

Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí

Teoretický úvod

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí se řadí mezi nejcitlivější separační metody určené ke kvantitativní analýze a v současnosti je stále více v praxi používána. Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní, popřípadě tandemovou hmotnostní detekcí (HPLC-MS/MS) se stává v komerčních firmách standardní analytickou separační technikou a u žadatelů o práci je velice často požadována i praktická zkušenost s touto metodou.

V této laboratorní úloze bude analyzován estriol metodou HPLC-MS/MS. Estriol se řadí mezi estrogení látky, což jsou ženské pohlavní hormony. V důsledku nejrůznějších lidských aktivit dochází ke kontinuálnímu zvyšování znečištění životního prostředí polutanty a toto znečištění se stává stále komplexnější. Relativně novou skupinou polutantů jsou látky, ovlivňující endokrinní systémy širokého spektra organismů. Mezi tyto látky, tzv. endokrinní disruptory (ED), se řadí i estriol.

Vzhledem k nízkým koncentracím estrogeních polutantů (desetiny až stovky ng/L) ve vodných vzorcích životního prostředí (říční voda, splašková voda aj.) vyžaduje jejich analýza vysoce citlivé metody. Mezi nejvýznamnější metody analýzy estrogeních polutantů v životním prostředí patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Jako stacionární fáze pro analýzu estrogenů jsou obvykle používány různé modifikace silikagelu s navázaným alkylovým řetězcem (nejčastěji oktadecyl nebo oktyl) a jako mobilní fáze směsi acetonitril/voda nebo methanol/voda s různým obsahem organické složky. Vzhledem k nutnosti stanovovat nízké koncentrace estrogeních polutantů, nemá řada detektorů používaných v kombinaci s HPLC dostatečnou citlivost. Proto existuje pouze málo studií zabývajících se stanovením estrogenů pomocí HPLC s jinou než hmotnostní detekcí.

Hmotnostní detektor se skládá z několika hlavních částí zahrnujících iontový zdroj, hmotnostní analyzátor, detektor iontů a zdroj vakua. Iontový zdroj slouží k zplynění mobilní fáze a k tvorbě iontů analytů. V našem případě budeme používat ionizaci elektrosprejem (ESI). Jedná se o měkkou ionizační techniku, která pracuje za atmosférického tlaku. Jako hmotnostní analyzátor je využíván kvadrupól. Kvadrupól je tvořen 4 paralelními tyčemi kruhového nebo hyperbolického průřezu, na něž je vkládáno napětí. Vstupující ionty začnou oscilovat. Oscilace jsou stabilní pouze pro ionty s určitým poměrem m/z a jen tyto ionty

kvadrupólem projdou. Ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích. Trojitý kvadrupól je tvořen třemi kvadrupóly zapojenými sériově za sebou, první a třetí kvadrupól slouží jako filtry hmot a druhý kvadrupól (v našem případě hexapól) slouží jako kolizní cela. Detektorem iontů může být elektronásobič, popřípadě fotonásobič.

Principem trojitého kvadrupólu je sledování specifického přechodu mezi prekursorovým a produktovým iontem daného analytu. Po separaci analytů na LC a jejich převedení na ionty, (pomocí iontového zdroje) jsou tyto ionty vedeny iontovou optikou (součástí je i iontová kapilára, na jejímž konci je vloženo napětí tzv. fragmentor, tato hodnota ovlivňuje intenzitu a vznik prekursorových iontů) do prvního kvadrupólu, ten propustí pouze námi zvolenou hmotu m/z (tato hmota se nazývá prekursorový iont). Tato hmota je vedena do kolizní cely, kde dochází (na základě zvolené kolizní energie) k její fragmentaci. Takto vznikají produktové ionty, které jsou vedeny do třetího kvadrupólu, kterým projde pouze námi specifikovaný produktový iont o dané hmotě. Tento produktový iont je detekován detektorem iontů. Cílem této úlohy je nalezení optimálních parametrů hmotnostního spektrometru nutných k měření v jeho nejcitlivějším modu tzv. MRM modu.

V této úloze budou použity čtyři druhy skenů:

SCAN – systém pracuje v režimu jednoduchého kvadrupólu. Kvadrupól propustí na detektor všechny ionty, tím se získá celkové hmotnostní spektrum.

SIM (selected ion monitoring) - systém pracuje v režimu jednoduchého kvadrupólu. Kvadrupól propustí na detektor pouze námi zvolenou m/z .

