

**DISEÑO Y APLICACION DE TEST DE VERIFICACION DEL
FUNCIONAMIENTO DE CROMATOGRAFOS DE HPLC.**

Por :

JAIR GAVIRIA ARANGO

Profesor Asistente

Trabajo realizado como requisito parcial para la promoción a Profesor Asociado

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA**

Sede Medellín

1996

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA



Sede Medellín

DEPARTAMENTO DE BIBLIOTECAS
Ciencias Agrícolas y Ciencias

543.0894

519

INDICE

SUMARIO

INTRODUCCIÓN

1. PARTE TEÓRICA

A la memoria de mi padre.

"Sí vemos más allá que nuestros antepasados, es porque estamos parados sobre sus hombros."

1.2. El como parámetro de verificación

1.3. Interacción en HPLC fase inversa

1.4. Requerimientos de la verificación de sistema

1.5. Test de prueba para columnas de fase inversa

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Diseño del test de equipos para columnas de fase inversa

2.2. Aplicación del test de equipos

2.2.1. Aplicación de equipos

129947

36189

ÍNDICE.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE MEDALLÍN
DEPTO. DE BIBLIOTECAS
BIBLIOTECA "EFE" GÓMEZ

ÍNDICE.....	i
SUMARIO.....	iv
INTRODUCCIÓN.....	vi
1. PARTE TEÓRICA.....	1
1.1. La resolución cromatográfica.....	1
1.2. N como parámetro de verificación.....	2
1.3. Interacción en HPLC fase inversa.....	5
1.4. Requerimientos de la verificación de instrumentos.....	5
1.5. Test de prueba para columnas de fase inversa.....	6
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	8
2.1. Diseño del test de equipos para cromatógrafos de HPLC.....	8
2.2. Aplicación del test de equipos a cromatógrafos de HPLC.....	13
2.2.1. Aplicación del test sencillo de verificación de instrumentos.....	13



2.2.2. Aplicación del test completo de verificación de instrumentos.....	14
2.2.3. Equipos a los que se aplica el test de verificación.....	17
2.3. Sensibilidad del test de verificación de instrumentos.....	20
2.4. Cartas de control de la mezcla de prueba del test de verificación.....	22
2.5. Resultados y discusión.....	23
2.5.1. Linealidad y factores de respuesta.....	23
2.5.2. Gráficas de sensibilidad del test de verificación.....	25
2.5.3. Resultados de las cartas de control.....	32
2.5.4. Comparación de equipos.....	33
2.6. Diseño del test para columnas de HPLC (fase inversa).....	37
2.7. Aplicación del test de columnas de HPLC de fase inversa.....	40
2.8. Resultados y discusión del test de columnas.....	42

CONCLUSIONES.

BIBLIOGRAFIA.

ANEXO N°1: PNT aplicación del test sencillo de verificación de instrumentos.

ANEXO N°2: PNT aplicación del test completo de verificación de instrumentos.

ANEXO N°3: PNT aplicación del test de columnas de HPLC fase inversa.

ANEXO N°4: Gráficas de linealidad, factores de respuesta y sensibilidad del test de verificación.

ANEXO N°5: Cromatogramas del perfil del test, el límite de cuantificación y el ruido de los cromatógrafos.

ANEXO N°6: Tabla general de resumen.

INTRODUCCIÓN.

El trabajo cotidiano con cualquier técnica de análisis químico exige que los instrumentos en los que se apoya la mencionada técnica, cumplan unos requisitos mínimos de funcionamiento que garanticen que los resultados obtenidos con el aparato son fiables y reproducibles.

Particularmente en el caso de la cromatografía líquida de HPLC, en la que influyen demasiados parámetros sobre el resultado final, es necesario asegurarse del correcto funcionamiento de los cromatógrafos; una manera fácil y rápida de llevar esto a cabo es contar en el laboratorio con tests de verificación del funcionamiento del cromatógrafo en un momento determinado.

El hecho de disponer de los mencionados tests le permite al cromatografista poseer una herramienta que le da la posibilidad de verificar el rendimiento de los equipos que usa, en todas y cada una de las etapas de su trabajo analítico, desde el diseño de la metodología analítica, pasando por la validación de la misma y hasta en el uso diario de la metódica trabajando con muestras reales.

Lo anterior significa que está plenamente justificado el hecho de que cada laboratorio que cuente con equipos diversos de cromatografía de HPLC, diseñe y ponga a punto sus propios tests de verificación del funcionamiento de equipos, adecuados a sus propias necesidades y conveniencias; sin embargo, esto no es obstáculo para que un test determinado pueda ser adoptado por otros laboratorios con las adaptaciones que sean necesarias.

