

Uma plataforma de detecção múltipla composta por UV/Vis, aerossol carregado e detecção por espectrometria de massa de quadrupolo simples para análise ampla de amostras

Autores

Stephan Meding, Katherine Lovejoy, Remco Swart, Frank Steiner, e Martin Ruehl

Thermo Fisher Scientific, Germering, Alemanha

Palavras-chave

Vanquish UHPLC, ISQ EC/ISQ espectrômetro de massa de quadrupolo simples EM, detecção por aerossol carregado, extraíveis, lixiviáveis

Objetivo

Verificação e quantificação confiável da presença de compostos estranhos presentes em uma amostra, tais como impurezas, produtos de degradação ou extraíveis e lixiviáveis.

Benefícios da Aplicação

- Diversos detectores complementares descobrem picos que passariam despercebidos em configurações UV-MS padrão.
- Substâncias desconhecidas são quantificadas por CAD e identificadas por MS. Substâncias conhecidas são quantificadas por CAD ou UV.
- Ionização química por pressão atmosférica (APCI) oferece um modo de ionização alternativo a ionização por electrospray aquecido (HESI) para compostos pouco ionizados, como alguns extraíveis e lixiviáveis.

Introdução

Cromatógrafos só podem analisar os conteúdos de uma amostra quando os detectores produzem uma resposta. Se os conteúdos da amostra estão bem definidos, a escolha de detector pode ser fácil. Por exemplo, se é sabido que todos os componentes possuem um cromóforo, um detector UV é adequado. Para amostras mal definidas, como amostras com impurezas, produtos de degradação ou contaminação por

extraíveis e lixiviáveis, um único detector poderá omitir alguns componentes. Diversos detectores são necessários para avaliar completamente a amostra.

Análise ampla de amostra com diversos detectores complementares é essencial para determinar a presença de compostos desconhecidos ou inesperados. Além da detecção simples, laboratórios frequentemente exigem confirmação da identidade e quantificação desses compostos para determinar suas naturezas e se estão abaixo dos limites aceitáveis de concentração. O detector UV oferece uma quantificação exata de substâncias que contêm cromóforos. O detector de aerossol carregado (CAD) entrega uma detecção universal de compostos não voláteis e semivoláteis, tornando-o um detector secundário ideal. Além disso, sua resposta quase uniforme permite a quantificação sem padrões de referência. Espectrometria de massa (MS) oferece a confirmação de identidade dos compostos detectados. Essas três técnicas de detecção fornecem uma plataforma de

análise ampla de amostras, que foi expandida pela aplicação de dois modos diferentes de ionização, HESI e APCI, para detecção por MS. Essa plataforma foi usada para analisar impurezas extraídas de bolsas de cultura de células.

Experimental

Agentes químicos e reagentes

Dezoito agentes químicos, selecionados a partir de relatos da literatura de extraíveis presentes em bolsas de cultura de células, ¹⁻³ foram usados como padrões de referência. Níveis e purezas estão listados na Tabela 1. Foram usados acetonitrila (P/N A955-212), ácido fórmico (P/N A117-50), isopropanol (A461-212), acetona (P/N A949), n-hexano (P/N H306) e metanol (P/N A456-212) em nível de LC/MS Optima™ da Fisher Scientific™. Água ultrapura foi produzida por um Sistema de Purificação de Água Ultrapura Barnstead™ GenPure™ xCAD Plus da Thermo Scientific™.

Tabela 1. Agentes químicos em padrões de calibração

#	Analito	CAS	Pureza	Quantidade em 10 mL (mg)	Solvente
1	Ftalato	87-41-2	0,98	10,20	metanol
2	Ftaldialdeído	643-79-8	0,99	10,10	metanol
3	Tereftalato de Bis(2-hidroxietila), (BHET)	959-26-2	0,945	10,58	metanol
4	Ftalato de dimetila	131-11-3	0,99	10,10	metanol
5	Bisfenol A	80-05-7	0,99	10,10	metanol
6	Butilparabeno	94-26-8	0,99	101,0	metanol
7	Tinuvín™ P	2440-22-4	0,97	10,31	isopropanol
8	Azobenzeno	103-33-3	0,98	10,20	metanol
9	2,4-di-t-Butilfenol	128-39-2	0,99	10,10	metanol
10	Butil-hidroxitolueno, (BHT)	128-37-0	0,99	10,10	metanol
11	Ácido palmítico	57-10-3	0,99	10,10	acetona
12	Erucamida	112-84-5	0,85	11,76	methanol
13	Ácido esteárico	57-11-4	0,985	10,15	acetona
14	Tinuvín™ 234	70321-86-7	desconhecido	10,31	metanol
15	Irganox™ 1010	6683-19-8	0,98	10,20	metanol
16	Irgafos™ 168	31570-04-4	0,98	10,20	acetona
17	Eicosano	112-95-8	0,99	101,0	n-hexano
18	Tetracosano	646-31-1	0,99	101,0	n-hexano

Sistema

Um sistema Vanquish™ Flex UHPLC da Thermo Scientific™ foi usado em duas configurações diferentes para análise cromatográfica (Figura 1 e Figura 2). Na configuração padrão (Figura 1), uma bomba de mistura quaternária de baixa pressão entregou o gradiente analítico. Na configuração inversa (Figura 2), um módulo de bomba contendo duas bombas ternárias de baixa pressão entregaram o gradiente analítico e o gradiente inverso. O gradiente inverso resultou em composição constante de solvente durante as detecções CAD e MS, melhorando a uniformidade de resposta do detector. A uniformidade de resposta de CAD é totalmente explicada na Nota Técnica 72806.4 Os métodos de ionização complementares, ionização por electrospray aquecido (HESI) e ionização química por pressão atmosférica (APCI) aumentaram o escopo da detecção.

Para a configuração de gradiente inverso, capilares com diâmetro interno (ID) padrão de 100 µm Vanquish entregaram o gradiente analítico para a coluna analítica e a célula de fluxo (vide Figura 2). A alta viscosidade do isopropanol exigiu capilares com 130 µm de ID a jusante da célula de fluxo para manter a contrapressão na célula de fluxo abaixo de 120 bar. Embora capilares com o menor diâmetro interno possível sejam preferíveis para reduzir a amplitude de pico, capilares maiores foram necessários nesse caso para permitir uma taxa de fluxo razoável. O gradiente inverso foi entregue usando capilares com 130 µm de ID. Divisão do fluxo passivo em uma proporção de 2:1 (CAD:MS) foi alcançada com uma peça T. A taxa de divisão entre CAD e MS foi alcançada ao gerar o dobro de contrapressão no trecho que leva à MS em relação ao que leva ao CAD. Para garantir a proporção exigida de contrapressão, um capilar com 100 µm de ID (8) foi usado entre o divisor de fluxo e a agulha vaporizadora do CAD.

A válvula de 2 posições e 6 vias no compartimento da coluna foi usada para desviar o fluxo para descarte ao lavar a coluna para minimizar a poluição do espectrômetro de massa e do detector de aerossol carregado.

