



- » Účinná korekce pozadí ICP-OES spekter
- » ICP-MS/MS – analýza bez interferencí
- » miRNA microarrays ve studiu regulace genové exprese
- » Imunodeplece plodové vody
- » Spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií
- » Přístroje pro extrakci na pevné fázi
- » Analýza environmentálních kontaminantů
- » Cílený screening a necílená analýza pomocí LC/MS Q-TOF
- » Nový iontový zdroj při analýze metodou static headspace

ChromAtoMol

časopis nejen pro analytické laboratoře

číslo 3

vychází zdarma a nepravidelně

Vydavatel:

HPST, s.r.o.
Písnická 372/20
142 00 Praha 4

Tel.: +420 244 001 231

Fax: +420 244 001 235

E-mail: info@hpst.cz

Web: www.hpst.cz

Redakce:

Ing. Ivo Novotný
produktový specialista
ivo.novotny@hpst.cz
Mob.: +420 724 309 027

Ing. Daniela Tršová, Ph.D.
manažer marketingu
daniela.trsova@hpst.cz
Mob.: +420 602 158 401

Ing. Michaela Vránová
marketingový specialista
michaela.vranova@hpst.cz
Tel.: +420 244 001 232
Mob.: +420 731 157 661

Autor fotografie na obálce:

Ing. Michaela Pluskalová, Ph.D.
odborný asistent obchodního týmu
(skupina genomiky a diagnostiky)
michaela.pluskalova@hpst.cz
Tel.: +420 244 001 245
Mob.: +420 736 606 878

Milí kolegové,

čas neúprosně letí a než jsme se stačili ohlédnout, je tu nový rok a dokonce již jaro. Možná jsme Vás před vydáním tohoto čísla časopisu déle napínali, ale jsme přesvědčeni, že Vás to, co jsme pro Vás v tomto i následujících letošních číslech připravili, mile překvapí.

Konec roku byl pro všechny z nás jako obvykle časově velmi náročný a na další aktivity tak nezbylo moc času. Proto jsme rádi, že ChromAtoMol vychází nepravidelně, nemusíme tedy připravovat články za každou cenu a můžeme se soustředit na ty, které v sobě skrývají kvalitní a jedinečný obsah. V minulém roce jsme v České republice instalovali téměř 250 instrumentů (moc Vám tímto děkujeme za projevenou důvěru!), což byl jeden z hlavních důvodů naší podzimní vytíženosti. Jen GC/MSD systémů bylo v loňském roce instalováno více než 30, a to nemluvě o náročných instalacích třech GC/Q-TOF nebo šesti GC/QQQ systémů zahrnujících častokrát kompletní vývoje a optimalizace metod.

Ale to už předbíháme a odhalujeme obsah speciálního – čtvrtého vydání časopisu, které můžete velice brzy očekávat a které přinese zatím nepublikované a jedinečné informace o dění v HPST a našich vybraných instalacích v minulém roce (a věřte, nebylo to lehké vybírání).

Velice nás také těší Váš čím dál větší zájem, ale i ochota publikovat Vaše vlastní výsledky. Docela často se setkáváme s Vašimi dotazy, kdy můžete očekávat další číslo, na co se v něm můžete těšit nebo dokonce přicházíte i s řadou Vašich podnětů a témat, která byste rádi v časopisu našli. Snažíme se na všem pracovat, a proto v dalších číslech můžete očekávat nové rubriky. Počet stažení časopisu z našeho webu nebo počet registrací pro pravidelný odběr tištěné nebo elektronické verze je pro nás povzbuzující signál, že si nechcete nechat ujít žádné z dalších čísel.

Aktuální vydání obsahuje opět články, které reflektují diskutovaná témata v našich oborech a přinášejí do české odborné veřejnosti informace, které častokrát nejsou v naší malé, ale krásné a technicky vysoce vyspělé zemi lokálně publikovány. I když jsou některé problematiky častokrát opakovány, není je vždy možné zcela a detailně díky jejich komplexnosti pochopit. Věříme, že články z našeho časopisu k tomu ale přispějí.

První dva články rozebírají horká témata z oblasti stopové analýzy kovů a způsoby, jakými si lze poradit s interferencemi a posunout tak Vaše analýzy o krok dál. Rozsáhlá a jedinečná review o fungování, možnostech a principech zatím málo známé hi-end techniky ICP-MS/MS instrumentů Vám jistě otevře nové obzory a možná přinese i nápady, jak řešit ne jeden problém ve Vaší laboratoři.

Druhá část časopisu je zaměřena na rychle rostoucí část HPST, která se věnuje oblasti molekulární biologie a genomiky. V tomto čísle se zaměříme konkrétně na oblast mutagenese, microarray analýzy a imunodeplece vysoce zastoupených proteinů. Dozvíte se o možnosti, jak si vyrobit klonovací a expresní vektor na míru svým potřebám nebo Vám představíme možnost studia regulace genové exprese prostřednictvím miRNA microarray analýzy. Na závěr kolegové z Centra Biomedicínského výzkumu z Hradce Králové popíší možnosti a své zkušenosti s imunodeplecí vysoce zastoupených proteinů ze vzorků plodové vody, což umožňuje následnou analýzu nízce zastoupených proteinů. A na závěr se podělíme o zkušenosti z námi pořádaného praktického workshopu na analýzu microarray.

Již tradičně největší a třetí částí je oblast separací a hmotnostní spektrometrie. Kolegové z Univerzity Palackého v Olomouci nám popisují kapilární elektroforézu ve spojení s hmotnostní spektrometrií, které má svoje nenahraditelné místo a mnoho svých jedinečných vlastností. Jak správně volit instrument a přistupovat k analýze nejen v oblasti LC/MS je tématem článku: „*Látky známé i neznámé: Cílený screening a necílená analýza pomocí LC/MS Q-TOF*“, který podrobně rozebírá jednotlivé strategie analýzy a vyhodnocení dat tak, aby bylo kýženého výstupu dosaženo co nejefektivněji. Příprava vzorků je a vždy bude důležitou součástí analýz a možnosti jedné z používaných technik naleznete společně s tipy a triky pro separace v kapalně fázi v dalších článcích. Celou sekci uzavírá ukázka možností našeho nejnovějšího přírůstku v oblasti GC/MS analýz s extrémním skokem v dosahovaných citlivostech. Jaký je jeho reálný výkon a srovnání s jeho bratříčkem v jedné z těch správných a cílových aplikací naleznete v aplikačním článku zaměřeném na analýzu těkavých látek metodou headspace.

Poslední částí je již tradičně přehled připravovaných akcí a školení HPST, které mají u Vás velký úspěch. Jejich přínos je hodnocen velice kladně a otevíráme díky Vašemu zájmu stále více nových termínů i typů školení.

Doufáme, že Vás potěší také přehled nejnovějších aplikací podle jednotlivých aplikačních oblastí, který Vám tak přinese rychlý náhled na to, co pro Vás Agilent připravil a jaká jsou aktuálně řešená témata. Abychom Vám byli blíže, a Vy jste měli lepší představu o našem týmu, rozhodli jsme se na konci tohoto čísla umístit již tradiční přehled kontaktů zpestřený novou kompletní fotogalerií našich tváří.

Ivo Novotný, šéfredaktor

Obsah

3	Pořádáme
4	Kde nás najdete
5	Účinná korekce pozadí komplexních matic s využitím softwarové dekonvoluce ICP-OES spekter (Jan Marek)
7	Tandemová hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS/MS) – analýza bez interferencí (Ivo Novotný)
16	Agilent miRNA microarrays – pokračte dál ve studiu regulace genové exprese (Iva Šenitková)
18	Praktický workshop na CGH microarray analýzu (Michaela Pluskalová)
19	SureVector – klonování nové generace (Irena Findejsová)
20	Imunodeplece plodové vody ve výzkumu nových biomarkerů předčasného porodu (Vojtěch Tambor, Fakultní nemocnice Hradec Králové)
23	Spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií (Vítězslav Maier, Univerzita Palackého v Olomouci)
26	Přístroje pro extrakci na pevné fázi (SPE) (Pavel Jehlička, Labicom s.r.o.)
27	Látky známé i neznámé: Cílený screening a necílená analýza pomocí LC/MS Q-TOF (Ondřej Lacina)
31	Ptáme se odborníka: Lze vylepšit chromatografi i bazických látek na starších HPLC systémech? (Labicom s.r.o.)
32	Použití nového iontového zdroje s vysokou účinností při analýze těkavých organických látek metodou static headspace (Michal Čaplygin)
38	Přehled školení v roce 2016 pořádaných společností HPST, s.r.o. (Růžena Penížková)
40	Kontakty

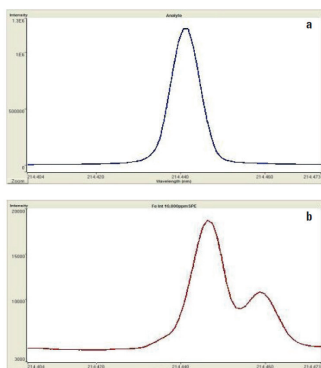
Pořádáme

Co:	Kdy:	Kde:	Info:
GC školení, uživatelské dovednosti a diagnostika	28. - 29. 4. 2016	Praha	http://hpst.cz/sluzby/hardware
GC školení, uživatelské dovednosti a diagnostika	3. - 4. 5. 2016	Praha	http://hpst.cz/sluzby/hardware
MS školení, uživatelské dovednosti a diagnostika	5. - 6. 5. 2016	Praha	http://hpst.cz/sluzby/hardware
MassHunter pro GC/MS	30. 5. - 3. 6. 2016	Broumov	http://hpst.cz/sluzby/software
LC školení, uživatelské dovednosti a diagnostika	4. - 5. 10. 2016	Praha	http://hpst.cz/sluzby/hardware
MassHunter pro GC/MS	31. 10. - 4. 11. 2016	Dřítěč	http://hpst.cz/sluzby/software
OpenLAB - ChemStation	1. - 4. 11. 2016	Dřítěč	http://hpst.cz/sluzby/software
GC školení, uživatelské dovednosti a diagnostika	29. - 30. 11. 2016	Praha	http://hpst.cz/sluzby/hardware
MS školení, uživatelské dovednosti a diagnostika	1. - 2. 12 2016	Praha	http://hpst.cz/sluzby/hardware

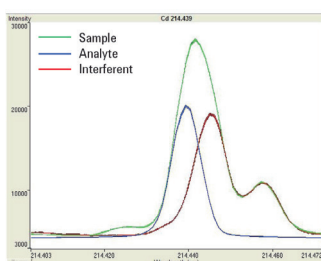
Kde nás najdete

Co:	Kdy:	Kde:	Info:
XXXVII. Imunoanalytické dny	10. - 12. 4. 2016	Plzeň	http://www.imunodny.eu/
5. konference České společnosti pro hmotnostní spektrometrii	13. - 15. 4. 2016	České Budějovice	http://www.czechms.org/cz/
5. Česká lipidomická konference	21. - 22. 4. 2016	Praha	http://lipidomics.uochb.cas.cz/5clk.html
Prague Spring Symposium	29. - 30. 4. 2016	Praha	http://www.slg.cz/2016/prague-spring-symposium
Discussion Forum - Host Pathogen Interaction	2. - 5. 5. 2016	Broumov	http://www.unob.cz/fvz/vyzkum_vyvoj/Documents/DF2016_Informace.pdf
Kurz laserové ablace	23. - 26. 5. 2016	Brno	http://www.spektroskopie.cz/kurz_laserove_ablace_2016
CHIRANAL	6. - 9. 6. 2016	Olomouc	http://chiranal2016.upol.cz/

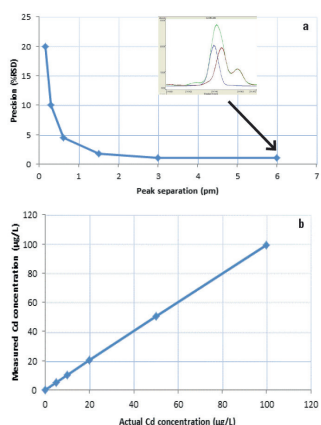
Účinná korekce pozadí komplexních matic s využitím softwarové dekonvoluce ICP-OES spekter



Obrázek 1
a) FACT model roztoku analytu Cd (10 mg/l)
b) FACT model roztoku interferentu Fe (10000 mg/l)



Obrázek 2
Ukázka FACT modelu aplikovaného na Cd 214.439 nm interferovaného Fe. Roztok obsahuje cca 100 µg/l Cd a 10000 mg/l Fe



Obrázek 3
a) Přesnost měření koncentrace Cd (50 replik) s využitím FACT pro separaci píků
b) správnost měření koncentrace Cd v různých hladinách ve vztahu k interferenci Fe

V dokonalém světě by poskytovaly ICP-OES spektrometry neomezené spektrální rozlišení a bez ohledu na typ vzoru by pro každý prvek byly dostupné nejcitlivější emisní čáry prosté spektrálních interferencí. U reálných vzorků s komplexními maticemi však tohoto ideálního stavu není povětšinou možné dosáhnout. Existuje však softwarové řešení, které proměňuje ideály ve skutečnost - FACT. Je toho dosaženo užitím velmi sofistikované, avšak uživatelsky snadno použitelné, softwarové techniky modelování spektra, která vytvoří přesný model komplexního analytického spektra, které je běžné při analýzách matričně složitých vzorků pomocí ICP-OES. Funkce FACT je běžnou součástí ovládacího softwaru Agilent ICP Expert II pro modely 5100 ICP-OES.

Praktickou výhodou FACT je jeho schopnost korekcí překrývajících se píků v blízkosti čáry analytu. Modely FACT je možné snadno vytvořit před, nebo i po změření vzorků, čímž získáváte jistotu, že budete schopni přesně vyhodnotit i ty nejzapeklitější vzorky. FACT také šetří drahocenný čas díky eliminaci opakované přípravy vzorků, re-analýz vzorků a nutnosti chrlení velkého množství výsledků pro odhalení nepravdivých výsledků. FACT je snazší a účinnější alternativou k mezivprvkovým korekcím. Poskytuje možnost přesné korekce pozadí, které může být využito u pozadí s velmi komplexní strukturou, kdy tradiční techniky korekce selhávají.

Jak FACT pracuje? Víme již, že FACT provádí okamžité spektrální korekce. Využívá k tomu značně složitých matematických technik pro modelování průběhu signálů spektra s výsledkem matematické dekonvoluce (tj. rozložení) analytického signálu od celkového (složeného) spektra. Matematické modely jsou vytvořeny změřením odezvy samostatných komponent, které předpokládáme ve vzorku. To v praxi představuje změření roztoku blanku, roztoku čistého analytu a roztoku čistého interferentu. Spektrální model každé složky je softwarově matematicky analyzován a připodobněn Gaussově křivce. Tím je získán matematický popis daného píku. Ve zbytcích spektra jsou kontrolovány zbývající struktury a pokud jsou dostatečně velké mohou být připodobněny dalším Gaussovým křivkám. Model složky je pak reprezentován jako soubor Gaussových píků a relativně malých zbytků.

Sebemensi odchylka vlnové délky nebo drift, které se mohou projevit od vytvoření daného modelu do doby jeho aplikace při analýze, jsou korigovány díky neustálému monitorování šesti plasmových argonových emisních čar v celém rozsahu vlnových délek. Díky tomu je zajištěna přesnost vlnových délek vytvořených modelů a to umožňuje jejich dlouhodobé použití. Na rozdíl od mezivprvkových korekcí není nutná znalost koncentrace analytu ani interferentu v daných roztocích. Koncentrace roztoků musí být jen dostatečně vysoká, aby bylo možné signál píku rozlišit od šumu (obvykle cca 50násobek detekčního limitu).

Jako první příklad (Obr. 1) můžeme uvést vytváření modelu silné emisní čáry kadmia 214.439 nm, která je částečně ovlivňována výrazně slabší emisní čarou železa 214.445 nm. To je běžným jevem například při analýze vzorků půd, kdy může být přesné stanovení stopového množství kadmia ovlivněno přítomností vysoké koncentrace železa. V momentě, kdy je model vytvořen, jsou všechny výsledky okamžitě updatovány. Na jeden analyt může být aplikováno až sedm interferenčních modelů. Následně lze všechny vytvořené interferenční modely přesunout a použít i v dalších metodách.

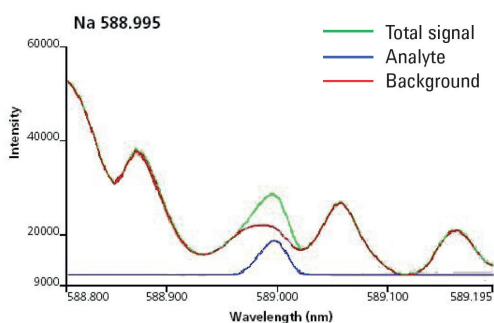
Rozlišení píků < 1pm

Optické rozlišení ICP-OES je dáno fyzikálními vlastnostmi optického systému. Je definováno jako šířka píku v polovině výšky (FWHM). To představuje šířku píku analytu v polovině intenzity signálu. Vzdálenost oddělující píky Cd a Fe (viz Obr. 2) je zhruba 6 pm. Takovouto vzdálenost neumí běžný optický systém ICP-OES plně rozlišit. V momentě, kdy se Vám na stejných vlnových délkách přímo překrývají píky analytu a interferentu, bývá obvyklou snahou volba jiné emisní čáry. V uvedeném příkladu na Obr. 2 je FACT schopen matematicky rozdělit tyto dva píky s přesností a správností < 2% RSD. FACT umožňuje stanovení koncentrací analytů s přesností (a správností) lepší než 5% RSD dokonce i při rozlišení 0.6 pm. Je tak dosaženo více než 10-krát lepšího výsledného rozlišení v porovnání se samotným optickým rozlišení přístroje (Obr. 3a). FACT je schopen v případě, kdy je v blízkosti píku dostupná další spektrální informace o chování interferentu, přesné korekce přímo

překrývajících interferujících píků. Ačkoliv se na Obr. 1b pík Fe 214.445 nm překrývá s píkem Cd 214.439 nm, můžeme druhý pík Fe 214.457 nm využít k ještě většímu zpřesnění korekce překrývajících se píků našeho analytu a interferentu.

Využití FACTu pro korekci pozadí

Spektrální interference, které zasahující do signálu analytu mohou pocházet z rozpouštědla. V případě analýzy kovů rozpouštěných v organických rozpouštědlech jsou známe interferenční vlivy emisního spektra uhlíku na stanovované analyty. Například víme, že při analýze otěrových kovů v olejích ovlivňuje komplexní pozadí matrice negativně detekční limity sodíku a draslíku. Tradiční techniky korekce pozadí neumožňují efektivní stanovení signálu pozadí pod píkem analytu s dostatečnou správností a přesností. S využitím techniky FACT, která snadno vymodeluje i takto složitou strukturu pozadí je možné dosáhnout mnohem přesnějších výsledků měření signálu analytu. Při stanovení Na v oleji rozpouštěném v rozpouštědlech na bázi kerosinu (např. Jet-A) můžeme s využitím FACT snížit meze kvantifikace až o jeden řád.



Obrázek 4

Správnost korekce pozadí při měření nízkých koncentrací Na v oleji (ředěném Jet-A) s využitím FACT

Analýza drahých kovů

V oblasti těžby a rafinace drahých kovů vzorky často obsahují velmi vysoké koncentrace zlata, kovů platinové skupiny (platina, palladium, rhodium, iridium, ruthenium a osmium) a také základních kovů (měď, chróm, nikl, kobalt, měď, železo a zinek) a jsou často analyzovány pomocí ICP-OES. Velmi často je při analýzách pro korekci možných spektrálních interferencí využívána meziprvková korekce, což představuje analýzu jednoprvkových roztoků všech prvků o známé koncentraci pro určení interferenčního faktoru pro každou kombinaci analyt/interferent. S dobrou volbou emisních čar bude většina prvků prosta spektrálních interferencí, i když v takto vysoce koncentrovaných vzorcích může být poměrně složité se interferencím vyhnout.

Názornou ukázkou využití modelů FACT může být příklad stanovení iridia, které je velmi důležitým drahým kovem. Iridium má své hlavní emisní čáry 224.268 nm a 212.681 nm. Zatímco tyto dvě vlnové délky nabízejí pro iridium nejnižší limity detekce, podléhají snadno spektrálním interferencím. Bez účinné korekce může přítomnost ostatních drahých a základních kovů (Cu, Au, Rh) ve vyšších koncentracích potenciálně vést k reportování chybných výsledků. Iridium 224.268 nm je interferováno mědí s docela silnou emisní čarou 224.262 nm (Obr. 5a). S odstupem píků 6 pm, bez korekce, budou i nevelké koncentrace mědi poskytovat chybné výsledky. Přestože výrazně slabší než interference mědi, ale za to s větším překryvem emisních píků, jsou pozorovatelné také interference zlata a niklu v koncentracích >1000 mg/l. Po vytvoření modelu pro Ir (analyt) a Cu (interferent), bude FACT eliminovat interference mědi. S rozlišením pouhých 2 pm bude FACT při vytvoření daného modelu pro Au (interferent) úspěšně korigovat také interference zlata (Obr. 5b).

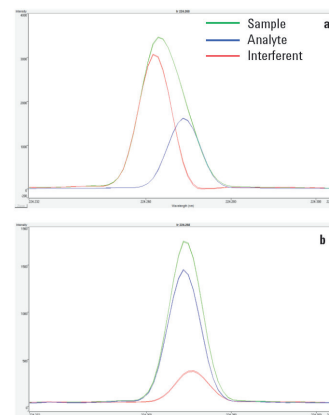
Ir 212.681 nm

Zatím co je druhá nejintenzivnější emisní čára iridia 212.681 nm prosta interferencí mědi, je v bezprostřední blízkosti nepříliš silné emisní čáry zlata (Obr. 6a). I když jsou píky Ir (analytu) a Au (interferentu) plně rozlišeny, může intenzivní emisní signál zlata snižovat správnost při měření nízkých koncentrací iridia. Jak ukazuje Obr. 6b, výrazně slabší čára rhodia 212.675 nm se také částečně překrývá s iridiovou čarou 212.681 nm. Obr. 6c ukazuje FACT korekci obou interferencí - tedy Au i Rh - na Ir a demonstruje výhodu FACT v poskytování správných korekcí v případě násobných interferencí. Zatímco interferující Au pík je v podstatě rozlišen od analytu Ir, chvost silného interferujícího signálu může vést k nesprávné korekci pozadí u analytu. FACT snadno počítá i s takovýmito situacemi a je tak velmi účinným softwarovým nástrojem, který Vám přinese klid na duši i v případě analýz složitých vzorků s komplexní maticí.

Jan Marek

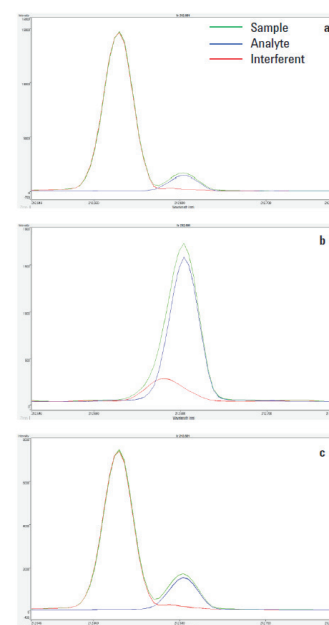
jan.marek@hpst.cz

6



Obrázek 5

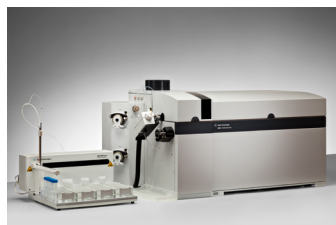
- a) FACT model 2.5 ppm Ir s 25 ppm Cu
- b) FACT model 2,5 ppm Ir s 1000 ppm Au



Obrázek 6

- a) FACT model 2,5 ppm Ir s 1000 ppm Au
- b) FACT model 2,5 ppm Ir s 1000 ppm Rh
- c) FACT model 2.5 ppm Ir s 500 ppm Rh a Au

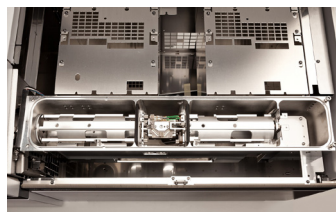
Tandemová hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS/MS) – analýza bez interferencí



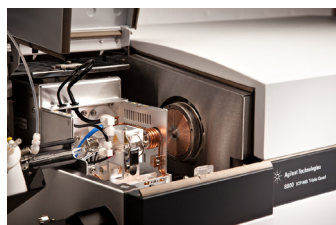
Obrázek 1
ICP/QQQ 8800 Agilent Technologies v konfiguraci pro pokročilé inteligentní dávkování vzorků ISIS



Obrázek 2
ICP/MS Triple Quad Agilent Technologies



Obrázek 3
Pohled na vnitřní konstrukční uspořádání ICP/MS Triple Quad Agilent Technologies



Obrázek 4
Oblast hořáku a plazmy ICP/MS Triple Quad Agilent Technologies

ICP-MS systémy na bázi kvadrupólových hmotnostních analyzátorů (ICP MS), jsou v dnešní době čím dál rozšířenější analytickou technikou v laboratořích zaměřených na anorganickou analýzu, a to především díky vysoké citlivosti, nízkým detekčním limitům, širokému dynamickému rozsahu a možnosti stanovení velkého množství prvků za velmi krátkou dobu. Technologie ICP MS má také samozřejmě určitá **omezení**, ale ta se postupně daří řešit díky neustálým pokrokům v této oblasti.