Product Ion - systém pracuje v režimu trojitého kvadrupólu. Prvním kvadrupólem projde definovaná m/z , ta je rozštěpena v kolizní cele, vzniklé ionty projdou třetím kvadrupólem a jsou detekovány.

MRM (multiple reaction monitoring) - systém pracuje v režimu trojitého kvadrupólu. Prvním kvadrupólem projde definovaná m/z (prekursorový iont), ta je rozštěpena v kolizní cele, třetím kvadrupólem projde definovaná m/z (produktový iont) a ta je detekována.

Přístroje, pomůcky a chemikálie

- Kapalinový chromatograf Agilent serie 1290 (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo)

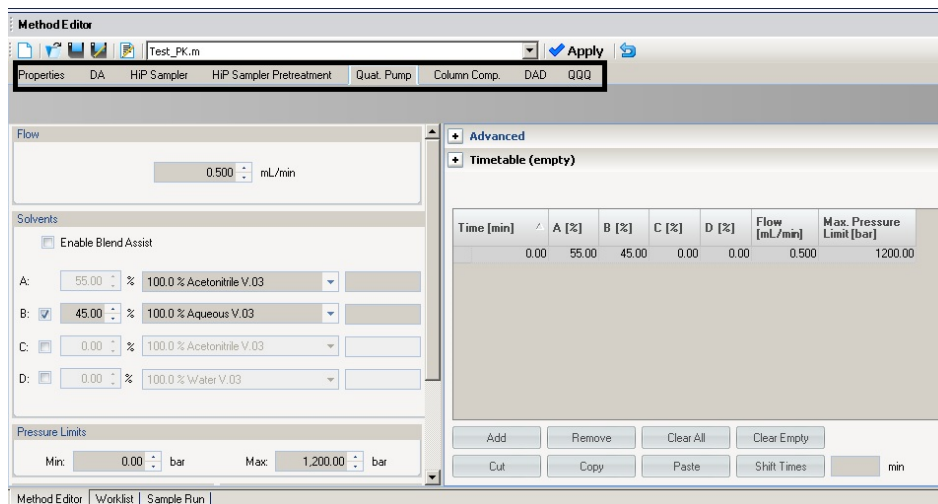
- Trojitý kvadrupólový hmotnostní spektrometr Agilent 6460 (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo)
- HPLC kolona SunFire C18, 4,6 x 150 mm, 5 μ m (Waters, Milford, USA)
- Mobilní fáze H₂O with 0,1% HCOOH; ACN with 0,1% HCOOH
- 4 skleněné vialky s roztokem estriolu označené čísly 1-4 ($c_1 = 800 \mu\text{g/ml}$; $c_2 = 80\mu\text{g/ml}$; $c_3 = 8 \mu\text{g/ml}$; $c_4 = x \mu\text{g/ml}$); 1 vialka se směsí estrogenních látek
- Mass Hunter workstation software

