



Cromatografie de lichide de inalta performanta cuplata cu spectrometrie de masa (HPLC-ESI Q-ToF MS)

Ing. Loredana Todi

- Cromatografie de lichide de inalta performanta (HPLC)
- Spectrometrie de masa (MS)
- Avantajele cuplarii HPLC-MS

HPLC

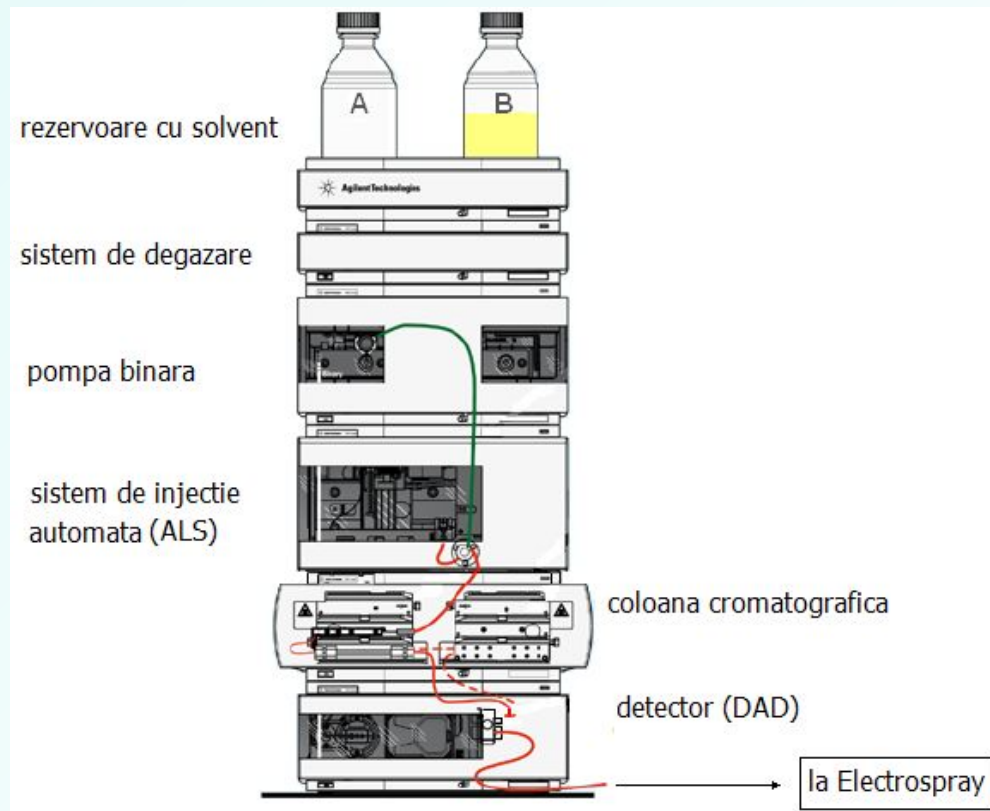
□ **HPLC** – metoda analitica utilizata in scopul separarii, identificarii si dozarii substantelor organice si anorganice aflate in solutie

ANALIZE:

- farmaceutice
- clinice
- toxicologice
- de mediu
- industriale
- alimentare

Calitativ: separarea, determinarea componentilor pe baza timpului de retentie;

Cantitativ: curba de etalonare - pe domeniul de valabilitate al legii **Lambert Beer** (variatie liniara a raspunsului DAD cu concentratia)

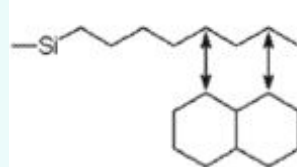


$$A = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) = \epsilon C L$$

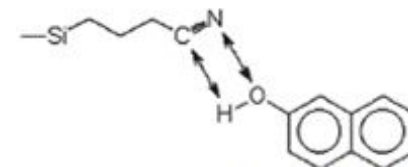
Clasificarea HPLC functie de natura fazei stationare

Cromatografia de adsorbție :

- ☞ faza stationara - adsorbant de tip silicagel/ alte umpluturi pe baza de silice
- ☞ principiul separarii: etape repetate de adsorbție-desorbție
- ☞ **Interactiuni hidrofobe** (nespecifice) - faza inversa
- ☞ **Interactiuni polare** (dipol-dipol) – faza normala



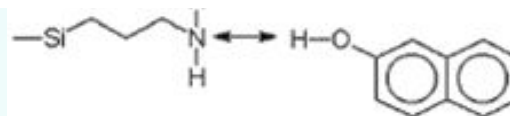
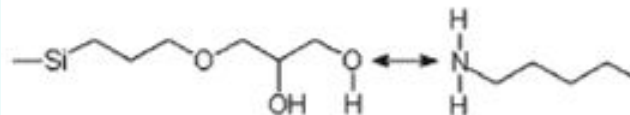
Interactiuni Van der Waals



Interactiuni dipol-dipol

Cromatografia de schimb ionic :

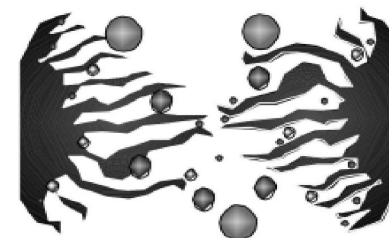
- ☞ suprafata fazei stationare este incarcata ionic, de semn contrar ionilor analitului
- ☞ specifica analitilor ionici/ionizabili
- ☞ **Interactiuni ionice**



Legaturi de hidrogen

SEC (GPC) :

- ☞ umplutura coloanei - pori cu dimensiuni controlate
- ☞ proba este separata functie de marimea ionului solvatat



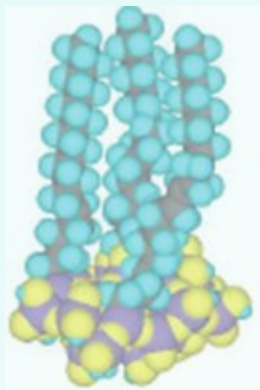
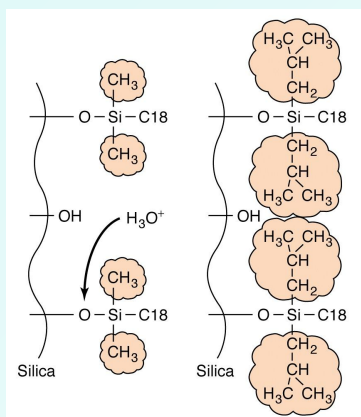
Clasificarea HPLC functie de polaritatea celor doua faze

☺ Cromatografie cu faza normala

- ☞ faza stationara – puternic polara (silicagel)
- ☞ faza mobila – nepolara

☺ Cromatografie cu faza inversa

- ☞ faza stationara – nepolara, lanturi hidrocarbonate hidrofobe legate de silice :



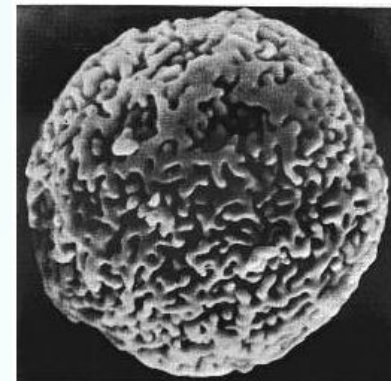
80% Octadecilsilice (ODS, C18)

10% Octil (C8)

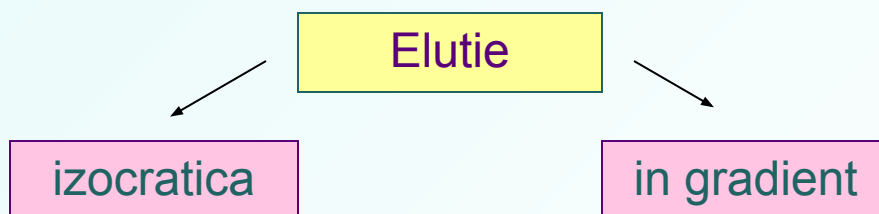
5% Butil (C4)

3% Fenil

2% Ciano (CN)

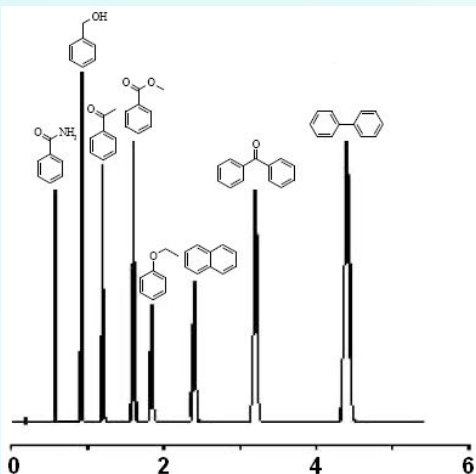


- ☞ faza mobila – polara (faza organica - CH₃OH, CH₃CN, THF si/sau apa, cu/fara sol. tampon)



Factorii care influenteaza separarea cromatografica

- **Coloana:** dimensiuni (L,d), T
- **Faza stationara:** natura, diametrul particulelor
- **Faza mobila:** tipul de elutie, debitul, solventii
- **Analitul:** polaritate, masa moleculara, concentratie



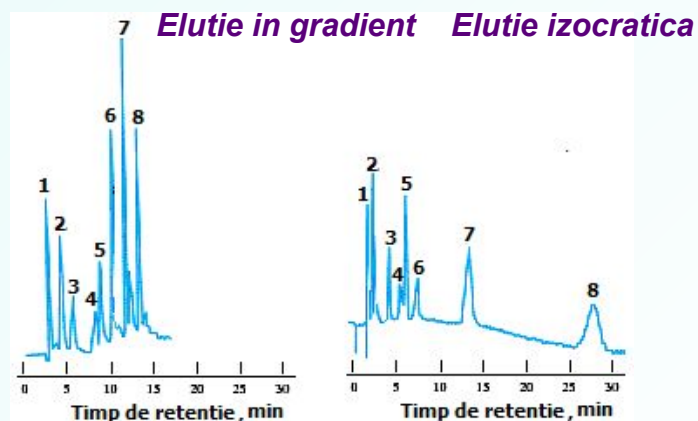
Faza mobila

- compatibila cu elementele instrumentului si cu faza stationara
- puritate avansata
- compresibilitate si vascozitate scazute
- lipsita de gaze dizolvate (aer) – rezultatul UV si probleme de compresibilitate

Separarea unor compusi aromatici folosind o coloana Hypersil-C8 (100x2) 3 mm, 60% MeOH in Apa:

Benzamida, alcool benzilic, acetofenona, benzoat de metil, fenetol, naftalina, benzofenona, bifenil

