

RISK IDENT

Identifizieren | Bewerten
Handeln | Kommunizieren

BMBF-Verbundprojekt RISK-IDENT

Retentionszeitindex als Validierungsgröße im
RISK-IDENT-Finale

Thomas Letzel

gefördert vom:



Augsburg, 27./28.03.2014



Bayerisches Landesamt für
Umwelt



HOCHSCHULE
WEIHENSTEPHAN-TRIESDORF
UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES



TUM
Technische Universität München

Zweckverband
Landeswasserversorgung



CONDIAS
CONDUCTIVE DIAMOND PRODUCTS

- Was ist der Retentionzeitindex RTI ? Warum ein Ringversuch ?
- Chromatographie von neutralen und negativ geladenen Molekülen oder von logP und logD
- RTI: Säulenvergleich und Berechnungsstrategien
- RTI als Parameter zur Nutzung in der STOFF-IDENT Datenbank
- RTI als Parameter zur Entscheidungshilfe in Strukturvorhersagen
- RTI als Parameter im Einsatz von HILIC ?

- Was ist der Retentionzeitindex RTI ? Warum ein Ringversuch ?
- Chromatographie von neutralen und negativ geladenen Molekülen oder von logP und logD
- RTI: Säulenvergleich und Berechnungsstrategien
- RTI als Parameter zur Nutzung in der STOFF-IDENT Datenbank
- RTI als Parameter zur Entscheidungshilfe in Strukturvorhersagen
- RTI als Parameter im Einsatz von HILIC ?

Ringversuch Retentionszeitindex (RTI) – neutrale Moleküle

Vorgabe:

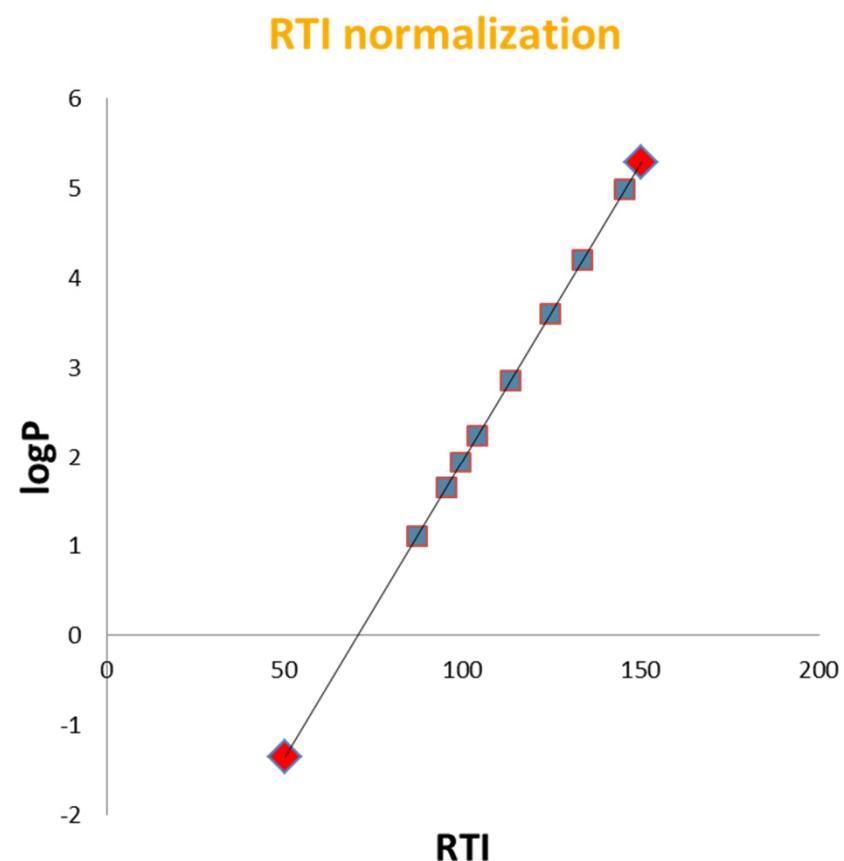
- RP-C18

Frei wählbar:

- Lösungsmittel (z.B. Acetonitril, Methanol)
- Additive (z.B. formic acid, acetic acid, Ammoniumacetat, Ammoniumformiat)
- Gradient
- ‚Endcapped‘, ‚polar endcapped‘ oder ‚nicht endcapped‘

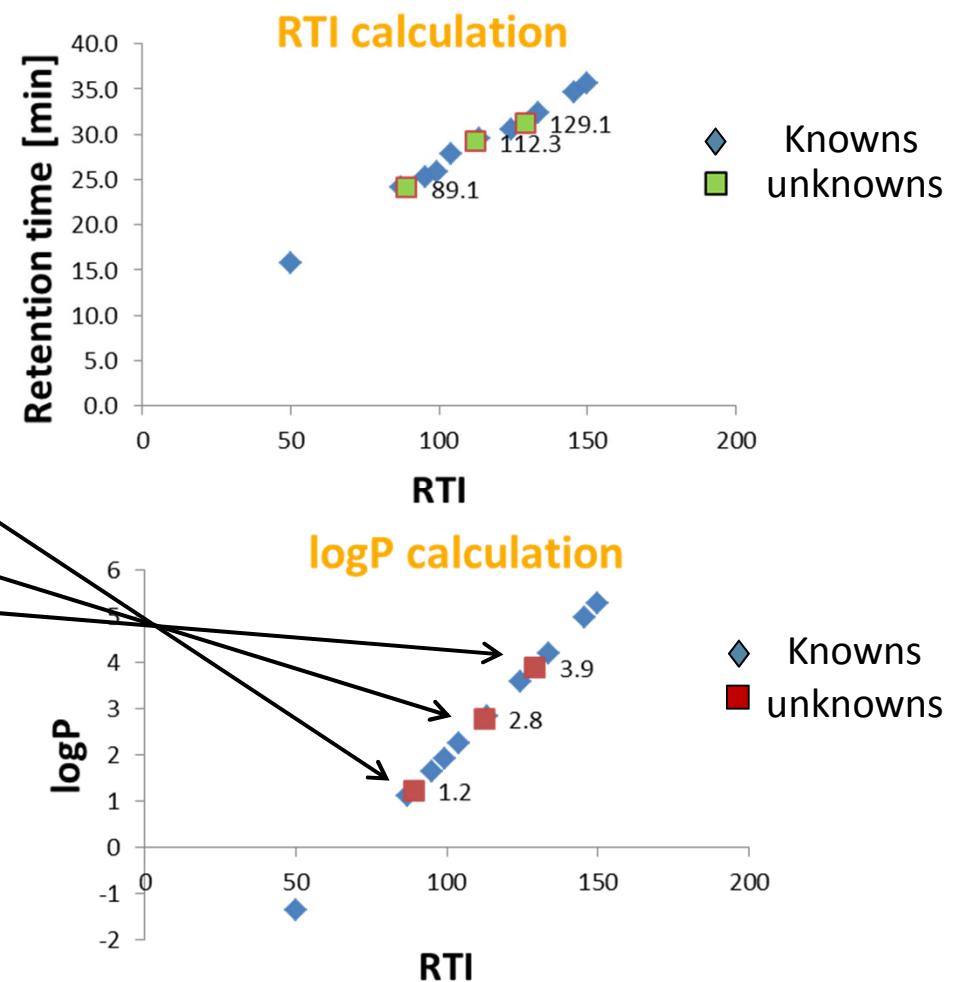
Normalization Retentionszeitindex – Known Standards

compound	logP	RTI
Metformin	-1.36	50.0
Chloridazon	1.11	87.2
Carbetamide	1.65	95.3
Monuron	1.93	99.5
Metobromuron	2.24	104.2
Chlorbromuron	2.85	113.4
Metconazole	3.59	124.5
Diazinon	4.19	133.6
Quinoxyfen	4.98	145.5
Fenofibrate	5.28	150.0



Berechnung RTI und logP Wert von unbekannten Molekülen

compound	MW [Da]	logP (theor.)	
		monoisotopic	chemicalize.org
Dapsone	248.06194	1.3	
Linuron	248.01192	2.7	
Picoxystrobin	367.10313	4.3	



Ringversuch – Ergebnisse RTI (Stand 21.03.2014)

compound	Total (all methods)		methods with MeOH		methods with ACN	
	RTI	RSD [%]	RTI	RSD [%]	RTI	RSD [%]
Dapson	5.7		4.0		2.2	
Linuron	1.6		1.4		1.7	
Picoxystrobin	4.4		1.2		2.1	
	n= 37 (Linuron) n= 36 (Dapson, Picoxystrobin)		n= 17 (Dapson, Linuron) n= 16 (Picoxystrobin)		n= 19 (Dapson) n= 20 (Linuron, Picoxystrobin)	

Known-Standard K- Ringversuch Known Standard K – Literatur [1]

compound	logP	RTI
Metformin	-1.36	50.0
Chloridazon	1.11	87.2
Carbetamide	1.65	95.3
Monuron	1.93	99.5
Metobromuron	2.24	104.2
Chlorbromuron	2.85	113.4
Metconazole	3.59	124.5
Diazinon	4.19	133.6
Quinoxifen	4.98	145.5
Fenofibrate	5.28	150.0

compound	logP	RTI
Omethoate	-0.55	50.0
Chloridazon	1.11	77.8
Oxadixyl	1.79	89.2
Monuron	1.93	91.5
Metobromuron	2.24	96.7
Chlorbromuron	2.85	107.0
Alachlor	3.59	119.3
Diazinon	4.19	129.4
Triclocarban	4.93	141.8
Fenazaquin	5.42	150.0

[1] Gilbert-Lopez, G. et. al, J. of Chromatogr. A, (2010), 1217, 6022-6035

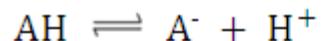


Berechnung unbekannte mit K Ringversuch vs K Literatur

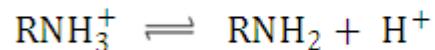
compound	calc. logP	calc. logP	theoretical
	K Ringversuch	K literature	logP
	(TUM LC-LC Methode)		chemicalize
Monolinuron	2.18	2.16	2.08
Linuron	2.74	2.76	2.68
Fenoxy carb	3.52	3.49	3.31

- Was ist der Retentionzeitindex RTI ? Warum ein Ringversuch ?
- Chromatographie von neutralen und negativ geladenen Molekülen oder von logP und logD
- RTI: Säulenvergleich und Berechnungsstrategien
- RTI als Parameter zur Nutzung in der STOFF-IDENT Datenbank
- RTI als Parameter zur Entscheidungshilfe in Strukturvorhersagen
- RTI als Parameter im Einsatz von HILIC ?

