

# Posibilidades Aplicativas de los Agilent LC/MS-TOF



## Soluciones LCMS Agilent



*LC/MS-TOF: Introducción y posibilidades de la masa exacta en LC/MS*

**Organizado por:** José Rodríguez  
Servicio Instrumentación Científica (SUIC).

**Colabora:** Isidro Masana – Agilent Technologies

Se presentarán los fundamentos, aportaciones y limitaciones de la técnica de LC/MS (cromatografía líquida/espectrometría de masas) con "Tiempo de Vuelo", así como su posicionamiento con respecto a técnicas de MS/MS.

**Lugar:** Aula del Edificio SACE

**Fecha:** Miércoles 23 de Abril 2008

**Hora:** 12:30.

# Introducción a las Técnicas de LC/MS con TOF

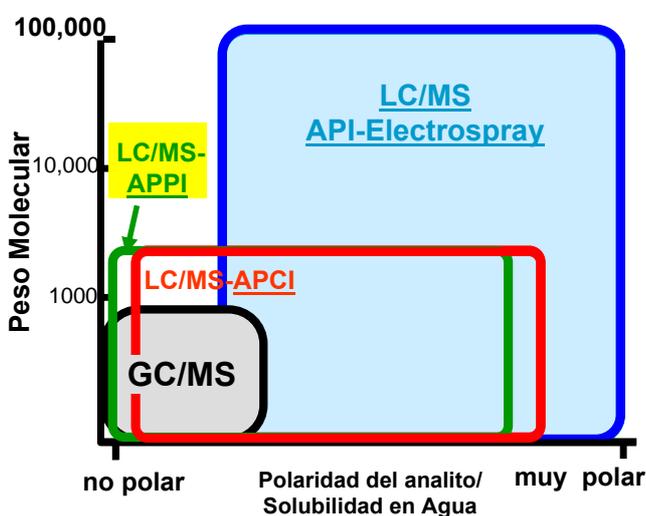


Soluciones LCMS Agilent

+3.500 LC/MS

## Rango Aplicabilidad de las Técnicas de LC/MS “versus” GC/MS

- Mucho mayor **rango de aplicabilidad** que GC/MS (p.e. no volátiles o iónicos), **pero cromatografía muchos menos resolutive**
- Permite analizar compuestos termolábiles.
- Evita las habituales derivatizaciones de GC/MS y suele simplificar los procesos de preparación de la muestra.



LC/MS permite detectar una muy elevada proporción de compuestos orgánicos –**SI LAS CONDICIONES SON ADECUADAS**

### LC/MS API-Electrospray:

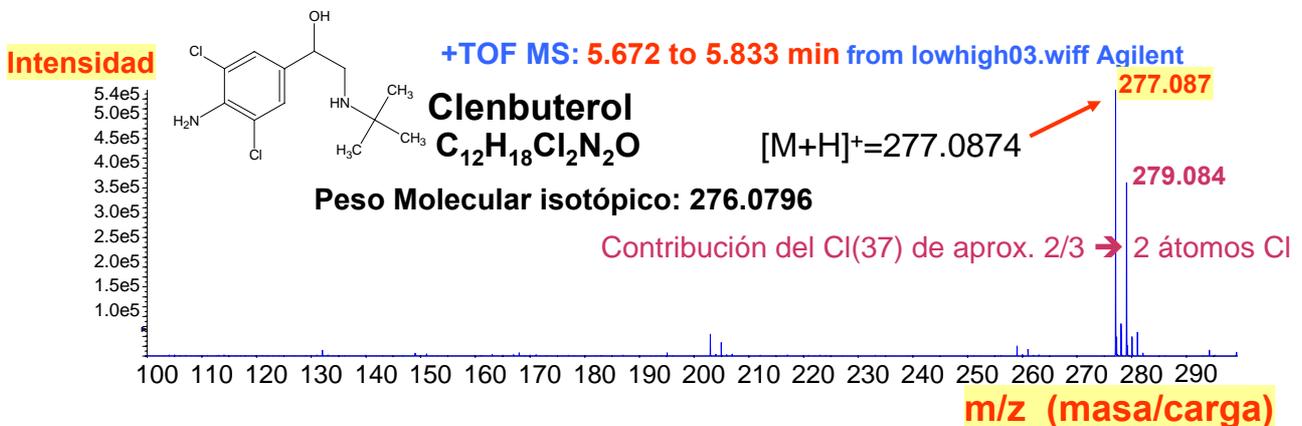
- Ideal también para compuestos lábiles.
- Válida para compuestos de baja-media a muy alta polaridad que se puedan ionizar en solución.
- Mediante la formación de iones con múltiples cargas, permite el análisis de compuestos de muy elevado peso molecular.

### LC/MS APCI:

- Válida para compuestos de baja a alta polaridad; no se requiere que estén ionizados en solución.
- **Requiere compuestos con una cierta volatilidad y NO termolábiles.**

# El Espectro de Masas por Ionización a Presión Atmosférica (API-LC/MS)

Las técnicas de ionización a presión atmosférica (API) utilizadas en LC/MS son muy suaves y **apenas fragmentan a la molécula**.



- **No existen bibliotecas universales de espectros de LC/MS**
- **Sólo existen bibliotecas de “masa exacta”**

## Obtención de Información Estructural en LC/MS

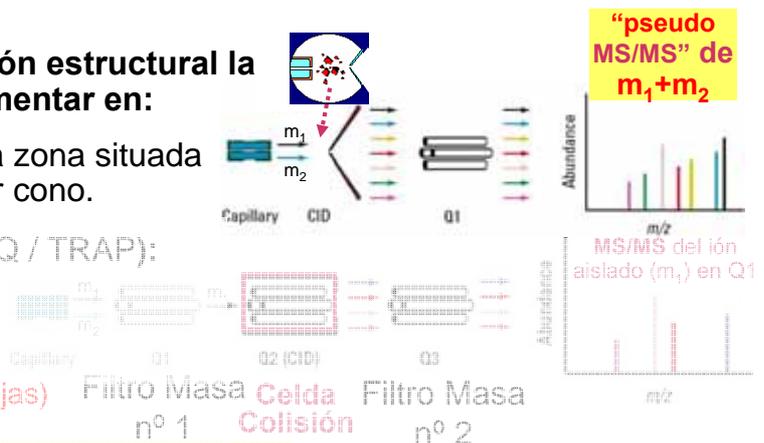
En LC/MS para obtener información estructural la molécula ionizada se puede fragmentar en:

• **Sistemas LC/MS (Q y TOF):** en la zona situada entre la salida del capilar y el primer cono.

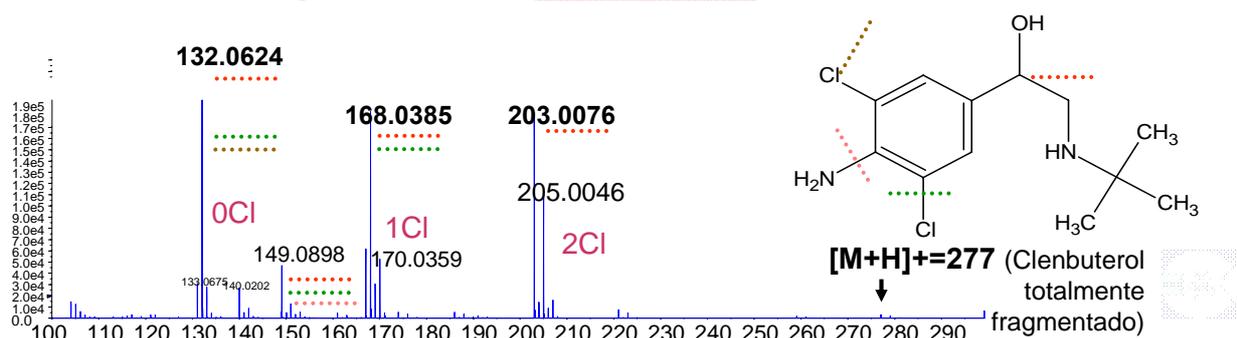
• **Sistemas LC/MS/MS (Q-TOF/ QqQ / TRAP):**

se fragmenta en celda de colisión o

en la trampa de iones. **Muy útil cuando existe coelución de compuestos** (p.e. en matrices complejas)



**QTOF dará MS y MS/MS con “masa exacta”**



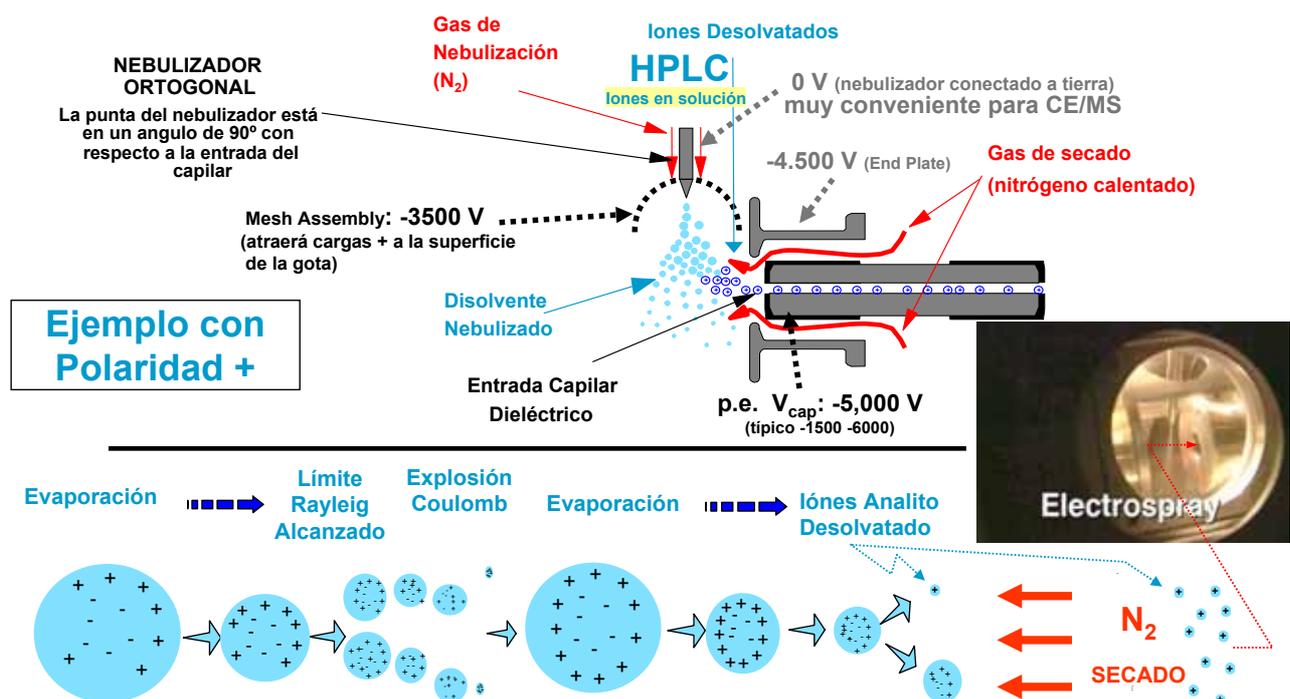
# 1.- Posibilidades y Criterios de Selección de la Técnica de Ionización a utilizar en LC/MS



ESI?  
 APCI?  
 FIA?  
 INFUSION?  
 APPI?  
 TRAP?  
 MS<sup>n</sup>?  
 Auto MS<sup>n</sup>?

???  
 (Cartoon man with question marks above his head)

## Agilent Series 1100: Diseño Ortogonal de la Fuente de Iones API – Electrospray



La presencia de sales no volátiles dificultará considerablemente la eficiencia del proceso de desolvatación  
 Para óptima sensibilidad los analitos deben estar totalmente ionizados al pH del eluyente

# Criterios Genéricos de Selección de Técnica Ionización

## ELECTROSPRAY:

Compuestos **iónicos**, o polímeros/biopolímeros que en disolución adquieren **múltiples cargas** (péptidos – proteínas - ...).

Compuestos **termolábiles** con grupos funcionales ionizables en disolución, o de los que se pueden obtener sus sales sódicas (ESI-) o sus clorhidratos (ESI+)

Técnicas que requieran trabajar a **nano o microflujos**

## APCI / APPI:

Compuestos NO termolábiles de **media-baja polaridad** y que contengan **algún heteroátomo**. Moléculas sin grupos funcionales ionizables.

Preferencia por trabajar con **fases móviles NO tamponadas**

“Necesidad” de trabajar con fases **fuertemente tamponadas** por necesidades cromatográficas. (APCI/APPI toleran mayores concentraciones de tampón)

## APPI:

Compuestos **apolares** NO termolábiles y **sin heteroátomos**

**En buena parte de los casos se podrán utilizar las 3 técnicas**

APCI / APPI “suelen” dar menor **supresión de la ionización\*** y **%RSDs algo menores que ESI**

\* Reducción de respuesta con respecto a patrones en disolvente



## Ejemplos de Aplicación de la Técnica LC/MS

### **APCI:**

Carbamatos  
Herbicidas: Fenilurea  
**Pesticidas**  
Triglicéridos  
Aditivos en plásticos  
Explosivos  
**Micotoxinas**  
**Fármacos**  
Antioxidantes  
Azúcares  
Ácido Succínico  
**Compuestos Fenólicos**  
**Aldehídos / Cetonas**<sup>\*a</sup>  
**Amidas**<sup>\*b</sup>

<sup>\*a</sup> APCI: Los compuestos carbonílicos en ocasiones pueden llegar a protonarse. <sup>\*b</sup> APCI: Las amidas e hidroxilos aromáticos perder un protón.

### **API-Electrospray:**

Sulfonilureas  
Hidratos de Carbono  
LSD  
Benzodiazepinas  
Morfinas  
**Pesticidas**  
Pigmentos  
**Micotoxinas**  
**Péptidos y proteínas**  
**Fármacos**  
Salbutamol  
Penicilina  
Aminas Aromáticas / Cuaternarias  
Antidepresivos  
Esteroides y corticoesteroides  
Antocianinas  
Iones

**Recordatorio: LC/MS-API no puede detectar analitos que no se ionicen !!**



# Típicos Escenarios de Aplicación de las Técnicas de LC/MS-TOF



## Escenarios de Aplicación “Exclusivos”\* de las Técnicas de LC/MS-TOF

En LC/MS el equipo “ideal” dependerá del “escenario central” de trabajo

- 1.- Identificación de picos cromatográficos **desconocidos**.
- 2.- Estudios **Metabólicos/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, ...
- 3.- “Screening” **de un nº “ilimitado”** / muy elevado de compuestos **sin disponibilidad de patrones\*\***. La confirmación y cuantificación de positivos si requerirá la disponibilidad de patrones)

\*Escenarios donde un QTOF (o un TOF cuando NO se requiera MS/MS) es muy diferencial con respecto a otras técnicas de LC/MS\*\* La confirmación final de positivos requiere del uso de patrones

## Requisitos Clave

Escenarios 1, 2, 3 y 4:



Agilent MS-Series 6210/6220 TOF & 6510/6520 Q-TOF:

**“Masa Exacta” en operación de rutina y con la Máxima Sensibilidad**

- Exactitud Masa en MS y MS/MS
- Masa “independiente” de la concentración de analito
- Sensibilidad

Opción preferente:

• **Tiempos de Vuelo (Q-TOF/TOF) en modo MS: proporcionan la “selectividad de la masa exacta” (tipo MS/MS) en matrices complejas con métodos de adquisición genéricos.**

• Q-TOF confirmación de la identificación mediante MS/MS con “masa exacta”.

