

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 506**

51 Int. Cl.:

G01N 30/36 (2006.01)

B01D 15/20 (2006.01)

G01N 30/54 (2006.01)

B01D 15/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.03.2015** **PCT/EP2015/055997**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2015** **WO15140326**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2015** **E 15717816 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018** **EP 3120140**

54 Título: **Procedimiento y aparato para el equilibrado de una columna de cromatografía empaquetada**

30 Prioridad:

21.03.2014 SE 1450333

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.04.2019

73 Titular/es:

BIOTAGE AB (100.0%)
P.O. Box 8
751 03 Uppsala, SE

72 Inventor/es:

RANA, SUNIL;
JORDAN, STEVE y
DAVIES, GEOFF

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 707 506 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento y aparato para el equilibrado de una columna de cromatografía empaquetada

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a cromatografía líquida y más específicamente a la cromatografía *flash* donde es usada la alta presión para impulsar un líquido a través de la columna de cromatografía.

10 **Antecedentes**

La cromatografía de alta presión (HPLC, de sus siglas en inglés) es un modo de cromatografía bien conocido donde se utiliza un líquido presurizado para impulsar una muestra a través de una columna de cromatografía empaquetada con un medio de partícula adecuada, conocido como la fase estacionaria. La cromatografía *flash* difiere de la HPLC preparativa en que se utilizan partículas mayores para permitir aplicaciones rápidas, estando el tamaño habitual de las partículas en un amplio intervalo de 20 a 60 μm . Las columnas pueden ser tubos o jeringas relativamente simples y fabricados en varios materiales, tales como vidrio, cuarzo o acero inoxidable. Está resultando frecuente el uso de materiales poliméricos en columnas preempaquetadas para la construcción de las columnas o fritas proporcionadas en cada extremo para impedir que salga el medio.

Antes de realizar la separación cromatográfica, deberían garantizarse condiciones uniformes por todo el empaquetado de la columna. Esto se soluciona normalmente mediante la utilización de una fase móvil adecuada tal como un disolvente o un tampón a través de la columna, cuyo proceso es conocido como el equilibrado o acondicionado de una columna empaquetada. Dado que la cromatografía *flash* se utiliza principalmente en aplicaciones rápidas, la etapa de equilibrado se realiza ventajosamente con la mayor presteza posible, p. ej., con el uso de unos pocos volúmenes de columna de fase móvil y/ o altos caudales.

Grivel et al. (In J Chromatogr A 2010 Jan 22; 1217(4):459-72: «La selección de condiciones operativas adecuadas para minimizar el tiempo de equilibrado de gradiente en la separación de fármacos mediante cromatografía líquida de presión ultra-alta (con tampones (compatibles con la espectrometría de masas)) se relaciona con la cromatografía de fase inversa. Más específicamente, este artículo ha dado cuenta de que los problemas se asocian con largos tiempos de equilibrado en la cromatografía *flash*, y presenta un estudio sobre la variación de temperatura, los diferentes caudales y los diversos aditivos que se relacionan con la fase móvil usada para el equilibrado. Al tiempo que se extraen ciertas conclusiones respecto a la variabilidad de retención y a aditivos de equilibrado específico, estos autores también concluyen que los mecanismos que gobiernan el equilibrado siguen siendo muy complejos y que será necesario mucho más trabajo.

La US 6.601.439 («Method of reducing baseline instabilities in liquid chromatography measurements and liquid chromatography apparatus») se refiere a la cromatografía de alto rendimiento (HPLC) y a sus problemas asociados con variaciones a partir de la referencia inicial, y específicamente respecto a las inestabilidades en conexión con las fases estacionarias funcionalizadas de amino. La patente '439 describe cómo se ha descubierto que las variaciones a partir de la referencia inicial provenientes de variaciones en la adsorción de agua con respecto a la fase estacionaria se encuentran relacionadas con fluctuaciones de temperatura. De acuerdo con esta patente, los problemas se reducen mediante el emparejamiento de un cuerpo sólido o baño líquido que posea una alta capacidad calorífica, además de una alta conductancia con la columna para albergar el equipo.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere al equilibrado de columnas de cromatografía, y específicamente a los problemas que surgen cuando se aumentan los caudales. Por ejemplo, se ha descubierto que durante el equilibrado de empaquetados de partículas porosas que exhiben amplias áreas de superficies disponibles, el calor generado mediante reacciones exotérmicas implicado en el equilibrado puede dañar las fritas de polietileno de las columnas de cromatografía.

