

Project 505.0070

Ontwikkeling methoden voor het verrichten van identificatie c.q. confirmatie (projectleider W.A. Traag)

Rapport 88.61

December 1988

Een inventarisatie van massaspectrometrische technieken voor het toekomstig onderzoek binnen het RIKILT

W.A. Traag en dr G. Vos

Goedgekeurd: ir L.G.M.Th. Tuinstra

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Telefoon 08370-19110
Telex 75180 RIKIL
Telefax 08370-17717

Copyright 1988, Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

sectorhoofden

coördinator dierlijke produkten

Tuinstra

Vos

afdeling BFA

afdeling DGM

afdeling TOX

afdeling OCON

afdeling ACON

afdeling MNT

projectleider

circulatie

bibliotheek

EXTERN:

Directie Landbouwkundig Onderzoek

INHOUD	<u>blz</u>
SAMENVATTING	3
1 INLEIDING	5
2 CAPACITEIT EN TOEPASSINGSGEBIED HUIDIGE SITUATIE	5
3 REFERENTIETAAK	7
4 MASSASPECTROMETRISCHE TECHNIEKEN	8
4.1 Introductie (met voorscheiding) en ionisatie	9
4.2 Introductie (zonder voorscheiding) en ionisatie	11
4.3 Ion scheiding	12
4.3.1 Sector machines	12
4.3.2 Quadrupool machines	13
4.3.3 Tandem massaspectrometers	14
4.3.4 Fourier transform massaspectrometrie	17
4.3.5 Ion trap massaspectrometrie	18
4.3.6 Time of flight massaspectrometer	18
4.3.7 Massaspectrometrie-systeem voor de bepaling van metalen	19
5 TANDEM MASSASPECTROMETRISCHE APPLICATIES UIT DE LITERATUUR	19
6 SELECTIECRITERIA EN UITGANGSPUNTEN VOOR AANSCHAF MASSASPECTROMETER	27
7 ONDERZOEK MS-MS SYSTEMEN	27
7.1 Onderzoeksopzet	27
7.2 Onderzoeksresultaten	28
7.2.1 VG-Tritech	28
7.2.2 Nermag	29
7.2.3 Finnigan	30
7.2.4 Voorlopige conclusie's	32
7.3 Aanvullend onderzoek Finnigan TSQ 70	32

8 SPECIFIEK ONDERZOEK NU EN IN DE TOEKOMST	34
9 CONCLUSIES	36
10 AANBEVELINGEN	37
11 VOORSTELLEN PERSONELE BEZETTING	40
12 SLOTWOORD	40
LITERATUUR	

SAMENVATTING

Ontwikkelingen op het gebied van de massaspectrometrie zijn bestudeerd en geïnventariseerd. Dit met name in relatie tot de huidige en toekomstige analytisch-chemische behoeften van het RIKILT, met de nadruk op de ontwikkelings- en referentietaken van het instituut. Enerzijds is dit gedaan door bestuderen van de literatuur, anderzijds door een aantal componenten te laten onderzoeken door drie leveranciers.

Op basis van de in dit rapport beschreven studie wordt geadviseerd een Finnigan TSQ 70 (MS-MS)-systeem aan te schaffen om de bewijskracht van huidige analytische methoden beter te onderbouwen. Daarnaast wordt geadviseerd om op termijn tevens een hoog-oplossend vermogen MS-systeem aan te schaffen en de mogelijkheid van off-line dataverwerking voor de HP-MSD (Hewlett Packard Mass Selective Detector) te creëren via de aanschaf van een HP "Work Station".

()

()

1 INLEIDING

Met betrekking tot de massaspectrometrie is eind 1987 een notitie opgesteld getiteld "Toekomst MS onderzoek op het RIKILT" (1).

In deze notitie werden de beperkingen, zowel qua techniek als qua capaciteit, beschreven van de beschikbare apparatuur.

Tevens werd een aantal ontwikkelingen op het massaspectrometrische gebied, in relatie tot de RIKILT analyse problematiek, beschreven.

Inmiddels is de capaciteit, voor een aantal applicaties, verruimd door aanschaf van een "Hewlett Packard Mass Selective Detector" (HP-MSD).

Een aantal nieuwe massaspectrometrische technieken is nader bestudeerd qua mogelijkheden voor het RIKILT.

Enerzijds is dit gedaan door bestuderen van de literatuur en anderzijds door het laten onderzoeken van een aantal componenten door drie leveranciers.

In dit verslag worden de resultaten nader uitgewerkt en in relatie gebracht met de huidige en in de toekomst te verwachten vraagstellingen zowel vanuit het RIKILT als extern.

Ook is de capaciteit in het licht van het huidige en het in de toekomst te verwachten onderzoek nader belicht.

2 CAPACITEIT EN TOEPASSINGSGEBIED HUIDIGE SITUATIE

In nota dd. 1987-10-08 (1) wordt de RIKILT-situatie en -capaciteit beschreven.

Ten gevolge van de aanschaf, in december 1987, van een HP-MSD is de situatie t.a.v. de capaciteit sterk verbeterd.

Met deze HP-MSD is het echter alleen mogelijk om vluchtige componenten (eventueel na derivatiseren) te analyseren.

Na installatie eind december 1987 is, in het eerste halfjaar van 1988, de apparatuur voornamelijk gebruikt voor de analyse van anabolica en androstenon (= beregeur veroorzakende component).

In mindere mate is de apparatuur ingezet voor de analyse van thyreostatica, chlooramphenicol en een aantal andere diergeneesmiddelen zoals clenbuterol etc., één en ander in het kader van het nationaal plan hormonen en het nationaal plan "overige stoffen".

Incidenteel is de apparatuur ingezet voor de analyse van polychloorbifenylen en organochloor bestrijdingsmiddelen, terwijl in samenwerking met de Stichting voor Plantenveredeling (SVP) onderzoek verricht is naar alkaloiden in aardappelen. Naar verwachting zal dit laatste onderzoek in de komende jaren geïntensiveerd worden.

De capaciteit van de HP-MSD wordt bijna ten volle gebruikt, dat wil zeggen, de bezettingsgraad ligt gemiddeld rond de 80%.

Ten gevolge van deze hoge bezettingsgraad is het uitwerken van analysesresultaten, anders dan routinemetingen, problematisch, dit wordt veroorzaakt doordat niet tegelijkertijd acquisitie en dataverwerking plaats kan vinden.

De Finnigan 4500 wordt voornamelijk gebruikt voor de analyse van enkelvoudige monsters, voor monsters welke met chemische ionisatie geanalyseerd moeten worden en voor ontwikkelingsonderzoek naar de toepassing van vloeistofchromatografie-massaspectrometrie.

Gezien het huidige monsteraanbod en gelet op de vraagstelling met betrekking tot onderzoek in de toekomst, met name de beregeur problematiek, clenbuterol en β -agonisten in het algemeen, de controle op steroiden, thyreostatica etc. is te verwachten dat de capaciteit binnen afzienbare tijd te klein zal blijken te zijn. Immers per 1989-01-01 is het nationaal plan overige stoffen voor wat betreft diergeneesmiddelen operationeel.

In het kader van dit plan dienen methoden ontwikkeld te worden voor de confirmatie van onder anderen: tranquillizers, β -blockers, sulfonamiden, chlooramphenicol, dapson, nitrofuranen, quinoxalinen en tetracyclinen.

Verder dient een aantal bestaande methoden voor de confirmatie van anabolica in urine, spuitplaatsen en vlees nader getoetst te worden, evenals voor thyreostatica en β -agonisten.

Gezien de fysische grootheden van bovengenoemde stoffen is het ontwikkelen van een massaspectrometrische methode gebaseerd op gaschromatografische voorscheiding niet eenvoudig en dus tijdrovend en soms zelfs onmogelijk.

Een aantal van bovengenoemde stoffen zal waarschijnlijk in het geheel niet met gaschromatografie - massaspectrometrie onderzocht kunnen worden maar zal bijvoorbeeld via vloeistofchromatografie in de massaspectrometer geïntroduceerd moeten worden.

Ook is de spectrale informatie van een aantal stoffen verkregen met de huidige apparatuur onvoldoende, bijvoorbeeld ten gevolge van te sterke fragmentatie of ten gevolge van het ontbreken van fragmentatie. Daardoor is het dan ook niet mogelijk deze stoffen met de huidige massaspectrometrische apparatuur te onderzoeken, zeker niet wanneer voldaan zou moeten worden aan de EEG criteria (2).

3 REFERENTIETAAK

Bij de kwaliteitsbewaking en verlening van kwaliteitscertificaten van en voor landbouwprodukten in brede zin is een niet onaanzienlijk aantal privaatrechtelijke- en overheidsinstellingen betrokken.

Voor een aantal van deze activiteiten kan de rechtsbasis, waarop keuringen worden verricht, gevonden worden in een aantal wetten en in verordeningen van Produktschappen en van de EEG. Daarnaast kunnen op ad hoc basis keuringen worden uitgevoerd door daarvoor aangewezen instellingen.

Keuring en certificering is van groot belang voor de export naar landen die eisen stellen aan door hen te importeren landbouwprodukten; de overheid draagt, in een groot deel van de aldus vereiste keuringen structureel aan de kosten bij.

Het is vanzelfsprekend, dat daar waar door keuringen kwaliteitseisen aan produkten worden gesteld, evenzeer geldt dat kwaliteitseisen gesteld moeten worden aan daarbij gehanteerde methodieken, aan het niveau van expertise van keurende instellingen en hun organisatie. Deze noodzaak voor kwaliteitsbewaking en -beheersing krijgt verder perspectief in het licht van het streven in Nederland om een meer uniforme benadering van het kwalificeren en standaardiseren van laboratoria te verkrijgen, tot uiting komend in de activiteiten van de Raad voor Certificatie. Het grote belang van de hier beoogde laboratoriumcertificering is dat hierdoor een betere uitgangspositie wordt verkregen bij het nastreven van wederzijdse internationale erkenning van keuringsresultaten.

Het RIKILT dient in het kader van zijn taak als referentie- en ontwikkelingsinstituut voor het Ministerie van Landbouw en Visserij toe te zien op de kwaliteitscontrole bij keuringen en certificering van landbouwprodukten en actief daarin deel te nemen.

Dit betekent dat het RIKILT door middel van kwaliteitsborgingsprogramma's toetst of keuringen en certificeringen met de vereiste kwaliteit (kunnen) worden uitgevoerd waarbij toegepaste methoden regelmatig op hun doeltreffendheid worden beoordeeld.

Voor wat betreft het massaspectrometrisch onderzoek kan bij de referentietaak van het RIKILT aan een aantal door het RIKILT uit te voeren actie's gedacht worden: toezicht houden op het gebruik van de door het RIKILT ontwikkelde referentiemethoden, beschikbaar stellen en testen van materialen (standaarden), beschikbaar stellen en testen van "referentie"monsters en het analyseren van opvraagmonsters.

Voor de invulling van de referentietaak inzake deze wordt verwezen naar het Kwaliteitsborgingsprogramma Keuringen en Toezicht van het RIKILT (nota Kwal. B1 dd. 1987-02-18).

Een zeer duidelijk voorbeeld is de referentietaak met betrekking tot residucontrole in vers vlees (EEG richtlijn 86/469) waarvoor het RIKILT naast het RIVM aangewezen is als referentie instituut. Vanaf 1988-01-01 wordt deze richtlijn uitgevoerd en wel in eerste instantie voor een gedefinieerd aantal verbindingen in een aantal matrices.

Het aantal verbindingen waarop gecontroleerd moet worden, zal uitgebreid worden. Hetzelfde geldt voor het aantal te onderzoeken matrices. Dit betekent dat referentiemethoden ontwikkeld en operationeel gemaakt dienen te worden. De MS-analyse zal hier (ook internationaal) een belangrijke rol spelen.

Om deze taak goed te kunnen uitvoeren dient het RIKILT dan ook te beschikken over apparatuur welke tenminste gelijkwaardig is aan de apparatuur waarover andere referentie-instituten zowel nationaal (o.a. RIVM) als internationaal kunnen beschikken.

4 MASSASPECTROMETRISCHE TECHNIEKEN

Op het gebied van de massaspectrometrie is in het verleden een groot aantal technieken ontwikkeld c.q. verbeterd (3-11).

In grote lijnen kan gesteld worden dat bij massaspectrometrie vijf hoofdzaken te onderscheiden zijn, namelijk:

- 1 Monster-introductie
- 2 Ionisatie
- 3 Ionscheiding
- 4 Detectie
- 5 Dataverwerking

Hieronder zullen in het kort enkele theoretische achtergronden met betrekking tot voornamelijk bovengenoemde punten 1, 2 en 3 besproken worden.

Een beschouwing van de theoretische achtergronden wordt in dit verband van belang geacht om een goed inzicht te verkrijgen in de mogelijkheden in deze voor het RIKILT.

4.1 Introductie (met voorscheiding) en ionisatie

Door de toenemende behoefte aan de analyse van polaire, niet-vluchtige en thermisch labiele componenten is er de laatste jaren, door meerdere onderzoekers, veel aandacht besteed aan het realiseren van een koppeling tussen vloeistofchromatografie en massaspectrometrie.

De koppelingsproblemen zijn erg groot. Dit wordt veroorzaakt doordat de flow van 1 ml/min uit de LC (vloeistof chromatograaf) bij verdampen een volume inneemt van ongeveer 1000 ml/min (afhankelijk van de temperatuur) waardoor vacuumproblemen ontstaan. Bij gaschromatografie-massaspectrometrie bedraagt de flow slechts één ml gas per minuut. Een van de eerste interfaces is gebaseerd op direct liquid introduction (DLI). Hierbij wordt het LC-eluens in een verwarmde pijp tot in de bron gebracht en daar verneveld met helium (CI met een oplosmiddel b.v. acetonitril).

Een nadeel van het systeem is dat het alleen geschikt is voor lage flows (orde grootte 10 µl/min.), slechts een beperkte eluenssamenstelling toepasbaar is en dat de spectra weinig structuurinformatie bevatten. Voornamelijk wordt er informatie verkregen met betrekking tot het molecuulion. Dit systeem is momenteel operationeel binnen het RIKILT. Door Finnigan is de "Moving Belt" ontwikkeld. Hierbij wordt het eluens van de HPLC op een continue bewegende belt (= snaar) gebracht.

De vloeistof wordt verwijderd door infrarood verwarming en een vacuum-sluis waarna het monster in de ionisatiekamer zeer snel verdampt wordt. Het grote voordeel van dit systeem is dat bijna iedere ionisatievorm toepasbaar is.

Het systeem is beperkt in de eluens keuze en er is vrij veel monster nodig, terwijl er ook adsorbtieproblemen kunnen voorkomen. Ook gelet op de vrij hoge aanschafprijs. Dit systeem is duur (fl. 100.000,--) en minder geschikt voor onderzoek binnen het RIKILT.

Eén van de, tegenwoordig, meest toegepaste interfaces is de thermospray (TSP). Bij thermospray wordt een nevel van fijne druppels met de te meten stof en een zoutoplossing gevormd.

Het oplosmiddel wordt gedeeltelijk verdampt waardoor geladen druppels ontstaan. Polaire verbindingen worden door dit proces geïoniseerd en voor een deel de MS-bron binnen gezogen. Met thermospray is het daardoor mogelijk 1-2 ml/min van een waterig eluens te gebruiken. Er is wel een koude val en een extra grote voorpomp noodzakelijk om het vacuum te handhaven.

De gevoeligheid bij thermospray is ongeveer gelijk aan die welke behaald wordt met gaschromatografie-massaspectrometrie dat wil zeggen in de fullscan mode 1-10 ng en in de MID-mode 100-1000 pg. Een nadeel van het gebruik van thermospray is dat er weinig fragmentatie optreedt. Er wordt voornamelijk informatie verkregen over het molecuulgewicht. Om meer structuurinformatie te verkrijgen kan een thermospray probe uitgerust worden met "Discharge ionisatie". Door de repeller spanning te verhogen kan aanzienlijk meer structuurinformatie worden verkregen. Bij VG heeft men de "discharge kathode" ingebouwd in de thermospray probe. Men noemt deze techniek "plasma spray".

Naast bovengenoemde technieken, die allen commercieel leverbaar en in de praktijk getoetst zijn, is er een aantal technieken welke nog in een ontwikkelingsstadium verkeren en slechts in een aantal universitaire laboratoria gebruikt worden. Deze technieken zijn daarom minder geschikt voor gebruik binnen het RIKILT. Het betreft hier onder andere ion spray, electrospray en MAGIC (Monodispersed Aerosol Generation Interface Combining LC and MS).

MAGIC is onlangs commercieel geïntroduceerd door onder andere HP. De andere technieken verkeren nog in het experimentele stadium en zijn derhalve minder geschikt voor gebruik binnen het RIKILT.

Naast bovengenoemde introductiemethode hebben ook veel onderzoekers zich bezig gehouden met "superkritische chromatografie". Omdat ook deze techniek nog niet rijp is voor toepassing bij monsteronderzoek en voor kleine polaire moleculen niet geschikt is, zal ook deze techniek niet verder besproken worden.

4.2 Introductie (zonder voorscheiding) en ionisatie

Eén van de eerste methoden om componenten massaspectrometrisch te onderzoeken zonder voorscheiding of na off-line voorscheiding is de vaste-stofinlaat (solid probe).

Bij deze techniek wordt de te onderzoeken stof in een cupje gebracht welke door middel van een probe, via een vacuumsluit, in de bron gebracht wordt.

Ionisatiemethoden zoals EI (electron impact), PCI (positieve chemische ionisatie) en NCI (negatieve chemische ionisatie) zijn mogelijk.

Voor deze techniek is relatief veel stof nodig en de methode kan niet kwantitatief voor onderzoek gebruikt worden.

Voor de massaspectrometrische analyse van weinig-vluchtige en sterk thermo-labele componenten kan gebruik gemaakt worden van DCI (discharge chemical ionization), FD (field desorption) en FAB (fast atom bombardment).

Bij DCI wordt het monster met de te onderzoeken component op een draad gebracht waarna de te meten component, door de draad te verwarmen, direct in het CI-plasma desorbeert.

Bij FD wordt het monster eveneens op een draad (field emitter) gebracht waarna de ionen, na ionisatie in de gasfase, worden verwijderd door een elektrisch veld.

Beide technieken leveren een extreem milde ionisatie, zodat alleen informatie wordt verkregen met betrekking tot het molecuulion.

Bij FAB wordt de te onderzoeken stof gebracht in glycerol waarbij de FAB-probe, via een vacuumsluit, in de bron is gebracht (sinds kort kan de monsterinbreng ook plaats vinden door injectie van het monster in een continue vloeistofstroom waaraan maximaal 10% glycerol is toegevoegd = "continuous flow"; koppeling met HPLC is dan mogelijk).

Ionisatie vindt plaats door een straal van neutrale atomen. Evenals bij FD, DCI wordt ook hier voornamelijk molecuulion-informatie verkregen.

Naast bovengenoemde technieken, welke commercieel verkrijgbaar zijn en in de praktijk hun waarde hebben bewezen, zijn er nog een aantal nieuwe ontwikkelingen te noemen die echter voor het RIKILT niet, althans voorlopig niet, toepasbaar zijn. Hieronder volgt een summiere opsomming:

- Atmospheric pressure ionization (API)
- Plasma desorption (PD)
- Laser desorption (LD)
- Multiphoton ionization (MPI)
- Inductively coupled plasma (ICP)
- Neutralization-reionization mass-spectrometry (NRMS).

4.3 Ionscheiding

Na ionisatie in de bron van de massaspectrometer moeten de geproduceerde ionen gescheiden worden overeenkomstig hun massa/lading-verhouding alvorens zij gedetecteerd kunnen worden.

Commercieel is een aantal typen ion analysatoren verkrijgbaar.

De twee meest gebruikte typen ion analysatoren zijn sectormachines en quadrupoolmachines (zie respectievelijk 4.3.1 en 4.3.2).

Bij tandem massaspectrometrie worden twee of meer ionanalysatoren toegepast zie 4.3.3.

4.3.1 Sectormachines

De in de bron geproduceerde ionen worden in een hoogspanningsveld van enkele kV versneld (= versnellend elektrisch veld).

Daarna treden de ionen in een magnetisch veld waarvan de veldlijnen loodrecht op de bewegingsrichting staan. Hier vindt dan, afhankelijk van de magneetveldsterkte en van de massa's van de ionen, afbuiging plaats. Dit type is de zogenaamde enkel focusserende massaspectrometer. Wanneer tussen het versnellende elektrische veld en het magneetveld een elektrische sector is geplaatst noemt men de massaspectrometer dubbel focusserend. Sectormachines worden toegepast voor de exacte massameting en voor het volgen van ionprocessen, bijvoorbeeld door opname van een Mike-spectrum (= mass analysed ion kinetic energy) of via een CID (collision induced dissociation) - Mike-spectrum. Wel is dan een omgekeerde geometrie noodzakelijk.

Een enkel focusserende massaspectrometer heeft een oplossend vermogen ($=M/\Delta M$) van ongeveer 10.000. Een dubbelfocusserende massaspectrometer kan een oplossend vermogen halen van 150.000 (Nier-Johnson geometrie). Opgemerkt dient te worden dat voor een éénduidige toekenning van de brutostructuur van een component op grond van de exacte massabepaling van het molecuulgewicht soms een oplossend vermogen nodig is van 150.000. Een toename van het oplossend vermogen gaat gepaard met een afnemende gevoeligheid.

Ook kan men met sectormachines een groot massabereik halen, hetgeen van belang is voor de analyse van hoog-moleculaire verbindingen. Een nadeel van sectormachines met een hoog oplossend vermogen is de hoge aanschafprijs, de gecompliceerdheid en een relatief lage output.

4.3.2 Quadrupool machines

Het quadrupool massafilter bestaat uit vier parallelle staven. Op een stel tegen over elkaar geplaatste staven wordt een bepaalde frequentie (RF) en gelijkspanning gezet (DC). Het andere paar staven is 180° uit fase. Slechts ionen met een bepaalde massa/lading verhouding kunnen de quadrupool passeren en gedetecteerd worden. Een massaspectrum wordt verkregen door het voltage te veranderen van een lage naar een hoge waarde bij een constante RF/DC-verhouding.

De massaschaal is lineair met de tijd. Een aantal voordelen van quadrupool machines ten opzichte van sector instrumenten is:

- a) lagere aanschafprijs
- b) gemakkelijker te bedienen
- c) hoge scansnelheid dus zeer goed geschikt voor koppeling met capillaire gaschromatografie
- d) meten van discrete massa's is mogelijk, wat resulteert in een hoge gevoeligheid.

Quadrupool machines zijn beperkt in resolutie. Slechts nominale massa's worden gemeten en informatie met betrekking tot de brutostructuur voor het molecuul wordt dan ook niet éénduidig verkregen.

Door Finnigan is een methode ontwikkeld om met quadrupoolmachines toch exactere massametingen uit te voeren. Dit doet men door het systeem zeer zorgvuldig te tunen zodat een resolutie verkregen wordt van 3000 voor bepaalde massa's van het calibratiegas.

Daar de exacte massa's van het fragmentation en van het calibratiegas bekend zijn kan via software-matige interpolatie de exacte massa van de te onderzoeken component berekend worden. Het oplossend vermogen is echter niet zo hoog als van een dubbelfocuserende sectormachine en de methode is niet geschikt voor éénduidige identificatie. Wel wordt additionele informatie verkregen waarmee de identificatie vergemakkelijkt wordt.

4.3.3 Tandem massaspectrometers

Tandem massaspectrometer systemen zijn combinaties van twee of meer van bovengenoemde analysatoren waardoor de analytische mogelijkheden sterk vergroot worden.

De eerste analysator wordt als filter gebruikt terwijl de tweede analysator de door botsingen ontstane dochterionen (= CID spectrum) scheidt. Snelle screenings zouden mogelijk zijn, zelfs zonder chromatografische voorscheiding. Bij LC-MS is het gebruik van tandem massaspectrometrie zeer aan te bevelen daar er bij gebruik van één analysator weinig structuur informatie wordt verkregen (meestal alleen van het molecuulion).

In onderstaand schema (figuur 1) is een aantal variabelen in tandem massaspectrometrie uitgezet.

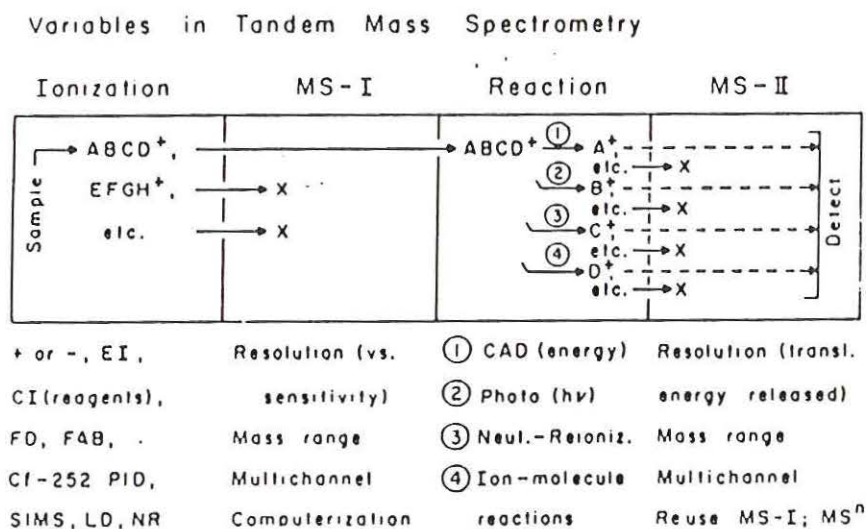


Fig 1. Analytical flexibility using multiple mass analyzers.

Men spreekt van tandem MS-MS wanneer de gebruikte analysatoren van hetzelfde type zijn b.v. alleen quadrupolen. Wanneer één of twee analysatoren van een afwijkend type zijn spreekt men van Hybride-MS-MS.

In figuur 2 is een aantal mogelijke configuraties schematisch weergegeven.

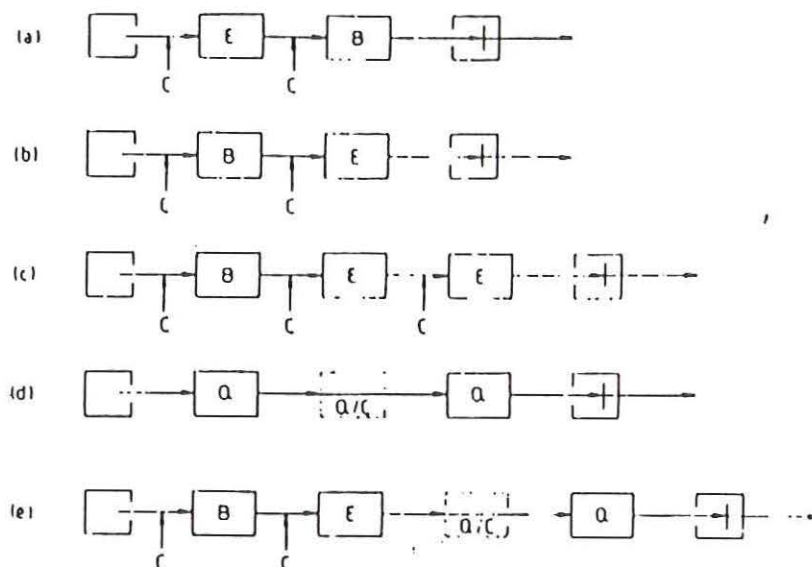


Fig 2 Schematic summary of some different tandem analyzers currently in use (B = magnetic field, E = electrostatic field, Q = rf quadrupole field, C = position of collision cell, Q/C = rf-only quadrupole containing collision gas).

De toepassing van MS-MS, onafhankelijk van de wijze van voorscheiding, kan globaal als volgt beschreven worden.

a) Meten van dochterionen

Dit is vooral van belang daar waar behoefte is om het fragmentatie patroon van een component te achterhalen. Immers, nagegaan kan worden welke fragmentionen behoren bij een bepaald fragmention, waardoor de interpretatie van het totale spectrum vereenvoudigd wordt. De toepassing bij het RIKILT zal met name liggen op het gebied van identificatie van metaboliëten, te denken valt hierbij aan b.v. steroïden en diergeneesmiddelen.

Ook kunnen conclusies getrokken worden of de voor confirmatie doeleinden geselecteerde ionen correct zijn en niet afkomstig zijn van b.v. thermische ontleding.

Eén van de belangrijkste toepassingen zal de combinatie LC-MS-MS zijn waarbij dochterionen gemeten worden. Immers bij LC-MS wordt meestal slechts informatie verkregen over het molecuulgewicht. Door nu dochterionen te meten van dit molecuulion wordt voldoende structuurinformatie verkregen voor zowel identificatie als confirmatie doeleinden.

b) Meten van parentionen

Bij deze methodiek wordt eigenlijk het omgekeerde gedaan als bij het meten van dochterionen. Hier kan nagegaan worden waar een bepaald fragmention zijn oorsprong vindt, is het een artefact of is het fragmention afkomstig uit een bepaald, structuur-gerelateerd ion.

Combinatie van a en b is van groot belang om fragmentatieprocessen te bestuderen.

c Neutral Loss

Bij deze methodiek worden de twee analysatoren b.v. Q1 en Q3 op een constant verschil gezet, zodat slechts die componenten die dat verschil in hun fragmentatie hebben gemeten worden. Te denken valt hierbij b.v. aan het screenen van matrices op aanwezigheid van b.v. chloor 35.

Op residu-niveau kan dan aangegeven worden of een monster gecontamineerd is met b.v. bestrijdingsmiddelen.

Toepassing binnen het RIKILT zal vooral liggen in het snel screenen, zonder veel voorzuivering, van monsters op bepaalde groepen, welke een kenmerkende structuur hebben. Te denken valt b.v. aan steroïden, dopingsmiddelen zoals amfetaminen, pijnstillers en diergeneesmiddelen sulfa's enz.

In het algemeen kan gesteld worden dat met MS-MS meer massaspectrometrisch informatie verkregen kan worden en dat ten gevolge van de selectiviteit volstaan kan worden met een minder uitvoerige opwerking. Naast bovengenoemde twee typen analysatoren zijn er nog twee typen welke berusten op het principe van "ion storage".

4.3.4 Fourier transform-massaspectrometrie

Bij dit type machine vindt ionisatie van de moleculen plaats door een gepulseerde elektronenstroom; de gevormde ionen worden vastgehouden (trapped) in een ion-analysator cel. De ionen in de analysatorcel worden gedwongen te bewegen in een cirkelvormige baan door een sterk, homogeen magnetisch veld (12).

De frequentie van de cirkelvormige beweging, w , is gelijk aan QB/M waarin w de cyclotron frequentie is, B de magnetische veldsterkte en Q/M is de lading/massa-verhouding.

Bij een FT-MS instrument wordt de cyclotron frequentie van de ionen gemeten waarna Q/M bekend is en dus ook de massa M .

De ionenbron bij een FT-MS machine is, in tegenstelling tot sector en quadrupool machines, relatief eenvoudig. Met FT-MS apparatuur kan een zeer hoog oplossend vermogen bereikt worden, met name voor het lage massagebied.

Het toepassingsgebied van dergelijke apparatuur ligt voornamelijk in:

- a. lage druk chemische ionisatie
- b. fundamenteel onderzoek naar ion-molecuul reactie's
- c. bepalen van exacte massa

Gezien de tijd welke de ionen vastgehouden worden in de cel (tot enkele seconden), is het systeem minder geschikt voor de analyse van complexe mengsels.

Alhoewel een FT-MS systeem qua principe zeer krachtig is, kan gesteld worden dat de ontwikkeling nog niet uitgekristalliseerd is. In het huidige stadium is FT-MS minder geschikt voor een instituut als het RIKILT, maar past het beter binnen het fundamenteel onderzoek.

Een aantal aspecten welke de toepasbaarheid beperken zijn:

- LC-interface niet beschikbaar
- GC-koppeling zeer beperkt
- gevoeligheid GC toepassing niet voldoende (> 10 ng per component)
- geen gevoeligheidswinst door toepassing selectieve ion monitoring
- systeem is gevoeliger voor achtergrond en contaminatie
- dynamisch bereik is zeer klein

4.3.5 Ion Trap

Bij de Ion Trap (ITD 800 van Finnigan) worden de te onderzoeken stoffen gaschromatografisch gescheiden en aansluitend geïoniseerd in de ionen opslagruimte (ionstorage region). De gevormde ionen worden enige tijd (ms) vastgehouden.

Door op de ringelektroden een zeker elektrisch veld aan te leggen worden de ionen versneld en gedetecteerd door de fotomultiplicator.