Alternativas

• **Ninguna de adecuada**

- Se debe operar en modo “scan MS”.
- Se deberá disponer de **selectividad “tipo MS/MS” con la extracción de cromatogramas de iones con “masa exacta”** (muy finas ventanas de extracción)
- Los cromatogramas de iones de trampas y cuadrupolos en modo MS ofrecen una limitada selectividad para matrices complejas.

## Escenarios de Aplicación “Compartidos”\* con otras Técnicas de LC/MS

5.- Screening y cuantificación de un n° “limitado” Compuestos Diana. (Análisis Multiresiduo) y con disponibilidad de patrones.

Típica aplicación de QqQ en modalidad MRM (registro de sólo 2-3 m/z de iones seleccionadas a “priori”. TOF también válido en modo “Exact IC” con una selectividad semejante a “MS/MS”, pero con menor sensibilidad que un QqQ en modalidad MRM, pero con la ventaja de trabajar en SCAN con MS exacta (se dispone de toda la información de compuestos ionizados en el disco duro).

6.- Identificación de Proteínas en complejas mezclas mediante “Peptide Mass Fingerprint” (no Auto-MS/MS) y búsquedas en bases de datos de proteínas. Localización e identificación de modificaciones post-traduccionales

7.- Cuantificación de proteínas, determinación de su masa, pero NO secuenciación de péptidos,.....

.....

.....

## Escenario 1: Posibilidades de los QTOF /TOF en “Identificación de Compuestos Desconocidos

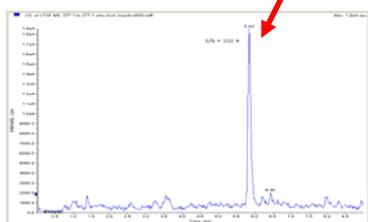


• Para identificar  
compuestos  
desconocidos la clave  
es disponer de “Masa  
Exacta” robusta

- Se trabaja en modo **SCAN-MS**
- **NO es imprescindible** disponer de patrones ni de sus tiempos de retención. Si se requieren para confirmar la identificación.
- Se pueden utilizar **bibliotecas de masa exacta** ( $T_r$  es opcional) o “calculadoras de fórmulas empíricas”.



## La Identificación de Compuestos Desconocidos por LC/MS:



Es como buscar :



en

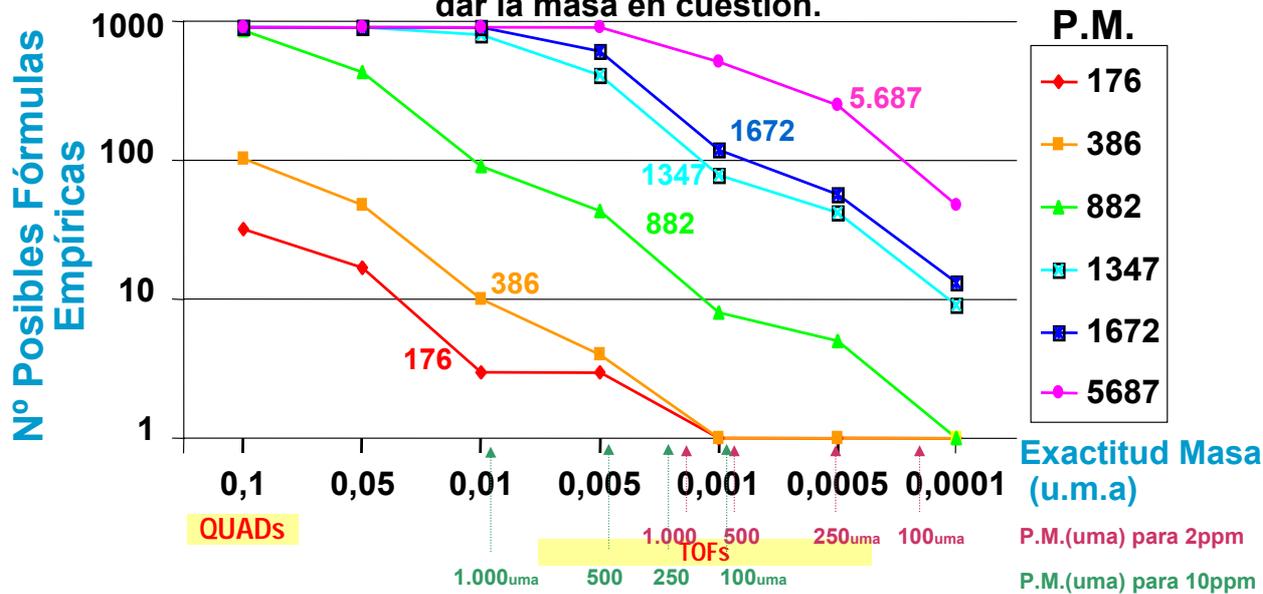


Primero se requerirá  
CENTRAR en que  
PEQUEÑA zona buscar



# La Importancia de disponer de “Masa Exacta” para “centrar” la búsqueda:

Al aumentar la Exactitud de la masa analizada se reducen muy considerablemente el n° de posibles composiciones elementales que pueden dar la masa en cuestión.



En moléculas pequeñas el poder determinar el peso molecular con la tercera cifra decimal permite típicamente definir una fórmula empírica inequívoca.



## La importancia de la “Masa Exacta” LC/MS

TOF- 6210



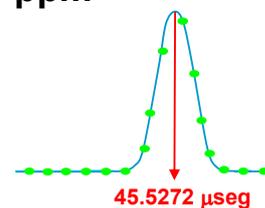
- En LC/MS NO existen bibliotecas universales de espectros.
- La identificación de desconocidos en LC/MS se base en la masa exacta

Reserpina ( $C_{33}H_{40}N_2O_9$ ) da un ión  $[M+H]^+$  a 609.28066 m/z

Los cuadrupolos proporcionan masa +/- 0.1 = 165 ppm

N° de posibles fórmulas usando sólo C, H, O y N:

Exactitud	n° posibilidades
165 ppm (quad)	209
10 ppm	13
5 ppm	7
3 ppm (Agilent 1100 TOF)	4
2 ppm (Agilent 6210 TOF)	2



Sistema medida Tiempo de Vuelo Basado en conversor AD

Para poder obtener “masa exacta” se requerirá la adición en continuo de algunos compuestos como referencia interna para m/z.

Disponer de Masa Exacta reduce enormemente el n° de posibles fórmulas empíricas.

Algunos AAS tienen m/z muy parecidas: Leu=Ile=113.084 / Lys=128.095 Gln=128.058



# Posibles Identificaciones por Búsqueda en Bases de datos de Masa Exacta de Metabolitos y de Estructuras Moleculares

**Possible Compositions**

chemical formula	ChemIDplus	DBE	pattern	score
1 C15H18N4	ChemIDplus	9.0	88	100
2 C13H23N2OP	METLIN	4.0	98	74

**Group #4 (RT=40.078) --- 4 Features**

Search Mass	METLIN	mass	abund.	width	satur.	
1	Settings	390.2774	22465150	0.401		
2	M+H	40.062	391.2843	390.2770	6963880	0.447
3	M+H+1	40.061	392.2877	390.2775	1491898	0.433
4	M+H+2	40.059	393.2913	390.2788	240178	0.377
5	M+H+3	40.060	394.2958	390.2809	38602	0.460
6						
7	M+Na	40.118	413.2664	390.2771	2885762	0.678
8	M+Na+1	40.120	414.2700	390.2779	679487	0.650
9	M+Na+2	40.128	415.2730	390.2785	93567	0.562
10	M+Na+3	40.105	416.2742	390.2773	9900	0.347
11						
12	M+K	40.090				0.593
13	M+K+1	40.084				0.423
14						
15	2M+Na	40.065				0.381
16	2M+Na+1	40.063				0.382
17	2M+Na+2	40.063				0.401
18	2M+Na+3	40.068	806.5531	390.2781	126078	0.352
19	2M+Na+4	40.073	807.5574	390.2791	19692	0.312
20	2M+Na+5	40.068	808.5651	390.2818	2957	0.148

**AGILENT "MOLECULAR FEATURE EXTRACTOR"**

**Search Results NIST**

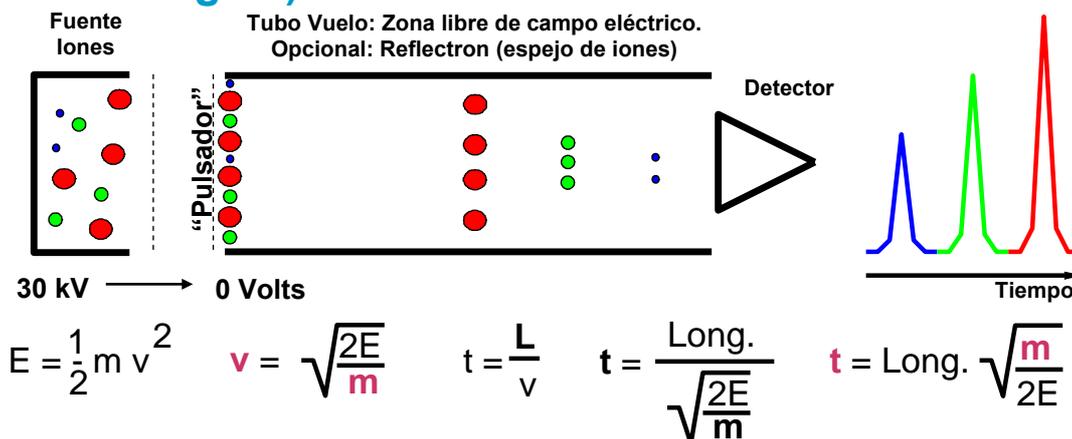
NAME: Piperazine, 1-(3-amino-4-pyridyl)-4-phenyl-  
RN: 6892-97-3

**METLIN Metabolite Database**

**+15.000 metabolitos endógenos & exógenos**

MD	Mass	Name	Formula	CAS	KEGG	Structure
204	129.0426	1-Pyridine-5-carboxylic acid, 5-hydroxy-	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> N <sub>1</sub> O <sub>3</sub>	22573-88-2		
3201	129.0426	Pyrogallanoic acid	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	84-79-1	C01578	
5769	129.0426	Pyridoxycarboxylic acid	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>			

## Fundamentos del TOF ó Tiempo de Vuelo ("Time-of-Flight")



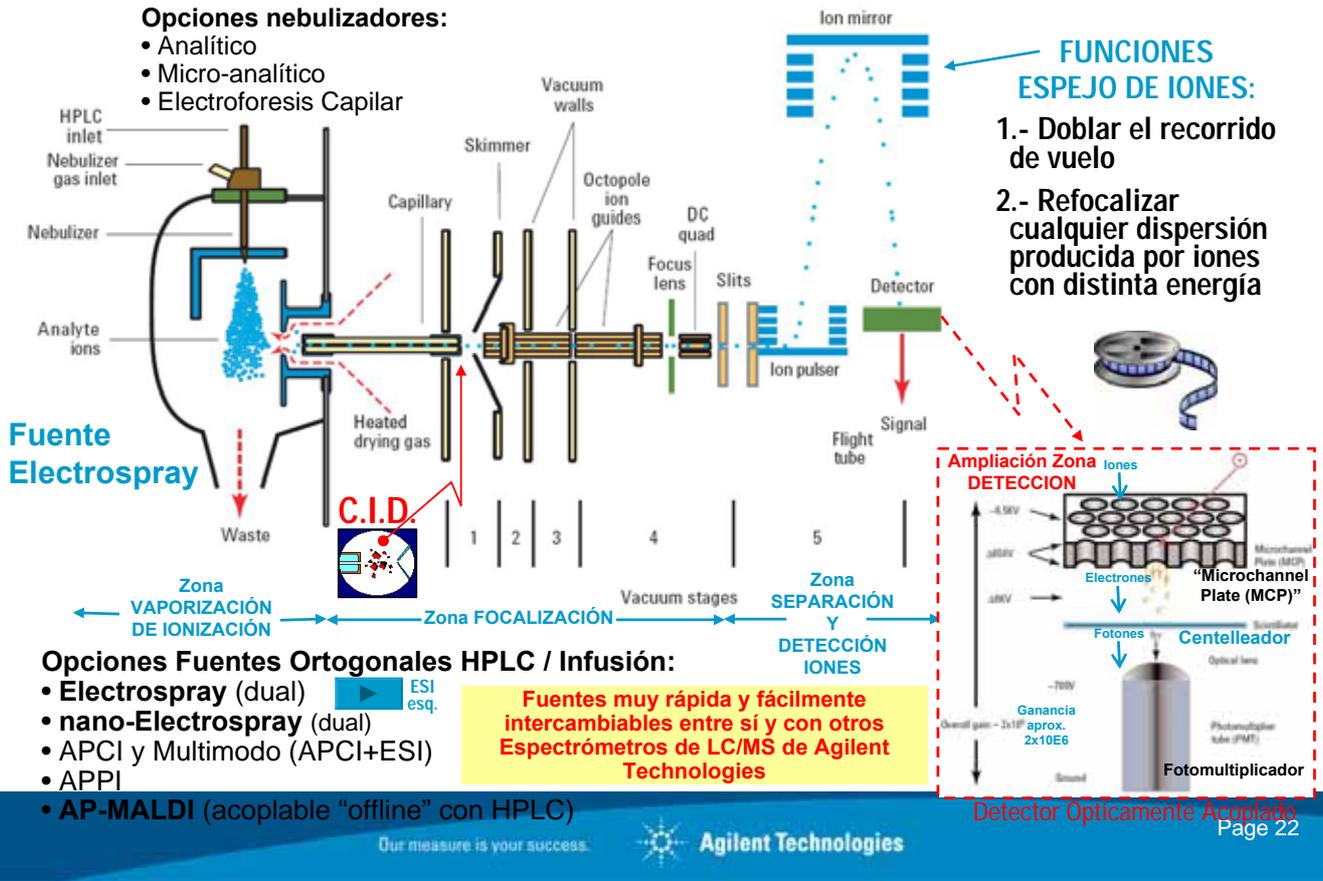
**Acercar con la misma energía a los iones procedentes de la fuente**  
**→ Los iones de distinta masa adquieren distintas velocidades y llegan al detector con distintos "tiempos de vuelo"**  
 (menor masa → mayor velocidad)

- Técnica pulsante con un intervalo típico de generación de pulsos de 100 μseg. (10.000 pulsos/s)
- Tiempos Vuelo típicos (vuelo 2m): m/z - μseg.: 118 = 20μs\*. 622 = 46μs. 3000 = 100μs.

