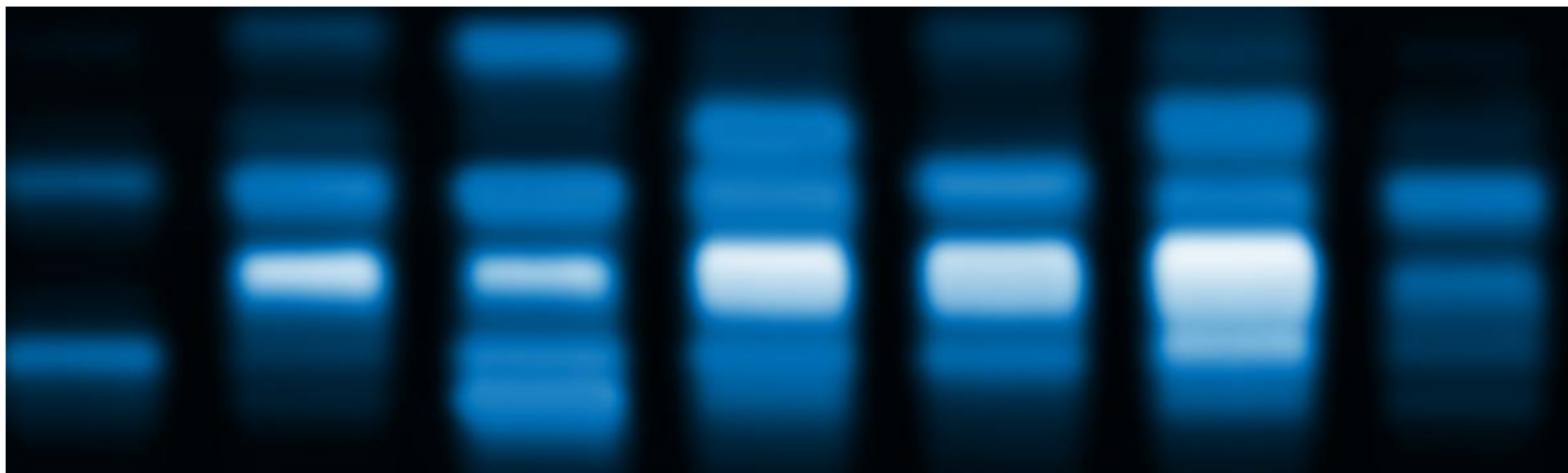


L'HPTLC couplée à la Spectrométrie de Masse Tandem pour l'analyse structurale de mélanges complexes à base de lipides



Vicente L. Cebolla

Instituto de Carboquímica, CSIC
Zaragoza, Spain

Introduction

- ➔ TLC a connu un grand développement instrumental ces dernières années
- ➔ Le couplage avec MS a ouvert une nouvelle ère dans la technologie HPTLC

But: évaluer si le couplage direct HPTLC-ESI Tandem MS via l'interface CAMAG peut contribuer d'une certaine façon à l'identification structurale des lipides dans des échantillons complexes par MS/MS (MS^n) et HR-MS



Des adduits de sodium sont formés chez les lipides complexes lorsque des spectres ESI + sont obtenus à partir de la plaque chromatographique

★ **Lipides neutres dans les FAME-ex biodiesel**

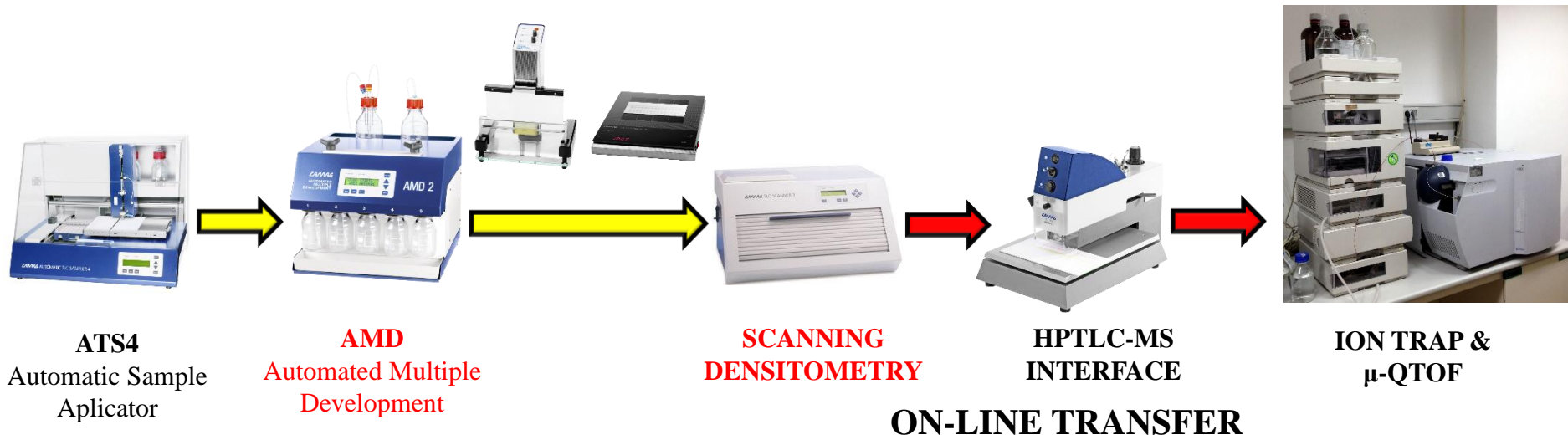
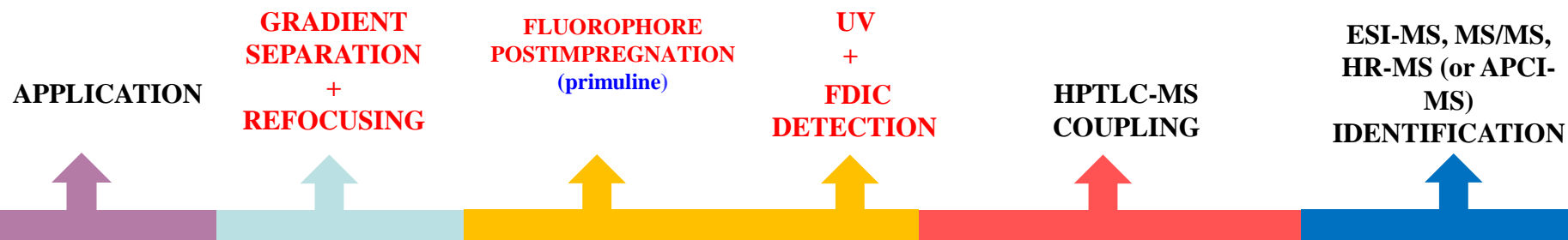
➔ Des profils et identification structural individual de MG, FA, DG (impuretés)

★ **Des sphingolipides dans le plasma humain**

➔ Des espèces moléculaires de SMs et Gb3

Couplage séquentiel HPTLC (AMD)-Densitometrie-MS

DETECTION AND QUANTIFICATION

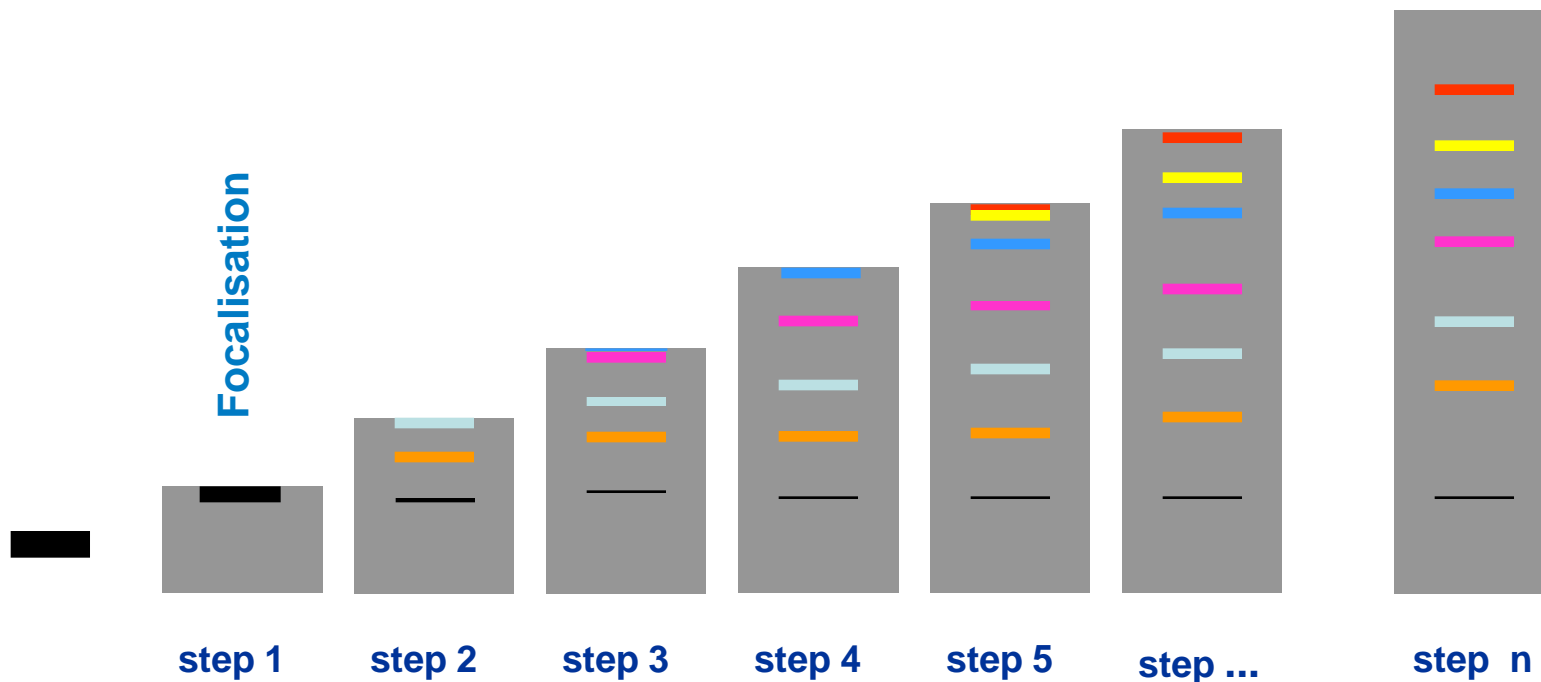


HPTLC

API-MS

Le principe de l'AMD

Developpement multi-étape



Automated Multiple Development (AMD)

Pour des échantillons complexes
avec un large interval de polarité



- ✓ Des étapes à 1-2 mm
- ✓ Composition différente dans chaque étape
- ✓ Répétabilité: ± 0.45 mm / 90 mm total m.d.
- ✓ Gradient jusqu'à 5 solvantes