Conforme recomendado para aplicações de MS, misturadores de 200 µL foram usados em vez dos misturadores padrão de 350 µL. Os misturadores menores reduziram o volume de atraso do gradiente, permitindo um método mais rápido.

Módulos exigidos

- Para a configuração padrão:
 - Bomba F Quaternária Vanquish™ da Thermo Scientific™ (P/N VF-P20-A)
 - Misturador estático de 200 µL (P/N 6044.5110)
- Para a configuração de gradiente inverso:
 - Bomba F Dupla Vanquish™ da Thermo Scientific™ para substituir a Bomba Quaternária (P/N VF-P32-A)
 - Dois misturadores estáticos de 200 µL (P/N 6044.5110)
- Amostrador FT Dividido Vanquish™ da Thermo Scientific™ (P/N VF-A10-A)
- Compartimento H de Coluna Vanquish™ da Thermo Scientific™ (P/N VH-C10-A)
 - Válvula de 2 posições e 6 vias (P/N 6036.1560)
- Detector FG de Arranjo de Diodo Vanquish™ da Thermo Scientific™ (P/N VF-D11-A)
 - Célula de fluxo de titânio 2,5 µL (P/N 6083.0550)
- Detector F de Aerossol Carregado Vanquish™ da Thermo Scientific™ (P/N VF-D20-A)
- ISQ EC/EM Vanquish™ da Thermo Scientific™ Espectrômetro de Massa de Quadrupolo Simples (P/N ISQEC-LC/ISQEM-ESI-APCI)
- Base F de Sistema Vanquish™ da Thermo Scientific™ (P/N VF-S01-A)

Sistema de dados da cromatografia

O espectrômetro de massa ISQ EC/ISQ EM é totalmente integrado ao Chromeleon 7.2.9 CDS, o qual foi usado para operação do sistema e análise de dados subsequente.

Configuração padrão

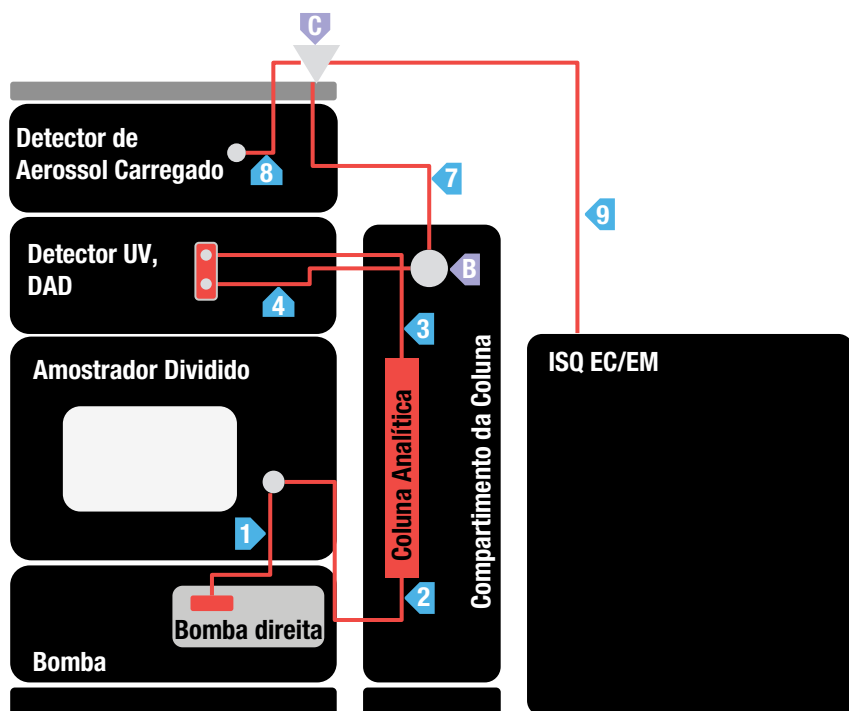


Figura 1. Esquema da configuração padrão. Usa apenas capilares com 100 µm de ID (diâmetro interno) de uma liga níquel-cobalto-cromo biocompatível, MP35N.

Divisores de fluxo e válvulas

Nº	Peça adicional	Descrição
B	Válvula de Desvio	Válvula de 2 posições e 6 vias Vanquish, P/N 6036.1560
C	Peça T	150 µm de I.D., Vici ZT1XCS6-M

Capilares

Nº	Conexão	Descrição
1	Saída da bomba direita – Via 1 da válvula de injeção	Capilar Viper™ da Thermo Scientific™, ID x L 0,10 x 350 mm, P/N 6042.2340 (todos os capilares na Figura 1 são MP35N)
2	Via esquerda 2 da válvula de injeção – Entrada da coluna	Pré-aquecedor ativo, 0,1 x 380 mm, P/N 6732.0110 (pré-aquecedor passivo opcional, P/N 6732.0174)
3	Saída da coluna – DAD	ID x L 0,10 x 300 mm, isolado, P/N 6083.2405
4	DAD – Válvula de Desvio	ID x L 0,10 x 250 mm, P/N 6042.2330 Para VWD: ID x L 0,10 x 350 mm, P/N 6042.2340
7	Válvula de Desvio – Divisor de Fluxo	ID x L 0,10 x 650 mm, P/N 6042.2370
8	Divisor de Fluxo – Saída do Detector de Aerossol Carregado	ID x L 0,10 x 450 mm, P/N 6042.2350
9	Divisor de Fluxo - Saída do MS	ID x L 0,10 x 750 mm, P/N 6042.2390

