

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 590 759**

51 Int. Cl.:

**H01J 49/00** (2006.01)

**H01J 49/42** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.02.2003 PCT/EP2003/01274**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.09.2003 WO03073464**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2003 E 03711878 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2016 EP 1481416**

54 Título: **Procedimiento de espectrometría de masas para el análisis de mezclas de sustancias**

30 Prioridad:

**28.02.2002 DE 10208626**  
**28.02.2002 DE 10208625**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.11.2016**

73 Titular/es:

**METANOMICS GMBH & CO. KGAA (100.0%)**  
**TEGELER WEG 33**  
**10589 BERLIN-CHARLOTTENBURG, DE**

72 Inventor/es:

**WALK, TILMANN, B. y**  
**DOSTLER, MARTIN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 590 759 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de espectrometría de masas para el análisis de mezclas de sustancias

La presente invención se refiere a un procedimiento de espectrometría de masas para el análisis de mezclas de sustancias con un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo.

5 Durante el análisis de mezclas de sustancias complejas de origen biológico y/o químico, el analizador, además de la tarea de la identificación de la estructura de sustancias individuales contenidas en la mezcla, se encuentra una y otra vez con el problema de detectar, y en la medida de lo posible cuantificar, todas las sustancias presentes en la mezcla. Esto debería ocurrir en la medida de lo posible rápidamente y con una alta precisión, esto quiere decir, con una reducida desviación de error. Esto cobra una mayor importancia cuando han de lograrse informaciones sobre un sistema biológico, por ejemplo, sobre un microorganismo cultivado en determinadas condiciones de fermentación o sobre una planta con crecimiento en diferentes condiciones de entorno o sobre un organismo tipo natural como un microorganismo o una planta en comparación con sus mutantes modificados genéticamente. Este tipo de comparaciones son necesarias para posibilitar una asignación de mutaciones de genes desconocidos en el genoma de estos organismos a un determinado fenotipo metabólico.

10 El éxito durante el análisis de estas mezclas de sustancias, por ejemplo, de principios de síntesis química de la química combinatoria o de extractos de microorganismos, plantas o partes de plantas, depende en este caso en gran medida de la rapidez y reproducibilidad de la técnica analítica usada. En un cribado de este tipo han de examinarse una pluralidad de muestras, son necesarios por lo tanto procedimientos de análisis rápidos, sencillos, altamente sensibles y altamente específicos.

20 Un problema principal de esta técnica analítica es la identificación rápida, sencilla, reproducible y cuantificable de las sustancias contenidas en las mezclas. Normalmente se usan para el análisis de los productos procedimientos de separación, como la cromatografía de capa fina (=DC por sus siglas en alemán, *Dünnschichtchromatographie*), la cromatografía líquida de alta eficacia (=HPLC por sus siglas en inglés) o la cromatografía de gases (=GC por sus siglas en inglés). Con la ayuda de estos procedimientos cromatográficos no obstante, no puede identificarse ni cuantificarse de manera rápida ni sencilla una gama amplia de sustancias. También se describen procedimientos como NMR (por sus siglas en inglés, *Nuclear Magnetic Resonance*, resonancia magnética nuclear) o espectrometría de masas para esta tarea. Normalmente es necesaria no obstante, una cierta preparación de las muestras para estos procedimientos de análisis, como preparación mediante por ejemplo, precipitación de sales y/o cromatografía posterior, concentración, desalinización de las muestras, intercambio de tampón o eliminación de detergentes contenidos eventualmente en la muestra. Tras este tratamiento previo pueden usarse las muestras para las técnicas analíticas mencionadas anteriormente y pueden identificarse y cuantificarse sustancias individuales en muestras seleccionadas. Estos procedimientos requieren no obstante mucho tiempo, y solo permiten un número de muestras limitado, de manera que este tipo de procedimientos de análisis no pueden usarse en el llamado cribado de alto rendimiento (HTS por sus siglas en inglés, *High Throughput Screening*) o en el cribado amplio de mezclas de sustancias en muestras biológicas o químicas. Es ventajoso en el caso de procedimientos muy precisos, como la espectrometría NMR o IR (por sus siglas en inglés *Infrared Spectroscopy*, espectroscopia infrarroja), que ofrecen informaciones tanto sobre la estructura como también eventualmente sobre la cantidad de una sustancia.

40 Para posibilitar un número de muestras mayor en el HTS, se usan a menudo procedimientos indirectos, de fácil medida, como reacciones colorimétricas en el rango visible, mediciones de la turbiedad, fluorescencia, mediciones de conductividad, etc. Éstos si bien en principio son muy sensibles, también son propensos a errores. Es desventajoso en este caso sobre todo, que al proceder de esta manera se analizan muchas muestras con falso positivo y dado que se trata de procedimientos de detección indirectos, no existen informaciones sobre la estructura y/o la cantidad de un compuesto. Para poder excluir los falsos positivos durante el resto del procedimiento se usan por norma procedimientos de análisis adicionales tras un primer análisis rápido, como por ejemplo, NMR, IR, HPLC/MS (por sus siglas en inglés, *Mass Spectrometry*, espectrometría de masas) o GC/MS. Esto por su parte requiere mucho tiempo.

En general puede decirse que la mejora de la sensibilidad y del valor informativo de los procedimientos de detección conduce a una ralentización en la velocidad de una técnica analítica.

50 En el caso del trabajo con mezclas biológicas complejas, como por ejemplo, extractos de microorganismos, plantas y/o animales, ha de tenerse en cuenta además de ello, que los compuestos individuales en las mezclas solo se presentan en cantidades muy reducidas o solo están a disposición cantidades muy reducidas de la muestra individual misma para la técnica analítica, de manera que el procedimiento usado tiene que tener una sensibilidad muy alta. Además de ello, para algunos procedimientos de análisis, los tampones y/o sales no volátiles presentes habitualmente en muestras biológicas representan un problema, dado que éstos influyen negativamente en la sensibilidad de los procedimientos o incluso en su uso. Lo mismo es válido para la presencia de detergentes en estas muestras.

Para el análisis de mezclas de muestras complejas, se conocen del estado de la técnica procedimientos de espectrometría de masas, que abarcan por ejemplo, el análisis de muestras de la química sintética, de la

petroquímica, de muestras del medio ambiente y de material biológico. Estos procedimientos se usan no obstante solo para el análisis de compuestos conocidos individuales en estas muestras. No se describen series de medición amplias por ejemplo en el marco de un HTS o en la identificación y cuantificación de una pluralidad de compuestos en estas muestras.

- 5 Se usa en este caso el acoplamiento de cromatografía de gases y espectrometría de masas (= GC/MS) para sustancias que son extraíbles de las mezclas de sustancias y ligeramente volátiles. Para el análisis de sustancias o analitos, que no pueden llevarse fácilmente o solo difícilmente a la fase gaseosa, y en cuyo caso ha de eliminarse aquí un gran excedente de disolvente presente, se usa la llamada cromatografía líquida o la cromatografía líquida de alta eficacia-espectrometría de masas (= HPLC/MS). Un resumen de los diferentes procedimientos LC (por sus siglas en inglés, *Liquid Chromatography*, cromatografía líquida)/MS y su equipamiento se desprende de la publicación de Niessen et al. (*Journal of Chromatography A*, 703, 1995: 37 – 57). En las publicaciones estadounidenses US 4,540,884 y US 5,397,894 se describen y reivindican espectrómetros de masas y su estructura.

10 Con la ayuda de los procedimientos mencionados anteriormente pueden determinarse sustancias en un rango de peso molecular de hasta 100 KD (= kiloDalton), esto quiere decir que puede determinarse una amplia gama de sustancias por ejemplo en un rango de masa inferior de hasta aproximadamente 5000 D (= Dalton), como ácidos grasos, aminoácidos, ácidos carbónicos, oligo o polisacáridos, esteroides, etc., y/o en un rango de masa superior de más de 5000 D, como péptidos, proteínas, oligonucleótidos u oligosacáridos o demás polímeros. También pueden analizarse materiales de gran peso molecular, como alquitrán de hulla, ácido húmico, ácido fúlvico o querógenos (Zenobie and Knochenmuss, *Mass Spec. Rev.*, 1998, 17, 337 - 366). Pueden determinarse tanto la identidad como también la estructura de sustancias, no siendo sin embargo siempre inequívoco el análisis de la estructura, de manera que tiene que ser confirmado con otros procedimientos, por ejemplo, NMR.

E. L. Esmans et al. (*J. Chromatogr. A* 794, 109 – 127 (1998) divulga particularmente procedimientos LC-MS para el análisis de nucleobases, nucleósidos, nucleótidos, oligonucleótidos y ADN.

25 G. Hopfgartner y F. Vilbois (*Analisis*, 2001, 28, nº 10, 906 – 914) describe un procedimiento para el cribado con la ayuda de LC/MS de metabolitos resultantes in vitro o in vivo de compuestos estructuralmente conocidos, que se presentan como sustancia activa en diferentes fases del desarrollo de la sustancia activa. Este procedimiento se desarrolla en dos pasos. En el primer paso de búsqueda se detectan iones interesantes en un “modo de escaneo completo” rápido, los cuales se tienen en consideración como candidatos para el resto de las pruebas. En este caso puede tratarse de iones que se corresponden con iones de una intensidad particularmente alta o que se tienen en consideración como candidatos de posibles productos de descomposición o metabolitos de las sustancias activas. Estos iones se usan en un segundo cribado para la identificación de la estructura química de estos iones o compuestos tras una fragmentación en una cámara de colisión del espectrómetro de masas. Para posibilitar un esclarecimiento rápido de la estructura de los iones o metabolitos, la cámara de colisión contiene constantemente gas de colisión. Es desventajoso en la determinación de la estructura, que es necesaria una masa conocida de un ión precursor, de un fragmento o de un aducto iónico. Ventajosamente la estructura de partida de la sustancia a examinar debería ser conocida para la HPLC/MS en estos experimentos. Dado que la HPLC/MS sola no es adecuada para la determinación de la estructura absoluta. Si se conoce sin embargo, la estructura del compuesto de partida, pueden hacerse declaraciones sobre la estructura de eventuales metabolitos. Dado que la estructura de la sustancia, la cual ha de desarrollarse como sustancia activa, se conoce, pueden hacerse declaraciones con algo de seguridad sobre la estructura de los metabolitos desconocidos de la sustancia activa. No obstante, la declaración es dificultada o impedida debido a posibles superposiciones de compuestos de la misma masa diferentes de ensuciamientos existentes. No es posible una cuantificación de los compuestos con este procedimiento.

En el documento US 2001/052569 y en el documento GB 2 363249 se divulgan procedimientos mejorados para el cribado de ión precursor.

45 Además de ello, se describe en el documento US 6,140,638 un procedimiento para la reducción de señales de interferencia isobáricas, en cuanto que se establece mediante la colocación de un campo adecuado en la célula de colisión, un filtro, el cual excluye al menos algunos iones precursores e intermediarios, que conducirían de lo contrario a interferencias isobáricas.