1. Tolerance k vyšším obsahům matrice

Díky hardwarovým vylepšením moderních ICP-MS spektrometrů během posledních 6 let došlo k dramatickému zlepšení tolerance k obsahu matrice. Systémy Agilent Technologies dnes rutinně využívají modul pro možnost vnášení vysoce zasolených vzorků HMI (High Matrix Introduction). Je to technologie ředění aerosolu před vstupem do hořáku, což snižuje zatížení plazmatu samotnou maticí (vzorku nebo ředícího roztoku v případě naředění v kapalně fázi). To umožňuje analyzovat rutinně a automaticky vzorky do 3% nebo až 25% celkového množství rozpuštěných pevných látek (TDS), a to přímo a bez předchozího ředění, a také výrazně zlepšit celkovou stabilitu a výtěžnost ionizace a minimalizovat kontaminaci a tím nutnost údržby samotného spektrometru.

2. Interference

Interference a jejich odstraňování je neméně důležitou výzvou a největším problémem v oblasti ICP-MS, na který se klade velký tlak v použitých technologiích a jejich vývoji. Od zavedení techniky ICP-MS do běžné praxe především pro ultra-stopovou analýzu v čistých maticích uběhlo již přes 20 let a tato technologie má za sebou velký skok. Od systémů bez kolizních/reakčních cel vyžadujících používání složitých korekčních rovnic, přes období prudkého vývoje v používání různých reakčních/kolizních plynů a hardwarových uspořádání (které trvá dodnes a jistě ještě bude pokračovat v budoucnu), přes nákladnější a složitější technologie s vysokým rozlišením až k nejmodernějším tandemovým technikám MS/MS.

Kontrola a potlačování/odstraňování interferencí je dnes na velice vysoké úrovni a systémy Agilent v této oblasti využívají již třetí, opět o něco vylepšenou generaci kolizně/reakční cely na bázi oktapólu, skvěle fungující nejen s různými reakčními plyny, ale díky své konstrukci především s kolizním plynem – heliem. To umožňuje s jedním nastavením podmínek kolizní cely jednoduchou, spolehlivou a přesnou kvantifikaci všech potřebných prvků v široké škále matic na úrovni běžně vyžadované v legislativě. Některé aplikace vyžadující větší citlivost v komplexních maticích způsobujících problémové spektrální interference zůstávají ale pro standardní kvadrupólové ICP-MS systémy stále velkou výzvou.

Nejmodernějším (a praxe potvrdila, že také nejúčinnějším) řešením problému odstraňování kritických interferencí je technologie využívající tandemové uspořádání hmotnostního spektrometru. Tandemová hmotnostní spektrometrie byla ještě před pár lety dominantou především v organické analytické chemii a díky jejím vlastnostem a principům také nejčastěji využívanou technikou pro ultrastopovou analýzu ve složitých maticích. Z aktuální situace v oblasti ultrastopové organické analytické chemie můžeme usuzovat, že technologie trojitých kvadrupólů v budoucnu téměř zcela vytlačí jiné MS techniky, např. MS s vysokým rozlišením, do oblasti pro tyto techniky velice úzce specializované. Je velkou otázkou, proč tato technologie nebyla dříve zavedená také do běžné praxe v oblasti anorganických analýz. Jedna z odpovědí, která se nabízí nejvíc je poptávka a potřeba této technologie v rutinní nebo výzkumné praxi. Toto také potvrzují plány a odhady Agilent Technologies při zavádění této technologie do praxe před 4 lety. Optimistické plány byly v prvním roce prodeje překročeny o více než 300%, a to především díky jednoduchosti použití, samotnému výkonu ICP-MS/MS systému a rychlému objevování stále nových a nových oblastí, kde technologie MS/MS může přinést výhodu nižších detekčních limitů, eliminace složitých úprav vzorků před analýzou nebo výrazně lepší přesnosti a stability výsledků nezávisle na složení matrice.

Agilent 8800 ICP-QQQ byl poprvé komerčně představen v roce 2012. Díky svému jedinečnému uspořádání hmotnostního detektoru sestávajícímu ze dvou tandemových kvadrupolových hmotnostních analyzátorů s vloženou kolizně/reakční celou na bázi oktapólu je Agilent 8800 schopen využívat režim MS/MS k odstranění/potlačení i takových interferencí, které jsou jinými technikami obtížně odstranitelné nebo neodstranitelné.

Lepší kontrola reakčních procesů v kolizní cele si tak velice rychle našla svoje místo v průmyslových nebo výzkumných laboratořích v oblastech **polovodičů**, ve výrobě **ultračistých chemikálií** a materiálů, v **geologii**, v oblasti analýzy **radionuklidů** nebo v oblasti „**life-science**“. Režim MS/MS je ale přínosný také pro analýzu náročnějších prvků nebo

odstraňování problémových interferencí často se vyskytujících v běžných aplikacích jako je **analýza půd, odpadních nebo podzemních vod**, analýzy širokého spektra **potravinářských vzorků**, ve **speciálních analýzách**, a v poslední době také v analýze **nanočástic**.

Velkou výhodou ICP-QQQ systémů Agilent série 8800 je již zmiňovaná stejná technologická platforma jako u jeho sourozenců z oblasti klasických ICP-MS systémů na bázi jednoduchých kvadrupólů. Ta přináší srovnatelnou jednoduchost použití, vysokou robustnost, možnost analýzy vysoce zasolených vzorků a nižší provozní náklady.

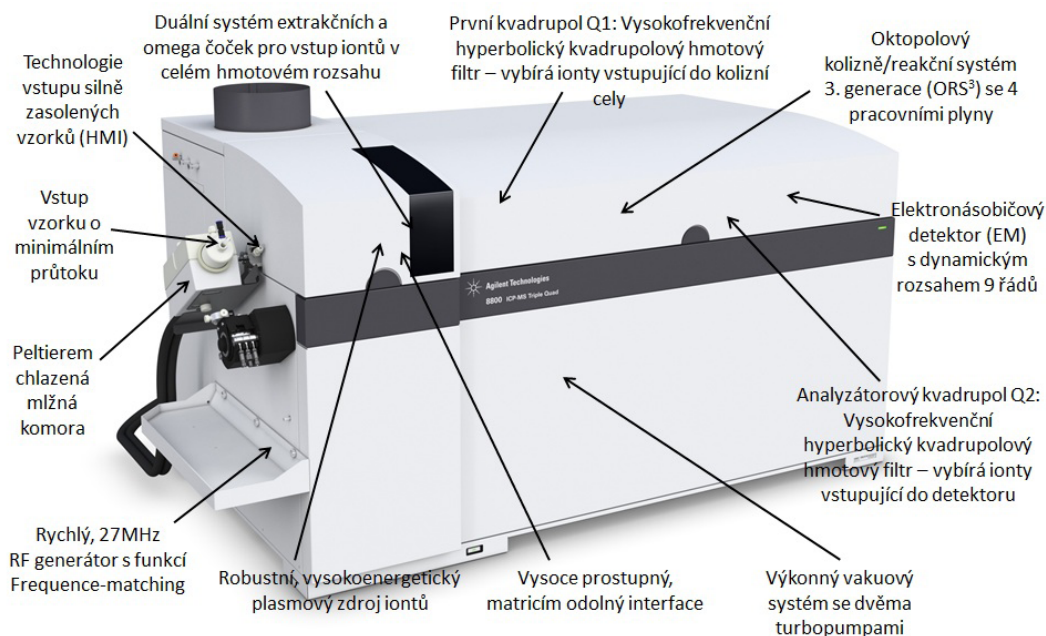
Technologie a principy ICP-QQQ

Možností nastavení ICP-QQQ systému je celá řada, což je společným rysem s principy fungování tandemových hmotnostních spektrometrů v organické analytické chemii. Tím ale veškerá jejich podobnost (kromě již zmiňované konstrukce) končí.

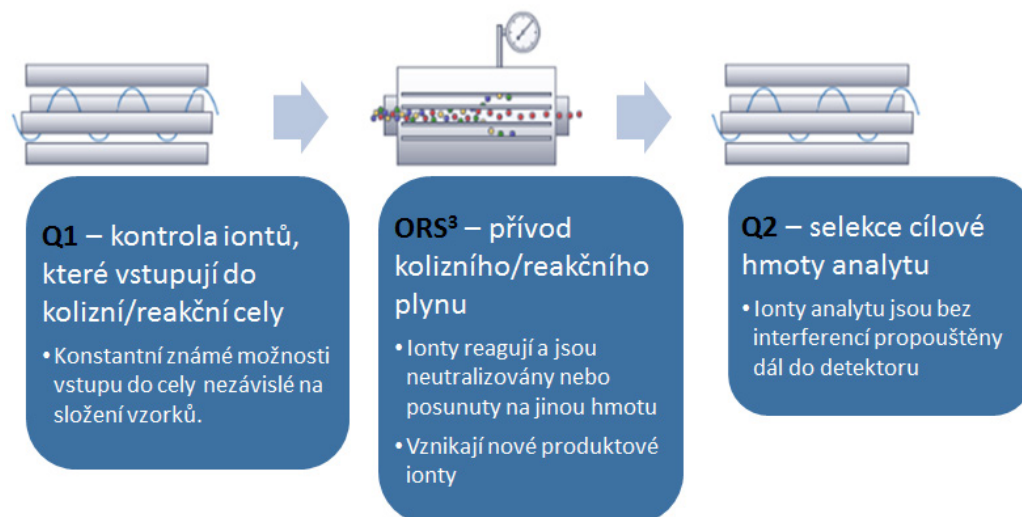
Základním principiálním rozdílem fungování je chemie probíhající v reakční cele. Zatímco filozofie tandemových spektrometrů v organické analytické chemii spočívá v principu štěpení molekul sledovaných analytů, v anorganické analytické chemii je tomu přesně naopak. Reakční cela ICP-QQQ spektrometrů využívá míry reaktivity sledovaných analytů nebo interferujících atomů/molekul s plyny, které jsou do reakční cely přiváděny. Z této míry reaktivity vycházejí dva základní MS/MS módy - „on-mass mode“ (měření na stejné

hmotě) a „mass-shift mode“ (měření na jiné hmotě), které si popíšeme níže.

Nesmíme ale zapomenout, že tandemový hmotnostní spektrometr může fungovat (a často také funguje) jako tradiční kvadrupolový systém v tzv. „single-quadrupole“ módu, kdy je první kvadrupól před kolizní celou nastaven jako zcela propustný („ion-guide“, tj. pouze ionty propouští) nebo částečně propustný („bandpass“, tj. filtruje určitý rozsah hmot vstupujících do kolizně/reakční cely). Přístroj tak může být použit v různých režimech provozu v závislosti na povaze měřených analytů, na typu a složení matrice vzorku, a na požadavcích analýzy z hlediska detekčních limitů a citlivosti.



Obrázek 5
Konstrukce ICP-QQQ spektrometru Agilent 8800 Series



Obrázek 6
Základní princip ICP-QQQ spektrometrů Agilent 8800 series

Operační režimy nastavení

1. Standardní kvadrupólový ICP-MS systém – Q1 pasivní

V tomto režimu je první kvadrupól nastaven do režimu pouze propustného vodiče iontů (tzv. pasivní cely/pasivního filtru), který všechny ionty propouští tak, jak do něj vstoupily. Ionty z plazmatu po selekci na iontové optice tak vstupují (obdobně jako u jednoduchých kvadrupólů) do kolizní/reakční cely a přímo tak interagují s kolizním/reakčním plynem. Tento mód je využíván pro velkou část prvků, které nejsou zatíženy interferencemi, nebo u kterých jsou interference snadno potlačitelné na akceptovatelné hodnoty pomocí inertního kolizního plynu He.

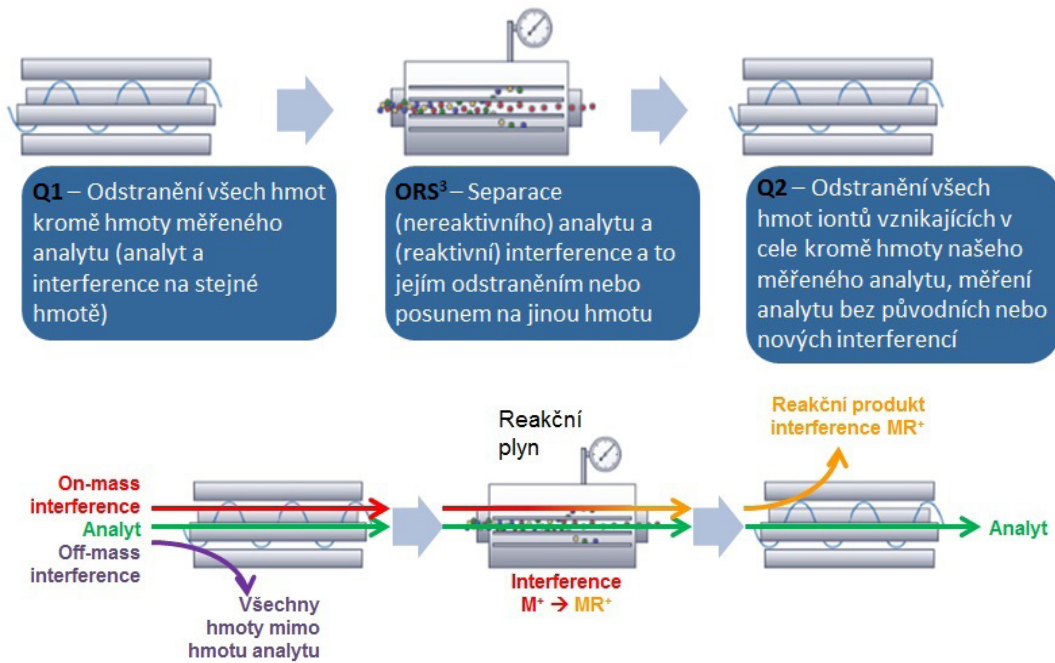
2. Standardní kvadrupólový ICP-MS systém – Q1 aktivní

V tomto režimu již první kvadrupól plnohodnotně filtruje ionty vstupující do kolizní/reakční cely, čímž významně napomáhá selektivnímu odstranění interferencí. Některé standardní ICP-MS spektrometry s kolizní celou typu kvadrupól/flatpole a jedním kvadrupólovým hmotnostním filtrem mohou používat kolizní celou nastavenou do režimu pouze omezeně propustného vodiče iontů (tzv. aktivní cely/bandpass filtru). Takový systém však ionty propouští pouze v určitém rozsahu hmot, a může tak jen částečně omezit tvorbu interferencí v reakční cele. Do kolizní/reakční cely tím vstupuje pouze omezená část iontů a může tak být sníženo riziko možných interferencí. Bohužel toto uspořádání není schopno fungovat jako skutečný jednotkový filtr, ale spíše jako filtr omezující vstup širšího pásu hmot vstupujících do kolizní cely. Pokud je ale hmota prekurzoru blízká cílové hmotě našeho analytu, nemusí být možné efektivně vznik interference potlačit. Právě v takových situacích je velkou výhodou vy-

užití konstrukčního řešení MS/MS systému se skutečným plnohodnotným kvadrupólovým filtrem s jednotkovým rozlišením, který omezí vstup všech interferencí ze vzorku nebo matrice vznikajících v plazmatu a propustí pouze hmotu vybraného analytu. Analýza cílového analytu v módu „on-mass“ nebo „mass shift“ je tak velice přesná, a to nezávisle na typu nebo složení matrice.

3. Tandemový kvadrupólový ICP-MS/MS systém - On-Mass Mode (měření na stejné hmotě - Q1 a Q2 jsou nastaveny na stejnou cílovou hmotu analytu)

Tento režim je jedním ze dvou základních operačních módů MS/MS systému. První z kvadrupólů Q1 je nastaven na cílovou hmotu sledovaného analytu a umožňuje tak vstoupit do kolizní cely pouze prekurzorům (analytu a interferujícím polyatomickým molekulám) o jedné vybrané hmotě. Následně díky vhodně zvoleným reakčním podmínkám dochází v reakční cele k interakci interferencí s reakčním plynem a vzniku nových molekul, které již ale mají jinou hmotu než cílový analyt, a nadále s ním tak neinterferují. Druhý kvadrupól je nastaven na stejnou hmotu jak cílový analyt (stejně jako první kvadrupól), nově vzniklé molekuly jsou tak odstraněny a detekován je tak pouze cílový analyt. Tento operační mód tedy převádí interferující molekuly na jinou hmotu, která již s cílovým analytem na jeho přirozené izotopické hmotě nekoliduje.

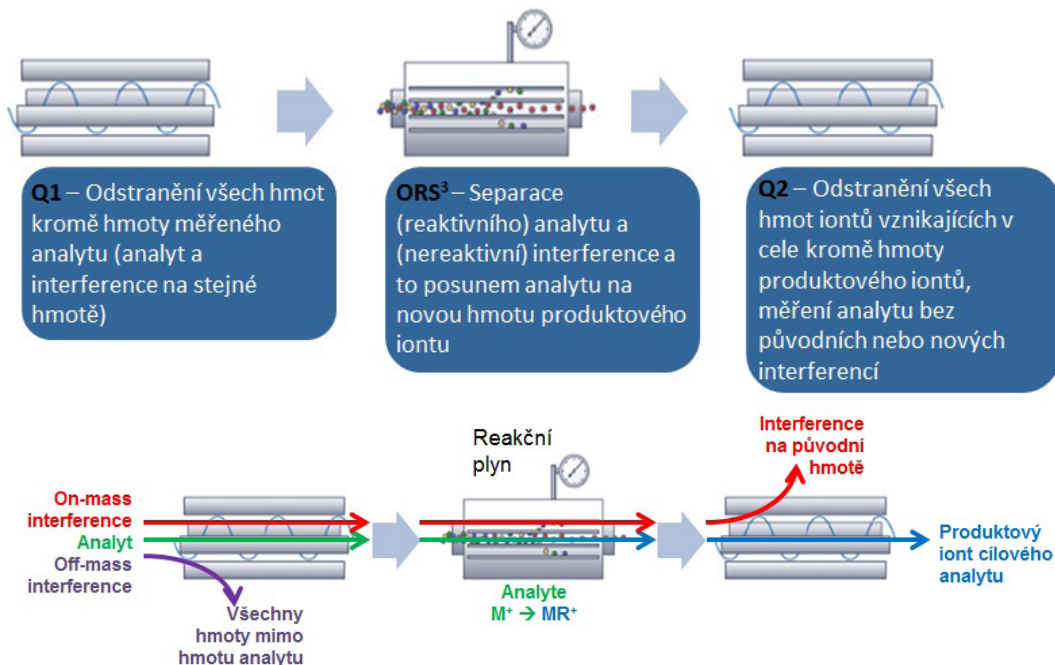


Obrázek 7
Tandemový kvadrupólový ICP-MS/MS systém - On-Mass Mode - měření na stejné hmotě

4. Tandemový kvadrupólový ICP-MS/MS systém – Mass-Shift Mode (měření na nové hmotě - Q1 a Q2 jsou nastaveny na různé hmoty)

Jedná se o druhý základní operační mód tandemových MS/MS systémů. První kvadrupól Q1 je nastaven na vstupní „přirozenou izotopickou“ hmotu sledovaného analytu a umožňuje vstup do kolizní cely pouze prekurzorům (analytu a interferujícím polyatomickým molekulám) o jedné vybrané hmotě. Následně díky vhodně zvoleným reakčním podmínkám dochází v reakční cele k interakci

analytu s reakčním plynem a vzniku nové molekuly (sloučeniny analytu a reakčního plynu), která již ale má jinou hmotu než původní nebo nově vzniklé interference a nadále s nimi tak neinterferuje. Druhý kvadrupól je nastaven na cílovou hmotu nově vzniklé molekuly analytu, interference jsou tak odstraněny a detekován je pouze cílový produkt analytu. Tento operační mód tedy převádí reaktivní analyt na jinou hmotu, která již s interferencemi na přirozené izotopické hmotě analytu nebo nově vzniklých molekul nekoliduje.



Obrázek 8
Tandemový kvadrupólový ICP-MS/MS systém – Mass-Shift Mode – měření na nové hmotě

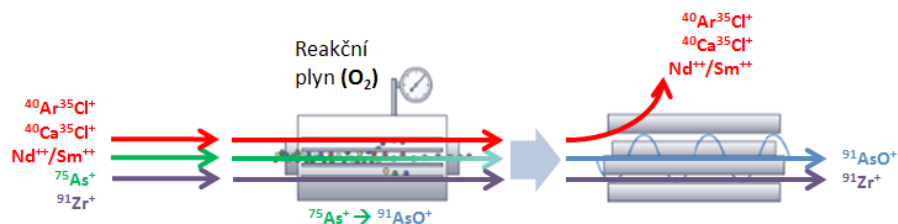
V běžné praxi je analýza některých prvků zatížena řadou interferencí v závislosti na typu vzorku a matrice a přesná analýza a vyhodnocení výsledků jsou dosti komplikované. Díky

technologii MS/MS je analýza těchto prvků přesnější a jednodušší. Následuje několik typických příkladů.

Analýza arsenu (As)

Arsen je jeden z typických „problémových“ prvků. Za jeho interference je zodpovědná řada prvků přítomných v běžných maticích vzorků. Výsledky analýz také mohou zkreslovat interference vytvořené v plazmatu díky přítomnosti argonu, nebo interference vzniklé z běžně používaných kyselin při rozpouštění vzorků (HCl a další). Helium v kolizní cele v režimu High Energy velice efektivně odstraní tyto běžné interference na hmotě 75 (např. ArCl^+ , CaCl^+ a další), takže dosažení mezí stanovitelnosti obvykle požadovaných v normách není velkým problémem. Heliový mód funguje velice robustně a nezávisle na typu matrice

nebo znalosti vzorku. Bohužel běžně přítomné dvojitě nabitě interference prvků vzácných zemin REE (Rare Earth Element) jsou již pro standardní kvadrupólové systémy problémem: díky své vysoké energii v případě použití helia jako kolizního plynu celou procházejí. Pokud použijeme reakční mód cely a O_2 jako reakční plyn, narážíme na další omezení systémů s jednoduchým kvadrupólem, a to na interferenci na hmotě 91 reakčního produktu AsO^+ s běžně přítomným $^{91}\text{Zr}^+$, který není schopen tak rychlé a kompletní reakce s O_2 jako As, a případně na nově vzniklé interference z reakční cely.