Het systeem is zeer recentelijk door het RIKILT getest in verband met de analyse van hormonen. De resultaten zijn vastgelegd in RIKILT-rapport 88.43 (13). Het systeem is zeer gevoelig. Bruikbare spectra kunnen verkregen worden vanaf 100-200 pg per component. Gezien de slechte reproduceerbaarheid is de techniek echter niet geschikt voor confirmatie doeleinden.

4.3.6 Time Of Flight Massaspectrometer (TOF)

Bij dit type apparatuur worden de ionen met verschillende massa's, na ionisatie met b.v. EI of CI, gescheiden door gebruik te maken van hun verschillende snelheden die ze verkregen hebben ten gevolge van een potentiaal verschil (V).

Daar $zV = 1/2 mv^2$ (waarin v de snelheid van het betreffende ion is, z de lading en m de massa) is de snelheid (v) van het ion gelijk aan $(2zV/m)^{1/2}$.

De snelheid van een ion is omgekeerd evenredig met de massa/lading verhouding. Dus wanneer een verzameling ionen met verschillende massa's versneld wordt en vervolgens een veldvrije ruimte passeert zullen de verschillende ionen op verschillende tijdstippen gedetecteerd worden.

Het oplossend vermogen van TOF-machines is laag (nominaal) maar het massabereik is bijna ongelimiteerd, waardoor zeer hoog moleculaire verbindingen geanalyseerd kunnen worden.

TOF machines zijn zeer geschikt om de nominale massa vast te stellen van grotere moleculen zoals peptiden, proteïnen en in het algemeen biomoleculen. Voor zover bekend kunnen TOF machines nog niet routinematig worden ingezet, hetgeen gezien de toepassingen waarschijnlijk ook niet noodzakelijk is. Het aantal machines dat, wereldwijd, operationeel is is zeer beperkt.

4.3.7 Massaspectrometrie-systeem voor de bepaling van metalen

Naast de bepaling van organische verbindingen zijn de laatste jaren ook massaspectrometrische technieken ter beschikking gekomen voor de bepaling van metalen (o.a. ICP-MS). Verwacht mag worden dat de ICP-MS op korte termijn een belangrijke rol gaat spelen bij de ontwikkeling van referentiemethoden voor (zware) metalen. Omdat ook isotopen bepaald kunnen worden, kan de detectietechniek ook een rol gaan spelen in het onderzoek van radio-actieve stoffen. De massaspectrometrische bepaling van organische componenten en metalen is niet te combineren in één detectiesysteem daar voor beide technieken een aparte ionisatiebron nodig is. Om de ontwikkelings- en referentietaken op het gebied van de anorganische contaminanten ook in de toekomst naar behoren te kunnen blijven vervullen, zal aanschaf van een ICP/MS-systeem in de komende jaren noodzakelijk zijn. In de komende tijd zal een afzonderlijk rapport over dit onderwerp worden opgesteld.

5 TANDEM MASSASPECTROMETRISCHE APPLICATIES UIT DE LITERATUUR

Alhoewel in de literatuur in de afgelopen jaren een ware stortvloed van applicaties is verschenen, zal hier een klein aantal voorbeelden worden gegeven, welke voor het RIKILT van belang zijn. In gedachte moet worden gehouden dat de vermelde applicaties ook van toepassing kunnen zijn op analoge verbindingen (de hieronder vermelde applicaties zijn hier niet uitvoerig beschreven maar liggen ter inzage op de afdeling OCON).

Met name door diverse fabrikanten is een groot aantal applicaties verzameld cq. uitgevoerd en vastgelegd in Application Notes.

Een groot aantal applicaties betreft het onderzoek naar de volgende groepen van verbindingen:

- | | |
|-----------------------|------------------------------------|
| - antibiotica | o.a. chlooramphenicol |
| - analgetica | o.a. buprofen, phenylbutazon |
| - drugs | o.a. furosemide, chloordiazepoxide |
| - milieucontaminanten | o.a. propoxur, methamyl |
| - mycotoxinen | o.a. aflatoxinen, deoxynivalenol |

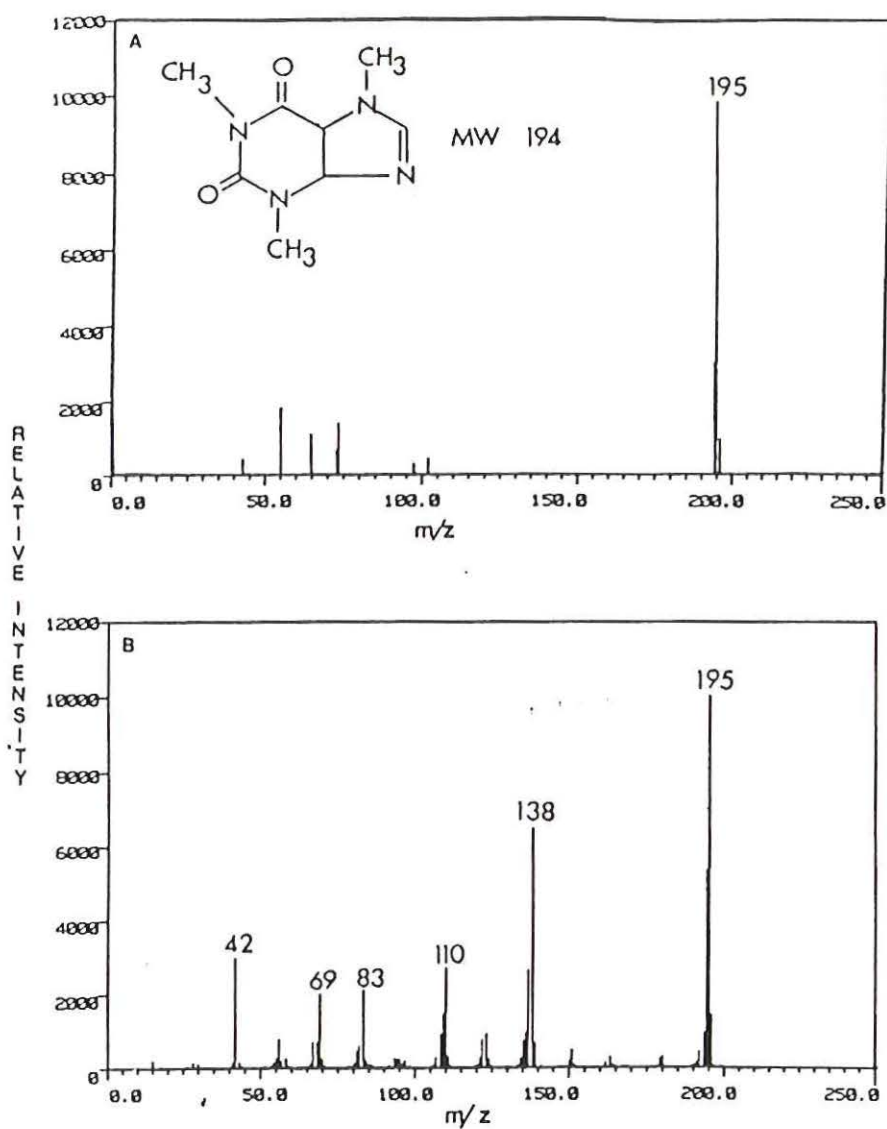
- steroïden o.a. bethamethason, progesteron
- suikers o.a. maltose, sucrose
- vitamines o.a. ascorbinezuur, tocopherol
- pesticiden/herbiciden o.a. triazinen, captan.

Alhoewel in het algemeen weinig gegevens verstrekt zijn m.b.t. de absolute hoeveelheid geanalyseerde component blijkt uit de verkregen informatie dat Thermospray MS inzetbaar is op een breed terrein van onderzoek, zowel op residu-niveau als op additief-niveau.

Met name moeilijke componenten zoals aflatoxine, betamethason, furosemide, welke met gaschromatografie, blijkens ervaring binnen het RIKILT, zeer moeilijk te analyseren zijn, lijken met Thermospray goed bepaalbaar te zijn.

In blz. 21 t/m 26 is uit de veelvoud aan applicaties een kleine selectie gemaakt van applicaties welke voor het RIKILT van belang zijn (14). De voor het RIKILT relevante onderzoeksvragen op het gebied van de massaspectrometrie konden tot nu toe in het algemeen afdoende beantwoord worden met behulp van een laag-oplossend vermogen systeem. Dit zal ook gelden voor de nabije toekomst indien de aanschaf van een MS-MS-systeem tot stand komt en koppeling met vloeistofchromatografie wordt gerealiseerd. In een beperkt aantal gevallen zal hoog-oplossend vermogen MS of hybride MS-MS nodig zijn voor exacte massabepalingen in relatie tot confirmatie-onderzoek. Het kan hierbij bijvoorbeeld gaan om structuuropheldering van onbekende residuen van anabolica/diergeneesmiddelen en om identificatie van stoffen bij metabolisme-onderzoek. Ook voor de bepaling van dioxinen heeft hoog-oplossend vermogen de voorkeur, omdat bij laag-oplossend vermogen de interferentie door componenten met hetzelfde nominale molecuulgewicht, een adequate bepaling kan belemmeren. Te verwachten is dat de behoefte aan hoog-oplossend vermogen MS sterk zal toenemen, met name door de snelle ontwikkelingen op het gebied van de biotechnologie. Er is een toenemende vraag te verwachten ten aanzien van de massaspectrometrische analyse van biomoleculen zoals peptiden, vitamines en proteïnen. Deze biomoleculen zijn met quadrupool machines (laag-oplossend vermogen) niet goed te analyseren. Naast een ontoereikend oplossend vermogen is dit een gevolg van het te beperkte massabereik.

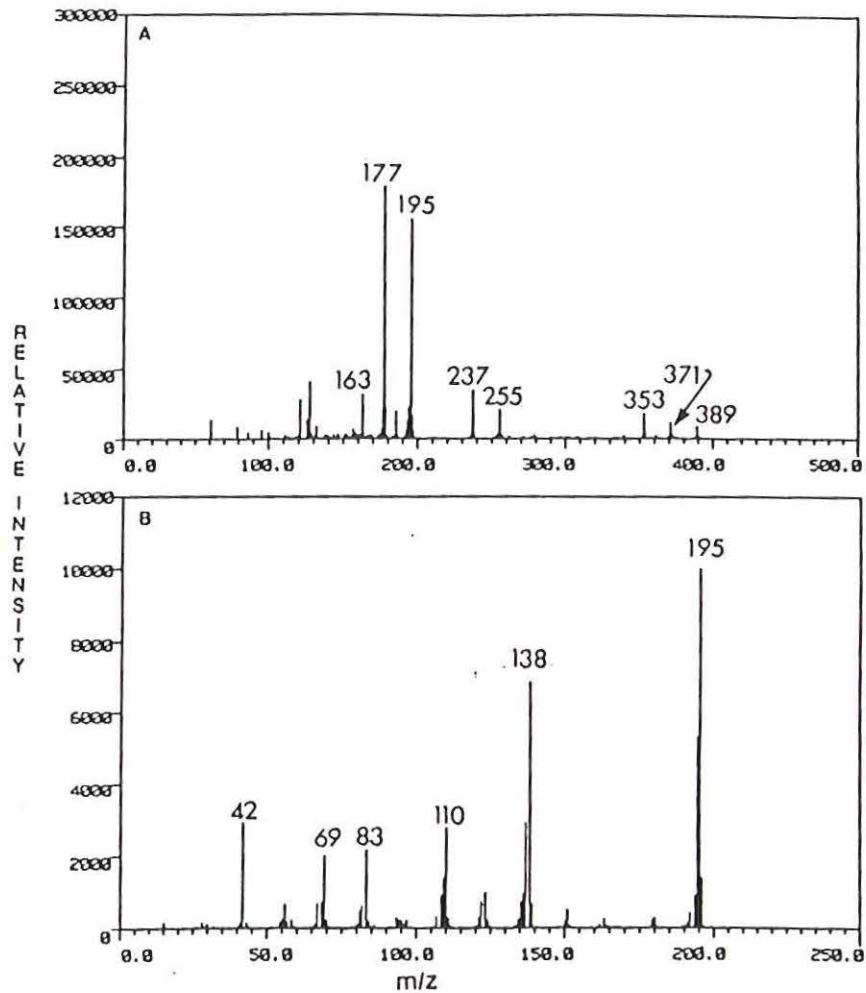
Analyse van caffeine (ref. 14)



A. Full scan analyse van caffeine

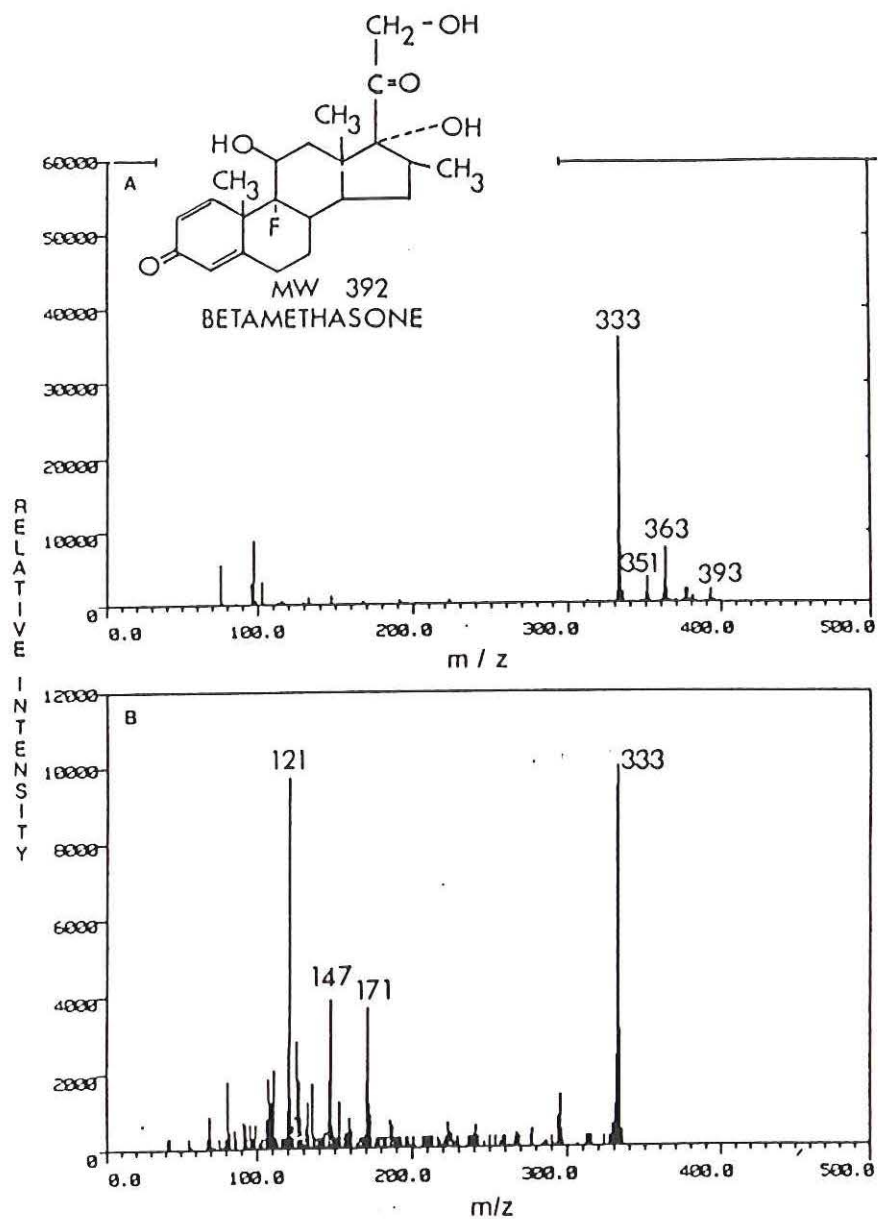
B. CID mass spectrum van caffeine (dochterionen $(m+1)^+$ ion = 195)

Toepassing van applicatie 1: bepaling van cafeïne in complexe matrices (ref. 14)



- A. Full scan analyse van een extract van de urine van een mens die rookt en veel koffie drinkt
- B. CID spectrum van hetzelfde extract waarbij dochterionen gemeten zijn van m/z 195

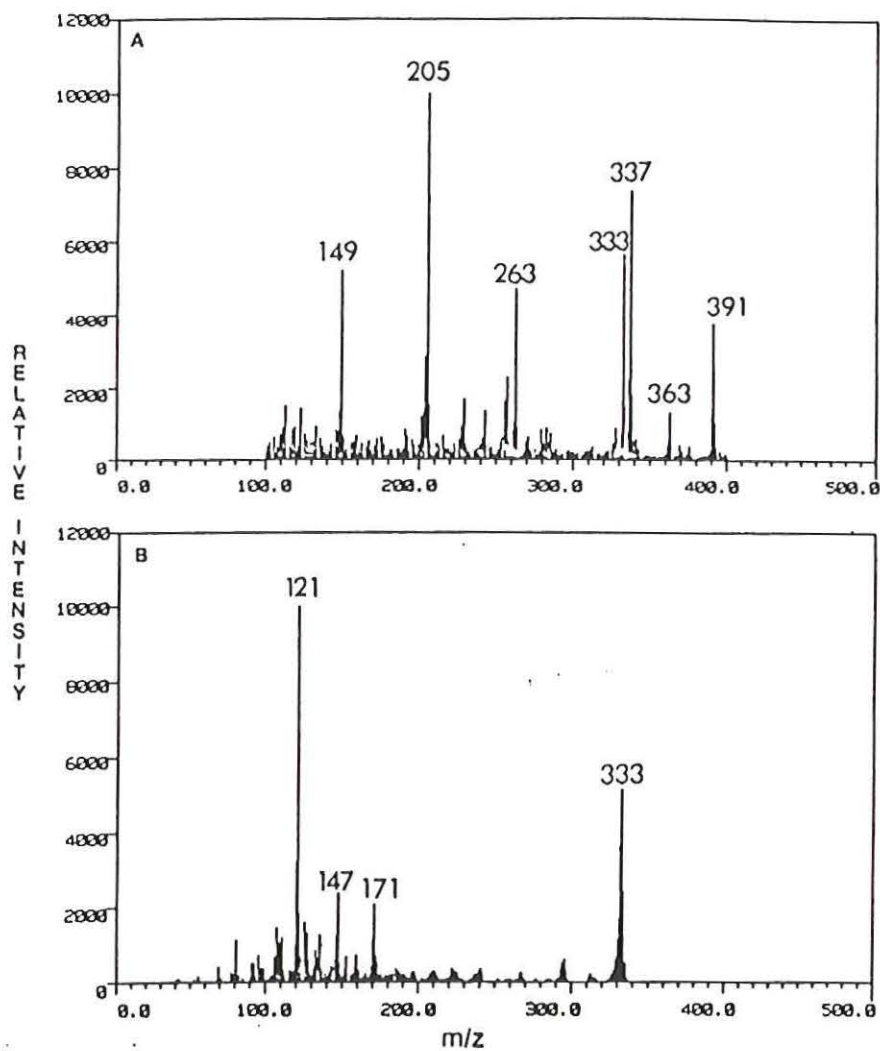
Analyse van betamethasone (ref. 14)



A. Full scan analyse van standaard bethamethasone

B. CID massa spectrum van betamethasone waarbij dochterionen gemeten zijn van m/z 333

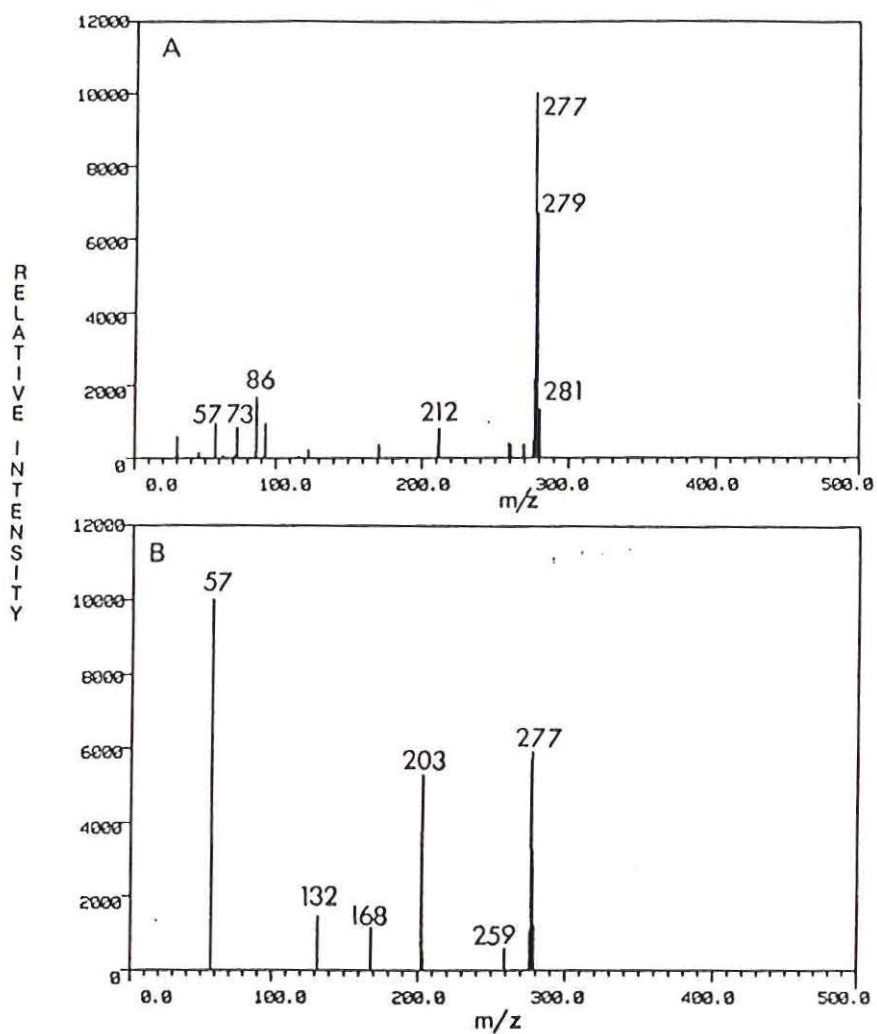
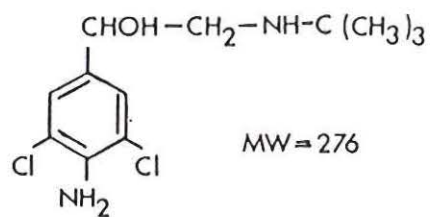
Toepassing van applicatie 3: bepaling van betamethasone in paarde-
urine (ref. 14)



A. Full scan analyse van paardeurine

B. CID massa spectrum van hetzelfde monster waarbij dochterionen geme-
ten zijn van m/z 333

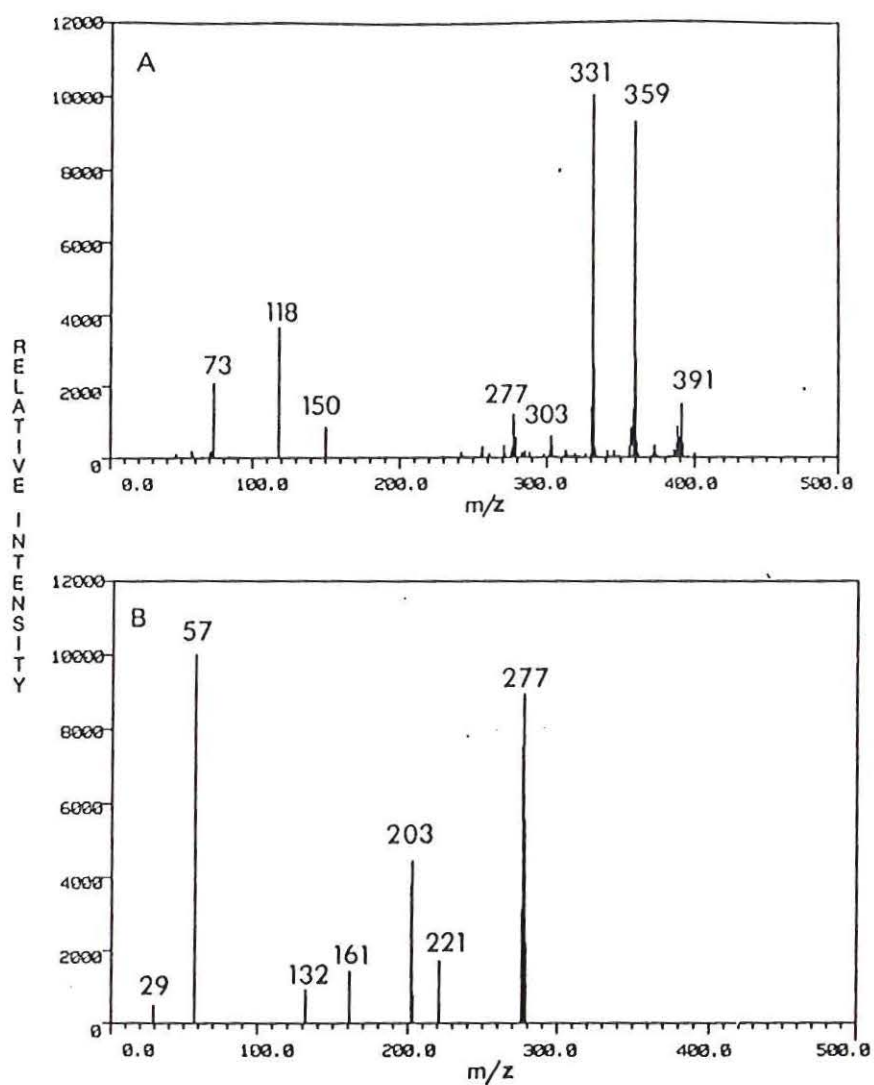
Analyse van clenbuterol (ref. 14)



A. Full scan analyse van standaard clenbuterol

B. CID massa spectrum van clenbuterol waarbij dochterionen gemeten zijn van m/z 277

Toepassing van applicatie 5: bepaling van clenbuterol (ref. 14)



A. Full scan analyse van een paardeurine extract

B. CID mass spectrum van hetzelfde extract waarbij dochterionen gemeten zijn van m/z 277

6 SELECTIECRITERIA EN UITGANGSPUNTEN VOOR AANSCHAF MASSASPECTROMETER

Om, uit de bovengenoemde veelheid van massaspectrometrische technieken en combinaties daarvan, voor het RIKILT de juiste configuratie te kunnen kiezen is een aantal uitgangspunten gedefinieerd.

a) Zowel gaschromatografische als vloeistofchromatografische introductie van de monsters moet mogelijk zijn, zonder dat dit gepaard gaat met veel sleutelwerk of verlies aan mogelijkheden.

b) Thermolabiele en polaire verbindingen welke off-line gezuiverd zijn moeten met verschillende ionisatie-technieken onderzocht kunnen worden.

c) Systeem moet geschikt zijn voor zowel fundamenteel onderzoek (ionprocessen en fragmentatie) ten behoeve van het identificeren van onbekende verbindingen b.v. metabolisme studies, als voor het onderzoek van series monsters (confirmaties) en moet daartoe voldoende structuurinformatie opleveren.

d) Systeem moet bij voorkeur relatief gemakkelijk te bedienen zijn.

e) Systeem moet volledig ontwikkeld zijn en zo mogelijk getoetst op bedrijfszekerheid bij andere laboratoria.

f) Serviceverlening aan het systeem moet gegarandeerd zijn.

7 ONDERZOEK MS-MS-SYSTEMEN

Op grond van de onder punt 6 genoemde overwegingen bestaat een voorkeur voor de volgende configuratie:

- Tandem massaspectrometer
- Gaschromatografische introductie (autosampler)
- Vloeistof chromatografische introductie (autosampler)
- Thermospray
- Solid probe
- DCI, FD en FAB

Op grond van bedieningsgemak, flexibiliteit en ook op grond van onderhoudswerkzaamheden is gekozen voor een triple stage quadrupool (QQQ) machine. Een dergelijke keuze sluit wel uit dat exacte massameting uitgevoerd kan worden evenals het meten van hoog moleculaire verbindingen.

7.1 Onderzoeksopzet

Bovengenoemde systeemconfiguratie wordt in Nederland geleverd door een aantal fabrikanten.

Van deze fabrikanten zijn er drie, met een redelijk goede vertegenwoordiging in Nederland, benaderd voor inventariserend onderzoek nl.:

- Finnigan
- VG - Tritech
- Nermag

Aan bovengenoemde leveranciers zijn drie monsters overhandigd met het verzoek deze te analyseren met hun apparatuur. De set bestond uit de volgende standaarden:

- Hexachloorbenzeen (bestrijdingsmiddel), onderzoek was aangevraagd met GC-MS zowel EI, NCI, PCI, alsmede GC-MS-MS
- Tylosine (anti-bacterieel), onderzoek was aangevraagd met LC-MS met thermospray interface, LC-MS-MS en FAB
- Ipronidazole (anti-microbiëel), onderzoek was aangevraagd met LC-MS (thermospray), LC-MS-MS, DCI

7.2 Onderzoeksresultaten

7.2.1 VG (zie bijlage 1)

Door de fa. VG is alleen het monster hexachloorbenzeen met behulp van de VG TS-250 geanalyseerd met de ionisatietechnieken EI, PCI en NCI, deze laatste twee met methaan als reactiegas.

Informatie met betrekking tot injectievolumina ontbraken en waren ook niet meer te achterhalen, zodat met de verkregen data niet verder kan worden gerekend. Hierdoor kan dus geen uitspraak worden gedaan over gevoeligheid en verschil tussen ionisatie met EI en CI.

Door VG is toegezegd dat onderzoek met verschillende, door ons gevraagde technieken, alsnog uitgevoerd zou worden, echter na verloop van tijd bleek dat de monsters spoorloos waren.

Op verzoek van VG is door het RIKILT nogmaals een set monsters ingezonden. Ook van deze tweede set werden geen resultaten ontvangen.

7.2.2 Nermag (zie bijlage 2)

De fa. Nermag heeft het onderzoek laten uitvoeren door de fa. TEXMS (USA), waarbij gebruik is gemaakt van een Nermag R3010 Triple Quadrupool Systeem voorzien van een Nermag Thermospray. Onderzocht zijn de standaarden tylosine en ipronidazol. Conform de verwachting werd van ipronidazol met behulp van Thermospray-MS een spectrum verkregen dat slechts informatie bevat over het geprotoneerde molecuul $(M + 1)^+ = 170$ (bijlage 2 fig. 2). Dit komt overeen met de resultaten verkregen binnen het RIKILT met DLI-MS. Opvallend is dat men 100 ng moest inspuiten om een redelijk signaal te krijgen (bijlage 2 fig. 1).

Aansluitend is het monster geanalyseerd, onder dezelfde condities, echter nu met MS-MS, waarbij gekeken is welke dochterionen er gevormd worden uitgaande van het geprotoneerde molecuul $(M + 1)^+ = 170$. In bijlage 2, pagina 3 zijn deze dochterionen alsmede hun mogelijke elementaire samenstelling gegeven (zie voor RIC (Reconstructed Ion Current) pagina 7 en voor het MS-MS spectrum pagina 6).

Uit dit voorbeeld blijkt duidelijk het voordeel dat LC-MS-MS biedt. Immers ipronidazol, een polaire verbinding, is niet of nauwelijks met GC-MS te analyseren.

Dankzij MS-MS is niet alleen het molecuulgewicht bekend, maar ook wordt via het ionproces inzicht gekregen in de elementaire samenstelling van de dochterionen.

De gegevens kunnen dus voor zowel identificatie doeleinden als voor confirmatie doeleinden gebruikt worden.

De analyse met behulp van LC-MS gaat goed. Het verkregen spectrum biedt echter geen informatie anders dan molecuulgewicht. Met een sectormassaspectrometer (hoog oplossend vermogen) zou het exacte molecuulgewicht en dus de brutostructuur gemeten cq. berekend kunnen

worden, waardoor het aantal mogelijke verbindingen sterk zou worden gereduceerd. Een éénduidige uitspraak zou echter alleen op grond van dit massaspectrometrische gegeven niet voldoende zijn.

Jammer is dat de Fa. TEXMS niet heeft laten zien wat de invloed is van de condities van het reactiegas in de botsingskamer, met name de gasdruk en de botsingsenergie, op de fragmentatie en daarmee ook op de gevoeligheid.

Gezien de signaal-ruis verhouding moet het mogelijk zijn om met de Nermag machine, onder gelijke condities, goede resultaten te behalen met ca. 10 ng ipronidazol. Dit is ruim voldoende om in eieren residuen te confirmeren.

Na dit onderzoek heeft men enige analyses uitgevoerd met het antibioticum Tylosine (thermolabiele verbinding). Deze verbinding is onmogelijk te bepalen met GC-MS.

