

# Analytická technika HPLC-MS/MS a možnosti jejího využití v hygieně

Šárka Dušková

# HPLC-MS/MS

**HPLC** – high-performance liquid chromatography  
vysokoúčinná kapalinová chromatografie  
high-pressure liquid chromatography  
vysokotlaká kapalinová chromatografie

**MS** – mass spectrometry  
hmotnostní spektrometrie

**MS/MS** – tandemová hmotnostní spektrometrie  
hmotnostní spektrometrie použitá dvakrát  
po sobě na jeden analyt

# Chromatografie

**Chromatografie** – separační technika pro rozdělení směsi látek mezi mobilní a stacionární fázi

**Rozdělení** – podle typu mobilní fáze na kapalinovou (LC) a plynovou (GC)

podle provedení na kolonách nebo v ploše (TLC, PC)

podle principu separace na rozdělovací, adsorpční, iontově výměnná, gelová permeační, afinitní, ...

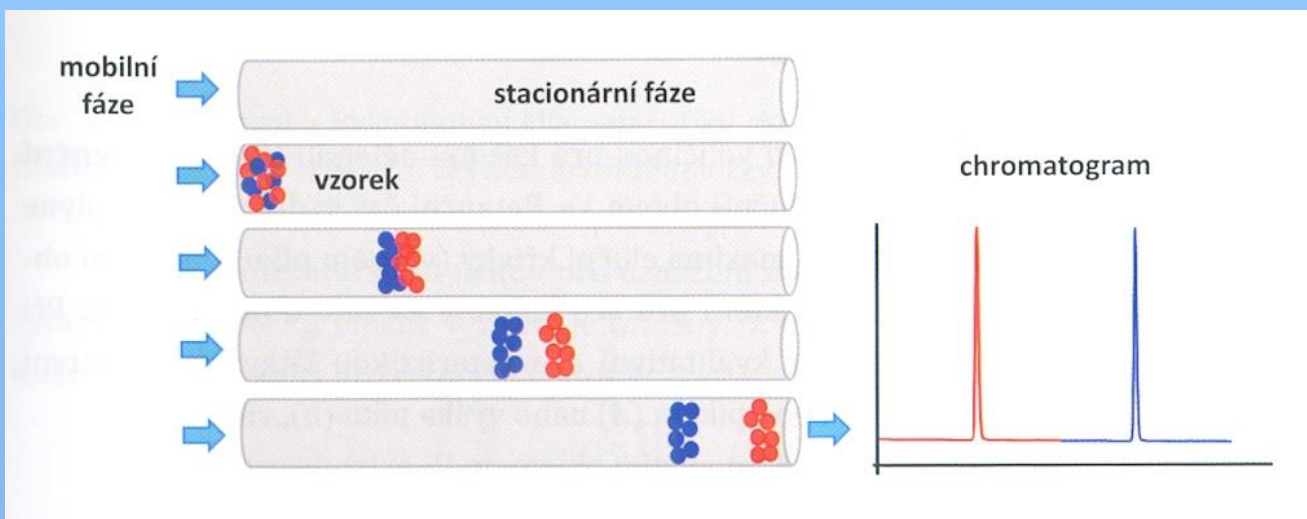
podle pracovního způsobu na eluční, frontální, vytěšňovací

