Kvantitativní analýza v hmotnostní spektrometrii a LC/MS

Úvod do kvantitativní hmotnostní spektrometrie

1/ Co je cílem kvantitativní analýzy?

- Zjistit **přesnou a správnou koncentraci stanovované sloučeniny**.

2/ Jaké výhody přináší hmotnostní spektrometrie (MS)?

- **Velká citlivost a selektivita** (nutná správná kalibrace a naladění přístroje).

3/ Má MS i nějaké nevýhody pro kvantitativní analýzu?

- **Matriční efekty** – ionizační účinnost v iontovém zdroji i další faktory (transmise iontů, odezva detektoru) nejsou konstantní za různých podmínek a v různém čase a je naprosto nezbytné to zohlednit (=korigovat) při kvantitativní analýze pomocí MS.
- Iontový zdroj je „chemický reaktor“. Nikdy nelze spoléhat na to, že podmínky ionizace budou v jinou dobu a za jiných podmínek stejné nebo podobné.

a proto:

… **Použití interního standardu je pro kvantitativní analýzu v hmotnostní spektrometrii nezbytné.**

Kvantitativní analýza v analytické chemii

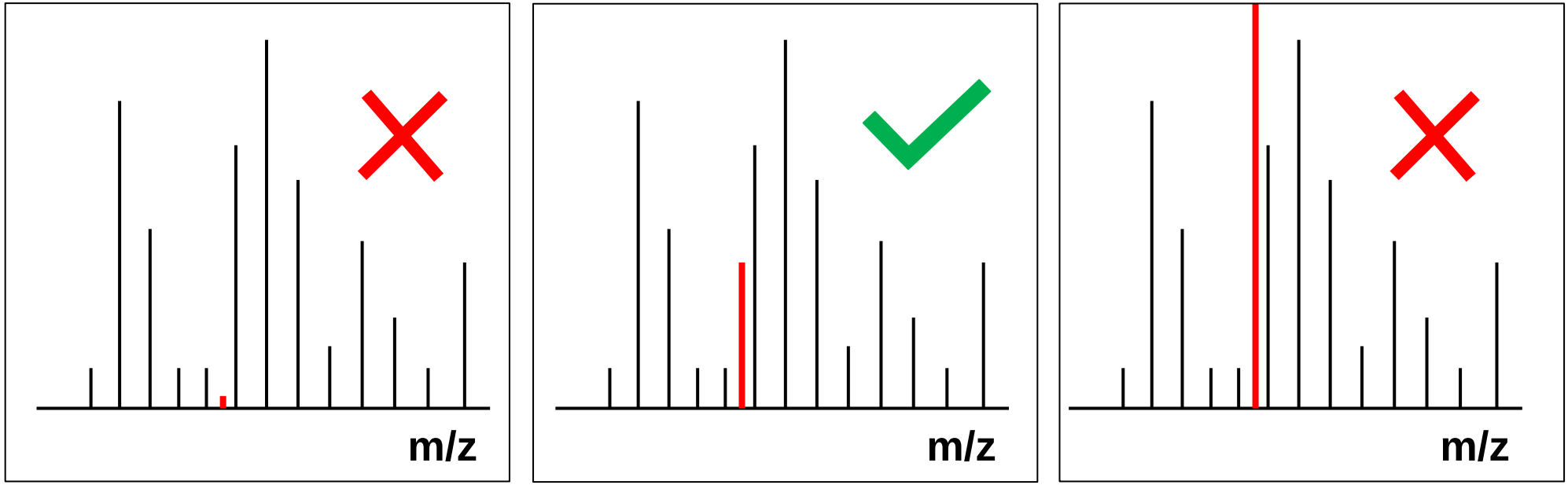
- **Metoda kalibrační křivky s vnějším standardem** – pro MS není vhodné, protože IS není ionizován ve stejnou dobu
- **Kalibrační křivka s využitím standardních přídavků** – v MS méně časté, musí být ověřen dostatečný lineární dynamický rozsah (standardní přídavek může také změnit potlačení odezvy)
- **Metoda kalibrační křivky s vnitřním IS** – pro MS považováno za nejvýhodnější, zejména ve spojení **s izotopicky značeným IS**

- **Koncentrace** může být stanovena jako **absolutní** (molární – mol/l, hmotnostní – např. ng/ml apod.) nebo **relativní** (% - sledujeme relativní změnu mezi dvěma experimenty nebo typy vzorků (často v proteomice, metabolomice), zastoupení sloučeniny v rámci celé třídy např. FA_1 / ∑všech FA apod.)

- prioritní z pohledu biologické interpretace je absolutní koncentrace
- relativní lze snadno dopočítat, pro velmi zjednodušenou kvantitu se u některých přístupů počítají relativní % i bez použití IS (v MS používat jen s velkou opatrností není-li možné použít lepší postup – nutné tento postup validovat)

Internal standard concentration

- Optimalizace – Intenzita IS musí být representativní v rámci očekávaných koncentrací



$$c_x = \frac{I_x}{I_{IS}} \times cIS$$

!!! Koncentrace IS je nutné optimalizovat pro každý typ analyzované vzorku (matrice)

Kvantitativní analýza v hmotnostní spektrometrii

- **Zásadní význam mají i všechny kroky předcházející vlastní kvantifikaci a také správné nastavení experimentu, jako např.:**

- **Zpracování vzorku** – dobře přečištěný extrakt obsahuje menší množství kontaminantů, sníží se problémy s matričními efekty, snížením kontaminace přístroje se může výrazně zvýšit robustnost metody (problémy v kvantitativní analýze často pochází ze špatné přípravy vzorku)
- **Optimalizace podmínek LC/MS** (průtoky plynů, teplota, ionizační a transmisní napětí, poloha ESI jehly atd.) **či MS/MS** (kolizní napětí, šířka izolačního okna) – důslednou optimalizací můžeme výrazně zvýšit citlivost metody, selektivitu, propustnost vzorků, robustnost, atd.
- **Randomizace pořadí vzorků pro extrakci i analýzu** (v případě větších studií)
- **Validace metody a pravidelné použití vzorků pro kontrolu kvality**

Interní standard (IS) v MS kvantitativní analýze

- **Volba IS – zcela zásadní otázka pro spolehlivou kvantifikaci**
  - **Izotopicky značený IS** – nejlepší možná volba, protože má identické chemicko-fyzikální vlastnosti jako analyt, pouze hodnoty m/z se liší podle počtu izotopicky značených atomů, což jde MS snadno rozlišit
  - **Exogenní IS pro danou třídu látek** (např. kratší mastná kyselina v případě lipidů apod. IS nesmí být přítomen ve vzorku) – v některých případech (např. lipidomika či jiné omické přístupy) je technicky nemožné získat IS pro všechny analyty, proto se volí alespoň 1 či více IS pro každou třídu stanovovaných sloučenin (nutné ověřit, že ionizační účinnost uvnitř třídy se příliš neliší, popř. vypočítat a použít **odezvové faktory**)
  - **Strukturně podobný IS** – pokud je nemožné či obtížné (např. izotopicky značený IS je komerčně nedostupný, nepřijatelně drahý nebo jeho syntéza příliš komplikovaná), tak se jako alternativní řešení může zvolit strukturní analog (měl by mít alespoň stejné funkční skupiny), je to nejméně vhodný postup, mohou být rozdíly v ionizační či extrakční účinnost, použít jen v případě nemožnosti lepšího postupu a pečlivě validovat.

Izotopicky značené IS v MS kvantitativní analýze

- **Izotopicky značený IS – vhodně zvolit způsob značení**
  - **Příliš velký hmotnostní posun (>6-8)** – může vést k částečné či úplné chromatografické separaci (zejména pro moderní vysokorozlišující UHPLC/UHPSFC systémy), což je nežádoucí (matriční efekt se může pro různé retenční časy lišit)
  - **Příliš malý hmotnostní posun (<4)** – může pro některé sloučeniny (zejména s vyšší M_R či složitější izotopickou distribucí, např. přítomnost halogenů) znamenat překryv izotopických distribucí a nutnost izotopické korekce (v lipidomice většinou nevyhnutelné)
  - **Posun 4-6 je obvykle optimální** (závisí na struktuře, izotopické obálce a použité MS metodě)
  - **Deuterace** – nejpoužívanější, nejlevnější, ale nutno počítat s možnou migrací D/H při fragmentaci v závislosti na poloze značení a struktuře
  - **^{13}C značení** – stabilní značení, kde nehrozí migrace jako u D/H, ale méně používané kvůli složitosti syntézy a vyšší ceně

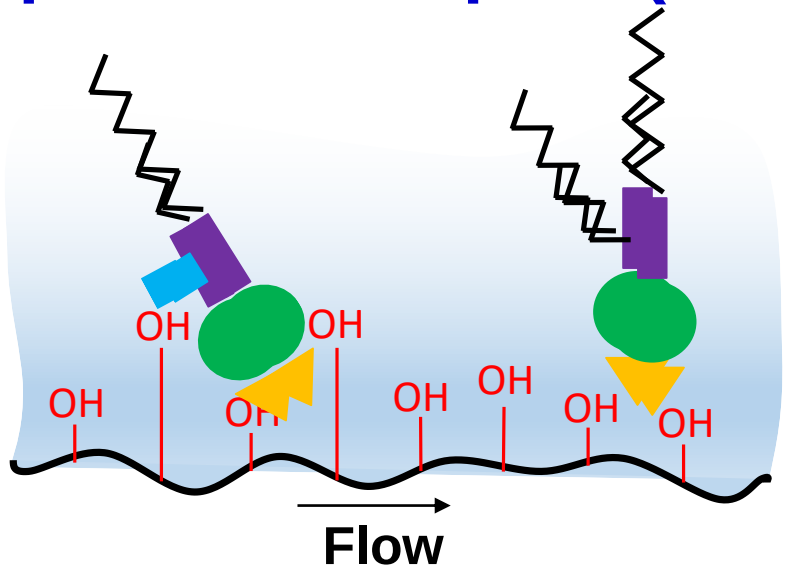
Interní standard (IS) v MS kvantitativní analýze

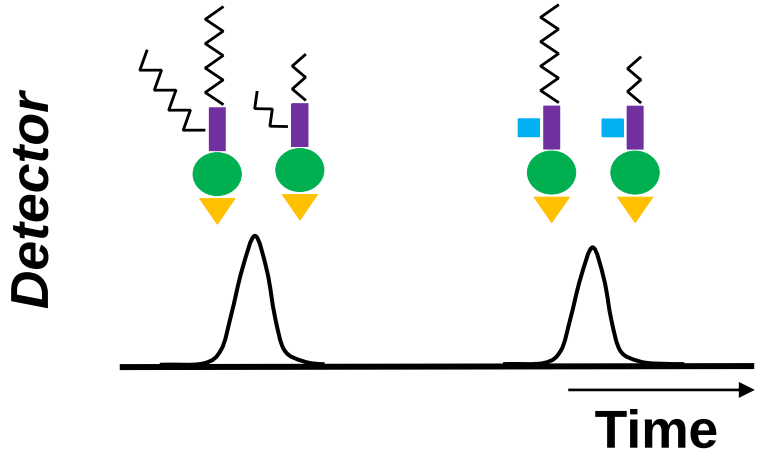
- **Koionizace IS a analytu** – ideální situace pro kvantitu je, pokud IS a analyt jsou ionizovány ve stejný moment (koionizace), tedy za absolutně identických podmínek (=shodný matriční efekt)
  - Automaticky zajištěno pro všechny **přístupy bez chromatografické separace** (přímá infúze vzorku, MALDI, ambientní techniky, atd.), nutné vysoké rozlišení hmotnostního analyzátoru pro rozlišení izobarických sloučenin. Matriční efekt bývá velký (všechny ionty jsou ve zdroji v jeden čas)
  - Vhodná alternativa je **separace podle tříd jednotlivých látek** koeluujících v jednom píku s maximálním potlačením dílčí separace v rámci třídy, např. HILIC nebo normální fáze
  - **Velká opatrnost v případě použití RPLC** (popř. 2D-LC, iontové mobility, apod.), kde je třeba volit větší počet IS pokrývající celé retenční okno pro studované analyty, aby bylo možné sledovat matricové efekty po celou dobu analýzy

- **IS musí být přidán před prvním krokem zpracování vzorku** - kompenzace všech možných experimentálních chyb

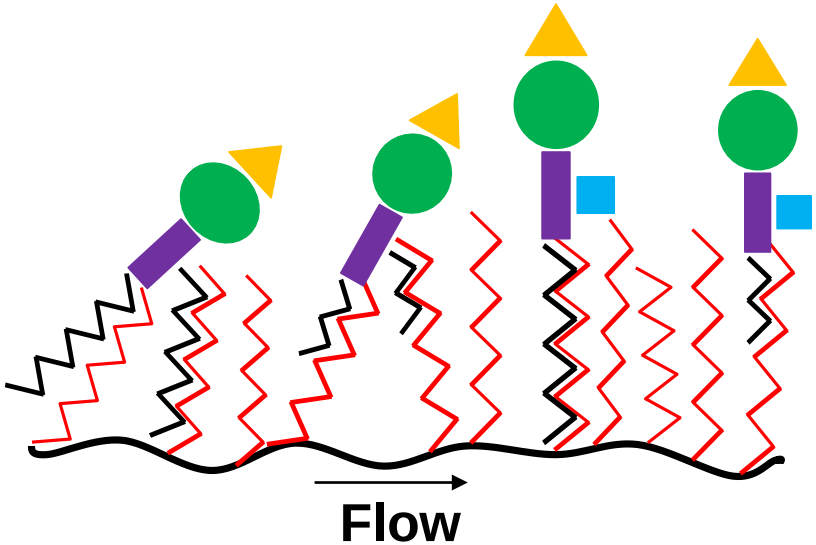
HILIC vs. RP separace v lipidomice

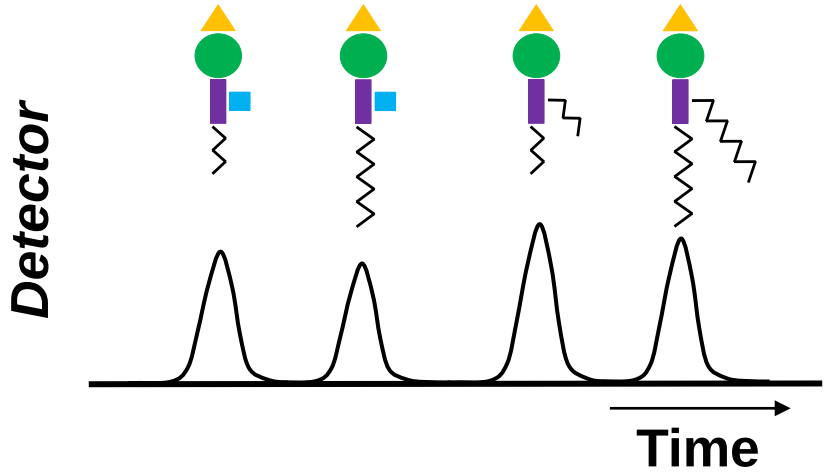
Separace tříd lipidů (HILIC)





Separace individuálních lipidů (RP)

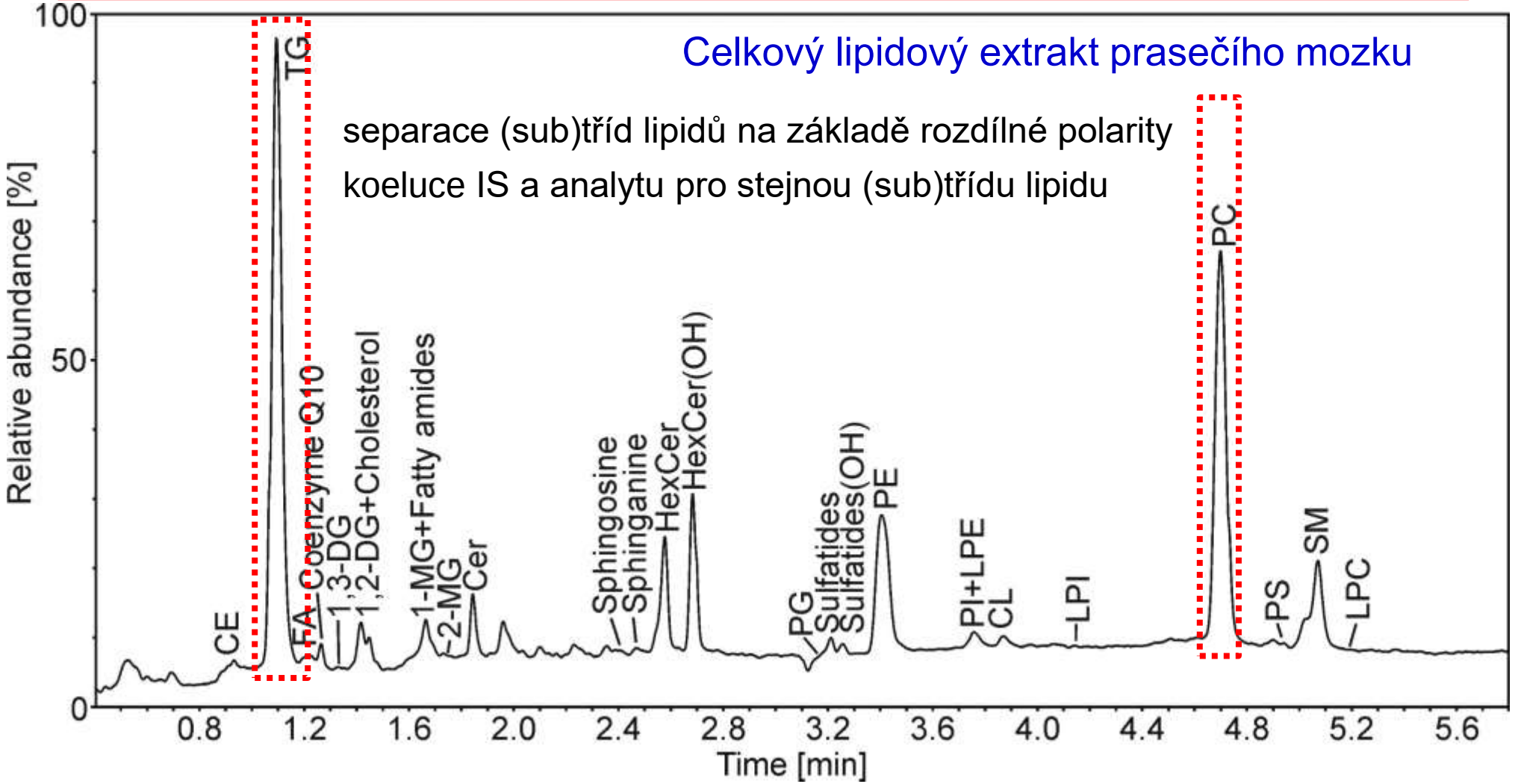




HILIC vs. RP separace v lipidomice

Mód (příklad)	Výhody	Nevýhody
Separace tříd (HILIC/MS, SFC/MS)	• **Koeluce IS a analytu** – lepší kvantita • Zjednodušená identifikace a procesování dat	• **Pouze sumární vzorec s CN a DB číslem**
Separace individuálních lipidů (RP, 2D-LC/MS)	• **Separace izomerů** – detekce cca 2-3 více lipidů v porovnání s HILIC	• **Náročnější kvantita** – potřeba více IS (dražší) • **náročnější identifikace**

