

Perspectivas del HPLC-MS con fines docentes en la asignatura Física del plan de estudios de Ingeniería Informática

L.E. Jiménez Rodríguez¹, J.F. Valiente-Márquez²

¹UCLA, MINAG, C.P. 10700, La Habana, Cuba.

²Centro Universitario Municipal, ISPJAE, C.P. 10400, La Habana, Cuba.

E-mail: enrijim@infomed.cu

(Recibido el 14 de marzo de 2022, aceptado el 15 de julio de 2022)

Resumen

La espectrometría de masas es una técnica altamente utilizada en el análisis de fármacos, alimentos, productos de síntesis química, análisis forense, contaminación medioambiental y en todo tipo de analitos que sean susceptibles de pasar a fase vapor e ionizarse sin descomponer a través de la cámara de ionización. En el Laboratorio Nacional de Higiene de los Alimentos (LNHA) se cuenta con un equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a la espectrometría de masas con detector triple cuadrupolo HPLC-MS/MS para la determinación de múltiples analitos en diversas matrices. En el presente trabajo se muestran algunas consideraciones sobre las perspectivas del HPLC-MS, con fines docentes en la asignatura Física del plan de estudios de Ingeniería Informática.

Palabras clave: HPLC-MS/MS.

Abstract

Mass spectrometry is a technique widely used in the analysis of drugs, foods, chemical synthesis products, forensic analysis, and environmental contamination and in all kinds of analytes that are likely to pass into the vapor phase and ionize without decomposing through the chamber ionization. The National Food Hygiene Laboratory (LNHA) has a high efficiency liquid chromatography equipment coupled to mass spectrometry with triple quadrupole detector HPLC-MS/MS for the determination of multiple analytes in various matrices. In the present work, some considerations about the perspectives of the HPLC-MS are shown, with teaching purposes in the Physics subject of the Computer Engineering curriculum.

Keywords: HPLC-MS/MS.

I. Introducción

Dentro de los núcleos temáticos de Física I según está concebido en el Programa, se encuentran: La Ionización por Electro spray (ESI), uno de los métodos de ionización más recientemente desarrollados en espectrometría de masas. El diseño y operación de fuentes de ionización por electro spray usadas comúnmente en los espectrómetros de masas están basados en diseños descritos por Fenn y colaboradores en 1985. En el proceso general de electro spray, que ocurre en la punta del emisor (capilar o aguja), una solución acuosa ácida o básica (dependiendo de la muestra) diluida del analito (10^{-4} - 10^{-5} molar) es rociada desde la punta del emisor en el cual se aplica un potencial de 3-4 kV, la solución debe proveer conductividad eléctrica que puede ser obtenida por el uso de analitos iónicos o aditivos iónicos tales como buffers o por algún grado de disociación electrolítica del solvente. El líquido comienza a salir de la aguja, incrementa su carga y asume una forma cónica, llamada cono de Taylor, en honor a G.I. Taylor quien describió este fenómeno en 1964. El líquido asume esta forma cuando incrementa su carga ya que una forma cilíndrica puede retener más carga que una esfera. En la *Lat. Am. J. Phys. Educ. Vol. 16, No.3, Sept., 2022*

punta del cono, el líquido cambia de forma a una línea fina, que se vuelve inestable ya que es forzado a retener más y más carga, y finalmente llega a un punto crítico donde no puede soportar más carga eléctrica y la solución entonces se dispersa en forma de niebla de pequeñas gotas (de menos de $10 \mu\text{m}$ de diámetro) altamente cargadas que vuelan buscando una superficie de carga opuesta. Debido a que las gotas están altamente cargadas con la misma carga eléctrica se repelen fuertemente, las gotas vuelan y se dispersan cubriendo un área cada vez mayor y se van reduciendo de tamaño ya que las moléculas de solvente se evaporan en su superficie, y la distancia entre las moléculas cargadas disminuye dramáticamente. Si la gota no encuentra donde disipar su carga, las cargas eléctricas llegan a un estado crítico y la gota explota violentamente. Este proceso fue originalmente observado por el físico John Zelany en 1914.