Dimensiunea particulelor (µm)	Timpul de retentie (min)	Presiunea (bar)
5	30	19
3	18	87
1,5	9	700



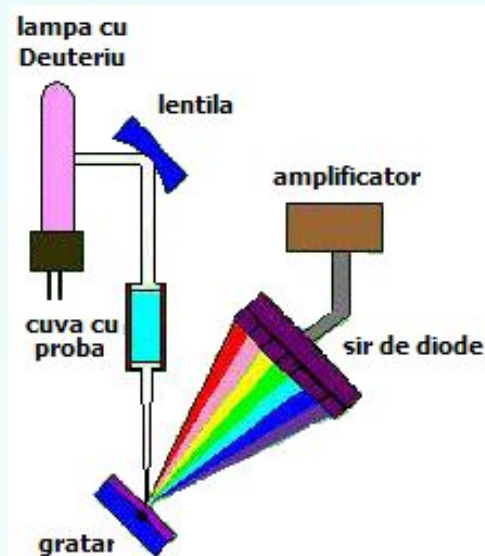
(1)-Benzen,(2)-Monoclorobenzen,(3)-Ortodiclorobenzen

(4)-1,2,3- triclorobenzen,(5)-1,3,5-triclorobenzen,

(6)-1,2,3,4 – tetraclorobenzen, (7)-Pentaclorobenzen, (8)-Hexaclorobenzen

Detectorul cromatografic ideal

- Raspuns independent de compoziția fazei mobile, debit, temperatura
- Sensibilitate – panta curbei de calibrare mare → sensibilitate mare
- Selectivitatea
- Raspuns rapid
- Zgomot de fond scazut
- Non-destructiv pentru proba
- Domeniu dinamic liniar mare
- Stabilitate într-un timp îndelungat de operare



	RI	UV/VIS	Fluorescenta	MS
Raspuns	Universal	Selectiv	Selectiv	Selectiv
Sensibilitate	4 micrograme	5 nanograme	3 picograme	1 picogram
Sensibilitate la debit	DA	NU	NU	NU
Sensibilitate la temperatura	DA	NU	NU	NU

Spectrometria de masa. Principiul metodei

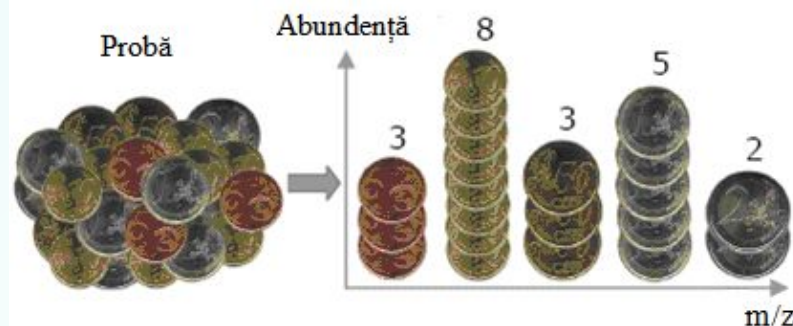
Spectrometria de masa

- metoda de caracterizare utilizata intens in ultimii ani in caracterizarea macromoleculor sintetice sau naturale: informatii despre *compozitie, distributia masei moleculare*
- principiul: transformarea *ionilor din faza lichida* → *ioni in faza gazoasa*, accelerarea si separarea acestora functie de raportul m/z , detectia si inregistrarea spectrului

Sursa de vid → Sursa de ioni → Analizor de masa → Detector → Sistem de date

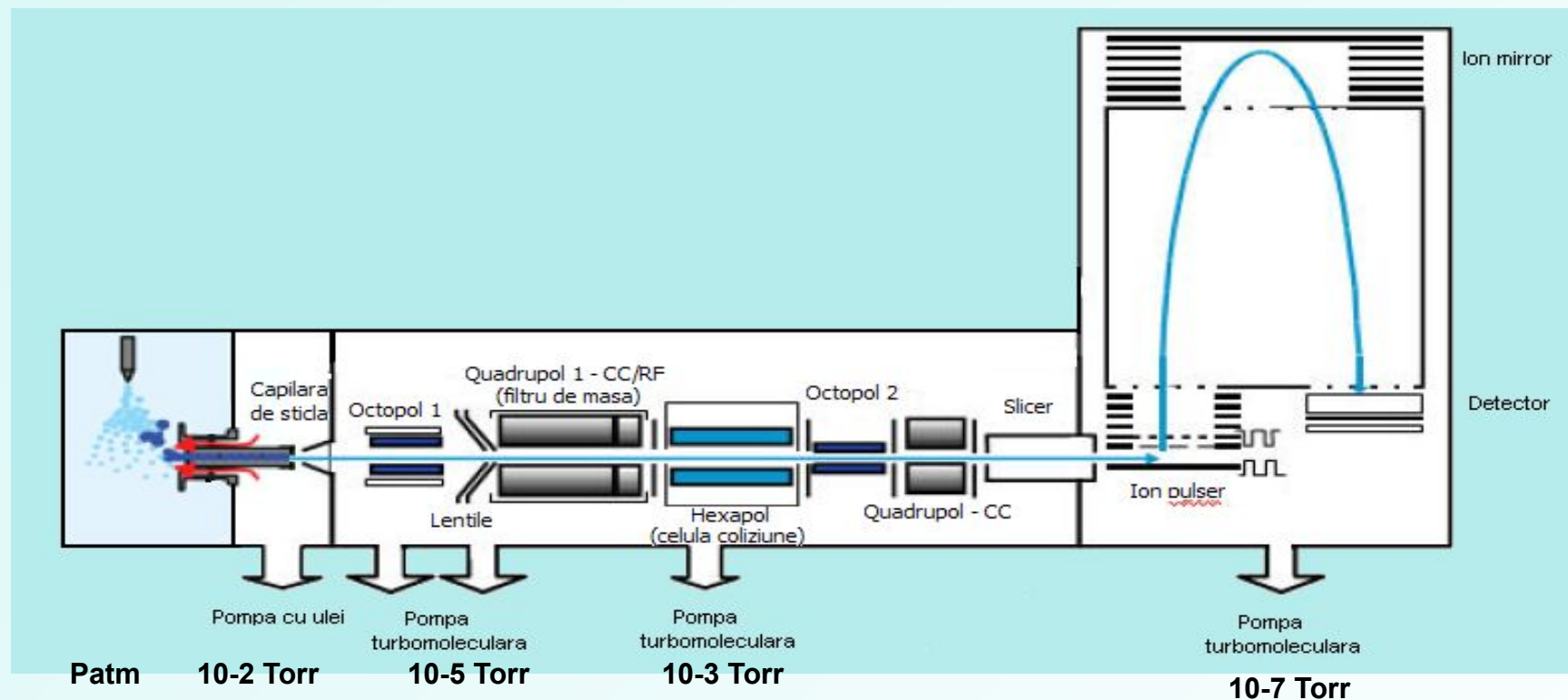
- Sursa de vid - atmosfera inertă in interiorul instrumentului;
- Sursa de ioni – ionizarea atomilor sau moleculelor neutre; polimeri: *MALDI, ESI*
- Analizorul de masa – selecteaza ionii functie de valoarea raportului m/z : *Quadrupol, ToF, Q-ToF*
- Detectorul – conversia curentului ionic in curent electric
- Sistem de analiza a datelor - controlul parametrilor, prelucrarea datelor

- Spectrul de masa - abundenta ionilor corelata cu raportul m/z



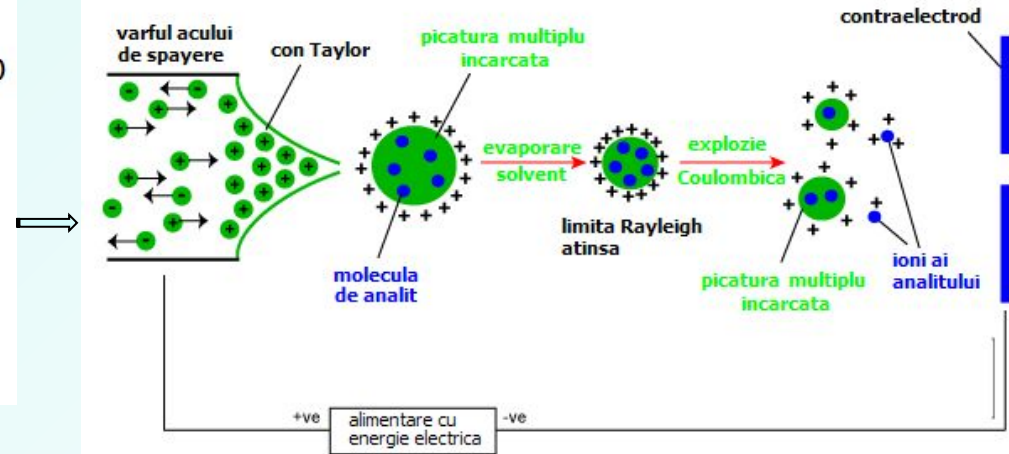
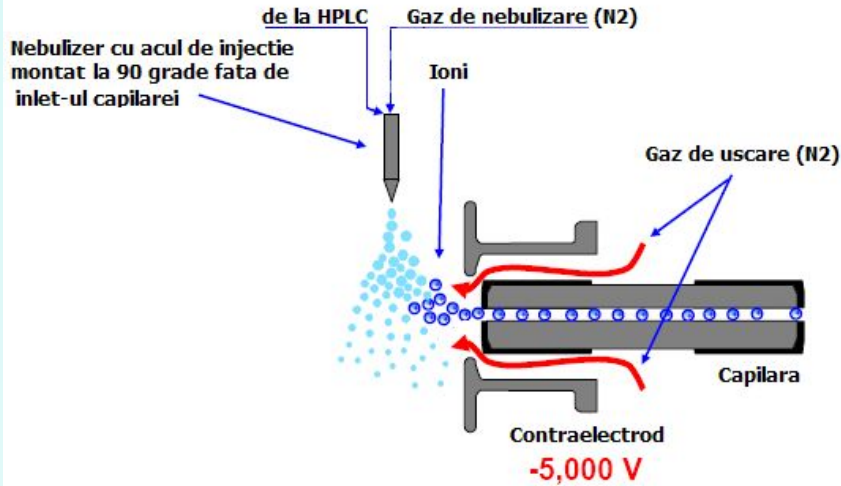
Metode de ionizare

