

Laboratorium z techniki łączonej LC-MS/MS dla kierunku Inżynieria Farmaceutyczna drugi stopień

Oznaczanie nieorganicznych form selenu w suplementach diety

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z możliwościami zastosowań nowoczesnej tandemowej spektrometrii mas oraz techniki łączonej LC-MS/MS, nabycie podstaw analizy i interpretacji widm mas oraz wykorzystania techniki do analiz jakościowo-ilościowych.

Uwagi:

1. Wszelkie operacje związane z obsługą aparatury może wykonywać wyłącznie osoba prowadząca zajęcia, ze względu na wysoko skomplikowany charakter urządzeń i oprogramowania sterującego.
2. Spektrometr mas działa przy włączonym wysokim napięciu (m. in. napięcie przyspieszenia, napięcie przyłożone do kapilary) i w związku z tym należy unikać bezpośredniego kontaktu z odsłoniętymi podzespołami elektronicznymi, przewodami, itp.
3. W czasie wykonywania ćwiczenia należy zachować ostrożność w związku z gorącymi powierzchniami komory źródła jonów typu ESI.
4. Należy pamiętać o noszeniu rękawiczek ochronnych oraz okularów i fartucha.
5. W czasie ćwiczeń obowiązują ogólne zasady bezpieczeństwa pracy w laboratorium chemicznym.

Część pierwsza ćwiczenia – wykonanie widm mas i ich interpretacja

Zagadnienia do przygotowania:

Zasada działania źródła jonów typu electrospray oraz tandemowego spektrometru mas

Aparatura: Spektrometr mas API 4000 QTRAP (Biosystems, MDS Sciex, USA), pompa strzykawkowa, strzykawka szklana, pipety automatyczne, probówki eppendorf 1,5 mL

Odczynniki: wzorec selenianu(VI) i selenianu(IV) sodu, metanol, woda destylowana, woda amoniakalna

Wykonanie ćwiczenia:

1. Zapoznanie się z budową spektrometru mas oraz konstrukcją źródła jonów typu electrospray.
2. Omówienie i prezentacja techniki wprowadzania próbek bezpośrednio do spektrometru mas – strzykawka.
3. Wykonanie widm:
 - selenianu(VI) i selenianu(IV) w roztworze wodno-metanolowym oraz amoniakalno-metanolowym,
 - wykonanie widma fragmentacyjnego dla związku selenu (jednego z dwóch).
4. Interpretacja otrzymanych widm mas z obserwacją rozkładu izotopowego związku zawierającego selen.
5. Omówienie danych uzyskanych na podstawie widma fragmentacyjnego.

Przygotowanie sprawozdania:

1. W opisie ćwiczenia należy podać dane dotyczące przebiegu ćwiczenia, uzyskane wyniki oraz wszelkie wydruki otrzymane drogą mailową od prowadzącego ćwiczenia.
2. Proszę zinterpretować widma mas oraz widma fragmentacyjne związków selenu (wskazać jon pseudomolekularny, obwiednię izotopową tego jonu, zaproponować struktury powstałych fragmentów w widmie fragmentacyjnym).

Część druga ćwiczenia – identyfikacja i wyznaczenie zawartości selenu w suplemencie diety

Zagadnienie do przygotowania:

Zasada działania tandemowego spektrometru mas z jonizacją typu ESI, ogólne informacje dotyczące chromatografii ciekowej (faza ruchoma, faza stacjonarna, budowa aparatu, elucja izokratyczna, elucja gradientowa, podstawowe parametry wykorzystywane w analizie jakościowej i ilościowej).

Aparatura: Chromatograf cieczowy połączony z tandemowym spektrometrem mas API 4000
QTRAP

Odczynniki:

- zlewki o pojemności 25-50 mL,
- kolby miarowe o pojemności 1 mL,
- pipety,
- fiołki o pojemności 1,5 mL,
- metanol,
- woda amoniakalna,
- roztwory wzorcowe selenianu(VI) i selenianu(IV),
- strzykawki lekarskie z igłami,
- filtry strzykawkowe,
- moździerz,
- myjka ultradźwiękowa,
- wirówka laboratoryjna,
- waga analityczna,
- suplement diety.

Wykonanie ćwiczenia:

1. Przygotowanie roztworów wzorcowych:

Z roztworu wzorcowego zawierającego po 5 $\mu\text{g/mL}$ selenianu(VI) i selenianu(IV) przygotować serię roztworów wzorcowych o stężeniach: 0,05 $\mu\text{g/mL}$; 0,1 $\mu\text{g/mL}$; 0,25 $\mu\text{g/mL}$; 0,5 $\mu\text{g/mL}$ oraz 1 $\mu\text{g/mL}$.

Rozcieńczenia powinny uwzględniać skład fazy ruchomej stosowanej do rozdzielania chromatograficznego (99% 5 mM NH_3aq oraz 1% metanolu).

