

**chromatografický systém Agilent Infinity 1290/1290 II s DAD detekcí
a hmotnostním spektrometrem Agilent 6460 QqQ**



HPLC / UPLC



1290 Infinity DAD detektor G4212A

diodové pole 1024 prvků
rychlost sběru dat 160 Hz
možnost sběru dat při 8 vlnových délkách
cela 10 mm
rozsah 190 - 640 nm



1290 Infinity kolonový termostat G1316C

dvě oddělené temperované zóny
teplotní rozsah 10 - 100°C



1290 Infinity II multisampler G71167B

tlakový rozsah až 1200 bar
externí oplach jehly
0,10 - 120 μ L
temperace od 4 - 40°C
108 pozic pro 2 mL vialky

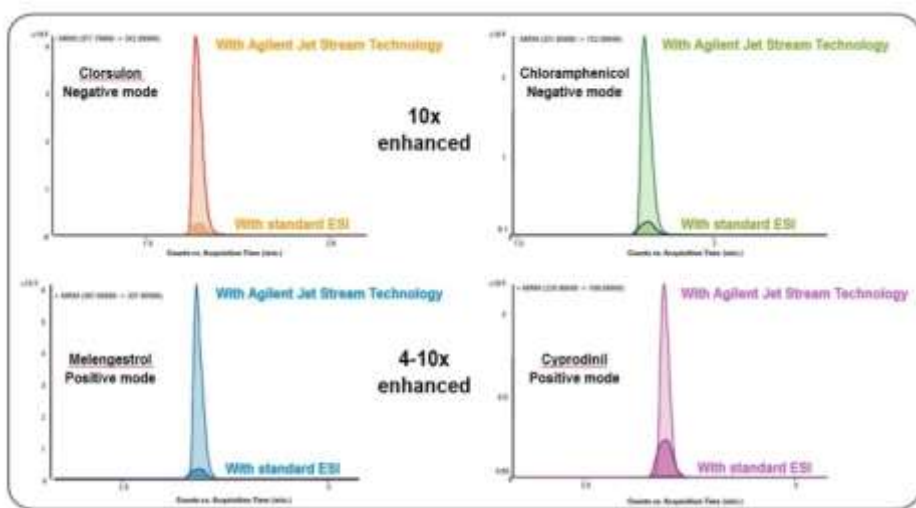
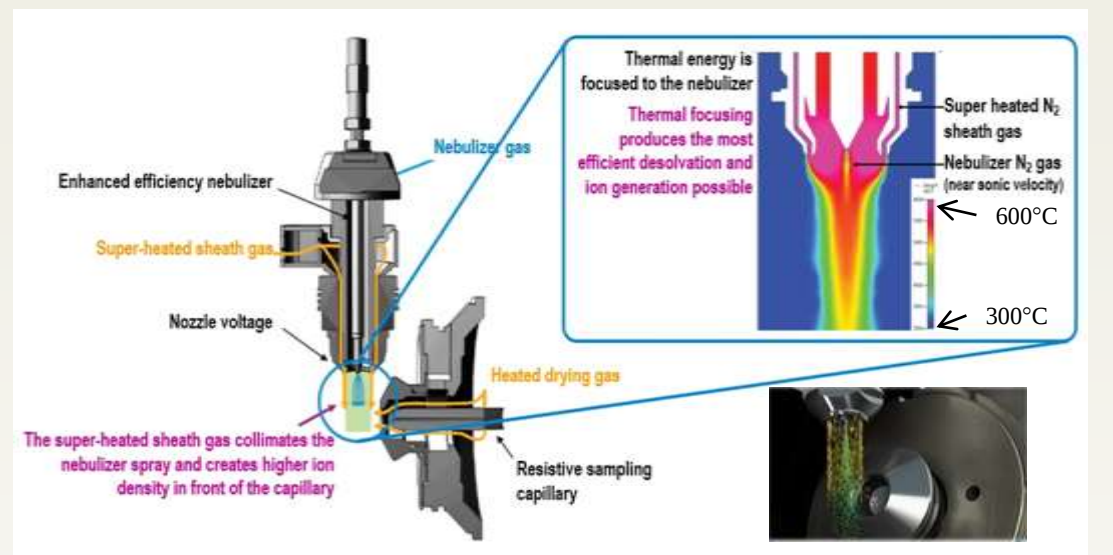