podle účelu na analytickou a preparativní

# Kapalinová chromatografie

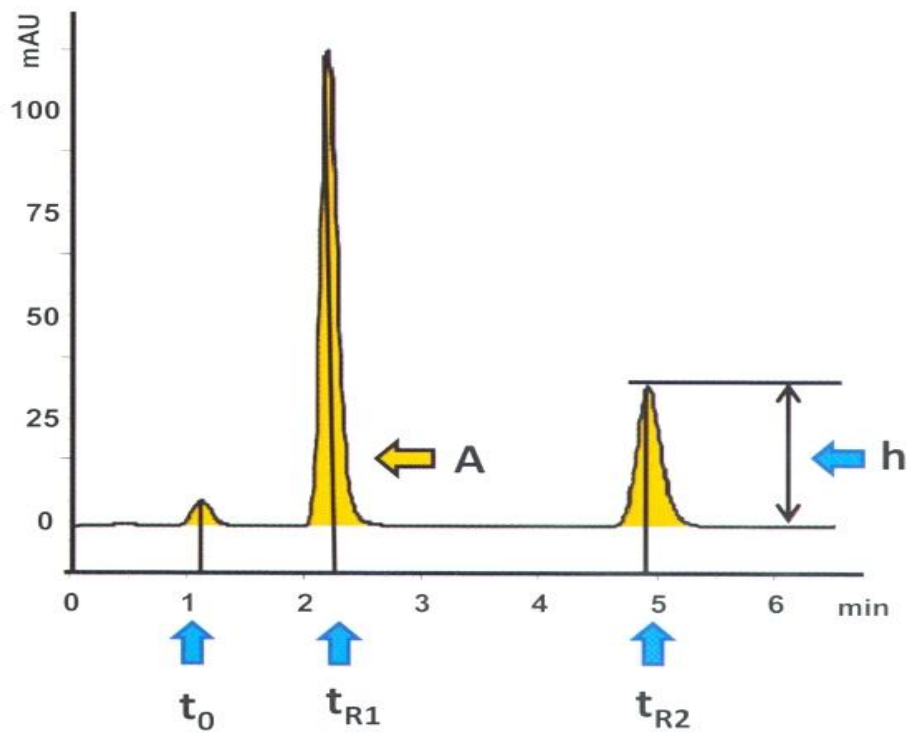
Mobilní fáze je kapalina, stacionární fáze tuhá látka nebo kapalina ukotvená na nosiči umístěná v chromatografické koloně ve formě sorbentu

Mobilní fáze protéká sorbentem, dochází k opakovanému ustavování rovnováhy dělených látek mezi mobilní a stacionární fází



# Kapalinová chromatografie

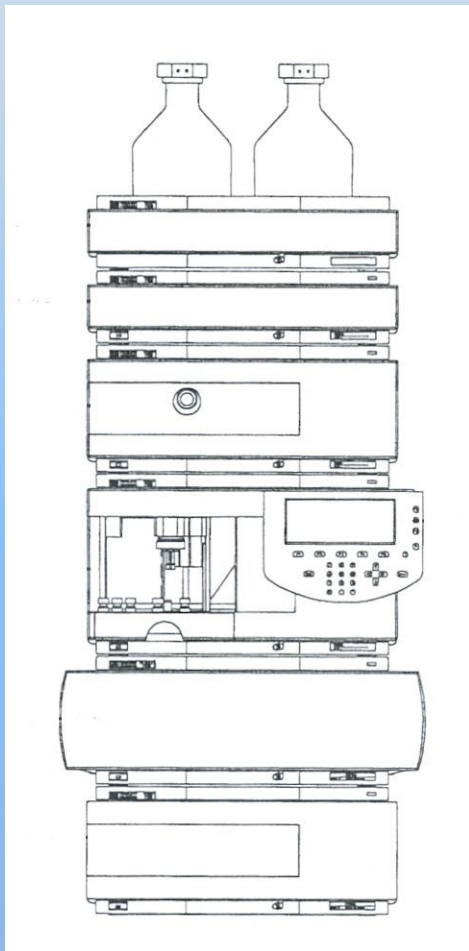
Kvalitativní a kvantitativní charakteristiky chromatografického procesu



$t_R$  – retenční časy látek  
 $t_0$  – retenční čas nezadržované látky  
A – plocha píku  
h – výška píku