Definition logP und logD Wert



$$P_0 = \frac{[\text{AH}]_{\text{octanol}}}{[\text{AH}]_{\text{water}}} \quad P_{-1} = \frac{[\text{A}^-]_{\text{octanol}}}{[\text{A}^-]_{\text{water}}} \quad D = \frac{[\text{AH}]_{\text{octanol}} + [\text{A}^-]_{\text{octanol}}}{[\text{AH}]_{\text{water}} + [\text{A}^-]_{\text{water}}}$$



$$P_0 = \frac{[\text{RNH}_2]_{\text{octanol}}}{[\text{RNH}_2]_{\text{water}}} \quad P_{+1} = \frac{[\text{RNH}_3^+]_{\text{octanol}}}{[\text{RNH}_3^+]_{\text{water}}} \quad D = \frac{[\text{RNH}_2]_{\text{octanol}} + [\text{RNH}_3^+]_{\text{octanol}}}{[\text{RNH}_2]_{\text{water}} + [\text{RNH}_3^+]_{\text{water}}}$$

logP

- Neutrale Moleküle **logP = logD**

logD

- Geladene Moleküle **logP ≠ logD**

Während P-Werte aufgrund der Beschränkung auf nur eine Spezies weitgehend vom pH-Wert der wässrigen Phase unabhängig sind, besteht für D-Werte häufig eine starke Abhängigkeit vom pH-Wert der wässrigen Phase

teilweise aus <http://www.chemaxon.com>



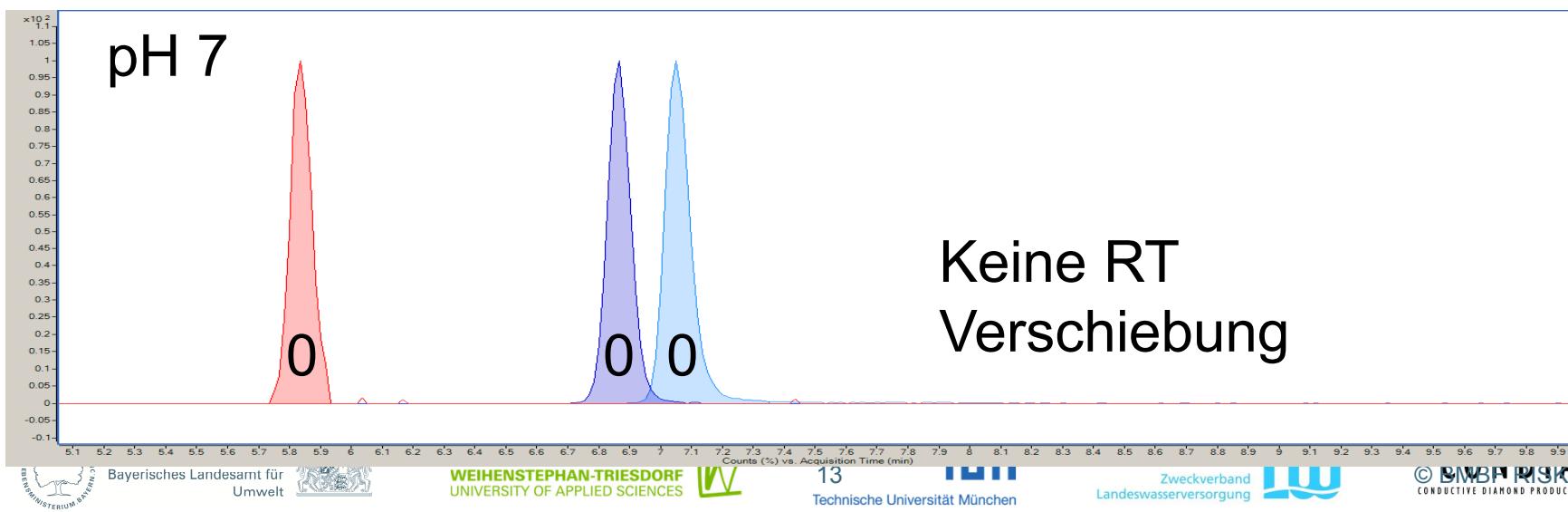
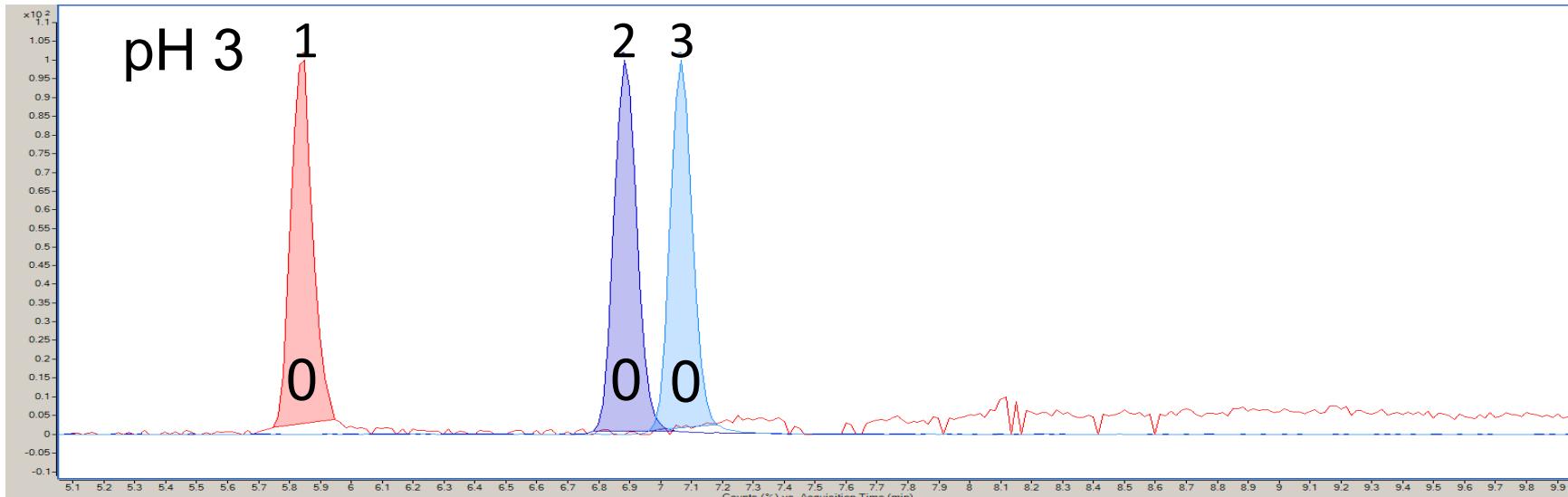
Neutrale Moleküle $\log P = \log D$

Nr.	Standard	logP	logD pH 3	logD pH 7
1	Primidon	1.12	1.12	1.12
2	Carbamazepine	2.77	2.77	2.77
3	Oxazepam	2.92	2.92	2.92

