

Sistema SFC Analítico Agilent 1260 Infinity com Detecção por Espectrometria de Massas por Tempo de Voo

Desenvolvimento de métodos usando o Method Scouting Wizard

Autores

Stefan Bieber
Analytical Research Institute
for Non-Target Screening
(AFIN-TS) GmbH
Augsburgo, Alemanha

Thomas Letzel
Grupo de Pesquisa Analítica,
Presidente da Engenharia de
Sistemas de Água Urbanos,
Technical University of Munich
(TUM)
Garching, Alemanha

Edgar Naegele e
Daniel Kutscher
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Alemanha

Resumo

Esta nota de aplicação demonstra o uso do software Agilent ChemStation Method Scouting Wizard para o desenvolvimento automatizado de um método de separação de fármacos por cromatografia de fluidos supercríticos (SFC) aquiral no sistema SFC analítico Agilent 1260 Infinity. O sistema SFC foi equipado com uma válvula seletora de solvente e uma válvula seletora de coluna, permitindo o screening com até 12 solventes diferentes e 6 fases estacionárias diferentes. O software ChemStation Method Scouting Wizard permite a criação fácil e simples de métodos e listas de trabalho. Isso resulta no desenvolvimento de métodos abrangentes e que economizam tempo.

Introdução

O número de aplicações para a SFC aumenta constantemente. Isso ocorre principalmente por causa das características de separação singulares da SFC, que facilitam a separação de uma ampla gama de compostos com alta eficiência.¹ Quase todas as fases estacionárias aquirais conhecidas na cromatografia líquida (LC) podem ser usadas na SFC, oferecendo ampla seletividade. Entretanto, devido à compressibilidade da fase móvel e ao mecanismo de retenção da SFC, que não são comparáveis aos conhecidos da LC clássica, o desenvolvimento de métodos pode ser uma tarefa desafiadora. Consequentemente, o desenvolvimento de métodos por SFC aquiral geralmente combina o screening de diferentes fases estacionárias, com diferentes composições, aditivos, pressões e temperaturas da fase móvel, o que pode ser demorado. Os benefícios do screening da coluna e da fase móvel foram relatados em uma nota de aplicação anterior.²

Esta nota de aplicação demonstra os benefícios do desenvolvimento de métodos assistido por software na SFC aquiral para a separação de seis compostos farmacêuticos ativos usando espectrometria de massas por tempo de voo (TOF MS). O desenvolvimento de métodos incluiu o screening de quatro fases estacionárias e 10 solventes orgânicos diferentes na fase móvel. As etapas de lavagem e equilíbrio, assim como os métodos de separação, foram criadas usando o software ChemStation Method Scouting Wizard.

Parte experimental

Instrumentação

O sistema SFC analítico Agilent 1260 Infinity continha os seguintes módulos:

- Módulo de controle de SFC Agilent 1260 Infinity II (G4301A)
- Bomba binária para SFC Agilent 1260 Infinity (G4302A)
- Multisampler para SFC Agilent 1260 Infinity II (G4767A)
- Detector de arranjo de diodos Agilent 1260 Infinity (G1315C) com cela de fluxo de SFC de alta pressão
- Compartimento termostaticado de coluna Agilent 1290 Infinity (G1316C)

Uma visão geral técnica³ anterior demonstra o desempenho do multisampler para SFC Agilent 1260 Infinity II (G4767A) incluído em uma solução analítica Agilent 1260 Infinity II para SFC.

Peças adicionais necessárias para o desenvolvimento de métodos assistido por software

- Acionador de válvula 1290 Infinity (G1170A), equipado com válvula seletora de solvente de troca rápida bio-inert de 12 posições/13 portas InfinityLab (G4235A) Agilent
- Válvula de troca rápida de 6 posições/14 portas InfinityLab Agilent (nº da p. 5067-4142)

Deteção espectrométrica de massas

- LC/MS Agilent 6230 Time-of-Flight com exatidão de massa (G6230B), equipada com uma fonte ESI Agilent Jet Stream (G1958-65138)
- Bomba isocrática Agilent 1260 Infinity (G1310B) para fluxo complementar

Uma visão geral técnica⁴ anterior demonstra a otimização dos parâmetros da ionização ESI Jet Stream, ao acoplar SFC e espectrometria de massas por tempo de voo.