Los autores de la presente invención han descubierto una forma de manejar y/ o controlar el calor generado durante las reacciones exotérmicas y comúnmente implicadas en el equilibrado del empaquetado de columnas, en el que pueden utilizarse altos caudales sin ningún impacto negativo sobre el empaquetado o la integridad de la columna.

Así, la presente invención se refiere a nuevos hallazgos que permiten la agilización del tiempo total en el procesamiento de una muestra en, por ejemplo, la cromatografía *flash*. Esto puede lograrse gracias a la combinación de disolventes en una etapa de equilibrado de gradiente.

La invención se refiere a un procedimiento para controlar el calor generado durante el equilibrado de una columna de cromatografía empaquetada de acuerdo con la reivindicación 1.

En una realización ventajosa, la columna de cromatografía empaquetada es una columna de cromatografía *flash*.

El procedimiento puede automatizarse ventajosamente.

- 5 Otras realizaciones, combinaciones de las realizaciones, así como ejemplos de la invención se mostrarán a partir de la siguiente descripción detallada.

Definiciones

- 10 El término «equilibrado» se usa en el presente documento como es usado convencionalmente en este ámbito, por ejemplo, para el procedimiento de lograr un punto donde el pH, la conductividad y la UV, cuantificadas en la salida de la columna, se muestren idénticas a los valores respectivos del tampón aplicado.

Breve descripción de los dibujos

- 15 La Figura 1(a) muestra un equilibrado isocrático de cartuchos SNAP Ultra de 25 g (Biotage) en una proporción 50:50 de heptano de v/v: con un % de acetato de etilo; 1 % de carga; una mezcla de 3 componentes; con un caudal predeterminado de 25 ml/min.
- 20 La Figura 1(b) muestra un equilibrado de gradiente de acuerdo con la invención, tal como se describe en el Ejemplo 1, usando de nuevo cartuchos SNAP Ultra de 25 g (Biotage), con un % de acetato de etilo al 50%, 1 % de carga y una mezcla de 3 componentes con un caudal de 200 ml/min.
- La Figura 2(a) muestra un equilibrado isocrático de cartuchos SNAP Ultra de 50g (Biotage) en una proporción 50:50 de heptano de v/v: con un % de acetato de etilo; 1 % de carga; una mezcla de 3 componentes; con un caudal predeterminado de 50 ml/min. El tiempo de equilibrado fue de 8,05 minutos.
- 25 La Figura 2(b) muestra un equilibrado de gradiente de acuerdo con la invención, tal como se describe en el Ejemplo 1, de nuevo usando cartuchos SNAP Ultra de 50 g (Biotage), con un % de acetato de etilo al 50%; 1 % de carga, una mezcla de 3 componentes y con un caudal de 200 ml/minutos.

Descripción detallada de la invención

- 30 En un primer aspecto de la descripción, sin formar parte de la invención, se indica un procedimiento para el equilibrado de una columna de cromatografía que comprende las etapas de (i) proporcionar una columna de cromatografía empaquetada; y (ii) hacer pasar una fase móvil presurizada a través de dicha columna; donde la fase móvil se obtiene mediante la combinación de, al menos, dos líquidos, cuyas proporciones varían a medida que la fase móvil atraviesa la columna.

- En una realización ventajosa, la variación de los, al menos, dos líquidos mencionados, se logra gracias a la combinación de una proporción creciente de un líquido y una proporción decreciente de otro líquido para originar un gradiente lineal en la fase móvil, a medida que atraviesa la columna. Los autores de la presente invención han descubierto que el gradiente lineal puede ajustarse para mantener una generación de calor aceptable, incluso con los caudales más elevados y preferidos, los cuales sin el gradiente dañarían o incluso, destruirían o degradarían los elementos de componentes tales como las fritas fabricadas con materiales poliméricos.

- 40 El equipo y las metodologías para generar gradientes de fases móviles se encuentran en el mercado orientadas a la etapa de elución, y componentes tales como recipientes de reactivos, bombas y tuberías pueden ser fácilmente configuradas y ajustadas por la persona experta para proporcionar un gradiente de equilibrado de acuerdo con la invención.