El diseño de los tests debe pensarse de tal manera que su aplicación de la posibilidad de evaluar todo el sistema cromatográfico, entendiendo por esto el inyector, el horno de la columna, las bombas y el detector. Para lograr lo anterior es indispensable efectuarle al test un estudio de su sensibilidad, es decir, cuantificar las variaciones que experimentan los resultados del test ante cambios en algunas de las condiciones de los componentes del sistema cromatográfico.

El diseño debe permitir también, además de verificar el funcionamiento de un equipo en un momento determinado, seleccionar aquel instrumento que se adapte mejor a un tipo de análisis específico, por sus características propias de estabilidad y sensibilidad, así como también comprobar cuales equipos pueden considerarse equivalentes y de esta forma saber si puede reemplazarse uno por otro, en cualquier momento, para un análisis determinado.

De otro lado, considerando que la columna es quizá el elemento cromatográfico que mayor incidencia tiene en la efectividad de la separación, es por supuesto también muy conveniente que los laboratorios posean sus propios tests para evaluar el rendimiento de las columnas que utilizan; otro hecho que justifica este aspecto es la amplia diversidad de casas comerciales y de columnas que existen hoy día.

El test de columnas se debe diseñar de tal manera que al aplicarlo se pueda evaluar el rendimiento de la columna en un momento determinado y a partir de una evaluación inicial efectuarle un seguimiento a la columna durante su vida útil; además de la evaluación, el test debe dar la posibilidad de caracterizar, clasificar y comparar las columnas, así como también seleccionar la más adecuada para cierto tipo de análisis. Para lograr el último objetivo mencionado, la mezcla de test debe contar con solutos básicos (que son los solutos que presentan mayores problemas en cromatografía de partición), con lo que estará en capacidad de comprobar si las columnas que están preparadas desde su fabricación para este tipo de solutos, cumplen verdaderamente con esta característica o por el contrario necesitan algún modificador en la fase móvil para su correcto funcionamiento.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, el presente trabajo se propone llevar a cabo los siguientes objetivos generales:

- Diseñar un test para cromatógrafos de HPLC que permita verificar el funcionamiento de un aparato específico en un momento determinado, así como también efectuar comparaciones y agrupaciones entre equipos.

- Realizar un estudio de la sensibilidad del test de verificación de instrumentos de HPLC; dicho estudio comprende la cuantificación de los cambios observados en las variables de los picos de los solutos cuando se introducen cambios en las condiciones cromatográficas de aplicación del test.

- Aplicar el test a los cromatógrafos existentes en la sección de cromatografía del IQS, para caracterizar su funcionamiento y compararlos entre sí.

- Diseñar un test para columnas de HPLC de fase inversa que comprenda solutos neutros, ácidos y básicos, que permita discernir que tipos de columnas son equivalentes y aconsejables para determinados análisis.

- Aplicar el test de columnas de fase inversa a diferentes columnas de la sección de cromatografía del IQS, para evaluar su rendimiento actual.

1. PARTE TEÓRICA.

1.1. La resolución cromatográfica.

El rendimiento cromatográfico, o capacidad de separar varios compuestos, que se puede obtener con un cromatógrafo con una columna determinada relativo al obtenido con otro instrumento utilizando la misma columna bajo las mismas condiciones, es una información valiosa. Una mejor separación bajo un grupo de condiciones dadas puede permitir al cromatografista disminuir el tiempo de análisis para cada inyección de muestra sin pérdida de información cuantitativa o cualitativa.

Para estimar cuantitativamente la calidad de las separaciones cromatográficas se puede usar la resolución entre dos picos (R_s). La resolución no se ve afectada por el tipo de detector y sus diferencias pueden surgir de factores tales como excesivo volumen muerto, distintas condiciones de operación o características de la columna. [1].

La ecuación (1) muestra que la resolución es una herramienta poderosa para probar el comportamiento cromatográfico ya que incluye la eficacia (N), la selectividad (α) y el factor de capacidad (k'):

$$R_s = \left(\frac{1}{4}\right) \left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right) \sqrt{N} \left[\frac{k_1}{(1+k_1)}\right] \quad (1)$$

La resolución se calcula habitualmente utilizando la ecuación (2):

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

Donde t y w representan los tiempos de retención y las anchuras en la base de los picos, respectivamente (en unidades similares). La desventaja de usar esta ecuación es que ignora la asimetría de los picos y asume forma de pico gaussiana. Para picos gaussianos, la separación entre dos picos se alcanza a un valor de $R_s = 1.5$. [2].