Configuração dos instrumentos

A bomba binária Agilent 1260 Infinity para SFC e a válvula de troca rápida de 12 posições/13 portas InfinityLab foram agrupadas na edição ChemStation do software OpenLab CDS Agilent. Esse screening usou até 12 combinações de solvente/aditivo diferentes, designadas na tela de configuração de instrumentos da edição ChemStation do software OpenLab CDS. O compartimento termostaticado de coluna 1290 Infinity foi equipado com uma válvula seletora de seis colunas de troca rápida de 6 posições/14 portas InfinityLab, permitindo o screening com até seis fases estacionárias diferentes. As fases estacionárias usadas foram adicionadas à tabela de colunas na tela Colunas do OpenLab CDS ChemStation. Todos os métodos foram criados usando o software ChemStation Method Scouting Wizard (Figure 1).

A saída do sistema SFC foi conectada à fonte ESI Jet Stream da LC/MS Agilent 6230 Time-of-Flight. Para a calibração de massa contínua, uma bomba isocrática 1260 Infinity foi conectada por uma peça em T à linha de saída da SFC. Purina e HP 921 serviram de massas de referência para a recalibração da MS.

Colunas

- Agilent ZORBAX Bonus-RP, 2,1 × 150 mm, 5 µm (nº da p. 883725-901)
- Agilent Polaris NH2, 3,0 × 100 mm, 3 µm (nº da p. A2014100X030)
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC, 3,0 × 100 mm, 1,9 µm (nº da p. 695675-301)
- Agilent ZORBAX Rx-SIL, 3,0 × 100 mm, 1,8 µm (alto rendimento de resolução rápida; nº da p. 828975-301)