Una característica de ESI es que debido a las condiciones ácidas usadas para producir las gotas cargadas positivamente se tienden a protonar todos los sitios básicos en las moléculas de analito. Una segunda característica de ESI es la eficiencia del proceso de ionización y, como resultado, la sensibilidad de los experimentos basados en

esta forma de ionización, la eficiencia en la protonación de estos sitios básicos en ambientes ácidos parece contribuir a la sensibilidad. Una tercera característica es su compatibilidad con los solventes de HPLC de fase reversa (reverse-phase high-performance liquid chromatography), ya que las mezclas agua/solvente tienen excelentes propiedades compatibles con ESI. En los experimentos de espectrometría de masas aparecen dos clases principales de iones, el ion molecular, que es la molécula completa del analito, y fragmentos iónicos, los cuales contienen solo una parte de la estructura. El peso molecular de una molécula puede ser calculado de la m/z del ion molecular, si la carga (z) es conocida, la información estructural se obtiene a partir de las m/z de los fragmentos del ion. La cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a la espectrometría de masas con detector cuadrupolo (HPLC-MS/MS) es un método físico-químico de separación que considera las relaciones masa/carga (m/e) del pico original o pico padre y la de sus fragmentos luego de pasar a través de un campo electromagnético de determinada intensidad de acuerdo al compuesto en cuestión, resultando por ello un método específico y muy selectivo para la identificación y cuantificación de moléculas orgánicas de cualquier tipo.

Los espectrómetros de masa generan datos espectrales de masas que pueden proporcionar una valiosa información sobre la identidad, la masa molecular y la estructura de un analito. Los principales componentes de un espectrómetro de masas son: la fuente de producción de los iones, el analizador -donde se produce la separación de los iones- y el detector. El movimiento de iones se lleva a cabo aplicando campos eléctricos y alto vacío y los iones son separados e identificados según su relación masa/carga (m/z). Todos los analizadores de masas comúnmente usados utilizan campos eléctricos y magnéticos para aplicar una fuerza a partículas cargadas (iones). La relación entre fuerza, masa y los campos aplicados puede verse a través de la segunda ley de Newton: $F=ma$ y la ley de Lorentz: $F= eE + evB$. De la segunda ley de Newton se observa que la fuerza aplicada causa una aceleración que es dependiente de la masa del ion, y la Ley de Lorentz indica que la fuerza aplicada es también dependiente de la carga del ion. Por lo tanto, los espectrómetros de masas separan los iones de acuerdo a su relación masa/carga (m/z) y no solo a partir de la masa únicamente. El analizador de masas de cuadrupolo es probablemente el analizador de masas más utilizado, ya que además de su alto desempeño analítico combina facilidad de uso. Este tipo de analizador está compuesto de cuatro barras organizadas paralelamente como dos grupos de dos barras conectadas eléctricamente. Una combinación de voltajes de radiofrecuencia (rf) y corriente directa (dc) son aplicados a cada par de barras, este arreglo simétrico permite producir campos hiperbólicos. Superficies diagonalmente opuestas están conectadas juntas a fuentes de voltajes rf y dc. Los iones se extraen de la fuente de iones y son acelerados (5 - 15 V) dentro del espacio central formado por el cuadrupolo a lo largo del eje longitudinal hacia el detector. Miller y Denton describieron el concepto de filtro de masas cuadrupolo como la combinación o superposición de filtros de pase bajo y pase alto. Al menos para iones relativamente ligeros (<300 Da), el análisis m/z no es

afectado por la estructura del ion. Una exploración rigurosa de la trayectoria de los iones a través del filtro cuadrupolo incluye un gran número de variables físicas que afectan los campos eléctricos instantáneos que afectan los iones. Para un filtro de masas hiperbólico clásico, el potencial de distribución (F) a cualquier tiempo (t) es descrito por la siguiente ecuación: $F = [U+V \cos(wt)] (x^2 - y^2) / 2r_0^2$, donde "x" y "y" son las distancias a lo largo de ejes de coordenadas, r_0^2 es la distancia desde el eje "z" a cualquiera de las superficies del cuadrupolo, "w" es la frecuencia angular ($2\pi f$) de la corriente alterna aplicada (AC), V es la magnitud de la señal rf aplicada, y U es la magnitud del potencial dc aplicado a las superficies.^{1,2}

I. Energía cinética de un ion de masa "m" y carga "z".

La capacidad de discriminación de m/z se basa en la variación de la trayectoria de un ión en función del campo magnético de su entorno.

La energía traslacional, o cinética, KE de un ion de masa "m" y carga "z" en la rendija de salida B viene dada por:

$$KE = zeV = 1/2 mv^2$$

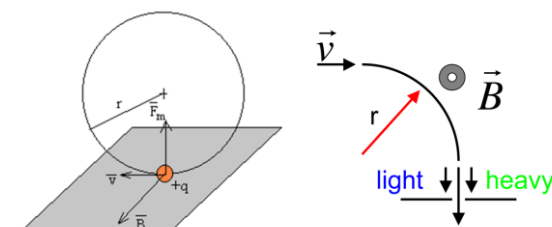
Dónde:

"V" es el potencial entre A y B.

"v" es la velocidad del ion después de la aceleración.

