

HOGE RESOLUTIE MASSASPECTROMETRIE MET UPLC- QTOF

Erik Olyslager
Lab apotheek
Gelre ziekenhuizen
LCMS gebruikersmiddag
Do-20-11-2014

WAAROM HRMS IN GELRE

- Vraag om dopingcontroles uit te voeren bij kamelenraces.
- Opzetten mobiel doping lab.

Eisen

- In korte tijd veel doping middelen kunnen analyseren in kamelen urine.
- Apparatuur moet in vrachtwagen passen.
- Apparatuur moet inzetbaar zijn voor breed scala aan componenten.
- HRMS in combinatie met LCMS het meest breed inzetbaar voor screening naar onbekenden.

KEUZE TYPE HRMS TOF OF ORBITRAP

- Orbitrap
 - Hogere resoluties dan TOF.
 - Scantijd snel minder bij hoge resolutie.
 - Trap kan overladen worden met als gevolg verminderde massaanauwkeurigheid.
- Time Of Flight (TOF)
 - Snel (nodig in combinatie met UPLC).
 - Robuust door eenvoudige werkingsprincipe.
 - Goedkoper dan Orbitrap.

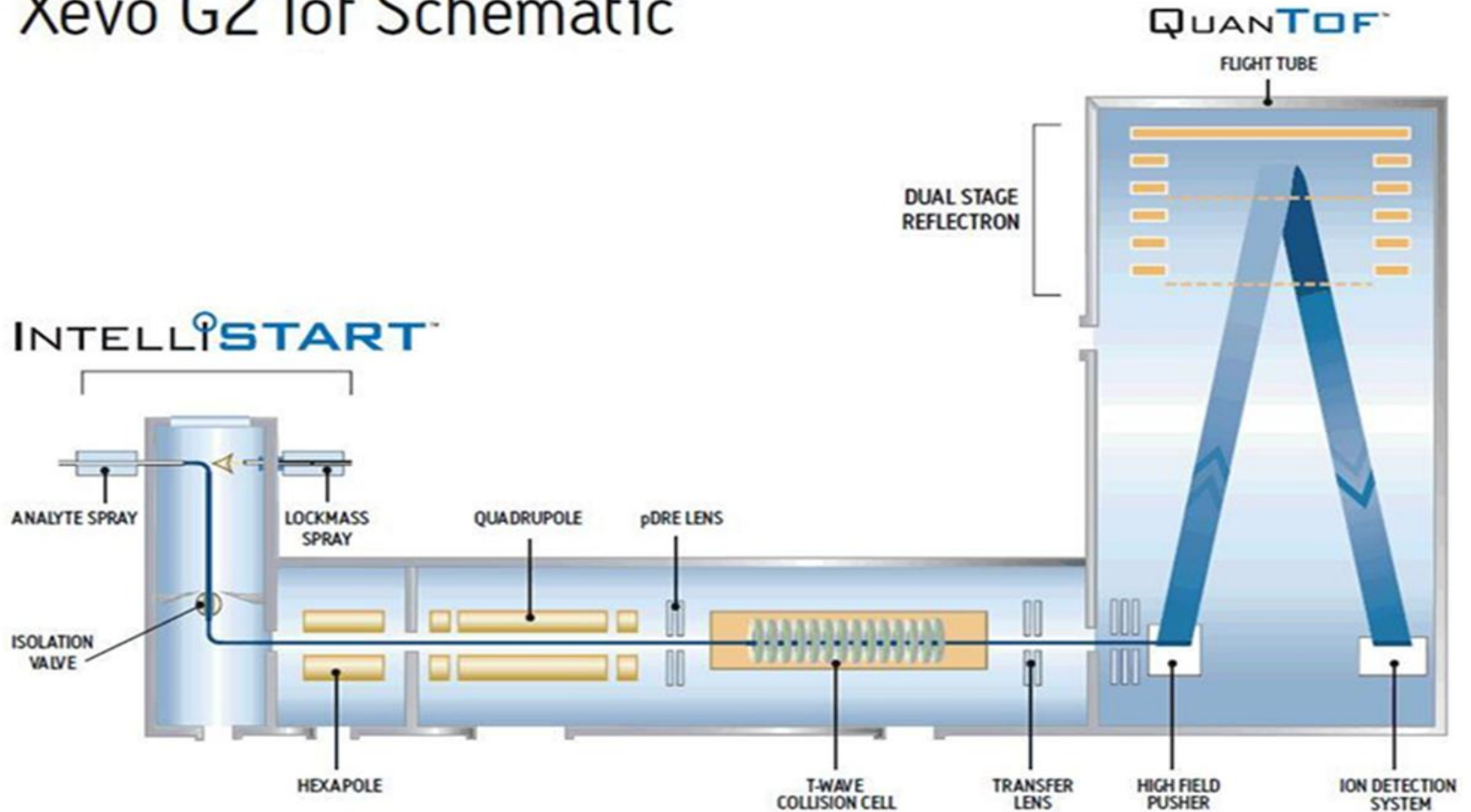
Mass analyzer type ^a	Resolving power [$\times 10^3$]	Mass accuracy (ppm)	m/z range (upper limit) [$\times 10^3$]	Acquisition speed (Hz)	Linear dynamic range	Price
Q	3-5	Low ^b	2-3	2-10	10^5 - 10^6	Lower
IT	4-20	Low	4-6	2-10	10^4 - 10^5	Moderate
TOF	10-60	1-5	10-20	10-50	10^4 - 10^5	Moderate
Orbitrap	100-240	1-3	4	1-5	5×10^3	Higher
ICR	750-2500	0.3-1	4-10	0.5-2	10^4	High