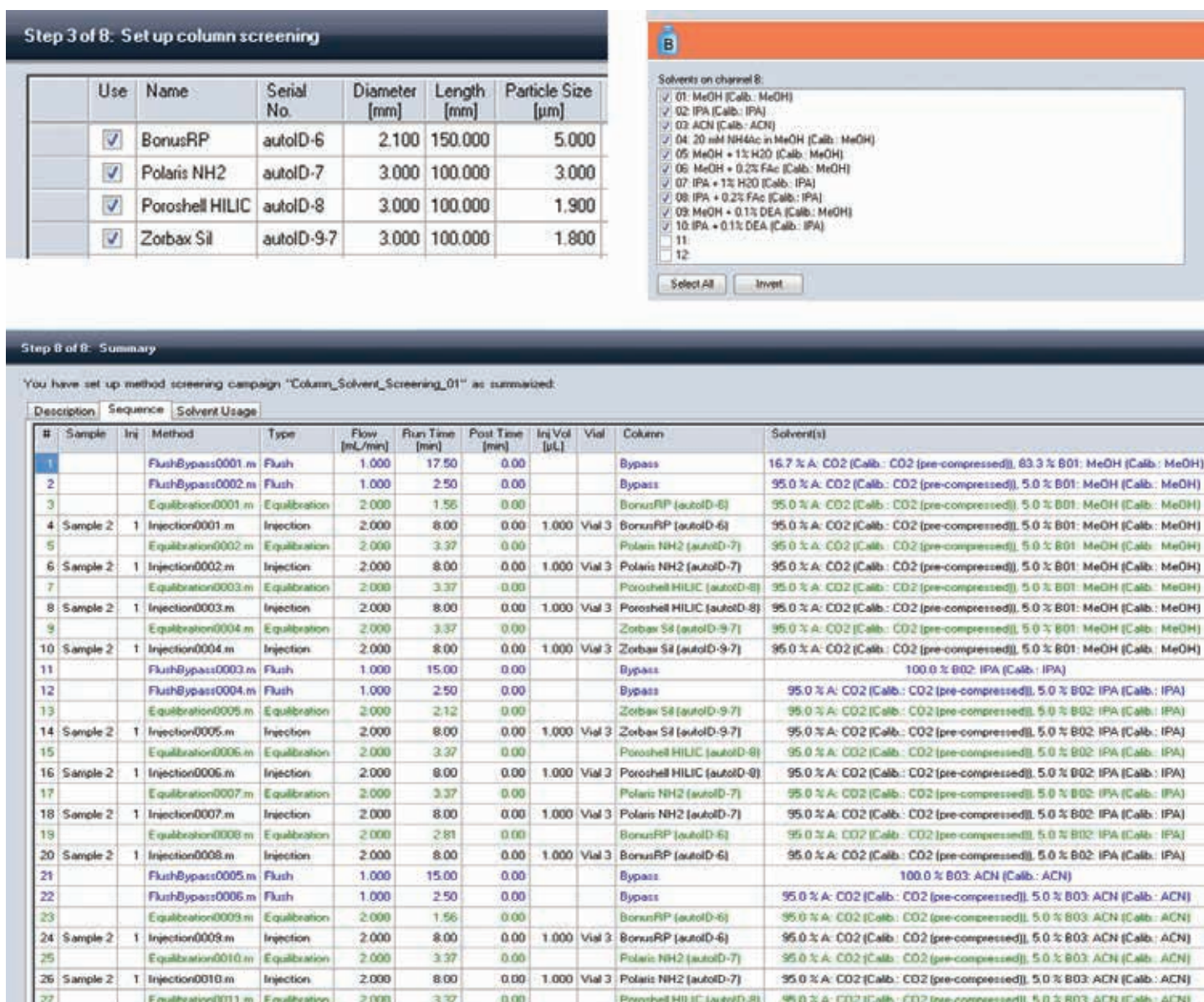


Figura 1. Etapas de configuração do screening do solvente de coluna usando o software Method Scouting Wizard.

Software

A edição ChemStation do software OpenLab CDS para sistemas de LC/MS e LC, versão C.01.07 SR3, com ChemStation Method Scouting Wizard, versão A.02.07 SR1, foi usada para o controle do sistema de SFC e para a criação de métodos. Os dados de MS foram registrados com o software de

aquisição de dados Agilent MassHunter B 05.00. Para a avaliação dos dados, foram utilizados o software Agilent MassHunter Profinder, versão B.06.00, e o software Agilent MassHunter de análise qualitativa, versão B06.00 SP1.

Produtos químicos

Todos os solventes foram comprados da Merck e todos os produtos químicos

foram obtidos da Sigma-Aldrich. O dióxido de carbono foi comprado da Westfalen Gas (Muenster, Alemanha).

Composições das fases móveis

A: Dióxido de carbono

B: Solvente orgânico contendo os aditivos listados na Tabela 1

Resultados e discussão

Na campanha apresentada, foi estabelecido um método de separação por cromatografia de fluidos supercríticos (SFC) com detecção por MS por tempo de voo para seis compostos farmacêuticos ativos diferentes. O objetivo deste estudo foi encontrar uma combinação adequada de fases estacionária e móvel, permitindo a detecção de todos os seis compostos com resolução da retenção e formato do pico suficientes. Portanto, foi feito o screening de quatro fases estacionárias e dez composições diferentes de fase móvel, usando um método de gradiente de fase móvel genérico. Ao todo, foram testadas 40 combinações diferentes de fases estacionária e móvel. Com um tempo de análise de 8 minutos para cada combinação de fases estacionária e móvel e tempos de lavagem e de equilíbrio suficientes, foi possível fazer o screening de toda a lista de trabalho em aproximadamente 11 horas. Os dados foram avaliados com o software MassHunter Profinder, com base na fórmula da soma dos compostos investigados (extração de dados segmentada por lote). Para a detecção por MS bem-sucedida dos compostos, foram esperados sinais com dois ou mais íons específicos e uma precisão superior a 10 ppm. A Tabela 2 resume os resultados da avaliação dos dados.

Tabela 1. Aditivos na fase móvel B.