# HPLC

## Schéma kapalinového chromatografu



Zásobník mobilních fází

Degasser

Čerpadlo

Autosampler

Oddělení kolon

Detektor

# HPLC

**Chromatografická kolona:** kovová trubička naplněná stacionární fází, délka 20 -150 mm  
vnitřní průměr 1.0 – 4.6 mm



## Stacionární fáze:

Požadavky : chemicky a tepelně stabilní, nesmí reagovat s mobilní fází ani se v ní rozpouštět

Rozdělení podle typu chromatografického modu:

- normální fáze
- reverzní fáze (reversed phase)
- ionexové fáze
- gely
- afinitní fáze

# HPLC

**Detektor:** zařízení, které monitoruje změny složení mobilní fáze měřením fyzikálních nebo chemických veličin

spektrofotometrický UV-VIS (**DAD**) – detekce založena na absorpci záření 190 – 800 nm

fluorescenční **FLD** – detekce emisního záření po excitaci primárním zářením

elektrochemický **ECD** – detekce změny hodnoty elektrické veličiny (elektrodový potenciál, proud, kapacita) vyvolané průchodem látky průtokovou celou detektoru

hmotnostní **MS** – destruktivní detektor - detekce ionty, které vznikají ionizací analytů, univerzální, vysoce selektivní a citlivý detektor, umožňuje identifikaci analytů na základě jejich hmotnostních spekter



# Hmotnostní spektrometrie

**Princip** – separace nabitých částic (iontů) v plynné fázi v magnetickém nebo elektrickém poli

Separace podle **m/z** – poměr relativní molekulové hmotnosti (**m**) a nábojového čísla (**z**)

Využití: identifikace sloučenin (přesná hmotnost)

objasnění struktury látek

kvantifikace látek

**Spektrometrie** - název instrumentální metody

Spektroskopie - název nauky

**Spektrometr** - zařízení, které měří hodnoty  $m/z$ , a zaznamenává jejich intenzitu

Spektroskop - zařízení, které měří hodnoty  $m/z$ , záznam na fotografickou desku (první spektroskop J.J. Thomson, 1906)

Spektrofotometr

# Hmotnostní spektrometrie

Schéma:



**Ionizace:** částicí - elektron (EI), foton (laser), urychlený atom  
chemická reakce – chemická ionizace (CI), chemická ionizace za normálního tlaku (APCI)  
elektrosprej – ESI  
interakce s matricí – MALDI

**Ionty:** molekulární ionty  $[M\pm e]^\pm$   
(de)protonované ionty  $[M\pm H]^\pm$   
iontové asociáty  $[M+X]^+$  ionty z mobilní fáze  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ag^+$   
fragmentové ionty vznikající štěpením kovalentních vazeb analytu

# Hmotnostní spektrometrie

Schéma:



**Hmotnostní analýza:** separace iontů podle  $m/z$  ve vysokém vakuu  
různá zakřivení dráhy letu iontů  
v magnetickém nebo elektrickém poli  
různá doba letu iontů ve vakuu (TOF)  
různé oscilace iontů při střídání  
stejnoseměrného a vysokofrekvenčního  
napětí (kvadrupoly, iontové pasti)  
různá frekvence cykloidálních pohybů iontů  
v elektrostatickém poli (Orbitrap)

**Detekce iontů:** elektronový násobič, fotonásobič

# Hmotnostní spektrometrie

Schéma:

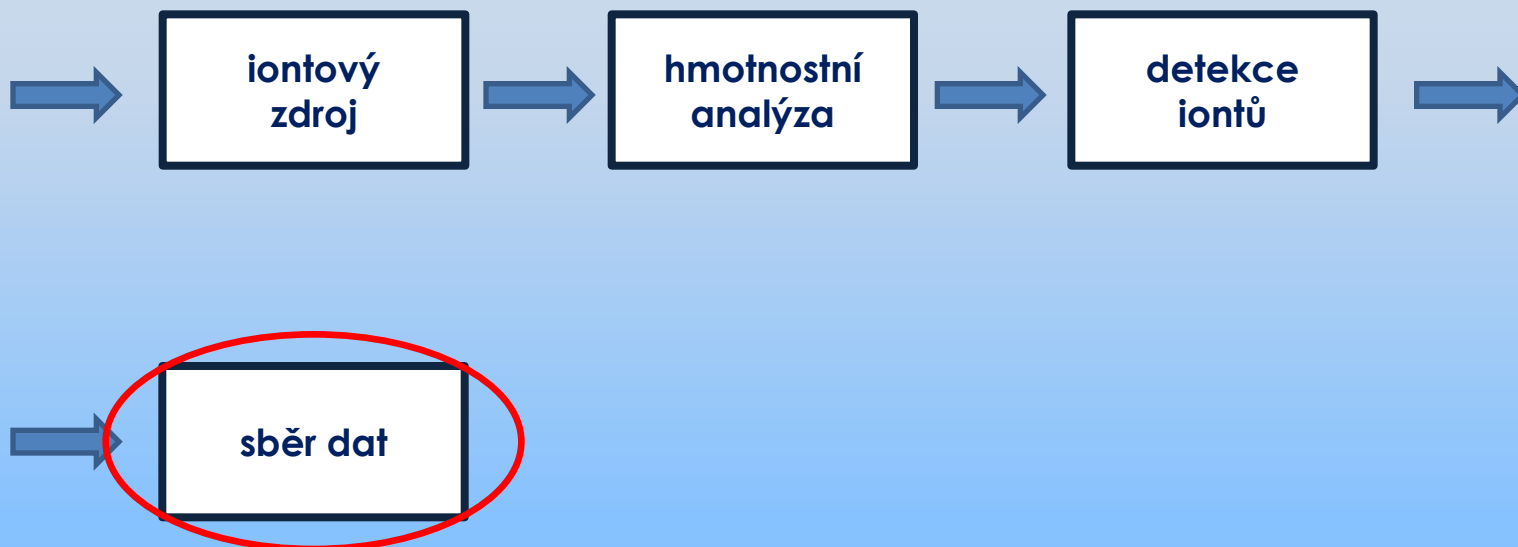


**Hmotnostní analýza:** separace iontů podle  $m/z$  ve vysokém vakuu  
různá zakřivení dráhy letu iontů  
v magnetickém nebo elektrickém poli  
různá doba letu iontů ve vakuu (TOF)  
různé oscilace iontů při střídání  
stejnoseměrného a vysokofrekvenčního  
napětí (kvadrupoly, iontové pasti)  
různá frekvence cykloidálních pohybů iontů  
v elektrostatickém poli (Orbitrap)