- Como apreciará la persona experta, la fase móvil puede diferir en su composición dependiendo de la sustancia objetivo de la muestra a purificar; el empaquetado de cromatografía usado; el modo de adsorción de la sustancia objetivo en relación con el empaquetado, etc.; y puede incluir un sistema multidisolvente en el que los diversos componentes del disolvente se mezclen en, al menos, los intervalos de concentración que se usarán para la separación subsiguiente. En una realización, los líquidos usados son disolventes seleccionados de entre el grupo formado de metanol, etanol, 2-propanol, acetonitrilo, acetato de etilo, tetrahidrofurano, acetona, diclorometano, cloroformo, éter dietílico, tolueno y hexano. Mientras que en la mayoría de los aspectos se espera que un sistema de líquidos binario adecuado proporcione resultados satisfactorios, como apreciarán aquellas personas expertas en la materia, el procedimiento de acuerdo con la invención puede adaptarse para incluir más de dos líquidos. Independientemente de cómo se incorporan muchos líquidos en la fase móvil, las concentraciones relativas de los líquidos usados para formar la fase móvil deben seleccionarse para garantizar que el calor generado por el equilibrado realizado no superará un valor que implique la consecución de un impacto negativo en los componentes usados.

Así, en una realización, al menos uno de los líquidos es un disolvente orgánico, tal como acetato de etilo y/ o hexano. En una realización ventajosa, el equilibrado se inicia con un 0 % en un primer líquido, tal como acetato de

etilo, y con un 100 % en un segundo líquido, tal como hexano. La proporción de acetato de etilo es posteriormente aumentada en la fase móvil suponiendo la correspondiente disminución en la proporción de hexano hasta la consecución de una composición equivalente a la composición del disolvente de la muestra a determinarse. El aumento puede ser escalonado y lineal, en una realización ventajosa, el gradiente es lineal.

Tal como se indicó anteriormente, la presente invención permite el uso de caudales durante el equilibrado el cual si careciera del uso de un gradiente dañaría el empaquetado y/ o los elementos debido a la generación de calor. Así, en una realización, la fase móvil pasa a través de la columna con un caudal de hasta 200 ml/min, estando dicho caudal en el intervalo de 50 a 100 ml/min. La persona experta será capaz fácilmente de determinar el caudal más elevado posible, o el caudal óptimo, mediante un simple análisis.

La columna de cromatografía de acuerdo con la invención puede empaquetarse con cualquier medio de cromatografía usado comúnmente, a veces denotado como material de adsorción. Una columna habitual para la cromatografía *flash* puede ser un cartucho que tenga un diámetro de aproximadamente 1 a 20 cm. En una realización ventajosa, la columna se empaqueta con un medio inorgánico, tal como sílice, gel de sílice, alúmina o tierra de diatomeas. Los cartuchos empaquetados con sílice, por ejemplo para cromatografía *flash*, se encuentran disponibles comercialmente gracias a, por ejemplo, Biotage.

En una realización del presente procedimiento, el área de superficie del empaquetado disponible para la fase móvil es de, al menos, 500 m²/g (peso en seco). Un ejemplo de un empaquetado adecuado es KP-Sil (Biotage), que consiste en sílice irregular con un área superficial estándar de 500 m²/g. En una realización específica, el área superficial disponible para la fase móvil es de, al menos, 700 m²/g, tal como en el intervalo de 700 a 800 m²/g. Un ejemplo ilustrativo de un medio de cromatografía usado ventajosamente con el procedimiento y de acuerdo con la invención es el empaquetado de cartuchos flash SNAP ULTRA de Biotage. Con una área superficial de 700 m²/g.

Tanto la columna como otros elementos usados pueden ser de cualquier material utilizado comúnmente, tal como materiales poliméricos que presenten cierta sensibilidad al calor en caso de que la temperatura se eleve por encima de los valores estándar. Así, en una realización, la columna y/ o las fritas de columna están hechas de material polimérico, tal como polipropileno o polietileno, donde al menos un elemento está fabricado de un material que posee sensibilidad limitada al calor. La columna usada es, a menudo, un cartucho preempaquetado con partículas de sílice, tal como el SNAP ULTRA de Biotage.

En un segundo aspecto de la descripción, que forma la invención, se proporciona un procedimiento para controlar y/ o evitar el exceso de calor generado durante el equilibrado de una columna de cromatografía empaquetada. En el procedimiento presente, el tamaño y material de la columna, junto con el tamaño de la partícula y el área superficial del empaquetado, son usados como parámetros para definir un gradiente líquido adecuado para un equilibrado previsto. Con el uso del procedimiento presente, se determina un caudal que permite los caudales más eficientes posibles en un proceso de equilibrado y sin superar una temperatura predeterminada en el empaquetado y/ o los componentes. Así, este aspecto de la invención puede usarse para diseñar las condiciones de procesamiento más adecuadas u óptimas que, a su vez, permitan un equilibrado rápido y, con ello, la disminución del tiempo total de procesamiento de un procedimiento determinado de cromatografía.

