

Click to edit Master



El uso de LC/MS/MS para Análisis de Multiresiduos

José Luis Freire
LC/MS Product Specialist
jose.freire@agilent.com



Agenda

- Ventajas de la utilización de QQQ
- Análisis altamente sensibles de multiresiduos y otros contaminantes
- Componentes del sistema 3Q
- Nueva base de tMRM
 - Diseño
 - Aplicaciones
 - Análisis de Desconocidos



Agilent tiene una posición única para forjar el camino más rápido hacia nuevas aplicaciones de seguridad de los alimentos

Cada Año alrededor del mundo

- **Decenas de millones** de casos de enfermedades transmitidas por los alimentos
- **Cientos de miles** de personas hospitalizadas
- **Miles** de vidas perdidas
- **Cientos de miles de millones** (de dólares) perdidos ante enfermedades transmitidas por alimentos



¿Porqué?

- Globalización
- Envejecimiento de la población
- Más agentes patógenos se agregan en la cadena alimenticia de nuevas maneras

Oportunidad

La demanda de aplicaciones está creciendo mucho más rápido en la industria de análisis de alimentos que en cualquier otro segmento



Agilent tiene también una historia única de forjar el camino más rápido hacia la nueva investigación forense y aplicaciones de toxicología

Cada Año alrededor del mundo

- El abuso de drogas exige un alto costo para la sociedad (la adicción, muerte, la pérdida de productividad, el tratamiento / aplicación de los costos)
- Escándalos de dopaje arrojan sombras sobre en logros deportivos
- Decenas de miles de incendios son deliberados
- Actos de terrorismo matan o hieren a miles

Circunstancias agravantes

- La aparición de drogas de diseño
- Aumento del abuso de medicamentos recetados
- El deseo de los atletas a "ganar a toda costa"
- La ampliación del acceso a los materiales e información acerca de la fabricación de bombas



Oportunidades

La demanda de nuevas aplicaciones está creciendo rápidamente, especialmente las relacionadas con las matrices de nuevas pruebas

Las cuestiones ambientales en los titulares

Cada Año alrededor del mundo

- Millones de enfermedades respiratorias agudas/crónicas
- Millones de personas viven sin servicios de saneamiento del agua
- Millones de dólares se pierden por el uso de agua potable no adecuada
- Miles de especies de plantas / animales amenazadas

Porqué?

- Incremento de la población: 7 mil millones y contando
- Nuevos contaminantes químicos identificados
- Aire/agua limpios tiene una menor prioridad que alimentos /trabajos /energía
- Catástrofes Naturales o producidos por el hombre



Oportunidad

La demanda de nuevas aplicaciones está creciendo rápidamente - especialmente en las áreas de agua potable y reutilización de agua

Algunos de los contaminantes de los que hay necesidad de analizar en los alimentos y piensos que conocemos

Acrylamide
Aflatoxins
Bisphenol A & F
Brominated Flame Retardants
Dioxins
Dibenzofurans
3-Monochloropropaned-1,2 Diol Esters
Synthetic Colors
Mycotoxins
Nanoparticles
PAHs
Pesticides
PCBs
Drug residues
Perfluorooctanesulfonate
Perfluorooctanoic Acid
Phthalates

Melamine
Nitrosamines
Nonylphenol
Octylphenol
Styrene dimers & Trimers



¿Qué pasa con los que no se conocen?

Acrylamide
Aflatoxins
Bisphenol A
Brominated Flame Retardants
Dioxins
Dibenzofurans
3-Monochloropropaned-1,2 Diol Esters
Synthetic Colors
Mycotoxins
Nanoparticles
PAHs
Pesticides
PCBs
Drug residues
Perfluorooctanesulfonate
Perfluorooctanoic Acid
Phthalates

