

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 881 670**

51 Int. Cl.:

G01N 30/02 (2006.01)
C40B 50/08 (2006.01)
G01N 30/72 (2006.01)
G01N 30/74 (2006.01)
G01N 30/04 (2006.01)
G01N 30/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2013** **PCT/CA2013/000252**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2013** **WO13134862**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013** **E 13760680 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.05.2021** **EP 2825877**

54 Título: **Estándares de índice de retención para cromatografía líquida**

30 Prioridad:

16.03.2012 US 201261611760 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
30.11.2021

73 Titular/es:

**NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA
(100.0%)
1200 MONTREAL ROAD
OTTAWA, ONTARIO K1A 0R6, CA**

72 Inventor/es:

QUILLIAM, MICHAEL, ARTHUR

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 881 670 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Estándares de índice de retención para cromatografía líquida

Campo de la invención

La presente invención se refiere a la química analítica, más particularmente a la cromatografía líquida, especialmente la cromatografía líquida con detectores de espectrometría de masas (LC-MS) y absorbancia UV (LC-UV).

Antecedentes de la invención

Los métodos analíticos basados en la separación por cromatografía líquida de alta resolución seguida de la detección por espectrometría de masas (LC-MS) o la detección de absorbancia UV (LC-UV) se usan ampliamente para el análisis de una amplia gama de compuestos como biotoxinas, fármacos, contaminantes ambientales persistentes, y otros productos químicos en una amplia gama de muestras, como tejidos vegetales y animales, suelo, agua, etc. La identificación de los compuestos presentes en las muestras se basa generalmente en una coincidencia del tiempo de retención cromatográfico y los datos espectrales de masa o UV para estándares químicos auténticos con los de los compuestos putativos observados en una muestra. Sin embargo, los tiempos de retención absolutos de los analitos pueden ser muy variables entre diferentes laboratorios e instrumentos, e incluso entre días en el mismo laboratorio. Esto generalmente requiere el análisis de estándares químicos de referencia el mismo día en que se procesa cada lote de muestras para permitir una buena coincidencia de los tiempos de retención para la identificación concluyente de contaminantes potenciales. Este enfoque aumenta la carga de trabajo de los analistas y el costo de los análisis. Además, no todos los laboratorios pueden almacenar todos los estándares para realizar esta tarea, ya que los analistas pueden estar interesados en el análisis de cientos de posibles analitos. Sería útil tener una mejor forma de catalogar los datos de retención para que los analitos puedan identificarse más fácilmente mediante una combinación de tiempos de retención sin el uso de estándares internos.

Como ejemplo, lo anterior es particularmente cierto con el análisis de biotoxinas marinas y de agua dulce. Hay muchos grupos diferentes de biotoxinas y dentro de cada grupo puede haber muchos análogos estructurales diferentes. Los estándares para muchas de estas biotoxinas no están disponibles comercialmente y, si lo están, pueden ser muy costosos. Los analistas en este campo se enfrentan al difícil problema de determinar qué análogos de biotoxinas podrían estar presentes en muestras como agua, algas y mariscos. De manera similar, para los análogos estructurales o metabolitos de productos farmacéuticos y contaminantes ambientales, muy pocos laboratorios tienen fácil acceso a compuestos estándares. Esto sería de interés para campos como el control de dopaje de los deportistas y el monitoreo de muestras ambientales y alimentos, entre otros.

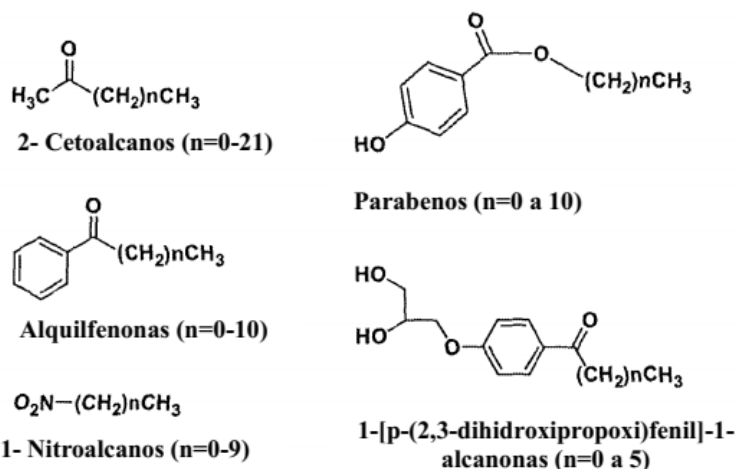
Otro tema de preocupación está relacionado con el establecimiento de métodos de análisis de LC-MS de rutina, como el monitoreo programado de reacciones seleccionadas, en el que las transiciones iónicas específicas se monitorean en ventanas estrechas que abarcan los analitos de interés. La primera etapa para establecer un método de este tipo suele ser realizar un análisis de una mezcla de todos los analitos diana antes de establecer las ventanas. Una vez más, la posible falta de todos los compuestos estándares en un laboratorio, así como también el extenso trabajo requerido en esta operación, presenta problemas al analista.

Una forma de corregir las variaciones en los datos de retención es usar "tiempos de retención relativos (RRT)", en los que los tiempos de retención de los analitos se miden con relación a los de un compuesto estándar interno. Este método funciona bastante bien en LC isocrática (composición de solvente constante) pero no en el modo de gradiente más comúnmente usado (composición de solvente cambiante) porque los diferentes instrumentos de LC tienen diferentes volúmenes de retención en el sistema de mezcla de gradiente, lo que da como resultado desplazamientos en los valores de RRT. Los valores de RRT también variarán si hay alguna diferencia en la velocidad de cambio de la pendiente del gradiente o en las dimensiones de la columna.

Una mejor manera de informar los datos de retención es usar valores de "índice de retención (RI)". En este procedimiento, se coinyectan una serie de compuestos de referencia homólogos con los analitos. Una interpolación de los tiempos de retención del analito en una curva ajustada del gráfico del tiempo de retención frente al valor del índice de retención para los compuestos de referencia da como resultado un valor del índice de retención para cada analito.

El uso de índices de retención se ha usado ampliamente en el campo de la cromatografía de gases. En este caso, se suele usar una serie de n-alcenos como estándares de RI y los índices interpolados resultantes suelen denominarse "índices de retención de Kovats". Esto es posible porque el detector de ionización de llama comúnmente usado responde bien a la mayoría de los compuestos orgánicos, incluidos los n-alcenos, aunque todos los compuestos deben ser volátiles. Estos no son aplicables a LC, especialmente LC-UV o LC-MS, porque los n-alcenos no se detectan fácilmente con los detectores comunes de UV o MS.

Otros investigadores han investigado varios sistemas RI diferentes para su uso en análisis LC-UV (ver Esquema 1).



Esquema 1- Algunos estándares de índice de retención usados en cromatografía líquida

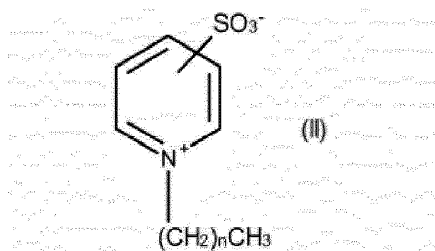
Estos se usan más comúnmente con el detector de absorbancia UV. Estos incluyen el trabajo de Smith sobre alquil aril cetonas (Smith RM, (1982) J. Chromatogr. 236, 313-320; Smith RM, (1995) Journal of Chromatography Library 57, 93-144), el trabajo de Baker y Ma sobre 2-cetoalcanos (Baker J.K., Ma C-Y., (1979) J. Chromatogr. 169, 107-115) y el trabajo de Bogusz y Aderjan sobre 1-nitroalcanos (Bogusz M., Aderjan R., (1988) J. Chromatogr. 435, 43-53). Dos artículos de revistas de un grupo aludieron al uso de parabenos (n-alquil ésteres de ácidos 4-hidroxibenzoicos) para medir los índices de retención de fenoles mediante el uso de análisis LC-UV (Yamauchi S., Mori, H., (1990) J. Chromatogr. A. 515, 305-311; Yamauchi S., (1993) J. Chromatogr. 635, 61-70). También se han realizado publicaciones sobre la aplicación de índices de retención LC-UV en el campo de las toxinas (Kuronen P., (1989) Archives Environ. Contam. Toxicology 18, 336-48; Frisvad J., Thrane U., (1987) J. Chromatogr. 404, 195-214.; Hill D.W., Kelley T.R., Langner K.J., Miller K.W., (1984) Analytical Chemistry 56, 2576-2579). Solo ha habido una publicación sobre el uso de índices de retención para LC-MS (Kostiainen R., Kuronen P., (1991) J. Chromatogr. 543, 39-47) y este se basó en 1-[p-(2,3-dihidroxipropoxi)fenil]-1-alcanonas (Esquema 1) como estándares de índice de retención. Sin embargo, el método Kostiainen usa un conjunto de estándares que son complicados de sintetizar y no están disponibles comercialmente, pero lo que es más importante, no se adaptan bien a los métodos modernos de LC-MS basados en electropulverización (ESI) o ionización química a presión atmosférica (APCI).

