Nota técnica 20670

Resultados del uso de viales y cierres relavados

Loy Shick, Thermo Fisher Scientific, Rockwood, TN, EE. UU.
Brian King, Thermo Fisher Scientific, Runcorn, Cheshire, R. U.

Palabras clave
Dispositivo automático de muestras, cierres, contaminación, viales usados, limpieza de viales, viales

Introducción

Cuando se utilizan viales de vidrio para los dispositivos automáticos de muestras, en los flujos de trabajo estándares es necesario considerar a los viales y los cierres como elementos consumibles, que se desechan una vez utilizados. En ocasiones, se han utilizado lavavajillas de laboratorio (empleados en la limpieza del instrumental de vidrio) para limpiar los viales de uso en dispositivos automáticos de muestras. Luego, los viales limpios se utilizan en el laboratorio con la esperanza de que esto reduzca los costos gastados en consumibles.

Esta nota demuestra que esta limpieza causa daños físicos a los viales de vidrio, al mismo tiempo que es ineficaz para eliminar la contaminación de la superficie del vial. Esta contaminación es impredecible, y produce picos de interferencia en aplicaciones de cromatografía de LC y GC. La contaminación impredecible puede ser la causa principal de las fallas sin explicación que ocurren en los ensayos, y que resultan en la necesidad de repetir todo el análisis a todas las muestras.

El trabajo experimental implicó la investigación de los efectos físicos del proceso de lavado, seguido por los problemas de contaminación generados por el uso anterior de los viales y las membranas asociadas.

Efectos físicos del relavado

Variación de la evaporación

Muestra 1: Se proporcionaron viales con rosca de 9 mm relavados en vidrio transparente.

Muestra 2: Se proporcionaron viales con rosca de 9 mm relavados en vidrio color ámbar.

Muestra 3: Thermo Scientific National proporcionó viales de 9 mm de vidrio transparente (C4000-1W) y cierres nuevos con membrana de PTFE/silicona ™ (C5000-54B)™ como muestras de referencia.

Thermo SCIENTIFIC

Evaporación a temperatura ambiente

- Los viales rellenos con metanol estuvieron una hora a temperatura ambiente.
- Se tomó el peso inicial en una balanza analítica de cuatro lugares.
- Los viales se cargaron en un bastidor de muestras y se los dejó a temperatura ambiente durante 7 días.
- Se tomó el peso a temperatura ambiente final, y se calculó la diferencia como pérdida de muestra en gramos.

Evaporación a alta temperatura

- Los viales se devolvieron al bastidor y se incubaron a 40 °C durante 24 horas.
- El peso de alta temperatura final se tomó y restó del peso de temperatura ambiente final, para tener la pérdida de muestra a 40 °C en gramos.

Los datos de evaporación se comparan en las Figuras 1a–1c.

Los niveles de evaporación son más altos para los viales que han pasado por el proceso de relavado.

Impacto de la reutilización de membranas

En la Figura 1d se muestra que cualquier membrana proveniente de los viales y las tapas reutilizados evidenció una pérdida de evaporación mayor. Esto demostró que se había perdido la integridad, debido a la separación física de la capa de silicona y PTFE.

Reutilización de la membrana

Evaluación de la membrana utilizada

- 10 viales 8-425 nuevos se llenaron con 100 % metanol y se taparon con un cierre 8-425 nuevo con membrana sin hendidura de PTFE/silicona.
- 10 membranas utilizadas se insertaron manualmente en tapas 8-425 nuevas y se adjuntaron a viales 8-425 nuevos rellenos con 100 % de metanol.

