

TARTU ÜLIKOOL
Loodus- ja täppisteaduste valdkond
Keemia instituut
Analüütilise keemia õppetool

Raido Maasik

**Massispektromeetri tööparameetrite mõju LC-MS
analüüsimeetodi määramispiirile**

Bakalaureusetöö (6 EAP)

Keemia

Juhendaja: Koit Herodes, kaasprofessor

Tartu 2022

Infoleht

Massispektromeetri tööparameetrite mõju LC-MS analüüsimeetodi määramispiirile

Massispektromeetria (MS) ühendatud vedelikkromatograafiaga (HPLC) on populaarne instrumentaalne meetod. MS instrumendi omadused tulenevad selle ehitusest ja mõõtmisrežiimist. Üldiselt on teada, et MS-detekteerimise korral võimaldavad vähema arvu ionide jälgimise režiimid saavutada madalamaid määramispiire (LoQ), kuid puudub vastav kvantitatiivne hinnang. Selles töös hinnati ühe- ja kolmekordse kvadrupooliga massispektromeetrite mõõterežiimide (MRM, SIM, skaneerivad režiimid) mõju meetodi LoQ-le. Uuritavaks mudelsüsteemiks oli kuue aine (3 püriidini derivaati ja 3 diestrit) segu, millele töötati välja isokraatiline pöördfaas-HPLC metoodika. Võrdluses leiti, et ühekvrupoolisel instrumendil oli kõige laiem skaneerimisvahemik (900 m/z ühikut) 1,7 kõrgema LoQ väärtusega kui kitsaim skaneerimisvahemik (50 m/z ühikut). SIM mõõtmisrežiim oli madalaima LoQ väärtusega – 2 korda madalam skaneerivast režiimist. Kolmekvrupoolisel instrumendil oli MRM mõõtmisrežiim madalaima LoQ väärtusega, olles keskmiselt 2 korda madalam kui SIM ja fragmenteerimisega skaneerivad režiimid ning 2,5 korda madalam kui skaneeriv mõõtmisrežiim.

Märksõnad: LC-MS, massispektromeetria, QqQ, LoQ, MRM, SIM, neutraali kao skaneerimine.
CERCS kood: P300

The effect of mass spectrometer measurement modes on the limit of quantitation of LC-MS analysis methods

Mass spectrometry (MS) coupled with liquid chromatography (HPLC) is a popular instrumental analysis technique. MS instrument performance is determined by the type and configuration of the mass-analyzers. theoretically monitoring a lower number of m/z values will lower the limit of quantitation (LoQ) of methods. This has not been quantitatively compared on LC-MS instruments. LoQ of methods using a single and a triple quadrupole instrument in various modes was compared. Standard solution with six analytes (3 pyridine derivatives and 3 diesters) were used with isocratic reverse-phase chromatography. Comparison on the single quadrupole, using widest scan width (900 m/z units) had 1,7 times higher LoQ compared to thinnest scan width (50 m/z units). SIM mode had the lowest LoQ, being 2 times lower than scan modes. On the triple quadrupole, MRM mode had the lowest LoQ, being 2 times lower than SIM and fragmentation scan modes, 2,5 times lower than scan modes.

Keywords: LC-MS, mass spectrometry, QqQ, LoQ, MRM, SIM, comparison, neutral loss scan.
CERC code: P300

Sisukord

Kasutatud lühendid ja mõisted	4
1. Sissejuhatus	5
2. Kirjanduse ülevaade	6
2.1. Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia (HPLC)	6
2.2. Vedelikkromatograafia massispektromeetrilise detektoriga (LC-MS).....	6
2.3. Elektropihustusionisatsioon (ESI)	7
2.4. Kvadrupool-MS (Q)	8
2.5. Kolmekordne kvadrupool MS (QqQ).....	9
2.6. LC-MS andmed	11
2.7. Määramispiir (LoQ).....	12
2.8. Töörežiimi mõju määramispiirile eelnevates allikates	12
3. Eksperimentaalne osa	14
3.1. Kemikaalid.....	14
3.2. Aparatuur	14
3.3. Meetodi kirjeldus.....	15
3.4. Määramispiiri hindamine.....	16
3.5. Ionisatsiooni erinevused ESI ja hESI allikates	16
4. Tulemused ja arutelu	17
4.1. Metoodika arendus	17
4.2. Ühekvrupoolne instrument: Shimadzu	18
4.3. Kolmekvrupoolne instrument: Agilent	23
4.4. Erinevused ühe- ja kolmekordse kvadrupooliga instrumentide vahel.....	27
5. Kokkuvõte	29
6. Kasutatud kirjandus.....	30

Kasutatud lühendid ja mõisted

Selles töös kasutatud terminid on vastavad IUPACi soovitudele, ebatavalisemad eestikeelsed tõlked on vastavad KemTerm sõnastikule, sest eestikeelne LC-MS-alane sõnavara on alles kujunemas. [1,2]

CE	fragmenteerimiseks ioonidele põrkerakus antav energia (<i>collison energy</i>)
EIC	valitud iooni kromatogramm (<i>extracted ion chromatogram</i>)
ESI	elektropihustusionisatsioon (<i>electrospray ionization</i>)
GC-MS	gaasikromatograafia-massispektromeetria (<i>gas chromatography-mass spectrometry</i>)
ICH	<i>International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
IE	ionisatsiooniefektiivsus (<i>ionization efficiency</i>) tavaliselt väljendatud logIE
IUPAC	Rahvusvaheline Puhta ja Rakenduskeemia Liit (<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
LC-MS	vedelikkromatograafia-massispektromeetria (<i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>)
m/z	massi ja laengu suhe
MRM	mitme ülemineku jälgimine (<i>multiple reaction monitoring</i>)
mSIM	mitme valitud iooni jälgimine
ppb	massiosa miljardi kohta (<i>parts per billion</i>), kasutatakse „nanogramm analüüdi sisaldust ühes grammis lahuses“ vastena
ppm	massiosa miljoni kohta (<i>parts per million</i>), kasutatakse „mikrogramm analüüdi sisaldust ühes grammis lahuses“ vastena
QqQ	kolmekvadrupoolne massianalüsaator, kus esimene ja viimane kvadrupool on massi-analüsaatorid ja keskmine on põrkerakk
SIM	valitud iooni jälgimine (<i>selected ion monitoring</i>)
SRM	valitud ülemineku jälgimine (<i>selected reaction monitoring</i>)
TICC	summaarse ioonvoolu kromatogramm (<i>total ion current chromatogram</i>)
TOC	orgaanilise süsiniku summaarne hulk (<i>total organic carbon</i>)

1. Sissejuhatus

Vedelikkromatograafia-massispektromeetria (LC-MS) on tähtis instrumentaalne keemilise analüüsi meetod. LC-MS kasutatakse laialdaselt nii kvalitatiivseteks kui ka kvantitatiivseteks analüüsideks tänu LC-MS instrumentide paindlikkusele. Instrumentide paindlikkus seisneb peamiselt massispektromeetria teostuses. Enim populaarsust on kogunud kvadrupool (Q) ja kolmikkvadrupool (QQQ) massi-analüsaatoriga instrumendid, mis võimaldavad palju erinevaid mõõteviise.

Analüüsimeetodi jõudluse hindamiseks on töötatud välja mitmed valideerimise protsessid. Valideerimine on tähtis, et määratleda, milliseks rakenduseks on kindel meetodika sobilik. Analüütide kvantitatiivsel analüüsil väga madalatel kontsentratsioonidel, näiteks ravimijääkide jälgede analüüsil, on tähtis meetodika määramispiir (LoQ) – madalaim analüüdi hulk, mida on võimalik kvantitatiivselt määrata.

Töö eesmärk oli hinnata, kuidas mõjutavad erinevad levinud massispektromeetria mõõterežiimid analüüsimeetodi määramispiiri. Muutuvate parameetrite hulk hoiti minimaalsena, keskendudes tavakasutuses olevate seadistustele. Kasutati kuut erinevat analüüti ilma maatriksita, et minimeerida võimalik proovimaatriksist tulenev määramatus. Analüüdid erinesid massi ja ionisatsiooni poolest. Vedelikkromatograafiline lahutus oli konstantne kõigi mõõtmiste korral.

Määramispiire hinnatakse ühe- ja kolmekvadrupoolse massi-analüsaatoriga instrumendil. Ühekvadrupoolsel instrumendil võrreldakse erineva laiusega skaneerimisvahemikke ja valitud iooni jälgimise režiimi (SIM). Kolmekvadrupoolsel instrumendil võrreldakse lisaks skaneerivale ja SIM mõõterežiimile järgnevaid fragmenteerivaid mõõterežiime: mitme ülemineku jälgimine (MRM), eellasiooni skaneerimine ning neutraali kao skaneerimine.

2. Kirjanduse ülevaade

2.1. Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia (HPLC)

Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia ehk HPLC on laialdaselt ja mitmekesiselt kasutusel olev kromatograafia liik. LC-MS korral on kõige populaarsem pöördfaaskromatograafia, millega on võimalik eraldada orgaanilisi ühendeid. Pöördfaaskromatograafias on mobiilseks faasiks polaarne eluent – vee või puhverlahuse ja orgaanilise lisandi segu. Kolonni statsionaarse faasina kasutatakse mitte-polaarset kolonni. Tavaline kolonni täiteaine on keemiliselt modifitseeritud silikageel, mille pinnal on alküülalähelad ja lisandid. [3]

Kolonni viidud ühendid interakteeruvad mõlema faasiga ja vastavalt omadustele väljuvad kolonnist eraldatuna. Mida polaarsem on analüüt ja mida tugevamad on vastastikmõjud eluendiga, seda kiiremini läbib analüüt kolonni. Vastastikmõjud täiteaine ja analüüdi vahel on ebaspetsiifilisemad ja nõrgemad. Tihti kasutatakse eluendis puhvertavat lisandit, et hoida ära analüütide ioniseerumist, mis muudaks vastastikmõjusid kolonnis. [3]

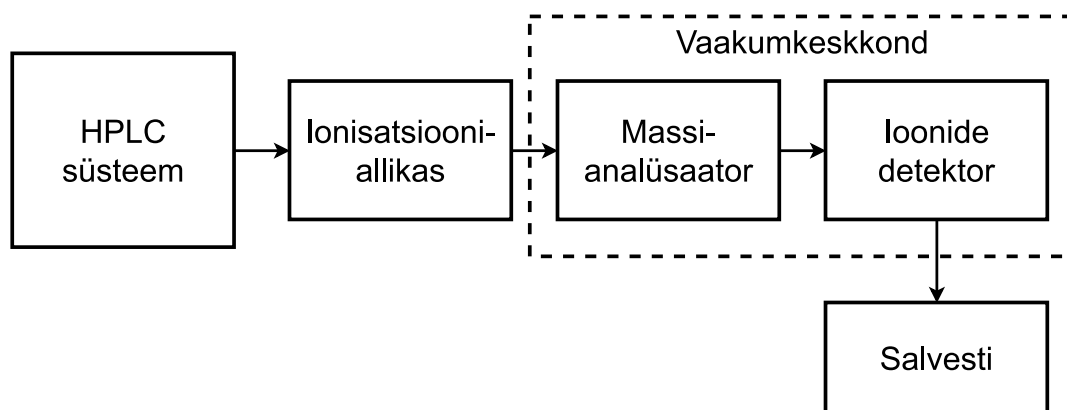
Selles töös kasutati pöördfaaskromatograafiat levinud konfiguratsiooniga: C18 kolonn, metanool ja 0,1% sipelghappe vesilahus.

