

Co přináší vysoké rozlišení a přesná hmota (HRAM) v plynné fázi?

Jitka Zrostlíková

Produktový specialista LC,GC/MS QQQ a QTOF



Obsah přednášky

- Proč **vysoké rozlišení a přesná hmota (HRAM)** v MS s plynovou chromatografií?
- **GC/MS QTOF** konstrukce a možnosti hardware
- Od dat k závěrům na **příkladu metabolomické studie**: vliv opiátů na mozek myši

Vysoké rozlišení a přesná hmota (HRAM) vs. jednotkové rozlišení

- Přidaná **selektivita**
- **Screening** proti databázím na základě přesné hmoty a izotopové obálky

- **Identifikace**
- **Diferenční analýza**



Plynná vs. kapalná fáze

**Molekulová
hmotnost**



Využití GC/HRAM MS pro ID neznámých látek a profilování?

A) Těkavé látky bez derivatizace

- **Foodomika, autenticita potravin:** víno, destiláty, oleje, medy
- **Terpeny a jiné aromatické látky:** složky parfémů, alergenů
- **Feromony hmyzu** – chemická ekologie
- Identifikace **degradačních produktů** perzistentních kontaminantů



Kde lze využít GC/HRAM MS pro ID neznámých látek a profilování

B) Netěkavé, polární látky po derivatizaci

Derivatizace?



- Pro **polární metabolity** (centrální metabolismus uhlíku, aminokyseliny, cukry) je v LC/MS třeba také derivatizace nebo speciální metody (HILIC, iontopárová chromatografie)
- Možná **automatizace**



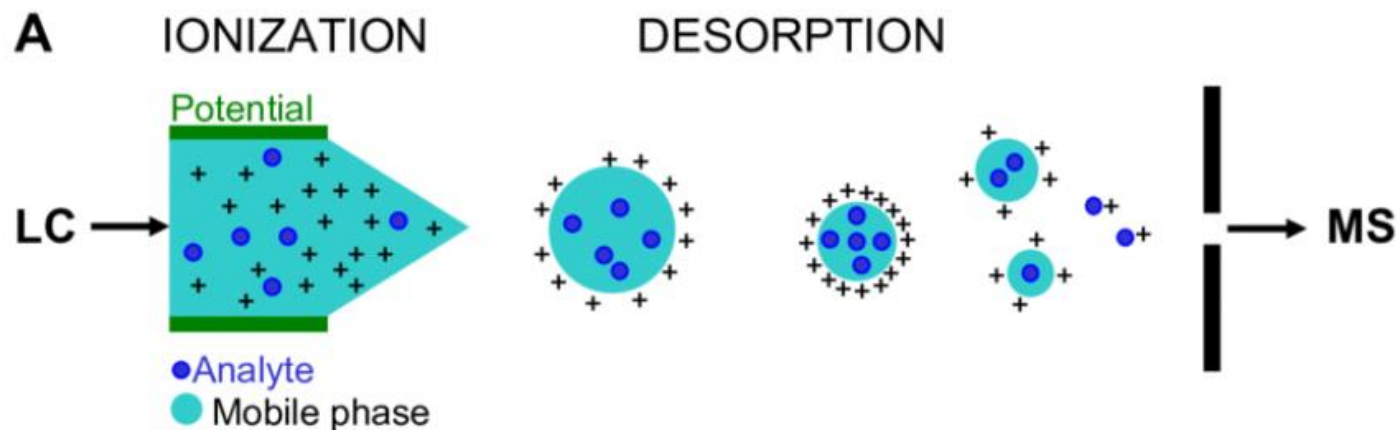
Chromatography Technical Note No AS164S

The fully on-line automation of MOX-TMS derivatisation for metabolomics applications

Camilla Liscio, Anatune Ltd., Girton, Cambridgeshire (UK).

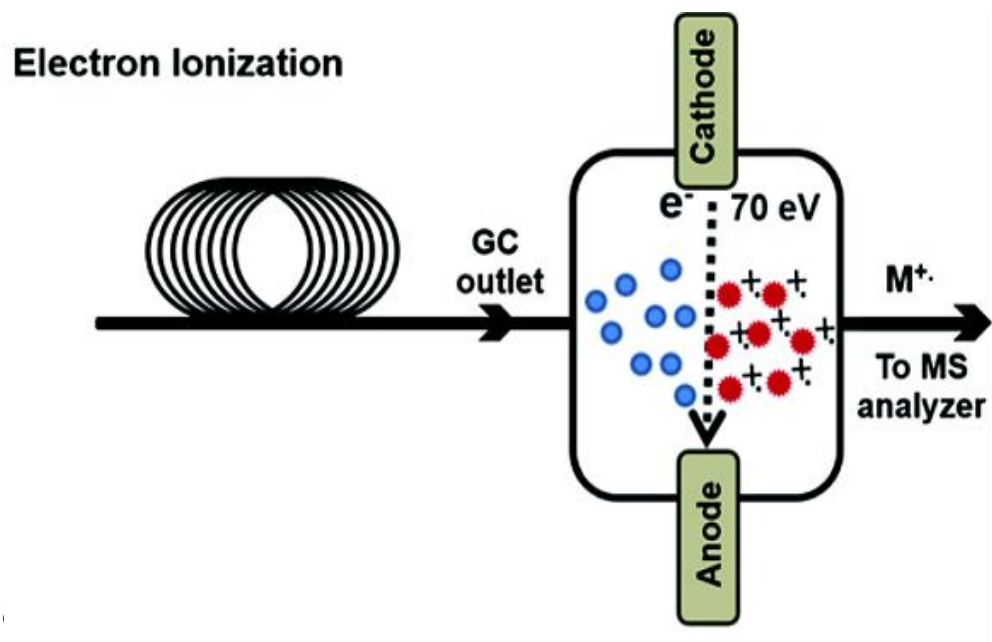


Ionizace ESI LC/MS



- **Komplexní mechanismus**, který je značně závislý na chemické povaze analytů, složení mobilní fáze, pH, historii systému (nepředpokládané adukty), přítomnosti koextraktů, na různých napětích, teplotách, průtocích plynů...

Ionizace GC/MS: Electron ionization

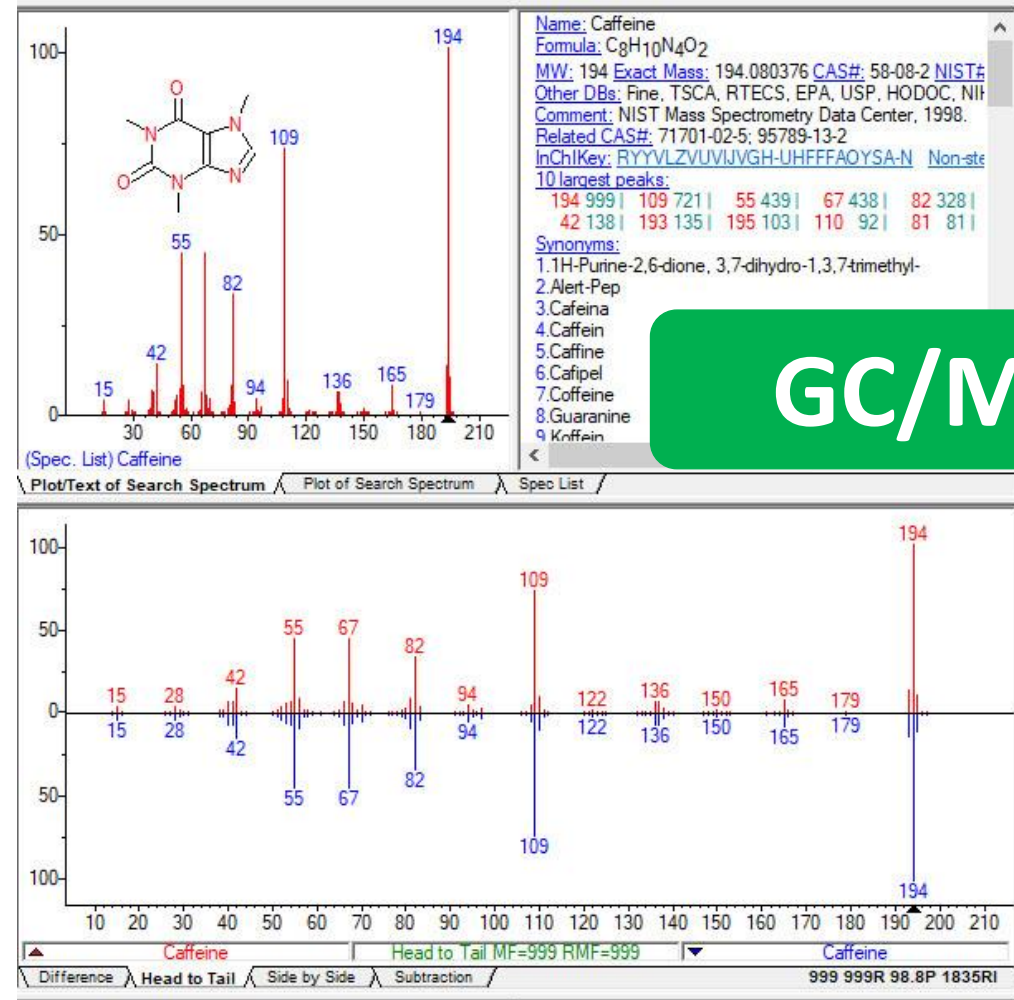


- ✓ Mobilní fáze (Helium) je inertní plyn
- ✓ Prakticky **bez optimalizace**.
- ✓ Spektra **bohatá na informaci**, řada fragmentů.
- ✗ Ve spektru často **není přítomen molekulový iont**
- ✗ Pro strukturní analýzu **nutná CI ionizace** nebo **jiná alternativní měkká ionizace**

Co by za to uživatelé LC/MS dali....