Separace podle tříd: HILIC mód v UHPSFC/MS



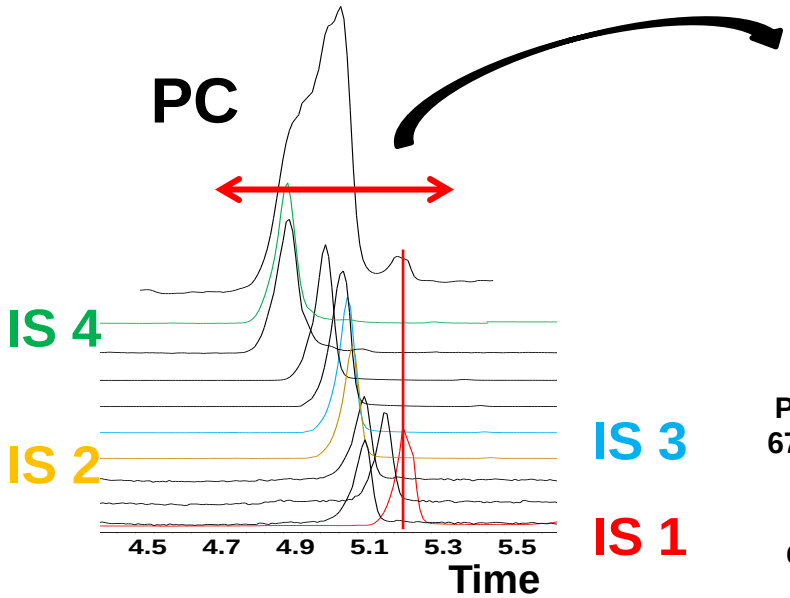
- ***Podmínky:*** *kolona Acquity BEH UPC2 (100x3 mm, 1.7 µm, Waters), ESI-MS, 60°C, super(sub)kritický CO_2 + modifikátor MeOH/H_2O (99:1) + 30 mM octan amonný*

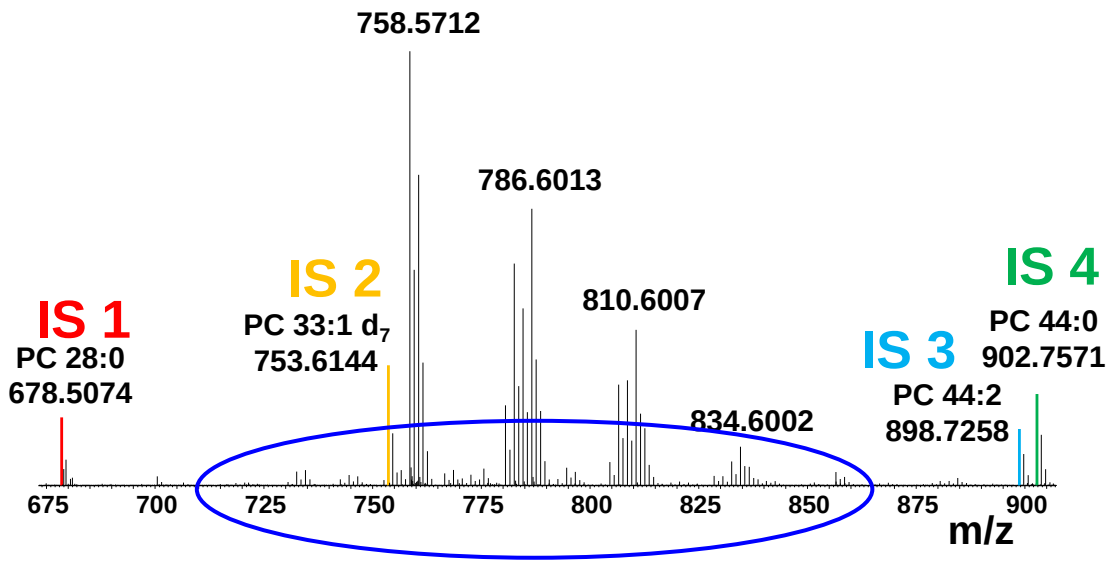
M. Lísa, M. Holčapek, Anal. Chem. 87 (2015) 7187

Kvantifikace - separace tříd (např. lipidy)

1. UHPLC/MS – základní sken

2. MS spektrum třídy lipidů (všechny PC, izomery nerozlišeny)





- Použití **1 IS na každou třídu** je minimum, lepší více IS (nonendogenous lipids – izotopicky značené - deuterované, kratší nebo delší acyly – musí být exogenní)
- IS musí být do vzorku **přidán před přípravou vzorku**
- **Koeluce IS a analytu** (potlačení matričních efektů)

Využití odezvových faktorů pro zlepšení kvantity

- Rovnice kalibrační křivky:

y = **a**.x + b

- Odezvový faktor (RF) je poměr směrnice zvoleného standardu, pro který je zvolen faktor 1.00, ku směrnici analytu
- RF(TG)=a(OOO)/a(TG), kde a – směrnice kalibrační křivky, TG – triacylglycerol, OOO – triolein jako zvolený standard (RF=1.00)

CN:DB	TG	UV	APCI	ELSD
C14:0	MMM	16.8	2.03	0.24
C16:1	PoPoPo	0.77	1.38	0.78
C16:0	PPP	15.4	1.23	0.20
C17:0	MaMaMa	12.8	1.04	0.22
C18:3	LnLnLn	0.10	0.49	1.10
C18:2	LLL	0.19	0.69	1.21
C18:1	OOO	1.00	1.00	1.00
C18:0	SSS	24.6	0.77	0.22
mixed	OPP	1.83	1.11	-
mixed	POP	1.51	1.09	-
mixed	OPO	1.37	1.06	-
mixed	OOP	1.06	1.00	-
DG	OO	0.89	2.42	1.01
MG	O	0.66	14.2	2.22

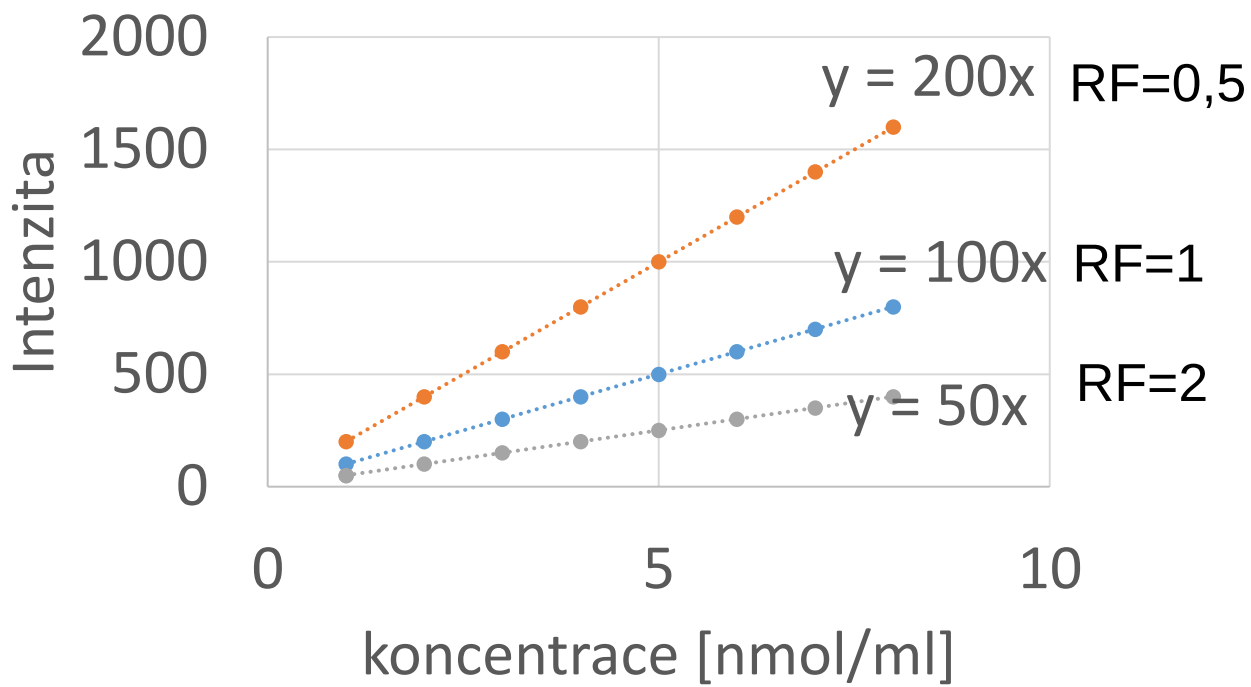
Využití odezvových faktorů pro zlepšení kvantity

- Rovnice kalibrační křivky:

y = **a**.x + b

- Odezvový faktor (RF) je poměr směrnice zvoleného standardu, pro který je zvolen faktor 1.00, ku směrnici analytu

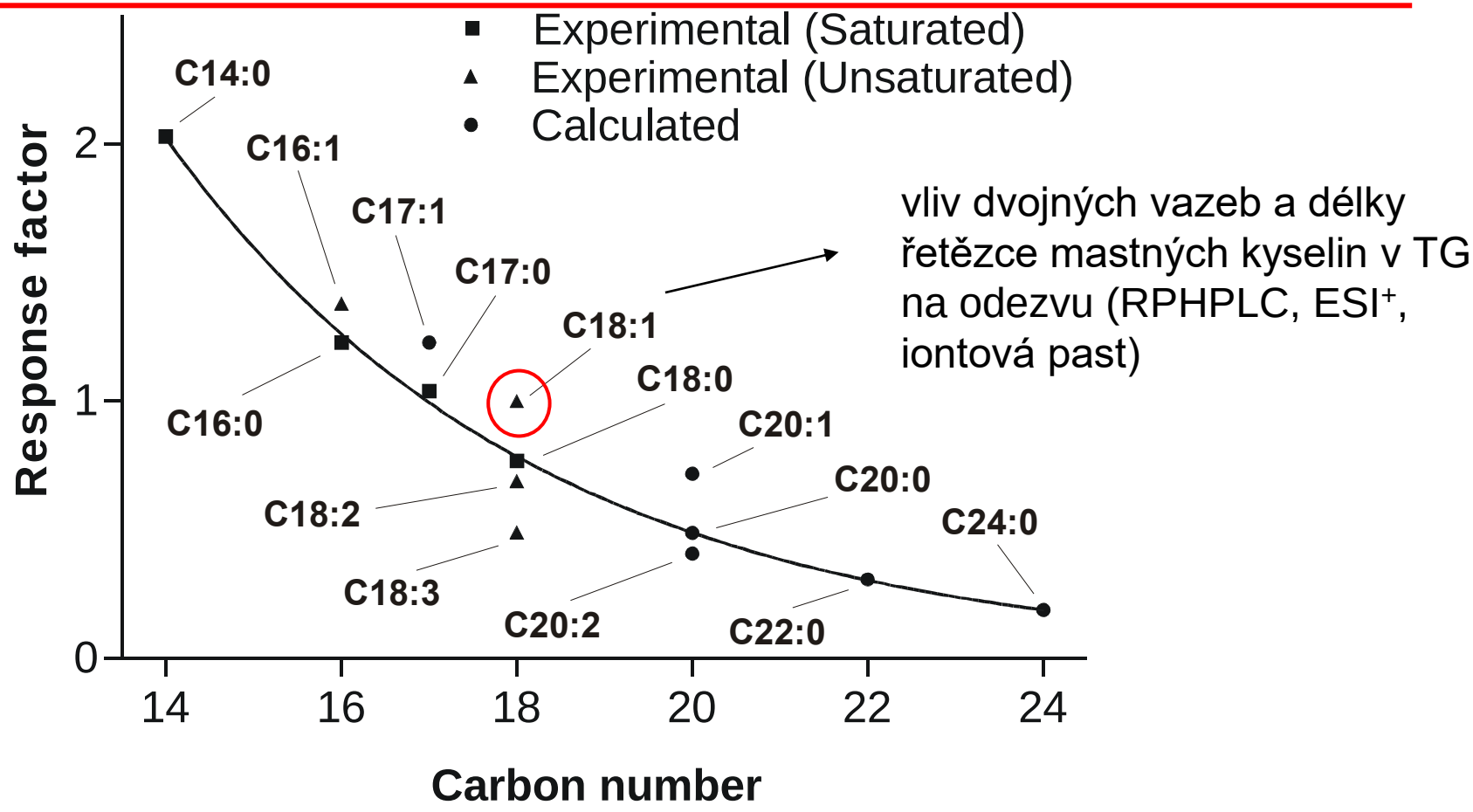
- RF(TG)=a(OOO)/a(TG), kde a – směrnice kalibrační křivky, TG – triacylglycerol, OOO – triolein jako zvolený standard (RF=1.00)



$$C_{(TG)} = \frac{INT_{(TG)} \cdot C_{(IS\ pro\ OOO)} \cdot RF}{INT_{(IS\ pro\ OOO)}}$$

Předpoklad, že IS pro OOO (např. deuterovaný) má podobné chování jako OOO

Využití odezvových faktorů pro zlepšení kvantity



- Použití odezvových faktorů může zlepšit přesnost kvantity, když nemáme dostatek IS pokrývající různé chemicko-fyzikální vlastnosti molekul v rámci studované třídy látek

M. Holčapek, M. Lísa, P. Jandera, N. Kabátová, J. Sep. Sci. 28 (2005) 1315

Validace metody

- **Validace = prokázání vhodnosti použitého postupu a daného systému pro zamýšlené použití a pro získání relevantních dat**
- **Nezbytností většiny vyvíjených analytických metod**
- **V souladu s vhodnými doporučení s ohledem na specifikace daného oboru**

European Medicines Agency (EMA)
Food and Drug Administration (FDA)
International Conference for Harmonization (ICH)
Association of Official Analytical Chemists (AOAC)
American Society for Testing and Material (ASTM)
Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling (CCMAS)
Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry (CITAC)
Environmental Protection Agency (EPA)
European Analytical Chemistry Group (EURACHEM)
European Committee for Normalization (CEN)
European Cooperation for Accreditation (EA)
Food and Agricultural Organization (FAO)
International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC)
International Organization for Standardization (ISO)
International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)
World Health Organization (WHO)

Validace MS kvantitativní metody

- V souladu s vhodnými doporučení (např. FDA, EMA) a také s ohledem na zvyklosti daného oboru. Nutné zhodnotit, které parametry jsou důležité (v každém oboru jsou různá doporučení – farmaceutický průmysl, environmentální analýza, proteomika, metabolomika, atd.)

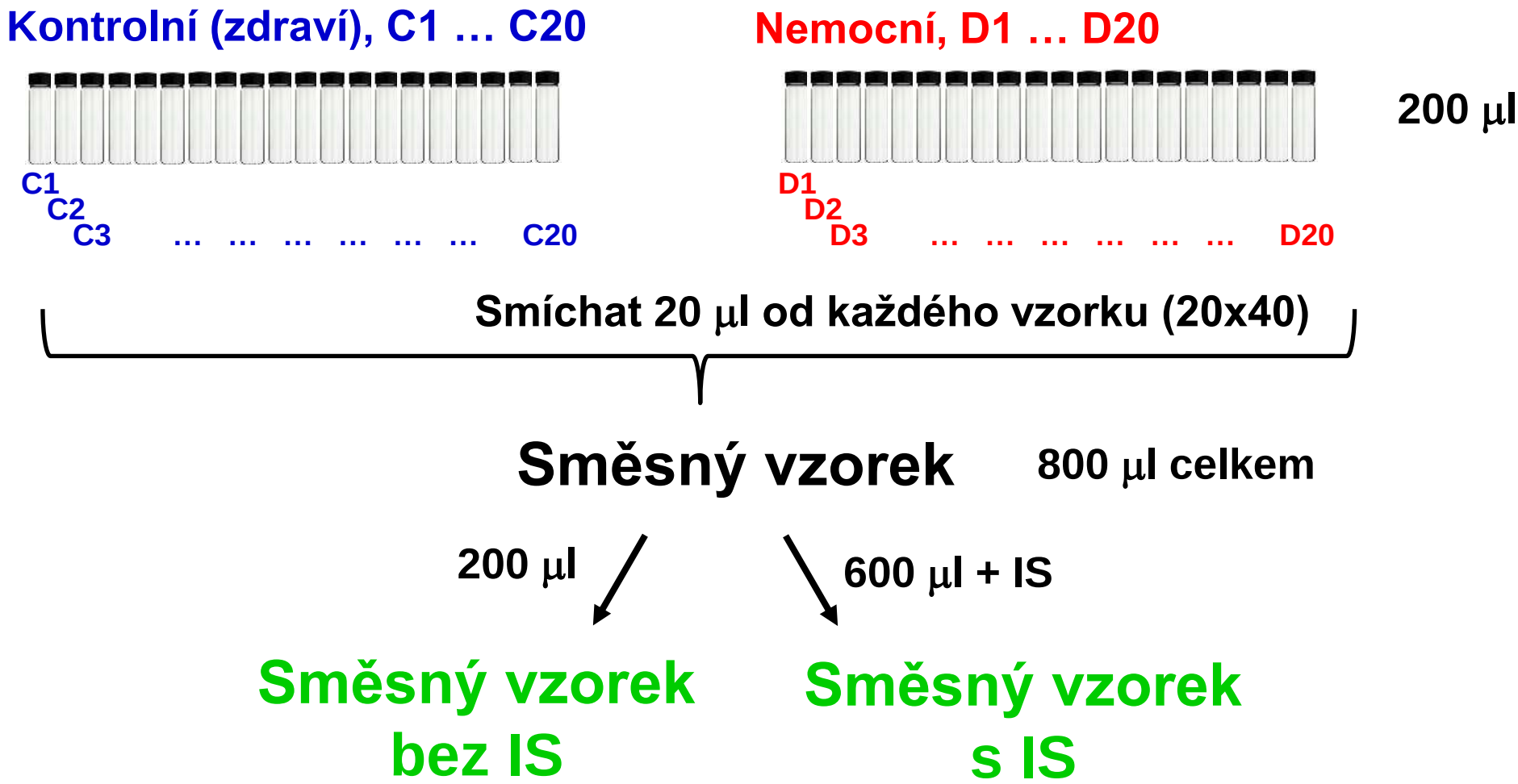
- Obvykle stanovované parametry při LC/MS/MS validaci:

- Linearita kalibrační křivky – lineární rozsah, limit detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) – nejnižší kvantifikované či detekované body z kalibrační přímky
- Paměťový efekt (Carry-over)
- Přesnost a správnost metody
- Extrakční účinnost, matriční efekt, selektivita, stabilita po rozmražení vzorku, stabilita doby v autosampleru (při měření větších sekvencí), atd.
- Stabilita chromatografické retence (zdali nedochází k posunu)

EMA: Guideline on bioanalytical method validation. Committee for Medicinal Products for Human Use.
FDA guidance for industry: bioanalytical method validation. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research: Rockville, MD. 2001.