Analyt a interferující ionty vstupují do kolizní cely

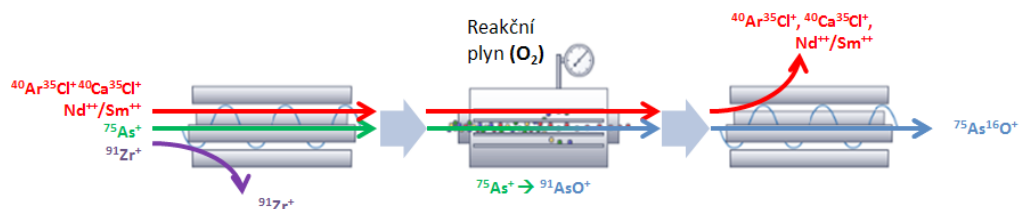
As^+ reaguje s O_2 za vzniku produktového iontu AsO^+ . Ne všichni Zr^+ reaguje za vzniku ZrO^+ (část Zr^+ prochází dál)

Kvadrupól je nastaven na produktovou hmotu AsO^+ (m/z 91) – odstraňuje původní interference $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$, $^{40}\text{Ca}^{35}\text{Cl}^+$, $\text{Nd}^{++}/\text{Sm}^{++}$ ale není schopen odstranit zbylý $^{91}\text{Zr}^+$

Obrázek 9
Analýza arsenu: ICP-MS – reakční mód s použitím O_2

Elegantním a jednoduchým řešením těchto problémů je využití reakčního MS/MS módu, který v prvním kvadrupólu odstraní veškeré interference na cílové hmotě 91 tím,

že propustí do kolizní cely pouze hmotu 75, a v druhém kvadrupólu propustí pouze produkt reakce $^{75}\text{As}^+ + 16\text{O} \rightarrow ^{91}\text{AsO}^+$, který není interferencemi zatížen.



Q1 nastaven na m/z 75, odstraní všech hmot mimo 75. $^{91}\text{Zr}^+$ je na hmotě 91 odstraněn

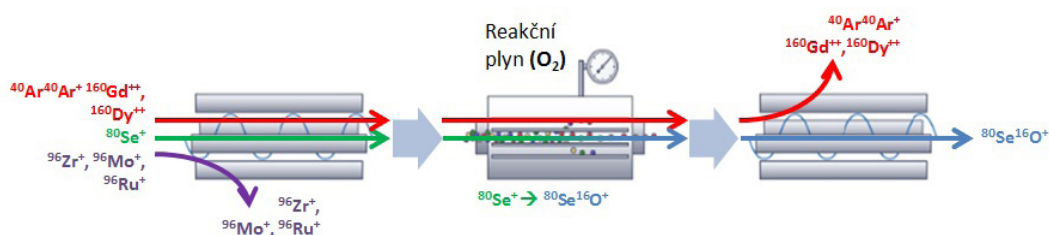
As^+ reaguje s reakčním plynem O_2 za vzniku produktového iontu AsO^+ . $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$, $^{40}\text{Ca}^{35}\text{Cl}^+$, $\text{Nd}^{++}/\text{Sm}^{++}$ nereagují a zůstávají na hmotě m/z 75

Q2 nastaven na m/z 91 produktového iontu AsO^+ – zbylé interference na původní hmotě m/z 75 jsou odstraněny

Obrázek 10
Analýza arsenu: ICP-MS/MS – reakční mód s použitím O_2

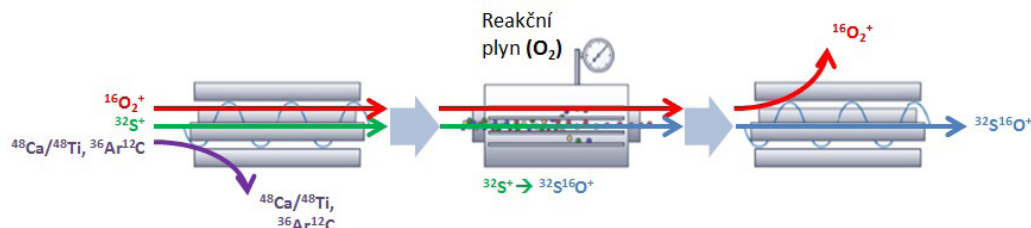
Analýza selenu (Se)

Zde je základní ukázka použitého reakčního módu při analýze selenu:



Obrázek 11
Analýza selenu: ICP-MS/MS – reakční mód s použitím O_2

Zde je základní ukázka použitého reakčního módu při analýze síry:



Obrázek 12
Analýza síry: ICP-MS/MS
– reakční mód s použitím O₂

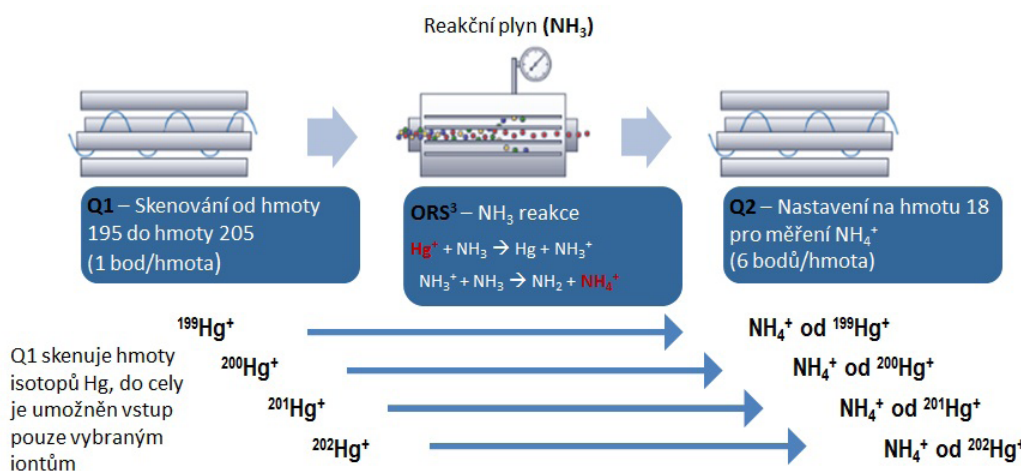
Kromě výše zmíněných standardních operačních módů využívaných v rutinní analýze nabízí tandemové hmotnostní spektrometry mnohem více. Tyto další MS/MS módy mohou být zajímavé především při výzkumu a vývoji nových metod pro ICP-MS/MS systémy, které (zdá se) jsou z pohledu techniky jako takové stále na začátku, a jsou tak velkým publikačním potenciálem pro vědecko-výzkumnou sféru,

kde mnoho nových aplikací stále čeká na své objevení. Nejen z těchto důvodů je investice do této techniky z dlouhodobého hlediska dobrou investicí také pro rutinní (komerční) laboratoře. Jelikož popsání těchto dalších operačních módů nemusí být na první pohled zcela pochopitelné, ukážeme si princip jejich fungování na vybraných příkladech.

5. Tandemový kvadrupólový ICP-MS/MS systém – Precursor Ion Scan (skenování prekursorových iontů – Q1 skenuje potenciálně zajímavé ionty vstupující do kolizní cely, Q2 je nastaven na cílovou hmotu)

Příkladem využití tohoto módu může být analýza rtuti v reakčním módu s NH₃, která za

běžných podmínkách není možná, jelikož jsou nabitě ionty Hg v reakci s NH₃ neutralizovány, a není je tedy možné dále detekovat: $\text{NH}_3 + \text{Hg}^+ \rightarrow \text{NH}_3^+ + \text{Hg}$. V reakční cele pak dále dochází k reakci mezi samotnými molekulami NH₃, předání náboje a vzniku cílové měřené molekuly NH₄⁺: $\text{NH}_3^+ + \text{NH}_3 \rightarrow \text{NH}_2 + \text{NH}_4^+$.



Obrázek 13
Tandemový kvadrupólový ICP-MS/MS systém – Precursor Ion Scan: skenování prekursorových iontů – Q1 skenuje potenciálně zajímavé ionty vstupující do kolizní cely, Q2 je nastaven na cílovou hmotu

6. Tandemový kvadrupólový ICP-MS/MS systém – Product Ion Scan (skenování produktových iontů – Q1 je nastaven na hmotu vybraného prekursoru, Q2 skenuje potenciálně zajímavé produktové ionty tvořící se v kolizní cele)

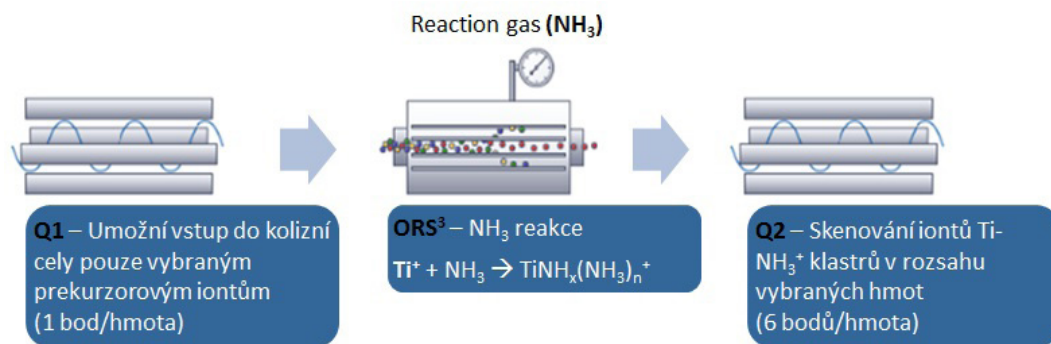
Příkladem použití tohoto módu může být analýza titanu v reakčním módu s NH₃. Pokud

bychom tuto analýzu Ti srovnali s analýzou na klasických kvadrupólových ICP-MS spektrometrech, tak dospějeme k závěru, že přesná kontrola iontů, které vstupují do kolizní cely, přináší odstranění možných interferencí od NH₃ klastrů jiných běžně přítomných analytů jako jsou například :

- $^{48}\text{TiNH}^+$
- $^{48}\text{TiNH}(\text{NH}_3)_3^+$
- $^{48}\text{TiNH}_2(\text{NH}_3)_3^+$
- ^{63}Cu (hmota 63)
- $^{64}\text{ZnNH}_2(\text{NH}_3)_2^+$ a $^{63}\text{Cu}(\text{NH}_3)_3^+$ (^{114}Cd a ^{114}Sn) (hmota 114)
- $^{65}\text{CuNH}_2(\text{NH}_3)_3^+$ a $^{64}\text{Zn}(\text{NH}_3)_3^+$ (^{115}In a ^{115}Sn) (hmota 115)

Obrázek 14

Tandemový kvadrupólový ICP-MS/MS systém – Product Ion Scan (skenování produktových iontů – Q1 je nastaven na hmotu vybraného prekursoru, Q2 skenuje potenciálně zajímavé produktové ionty tvořící se v reakční cele)



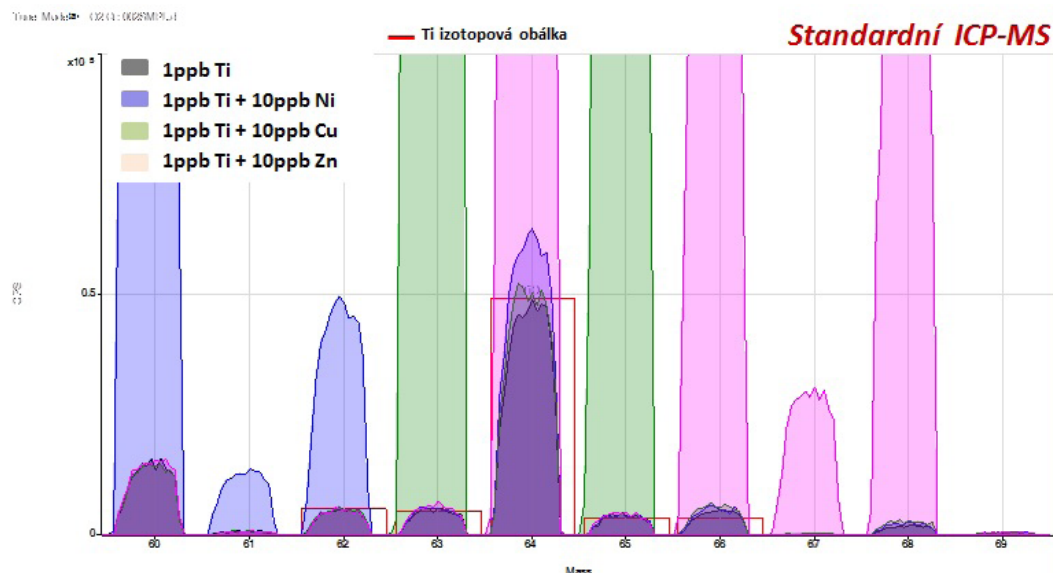
7. Tandemový kvadrupólový ICP-MS/MS systém – Neutral Gain Scan (skenování neutrální ztráty – Q1 a Q2 skenují společně v nastaveném rozdílu hmot)

Tento operační mód umožňuje monitorování produktových iontů s vybraným rozdílem hmoty od prekursorů – např. po reakci s O_2 nebo NH_3 . Příkladem použití může být měření titanu v reakčním módu s O_2 , kde možnost odstranění interferencí běžných prvků jako

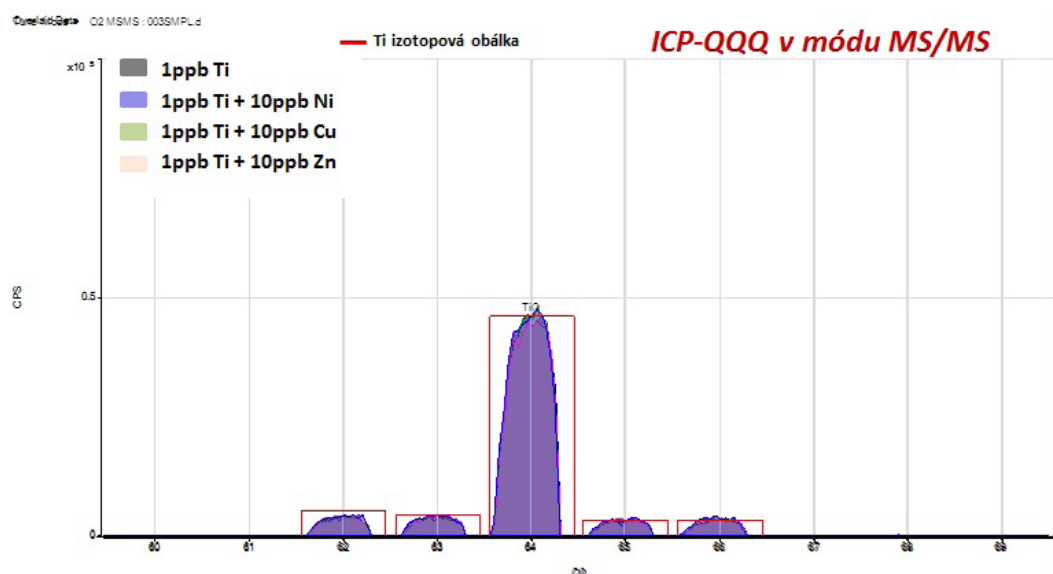
Ni, Cu nebo Zn může být u klasických ICP-MS systémů problémem. Potvrzení přesnosti a správnosti výsledků měření pomocí sledování izotopů a izotopické obálky oxidů Ti je výhodou ve srovnání s klasickými systémy. Q2 je nastaven na sledování reakce, tedy navázání atomu O s hmotou 16 na jednotlivé izotopy Ti ($^{46}\text{Ti}^+ \rightarrow ^{62}\text{TiO}^+$, $^{47}\text{Ti}^+ \rightarrow ^{63}\text{TiO}^+$, $^{48}\text{Ti}^+ \rightarrow ^{64}\text{TiO}^+$, atd.).

Obrázek 15

Tandemový kvadrupólový ICP-MS/MS systém – Neutral Gain Scan: standard Ti 1 ppb ovlivněn interferencemi 10 ppb Ni, Cu a Zn

**Obrázek 16**

Tandemový kvadrupólový ICP-MS/MS systém – Neutral Gain Scan: TiO píky přesně kopírují izotopickou obálku Ti. MS/MS mód umožňuje měření Ti jako TiO bez interferencí Ni, Cu a Zn



Pokud bychom měli zhodnotit, který z módů a kolizních/reakčních plynů je nevhodnější pro použití v rutinní praxi, dospějeme logicky k závěru, že tímto módem je „mass-shift“ mód s reakčním plynem O_2 . Důvodem tohoto závěru je skutečnost, že O_2 je jako reakční plyn aplikovatelný na širokou paletu „problémových“ analytů, a díky kontrole reakčních procesů řízením vstupů do reakční cely se stává unikátním řešením pro ty případy, které nebylo do té doby možné řešit pomocí klasických kvadrupolových ICP-MS systémů. Ve vybraných případech je skvělým řešením

použití reakčního plynu NH_3 , který umožňuje použití ICP-QQQ i v aplikacích, které byly donedávna odkázány pouze na SF-ICP-MS systémy se sektorovými analyzátory a s vysokým rozlišením. Ty však přes výrazně vyšší pořizovací i provozní náklady (obdobně jako v organické analytické chemii) nedosahují tak nízkých detekčních limitů jako tandemové systémy.

Mezi analyzované prvky využívajících výhod ICP-MS/MS v různých maticích a aplikacích popsaných v literatuře patří:

B (11)	C (12, 13)	Al (27)
Si (28, 29, 30)	P (31)	S (32, 33, 34)
Cl (35)	Ca (46)	Ti (46, 47, 48, 49, 50)
V (51)	Cr (52, 53)	Mn (55)
Ni (58, 60)	Co (59)	Zn (66)
As (75)	Se (77, 78, 80, 82)	Sr (86, 87, 88)
Mo (92, 95, 96, 98)	Rh (103)	Pd (104, 105, 106, 108, 110)
Cd (110, 111, 112, 113, 114)	I (127, 129)	Cs (134, 135, 137)
Pt (194, 195, 196)	Hg (202)	U (236, 238)

Tabulka 1
Kritické prvky využívající výhody ICP-MS/MS

Obecné srovnání hi-end modelů ICP-MS 7900 a ICP-MS/MS 8800 Agilent Technologies

ICP-MS systémy jsou obecně využívány jako nejvyšší možné („hi-end“) řešení pro ultrastopovou analýzu širokého spektra prvků v různých maticích. Z pohledu ICP-MS systémů na bázi kvadrupolových analyzátorů můžeme tvrdit, že s rezervou splňují většinu aktuálních požadavků na detekční limity daných normami. Každé řešení má svoje výhody i omezení počínaje výrazným rozdílem v pořizovací ceně, přes výrazně odlišné možnosti pro analýzu především kritických prvků ovlivněných interferencemi, až po různé požadavky na údržbu a provozní náklady.

Výkon

Standardní detekční limity jsou pro „hi-end“ modely Agilent 7900 ICP-MS a Agilent 8800 ICP QQQ velice podobné v běžných provozních módech, v čistých standardech, a pro většinu standardních prvků také v reálných maticích.

Pro reálné vzorky s různými obsahy interferujících prvků a především prvků tvořící dvojité nabitě interference, které není možné pomocí standardních ICP-MS systémů analyticky odstranit, má ICP-QQQ nespornou výhodu v přesnosti výsledku díky eliminaci

použití matematických korekcí.

Robustnost

Oba modely (Agilent 7900 ICP-MS i Agilent 8800 ICP-QQQ) jsou vybaveny systémem pro možnost ředění aerosolu v plynné fázi před vstupem do plazmatu, a to faktorem až ± 100 krát (max. 25% TDS) pro Agilent 7900 ICP-MS, a faktorem až ± 25 krát (max. 3% TDS) pro Agilent 8800 ICP-QQQ.

Model Agilent 8800 je díky principiální konstrukci MS/MS systému více náchylný na kontaminaci prvního kvadrupólu, a může vyžadovat častější údržbu ve formě čištění (četnost údržby je závislá především na reálném počtu vzorků, typu matic a nastavení analytických metod).

Provozní náklady

Z pohledu standardních provozních nákladů je v případě MS/MS módů nutno počítat s lehce delší dobou analýzy způsobenou používáním více reakčně-kolizních módů pro analýzy kritických prvků (doba analýzy se prodlouží o řádové několika málo desítek sekund). Veškeré ostatní provozní náklady jsou pro oba systémy srovnatelné.

Analýza nanočástic

Elektronika Agilent 7900 ICP-MS umožňuje dosahovat 30x kratší dwell time pro měření nanočástic: 0,1 ms u modelu 7900 ve srovnání s 3 ms pro model 8800 series. Pro běžné typy analýz je ale dwell time 3 ms naprosto dostačující, což dokazuje také množství publikací.

ICP-MS/MS systém má naopak velkou výhodu v odstranění případných interferencí a snížení vlivu pozadí na minimum, což umožňuje měření menších nanočástic a nižších

koncentrací, a to i pro „problémové“ prvky jako Ti, Si a další.

Speciační analýza

Pro speciační analýzu je z pohledu detekčních limitů použití Agilent 7900 ICP-MS srovnatelné s použitím Agilent 8800 ICP-QQQ. Podobná je také reprodukovatelnost analýz, nicméně co se týče kvality výsledků, tak ICP-MS/MS systém může být (stejně jako v předchozích případech) díky MS/MS módu přesnější.

Závěr

Z pohledu splnění aktuálních požadavků kladených legislativou v oblasti širokého spektra běžných analýz splňují oba systémy s rezervou veškeré požadavky. Z pohledu provozních nákladů jsou systémy také srovnatelné. Rozdílné jsou především pořizovací náklady, přesnost dosahovaných výsledků a reálných detekčních limitů především pro problematické prvky.

Nároky a požadavky kladené na kontrolní, provozní, výzkumné a další špičkově vybavené laboratoře u nás i v jiných zemích vyžadují co možná nejpřesnější a nejjistější výsledky. Ty jsou lépe dosažitelné s ICP-MS/MS systémy, které na rozdíl od ICP-MS systémů odstraňují problematické interference efektivněji díky MS/MS módům, ve kterých se interference odstraní selektivně bez rizika vzniku dalších sekundárních interferencí. Nemusí se tak používat matematické korekce a odhady, jejichž výsledek díky rozdílnosti vzorků nemusí být vždy správný.

Při analýze nanočástic (i přes vyšší hodnoty dwell time, které jsou v běžné praxi dostačující) přináší MS/MS nízké hodnoty pozadí, nízké detekční limity a vyšší přesnost analýz, a to především pro problematické nanočástice s Ti nebo Si.

Vzhledem k rychlému rozvoji ICP-MS/MS technologie a novým aplikacím ukazujícím na stále nové možnosti (podobně jako v případě LC-MS/MS a GC-MS/MS) je systém Agilent 8800 určitě vhodnou investicí do budoucna

Ivo Novotný

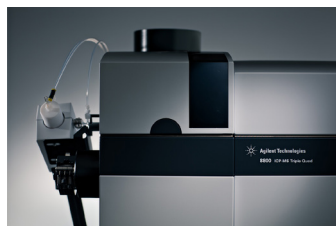
ivo.novotny@hpst.cz

Martin Juříček

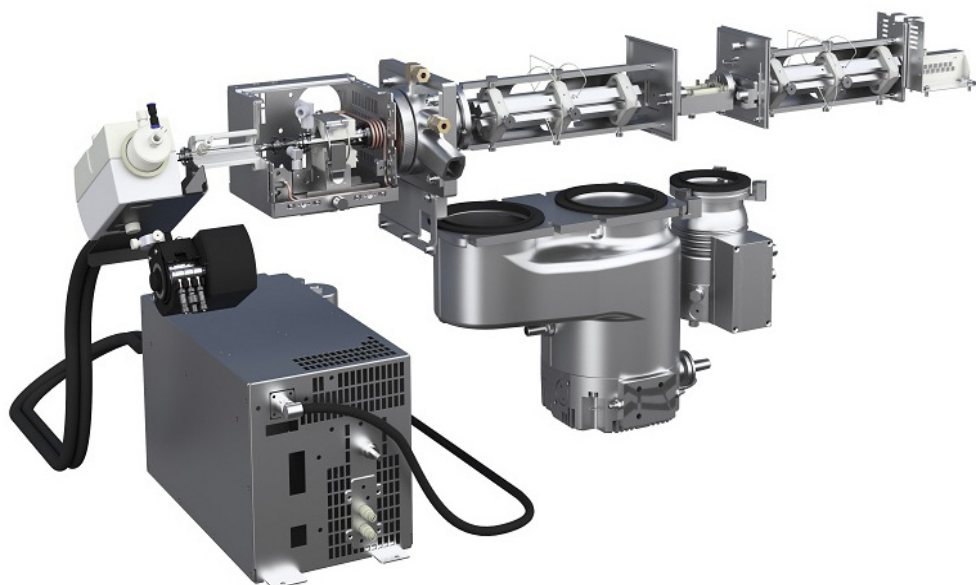
martin.juricek@hpst.cz

Daniela Tršová

daniela.trsova@hpst.cz



Obrázek 17
ICP/QQQ 8800 Agilent Technologies



Obrázek 18
Náhled technického uspořádání ICP/QQQ 8800 Agilent Technologies

Agilent miRNA microarrays

- pokračte dál ve studiu regulace genové exprese

16

MicroRNA (miRNA) je skupina jednovláčkových nekódujících molekul RNA o délce kolem 22 nukleotidů [1] a vznikají transkripcí tzv. *mir* genů, které se ve velkém množství nacházejí v genomech živočichů i rostlin. Na rozdíl od jiných typů malých molekul RNA (např. snRNA, small nuclear RNA), jejichž exprese je v buňce konstantní, miRNA jsou exprimovány pouze v určitý čas nebo určitými tkáněmi [2]. Molekuly miRNA jsou částečně nebo zcela komplementární k jedné nebo více molekulám mediátorové RNA (mRNA) a jejich vzájemná vazba inhibuje následnou translaci této mRNA do proteinu [3]. Díky těmto základním charakteristikám patří miRNA mezi hlavní regulátory genové exprese a tím i veškerých dějů probíhajících v živém organismu (např. proliferace, diferenciace, apoptóza). Studium zastoupení miRNA molekul v různých typech tkání se stalo nepostradatelným především při výzkumu onkogeneze, ale s přibývajícím znalostmi o těchto nekódujících molekulách se ukazuje také jejich velký potenciál pro jejich použití jako diagnostických a prognostických markerů. Jedním z hlavních úskalí studia miRNA molekul je obtížné srovnání dat získaných pomocí různých technologií. Této problematice se věnovala studie kolektivu autorů [4], ve které bylo podrobně porovnáváno celkem 12 komerčně dostupných platform zastupujících tři hlavní používané technologie (kvantitativní PCR, hybridizace a sekvenování). Mezi hlavní parametry, které byly sledovány, patřila např. reprodukovatelnost, hladina detekce, citlivost a specifita. miRNA microarrays od Agilent Technologies byly zařazeny mezi tři nejlépe hodnocené platformy a tento výsledek ukazuje, že jsou vhodným nástrojem studia genové exprese [4].

