Estelle Riché, Anastasia Khvataeva, Stephane Mabic
Merck Millipore Lab Water business field,
St.-Quentin-en-Yvelines, Francia

En los últimos años, la introducción de la cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UHPLC) ha ampliado el ámbito de las aplicaciones de laboratorio y ha hecho posible alcanzar límites de detección extremadamente bajos.

Agua ultrapura que cumple con los requisitos de la UHPLC

Existen, sin embargo, ciertos requisitos cuando se trabaja con esta técnica analítica tan sensible: para sacar el máximo provecho de la técnica UHPLC y conseguir datos analíticos representativos, es necesario utilizar disolventes y reactivos de alta pureza. En concreto, hay que prestar especial atención al agua, ya que se utiliza durante todo el proceso analítico, desde la preparación de muestras, tampones y fases móviles hasta el enjuagado de las columnas y del propio sistema. En una serie de experimentos en los que se utilizó agua procedente de un sistema de purificación de agua Milli-Q®, se demostró que el agua ultrapura recién producida es adecuada para análisis mediante UHPLC.

La cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UHPLC) es una técnica cada vez más popular[1]. Utilizando una combinación de partículas sub-2 µm y un equipo capaz de funcionar a presiones muy elevadas y de mantener la forma del pico, permite una sensibilidad, resolución y velocidad mayores que la HPLC tradicional. Dado que los sistemas UHPLC permiten análisis mucho más rápidos, se produce un aumento significativo del rendimiento en número de muestras, así como una reducción del uso de disolvente, lo que constituye una ventaja tanto desde el punto de vista financiero como del medioambiental.

Comparados con los equipos de HPLC convencional, los sistemas UHPLC exigen un mayor cuidado en la preparación de las muestras y en la manipulación de los disolventes, para obtener un rendimiento óptimo del sistema. Cuando se transfieren los métodos de HPLC a UHPLC, suele ponerse de manifiesto el efecto de utilizar buenas prácticas de laboratorio. Dada la mayor sensibilidad de la UHPLC, es posible que mediante esta técnica analítica se detecten trazas de impurezas (que proceden de los disolventes, el material de vidrio o los filtros) que no eran detectadas con un equipo de HPLC. Esto es todavía más significativo si el equipo está acoplado a detección mediante espectrometría de masas (MS). Además de la pureza química[2], también es importante asegurarse de que los disolventes utilizados para esta técnica carecen de partículas o bacterias, ya que pueden aumentar la contrapresión del sistema, dañar los cabezales de la bomba u obstruir las fritas de la columna. La utilización de disolventes de alta pureza exentos de partículas puede contribuir a asegurar la longevidad de las columnas y los equipos de UHPLC.

El objetivo del presente estudio era cerciorarse de que el agua purificada con un sistema de purificacion de agua Milli-QR es tambien adecuada para ser utilizada con equipos de UHPLC y que da buenos resultados

Al comprar disolventes y aditivos orgánicos, se recomienda elegir los de la mayor pureza disponible (grado HPLC o LC-MS). En la mayoría de los casos, estos disolventes son filtrados por el fabricante, de modo que pueden utilizarse sin más manipulación. Cuando se trata del agua, sin embargo, los científicos deben elegir entre los diversos tipos de agua embotella comercializados y el agua purificada en el laboratorio mediante un sistema de purificación de agua. Puede resultar difícil hacer una selección entre todos los grados de agua disponibles.

El agua ultrapura preparada utilizando un sistema de purificación de agua suele emplearse para elaborar fases móviles para análisis de HPLC, y se sabe que da buenos resultados[3]. El objetivo del presente estudio era cerciorarse de que el agua purificada con un sistema de purificación de agua Milli-Q® es también adecuada para ser utilizada con equipos de UHPLC y que da buenos resultados. Con este objetivo, investigamos el efecto de la calidad del agua sobre los análisis de UHPLC, así como sobre la contrapresión del sistema, y evaluamos la idoneidad del agua ultrapura recién purificada para esos análisis.