2.2. Vedelikkromatograafia massispektromeetrilise detektoriga (LC-MS)

Selles töös on HPLC eraldusmeetod ühendatud massispektromeetria instrumendiga ehk MS instrumendiga, selleks et saaks analüüsida MS instrumendiga analüütide segusid. Ühendus nende kahe instrumendi vahel on otsene ja seega on vaja elueeriv lahustunud proov viia üle MS instrumendile sobilikku olekusse. Selleks on esimene MS instrumendi osa ionallikas, mis viib proovi gaasifaasi ja ioniseerib (joonis 1). Lisaks peab ionallikas hoidma MS instrumendis olevat vaakumkeskkonda. Selles töös on ionallikaks elektropihustus-ionisatsioon (ESI). [4]

MS instrumendi ionallikast suunatakse analüüdi ioonid edasi massi-analüsaatorisse. Massi-analüsaatorid kasutavad elektri- ja magnetvälju, et muuta sisse suunatud laetud osakeste liikumist vastavalt nende massi ja laengu suhtele (m/z). Osakestele määratud trajektoori kindlustamiseks peab massianalüsaatoris olema kõrge vaakum. Tulemusena eraldatakse kindlas vahemikus m/z osakesed, mis suunatakse ionide detektorisse, kus registreeritakse nende hulk. [4]

Massi-analüsaatori teostus on MS instrumendi peamine defineeriv osa. Selles töös kasutati koos HPLC-ga kõige populaarsemalt ühekordse kvadрупooliga (Q) ja kolmekordse kvadрупooliga (QqQ) massispektromeetreid. Järgnevates lõikudes on tutvustatud töös kasutatud ühe- ja kolmekordse kvadрупooliga instrumente ning nende tehnilisi erinevusi.



Joonis 1. LC-MS süsteemi plokk skeem. Elueeritud proov ioniseeritakse, suunatakse massi-analüsaatorisse, mis eraldab ioonid vastavalt massi ja laengu suhtele ning registreeritakse ioonide detektoriga.

2.3. Elektropihustusionisatsioon (ESI)

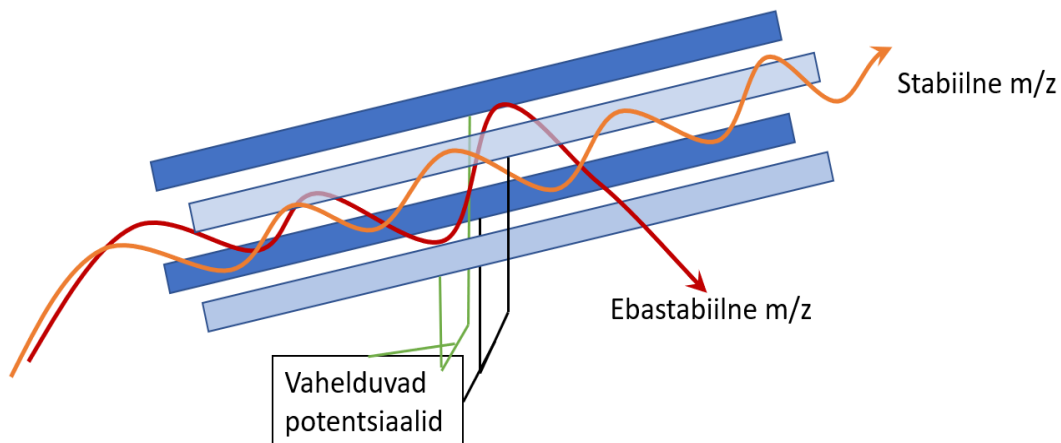
Elektropihustusionisatsioon on väga populaarne ionisatsiooniallikate liik. ESI-s tekitatakse uuritavast lahusest elektriväljas laetud tilgakesed, lahusti aurustatakse osaliselt ja solvateeritud gaasifaasilised ioonid juhitakse massispektromeetrisse. Ioonid desolvateeritakse ning nende m/z määratakse massi-analüsaatoris. ESI on sobilik väga erinevate analüütide detekteerimiseks. Selles töös on tegu levinud ESI tüüpidega: pneumaatilise pihustusega ESI ja kuumutatud ESI (hESI) allikad. [5]

Kuigi ESI on väga paindlik ja sobib paljude aineklasside ioniseerimiseks, siis ESI tõhusus erinevate analüütidega erineb suures ulatuses. Ioniseerimise tõhususe kvantitiseerimiseks on kasutusel ionisatsiooniefektiivsus (IE, $\log IE$). IE iseloomustab, kui palju vedelas faasis analüüti muudetakse gaasi faasis ioonideks ja detekteeritakse massispektromeetris. Ionisatsiooniefektiivsust mõjutavad analüüdi omadused ja solventi (mobiilfaasi) koostis. [5]

2.4. Kvadrupool-MS (Q)

Kvadrupoolanalüsaatori töö põhineb ioonide trajektooride mõjutamisel elektrivälja abil, et eraldada ioone massi ja laengu suhte (m/z) põhjal. Selleks rakendatakse vahelduv elektriväli, mis hoiab valitud m/z suhtega ioonid stabiilsel trajektooril piki kvadrupooli telge. Ülejäänud ioonide trajektooridele mõjub elektriväli destabiliseerivalt, need ioonid neutraliseeruvad kvadrupooli varrastel ja eemaldatakse vaakumpumba abil. [4]

Kvadrupool koosneb neljast vardast (elektroodist), mis peavad olema paralleelsed ja ümmarguse või hüperboolse ristlõikega. Neile elektroodidele rakendatakse samaaegselt alalis- ja vahelduvpotentsiaalid (joonis 2). Tulemuseks on elektriväli, mis hoiab ioone kvadrupooli telje ümber võnkumas. Iooni liikumiskiirus mööda kvadrupooli telge ei ole mõjutatud ja ioon läbib analüsaatori, kui iooni võnkumise amplituud on väiksem kui kvadrupooli raadius. [4]

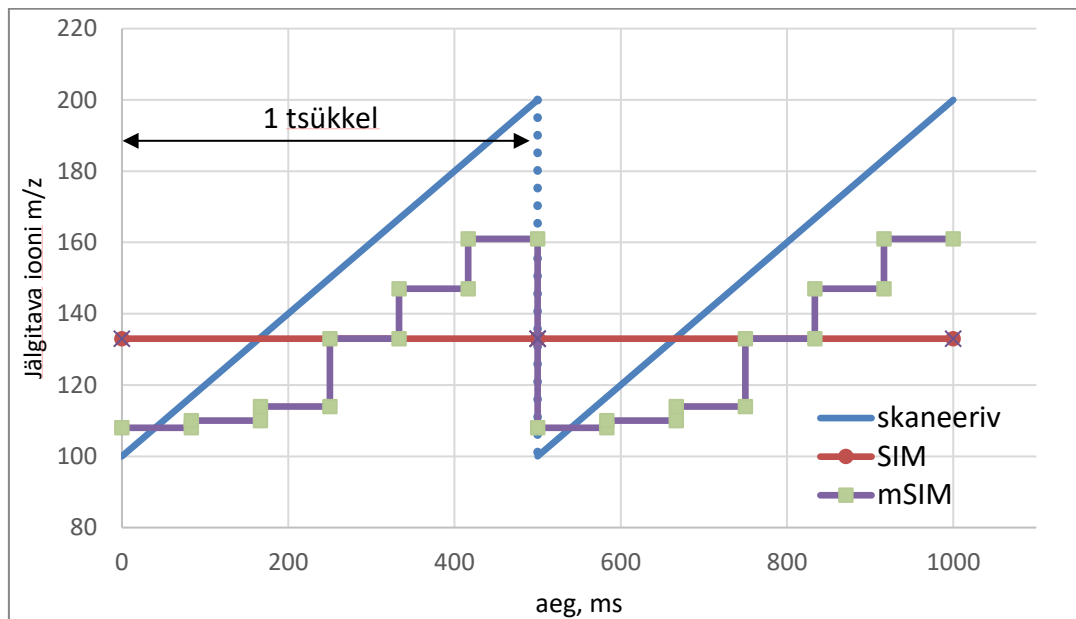


Joonis 2. Kvadrupool koosneb neljast paralleelsest elektroodist. Neile rakendatakse alalis- ja vahelduvpotentsiaalid.

Kvadrupool analüsaator kombineeritakse iooniallikaga, ioonoptikaga ja iooni detektoriga, et saada kvadrupool-MS instrument. Selline instrument võimaldab kahte mõõtmisviisi: skaneeriv mõõterežiim ja valitud iooni jälgimine ehk SIM. Skaneerivas režiimis mõõdetakse ioone üle laia mõõtmisvahemiku väikeste sammudega. SIM-is määratakse ainult kindla m/z -ga ioone. Mida kitsam on mõõtmisvahemik, seda suurem osa tööajast on pühendatud ühele m/z ühiku sammule (joonis 3). [4]

SIM mõõterežiimi rakendamiseks mitme analüüdi jaoks on vaja kasutada mSIM või ajaaknaid. mSIM vahetab ühe tsükli sees valitud m/z väärtust. Mida rohkem on jälgitavaid m/z väärtusi, seda väiksemat osa tsükli ajast pühendatakse valitud analüüdi signaali registreerimisele. Ajaakende korral määratakse ajavahemikud, kus instrument kasutab vastavat mõõterežiimi.

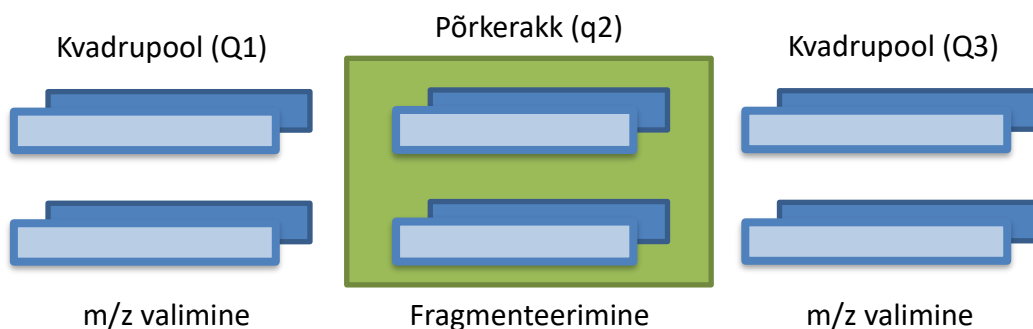
Näiteks esimesed 3 minutit detekteeritakse ühte m/z väärtust (SIM) ja peale kolmandat minutit teist m/z väärtust (eelnevast erinev SIM). Mõlemaid tehnikaid on võimalik kasutada kõigi mõõterežiimidega.