Los estándares de índice de retención de la técnica anterior, como las alquilfenonas, se diseñaron principalmente para LC con detección de absorbancia UV. No se adaptan bien a los métodos LC-MS basados en electropulverización (ESI) o ionización química a presión atmosférica (APCI), los sistemas de ionización más usados. En estudios llevados a cabo por los inventores de la presente invención, las pruebas sobre alquilfenonas como estándares de índice de retención en LC-MS muestran que la sensibilidad de las alquilfenonas en ESI de iones positivos es baja, lo que requiere inyectar soluciones más concentradas, lo que a su vez resulta en malas formas de pico en los cromatogramas. Además, no se pueden detectar en el modo de iones negativos. Las pruebas con parabenos como estándares de índice de retención en LC-MS fueron más prometedoras porque pueden detectarse en modo de iones negativos, pero en general, su rendimiento fue deficiente en términos de sensibilidad y aún requieren altas concentraciones para inyectarse. Además, existe una susceptibilidad potencial de los compuestos fenólicos a cambios en el tiempo de retención debido a variaciones en el pH de la fase móvil, lo que puede cambiar el estado de carga de los parabenos.

Sigue existiendo la necesidad de estándares de índice de retención de LC efectivos, particularmente para los métodos de LC-MS.

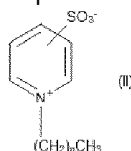
Resumen de la invención

Ahora se ha encontrado que una serie homóloga de compuestos basados en ácido 1-alquilpiridinosulfónico, en donde el ácido 1-alquilpiridinosulfónico tiene la Fórmula (II):



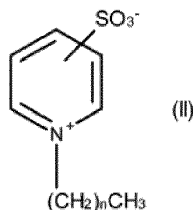
donde n es un número entero de 0 a 23, y donde cada compuesto de la serie tiene un valor diferente para n, son estándares de índice de retención ventajosos para cromatografía líquida, especialmente para métodos de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS), más especialmente para métodos LC-MS que emplean sistemas de ionización por electropulverización (ESI) o ionización química a presión atmosférica (APCI). El término "serie homóloga" se usa para referirse a un grupo de compuestos que varían en estructura solo por el número de grupos metileno en una cadena de alquilo.

Un método de identificación de un analito de interés comprende introducir el analito de interés junto con una serie de estándares de índice de retención de la presente invención en un sistema de cromatografía líquida, la serie de estándares de índice de retención comprende dos o más compuestos homólogos con carga neutra, cada compuesto comprende un ácido 1-alkilpiridiniosulfónico diferente que tiene la Fórmula (II):



donde n es un número entero de 0 a 23 y donde cada compuesto de la serie tiene un valor diferente para n; asignar un valor de índice de retención al analito de interés basado en los tiempos de retención y los valores del índice de retención de los estándares del índice de retención; y comparar los datos espectrales y el valor del índice de retención del analito de interés con una biblioteca de datos espectrales y los valores del índice de retención para compuestos conocidos para identificar el analito de interés, en donde el sistema de cromatografía líquida comprende un sistema de cromatografía líquida-espectrometría de masas y los datos espectrales comprenden datos de espectrometría de masas o en donde el sistema de cromatografía líquida comprende un sistema de cromatografía líquida con un detector de absorbancia ultravioleta y los datos espectrales comprenden datos de absorbancia ultravioleta.

La presente invención está dirigida a una serie de estándares de retención para su uso en cromatografía líquida, la serie de estándares de índice de retención comprende dos o más compuestos homólogos con carga neutra, cada compuesto comprende un ácido 1-alkilpiridiniosulfónico diferente de Fórmula (II):



donde n es un número entero de 0 a 23, y donde cada compuesto de la serie tiene un valor diferente para n, y en donde la cromatografía líquida comprende cromatografía líquida-espectrometría de masas o en donde la cromatografía líquida es cromatografía líquida con un sistema de detección de absorbancia ultravioleta.

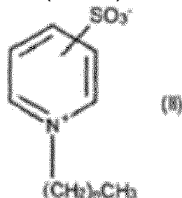
Se proporciona además un uso de la serie de estándares de índice de retención de acuerdo con la presente invención para crear una biblioteca de índices de retención para compuestos de referencia en una primera columna de cromatografía líquida o sistema de cromatografía líquida.

Se proporciona además un kit que comprende una serie de estándares de índice de retención de acuerdo con la presente invención para su uso en cromatografía líquida.

Los compuestos con carga neutra útiles como estándares de índice de retención en la presente invención tienen una carga neutra general, pero tienen grupos funcionales cargados individualmente. Uno de los grupos funcionales cargados individualmente tiene una carga positiva permanente mientras que el otro tiene una carga negativa permanente siempre que la carga total del compuesto sea cero. La separación de la carga entre los grupos funcionales ionizados dentro del compuesto mejora ventajosamente la ionización y la sensibilidad en la espectrometría de masas tanto en el modo de ion positivo como en el negativo. Además, los compuestos que tienen grupos funcionales permanentemente ionizados y un estado de carga neutra general no variarán con los cambios en el pH de la fase móvil, haciendo así sus tiempos de retención menos sensibles a los cambios de pH en la fase móvil.

Además, los estándares de índice de retención (RI) usados en la presente invención son más polares que los que se usan actualmente, lo que da como resultado una elución más rápida de los miembros más polares de los estándares de RI en las columnas de fase inversa típicamente usadas en los métodos de cromatografía líquida. La elución anterior de los estándares permite el agrupamiento de analitos polares que no están incluidos en los estándares no polares actuales, lo que de esta manera extiende la utilidad de los estándares de índice de retención actuales a una gama más amplia de analitos.

Los compuestos son ácidos 1-alkilpiridinosulfónicos (APSA) de Fórmula (II):



donde n es un número entero de 0 a 23, preferentemente de 0 a 17. El grupo sulfonato (SO_3^-) puede estar en la posición 2, 3 o 4. Preferentemente, el grupo sulfonato (SO_3^-) está en la posición 3. Una serie de compuestos homólogos de Fórmula II significa un conjunto de compuestos de Fórmula II en donde solo se varía n.

Los compuestos de Fórmula (II) se pueden sintetizar por reacción de un ácido piridinosulfónico (por ejemplo, ácido 3-piridinosulfónico (Número de Registro CAS: 636-73-7)) con haluros de n-alkilo ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{L}$, donde n es como se definió anteriormente y L es un grupo saliente, por ejemplo, un halógeno (por ejemplo, Cl o Br). También se conocen en la técnica algunos ejemplos de APSA, por ejemplo, homólogos de C10 (n=9) y C12 (n=11) (Ainsworth C., y otros (1967) J. Medicinal Chemistry 10(2), 158-161) y homólogos de C8 (n=7) a C24 (n=23) (patente de Estados Unidos 4,148,797; patente de Estados Unidos 4,501,673). El homólogo N-metilo (n=0) está disponible comercialmente. No se sabe que ninguno de los APSA conocidos sea útil como estándares de índice de retención.

En la práctica de la presente invención, una serie de compuestos homólogos útiles como estándares de índice de retención de acuerdo con la presente invención se introducen en un sistema de LC junto con uno o más analitos de interés o una muestra, por ejemplo, mediante coinyección. Si el instrumento proporciona suficiente reproducibilidad en el tiempo de retención, entonces los estándares de índice de retención también pueden inyectarse en una corrida y los analitos de interés o una muestra en una corrida separada. Los estándares de índice de retención permiten la asignación de valores de índice de retención (RI) al uno o más analitos. Por tanto, puede obtenerse un valor del índice de retención (RI) para cada analito mediante la interpolación de los tiempos de retención del analito en una curva ajustada del gráfico del tiempo de retención frente al valor del índice de retención para los estándares de índice de retención. El valor del índice de retención del estándar de índice de retención se define por el número de carbonos en la cadena de alquilo más larga de la molécula. Debe haber al menos dos estándares de índice de retención en la serie, pero es preferible más de dos. Preferentemente, el número de estándares de índice de retención en la serie debe estar en un intervalo de aproximadamente 4 a 16 homólogos. La serie de compuestos homólogos usados como estándares de índice de retención cubre preferentemente una amplia gama de masas para permitir una buena dispersión en los tiempos de retención, de esta manera permite la inclusión efectiva de todos los analitos de interés y la interpolación de los tiempos de retención para una gama más amplia de analitos. Los valores de RI de los analitos de interés en una muestra pueden usarse junto con datos espectrales (por ejemplo, datos de espectrometría de masas o de absorbancia UV) en los mismos analitos para buscar una biblioteca (por ejemplo, base de datos) o bibliotecas de índices de retención y/o espectros de compuestos de referencia para la identificación positiva de compuestos conocidos en la muestra.