1290 Infinity II binární čerpadlo tlakové G7120A

rozsah 1200 bar do 2 mL/min
800 bar do 5 mL/min
rozsah průtoku MF 1 μ L - 5 mL/min
vysokotlaký binární mixer
vakuový čtyřkanálový degaser
selekční ventil- výběr složek MF ze 4 zásobníků
automatický a programovatelný oplach pístů
rozsah pH 1 - 12,5



Agilent Jet Stream (AJS) iontový zdroj



technologie AJS založena na tradičním Agilent ESI iontovém zdroji s orthogonálním uspořádáním, kromě zmlžovacího plynu okolo sprejovací kapiláry zaveden koaxiální proud přehřátého plynu → dochází k fokusaci termálním gradientem a efektivní desolvataci spreje, vzniká fokusovaná zóna bohatá na ionty přímo před vstupní kapilárou → asi desetinásobné zvýšení citlivosti v porovnání s tradičním elektrosprejem, lepší opakovatelnost a robustnost

porovnání citlivosti klasického elektrospreje a Agilent AJS iontového zdroje

ionizace elektrosprejem (ESI; Electro Spray Ionization)

měkká ionizační technika, k ionizaci dochází pomocí vysokého napětí (2 – 5 kV) za atmosférického tlaku

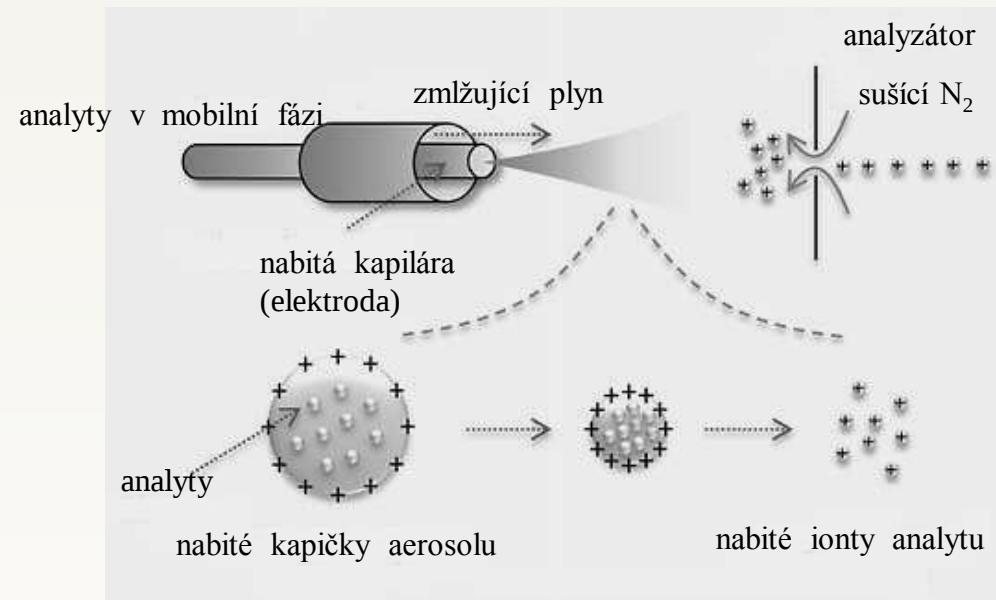
do kapiláry vstupují analyty v mobilní fázi,

aplikace silného elektrického pole na elektrodu → **vznik nabitých kapiček** – aerosolu na hrotu elektrody, (tvorba aerosolu podporována koaxiálně proudícím zmlžujícím plynem)

rozpuštědlo z nabitých **kapiček rychle odpařeno** proudem plynu o zvýšené teplotě (sušící plyn)

→ **zvýšení povrchového náboje**,

→ souhlasně nabitý náboje se odpuzují → **překonání povrchového napětí** → exploze nabitých kapiček, **uvolnění iontů z povrchu kapiček do plynné fáze**



nevýhoda - **potlačení tvorby iontů analytu (ion suppression)**

tj. ve stejném okamžiku vznikají **konkurenční ionty** ze složek vzorku přítomných ve vysoké koncentraci

eliminace jevu:

separaci cílových analytů od složek snižujících iontový výtěžek **na LC-koloně** a současně

použití **interních standardů** značených **stabilními izotopy**

tandemový hmotnostní spektrometr s analyzátořem typu QqQ Agilent 6460 CA a detektorem na principu elektronového násobiče