Joonis 3. Skaneeriv režiim mõõdab määratud m/z vahemiku ühe tsükli jooksul (joonisel 100-200 m/z vahemiku 500 ms jooksul). SIM ja mSIM mõõdavad ainult ühte või mitut kindlat m/z väärtust ja tööaeg on seega ühe tsükli kestus jagatud analüütide hulga (joonisel vastab mSIM 6 erineva iooni jälgimisele, igäüht mõõdetakse umbes 80 ms vältel).

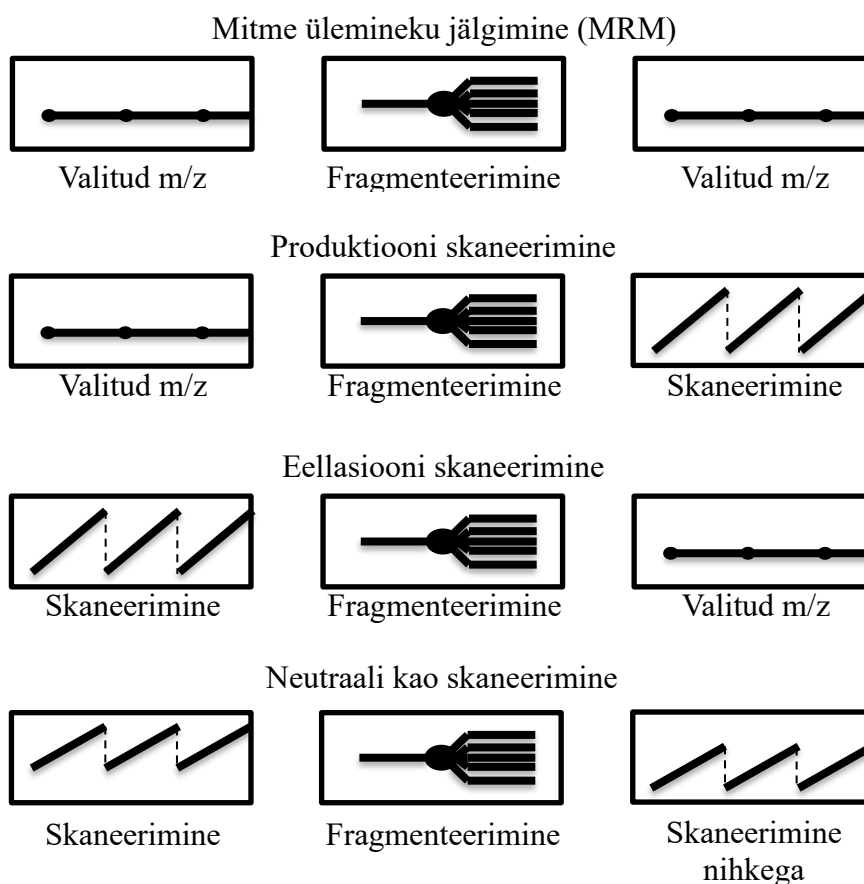
2.5. Kolmekordne kvadrupool MS (QqQ)

Kolmekordne kvadrupool MS instrumendis on kasutusel kolm kvadrupooli (joonis 4), Mis on seatud jadamisi konfiguratsioonis QqQ. Esimene ja kolmas on massianalüsaatoritena toimivad kvadrupoolid (tähistatakse Q) ning keskmine kvadrupool on pörkerakk (tähistatakse q). Pörkeraku kvadrupoolile rakendatakse ainult vahelduvvoolu potentsiaal ja selle piirkonda juhitakse inertgaasi, millega ioonid saavad pörkuda. Põrgete tulemusena ioonid fragmenteeruvad ühe või mitu korda. [4]



Joonis 4. QqQ MS instrument koosneb kahest kvadrupool massi-analüsaatorist ja nende vahel on modifitseeritud kvadrupool põrkerakk, kuhu on lisatud inertset gaasi. Ioonide põrkumine inertgaasiga põhjustab fragmenteerumise.

Selline konfiguratsioon võimaldab kõiki ühe-kvadrupoolse instrumendi mõõtevõimalusi ja lisaks veel fragmenteerimist sisaldavaid režiime. Peamised neli režiimi on ühe või mitme ülemineku jälgimine (SRM, MRM), produktioon skaneerimine (*product ion scan*), eellasiooni skaneerimine (*precursor ion scan*) ja neutraali kao skaneerimine (*neutral loss scan*). Need neli on illustreeritud joonisel 5. [4]



Joonis 5. Tandem mass spektrometria neli peamist töörežiimi põhinevad fragmenteerimisel. Kombineeritakse skaneerivaid ja valitud iooni jälgimisi esimesel ja kolmandal kvadrupoolil.

Mitme ülemineku jälgimine (MRM), vahel nimetatud ka valitud ülemineku jälgimine (SRM), seisneb kindla fragmenteerumise jälgimises. Esimene kvadрупool eraldab ühe m/z väärtuse, põrkerakus valitud ioon fragmenteerub ja kolmas kvadрупool eraldab kindla m/z väärtusega fragmendi. See meetod on väga selektiivne. Kindel fragmenteerimine eemaldab suurema osa keemilisest müra, mistõttu on MRM kõrge signaali-müra suhtega (SNR). [4]

Produktiooni skaneerimine põhineb valitud m/z ionide fragmenteerimisel ja tekkinud fragmentide detekteerimisel skaneeriva režiimiga. See meetod on peamiselt kasutusel meetodi arenduses, et määrata üleminekud, mida hiljem jälgida MRM režiimis, eellasiooni või neutraali kao skaneerimisel. Eellasiooni skaneerimine on produktiooni skaneerimine ümberpööratud. Määratakse kõik ionid, mis fragmenteerivad tekitades valitud m/z fragmendi. See režiimi võimaldab detekteerida kõiki ühendeid, mis fragmenteerudes annavad kindla m/z -ga fragmendi. [4]

Neutraali kao skaneerimine põhineb fragmenteerimisel eemalduva neutraali kaudsel detekteerimisel. Selleks valitakse kindel neutraali massi väärtus ja mõlemad kvadрупoolid skaneerivad samaegselt üle vahemiku, kus kolmas kvadрупool on neutraali massi suuruse võrra nihkes esimese kvadрупooliga. Selline meetod on kasulik kui eellasioonide ega produktioonide m/z väärtused pole kindlad, aga eemalduv neutraal on, näiteks rasvhapete analüüs. [4]

Võrreldes kõiki mõõtmisviise on tähtis arvestada analüütilise infohulgaga. Skaneeriv režiim annab suurima hulga analüütilist infot, saades ka signaali kõrvaliste ionide kohta. SIM saab salvestada infot ainult ühe m/z kohta ja MRM lisab veel fragmenteerimise sammu, seega väheneb lisainfo veelgi, aga kasvab spetsiifilisus. Spektromeetri tundlikkus ehk signaali tõus analüüdi hulga suurenemisega, kasvab järjestuses skaneeriv, SIM ja MRM. Kuigi MRM korral jõuab vähem valitud ioone detektorisse, on huvipakkuvate ionide signaali suhe mürasse kõrgem. [4]

2.6. LC-MS andmed

LC-MS instrumentide lahutamatu osa on tarkvara, mis annab instrumendile ette tööparameetrid, salvestab tulemusi ja võimaldab neid töödelda ning analüüsida.

LC-MS-i mõõtmistulemused on vaadeldavad mitmel eri viisil. Peamised väljendusviisid on TICC ehk summaarse ioonvoolu kromatogramm ja EIC ehk valitud iooni kromatogramm. TICC näitab detektori registreeritud kõikide ionide summaarset signaali ajas. EIC näitab

valitud m/z -iga ionide signaali ajas, tavaliselt rakendatakse EIC-e andmeanalüüsiks. Fragmenteerivate mõõtmistulemuste jaoks on analoogsed kromatogrammid. [6]

2.7. Määramispiir (LoQ)

Määramispiir ehk LoQ on madalaim analüüdi hulk, mis vajaliku korratavuse ja tõesusega on uuritava meetodikaga kvantitatiivselt määratav. Määramispiir on tähtis osa iga meetodi valideerimisest ja selle määramine ning vajalikud parameetrid on kirjeldatud valideerimisjuhendites. Määramispiiri hindamiseks peab katse sisaldama uuritava meetodika kõiki etappe, et kirjeldada uuritavat meetodikat korrektselt. [7]

Selles töös on kasutusel määramispiiri määramiseks mudelsüsteem, kus MS-instrumentist sõltumatud etappide mõju on minimeeritud. Sellega eemaldatakse näiteks proovitöötlus, millel on väga suur mõju meetodika määramispiirile ja korratavusele [4]. Proovidena kasutatakse puhaste ainete lahuseid eluendis.

Määramispiiri hindamine on keerukas, sest puudub ühine lähenemine valideerimisjuhendite vahel. Valideerimisjuhend valitakse vastavalt meetodika rakendusvaldkonnale ja täpsuse vajadusele. Paljudes rakendustes on kindel juhend nõutud, aga tihti jääb valideerimismeetodi täpne arendamine analüütiku otsustada. [7]

Tihti kasutatakse LoQ määramiseks visuaalset või signaali-müra suhte (SNR) hindamist. Tavaline SNR väärtus LoQ korral on vähemalt 10, kui meetodil esineb baasjoone müra. Leidub mitmeid arvutuslike meetodeid, mis erinevad vastavalt juhendile. Töös kasutati ICH juhendi arvutusmeetodit kalibreerimisgraafiku põhjal. [7]

2.8. Töörežiimi mõju määramispiirile eelnevates allikates

Töörežiimi mõju LC-MS analüüsimeetodika määramispiirile ei ole süstemaatiliselt kvantitatiivselt uuritud. Kvalitatiivsel tasemel tuuakse välja, et skaneeriv režiim on kõrgema määramispiiriga kui SIM, mis on omakorda kõrgema määramispiiriga kui MRM. Tundlikkuse erinevust skaneeriva ja SIM vahel on iseloomustatud tuhande-kordse kasvuga. Tundlikkus ei ole võrdväärne määramispiiriga. [4]

Gaasikromatograafia-massispektromeetria korral on mõnes artiklis iseloomustatud määramispiire erinevate mõõterežiimide korral, aga ainult toetudes signaali-müra suhtele.

Töös, kus kasutati toornafta lahjendusi keemilise müra modelleerimiseks, leiti skaneeriva režiimi ja SIM vahel 5-10 kordse määramispiiri vähenemine ning SIM ja MRM vahel 10-40 kordse erinevus [8]. Sünteetiliste steroidide GC-MS määramisel leiti kuni 4 kordne määramispiiri langust skaneerivaga võrreldes mSIM meetodiga ja kuni 5 kordset skaneeriva võrdluses MRM meetodiga [9]. Tegu oli GC-MS meetodiga, mis kasutas derivatiseerimist ja SNR võrdlust. Viimane leitud sarnase võrdlusega artikkel arendas meetodit, et määrata lisandeid ravimiproovides GC-MS meetodil lisandeid määrates tuvastati SIM ja MRM režiimidel LoQ väärtused vastavalt 0.03 ja 0.015 µg/mL [10]. Ehk siis, MRM võimaldas 2x madalamat määramispiiri.