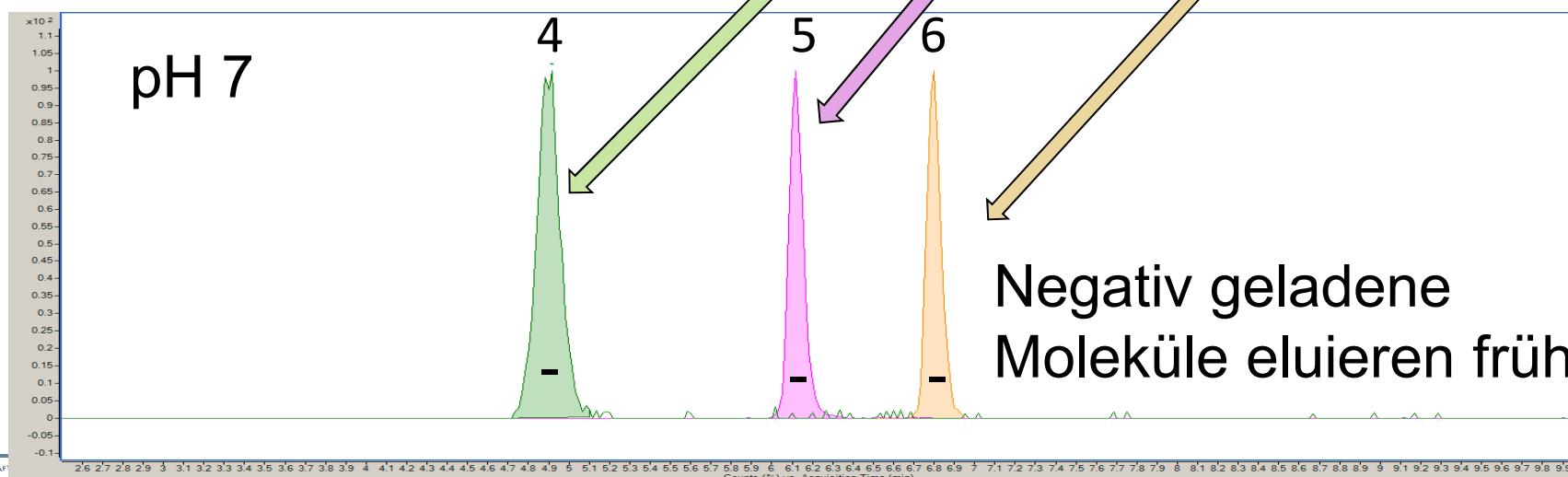
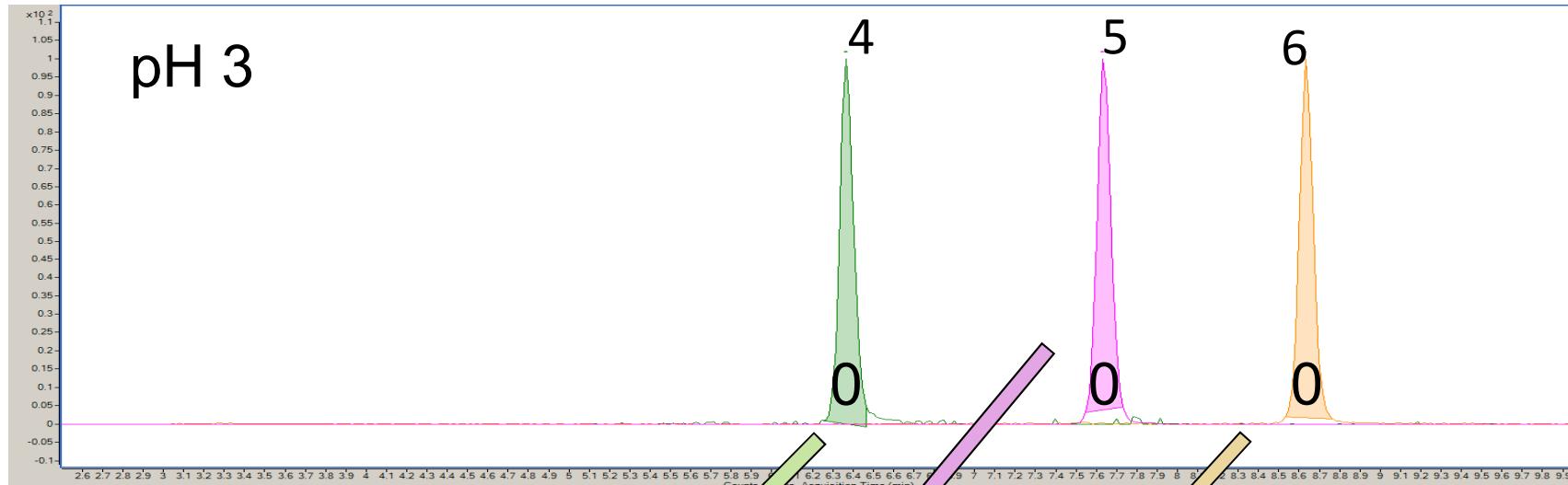
Geladene Moleküle $\log P \neq \log D$

Nr.	Standard	logP	logD pH 3	logD pH 7
4	Valsartansäure	2.56	2.50	-1.88
5	Bezafibrate	3.99	3.93	0.97
6	Diclofenac	4.26	4.22	1.37

Moleküle Neutral bei pH 3 und pH 7



Moleküle neutral bei pH 3 und negativ bei pH 7



Stoff-Ident Anwendungsbeispiel: negativ geladenes Molekül

Target identifier	Best match	Monoisotopic mass	Δ mass	logP	Δ logP	Name
Diclofenac		295.0167	0.0000	6.09	4.20	Meclofenamic acid
Diclofenac	X	295.0167	0.0000	4.26	2.37	Diclofenac

Ziele

Identifier	RTI	logP	Exakte Masse	RT Mittel	rt1
Oxazepam	100.4	1.99	286.0509	7.0	7.0
Bezafibrate	86.5	1.06	361.1081	6.1	6.1
Irbesartan	91.1	1.37	428.2324	6.4	6.4
Valsartansäure	72.4	0.13	266.0804	5.0	5.0
Diclofenac	98.9	1.89	295.0167	6.9	6.9
Sucratose	80.9	0.69	396.0145	5.7	5.7

Diclofenac

Wert	Quelle	Zusatz
4.26	chemicalize.org	

logD

Wert	Quelle	Zusatz
4.22	ChemAxon's Marvin	pH 3.0
3.22	ChemAxon's Marvin	pH 5.0
1.39	ChemAxon's Marvin	pH 7.0
0.82	ChemAxon's Marvin	pH 9.0

theor. logP	theor. logD pH 7	calc. logP	calc. logD	Δ logP	Δ logD
4.26	1.39	1.89	1.89	2.37	0.5

Bayerisches Landesamt für
UmweltHOCHSCHULE
WEIHENSTEPHAN-TRIESDORF
UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

15

Zweckverband
Landeswasserversorgung

- Was ist der Retentionzeitindex RTI ? Warum ein Ringversuch ?
- Chromatographie von neutralen und negativ geladenen Molekülen oder von logP und logD
- RTI: Säulenvergleich und Berechnungsstrategien
- RTI als Parameter zur Nutzung in der STOFF-IDENT Datenbank
- RTI als Parameter zur Entscheidungshilfe in Strukturvorhersagen
- RTI als Parameter im Einsatz von HILIC ?

Phasenvergleich, ACN, pH 7 – neutrale Moleküle auf logP bzw. logD bezogen

Name	theor. log P	C18 $\Delta\log P$	C18A $\Delta\log P$	phenyl $\Delta\log P$	PFP $\Delta\log P$
Linuron	2.68	0.05	0.07	0.09	0.09
Fenuron	1.32	-0.34	-0.45	-1.09	-0.41
Dapson	1.27	-0.01	0.15	0.25	0.22
Picoxystrobin	4.31	-0.29	-0.21	0.3	0.16

Name	theor. log D	C18 $\Delta\log D$	C18A $\Delta\log D$	phenyl $\Delta\log D$	PFP $\Delta\log D$
Linuron	2.68	0.05	0.07	0.09	0.09
Fenuron	1.32	-0.34	-0.45	-1.09	-0.41
Dapson	1.27	-0.01	0.15	0.25	0.22
Picoxystrobin	4.31	-0.29	-0.21	0.3	0.16

Phasenvergleich, ACN, pH 7 – negativ geladene Moleküle auf logP bzw. logD bezogen

Name	theor. log P	C18 $\Delta \log P$	C18A $\Delta \log P$	phenyl $\Delta \log P$	PFP $\Delta \log P$
Haloxylfop	4.27	-2.32	-2.94	-2.15	-2.34
Acifluorfen	4.55	-2.57	-3.18	-2.45	-2.73
Diclofenac	4.26	-2.27	-2.83	-2.06	
Indomethacin	3.53	-1.52	-2.02	-1.19	-1.33
Chlorsulfuron	2.62	-2.14	-3.45	-3.71	-3.11
Clofibric acid	2.90	-1.96	-3.31	-3.58	-2.55

Name	theor. log D	C18 $\Delta \log D$	C18A $\Delta \log D$	phenyl $\Delta \log D$	PFP $\Delta \log D$
Haloxylfop	0.77	1.18	0.56	1.35	1.16
Acifluorfen	1.03	0.95	0.34	1.07	0.79
Diclofenac	1.37	0.62	0.06	0.83	
Indomethacin	0.50	1.51	1.01	1.84	1.7
Chlorsulfuron	-0.86	1.34	0.03	-0.23	0.37
Clofibric acid	-0.38	1.32	-0.03	-0.3	0.73

K-Standard

compound	logD pH 7	logD pH 3
Metformin	-1.36	(-5.75)
Chloridazon	1.11	1.11
Carbetamide	1.65	1.65
Monuron	1.93	1.93
Metobromuron	2.24	2.24
Chlorbromuron	2.85	2.85
Metconazole	3.59	3.53
Diazinon	4.19	(3.00)
Quinoxyfen	4.98	(4.15)
Fenofibrate	5.28	5.28

G-Standard

compound	logD pH 7	logD pH 3
Chlorsulfuron	-0.86	1.08
Fluazifop	0.19	3.25
Acifluorfen	1.03	2.91
Gemfibrozil	1.85	4.37

Berechnungsstrategien – negativ geladene Moleküle

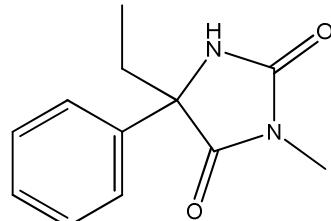
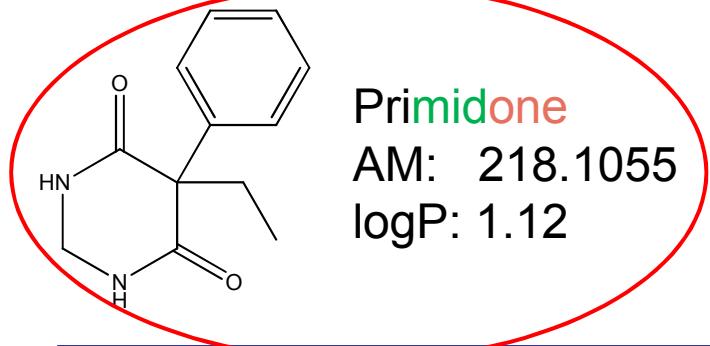
Name	theor. logD	mit K $\Delta\log D$	mit G $\Delta\log D$
Fenoprop	0.21	1.14	-0.02
Indomethacin	0.5	1.26	0.53
Fenoxyprop	0.69	0.84	-0.08
Fenoprofen	0.71	0.82	-0.1
Haloxylfop	0.77	0.84	0.01
Bensulfuronmethyl	0.93	1.08	0.29
Bezafibrat	0.97	0.33	-0.87
Fenofibric acid	0.98	0.48	-0.54
Diclofop	1.15	0.61	-0.12
Diclofenac	1.37	0.33	-0.42
Ibuprofen	1.71	0.22	-0.61

