMAS FOTOMETRÁFICOS	
MEMORIA PRINCIPAL	
AYUDA SALIDA	

PROBLEMAS INSTRUMENTALES

Como separación tipo puede utilizarse la separación provista por el fabricante de las columnas o alguna de las preparaciones indicadas como referencia en la literatura. Para el control de las columnas de fase reversa se sugiere la utilización de una mezcla de ureclol, fenol acetileno, nitrobenzono, benzato de metilo, anilol y tolueno mientras que otras personas sugieren la utilización de metil estil propil y butil p-hidroxiacetato con tetraoxano como indicador del volumen muerto. Los criterios de aceptación para cada uno de los parámetros a medir se encuentran en la siguiente tabla:

FACTOR	CRITERIOS DE ACEPTACION	
	Desviación estándar	Mayor de 1000
Resolución	≥ 1.5	≥ 2.0
Área de pico (muestras)	± 1.5	± 1.5

1) 3 de Columna Bona (60/20/50/25/20) + 8 de Columna m. de fase reversa

2) Mide la eficiencia de acuerdo a lo indicado por el fabricante y después la eficiencia cuando la eficiencia sea de 50% de su valor inicial.

Para más datos para el control de las columnas cromatográficas (si mide el S.D. de la altura) (S) se calcula doblando la altura equivalente a un plato teórico (D) por el área de partículas de material de relleno de la columna.

PROBLEMAS CROMATOGRAFICOS

La deformación del pico cromatográfico es un hecho muy importante porque habitualmente se traduce en pérdidas de resolución o defectos en la cuantificación. La identificación de este problema puede resultar de la aparición visual del pico en el cromatograma, de la medición del tailing o de la eficiencia tanto durante el control periódico de las columnas como en los análisis de rutina. La aparición de estos fenómenos durante el desarrollo de un nuevo método de análisis es una condición necesaria y suficiente para que la nueva metodología debe replantearse y eventualmente, descartarse.

PROBLEMAS CROMATOGRAFICOS

Las derivas, conjuntamente con otros problemas relacionados con la línea base, y las causas más comunes que las originan se encuentran detalladas, junto con sus soluciones en la tabla.

La aparición de derivas dificulta la definición de la base del pico resultando, así, en errores más o menos severos en la cuantificación.

Defectos en la desgasificación o presencia de impurezas en las fases móviles son las causas relacionadas con los solventes, que producen derivas anómalas.

Otra de las causas que lo producen se refiere al lento equilibrio de la columna cromatográfica.

Las derivas pueden originarse además cuando la columna lleva componentes excesivos retenidos. Estos componentes suelen estar como banda muy anchas que se confunden con las variaciones propias de la línea base y pueden provenir de la muestra o de la misma columna cromatográfica. En el primer caso es posible esperar la elución del pico luego antes de inyectar una segunda muestra o, preferentemente, diseñar algún procedimiento de preparación que ayude a componerse excesivos retenidos. En el segundo caso se trata de columnas en las cuales han quedado residuos impurizados presentes tanto en los solventes como en las muestras que eluyen lentamente. Este último problema puede evitarse lavando diariamente la columna (o cuando se inyectan muestras muy sucias) con un solvente neutro.

PROBLEMAS CROMATOGRAFICOS

Continúa

PROBLEMAS CROMATOGRAFICOS

CAUSA	SOLUCION
1. Línea base ruidosa	1. Verificar el nivel de la columna cromatográfica.
2. Línea base con deriva	2. Verificar el nivel de la columna cromatográfica.
3. Línea base con deriva y ruido	3. Verificar el nivel de la columna cromatográfica.
4. Línea base con deriva y ruido y picos	4. Verificar el nivel de la columna cromatográfica.
5. Línea base con deriva y ruido y picos y picos	5. Verificar el nivel de la columna cromatográfica.
6. Línea base con deriva y ruido y picos y picos y picos	6. Verificar el nivel de la columna cromatográfica.
7. Línea base con deriva y ruido y picos y picos y picos y picos	7. Verificar el nivel de la columna cromatográfica.

PROBLEMAS CROMATOGRAFICOS

TAILING

Para obtener resultados cuantitativamente válidos es necesario trabajar sobre "buenos" cromatogramas. Es decir, sobre picos simétricos (Gaussianos) bien separados (R ≥ 1.5). Cualquier factor que ataque o bien contra la simetría de los picos, o bien contra su separación, desfavorecerá sin lugar a dudas, su cuantificación. Los tipos más comunes de deformaciones y síntomas en los picos se ejemplifican en la figura.

- Defectos en la columna cromatográfica: Volúmenes muertos, Contaminación química.
- Efectos extracolumnares: Causa del detector demasiado grande, Efectos de difusión en las longitudes inadecuadas, Volumen de inyección demasiado grande.
- Efectos de solvente.
- Efectos de la columna.
- Mecanismos múltiples de retención.
- Efectos de interacción de adsorción.
- Efectos de picos bufferizados.

El tailing es una de las deformaciones del pico más frecuentes. Es interesante destacar que los picos con tailing son difíciles para integrar aun con los instrumentos más modernos y sofisticados, y que la presencia de tailing reduce sustancialmente la resolución.

Por otro lado, la completa ausencia de asimetrías es un hecho poco habitual. Las causas más comunes que originan tailing se detallan en la tabla.

PROBLEMAS CROMATOGRAFICOS

TAILING

2 Efectos Extracolumnares

Habitualmente cuando se mide la eficiencia en un cromatograma que contiene varios picos se encuentra que el número de platos teóricos de la columna parece "menor" cuando aumenta el tiempo de retención hasta que alcanza un valor aproximadamente constante. Este fenómeno experimental no está de acuerdo con la definición de la eficiencia que indica que el número de platos teóricos de una columna debe ser constante para un sistema determinado. Esta discrepancia se debe a los efectos extracolumnares. Los efectos extracolumnares son ensanchamientos de la banda cromatográfica no adjudicables a la columna, sino al resto del instrumento. Debido a su naturaleza estos efectos son poco importantes cuando la dispersión debida a la columna es grande pero comienza a tener influencia cuando la dispersión debida a la columna es baja. La dispersión debida a la columna puede calcularse como:

$$W_b = \frac{4(t_r + k) V_0}{R}$$

Donde W_b es la dispersión de la banda debida a la columna. De dicha ecuación puede deducirse que los efectos extracolumnares tendrán mayor magnitud cuando k es pequeño (tiempos de retención cortos) y V_0 es pequeño (columnas más cortas o de diámetro interno menor) y cuando el número de platos teóricos es grande.

PROBLEMAS CROMATOGRAFICOS

TAILING

Se ha estudiado la influencia de los efectos extracolumnares en distintos modos de trabajo en CLAR a los cuales se les clasifica de la siguiente manera convencional ($n = 1$ min), de alta velocidad (High Speed, $t_r = 10$ s) y de super velocidad (Super Speed, $t_r = 1$ s). Los mayores problemas aparecen, obviamente, en los dos últimos.

La influencia de los efectos extracolumnares puede detectarse cuando se utilizan columnas cortas en equipos diseñados hace algunos años. Estos instrumentos estaban preparados para operar con columnas más cortas o de menor diámetro interno. Estas columnas producen dispersiones de la banda cromatográfica mucho menores por lo cual los efectos extracolumnares se hacen más manifiestos. Estos efectos producen un aumento de n al incrementarse el tiempo de retención y un tailing más pronunciado de los picos tempranos comparado con los picos tardíos.

La necesidad de corregirlos está dada por la deformación que presentan los picos a analizar.

En los casos donde los efectos extracolumnares producen deformaciones severas de los picos a cuantificar, es posible o bien operar con otro instrumento que no posea esa inconveniencia, o bien intentar reducirlos en el instrumento original. Si se opta por la segunda opción se debe que se utilice sólo la longitud de bobina (preferentemente de 0.10 en lugar de 0.22 mm de diámetro interno) estrictamente necesaria para la conexión, y que la celda del detector tenga un volumen pequeño.

PROBLEMAS

PROBLEMAS CROMATOGRAFICOS

TAILING

Los efectos extracolumnares en la tubería del instrumento de CLAR han sido estudiados. Habitualmente las tuberías no son las partes del instrumento que crean mayores problemas al respecto sino que es la celda del detector la que produce mayor dispersión en la banda cromatográfica. Desafortunadamente las celdas de menores capacidades tienen caminos ópticos menores, y la sensibilidad se ve reducida.

Otro de los factores que contribuye al ensanchamiento de banda extracolumnar es el volumen de inyección si las muestras están disueltas en fase móvil o en un "solvente más fuerte" que la fase móvil. En estos casos el volumen de inyección debe mantenerse tan pequeño como sea posible y no superar las cantidades indicadas anteriormente para cada tipo de columna.

En cambio suelen inyectarse volúmenes mucho mayores (hasta 5 veces los indicados) si para disolver las muestras, se utiliza un solvente más débil que la fase móvil. En este último caso la presencia del solvente débil favorece la concentración de los componentes de la muestra en la cabeza de la columna y finalmente, estos componentes euyen a través de la columna cuando la fase móvil reaparece al solvente de disolución de la muestra. Adicionalmente, la constante de tiempo del detector pueden tener un efecto muy marcado en el ancho de los picos.