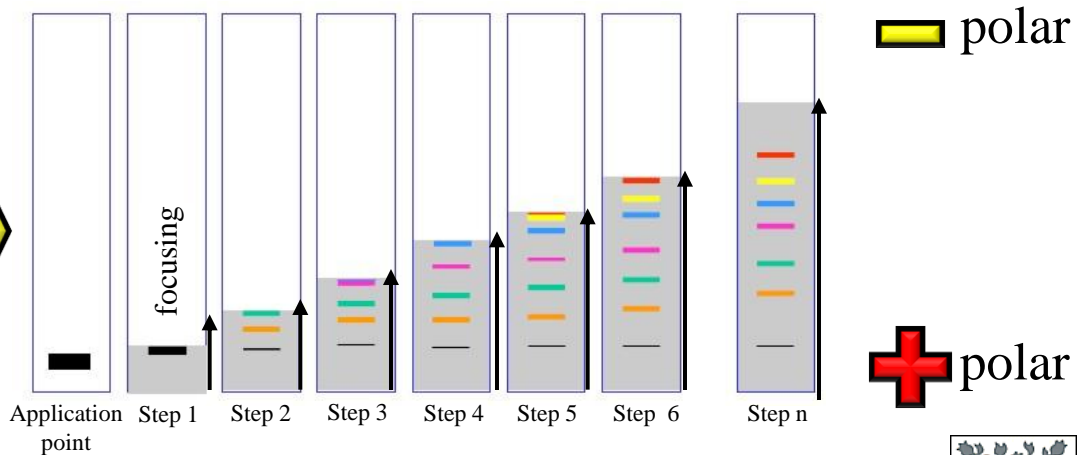
Developpement incremental



Gradient

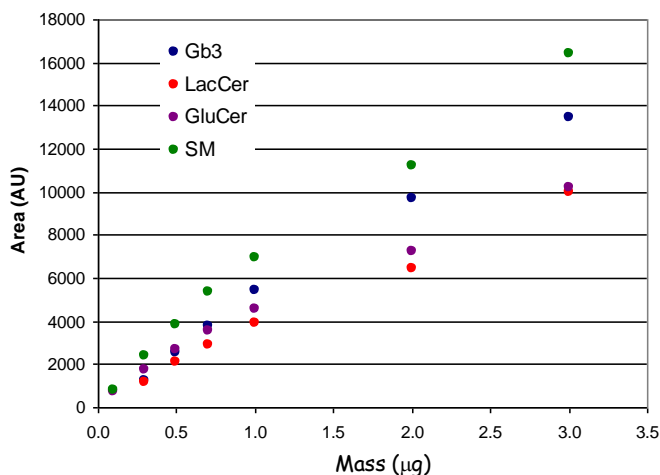
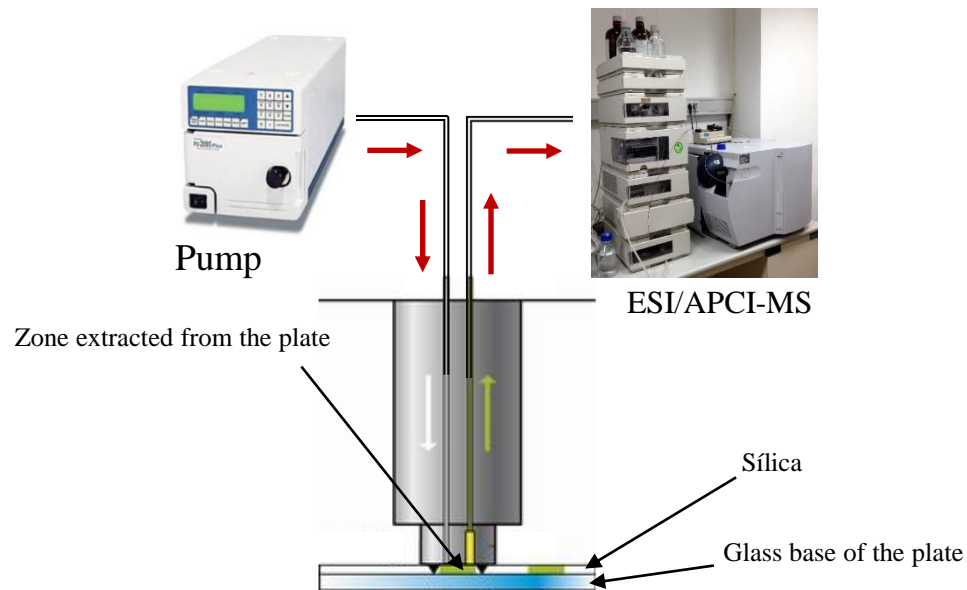
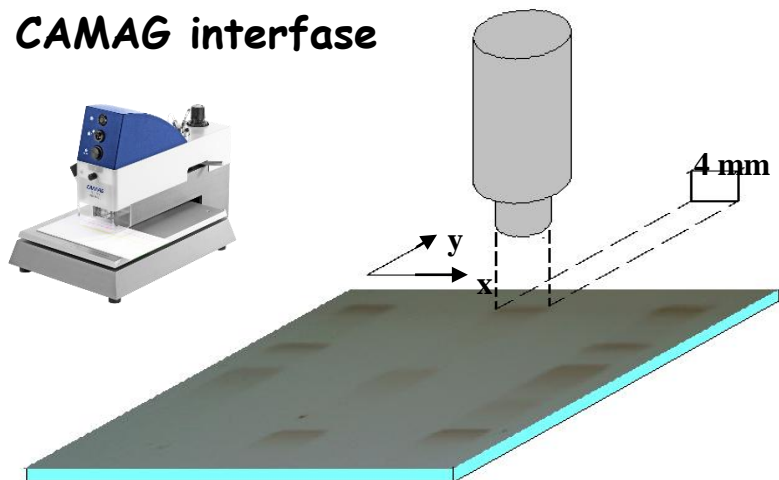


Refocalization



Couplage HPTLC-MS

CAMAG interfase



UV ou/et

FDIC-primuline pour détection et quantification:

- Permet une détection quasi-universelle
- Plus sensible que l'UV
- (Semi)Quantification des pics séparés
- Réperer les coordonnées

Primuline n'interfère pas avec les spectres MS

- ◆ *ESI-MS, MS/MS (MSⁿ), HR-MS*
- ◆ *directement à partir de la plaque, via interfase*

Des adduits de sodium provenant d'une variété de lipids peuvent être fragmentés en mode ESI+ avec une technologie type trappe à ions. Le sodium reste comme la charge des ions fragmentés. Ceci est utile pour leur identification structurelle par MSⁿ et HR-MS

Quadripôle trappe à ions

MS/MS ou MSⁿ: degré élevé d'information structurel

Bien adapté lorsqu'un nombre défini de lipides doit être analysé

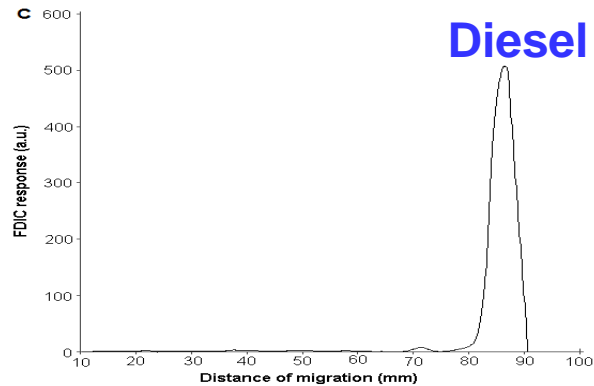
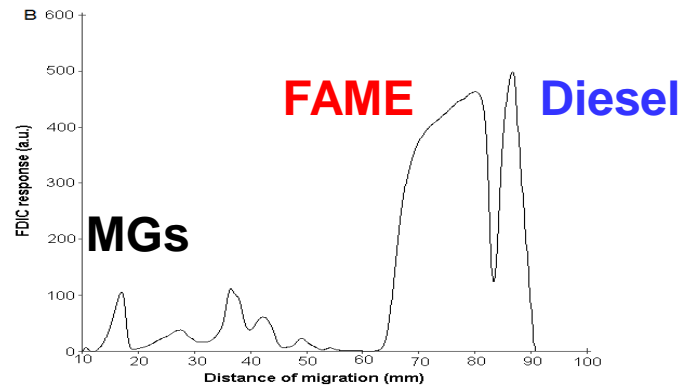
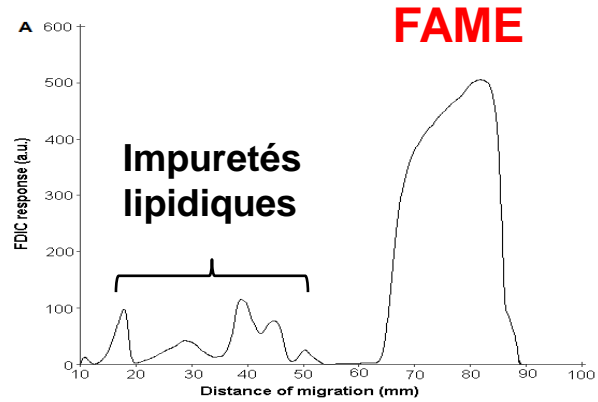
μ-QToF

Haute Resolution (HR-MS), masse exacte

FAME-based biodiesel

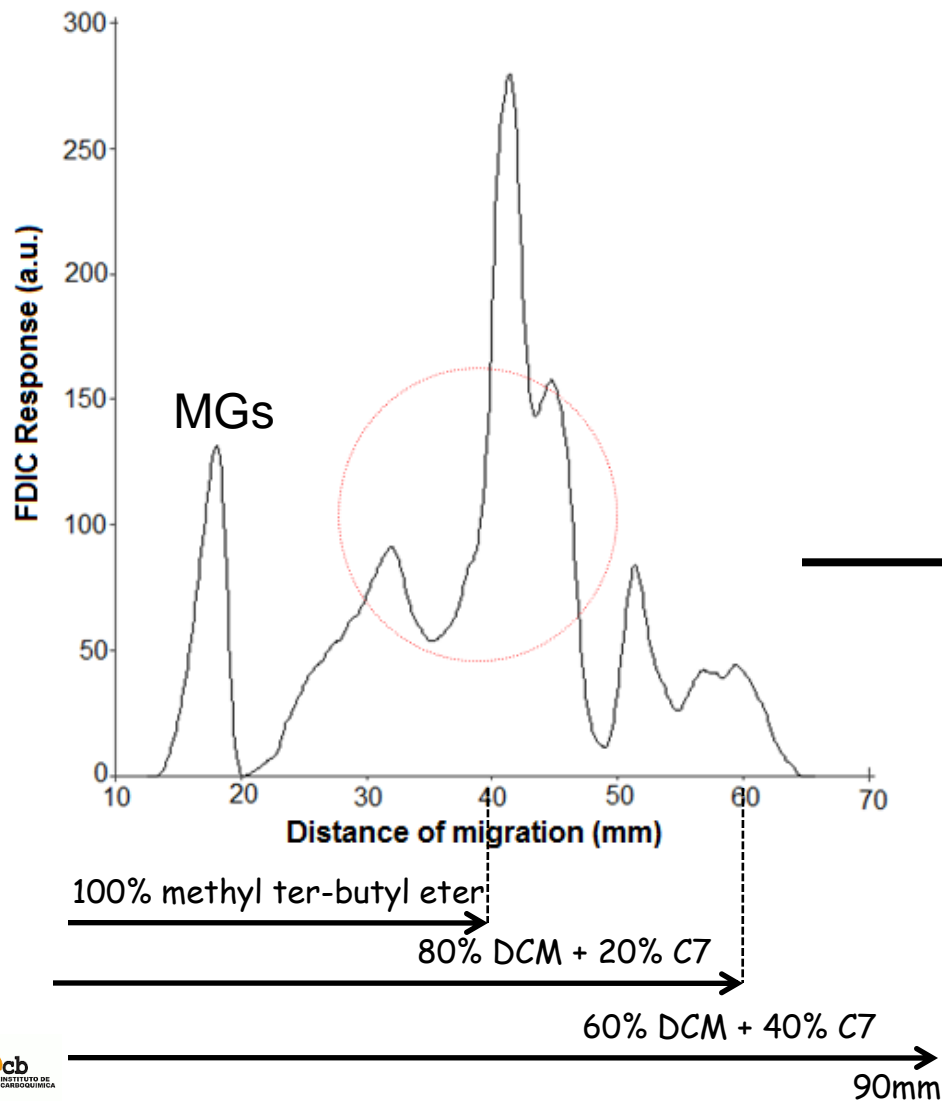
(FAME=EMAG)

