

Folyadékkromatográfia – kapcsolt tandem tömegspektrometria (HPLC-MS/MS) alkalmazása a bioanalitikában

Tananyag és leirat a laboratóriumi gyakorlathoz

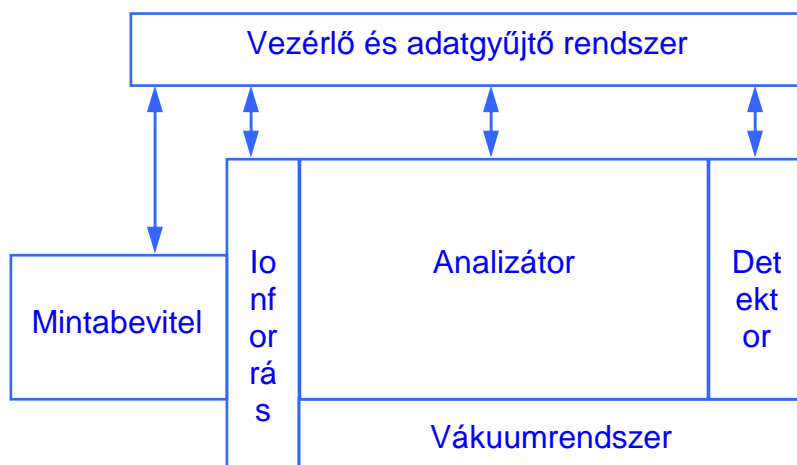
Összeállította: Renkecz Tibor, Dr. Horváth Viola

A HPLC-MS/MS a mai nagyműszeres analitika egyik legnépszerűbb és egyre szélesebb körben elterjedt technikája. Elvénél fogva nagyfokú szelektivitása, univerzalitása (a tömegmérés univerzális detektálást tesz lehetővé), szerkezeti információk szolgáltatása és nagy érzékenysége miatt a nyomnyi mennyiségek meghatározásában az első számú módszerre lépett elő az utóbbi évtizedben. A számos alkalmazási terület közül kiemelkedik a különböző gyógyszermolekulák (kismolekulák és fehérjék) biológiai mintákból történő mérése.

A folyadékkromatográfia és a tömegspektrometria összekapcsolása sokáig nem volt megoldott. A gázkromatográfiával ellentétben – ahol már az elválasztás is gázfázisban történik – nem volt egyszerű megoldani a csatolást. A folyadék formában érkező mintát el kell először párologtatni, az oldószertől meg kell szabadulni, és csak a gázfázisba került töltött részecskéket (ionokat) lehet a nagyvákuum alatt működő analizátorba juttatni. E problémára nyújt megoldást a ma már egyik legelterjedtebb ionizációs mód, az elektropray ionizáció, melynek kifejlesztéséért John B. Fenn 2002-ben Nobel-díjban részesült.

1. A tömegspektrométer részei

A tömegspektrométer részeit az alábbi ábra mutatja be.



1. ábra: A tömegspektrométer általános felépítése

A **mintabevitelt** HPLC-kapcsolat esetén maga a folyadékkromatográf végzi. Ekkor az egész tömegspektrométert a HPLC készülék detektorának tekinthetjük, és kromatogramokat (idő függvényében ion intenzitás) vehetünk fel. Zárójelben megjegyezzük, hogy lehetőség van a kromatogram minden pontjában tömegspektrumot (m/z függvényében az ion intenzitás) is felvenni egyidejűleg.

Van olyan eset, amikor csak a tömegspektrométert használjuk, pl. amikor optimalunk, azaz kiválasztjuk az MS paramétereket mennyiségi meghatározáshoz a legnagyobb érzékenység

eléréséhez; vagy egy vegyület fragmentálódási útvonalát vizsgáljuk. Ekkor fecskendőből egy pumpa segítségével juttatjuk a folyadékmintát közvetlenül az MS ionforrásába nagyon kis áramlási sebességgel (tipikusan 5-10 $\mu\text{l}/\text{min}$). Ilyenkor tömegspektrumokat veszünk fel.

Az **ionforrás** végzi az oldószer-eltávolítást és a semleges molekulákból, töltött gázfázisú ionok előállítását. A HPLC-MS-ben a legelterjedtebb ionizációs módok a légköri nyomáson működő technikák (atmospheric pressure ionisation, API).

Az **analizátor** végzi a töltött ionok tömeg/töltés (m/z) szerinti szétválasztását. Különböző analizátorok terjedtek el, úgymint kvadrupol, repülési idő, ioncsapda, mágneses szektor és ion ciklotron rezonancia típusú¹. Az analizátort beállíthatjuk úgy is, hogy a mérés során végig a kiválasztott ionokat detektáljuk, vagy úgy, hogy egy megadott tömegtartományban minden iont megmérünk egymás után (tömegspektrum felvétele).

A **detektorok** az analizátor felől érkező ionokat felfogják, és sokszorozzák, felerősítik az ionok által keltett elektromos jelet.

A tömegspektrométer analizátor és detektor egysége **vákuum** alatt van, hogy a képzett ionok ne rekombinálódjanak, ne ütközzenek gázmolekulákkal. Az alkalmazott vákuumot ($\sim 10^{-5}$ torr, azaz 10^{-8} bar a mi készülékeinkben) két lépésben érjük el. Olajrotációs vákuumszivattyúkkal állítjuk elő az elővákuumot, a nagyvákuumot pedig a turbomolekuláris pumpa² tartja fenn.

Az egész rendszer vezérlését **számítógéppel** végezzük, amely lehetővé teszi az adatok gyűjtését, kiértékelését, visszakeresését.

2. Az ionforrás

A legelterjedtebb ionizációs módok a HPLC-MS-ben a légköri nyomáson működő technikák (API). Két fontos folyamat játszódik le az ionforrásban:

- a mérendő molekulák deszolvatációja: az oldószer-molekulák eltávolítása és az analátmolekulák gázfázisba jutása
- töltött részecskék előállítása: ionok előállítása szükséges, hogy azok az analizátorba juttathatók legyenek, és ezáltal detektálhatóvá váljanak.

Fontos különbség a GC-MS-ben történő ionképzéssel szemben, hogy itt minden esetben egy protonálódási vagy deprotonálódási, esetleg adduktképződési (ekkor pl. nátrium-, kálium- vagy ammóniumion társul a molekulához) folyamattal jár az ionizáció. További eltérést jelent még, hogy itt lágy ionizációról beszélhetünk, nincs fragmentálódás az ionforrásban, azaz a molekulák nem tördelődnek szét. Így az itt előállt ionok pseudo-molekulaionként jelennek meg a tömegspektrumban. Pozitív ionizáció esetén $[M+H]^+$, negatív ionizáció esetén $[M-H]^-$, vagyis a semleges molekulatömeghez képest mindig egy egységgel odébb kell keresnünk a molekulaiont.

Részletesen két ionforrástípussal ismerkedünk meg, az elektropray ionizációval (ESI) és az atmoszférikus nyomású kémiai ionizációval (APCI), mivel ezek a legelterjedtebbek.