La serie de estándares de índice de retención también se puede usar para crear bibliotecas (por ejemplo, bases de datos) de índices de retención para compuestos de referencia para su uso en análisis de cromatografía líquida. Dichas bibliotecas pueden usarse no solo para identificar analitos como se discutió anteriormente, sino también para predecir los tiempos de retención de los analitos en varias columnas mediante el uso de varias condiciones de gradiente y en diferentes instrumentos de LC. Los índices de retención documentados para compuestos de referencia en una biblioteca pueden facilitar el establecimiento de ventanas de retención de analitos diana para permitir la programación de un método de monitoreo programado de reacciones seleccionadas. El proceso implicaría primero realizar un análisis de una mezcla de los estándares de índice de retención en las condiciones de LC y las columnas que se usarán para la muestra. Al interpolar los índices de retención de los compuestos de referencia en la biblioteca mediante el uso de un gráfico de tiempo de retención versus índice de retención para los estándares de índice de retención, se pueden calcular los tiempos de retención esperados de varios compuestos de referencia en las condiciones de corrida.

La serie de compuestos homólogos usados como estándares de índice de retención se pueden empaquetar en un kit junto con una indicación o instrucciones para su uso como estándares de índice de retención en cromatografía líquida. Los compuestos pueden proporcionarse en el kit en recipientes separados y luego mezclarse en las proporciones deseadas para introducirlos con el analito en el sistema LC. Preferentemente, los compuestos se preparan previamente y se incluyen en el kit en mezclas listas para usar de estándares de índice de retención en solución.

El sistema de cromatografía líquida (LC) puede ser cualquier sistema LC adecuado. Se prefieren particularmente los sistemas de cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC-MS) o detectores de absorbancia UV (LC-UV). La invención es particularmente útil para métodos de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS), más particularmente para métodos LC-MS que emplean sistemas de ionización por electropulverización (ESI) o ionización química a presión atmosférica (APCI).

- 5 Los analitos de interés pueden ser, por ejemplo, toxinas (por ejemplo, biotoxinas u otros venenos), productos farmacéuticos, drogas de abuso, péptidos, contaminantes ambientales persistentes, contaminantes alimentarios o cualquier otro compuesto de interés. Son de particular interés las toxinas marinas y de agua dulce, así como también los fármacos usados en la acuicultura. Los analitos pueden ser de muestras de cualquier tipo, por ejemplo, muestras ambientales (por ejemplo, agua, suelo y aire), muestras de tejido (por ejemplo, tejidos vegetales o animales), fluidos corporales (por ejemplo, orina, sangre, suero, semen), etc. La preparación de muestras para su uso en métodos de LC se puede realizar mediante procedimientos generalmente conocidos en la técnica.

Se describirán características adicionales de la invención o serán evidentes en el curso de la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de las figuras

- 15 Para que la invención se entienda más claramente, las modalidades de la misma se describirán ahora en detalle a manera de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos, en los cuales:

La Figura 1 representa un análisis LC-MS de una mezcla de ácido 1-alkil-3-piridinossulfónico (APSA) que contiene homólogos de C4 a C18 (compuestos de Fórmula (I) donde $n=3-17$);

- 20 la Figura 2 representa un gráfico de ajuste de spline para estándares APSA con tiempos de retención de APSA que se grafica frente al valor del índice de retención y ajustado con una curva spline cúbica;

la Figura 3 representa las características de ionización y fragmentación de las APSA;

- 25 la Figura 4 representa el análisis LC-MS de un extracto de cianobacterias que contiene microcistinas coinyectadas con una mezcla de estándares APSA, en el cual: los gráficos superiores muestran señales para microcistinas diana (no todos los picos de analitos etiquetados) y el gráfico de la parte inferior muestra señales para estándares APSA (los picos de APSA etiquetados con sus números de índice de retención, 400 a 1800);

- 30 la Figura 5 representa un gráfico del tiempo de retención frente al valor del índice de retención para los estándares APSA observados en el análisis LC-MS que se muestra en la Figura 4 (círculos y trazo sólido) y para un análisis separado (triángulos y trazo discontinuo) en la misma columna LC pero con un gradiente de 60 min en lugar de los 30 min usados en la Figura 4;

la Figura 6 representa el análisis LC-MS de una mezcla de estándares de referencia de varios fármacos que se monitorean rutinariamente por las agencias de inspección de alimentos debido a su uso en agricultura y acuicultura;

- 35 la Figura 7 representa un gráfico de los tiempos de retención frente a los valores del índice de retención para los estándares APSA observados en el análisis LC-MS mostrado en la Figura 6, con un ajuste spline cúbico generado para ajustar los datos; y,

- 40 la Figura 8 representa un gráfico de los tiempos de retención frente a los valores del índice de retención para los estándares APSA medidos en tres análisis LC-MS diferentes mediante el uso dos columnas diferentes (150 frente a 50 mm de longitud) y dos gradientes diferentes, con ajustes de spline cúbicos generados para adaptarse los datos.

Descripción de las modalidades preferidas

- 45 Con referencia a la Figura 1, un análisis LC-MS de una mezcla de ácido 1-alkil-3-piridinossulfónico (APSA) que contiene homólogos de C4 a C18 demuestra que los APSA dan un buen rendimiento cromatográfico. Con referencia a la Figura 2, el gráfico del tiempo de retención frente al índice de retención para los homólogos de APSA da una curva que se ajusta bien a un spline cúbico. El índice de retención se define como el número de carbonos en la cadena lateral del APSA multiplicado por 100. Los compuestos APSA dan una excelente respuesta en la detección espectrométrica de masas mediante el uso de modos de iones positivos o negativos. El monitoreo de reacciones seleccionadas (SRM) puede usarse para monitorear los compuestos, ya que todos se fragmentan en el mismo ion producto (m/z 160 en modo positivo y m/z 158 en modo negativo) (ver la Figura 3). Los compuestos también tienen un cromóforo UV excelente con un máximo de absorbancia a 266 nm, por lo que también puede usarse como marcadores de índice de retención en análisis LC-UV.

Ejemplo 1: Uso de estándares APSA de índice de retención para identificar microcistinas por LC-MS

Se coinyectó una muestra de extracto de cianobacterias que contenía analitos de interés (es decir, microcistinas) con una mezcla de los estándares APSA de C4-C18 en un sistema de cromatografía líquida de fase inversa-espectrometría de masas. El sistema comprende un instrumento LC-ESI-QqQ (QTRAP 4000) con una columna Agilent 2,7 µm-Poroshell 120A SB-C18 (2,1 x 150 mm). Las condiciones de elución comprenden la fase móvil: A = agua, B = MeCN/agua (95:5), ambos con ácido fórmico 50 mM + hidróxido de amonio 2 mM a pH 2,2; con un gradiente de B de 25-75 % durante 30 min con un tiempo de retención de 5 min, un régimen de flujo de 0,25 mL/min y una temperatura de la columna de 40 °C. La columna de cromatografía líquida (LC) proporciona la separación de la mezcla compleja mientras que el espectrómetro de masas proporciona la detección tanto de las microcistinas dentro de la muestra como de los estándares APSA coinyectados (Figura 4). Se miden las señales espectrales de masas características y los tiempos de retención de las microcistinas y APSA en la muestra. En la Figura 4, el cuadro superior muestra las señales para las microcistinas objetivo, mientras que el cuadro en la parte inferior muestra las señales para los estándares APSA. Los picos de APSA se etiquetan con sus números de índice de retención, 400 a 1800.

Una interpolación del tiempo de retención de microcistina en una curva ajustada del gráfico del tiempo de retención frente al valor del índice de retención para los APSA (Figura 5) da como resultado un índice de retención medido para las microcistinas. En la Figura 5, el gráfico con círculos y trazo sólido es para el análisis LC-MS que se muestra en la Figura 4 (gradiente de 30 min), mientras que el gráfico con triángulos y trazo discontinuo es un análisis separado en la misma columna LC bajo la misma condiciones pero con un gradiente de 60 min en lugar de un gradiente de 30 min. El ajuste de la curva se realiza mejor mediante el uso del método de splines cúbicos, y la Figura 5 muestra los ajustes de splines cúbicos generados para ajustar ambos conjuntos de datos.

El índice de retención resultante del analito de interés, así como también sus datos espectrales de masas, se pueden comparar con una base de datos establecida previamente para una amplia gama de analitos para identificar el analito de interés. En el presente ejemplo, la muestra contiene más de un analito de interés (es decir, múltiples microcistinas) y el método genera una lista de analitos identificados en la muestra (Tablas 1a-1c).