Faza in care se gaseste proba	Metoda de ionizare	Presiunea
Gaz	<i>Electron Impact (EI)</i>	Vid inaintat
	Chemical Ionization (CI)	Vid mijlociu
	Photoionization (PI)	Vid inaintat
	Field ionization (FI)	Vid inaintat
	Metastable Atom Bombardment	Vid inaintat
Solutie	Thermospray (TS)	Vid grosier
	Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)	Presiune atmosferica
	Atmospheric Pressure Photoionization (APPI)	Presiune atmosferica
	<i>Electrospray (ESI)</i>	Presiune atmosferica
Solid	Plasma Desorption	Vid inaintat
	Field Desorption (FD)	Vid inaintat
	Fast Atom Bombardment (FAB)	Vid inaintat
	<i>Matrix Asisted Laser Desorption (MALDI)</i>	Vid inaintat



- Sursa ionizare **ESI** (evaporare & ionizare)
- Sisteme de mentinere a vacuumului (pompa rotativa, pompe turbomoleculare)
- Elemente de ghidare si focusarea fasciculului de ioni
- Analizoare de masa **Q, ToF** (CC/RF- Scan sau SIM)
- Detector de ioni si Amplificator de semnal
- Sistem de control si achizitie a datelor

Electrospray Ionization (ESI)



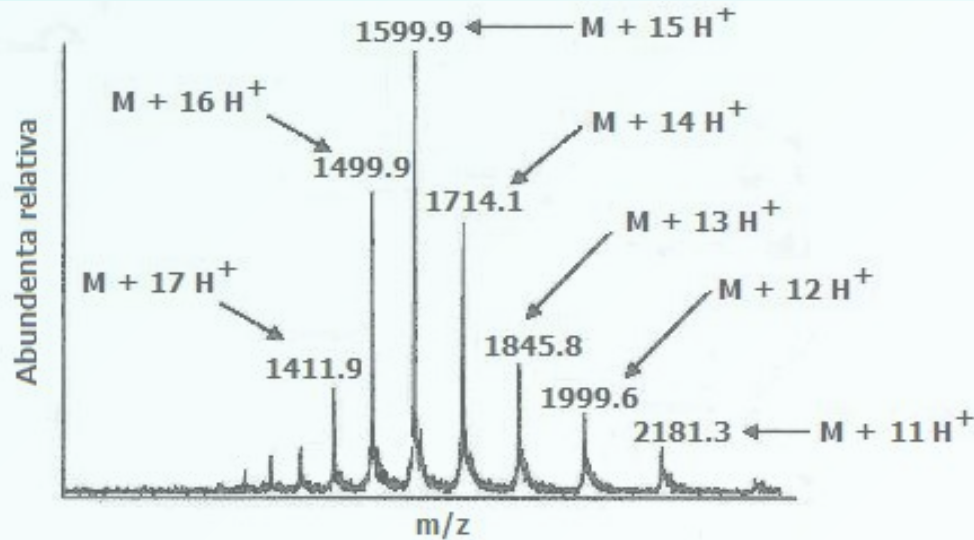
- Producerea picaturilor incarcate electric
- Evaporarea solventului si contractia picaturilor
- Densitate de sarcini crescuta → explozii coulombice si dezintegrarea picaturii in picaturi mai mici
- Desorbția ionilor in faza gazoasa

Metoda de ionizare	Analiti uzuali	Introducerea probei	Domeniul de masa	Caracteristici
Electron Impact (EI)	<ul style="list-style-type: none"> ■ Mic-moleculari ■ Volatili 	<ul style="list-style-type: none"> □ GC □ Probe lichide/solide 	→ 1.000 Da	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Ionizare agresiva ❖ Informatii structurale
Electrospray (ESI)	<ul style="list-style-type: none"> ■ Mic-moleculari ■ Macromoleculari ■ Volatili, nonvolatili 	<ul style="list-style-type: none"> □ LC □ Injectie directa (seringa) 	→ 20.000 Da	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Ionizare blanda ❖ Specii incarcate multiplu

Formarea aductilor

Modul ESI (+)

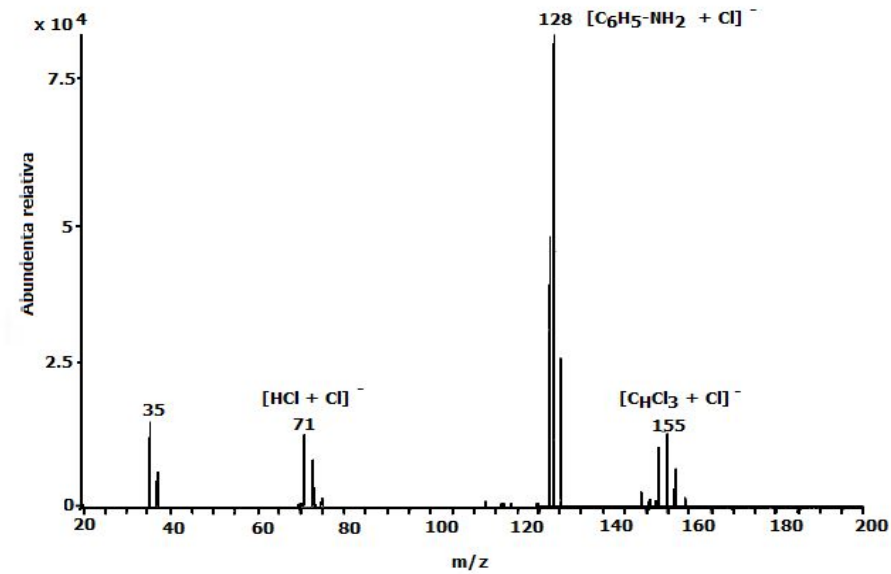
- Moleculele protonate $[M+H]^+$, $[M+nH]^+$
- Aducti cu diferiti ioni $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ sau cu Ag^+ , Cs^+ , Li^+ , NH_4^+
- Aducti de tip cluster cu solvent $[M+nxCH_3CN+H]^+$



Spectrul ESI al Tripsinogenului (+)
(Mw=23983)

Modul ESI (-)

- Molecule deprotonate $[M-H]^-$, $[M-nH]^-$
- Aducti $[M+HCOO^-]^-$, $[M+Cl^-]$ etc.



Spectrul ESI al anilinei (-)

Factorii care influenteaza procesul ESI

- *Natura probei*: pH, puritate, polaritatea analitului, caracter covalent/ionic, mic/macro-molecular
- *Concentratia analitului*
- *Natura solventului*: tensiune superficiala, polaritate, viscozitate, constanta dielectrica, volatilitate, debit;
 - ▶ solventul ideal – functie de natura analitului:
 - modul ESI (+)** : 50% CH₃OH/ CH₃CN si 50% H₂O
 - modul ESI (-)** : solventi halogenati: CH₂Cl₂, CHCl₃
- *Parametrii din sursa ESI*: temperatura gazului de uscare, presiunea nebulizatorului, debitul de gaz de uscare, voltajele elementelor de transport si ghidaj, distanta de la capatul acului de injectie la contraelectrod
- *Prezenta unor agenti de cationizare*: NaI, KI, HCOONH₄, HCOOH, CH₃COOH etc.

Determinarea cantitativa a amestecurilor in ESI Q-ToF

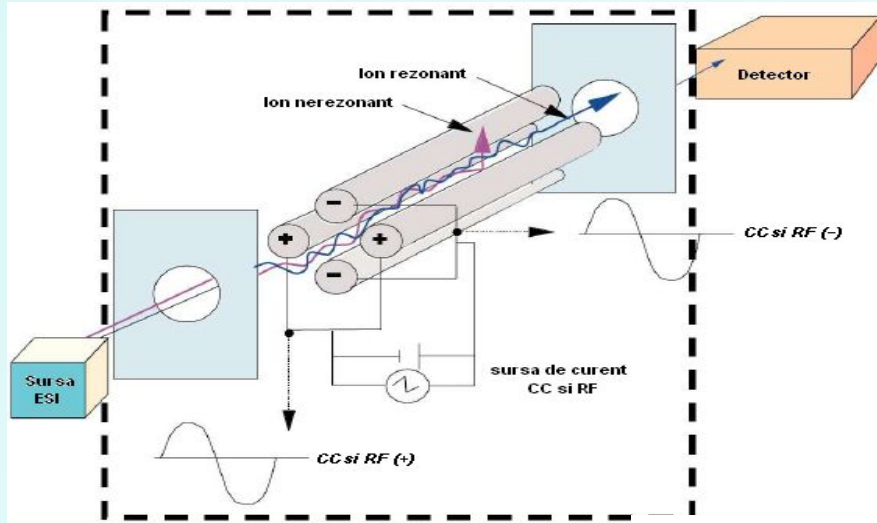
- eficienta de ionizare a tuturor componentelor (Mw, solubilitate, gr functionale – nr situsuri la care se pot atasa electrostatic H⁺, cationi)
- competitie
- supresie

Ce tipuri de analiti pot fi analizati prin ESI-Q-ToF-MS?

- Molecule organice volatile si mai ales nevolatile, labile termic
 - Molecule polare/ polarizabile - solubile in solventi polari si volatili
R-NH₂, R-COOH, R-SO₃H, R-OH, R-O-R, R-CHO, R₁-CO-R₂, zaharide etc
- Biopolimeri
 - Proteine, peptide, ADN, ARN, polizaharide
- Polimeri sintetici
- Complecsi organometalici

Ce tipuri de analiti NU pot fi analizati prin ESI-Q-ToF-MS?