Configuração de gradiente inverso

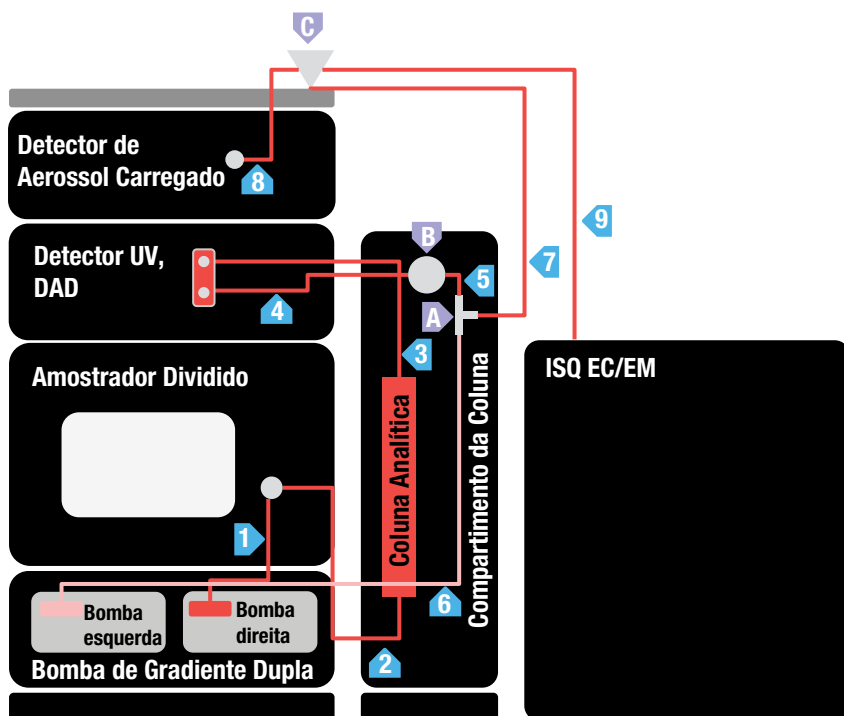


Figura 2. Esquema da configuração de gradiente inverso. Os capilares com 100 μm de ID foram usados para a entrega do gradiente analítico para a coluna analítica e para a célula de fluxo. A jusante da célula de fluxo, capilares com 130 μm de ID foram usados. Um capilar com 100 μm de ID (8) foi usado a jusante da célula de fluxo para garantir uma divisão adequada de fluxo. O gradiente inverso foi entregue usando capilares com 130 μm de ID.

Divisores de fluxo e válvulas

Nº	Peça adicional	Descrição
A	Peça T	500 μm de ID, P/N 6263.0035
B	Válvula de Desvio	Válvula de 2 posições e 6 vias Vanquish, P/N 6036.1560
C	Peça T	150 μm de I.D., Vici ZT1XCS6-M

Capilares

Nº	Conexão	Descrição
1	Saída da bomba direita – Via 1 da válvula de injeção	Capilar Viper, ID \times L 0,10 \times 350 mm, MP35N, P/N 6042.2340
2	Via esquerda 2 da válvula de injeção – Entrada da coluna	Active pre-heater, 0.1 \times 380 mm, MP35N, P/N 6732.0110
3	Saída da coluna – DAD	ID \times L 0,10 \times 300 mm, MP35N, P/N 6083.7950
4	DAD – Válvula de Desvio	ID \times L 0,13 \times 250 mm, SST, P/N 6040.2325
5	Válvula de Desvio – Peça T	ID \times L 0,13 \times 65 mm, SST, P/N 6040.2307
6	Saída da bomba esquerda – Peça T	ID \times L 0,13 \times 950 mm, SST, P/N 6040.2340
7	Peça T – Divisor de Fluxo	ID \times L 0,13 \times 350 mm, SST, P/N 6040.2335
8	Divisor de Fluxo – Saída do Detector de Aerossol Carregado	ID \times L 0,10 \times 350 mm, MP35N, P/N 6042.2340
9	Divisor de Fluxo – Entrada do MS	ID \times L 0,13 \times 750 mm, SST, P/N 6040.2320

Procedimento cromatográfico e parâmetros de detecção

A cromatografia de fase reversa foi realizada usando uma coluna com núcleo sólido de sílica e um gradiente de água/isopropanol (Tabela 2). O gradiente inverso foi programado para um atraso equivalente a 364 μ L para que os gradientes inverso e analítico chegassem à peça T simultaneamente. O atraso para o gradiente inverso foi calculado automaticamente por um assistente no Sistema de Dados da Cromatografia (CDS) do Chromeleon™ 7.2 da Thermo Scientific™ baseado no volume da coluna e na configuração fluídica.

Tabela 2A Condições cromatográficas

Parâmetro	Configuração														
Coluna:	Accucore™ C18 da Thermo Scientific™, 100 x 2,1 mm, 2,6 μ m (P/N 17126-102130)														
Eluentes:	A: Ácido fórmico 4 mM em água, pH 3,1 B: Isopropanol														
Volume de Injeção:	2 μ L														
Gradiente Analítico:	Taxa de fluxo 0,5 mL/min														
	<table border="1"> <thead> <tr> <th><i>Tempo [min]</i></th> <th><i>%B</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>10,5</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>12</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>12,1</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>16</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>	<i>Tempo [min]</i>	<i>%B</i>	0	5	10,5	100	12	100	12,1	5	16	5		
<i>Tempo [min]</i>	<i>%B</i>														
0	5														
10,5	100														
12	100														
12,1	5														
16	5														
Gradiente Inverso:	Taxa de fluxo 0,5 mL/min														
	<table border="1"> <thead> <tr> <th><i>Tempo [min]</i></th> <th><i>%B</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>0,728</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>11,228</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>12,728</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>12,828</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>16</td> <td>100</td> </tr> </tbody> </table>	<i>Tempo [min]</i>	<i>%B</i>	0	100	0,728	100	11,228	5	12,728	5	12,828	100	16	100
<i>Tempo [min]</i>	<i>%B</i>														
0	100														
0,728	100														
11,228	5														
12,728	5														
12,828	100														
16	100														
Temp. da Coluna:	45 °C modo ar forçado, 45 °C pré-aquecedor ativo														
Temp. do Amostrador:	4 °C														

Tabela 2B Configurações do Detector

Parâmetro	Configuração										
Configurações UV:	Taxa de coleta de dados de 10 Hz, tempo de resposta de 0,5 s, largura de banda de 4 nm, 210, 220, 254, 280, 300, 320 nm e 190–345 nm (campo 3D)										
Configurações CAD:	Temperatura de evaporador 35° C, filtro 3,6, valor da função de energia 1,0, taxa de coleta de dados de 10 Hz										
Configurações MS:	Configurações fonte padrão de HESI e APCI para 0,167 mL/min (configuração padrão) ou taxa de fluxo de 0,333 mL/min (configuração de gradiente inverso)										
Varredura Completa do MS, +:	<table border="1"> <tbody> <tr> <td>Tempo</td> <td>0 a 16 min</td> </tr> <tr> <td>Intervalo de massa</td> <td>130 a 1250 <i>m/z</i></td> </tr> <tr> <td>Tempo de Permanência</td> <td>0,1 s</td> </tr> <tr> <td>Polaridade</td> <td>Positiva</td> </tr> <tr> <td>Voltagem da fonte CID</td> <td>10 V</td> </tr> </tbody> </table>	Tempo	0 a 16 min	Intervalo de massa	130 a 1250 <i>m/z</i>	Tempo de Permanência	0,1 s	Polaridade	Positiva	Voltagem da fonte CID	10 V
Tempo	0 a 16 min										
Intervalo de massa	130 a 1250 <i>m/z</i>										
Tempo de Permanência	0,1 s										
Polaridade	Positiva										
Voltagem da fonte CID	10 V										
Varredura Completa do MS, -:	<table border="1"> <tbody> <tr> <td>Tempo</td> <td>0 a 16 min</td> </tr> <tr> <td>Intervalo de massa</td> <td>130 a 700 <i>m/z</i></td> </tr> <tr> <td>Tempo de Permanência</td> <td>0,1 s</td> </tr> <tr> <td>Polaridade</td> <td>Negativa</td> </tr> <tr> <td>Voltagem da fonte CID</td> <td>10 V</td> </tr> </tbody> </table>	Tempo	0 a 16 min	Intervalo de massa	130 a 700 <i>m/z</i>	Tempo de Permanência	0,1 s	Polaridade	Negativa	Voltagem da fonte CID	10 V
Tempo	0 a 16 min										
Intervalo de massa	130 a 700 <i>m/z</i>										
Tempo de Permanência	0,1 s										
Polaridade	Negativa										
Voltagem da fonte CID	10 V										

Preparação do eluente

Eluente A foi preparado ao adicionar 150 μ L de ácido fórmico a 1.000 mL de água.