Solvente orgânico	Aditivo
Metanol	Nenhum
Metanol	1% de água
Metanol	0,2% de ácido fórmico
Metanol	20 mM de acetato de amônio
Metanol	0,1% de dietilamina
Isopropanol	Nenhum
Isopropanol	1% de água
Isopropanol	0,2% de ácido fórmico
Isopropanol	0,1% de dietilamina
Acetonitrila	Nenhum

Gradiente genérico da fase móvel

Tempo (min)	% B
0	5
4	40
6	40
7	5
8	5

Amostra

Composto	Fórmula da soma	[M+H] ⁺	Número CAS	Uso do composto
Primidona	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂	219,11279	125-33-7	Anticonvulsivo
Carbamazepina	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	237,10223	298-46-4	Antiepiléptico
Fenofibrato	C ₂₀ H ₂₁ ClO ₄	361,12010	49562-28-9	Agente antilipêmico
Nafcilina (sódica)	C ₂₁ H ₂₁ N ₂ NaO ₅ S	415.13220 (não sódica)	985-16-0	Antibiótico beta-lactâmico
Decoquinato	C ₂₄ H ₃₅ NO ₅	418,25878	18507-89-6	Agente antiprotozoário
Cloxacilina (sódica)	C ₁₉ H ₁₇ ClN ₃ NaO ₅ S	436.07283 (não sódica)	642-78-4	Antibiótico beta-lactâmico

Os compostos foram dissolvidos em acetonitrila e combinados em uma mistura de trabalho contendo 50 µmol/L de cada um em acetonitrila.

Método da SFC

Parâmetro	Valor
Solvente A	CO ₂
Modificador B	10 combinações diferentes de solventes orgânicos e aditivos
Fluxo da SFC	2 mL/min
Regulador da pressão resultante	100 bar, 60 °C
Temperatura	25 °C
Volume de injeção	1 µl

Método de espectrometria de massas (modo ESI+)

Parâmetro	Valor
Temperatura do gás de secagem	275 °C
Vazão do gás de secagem	5 L/min
Temperatura do gás de impulsão	275 °C
Vazão do gás de impulsão	6 L/min
Pressão do nebulizador	45 psi
Voltagem do capilar	4.000 V
Fragmentador	150 V
Skimmer	60 V

Tabela 2. Tempos de retenção (RT) dos compostos, submetidos a screening com diferentes combinações das fases estacionária e móvel. Os compostos não detectados estão marcados com “-”. As combinações que permitiram a separação eficiente e a detecção de todos os seis compostos selecionados estão marcadas com um asterisco (*).