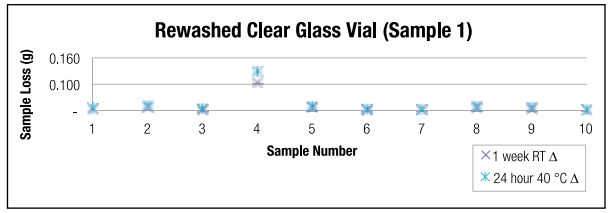

Figura 1a

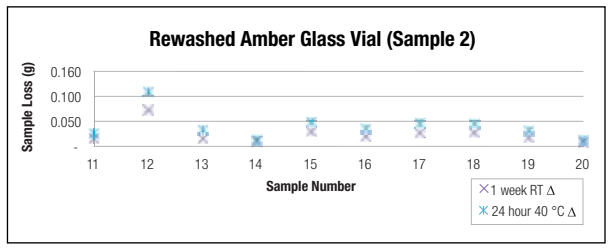

Figura 1b

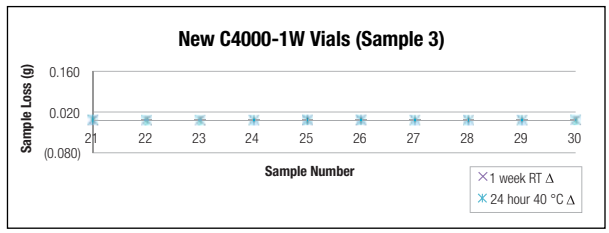

Figura 1c

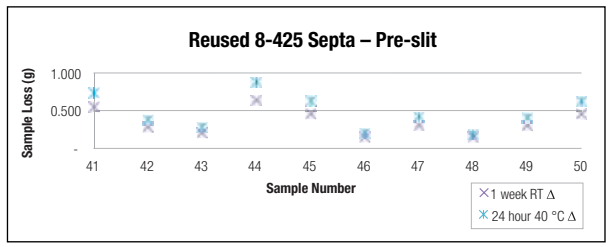

Figura 1d

Figura 2a: Viales prelavados en vidrio transparente y color ámbar

Figura 2b: Daño típico a la rosca relavada

Figura 2c: Restos de parches de identificación en viales color ámbar después del relavado

Deterioro de la superficie

Físicamente, los viales exhibían daños en las roscas y había abrasión considerable en la superficie del vial. La magnitud de la abrasión fue tal que se habían eliminado los parches de identificación que suelen estar en este producto. La eliminación estaba asociada con la opacidad del vidrio, que limita la transparencia y la visibilidad de los niveles de la muestra (Figura 2a–c).

Microestructura de la superficie de vidrio

Los viales para cromatografía están compuestos por vidrio borosilicatado neutral de alta calidad. Las tiras de vidrio fundido primero se transforman en tubos largos de un diámetro externo específico y con un espesor de las paredes también específico. Estos tubos luego se vuelven a trabajar a altas temperaturas para formar el perfil de cierre y la forma de la base de los viales. Los viales luego se templan para eliminar las tensiones y reforzar el vidrio antes de embalarlo. La superficie del vidrio templado es lisa, y está libre de rayones superficiales y abrasiones.

Cuando los viales se vuelven a lavar, se rayan, presentan abrasiones y se les depositan placas en la superficie. La superficie ya no se encuentra libre de tensiones, y presenta zonas de rayones donde se pueden identificar roturas y grietas potenciales (Figura 3).

El vidrio borosilicatado neutral después de templado puede considerarse vidrio Tipo 1 con superficie homogénea con enlaces de siloxano. La rotura de esta superficie aumenta el área de superficie y divide los siloxanos que liberan grupos silanoles en la superficie del vidrio. El aumento en los silanoles ácidos aumentará la actividad superficial, lo que dará como resultado una adsorción potencial aumentada de cualquier especie química básica presente en la muestra.

El efecto del daño físico en la superficie del vial y a la rosca puede tener consecuencias de largo alcance.

- Los cambios en la tasa de evaporación del vial introducirá incertidumbre en la concentración de los estándares y las muestras.
- La pérdida de solvente que experimentan los viales cambiará la concentración, y tendrá impactos en la recuperación y la precisión de la medición, incluso cuando se utilicen estándares internos.
- El cambio en las características superficiales aumentará el riesgo de adsorción permanente de la muestra dentro del vial, en particular de los solutos básicos.
- El vidrio se debilita, y no se puede descartar que haya rotura de los viales durante el transporte del dispositivo automático de muestras.

