

Validación de gradientes de HPLC con caudalímetros no invasivos

La HPLC de gradiente es una herramienta crucial para analizar muestras que contienen compuestos de polaridad variable. Su eficacia radica en la capacidad de adaptar tanto el tiempo como la composición del gradiente, lo que permite manipular los tiempos de retención de los analitos.

Testa Analytical Solutions

Sin embargo, las desviaciones en los perfiles de gradiente programados producidos por los sistemas HPLC plantean problemas que afectan al tiempo de retención y a la forma de los picos. Varios factores contribuyen a esta variabilidad en la HPLC de gradiente, como la calidad del disolvente, el rendimiento de la bomba, los cambios en la presión del sistema y el estado de las columnas. Para hacer frente a estos retos es necesario controlar y supervisar con precisión los perfiles de gradiente.

El método tradicional y generalmente aceptado para la validación de gradientes en un sistema HPLC depende actualmente en gran medida de la ayuda de un detector UV. Típicamente, para un gradiente binario, se utiliza agua pura y agua que contiene 0,1% de acetona. La determinación de la absorbancia de la acetona en función del tiempo representa con gran exactitud el gradiente realizado por el sistema. Sin embargo, aunque este método es exacto, no es representativo del gradiente utilizado en una separación cromatográfica real, ya que hay varios factores importantes, como la viscosidad y la densidad de la solución de los disolventes utilizados. Además, las peculiaridades de las electroválvulas del sistema HPLC utilizado, como los diferentes tiempos de conmutación para las fases de encendido y apagado, no entran realmente en juego cuando los disolventes utilizados son muy similares, como ocurre en el método de validación tradicional.

Teniendo en cuenta, sin embargo, la importancia de gradientes reproducibles para cualquier aplicación de HPLC, un método reproduciblemente preciso de monitorización continua de la mezcla de disolventes creada por el sistema debería ser de interés primordial para las muchas aplicaciones de HPLC de gradiente críticas utilizadas en las industrias farmacéutica, cosmética, alimentaria y otras similares estrictamente reguladas.

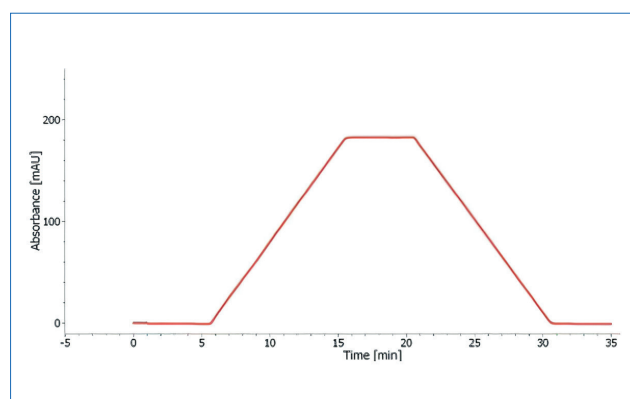


Figura 1: Cromatograma de absorción UV a 265 nm de una prueba de gradiente estándar

Los modernos caudalímetros no invasivos, basados en un principio térmico, son bien conocidos por ser una herramienta rápida y precisa para la determinación del caudal en sistemas HPLC. Esto se ha demostrado en varios artículos y publicaciones¹. Una característica interesante de estos dispositivos, en el contexto de la monitorización de la composición del gradiente, es que los valores de caudal notificados están estrictamente relacionados con el disolvente para el que se ha calibrado el dispositivo. En otras palabras, estos caudalímetros, sin calibración específica, proporcionan un caudal aparente que depende de la composición del eluyente medido. Como tales, son, al menos en teoría, la herramienta perfecta para controlar continuamente la composición del eluyente en un sistema HPLC de gradiente, con el objetivo de determinar la reproducibilidad de la mezcla.

La prueba del concepto descrito se llevó a cabo mediante la determinación simultánea de la composición del eluyente uti-