- Molecule nepolare (lanuturi hidrocarbonate), fara grupari polarizabile
- Probe in solventi nepolari sau nevolatili: *hexan*, *benzen*, *CH₂Cl₂*, *DMSO*, *DMF*, etc.
- Probe care contin:
 - sisteme tampon incompatibile cu ESI : saruri nonvolatile
 - solutii cu o conductivitate electrica prea mare (ex. > 100 mM HCl, TFA)
 - detergenti
- Amestecuri complexe → spectre de masa complexe



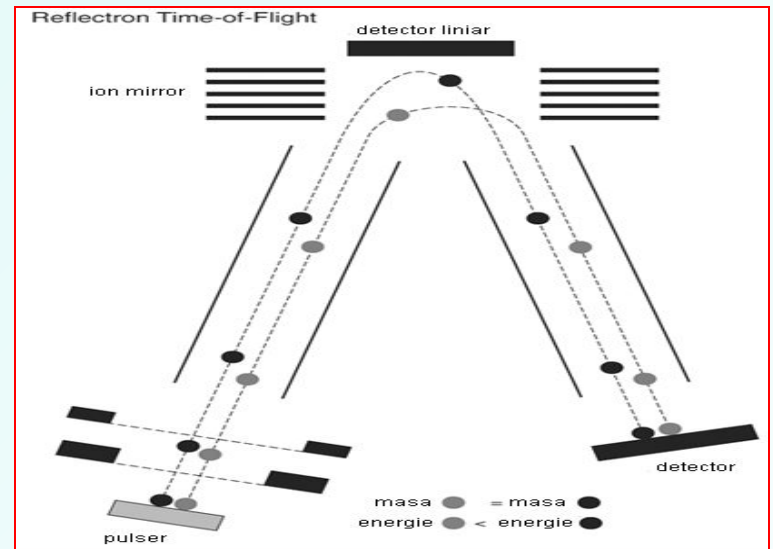
Quadrupolul

Avantaje

- Ieftin
- Usor de cuplat cu multe tipuri de surse de ionizare

Dezavantaje

- Rezolutie scazuta (<4000)
- Precizie joasa (>100ppm)
- MS/MS necesita mai multe analizoare
- Domeniu de masa scazut (<4000)
- Scanare lenta



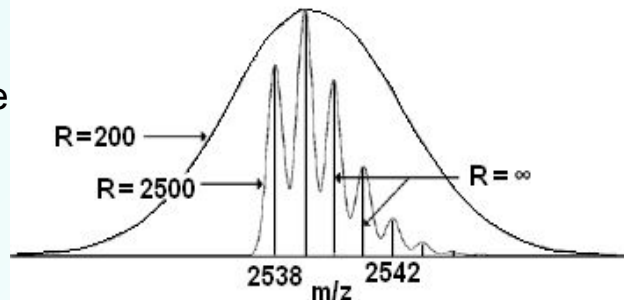
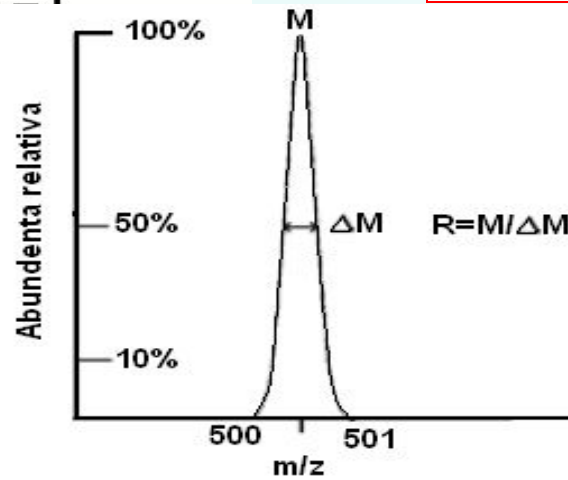
ToF

Avantaje

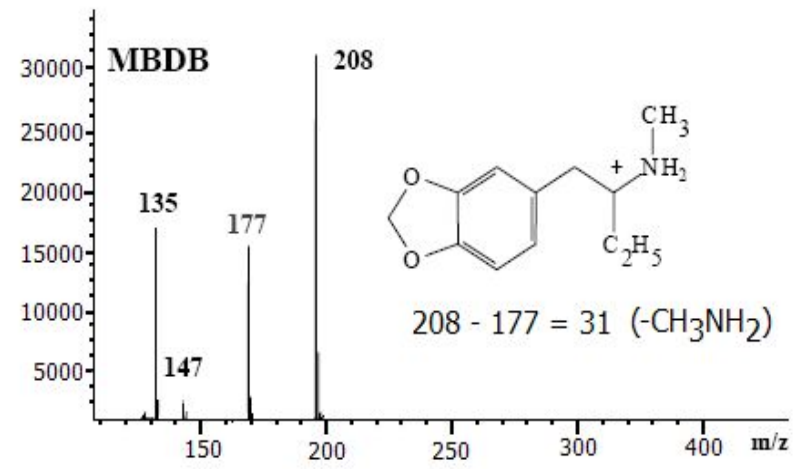
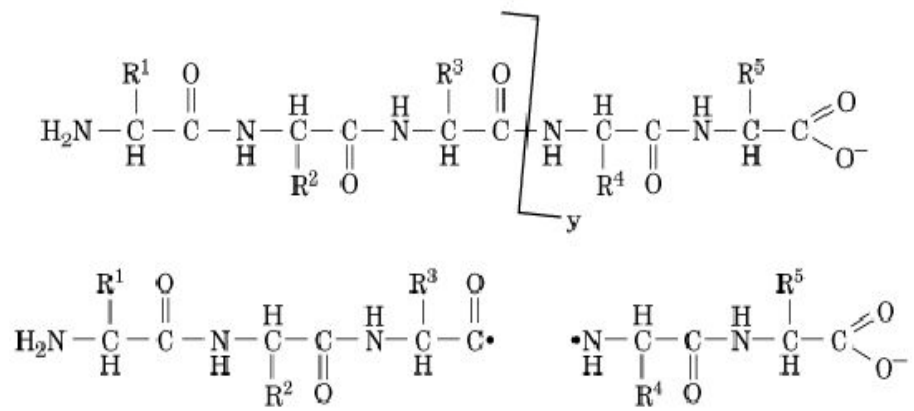
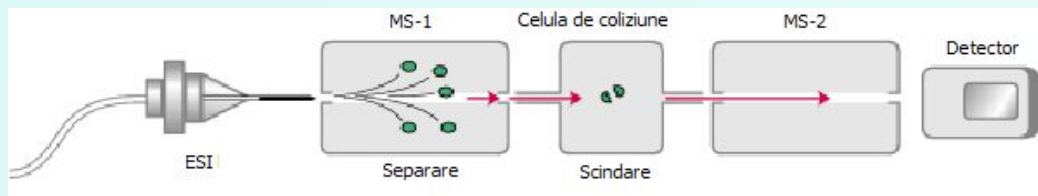
- Rezolutia inalta (>20.000 la unele modele)
- Precizie inalta (<5ppm)
- Domeniu de masa larg (20.000)
- Scanare rapida

Dezavantaje

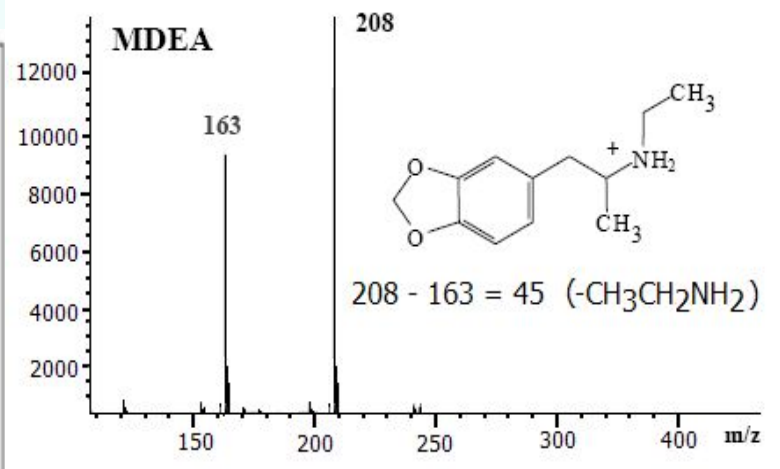
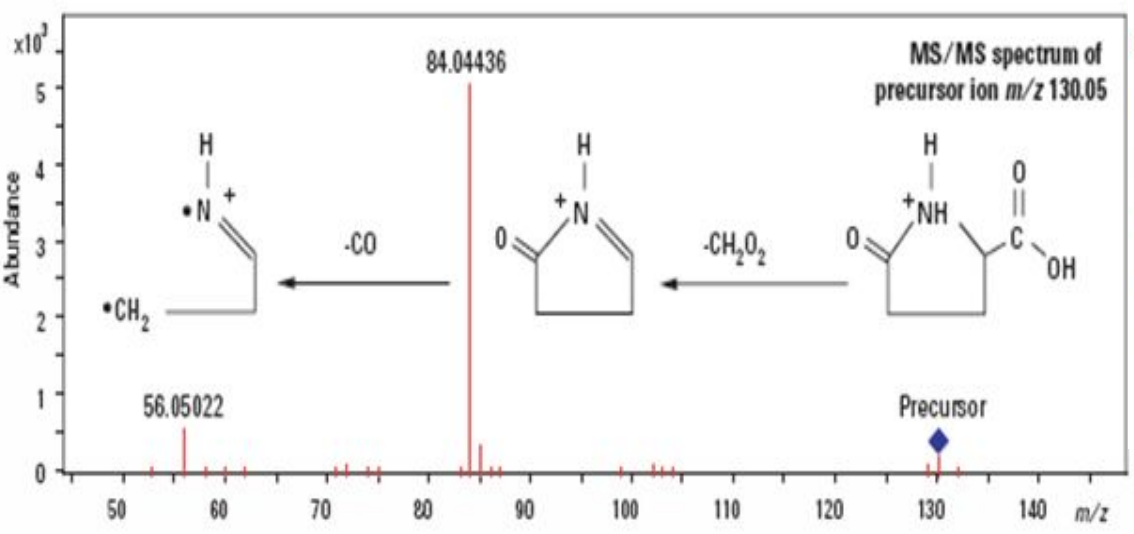
- Rezolutia scazuta pentru MS/MS



MS/MS



***N*-metil-1-(3,4-metilendioxifenil)-2-butana mina (MBDB)**



***3,4*-metilendioxietilamfetamina (MDEA)**

Caracterizarea polimerilor sintetici prin spectrometria de masa

Caracterizarea compusilor macromoleculari de origine sintetica presupune determinarea unor parametri specifici:

- Natura chimica a catenei principale
- Arhitectura catenei: liniara, ramificata sau macrociclu
- Natura capetelor de lant