En un tercer aspecto de la descripción, que no forma parte de la invención, se proporciona un programa de ordenador que es capaz de realizar el procedimiento de acuerdo con la invención.

En un cuarto aspecto que no forma parte de la invención, la descripción proporciona un sistema de cromatografía que comprende, al menos, una columna de cromatografía empaquetada; recipientes para muestras y reactivos; y tubos para hacer que pase uno o más líquidos entre el/los recipiente(s) y la(s) columna(s); siendo este sistema capaz de controlar el calor generado por las reacciones exotérmicas que tienen lugar durante el equilibrado. El presente sistema se usa ventajosamente con un procedimiento de acuerdo con el primer aspecto de la descripción.

En una realización, el sistema además comprende un equipo para análisis de una o más sustancias objetivo separadas de los otros componentes de una muestra en la columna de cromatografía, preferentemente un equipo para la detección de masa (MS, siglas en inglés), tal como un detector de masa. En realizaciones alternativas, el detector es un detector de UV/VIS, un detector de ionización de llama, un detector por infrarrojos o cualquier otro detector adecuado para combinar con la cromatografía *flash*. El sistema puede automatizarse ventajosamente. En una realización, el sistema es un sistema de cromatografía *flash*, que permite el muestreo inteligente ya que proporciona al detector de masa una cantidad apropiada de material a partir de la ejecución *flash*.

En una realización, el sistema se ajusta automáticamente a cambios en el caudal *flash* cuando se usan diferentes tipos o tamaños de cartuchos. Gracias al equilibrado optimizado de acuerdo con la invención, tal sistema proporciona una separación más rápida de las muestras para su purificación.

EXPERIMENTACIÓN

Los ejemplos presentes se proporcionan con propósitos únicamente ilustrativos, y en ningún sentido deben ser interpretados como limitantes de la presente invención.

Materiales y procedimientos

Más adelante, se han utilizado SNAP/ZIP Gradient Equilibration y PD0170 Isolera High Performance Upgrade. La abreviatura «VC» se utilizará, a continuación, para denotar el 'volumen de columna', tal como es ampliamente usado en el campo de la cromatografía.

El objetivo de los ejemplos consistió en determinar la viabilidad del empleo de un equilibrado de gradiente como medio para negar el efecto del 'calor de hidratación' cuando se equilibran las columnas SNAP Ultra en un intervalo de formato de 10 g a 340 g y con las columnas ZIP Sphere en dicho intervalo de 5 g a 120 g al usar fases móviles isocráticas que contienen de un 30 % a un 50 % de acetato de etilo con caudales elevados (mayores que los predeterminadas).

Parte experimental

- Las evaluaciones se llevaron a cabo en columnas estándar SNAP y SNAP Ultra (Biotage) de 340 g, 100 g, 50 g, 25 g y 10 g.
- Con formatos ZIP y ZIP Sphere de 10 g, 30 g, 45 g, 80 g y 120 g.
- Datos de caudal máximo para todos los formatos y para referencia del caudal

Cada configuración fue equilibrada hasta una combinación de disolvente final de heptano:acetato de etilo en proporción 70:30 v/v y fase móvil en proporción 50:50 con caudales elevados.

Resultados: Viabilidad

Todas las evaluaciones se interpretaron para abarcar un intervalo de equilibrado de VC de 3 a 5 VC en cada intervalo de columna seleccionado.

Gradiente 1

A: Heptano	B: Acetato de etilo	VC
	De A a B - de 10 a 30	2
	Mantenido en 30	2

Gradiente 2

A: Heptano	B: % Acetato de etilo	VC
	De A a B - de 10 a 30	2,5
	Mantenido en 30	2

Gradiente 3

A: Heptano	B: % Acetato de etilo	VC
	10	1
	De 10 a 50	2
	Mantenido en 50	2

Actualización de tabla de caudal para ZIP, SNAP, ZIP Sphere, SNAP Ultra, todos los tamaños disponibles estándar. Basado en directrices de equilibrado predeterminadas no modificadas y tamaños de 340 g, usando una concentración estándar de acetato de etilo del 7 %.

- N=5 para cada formato. Resultado promediado.

