

LC-MSMS technika alkalmazása mennyiségi meghatározásoknál

Az analitikai kémia két leggyakoribb kérdése a miből, mennyi van egy adott mintában. Különböző analitikai módszereket fejlesztettek ki, melyek során a cél a mérhető komponensek számának növelése, illetve a legkisebb mérhető mennyiség csökkentése.

A tömegspektrometria nagy érzékenységének köszönhetően jelentős szerepet kap a mennyiségi meghatározásokban. A technika száz éves múltra tekint vissza. Ez volt az a műszer, amivel felfedezték az izotópokat. Míg kezdetben a szerves kémia területén használták, ma egyre inkább a szerves kémiában szolgáltató nélkülözhetetlen eredményeket. Köszönhetően az ionizációs technikák terén tapasztalt fejlesztéseknek, ma már szinte minden szerves molekula ionizálható, ezáltal tömegspektrométerrel vizsgálható.

A tömegspektrométer főbb részei a következők:

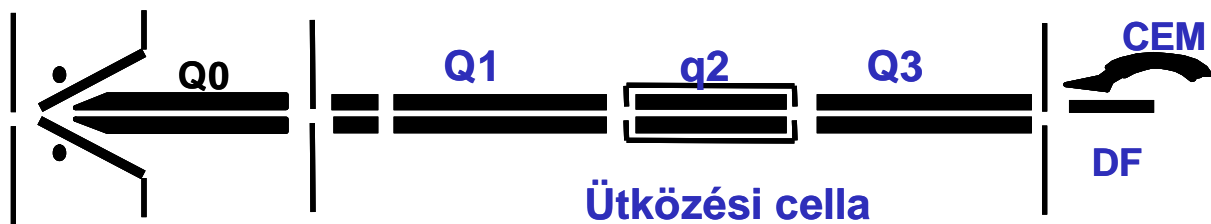
- Mintabeviteli egység: feladata a minták tömegspektrométerbe történő bejuttatása. Lehet közvetlen (direkt), vagy elválasztástechnikával (GC, LC) kombinált.
- Ionforrás: feladata a semleges molekulákból ionok előállítása, mivel a tömegspektrometria töltött részecskék vizsgálatával foglalkozik.
- Analizátor, melynek feladata az ionizált részecskéket tömeg/töltés szerint szétválasztani
- Detektor: a szétválasztott ionok detektálása.
- Vákuumrendszer: nélkülözhetetlen része a tömegspektrométereknek, hiszen az ionok légritka térben repülnek egészen a detektorig.
- Számítógép, mely felügyeli a mérést, gyűjti az adatokat, és ami segít a kiértékelésben.

A gyakorlat során egy folyadékkromatográfal összekapcsolt, elektroporlasztásos ionforrással és kvadrupol-ioncsapda analizátorral felszerelt (QTrap) tandem tömegspektrométert fogunk használni.

A gyakorlat célja: megismertetni a hallgatókkal a technika alkalmazhatóságát szerves molekulák biológiai mátrixból történő mennyiségi meghatározása során.

A mérés során a mintabeviteli egység egy folyadékkromatográf. Ennek az az oka, hogy a vizsgálni kívánt komponens az esetek jelentős részében nem tiszta oldatban, hanem komplex mátrixban található. Ezek a mátrixkomponensek zavaró hatással lehetnek a mérni kívánt

komponens(ek)re, ezért a mintát egy HPLC oszlopra injektáljuk, ahol a vizsgálni kívánt komponens kikötődik, és egészen addig marad az oszlopon, míg a zavaró komponensektől meg nem szabadulunk. Ezt követően az eluensáram összetételének változtatásával eluálhatjuk a komponenseket az oszlopról, majd az MS-be bekerülve vizsgálhatjuk azokat. A vizsgálat elektroporlasztásos ionizációval (ESI) történik. Ez egy széles körben alkalmazható technika, mely leggyakrabban protonálódással állítja elő a semleges molekulákból az ionokat. Az ionizált részecskék ezt követően bekerülnek az analizátorba, mely jelen esetben egy hármas kvadrupol rendszer, ahol az utolsó kvadrupol ioncsapdaként is használható.



