



# Análisis LC/MS de compuestos hidrofílicos utilizando el modo HILIC y eluyente alcalino.

## Introducción

Los componentes de productos farmacéuticos y alimentarios usualmente incluyen compuestos altamente polares. Estos compuestos son difíciles de retener en el modo de fase reversa, que es el modo de separación más común en HPLC. Para superar este problema, típicamente se utilizan la derivatización en pre-columna o reactivos de ion-par. Sin embargo, el uso de derivatización añade pasos adicionales en el análisis, mientras que el uso de un reactivo de ion-par aumenta el nivel de ruido debido a los residuos del reactivo de ion-par en la columna y en las líneas de flujo.

La serie Shodex HILICpak VG-50 utilizada en esta aplicación es un conjunto de columnas de amino con base de polímero que separan eficazmente varios sacáridos. El material de empaque consiste de alcohol polivinílico con un grupo funcional hidrofílico, una amina terciaria modificada (Fig. 1).

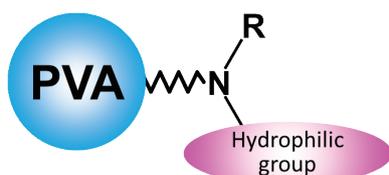


Fig. 1. Diagrama esquemático del material de empaque VG-50

Con algunas columnas en el mercado, las azúcares reductores forman una base de Schiff con el material de empaque y se retienen en la columna. Sin embargo, esto no ocurre con las columnas de la serie HILICpak VG-50, lo que les permite lograr una alta tasa de recuperación. Además, la liberación de partículas del material de empaque de la columna (column bleeding), que se observa en columnas de amino basadas en sílice, rara vez se encuentra en las columnas de la serie HILICpak VG-50, lo que reduce la probabilidad de problemas relacionados con el aumento del ruido y/o la supresión iónica en MS. Otra ventaja de estas columnas en comparación con las columnas de amino basadas en sílice es que las columnas de la serie HILICpak VG-50 pueden utilizarse en condiciones alcalinas (rango de pH de trabajo de 2 a 13). Esto permite el análisis de sacáridos con alta sensibilidad utilizando el modo negativo en ESI-MS. Además, los compuestos aniónicos, como los sacáridos orgánicos, tienden a retenerse en la columna cuando se utilizan métodos disponibles anteriormente. Sin embargo, las condiciones alcalinas en las columnas de la serie VG-50 permiten su elución, lo que permite el análisis de sacáridos orgánicos.

Esta aplicación introduce el análisis no solo de sacáridos, sino también el análisis simultáneo de sacáridos, ácidos orgánicos y aminoácidos utilizando una columna de tamaño semi-micro, Shodex HILICpak VG-50 2D, con condiciones de gradiente alcalino de LC/MS.

## Ensayo

El sistema LC/MS utilizado fue Shimadzu Nexera/LCMS-8030 Plus. La columna utilizada fue Shodex HILICpak VG-50 2D (2.0 mm de diámetro interno x 150 mm; tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$ ; tamaño de poro 100  $\text{\AA}$ ). Se mencionan las condiciones analíticas específicas utilizadas para cada análisis junto con sus resultados. Cabe destacar que el pH del agua de amoníaco al 0,5 % utilizada como eluyente es aproximadamente 11,5. El sistema LC/MS utilizado en el experimento fue resistente a la condición alcalina hasta pH 13.

## Resultados y Discusión

### 1. Análisis de sacáridos por LC/MS

#### 1.1 Sacáridos neutros

La Figura 2 muestra los cromatogramas para el meso-eritritol, arabinosa, xilosa, fructosa, manosa, glucosa, sacarosa, lactosa y maltosa. Se utilizó una elución en gradiente de agua de amoníaco al 0.1 %/acetonitrilo. Los sacáridos neutros analizados en este experimento también pueden separarse utilizando agua/acetonitrilo como eluyente y dan resultados de resolución similares. Sin embargo, la adición de amoníaco (análisis en condiciones alcalinas) promueve la deprotonación durante la ionización por electrospray (ESI), lo que aumenta la sensibilidad de la detección en modo de ion negativo. La altura del pico observada utilizando agua de amoníaco/acetonitrilo como eluyente fue tres veces mayor que la obtenida utilizando agua/acetonitrilo como eluyente. El pH del agua de amoníaco al 0.1 % es de aproximadamente 11, por lo tanto, la mayoría de las columnas LC basadas en sílice no pueden utilizarse bajo esta condición. Esto resalta una ventaja del VG-50 2D, empaquetado con material de empaque a base de polímero, ya que tolera bien el eluyente de alto pH como el utilizado en este experimento.