MATERIALES Y MÉTODO

En todos los experimentos se utilizó un sistema Waters ACQUITY UPLC® I-Class (Waters Corps., Milford, Massachussetts, EE.UU.), equipado con un detector de "array" de fotodiodos. El agua analizada era agua ultrapura recién preparada mediante un sistema Milli-Q® Integral (Merck Millipore, Billerica, Massachussetts, EE.UU.), equipado con un filtro de membrana de 0,22 µm Millipak® en el punto final de uso. La resistividad del agua indicada por

el sistema era de 18,2 MOhm.cm y la concentración de carbón oxidable total (TOC) era de 5 ppb o inferior. Los productos químicos utilizados eran de la mayor pureza disponible. Se utilizó acetonitrilo de grado ULC/MS (Biosolve BV, Países Bajos) para la elución en gradiente. El ácido fórmico procedía de J.T. Baker (Avantor Performance Materials, Center Valley, PA, EE.UU.).

a. Contrapresión del sistema después de 10 horas de flujo isocrático continuo

Se hizo fluir a través de una columna Acquity UPLC® BEH C18 (1,7 µm, 2,1 x 50 mm) una mezcla 50:50 de agua ultrapura y acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1% durante 10 horas a 0,45 ml/min. Se registró la contrapresión del sistema.

b. Perfil del gradiente de agua ultrapura

Se utilizó una columna ACQUITY UPLC® BEH Shield RP18 (1,7 µm, 2,1 x 50 mm) y se mantuvo a 35 °C. El gradiente consistía en acetonitrilo del 0% al 100% en 5 minutos, luego se mantuvo durante 1 min en acetonitrilo al 100%. El caudal era de 0,60 ml/min. Se observó la línea de base a 254 nm.

c. Idoneidad del agua ultrapura para análisis mediante UHPLC

Una mezcla de siete compuestos se analizó 600 veces seguidas, y se controló la contrapresión del sistema. Para cada ensayo, se inyectaron 2 µl de la siguiente mezcla: 2-acetilfurano, acetanilida, acetofenona, propiofenona, butilparabén, benzofenona y valerofenona (4 µg/ml de cada compuesto). Se utilizó una columna ACQUITY UPLC® BEH Shield RP18 (1,7 µm, 2,1 x 50 mm) y se mantuvo a 35°C. El gradiente consistía en acetonitrilo del 20% al 90% en 3 minutos, luego se mantuvo isocrático durante 1 min y se volvió a las condiciones iniciales. El caudal era de 0,6 ml/min y la separación se controló a 254 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El agua desempeña un importante papel en la UHPLC, ya que puede utilizarse no solo para preparar las fases móviles, sino también para preparar las muestras y los patrones, así como los blancos. Cualquier contaminante presente en el agua utilizada para esas tareas puede afectar a los resultados analíticos, además de al equipo. El agua utilizada para esos análisis debe ser de la mayor calidad para obtener resultados precisos y reproducibles.

Contrapresión del sistema después de 10 horas de flujo isocrático continuo

Dado que las columnas de UHPLC están rellenas con partículas de un tamaño inferior a los 2 µm, se utilizan fritas de una porosidad mucho menor (normalmente 0,2 µm) que las utilizadas en las columnas de HPLC convencional. Los menores diámetros internos de las columnas y las conexiones también las hacen especialmente sensibles a las partículas, que pueden generar contrapresión en el sistema, lo que dañará las columnas y hará que el sistema se pare. Cuando se trabaja con agua o fases móviles acuosas, una preocupación habitual es la contaminación bacteriana, que puede tener el mismo efecto que las partículas en el equipo y las columnas. Las bacterias liberan también productos se-

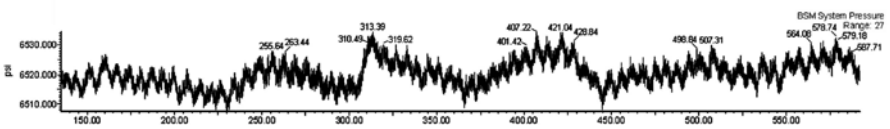

Figura 1.Contrapresión del sistema durante un periodo de 10 horas cuando se procesó por la columna un flujo isocrático continuo de agua: acetonitrilo 50:50.

cundarios (orgánicos e iónicos), que pueden afectar a los resultados analíticos.