Tyto microarrays spojují unikátní přímé značení miRNA molekul s inovativním designem a syntézou průb, která je umožňována tzv. „SurePrint Inkjet“ technologií a přímým provázáním na aktuální miRBase databázi, která roste a je aktualizována tak, jak jsou odhalovány nové miRNA molekuly. Díky dostupným formátům 8x15K a 8x60K umožňují arrays velmi citlivou a specifickou analýzu miRNA exprese.

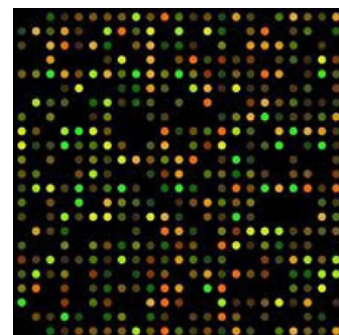
Pomocí patentované SurePrint Inkjet

technologie jsou *in situ* syntetizovány oligomerní řetězce o délce 40 – 60 nukleotidů přímo na microarray sklo. Díky této technologii a inovativnímu designu (Obr. 3) lze dosáhnout vysoké čistoty, přesnosti a uniformity průb a zároveň umožňuje vytvoření zákaznické microarray pro jakýkoli organismus nebo více organismů najednou. Navíc protokol přípravy vzorku využívající metodu přímého značení dovoluje pracovat se vstupním množstvím celkové RNA kolem 100 ng. Pro kontrolu účinnosti značení a hybridizace je připraven miRNA Spike-In Kit a jako referenci lze použít Universal miRNA Reference Kit. A v rámci kompletnosti portfolia je dostupný také analytický software **GeneSpring SX**, díky kterému můžete získaná data porovnávat s dalšími daty z transkriptomických nebo jiných –omic analýz.

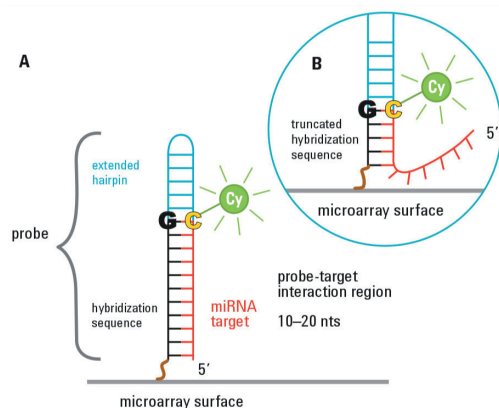
Je obecně známé, že nejen kvantita, ale i kvalita RNA významně ovlivňuje validitu a spolehlivost získaných dat. Kvalita RNA je definována čistotou a integritou RNA. Této problematice pro oblast reverzní PCR (RT-PCR) se věnuje např. MIQE guidelines [5], kde je uváděn systém 2100 Bioanalyzer od Agilent Technologies (Obr. 4) jako užitečný nástroj pro zjištění kvantity a kvality RNA. Pro oblast „small RNA“ vyvinul Agilent Technologies speciální kit Small RNA Assay, pomocí kterého lze selektivně kvantifikovat absolutní množství (pg/μl) a relativní zastoupení (%) tzv. small RNA. Díky technologii, kterou využívá systém **2100 Bioanalyzer**, tak kromě číselných dat získáte také elektroforeogram a „gel-like“ obrázek. Při kombinaci s kitem RNA 6000 Nano, který je vhodný pro analýzu celkové RNA, můžete mít ucelený přehled o množství a stavu RNA, která vstupuje do Vašich analýz, ať už s použitím RT-PCR nebo microarrays.



Obrázek 1
Agilent 2100 Bioanalyzer



Obrázek 2
Detail microarray

**Obrázek 3**

Design miRNA microarray prób.

Nasytovaná sekvenční mikroarray próba (černá) se hybridizuje k cílové sekvenci RNA (červená). Hnědě je vyznačeno ukotvení próby na skleněném povrchu mikroarray. A) Začleněný guanin (G) na 5' konci syntetizované sekvence je komplementární k přídavnému a fluorescenčně naznačenému cytosinu (C) na 3' konci cílové miRNA sekvence. Tento dodatečný G-C pár mezi prábou a sekvencí miRNA zvyšuje stabilitu celé vazby. Navíc všechny próby obsahují tzv. vlásenky (modrá), které sousedí s oblastí hybridizace miRNA molekuly a znesnadňují hybridizaci větších molekul RNA, tzv. non-target RNAs. B) V případě, že by mohlo docházet k nespecifickým interakcím, umožňuje optimalizace designu zkrácení sekvence 5' konce miRNA molekuly a tím zlepšit finální specifitu próby.

**Obrázek 4**

Agilent 2100 Bioanalyzer je univerzální systém pro kvantifikaci a kontrolu kvality DNA, RNA, proteinů a buněk pomocí jedné platformy.

Pokud je v centru Vašeho zájmu studium regulace genové exprese, nabízí Vám Agilent Technologies kompletní řešení pro všechny kroky Vaší práce. Jeho výrobky Vás mohou provázet od izolace RNA přes kontrolu její kvality a kvantity až po samotnou analýzu pomocí katalogových nebo zákaznických arrays

a analytického softwaru. miRNA microarrays od Agilent Technologies Vám umožní pokročit dál ve Vaší práci.

Iva Šenitková

iva.senitkova@hpst.cz

Literatura

- [1] Ambros, V., microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell* 2001, 107, 823–826.
- [2] Moss, E.G., MicroRNAs: hidden in the genome. *Curr. Biol.* CB 2002, 12, R138–140.
- [3] Carthew, R.W., Sontheimer, E.J., Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009, 136, 642–655.
- [4] Mestdagh, P., Hartmann, N., Baeriswyl, L., Andreasen, D., et al., Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. *Nat. Methods* 2014, 11, 809–815.
- [5] Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., et al., The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 2009, 55, 611–622.

Praktický workshop na CGH microarray analýzu

Na podzim 2015 skupina pro diagnostiku a genomiku (DGG) uspořádala workshop pro zákazníky, kteří se zabývají nebo mají v plánu začít pracovat s mikroarrayami. Hlavní myšlenkou kurzu bylo prakticky provést účastníka celým protokolem přípravy a zpracování microarray od Agilent Technologies včetně vyhodnocení výsledků. Workshop vedl aplikační specialista RNDr. Zbyněk Halbhuber, Ph.D., který má s prací s microarray dlouholetou praktickou zkušenost.

Workshopy probíhaly v sídle společnosti HPST, s.r.o. v Praze 4. Pro praktickou část workshopu jsme využili nově vybudovanou laboratoř, která je vybavená nejdůležitějšími přístroji pro genomiku od Agilent Technologies. Drobné laboratorní přístroje nám zapůjčila naše sesterská společnost Labicom, s.r.o. K účasti na workshopu jsme nejprve zvali zákazníky, u kterých jsme předpokládali zájem o workshop, po té jsme informaci o akci rozšířili elektronicky a uveřejnili na internetových stránkách www.hpst.cz. Zájem o workshop předčil naše očekávání a díky velkému zájmu jsme akci opakovali celkem třikrát. Další termín plánujeme 16. – 17. března 2016. Kapacita jednoho kurzu je osm účastníků. Pracovalo se ve dvou čtyřčlenných skupinách. Každý účastník si přivezl dva vzorky lidské DNA, které považoval zajímavé pro CGH microarray analýzu (Comparative Genomic Hybridization). Kurzu se zúčastnili pracovníci lékařských fakult, nemocnic i soukromých laboratoř. Akce tak splnila rovněž funkci společenskou, setkání lidí z pracovišť z celé republiky a sdílení praktických zkušeností.

Vzorky DNA se nejprve označí fluorescenčními barvičkami (SureTag DNA Complete Labeling Kit, kat. č. 5190-4240) a dále přes noc hybridizují (Oligo aCGH/ChIP-Chip Hybridization Kit, kat. č. 5188-5220). Kvalita vzorků DNA byla ověřena na přístroji 2200 TapeStation s použitím kytu pro analýzu genomické DNA (Genomic DNA ScreenTape and Reagents, kat. č. 5067-5365 a 5067-5366). Kritickým krokem celého protokolu je promývání sklíček (Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer Set, kat. č. 5188-5226), po kterém následuje vlastní skenování na skeneru na Agilent SureScan Microarray Scanner pomocí programu Feature Extraction Software a vyhodnocení výsledků programem CytoGenomics Software

od Agilent Technologies.

Pro analýzu byly použity microarray CGH ISCA (SurePrint G3 Unrestricted CGH ISCA, v2 8x60K, kat. č. G4827A). Na každé sklíčko byly naneseny 4 vzorky. Microarray byly naskenovány na špičkovém přístroji Agilent SureScan Microarray Scanner.

Během inkubací a různých časových prostojů školitel dr. Halbhuber účastníky kurzu postupně provedl ve svých přednáškách hlavními okruhy souvisejícími s metodikou microarray. Každou praktickou část tak vždy předcházel teoretický úvod. Nejprve se účastníci seznámili s technologií výroby microarray. Dále si ukázali, jak je možné si vybrat z různých typů microarray pomocí volně dostupné internetové aplikace SureDesign na stránkách Agilent Technologies. Je možné si připravit vlastní design na míru konkrétnímu výzkumnému záměru rovněž programem SureDesign. Závěrečným bodem programu bylo vyhodnocení výsledků programem CytoGenomics Software a diskuze výsledků.

Každý účastník si odnesl své výsledky na usb disku, včetně prezentací a protokolů. Protokoly dostali účastníci i v papírové formě, aby mohli sledovat průběh analýzy a dělat si poznámky. Kurz účastníci hodnotili velmi kladně. Po skončení workshopu obdrželi účastníci certifikát o jeho úspěšném absolvování. Z několika stran zazněla prosba o pokračování workshopu se zaměřením na podrobnou analýzu výsledků, které bychom do budoucna rádi vyhověli. V organizování praktických workshopů budeme pokračovat i v letošním roce. Pokud si přejete dostávat informace o jejich konání, napište na naši adresu: dgg@hpst.cz nebo sledujte naše internetové stránky www.hpst.cz. Novinkou v nabídce našich služeb je možnost pronájmu laboratoře. Můžeme vám také naskenovat vaše microarray (rovněž proteinové a microarray od různých výrobců) na Agilent SureScan Microarray Scanner.

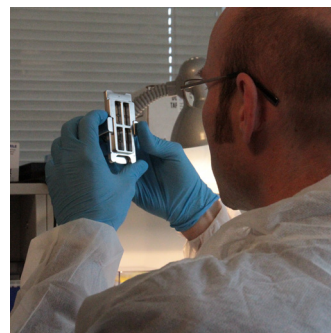
Michaela Pluskalová
michaela.pluskalova@hpst.cz

(Autor fotografií: Michaela Pluskalová)

18



Obrázek 1
Fluorescenční značení vzorků



Obrázek 2
Hybridizace vzorků na sklíčko s microarray



Obrázek 3
Promývání sklíček

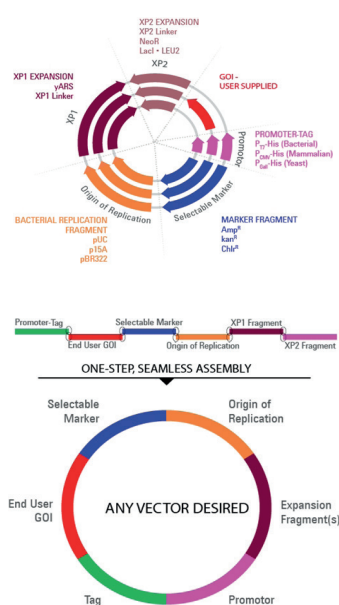


Obrázek 4
Skenování sklíček



Obrázek 5
Přednášky dr. Halbhubera o technice microarray

SureVector – klonování nové generace



Obrázek 1
Schématické znázornění systému SureVector

SureVector je nejnovějším přírůstkem v oblasti technik klonování nové generace. Umožňuje kombinovat standardní DNA komponenty pro přípravu vlastního vektorového konstruktů a využít tak možností biologické syntézy.

Díky SureVectoru si jednoduše můžete navrhnout vlastní vektor, objednat nebo naamplifikovat váš gen pomocí PCR, a váš vlastní plazmid bude během jediné 20 minutové reakce hotov! SureVector systém využívá patentovanou enzymovou směs a umožňuje tak rychlé složení několika DNA fragmentů do cirkulárního rekombinantního plazmidu obsahujícího váš gen.

Mezi volitelné komponenty systému SureVector patří: bakteriální selekční marker, bakteriální počátek replikace, savčí selekční marker, kvasinkový promotor, savčí a bakteriální buňky a různé afinitní tagy (nebo tagy usnadňující rozpustnost proteinu).

K vytvoření vlastní mapy plazmidu lze využít uživatelsky vstřícné webové aplikace, která je dostupná na adrese www.agilent.com/genomic/surevector.

SureVector je klonovací a expresní vektor, který je funkční u všech tří biologických sys-

témů — bakterie (*E. coli*), kvasinky i savčí buňky. Obsahuje všechny nutné součásti (pufry, enzymovou směs a nukleotidy) potřebné k sestavení funkčního plazmidu během jediné reakce.

Hlavní výhody systému SureVector jsou:

- rychlá tvorba vlastního vektoru – umožňuje složení několika DNA fragmentů do cirkulárního plazmidu během 20 minut
- spolehlivé a přesné složení – solidní validace systému zajišťuje, že i když budou standardní úseky vektoru přehozeny, vektor tím neztratí funkčnost
- větší flexibilita v porovnání s tradičními systémy – umožňuje sestavení nových vektorů ve vaší laboratoři místo toho, abyste pokaždé objednávali nové
- kontrolujte pouze své experimenty – řešte pouze problémy vlastních experimentů, ne problémy nabízených prostředků pro složení DNA.

Irena Findejsová
irena.findejsova@hpst.cz

Tabulka 1
Přehled součástí a produktová čísla systému SureVector

SureVector System Fragments & Part Numbers			
	<i>E. coli</i>	Mammalian	Yeast
Promoters	T7 (G7515A-B)	CMV (G7516A-B)	GAL1 (G7517A-B)
	Trp (G7515A-B, G7518B-C)	SV40 (G7516A-B)	CUP1 (G7517A-B)
	Tac (G7515A-B, G7518B-C)	EF-1a (G7516A-B)	ADHI (G7517A-B)
	Rhamnose (G7515A-B, G7518B-C)		
Tags	GST (n-term only) (G7515A, G7518D)	6xHis (G7516A-B)	6xHis (G7517A-B)
	MBP (n-term only) (G7515A, G7518D)	c-Myc (G7516A-B)	c-Myc (G7517A-B)
	DsbA (n-term only) (G7515A, G7518D)	3xFLAG (G7516A-B)	3xFLAG (G7517A-B)
	6xHis (G7515A-B, G7518D-E)	hrGFPII (G7516A-B)	hrGFPII (G7517A-B)
	SBP (G7515A-B, G7518D-E)	3xHA (G7516A-B)	3xHA (G7517A-B)
	CBP (G7515A-B, G7518D-E)	SBP (G7516A-B)	SBP (G7517A-B)
	Thioredoxin (c-term only) (G7515B, G7518E)		
	c-Myc (c-term only) (G7515B, G7518E)		
	HA (c-term only) (G7515B, G7518E)		
Bacterial Selection	AmpR (G7514A, G7518A-E)	AmpR (G7514A, G7518A-E)	AmpR (G7514A, G7518A-E)
	CamR (G7514A, G7518A)	CamR (G7514A, G7518A)	CamR (G7514A, G7518A)
	KanR (G7514A, G7518A)	KanR (G7514A, G7518A)	KanR (G7514A, G7518A)
Bacterial Origins of Replication	pUC (G7514A, G7518A-G)	pUC (G7514A, G7518A-G)	pUC (G7514A, G7518A-G)
	p15A (G7514A)	p15A (G7514A)	p15A (G7514A)
	pBR322 (G7514A)	pBR322 (G7514A)	pBR322 (G7514A)
	XP1 (G7514A, G7518A-G)	yARS (G7514A)	XP1 (G7514A, G7518A-G)
XP1 Fragments			
XP2 Fragments	LacI (G7514A, G7518A-G)	Blasticidin (G7516A)	URA3 (G7517A)
	XP2 (G7514A)	Gentamycin (G7516A)	HIS3 (G7517A)
		Puromycin (G7516A)	Hygromycin (G7517A)
		NeoR (G7514A)	LEU2 (G7517A)
Promoter-Tag Fusions	His-T7 (G7514A)	His-CMV (G7514A)	His-GAL1 (G7514A)

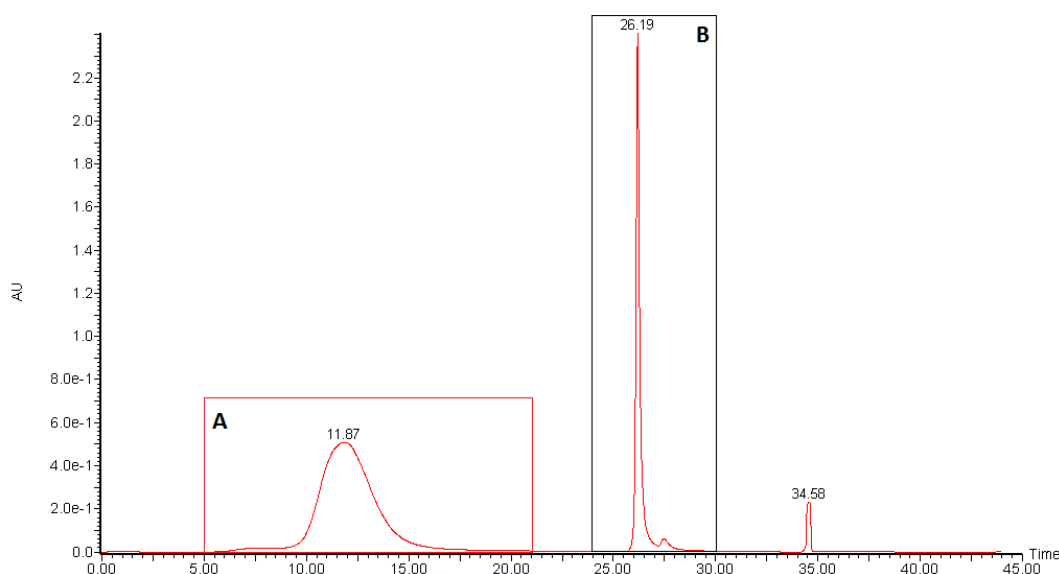
Imunodeplece plodové vody ve výzkumu nových biomarkerů předčasného porodu

Biologický materiál jako je krevní plazma, sérum, mozkomíšní mok, moč či plodová voda jsou vysoce komplexní směsi s velkým koncentračním dynamickým rozsahem obsažených proteinů. Rozdíly v zastoupení jednotlivých proteinů dosahují až 12 řádů. Více než 90 % celkového proteinového obsahu těchto vzorků však tvoří několik málo vysoce zastoupených proteinů, především albumin, imunoglobulin G a další, které zastiňují diagnosticky často zajímavé a nízko koncentrované proteiny, které mohou být slibnými kandidáty pro výzkum biomarkerů rozličných klinických stavů. Současné proteomické techniky umožňují pouze velmi omezenou identifikaci těchto málo zastoupených proteinů na pozadí proteinů vysoce zastoupených bez předchozí úpravy analyzovaného vzorku [1].

Kromě obecných metod pro redukci komplexity založených na různých chromatografických principech je k dispozici i elegantní řešení, které cílí specificky na vysoce zastoupené proteiny. Imunodeplece využívá imobilizovaných protilátek, které ze vzorku vyčtyají vybrané proteiny, přičemž nízce zastoupené proteiny, které se nenaváží, se využívají pro následnou analýzu.

Odstranění vysoce zastoupených proteinů touto metodou by mělo ideálně proběhnout

kompletně, jednoduše, s možností automatizace a především reprodukovatelně [2]. Jako vhodné se tedy jeví využití imunodeplece v HPLC formátu. Je k dispozici řada produktů v podobě chromatografických kolon, jako je Multiple Affinity Removal System (MARS, Agilent), které cílí různé spektrum proteinů. Například kolona MARS Hu-14 je zaměřena na 14 nejvíce zastoupených proteinů v lidské plazmě (viz Tab. 1). V kolonách jsou na nosiči imobilizovány protilátky proti požadovaným vysoce zastoupeným proteinům. Biologický vzorek je na kolonu aplikován v nanášecím pufru, který minimalizuje protein – proteinové interakce, čímž dovoluje nízko zastoupeným proteinům, které často využívají velké proteiny jako transportní, uvolnit se z této vazby a volně projít kolonou. Vysoce zastoupené proteiny, které najdou vazebného partnera v podobě protilátky, se pak na koloně zachytí. Během promytí vzorku nanášecím pufrům je jímána frakce všech nezachycených proteinů. Poté je systém převeden do elučního pufru, který rozruší vazbu mezi imobilizovanou protilátkou a proteiny, což vede k vyplavení vysoce zastoupených proteinů v další frakci (Obr. 1). Takto upravený vzorek je pak možné podrobit další analýze pomocí elektroforézy, LC-MS či jiných metod [2].



Obrázek 1

UV chromatografický záznam imunodeplece: frakce A obsahuje proteiny nenavázané na protilátky kolony – nízko a středně zastoupené; frakce B obsahuje vysoce zastoupené proteiny navázané na kolonu.

Kromě nesporných výhod s sebou však imunodeplece přináší i určitá rizika. Pravděpodobně nejvýznamnějším je nechtěné odstranění proteinů kvůli nespecifickým vazbám na no-

sič kolony či možnosti navázání potenciálně zajímavých proteinů na vysoce zastoupené proteiny.