Pracovní postup

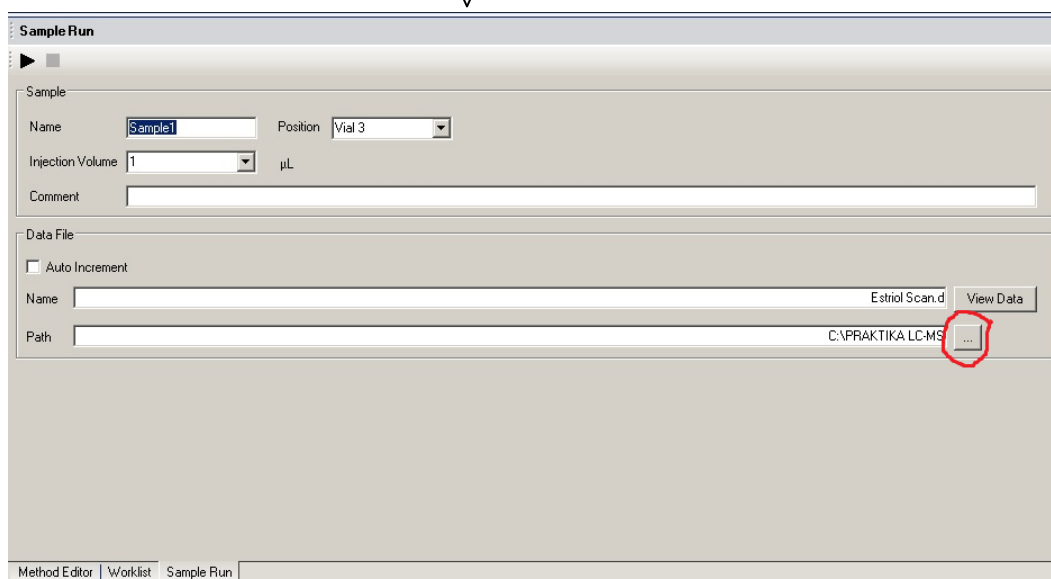
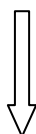
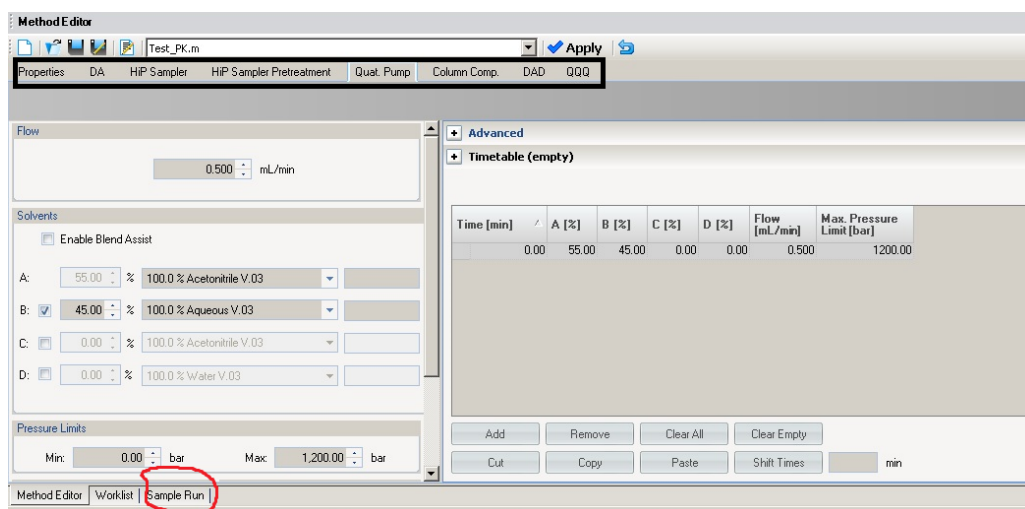
1. Vytvořte složku, kde se budou ukládat vámi změřená data: Na ploše dvakrát poklepejte na ikonku Computer-Shortcut, otevřete adresář Windows (C:), poté složku PRAKTIKA LC-MS a zde vytvořte složku s názvem vaší skupiny, tak aby bylo poznat, kdo naměřil daná data (nejlépe vaše příjmení).
2. Rozklikněte záložku Agilent MassHunter Workstation Data Acquisition, která se nachází na liště. Zobrazí se vám software, který ovládá celý LC-MS instrument. Systém je v režimu on (nemusí se nic zapínat).
3. Vložte do karuselu vialky. Do pozice 1 vialku s označením 1, do pozice 2 vialku s označením 2 a do pozice 3 vialku s označením 3 atd.

A. Vytvoření metody

1. V levé dolní části programu jsou záložky, které ovládají jednotlivé části instrumentu:

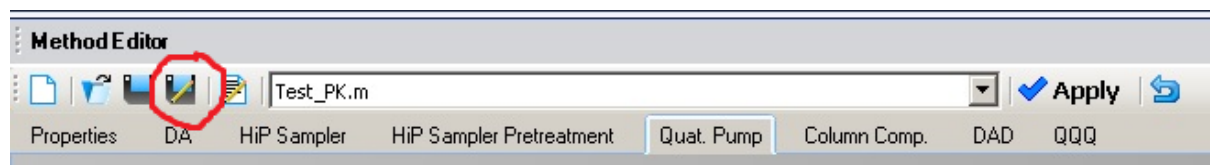


- Klikněte na záložku Sample Run (označeno červeně), zadejte cestu, kam se budou ukládat naměřená data (pomocí zakroužkované ikonky se proklikejte do vámi vytvořené složky).



