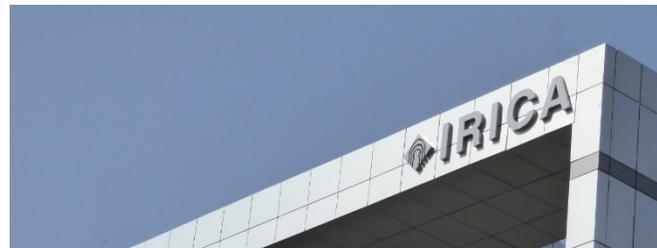


SERVICIO DE INSTRUMENTACIÓN DEL IRICA

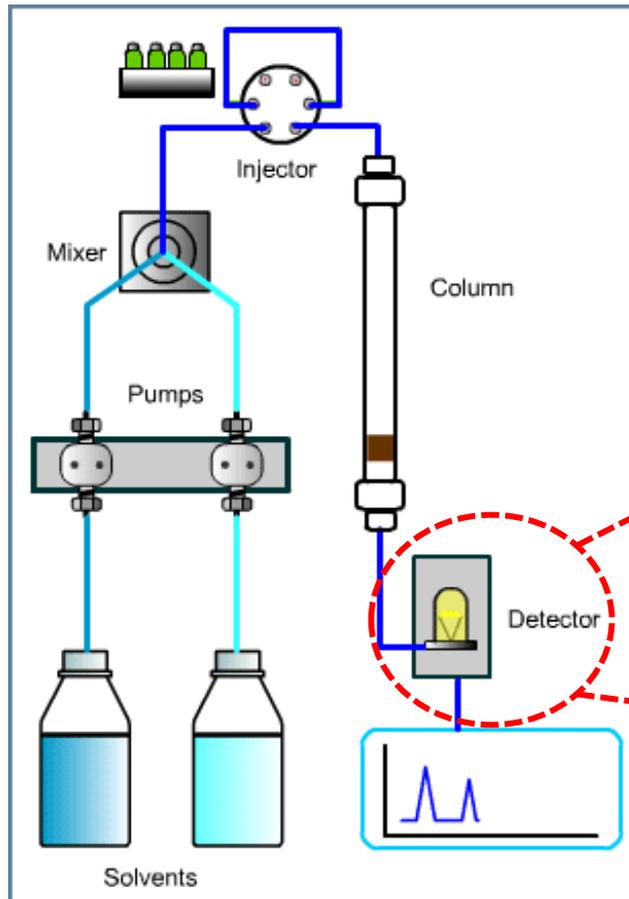
HPLC-QTOF



Universidad de
Castilla-La Mancha

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

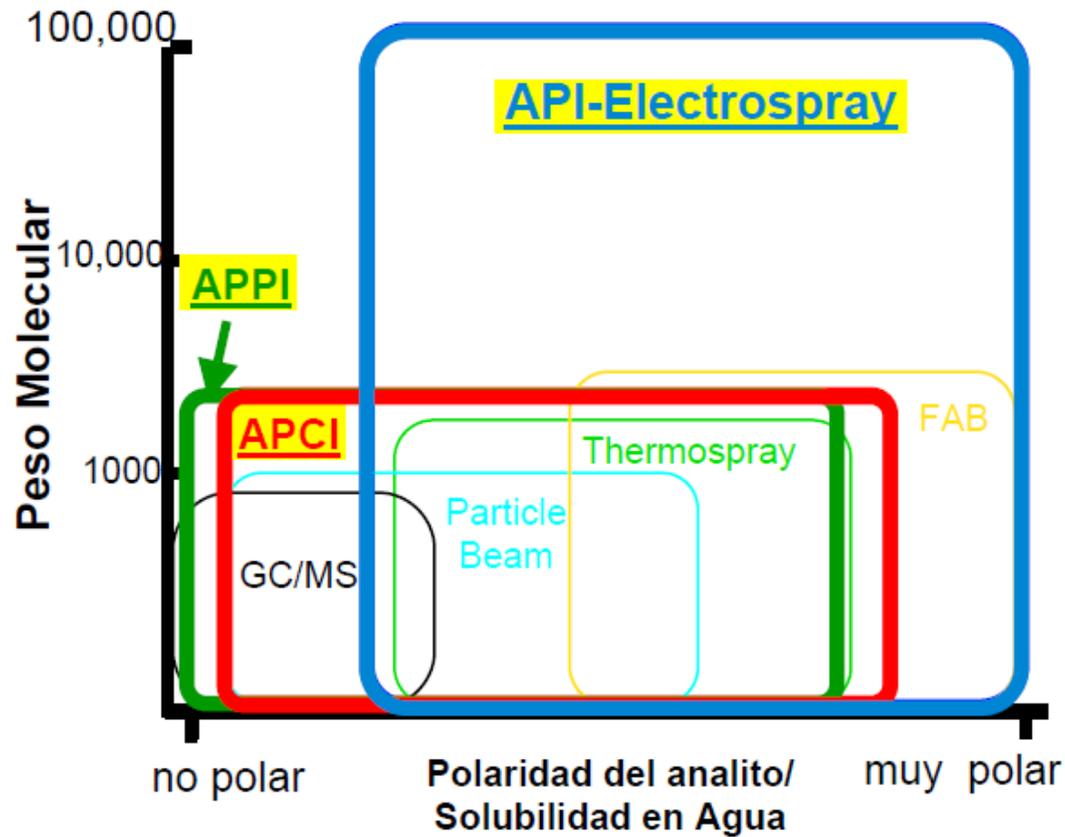
HPLC



HPLC: técnica cromatográfica muy apropiada para el análisis de compuestos no volátiles; muchas posibilidades en tipos de columnas, de fases móviles y de detectores

DAD: capacidad limitada de identificación; gran capacidad de cuantificación

MS: gran capacidad, tanto de identificación como de cuantificación (coelución; trazas)



API-Electrospray (LC y CE):

- La técnica de ionización más suave.
- **Ideal también para compuestos lábiles.**
- Interfase con mayor sensibilidad y aplicabilidad.
- Válida para compuestos de baja-media a muy alta polaridad que se puedan ionizar en solución.
- Mediante la formación de iones con múltiples cargas, permite el análisis de compuestos de muy elevado peso molecular.

Las interfases LC/MS tipo API (**ESI y APCI**) son hoy en día las más utilizadas

ANALIZADORES DE MASAS: dispositivos que permiten la separación de iones respecto a su relación m/z .

Basados en la interacción de partículas cargadas con campos eléctricos (E) y magnéticos (B)

TRANSMISIÓN DE IONES: capacidad de llevar al detector todos los iones que entran en el analizador, lo que determina la sensibilidad (LD)

RESOLUCIÓN DE MASAS: capacidad del analizador para separar dos iones vecinos (con valores m/z muy próximos)

Parts per Million (ppm) as a Measure of Mass Accuracy

$$\frac{(\text{Measured mass} - \text{Calculated mass}) \times 1,000,000}{\text{Calculated mass}} = \text{ppm}$$

A compound with a mass of 1000 Daltons

1000 ± 2.0 Da (or ± 2000 ppm)

1000 ± 0.5 Da (or ± 500 ppm)

1000 ± 0.1 Da (or ± 100 ppm)

1000 ± 0.01 Da (or ± 10 ppm)

1000 ± 0.002 Da (or ± 2 ppm)