**Detekce iontů:** elektronový násobič, fotonásobič

# Hmotnostní spektrometrie

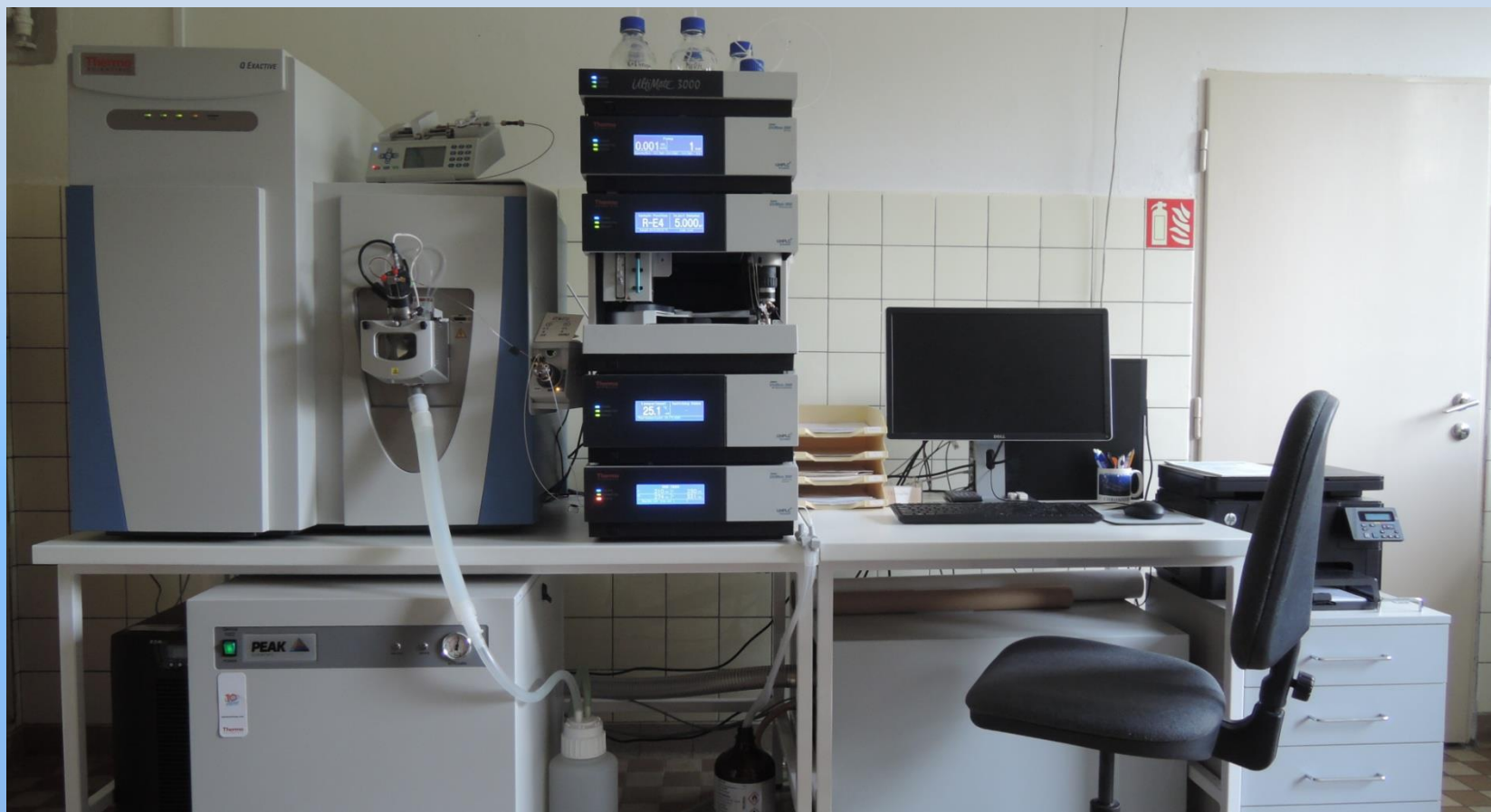
Schéma:



počítač - ovládání a ladění přístroje,  
sběr, ukládání a zpracování dat,  
porovnání spekter s knihovnou,  
vyhledávání v internetových databázích