GENERALIDADES

PROBLEMAS INSTRUMENTALES

PROBLEMAS CROMATOGRAFICOS

RENTA PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

PROBLEMAS

PROBLEMAS CROMATOGRAFICOS

TAILING

3 Efectos de Sobretiro

Para evitar problemas posteriores es conveniente que la muestra se disuelva en la misma fase móvil. Por motivos de solubilidad del analito muchas veces esto no es posible y se recurre a solventes "más fuertes" que la fase móvil para lograr su total disolución. Al inyectar estas soluciones en el equipo de CLAR se produce una deformación de los picos cromatográficos que desaparece completamente cuando la muestra se disuelve en fase móvil. En las figuras 135 y 137 se ejemplifican dos casos donde se han manifestado estos dos efectos de solvente.

Para detectar su presencia durante el desarrollo de los métodos de análisis se recomienda inyectar la muestra disuelta en el solvente seleccionado para la cuantificación y comparar el perfil del pico obteniendo con el perfil del mismo pico en una solución preparada con la misma concentración del analito disuelto en fase móvil.

La corrección de este problema es muy sencilla la solución a inyectar debe estar preparada en fase móvil o en un solvente tan similar a la fase móvil como sea posible, o se debe reducir el volumen de inyección.

GENERALIDADES

PROBLEMAS INSTRUMENTALES

PROBLEMAS CROMATOGRAFICOS

RENTA PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

PROBLEMAS

PROBLEMAS CROMATOGRAFICOS

TAILING

5 Mecanismos Mixtos de Retención

La presencia de mecanismos mixtos de retención es, probablemente, el inconveniente más severo. Este efecto se manifiesta como señales más o menos importantes en los picos de los componentes que presentan interacción mientras que los que no lo hacen usualmente exhiben picos asimétricos y asimétricos. La interacción con efectos extracolumnares está en que en estos últimos los picos más asimétricos son los que efluyen a bajos valores de k' mientras que cuando existen mecanismos mixtos de retención la asimetría puede darse en cualquier zona del cromatograma. Si se trabaja con familias de compuestos que presenten el mismo tipo de interacción se puede observar que el tailing es más pronunciado en los picos que efluyen con valores de k' elevados.

Los mecanismos mixtos de retención suelen aparecer en los casos donde la naturaleza del material de relleno de la columna induce a la retención de ciertos solutos por más de un mecanismo. En fase reversa los responsables de este tipo de fenómenos son los grupos silanol sin recubrir de la columna. Estos grupos, si están disociados, pueden interactuar con sustancias básicas protonadas por mecanismos de intercambio iónico, o por enlaces de puente de hidrogeno.

Los mecanismos mixtos (es decir la calidad y tipo de silencias libres del material de relleno de la columna) son, generalmente, los responsables de las distorsiones encontradas en la columna supuestamente equivalentes de diferentes fabricantes y aun en columnas de diferente lote de un mismo fabricante.

GENERALIDADES

PROBLEMAS INSTRUMENTALES

PROBLEMAS CROMATOGRAFICOS

RENTA PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

PROBLEMAS

PROBLEMAS CROMATOGRAFICOS

TAILING

La solución a este problema consiste en desarrollar los métodos de análisis de manera tal de minimizar estos efectos. En principio si se desea evitar el intercambio iónico con los grupos silanol, hecho que probablemente sea el más frecuentemente encontrado, se debe bloquear de algún modo su capacidad de intercambio, por ejemplo:

- Utilizar fases móviles buffereadas con altas concentraciones de buffer. Se ha reportado que el agregado de buffer a las fases móviles reduce el efecto sistémico que presentan los solutos básicos.
- Bloqueando a los silanolos libres de la columna con el agregado de una base (prelavar o enjuagar en general) a la fase móvil. Varios autores han reportado que la utilización de aminas en la fase móvil mejora la asimetría de sustancias básicas.
- Utilizando columnas que posean altos recubrimientos superficiales y bajos contenidos de silanolos (Figura 133).

Disminuyendo el valor de pH de la fase móvil por debajo de 3, o preferentemente de 2 de manera tal de suprimir la disociación de los grupos silanol. De hecho, esta es la modalidad de preferencia cuando se analizan péptidos o proteínas pequeñas que posean aminoácidos básicos que puedan actuar con los silanolos de la columna. El problema, en este caso, resulta ser la baja variabilidad de la fase ligada al disminuir el pH de la fase móvil.

GENERALIDADES

PROBLEMAS INSTRUMENTALES

PROBLEMAS CROMATOGRAFICOS

RENTA PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

PROBLEMAS

PROBLEMAS CROMATOGRAFICOS

TAILING

7 Sistemas no Buffereados

Otro de los problemas que conducen a la aparición de asimetrías en los picos es la ausencia de sistemas buffereados cuando las sustancias a analizar están parcialmente ionizadas en el valor de pH seleccionado para la separación. La retención de los solutos ionizados depende del valor de pH de la fase móvil en fase reversa los solutos no ionizables se retienen más favorablemente que los solutos ionizados cuando que el pH de la fase móvil es un verdadero "motor" es la retención de solutos ionizables. Cuando la sustancia en cuestión se encuentra parcialmente disociada se produce una modificación del pH en la columna (por efecto de la misma disociación) y, consecuentemente, la presencia de las dos formas (ionizada y no ionizada) conduce a la aparición de tailing. Este efecto es mucho más marcado cuando el valor del pH de la fase móvil se aproxima al valor del pH del analito en cuestión.

El agregado de buffers a las fases móviles ayuda a evitar este problema por lo cual la utilización de fases móviles buffereadas se ha transformado en un "deber" que ningún analista debe evitar al analizar sustancias disociables.

GENERALIDADES

PROBLEMAS INSTRUMENTALES

PROBLEMAS CROMATOGRAFICOS

RENTA PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

PROBLEMAS

PROBLEMAS CROMATOGRAFICOS

TAILING

PROBLEMA	CAUSA/FUNDAMENTO	SOLUCION
La muestra no es homogénea en el momento de la inyección.	El solvente de la muestra es diferente al de la fase móvil.	Disolver la muestra en la misma fase móvil que se utilizará para el análisis.
Picos anchos.	El volumen de inyección es demasiado grande.	Reducir el volumen de inyección.
Picos asimétricos.	El pH de la fase móvil no es el adecuado para el analito.	Ajustar el pH de la fase móvil.
Picos con tailing.	El analito interactúa con los silanolos de la columna.	Utilizar columnas con alto recubrimiento superficial y bajo contenido de silanolos.

Continúa

GENERALIDADES

PROBLEMAS INSTRUMENTALES

PROBLEMAS CROMATOGRAFICOS

RENTA PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

PROBLEMAS

PROBLEMAS CROMATOGRAFICOS

La presencia de picos anchos es, al igual que el tailing, un fenómeno que se origina en algún problema de índole cromatográfica. Estos picos pueden ser perfectamente simétricos, por lo cual no presentan demasiados problemas de integración, pero debido a la extensión de su base, pueden presentar problemas de resolución si se encuentran relativamente próximos.

Las mismas causas que originan picos con tailing pueden generar picos anchos. Cuando se observa un pico ancho también debe considerarse la posible existencia de algún pico no resuelto completamente. La presencia de picos anchos o de picos con tailing en Cromatografía de Exclusión Molecular (y su asimetría) se refiere a la dispersión (o asimetría en la dispersión) de especies moleculares del polímero en cuestión.

La eficiencia de la columna debe medirse cada vez que se efectúe un análisis sobre la misma muestra que se desea cuantificar. Si se determina que los picos tienen un ancho fuera de lo normal (es decir que la eficiencia de la columna ha disminuido) es conveniente repasar la metodología en función de la resolución obtenida y la resolución mínima requerida para una buena cuantificación. De esta manera es posible concluir si se puede analizar las muestras con la misma columna o si es necesario cambiarla.

GENERALIDADES

PROBLEMAS INSTRUMENTALES

PROBLEMAS CROMATOGRAFICOS

RENTA PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

PROBLEMAS

PROBLEMAS CROMATOGRAFICOS

PROBLEMA	CAUSA/FUNDAMENTO	SOLUCION
La muestra no es homogénea en el momento de la inyección.	El solvente de la muestra es diferente al de la fase móvil.	Disolver la muestra en la misma fase móvil que se utilizará para el análisis.
Picos anchos.	El volumen de inyección es demasiado grande.	Reducir el volumen de inyección.
Picos asimétricos.	El pH de la fase móvil no es el adecuado para el analito.	Ajustar el pH de la fase móvil.
Picos con tailing.	El analito interactúa con los silanolos de la columna.	Utilizar columnas con alto recubrimiento superficial y bajo contenido de silanolos.

Continúa

GENERALIDADES

PROBLEMAS INSTRUMENTALES

PROBLEMAS CROMATOGRAFICOS

RENTA PRINCIPAL

AYUDA SALIDA

Adsorción
Es la retención de una especie química por parte de una masa y depende de la tendencia que tiene esta a formar mezcla o reaccionar químicamente con la misma.

Actividad
En cromatografía de adsorción, la actividad es la fuerza relativa de la superficie del empaque. Para sílice gel, está más expuesto al grupo silanol, la superficie es más activa. La actividad puede ser controlada agregando agua u otro modificador polar que son bases hidrogenadas a los sitios activos y por eso reducen la actividad de la superficie.