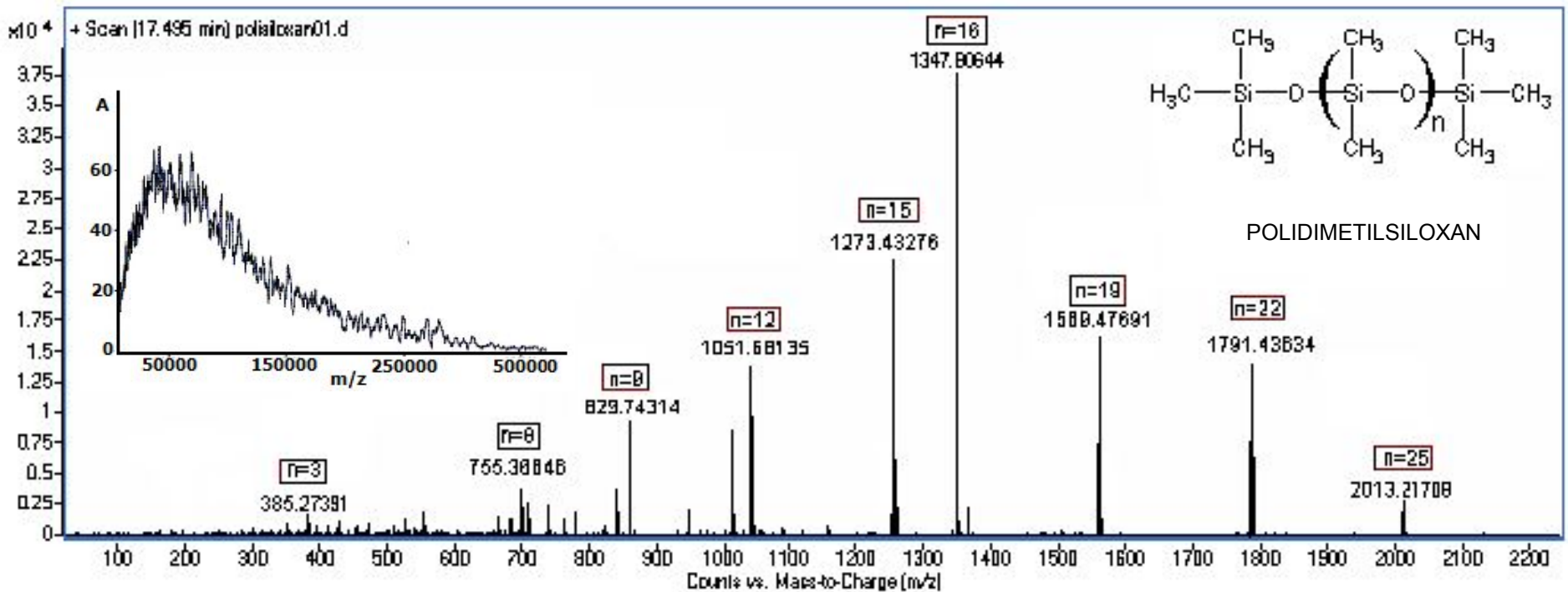
- Biopolimeri - $[M-H]^+$; polimeri sintetici cu grupari ionizabile : **polieteri, poliesteri, poliacrilati polimetacrilati, polisiloxani, etc.**- $[M-Me]^+$: Na^+, K^+, NH_4^+
- Polimerii sintetici fara heteroatomi dar cu duble legaturi: **polistirenul, polibutadiena** sau **poliizoprenul**: Cu, Ag, Cs, Rb, Co (interactii cu legaturile duble)
- Polimerii sintetici fara heteroatomi si fara legaturi duble : **polietilena** si **polipropilena** - dificil de analizat prin ESI

- Intensitatea semnalului produs de detector - proportional cu numarul de molecule **Ni** (Abundenta) de aceeasi masa **Mi** care il lovesc in acelasi moment - calculul Mn, Mw si IP
- Structura ionior proveniti de la homopolimeri analizati in spectrometria de masa este de forma:

- In cazul copolimerilor gradul de complexitate a spectrelor obtinute creste → analiza devine foarte dificila: **spectru teoretic** care poate fi comparat cu ¹spectrul obtinut ²practic.

Spectrul MS al polimerilor sintetici

- MS → date asupra masei moleculare a tuturor lanturilor aflate in componenta sistemului polimeric → HPLC, GPC anterior analizei
- Lanturile polimerice pot prezenta grupari finale diferite datorita modului diferit de initiere si terminare a reactiei de polimerizare;
- Sistemele de polimeri si copolimeri mai prezinta o *distributie de catena*;
- Solubilitatea polimerilor = f (*Mw, grad cristalinitate, T, polaritate*)



- Probele cu indice de polidispersitate mai mare de 1,5 + rezolutie slaba - analiza extrem de complexa
- In cazul formarii de complexi ionici - favorizate lanturile de mici dimensiuni

Spectrul ESI-MS al proteinelor (polimeri naturali)

$$M_1 = (MW + (1.007)(n+1)) / (n+1)$$

$$M_2 = (MW + (1.007)n) / n$$

$$(M_1 - 1.007) / (M_2 - M_1) = n$$

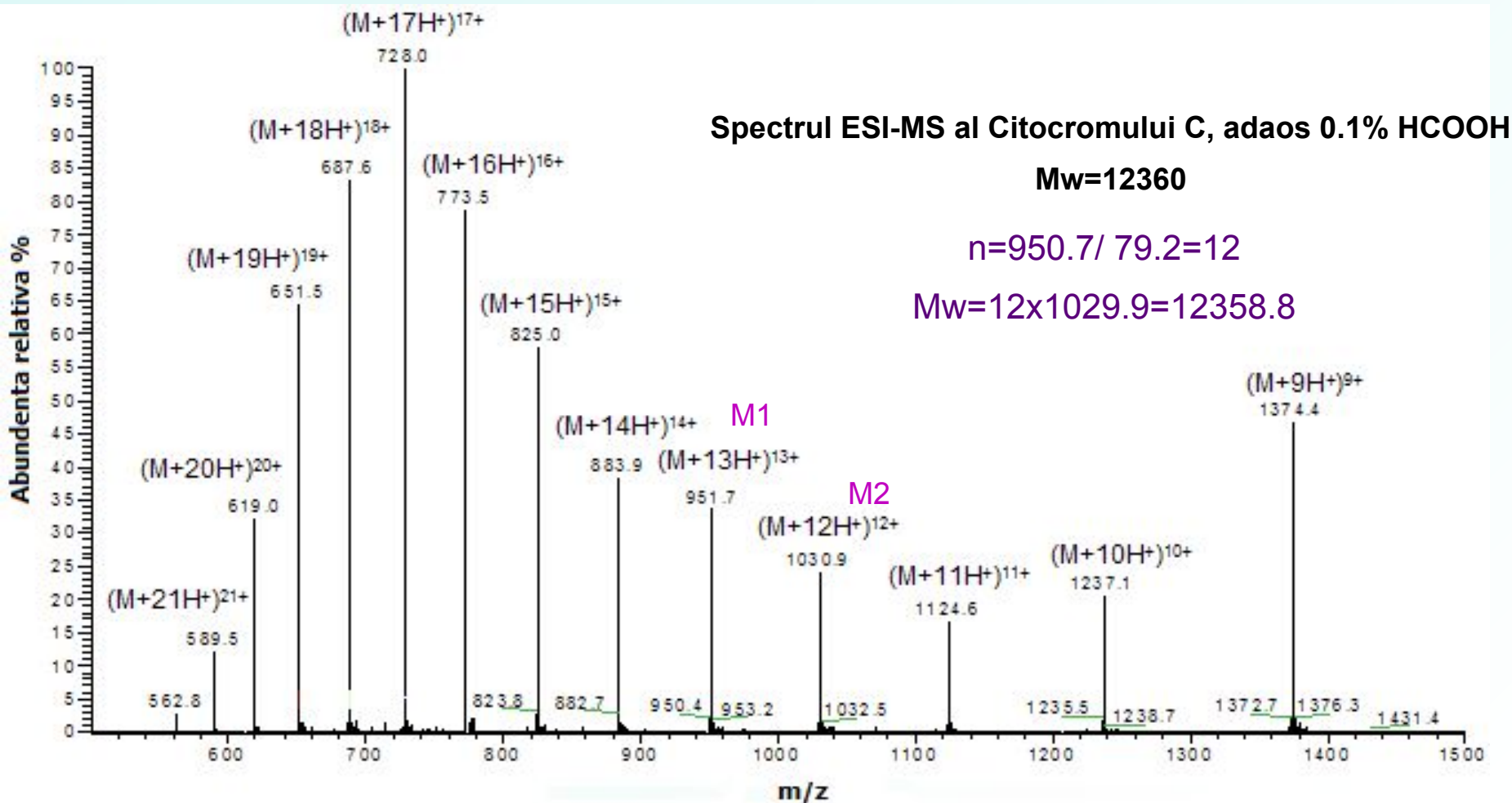
$$MW = nx(M_2 - 1.007)$$

$$M_1 = \text{CytC} + 13 \text{ H}^+$$

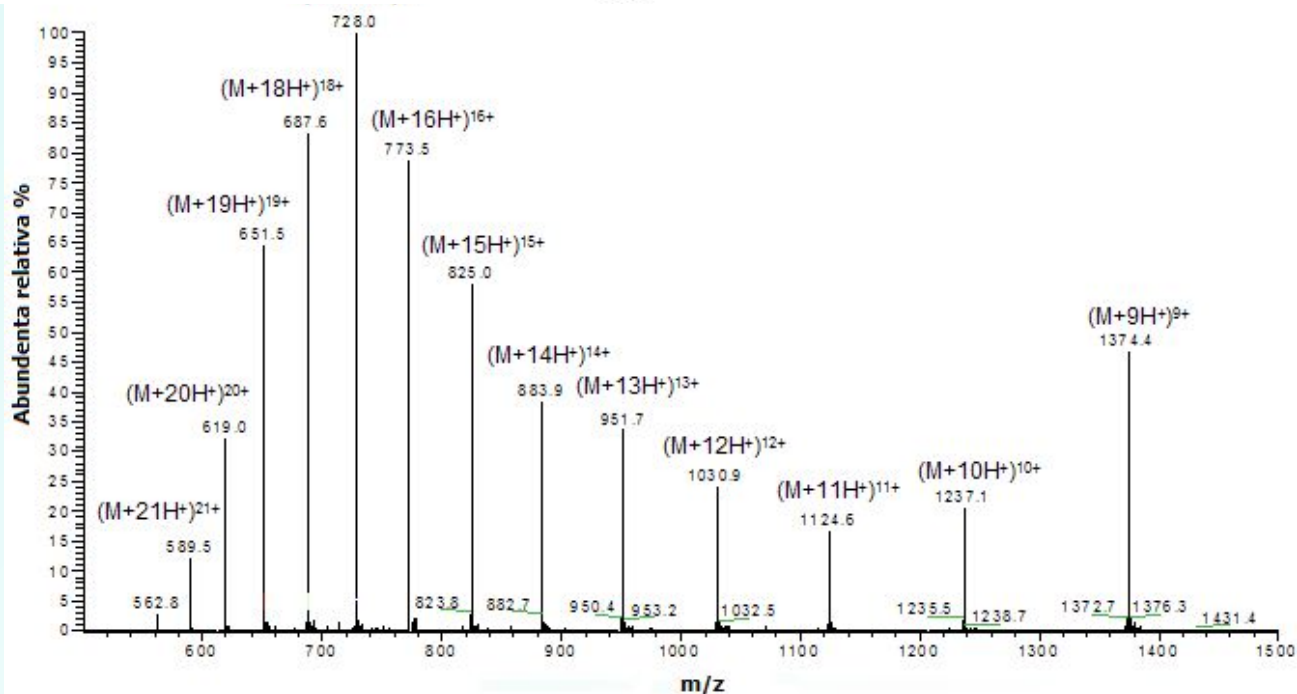
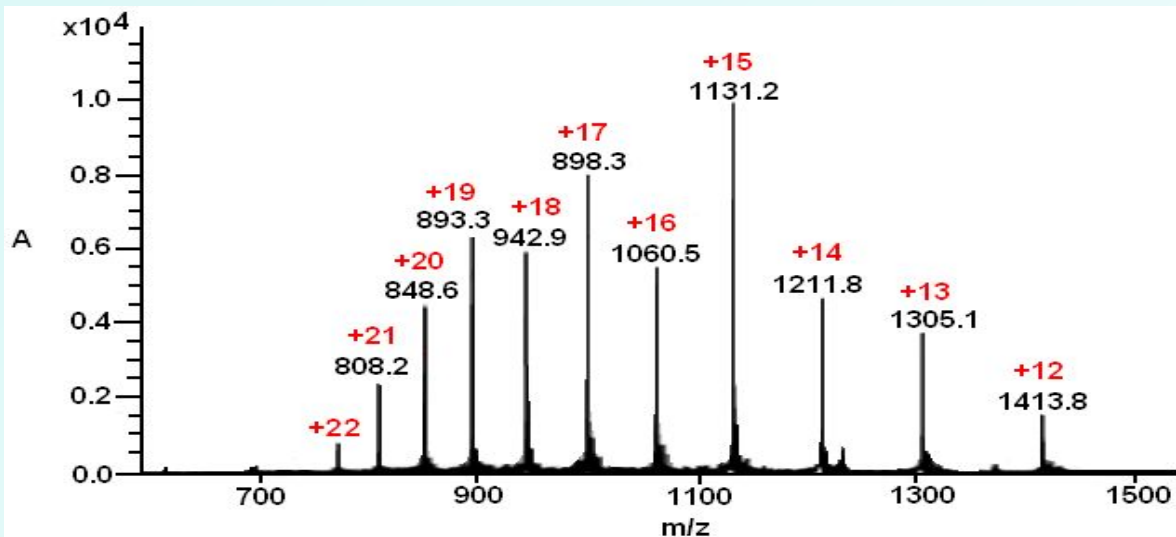
$$M_2 = \text{CytC} + 12 \text{ H}^+$$