¹

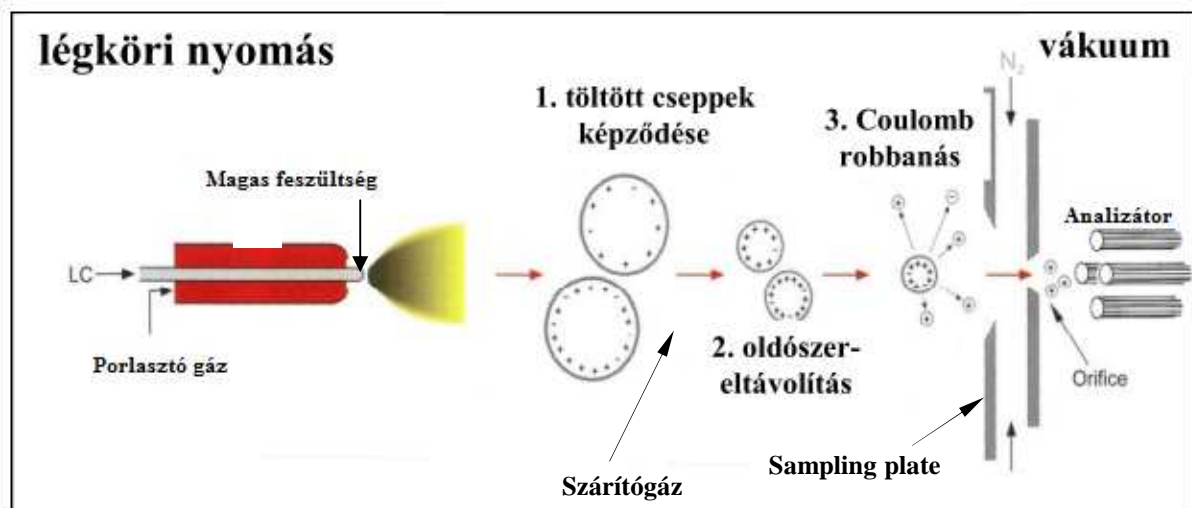
[http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Mass_Spectrometry/Mass_Analyzers_\(Mass_Spectrometry\)](http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Mass_Spectrometry/Mass_Analyzers_(Mass_Spectrometry))

² http://en.wikipedia.org/wiki/Turbomolecular_pump

Elektrospray ionizáció (ESI) (2. ábra)

- A folyadékkromatográf felől érkező eluens egy nagyfeszültségre (3000-5500 V) kapcsolt kapillárison (átmérője ~0,1 mm) érkezik a fűtött ionforrásba. A kapillárist koncentrikusan körülveszi egy másik cső, amelyben porlasztógáz áramlik.
- Így a kapilláris végén finom cseppek formájában, porlasztva lép ki a folyadék, amely már a feszültség hatására töltéssel rendelkezik (elektrospray) és elindul az ellentétes potenciálra kapcsolt *sampling plate* irányába.
- Ezután egy forró (200-500 °C) szárítógáz hatására az oldószer párologni kezd, a cseppek zsugorodnak.
- Felületi töltéssűrűségük megnő, majd egy kritikus értéket elérve szétrobbannak. Ezt a jelenséget nevezik Coulomb-robbanásnak. A szétrobbant csepp, így egyre kisebb és kisebb cseppekre esik szét, míg végül egyetlen ion marad egy cseppben, és ez az oldószer teljes elpárolgása után már a nagyvákuum alatt levő analizátorba juttatható egy nagyon apró lyukon, az *orifice*-en keresztül.
- Az orifice és a sampling plate közötti teret folyamatosan öblítik nitrogén gázzal, ami a sampling plate nyílásán a tömegspektrométerből kifelé áramlik, annak érdekében, hogy az analizátorba csak a töltött ionok jussanak be, egyéb szennyező molekulák ne.

Az áramlási sebesség 20 nL/perctől akár 1 mL/percig változhat az ionforrás kialakításától függően.



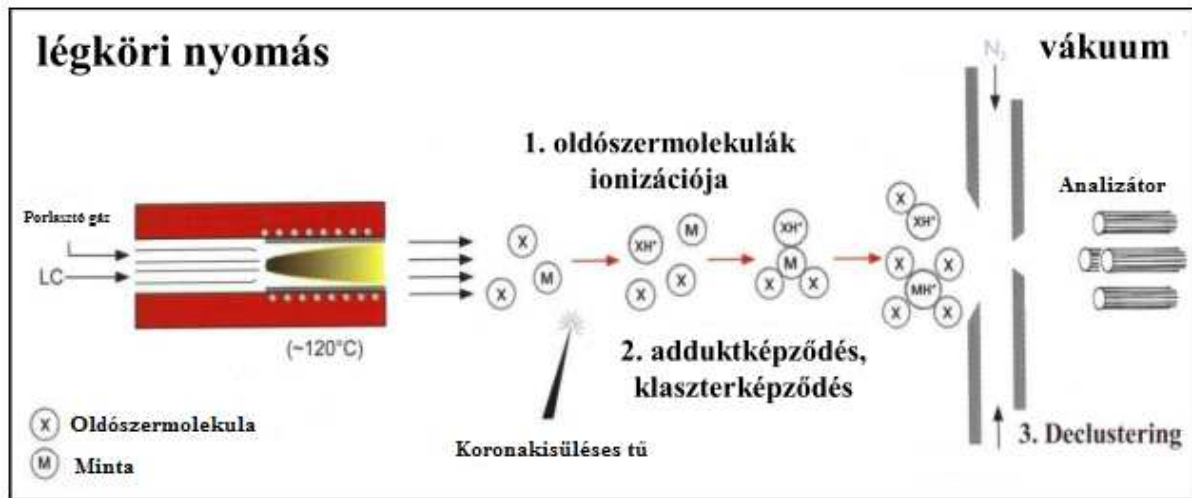
2. ábra: ESI vázlatos rajza

Atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció (APCI) (3. ábra)

- Ebben az esetben is, hasonlóan az ESI-hez, egy kapillárison érkezik az eluens a folyadékkromatográfból, ellenben itt a kapilláris nincs nagyfeszültségre kapcsoltva.
- A porlasztó gáz hatására apró cseppek képződnek, és a fűtés hatására erőteljesen párologni kezd a folyadék.
- A fűtött térbe egy tűt helyeznek, amelyre nagyfeszültséget kapcsolva koronakisülés³ jön létre. Ez először az oldószer-molekulákat ionizálja, és ezután ezek az ionok adják át a töltésüket a mintamolekuláknak ütközéssel, vagy összekapcsolódás (klaszter v. adduktképződés) útján.

³ <http://hu.wikipedia.org/wiki/Koronakis%C3%BCI%C3%A9s>

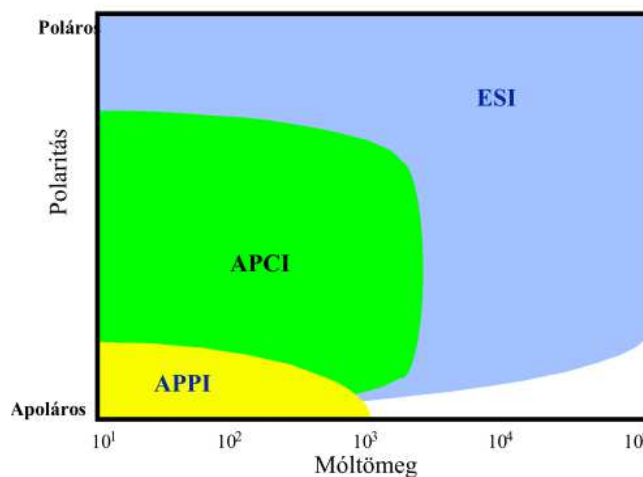
Fontos megemlíteni, hogy APCI alkalmazása esetén nagyobb áramlási sebességek (0,5-2 ml/perc) szükségesek, mint az ESI-nél, hiszen itt az ionizációhoz mint „reagens” szükséges az oldószer.