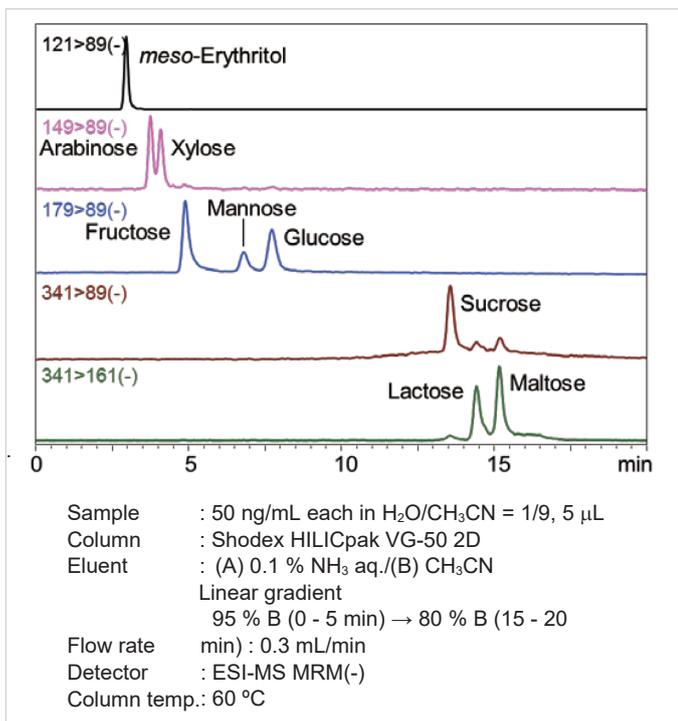


Fig. 2. Cromatogramas de varios sacáridos neutros.

### 1.2 Sacáridos ácidos

El uso de un eluyente de agua/acetoneitrilo causa efectos de adsorción iónica y, por lo tanto, retiene los sacáridos ácidos en la columna. El uso de un eluyente alcalino evita la disociación de los grupos funcionales amino en la fase estacionaria, lo que impide que los sacáridos se retengan en la columna. La Figura 3 muestra los cromatogramas del ácido glucurónico y los ácidos galacturónicos. El grado de separación logrado aquí fue mejor que el método previamente disponible utilizando cromatografía de exclusión iónica. El uso de una alta proporción de acetoneitrilo también es ventajoso para lograr un resultado de MS de alta sensibilidad.