Některé práce provedené na krevní plazmě poukazují na neúplnou depleci požadovaných vysoce zastoupených proteinů [3, 4] či naopak na nechtěné zadržení proteinů jako je α_1 -kyselý glykoprotein 1, α_1 -kyselý glykoprotein 2 a α_1 -antichymotrypsin na MARS koloně [5]. I navzdory tomuto riziku je imunodeplece vysoce zastoupených proteinů velmi přínosným či dokonce nutným krokem při přípravě vzorku pro proteomickou analýzu zaměřenou na identifikaci nových biomarkerů, protože její výhody značně převažují možná rizika [5, 6].

I když jsou výše zmíněné produkty primárně určeny a také nejčastěji využívány ke zpracování lidské plazmy, v principu nic nebrání jejich aplikaci také na jiné biologické tekutiny, jak dokazují studie, kde byla MARS kolona použita k depleci vysoce zastoupených proteinů v lidské moči [7], cerebrospinální tekutině [8] a dalších tělních tekutinách [9].

Specifickou oblastí využití imunoafinitní deplece je oblast výzkumu předčasného porodu a jiných komplikací spojených s těhotenstvím, kde je často jako biologický materiál analyzována plodová voda. Vzhledem k tomu, že podobně jako ostatní tělní tekutiny vzniká i plodová voda primárně z plazmy, sdílí s ní i spektrum nejvíce zastoupených proteinů. Nicméně s postupující délkou těhotenství se plodová voda svým složením od krevní

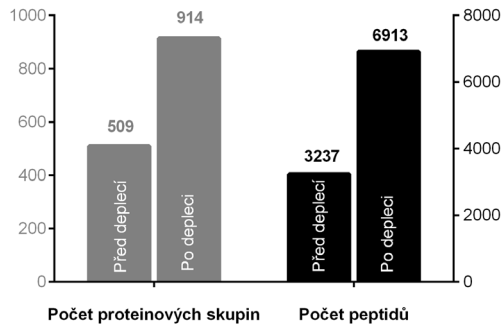
plazmy vzdaluje. Přes placentu do plodové vody neprocházejí velké molekuly, neobsahuje tedy např. imunoglobulin M, který je v plazmě hojně zastoupený. Dále na rozdíl od krevní plazmy obsahuje velké množství fibronektinu místo fibrinogenu a neobsahuje haptoglobin ve významné koncentraci [10]. Při použití MARS kolony navržené pro depleci krevní plazmy nedosahuje pak frakcionace takové účinnosti jako v případě krevní plazmy, ale i přesto dochází k odstranění přibližně 90% celkového proteomu ve formě vysoce zastoupených proteinů.

Tento přístup byl využit v mnoha projektech analyzujících plodovou vodu pomocí LC-MS/MS. Díky němu bylo možné identifikovat mnoho potenciálních biomarkerů předčasného porodu spojeného s předčasným odtokem plodové vody (např. cathelicidin, myeloperoxidasa, matrix metalloproteinasa-9 [MMP-9], neutrofil defensin 1) [11, 12], či se spontánním předčasným porodem vyvolaným infekcí (lipocalin-1, glycodelin nebo nikotinamid fosforibosyltransferasa) [13]. Tyto a další naše studie potvrzují efektivitu MARS deplece a především poukazují na možnost až dvojnásobného množství identifikací (Obr. 2), právě díky odstranění vysoce zastoupených proteinů z biologického vzorku.

Proteiny odstraněné pomocí MARS Hu-14 kolony	15 nejvíce zastoupených proteinů krevní plazmy [10]	15 nejvíce zastoupených proteinů plodové vody [10]
albumin	albumin	albumin
IgG	imunoglobuliny (IgG, IgA, IgM)	imunoglobuliny (IgG, IgA)
antitrypsin	transferrin	fibronektin
IgA	fibrinogen	transferrin
transferrin	α -mikroglobulin	komplement C3
haptoglobin	α_1 -antitrypsin	α_1 -antitrypsin
fibrinogen	komplement C3	ceruloplasmin
α_2 -makroglobulin	haptoglobin	α -fetoprotein
α_1 -kyselý glykoprotein	apolipoprotein A-I	vitamín D-vážeč protein
IgM	apolipoprotein B	periostin
apolipoprotein A-I	α_1 -kyselý glykoprotein	apolipoprotein A-I
apolipoprotein A-II	lipoprotein	antithrombin III
komplement C3	faktor H	prekurzor transformačního růstového faktoru indukovaný proteinem Ig-H3
transthyretin	ceruloplasmin	α -mikroglobulin
	komplement C4	plasminogen

Tabulka 1

Seznam proteinů depletovaných pomocí MARS Hu-14 kolony, a porovnání nejvíce zastoupených proteinů krevní plazmy a plodové vody.



Obrázek 2

Graf znázorňující nárůst počtu identifikací při využití MARS imunodeplece vzorku plodové vody.

Vojtěch Tambor

vojtech.tambor@gmail.com

Irena Findejsová

irena.findejsova@hpst.cz

Petra Domašinská^{1,2}, Kristýna Pimková² a Vojtěch Tambor²

¹ Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra biologických a biochemických věd;

² Centrum biomedicínského výzkumu, Fakultní nemocnice Hradec Králové

Proteomická skupina Centra biomedicínského výzkumu Fakultní nemocnice Hradec Králové se zabývá aplikací proteomických technologií do klinicky orientovaného výzkumu. Díky širokým možnostem spolupráce s klinickými pracovišti je většina projektů zaměřena na hledání nových diagnosticky zajímavých molekul, zejména proteinů a peptidů.

Literatura

[1] Wolters, D.A., Washburn, M.P., Yates, J.R., An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal. Chem.* 2001, 73, 5683–5690.

[2] Smith, M.P.W., Wood, S.L., Zougman, A., Ho, J.T.C., et al., A systematic analysis of the effects of increasing degrees of serum immunodepletion in terms of depth of coverage and other key aspects in top-down and bottom-up proteomic analyses. *Proteomics* 2011, 11, 2222–2235.

[3] Brand, J., Haslberger, T., Zolg, W., Pestlin, G., Palme, S., Depletion efficiency and recovery of trace markers from a multiparameter immunodepletion column. *Proteomics* 2006, 6, 3236–3242.

[4] Echan, L.A., Tang, H.-Y., Ali-Khan, N., Lee, K., Speicher, D.W., Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma. *Proteomics* 2005, 5, 3292–3303.

[5] Tu, C., Rudnick, P.A., Martinez, M.Y., Cheek, K.L., et al., Depletion of abundant plasma proteins and limitations of plasma proteomics. *J. Proteome Res.* 2010, 9, 4982–4991.

[6] Roche, S., Tiers, L., Provansal, M., Seveno, M., et al., Depletion of one, six, twelve or twenty major blood proteins before proteomic analysis: the more the better? *J. Proteomics* 2009, 72, 945–951.

[7] Fisher, W.G., Lucas, J.E., Mehdi, U.F., Qunibi, D.W., et al., A method for isolation and identification of urinary biomarkers in patients with diabetic nephropathy. *Proteomics Clin. Appl.* 2011, 5, 603–612.

[8] Shores, K.S., Knapp, D.R., Assessment approach for evaluating high abundance protein depletion methods for cerebrospinal fluid (CSF) proteomic analysis. *J. Proteome Res.* 2007, 6, 3739–3751.

[9] Berle, M., Kroksveen, A.C., Garberg, H., Aarhus, M., et al., Quantitative proteomics comparison of arachnoid cyst fluid and cerebrospinal fluid collected perioperatively from arachnoid cyst patients. *Fluids Barriers CNS* 2013, 10, 17.

[10] Cho, C.-K.J., Shan, S.J., Winsor, E.J., Diamandis, E.P., Proteomics analysis of human amniotic fluid. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 2007, 6, 1406–1415.

[11] Tambor, V., Kacerovsky, M., Andrys, C., Musilova, I., et al., Amniotic fluid cathelicidin in PPRM pregnancies: from proteomic discovery to assessing its potential in inflammatory complications diagnosis. *PloS One* 2012, 7, e41164.

[12] Tambor, V., Kacerovsky, M., Lenco, J., Bhat, G., Menon, R., Proteomics and bioinformatics analysis reveal underlying pathways of infection associated histologic chorioamnionitis in pPROM. *Placenta* 2013, 34, 155–161.

Spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií



Obrázek 1
CE-7100

Vysoce účinné separační techniky ve spojení s hmotnostní spektrometrií jsou v současné době již standardním vybavením mnoha laboratoří zabývajících se analýzami složitých směsí látek v komplexních maticích. Především se jedná o spojení chromatografických technik s hmotnostní spektrometrií (GC-MS, LC-MS či SFC-MS). Kapilární elektroforéza ve spojení s hmotnostní spektrometrií (CE-MS) je stále na okraji zájmu a představuje spíše techniku využívanou především na akademické půdě, přitom aplikační potenciál CE-MS je velmi široký. Přestože je spojení CE-MS jednou z nejmladších analytických technik, může její využití přinést určité nesporné výhody oproti zavedeným technikám GC-MS a zejména oproti LC-MS.

Spojení CE-ESI-MS firmy Agilent je elegantním řešením díky nebulizeru, který umožňuje uzavřít elektrický okruh nutný pro elektroforetickou separaci a dále umožňuje koaxiálně přivádět dusík nutný pro vznik stabilního elektrospreje zároveň s pomocnou sprejovací kapalinou. Současně je na sprejovací špičku vkládáno sprejovací napětí. Ortogonální uspořádání elektrospreje pak navíc umožňuje, aby se co největší množství iontů analytů dostalo do analyzátoru hmotnostního spektrometru.

Spojení CE-MS má oproti spojení LC-MS svá specifika. Nejčastější spojení CE-MS využívá ionizace elektrosprejem (ESI). Vzhledem k tomu, že průtok separačního elektrolytu v kapiláře je nižší než průtok mobilní fáze v LC-MS, je nutné podpořit ionizaci a tvorbu stabilního elektrospreje přidáním tokem sprejovací kapaliny v místě výstupu eluátu z kapiláry. Dalším úskalím je nutnost využití těžkých složek separačního elektrolytu, takže konvenční pracovní elektrolyty na bázi fosforečnanů a kyseliny borité je možné používat pouze ve velmi nízkých koncentracích (do 10 mM). Vhodné jsou naopak elektrolyty na bázi kyseliny octové, mravenčí, hydrogenuhličitanu a amoniaku, případně triethylaminu.

V mnoha případech je k dosažení požadované selektivity elektroforetické separace nutné využít málo těžké složky a aditiva separačního elektrolytu, jako jsou např. chirální selektory (cyklodextriny, crown ethery apod.), případně tenzidy (dodecylsulfát sodný). Tenzidy také umožňují separovat jak nabitě, tak nenabitě

látky v jediné analýze (micelární elektrokinetická chromatografie, MEKC). V tomto případě je vhodná metoda částečného plnění kapiláry elektrolytem obsahujícím netěkavou složku a navržením podmínek separace tak, aby netěkavé složky nevstupovaly do iontového zdroje. Druhou možností je náhrada netěkavých látek jejich těžavějšími fluorovanými analogy. Dodecylsulfát sodný je možné nahradit perfluorocarboxylovými nebo perfluorosulfonovými kyselinami ve směsi s hydroxidem amonným.

Aplikační oblast CE-MS je dána elektroforetickým principem separace a dále povahou zvolené ionizační techniky hmotnostní spektrometrie. Kapilární elektroforéza umožňuje separace nabitých i nenabitých látek s velmi širokým spektrem vlastností. Od nízkomolekulárních anorganických i organických iontů, polárních látek, přes málo polární a nepolární látky (např. aromatické uhlovodíky) až po vysokomolekulární látky (např. proteiny, fragmenty nukleových kyselin, viry, bakterie). Spojení CE-ESI-MS je vhodné zejména pro polární a středně polární látky s širokým rozpětím molekulových hmotností. Je tedy zřejmé, že aplikační potenciál CE-MS se do značné míry překrývá zejména s aplikačním potenciálem LC-MS metod, které jsou v rutinní praxi využívány častěji. Přitom CE-MS se nesnaží být konkurentem zavedené techniky LC-MS, naopak je velmi užitečnou komplementární technikou k LC-MS. Výhodou spojení CE-MS oproti LC-MS je velmi nízká spotřeba vzorků, chemikálií a rozpouštědel. Spojením CE s MS se také z velké části řeší nedostatečná citlivost déle zavedené kapilární elektroforézy s DAD detekcí. Nesporná výhoda spojení CE-MS spočívá také v možnosti přesné identifikace separovaných látek. Spotřeba vzorku pro jednu CE-MS analýzu se typicky pohybuje okolo 10 nL. CE-MS pak může být výhodnou alternativou k LC-MS například v případech analýzy klinických vzorků, kde je nízký spotřebovaný objem vzorku jedním z kritérií při volbě analytické metody.

Využitím CE-ESI-MS v klinické analýze je možné dokumentovat na příkladu stanovení poměru D- a L-mléčné kyseliny ve vzorcích krevního séra jako podpůrné metody v diagnostice diabetu. Běžně je v klinické laboratoři prováděno stanovení D- a L-laktátu s využitím některé z enzymatických metod a je nutné



Obrázek 2
CE-7100 s QQQ

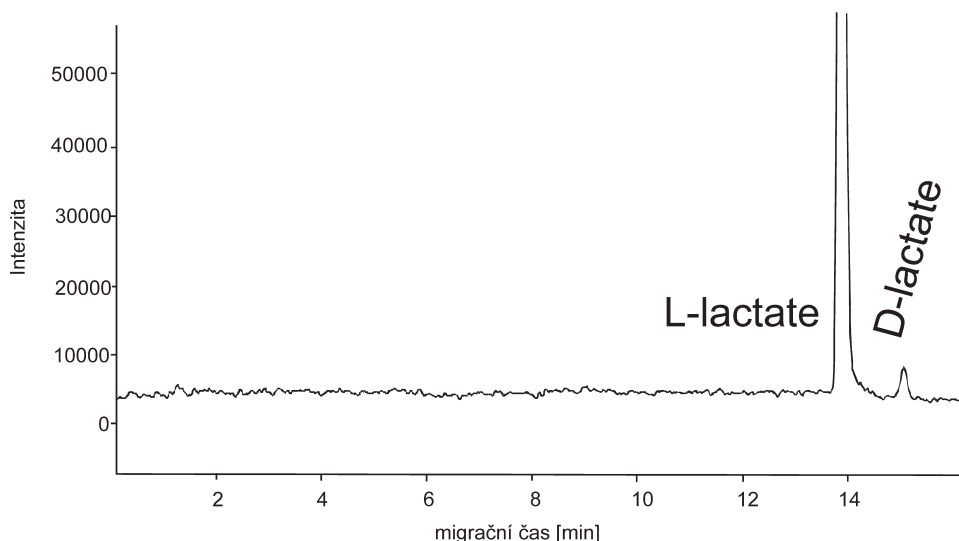


Obrázek 3
CE-7100 s QTOF

stanovit každý enantiomer zvlášť. Pro rychlé stanovení vzájemného poměru D- a L-laktátu je možné využít i CE-ESI-MS s mnohem nižšími náklady na jednu analýzu. Přičemž není nutné využívat drahých kolon s chirální stacionární fází, či provádět derivatizaci chirálním derivatizačním činidlem. Jako chirální selektor v tomto případě může sloužit vankomycin

chlorid, který se pouze rozpustí v pracovním elektrolytu. Přestože je kyselina mléčná molekula s velmi nízkou molekulovou hmotností, je možné ji i při využití negativního sprejovacího módu detekovat na koncentračních úrovních, které umožňují monitorovat hladinu D- i L-laktátu ve vzorcích séra zdravých i nemocných pacientů (Obr. 4).

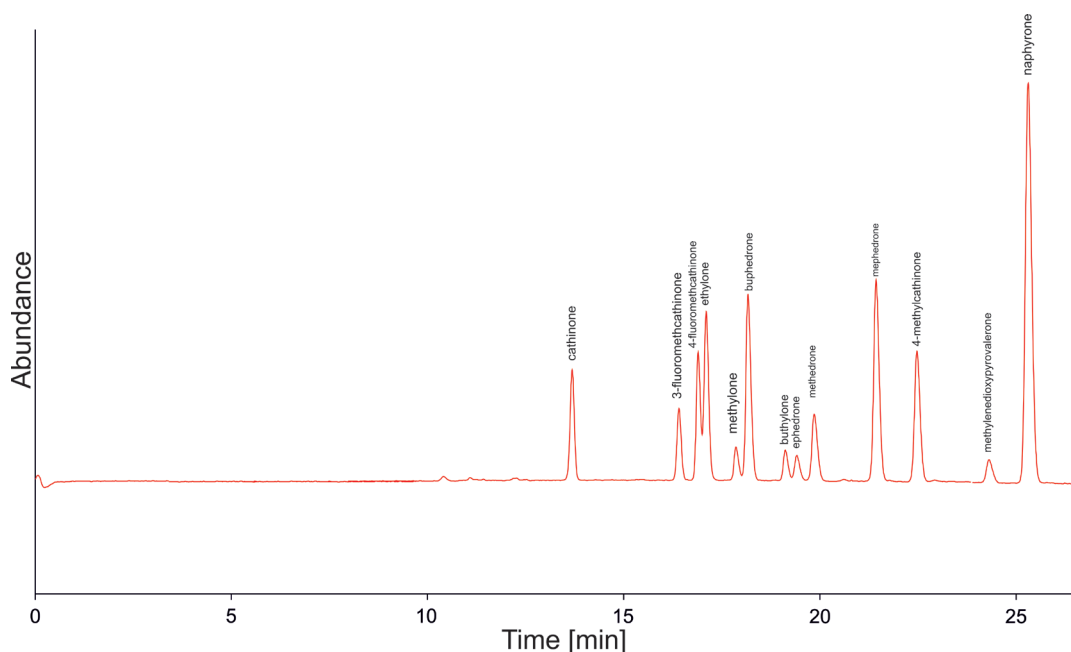
24



Obrázek 4
SIM záznam separace D,L-laktátu krevního séra zdravého pacienta. LOD (L-laktát) 60 nmol/L, (D-laktát) 72 nmol/L

Jedním z posledních trendů je aplikace CE-ESI-MS při analýze drog jak v zachyceném důkazním materiálu (psaníčka, tablety apod.), tak v samotném biologickém materiálu intoxikovaných osob. S výhodou lze uplatnit velmi podobné postupy, které se používají před LC-MS analýzou pro úpravy a extrakci toxických látek i jejich metabolitů. Jedním z mnoha příkladů, kdy CE-ESI-MS představuje výhodnou analytickou techniku je analýza tzv. „new designer drugs“ - nových syntetických drog na bázi derivátů kationů či syntetických kanabinoidů. Analýza derivátů kationů

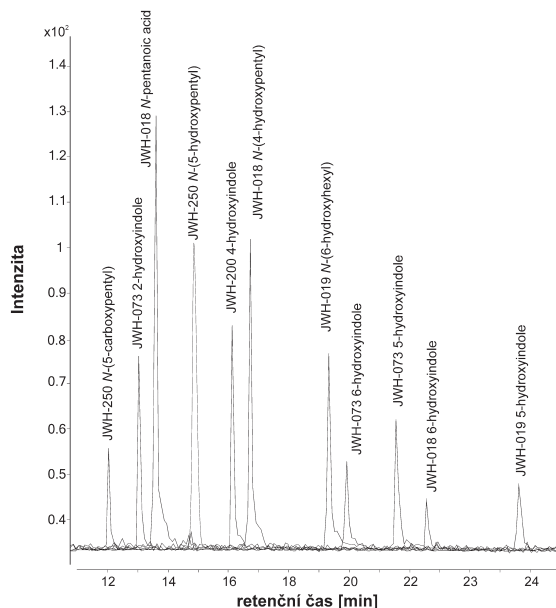
(jde zejména o primární a sekundární aminy) s využitím GC-MS vyžaduje derivatizaci, v případě LC-MS je zase nutné potlačit jejich sorpci na stacionární fázi. CE-ESI-MS umožňuje jejich přímou separaci bez nutnosti derivatizace s minimální úpravou vzorku. Separaci syntetických kationů je možné uskutečnit s použitím kombinace chromatografické a elektroforetické separace, která je zprostředkována pomocí těkavého tenzidu (perfluorooctanové kyseliny) v pracovním elektrolytu (Obr. 5).



Obrázek 5
Rekonstruovaný MRM záznam separace syntetických kationů ve vzorku naspikovaného krevního séra po SPE extrakci

Další skupinou nových syntetických drog jsou syntetické kanabinoidy. Pro objektivní diagnostiku intoxikace syntetickými kanabi-

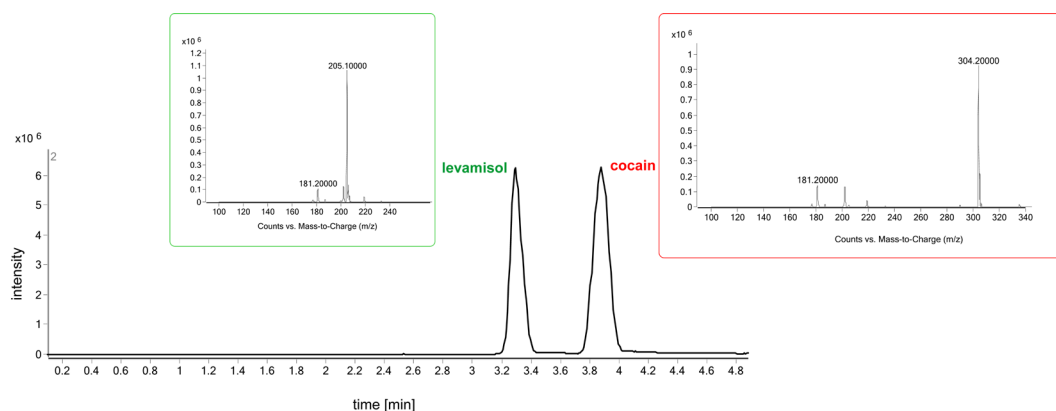
noidy je vhodná separace a identifikace jejich metabolitů s využitím perfluoroheptanové kyseliny jako těkavého tenzidu (Obr. 6).



Obrázek 6
Rekonstruovaný SRM záznam separace metabolitů syntetických kanabinoidů v moči po L-L extrakci

CE-ESI-MS je možné využít i pro rychlé odhalení ředění drog na černém trhu, kdy je vedle hlavní komponenty - samotné drogy - nutné také identifikovat a stanovit množství látky, která slouží jako ředidlo prodáváných drog, a která může pro zdraví představovat daleko vyšší riziko než samotná droga.

Příkladem může být identifikace a stanovení ředidla kokainu, který je na černém trhu drahý (Obr. 7). V tomto případě byla čistá droga ředěna veterinárním léčivem, které je pro lidský organismus nebezpečnější než samotná droga.



Obrázek 7
TIC elektroferogram separace levamisolu a kokainu

Spojení CE-MS firmy Agilent se vyznačuje vysokou robustností. Navíc je nebulizér, přes které se realizuje spojení CE s MS nenáročný na experimentální zručnost a analytik se tak

může soustředit na vlastní vývoj metody bez nutnosti náročné experimentální adjustace sprejovací špičky.

Skupina elektromigračních metod laboratoře R-Lab, Regionálního Centra Pokročilých Technologí a Materiálů, Katedry analytické chemie UP v Olomouci se zabývá vývojem elektroforetických metod separace, identifikace a stanovení nízkomolekulárních látek z oblasti farmak, drog a klinicky významných látek, zejména s využitím kapilární elektroforezy včetně spojení s hmotnostní spektrometrií. Dalším zaměřením jsou pak separace širokého spektra chirálních látek. Skupina spolupracuje s forenzními tuzemskými i za-

hraničními pracovišti zabývající se mimo jiné forenzní analýzou, zejména v oblasti objektivní diagnostiky intoxikací.

Vítězslav Maier
vitezslav.maier@upol.cz

Martin Švidrnoch
martin.svidrnoch@upol.cz

Jan Kovář
jan.kovar@hpst.cz

Přístroje pro extrakci na pevné fázi (SPE)

Neustálý vývoj v oblasti chromatografických separací a detektorů klade stále vyšší požadavky na přípravu vzorků. Extrakce na pevné fázi (SPE) je jedna z nezastupitelných technik, která může být použita jak pro čištění, tak i pro zakoncentrování vzorků.

Zatímco chromatografy jsou dnes plně automatizované, řízené softwarem a dosahují extrémní opakovatelnosti analýz, reprodukovatelnost v přípravě vzorků kolísá často i v desítkách procent.