Importance of Mass Accuracy

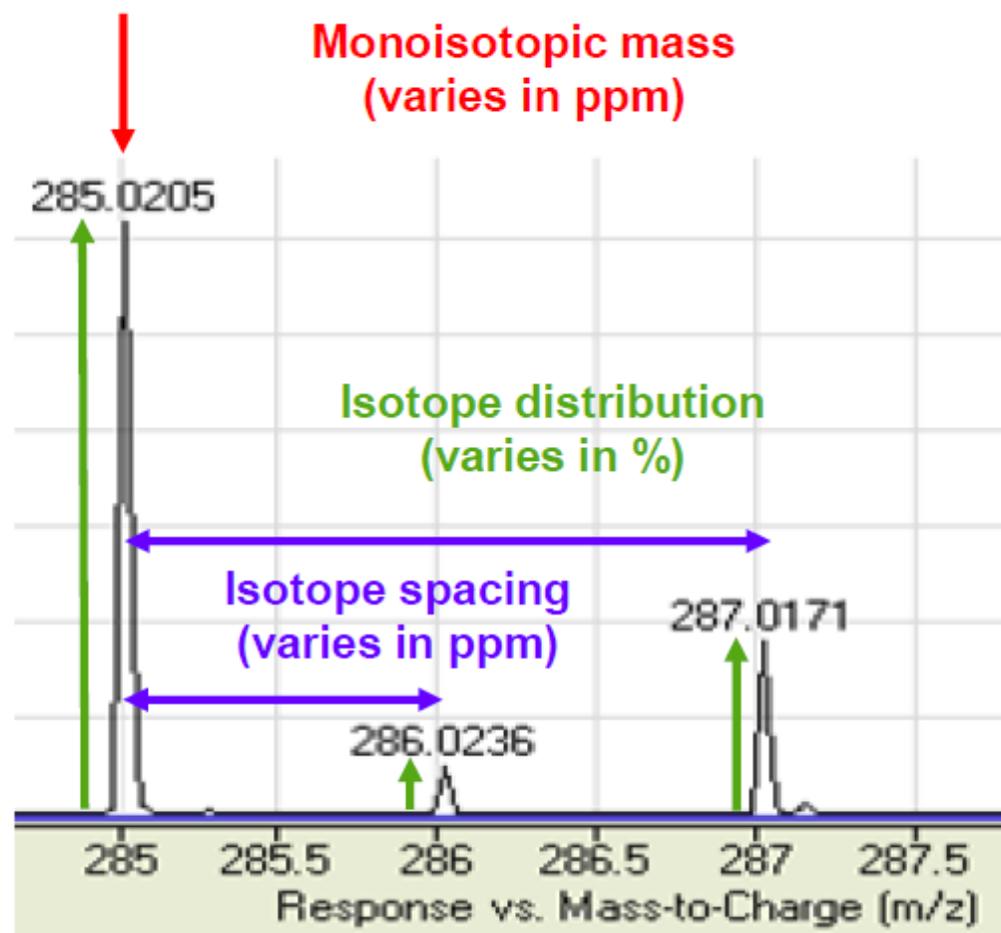
Reserpine ($C_{33}H_{40}N_2O_9$) has a protonated ion at 609.28066

Single quad reports mass to $\pm 0.1 = 164.128$ ppm

Number of possible formulas using only C, H, O & N:

- 165 ppm	209	
- 10 ppm	13	Agilent Q-TOF
- 5 ppm	7	1-2 ppm MS
- 3 ppm	4	2-4 ppm MS/MS
- 2 ppm	2	

Accurate mass reduces risk of investing effort on the wrong molecule



Agilent 1260 Infinity HPLC



<https://www.youtube.com/watch?v=4zgCKaMRGqo>

Agilent 6545 QTOF



Rango de masas:

100-10.000

50-1700

50-3200

Exactitud de masas:

