

COUPLAGES LC-MS



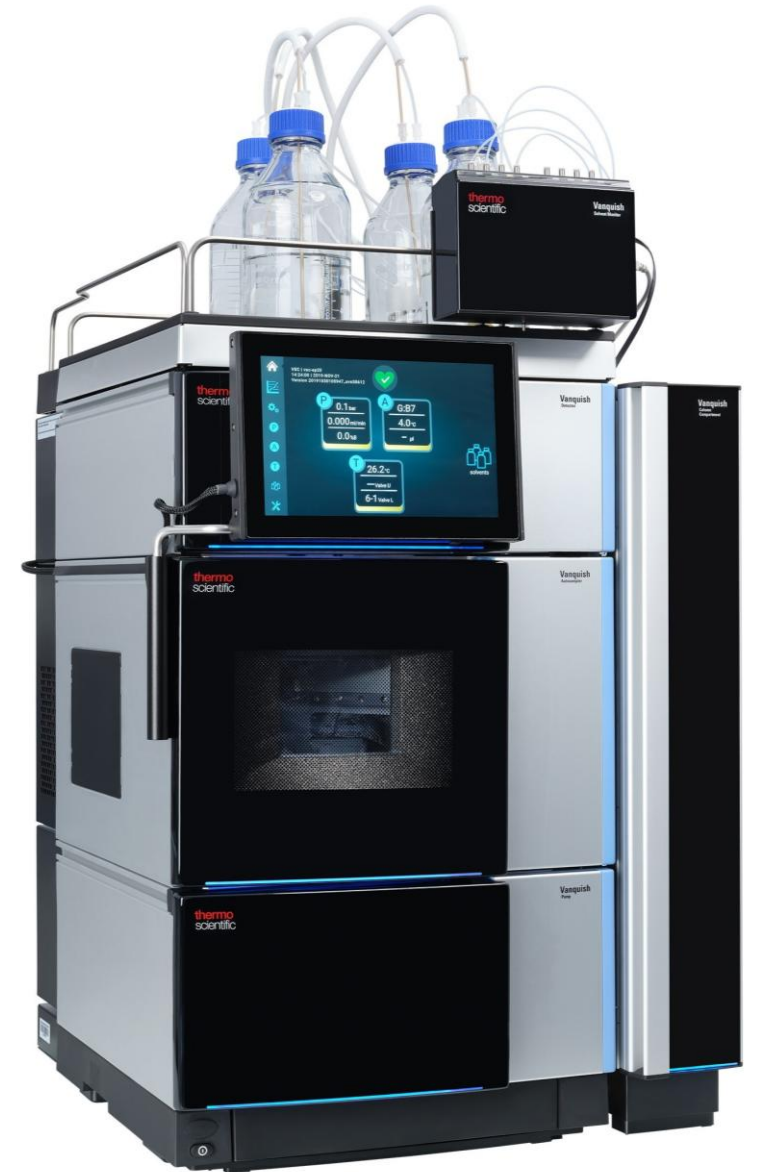
Quels couplages?



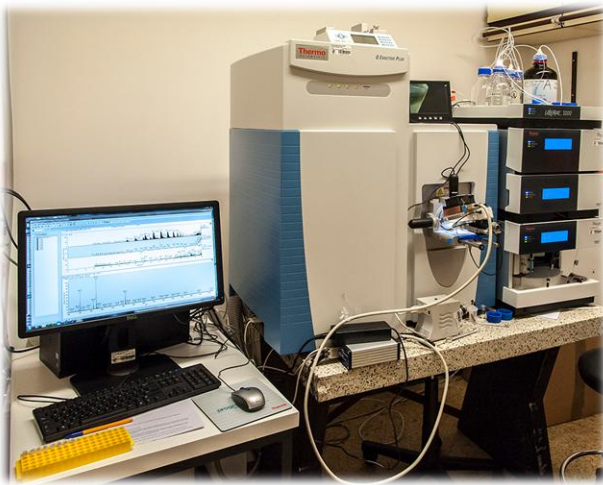
Pompe d'infusion
Pompe seringue



INTRODUCTION DIRECTE



HPLC en mode FIA
(Flow injection analysis)



**HPLC-MS
(Q-Orbitrap)**

COUPLAGES



**Flash-MS
(Q)**



**μ et nano
LC-MS (LT)**



**UHPLC-MS
(QqQ)**



TLC-MS



**SFC-MS
(Q TOF)**

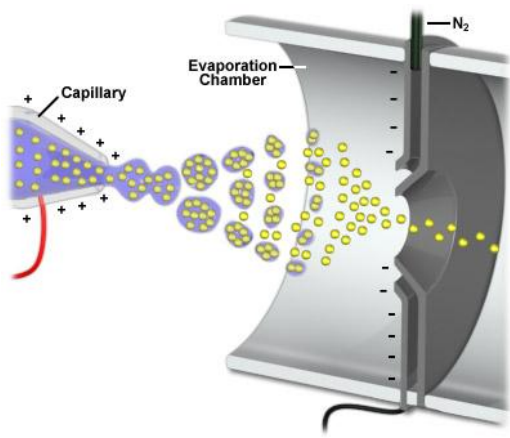


**CE-MS
(TOF)**

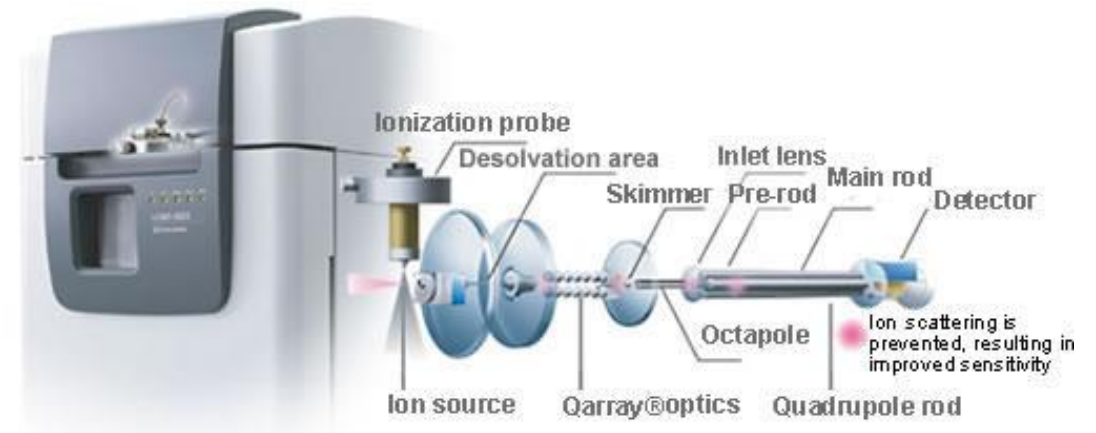


**IC-MS
(Q)**

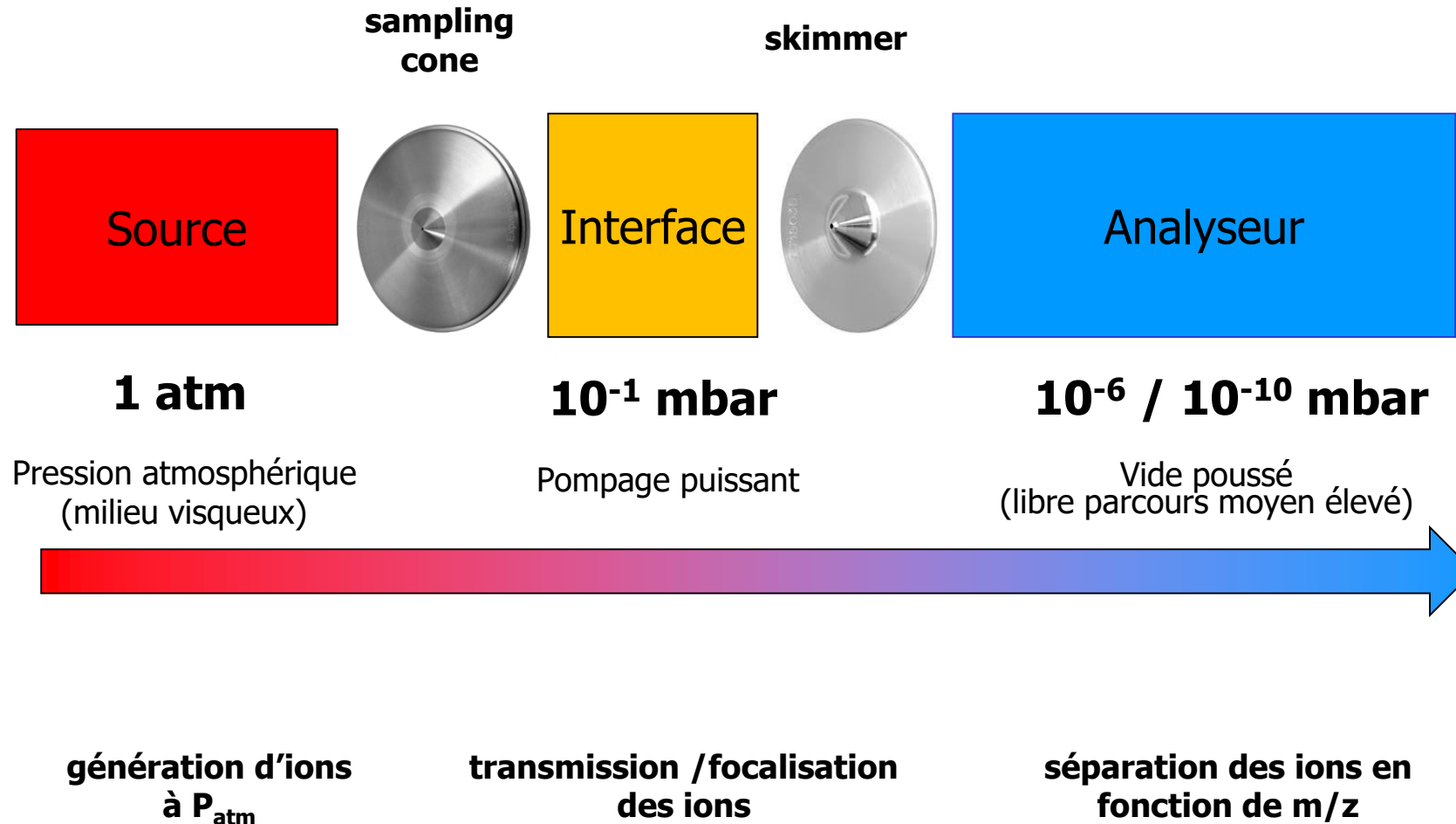
A) Interfaces LC-MS : éléments communs



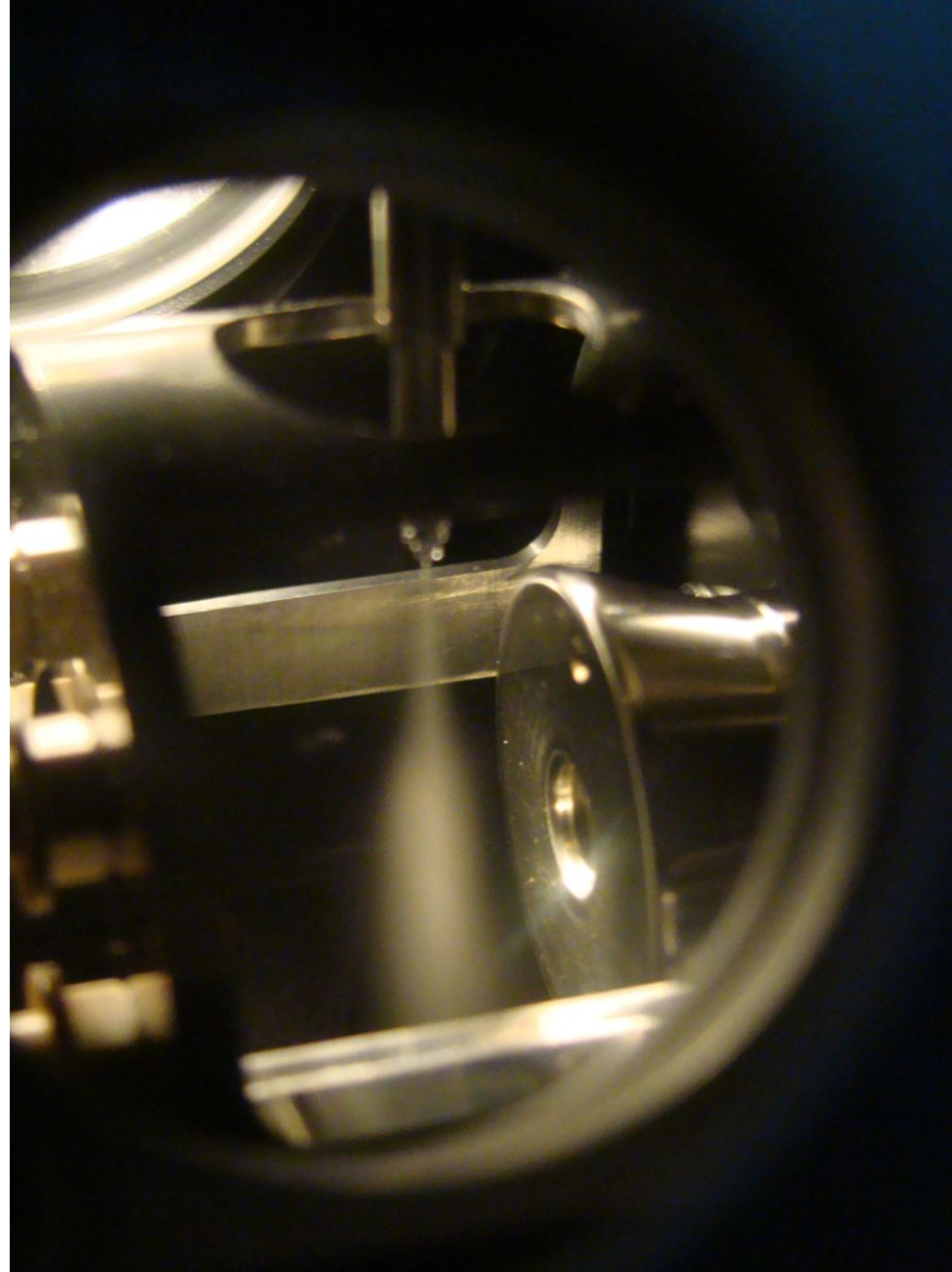
**un rôle multiple :
ionisation à P_{atm}
+
passage ions état gazeux**



Comment passer de 1 atmosphère à 10^{-6} millibar?



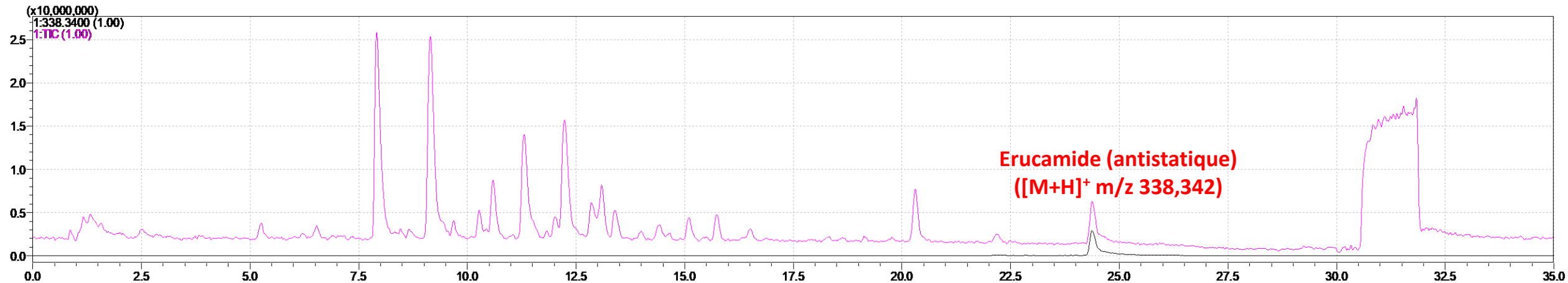
Interface spécifiques avec un élément commun le spray



**Sensibilité et robustesse:
Les problèmes de contamination
(background ou ubiquitous ions)**

Les contaminants majeurs

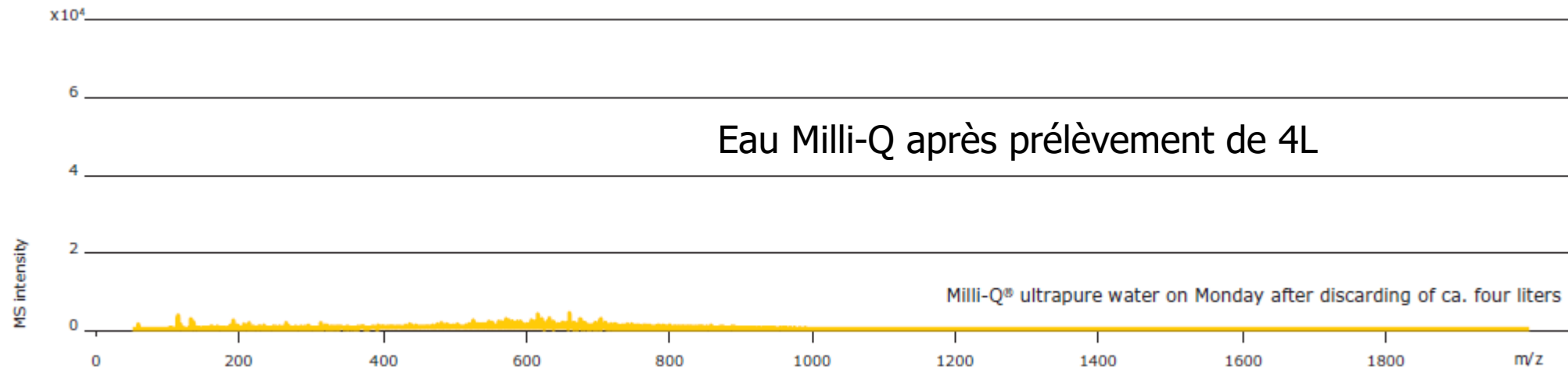
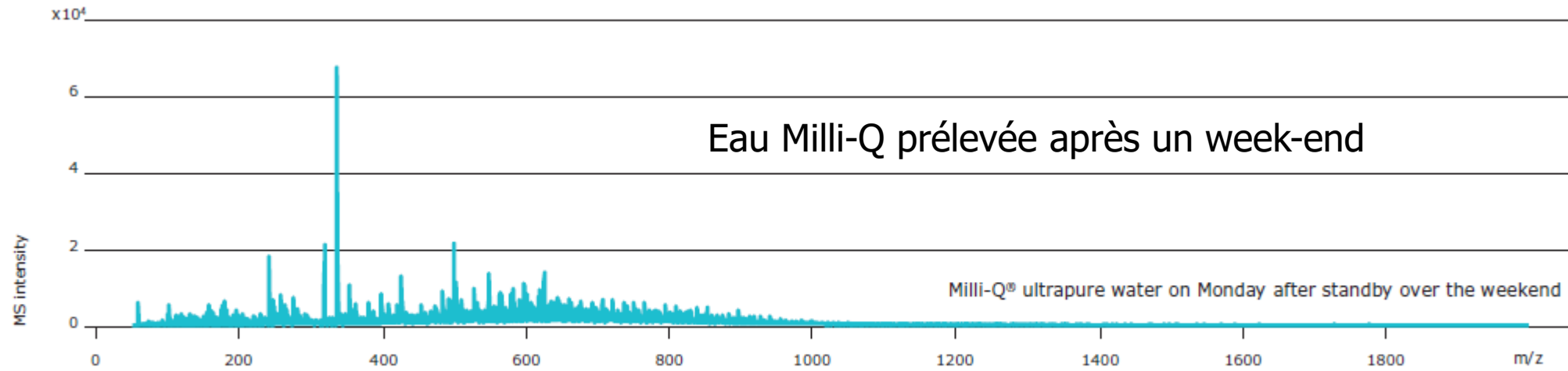
- Phtalates : plastifiants
ex : dioctyl phtalate => m/z 391 $[M+H]^+$, 413 $[M+Na]^+$, 429 $[M+K]^+$, 798 $[2M+NH_4]^+$, 803 $[2M+Na]^+$
- Antistatiques (amides) pour les plastiques:
Oleamide ($[M+H]^+=282$) / Stearamide ($[M+H]^+=284$) / Erucamide ($[M+H]^+=338$)
- PEG: solvants, détergents, cosmétiques,...
=>série de pics avec $\Delta m/z$ de 44
- Ions métalliques : Li, Na, K, Fe, Pt, Cu
Ex Fe: Solvants (H_2O , ACN), Acides (acétique, formique), parties en acier