$$\text{Obs. } M_1 = [12360 + 13(1.007)] / 13 = 951.8$$

$$\text{Obs. } M_2 = [12360 + 12(1.007)] / 12 = 1031.0$$

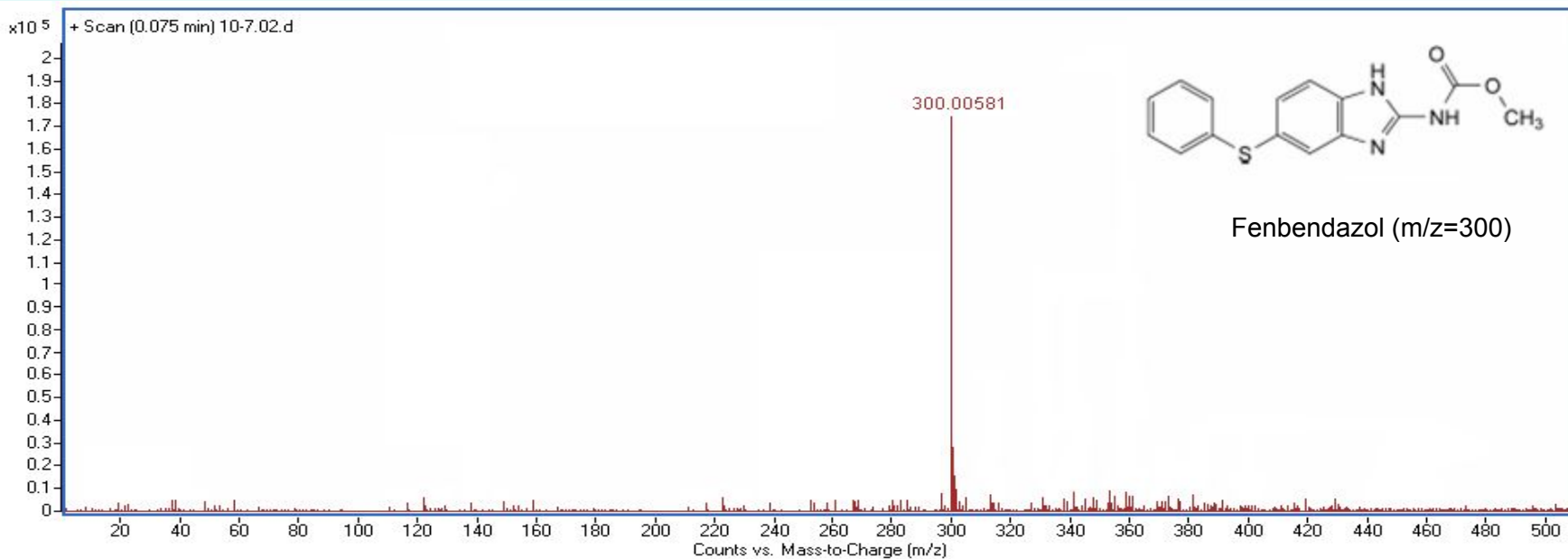
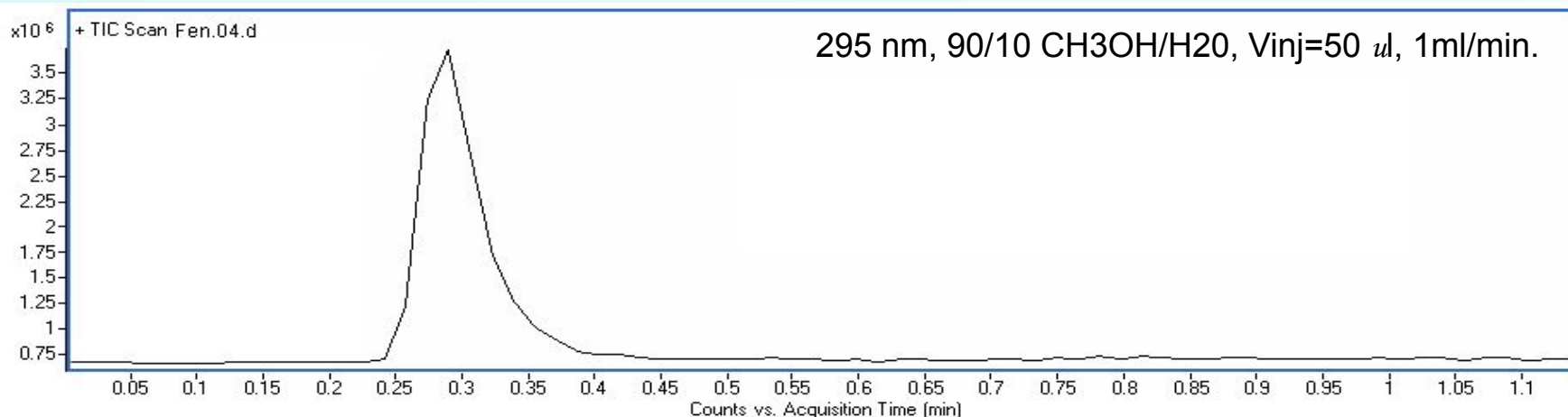