50 Una identificación y cuantificación de una pluralidad o de todos los componentes individuales en una mezcla de sustancias sin sustancias puras a disposición representa aún a día de hoy un problema no solucionado en la espectrometría de masas.

Existía por lo tanto la tarea de desarrollar un procedimiento para el análisis de una pluralidad de compuestos y preferiblemente para su cuantificación.

55 Esta tarea se solucionó mediante un procedimiento de espectrometría de masas para el análisis de mezclas de sustancias con un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, ionizándose las mezclas de sustancias antes del análisis, caracterizado porque el procedimiento comprende los siguientes pasos:

- a) selección de al menos un cociente de masa/carga ( $m/z$ ) de un ión resultante por ionización en un primer cuadrupolo (I) analítico del espectrómetro de masas,

b) fragmentación del (de los) ión (iones) elegido(s) en (a) aplicándose una tensión de aceleración en otro cuadrupolo (III) subsiguiente, el cual está lleno de un gas de colisión y que funciona como cámara de colisión,

c) selección de un cociente de masa/carga de un ión de fragmentación resultante de la fragmentación (b), en otro cuadrupolo (III) subsiguiente y su análisis, realizándose los pasos de procedimiento (a) a (c) al menos una vez y

5 d) análisis de los cocientes masa/carga de todos los iones presentes en la mezcla de sustancias por la ionización, estando lleno el cuadrupolo (III) con gas de colisión, no aplicándose sin embargo durante el análisis ninguna tensión de aceleración,

pudiendo llevarse a cabo los pasos (a) a (c) y el paso (d) también en orden inverso.

10 Con mezclas de sustancias en el sentido de la invención han de entenderse principalmente todas las mezclas, las cuales contienen más de una sustancia, como por ejemplo, mezclas de reacción complejas de síntesis químicas, como productos de síntesis de la química combinatoria o mezclas de sustancias de origen biológico, como caldos de fermentación de una fermentación aerobia o anaerobia, fluidos corporales como sangre, linfa, orina o heces, productos de reacción de una síntesis biotecnológica con una o varias enzimas libres o ligadas, extractos de material animal, como extractos de diferentes órganos o tejidos, o extractos vegetales, como extractos de la totalidad de la planta o de órganos individuales, como raíz, tallo, hoja o semillas o sus mezclas. Ventajosamente se analizan en este procedimiento mezclas de sustancias de origen biológico, como extractos de origen animal o de origen vegetal, ventajosamente de origen vegetal.

15 Los espectrómetros de masas que pueden usarse en el procedimiento se componen por norma de un sistema de entrada de muestras, de un espacio de ionización, de una interfaz, de una óptica de iones, de uno o varios filtros de masa y de un detector.

20 Para la producción de iones en el procedimiento, pueden usarse en principio todas las fuentes de iones conocidas por el experto. Estas fuentes de iones se acoplan dependiendo de las fuentes de iones usadas, a través de una llamada interfaz, a los siguientes componentes del espectrómetro de masas, por ejemplo, a la óptica de iones, al o a los filtros de masa o al detector. La interconexión de una interfaz tiene la ventaja de que el análisis puede llevarse a cabo sin demora. Además de ello, pueden llevarse a la fase gaseosa directamente a través de la fuente de iones sustancias no volátiles y/o volátiles, preferiblemente no volátiles. Debido a ello también pueden llevarse a cabo limpiezas previas de mezclas de sustancias mediante separación cromatográfica ventajosa, que presentan flujos de material de diferente anchura en la técnica analítica, dado que pueden procesarse estos flujos de material a través de la interfaz. Las muestras a analizar o las sustancias contenidas en éstas pueden enriquecerse también debido a ello. Además de ello puede procesarse una amplia gama de disolventes con una pérdida mínima de muestra.

25 Durante la ionización se usan esencialmente tres procesos para la producción de las partículas cargadas (iones):

30 a) evaporación de las mezclas de sustancias e ionización de las moléculas o de la mezcla de sustancias en la fase gaseosa, por ejemplo, como en el caso de la ionización por impacto electrónico (EI por sus siglas en inglés, *Electron Ionization*) en la que las moléculas se evaporan con un flujo de electrones en una cámara de ionización a baja presión ( $< 10^{-2}$  Pa) o como en el caso de la ionización química (CI por sus siglas en inglés, *Chemical Ionisation*) con un gas reactante en la que los iones se producen con una presión aumentada de aproximadamente 100 Pa. Son gases reactantes típicos por ejemplo metano, isobutano, amonio, argón o hidrógeno. Si se lleva a cabo la ionización química con presión atmosférica, entonces se habla de la llamada ionización química a presión atmosférica (APCI por sus siglas en inglés, *Atmospheric-Pressure Chemical Ionization*).

35 b) Desorción de las mezclas de sustancias de una superficie como por ejemplo como en el caso de la desorción por plasma (PD por sus siglas en inglés, *Plasma Desorption*), la espectrometría líquida de masas de iones secundarios (LSIMS por sus siglas en inglés, *Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry*), el bombardeo rápido de átomos (FAB por sus siglas en inglés, *Fast Atom Bombardment*), la desorción láser (LD por sus siglas en inglés, *Laser Desorption*) oder la desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI por sus siglas en inglés, *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation*). En todos estos procedimientos se estimulan las mezclas de sustancias mediante la entrada de partículas ricas en energía (fragmentación radioactiva, fotones UV, IR, iones  $Ar^{+}$  o  $Cs^{+}$ , rayos láser) en una cascada de colisión vibratoria y de esta manera se ionizan.

40 c) Pulverización de las mezclas de sustancias en el campo eléctrico, como en el caso de la ionización por electrospray (ESI por sus siglas en inglés, *Electrospray Ionization*). Durante la pulverización de las mezclas de sustancias en el campo eléctrico se pulverizan las muestras a presión atmosférica.

45 La ionización por electrospray es un procedimiento muy respetuoso. Durante la ESI se conforman iones continuamente. Esta conformación de iones continua tiene la ventaja de que puede acoplarse sin esfuerzo en unión con casi cualquier tipo de analizador y de que puede conectarse sin problemas con una separación cromatográfica, como una separación a través de electroforesis capilar (CE por sus siglas en inglés, *Capillary Electrophoresis*), cromatografía líquida (LC) o cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), dado que tienen una buena tolerancia para caudales altos de hasta 2 ml/min de eluato. En este caso se refuerza la pulverización del eluente

neumáticamente mediante un llamado gas de nebulización, por ejemplo, nitrógeno. Para ello se pulveriza el gas con una presión de hasta 4 bares, preferiblemente de hasta 2 bares desde un capilar, que rodea los capilares de entrada del eluyente. En principio también son posibles presiones mayores. En la separación cromatográfica preconectada se prefieren las llamadas columnas de fase normal (por ejemplo columnas de gel de sílice, de óxido de aluminio, de aminodesoxihexosa, de aminodesoxi-d-glucosa, de tetrilentetramina, de óxido de polietileno o aminodicarboxílicas) y/o de fase inversa, preferiblemente columnas de fase inversa como columnas con una fase estacionaria de C<sub>4</sub>, C<sub>8</sub> o C<sub>18</sub>. En condiciones estándar la técnica de electrospray conduce debido a la ionización particularmente respetuosa al (casi) ión molecular. Habitualmente esto son eductos con iones ya presentes en la solución de muestra (por ejemplo, protones, iones alcalinos y/o de amonio). Es ventajoso además de ello, que también pueden detectarse iones múltiplemente cargados, de manera que pueden detectarse iones con un peso molecular de hasta cien mil Dalton, ventajosamente pueden detectarse en el procedimiento según la invención, pesos moleculares en un rango de 1 a 10000 Dalton, preferiblemente en un rango de 50 a 8000 Dalton, de manera particularmente preferida en un rango de 100 a 4000 Dalton. Como otros procedimientos a modo de ejemplo se mencionan la ionización por pulverización de iones, la ionización a presión atmosférica (APCI) o la ionización por pulverización térmica.

En los procedimientos de ionización mencionados anteriormente el proceso de ionización se desarrolla bajo presión atmosférica y se estructura esencialmente en tres fases: primeramente se pulveriza la solución a analizar en un campo electroestático fuerte, el cual se genera mediante la producción de una diferencia de potencial de 2 – 10 kV, preferiblemente de 2 – 6 kV, entre los capilares de entrada y un electrodo contrario. Un campo eléctrico entre la punta de capilar de entrada y el espectrómetro de masas atraviesa en este caso la solución de analito y separa con ello los iones en un campo eléctrico. Los iones positivos se atraen en este caso en el llamado modo positivo, hacia la superficie del líquido, los iones negativos en la dirección contraria o a la inversa en mediciones en el llamado modo positivo. Los iones positivos acumulados en la superficie se continúan atrayendo en lo sucesivo en dirección del cátodo. Al usarse capilares de pulverización (nanopulverización), en los que la solución a examinar no se presiona hacia el exterior de los capilares debido a la aplicación de presión, se conforma un cono de líquido, el llamado cono de Taylor, dado que la tensión de la superficie del líquido actúa en contra del campo eléctrico. Si el campo eléctrico es lo suficientemente fuerte, el cono es estable y emite en su punta un flujo de corriente continuo. En el caso de la pulverización reforzada por presión de la solución a examinar (por ejemplo con HPLC), el cono de Taylor no es tan pronunciado.

En este caso se conforma correspondientemente un aerosol, que consiste en analito y disolvente. En la siguiente fase se produce la desolvatación de las gotas conformadas, lo que conduce a la reducción sucesiva del tamaño de las gotas. La evaporación del disolvente se logra mediante actuación térmica, por ejemplo mediante el suministro de gas inerte caliente. Mediante la evaporación en relación con las fuerzas electroestáticas aumenta constantemente la densidad de carga en la superficie de las gotitas de mezcla de sustancias pulverizadas. En caso de superar finalmente la densidad de carga o sus fuerzas de repulsión de carga la tensión de la superficie de las gotitas (el llamado límite Rayleigh), entonces explotan (explosión Coulomb) estas gotitas en gotitas parciales más pequeñas. Este proceso "evaporación de disolvente/explosión Coulomb" se realiza varias veces hasta que finalmente los iones pasan a la fase gaseosa. Para obtener buenos resultados de medición, el flujo de gas en la interfaz, la temperatura de calentamiento aplicada, el caudal del gas de calentamiento, la presión del gas de nebulización y la tensión capilar tienen que supervisarse y controlarse de manera precisa.