QTOF GELRE



QTOF GELRE

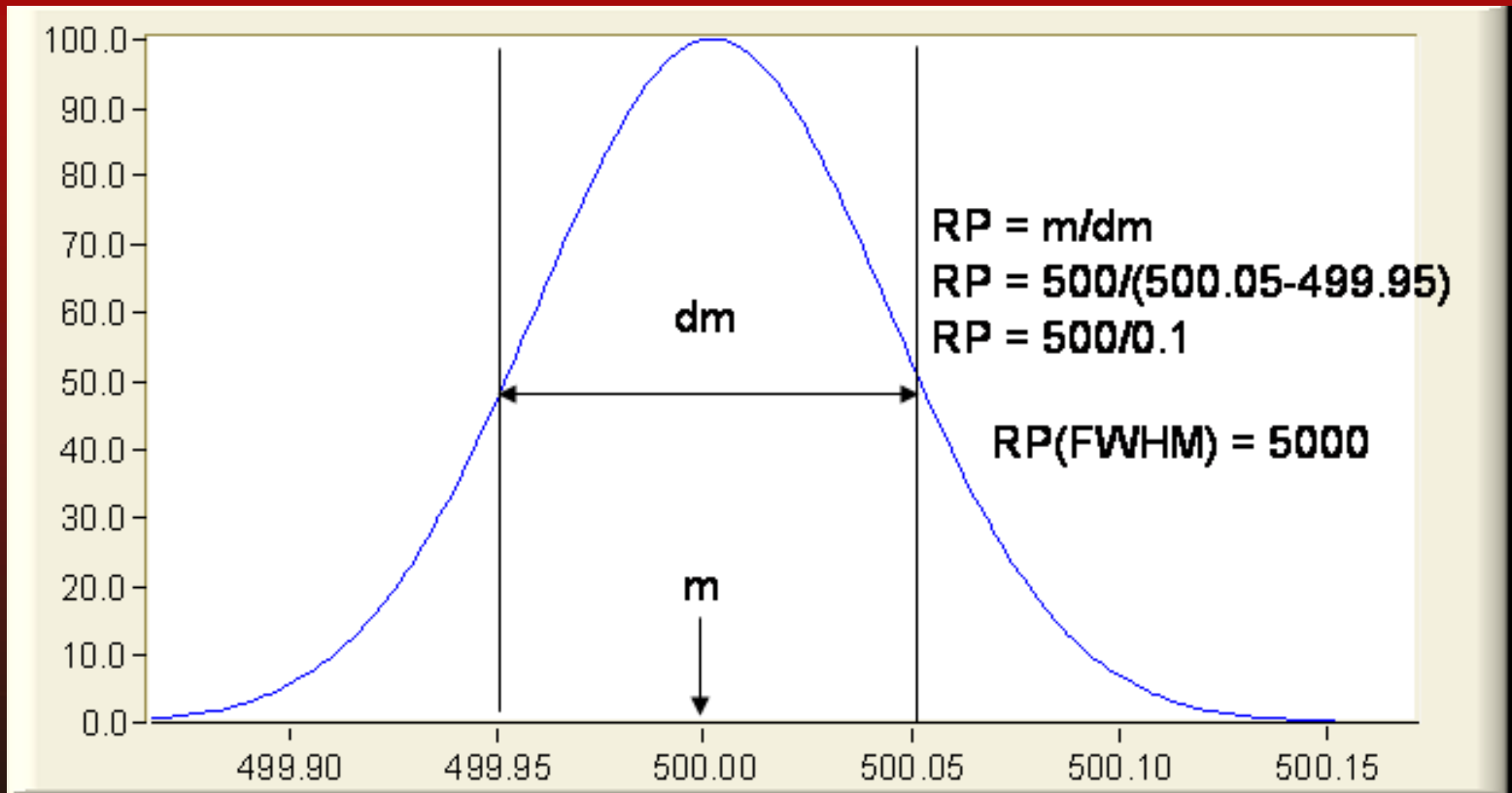
Xevo G2 ToF Schematic



Indien men 2 moleculen dezelfde energie meegeeft zal het zwaardere molecuul langzamer bewegen door een vacuüm tube dan het lichtere molecuul.

QTOF GELRE

- RP = Resolving Power (oplossend vermogen)
- Resolutie >22500 (ca 30000) FWHM (Full Width at Half Max)



VOORDELEN TOF BIJ TOXICOLOGIE

- Accurate massa sluit veel verbindingen uit. Molecuulformule is beter te voorspellen.
- M.b.v. fragmentionen en isotooppatronen is structuuropheldering mogelijk.
- Alle data worden opgeslagen. Handig bij nieuwe inzichten in de toekomst.

BEPERKINGEN TOF

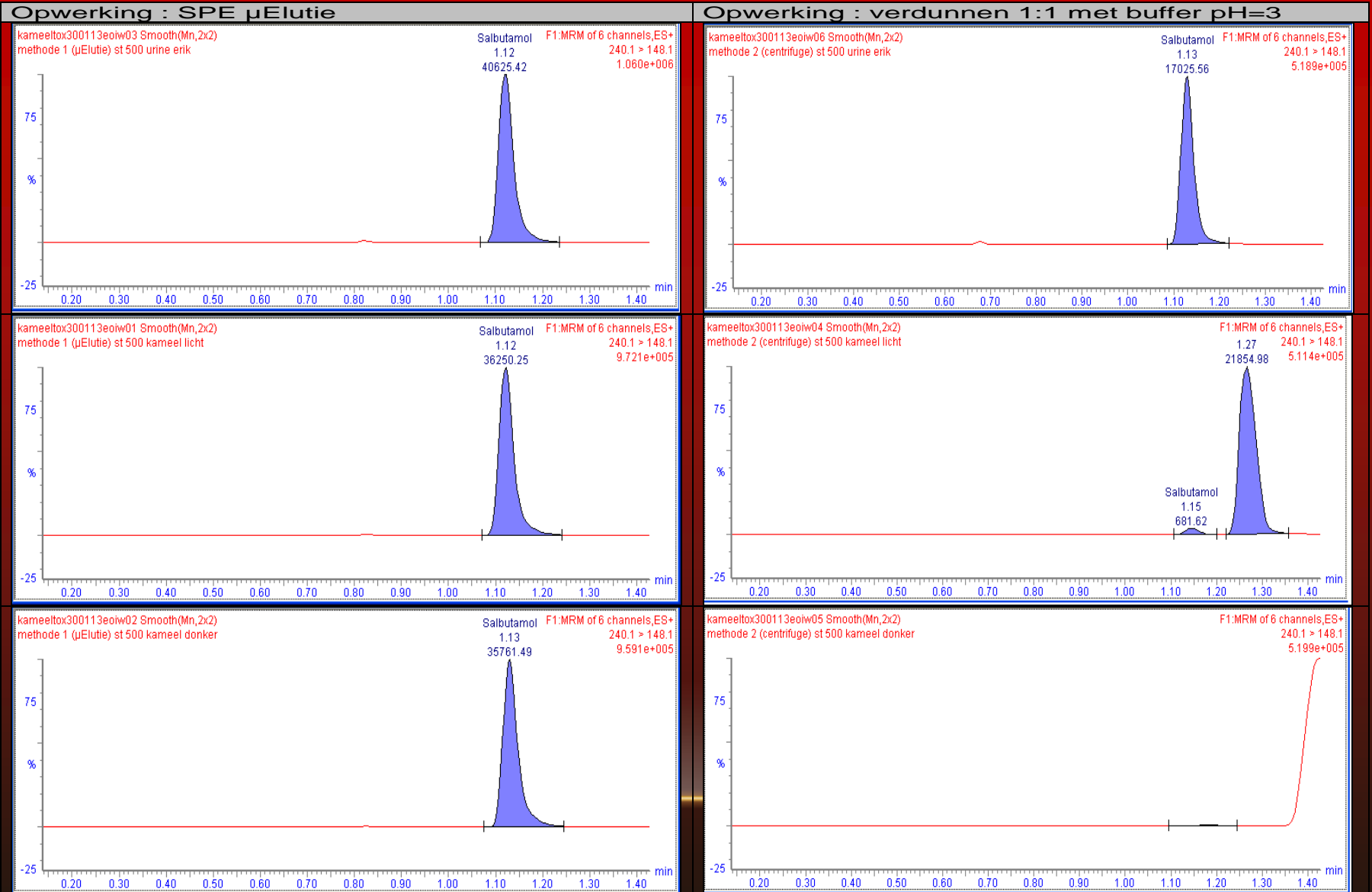
- De door ons gebruikte methode blijft een target analyse.
- Nog steeds veel molecuulformules mogelijk.
- Veel structuren mogelijk met een molecuulformule.
- Retentietijd blijft belangrijk.

TOXICOLOGIE MET QTOF IN HET GELRE ZIEKENHUIS

Opwerking

- 100 μ l serum neerslaan met acetonitril.
- 100 μ l urine met spe μ Elutie vanwege matrixeffecten.
- Injecteer 5 μ l.