Preparação da solução padrão

Para preparar a solução padrão de 18 padrões de referência, primeiro cada padrão (exceto butilparabeno, eicosano e tetracosano) foi preparado como uma solução de 1 mg/mL em um frasco volumétrico de 10 mL usando a massa fornecida na Tabela 1 e adicionando o solvente especificado na Tabela até a linha de preenchimento. Butilparabeno, eicosano e tetracosano foram preparados em 10 mg/mL. A massa na Tabela 1 foi calculada com base na pureza, e para prováveis cátions, formação de sal com ácido fórmico no CAD.

Formação de sal no CAD e seu uso para estabilizar semivoláteis é abordada na Nota Técnica 72806.4. A partir das soluções individuais, padrões de calibração contendo todos os 18 padrões foram preparados em metanol. As concentrações das calibrações foram de 1, 2, 5, 10, 20, e 50 µg/mL, exceto pelos semivoláteis butilparabeno, eicosano e tetracosano, os quais estiveram presentes nas soluções de calibração em 10, 20, 50, 100, 200, e 500 µg/mL pela perda parcial dessas substâncias no tubo de evaporação.

Preparação das amostras

Quatro tipos diferentes de bolsas de cultura de célula de uso único, com a camada interna composta de acetato-vinilo de etileno e níveis diferentes de densidade de polietileno, foram investigadas. Extratos foram preparados por lavagens com 50:50 de isopropanol/água (v/v) e reduzindo os extratos até a secura usando um concentrador a vácuo. As amostras foram reconstituídas em 70 µL de 50:50 de isopropanol/água (v/v).

Nota sobre fluxo de trabalho:

HESI e APCI Embora os dados de HESI e APCI sejam relatados lado a lado neste texto e o ISQ EM possa ser suprido com uma única fonte dupla HESI/APCI, os dados não são medidos na mesma injeção. A coleta de dados do HESI e do APCI para uma amostra específica exige dois métodos de instrumento e

injeções separados. Mudanças físicas na fonte também são exigidas para a troca de modos. A coleta de dados HESI exige uma sonda capilar de spray HESI. A coleta de dados APCI exige uma sonda APCI e a agulha corona de APCI. Um interruptor na fonte altera a posição da agulha corona de APCI.

Resultados e discussão

Os 18 padrões de referência foram analisados com as duas configurações. O CAD e o detector UV/Vis de arranjo de diodo foram usados para determinar os tempos de retenção de pico. O CAD e o detector UV foram complementares. Alguns picos só foram detectados pelo CAD, enquanto outros foram detectados pelo detector UV/Vis. Ao combinar as técnicas de detecção, todos os 18 padrões puderam ser medidos com as configurações padrão e de gradiente inverso. Treze padrões foram detectados pelo detector UV/Vis, onze pelo CAD e seis pelos dois detectores (Tabela 3). Cromatogramas representativos de UV/Vis e CAD são apresentados na Figura 3. Sete analitos não puderam ser detectados pelo CAD por serem muito voláteis. Entretanto, eles possuíam um cromóforo suficientemente ativo para permitir a medição por detecção UV/Vis. Por outro lado, cinco analitos com cromóforos fracos não foram detectados pela detecção UV/Vis, mas foram detectados pelo CAD. Dois analitos não mostraram um sinal MS forte, provavelmente devido à baixa ionizabilidade.

Tabela 3. Resumo dos resultados para cada padrão de referência. A detectabilidade com UV, CAD, MS com HESI e MS com APCI é indicada com vistos. Células em cinza escuro indicam substâncias para as quais a área de pico relativo de MS usando um modo de ionização foi pelo menos 20 vezes maior do que a área de pico relativo usando a outra fonte. [M] refere-se à massa monoisotópica. LOQ refere-se ao limite de quantificação do CAD (exceto onde marcado como UV), definido como uma razão sinal/ruído (S/N) maior do que 6:1 para o padrão em uma dada concentração, relativo ao ruído medido em uma amostra em branco.

Nº	Analito	UV	CAD	MS (HESI)	MS (APCI)	[M]	m/z detectado, HESI / APCI	Íon detectado HESI / APCI	LOQ (µg/mL)
1	Ftalato	✓		✓	✓	134,0	135,1	[M+H] ⁺	5 (UV)
2	Ftaldialdeído	✓		✓	✓	134,0	135,1	[M+H] ⁺	5 (UV)
3	BHET	✓	✓	✓	✓	254,1	255,1	[M+H] ⁺	1
4	Ftalato de dimetila	✓		✓	✓	194,1	195,1	[M+H] ⁺	1 (UV)
5	Bisfenol A	✓	✓	✓	✓	228,1	227,1 / 228,1	[M-H] ⁻ / [M] ⁺	1
6	Butilparabeno	✓	✓	✓	✓	194,1	195,1	[M+H] ⁺	50
7	Tinuvín P	✓		✓	✓	225,1	226,1	[M+H] ⁺	1 (UV)
8	Azobenzeno	✓		✓	✓	182,1	183,1	[M+H] ⁺	1 (UV)
9	2,4-di-t-Butilfenol	✓		✓	✓	206,2	205,2 / 206,2	[M-H] ⁻ / [M] ⁺	1 (UV)
10	BHT	✓		✓	✓	220,2	219,2 / 220,2	[M-H] ⁻ / [M] ⁺	1 (UV)
11	Ácido palmítico		✓	✓	✓	256,2	255,2	[M-H] ⁻	1
12	Erucamida		✓	✓	✓	337,3	338,3	[M+H] ⁺	1
13	Ácido esteárico		✓	✓	✓	284,3	283,3	[M-H] ⁻	1
14	Tinuvín 234	✓	✓	✓	✓	447,2	448,2	[M+H] ⁺	1
15	Irganox 1010	✓	✓	✓	✓	1176,8	1193,8 / 1176,8	[M+NH ₄] ⁺ / [M] ⁺	1
16	Irgafos 168	✓	✓	✓	✓	646,5	647,5	[M+H] ⁺	1
17	Eicosano		✓			282,3			50
18	Tetracosano		✓			338,4			50

