

## ORGANIZACIÓN GENERAL

Con objeto de conseguir la mayor eficacia y rendimiento del Servicio de Cromatografía y Espectrometría de Masas se ruega cumplir las siguientes normas:

1. **Se ha de rellenar la Hoja de solicitud correspondiente, en todos sus campos. En particular**
  - Persona de contacto y teléfono
  - Tiempo estimado a reservar
  - Cuenta de cargo
2. **Información relativa a la muestra:**
  - Concentración y la presencia de sales u otras sustancias, peligrosidad, etc.
  - Masas moleculares esperadas,
  - Naturaleza de la muestra y número total incluido el número de réplicas deseado
  - Identificación de la columna si la aporta el usuario,
  - Descripción completa del método analítico si lo aporta el usuario, indicando fases móviles.
  - Bibliografía de apoyo. Patrones de fragmentación si se conocen.
  - Disponibilidad de patrones puros o de referencia.
  - Necesidad del diodo Array.
3. **No se aceptarán muestras para análisis que:**
  - no hayan sido solicitadas mediante el correspondiente formulario debidamente cumplimentado.
  - no se ajusten a los requisitos indicados de compatibilidad con la técnica
4. El usuario mostrará el método de extracción y preparación de la muestra a fin de prever cualquier inconveniente en la misma.
5. **A fin de optimizar el rendimiento del Servicio y evitar su eventual colapso, se priorizarán aquellas solicitudes que:**
  - Hayan sido entregadas en la debida forma primero.
  - se puedan analizar por Métodos de rutina previamente establecidos y comprobados.
  - cumplan los requisitos de concentración, niveles de aditivos, etc.
  - en períodos de elevada demanda, procedan de investigadores del ICTAN (IF). con un tiempo máximo de uso del equipo de 3 SEMANAS días para cada investigador.
6. **Recordar que:**
  - Los métodos cromatográficos NO son por sí solos compatibles con el análisis acoplado con espectrometría de masas. Por tanto el usuario deber ser consciente de que quizás el método que utiliza en su laboratorio no podrá ser el mismo que el utilizado en este Servicio.
  - El objetivo prioritario del uso de este equipo ha de ser siempre la identificación o confirmación de picos.
  - A veces, la imposibilidad de utilizar ciertos disolventes en el equipo HPLC-MS hace necesaria una recolección de picos de forma independiente por parte del usuario para su posterior análisis por espectrometría.
  - Métodos no incluidos entre los que ofrece el servicio, el Usuario proporcionará columna y solventes que desee utilizar y. Los solventes para espectrometría de masas deben ser de la máxima pureza (calidad espectroscópica o para *masas*).
7. **Una vez analizadas las muestras,** se entregarán al solicitante los resultados. o copia de los archivos según el tipo de análisis. El tiempo transcurrido entre la recepción de las muestras y el envío de resultados, se intentará que sea el menor posible. Sin embargo, ha de tenerse en cuenta que éste será función del ritmo de trabajo en el Servicio, que a su vez depende del personal existente en ese momento, del número y tipo de solicitudes, así como de las necesarias operaciones de mantenimiento y puesta a punto de los espectrómetros de masas.

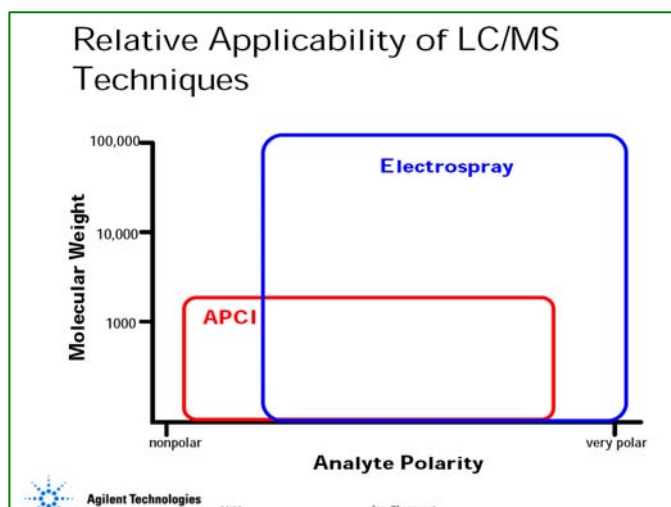
Los usuarios podrán solicitar asistencia para el manejo del *Data Analysis* e interpretación de los datos.

## LC1100-MSD-(sQ)

Es una técnica cromatográfica acoplada a un espectrómetro de masas cuadrupolar. Sirve fundamentalmente para confirmar analitos por comparación de su espectro de masas con librerías obtenidas a partir de patrones introducidos en equivalentes condiciones analíticas. También tiene capacidad cuantitativa.

- Muestras a analizar : Líquidas o en disolución
- Moléculas analizables: masa molecular hasta 3.000 u si producen iones monocargados y hasta ~100.000 u si son iones policargados

Interfases disponibles: ESI y APCI.



### Interfase (ESI)

- Para compuestos principalmente polares.
- Favorecido si los analitos están en forma ionizada.
- Preferida la separación en fase reversa. Posible en fase normal.
- Ionización muy suave. Ion molecular muy mayoritario generalmente.
- pH de la fase móvil tiene mucha influencia.
- Evitar sales Na y Ka en la muestra.
- Formación de aductos probable.
- Volatilidad media o baja.
- Admite moléculas lábiles.

### Interfase (APCI)

- Para compuestos principalmente apolares.
- Complementaria a ESI para compuestos de polaridad media-baja; PM moderado.
- Menos sensible que ESI a química de los solventes.
- Desaconsejable para compuestos térmicamente lábiles.
- Sensibilidad dependiente de la cantidad de analito.
- Favorecida si los analitos están en forma neutra en fase vapor.
- Preferida la separación en fase normal. Posible en fase reversa.
- Usar solventes orgánicos neutros volátiles. El tipo de solvente orgánico afecta a la ionización.