MATRIX EFFECTEN VERDUNDE URINE MONSTERS



Toxicologie met QTOF in het Gelre ziekenhuis

- UPLC methode van Waters
- Kolom HSS C18 150 x 2.1 mm (1.8 μ m)
- Eluens A : 5 mM Ammoniumformiaat pH=3
- Eluens B : Acetonitril met 0.1% mierenzuur
- Gradiënt 15 minuten

Tijd (min.)	% A	% B
0.0	87	13
0.5	87	13
10.0	50	50
10.75	5	95
12.25	5	95
12.50	87	13
15.00	87	13

Toxicologie met QTOF in het Gelre ziekenhuis

- Kalibreren TOF blijkt meestal niet noodzakelijk
- Testmengsel injecteren
- Monster injecteren
- Controleer retentietijden en massa van de testmengsel componenten

Stof	Retentietijd	MH+
Acetamiophen	1.5	152.0712
Cafeïne	2.1	195.0882
Sulfadimethoxine	6.1	311.0814
Verapamil	8.4	455.2910

- Dataverwerking monster m.b.v. software

Testmengsel

Testmix

Bib220513eo01

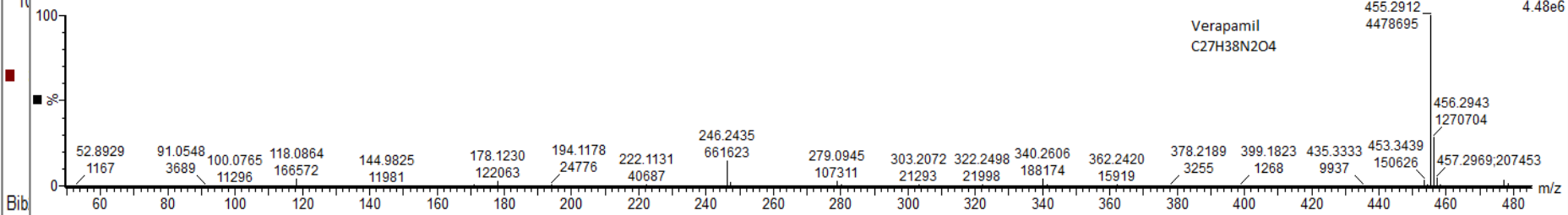
1: TOF MS ES+

10 Testmix

Bib Testmix

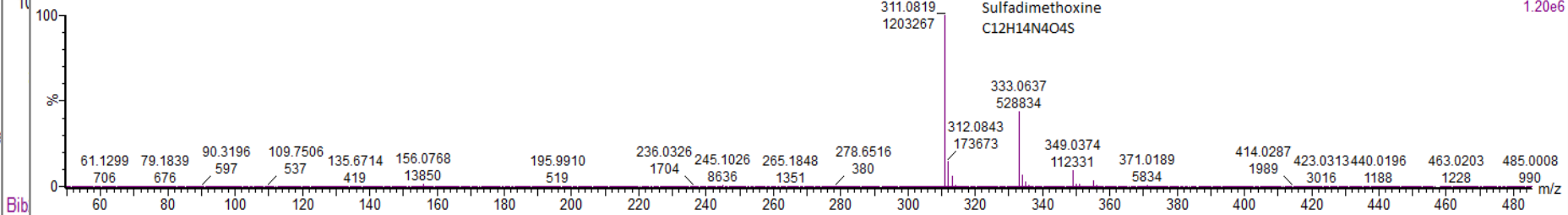
Bib220513eo01 2023 (8.282) Cm (2019:2029-2005:2012)

1: TOF MS ES+
4.48e6



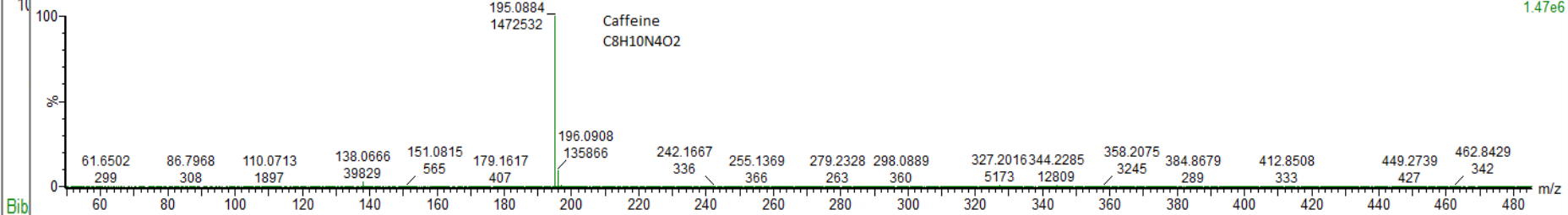
Bib220513eo01 1424 (5.977) Cm (1420:1427-1394:1405)

1: TOF MS ES+
1.20e6



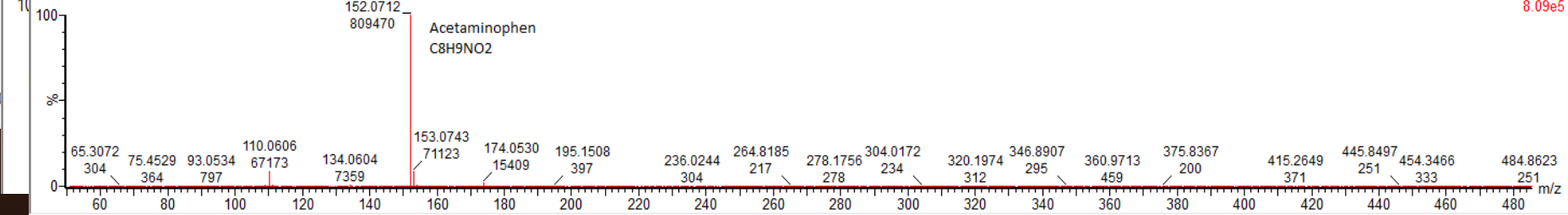
Bib220513eo01 411 (2.079) Cm (408:414-392:401)

1: TOF MS ES+
1.47e6



Bib220513eo01 261 (1.500) Cm (259:263-245:251)

1: TOF MS ES+
8.09e5



Toxicologie met QTOF in het Gelreziekenhuis

- Waters QTOF methode neemt alternerend spectra met Low CE en High CE op
- 1 chromatogram met vooral molecuulion
- 1 chromatogram met vooral fragmenten

Experiment Setup - c:\projects\toxicologie.pro\acqddb\toxicologie.exp

File Edit Options Toolbars Functions Help

MS MSMS PID Product PID Neutral MS^E Continuum MS^E Centroid Fast DDA

Total Run Time: 13.50 10mins

No.	Information	Time
1	Met ID, Time 0.50 to 13.50, Mass 50.00 to 1200.00 ES+	

Function:1 MSe Centroid

Acquisition TOF MS Collision Energy Cone Voltage

Function 1 - Low Energy

Collision Energy

Off

On 6 V

Function 2 - High Energy

Ramp Collision Energy

Off

On 20 to 45 V

Toxicologie met QTOF in het Gelreziekenhuis

Parameters in bibliotheek:

- Naam
- Molecuulformule
- Retentietijd
- 1 of meerdere fragmenten

Identificatie component:

- Molecuulion
- Retentietijd
- Eerste fragment

TOXICOLOGIE MET TOF

- Bibliotheek is een eenvoudig tekst bestand
- 1165 componenten opgenomen in Positive mode