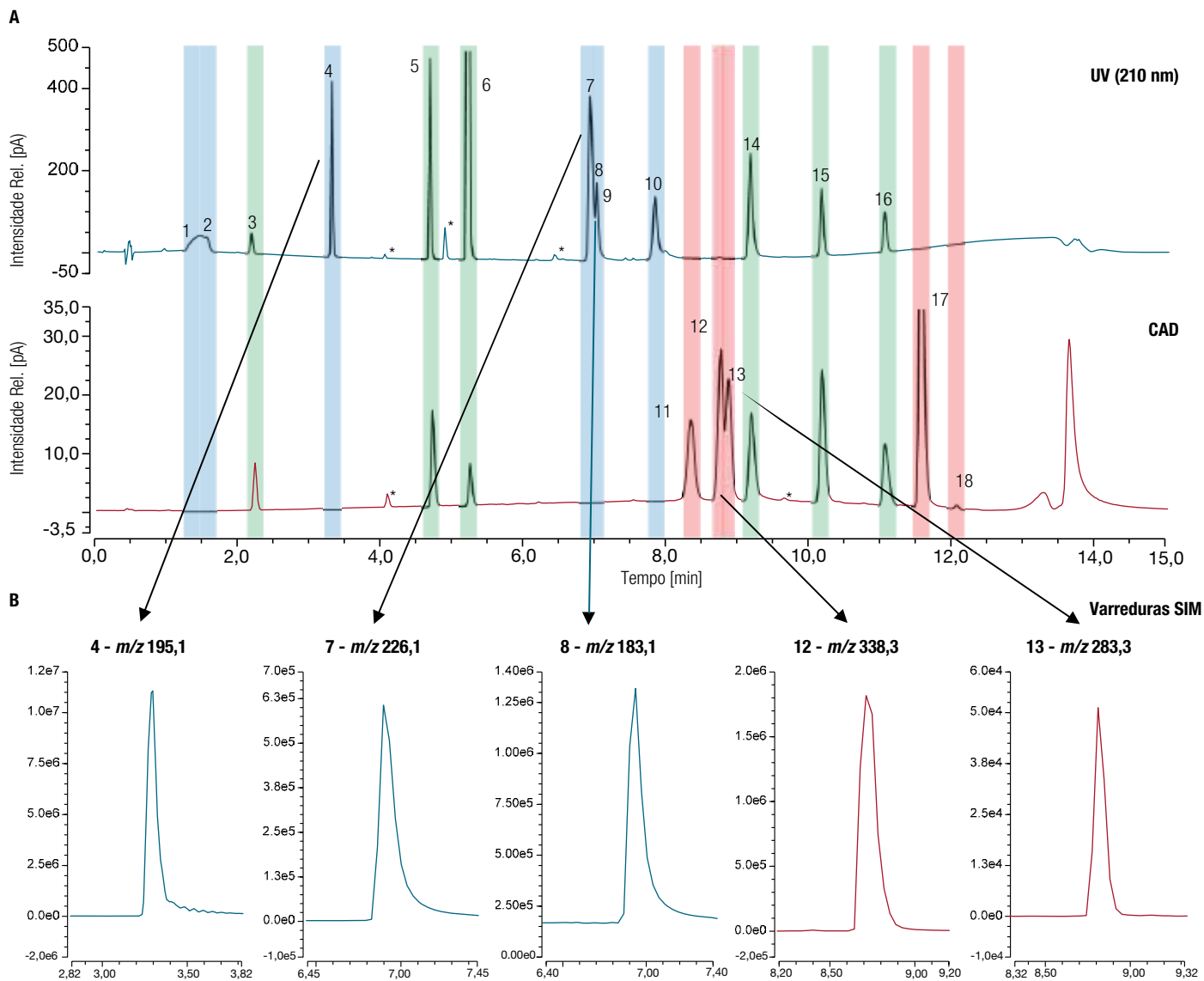


Figura 3. (A). Cromatogramas representativos de UV/Vis e CAD de uma análise de uma mistura padrão de referência usando a configuração padrão. Azul indica analitos detectados apenas por UV/Vis, vermelho destaca analitos detectados apenas pelo CAD, e verde indica analitos detectados por UV/Vis e CAD. Asteriscos indicam impurezas presentes em padrões analíticos. A concentração da amostra foi de 50 $\mu\text{g/mL}$, exceto para butilparabeno, eicosano e tetracosano. Essas substâncias foram preparadas em 500 $\mu\text{g/mL}$ por serem semivoláteis com CAD LODs mais altos. Os números de identificação referem-se aos nomes padrão listados na Tabela 3. (B). Cromatograma de íons extraído representativo (XICs) de 5 analitos usando a fonte HESI. Os números de identificação no cabeçalho referem-se aos nomes na Tabela 3. Os m/z apresentados são os valores usados para as varreduras de monitoramento de íon único (SIM).

Dezesseis compostos puderam ser detectados claramente com o espectrômetro de massa de quadrupolo simples (Tabela 3) por HESI e APCI. Confirmação de massa foi baseada na detecção da respectiva espécie m/z em modo positivo ou negativo em varredura completa e varredura SIM no mesmo tempo de eluição observado na detecção por UV/Vis ou na detecção por aerossol carregado. Cinco varreduras SIM extraídas representativas são

apresentadas na Figura 3. Substâncias que apresentaram áreas de pico relativo com APCI foram azobenzeno e BHT. Amostras áreas de pico relativo melhores com HESI foram BHET, ácido palmítico e ácido esteárico. Varreduras SIM extraídas comparando detectabilidade de BHT e ácido palmítico com APCI e HESI são apresentadas na Figura 4.