1. ábra: hármas kvadrupol

A mennyiségi meghatározásoknál kulcsszerepe van az érzékenység mellett a szelektitásnak, amit a hármas kvadrupol rendszerrel úgy valósítanak meg, hogy az első kvadrupollal kiválasztják a molekula protonált ionját, amit bevezetnek a második kvadrupolba, ami tulajdonképpen egy ütközési cella, ahol gázok és potenciál segítségével az ionokat feldarabolják, fragmentálják. A fragmensek mennek be ezt követően a harmadik kvadrupolba, ami csak egy, a vizsgálni kívánt vegyületre jellemző fragmensiont enged át. A metodika a reakciócsatornák figyelésének angol nevéből (Multiple Reaction Monitoring) MRM névre hallgat. A kettős szűrőként is felfogható MRM adja a módszer szelektivitását és érzékenységét. Az így előállt technika érzékenysége a ng/ml szint alá is mehet! További fontos tényező az egy injektálásból meghatározható komponensek száma. A QTrap technika esetén a harmadik kvadrupol ioncsapdaként is használható, amely köztudottan nagyobb érzékenységgű és gyorsabb analizátor, mint a kvadrupol. Ezzel a rendszerrel a gyakorlat során 300 potenciálisan előfordulható komponens közül fogjuk meghatározni, hogy valójában mely komponenseket tartalmazza a minta. Mátrixként vizeletet fogunk használni. Mivel a keresett komponenseket ismerjük, ezeket potenciális célmolekuláknak lehet tekinteni. A módszer is erről kapta a nevét célmolekulák keresése (Multi Target Screening, MTS).

A komponensek megbízható azonosításában fontos szerepet kap a QTrap készülékek esetén alkalmazható spektrumkönyvtár. Ez jelentős biztonságot ad az analitikusnak.

A mérés információfüggő módban történik, ami azt jelenti, hogy minden egyes pásztázás (scan) után a rendszer megvizsgálja a kapott kromatogramot, hogy a 300 komponens közül meghaladja-e valamelyiknek az intenzitása egy általunk előre beállított értéket. Amennyiben nem, abban az esetben újabb pásztázás következik, és ismét megvizsgálja a rendszer a kapott kromatogramot. Ha bármely anyag kromatogramjában az intenzitás egy küszöbértéket meghalad, akkor az adott anyaiion kiválasztásra kerül, és egy nagy érzékenységű fragmension spektrumot veszünk fel (Enhanced Product Ion spectrum, EPI). A módszerben szereplő 300 komponens EPI spektruma megtalálható egy könyvtárban, mely adatok összehasonlításra kerülnek a mérés során az éles mintából nyert spektrummal. Azonosság esetén pozitív találatról beszélhetünk.

A gyakorlaton előre kidolgozott, 300 komponens egyidejű meghatározására alkalmas módszert fogunk alkalmazni biológiai mintából (vizeletből) történő azonosításra. Analitként terápiában használatos gyógyszereket fogunk használni, amit hozzáadunk a vizeletmintánkhoz. Minta-előkészítésként az addicionált vizeletminta desztvízzel történő 10-szeres hígítását fogjuk alkalmazni. A hozzáadott komponensek mellett a vizeletben előfordulható egyéb komponenseket is vizsgálni fogjuk. A méréshez használatos kromatográfiai körülményeket közösen fogjuk kidolgozni. A kapott anyagokat spektrumkönyvtár segítségével is azonosítjuk. A gyakorlat során meghatározzuk a módszer kimutatási határát is az adott komponensek esetében, illetve megvizsgáljuk, mennyivel tud többet a QTrap a hagyományos hármás kvadrupolnál.