Z velké části se na tomto faktu podílí matrice i typ analýzy. Nezanedbatelný vliv na reprodukovatelnost v přípravě vzorku však hraje též pracovní postup a přístrojová technika. V našich laboratořích je pro SPE nejčastěji používanou technikou klasický vakuový „manifold“. Výrobci přístrojů pro SPE jsou si však vědomi pozitivního vlivu strojových postupů na reprodukovatelnost i výtěžnost SPE, a proto je dnes k dispozici celá řada poloautomatických a plně automatických přístrojů, které posouvají možnosti SPE na novou úroveň.

Firma LABICOM nabízí širokou škálu přístrojů pro SPE od několika výrobců a pokrývá téměř

všechny aplikační potřeby.

Většina SPE přístrojů je konstruována tak, aby vyhovovaly různým aplikačním požadavkům, a liší se pouze v kapacitě vzorků a stupni automatizace.

Jsou však i přístroje, které jsou zaměřeny specifickým směrem. Například pro biochemické aplikace, vyžadující velkou průchodnost vzorků, lze s výhodou použít systém Extrahera (Obr. 1) pro SPE kolony i well-plate destičky pro paralelní automatické zpracování až 96 vzorků.

Dalším takovým přístrojem je SPE-DEX 4790 (Obr. 3), určený pro stopovou analýzu organických kontaminantů ve vodách s vysokým obsahem mechanických nečistot. Jedná se o automatický systém určený pro SPE disky s předfiltrací vzorků. Filtrát i SPE disk je extrahován rozpouštědlem, což umožňuje dosahovat vysoké účinnosti extrakce. Existuje řada detailních aplikací pro PAU, PCB, SVOC, aj., včetně hodnot výtěžností pro jednotlivé látky.

Pavel Jehlička
pavel.jehlicka@labicom.cz



Obrázek 1
Extrahera SPE



Obrázek 2
SmartPrep SPE



Obrázek 4 FreeStyle SPE, GPC, EVA



Obrázek 3
SPE-DEX 4790

Látky známé i neznámé: Cílený screening a necílená analýza pomocí LC/MS Q-TOF

Hmotnostní spektrometry s vysokým rozlišením a přesnou hmotou (high-resolution, accurate mass, HRAM) umožňují zaznamenat obrovské množství informací; několikrát za vteřinu změří s vysokou citlivostí hmotnostní spektrum přes široký rozsah m/z (i několik tisíc amu). Získáme tak záznam o všech ionizovatelných látkách, které jsou ve vzorku přítomny. Toho lze využít při tzv. screeningu, tedy hledání velkého množství neočekávaných nebo dokonce neznámých látek. Jak ale v tak komplikovaných datech, jaké HRAM

spektrometry generují, najít látky, které nás zajímají? V lepším případě máme k dispozici seznam látek (často daný legislativou) a takové analýze se říká **cílený screening**. V tom horším případě (minimálně mnohem náročnějším) nevíme vůbec nic a jedná se tedy o **necílenou analýzu**. V takových případech je vždy nutné mít referenční vzorek a porovnat profil látek ve vzorku vyšetřovaném a referenčním. **Tabulka 1** shrnuje typy LC/MS analýz, jaké informace jsou typicky k dispozici a jaký typ instrumentace je vhodné použít.

Cílená analýza	Cílený screening	Necílená analýza
<i>Co je známo ?</i>		
✓ Struktura	✓ Struktura	✗ Struktura
✓ Retenční čas	✗ Retenční čas	✗ Retenční čas
✓ Molekulový iont (m/z)	✗ Molekulový iont (m/z)	✗ Molekulový iont (m/z)
✓ Produktové ionty (m/z)	? Produktové ionty (m/z)	✗ Produktové ionty (m/z)
✓ Dostupný standard	✗ Dostupný standard	✗ Dostupný standard
<i>Co je cílem?</i>		
Rychlé zpracování dat	Nalezení podezřelých látek podle seznamu	Porovnání profilu látek podezřelého a „standardního“ vzorku (t-test, PCA)
Konfirmace a přesná kvantifikace analytů	Identifikace nálezů	Identifikace látek, které jsou unikátní pro vyšetřovaný vzorek
<i>Jakou instrumentací?</i>		
QQQ (MS/MS)	Q-TOF (HRAM)	Q-TOF (HRAM)
QTOF (HRAM)		

Tabulka 1
Typy analytických zadání a vhodná MS instrumentace

Cílený screening

Při cíleném screeningu máme k dispozici seznam látek, které ve vzorcích hledáme. Protože se tedy nejedná o látky neznámé, máme alespoň nějakou informaci o analytu (struktura, hmotnost nebo i produktové spektrum), avšak obvykle není k dispozici analytický standard ani informace o retenčních časech sloučenin (pokud bychom je měli, bude se jednat spíše o cílenou analýzu). Informace o analytech jsou často dostupné ve formě **databází nebo knihoven**.

Databáze a knihovny

Agilent Technologies pro screening a identifikaci látek nabízí specializované databáze a knihovny:

- **Forenzní toxikologie**
cca 9000 léků, drog, jedů, spektra pro 3400 látek
- **Pesticidy**
1700 látek, spektra pro 770 látek
- **Mykotoxiny a bakteriální toxiny**
450 látek, spektra pro 300 látek
- **Veterinární léčiva**
2100 látek, spektra pro 1400 látek
- **Databáze Metlin**
79 000 látek, spektra pro 9400 látek

Pod pojmem databáze rozumíme soubor informací o dané sloučenině jako je název látky (běžný i IUPAC), CAS #, sumární i strukturální vzorec. Knihovna kromě těchto informací obsahuje i naměřená produktová spektra získaná při několika kolizních energiích (korigované na přesnou teoretickou hmotu) a nese zároveň informaci o polaritě a m/z prekursoru. Pro cílený screening se využívají dvě strategie, které se liší způsobem akvizice dat a identifikací látek (viz **Obrázek 1**).

Strategie Auto MS/MS

První strategie využívá pro screening akviziční režim **Auto MS/MS**. V režimu Auto MS/MS je nejprve během několika desítek milisekund změřeno plné MS spektrum bez fragmentace, ve kterém je podle intenzity vybráno několik prekursorů. Pro ty jsou následně změřena produktová spektra. Díky tomu, že technologie QTOF umožňuje velmi rychlý sběr dat, lze celý popsaný cyklus zvládnout několikrát za vteřinu a dosáhnout tak dostatečného prokreslení i úzkých piků z UHPLC.

Při zpracování dat vyhodnocovací algoritmus **softwaru Mass Hunter** v prvním kroku prohledá MS spektra, ze kterých se vyextrahují ionty odpovídající sloučeninám z databáze, popř. sub-databáze. Aby byla látka identifikována jako možná shoda s databází, je hodnocena nejen shoda přesné hmoty monoizotopického iontu, ale také přesnost hmoty jednotlivých izotopů, jejich poměry a spacing, tj. vzdálenost od monoizotopického iontu – viz **Obrázek 2**. V druhém kroku jsou změřená produktová spektra nalezených látek porovnána se spektry v knihovně, čímž je potvrzena nebo vyloučena identita analytu. Pokud jsou produktová spektra v knihovně získána na stejném typu přístroje, nebo alespoň na přístroji se stejnou geometrií kolizní cely, je shoda velmi dobrá. V **Obrázku 3** je reálný příklad identifikace sloučeniny thiacloprid na základě shody molekulového iontu (přesná hmotu a izotopová obálka) a produktového MS spektra s knihovnou.

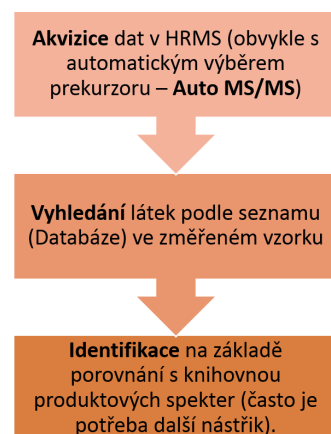
Pokud pro danou sloučeninu není v knihovně k dispozici produktové MS spektrum, není situace ztracená. Agilent Technologies dodává ke QTOF systémům softwarový nástroj **Molecular Structure Correlator**, který na

základě fragmentačních pravidel hodnotí pravděpodobnost, že změřené produktové spektrum vzniklo z předpokládané struktury. Lze se tedy na základě MS/MS spektra například rozhodnout mezi dvěma sloučeninami s totožným sumárním vzorcem nebo dokonce z internetových databází automaticky stáhnout všechny možné strukturální vzorce a seřadit je podle vypočtené pravděpodobnosti, podle počtu citací v literatuře apod.

Strategie All ions MS/MS

Druhá strategie cíleného screeningu (viz **Obrázek 1B**) využívá tzv. „All Ions MS/MS“ technologii. Při „All Ions MS/MS“ je kvadrupól v přístroji QTOF propustný pro všechny ionty a pouze se mění napětí v kolizní cele. Získá se tedy záznam MS spekter bez fragmentace a MS spekter s indukovanou fragmentací všech koeluovaných látek. První krok při vyhodnocení dat je identický s Auto MS/MS režimem, tedy v datech bez kolize jsou podle databáze vyhledány podezřelé látky. Identifikace látek je však zcela odlišná – z produktových spekter v knihovně jsou použity přesné hmoty fragmentů a pro ně se vyextrahují chromatogramy. Poté je hodnoceno tzv. „koeficientní skóre“, tedy do jaké míry se překrývá chromatografický pik molekulového iontu a fragmentů, které charakterizují danou sloučeninu – viz **Obrázek 4**.

Výhoda postupu „Auto MS/MS“ před „All Ions MS/MS“ spočívá v naprosto jednoznačné identifikaci látek a dále i ve výše zmíněné možnosti identifikace látek, které nemají produktové spektrum v knihovně. Jistotou nevýhodou je, že pokud se automaticky nevybere prekursor analytu v režimu Auto MS/MS, je nezbytné pro potvrzení analytu změřit produktové spektrum dodatečně. V případě All Ions MS/MS jsou produktové ionty vždy změřeny, ale chybí vztah mezi konkrétním prekuzorem a jeho produktovými ionty. Z toho důvodu lze identifikovat pouze látky, pro které je v knihovně analytů již produktové spektrum změřené. Zároveň je přístup s All Ions MS/MS akvizicí vhodnější pro kvantifikaci látek.

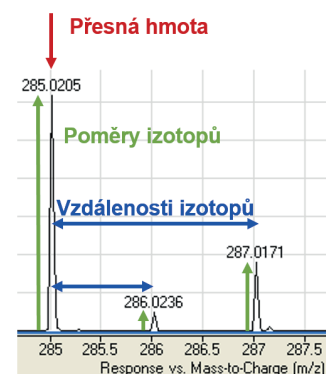
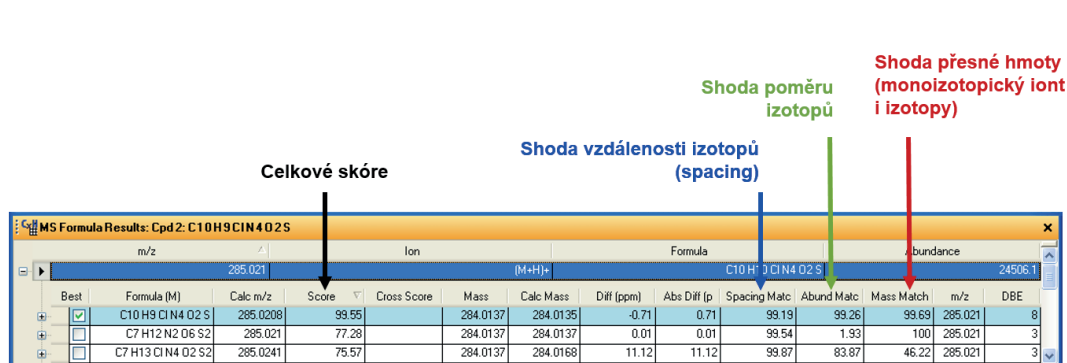


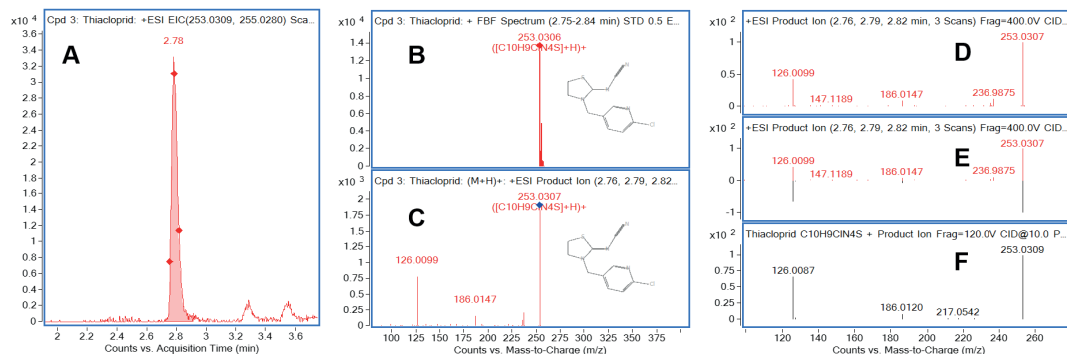
Obrázek 1 A Možnosti postupů cíleného screeningu: Strategie Auto MS/MS



Obrázek 1 B Možnosti postupů cíleného screeningu: Strategie All Ions MS/MS

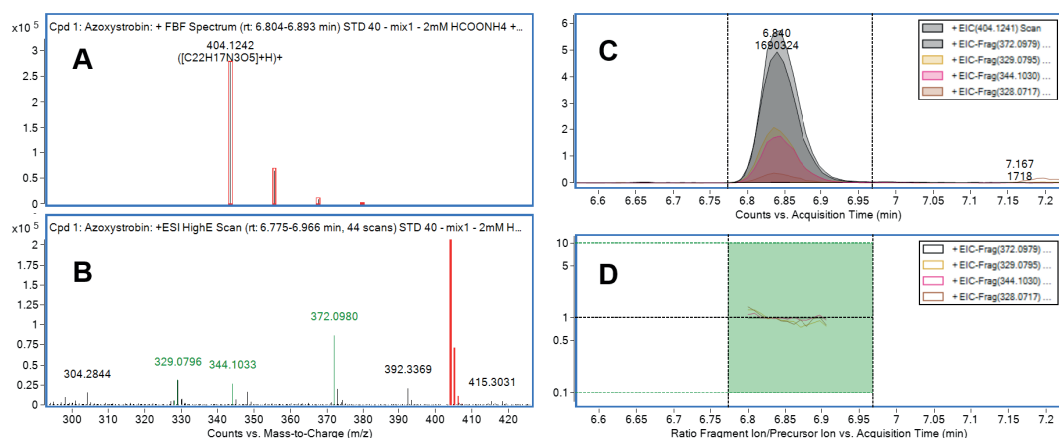
Obrázek 2 Identifikace sloučeniny pomocí porovnání naměřeného molekulového iontu s knihovnou





Obrázek 3 Příklad identifikace sloučeniny (pesticid thiacloprid) při měření v režimu „Auto MS/MS“. Suspektní píky analytů jsou nalezeny podle shody molekulového iontu s databází (přesná hmota, izotopová obálka) a poté potvrzovány na základě shody produktového MS spektra s knihovnou.

- Extrahovaný chromatogram
- MS spektrum
- Produktové MS spektrum
- Změřené MS/MS spektrum
- Diferenční spektrum
- Produktové MS spektrum z knihovny



Obrázek 4 Příklad identifikace sloučeniny (pesticid azoxystrobin) při měření v režimu „All ion MS/MS“. Analyty jsou nalezeny podle shody molekulového iontu s databází (přesná hmota, izotopová obálka). Potvrzení identity je realizováno extrakcí fragmentů ze spektra s kolizí a následným výpočtem koeficientního skóre fragmentů s molekulovým iontem.

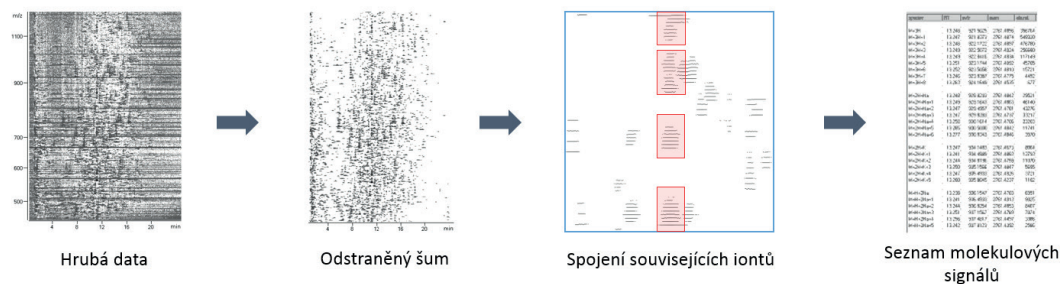
- MS spektrum bez fragmentace
- MS spektrum s fragmentací
- Extrahované chromatogramy molekuly a fragmentů
- Graf koeficientních skóre

Necílený screening

Úkolem necílené analýzy je nalézt a identifikovat „vše“ co je obsaženo ve vzorku. To představuje nesmírně náročný úkol, navíc řada sloučenin ve vzorku není ničím zajímavá. V praxi je tedy vhodné specifikovat látky, které jsou nějak zajímavé nebo důležité. Nejčastější cestou, jak tyto látky nalézt je tzv. **diferenční analýza**, kdy se porovnává profil molekul mezi dvěma vzorky nebo dvěma skupinami vzorků a hledají se látky, které představují významný rozdíl mezi nimi. Například lze zjistit kontaminanty, které se dostávají z továrny/města do řeky analýzou vzorků vody nad místem znečištění a pod ním. Stejně tak lze sledovat odlišnosti mezi šaržemi výrobků apod.

Při necíleném screeningu jsou ze změřených vzorků vyextrahovány píky látek, tzv. **peak picking**. Jedná se o poměrně komplikovaný algoritmus, který vyhledává signály odpovídající jedné sloučenině (různé adukty, odlišné nábojové stavy, dimery, fragmenty) a spojuje

je do tzv. **molekulových signálů** (features), kde společným jmenovatelem všech iontů je jejich neutrální hmotnost. Aby bylo možné porovnat látky přítomné ve vyšetřovaném vzorku a v referenci, je potřeba provést jejich zarovnání (tzv. alignment) podle retenčního času a zároveň neutrální hmotnosti. Pro úspěch celé diferenční analýzy jsou nesmírně důležité právě první dva kroky, tedy extrakce signálů a alignment. Při extrakci signálů je nezbytné, aby softwarový algoritmus správně našel a sloučil všechny signály iontů příslušejících danému analytu. Pokud by látka, i když přítomná v obou vzorcích, byla vyextrahovaná pouze v jednom z nich, dojde k tomu, že z diferenční analýzy vyjde jako unikátní. Ke stejnému výsledku dojde i v případě, kdy je látka vyextrahovaná z obou vzorků, ale během alignmentu je vyhodnocena jako dvě odlišné (např. kvůli posunu retenčního času). Tak vzniknou dvě falešně unikátní látky.



Obrázek 5 Extrakce molekulových signálů: Při extrakci molekulových signálů z LC/MS záznamu jsou hrubá data zobrazena ve třech rozměrech (retenční čas \times m/z \times intenzita) a je podle předem nastavené intenzity odstraněn šum. Ve zbylých datech jsou spojovány ionty se stejným chromatografickým profilem, které zároveň odpovídají stejné neutrální hmotě.

Na uvedených příkladech je vidět, že problémem necíleného screeningu obvykle není nalezení rozdílů mezi vzorky, ale minimalizace vzniku falešných diferencí. To lze řešit dvoukoleovou extrakcí látek, kdy v prvním kole dojde k necílené extrakci signálů ze všech vzorků, provede se alignment, ale ionty látek ze všech vzorků jsou v druhém kole znovu, cíleně vyhledány ve změřených datech (tzv. **rekurzivní extrakce**). Tím je zajištěno, že budou porovnávány stejné analyty, a že i málo intenzivní látky, které v jednom ze vzorků nebyly nalezeny necílově, budou vyextrahovány. Tím pádem výsledkem diferenční analýzy budou skutečně pouze analyty unikátní pro jeden ze vzorků.

Pro usnadnění necíleného screeningu nabízí Agilent Technologies jednoduchý softwarový nástroj **Mass Profiler**, který automaticky provádí výše zmíněnou dvoukoleovou extrakci látek, a poskytuje tak kvalitní výsledky bez falešně pozitivních chyb. Kromě toho obsahuje řadu možností grafického zobrazení nalezených diferencí, lze pro ně vypočítat sumární vzorce nebo je identifikovat pomocí různých offline nebo online databází. To vše při zachování velmi jednoduchého rozhraní, které nevyžaduje hlubší znalosti statistické analýzy.

Závěr

Je zřejmé, že při cíleném screeningu je úspěch podmíněn především rozsahem použitých databází a knihoven; analyty, které v databázi nejsou, není možné nalézt a reportovat. Kromě počtu analytů jde i o informace k nim dostupné. Především jsou podstatná kvalitní MS/MS spektra pro snadnou potvrzení suspektních nálezů, protože bez potvrzení není validní výsledek. Kromě toho je důležitá i zkušenost analytika s danou skupinou látek, protože i přes moderní software a obsáhlé databáze látek je to nakonec on, kdo rozhoduje, jakým způsobem se bude vzorek analyzovat a zda nalezená látka je skutečně hledaný analyt nebo interference z matrice.

Necílená analýza je mnohem náročněj-

ším úkolem a klade ještě vyšší nároky na zkušenosti analytika než cílený screening. Klíčovým faktorem je zde kvalitní extrakce molekulových signálů a příprava dat před samotnou diferenční analýzou. K tomu jsou využívány pokročilé algoritmy, které zajišťují minimalizaci falešně pozitivních píků a zároveň umožní vyhledávat signály i na nízké úrovni intenzit. Obvykle obávaná statistická analýza je až pomyslná „třešnička na dortu“. Samostatnou kapitolou je potom identifikace diferencí, kde se používají obsáhlé offline i online databáze kombinované s manuální interpretací produktových spekter látek a všechny dostupné informace z literatury.

Ondřej Lacina

ondrej.lacina@hpst.cz

Jitka Zrostlíková

jitka.zrostlikova@hpst.cz

Ptáme se odborníka: Lze vylepšit chromatografii bazických látek na starších HPLC systémech?

Agilent Technologies nabízí širokou škálu 4 μ m kolon Agilent Poroshell 120, která uspokojí všechny LC specialisty. Ať už ty, kteří rádi pracují na delších kolonách (např. 4.6 x 250 mm), nebo ty, kteří chtějí omezit tlak v systému pod 200 bar (3000 psi).

Mohu využít výhod kolon s částečně porézními částicemi na mém starším HPLC systému?

Kolony plněné částečně porézními částicemi Agilent Poroshell 120 mají (oproti kolonám s plně porézními částicemi) mnoho výhod, ale především je to rychlejší analýza a vyšší rozlišení, umožněné vyšší dělicí účinností za přijatelných tlaků.

Jaké jsou výhody a nevýhody mobilních fází s vysokým pH?

Bazické sloučeniny (což je většina účinných látek v léčivech) může být náročné analyzovat na HPLC s reverzní fází, protože mají tendenci ionizovat v mobilní fázi, což vede ke chvostování píků, horšímu rozlišení a nižší kapacitě. Zvýšením pH mobilní fáze potlačíme ionizaci bazických látek, ale tento přístup může způsobit problémy se zkrácením život-

nosti kolon díky rozpouštění křemičitých částic v mobilní fázi s pH nad 7-8.

Existuje nějaké řešení, které by zajistilo vyšší stabilitu kolon?

Ano, Agilent vyvinul patentovanou organickou modifikaci částečně porézních částic. Kolony s touto modifikovanou fází se prodávají pod názvem Agilent Poroshell HPH-C18 a Agilent Poroshell HPH-C8. Jsou určeny pro pH od 3,0 do 11,0 a jsou dostupné jak ve velikosti částic 2,7 tak 4,0 μ m.

Jaké výsledky mohu u těchto kolon očekávat?