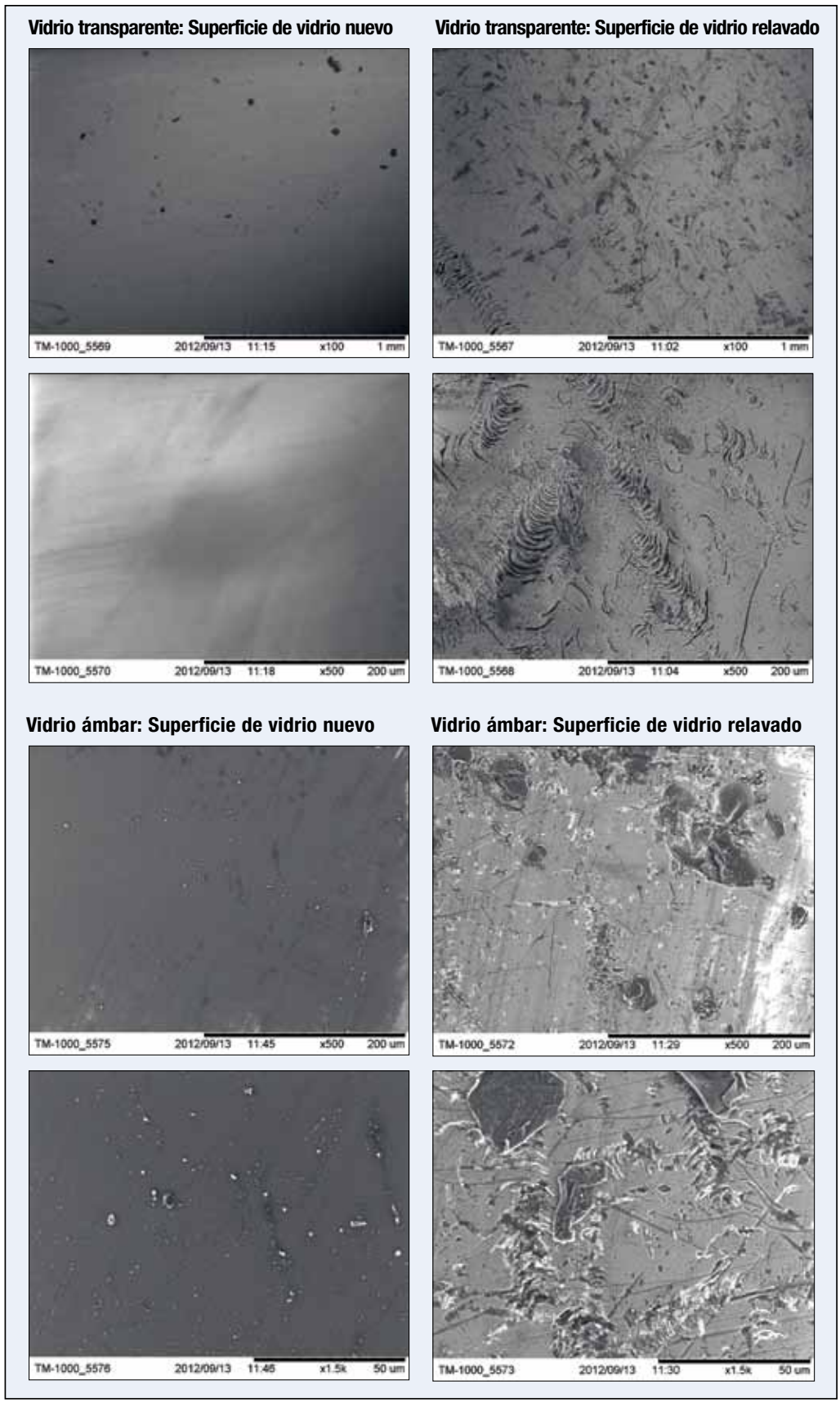

Figura 3: Comparación de superficies de viales de vidrio nuevo y relavado

Comparación de GC-MS de viales nuevos y relavados

Las muestras de un mililitro de metanol utilizadas como solvente en blanco se almacenaron en varios viales de vidrio estándares. Las muestras almacenadas en viales nuevos luego se compararon con las muestras inyectadas de viales relavados seleccionados al azar. Se emplearon dos tipos de viales, color ámbar y transparentes. Los viales transparentes fueron fabricados en vidrio borosilicatado neutral de expansión 33. Los viales color ámbar eran de Tipo 1 de vidrio borosilicatado neutral de expansión 51. Todos los viales relavados se habían sometido a varios ciclos de lavado.

El nuevo vial en blanco TIC (conteo de iones totales) se compara con dos viales color ámbar en blanco.

Los perfiles de los dos viales muestran que el vial A tiene polisiloxanes cíclicos como contaminante, mientras que el vial B tiene picos de impureza adicionales. La contaminación no es predecible, pero depende de las muestras que estuvieron anteriormente en los viales (Figura 4).

Una comparación en blanco semejante se realizó con los viales de expansión 33 de vidrio transparente, que también mostraron gran variación en la intensidad y el perfil de los contaminantes que se extrajeron de los viales. En este caso, un vial mostró que las especies con cola se extrajeron y distorsionaron los valores de referencia de GC en una parte clave del perfil de GC.

Otro vial probado en la misma secuencia mostró respuestas mucho menores para todos los picos (Figura 5).

El uso de dichos viales relavados con GC-MS en modo TIC dará lugar a la generación de picos de impureza significativos que interferirán con los picos analíticos, o llevarán a cuantificaciones escasas debido a la coelución.