Melamine
Nitrosamines
Nonylphenol
Octylphenol
Styrene dimers & Trimers



Análisis de residuos químicos con detectores selectivos o por GC/MS LC/MS/MS

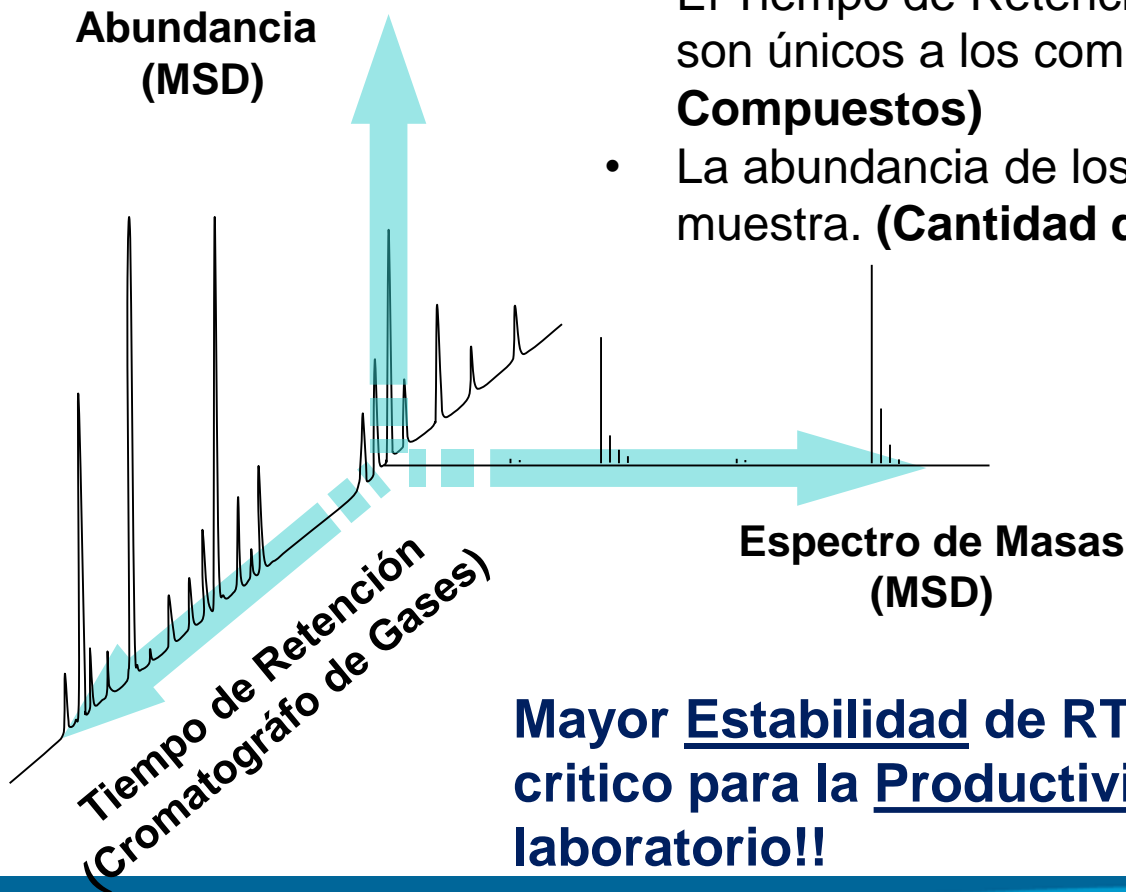


Agilent 1200LC/6400 Series LC/QQQ

LC/MS Estructura de Datos

Qué información es adquirida en el LC/MS?

- LC/MSD Los información de los Datos tienen 3-dimensiones (3D), **Tiempo de Retención, Espectros de Masas y Abundancia del Pico.**
- El Tiempo de Retención y el espectro de Masas son únicos a los compuestos en la muestra. (**ID Compuestos**)
- La abundancia de los picos es única al tipo de muestra. (**Cantidad de los compuestos**)



Mayor Estabilidad de RT, MS y Abundancia es critico para la Productividad del sistema del laboratorio!!

¿Porqué la Demanda para Alta Resolución y Masas Exactas en MS y MS/MS?

Los Analitos son los mismos (MS o MS/MS)

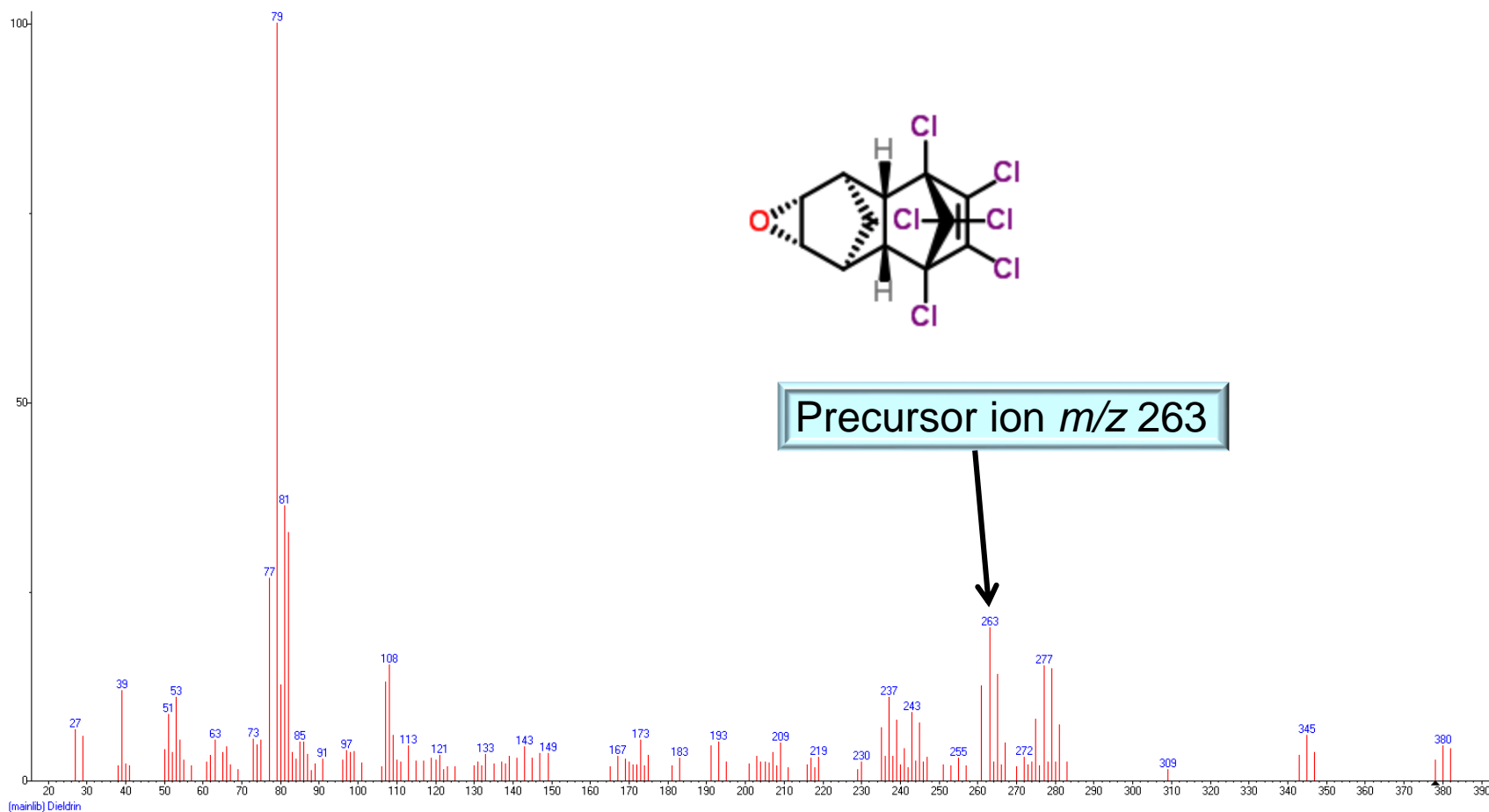
**La demanda esta dada por la
COMPLEJIDAD DE LA MATRIZ**