- ✓ **Standardní 70 eV EI spektra**, jsou přenositelná a prohlédavatelná rozsáhlými univerzálními knihovnami
 - ✓ **NIST library:** 306 000 látek
 - ✓ **Fiehn Library:** > 1000 metabolitů po derivatizaci pro GC/quad MS a GC/(Q)TOF MS
- ✓ V rámci každého spektra k dispozici **mnoho iontů**, na nichž lze provést výpočet sumárního vzorce v případě GC s HRAM MS
- ✓ Možnost „zamknutí“ **retenčních časů (RT locking)** využití informace o těchto RT z knihovny (např. Fiehnova knihovna)
- ✓ Možnost využití **retenčních indexů**



Agilent 7250 GC/MS QTOF

Hardware



Agilent 7250 GC/MS QTOF

Vysoké rozlišení a přesná hmota
($>25,000$ at m/z 272)

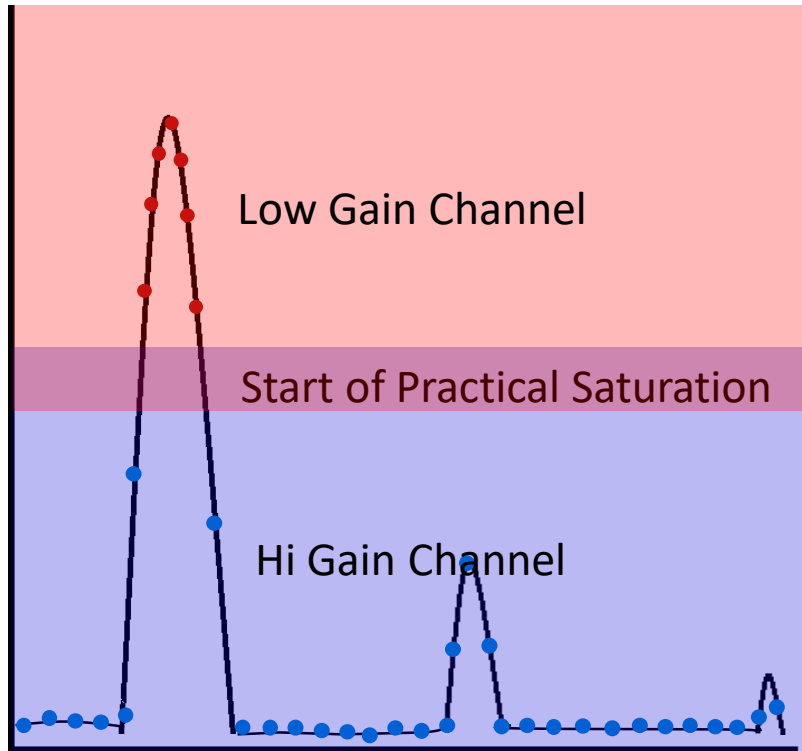
Široký dynamický rozsah ve spektru
bez kompromisu v rozlišení

Ionizace: EI, Low Energy EI a CI (opce)

Možnost Retention Time
Locking (RTL)



10 GHz převodník

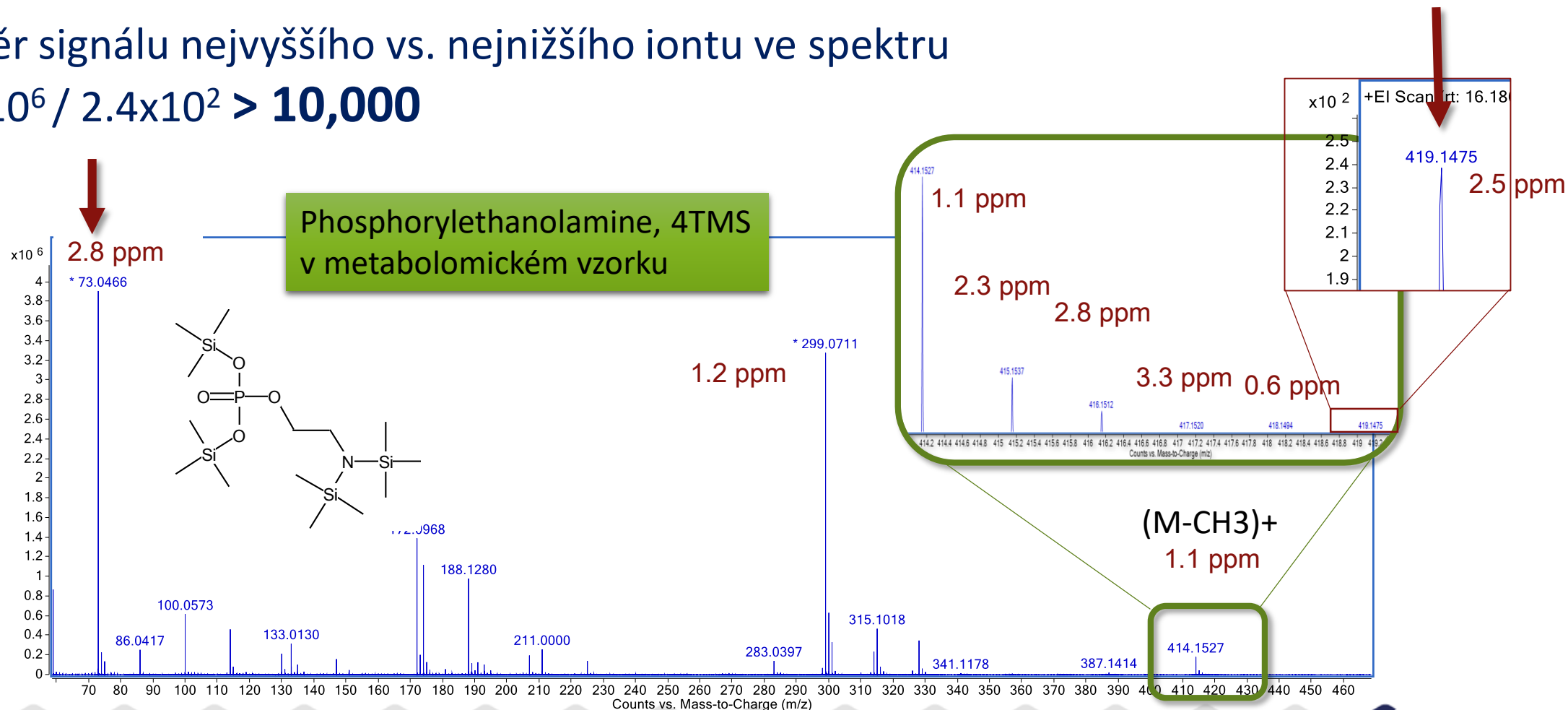


Před zasláním signálu do akvizičního PC přístroj **kombinuje Hi gain a Lo Gain kanály do jednoho spektra**. Toto umožňuje vyšší efektivní dynamický rozsah bez ztráty MS rozlišení.

Široký dynamický rozsah ve spektru

Poměr signálu nejvyššího vs. nejnižšího iontu ve spektru

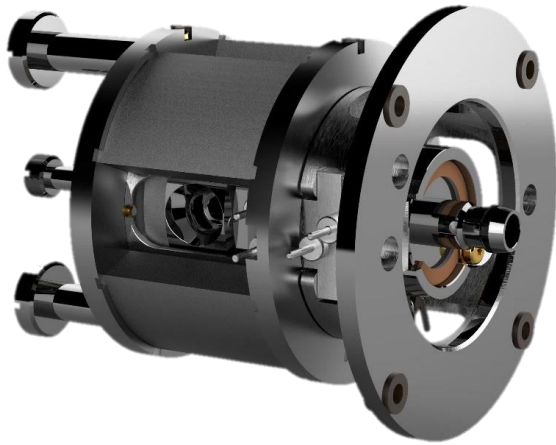
$$3.9 \times 10^6 / 2.4 \times 10^2 > \mathbf{10,000}$$



7250 GC/MS QTOF měkké ionizační techniky

- Pozitivní chemická ionizace (PCI)
- Negativní chemická ionizace (NCI)
- Nízkoenergetické EI

Agilent 7250 GC/MS QTOF: nízkoenergetické EI



High Efficiency Source (HES)

- Silnější axiální magnet a modifikovaná geometrie čoček
- Filamet v ose efluentu
- Významně **účinnější ionizace** složek efluentu

Ion source

Ion source: EI

Source temp.

Tune Setting 200 °C

Fixed °C

EI Mode

Standard Low Energy

Emission

Tune Setting 1.0 5.0 μA

Fixed μA

By time segment

Electron energy

Tune Setting 70.0 15.0 eV

Fixed eV

By time segment

Tune file

atune-2654-a.eihs.tun...