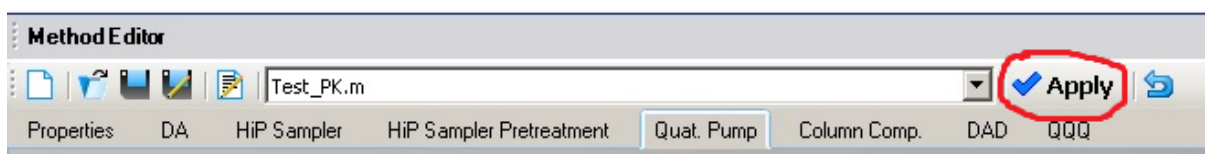
- V Sample do políčka s názvem Position vyplňte: Vial 1 do políčka Injection Volume vyplňte 1.
- Překlikněte na Method Editor. V záložce Quat Pump nastavte Stop Time na 3 minuty. Zkontrolujte, zda průtok mobilní fáze je nastaven na 0,8 ml/min a složení solventů odpovídá 55/45 H₂O with 0,1% HCOOH/ACN with 0,1% HCOOH.

5. V záložce Column Comp. nastavte teplotu vyhřívání kolony na 30 °C (jak u Left tak i u Right).
6. Metodu uložte kliknutím na označenou ikonu ve formátu: Praktika_Jméno (Místo jména napište název, jak jste si pojmenovali vaši složku, kam se ukládají data).

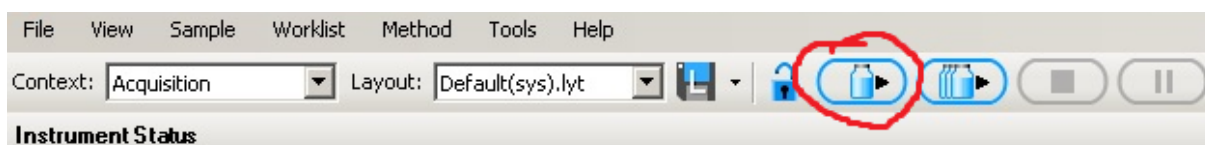


B, Proměření full scan spektra

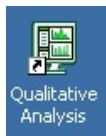
1. V záložce QQQ a podzáložce Acquisition nastavte tyto hodnoty: Start Mass – 100; End Mass – 300; Scan Time 500; Fragmentor – 100 V; Polarity – Positive.
2. V záložce QQQ a podzáložce Source nastavte tyto hodnoty: Gas Temp – 350 °C; Gas Flow – 10 l/min; Nebulizer – 55 psi; Capillary (Positive) – 4000 V.
3. V záložce Sample Run do políčka Name (pro Data File), napište: Estriol Scan 01.d
4. Pro potvrzení vámi nastavených parametrů klikněte na ikonku Apply v Method Editoru.





5. Spusťte analýzu pomocí ikonky Start Sample Run v horní části programu.




- Po doběhnutí analýzy minimalizujte program Agilent MassHunter Workstation Data Acquisition na lištu a otevřete program k vyhodnocení dat Qualitative Analysis, který se nachází na ploše.

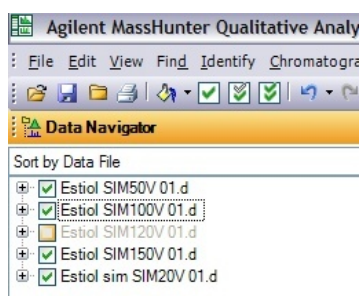


- Otevřete vámi změřený soubor Estriol Scan 01.
- Klikněte na ikonku Manual Integration  a zintegrujte peak estriolu. Poté klikněte na ikonku Peak Select , čímž se označí zintegrovaný peak. Klikněte pravým tlačítkem myši na peak a vyberte Extract Peak Spectrum. Tímto získáme hmotnostní spektrum estriolu. Nejintenzivnější hmota odpovídá prekursorovému iontu (tuto hmotu si poznamenejte).
- Klikněte na File/Save results, poté na File/Close Data File.
- Minimalizujte program Qualitative Analysis na lištu a otevřete program Agilent MassHunter Workstation Data Acquisition (na liště).

C, Nalezení optimálního napětí na kapiláře

- V záložce Sample Run do políčka Name (Data File) napište: Estriol SIM100V 01.d do políčka Position vyplňte: Vial 2
- V záložce QQQ změňte Scan Type na MS2SIM. V podzáložce Acquisition nastavte (popřípadě zkontrolujte) tyto hodnoty: Mass – zde zadejte hmotu prekursorového iontu, kterou jste si poznamenali; MS2 Res – Unit; Dwell – 200; Fragmentor – 100V; Polarity – Positive. Klikněte na ikonku Apply. Spusťte analýzu.
- V záložce Sample Run do políčka Name (Data File) napište: Estriol SIM120V 01.d
- V záložce QQQ a podzáložce Acquisition změňte parametr Fragmentor na 120V. Klikněte na ikonku Apply. Spusťte analýzu.