Methyl t-butyl ether	DCM	C7	Migration/mm
100.0 Vol %	0.0 Vol %	0.0 Vol %	40.0mm
0.0 Vol %	80.0 Vol %	20.0 Vol %	60.0mm
0.0 Vol %	60.0 Vol %	40.0 Vol %	90.0 mm

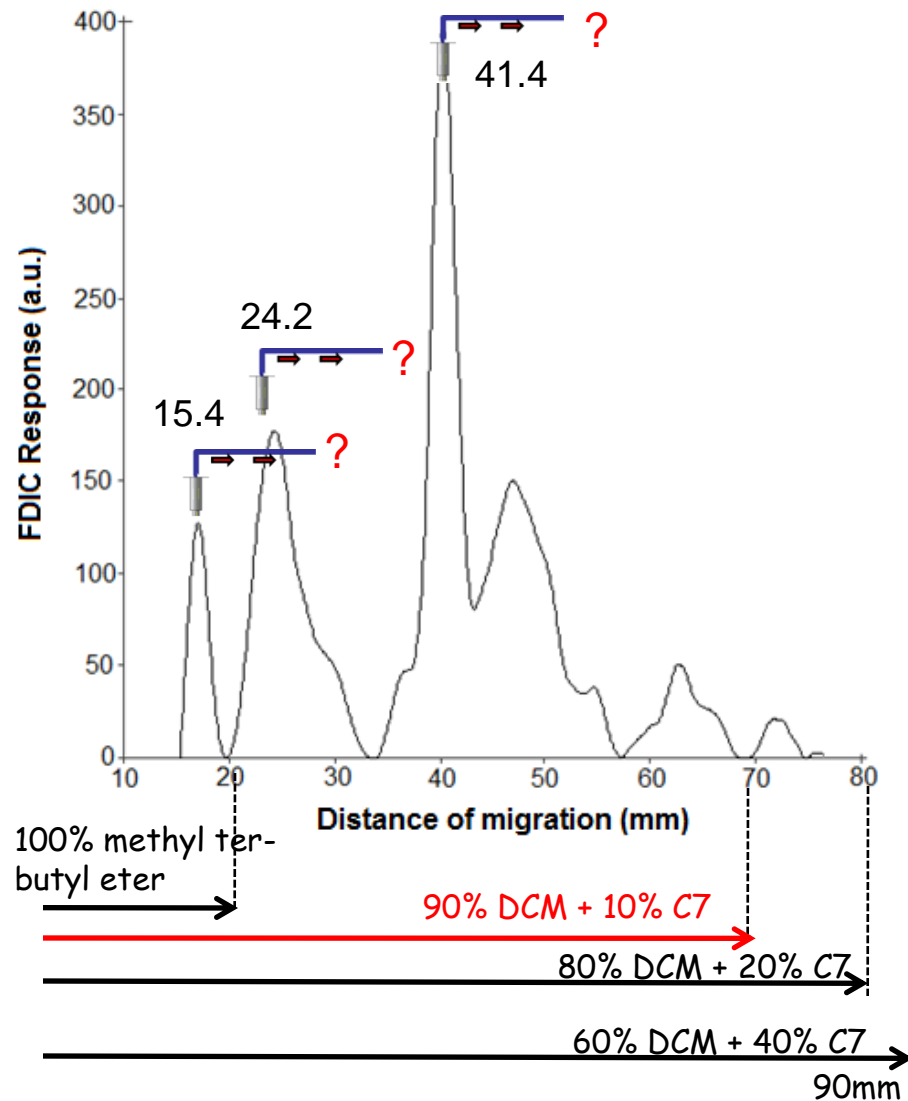


FAME-BIODIESEL: séparation AMD de classes de lipides

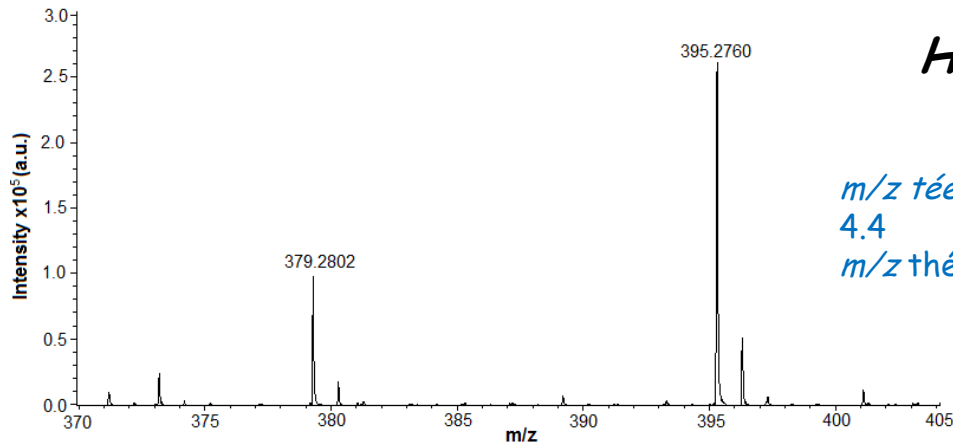
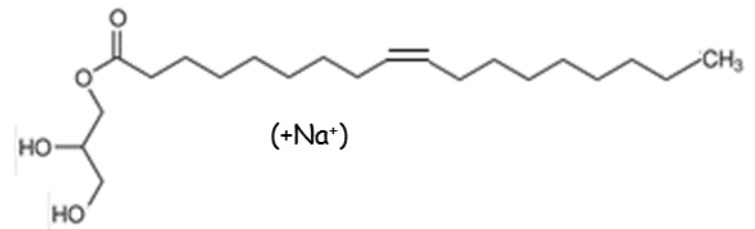
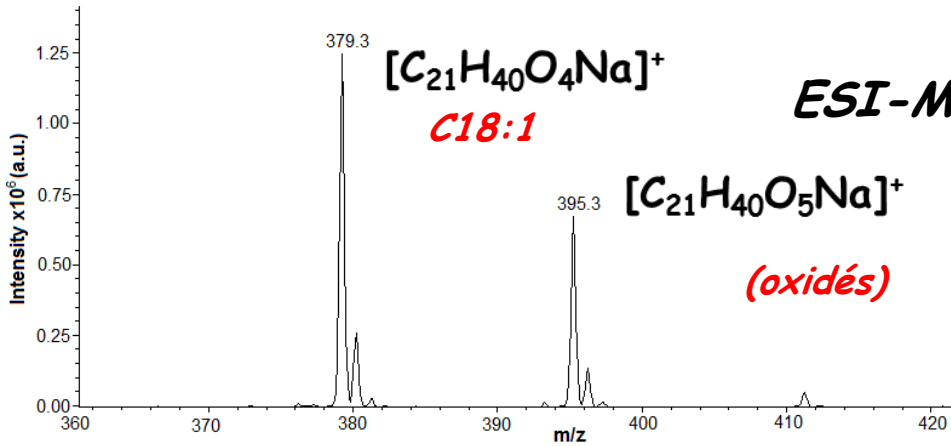
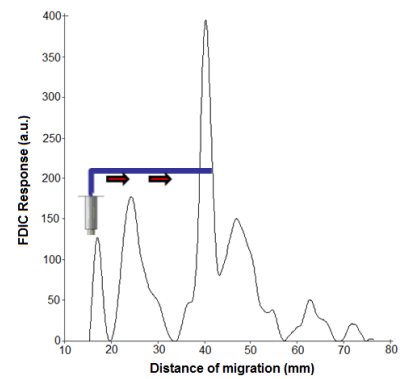
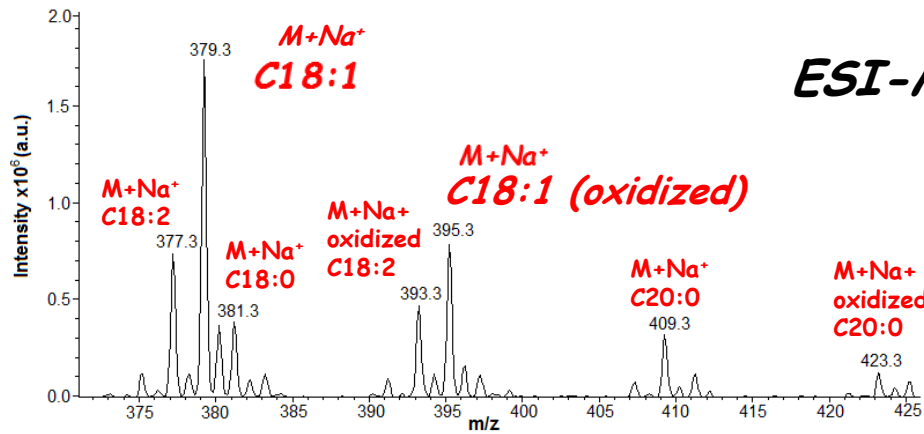
Methyl t-butyl ether	DCM	C7	Migration/mm
100.0 Vol %	0.0 Vol %	0.0 Vol %	40.0mm
0.0 Vol %	80.0 Vol %	20.0 Vol %	60.0mm
0.0 Vol %	60.0 Vol %	40.0 Vol %	90.0 mm



Methyl t-butyl ether	DCM	C7	Migration/mm
100.0 Vol %	0.0 Vol %	0.0 Vol %	20.0mm
0.0 Vol %	90.0 Vol %	10.0 Vol %	70.0mm
0.0 Vol %	80.0 Vol %	20.0 Vol %	80.0mm
0.0 Vol %	60.0 Vol %	40.0 Vol %	90.0 mm