- El caudal se aumentó gradualmente hasta un flujo máx. justo por debajo del límite de presión registrado y seguro para cada tipo de formato. El flujo máx. fue también impuesto por el sistema de procesamiento, siendo en este caso Isolera One con 200 ml/min.

- Contrapresión registrada para cada flujo máx.

Tabla 1

Formato	Medios	Flujo predeterminado en ml/min	Masa del lecho (g)	Caudal máx. en ml/min	Contrapresión (bar)	Índice de presión de columna (bar)
ZIP	KP-Sil	6	5	200	6,0	10
ZIP	Sphere	6	5	170	6,8	7
SNAP	KP-Sil	12	10	200	4,7	7
SNAP	Ultra	12	10	165	6,9	7
ZIP	KP-Sil	12	10	200	6,0	10
ZIP	Sphere	12	10	200	6,9	7

Tabla 2

Formato	Medios	Flujo predeterminado en ml/min	Masa del lecho (g)	Caudal máx. en ml/min	Contrapresión (bar)	Índice de presión de columna (bar)
SNAP	KP-Sil	25	25	200	4,2	7
SNAP	Ultra	25	25	200	6,7	7
ZIP	KP-Sil	20	30	200	5,4	10
ZIP	Sphere	20	30	200	5,6	7

Tabla 3

Formato	Medios	Flujo predeterminado en ml/min	Masa del lecho (g)	Caudal máx. en ml/min	Contrapresión (bar)	Índice de presión de columna (bar)
SNAP	KP-Sil	50	50	200	3,5	7
SNAP	Ultra	50	50	200	5,5	7
ZIP	KP-Sil	30	45	200	4,9	10
ZIP	Sphere	30	45	200	5,0	7

Tabla 4

Formato	Medios	Flujo predeterminado en ml/min	Masa del lecho (g)	Caudal máx. en ml/min	Contrapresión (bar)	Índice de presión de columna (bar)
ZIP	KP-Sil	50	80	200	4,2	8
ZIP	Sphere	50	80	200	4,1	7
SNAP	KP-Sil	50	100	200	4,5	7
SNAP	Ultra	50	100	170	6,8	7
ZIP	KP-Sil	50	120	200	4,6	10
ZIP	Sphere	50	120	200	4,8	7

Tabla 5

Formato	Medios	Flujo predeterminado en ml/min	Masa del lecho (g)	Caudal máx. en ml/min	Contrapresión (bar)	Índice de presión de columna (bar)
SNAP	KP-Sil	100	340	200	3,0	5
SNAP	Ultra	100	340	200	4,4	5

Tabla 6

Formato	Medios	Flujo predeterminado en ml/min	Masa del lecho (g)	Caudal máx. en ml/min	Contrapresión (bar)	Índice de presión de columna (bar)
SNAP	KP-Sil	100	340	500	2,8	5
SNAP	Ultra	100	340	450	4,7	5

El desarrollo del equilibrado de gradiente, según la invención, se basó en algunas evaluaciones precursoras que indicaron el uso de gradientes para eliminar el intenso calor de la hidratación experimentada con todos los formatos que utilizaron altas concentraciones de acetato de etilo con altos caudales.

Ejemplo 1: equilibrado de acuerdo con la invención

El gradiente usado para el equilibrado según la invención tuvo una concentración de acetato de etilo al 50 %.

1 VC al 10-10 %,
2 VC al 10-50 %,
2 VC mantenidos al 50 %.

Según la Tabla 1 siguiente, cabe concluir que un gradiente según la invención permite el acondicionamiento de todos los formatos a caudales máximos determinados con acetato de etilo al 50 %, aunque el volumen para el equilibrado ha aumentado el tiempo de equilibrado frente al (equilibrado) isocrático que ha disminuido aproximadamente un 75 %.

La tabla también compara el tiempo usado para acondicionar los mismos formatos con un % inferior de acetato de etilo (un 7 %) usando los caudales predeterminados para los formatos que utilizan el sistema Isolera de Biotage. Los datos de equilibrado isocrático con % inferior se usaron como comparación ya que el calor de hidratación estaría, en el peor de los casos, con un acetato de etilo al 50 % por debajo de las condiciones isocráticas normales. Las tasas de flujo tuvieron los caudales máximos alcanzables y seguros, determinados previamente para cada formato, debido a que esto representa el escenario del peor caso, es decir, el flujo más elevado y una muy elevada concentración de acetato de etilo para el equilibrado.