500 ng Tylosine is geanalyseerd met Thermospray-MS (TSP-MS). In het spectrum (zie bijlage 2 pagina 9) is naast het molecuulion een groot aantal fragmentionen aanwezig door verlies van suikergroepen en water.

Dit spectrum biedt op zichzelf al voldoende informatie voor zowel identificatie als confirmatie doeleinden.

Aansluitend is een TSP-MS-MS analyse uitgevoerd. Dit spectrum (bijlage 2 pagina 10) laat zien welke fragmenten uit het molecuulion ontstaan. Het verschil ten opzichte van bijlage 2, pag. 9 is, dat nu fragmenten ontstaan onder thermische invloeden, ontbreken.

7.2.3 Finnigan (zie bijlage 3)

Door Finnigan zijn alle drie de standaarden geanalyseerd conform ons wensenpakket en wel met de TSQ 70.

In eerste instantie heeft men 10 ng hexachloorbenzeen geanalyseerd met EI ionisatie. In bijlage 3.1 en 3.2 is respectievelijk het RIC en het spectrum gegeven. Hieruit blijkt dat de gevoeligheid goed is. Daarna is wederom 10 ng hexachloorbenzeen geanalyseerd waarbij met de derde quadropool gekeken is naar dochterionen van massa 282 en wel bij verschillende botsingsenergie (zie bijlage 3.3 t/m 3.10).

Uit dit experiment is de invloed van de botsingsenergie op de chloor-afsplitsing duidelijk te zien.

Dit zelfde is gedaan uitgaande van m/z 284. Waarbij wij niet alleen de afsplitsing van steeds één chloor maar ook de isotoopverhouding zien (b.v. bijlage 3.11). Ook is dit gedaan uitgaande van m/z 286 en m/z 288, waarbij steeds de afsplitsing van chloor alsmede de bijbehorende isotoopverhouding te zien is. Dergelijke experimenten kunnen met de TSQ 70 in één run uitgevoerd worden en leveren voldoende informatie om te komen tot een juiste identificatie.

Na bovengenoemde experimenten met hexachloorbenzeen in de EI mode waaruit de gevoeligheid van de TSQ alsmede de geweldige informatiestroom, welke zeer gemakkelijk verkregen wordt, blijkt, is een aantal experimenten uitgevoerd met hexachloorbenzeen met negatieve chemische ionisatie.

In eerste instantie heeft men dezelfde experimenten uitgevoerd als in de EI-mode. Deze zijn in dit verslag niet opgenomen omdat m.u.v. het verschil in gevoeligheid tussen EI en CI er verder niet meer relevante informatie dan met EI wordt verkregen. Tot slot heeft men een analyse uitgevoerd volgens het principe van neutral loss.

Men stelt hiertoe de quadropool Q1/Q3 in op een verschil van m/z 35. Bij deze instelling worden dan alleen componenten gemeten welke een fragmentatie vertonen met een verlies van m/z 35 (chloor).

Op deze wijze is het mogelijk zeer gevoelig en specifiek in één run alle componenten welke één of meerdere chlooratomen bevatten, te detecteren.

Ter illustratie is in bijlage 3.12 een voorbeeld gegeven waarbij 1 pg hexachloorbenzeen geanalyseerd wordt (bijlage 3.12 toont de achtergrond).

Met behulp van Thermospray is de standaard ipronidazol geanalyseerd. In bijlage 3.13 is het RIC plaatje gegeven alsmede het signaal van het geprotoneerde molecuulion $(M + 1)^+ = 170$.

Bijlage 3.14 toont het bijbehorende spectrum. Ook hier wordt weer alleen informatie met betrekking tot het molecuulgewicht verkregen. Om wat meer fragmentatie te verkrijgen is de standaard geanalyseerd met twee verschillende repeller-instellingen. In bijlage 3.15 en 3.16 zijn twee spectra gegeven. Duidelijk is dat t.g.v. het inschakelen van de repeller er meer fragmentatie ontstaat. Dit gaat echter wel ten koste van de gevoeligheid (in dit geval een factor 200).

Ook is de standaard ipronidazol geanalyseerd met TSP-MS-MS, waarbij dochterionen van $(M + 1)^+ = 170$ gemeten zijn (bijlage 3.17). Nu wordt voldoende structuurinformatie gekregen, terwijl er een geringere afname van de gevoeligheid is t.o.v. het voorgaande experiment (nu factor 25). Ook de standaard Tylosine is met Thermospray geanalyseerd. In bijlage 3.18 is het spectrum gegeven en in bijlage 3.19 het spectrum van de dochterionen van $M^+ = 196$.

Door combinatie van beide gegevens kan een aantal relevante gegevens zoals aantal suikergroepen en hydroxylgroepen achterhaald worden, waarvoor identificatie en confirmatie mogelijk wordt gemaakt.

Ook is een FAB-spectrum van Tylosine opgenomen (zie bijlage 3.20). Deze laatste analyse biedt, net als bij het Nermag Systeem voldoende interessante informatie.

7.2.4 Voorlopige conclusies

Uit het door de drie fabrikanten uitgevoerde onderzoek kan geconcludeerd worden dat de Nermag machine en de Finnigan TSQ 70 ongeveer gelijkwaardig zijn. De resultaten zijn voor beide systemen als voldoende aan te merken.

Het door VG uitgevoerde onderzoek is onvolledig en derhalve kan er over de toepassingsmogelijkheden van de VG apparatuur geen uitspraak gedaan worden.

Besloten werd om door Finnigan een aanvullend onderzoek uit te laten voeren gericht op de bepaling van clenbuterol (zie 7.3).

7.3 Aanvullend onderzoek Finnigan TSQ-70

Een voor het RIKILT momenteel zeer belangrijke onderzoeksvraag betreft de bepaling van clenbuterol. Door Henion en Maylin (14) is een methode beschreven voor de bepaling van clenbuterol in paardeurine met behulp van MS-MS. Clenbuterol kon eenduidig worden aangetoond door de dochterionen te meten van het molecuulion $M^+ = 277$ (blz. 25-26). Helaas werd geen informatie verschaft over de gevoeligheid van de methode.

Om inzicht te krijgen in de gevoeligheid, die bereikt kan worden bij de MS-MS bepaling van clenbuterol, werd Finnigan verzocht nader onderzoek uit te voeren.

In eerste instantie werd een standaard onderzocht met behulp van de TSQ-70, waarbij clenbuterol werd geïntroduceerd via een solid probe. Na chemische ionisatie werd van het molecuulion een dochterspectrum opgenomen. Na optimaliseren van het systeem kon nog een goed dochterspectrum worden verkregen van 10 pg. Bij "routinematige" toepassing zal ca. 100 pg gebruikt moeten worden. Dit laatste betekent nog altijd een verlaging van de detectiegrens met een factor 10 à 50 ten opzichte van de momenteel toegepaste methode.

Tevens werd onderzoek uitgevoerd in, door het RIKILT opgewerkte, blanco monsters lever en urine. Na opwerking werden deze monsters gespiked met 1 ppb clenbuterol. Door Finnigan werd dit onderzoek op 2 manieren uitgevoerd:

1. De extracten werden, na droogdampen, opgenomen in 100 µl methanol, waarna 1 µl met de DCI-probe in de bron van de TSQ is geïntroduceerd. In bijlage 3.21 en 3.22 worden achtereenvolgens het signaal van het oplosmiddel en het levermonster met spike weergegeven. De overgang van $M^+ = 277$ naar $M^+ = 259$ werd gemeten.

Op dezelfde wijze zijn ook andere overgangen gemeten. Uit de verrichte analyses kan geconcludeerd worden, dat een bepaling op 1 ppb-niveau, en vermoedelijk ook op een niveau van een factor 20-50 lager, binnen enkele minuten zeer goed uitvoerbaar is.

2. Tevens zijn van de monsterextracten TMS-derivaten bereid. Deze werden met GC-MS en GC-MS-MS geanalyseerd, waarbij positieve ionen gemeten zijn na chemische ionisatie met NH_3 .

In bijlage 3.23 is het totaal-ionenstroom chromatogram gegeven voor een urine-extract, gespiked met 1 ppb clenbuterol. In de GC-MS-mode werd alleen gebruik gemaakt van de eerste quadrupool. De quadrupool was zodanig ingesteld dat alleen $M^+ = 349$ werd doorgelaten en direct gemeten. De signaal/ruis-verhouding bedroeg in dit geval ca. 10, hetgeen normaal is voor een single quadrupool-analyse op dit niveau. In bijlage 3.24 worden de resultaten van de GC-MS-MS-analyse gegeven. Het betreft het totaal ionenstroom-chromatogram, waarbij de overgang van $M^+ = 349$ naar het dochterion m/z 203 is gemeten. De signaal/ruis-verhouding bedraagt in dit geval ca. 500. Door toepassing van het MS-MS wordt derhalve een toename in de gevoeligheid bereikt van ongeveer een factor 50, terwijl de selectiviteit veel groter is.

Op dezelfde manier kunnen meerdere overgangen gemeten worden, waardoor voldaan kan worden aan de EEG-criteria voor bevestiging, vastgelegd in "directive nr. 87/401 (2).

8 SPECIFIEK ONDERZOEK NU EN IN DE TOEKOMST

Hieronder volgt een aantal projecten, waarvan de afhandeling in belangrijke mate afhankelijk is van MS-ondersteuning. Tevens is aangegeven met welke techniek of combinatie van technieken dit onderzoek uitgevoerd zou kunnen worden.

1. Chronische ziekten in relatie tot voedings- en leefgewoonten. In het bijzonder onderzoek naar N-verbindingen in groenten, die na opname van nitraat aanleiding kunnen geven tot mutagene verbindingen (samenwerking: afd. Toxicologie). Techniek: TSP/MS/MS.
2. Ontwikkeling en verbetering van onderzoek naar het voorkomen van glucosinolaten in kruisbloemige akkerbouwprodukten (samenwerking: afd. AC). Techniek: GC-MS (CI).
3. Identificering en karakterisering van metabolieten van diergeneesmiddelen in weefsels en organen. In het bijzonder metabolieten in doeldieren, in-vitro testsystemen, "drug-like" cellulair gebonden complexen, interacties drugs/hormonen (samenwerking: afdeling Toxicologie). Techniek: GC-MS; GC-MS-MS; TSP-MS-MS; FD; FAB.
4. Het ontwikkelen van methoden voor het identificeren van antibiotica na het aantonen op microbiologische wijze (samenwerking: afd. Microbiologie). Techniek: TSP-MS-MS; FAB; FD.
5. Specifiek bevestigingsonderzoek en ontwikkelen van methoden ten behoeve van keuringen in nationaal en internationaal verband (steroiden, chlooramphenicol, sulfonamiden, nitroimidazolen, tranquillizers, nitrofuranen, coccidiostatica, tetracyclines). In het algemeen diergeneesmiddelen (inclusief paardedoping middelen) en organische contaminanten (samenwerking: afdeling Diergeneesmiddelen en Biofarmaceutische Analyse). Techniek: GC-MS; GC-MS-MS; TSP-MS-MS.

6. Identificatie van voedseladditieven en micronutriënten (b.v. vitaminen, verdikkingsmiddelen, conserveermiddelen etc.) (samenwerking: afdeling Micronutriënten en Natuurlijke Toxische stoffen). Techniek: TSP-MS-MS.
7. Identificatie van organometaalverbindingen b.v. fenyl-tin in diverse matrices (samenwerking: afdeling Anorganische Contaminanten) Techniek GC-MS; TSP-MS-MS.
8. Identificatie van alkaloiden en glycoalkaloiden in aardappel ter ondersteuning van het onderzoek naar de veredeling van aardappelrassen (samenwerking SVP). Techniek: GC-MS, GC-MS-MS, LC-MS, FAB-MS.
9. Onderzoek naar het voorkomen van androstenon in varkensvlees ter vaststelling van het geslacht van het dier (samenwerking: afdeling Biofarmaceutische Analyse). Techniek: GC-MS.
10. Onderzoek naar de identiteit van componenten welke met de in de BRD toegepaste ELISA-methode voor de bepaling van androstenon een mogelijke kruisreactie vertonen (samenwerking: afdeling Biofarmaceutische Analyse). Techniek: GC-MS-MS; TSP-MS.
11. Confirmatie van β -agonisten in urine en vlees van landbouwhuisdieren en veevoeder van met de HPLC screeningsmethode positief bevonden monsters (Samenwerking: afdeling Biofarmaceutische Analyse). Techniek: TSP-MS-MS.
12. Identificatie onderzoek van metabolieten van carbadox, met name desoxycarbadox in varkensvlees (samenwerking: afdeling Diergeneesmiddelen). Techniek: TSP-MS-MS.

Met de momenteel ter beschikking staande apparatuur kunnen de onder de nummers 1, 3, 4, 5, 6, 10, 11 en 12 genoemde onderzoeksprojecten niet op verantwoorde wijze worden uitgevoerd.

9 CONCLUSIES

Zowel uit de in de literatuur beschreven theoretische achtergronden als uit de gerapporteerde applicaties en het op verzoek van het RIKILT door drie fabrikanten uitgevoerde onderzoek kan een aantal conclusies getrokken worden.

- Voor analyses van niet vluchtige thermolabiele verbindingen in complexe matrices, is vloeistofchromatografie-massaspectrometrie met thermospray als interface zeer goed toepasbaar, ook voor residue-analyses.
- Met thermospray-massaspectrometrie (single quadrapool) wordt in het algemeen slechts informatie verkregen met betrekking tot het molecuulgewicht.
- Om voor zowel confirmatiedoeleinden als voor identificatiedoeleinden voldoende relevante structuurinformatie te verkrijgen dient vloeistof-chromatografie met thermospray als interface gevolgd te worden door tandem-massaspectrometrie (MS-MS).
- Voor analyse van enkelvoudige, niet met gaschromatografie te introduceren componenten, is FAB en/of FD in combinatie met massaspectrometrie een zeer goede methode voor de identificatie van b.v. metabolieten van steroiden, diergeneesmiddelen etc.
- Voor het achterhalen van fragmentatiepatronen en daaruit volgend het identificeren van onbekende verbindingen is, afgezien van de wijze van introductie, tandem-massaspectrometrie en/of hoge resolutie massaspectrometrie onmisbaar.
- Voor het éénduidig selecteren van fragmentionen voor monitoring in verband met het uitvoeren van confirmatieonderzoek is tandem massaspectrometrie en/of hoge resolutie massaspectrometrie zeer gewenst.
- In complexe matrices kunnen verdachte componenten en/of metabolieten met tandem-massaspectrometrie, vaak zonder uitgebreide voorzuivering, opgespoord worden.
- Onderzoek naar groepspecifieke verbindingen in monsters is met tandem-massaspectrometrie, via "neutral loss" goed mogelijk en is een uitstekend hulpmiddel bij b.v. het opsporen van pesticiden (chloorverlies).

- Uit het door de drie fabrikanten uitgevoerde applicatie-onderzoek, en uit ervaringen elders, kan geconcludeerd worden dat de door Finnigan geleverde TSQ 70 zowel inzetbaar is voor monsteronderzoek als voor research doeleinden. Ditzelfde geldt ook voor de Nermag, echter de serviceverlening zou problemen kunnen opleveren, met name lange wachttijden, daar deze vanuit Frankrijk wordt verzorgd. De fa. VG is niet in staat gebleken de door ons aangevraagde applicaties uit te voeren.
- Uit het in het afgelopen jaar uitgevoerde onderzoek o.a. naar het voorkomen en identificeren van steroïden b.v. androstenon (beregeur), clenbuterol, thyreostatica, chlooramphenicol, carbadox, pesticiden, alkaloiden etc. en gelet op het te verwachten onderzoek kan geconcludeerd worden dat de huidige capaciteit en mogelijkheden te kort schieten.

Uitbreiding van de capaciteit voor analyses is dan ook dringend noodzakelijk.

- Uitbreiding van de technische mogelijkheden is gezien het te verwachten toekomstige onderzoek nl. het ontwikkelen van methoden voor een aantal diergeneesmiddelen, in het kader van het nationaal plan, o.a. β -agonisten, β -Blockers, antibiotica, tranquilizers etc. dringend gewenst.

Zonder uitbreiding van de technische faciliteiten zal het in de toekomst niet mogelijk zijn om de opgelegde taak naar behoren uit te voeren.

- Voor het vaststellen van de exacte massa, en daaruit volgend de bruto structuur alsmede voor het analyseren van hoog moleculaire verbindingen (b.v. biomoleculen) is een sectormachine met een oplossend vermogen van 50.000 en een massabereik tot 15.000 noodzakelijk.

10 AANBEVELINGEN

Om zowel nu als in de nabije toekomst de opgelegde taken op het gebied van het opsporen van residuen en additieven van ongewenste verbindingen te kunnen uitvoeren dient de massaspectrometrische capaciteit zowel kwantitatief als kwalitatief uitgebreid te worden.

Voorgesteld wordt dan ook om op korte termijn over te gaan tot de aanschaf van de volgende apparatuur.

a) Finnigan TSQ 70

Geschikt voor zowel de analyse van vluchtige als niet vluchtige verbindingen voor zowel monster-/keuringsonderzoek als voor research doeleinden.

Het apparaat bestaat uit:

- autosampler (GC)
- gaschromatograaf
- autosampler (HPLC)
- vloeistofchromatograaf
- thermospray interface
- field desorption
- fast atom bombardment (continuous flow)
- massaspectrometer, triple stage quadrapool
- data verwerking en opslag

Kosten ca. fl. 1.000.000,--

Dit systeem sluit nauw aan bij het RIKILT-advies aangaande aanschaf van apparatuur door de CL-RVV, nl. een Finnigan SSQ-70.

Bij aanschaf van de Finnigan TSQ-70 kunnen hormonen en stoffen als clenbuterol op voldoende laag niveau gemeten worden. Tevens kan ruimschoots voldaan worden aan de criteria die door de EEG gesteld zijn voor confirmatie-onderzoek. Er wordt dan ook voldoende structuurinformatie verkregen om keuringsbeslissingen op te baseren en bij internationale disputen meestal met voldoende zekerheid analysere-sultaten te kunnen verdedigen dan wel aan te vechten. In een beperkt aantal gevallen zal hiervoor echter toepassing van een hoog-oplossend vermogen systeem nodig zijn.

Met behulp van deze apparatuur kan ook de referentietask in het kader van de Nationale Programma's ten aanzien van onder andere de diergeneesmiddelen naar behoren worden uitgevoerd. Aanschaf van genoemde systemen brengt het RIKILT voor wat betreft de massaspectrometrische uitrusting op een vergelijkbaar niveau als keuringsinstellingen in het buitenland. Vanuit het oogpunt van de Nederlandse export is dit van groot belang.

De belangrijkste beperkingen van de Finnigan TSQ-70 liggen in het laag-oplossend vermogen en het beperkte massabereik (tot 4000). Het systeem is niet geschikt voor exacte massabepalingen. Voor het bepalen van exacte massa's is een hoog-oplossend vermogen systeem nodig (b.v. Finnigan MAT-90, kosten fl. 1.200.000,-). Deze apparatuur heeft tevens een groter massabereik (tot 15.000). Met dergelijke apparatuur kan DLO ook inspelen op ontwikkelingen in onder andere de biotechnologie via structuuropheldering van biomoleculen. Aanschaf van een dergelijk systeem moet op termijn tevens worden overwogen.

b) Hewlett Packard "work station", software revisie, library

Deze post betreft een extra werkstation voor het off-line verwerken van data alsmede een nieuwe revisie software en een specifieke library (1700 drugs, gifstoffen en metabolieten).

Kosten ca. fl. 40.000,--

Opgemerkt wordt dat bij het toenemende monsteraanbod er op korte termijn dringend behoefte is aan een tweede HP-MSD.

Kosten ca. fl. 250.000,--

Tevens wordt geadviseerd om in de komende jaren rekening te houden met de aanschaf van een ICP-MS. Kosten fl. 650.000,--

Naast de hierboven genoemde aanschaf van apparatuur is het ook van belang om te beschikken over een geautomatiseerd literatuurbestand. Momenteel gaat veel tijd verloren met het vinden van de juiste literatuur referentie voor een bepaalde applicatie. Dit is van belang om snel in te kunnen spelen op de steeds wisselende vraag naar massaspectrometrisch onderzoek.

Het opzetten van een dergelijk bestand kan plaatsvinden in samenwerking met het Pudoc.

De kosten bedragen hiervoor éénmalig ca. fl. 5.000,- en jaarlijks cq. fl. 1.000,-. Er wordt dan aangenomen dat een PC beschikbaar is.

13 PERSONELE BEZETTING

Om een zo optimaal mogelijke benutting van kennis en apparatuur te realiseren is binnen het RIKILT terecht gekozen voor het centraal onderbrengen van de massaspectrometrie. De behoefte aan massaspectrometrisch onderzoek is de laatste jaren sterk toegenomen, o.a. op het gebied van de diergeneesmiddelen, hormonen en van nature voorkomende stoffen. De centrale functie van de massaspectrometrie uit zich via een nauwe samenwerking met verschillende afdelingen binnen het RIKILT. Daarnaast vervult de sectie een referentietaak richting de RVV en wordt ondersteuning verleend aan andere (DLO)-onderzoeksinstituten. De sectie massaspectrometrie binnen de afdeling OCON wil zijn centrale rol vervullen via o.a. een goede ondersteuning en dienstverlening naar andere afdelingen binnen het RIKILT. Een ondersteuning die plaats moet vinden tegen de achtergrond van de binnen het instituut gestelde prioriteiten. Het uitvoeren van die taak stelt eisen aan de personele bezetting, zowel kwantitatief als kwalitatief. Vooralsnog wordt een permanente bezetting van de sectie met twee medewerkers noodzakelijk geacht. Om de centrale rol van het RIKILT binnen DLO op het gebied van de massaspectrometrie nog beter gestalte te kunnen geven wordt geadviseerd om de sectie massaspectrometrie zowel ten aanzien van apparatuur als ten aanzien van personele bezetting uit te breiden.

14 SLOTWOORD

In dit verslag is getracht een aantal massaspectrometrische technieken te evalueren waarbij de aandacht vooral is gericht op de praktische toepassing binnen het RIKILT.

Theoretische achtergronden zijn dan ook slechts summier beschreven, terwijl een aantal technieken, welke overigens zeer interessant zijn, uitsluitend worden vermeld daar zij ons inziens voorlopig nog niet geschikt zijn voor laboratoria zoals het RIKILT.

LITERATUUR

- 1 Traag, W.A., L.G.M.Th. Tuinstra, M.M.L. Aerts. Nota "Toekomst MS onderzoek op RIKILT", 1987-10-08
- 2 EEG rapport 87/410/EEG
- 3 Apffel, J.A., U.A.Th. Brinkman, R.W. Frei. Analytical Chemistry 1983, 55, 2280
- 4 Finnigan mat publication "Spectra". Volume 9, no. 1
- 5 Todd, J.F.Y. Advances in mass spectrometry 1985, 35, 70
- 6 Lee, E.D., A.P. Bruins, J.D. Hennion. Analytical chemistry, vol. 58, no. 14, 1451A-1461A
- 7 Games D.E. Advances in mass spectrometry 1985, 323, 342
- 8 Jong E.G. de. Chemisch weekblad, december 1986, 876
- 9 McLafferty, F.W. Advances in mass spectrometry 1985, 493, 504
- 10 Burlingame, A.L., T.A. Baillie, P.J. Derrick. Analytical chemistry 1986, 58, 165R-211R
- 11 McLafferty, F.W. Tandem mass spectrometry. John Wiley and Sons, New York 1983, ISBN 0-471-86597-4
- 12 Ledford E.B., S. Ghaderi, C.L. Wilkins, M.L. Gross. Instrumentation 1707-1724
- 13 Traag W.A., L.G.M.Th. Tuinstra. RIKILT rapport 88.43, juni 1988
- 14 Henion J., G.A. Maylin. Journal of chromatography 271 (1983), 107-124



VG TRITECH
the 3rd technology
mass spectrometry

VG Tritech
Crewe Road
Wythenshawe
Manchester M23 9BE
England

Telephone (national) 061 998 2500
(international) +44 61 998 2500
Telex 668534

Our Ref: OW/KC

25th January 1988.

Attention of Dr. Tuinstra

c/o Jan Litjens,
VG Instruments B.V.,
P.O. Box 171,
1380 Weesp,
Netherlands.

Dear Dr. Tuinstra,

Please find enclosed results of the GC/MS sample received via Jan Litjens of VG Holland. The sample, hexachlorobenzene in iso-octane, was run on the VG TS-250 in the following modes of ionisation.

- (1) Electron Impact.
- (2) Chemical Ionisation Positive Ion.
- (3) Chemical Ionisation Negative Ion.

Scanning and gas chromatography conditions are enclosed. The GC programme was modified between runs to reduce analysis time.

The GC used was the HP5890 and the column was a chrompack CP-SIL-8-CB capillary column.

The electron impact (EI+) total ion current is displayed on page R1. The spectrum of scan 570 is on R2. This was submitted to the NBS library for identification. The spectrum and its library fit are on page R3. Fit factors are located on the top left hand corner of the page.

Purity Fit = 80%
Mixture Fit = 92.4%
Reverse Fit = 82.4%

Datafile R1KC12 contains the positive CI total ion current (R5) and spectrum (R6) of the sample. Methane was used as the reactant gas.

/cont'd.....

RIKCIN is datafile name given to sample run in negative ion CI with methane as the reactant gas. The selectivity and sensitivity of the mode is considerably better than that of positive ion CI.

The negative ion spectrum on page R9 is dominated by the molecular ion. Some ionisation occurs in the m/z 250 cluster but this is relatively insignificant. The peak at m/z 127 is due to some residual iodine in the system. No other background is observed.

I hope these results are to your satisfaction. If you have any queries on same do not hesitate to contact me. Unfortunately, time constraints have not permitted the running of your other samples. These will be run in due course.

Yours sincerely,



Orla Weir

Encl.

Formula: (NOM,ACC,SPE)

Mode: [NOM,ACC,SPE]

NOM

Element #Atoms #Isotopes

Element #Atoms #Isotopes

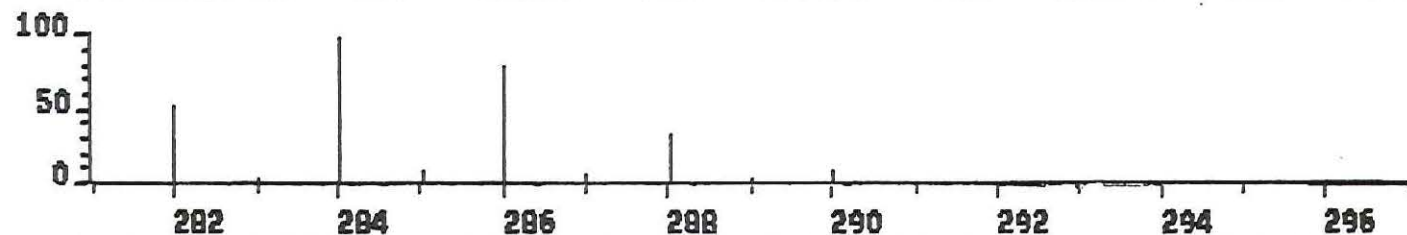
Element #Atoms #Isotopes

C 6 2

CL 6 2

Spectrum: (SPE)

Mass	%Int	Mass	%Int	Mass	%Int	Mass	%Int	Mass	%Int
282	52.0672	285	6.7296	288	24.2046	291	0.5510	294	0.0577
283	2.5066	286	80.0560	289	2.2957	292	1.0601	295	0.0028
284	100.0000	287	5.2817	290	8.2217	293	0.0706	296	0.0001



'Q=return to edit mode

'X=exit

'H=hardcopy

?=Help

RIK1 #480-700

18-JAN-88 11:03 TS250

(EI+)

Sys:RIKILT

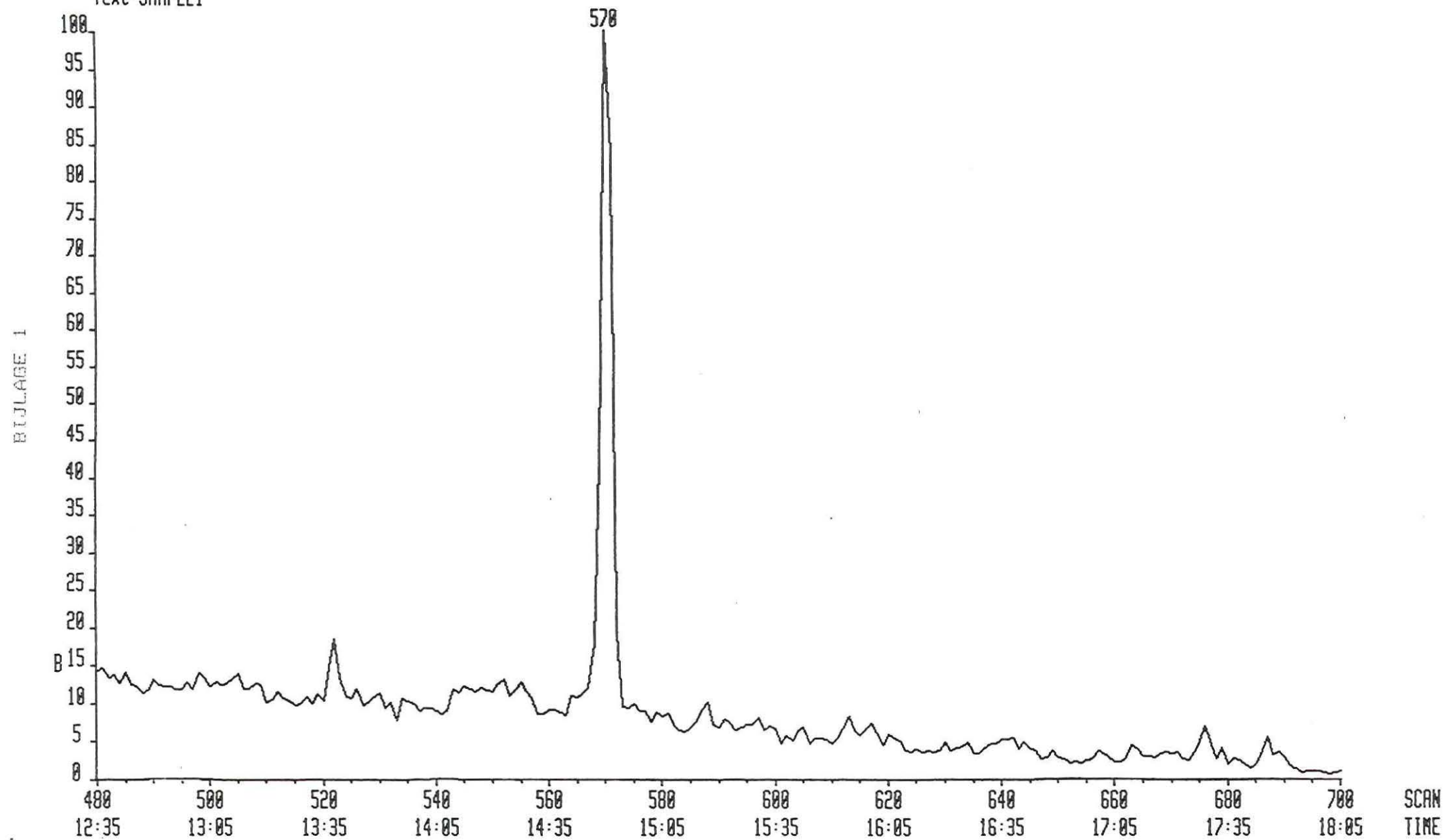
R1

IHP

Chromatogram Identifiers : B0:TIC

B: 54119500

Text: SAMPLE1



BpM=0 I=9.6v Hm=0 TIC=54119500

Acnt:RIKILT Sys:RIKILT

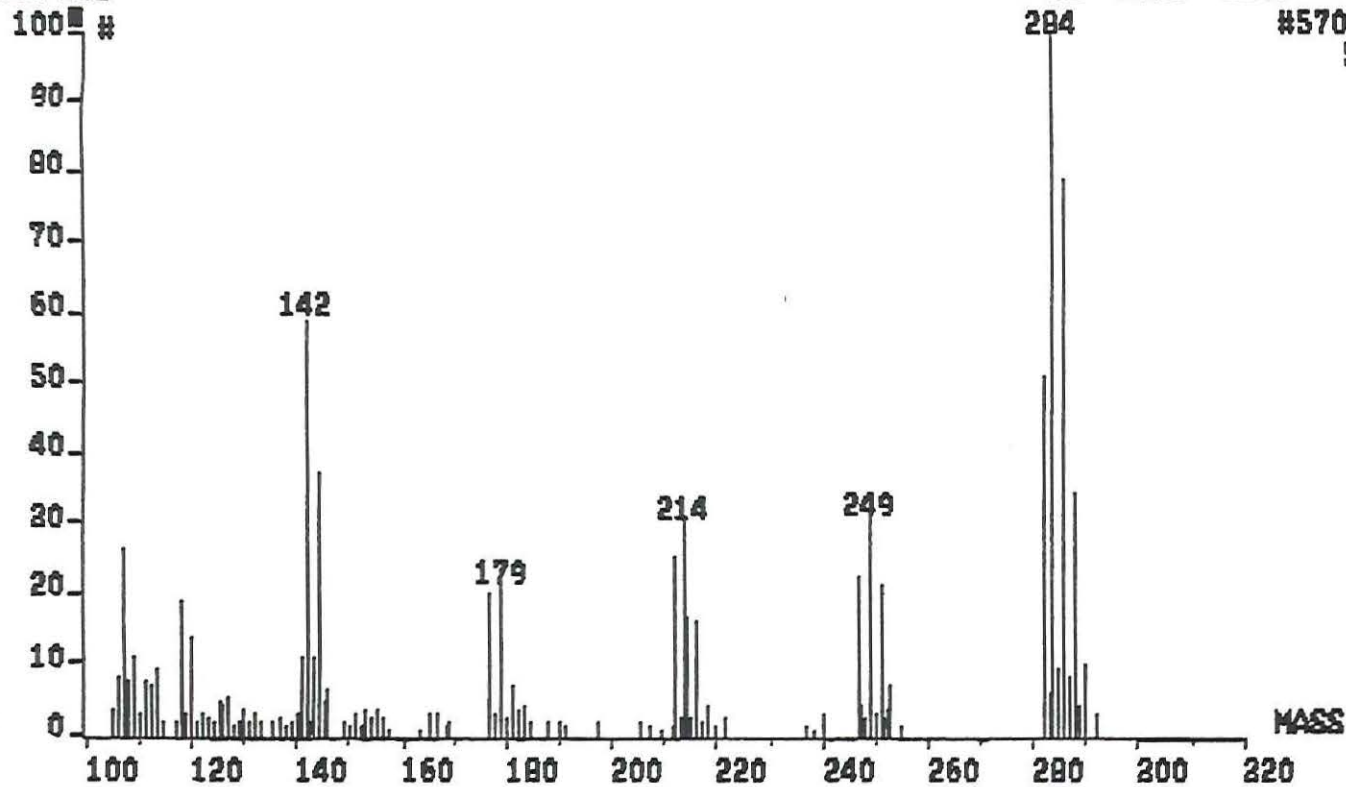
22

SAMPLE1

GC= 1720 Cal:

#570 1.0
5642200

BIJLAGE 1



LIBFITS1#3+ x1 Bgd=570 RIK1

+0:00:00

BENZENE, HEXACHLORO-

C6.CL6.

p801 M924 r824 RFN:11 74-1

Lib:NBS

27402 Bpk: 284 Mwt: 282

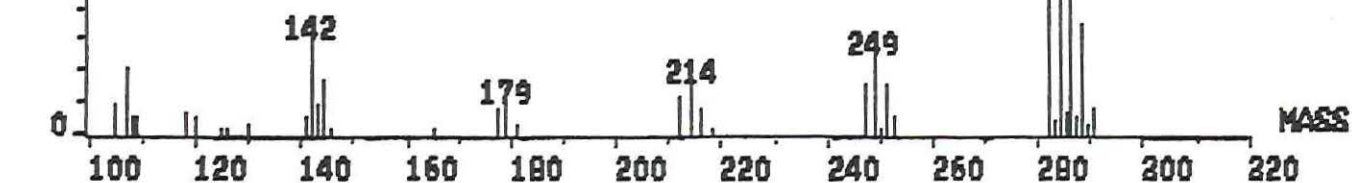
23

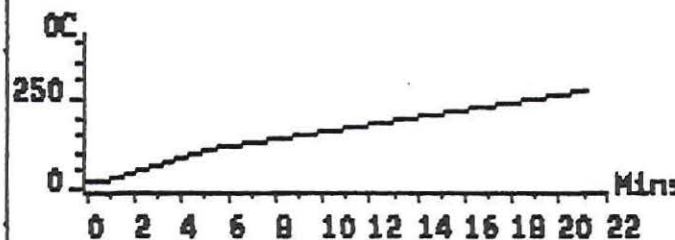
100 284 #570 1.0
5643200



100 284 #570 1.0
65525000

BIJLAGE 1



SYS		20-JAN-88	GCC Parameters		12:15:09	GCC
INS Instrument		TS250	IMR Mass Range (amu)		1200	
DAT Data Filename		A:RIKCI2	TE1 Temperature 1(deg C)		25	
ACN Customer Account		RIKILT'	TI1 Time 1(mins)		1.00	
TXT			RT1 Rate 1(deg C/min)		20.0	
			TE2 Temperature 2(deg C)		120	
			TI2 Time 2(mins)		0.00	
			RT2 Rate 2(deg C/min)		10.0	
			TE2 Temperature 2(deg C)		280	
HIM High Mass		500	GCC Temperature Profile 			
LOM Low Mass		100				
TIM Scan Time (s)		1.00				
RES Resolution		400				
TAM Tic Above Mass		20				

BIJLAGE 1

RIKCI2 #1-980

19-JAN-88 10:50 TS250

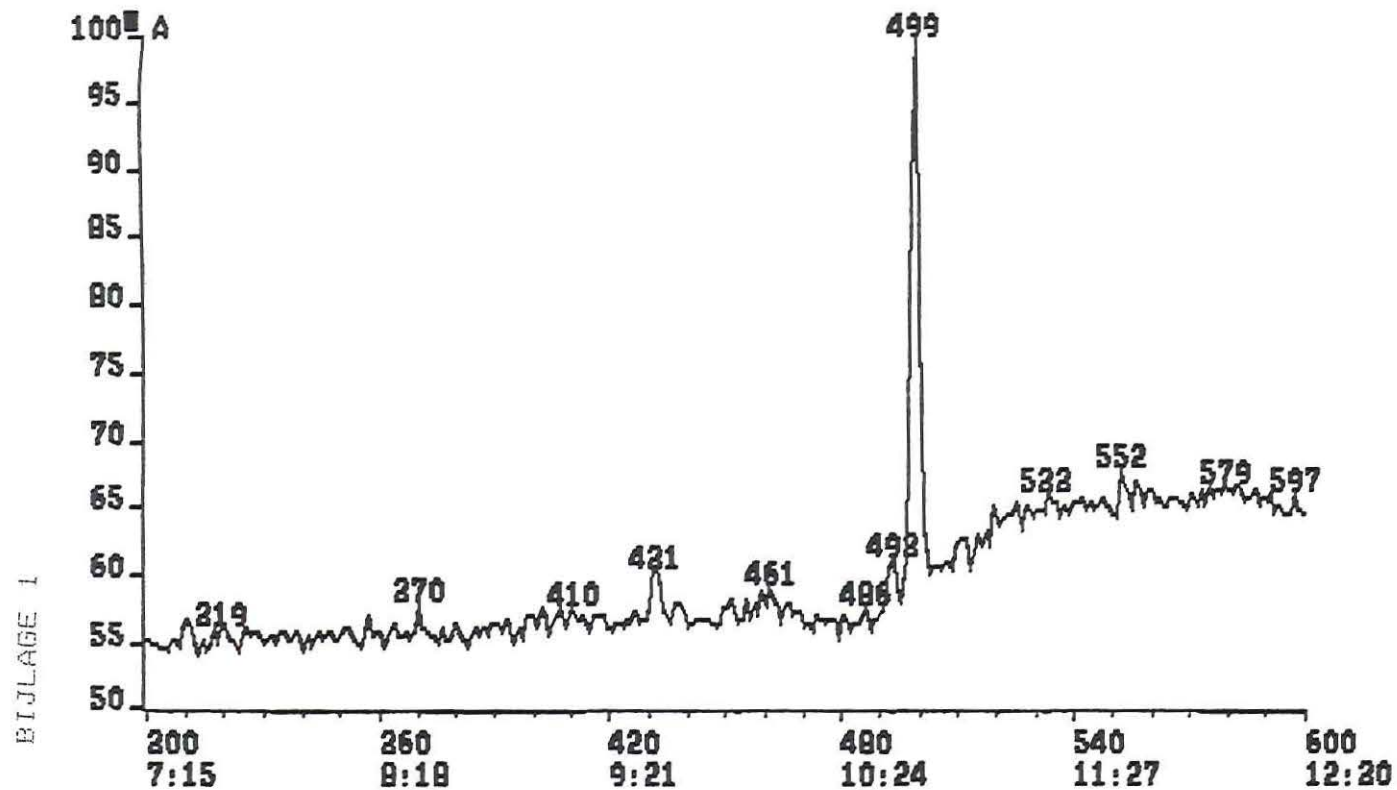
(C1+)

Sys:RIKILT

A:ATIC

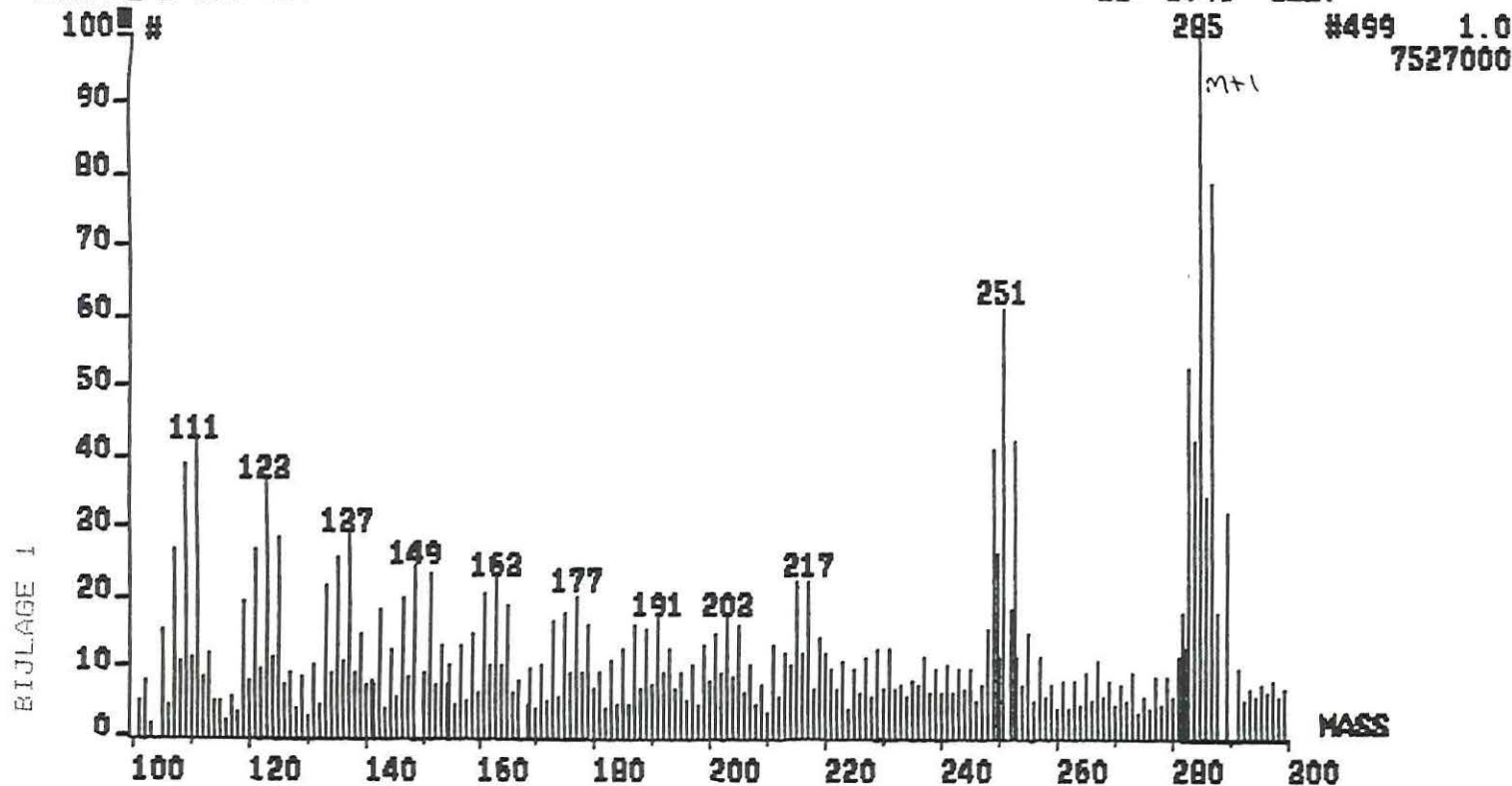
Text: SAMPLE 1 CH4 CI+

RS



RIK12#499 x1 Bgd=292 19-JAN-88 10:50+0:10:44 TS250 C1+
BpM=0 I=1.1v Hm=0 TIC=222925008 Acnt:RIKILT Sys:RIKILT
SAMPLE 1 CH4 CI+ GC= 1740 Cal:

RE



SPE SUB01 #1 x1 Bgd=0
Bpm=0 I=476uvs Hm=299 TIC=0
A:RIKCI2#499-A:RIKCI2#520

+0:00:00

SU

Acnt:

Sys:

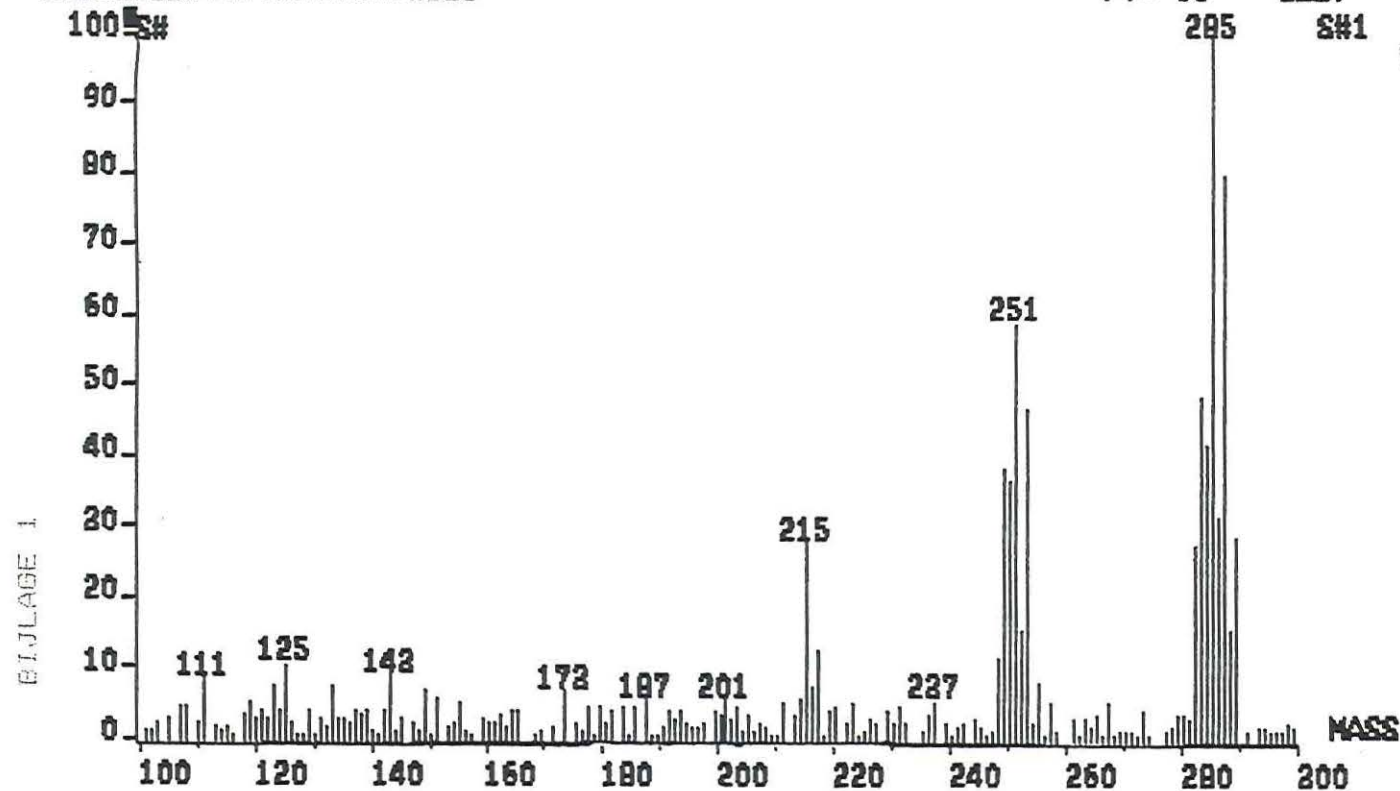
R7

PT= 00

Cal:

S#1 1.0

7001000



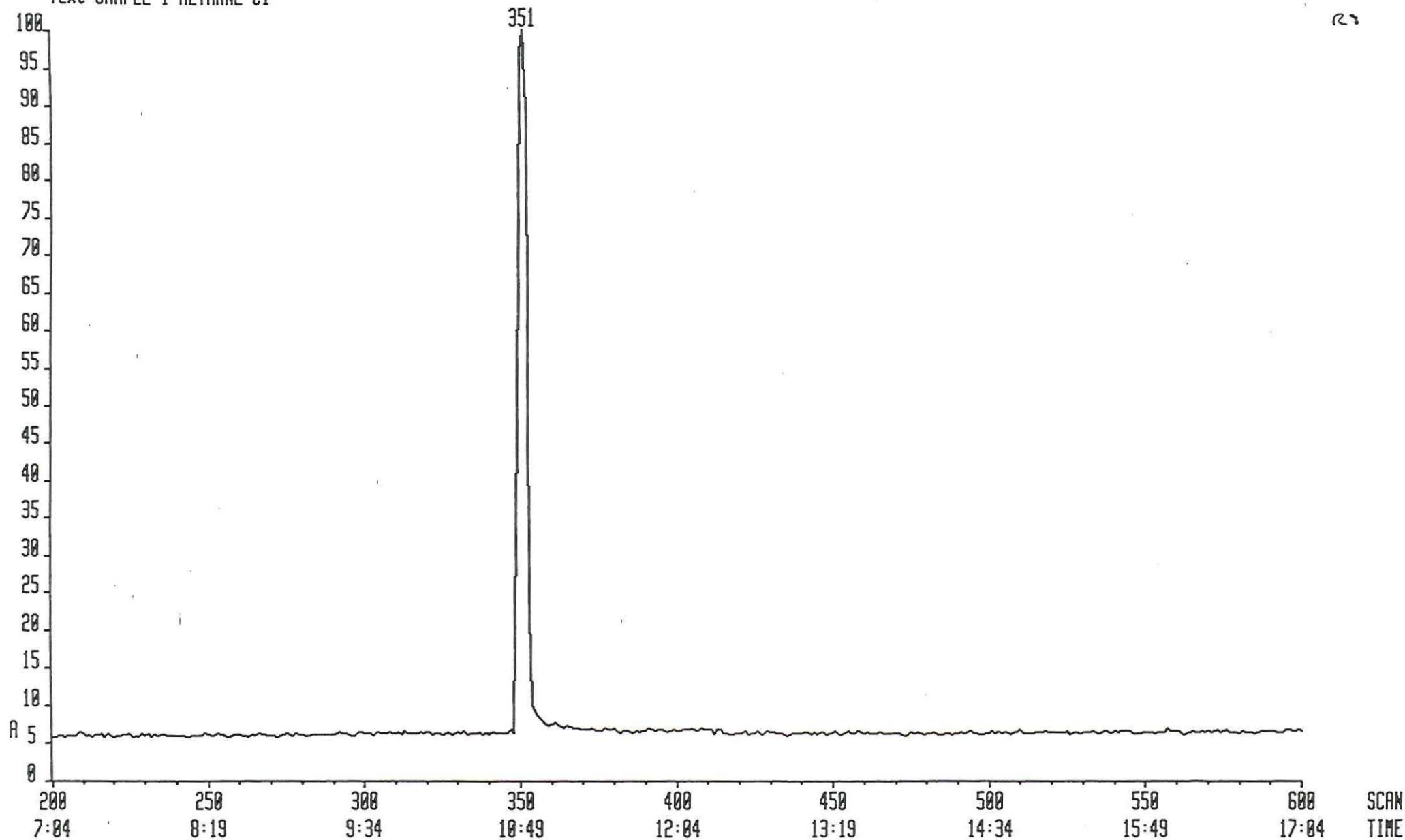
Background subtracted
CI+ spectrum of scan 499

RIKICIN #200-600 19-JAN-88 12:06 TS250
Chromatogram Identifiers : A :ATIC
Text: SAMPLE 1 METHANE CI-

(C1-)

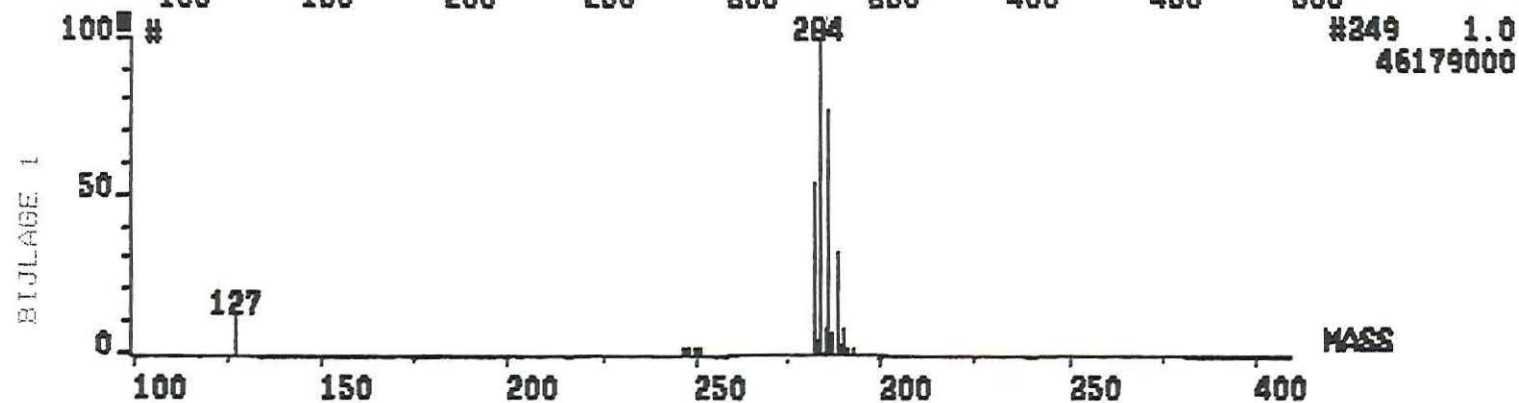
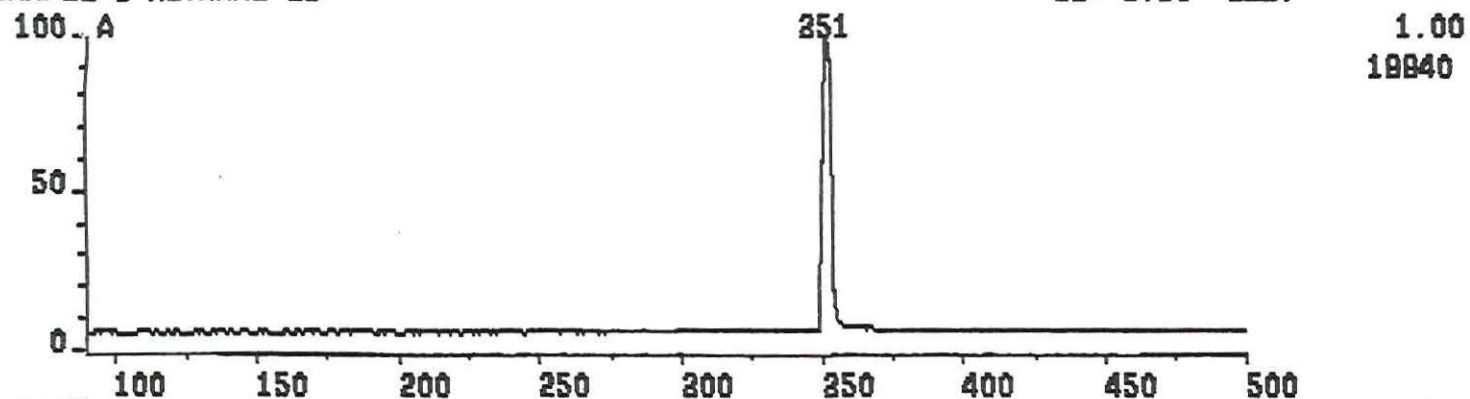
Sys:RIKILT

IHP
A: 18848



RIKICIN#249 x1 Bgd=1 19-JAN-88 12:06+0:10:42 TS250 C1=
BpK=0 I=7.0v Hm=0 TIC=142674000 Acnt:RIKILT Sys:RIKILT
SAMPLE 1 METHANE CI- GC= 1750 Cal:

R9



TEXMS ANALYTICAL SERVICES DATA PACKAGE 7-688

This data package contains LC/MS and LC/MS/MS data on Ipronidazole and Tylosine. It was obtained for RIKILT Co. at the request of Delsi Inc.

Date: July 8, 1988

Prepared by: Daniel A. Garteiz, Ph.D.

Daniel A. Garteiz
President, TEXms Inc.

ENCLOSURE 2

EXPERIMENTAL CONDITIONS:

Sample Preparation: Both Ipromidazole and Tylosine were received in methanolic solution at a concentration of 500ng/ml.

HPLC: Waters Multisolvent Delivery System 600

Column: Altex Ultrasphere ODS 4.5cmx4.6mm ID, 5u

Mobile Phase: 80/20, 0.05M NH_4^+Ac^- / Methanol

Flow: 1.6ml/min.

MS/MS: NERMAG R3010 Triple Quadrupole System equipped with a Nermag Thermospray Source and repeller

Collision Gas: Argon

Collision Energy: -17ev

Collision Pressure: 35 MilliTorr

THERMOSPRAY:

Source Temperature: 250 °C

Vaporizer Tip: 230 °C

Repeller: 135 Volts

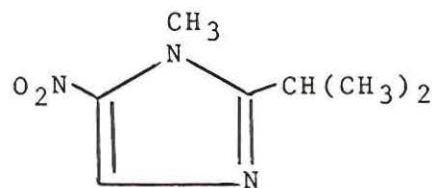
IPRONIDAZOLE RESULTS:

Ipronidazole is an antimicrobial agent derived from nitroimidazole (I). It is a strong base and as such it has a high proton affinity. For this reason, it is expected to display high Thermospray sensitivity. This can be seen in Figure 1, where the TIC (total ion chromatogram) for a 100ng injection is shown. More than 2.5×10^6 counts were obtained. This projects to thermospray sensitivities in the picomole range.

Its thermospray spectrum (Figure 2) is dominated by the protonated molecular ion at (m/z 170). It was also possible to obtain good MS/MS spectra with a 100ng sample (Figure 3). To reduce chromatographic tailing as was observed during the single MS run, the pH of the mobile phase was reduced to 5 with glacial acetic acid. Notice the sharper chromatographic trace obtained during the LC/MS/MS run, shown in Figure 4.

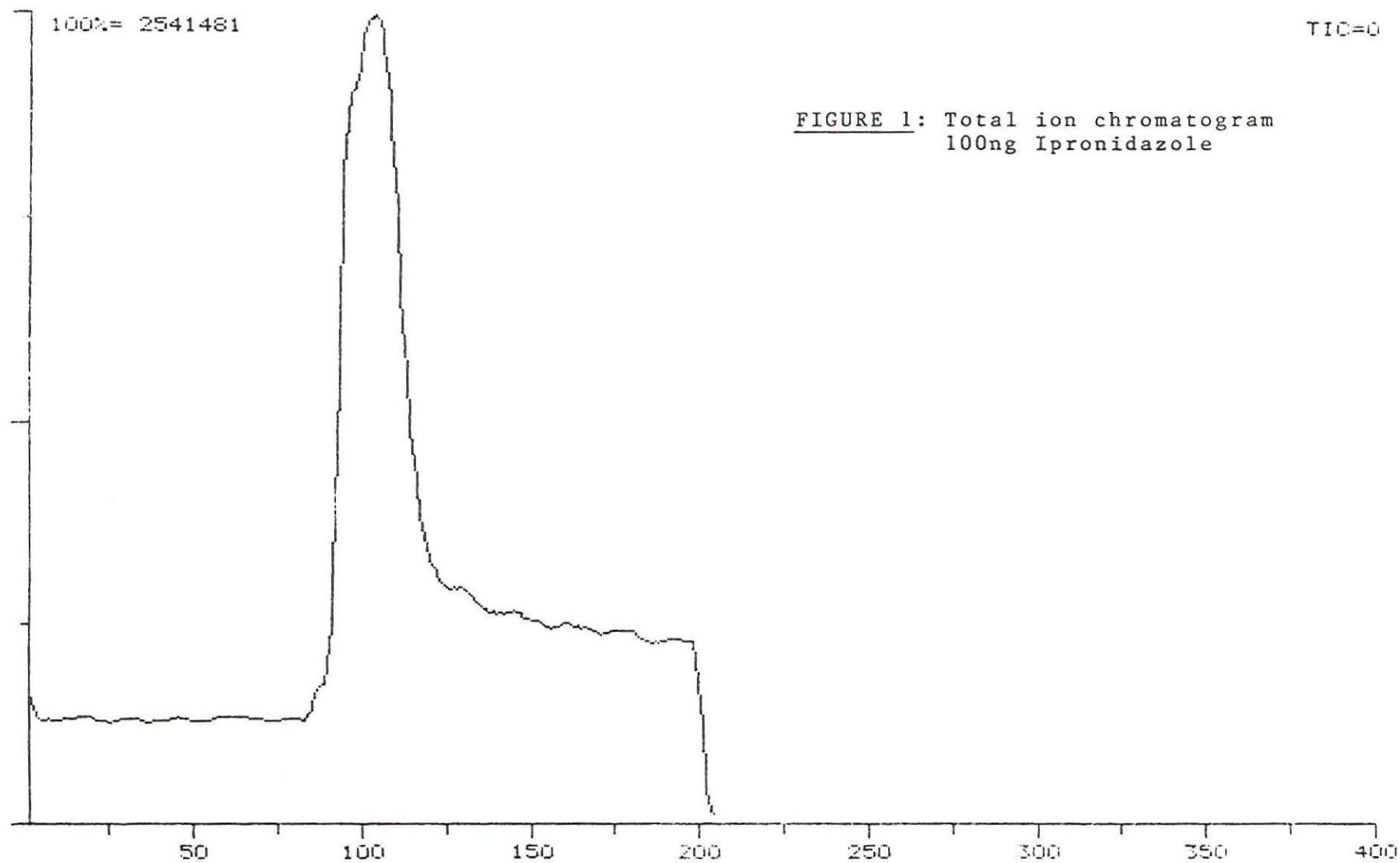
Tentative Structural Assignment of Daughter Ions:

The LC/MS/MS spectrum of Ipronidazole is characterized by ring opening with extensive rearrangements. The daughters observed are:

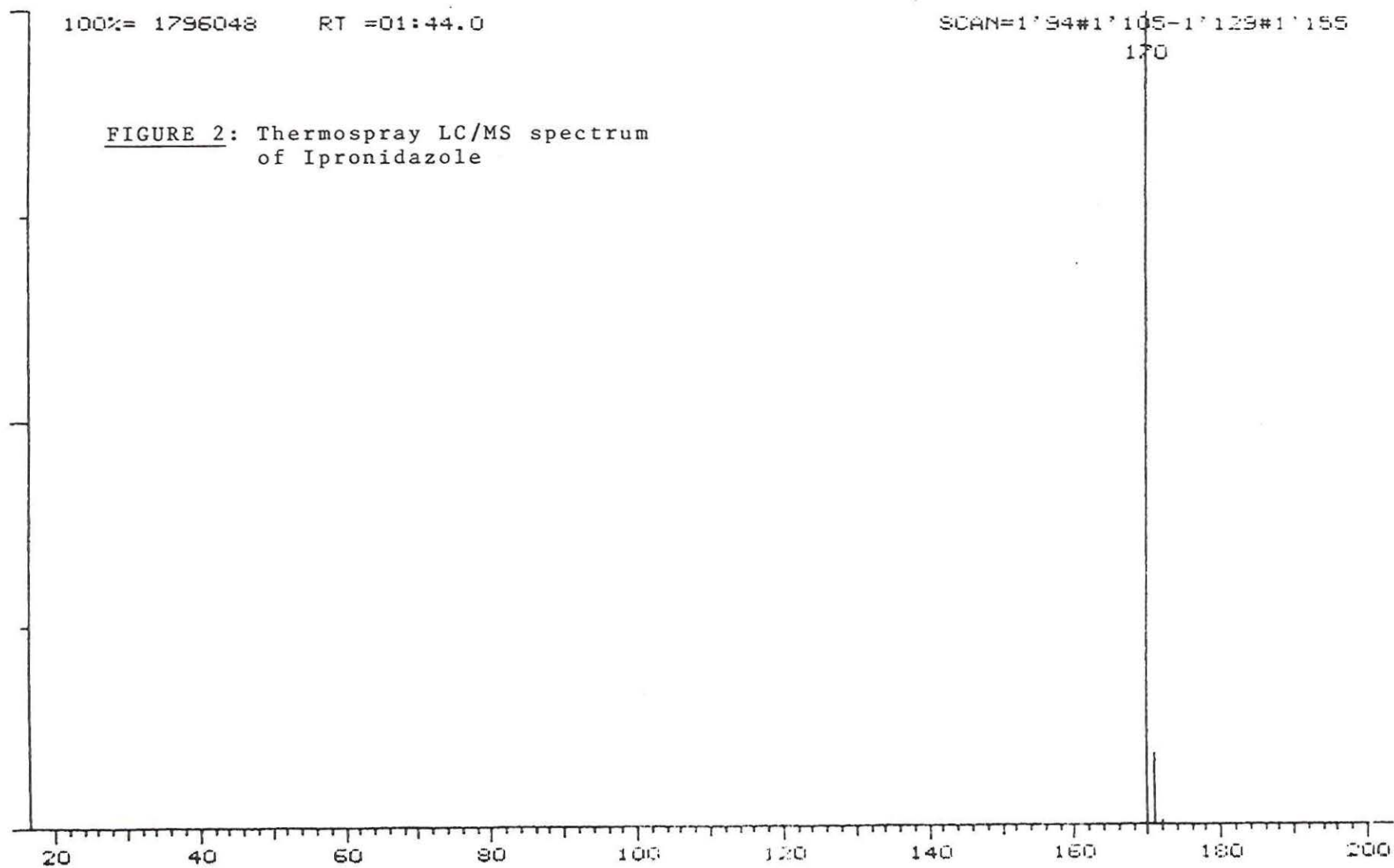


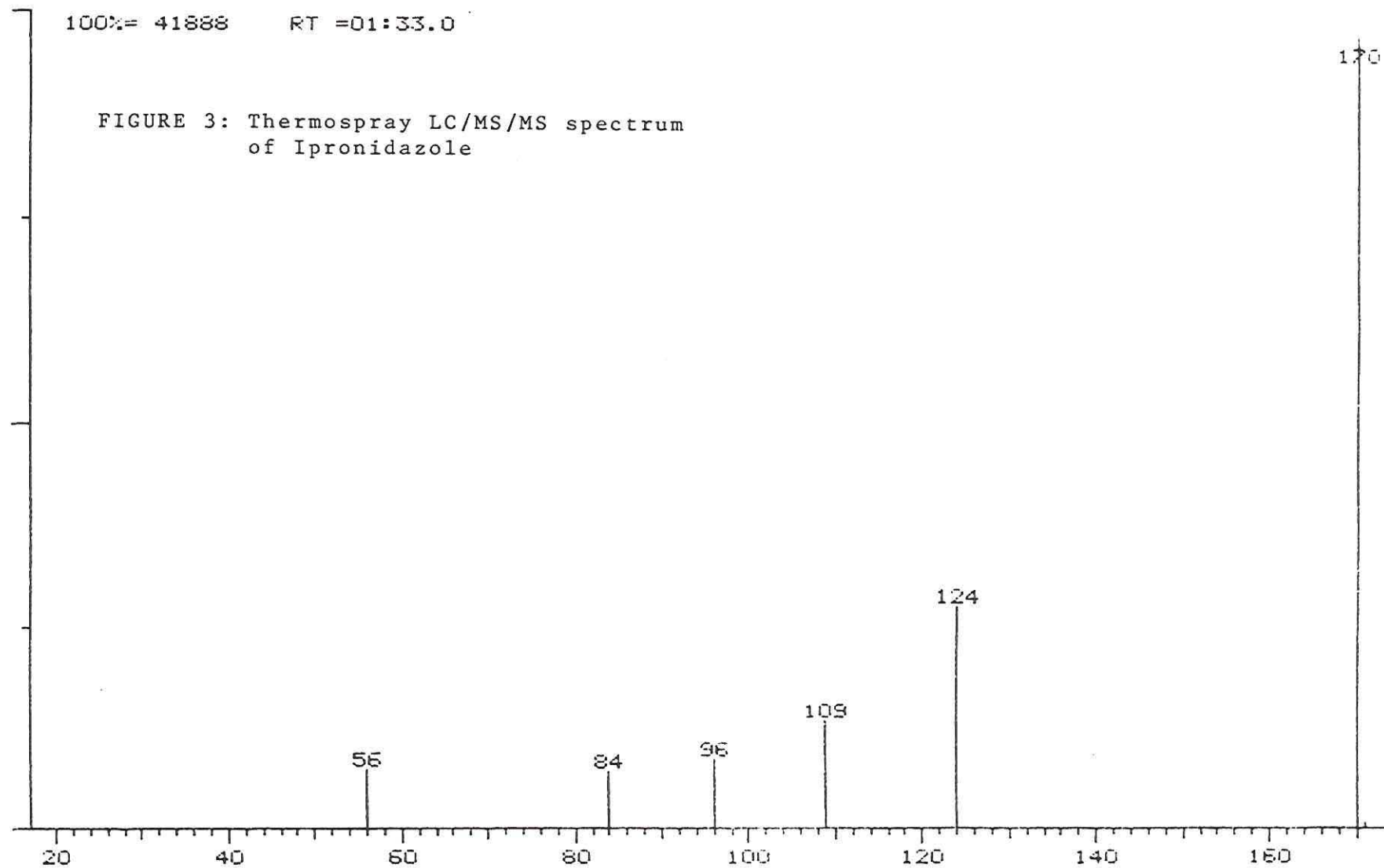
(I)

<u>M/Z</u>	<u>Assignment</u>
170	MH^+
124	$MH^+ - NO_2$
109	$MH^+ - NO_2 - CH_3$
96	$NO_2C = C\dot{N} = C$
84	$CH_3\dot{N}H = C = C(CH_3)_2$
56	$CH_3\dot{N}H = C = N$

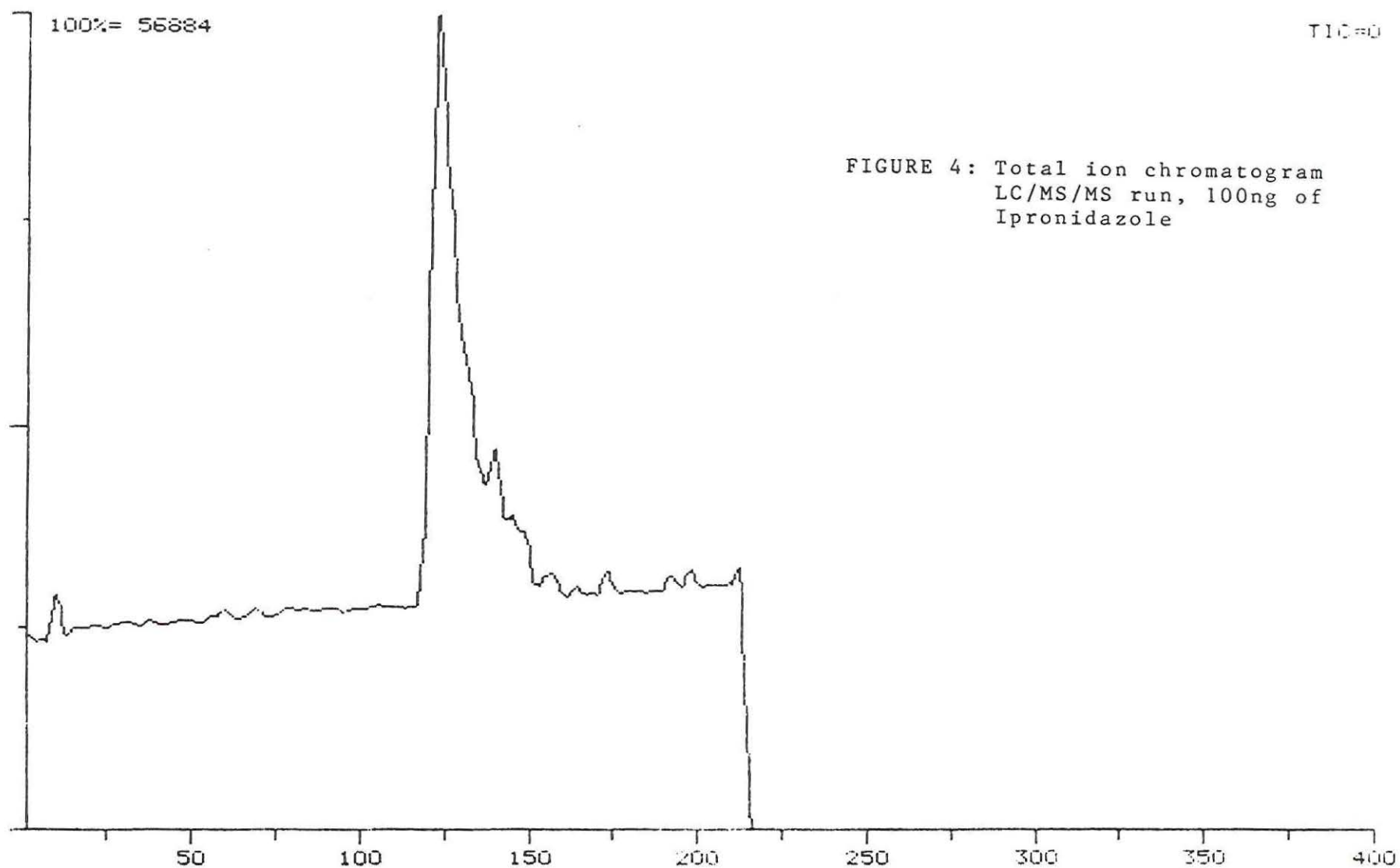


BIJLAGE 2



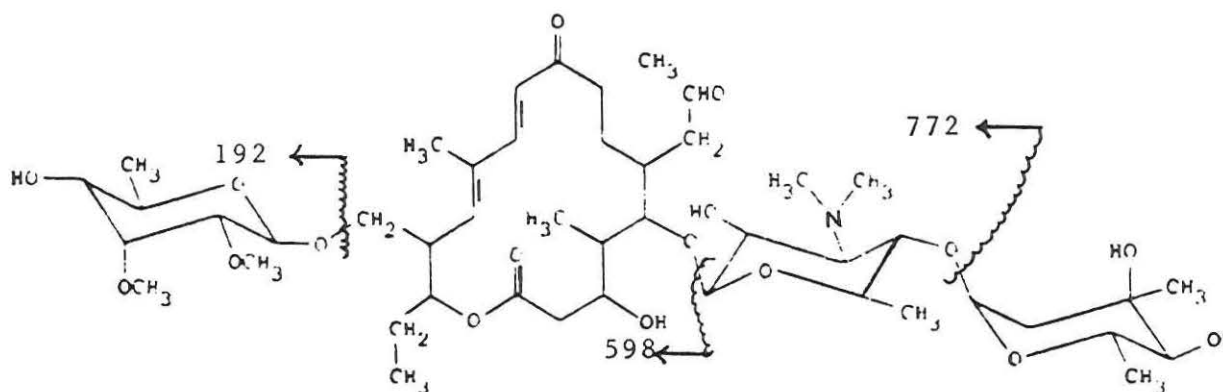


SIJLAGE 2



TYLOSINE RESULTS:

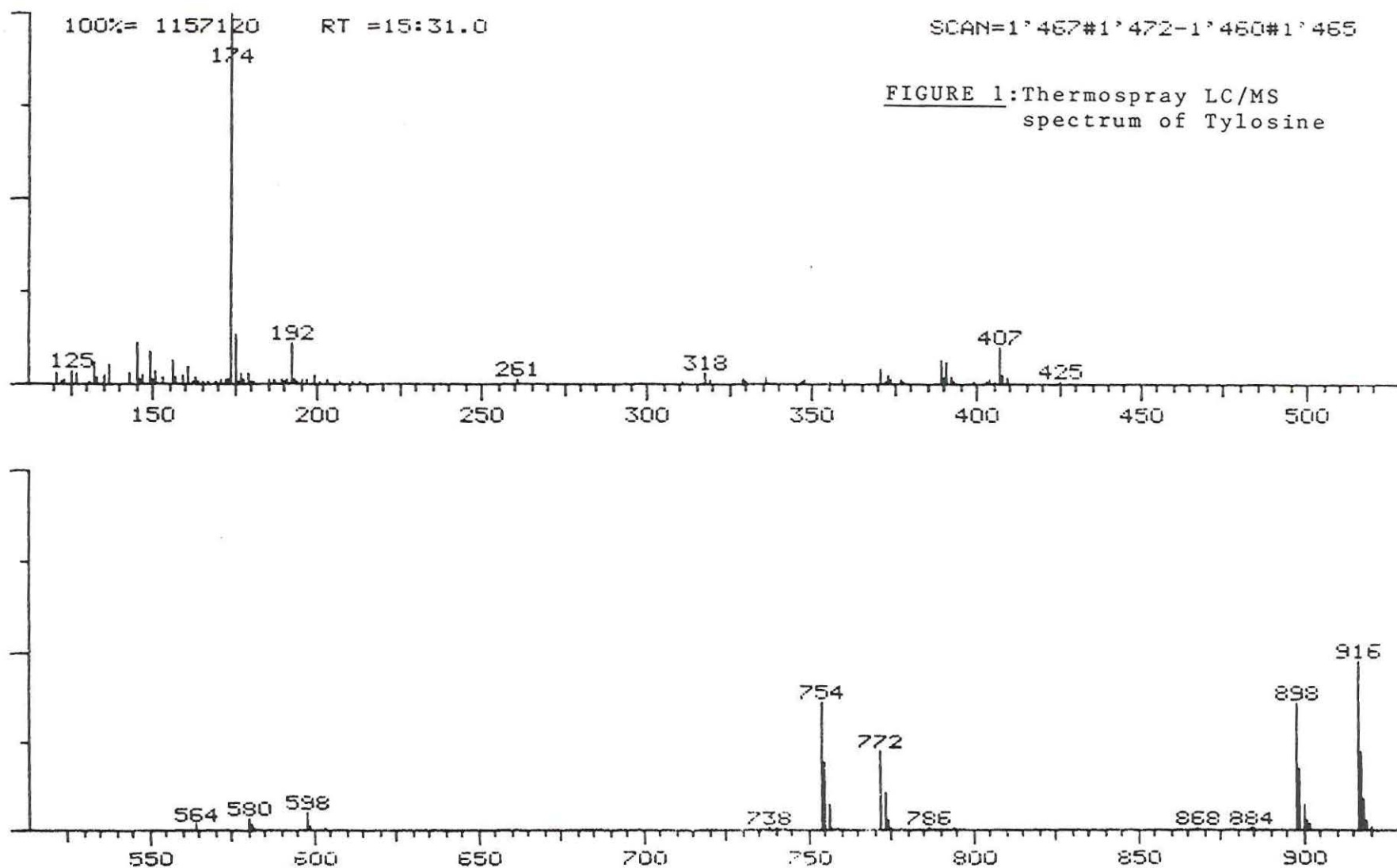
Tylosine is a macrolide antibiotic isolated from a micro-organism found in soil from Thailand. Although one of its sugar residues has an N-dimethyl amino substituent of high proton affinity and therefore, good thermospray sensitivity, its various sugar residues, makes this molecule heat labile.



TYLOSINE MW 915

This thermal lability is displayed in its thermospray spectrum, which shows cleavages of its glycosidic linkages giving rise to m/z 772, 598 and 192. All of these "thermal fragments" are accompanied by ions of 18 mass units lower which arise from loss of H₂O at m/z 754, 580 and 174, respectively. In spite of its thermal lability, its thermospray spectrum shows a very intense protonated parent ion at m/z 916. The MH⁺ species, also loses the elements of H₂O. The thermospray spectrum of Tylosine is shown in Figure 1.

The MS/MS spectrum of Tylosine obtained under identical thermospray conditions, is not as structurally revealing (Figure 2). It does allow you to determine which ions in the single MS spectrum, arise by a thermal process, i.e. all water losses and possibly the fragment at m/z 598.



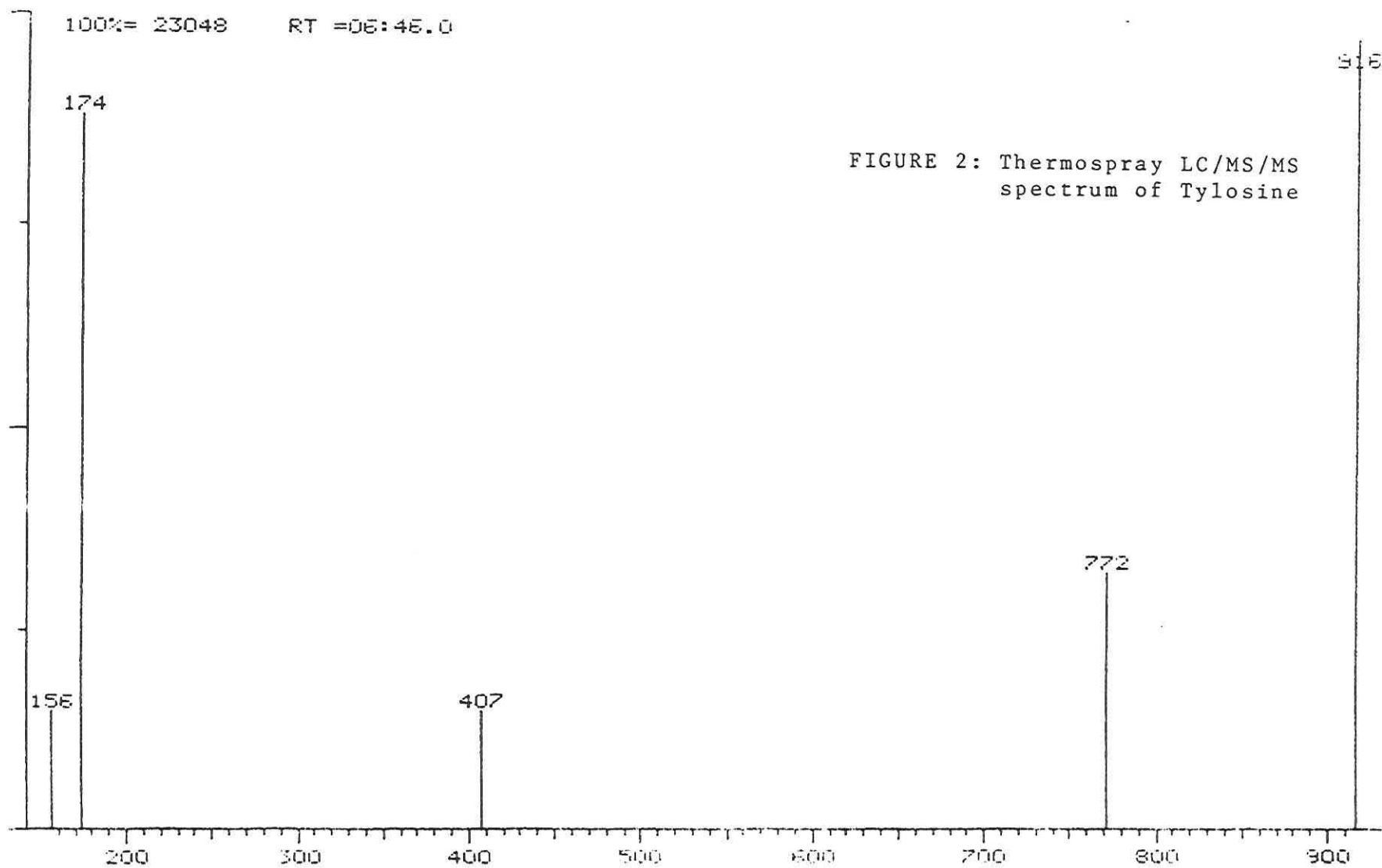


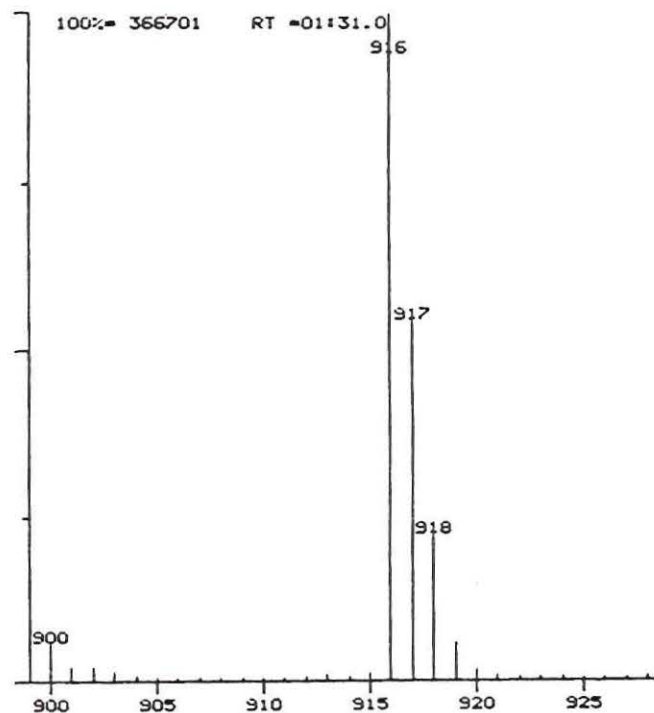
FIGURE 2: Thermospray LC/MS/MS
spectrum of Tylosine

EXHIBIT 2

IMPORTANT KEY POINTS:

Inspite of the thermal lability of Tylosine, a very strong protonated molecular ion species was observed. A 500ng injection gave in excess of 3.6×10^5 counts. This is a reflection of a good thermospray interface design. It is also important to note that the MS/MS experiments were run at a resolution setting where the molecular ion isotopic ratio obtained using the NERMAG 3010 triple (See below) was essentially identical to the theoretical ratio as calculated by the ISOMASS program of the SIDAR data system.

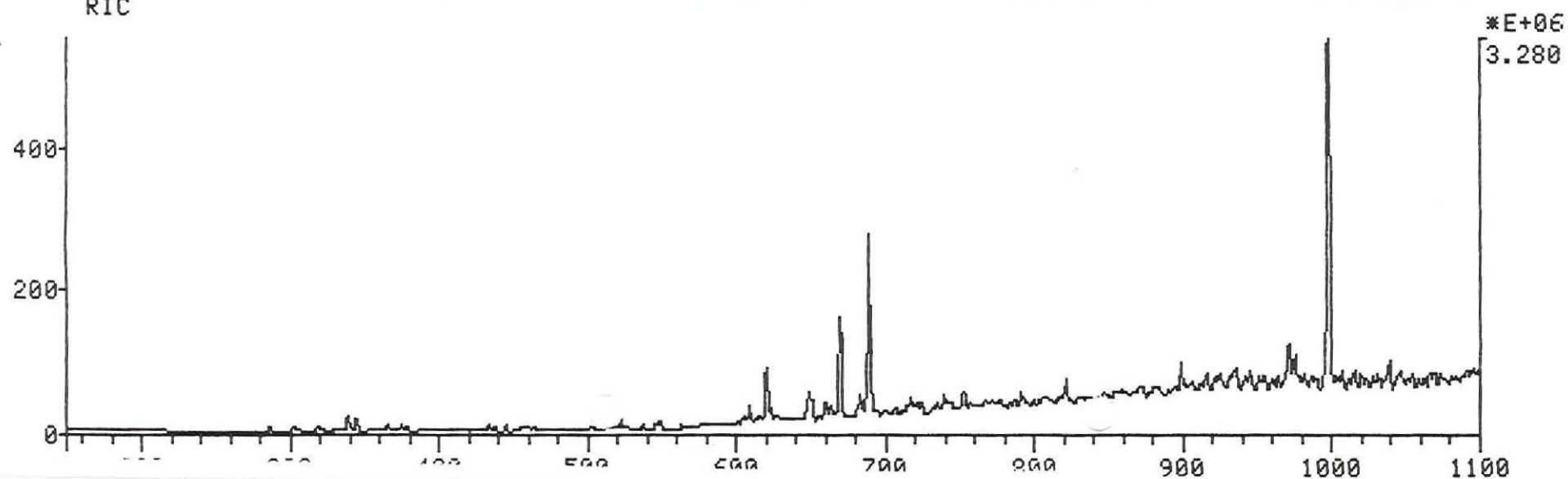
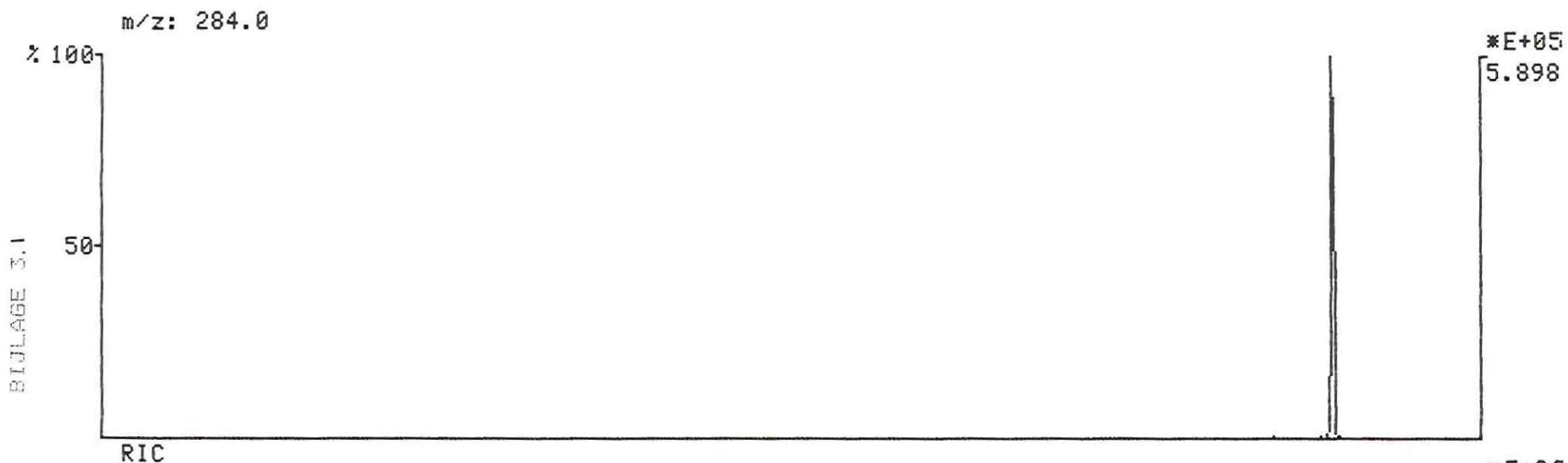
***** * ISOMASS * *****			
FORMULA : C46H77O17N1			
EXACT MASS	915.519		
ORGANIC MASS	916.123		
MASS DEFECT	0.060	AMU PER 100 AMU	
UNSATURATION DEGREE:	9		
THEORETICAL MASS	915		
NOMINAL MASS	915		
RATIO% MASS			
100.0	915		
53.79	916		
17.30	917		
2.98	918		



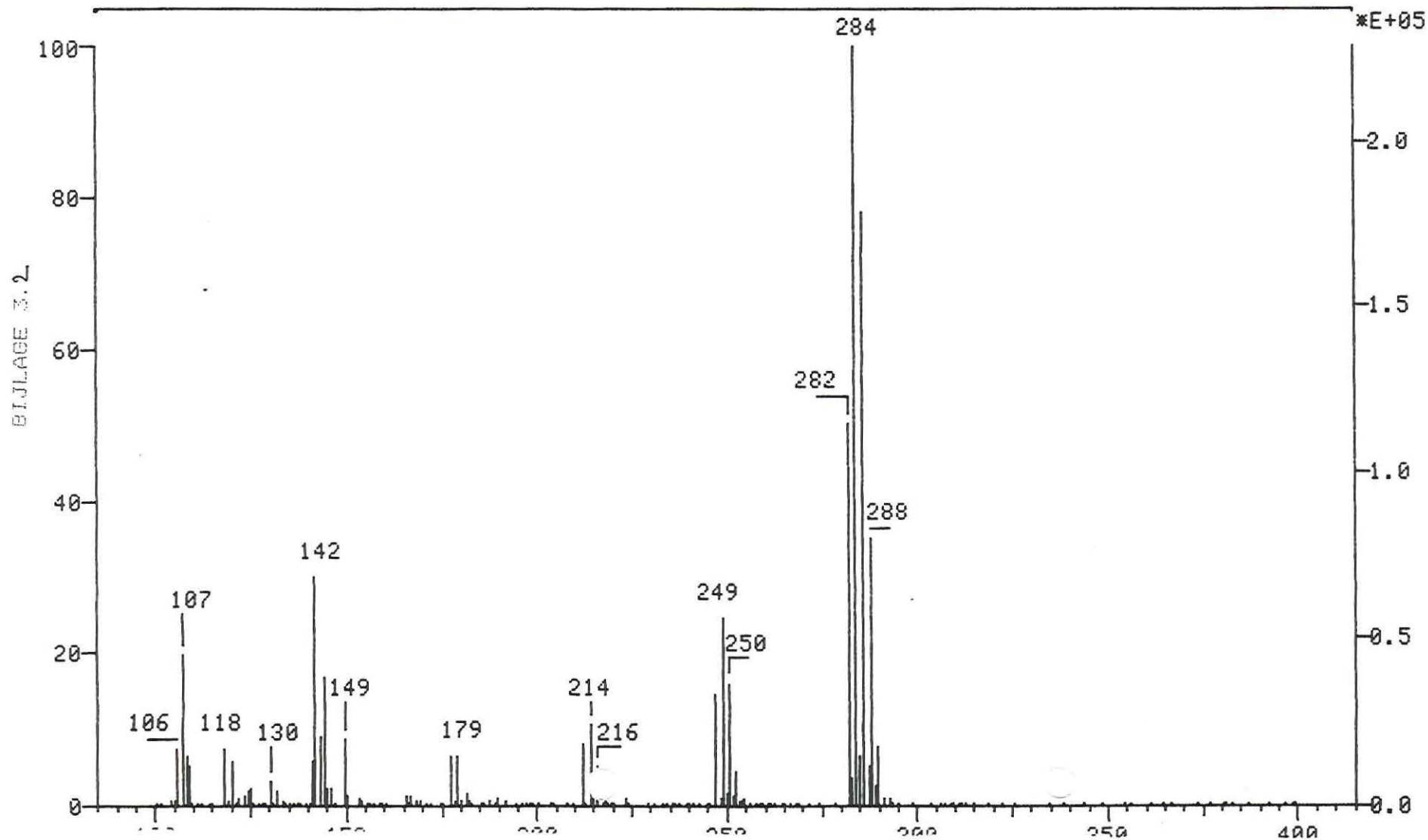
TYPICAL RESOLUTION SETTING
NERMAG R3010 TRIPLE

CHRO: RIKILT16 ver 1 on UIC 2 16 2-MAR-88 Elapse: 00:00:01 1
Samp: HEXACHLOROBENZENE 10NG EI Start : 13:42:07 1489
Comm: 25M SE54, 80 FOR 4MIN, >010/MIN TO 240, ON-COLUMN INJ
Mode: EI +Q1MS LMR UP LR
Oper: PBE Inlet : GC
Peak: 1000.00 mmu Label wndw: 150 > 1100 Masses: 100 > 400
Area: 0, 4.00 Baseline : 0, 3 Label : 0, 40.00

*GC/MS
voorbeeld
van MS spectrum
LMR/LR Q1*



SPEC: RIKILT16 ver 1 on UIC 2 16 2-MAR-88 DERIVED SPECTRUM 9
Samp: HEXACHLOROBENZENE 10NG EI Start : 11:53:49 1490
Comm: 25M SE54, 80 FOR 4MIN,>010/MIN TO 240, ON-COLUMN INJ
Mode: EI +Q1MS LMR UP LR
Oper: PBE Inlet : GC
Base: 283.8 Inten : 228153 Masses: 100 > 400
Norm: 283.8 RIC : 1256578 # peaks: 205
Peak: 1000.00 mmu
Data: / 995 > 1000 - / 1001 > / 985 > 994