Adsorbente
Empaque usado en cromatografía de adsorción. La sílice gel y la alumina son la mayoría de los adsorbentes frecuentemente usados en CLAR.

Afinidad Cromatográfica
Es una técnica en la que un adsorbente biospecífico se ha preparado acoplado un ligando específico (como una enzima, hormona o antígeno) para la macromolécula de interés a un soporte sólido (o portador). Esto inmoviliza los ligando sólo la interacción específica con moléculas que pueden ligar selectivamente a él. Moléculas que no ligan al sitio no lo retienen. El compuesto referido puede soltarse después un estado puro.

Agarosa
Es un polisacárido de alto peso molecular usado como un medio para separaciones biocromatográficas. Se usa con frecuencia en cromatografía en flujo por gel con fases móviles acuosas.

Altura Equivalente a un Plato Teórico (H)
Otra medida de la eficiencia de una columna es la altura equivalente a un plato teórico (H). Esta se calcula usando la Ecuación y usualmente se reporta en mm.

H = L/N
L = longitud de columna (mm)
N = número de platos teóricos

Alumina
Es un adsorbente usado a veces en cromatografía de adsorción. Óxido de aluminio (Al₂O₃) es un adsorbente poroso que está disponible con una superficie ligamente básica. Por esta razón puede tener ventajas sobre la sílice que se considera que tiene una superficie ácida.

Análisis
Compuesto químico a ser caracterizado y cuantificado en una muestra.

Asimetría
Es un factor que describe la forma de una cresta del cromatograma. La teoría asume una forma de cresta gaussiana que es simétrica. El factor de asimetría de cresta es la proporción (a 10 por ciento de la altura de la cresta) de la distancia entre el ápice de la cresta y la parte de atrás así el lado de la curva del cromatograma a la distancia entre el ápice de la cresta y el lado delantero de la curva del cromatograma. Un valor >1 es una cresta yendo detrás de, mientras un valor <1 es una cresta adelantado.

Asimetría de Pico
Una medida de la imperfección de la forma del pico debe ser lo más cercano a una curva gaussiana perfecta.

Bomba
Las bombas de CLAR impulsan la fase móvil proveniente del reservorio de solvente hacia el inyector y desde allí hacia la columna. Su caudal de trabajo puede ser muy variable, según la escala de trabajo. Escogido. Básicamente existen dos tipos de bombas, las de pistón (bombas reciprocantes) y las de desplazamiento continuo (bombas peristálticas). Las primeras son las de uso más difundido son muy versátiles y fáciles de adaptar a la rutina del laboratorio. Las segundas no emiten pulsos en la entrega del solvente.

Columna
Es el lugar donde ocurre la separación. Se dice que es el corazón de un cromatograma. Los materiales con los cuales generalmente se pueden elaborar las columnas son cobre, aluminio, acero inoxidable, vidrio o teflón. El relleno puede ser un sólido, o un líquido recubriendo un sólido. Podemos clasificar las columnas según el propósito del proceso cromatográfico: Analíticas o Preparativas.

Cromatografía
Es un gráfico en el que se representa la respuesta del detector en función del tiempo de elución.

Corrosión
Reacción química o electroquímica entre un metal y su entorno ambiente.

Cromatografía
Es la técnica para separar los componentes o solutos de una mezcla sobre la base de las características relativas de cada soluto, distribuidos entre un fluido que se mueve, llamado la fase móvil, y una fase estacionaria soportante. La fase móvil puede ser un líquido, un gas o un fluido supercrítico, mientras que la fase estacionaria puede ser un líquido o un sólido.

Deriva
La deriva es un cambio continuo (positivo o negativo) en la entrega de solvente que se produce en intervalos de tiempos muy largos (típicamente durante horas). La deriva en el caudal conduce a diferencias en las áreas de los picos durante operaciones automáticas en períodos de tiempos muy largos (por ejemplo toda la noche). Para minimizar el efecto de la deriva sobre los resultados cuantitativos se suele efectuar una nueva calibración del instrumento en estándares apropiados luego de la inyección de cada serie de 6 a 10 muestras.

Deriva de la línea base
Desviación gradual de la línea base en un período de tiempo determinada debido al ruido electrónico del equipo, condiciones ambientales y condiciones de análisis.

Detector
Es la parte del equipo cromatográfico que permite ver y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica.

Detector de Índice de Refracción
Este detector mide la diferencia de índice de refracción entre el solvente puro y el solvente que contiene la muestra. Es un detector universal. Es muy poco sensible, lo cual limita su campo de aplicación y es muy afectado por cambios en la temperatura.

Detector UV
Es el detector más empleado en CLAR. Posee buena sensibilidad y rango lineal, y permite detectar análisis en el orden de los nanogramos. No es destructivo y puede emplearse con gradientes de solventes, con la única limitación de que estos deben ser transparentes en la longitud de onda de trabajo. Es muy poco sensible a los cambios de caudal y de temperatura. Existen dos tipos de detectores UV: los de longitud de onda fija y los de longitud de onda variable.

Detector de Onda Fija o Fotométrico
Este detector opera a longitudes de onda prefijadas, determinadas por las líneas de emisión de su lámpara, habitualmente de mercurio de baja presión. Como la longitud de onda de trabajo se utilizan las bandas de emisión de la lámpara de Hg especialmente la fuerte línea de 254 nm.

Detector de Onda Fija o Fotométrico
Este detector es simplemente un espectrofotómetro, en el cual se reemplaza el compartimiento de cubetas por una celda de flujo. Es mucho más versátil que el detector de longitud de onda fija, ya que al tener red de difracción permite seleccionar libremente la longitud de onda de trabajo. Escogiendo así la longitud de onda de máxima absorción del analito para aumentar la sensibilidad de medición.

Desgasificación
Es el proceso de remover el gas disuelto en la fase móvil antes o durante su uso. El gas disuelto en la solución puede llegar a la celda del detector y causar picos en la línea base y ruido. La desgasificación se puede llevar a cabo por calentamiento de solvente, por vacío, turbulencia de helio, etc.

3.1

Diodos
Dispositivos fotosensibles que transforman la información luminosa (absorbancia a cada una de las longitudes de onda del intervalo) en una señal eléctrica cada uno de ellos proporciona una señal

Dilución
Mezcla homogénea de partículas en una fase dispersa, formada por diferentes componentes, que pueden separarse de ella por métodos físicos para su apariencia es totalmente uniforme. El componente que está en exceso se conoce como disolvente. El componente o los componentes que se encuentran en menor proporción se llaman solutos.

Disolvente de alta fuerza de elución
Es el solvente con que la columna se pueda lavar para eliminar los posibles análisis retenidos con el tiempo y liberar los sitios activos que ellos ocupan, que la fase móvil en su no tiene la "fuerza" (afinidad) para hacerlo

PRINCIPAL
AYUDA SALIDA

3.2

Especificidad
Habilidad de un método para cuantificar exactamente y de manera exclusiva los principios activos en presencia de los componentes de la muestra (impurezas, componentes endógenos de la matriz biológica, metabolitos, excipientes), el método debe separar y cuantificar sólo los compuestos de interés

Estándar de referencia
Son productos de uniformidad conocida, destinados para utilizarse en comprobaciones analíticas físicas, químicas o microbiológicas, cuya evaluación se basa en la comparación de sus propiedades con respecto a la sustancia que está en examen. Su finalidad es disminuir errores en el laboratorio

Eluato
Es la combinación de la fase móvil y el solvente que sale de la columna.

Eluyente
Es la fase móvil usada para llevar cabo la separación

Exactitud
Grado de concordancia entre el resultado y un valor de referencia certificado. En ausencia de exactitud se tiene error sistemático

Extracción
Es una técnica de separación que usa dos fases inmiscibles para separar un soluto de una fase dentro de la otra.

PRINCIPAL
AYUDA SALIDA

3.3

Factor de coelución
Es una expresión que nos indica la similitud de un pico

F calculada
Valor calculado estadísticamente para comparación entre variancias

Factor de Retención (k)
El Factor de Retención (k) es otra medida de la retención. Es la relación de tiempo que gasta el soluto en la fase estacionaria y móvil. Se calcula utilizando la Ecuación

$k = (R - t_M) / t_M = t_R / t_M$

t_R = Tiempo de Retención
 t_M = Tiempo de Retención Ajustado
 t_M = Tiempo de Retención de un soluto no retenido

Factor de Separación (N)
El factor de Separación es una medida del tiempo o distancia entre el máximo de dos picos. Se calcula utilizando la Ecuación

$N = 2.1 k^2$

k_1 = factor de retención para el primer pico
 k_2 = factor de retención para el segundo pico

Fase normal
Proceso cromatográfico que se caracteriza por la naturaleza no polar del "lecho estacionario" y la naturaleza polar de la fase móvil.