Tabla 7: Resultados del Ejemplo 1

Formato	Caudal de equilibrado en ml/min	Número de gradiente	Contrapresión (bares)	Tiempo de equilibrado (min)	Flujo predeterminado (ml/min)	Tiempo de equilibrado isocrático (predeterminado)
SNAP Ultra con 10 g	165	3	6,5	0,51	12	7,08
SNAP Ultra con 25 g	200	3	6,8	1,12	25	9,0
SNAP Ultra con 50 g	200	3	5,5	2,07	50	8,5
SNAP Ultra con 100 g	170	3	6,4	4,52	50	16,4
SNAP Ultra con 340 g	200	3	5,4	14,55	100	29,1
ZIP Sphere con 5 g	170	3	6,4	0,12	6	6,6
ZIP Sphere con 10 g	200	3	6,5	0,21	12	6,5
ZIP Sphere	200	3	5,4	1,04	20	11,2

con 30 g						
ZIP Sphere con 45 g	200	3	4,9	1,20	30	10
ZIP Sphere con 80 g	200	3	4,4	2,32	50	10
ZIP Sphere con 120 g	200	3	5,0	3,35	50	17
SNAP KP-Sil con 10 g	200	3	5,0	0,22	12	6,25
SNAP KP-Sil con 25 g	200	3	4,7	0,47	25	6,6
SNAP KP-Sil con 50 g	200	3	3,8	1,37	50	6,6
SNAP KP-Sil con 100 g	170	3	4,4	3,17	50	13,2
SNAP KP-Sil con 340 g	200	3	3,2	12,75	100	25,5
ZIP KP-Sil con 5 g	170	3	6,1	0,14	6	6,6
ZIP KP-Sil con 10 g	200	3	6,8	0,22	12	6,25
ZIP KP-Sil con 30 g	200	3	5,9	1,07	20	11,25
ZIP KP-Sil con 45 g	200	3	4,9	1,5	30	10
ZIP KP-Sil con 80 g	200	3	4,4	2,32	50	10,2
ZIP KP-Sil con 120 g	200	3	4,3	4,14	50	17

Ejemplo 2: Comparativa

5 El objetivo de este ejemplo fue investigar el efecto en el acondicionamiento de la columna con un caudal predeterminado y usando heptano/AcOEt en una proporción 70/30.

Columnas analizadas con SNAP ULTRA, N=5; 10 g; 25 g; 50 g; 100 g y 340 g.

10 g: caudal predeterminado a 12 ml/min	25 g: caudal predeterminado a 25ml/min
50 g: caudal predeterminado a 50ml/min	100 g: caudal predeterminado a 50ml/min
340 g: caudal predeterminado a 100ml/min	

Los resultados se presentan en las tablas siguientes:

Tabla 8: ejecución isocrática

Columna de 340 g	Caudal	Observaciones	Sobrepresurizado
1: 70/30 heptano/AcOEt	100 ml/min	782 ml anterior a la sobrepresurización	Sí
2: 70/30 heptano/AcOEt	100 ml/min	767 ml anterior a la sobrepresurización	Sí
3: 70/30 heptano/AcOEt	100 ml/min	770 ml anterior a la sobrepresurización	Sí
4: 70/30 heptano/AcOEt	50 ml/min	Acondicionado por 2 volúmenes de columna con presión máx. de 0,8 bar Después de 3 volúmenes de columna el flujo aumentó hasta los 100 ml/min con una presión de 1,7 bares. 150 ml/min, 3 bares. 200 ml/min, 4,2 bares	No
5: 80/20 heptano/AcOEt	100 ml/min	Acondicionado con la presión máxima de 2,1 bares	No

Tabla 9

Columna de 100 g	Caudal	Observaciones	Sobrepresurizado
1	50 ml/min	Acondicionado con la presión máxima de 1,5 bares	No
2	50 ml/min	Acondicionado con la presión máxima de 1,5 bares	No
3	50 ml/min	Acondicionado con la presión máxima de 1,5 bares	No
4	50 ml/min	Acondicionado con la presión máxima de 1,5 bares	No
5	50 ml/min	Acondicionado con la presión máxima de 1,5 bares	No

Tabla 10

Columna de 50 g	Caudal	Observaciones	Sobrepresurizado
1	50 ml/min	Acondicionado con la presión máxima de 1,4 bares	No
2	50 ml/min	Acondicionado con la presión máxima de 1,4 bares	No
3	50 ml/min	Acondicionado con la presión máxima de 1,1 bares	No
4	50 ml/min	Acondicionado con la presión máxima de 1,2 bares	No