Con los diferentes procedimientos de ionización pueden producirse iones de carga simple o múltiple. Para el procedimiento según la invención se usan ventajosamente como procedimientos de ionización, procedimientos para la pulverización de la mezcla de sustancias en el campo eléctrico, como el procedimiento de pulverización térmica, de electrospray (= ES) o de ionización química a presión atmosférica (=APCI). En la ionización APCI la ionización se produce con un llamado efecto corona. Se prefiere el procedimiento de pulverización térmica o de electrospray, se prefiere particularmente el procedimiento de electrospray. El espacio de ionización está en contacto a través de una interfaz, es decir, a través de una microabertura (100 µm) con el subsiguiente espectrómetro de masas. En el lado de la cámara de ionización hay dispuesta otra placa de interfaz con una abertura mayor. Entre esta placa y el llamado "orificio" se insufla un gas portador calentado (=gas cortina), por ejemplo, nitrógeno. El nitrógeno colisiona en este caso con los iones producidos por ejemplo mediante electrospray, los cuales se generaron en la mezcla de sustancias. Al insuflarse el gas cortina se evita ventajosamente que se aspiren partículas neutras al alto vacío del subsiguiente espectrómetro de masas. Además de ello, se refuerza la desolvatación de los iones mediante el gas cortina.

El procedimiento según la invención puede llevarse a cabo con todos los espectrómetros de masas cuadrupolo, así como espectrómetros de masas de triple cuadrupolo conocidos por el experto. En el documento US 2,939,952 Paul et al. Describe y reivindica un primer aparato de este tipo. Estos aparatos tienen un rango de masas ventajoso de hasta aproximadamente m/z = 4000 y alcanzan valores de resolución de entre 500 y aproximadamente 5000. Tienen una alta transmisión de iones desde la fuente hasta el detector, son fáciles de focalizar y de calibrar y tienen ventajosamente una alta estabilidad de calibrado durante el funcionamiento continuo. Los instrumentos de triple cuadrupolo conforman los instrumentos estándar para los estudios de activación de colisión de baja energía. Estos aparatos consisten habitualmente en un primer cuadrupolo, el cual es adecuado para el análisis del cociente masa/carga (m/z) de los iones contenidos en la mezcla de sustancias en el alto vacío (aproximadamente 10<sup>-5</sup> Torr) tras la ionización, pudiendo medirse la(s) masa(s) de iones individuales, de varios o de todos los iones. A este cuadrupolo analítico (= I o Q1) pueden haber preconectados uno o varios cuadrupolos (= Q0), que normalmente se

usan para la focalización de los iones. En lugar de este o de estos cuadrupolos preconectados también pueden usarse llamados “conos”, lentes o sistemas de lentes para la focalización e introducción de los iones en el primer cuadrupolo analítico. También se realizan y pueden usarse combinaciones de cuadrupolos y conos.

5 Otro cuadrupolo (= II o Q2) que sigue a Q1 sirve como cámara de colisión. En él se fragmentan los iones ventajosamente mediante la aplicación de una tensión de fragmentación. Para la fragmentación se aplican potenciales de ionización en el rango de 5 – 11 electronvoltios (eV), preferiblemente de 8 – 11 electronvoltios (eV). Q2 está además de ello lleno con un gas de colisión, como un gas noble como argón o helio u otro gas como CO<sub>2</sub> o nitrógeno o mezclas de estos gases como argón/helio o argón/nitrógeno, para la fragmentación en el procedimiento según la invención. Debido a motivos de coste, se prefieren argón y/o nitrógeno. En la cámara de colisión el gas de colisión se presenta en el procedimiento según la invención con una presión de  $1 \times 10^{-5}$  a  $1 \times 10^{-1}$  Torr, preferiblemente  $10^{-2}$ . Es particularmente preferido el nitrógeno. También puede producirse una fragmentación individualizada de los iones en la cámara de colisión en presencia de un gas de colisión sin la aplicación de una tensión de fragmentación. Entre el cuadrupolo Q1 y Q2 pueden haber otros cuadrupolos o conos para la conducción de los iones.

15 Al cuadrupolo Q2, el cual sirve como cámara de colisión, se une finalmente otro cuadrupolo (= III o Q3). En este Q3 pueden o bien determinarse los cocientes m/z de fragmentos seleccionados individuales, de varios o de también todos los cocientes m/z presentes en las mezclas de sustancias tras la ionización (denominados en esta solicitud por motivos de simplificación como masa o masas). Entre los cuadrupolos Q2 y Q3 también puede haber otros cuadrupolos o conos para la conducción de los iones.

20 En el procedimiento según la invención, pueden funcionar cuadrupolos individuales para el acumulamiento de iones también como trampa de iones, de las cuales se liberan entonces nuevamente los iones tras un determinado tiempo para el análisis.

Los cuadrupolos usados en los espectrómetros de masas de triple cuadrupolo generan un campo eléctrico tridimensional en el que pueden mantenerse o conducirse los iones generados. Consisten por norma en 4, 6 u 8 barras o varillas con cuya ayuda se genera un campo eléctrico oscilante, estando conectadas eléctricamente barras opuestas. Además de la denominación cuadrupolo, también se usan las denominaciones hexapolo u octapolo. En la presente solicitud estas denominaciones quedan comprendidas cuando se usa el concepto cuadrupolo. Ventajosamente en los cuadrupolos del espectrómetro de masas de triple cuadrupolo para la conducción de los iones solo son necesarias tensiones de aceleración reducidas de unos pocos voltios, preferiblemente de unos 10 V.

30 En el procedimiento según la invención se usan ventajosamente mezclas de sustancias como extractos animales o vegetales, preferiblemente extractos vegetales.

En el procedimiento según la invención, tras la ionización de las mezclas de sustancias se realizan los siguientes pasos de procedimiento

35 I) en los pasos de procedimiento (a) hasta (c) se analiza y se selecciona la masa de al menos un ión presente en la mezcla de sustancias tras la ionización en Q1. Este ión seleccionado se fragmenta a continuación en Q2 en presencia de gas de colisión y una tensión de fragmentación y después de ello se identifica uno de los iones fragmentados resultantes en otro cuadrupolo Q3 analítico y ventajosamente también se cuantifica. En este caso la selección del ión fragmentado a analizar se realiza de tal manera, que este ión tiene ventajosamente una alta intensidad, una masa característica fácilmente identificable y que permite en una forma de realización ventajosa del procedimiento una cuantificación fácil.

40 II) A continuación, se analizan en el paso de procedimiento (d) las masas de todos los iones presentes tras la ionización en la mezcla de sustancias, estando el cuadrupolo Q2 usado como cámara de colisión siempre lleno de gas de colisión, no aplicándose sin embargo en el paso de procedimiento (d) ninguna tensión de fragmentación en Q2. Este análisis puede producirse principalmente tanto con Q1 como también con Q3, es más ventajoso sin embargo, llevar a cabo el análisis con Q3, dado que entre Q1 y el detector que se conecta con el espectrómetro de masas, se encuentra el cuadrupolo Q2 usado como cámara de colisión. En caso de producirse en Q2 una fragmentación a pesar de la falta de aplicación de tensión de fragmentación, esto no tiene ninguna influencia en una posible detección de las masas de iones en el detector. En el caso de un análisis de masas con Q1, una fragmentación de este tipo en Q2 conduciría no obstante a errores en la detección. Por lo tanto se prefiere una detección de masas con Q3, dado que se eliminan o pueden despreciarse posibles fuentes de error.

Los pasos de proceso (I) o (II) indicados anteriormente también pueden llevarse a cabo en orden inverso. De la figura 1 se desprende el desarrollo del procedimiento según la invención. En el procedimiento según la invención se llevan a cabo los pasos de procedimiento (a) hasta (c) y (d) preferiblemente en, de 0,1 a 10 segundos al menos una vez, preferiblemente entre, de 0,2 a 6 segundos al menos una vez, de manera particularmente preferida entre, de 0,2 a 2 segundos, de manera muy particularmente preferida una vez entre, de 0,3 a por debajo de 2 segundos. Para posibilitar una evaluación de las mediciones estadísticamente ventajosa, los pasos de procedimiento se llevan a cabo entre, de 0,2 a 6 segundos de dos a tres, preferiblemente tres veces. Para posibilitar este tipo de mediciones que se producen rápidamente unas tras otras, el cuadrupolo Q2 que funciona como cámara de colisión está lleno

permanentemente con gas de colisión. Como mostraron las mediciones propias, esto no tiene ningún efecto negativo sobre la reproducibilidad de las mediciones.

5 Durante un análisis pueden analizarse en el procedimiento según la invención entre 1 y 100 cocientes de masa/carga de diferentes iones resultantes y seleccionados en el paso (a). Ventajosamente se identifican y/o cuantifican al menos 20 cocientes m/z, preferiblemente al menos 40 cocientes m/z, de manera particularmente preferida al menos 60 cocientes m/z, de manera muy particularmente preferida al menos 80 cocientes m/z de diferentes iones o más.

10 Con la ayuda del procedimiento según la invención pueden analizarse ventajosamente además del análisis de todas las masas presentes en una masa de sustancias, también sustancias individuales o sus masas y cuantificarse ventajosamente.

15 Una limpieza de las mezclas de sustancias en principio no es necesaria en el procedimiento según la invención. Las mezclas de sustancias pueden medirse directamente tras la introducción en una fuente de iones. Esto también es válido para mezclas de sustancias complejas. Tampoco tienen que añadirse a las mezclas de sustancias como estándares internos ningunas sustancias puras marcadas o no marcadas de sustancias posiblemente contenidas en las mezclas, si bien esto naturalmente es posible y facilita una cuantificación posterior de las sustancias contenidas en las mezclas.

20 Es ventajosa no obstante, una limpieza mediante procedimientos conocidos por el experto, como procedimientos cromatográficos. Debido al procedimiento de ionización preferido en el procedimiento según la invención a través de una pulverización de las mezclas de sustancias en el campo eléctrico, pueden acoplarse una limpieza y/o una limpieza previa de las mezclas de sustancias por ejemplo mediante una cromatografía de manera muy sencilla al análisis de espectrometría de masas. Como procedimientos cromatográficos pueden usarse en este caso todos los procedimientos de separación conocidos por el experto, como LC, HPLC o electroforesis capilar. Pueden usarse los procedimientos de separación que se basan en la cromatografía de adsorción, permeación de gel, de par de iones, de intercambio de iones, de exclusión, de afinidad, de fase normal o de fase inversa, por nombrar solo algunos de los posibles. Ventajosamente se usan cromatografías basadas en fase normal y/o en fase inversa, preferiblemente columnas de fase inversa con diferentes materiales hidrófobos modificados como C<sub>4</sub>, C<sub>8</sub> o C<sub>18</sub>.

25 En el procedimiento según la invención es posible por ejemplo, un acoplamiento de procedimientos de limpieza, preferiblemente de procedimientos de cromatografía con una velocidad de flujo del eluyente (analitos + disolvente) de ventajosamente entre 1 µl/min hasta 2000 µl/min, preferiblemente entre 5 µl/min hasta 600 µl/min, de manera particularmente preferida entre 10 µl/min a 500 µl/min. También pueden usarse velocidades de flujo menores o mayores sin dificultades en el procedimiento según la invención.

