



Análisis de drogas de abuso a valores de pH bajos y altos mediante LC/MS con una columna Agilent Poroshell HPH C18

Nota de aplicación

Fármacos - pequeña molécula

Autor

William Long
Agilent Technologies, Inc.

Introducción

En esta nota de aplicación se comparan los resultados del análisis de varios compuestos asociados con drogas de abuso a valores de pH bajos y altos mediante cromatografía de líquidos/espectrometría de masas (LC/MS), utilizando un gradiente genérico por electrospray en modo de ionización positiva (ESI+). En condiciones normales, cabría esperar que el estado de ionización de las moléculas del analito dependiese del pH de la fase móvil, y que la eficiencia de la ionización por electrospray en modo de iones positivos en la LC/MS se redujera drásticamente en fases móviles con pH alto, dado que los compuestos se vuelven neutros. Sin embargo, muchos investigadores que trabajan con distintos tipos de muestras (como proteínas, péptidos y aminoácidos) han observado insensibilidad al incremento del pH de la fase móvil o incluso un aumento de la sensibilidad [1-6]. Las fases móviles con pH alto no suprimen la ionización de los compuestos básicos en la ESI+. Se forman iones positivos en abundancia, y a menudo las respuestas del analito son mejores con valores de pH altos que con fases móviles ácidas con valores de pH bajos. Este hallazgo es importante, ya que amplía el campo de aplicación de los métodos de elución genéricos al análisis de compuestos básicos polares que anteriormente resultaban difíciles de retener.

Sin embargo, muchas de las condiciones que podrían utilizarse para valores de pH altos han demostrado ser contraproducentes para las columnas HPLC convencionales de sílice. Las nuevas columnas estables a pH alto, como la columna Agilent Poroshell HPH C18, permiten utilizar el control del pH para ajustar la selectividad y la sensibilidad sin que los valores altos de pH acorten la vida útil de la columna. Gracias a estas columnas, los cromatografistas pueden aventurarse ahora a usar un rango mayor de pH para el desarrollo de métodos con tecnología de partículas superficialmente porosas, que se utiliza cada vez más gracias a su alta eficiencia y velocidad [7].



Agilent Technologies

Experimento

Se utilizó un sistema LC Agilent 1290 Infinity con un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Agilent 6460, compuesto por los elementos siguientes:

- Bomba binaria Agilent 1290 Infinity, capaz de proporcionar hasta 1.200 bar (G4220A), modificada con un sello de PEEK en la válvula de derivación de disolvente (sello de rotor de PEEK FL, ref. 5068-0171).
- Compartimento termostatzado de columna (TCC) Agilent 1290 Infinity (G1316C).
- Inyector automático de alto rendimiento Agilent 1290 Infinity (G4226A) con sello de rotor de PEEK (sello de rotor de PEEK FL, ref. 5068-0170).
- Agilent Poroshell HPH-C18, 3 x 100 mm, 4 μ m (ref. 695970-502).

Los sellos de PEEK FL deben utilizarse con tampón de bicarbonato amónico. Los sellos estándar del rotor de los instrumentos Agilent serie 1290 están fabricados en Vespel y soportan un rango de pH limitado (1-10). Los sellos de rotor de PEEK FL están fabricados en una mezcla especial de PEEK que es compatible con un rango de pH más amplio (1,0-12,5). El instrumento UHPLC se montó en un espacio de trabajo A-Line. El sistema se conectó con tubos de 0,075 μ m para minimizar la dispersión. Esto produjo una retropresión superior a la de los tubos convencionales de 0,12 o 0,17 mm de d.i., pero no supuso un problema ya que las columnas Poroshell HPH C18 de 4 μ m generan poca presión. En la Tabla 1 se indican las transiciones MRM y los iones monitorizados.

Se prepararon formiato de amonio y ácido fórmico con una concentración de 5 mM; después, se utilizaron para preparar un tampón de pH bajo (pH 3). El formiato de amonio se adquirió a Sigma-Aldrich, Corp. El ácido fórmico de doble destilación se adquirió a GFS. Se utilizaron bicarbonato amónico e hidróxido amónico, suministrados por Sigma-Aldrich, para preparar un tampón de pH 10,5.

Tabla 1. Transiciones MRM de los compuestos utilizados en este estudio.

Compuesto	Ión precursor	Tensión del fragmentador	Ión producto 1	Energía de colisión 1	Ión producto 2	Energía de colisión 2
Estricnina	335,2	195	184	41	156	53
Alprazolam	309,1	179	281	25	205	49
MDMA	194,1	97	163	9	105	25
Anfetamina	136,1	66	119,1	5	91	17
Trazodona	372,2	159	176	25	148	37
Meperidina	248,2	128	220,1	21	174,1	17
Verapamilo	455,3	158	165	37	150	45
Metadona	310,2	112	265,1	9	105	29
Proadifeno	354,2	153	167	29	91,1	45
Diazepam	285,1	169	193	45	154	25
THC	315,2	150	193,2	20	123,3	30

Resultados y comentarios

En esta nota de aplicación, en la que se compara la elución de estos compuestos en una fase móvil básica frente a una fase móvil ácida, comprobamos que las bases permanecen retenidas durante más tiempo en una fase móvil básica. Los compuestos básicos están completamente protonados y se retienen mejor que los compuestos cargados en la columna HPLC de fase reversa. Dado que estos compuestos se retienen mejor, pueden realizarse más ajustes del disolvente y eso permite mejorar la separación de los picos, tal como se muestra en la Figura 1. Las condiciones del gradiente y la fase móvil se indican en la Figura 1. Por último, algunos de los picos de analito son mayores en un disolvente básico que en una fase móvil ácida. Los picos asociados a la trazodona, el verapamilo, la metadona y el proadifeno son notablemente mayores con la fase móvil básica. Esto se puede deber al efecto del pH, pero también a que el compuesto esté retenido durante más tiempo y se eluya en una fase móvil con mayor contenido orgánico.