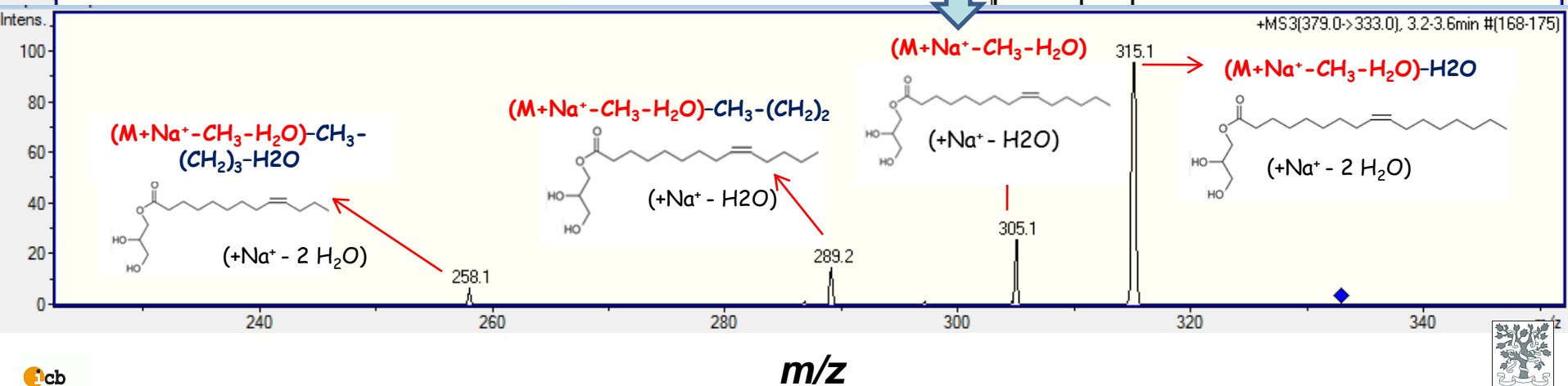
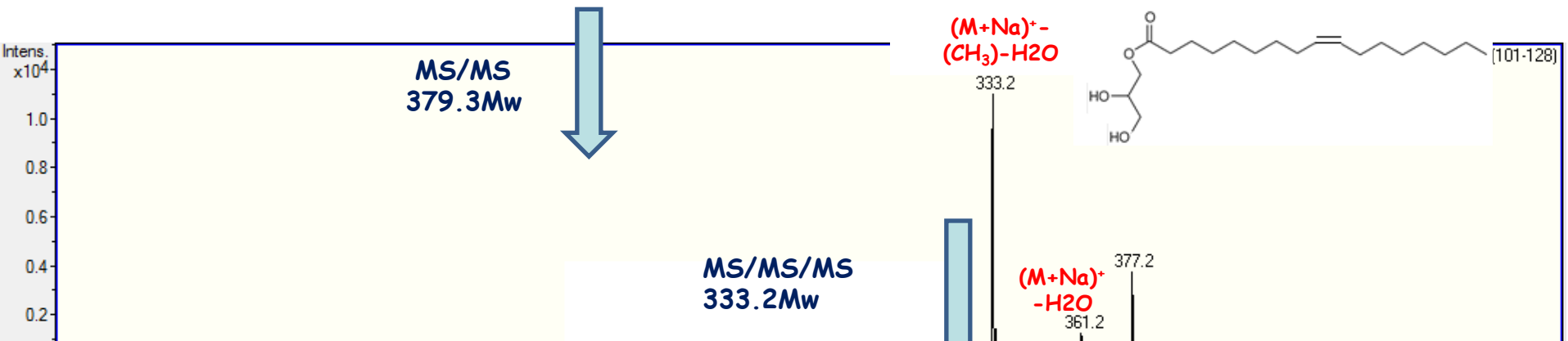
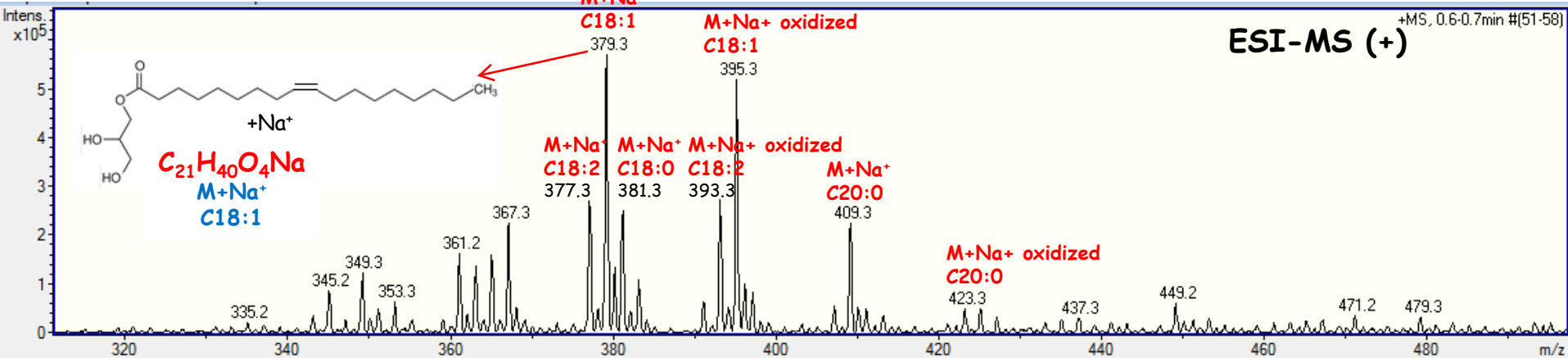
Peak 1 (15.4 mm): Mono-acylglycerides



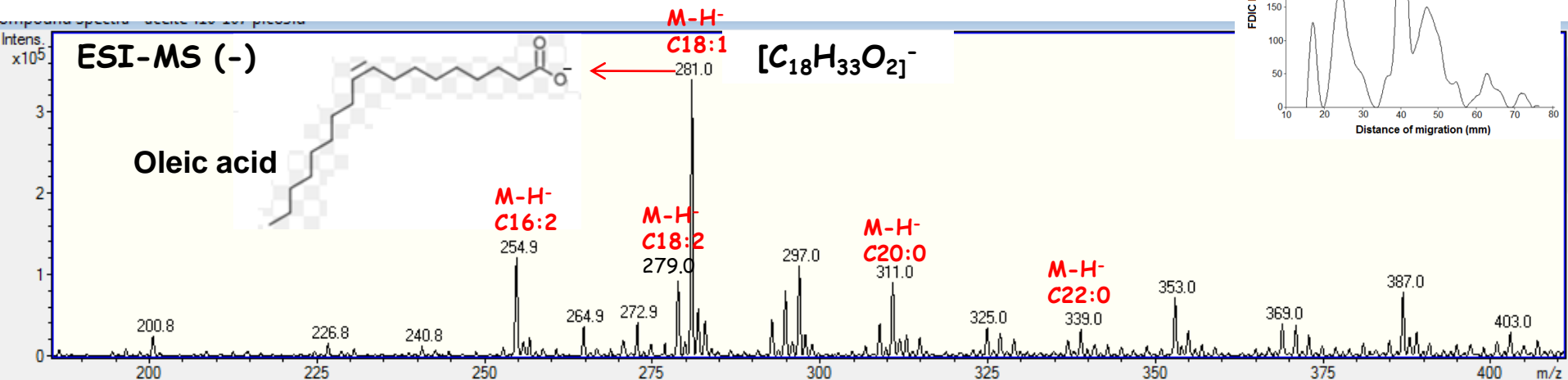
m/z théorique = 379.2819, err (mDa) = 1.7 and err (ppm) = 4.4

m/z théorique = 393.2768, err (mDa) = 0.8 and err (ppm) = 1.9

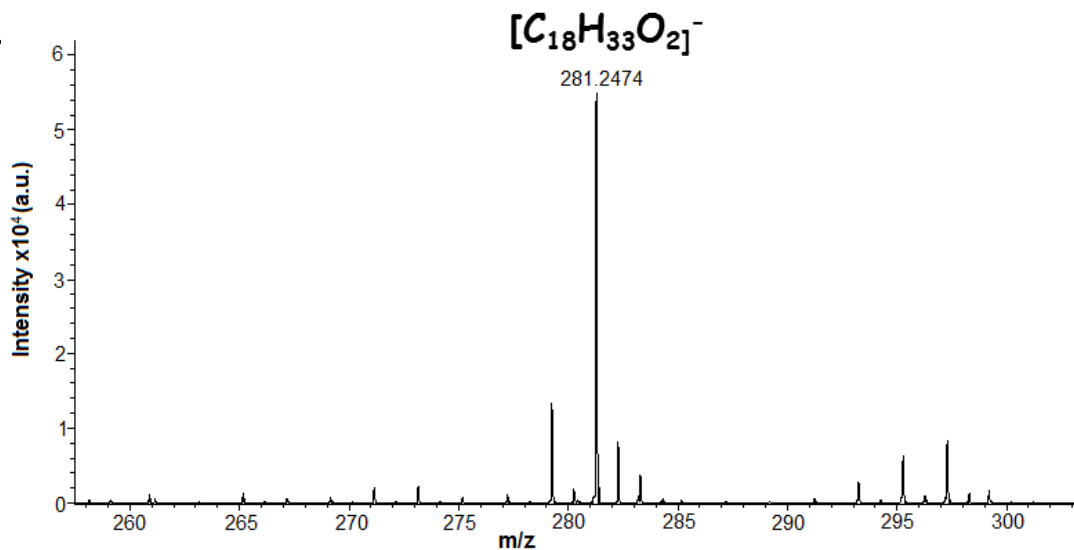
Pic 1(15.4 mm): Mono-acylglycerides



Pic 2 (24.2 mm): Acides gras

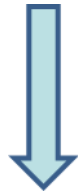


ESI HR-MS

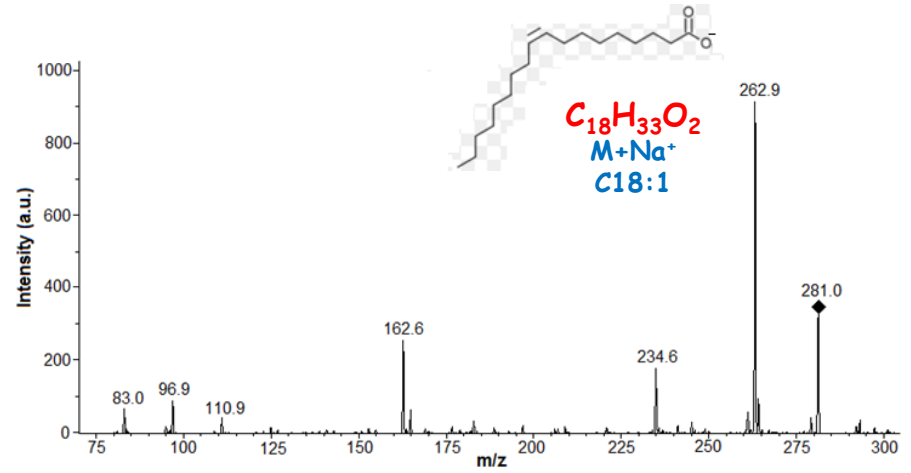
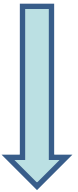


Spectre High Resolution (HR)-ESI-MS d'acide oléique dans le FAME-biodiesel à partir de la plaque; m/z theorique = 281.2486, err (mDa) = 1.2 and err (ppm) = 4.3