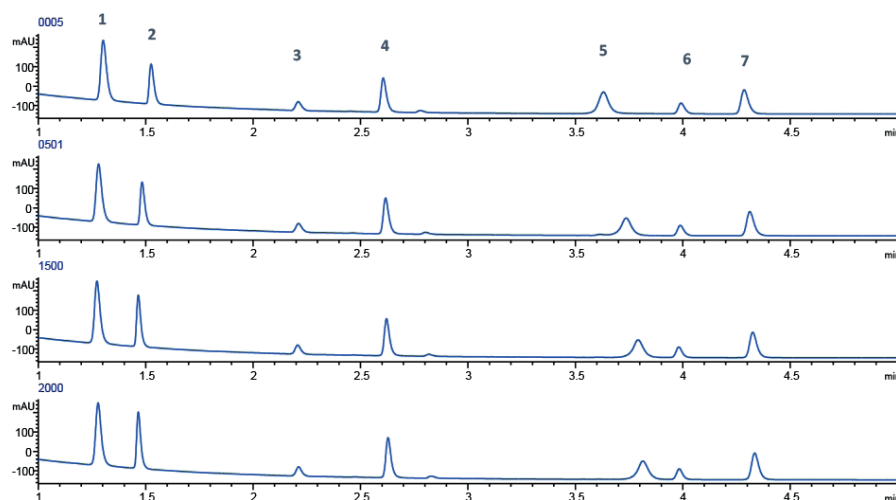
Na chromatogramu (viz Obrázek 1) je vidět vynikající separace bazických látek pomocí kolony Poroshell HPH-C18 2.1 x 50 mm, 4 μ m v mobilní fázi pH 10. Bylo provedeno více než 2000 nástřiků a kolona nevykazuje žádná známky degradace. Kolony Agilent Poroshell HPH-C18 a Poroshell HPH-C8 4 μ m v sobě kombinují výhody kratších retenčních časů, vysokého rozlišení a schopnosti poskytovat pěkné chromatografické záznamy i pro bazické sloučeniny. Tuto kombinaci vlastností ocení jistě všichni uživatelé HPLC.

Obrázek 1

Analýza bazických látek na koloně Agilent Poroshell HPH-C18 2.1 x 50 mm, 4 μ m. Kolona je dlouhodobě stabilní při pH 10 i po 2 tisících nástřiků (na obrázku chromatogramy nástřiků č. 5, 501, 1500 a 2000).

1. 2-Hydroxy-5 methyl-benzaldehyde
2. 4-Chloro-cinnamic acid
3. Acetophenone
4. Quinine sulfate
5. Nortriptyline
6. Hexanophenone
7. Amitriptyline.

Mobilní fáze: A: acetonitril; B: hličitán amonný, 10 mM, pH 10, gradient 5%B → 95%B → 5%B (celkový čas 7 min). Teplota 25 °C, průtok 0.4 ml/min, detektor UV 220 nm.



Kolony Agilent Poroshell 120: rychlejší analýzy s vyšším rozlišením

Kolony Poroshell 120 poskytují robustní separaci s vysokým rozlišením v rozsahu tlaků běžného HPLC systému. Jsou dostupné ve velikosti částic 2,7 a 4 μ m, a lze si vybrat z dvanácti různých fází, které chemicky navazují na technologii ZORBAX, takže transfer metod nebo vývoj nových metod je

velice snadný a rychlý. Více o kolonách Poroshell 120 na stránce www.agilent.com/chem/DiscoverPoroshell120.

info@labicom.cz

(Převzato z: Agilent eNewsletter AccessAgilent January 2016 (www.agilent.com/chem/access))

Použití nového iontového zdroje s vysokou účinností při analýze těkavých organických látek metodou static headspace

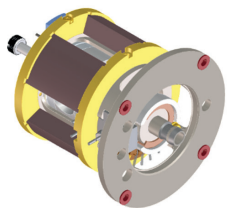
Toto je první studie demonstrující výhody nového zdroje s vysokou účinností (High Efficiency Source - HES) na citlivost při stanovení těkavých organických látek (Volatile Organic Compounds - VOC). V této práci byla zkoumána následující kritéria: LOD, opakovatelnost, reprodukovatelnost a dlouhodobá stabilita.

Pro měření byla použita instrumentace Agilent Technologies - nový hmotnostní detektor 5977B s HES, plynový chromatograf 7890B a static headspace sampler 7697A.

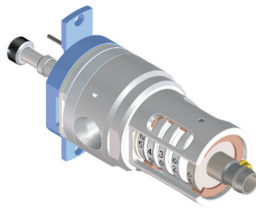
Zatím nejvyspělejší EI GC/MS zdroj je schopen vyprodukovat až 20x více iontů než dosavadní iontové zdroje a to zejména kvůli intenzivnějšímu paprsku elektronů a delší trase, kde dochází ke kolizi elektronů a eluovaných analytů. Díky tomu je IDL (Instrument Detection Limit) – detekční limit nového hmotnostního spektrometru 5977B s HES 6-7x lepší než detekční limit staršího stroje 5977A s extrakčním zdrojem (1.5fg OFN na 5977B oproti 10fg OFN na 5977A).



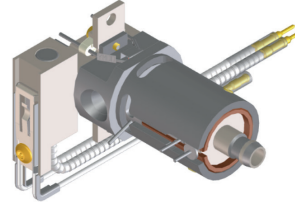
Obrázek 1
Systém HS-GC/MS



Nový! 5977B Zdroj s vysokou účinností



5977B Zdroj s vysokou účinností bez magnetického obalu



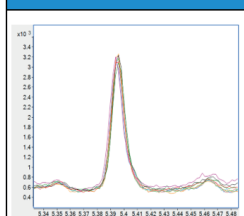
5977A Zdroj s extraktorem

Obrázek 2
Intenzivnější elektronový paprsek, delší trasa pro kolizi elektronů a eluovaných analytů -> téměř 20x více vyprodukovaných iontů

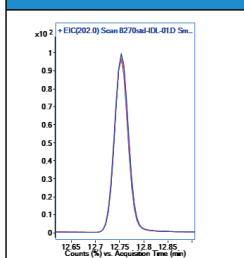
S novým iontovým zdrojem HES se otvírají nové možnosti úpravy pracovních procesů

Dosažení nejnižších detekčních limitů

Extrémně nízké detekční limity



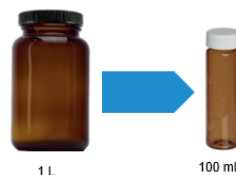
Perfektní preciznost



Snížení nákladů na dopravu

Snížení nákladů na skladování

Snížení nákladů na likvidaci odpadu



Menší množství vzorku = čistější systém

Delší životnost kolony

Rychlejší příprava vzorků

Méně častá výměna lineru

Obrázek 3a

- Detekční limity v řádu atto gramů
- Preciznost
- Citlivost v režimu Scan bude nyní stejná jako v režimu SIM se standardními iontovými zdroji

Obrázek 3b

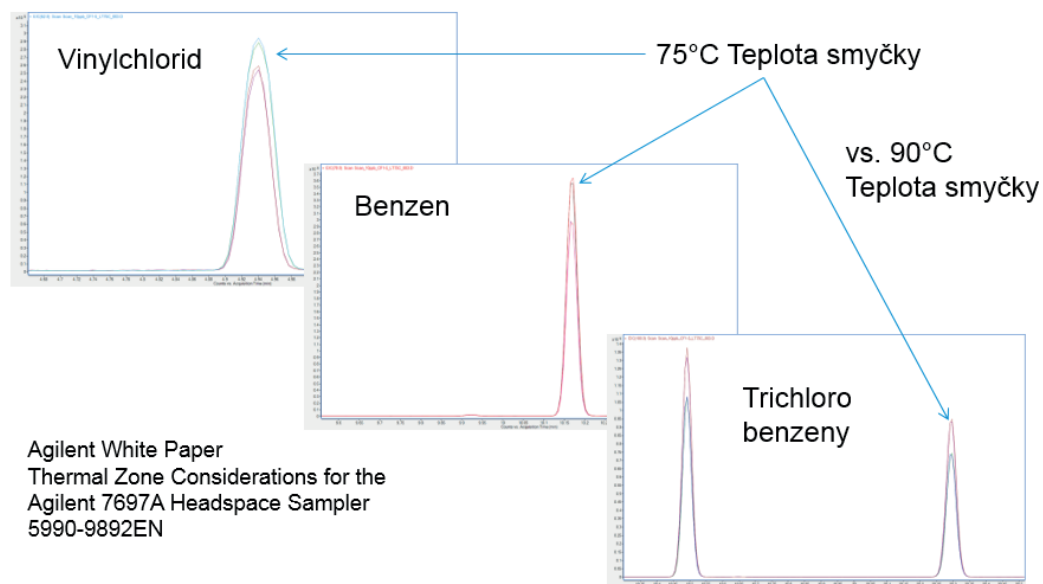
Optimalizace pracovního procesu

Optimalizace parametrů HS metody

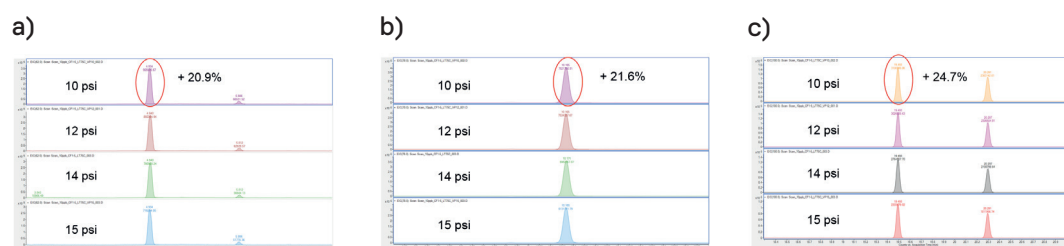
Pro zajištění robustních výsledků byly vybrány tři sloučeniny reprezentující nízko vroucí, středně vroucí a výše vroucí skupiny látek, a to vinylchlorid, benzen a trichlorobenzeny. Při optimalizaci metody bylo použito standardu o koncentraci 10 µg/L VOC. Měření

probíhalo v módu SCAN a ladily se následující parametry:

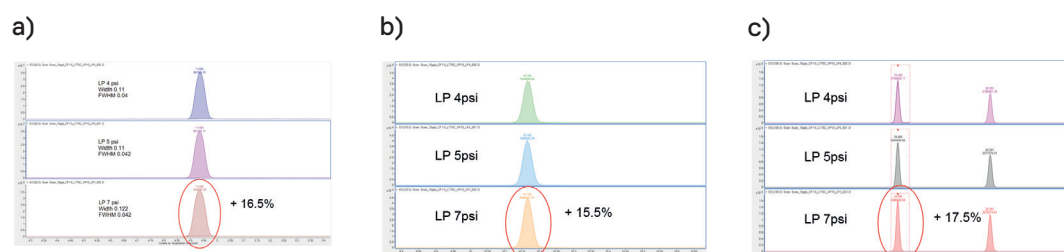
- Teplota pece a teplota smyčky
- Plnicí tlak vialky
- Plnicí tlak smyčky
- GC splitovací poměr



Obrázek 4
Teplota smyčky = Teplota Pece
(75°C)



Obrázek 5
Tlak ve vialce (10 – 15 psi):
a) Vinylchlorid
b) Benzen
c) Trichlorobenzeny



Obrázek 6
Plnicí tlak smyčky
a) Vinylchlorid
b) Benzen
c) Trichlorobenzeny



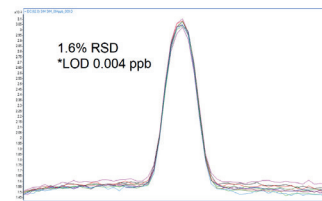
Obrázek 7
GC splitovací poměr
a) Vinylchlorid
b) Benzen
c) Trichlorobenzeny

Odhad limitu detekce a opakovatelnosti

Pro odhad limitu detekce byla analýza VOC provedena v režimu SIM a jako matrice byla použita voda přečištěná reverzní osmózou a obohacená směsí VOC v kalibračním rozmezí 0.02 -20 µg/L. Pro odhad detekčního

limitu metody (MDL) bylo použito opakovaných měření na hladině 0.04 µg/L. Testování dlouhodobé stability bylo provedeno opakovaným měřením na vzorcích kohoutkové vody.

34



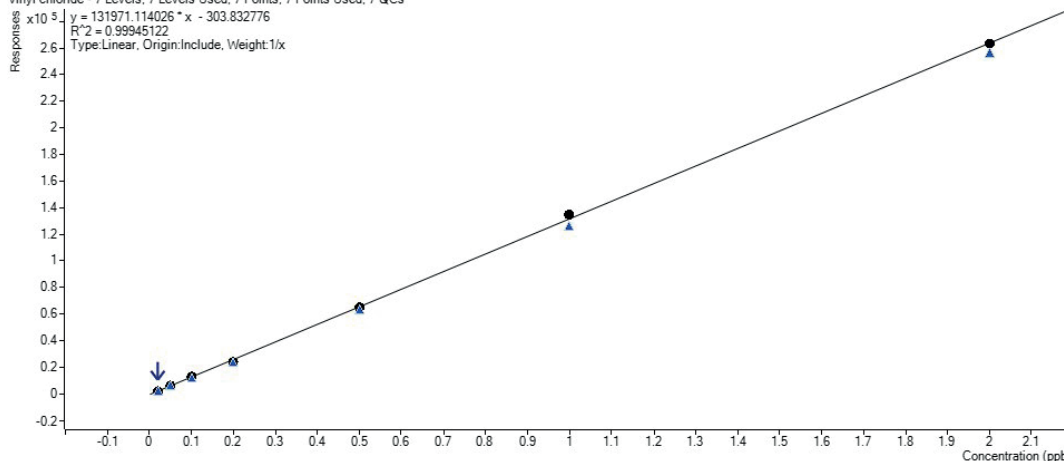
Obrázek 8
Odhad limitu detekce - 40 ppt
Vinylchlorid – 9 opakovaných nástřiků

Příprava kalibrační řady

Do každé 20 mL vialky bylo odměřeno 10 mL vody, která byla následně obohacena standardy ze zásobních roztoků připravených

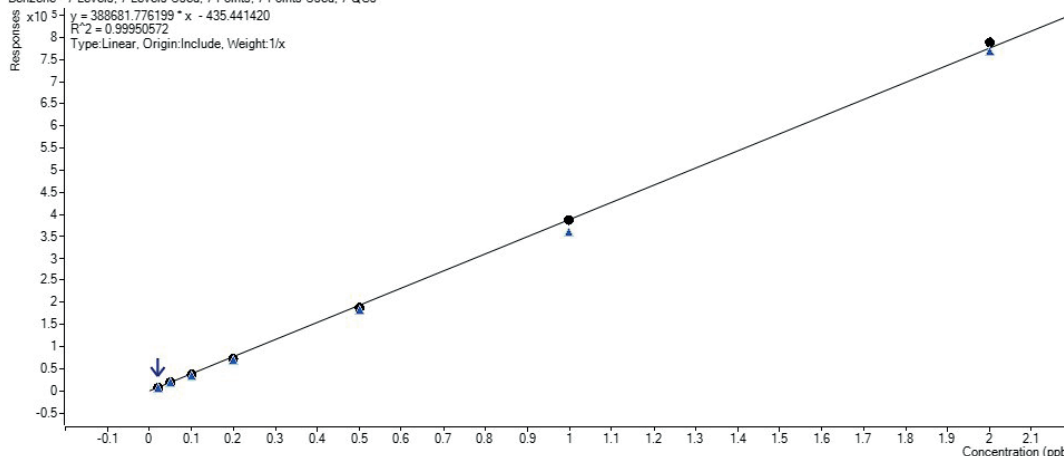
v metanolu na koncentračních hladinách: 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 10 a 20 µg/L.

Vinyl chloride - 7 Levels, 7 Levels Used, 7 Points, 7 Points Used, 7 QCs
x10⁵
 $y = 131971.114026 * x - 303.832776$
 $R^2 = 0.99945122$
Type:Linear, Origin:Include, Weight:1/x



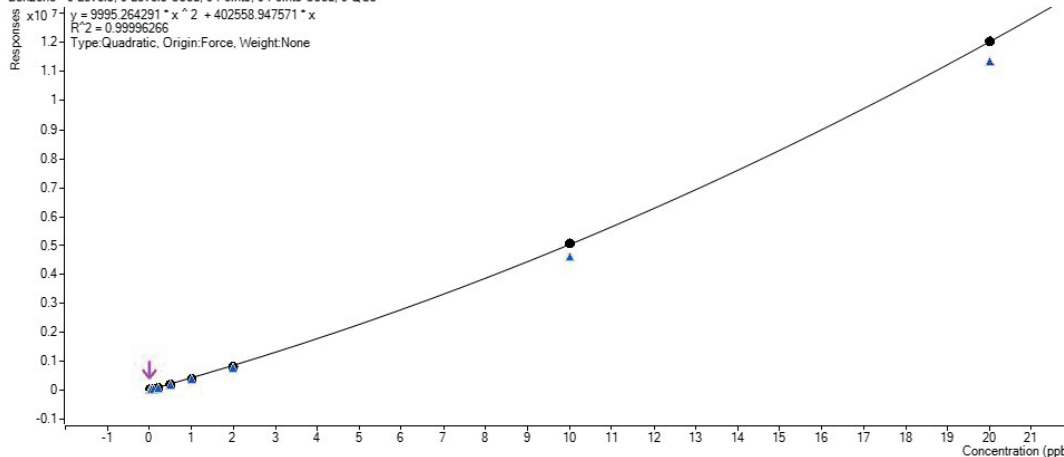
Obrázek 9
Kalibrační závislost pro Vinylchlorid
20 – 2,000 ppt

Benzene - 7 Levels, 7 Levels Used, 7 Points, 7 Points Used, 7 QCs
x10⁵
 $y = 388681.776199 * x - 435.441420$
 $R^2 = 0.99950572$
Type:Linear, Origin:Include, Weight:1/x



Obrázek 10
Kalibrační závislost pro Benzen
20 – 2,000 ppt

Benzene - 9 Levels, 9 Levels Used, 9 Points, 9 Points Used, 9 QCs
x10⁷
 $y = 9995.264291 * x^2 + 402558.947571 * x$
 $R^2 = 0.99996266$
Type:Quadratic, Origin:Force, Weight:None



Obrázek 11
Kalibrační závislost pro Benzen
20 – 20,000 ppt

Nastavení metody HS-GC/MS

Headspace parameters	Agilent 7697A Headspace Sampler	GC parameters	Agilent 7890B GC
Instrument settings		Inlet	
Loop size	1 mL	Inlet type	Split/Splitless Inlet (SSL)
Transfer line type	Fused Silica, deactivated (p/n160-2535-5)	Mode	Split
Transfer line diameter	0.53 mm	Inlet liner	Straight, 2 mm id, 250 µL (p/n 5181-8818)
HSS-GC coupling	Transfer line interface (G3520A)	Heater	125 °C
Carrier control	GC Instrument	Column flow	1.5 mL/min constant flow
Pressurization gas	Helium	Total flow	25 mL/min
Vial standby flow	20 mL/min	Septum purge flow	1.0 mL/min
Temperature settings		Gas saver	OFF
Oven temperature	75 °C	Split ratio	15:1
Loop temperature	75 °C	Split flow	22.5 mL/min
Transfer line temperature	110 °C	Oven	
Transfer line interface (Aux1)	115 °C	Column	Agilent VF-624 MS
Timing settings		Column dimensions	60 m × 0.25 mm, 1.4 µm
Vial equilibration time	12 minutes	Equilibration time	0.25 minutes
Injection duration	0.3 minutes	Temperature program	32 °C (2 minutes), 12 °C/min to 220 °C (5 minutes)
GC cycle time	30 minutes	Mass Selective Detector parameters Agilent 5977B	
Vial and loop settings		Type	High Efficiency Source (HES EI)
Vial size	20 mL	Source temperature	300 °C
Vial shaking	Level 7	Quad temperature	150 °C
Fill pressure	10 psi	Transfer line temperature	280 °C
Fill time	0.2 minutes	Tune file	HES Auto Tune (HES_Atune.u)
Loop ramp rate	20 psi/min	Acquisition type	SIM (see Table 2)
Loop final pressure	7 psi	Solvent delay	3.95 minutes
Loop equilibration time	0.01 minutes	Gain factor	3
Post injection purge	100 mL/min for 2 minutes		
Leak check	Default, 0.2 mL/min		
Mode	Single Extraction		

Tabulka 1
Nastavení metody HS-GC/MS

Výsledky a diskuse

V následující tabulce jsou shrnuty výsledky odhadu MDL, které byly měřeny na koncentrační hladině 0.04 µg/L v devíti opakováních. S výjimkou dvou látek měly všechny ostatní

sloučeniny MDL pod hranicí 0.025 µg/L, většina pak dokonce pod 0.015 µg/L a to včetně látek s relativně nízkou odezvou.

Name	RT	Quant ion	MDL	Name	RT	Quant ion	MDL
Vinyl chloride	4.934	62	0.004	1,2-Dibromoethane	13.427	106.9	0.006
Bromomethane	5.611	93.9	0.003	Chlorobenzene	13.969	112	0.015
Chloroethane	5.806	64	0.003	Ethylbenzene	14.03	91	0.014
1,1-Dichloroethene	7.007	95.9	0.008	1,1,1,2-Tetrachloroethane	14.049	130.9	0.005
trans-1,2-Dichloroethene	8.007	95.9	0.009	o-Xylene	14.664	91	0.018
1,1-Dichloroethane	8.554	63	0.004	Styrene	14.683	104	0.015
cis-1,2-Dichloroethene	9.19	95.9	0.011	Bromoform	14.975	170.8	0.006
2,2-Dichloropropane	9.208	77	0.013	1,1,2,2-Tetrachloroethane	15.45	82.9	0.041
Bromochloromethane	9.47	127.8	0.004	1,2,3-Trichloropropane	15.567	110	0.007
1,1,1-Trichloroethane	9.769	96.9	0.005	Bromobenzene	15.573	155.9	0.017
1,1-Dichloro-1-propene	9.921	75	0.012	n-Propylbenzene	15.63	91	0.017
Carbon tetrachloride	9.94	116.9	0.003	2-Chlorotoluene	15.768	91	0.016
Benzene * (blank issue)	10.165	78	0.009	1,3,5-Trimethylbenzene	15.84	105	0.018
1,2-Dichloroethane	10.202	62	0.006	4-Chlorotoluene	15.914	91	0.018
Trichloroethene	10.848	129.9	0.009	tert-Butylbenzene	16.225	134	0.017
1,2-Dichloropropane	11.165	63	0.005	sec-Butylbenzene	16.499	105	0.016
Dibromomethane	11.275	173.8	0.006	4-Isopropyltoluene	16.67	119	0.017
Bromodichloromethane	11.421	82.9	0.005	1,3-Dichlorobenzene	16.719	145.9	0.020
cis-1,3-Dichloropropene	11.89	75	0.014	1,4-Dichlorobenzene	16.841	145.9	0.023
trans-1,3-Dichloropropene	12.506	75	0.013	n-Butylbenzene	17.194	134	0.020
1,1,2-Trichloroethane	12.762	96.9	0.011	1,2-Dichlorobenzene	17.316	145.9	0.021
Tetrachloroethene	12.884	163.8	0.009	1,2-Dibromo-3-chloropropane	18.334	154.9	0.010
1,3-Dichloropropane	12.963	76	0.009	1,2,4-Trichlorobenzene	19.493	179.9	0.028
Dibromochloromethane	13.238	126.8	0.004	Hexachlorobutadiene	19.651	224.8	0.006

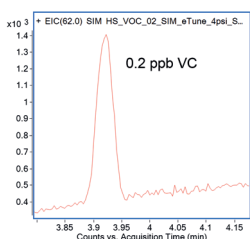
*Blanks showed some low-level contamination for benzene.