Fase estacionária	Fase móvel (modificador em CO ₂)	Primidona RT (min)	Carbamazepina RT (min)	Cloxacilina RT (min)	Fenofibrato RT (min)	Nafcilina RT (min)	Decoquinato RT (min)
ZORBAX Bonus-RP	Metanol	0,89	0,84	1,85	0,65	-	1,59
ZORBAX Bonus-RP	Metanol + 20 mM de acetato de amônio	0,86	0,79	1,54	0,63	2,10	1,52
ZORBAX Bonus-RP	Metanol + 1% de água	0,90	0,83	1,81	0,65	3,13	1,54
ZORBAX Bonus-RP	Metanol + 0,2% de ácido fórmico	0,90	0,84	1,80	0,64	3,13	1,55
ZORBAX Bonus-RP	Metanol + 0,1% de dietilamina	-	-	-	-	-	-
ZORBAX Bonus-RP	Isopropanol	1,20	1,10	-	0,66	-	2,29
ZORBAX Bonus-RP	Isopropanol + 1% de água	1,18	1,10	-	0,64	-	2,17
ZORBAX Bonus-RP	Isopropanol + 0,2% de ácido fórmico	1,23	1,13	2,55	0,63	3,17	2,27
ZORBAX Bonus-RP	Isopropanol + 0,1% de dietilamina	-	-	-	-	-	-
ZORBAX Bonus-RP	Acetonitrila	2,55	1,56	-	0,62	-	-
Polaris NH2	Metanol	1,80	1,45	5,56	0,73	-	2,00
Polaris NH2	Metanol + 20 mM de acetato de amônio	-	1,36	-	0,65	-	-
Polaris NH2	Metanol + 1% de água	1,81	1,46	-	0,62	3,24	1,89
Polaris NH2	Metanol + 0,2% de ácido fórmico	1,84	1,47	5,79	0,60	-	1,93
Polaris NH2	Metanol + 0,1% de dietilamina	-	-	-	-	-	-
Polaris NH2	Isopropanol	2,55	2,15	-	0,70	-	3,47
Polaris NH2	Isopropanol + 1% de água	2,55	2,14	-	0,67	-	3,26
Polaris NH2	Isopropanol + 0,2% de ácido fórmico	-	2,23	-	0,68	-	7,35
Polaris NH2	Isopropanol + 0,1% de dietilamina	-	-	-	-	-	-
Polaris NH2	Acetonitrila	-	4,52	-	0,69	-	-
InfinityLab Poroshell 120 HILIC	Metanol	1,84	1,54	1,72	0,63	1,94	1,36
InfinityLab Poroshell 120 HILIC	Metanol + 20 mM de acetato de amônio	-	-	-	0,60	3,63	-
*InfinityLab Poroshell 120 HILIC	Metanol + 1% de água	1,79	1,51	2,51	0,55	2,56	1,41
InfinityLab Poroshell 120 HILIC	Metanol + 0,2% de ácido fórmico	1,83	1,53	1,60	0,61	1,79	1,38
InfinityLab Poroshell 120 HILIC	Metanol + 0,1% de dietilamina	-	1,45	-	-	-	1,39
InfinityLab Poroshell 120 HILIC	Isopropanol	-	2,18	1,53	0,56	1,70	-
InfinityLab Poroshell 120 HILIC	Isopropanol + 1% de água	2,28	2,03	1,54	0,60	1,70	-
InfinityLab Poroshell 120 HILIC	Isopropanol + 0,2% de ácido fórmico	2,43	2,20	1,39	0,59	1,54	-
InfinityLab Poroshell 120 HILIC	Isopropanol + 0,1% de dietilamina	-	-	-	-	-	-
InfinityLab Poroshell 120 HILIC	Acetonitrila	-	4,82	-	0,71	-	-
*ZORBAX Rx-SIL	Metanol	1,95	1,65	1,44	0,58	1,73	1,73
ZORBAX Rx-SIL	Metanol + 20 mM de acetato de amônio	1,95	1,64	2,99	0,53	-	1,55
*ZORBAX Rx-SIL	Metanol + 1% de água	1,95	1,63	2,44	0,56	2,62	1,53
ZORBAX Rx-SIL	Metanol + 0,2% de ácido fórmico	1,95	1,66	1,58	0,60	1,84	1,56
ZORBAX Rx-SIL	Metanol + 0,1% de dietilamina	-	1,64	-	0,68	-	1,49
ZORBAX Rx-SIL	Isopropanol	2,49	2,28	1,55	0,64	1,81	3,97
ZORBAX Rx-SIL	Isopropanol + 1% de água	2,41	2,18	1,58	0,63	1,80	-
ZORBAX Rx-SIL	Isopropanol + 0,2% de ácido fórmico	2,55	2,35	1,49	0,63	1,69	-
ZORBAX Rx-SIL	Isopropanol + 0,1% de dietilamina	-	-	-	-	-	-
ZORBAX Rx-SIL	Acetonitrila	-	4,85	-	0,73	-	-

Três das combinações testadas resultaram em separação e detecção suficientes dos seis compostos investigados. Essas combinações foram a coluna HILIC InfinityLab Poroshell 120 com 1% de água em metanol e a coluna ZORBAX Rx-SIL com metanol puro e metanol com 1% de água. A Figura 2 apresenta os cromatogramas de íons extraídos (EICs) das três diferentes separações. Foi possível separar os seis compostos em menos de três minutos com todas as três combinações. Para primidona, carbamazepina, fenofibrato

