

Agilent LC/MS/MS pro analýzu malých molekul v biologických vzorcích

Ondřej Lacina, Ph.D.

Aplikační specialista (LC, LC/MS)



Portfolio LC/MS trojitých kvadrupólů Agilent

Ultivo



Nejmenší LCMS QQQ
IDL < 10fg

6470B



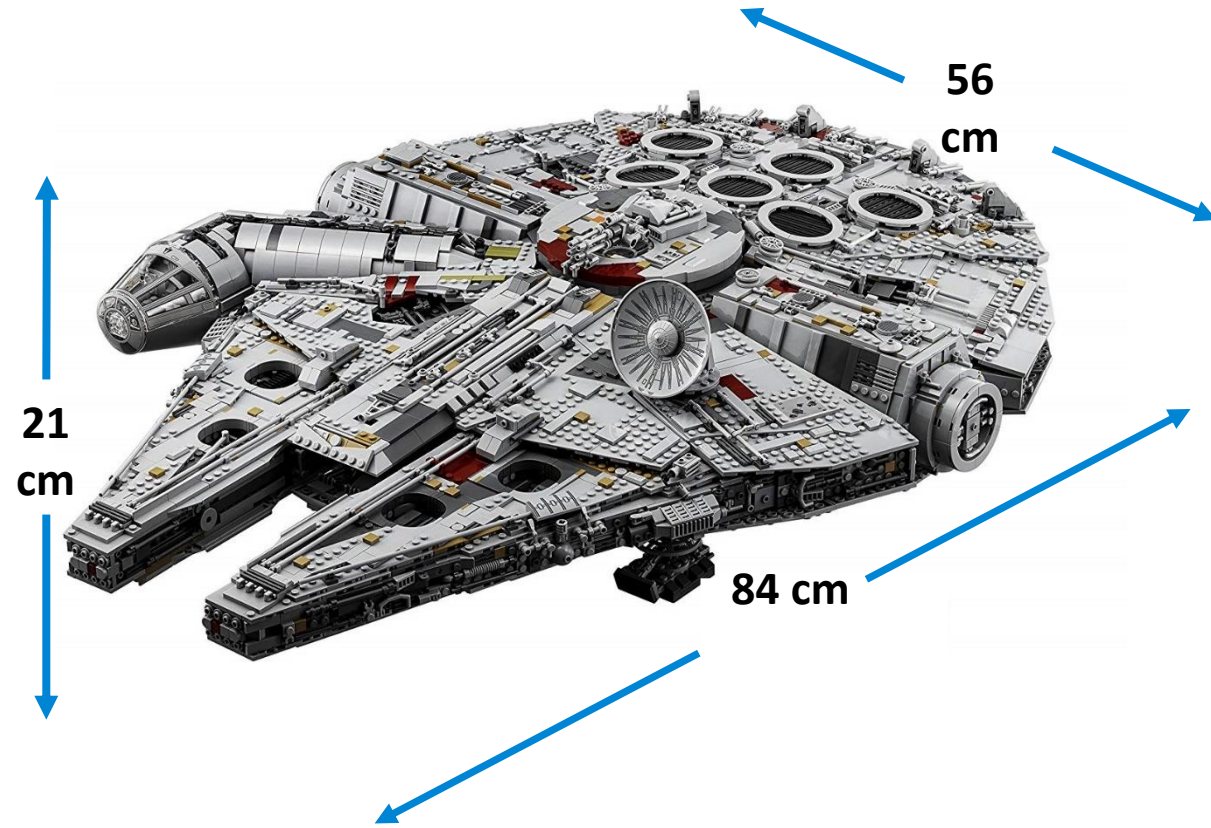
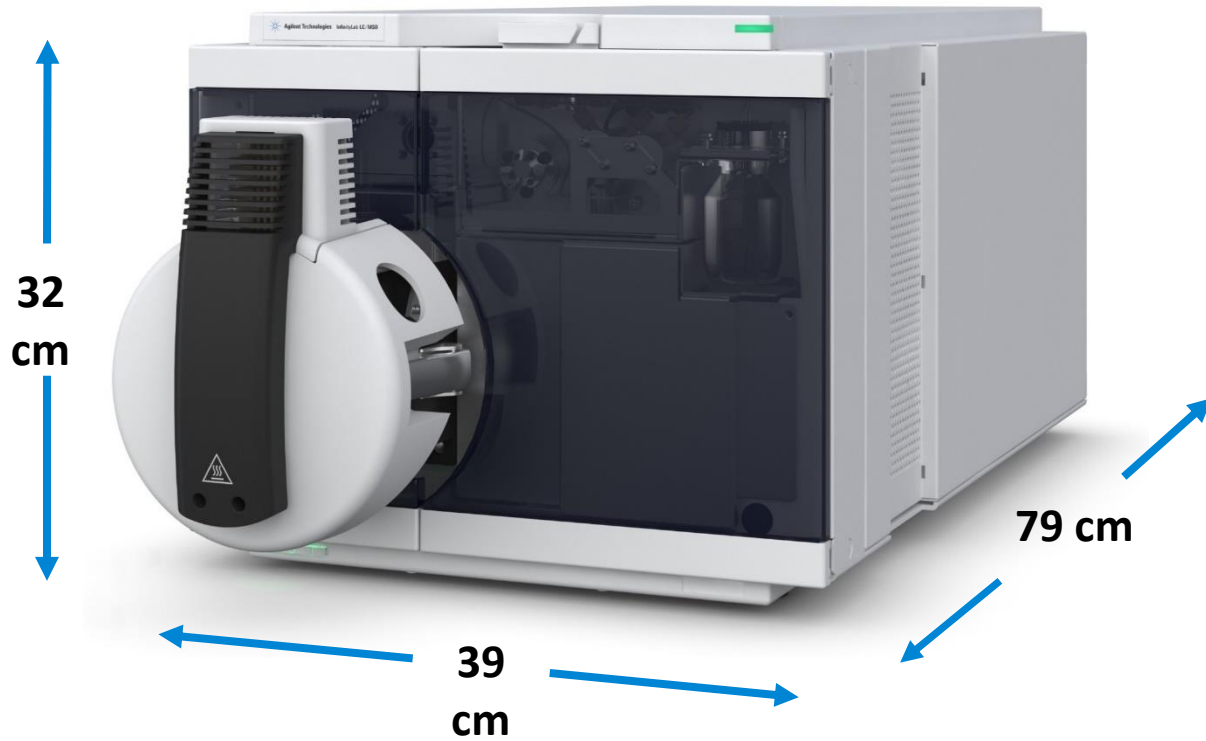
Rutinní cílená analýza
IDL < 2,5fg