Para proteger a los sistemas UHPLC del daño causado por las partículas, algunos fabricantes de disolventes ofrecen ahora agua y disolventes orgánicos filtrados con un filtro de 0,1 µm. Dado que los sistemas de purificación de agua suelen estar equipados con un filtro final de 0,22 µm, investigamos si esa filtración era suficiente o si era necesaria una etapa de filtración añadida. En la Figura 1 se muestra la contrapresión de un sistema controlada durante 10 horas cuando se utilizó agua ultrapura para preparar una fase móvil de acetonitrilo al 50%. La contrapresión del sistema permaneció estable (ΔP = 24-27 psi) durante todo el proceso. Esto indica que el agua ultrapura recién purificada producida en un sistema equipado con un filtro final de 0,22 µm es adecuada para ser utilizada con los sistemas UHPLC. No se necesita filtración adicional, en especial porque, si no se utiliza el filtro adecuado, cabe la posibilidad de que la filtración introduzca contaminación[4].

Perfil del gradiente de agua ultrapura

Cabe esperar que las trazas de moléculas orgánicas presentes en el agua utilizada para preparar los eluyentes tengan un efecto negativo en los análisis de UHPLC. Pueden afectar a las líneas de base y a la sensibilidad del método analítico, y pueden también acumularse en la columna de fase reversa durante el equilibrado y eluir después en forma de picos fantasma. La extensión de la contaminación orgánica del agua puede evaluarse analizando el perfil del propio gradiente. Esto se hace eluyendo en gradiente desde niveles elevados de eluyente acuoso hasta niveles elevados de eluyente orgánico sin inyección de muestra. Si el agua contiene contaminantes orgánicos, cabe esperar que se acumulen con el eluyente acuoso en la columna durante el equilibrado y que eluyan más adelante durante la prueba de gradiente. Cuando se utilizó agua ultrapura se obtuvo una línea de base buena (Figura 2), lo que demuestra su idoneidad para ser utilizada con UHPLC.

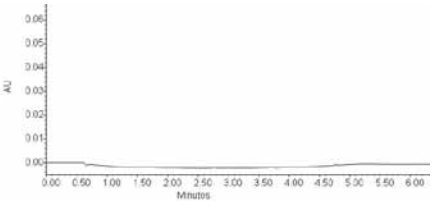

Figura 2. Cromatograma UHPLC representativo de una línea de base obtenida con agua ultrapura recién purificada durante una prueba de gradiente a 254 nm.

Idoneidad del agua ultrapura recién purificada para los análisis con UHPLC

Para demostrar aún más la idoneidad del agua ultrapura para los análisis de UHPLC, se analizó repetidamente una mezcla de siete compuestos por elución en gradiente. Se controló la contrapresión y la calidad de la separación durante 600 análisis sucesivos (60 horas de utilización continua). En la Figura 3 se demuestra que la contrapresión del sistema se mantenía perfectamente estable durante todas las inyecciones repetidas. Además, el rendimiento cromatográfico era bueno y se mantuvo idéntico durante los numerosos análisis realizados en este experimento. Para ilustrar esos resultados, en la Figura 4 se muestran los cromatogramas del primer análisis y el del número 600. Estos resultados confirman que el agua ultrapura recién purificada es apropiada para usar en experimentos de UHPLC. No se necesita filtración añadida si se coloca un filtro final de 0,22 µm en el punto de uso del sistema, sobre todo si se tiene en cuenta que la filtración puede introducir contaminación cuando no se utiliza el filtro adecuado.

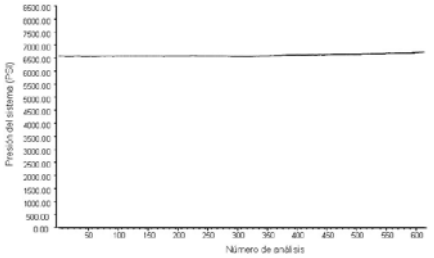

Figura 3. Contrapresión del sistema UHPLC medida para cada uno de los 600 análisis de gradiente en el punto temporal correspondiente a los 0,50 minutos. Como eluyentes se utilizaron agua ultrapura recién purificada y acetonitrilo.