Run time 10 min

Solvent delay 3 min

Time filtering

Peak width 0.700 sec

Data Threshold

MS 0 counts 0 %

MS/MS 0 counts 0 %

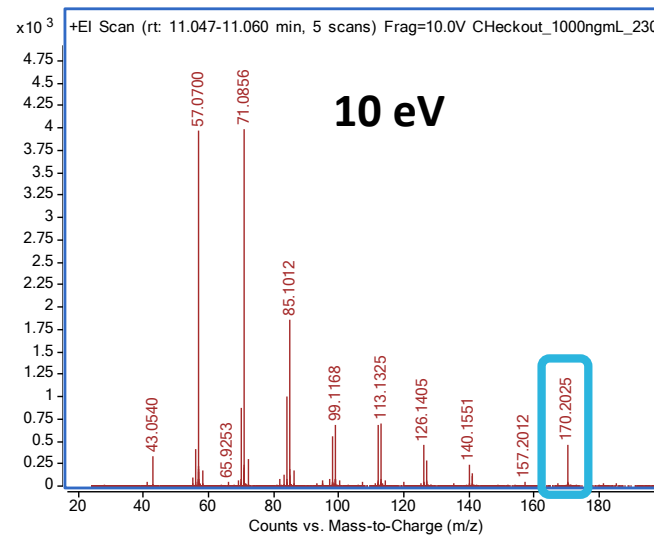
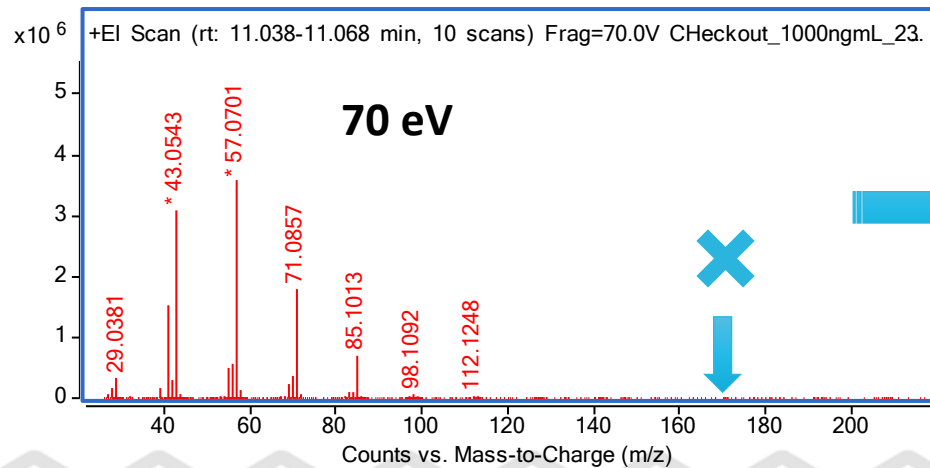
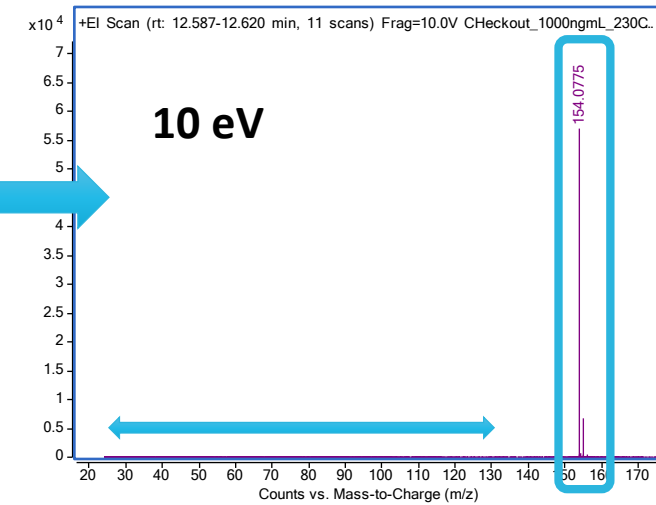
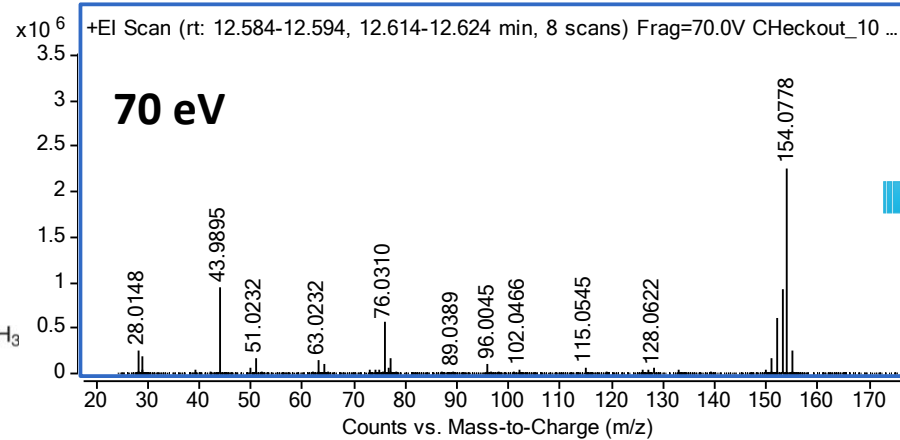
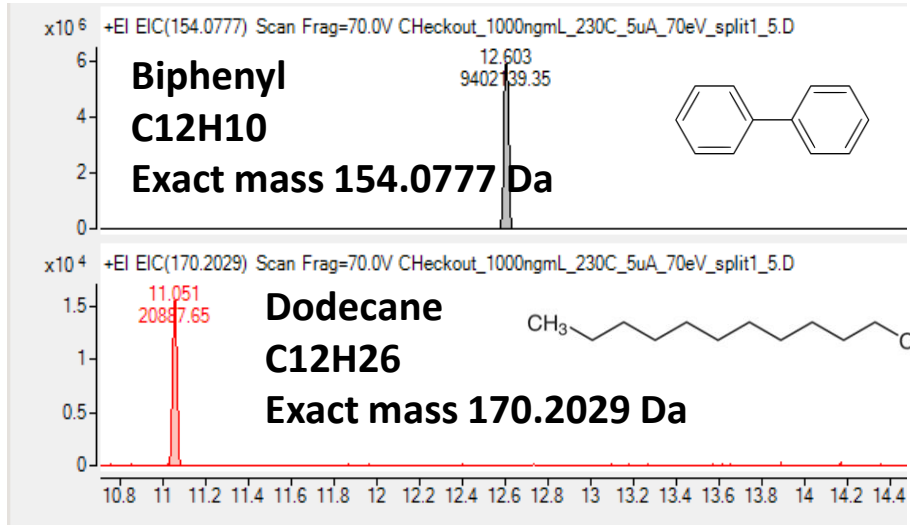
Apply to Profile data

Time segments

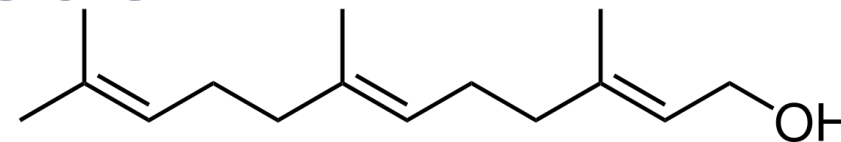
	Time	Acq mode	EI Mode	Emission	Electron energy	Data storage	Data stored
▶ 1	0.00	MS	Standard	5	70	Both	<input checked="" type="checkbox"/>

Možnost snížení ionizační energie, při zachování přijatelné citlivosti

Nízkoenergetické EI (10 eV, 0.5 μ A)

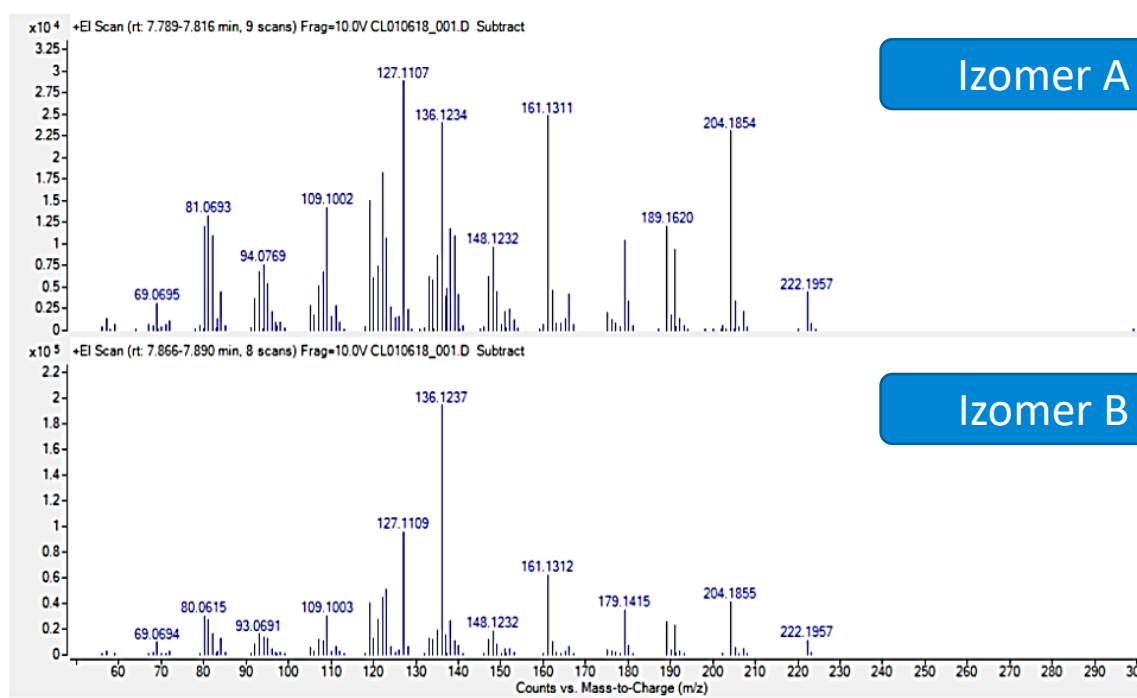
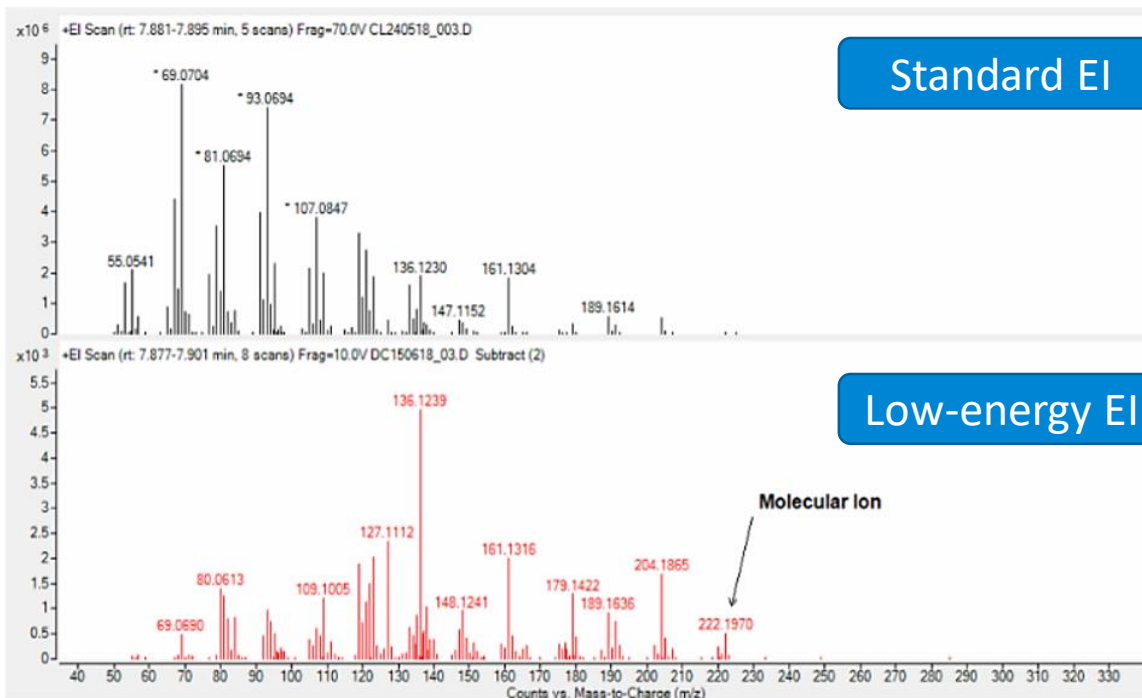