PRINCIPAL
AYUDA SALIDA

3.4

Fase normal
Proceso cromatográfico que se caracteriza por la naturaleza polar del "lecho estacionario" y la naturaleza polar de la fase móvil

Filtración
El procedimiento de Filtración consiste en retener partículas sólidas por medio de una barrera, la cual puede consistir de mallas, fibras, material poroso o un relleno sólido

Fluorescencia
Luminiscencia presentada por ciertas sustancias después de haber sido iluminadas por rayos visibles o UV, cuya luminiscencia persiste después de haber cesado la radiación excitante

Fosforescencia
Luminiscencia presentada por ciertas sustancias después de haber sido iluminadas por rayos visibles o UV

PRINCIPAL
AYUDA SALIDA

3.5

Gasto en Volumen
Indice cuantos mililitros de solvente por minuto recorren la columna. Es el volumen de solvente que pasa por la columna por unidad de tiempo

Gel
Es un empaque sólido usado en cromatografía de permeación de gel. Una gel realmente consiste en dos partes: el medio dispersante (porción sólida) y el medio dispersante (el solvente)

Gradiente de elución
Es una técnica donde disminuye el tiempo de la separación aumentando fuerza de la fase móvil contra el tiempo durante una separación cromatográfica. También es conocido como programación de solvente. Las pendientes pueden ser constantes o paso a paso. Se usan pendientes solventes binarias, ternarias, y cuaternarias rutinariamente en HPLC

Guardacolumna
Una columna pequeña puso entre el inyector y la columna analítica. Protege la columna analítica contra contaminación por partículas de la muestra, y por especies fuertemente reactivas. La columna de guarda normalmente se condensa con el mismo material como la columna analítica y es de tamaño del mismo I.C. es muy más corto, cuesta menos y normalmente se desecha cuando se contamina

PRINCIPAL
AYUDA SALIDA

3.6

HETP
The height equivalent of a theoretical plate. It is a crossover from distribution theory which is a assure of a column efficiency. For a typical HPLC column packed with 5 mm particles, HETP (or H) values are usually between 0.01 and 0.03 mm. $HETP = LN$, where L is the column length, and N is the number of theoretical plates

Hydrophilic
It is often referred to as water loving. It adsorbs both to water compatible stationary phases, and to water soluble molecules. Most columns used to separate proteins are hydrophilic in nature and should not sorb or denature protein in the aqueous environment

Hydrophobic
It is often referred to as water hating. It adsorbs both to stationary phases not compatible with water and molecules with little affinity for water. Hydrophobic molecules have few polar functional groups and are mostly hydrocarbons or have high hydrocarbon content.

Hydrophobic interaction
A technique in which reversed-phase packings are used to separate molecules by the interactions between their hydrophobic moieties and the hydrophobic sites on the surface. High salt concentrations are used in the mobile phase and separations are effected by changing the salt concentration. The technique is analogous to "salting out" molecules from solution. Gradients are run by decreasing the salt concentration over time

PRINCIPAL
AYUDA SALIDA

3.7

Intercambio iónico
Tipo de separación cromatográfica en donde la fase estacionaria es un intercambiador iónico

Inyector
El inyector es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el caudal de solvente a través del sistema

In-line filter
A device that prevents particulate matter from damaging the column by filtration. Modern in-line filters can be placed between the injector and the column without contributing to band broadening. A filter in this position is used to prevent sample particulates from entering the packed bed or the inlet frit.

Inlet
The initial part of the column, where the solvent and sample enter. There is usually an inlet frit that holds the packing in place and, in some cases, protect the packed bed

Internal standards
Internal standards consist of a specific quantity of a compound that is known not to be in the sample, but that exhibits the same characteristics under the separation conditions as the sample components. Internal standards are used primarily to calibrate quantitative capability for methods susceptible to volumetric error resulting from sample preparation

PRINCIPAL
AYUDA SALIDA

3.8

Interparticle volume (V₀)
The total volume of mobile phase within the length of the column. It is made up of the intraparticle volume (inside the packing, I_{av}) and interparticle volume (between the packing particles). Same as Void volume. It is also abbreviated V₁ or V_m

Ion chromatography (IC)
An ion-exchange technique in which low concentrations of anions or cations are determined using low capacity ion exchangers with weak buffers. Conductivity detectors are often used. Ion chromatography is practiced in two forms: suppressed IC, and non-suppressed IC

Ion-exchange chromatography (IEC)
A mode of chromatography in which ionic substances are separated on cationic or anionic sites of the packing. The sample ion (and usually a counterion) will exchange with ions already on the ionogenic group of the packing. Retention is based on the affinity of different ions for the site and on a number of other solution parameters such as pH, ionic strength, and counterion type

Ion-exchange capacity
The number of ionic sites on the packing that can take part in the exchange process. The exchange capacity is expressed in mequiv. Typical strong anion exchange resin may have 3 to 5 mequiv/capacity

Ion exclusion
A process in which ionized solutes can be separated from unionized or partially ionized solutes using ion-exchange resins. Separation results from Donnan membrane potential. This is where ionic solutes exist at a higher concentration in solution than in the resin but nonionic solutes are evenly distributed between the mobile phase and resin

PRINCIPAL
AYUDA SALIDA

Ion pair chromatography
 A form of chromatography in which ions in solution can be "paired" or neutralized and separated as an ion pair on a reversed-phase column. Ion-pairing agents are usually ionic compounds that contain a hydrocarbon chain which imparts a certain hydrophobicity so that the ion pair can be retained on a reversed-phase column. Ion-pairing can also occur in normal-phase chromatography when one part of the pair is loaded onto a sorbent, but this technique is not as popular as the RPC technique.

Ion suppression
 This involves buffering in an aqueous mobile phase at a particular pH to suppress solute ionization. For example, the ionization of weak carbonic acids can be suppressed by adjusting the pH below their ionization constant. This technique is useful for improving the peak shape of weak acids and bases in RPC.

Irregular packing
 The shape of a silica gel-based packing. Irregular packings are available in microparticulate sizes. The packings are made by grinding silica gel into small particles, sizing them into small particles, and into narrow fractions using classification machinery. While spherical packings are now used more often than irregular packings in HPLC, the less expensive irregular packings are still widely used in prep LC.

Irreversible adsorption
 A state when a compound with a very strong affinity for the adsorbent is injected into a column. It is so strongly adsorbed that it cannot be eluted from the column. An example of irreversible adsorption is a chemical reaction between the sample and the surface of the adsorbent.

PRINCIPAL
 AYUDA SALIDA

PRINCIPAL
 AYUDA SALIDA

Retention factor (k')
 The capacity factor. It can be calculated from the equation, where t_R is the retention time for the sample peak, and t_0 is the retention time for an unretained peak.

PRINCIPAL
 AYUDA SALIDA

Límite de detección
 Concentración correspondiente a una señal de magnitud igual al blanco más tres veces la desviación estándar del blanco.

Línea base
 Gráfico obtenido de la señal que emite un detector cuando se le hace pasar por un período de tiempo determinado sólo la fase móvil bajo las condiciones de análisis.

Linealidad
 La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente a mediante una transformación matemática, son directamente proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

PRINCIPAL
 AYUDA SALIDA

Método
 Se refiere a todos los componentes de la muestra excepto el analito o los análisis de interés.

Métodos de análisis
 Se basan en propiedades químicas del analito. Se incluyen las gravimétricas, las volumétricas y los métodos de análisis cuantitativo clásico.

Métodos instrumentales
 Basados en propiedades químico físicas. La clasificación de los métodos instrumentales se realiza en base a la propiedad que se mide (espectroscópicos, electroanalíticos, térmicos).

Métodos de separación
 Se incluyen en este grupo los métodos cuya finalidad es la separación de compuestos para eliminar las interferencias y facilitar las medidas.

PRINCIPAL
 AYUDA SALIDA

Numero de platos teóricos
 El número de platos teóricos es una medida indirecta del ancho del pico para un pico a un tiempo de retención específico. Las columnas con un alto número de platos teóricos son consideradas por ser más eficientes (esto es, columnas más eficientes) que aquellas con un número más bajo de platos teóricos.

PRINCIPAL
 AYUDA SALIDA

Octadecylsilane (ODS)
 The most popular reversed phase in HPLC. Disubstituted silanes are bonded to silica or polymeric packings. Both monomeric and polymeric phases are available.

Open-tubular columns
 Columns of small internal diameter. Stationary phases can be bonded on the internal walls of these columns. The most common type is the fused silica tubing made for capillary GC. These columns are currently being investigated for HPLC, SFC, and capillary electrophoresis.

Organic modifier
 A water miscible organic solvent which is added to an aqueous mobile phase to effect separation in reversed-phase.

Overload
 The increased mass of sample injected onto a column which begins to affect efficiency and resolution. See Sample capacity.

PRINCIPAL
 AYUDA SALIDA

Partición
 En cromatografía, es la separación de componentes de una muestra, por afinidad química o física en dos fases (fase móvil y fase estacionaria).

Plato teórico (R)
 La región en la que la concentración del soluto se encuentra en equilibrio entre las dos fases (estacionaria y móvil).

Polaridad de la fase móvil
 Característica fisicoquímica del disolvente empleado como fase móvil, dada por la concentración de moléculas disociadas en iones con carga eléctrica y la electronegatividad de los mismos.

Precisión
 Grado de concordancia entre los datos obtenidos de una serie. Refleja el efecto de los errores aleatorios producidos durante el proceso analítico.

Puente de Hidrógeno
 Atracción intermolecular que se presenta entre moléculas en las cuales el hidrógeno está unido a un átomo pequeño altamente electronegativo (que puede ser átomo electrónico, generalmente N, O y F).