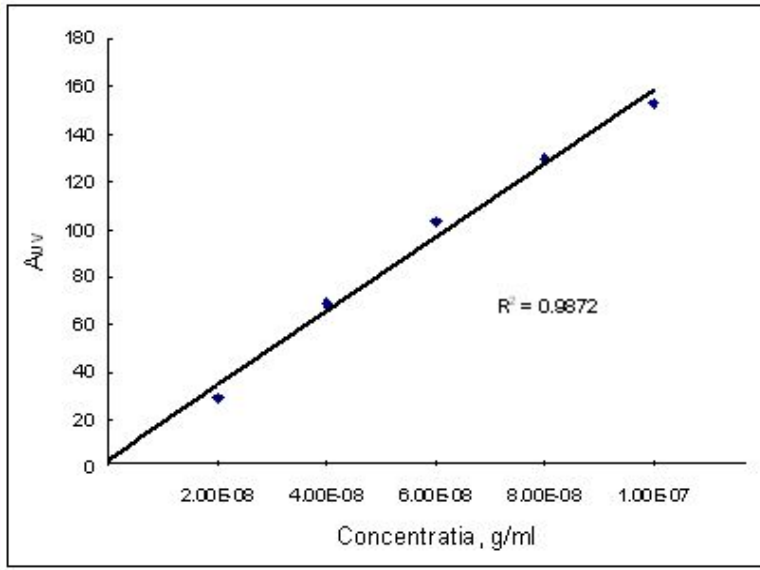
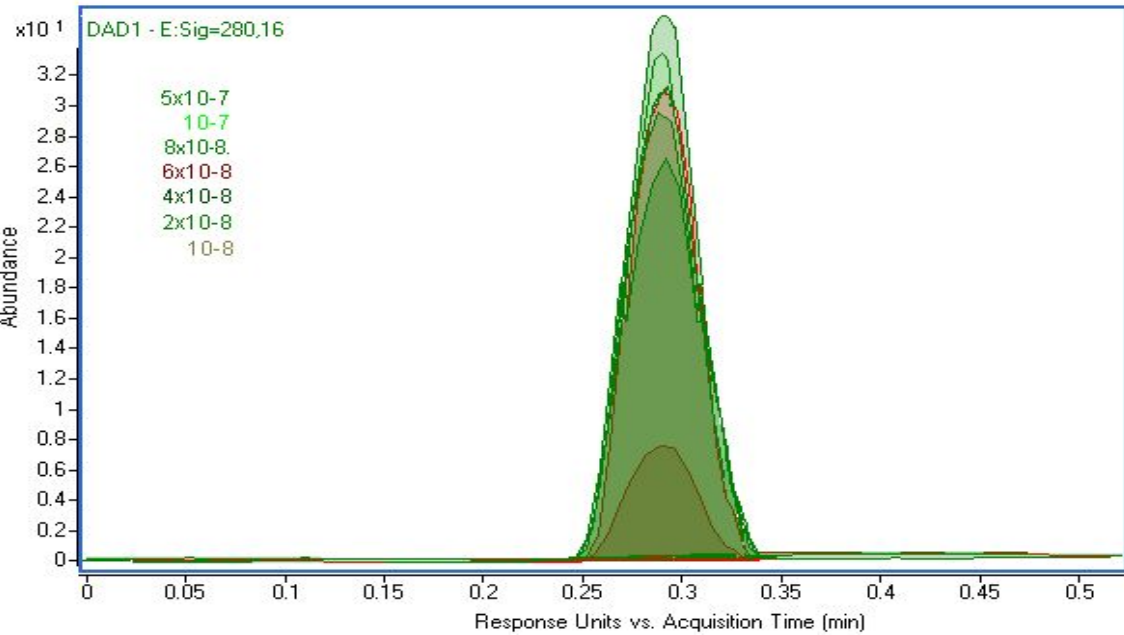
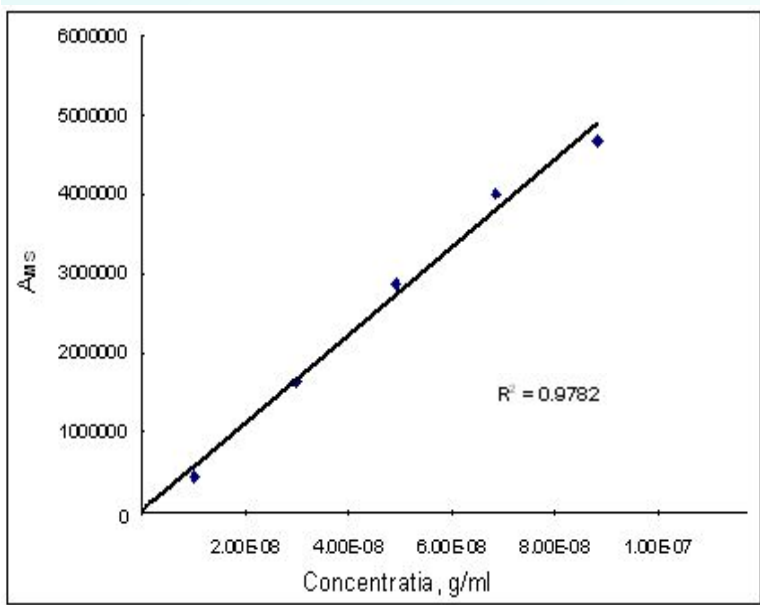
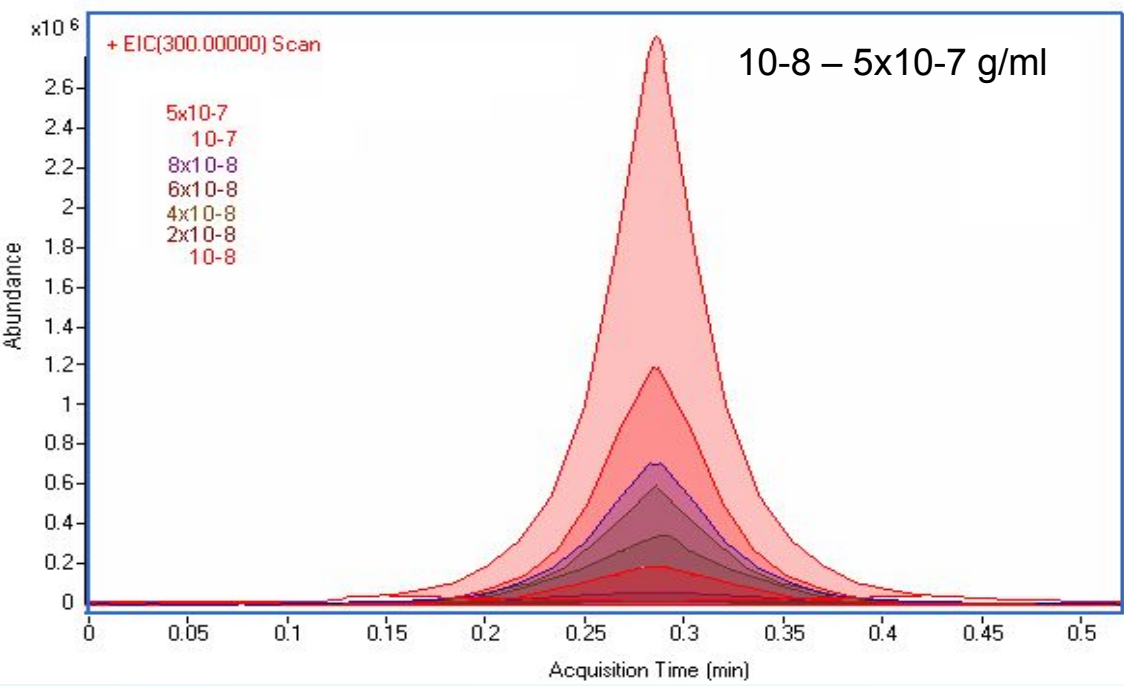
Spectrul ESI-MS polimerilor naturali



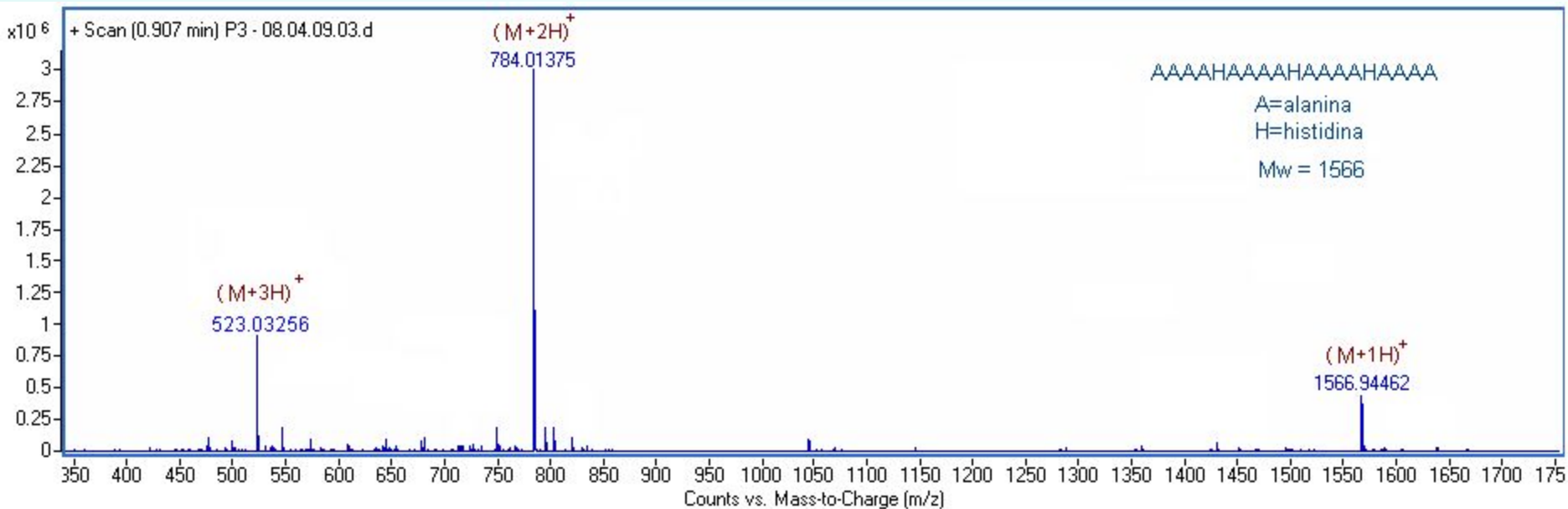
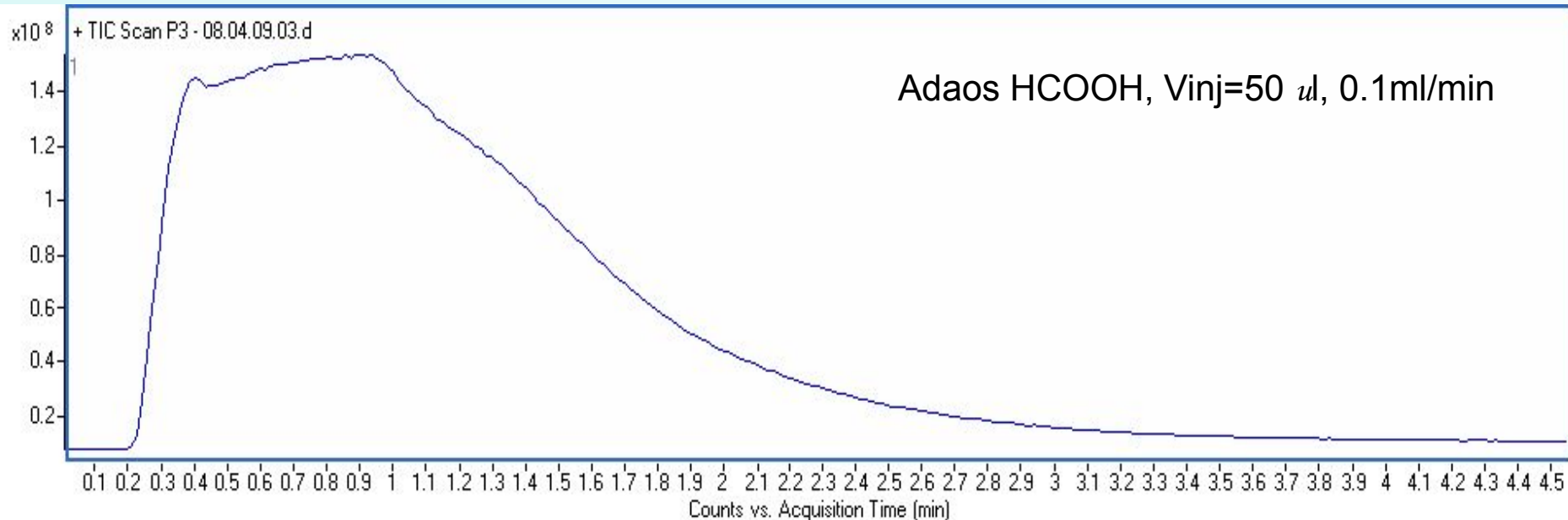
Curba calibrare – dozarea Fenbendazolului