Método GC-MS

Instrumento GC	Thermo Scientific™ TRAZA™ GC
Horno	40 °C (0.5 minutos), 15 °C/minuto, 150 °C (1 minuto), 10 °C/minuto, 290 °C (5 minutos)
SSL	Sin división (1 minuto), 50 ml/minuto flujo dividido, purga de membrana constante
Portador izquierdo	Helio a 1.2 ml/minuto, flujo constante, compensación de vacío activada
Temp. SSL	250 °C
Columnas	Thermo Scientific™ TraceGOLD™ TG-5MS 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm
Instrumento MS	Thermo Scientific™ ISQ™ cuadrupolo único GC-MS
Temp. de línea de transferencia	290 °C
Temp. de origen de ion	230 °C
Fuente de ionización	EI
Energía	70 eV
Rango de barrido	50–650 barrido completo, tiempo de espera de 0.2 segundos
Demora de solvente	3.5 minutos
Dispositivo automático	Thermo Scientific™ TriPlus RSH™ de muestras
Volumen de muestra	1 µL

Tabla 1

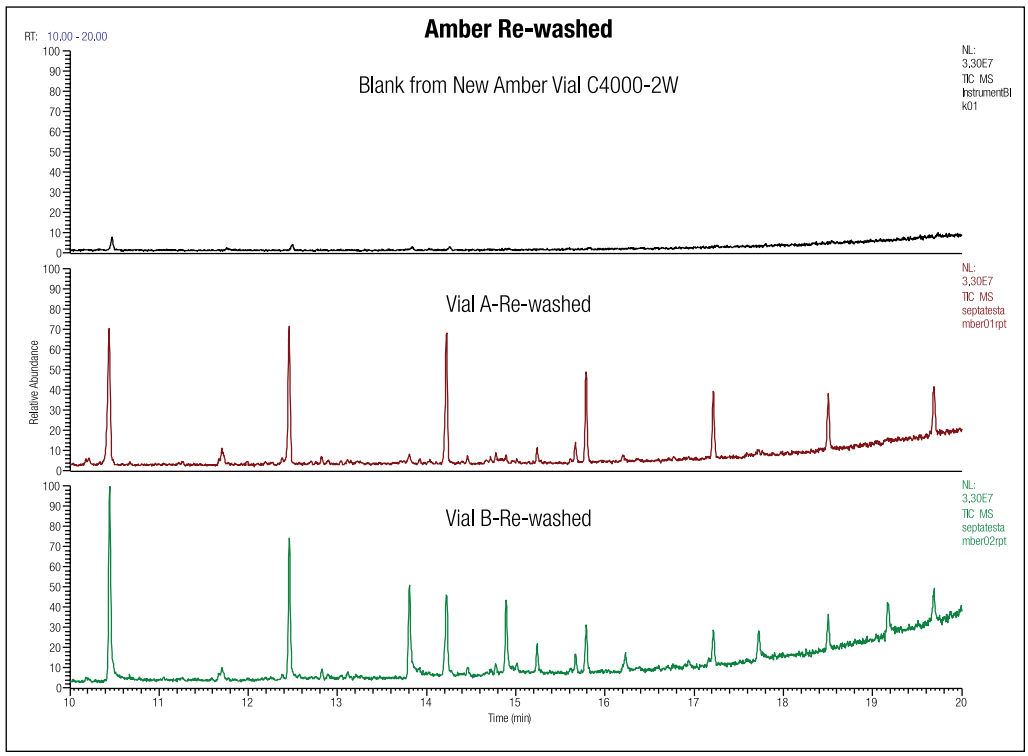

Figura 4: Pantalla de TIC de 10-20 minutos

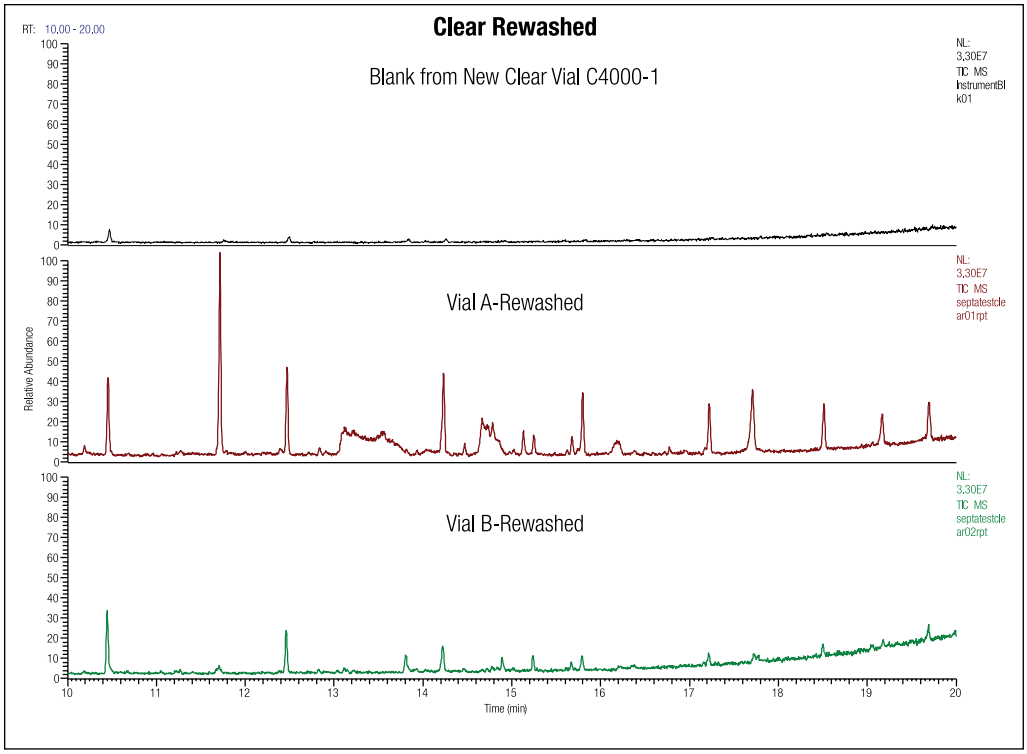

Figura 5

Impacto de la reutilización de membrana

Además de la reutilización de viales, también es posible encontrarse con la extracción y reutilización de membranas de inyección.

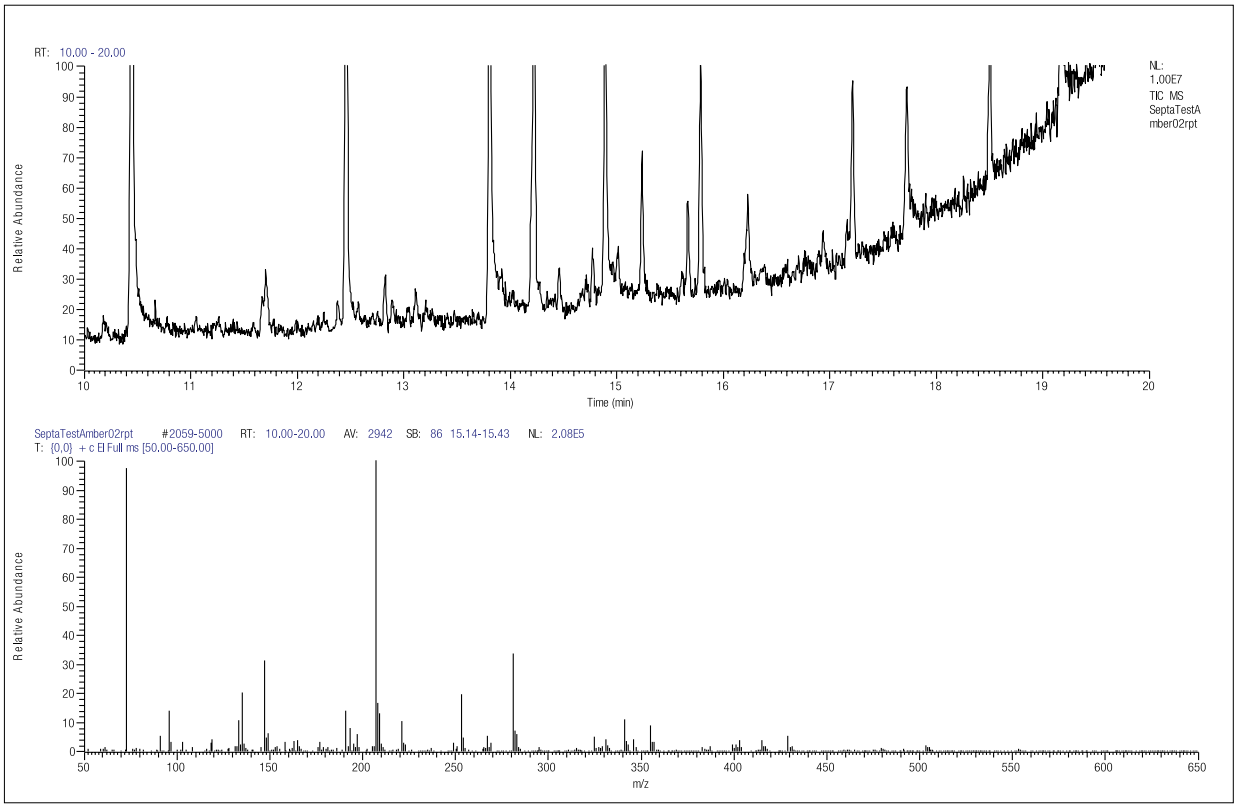

Figura 6: (Arriba) GC-MS y elementos traza de TIC que muestran los componentes de los picos de extracción de siloxano. (Abajo) Especialmente los siloxanos son más fácilmente extraíbles de las membranas con hendiduras dañadas.