A pesar de este inconveniente, la ecuación (2) se usa frecuentemente aún cuando los picos no sean gaussianos ni totalmente simétricos. Así, con picos no gaussianos, serán necesarios factores de resolución por encima de este valor de $R_s = 1.5$ para obtener una buena separación.

Con frecuencia se establece que si la resolución es $R_s = 1.0$, cada pico incluye un 2% del componente minoritario y un 98% del mayoritario. Se debe tener presente, sin embargo, que la validez de estos porcentajes dependen tanto de la concentración relativa de los dos solutos como de los factores de respuesta relativos con los que se detectan ambas sustancias. Se considera que la separación es completa cuando R_s es mayor que 1.5, ya que en este punto usualmente se dice que la pureza de los picos es del 99.7%. Para factores de selectividad grandes ($\alpha > 2$), raramente hay necesidad de inquietarse acerca del grado de resolución entre los picos.

La ecuación (1) se usa para separaciones donde $1 < \alpha < 2$. Consecuentemente, $(k'_1) \sim (k'_2)$. La discusión se limita a situaciones donde el solapamiento de los picos no es menor que 0.01% que corresponde aproximadamente a $R_s < 2$. [3].

1.2. N como parámetro de verificación.

N, el número de platos teóricos, es el parámetro de eficacia más ampliamente usado. Esto es debido a que N se puede medir fácilmente por medio de una amplia variedad de técnicas, su raíz cuadrada es proporcional a la resolución y se puede relacionar con varios procesos cromatográficos de ensanchamiento de banda a través de su dependencia con el flujo del eluyente. El valor de N refleja el aumento de la anchura de banda en función de la retención y se define como:

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 \quad (3)$$

Donde t_R es el tiempo de retención y σ es la varianza del pico. Para picos de forma casi gaussiana, la varianza se puede estimar de varias formas que llevan a expresiones tales como:

$$N = 16 \left(\frac{tR}{w} \right)^2 \cong 5.54 \left(\frac{tR}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (4)$$

Donde w y $w_{1/2}$ se refieren a las anchuras del pico en la línea base y a la mitad de la altura, respectivamente.

Al calcular N para picos gaussianos, todos los procedimientos suministran valores de número de platos similares; sin embargo, cuando aumenta la asimetría de pico, las ecuaciones que suponen forma de pico gaussiana {como la ecuación (4)} dan valores sobrestimados.

Una disminución de N se puede interpretar como debida al ensanchamiento del pico causado por el volumen muerto en el cromatógrafo; el ensanchamiento del pico, originado por factores diferentes al volumen muerto, es lineal con el aumento del tiempo de retención y, por lo tanto, N debe permanecer constante. La contribución del volumen muerto al ensanchamiento del pico {en el denominador de la ecuación (5)} permanece constante y tiene menos efecto cuando aumenta el tiempo de retención para cada inyección. Así, el denominador del lado derecho de la ecuación (5) llega a ser más pequeño con respecto al numerador y, como resultado, N se incrementa cuando la contribución del volumen muerto al ensanchamiento del pico es significativa:

$$N = 16 \left(\frac{tR}{anchura} \right)^2 \quad (5)$$

El uso de N como un parámetro de test tiene varias desventajas, a saber: Es una función de la longitud de la columna, del diámetro de partícula y del flujo. La comparación de valores de N no revelará si dos columnas de longitudes diferentes y que contienen partículas de tamaños distintos están igualmente bien empacadas. La dependencia con la longitud de la columna se puede eliminar usando la altura equivalente a un plato teórico (H) dada por $H=L/N$, donde L es la longitud de la columna. [4].

Por otro lado, utilizando la altura de plato reducida (h) se elimina además la influencia que tiene sobre la eficacia el tamaño de partícula de la columna; h está dado por H/d_p , siendo d_p el tamaño de partícula del relleno de la columna. La principal justificación para usar h como expresión de la eficacia, es la facilidad con la que se pueden comparar los resultados obtenidos con rellenos, eluyentes y solutos diferentes.