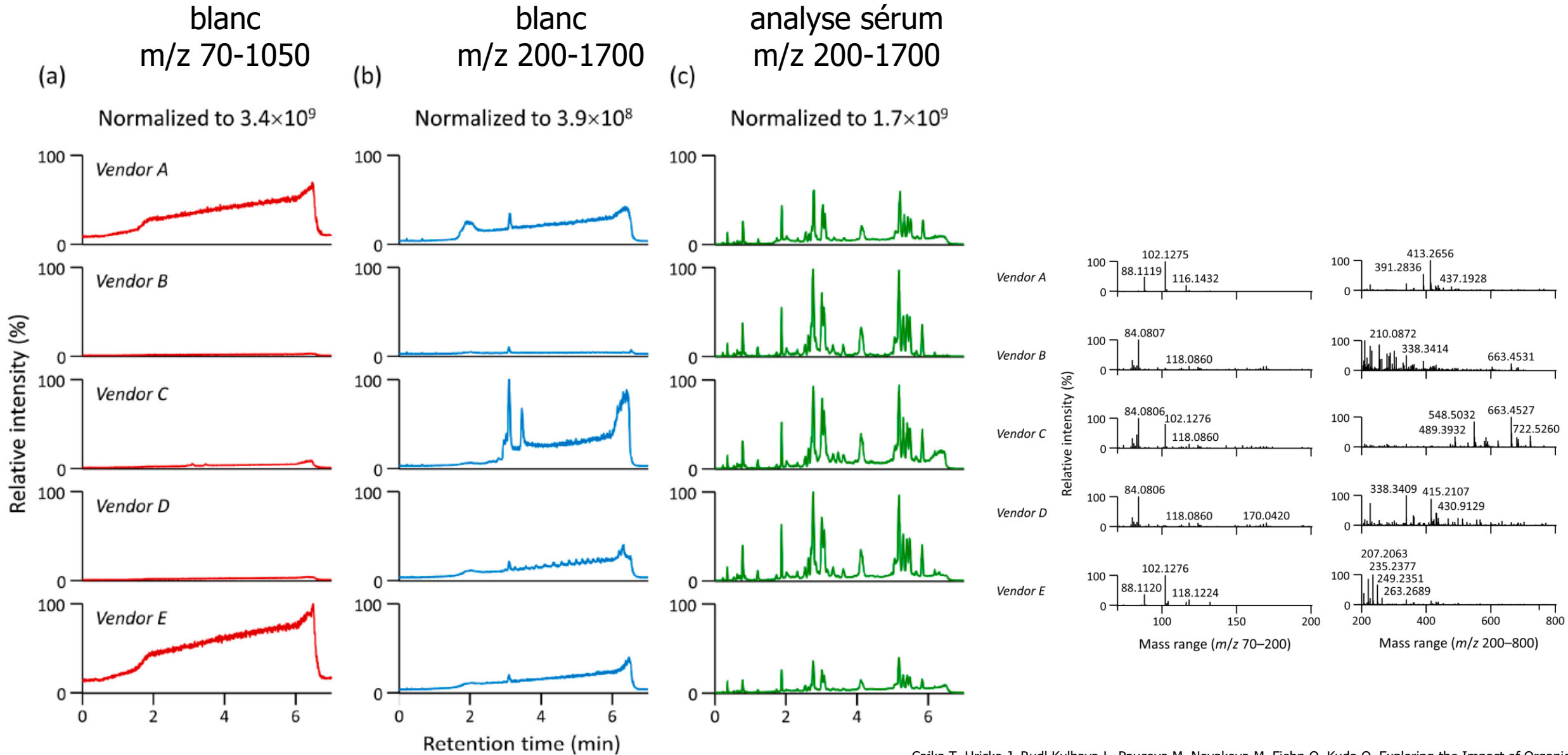
Recommandations

- Eau ultrapure:
 - eau Milli-Q déjà filtrée à travers une membrane 0.22 µm, pas besoin de refiltrer
 - Ne pas transférer les nouveaux solvants aqueux dans la bouteille déjà en utilisation
 - Changer les phases aqueuses chaque jour (UPLC) ou tous les 2 jours (HPLC)
- Solvants LC-MS / ULC-MS préfiltrés (y compris eau)
- Tampons / additifs: High Grade
- Stockage : jamais >90% eau
- Flacons : verre borosilicaté (verre neutre à haute résistance hydrolytique, résiste très bien à l'eau et à la plupart des produits chimiques)
- Pas de films plastique (ex Parafilm[®]) : utiliser aluminium si nécessaire
- Vials avec bouchons Teflon[®] (PTFE)
- Pour les analyses de traces: salle blanche

Eau ultrapure:

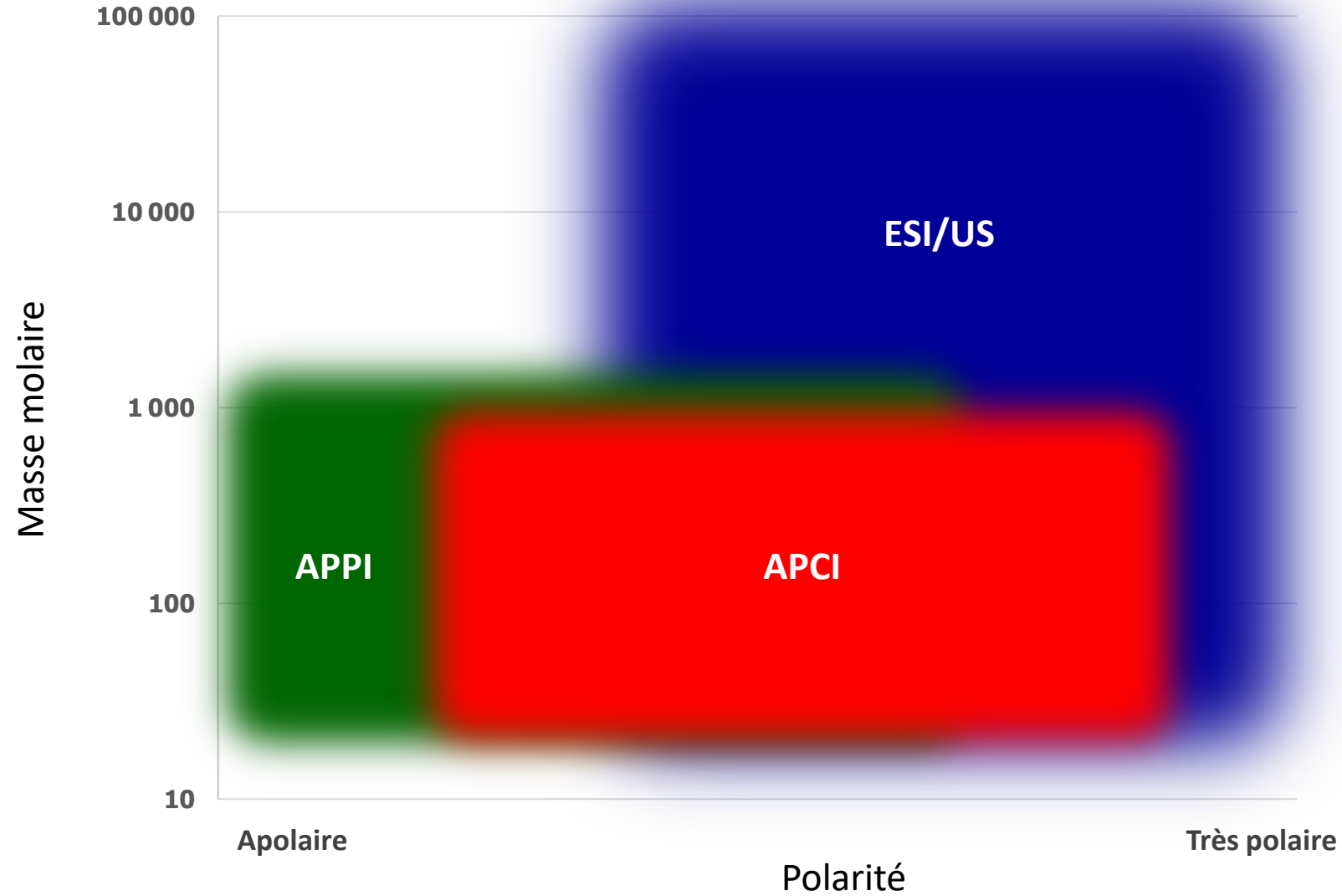


Solvents LC-MS : Analyses avec phase mobile contenant de l'IPA LC-MS provenant de différents vendeurs



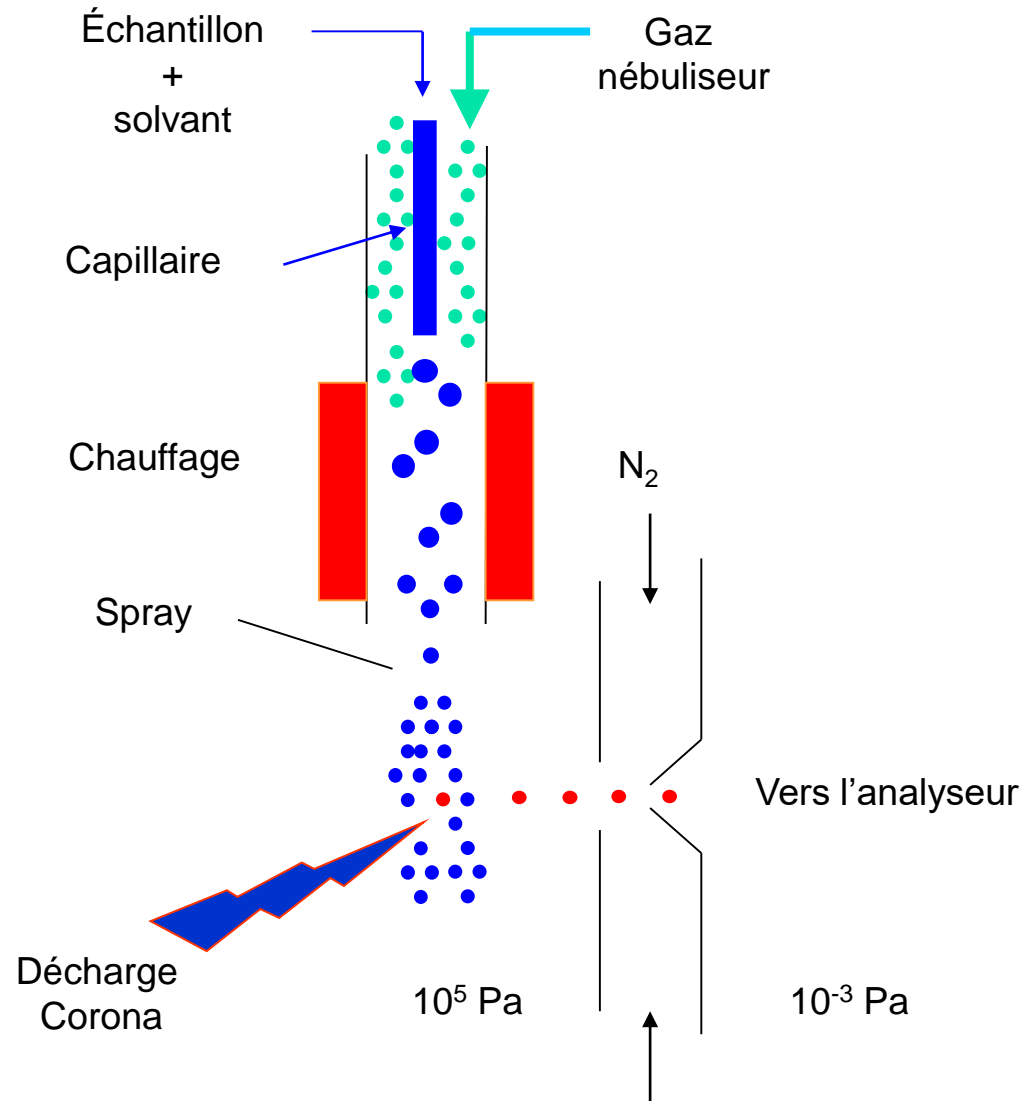
**B) modes d'ionisation
spécifiques:
APCI, APPI, ESI, US**

Des interfaces dépendant du type de molécules



1) Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique (APCI)

schéma de source



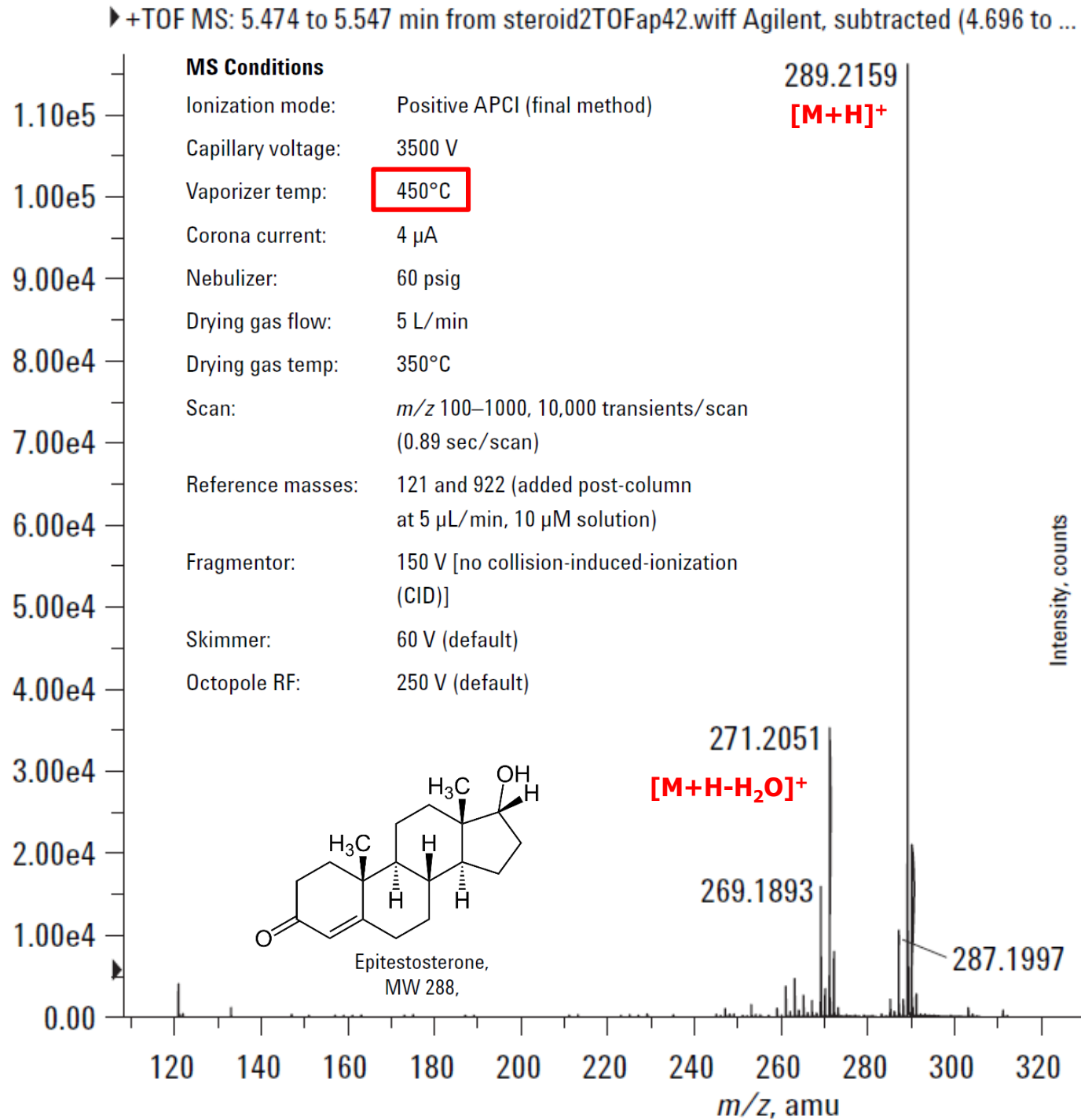
APCI+ : Ionisation de l'analyte

=> ions monochargés par réaction ions/molécules avec le plasma

ionisation positive: $[M + H]^+$

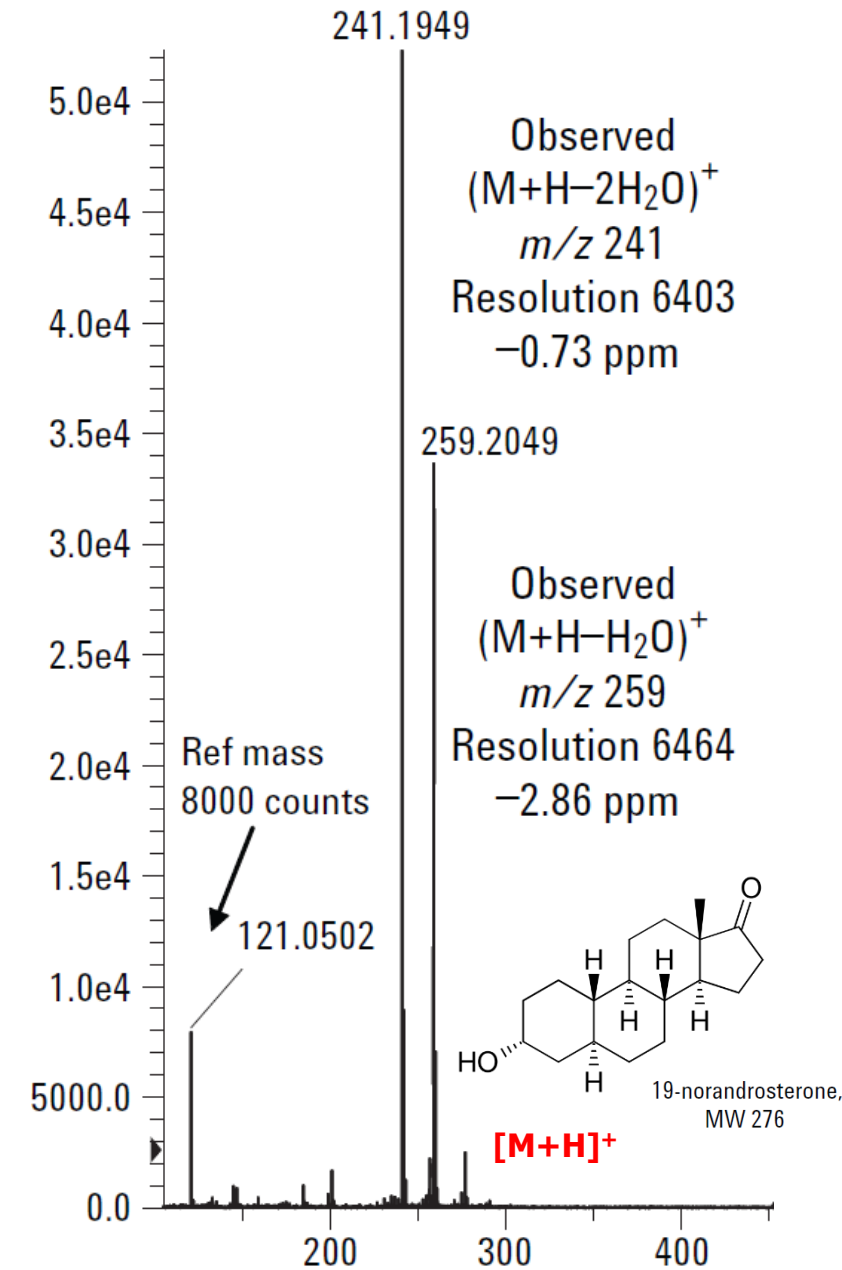
ionisation négative: $[M - H]^-$

Influence de la température de source

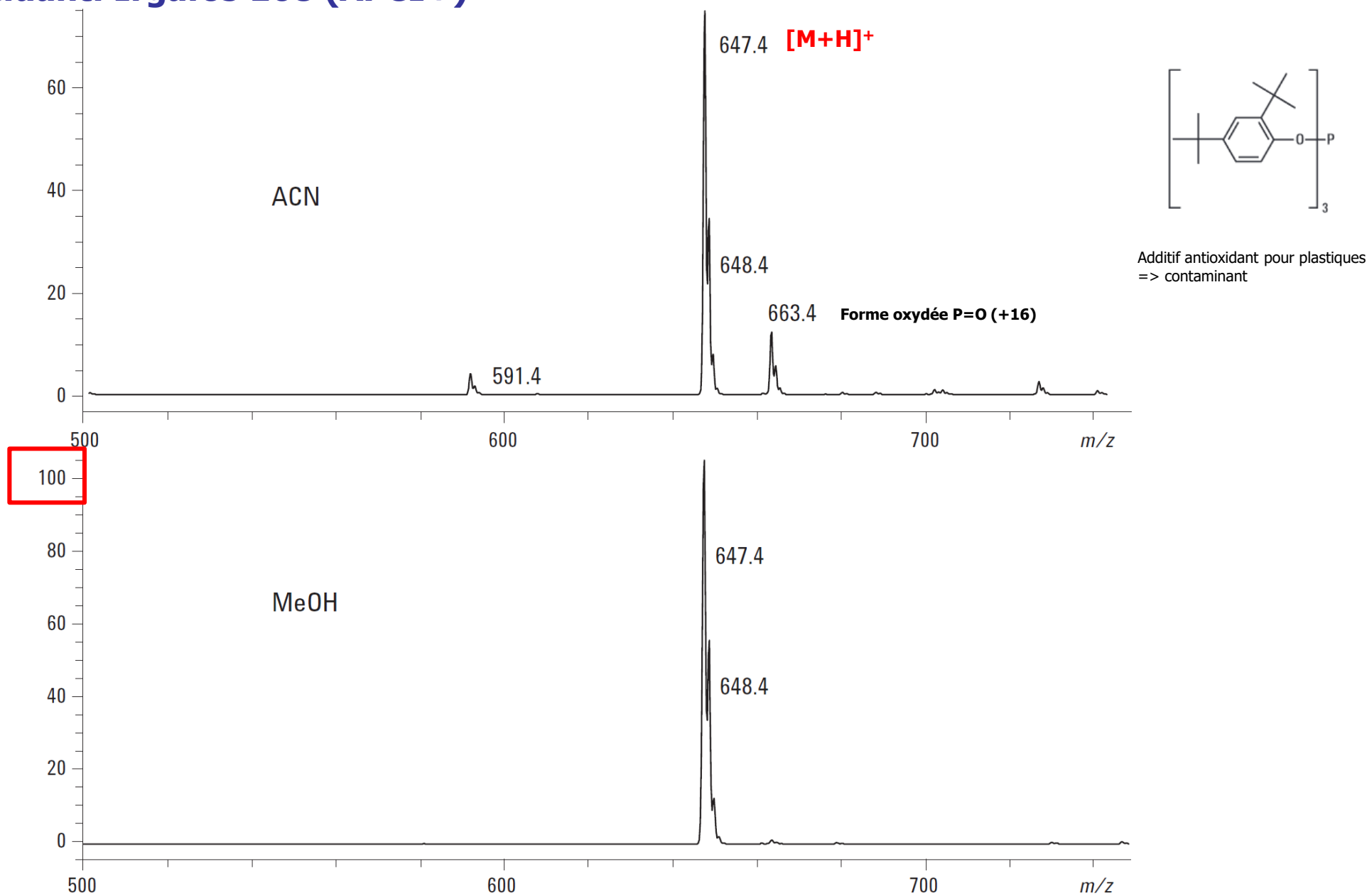


analytes types:

- apolaires à moyennement polaires
=> HAP, PCB, lipides (AG, TAG), phtalates,...
- présence hétéroatome favorise ionisation
=> pesticides, herbicides, fongicides, médicaments,...
- pas adapté pour: composés thermolabiles ou non volatils
- bon complément à l'ESI



Influence de l'éluant: Irgafos 168 (APCI+)