Efectos en los instrumentos

Después de realizar tres pruebas separadas con los viales y las membranas relavados, el desempeño de GC comenzó a deteriorarse, incluso con las piezas en blanco limpias.

Se inspeccionó el alineador de inyecciones y se encontraron depósitos atrapados allí. Algunos se veían como fragmentos negros provenientes de la capa de silicona decolorada.

El deterioro de la membrana puede aumentar el tiempo de inactividad del instrumento necesario para reemplazar el alineador de inyecciones, y también provocar arrastres en los estándares y las piezas en blanco.

Interferencias en HPLC-UV encontradas en perfiles de gradiente

Instrumento HPLC	Thermo Scientific™ Accela™ 1250 PDA
Fase móvil	A: Agua/ácido fórmico 1 % B: Acetonitrilo A:B 5–95 % 10 minutos
Caudal	0.5 ml/minuto
Volumen de inyección	5 µL
Detección	PDA 210 nm, 220 nm, 254 nm

Tabla 2

Una serie de gradientes lineales se ejecutaron y monitorearon mediante UV. Las inyecciones de los viales relavados mostraron que una serie de picos se detectaron en 220 nm y 254 nm, que no estuvieron presentes en las muestras de los viales nuevos.

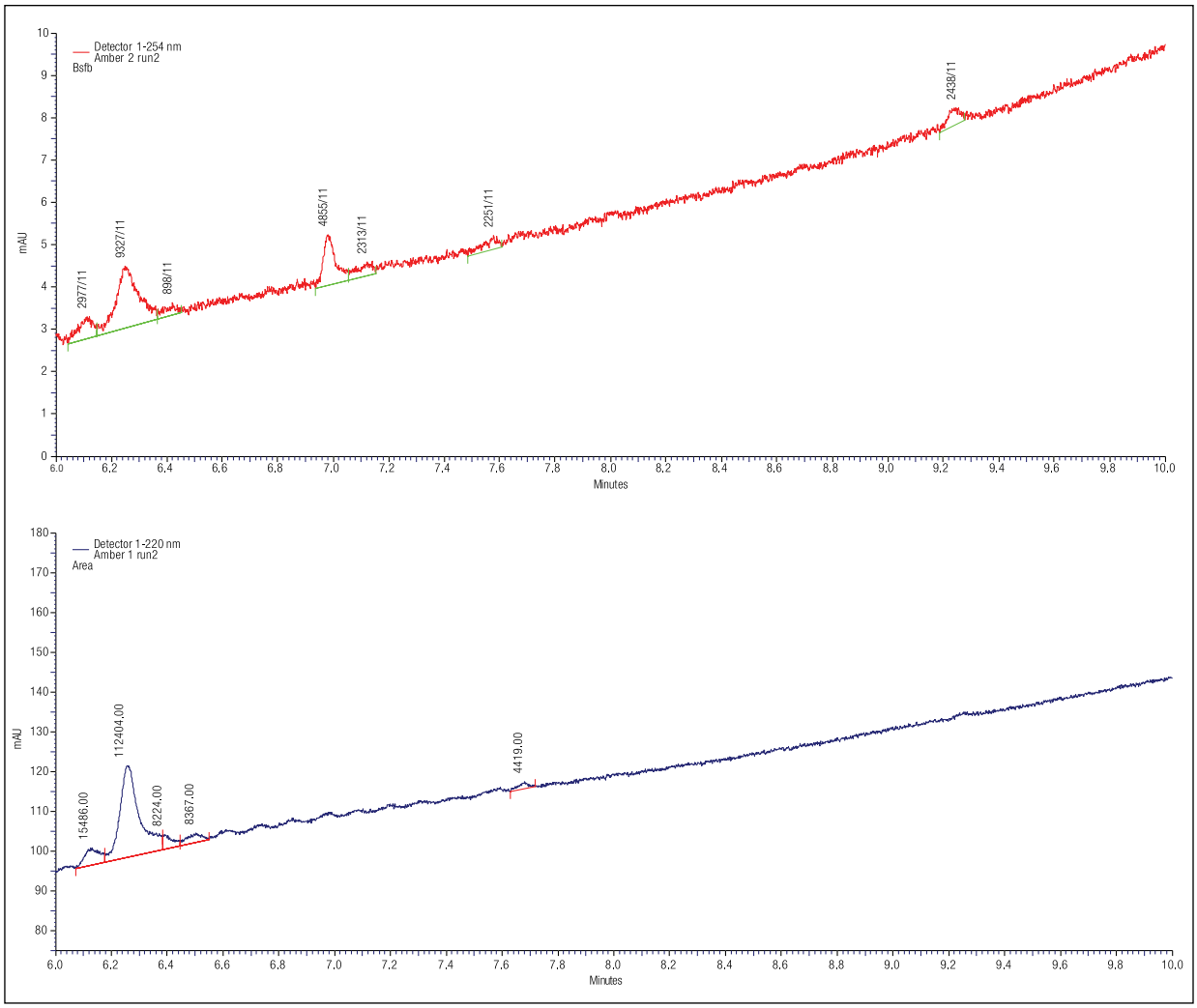

Figura 7: Extracción del perfil de gradiente de vial relavado

Instrumento HPLC	Thermo Scientific Accela 600 LCQ Deca XP	
Columna	Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™ 3 µm 100 mm × 2.1 mm	
Fase móvil	A: Agua/ácido fórmico 1 % B: Acetonitrilo A:B 10–100 %; B en 25 minutos	
Caudal	0.3 ml/minuto	
Volumen de inyección	10 µL	
Detección	+ESI MS	
	Posición de la sonda	C5
	Voltaje de la aguja ESI	4.5 kV
	Temperatura capilar	300 °C
	Voltaje capilar	46 V
	Gas de protección	40
	Gas auxiliar	10
	Barrido completo	50 a 1500
	Microbarridos	3

Tabla 3: HPLC-MS

Comparación de HPLC-MS de señal de fondo de las membranas reutilizadas vs. las combinaciones de vial y membranas nuevas.

La presencia de contaminación por siloxano de las membranas reutilizadas se evidencia por los picos de masa adicionales que se muestran en el barrido de una elución de gradiente semejante a los barridos UV a continuación.

Muestra incubada con metanol a 30 °C durante 12 horas con 1) Vial nuevo en vidrio transparente con membrana de silicona/PTFE 2) Vial relavado en vidrio transparente con una membrana dividida reciclada.

La señal MS de fondo aumentó por un factor de 5 en comparación con la combinación de vial y membrana nuevos cuando se compararon las muestras mediante las condiciones del instrumento mostradas en la Tabla 3.