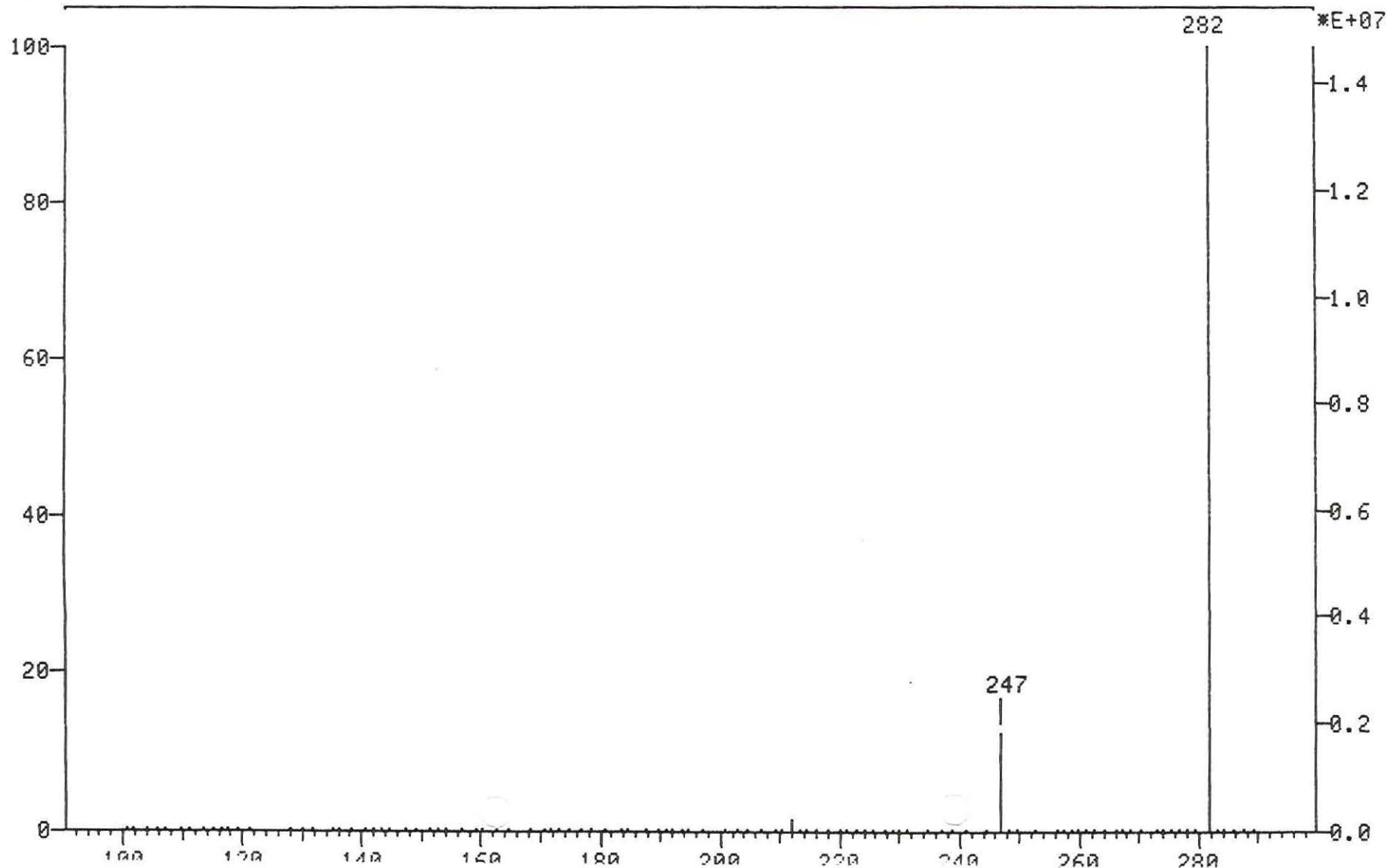


SPEC: HCB1 ver 1 on UIC 2 16 2-MAR-88 Elapse: 00:00:20 20
 Samp: PROBE EI Start : 16:43:24 405
 Comm: HCB AT DIFFERENT COLL ENERGIES
 Mode: EI +DAUGHTERS OF 281.9 @ -5eV LMR GAS UP LR
 Oper: JKW Inlet :
 Base: 281.8 Inten : 14728302 Masses: 100 > 290
 Norm: 281.8 RIC : 16969958 # peaks: 141
 Peak: 1000.00 mmu

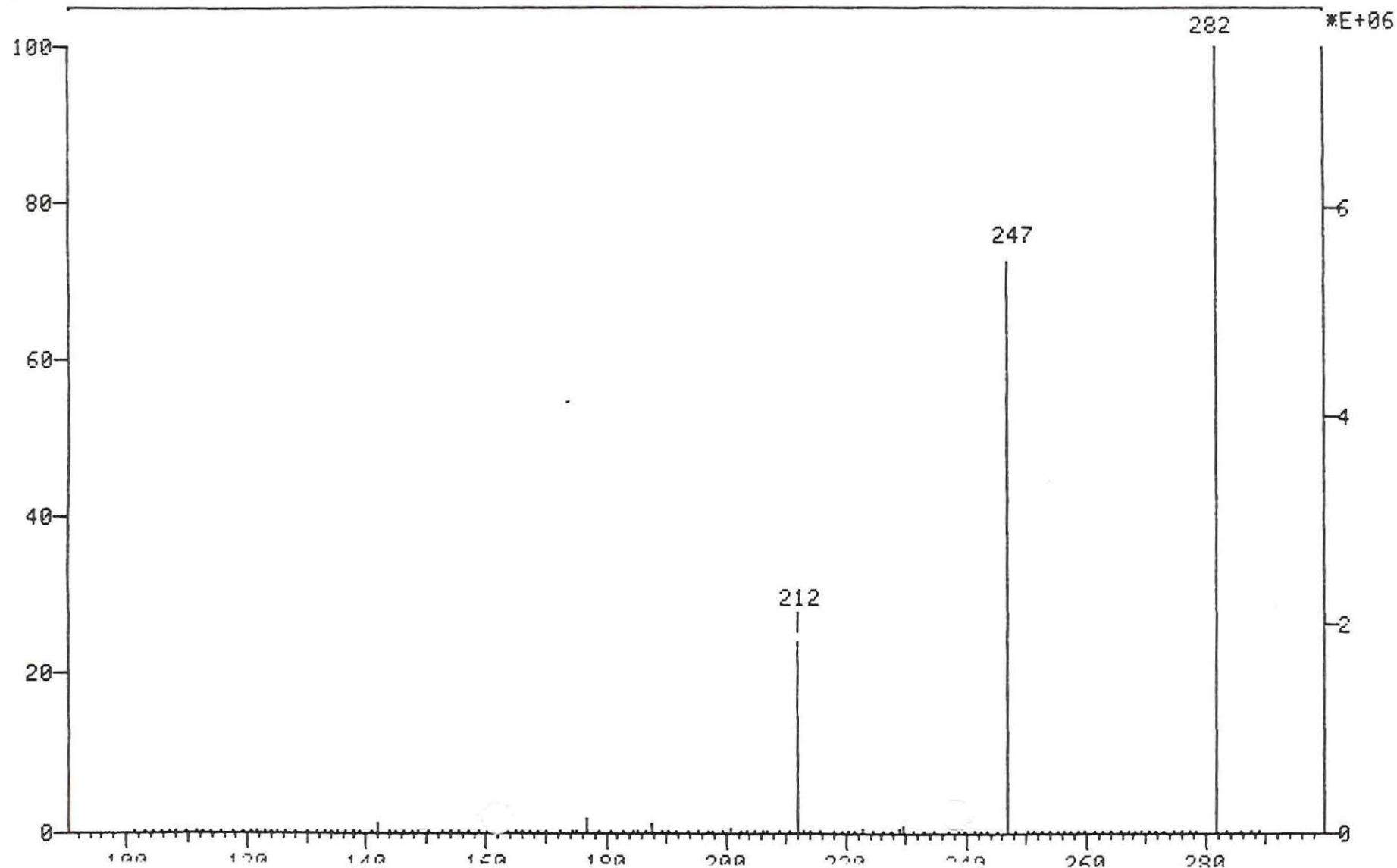
Involved
Antio Collision energy Δ
daughters mass 282
Q1 → 282
Q2 → full scan
EI probe

CL35

BIJLAGE 3.3



SPEC: HCB1 ver 1 on UIC 2 16 2-MAR-88 Elapse: 00:01:01 60
Samp: PROBE EI Start : 16:43:24 405
Comm: HCB AT DIFFERENT COLL ENERGIES
Mode: EI +DAUGHTERS OF 281.9 @ -15eV LMR GAS UP LR
Oper: JKW Inlet :
Base: 281.8 Inten : 7577182 Masses: 100 > 290
Norm: 281.8 RIC : 15549628 # peaks: 131
Peak: 1000.00 mmu



SPEC: HCB1 ver 1 on UIC 2 16

2-MAR-88 Elapse: 00:01:32 90

Samp: PROBE EI

Start : 16:43:24 405

Comm: HCB AT DIFFERENT COLL ENERGIES

Mode: EI +DAUGHTERS OF 281.9 @ -25eV LMR GAS UP LR

Oper: JKW

Inlet :

Base: 211.8

Inten : 5634468

Masses: 100 > 290

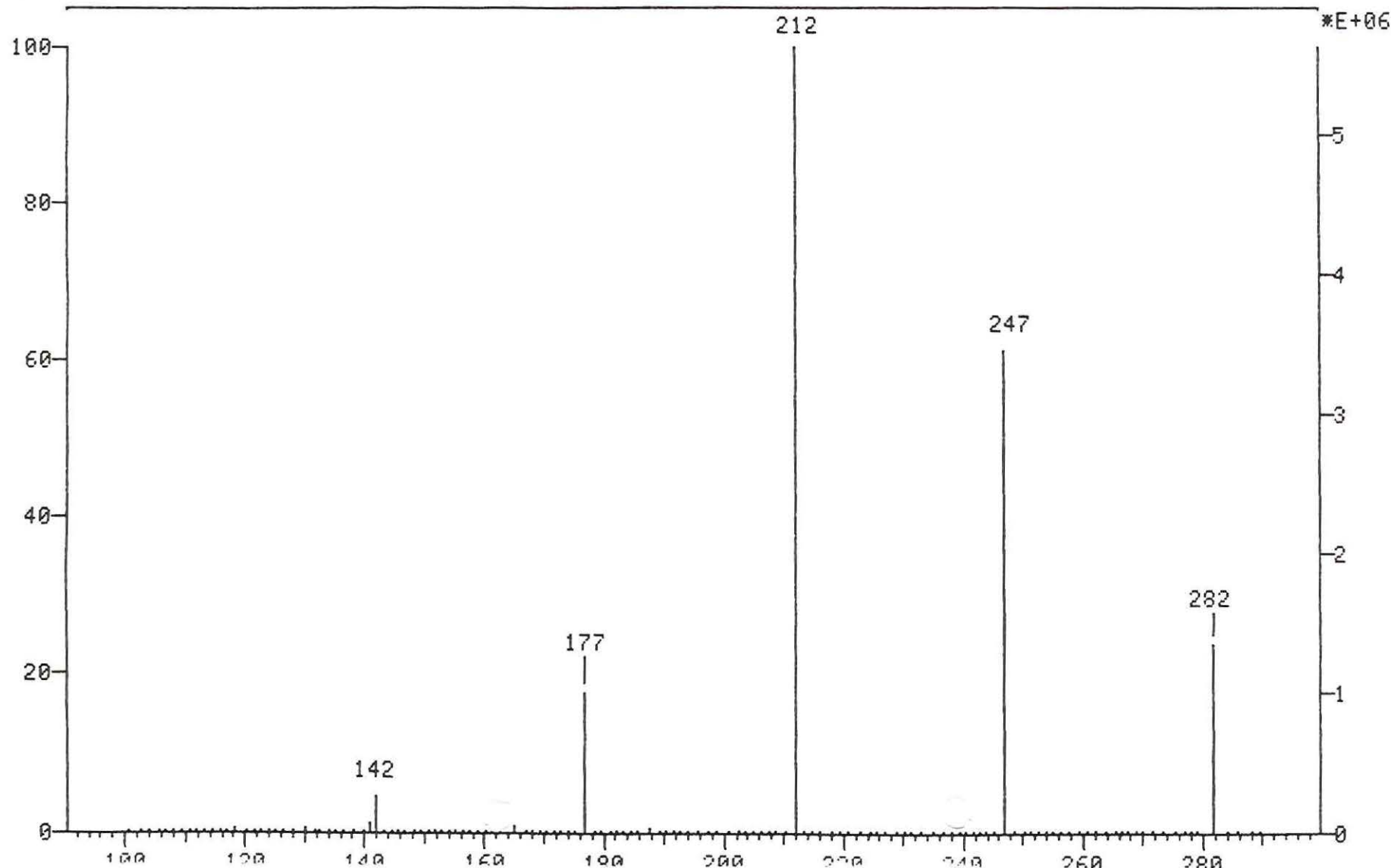
Norm: 211.8

RIC : 11979450

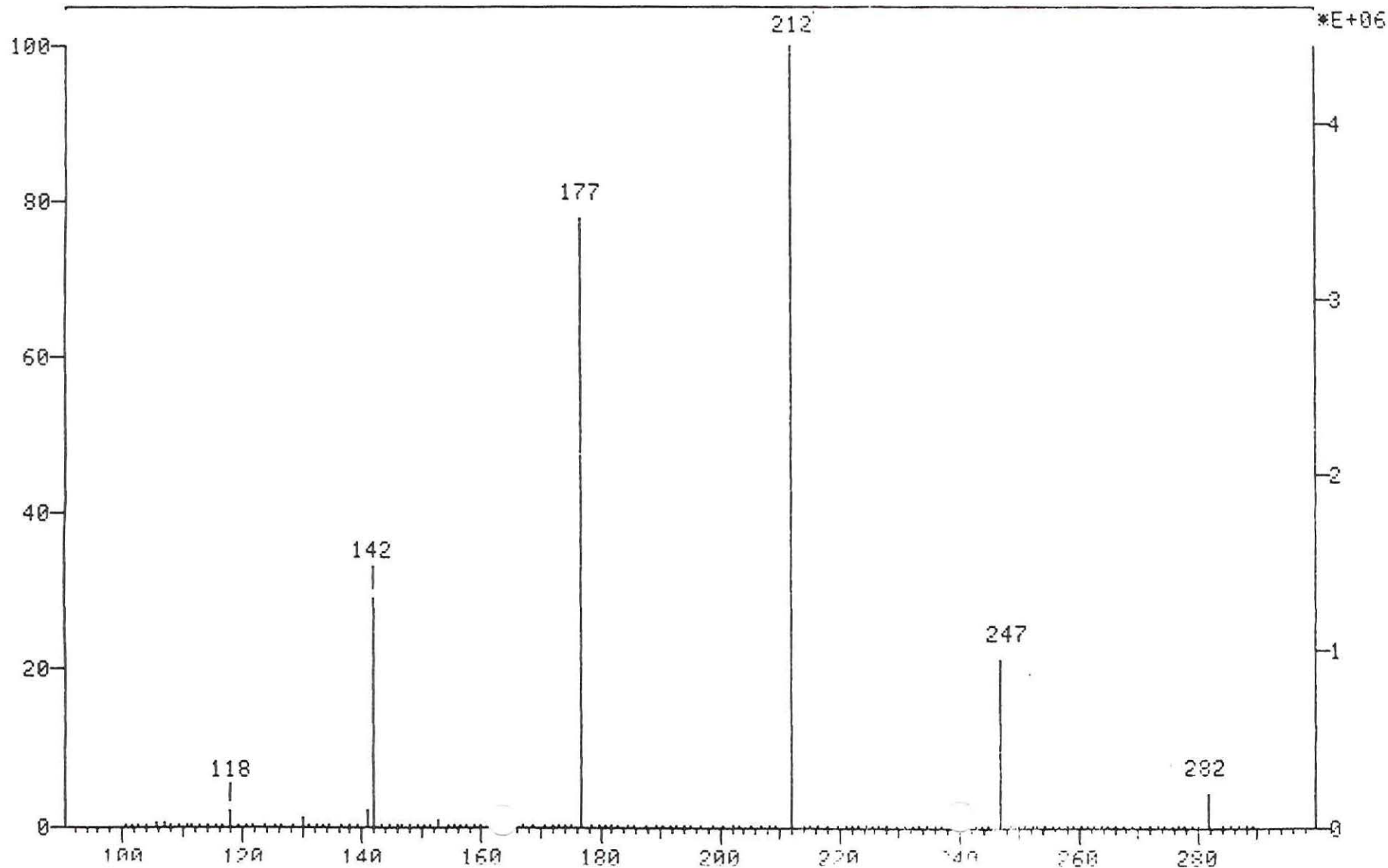
peaks: 135

Peak: 1000.00 mmu

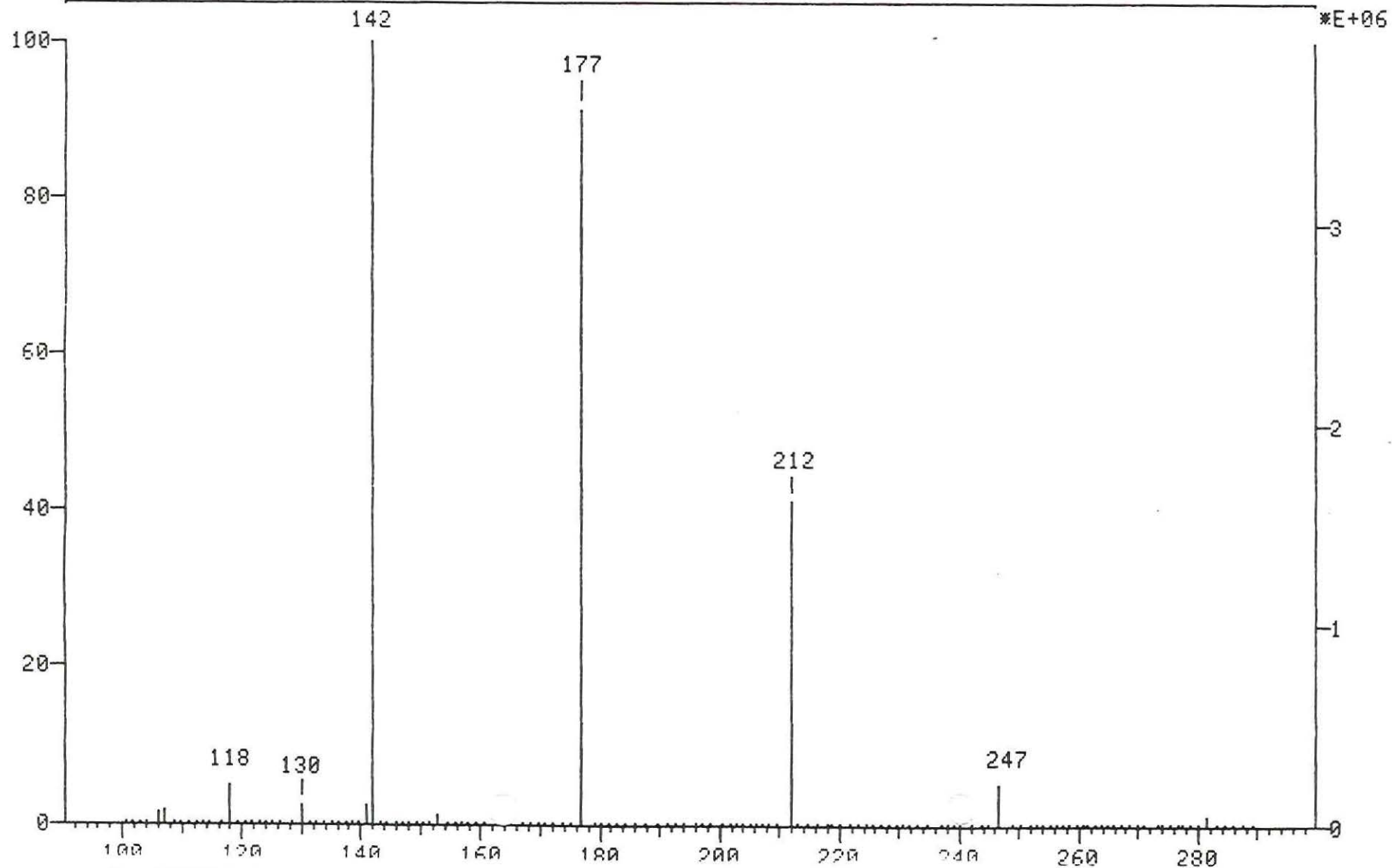
BIJLAGE 3.5



SPEC: HCB1 ver 1 on UIC 2 16 2-MAR-88 Elapse: 00:01:48 105
Samp: PROBE EI Start : 16:43:24 405
Comm: HCB AT DIFFERENT COLL ENERGIES
Mode: EI +DAUGHTERS OF 281.9 @ -35eV LMR GAS UP LR
Oper: JKW Inlet :
Base: 211.8 Inten : 4451188 Masses: 100 > 290
Norm: 211.8 RIC : 10832124 # peaks: 141
Peak: 1000.00 mmu

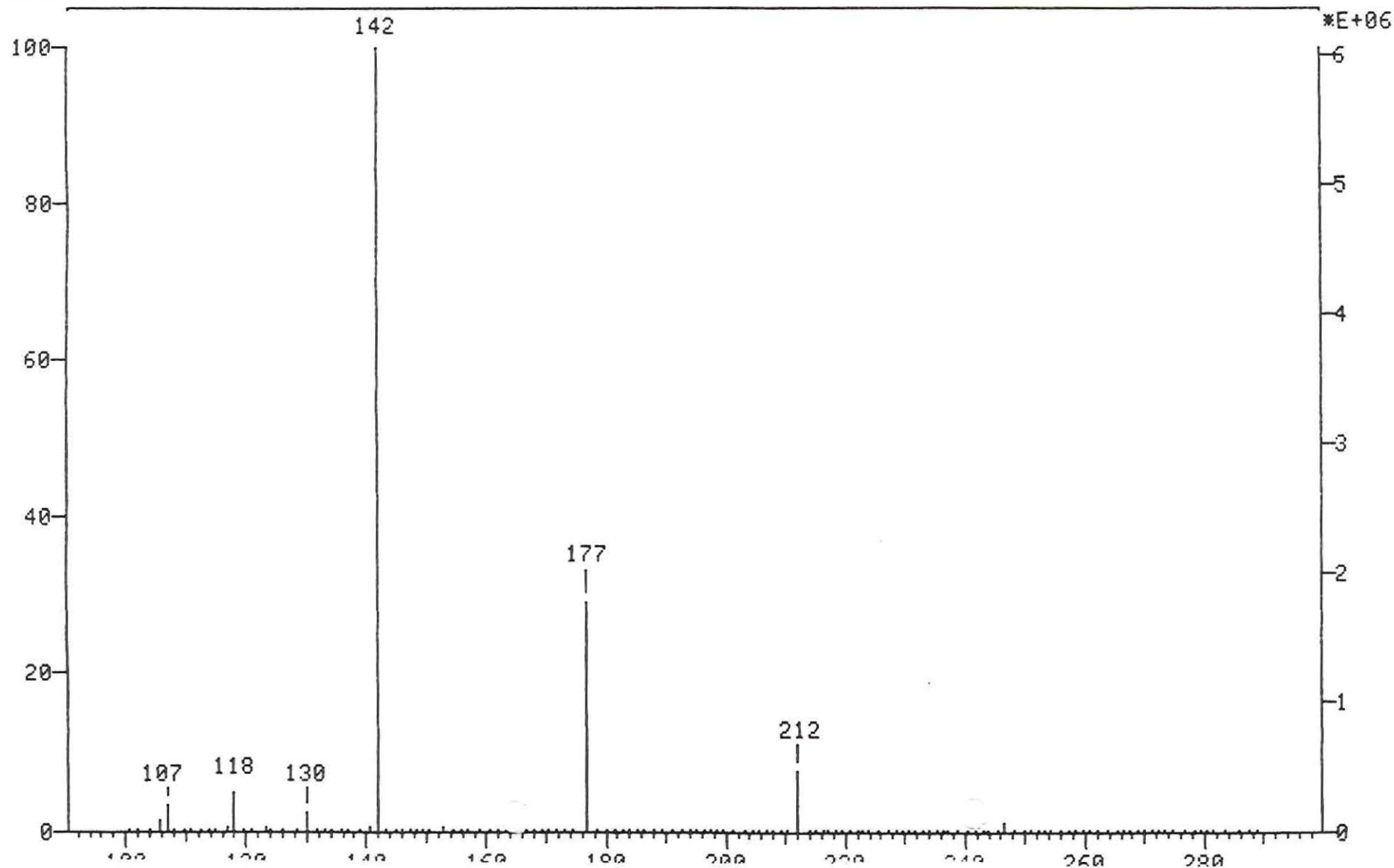


SPEC: HCB1 ver 1 on VIC 2 16 2-MAR-88 Elapse: 00:01:58 115
Samp: PROBE EI Start : 16:43:24 405
Comm: HCB AT DIFFERENT COLL ENERGIES
Mode: EI +DAUGHTERS OF 281.9 @ -45eV LMR GAS UP LR
Oper: JKW Inlet :
Base: 141.9 Inten : 3927378 Masses: 100 > 290
Norm: 141.9 RIC : 10070238 # peaks: 141
Peak: 1000.00 mmu



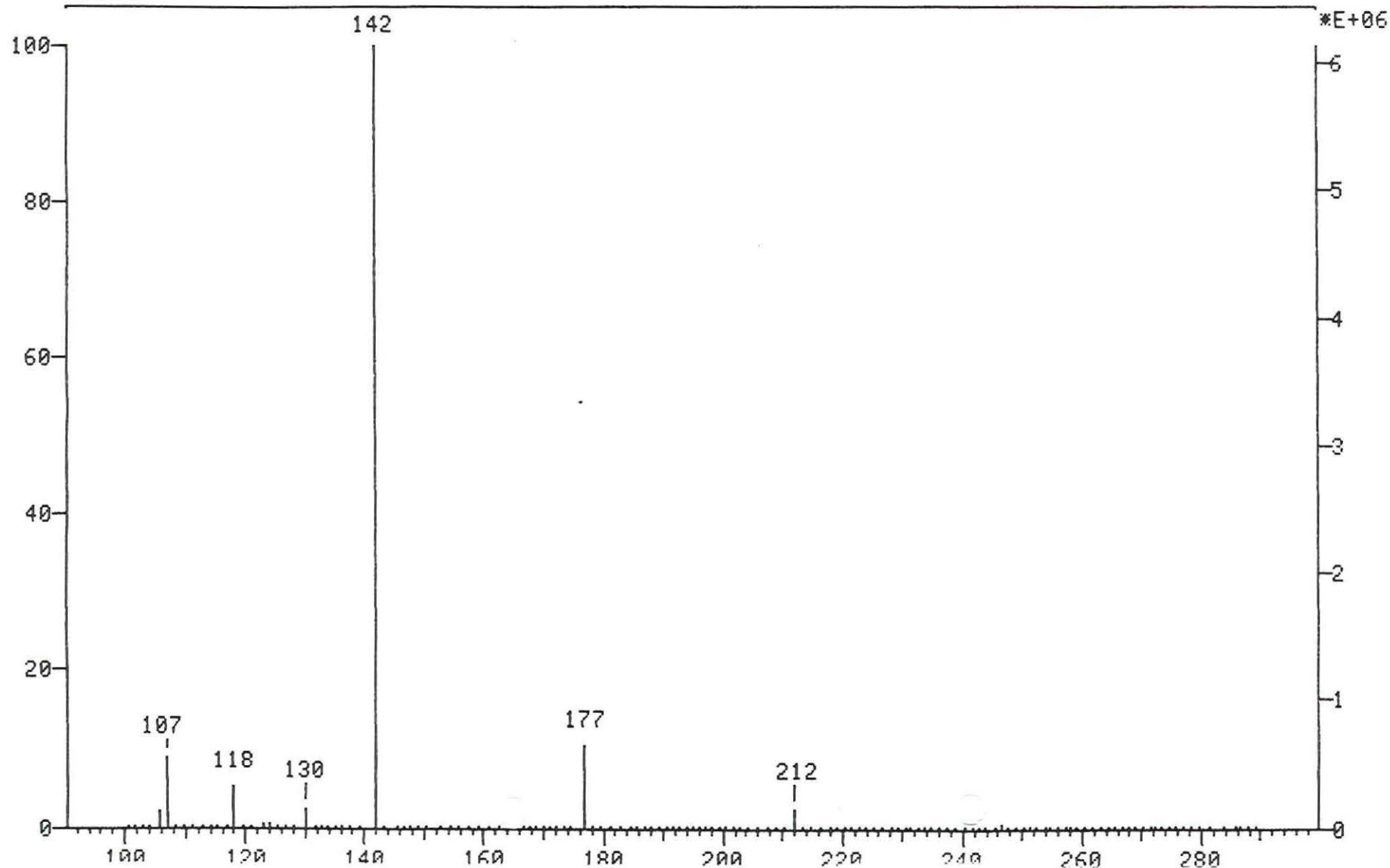
SPEC: HCB1 ver 1 on UIC 2 16 2-MAR-88 Elapse: 00:02:08 125
Samp: PROBE EI Start : 16:43:24 405
Comm: HCB AT DIFFERENT COLL ENERGIES
Mode: EI +DAUGHTERS OF 281.9 @ -55eV LMR GAS UP LR
Oper: JKW Inlet :
Base: 141.9 Inten : 6061944 Masses: 100 > 290
Norm: 141.9 RIC : 9348092 # peaks: 137
Peak: 1000.00 mmu

BIJLAGE 3.8



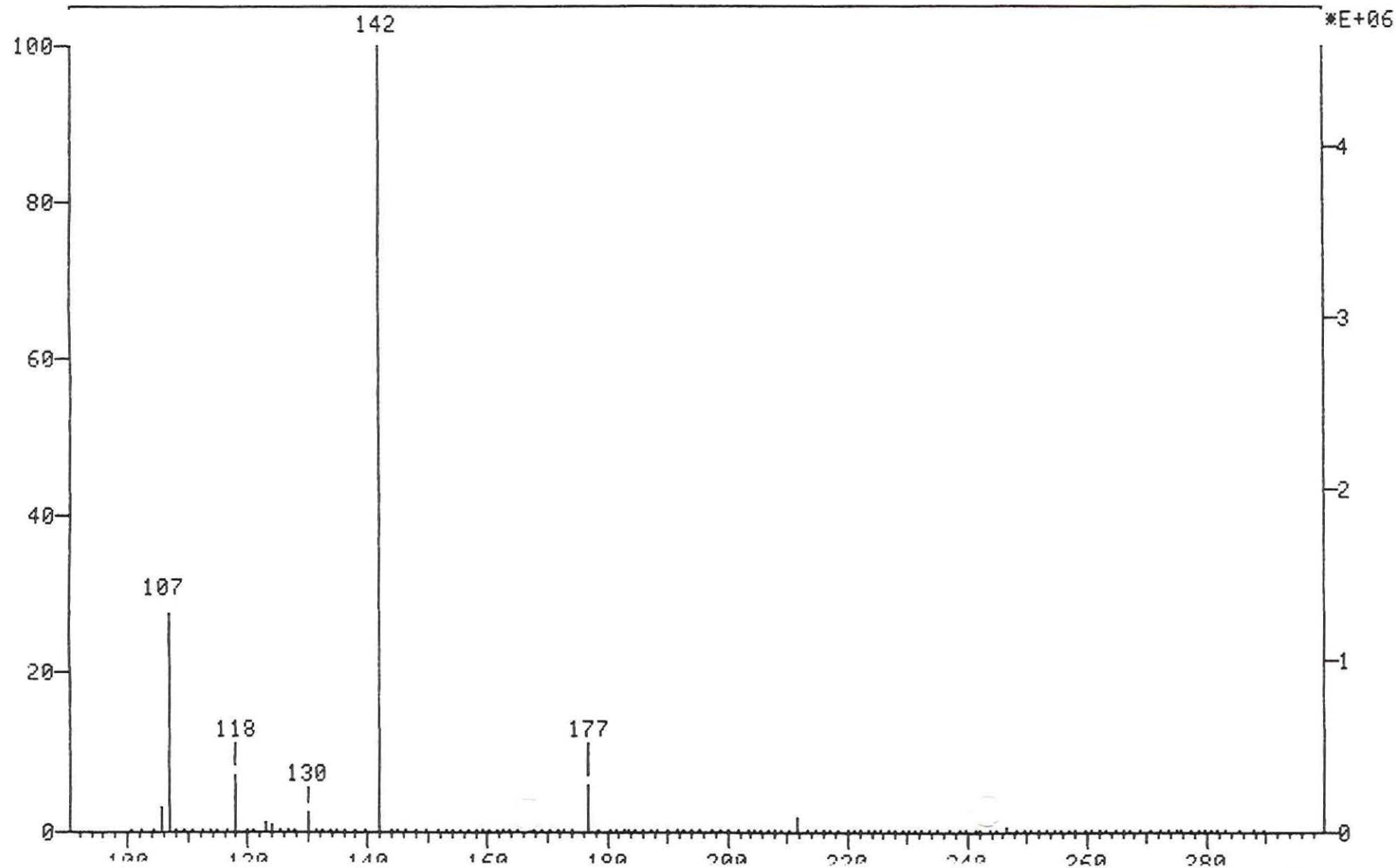
SPEC: HCB1 ver 1 on UIC 2 16 2-MAR-88 Elapse: 00:02:19 135
Samp: PROBE EI Start : 16:43:24 405
Comm: HCB AT DIFFERENT COLL ENERGIES
Mode: EI +DAUGHTERS OF 281.9 @ -65eV LMR GAS UP LR
Oper: JKW Inlet :
Base: 141.9 Inten : 6148332 Masses: 100 > 290
Norm: 141.9 RIC : 8346030 # peaks: 141
Peak: 1000.00 mmu