Nízkoenergetické EI: Farnesol



Detekce molekulového iontu:

Low energy EI: Identifikace izomerů



Od dat k výsledkům



Metabolomická studie

Změny mozku u myši vyvolané opiáty





Metabolomics of Opiate-Induced Changes in Murine Brain by GC/Q-TOF

Application Note

Metabolomics



Cíle a podmínky studie

Cíle studie

- Využití **necílené metabolomiky GC/MS QTOF** pro charakterizaci metabolických změn vyvolaných opiáty
- Porovnání **kmenů myší**, lišících se významně **hladinou citlivosti** na morfinu

Podmínky GC (Agilent 7890)

Kolona	Agilent DB-5 MS Ultra Inert 30 m x 0,25 mm, 0,25 mm film
Objem nástřiku	1 ml
Nástřik	Split 1:10 (EI), splitless (PCI a MS/MS) 250°C
Program pece	60°C 1 min, 10°C/min do 325°C 3,5 min
Nosný plyn	Helium 1 ml/min

Podmínky MS (Agilent GC/MS QTOF 7200)

Ionizační mód	EI, positive CI
Teplota iontového zdroje	230°C
Hmotnostní rozsah	40- 600 m/z
Rychlost sběru dat	5 Hz

Design studie

- Myším byl podáván **morphin po dobu 4 po sobě jdoucích dní**
- **Kontrolám** podáván **solný roztok**
- Experiment proveden s kmeny C57BL/6 (**citlivé na morphin**) a 129Sv1 (**rezistivní vůči morphinu**), samečci, stáří 7–8 týdnů
- **7-8 biologických replikátů**
- **Extrakce** mozkové tkáně metodou **dle Folche**, vodná fáze byla vysušena a **derivatizována silylací**

Od dat k výsledkům

Prvotní identifikace píků

GC/EI TOF MS

- Spektrální **dekonvoluce pomocí Sure Mass**
- **Identifikace pomocí knihoven** (unit mass nebo HRAM knihovny)
- **Anotace fragmentů** pomocí přesné hmoty a izotopové obálky

Unknowns analysis

Diferenční analýza

GC/EI TOF MS

- Aligment
- Normalizace
- Filtrování
- PCA
- Statistická analýza

Profinder
Mass profiler professional

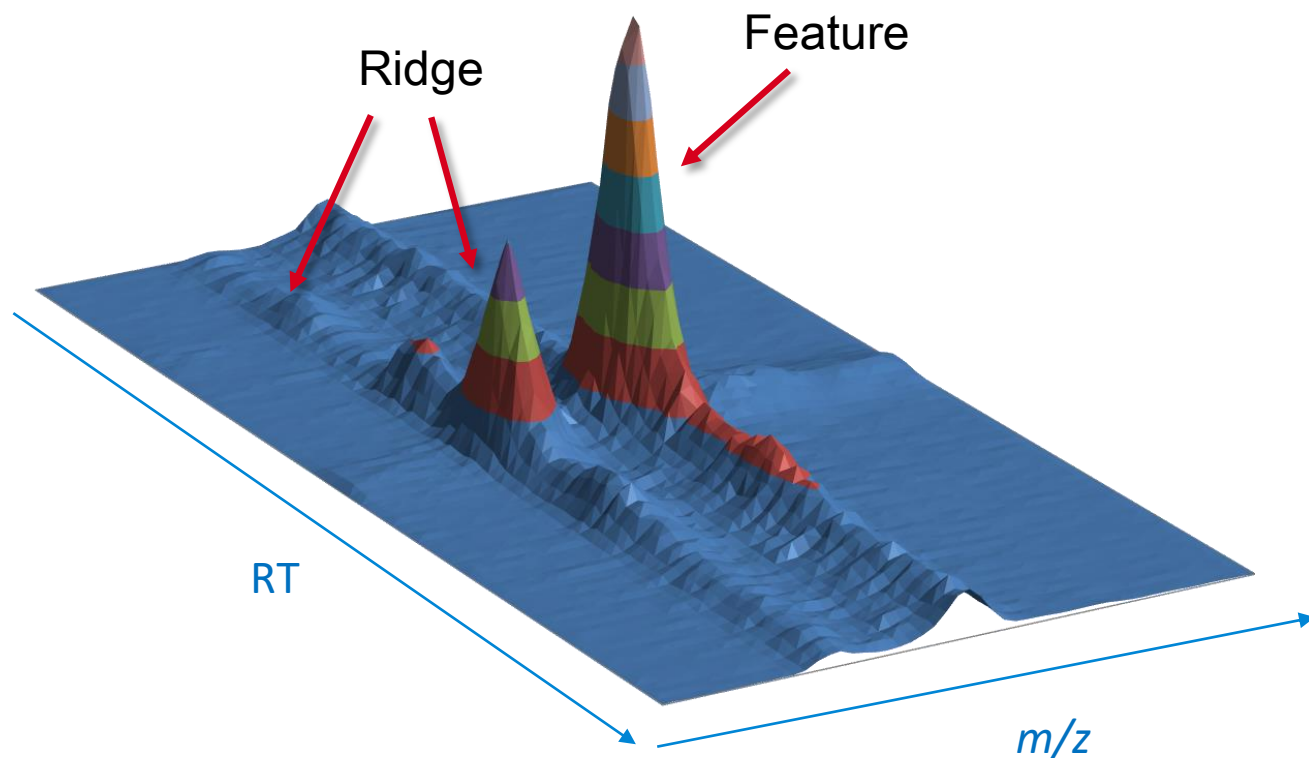
Konfirmace struktury a de-novo identifikace látek

Měkká ionizace
(Nízkoenergetické EI, PCI, NCI) a MS/MS

- Interpretace MS/MS spekter
- Určení struktury

Molecular structure
correlator

Sure Mass algoritmus pro detekci látek a spektrální dekonvoluci



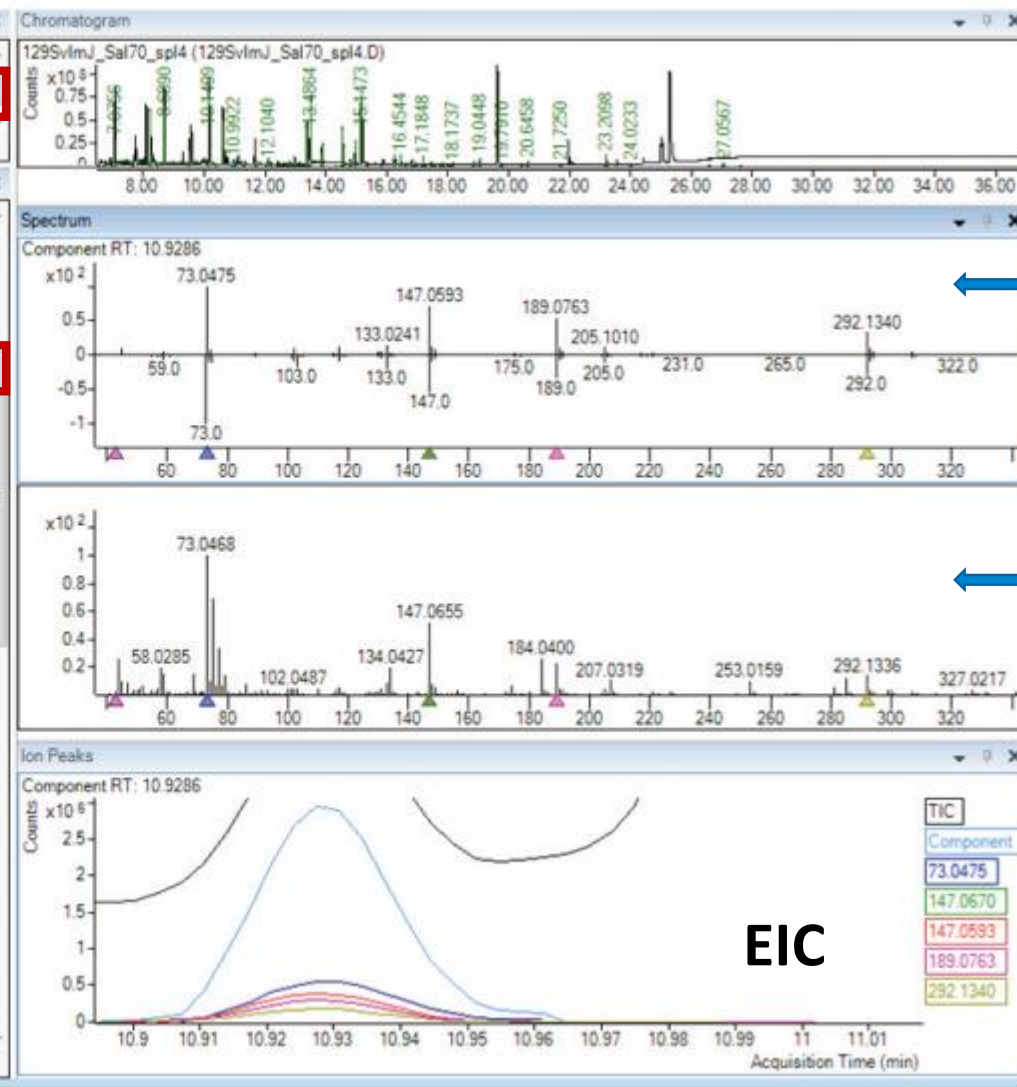
Prvotní ID v MH Unknowns analysis

Tabulka vzorků

Sample Name	File Name	Components	Hits	Target M.
129SvmJ_Sal70_spl4	129SvmJ_Sal70...	711	65	

