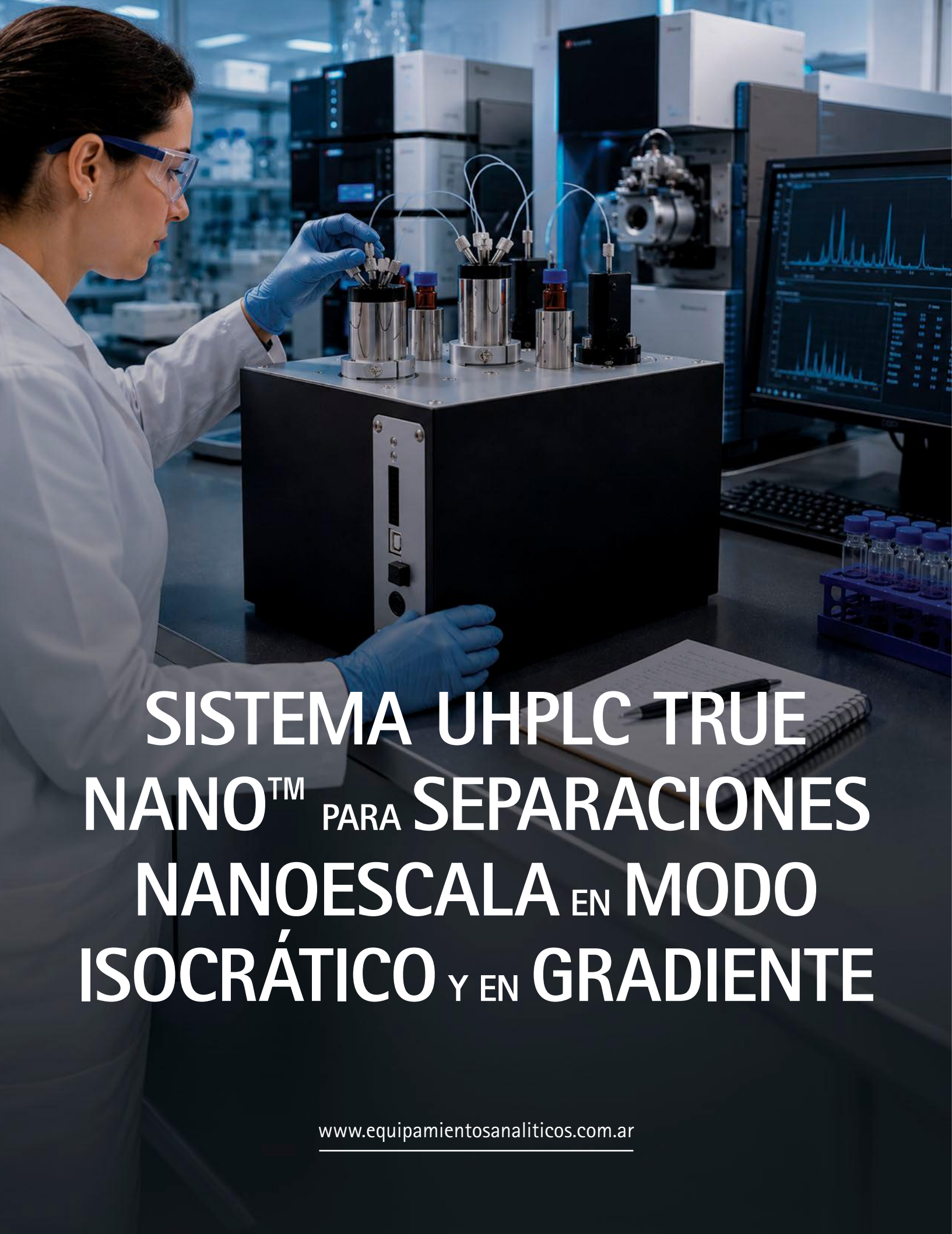




SISTEMA UHPLC TRUE NANO™ PARA SEPARACIONES NANOESCALA EN MODO ISOCRÁTICO Y EN GRADIENTE

www.equipamientosanaliticos.com.ar



Los instrumentos HPLC actuales utilizan conexiones, válvulas y bombas diseñadas para suministrar desde microlitros hasta mililitros de fase móvil por minuto. Los avances en la tecnología de los espectrómetros de masas permiten analizar rápidamente muestras cada vez más complejas, mientras que las mejoras en la tecnología de columnas hacen posible la separación de miles de compuestos, dando lugar a una nueva era de separaciones cromatográficas de ultraalta eficiencia que requieren un sistema cromatográfico igualmente eficiente. Hemos desarrollado un sistema UHPLC de nanoescala que incorpora la conexión directa de tubería de 360 μm a válvulas de nanodiámetro y bombas de nanovolumen.

ANTECEDENTES

A medida que aumentó la eficiencia de las columnas mediante el uso de partículas inferiores a 2 μm para el empaquetamiento de las columnas, este incremento en la eficiencia hizo que las columnas de menor diámetro interno se convirtieran en una opción viable para lograr una separación adecuada utilizando menor cantidad de muestra.

- Eluciones más rápidas.
- Menores caudales.
- Mayor contrapresión.
- Se requieren capilares con diámetro exterior de 360 μm y diámetros interiores de hasta 50 μm .
- El uso de estos capilares de microdiámetro proporciona:
 - Mayor velocidad lineal.

- Menor influencia del calor generado por fricción.
- Reducción del volumen de permanencia del gradiente (gradient dwell volume).
- Requiere menores volúmenes de solventes y eluentes tóxicos, costosos o de alto valor.

La conexión directa al capilar reduce el volumen muerto.

Permite una cromatografía líquida verdaderamente de alta presión y bajo caudal.

MÉTODOS

La evaluación del sistema UHPLC VICI True Nano™ consiste en adaptar los métodos actuales a sus nuevas capacidades. Gracias a sus líneas de transferencia reducidas o prácticamente inexistentes y a su mínimo volumen