Tabla 1a - Pendiente corta (25-75 % B, 30 min)

Código de Microcistina	Ion Precursor > 135	RT (min)	Promedio de Rla	SD día 1 (n=5)	SD día 4 (n=5, d=4)
3dm7dmRR	505,8	9,17	832,6	0,4	0,5
RR	519,8	9,64	847,2	0,3	0,8
7dmRR	512,8	9,72	850,4	0,4	0,7
Nod-R	825,5	10,91	888,7	0,5	0,7
YR	1045,6	12,12	929,3	0,4	0,6
7dmYR	1031,6	12,30	934,1	0,4	0,7
LR	995,6	12,69	946,7	0,1	1,3
7dmLR	981,6	12,87	953,3	0,3	1,3
3dm7dmLR	967,6	13,24	965,6	0,4	1,2
(O-Me)LR	1009,9	13,61	977,8	0,5	1,3
7dmHlIR	995,6	13,82	985,2	0,8	0,9
RA	953,8	14,16	995,3	0,6	2,1
LA	910,6	16,93	1092,5	0,2	2,4
isoLA	910,6	17,35	1106,8	0,3	2,9
LY	1002,9	17,91	1128,3	0,4	1,8
LW	1025,9	20,77	1232,9	0,2	1,8
LF	986,8	21,38	1255,1	0,3	2,4

Tabla 1b - Pendiente larga (25-75 % B, 60 min)

Código de Microcistina	Ion Precursor > 135	RT (min)	Promedio de Rib	SD día 1 (n=5)	SD día 4 (n=5, d=4)
3dm7dmRR	505,8	11,33	842,3	0,7	1,2
RR	519,8	12,18	858,4	0,5	1,5
7dmRR	512,8	12,32	862,0	0,3	1,2

Código de Microcistina	Ion Precursor > 135	RT (min)	Promedio de Rib	SD día 1 (n=5)	SD día 4 (n=5, d=4)
Nod-R	825,5	14,29	901,3	0,2	1,1
YR	1045,6	16,75	947,0	0,4	0,8
7dmYR	1031,6	17,01	952,1	0,5	0,8
LR	995,6	17,75	964,9	0,2	1,6
7dmLR	981,6	18,19	972,9	0,2	1,9
3dm7dmLR	967,6	18,85	984,7	0,5	1,3
(O-Me)LR	1009,9	19,59	997,6	0,4	1,5
7dmHiLR	995,6	19,94	1004,5	0,5	1,4
RA	953,8	20,45	1012,8	0,2	2,3
LA	910,6	25,63	1110,0	0,4	2,8
isoLA	910,6	26,39	1124,4	0,2	3,0
LY	1002,9	27,68	1150,4	0,2	1,9
LW	1025,9	33,20	1259,1	0,5	1,9
LF	986,8	34,25	1280,6	0,4	2,5

Tabla 1c - Corrección de 2 puntos de (b) para que coincida con (a)

Código de Microcistina	Ion Precursor > 135	Rlc	% Dif. a (a)
3dm7dmRR	505,8	831,6	-0,11
RR	519,8	847,2	0,00
7dmRR	512,8	850,8	0,04
Nod-R	825,5	888,9	0,03
YR	1045,6	933,3	0,42
7dmYR	1031,6	938,3	0,44
LR	995,6	950,7	0,41
7dmLR	981,6	958,4	0,53
3dm7dmLR	967,6	969,9	0,43
(O-Me)LR	1009,9	982,4	0,46
7dmHiLR	995,6	989,0	0,38
RA	953,8	997,1	0,18
LA	910,6	1091,0	-0,13
isoLA	910,6	1104,8	-0,18
LY	1002,9	1129,9	0,14
LW	1025,9	1234,5	0,12
LF	986,8	1255,1	0,00

La Tabla 1a proporciona los tiempos de retención (RT) y los índices de retención (RI) medidos para las microcistinas detectadas en el análisis LC-MS mostrado en la Figura 4 (gradiente de 30 min). Se muestran excelentes datos de reproducibilidad para análisis para corridas dentro del día (número de corridas, n=5) y entre días (número de días, d=4). También se muestran los datos mediante el uso de la misma columna, pero con un gradiente de 60 min (Tabla 1b). Finalmente, en la Tabla 1c, los datos del gradiente de 60 min (Tabla 1b) se han ajustado para coincidir con los datos del gradiente de 30 min (Tabla 1a) mediante el uso de una corrección de 2 puntos basada en los datos de retención para dos microcistinas, RR y LF. Este proceso permite un ajuste fino de la coincidencia de datos y da como resultado una diferencia de menos del 1 % para los datos de RI de 60 min corregidos frente a los datos de RI de 30 min (Tabla 1c).

Ejemplo 2: Uso de estándares APSA de índice de retención para establecer una base de datos de índices de retención de analitos para LC-MS

Una solución que contiene varios compuestos de referencia (es decir, fármacos que se han usado en la agricultura y la acuicultura y que son controlados de forma rutinaria por las agencias de inspección de alimentos) se coinyecta junto con una mezcla de los estándares APSA de C4-C18 en un sistema de cromatografía líquida de fase inversa-espectrometría de masas. El sistema comprende un instrumento LC-ESI-QqQ (QTRAP 4000) con una columna Agilent 2,7 µm-Poroshell 120A SB-C18 (2,1 x 150 mm). Las condiciones de elución comprenden la fase móvil: A = agua, B = MeCN/agua (95:5), ambos con ácido fórmico 50 mM + hidróxido de amonio 5 mM a pH 2,2; con un gradiente de 5-100 % de B durante 30 min con un tiempo de retención de 5 min, un régimen de flujo de 0,25 mL/min y una temperatura de la columna de 35 °C. La columna de cromatografía líquida (LC) proporciona la separación de la mezcla compleja, mientras que el espectrómetro de masas proporciona la detección tanto de los compuestos de referencia como de los estándares APSA coinyectados. Se miden los tiempos de retención característicos de los compuestos de referencia y los APSA. La Figura 6 representa el análisis LC-MS de la mezcla de compuestos de referencia y estándares APSA coinyectados. Los gráficos superiores muestran las señales de los fármacos (no todos los picos de los fármacos están etiquetados) mientras que el gráfico de la parte inferior muestra las señales de los estándares APSA que se coinyectaron con los fármacos.

Una interpolación de los tiempos de retención de los compuestos de referencia en una curva ajustada del gráfico del tiempo de retención frente al valor del índice de retención para los APSA (Figura 7) da como resultado un índice de retención medido para los compuestos de referencia. El ajuste de la curva se realiza mediante el uso del método de splines cúbicos. El índice de retención resultante de los compuestos de referencia se ingresa luego en una base de datos, por ejemplo, en la Tabla 2. La Tabla 2 proporciona una lista de los compuestos de referencia que se analizan en la Figura 6 junto con sus tiempos de retención medidos (RT) e índices de retención calculados (RI). El valor de la desviación estándar (SD) muestra la excelente reproducibilidad medida a partir de 5 análisis repetidos el mismo día.

Tabla 2

Nombre del Compuesto	Abreviaturas	Transición SRM	Promedio RT (min)	Promedio RI	SD (n=5) de RI
Sulfonamidas					
Sulfanilamida	SNA	173,1 > 92,1	2,70	379,7	1,3
Sulfacetamida	SAA	215,1 > 156,1	5,58	471,9	0,6
Sulfadiazina	SDZ	251,1 > 156,1	6,42	500,1	0,4
Sulfatiazol	STZ	256,1 > 156,1	7,29	530,4	0,4
Sulfapiridina	SPR	250,1 > 156,1	7,34	531,9	0,2
Sulfamerazina	SMR	265,1 > 92,1	7,75	546,8	0,4
Sulfametazina	SMZ	279,1 > 186,1	8,76	584,0	0,3
Sulfametizol	SML	271,1 > 156,1	9,19	600,3	0,2
Sulfametoxipiridazina	SMP	289,1 > 126,1	9,25	602,9	0,2
Sulfacloropiridazina	SCP	285,1 > 156,1	10,52	653,9	0,3
Sulfadoxina	SDO	311,1 > 156,1	11,07	676,9	0,3
Sulfametoxazol	SMO	254,1 > 156,1	11,25	685,1	0,2
Sulfaquinoxalina	SQO	301,1 > 156,1	13,24	780,4	0,2
Nitroimidazoles					
1-(2-Hidroxietil)-2-hidroximetil-5-nitroimidazol	MNZ-OH	188,1 > 123,1	3,95	419,5	0,5
2-Hidroximetil-1-metil-5-nitrimidazol	HMMNI	158,1 > 140,1	5,00	453,1	0,2
Metronidazol	MNZ	172,1 > 128,1	5,13	457,3	0,5
Dimetridazol	DMZ	142,1 > 96,1	5,90	482,6	0,3
Ronidazol	RNZ	201,1 > 55,1	6,22	493,3	0,4

5	1-Metil-2-(2'-hidroxiisopropil)-5-nitroimidazol	IPZ-OH	186,1 > 168,1	8,93	590,6	0,2
	Ipronidazol	IPZ	170,1 > 109,1	11,07	676,9	0,4
	1-(2-Hidroxietil)-2-hidroximetil-5-nitroimidazol	MNZ-OH	188,1 > 123,1	3,95	419,5	0,5
10	2-Hidroximetil-1-metil-5-nitrimidazol	HMMNI	158,1 > 140,1	5,00	453,1	0,2
	Metronidazol	MNZ	172,1 > 128,1	5,13	457,3	0,5
	Dimetridazol	DMZ	142,1 > 96,1	5,90	482,6	0,3
15	Ronidazol	RNZ	201,1 > 55,1	6,22	493,3	0,4
	1-Metil-2-(2'-hidroxiisopropil)-5-nitroimidazol	IPZ-OH	186,1 > 168,1	8,93	590,6	0,2
	Ipronidazol	IPZ	170,1 > 109,1	11,07	676,9	0,4
20	Fluoroquinolonas					
	Ciprofloxacina	CIPRO	332,2 > 245,1	9,20	601,0	0,2
	Danofloxacina	DANO	358,2 > 96,1	9,54	614,1	0,3
25	Enrofloxacina	ENRO	360,2 > 316,2	9,82	625,2	0,4
	Sarafloxacina	SARA	386,2 > 342,2	10,82	666,2	0,3
	Quinolonas					
30	Ácido oxolínico	OXA	262,1 > 216,1	12,53	744,6	0,6
	Macrólidos					
	Eritromicina	ERY	734,5 > 158,1	14,23	833,3	0,6
35	Colorantes					
	Leucocrystal Violeta	LCV	374,4 > 358,1	10,68	660,3	0,6
	Leucomalaquita Verde	LMG	331,1 > 316,1	16,76	983,2	0,9
40	Malaquita Verde	MG	329,2 > 313,1	19,84	1180,8	1,2
	Cristal Violeta	CV	372,4 > 356,1	23,31	1406,5	1,1
	Verde Brillante	BG	385,3 > 341,1	25,90	1572,6	1,0