\*velocidad 118m/z = 1000Km/seg.

- Resoluciones en el rango de ppm's requerirán la medición del tiempo de vuelo con una precisión mejor de 1 nanosegundo

# Esquema Agilent 6000 LC/MS-TOF



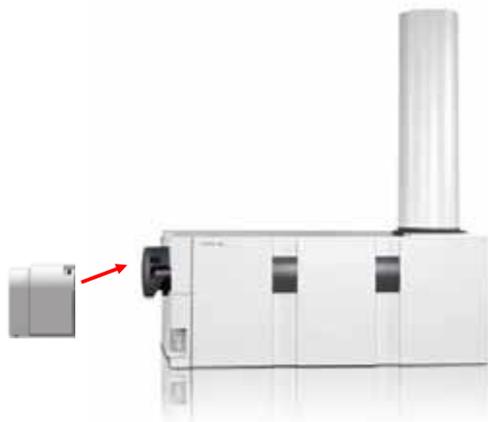
## Agilent TOF- 6520

TOF- 6210

Las mejores prestaciones del mercado:



- Sensibilidad: 10pg reserpina S/N> 10:1 p/p
- Exactitud de masa: < 2ppm
- Rango Dinámico Espectral: 5 órdenes
- Rapidez y Resolución Espectral: hasta 40 espectros /seg. a Rs >16.000



La mejor Robustez y Facilidad de uso del mercado:

- ESI con doble nebulizador
- Sistema automático suministro calibrante
- Sintonizado Automático Altas Prestaciones
- Independencia condiciones ambientales

Mass Hunter: muy potente software de análisis y "deconvolución" de datos

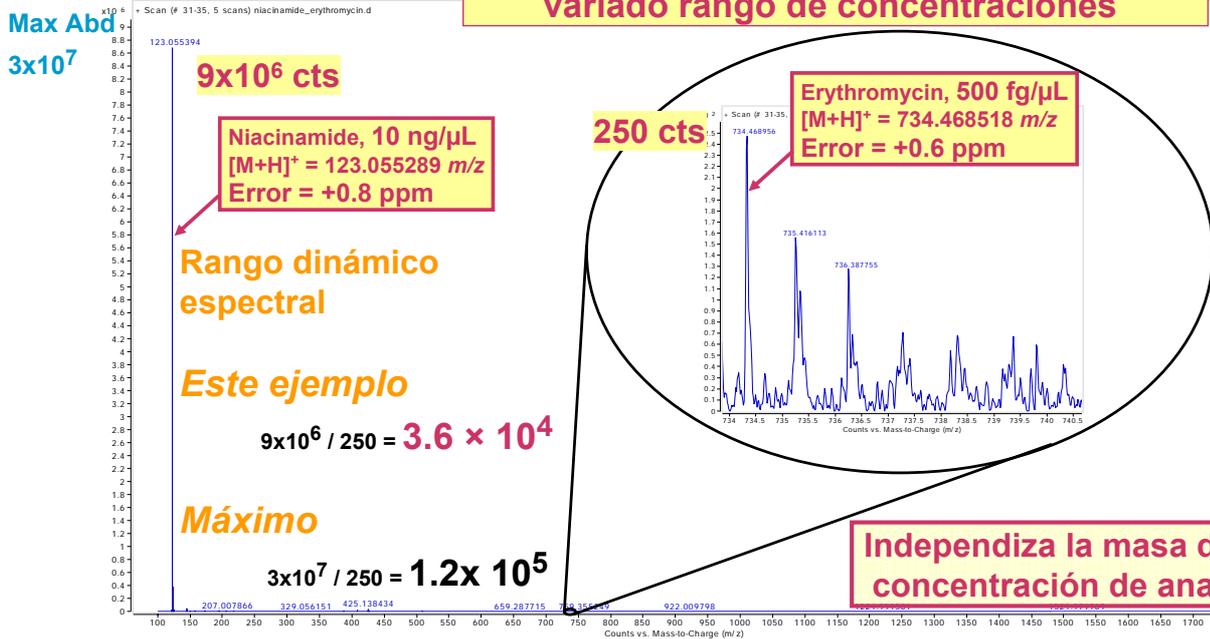
Agilent Proporciona **simultáneamente:**

- Máxima Sensibilidad, Resolución, Exactitud de Masa y Rango Dinámico
- NO requiere tomar soluciones de compromiso según prioridades

# Masa “independiente” de la concentración de analito

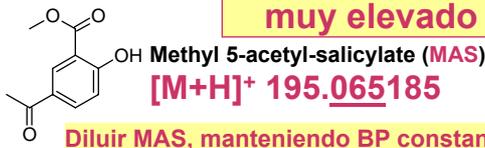
Rango Dinámico 6520-QTOF (muy diferencial): hasta 5 Décadas de Rango Dinámico Espectral

Muy importante en Metabolómica donde se medirán metabolitos con un muy variado rango de concentraciones



# Elevada Resolución Espectral para reducir interferencias de Compuestos Isobáricos

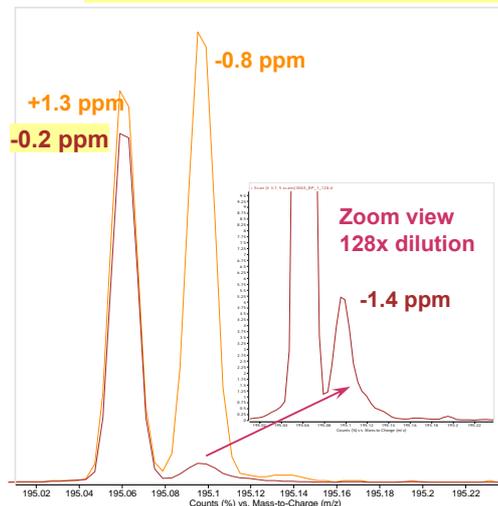
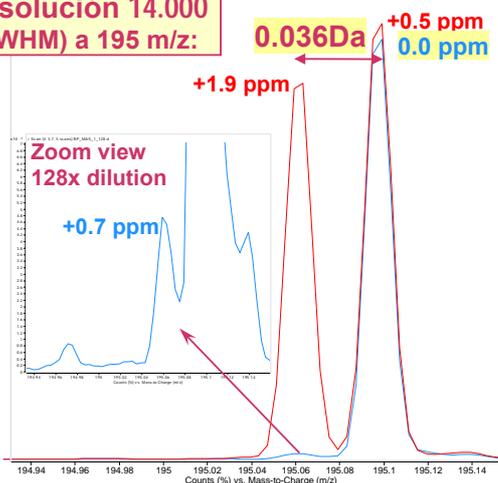
Importante en Metabolómica y matrices complejas donde se analizan muestras con un muy elevado nº de metabolitos/compuestos



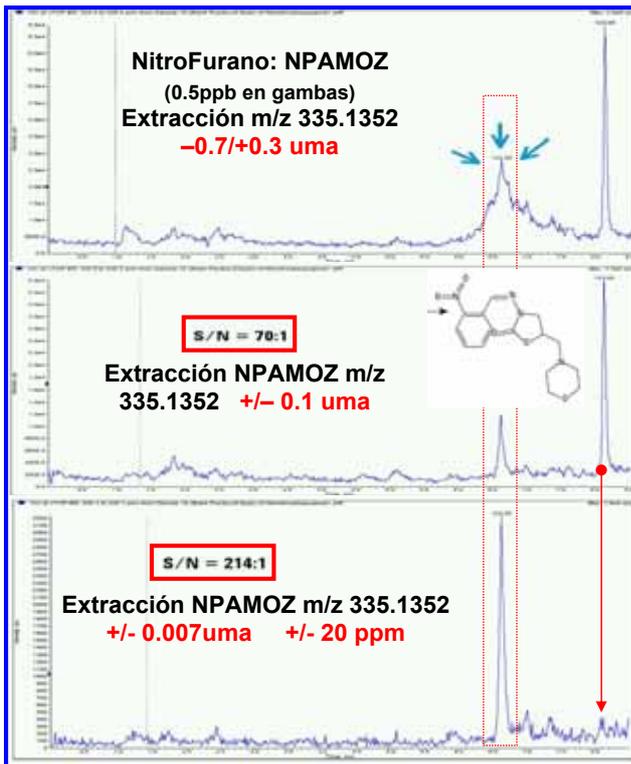
Diluir MAS, manteniendo BP constante

Manteniendo MAS constante diluir BP

Resolución 14.000 (FWHM) a 195 m/z:



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



Compuesto analizado : NPAMOZ (metabolito Nitrofurano)

Un TOF con Masa exacta permite IC con muy finas bandas de extracción permite:

- **Mejor selectividad** (semejante a MS/MS) y **sensibilidad**
- Disponer de **TODA LA INFORMACIÓN** en disco duro para reprocesarla y extraer nuevos cromatogramas iones cuando se requiera.
- Métodos de adquisición genéricos. No requiere pre-programar los iones precursores a aislar ni las transiciones a monitorizar. Por ejemplo cuantificar nuevos metabolitos no esperados después de haber ya adquirido los datos.
- Cuantificar la muestra retrospectivamente mediante factores de respuesta relativos.
- Confirmar la identificación mediante el espectro del analito **con** ("pseudo espectro MS/MS" con masa exacta) y **sin** fragmentación ("ión precursor") obtenidos con adquisición multiseñal .

**REQUIRE MASA EXACTA ROBUSTA**

## Aspectos a Considerar para una Máxima Exactitud de Masa

**Relación S/N >50:1 para una óptima exactitud de masa (<2ppm)**

(Unresolved chemical background shifts mass peak centroid. With a signal to background ratio of **10 : 1 the shift can be as high as 10 ppm**. With a signal to background ratio of **50 : 1 the shift is generally less than 2 ppm**).

**Intensidad Señal Espectros MS: >50.000** para un suficiente  $n^0$  de iones para reducir el error estadístico para una óptima exactitud de masa.

**Intensidad Señal Espectros MS/MS (Q-TOF): >3.000** para un suficiente  $n^0$  de iones para reducir el error estadístico para una óptima exactitud de masa.

**Intensidad Señal Espectros MS: < 3 x 10e6**

**Rango óptimo intensidad señal: 50.000-3.000.000**

**La separación cromatográfica es importante para evitar la coelución de masas isobáricas (muy próximas).** A resolución 10,000, una diferencia de masa entre muestra y contaminante de 50 ppm y una relación de intensidades 10:1 implica un error de 5ppm.

## Escenario 2:

Estudios Metabólicos y de Identificación por análisis diferencial



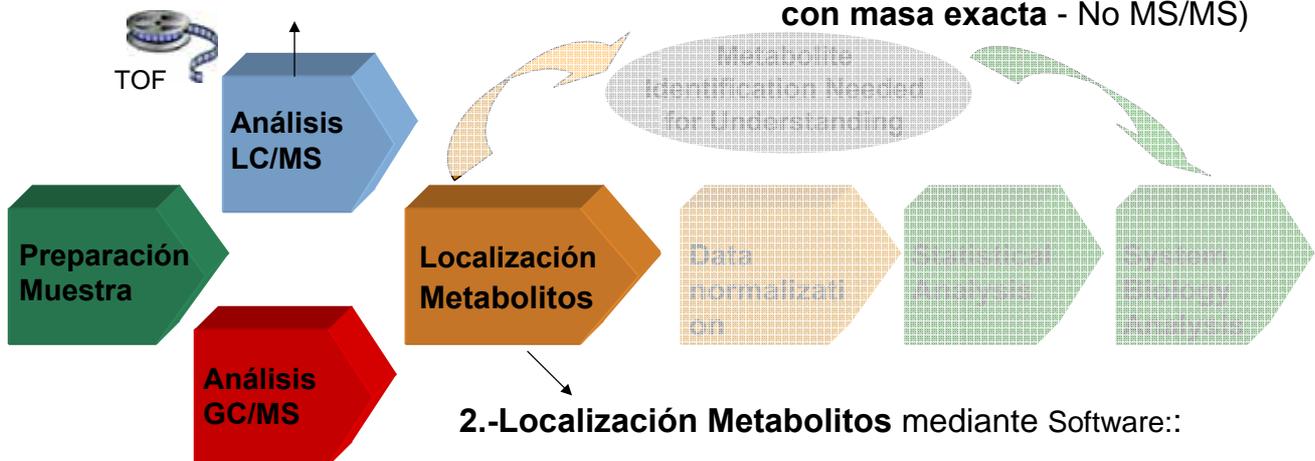
• Para Metabolómica es clave es disponer de “Masa Exacta” robusta

- Se trabaja en modo **SCAN-MS**
- Requerirá un Software Análisis Estadístico (Agilent GeneSpring MS)
- **NO es imprescindible disponer de patrones** ni de sus tiempos de retención.
- Algunos metabolitos se pueden identificar mediante **bibliotecas de masa exacta** de metabolitos.



## Fase Inicial - Determinación de los Perfiles de Metabolitos: Localización de “Todos” los Metabolitos Ionizados

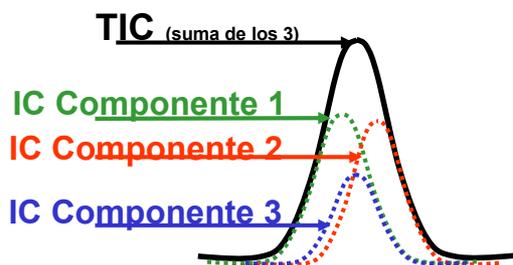
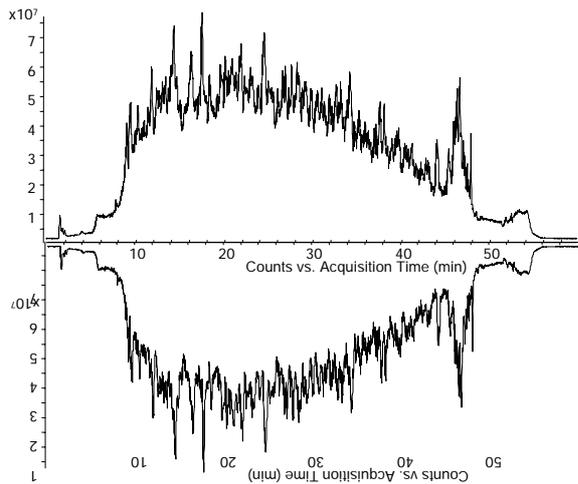
1.- Adquisición datos LC/MS con **TOF o Q-TOF** (modo barrido “Scan” MS con masa exacta - No MS/MS)



2.-Localización Metabolitos mediante Software::

- **LC/MS:** Agilent “MassHunter **Molecular Feature Extractor**” (MFE).
- **GC/MS:** librería NIST y el Agilent AMDIS & DRS (software de deconvolución e identificación)

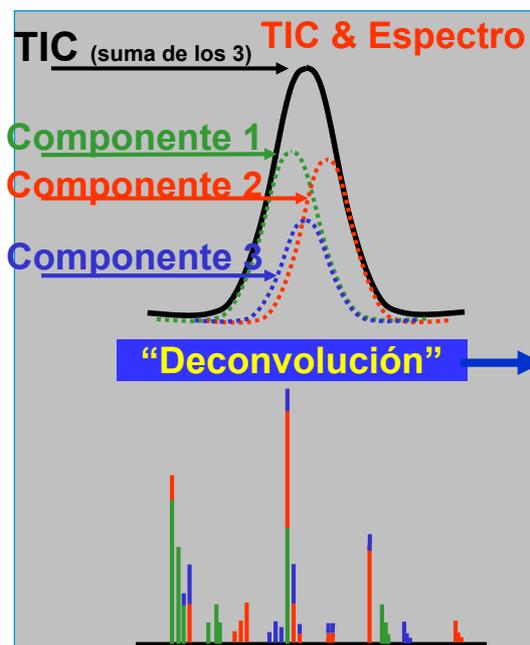
# Comparación de Perfiles de Metabolitos: ¿Dónde están las diferencias?



