

INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ
im. Henryka Niewodniczańskiego
Polskiej Akademii Nauk
ul. Radzikowskiego 152, 31-342 Kraków
www.ifj.edu.pl/publ/reports/2016/
Kraków, luty 2016

Raport Nr 2089/Ch

**Chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS),
jako przykład techniki łączonej – podstawy teoretyczne i przykłady zastosowań**

Monika Skowron¹, Beata Grabowska-Polanowska¹,
Piotr Waligórski², Jacek Faber¹, Ireneusz Śliwka¹

¹ Instytut Fizyki Jądrowej im. H. Niewodniczańskiego PAN, ul. Radzikowskiego 152, 31– 342 Kraków

² Instytut Fizjologii Roślin im. F. Górskiego PAN, ul. Niezapominajek 21, 30 – 239 Kraków

Streszczenie

Chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) jako przykład techniki łączonej – podstawy teoretyczne i przykłady zastosowań.

W technikach sprzężonych wykorzystana zostaje zdolność rozdzielcza metody analitycznej oraz zdolność spektrometrii mas do identyfikacji rozdzielonych składników. Jedną z technik analitycznych cieszącą się coraz większym zainteresowaniem laboratoriów środowiskowych, przyrodniczych czy diagnostyki medycznej, jest chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas. Najważniejszą zaletą tej techniki jest możliwość oznaczania związków polarnych i wielkocząsteczkowych, dlatego znajduje szerokie zastosowanie w analizie próbek biologicznych. W odróżnieniu od chromatografii gazowej chromatografia cieczowa pozwala na analizę związków nielotnych, o masie atomowej do kilku tysięcy Da¹. Jest techniką o potencjalnie większych możliwościach aplikacyjnych niż chromatografia gazowa. Stosując chromatografię cieczową, można analizować znacznie większą grupę substancji (ok. 80% znanych związków chemicznych). Mogą to być ciecze i ciała stałe, w tym związki łatwo ulegające rozkładowi termicznemu, polimery i związki nieorganiczne. Warunkiem koniecznym zastosowania chromatografii cieczowej jest rozpuszczalność analitów [1-6]. W pracy zebrano podstawowe informacje o chromatografii cieczowej, omówiono rozwiązania pozwalające na połączenie analizy chromatograficznej ze spektrometrem masowym wykorzystanym, jako detektor. Szczególną uwagę zwrócono na możliwości aplikacyjne chromatografii cieczowej połączonej z tandemową spektrometrią mas (LC/MS/MS). W tej technice możliwa jest identyfikacja analitów na podstawie widma masowego, co zapewnia wysoką specyficzność i umożliwia ilościowe oznaczanie badanej substancji w złożonych mieszaninach nawet, jeżeli nie są w pełni rozdzielone chromatograficznie [1-7].

Summary

Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) as an example of combined technique – theoretical basics and examples of use.

In coupled techniques, resolution sensitivity of the analytical method and mass spectrometry for identification of the separated components, are used. One of the analytical techniques which enjoys growing interest of the environmental laboratories, natural or medical diagnostics, is the liquid chromatography coupled with mass spectrometry. The most important advantage of this technique is the possibility of determining polar compounds and polymers, therefore it is widely used in the analysis of biological samples. In contrast to gas chromatography, liquid chromatography allows the analysis of non-volatile compounds of atomic mass up to several thousands of Da [1]. It is a technique potentially more powerful in applications than gas chromatography. The application of liquid chromatography allows analysis of a much larger group of substances (approx. 80% of the known chemical compounds). They may be liquids or solids, including compounds easily being decomposed thermally: polymers and inorganic compounds. The necessary condition for liquid chromatography is the solubility of the analytes [1-6]. The study collected basic information about liquid chromatography and discussed solutions allowing connecting chromatographical analysis with the mass spectrometer used as a detector. Particular attention was paid to the abilities of application of liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). When using this technique, it is possible to identify the analytes through the mass spectrum, which in turn provides high specificity and allows quantification of the test substances in complex mixtures, even if not fully resolved by chromatography [1-7].

¹ 1 dalton (Da) – jednostka masy odpowiadająca jednostce masy atomowej 1 unit (u), która w przybliżeniu jest równa masie atomu wodoru.