6495C



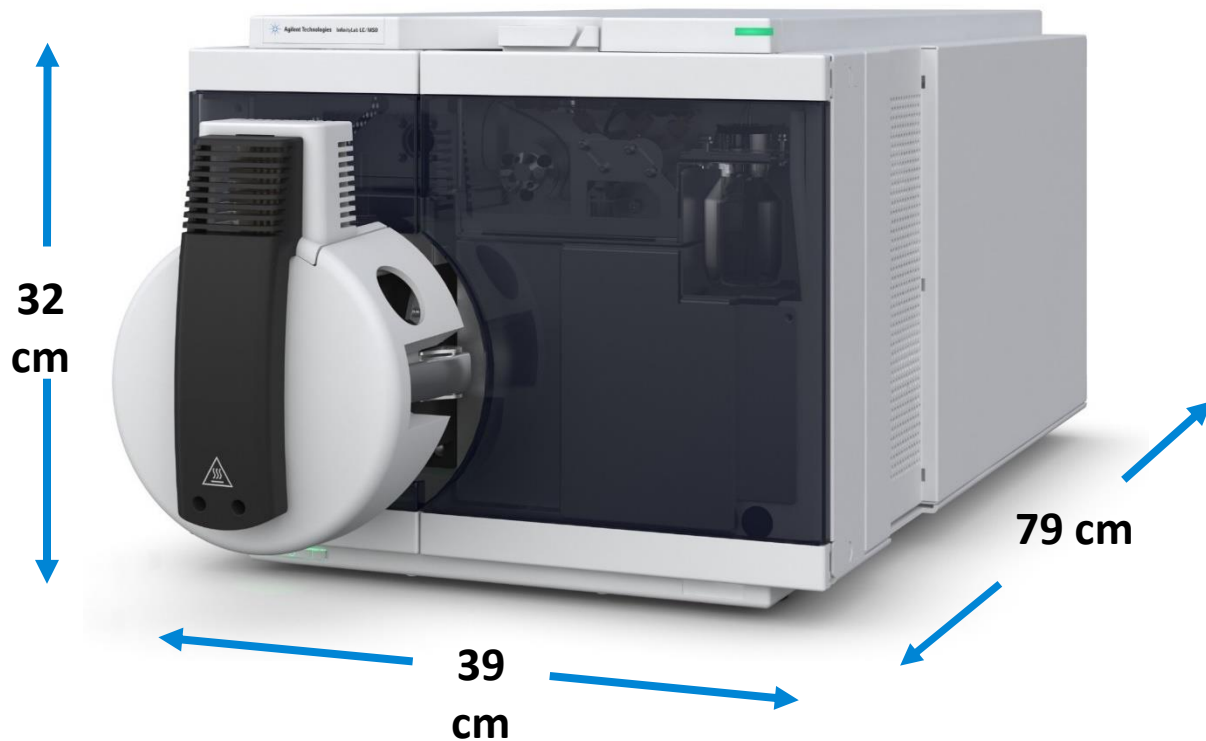
Nejvyšší citlivost
IDL < 0,75fg

Nejmenší trojitý kvadrupól



Největší stavebnice Lego

Nejmenší trojitý kvadrupól

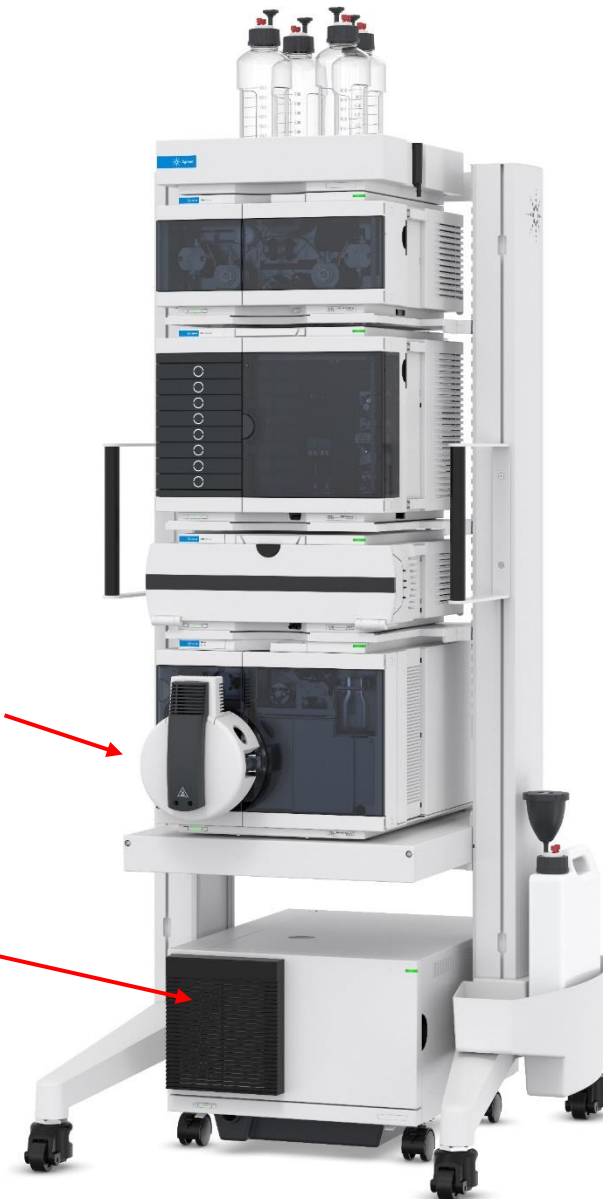


Ultivo lze provozovat
jedné věži s HPLC

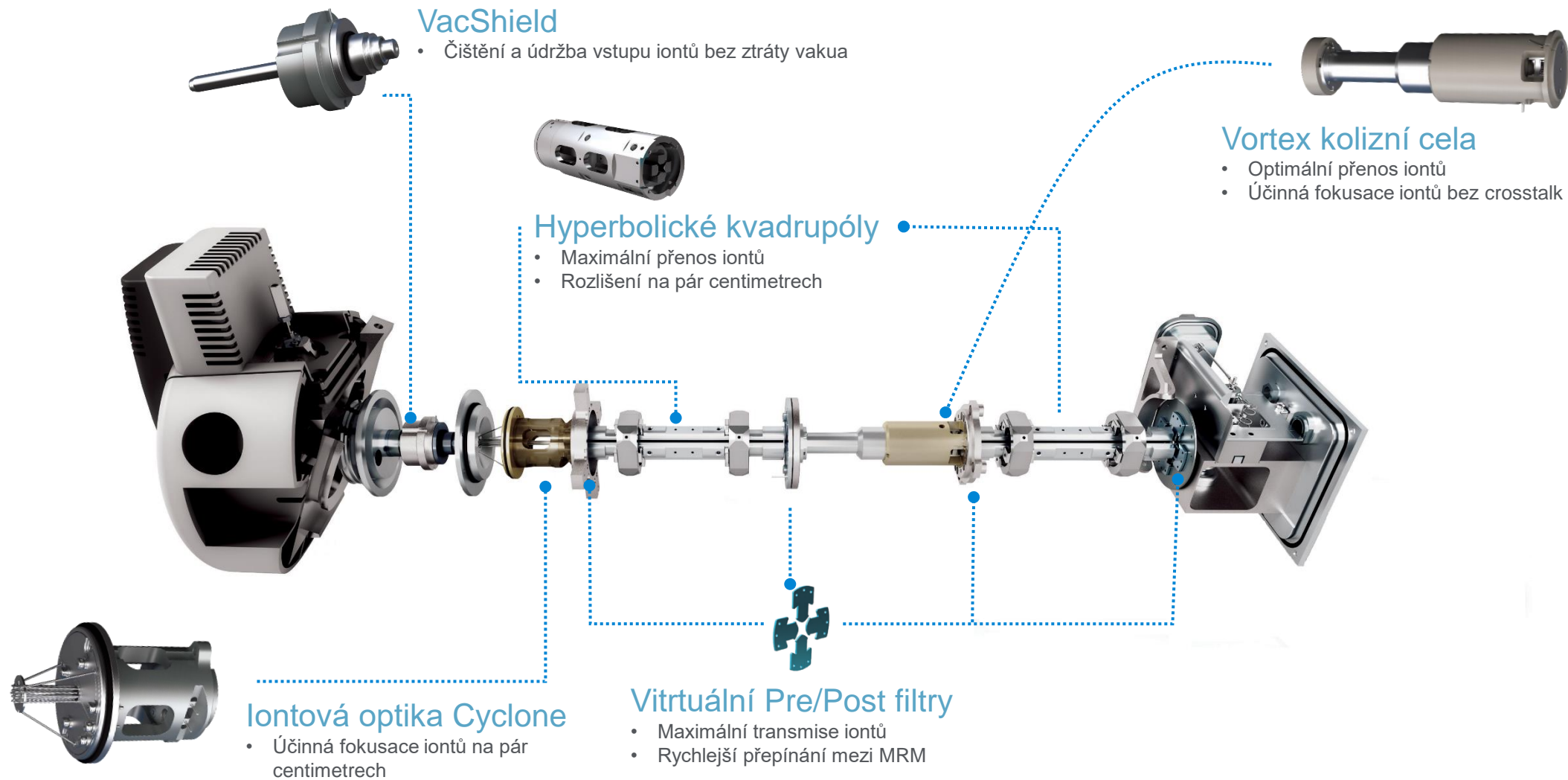
Stojan pro Ultivo!

Ultivo lze na stojanu
vysunout a servisovat.