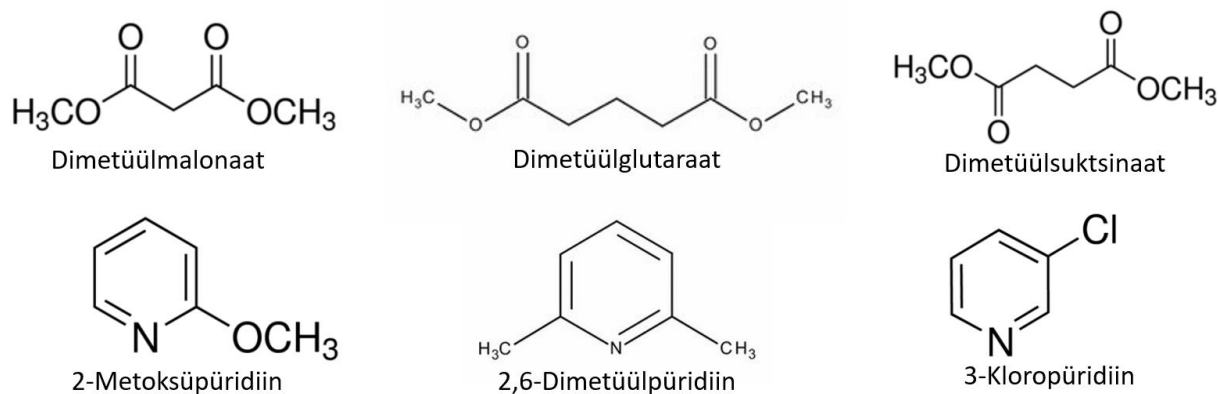
3. Eksperimentaalne osa

3.1. Kemikaalid

Eluentide ja lahustina kasutati Honeywell *LCMS Chromasolv methanol* (puhtus > 99,9%), Honeywell *Puris p.a. Formic acid* ja vesi MilliQ *Millipore Advantage A10* (TOC: 3-10 ppb, eritakistus: 18,2 MΩ·cm)

Analüütideks olid dimetüülmalonaat, dimetüülsuksinaat, dimetüülglutaraat, 2-metoksüpüridiin, 2,6-dimetüülpüridiin ja 3-kloropüridiin (joonis 6).

Analüüdid on varasemalt kasutatud doktoritöös [5]. Dimetüüldiestrid olid ostetud tootjalt Merck: dimetüülmalonaat (puhtus ≥ 99%), dimetüülsuksinaat (puhtus ≥ 98%) ja dimetüülglutaraat (puhtus ≥ 99%). Analüütide emalahused hoiustati mõõtmiste vahel 4 °C juures.



Joonis 6. kasutatud analüüdid ja nende struktuurid.

3.2. Aparatuur

Töös kasutati kahte LC-MS massispektromeetrit: ühekvadropoolne Shimadzu LCMS-2020 ja kolmekvadropoolne Agilent 6495 Triple Quad LC/MS. HPLC instrumendid olid vastavalt Shimadzu HPLC süsteem ja Agilent 1290 infinity. Ioonallikas oli vastavalt ESI ja kuumutamiseega ESI (hESI). Shimadzu instrument oli väheses kasutuses analüüsides perioodil, Agilendi instrumenti kasutati intensiivselt. LC kolonniks oli Phenomenex Kinetex 2,6 µm C18 100Å 100 × 3,00 mm.

Kõik valmistatud lahused kaaluti valmistamisel, et määrata täpsemalt kontsentratsioone. Kasutuses olid kaalud: Precisa XR 205SM-DR ja Radwag AS 210.X2 Plus.

Kromatogrammide integreerimine viidi läbi vastava instrumendi tarkvaras. Andmetöötlus viidi läbi tabelarvutusprogrammis.

3.3. Meetodi kirjeldus

LC meetodi eluendiks oli 20% MeOH ja 80% sipelghappe 0,1% lahuse segu, voolukiiruseks 0,4 ml/min, sisestatud proovi ruumala on 1 µl, mõõtmise kestuseks oli 15 minutit. Kolonniks oli 2,6 µm C18 100Å 100 × 3,00 mm kolonn temperatuuril 30 °C.

Ioonallika parameetrid olid Agilendi instrumendil hESI: gaasi temperatuur 200 °C, pihustusgaasi (*nebulizer*) voolukiirus 14 l/min, pihustusgaasi rõhk 20 psi (137,9 kPa), ümbrisgaasi (*sheathe gas*) temperatuur 350 °C ja voolukiirus 11 l/min, kapilaari pinge 3000 V, nõela (*nozzle*) pinge 0 V. ESI parameetrid Shimadzu instrumendil olid vastavad seadistuse failile ja kasutusel oli kuivatusgaas (*dry gas*) voolukiirusega 20 l/min. Kõik jooksud viidi läbi positiivses ioonallika režiimis.

Tsükli kestus oli kõigil ühekvadru poolse instrumendi meetoditel 500 ms. kolmekvadru poolisel instrumendil oli skaneerivatel meetoditel tsükli pikkuseks 500 ms ja ühte m/z või üleminekut jälgivatel meetoditel oli viibimisaeg 200 ms.

Mõõtmisrežiimide defineerivad parameetrid on toodud tabelis 1 ja tabelis 2. Skaneerivate mõõtmisrežiimide samm oli 0.1 m/z ühikut.

Tabel 1. Uuritavatele analüütidele vastavad SIM ja MRM parameetrid.

Analüüt	M	logIE [5]	SIM siht* (m/z)	MRM üleminek (m/z)	CE (eV)
2,6-dimetüülpiridiin	107	3,50	108	108 → 65	30
2-metoksüpiridiin	109	0,99	110	110 → 78	20
3-kloropüridiin	113	1,00	114	114 → 78	30
Dimetüülglutaraat	160	2,47	161, 183	161 → 59	30
Dimetüülmalonaat	132	1,43	133, 155	133 → 59	30
Dimetüülsuksinaat	146	2,12	147, 169	147 → 87	20

*) Shimadzu ühe kvadru poolisel instrumendil detekteeriti ainult esimene m/z väärtus, Agilent kolmekvadru poolses lisandus teine m/z väärtus.

Tabel 2. Uuritavate analüütide skaneerivate meetodite parameetrid.

Analüüt	Neutraali kao vahemik	Neutraali kao üleminek (m/z)	Eellasioon vahemik	Produktioon (m/z)	CE (eV)
2,6-dimetüülpiridiin	100-300	-[43]	10-310	65	30
2-metoksüpiridiin	100-300	-[32]	80-310	78	20
3-kloropüridiin	100-300	-[36]	80-310	78	30
Dimetüülgutaraat	120-300	-[102]	60-310	59	30
Dimetüülmalonaat	100-300	-[74]	60-310	59	30
Dimetüülsuktsinaat	100-300	-[60]	90-310	87	20

3.4. Määramispiiri hindamine

Määramispiir hinnati vastavalt ICH Q2(R1) valideerimis juhendile toetudes [11]. Seda lähenemist on soovitatud ka õppetoolis publitseeritud valideerimise ülevaate artiklis [7].

Määramispiiri hindamiseks koostati kalibreerimisgraafik määramispiiri piirkonnas. Määrati graafiku tõus ja jääkliikmete standardhälve. Rakendatakse võrrand 1, kus σ on jääkliikmete standardhälve ja S on kalibreerimisgraafiku tõus.

$$LoQ = \frac{10 * \sigma}{S} \quad (1)$$

Iga töörežiimi LoQ hindamiseks mõõdeti signaalid kuuel kontsentratsioonitasemel. Kõiki kalibreerimiseeriaid hinnati ja jäeti välja liiga madala signaal-müra suhtega (alla LoQ) tulemused ning selgelt hälbivad tulemused. Igal graafikul oli vähemalt neli katsepunkti.

3.5. Ionisatsiooni erinevused ESI ja hESI allikates

Dimetüüldiestrid olid väga erinevate ionisatsioonimustritega ESI ja hESI ionallikate korral. Shimadzu ESI allikas tekkisid nii protoneeritud vorm ja naatrium liitioon. Agilendi hESI korral oli protoneeritud vormi tekke palju väiksem ja naatrium liitiooni teke oli peamine ionisatsiooniprotsess. Sellega arvestades oli mõõtmised Agilendi instrumendil keerulisemad ja Shimadzu tulemustega võrreldamatu. Naatrium liitiooni tekkimist kasutatud dimetüülestritel on kirjeldatud kirjanduses [12].

4. Tulemused ja arutelu

4.1. Metoodika arendus

Uuritavateks analüütideks valiti 3 dimetüüldiestrit ja 3 püridiini. Valiti erinevate molekulmasside ja ionisatsiooniefektiivsustega ühendeid. Mudelsüsteemi valmistamiseks tehti puhastest analüütidest eraldi vesilahused, mida hiljem lahjendati 1-3 korda, et saavutada analüüsiks vajalikke madalaid kontsentratsioone.

Esimesena määrati sobiv eluendikoostis isokraatiliseks kromatograafiliseks lahutuseks. Eluendi koostise optimeerimiseks tehti mitmeid analüüse kasutades erinevaid sipelghappe 0,1% vesilahuse ja metanooli vahekordasid. Optimaalseks loeti eluendi koostis, mille korral kromatogrammil olid analüütide piigid üksteisest eraldunud ja analüüsi kogupikkus oli võimalikult lühike. Sobivaks eluendiks osutus 80% sipelghappe 0.1% vesilahuse ja 20% metanooli segu. HPLC instrumentide ehituse erinevusest tingitud mõjude vältimiseks kasutati edasistes katsetes eelnevalt kokku segatud eluent.

Järgnevalt tehti ettevalmistavaid kromatograafilisi jookse, mille eesmärgiks oli välja selgitada nt kui laiu skaneerimisvahemikke on mõistlik kasutada, et uuritavad efektid ilmneksid ja oleks sobivad ka analüütide kontsentratsioonivahemikega. Uuriti ka signaali-müra suhet erinevatel analüütide kontsentratsioonidel esmase LoQ hinnangu saamiseks. Kõigile kuuele analüüdile määrati kontsentratsioonivahemik, mis oleks LoQ ümber. Fragmenteerivate meetodite jaoks tehti produktiooni skaneerimisega jookse erinevatel pörkeenergiatel ning valiti kõige intensiivsemad üleminekud protoneeritud ionidele ja neile sobivad pörkeenergiad.

Massispektrometria meetodite üldised parameetrid püüti valida võimalikult tavalised, enamasti LC-MS juhtarkvara soovituslikud vaikeväärtused. Täpsed ionallika ja instrumendi seadistused on toodud peatükis 3.3. Ühekvadrupoolsel instrumendil (Shimadzu) analüüsiti: skaneerimine üle vahemike laiusega 60 kuni 900 m/z ühikut kuue eri meetodiga, SIM, mSIM ja *profile mode*. Kolmekvadrupoolsel instrumendil (Agilent) analüüsiti: skaneerimisi vahemikes laiustega 300, 900 ja 190 ühikut, SIM, mSIM, MRM, neutraali kao ning eellasiooni skaneerimine. Meetoditele vastavad m/z väärtused ja fragmenteerimisel kasutatud pörkeenergia on toodud välja ühteiooni jälgivatele meetoditele (tabel 1) ja skaneerivatele meetoditele (tabel 2).