Příprava směsného vzorku (Pooled sample)

- **Pro menší série vzorků (ca. 20-100)** – malé množství všech vzorků použito do směsného vzorku

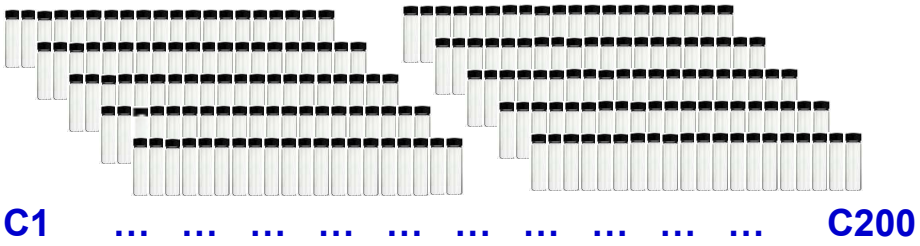


příklad směsného vzorku v klinické studii – např. zkoumáme složení plasmy nemocných pacientů a zdravých kontrol

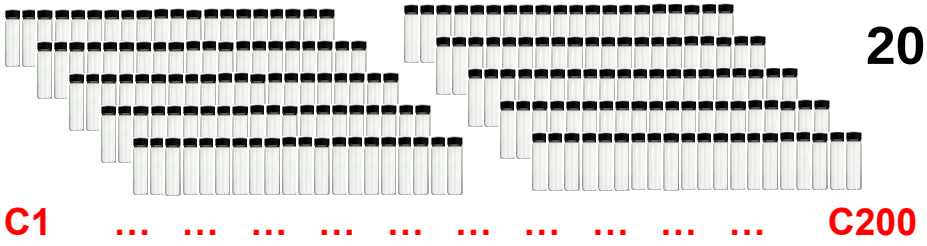
Příprava směsného vzorku (Pooled sample)

- **Pro větší série vzorků (>100)** – náhodný výběr reprezentativního počtu vzorků pro přípravu směsného vzorku

Kontrolní (=zdraví), C1 … C200



Nemocní, D1 … D200



200 µl

Smíchat 10 µl od 50+50 vzorků

Směsný vzorek **1000 µl celkem**

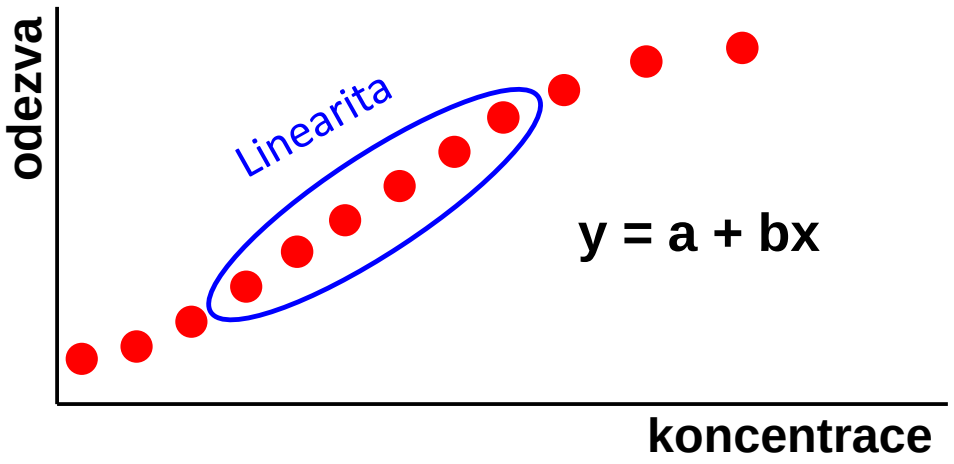
200 µl ↙ ↘ **800 µl + IS**

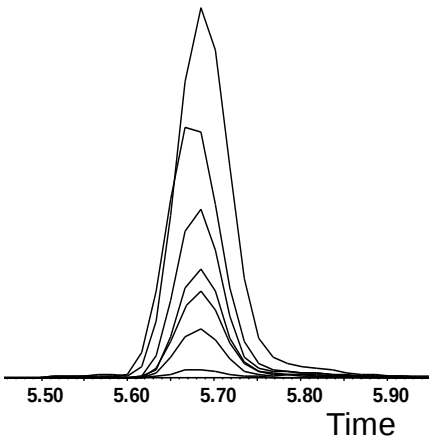
Směsný vzorek bez IS **Směsný vzorek s IS**

- **Dodržet poměry zdravých/nemocných, mužů/žen, reprezentativní věkové zastoupení apod. stejně jako pro celou studii!**

Kalibrační křivka

- Linearita je nejčastěji hodnocena koeficientem determinace (**R^2**)





- Závislost odezvy detektoru na koncentraci analytu
- Stanovit koncentrační rozsah metody (LLOQ a ULOQ)
- Příprava kalibračních roztoků se známou koncentrací standardů v reálné matrici (např. směsný vzorek)
- Minimálně 6 kalibračních bodů (linearní), opakované měření
- Pro každý standard vlastní kalibrační řada (směrnice + úsek linearity)
- Zpětně vypočítané koncentrace z regresní rovnice

± 15% (RSD) (LLOQ = ± 20%)

- *snímek převzat z přednášky Ing. M. Chocholouškové, Ph.D. (Škola MS 2020)*

LOD, LOQ, paměťový efekt

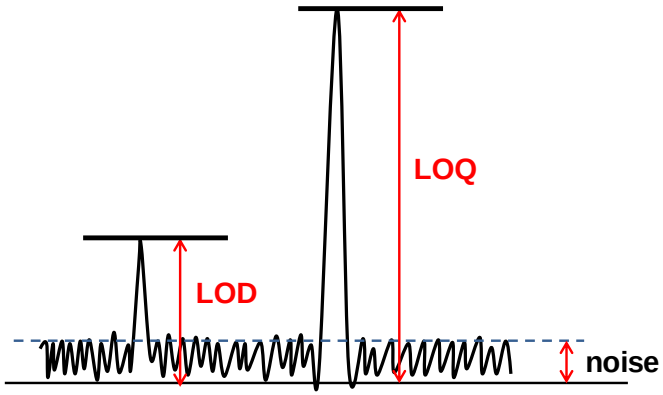
LOD = limit of detection; mez detekce; nejnižší detekovatelné množství
LOQ = limit of quantification; mez stanovitelnosti; nejnižší stanovitelné množství

↓

Možné výpočty:

1. Poměr signálu a šumu (nedoporučuje se)
2. Z kalibrační křivky

~~**LOD = 3xS/N**~~
~~**LOQ = 10xS/N**~~



Nejspolehlivější způsob
(podle FDA, EMA)
LLOQ = lower limit of quantification

→ Nejnižší koncentrace, která může být stanovena s požadovanou přesností a správností v rámci lineárního rozsahu

LOQ resp. LLOQ musí být součástí lineárního rozsahu metody!

Paměťový efekt

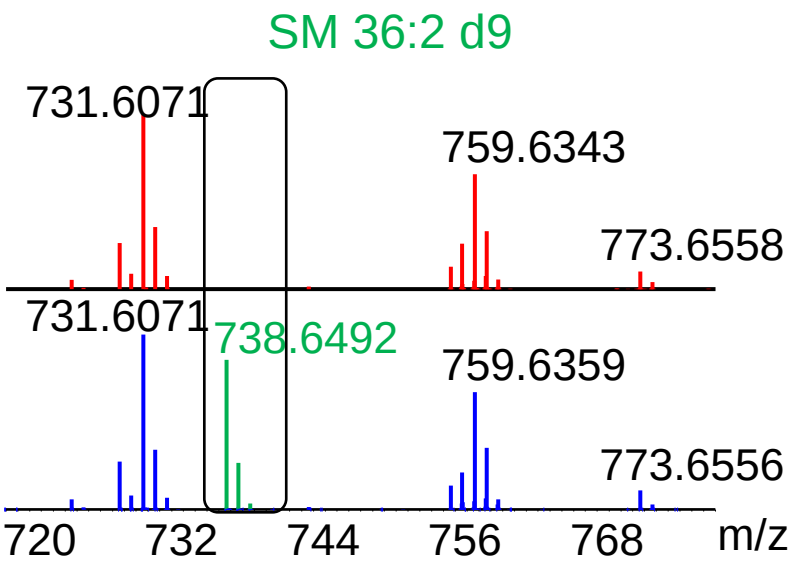
- musí být stanoven a případně minimalizován (vylepšení promývacího kroku)
- nástřik blanku (vzorek bez matrice a IS) po nástřiku kalibračního roztoku s nejvyšší koncentrací

(signál analytů musí být ≤ 20% hodnoty LLOQ a signál IS **≤ 5%** hodnoty LLOQ)

- *snímek převzat z přednášky Ing. M. Chocholouškové, Ph.D. (Škola MS 2020)*

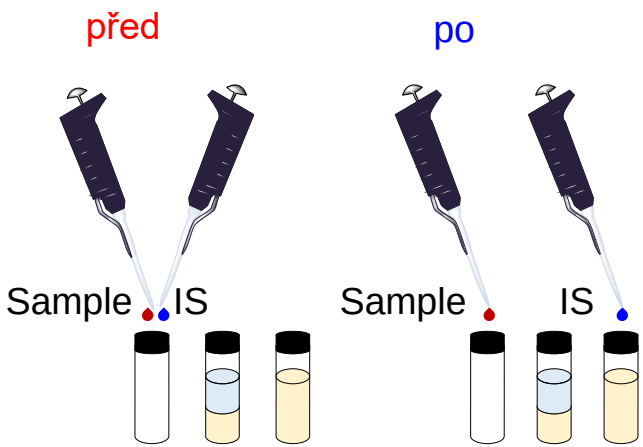
Selektivita

- Ověření, zdali nejsou na hodnotách příslušných m/z interních standardů interference z matrice, systému)
- Minimálně **6** individuálních vzorků bez IS a s IS po extrakci
- Přítomnost interferujících látek je obyčejně akceptována, když je jejich odezva <20% LLOQ (pro interní standard to musí být <5% než LLOQ)



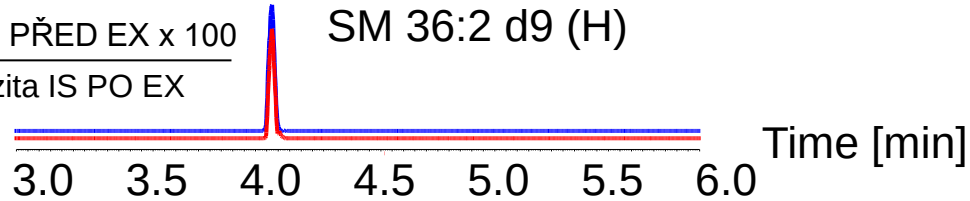
Extrakční účinnost

- např. kapalina-kapalina, SPE, deproteinizace
  - IS v alespoň třech koncentračních hladinách (nízká, střední a vysoká)
    - IS přidán před extrakcí
    - IS přidán po extrakci



	Recovery [%]		
IS-Mix	L	M	H
CE 16:0 d7	89	92	99
TG 48:1 d7	97	93	98
TG 57:3	97	94	97
DG 24:2	91	89	93
DG 33:1 d7	94	90	94
DG 36:2 d5	91	89	92
MG 18:1 d7	96	84	101
MG 19:1	95	92	93
Cer 30:1	96	93	98
Cer 35:1	94	93	97
Cer 36:1 d7	97	92	96
PC 28:0	100	95	100
PC 33:1 d7	100	94	100
PC 44:2	97	91	100
PC 44:0	98	92	101
SM 30:1	92	87	113
SM 36:2 d9	91	84	91
LPC 17:0	98	91	98
LPC 18:1 d7	95	87	95
CholD7	102	103	88

$$\% = \frac{\text{Intenzita IS PŘED EX} \times 100}{\text{Intenzita IS PO EX}}$$



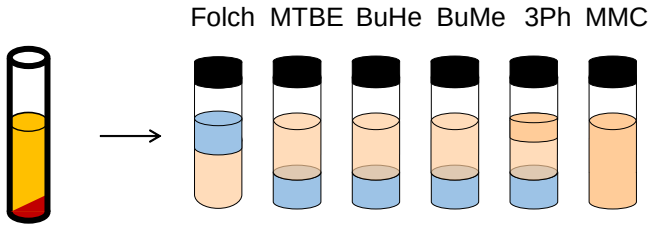
Extrakční účinnost: 85-115%

D. Wolrab et al., Anal. Bioanal. Chem. 412 (2020) 2375

Příprava vzorku: Optimalizace

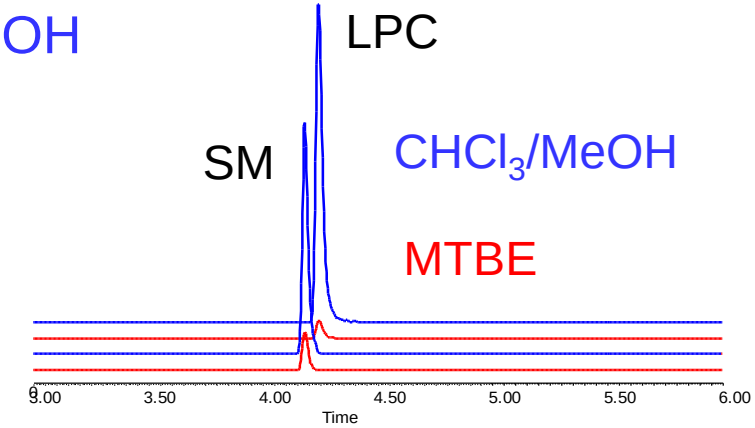
- Výběr extrakčního protokolu (kapalina/kapalina)
  - Selected IS, > 90% výtěžnost extrakce

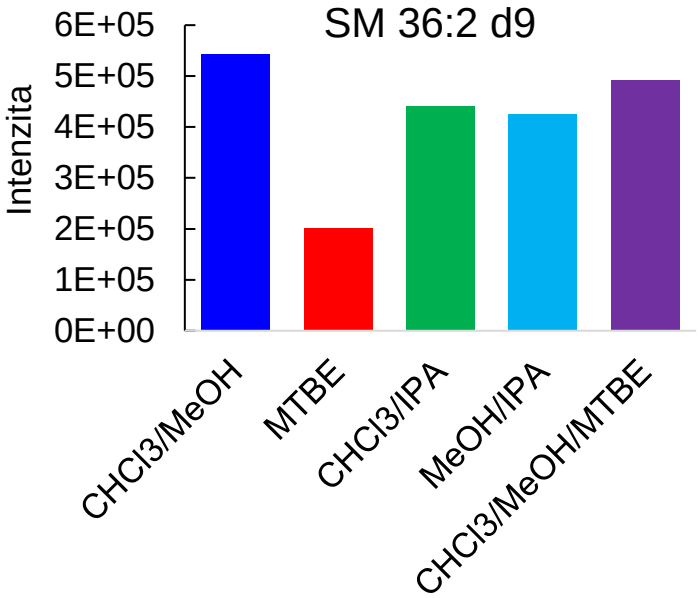
Recovery [%]	Folch	MTBE	BuHe	BuMe	3P	MMC
TG 57:3	93	87	89	89	86	93
DG 36:2 d5	97	78	80	69	80	57
MG 18:1 d7	93	85	89	88	82	88
Cer 30:1	106	95	94	95	84	96
PC 28:0	92	85	88	87	83	96
SM 30:1	91	78	96	93	60	101
SM 36:2 d_9	90	82	88	94	72	97
LPC 18:1 d_7	87	66	85	87	34	95



- Folch: $CHCl_3$/MeOH (2/1)
- MTBE: MTBE/MeOH (3.3/1)
- BuHe: BuOH/Heptane (4/6)
- BuMe: BuOH/MeOH & Heptane/EtOAc +(2.75/1), 1% AcOH
- MMC: MeOH/MTBE/$CHCl_3$ (1.5/1/1)
- 3Ph: Hexane/EtOAc/ACN/H2O (4/4/3/4)

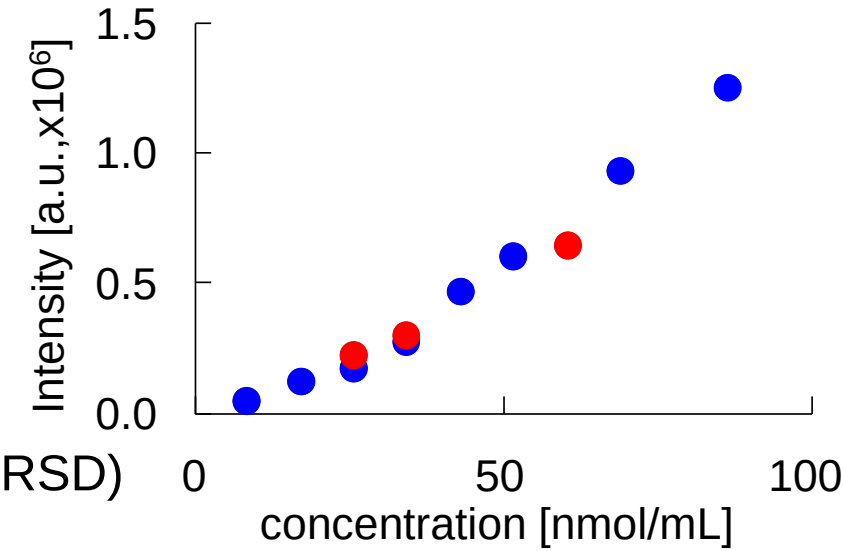
- Výběr rozpouštědel pro rozpuštění extraktu
  - $CHCl_3$/MeOH



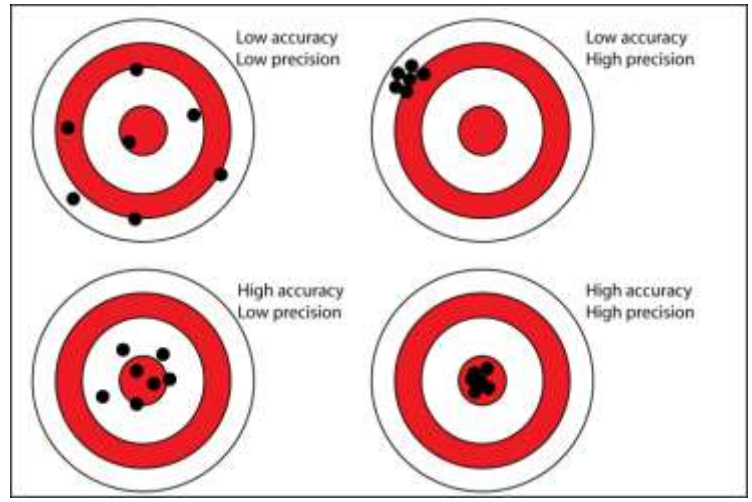


Přesnost, správnost a LLOQ

- Výpočet koncentrace z regresní rovnice kalibrační přímky (IS o známe koncentraci přidán před extrakcí):
  - zpětný výpočet kalibračních bodů
  - vzorky (IS před extrakcí – 3 hladiny)
- intenzitu pro danou koncentrační hladinu dosadíme do kalibrační přímky a spočítáme c_{calc}
- alespoň 6 opakování pro každou hladinu
  - přesnost měření (standardní relativní odchylka - RSD) (chyba určené koncentrace v rámci opakování)
  - % chyba (vůči známé koncentraci c_{theor}) = správnost
  - Guideline:
    - Správnost → Error: <15% (<20% LLOQ)
    - Přesnost → RSD: <15% (< 20% LLOQ)



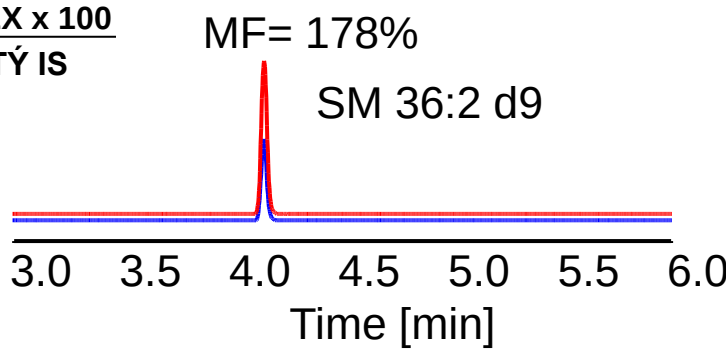
$$error\ [\%] = 100 * \frac{c_{calc.} - c_{theor.}}{c_{theor.}}$$



Matriční efekt a faktor

- Matriční efekt: vliv matrice na signál (min. 6 zkoumaných vzorků, počítáme matriční faktor po každý zkoumaný vzorek)