Zusammenfassung unpolare Moleküle (RP)

- Neutrale Moleküle
 - RTI mit logP und logD nutzbar
 - Ausnahmen bekannt
- Negative Moleküle
 - RTI mit logP Korrektur nutzbar
 - RTI mit logD nutzbar
 - RTI mit G Standard geladene Moleküle nutzbar
- Positive Moleküle
 - Momentan keine ausreichende Datenmenge vorhanden

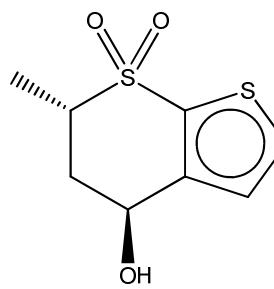
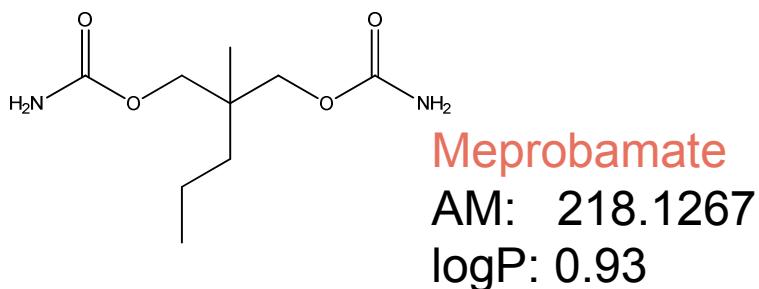
- Was ist der Retentionzeitindex RTI ? Warum ein Ringversuch ?
- Chromatographie von neutralen und negativ geladenen Molekülen oder von logP und logD
- RTI: Säulenvergleich und Berechnungsstrategien
- RTI als Parameter zur Nutzung in der STOFF-IDENT Datenbank
- RTI als Parameter zur Entscheidungshilfe in Strukturvorhersagen
- RTI als Parameter im Einsatz von HILIC ?

RTI zur Nutzung in Stoff-Ident – Bsp. Primidone



Mephenytoin
 AM: 218.1055
 $\log P$: 1.67

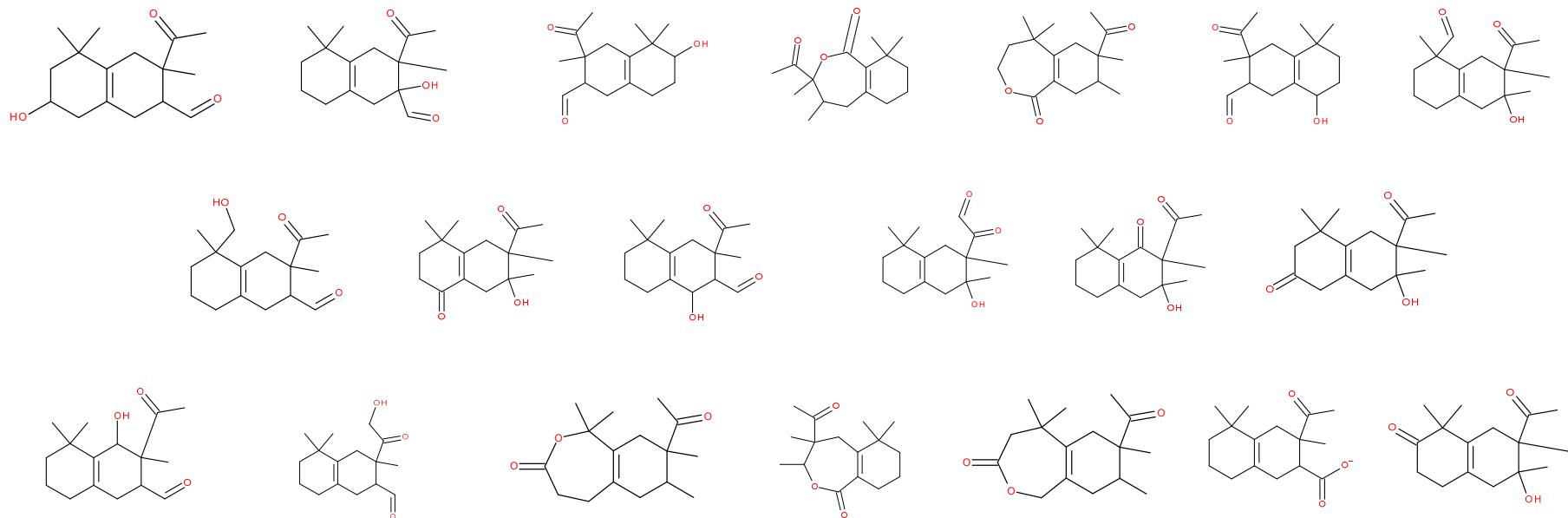
Massenabweichung	Anzahl Treffer mit $\Delta \log P \leq +/- 0.5$	Anzahl Treffer inkl. $\Delta \log P > +/- 0.5$
5 ppm (0.001Da)	1	2
500 ppm (0.1 Da)	3	25
1000 ppm (0.2 Da)	3	27



Dorzolamide inter-7
 AM: 218.0071
 $\log P$: 0.66

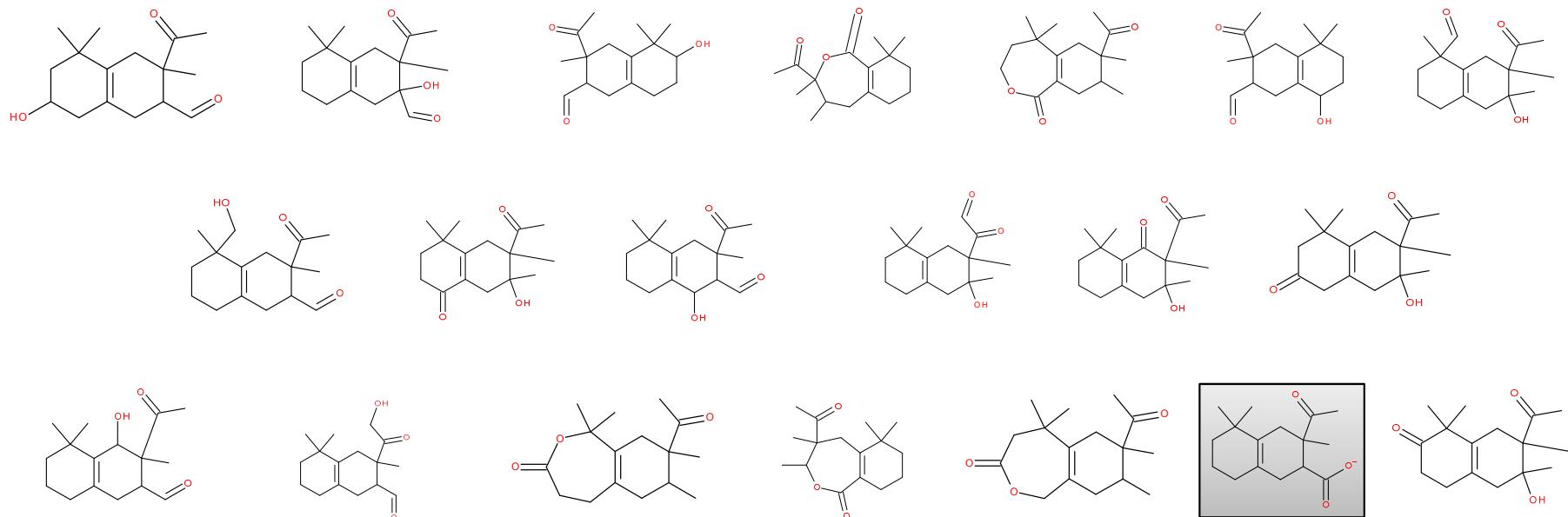
- Was ist der Retentionzeitindex RTI ? Warum ein Ringversuch ?
- Chromatographie von neutralen und negativ geladenen Molekülen oder von logP und logD
- RTI: Säulenvergleich und Berechnungsstrategien
- RTI als Parameter zur Nutzung in der STOFF-IDENT Datenbank
- RTI als Parameter zur Entscheidungshilfe in Strukturvorhersagen
- RTI als Parameter im Einsatz von HILIC ?