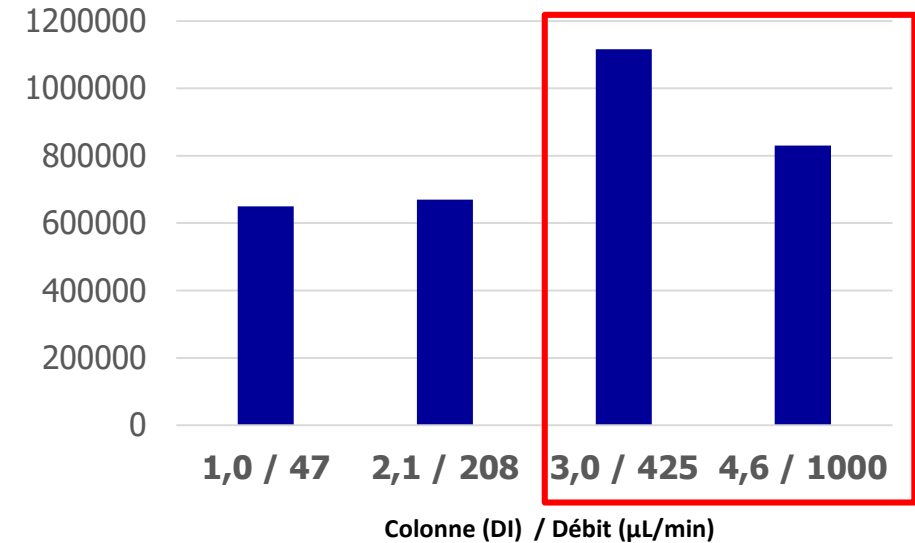


couplage LC:

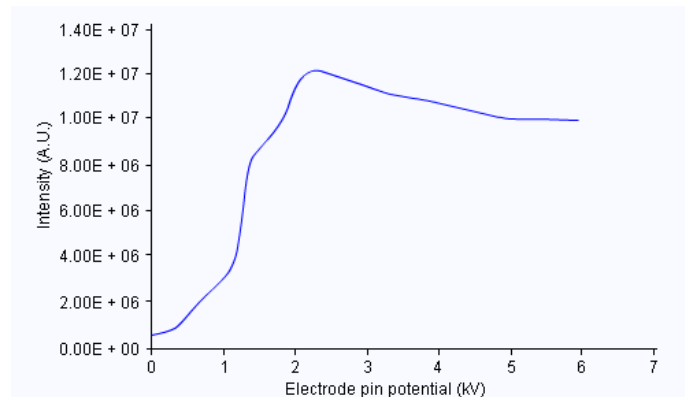
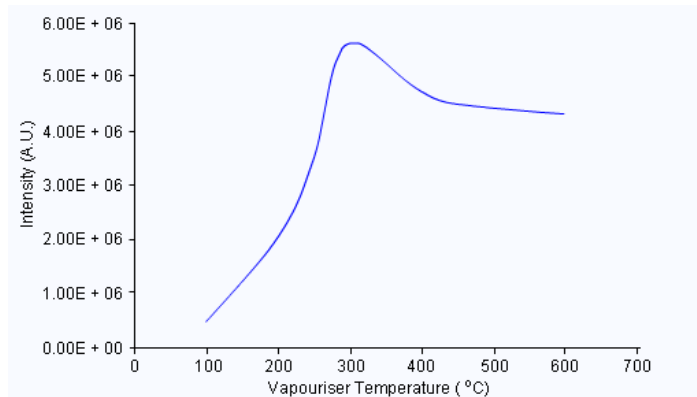
- peu sensible aux effets matrices
- compatibilité LC large: RPLC, NPLC
 - éluants: CH_2Cl_2 , hexane, toluene, MeOH, ACN, H_2O ,... (attention aux solvants trop inflammables)
 - attention aux acides: risque de compétition analytes avec HCOOH et CH_3COOH en mode –
 - tampon si volatils; tolérance au tampon >ESI (-> 100mM)
- débit > ESI (-> 1,5-2 mL/min) et idéalement > ~ 0,5 mL/min

optimisation des paramètres de source

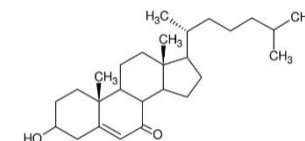
- réponse dépend de:
 - nature de l'analyte
 - composition PM
 - débit PM
 - conditions de source:



⇒ optimiser T° du vaporiseur et débit N_2 + gaz de séchage (T° , débit) + potentiel corona

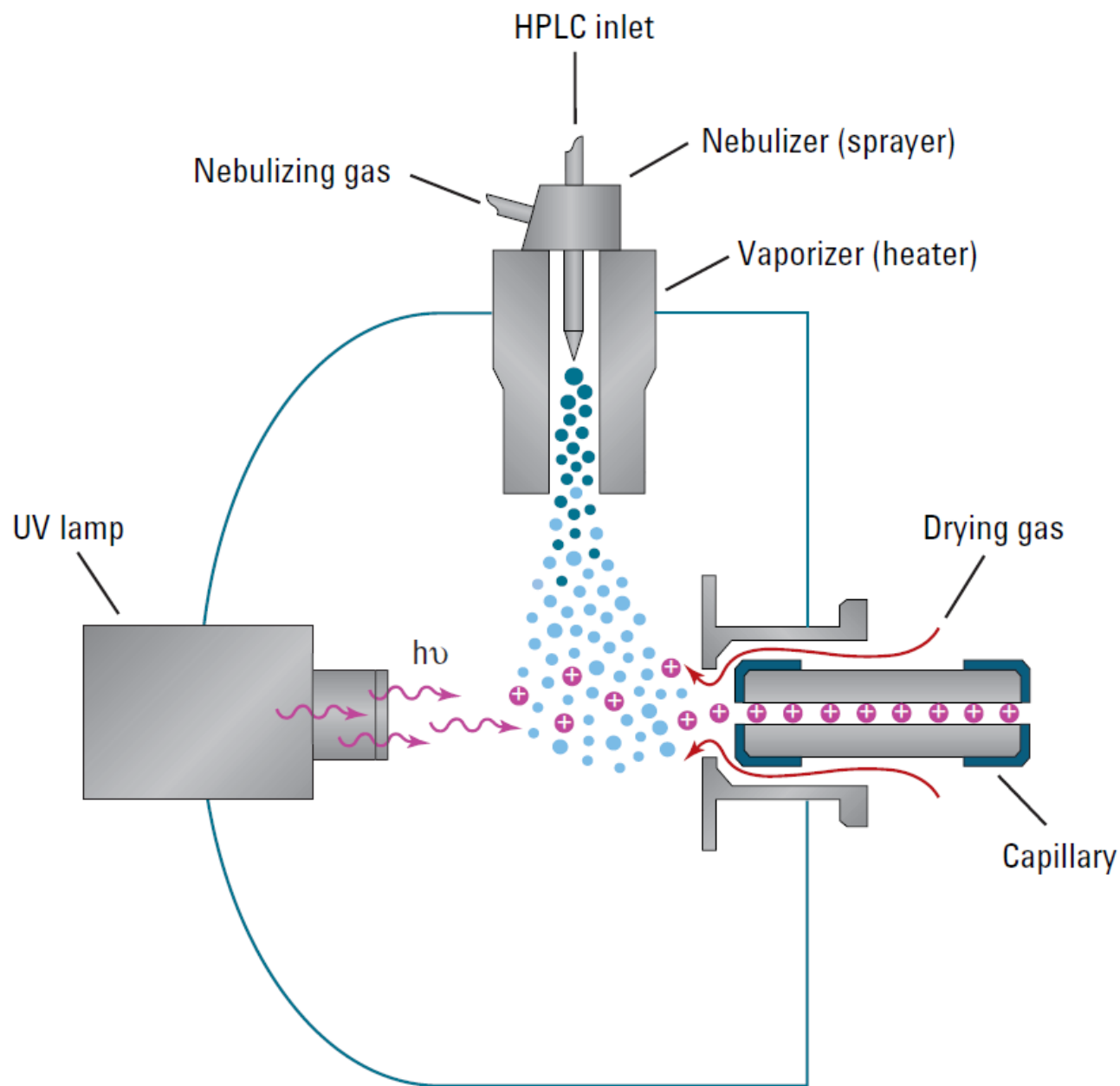


Optimisation de la réponse pour le 7-cétocholesterol

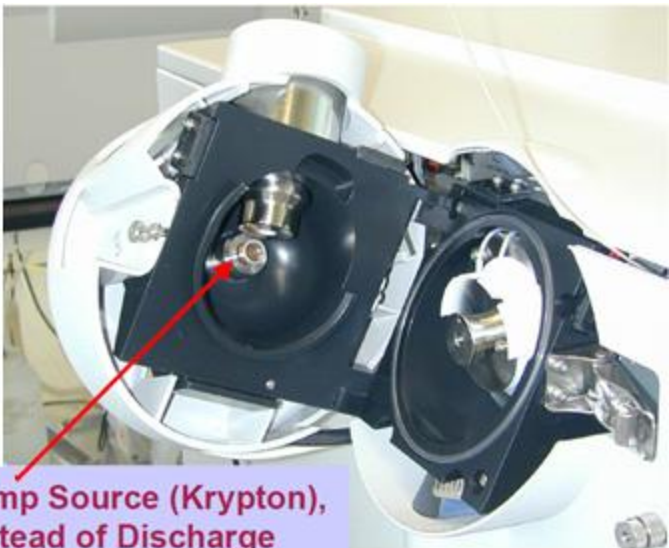


2) Photoionisation à Pression Atmosphérique (APPI)

Principe et schéma de source



Robb, D. B., T. R. Covey and A. P. Bruins (2000). "Atmospheric Pressure Photoionization: An Ionization Method for Liquid Chromatography–Mass Spectrometry." *Analytical Chemistry* **72**(15): 3653-3659.



Lamp Source (Krypton),
instead of Discharge
Needle



Agilent Technologies

Raffaelli, A. and A. Saba (2003). "Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry." *Mass Spectrometry Reviews* **22**(5): 318-331.

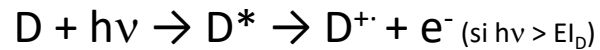


Mécanismes d'ionisation: importance du dopant

Photoionisation directe

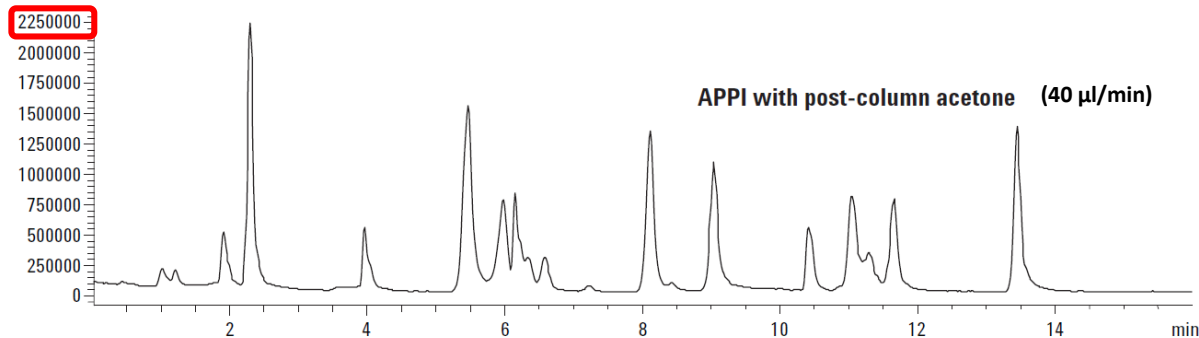
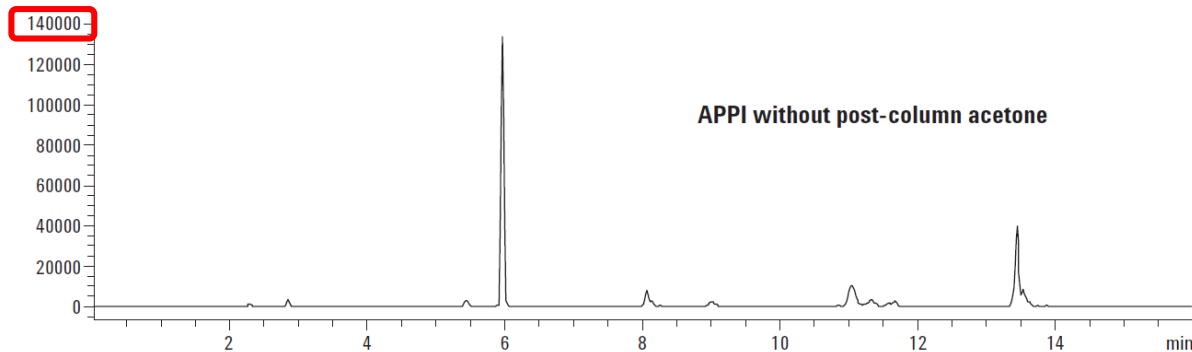


Rdt faible=> amélioration : utilisation dopant (toluène, acétone)



Lampe Sélectivité	Composé	Energie d'ionisation (eV)
non détectable	Azote	15.58
	Eau	12.62
	Acétonitrile	12.20
	Oxygène	12.07
	Méthanol	10.80
Krypton 10.6 eV		
détectable	Isopropanol	10.17
	n-Hexane	10.13
	Heptane	9.93
	Isooctane	9.80
	Acétone	9.70
	Pyridine	9.26
	Benzène	9.24
	Furane	8.88
	Toluène	8.83
	Anisole	8.20
	Naphtalène	8.14
	Triéthylamine	7.53

Dopant: 10-50% du flux éluant



Types d'ions:

Ionisation positive

Principalement : $[M+H]^+$

Possible : $M^{+\bullet}$

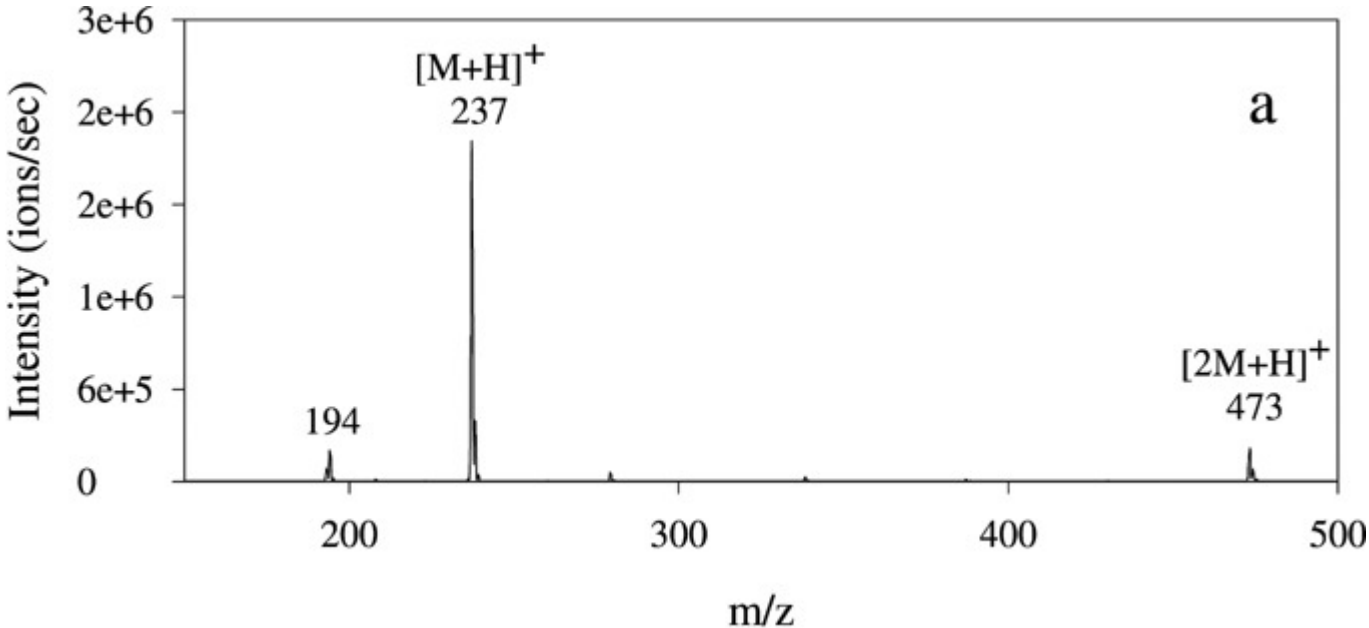
Ionisation negative

Principalement : $[M-H]^-$

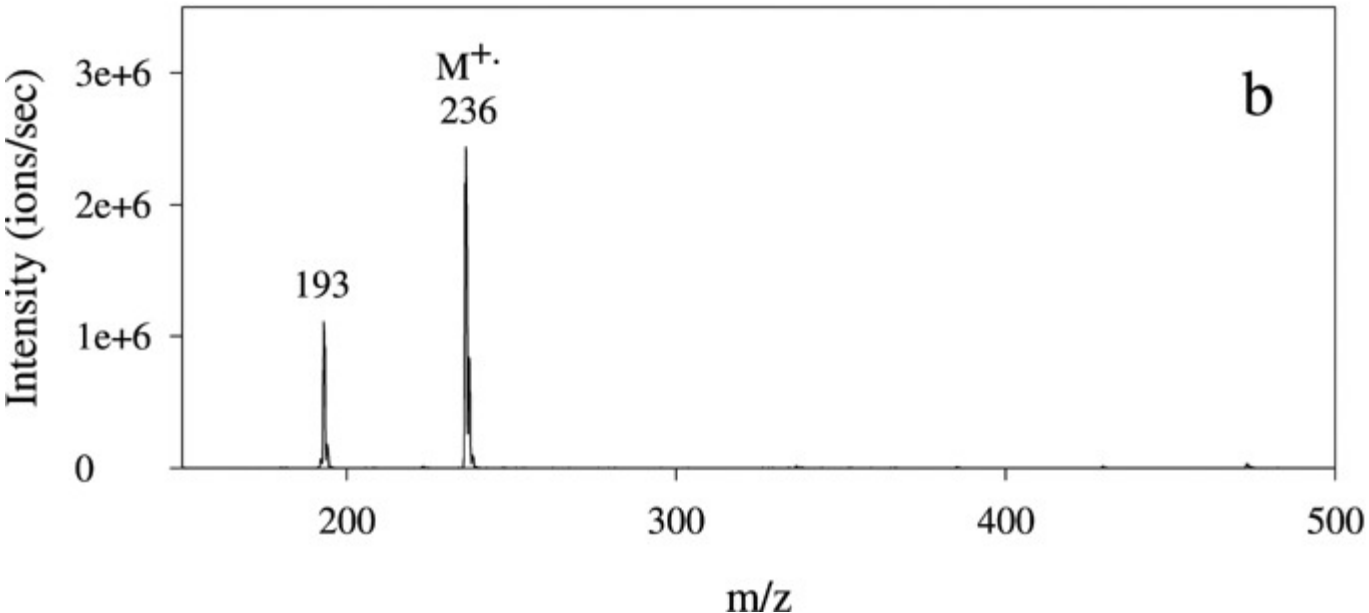
Possible : $M^{-\bullet}$

influence du dopant

Dopant : Toluène

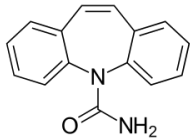


Dopant : Anisole



Dopant	IE (eV) ¹⁹	PA* (kJ.mol ⁻¹) ¹⁹
Acetone	9.70	812
Tetrahydrofuran (THF)	9.40	822
Benzene	9.24	750
Chlorobenzene	9.07	753
Bromobenzene	9.00	754
Toluene	8.83	784
Anisole	8.20	840

carbamazépine / acétonitrile



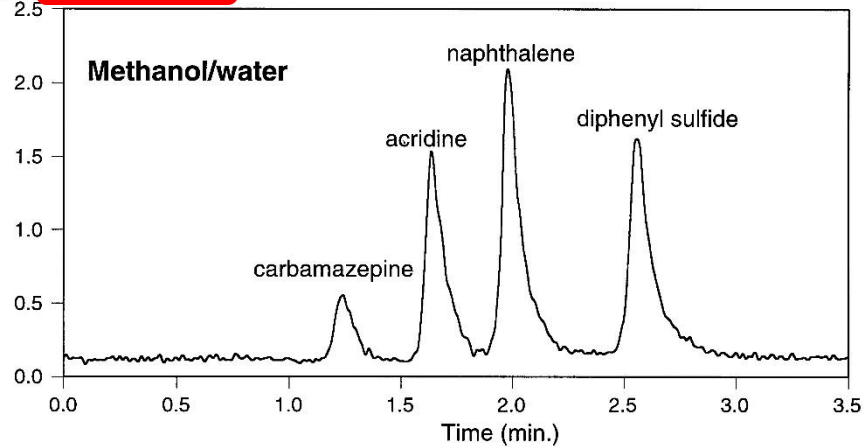
Monoisotopic mass: 236.1



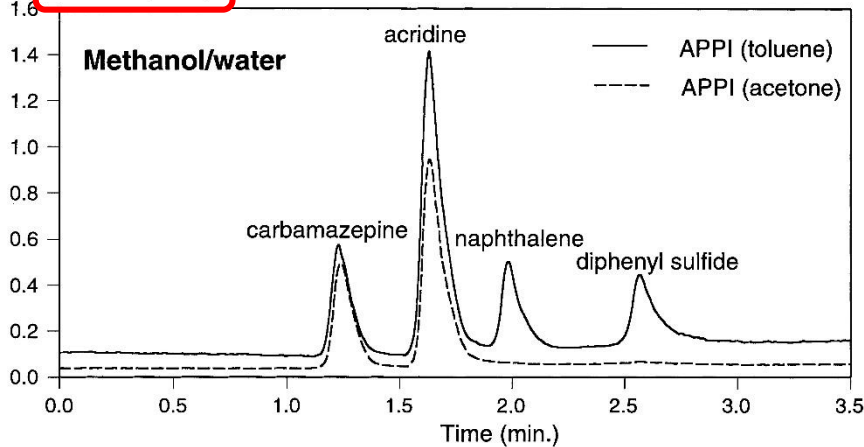
traitement
épilepsie

Influence de la nature du dopant

(a) Ions/sec. ($\times 10^4$)



Ions/sec. ($\times 10^6$)



Dopant	IE (eV) ¹⁹	PA* (kJ.mol ⁻¹) ¹⁹
Acetone	9.70	812
Tetrahydrofuran (THF)	9.40	822
Benzene	9.24	750
Chlorobenzene	9.07	753
Bromobenzene	9.00	754
Toluene	8.83	784
Anisole	8.20	840

Atmospheric Pressure Ionization Sources: Their Use and Applicability
Waters (2017) White Paper (720005935en)

Avec et sans dopant:

+ toluène ↗ sensibilité
carbamazépine ($\times 100$)
naphtalène / diméthyl sulfide ($\times 25$)