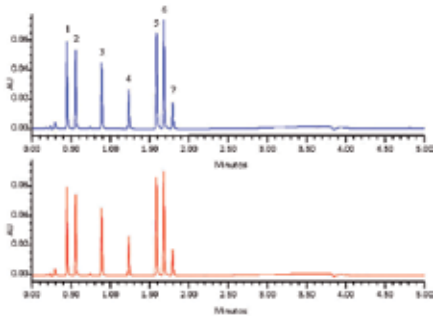

Figura 4. Cromatogramas UHPLC de una mezcla de siete compuestos a 254 nm. Cromatograma inferior: primer análisis; Cromatograma superior: análisis número 600. (1: 2-acetilfurano, 2: acetanilida, 3: acetofenona, 4: propiofenona, 5: butilparabén, 6: benzofenona y 7: valerofenona)

CONCLUSIÓN

Conforme se van sustituyendo los sistemas de HPLC convencional por sistemas de UHPLC, van surgiendo dudas relativas a las mejores opciones de los disolventes para esos sistemas. En este estudio se demostró que el agua ultrapura recién purificada es adecuada para ser utilizada en los sistemas de UHPLC, y que contribuye a proporcionar líneas basales estables y un rendimiento cromatográfico óptimo.

El filtro de membrana de 0,22 µm colocado a la salida del sistema de purificación de agua asegura la retirada de las partículas o bacterias que podrían interferir en el funcionamiento apropiado del equipo, como demostró la ausencia de aumento de contrapresión. Es importante asegurar un buen mantenimiento del sistema de purificación de agua y que éste produzca agua con bajas concentraciones de iones (resistividad de 18,2 MOhm.cm) y de compuestos orgánicos totales (TOC en o por debajo de 5 ppb). Además, dado que la calidad del agua puede degradarse con el tiempo, es preferible no conservar agua ultrapura durante más de un día, sino obtener un lote fresco de agua ultrapura cada mañana para usar en la UHPLC.

Reconocimientos:

Los autores están muy agradecidos a los doctores Jean-Michel Plankeele (Waters Corp.) y Marijn Van Hulle (Waters Corp.) por su ayuda y apoyo. ⏮

Referencias:

(1) D. Guillarme, J. Schappler, S. Rudaz, J.L. Veuthey, "Coupling ultra-high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry," *Trends in Analytical Chemistry*, 2010, 29(1), 15-27.

(2) S. Liu, "Quality Evaluation of HPLC-Grade Acetonitrile," *Am. Laboratory*, 2008, 40, 22-29.

(3) M. Tarun, C. Monferran, C. Devaux and S. Mabic. "Improving chromatographic performance by using freshly delivered ultrapure water in the mobile phase," *LCGC, The Peak*, 2009, June, 7-14.

(4) S. Kulkarni, J. George and V. Joshi, "Mobile Phase Preparation for UHPLC: Impact of Filtration Through 0.2-µm Membranes on System Performance," *American Biotechnology Laboratory*, 2008, 26(10), 14-15.

Pasión por la innovación.... confianza de un *líder*

DAIFUKU

INGENIERÍA E INNOVACIÓN LOGÍSTICA

Sistemas de preparación de pedidos
Sistemas de almacenamiento automático
Sistemas de clasificación automática
Sistemas de final de línea
Sistemas de transporte automático
Supply Chain Software

Amplia experiencia en el sector:

GLAXOSMITHKLINE, ROCHE PHARMA, DISTRIVET, KERN PHARMA, URGO, HEFAME, LILLY, PROCLINIC, CINFA...

ULMA
HANDLING SYSTEMS

B° Garagaltza, 50 · 20560 Oñati (Guipúzcoa)
Tel.: 943 782492 Fax: 943 782910
informa@manutencion.ulma.es · www.ulmahandling.com