Component RT	Is Primary Hit	Compound Name	Match Factor	CAS#
10.1409	<input checked="" type="checkbox"/>	[1004] phosphoric acid [9.966]	79.1	7664-31
10.4107	<input checked="" type="checkbox"/>	[6288] L-threonine 1 [10.224]	50.1	72-19-5
10.6089	<input checked="" type="checkbox"/>	[750] glycine [10.456]	72.8	56-40-6
10.9286	<input checked="" type="checkbox"/>	[439194] glyceric acid [10.735]	85.4	473-81-
10.9922	<input checked="" type="checkbox"/>	[8888] porphine 1 [10.77]	72.9	681295
11.0200	<input checked="" type="checkbox"/>	[1174] uracil [10.777]	56.7	66-22-8
11.0387	<input checked="" type="checkbox"/>	[444972] fumaric acid [10.94]	85.2	170134
11.3260	<input checked="" type="checkbox"/>	[5951] L-serine 2 [11.174]	90.1	56-45-1
11.6960	<input checked="" type="checkbox"/>	[6288] L-threonine 2 [11.464]	84.6	72-19-5
12.1040	<input checked="" type="checkbox"/>	[5960] aspartic acid 1 [12.002]	84.9	56-84-8
12.1867	<input checked="" type="checkbox"/>	[239] Beta- alanine 1 [12.044]	87.6	107-95-
12.8125	<input checked="" type="checkbox"/>	[936] nicotinamide 2 [12.743]	59.5	98-92-0
12.9721	<input checked="" type="checkbox"/>	[92824] D-malic acid [12.794]	88.0	617-48-
13.2792	<input checked="" type="checkbox"/>	[169019] D-threitol [12.954]	50.3	6968-1f
13.3748	<input checked="" type="checkbox"/>	[5960] aspartic acid 2 [13.207]	91.6	56-84-8
13.4080	<input checked="" type="checkbox"/>	[33032] L-glutamic acid 3 (dehydr...	88.5	56-86-0
13.4370	<input checked="" type="checkbox"/>	[33032] L-glutamic acid 1 [13.338]	53.3	56-86-0
13.4864	<input checked="" type="checkbox"/>	[500] 4-guanidinobutyric acid 2 [1...	69.0	463-00-
13.8729	<input checked="" type="checkbox"/>	[588] Creatinine [13.629]	86.2	60-27-5
14.3526	<input checked="" type="checkbox"/>	[1662] 3-hydroxy-3-methylglutaric ...	74.0	503-49-
14.5414	<input checked="" type="checkbox"/>	[33032] L-glutamic acid 2 [14.398]	89.9	56-86-0
			89.5	143-07-
			92.8	997-55-
			80.5	997-55-

Identifikované látky



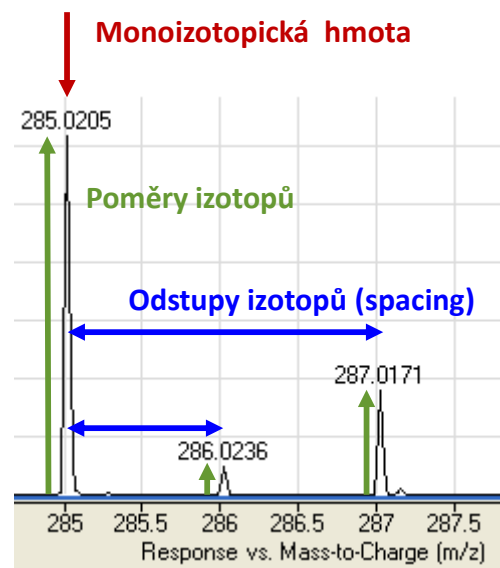
TIC
Compounds

Porovnání s knihovnou

Spektrum po dekonvoluci

EIC

Molecular Formula Generation (MFG)



Monoizotopická hmota

Poměry izotopů

Odstupy izotopů

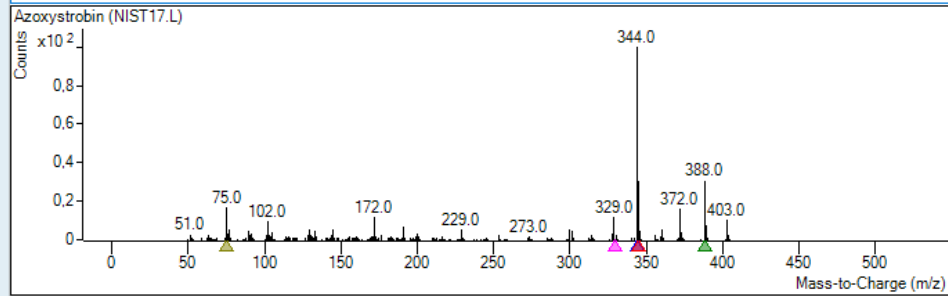
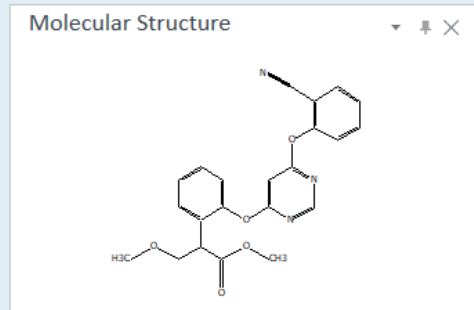
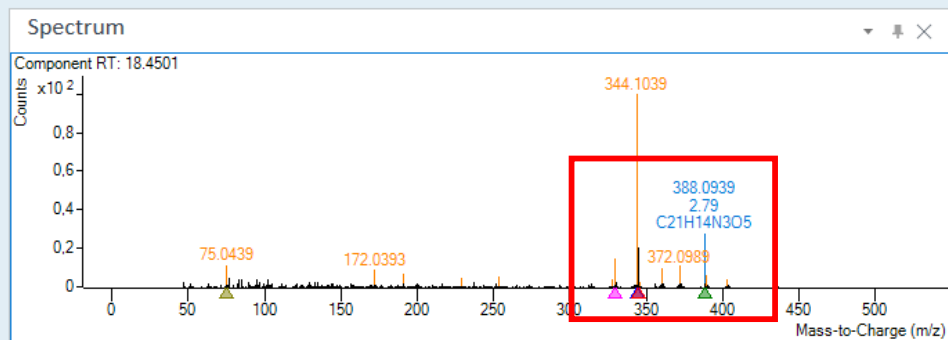
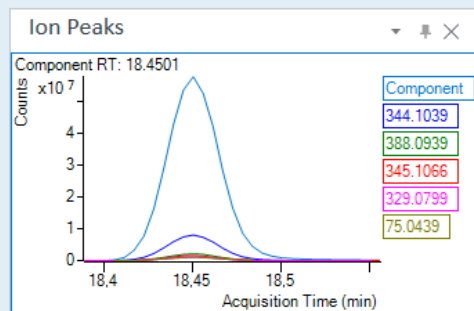
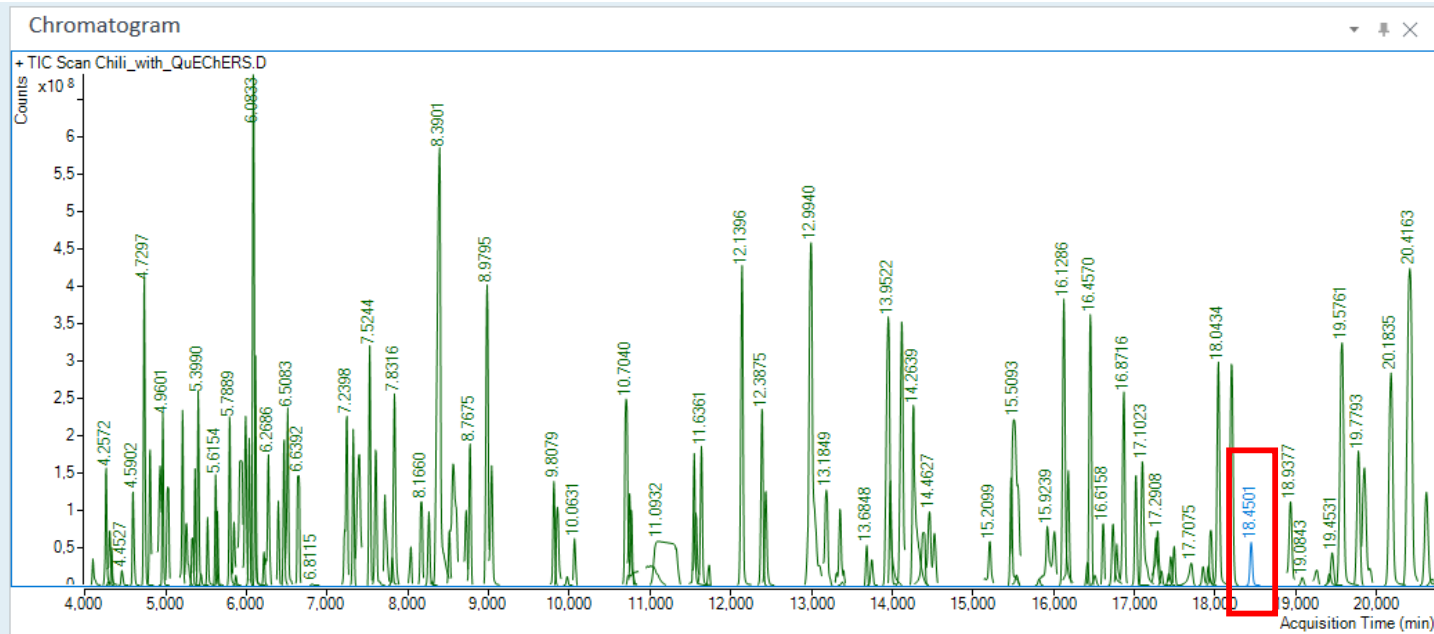
Celkové skóre identifikace