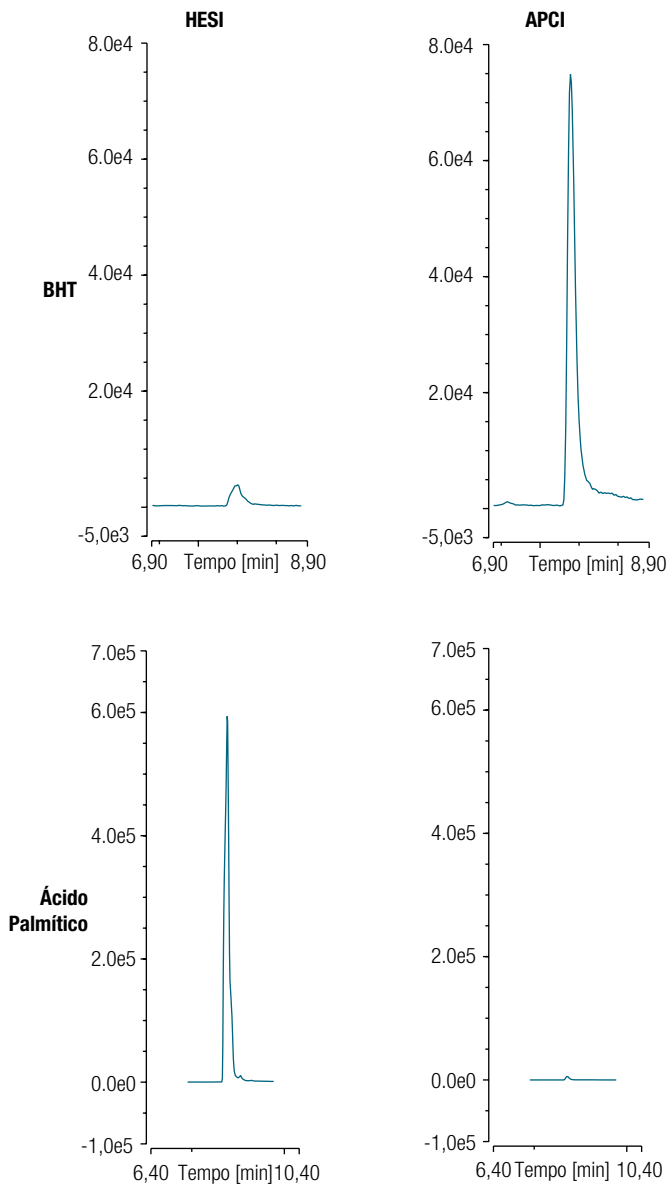


Figura 4. Exemplos de substâncias que apresentaram diferenças na sensibilidade de detecção entre APCI e HESI. BHT foi mais bem detectado com APCI, ácido palmítico com HESI. (Fileira superior, BHT, HESI apresenta varredura SIM com polaridade negativa para m/z 219,2. APCI apresenta varredura SIM com polaridade positivo para m/z 220,2, fileira inferior, ácido palmítico, varreduras SIM com polaridade negativa para m/z 255,2).

Curvas de calibração para quantificação por CAD na presença e na ausência do gradiente inverso foram comparadas (Figura 5). Com o gradiente inverso, a sobreposição das curvas de calibração, e conseqüentemente a uniformidade da resposta foi melhor do que sem o gradiente.

O benefício geral do gradiente inverso é a maior uniformidade da resposta e a possibilidade de quantificação com um calibrador universal. A melhor uniformidade de resposta do CAD com o gradiente inverso é imediatamente aparente. As

curvas de resposta na Figura 5B apresentam uma similaridade maior que as curvas na Figura 5A, como refletido pela maior similaridade entre as curvas de resposta. Os resultados de gradiente inverso em curvas de resposta menos acentuadas para substâncias que eluem em condições predominantemente aquosas e curvas de respostas mais acentuadas para substâncias que eluem principalmente em condições orgânicas.⁴ Essa equalização facilita o use de um único calibrador para quantificação de analitos onde padrões podem não estar disponíveis. Essa capacidade é demonstrada na Figura 6, que exhibe a quantificação de diferentes analitos usando um único calibrador.

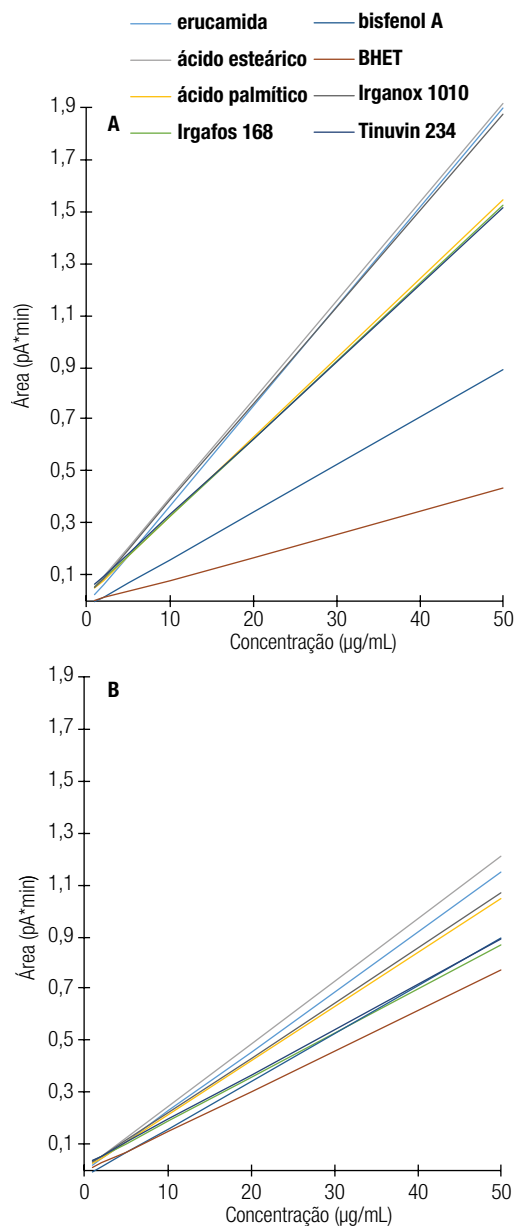


Figura 5. Curvas de calibração para quantificação por CAD sem (A, superior) e com (B, inferior) o gradiente inverso. Curvas para butilparabeno, tetracosano e eicosano não são apresentadas por seus resultados de volatilidade em um limite de quantificação de 50 µg/mL.

(bisfenol A). Bisfenol A foi escolhido por eluir aproximadamente no ponto médio do gradiente. Quando o gradiente inverso foi aplicado, quantidades estimadas para oito analitos estavam muito mais próximas da marca de 20 µg/mL do que na ausência do gradiente inverso. Os três analitos semivoláteis, butilparabeno, eicosano e tetracosano tiveram uma resposta menor que o esperado e não puderam ser precisamente quantificados por um único calibrador universal (vide também Figura 6). Eles não foram apresentados na Figura 4 porque não puderam ser quantificados em uma concentração abaixo de 50 µg/mL. Além da volatilidade de analitos, a formação de sal também pode afetar a resposta. Esses fatores e métodos para identificar semivoláteis são explicados em detalhes na Nota Técnica 72806.⁴

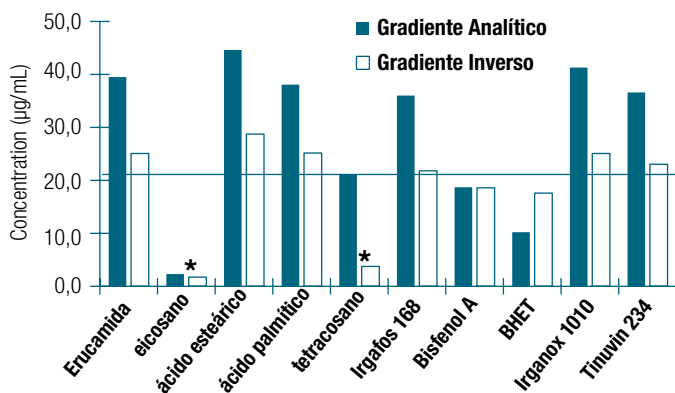


Figura 6. Calibração usando um calibrador universal (bisfenol A) com e sem o gradiente inverso. Usar a configuração de gradiente inverso resulta em um sinal de resposta mais uniforme para o CAD e consequentemente uma quantificação mais precisa com um padrão universal. Os asteriscos indicam semivoláteis, que possuem uma resposta baixa e um limite de quantificação de apenas 50 µg/mL.