Ejemplo 3: Uso de estándares APSA de índice de retención para predecir los tiempos de retención de los analitos para establecer ventanas para el análisis SRM programado por LC-MS

Se usa una base de datos de índices de retención para compuestos de referencia (por ejemplo, Tabla 2) para predecir los tiempos de retención de los mismos compuestos que se van a procesar en columnas con diferentes dimensiones, posiblemente mediante el uso de varias condiciones de gradiente o diferentes instrumentos de LC. Esto puede facilitar el establecimiento de ventanas de retención de analitos diana para permitir la programación de un método de monitoreo programado de reacciones seleccionadas. El proceso implica primero realizar un análisis de una mezcla de los estándares APSA de índice de retención en las condiciones de LC y en la columna y el instrumento que se usará para las muestras. La interpolación de los índices de retención de la base de datos para compuestos de referencia en un gráfico de los tiempos de retención frente a los valores del índice de retención para los estándares APSA permitiría calcular los tiempos de retención esperados bajo esas nuevas condiciones.

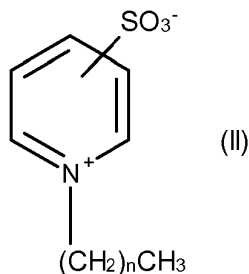
La Figura 8 representa un gráfico del tiempo de retención frente a los valores del índice de retención para los estándares APSA medidos en tres análisis LC-MS diferentes mediante el uso de dos columnas diferentes (150 frente a 50 mm de longitud) y dos gradientes diferentes. Se ha generado un ajuste de spline cúbico para ajustar los datos. La Tabla 3 presenta la predicción de los tiempos de retención del fármaco en una columna de 50 x 2 mm mediante el uso de los índices de retención documentados en la Tabla 2 y el gráfico que se muestra en la Figura 8.

Tabla 3

	Clase de Fármaco	Nombre del Compuesto	Abreviaturas	Transición SRM	Base de Datos de RI	RT Previsto (min)
5	Sulfonamidas	Sulfanilamida	SNA	173,1 > 92,1	379,7	0,8
		Sulfacetamida	SAA	215,1 > 156,1	471,9	2,3
		Sulfadiazina	SDZ	251,1 > 156,1	500,1	2,9
		Sulfatiazol	STZ	256,1 > 156,1	530,4	3,7
		Sulfapiridina	SPR	250,1 > 156,1	531,9	3,7
10		Sulfamerazina	SMR	265,1 > 92,1	546,8	4,1
		Sulfametazina	SMZ	279,1 > 186,1	584,0	5,2
		Sulfametizol	SML	271,1 > 156,1	600,3	5,6
15		Sulfametoxipiridazina	SMP	281,1 > 126,1	602,9	5,7
		Sulfacloropiridazina	SCP	285,1 > 156,1	653,9	7,1
		Sulfadoxina	SDO	311,1 > 156,1	676,9	7,6
		Sulfametoxazol	SMO	254,1 > 156,1	685,1	7,8
		Sulfaquinoxalina	SQO	301,1 > 156,1	780,4	9,9
20	Nitroimidazoles	1-(2-Hidroxietyl)-2-hidroxietyl-5-nitroimidazol	MNZ-OH	188,1 > 123,1	419,5	1,4
		2-Hidroxietyl-1-metil-5-nitrimidazol	HMMNI	158,1 > 140,1	453,1	2,0
25		Metronidazol	MNZ	172,1 > 128,1	457,3	2,0
		Dimetridazol	DMZ	142,1 > 96,1	482,6	2,5
		Ronidazol	RNZ	201,1 > 55,1	493,3	2,8
30		1-Metil-2-(2'-hidroxiisopropil)-5-nitroimidazol	IPZ-OH	186,1 > 168,1	590,6	5,4
		Ipronidazol	IPZ	170,1 > 109,1	676,9	7,6
35	Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	CIPRO	332,2 > 245,1	601,0	5,7
		Danofloxacina	DANO	358,2 > 96,1	614,1	6,0
		Enrofloxacina	ENRO	360,2 > 316,2	625,2	6,3
		Sarafloxacina	SARA	386,2 > 342,2	666,2	7,4
	Quinolonas	Ácido oxolínico	OXA	262,1 > 216,1	744,6	9,2
40	Macrólidos	Eritromicina	ERY	734,5 > 158,1	833,3	10,9
	Colorantes	Leucocristal Violeta	LCV	374,4 > 358,1	660,3	7,2
		Leucomalaquita Verde	LMG	331,1 > 316,1	983,2	13,5
		Malaquita Verde	MG	329,2 > 313,1	1180,8	16,3
		Cristal Violeta	CV	372,4 > 356,1	1406,5	19,3
45		Verde Brillante	BG	385,3 > 341,1	1572,6	21,5

REIVINDICACIONES

1. Una serie de estándares de índice de retención para su uso en cromatografía líquida, la serie de estándares de índice de retención comprende dos o más compuestos homólogos con carga neutra, cada compuesto comprende un ácido 1-alkilpiridinosulfónico diferente de Fórmula (II):



donde n es un número entero de 0 a 23, y donde cada compuesto de la serie tiene un valor diferente para n, y en donde la cromatografía líquida comprende cromatografía líquida-espectrometría de masas o en donde la cromatografía líquida es cromatografía líquida con un sistema de detección de absorbancia ultravioleta.

2. La serie de estándares de índice de retención de acuerdo con la reivindicación 1, en donde cada ácido 1-alkilpiridinosulfónico comprende un grupo sulfonato en la posición 3 de la piridina.
3. La serie de estándares de índice de retención de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la serie comprende de 4 a 16 homólogos.
4. Uso de la serie de estándares de índice de retención como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para crear una biblioteca de índices de retención para compuestos de referencia en una primera columna de cromatografía líquida o sistema de cromatografía líquida.
5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la biblioteca se usa además para predecir el tiempo de retención de uno o más de los compuestos de referencia en una segunda columna de cromatografía líquida o sistema de cromatografía líquida.
6. Un kit que comprende la serie de estándares de índice de retención de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en cromatografía líquida.