Tlumící box s
olejovou pumpou

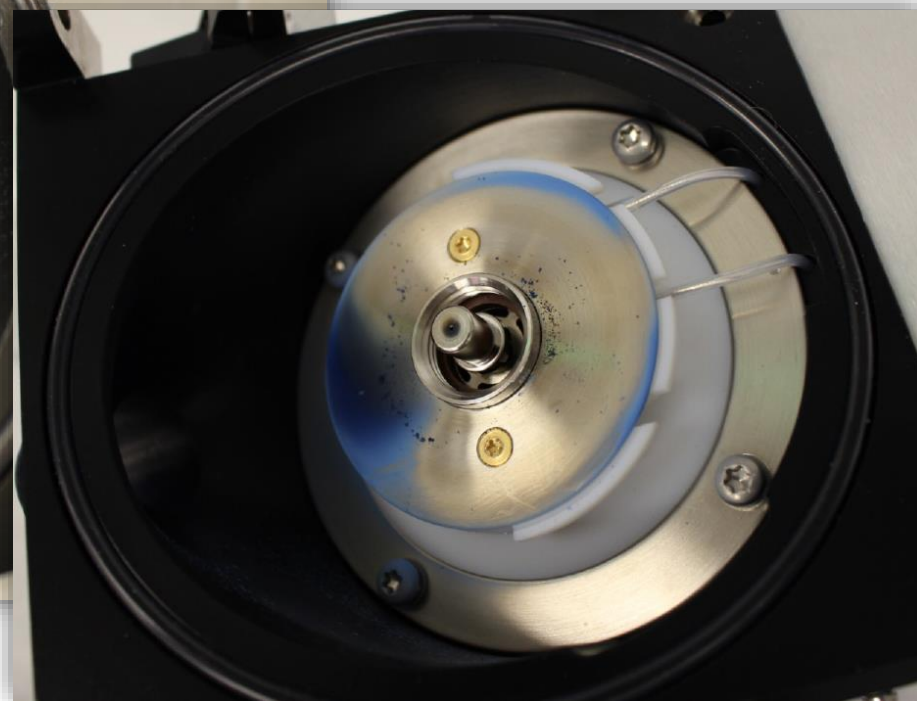
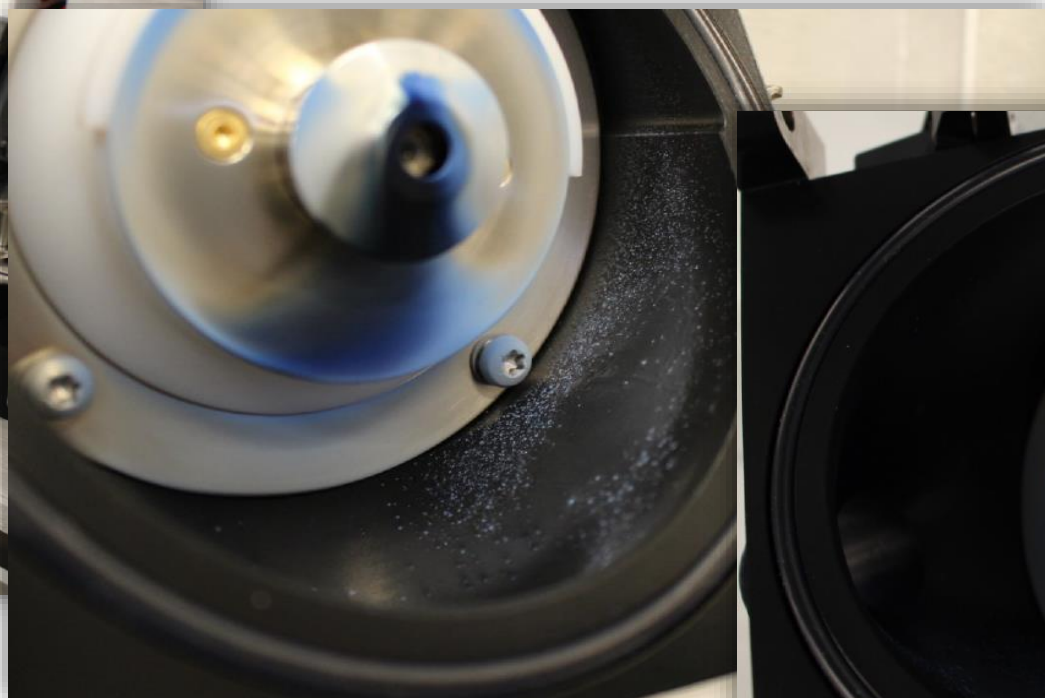
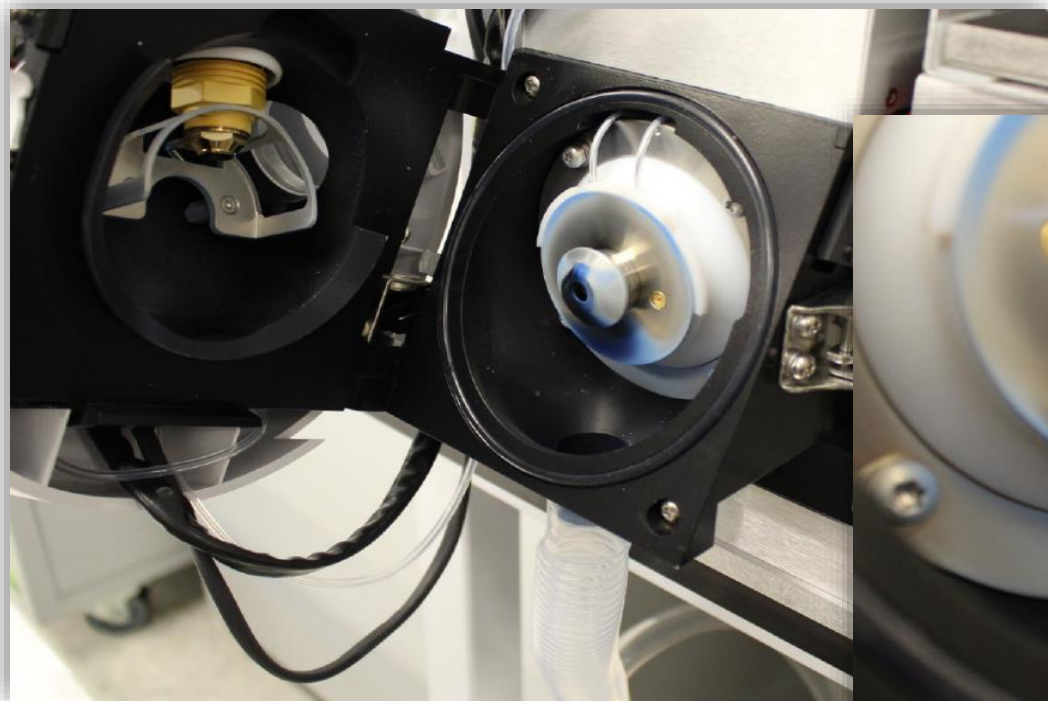