### Cantidad de muestra estimada necesaria y niveles de concentración 1

Compuesto	Volumen	Concentración
Compuestos en general	> 100 µl	≈ 10 ng/µl
Digestiones de péptidos (LC-MS) Disponible poca sensibilidad	> 100 µl	≈ 500 ng/µl

### Condiciones de las muestras

- Las muestras serán entregadas en el Servicio en viales de 2ml con volumen mínimo de 0,5ml, de color ámbar para muestras fotosensibles. En caso de poca cantidad de muestra se utilizarán insertos compatibles con el disolvente utilizado.
- Los viales, tapones e insertos utilizados en este Servicio deberán de ser de primer uso para evitar contaminaciones e incidentes con el inyector automático. Los viales pueden solicitarse al Servicio y serán adicionados en la facturación final.
- La muestra deberá estar preferiblemente disuelta disolventes similares a la fase móvil utilizada para evitar insolubilidad entre el frente inyectado y la fase móvil del método.
- Las muestras deberán estar libre de sales no volátiles que puedan precipitar en la fuente de ionización
- Las muestras deberán estar previamente filtradas con filtros de 0.45  $\mu\text{m}$  o menor diámetro para evitar precipitaciones en columna o aguja de nebulización, entre otros.
- Las muestras deberán estar disponibles en su totalidad al inicio del análisis para evitar disparidad de señales y retrasos.

### Condiciones del Análisis y Fases móviles

No se aceptarán muestras/fases móviles que lleven alguno de los siguientes interferentes (suprimen señal o interfieren en la ionización)

- Ácidos y bases inorgánicos
- Cualquier tipo de sal no volátil como, boratos, citratos, etc.
- Fosfatos.
- Ácido Trifluoroacético.
- Detergentes (SDS, Tween, Tritón, NP-40, etc.), Poliacrilamida reactivos no volátiles (como los agentes alquilantes, reductores y tampones usados en la extracción y digestión de muestras biológicas),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (desaconsejable), Glicerol, EDTA, etc.
- Polietilen glicol y Plásticos (aumentan el ruido de fondo)

Se toleran: (< 20 mM):

- Tampones de sales volátiles como  $\text{NH}_4\text{AcO}$  y  $\text{NH}_4\text{HCOO}$ .
- Sales de alquil amonio de ácidos orgánicos volátiles (inconveniente: el catión alquil amonio suele ser el mas abundante en modo+)
- Mínimas presencias de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  (dan aductos, deposiciones salinas en interfase)

No interfieren:

- $\text{HCOOH}$ ,  $\text{CH}_3\text{-COOH}$ ,  $\text{NH}_4\text{OH}$ , Metanol, ACN

Sales amónicas pueden favorecer la formación de aductos de amonio.

### Fases Móviles

Agua y solventes orgánicos volátiles, calidad máxima (excluidos Trifluoroacético y similares).

Intervalo pH recomendado 3-10.

- Adición de un ácido o una base volátil para favorecer la ionización
- Para iones negativos adicionar Base preferiblemente (pH Básico >7.0 - 9)
- Para iones positivos, adicionar Ácido preferiblemente (pH Acido <7.0-2)
- Condiciones extremas de pH no se aceptarán, salvo que el usuario, por excepcionalidad de la muestra, acepte la responsabilidad sobre cualquier deterioro del sistema y use columna especial. (ej. Valores extremos favorecen corrosión de la aguja de nebulización de la fuente de ionización)

Evitar disolventes con altos puntos de ebullición (DMSO) y los muy inflamables (THF)

Estudiar el pKa de los compuestos a analizar y verificar su compatibilidad con el rango de pH de la Fase Móvil elegida

**Columnas disponibles en el Servicio:**

N1-Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18	4.6 x 150 x 5	pH=2-9	< 400 bar
N3-Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C8	4.6 x 150 x 5	pH=2-9	< 350 bar
N7-Teknokroma HALO C18	2.1 x 50 x 2.7	pH=2-9	< 600 bar

Ácidos preferidos para ionización POSITIVA	Bases preferidas para ionización NEGATIVA	Tampones tolerados		
<b>Flujo &lt; 1 ml/min (preferido 0.3-0.5 ml/min)</b>			<b>ELECTROSPRAY (ESI)</b>	
Formic Acid, 0.1 - 1.0% Acetic Acid, 0.1 - 1.0%	Ammonium hydroxide (pH 10-11)	Ammonium Acetate Ammonium Formate Triethylamine Other volatile < 0.5%	Solventes adecuados	Solventes inadecuados
			Agua	Benzeno
			ACN (preferible)	Tolueno
			Metanol	Ligroina
			Etanol	CCl <sub>4</sub>
			Isopropanol	CS <sub>2</sub>
			Acetona	Formamida
			t-Butil alcohol	Hexano
			THF	Ciclohexano
<b>Flujo &gt; 1 ml/min</b>			<b>A P C I</b>	
Formic Acid, 0.1 - 1.0% Acetic Acid, 0.1 - 1.0%	Ammonium hydroxide (pH 10-11)	Ammonium Acetate Ammonium Formate Triethylamine Other volatile < 0.5%	Solventes adecuados	Solventes inadecuados
			H <sub>2</sub> O/Metanol	Alto Agua
			Metanol (preferible a ACN)	Alto ACN
			Solventes prótidos para APCI+	
			Solventes captura e <sup>-</sup> para APCI <sup>-</sup>	
			Solventes volátiles neutros	