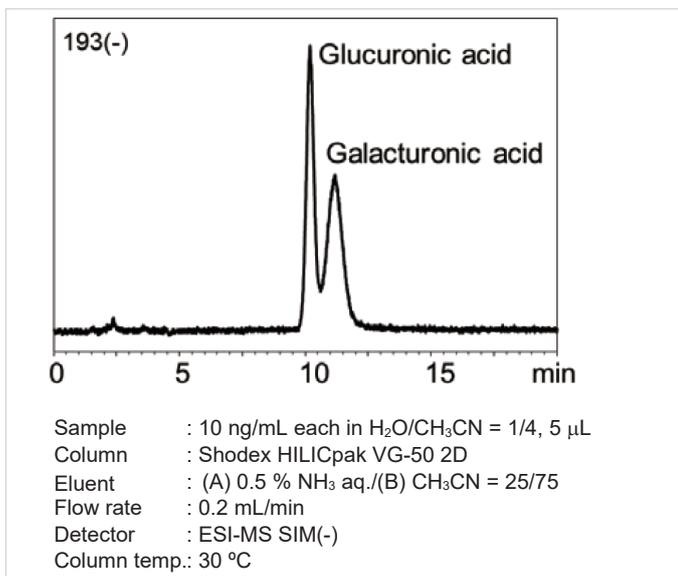


Fig. 3. Chromatograms of two acidic saccharides

### 1.3 Glucosa y ácido glucónico

El ácido glucónico se obtiene generalmente a partir de la glucosa, por lo que a veces es necesario realizar un análisis simultáneo de estos dos compuestos. Sin embargo, los métodos disponibles previamente utilizando cromatografía de exclusión iónica en condiciones ácidas no proporcionaban una separación efectiva. La Figura 4 muestra cromatogramas que demuestran una buena separación de los dos compuestos. Una ventaja adicional del método descrito es que, mientras que las condiciones ácidas lactonizan el ácido glucónico, lo que provoca una cola en el pico, el análisis en condiciones alcalinas evita la lactonización y, por lo tanto, evita la formación de colas en el pico. Así, el uso de un eluyente alcalino mejora la cuantificación del ácido glucónico.

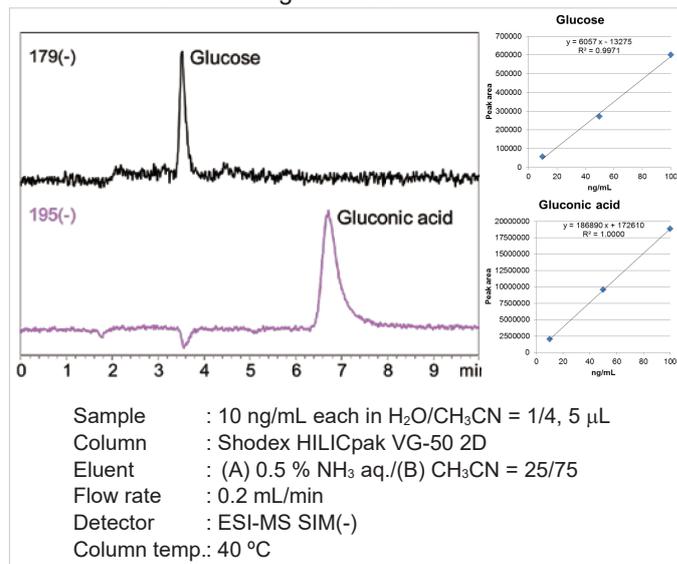


Fig. 4. Cromatogramas de glucosa y ácido glucónico.

## 1.4 Aminoácidos

La Figura 5 muestra cromatogramas de N-acetilglucosamina y glucosamina. Dado que la glucosamina contiene un grupo funcional amino, se logró una mayor sensibilidad al monitorear el compuesto protonado en lugar de su forma desprotonada. Los azúcares amino y sus metabolitos acetilados también pueden analizarse en condiciones alcalinas (datos no mostrados).

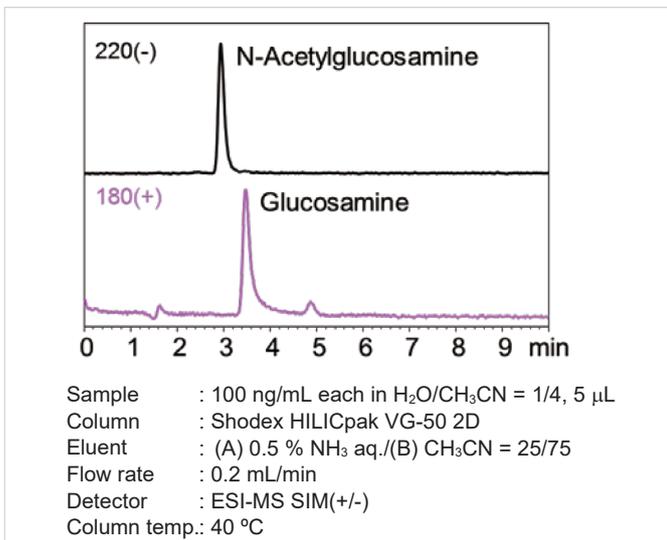


Fig. 5. Cromatogramas de N-Acetilglucosamina y glucosamina.