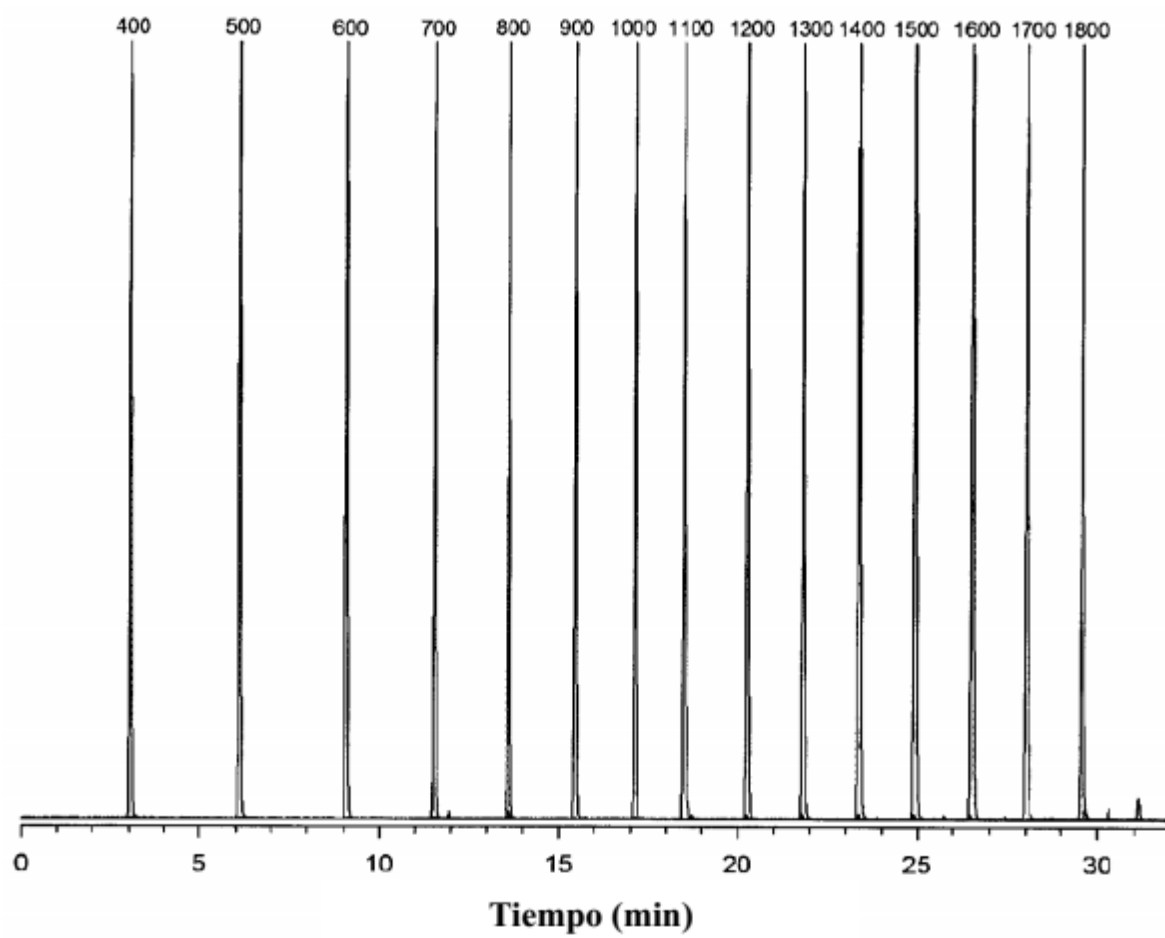


Figura 1

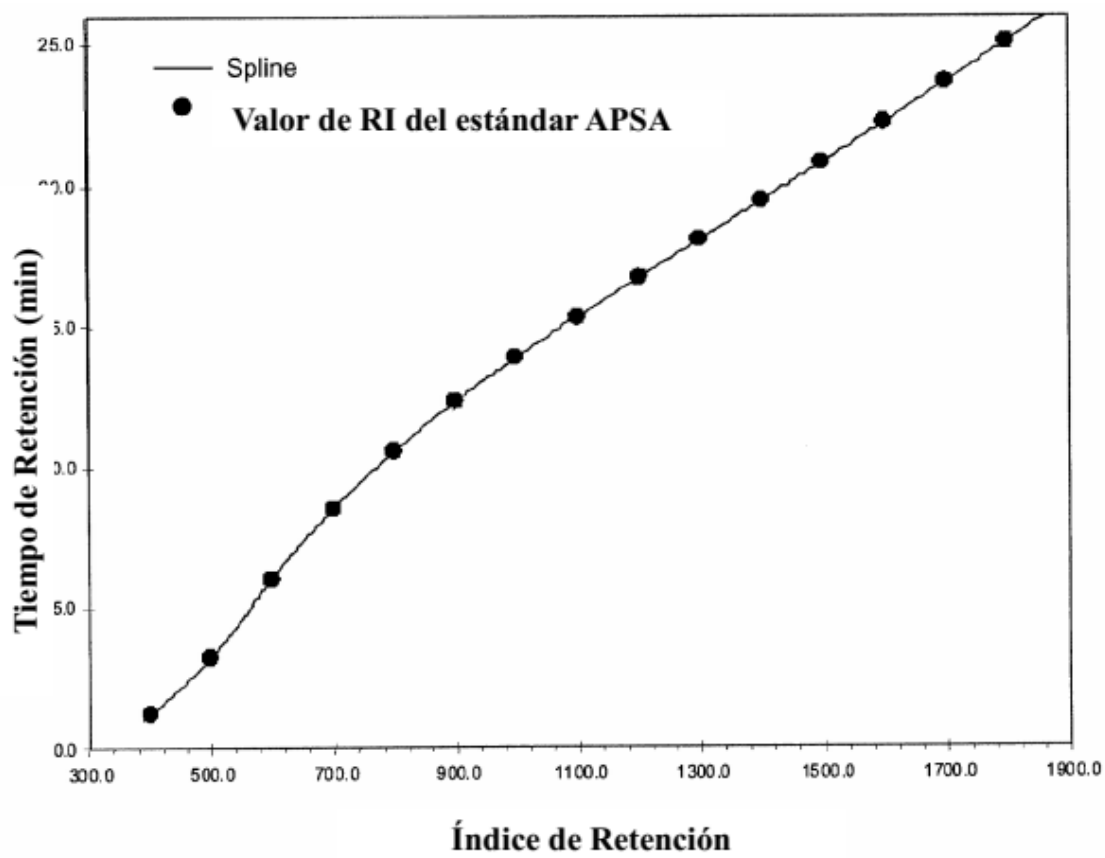


Figura 2

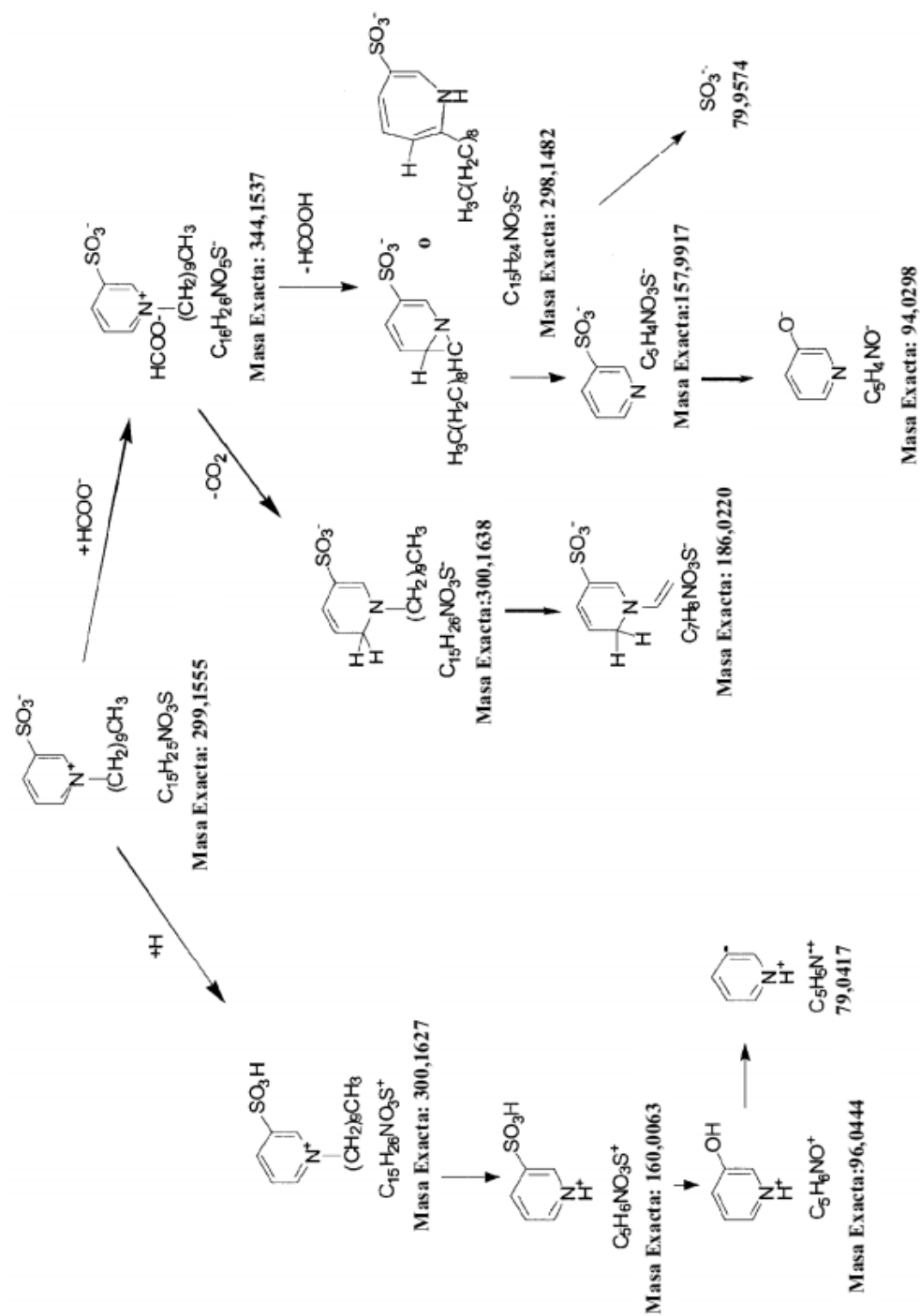