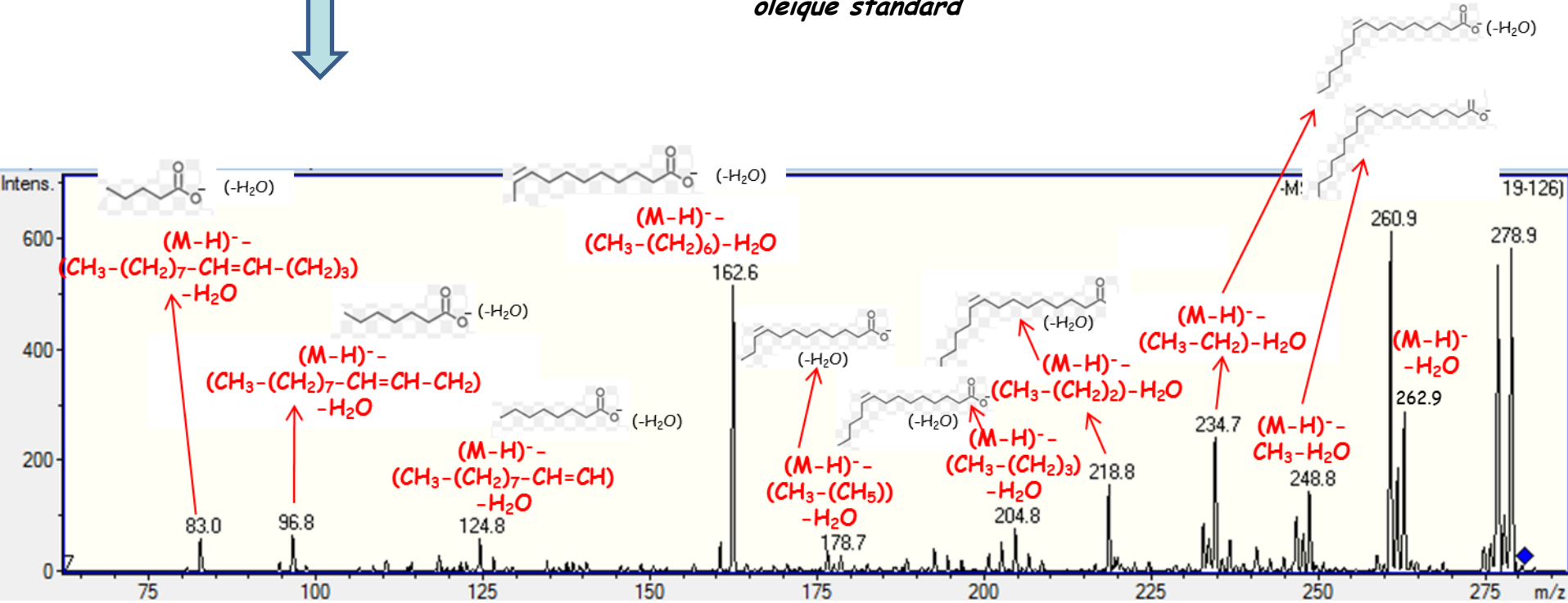
Peak 2 (24.2 mm): Acides gras



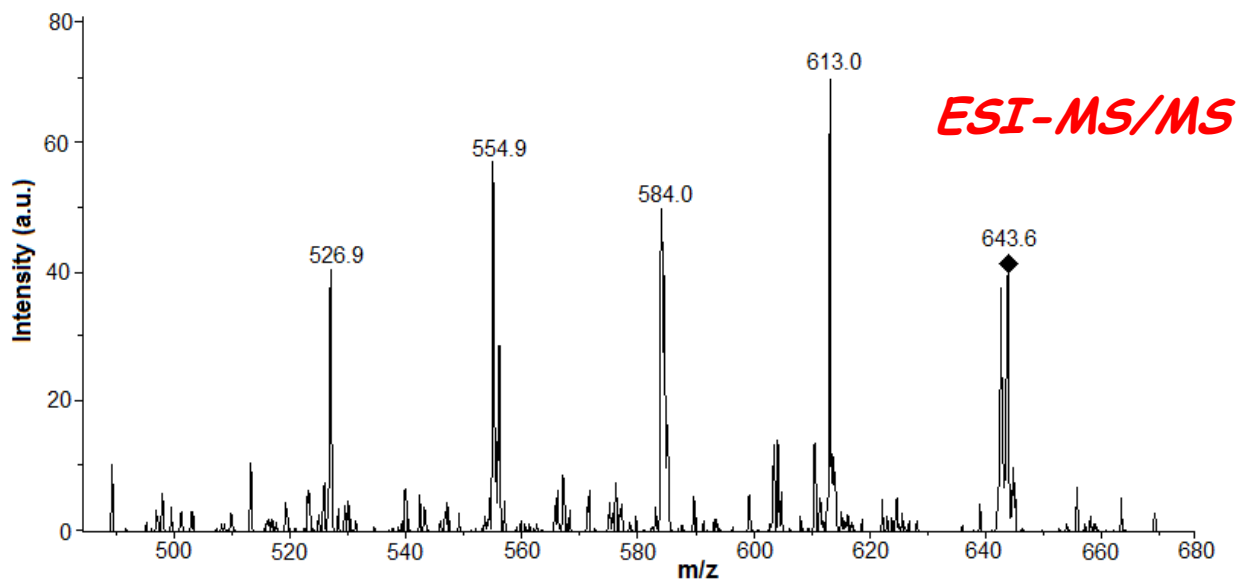
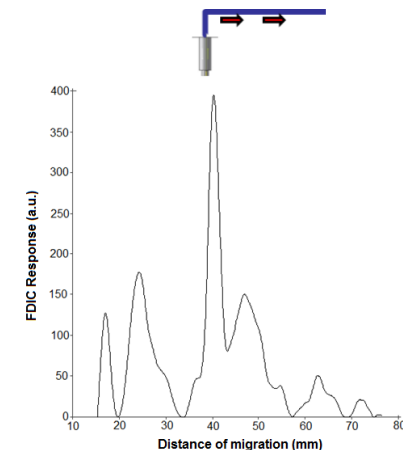
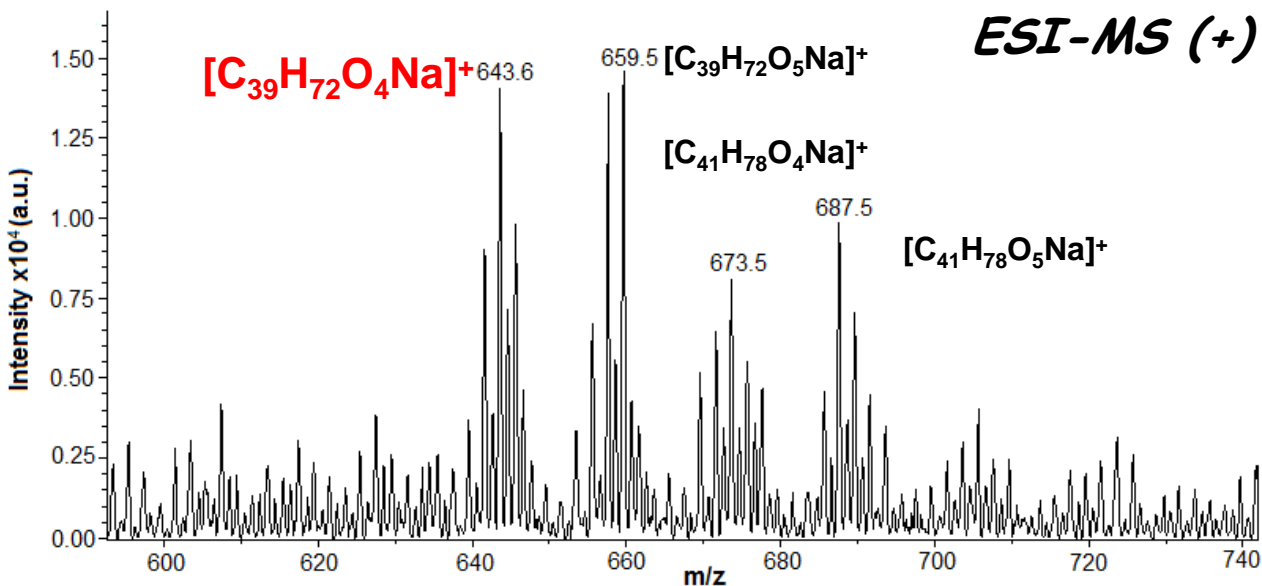
MS/MS 281



Spectre ESI-MS/MS de l'ion m/z 381 à partir de acid oléique standard



Pic 3 (41.4 mm): Diacyl-glycerides



Spectre ESI-MS/MS de l'ion m/z 643 ion à partir des DGs dans le FAME (643 → 613, 584, 554 and 526). Pertes de H_2O et de groupes CH_2