## 2. Análisis simultáneo de sacáridos, ácidos orgánicos y aminoácidos

El exitoso método desarrollado para el análisis de sacáridos ácidos en condiciones alcalinas se extendió para la separación de ácidos orgánicos y aminoácidos. La Figura 6 muestra los cromatogramas de una mezcla que contiene 14 sacáridos, 9 ácidos orgánicos y 20 aminoácidos. Se utilizó un método de gradiente para el análisis. El resultado demuestra la capacidad de la columna VG-50 para analizar ácidos orgánicos. El orden de elución de los ácidos orgánicos fue ácidos monobásicos, dibásicos y tribásicos. Fue necesario utilizar aproximadamente un 0.5 % de amoníaco para lograr que el ácido cítrico (un ácido tribásico) eluya. El ácido oxálico y el ácido cítrico no se retienen bien en la cromatografía de exclusión iónica. El método desarrollado aquí retiene bien los picos de ácido y permite que los picos se vean menos afectados por impurezas que eluyen temprano. También se demostró la viabilidad de analizar aminoácidos. Los cromatogramas mostraron que los aminoácidos hidrofóbicos tienden a eluir más temprano, mientras que los aminoácidos ácidos eluyen más tarde.

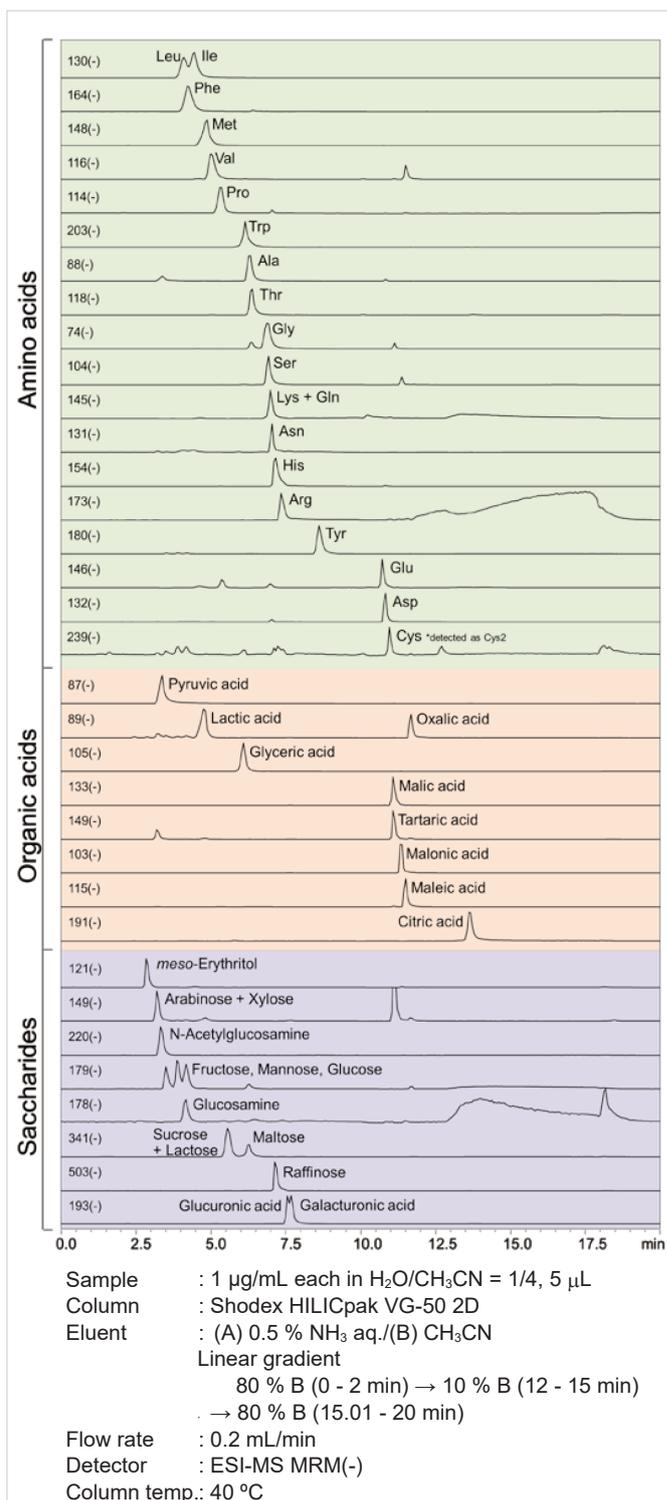
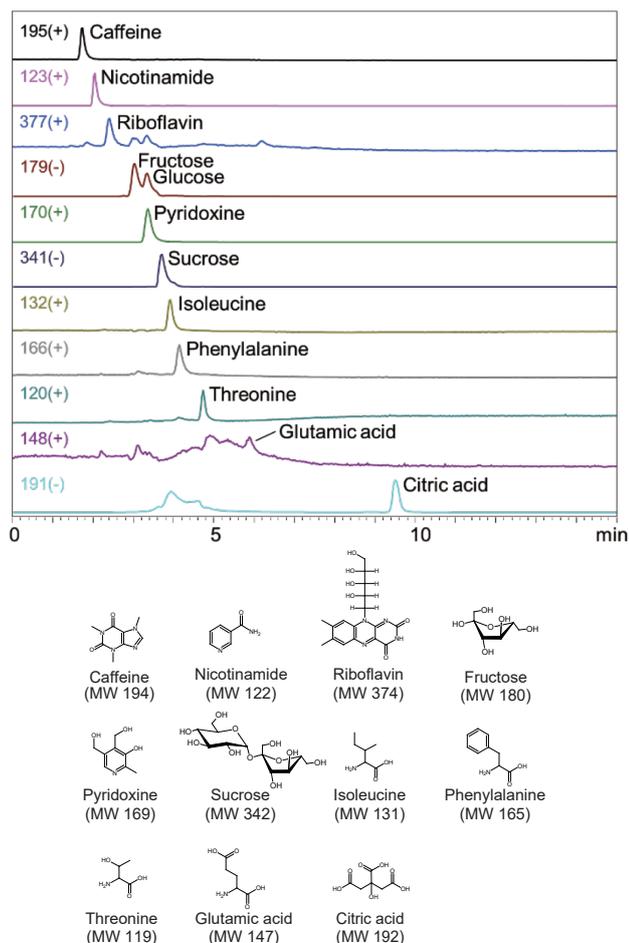