Beispiel aus der MS/MS-Auswertung (LW)



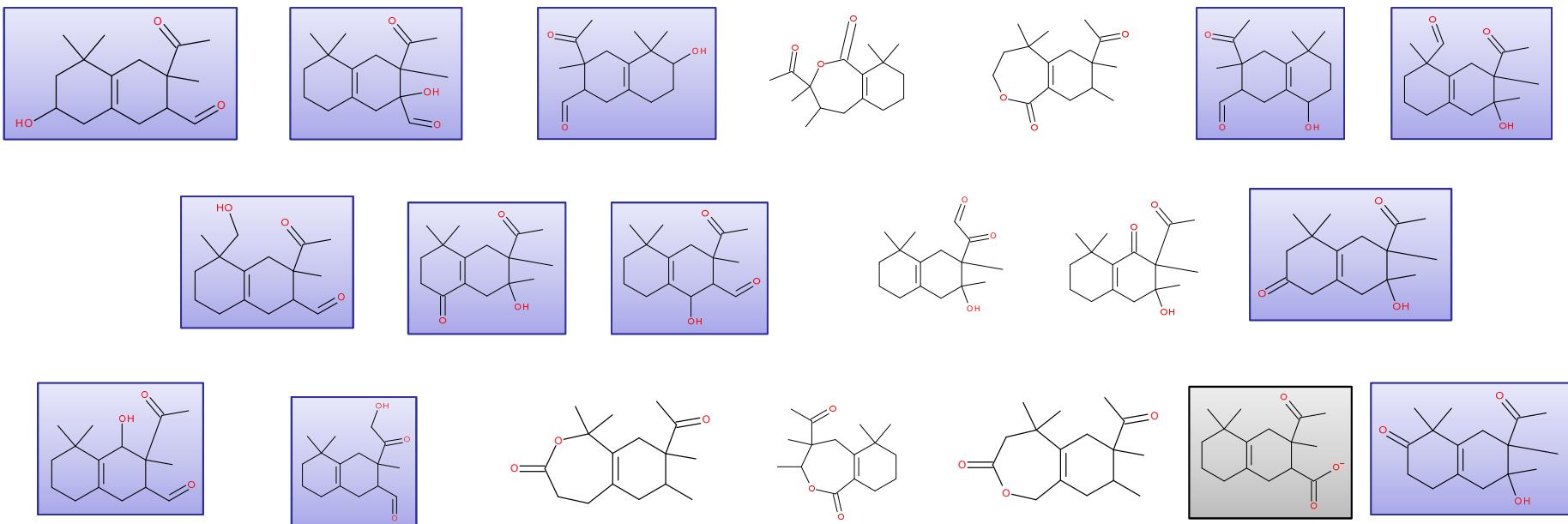
20 Strukturformelvorschläge aus UM-PPS
für ein MS/MS-Spektrum

Beispiel aus der MS/MS-Auswertung (LW)



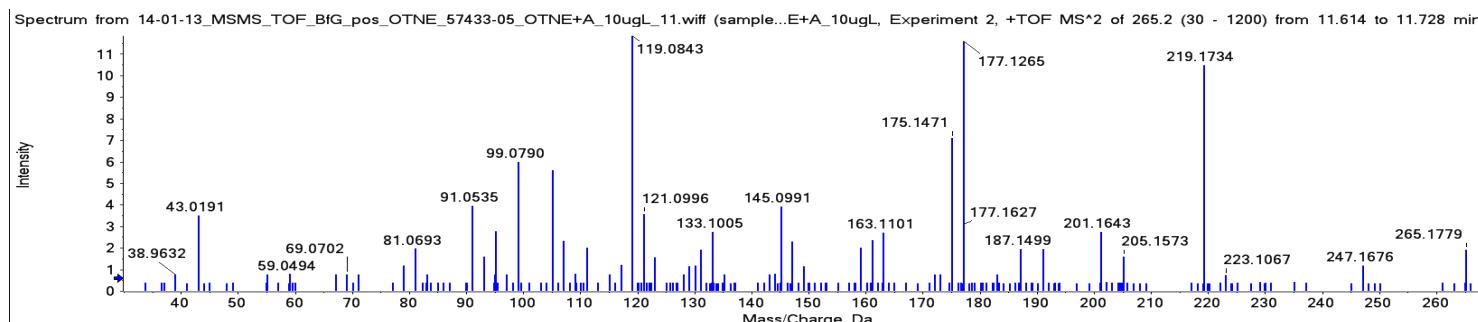
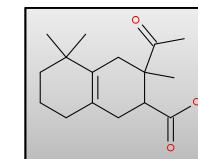
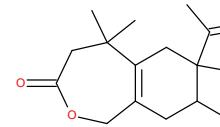
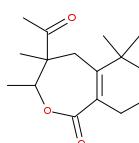
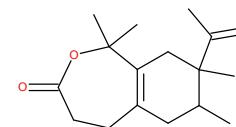
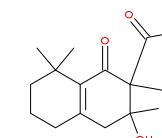
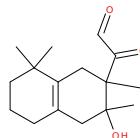
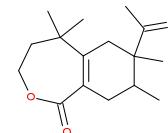
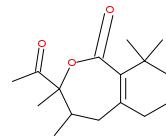
Für disoziierbare Verbindungen funktioniert RTI
derzeit noch nicht genau genug (da noch nach logP) !

Beispiel aus der MS/MS-Auswertung (LW)

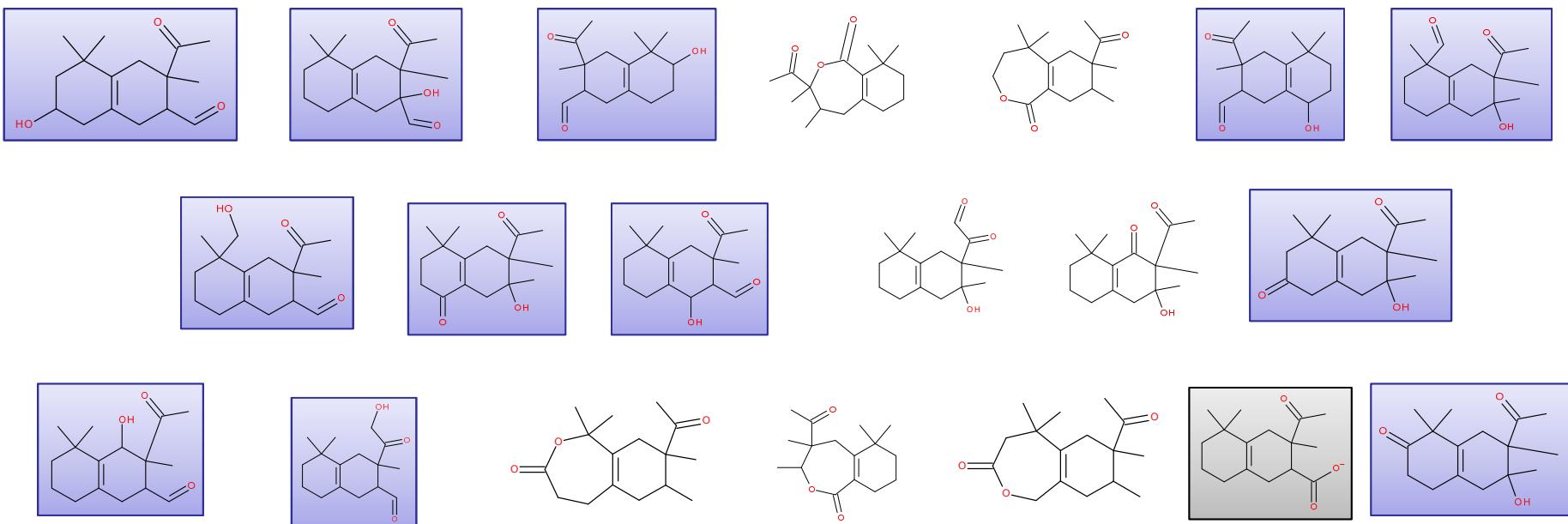


Berechneter LogP aus RTI-Modul: 2,87
Möglichkeiten bei Fehlergrenzen +/- 25%

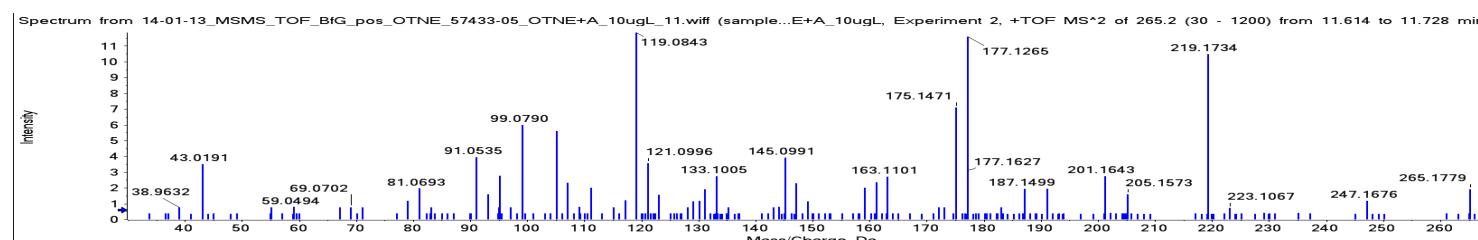
Beispiel aus der MS/MS-Auswertung (LW)



