

Agua ultrapura para análisis con HPLC*

Katrin Töppner, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen
Dr. Dirk Hansen, Fa. Phenomenex, Aschaffenburg
Dr. Elmar Herbig, Sartorius Weighing Technology, Goettingen

Introducción

La HPLC es un procedimiento analítico para la separación, identificación y cuantificación de sustancias mediante la cromatografía de líquidos. Los comienzos de la HPLC (High Pressure Liquid Chromatography, cromatografía líquida de alta presión) se remontan a la década de los sesenta. Gracias a la mejora de los materiales para las columnas y de los aparatos, se puede hablar desde finales de los 70 de High Performance Liquid Chromatography (cromatografía líquida de alta eficacia) [1].

En la HPLC se bombea la mezcla que se desea separar con ayuda de un disolvente (medio de elución) o de una mezcla de disolventes (eluyente / fase móvil) y mediante un inyector y una bomba al cilindro de separación, que suele ser un tubo de acero inoxidable lleno con la llamada fase estacionaria (véase Figura 1). La fase estacionaria consta normalmente de partículas porosas de gel de sílice o de polímeros en cuya superficie están fijados ligandos químicos. Estos ligandos son responsables de las interacciones selectivas de los analitos en la fase estacionaria, que son necesarios para obtener una separación cromatográfica efectiva. Como mecanismos de separación, y dependiendo de la muestra

y la fase estacionaria cabe tomar en consideración, por ejemplo, la absorción por las fuerzas de Van der Waals, el intercambio de iones, la exclusión de iones y demás. En la separación, las sustancias de muestra se retienen en el material de la columna durante períodos de tiempo diferentes y, por ello, abandonan la columna transcurridos tiempos diferentes. El detector registra seguidamente cada uno de los componentes de la muestra y estos se evalúan en un ordenador. El resultado es un cromatograma (Figura 1). El número de picos equivale a la cantidad de componentes de la muestra separados, la superficie representa su cantidad proporcional (según Kromidas 2000 [1]).

El análisis de azúcar constituye una típica aplicación de la HPLC. Esta analítica se ha llevado a cabo en el marco de diferentes ensayos para caracterizar la calidad de las membranas. Por un lado se ensayó un empobrecimiento de azúcares con membranas, por otro lado se determinó la actividad de membranas inmovilizadoras de enzimas. Para ello tuvieron que determinarse azúcares como la rafinosa, la glucosa y la fructosa.

Para la detección específica de los azúcares pueden emplearse métodos enzimáticos (por ejemplo, el método GOD/POD para

*Artículo publicado en *Labo* en junio de 2013. Reproducido con autorización.

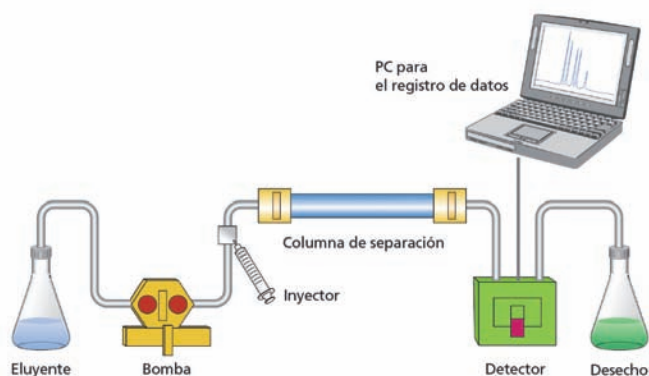


Figura 1. Estructura típica de una instalación de HPLC.

la determinación de glucosa [2]), o métodos espectroscópicos (por ejemplo, la determinación de fructosa según Dische & Borenfreund [3]).

Hoy en día, en la analítica moderna, los azúcares se determinan con frecuencia con ayuda de la cromatografía en capa fina (CCF), la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida de altas prestaciones (HPLC). Estos procedimientos se aplican especialmente en las mezclas en las que sea necesario separar varios azúcares [4].

