

Sistema de HPLC/MS diseñado para Rápida Resolución



Resumen:

La demanda de alta productividad ha hecho que las técnicas que utilizan columnas con tamaño de partículas por debajo de los 2 micrones pasen a ser muy populares. Este tipo de cromatografía requiere de cromatógrafos y detectores capaces de manejar y adquirir señal mucho más rápido que los sistemas convencionales. Esta nota de aplicación describe, en particular, un Espectrómetro de Masa (con tecnología de cuadrupolo simple) usado como detector y capaz de escanear picos muy angostos.

Introducción:

Hoy en día existe la tendencia a acortar los tiempos de análisis, con el solo objetivo de analizar una mayor cantidad de muestras por día. Por otro lado, el desarrollo requerido para la optimización de los parámetros también debe ser lo más rápido posible. Por tales motivos, un detector con alta velocidad de adquisición se hace necesario.

Históricamente fue siempre un desafío poder producir buenos espectros en picos muy angostos. Esta nota de aplicación describe los componentes de un sistema HPLC/MS optimizado para cromatografía de alta velocidad.

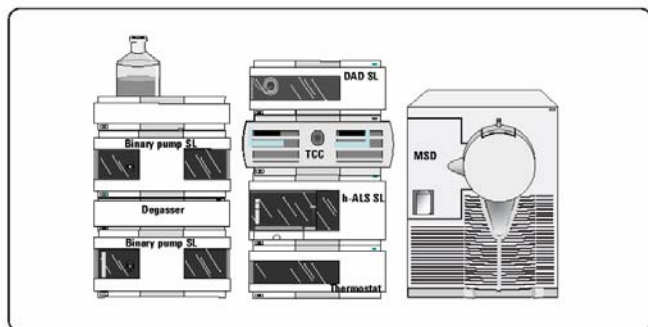
Experimental:

Se configuró un cromatógrafo líquido marca Agilent 1200 Rapid Resolution con la opción de regeneración de columnas.

El sistema consiste en los siguientes módulos:

- Dos bombas 1200 binarias SL con degasificador en cada una
- Automuestreador 1200 SL de alta performance
- Compartimiento de columna con una válvula de 10 vías para regeneración de columnas
- Detector por arreglo de diodos SL con capacidad de adquirir datos a 80 Hz
- Detector de masas de simple cuadrupolo marca Agilent Technologies modelo 6140 con capacidad de adquirir señal hasta 10.000 u/segundo equipado con fuente multimodo (ESI/APCI).
- Columnas Zorbax SB C18 de 2,1 x 50 mm, 1.8 μ m de tamaño de partícula
- Software Chemstation revisión B.02.01 SR1

Las muestras utilizadas contienen 4 sulfas.



En esta configuración los módulos fueron colocados de tal manera de minimizar la distancia entre el detector por Arreglo de Diodos y el de Masa. Para el Detector de Diodos se utilizó una celda de 2 μ L. El capilar de salida se conectó directamente al nebulizador del Espectrómetro de Masa.

El sistema se muestra en la **Figura 1**

Figura 1

Agilent 1200 Rapid Resolution con detector de masas de simple cuadrupolo modelo 6140

Condiciones del método

Solvente A: 1mM de acetato de amonio en agua con 2% de metanol
Solvente B: 1 mM de acetato de amonio en metanol
Flujo: 1,3 mL/min para la columna de 2,1 mm y 2 ml/min para la de 3 mm
Gradiente: 8% B a 60 % B en 0,5 minutos
Finalización: 0,8 minutos

El autosampler fue utilizado en el modo de superposición de inyección con el modo de reducción de volumen muerto activado. El horno de columna fue operado a 80°C y el DAD a 40 Hz, con longitud de onda 272 nm/16, referencia 360/100, con espectros adquiridos en todo el pico desde 210 a 400 nm.

Condiciones del Espectrómetro de Masa

Fuente multimodo combinado con ESI-APCI
Rango de escaneo: m/z 100-600,
Vaporizador 200°C
Dry Gas 6 L/min a 265°C,
Nebulizador 35 psi,
Fragmentador 150 V,
VCap: 3000 V,
Corriente de corona 4 uA
Voltaje de carga 2000 V

Resultados y discusión:

Al utilizar columnas de tamaño de partículas de 1,8 μm , con elevadas temperaturas y altos flujos, se obtienen separaciones con excelente resolución. A flujos de 1.2 a 1.4 mL/min, con columnas de 2,1 mm de diámetro interno, o 2 ml/min con 3 mm de diámetro interno, se obtienen picos de menos de 1 segundo de ancho.