BIJLAGE 3.9

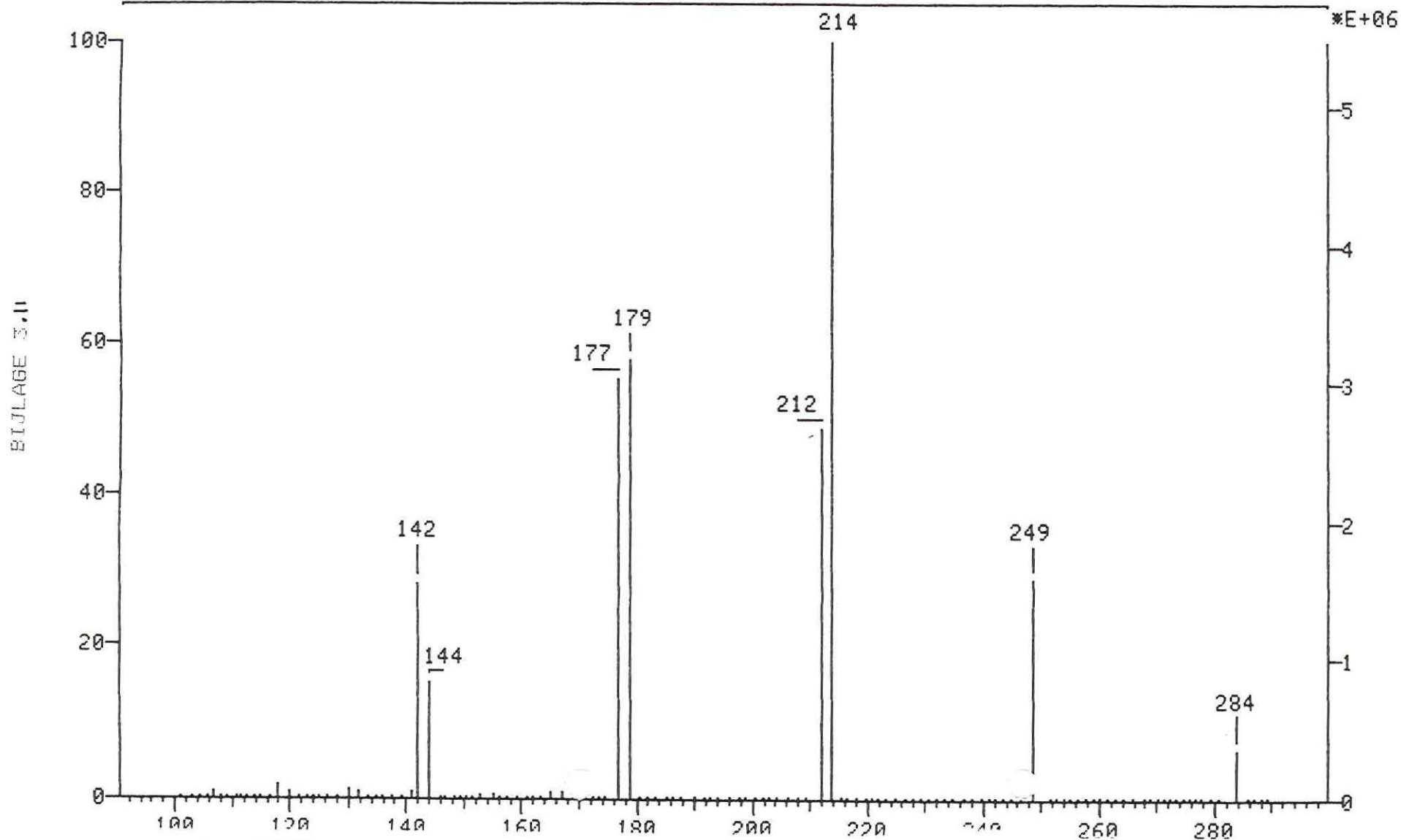


SPEC: HCB1 ver 1 on UIC 2 16 2-MAR-88 Elapse: 00:02:29 145
Samp: PROBE EI Start : 16:43:24 405
Comm: HCB AT DIFFERENT COLL ENERGIES
Mode: EI +DAUGHTERS OF 281.9 @ -75eV LMR GAS UP LR
Oper: JKW Inlet :
Base: 141.9 Inten : 4595941 Masses: 100 > 290
Norm: 141.9 RIC : 7021260 # peaks: 138
Peak: 1000.00 mmu

BIJLAGE 3.10



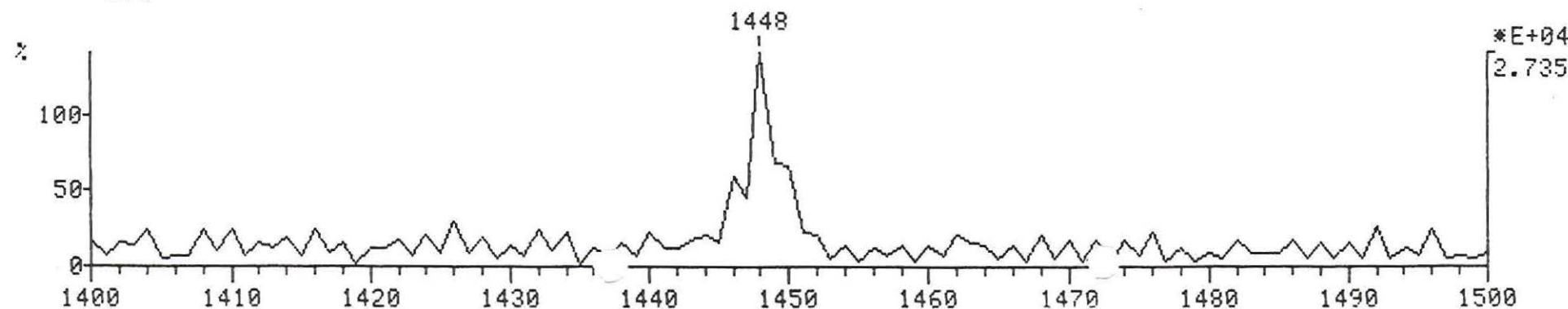
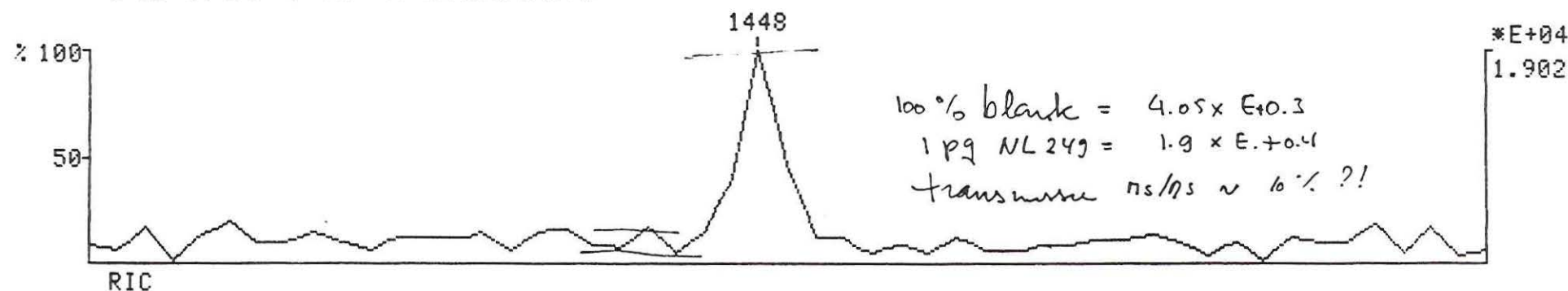
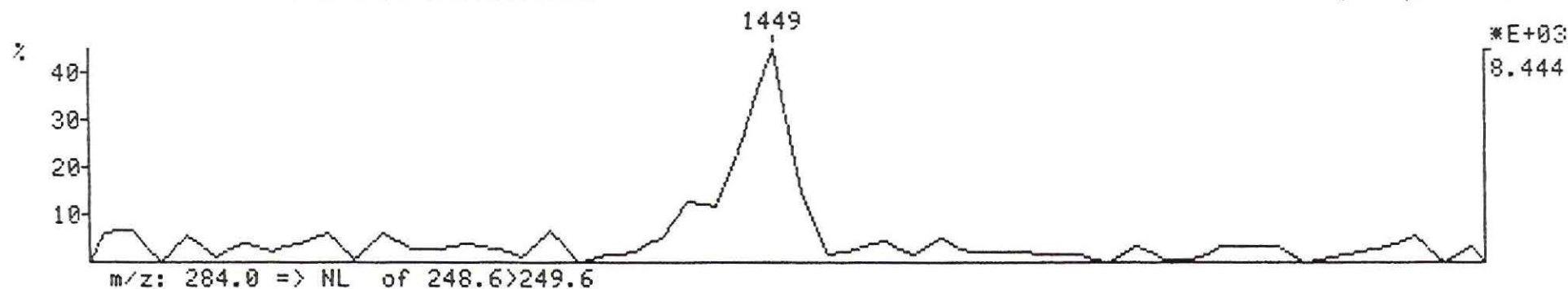
SPEC: HCB1 ver 1 on UIC 2 16 2-MAR-88 Elapse: 00:03:32 206
Samp: PROBE EI Start : 16:43:24 405
Comm: HCB AT DIFFERENT COLL ENERGIES
Mode: EI +DAUGHTERS OF 283.9 @ -35eV LMR GAS UP LR
Oper: JKW Inlet :
Base: 213.8 Inten : 5494235 Masses: 100 > 290
Norm: 213.8 RIC : 19489630 # peaks: 130
Peak: 1000.00 mmu



CHRO: RIKILT22 ver 1 on UIC 2 16 4-MAR-88 Elapse: 00:00:01 1
 Samp: 1PG HCB NICI, NEUTRAL LOSS 247,249 Start : 14:36:26 1562
 Comm: 25M SE54, 80 FOR 4MIN, >@10/MIN
 Mode: CI -NLOSS LMR GAS UP LR
 Oper: PBE
 Peak: 1000.00 mmu Label wndw: 1441 > 1456 Masses: 275 > 295
 Area: 0, 4.00 Baseline : 0, 3 Label : 3, 40.00

1pg HCB
 GC/MS
 neutral loss
 MS/MS!
 Q1/Q3 fixed difference
 m/c 55 off set

m/z: 282.0 => NL of 246.6>247.6



CHRO: RIKILT21 ver 1 on UIC 2 16 4-MAR-88 Elapse: 00:00:01 1
Samp: BLANK HCB NICI, NEUTRAL LOSS 247,249 Start : 14:04:22 2022
Comm: 25M SE54, 80 FOR 4MIN,>010/MIN
Mode: CI -NLOSS LMR GAS UP LR
Oper: PBE
Peak: 1000.00 mmu Label wndw: 1380 > 1460 Masses: 275 > 295
Area: 0, 4.00 Baseline : 0, 3 Label : 0, 40.00

blank

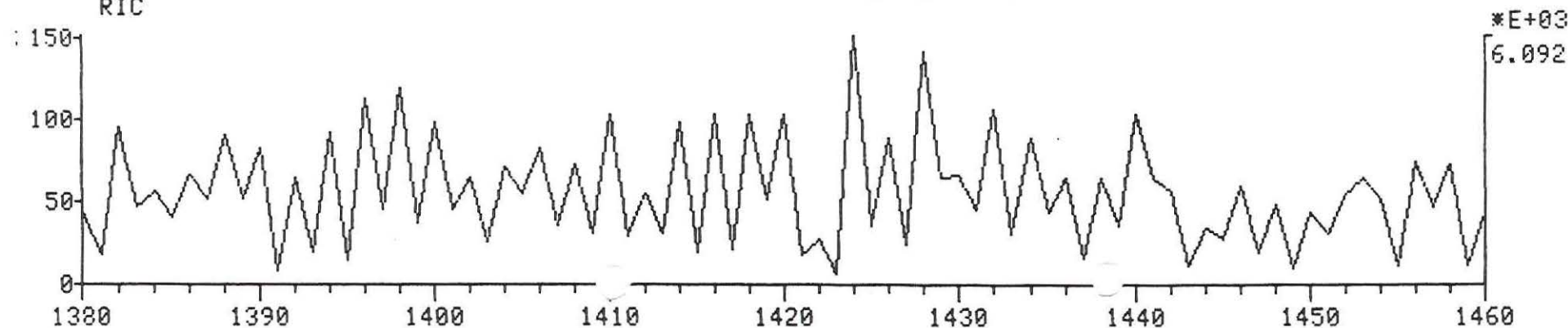
m/z: 282.0 => NL of 246.6>247.6



m/z: 284.0 => NL of 248.6>249.6

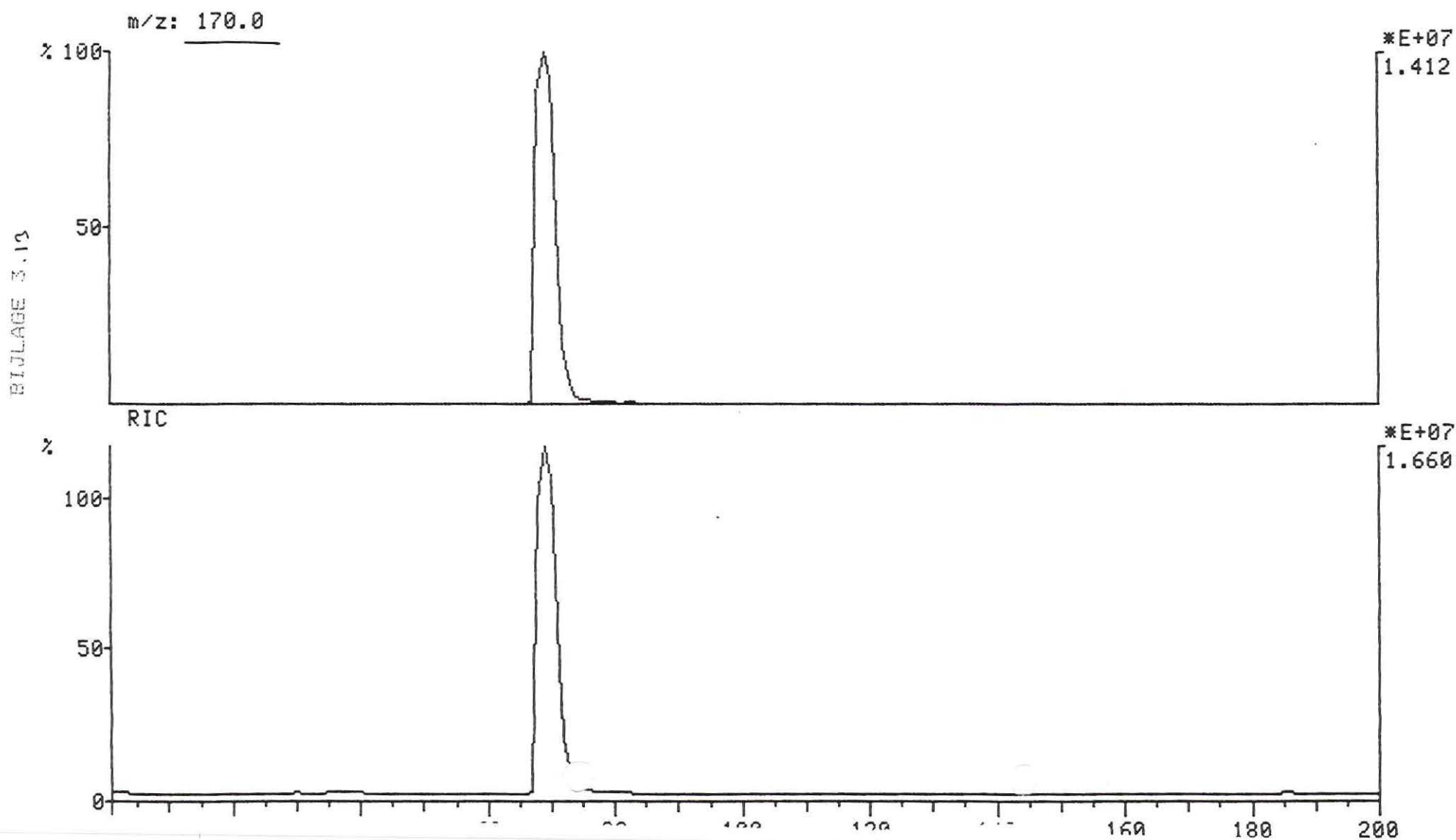


RIC



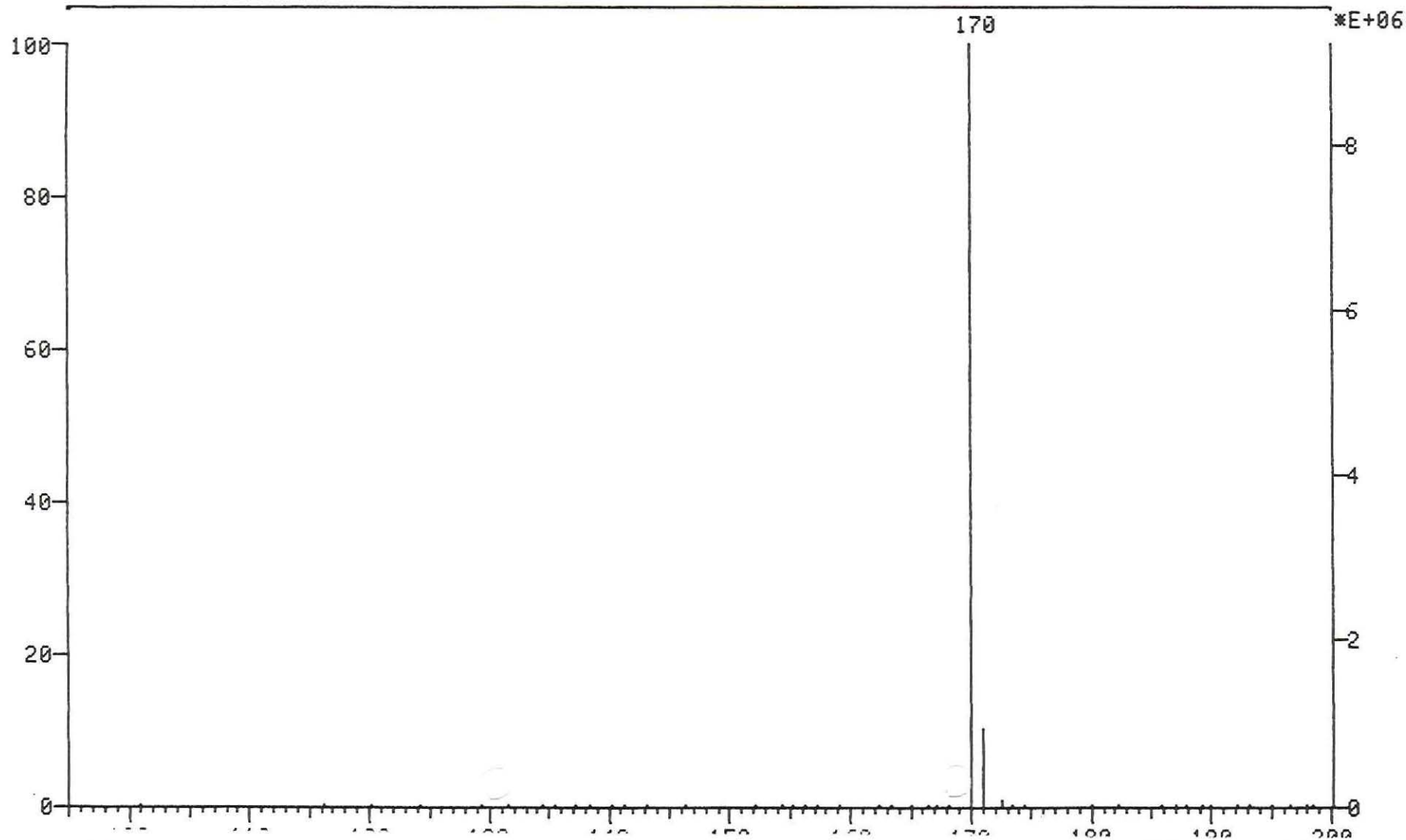
CHRO: RIKILT3 ver 1 on UIC 2 16 24-FEB-88 Elapse: 00:00:01 1
Samp: IPRONIDAZOLE TSP (SAMPLE 3) Start : 14:17:27 231
Comm: 1.7ML/MIN 50% METHANOL/WATER +0.3ML/MIN 0.2MAMMONIUM ACETATE
Mode: TSP +Q1MS LMR UP LR
Oper: PHIL Inlet :
Peak: 1000.00 mmu Label wndw: 1 > 200 Masses: 100 > 300
Area: 0, 4.00 Baseline : 0, 3 Label : 0, 40.00

TSP



SPEC: RIKILT3 ver 1 on UIC 2 16 24-FEB-88 DERIVED SPECTRUM 9
Samp: IPRONIDAZOLE TSP (SAMPLE 3) Start : 14:17:27 231
Comm: 1.7ML/MIN 50% METHANOL/WATER +0.3ML/MIN 0.2MAMMONIUM ACETATE
Mode: TSP +Q1MS LMR UP LR
Oper: PHIL
Base: 170.1 Inten : 9216677 Inlet :
Norm: 170.1 RIC : 10462180 Masses: 100 > 300
Peak: 1000.00 mmu # peaks: 171
Data: / 67 > 71 - / 74 > 81

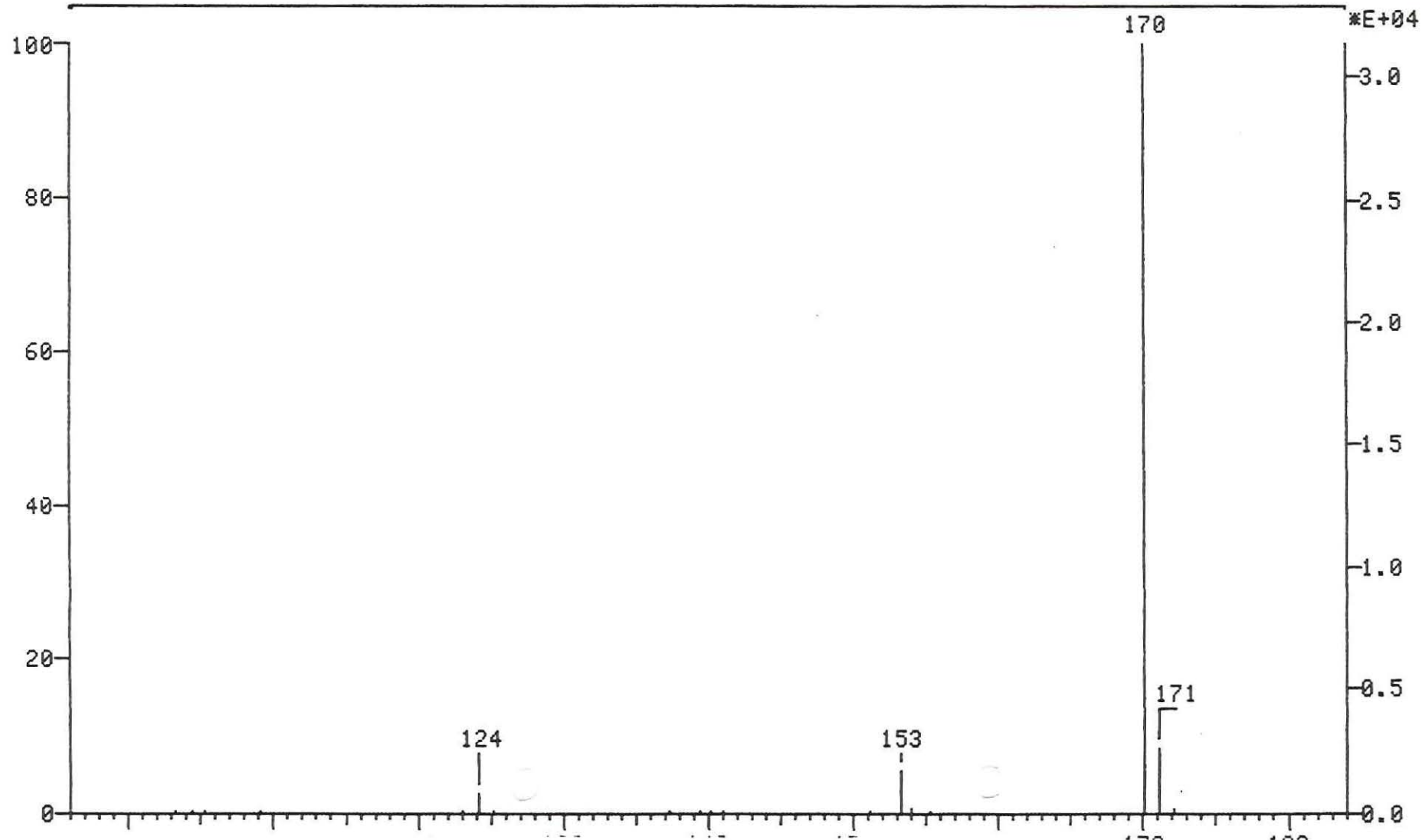
← pure TSP



SPEC: RIKILT9 ver 1 on UIC 2 16 24-FEB-88 DERIVED SPECTRUM 9
Samp: IPRONIDAZOLE PLASMA DISCHARGE, REP 80V Start : 15:28:57 62
Comm: 1.7ML/MIN METHANOL/WATER
Mode: TSP +Q1MS LMR UP LR
Oper: PHIL
Base: 170.1 Inten : 31289 Inlet :
Norm: 170.1 RIC : 36846 Masses: 100 > 180
Peak: 1000.00 mmu # peaks: 18
Data: / 19 > 24 - / 26 > 28

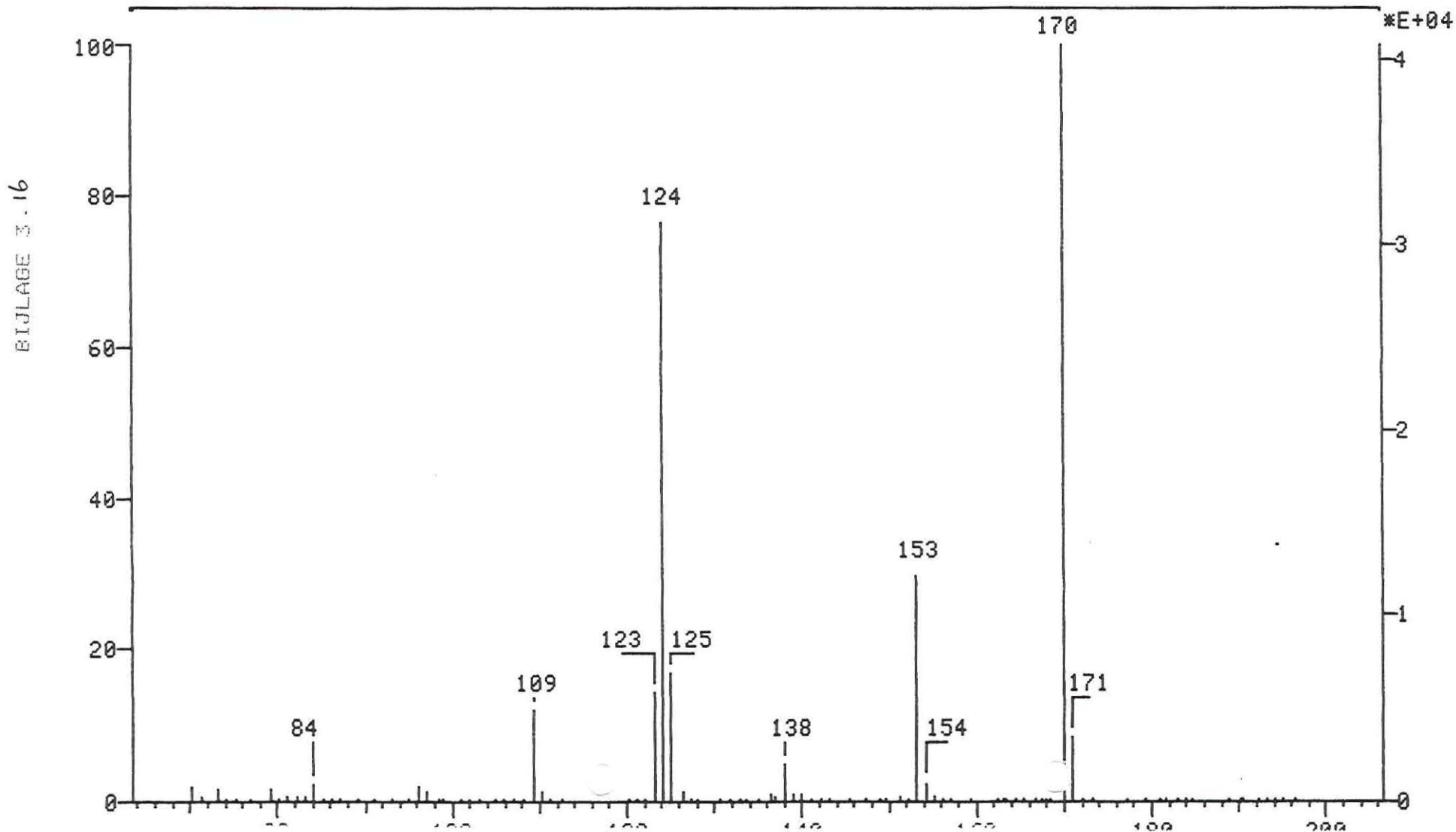
*this.
repeller 80V
to induce fragm.
discharge
no buffer*

BIJLAGE 3.15



SPEC: RIKILT11 ver 1 on UIC 2 16 24-FEB-88 DERIVED SPECTRUM 9
Samp: IPRONIDAZOLE PLASMA DISCHARGE, REP 115V Start : 15:42:47 62
Comm: 1.7ML/MIN METHANOL/WATER
Mode: TSP +Q1MS LMR UP LR
Oper: PHIL
Base: 170.1 Inten : 40739 Inlet :
Norm: 170.1 RIC : 116133 Masses: 70 > 200
Peak: 1000.00 mmu # peaks: 99
Data: / 20 > 24 - / 26 > 28