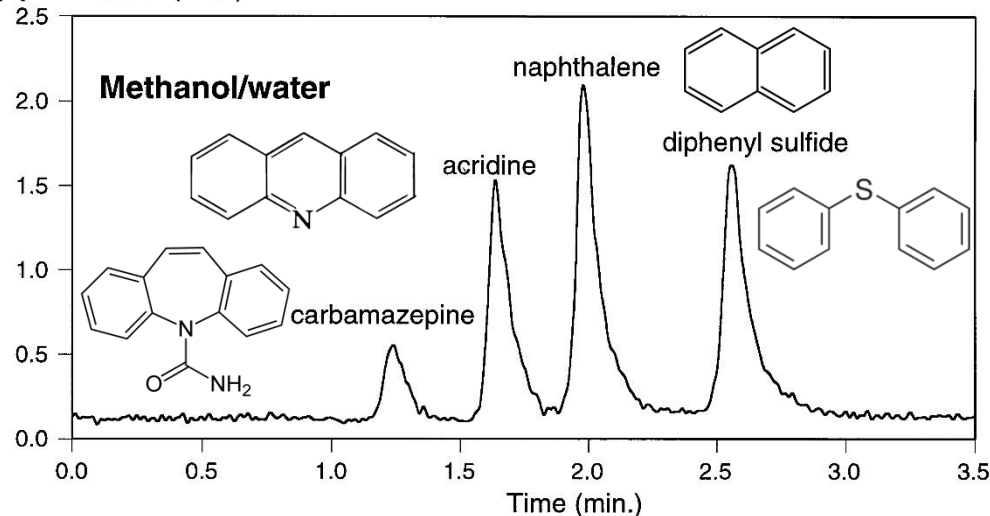
Nature du dopant:

toluène: dopant tous composés
acétone: pour composés de forte AP

Acridine (973 kJ/mol) > **Acétone** (812 kJ/mol) > **Naphtalène** (803 kJ/mol) > **Toluène** (784 kJ/mol)

Influence de l'éluant sur l'ionisation (pas de dopant)

(a) Ions/sec. ($\times 10^4$)

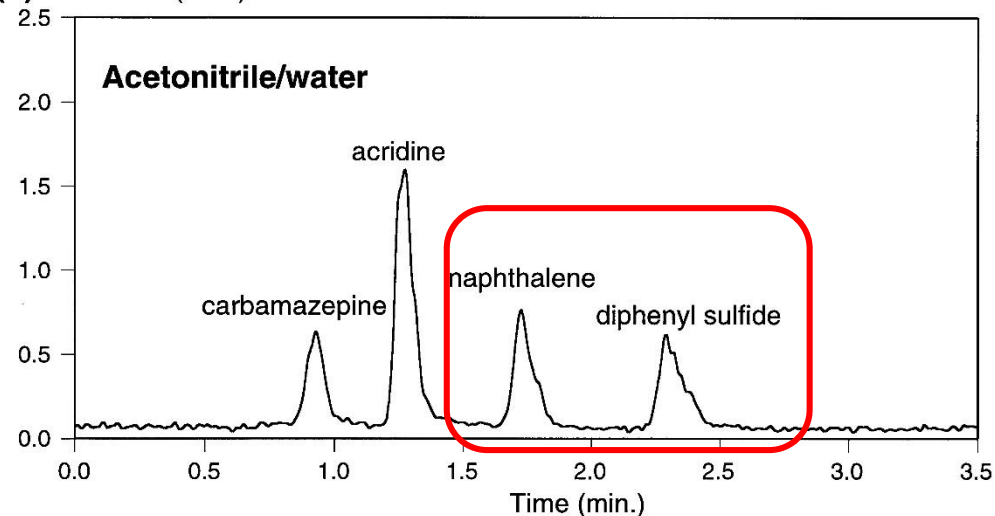


MeOH	AP=754.3 kJ/mol
ACN	AP=779.2 kJ/mol

=> trop proches

Acridine (973 kJ/mol) > Naphtalène (803 kJ/mol) > ACN (779 kJ/mol) MeOH (754 kJ/mol)

(b) Ions/sec. ($\times 10^4$)

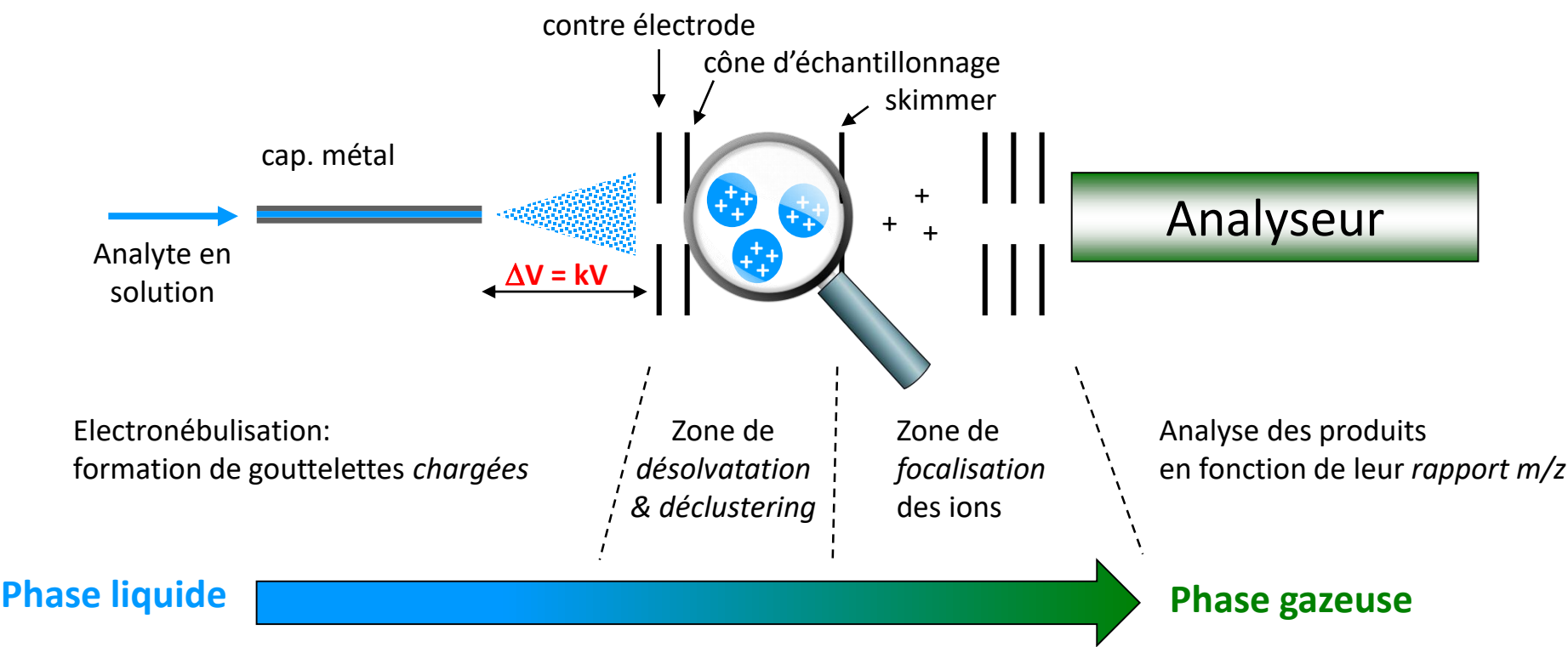
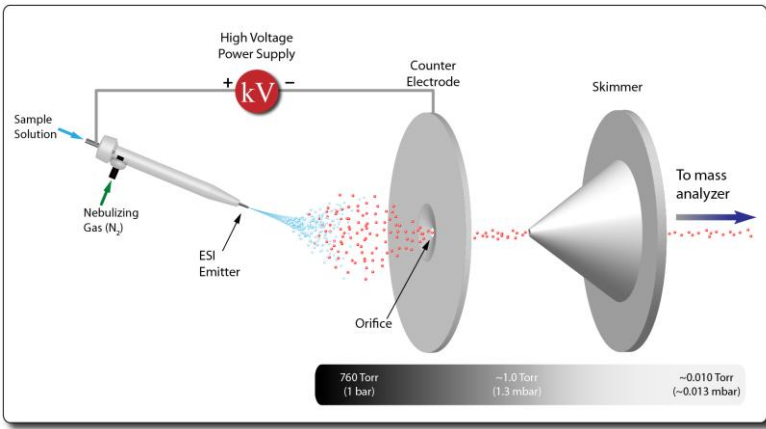


=> préférer MeOH à ACN

3) Electronébulisation Electrospray (ESI)

schéma général:

- analyte en solution introduit par un **capillaire métallique** porté à un **haut potentiel**
- tension (ΔV) **induit une séparation des charges dans la solution**
- sortie du capillaire => on a un « **nébulisat** » (spray) de gouttelettes (μm)
- évaporation des gouttelettes => **libération d'ions en phase gazeuse**



a) Formation des ions

4 mécanismes possibles:

- séparation de charge (acides, bases)
- réaction redox due HT (interface liquide/métal)
- formation d'adduit
- transfert de proton en phase gazeuse

Cech, N. B. and C. G. Enke (2001). "Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals." *Mass Spectrometry Reviews* **20**(6): 362-387.

Banerjee, S. and S. Mazumdar (2012). "Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte." *International Journal of Analytical Chemistry* **2012**: 40.

phase liquide

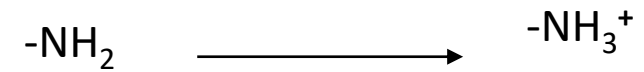
Typical redox reactions of the solvents expected to occur in the electrospray emitter and their corresponding standard potentials.

Solvent systems	Positive-ion mode		Negative-ion mode	
	Oxidation reactions	E^0 (V)	Reduction reactions	E^0 (V)
Water	$2\text{H}_2\text{O} = \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 2\text{e}^-$	1.23	$2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 + 4\text{e}^- = 4\text{OH}^-$	0.40
	$2\text{H}_2\text{O} = \text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$	1.77	$\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2^- + \text{e}^- = \text{HO}_2^- + \text{OH}^-$	0.20
	$\text{H}_2\text{O} = \text{HO}^* + \text{H}^+ + \text{e}^-$	2.72	$\text{H}_2\text{O} + \text{HO}_2^- + \text{e}^- = \text{HO}^* + 2\text{OH}^-$	0.18
			$2\text{H}_2\text{O} + 2\text{e}^- = \text{H}_2 + 2\text{OH}^-$	0.07
			$2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 + 2\text{e}^- = \text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{OH}^-$	-0.13
			$\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 + 2\text{e}^- = \text{HO}_2^- + \text{OH}^-$	-0.83
Methanol	$\text{CH}_3\text{OH} = \text{HCHO} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$	0.23	$\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O} + 2\text{e}^- = \text{CH}_4 + 2\text{OH}^-$	-0.25
	$\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O} = \text{HCOOH} + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$	0.10	$\text{CH}_3\text{OH} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- = \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$	0.58
	$\text{HCOOH} = \text{CO}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$	-0.20		

Ions formés par protonation ou déprotonation:

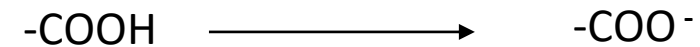
Ionisation positive :

principalement par protonation d'un site basique



Ionisation négative:

principalement par perte d'un proton



Choix du mode d'ionisation +/-:

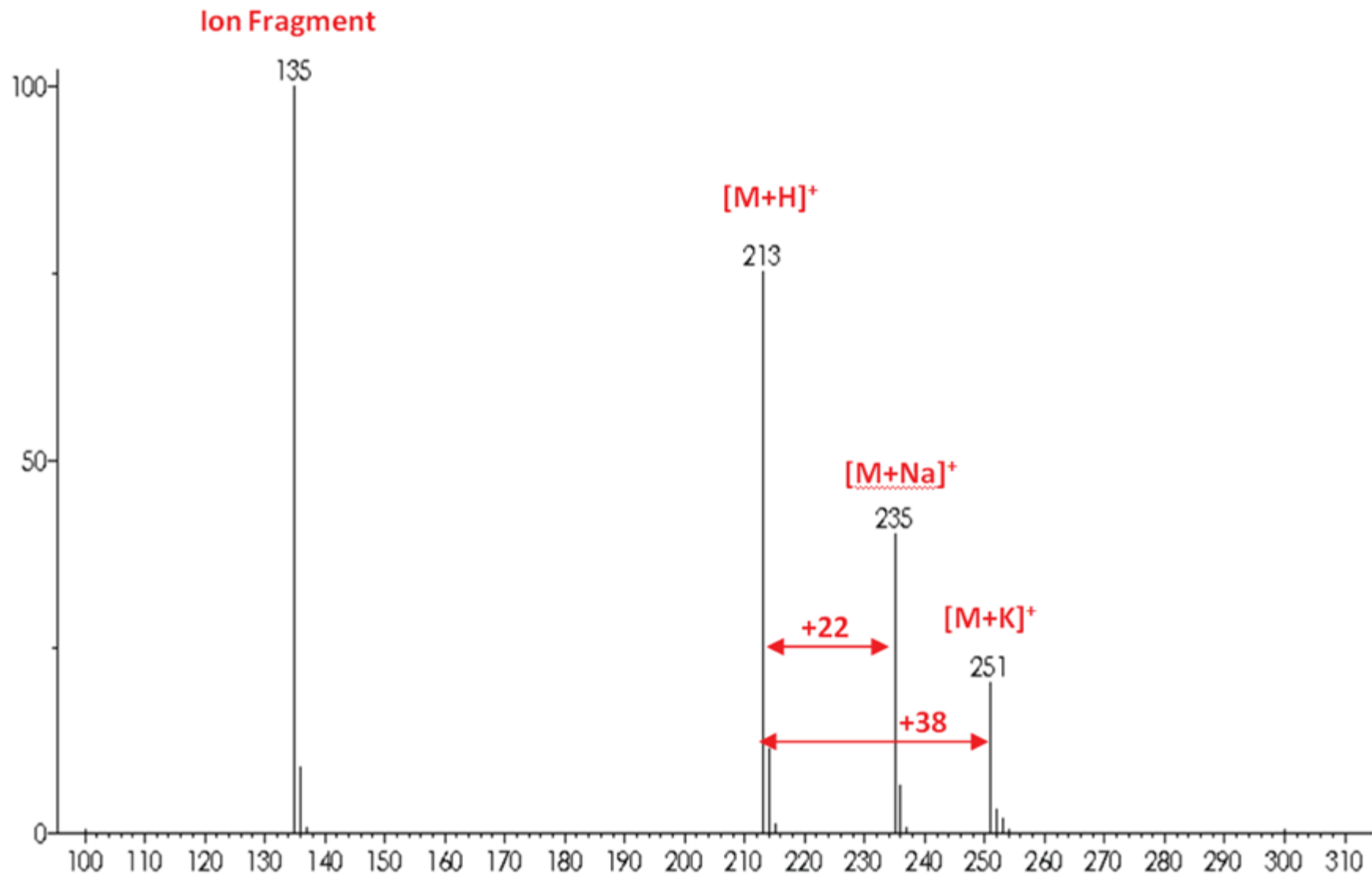
- imposé le + souvent par structure analyte
- sinon favoriser sélectivité (+ de composés répondant en ESI+ qu'en ESI-)
sensibilité (S/N)

Ions formés d'adduits:

Mode d'ionisation	Adduit	m/z
ESI+	[M+nH]ⁿ⁺	(M+n.m_H)/n
	[M+NH ₄] ⁺	M+18
	[M+Na]⁺	M+23
	[M+K] ⁺	M+39
	[M+H+CH ₃ OH] ⁺	M+33
	[M+H+CH ₃ CN] ⁺	M+42
ESI-	[M-nH]ⁿ⁻	(M-n.m_H)/n
	[M-H+CH ₃ OH] ⁻	M+31
	[M-2H+Na] ⁻	M+21
	[M-H+CH ₃ CN] ⁻	M+40
	[M-H+HCO ₂ H] ⁻	M+45
	[M-H+CH ₃ CO ₂ H] ⁻	M+59
	[M-H+CF ₃ CO ₂ H] ⁻	M+113

Principaux adduits avec des cations métalliques ou solvants

Ces ions peuvent coexister dans un même spectre



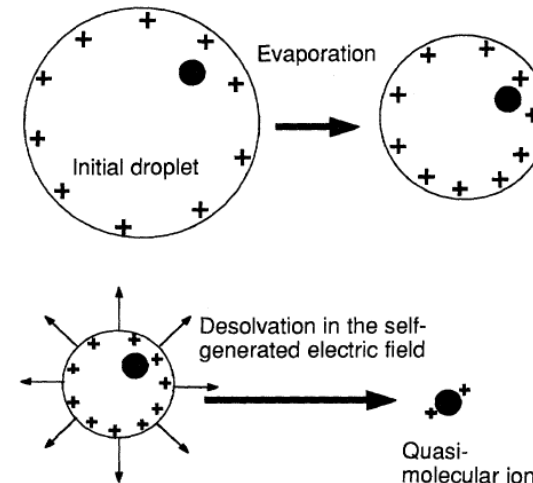
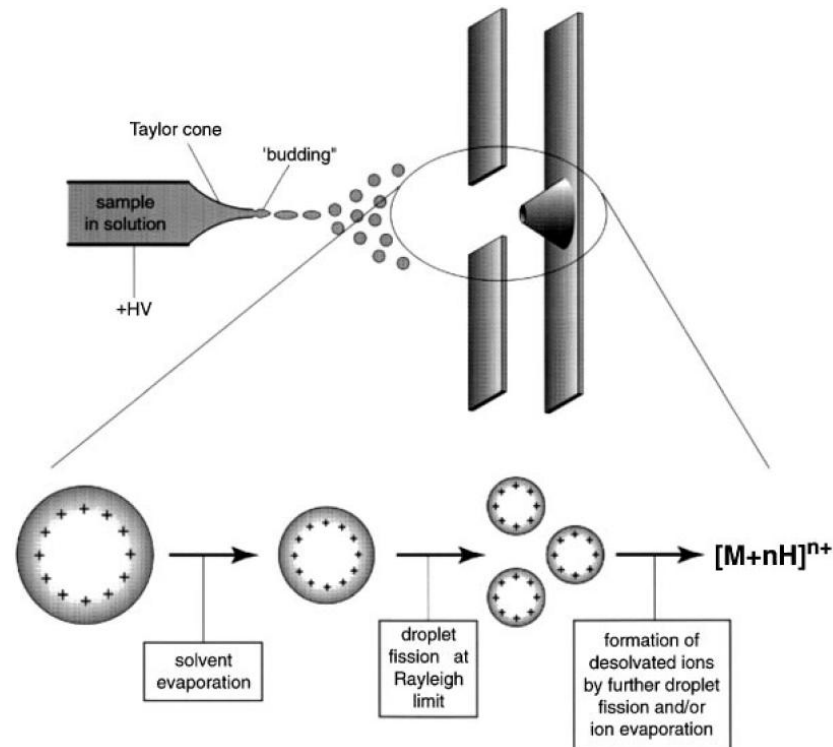
b) Passage des ions de la phase liquide à la phase gazeuse

Passage phase liquide/ phases gazeuse en 3 étapes

1- production de gouttelettes chargées

2- réduction des gouttelettes chargées en gouttelettes + petites

3- désolvatation & déclustering => « transfert » des ions en phase gazeuse

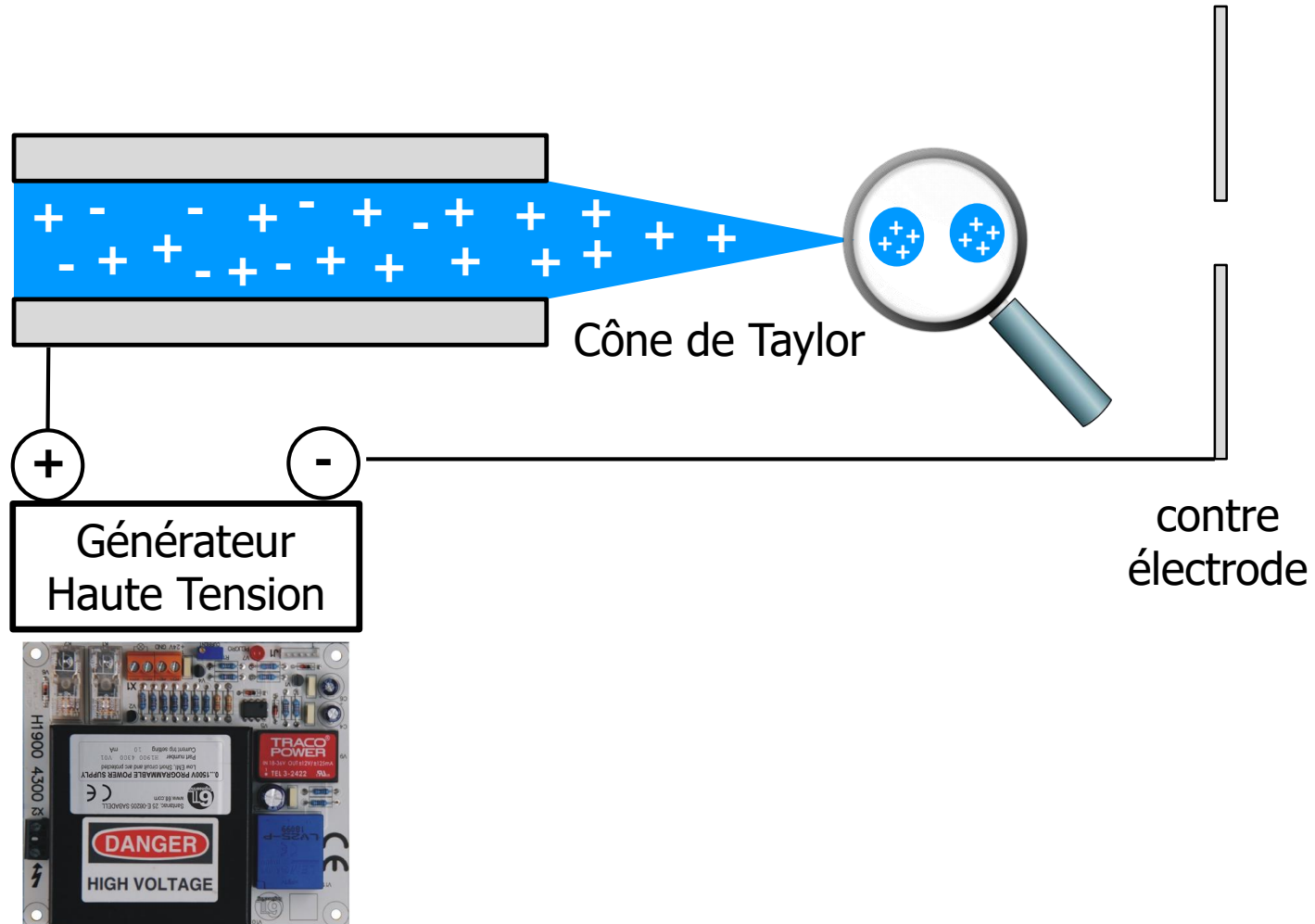


Fenn, J., M. Mann, C. Meng, S. Wong and C. Whitehouse (1989). "Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules." *Science* **246**(4926): 64-71.