Tabulka 2
Výsledky odhadu MDL, měřené na koncentrační hladině 0.04 µg/L v devíti opakováních

	7697A/5977A Demo WAD		App. Note Mike S. 7697A / 5977A		5977B HES	
	RSD 200 ppt	LOD	RSD	LOD	RSD 40 ppt	LOD
Vinylchlorid	4.8	0.029	n.a.	0.060	1.6	0.002
Benzen	3.7	0.020	n.a.	0.020	4.1	0.005
1,2-Dichloroethan	4.3	0.025	n.a.	0.230	2.7	0.003
Trichloroethen	2.3	0.014	n.a.	0.021	4.1	0.005
Tetrachlorethen	n.a.	n.a.	n.a.	0.017	3.7	0.004
Bromoform	5.7	0.032	n.a.	n.a.	2.7	0.0032

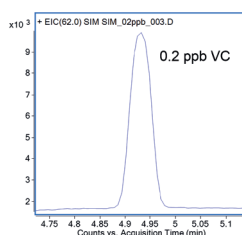
Tabulka 3
Porovnání dat naměřených na 5977B a 5977A

a)



5977A Extractor Source
S/N: 60:1 RMS

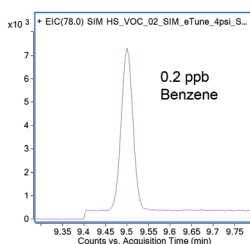
Gain Factor 10; 20 data points



5977B High Efficiency Source
S/N: 1000:1 RMS

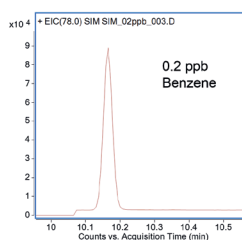
Gain Factor 3; 14 data points

b)



5977A Extractor Source
S/N: 450:1 RMS

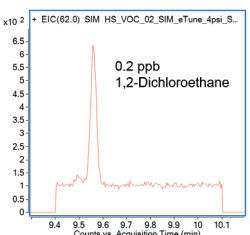
Gain Factor 10; 19 data points



5977B High Efficiency Source
S/N: 5000:1 RMS

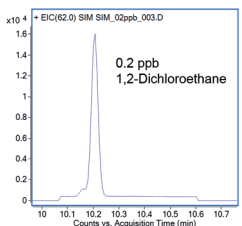
Gain Factor 3; 11 data points

c)



5977A Extractor Source
S/N: 100:1 RMS

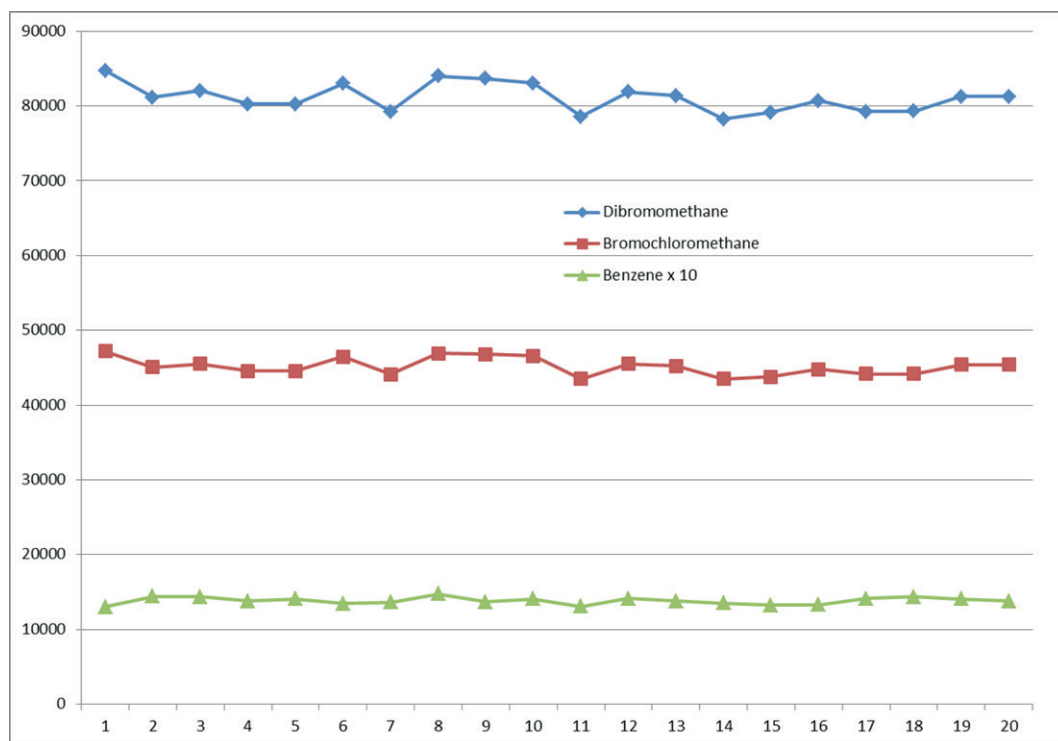
Gain Factor 10; 16 data points



5977B High Efficiency Source
S/N: 2000:1 RMS

Gain Factor 3; 10 data points

Obrázek 12
Porovnání dat naměřených na 5977B a 5977A - SIM Mode
a) Vinylchlorid - 0.2 ppb ($\mu\text{g/l}$)
b) Benzen - 0.2 ppb ($\mu\text{g/l}$)
c) Dichloroethan - 0.2ppb ($\mu\text{g/l}$)



Obrázek 13

Odezva jako plocha píků benzenu, dibromometanu a bromochlorometanu ve 20 opakovaných nástřicích kohoutkové vody, ukazující dlouhodobou stabilitu systému.

Závěr

Použitím nového hmotnostního spektrometru Agilent 5977B GC/MSD vybaveného iontovým zdrojem HES se při analýze VOC dospělo k výraznému snížení detekčních limitů oproti staršímu modelu 5977A, a to 4x - 10x v závislosti na vybraných analytech. Po optimalizaci parametrů headspace sampleru bylo taktéž

dosaženo vynikající opakovatelnosti a dlouhodobé stability systému. Kalibrační křivky byly pro většinu analytů lineární v celém měřeném kalibračním rozsahu 0,2 µg/L až 20 µg/L.

Michal Čaplygin

michal.caplygin@hpst.cz

Přehled školení v roce 2016 pořádaných společností HPST, s.r.o.

38

V letošním roce opět pořádáme celou řadu školení se zaměřením na kapalinovou i plynovou chromatografii, a to včetně školení zabývajících se hmotnostní spektrometrií.

Školení se zaměřením na teoretickou a hardwarovou problematiku jsou vhodná pro zkušené uživatele i začátečníky, stejně tak i pro studenty, tedy pro každého, kdo si chce rozšířit znalosti v oboru chromatografie. V obecné a teoretické části, kterou začíná každé hardwarové školení, se dozvíte nebo si zopakujete principy chromatografie i technické řešení jednotlivých částí plynových či kapalinových chromatografů užívaných v praxi. Informace z diagnostické sekce školení Vám navíc pomůžou vyřešit situace, kdy se systém nechová podle předpokladů, a které je možné vyřešit operativně uživatelem. Tato školení jsou jedno až dvoudenní a pořádáme je v prostorách HPST, s.r.o.

Vzhledem k náročnosti řídicích a operačních softwarů jsou SW školení čtyř až pětidenní a pořádáme je ve smluvních hotelech. V rámci školení tedy zajišťujeme i ubytování a plnou penzi, případně dopravu na místo školení. Aktuálně jsou vypsaná školení se zaměřením Software OpenLAB – ChemStation,

používaný pro instrumentaci HPLC nebo GC a dále MassHunter používaný pro hmotnostní spektrometrii GC/MSD a LC/qTOF. Tato školení jsou vhodná pro uživatele daných softwarů. Na softwarových školeních se zabýváme funkcemi, které jsou důležité pro každodenní práci v laboratoři – správným nastavením instrumentu dle požadavků metod včetně nastavení sběru dat, podrobně se zabýváme vyhodnocováním dat včetně různých způsobů kalibrace. Nemalý časový prostor je věnován vytvoření a nastavení reportů dle požadavků uživatelů.

Podrobné informace najdete na našich webových stránkách: <http://hpst.cz/sluzby>

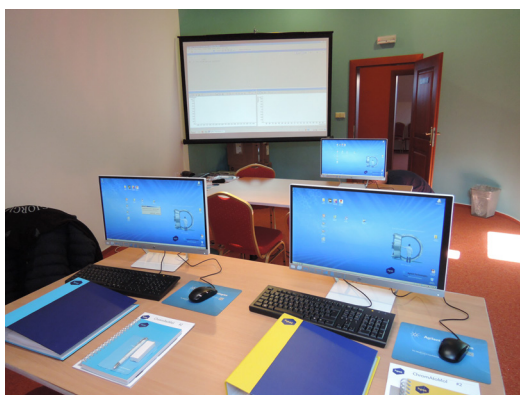


V případě zájmu se prosím přihlašte pomocí formuláře: <http://hpst.cz/registrace-na-skoleni-zavazna-prihlaska>



Pro další informace nás prosím kontaktujte.

Růžena Penížková
ruzena.penizkova@hpst.cz



Obrázek 1
Momenty z hardwarových a softwarových školení

Hardwarová a aplikační školení

GC školení, uživatelské dovednosti a diagnostika

Termíny:

- 28. - 29. dubna 2016
- 3. - 4. května 2016
- 29. - 30. listopadu 2016

Co se na školení naučíte:

- obecné principy plynové chromatografie včetně popisu všech součástí systému
- základy údržby - výměnu kolony, linerů, o-ringů, zlatého těsnění, trysky, splitové cartridge aj.
- výhody a nevýhody různých typů spotřebního materiálu – ferulí, linerů aj.
- diagnostikovat příčinu problémů se zapalováním FIDu, problémů s tlakováním inletu, vysokého signálu aj.

MS (single-quad/QQQ pro GC) školení, uživatelské dovednosti a diagnostika

Termíny:

- 5. - 6.5.2016
- 1. - 2.12.2016

Co se na školení naučíte:

- obecné principy hmotnostní detekce včetně popisu hmotnostního detektoru
- ovládání systému a možnosti nastavení hmotnostního detektoru
- základy údržby vakuových pump, iontového zdroje, detektoru apod.
- diagnostiku častých potíží a drobných závad

LC školení, uživatelské dovednosti a diagnostika

Termíny:

- 4. - 5.10.2016

Co se na školení naučíte:

- obecné principy kapalinové chromatografie včetně popisu jednotlivých částí přístroje
 - základy údržby - výměnu PTFE fritky, cartridge v aktivním ventilu, lampy, ventilů, jehly, sedla aj.
 - výhody a nevýhody různých typů spotřebního materiálu – ferulí, kapilár ap.
 - diagnostikovat příčinu přetlaku systému, zvýšeného šumu, problémy v komunikaci mezi instrumentem a počítačem aj.
-

Softwarová školení

Školení OpenLAB – ChemStation

Termíny:

- 15. - 18.3.2016
- 1. - 4.11.2016

Co se na školení naučíte:

- detailní ovládání a nastavení všech parametrů instrumentu – využití skutečných možností systému
- tvorbu metody včetně různých možností kalibrace a vytvoření sekvence
- kvalitativní a kvantitativní vyhodnocování dat
- využívat funkce „intelligent reports“ – naučíte se tvořit reporty přímo na míru Vaším požadavkům

Školení MassHunter pro GC/MS:

Termíny:

- 14. - 18.3.2016
- 30.5. - 3.6.2016
- 31.10. - 4.11.2016

Co se na školení naučíte:

- detailní ovládání a nastavení všech parametrů instrumentu – využití skutečných možností systému
- tvorbu metody včetně možností kalibrace a vytvoření sekvence
- kvalitativní a kvantitativní vyhodnocování dat včetně možností reportování
- využití funkce „retention time locking“

Školení MassHunter pro qTOF:

Termíny:

- 14. - 18.3.2016

Co se na školení naučíte:

- detailní ovládání a nastavení všech parametrů instrumentu – využití skutečných možností systému
 - přípravu systému na měření – konfiguraci systému, ladění, vytvoření metody
 - kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení dat včetně možností reportování
 - základní údržbu a diagnostiku systému
-



Management



Karel Vranovský
generální ředitel

Tel.: 244 001 242
Mob.: 725 924 019



Naděžda Jeřábková
manažer obchodu
(HPLC, CE, disoluce)
Tel.: 244 001 242
Mob.: 724 252 914



Alexandr Skála
manažer servisu
(servis GC/MS, LC/MS)
Tel.: 244 001 243
Mob.: 724 803 434



Michaela Kopalová
manažer administrativy
(objednávky přístrojů)
Tel.: 244 001 234
Mob.: 602 330 264



Zbyněk Halbhuber
manažer pro skupinu
genomiky a diagnostiky
Tel.: 244 001 245
Mob.: 607 081 918



Daniela Tršová
manažer marketingu
Tel.: 244 001 232
Mob.: 602 158 401

Aplikační tým



Ondřej Lacina
aplikační specialista
(LC/MS)
Tel.: 244 001 249
Mob.: 602 600 235



Michal Čaplygin
aplikační specialista
(GC/MS)
Tel.: 244 001 248
Mob.: 725 433 353



Anastassiya Zidkova
bioinformatik
(genomika a diagnostika)
Tel.: 244 001 245
Mob.: 739 030 865

Obchodní tým



Jan Kovář
produktový specialista
(HPLC, CE, disoluce)
Tel.: 244 001 231
Mob.: 607 081 917



Jitka Zrostlíková
produktový specialista
(LC/MS)
Tel.: 244 001 249
Mob.: 606 047 034



Ivo Novotný
produktový specialista
(GC/MS, ICP-MS)
Tel.: 244 001 240
Mob.: 724 309 027



Jan Marek
produktový specialista
(GC, MP-AES, ICP-OES, AAS)
Tel.: 244 001 231
Mob.: 606 050 908



Martina Háková
produktový specialista
(FTIR, UV-Vis-NIR, fluorescence)
Tel.: 244 001 239
Mob.: 730 572 998



Michaela Pluskalová
odborný asistent týmu
(genomika a diagnostika)
Tel.: 244 001 231
Mob.: 606 050 908



Iva Šenitková
produktový specialista
(genomika a diagnostika)
Tel.: 244 001 245
Mob.: 702 281 171



Irena Findejsová
produktový specialista
(genomika a diagnostika)
Tel.: 244 001 245
Mob.: 731 538 641



Andrea Barešová
obchodní asistent
Tel.: 244 001 239
Mob.: 732 963 045



Michaela Vránová
marketingový specialista
Tel.: 244 001 232
Mob.: 731 157 661

Administrativní tým



Ludmila Freyová
logistika, objednávky
spotřebního materiálu
Tel.: 244 001 236
Mob.: 724 105 611



Dagmar Lehká
příjem oprav, koordina-
ce servisu
Tel.: 244 001 237
Mob.: 724 004 993



Kateřina Doušová
asistentka
Tel.: 244 001 231
Mob.: 724 804 643



Lucie Bahníková
obchodní referentka
Tel.: 244 001 234
Mob.: 735 192 822



Jan Adamiec
servis LC, LC/MS, CE,
UV/Vis, FTIR
Tel.: 244 001 244
Mob.: 602 261 365



Zbyněk Boháček
aplikační podpora,
servis GC, GC/MS, LC
Tel.: 244 001 237
Mob.: 724 805 278



Petr Dušek
servis LC/MS, GC,
GC/MS
Tel.: 244 001 246
Mob.: 724 807 189



Tomáš Fojtík
servis AAS, ICP-OES
ICP-MS
Tel.: 244 001 237
Mob.: 702 287 862



Martin Juříček
servis AAS, ICP-MS,
ICP-OES, MP-AES
Tel.: 244 001 246
Mob.: 724 703 774



Radek Koláčný
servis LC, CE, UV-Vis,
disoluce
Tel.: 244 001 237
Mob.: 724 891 356



Vladimír Navara
servis GC, GC/MS,
headspace, desorpce
Tel.: 244 001 246
Mob.: 724 805 769



Rostislav Pantůček
servis LC, automatizace

Tel.: 244 001 237
Mob.: 725 341 292



Milan Souček
servis GC, GC/MS

Tel.: 244 001 230
Mob.: 602 651 576



Hana Lišková
servis GC, GC/MS

Tel.: 244 001 237
Mob.: 602 319 689



Vít Peterka
servis přístrojů pro
genomiku
Tel.: 244 001 244
Mob.: 605 205 892



Růžena Penížková
servisní smlouvy, servis
přístrojů pro genomiku
Tel.: 244 001 230
Mob.: 724 305 436



Michal Novotný
softwarový specialista,
IT specialista
Tel.: 244 001 244
Mob.: 724 309 037

Labicom s.r.o. (kolony, spotřební materiál)

Obchodní tým

Robert Kukula
manažer obchodu
Čechy-severozápad,
Praha 2, 3, 9
Mob.: 724 807 092

Jitka Berková
obchodní specialista
Čechy-jih, Praha 4, 5, 6

Mob.: 602 777 356

Jana Havelková
obchodní specialista
Jižní Morava

Mob.: 607 006 300

Markéta Donthová
obchodní specialista
Severní a Střední Mo-
rava
Mob.: 731 479 740

Jaroslav Andrlé
obchodní specialista
Čechy-severovýchod,
Praha 1, 7, 8, 10
Mob.: 731 155 148

Jitka Juřicová
odborný asistent ob-
chodního týmu

Mob.: 733 537 084



Společnost HPST, s.r.o., je součástí mezinárodní skupiny SEM group, která v současné době působí v sedmi zemích. Kromě České republiky (HPST, s.r.o., Labicom s.r.o.) patří do této skupiny také Polsko (Perlan Technologies, www.perlan.com.pl), Chorvatsko, Bosna a Hercegovina, Kosovo (AlphaChrom, www.alphachrom.hr), Turecko (SEM, www.sem.com.tr) a Ázerbájdžán (SEM-AZ, www.sem-az.net).

Nejnovější aplikační literatura

Biologie, biofarmacie a medicína

- 5991-6621EN Determination of Drug-to-Antibody Ratio for Antibody-Drug Conjugates Purified from Serum
 - 5991-6458EN Fast, High-Resolution Size Exclusion Chromatography of Aggregates in Biotherapeutics
 - 5991-6522EN Peptide Mapping of Innovator and Biosimilar Monoclonal Antibody
 - 5991-6661EN Use of Spike-ins for Sample Tracking in Agilent Array CGH
 - 5991-6424EN Size Exclusion Chromatography UV/DAD Workflow. Agilent AdvanceBio Columns.
-

Energetika a chemie

- 5991-6552EN Agilent Gas Chromatography and Sulfur-Selective Detection
 - 5991-6434EN Determination of Olefin Content in Gasoline According to ASTM D6550
 - 5991-6549EN Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Petroleum Vacuum Residues by 2D-LC
 - 5991-6432EN Gas chromatographic separation of metal carbonyls in carbon monoxide with detection using the Agilent 8800 ICP-QQQ
-

Farmaceutický průmysl

- 5991-6541EN Method Transfer Using the Agilent 1290 Infinity II LC with ISET
 - 5991-6408EN Analysis of Paracetamol and Impurities using an Agilent 1290 Infinity II LC with ISET
 - 5991-6540EN HPLC to UHPLC Transfer of USP Method for Amlodipine Besylate
 - 5991-6535EN Agilent 6120B Single Quadrupole Walk-up for Multiuser Labs
 - 5991-6511EN Average Degree of Substitution of Betadex Sulfobutyl Ether Sodium
 - 5991-6512EN Analysis of Tricyclic Antidepressants using Agilent Poroshell HPH C18
 - 5991-6519EN Separation of Beta Blockers at low and high pH using Poroshell HPH C18
 - 5991-6657EN Cary 630 Lab FTIR and 4500 Portable FTIR for Detection of Counterfeit Pharmaceuticals
-

Forenzní analýza a toxikologie

- 5991-6437EN Determination of Beta-Blockers in Urine Using SFC and Mass Spectrometry
 - 5991-6671EN Cocaine detection in seized drugs by CE-MS/MS
 - 5991-6523EN Analysis of Drugs of Abuse at Low and High pH using Agilent Poroshell HPH C18 by LC/MS
-

Klinický výzkum

- 5991-6530EN Plasma Catecholamines by LC/MS/MS
 - 5991-6531EN Plasma Metanephrines and 3-Methoxytyramine by LC/MS/MS
 - 5991-6595EN GC-MS/MS Analysis of Persistent Organic Pollutants in Small Volumes of Human Plasma
-

Analýza materiálů

- 5991-6515EN Field-Flow Fractionation with Single Particle ICP-MS as an online detector
 - 5991-6624EN Advanced GPC Analysis of Fluoroelastomers using an Agilent 1260 MDS with RI and Viscometry Detection
 - 5991-6354EN Characterization of polyethylene type, density and molecular weight by coupling an Agilent GC with the Agilent PL-GPC 22
 - 5991-6538EN Fast, Simple, Automated Analysis of Sunglasses to meet the requirements of BS EN ISO12312-1
-

Proteomika a metabolomika

- 5991-6416EN A Multi-omic Approach to Reveal the Effect of Low-level Gamma Radiation on Rice Seeds
- 5991-6478EN Rapid Antibody Digestion Enabled by Automated Reversed-Phase Desalting on the Agilent Assay-MAP Bravo Platform
- 5991-6376EN Analysis of Monoclonal Antibodies using Multiple Heart-cutting Hydrophobic Interaction/Reversed Phase 2D-LC/MS

Potraviný a zemědělství

- 5991-6470EN Plant nutrient analysis using the Agilent 5100 Synchronous Vertical Dual View ICP OES
- 5991-6473EN Simultaneous Determination of 20 Polyfluoroalkane Substances in Dietary Milk by QuEChERS Combined with on-line Interference Trapping LC-MS/MS Technique
- 5991-6532EN Milk powder analysis using Chinese GB 5413.21—2010 method & Agilent 5100 SVDV ICP-OES
- 5991-6580EN Analysis of Sweeteners, Preservatives, and Caffeine in Food and Consumer Products
- 5991-6665EN Determination of Bitter and Clove-like Flavor in Beer with the 1290 Infinity II LC
- 5991-6526EN UHPLC-MS/MS Triple Quadrupole Analysis of Anthocyanin Metabolites in Human Plasma
- 5991-6638EN Analysis of Distilled spirits Using J&W DB-WAX Ultra Inert Capillary GC Column
- 5991-6268EN Quantify Quinine in Beverages Using Agilent Cary Eclipse and Fiber Optic Dip Probe
- 5991-6357EN Routine Multiresidue Pesticide Analysis using the Agilent 6470
- 5991-6207EN Multipesticides Residue Determination in Fresh Okra Using QuEChERS Sample Preparation
- 5991-6707EN Benefits of EMR-Lipid Clean-up with Enhanced Post Treatment on GC/MS/MS Analysis
- 5991-6635EN Lavender Oil analysis using Agilent J&W DB-WAX Ultra Inert Capillary GC Columns
- 5991-6637EN GC Analysis of Glycols in Toothpaste

Životní prostředí

- 5991-6682EN HPLC Analysis of Isoproturon in Water Using Online Sample Enrichment
- 5991-6417EN Analysis of Haloacetic Acids, Bromate, and Dalapon in Natural Waters
- 5991-6544EN Determination of Trace-Level Nonylphenol Polyethoxylates in Effluents
- 5991-6631EN Determination of Elements in Drinking Water as per Bureau of Indian Standards 10500, 14543 & 13428 Using the Agilent 5100 ICP-OES
- 5991-6553EN Using ICP-QQQ for UO₂⁺ product ion measurement to reduce uranium hydride ion interference and enable trace ²³⁶U isotopic analysis
- 5991-6488EN The use of high resolution accurate mass GC/Q-TOF and chemometrics
- 5991-6433EN Transferring a Method for Analysis of Aldehydes and Ketones from HPLC to UHPLC
- 5991-6509EN MSIS sample introduction for simultaneous hydride analysis and standard nebulization
- 5991-6539EN Improved volatiles analysis using static headspace, the 5977B GC/MSD and a high-efficiency source
- 5991-6612EN The Agilent 5977B GC/MSD and High Efficiency Source (HES) Lowers Detection for Semivolatile Compounds
-

Tyto publikace jsou k nalezení a ke stažení na našich stránkách www.hpst.cz, nebo nás o ně případně můžete požádat spolu s uvedením příslušného čísla publikace na emailu marketing@hpst.cz.

HPST, s.r.o.
Písnická 372/20
142 00 Praha 4
Česká republika

Tel.: +420 244 001 231
Fax: +420 244 001 235
E-mail: info@hpst.cz
Web: www.hpst.cz



hpst