Spingolipides dans le plasma humain

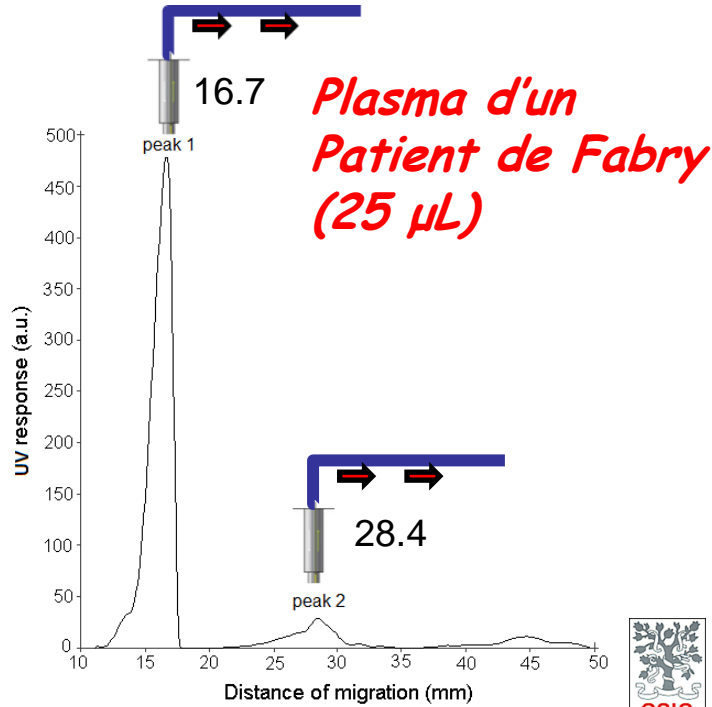
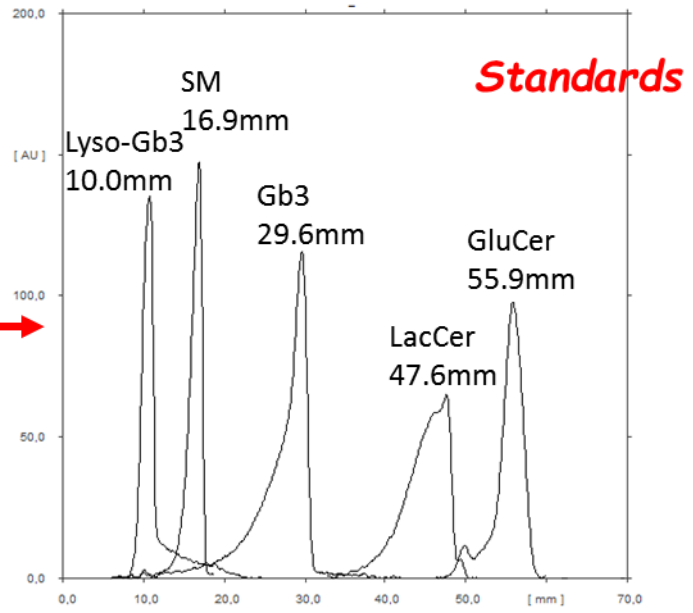
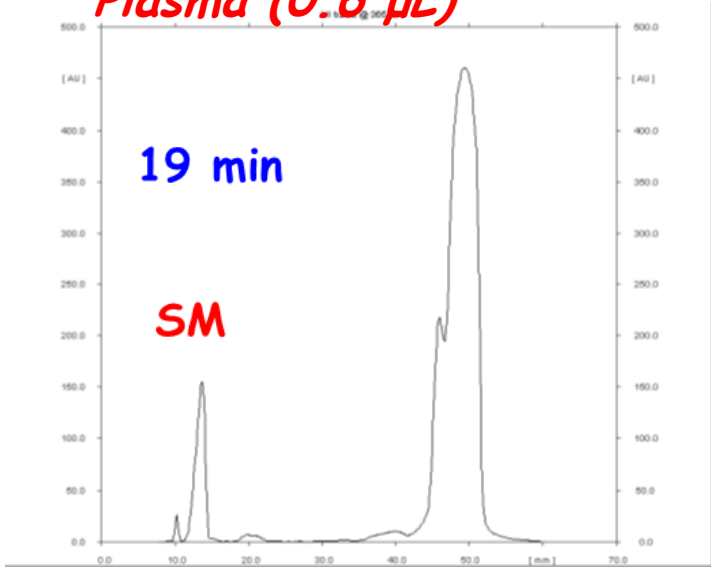
Classes d'spingolipides dans plasma par AMD

DCM	MeOH	m.d.	Drying time	
20.0 Vol %	80.0 Vol %	20.0 mm	2.0 min	SM
50.0 Vol %	50.0 Vol %	30.0 mm	2.0 min	
50.0 Vol %	50.0 Vol %	30.0 mm	2.0 min	
50.0 Vol %	50.0 Vol %	30.0 mm	2.0 min	Gb3 refocusing
50.0 Vol %	50.0 Vol %	30.0 mm	2.0 min	
50.0 Vol %	50.0 Vol %	30.0 mm	2.0 min	
70.0 Vol %	30.0 Vol %	40.0 mm	2.0 min	LacCer
80.0 Vol %	20.0 Vol %	50.0 mm	2.0 min	GluCer
90.0 Vol %	10.0 Vol %	60.0 mm	2.0 min	Cleaning

Spingomyelines à partir du plasma par AMD

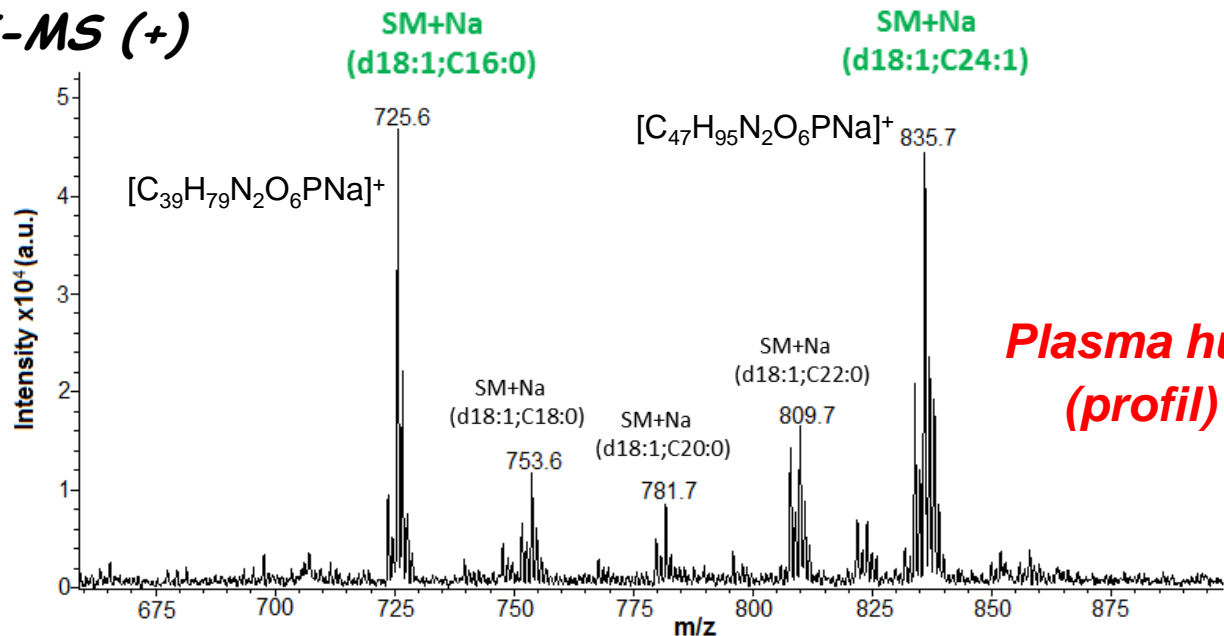
DCM	MeOH	MD
20.0 Vol %	80.0 Vol %	20.0 mm
50.0 Vol %	50.0 Vol %	50.0 mm

Plasma (0.6 µL)

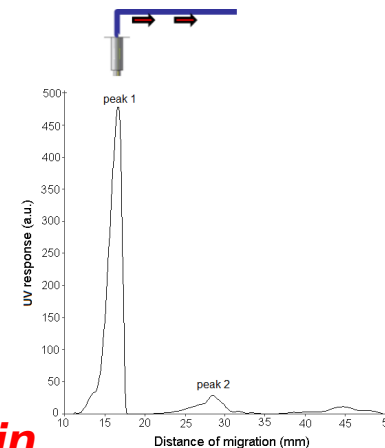


Pic 1 (16.7 mm): Sphingomyelins

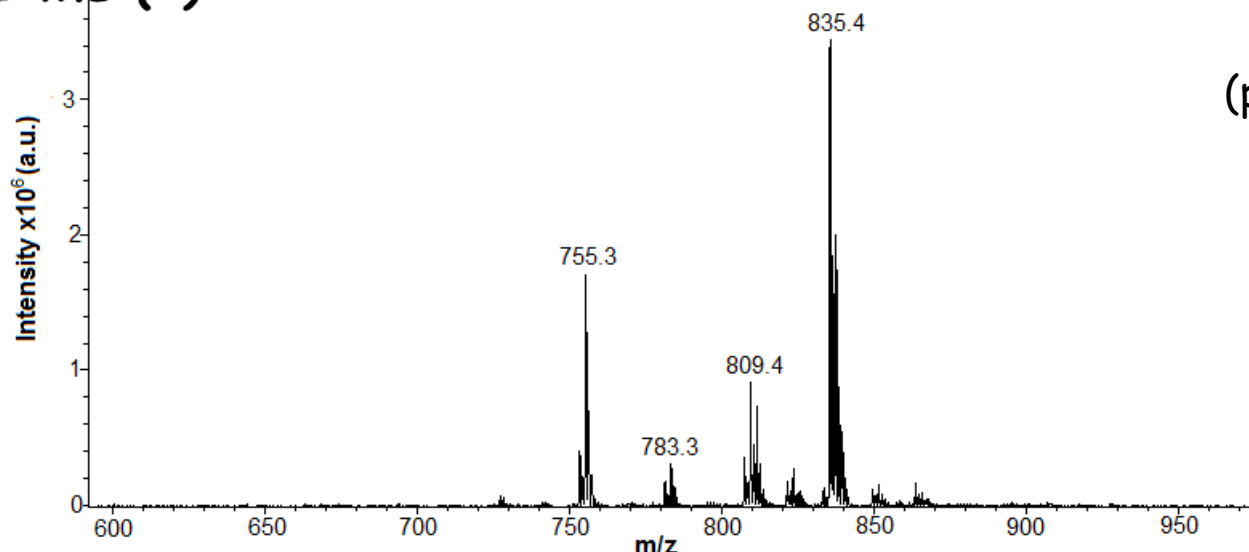
ESI-MS (+)



**Plasma humain
(profil)**



ESI-MS (+)