Kebarle, P. and L. Tang (1993). "From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry." *Analytical Chemistry* **65**(22): 972A-986A.

Étape 1: Formation du spray

Formation du spray sous l'action d'un champ électrique (ex: ESI+)



Electrospray-ion spray: a comparison of mechanisms and performance.
Ikononou, M.G., A.T. Blades, and P. Kebarle
Analytical Chemistry, 1991. **63**(18): p. 1989-1998.

propriétés des solvants pouvant impactant le spray

- tension de surface
- conductivité
- constante diélectrique
- force ionique
- volatilité

Éluant usuels:
MeOH, ACN, IPA, H₂O

LC: RPLC, HILIC, NPLC (éluant souvent peu compatibles)

=> Le nombre de charge par gouttelette est limité

=> si on augmente le débit pour gagner en nb de charges on perd en formant des gouttelettes + difficiles à évaporer

Étape 2 : Évaporation/Scission/Désolvatation

➔ Après formation des gouttelettes il y a évaporation du solvant (N_2 , T°):

=> ↘ taille gouttelette

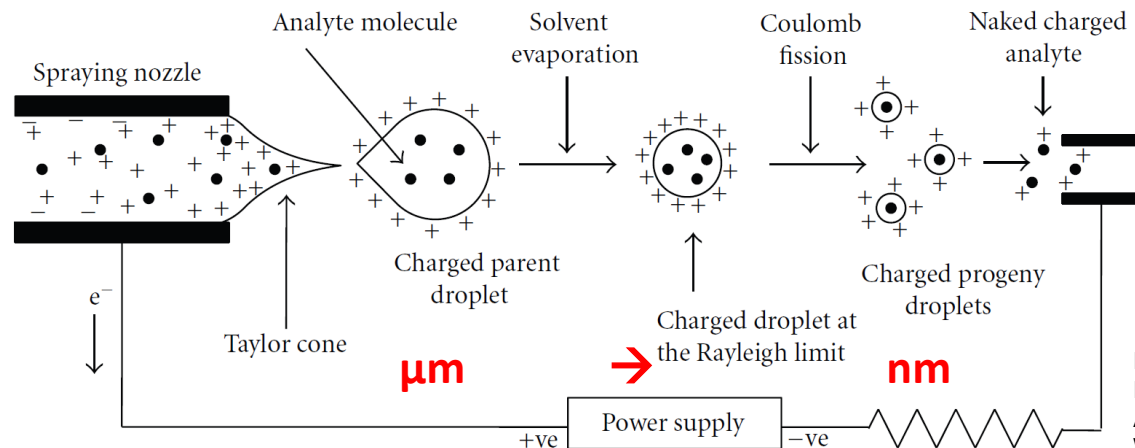
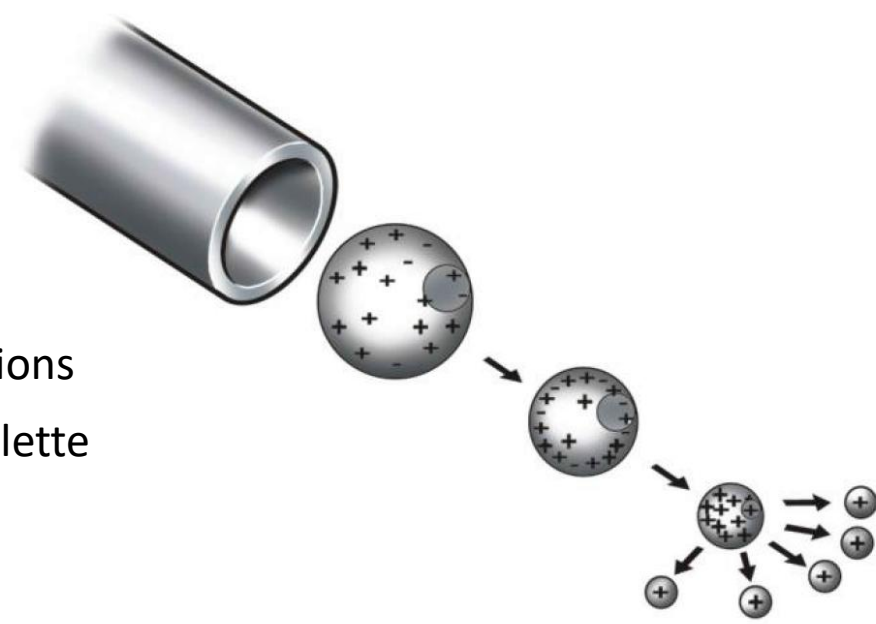
=> ↗ densité de charges au sein de la gouttelette

=> ↗ forces de répulsion coulombiennes

=> scission de la gouttelette en gouttelettes plus petites ou éjection d'ions

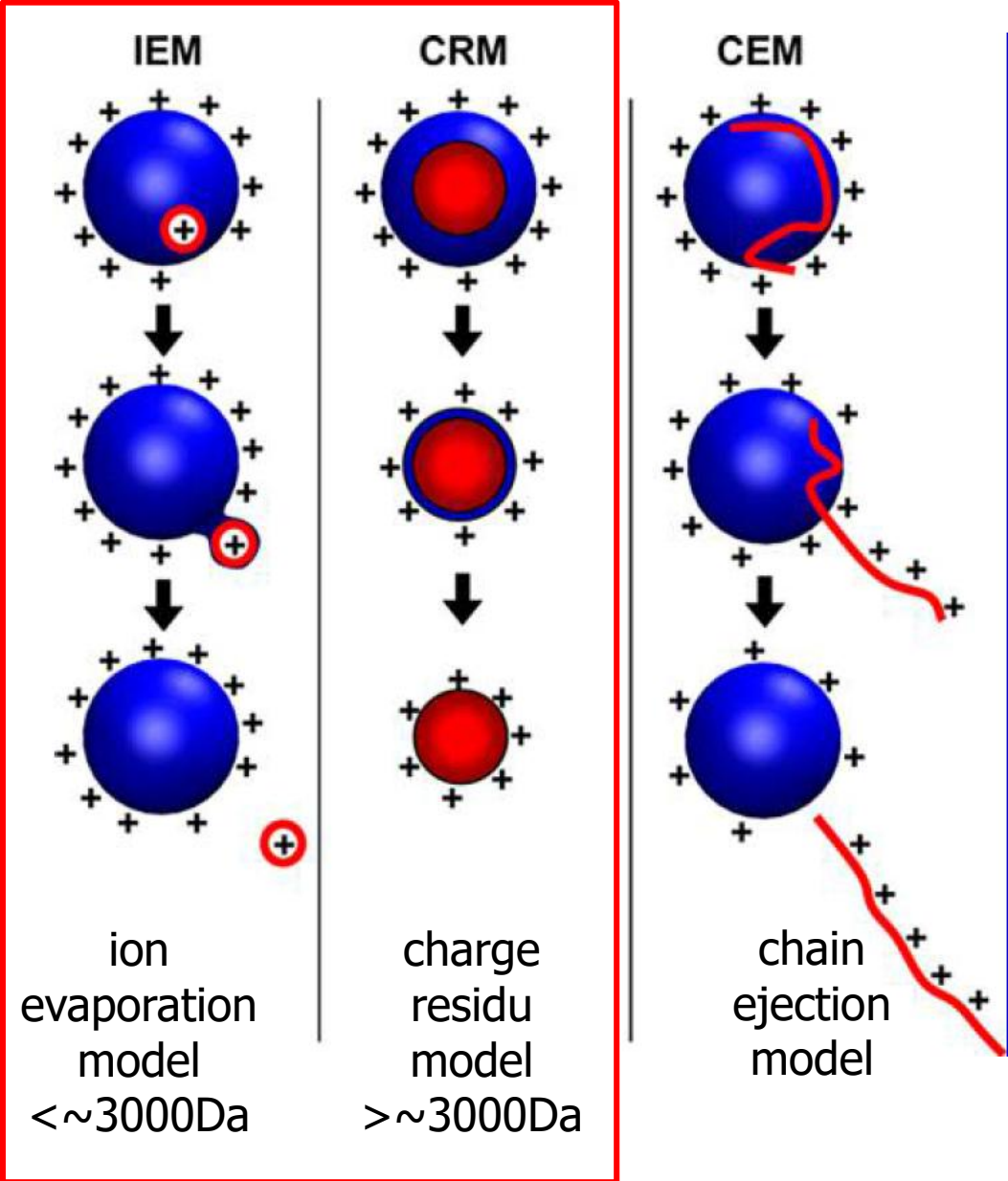
⇒ les ions éjectés sont situés principalement à la surface de la gouttelette

⇒ il peut y avoir un phénomène de compétition



Banerjee, S. and S. Mazumdar (2012). "Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte." *International Journal of Analytical Chemistry* **2012**: 40.

Influence de la masse molaire des analytes sur les mécanismes de désolvatation et sur l'état de charge des ions



Konermann, L., E. Ahadi, A. D. Rodriguez and S. Vahidi (2013). "Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization." *Analytical Chemistry* **85**(1): 2-9.

Paramètres de la source à optimiser

Analytes

- Mode d'ionisation

Nébulisation:

- Eluant: nature / débit
- Capillaire: voltage / positionnement
- Gaz de nébulisation : débit

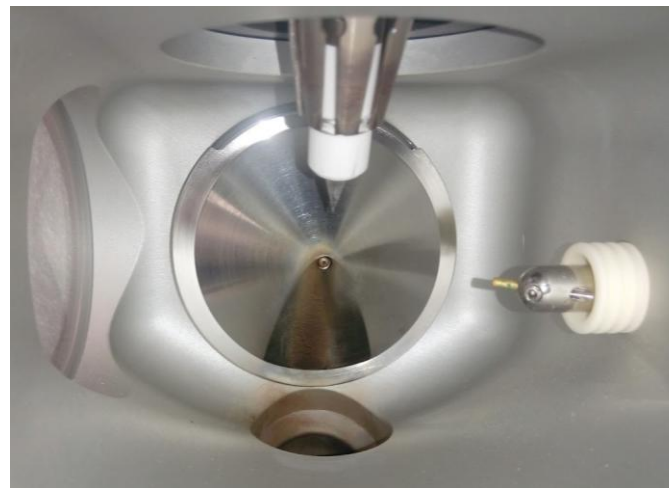
Désolvatation:

- Source: température
- Gaz de désolvatation : débit / température
- Voltage de désolvatation

Procédure d'auto-tune ou manuel

Réglages généraux (non ciblé) ou spécifiques (ciblé)

Positionnement



c) IMPACT DES CONDITIONS D'ANALYSE

**Impact du débit de la phase mobile:
Importance du type de LC
(HPLC, UPLC, μ LC, nano LC)**

Importance vis-à-vis de la stabilité du spray

débit < $\mu\text{L}/\text{min}$



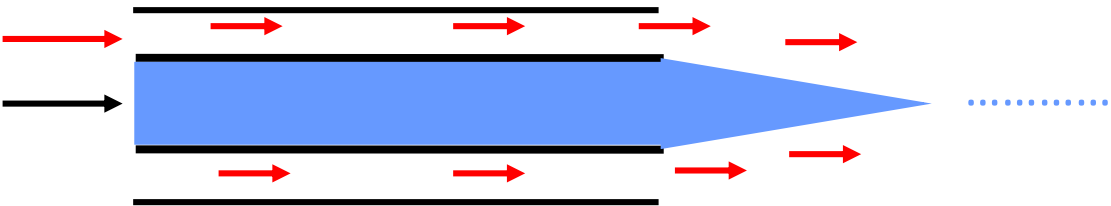
Capillaire d'environ 100 microns
de diamètre intérieur

nano-LC

assistance pneumatique à la nébulisation
(Pneumatically assisted ESI)

Flux N_2 comprimé

débit > $\mu\text{L}/\text{min}$



Des gouttelettes sont arrachées
par le gaz à la surface du cône de liquide.

μ -LC

UHPLC

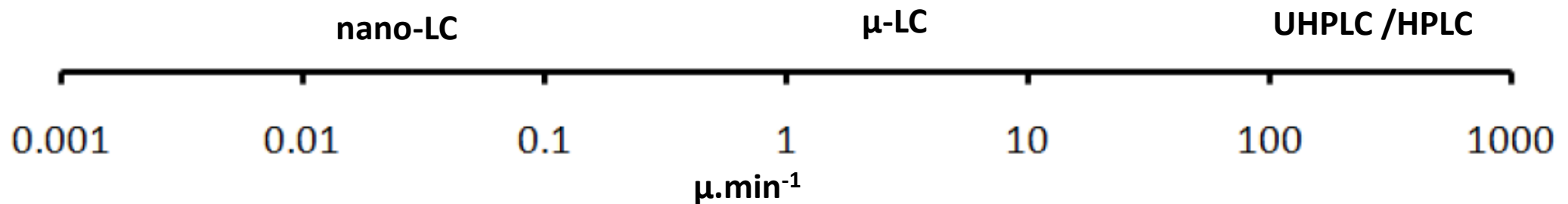
HPLC

Impact du type de LC sur la sensibilité

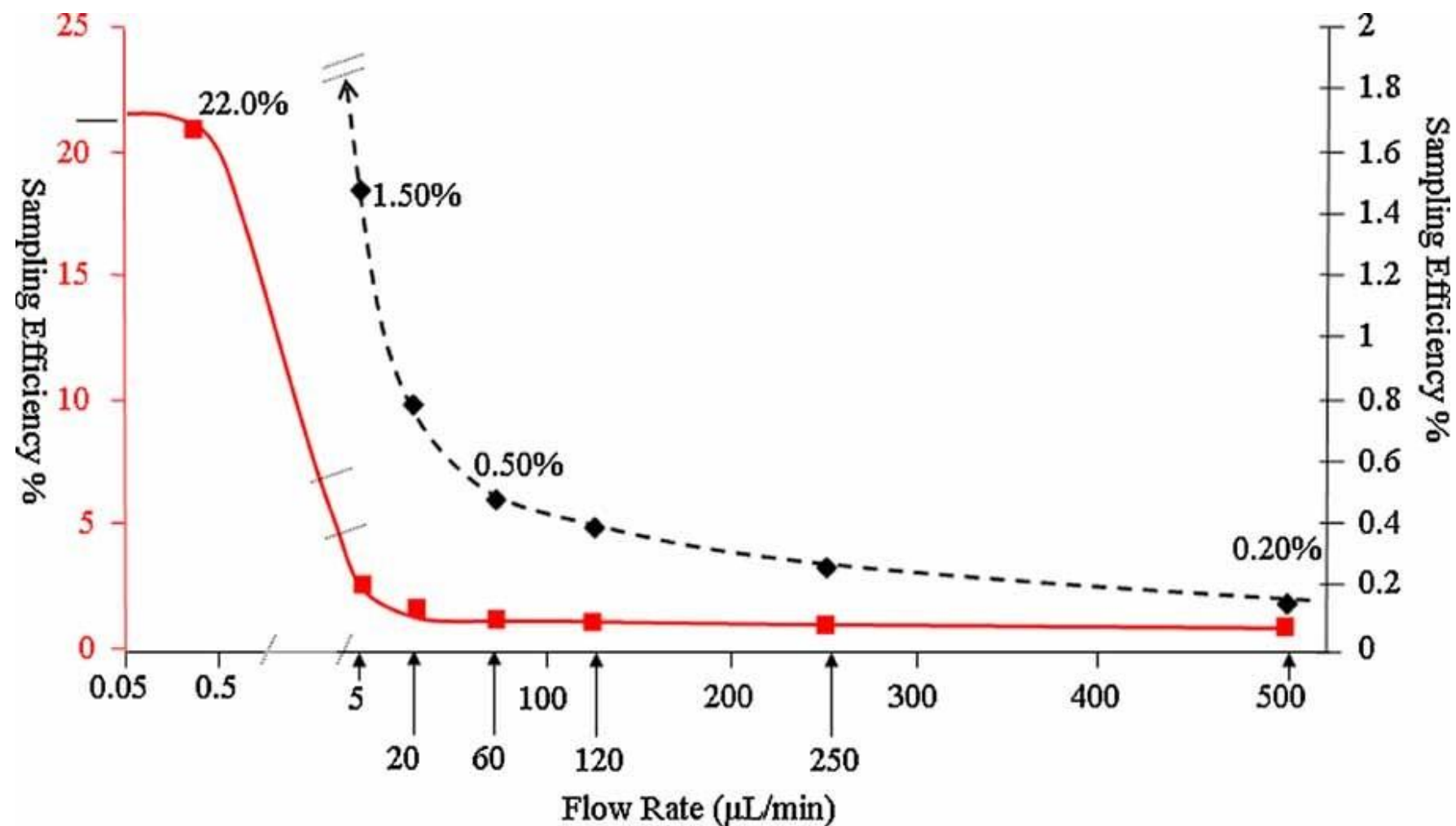
Le signal est \approx concentration dépendant:

Signal proportionnel à [analyte] pas au débit

(\nearrow débit \Rightarrow \nearrow qté éliminée par pompes à vide)



Impact du débit sur la réponse

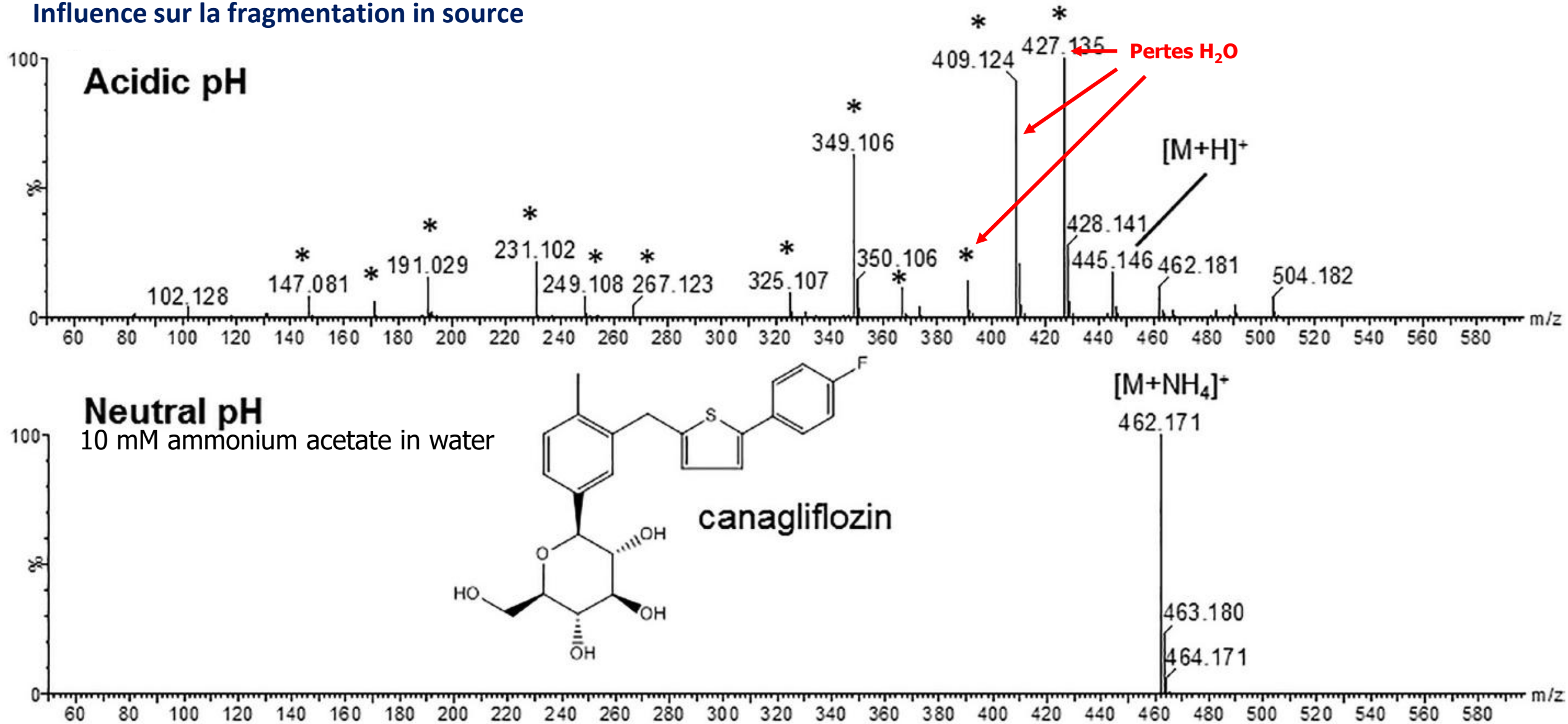


Impact du pH de la phase mobile
Utilisation d'additifs / modificateurs de phase mobile

Pour favoriser ionisation on peut ajouter:

- **traces d'acide (ESI+)**
 - acide formique (HCOOH) / pKa: 3.75
 - acide acétique (CH₃COOH) / pKa: 4.75
- **traces de base en (ESI-)**
 - hydroxyde d'ammonium / pKa 9,24
 - triéthylamine / pKa 10,7
- **tampon volatil pour ajuster pH**
 - formate d'ammonium / pKa: 3,74 et 9,24
 - acétate d'ammonium / pKa: 4,76 et 9,24