# HPLC-MS/MS

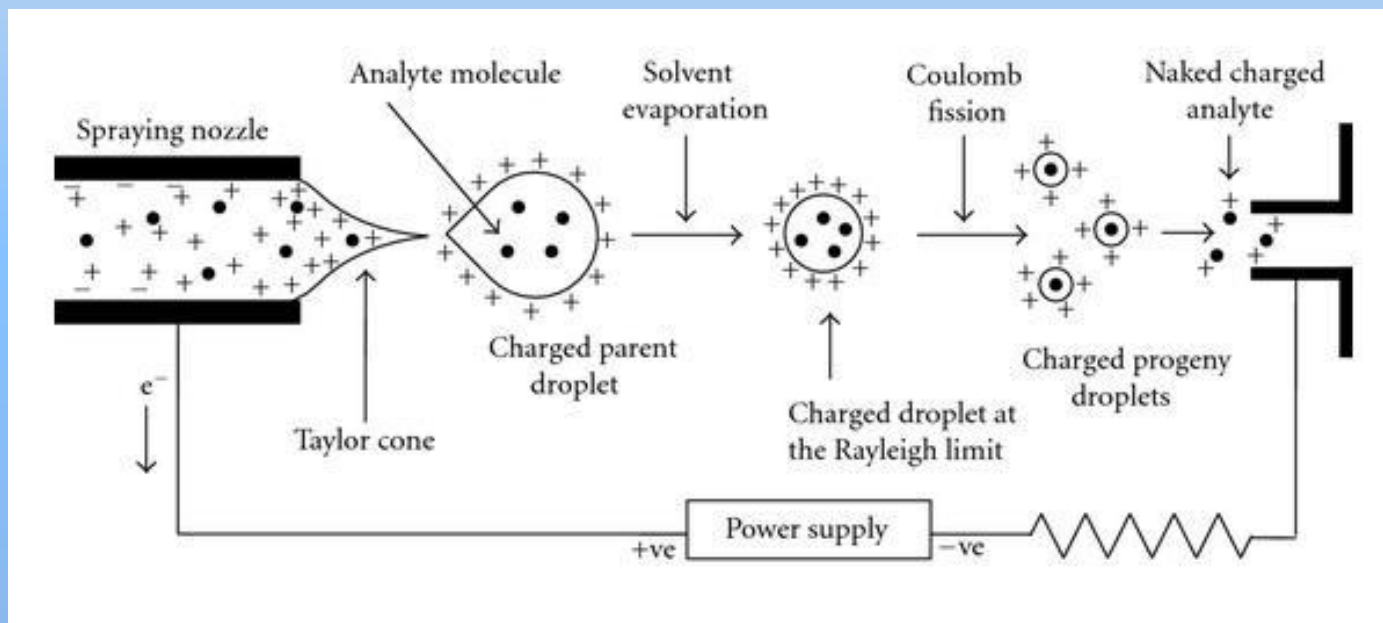
## Q Exactive (Thermo Scientific)