"vyšší střední třída" portfolio řady 6400
díky technologii AJS má dosahovat mezí detekce na úrovni desítek femtogramů i ve složitých maticích →
ideální pro rutinní aplikace ultrastopové analýzy

rozsah měření hmot 5 až 3000 amu (pro oba Q)
doba přepínání polarity během měření max 30 msec
minimální doba měření přechodu 1 ms
rychlost scanu 12500 amu/s
rychlost čištění kolizní cely < 1 ms
MRM přechodů v jedné analýze > 40000
dynamických přechodů v jedné metodě 4000
dynamický rozsah $6 \cdot 10^6$

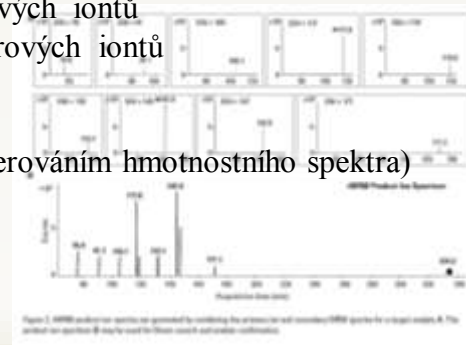
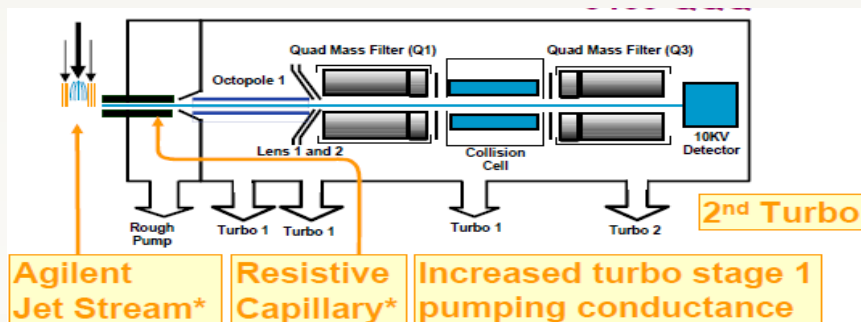


automatické ladění (tune)
automatická optimalizace MRM metody
automatická optimalizace iotového zdroje

systém umožňuje:

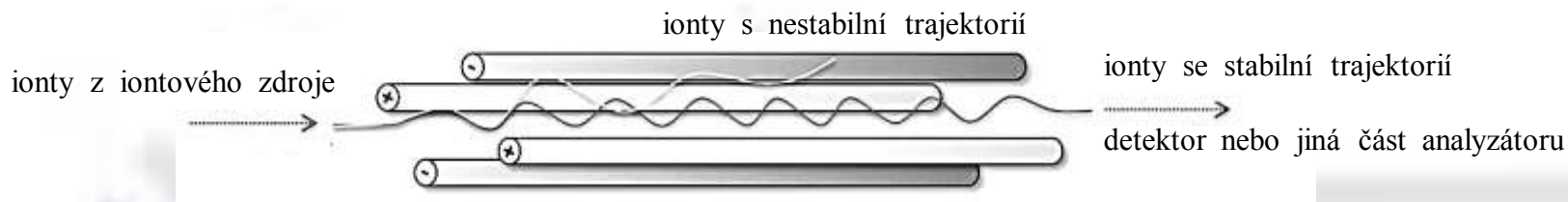
MS SCAN
MS SIM
MS/MS MRM
MS/MS neutrální ztráty
MS/MS sken produktových iontů
MS/MS sken prekurzorových iontů
dynamický MRM
triggered MRM

(kombinace MRM metody s generováním hmotnostního spektra)



softwarové vybavení - MassHunter

kvadrupól → selekce iontů dle poměru m/z v plynné fázi za vakua na základě stability oscilace iontů



