



# Analisi di droghe di abuso a basso e alto pH tramite LC/MS con utilizzo di una colonna Poroshell HPH C18 Agilent

## Nota applicativa

Piccole molecole prodotti farmaceutici

### Autore

William Long  
Agilent Technologies

### Introduzione

In questa nota applicativa si confronta l'analisi LC/MS di varie sostanze associate a droghe di abuso ad alto e basso pH, utilizzando un gradiente generico con elettrospray in modalità di ionizzazione positiva (ESI+). Normalmente, ci si aspetterebbe che lo stato di ionizzazione delle molecole di analita dipenda dal pH della fase mobile e che l'efficienza di ionizzazione nell'analisi LC/MS con elettrospray in modalità di ionizzazione positiva si riduca drasticamente in fasi mobili a pH elevato, poiché i composti diventano neutri. Tuttavia, molti ricercatori che hanno analizzato diversi tipi di campioni (inclusi aminoacidi, peptidi e proteine) non hanno osservato effetti sulla sensibilità in seguito all'aumento del pH della fase mobile, o addirittura hanno notato un incremento della sensibilità [1-6]. Le fasi mobili a pH elevato non impediscono la ionizzazione dei composti basici nella tecnica ESI+. Gli ioni positivi si formano in quantità elevate e le risposte degli analiti sono spesso migliori nelle fasi mobili a pH elevato che in quelle acide a basso pH. Questa osservazione è significativa, perché estende l'applicabilità dei metodi generici di eluizione all'analisi di composti basici polari la cui ritenzione presentava finora delle difficoltà.

Tuttavia, è stato dimostrato che molte delle condizioni a pH elevato che si potrebbero utilizzare sono dannose per le colonne in silice per HPLC convenzionali. Il controllo del pH può essere utilizzato per regolare la selettività e la sensibilità senza ridurre la durata delle colonne utilizzando le nuove colonne stabili a pH elevato, come Poroshell HPH C18 Agilent. Utilizzando queste colonne, gli operatori di cromatografia possono ora prendere in considerazione un intervallo più ampio di pH nello sviluppo di metodi, attraverso l'impiego della tecnologia per particelle a superficie porosa, sempre più utilizzata grazie alla sua elevata efficienza e rapidità [7].



**Agilent Technologies**

## Risultati sperimentali

È stato utilizzato un sistema LC Agilent 1290 Infinity con uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo Agilent 6460, comprendente i seguenti componenti:

- pompa binaria Agilent 1290 Infinity, in grado di fornire pressioni fino a 1.200 bar (G4220A), modificata con una guarnizione in PEEK nella valvola di bypass del solvente (guarnizione del rotore PEEK FL codice 5068-0171)
- comparto colonna termostato (TCC) Agilent 1290 Infinity (G1316C)
- autocampionatore ad alte prestazioni Agilent 1290 Infinity (G4226A) con guarnizione del rotore in PEEK (guarnizione del rotore PEEK FL 5068-0170)
- Poroshell HPH C18 Agilent, 3 × 100 mm, 4 µm (codice 695970-502)

Le guarnizioni PEEK FL dovrebbero essere usate con tampone bicarbonato di ammonio. Le guarnizioni del rotore standard presenti negli strumenti Agilent serie 1290 sono realizzate in Vespel e supportano un intervallo di pH limitato (1-10). Le guarnizioni del rotore PEEK FL sono realizzate con una speciale miscela di materiale PEEK che copre un intervallo di pH più ampio (1,0-12,5). L'UHPLC è stata montata su un rack A-line. Per ridurre al minimo la dispersione, nel sistema sono stati installati tubi da 0,075 mm. Questo crea una maggiore contropressione rispetto ai tubi convenzionali con d.i. di 0,12 o 0,17 mm, ma ciò non rappresenta un problema in quanto le colonne Poroshell HPH C18 da 4 µm generano una pressione minima. La tabella 1 elenca le transizioni MRM e gli ioni monitorati.

Il formiato di ammonio e l'acido formico sono stati preparati a una concentrazione di 5 mM e utilizzati per preparare un tampone a basso pH (pH 3). Il formiato di ammonio è stato acquistato da Sigma-Aldrich, Corp. L'acido formico bidistillato è stato acquistato da GFS. Il bicarbonato di ammonio e l'idrossido di ammonio sono stati utilizzati per preparare un tampone a pH 10,5 e sono stati forniti da Sigma-Aldrich.

Tabella 1. Transizioni MRM per i composti utilizzati nel presente lavoro.