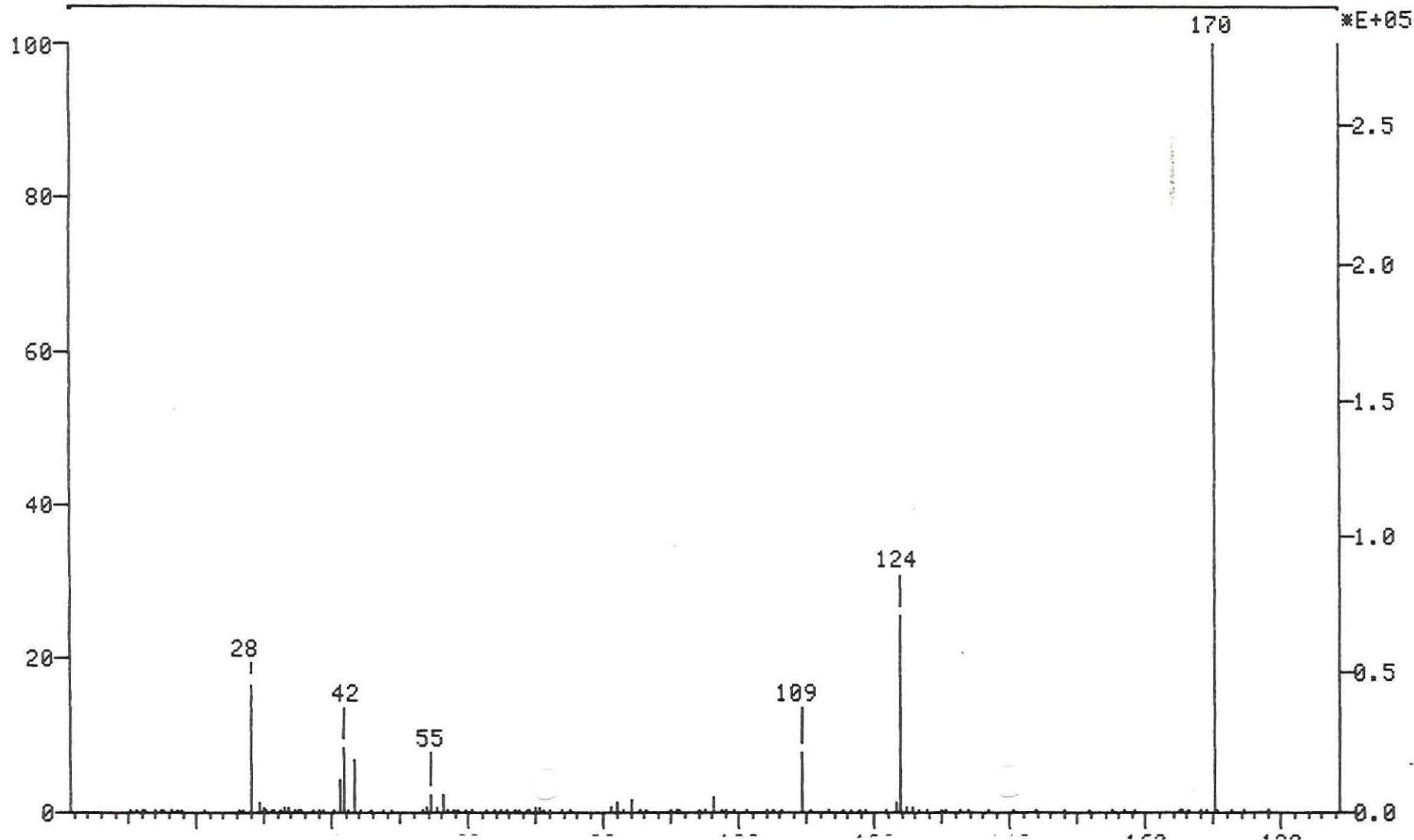
rep 115V
no buffer



SPEC: RIKILT5 ver 1 on UIC 2 16 24-FEB-88 DERIVED SPECTRUM 9
 Samp: IPRONIDAZOLE TSP, DAUGHTERS OF 170 Start : 14:52:31 62
 Comm: 1.7ML/MIN 50% METHANOL/WATER +0.3ML/MIN 0.2MAMMONIUM ACETATE
 Mode: TSP +DAUGHTERS OF 170.1 @ -30eV LMR GAS UP LR
 Oper: PHIL Inlet :
 Base: 170.1 Inten : 279688 Masses: 10 > 180
 Norm: 170.1 RIC : 529684 # peaks: 141
 Peak: 1000.00 mmu
 Data: / 23 > 29 - / 30 > 36

→ pure TSP
 daughter sp. m/e 170
 -30 eV

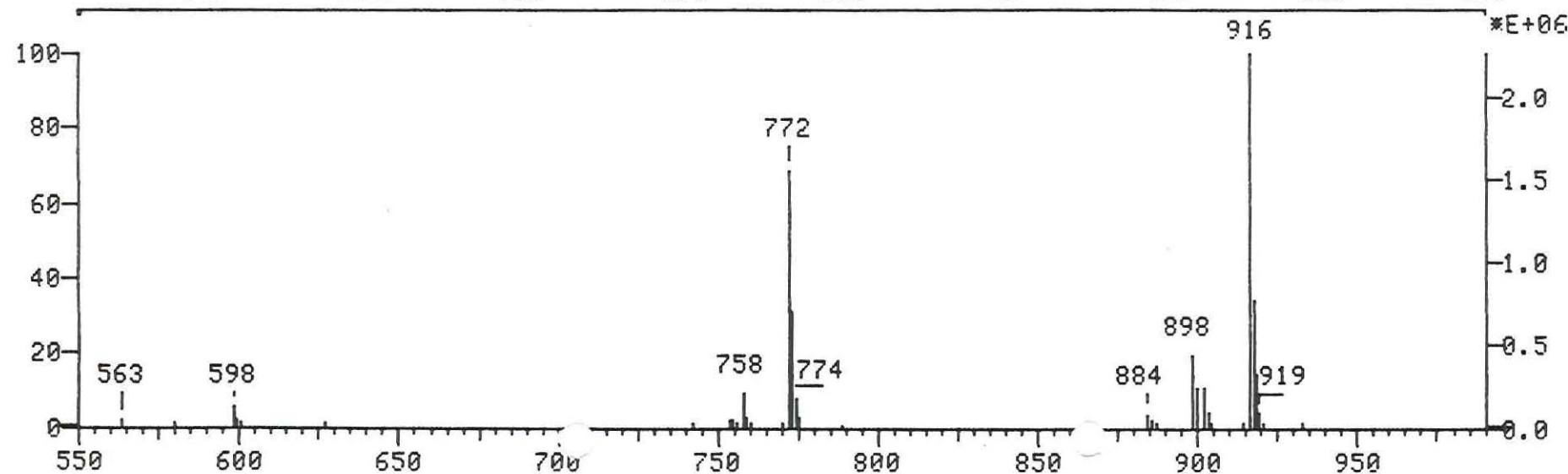
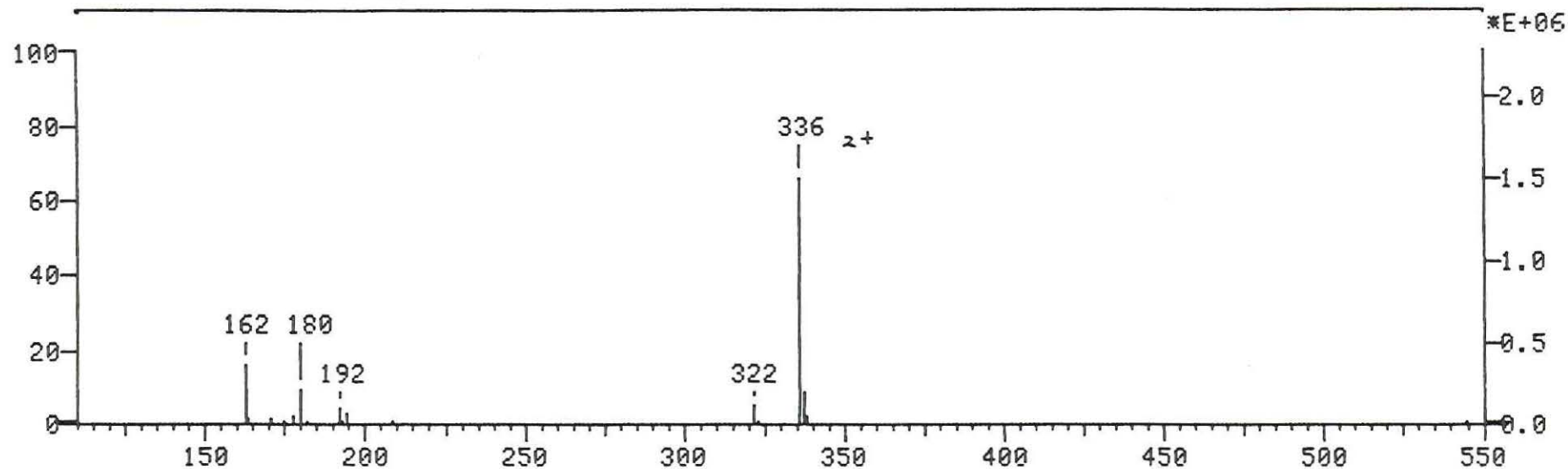
BIJLAGE 3.17



SPEC: RIKILT12 ver 1 on UIC 2 16 24-FEB-88 DERIVED SPECTRUM 9
 Samp: TYLOSINE TSP (SAMPLE 2) Start : 16:20:20 97
 Comm: 1.7ML/MIN 50% METHANOL/WATER + 0.3ML/MIN 0.2M AMONIUM ACETATE
 Mode: TSP +Q1MS LMR UP LR
 Oper: PHIL
 Base: 916.4 Inten : 2271863 Inlet :
 Norm: 916.4 RIC : 12245674 Masses: 150 > 950
 Peak: 900.00 mmu # peaks: 625
 Data: / 70 > 73 - / 77 > 80

TSP Tylosine

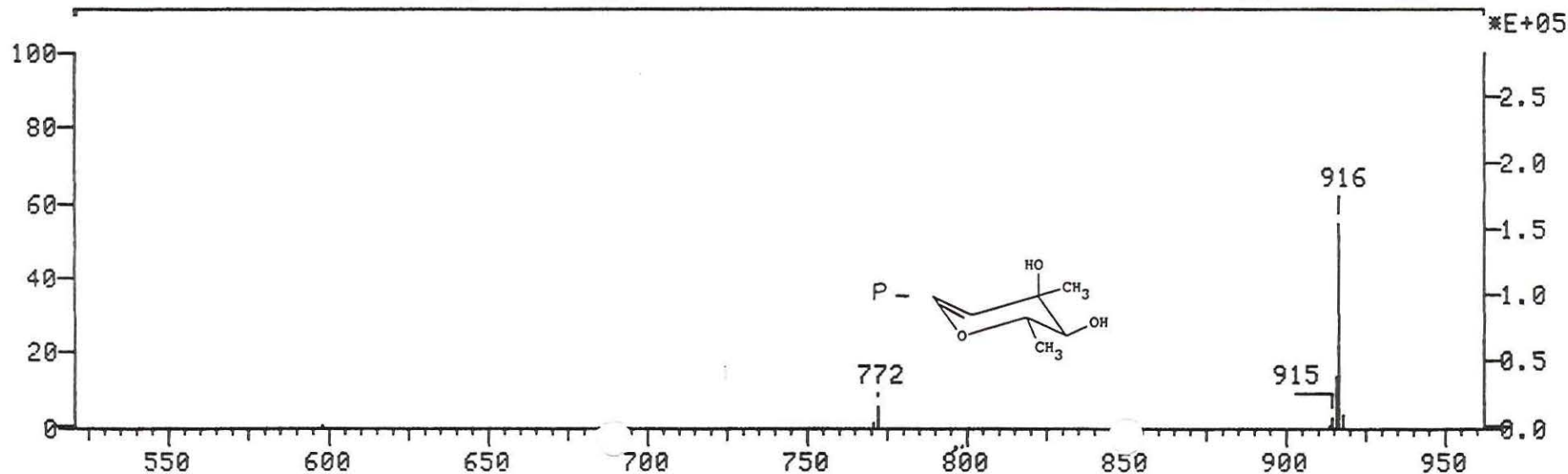
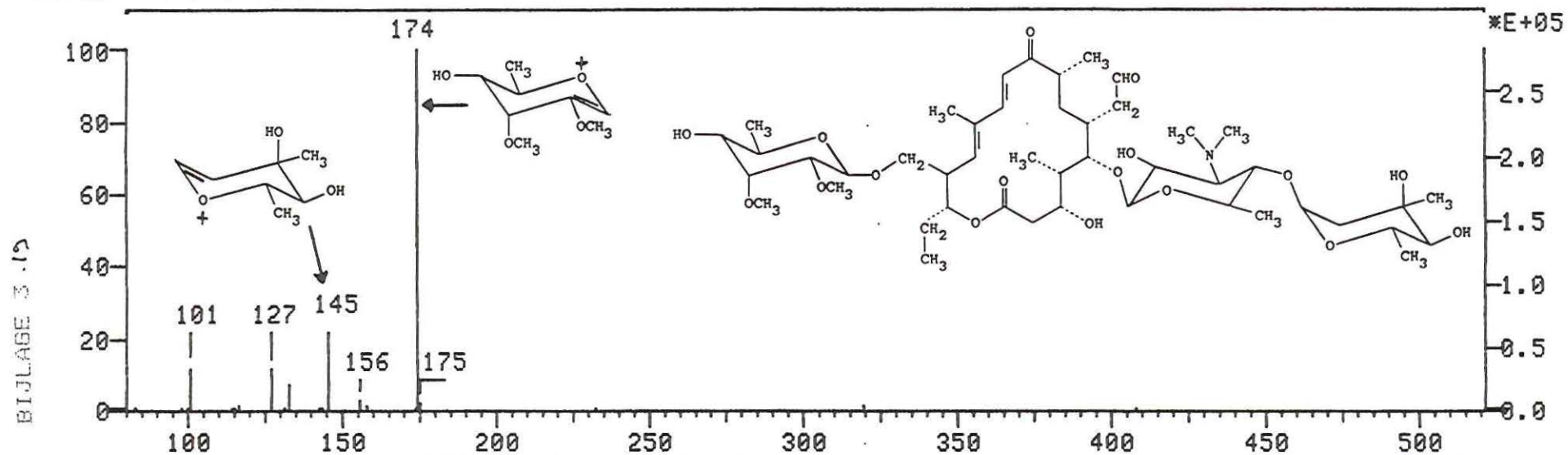
BIJLAGE 3.18



SPEC: RIKILT13 ver 1 on UIC 2 16 24-FEB-88 DERIVED SPECTRUM 9
 Samp: TYLOSINE TSP, DAUGHTERS OF 916 Start : 16:44:36 141
 Comm: 1.7ML/MIN 50% METHANOL/WATER + 0.3ML/MIN 0.2M AMONIUM ACETATE
 Mode: TSP +DAUGHTERS OF 916.3 @ -30eV LMR GAS UP LR
 Oper: PHIL Inlet :
 Base: 174.0 Inten : 283191 Masses: 20 > 920
 Norm: 174.0 RIC : 814131 # peaks: 874
 Peak: 1000.00 mmu
 Data: / 47>78-/30>44

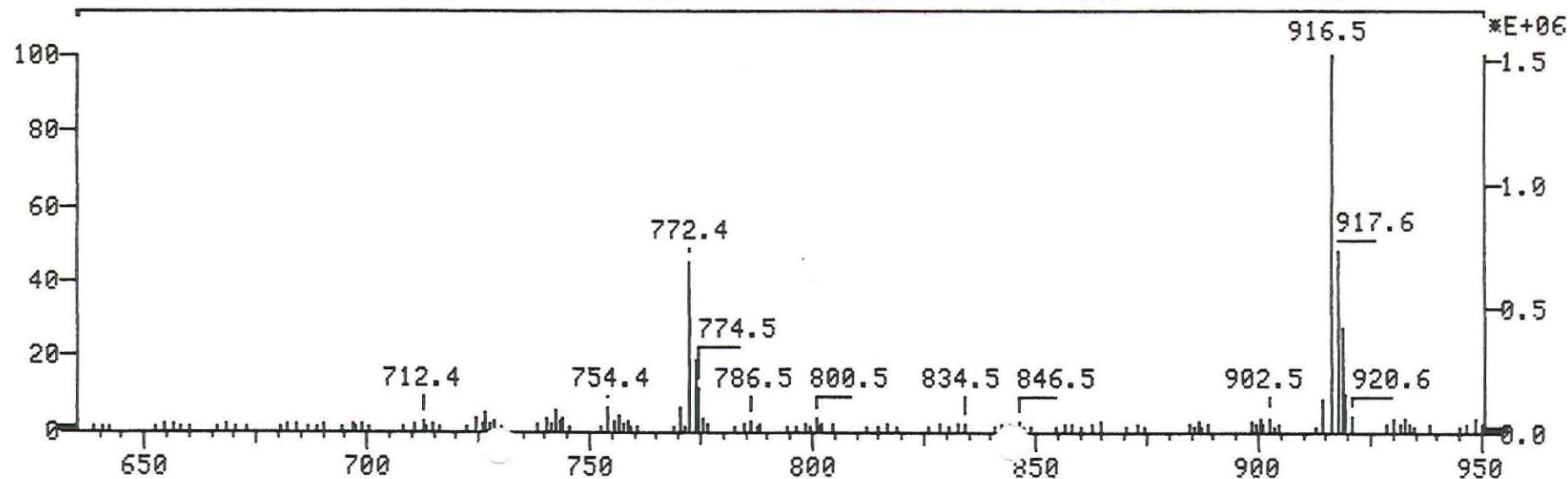
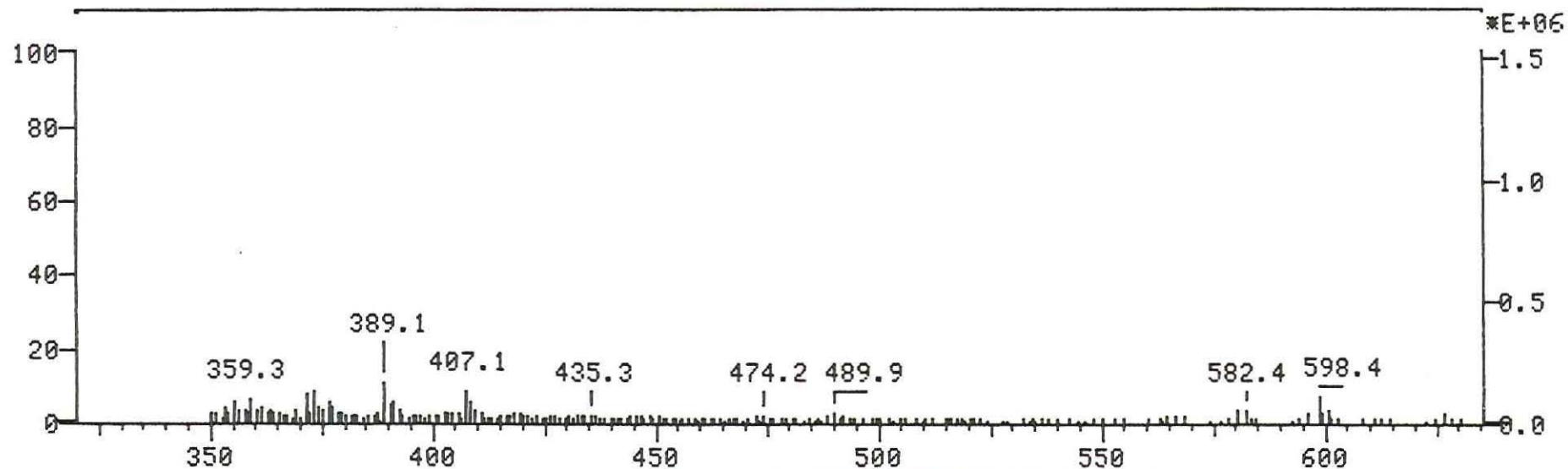
dochter m/e 916
 Tylosine
 TSP

PET emulator.



SPEC: RIKILT15 ver 1 on UIC 2 16 29-FEB-88 DERIVED SPECTRUM 9
Samp: TYLOSIN FAB Start : 10:19:24 62
Comm: FAB
Mode: FAB +Q3MS LMR UP LR
Oper: PHIL
Base: 916.5 Inten : 1525881 Inlet :
Norm: 916.5 RIC : 33774196 Masses: 250 > 1000
Peak: 1000.00 mmu # peaks: 776
Data: / 43>46

FAB. Q3
Tylosine



CHRO: CLEN ver 11 on UIC 2 10

5-DEC-88 Elapse: 00:00:00.7 1

Samp:

Start : 12:14:44 118

Comm: blank spritze

Mode: EI +DAU LMR SYNTH GAS UP LR

Oper: NH3 DCI

Inlet :

Peak: 1000.00 mmu

Label wndw: 1 > 118

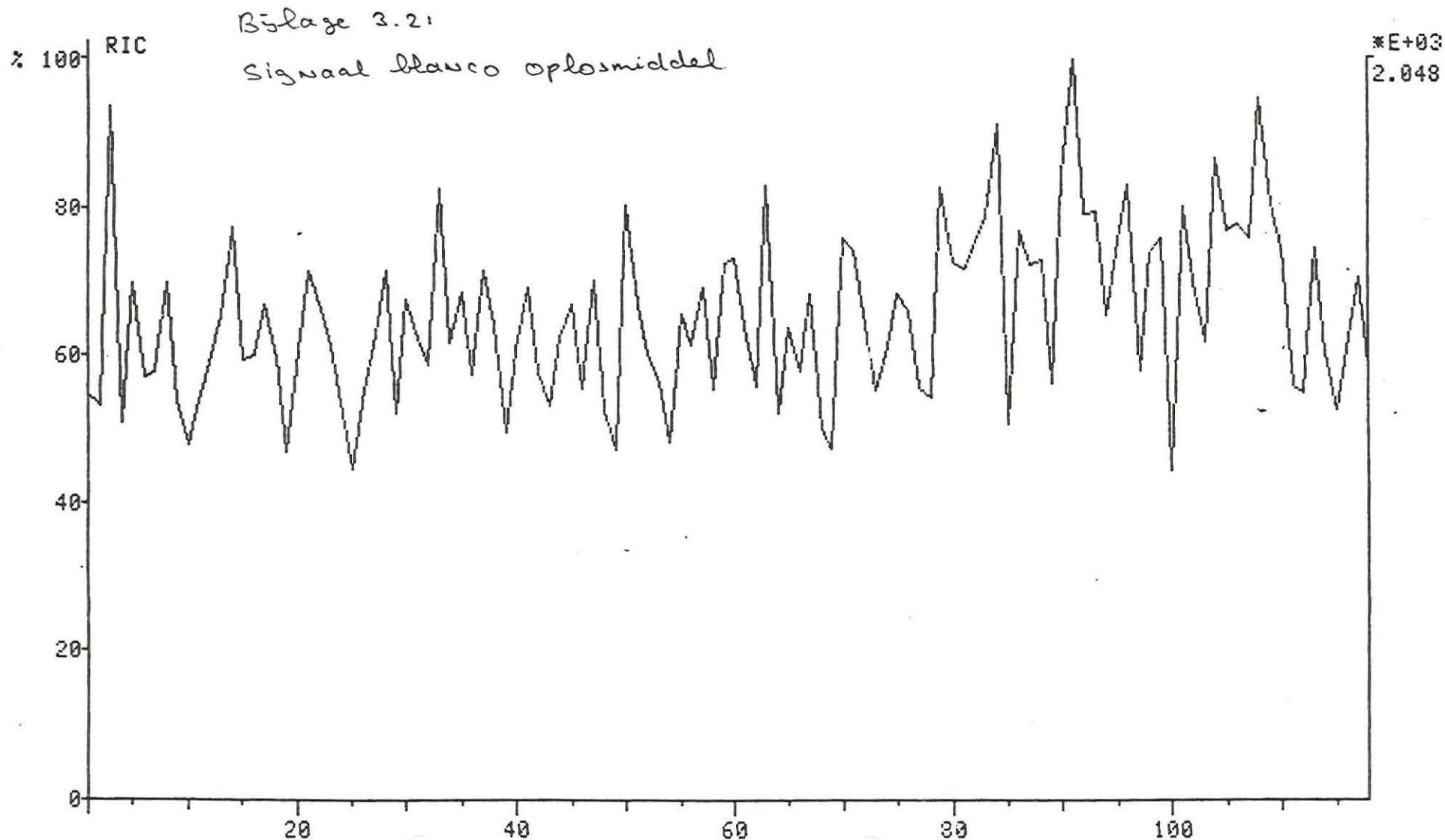
Masses: 203 > 203

Area: 0, 4.00

Baseline : 0, 3

Label : 0, 40.00

fig 11



CHRO: CLEN ver 8 on UIC 2 10

5-DEC-88 Elapse: 00:00:17.9 48

Samp:

Start : 11:58:00 125

Comm: L8 Leberextrakt in 100 ul DCI

Mode: EI +DAU LMR SYNTH GAS UP LR

Oper: NH3 CI

Inlet :

Peak: 1000.00 mmu Label wndw: 1 > 125

Masses: 203 > 203

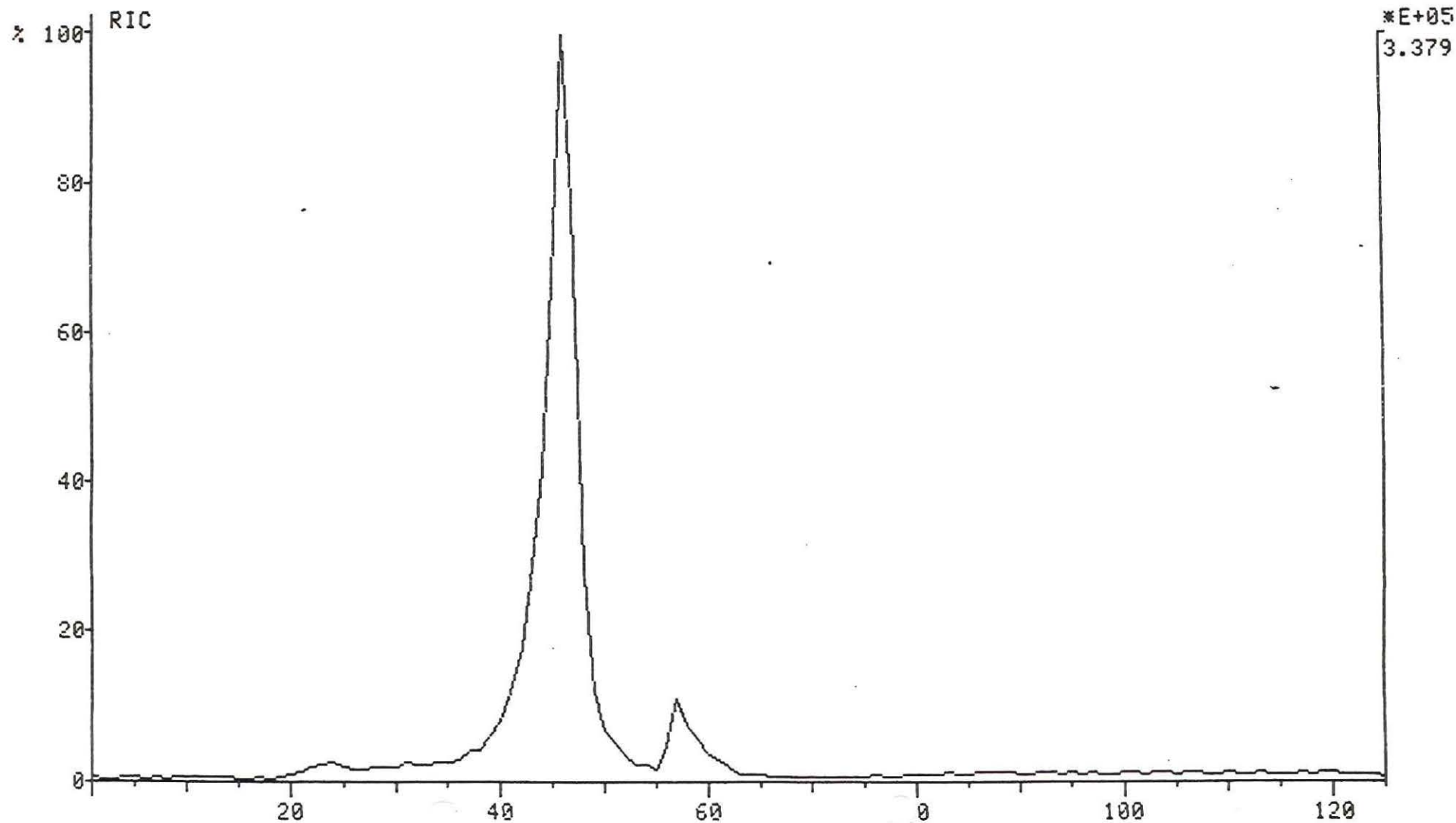
Area: 0, 4.00

Baseline : 0, 3

Label : 0, 40.00

fig 10

BSlage 3.22 Leber extrakt + 1ppm clenbutolol



CHRO: CLEN ver 48 on UIC 2 10

5-DEC-88 Elapse: 00:00:01.1 1

Samp:

Start : 16:39:55 1335

Comm: u3 in 25 ul Ethylacetat

Mode: EI +Q1MS LMR UP LR

Oper: NH3 DCI

Inlet : GC

Peak: 1000.00 mmu

Label wndw: 800 > 1300

Masses: 349 > 349

Area: 0, 4.00

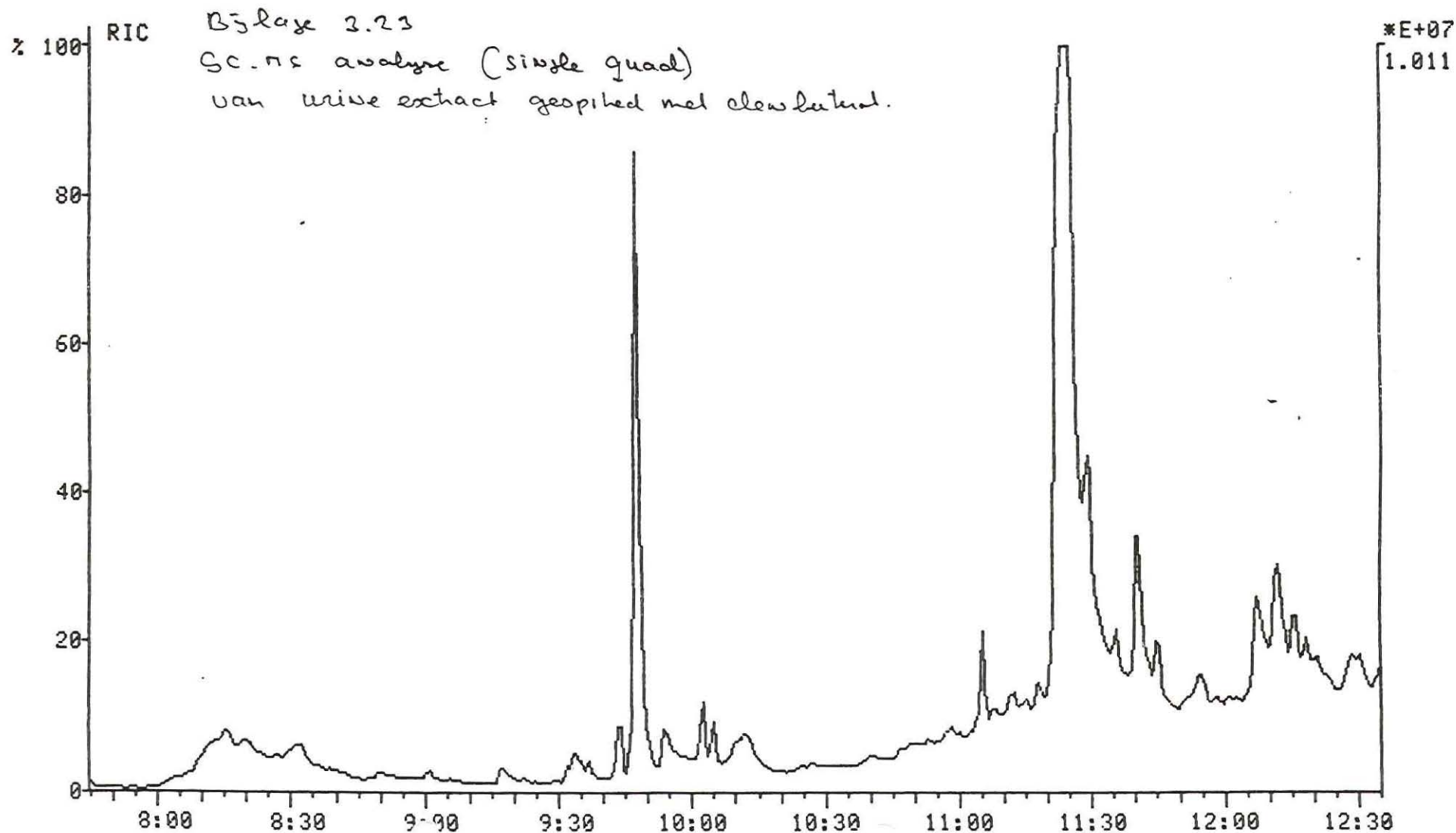
Baseline : 50, 3

Label : 0, 40.00

Mid

R_t scale

fig 85.



CHRO: CLEN ver 47 on UIC 2 10

5-DEC-88 Elapse: 00:00:00.9 1

Samp:

Start : 16:18:16 1332

Comm: u3 in 25 ul Ethylacetat

Mode: EI +DAU LMR SYNTH GAS UP LR

Oper: NH3 DCI

Inlet : GC

Peak: 1000.00 mmu

Label wndw: 800 > 1300

Masses: 203 > 203

Area: 0, 4.00

Baseline : 0, 3

Label : 0, 40.00

ms/ms

fig 24.

Baseline : 2.24