interno, las corridas estándar pueden realizarse en tiempos menores que los de los sistemas convencionales de menor presión, o bien desarrollarse mediante métodos más complejos, aportando otra ventaja adicional a la cromatografía UHPLC que actualmente no está ampliamente disponible en el mercado.

Las pruebas realizadas con estándares UHPLC demuestran estabilidad de la línea base, excelente repetibilidad de las inyecciones y un desarrollo estable del gradiente. Demostraremos la mejora de los métodos HPLC convencionales mediante el uso de este equipo.

CARACTERÍSTICAS

El sistema de gradiente está construido con un controlador integrado, bombas y válvulas para llevar la muestra hasta la columna y, debido a su reducido tamaño, puede conectar la columna directamente al espectrómetro de masas.

El recorrido de flujo (flowpath) del VICI True Nano™ UHPLC es único.

- Válvula de funcionamiento con bomba única.
- Posición dedicada para pruebas.
- Mayor vida útil de la válvula.
- Suministro exclusivo del solvente A.
- Suministro combinado de los solventes A y B previamente mezclados.

Conexiones VICI de 360 µm de ajuste manual (Fingertight)

- Soportan presiones de hasta 1725 bar (25.000 PSI).
- Férulas optimizadas para ofrecer resistencia y compatibilidad química.



FIGURA 1: Conexión manual VICI de 360 µm con férula de PEEK reforzada con vidrio.

“EL SISTEMA DE GRADIENTE ESTÁ CONSTRUIDO CON UN CONTROLADOR INTEGRADO, BOMBAS Y VÁLVULAS PARA LLEVAR LA MUESTRA HASTA LA COLUMNA Y, DEBIDO A SU REDUCIDO TAMAÑO, PUEDE CONECTAR LA COLUMNA DIRECTAMENTE AL ESPECTRÓMETRO DE MASAS.”

- Aislamiento electrónico o conductividad.
- La conexión directa del tubo a la válvula reduce el volumen muerto y el arrastre entre muestras (carryover).

VICI True Nano™ UHPLC

El sistema de gradiente incorpora dos bombas de ultraalta presión y un exclusivo recorrido de flujo mediante una válvula de bomba única.