30 Como disolvente para el procedimiento de limpieza pueden usarse en principio todos los disolventes próticos o apróticos polares o no polares, los cuales son compatibles con la posterior técnica analítica. Si un disolvente es compatible con la espectrometría de masas puede ser determinado fácilmente por el experto mediante sencillas muestras de prueba. Los disolventes adecuados son por ejemplo disolventes, los cuales no poseen o solo poseen cargas bajas, como disolventes apróticos no polares, los cuales están caracterizados por una constante dieléctrica baja ( $\epsilon_r < 15$ ), momentos dipolares bajos ( $\mu < 2,5D$ ) y valores  $E_T^N$  (0,0 – 0,5). Pero también son adecuados para el procedimiento según la invención disolventes orgánicos dipolares o sus mezclas como disolventes. Como disolventes adecuados se nombran en este caso a modo de ejemplo, metanol, etanol, acetonitrilo, éter, heptano. También son adecuados disolventes ácidos bajos como ácido fórmico, ácido acético o ácido trifluoroacético de 0,01 - 0,1 %. Son adecuados también disolventes de base baja como trietilamina o amoniaco de 0,01 - 0,1 %. También son adecuados principalmente como disolventes, disolventes muy ácidos o muy básicos como HCL de 5 % o trietilamina de 5 %. También son ventajosas mezclas de los disolventes mencionados anteriormente. También son adecuados como disolventes los tampones habituales en la bioquímica, usándose ventajosamente tampones de < 200 mM, preferiblemente de < 100 mM, de manera particularmente preferida de < 50 mM, de manera muy particularmente preferida de < 20 mM. También es ventajoso cuando se usan tampones de < 100 mM para la producción de las mezclas de sustancias, que los tampones se eliminen total o parcialmente por ejemplo mediante una diálisis. Como tampones se nombran a modo de ejemplo tampón de acetato, de formiato, de fosfato, de tris, de MOPS, de HEPES o sus mezclas. Unos tampones y/o concentraciones de sales altos influyen negativamente en los procesos de ionización y eventualmente han de evitarse.

35 En el procedimiento según la invención pueden determinarse moléculas, las cuales están contenidas en las mezclas de sustancias, de 100 Dalton (= D) a 100 kiloDalton (= kD), preferiblemente de 100 D a 20 kD, de manera particularmente preferida de 100 D - 10 kD, de manera muy particularmente preferida de 100 D a 2000 D, esto quiere decir, identificarse y eventualmente también cuantificarse.

55 Ventajosamente las mezclas de sustancias para el procedimiento según la invención, las cuales por lo demás solo pueden determinarse difícilmente o no pueden determinarse, pueden derivatizarse antes del análisis y de esta manera finalmente analizarse. Una derivatización es particularmente ventajosa en casos en los que se introducen en compuestos hidrófobos o volátiles, como por ejemplo, éster, amidas, lactonas, aldehídos, cetonas, alcoholes, etc., grupos hidrófilos, que ventajosamente tienen también una funcionalidad ionizable. Ejemplos de este tipo de

derivatizaciones son transformaciones de aldehídos o cetonas en oxinas, hidrazonas o sus derivados, o alcoholes en ésteres, por ejemplo, con anhídridos simétricos o mixtos. Debido a ello puede ampliarse ventajosamente el espectro de determinación del procedimiento.

5 Ventajosamente se añade para el análisis de las mezclas de sustancias en el procedimiento según la invención, un estándar interno como por ejemplo, péptido, aminoácidos, coenzimas, azúcar, alcoholes, alquenos conjugados, ácidos orgánicos o bases. Este estándar interno posibilita ventajosamente la cuantificación de los compuestos en la mezcla. Las sustancias contenidas en la mezcla de sustancias pueden analizarse de esta manera más fácilmente y finalmente cuantificarse.

10 Como estándar interno se usan ventajosamente sustancias marcadas, pero principalmente también son adecuadas sustancias no marcadas como estándar interno. Este tipo de compuestos químicos parecidos son por ejemplo los llamados compuestos de una sucesión homóloga, cuyos miembros solo se diferencian por ejemplo, por un grupo de metileno adicional. Como estándar interno se usan preferiblemente sustancias marcadas por al menos un isótopo elegido del grupo  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{36}\text{S}$ ,  $^{35}\text{Cl}$ ,  $^{37}\text{Cl}$ ,  $^{29}\text{Si}$ ,  $^{30}\text{Si}$ ,  $^{74}\text{Se}$  o sus mezclas. Preferiblemente se usa como isótopo debido a motivos de costes y debido a motivos de accesibilidad,  $^2\text{H}$  o  $^{13}\text{C}$ . Estos estándares internos no tienen que estar completamente marcados para el análisis, es decir, totalmente marcados. Un marcado parcial es totalmente suficiente. Ventajosamente también se elige en el caso de un estándar interno marcado, una sustancia que tiene una composición química lo más homóloga posible a las sustancias a analizar en la mezcla, esto quiere decir, similitud estructural con la que va a medirse. Cuanto mayor es la similitud estructural, mejores son los resultados de la medición y con mayor exactitud puede producirse la cuantificación del compuesto.

20 Para el procedimiento según la invención y particularmente para la cuantificación de las sustancias presentes en la mezcla, es ventajoso usar el estándar interno en una proporción ventajosa con respecto a la sustancia a medir. Proporciones de analito (=compuesto a determinar) con respecto al estándar interno mayores a 1:15 no conducen a ninguna mejora en el resultado de medición, pero en principio son posibles. Ventajosamente se ajusta una proporción de analito con respecto al estándar interno en un rango de 10:1 a 6:1, preferiblemente en un rango de 6:1 a 4:1, de manera particularmente preferida en un rango de 2:1 a 1:1

30 Las muestras de mezclas de sustancias en el procedimiento según la invención pueden prepararse manual o ventajosamente de manera automática con robots de laboratorio habituales. El análisis con el espectrómetro de masas tras eventual separación cromatográfica también puede llevarse a cabo manual o ventajosamente de manera automática. Mediante la automatización del procedimiento según la invención, la espectrometría de masas puede usarse ventajosamente para el cribado rápido de diferentes mezclas de sustancias, por ejemplo, extractos de plantas en el cribado de alto rendimiento. El procedimiento según la invención se caracteriza en este caso por una alta sensibilidad, una buena cuantificabilidad, una excelente reproducibilidad, con un uso de muestra mínimo. Con el procedimiento pueden encontrarse por lo tanto rápidamente en mezclas de origen biológico, por ejemplo, nuevos mutantes de actividades enzimáticas conocidas o no conocidas tras una mutagénesis, por ejemplo tras una mutagénesis clásica con agentes químicos como NTG, radiación, como radiación UV o radiación de rayos X o tras una llamada mutagénesis de sitio dirigido, mutagénesis PCR, mutagénesis de transposones o el llamado barajado de genes.

40 El procedimiento según la invención posibilita el análisis de una amplia gama de sustancias en un amplio rango de medición, con una buena a muy buena resolución, con una transmisión de iones alta desde la fuente al detector, con una alta velocidad de cribado tanto en el modo de cribado completo de todas las sustancias en las mezclas de sustancias [= FS (por sus siglas en inglés, *Full Scan-Modus*), paso de procedimiento (d)], como también en el modo de monitorización de reacción múltiple [= MRM (por sus siglas en inglés, *Multiple Reaction Monitoring-Modus*), pasos de procedimiento (a) hasta (c)]. El procedimiento tiene además de ello, una sensibilidad de recepción muy alta y una extraordinaria estabilidad de calibración. Además de ello, es muy adecuado para el funcionamiento continuo y con ello para el uso en un cribado HTS.

45 La invención se explica con mayor detalle mediante los siguientes ejemplos:

## Ejemplos

### 1. Ejemplos: mediciones MRM + FS

a) TIC de la medición MRM + FS

50 En la figura 2 se representa el cromatograma iónico total de una medición MRM + cribado completo [MRM - *Multiple Reaction Monitoring*, monitorización de reacción múltiple, FS - *Full Scan*, cribado completo, TIC - *Total Ion Chromatogram*, cromatograma iónico total, XIT = suma de varios cromatogramas iónicos totales]. Se midió una muestra de control de calidad. Este tipo de muestra contiene una cantidad definida de analitos. Estos analitos se consiguieron comercialmente y se disolvieron en concentraciones conocidas en disolvente adecuado.

55 La representación de la medición elegida en la figura 2 muestra la suma de las intensidades (eje y) medidas en el detector en los correspondientes momentos (eje x) de los dos experimentos de espectrometría de masas de la monitorización de reacción múltiple (MRM) y del cribado completo (FS). El cromatograma de la figura 2 representa

por lo tanto la suma de los cromatogramas TIC de los dos experimentos de espectrometría de masas mencionados anteriormente

b) TIC del experimento MRM

En la figura 3 se representa el cromatograma iónico total del experimento MRM de una medición MRM + FS.

- 5 La representación de la medición MRM elegida en la figura 3 muestra la suma de las intensidades (eje y) medidas en el detector en los correspondientes momentos (eje x) de los de los pasos de masa predefinidos del experimento MRM. La representación elegida en la figura 4 muestra los correspondientes resultados de medición de cada paso de masa individual (en este caso 30) en un eje de coordenadas.

c) TIC del experimento FS

- 10 En el TIC de la figura 5 se representa el experimento FS medido de manera alterna con respecto al experimento MRM.

En la figura 6 se representa el TIC del experimento FS. La suma de todos los espectros de masa FS que se recogieron en el intervalo temporal representado de manera sombreada se representan en la figura 7.

d) TIC de un experimento MRM

- 15 En la figura 8 se representa como en la figura 3 un cromatograma iónico total de una medición MRM + cribado completo. Se midió una muestra de calibración.

La representación de la medición elegida en la figura 8 muestra la suma de las intensidades (eje y) medidas en el detector en los correspondientes momentos (eje x) del experimento de espectrometría de masas de la monitorización de reacción múltiple.

- 20 La figura 9 reproduce un cromatograma extraído, en el que se identificó la coenzima Q 10.

La figura 10 y la figura 11 reflejan la identificación de respectivamente capsantina y bixina.

La figura 12 refleja un cromatograma iónico total de un cribado completo de un extracto vegetal.

Las figuras 13 a 15 muestran las masas de diferentes analitos en el cromatograma extraído, cuya asignación a una estructura específica aún tiene que ocurrir.

- 25 En el procedimiento descrito pudieron detectarse selectivamente hasta el momento 200 analitos más.