Zcela nový trojitý kvadrupól



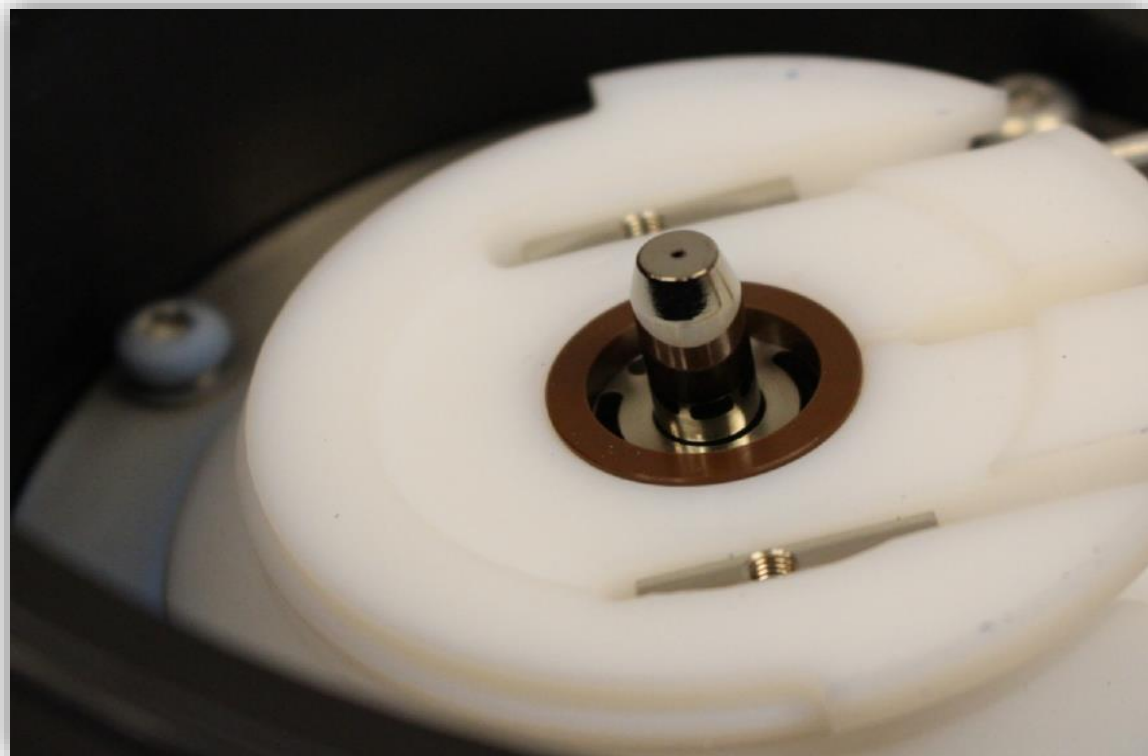
Blue Dye Experiment: test robustnosti

Iontový zdroj po experimentu



Blue Dye Experiment: test robustnosti

Vstupní kapilára - vnější část

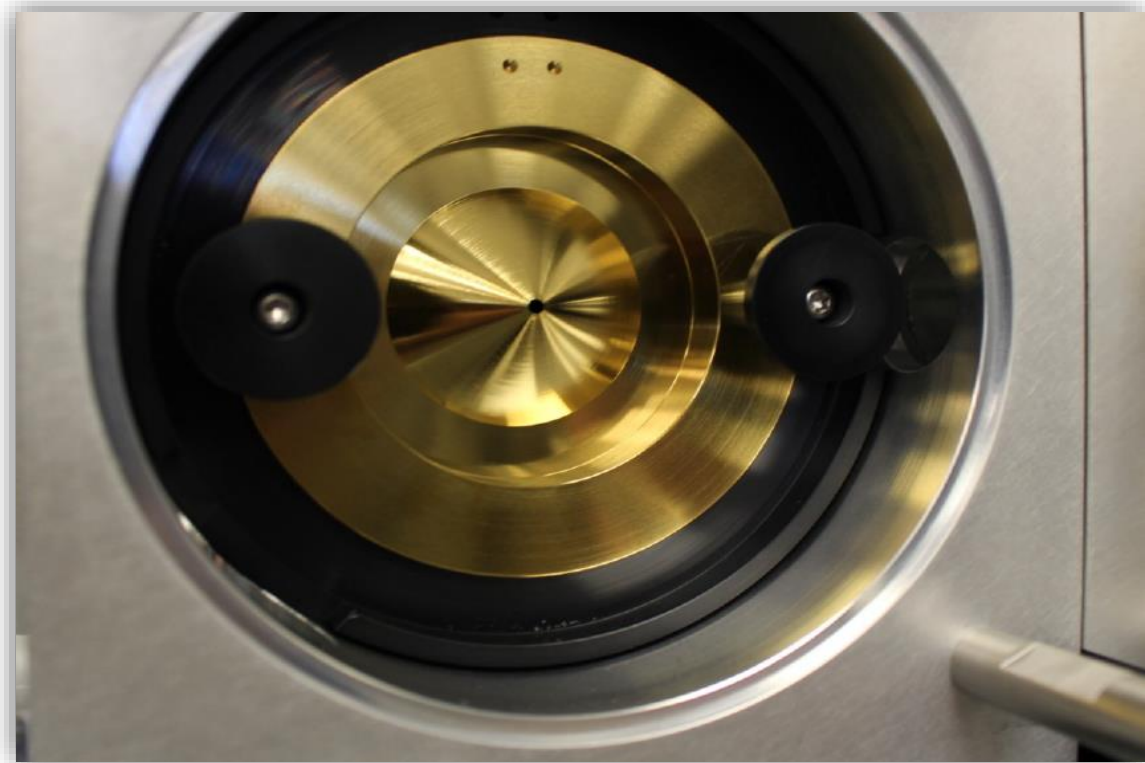


Vstupní kapilára - vnitřní část

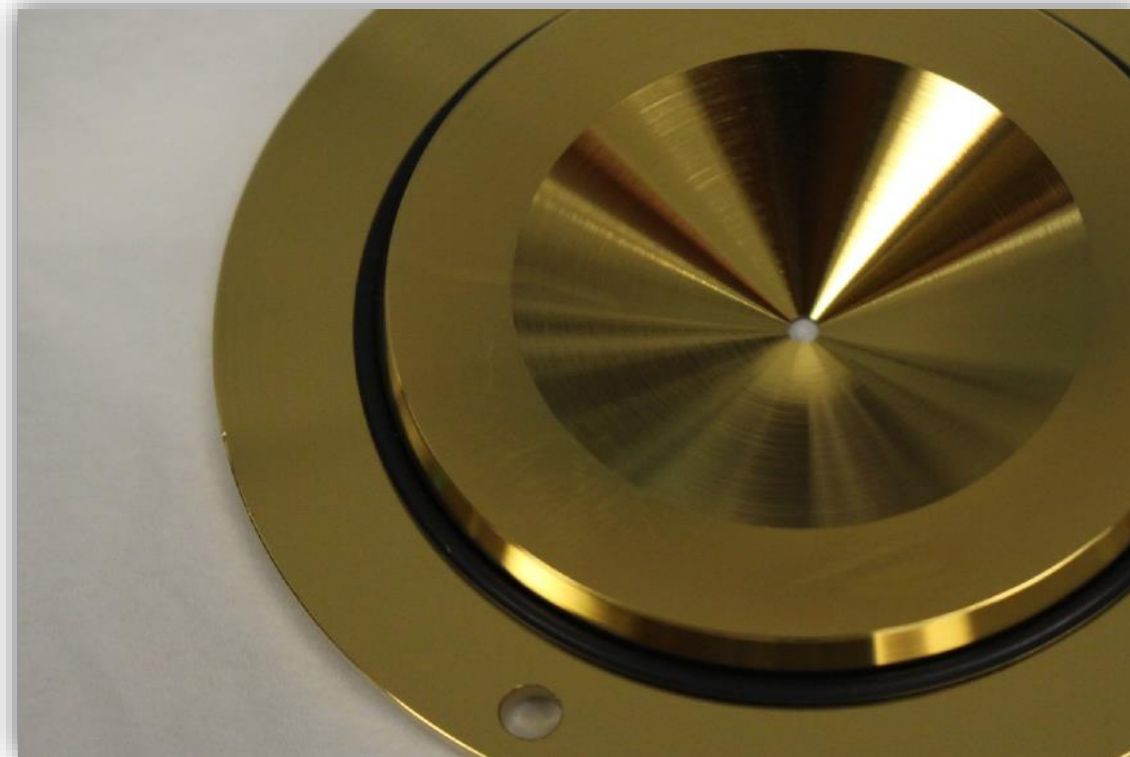


Blue Dye Experiment: test robustnosti

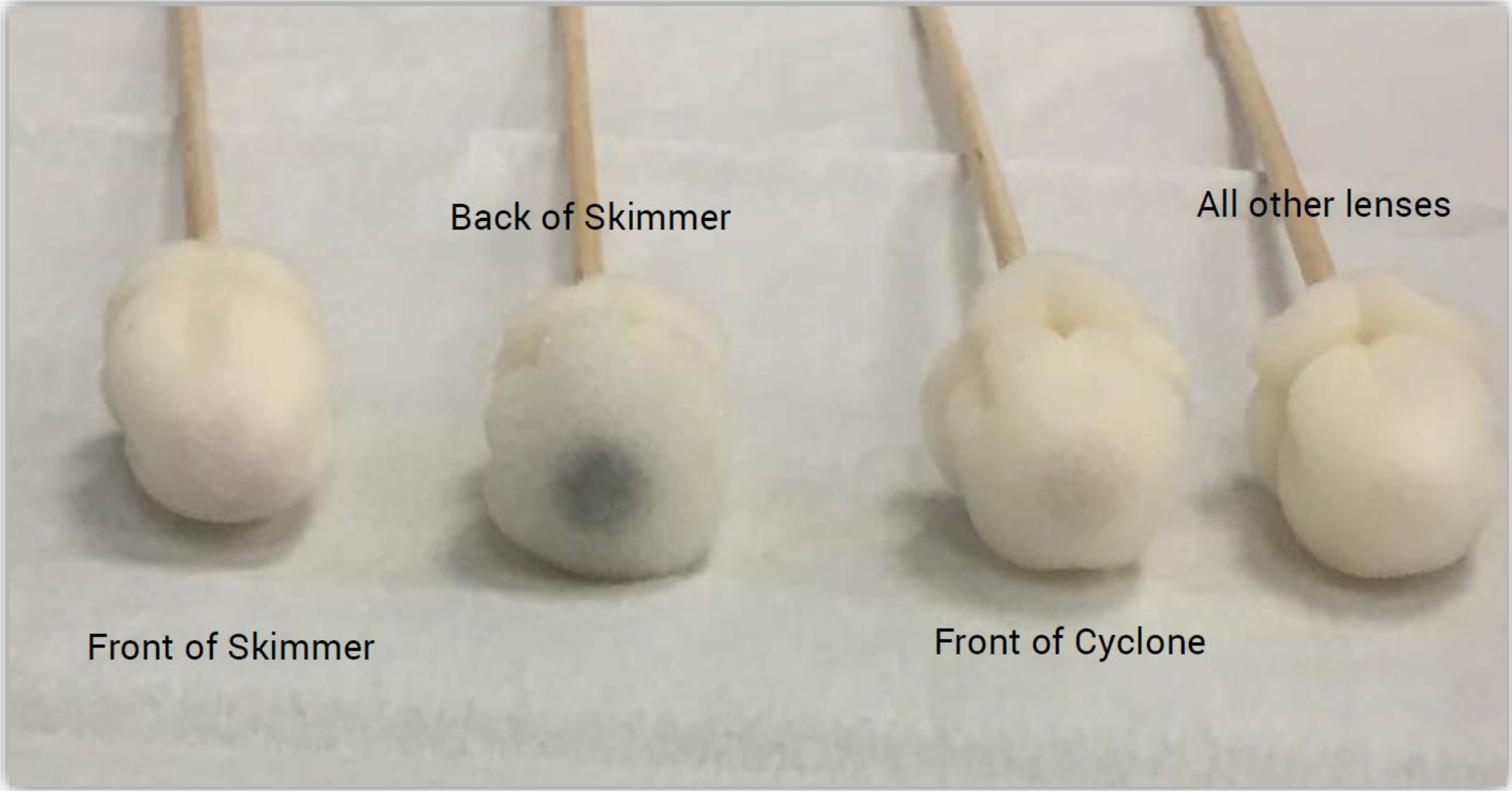
Skimmer - vnější část



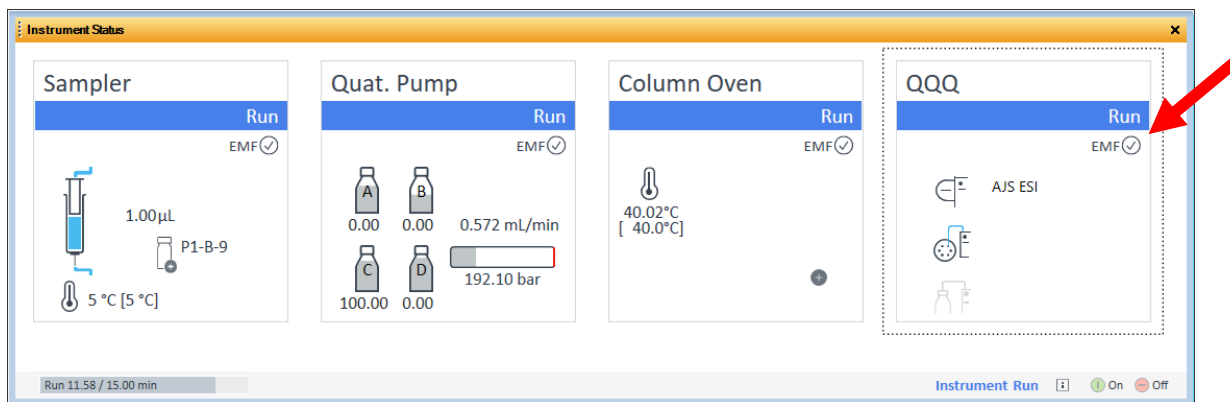
Skimmer - vnitřní část



Blue Dye Experiment: test robustnosti



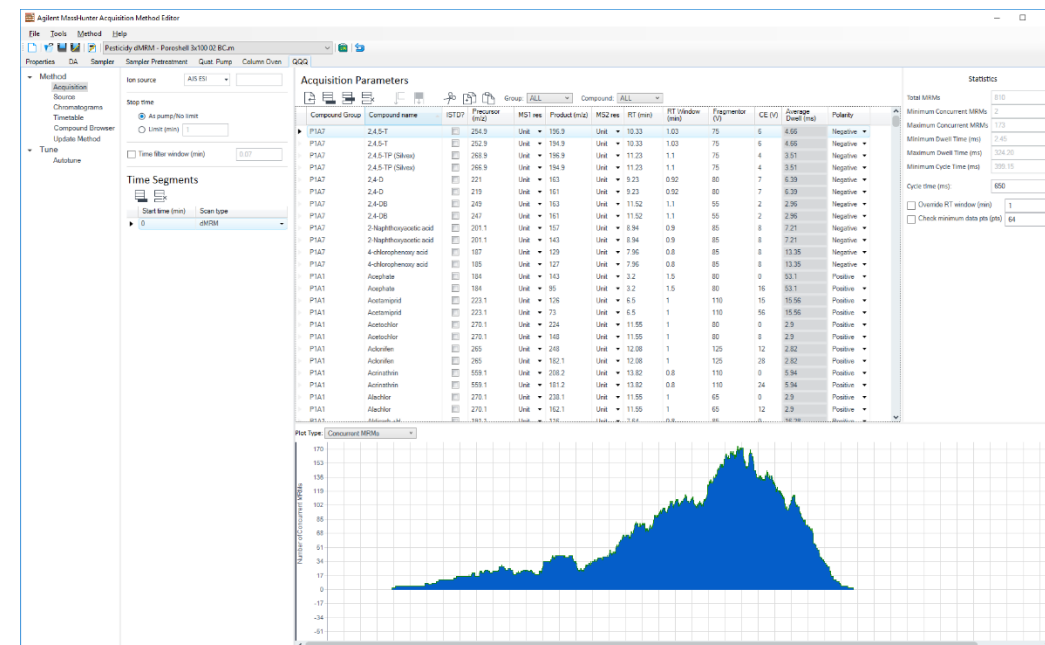
MassHunter Acquisition pro NE-experty



EMF (Early Maintenance Feedback):

- Výměna nebulizeru (nestabilní sprej).
- Detekce neprůchodnosti vstupní kapiláry.
- Špatná/kontaminovaná kapilára
- Detekce životnosti elektronásobiče.
- Výměna oleje v rotační pumpě.
- Expirace ladění...