Composto	Ione precursore	Tensione del frammentatore	Ione prodotto 1	Energia di collisione 1	Ione prodotto 2	Energia di collisione 2
Stricnina	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
Trazadone	372,2	159	176	25	148	37
Meperidina	248,2	128	220,1	21	174,1	17
Verapamil	455,3	158	165	37	150	45
Metadone	310,2	112	265,1	9	105	29
Proadifene	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

## Risultati e discussione

In questa nota applicativa, che mette a confronto l'eluizione di questi composti in una fase mobile basica e in una fase mobile acida, osserviamo una ritenzione più prolungata delle basi nella fase mobile basica. I composti basici sono completamente protonati e hanno una ritenzione migliore rispetto ai composti carichi nella cromatografia HPLC a fase inversa. Visto che i composti hanno una ritenzione migliore, è possibile effettuare più adeguamenti del solvente, e questo permette una migliore spaziatura dei picchi, come mostrato nella figura 1. Le condizioni della fase mobile e del gradiente sono descritte nella figura 1. Infine, alcuni dei picchi degli analiti sono più larghi nel solvente basico che nella fase mobile acida. I picchi associati al trazodone, al verapamil, al metadone e al proadifene sono sensibilmente più larghi nella fase mobile basica. Questo potrebbe essere un effetto del pH, ma potrebbe anche essere dovuto a una ritenzione più prolungata del composto e alla sua eluizione in una fase mobile più organica.

## Conclusioni

È stato dimostrato in precedenza che le colonne Poroshell HPH C18 Agilent possono essere utilizzate per periodi prolungati (oltre 2.000 iniezioni) con fasi mobili a pH elevato, come un tampone bicarbonato di ammonio a pH 10. Pertanto, gli operatori di cromatografia possono ora prendere in considerazione un intervallo più ampio di pH nello sviluppo di metodi, attraverso l'impiego della tecnologia per particelle a superficie porosa, sempre più utilizzata grazie alla sua elevata efficienza e rapidità. L'uso di fasi mobili a pH elevato con particelle a superficie porosa è vantaggioso e pratico [8].

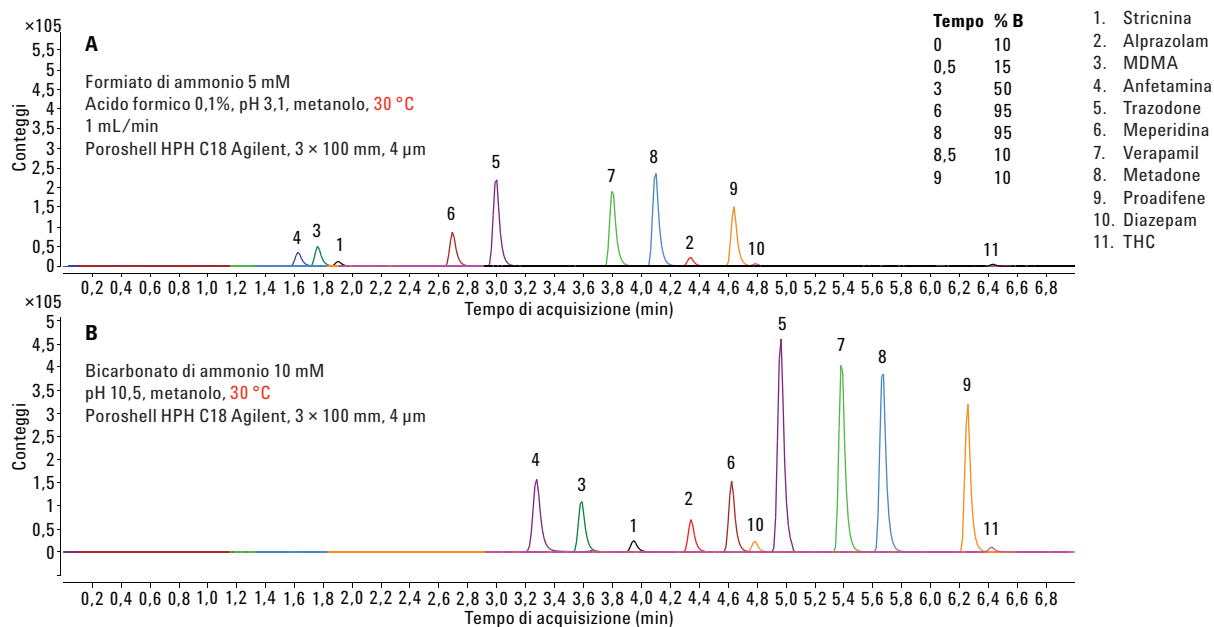


Figura 1. Separazione a basso e alto pH con utilizzo di una colonna Poroshell HPH C18 Agilent, 4 μm.

## Bibliografia

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. 4th WCBP, San Francisco, Ca., Stati Uniti **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 applicativa, Agilent Technologies, Inc., codice pubblicazione 5990-6345EN, **2010**.

## Ulteriori informazioni

Questi dati rappresentano i risultati tipici. Per ulteriori informazioni sui nostri prodotti e servizi, visitare il nostro sito web all'indirizzo [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem).

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

Agilent non può essere ritenuta responsabile per errori contenuti nella presente pubblicazione o per danni accidentali o consequenziali derivanti dalla fornitura, dalle prestazioni o dall'utilizzo del presente materiale.

Le informazioni, descrizioni e specifiche fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2015  
Stampato negli Stati Uniti  
11 dicembre 2015  
5991-6523ITE



**Agilent Technologies**