- Soporta presiones de hasta 1725 bar (25.000 PSI).
- Presión máxima: hasta 1.500 bar.
- Capacidad máxima: 35 μ L por bomba.
- Caudal mínimo: 10 nL/min.
- Resolución del caudal: 250 pasos por μ L (4 nL/paso).
- Transductores de presión integrados.
- Menor cantidad de conexiones.
- Menor volumen muerto.
- El diseño modular permite múltiples configuraciones.
- Funcionamiento en modo simple, isocrático o en gradiente.
- Diversas configuraciones de válvulas: inyección interna desde 5 nL o mediante válvula externa.



FIGURA 2: Sistema de gradiente VICI True Nano™ UHPLC.

El sistema de gradiente está construido con un **controlador integrado, bombas y válvulas** que permiten conducir la muestra hasta la columna. Gracias a su tamaño extremadamente compacto, es posible conectar la columna directamente al espectrómetro de masas.

El recorrido de flujo (flow path) del **VICI True Nano™ UHPLC** es exclusivo y ofrece las siguientes características:

- Válvula de operación con una sola bomba.
- Posición dedicada para pruebas.
- Mayor vida útil de la válvula.
- Suministro exclusivo del solvente A.
- Suministro de los solventes A y B previamente mezclados.

Ver Figura 3

RESULTADOS

A continuación se presentan algunos cromatogramas de prueba que muestran el rendimiento del sistema True Nano™ UHPLC.

“EL SISTEMA DE GRADIENTE INCORPORA DOS BOMBAS DE ULTRAALTA PRESIÓN Y UN EXCLUSIVO RECORRIDO DE FLUJO MEDIANTE UNA VÁLVULA DE BOMBA ÚNICA.”

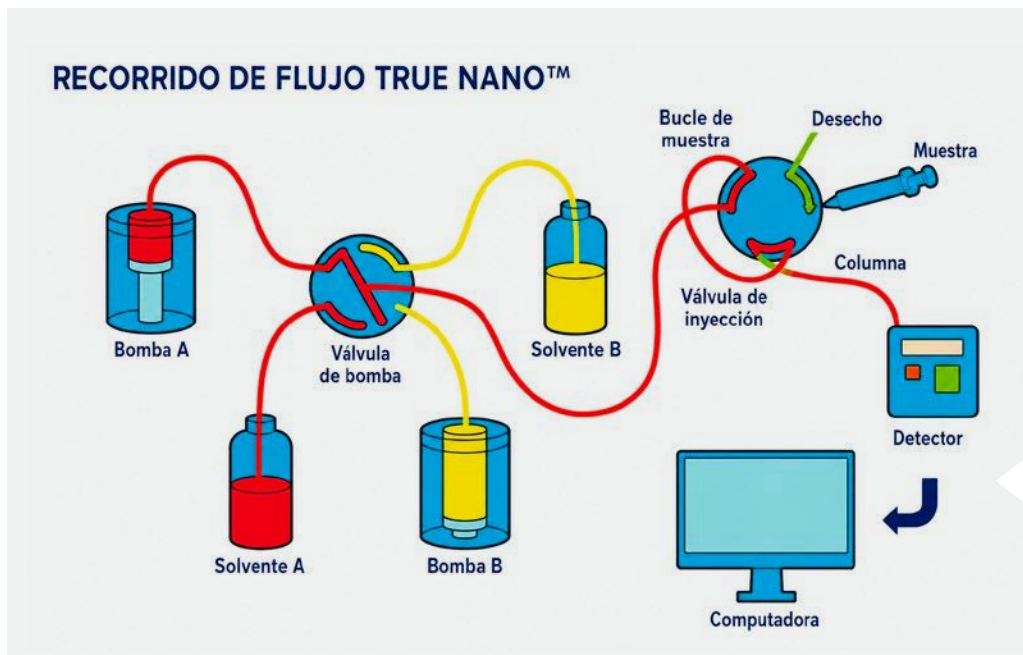


FIGURA 3: Recorrido de flujo que muestra el sistema de gradiente con una válvula externa de inyección de muestras y un detector ubicado al final de la columna.