Figuras:

- Figura 1: representación esquemática del procedimiento de análisis. Después de que en el paso de proceso I se han realizado los pasos de procedimiento (a) hasta (c) se realiza en el paso de proceso II el paso de procedimiento (d), y a la inversa.
- 30 Figura 2: representación de la suma de los cromatogramas iónicos totales (TIC) de una medición de monitorización de reacción múltiple (MRM) (pasos de procedimiento (a) hasta (c) del procedimiento) y de una medición de cribado completo (FS) (paso de procedimiento (d) del procedimiento) de la muestra 2.
- 35 Figura 3: representación del cromatograma iónico total (TIC) en relación con la parte de la monitorización de reacción múltiple (MRM) (pasos de procedimiento (a) hasta (c) del procedimiento) con 30 pasos de masa predefinidos (llamados pares), basándose la medición misma tanto en una medición MRM (pasos de procedimiento (a) hasta (c)) como también en una medición FS (paso de procedimiento (d)) de la muestra 2.
- 40 Figura 4: representación del cromatograma iónico total (TIC) en relación con la parte de la monitorización de reacción múltiple (MRM) (pasos de procedimiento (a) hasta (c) del procedimiento) con 30 pasos de masa predefinidos (llamados pares), basándose la medición misma tanto en una medición MRM (pasos de procedimiento (a) hasta (c)) como también en una medición FS (paso de procedimiento (d)) de la muestra 2, y representándose cada par individualmente.
- 45 Figura 5: representación del cromatograma iónico total (TIC) en relación con la parte de cribado completo (FS) (paso de procedimiento (d) del procedimiento), basándose la medición misma tanto en una medición MRM (pasos de procedimiento (a) hasta (c)) como también en una medición FS (paso de procedimiento (d)) de la muestra 2.
- Figura 6: representación del cromatograma iónico total (TIC) en relación con la parte de cribado completo (FS) (paso de procedimiento (d) del procedimiento), basándose la medición misma tanto en una

medición MRM (pasos de procedimiento (a) hasta (c)) como también en una medición FS (paso de procedimiento (d)) de la muestra 2, como en la figura 5, destacándose de forma sombreada un intervalo temporal.

- 5      Figura 7:      representación del cromatograma iónico total (TIC) en relación con la parte de cribado completo (FS) (paso de procedimiento (d) del procedimiento), la cual se recogió en la figura 6 en el intervalo temporal representado de manera sombreada (1,491 a 2,004), basándose la medición misma tanto en una medición MRM (pasos de procedimiento (a) hasta (c)) como también en una medición FS (paso de procedimiento (d)) de la muestra 2.
- 10      Figura 8:      representación del cromatograma iónico total (TIC) en relación con la parte de la monitorización de reacción múltiple (MRM) (pasos de procedimiento (a) hasta (c) del procedimiento) con 36 pasos de masa predefinidos (llamados pares), basándose la medición misma tanto en una medición MRM (pasos de procedimiento (a) hasta (c)) como también en una medición FS (paso de procedimiento (d)) de una muestra de calibración.
- 15      Figura 9:      representación del cromatograma iónico total extraído para el paso de masa  $m/z$  863.7 tras 197 (coenzima Q10) de una muestra de calibración, en el que la parte MRM comprendió 36 pares.
- Figura 10:    representación del cromatograma iónico total extraído para el paso de masa  $m/z$  585.4 tras 109.1 (capsantina) de una muestra de calibración, en el que la parte MRM comprendió 36 pares.
- Figura 11:    representación del cromatograma iónico total extraído para el paso de masa  $m/z$  395.1 tras 91.1 (bixina) de una muestra de calibración, en el que la parte MRM comprendió 36 pares.
- 20      Figura 12:    representación del cromatograma iónico total (TIC) de un extracto vegetal en relación con la parte FS (paso de procedimiento (d) del procedimiento).
- Figura 13:    representación del cromatograma iónico total extraído para  $m/z = 518.4$  de la muestra 4.
- Figura 14:    representación del cromatograma iónico total extraído para  $m/z = 609.2$  de la muestra 4.
- Figura 15:    representación del cromatograma iónico total extraído para  $m/z = 210.0$  de la muestra 4.

25

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de espectrometría de masas para el análisis de mezclas de sustancias con un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, ionizándose las mezclas de sustancias antes del análisis, **caracterizado porque** el procedimiento comprende los siguientes pasos:
- 5 a) selección de al menos un cociente de masa/carga ( $m/z$ ) de iones resultantes por ionización en un primer cuadrupolo (I) analítico del espectrómetro de masas,  
 b) fragmentación del (de los) ión (iones) elegido(s) en (a) aplicándose una tensión de aceleración en otro cuadrupolo (III) subsiguiente, el cual está lleno de un gas de colisión y que funciona como cámara de colisión,  
 10 c) selección de un cociente de masa/carga de un ión de fragmentación resultante de la fragmentación (b), en otro cuadrupolo (III) subsiguiente y su análisis, realizándose los pasos de procedimiento (a) a (c) al menos una vez y  
 d) análisis de los cocientes masa/carga de todos los iones presentes en la mezcla de sustancias por la ionización, estando lleno el cuadrupolo (III) de gas de colisión, no aplicándose sin embargo durante el análisis, ninguna tensión de aceleración,
- pudiendo realizarse los pasos (a) a (c) y el paso (d) también en orden inverso.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la ionización de la mezcla de sustancias va precedida de una separación cromatográfica.
3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque** en el caso de la separación cromatográfica se trata de una separación por cromatografía de alta eficacia (HPLC).
- 20 4. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** los pasos (a) a (d) se realizan al menos una vez en, en el intervalo de 0,1 a 10 segundos.
5. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** los pasos (a) a (d) se realizan al menos una vez en, en el intervalo de 0,2 a 2 segundos.
6. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** la ionización se produce por evaporación de la mezcla de sustancias e ionización en la fase gaseosa, por desorción de la mezcla de sustancias en una superficie o por pulverización de la mezcla de sustancias en el campo eléctrico.
- 25 7. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** la ionización se produce por pulverización de la mezcla de sustancias en el campo eléctrico.
8. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** en el paso (a) se analizan entre 1 y 100 cocientes de masa/carga de diferentes iones resultantes por ionización y seleccionados.
- 30 9. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado porque** la mezcla de sustancias tiene origen biológico o químico.
10. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado porque** las mezclas de sustancias se derivatizan antes del análisis o antes de la separación cromatográfica según las reivindicaciones 2 o 3.
- 35 11. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado porque** el procedimiento se lleva a cabo manual o automáticamente.
12. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado porque** el procedimiento se usa en un cribado de alto rendimiento.
13. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado porque** se cuantifican
- 40 (i) el ión fragmentado analizado en el paso (c) y los cocientes ( $m/z$ ) analizados en paso (d) de todos los iones presentes en la mezcla de sustancias, o  
 (ii) el ión fragmentado analizado en el paso (c), o  
 (iii) los cocientes ( $m/z$ ) analizados en el paso (d) de todos los iones presentes en la mezcla de sustancias.

Figura 1:

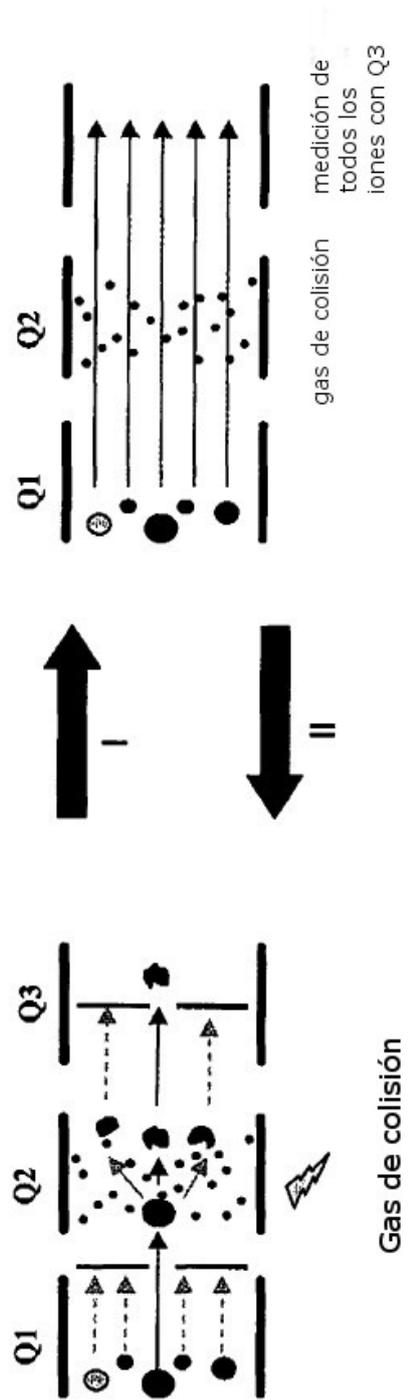
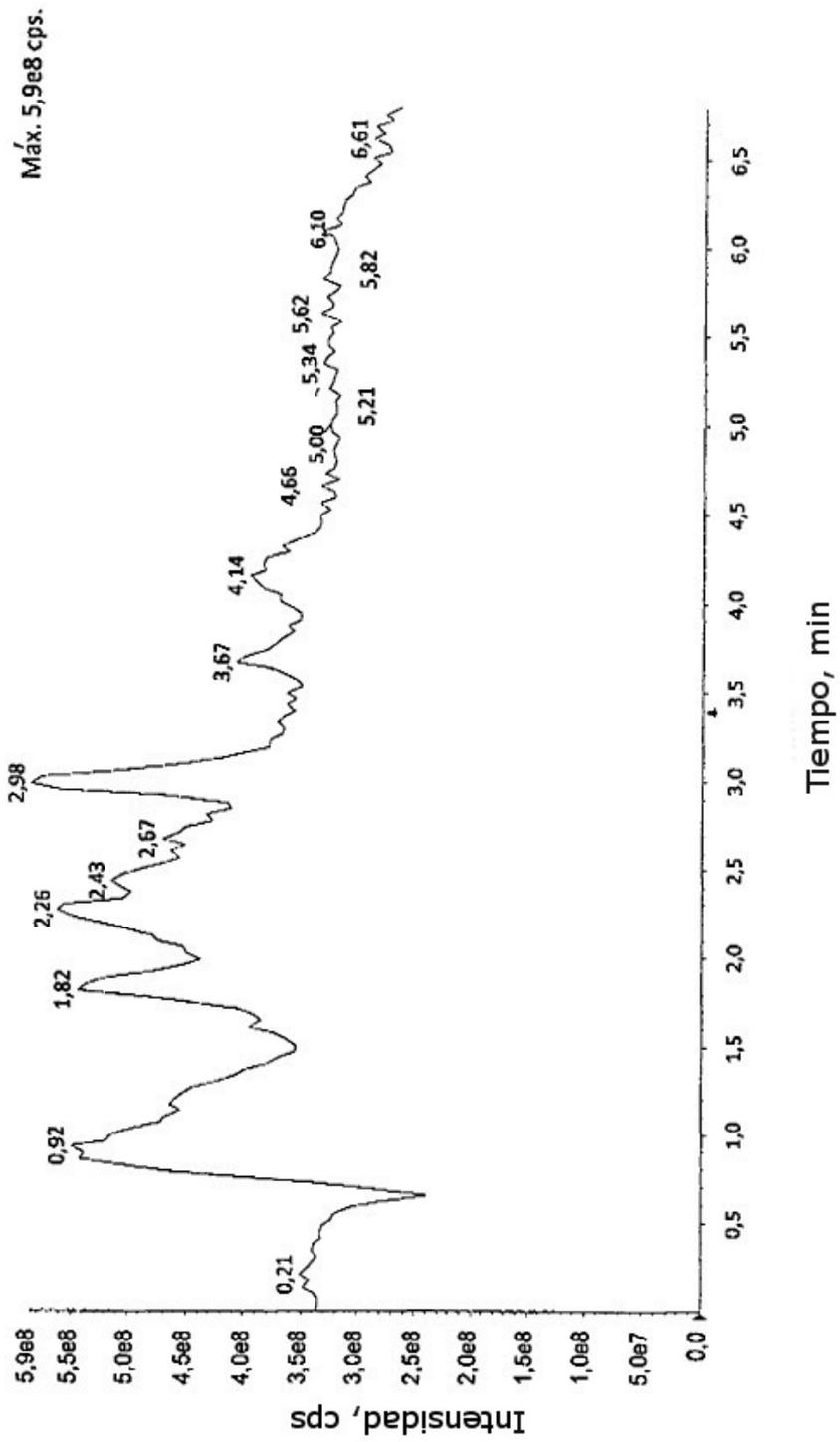
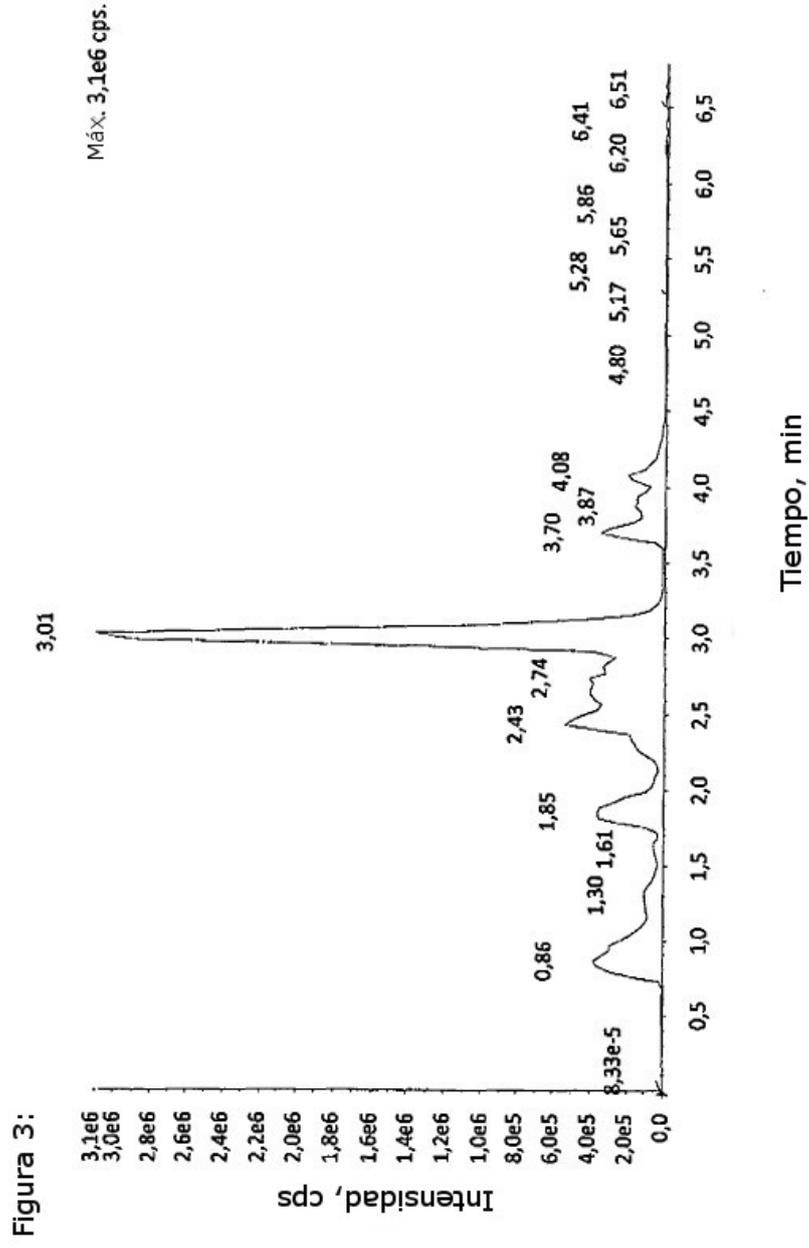
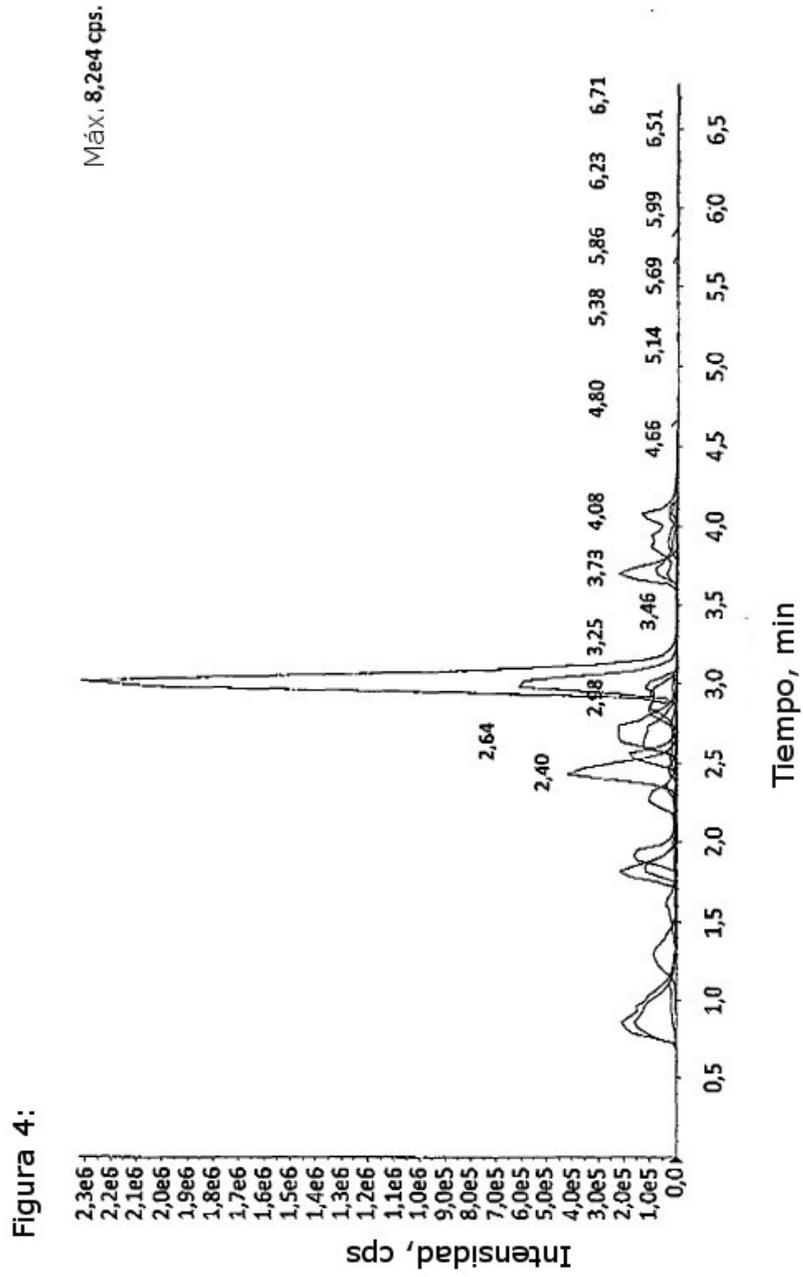
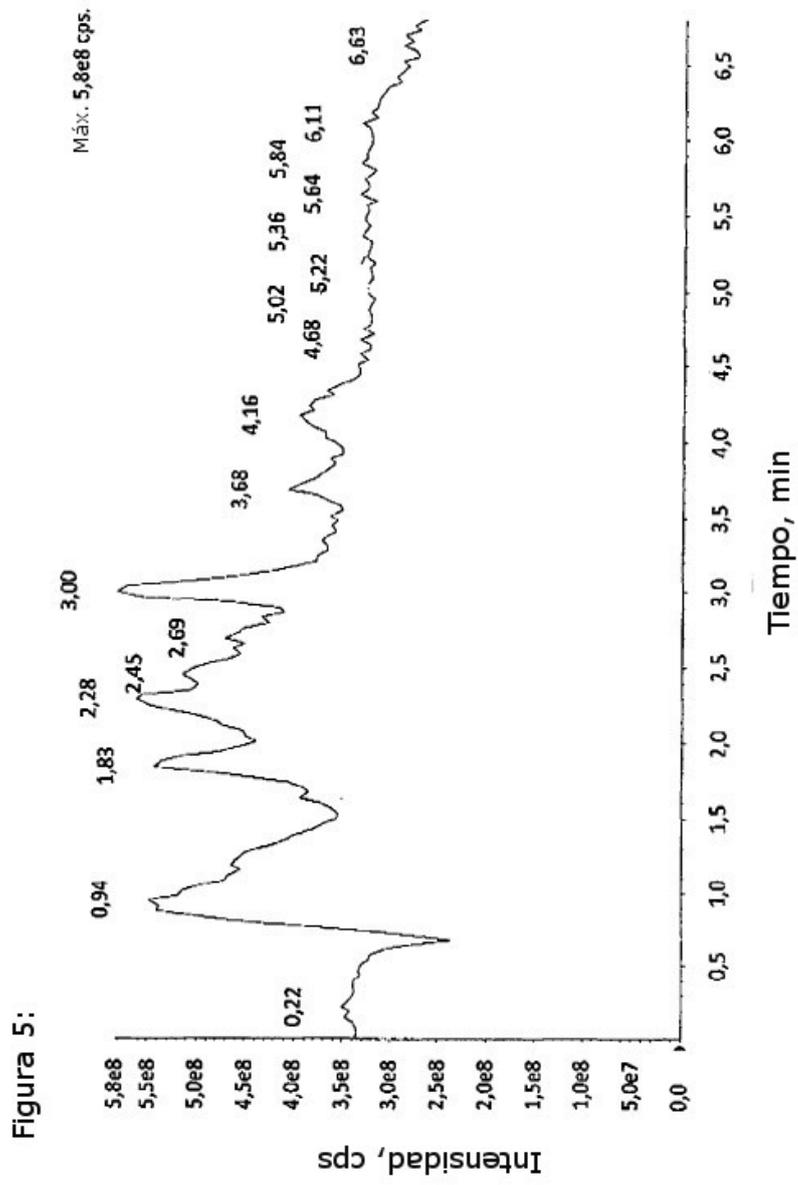