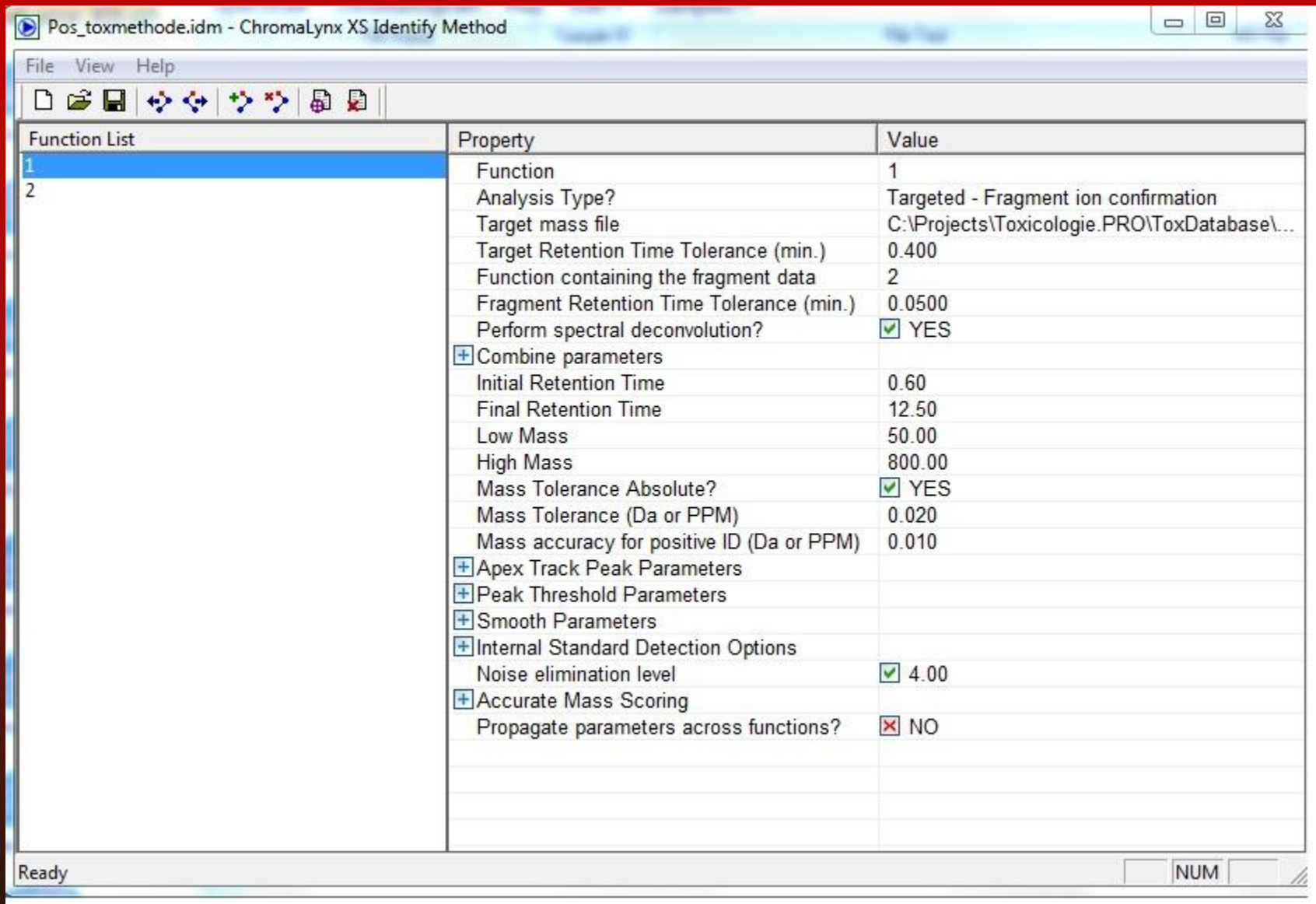
Loprazolam	C23H21ClN6O3	6.27				
Loratidine	C22H23ClN2O2	11.15	f:337.1108	f:267.0815	f:259.1447	f:281.0971
Lorazepam	C15H10Cl2N2O2	8.26	f:275.0143	f:229.0533	f:138.0111	
Lormetazepam	C16H12Cl2N2O2	9.7	f:289.0299	f:243.0689	f:177.0220	f:317.0248
Losartan	C22H23ClN6O	8.9	f:207.0922	f:405.1594	f:377.1533	f:235.0984
Lovastatin	C24H36O5	11.8				
Loxapine	C18H18ClN3O	7.39	f:271.0638	f:297.0795		
Loxapine-7-hydroxy	C19H20ClN3O2	7.46				
Loxapine-8-hydroxy	C18H18ClN3O2	5.21	f:287.0587			
Loxoprofen	C15H18O3	8.4				
LSD	C20H25N3O	4.97	f:223.1235	f:207.0922	f:180.0813	f:197.1079
Maprotiline	C20H23N8.17	8.17	f:250.1596	f:219.1174	f:117.0704	
MAPROTILINE DESMETHYL	C19H21N7.86	7.86	f:219.1174	f:247.1487	f:117.0704	
Mazindol	C16H13ClN2O	5.15	f:242.0373			
MBDB	C12H17NO2	3.32	f:135.0446	f:177.0916		
MDA	C10H13NO2	2.25	f:163.0759	f:135.0446	f:105.0704	f:133.0653
MDAI	C10H11NO2	1.3	f:131.0497	f:161.0603		
MDEA	C12H17NO2	2.95	f:163.0759	f:135.0446	f:105.0704	f:133.0653
MDMA	C11H15NO2	2.51	f:163.0759	f:135.0446	f:105.0704	
MDPPP	C14H17NO3	2.7	f:147.0449			
MDPV	C16H21NO3	4.3	f:126.1283	f:175.0759	f:135.0446	f:205.0865
Mebeverine	C25H35NO5	8.03	f:149.0966	f:121.0653		

Toxicologie met QTOF in het Gelreziekenhuis

- Bibliotheek is een eenvoudig tekst bestand
- 74 componenten opgenomen in Neg mode

Furosemide	C ₁₂ H ₁₁ ClN ₂ O ₅ S	7.00	f:204.9838	f:206.9806
Heptabarbital	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₃	7.42	f:206.1177	
Heptobarbital	C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O ₃	4.42	f:174.0557	
Hexobarbital	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₃	7.47		
Hydrochloorthiazide	C ₇ H ₈ ClN ₃ O ₄ S ₂	2.24	f:268.9461	f:204.9840
Indometacine	C ₁₉ H ₁₆ ClNO ₄	11.43	f:312.0792	f:314.0752
Naproxen	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	9.79	f:185.0964	f:169.0650
Pentobarbital	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₃	7.40	f:182.1175	
Salicylzuur	C ₇ H ₆ O ₃	4.60	f:93.0339	
Secobarbital	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O ₃	8.23	f:194.1177	