MS Formula Results: Cpd 2: C10H9ClN4O2S														
		m/z			Ion			Formula			Abundance			
		285.021			[M+H] ⁺			C10H10ClN4O2S			24506.1			
Best	Formula (M)	Calc m/z	Score	Cross Score	Mass	Calc Mass	Diff (ppm)	Abs Diff (p)	Spacing Matc	Abund Matc	Mass Match	m/z	DBE	
<input checked="" type="checkbox"/>	C10H9ClN4O2S	285.0208	99.55		284.0137	284.0135	-0.71	0.71	99.19	99.26	99.69	285.021	8	
<input type="checkbox"/>	C7H12N2O6S2	285.021	77.28		284.0137	284.0137	0.01	0.01	99.54	1.93	100	285.021	3	
<input type="checkbox"/>	C7H13ClN4O2S2	285.0241	75.57		284.0137	284.0168	11.12	11.12	99.87	83.87	46.22	285.021	3	

Sample Name	File Name	Components	Hits	Type
267974.2 Chili Extract with Qu...	Chili_with_Qu...	799	129	Sample

Component RT	Compound Name	Match Factor	Formula	# of Exact Masses	Component Is Accurate Mass
18.4501	Azoxystrobin	90.5	C22H17N3O5	17	<input checked="" type="checkbox"/>
18.2081	hentriacontane	84.1	C31H64	20	<input checked="" type="checkbox"/>
18.0434	.gamma.-Tocopherol	93.0	C28H48O2	13	<input checked="" type="checkbox"/>
17.9490	triacontane	85.0	C30H62	20	<input checked="" type="checkbox"/>
17.9375	.beta.-Tocopherol	87.9	C28H48O2	6	<input checked="" type="checkbox"/>
17.9208	Difenoconazole	93.5	C19H17Cl2N3...	18	<input checked="" type="checkbox"/>
17.8538	Difenoconazole	88.4	C19H17Cl2N3...	19	<input checked="" type="checkbox"/>
17.7075	Benzenepranal, 4-...	81.6	C13H18O	15	<input checked="" type="checkbox"/>
17.4951	pyraclostrobin	88.7	C19H18ClN3O4	18	<input checked="" type="checkbox"/>
17.4527	Docosanoic acid, he...	77.6	C28H56O2	18	<input checked="" type="checkbox"/>
17.4295	Cyclodecasiloxane, e...	83.1	C20H60O10Si...	20	<input checked="" type="checkbox"/>
17.3381	Fenobucarb	78.3	C12H17NO2	15	<input checked="" type="checkbox"/>

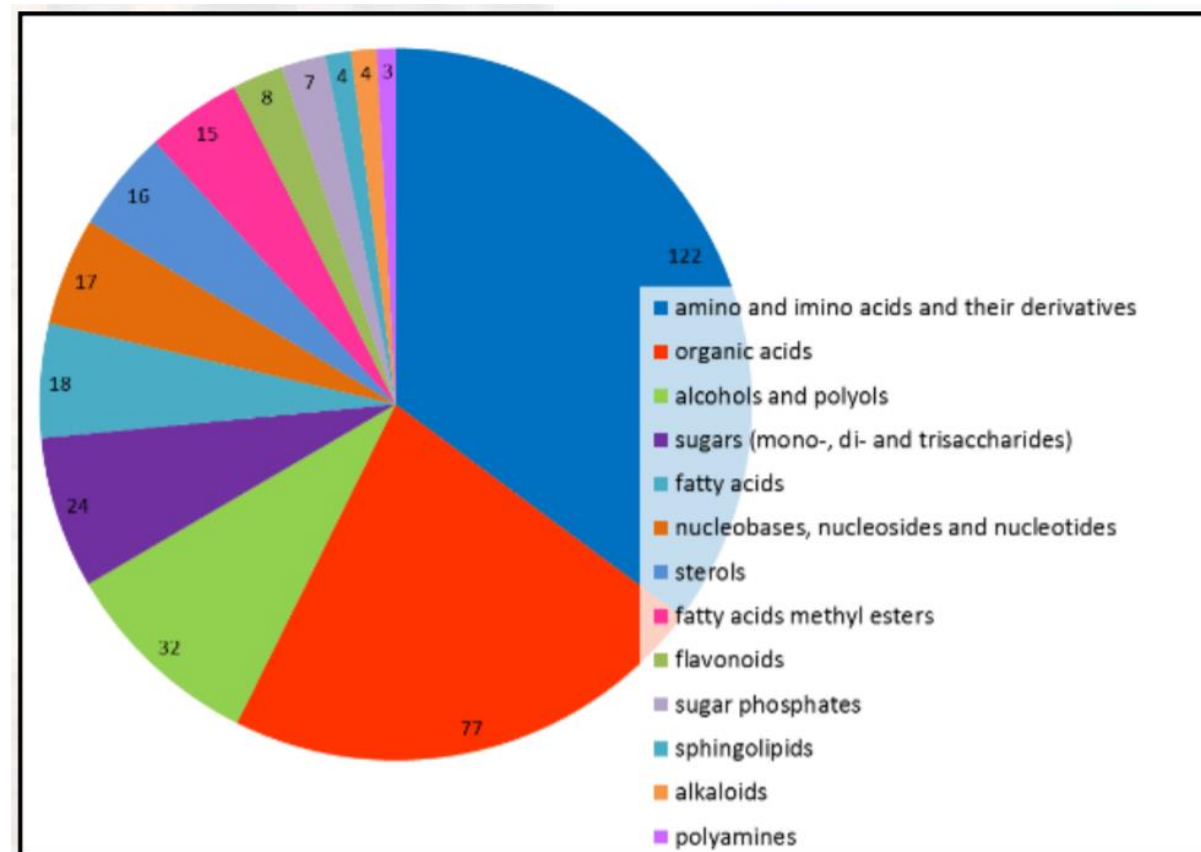
Source Ion (m/z)	Exact Mass (m/z)	Mass Delta (ppm)	Fragment Formula	Unique
328.0717	328.0717	-0.04	C19H10N3O3	<input type="checkbox"/>
329.0799	329.0795	1.19	C19H11N3O3	<input type="checkbox"/>
330.0830				
344.1039	344.1043	-1.32	C22H16O4	<input type="checkbox"/>
345.0749	345.0744	1.39	C19H11N3O4	<input type="checkbox"/>
345.1066				
346.1085	346.1074	3.19	C21H16N4O4	<input checked="" type="checkbox"/>
360.0987	360.0992	-1.51	C22H16O5	<input type="checkbox"/>
372.0989	372.0979	2.70	C21H14N3O4	<input checked="" type="checkbox"/>
373.1013				
388.0939	388.0928	2.79	C21H14N3O5	<input checked="" type="checkbox"/>
389.0968	389.1006	-9.89	C21H15N3O5	<input checked="" type="checkbox"/>
403.1169	403.1163	1.46	C22H17N3O5	<input checked="" type="checkbox"/>



Fiehnova metabolomická knihovna

HARAM

- 500 metabolitů s anotovanými spektry, korigovanými na teoretickou přesnou hmotu
- Každá látka v různých stupních derivatizace



Unknowns analysis: prvotní identifikace

- Cca **700 látek v každém vzorku** bylo nalezeno pomocí Unknowns analysis
- Pomocí Fiehnovy metabolické knihovny **získáno 70-100 tentativních identifikací**
- Další identifikace prováděny až **po filtraci signifikantních diferencí** pomocí **NIST knihovny** a **interpretace spekter**

Od dat k výsledkům

Prvotní identifikace píků

GC/EI TOF MS

- Spektrální **dekonvoluce** pomocí Sure Mass
- **Identifikace pomocí knihoven** (unit mass nebo HRAM knihovny)
- **Anotace fragmentů** pomocí přesné hmoty a izotopové obálky