En la HPLC, tal y como se describe aquí, el fluido debe ser especialmente puro, tanto física como químicamente, no debe contener sustancias o partículas en suspensión ni sustancias disueltas que puedan liberarse de la columna con retardo y emitir con ello una señal. La calidad del disolvente es a menudo determinante por lo que respecta a la fiabilidad de un análisis HPLC. La presencia de trazas de impurezas en la elución del gradiente puede provocar la aparición de "picos fantasma". Estas trazas de sustancias se van acumulando en la columna lo largo del análisis y se liberan en el siguiente cambio de elución. El agua empleada como fluido debe carecer de gérmenes. Para ello pueden añadirse sustancias (por ejemplo, sales de cobre, azida de sodio) que previenen la aparición de gérmenes o algas en el fluido [5]. En este sentido es necesario tener en cuenta las recomendaciones del fabricante de la columna, ya que el uso de aditivos incorrectos puede provocar caños irreversibles en la columna.

El agua desalinizada o destilada contiene aún cantidades considerables de sustancias orgánicas que pueden provocar picos fantasma [5]. Un fluido con impurezas puede provocar deposiciones en la fase estacionaria que derivan en taponamientos, lo que produce un aumento de presión y se manifiesta en una variación del tiempo de desplazamiento de las muestras.

El agua, especialmente para la HPLC con la correspondiente calidad, puede adquirirse a diversos fabricantes o crearse directamente sobre el terreno en las cantidades necesarias con ayuda de un sistema de purificación de agua como, por ejemplo, el arium® pro VF.

A continuación se describen ensayos para separar mezclas de azúcares en las que se ha utilizado agua ultrapura como fase móvil (fluido) elaborada con el arium® pro VF.

Descripción del sistema de agua ultrapura arium® pro VF



Figura 2. Sistema de agua ultrapura arium® pro VF (Foto: Sartorius).

El sistema arium® pro VF (Figura 2) se ha diseñado para producir agua ultrapura a partir de agua potable sometida a un tratamiento previo y elimina de ésta las impurezas que aún pueda contener. La producción de agua ultrapura requiere la recirculación continuada del agua ultrapura dentro del sistema y un caudal de agua constante, lo que se consigue mediante un sistema de bombeo con regulación de la presión. La conductividad del agua se mide en la entrada del agua de alimentación y en el agua de producto (en la salida de agua).

El sistema arium® pro VF (aparato predecesor con las mismas especificaciones técnicas como el aquí representado y rediseñado sistema) utilizado en las investigaciones aquí descritas, funciona con dos cartuchos diferentes. Estos cartuchos están llenos de un absorbente especial de carbón activo y de resinas de intercambio de iones en lecho mezclado para suministrar agua de alta pureza con un reducido contenido de TOC. Asimismo se ha integrado una lámpara de UV, que a unas longitudes de onda de 185 nm y 254 nm actúa como oxidante y elimina los gérmenes.

El sistema arium® pro VF incorpora además un módulo de ultrafiltración que se emplea como filtro de flujo cruzado. La