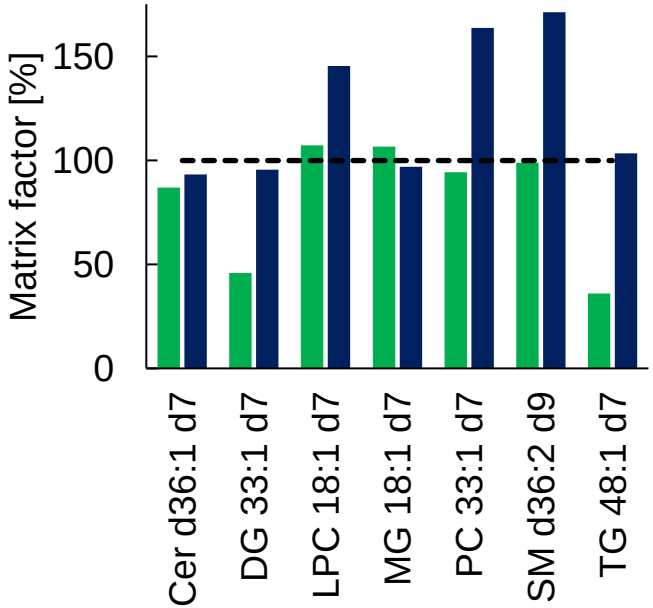
$$MF = \frac{\text{IS PO EX x 100}}{\text{ČISTÝ IS}}$$

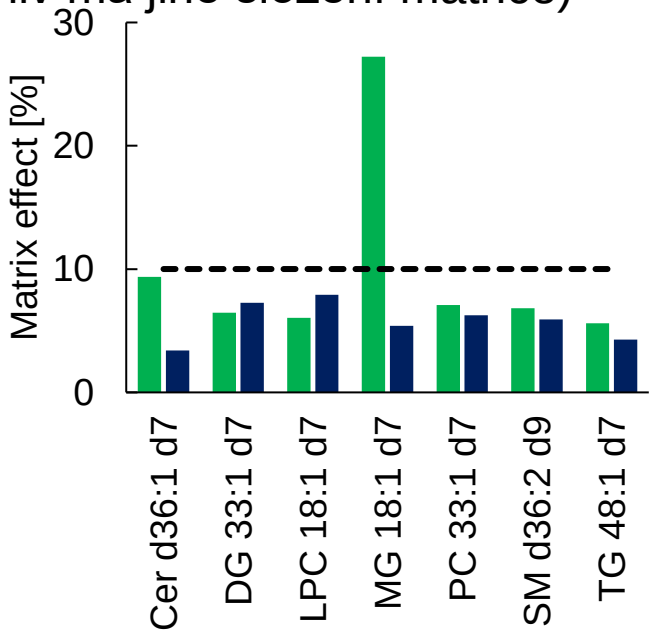


  - tři koncentrační hladiny (nízká/střední/vysoká)
  - IS přidán k matrici po extrakci
  - zředěný čistý IS o stejné koncentraci
  - příklad UHPSFC: zvýšení signálu (polarní sloučeniny)
  - i přes velký matriční efekt může být metoda aplikovatelná (kompenzováno interním standardem - matrice ovlivňuje podobně analyt a IS)
  - Matriční efekt (% RSD mezi jednotlivými vzorky – jaký vliv má jiné složení matrice)

HILIC-UHPLC

UHPSFC





D. Wolrab et al., Anal. Bioanal. Chem. 412 (2020) 2375

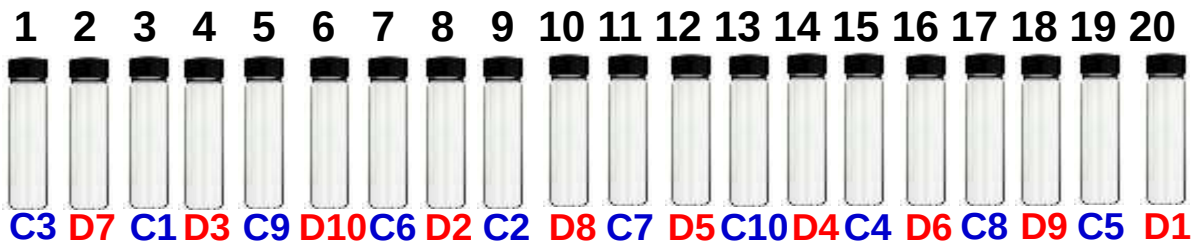
Matricové efekty

- **Matricové efekty se mohou lišit** - pro různé retenční časy, pro různou dobu měření, různé chromatografické kolony, rozpouštědla, atd. (celá řada dalších (ne)známých faktorů)
- Pokud nedokážeme co nejlépe eliminovat vliv matricových efektů, tak nejsme schopni provést spolehlivou kvantifikaci
- Nejlepším způsobem eliminace vlivu měnících se matricových efektů je **použití vnitřních interních standardů, které koeluují s analytem**

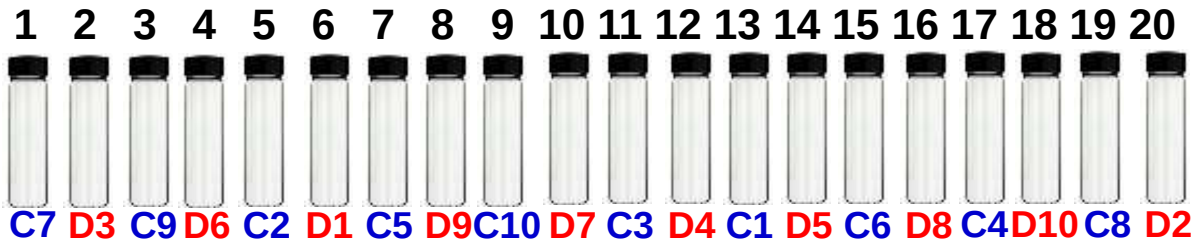
Randomizace (znáhodnění)

- **Randomizace** - náhodné rozdělení experimentálních jednotek napříč skupinami (Wikipedie)
- **Randomizační techniky** – házení kostkou, mincí, ruleta, generátor náhodných čísel (možné v Microsoft Excel spod.)
- Používá se pro pořadí vzorků pro extrakci i pro vlastní měření, příklad pro sérii vzorků 10 kontrolních (C) a 10 nemocných (D)

Extrakce



Měření



- Modelový příklad naprosto chybného plánu: čtvrtek extrakce zdravých, pátek měření, pondělí extrakce nemocných a úterý měření

Použití směsného vzorku: kontrola kvality měření

- **QC vzorek:** směsný vzorek + IS
- po 20 nástřicích vzorků

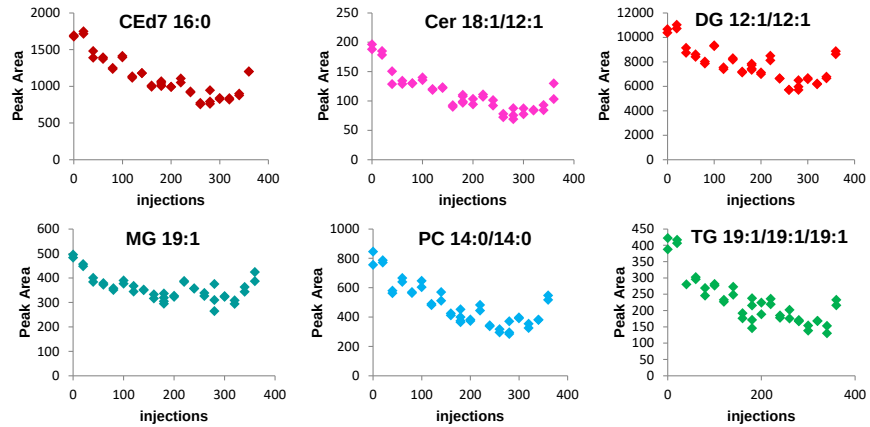
→ kontrola funkce přístroje

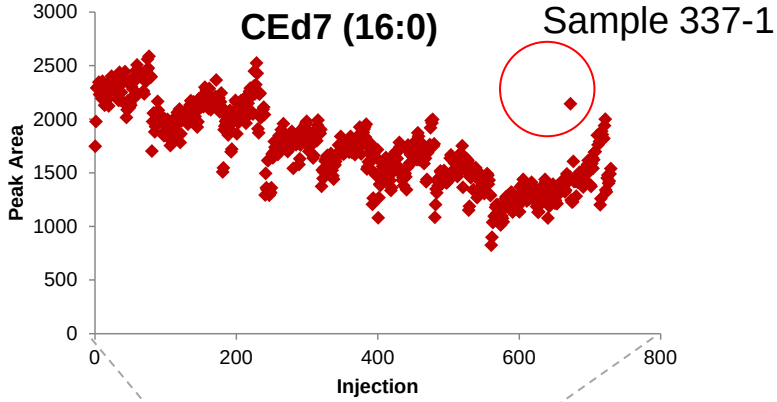
- **Online kontrola měření:**
- pro každý vzorek v sérii

→ kontrola funkce přístroje

→ kontrola kvality přípravy jednotlivých vzorků

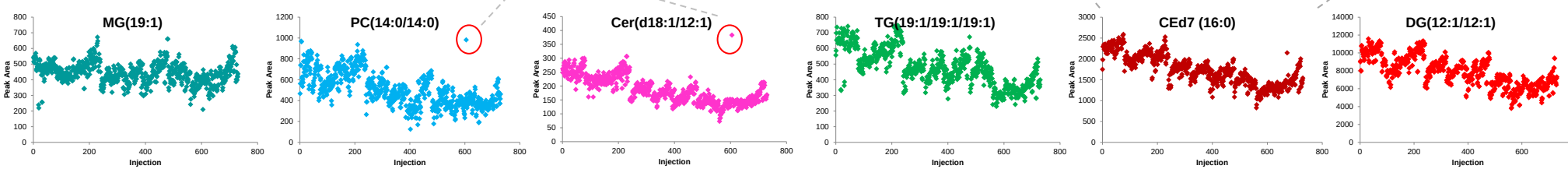
QC





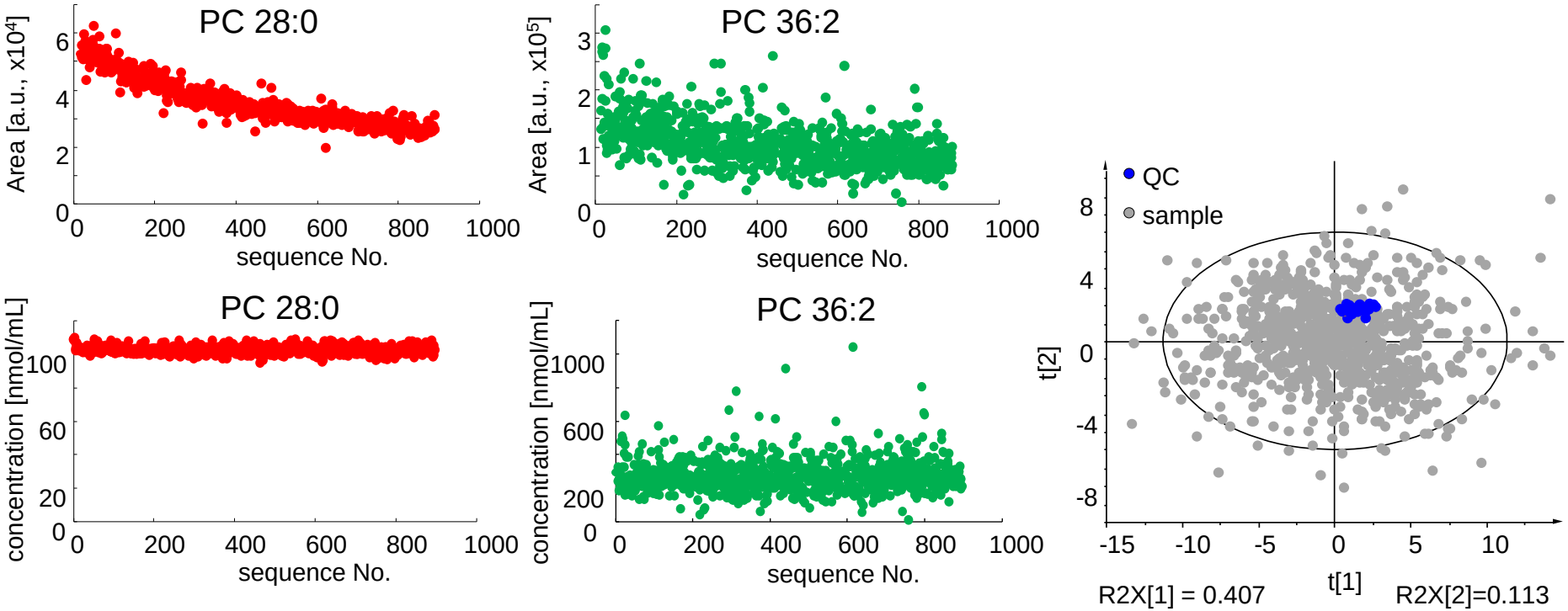
Online kontrola měření

After Error: communication failure



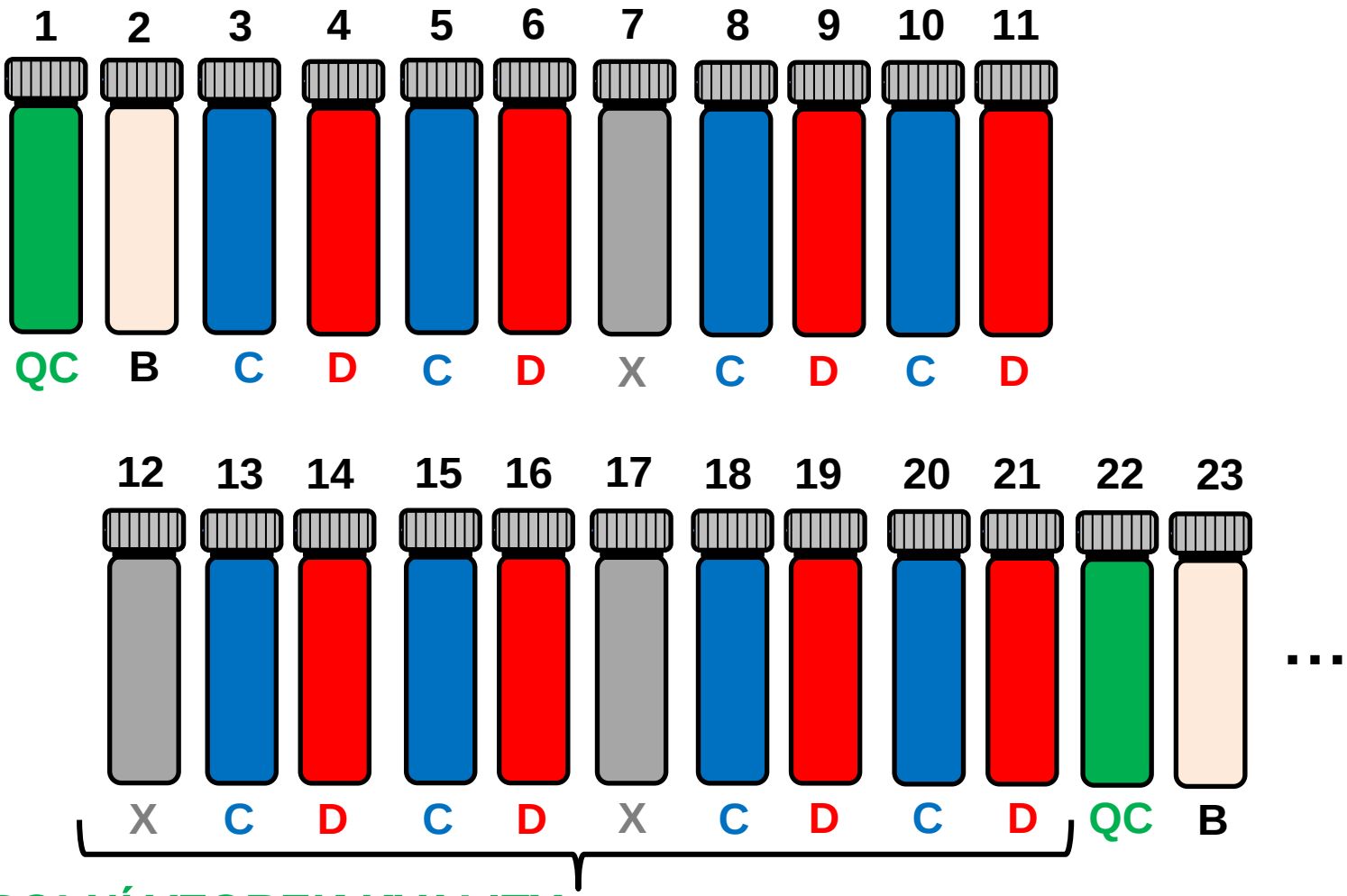
Kontrolní vzorek (QC) v lipidomické analýze

- Online kontrola měření
  - Obyčejně pokles signálu během sekvenčního měření (nutná normalizace – IS)
- QC nástřiky během celé sekvence měření
- Sledujeme odezvu IS i endogenně zastoupených sloučenin
  - Kontrola instrumentu i přípravy vzorku - normalizovaná hodnota (je potřeba pomocí druhého IS) by měla být konstantní v rámci rozumné RSD)



D. Wolrab et al., ACA. 1137 (2020) 74-84

Příklad sekvence nástřiků při MS kvantitě v klinických studiích



20 VZORKŮ MEZI QC

QC = KONTROLNÍ VZOREK KVALITY

B = BLANK

C = ZDRAVÁ KONTROLA

N = VZOREK PACIENTA

X = SLEPÝ VZOREK

Obvyklé konfigurace MS v kvantitativní analýze

- **1/ Nízké rozlišení (QqQ, QqLIT)** – využití charakteristických skenů v MS/MS módu:

– **Selektivní záznam iontových reakcí (Selected Reaction Monitoring, SRM)** – nejvyšší selektivita i citlivost

– **Sken iontů prekurzoru (PI) nebo sken neutrálních ztrát (NL)** – vhodné pro třídy látek nebo sloučeniny obsahující stejnou funkční skupinu, které poskytují stejný typ fragmentového iontu (PI sken) nebo stejnou neutrální ztrátu (NL sken)

- **2/ Vysoké rozlišení (využití RIC = EIC v MS nebo MS/MS módu)**

– buď v MS/MS uspořádání nebo v případě dostatečně vysokého rozlišení je dostatečně selektivní i v MS módu

– QTOF, orbitální past, iontová cyklotronová rezonance (ICR)

Typy MS skenů pro kvantitativní a kvalitativní MS

• použití skenů pro identifikaci látek a kvantitativní analýzu (zlepšení citlivosti, selektivity)

• **jednoduché skeny:**

- základní sken, sken v určitém rozsahu

- selektivní záznam vybraného iontu

• **MS/MS skeny:**

- sken produktových iontů

- sken iontů prekurzoru

- sken neutrálních ztrát

- sken jedné nebo více iontových reakcí

Základní sken

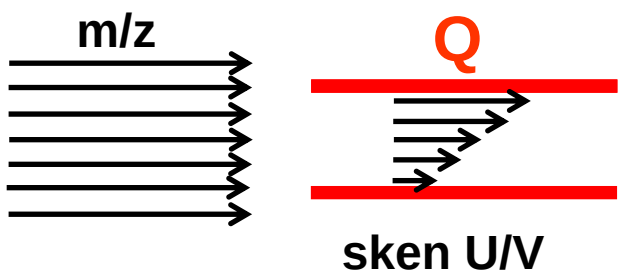
Full scan

- měření hmotnostních spekter v plném rozsahu m/z
  - kompletní informace o iontech analyzované látky
  - možnost vyvolání spektra v určitém čase
  - průměrování spekter za určitý čas
  - záznam intenzity vybrané m/z v čase (Reconstructed ion current, RIC)
  - všechny typy analyzátorů
  - velké množství dat