Toxicologie met QTOF in het Gelreziekenhuis

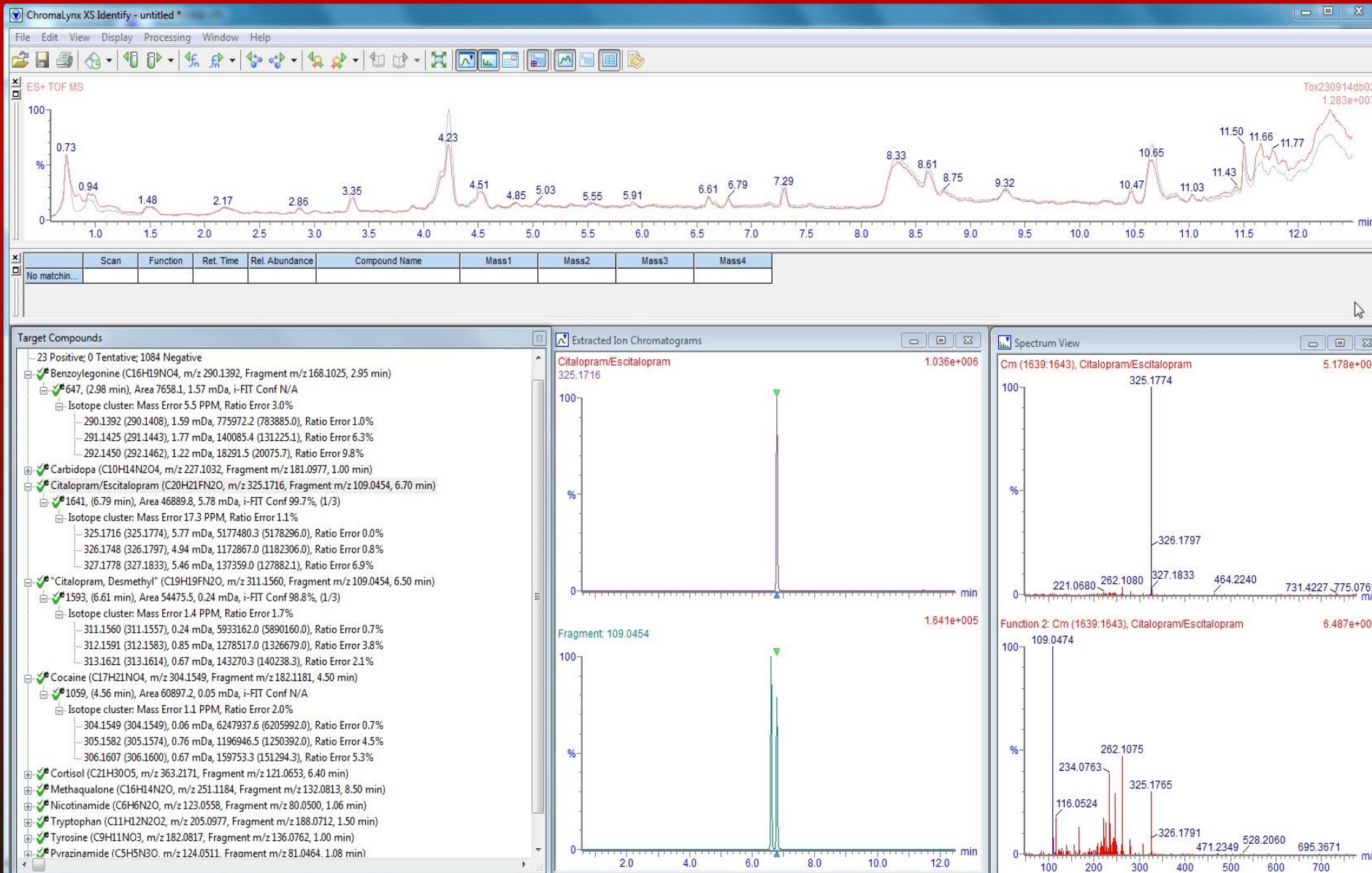


The screenshot displays the 'Pos_toxmethode.idm - ChromaLynx XS Identify Method' window. The interface includes a menu bar (File, View, Help), a toolbar with various icons, and a main table with three columns: 'Function List', 'Property', and 'Value'. The 'Function List' column contains two entries, '1' and '2', with '1' selected. The 'Property' column lists various parameters, and the 'Value' column shows their corresponding values, including numerical values, file paths, and boolean states (checked/unchecked).

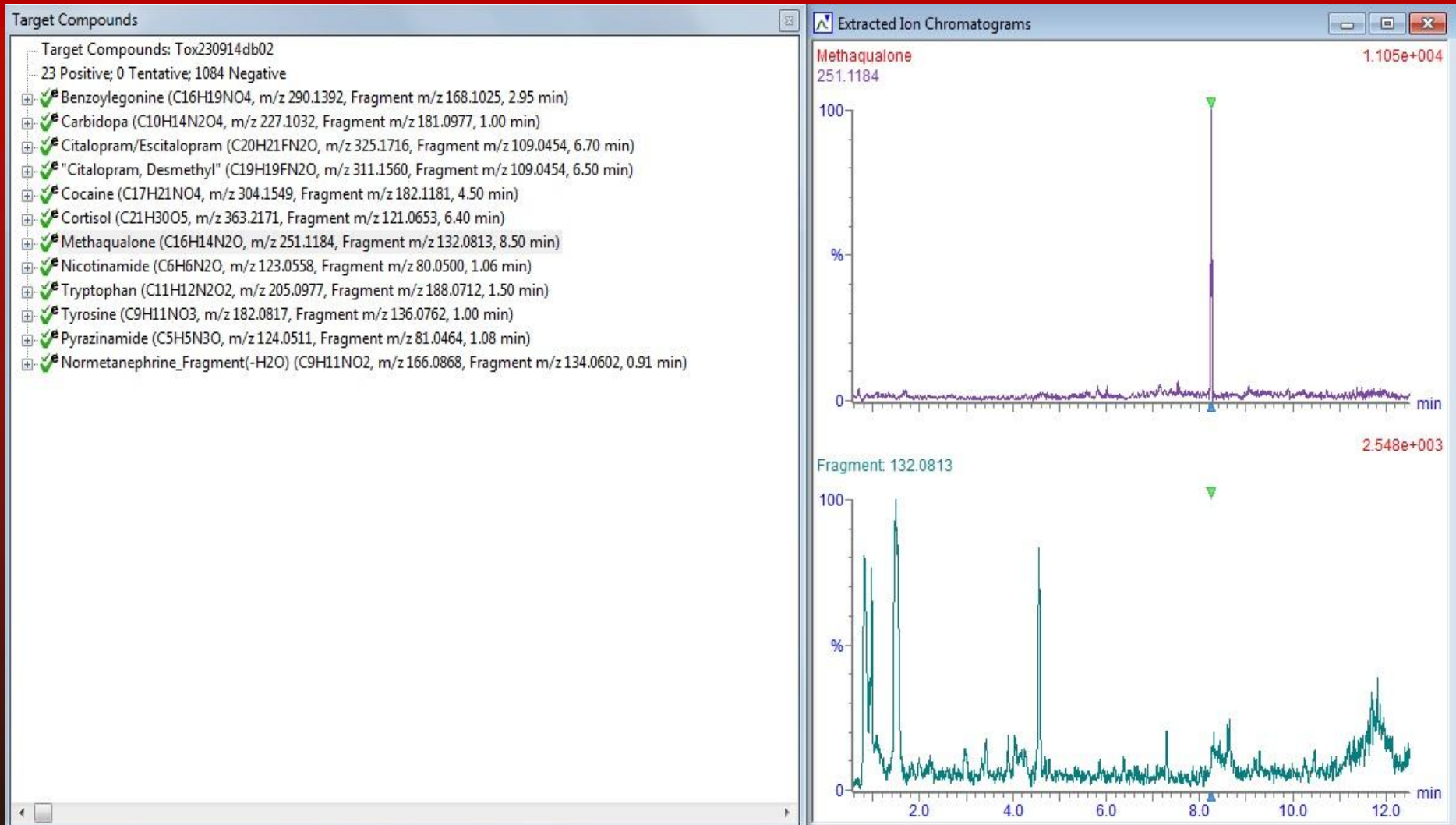
Function List	Property	Value
1	Function	1
2	Analysis Type?	Targeted - Fragment ion confirmation
	Target mass file	C:\Projects\Toxicologie.PRO\ToxDatabase\...
	Target Retention Time Tolerance (min.)	0.400
	Function containing the fragment data	2
	Fragment Retention Time Tolerance (min.)	0.0500
	Perform spectral deconvolution?	<input checked="" type="checkbox"/> YES
	+ Combine parameters	
	Initial Retention Time	0.60
	Final Retention Time	12.50
	Low Mass	50.00
	High Mass	800.00
	Mass Tolerance Absolute?	<input checked="" type="checkbox"/> YES
	Mass Tolerance (Da or PPM)	0.020
	Mass accuracy for positive ID (Da or PPM)	0.010
	+ Apex Track Peak Parameters	
	+ Peak Threshold Parameters	
	+ Smooth Parameters	
	+ Internal Standard Detection Options	
	Noise elimination level	<input checked="" type="checkbox"/> 4.00
	+ Accurate Mass Scoring	
	Propagate parameters across functions?	<input type="checkbox"/> NO