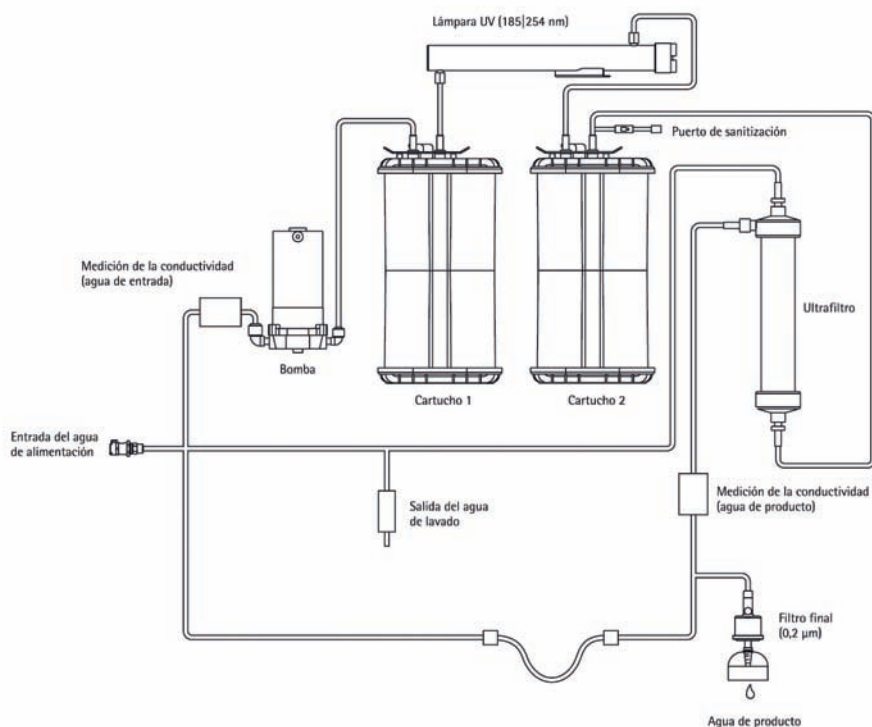


Figura 3. Representación esquemática del diagrama de flujo en el sistema de agua ultrapura arium® pro VF. Para obtener una visión más clara no se han incluido las válvulas y su control.

membrana de ultrafiltración utilizada retiene coloides, microorganismos, endotoxinas, ARN y ADN.

En la salida de agua se ha instalado un filtro final de 0,2 µm que sirve para la eliminación de partículas y bacterias durante la dosificación del agua ultrapura elaborada. El proceso de purificación de agua específico del aparato está representado en la Figura 3 (diagrama de flujo arium® pro VF).

función de diferentes interacciones iónicas. Debido a los grupos sulfonatos en la superficie del material, los poros presentan una carga negativa. Esto provoca que las moléculas con carga negativa no puedan penetrar en los poros del material y acelera su elución. Esta exclusión se basa en el equilibrio de iones en membranas de Gibbs-Donnan. Los analitos que puedan penetrar en los poros se separan en la superficie de la fase estacionaria mediante diferencias estéri-

cas así como interacciones hidrófobas y polares con los grupos funcionales. Para obtener información detallada sobre el mecanismo de separación, véase [7].

Los tiempos de retención de los diferentes azúcares se determinaron mediante el registro de la señal del índice de refracción (RI). La señal RI se indica en una cifra adimensional en nRIU (nano Refractive Index Unit) y constituye la diferencia entre el índice de refracción de la muestra en la célula de la muestra y la fase móvil en la célula de referencia.



Figura 4. Instalación HPLC Agilent 1200 series (foto: Sartorius).

Materiales y métodos

El análisis de las muestras se llevó a cabo en un HPLC Agilent 1200 series (Figura 4 y Tabla 1) con una columna HPLC "Rezex RNM Carbohydrate Na+8%" de la empresa Phenomenex [6]. Es una columna llena con un copolímero reticulado de estireno y divinilbenceno que se ha modificado con grupos de sulfato de sodio. Este material aprovecha el mecanismo de exclusión de iones. Esto significa que los analitos se separan en

Tabla 1. Aparatos y materiales utilizados.

Aparato	Empresa	Artículo
Bomba binaria	Agilent	G1312A
Desgasificador	Agilent	G1379B
Extractor de muestras ALS	Agilent	G1329A
Horno de columnas TCC	Agilent	G1316A
Detector de RI RID	Agilent	G1362A
Columna Na+ 8%	Phenomenex	00H-0136-KO Rezex RNM Carbohydrate

Como fase móvil se utilizó agua ultrapura, producida con el sistema arium® pro VF. Para efectuar la desgasificación necesaria para la HPLC, el agua ultrapura se filtró al vacío mediante un Sartolab BT 500 bottle top 0,2 µm (Sartorius Sartolab BT 180C5).

Ejecución del análisis HPLC

Como preparativo de los análisis, la columna Rezex se calentó a 75 °C en el horno de columnas y se lavó durante la noche con 0,6 ml/minuto de agua ultrapura producida con el sistema arium® pro VF. La unidad óptica del detector RI se atemperó a 35 °C. Las muestras a investigar se prepararon con agua ultrapura arium® pro VF y se sometieron a un filtrado previo por medio del filtro de jeringa de 0,2 µm (Sartorius Minisart® RC4 17822).