Las pruebas realizadas con detector de ionización de llama (FID) tienen como objetivo demostrar la estabilidad del caudal. El FID detecta la presencia de compuestos orgánicos y aumenta su respuesta a medida que se incrementa el caudal. La línea de transferencia

utilizada tenía un diámetro interno de 25 μm y una longitud de 0,6 m.

Las pruebas realizadas con detector de longitud de onda ultravioleta se efectuaron utilizando un detector monocromático de 256 nm.

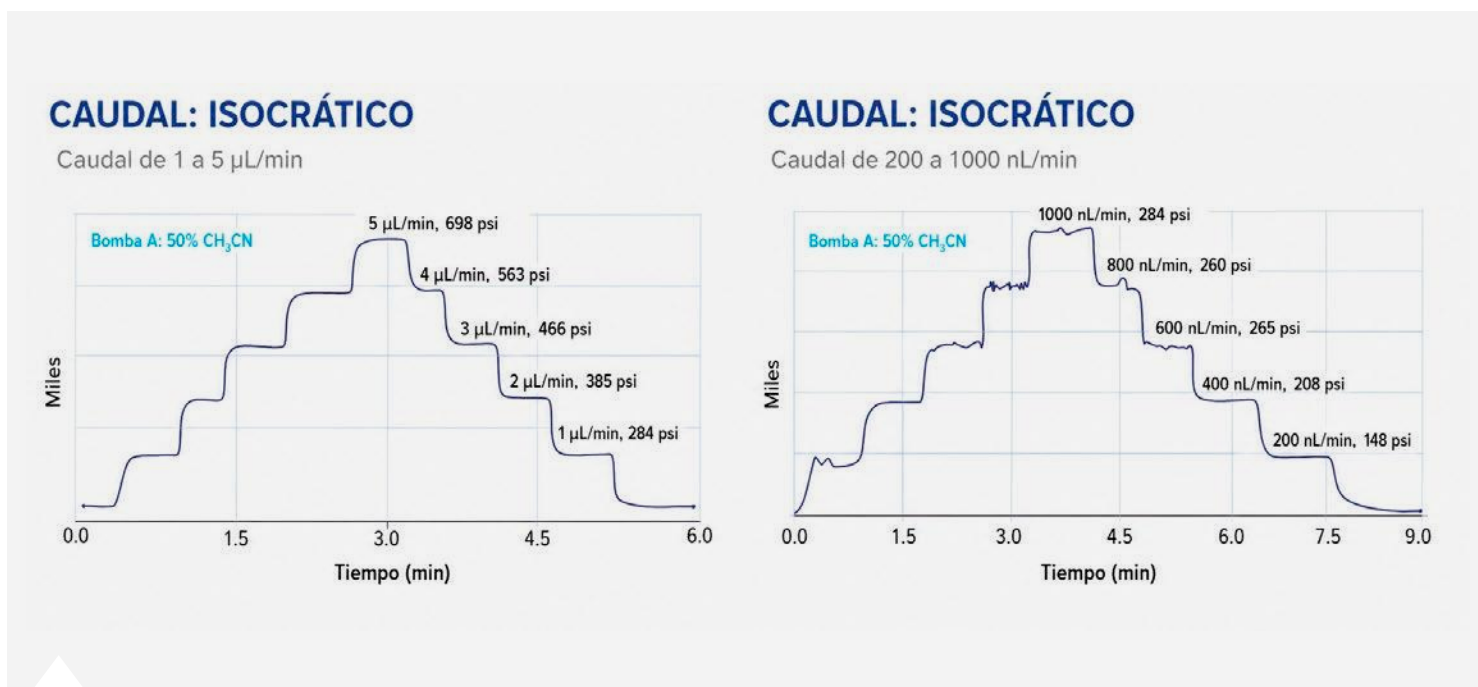


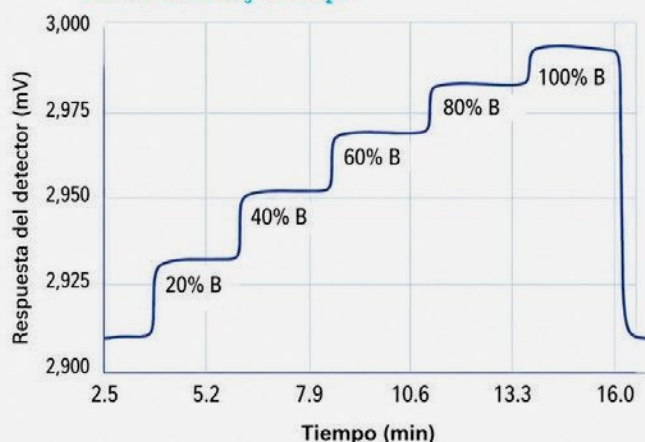
GRÁFICO 1: Datos del detector de ionización de llama (FID)

MEZCLA: RESPUESTA ESCALÓN

Caudal: 2 μ L/min

Longitud de onda del detector: 256 nm

Bomba A: Agua (H_2O)
Bomba B: 30% CH_3CN en H_2O

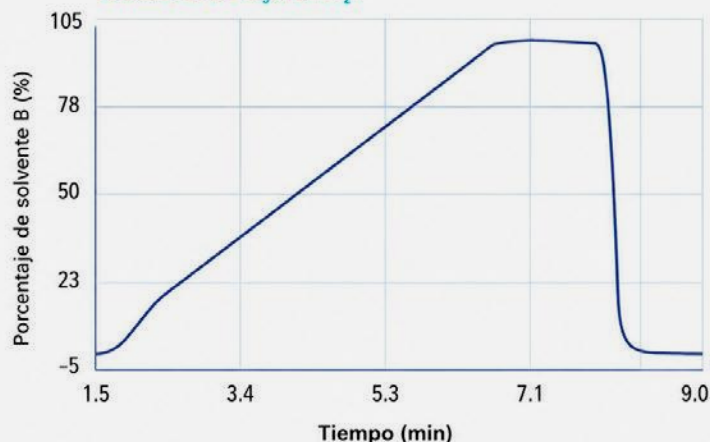


MEZCLA: GRADIENTE

Caudal: 2 μ L/min