3. ábra: APCI vázlatos rajza

A HPLC-MS-ben oldószerként a fordított fázisú folyadékkromatográfiában használt eluensek használhatók, azzal a megkötéssel, hogy csak illékony puffereket használhatunk (pl. ammónium-acetát és -formiát). Foszfátpuffer használata kerülendő, mivel kiválhat a kapillárisban, HPLC-UV módszerek HPLC-MS-re történő átvételénél ezt mindig figyelembe kell venni.

Elmondható, hogy ESI ionforrással a poláris, kis molekulatömegű vegyületektől akár a nagy biomolekulákig minden ionizálható. Az APCI a kevésbé poláris vegyületek ionforrása, ezekre általában érzékenyebb mérést tesz lehetővé, mint az ESI. Ha viszont nagyon apoláris vegyületekkel van dolgunk mint pl. a policiklusos aromás szénhidrogének (PAH-ok), szteroidok, akkor az **atmoszférikus nyomású fotoionizáció** (atmospheric pressure photoionisation, APPI) lehet a legjobb megoldás. Itt egy erős intenzitású UV-lámpa és fényelnyelő reagens (toluol) adagolásával valósul meg az ionizáció.



4. ábra: A különböző ionizációs technikákkal vizsgálható vegyületek köre

Az ESI és az APCI ionforrások összehasonlítása az alábbi táblázatban látható.

	ESI	APCI
Jól mérhető minták	<ul style="list-style-type: none"> • Oldatban többszörösen töltött molekulák, pl. fehérjék, peptidek, oligonukleotidok • oldatban ionizált állapotban lévő molekulák, pl. katekolaminok, szulfát csoportot, vagy kvaterner ammónium csoportot tartalmazó anyagok • heteroatomot tartalmazó molekulák, pl. karbamátok, benzodiazepinek 	<ul style="list-style-type: none"> • Poláris és apoláris kis molekulák, pl. PAH-ok, PCB-k, zsírsavak, szteroidok, ftalátok • heteroatomot tartalmazó molekulák, pl. karbamátok, benzodiazepinek, karbamidok
Elkerülendő minták	<p>Extrém apoláros anyagok, pl. policiklusos aromás szénhidrogének (PAH-ok), poliklórozott bifenilek (PCB-k)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Nem illékony vegyületek • Oldatban többszörösen ionizált állapotban levő molekulák • Termikusan instabil vegyületek
A minta mátrix és az eluens hatása	<ul style="list-style-type: none"> • Érzékenyebb a minta mátrixra és a mozgófázis összetételére, mint az APCI • Még a nagyon illékony pufferekből is sokkal kisebb koncentrációt tolerál, mint az APCI • Kationokkal (Na^+, K^+) és anionokkal (COO^-, Cl^-) adduktot képez 	<ul style="list-style-type: none"> • Kevésbé érzékeny, mint az ESI • Az illékony puffereket jobban tűri, mint az ESI • Szerves oldószerek és adalékok befolyásolják az ionizációt
Oldószer	<ul style="list-style-type: none"> • Az oldatban levő ionos molekulákra a pH nagy befolyást gyakorol • Bázikus pH negatív ionokhoz • Savas pH pozitív ionokhoz 	<ul style="list-style-type: none"> • Az oldószer-választás nagyban befolyásolja az ionizációt, a pH kevésbé • Bázikus pH negatív ionokhoz • Savas pH pozitív ionokhoz
Áramlási sebesség	<ul style="list-style-type: none"> • Kis áramlási sebességek (100 $\mu\text{l}/\text{perc}$) működik jól • Nagyobb áramlási sebességeknél (>750 $\mu\text{l}/\text{perc}$) nem olyan jó, mint az APCI 	<ul style="list-style-type: none"> • Kis áramlási sebességeknél (<100 $\mu\text{l}/\text{perc}$) nem működik jól • Nagyobb áramlási sebességeknél (>750 $\mu\text{l}/\text{perc}$) jobb, mint az ESI

3. Analizátor

Az analizátor feladata, hogy az ionforrásban előállított ionokat megsűrje és szétválassza tömeg/töltésszám (m/z) szerint. Az analizátorokat a felbontásukkal (R) jellemezhetjük. A felbontás megadja, hogy két egymás melletti, eltérő tömegű ion mennyire különböztethető meg egymástól.

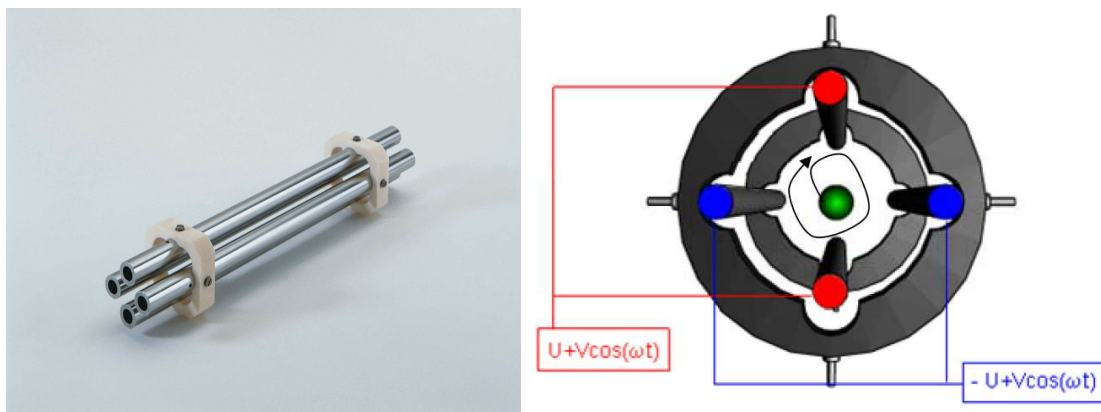
$$R = m/\Delta m$$

ahol R a felbontás értéke, m a vizsgált ion tömege, és Δm az ionok közötti tömegkülönbség. Például ha a 100,00 tömegű iontól megkülönböztethető a 100,01 tömeg akkor a felbontás:

$$R = 100,00/(100,01-100,00)=10\ 000$$

Megállapodás szerint, ha ennek értéke 10.000 fölött van, akkor nagy felbontásról, ha ennél kevesebb, közepes, vagy kis felbontásról beszélünk. Például a következőkben ismertetendő kvadrupol analizátor tömegfelbontása ~100-1000, ami gyakorlatilag azt jelenti, hogy két egymástól egy tömegegységgel különböző iont tud csak elválasztani, míg a legnagyobb felbontással rendelkező ion ciklotron rezonancia analizátorok 1.000.000 feletti tömegfelbontással rendelkeznek. A 10.000, vagy afölötti felbontású analizátorok egymástól akár csak század tömegegységgel eltérő ionokat is el tudnak különíteni. Ezért ezek a készülékek alkalmasak pontos tömegmeghatározásra, így akár elemi összetételt is lehet velük mérni.

A kvadrupol analizátorban elektromos mezőket alkalmazunk a tömeg/töltés szerinti szétválasztáshoz. A kvadrupol 4 darab, kb. 5-10 cm hosszú párhuzamos fémrúdból áll, ezekre kapcsolunk rá váltó- és egyenfeszültséget (5. ábra).