El análisis HPLC de las muestras se llevó a cabo según los parámetros fijados de un método para la HPLC [6] (Tabla 2).

Tabla 2. Método HPLC.

Parámetros		
Caudal	[ml/minuto]	0,6
Tiempo	[minutos]	25
Presión máxima	[bar]	70
Temperatura del horno de columnas	[°C]	75
Temperatura del detector RI	[°C]	35
Volumen inyectado	[µl]	2

Resultados

Para determinar los tiempos de retención de cada uno de los azúcares (Tabla 3) se prepararon e inyectaron de forma individual (Figura 5). Como los azúcares sufren interacciones diferentes en la fase estacionaria, se registraron con el detector RI tiempos de retención específicos para cada azúcar tras pasar a través de la columna.

Tabla 3. Tiempos de retención de azúcares a través de una columna Rezex RNM Carbohydrate Na+ 8%.

Azúcar	Tiempo de retención [minutos]	
Rafinosa	Fluka 83400	8,96
Maltosa	Sigma M5885	10,30
Glucosa	Roth 6887.1	12,53
Fructosa	Sigma F0127	13,62

Después de determinar los diferentes azúcares se elaboró y separó una mezcla de azúcares (Figura 5).

Los diferentes azúcares se separaron unos de otros. Los picos de los diferentes tiempos de retención pueden asignarse a los azúcares determinados anteriormente de forma individual.

El efecto de las impurezas o, en su caso, de las sales, se matizaron mediante la inyección de agua corriente y de tampón de fosfato tripotásico (Figura 6).

Una inyección de agua corriente (conductividad 265 µS/cm) y de tampón de fosfato tripotásico (conductividad 1.700 µS/cm) muestra claras señales y puede, por tanto, reconocerse de forma inequívoca como impureza. Especialmente los iones de carga múltiple del agua corriente pueden enlazarse fácilmente por medio de grupos sulfonatos. Los equilibrios disociativos modificados por ello pueden influir también en los tiempos de retención de los correspondientes azúcares. Para un análisis seguro de HPLC con tiempos de retención estables y para evitar la aparición de picos fantasma, es necesario que la fase móvil no presente sales ni otras impurezas. El agua Arium utilizada en esta ocasión presenta una conductividad de 0,055 µS/cm y está prácticamente libre de impurezas molestas, lo que se traduce en una línea base recta sin picos (línea base verde, Figura 6).

La presión de la columna durante los ciclos se mantuvo a un valor constante de 23 bar. Esto demuestra que no existía ninguna deposición en la columna. Ciclos Blank run al comienzo y al final no mostraron ninguna modificación, esto es, no existía ninguna impureza en la fase móvil.

Para determinar la reproducibilidad y el límite de detección, se analizaron series estándares con diferentes concentraciones. En el ejemplo se utiliza la rafinosa. Se registraron los tiempos de retención y las superficies de los picos, representándose en una tabla (Tabla 4).

Tabla 4. Reproducibilidad de los tiempos de retención y determinación del límite de detección en el ejemplo de una serie estándar de rafinosa.

Concentración [mg/ml]	Tpo. de retención [minutos]	Superficie del pico [nRIU*s]
0	-	-
0,015	8,96	603
0,03	8,96	1088
0,06	8,96	2327
0,125	8,96	4178
0,25	8,96	7607
0,5	8,96	15097
1	8,96	30495