čtyři paralelních tyče kruhového nebo hyperbolického průřezu,

na které je přivedena kombinace střídavého a stejnosměrného napětí,

protilehlé elektrody mají stejnou polaritu,

z iontového zdroje vstupující ionty oscilují,

ionty s určitou hodnotou m/z se pohybují po stabilní trajektorii směrem k detektoru na základě

velikosti stejnosměrného napětí a amplitudy střídavého napětí v daném okamžiku,

ionty s nestabilní trajektorií jsou vychýleny a zachyceny na tyčích

analyzátor pracuje v režimech:

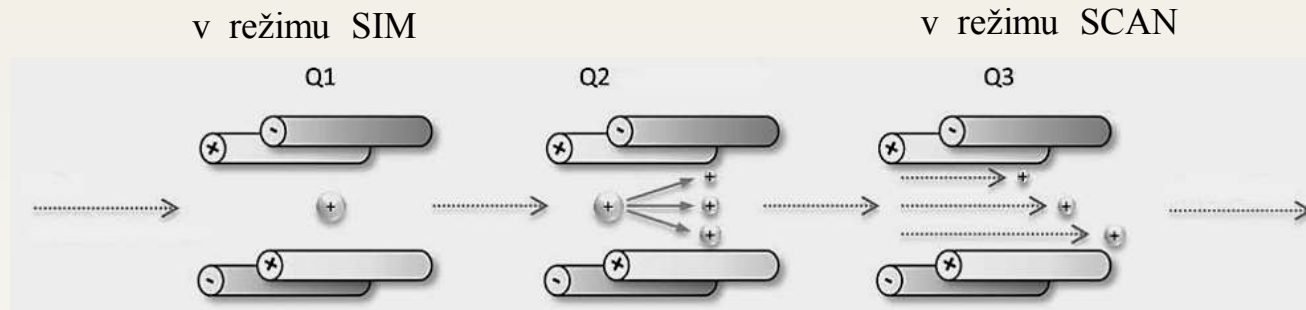
SCAN elektrické pole se kontinuálně mění

→ proměřeny všechny hodnoty m/z → kvadrupól propustí na detektor všechny ionty → *celkové hmotnostní spek.*

SIM (Selected Ion Monitoring) elektrické pole se nastaví tak, aby procházely ionty se zvolenou hodnotou m/z

→ kvadrupól propustí pouze ionty se zvoleným m/z – *kvantitativní stanovení analytu se známou chem. strukturou*

trojitý kvadrupól



Q2 kolizní cela - kolizně indukovaná disociace (CID)

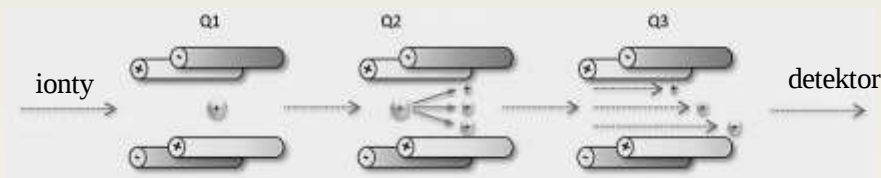
do Q2 přiváděn kolizní plyn (N_2 , Ar)

zvýšení tlaku a urychlení iontu elektrickým polem $\longrightarrow$ kolize iontu s atomy kolizního plynu $\longrightarrow$

roste vnitřní energie iontu $\longrightarrow$ fragmentace $\longrightarrow$ specifické produktové ionty do Q3

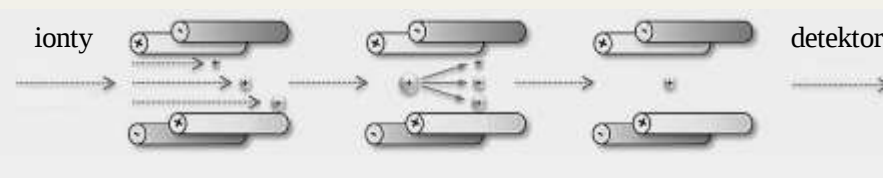
- Q1 propouští iont s definovanou hodnotou m/z
- Q2 fragmentace definovaného iontu
- Q3 v režimu skenování v definovaném rozsahu hodnot m/z
 - fragmenty zaznamenány detektorem
 - informace o fragmentaci vybraného iontu
 - identifikace látek nebo
 - určení přechodů vhodných pro kvantifikaci