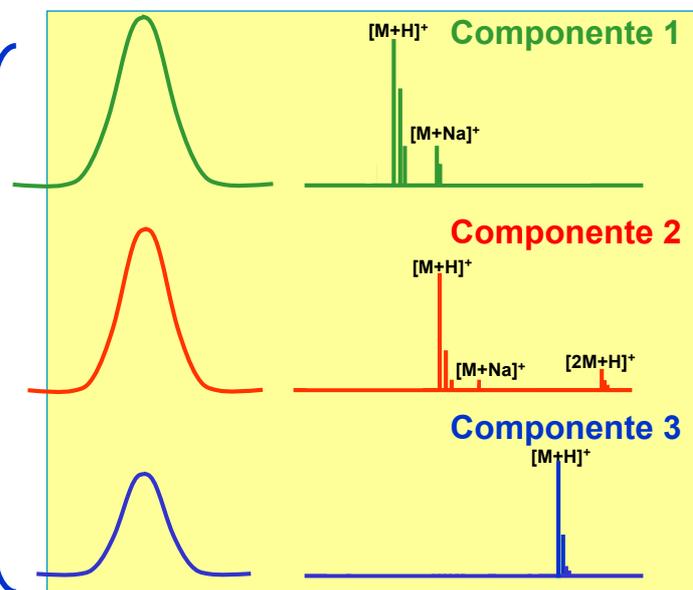
- La comparación de perfiles totales sólo sirve para ver diferencias de componentes mayoritarios.
- En muestras muy complejas incluso muchos componentes mayoritarios pueden quedar enmascarados.
- En muestras complejas es difícil conseguir una buena separación cromatográfica (especialmente HPLC – más fácil en GC). **Se requerirá de la selectividad de un MS para “resolver” los solapamientos cromatográficos**

# Extracción de los Espectros de los Componentes Individuales (“Mass Hunter Molecular Feature Extractor”)

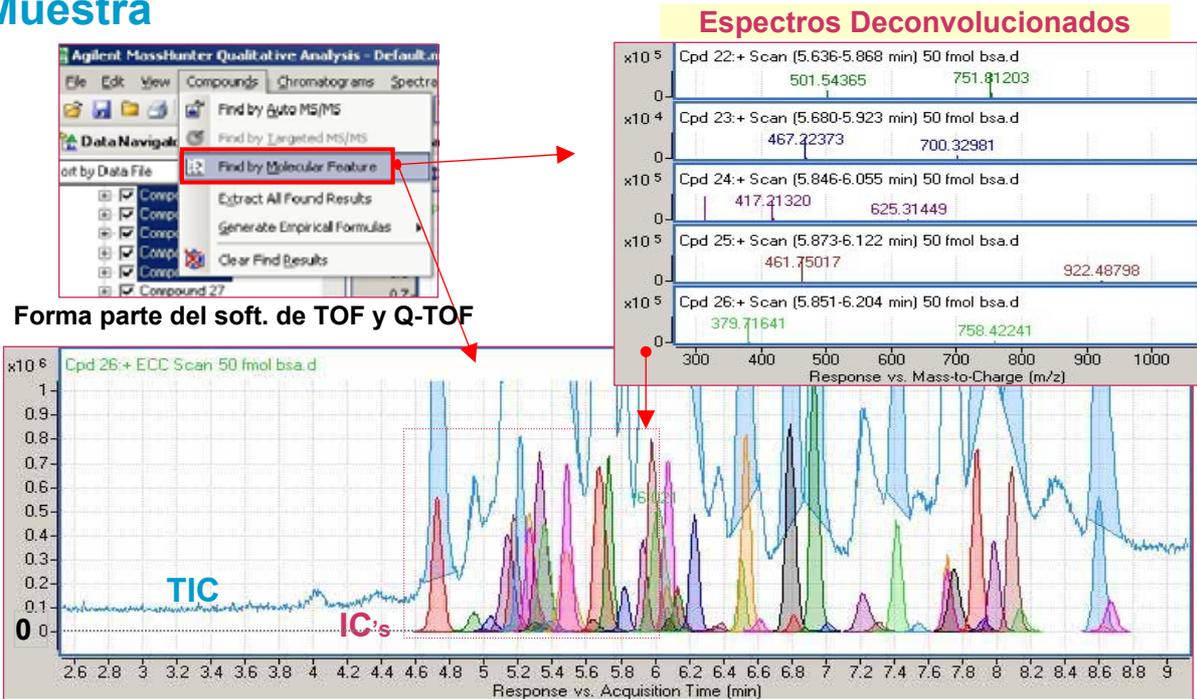
En muestras complejas 1 pico (TIC) suele estar formado por varios compuestos no resueltos y algunos del propio fondo



## 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



20m

Our measure is your success.



Agilent Technologies

Page 33

## Listado de Compuestos Detectados por el Algoritmo "LC/MS Mass Hunter Molecular Feature Extractor"

Compound Name	Retention Time	Width	Height	Area	Mass
Compound 1	4.726	0.06	222587	1071.50627	
Compound 2	4.942	0.07	34596	1050.40797	
Compound 3	5.039	0.07	36288	829.39682	
Compound 4	5.139	0.08	216915	885.40936	
Compound 5	5.176	0.06	230458	1137.49286	
Compound 6	5.184	0.05	12900	1137.48985	
Compound 7	5.213	0.05	292491	1442.63618	
Compound 8	5.268	0.07	183667	1290.59812	
Compound 9	5.269	0.08	170257	1033.4674	
Compound 10	5.296	0.07	23721	664.36901	
Compound 11	5.327	0.08	18739	784.39024	
Compound 12	5.327	0.07	28520	299.37294	
Compound 13	5.328	0.07	13209	299.70937	
Compound 14	5.329	0.08	342092	897.48015	
Compound 15	5.353	0.07	22337	745.33915	
Compound 16	5.354	0.07	188832	973.45314	
Compound 17	5.389	0.08	11982	1672.76497	
Compound 18					
Compound 19					
Compound 20					
Compound 21					
Compound 22	5.729	0.05	217935	1501.6091	
Compound 23	5.823	0.05	69618	1398.6487	
Compound 24	5.931	0.05	101357	1248.6202	
Compound 25	5.985	0.01	424550	921.48551	
Compound 26	6.021	0.10	280314	757.41799	
Compound 27	6.069	0.06	51008	911.40588	
Compound 28	6.069	0.05	69129	1120.46384	
Compound 29	6.078	0.06	206105	1748.66086	

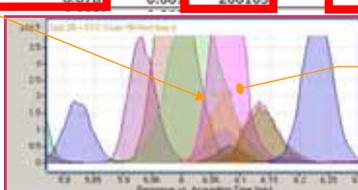
+ 20 compuestos en 1 minuto

Información comparada entre muestras: tiempo, abundancia y masa

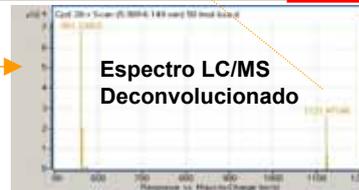
Detalle de los iones del compuesto seleccionado: Localiza y utiliza todas las m/z de los iones correspondientes al mismo compuesto para calcular su masa con la mayor exactitud posible

m/z	Abund.	Abund%	Sat.	Charge	Cluster	Mono m/z	Species	Formula
561.23915	69129	100		2	1	561.2391	(M+2H) <sup>2+</sup>	C51H76N8O14S3
561.74009	42451	61		2	1	561.2391	(M+2H) <sup>2+</sup>	C51H76N8O14S3
562.24016	20527	30		2	1	561.2391	(M+2H) <sup>2+</sup>	C51H76N8O14S3
562.74097	9895	14		2	1	561.2391	(M+2H) <sup>2+</sup>	C51H76N8O14S3
563.2419	2288	3		2	1	561.2391	(M+2H) <sup>2+</sup>	C51H76N8O14S3
563.7403	813	1		2	1	561.2391	(M+2H) <sup>2+</sup>	C51H76N8O14S3
564.23806	478	1		2	1	561.2391	(M+2H) <sup>2+</sup>	C51H76N8O14S3
572.22967	1352	2		2	2	572.2296	(M+HN) <sup>+</sup>	
572.72837	1458	2		2	2	572.2296	(M+HN) <sup>+</sup>	
573.2233	1160	2		2	2	572.2296	(M+HN) <sup>+</sup>	
1121.4714	26412	38		1	3	1121.471	(M+H) <sup>+</sup>	C51H76N8O14S3
1122.4735	3946	22		1	3	1121.471	(M+H) <sup>+</sup>	C51H76N8O14S3
1123.4718	7659	11		1	3	1121.471	(M+H) <sup>+</sup>	C51H76N8O14S3
1124.4750	2447	4		1	3	1121.471	(M+H) <sup>+</sup>	C51H76N8O14S3
1125.4743	1177	2		1	3	1121.471	(M+H) <sup>+</sup>	C51H76N8O14S3

Listado Compuestos Ionizados



Espectro LC/MS Deconvolucionado



También es capaz de detectar multímeros

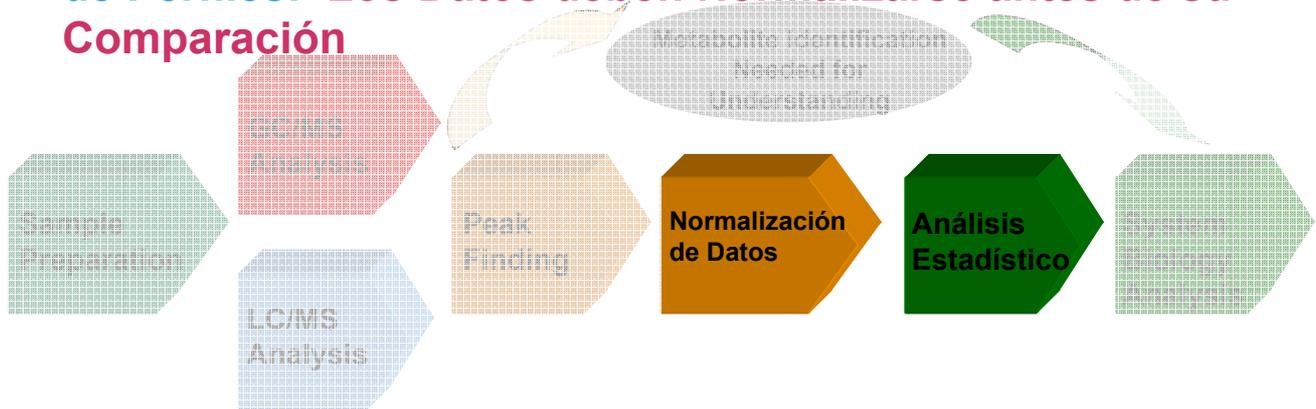
Our measure is your success.



Agilent Technologies

Page 34

## Metabolómica – Fase de Análisis Estadístico Diferencial de Perfiles: Los Datos deben Normalizarse antes de su Comparación



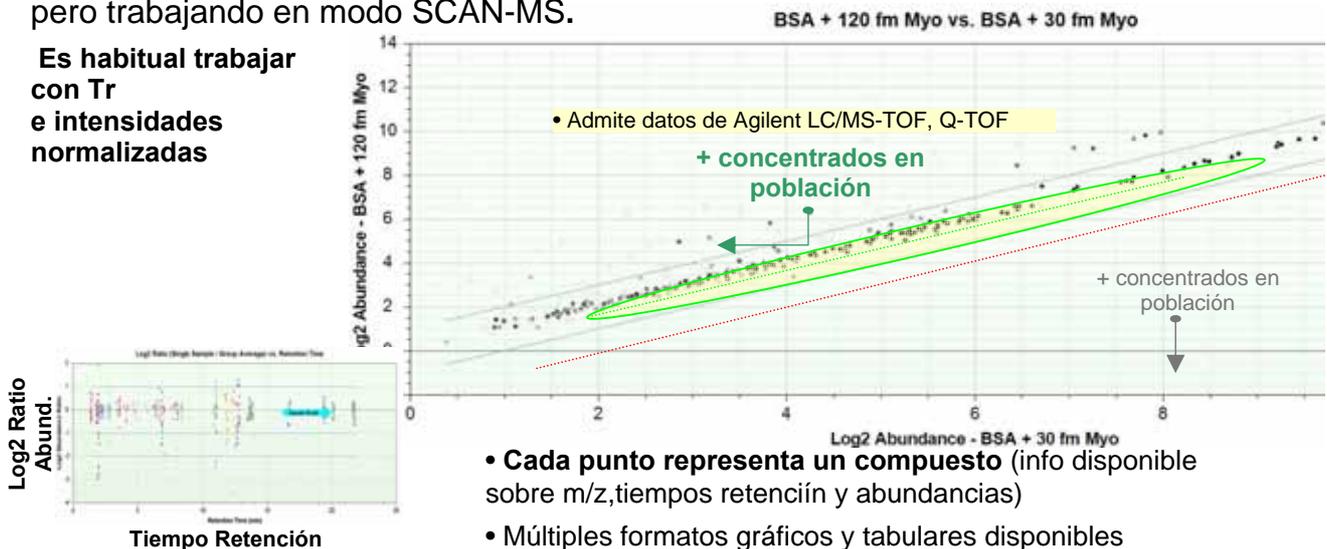
- Utilizando patrones internos se normalizarán las **intensidades** de las señales y los **tiempos de retención** (muy útil Agilent RTL en GC/MS).
- Se **alinearán las masas** de los “compuestos & metabolitos” detectados (“molecular features”).
- Se **compararán las intensidades de señal** de los compuestos **identificados** por tiempo de retención y masa exacta (en LC/MS) o por **identificación con biblioteca de espectros** (en GC/MS).

## Automatización Comparación Diferencial de Perfiles

Análisis Diferencial: **Mediante el** software “Mass Profiler” o “GeneSpring MS” **comparar las intensidades de las molecular features”** (compuestos presentes), **entre muestras problema y muestras control para poder localizar las diferencias.**

**No es necesario identificar la identidad del compuesto, basta saber su Tr y su m/z exacta** (para evitar ambigüedades y disponer de una selectividad tipo MS/MS pero trabajando en modo SCAN-MS).