Mõõteseeriad viidi läbi kuue tasemega, järjest kõik või mitu meetodit, kõigile meetoditele kõik kuus taset. Mõõteseeria lõpus oli esimese meetodi kordus. Shimadzu ühekvadrupoolsel

instrumendil viidi läbi kõik meetodid ühes seerias, seeriat korrati neli korda erinevatel päevade kolme kuu perioodil. Agilendi kolmekvadrupoolisel instrumendil viidi läbi meetodid kahes seerias, mida korrati neli ja viis korda 3 kuu perioodil.

4.2. Ühekvadrupoolne instrument: Shimadzu

Kokku määrati ühekvadrupoolisel instrumendil määramispiiri väärtus kümnel mõõterežiimil: 6 erineva vahemikuga skaneerivat režiimi, *profile mode*, SIM ja mSIM. Kõik määramispiirid määrati analüütide protoneeritud vormidele. Iga mõõteseeriast korrati 4 korda erinevatel päevadel. Skaneeriva mõõterežiimi määramispiiride keskmised väärtused on esitatud tabelis 3. SIM ja mSIM mõõterežiimide määramispiiride keskmised väärtused on esitatud tabelis 4, võrdluseks on lisatud madalaim skaneeriva mõõterežiimi määramispiiri väärtus igale analüüdile eelnevast tabelist. Suhtelised LoQ väärtused, kus SIM režiimi keskmine LoQ on 1, väärtused on visualiseeritud joonisel 7 iga analüüdi korral.

Tabel 3. Määramispiiri väärtuste keskmised skaneerivate mõõterežiimidel ühekvadrupoolisel instrumendil ($n = 4$).

Analüüt	Keskmine määramispiir (ppm)							
	Skaneerimine							<i>profile mode</i>
	105-165	100-200	100-200(2)*	10-310	100-400	100-600	100-1000	100-300
2,6-dimetüülpüridiin	0,26	0,15	0,32	0,24	0,47	0,31	0,31	0,27
2-metoksüpüridiin	36	24	31	38	16	27	31	37
3-kloropüridiin	41	40	66	49	37	70	82	79
dimetüülglutaraat	2,2	1,6	2,0	2,5	1,8	3,3	2,4	1,8
dimetüülmalonaat	2,1	2,8	4,4	4,9	6,0	3,6	4,6	5,0
dimetüülsuktsinaat	2,4	2,5	2,8	2,4	3,0	3,5	6,1	3,5

*) Skaneerimise mõõterežiimi vahemikus 100-200 viidi läbi mõõteseerias esimesena ja viimasena. Need mõõtmised on analüüsitud eraldi.

Erinevate skaneerimisvahemike puhul on näha erinevusi määramispiiri väärtustes. *Profile mode* saavutab sarnased LoQ väärtuseid kui tavalise skaneeriva režiimi puhul 100-300 ühikulise skaneerimisvahemikuga 5 analüüdi korral ja 3-kloropüridiini korral saavutab 900 ühikulise skaneerimisvahemikuga lähedase LoQ väärtuse. Seega *profile mode* ei ole mõõtmisetele toetudes tehniliselt suutlikum, kui tavaline skaneerimine.

Skaneerimisvahemikke võrreldes on näha, et kõrgeim LoQ on 3-kloropüridiini ja dimetüülsuktsinaadi puhul 100-1000 skaneerimisvahemikus, olles 2 ja 2,4 korda suurem kui kitsaima vahemiku, 105-165 ühikut, korral. Kolme analüüdi jaoks oli kõrgeim LoQ 300 ühiku laiuse skaneerimisvahemiku korral ja ühe analüüdi jaoks 500 ühikulise skaneerimisvahemiku korral. Kõige madalam LoQ saavutati kõige kitsamate skaneerimisvahemike, 100-200 ja 105-165 korral.

Tabel 4. Määramispiiri väärtuste keskmised SIM ja mSIM mõõterežiimil ühekvadropoolisel instrumendil ($n = 4$), võrdluseks skaneeriva režiimi madalaim LoQ keskmine.

Analüüt	Keskmine määramispiir (ppm)			Suhe	
	madalaim skaneeriv režiim	SIM	mSIM	Skaneeriv/ SIM	mSIM/ SIM
2,6-dimetüülpüridiin	0,15	0,24	0,24	0,6	1,0
2-metoksüpüridiin	16	14	18	1,2	1,3
3-kloropüridiin	37	18	26	2,0	1,4
dimetüülglutaraat	1,6	1,4	2,0	1,1	1,4
dimetüülmalonaat	2,1	1,1	1,6	1,9	1,4
dimetüülsuktsinaat	2,4	1,3	2,7	1,8	2,1

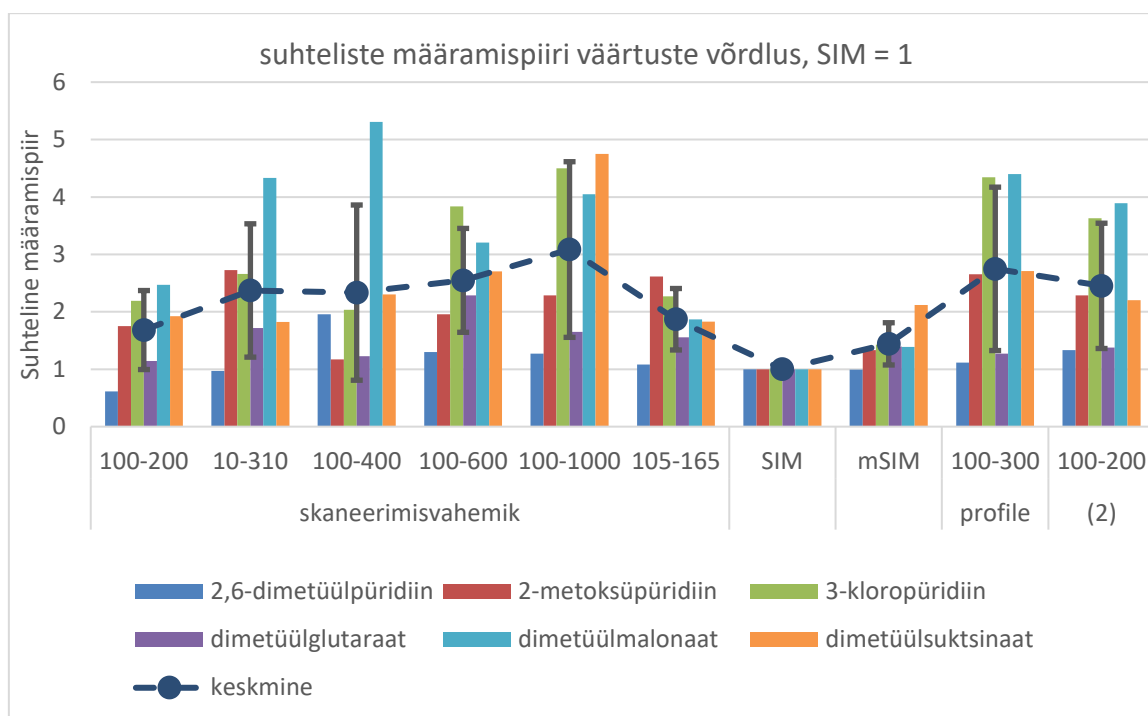
Võrreldes skaneerivas režiimis kõige madalama keskmise LoQ saavutanud režiimi ja valitud iooni jälgivaid režiime, on SIM madalama LoQ-ga 5 analüüdi korral ja 2,6-dimetüülpüridiini korral oli mSIM ning SIM võrdväärtsete määramispiiridega. SIM on 5 analüüdi korral 1.1 kuni 2 korda madalama LoQ väärtusega kui skaneeriv mõõterežiim.

SIM ja mSIM LoQ väärtused on võrdsed 2,6-dimetüülpüridiini korral, ülejäänud analüütide korral on mSIM kõrgema LoQ väärtusega. See tulemus on ootuspärane, sest mSIM korral kasutab instrument ainult 1/6 tsükli ajast ühe analüüdi jaoks, samas kui SIM korral mõõdetake ühte analüüti kogu tsükli vältel. Erinevus SIM ja mSIM vahel on 1,3-1,4 korda nelja analüüdi korral ja 2,1 korda dimetüülsuktsinaadi korral.

Vaadates joonist 7 näeme, et SIM on keskmiselt kõige madalama LoQ väärtusega, olles madalam mSIM ja skaneerimise 100-200 keskmistest. Vaadates 2,6-dimetüülpüridiini suhtelisi LoQ väärtuseid on näha, et skaneerivad meetodid saavutasid SIM mõõtmisega sarnaseid tulemusi ja kõrgeim LoQ väärtus (skaneerimisvahemik 100-400) ületab vähem kui 2 korda SIM LoQ väärtust. Lihtsat selgitust 2,6-dimetüülpüridiini LoQ sellisele muutusele ei ole. 2,6-

dimetüülpüridiin elueerus väga lähedal surnud ajale, kuid kas sellel on seos LoQ-ga, jääb siiski ebaselgeks.

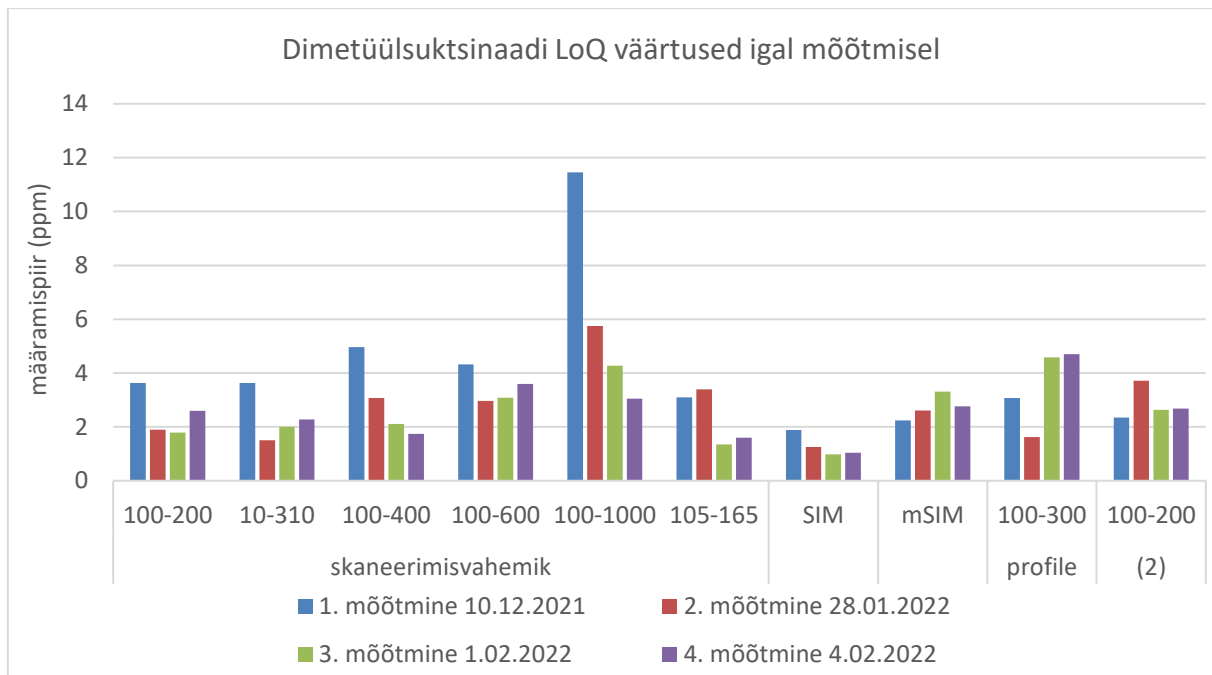
Teiste analüütide korral on selge, et SIM saavutas madalaima määramispiiri. SIM on seega kõige madalama määramispiiriga meetod, mis on ootuspärane. Näiteks on 500-ühikulise skaneerimisvahemiku (100-600) korral LoQ keskmiselt 2,5 korda kõrgem kui SIM režiimis.