Puntos críticos
 Aspectos que afectan directamente o indirectamente los resultados analíticos del laboratorio.

PRINCIPAL
 AYUDA SALIDA

Quimisorción
Es la sorción causada por una reacción química con el adsorbente. Tal como interacciones irreversibles, ocurre usualmente sobre empaques de reactivos con grupos funcionales tal como silanol o fases límino entrelazadas.

Reservorio
Es el recipiente que contiene la fase móvil. Puede ubicarse dentro de la caja negra de un equipo integrado o externamente en un equipo modular.

Resolución
Es una medida de la eficiencia que tiene la columna para separar dos compuestos.

Reproducibilidad
Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas en diferentes laboratorios, bajo condiciones diferentes (analista, tiempo, equipo).

Robustez
Es sólo parte integral del amortiguamiento contra excesos típicos, esto es, contra diferentes técnicas, equipo y condiciones.

MENU PRINCIPAL
AYUDA SALIDA

Selektividad
Cuantifica el grado de ausencia de interferencias debidas a otras especies contenidas en la matriz.

Seguridad
Amplitud de condiciones experimentales en las que puede realizarse un análisis.

Sensibilidad
Capacidad para discriminar entre pequeñas diferencias de concentración del analito. Se evalúa mediante la sensibilidad de calibración, que es la pendiente de la curva de calibración a la concentración de interés.

Solución Saturada
Solución cuya concentración es la Solubilidad del Sóluto.

Solución No Saturada
Solución cuya concentración es menor que la Solubilidad del Sóluto.

Solución Sobre Saturada
Solución cuya concentración es mayor que la Solubilidad del Sóluto (es un sistema inestable).

Solubilidad
Concentración Máxima de Sóluto en una Solución a una temperatura dada.

Tiempo de Retención
El tiempo de Retención (t_R) es el tiempo que toma un soluto en recorrer toda la columna.

Tolerancia del sistema
Es una medida de la capacidad del procedimiento analítico para no ser deteriorada con aceptable precisión y exactitud en el análisis de muestras, tales como impurezas en el caso de materias primas (principios activos), o productos de degradación en productos farmacéuticos finales. Bajo condiciones normales de operación.

MENU PRINCIPAL
AYUDA SALIDA

Unión Covalente
Enlace químico ordinario entre átomos, cada uno de los cuales cede un electrón al par compartido.

Ultraviolet/Visible Light (UV/VIS)
The tunable or variable wavelength UV/VIS detector is the most popular form of detector. For methods involving organic compounds in aqueous mobile phases, the UV/VIS detector takes advantage of compounds varying absorptivities of ultraviolet and visible light.

Unretained compounds
These compounds are not retained at all on the column but elute at the beginning of the chromatogram immediately after the void volume.

Verificación
Proceso que tiene como objetivo examinar si un resultado de medición es consistente con el valor de referencia correspondiente, o la diferencia observada se le realiza una prueba de significancia contra la Incertidumbre relativa, típicamente correspondiente a una combinación de las Incertidumbres en los resultados de la medición y con el valor de referencia. Usando pruebas estadísticas apropiadas, esta prueba de significancia puede ser organizada como de solo nivel o multiniveles.

MENU PRINCIPAL
AYUDA SALIDA

Wall effect
The consequence of the looser packing density near the walls of the rigid HPLC column. Mobile phase has a tendency to flow slightly faster near the wall because of the decreased permeability. The solute molecules that happen to be near the wall are eluted along faster than the average of the solute band and band spreading results.

Waste container
At the end of the fluid path, the mobile phase and separated sample components are collected into a waste container. This container is suitable for safely collecting and disposing of the solvents used in the separation.

Xerogels
Gels that are used in size-exclusion chromatography. They have the ability to swell and shrink in different solvents.

X-axis
The X-axis of the chromatogram records the time or volume of mobile phase that passes through the detector.

MENU PRINCIPAL
AYUDA SALIDA

Waste container
At the end of the fluid path, the mobile phase and separated sample components are collected into a waste container. This container is suitable for safely collecting and disposing of the solvents used in the separation.

Xerogels
Gels that are used in size-exclusion chromatography. They have the ability to swell and shrink in different solvents.

X-axis
The X-axis of the chromatogram records the time or volume of mobile phase that passes through the detector.

MENU PRINCIPAL
AYUDA SALIDA

Waste container
At the end of the fluid path, the mobile phase and separated sample components are collected into a waste container. This container is suitable for safely collecting and disposing of the solvents used in the separation.

Xerogels
Gels that are used in size-exclusion chromatography. They have the ability to swell and shrink in different solvents.

X-axis
The X-axis of the chromatogram records the time or volume of mobile phase that passes through the detector.

MENU PRINCIPAL
AYUDA SALIDA

Waste container
At the end of the fluid path, the mobile phase and separated sample components are collected into a waste container. This container is suitable for safely collecting and disposing of the solvents used in the separation.

Xerogels
Gels that are used in size-exclusion chromatography. They have the ability to swell and shrink in different solvents.

X-axis
The X-axis of the chromatogram records the time or volume of mobile phase that passes through the detector.

MENU PRINCIPAL
AYUDA SALIDA

Waste container
At the end of the fluid path, the mobile phase and separated sample components are collected into a waste container. This container is suitable for safely collecting and disposing of the solvents used in the separation.

Xerogels
Gels that are used in size-exclusion chromatography. They have the ability to swell and shrink in different solvents.

X-axis
The X-axis of the chromatogram records the time or volume of mobile phase that passes through the detector.

MENU PRINCIPAL
AYUDA SALIDA

<p>PRINCIPAL ENTRADA SALIDA</p>	<p style="text-align: center;">13</p> <p>Y-axis The Y-axis of the chromatogram records the strength of the detector signal, which is usually proportional to the concentration of sample in the eluent passing through the detector. The units depend on the type of detector being used.</p>		<p style="text-align: center;">14</p> <p>Zwitterions Compounds that carry both positive and negative charges in solution.</p>
	<p style="text-align: right;">42 43 44 45</p>		<p style="text-align: right;">PRINCIPAL ENTRADA SALIDA</p> <p style="text-align: right;">42 43 44 45</p>

DISCUSSION

DISCUSION

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) es una de las técnicas analíticas de gran importancia en el ámbito farmacéutico, siendo esencial su conocimiento en la formación de los Químicos Farmacéuticos Biólogos. Existe una gran cantidad de información sobre cromatografía líquida que en su mayoría se encuentra en el idioma inglés, haciendo más difícil su acceso y comprensión. **MACROMIL** es un producto informático computacional en ambiente multimedia totalmente en español, que contiene información relacionada con aspectos cromatográficos, manejo del equipo cromatográfico de la marca *Waters* junto con el *software Millennium 2010*, características y selección de las columnas y de los solventes, manejo de muestras y todos aquellos problemas que se presentan con mayor frecuencia en el equipo cromatográfico.

La información que contiene **MACROMIL** se eligió en base a consideración de la autora, dicha información abarca desde aspectos básicos hasta aspectos más profundos y debido a su fácil manejo y comprensión es adecuado tanto para estudiantes, profesores ó todas aquellas personas que se interesan en la cromatografía de líquidos. Con éste sistema se pretende conseguir que los usuarios conozcan la cromatografía líquida y todo lo que implica su manejo, ya sea en un proyecto de investigación ó en el ámbito laboral.

Para el desarrollo de **MACROMIL** se establecieron ciertas etapas, basándonos en una combinación de ellas, mencionadas por los autores Marton, 1992 y Riquelme, 1995 en relación con los productos de información educativa, citados en los trabajos de tesis por "Monsalvo, 1997, Jiménez, 1998 Bahena, 1999 y Narvaez, 2000". Las etapas que nos llevaron a la realización de nuestro sistema informático fueron seis: análisis, planificación, concepción, desarrollo, pruebas y corrección

Los aspectos que hicieron posible el diseño de **MACROMIL** fueron:

- ♦ La recopilación de la información, la cual fue cuidadosamente seleccionada y organizada. Dicha información fue enfocada hacia aspectos básicos tanto teóricos como de operación en el manejo del equipo, con la finalidad de que el sistema tuviera un carácter preferentemente didáctico, pues se pretendió que el sistema sea visto como un materia de consulta para el aprendizaje de la cromatografía y por otro lado que sea visto como una herramienta en la capacitación para el manejo del equipo cromatográfico exclusivamente de la marca *Waters* y del *Software Millennium 2010*.
- ♦ La organización de la información nos llevó a realizar una selección por temas, de tal modo que se pudo plantear la manera en que tales temas se abordaran en el sistema, de este modo es como surgió la división del sistema en módulos o libros, cada uno de ellos cubriendo un aspecto particular. El elemento que surgió de esta etapa fue el diagrama de flujo, ya que con este se realizó la interface del usuario, que nos permitió enlazar adecuadamente los diferentes temas, subtemas y subsubtemas.
- ♦ El colocar el material de apoyo (imágenes, videos, animaciones, sonidos) entre los textos, creando nuestro propio estilo utilizando imágenes y animaciones para explicar ciertos fenómenos, diferentes cromatogramas como ejemplos, videos para conocer algunos aspectos fundamentales y archivos de sonido relacionados.
- ♦ Se contó con un formato para las pantallas, en las cuales están colocados en el mismo lugar los botones de navegación, títulos, temas y el menú principal durante todo el sistema, esto con el fin de que el usuario se enfoque en la información y no tenga

que estar buscando dónde están los botones para avanzar, retroceder o regresar a la página inicial, y para dar la sensación que se ha cambiado de tema, se utilizó diferente color del *background*.