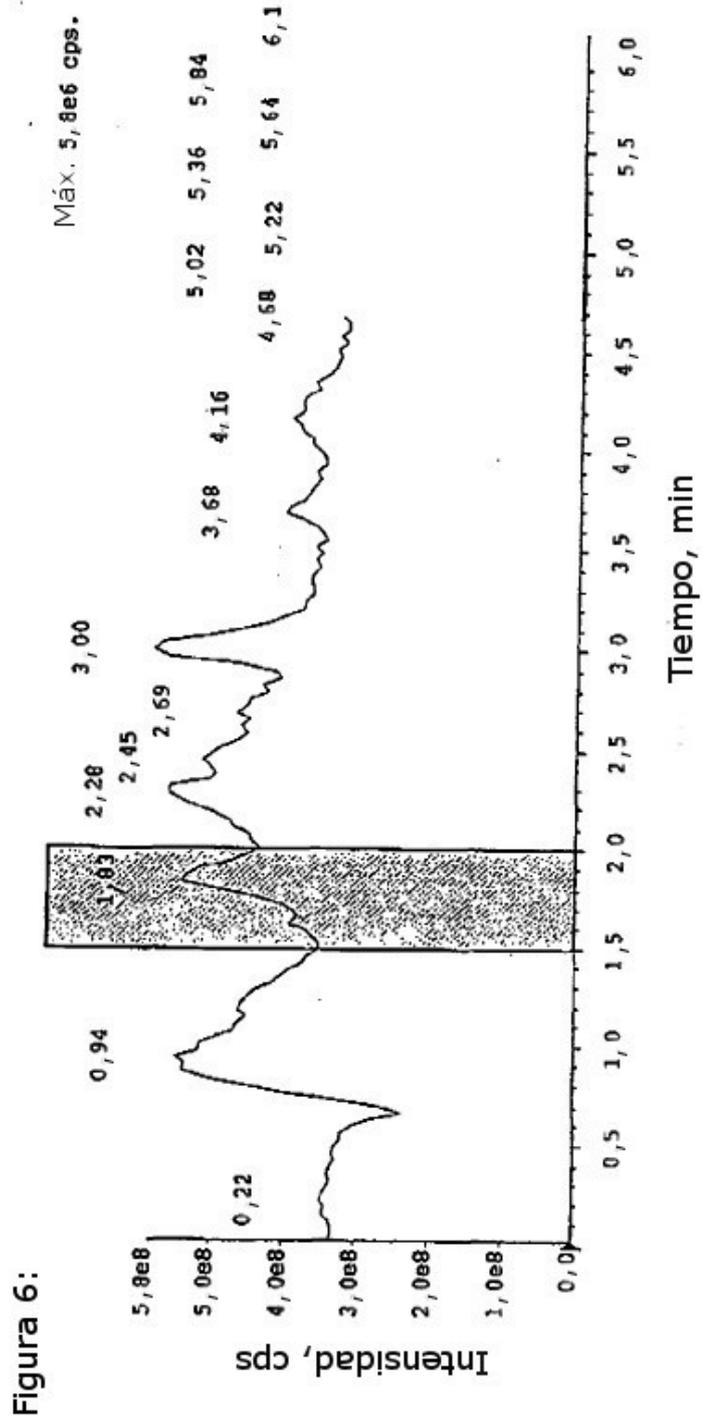
Figura 2:

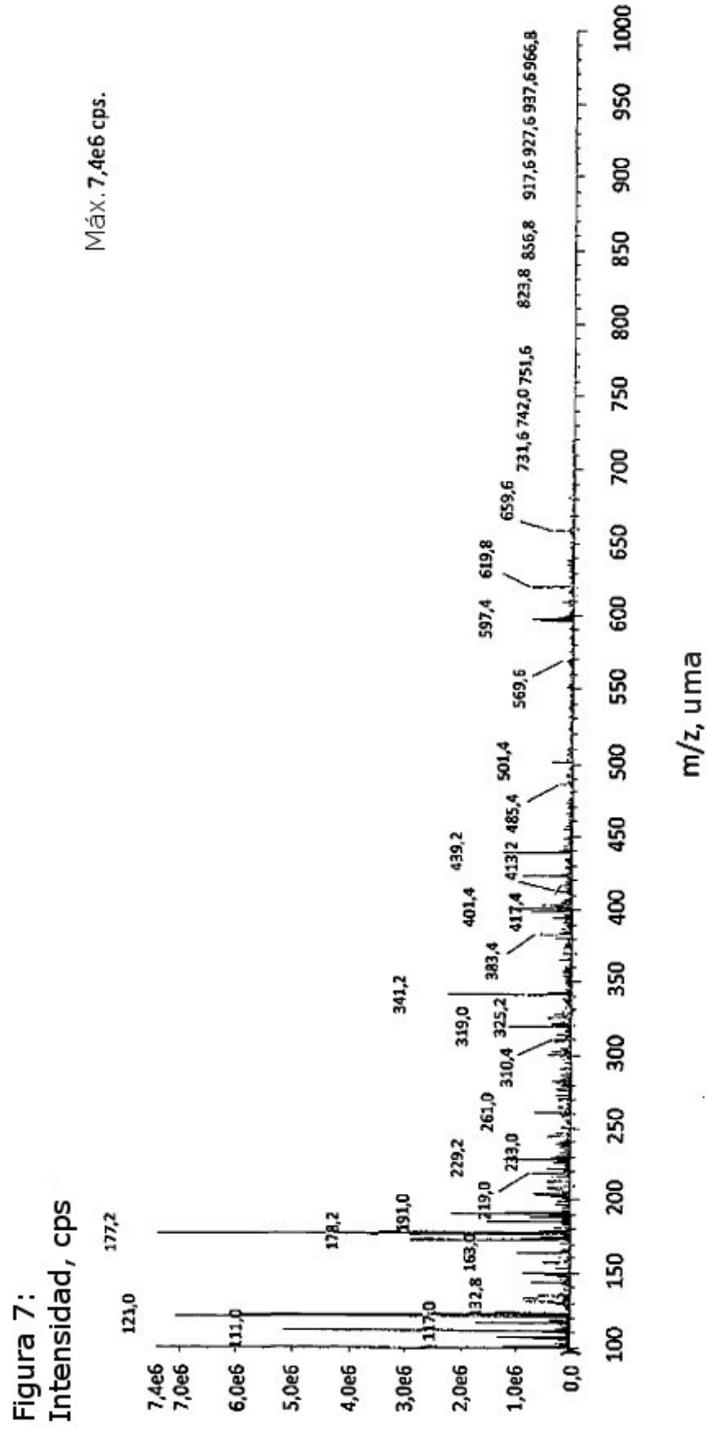












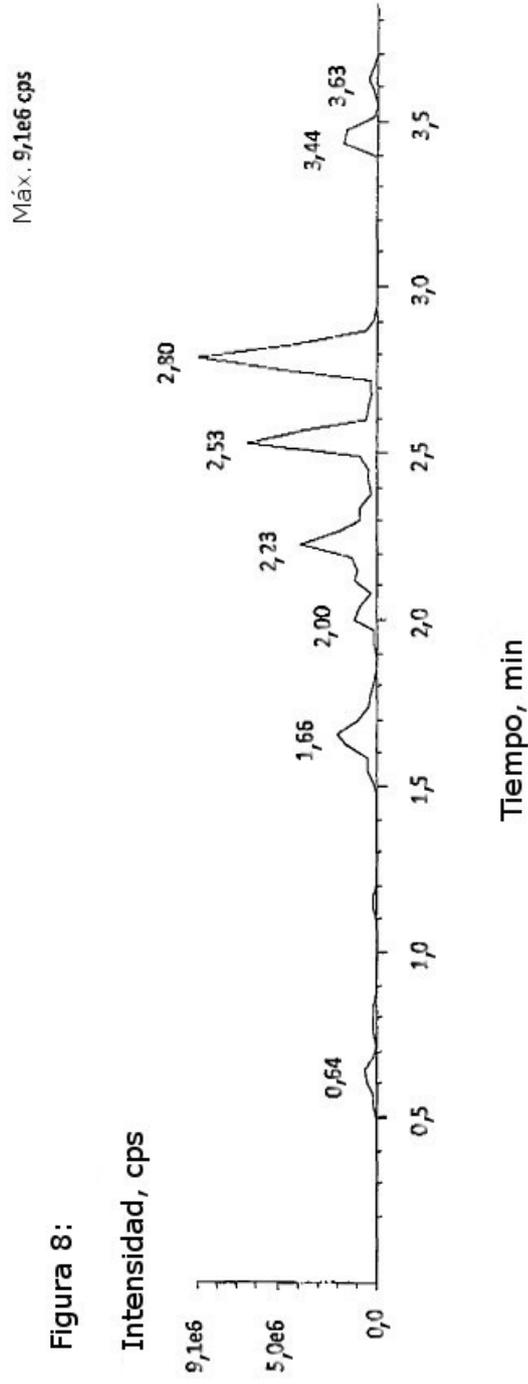


Figura 9:

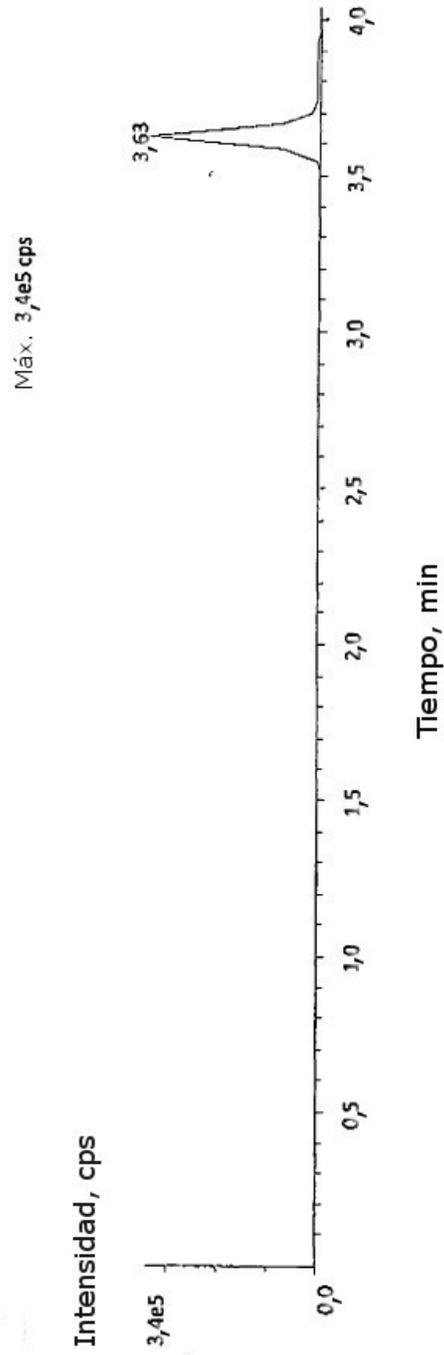
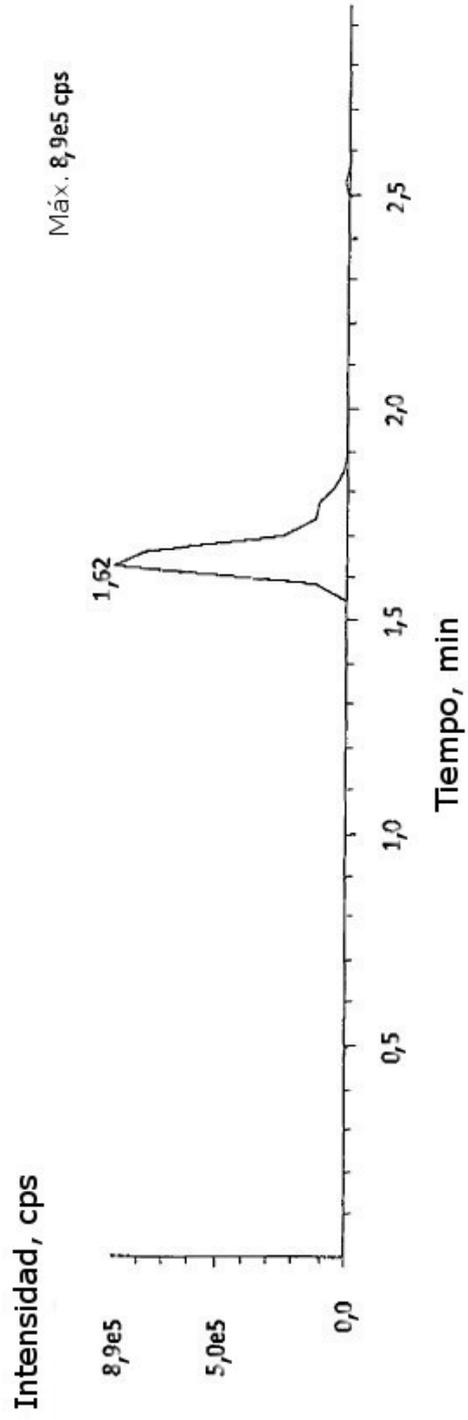


Figura 10:



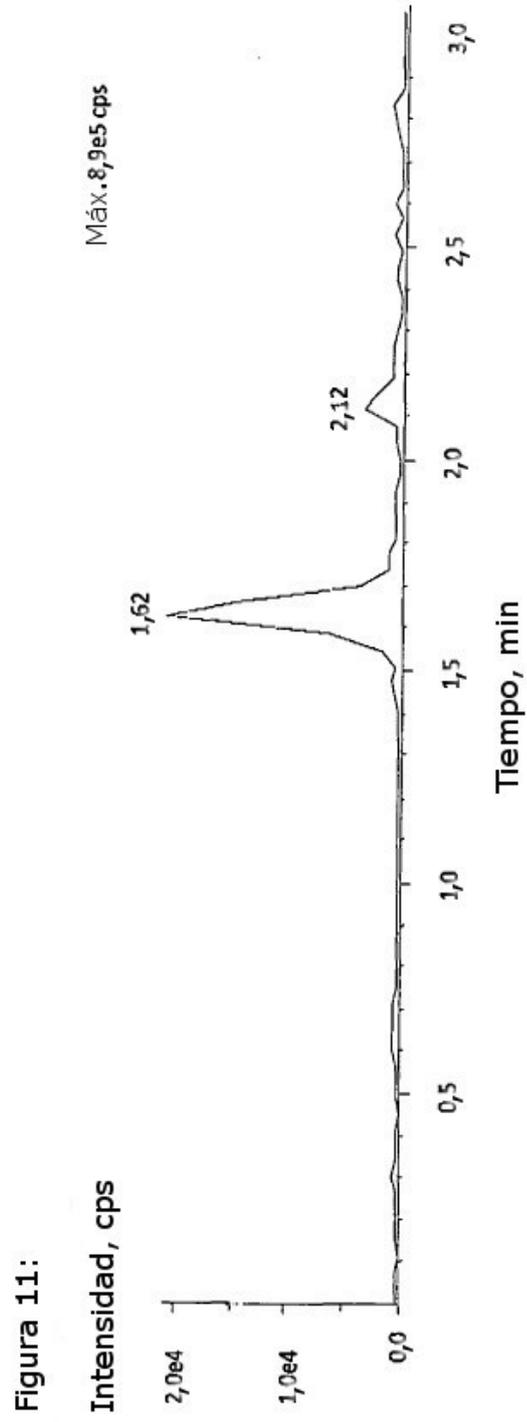


Figura 12:

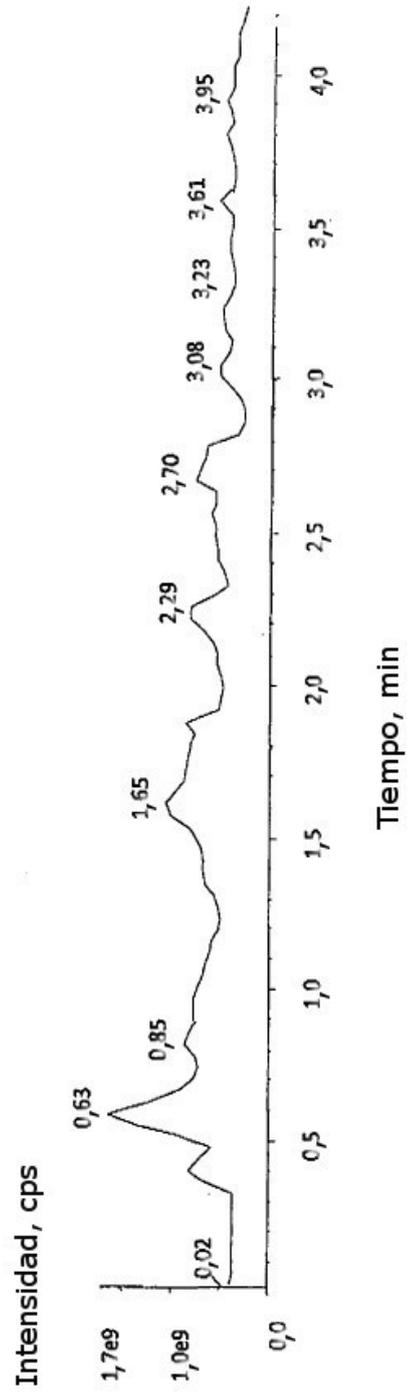


Figura 13:

Intensidad, cps

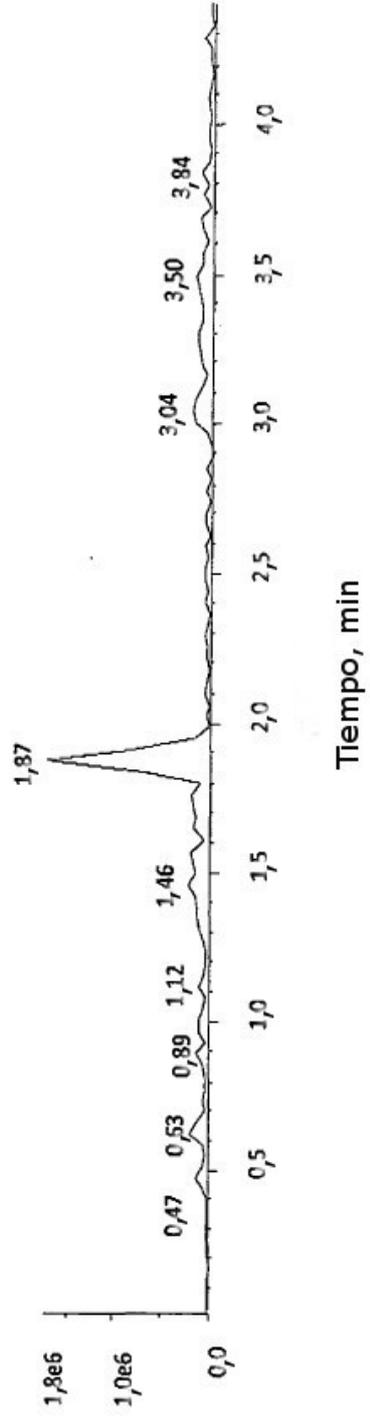


Figura 14:

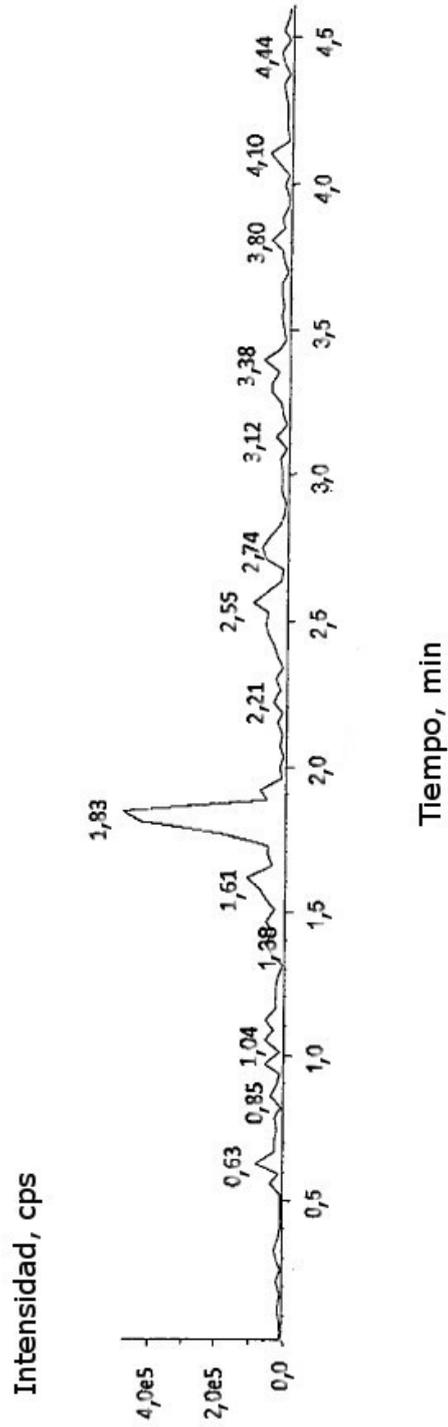


Figura 15:

