

ESTERILIZACIÓN

La cromatografía líquida - espectrometría de masas (LC-MS) es una potente técnica analítica que combina las capacidades de separación de la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o la cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC) con el análisis de masas por espectrometría de masas. Se presta mucha atención a que la calidad de los patrones, los disolventes orgánicos y las fases móviles para HPLC sean de la máxima pureza, pero frecuentemente se da por sentado la calidad del agua, que puede tener un impacto sobre el rendimiento cromatográfico y la calidad de los datos espectrales de masas.

■ Dr. Paul Whitehead, PhD, CChem, FRSC,
ELGA Labwater R&D Facility (England)

El agua ultrapura proporciona un rendimiento excelente en el análisis LC-MS

Introducción

La LC-MS es una técnica extremadamente versátil, altamente sensible y selectiva, utilizada usualmente en laboratorios farmacéuticos, bioanalíticos, medioambientales, de alimentos y bebidas, clínicos, forenses, de proteómica, de metabolómica y de desarrollo de fármacos.

Un buen rendimiento cromatográfico y la obtención de datos espectrales de masas de alta calidad dependen de la pureza del agua¹. El agua puede contener diversas impurezas capaces de influir negativamen-

te en el rendimiento cromatográfico por su impacto sobre la resolución, la integración y las líneas basales, introduciendo picos fantasma y alterando la selectividad de la fase estacionaria. Las partículas presentes en el agua impura pueden dañar el sistema LC y originar bloqueos de columna que tienen como consecuencia un aumento de los tiempos de parada, mientras que los contaminantes iónicos pueden hacer que resulte más complicada la interpretación de los espectros de masas, al interferir con la identificación y cuantificación espectral de analitos de bajo nivel.

Compuestos orgánicos

Los contaminantes orgánicos presentes en el agua pueden provocar diversos problemas cromatográficos. Si se hallan presentes en la fase móvil, los compuestos orgánicos pueden competir con el analito para fijarse a los puntos activos de la fase estacionaria.

Esto reduce la cantidad de analito retenido en la columna y en consecuencia eluido, con la correspondiente reducción de sensibilidad del método. Si sobre la superficie de la columna se acumulan compuestos orgánicos pueden limitar el acceso de analitos y disolventes a puntos activos, teniendo como resultado problemas de transferencia de masa y pérdida de resolución, mientras que cualquier acumulación en la cabeza de la columna puede causar picos fantasma. Adicionalmente, la acumulación de contaminantes orgánicos en la columna puede tener como resultado un incremento de la contrapresión y, en último término, acortar la vida de la columna. En situaciones en que los niveles de contaminación orgánica sean muy elevados, es posible que los compuestos orgánicos se acumulen con el tiempo y actúen como una nueva fase estacionaria, provocando picos con colas y cambios en los tiempos de retención.





Bacterias

Las bacterias originan subproductos orgánicos, tales como pirógenos, nucleasas o fosfatasa alcalina, que pueden provocar bloqueos de columna y problemas cromatográficos, como los descritos anteriormente.

Iones

Los contaminantes iónicos pueden modificar la fuerza iónica de una solución, lo que puede afectar a algunas separaciones cromatográficas. Los analitos pueden formar considerables aductos con iones metálicos contaminantes, como Na⁺ y K⁺, lo que complicaría la interpretación del espectro de masas.

Partículas y coloides

Las partículas pueden causar daños en la bomba de HPLC y también hacer que se bloqueen columnas. Este efecto es aún más importante para los usuarios de UHPLC, ya que los tamaños muy pequeños de las partículas y los menores diámetros de esas columnas hacen que sean más susceptibles a un bloqueo prematuro que sus equivalentes de HPLC. Los coloides pueden ser absorbidos irreversiblemente por la fase estacionaria, causando un cambio en la eficiencia de separación de la columna.

Radiación ultravioleta (UV)

Pasar el agua a través de un rayo de luz ultravioleta descompone

los compuestos orgánicos. Una longitud de onda de 185 nm descompone y oxida efectivamente las moléculas que contienen carbono, produciendo fragmentos ionizados para su posterior eliminación por intercambio iónico, mientras que una longitud de onda de radiación UV más larga (254 nm) altera la actividad de los enzimas bacterianos, impidiendo la replicación. Para maximizar la descomposición de las moléculas orgánicas, PURELAB Ultra Analytic y PURELAB flex utilizan una lámpara UV de espectro total.

Medios

Los cartuchos de PURELAB Ultra Analytic y PURELAB flex contienen perlas sintéticas de carbón activado, que absorben una amplia variedad de compuestos orgánicos, y

resinas de intercambio iónico de alta pureza para minimizar la liberación de impurezas.

Purificar el agua para LC-MS

La elevada sensibilidad de la LC-MS requiere el uso de agua ultrapura para la preparación de todos los reactivos, tampones, fases móviles y todos los pretratamientos de muestras². Para aplicaciones LC-MS ultrasensibles que requieran niveles muy bajos de carbono orgánico total (COT), es muy recomendable el agua PURELAB Ultra Analytic (Tipo 1+) de ELGA –generalmente con una resistividad de 18,2 MΩ.cm, un valor COT muy bajo, inferior a 2 ppb (figura 1) y unos niveles bacterianos inferiores a 0,1 UFC/ml. Para todas las demás aplicaciones LC-MS, se recomienda el equipo PURELAB flex de ELGA, con un COT inferior a 5 ppb.

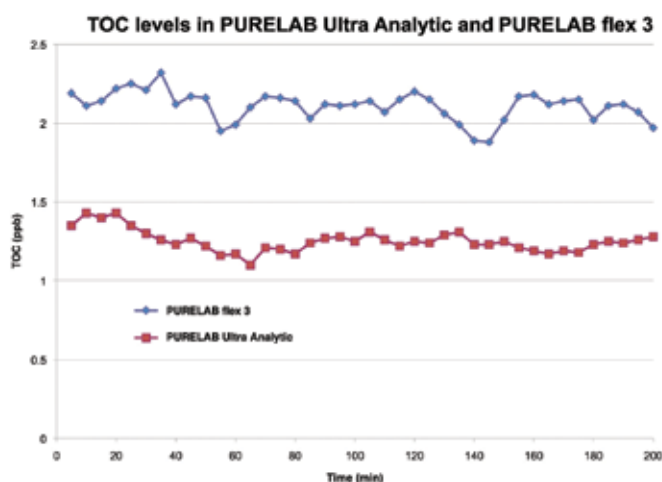


Gráfico LCMS. Niveles de COT en PURELAB Ultra Analytic y PURELAB flex 3

Conclusión

Para todas las aplicaciones LC-MS se debe utilizar agua ultrapura con una elevada resistividad (>18,2 MΩ.cm), libre de partículas, compuestos orgánicos e iónicos, para garantizar un buen rendimiento cromatográfico y unos datos de espectro de masas de alta calidad. ◀

Referencias

- Whitehead, P. Ultra-pure water for HPLC. Why is it needed and how is it produced? Laboratory Solutions, December 1998
- ASTM Standard Guide for Bio-applications Grade Water D 5196-06