2. Przygotowanie suplementu do analizy:

- A. Zważyć tabletkę na wadze analitycznej.
- B. Utrzeć tabletkę w moździerzu.
- C. Odważyć utartą tabletkę.
- D. Zalać odważoną próbkę utartej tabletki 10 mL wody destylowanej.
- E. Umieścić próbkę na okres 15 minut w myjce ultradźwiękowej.
- F. Przenieść zawiesinę do probówki wirówkowej.
- G. Odwirować próbkę przez 15 minut.

H. Przesączyć roztwór nad osadem przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,45 μm , a następnie jeszcze raz przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,22 μm .

I. Na podstawie danych o zawartości selenu w suplemencie obliczyć objętość próbki jaką należy pobrać do analizy chromatograficznej.

Uwaga: w obliczeniach proszę założyć, że teoretyczna zawartość związku selenu w próbce do analizy powinna wynosić 0,25 $\mu\text{g/mL}$.

Obliczoną objętość ekstraktu proszę uzupełnić do 1 mL fazą ruchomą.

3. Wykonanie oznaczenia techniką LC-MS/MS:

Prowadzący ćwiczenie umieści próbki w autosamplerze i uruchomi proces ich oznaczania metodą, której warunki opisane są poniżej:

Warunki rozdzielania chromatograficznego

Rozdzielenia chromatograficznego mieszaniny związków selenu dokonać na kolumnie chromatograficznej Luna C18, jako fazę ruchomą zastosować mieszaninę 5 mM roztworu wodnego wody amoniakalnej i metanolu. Przepływ fazy ruchomej przez kolumnę ustawić 0,20 mL/min. Rozdzielanie prowadzić w temperaturze 35°C.

W Tabeli 1 zebrano parametry pracy chromatografu cieczowego.

Tabela 1. Warunki rozdzielania chromatograficznego

Element układu pomiarowego	Parametry pracy układu		
Chromatograf cieczowy	UltiMate 3000 RSLC, Dionex		
Kolumna chromatograficzna	Luna C18 C18 RP (150 mm x 2,1 mm i.d.), Thermo Scientifix		
Faza ruchoma	A: H ₂ O + 5 mM NH ₃ aq B: MeOH		
Natężenie przepływu fazy ruchomej	0,20 mL/min		
Gradient	Czas [min.]	% A	% B
	0	99	1
	1,5	99	1
	2,5	0	100
	3	0	100
Czas trwania analizy	3 minuty		

Warunki detekcji MS/MS

Detekcji z wykorzystaniem MS/MS analitów dokonać stosując jonizację w trybie ujemnym. Próbkę jonizować przez elektrorozpylanie. Szczegółowe warunki pracy spektrometru mas przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Warunki pracy detektora masowego

Element	Parametr pracy
Sposób jonizacji	ESI
Tryb pracy	ujemny
Temperatura [°C]	550
Gaz osłonowy [psi]	30
Ciśnienie gazu w rozpylaczu [psi]	40
Gaz suszący [psi]	40
Napięcie przyłożone do kapilary [V]	-4500

Na podstawie widm fragmentacyjnych wykonanych dla wzorców selenianów(VI) i (IV) wybrane zostały charakterystyczne pary MRM, które posłużyły do wykonania analiz ilościowych. Następnie dla tych par zoptymalizowano takie parametry pracy spektrometru mas jak: potencjał fragmentacji i energię kolizji, mające wpływ na czułość i selektywność analizy ilościowej i jakościowej. W tabeli 3 przedstawiono parametry pracy spektrometru mas stosowane do oznaczeń jakościowo-ilościowych związków selenu.

Tabela 3. Optymalne parametry pracy MS/MS dla związków selenu

Związek	Jon pseudomolekularny [M-H] ⁻¹	Potencjał fragmentacji [V]	MRM1	Energia kolizji [V]
selenian (VI) ⁸⁰ Se	145	-50	145 → 128	-28
selenian (VI) ⁷⁸ Se	143	-50	143 → 126	-28
selenian (VI) ⁸² Se	147	-50	147 → 130	-28
selenian (IV) ⁸⁰ Se	129	-45	129 → 112	-32
selenian (IV) ⁷⁸ Se	127	-45	127 → 110	-32
selenian (IV) ⁸² Se	131	-45	131 → 114	-32

- Na podstawie otrzymanych wyników dla roztworów wzorcowych oraz próbek suplementu dokonać identyfikacji zawartego w suplementie związku selenu.

5. Wyznaczyć zawartość selenu w badanym suplemencie (zastosować technikę krzywej wzorcowej lub technikę wielokrotnego dodatku wzorca – decyzję podejmuje prowadzący zajęcia).

Przygotowanie sprawozdania:

1. Podać oznaczoną formę chemiczną selenu w suplemencie.
2. Wyznaczyć zawartość związku selenu w tabletkie suplementu.
3. Przeliczyć związek selenu na zawartość pierwiastka (selenu).
4. Porównać otrzymaną zawartość selenu oraz jego formę chemiczną z podaną przez producenta.