- Přímý přístup do databáze MRM přechodů
- Automatický převod MRM na dynamické MRM – jednodušší vývoj velkých metod.
- Statistika MRM metody (minimální, maximální dwelltime, počet MRM přechodů, nejnižší nastavitelný cyklus...)
- V dynamické MRM se automaticky počítá průměrný dwelltime, je vidět graficky počet MRM přes sebe.
- Kombinovaná akvizice – kombinace různých režimů v jednom časovém okně.



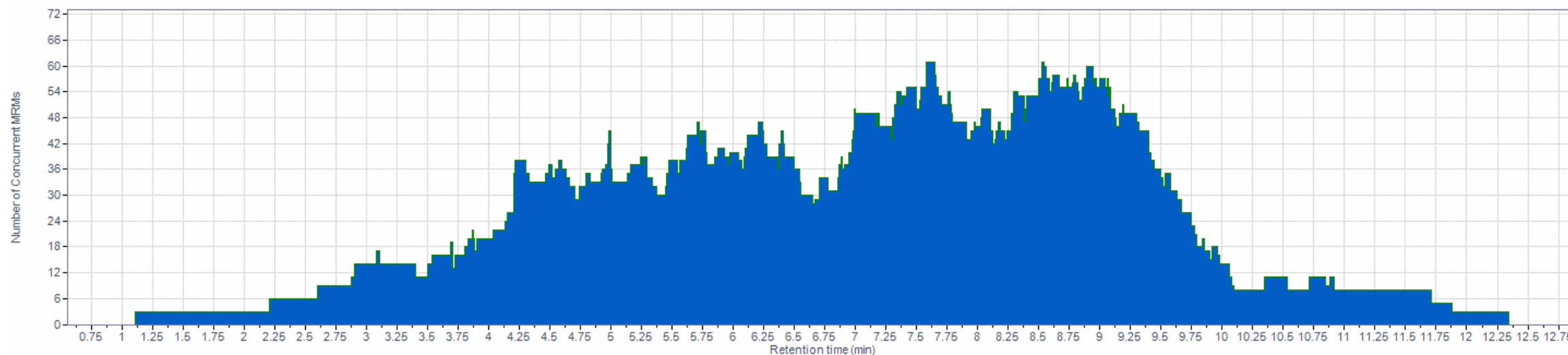
Analýza drog a léčiv v moči

- > 150 unikátních analytů, 331 MRM
- ESI+/ESI-, přepínání polarity během měření
- Matrice: moč, ředění 1:4
- Nástřik: 2 μ l
- Kolona: Poroshell EC-C18 (100 \times 3mm; 2,7 μ m)

Statistics

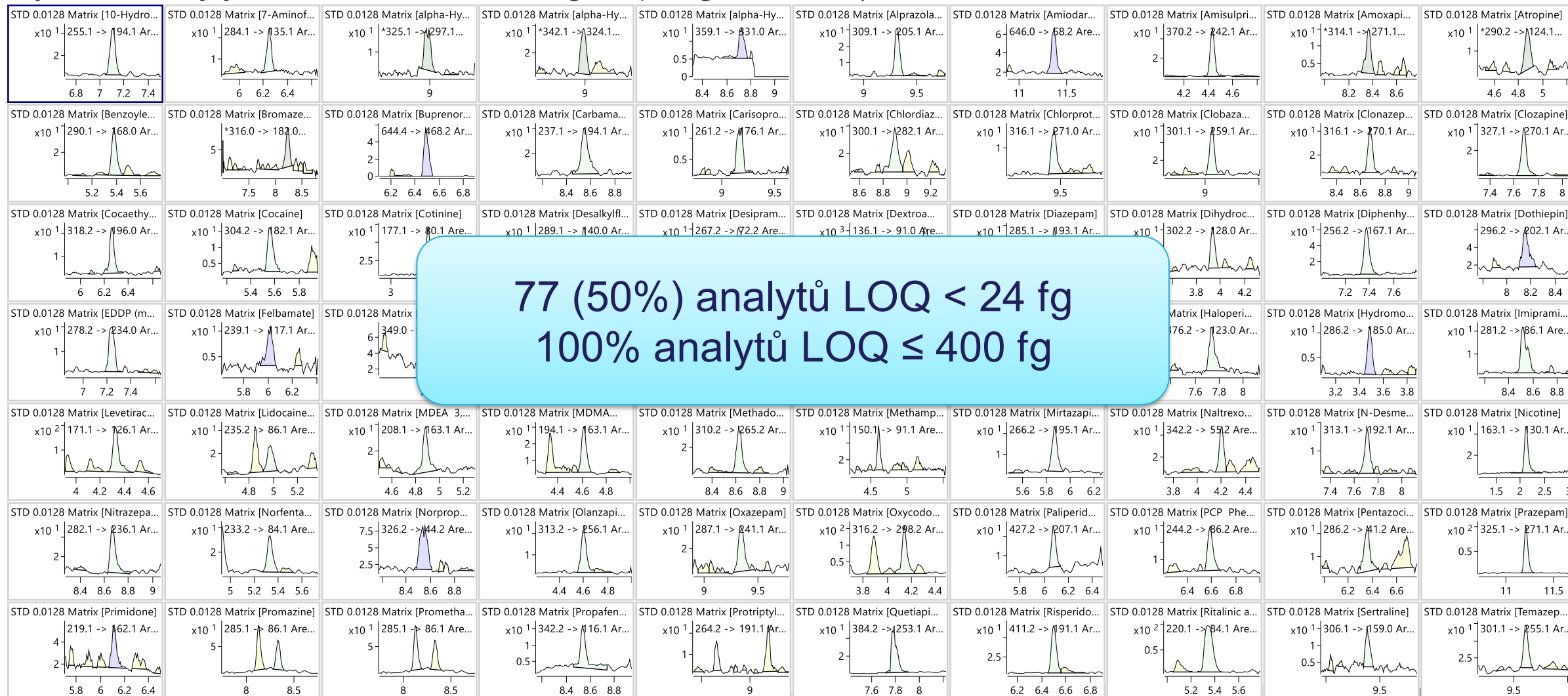
Total MRMs	331
Minimum Concurrent MRMs	3
Maximum Concurrent MRMs	61
Minimum Dwell Time (ms)	6.40
Maximum Dwell Time (ms)	165.90
Minimum Cycle Time (ms)	170.60
Cycle time (ms):	500
<input type="checkbox"/> Override RT window (min)	1
<input type="checkbox"/> Check minimum data pts (pts)	64