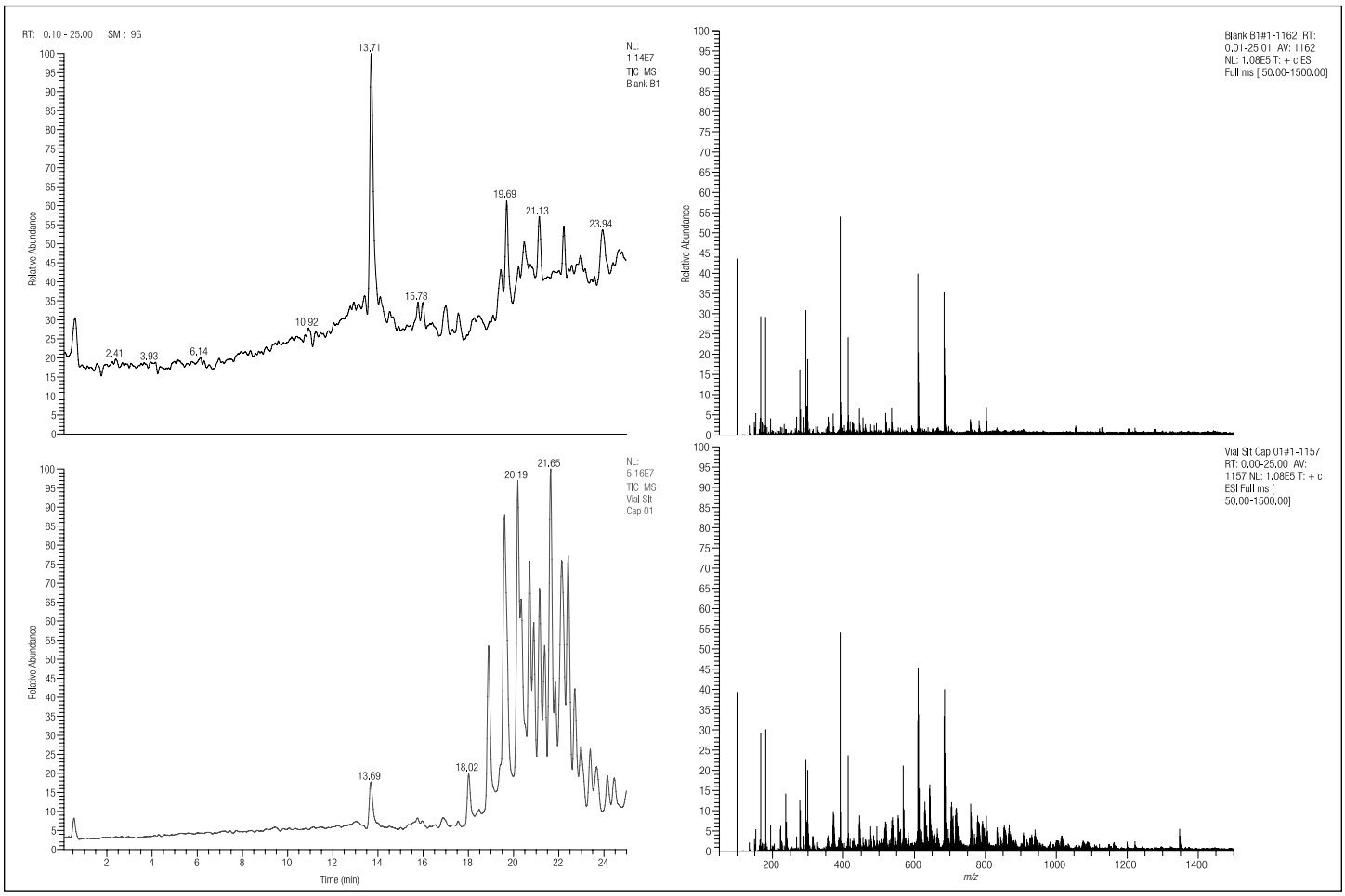

Figura 8: Comparación de viales contaminados con viales en blanco con membrana de silicona/PTFE

Resumen

El uso de viales relavados y la reutilización de membranas se compara con el uso de viales nuevos.

- Se realizó una comparación de inyecciones vacías de dichos viales relavados, con instrumentos GC y HPLC.
- En todos los casos se encontraron componentes adicionales en las muestras en blanco de GC-MS. En el modo TIC se detectó interferencia con los estándares.
- El tiempo de inactividad de los instrumentos y la GC aumentó, debido a que el índice de reemplazo del alineador de inyecciones fue mayor.
- En HPLC, incluso la introducción de inyecciones de volumen pequeño implicó la introducción de picos adicionales en el modo UV.
- La comparación entre los viales contaminados y los viales nuevos se mostró claramente mediante un barrido de rango de masa completo.
- Cuando se agregaron membranas reutilizadas, la contaminación de la inyección de los viales aumentó.

Conclusión

El uso de viales relavados y membranas reutilizadas puede comprometer los resultados óptimos de la cromatografía. Los viales relavados y las membranas reutilizadas pueden introducir picos de interferencia no reproducibles en métodos cromatográficos que son de otro modo estables. Esto puede ser la causa principal de las fallas sin explicación que ocurren en los ensayos, y que suelen exigir nuevas pruebas a todas las muestras, a veces desde los pasos iniciales de preparación. El tiempo perdido en la realización de nuevas pruebas y en la búsqueda de soluciones cuando