Figura 3

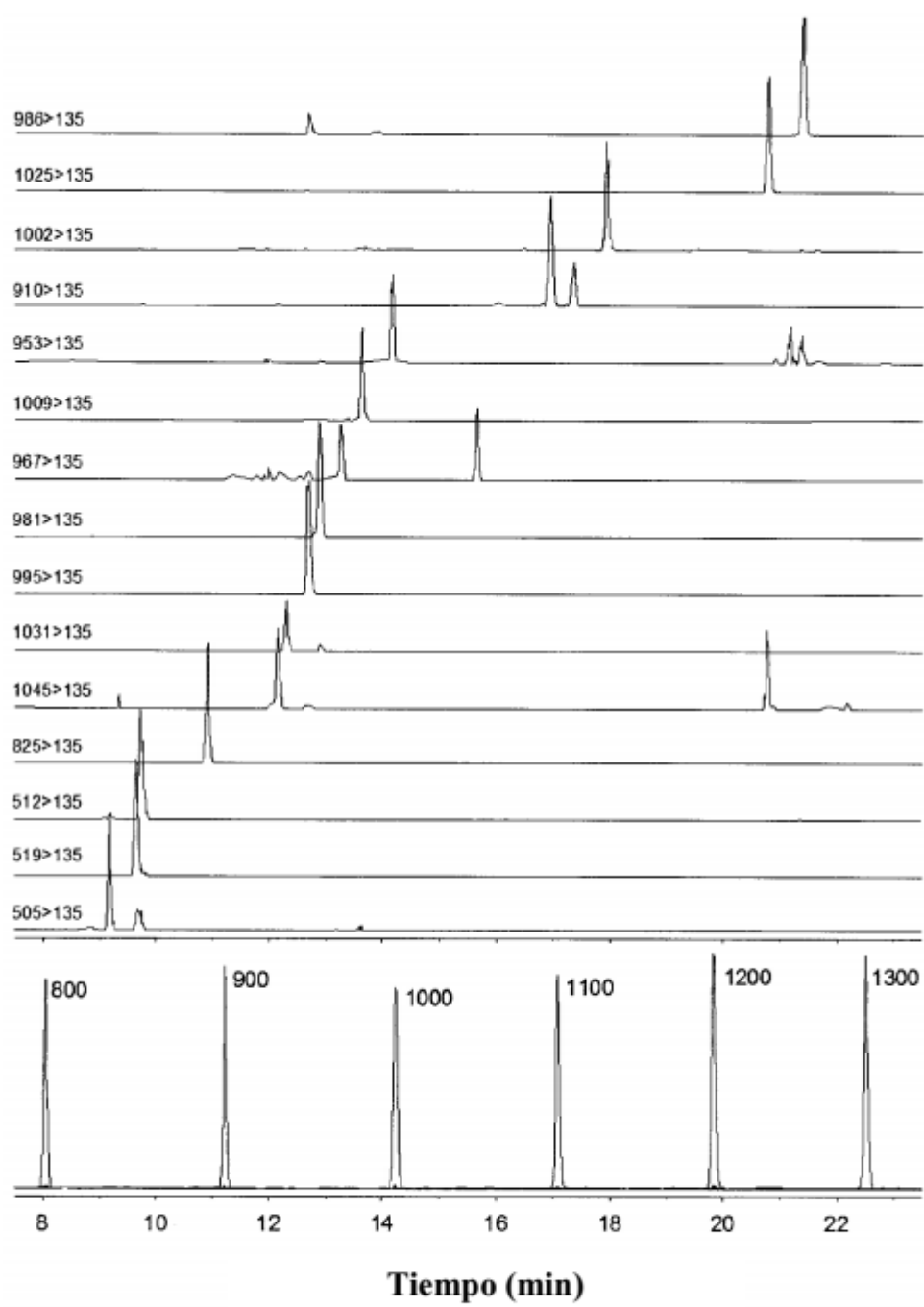


Figura 4

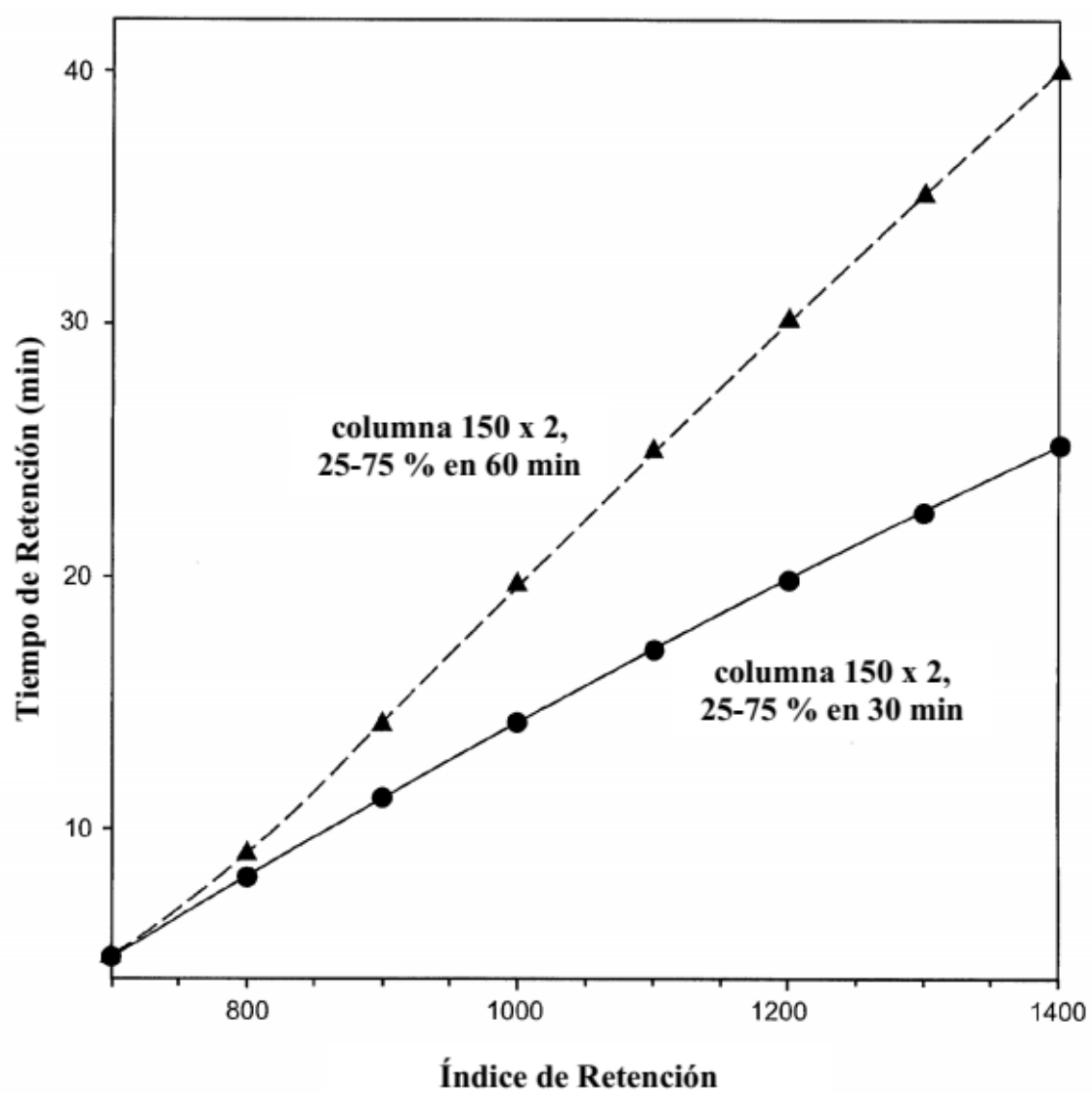


Figura 5