Alta Res & MS/MS Incrementan la selectividad

**La Demanda es dada por
ANALISIS DE NO_TIPIFICADOS & DESCONOCIDOS**

**Masas Exactas, Especialmente MS/MS,
facilita enormemente el Análisis Cualitativo**

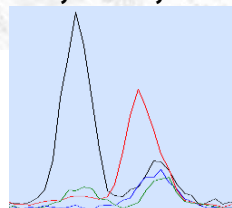
Dieldrin EI Spectrum



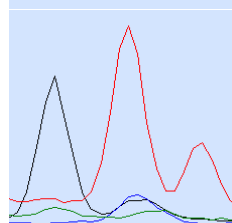
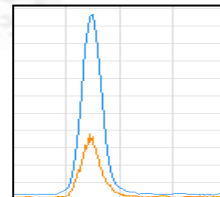
MS SIM vs. QQQ; Dieldrin at 10 ppb

GC/SIM
m/z 263, 265, 277, 279

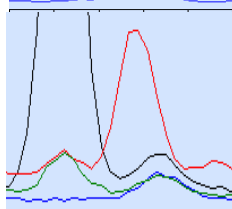
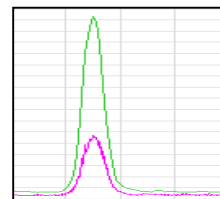
GC/QQQ MRM
263 → 191 & 263 → 193



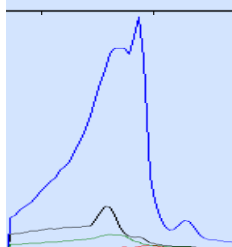
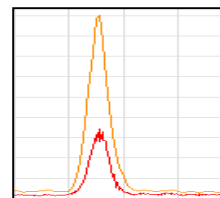
Manzana



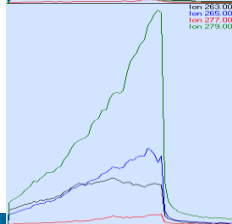
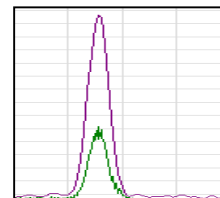
Col