HPLC

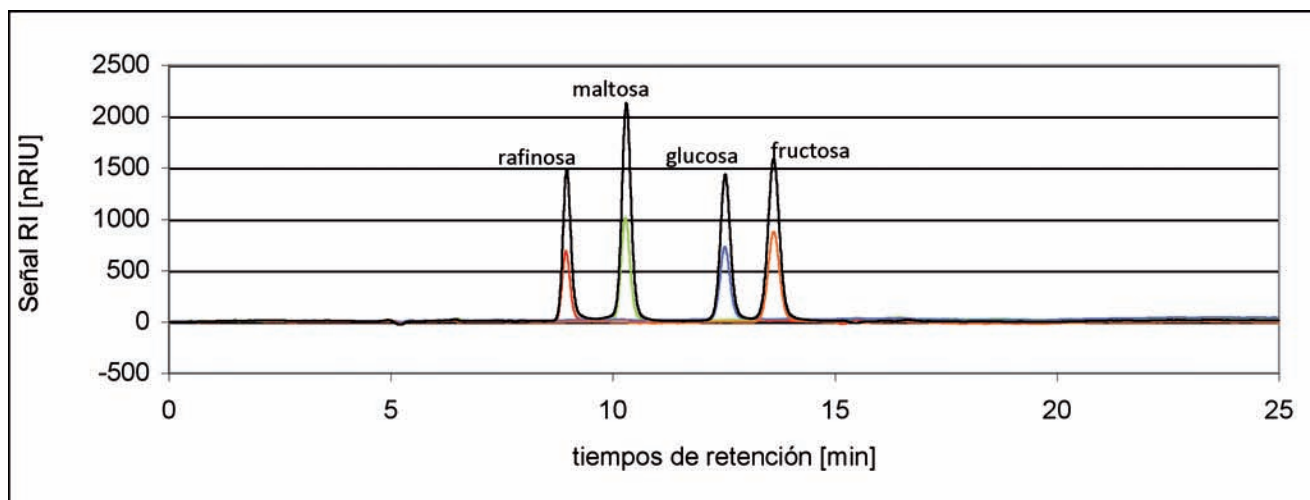


Figura 5. Separación de azúcares inyectados individualmente y de una mezcla de azúcares a través de una columna Rezex RNM Carbohydrate Na⁺ 8% con agua ultrapura arium[®] pro VF.

Azul: mezcla de azúcares.

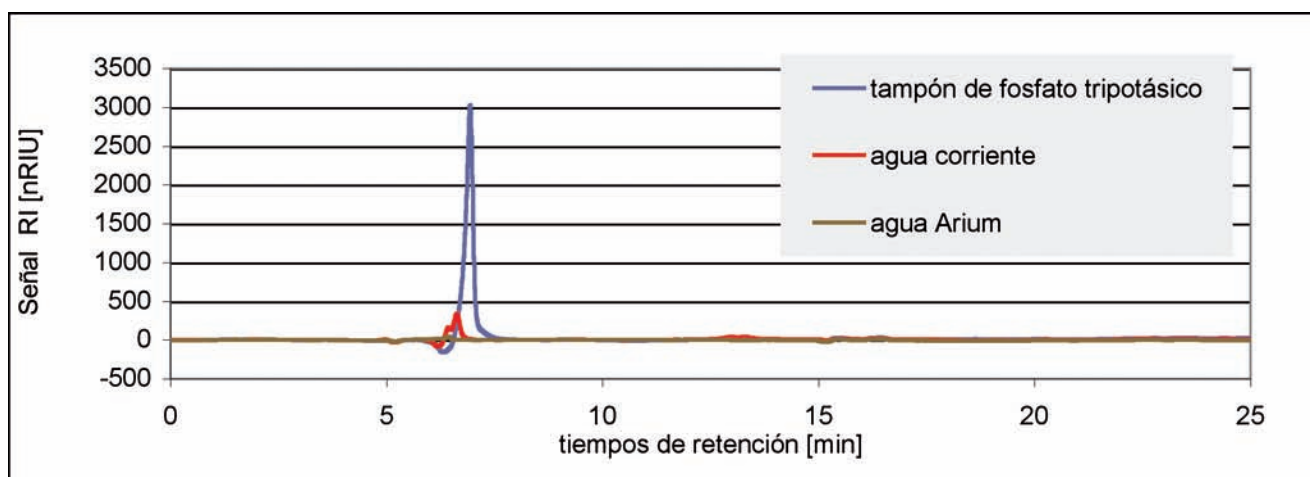


Figura 6. Cromatogramas de tampón de fosfato tripotásico, agua corriente y agua de Arium.