"e" es la carga del electrón ($e = 1,60 \cdot 10^{-19}C$) donde todos los iones que tienen la misma carga "z" se asumen con la misma energía cinética después de la aceleración, independientemente de su masa.

II. Fuerza Magnética (F M) y Centrípeta (F C)

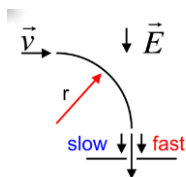


- I.
- II. Los iones más pesados deben viajar a través del sector magnético a velocidades menores. La trayectoria descrita en el sector por los iones de una masa y carga dadas representa un balance entre las dos fuerzas que actúan sobre ellos. La fuerza magnética F_M viene dada por la relación:

$$F_M = Bzev$$

donde B es la fuerza del campo magnético y la fuerza centrípeta resultante F_c , viene dada por:

$$F_c = mv^2/r$$



donde r es el radio de curvatura del sector magnético.

III. ECUACIÓN FUNDAMENTAL DE LA SEPARACIÓN IÓNICA

Para que un ion atraviese la trayectoria circular hasta el colector, es necesario que F_M y F_c , sean iguales. Así, resulta que:

$$Bzev = mv^2/r$$

Reordenando y sustituyendo se obtiene:

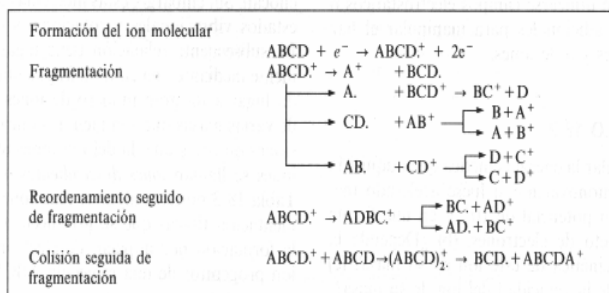
$$v = Bze/m$$

$$m/z = B^2 r^2 e / (2V)$$

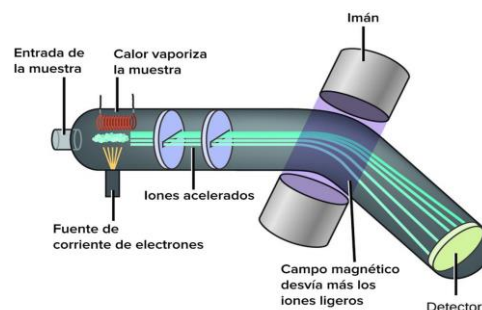
Son ecuaciones fundamentales de la separación iónica, deduciéndose que los espectros de masas pueden obtenerse variando una de las tres variables ("B"; "V"; "r") manteniendo "m"; "z" constantes.

Por medio de un electroimán, los iones se separan manteniendo V y r constantes mientras se varía la corriente en el imán y por tanto B, con barridos magnéticos, o manteniendo constante la corriente aplicada al imán y variando el potencial V (voltaje de aceleración), mediante barridos eléctricos.

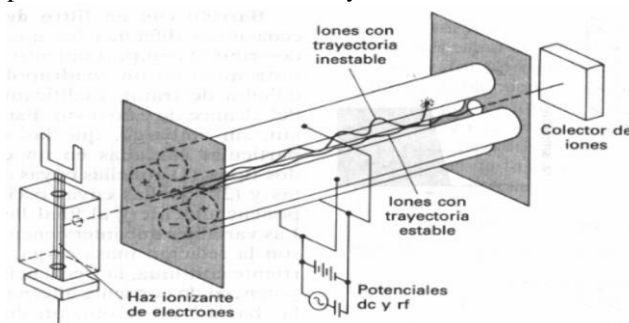
Colisiones típicas por impacto electrónico en espectrometría de masas:



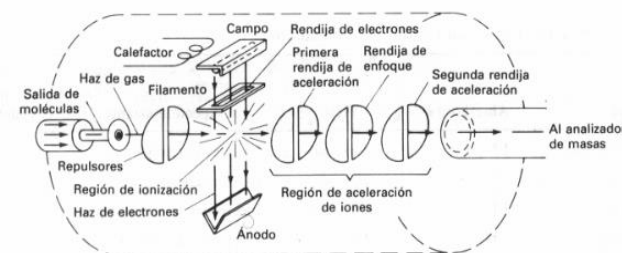
Esquema de un Detector de Masas:



El **cuadrupolo** transmite una banda de iones que tienen un intervalo limitado de valores de m/z de forma que el centro de esta banda puede variarse ajustando los potenciales de corriente alterna y continua.