En el aspecto informático, **MACROMIL** cumple con las características mencionadas por Riquelme (1995) citado por Jiménez, 1998, para ser considerado como un producto informático computacional, cuyas características son:

1. Debe verse como una realización de cine o una obra de teatro, dándole la importancia y recursos que su desarrollo lo amerita.

El sistema se desarrolló mediante una búsqueda exhaustiva de la información, recopilándola y sistematizándola, dándole la importancia a los recursos tanto humanos como computacionales, los cuales fueron utilizados de manera previamente planeada.

2. Debe utilizar herramientas informáticas nuevas en su diseño.

Para el desarrollo de **MACROMIL** se hizo uso de una herramienta integradora de medios (*authoring*), para difundir la información de forma interactiva y novedosa, la cual se conformó en base al conocimiento de la autora.

3. Debe ser eficaz, eficiente, amigable y robusto.

MACROMIL es un sistema informático computacional eficaz en el manejo de la información, amigable lo que permite usarlo sin dificultad y viajar a través de él de manera fácil y accesible.

4. Debe tener como principal ingrediente de diseño la interactividad.

La interactividad es una de las características con las cuenta **MACROMIL**, ya que tiene una navegación vía botones, *hotwords* y campos, la cual puede ser controlada por el usuario al ritmo que éste así lo desee. Debido a que cuenta con simulaciones en el manejo del equipo cromatográfico y videos que explican con mayor detenimiento, lo hace aún más motivante y de fácil consulta.

MACROMIL trata los aspectos cromatográficos y el manejo del equipo, de una forma diferente, fácil de entender, amena y sobre todo interactiva, ya que integra información que por lo general se encuentra en el idioma inglés y en un gran número de libros, permitiendo así al usuario consultar el sistema sin preocuparse por el idioma, profundizando en la información y al ritmo que así lo desee. **MACROMIL** es un sistema interactivo que reúne texto, diagramas, imágenes, animaciones, video y archivos de sonido de manera novedosa y diferente haciendo motivante su uso, ya que permite viajar por todo el sistema sin necesidad de salir de él. Debido a que la información contenida en **MACROMIL** está conformada en un orden lógico, el usuario puede comprender dicha información de manera fácil. Por todas estas razones consideramos a **MACROMIL** como una herramienta útil en la enseñanza y capacitación de los usuarios.

CONCLUSIONES

- ✓ Como resultado de la información recabada, ésta se integró en un sistema informático computacional en ambiente multimedia, denominado **MACROMIL**, el cual trata aspectos cromatográficos, así como el manejo del cromatógrafo CLAR Waters y del software Millennium 2010.
- ✓ Los factores que dieron origen al desarrollo de **MACROMIL** fueron; el poco interés que los usuarios presentan al leer manuales o libros con demasiada información e incluso en diferentes idiomas. El alto costo de los equipos cromatográficos y que requieren de operadores experimentados en el manejo de CLAR.
- ✓ En la elaboración de **MACROMIL** fue importante tener organizada la información de manera condensada, la cual formó parte del sistema y por otra el diseño, el cual es la parte fundamental de la presentación de ésta información, ya que es necesario tener un equilibrio entre texto, imágenes, diagramas, animaciones, vídeo y sonido, dicho equilibrio es importante para la presentación, ya que el sólo texto en una pantalla causaría aburrimiento en el usuario y terminaría por dejarlo. La integración de éstos medios sirvió como un apoyo a la información y el desarrollo de la interface el cual es el aspecto más importante de todo el sistema, ya que esto da la característica de interactividad.
- ✓ El sistema es sumamente fácil de manejar, permite tener acceso a la información de manera, amena, rápida y sobre todo interactiva. Los videos con los que cuenta dan al usuario una amplia visión del manejo del equipo cromatográfico, permitiéndole estar capacitado para manejar el equipo sin problemas.
- ✓ **MACROMIL** forma parte de los sistemas multimedia y pretende ser una herramienta más, para facilitar el camino a las siguientes generaciones que desarrollen sistemas multimedia en el futuro, tomando como base éste sistema informático junto con los ya realizados por Monsalvo, 1997, Jiménez, 1998 Bahena, 1999 y Narvaez, 2000 Ferrer 2000.
- ✓ El sistema **MACROMIL** es una herramienta útil, para apoyar la enseñanza de la cromatografía de líquidos y el manejo del equipo cromatográfico de la marca *Waters* y del *Software Millennium 2010*, el cual sobresale de otros medios de enseñanza comunes porque hace que el usuario involucre todos sus sentidos por lo que la adquisición del conocimiento se hace más amena, un aspecto importante de **MACROMIL** es su interactividad que permite al usuario determinar el orden en que desee revisar la información y el ritmo de trabajo.

GLOSARIO DE TERMINOS

Absorción: Es la retención de una especie química por parte de una masa y depende de la tendencia que tiene ésta a formar mezcla o reaccionar químicamente con la misma.

Actividad: En cromatografía de adsorción, la actividad es la fuerza relativa de la superficie del empaque. Para sílicagel, está más expuesto al grupo silanol, la superficie es más activa. La actividad puede ser controlada agregando agua u otro modificador polar que son bases hidrogenadas a los sitios activos y por eso reducen la actividad de la superficie.

Adsorbente: Empaque usado en cromatografía de adsorción. La sílicagel y la alúmina son la mayoría de los adsorbentes frecuentemente usados en CLAR.

Adsorción: Es el proceso de interacción entre el soluto y la superficie de un adsorbente. Las fuerzas involucradas pueden ser fuertes (por ejemplo, los puentes de hidrógeno) o débil (fuerzas de Van der Waals). Para la sílica gel, el grupo silanol es la fuerza que conduce la adsorción, y cualquier soluto que puede actuar recíprocamente con el grupo funcional puede ser retenido por cromatografía de líquido-sólido en sílica.

Afinidad Cromatográfica: Es una técnica en la que un adsorbente biospecífico se ha preparado acoplado un ligando específico (como una enzima, hormona o antígeno) para la macromolécula de interés a un soporte sólido (o portador). Esto inmoviliza los ligando sólo la interacción recíproca con moléculas que pueden ligar selectivamente a él. Moléculas que no ligan al eluato no lo retienen. El compuesto retenido puede soltarse después en estado puro.

Agarosa: Es un polisacárido de alto peso molecular usado como un medio para separaciones biocromatográficas. Se usa con frecuencia en cromatografía en filtración por gel con fases móviles acuosas.

Altura Equivalente a un Plato Teórico (H): Otra medida de la eficiencia de una columna es la altura equivalente a un plato teórico (H). Esta se calcula usando la Ecuación y usualmente se reporta en mm.

$$H = L / N$$

L = longitud de columna (mm)

N = número de platos teóricos

Alúmina: Es un adsorbente usado a veces en cromatografía de adsorción. Óxido de aluminio (Al_2O_3) es un adsorbente poroso que está disponible con una superficie ligeramente básica. Por esta razón, puede tener ventajas sobre la sílica que se considera que tiene una superficie ácida.

Analito: Compuesto químico a se caracterizado y cuantificado en una muestra

Asimetría: Es un factor que describe la forma de una cresta del cromatograma. La teoría asume una forma de cresta gaussiana que es simétrica. El factor de asimetría de cresta es la proporción (a 10 por ciento de la altura de la cresta) de la distancia entre el ápice de la cresta y la parte de atrás está al lado de la curva del cromatograma a la distancia entre el ápice de la cresta y el lado delantero de la curva del cromatograma. Un valor >1 es una cresta yendo detrás de, mientras un valor <1 es una cresta afrontando.

Asimetría de Pico: Una medida de la imperfección de la forma del pico, debe ser lo más cercano a una curva gaussiana perfecta.

Bomba: Las bombas de CLAR impulsan la fase móvil proveniente del reservorio de solvente hacia el inyector y desde allí hacia la columna. Su caudal de trabajo puede ser muy variable, según la escala de trabajo escogido. Básicamente existen dos tipos de bombas; las de pistón (bombas recíprocas) y las de desplazamiento continuo (bombas jeringa). Las primeras son las de uso más difundido son muy versátiles y fáciles de adaptar a la rutina del laboratorio. Las segundas no emiten pulsos en la entrega del solvente.

Columna: Es el lugar donde ocurre la separación. Se dice que es el corazón de un cromatógrafo. Los materiales con los cuales generalmente se pueden elaborar las columnas son: cobre, aluminio, acero inoxidable, vidrio o teflón. El relleno puede ser un sólido, o un líquido recubriendo un sólido. Podemos clasificar las columnas según el propósito del proceso cromatográfico: Analíticas o Preparativas

Cromatografía: Es la técnica para separar los componentes o solutos de una mezcla sobre la base de las cantidades relativas de cada soluto, distribuidos entre un fluido que se mueve, llamado la fase móvil, y una fase estacionaria adyacente. La fase móvil puede ser un líquido, un gas o un fluido supercrítico, mientras que la fase estacionaria puede ser un líquido o un sólido.