Comparação da uniformidade de resposta de UV e CAD (Figura 7) confirma que o CAD é mais preciso para a quantificação de substâncias desconhecidas. A resposta do detector UV para uma molécula pequena

depende do coeficiente de extinção molar da molécula, que pode variar de 0 até 10.000 M⁻¹cm⁻¹. Portanto, analitos podem apresentar uma resposta forte ou fraca em um comprimento de onda determinado dependendo do cromóforo presente. Resposta do CAD é amplamente independente das propriedades químicas e físicas de um analito.⁵

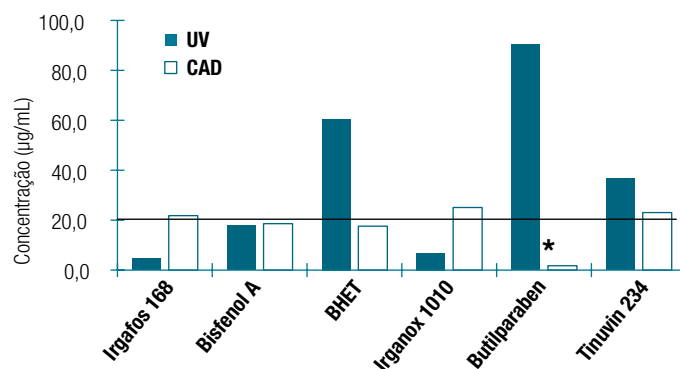


Figura 7. Comparação da quantificação de um padrão reinjetado de 20 µg/mL por UV e CAD usando um calibrador universal (bisfenol A). O CAD fornece uma resposta uniforme, e portanto uma quantificação mais precisa que o UV se um calibrador universal for aplicado. Butilparabeno foi identificado como um semivolátil no CAD e não pôde ser quantificado pelo calibrador universal por seu limite de detecção de 50 µg/mL.

Análise de amostra

A análise de contaminantes que lixiviam de bolsas de cultura de células usadas na produção biofarmacêutica é essencial para prevenir que extraíveis e lixiviáveis tóxicos acabem no produto e potencialmente prejudiquem o paciente. As camadas internas de quatro marcas diferentes de bolsas de cultura de células de uso único foram extraídas com isopropanol e água. A composição do polímero da camada interna dessas bolsas era de acetato-vinilo de etileno e níveis diferentes de densidade de polietileno. A análise de extrato revelou altos níveis do agente deslizante invisível de UV, erucamida, em três dos quatro extratos (Tabela 4 e Figura 8).

Tabela 4. Extraíveis conhecidos e desconhecidos das bolsas de cultura de células (Amostras A, B, C e D) e de tubos de microcentrifugas usados para preparar as amostras (rotulados com um traço, —). Onze picos menores adicionais (dados não apresentados), também foram detectados e quantificados por CAD. Abreviações: bDtBPP = bis(2,4-di-*terc*-butilfenol)fosfato; TBPP-ox = Irgafos 168 oxidado; IPA = isopropanol; RT = tempo de retenção.

RT (min)	UV	CAD	HESI - MS	Quantidade (µg/mL)					Massa Detectada	Possível Identidade
				—	A	B	C	D		
7,14		✓	✓	5,5	5,2	5,2	5,6	5,2	325,3 (+)	desconhecida
7,29	✓	✓	✓	x	1,9	1,7	3,1	x	374,3 (+)	desconhecida
7,66		✓	✓	5,9	4,6	8,9	3,8	6,2	375,4 (-)	desconhecida
7,73	✓	✓	✓	149	144	111	144	136	473,4 (-)	bDtBPP, [M-H] ⁻
8,28	✓	✓	✓	124	131	95,6	132	115	403,4 (-)	desconhecida
8,72	✓	✓	✓	x	31,8	31,9	36,8	2,1	338,3 (+)	erucamida, [M+H] ⁺
8,83		✓	✓	3,0	3,7	3,5	32,1	4,0	283,3 (-)	ácido esteárico, [M+H] ⁺
10,17	✓	✓	✓	1,9	15,8	16,2	15,2	8,2	663,5, 685,5, 723,5 (+)	TBPP-ox, [M+H] ⁺ , [M+Na] ⁺ , [M+H+IPA] ⁺
10,88	✓	✓	✓	1,4	1,9	2,0	1,7	3,1	279,2, 366,2 (+)	desconhecida