Unknowns analysis

Diferenční analýza

GC/EI TOF MS

- Aligment
- Normalizace
- Filtrování
- PCA
- Statistická analýza

Profinder
Mass profiler professional

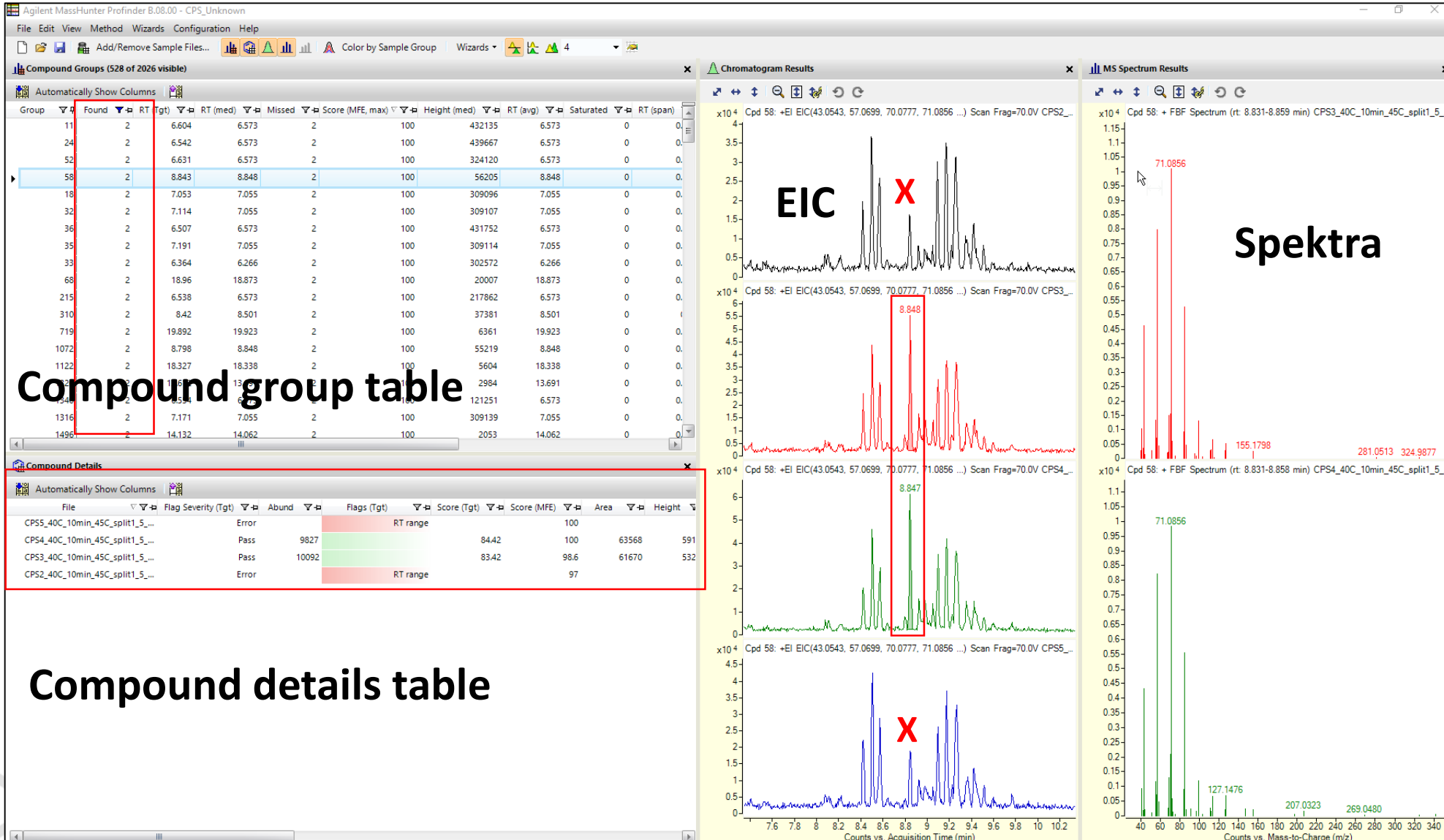
Konfirmace struktury a de-novo identifikace látek

Měkká ionizace
(Nízkoenergetické EI, PCI,
NCI) a MS/MS

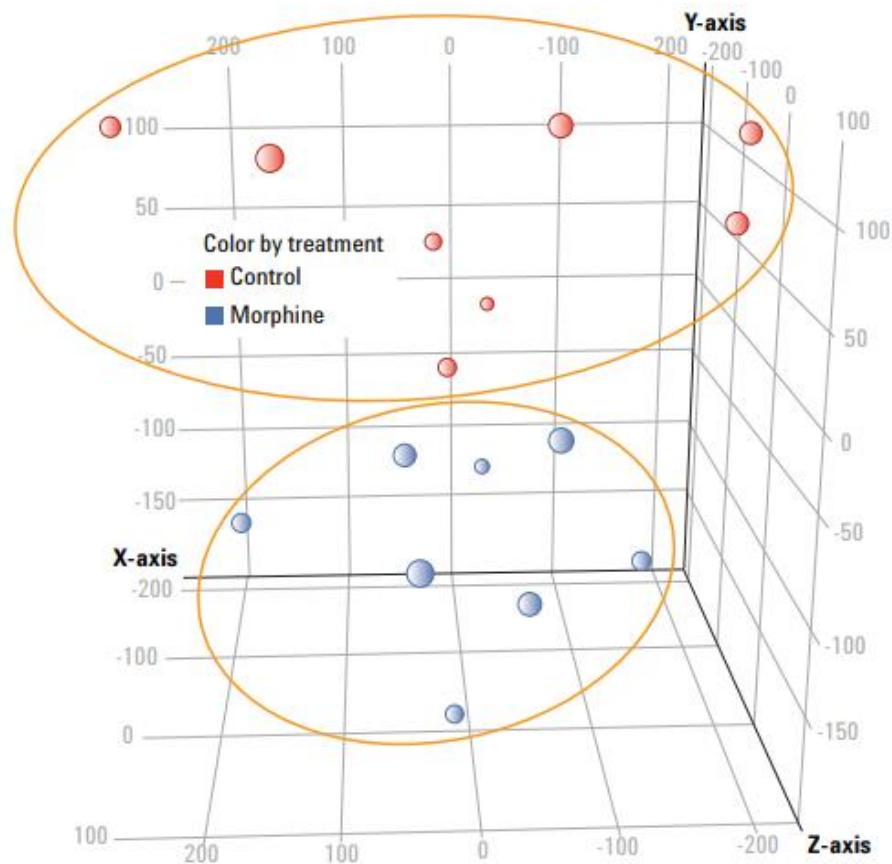
- Interpretace MS/MS spekter
- Určení struktury

Molecular structure
correlator

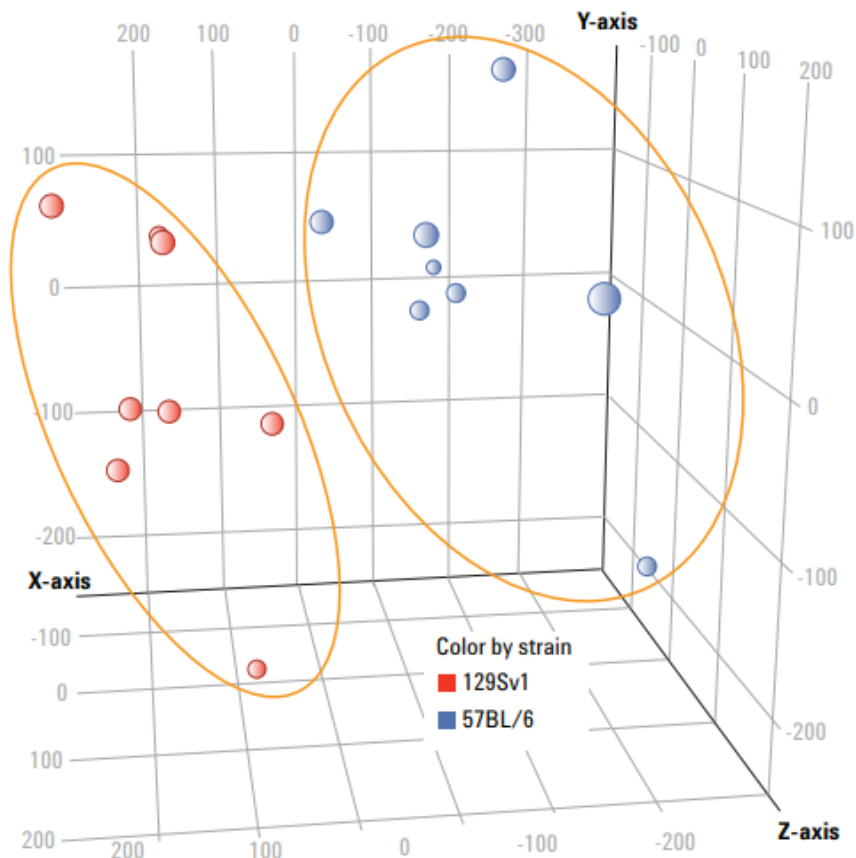
MH Profinder software: alignment píků



Mass Profiler Professional: PCA

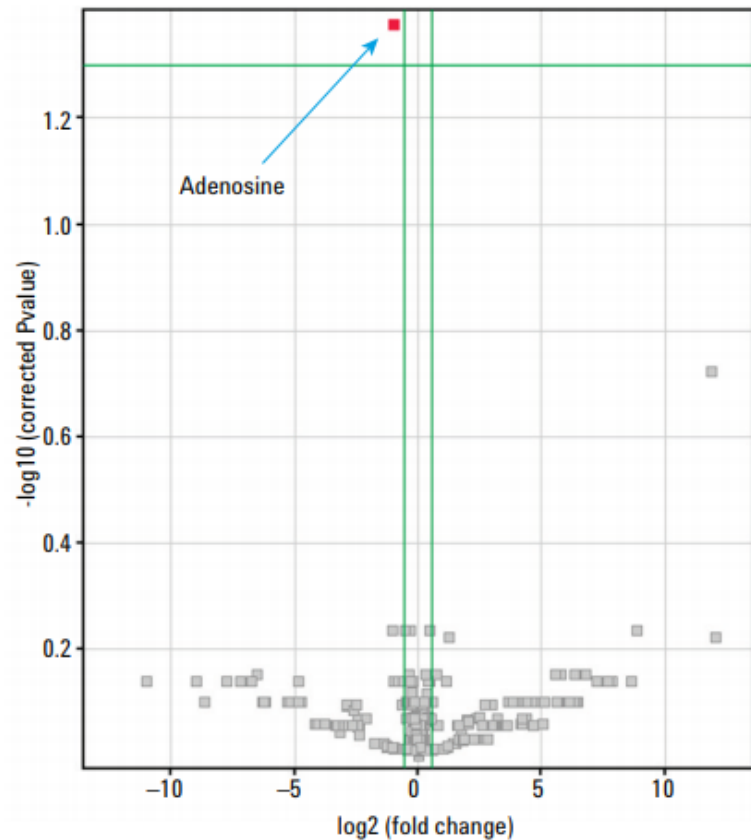


Podávání morphinu vs. kontrola (kmen citlivý na morphin)