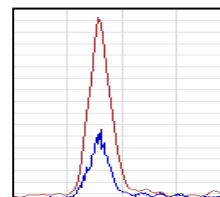
Ginseng



Naranja



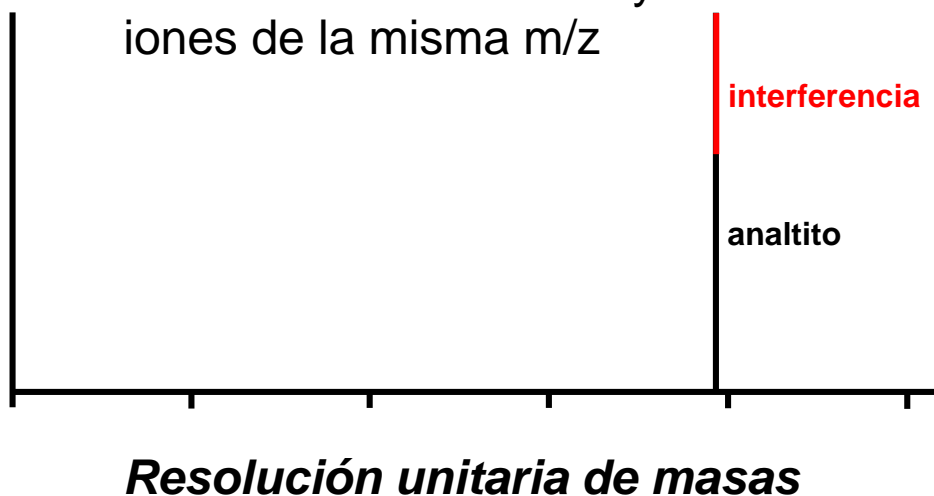
Espinaca



MS/MS Elimina las Interferencias en Scan and SIM

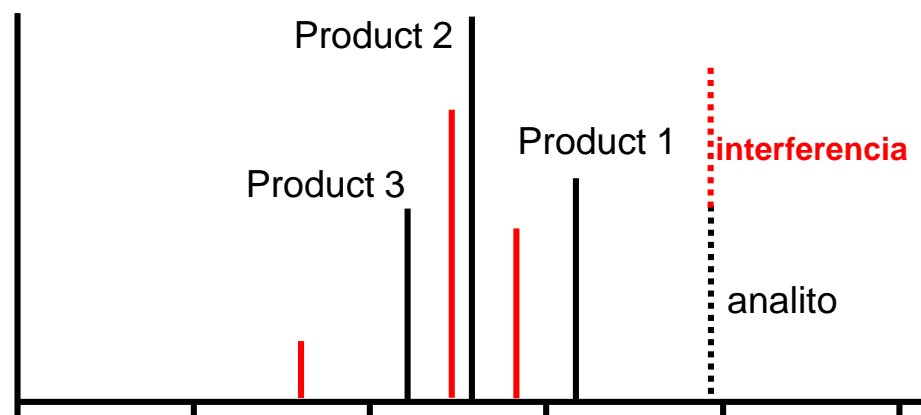
Single Quad MS

No es selectivo cuando hay iones de la misma m/z

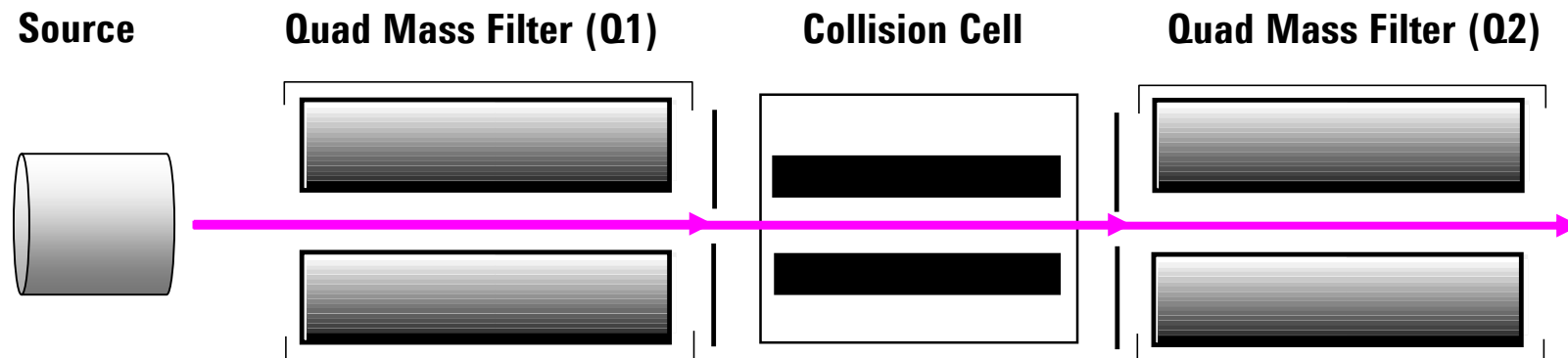


Triple Quad MS

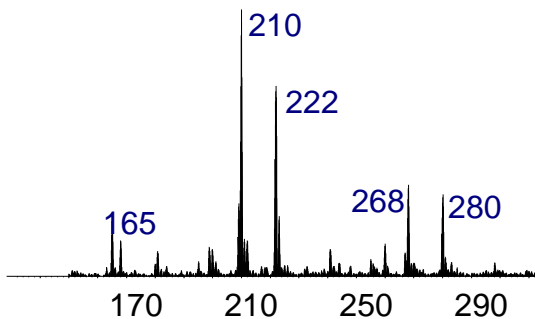
Selectividad por la selección de iones producto



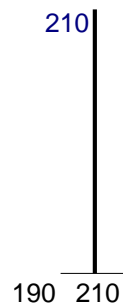
Ventajas de un QQQ como un detector cromatográfico - control de la reacción múltiple (MRM)



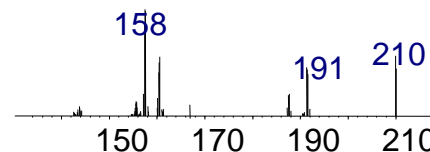
Espectro con iones de fondo (de la IE)



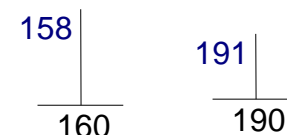
Q1 permite sólo el paso de iones a 210



La Celda de Colisión fragmenta el ion 210



Q2 monitorea los fragmentos 158 y 191 para cuant y cual.



No hay ruido químico

Construcción de Métodos MRM para el Análisis de Multiresiduos



¿Cuál es la parte más difícil sobre el desarrollo de un GC / QQQ? Método?

- ✓ Optimización del Método GC
- ✓ Identificación de las transiciones MRM para cada compuesto
 - ✓ Compra de los estándares - \$\$\$\$\$
 - ✓ Correr cada uno en modo scan
 - ✓ Seleccionar los posible/s iones precursor/es
 - ✓ Correr scans de los iones Producto
 - ✓ Seleccionar as mejores transiciones
 - ✓ Optimizar la energía de colisión
 - ✓ Crear el método
 - ✓ Probar y validar el método

El desarrollo del Método puede tomar días o semanas



Agilent ha desarrollado métodos para usted.

Nueva base de datos de MRM de plaguicidas y otros contaminantes de alimentos / Medio Ambiente

❖ 8000+ MRMs optimizados para >1000 Pesticidas & Contaminantes

-- basados en >3500 inyecciones con un valor de **\$70,000 de estándares químicos**

Extiende la flexibilidad, permitiendo la optimización de los métodos

- En promedio transición de 8 MRM con la intensidad relativa para cada compuesto
 - provee de alternativas para evitar la **interferencia de matriz**
- Clasificación de compuestos con, número CAS. En formato Excel
 - permite la búsqueda y ordenamiento para la adecuación de los métodos
- Tres métodos GC con tiempos de retención (RTs) e índices de retención (RIs)
 - Permite la máxima libertad al usuario para adecuar su flujo de trabajo

❖ Herramientas y Macros en la base de Datos

-- Construir los métodos de adquisición MRM, basados en su lista de compuestos en menos de **5 min**

Nosotros compramos los estándares e hicimos >3500 corridas que ya no tiene que hacer Usted!



Flexibilidad: Formato en Excel, Intensidad relativa y absoluta de transición

Formato MassHunter

Intensidades de transición absolutas y relativas

(Escala de color: Rojo denota una fuerte intensidad y azul denota una intensidad baja entre todas las transiciones)