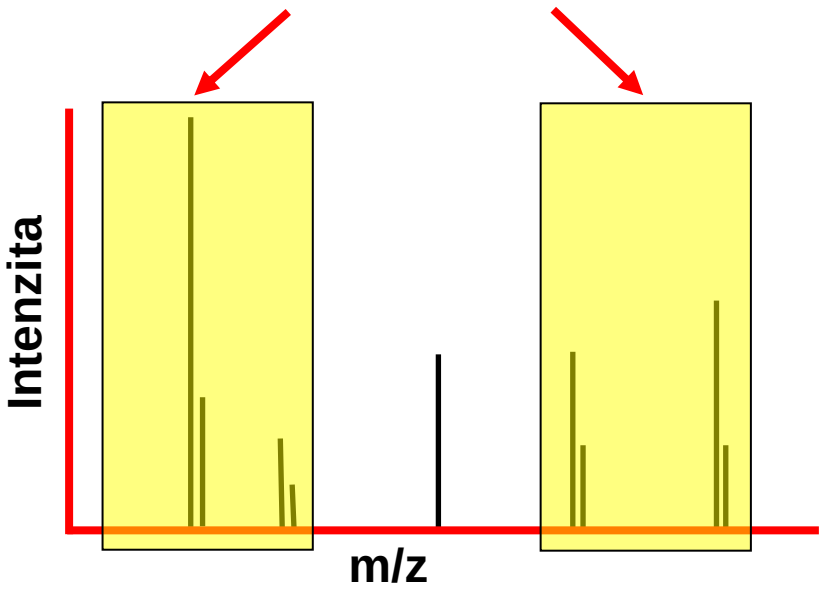
- měření hmotnostních spekter v omezeném rozsahu m/z
  - vyšší rychlost
  - vyšší citlivost
  - menší objem dat

Základní sken

V Každém bodu LC/MS analýzy úplné spektrum v nastaveném rozsahu m/z stupnice



měření v určitém rozsahu m/z



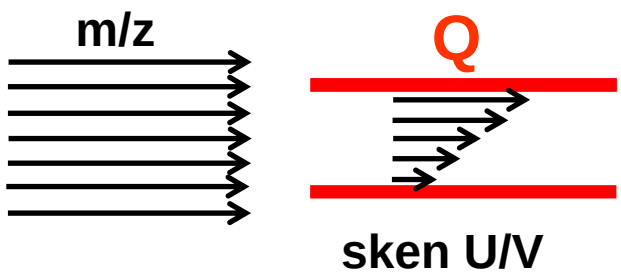
Selektivní záznam vybraného iontu

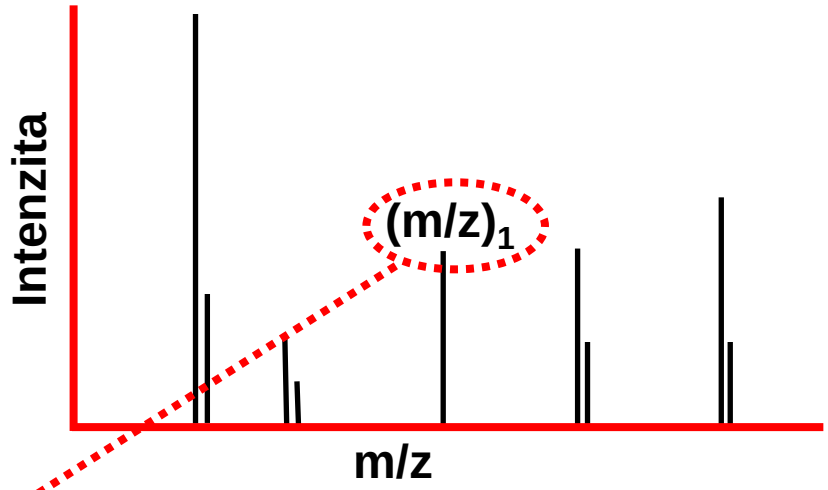
Selected Ion Monitoring - SIM

- výběr (filtr) jednoho iontu pomocí nastavených parametrů (U, V, B)
- stále je měřena intenzita pouze jednoho iontu, ostatní ionty nejsou zaznamenány
- výrazné zvýšení citlivosti oproti základnímu skenu, vhodné pro kvantitativní analýzu
  - pro Q platí: m/z = 1 až 1 000 → 1/1 000 času na 1 ion, u SIM 100% času na 1 ion
- možnost výběru několika iontů (peak switching) – úměrné snížení citlivosti!
- Q, sektorové analyzátory
- nelze zpětně vyvolat spektrum

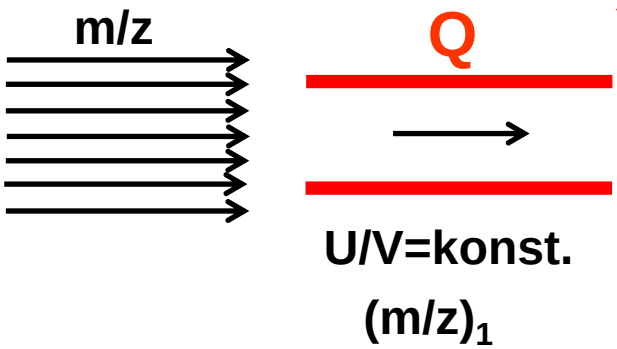
Selektivní záznam vybraného iontu

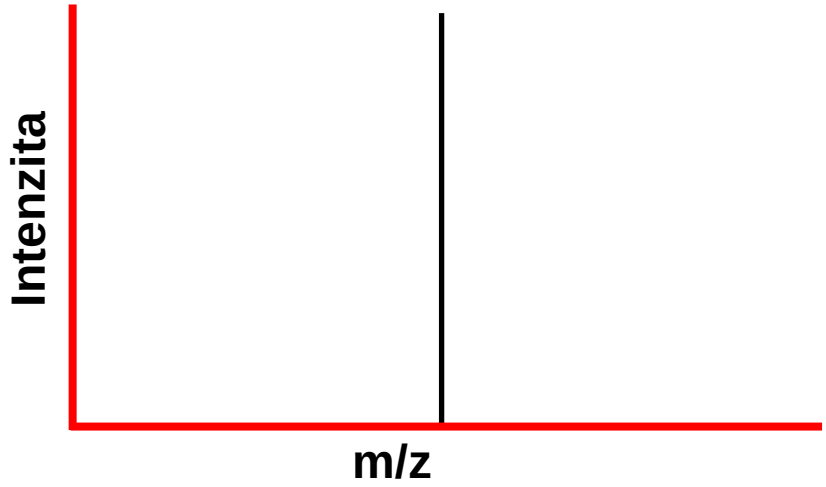
Základní sken





SIM

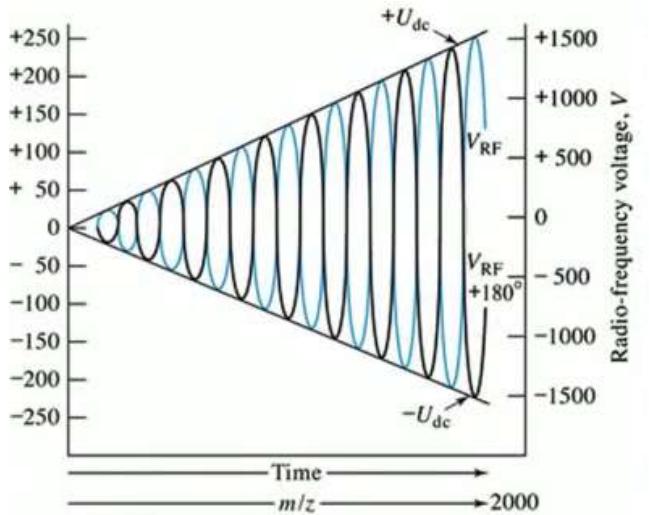




Sken produktových iontů (MS/MS měření)

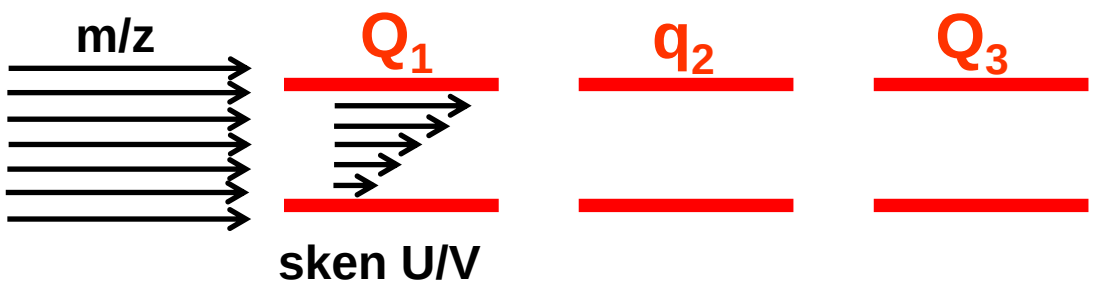
Product Ion Scan - PR

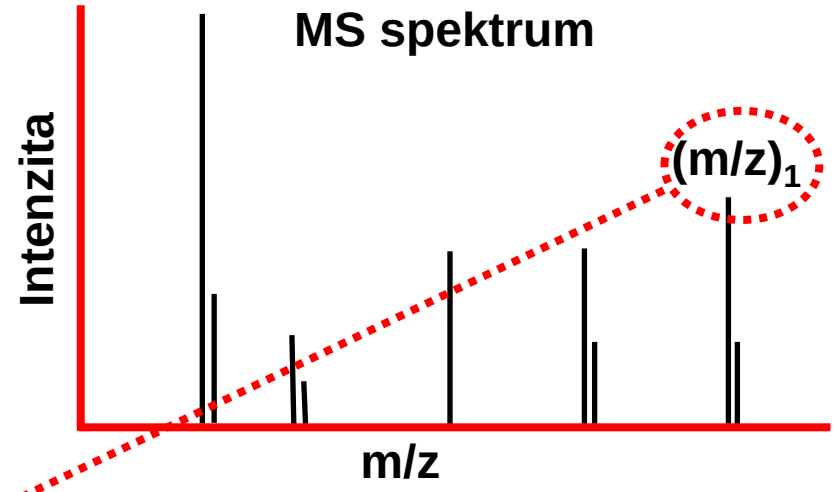
- zastaralý název sken dceřiných (Daughter ion scan) nebo fragmentových (Fragment ion scan) iontů
- měří se produktové ionty po fragmentaci vybraného iontu prekurzoru
- jedná se o měření MS/MS nebo MS^n spekter z vybraných iontů
- manuálně nebo plně automaticky v průběhu HPLC/MS analýzy
- informace o struktuře látky, identifikace, kvantitativní analýzy
- všechny analyzátory s možností MS/MS (QqQ, IT, sektorové analyzátory, hybridní analyzátory, atd.)



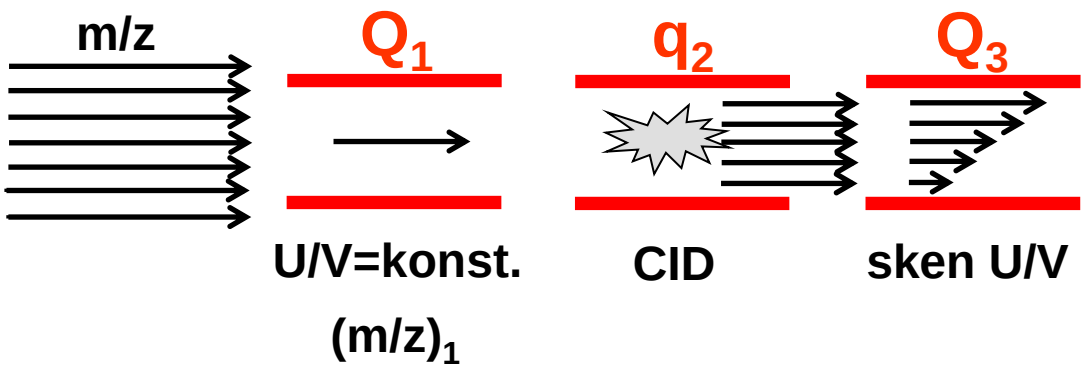
Sken produktových iontů

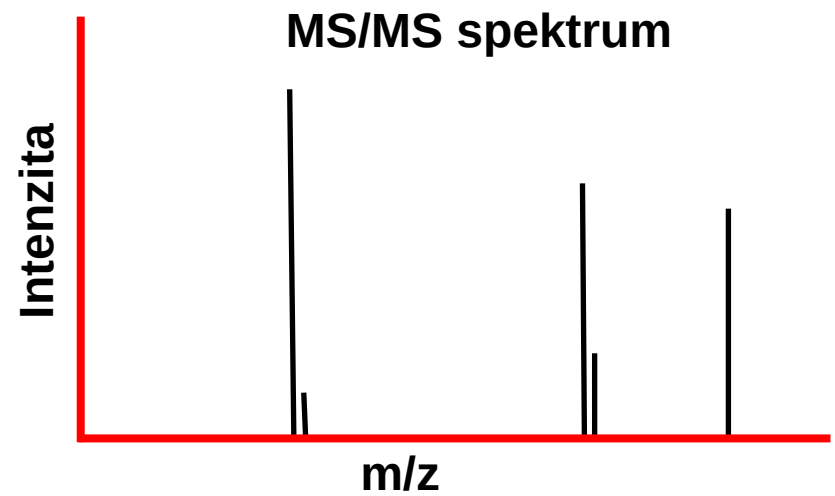
Základní sken





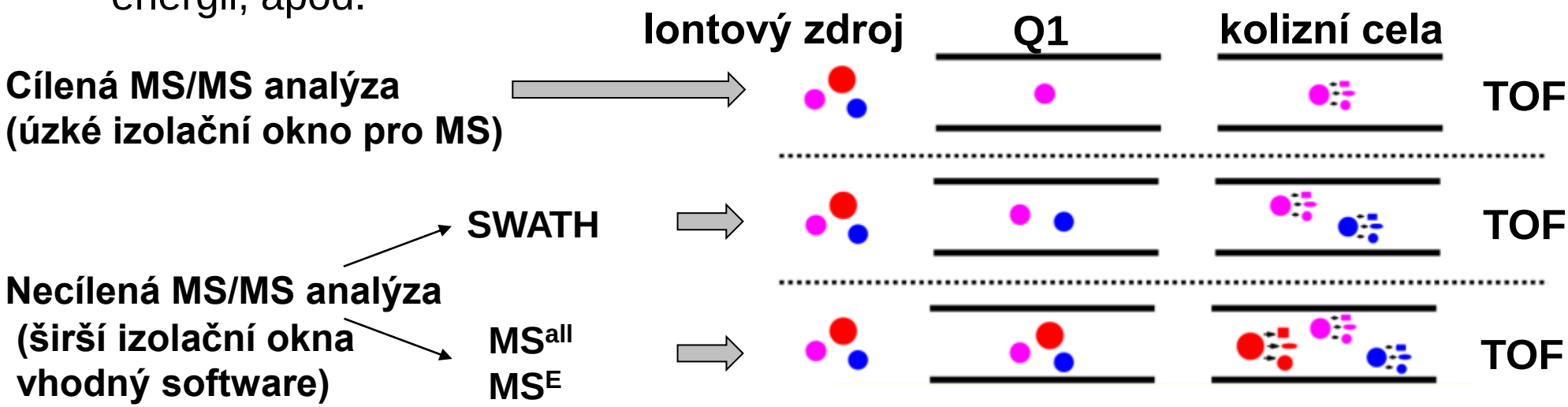
Sken produktových iontů



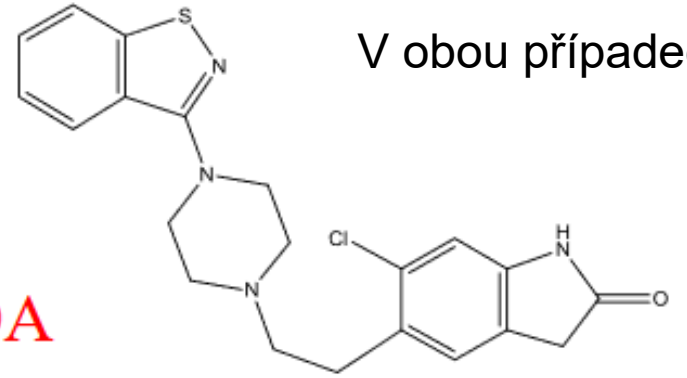


Cílená LC/MS/MS analýza (QqTOF)

- DDA (data dependent analysis), někdy nazýváno IDA (information dependent analysis)
- MS/MS – předem definovaných vybraných prekurzorových iontů (víme, co chceme fragmentovat – specifické prekurzory přítomné v předchozím základním MS skenu
- Fragmentace na základě preferenčních pravidel (parametry nastaveny v daném časovém intervalu) – součástí softwaru
  - např. zadáme, že chceme měřit v prvním skenu MS a pak postupně MS/MS spektra pro 5 konkrétních nebo 5 nejintenzivnějších iontů - konkrétní ionty v posloupnosti podle intenzity nebo hmotnosti, atd.), nastavení kolik MS/MS spekter se má pro daný ion změřit, minimální intenzitu prekurzoru, kolizní energii, apod.