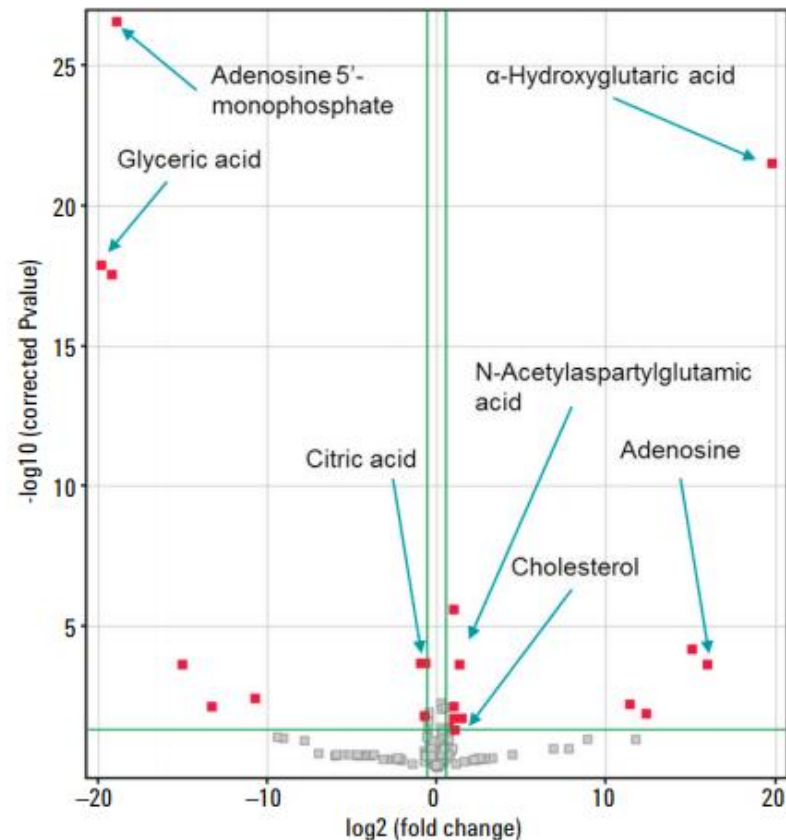


Oba kmeny myši, bez podání morphinu

Mass Profiler Professional: volcano plots



Podávání morphinu vs. kontrola (kmen citlivý na morphin)



Oba kmeny myší, bez podání morphinu

Od dat k výsledkům

Prvotní identifikace píků

GC/EI TOF MS

- Spektrální **dekonvoluce pomocí Sure Mass**
- **Identifikace pomocí knihoven** (unit mass nebo HRAM knihovny)
- **Anotace fragmentů** pomocí přesné hmoty a izotopové obálky

Unknowns analysis

Diferenční analýza

GC/EI TOF MS

- Aligment
- Normalizace
- Filtrování
- PCA
- Statistická analýza

Profinder
Mass profiler professional

Konfirmace struktury a de-novo identifikace látek

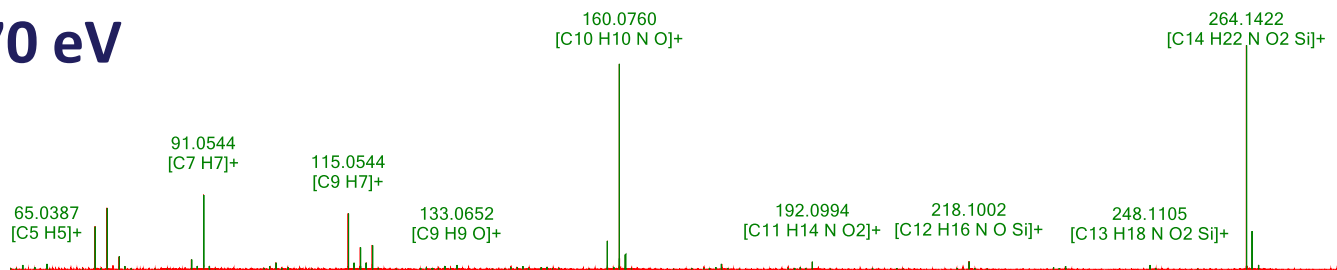
Měkká ionizace
(nízkoenergetické EI, PCI,
NCI) a MS/MS

- Interpretace MS/MS spekter
- Určení struktury

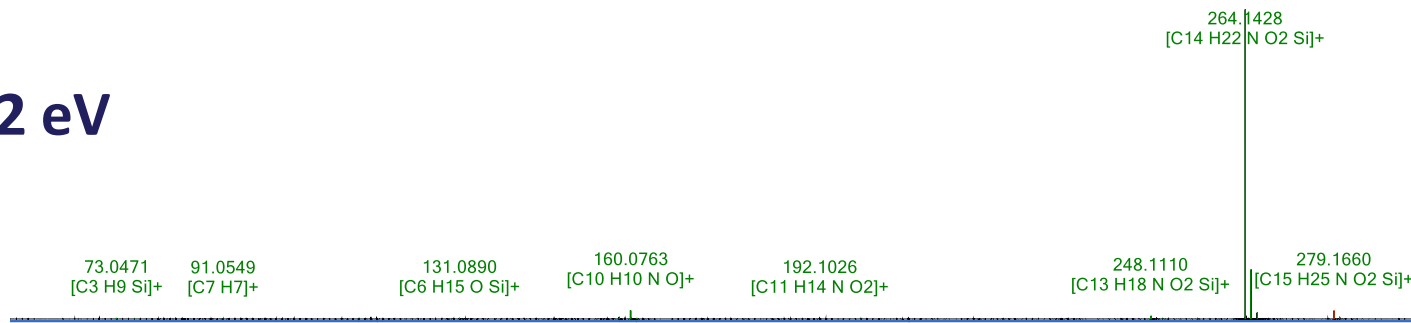
Molecular structure
correlator

Nízkoenergetická EI ionizace: Strukturní interpretace

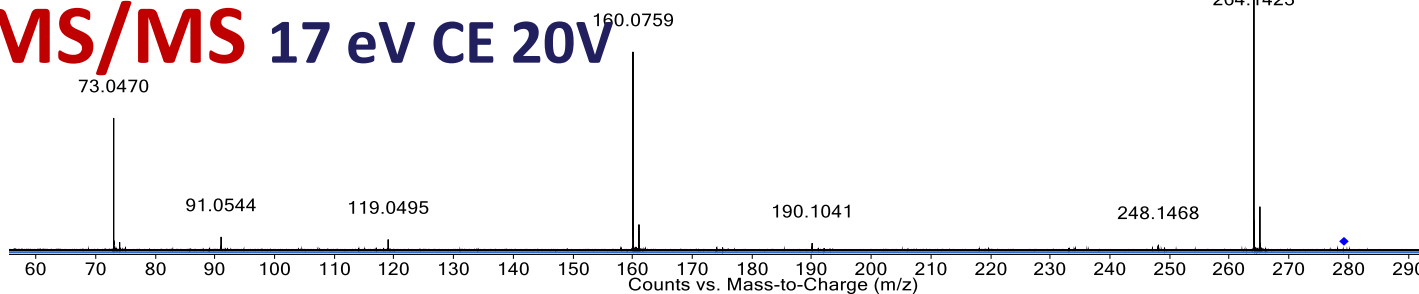
70 eV



12 eV

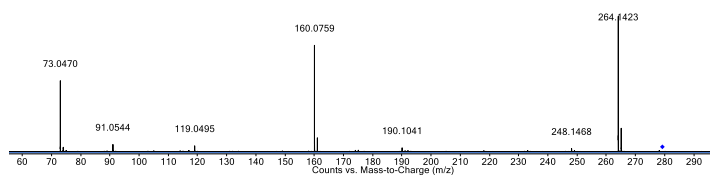


MS/MS 17 eV CE 20V



Molecular Structure Correlator (MSC): Interpretace struktury

MS/MS, 17 eV CE 20V



Structure #2 -- elucidated: 100.0% ions, 100.0% Weight

Mass	Intensity	Weight(%)	No. of candi.	Best score
264.1422	6359.06	75.2	3	98.0
160.0759	5076.16	22.0	5	94.1
73.0470	3103.87	2.8	1	99.5

Penalty=4.0 dM=-1.3ppm F.D.S.=99.9 C10H13NO-3H Score=94.1

Penalty=7.0 dM=-1.3ppm F.D.S.=99.9 C10H15NO-5H Score=83.2

Penalty=2.0 dM=18.3ppm F.D.S.=74.7 C6H15NO2S-H Score=73.6

Penalty=2.5 dM=18.3ppm F.D.S.=74.7 C6H15NO2S-H Score=73.0

Penalty=3.0 dM=18.3ppm F.D.S.=74.7 C6H15NO2S-H Score=72.3

8 structures found for r=14.036

Sort by Score Show structures for All Formulas

Structure #1 -- elucidated: 100.0% ions, 100.0% Weight

Mass	Intensity	Weight(%)	No. of candi.	Best score
264.1422	6359.06	75.2	3	98.0
160.0759	5076.16	22.0	5	94.1
73.0470	3103.87	2.8	1	99.5

Penalty=3.5 dM=-1.3ppm F.D.S.=99.9 C10H13NO-3H Score=95.4

Penalty=8.0 dM=-1.3ppm F.D.S.=99.9 C10H15NO-5H Score=78.7

Penalty=8.5 dM=-1.3ppm F.D.S.=99.9 C10H15NO-5H Score=76.3

Penalty=6.0 dM=18.3ppm F.D.S.=74.7 C6H17NO2Si-3H Score=65.4

Penalty=6.0 dM=18.3ppm F.D.S.=74.7 C6H17NO2Si-3H Score=65.4

Shrnutí

- GC/MS QTOF představuje potenciál pro řadu aplikací, kde je třeba **identifikovat nebo profilovat neznámé látky**
- **Agilent 7250 GC QTOF**: přesná hmota, izotopová obálka, dynamický rozsah, měkká ionizace
- Mass Hunter **software workflow**: rychlé tentativní identifikace, anotace spekter, tvorba HRAM knihoven, interpretace MS/MS spekter
- Porovnání vzorků a profilování

VIBRATIONAL SPECTRIS CANTUS ANGELI - VIBRAČNÍ SPEKTRA ANDĚLSKÉ HUDBY

VIBRATIONAL SPECTRIS

CANTUS ANGELI

DNES VE 20,30 HODIN

**VE FARNÍM KOSTELE
NEJSVĚTĚJŠÍ TROJICE V SRNÍ**



Děkuji za pozornost