sken produktových iontů



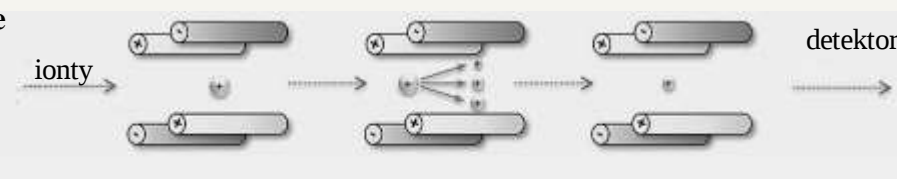
- Q1 v režimu skenování v definovaném rozsahu hodnot m/z
- Q2 fragmentace iontů se zvyšující se hodnotou m/z
- Q3 do detektoru propouští pouze jeden specifický fragment
 - detekce vybrané funkční skupiny, detekce látek s podobnou funkční skupinou s typickou fragmentací

sken prekurzorových iontů



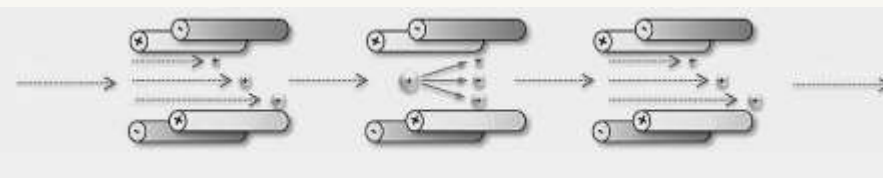
- Q1 propouští iont s definovanou hodnotou m/z (prekurzorový)
- Q2 fragmentace definovaného iontu za **optimální kolizní energie pro vznik nejintenzivnějšího produktu** (produktový iont)
- Q3 projde iont (produktový) s definovanou hodnotou m/z
 - kvantifikace

SRM (MRM) sledování rozpadu iontů



- Q1 a Q3 skenují ionty s konstantním rozdílem hodnot m/z , který představuje neutrální fragment vzniklý v Q2
 - detekce látek se stejnou funkční skupinou

sken neutrální ztráty



pár hodnot m/z odpovídající prekurzorovému a produktovému iontu
 tj. **iontový přechod** výběr vhodné kombinace prekurzorových
 a produktových iontů → vysoká selektivita → kvantitativní analýza

SRM
MRM

Selected Reaction Monitoring
Multiple reaction Monitoring

pracovní itinerář

příprava zásobních roztoků každého analytu v CH₃OH 1 g/L

příprava standardního směsného roztoku 1 µg/L v UPW

metoda ladění ESI+

metoda ladění ESI-

obecný gradient, separační kolona (2.1 x 50 mm; 1,8 µm)

automatická optimalizace MRM metody

(prekurzorové ionty, produktové ionty, kolizní energie, napětí na konci rezistivní kapiláry, gradient napětí v kolizi cele)

vyhodnocení výsledků ladění v programu Quolity

převedení výsledků optimálních výsledků ladění do MRM metody

vývoj MRM metody na požadované koloně z hlediska účinnosti separace (složky mobilní fáze, gradient, ...)

automatická optimalizace iontového zdroje

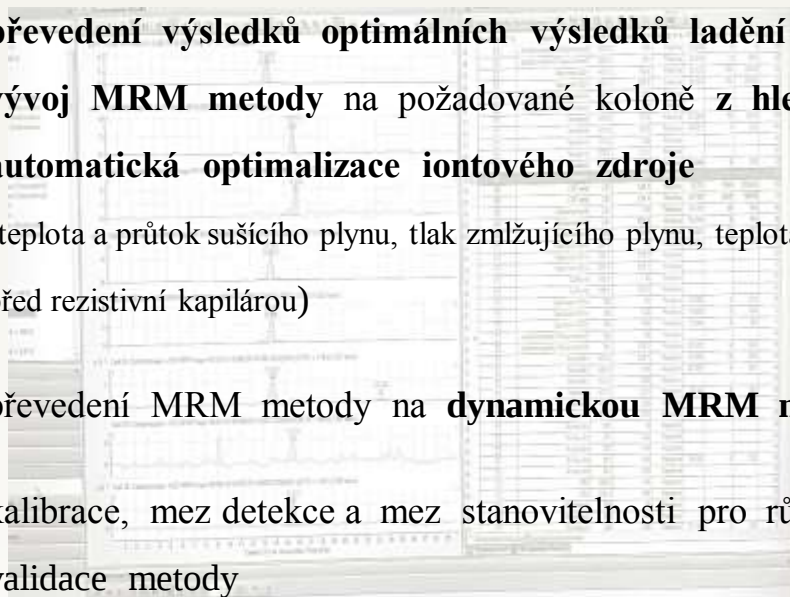
(teplota a průtok sušícího plynu, tlak zmlžujícího plynu, teplota a průtok přehřátého plynu, napětí na hrotu zmlžující kapiláry, napětí