Cromatograma: Es un gráfico en el que se representa la respuesta del detector en función del tiempo de elución.

Corrosión: Reacción química o electroquímica entre un metal y su medio ambiente.

Deriva: La deriva es un cambio continuo (positivo o negativo) en la entrega de solvente que se produce en intervalos de tiempos muy largos (típicamente durante horas). La deriva en el caudal conduce a diferencias en las áreas de los picos durante operaciones automáticas en períodos de tiempos muy largos (por ejemplo toda la noche). Para minimizar el efecto de la deriva sobre los resultados cuantitativos se suele efectuar una nueva calibración del instrumento en estándares apropiados luego de la inyección de cada serie de 5 ó 10 muestras.

Deriva de la línea base: Desviación gradual de la línea base en un período de tiempo determinada, debida al ruido electrónico del equipo, condiciones ambientales y condiciones de análisis.

Detector: Es la parte del equipo cromatográfico que permite "ver" y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica.

Detector de Índice de Refracción: Este detector mide la diferencia de índice de refracción entre el solvente puro y el solvente que contiene la muestra. Es un detector universal. Es muy poco sensible, lo cual limita su campo de aplicación y es muy afectado por cambios en la temperatura.

Detector UV: Es el detector más empleado en CLAR. Posee buena sensibilidad y rango lineal, y permite detectar analitos en el orden de los nanogramos. No es destructivo y puede emplearse con gradientes de solventes, con la única limitación de que éstos sean transparentes en la longitud de onda de trabajo. Es muy poco sensible a los cambios de

caudal y de temperatura. Existen dos tipos de detectores UV; los de longitud de onda fija y los de longitud de onda variable.

Detector de Onda Fija o Fotométrico: Este detector opera a longitudes de ondas prefijadas, determinadas por las líneas de emisión de su lámpara, habitualmente de mercurio de baja presión. Como la longitud de onda de trabajo se utilizan las bandas de emisión de la lámpara de Hg, especialmente la fuente línea de 254 nm.

Detector de Onda Fija o Fotométrico: Este detector es simplemente un espectrofotómetro, en el cual se reemplaza el compartimento de cubetas por una celda de flujo. Es mucho más versátil que el detector de longitud de onda fija, ya que al tener red de difracción permite seleccionar libremente la longitud de onda de trabajo. Escogiendo así la longitud de onda de máxima absorción del analito para aumentar la sensibilidad de medición.

Desgasificación: Es el proceso de remover el gas disuelto en la fase móvil antes o durante su uso. El gas disuelto en la solución puede llegar a la celda del detector y causar picos en la línea base y ruido. La desgasificación se puede llevar a cabo por: calentamiento de solvente, por vacío, burbujeo de helio, etc.

Diodos: Dispositivos fotosensibles que transforma la información luminosa (absorbancia a cada una de las longitudes de onda del intervalo) en una señal eléctrica, cada uno de ellos proporciona una señal.

Disolución: Mezcla homogénea de partículas en una fase dispersa, formada por diferentes componentes, que pueden separarse de ella por métodos físicos pero su apariencia es totalmente uniforme. El componente que está en exceso se conoce como disolvente. El componente o los componentes que se encuentran en menor proporción se llaman solutos.

Disolvente de alta fuerza de elución: Es el solvente con que la columna se puede lavar para eliminar los posibles analitos retenidos con el tiempo y liberar los sitios activos que ellos ocupan, que la fase móvil en uso no tiene la "fuerza" (afinidad) para hacerlo. Así, el disolvente de alta fuerza de elución se elige de acuerdo a las características de la columna y debe de tener mayor afinidad por los analitos que la propia columna

Especificidad: Habilidad de un método para cuantificar exactamente y de manera exclusiva los principios activos en presencia de los componentes de la muestra (impurezas, componentes endógenos de la matriz biológica, metabolitos, excipientes), el método debe separar y cuantificar sólo los compuestos de interés.

Estándar de referencia: Son productos de uniformidad conocida, destinados para utilizarse en comprobaciones analíticas físicas, químicas o microbiológicas, cuya evaluación se basa en la comparación de sus propiedades con respecto a la sustancia que está en examen. Su finalidad es disminuir errores en el laboratorio.

Eluato: Es la combinación de la fase móvil y el solvente que sale de la columna.

Eluente: Es la fase móvil usada para llevar a cabo la separación

Exactitud: Grado de concordancia entre el resultado y un valor de referencia certificado. En ausencia de exactitud se tiene error sistemático.

Extracción: Es una técnica de separación que usa dos fases inmiscibles para separar un soluto de una fase dentro de la otra.

Factor de coleo o asimetría: Es una expresión que nos indica la asimetría de un pico.

F calculada: Valor calculado estadísticamente para comparación entre variancias.

Factor de Retención (k): El Factor de Retención (k) es otra medida de la retención. Es la relación de tiempo que gasta el soluto en las fases estacionaria y móvil. Se calcula utilizando la Ecuación.

$$k = (t_R \cdot t_M) / t_M = t'R / t_M$$

t_R = Tiempo de Retención

$t'R$ = Tiempo de Retención Ajustado

t_M = Tiempo de Retención de un soluto no retenido

Factor de Separación (a): El factor de Separación es una medida del tiempo o distancia entre el máximo de dos picos. Se calcula utilizando la Ecuación.

$$a = k_2 / k_1$$

k_1 = factor de retención para el primer pico

k_2 = factor de retención para el segundo pico

Fase normal: Proceso cromatográfico que se caracteriza por la naturaleza no polar del lecho estacionario (fase estacionaria) y la naturaleza polar de la fase móvil.

Fase normal: Proceso cromatográfico que se caracteriza por la naturaleza polar del lecho estacionario (fase estacionaria) y la naturaleza polar de la fase móvil.

Filtración: El procedimiento de Filtración consiste en retener partículas sólidas por medio de una barrera, la cual puede consistir de mallas, fibras, material poroso o un relleno sólido.

Fluorescencia: Luminiscencia presentada por ciertas sustancias después de haber sido iluminadas por rayos visibles o UV, cuya luminiscencia persiste después de haber cesado la radiación excitante.

Fosforescencia: Luminiscencia presentada por ciertas sustancias después de haber sido iluminadas por rayos visibles o UV.

Gasto en Volumen: Indica cuántos mililitros de solvente por minuto recorren la columna. Es el volumen de solvente que pasa por la columna por unidad de tiempo.

Gel: Es un empaque sólido usado en cromatografía de permeación de gel. Una gel realmente consiste en dos partes: el medio dispersivo (porción sólida) y el medio dispersante (el solvente).

Gradiente de elución: Es una técnica donde disminuye el tiempo de la separación aumentando la fuerza de la fase móvil contra el tiempo durante una separación cromatográfica. También es conocido como gradiente de solvente. Se usan solventes binarios, ternarios, y cuaternarios rutinariamente en CLAR.

Guardacolumna: Es una columna pequeña que se coloca entre el inyector y la columna analítica. Protege a la columna analítica contra la contaminación de partículas de la muestra, y por especies fuertemente retenidas. La guardacolumna normalmente contiene el mismo material de la columna analítica y es a menudo del mismo diámetro interno, es mucho más corta, cuesta menos, y normalmente se desecha cuando se contamina.

Intercambio iónico: Tipo de separación cromatográfica en donde la fase estacionaria es un intercambiador iónico.

Inyector: El inyector es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el caudal de solvente a través del sistema.

Límite de detección: Concentración correspondiente a una señal de magnitud igual al blanco más tres veces la desviación estándar del blanco.

Línea base: Gráfico obtenido de la señal que emite un detector cuando se le hace pasar por un período de tiempo determinado sólo la fase móvil bajo las condiciones de análisis.

Linealidad: La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o mediante una transformación matemática, son directamente proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado. Es decir, mide el grado en que la respuesta del método se aproxima a una función lineal del tipo $y = mx + b$ al trabajar con diferentes concentraciones.

Límite de detección: Es la concentración mínima de analito en una muestra que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud en matriz de muestras tales como impurezas en el caso de materias primas (principios activos), o productos de degradación en productos farmacéuticos finales. Bajo condiciones normales de operación.

Matriz: Se refiere a todos los componentes de la muestra excepto el analito o los analitos de interés.

Métodos de análisis: Se basaban en propiedades químicas del analito. Se incluyen las gravimetrías, las volumetrías y los métodos de análisis cualitativo clásico.

Métodos instrumentales: Basados en propiedades químico-físicas. La clasificación de los métodos instrumentales se realiza en base a la propiedad que se mide (espectroscópicos, electroanalíticos, térmicos, etc.)

Métodos de separación: Se incluyen en este grupo los métodos cuya finalidad es la separación de compuestos para eliminar las interferencias y facilitar las medidas

Número de platos teóricos: El Número de platos teóricos es una medida indirecta del ancho del pico para un pico a un tiempo de retención específico. Las columnas con un alto número de platos teóricos son consideradas por ser más eficientes (esto es, columnas más eficientes) que aquellas con un número más bajo de platos teóricos.

Partición: En cromatografía, es la separación de componentes de una muestra por afinidad química o física en dos fases (fase móvil y fase estacionaria).