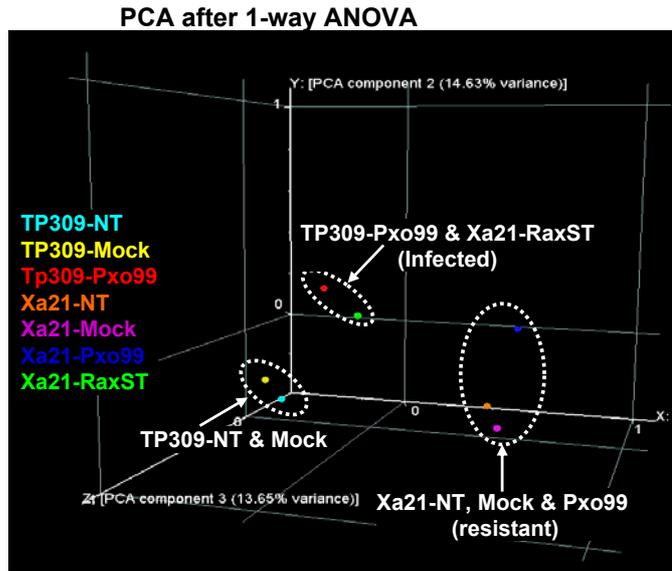
Es habitual trabajar con Tr e intensidades normalizadas



- Cada punto representa un compuesto (info disponible sobre m/z, tiempos retención y abundancias)
- Múltiples formatos gráficos y tabulares disponibles

# Comparación Estadística de Perfiles mediante **Análisis de Componentes Principales (PCA)** y **Análisis de Varianza**. “GeneSpring MS”

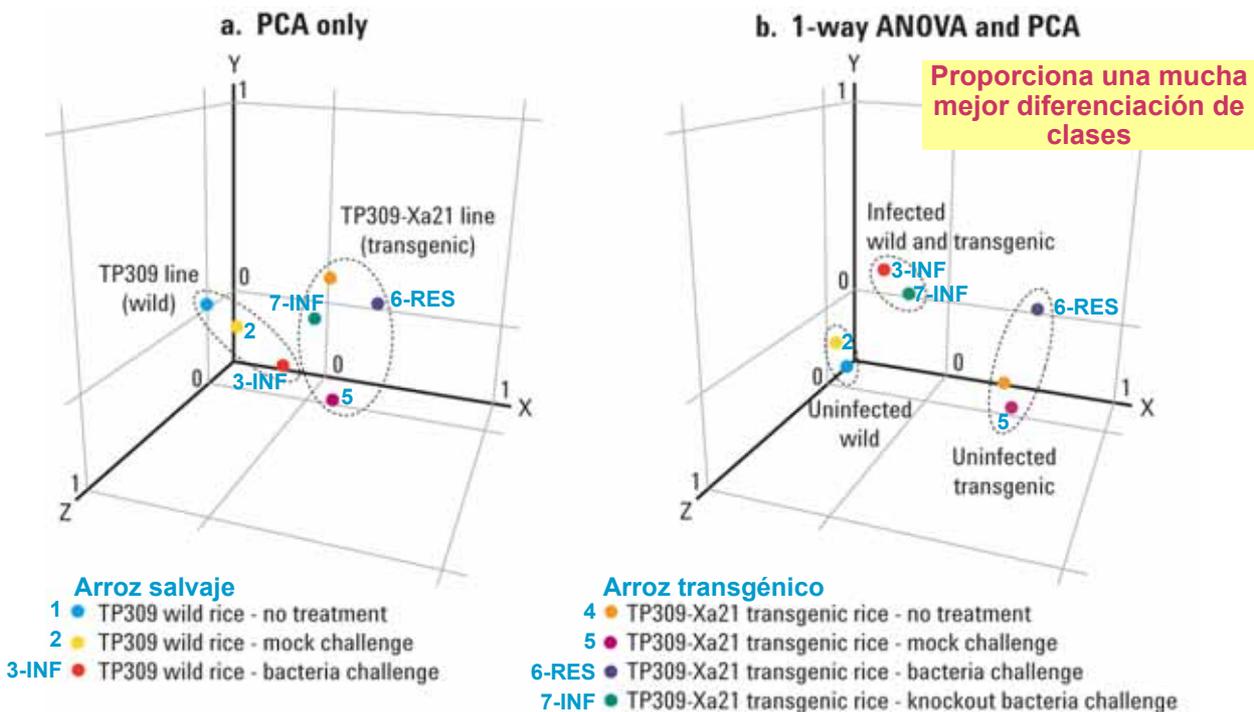
- “GeneSpring MS”: Muy avanzado software de análisis estadístico para “revelar de los miles de metabolitos cuales están **estadísticamente correlacionados con diferencias en las poblaciones** sujetas a estudio.
- Permite **Análisis de Varianza (ANOVA de 1 o 2 vías)** y de **Componentes Principales (PCA)**, comparar múltiples grupos de condiciones, poblaciones y agrupar aquellos componentes cuyos incrementos y reducciones en concentración puedan estar **correlacionadas,.....**



- Agilent LC/MS-TOF, Q-TOF & QqQ
- admite importación MS genéricos con ficheros XML y de GC/MS con AMDIS



## GeneSpring MS: Comparación del **Análisis de PCA** de todos los “Molecular Features” versus **Comparación Utilizando sólo los “significativos”** de acuerdo con un **ANOVA de 1-vía**



## Escenario 4:

### Posibilidades de los LC/MS-QTOF & TOF en “Screening” Multiresiduo



### • La Selectividad de la “Masa Exacta” permitirá efectuar “screenings” de un nº ilimitado de compuestos:

- Cualquier compuesto ionizado.
- Trabajando en modo SCAN-MS
- Sin necesidad de disponer de patrones ni de sus tiempos de retención (sólo para confirmar / cuantificar positivos)
- Sin tener que programar la adquisición de iones precursoros o segmentos en el tiempo (métodos adquisición genéricos)
- Utilizar bases de datos de masa exacta ( $T_r$  es opcional)
- Cuantificar con 5 órdenes de rango de linealidad con

Agilent Technologies  
TOF-6220 & QTOF 6520

## Análisis Posterior de Compuestos No Esperados



# Análisis Posterior de Compuestos No Esperados

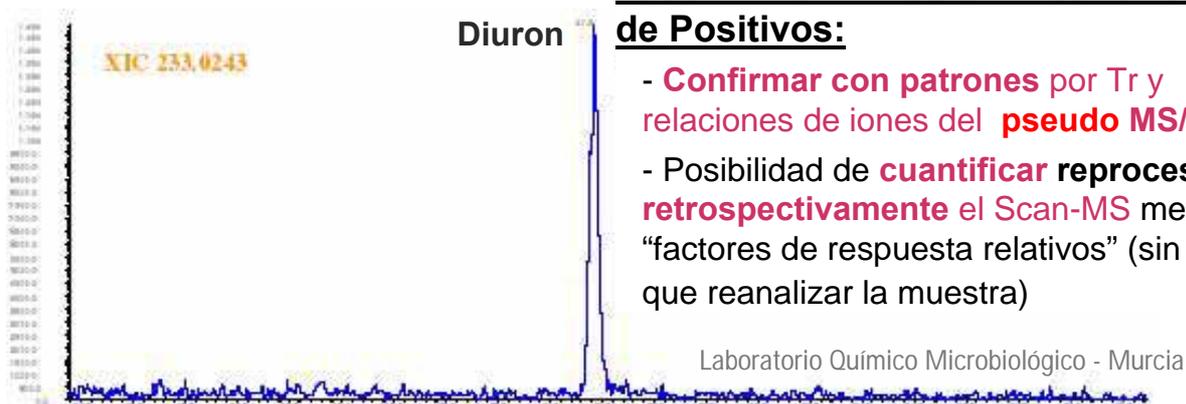
## DIURON

Fórmula empírica: C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O

Masa Exacta : 243.0243 (El software incluye una calculadora de masas)

### Fase 1.- Localización de Potenciales Positivos:

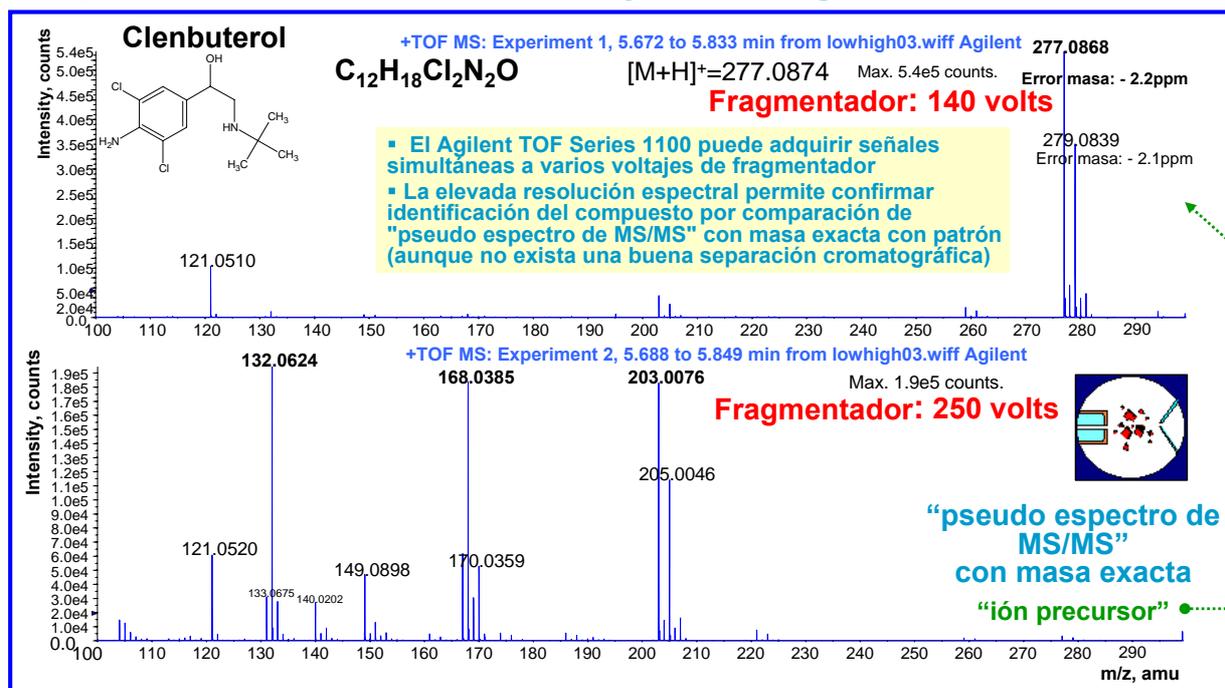
- Extraer IC's de "masa exacta" (muy finas ventanas de extracción)
- **NO se requieren patrones.**



### Fase 2.- Confirmación /Cuantificación de Positivos:

- **Confirmar con patrones** por Tr y relaciones de iones del **pseudo MS/MS**
- Posibilidad de **cuantificar** reprocesando **retrospectivamente el Scan-MS** mediante "factores de respuesta relativos" (sin tener que reanalizar la muestra)

## Confirmación Identificación con LC/MS-TOF por Espectros Simultáneos Con y Sin Fragmentación



Espectros Clenbuterol: en canal a bajo fragmentador se observa el "ión precursor" aislado cromatográficamente. En el de elevado fragmentador (fig. inferior) se puede observar el "pseudo espectro de MS/MS" obtenido por Disociación Inducida por Colisión (CID)

# Automatización “Screening” Multiresiduo : Creación de Bases de Datos

## Consideraciones generales

- 1) Las Bases de Datos NO SON de ESPECTROS (como es habitual en MS) sino de FORMULAS EMPIRICAS /”Masa Exacta”.
- 2) Para la creación de las bases de datos sólo se necesita conocer la FORMULA EMPIRICA y su masa exacta de cada compuesto
- 3) No se necesitan estándares, ni la inyección de los mismos
- 4) La herramienta de creación de las bases de datos es EXCEL
- 5) Si se emplean condiciones estandarizadas de análisis para mantener los tiempos de retención constantes, se podrá incorporar el TIEMPO de RETENCION a la base de datos como medio de confirmación adicional
- 6) La búsqueda también se puede efectuar previa aplicación del software de deconvolución Agilent “Molecular Feature Extractor” (MFE)



## Ejemplo Base Datos Fichero Excel (formato CSV)

Fórmula	T <sub>r</sub> (opt)	Masa Exacta	Nombre	Comentarios
C11H19N5	21.2	253.13557	Irgarol	
C7H5N2O3	19.2	253.9661257	Fluroxypyr	
C9H10N5O	16	255.0523023	Imidacloprid	
C11H10N2	14.6	256.0170184	Imazalil Degradate	
C11H15NC	15.2	257.0721787	Ethiofencarb sulfone	
C11H15NC	17.7	257.0721787	Methiocarb sulfone	
C9H11N2O	22.1	258.0003902	Metobromuron	
C9H13N2O	18.5	260.0160403	Bromacil	
C13H15N3	13.7	261.1113414	Imazapyr	
C12H15N3	18.1	265.0884974	Albendazole	
C14H20NC	26.1	269.1182566	Acetochlor	
C10H13N	26.1	147.1042509	Acetochlor Fragment Ion	
C14H20NC	26.1	269.1182566	Alachlor	
C11H15N	26.1	161.119901	Alachlor Fragment Ion	
C11H15N4	11.9	270.0878	Nitenpyram	
C7H3NOB	21.7	274.8581389	Bromoxynil	
C12H18NC	24.3	275.0746772	Dimethenamide	
C14H18N2	19.1	278.1266	Oxadixyl	
C12H14N2	19.1	218.105	Oxadixyl Fragment Ion	
C15H21NC	21.5	279.1470582	Metalaxyl	
C13H19N3	30.2	281.1375561	Pendimethalin	
C8H9N3O4	30.2	211.0587573	Pendimethalin Fragment Ion	
C15H22NC	25.9	283.1339067	Metolachlor	
C16H18N2	21.6	286.1317425	Difenoxuron	
C12H21N2	21.1	288.1238937	Diazoxon	
C15H15N2	23.6	290.0822054	Chloroxuron	
C10H14NC	27.3	291.033	Parathion Ethyl	
C15H18N3	23.6	291.1138399	Cyproconazole	
C9H10N2O	24.01	291.9614179	Chlorbromuron	
C16H13N3	18.4	295.0956913	Mebendazole	
C14H14N2	18.1	296.0483185	Imazalil	
C18H35NC	19.7	297.2668	SPIROXAMINE	

Fragment Ion

• El desarrollo de la base de datos es fácil y GRATUITA.

• Sólo requiere conocer los PM exactos de los compuestos de interés

• Tiempo de retención opcional.