Ready NUM

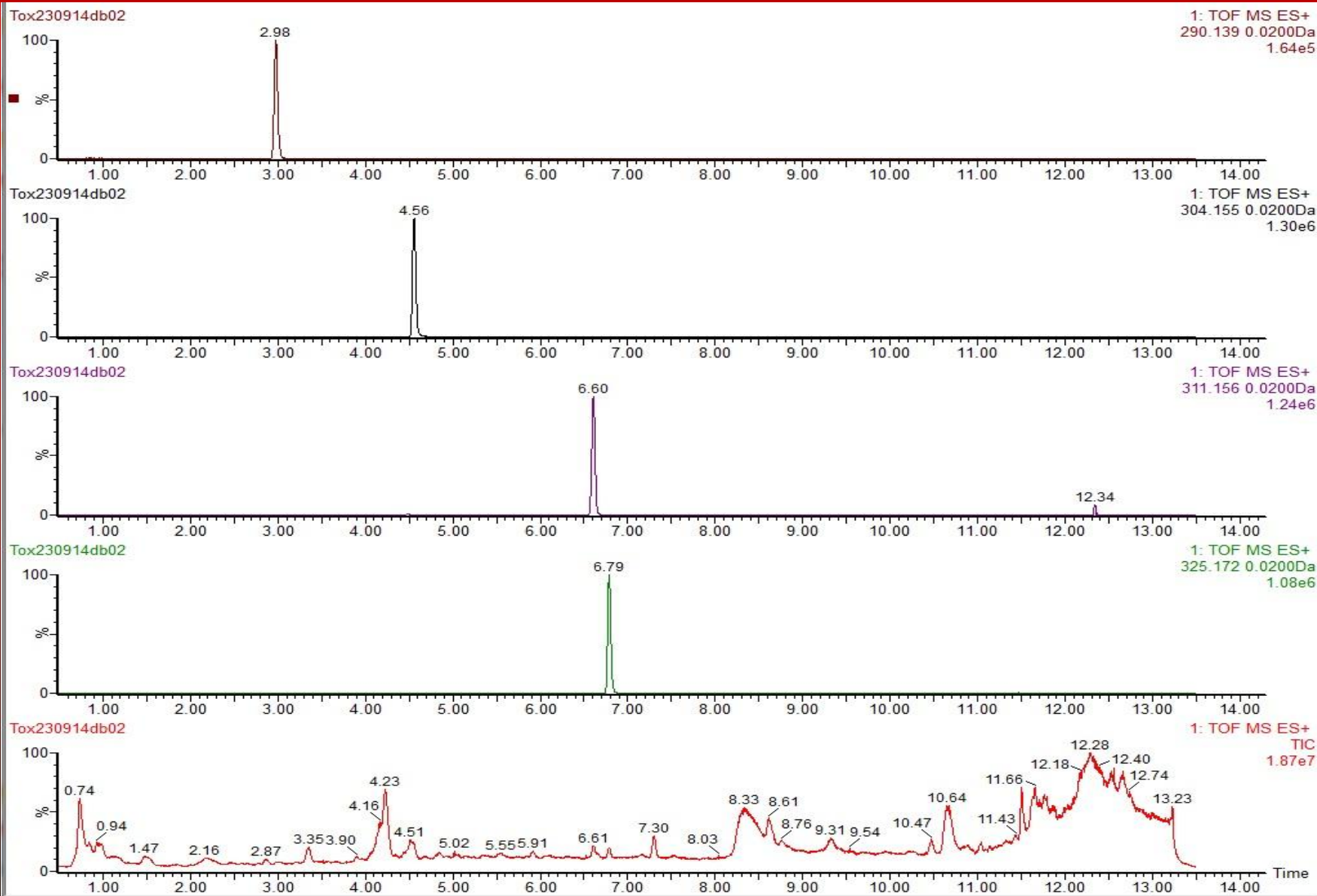
Voorbeeld KKG T tox



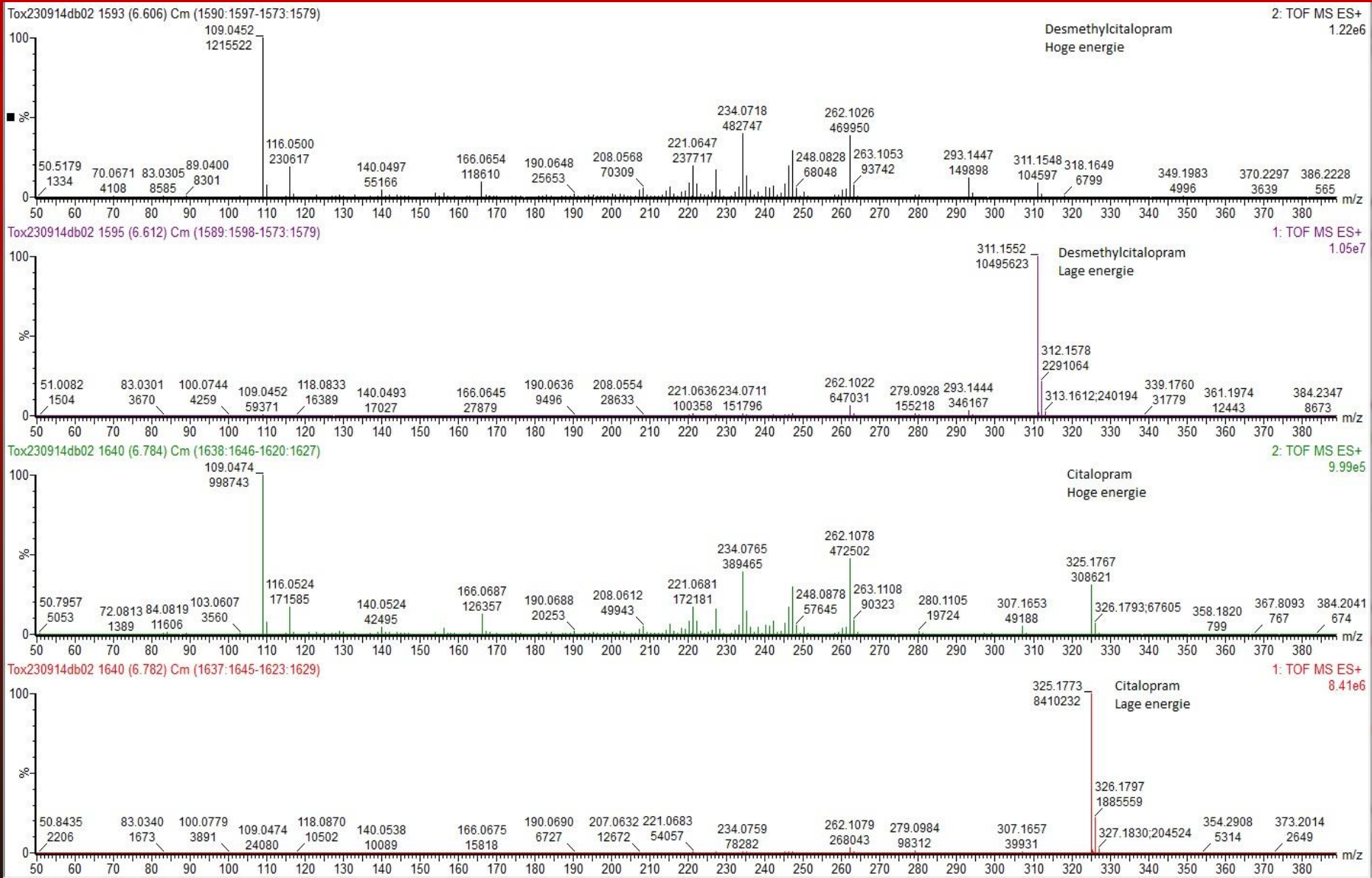
Voorbeeld KKG T tox



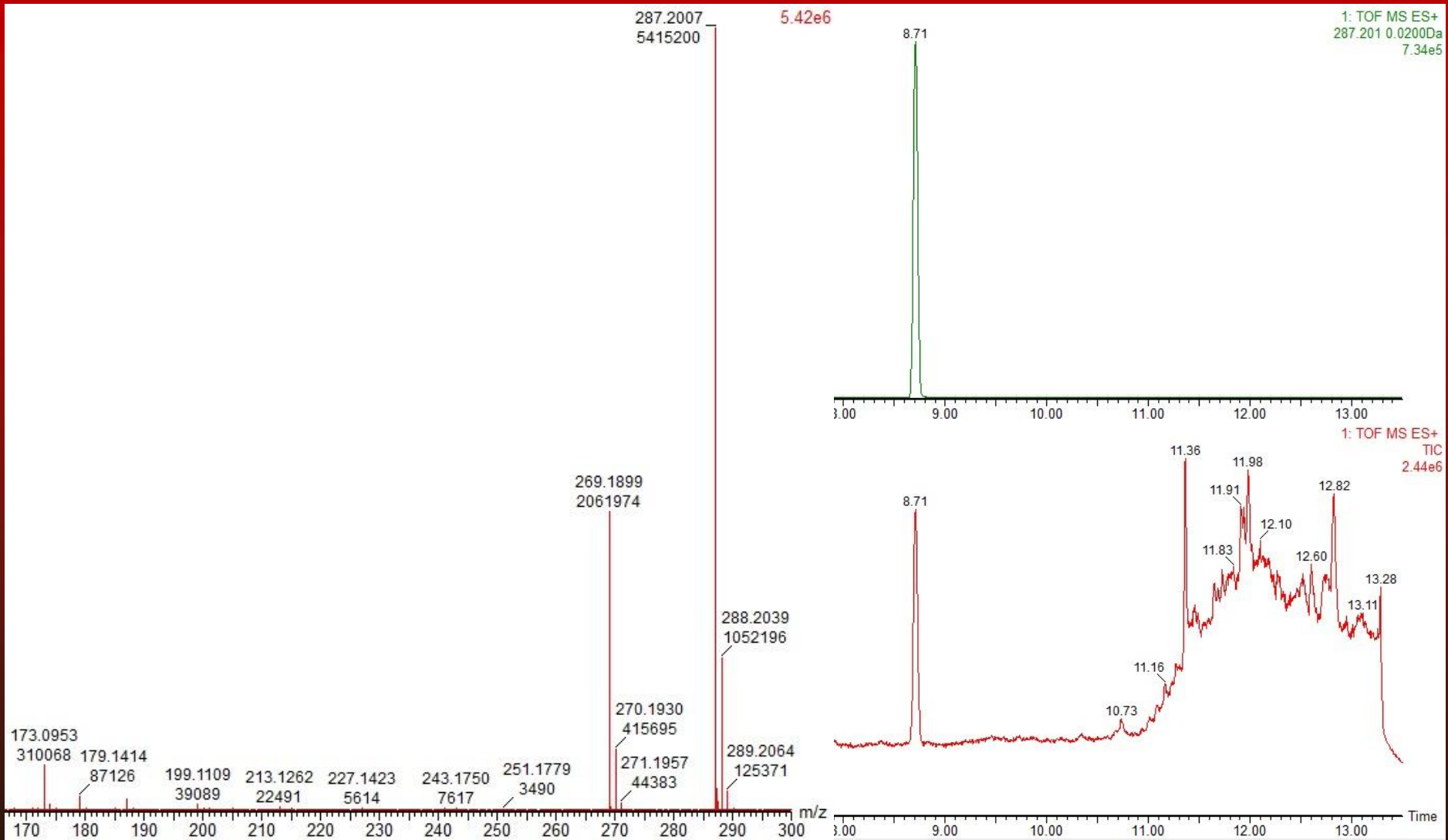
Voorbeeld KKG T tox



Voorbeeld KKG T tox



VOORBEELD ONBEKENDE STOF



VOORBEELD ONBEKENDE STOF

Isotoop n+1 t.o.v. basispiek : 19.43%

Dit duidt op circa 18 C atomen.

No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC
2333:	285.5390	2.10e1	0.00	0.00	2386:	287.8762	2.15e2	0.00	0.00
2334:	285.5844	9.61e1	0.00	0.00	2387:	287.9095	4.19e2	0.01	0.00
2335:	285.6374	4.30e1	0.00	0.00	2388:	287.9496	5.27e2	0.01	0.00
2336:	285.6863	2.14e2	0.00	0.00	2389:	288.0056	3.01e2	0.01	0.00
2337:	285.7278	2.10e1	0.00	0.00	2390:	288.0462	2.00e2	0.00	0.00
2338:	285.7712	6.90e1	0.00	0.00	2391:	288.0869	3.71e2	0.01	0.00
2339:	285.8699	6.50e1	0.00	0.00	2392:	288.1129	4.70e1	0.00	0.00
2340:	285.9364	2.12e2	0.00	0.00	2393:	288.1411	4.12e2	0.01	0.00
2341:	285.9771	9.97e1	0.00	0.00	2394:	288.1685	3.96e1	0.00	0.00
2342:	286.0182	1.75e2	0.00	0.00	2395:	288.2039	1.05e6	19.43	8.49
2343:	286.0522	5.70e1	0.00	0.00	2396:	288.2521	6.56e2	0.01	0.01
2344:	286.1530	2.48e0	0.00	0.00	2397:	288.2918	1.53e2	0.00	0.00
2345:	286.1888	2.00e1	0.00	0.00	2398:	288.3358	9.12e2	0.02	0.01
2346:	286.2144	6.03e2	0.01	0.00	2399:	288.3764	1.33e2	0.00	0.00
2347:	286.2682	1.15e2	0.00	0.00	2400:	288.4142	3.88e2	0.01	0.00
2348:	286.3059	1.10e2	0.00	0.00	2401:	288.4587	4.09e2	0.01	0.00