Plato teórico (N): La región en la que la concentración del soluto se encuentra en equilibrio entre las dos fases (estacionaria y móvil).

Polaridad de la fase móvil: Característica fisicoquímica del disolvente empleado como fase móvil, dada por la concentración de moléculas disociadas en iones con carga eléctrica y la electronegatividad de los mismos.

Precisión: Grado de concordancia entre los datos obtenidos de una serie. Refleja el efecto de los errores aleatorios producidos durante el proceso analítico.

Puente de Hidrógeno: Atracción Intermolecular que se presenta entre Moléculas en las cuales el Hidrogeno está unido a un átomo pequeño altamente electronegativo (que tiende a atraer electrones, generalmente N, O y F).

Puntos críticos: Aspectos que afectan directamente o indirectamente los resultados analíticos del laboratorio.

Quimisorción: Es la sorción causada por una reacción química con el empaque. Tal como interacciones irreversibles; ocurre usualmente sobre empaques en reactivos con grupos funcionales tal como; silanol o fases amino enlazadas.

Reservorio: Es el recipiente que contiene la fase móvil. Puede ubicarse "dentro de la caja negra" de un equipo integrado o extremadamente en un equipo modular.

Resolución: Es una medida de la eficiencia que tiene la columna para separar dos compuestos.

Reproducibilidad: Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas en diferentes laboratorios, bajo condiciones diferentes (analista, tiempo, equipo).

Robustez: Es sólo parte integral del amortiguamiento contra excesos típicos, esto es, contra diferentes técnicas, equipo y condiciones.

Ruido: Señal eléctrica adicional que afecta la línea base.

Selectividad: Cuantifica el grado de ausencia de interferencias debidas a otras especies contenidas en la matriz.

Seguridad: Amplitud de condiciones experimentales en las que puede realizarse un análisis.

Sensibilidad: Capacidad para discriminar entre pequeñas diferencias de concentración del analito. Se evalúa mediante la sensibilidad de calibración, que es la pendiente de la curva de calibración a la concentración de interés.

Solución Saturada: Solución cuya concentración es la Solubilidad del Solute

Solución No-Saturada: Solución cuya concentración es menor que la Solubilidad del Solute.

Solución Sobre Saturada: Solución cuya concentración es mayor que la Solubilidad del Solute (es un sistema inestable)

Solubilidad: Concentración Máxima de Solute en una Solución a una temperatura dada.

Tiempo de Retención: El tiempo de Retención (t_R) es el tiempo que toma un soluto en recorrer toda la columna.

Tolerancia del sistema: Es una medida de la capacidad del procedimiento analítico para no ser determinada con aceptable precisión y exactitud en matriz de muestras, tales como impurezas en el caso de materias primas (principios activos), o productos de degradación en productos farmacéuticos finales. Bajo condiciones normales de operación.

Unión Covalente: Enlace químico ordinario entre átomos, cada uno de los cuales cede un electrón al par compartido.

Verificación: Proceso que tiene como objetivo examinar si un resultado de medición es consistente con el valor de referencia correspondiente, a la diferencia observada se le realiza una prueba de significancia contra la incertidumbre relevante, típicamente corresponde una combinación de las incertidumbres en los resultados de la medición y con el valor de referencia Usando pruebas estadísticas apropiadas, esta prueba de significancia puede ser organizada como de un solo nivel o multiniveles.

Xerogel: Gel que es usado en cromatografía de exclusión molecular. Tiene la excelente capacidad de encogerse en diferentes solventes

Zwitterion: Compuesto que lleva ambas cargas positiva y negativa en una solución.

BIBLIOGRAFIA

1. Bahena T. P. "Fluidiza. Desarrollo de un Sistema Computacional Multimedia para Explicar el Proceso de Fluidización Aplicado a la Farmacia Industrial" ; Tesis de Licenciatura; FES Cuatitlán UNAM; Cuatitlán Izcalli Edo. de México; 1998.
2. Bartolomé, A. "Multimedia interactivo y sus posibilidades en educación". Ed. Pixel-Bit, 1994, p 5-14.
3. Brown, R. P y Grushka, E. "Advances in Chromatography". Vol. 33, New York, 1993, pp. 37-41.
4. Burns, A. "Multimedia as a Quality Solution"; *Quality Progress*; february 1997; pp 51-54.
5. Jiménez, J. R. "Manual de Buenas Prácticas de Manufactura en un Sistema Multimedia"; Tesis de Licenciatura; FES Cuatitlán UNAM; Cuatitlán Izcalli Edo. de México; 1998., pp. 87-91.
6. Karger, B., Snyder, L. and Horvath, C. "Introduction to Separation Science". Ed Wiley 1973, p 586.
7. Manual de Operación "Millennium Software User's Guide". Volumen1. Waters, 1994.
8. Manual de Operación "Quick Reference Guide". Waters, 1994.
9. Manual de Operación "Waters 717 plus Autosampler". Waters, 1993.
10. Manual de Operación "Waters 996 Photodiode Array Detector". Waters, 1994
11. Manual de Operación "Waters 616 LC System". Waters, 1993.
12. Monsalvo, R. M. "Proyecto Mezclado. Sistema Multimedia para Apoyar la Enseñanza de la tecnología Farmacéutica"; Tesis de Licenciatura; FES Cuatitlán UNAM; Cuatitlán Izcalli Edo. de México; 1998., pp. 135
13. Mota, J. C. "Introducción a Toolbook y Multimedia Toolbook 3". Ed. RA-MA, Madrid 1996, pp. 1-4 y 51-54.
14. Narvaez, A. M. "Elaboración de un Sistema Computacional Multimedia Sobre Disolución de Polvos y Tabletas"; Tesis de Licenciatura; FES Cuatitlán UNAM; Cuatitlán Izcalli Edo. de México; 2000., pp. 126-154
15. Osuna, A. M "Memorias de un Desempeño Profesional: Buenas Prácticas de Laboratorio en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución". FES Cuatitlán Campo1, 1997, pp. 4-54
16. Pickering, W.F "Química Analítica Moderna". Ed. Reverté, España 1976, pp. 653-661.
17. Pool, C and Poole S. "Chromatography Today". Elsevier, 1991, pp 1026.

-
18. Quattrocchi, O. , Abelaira, A. y Laba, R. "Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica". Ed. Farro, Buenos Aires, Argentina 1992, pp. 1-15.
 19. Riquelme, A. G. "Información y Métodos de Diseño de Productos Informáticos Computaciones"; Tesis de Maestría; IPN, México, D.F., 1995, pp. 92
 20. Rivera, G. P. "Clataxon: una Propuesta en Multimedia para la enseñanza de la Taxonomía de Insectos"; Tesis de Maestría; IPN, México, D.F., 1997, pp. 43-61
 21. Rivera, G. P.; Cervantes, S. A.; Landois, P. L. "Multimedia, texto, animación, sonido y video en computadoras personales". Tópicos de Investigación y Posgrado; Vol. 3, No. 4, 1994, pp 7-13.
 22. Rosch, W. L. "Todo Sobre Multimedia". Ed. Prentice Hall Hispanoamericana, 1996, pp. 3-14, 22-32 y 93.
 23. Snyder L. And Kirkland, J., "Introduction to Modern Liquid Chromatography". Ed. J. Willwey, 2º ed. New York 1979, pp. 4-10.
 24. Valcárcel, M y Gómez, A. "Técnicas Analíticas de Separación". Ed Reverté, España 1988, pp. 133-385 y 485-531.

REFERENCIAS

1. <http://www.waters.com/>
2. <http://www.redhucyt.oas.org/RLQ/tutoriales/cromatografía/hplc.htm>
3. <http://www.uib.es/depart/gte/becape.html>
4. <http://kerouac.pharm.uky.edu/asrg/hplc/troubleshooting.html>
5. <http://matematicas.Udea.edu.co/~carlopez/index.html>
6. http://www.cgcmag.com/articles/0005_articles/0005_sampleprep/0500_sampleprep.html
7. <http://www.corbis.com>
8. <http://www.dkv.com.ve/asymetrix/tbiiins.htm>
9. <http://www.canaldinamic.es/PCMANIA/PC037/AE/TOOL/pc037032answtool.html>
10. <http://coqui.lce.org/acarabal/ponencia.htm>
11. <http://www.sep.gob.mx/cete/publi.htm>
12. <http://www.gda.itesm.mx>
13. <http://msip.lce.org/erporto/libros/edu2/capi1.html>

-
14. <http://www.galbraith.com/contact.html>
 15. <http://www.battelle.org/polymer/material.htm>
 16. <http://hemeroteca.icfes.gov.co/revistas/recolqui/972601/97260104art.html>
 17. <http://www.scimedia.com/chem-ed/sep/gc/gc-col.htm>
 18. <http://www.keystonescientific.com/index.htm>
 19. <http://www.ur.mx/cursos/diya/quimica/jescobed/defcap1.htm#boil>
 20. <http://kerouac.pharm.uky.edu/asrg/hplc/troubleshooting.html>
 21. http://www.waters.com/menu.cfm.link=/Waters_Website/query.htm
 22. http://www.Glossary/df_ret.html#reversed-phase.chromatography
 23. <http://www.gda.itesm.mx>