< 1 ppm en modo MS

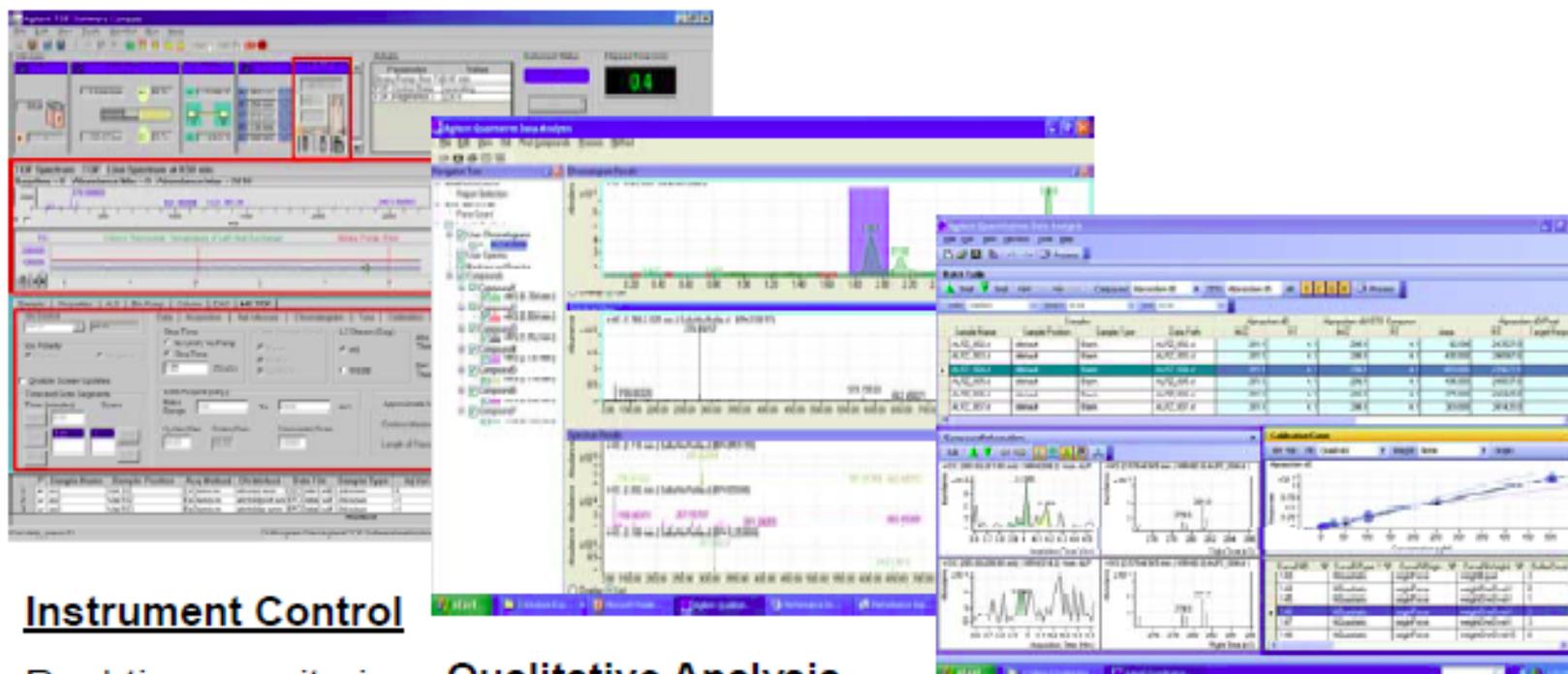
< 2 ppm en modo MS/MS

Rango dinámico extendido

5 órdenes de magnitud

<https://www.youtube.com/watch?v=W-DRL-V2Rkg>

MassHunter WorkStation for Control and Analysis



Instrument Control

Real-time monitoring

Method set-up

Autotune

Qualitative Analysis

Chromatographic results

Spectral results

Find compounds

Identify compounds

Quantitative Analysis

User filters

Compound results

Calibration curve

APLICACIONES HPLC-QTOF

Identificación de picos cromatográficos desconocidos

“Screening” de un número “ilimitado” / muy elevado de compuestos sin disponibilidad de patrones (sí serán necesarios para confirmación y cuantificación)

Estudios Metabolómicos/Biomarcadores y de identificación por análisis diferencial de metabolitos u otros compuestos potencialmente correlacionados con cambios en el metabolismo o propiedades de un producto, origen de la muestra, etc.

Identificación de picos cromatográficos desconocidos

Masa exacta

Perfil isotópico

Fragmentación MS/MS



Molecular Formula Generator

“Screening” de un número muy elevado de compuestos (Cualquier compuesto ionizado)