Joonis 7. Shimadzu ühekvaadrupoolse instrumendi suhtelised (SIM režiimi LoQ on võrdsustatud ühega) LoQ väärtused kõigile analüütidele. Keskmine näitab, et SIM režiim on läbivalt madala LoQ väärtusega. Mõõterežiimid on graafikul toodud mõõtmiste teostamise järjekorras. Vearivad tähistavad standardhälvet kõigi analüütide keskmisele vastaval mõõtmisrežiimil.

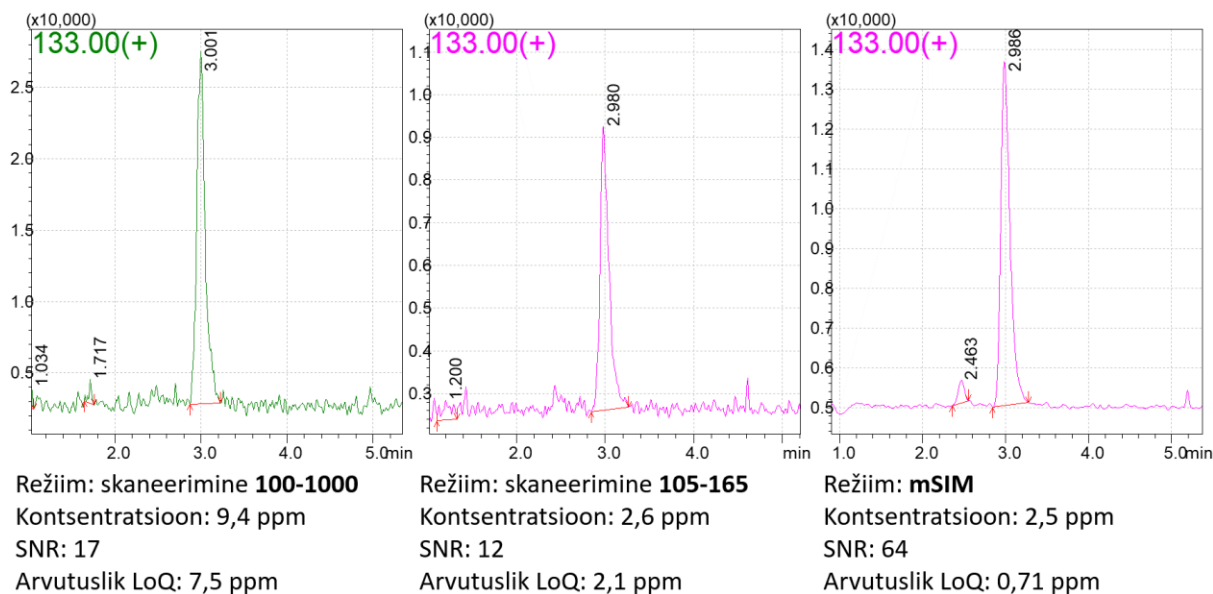
Võrreldes läbiviimise järjekorras esimest ja viimast mõõtemetodit joonisel 7 selgub, et kõigi analüütide korral oli hilisema mõõtmise LoQ kõrgem kui esimesel mõõtmisel, kuigi mõõtmisrežiim on sama. See võib olla põhjustatud instrumendi elektroonika triivist või ionoptika saastumisest mõõtmiste seeria käigus. Pikaajaline seos määramispiiri muutuse ja aja vahel ei selgu 3 kuu perioodi alusel (joonis 8).

Suhteliste määramispiiride standardhälbed üle erinevate analüütide varieeruvad laiades piirides. mSIM ja alla 100-ühikuliste vahemike skaneerimiste on standardhälbed väiksemad. Suured standardhälbed näitavad, et mitte kõigi analüütide korral ei ole seos mõõterežiimi ja LoQ vahel sama. Teoreetiliselt peaksid kõik analüüdid käituma sarnaselt, sest kõigi analüütide korral signaalide kogumisajad (töötssüklid) samad.



Joonis 8. LoQ väärtused erinevatel mõõteseriaitel ühe analüüdi jaoks. Mõõtmised viidi läbi erinevatel päevadel üle mitme kuu. Seos määramispiiri väärtuse ja aja vahel puudub. Sama oli teiste analüütide korral.

Arvutatud määramispiiri väärtuste kõrvutamisel visuaalse hindamisega on näha, et signaali-müra suhe annab määramispiiri kohta üldist infot (joonis 9). Arvutusliku väärtuse ja signaali-müra suhte järgi hinnatud LoQ erinesid tihti. Enamasti on arvutuslik LoQ väärtus kõrgem kui $SNR > 10$ alusel hinnatud LoQ. Näide on toodud joonisel 9, kus on näidatud dimetüülmalonaadi kromatograafilised piigid eri režiimide LoQ-lähedaste kontsentratsioonide korral. Laias ja kitsas vahemikus skaneeriva mõõtorežiimil saadud signaalid on sarnase SNR väärtustega, kuigi analüüdi kontsentratsioon on kitsama vahemiku korral 3,7 korda madalam. Võrreldes kitsa vahemikuga mõõtmisega samal tasemel SIM mõõtorežiimis tehtud mõõtmisega, on müra selgelt madalam. Tänu mSIM mõõtorežiimi madalamale müratasemele, on võimalik tuvastada ka madal lisandi piiki (retentsiooniajaga 2,46 min), mis teistel režiimidel on müra poolt varjatud.



Joonis 9. Dimetüülmalonaadi kromatogrammid kolme erineva mõõterežiimi korral. Välja on toodud määramispiirile lähimad tasemed, mSIM korral on madalaim tase nähtavalt väiksema müraga.

4.3. Kolmekvadrupoolne instrument: Agilent

Kokku määrati kolmekvadrupoolisel instrumendil määramispiir üheteistkümmel mõõterežiimil. Määramised tehti kahes seerias. Esimene määras kolme erineva vahemikuga skaneerivat, SIM ja mSIM mõõterežiime. Teine määras ühe vahemikuga skaneerivat, neutraali kao skaneerimise, eellasiooni skaneerimise, MRM ja SIM mõõterežiimi. Korduseid tehti vastavalt 4 ja 5. Määramispiiride keskmised on esitatud tabelis 5 ja tabelis 6. Suhtelised LoQ väärtused, kus SIM režiimi LoQ on 1, väärtused on visualiseeritud esimese mõõteseria jaoks joonisel 10 ja teise mõõteseria korral, MRM režiimi LoQ on 1, visualiseeritud joonisel 11.

Madalaima LoQ saavutas kolme analüüdi korral mSIM ja ülejäänud kolme analüüdi korral skaneerimine vahemikus 10-200. Seos skaneerimisvahemiku laiuse ja määramispiiri vahel ei ole selge. Kõige kõrgem LoQ on nelja analüüdi korral esimene 10-310 vahemikus skaneeriv režiim ja kahe analüüdi korral viimasena mõõdetud 10-310 vahemikus skaneeriv režiim. Seega, vastupidiselt ootuspärasele, kõige laiema vahemikuga skaneeriv režiim ei olnud kõige kõrgema määramispiiriga.

Erinevus skaneerivate mõõterežiimide ja SIM režiimide vahel on kõige suurem 3-kloropüridiinil, kus 10-310 vahemik korral oli 3 korda kõrgem määramispiir võrreldes SIM ja mSIM

režiimiga. Laiema ja kitsama vahemiku skaneerimise LoQ oli ainult 2 korda suurema väärtusega kui SIM.

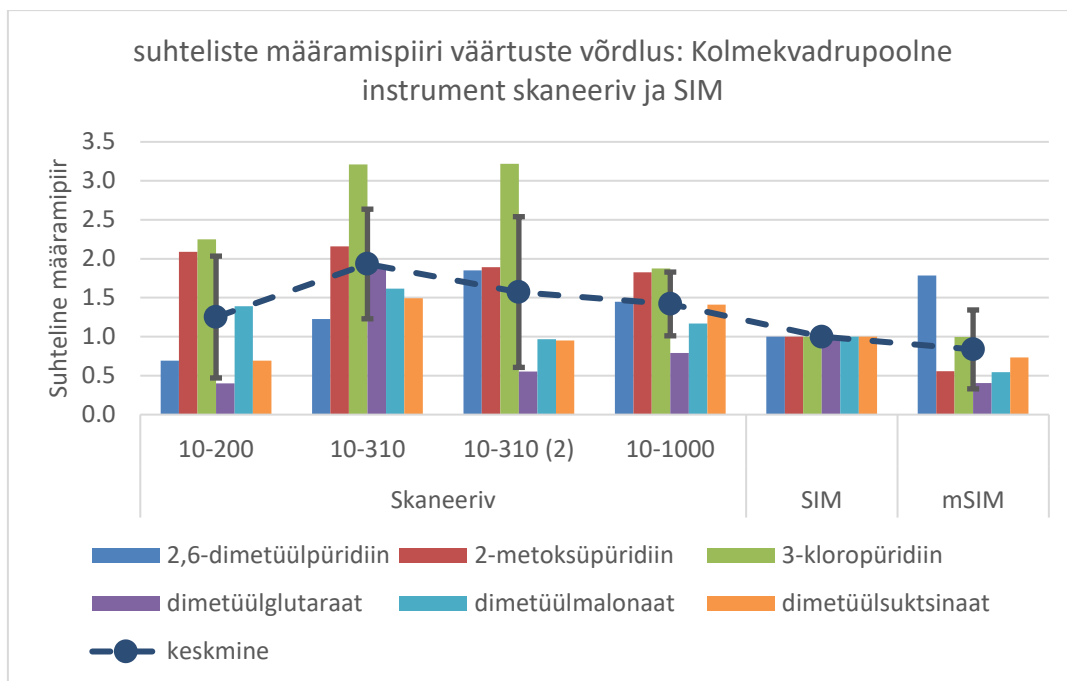
Tabel 5. Määramispiiri väärtuste keskmised skaneerival, SIM ja mSIM mõõterežiimidel kolmekvadrupoolisel instrumendil ($n = 3-6$).