Evropský fond pro regionální rozvoj – IOP CZ.1.06/3.2.01/11.08435

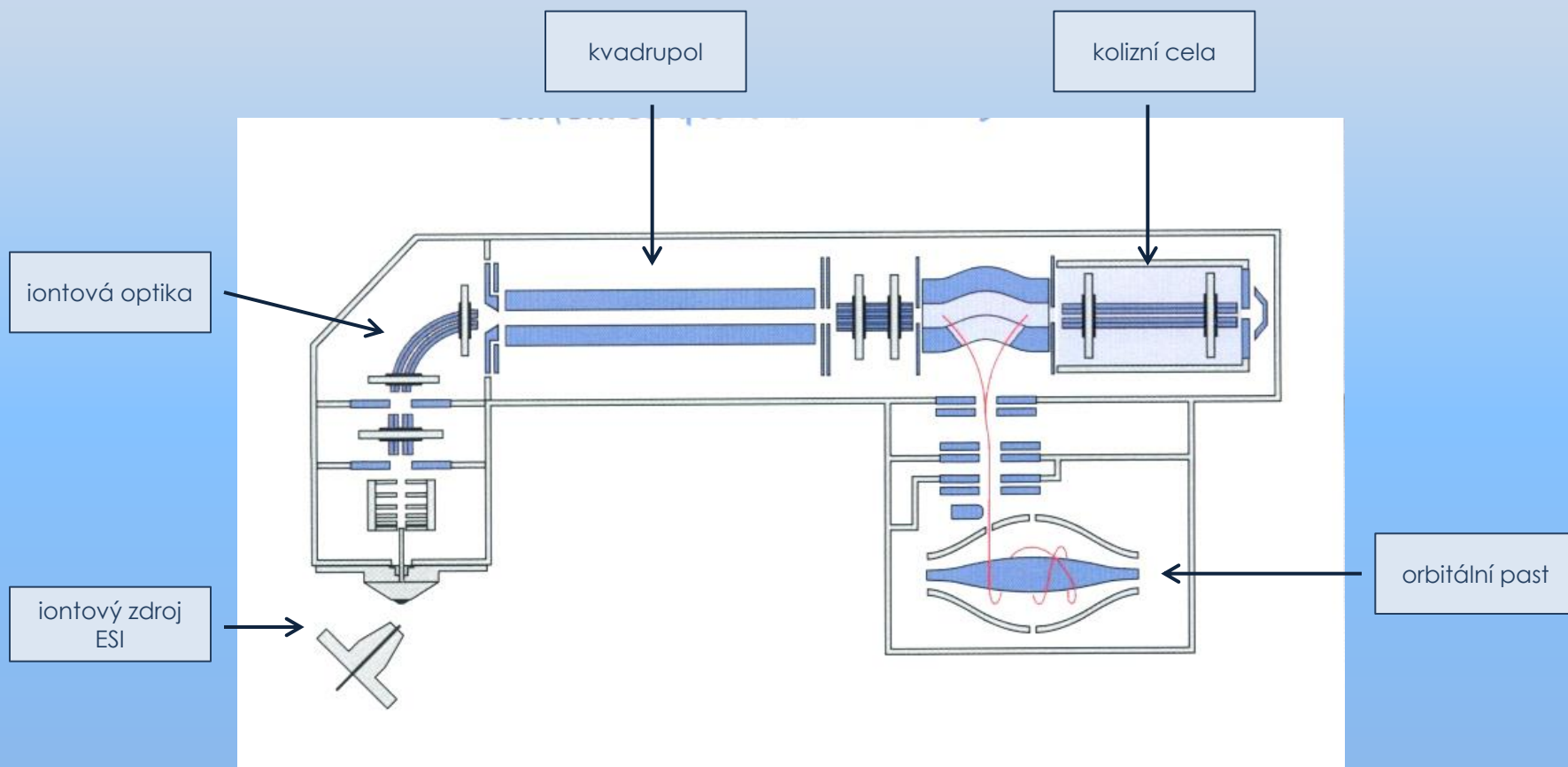
# HPLC-MS/MS

**Elektrosprej (ESI):** měkká ionizační technika, vznik molekulárních iontů, určení molekulové hmotnosti iontových a polárních látek, vznik vícenásobně nabitých iontů – analýza velkých molekul (peptidů), mobilní fáze musí být těkavé, průtok 0,1 -1 ml/min