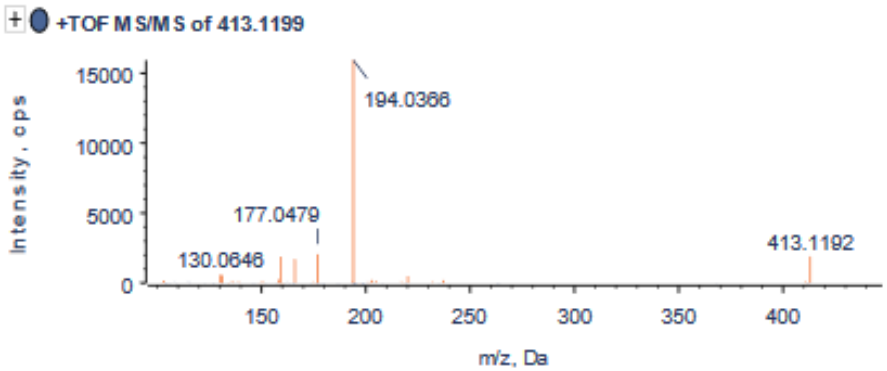
Porovnání cílené a necílené LC/HR-MS/MS



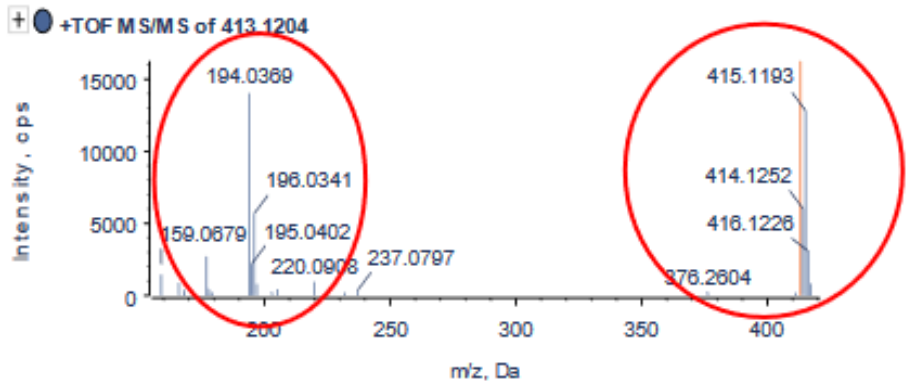
V obou případech obsahují MS/MS stejné strukturně informativní ionty

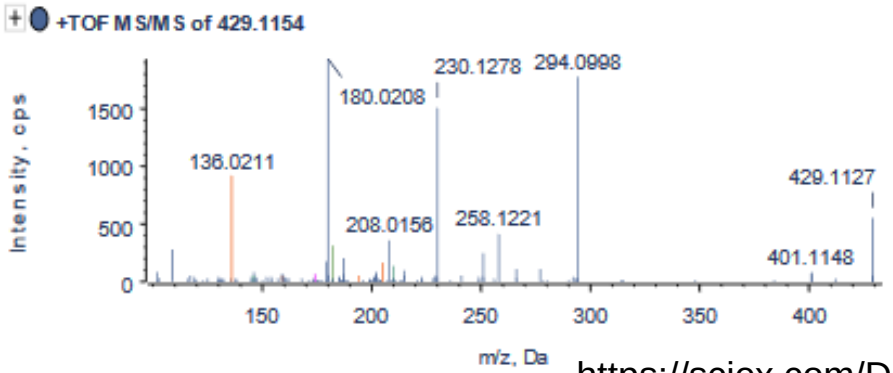
Ziprasidone

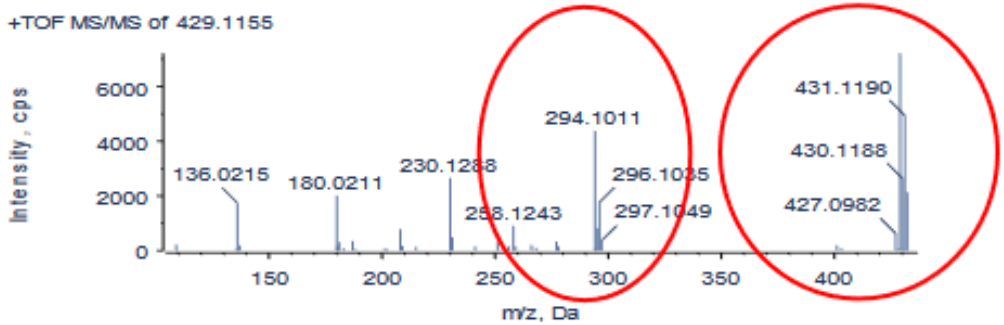
IDA



SWATH





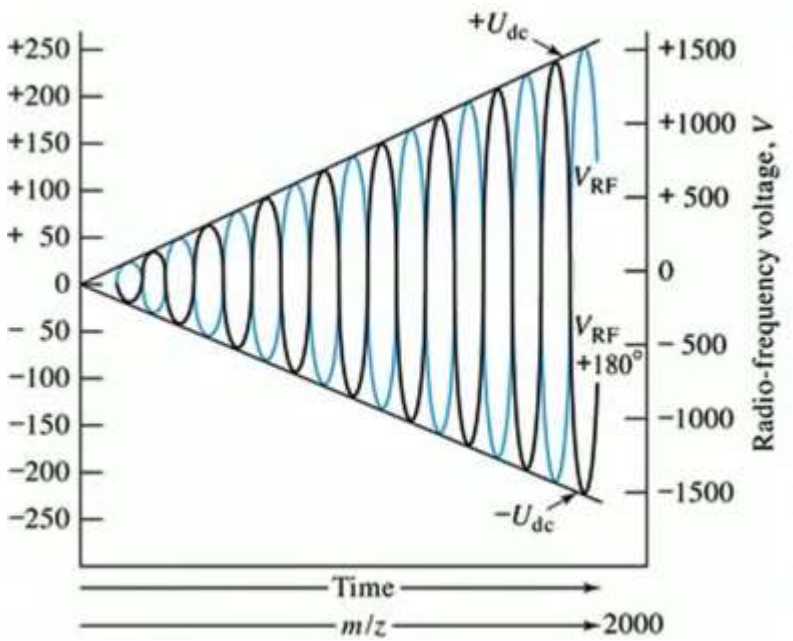


https://sciex.com/Documents/posters/asms2014_642_Pharma_Penner_Ramagiri.pdf

Sken iontů prekurzoru

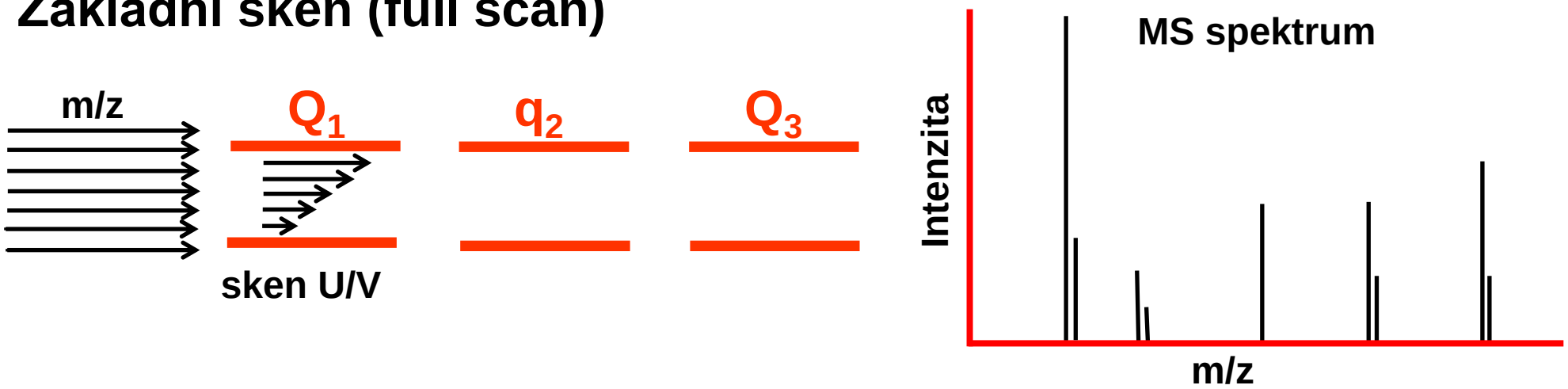
Precursor Ion Scan - PI

- zastaralý název sken rodičovských iontů (Parent ion scan)
- pro vybraný produktový (fragmentový) iont se zjišťuje původní iont prekurzoru
- strukturně informativní sken, selektivní kvantifikace
- detekce vybrané funkční skupiny nebo detekce tříd sloučenin s podobnou strukturou na základě jejich charakteristického fragmentového iontu
- zjednodušení spekter
- zvýšení S/N
- QqQ, sektorové analyzátory

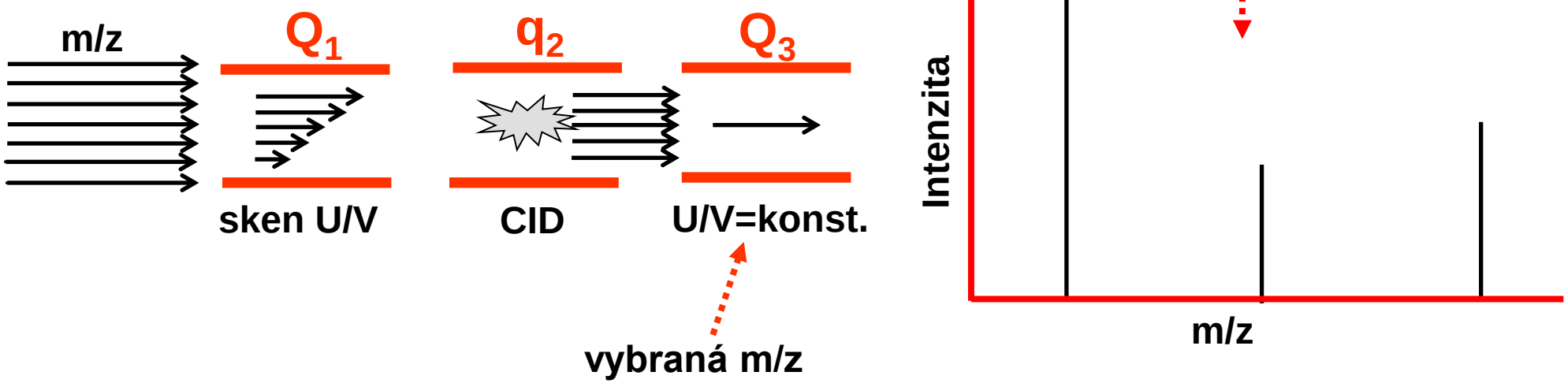


Sken iontů prekurzoru (PI)

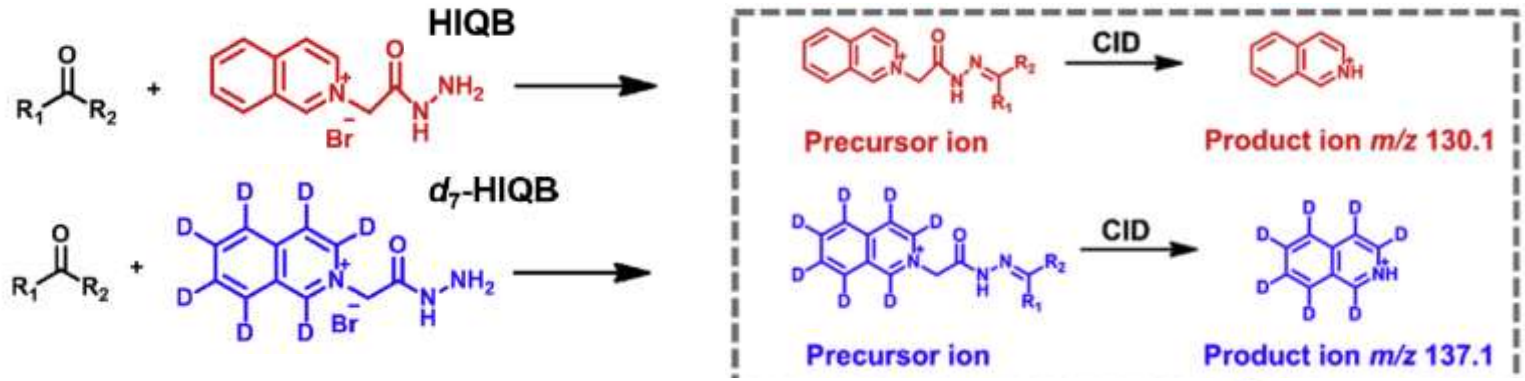
Základní sken (full scan)



Sken iontů prekurzoru

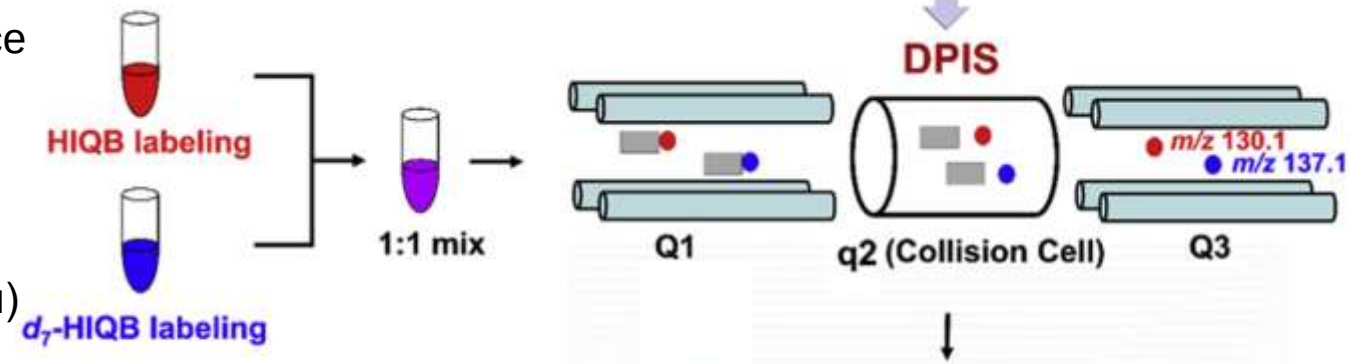


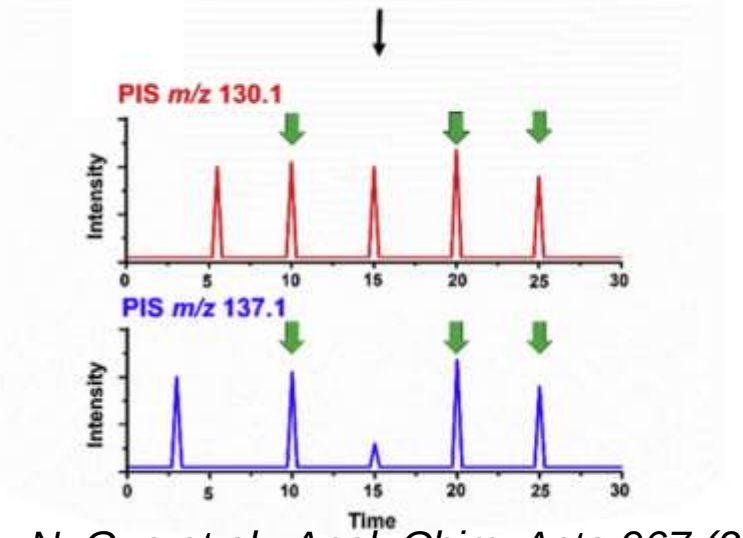
Sken iontů prekurzoru (PI) – profilování karbonylů



Neznačená derivatizace pro jednotlivé vzorky

značená derivatizace pro směsný vzorek (přidáváme ke každému vzorku)



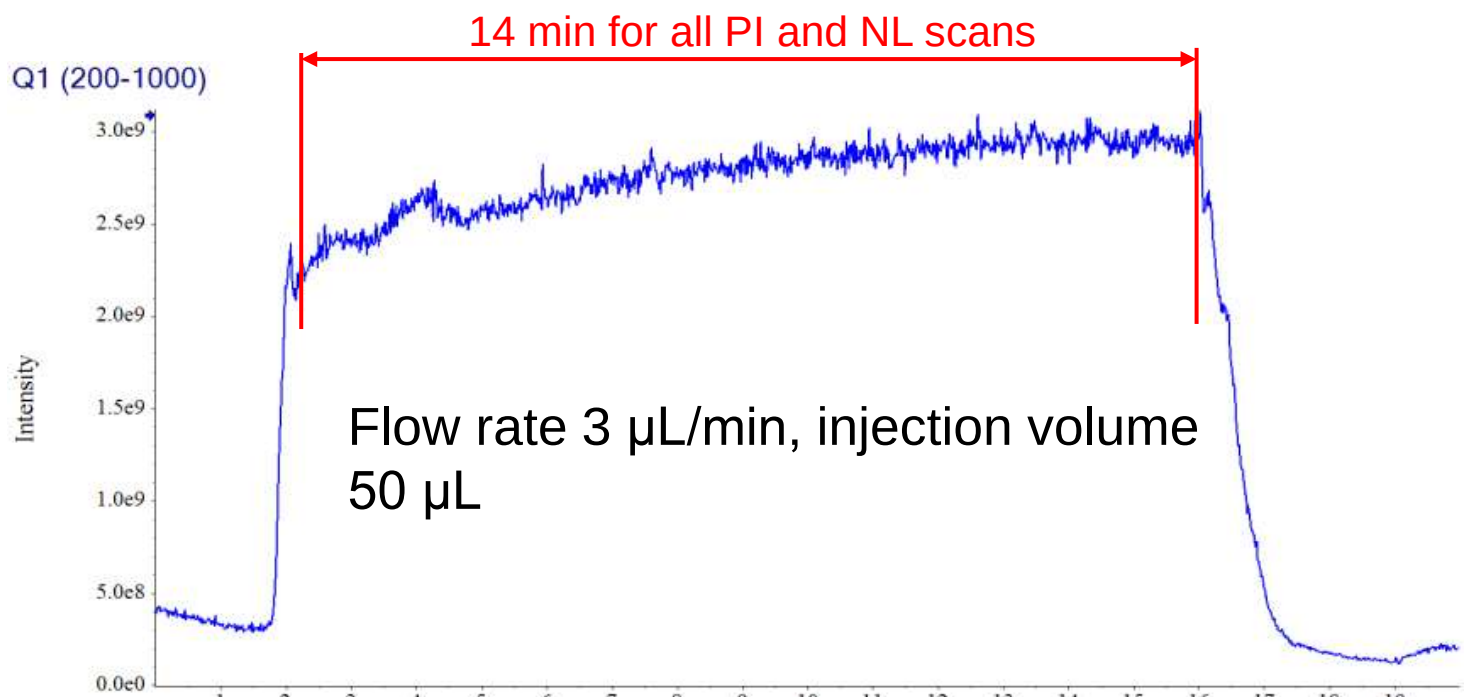


- selektivní značení (derivatizační reakce)
- specifické páry důkazem karbonylu
- specifická fragmentace značky
- pak relativní kvantifikace (v případě známých koncentrací ve směsném vzorku i absolutní

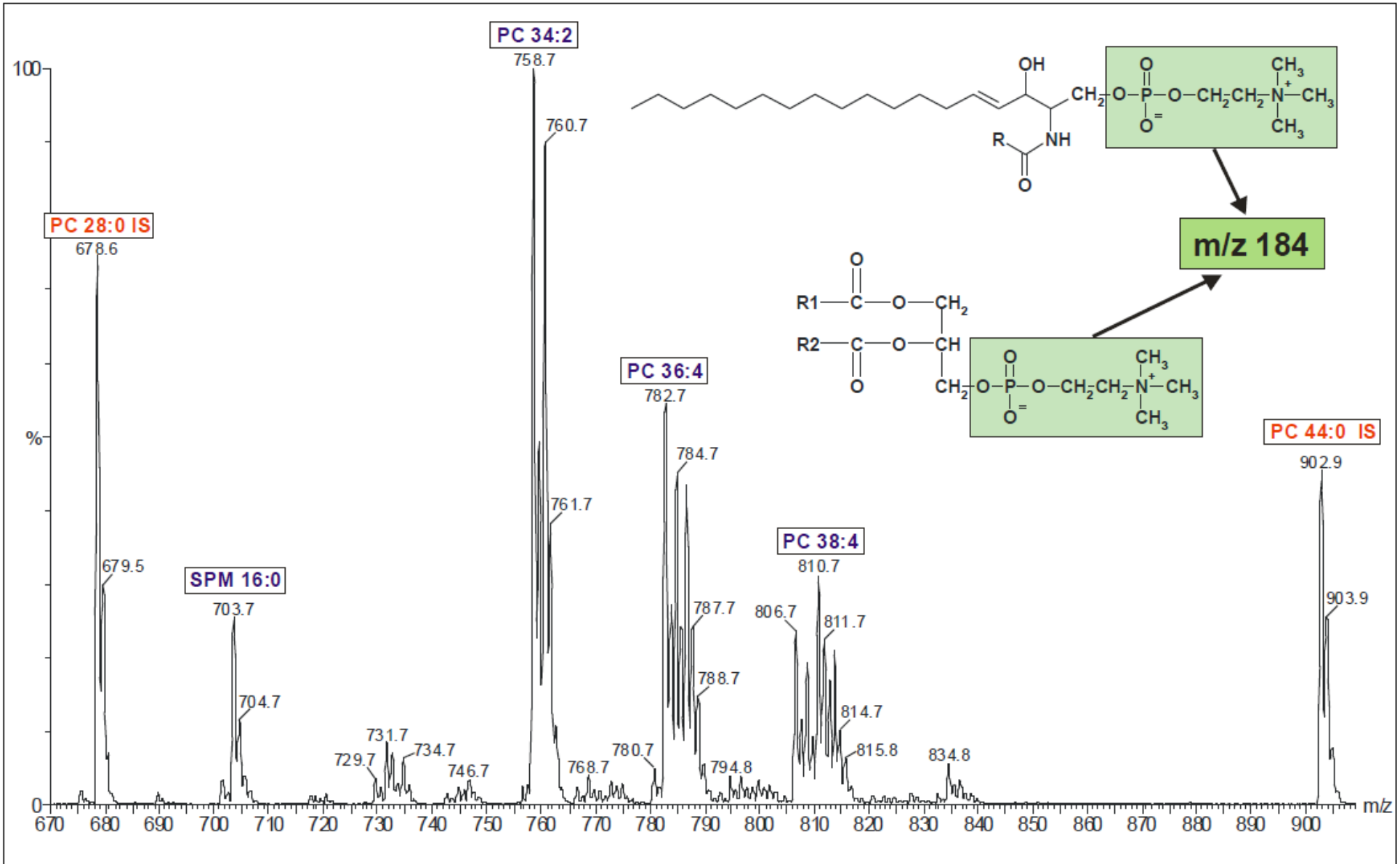
N. Guo et al., Anal. Chim. Acta 967 (2017) 42