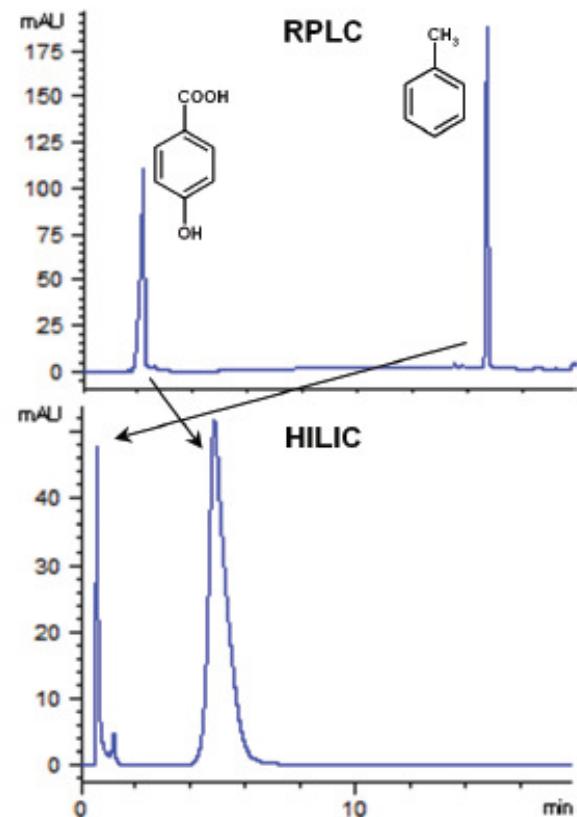
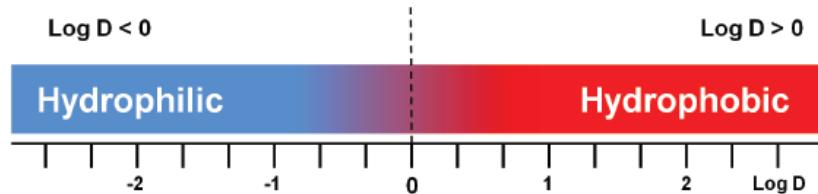
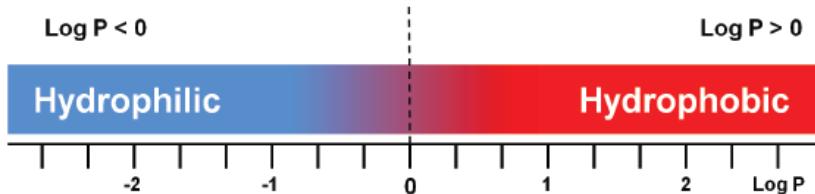
Beispiel aus der MS/MS-Auswertung (LW)



LogP aus RTI-Modul: 2,87 (+/- 25%)



- Was ist der Retentionzeitindex RTI ? Warum ein Ringversuch ?
- Chromatographie von neutralen und negativ geladenen Molekülen oder von logP und logD
- RTI: Säulenvergleich und Berechnungsstrategien
- RTI als Parameter zur Nutzung in der STOFF-IDENT Datenbank
- RTI als Parameter zur Entscheidungshilfe in Strukturvorhersagen
- RTI als Parameter im Einsatz von HILIC ?

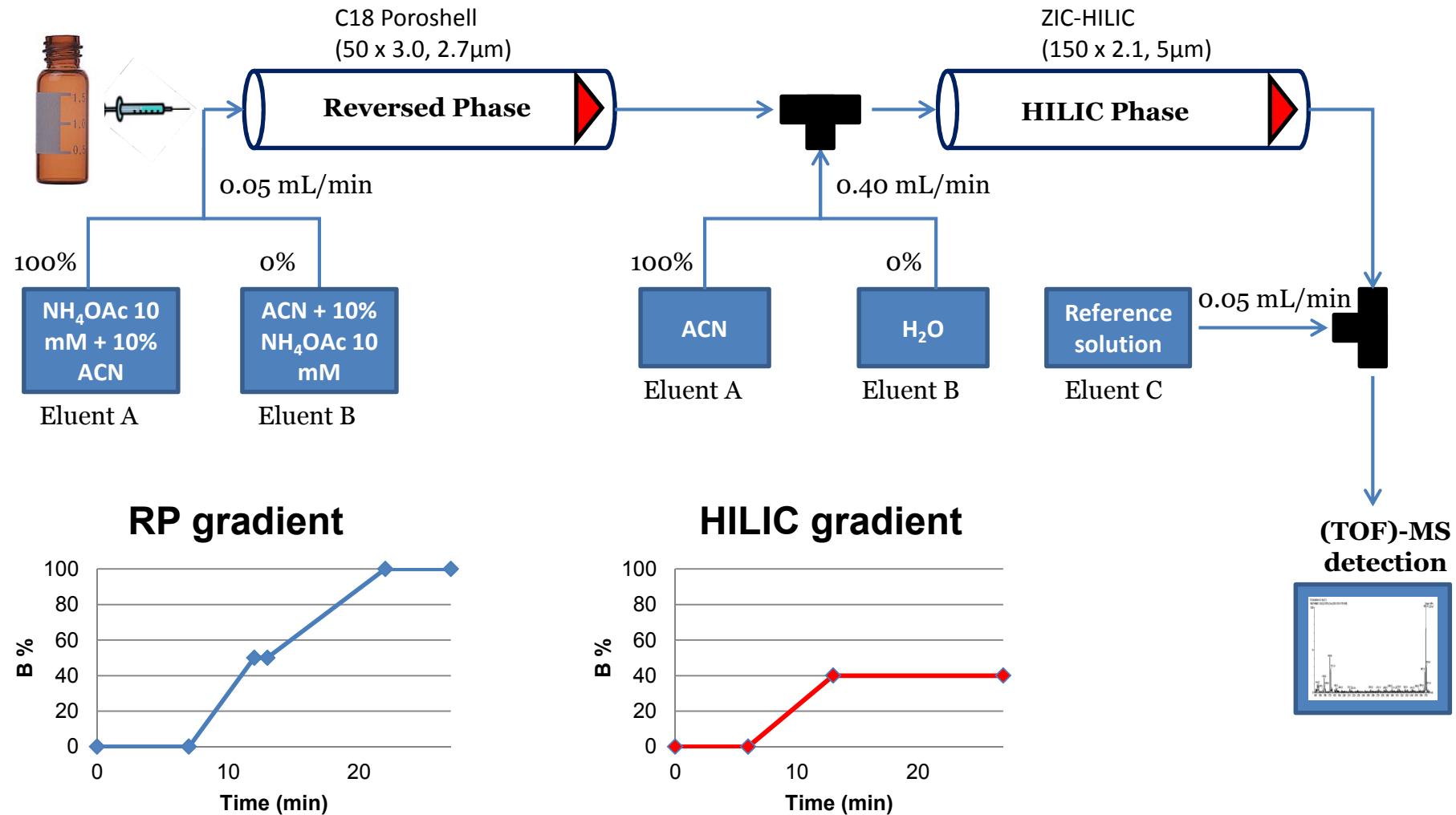


Compound	Structure	Marvin values	Retention
Toluene	<chem>Cc1ccccc1</chem>	log P = 2.5	> 0 hydrophobic RPLC
4-hydroxybenzoic acid	<chem>Oc1ccc(C(=O)O)cc1</chem>	log D (pH 7) = -1.4	< 0 hydrophilic HILIC

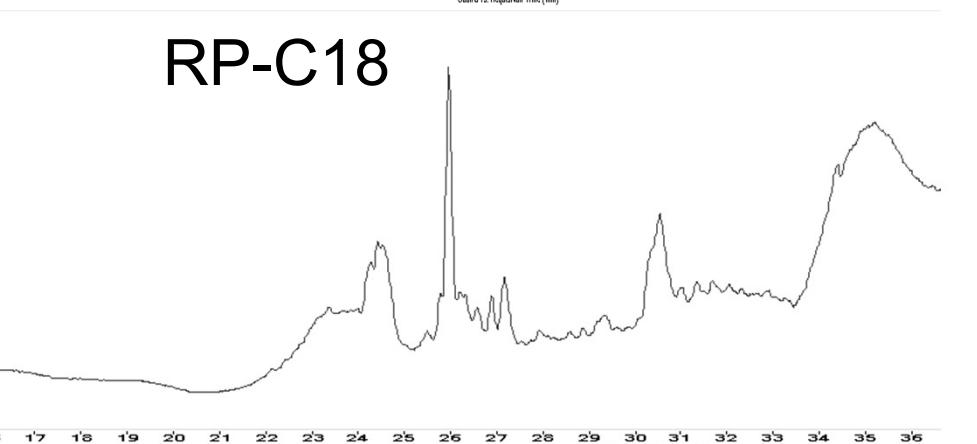
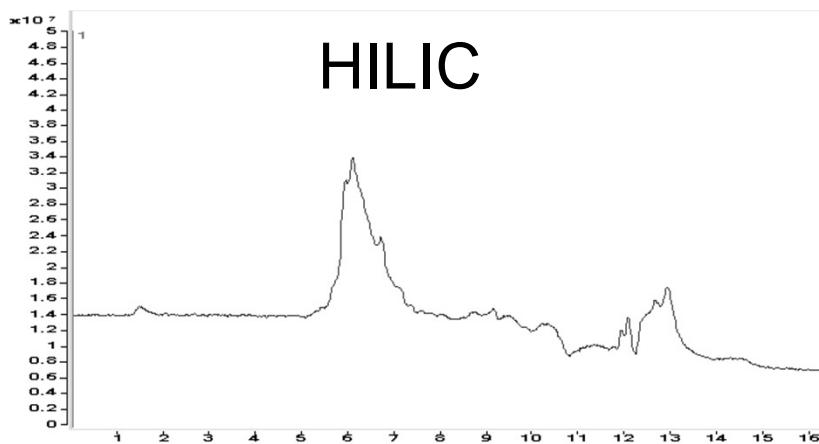
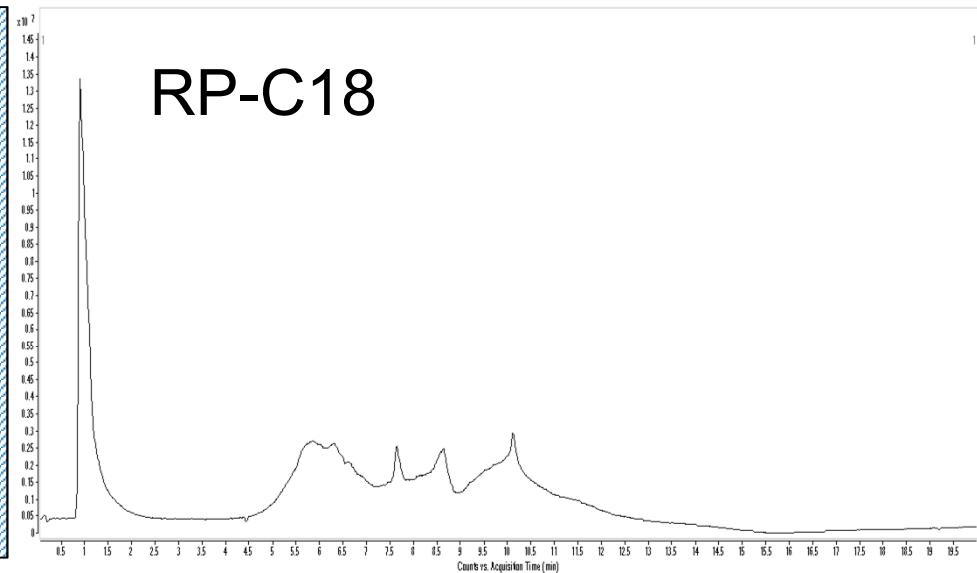
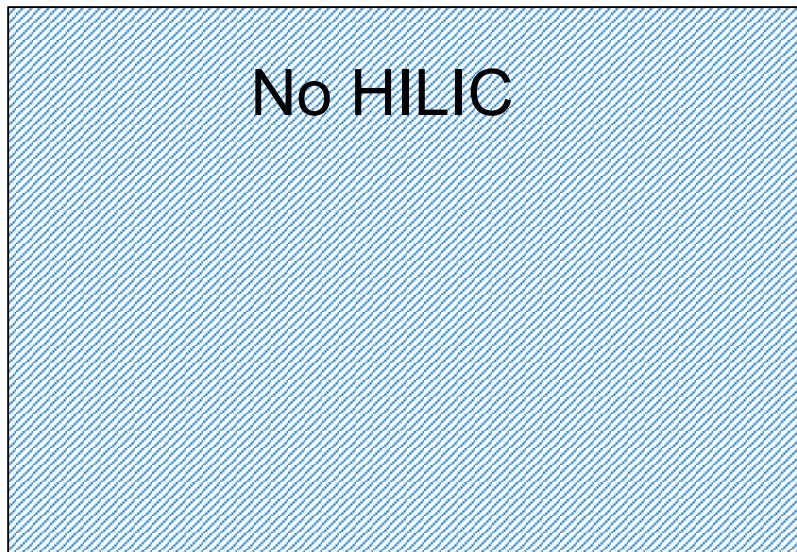
Greco and Letzel.
Sep. Sci. 2013,
HILIC Solutions No.1