Analüüt	Keskmise määramispiir (ppm)					
	Skaneerimine				SIM	mSIM
	10-200	10-310	10-310 (2)*	10-1000		
2,6-dimetüülpüridiin	0,0047	0,0084	0,013	0,0099	0,0068	0,012
2-metoksüpüridiin	65	67	59	57	31	17
3-kloropüridiin	36	52	52	30	16	16
Dimetüülglutaraat**	3,8	18	5,3	7,5	9,5	3,8
Dimetüülmalonaat**	130	150	90	110	93	51
Dimetüülsuktsinaat**	22	48	31	46	32	24

*) Skaneerimise mõõterežiimi vahemikus 10-310 viidi läbi mõõteseerias esimesena ja viimasena. Need mõõtmised on analüüsitud eraldi.

***) Selles mõõteseerias jälgiti naatrium liit-iooni dimetüüldiestrite korral.

Võrreldes SIM ja mSIM režiime on näha, et mSIM on keskmiselt madalama LoQ väärtusega. Nelja analüüdi korral oli mSIM kuni 2 korda madalama määramispiiriga. See on erinev ühekvadrupoolse instrumendi tulemustest. Põhjuseks on väga tõenäoliselt see, et kolmekvadrupoolses instrumendis kasutatakse SIM ja mSIM korral sama viibimisaega (200 ms). Seega mSIM kasutas üheks tsükliks $6 \cdot 200 = 1200$ ms ja see mõjus signaalile mürafiltrina.



Joonis 10. Agilent kolmekvadrupoolse instrumendi esimese mõtteseeria suhtelised LoQ väärtused võrreldes SIM mõõterežiimiga kõigile analüütidele. mSIM on madalaima keskmise LoQ väärtusega. Vearivad tähistavad standardhälvet kõigi analüütide keskmisele vastaval mõõtmisrežiimil.

Standardhälbed üle erinevate analüütide suhteliste määramispiiride on ebahütlased. See näitab, et analüütide suhteliste LoQ-de seosed mõõtmisrežiimidega ei ole täpselt samasugused. Teoreetiliselt peaksid kõik analüüdid käituma sarnaselt.

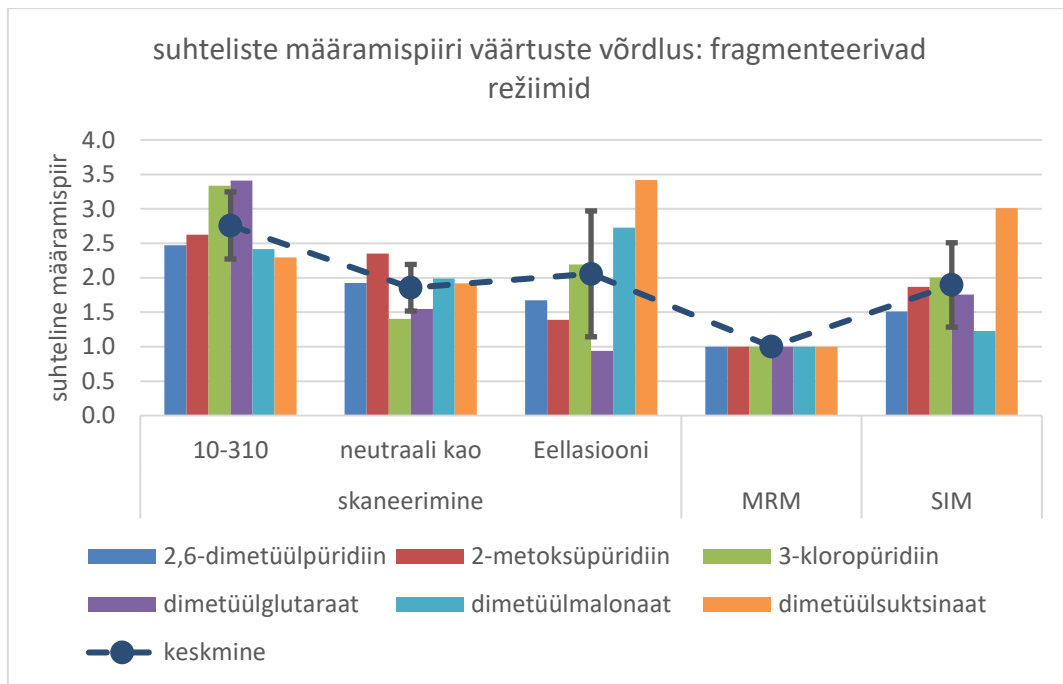
Tabel 6. Määramispiiri väärtuste keskmised tavalisel, neutraali kao ja eelasiooni skaneerimisel, MRM ning SIM mõõterežiimil. ($n = 4-6$)

Analüüt	Keskmine määramispiir (ppm)				
	Skaneerimine			MRM	SIM
	10-310 (3)*	Neutraali kao	Eellasioon		
2,6-dimetüülpüridiin	0,011	0,0084	0,0073	0,0044	0,0066
2-metoksüpüridiin	36	33	19	14	26
3-kloropüridiin	78	33	51	23	47
Dimetüülglutaraat	17**	7,7	4,7	5,0	8,7
Dimetüülmalonaat	96**	79	110	40	49
Dimetüülsuktsinaat	38**	32	57	17	50

*) Skaneerimise mõõterežiimi vahemikus 10-310 3 mõtteseeriad on analüüsitud eraldi teistest sama vahemikuga mõtteseeriastest.

**) Skaneeriva režiimi korral oli $n = 1$. Detekteeriti protoneeritud vormi.

MRM on kõige madalamate LoQ väärtustega kõigile välja arvatud dimetüülglutaraadile. Dimetüülglutaraadi puhul on madalaim LoQ eellasiooni skaneerimise korral, kuid erinevus MRM-st on minimaalne (1.06 korda). SIM saavutas neutraali kao ja eellasiooni skaneerimisega sarnaseid LoQ väärtuseid, aga madalamad LoQ väärtuseid võrreldes tavalise skaneeriva režiimiga. MRM korral olid LoQ väärtused 1 kuni 3 korda madalamad kui SIM korral.

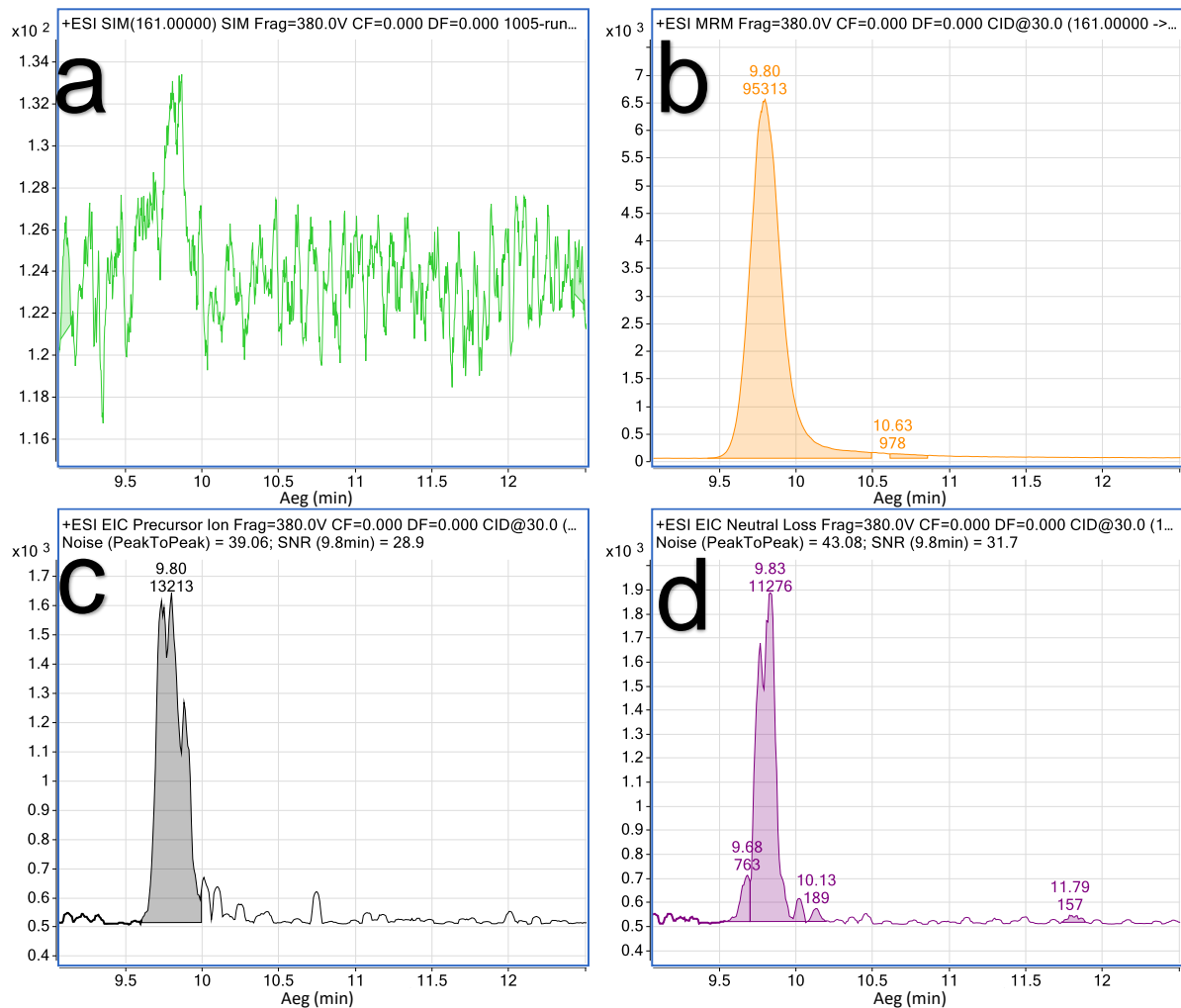


Joonis 11. Agilent kolmekvadrupoolse instrumendi teise mõõteseeria suhtelised LoQ väärtused võrreldes SIM režiimiga kõigile analüütidele. MRM ja SIM on keskmiselt madalaima LoQ väärtustega. Vearibad tähistavad standardhälvet kõigi analüütide keskmisele vastaval mõõtmisrežiimil.

Suhteliste LoQ väärtustele toetudes on näha, et skaneerivad režiimid olid keskmiselt 2 korda kõrgemate LoQ väärtustega kui MRM ja natuke kõrgemate keskmiste väärtustega kui SIM. Saadud tulemused kinnitavad, et skaneerivate mõõteviiside lisamine tõstab (st halvendab) meetodika määramispiire.

Kolmanda mõõteseeria korral on suhteliste määramispiiri standardhälbed üle kõigi analüütide väiksemad kui teisel kahel mõõteseerial. See näitab, et eri analüütide LoQ-de ja mõõtmisrežiimide vahel on tihedam seos. Mõjutada võib ka lühem intervall mõõtmiste vahel, sest viidi läbi 2 mõõtmist järjestikustel päevadel.