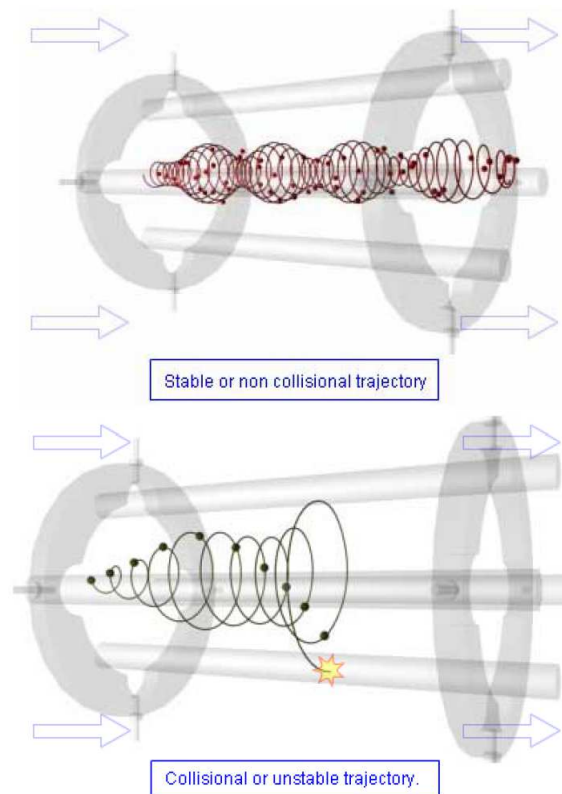


5. ábra: Kvadrupol rudak és a rákapcsolt feszültségek

Az egymással szemben lévő rúdra azonos polaritású $\pm U+V\cos(\omega t)$ potenciált kapcsolunk, ahol U az egyenfeszültség, $V\cos(\omega t)$ pedig egy V amplitúdójú és ω frekvenciájú rádiófrekvenciás⁴ feszültség. A rudak polaritása tehát folyamatosan változik. Emiatt az ionok a 6. ábrán látható oszcilláló mozgásra kényszerülnek. Az ionok csak akkor jutnak keresztül a kvadrupol pólusai között, ha a mozgás amplitúdója kisebb a kvadrupol rudak közötti távolságnál (6.a ábra). Az ennél nagyobb amplitúdóval mozgó ionok beleütköznek a rudakba és a vákuum elszívja őket (6.b ábra).

⁴ <http://hu.wikipedia.org/wiki/R%C3%A1di%C3%B3frekvencia>

A kvadrupol analizátor tömegfelbontása egységnyi, és a felső tömeghatára általában néhány ezer m/z .



6. ábra: Ionok pályája a kvadrupol analizátorban. a) stabil pályájú, áteresztett ion; b) instabil pályájú, kiszűrt ion

4. Tandem tömegspektrometria

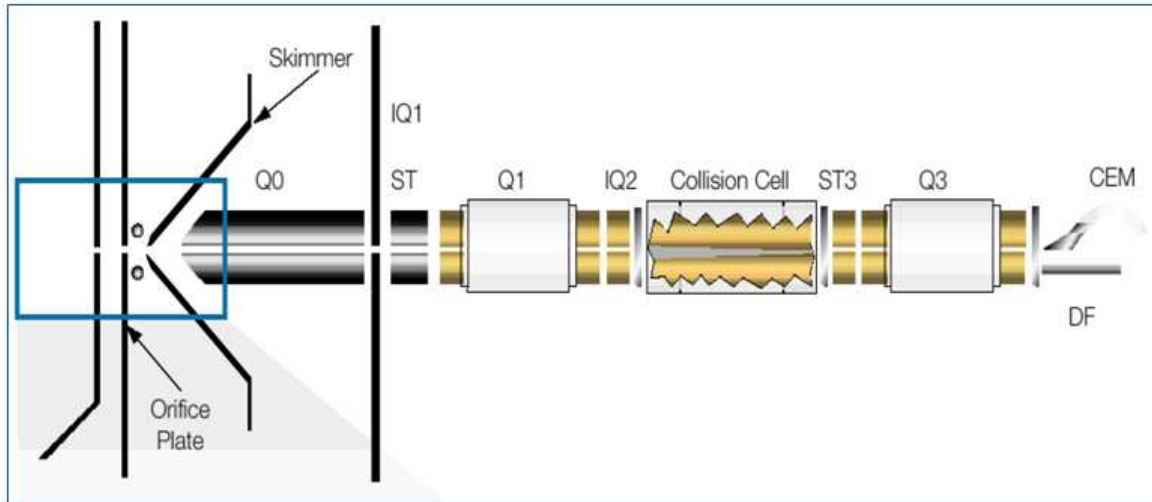
Ez a technika lehetővé teszi, hogy szerkezeti információt nyerjünk a vizsgálandó molekulákról. Mint ahogy azt már említettük a HPLC-MS ionizációs módszerek ún. lágy ionizációt biztosítanak, frgmentek képződése minimális. Ezért ha nem elegendő a molekulaiont detektálni, hanem szerkezeti információra is szükség van, a készüléken belül kell létrehozni a molekulaionokból a frgmentionokat kis nyomású gázzal való ütköztetéssel.

- Az első analizátor (Q1) kiválasztja az adott molekulaiont (ezt nevezik anyaiionnak is, angolul parent ion).
- Majd ezt követi egy ún. ütközési cella (Q2), ahol gázbevezetés hatására bekövetkezik a kiválasztott ion frgmentációja.
- Ezután egy újabb analizátor egységet (Q3) kell kapcsolnunk, hogy a keletkezett új frgmentionokat (nevezik leányionnak is, az angol szaknyelvben product ion vagy daughter ion kifejezés terjedt el) tömeg/töltés szerint szétválogassuk.

A 7. ábrán az ún. hármas kvadrupol (triple quadrupol) tandem tömegspektrométer sematikus rajza látható. Itt az ütközési cella maga is egy kvadrupol (Q2), ami persze itt nem az ionok elválasztására, hanem frgmentálására szolgál, elé és mögé pedig egy-egy kvadrupol analizátor (Q1 és Q3) van kapcsolva.

Kétféle módon használhatjuk az analizátorokat:

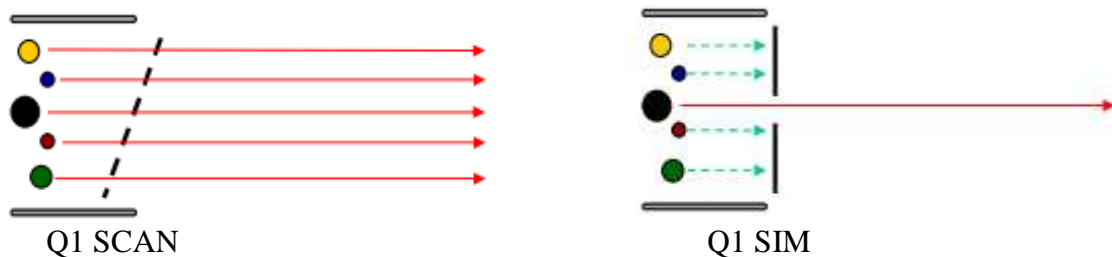
1. Pásztázó (SCAN) módban egy adott tömegtartományt vizsgálhatunk, ekkor a potenciálváltozás m/z egységenként lépteti az átengedett ionokat egy adott időciklus alatt.
2. Ha ismerjük a mérendő komponensre jellemző ionok tömegét, akkor csak az erre jellemző potenciálértéket állítjuk be: ez a szelektív ion figyelés (selective ion monitoring, SIM).



7. ábra: Tandem tömegspektrométer vázlatos rajza

Attól függően, hogy milyen módban használjuk a két analizátorcellát, többféle tandem tömegspektrometriás üzemmódot különböztetünk meg.