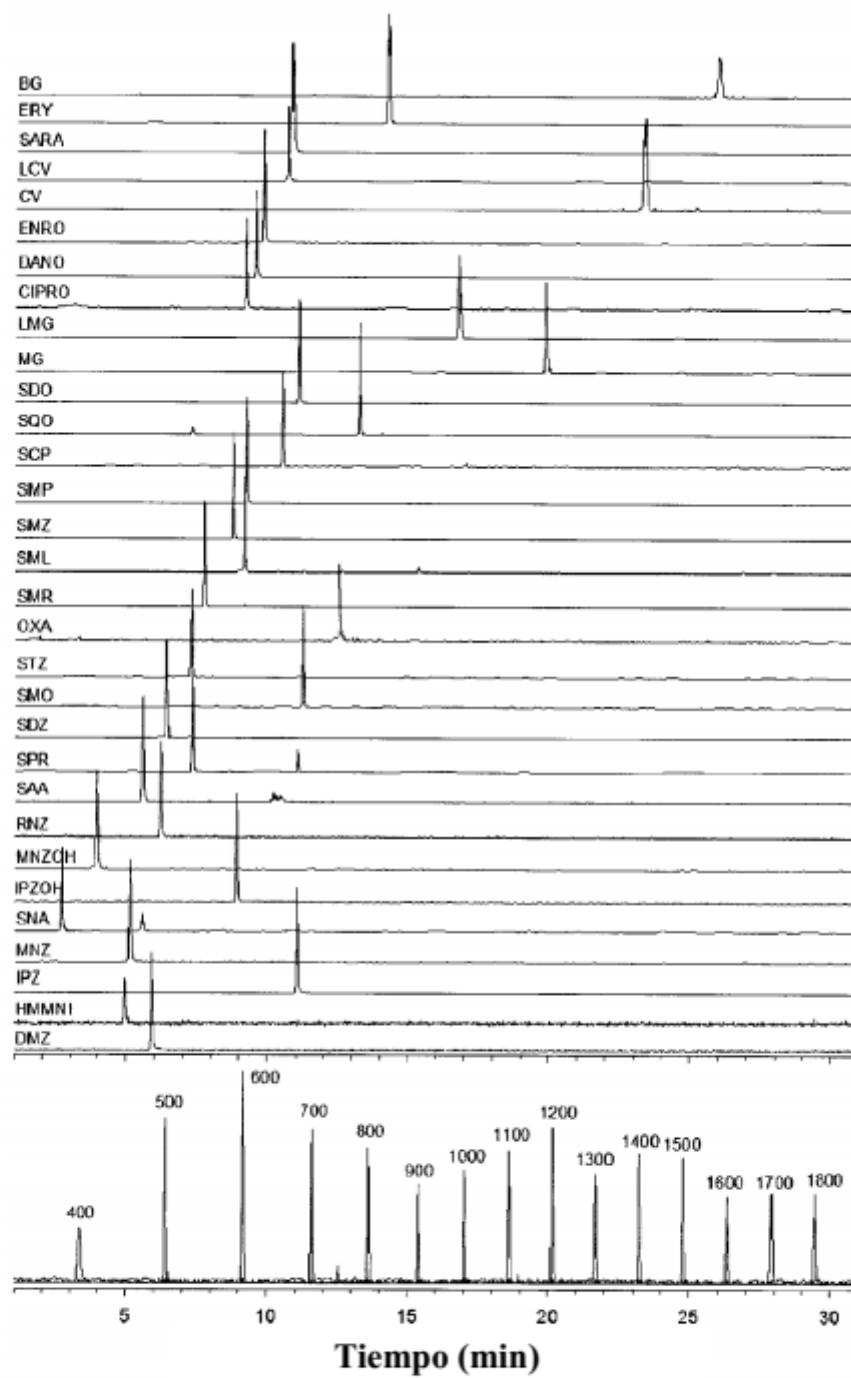


Figura 6

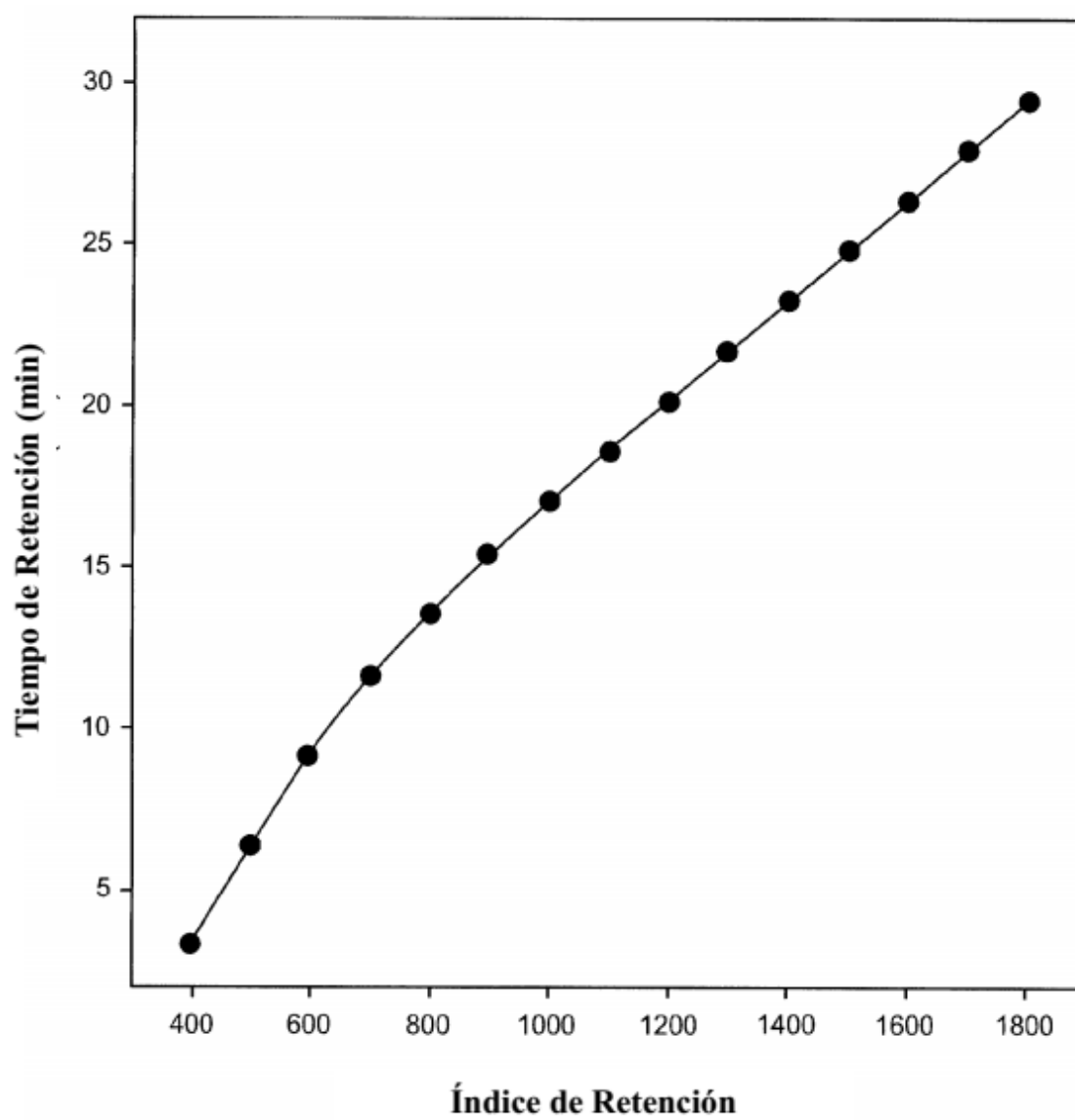


Figura 7

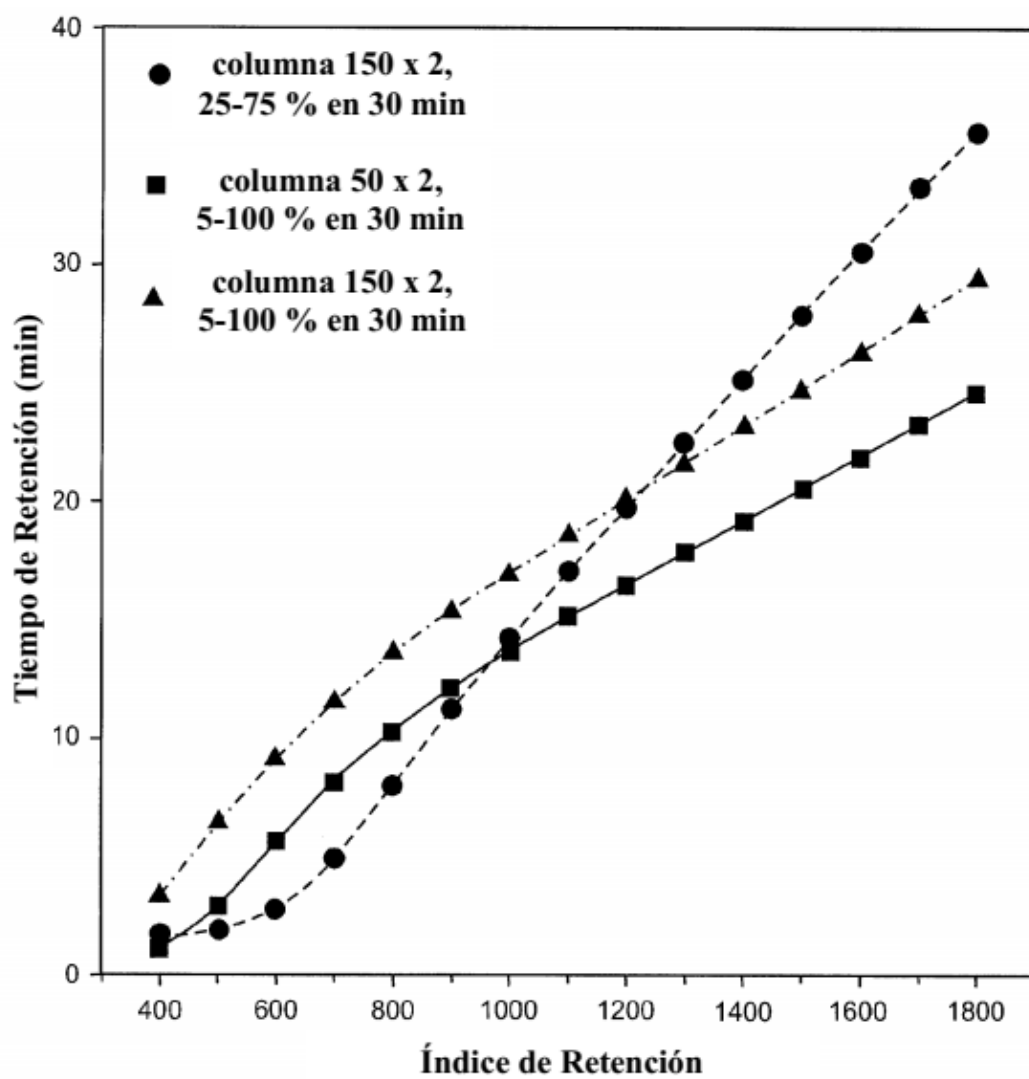


Figura 8