Joonis 12 näitab visuaalset müra erinevust skaneeriva, MRM, neutraali kao skaneeriva ja eellasiooni skaneeriva mõõterežiimi vahel. MRM saavutab praktiliselt mürata signaali. Neutraali kao ja eellasiooni skaneerimise näevad väga sarnased välja, piikide tippude sakilisus näitab müra mõju.



Joonis 12. Dimetüülglutaraadi kromatogramm (a), MRM (b), eellasiooni skaneerivas (c) ja neutraali kao skaneerivas (d) mõõterežiimis. Kõik on mõõdetud sama analüüdi kontsentratsioonitasemega ($c = 3,9$ ppm), samal päeval. Kõik välja arvatud skaneeriva mõõterežiimiga on LoQ lähedasel tasemel.

Vaadates saadud tulemusi on näha kooskõla varasemalt läbi viidud uurimustes GC-MS instrumentidil (ptk. 2.8). Sarnaselt on 2 kordne erinevus SIM ja MRM mõõtmisrežiimide vahel [10]. Autor [8] leidis, et MRM võimaldab kuni 40 korda madalamat avastamispiiri kui SIM mõõtmisrežiim. See on oluliselt suurem LoQ paranemine kui käesolevas töös leitud 2-3 korda. Erinevuse põhjuseks on proovi maatriksi mõju puudumine käesolevas töös.

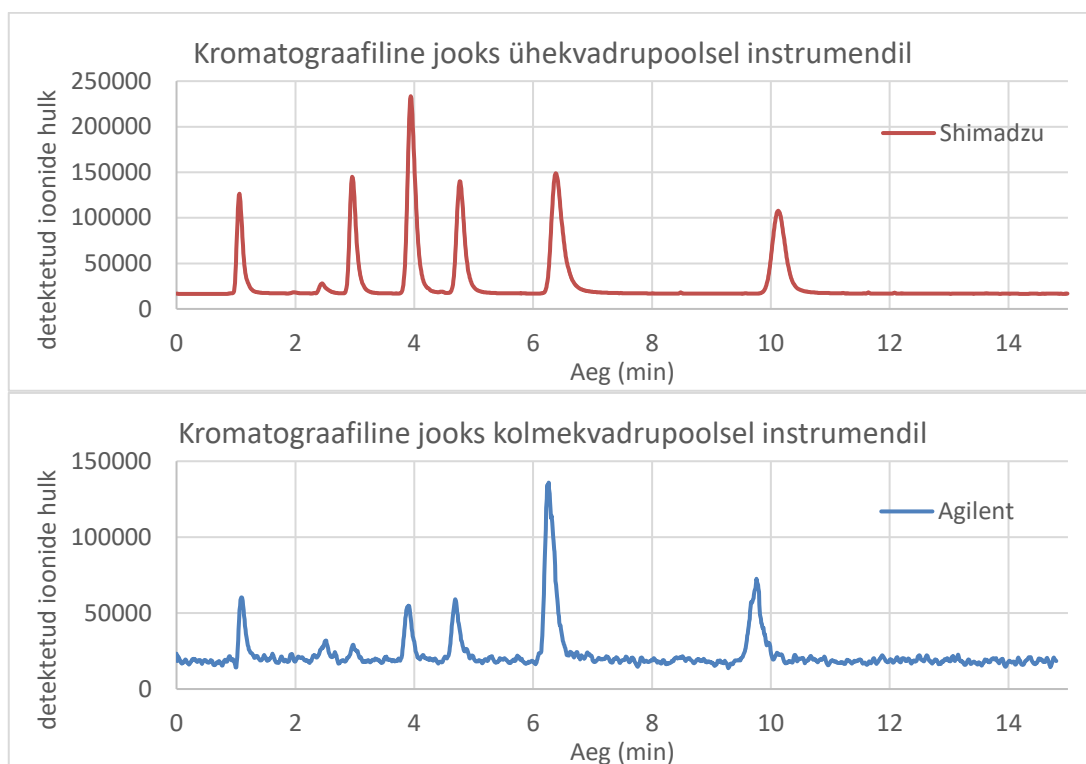
4.4. Erinevused ühe- ja kolmekordse kvadrupooliga instrumentide vahel

Instrumentide tulemused erinesid mõnes võtmekohas. Shimadzu puhul oli selgelt näha SIM ja mSIM määramispiiri erinevust, Agilendi puhul oli mõõtmise ajaline seadistus erinev ja SIM oli

kõrgema LoQ-ga kui mSIM. See tõi esile mõõtmistsükli aja seadistuse tähtsuse ja erinevad lähenemised, mida instrumenditootjad kasutavad.

Shimadzu korral oli seos laiem skaneerimisvahemiku ja määramispiiri vahel selge. Agilendi instrumendil oli vähem skaneerivaid mõõtmisi ja selget seost skaneerimisvahemiku ja määramispiiri vahel ei saanud määrata.

Üks täispikkuses kromatograafiline jooks on näidatud joonisel 13. Retentsiooniajad analüütidel varieerusid kahel instrumendil kuni 3%. Arvestades, et tegemist oli isokraatilise elueerimisega, ei tohiks retentsiooniaegade erinevus mõjutada massispektromeetrilisi määramise tulemusi.



Joonis 13. Kromatograafilised jooksud mõlemal instrumendil. Suurim erinevus on dimetüülglutaraadi piigi (10 minuti juures) retentsiooniajas, mis oli Agilendi LC-MS instrumendil 0,2 minutit lühem.

5. Kokkuvõte

Töö eesmärgiks oli hinnata, kuidas erinevad massispektromeetria mõõtmiserežiimid ja nende parameetrid mõjutavad analüüsimetoodi määramispiiri LC-MS instrumendil. Seni puudus kvantitatiivne hinnang LC-MS mõõterežiimide mõjust analüüsi määramispiirile. Määramispiiri määramiseks kasutati ICH arvutuslikku meetodit.

Mõõtmised viidi läbi ühekvadрупoolsel ja kolmekvadрупoolsel LC-MS instrumendil. Kokku mõõdeti 21 mõõterežiimi, 10 ja 11 vastavalt kummalgi instrumendil. Kordusi viidi läbi 4-5 iga mõõterežiimiga. Kasutati mudelproove kuue analüüdiga ja ilma maatriksita, et minimeerida mõjusid, mis pole põhjustatud MS töörežiimist. Kuue tasemega kalibreerimisgraafikute põhjal arvutatud määramispiiride keskmiseid väärtuseid võrreldi kolmes grupis.

Ühekvadрупoolse instrumendi korral ilmnas seos keskmiste määramispiiri väärtuste ja skaneeriva mõõtmiserežiimi skaneerimisvahemiku laiuse vahel. Mida laiem oli skaneerimisvahemik, seda kõrgem oli keskmine määramispiiri väärtus. Kõige laiema skaneerimisvahemiku (900 m/z ühikut) korral oli määramispiir keskmiselt 1,7 korda kõrgem kui kitsaima vahemiku (50 m/z ühikut) korral. Võrreldes ühte iooni jälgivat (SIM) mõõtmiserežiimi skaneeriva mõõtmiserežiimiga, on 3 analüüdi korral SIM umbes 2 korda madalama keskmise määramispiiriga. Suhe mitme ühte iooni jälgiva (mSIM) mõõtmiserežiimi ja SIM vahel oli 4 analüüdiga 1,4 ja ühega 2,1. Esines erandeid ühe analüüdiga.

Kolmekvadрупoolsel instrumendi korral seost määramispiiri väärtuste ja skaneerimisvahemiku laiuse vahel ei selgunud. SIM mõõtmiserežiim saavutas keskmiselt 1,3 kuni 2 korda madalama keskmise määramispiiri kui skaneeriv meetod. mSIM puhul olid keskmised määramispiiri väärtused neljal analüüdil kuni 2 korda madalamad, mis on ootamatu tulemus. Kolmandas grupis võrreldud fragmenteerivad skaneerimisega mõõtmiserežiimid olid keskmiselt võrdsete määramispiiri väärtustega SIM mõõtmiserežiimiga ja skaneerivast mõõtmiserežiimist keskmiselt 1,3 korda madalam. MRM olles kõige spetsiifilisem mõõtmiserežiim saavutas 1,2 kuni 3 korda ja keskmiselt 1,9 korda madalamaid määramispiire kui SIM mõõterežiim.

Töö tulemusena selgus, mitu korda madalamaid või kõrgemaid määramispiire võimaldavad saavutada erinevad LC-MS mõõtmiserežiimid. See võimaldab LC-MS praktikutel hinnata kui palju võidetakse või kaotatakse määramispiiris, kui üks mõõtmiserežiim asendatakse teisega. Töö eesmärk täideti.

6. Kasutatud kirjandus

1. KemTerm, Keemia-Alased Terminid. (n.d.).
2. K.K. Murray, R.K. Boyd, M.N. Eberlin, G.J. Langley, L. Li, Y. Naito, Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013), *Pure and Applied Chemistry*. 85 (2013) 1515–1609.
3. W.M.A. Niessen, LIQUID CHROMATOGRAPHY AND SAMPLE PRETREATMENT, in: *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, 3rd ed., CRC Press, 2006: pp. 3–22.
4. E. De Hoffmann, V. Stroobant, *Mass spectrometry: principles and applications*, John Wiley & Sons, 2007.
5. M. Oss, Ionization efficiency in electrospray ionization source and its relations to compounds' physico-chemical properties, PhD, Tartu Ülikool, 2021.
6. Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler, Stanley R. Crouch, *High-Performance Liquid Chromatography*, in: *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Eighth Edition, Cengage Learning, 2004: pp. 973–982.
7. A. Kruve, R. Rebane, K. Kipper, M.-L. Oldekop, H. Evard, K. Herodes, P. Ravio, I. Leito, Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I, *Analytica Chimica Acta*. 870 (2015) 29–44.
8. Y. Han, F. Yin, G.F. John, T.P. Clement, Understanding the relative performance of SCAN, SIM, PMRM and MRM methods for quantifying polycyclic aromatic hydrocarbons in crude oil samples, *RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY*. 34 (2020).
9. N. Andrási, A. Helenkár, A. Vasánits-Zsigrai, G. Záray, I. Molnár-Perl, The role of the acquisition methods in the analysis of natural and synthetic steroids and cholic acids by gas chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*. 1218 (2011) 8264–8272.
10. M.D. Khorol'skii, O.V. Anan'ina, A.A. Chaplenko, I.V. Nedkov, N.V. Maslennikova, G.V. Ramenskaya, Comparison of Approaches to Determining N-Nitrosodimethylamine Impurity in Valsartan Drug Substance By GC-MS Methods, *PHARMACEUTICAL CHEMISTRY JOURNAL*. 53 (2019) 766–770.
11. International Conference of harmonization, ICH harmonized tripartite guideline: validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1), (2005).
12. A. Kruve, K. Kaupmees, Adduct Formation in ESI/MS by Mobile Phase Additives, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 28 (2017) 887–894.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, **Raido Maasik**

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „**Massispektromeetri tööparameetrite mõju LC-MS analüüsimeetodi määramispiirile**“, mille juhendaja on **Koit Herodes**. reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates 26.05.2024 kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Raido Maasik
26.05.2022