# Selección Parámetros “Screening”

Data Analysis Method Editor - C:\Program Files\Agilent\TOF Software\damethods\mol feature.am

File Edit Help

Properties | **Molecular Feature Extraction**

Report Type | Processing Options | Adducts | Formula Generation | **Confirmation Screening** | Report Options

Formula database: jre\databases\formulae\Pesticide\_dbase\_600.csv Browse...

Mass tolerance: 5 ppm

Retention time tolerance: -1 min

Positive neutral loss:  H<sub>2</sub>O  Cl Add Remove

Negative neutral loss:  H<sub>2</sub>O  Cl Add Remove

Report options: Sort results by: mass error

Automated Screening of 600 Pesticides in Food by LC/TOF MS Using a Molecular-Feature Database Search Application  
Food Safety  
Authors: J. Michael Thomas and James Foster  
Pesticide Residue Research Group  
University of Almería

**Automated Screening of 600 Pesticides in Food by LC/TOF MS Using a Molecular-Feature Database Search**  
Search p/n: 5989-5496EN - Pesticide Residue Research Group - University of Almería (grupo Amadeo Rodríguez)

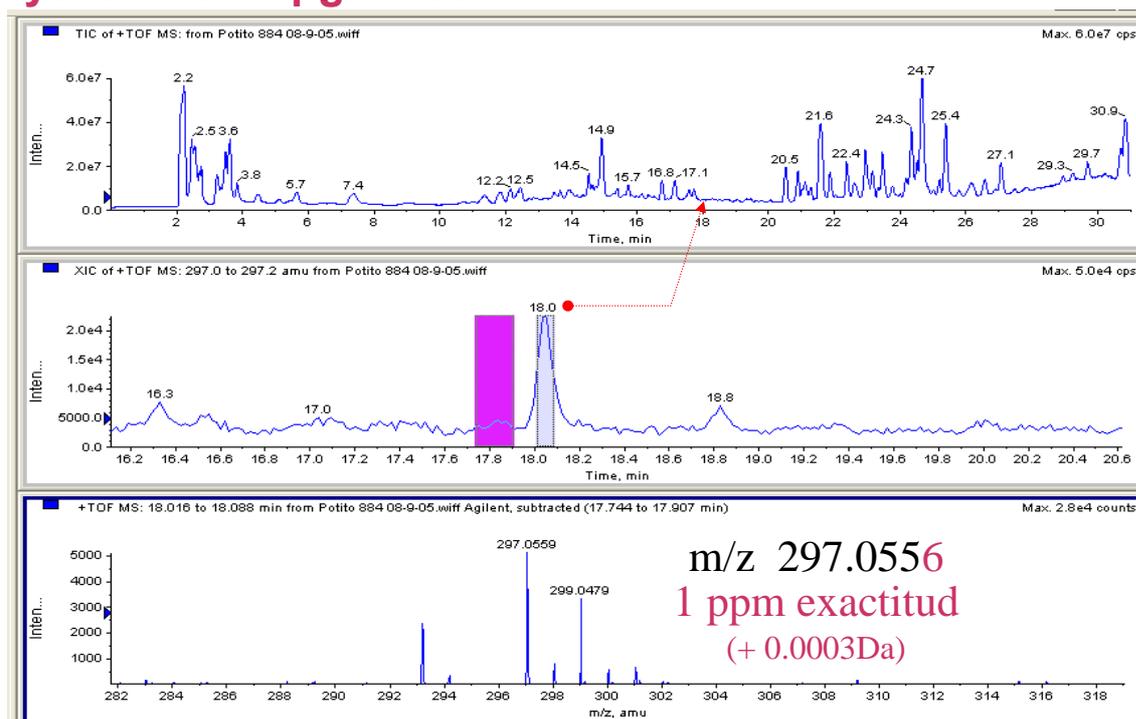
30m

Our measure is your success.



Page 46

## Imazalil en “Babyfood”(pera+naranja+plátano): inyectados 25 pg en columna!



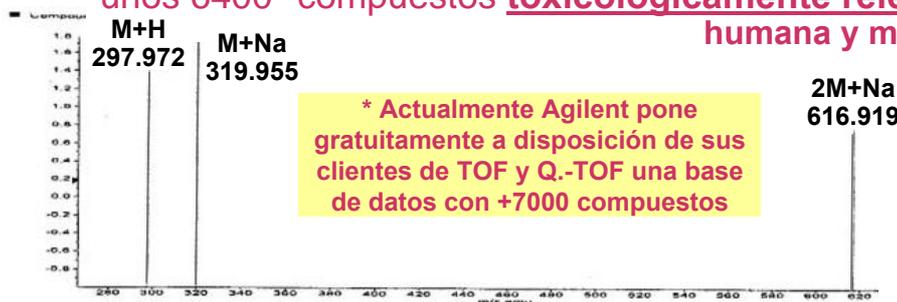
Our measure is your success.



Page 47

# LC/MS-TOF & Q-TOF: “Screening“ de un muy elevado n° de compuestos mediante “Masa Exacta” : Fármacos, Drogas de Abuso, Pesticidas, Disruptores,....

Loa autores abajo indicados han creado una base de datos con unos 6400\* compuestos toxicológicamente relevantes (salud humana y medio ambiente)



\* Actualmente Agilent pone gratuitamente a disposición de sus clientes de TOF y Q.-TOF una base de datos con +7000 compuestos

Experiment#: 1 Compound#: 1035 Mass: 296.96572

Mass Value = 296.96572				
#	Ion	Retention Time	Mass	Volume
1	M+H	2.34	297.9723	1.43
1	M+Na	2.34	319.95498	1.77
1	2M+Na	2.34	616.91872	0.78

**Autores:** J. Hallbach, A. von Meyer, **Clinical Chemistry Dept., Municipal Hospital, Munich,** F. Pragst, Charité , **Universitätsmedizin Berlin, Institute of Forensic Medicine, Berlin,** Germany B. Wüst, L. Bonnington, E. Nägele, **Agilent Technologies, Germany**

Mass Value = 296.96572							
#	Formula	Compound	Mass	Error (mDa)	* Error (ppm)	Ret. Time Error	Description
1	C7H8N3O4S2Cl	Hydrochlorothiazide	296.96447	1.25	4.2	-	Diuretikum

• “Accurate molecular mass determination by HPLC-ESI-MS-TOF in **clinical toxicology**” (5989-5916EN).

## Disponibilidad de Base de Datos Toxicología con “Masa Exacta” de +7.000 compuestos incluyendo Fármacos, Pesticidas,.....

Formula	Mass	Compound name	Description
C10H11NO	161.08406	Abikoviromycin	Virucide
C30H40O6	496.28249	Absinthin	Biomolecule
C25H43NO18	645.24801	Acarbose	Enzyme inhibitor
C29H48O2Br2	586.20211	Acebrochol	Hypnotic
C6H10O4	146.05791	Aceburic acid	Analgesic
C18H28N2O4	336.20491	Acebutolol	Beta-Blocker
C15H23N3O2	277.17903	C12H12N2O3	232.0848 Dazoxiben
C9H15N2O3Br	278.02661	C14H10Cl4	317.9537 DDD, o,p' -
C9H15NO2	169.11028	C14H10Cl4	317.9537 DDD, p,p' -
C16H13NO4Cl2	353.02216	C14H8Cl4	315.938 DDE, o,p' -
.....		C14H8Cl4	315.938 DDE, p,p' -
		C14H9Cl3	281.977 DDMU
		C14H12OCl2	266.0265 DDOH-4,4'
		C14H9Cl5	351.9147 DDT, o,p' -
		C14H9Cl5	351.9147 DDT, p,p' -
		C4H11NO	89.08406 Deanol

Base de datos con +7000 compuestos toxicológicamente relevantes

Pesticidas

# Escenario Proteómica :

- Identificación de Proteínas en complejas mezclas. Localización e identificación de modificaciones post-traduccionales,...

- Cuantificación de proteínas, determinación de su masa, secuenciación de péptidos



**HPLC-Chip/QTOF la más avanzada nanotecnología para proteómica**

• Disponer de **MS/MS con “Masa Exacta”** mejora la fiabilidad de los resultados

• Se trabaja en modo **Auto MS/MS**

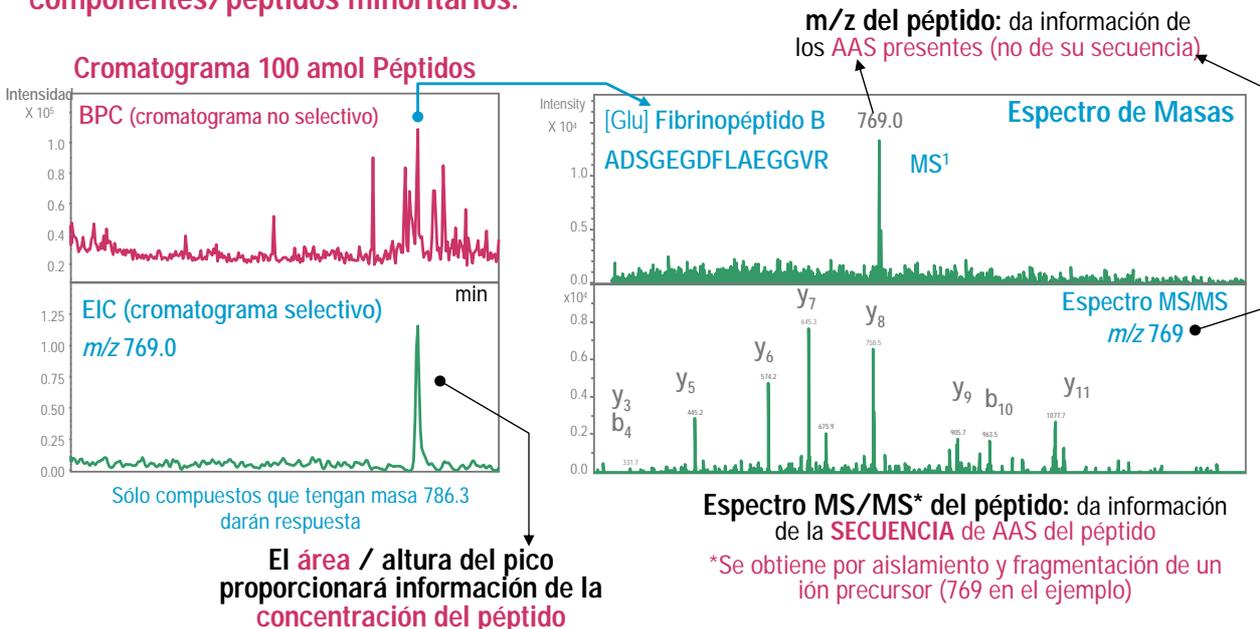
• Requerirán **Softwares Bioinformáticos tipo Spectrum MIII**, que incluyan motor de búsqueda en base de datos de proteínas, comparación de expresión diferencial, secuenciación Denovo, deconvolución iones con múltiples cargas, admita datos de múltiples fabricantes y equipos,.....



**Agilent Technologies**

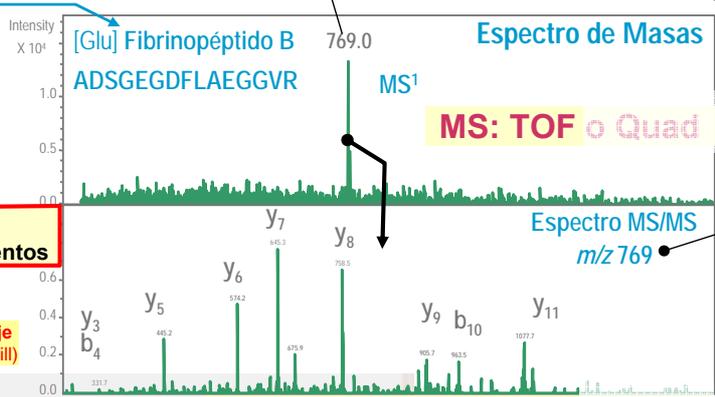
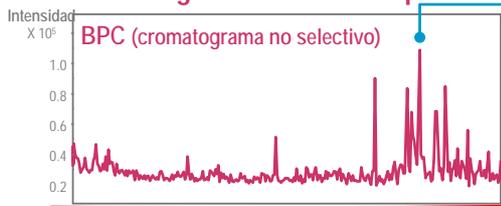
## ¿Qué Información Proporciona la Espectrometría de Masas y su Acoplamiento con HPLC ?

• La cromatografía permitirá que los diversos componentes de una muestra (p.e. péptidos) lleguen a distinto tiempo al detector **facilitando así la detección de componentes/péptidos minoritarios.**



# ¿ Qué es un Motor de Búsqueda ?

**Mezcla Proteínas Digerida**  
Cromatograma 100 amol Péptidos



**Motor Búsqueda** ← Masa Exacta  
← Masa+Fragmentos

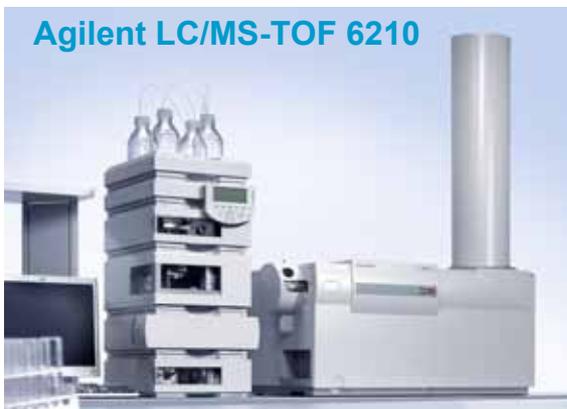
Nivel Expresión sin marcaje isotópico (diferencial de SPMill)

Group (F)	Spectra (F)	Distinct Peptides (F)	Summed MS/MS Search Score	% AA Coverage	Mean Peptide Spectral Intensity	Protein MW (Da)	Database Accession #	Protein Name
1	60	371	14	93	4.8e+08	46914.4	6321968	ENOLASE 2 (D-PHOSPHOGLYCERATE DEHYDRATASE) (D-PHOSPHO-D-GLYCERATE HYDRO-LYASE)
2	40	323	91	50	3.3e+08	44730.6	Y0383781	Phosphotyrosine kinase
3	39	223	06	48	2.0e+08	39621.0	6322790	FRUCTOSE BIPHOSPHATE ALDOSE
4	50	220	72	82	3.7e+08	35748.8	6321681	GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE (GAPDH)

**Proteínas identificadas**

**Agilent Spectrum Mill**

## TOF “versus” TRAP



El poder de la “Masa Exacta” versus Capacidad MS<sup>n</sup>

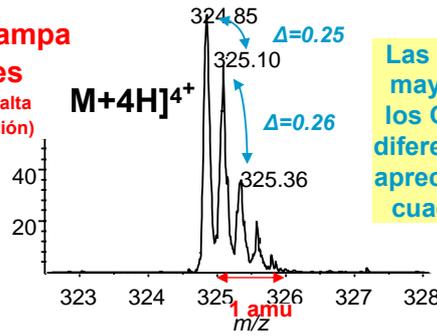
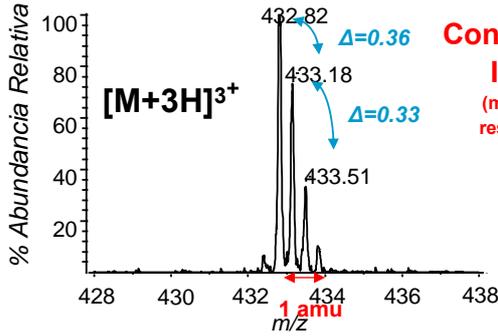