En el caso de la cromatografía ideal se esperan picos simétricos. Los picos asimétricos surgen debido a varios factores que incluyen isothermas de distribución no lineales, ensanchamiento instrumental de la banda y procesos cinéticos lentos. La asimetría de pico causa una disminución en la resolución cromatográfica y un aumento en los límites de detección. La fiabilidad de las medidas de altura de plato dependen de la simetría de pico ya que h se calcula usualmente suponiendo pico de forma gaussiana; los procedimientos más comunes para calcular h sobrestimarán su valor verdadero si los picos son asimétricos.

Es importante tener una visión real de los factores que contribuyen al valor calculado de la eficacia. Una forma pobre de pico no siempre significa un problema con la eficacia. Se pueden ver en un cromatograma picos con cola aún cuando se usen columnas altamente eficaces. Cuando se analizan solutos ácidos o básicos junto con solutos menos polares, el cromatograma resultante puede contener una mezcla de picos simétricos agudos para los solutos menos polares y picos con colas muy pronunciadas para, por ejemplo, las bases. Este problema se puede resolver generalmente con la adición de modificadores adecuados al eluyente, y tiene poca relación con la eficacia de la columna usada.

1.0. Requerimientos de la verificación

El cromatografista debe seleccionar el método de cálculo más apropiado para sus necesidades. En algunas situaciones la exactitud del método puede importar muy poco, como en el caso del control de una columna a través de su vida útil. En este caso se intentan detectar los cambios en la eficacia, debidos por ejemplo a la aparición de vacíos o canales en la estructura del lecho de la columna. En esta situación se puede usar cualquier método de cálculo apropiado para determinar si el rendimiento de la columna ha empeorado, comparado con su comportamiento inicial. [5].



1.3. Interacción en HPLC fase inversa.

La retención en cromatografía líquida (LC) está gobernada por una variedad de interacciones, no bien entendidas del todo, que dependen tanto de la columna como de la fase móvil. Cuando se usan columnas de fase inversa, hay dos interacciones predominantes que son la Hidrofóbica y la Silanofílica. Este concepto se enlaza directamente con las características físicas de las columnas C-18, que incluyen las superficies Hidrocarbonadas formadas por los grupos C-18 enlazados, en algunos casos las superficies Hidrocarbonadas adicionales producidas por el proceso de "End-Capping" con TrimetilCloroSilano, y los grupos Silanol libres no desactivados. Las superficies hidrocarbonadas representan puntos de interacción Hidrofóbica, mientras que las interacciones Silanofílicas ocurren en los Silanoles libres. [6].

Los mecanismos propuestos más comunes de separación de compuestos no polares por cromatografía de fase inversa involucran la interacción entre la porción no polar del soluto y la porción Hidrocarbonada del relleno de la columna. Generalmente, rellenos más Hidrofóbicos generan mayores retenciones. Parece razonable esperar que las columnas "ODS" (Octadecilsilano o C-18) retengan más que las C-8 y que las C-8 tengan, a su vez, mayor poder de retención que las fases enlazadas de cadena Alquil corta. Los rellenos de fase inversa son particularmente útiles para separar miembros de series homólogas. [7].

1.4. Requerimientos de la verificación de instrumentos.

El test de verificación del funcionamiento de un cromatógrafo de HPLC (idoneidad) puede incluir inyecciones replicadas de un estándar para el que sus coeficientes de variación no deben superar un determinado valor, un rango de valores de k' o de tiempos de retención aceptables, y un factor de resolución. Además, se han establecido valores mínimos para el número de platos teóricos, tiempos de retención relativos o selectividad (α) y valores máximos aceptables para los factores de asimetría de pico. La conveniencia de escoger unos u otros parámetros para el test de idoneidad depende del usuario, aunque se recomienda el uso del tiempo de retención, la simetría, la eficacia y la resolución.

La USP requiere corrientemente un mínimo de cinco (5) inyecciones replicadas de estándar con un máximo de coeficiente de variación del 2%, junto con la recomendación de calcular el factor de asimetría. La FDA en el "Borrador de la directiva para validación de métodos en NDAs", requiere un porcentaje de coeficiente de variación máximo para inyecciones replicadas del estándar y el cálculo de un factor de resolución, así como de la asimetría de pico. [8].

1.5. Test de prueba para columnas de fase inversa.

Hay varias razones para efectuar un test de columnas: Comparar la calidad de las columnas suministradas por fabricantes diferentes, medir el rendimiento de una columna con su edad para asegurar que continúa reuniendo los estándares mínimos, o para determinar la causa de su mal funcionamiento. El examen debe suministrar información sobre la eficacia de la columna, actividad de adsorción, puntos ácido-base y contenido de Carbono; para ello es necesario investigar parámetros básicos de la columna, incluyendo aquellos relacionados con la estructura del lecho y la eficacia o la actividad del relleno de la columna.