Plot Type: Concurrent MRMs

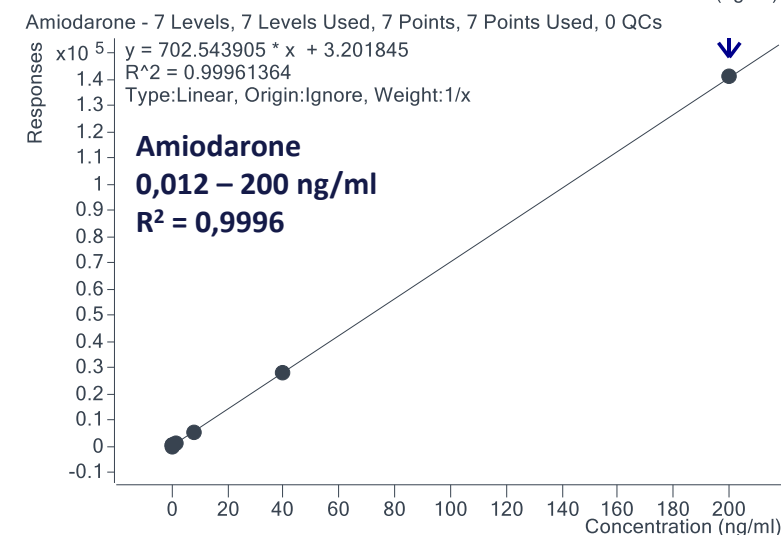
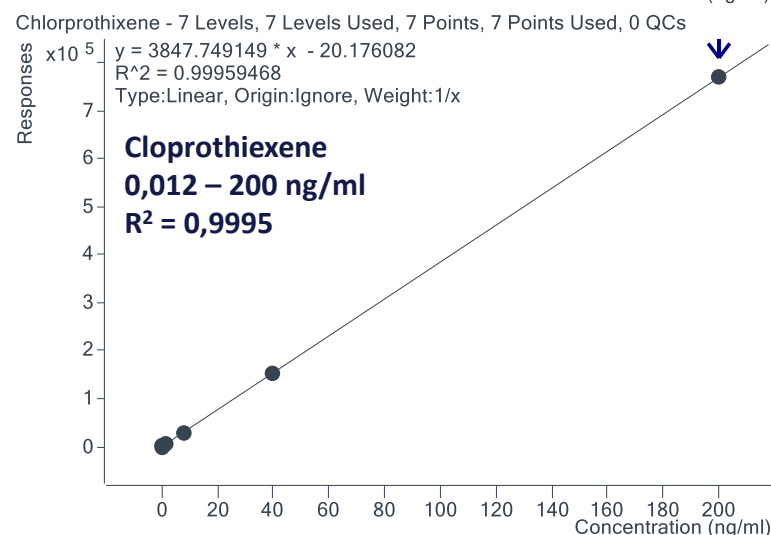
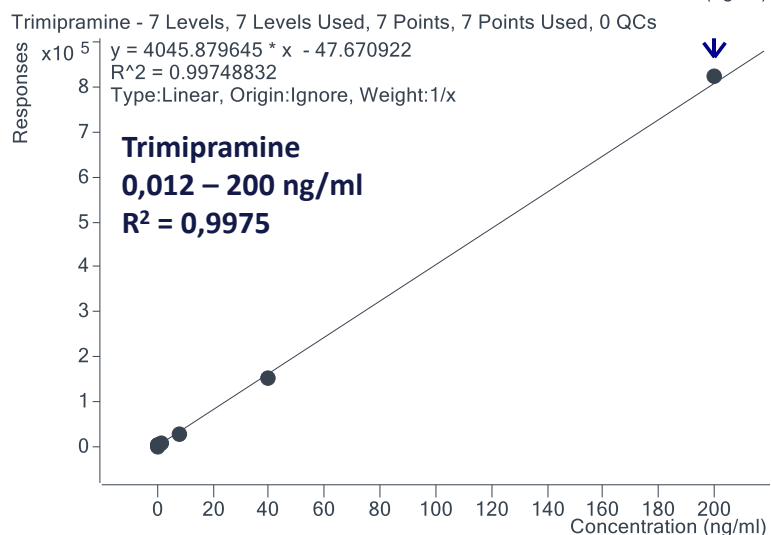
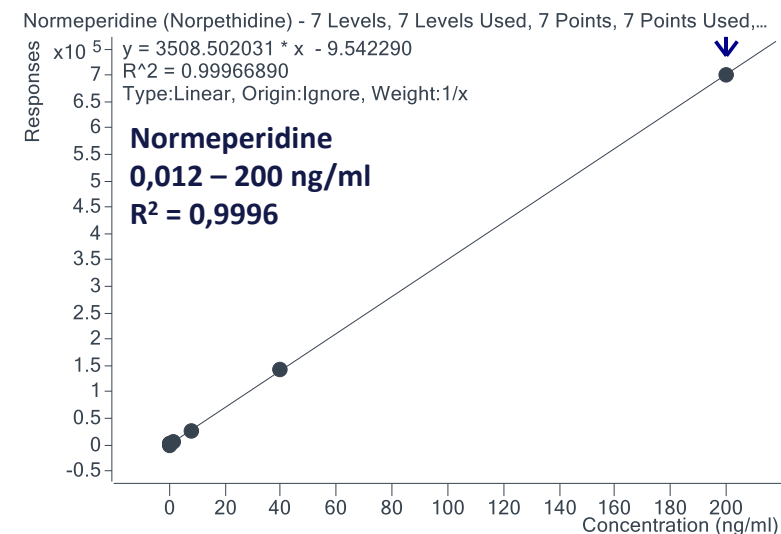
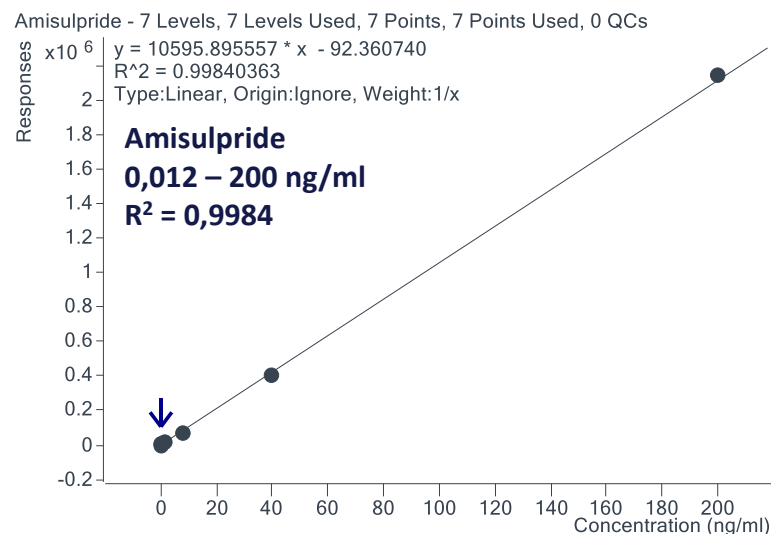
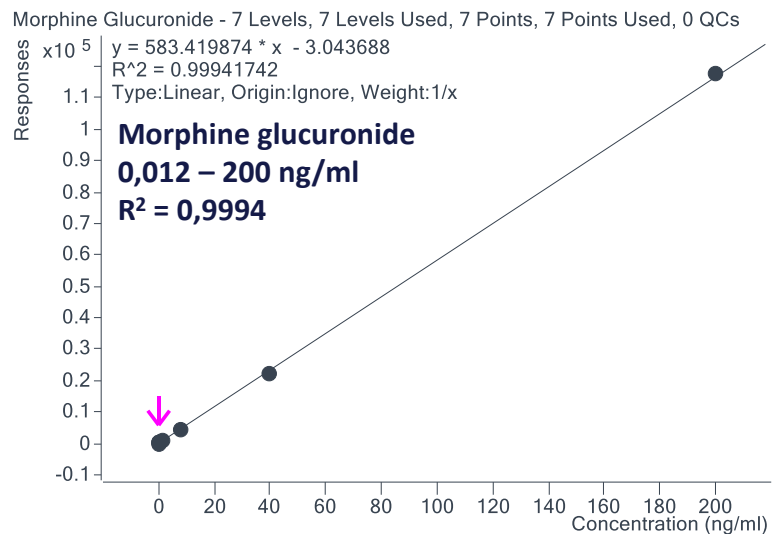


Analýza drog a léčiv: Citlivost

Vybrané analyty na koncentraci 0.012 ng/ml (24 fg absolutně) v matrici

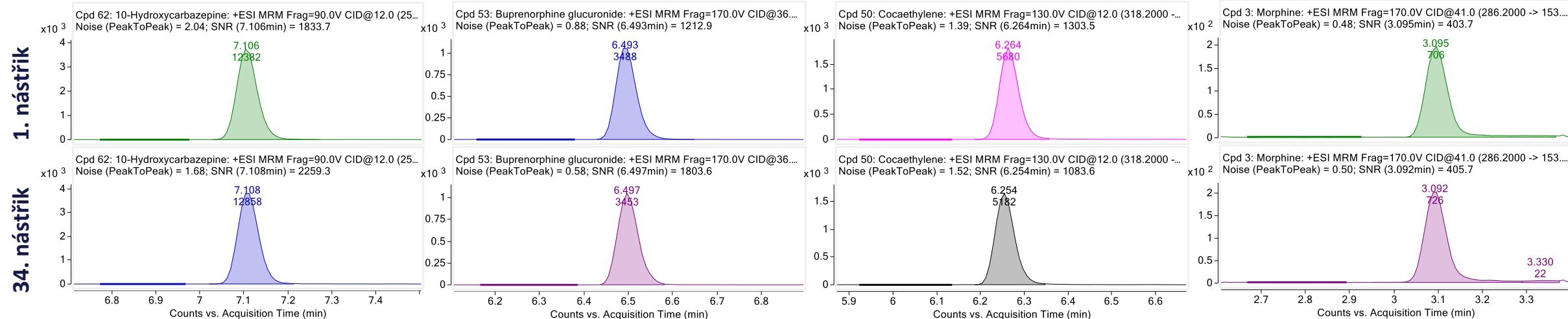
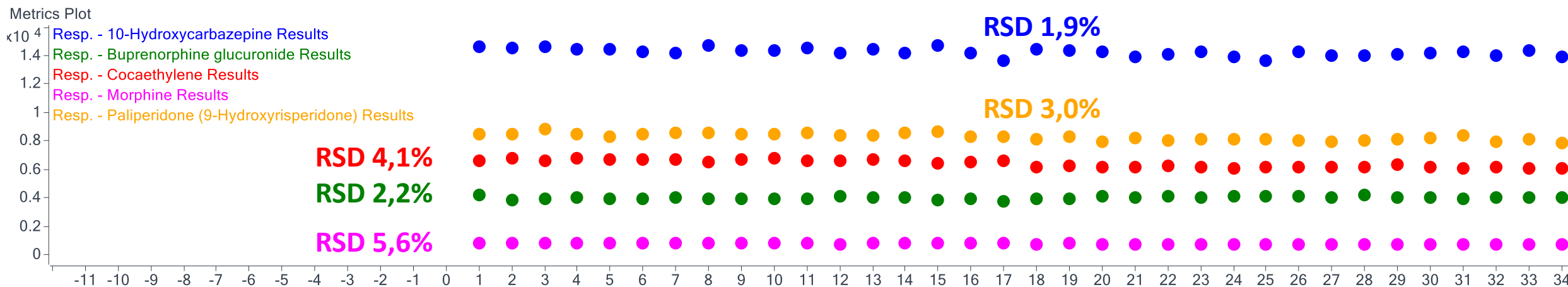


Analýza drog a léčiv: Linearita v matrici



Analýza drog a léčiv: Reprodukovanost

- 4 dny měření ≈ 400 nástříků matrice bez přerušení
- Každý 12. nástřík ze stejné vialky – STD 1,6 ng/ml ≈ 3 pg absolutně