Influence sur la fragmentation in source



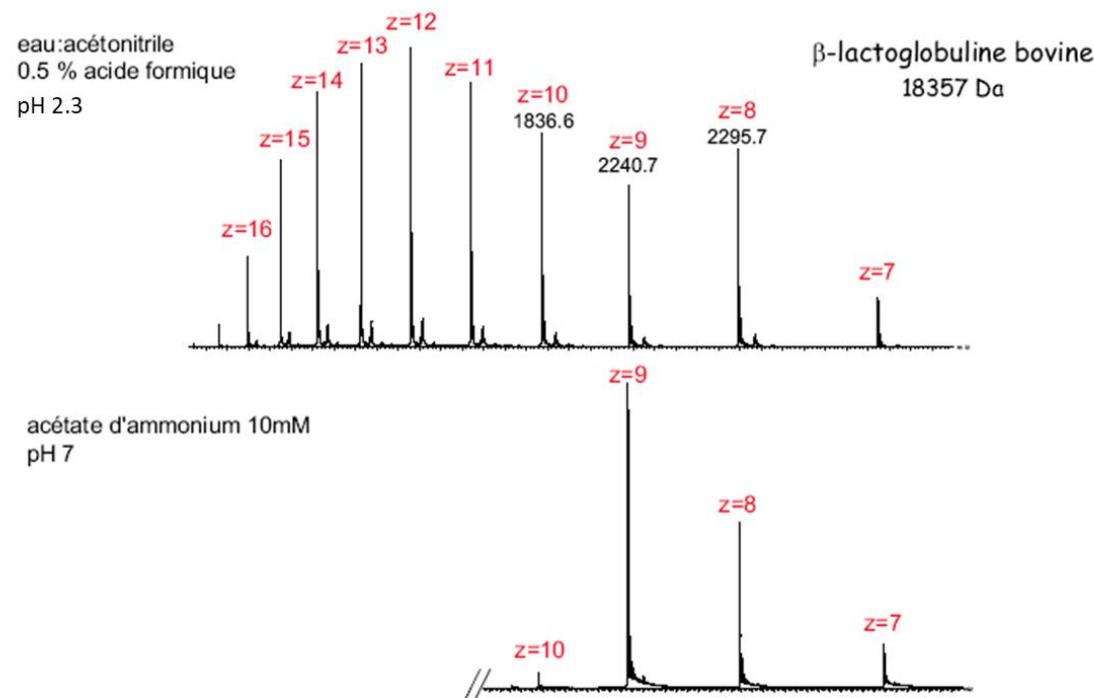
MS spectrum obtained under acidic (0.1% v/v TFA in water) and neutral pH (10 mM ammonium acetate in water, pH 7).
In acidic conditions, many in-source fragments are formed (*)

Influence sur l'état de charge

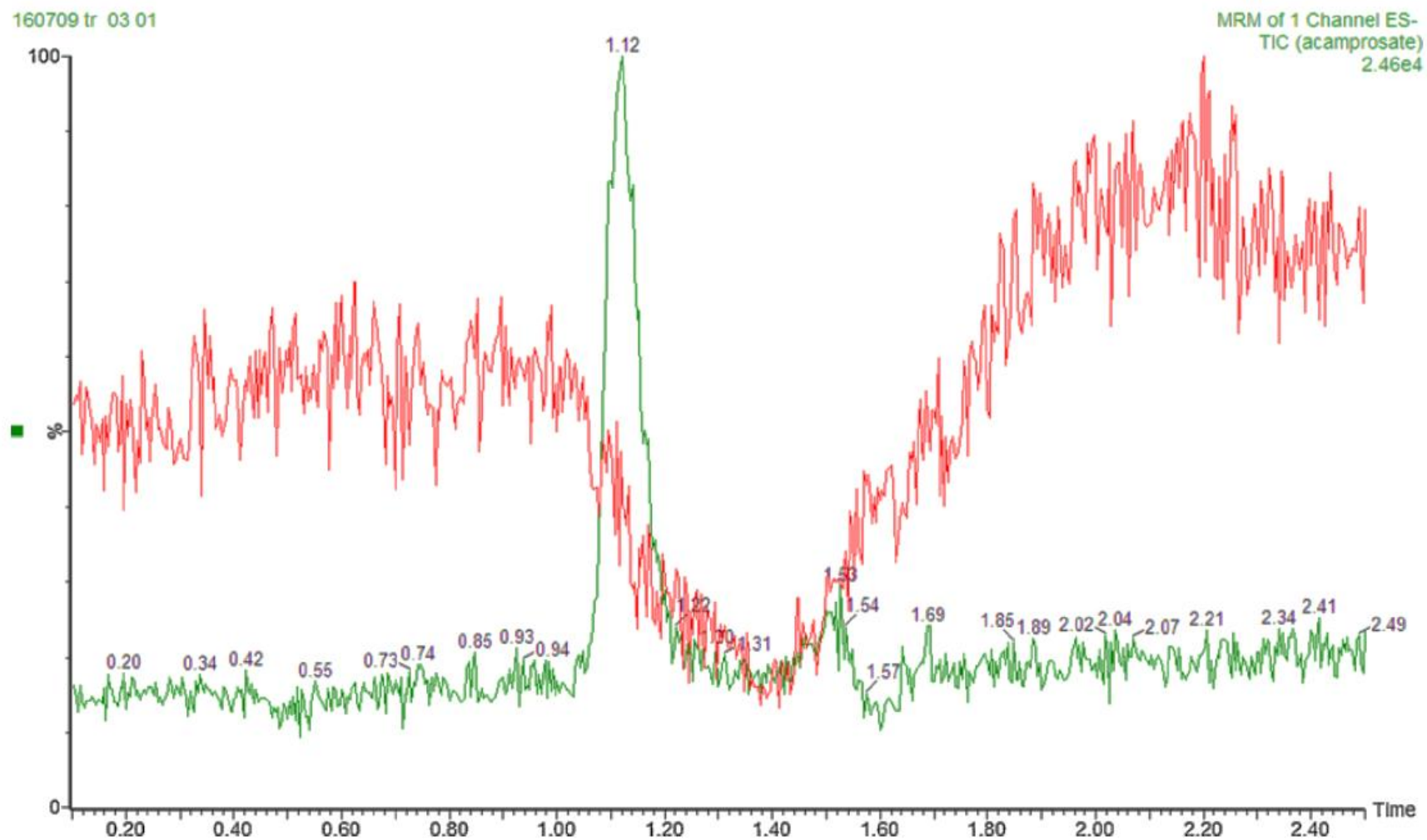
nombre de charges maximum: déterminé par le nombre de sites ionisables

distribution des états de charge influencée par:

- conditions source: débit, température, gaz rideau, collisions,...
- analyte: structure, concentration,...
- conditions environnementales: pH, nature solvant, autres composés,...



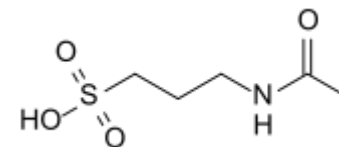
D) Effets de matrice (modulations d'intensité du signal)



acamprosate (traitement alcoolisme)

a) en solution dans l'eau (vert)

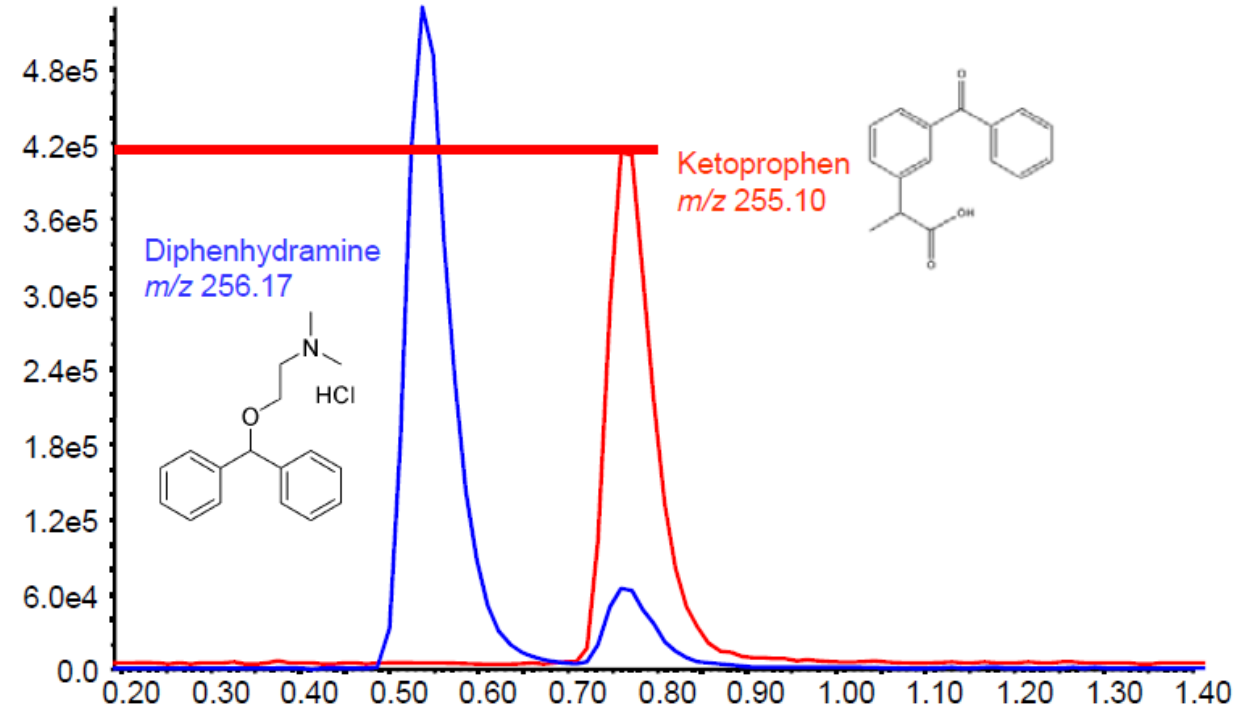
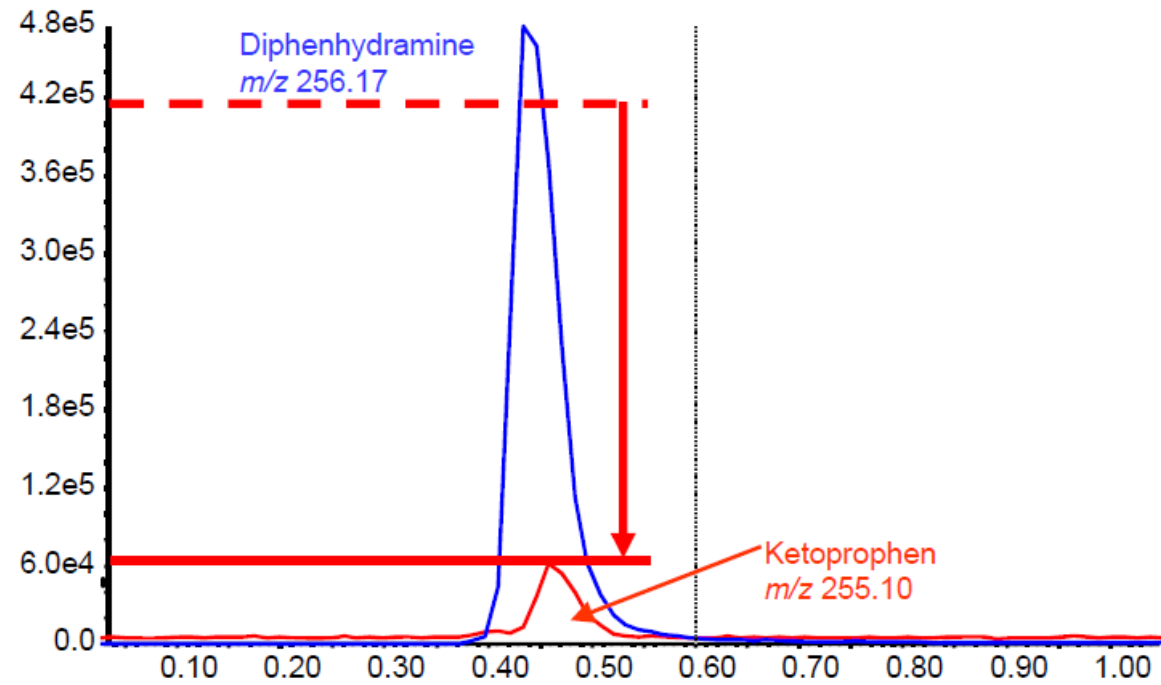
b) en solution dans du plasma sanguin (rouge)



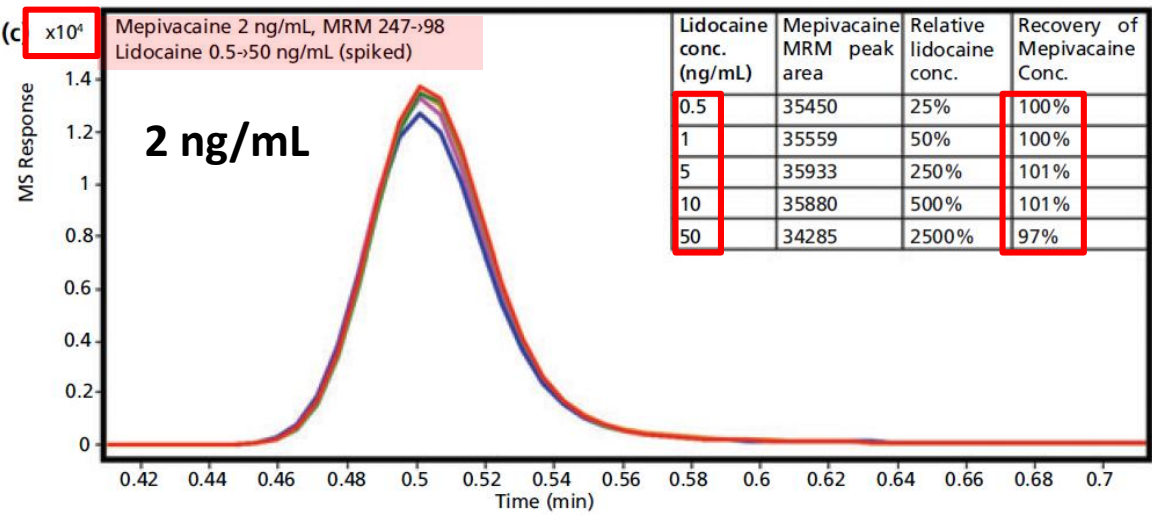
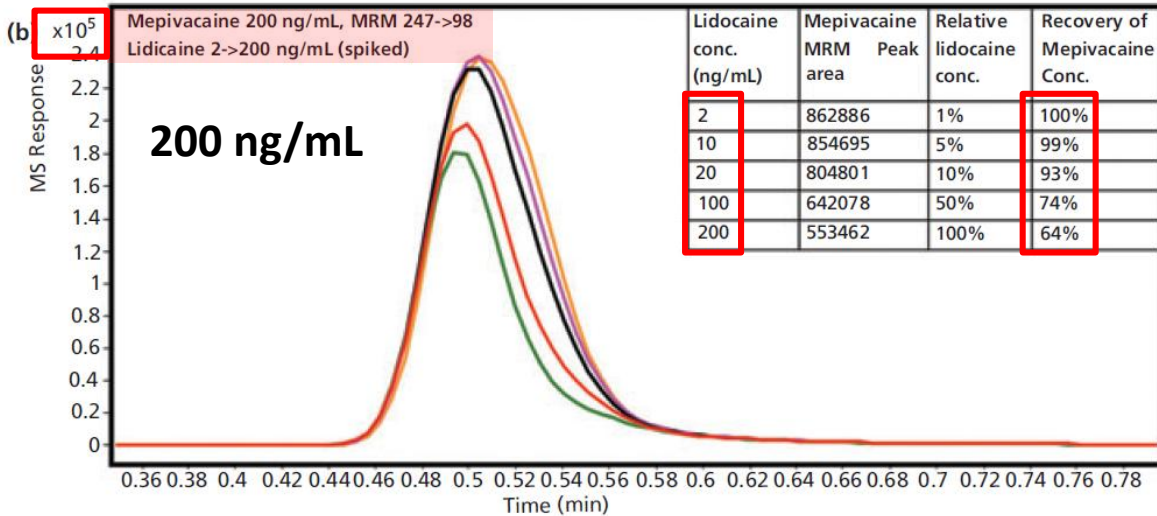
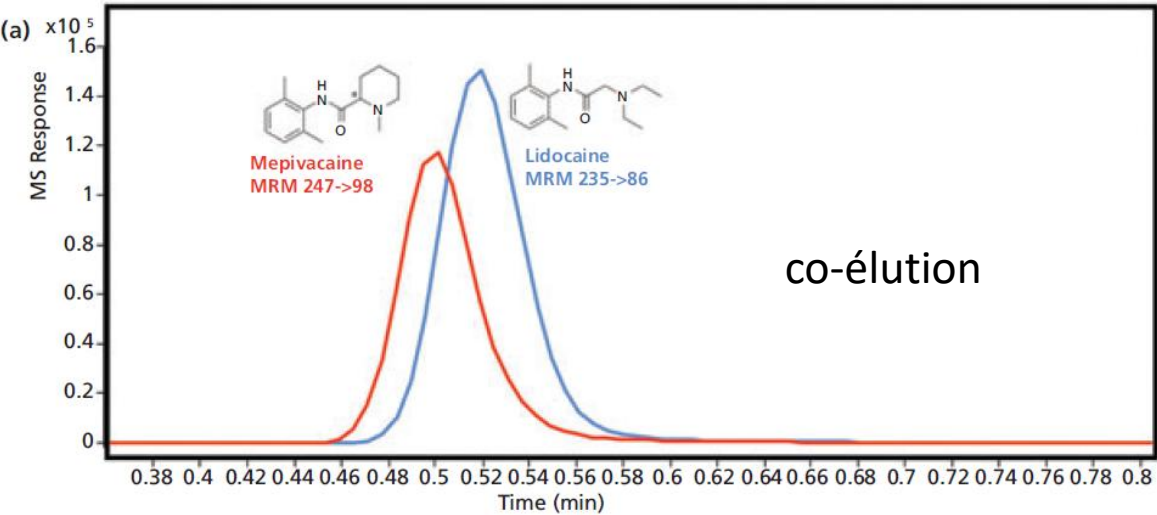
causes majeures des effets de matrice en ESI

- **Compétition à l'ionisation** : la présence d'autres composés induits une suppression de l'analyte (compétition pour le nombre de charge, pour la migration vers la surface de la gouttelette)
- **Formation d'agrégats** (agrégats non volatils, adduits neutres (appariement d'ion))
- **Alteration du spray**: Modification de la tension de surface de la solution (détergents, glycérol)
- **Phénomènes de répulsion de charge**

Optimiser la séparation chromatographique

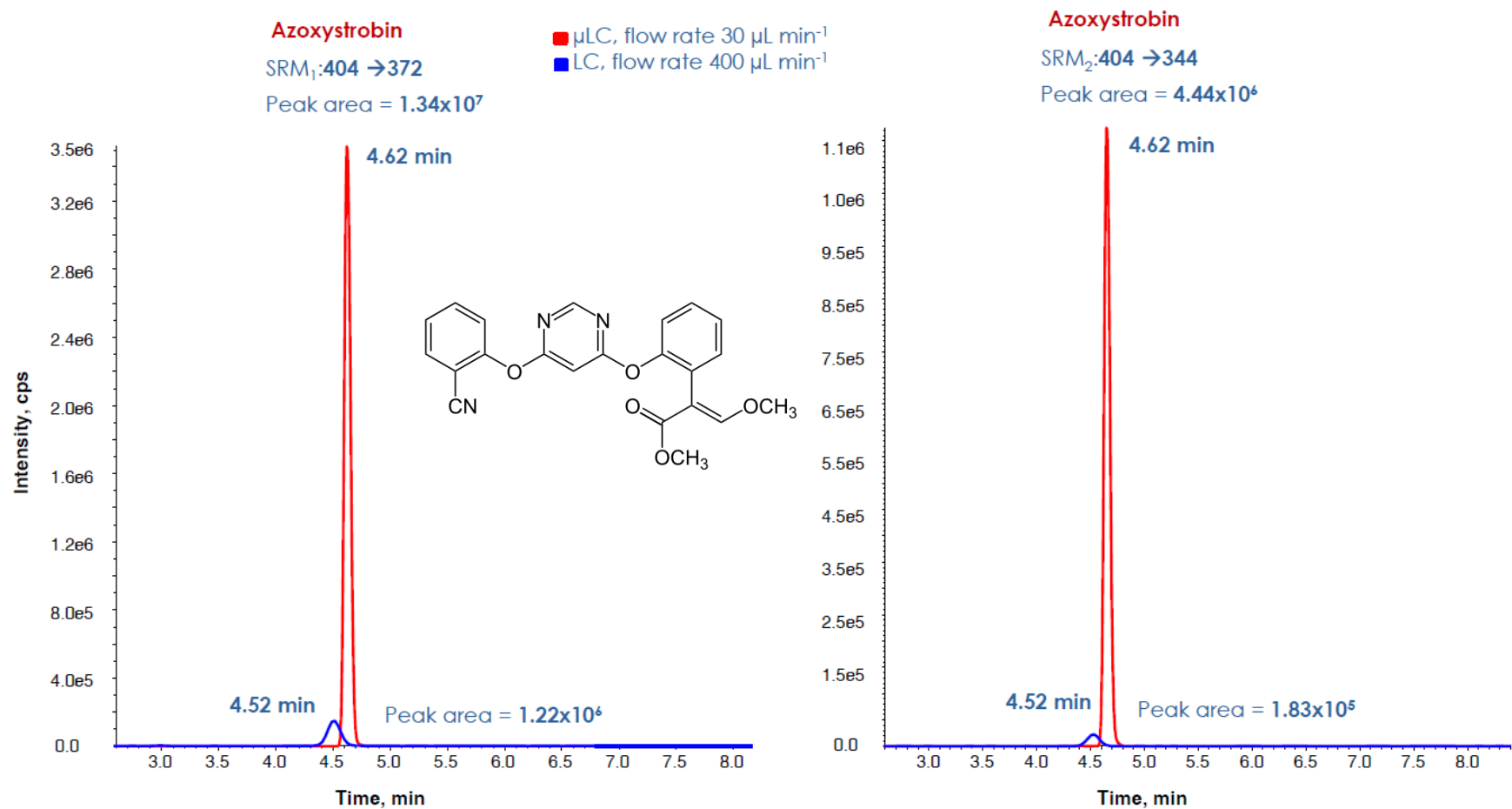


La dilution de l'échantillon peut permettre de limiter la compétition
dosage d'anesthésiques locaux: impact sur la concentration mesurée en mepivacaïne de la présence en concentrations variables de lidocaïne



Dilution x100 => réponse / 15-20

La diminution du débit peut permettre de limiter la compétition en favorisant la désolvatation