Longitud de onda del detector: 256 nm

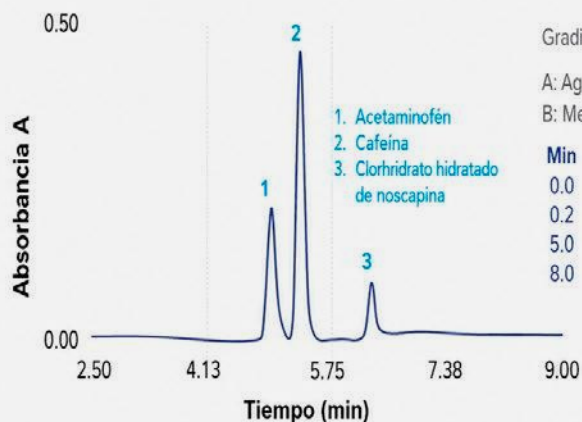
Bomba A: Agua (H_2O)
Bomba B: 30% CH_3CN en H_2O



DATOS DE LA MUESTRA

Caudal: 2 μ L/min

Longitud de onda del detector: 256 nm



Gradiente:

A: Agua (H_2O)
B: Metanol (CH_3OH)

Min	% B
0.0	0
0.2	0
5.0	100
8.0	100

Información de la columna: 3 μ m C18 DI 150 μ m
DE 360 μ m x 10 cm de longitud

Calibrado para la absorbancia del ACN a 256 nm

DATOS DE REPRODUCIBILIDAD

Tiempo de retención (min)				Área de pico (mV·s)		
Corrida	t1	t2	t3	A1	A2	A3
1	5.004	5.382	6.304	1005.1	1429.0	556.1
2	5.016	5.393	6.309	1007.1	1432.7	528.0
3	5.020	5.396	6.311	1000.2	1431.2	523.0
4	5.011	5.389	6.307	1017.1	1436.0	544.7
5	5.011	5.389	6.302	1012.6	1441.2	541.2
Promedio	5.012	5.390	6.307	1008.4	1434.0	538.6
RSD (%)	0.12	0.10	0.06	0.65	0.33	2.47