2349:	286.3423	1.05e2	0.00	0.00	2402:	288.5007	3.40e2	0.01	0.00
2350:	286.3727	7.90e1	0.00	0.00	2403:	288.5426	2.33e2	0.00	0.00
2351:	286.4255	1.50e2	0.00	0.00	2404:	288.5914	4.27e2	0.01	0.00
2352:	286.4696	2.86e2	0.01	0.00	2405:	288.6194	4.30e1	0.00	0.00
2353:	286.5185	3.64e2	0.01	0.00	2406:	288.6452	4.86e2	0.01	0.00
2354:	286.5687	3.11e2	0.01	0.00	2407:	288.6950	6.44e1	0.00	0.00
2355:	286.6097	1.07e2	0.00	0.00	2408:	288.7267	4.16e2	0.01	0.00
2356:	286.6560	7.86e1	0.00	0.00	2409:	288.7882	4.54e2	0.01	0.00
2357:	286.7028	4.23e2	0.01	0.00	2410:	288.8277	2.10e1	0.00	0.00
2358:	286.7377	1.84e2	0.00	0.00	2411:	288.8564	1.90e1	0.00	0.00
2359:	286.7728	5.44e2	0.01	0.00	2412:	289.0007	8.30e1	0.00	0.00
2360:	286.7994	2.50e1	0.00	0.00	2413:	289.0342	4.35e2	0.01	0.00
2361:	286.8255	5.36e2	0.01	0.00	2414:	289.0632	5.00e0	0.00	0.00
2362:	286.8718	3.98e2	0.01	0.00	2415:	289.0910	1.08e2	0.00	0.00
2363:	286.9128	1.16e3	0.02	0.01	2416:	289.2064	1.25e5	2.32	1.01
2364:	286.9573	9.24e2	0.02	0.01	2417:	289.2516	1.71e1	0.00	0.00
2365:	286.9870	9.55e1	0.00	0.00	2418:	289.3088	2.85e2	0.01	0.00
2366:	287.0142	1.11e3	0.02	0.01	2419:	289.3394	4.70e1	0.00	0.00
2367:	287.0506	6.53e2	0.01	0.01	2420:	289.3733	2.76e2	0.01	0.00
2368:	287.0942	1.47e3	0.03	0.01	2421:	289.4258	7.60e1	0.00	0.00
2369:	287.1414	1.98e3	0.04	0.02	2422:	289.4546	5.90e1	0.00	0.00
2370:	287.2007	5.42e6	100.00	43.70	2423:	289.4847	1.36e2	0.00	0.00
2371:	287.2455	1.74e3	0.03	0.01	2424:	289.5110	1.86e1	0.00	0.00