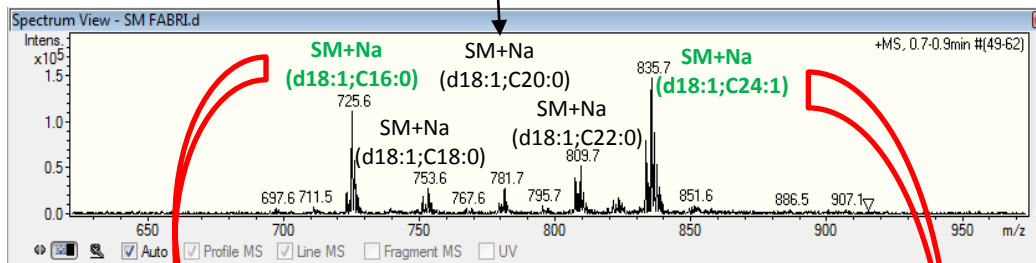


**SM standard
(pas d'origine humaine)**

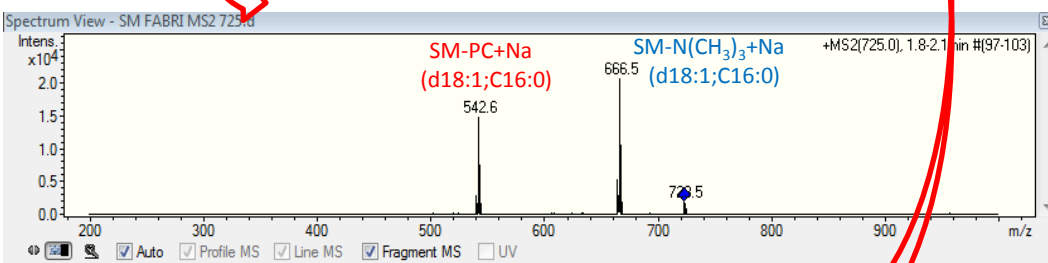
Pic 1 (16.7 mm): Sphingomyelins

Plasma humain, 30 μ L

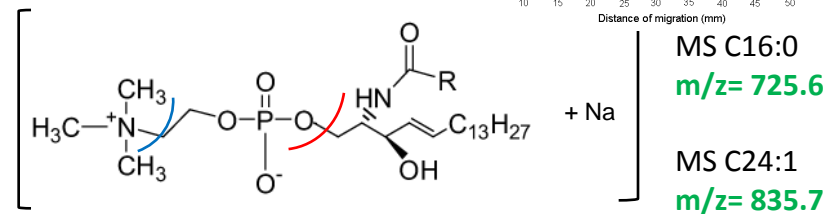
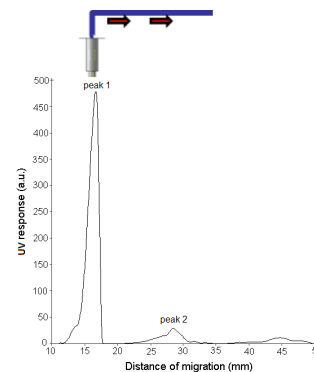
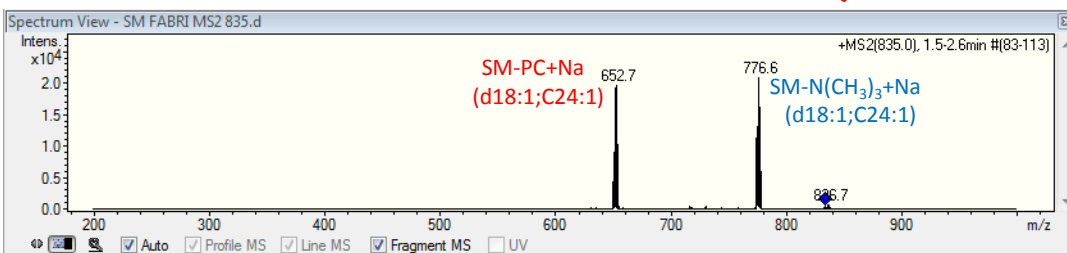
ESI-MS (+) (pic SM)



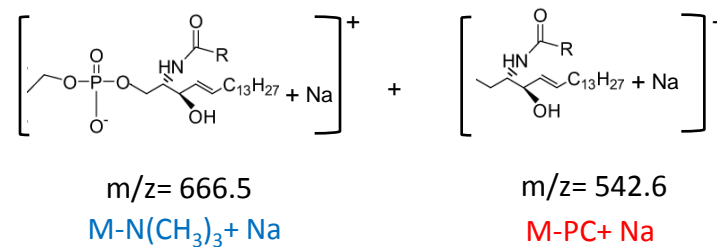
MS² (fragmentation of 725 m/z)



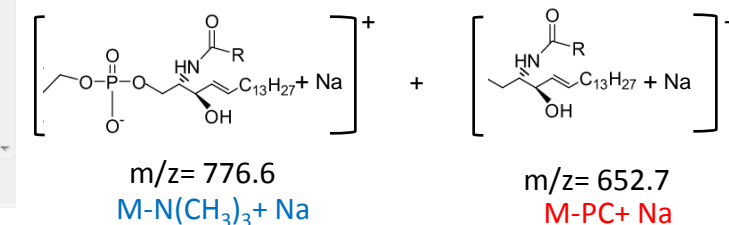
MS² (fragmentation of 835 m/z)



d18:1;C16:0

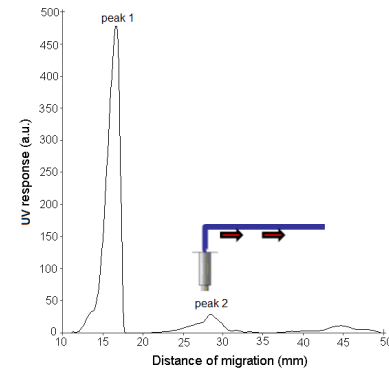
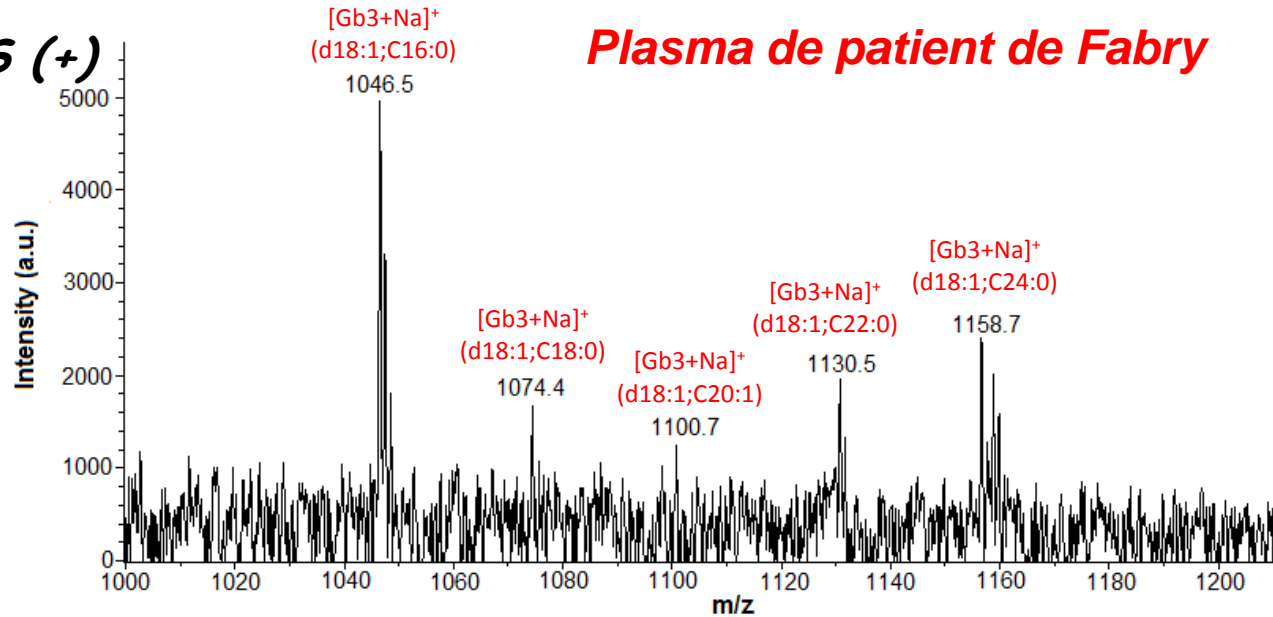


d18:1;C24:1

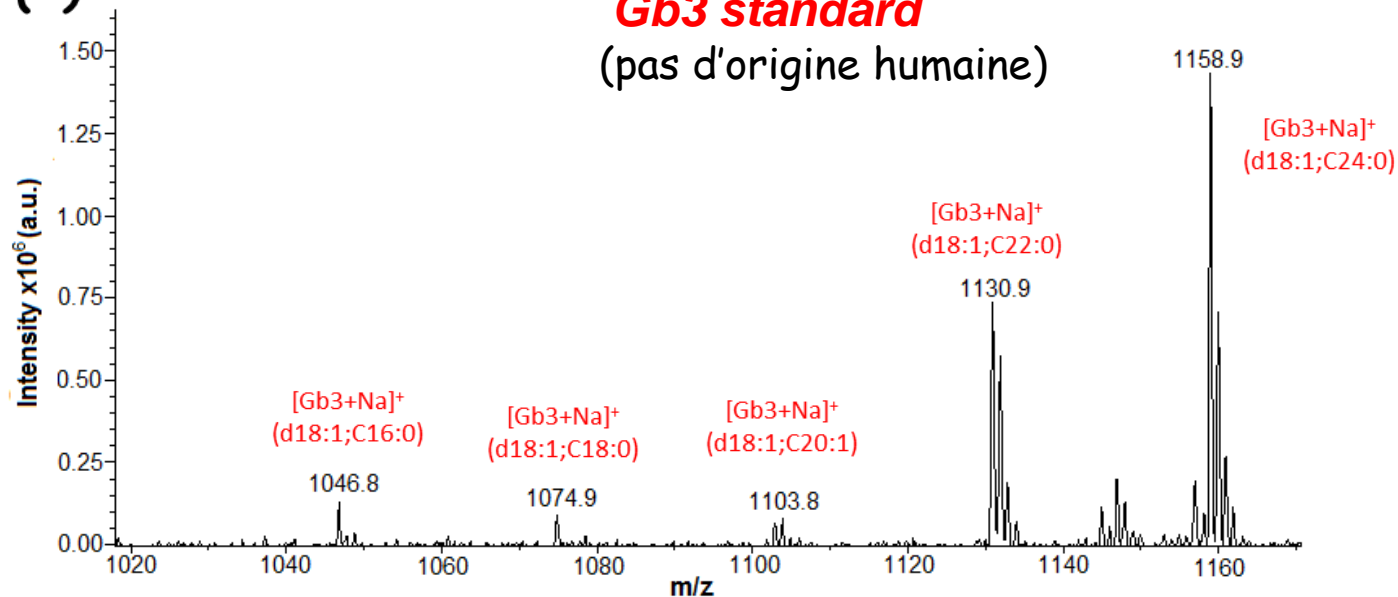


Pic 2 (28.4 mm): Gb3 (globotriaosylceramide)

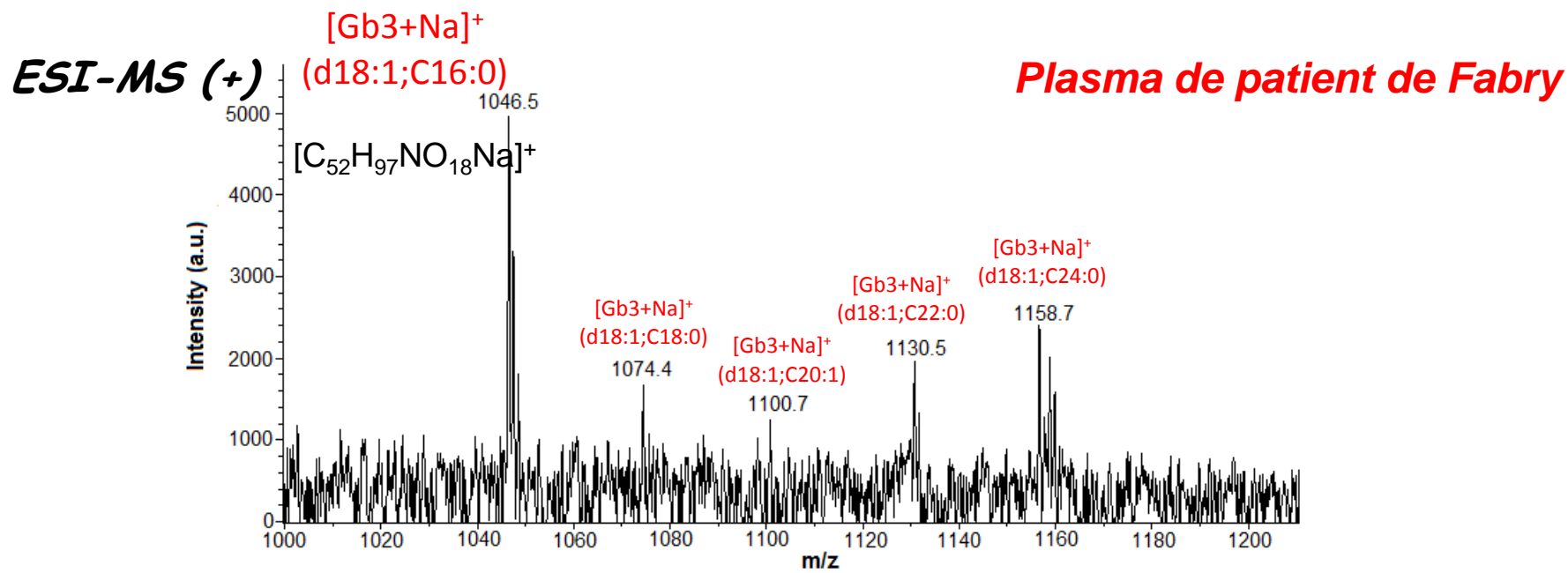
ESI-MS (+)