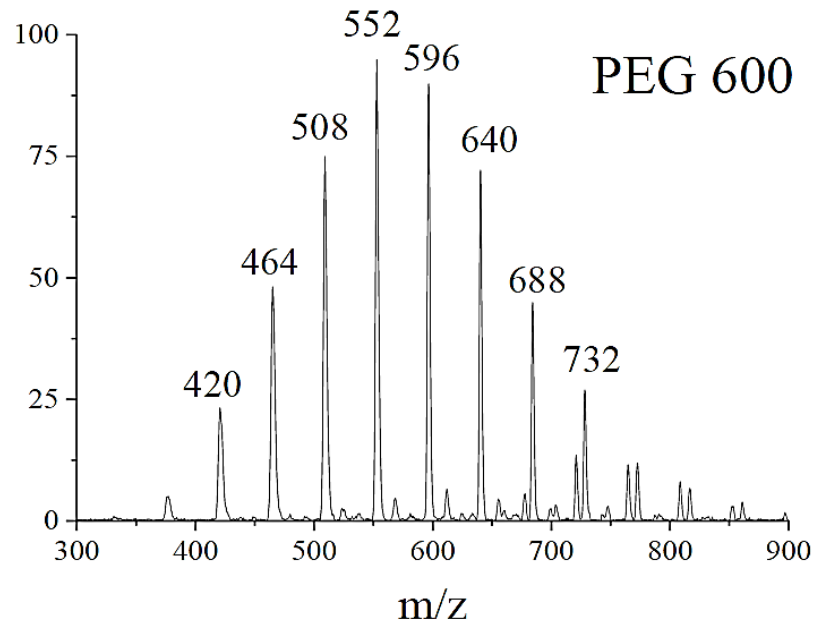


Comparaison des chromatogrammes XIC des transitions MRM 404->372 et 404->344 de l'azoxystrobin (fongicide) observées dans des oranges dopées à 10µg/kg pour des débits **HPLC** de 400µL/min et **µLC** de 30µL/min

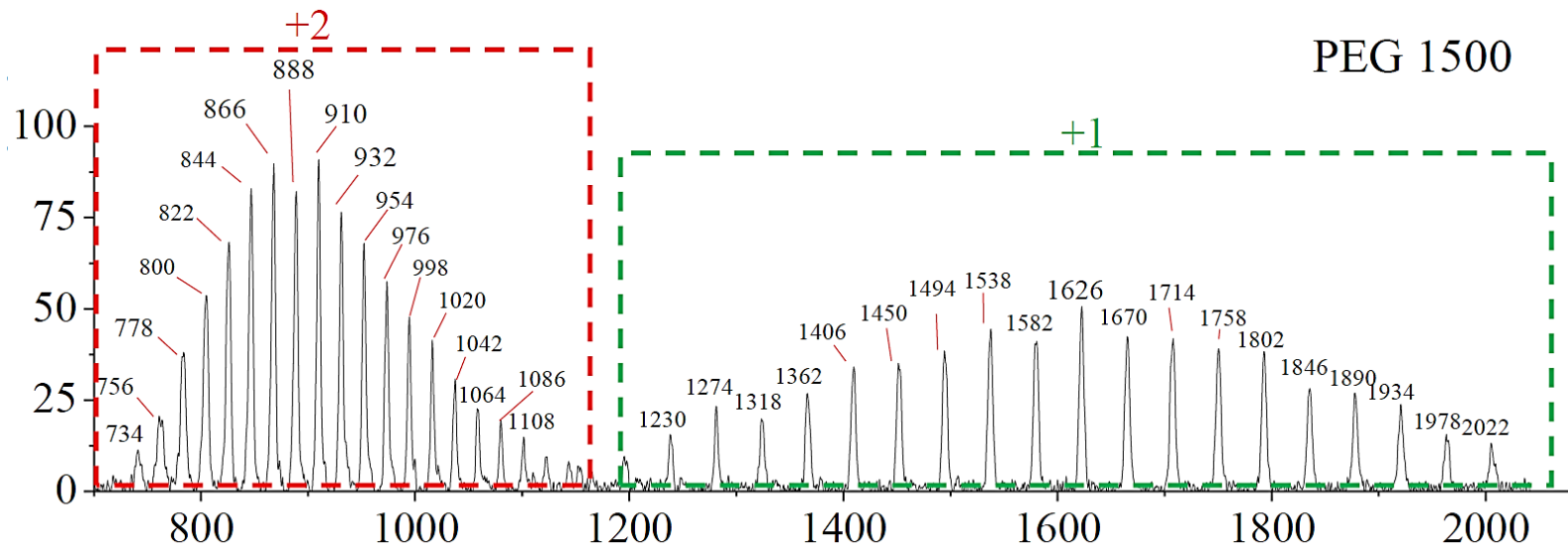
Uclés Moreno, A., S. Herrera López, B. Reichert, A. Lozano Fernández, M. D. Hernando Guil and A. R. Fernández-Alba (2015). "Microflow Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry—An Approach to Significantly Increase Sensitivity, Decrease Matrix Effects, and Reduce Organic Solvent Usage in Pesticide Residue Analysis." *Analytical Chemistry* **87**(2): 1018-1025.

E) DÉTERMINATION DES MASSES MOLAIRES LES SPECIFICITES DE L'ESI

Petites molécules (monochargées)



Molécules moyennes (multichargées)



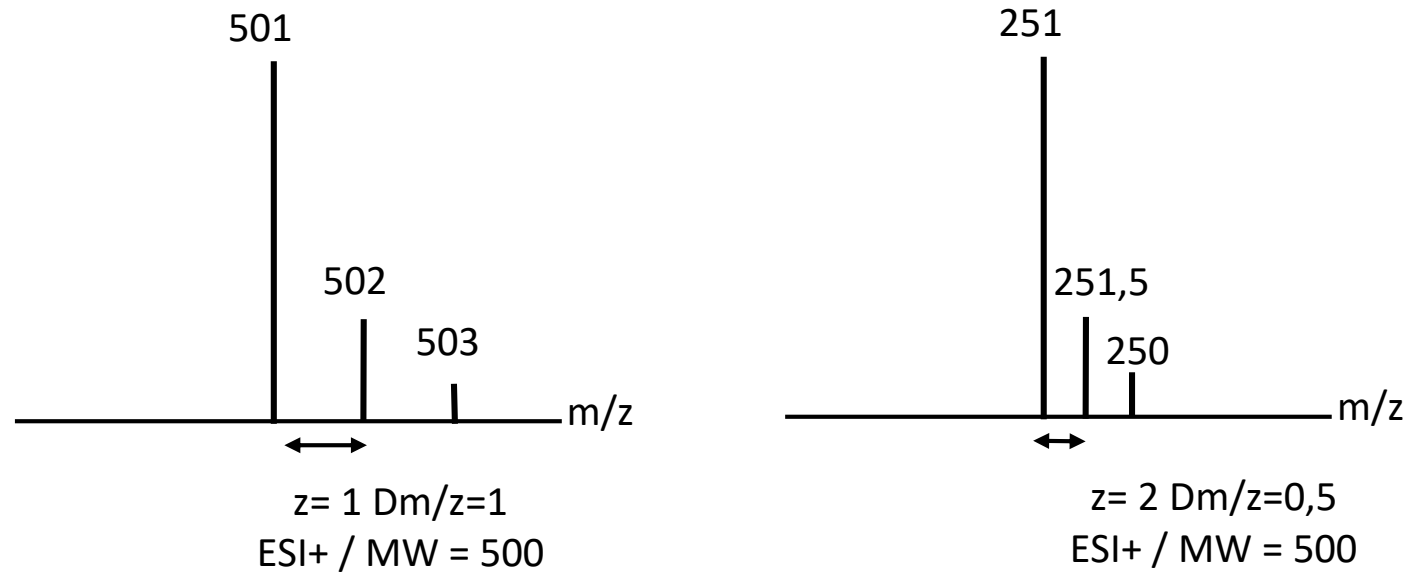
ESI+ (charges par addition H^+)



Pb : Comment déterminer l'état de charge?

Cas des états de charge faibles

=> utiliser les massifs isotopiques



Δ masse apportée par la présence d'1 isotope est de ~ 1 => écart entre pics isotopique est $\sim 1/z$

Si	z=1	$\Delta m/z=1$	
	z=2	$\Delta m/z=0.5$	
	z=3	$\Delta m/z=0.33$	etc

Comment calculer la masse de la molécule analysée?

Ionisation positive: espèce $[M+nH]^{n+}$

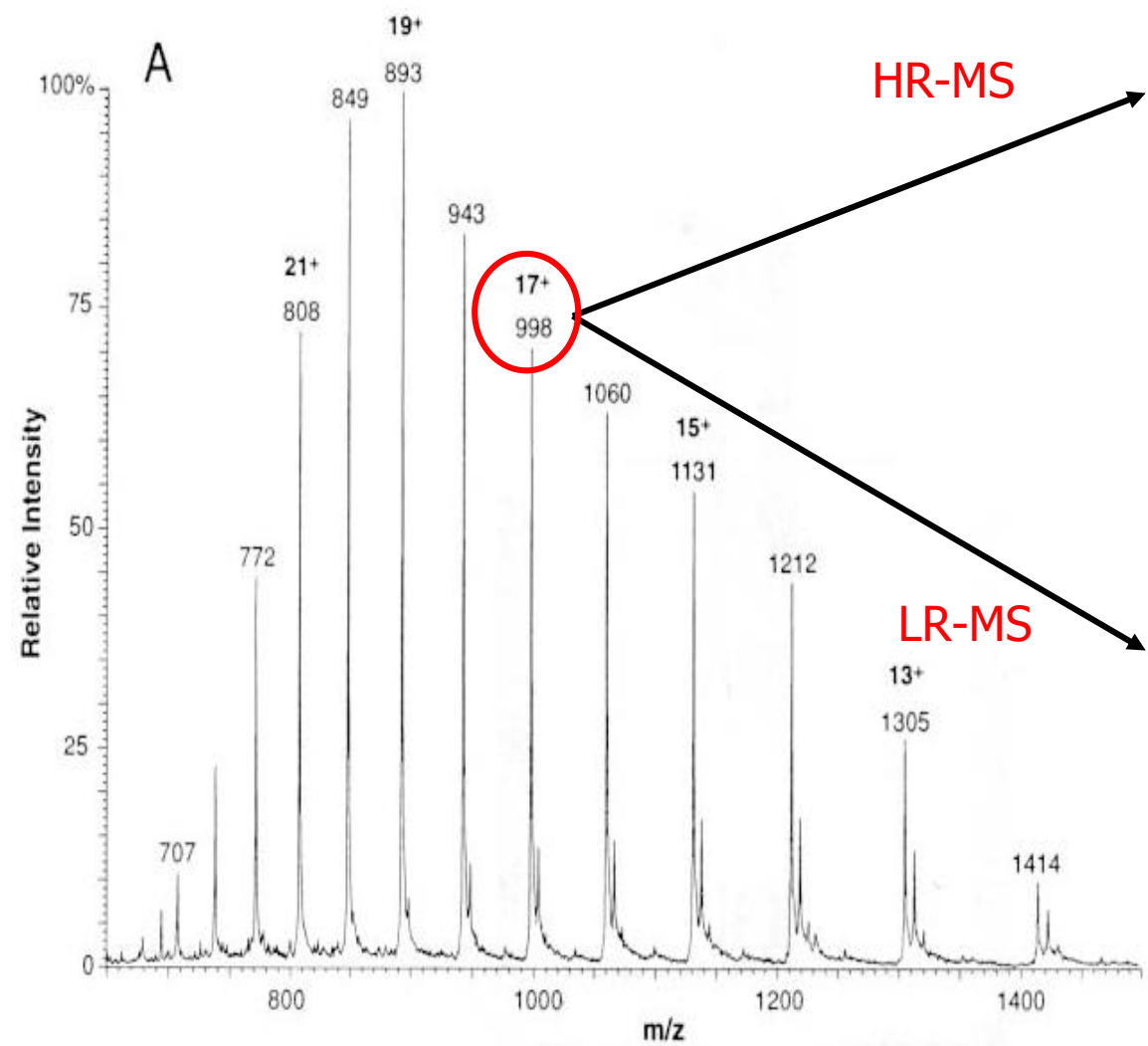
$$M_{\text{mono}} = (m/z * n) - n * mH^+ = n(m/z - mH^+)$$

Ionisation negative: espèce $[M-nH]^{n-}$

$$M_{\text{mono}} = (m/z * n) + n * mH^+ = n(m/z + mH^+)$$

Quelle masse mesure-t-on avec les multichargés?

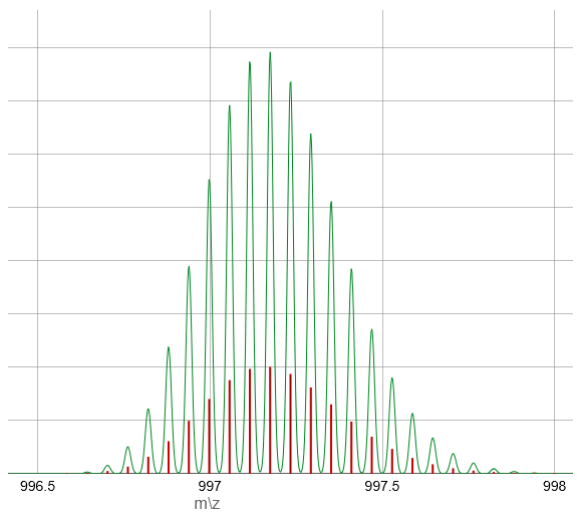
la détection du profil isotopique dépend de la résolution de l'analyseur



HR-MS

R = 50000

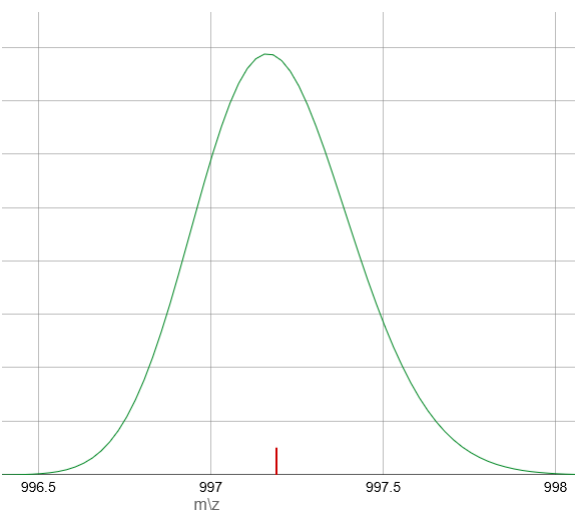
On mesure la
masse
monoisotopique



LR-MS

R = 4000

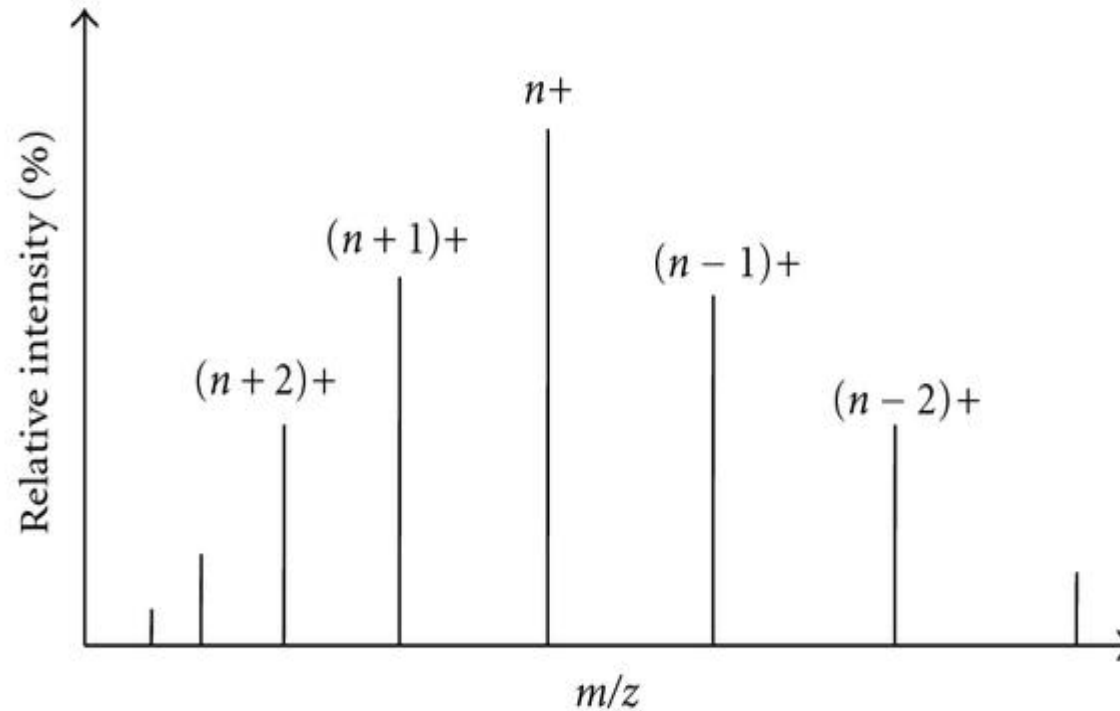
On mesure la
masse
moyenne



Pb : Comment déterminer l'état de charge?

Cas des états de charge importants en ESI+

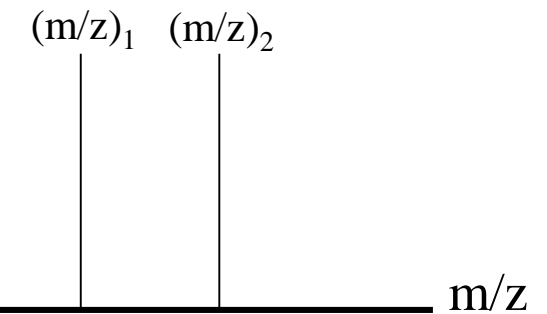
Il faut d'abord déterminer les valeurs de z



$$n = \frac{m_1 - m_H}{m_2 - m_1}$$

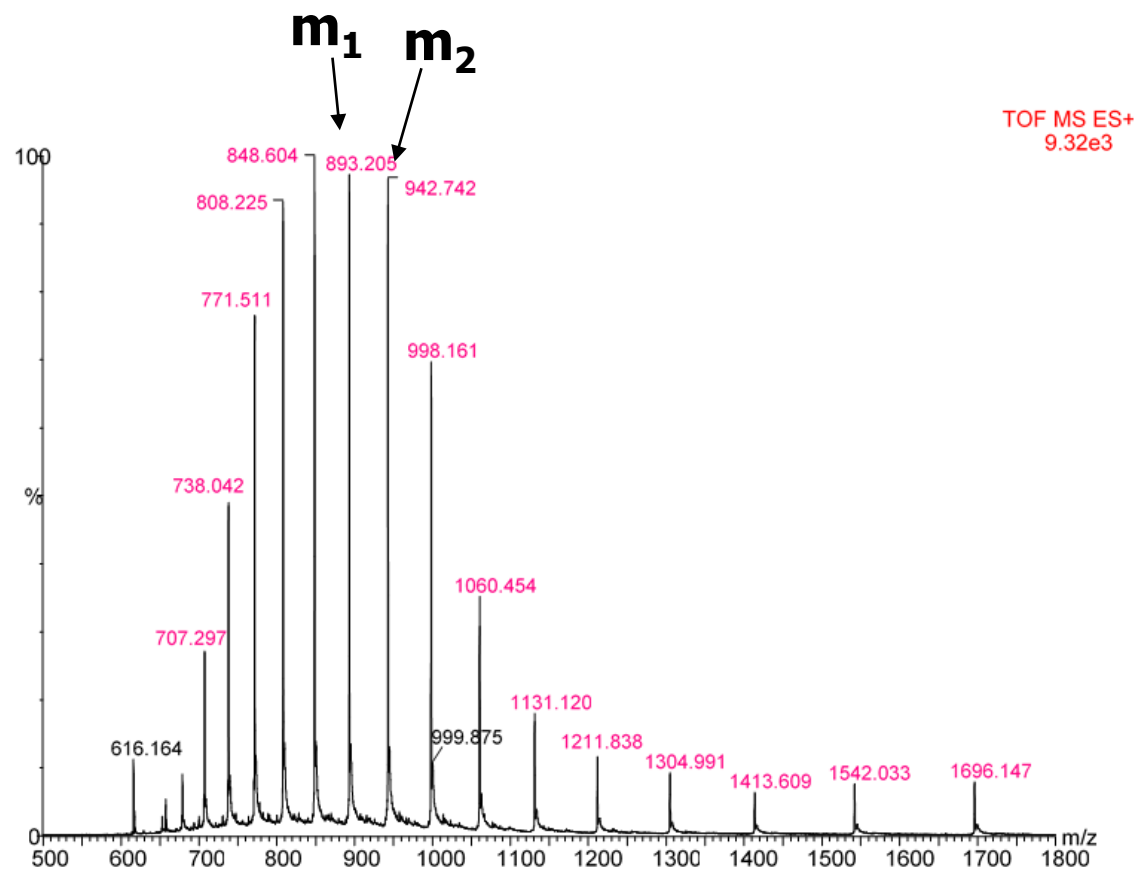
$$M = n \times (m_2 - m_H)$$

Deux pics consécutifs
permettent de déterminer
M et n



$$(m/z)_1 \Rightarrow m_1 = \frac{M + ((n + 1) \times m_H)}{n + 1}$$

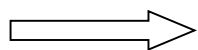
$$(m/z)_2 \Rightarrow m_2 = \frac{M + (n \times m_H)}{n}$$



$$m_1 = 893,205$$

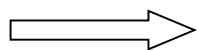
$$m_2 = 942,742$$

Calcul de n:



$$n = \frac{m_1 - 1}{m_2 - m_1} = \frac{893.205 - 1,007}{942.742 - 893.205} = 18.01 \longrightarrow n = 18$$

Calcul de M:



$$M = n(m_2 - m_h) = 18(942,742 - 1,007) = 16951.230$$

Cas des états de charge importants en ESI-

$$(m/z)_1 \Rightarrow m_1 = \frac{M - ((n + 1) \times m_H)}{n + 1}$$

$$(m/z)_2 \Rightarrow m_2 = \frac{M - (n \times m_H)}{n}$$

$$n = \frac{m_1 + m_H}{m_2 - m_1}$$

$$M = n \times (m_2 + m_H)$$

L'ESI en résumé

Pour l'ionisation

- Mode le + usité en LC-MS
- Analytes: moyennement polaires à polaires
MM faible à élevée
bonne ionisation si hétéroatomes
volatilité pas nécessaire
- Ionisation +/-
douce => pas ou peu de fragmentation
ions formés en solution
possibilité de multichargés
réponse concentration dépendante
risque de modulation de signal (supression/augmentation)
- Bonne sensibilité ($C \approx \text{mM}$)