Trabajos previos han demostrado que la utilización de gradientes con agua y metanol, con acetato de amonio como modificador, y fuente en modo dual resulta en la formación de buenos iones para un rango muy amplio de compuestos.

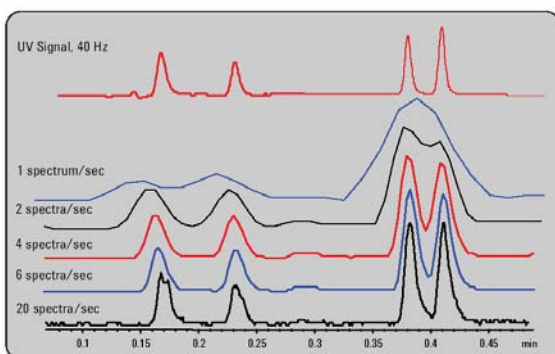


Figura 2
Efectos en la resolución al cambiar la velocidad de adquisición.

Tal como puede ser visto en dicha figura, los espectros obtenidos con velocidades de 1 a 2 espectros/segundo son inadecuados para obtener una buena resolución.

Detector	Data Rate (Hz)	PWHM (msec)
UV	40	373
MS	6	804
MS	20	546

Tabla 1
Ancho de pico de sulfametazina a diferentes velocidades de adquisición

También se realizó un estudio para determinar el impacto de la velocidad de escaneo en la resolución aparente. Utilizando las mismas condiciones cromatográficas, las masas fueron adquiridas a 1, 2, 4, 6 y 20 espectros/segundo. Los resultados se muestran en la **Figura 2**

Solamente a tasas de 6 espectros/segundo en adelante comienza a parecerse al cromatograma obtenido en UV. Como se muestra en la **Tabla 1**, el aumento en la velocidad del detector se ve reflejado en el ancho de pico (**Figura 2**).

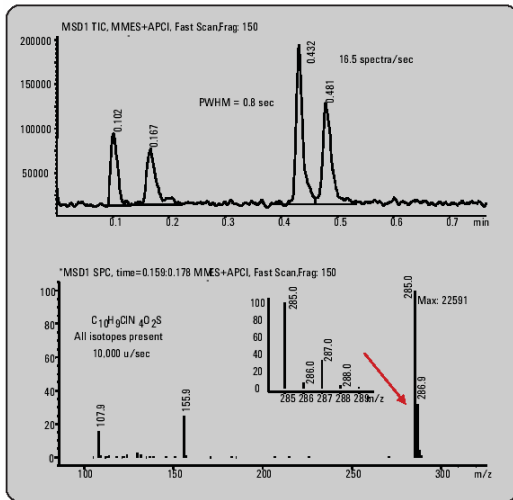


Figura 3
Cromatograma iónico total y espectro de sulfaclopiridazina, velocidad 10.000 u/seg

Conclusión:

El cuadrupolo Agilent 6140 puede adquirir espectros de masas de excelente calidad a velocidades de barrido altas que se adaptan a las técnicas de alta resolución. Estas reciben día a día mayor aceptación en el mercado debido a la alta productividad y excelente resolución cromatográfica. Este Espectrómetro de Masa, en combinación con el Agilent 1200 RRHT HPLC, se adecua entonces perfectamente a los actuales requerimientos del mercado.

FUENTE: Agilent Technologies Inc. Publication Number 5989-5917EN.
By Doug McIntyre. Published December 1, 2006

El Espectrómetro de Masa cuadrupolar Agilent 6140 opera a tasas de 1,4 MHz, a diferencia de los tradicionales de 1 MHz. Esto trae aparejado mayores ciclos de radio frecuencia para lograr velocidades de escaneo muy altas. En velocidades ultra rápidas, el cuadrupolo puede llegar a barrer 10.000 u/segundo. Tomando masas de 100 a 600 unidades de m/z, el sistema dio 16,6 espectros/segundo. La **Figura 3** muestra los resultados obtenidos a esas velocidades. El espectro de masas del segundo pico, sulfaclopiridazina, se muestra debajo del TIC (Total Ion Chromatogram)