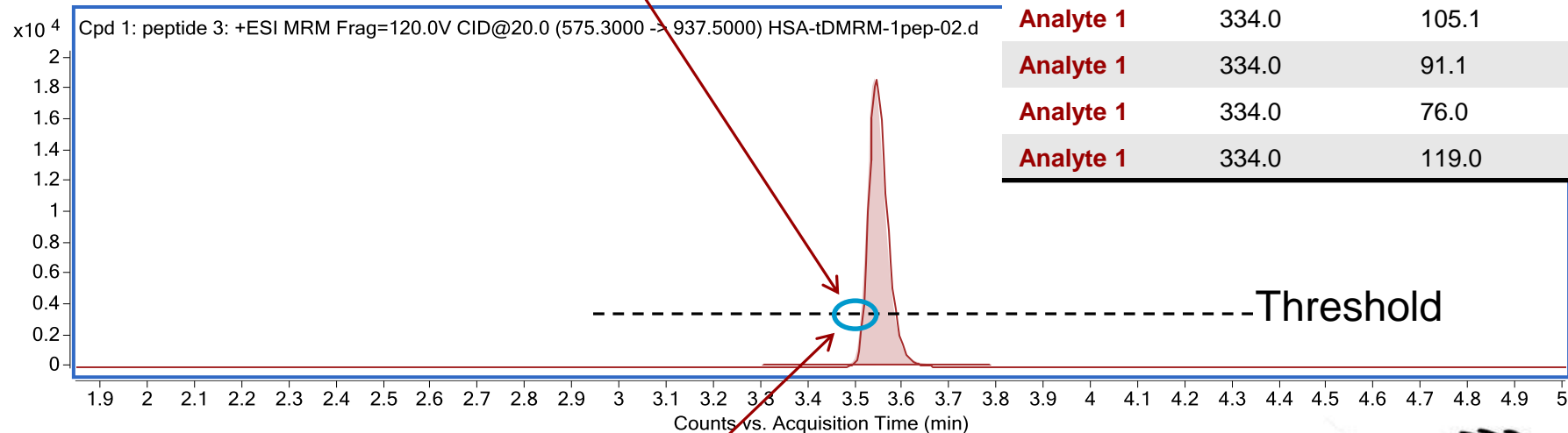
	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y
		Common Name	ISTD?	Precursor I _c	MS1 Resolution	Product I _c	MS2 Resolution	Dwell Time (ms)	CE (V)	Intensity Scale within the Database	Transit Relat Intens
1	RI - 0502										
2		Acephate	FALSE	136.0	Wide	94.0	Wide	20	10	136	100%
3		Acephate	FALSE	142.1	Wide	96.0	Wide	20	10	50	21%
4		Acephate	FALSE	95.0	Wide	78.9	Wide	20	10	20	19%
5		Acephate	FALSE	95.0	Wide	79.9	Wide	20	10	20	17%
6		Acephate	FALSE	142.1	Wide	65.0	Wide	20	25	20	16%
7		Etridiazole (Terrazole, Echlomezol)	FALSE	183.0	Wide	140.0	Wide	20	15	2440	100%
8		Etridiazole (Terrazole, Echlomezol)	FALSE	211.1	Wide	183.0	Wide	20	15	2150	88%
9		Etridiazole (Terrazole, Echlomezol)	FALSE	185.0	Wide	142.1	Wide	20	15	1680	69%
10		Etridiazole (Terrazole, Echlomezol)	FALSE	211.1	Wide	140.0	Wide	20	15	1590	65%
11		Etridiazole (Terrazole, Echlomezol)	FALSE	213.1	Wide	185.0	Wide	20	15	1460	60%
12		Etridiazole (Terrazole, Echlomezol)	FALSE	213.1	Wide	142.1	Wide	20	15	1080	44%
13		Etridiazole (Terrazole, Echlomezol)	FALSE	183.0	Wide	108.0	Wide	20	45	500	20%
14		Methabenzthiazuron	FALSE	164.0	Wide	136.0	Wide	20	5	310	100%
15		Methabenzthiazuron	FALSE	163.1	Wide	136.0	Wide	20	15	190	60%
16		Methabenzthiazuron	FALSE	134.9	Wide	90.9	Wide	20	15	150	49%
17		Methabenzthiazuron	FALSE	134.9	Wide	108.0	Wide	20	15	100	32%
18		Methabenzthiazuron	FALSE	135.9	Wide	109.0	Wide	20	25	90	31%
19		Methabenzthiazuron	FALSE	135.9	Wide	64.9	Wide	20	35	80	25%
20		Methabenzthiazuron	FALSE	163.1	Wide	109.0	Wide	20	15	80	24%
21		Methabenzthiazuron	FALSE	164.0	Wide	108.0	Wide	20	30	50	16%
22		Ethoxyquin	FALSE	202.1	Wide	174.0	Wide	20	15	2890	100%
23		Ethoxyquin	FALSE	202.1	Wide	145.1	Wide	20	25	360	12%
24		Ethoxyquin	FALSE	203.0	Wide	175.0	Wide	20	15	360	12%
25		Ethoxyquin	FALSE	217.0	Wide	202.0	Wide	20	10	360	12%
26		Ethoxyquin	FALSE	174.0	Wide	146.1	Wide	20	10	310	11%
27		Ethoxyquin	FALSE	202.1	Wide	159.0	Wide	20	30	260	9%
28		Dicloran (Dichloran)	FALSE	206.0	Wide	176.0	Wide	20	15	2480	100%
29		Dicloran (Dichloran)	FALSE	207.9	Wide	178.0	Wide	20	15	1560	63%
30		Dicloran (Dichloran)	FALSE	124.0	Wide	73.1	Wide	20	15	1410	57%

database database-WORKING 0501 Method 0502 Method 0502 Screening Method

Un ion de calificación y varios para la calificación de cada compuesto

Triggered MRM (tMRM) Analysis

Secondary MRM
Transitions are “Triggered”



Triggered cycle (above threshold)

Compound	Precursor	Product
----------	-----------	---------

Analyte 1	334.0	145.0
-----------	-------	-------

Analyte 1	334.0	117.0
-----------	-------	-------

Analyte 1	334.0	132.1
-----------	-------	-------

Analyte 1	334.0	105.1
-----------	-------	-------

Analyte 1	334.0	91.1
-----------	-------	------

Analyte 1	334.0	76.0
-----------	-------	------

Analyte 1	334.0	119.0
-----------	-------	-------

Primary cycle (below threshold)