5. Analogicky (změna v záložce Sample Run do políčka Name (Data File) a změna v záložce QQQ a podzáložce Acquisition parametr Fragmentor) změřte hodnoty parametru Fragmentor: 150, 50, 20 V. Nezapomínejte před spuštěním každé analýzy potvrdit nastavení ikonkou Apply.
6. Otevřete program Qualitative Analysis (na liště). Otevřete (File/Open Data File) všechny soubory, které mají v názvu SIM.
7. Klikněte na ikonku Overlaid mode  (dojde k překrytí jednotlivých peaku). Optimální napětí na kapiláře bude odpovídat napětí fragmentoru při kterém je peak estriolu nejvyšší. Peak, který odpovídá danému napětí, zjistíte vyklikáváním názvů jednotlivých souborů.



8. Optimální napětí Fragmentoru si poznamenejte. Výsledky uložte (File/Save results) a soubory zavřete (File/Close Data File).
9. Minimalizujte program Qualitative Analysis na lištu a otevřete program Agilent MassHunter Workstation Data Acquisition (na liště).

D. Nalezení produktového iontu a optimální hodnoty kolizní energie

1. V záložce Sample Run do políčka Name (Data File) napište: Estriol PROD15V 01.d
2. V záložce QQQ změňte Scan Type na Product Ion. V podzáložce Acquisition nastavte (popřípadě zkontrolujte) tyto hodnoty: Precursor Ion – zde zadejte hmotu prekurzorového iontu, kterou jste si poznamenali; MS2 From – 100; MS2 To – 300;

Scan Time – 500; Fragmentor – zadejte optimální hodnotu, kterou jste si poznamenali;
Collision Energy – 15V Polarity – Positive. Spusťte analýzu.

3. V záložce Sample Run do políčka Name (Data File) napište: Estriol PROD30V 01.d
4. V záložce QQQ a podzáložce Acquisition změňte parametr Collision Energy na 30V. Spusťte analýzu.
5. Analogicky (změna v záložce Sample Run do políčka Name (Data File) a změna v záložce QQQ a podzáložce Acquisition parametr Collision Energy) změňte hodnoty parametru Collision Energy: 20, 25 V.
6. Otevřete program Qualitative Analysis (na liště). Otevřete (File/Open Data File) všechny soubory, které mají v názvu PROD.
7. Klikněte na chromatogram pravým tlačítkem myši a zvolte Integrate and Extract Peak Spectra. Zavřete Chromatogram Results křížkem. Zůstanou vám zobrazena pouze MS Spectrum Results. Pokud nejsou MS spektra překryta, překryjte je ikonkou Overlaid mode.
8. Zjistěte produktový ion (hmota, která má největší intenzitu) a hodnotu kolizní energie, při které je hmota produktového iontu nejintenzivnější stejným způsobem jako při zjišťování optimální hodnoty Fragmentoru (viz. C, 6.). Hodnotu produktového iontu a kolizní energie si poznamenejte. Soubory uložte a zavřete.
9. Minimalizujte program Qualitative Analysis na lištu a otevřete program Agilent MassHunter Workstation Data Acquisition (na liště).