před rezistivní kapilárou)

převedení MRM metody na dynamickou MRM metodu

kalibrace, mez detekce a mez stanovitelnosti pro různé matrice, přístrojová mez detekce

validace metody



analyzované matrice / cílové analyty

analýza různých druhů vod z hlediska identifikace a **především kvantifikace** polutantů
(v původní formě nebo ve formě některých jejich transformačních produktů)

ze skupin organických látek:

léčivé látky (nesteroidní antirevmatika, antiepileptika, cytostatika),

steroidní látky (anti/estrogeny, anti/androgeny),

náhradní sladidla,

jodované kontrastní látky,

možnými cílovými analyty jsou **antiparkinsonika** či **inhibitory cholinesterázy**

dizertační práce

bakalářská práce

diplomová / dizertační práce

diplomová práce

diplomová práce

účinnost eliminace vybraných jodovaných kontrastních látek po ozonizaci

kvantitativní stanovení vybraných estrogenů, androgenů a antiandrogenů

účinnost biotransformace vybraných léčivých látek mikroorganismy

účinnost eliminace vybraných léčivých látek membránovými procesy

účinnost eliminace vybraných léčivých látek fytořemediací



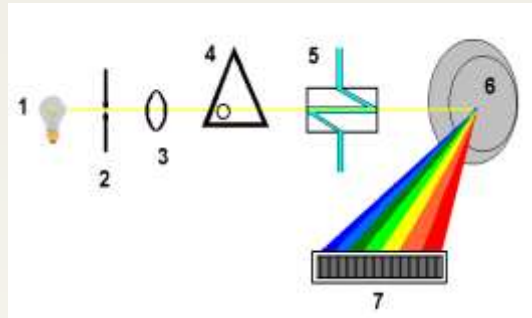
DĚKUJI ZA POZORNOST



stanovení cílových analytů - instrumentální analytická koncovka

detekce DAD

DAD detektory celé spektrum v reálném čase

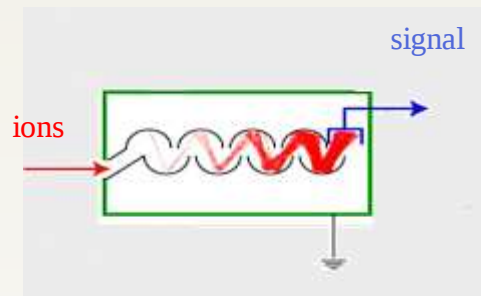


- záření ze zdroje (1) (deuteriová výbojka) prošle štěrbinou (2), čočkou (3), clonou (4), měrnou celou (5), se spektrálně rozkládá holografickou mřížkou (6)
=> na každou fotodiodu (7) dopadá zářivý tok Φ o určité λ zeslabený absorpcí v cele
- každá fotodioda spojena s předem nabitým kondenzátorem, po dopadu záření na fotodiodu vznikající **fotoelektrický proud** kondenzátor vybije - **úměrné intenzitě dopadajícího záření**,
v další fázi se kondenzátor dobíjí a **měří se proud potřebný na dobítí**
- sequence vybití / nabití se rychle opakuje (10 ms/ 190 – 600 nm) =>
údaje o A při každé λ v každém okamžiku

po selekci v hmotnostním analyzátoru ionty dopadají do detektoru → detektor generuje signál

elektronový násobič

ionty dopadají na dynodu, ze které vyrazí 1 až 2 elektrony,
elektrony jsou zesíleny systémem dynod,
zesílení až $10^8 \times$



chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)

pro širokou oblast středně polárních i nepochárních tčkavých analytů s $M < 1\,500$,