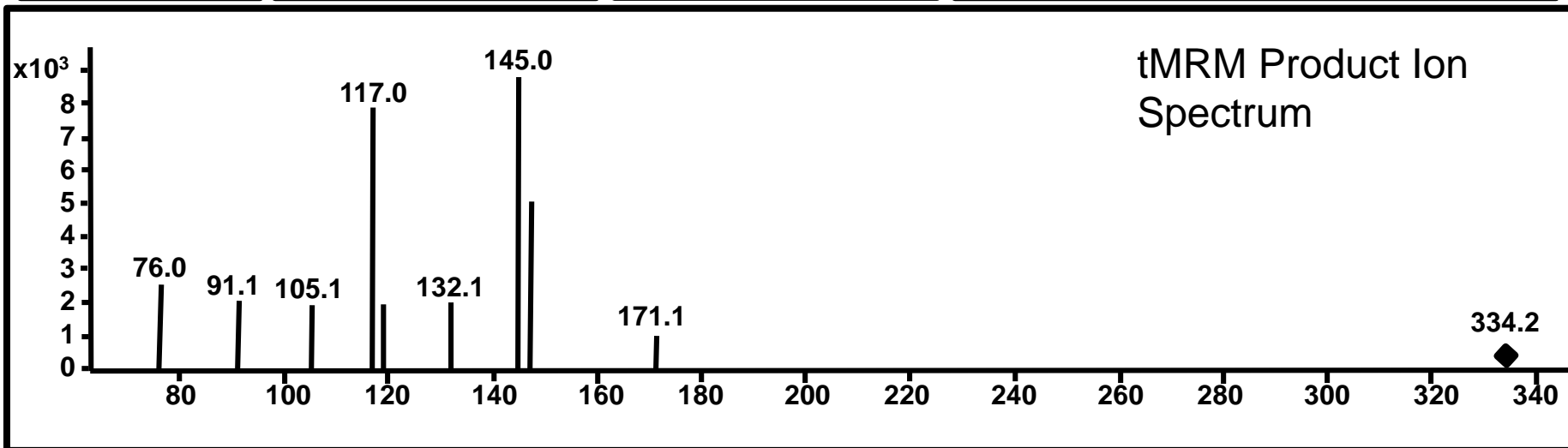
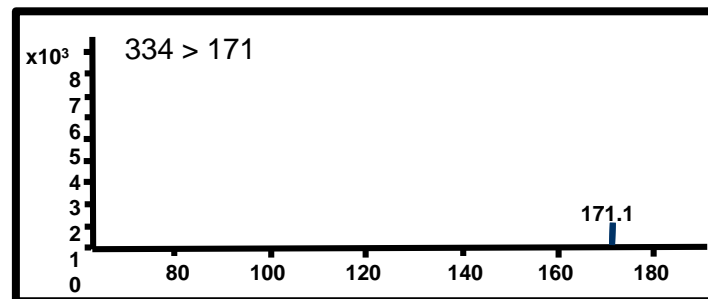
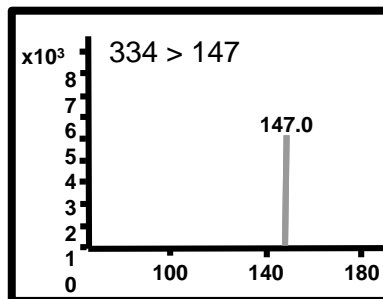
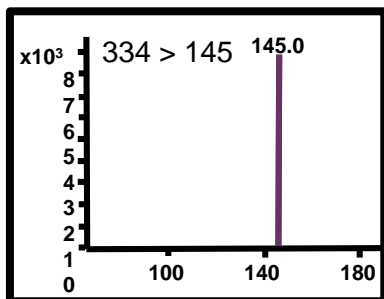
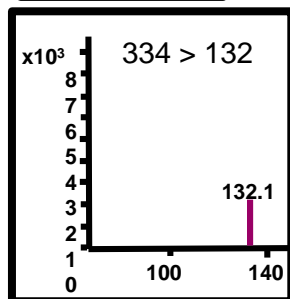
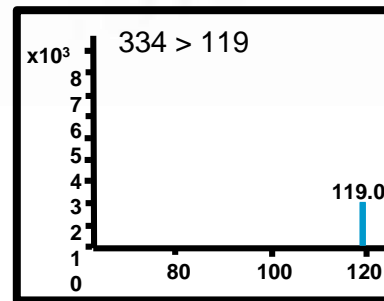
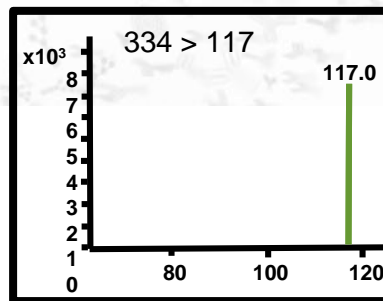
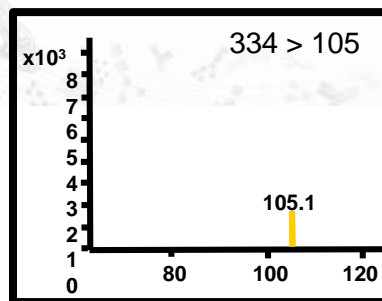
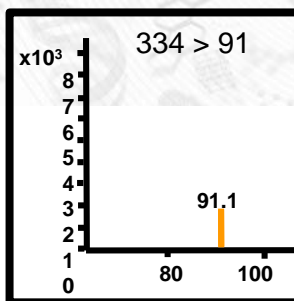
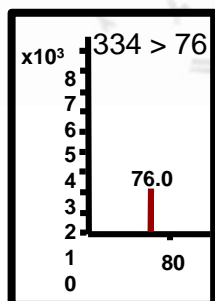
Compound	Precursor	Product
----------	-----------	---------

Analyte 1	334.0	145.0
-----------	-------	-------

Analyte 1	334.0	117.0
-----------	-------	-------



tMRM Product Ion Spectrum



Línea de tiempo típica para métodos LC/MS

Evite los tiempos muertos

Instalación
Completa
del LC/MS

Optimización de
las condiciones de
MS

Desarrollo de la
Base de datos y/o
Biblioteca de
Referencia

Con los componentes de origen de forma individual y el desarrollo del método a partir de cero

Compra/
Preparación de
Soluciones
Estándar

Optimización de
Métodos LC

Inicio de la
Validación del
Método

1-4 semanas

+

2-3 semanas

+

2-3 semanas

+

2 semanas -
2 meses

Tiempo Total de montaje:
~7 semanas a 5 meses

Instalación
Completa
del LC/MS

Adecuación o
implementación del
Método

Con los kits de aplicación Agilent LC/MS

Kit de Instalación

Inicio de la
Validación

1 día

+

3 días

Tiempo Total de Montaje:
~1 semana

tMRM LC/MS Kits de Aplicación

Detección Dirigida con QQQ



Pesticidas



- Mezcla de Prueba: 253 compuestos
- DB: 700+ compuestos
- Biblioteca: 200+ compuestos