e nafcilina, foram obtidos formatos de pico simétricos suficientes com todas as configurações de separação. Decoquinato e cloxacilina demonstraram cauda no pico ao serem separados na coluna ZORBAX Rx-SIL usando metanol. A adição de 1% de água ao modificador resultou em melhora do formato do pico para esses dois compostos. A altura do sinal dos EICs quase não foi influenciada pela adição de água. A comparação dos tempos de retenção dos compostos nas separações na coluna ZORBAX Rx-SIL demonstra que aditivos como água

não só afetam o formato do pico, mas também podem influenciar a retenção dos compostos (Tabela 3). Entretanto, esses efeitos são difíceis de prever e dependem do composto. Para primidona e carbamazepina, a retenção diminuiu discretamente com a adição de 1% de água, enquanto a retenção de nafcilina e cloxacilina aumentou significativamente. Este fato salienta a necessidade de incluir diferentes aditivos no procedimento de screening do método. Esses fatores que com frequência interagem e influenciam a separação podem complicar o desenvolvimento de métodos na SFC.

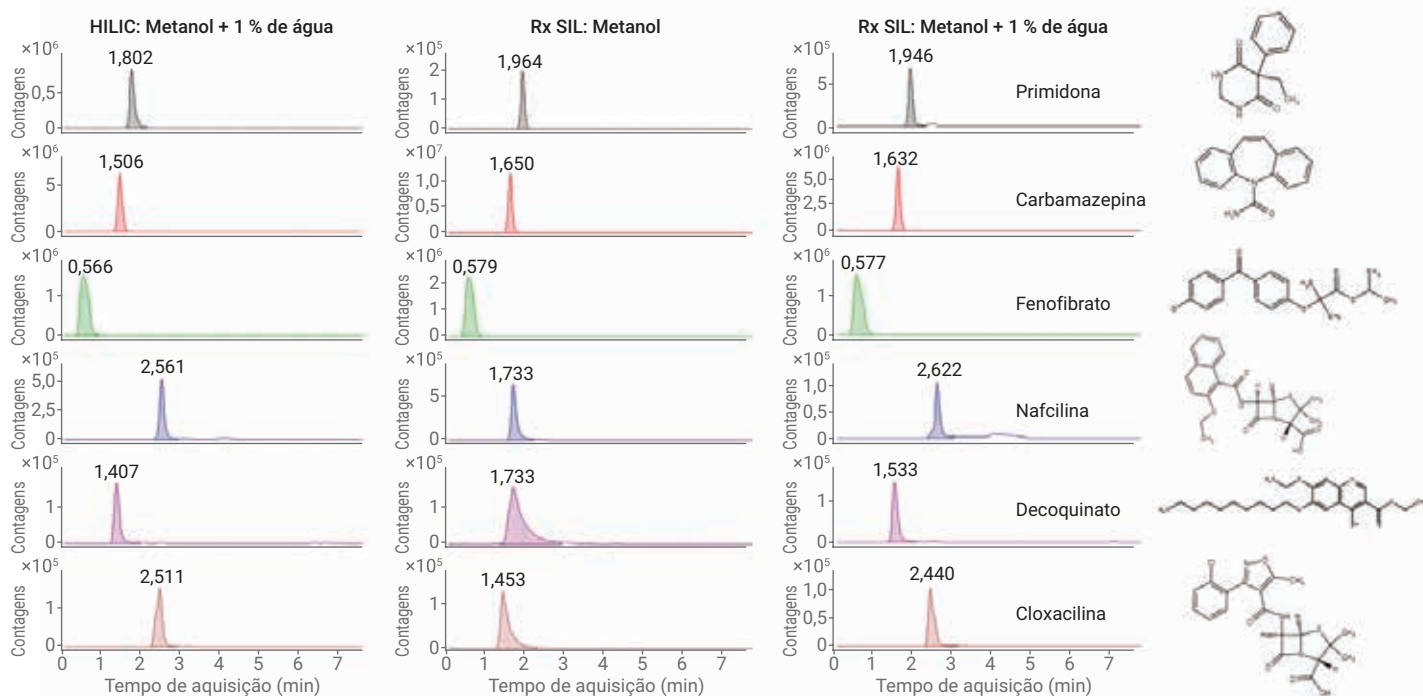


Figura 2. Cromatogramas de íons extraídos dos seis compostos investigados (exatidão de massa de 20 ppm), separados por SFC usando o InfinityLab Poroshell 120 HILIC com metanol + 1% de água, Rx-SIL com metanol e Rx-SIL com metanol + 1% de água.