Tabla 11

Columna de 25 g	Caudal	Observaciones	Sobrepresurizado
1	25 ml/min	Acondicionado con la presión máxima de 0,7 bares	No
2	25 ml/min	Acondicionado con la presión máxima de 0,6 bares	No
3	25 ml/min	Acondicionado con la presión máxima de 0,8 bares	No
4	25 ml/min	Acondicionado con la presión máxima de 0,8 bares	No
5	25 ml/min	Acondicionado con la presión máxima de 0,8 bares	No

Tabla 12

Columna de 10 g	Caudal	Observaciones	Sobrepresurizado
1	12 ml/min	Acondicionado con la presión máxima de 0,4 bares	No
2	12 ml/min	Acondicionado con la presión máxima de 0,3 bares	No
3	12 ml/min	Acondicionado con la presión máxima de 0,4 bares	No
4	12 ml/min	Acondicionado con la presión máxima de 0,4 bares	No
5	12 ml/min	Acondicionado con la presión máxima de 0,4 bares	No

Este ejemplo destaca el problema de la fusión de la frita de los procedimientos de equilibrado en la técnica anterior. En este experimento, la columna SNAP Ultra de 340 g resultó el motivo principal de preocupación ya que no pudo acondicionarse con el bajo caudal predeterminado (100 ml/min). La presente invención muestra ahora que las columnas pueden ser equilibradas con éxito con caudales más elevados, lo que en la técnica anterior solo resultó posible con concentraciones más bajas de acetato de etilo tales como acetato de etilo al 10 % o menos, aunque no a caudales más elevados debido a la generación de calor y el ablandamiento de la frita.

- 5
- 10 De esta forma, el uso de un gradiente para el equilibrado según la invención permite un aumento en el caudal que incluye un equilibrado de hasta tres veces el actual predeterminado para columnas de hasta 50 g y el doble del predeterminado para columnas mayores de los 50 g (incluidos 340 g).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para controlar el calor generado durante el equilibrado de una columna de cromatografía empaquetada; **caracterizado porque** el tamaño y el material de la columna además del área superficial del empaquetado disponible para la fase móvil se usan como parámetros para seleccionar un gradiente de equilibrado formado de dos líquidos, en el que un caudal de gradiente de equilibrado se proporciona sin superar una temperatura predeterminada en los componentes y/ o empaquetado de la columna.
- 10 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, donde la columna de cromatografía empaquetada es una columna de cromatografía *flash*.
3. Un procedimiento según la reivindicación 1 o 2, que ha sido automatizado.