Drogas Veterinarias

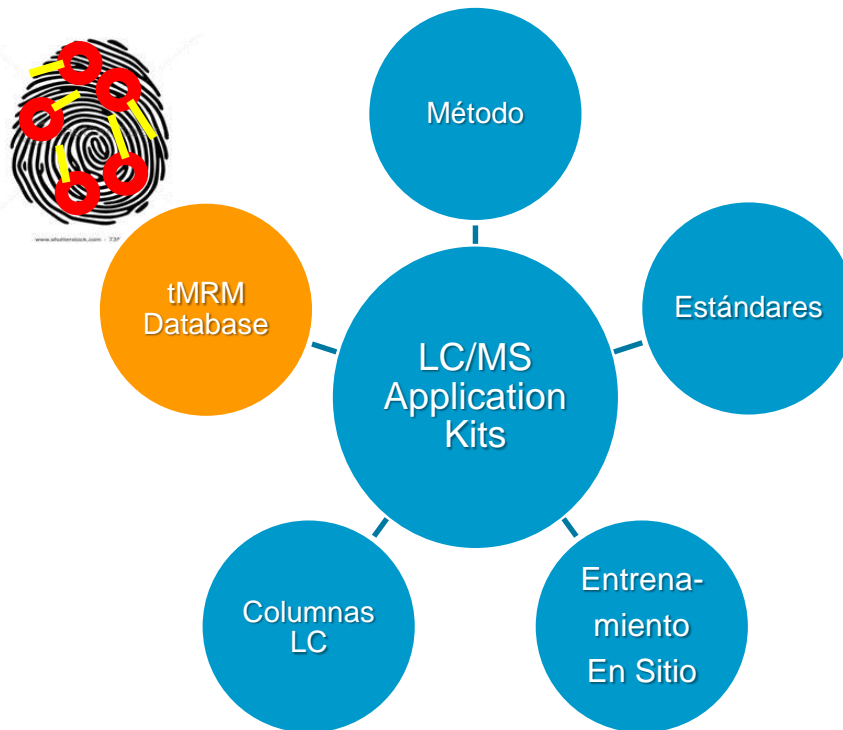


- Mezcla de prueba: 146 compuestos
- DB: 600+ compuestos
- Library: 100+ compuestos

Forense y Toxicología



- Mezcla de prueba: 139 compuestos
- DB: 2600+ compuestos
- Library: 100+ compuestos



El valor de los Kits de Aplicaciones LC/MS



Drogas Veterinarias kit de Aplicación LC/MS QQQ tMRM

SIMPLIFY YOUR STARTUP
FOR TARGETED VETERINARY DRUG SCREENING
QQQ LC/MS Veterinary Drug Application Kit
 The Measure of Confidence

Anilent LC/MS Application Kits

Minimize the need for tedious manual method development with pretested methods and a triggered MRM (tMRM) database and library

Analyzing veterinary drug compounds is challenging for two reasons: low concentrations in difficult matrices and a large number of analytes to be monitored and quantified. With so many variables to consider, it can be difficult to find a solid starting point for method development.

A faster, easier way to develop customized screening methods

Agilent's Veterinary Drug Screening tMRM Application Kit is truly unique, because much of the development work has already been completed. The kit features easy-to-use examples that show you how to set up screening methods and quickly adapt them to your specific needs. It also includes:

- A tMRM database and library for several hundred Veterinary Drug compounds that includes compound names, up to 10 MRM transitions, fragmentor voltages, collision energies, and retention times for each database compound for reliable forensic screening with tMRM library verification.

The following components are included – saving you time and money:

- Agilent's Veterinary Drug tMRM database and library
- Comprehensive standard test mix with more than 140 compounds
- Agilent LC columns ideally suited for Rapid Resolution Liquid Chromatography (RRLC) and Ultra High Pressure Liquid Chromatography (UHPLC) methods
- Quick-start guide and Application Note that show you how to run the test mixes and create tMRM methods
- CD-ROM with examples of screening methods, data files, and reports
- On site application-based training to assist with method setup for quick and effective startup

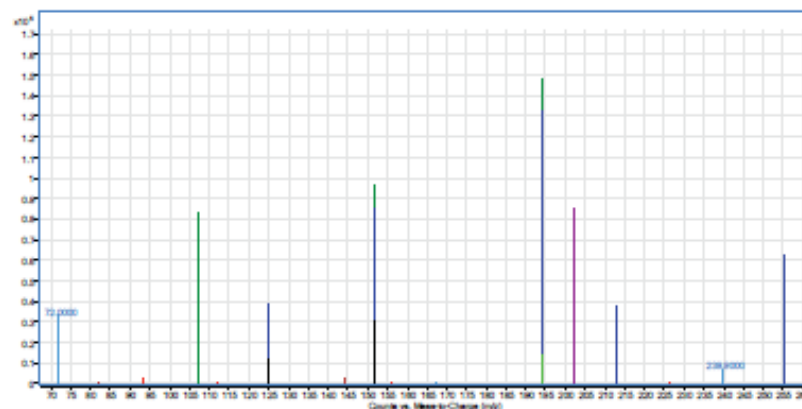
Ordering information:

Agilent's QQQ LC/MS Veterinary Drug Application Kit (G1735AA)

The following are required but not included with the G1735AA kit:

- Agilent 1200 Series RRLC System or Agilent 1290 Infinity LC
- Agilent 6400 Series Triple Quadrupole LC/MS system
- Agilent MassHunter Acquisition Software B.06 or higher

Pre-developed examples help you implement your screening method in a fraction of the time

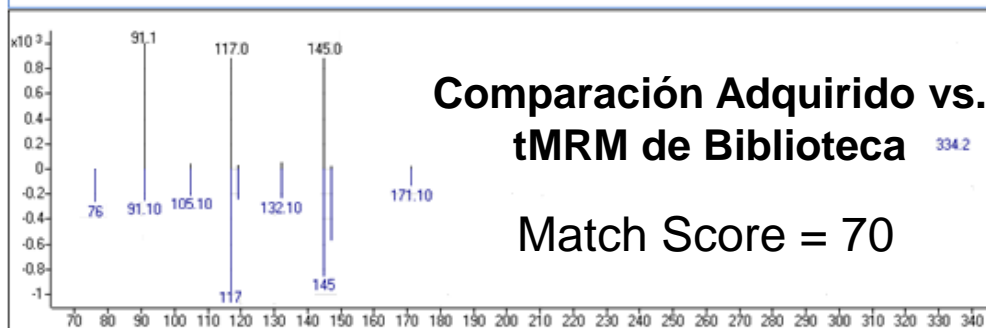
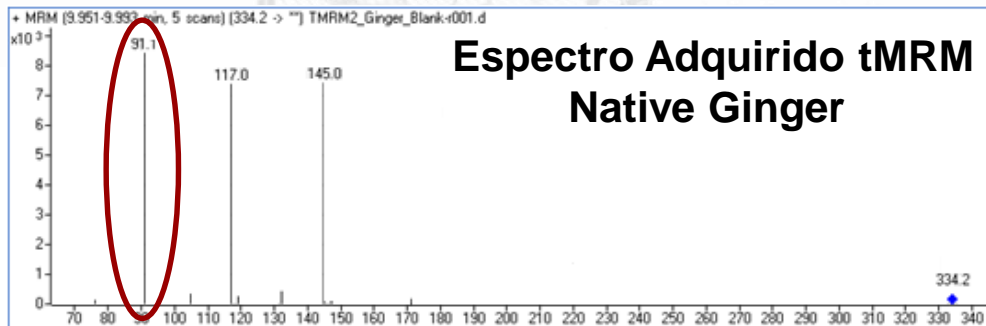