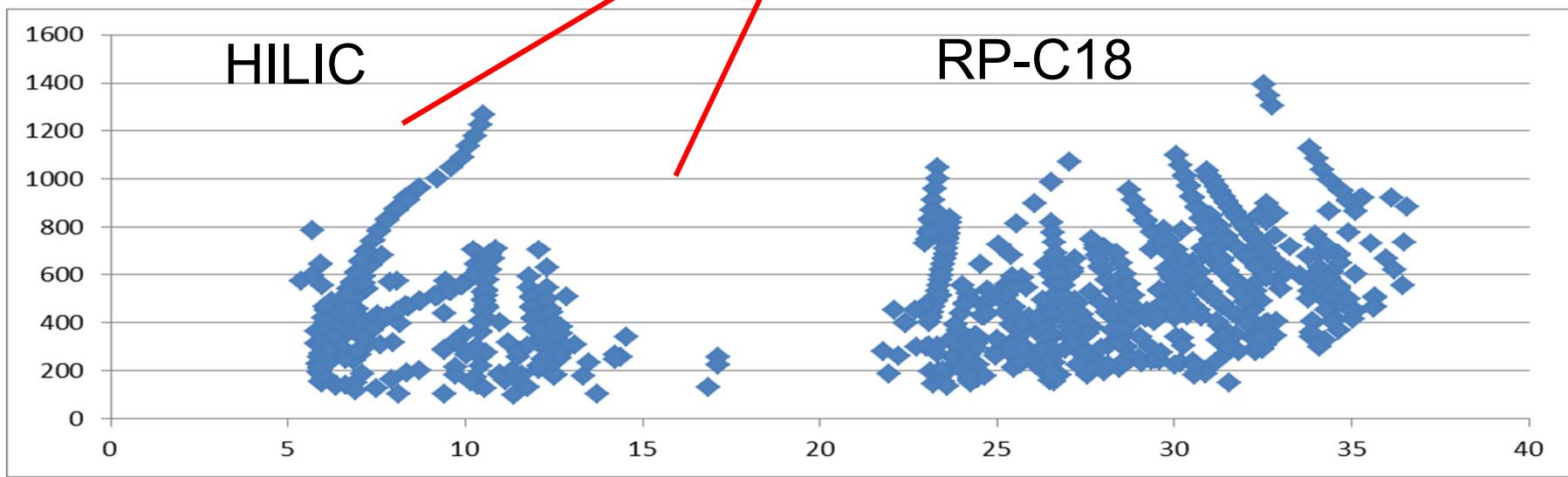
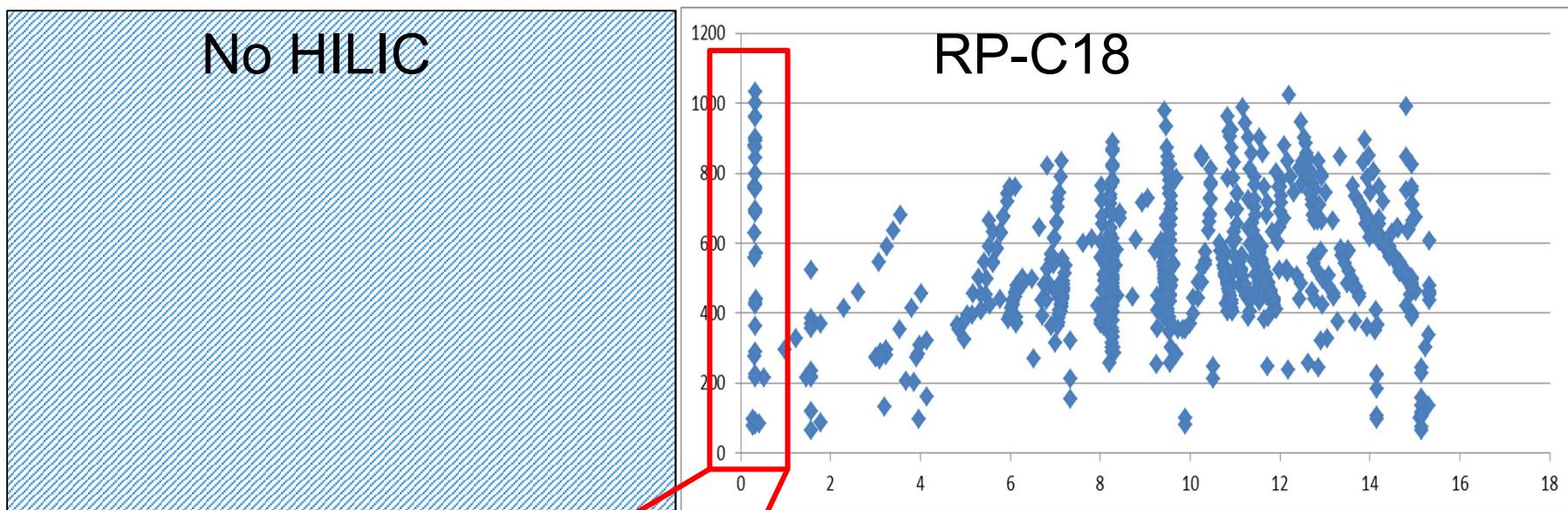
log P or log D > 0 → RPLC
log P or log D < 0 → HILIC

Method LC-LC-ToF-MS



Ausblick polare Moleküle ($\log D < 0$, HILIC mode)





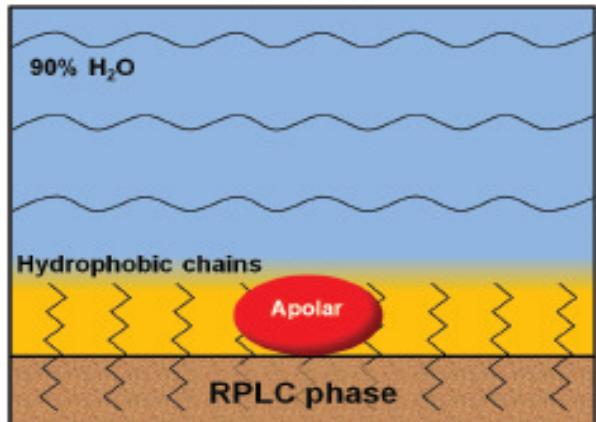
Ausblick polare Moleküle ($\log D < 0$, HILIC mode)

Name	$\log D$ pH 7	RT
1,2,4-Triazole	-1.11	5.84
Gabapentin	-1.27	10.83
Hydroxycarbamid	-1.37	7.13
Melamine	-2.02	7.29
Sotalol	-2.47	14.17
Dicyandiamide	-2.94	6.29
Acetylcholine	-4.22	11.69
Metformin	-5.69	16.9
Glutamat	-5.86	6.23
Glyphosate	-6.9	12.95