Sken iontů prekurzoru (PI) – shotgun lipidomika

- **QqQ or Q-LIT hmotnostní spektrometry** – PI skeny pro celou třídu lipidů (fosfatidylcholiny – stejná polární skupina v SN3 pozici, ale různé acyly v SN1 a SN2 pozicích
- Vzorek zaveden do MS přímou infuzí nebo průtokovou injekční analýzou
- např. PI sken iontu m/z 184 (na detektor projdou pouze prekurzorové ionty $[M+H]^+$, které poskytují tento fragment)



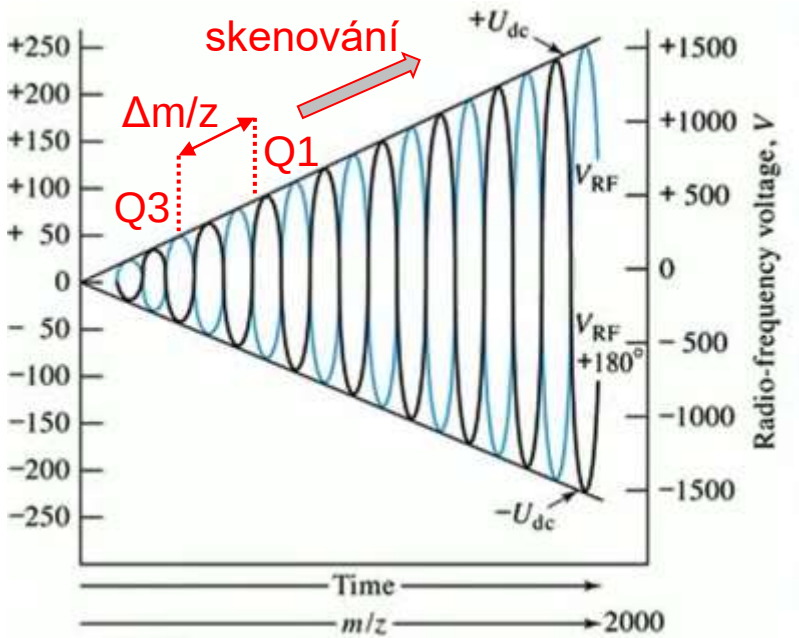
Příklad PI skenu pro stanovení fosfatidylcholinů a sfingomyelinů (PI sken 184)



Sken neutrálních ztrát

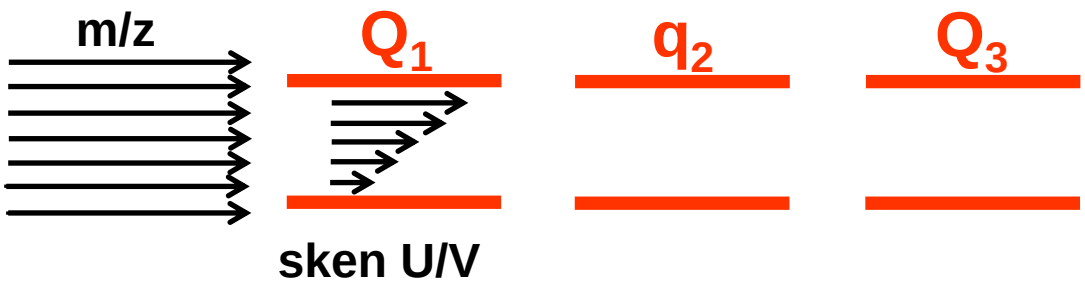
Neutral Loss Scan - NL

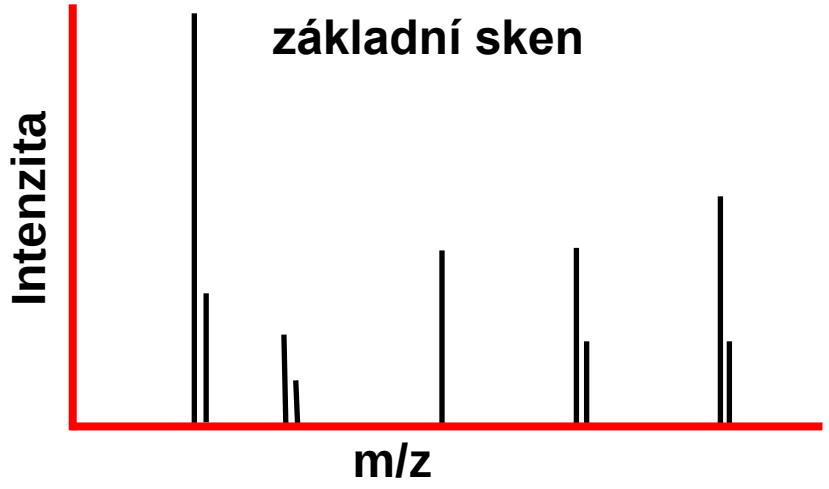
- detekce látek se stejnou funkční skupinou
- ztráta stejné neutrální časti iontu o určité Δm/z (např. alkoholy Δm/z = 18 – není moc specifické, ztráta SO_3 u sulfátů apod.)
- zjednodušení spektra, selektivní kvantifikace
- zvýšení S/N
- QqQ (skenování na obou kvadrupólech se stále stejným Δm/z), sektorové analyzátory



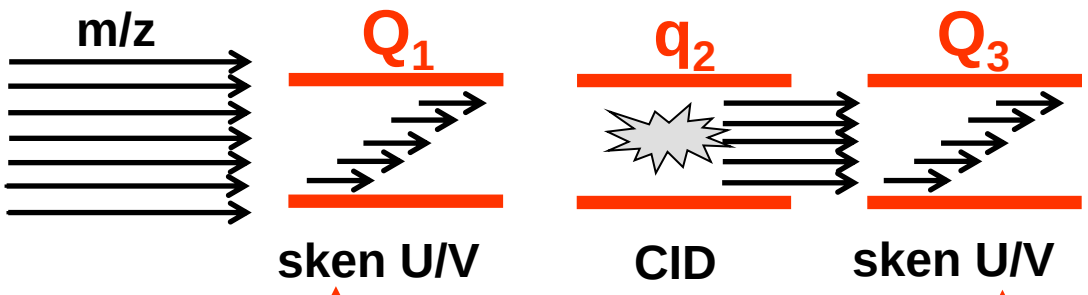
Sken neutrálních ztrát (NL)

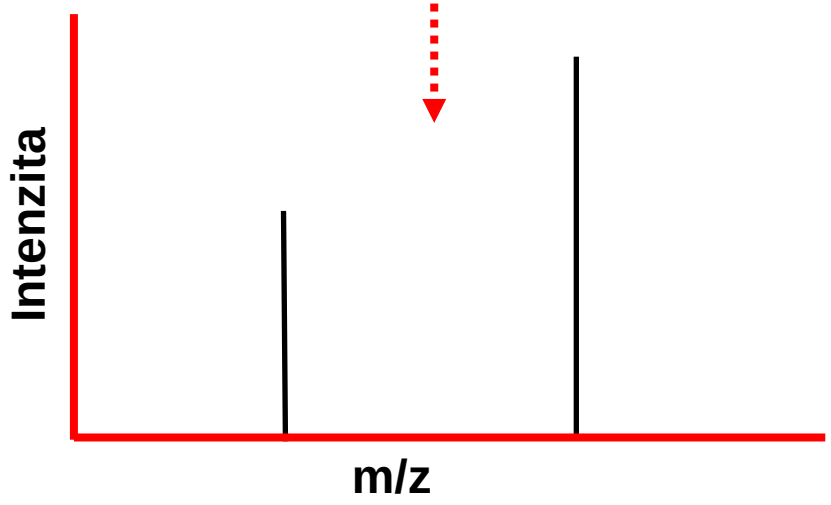
Základní sken





Sken neutrálních ztrát

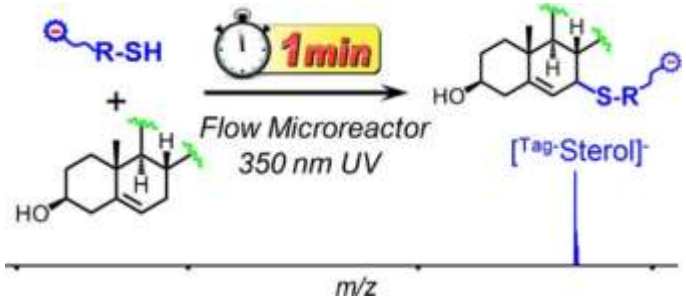




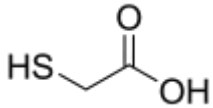
Δm/z = konst.

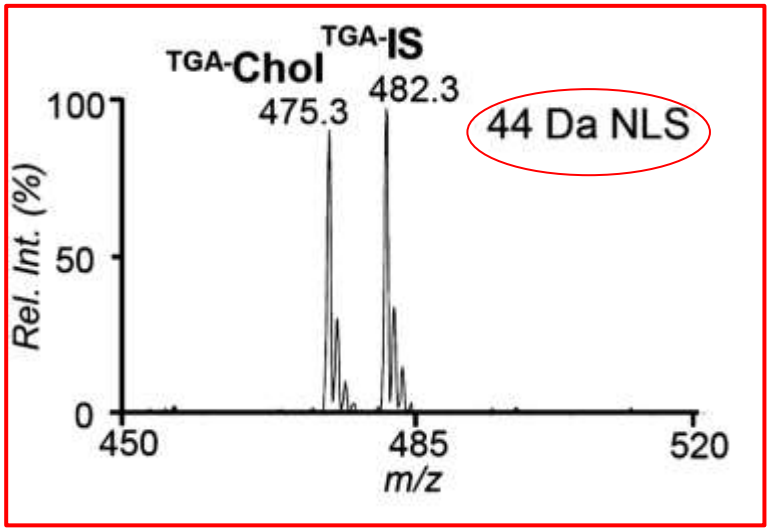
Q_3 je o Δm/z menší než Q_1

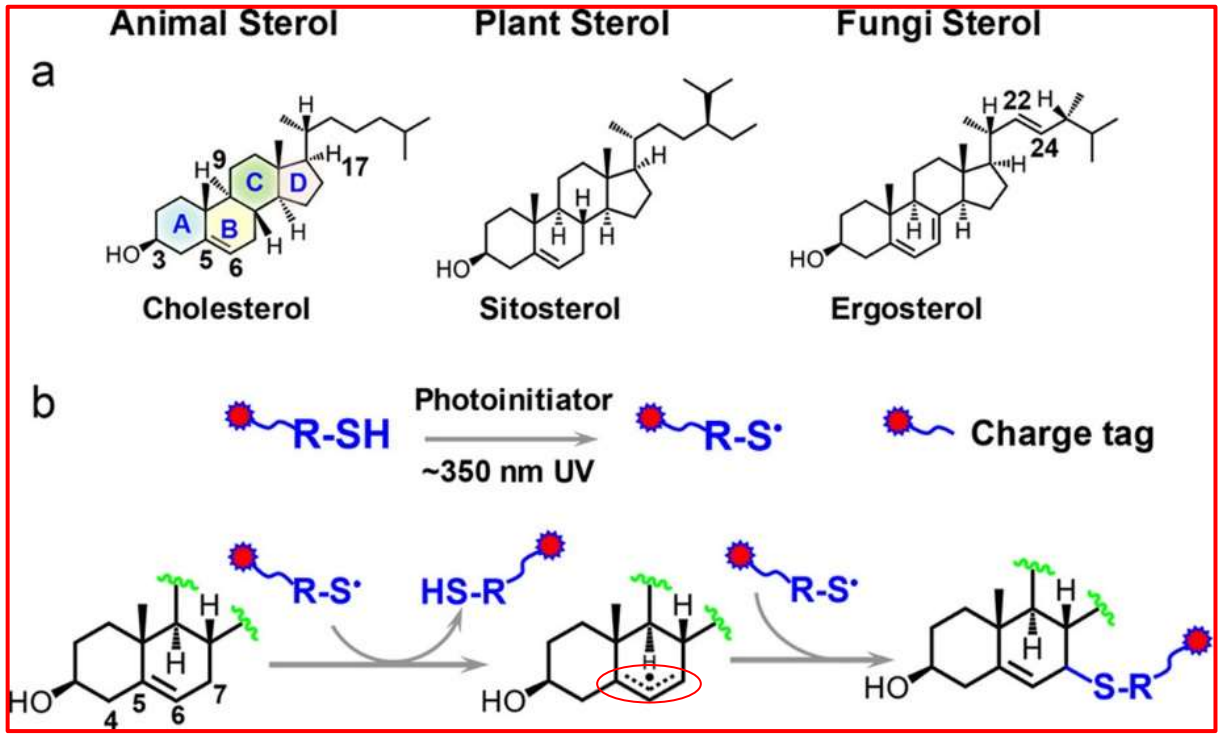
Sken neutrálních ztrát (NL)

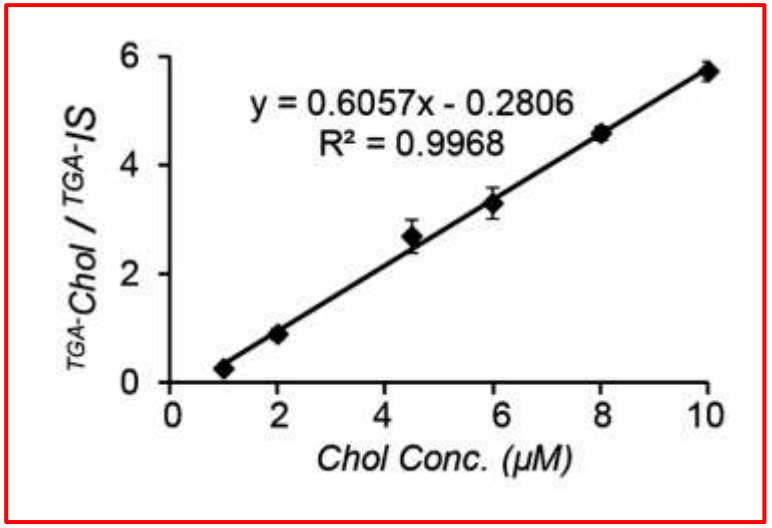


Značící činidlo
kyselina thioglykolová









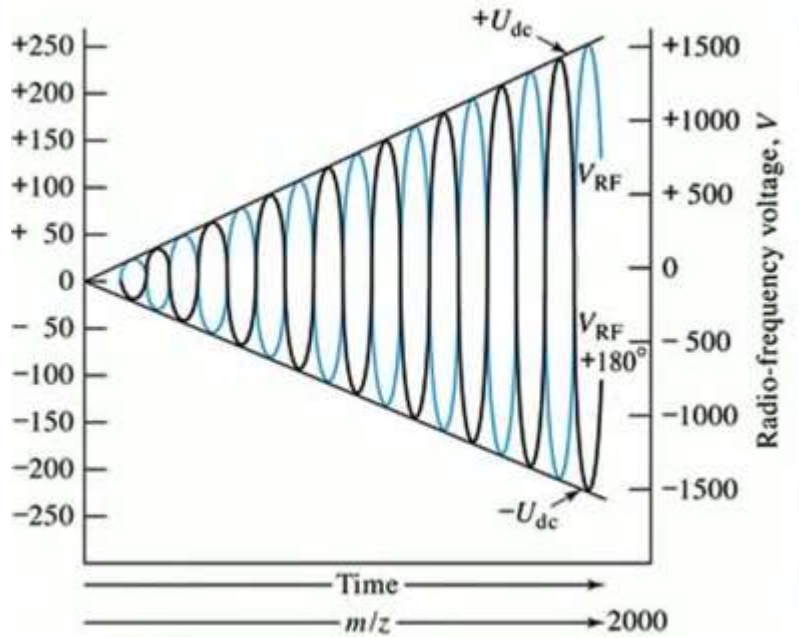
- Značka – zvýšení citlivosti detekce, specifická fragmentace CO_2

S. Adhikari, Y. Xia, Anal. Chem. 89 (2017) 12631

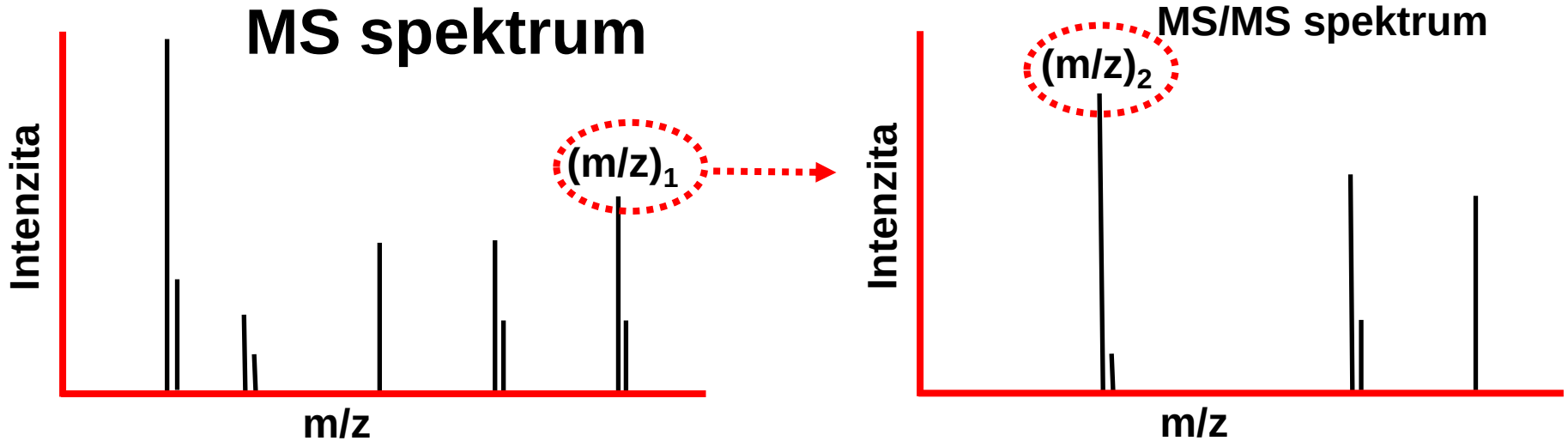
Sken jedné nebo více iontových reakcí

Selected Reaction Monitoring - SRM

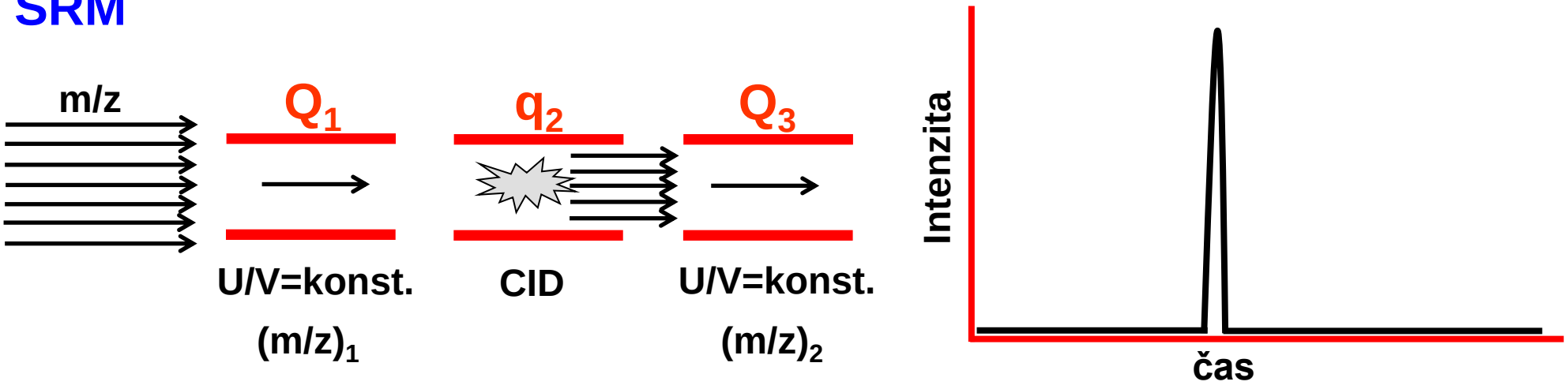
- podle IUPAC není označení MRM doporučováno
- podobné skenu iontu prekurzoru, ale prekurzory jsou předem známy
- výrazné zlepšení citlivosti, kvantitativní analýza
- oproti SIM výrazné zlepšení selektivity
- QqQ, sektorové analyzátory