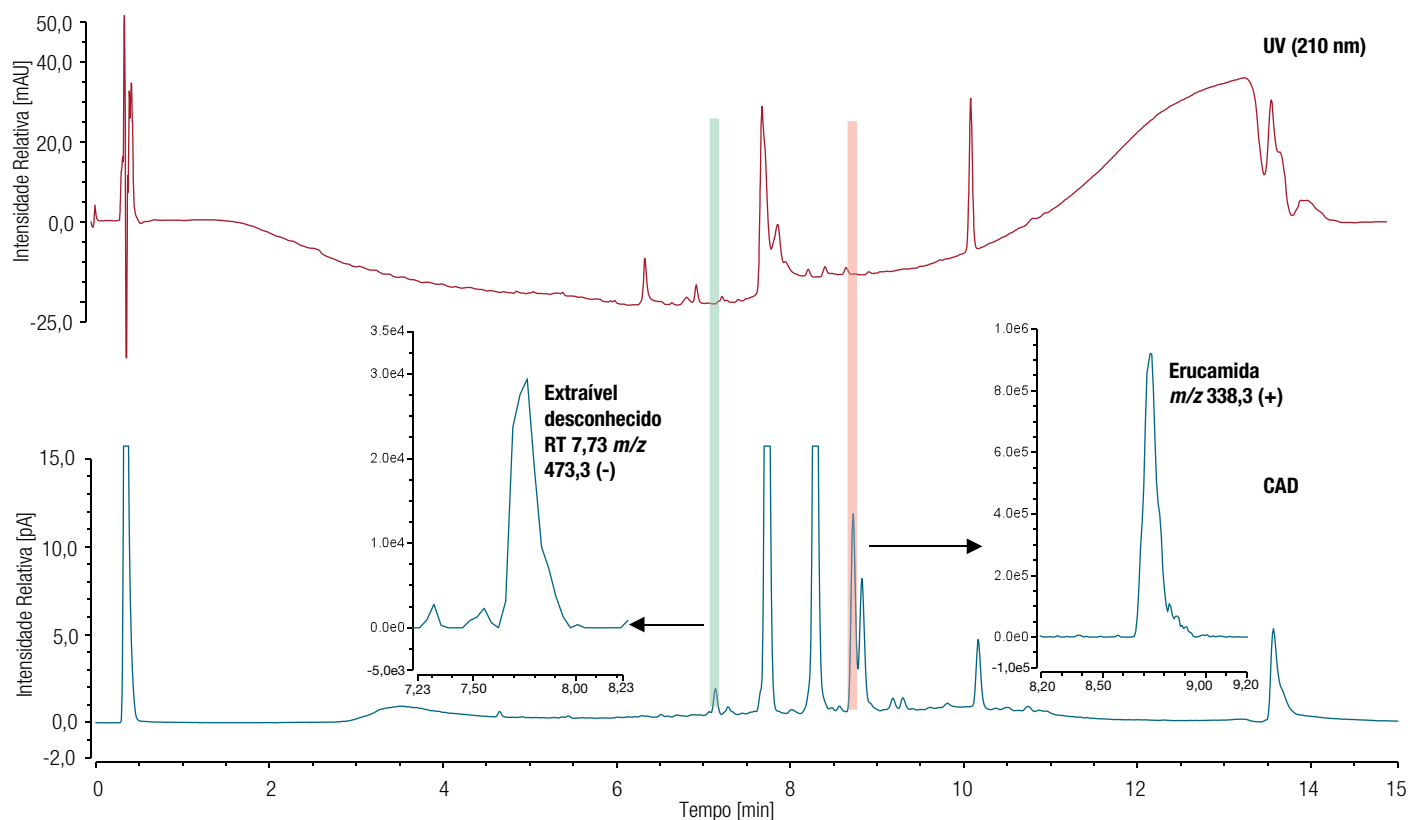


Figura 8. Análise dos extratos do revestimento de bolsas de cultura de células pelo detector UV/Vis, por CAD e por MS. Cromatogramas de UV (210 nm) e CAD da Amostra C. Vários extraíveis foram detectados com os dois métodos de detecção. Inserções: XICs de varreduras completas usando HESI de dois extraíveis encontrados em várias amostras. Um é um extraível desconhecido com um tempo de retenção de 7,73 minutos e um *m/z* de 473,3 em modo negativo. O outro é erucamida.

Dois derivados de Irgafos™ 168 também estavam presentes em várias amostras (Tabela 4), como descrito anteriormente.¹ Ao todo, todas as 19 substâncias desconhecidas e duas conhecidas (ácido esteárico e erucamida) encontradas nas bolsas foram quantificadas pela curva de calibração

universal, isso para bisfenol A (Figura 9 e Tabela 4). A MS permitiu atribuições de massa para todas as substâncias extraídas. Duas desconhecidas, bis(2,4-di-*terc*-butilfenol)fosfato e uma forma oxidada de Irgafos 168 puderam ser identificadas baseado por suas massas detectadas e registros anteriores.¹

Escolha de modo de ionização

Tanto HESI ou APCI mostraram-se adequados para essa análise. Dezesesseis das dezoito substâncias no padrão de calibração foram detectadas com as duas fontes, porém, sensibilidades variaram entre os modos de ionização. A escolha do modo de ionização é baseada no tipo de analito. APCI é um processo de ionização em fase gasosa adequado para analitos que não protonam ou deprotonam na fase líquida, ao contrário do HESI, que é um processo que depende de íons presentes na fase líquida. Por outro lado, HESI é mais adequado para compostos termolábeis que sofrem sob as condições mais rigorosas do APCI. Em caso de dúvida, analisar a mesma amostra por dois modos diferentes de ionização minimiza o risco de perder picos pela baixa ionização do composto.

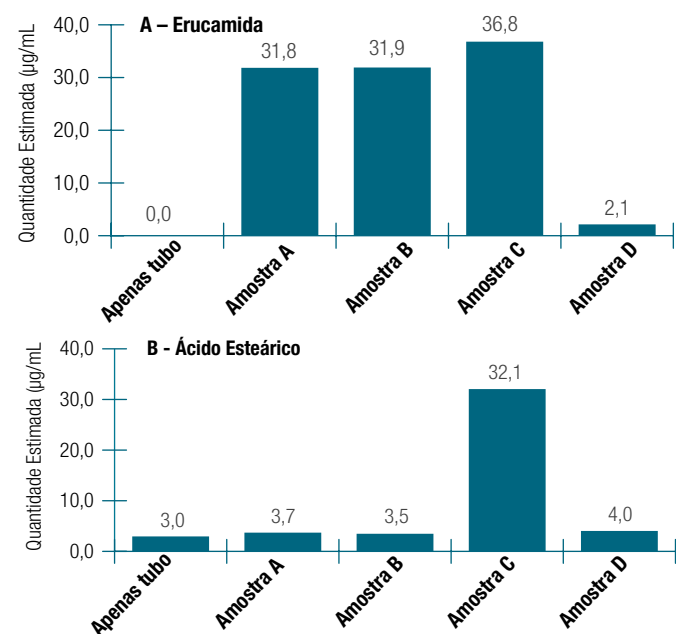


Figura 9. Análise dos extratos do revestimento de bolsas de cultura de células por UV, CAD e MS. (A). Quantidades estimadas do agente deslizante, erucamida. **(B).** Quantidades estimadas do agente de revestimento, ácido esteárico.

Escolha de plataforma

Quando a amostra contém substâncias desconhecidas para as quais não existem padrões, a configuração multidetectora de gradiente inverso deve ser usada para quantificar essas substâncias pelo CAD. A identificação de picos deve ser realizada por MS e suportada por UV 3D/curvas de nível. Se padrões existem para todos os picos em uma amostra, uma configuração multidetectora com apenas um gradiente analítico pode ser usada. A quantificação é realizada pelo CAD complementar e detectores UV, e a MS deve ser usada para confirmação de picos.

Conclusão

- O detector UV/Vis e o CAD se complementam, resultado em uma análise de amostra ampla.
- A configuração multidetectora de gradiente inverso aceita o uso de um único calibrador que permite a quantificação de compostos que não estão disponíveis como padrões de referência ou cuja identidade é desconhecida.
- Detecção por espectrometria de massa fornece informações adicionais sobre os analitos detectados permitindo a confirmação das identidades de compostos conhecidos ou identificações preliminares de compostos desconhecidos. Para uma caracterização completa da amostra, dois modos de ionização, APCI e HESI, podem ser aplicados.

Referências

1. Dorival-García, N.; Bones, J. Monitoring leachables from single-use bioreactor bags for mammalian cell culture by dispersive liquid-liquid microextraction followed by ultra high performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry. *J. Chrom. A* **2017**, 1512, 51–60.
2. Norwood, D.L.; Jenke, D.; Manolescu, C.; Pennino, S.; Grinberg, N. HPLC and LC/MS Analysis of pharmaceutical container closure system leachables and extractables. *J. Liquid Chrom. Related Tech.* **2009**, 32, 1768–1827.
3. Asa, D.; Carreiro, D. Extractable and leachable measurements by universal HPLC detection. The Application Notebook. Setembro de **2007**, 65. Acessado em outubro de 2018 em www.chromatographyonline.com/parabens-topical-preparations-using-spme-gc-ms
4. Menz, M.; Eggart, B.; Lovejoy, K.; Acworth, I.; Gamache, P.; Steiner, F. Charged aerosol detection — factors affecting uniform analyte response. Nota Técnica 72806 da Thermo Fisher Scientific; outubro de 2018.

Saiba mais em thermofisher.com/ISQEM
e thermofisher.com/Vanquish