tMRM acquisition produces a tMRM product ion spectrum with up to 10 spectral peaks per compound present. These spectra are searched against a tMRM reference library for compound verification. A typical tMRM spectrum is shown here.

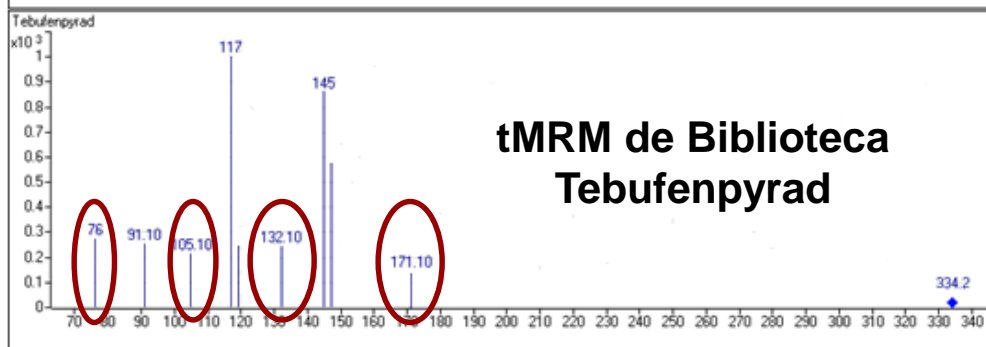
Run segment																	
Compound #/mol	Compound Name	RT/yr	Pressure (torr)	MS1 Res	Product Ion	MS1 Res	Pressure	Trigger	Threshold	Ref Time (s)	Exp Time (s)	Fragment	Cation Charge	Collisional Energy	Collisional Voltage	Isobar	Signal
M	Dimethylsiloxane	1.0	405.1 Torr	441.1 Torr	SP	SP	SP	SP	500	1.4	1	125	12	7.7kV	0	0	0
	Dimethylsiloxane	1.0	405.1 Torr	441.1 Torr	SP	SP	SP	SP	500	1.4	1	125	20	7.7kV	0	0	0
	Dimethylsiloxane	1.0	405.1 Torr	441.1 Torr	SP	SP	SP	SP	500	1.4	1	125	20	7.7kV	0	0	0
	4-Dimethylsiloxane	1.0	405.2 Torr	441.1 Torr	SP	SP	SP	SP	400	4.25	1	100	12	7.7kV	0	0	0
	Dimethylsiloxane	1.0	405.2 Torr	441.1 Torr	SP	SP	SP	SP	125	5.1	1	100	0	7.7kV	0	0	0
	Dimethylsiloxane	1.0	405.2 Torr	441.1 Torr	SP	SP	SP	SP	5.1	1	100	100	0	7.7kV	0	0	0
	Dimethylsiloxane	1.0	405.2 Torr	441.1 Torr	SP	SP	SP	SP	5.1	1	100	80	0	7.7kV	0	0	0
	Methylsiloxane	1.0	405.2 Torr	391.1 Torr	SP	SP	SP	SP	200	5.2	1	125	10	7.7kV	0	0	0
	Methylsiloxane	1.0	405.2 Torr	391.1 Torr	SP	SP	SP	SP	5.2	1	125	20	0	7.7kV	0	0	0
	Methylsiloxane	1.0	405.2 Torr	200.1 Torr	SP	SP	SP	SP	5.2	1	100	40	0	7.7kV	0	0	0
M	Dimethylsiloxane	1.0	405.2 Torr	401.1 Torr	SP	SP	SP	SP	500	5.05	1	125	10	7.7kV	0	0	0
	Dimethylsiloxane	1.0	405.2 Torr	401.1 Torr	SP	SP	SP	SP	500	6.05	1	125	0	7.7kV	0	0	0
	Tetramethylsiloxane	1.0	405.2 Torr	811.1 Torr	SP	SP	SP	SP	6.05	1	125	10	0	7.7kV	0	0	0
	Tetramethylsiloxane	1.0	405.2 Torr	154.1 Torr	SP	SP	SP	SP	6.05	1	125	20	0	7.7kV	0	0	0
	Dimethylsiloxane	1.0	405.2 Torr	98.1 Torr	SP	SP	SP	SP	0	6.05	1	125	48	0	7.7kV	0	0
Dynamic MS/MS Parameters																	
Scan Time 3000 to										Triggered MS/MS							
										Triggered MS/MS							
										Triggered MS/MS							

Agilent's tMRM acquisition software and Veterinary Drug tMRM database and library ensure fast method implementation for targeted veterinary drug screening with compound verification.

tMRM Previene la ID de Falsos Positivos



Match Score = 70



Ordering information:

Agilent's QQQ LC/MS Forensic Toxicology Application Kit
(G1734BA)



<http://www.chem.agilent.com/Library/flyers/Public/5990-5640EN.pdf>

QuEChERS Preparación de la Muestra

Quick

Easy

Cheap

Effective

Rugged

Safe

- ❖ Muy Popular en los laboratorios en todo el mundo
- ❖ “Justo lo suficiente ” para la preparación de la muestra