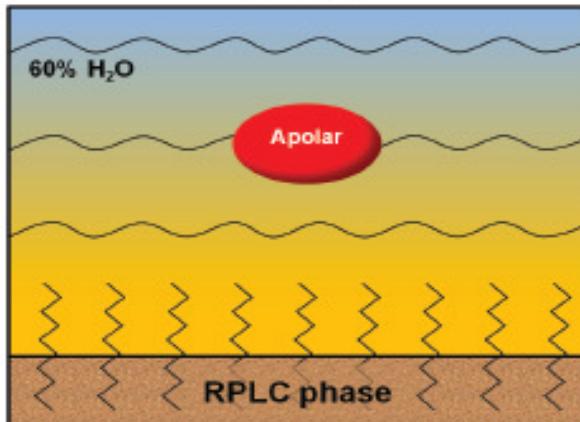
Steigende Polarität

Streuende Retention

Retention



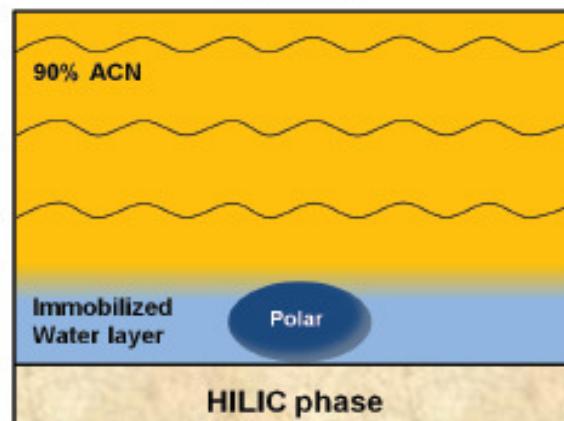
Elution



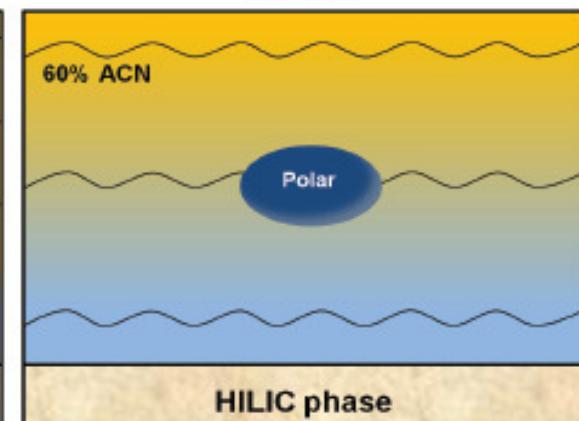
RPLC und HILIC: Mechanismus

Greco and Letzel.
Sep. Sci. 2013,
HILIC Solutions
No.2

Retention



Elution



Dankeschön

- Partner im RISK-IDENT Projekt
- Andrea Boltner
- Johanna Grassmann
- Giorgia Greco
- Sylvia Grosse
- Thomas Lucke (Folien 25-29)

TU München,
Germany

Funding:

- Agilent
- AiF
- BfS
- EU
- FCI
- BMBF
- JAS
- LL-Stiftung
- Knauer



Bayerisches Landesamt für
Umwelt



HOCHSCHULE
WEIHENSTEPHAN-TRIESDORF
UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES



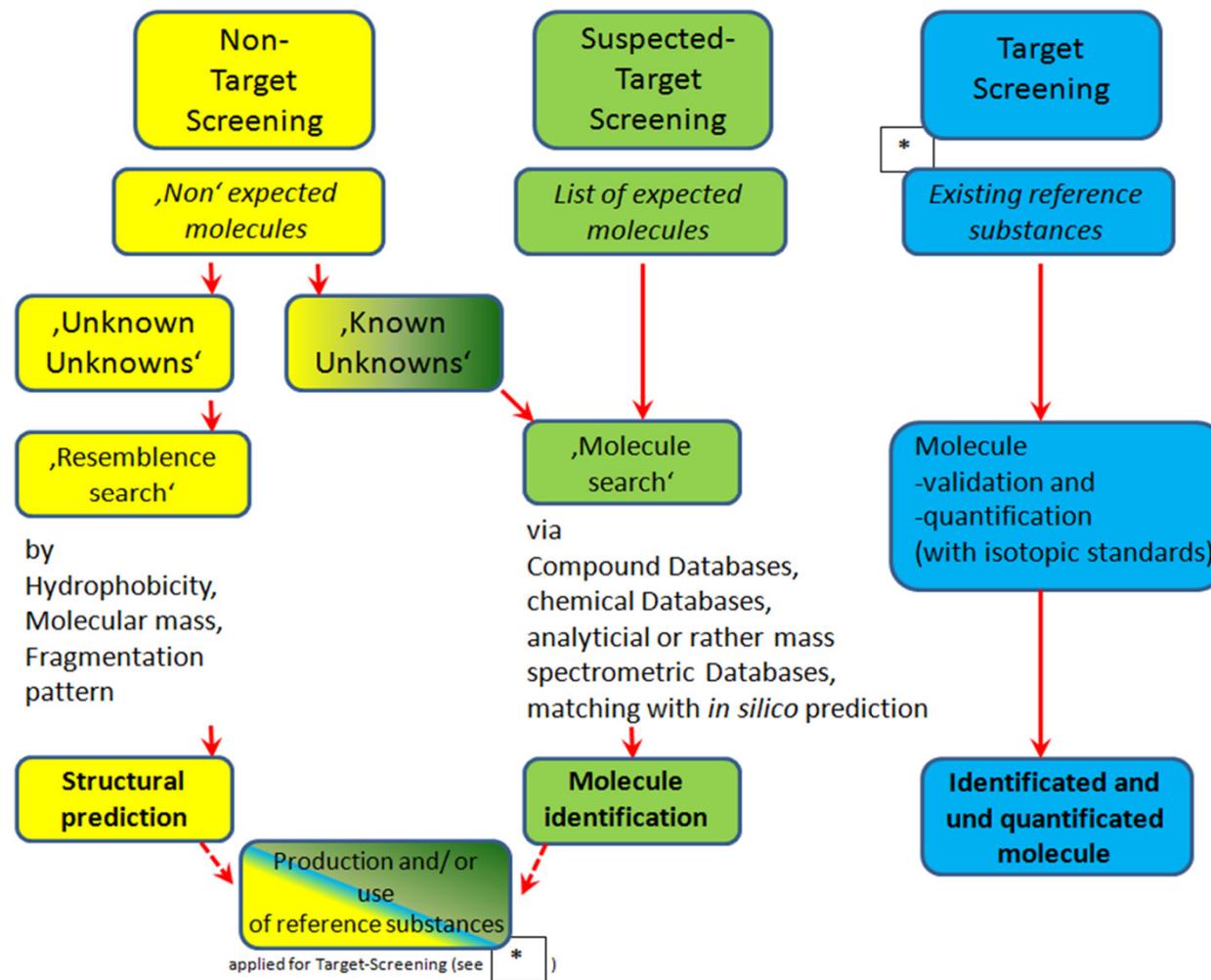
TUM
Technische Universität München

Zweckverband
Landeswasserversorgung



CONDIAS
CONDUCTIVE DIAMOND PRODUCTS

Screening Techniken im Abwasser



Neutrale Moleküle vs geladene Moleküle

Neutral - Primidon

Calc. logP mit K	0.97	Soll logP	1.22	Differenz	-0.25
Calc. logP mit K	0.97	Soll logD	1.22	Differenz	-0.25
Calc. logD mit G	-0.49	Soll logD	1.22	Differenz	-1.71

Negativ pH 7 - Diclofenac

-60%

Calc. logP mit K	1.70	Soll logP	4.26	Differenz	-2.56
Calc. logP mit K	1.70	Soll logD	1.37	Differenz	0.33
Calc. logD mit G	0.95	Soll logD	1.37	Differenz	-0.42

Phasenvergleich, ACN, pH 7 – neutrale und negativ geladene Moleküle auf logP bezogen

Name	theor. log P	C18 logP Abw [%]	C18A logP Abw [%]	phenyl logP Abw [%]	PFP logP Abw [%]
Linuron	2.68	2	3	3	3
Fenuron	1.32	-26	-34	-83	-31
Dapson	1.27	-1	12	20	17
Picoxystrobin	4.31	-7	-5	7	4

Name	theor. log P	C18 logP Abw [%]	C18A logP Abw [%]	phenyl logP Abw [%]	PFP logP Abw [%]
Haloxyfop	4.27	-54	-69	-50	-55
Acifluorfen	4.55	-56	-70	-54	-60
Diclofenac	4.26	-53	-66	-48	
Indomethacin	3.53	-43	-57	-34	-38
Chlorsulfuron	2.62	-82	-132	-142	-119
Clofibric acid	2.90	-68	-114	-123	-88

Abweichungen berechnet mit Standard K und logP Wert

Phasenvergleich, ACN, pH 7 – neutrale und negativ geladene Moleküle auf logD bezogen

Name	theor. log D	C18 logD Abw [%]	C18A logD Abw [%]	phenyl logD Abw [%]	PFP logD Abw [%]
Linuron	2.68	2	3	3	3
Fenuron	1.32	-26	-34	-83	-31
Dapson	1.27	-1	12	20	17
Picoxystrobin	4.31	-7	-5	7	4

Name	theor. log D	C18 logD Abw [%]	C18A logD Abw [%]	phenyl logD Abw [%]	PFP logD Abw [%]
Haloxyfop	0.77	153	73	175	151
Acifluorfen	1.03	92	33	104	77
Diclofenac	1.37	45	4	61	
Indomethacin	0.50	302	202	368	340
Chlorsulfuron	-0.86	-156	-3	27	-43
Clofibric acid	-0.38	-347	8	79	-192