Tabela 3. RTs e largura dos picos dos compostos separados com ZORBAX Rx-SIL e InfinityLab Poroshell 120 HILIC usando metanol ou metanol + 1% de água.

Coluna	Modificador em CO ₂	Primidona		Carbamazepina		Cloxacilina		Fenofibrato		Nafcilina		Decoquinato	
		RT (min)	Largura (min)	RT (min)	Largura (min)	RT (min)	Largura (min)	RT (min)	Largura (min)	RT (min)	Largura (min)	RT (min)	Largura (min)
InfinityLab Poroshell 120 HILIC	Metanol + 1% de água	1,80	0,10	1,51	0,10	2,51	0,07	0,57	0,24	2,56	0,07	1,41	0,11
ZORBAX Rx-SIL	Metanol	1,96	0,07	1,65	0,09	1,45	0,11	0,58	0,21	1,73	0,09	1,73	0,29
ZORBAX Rx-SIL	Metanol + 1% de água	1,95	0,08	1,63	0,09	2,44	0,07	0,58	0,21	2,62	0,08	1,53	0,10

Conclusão

Nesse estudo, seis compostos farmacêuticos ativos diferentes foram separados e detectados por SFC/TOF-MS. O desenvolvimento de métodos considerou 40 combinações diferentes das fases estacionária e móvel. Duas fases de sílica (InfinityLab Poroshell 120 HILIC e ZORBAX Rx-SIL), ambas com metanol contendo 1% de água (e puro para ZORBAX Rx-SIL) como modificador, foram consideradas as mais adequadas dentre as fases testadas para a separação dos analitos testados. O software Method Scouting Wizard possibilita o screening de várias combinações de fases estacionária e móvel de forma altamente automatizada e reduz significativamente o tempo necessário para a criação dos procedimentos de screening. Ele oferece a opção de fazer o screening e otimizar a temperatura de separação, a composição da fase móvel e os perfis de gradiente. Isso permite o desenvolvimento de métodos rápido e abrangente, considerando os parâmetros que influenciam a separação mais importantes na SFC.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a Agilent Technologies pelo empréstimo do sistema de SFC e pela bolsa de projeto de pesquisa concedida pela Agilent Technologies, Inc. em 2016. Nosso imenso reconhecimento a Andreas Borowiak, Thorsten Gebhardt, Patric Hörth, Uwe Kistler e Tom van de Goor pelo apoio contínuo e disponibilidade geral em todos os tipos de situação. Agradecemos a Sylvia Große, Felix List e Wolfgang Schröder por suas contribuições.

Referências

1. Bieber, S.; *et al.* RRLC-HILIC and SFC with Mass Spectrometry: Polarity Extended Organic Molecule Screening in Environmental (Water) Samples. *Analytical Chemistry* **2017**, *89(15)*, 7907-7914.
2. Strategies for Column and Mobile Phase Selection with the Agilent 1260 Infinity SFC System, *nota de aplicação da Agilent Technologies*, número de publicação 5990-7147EN.
3. Supercritical Fluid Chromatography with Flexible Injection Volumes at Highest Precision – Performance Evaluation of the Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler in the Agilent Infinity II Analytical SFC Solution, *visão geral técnica da Agilent Technologies*, número de publicação 5991-7623EN.
4. Optimization of Jet Stream ESI Parameters When Coupling Agilent 1260 Infinity Analytical SFC System with Agilent 6230 TOF LC/MS, *visão geral técnica da Agilent Technologies*, número de publicação 5991-4510EN.

www.agilent.com/chem

Estas informações estão sujeitas a alterações sem aviso prévio.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
Impresso nos EUA, 5 de outubro de 2018
5994-0251PTBR