GRÁFICO 2: Datos del detector de longitud de onda ultravioleta

DATOS DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS

Los datos obtenidos mediante espectrometría de masas fueron adquiridos utilizando

un Thermo Orbitrap Elite equipado con una columna de 70 cm de longitud, 360 μ m de diámetro exterior y 75 μ m de diámetro interior, empaquetada con partículas C18 de 3 μ m.

DATOS DE LA MUESTRA

Caudal: 300 nL/min

Solvente A: agua con 0.1%
de ácido fórmico

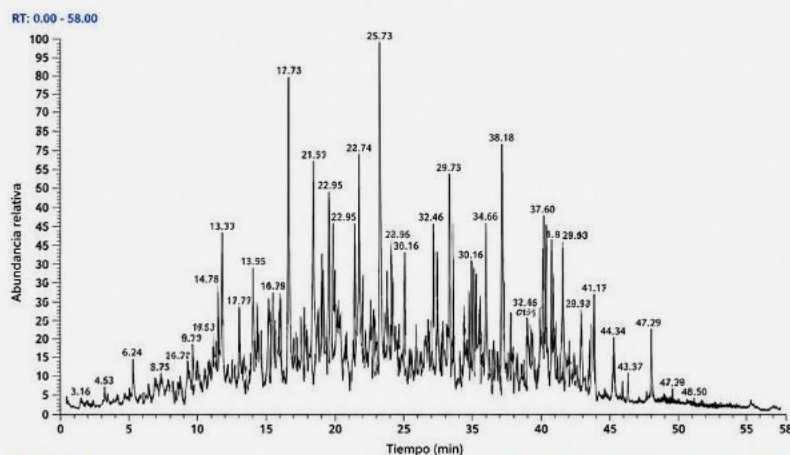
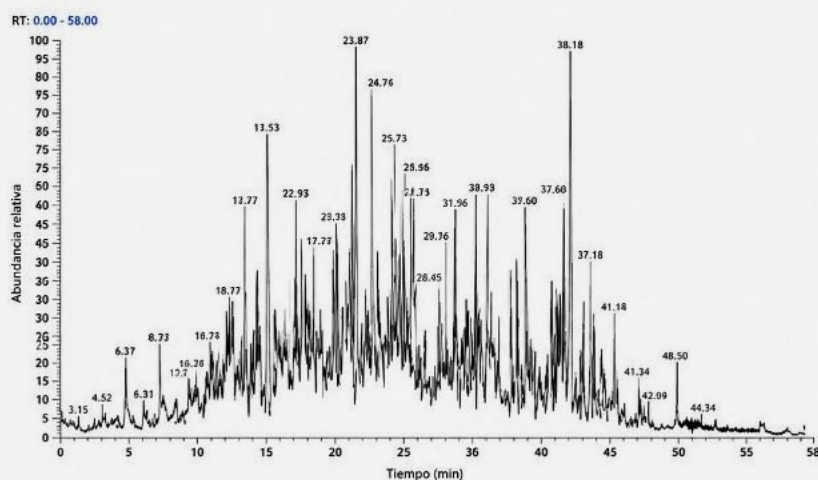
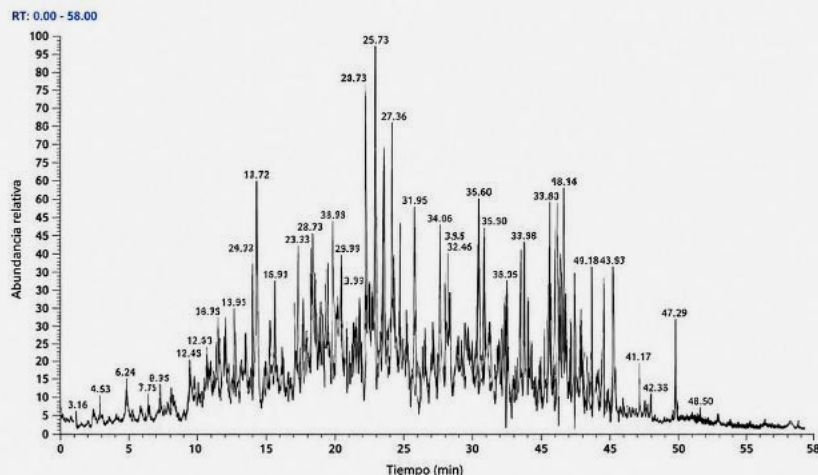
Solvente B: acetonitrilo con
0.1% de ácido fórmico