hay fallas de ensayos no reproducibles contrarresta los posibles beneficios que pueda tener la reutilización de viales y membranas. El cromatografista que necesita contar con muestras cuya integridad no ha sido contaminada, debería usar siempre membranas y viales nuevos para cada análisis.

Para obtener más información, visite nuestro sitio web en **www.thermoscientific.com/vials**

©2013 Thermo Fisher Scientific Inc. Todos los derechos reservados. Todas las marcas comerciales son propiedad de Thermo Fisher Scientific Inc. y sus subsidiarias. Esta información se presenta como un ejemplo de las capacidades que poseen los productos de Thermo Fisher Scientific Inc. No tiene como finalidad alentar el uso de estos productos de manera tal que pudiera violar los derechos de propiedad intelectual de otros. Las especificaciones, los términos y los precios están sujetos a cambios. Algunos productos no están disponibles en todos los países. Para obtener más información comuníquese con su representante local.

EE. UU. y Canadá +1 800 332 3331
Australia 1300 735 292
(llamadas nacionales gratuitas)
China +86 21 68654588
+86 10 84193588
+86 20 83145199
800 810 5118
Francia +33 (0)1 60 92 48 34
Alemania +49 (0) 2423 9431 20 o 21
India +91 22 6742 9494
+91 27 1766 2352
Japón +81 3 5826 1615
Reino Unido +44 (0) 1928 534 110
Nueva Zelanda 0800 933 966
(llamadas nacionales gratuitas)
Para otras consultas +44 (0) 1928 534 050

Soporte técnico
América del Norte +1 800 332 3331
Fuera de América del Norte
+44 (0) 1928 534 440

TN20670_S 02/13M

Thermo SCIENTIFIC
Part of Thermo Fisher Scientific