Mindenekelőtt lehetséges egy hármaskvadrupolt is egyszeres kvadrupolként (single quadrupol) üzemeltetni. Ekkor a Q1 végzi a keletkezett molekulaionok szétválasztását, majd ezek jutnak a detektorba, nincs tehát fragmentálás, és a Q3 kvadrupol sem működik. Lehet vele pásztázni (SCAN mód) és lehet csak kiválasztott ionokat is figyelni (SIM mód) (8. ábra).

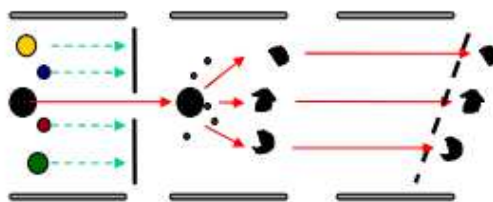


8. ábra: Single quadrupol üzemmódok

Tandem tömegspektrometriában mindig az anyaion – leányion viszonyt vizsgáljuk valamilyen módon. Négy különböző lehetőségünk van:

Leányion-analízis (Product ion scan)

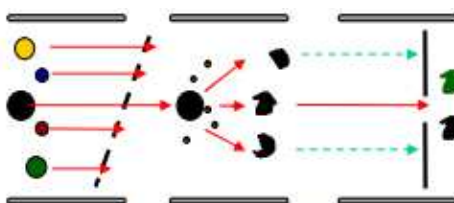
Ekkor a Q1 kvadrupol egy meghatározott molekulaiont enged át, és a Q2-ben történő fragmentálás után az összes keletkezett fragmens detektálásra kerül, egy fragmension-tömegspektrumot veszünk fel. Szerkezeti információk nyerhetők. A legintenzívebb fragmensionokat is itt választhatjuk ki a fejlesztendő kvantitatív analitikai módszerhez.



9. ábra: Product ion scan

Anyaion-analízis (Precursor ion scan)

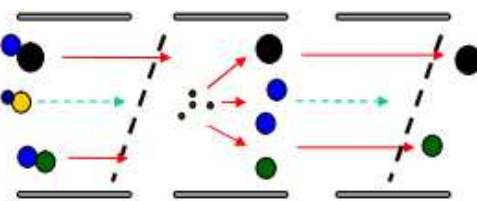
A Q3 kvadrupol csak meghatározott tömegű fragmensionokat enged át. A Q1-ben pedig minden olyan molekulaion vizsgálható, amely az adott tömegű leányionra esik szét. Pl. foszforilált peptidok vizsgálatánál felderíthető az összes foszfátcsoportot tartalmazó peptid, ha a Q3 kvadrupolon csak a foszfátcsoportnak megfelelő tömeget engedjük át.



10. ábra: Precursor ion scan

Semleges tömeg-vesztés (Neutral loss scan)

Mindkét kvadrupol beállított tömegtartományt pásztáz. A Q3 egy meghatározott semleges tömeggel (pl. 18-víz, 180-glükóz) eltolt kisebb értékre áll be. Ezáltal olyan folyamatok mutathatók ki, ahol egy semleges molekula lép ki az anyaionból. Ez a technika, akárcsak az előző, hasonló jellegű vegyületek egymás melletti kimutatására alkalmas, aminek főleg a fehérjekutatásban és a metabolitvizsgálatokban van jelentősége.



11. ábra: Neutral loss scan

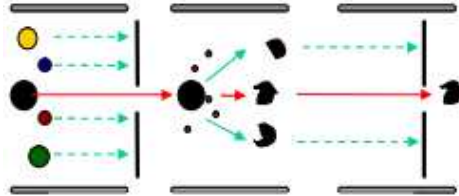
Kiválasztott ionfolyamat-követés (Multiple reaction monitoring, MRM⁵)

Mindkét kvadrupol SIM-módban működik, csak meghatározott anyaionokat (Q1) és fragmensionokat (Q3) engednek át. Több adott molekula is figyelhető egyszerre, melyekből rendre csak néhány, a rájuk jellemző fragmens kerül detektálásra.

Nagyon kis koncentrációk mennyiségi meghatározásánál ez a legelterjedtebb üzemmód, mivel nagyfokú szelektivitást és érzékenységet biztosít. A nagyfokú szelektivitás magyarázata a következő: annak valószínűsége, hogy két különböző molekula azonos móltömeggel (azonos

⁵ Különböző készülékgyártók eltérően hívják ezt a technikát, van ahol Selected Reaction Monitoring (SRM) néven szerepel.

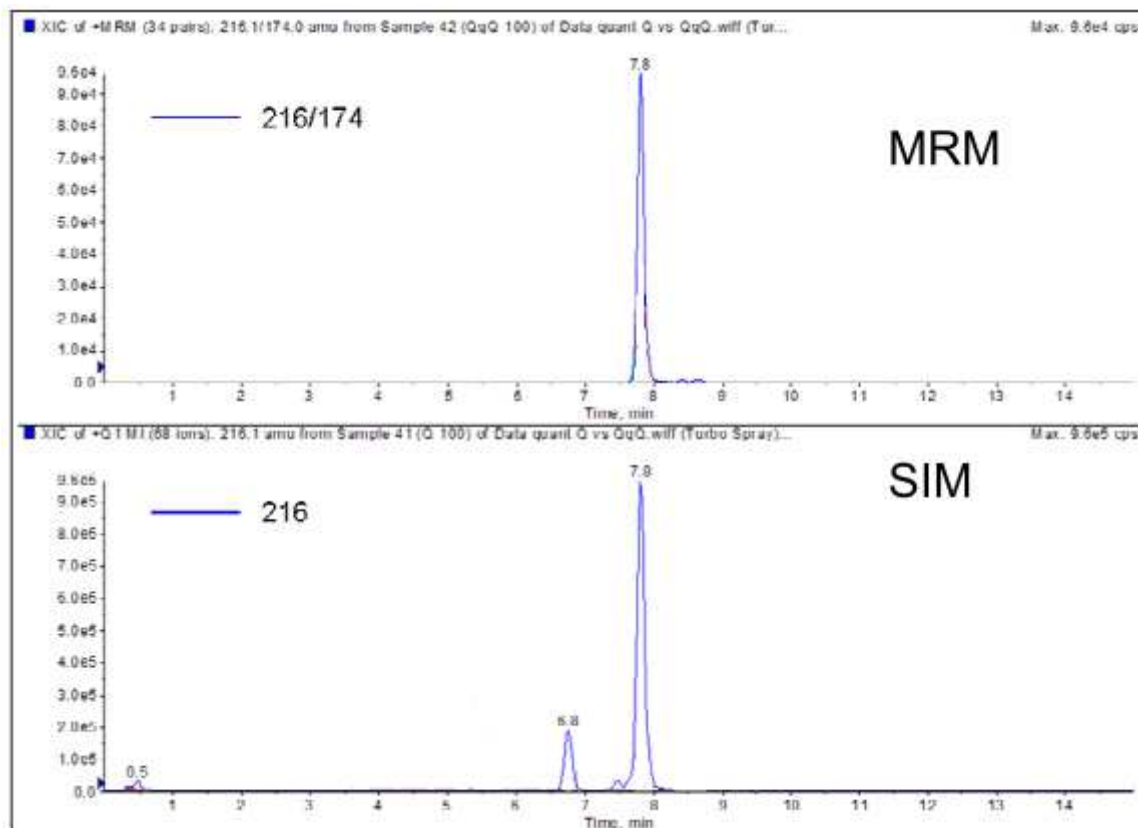
molekulaionnal) rendelkezik viszonylag nagy. Például több száz ismert vegyületnek van 250 körüli móltömege. Annak valószínűsége azonban, hogy ezek a fragmentáció során ugyanolyan fragmenseket képeznek, sokkal kisebb. Tehát, ha az anyaion-leányion átmenetet mérjük sokkal kisebb a valószínűsége, hogy más vegyületet mérünk, mint amelyikre kíváncsiak vagyunk. Ugyanez az oka, hogy a mérés sokkal érzékenyebb, mivel sokkal kisebb a zaj, tehát a jel/zaj viszony, vagyis a kimutatási határ megnő.