Digestiones tripticas de
Shewanella oneidensis

Tiempo (min)	%B
0	2
2	8
20	12
75	30
97	45
100	95

DATOS DE REPRODUCIBILIDAD

Relación masa/carga (m/z)	492.3	547.8	617.3	727.4
Tiempo de retención (min) – corrida de 110 minutos				
Corrida 1	21.65	36.964	60.834	76.216
Corrida 2	21.998	37.19	60.749	76.255
Corrida 3	22.045	37.214	60.735	76.255
Corrida 4	22.21	37.296	60.992	76.418
Corrida 5	22.353	37.068	60.854	76.277
Corrida 6	22.409	36.732	60.783	76.302
Desv. estándar (min)	0.2781	0.2056	0.0943	0.0701
Desv. estándar (seg)	16.689	12.336	5.6572	4.2064



DATOS

*Datos cedidos por Deniz Ozei at Estrella PNL

GRÁFICO 3: Datos del espectrómetro de masas

CONCLUSIONES

El sistema de gradiente VICI True Nano™ UHPLC proporciona detección directa sobre la columna

y un volumen extracolumna mínimo, eliminando el ensanchamiento de bandas y proporcionando una unidad de volumen mínima para la

introducción de la muestra al detector.

Gracias a estas ventajas, este sistema UHPLC es ideal para inyecciones de nanoflujo con muestras de bajo volumen, siendo la opción perfecta para los espectrómetros de masas de última generación y mayor sensibilidad que están llegando al mercado.

AGRADECIMIENTOS

Milton Lee, Luke Tolley, Greg Ward y el resto del equipo de Axcend LLC por el uso de un detector UV y por proporcionar las columnas y su experiencia técnica.

Daniel Orton, Ronald Moore y otros investigadores de Battelle, PNNL, por proporcionar columnas, datos de espectrometría de masas y su experiencia científica.

Partes de esta investigación fueron financiadas

por el National Institute of General Medical Sciences de los NIH (GM103493), el National Institute of Allergy and Infectious Diseases (AA12042-001), el programa Laboratory Directed Research and Development (LDRD) del Pacific Northwest National Laboratory (PNNL) y por el programa Genome Sciences de la Oficina de Biological and Environmental Research del Departamento de Energía de los Estados Unidos, en el marco del proyecto Pan-omics.

Este trabajo se llevó a cabo en el Environmental Molecular Science Laboratory, una instalación científica nacional para usuarios del Departamento de Energía de los Estados Unidos (DOE), ubicada en el Pacific Northwest National Laboratory (PNNL), en Richland, Washington. Battelle opera el PNNL para el DOE bajo el contrato DE-AC05-76RLO01830.

Huamin Cai, Martin Brisbin, Alex Plistil, Hal Barnett y los ingenieros de VICI Houston por su experiencia y por los datos utilizados en esta presentación.

Julia Stearns, Moe Abbott, Christian Hamm, Shirley Li y el resto del grupo de Marketing y Diseño de VICI por la edición y preparación del material de la presentación.



Equipamientos Analíticos S.A

35 años brindando soluciones

**Representante Exclusivo en ARGENTINA
EQUIPAMIENTOS ANALITICOS SA**

Roosevelt 2445 8A (1428) CABA

Teléfono: 11 4788 8494

equipamientos@equipanaliticos.com.ar

www.equipanaliticos.com.ar ►