Agilent Series 6000 CE/MS-TOF (-TRAP -QUAD)

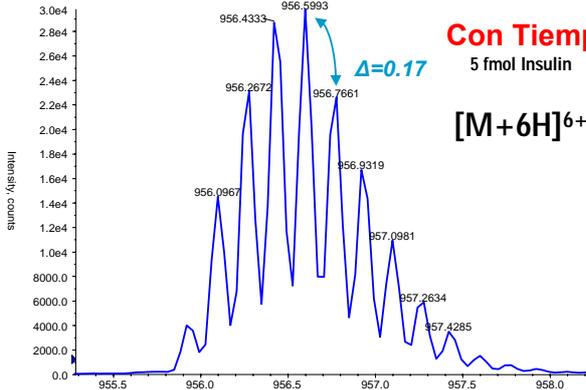
# Comparación Resolución Espectral: TRAP vs TOF

Iones con 3 cargas:  $\Delta m/z = 0.33$

Iones con 4 cargas:  $\Delta m/z = 0.25$



Las "Trampas" ofrecen mayor Resolución que los Cuadrupolos. Estas diferencias no se pueden apreciar en sistemas con cuadrupolo (Q y QQQ)



Con Tiempo de Vuelo (TOF)

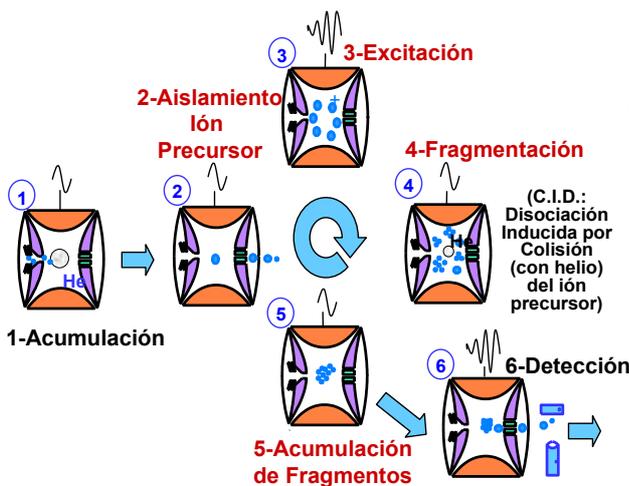
[M+6H]<sup>6+</sup>

[M+4H]<sup>4+</sup>

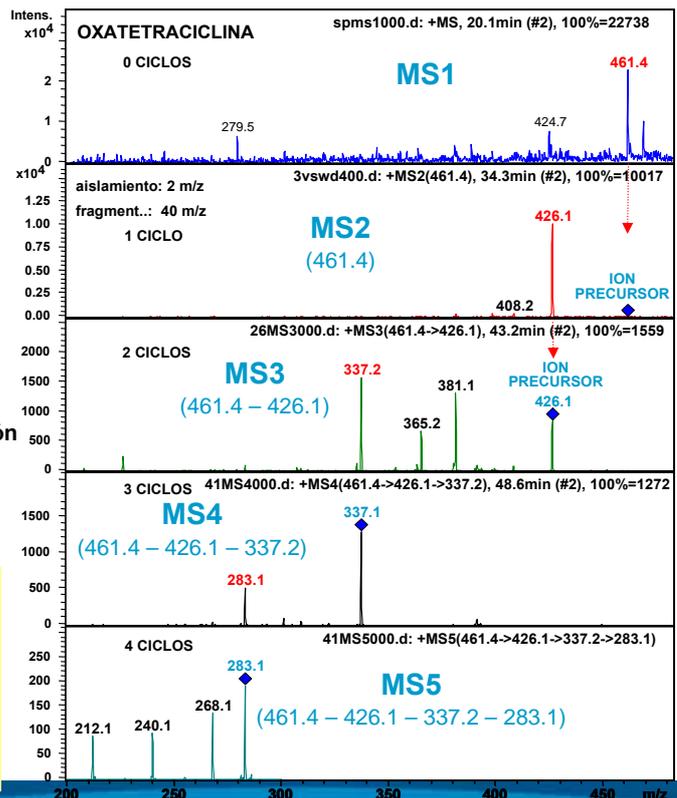
Los TOF proporcionan mayor Resolución que los sistemas con Trampa o con Cuadrupolo. Además pueden llegar a proporcionar "masa exacta"

# Trampas de Iones: Obtención Espectro MS<sup>n</sup>

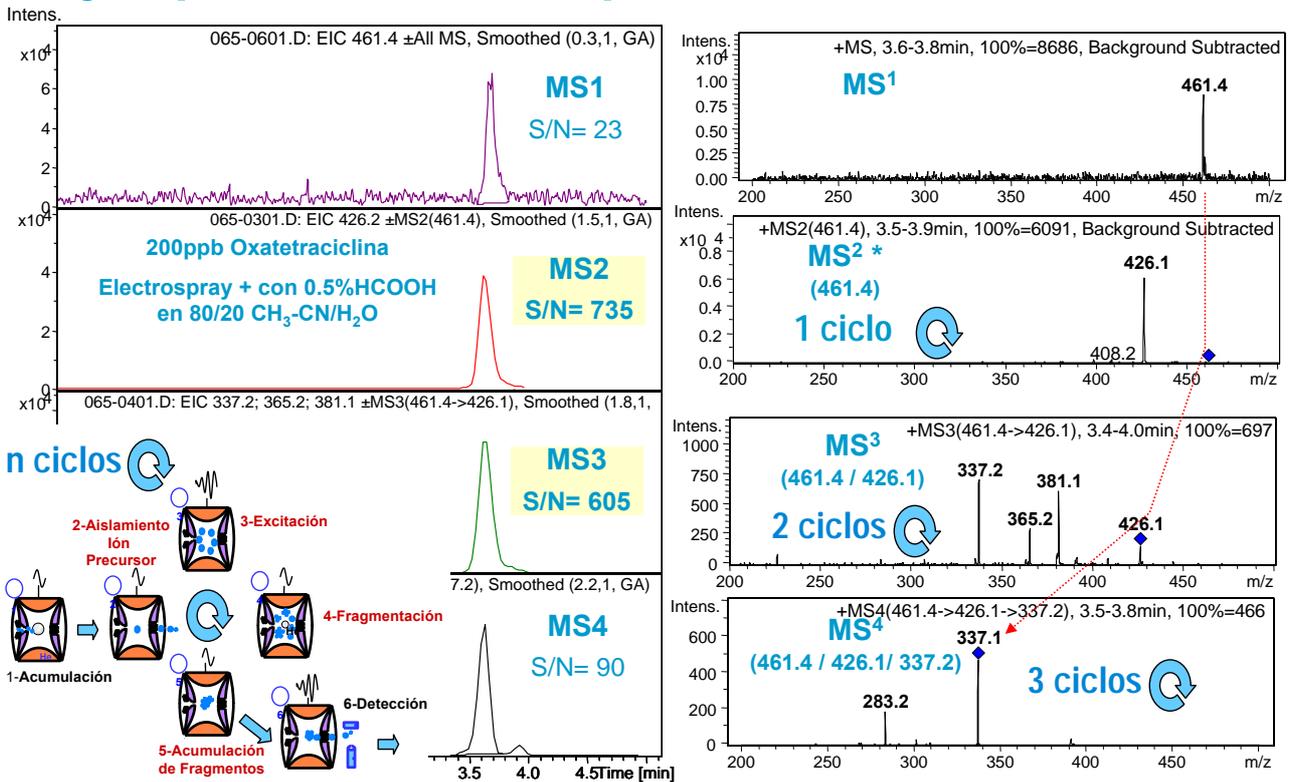
1 Acumulación + N ciclos = 1 espectro MS<sup>N+1</sup>



La energía de Fragmentación se aplica selectivamente. Sólo la recibe el Ión Precursor o rango de iones que interese fragmentar, y así **facilita enormemente la interpretación espectral** al saberse de donde procede cada ión



# Ejemplo Obtención Espectros LC/MS<sup>n</sup>

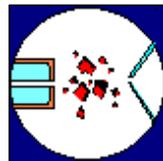


En LC/MS la gran selectividad proporcionada por MS2 y MS3 suele proporcionar una mejor sensibilidad en la detección de picos minoritarios

\* MS2: Ión precursor 461.4 aislando 2m/z. Frag.: 3.01v aplicado a 40m/z "cut-off": 210

## CID en TOF y TRAP: mecanismos de Fragmentación Distintos.

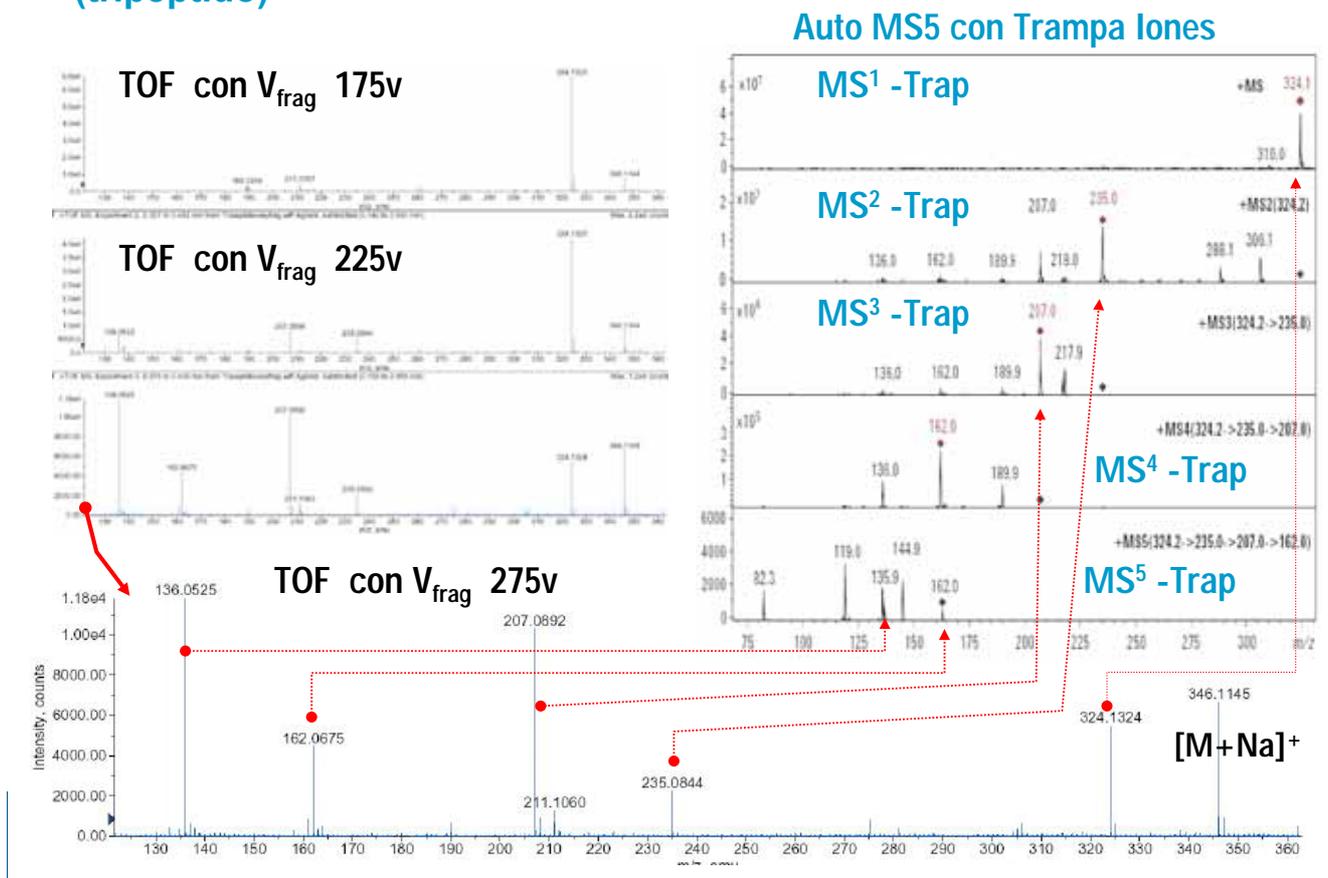
Genérico en TOF: "rompe todo" como en una celda de colisión de QTOF o QQQ → pseudo MS/MS con mayor n° de fragmentos (iones)



Selectivo en TRAP: sólo rompe ión precursor. → MS/MS con menor n° de fragmentos habitualmente más intensos)



# Auto-MS<sup>5</sup> (TRAP) “versus” CID-TOF: Antibiótico Bialaphos (tripéptido)



## TOF “versus” TRAP

TOF da masa exacta pero NO MS<sup>n</sup>.

TRAP da MS<sup>n</sup> pero NO masa exacta.

La combinación TOF-TRAP permitirá obtener la masa exacta de bastantes de los iones producto del MS<sup>n</sup>

El rango de masa del TOF es más amplia y su sensibilidad menos “masa dependiente”. La trampa al alejarse de la “target mass” dará menor sensibilidad.

La trampa es más sensible que el TOF para moléculas con pocas cargas, pero más “entorno dependiente”.

El TOF es más sensible para iones con muchas cargas como proteínas en ESI

La selectividad del “IC exacto” de un TOF permite cuantificar muchos más compuestos por segmento de tiempo que el modo target MS/MS de la trampa

# Preparación de la Muestra y Selección de Fases Móviles



## Consideraciones Genéricas en la Preparación de una Muestra para analizar por LC/MS

El disolvente de la muestra a utilizar dependerá de ésta y de la técnica de ionización utilizada.

Las características de la muestra (solubilidad/ termolabilidad/ volatilidad/ concentración...) pueden limitar el uso de algunas técnicas de ionización

Dependiendo de la información espectral que se requiera y -de las características de la muestra y de su matriz- convendrá utilizar una u otra técnica de introducción de muestra al MS.

**Sólo si se consigue ionizar la muestra se podrá analizar por MS**

La química del analito juega un papel esencial en el proceso de su ionización

**Cuando mayor sea el conocimiento de la muestra a analizar mejores serán los resultados obtenidos**



# Información Requerida para una Correcta Preparación de una Muestra a Analizar por LC/MS

Información “necesaria” para el analista:



- ???
- ¿Soluble en soluciones acuosas?
  - ¿La molécula es ionizable?
  - ¿Descompone térmicamente?
  - ¿Tiene una cierta volatilidad?
  - ¿M esperado?
  - ¿Qué tipo de información interesa?
  - ¿pK?
  - ¿Qué interfase puede ser la más adecuada?
  - ¿La solución contiene sales alcalinas?