Azul: inyección 2 μ l tampón de fosfato tripotásico 10 mM

Rojo: inyección 2 μ l agua corriente

Azul: inyección 2 μ l agua Arium

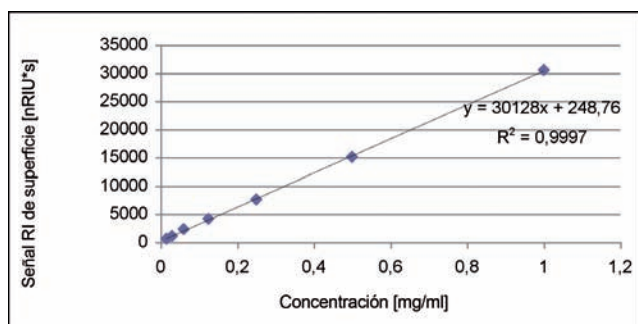


Figura 7. Serie estándar para rafinosa (valores de la Tabla 4) a través de una columna RNM Carbohydrate Na⁺ 8% con agua ultrapura arium[®] pro VF.

Los tiempos de retención constantes obtenidos repetidamente muestran una muy buena reproducibilidad. La serie estándar de rafinosa muestra un desarrollo lineal en una concentración de hasta 0,015 mg/ml (Figura 7).

La creación de una recta estándar a partir de las superficies de los picos permite una cuantificación de muestras; en este caso, de rafinosa, con una concentración desconocida.

Conclusión

Los ejemplos muestran que el agua ultrapura producida con el sistema arium[®] pro VF puede utilizarse sin ningún problema en el análisis de azúcar como fase móvil en el análisis de HPLC. La

fase móvil no influye en las interacciones de la muestra con la fase estacionaria, ya que el agua ultrapura generada con una conductividad de 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$ puede considerarse como prácticamente libre de impurezas. No se producen picos fantasma debido a las sales [5]. Asimismo, los ensayos permiten llegar a la conclusión de que no se producen deposiciones en la fase estacionaria debidas a impurezas, ya que no se observa ningún aumento de presión ni un desplazamiento del tiempo de paso de las muestras.

Con ello, el agua ultrapura que puede producirse en todo momento con el sistema arium® pro VF; constituye una alternativa económica con respecto al agua ultrapura comercial utilizada para elaborar fluidos de gran pureza para la técnica de análisis HPLC, tal como se emplea en los análisis de alimentos y del medio ambiente, así como en la investigación médica, química y bioquímica y en los controles de procesos de las industrias farmacéutica y biotecnológica.

Los trabajos aquí ejecutados y la experiencia positiva resultante sobre la aptitud del agua ultrapura arium® pro VF como fase móvil en la HPLC, provocan que en un futuro próximo se amplíe a otras técnicas de separación como la cromatografía Reversed Phase, la cromatografía Size Exclusion o la uHPLC.

Bibliografía

1. Kromidas, Stavros: *HPLC für Neueinsteiger, aus dem Internet*, ©by Novia GmbH (2000).
2. Hans Ulrich Bergmeyer, *Methoden der enzymatischen Analyse Band II, Verlag Chemie*, Seite 1179,1180 (1970).
3. Dische, Z. and Borenfreund, E.: A New Spektrophotometric Method for the Detection of Keto Sugars and Trioses, *J. Biol. Chem.* 192, 583-587, (1951).
4. Süßwaren, Heft 10, Seite 7, *LCI-Focus*, (2006).
5. Gottwald, W.: RP-HPLC für Anwender. Reihe: *Die Praxis der instrumentellen Analytik*, Herausgeber Gruber, U. und Klein, W., VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Seite 7-8 (1993).
6. *Chromatography Product Guide 12/13*, Phenomenex, pages 232-233, (2012).
7. Weiß, Joachim: *Ionenchromatographie*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Kapitel 5, Seiten 349 ff. (2001).

Agradecimientos

Queremos agradecer a la empresa Phenomenex (Aschaffenburg) que haya puesto a nuestra disposición la columna Rezex RNM Carbohydrate.