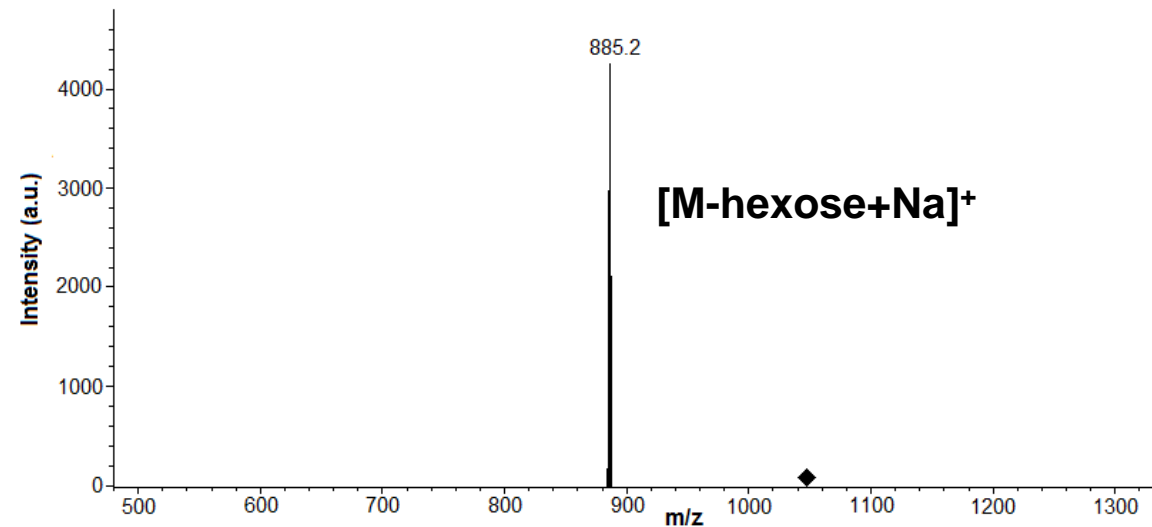
ESI-MS (+)



Pic 2 (28.4 mm): Gb3 (globotriaosylceramide)

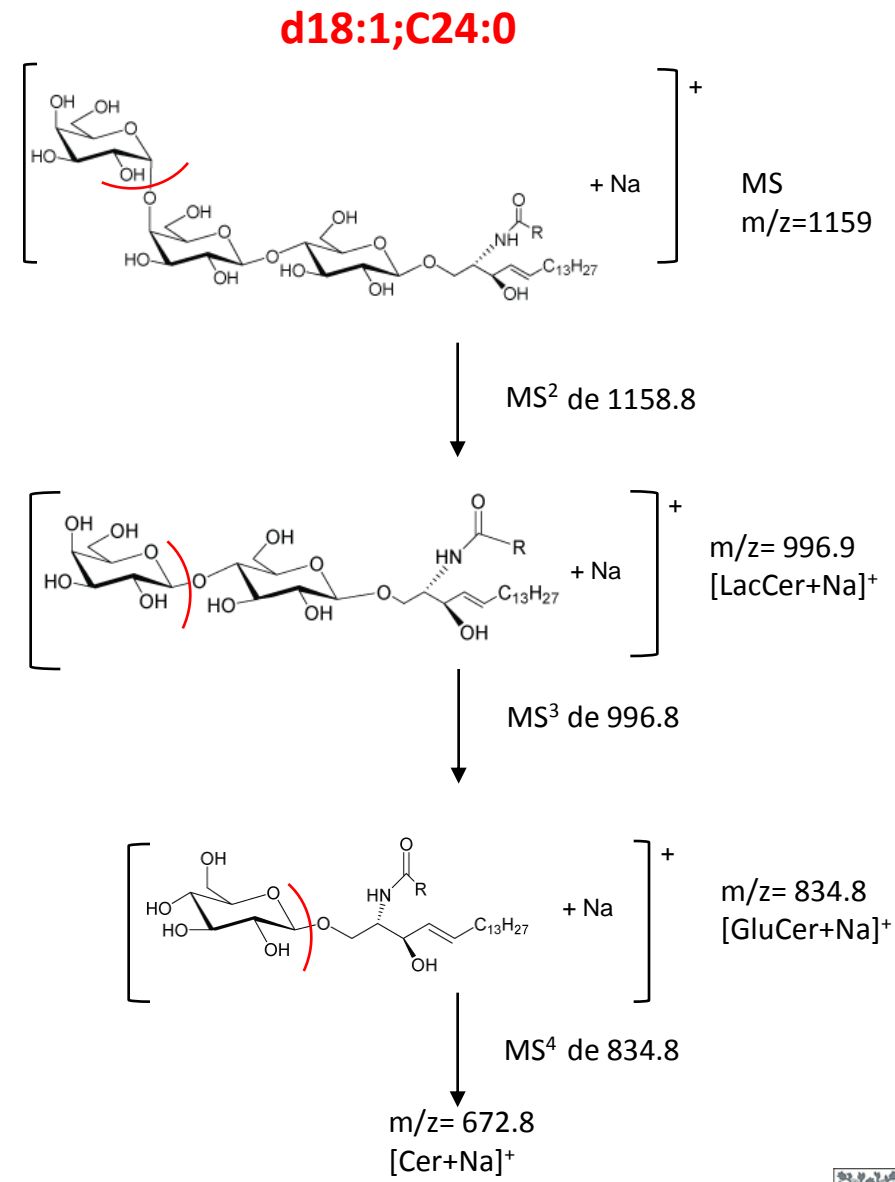
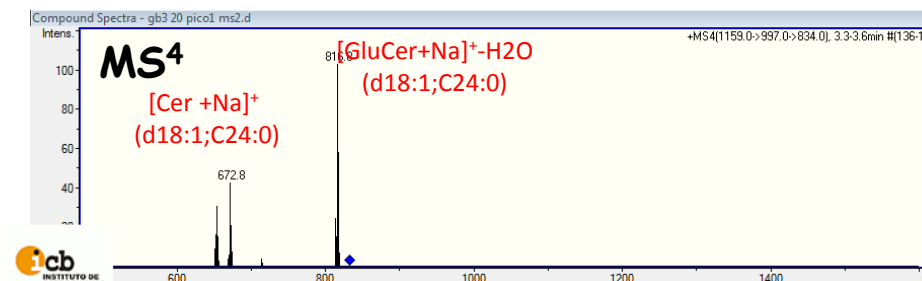
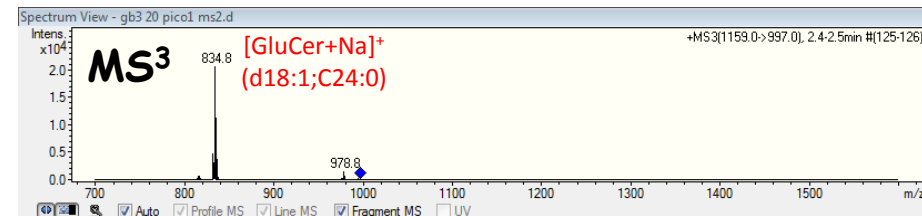
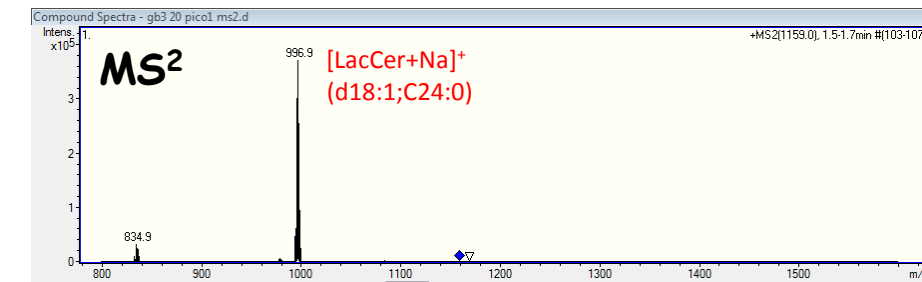
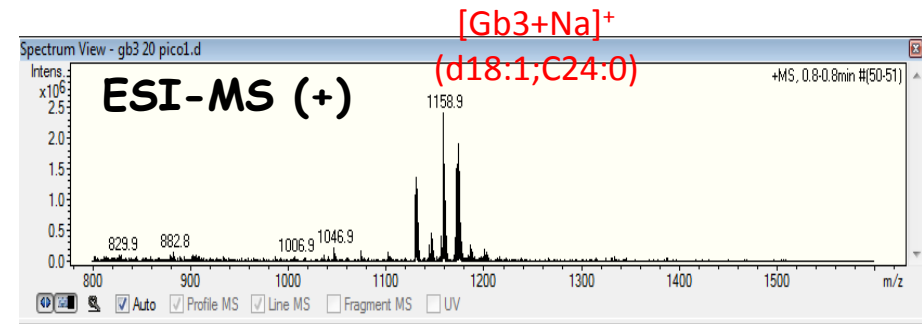


ESI-MS/MS de m/z 1046






Gb3 (globotriaosylceramide)

Standard



Fragmentation à base energie

Conclusions

-  Le couplage en ligne HPTLC-MS (MS/MS et/ou HR-MS, dans les modes ESI positive ou négative) via l'interface basée sur l'élution, peut être utilisé pour l'identification structurale des lipides et des sphingolipides neutres dans des échantillons complexes, comme le biodiesel ou le plasma humain, directement à partir de la plaque chromatographique
-  **Seuls les pics souhaités sur la plaque sont transférées vers l'appareil MS. Ceci peut également être utile pour un criblage rapide pour confirmer la présence / absence d'un lipide donné. Les coûteux enregistrements MS d'échantillons inconnus peuvent être réduits à un minimum en utilisant HPTLC-MS : on peut gagner du temps et économiser de l'argent**
-  La sélectivité spatiale fournie par HPTLC-MS est d'intérêt pour la considérer comme une technique complémentaire à LC-MS pour l'analyse des lipides

Merci à:

Dr Carmen Jarne

Dr Luis Membrado

Grad. María Pilar Lapieza

Dr María Saviron

Dr. Jesús Orduna

Dr Jesús Vela

Prof. Dr. Javier Galbán

Prof. Dr. Gerda Morlock

Justus Liebig University Giessen, Germany



**Universidad
Zaragoza**

Et merci de votre attention!



Unión Europea

Fondo Europeo de
Desarrollo Regional