Figura 1(a) - Equilibrado isocrático con un caudal predeterminado de 25 ml/min

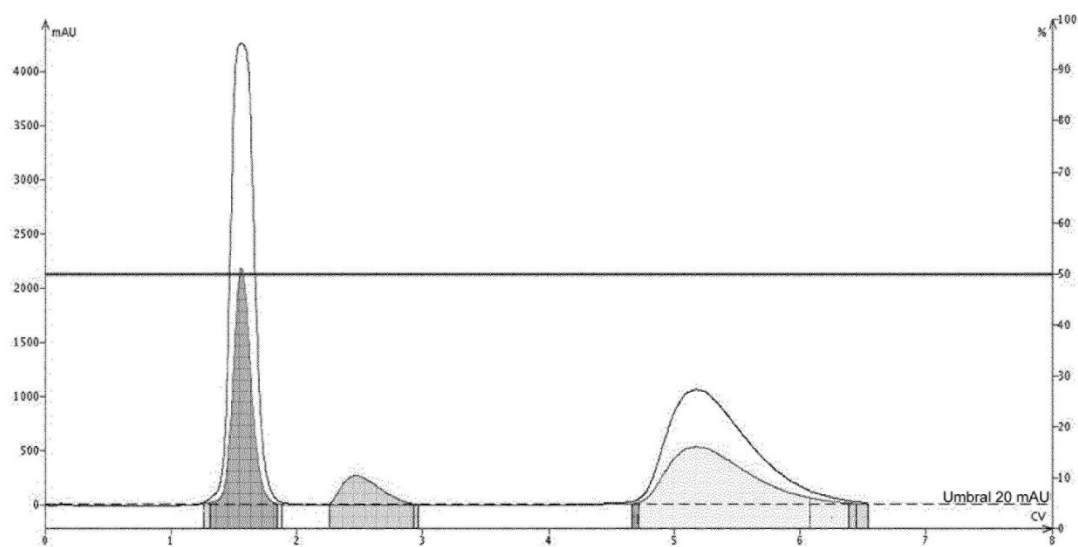


Figura 1(b) - Equilibrado de gradiente a 200 ml/minuto

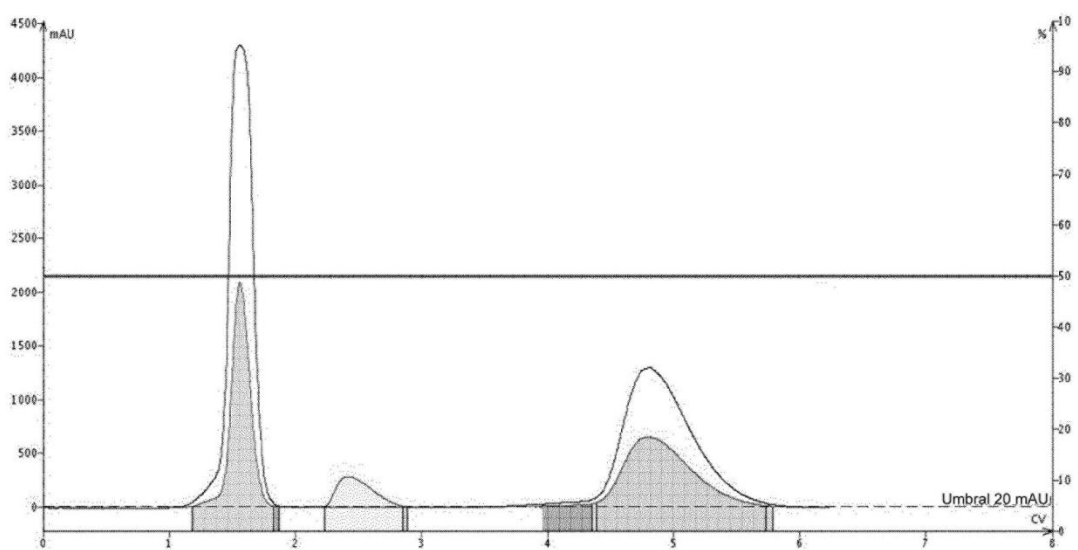


Figura 2(a) - Equilibrado isocrático con un caudal predeterminado de 50 ml/min

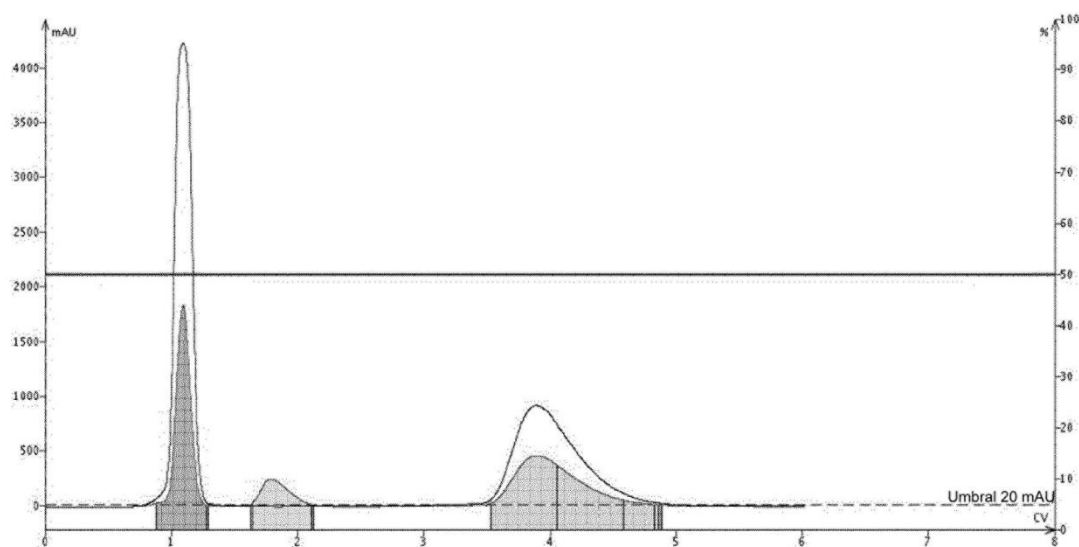


Figura 2(b) - Equilibrado de gradiente a 200 ml/minuto