Masa exacta

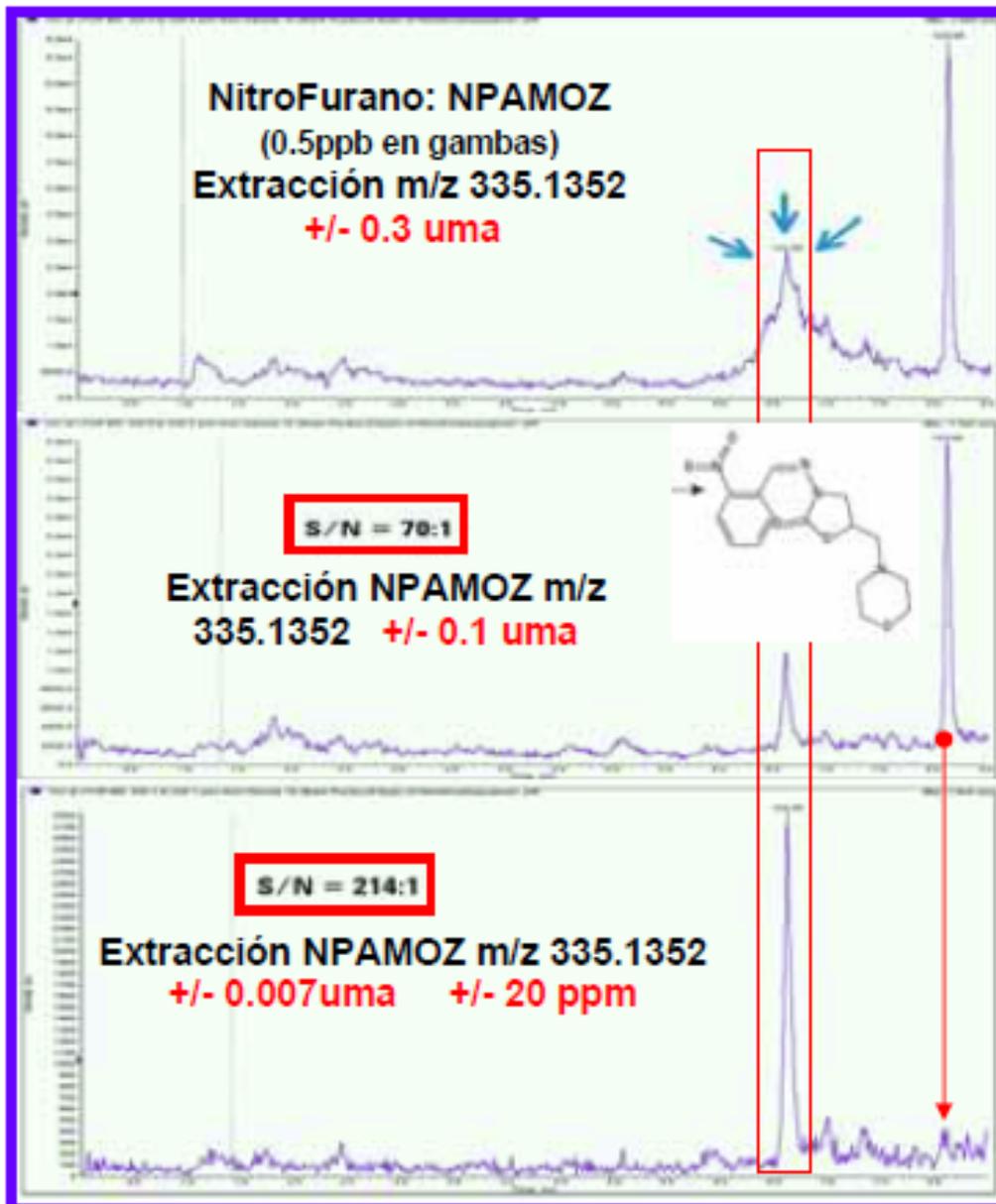
Perfil isotópico

Fragmentación MS/MS

Find by Formula



Sin tener que programar la adquisición de iones precursores
Búsqueda posterior en cromatogramas de compuestos “no esperados”



Mejora de la Selectividad y Relación S/N con la Reducción de la Banda de Extracción

Compuesto analizado : NPAMOZ (metabolito Nitrofurano)