12. ábra: Multiple reaction monitoring

A hármas kvadropol single kvadropollal szembeni előnyei mennyiségi meghatározásnál tehát a szelektivitás, és a kiemelkedő érzékenység.

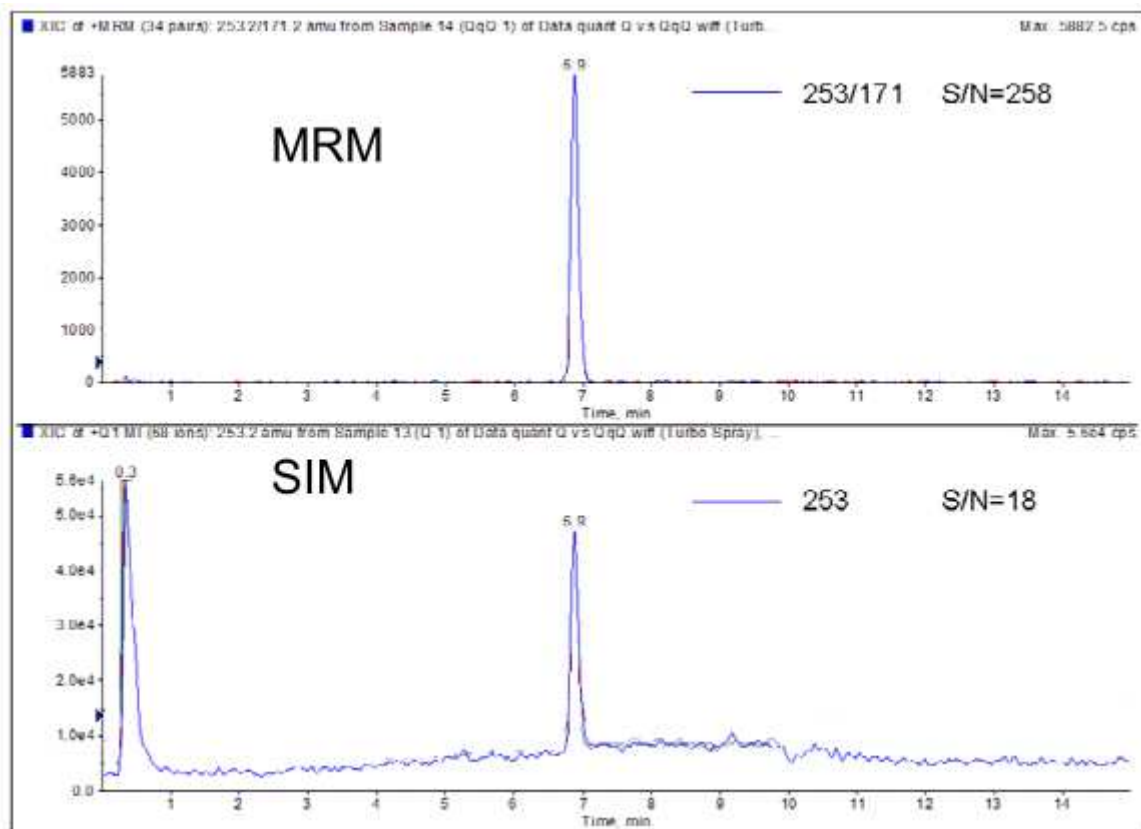
A szelektivitást a következő dupla ábra szemlélteti. Az első részen az atrazinra (molekulaion: 216) jellemző MRM-módban felvett kromatogram látható a rá jellemző leányionjára (174 m/z) állítva a Q3 kvadropolt. Az atrazin 7,8 percenél eluálódik. A második részen egy olyan kromatogram látható, amit 1 kvadropol alkalmazásával vettünk fel (Q1 SIM), vizsgálva az ábrán jelzett 216 m/z molekulaiont. Látható, hogy ez az eljárás nem szelektív az atrazinra, hiszen a 216-os molekulaionnak megfelelő kromatogramban nemcsak 7,8 percenél hanem 6,8 percenél is kapunk csúcsot, ami nyilván nem az atrazin, hanem valami más, zavaró anyag.



13. ábra

A megnövekedett érzékenységet, a kedvezőbb jel/zaj viszonyt a 14. ábra szemlélteti.

Habár MRM-módban az abszolút intenzitás kisebb, mint a SIM-módban detektált, az alapzaj is sokkal kisebb. Ezért a jel/zaj viszony sokkal kedvezőbb, ami azt eredményezi, hogy a mennyiségi meghatározásoknál oly fontos kimutatási határ is sokkal alacsonyabb.



14. ábra: Ugyanazon minta kromatogramjai SIM illetve MRM üzemmódban

Az áttekinthetőség érdekében táblázatosan is megadjuk a különböző üzemmód beállításokat.

Üzemmód	Q1	Q3
Leányion-analízis	SIM	SCAN
Anyaiion-analízis	SCAN	SIM
Semlegestömeg-vesztés	SCAN	SCAN
Kiválasztott ionfolyamat-követés	SIM	SIM

5. Alkalmazások

A hármas kvadrupol tandem tömegspektrometriát leggyakrabban HPLC-vel kapcsolva mennyiségi meghatározásokra használják MRM módban. Bonyolult mintamatrixokból vérből, vizelethől, élelmiszerekből, talajextraktumokból stb. történő nyomnyi mennyiség elemzését teszi lehetővé. Mennyiségi meghatározásokhoz – ha van rá mód – belső standard módszert használnak egyrészt a minta-előkészítés szórása, az esetleges fellépő hibák (pl. injektálás), valamint a mérőműszer érzékenységének változásából adódó bizonytalanság kiküszöbölése végett. Ez utóbbi abból adódik, hogy ha például egy 500 vérmintából álló mérési sorozatunk van, akkor az első injektálás és az 500. injektálásnál a készülék nem lesz ugyanolyan érzékeny, mert az ionforrás elkoszolódik, és csökken az érzékenység. Belső standard használatával ezt figyelembe vesszük, hiszen akkor az arra kapott jel is kisebb lesz az 500.

injektálásnál, nemcsak a mérendő komponensé. Természetesen a jelcsökkenésnek ugyanolyan mértékűnek kell lennie a mérendőre és a belső standardre nézve egyaránt. Ez úgy biztosítható, hogy a célvegyülethez nagyon hasonló vegyületet választunk. A meghatározandó anyaghoz legjobban hasonlító anyag annak deuterált változata, amely kémiaiilag azonosan viselkedik (ugyanott van a retenciós ideje is!), de a tömegkülönbség folytán megkülönböztethetően detektálható.

Biológiai mintákat fehérjekicsapással, folyadék-folyadék extrakcióval (LLE), vagy szilárd fázisú extrakcióval (SPE) készíthetünk elő.

Bioanalitikai vizsgálatok lehetnek pl. az alábbiak:

- farmakokinetikai mérések

A farmakokinetika a gyógyszerek sorsát követi nyomon a szervezetben. A gyógyszerfejlesztés során állatokon, később embereken tesztelik a hatóanyagokat. A gyógyszer beadása után meghatározott időközönként vérmintát vesznek a páciensről, és a gyógyszermolekula koncentrációját mérik (ng/ml). Ezáltal vizsgálható a gyógyszer felszívódása, szétterjedése, metabolizmusa és kiürülése a szervezetből⁶.

- biológiai hasznosíthatóság

A biológiai hasznosíthatóság (bioavailability) azt jelenti hogy a beadott gyógyszer mennyiségnek hányad része jut be a vérkeringésbe.

- toxikokinetika

Egyre növekvő, akár toxikus mennyiségben beadott gyógyszer farmakokinetikája (csak állatkísérletek)

- ételinterakciós vizsgálatok

Étkezéskor bevett gyógyszer felszívódása, eloszlása, metabolizmus és kiürülése, összehasonlítva az éhgyomorra bevett gyógyszerrel

- bioekvivalencia

Az eredeti gyártó által gyártott originális gyógyszer és az utángyártott generikus készítmény összehasonlítása a farmakokinetikájuk alapján

- agypenetrációs vizsgálatok

A bevett gyógyszer milyen mértékben jut-át a vér/agy gátom, azaz mennyire jut be az agyba.

Gyógyszerek és növényvédőszer nem humán mintákból való⁷ elemzésével foglalkozó laboratóriumoktól megkövetelt, hogy szigorú minőségbiztosítási rendszerben végezzék munkájukat. Ezt a Helyes Laboratóriumi Gyakorlat (Good Laboratory Practice, GLP) minisztériumi rendelet szabályozza (<http://www.muszeroldal.hu/assistance/glp.pdf>).

6. Az elvégzendő laborgyakorlat

A mérés célja: A derámciklán nevű gyógyszer mérése humán vérplazma mintában HPLC/MS/MS módszerrel farmakokinetikai vizsgálatokhoz.

A derámciklán gyógyszermolekulára dolgozunk ki HPLC-MS/MS módszert. Az ismeretlen plazma minta derámciklán koncentrációjának meghatározására deuterált belső standardet (derámciklán-d6) és kalibrációs módszert fogunk használni.

Elkészítjük a kalibrációs és minőségellenőrző mintákat, majd előkészítjük őket két különböző minta-előkészítési módszerrel, szerves oldószerrel történő fehérjekicsapással és folyadék-folyadék extrakcióval. A gyakorlat során egy harmadik módszerről is szó lesz, a szilárd fázisú

⁶ <http://en.wikipedia.org/wiki/Pharmacokinetics>

⁷ A humán mintákból történő mérésre másfajta minőségbiztosítási rendszer vonatkozik.

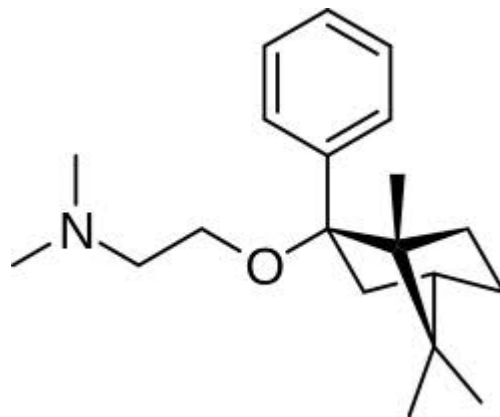
extrakcióról (solid phase extraction, SPE), mint egy harmadik lehetséges mintaelőkészítési technikáról.

Anyagok:

- üres, vak (blank) plazma
- derámciklán KAL standard oldat (10 µg/ml) kalibrációs minták készítéséhez
- derámciklán QC standard oldat (10 µg/ml) QC minták készítéséhez
- derámciklán-d6 belső standard oldat (200 ng/ml) (BS)
- oldószerek: víz, acetonitril, n-hexán, etil-acetát
- 25 mM NH₄OH
- eluens: metanol + 1% ecetsavat tartalmazó víz
-

Készülékek, eszközök:

- Perkin Elmer Sciex API 365 hármas kvadrupol tömegspektrométer
- Perkin Elmer Series 200 HPLC rendszer
- TurboVap bepárló
- Sigma 200 kémcső-centrifuga
- Vortex-keverő
- Heidolph Reax 2000 orbitális rázó
- pipetták: 20-200 µl és 100-1000 µl mérőtérfogattal
- csiszolatos kúpos centrifugacsövek (bepárláshoz is)



15. ábra: A derámciklán szerkezeti képlete

A gyakorlat menete:

HPLC/MS/MS módszer kidolgozása: a tömegspektrometriás paraméterek optimalálása az derámciklánra és az derámciklán-d6-ra

1. A molekulaion keresése (Q1 pásztázás)
2. Az ionforrás és paraméterek optimalálása
3. A legintenzívebb fragmensionok kiválasztása (Product Ion scan)
4. További optimalálás a legnagyobb hatásfokú fragmentálódás eléréséhez (ütközési energia - collision energy) megfelelő értékének beállítása
5. (áramló oldatba injektálva mintát további paraméterek (ionforrás hőmérséklet, függőnygáz, szárítógáz, ütközési gáz mennyisége, elektropray feszültség) valamint a

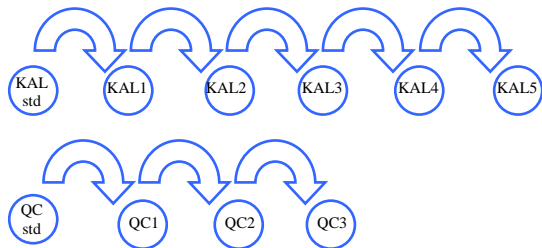
folyadékkromatográfiai körülmények (oszlop, eluens-összetétel stb.) beállítása Ezek optimális értékeit a gyakorlat rövidege miatt a gyakorlatvezető ismerteti.)

Kalibráció standardok, QC minták és ismeretlen minta készítése:

- 1 db kettős vak minta (csak plazma),
- 1 db vak minta (csak belső standardet tartalmazó plazma!),
- 5 kalibrációs pont (vérplazma mátrixban készült standardok: 50; 100; 250; 500 és 1000 ng/ml)
- 3 koncentrációsinten 2-2 párhuzamos minőségellenőrző (quality control, QC) minta vérplazma mátrixban: 100; 500 és 800 ng/ml)
- Ismeretlen koncentrációjú plazmaminta

A legtöményebb kalibrációs pontot és QC mintát 10 µg/ml derámciklán standard oldat és üres (blank) plazma összemérésével (spike-olás) állítjuk elő.

Külön tömegbemerésből származó standard oldatokat használunk a kalibrációs és a QC mintákhoz. A hígabb kalibrációs és QC mintákat ezekből tova futó hígítással készítjük, vagyis a töményebb mintát hígítjuk üres plazmával.