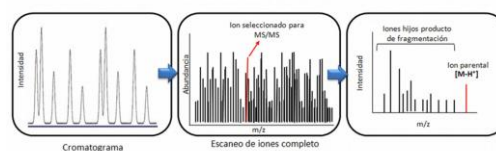
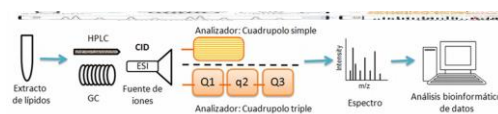
El objetivo del sistema de entrada es el de introducir una pequeña cantidad de muestra (un μmol o menos) en el **espectrómetro de masas**, convirtiéndose así sus componentes en iones gaseosos.



Una vez que los diversos iones abandonan la cámara de de ionización, llevan una cierta velocidad que les ha sido suministrada por el campo eléctrico al que han sido sometidos. La energía cinética de llevan los iones (E_c), será:

$$E_c = eV + E_0 = \frac{1}{2} mv^2$$

Se obtiene así el espectro de masas:



Plan temático de la asignatura Física General:

Los núcleos temáticos de Física I según está concebido en el Programa, son:

- 1- Leyes de la mecánica clásica.
- 2- Leyes de conservación y propiedades de la materia. Trabajo y energía.
- 3- Relatividad del movimiento mecánico.
- 4- Oscilaciones y ondas mecánicas.
- 5- Teoría cinético-molecular. Entropía.

Leyes de la Termodinámica.

De esta forma, de acuerdo al Plan Temático, el esquema de clases es:

Semana	Primera actividad	Segunda actividad	Tercera actividad
1	C1 Magnitudes Físicas. Vectores	CP1 Conversión de unidades Suma de vectores.	CP2 Productos entre vectores
2	C2 Cinemática	CP3 Movimiento rectilíneo	
3		CP4 Proyectiles. Mov. circular	PI 1
4	C3 Dinámica	CP5 Movimiento relativo	L1
5	C4 Trabajo y energía	CP6 Dinámica 1	CP7 Dinámica 2
6	CP8 Trabajo y energía	CP9 Conservación de la energía	L2
7	C5 Cantidad de movimiento. Choques	CP10 Conservación de la cantidad de mov.	S1
8	C6 Movimiento de rotación	CP11 Rotación 1	L3
9		CP12 Rotación 2	PI 2
10	C7 Oscilaciones mecánicas	CP13 Oscilaciones 1	L4
11	C8 Ondas elásticas	CP14 Oscilaciones 2	CP15 Ondas elásticas
12	C9 Sonido	S2	L5
13	C10 TCM de los gases	CP16 Modos normales y efecto Doppler.	CP17 TCM de los gases
14	C11 1ª y 2ª ley de la Termodinámica	CP18 Primera ley de la Termodinámica	L6
15		CP19 Primera y Segunda ley de la Termodinámica	PI3
16	C12 Fenómenos de transporte	CP20 Fenómenos de transporte	ECLab

Desarrollo:

En este trabajo se pretenden establecer las bases para una modificación en la semana 7 del calendario, de forma que en el Seminario 1 (S1) se efectúe una visita de trabajo al Laboratorio de Residuos del LNHA con vistas a reafirmar los conocimientos teóricos adquiridos en las clases de Física, con una visión práctica de aplicación de los conocimientos, en particular sobre:

- Teoría de las colisiones (choques entre partículas)
- Transformación (cambios) de energía luego de las colisiones (cinética en potencial)

Propuesta:

Modificar el orden de los núcleos temáticos de la asignatura Física I, por el siguiente:

- 1- Leyes de la mecánica clásica.
- 2- Relatividad del movimiento mecánico. Oscilaciones y ondas mecánicas.
- 3- Leyes de la Termodinámica.
- 4- Teoría cinético-molecular. Entropía.
- 5- Leyes de conservación y propiedades de la materia. Trabajo y energía.

CONCLUSIONES

Se cuenta con un equipo de espectrometría de masas con detector cuadrupolo (HPLC-MS) con el cual se puede dar respuesta a las necesidades actuales y futuras del país acorde con las exigencias internacionales.

Se muestra la forma de establecer una posible colaboración con centros docentes de nivel superior en el país que sirva de aplicación práctica a los conocimientos teóricos adquiridos por los estudiantes de la asignatura Física del plan de estudios de Ingeniería Informática.

REFERENCIAS

- [1] Sears, F. W., Zemansky, M. W., Young, H. D., Roger, A., *Física. Universitaria*, 11 ed. Vol. 1., USA: Carnegie Mellon University.
- [2] Kitson, F. G., Larsen, B. S. and MacEwen, Ch. N., (1996). Gas chromatography and spectrometry.
- [3] Programa analítico de Física I. Ingeniería.