Studiu comparativ UV-MS

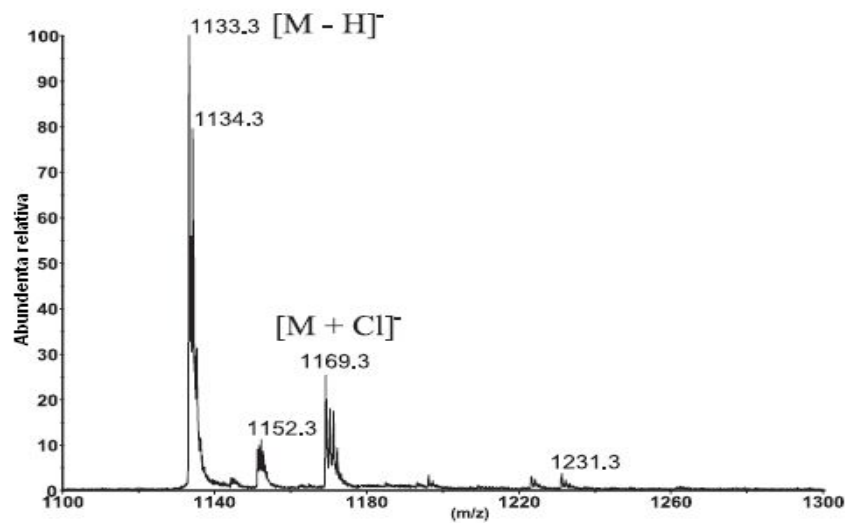
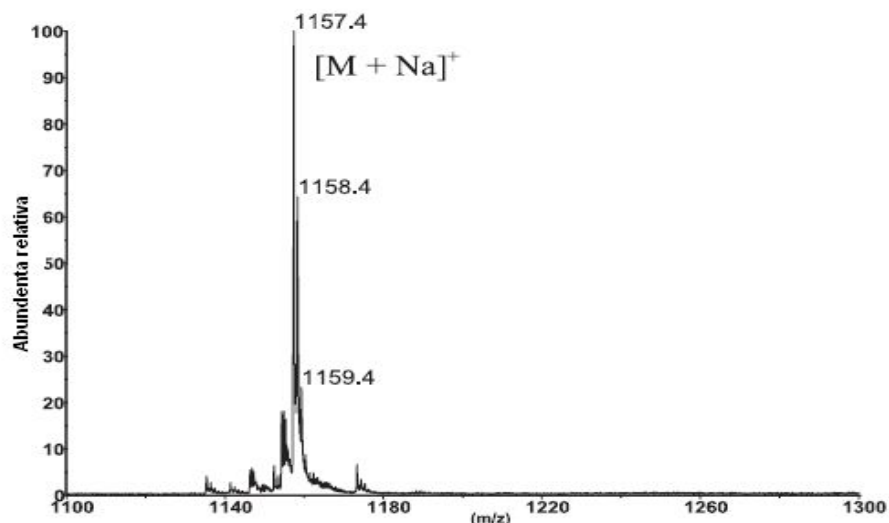




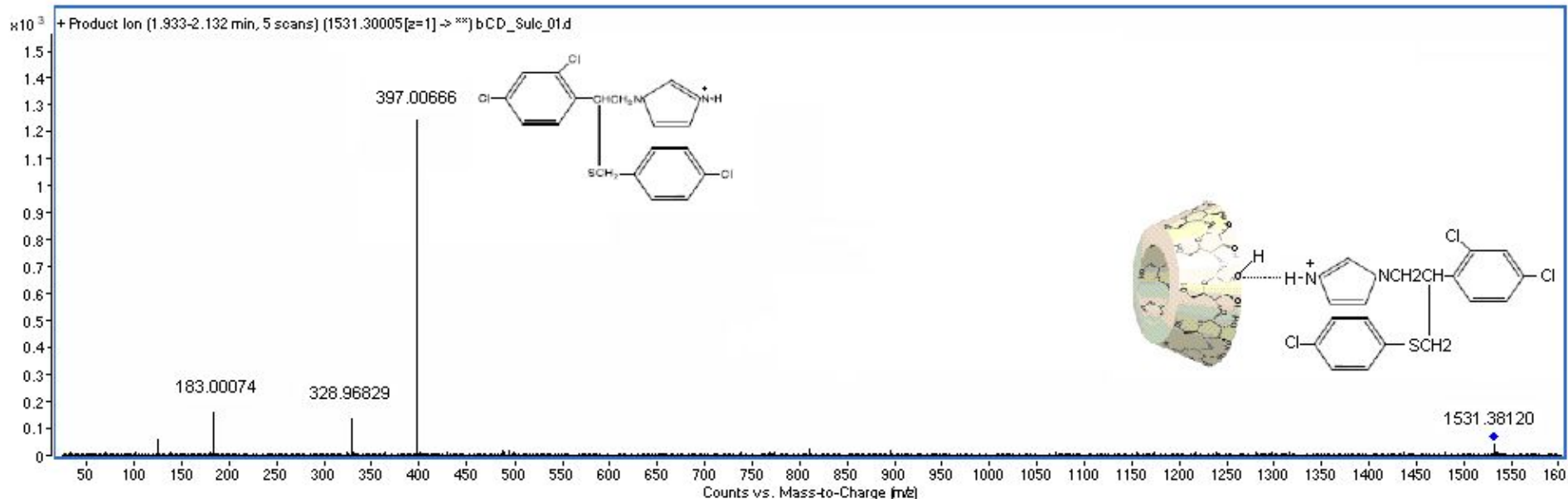
Analiza peptidelor prin ESI-MS



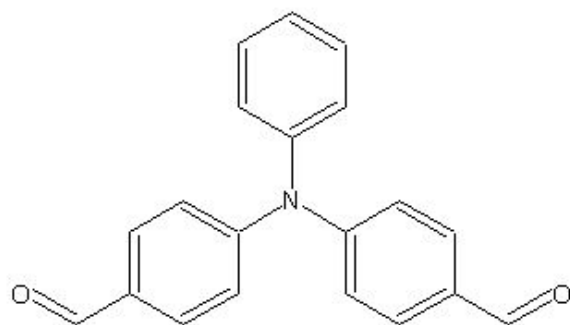
Spectrele ESI (+) si (-) ale beta-Ciclodextrinei



Spectrul de fragmentare (MS/MS) al complexului de incluziune pe baza de beta-Ciclodextrina si Sulconazol



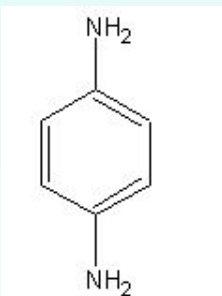
Spectrul ESI (+) al amestecului provenit din reactie de condensare a para-fenilendiaminei cu 4-[(4-formilfenil)fenilamino]benzaldehida



4-[(4-formilfenil)fenilamino]benzaldehida

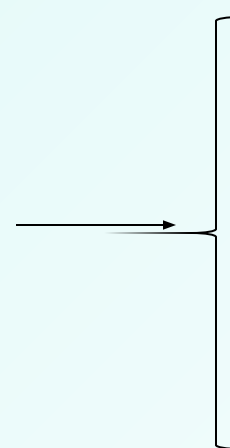
Mw = 301.339

+

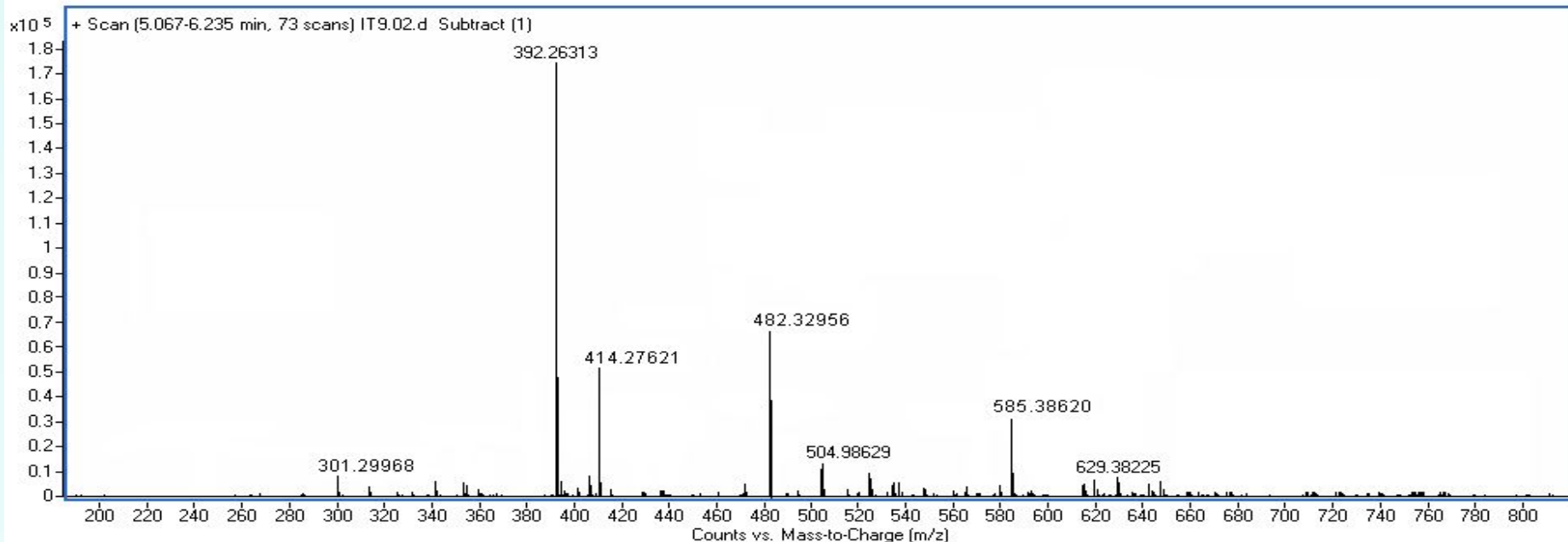


para-fenilendiamina

Mw = 108.141



- $m/z=392=301+108-18+1$
- $m/z=414=301+108-18+23$
- $m/z=482=301+2 \times 108-2 \times 18+1$
- $m/z=504=301+2 \times 108-2 \times 18+23$
- $m/z=607=2 \times 301-18+1$
- $m/z=629=2 \times 301-18+23$



Avantajele cuplării HPLC/MS

- Cromatografia – metoda “oarba” → achiziție simultană atât a timpilor de retenție, cât și a maselor moleculare ale componentelor din amestec ;
- Polimeri sintetici cu indice de polidispersitate crescut – eficiența de ionizare inegală pentru componentii probei – necesitatea separării prealabile – LC sau GPC
- Nu există degradare termică
- Analiză rapidă
- Cantități foarte mici de probă, sensibilitate înaltă
- Informații structurale prin LC/MS/MS
- Masa moleculară medie sau indicii de polidispersitate pot fi utilizați pentru a verifica procedurile de sinteză, în studiul mecanismelor de degradare, determinarea aditivilor și a impurităților, etc.
- Determinarea masei moleculare absolute a lanțurilor macromoleculare spre deosebire de tehnicile cromatografice precum SEC care furnizează valori relative.