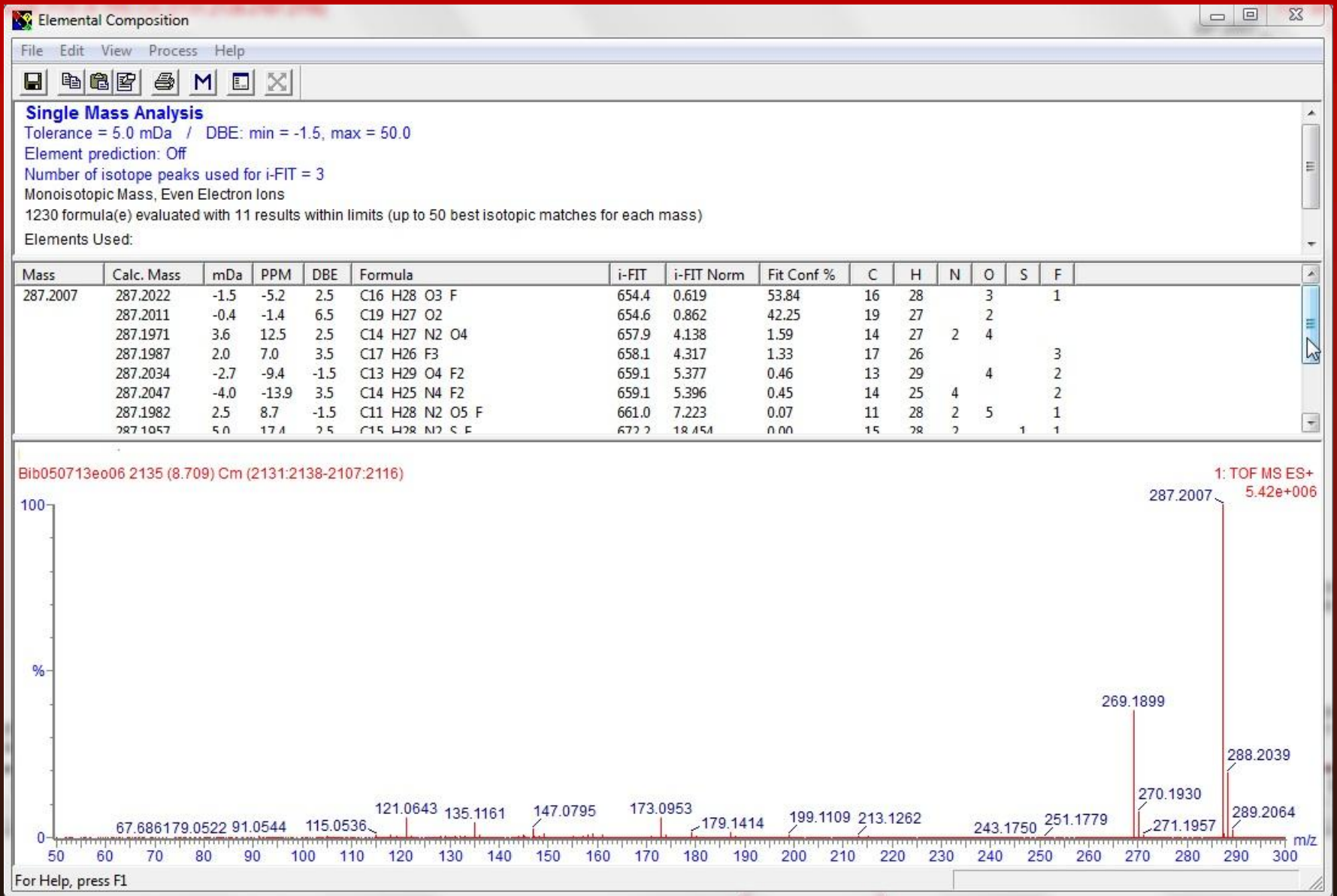
VOORBEELD ONBEKENDE STOF

- Gevonden ion : 287,2007
- Positive mode meestal MH⁺ (elektron = 0.00054858 Da)
- Zoeken naar mogelijke molecuulformules m.b.v. eigen software.

Nr	Molec.form.	Afw (Dalton)
1	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	0,0002
2	C ₁₄ H ₂₅ N ₃ O ₂ F	0,0003
3	C ₁₂ H ₂₆ N ₆ S	0,0005
4	C ₁₄ H ₂₉ F ₃ S	0,0008
5	C ₁₆ H ₂₇ O ₃ F	0,0010
6	C ₁₄ H ₂₆ O ₂ F ₄	0,0014
7

- Meest waarschijnlijk : C₁₉H₂₆O₂ (uit isotoop patroon)

VOORBEELD ONBEKENDE STOF



VOORBEELD ONBEKENDE STOF

- Welke stoffen zijn mogelijk bij bekende molecuulformule C₁₉H₂₆O₂?

Nr	Stof	RT
1	Boldenone	8,71
2	17- α -boldenone	9,84
3	Methyldienolone	9,02
4	6-dehydro-testosterone	9,15
5	Androstendion	10,52
6	1-Androstendione	
7	5-Androstendione	
8	2.Benzenepropanoic acid, 3,7-dimethylocta-2,6-dienyl ester	

- Retentietijd nog steeds een belangrijke parameter

CONCLUSIES

- QTOF is een zeer nuttig apparaat voor met name toxicologie en het zoeken naar onbekende stoffen (poeders en pillen).
- Meeste laboratoria zullen zich geen QTOF niet kunnen veroorloven.
- Voor TDM is triple Quad meer geschikt.