Mintaelőkészítés menete:

Fehérjekicsapás

- 100 µl plazma minta (kalibrációs, QC, vagy ismeretlen) kimérése csiszolatnélküli kémcsőbe
- 50 µl 200 ng/ml koncentrációjú belső standard hozzáadása
- vortex néhány s-ig
- 300 µl acetonitril hozzáadása
- vortex 10 s-ig
- 5 perc centrifugálás 3000 rpm-en
- 100 µl tiszta felülúszó átpipettázása HPLC-mintatartóba

Folyadék-folyadék extrakció

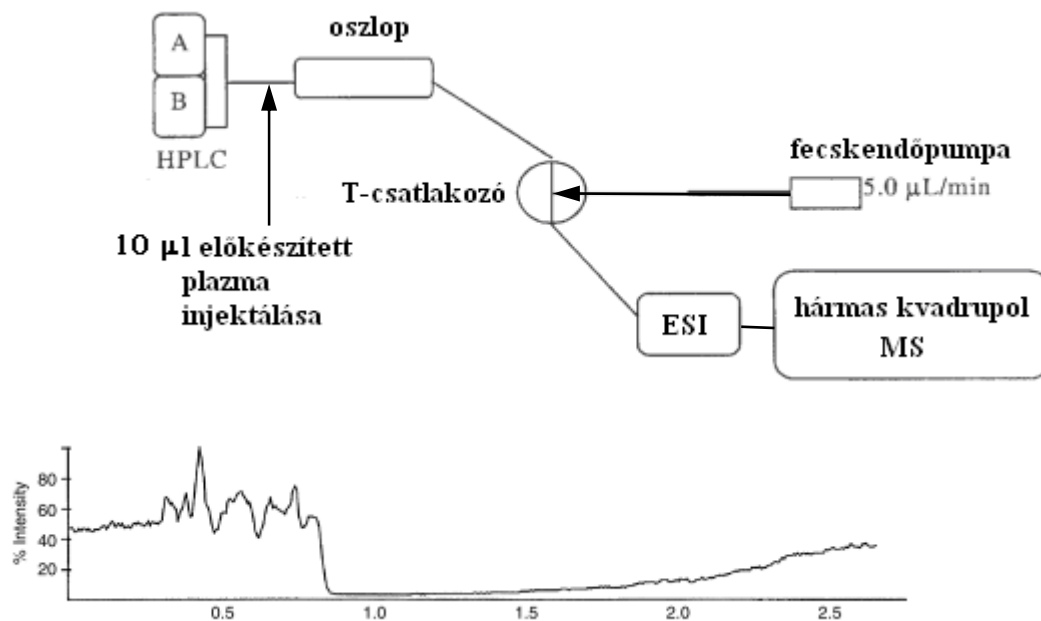
- 100 µl plazma minta (kalibrációs, QC, vagy ismeretlen) kimérése csiszolatos kémcsőbe
- 50 µl 200 ng/ml koncentrációjú belső standard hozzáadása
- vortex néhány s-ig
- 200 µl 25 mM NH₄OH hozzáadása
- vortex néhány s-ig
- 2 ml extrahálószer (hexán – etil-acetát 9:1 elegy) hozzáadása
- 5 perc rázatás orbitális rázógépen
- 5 perc centrifugálás 3000 rpm-en (a csiszolatos dugót levéve)
- 1 ml felülúszó leszívása csiszolat nélküli bepárlócsőbe

szárazra párlás 50°C-on N₂ atmoszférában
visszaoldás 100 µl eluensben
vortex 1 percig
átpipettázás HPLC-mintatartóba.

Mátrixhatás-vizsgálat:

Elektrospray ionizáció esetén a mátrixhatás ún. ionszuppresszióként lép fel, ami legtöbbször a detektorjel csökkenését eredményezi. A minta mátrixkomponensei pl. nem megfelelő minta-előkészítés és/vagy kromatográfiás elválasztás miatt zavarják, legtöbb esetben lerontják a célvegyületek ionizációját ha együtt eluálódnak velük. Azt, hogy módszerünk mentes-e az ionszuppresszió jelenségétől az alábbi ábrán szemléltetett módszerrel tudjuk igazolni (validálni). A HPLC-rendszerbe előkészített üres mátrixot (pl. vérplazmát) injektálunk, miközben a kolonna után fecskendőpumpából egy T-elágazás beiktatásával a mérendő vegyület viszonylag tömény oldatát vezetjük be az eluensbe. A mérendő vegyület tehát *folyamatosan áramlik* a tömegspektrométerbe egy állandó, a tiszta eluenshez képest magasabb detektorjelet adva. Erős mátrixhatás esetén felvett kromatogramot mutat be a 16. ábra.

Mátrixhatás vizsgálat sematikus rajza:



16. ábra: Zavaró mátrix hatása a kromatogramra mátrixhatás vizsgálat során

Látható, hogy 0,8 perc körül a detektorjel szinte nullára csökken, amit az okoz, hogy az oszlopról nagyon erős ionszuppressziót okozó szennyezők kezdenek eluálódni. Ennek következménye, hogy a folyamatosan áramló mérendő vegyület sokkal kevésbé tud ionizálódni és bejutni a tömegspektrométerbe, tehát lecsökken a jel.

Az előkészített minták mérése és kiértékelése:

Az automata mintaváltóba elhelyezett mintákat szoftverből vezérelve mérjük le. Először beírjuk a számítógépbe a mérési szekvenciát (sorozatot), ami a készüléknek megadja, hogy a mintaváltóban lévő mely mintákat, milyen sorrendben és milyen módszerrel mérje le.

Elindítjuk a mérést, és sorban regisztráljuk a kromatogramokat. A kromatogramok mennyiségi kiértékelését is a szoftver végzi: az derámciklánra és az derámciklán-d6-ra kapott csúcsterületeket integrálással határozza meg. A kalibrációs függvény felvételekor a mérendő anyag/belső standard csúcsterület arányt ábrázolja az derámciklán/derámciklán-d6 koncentráció arányának függvényében. A kapott pontokra a súlyozott legkisebb négyzetek módszerével illeszt egyenest.

A kalibrációs egyenes alapján kiszámítjuk az ismeretlen minták koncentrációját, valamint a visszszámoljuk a kalibrációs minták és a QC minták koncentrációját.

Meghatározzuk a kalibrációs pontok és a QC minták pontosságát (Accuracy). A pontosság a mért koncentráció a névleges koncentráció százalékában.

A mérés elfogadási kritériumai:

A kalibrációs mintáknak a kalibráció alapján visszszámolt koncentrációja $\pm 15\%$ -kal térhet el a névleges koncentrációjuktól, kivéve a legkisebb pontot ahol $\pm 20\%$ a megengedett eltérés. Egy kalibrációs pont kieshet. Ha több kalibrációs pont esne ki, a mérés nem elfogadható, meg kell ismételni.

A QC minták 2/3-ának, azaz 4 QC mintának a kalibráció alapján visszszámolt koncentrációja maximum $\pm 15\%$ -kal térhet el a névleges koncentrációjuktól. A kieső két pont nem lehet ugyanaz a koncentrációszint.

Jegyzőkönyvben rögzítendő:

- mérés célja
- anyagok, készülékek, eszközök
- a mérési módszer paraméterei (MS/MS és HPLC körülmények)
- minta-előkészítés lépései, szükséges számítások
- kalibrációs egyenes megfelelőségének ellenőrzése, QC minták elfogadhatósága
- kinyerési hatásfok kiszámítása
- ismeretlen minta koncentrációjának kiszámítása
- mátrixhatás-vizsgálat, két minta-előkészítési módszer összehasonlítása

Mivel biológiai mintákkal dolgozunk, fokozott odafigyelés szükséges, kérjük, hogy a gyakorlatra mindenki hozzon magával:

- laborköpenyt,
- védőszemüveget.

Felhasznált irodalom:

1. Dr. Szabó Pál: Korszerű tömegspektrometria a biokémiában című tárgyának előadás anyaga
2. http://www.chromacademy.com/lms/sco30/Fundamental_LC-MS_Introduction.pdf
3. http://www.ekol.chem.elte.hu/documents/lcms_2011.pdf
4. Robert K. Boyd, Cecilia Basic, Robert A. Bethen: Trace quantitative analysis by mass spectrometry, 2008, Wiley
5. Victor A. Gault, Neville H. McClenaghan: Understanding bioanalytical chemistry: principles and applications, 2009, Wiley