Conclusiones

Previamente, ya se demostró que una columna Agilent Poroshell HPH-C18 puede utilizarse durante períodos largos (más de 2.000 inyecciones) con fases móviles de pH alto, como un tampón de bicarbonato amónico de pH 10. Gracias a esto, los cromatografistas pueden aventurarse ahora a usar un rango mayor de pH para el desarrollo de métodos con tecnología de partículas superficialmente porosas, que se utiliza cada vez más gracias a su alta eficiencia y velocidad. El uso de fases móviles de pH alto y partículas superficialmente porosas resulta tanto ventajoso como práctico [8].

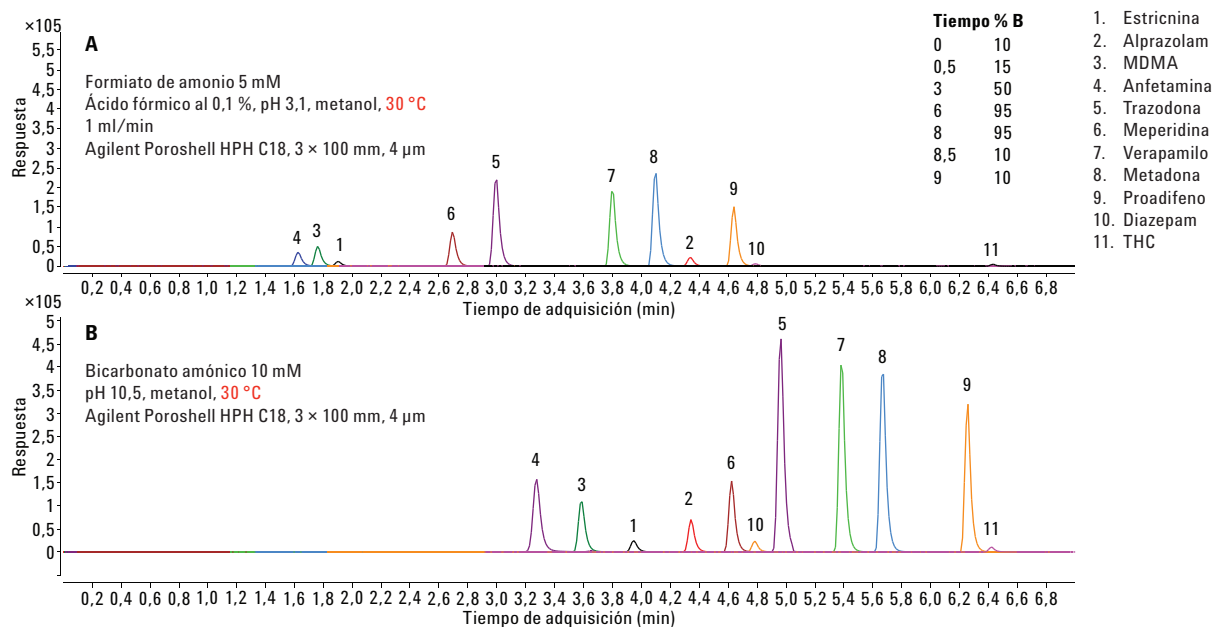


Figura 1. Separación a pH bajo y alto con una columna Agilent Poroshell HPH C18 de 4 μm.

Referencias

1. R. Chirita-Tampu; C. West; L. Fougere; C. Elfakir. Advantages of HILIC Mobile Phases for LC–ESI–MS–MS Analysis of Neurotransmitters. *LCGC Europe*. **2013**, *26*, 128-140.
2. H. P. Nguyen; K. A. Schug. The advantages of ESI-MS detection in conjunction with HILIC mode separations: Fundamentals and applications. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 1465–1480.
3. S. Zhou; K. D. Cook, J. Am. Soc. Protonation in electrospray mass spectrometry: Wrong-way-round or right-way-round? *Mass Spectrom.* **2000**, *11*, 961-966.
4. B. E. Boyes. Separations and Analysis of Peptides at High pH. 4.º simposio WCBP, San Francisco (California, EE. UU.). **2000**.
5. F. E. Kuhlmann; A. Apffel; S. M. Fischer; G. Goldberg; P. Goodley. Signal enhancement for gradient reverse-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry analysis with trifluoroacetic and other strong acid modifiers by postcolumn addition of propionic acid and isopropanol. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1995**, *6*, 1221-1225.
6. C. R. Mallet; Z. Lu; J. R. Mazzeo, Rapid Commun. A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts. *Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 49-56.
7. W. J. Long; A. E. Mack; X. Wang; W. E. Barber. Selectivity and Sensitivity Improvements for Ionizable Analytes Using High-pH-Stable Superficially Porous Particles. *LCGC* **2015**, *33* (4).
8. A. E. Mack; J. R. Evans; W. J. Long. *Fast Analysis of Illicit Drug Residues on Currency using Agilent Poroshell 120*. Nota de aplicación, Agilent Technologies, Inc. Número de publicación: 5990-6345EN, **2010**.

Más información

Estos datos representan resultados típicos. Si desea obtener más información sobre nuestros productos y servicios, visite nuestra página web www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Agilent no se hace responsable de ningún error incluido en este documento ni de ningún daño incidental o consecuencial relacionado con la distribución, la aplicación o el uso de este material.

La información, las descripciones y las especificaciones de esta publicación están sujetas a modificación sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2015
Impreso en EE. UU.
11 de diciembre de 2015
5991-6523ES



Agilent Technologies