# HPLC-MS/MS

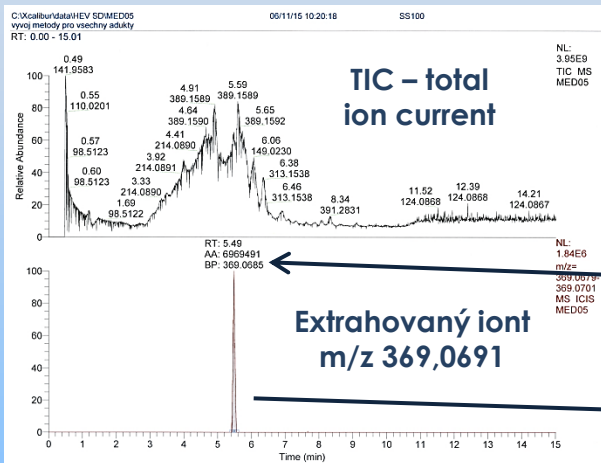
## Q Exactive - schéma





# HPLC-MS/MS

## Stanovení HEV – adukt EO s N-koncovým valinem globinu



**HE-PFPTH** (1-(2-hydroxyethyl)-5-isopropyl-3-pentafluorophenyl-2-thiohydantion)

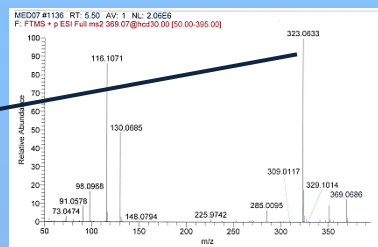
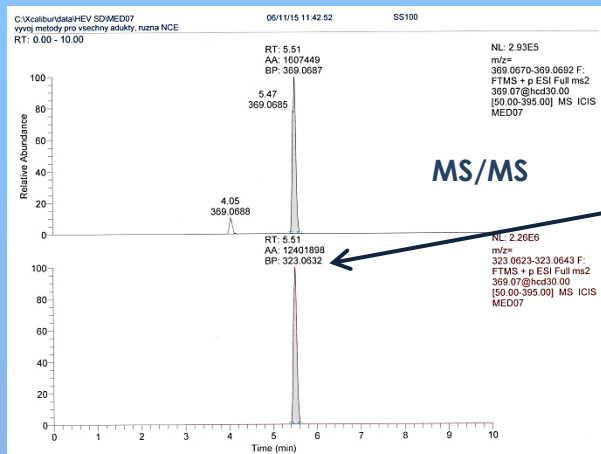
MW = 368,0618

Stanovení protonovaného iontu  $[M+H]^+$

m/z = 369,0691

Prekursorový iont + kolizní energie (HCD) →  
→ fragmentace → fragmentové ionty

m/z = 369,0691 → m/z = 323,0633



MS/MS spektrum

# HPLC-MS/MS

**Využití:** analýza malých molekul (organické látky) a analýza velkých molekul (proteinů), farmaceutický a klinický výzkum (vývoj a studium léčiv, novorozenecký screening, mechanismus vzniku rakoviny a její léčby, ...), forenzní analýza (analýza léčiv a drog, prokazování dopingu, analýza tělesných pozůstatků,...), analýza životního prostředí (bromované retardéry hoření, pesticidy, léčiva, hormony, ...), analýza potravin (kontaminanty potravin pesticidy, bisfenoly, mykotoxiny, akrylamid, ...)

Rozvoj nových vědních oborů

**Proteomika** – studium proteinů, jejich struktury, funkcí, vlastností

**Metabolomika** – komplexní analýza metabolomu (kompletní sada metabolitů) organismu, informace o aktuální stavu organismu

**Lipidomika** – studium lipidů

# HPLC-MS/MS

## Typy analýz:

Cílová analýza: známe strukturu látky, ret.čas, molekulový iont, produktový iont, standard – kvantifikace analytů

Cílový screening: známe strukturu, neznáme ret.čas, molekulový iont, produktový iont – identifikace látek

Necílový screening: neznáme strukturu látky, ret.čas, molekulový iont, produktový iont – porovnání profilů podezřelého a standardního vzorku, identifikace látek unikátních pro podezřelý vzorek

**Hmotnostní spektrometrie** - účinný nástroj pro široké spektrum analytických úkolů

- Hardware: rychlost, citlivost, vysoké rozlišení, přesnost hmoty
- Software: rychlý software pro zpracování dat
- Knihovny spekter : identifikace, navržení možné struktury
- Analytik: analytická metoda, vyhodnocení a interpretace dat

# HPLC-MS/MS

## Závěr:

Současné přístroje dosahují vynikajících parametrů a generují **enormní množství dat** – většinou více než jedinec dokáže zpracovat, pochopit a využít

Podíl času na **zpracování dat** stále narůstá oproti vlastnímu experimentu

Budoucnost hmotnostní spektrometrie – rozvoj **bioinformatiky** a **tvorba multioborový týmů** – odborníci z oblasti analytická chemie , biologie, mikrobiologie, medicína, farmacie, bioinformatika

## Děkuji za pozornost

L.Nováková, M.Douša: Moderní HPLC separace v teorii a praxi

J.Preisler, J.Havliš, M.Bittová, I.Benešová: Sborník 16. ročníku Školy hmotnostní spektrometrie