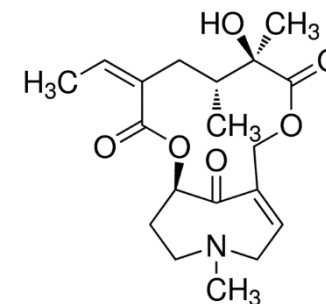
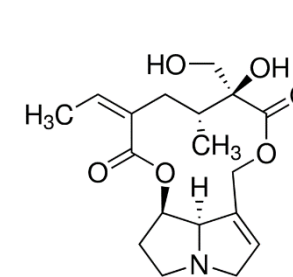
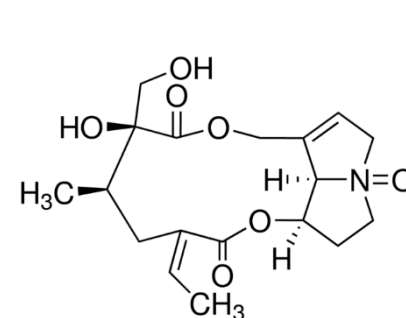
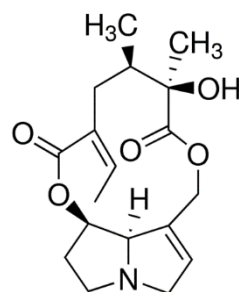
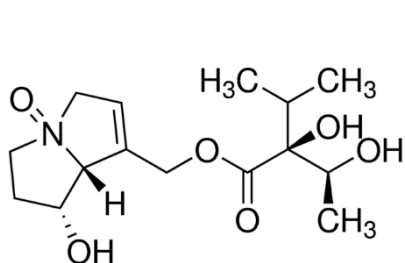
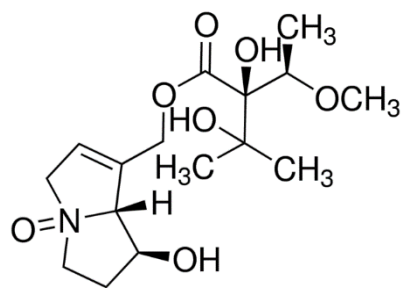


Pyrolizidinové alkaloidy v čajích

- PA jsou produkovány velkým množstvím rostlin po celém světě.
- Do potravin se dostávají jako kontaminace (bylinné čaje, rooibos, máta, oregano, majoránka, římský kmín...)
- Nálezy 0 – 5000 µg/kg
- Stanovení maximálních limitů upravuje **Nařízení komise (EU) 2020/2040**, platné od 3.1.2021.
- Limity 1 µg/kg (pravý čaj) – 1000 µg/kg na sumu 21 alkaloidů.

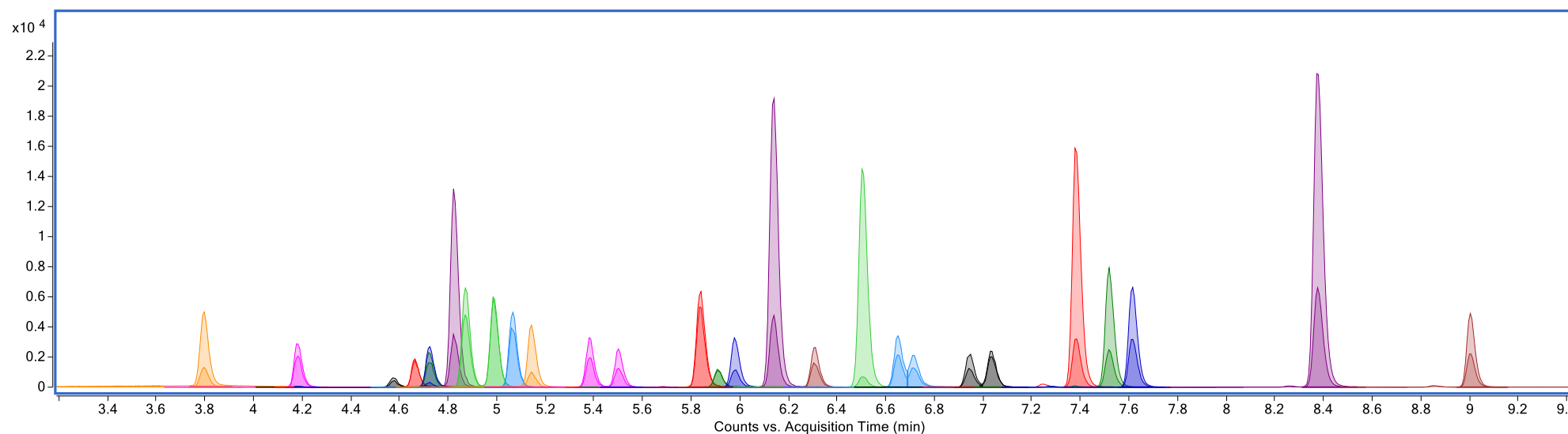
Analytické výzvy při stanovení PA:

- Mnoho analytů má stejné MRM přechody.
- Časté koeluce izomerních PA.
- Komplexní matrice, velké matriční efekty.
- Vzorkování: málo vzorku, velká nehomogenita.
- Nízká stabilita analytů ve standardu i v extraktu.
- Velmi nákladné analytické standardy.



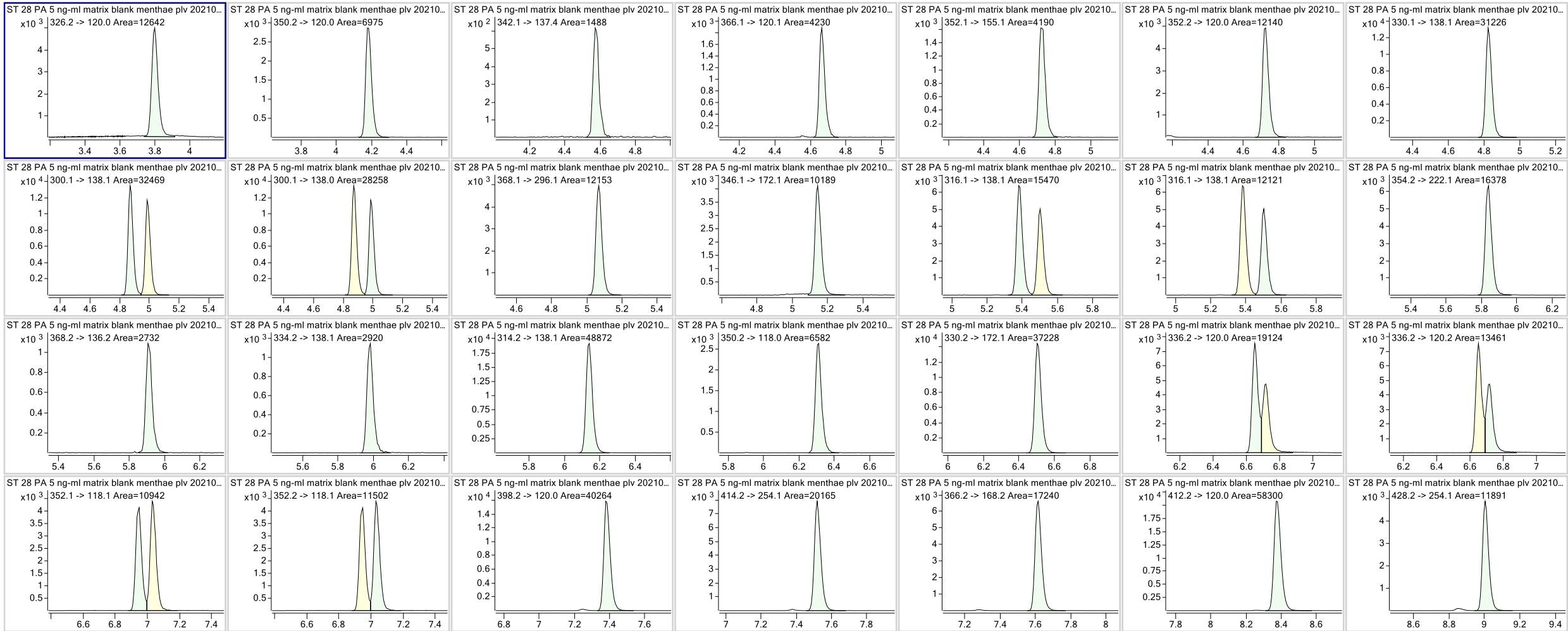
Pyrolizidinové alkaloidy v čajích

- 28 pyrolizidinových alkaloidů
- UHPLC Agilent 1290 + Agilent Ultivo QQQ
- Matrice: bylinné čaje, přečištění SPE
- Nástřik: 1 μ l
- Kolona: Agilent Poroshell EC-C18 (150 \times 3mm; 2,7 μ m)