Selektivní záznam iontových reakcí (SRM)



SRM



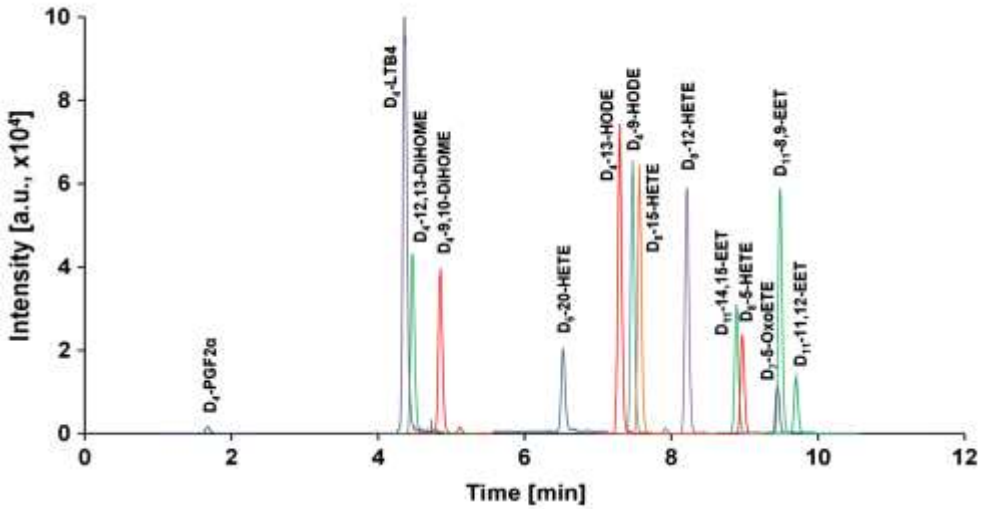
Optimalizace SRM podmínek

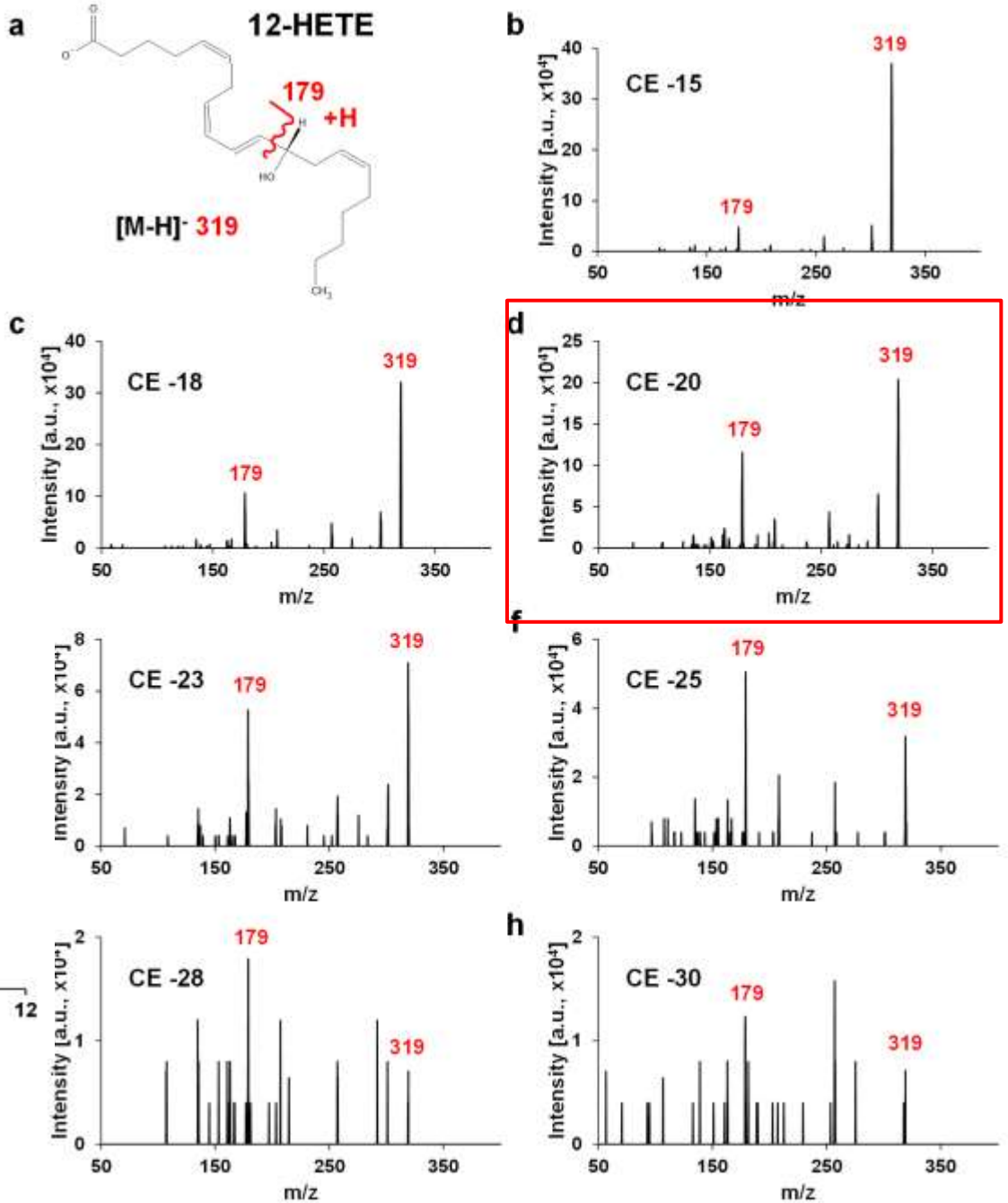
Je třeba zoptimalizovat následující parametry:

- **Volba prekurzorového iontu** – obvykle $[M+H]^+$ nebo $[M-H]^-$, event. jiný ion molekulového aduktu (méně časté)
- **Volba produktového iontu** – fragmentový ion poskytující nejvyšší intenzitu zvoleného přechodu, pokud je to možné, tak se vyhnout málo selektivním přechodům jako ztráta vody (vyšší riziko interference)
- **Volba kolizní energie** či dalším nastavení MS/MS po maximální citlivost (různé typy napětí, teplot a průtoků sušících plynů, atd.)
- **Skenovací rychlost** – velmi důležitý parametr, aby zvolená rychlost skenování poskytovala zároveň dostatečný počet bodů na pík (min. 10 -15, ideální 20) a také stabilní signál bez fluktuace
- **Optimalizace podmínek SRM nastavení** – manuální nebo automatická podle možností daného typu přístroje

Příklad reálné studie: oxylipiny v plazmě

- **Optimalizace kolizní energie pro nejvyšší citlivost SRM přechodu**
- **Porovnání intenzit produktového iontu v produktových spektrech**





M. Chocholoušková a kol., Anal Bioanal Chem 411 (2019) 1239-1251.

Využití SIM a RIC (EIC) v HR-MS/MS

- **Selektivní záznam iontů (SIM)** – záznam pouze zvolené hodnoty m/z s definovanou šířkou okna, v podstatě jde o první část SRM experimentu, ale bez použití MS/MS, výrazně nižší selektivita, ve spojení s nízkým rozlišením nelze pro kvantitu doporučit
- **Rekonstruovaný (extrahovaný) záznam iontů (RIC nebo XIC)** – v podstatě to samé jako SIM, jen rekonstrukce (extrakce) zvoleného iontu probíhá až dodatečně po změření LC/MS experimentu, takže plná spektra jsou pro všechny molekuly změřena (na rozdíl od SIM nebo SRM), ale citlivost je nižší oproti SIM
- **LC/MS s vysokorozlišujícím MS** – v takovém případě je selektivita SIM nebo RIC velmi vysoká, protože kombinujeme přesnou hodnotu m/z a známý retenční čas, pro kvantitu výhodné, např. úzkým izolačním oknem lze efektivně izolovat a kvantifikovat všechny izomerní molekuly s daným sumárním vzorcem a různými retenčními časy (pokud k tomu měříme MS/MS selektivita vzrůstá)

HR-MS/MS v kvantitativní analýze: příklad studie

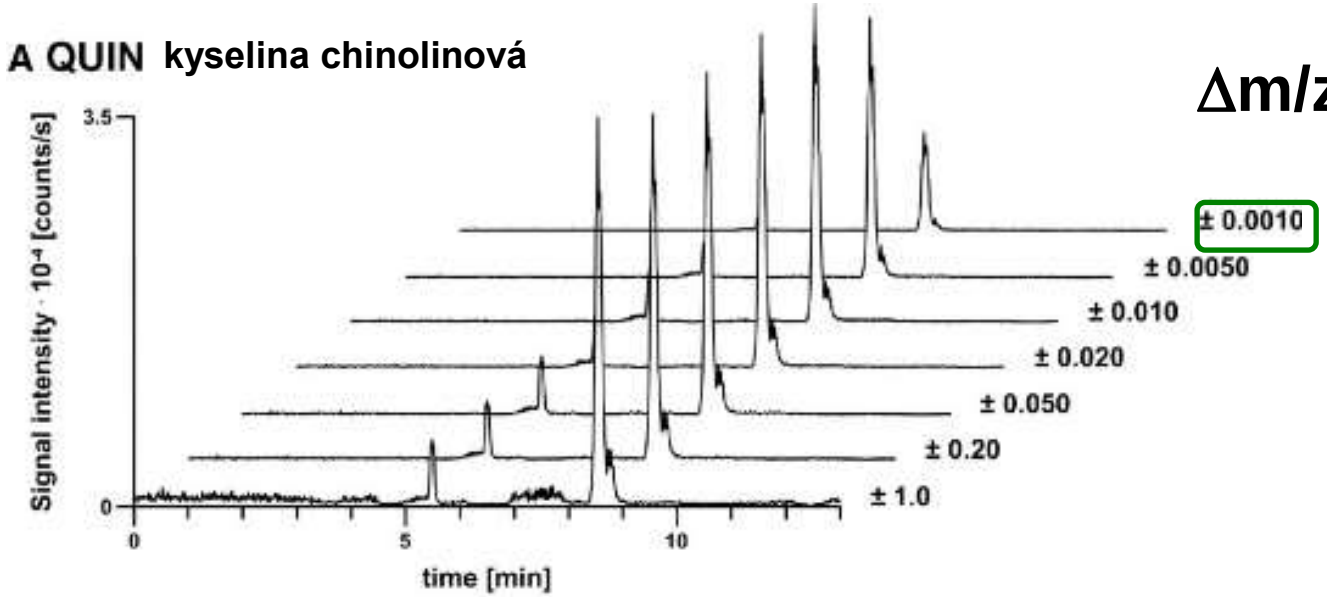
- **LC/QTOF-MS/MS, stanovení 4 metabolitů tryptofanového metabolismu v plazmě s použitím izotopicky značených IS pro každý metabolit - využití vysokého rozlišení (QTOF) a RIC (EIC) módu v MS/MS (rekonstrukce (extrakce) fragmentového iontu), optimalizace všech podmínek, validace**

Table 1. Optimized parameters for mass spectrometric detection of analytes and internal standards

	TRP	KYN	KYNA	QUIN	TRP-D5	KNYA-D5	QUIN-D3
Precursor ion *m/z*	203	207	188	166	208	193	169
Collison energy [eV]	−30	−12	−25	−12	−25	−35	−15
Declustering potential [V]	−10	−10	−10	−10	−10	−10	−10
Accumulation time [s]	0.01	0.1	0.1	0.1	0.01	0.1	0.1
Internal Standard	TRP-D5	TRP-D5	KYNA-D5	QUIN-D3			
Extracted fragment ion mass range	159.0870–159.0970	144.0411–144.0511	144.0377–144.0477	122.0177–122.0277	164.1185–164.1285	149.0715–149.0815	125.0381–125.0481

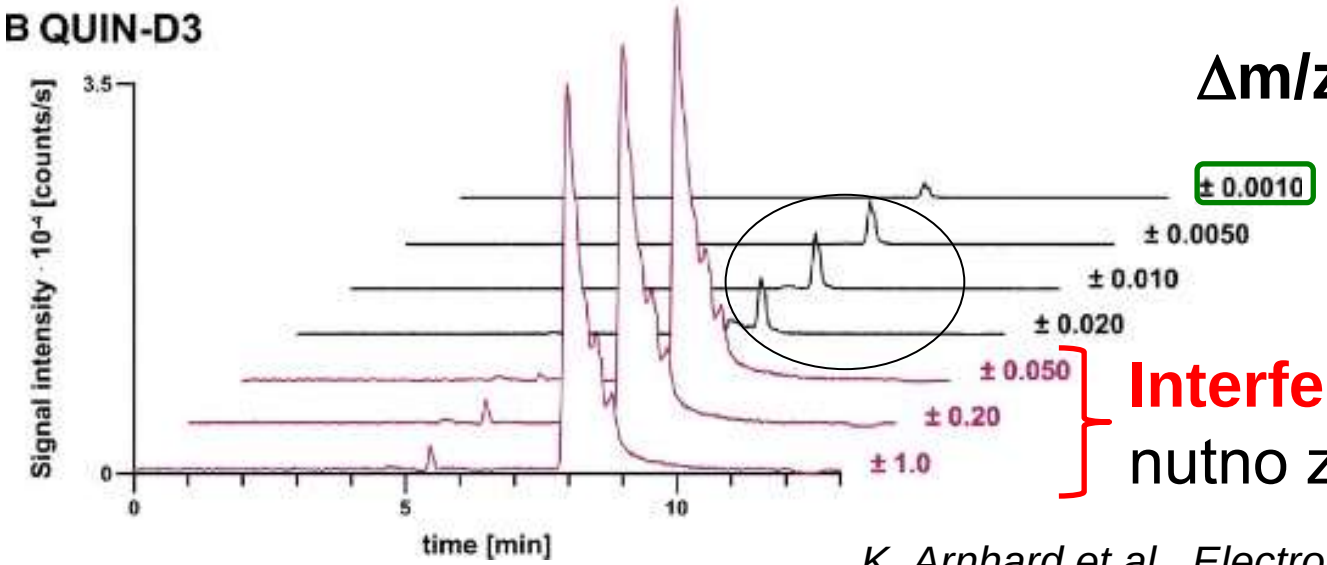
K. Arnhard et al., Electrophoresis 39 (2018) 1171

HR-MS/MS: optimalizace šířky izolačního okna pro vyvolání rekonstruovaného MS/MS chromatogramu



Δm/z

Pokles citlivosti – příliš úzké okno



Δm/z

Pokles citlivosti – příliš úzké okno

Interference – nutno zúžit izolační okno

K. Arnhard et al., Electrophoresis 39 (2018) 1171

HR-MS/MS: výsledky validace

Table 2. Results of the validation experiments

		TRP	KYN	KYNA	QUIN
Retention time [min]		5.3	5.1	7.5	8.3
LOD [ng/mL]		200	10	0.5	10
Linear range		500–50000 ng/mL	20–1000 ng/mL	1–50 ng/mL	20–1000 ng/mL
Intra-day precision [%]	*Low, n = 5*	7.3	11.1	6.0	13.2
	High, n = 5	5.3	4.8	4.8	7.9
Inter-day precision [%]	*Low, n = 15*	11.7	9.2	8.1	9.0
	High, n = 15	4.4	6.4	8.1	11.5
	Plasma sample 1, n = 10	12.2	10.2	17.7	17.5
	Plasma sample 2, n = 10	6.6	10.8	13.2	15.2
Accuracy [%]	*Low, n = 15*	98.2 ± 11.5	102.0 ± 9.4	102.4 ± 8.3	97.5 ± 8.8
	High, n = 15	105.1 ± 5.0	96.4 ± 6.2	101.8 ± 8.4	97.2 ± 11.8
Matrix effects [%]	*Low, n = 3*	81.3	80.7	72.4	102.0
	High, n = 3	83.3	82.1	79.7	79.5
Extraction Recovery [%]	*Low, n = 3*	90.4	105.7	119.5	124.6
	High, n = 3	100.7	98.7	113.6	109.4
Autosampler stability [h]		24	15	15	24

K. Arnhard et al., Electrophoresis 39 (2018) 1171

Porovnání QqQ a HR-MS/MS v kvantitativní analýze

- **QqQ ve spojení s SRM a izotopicky značenými IS**

– zavedená a široce používaná metoda pro spolehlivou kvantitu, nejlépe ve spojení s HPLC či ještě lépe UHPLC / UHPSFC

– spolehlivá a akceptovaná regulatorními orgány

- **Novější přístupy založené na HR-MS/MS**

– citlivost na nejnovějších HR systémech je srovnatelná, někdy dokonce vyšší než SRM u QqQ, zejména pro velký počet analytů (velmi záleží, na jakém příkladu budeme srovnávat, cílenou volbou příkladu lze podpořit vlastní preferenci)

– možné zvýšení selektivity a snížení izobarických interferencí, zejména pro velmi vysoké rozlišení >100 tisíc u FT přístrojů (orbitální past a ICR)

– pozor na zvolení vhodné skenovací rychlosti u FT přístrojů, aby byl dostatečný počet bodů na chromatografický pík (min. 10 až 15)

Porovnání MS skenů

Sken	Q_1	q_2	Q_3
základní sken	U/V skenování	-	-
selektivní záznam vybraného iontu (SIM)	Konstantní velikost napětí	-	-
sken produktových iontů (PR)	Konstantní velikost napětí	CID	U/V skenování
sken iontů prekurzoru (PI)	sken	CID	Konstantní velikost napětí
sken neutrálních ztrát (NL)	U/V skenování	CID	U/V skenování (konst. změna oproti Q1)
sken iontových reakcí (SRM)	Konstantní velikost napětí	CID	Konstantní velikost napětí