E. Měření estriolu pomocí MRM modu

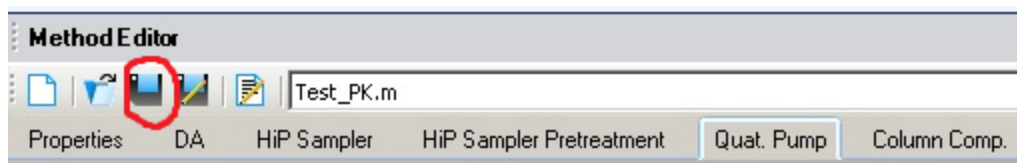
1. V záložce Sample Run do políčka Name (Data File) napište: Estriol MRM 01.d do políčka Position vyplňte: Vial 3
2. V záložce QQQ změňte Scan Type na MRM. V podzáložce Acquisition nastavte (popřípadě zkontrolujte) tyto hodnoty: Precursor ion – zde zadejte hmotu prekurzorového iontu, kterou jste si poznamenali; MS1 Res – Unit; Product ion - zadejte hmotu produktového iontu, kterou jste si poznamenali; MS2 Res – Unit; Dwell – 200; Fragmentor – hodnota, kterou jste si poznamenali; Collision Energy – hodnota, kterou jste si poznamenali; Polarity – Positive. Spusťte analýzu.
3. Otevřete program Qualitative Analysis (na liště). Otevřete (File/Open Data File) všechny soubory, které mají v názvu MRM. Klikněte pravým tlačítkem myši na chromatogram a vyberte Extract Chromatograms/Type – MRM a potvrďte OK. V Data Navigatoru (viz. obr. C, 6.) vyklikněte TIC MRM a ponechte zaškrtnuto pouze MRM (dané přechody).
4. Klikněte pravým tlačítkem myši na chromatogram a zvolte Integrate Chromatogram. Poté klikněte opět pravým tlačítkem myši na chromatogram a zvolte Peak List (pokud již není zobrazen).
5. Zaznamenejte si retenční čas (RT), plochu (Area), výšku (Height). Soubor uložte a křížkem zavřete program Qualitative analysis.

F. Stanovení neznámé koncentrace estriolu ve vzorku X

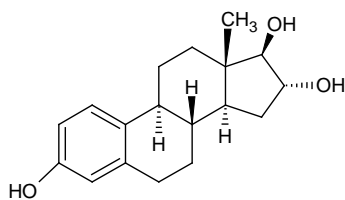
1. Vložte vialku s neznámou koncentrací estriolu do autosampleru (pozice 4).
2. Změňte tento vzorek pomocí MRM modu (viz. bod E); proveďte celkem 3 analýzy.
3. Na základě zjištěné odezvy (plocha) pro danou koncentraci estriolu v bodě E, vypočítejte koncentraci estriolu ve vialce 4 (výsledek uveďte jako průměr spolu s relativní směrodatnou odchylkou).

G. Identifikace estrogenů pomocí MS spekter

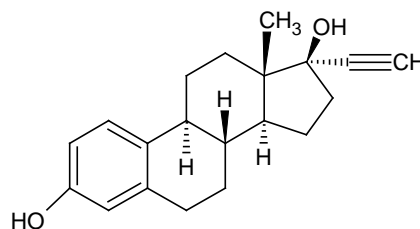
1. Vložte vialku číslo 5 do autosampleru (pozice 5).
2. V záložce Quat Pump nastavte Stop Time na **14 minut**.
3. V záložce QQQ změňte Scan Type na MS2 Scan.
4. V záložce QQQ a podzáložce Acquisition nastavte tyto hodnoty: Start Mass – 150; End Mass – 300; Scan Time 500; Fragmentor – 100 V; Polarity – Positive.
5. Metodu uložte.



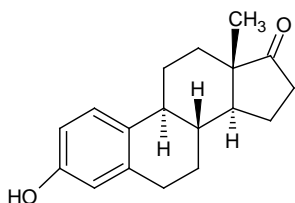
6. Změňte vzorek číslo 5, který obsahuje následující estrogeny:



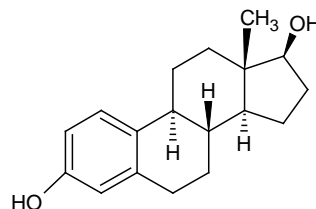
Estriol



17 α -ethynylestradiol (EE2)



Estron



17 β -estradiol (β E2)

7. Na základě hmotnostních spekter, která si vyhodnotíte v Qualitative Analysis, rozhodněte, které píky odpovídají jednotlivým estrogenům (uvědomte se, že ne všechny analyty musí mít nejintenzivnější hmotu $[M+H]^+$).

PROTOKOLY: jeden protokol za skupinu (dvojice popřípadě trojice); neuvádět teoretický princip ani postup práce; protokol bude obsahovat stručně, co bylo měřeno (i v jakém rozsahu) + výsledek, MS spektrum scanu estriolu a MS spektrum produktového iontu estriolu při optimální hodnotě kolizní energie (export dat bude ukázán při úloze). Protokoly budou hotovy **do 5 dní** od absolvování úlohy a zaslány na email: kozlik@natur.cuni.cz