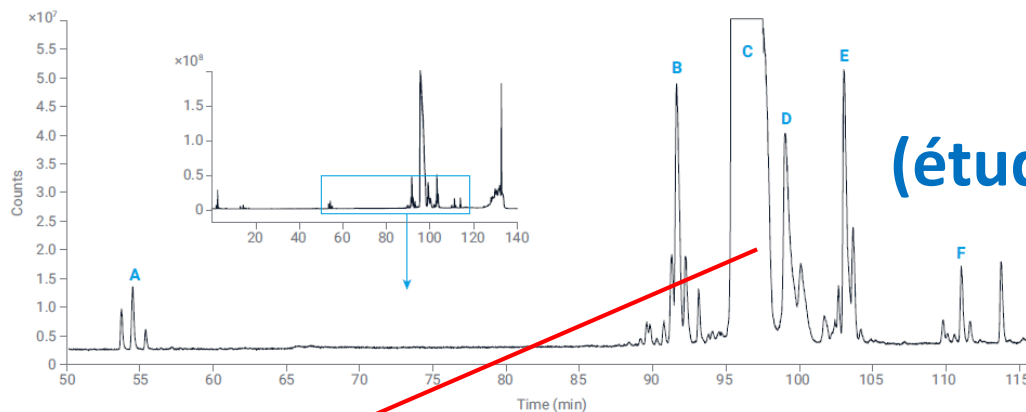
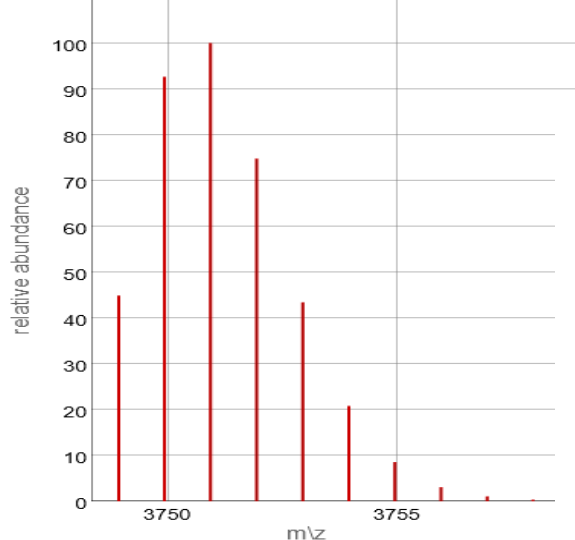
Pour le couplage

- pH PM et pKa analyte jouent sur la formation des ions (sensibilité)
- co-solvant organique a – d'influence
- éviter [tampon] > 10-25 mM
- éviter débit trop élevé (> 500µL/min en ESI conventionnel)
- compatible avec RPLC, HILIC et NPLC (sous réserve)

Applications LC-MS



Liraglutide (peptide) / diabète
monoisotopique: 3748.9465
+ abondant: 3750.9522

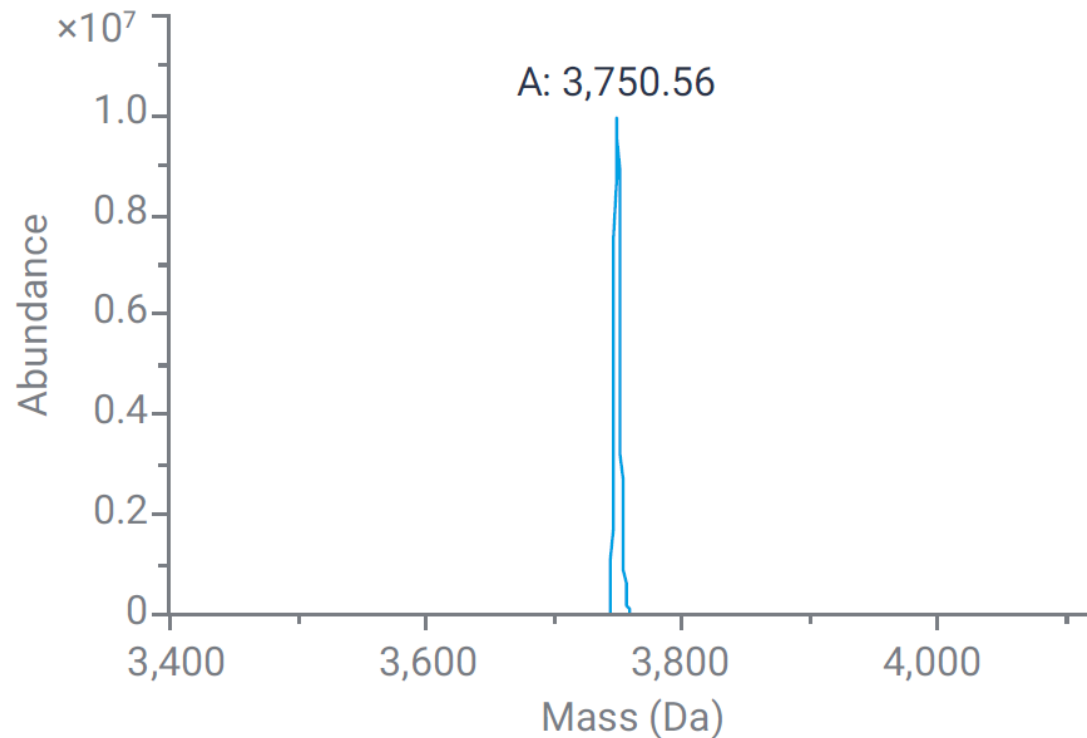
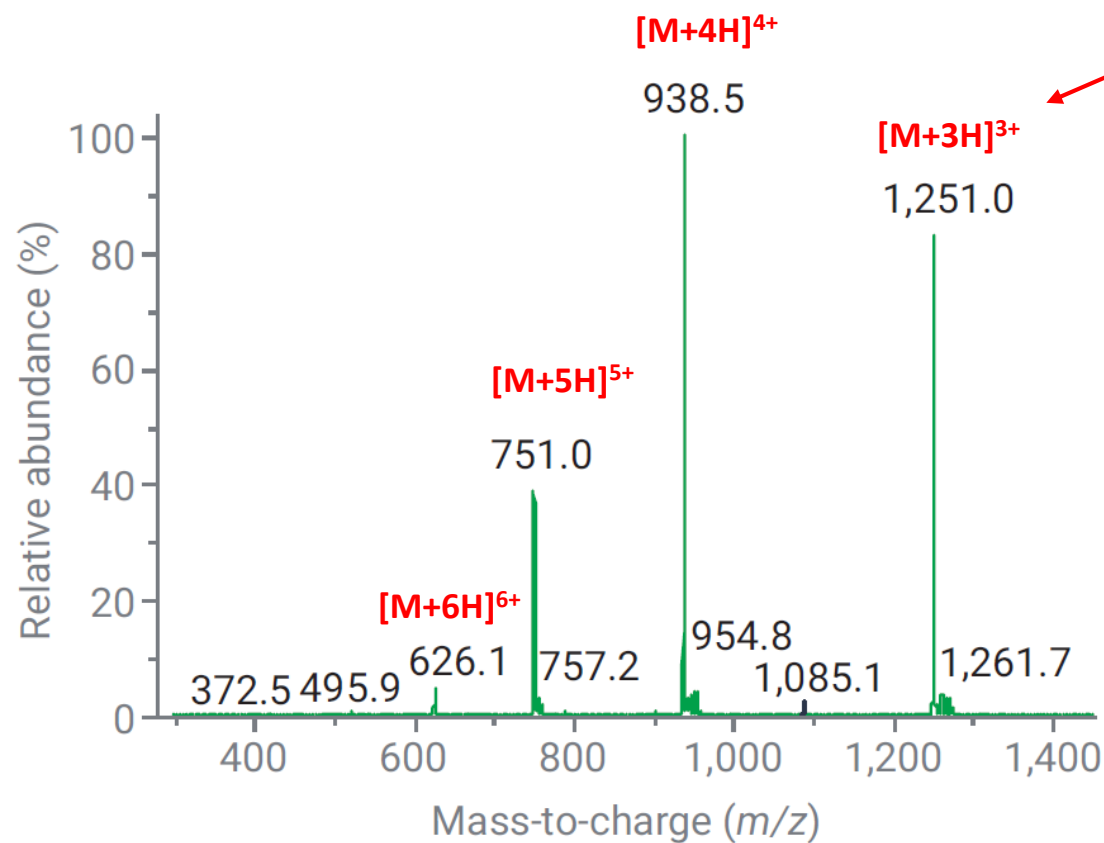


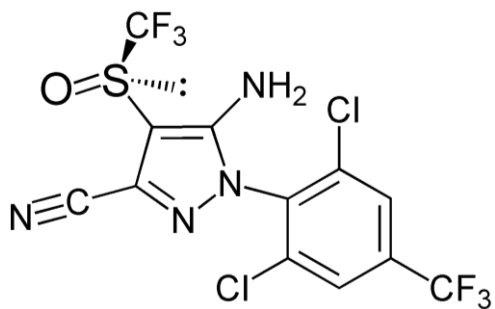
LC-MS

ESI⁺

(étude de stabilité)

Peptide Drug Stability Analysis Using Agilent InfinityLab
LC/MSD and OpenLab CDS Deconvolution
Agilent AN DE40962987 (2024)





- Extraction**
- Weigh 5 g homogenized eggs into 50 mL polypropylene tube and add 5 mL of water
 - Add 10 mL acetonitrile, shake for 2 min
 - Add 4 g MgSO₄ and 1 g NaCl (60105-340 HyperSep Mylar pouch 4000 mg Magnesium Sulfate and 1000 mg (NaCl))
 - Shake for 2 min and centrifuge for 5 min at 4000 rpm

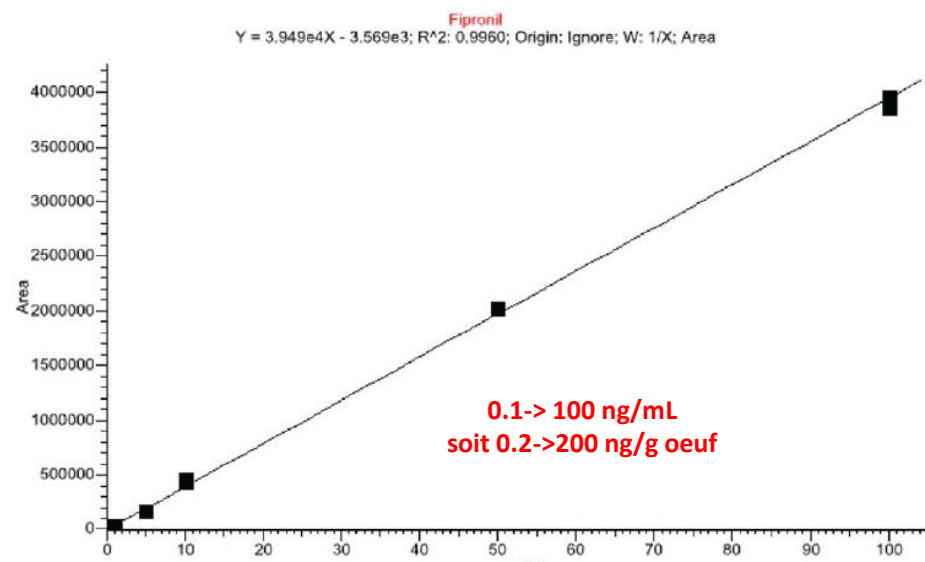
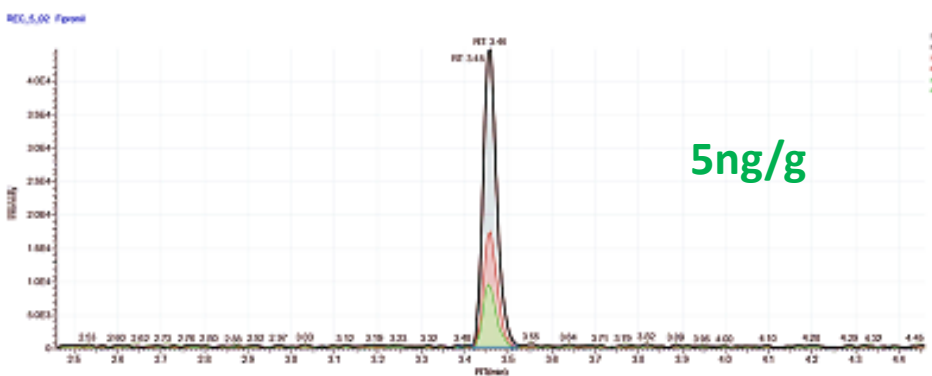
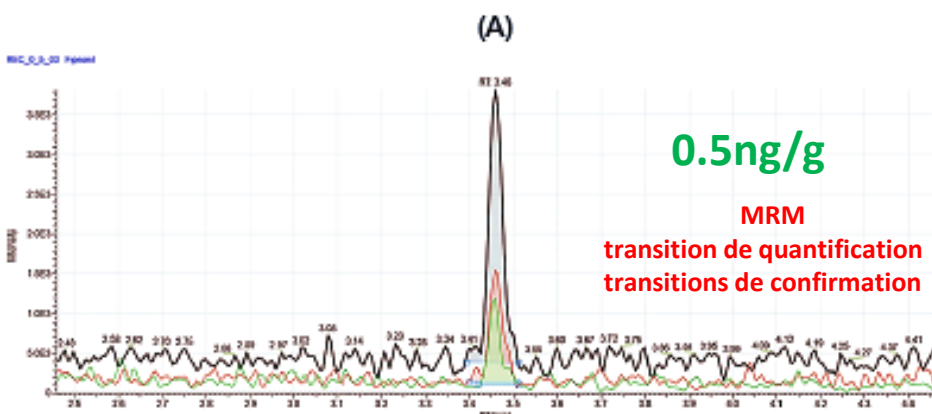
- dSPE cleanup**
- Transfer 4 mL of acetonitrile phase into empty 15 mL tube; avoid pipetting the hexane upper layer
 - Add dSPE cleanup sorbent consisting of 600mg anhydrous MgSO₄ and 500 mg C18 (ACROS Organic, 413485000; C18 dSPE pouches – P/N 60105-367-SP)
 - Shake for 2 min and centrifuge for 5 min at 4000 rpm

- LC-MS/MS**
- Transfer the supernatant into LC-MS vial
 - Inject 1 µL into LC-MS system



LC-MS/MS

Compound	Polarity	Precursor (m/z)	Product (m/z)	Collision energy (eV)	Min dwell Time (ms)
Fipronil	Negative	434.93	249.96	27.02	21
Fipronil	Negative	434.93	329.99	16.56	21
Fipronil	Negative	434.93	398.85	10.23	21
Fipronil Sulfone	Negative	450.93	243.85	46.17	21
Fipronil Sulfone	Negative	450.93	282.00	26.49	21
Fipronil Sulfone	Negative	450.93	415.04	15.04	21

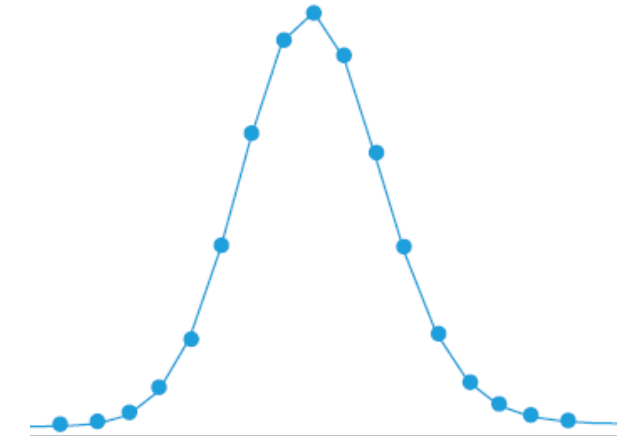
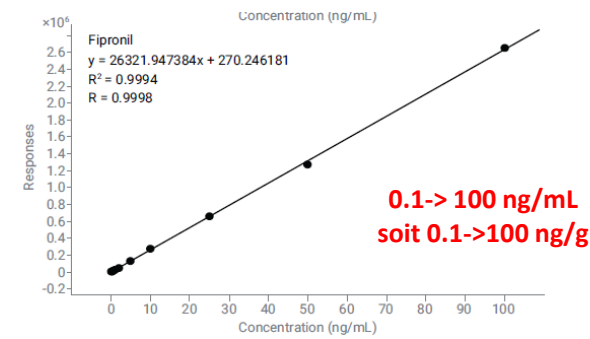
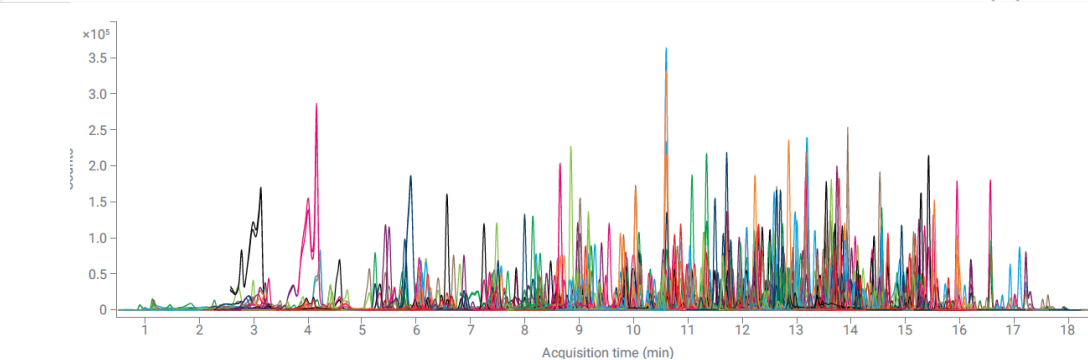
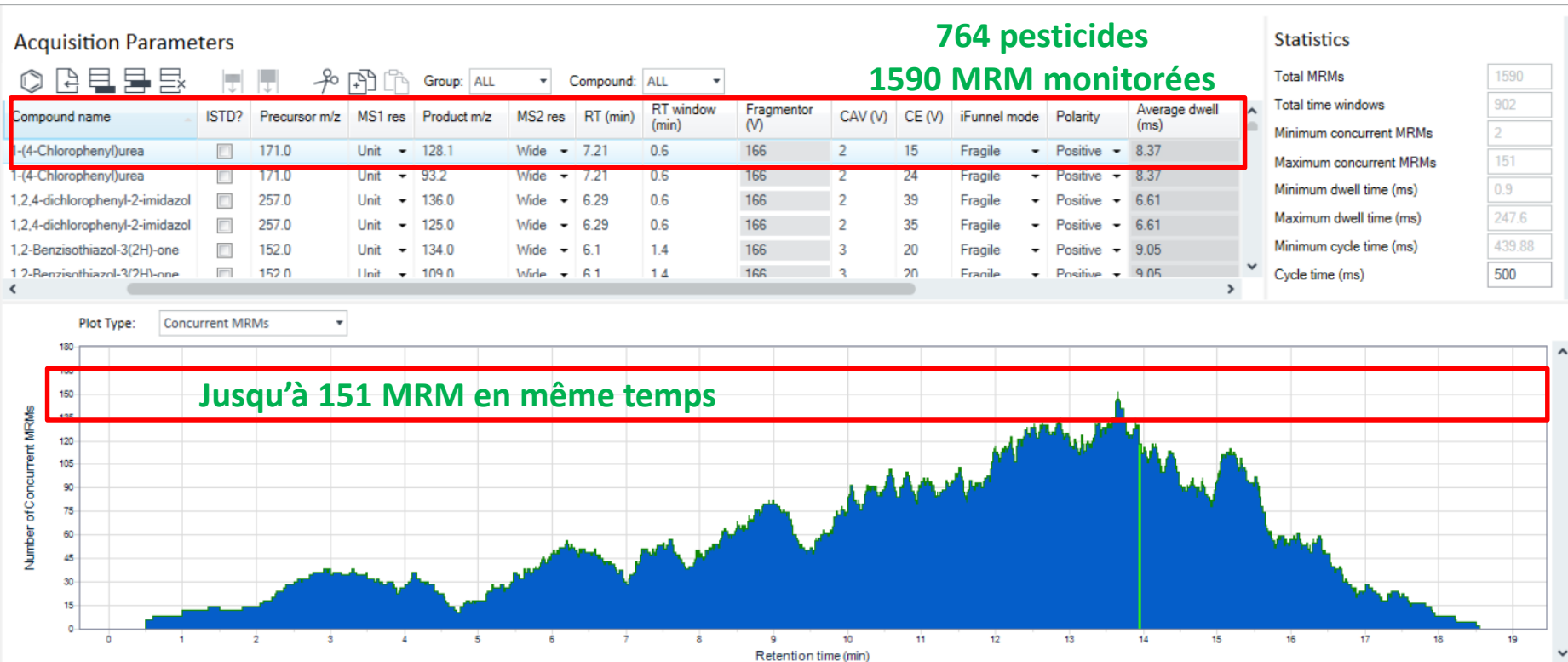
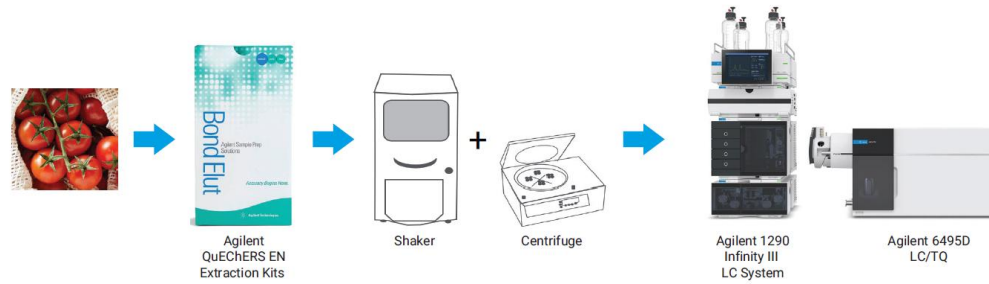


Rapid analysis of fipronil and fipronil sulfone in eggs by liquid chromatography and triple quadrupole mass spectrometry

Thermo AB 72483 (2017)

LC-MS/MS

Analysis of 764 pesticides in tomato using an Agilent 6495D triple quadrupole LC/MS system
Agilent AN : DE-003228 (2025)



1 cycle = 500 ms
Pics 8-12s