Fig. 6. Cromatogramas que muestran el análisis simultáneo por LC/MS de una mezcla que contiene sacáridos, ácidos orgánicos y aminoácidos.

### 3. Aplicación del método para analizar una bebida energética comercial.

La Figura 7 muestra los resultados del análisis LC/MS de una bebida energética comercialmente disponible. Se demostró un análisis simultáneo efectivo de sacáridos (fructosa, glucosa, sacarosa), ácido cítrico y aminoácidos (isoleucina, fenilalanina, treonina, ácido glutámico). Además, el método fue viable para analizar cafeína y vitaminas solubles en agua (nicotinamida, riboflavina, piridoxina) presentes en la bebida energética.



Sample : Commercial energy drink x100 dilution  
 in H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN = 1/1, 2 μL  
 Column : Shodex HILICpak VG-50 2D  
 Eluent : (A) 0.5 % NH<sub>3</sub> aq./ (B) CH<sub>3</sub>CN  
 High pressure linear gradient  
 70 % B (0 min) → 10 % B (5 - 15 min)  
 Flow rate : 0.2 mL/min  
 Detector : ESI-MS MRM(-)  
 Column temp.: 40 °C

Fig. 7. Resultados del análisis LC/MS de una bebida energética comercial.

### Conclusiones

Una columna de polímero basada en aminoácidos, Shodex HILICpak VG-50 2D, proporciona muchas características analíticas ventajosas cuando se utiliza en condiciones alcalinas. La LC/MS con una elución de gradiente de agua de amoníaco/acetonitrilo es efectiva para lograr una buena separación y un análisis de alta sensibilidad de varios compuestos hidrofílicos. El método es viable para el análisis simultáneo de sacáridos, ácidos orgánicos y aminoácidos, lo cual era difícil de lograr utilizando métodos previamente disponibles. Esto se puede lograr sin necesidad de utilizar derivatización previa en la columna ni adición de reactivos de enlace iónico. Las condiciones alcalinas promueven la desprotonación de los sacáridos, lo que permite la detección de iones negativos y contribuye a una mayor sensibilidad de detección. El método desarrollado mostró su eficacia en el análisis de una bebida energética comercial. Además de monitorear sacáridos, ácido cítrico y aminoácidos, el método demostró su capacidad para monitorear simultáneamente cafeína y vitaminas solubles en agua.

<https://www.shodexhplc.com/>

**Resonac America, Inc**

Figures and descriptions in this article are provided to help you select appropriate columns. However they do not guarantee nor warrant the suitability for your applications.

TA. NO. 003. (2) 20 D. APR. P