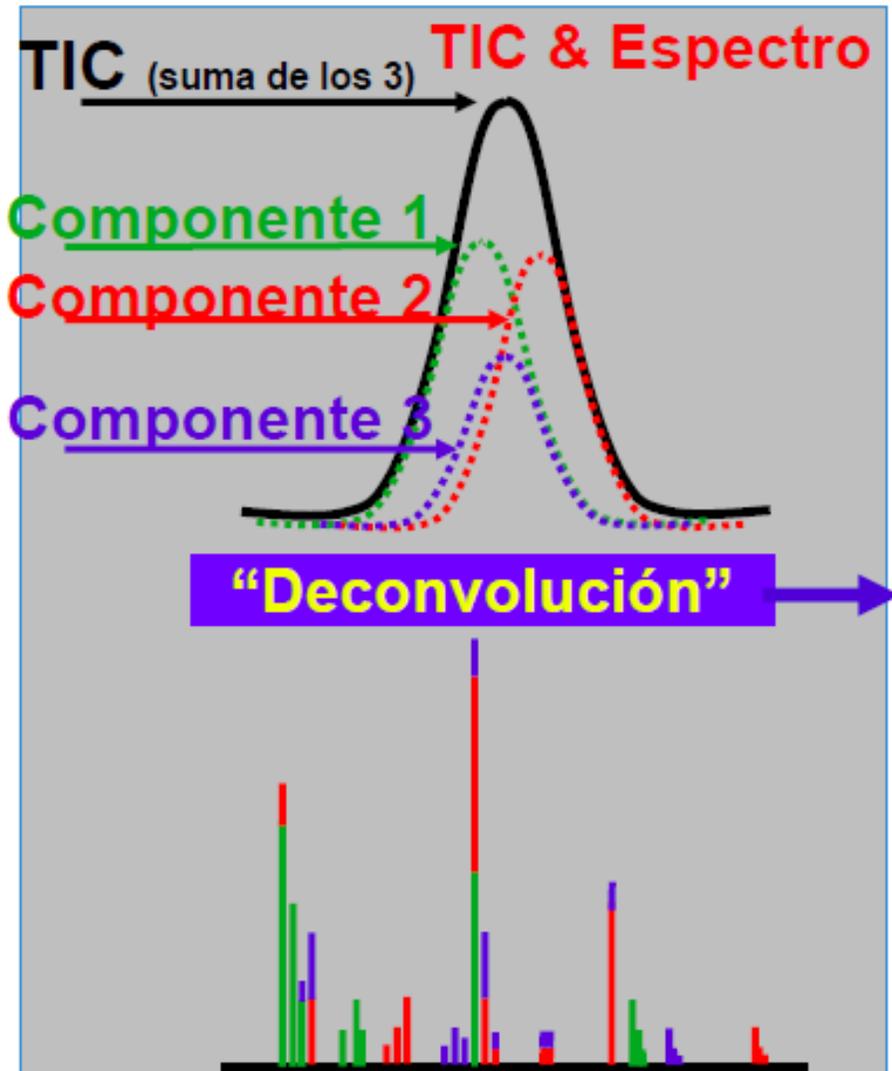
Estudios Ómicos-Biomarcadores

La comparación de perfiles totales sólo sirve para ver diferencias de componentes mayoritarios