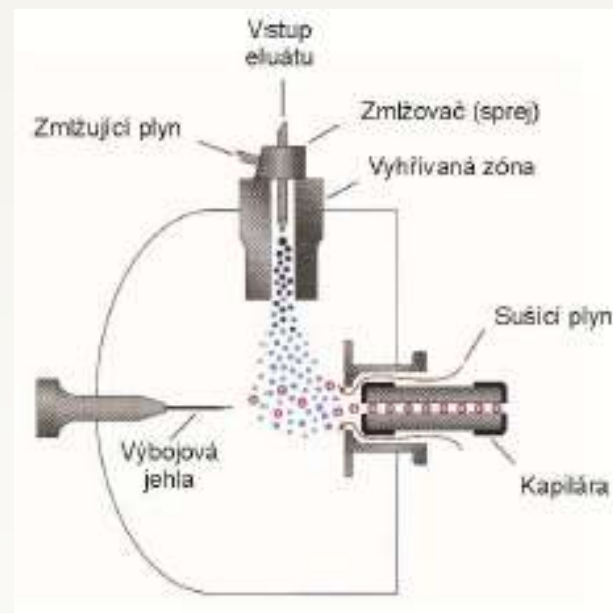
nevhodná pro nestabilní analyty

ve vyhřáté komoře zmlženy cílové analyty i MF zmlženy,

na výbojovou jehlu vloženo vysoké napětí → koronový výboj ionizuje molekuly MF a

následně molekuly analytu ion - molekulárními reakcemi s reakčním plynem,

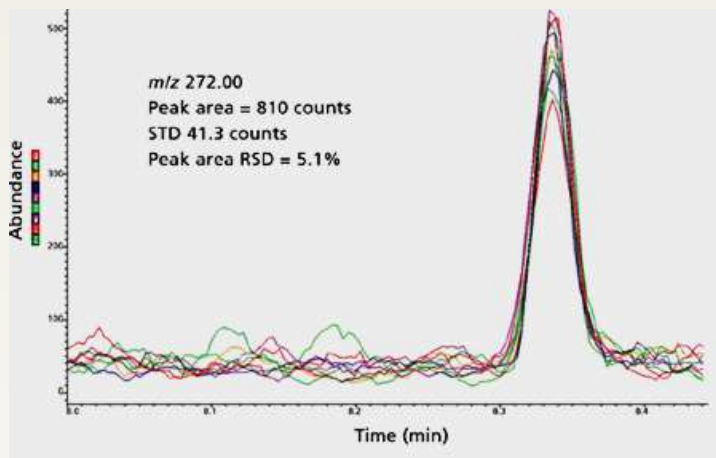
vzniklé ionty elektrodami usměrněny do hmotnostního analyzátoru



U.S. EPA **předepisuje** pro odhad IDL a MDL statistický přístup

Ústřední věstník Evropského společenství (Rozhodnutí komise ze dne 12. srpna 2002, Prováděcí směrnice Rady 96/23/ES) o provádění analytických metod a interpretaci výsledků **předepisuje**

běžný standard pro stanovení IDL a MDL používaný v Evropě



oba postupy identické:

8 nástříků roztoku standardu

200 fg standardu v objemu nástříku, tj. 200 fg na kolonu

8 elučních křivek v jednom záznamu

$(n - 1)$ stupňů volnosti = 7

na 99% hladině spolehlivosti = 2,999 kritická hodnota

Studentova rozdělení

IDL = (relativní směrodatná odchylka plochy píku získaná z 8 měření / 100) · 2,999 · nástříkové množství standardu

$$\text{IDL} = (5,1 / 100) \cdot 2,999 \cdot 200 = 31 \text{ fg}$$

→ s 99% pravděpodobností je množství analytu vyšší nebo rovno 31 fg
odlišitelné od základní linie chromatografického systému (detegovatelné)

IDL [ng/L] matrice: pitná voda

EE2	0,78
17β-E2	0,20
E3	0,17
E1	0,04