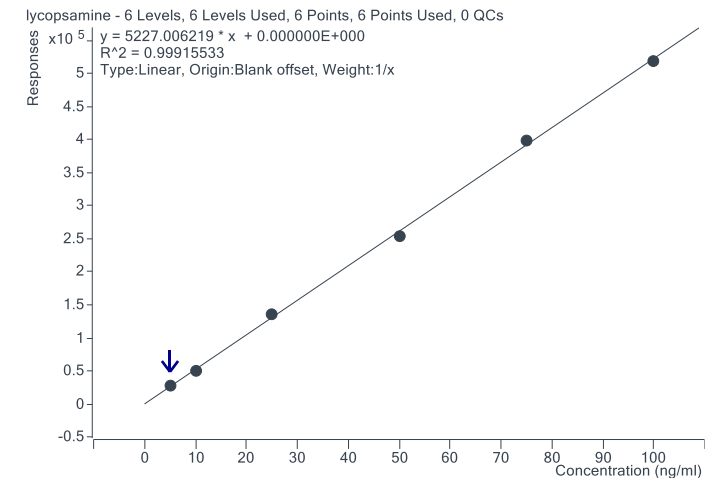
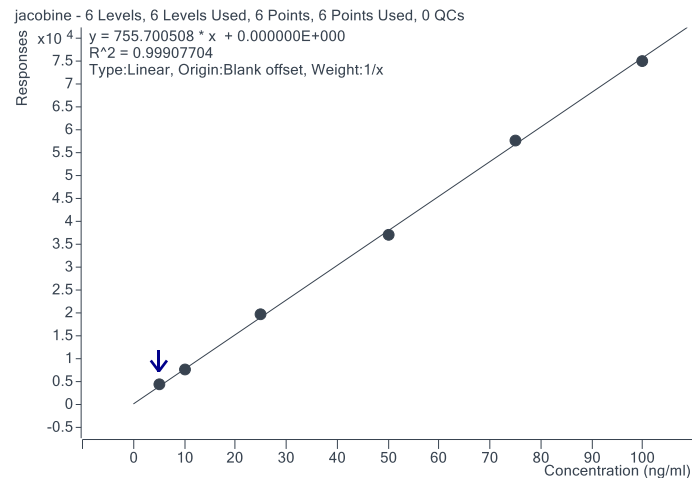
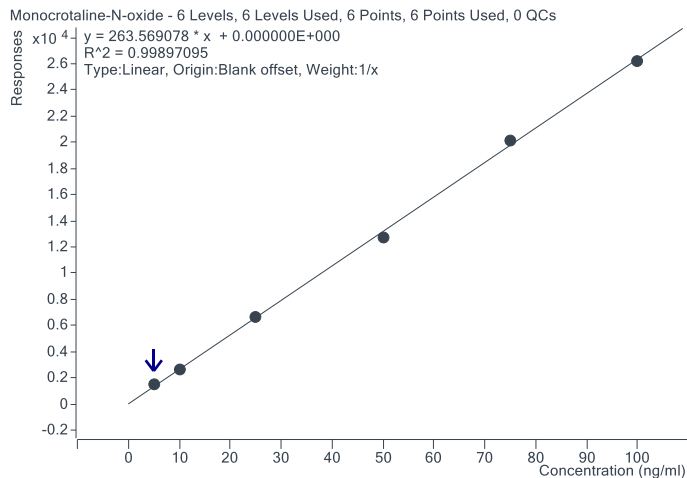
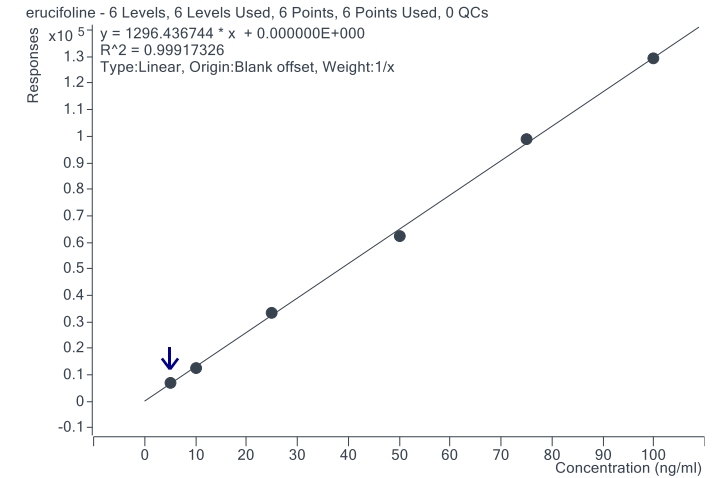
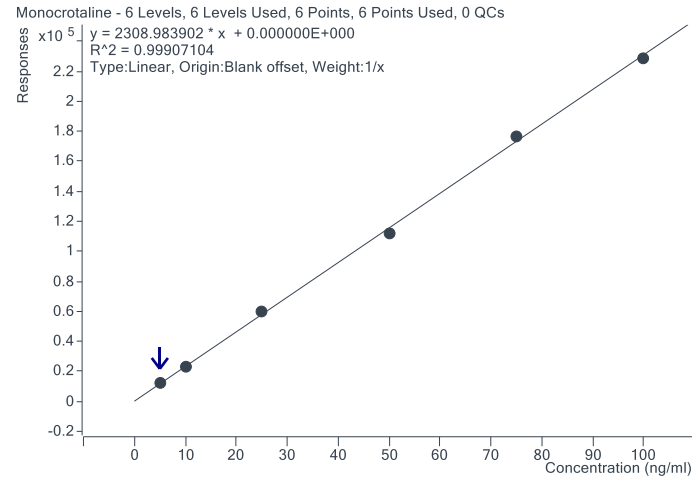
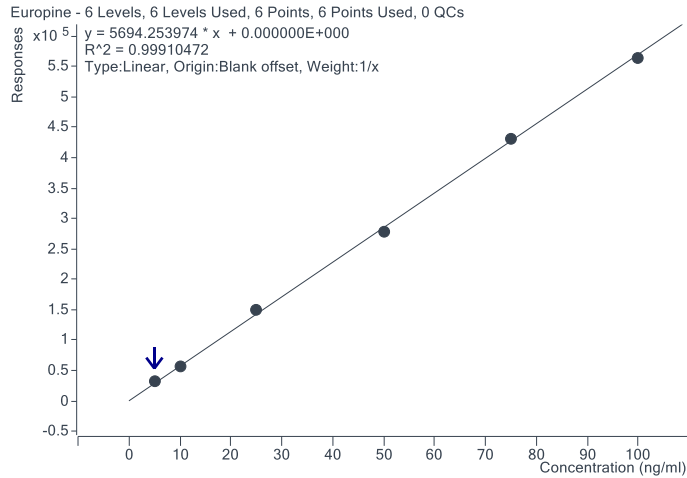
Pyrolizidinové alkaloidy v čajích

STD 5 ng/ml \approx 10 μ g/kg, 28 PA



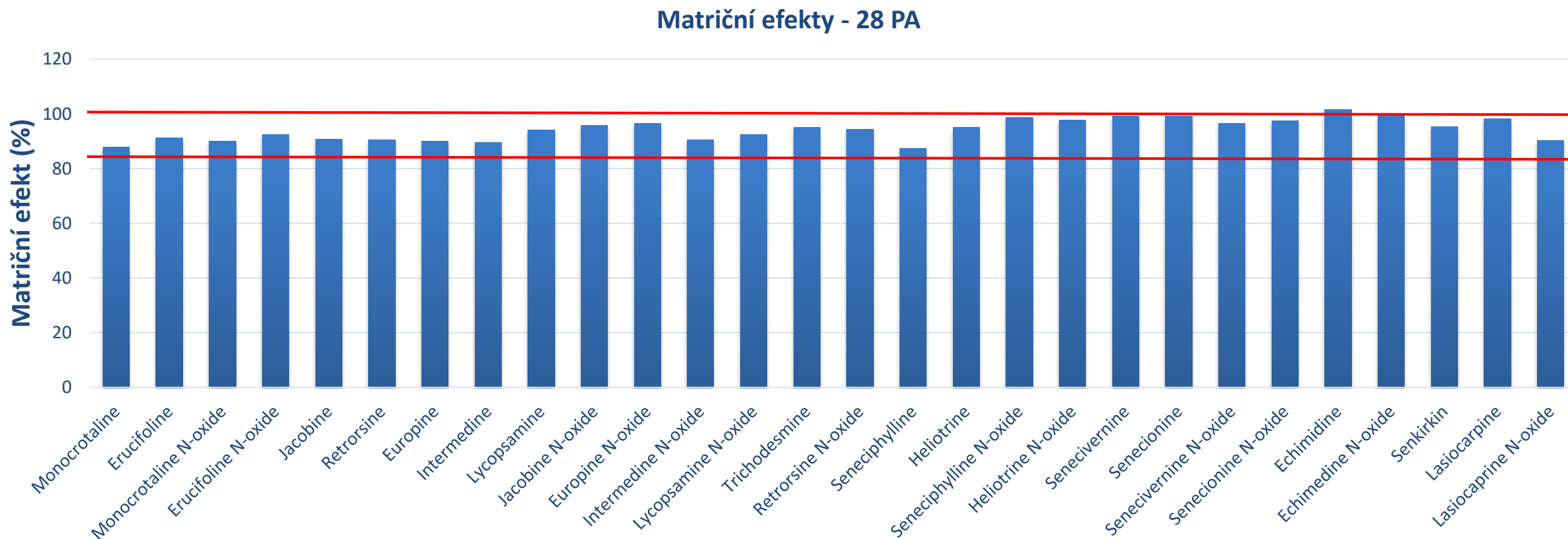
Pyrolizidinové alkaloidy v čajích

Kalibrace 5 – 100 ng/ml \approx 10 – 200 μ g/kg



Pyrolizidinové alkaloidy v čajích

- Neexistují izotopově značené IS, velké matriční efekty.
- Díky SPE přečištění je odezva v matici 85-100% odezvy v rozpouštědle.



LC/MS jde do rutinních laboratoří!

- Ultivo je nejmenší LC/MS trojitý kvadrupól.
 - **Potřebuje podobné místo jako normální HPLC.**
- Zcela nová iontová optika.
- Robustnost testovaná při vývoji i v praxi.
- Podle specifikace je IDL (LOD) ≈ 10 fg, lze v reálné analýze pro spousty analytů dosáhnout daleko lepší citlivosti!
 - **Ultivo měří s dobrou citlivostí i při přepínání polarity ionizace.**
- Excelentní stabilita poměru MRM přechodů i odezev analytů.
- Automatická kontrola spousty parametrů v MS.

Poděkování: Mgr. Pavel Hebelka a Ing. Marek Žeravík ze společnosti Dr. Müller Pharma za poskytnutí dat a konzultace.



Autorizovaný distributor
Agilent Technologies



Děkuji za pozornost...

Ondřej Lacina

Aplikační specialista (LC, LC/MS)

ondrej.lacina@hpst.cz

www.hpst.cz