Los ensayos dinámicos suministran datos sobre la estructura del relleno y las características de transferencia de masa de una columna; las medidas de asimetría son útiles para establecer los efectos del volumen muerto sobre el rendimiento de la columna, mientras que las medidas de actividad pueden identificar aquellas columnas no aconsejables para la determinación de componentes que interactúan fuertemente con el relleno.

Un problema ocasional en la separación de solutos altamente funcionalizados sobre columnas de fase inversa es la aparición de picos con colas pronunciadas. Se cree que esto se debe a interacciones entre los solutos y los Silanoles libres que quedan después de funcionalizar la superficie de Silica. Las pruebas para la determinación de la actividad residual pueden ser de utilidad en la selección de columnas para la separación de materiales altamente activos.

Las interacciones que gobiernan la retención de compuestos polares son más complejas que para moléculas no polares, debido a que los grupos Silanol no derivatizados residuales sobre la superficie del relleno pueden participar en la separación. Las sustancias básicas son a menudo retenidas fuertemente en algunos rellenos de fase inversa, probablemente por la interacción con grupos Silanol ácidos residuales de la superficie; las complejas interacciones resultantes incluyen fenómenos de adsorción o intercambio iónico más partición. El mecanismo de separación para ácidos involucra probablemente una interacción con la porción Hidrofóbica no polar del soluto de prueba.

2. PARTE EXPERIMENTAL.

2.1. Diseño del test de equipos para cromatógrafos de HPLC.

El objetivo principal es contar con una mezcla de prueba que permita obtener una información amplia sobre el funcionamiento de un cromatógrafo de HPLC en un momento determinado; por lo tanto, es necesario fijar una serie de variables que se puedan reproducir de manera precisa.

Inicialmente hay que elegir los solutos que componen la mezcla de prueba; para ello se toma como base el test, ya existente en el IQS, para cromatografía de HPLC en fase inversa; dicho test está preparado de la siguiente forma :

Benceno: 4000 mg.

Naftaleno: 450 mg.

Antraceno: 15 mg.

Estas cantidades se disuelven en 100 ml de Acetonitrilo (solución madre) y se hace una dilución posterior tomando 5.00 ml de la solución madre y llevando a 250 ml de nuevo con Acetonitrilo.

El test descrito anteriormente se aplica indistintamente a columnas y equipos, sin fijar variables tales como el sistema de tratamiento de los datos, el volumen de inyección, la temperatura de columna, y lo que se hace es observar el perfil del cromatograma y si los picos son simétricos y sin cola; algunas otras variables si están preestablecidas y son las siguientes:

Composición de la fase móvil: Acetonitrilo-Agua (80%-20% v/v).

Flujo de la fase móvil: 1.00 ml/min.

Detección UV. λ 254 nm.

En el presente trabajo se decide prescindir del Benceno por sus problemas de toxicidad y volatilidad y se ve la necesidad de introducir otros solutos que se eluyan entre el Naftaleno y el Antraceno para obtener datos que permitan calcular factores de resolución entre esos picos; después de probar varios compuestos orgánicos aromáticos no polares, se eligen los tres siguientes para incorporarlos a la mezcla de prueba: Bifenilo, Fluoreno y Fenantreno.

En consecuencia, la mezcla de prueba definitiva queda conformada de la siguiente manera:

Naftaleno: 1000 mg.

Bifenilo: 250 mg.

Fluoreno: 300 mg.

Fenantreno: 100 mg.

Antraceno: 50 mg.

Estas cantidades se disuelven en 100 ml de Acetonitrilo (solución madre) y se hace luego una dilución tomando 1.00 ml de la solución madre y llevando a 100 ml con una mezcla de Acetonitrilo-Agua (de la misma composición de la fase móvil usada para aplicar la mezcla de prueba).

Las sustancias escogidas son solutos orgánicos no polares con anillos aromáticos, lo que permite su detección por UltraVioleta y sus concentraciones son tales que originan picos de aproximadamente 250 mv de altura, lo cual a su vez garantiza que se está efectuando la detección alrededor de las 0.500 unidades de absorbancia (esto será de importancia en la determinación del rango lineal de los instrumentos).

En la figura A se observa: (a) cromatograma del test de partida, y (b) cromatograma del test diseñado en el presente trabajo. Ambos están obtenidos con el cromatógrafo líquido HP-1050.