## Información Útil para el Analista

¿La muestra soluble en medios acuosos? ó ¿Requiere disolventes NO polares?

¿En que rango de pH's estará la muestra ionizada y con que carga (+/-)?  
¿Se conoce su pK, (su potencial de ionización:APPI),...?

¿Termolabilidad y volatilidad de la muestra?

¿Rango de masas esperado?

¿La solución de la muestra contiene cationes alcalinos, sales no volátiles, reactivos de par iónico, tensoactivos,.....?

¿Cantidad de analito disponible?

En general unos pocos ng/μl (unas pocas ppm) es suficiente para trabajar con muy buena señal.

Para MS<sup>n</sup> con infusión: 500μl de una solución adecuada suelen ser suficientes para “extensivos” experimentos de MS<sup>n</sup> (> 30-60 minutos infusión)

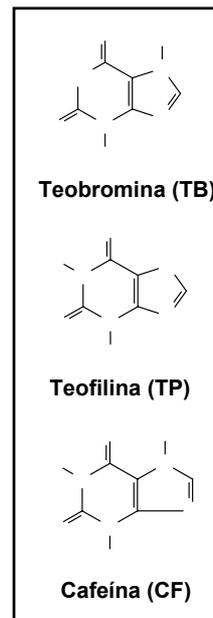
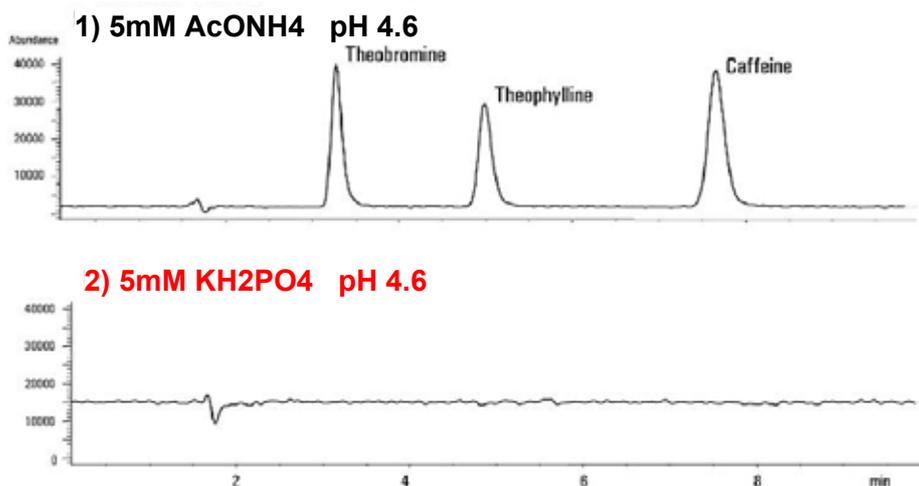
En el mejor de los casos (condiciones óptimas - equipo en buen estado – disolventes de muy elevada calidad) con unos pocos μl y unos pocos pg de analito puede ser suficiente para obtener un MS1 ó MS2.

En MS<sup>n</sup> a medida que aumenta el valor de n, se requerirá una mayor cantidad inicial de analito.

¿Qué tipo de información interesa? ¿En Auto MS<sup>n</sup>: iones preferentes, a excluir,...?

¿Qué fuente de ionización puede ser la más adecuada?

# Comparación entre Tampón Volátil y NO Volátil (ambos a pH 4.6)



### Condiciones HPLC:

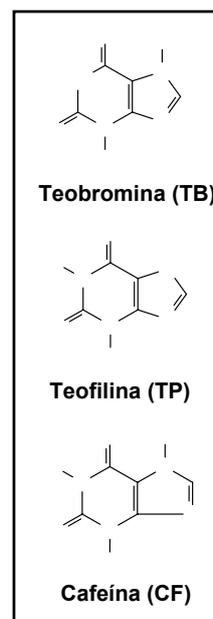
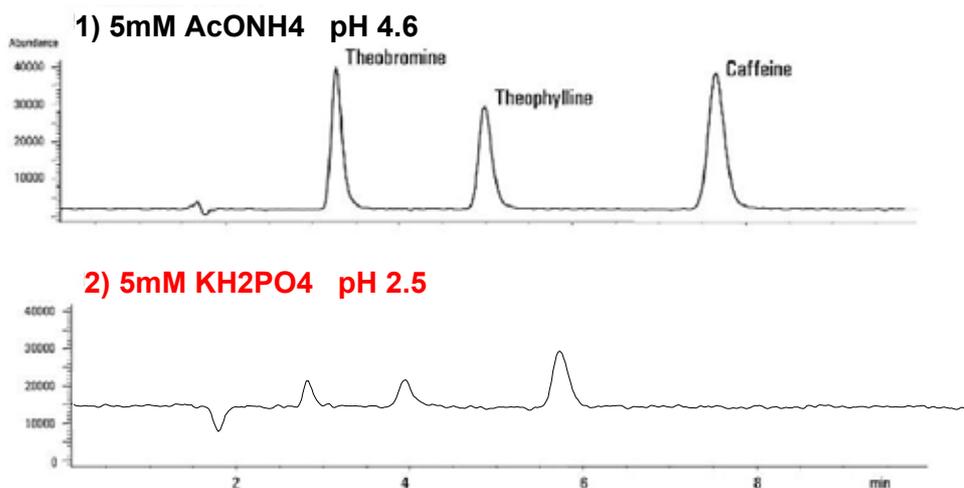
Columna: ZORBAX Eclipse XDB-C18  
 2.1 x 150 mm, 5µm  
 Eluyente: 1) 5mM AcONH4 (pH 4.6)/MeOH=80:20  
 2) 5mM KH2PO4 (pH 4.6)/MeOH=80:20  
 Flujo: 0.2mL/min  
 Temp: 40°C  
 Volumen iny.: 5µL sol. 10ppm

### Condiciones MS:

Ionización: ESI  
 Modo: Positivo  
 Rango Masa: 100 –200 (m/z)  
 Volt. Capilar: 3.5kV  
 Volt. Fragm.: 100V  
 "Gas secado": N2 (12.0L/min 350°C)  
 "Gas Nebulización": N2 (50psi)

Los tampones no volátiles dificultan considerablemente el proceso de desolvatación y producen una muy importante pérdida de sensibilidad y robustez del método de LC/MS

# Comparación entre Tampón Volátil y NO Volátil (fosfato a pH 2.5)



### Condiciones HPLC:

Columna: ZORBAX Eclipse XDB-C18  
 2.1 x 150 mm, 5µm  
 Eluyente: 1) 5mM AcONH4 (pH 4.6)/MeOH=80:20  
 2) 5mM KH2PO4 (pH 2.5)/MeOH=80:20  
 Flujo: 0.2mL/min  
 Temp: 40°C  
 Volumen iny.: 5µL sol. 10ppm

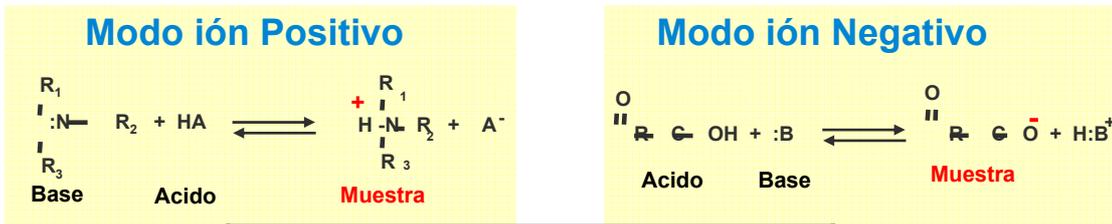
### Condiciones MS:

Ionización: ESI  
 Modo: Positivo  
 Rango Masa: 100 –200 (m/z)  
 Volt. Capilar: 3.5kV  
 Volt. Fragm.: 100V  
 "Gas secado": N2 (12.0L/min 350°C)  
 "Gas Nebulización": N2 (50psi)

\* En este ejemplo se observa que al reducir el pH del tampón fosfato de 4.6 a 2.5 se mejora algo la respuesta

# Consideraciones para el Trabajo con Electropray

- El pH de la fase móvil tiene mayor influencia en aquellos analitos que en disolución son iones
  - pH básico para iones negativos:  $pH > pK + 1$  ó  $2$  (análisis de ácidos)
  - pH ácido para iones positivos:  $pH < pK - 1$  ó  $2$  (análisis de aminas)

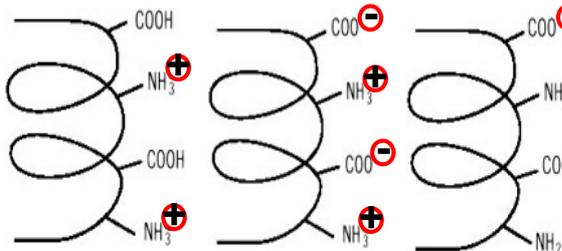


pH	Comp. Ácidos	Comp. Básicos
$pH = pK + 2$	99% ionización	1% ionización
$pH = pK + 1$	90% ionización	10% ionización
$pH = pK$	50% ionización	50% ionización
$pH = pK - 1$	10% ionización	90% ionización
$pH = pK - 2$	1% ionización	99% ionización

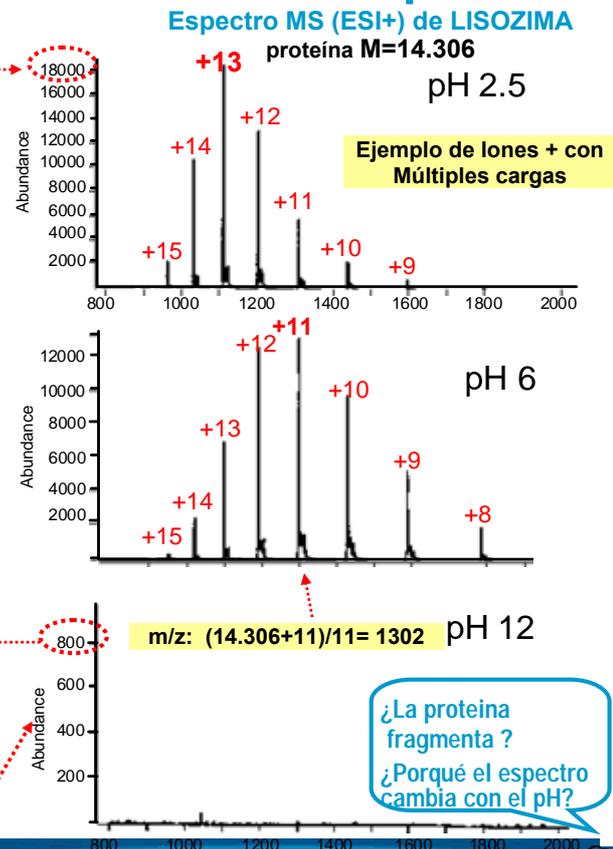
Para una buena repetibilidad de los factores de respuesta y de los tiempos de retención será especialmente importante un buen control del pH de la fase móvil, cuando éste sea próximo al  $pK_a$  (+/-1 (2)) de alguno de los analitos, dada la gran variabilidad en su grado de ionización en esta zona

## Espectros de Proteínas/ Iones con Múltiples Cargas

- Moléculas de gran tamaño, p.e. péptidos y proteínas, suelen proporcionar en ESI iones con **Múltiples Cargas** ⇒ respuesta a múltiples relaciones m/z (masa/carga)
- Con **moléculas anfotéricas** (moléculas con grupos ácidos y básicos - p.e. Péptidos y Proteínas) si  $pH = pI$  (pto. Isoeléctrico) ⇒ molécula globalmente será **neutra**:



- El perfil del espectro de iones con múltiples cargas variará en función del pH de la fase móvil.



# Disolventes Compatibles con LC/MS

## Adecuados para ES y APCI

**Metanol**  
Etanol  
Propanol  
Isopropanol  
Butanol  
**Acetonitrilo**  
**Agua**  
DMF<sup>(1)</sup>  
DMSO<sup>(1)</sup>  
Ácido Acético  
Ácido Fórmico  
Acetona  
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>  
CHCl<sub>3</sub>

## Adecuados sólo en APCI

Tolueno  
Benceno  
Hidrocarburos  
(p.e., Hexano)  
Estirene  
CCl<sub>4</sub>  
CS<sub>2</sub>  
Hidrocarburos Cíclicos  
(p.e., Ciclohexano)

(1) A bajos porcentajes (<10%) en ES



# Tampones Típicos para API-ES y APCI

## Modo ión positivo (uso pH < 7.0; 5 preferido)

- **Ácido acético** (rango pH 3.8-5.8)
- **Ácido fórmico** (rango pH 2.8-4.8)
- (Ácido trifluoroacético (TFA) (rango pH 1.5-2.5)) (no recomendable – usar mínima concentración posible)

## Modo ión negativo (pH > 7.0; 9 preferido)

- **Hidróxido amónico** (rango pH 8.2-10.2) (o formiato/ acetato amónicos)
- **Trietilamina (TEA)** (rango pH 10.0-12.0)
- **Dietilamina (DEA)** (rango pH 9.5-11.5)
- **Piperidina** (rango pH 10.1-12.1)

▪ Puede emplearse la **adición post-columna** de ácido o base para **ajustar el pH** si el proceso cromatográfico necesita diferente.

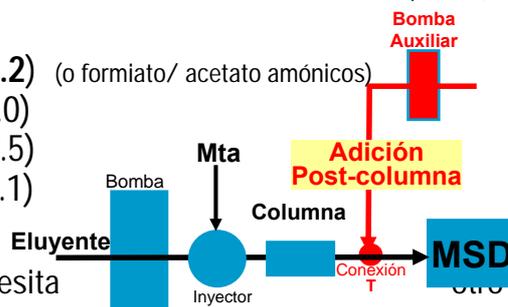
▪ Los **tensoactivos** pueden **interferir** en la evaporación. Los reactivos de **par iónico** producir un **elevado background** y si el par iónico formado es muy estable **llegar a suprimir ionización**; utilizarlos volátiles: TFA, Ácido heptafluorobutírico (HFBA), hidróxido tetrabutilamonio (TBAH).

▪ En modo **Negativo (ESI y APCI)** puede adicionarse un anión:



▪ Algunas **moléculas neutras con tendencia a formar puentes de hidrógeno** (p.e. Mentol y carbohidratos) pueden formar **aductos con NH<sub>4</sub> y metales alcalinos** (probar AcNH<sub>4</sub> o AcNa como tampón).

▪ En **APCI** los compuestos **carbonílicos** en ocasiones pueden llegar a **protonarse**, las **amidas e hidroxilos aromáticos perder un protón** y los halogenados y aromáticos captar un electrón (M<sup>-</sup>)





# ¿Preguntas?



## Muchas Gracias por su Atención

Estamos a su disposición en:

<http://www.chem.agilent.com>



isidre\_masana@agilent.com

tel . Agilent : +34.901.11.6890

customercare\_spain@agilent.com