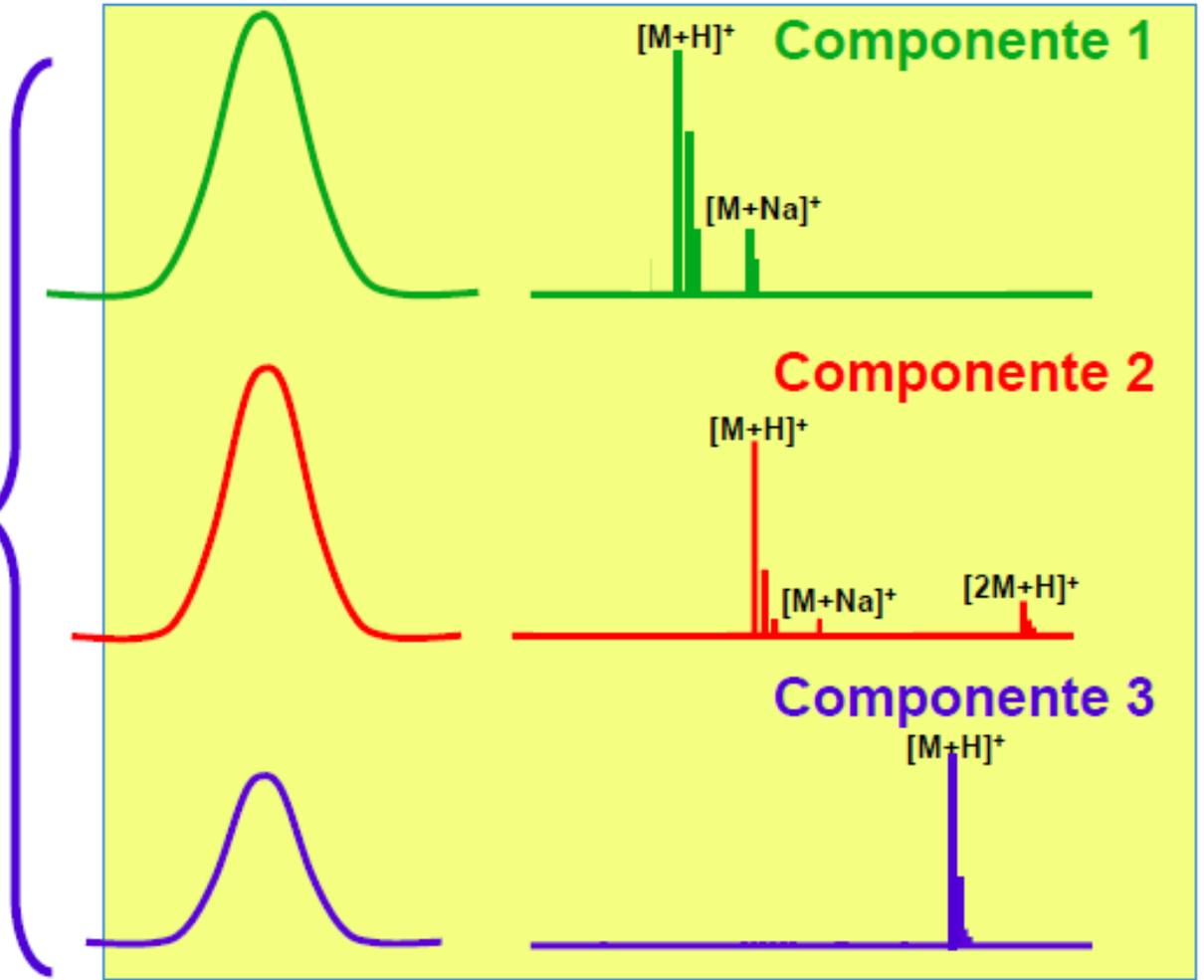
En muestras muy complejas incluso muchos componentes mayoritarios pueden quedar enmascarados

En muestras complejas es difícil conseguir una buena separación cromatográfica. Se requerirá de la selectividad de un MS para “resolver” los solapamientos cromatográficos

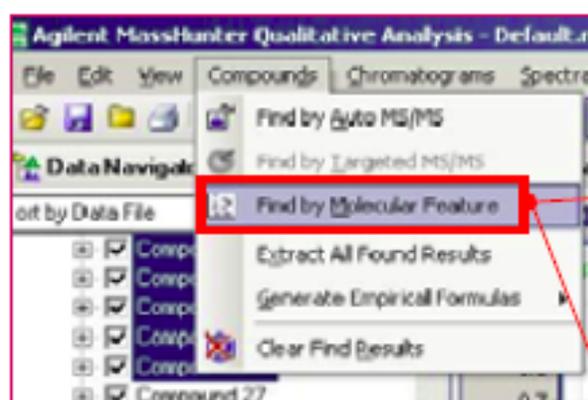
En muestras complejas 1 pico (TIC) suele estar formado por varios compuestos no resueltos y algunos del propio fondo



Picos deconvolucionados y espectros



Avanzado Algoritmo de Deconvolución "LC/MS Mass Hunter Molecular Feature Extractor" para obtener por la Masa Exacta de "todos" los Compuestos Ionizados en la Muestra



Forma parte del soft. de TOF y Q-TOF

Espectros Deconvolucionados