¹ Véase <https://www.testa-analytical.com/papers/paper45.html>

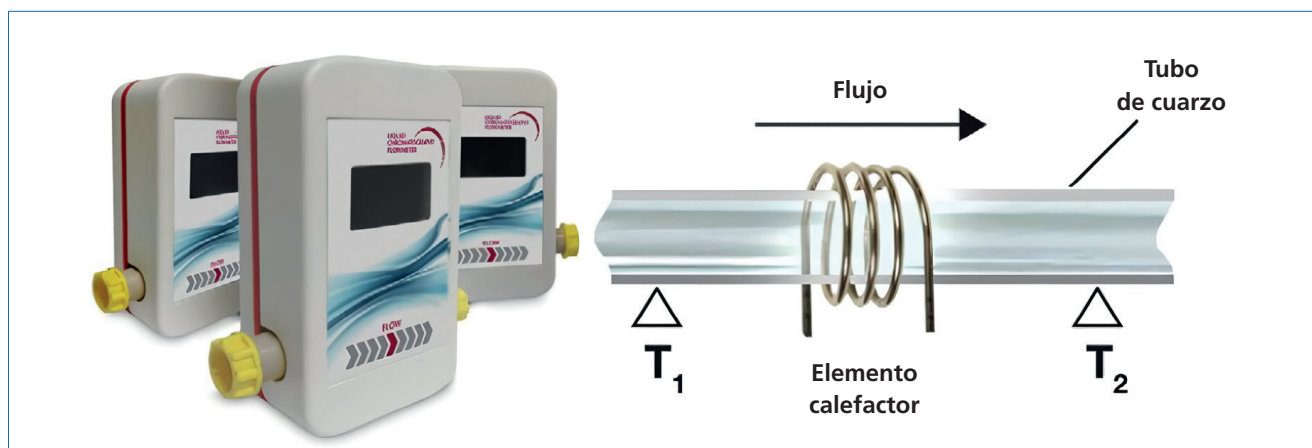


Figura 2: Caudalímetro analítico LC Testa

lizando el método generalmente reconocido de la absorbancia UV, al tiempo que se medía el caudal aparente indicado por un caudalímetro conectado en el extremo del sistema de HPLC. Esta configuración garantiza que la medición del caudal aparente no interfiere en modo alguno con la separación por HPLC. Al contrario que el método tradicional, se trata de un método totalmente no invasivo y, por lo tanto, ideal para monitorizar la composición del eluyente independientemente de una aplicación de HPLC concreta. En detalle, nuestro objetivo de la monitorización no era determinar la composición absoluta del eluyente mezclado, sino comprobar si la reproducibilidad de la mezcla puede determinarse mediante este método confirmando así la validez de la supuesta idoneidad de este método para la tarea de control continuo de la reproducibilidad.

La Figura 3 muestra los resultados de los dos métodos ejecutados al mismo tiempo. El experimento se repitió dos veces, las trazas de los dos experimentos están superpuestas. Es claramente visible que tanto el método tradicional como el de "flujo aparente" (utilizando el caudalímetro LC) informan de forma reproducible sobre la composición de la mezcla eluyente.

Aunque el método de "flujo aparente" no proporciona una determinación absoluta de la composición del eluyente, sí lo hace ofrecen la ventaja real de no interferir en la separación, permitiendo así el seguimiento de cualquier forma y composición de gradiente requeridas, lo que no es posible con el método de validación tradicional.

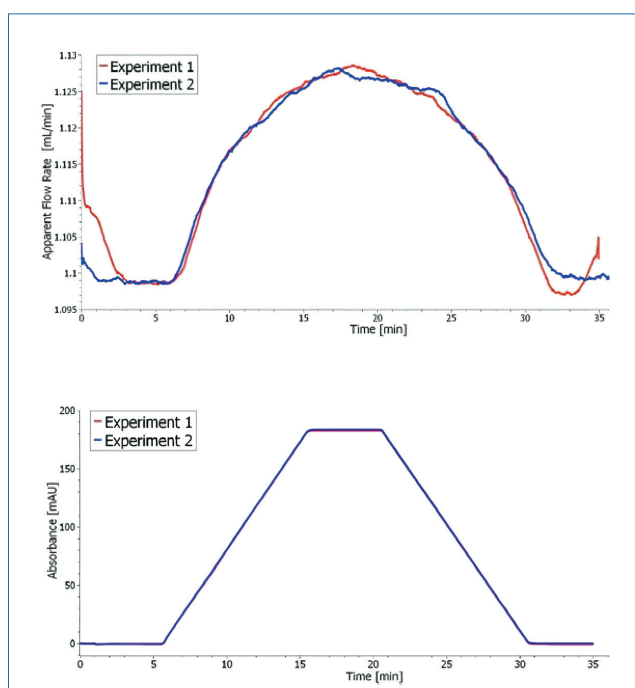


Figura 3: Reproducibilidad del perfil de caudal en comparación con la absorbancia UV

Conclusión

Este estudio experimental demuestra la capacidad de los modernos caudalímetros no invasivos como valiosas herramientas para validar y controlar el gradiente en sistemas de HPLC de una forma que hasta ahora era imposible. Al monitorizar con precisión los caudales aparentes en tiempo real y permitir el registro de datos, estos caudalímetros garantizan que el gradiente programado se reproduzca fielmente, facilitando una separación precisa y consistente en HPLC. Esto permite utilizar la HPLC de gradiente con un mayor grado de confianza.

Los caudalímetros analíticos de LC Testa son la herramienta perfecta para los laboratorios en los que se desea o se necesita una mayor confianza en los resultados de HPLC. La flexibilidad y las ventajas de estos caudalímetros no invasivos como dispositivo de monitorización de la composición del eluyente en sistemas HPLC de gradiente se han confirmado en comparación con las técnicas tradicionales de detección UV.

www.testa-analytical.com