Spis treści

1.	WPROWADZENIE	4
2.	TECHNIKA LC-MS JAKO PRZYKŁAD TECHNIKI ŁĄCZONEJ	5
2.1.	Podstawy chromatografii cieczowej.....	5
2.2.	Zasada działania spektrometru masowego	7
2.2.1.	Rodzaje jonizacji	9
2.2.2.	Rodzaje analizatorów mas.....	11
2.2.3.	Tandemowe spektrometry masowe	13
3.	PRZYGOTOWANIE PRÓBEK DO ANALIZY	15
3.1.	Ekstrakcja do fazy stałej.....	15
3.2.	Technika QuECHERS	17
4.	MOŻLIWOŚCI APLIKACYJNE CHROMATOGRFII CIECZOWEJ	19
4.1.	Zastosowanie techniki LC-MS/MS w diagnostyce medycznej i farmacji.....	20
4.2.	Zastosowanie techniki LC-MS/MS w analizach środowiskowych	23
4.3.	Zastosowanie techniki LC-MS/MS w badaniu ekstraktów roślinnych	24
5.	AGILENT 6460 TRIPLE QUAD LC/MS.....	25
5.1.	Ultrasprawy chromatograf cieczowy Agilent 1290 Infinity	25
5.2.	Potrójny kwadrupol MS firmy Agilent.....	28
5.3.	Tryby pracy potrójnego kwadrupola MS	30
6.	ZASTOSOWANIE POTRÓJNEGO KWADRUPOLA MS FIRMY AGILENT	32
7.	PODSUMOWANIE	41
8.	LITERATURA	42

1. WPROWADZENIE

Na przestrzeni ostatnich lat obserwuje się niezwykle intensywny rozwój metod analitycznych, pozwalających na precyzyjną i kompleksową analizę całego spektrum związków występujących w badanej matrycy. Współczesna analiza chemiczna, charakteryzuje się dążeniem do oznaczania możliwie największej liczby związków chemicznych, na coraz niższym poziomie stężeń, w coraz bardziej złożonych matrycach i w coraz krótszym czasie. Za sukcesem ilościowego i jakościowego oznaczenia danego związku na niskim lub ultra niskim poziomie stężeń, stoją specyficzne i selektywne metody pobierania i przygotowywania próbek oraz sprzężone wielowymiarowe techniki analityczne [1-7]. Podstawą pomysłu łączenia różnych technik, była chęć stworzenia metod pomiarowych, dzięki którym możliwe będzie rozdzielenie mieszanin, z możliwością ich natychmiastowej i jednoznacznej identyfikacji. Identyfikacja analitów wykorzystująca spektrometrię mas jest najczęściej łączona z technikami separacyjnymi, takimi jak chromatografia i elektroforeza kapilarna. Połączenie tych analitycznych technik ze spektrometrem masowym, jako detektorem, dostarcza skutecznego narzędzia do jakościowej charakterystyki złożonych mieszanin [1-7]. Spektrometrię mas stworzyli na przełomie XIX i XX wieku Joseph John Thomson oraz Francis William Aston [5,7,8]. Początkowo w spektrometrach mas wykorzystywano technikę jonizacji strumieniem elektronów i analizator magnetyczny. Kolejne lata sukcesywnie przynosiły nowe rozwiązania konstrukcyjne, aż do stworzenia w 1956 roku zestawu GC-MS, będącego połączeniem chromatografii gazowej i spektrometrii mas. Do chwili obecnej system GC-MS zajmuje czołową pozycję w chemii analitycznej, gdyż łączy wysoką czułość z szerokim zakresem zastosowań i wszechstronnością [5-10]. Ze względów technicznych, na przyłączenie do spektrometru mas chromatografu cieczowego trzeba było poczekać do lat 70 XX wieku [6]. Trudnym problemem technicznym był intensywny strumień fazy ruchomej, zawierający badane składniki (eluat), który zaburzał próżnię w źródle jonów. Rozwiązaniem było skonstruowanie w 1968 roku, źródła jonów pracującego w warunkach ciśnienia atmosferycznego [6-8]. Przełom XX i XXI wieku to okres intensywnych badań nad doskonaleniem aparatury badawczej pod kątem wykorzystywanego mechanizmu rozdziału oraz sprzężonych z nim sposobów detekcji, czego owocem są powstające, wciąż nowe techniki analityczne. Rosnąca potrzeba analizowania skomplikowanych próbek, narzuca konieczność poszukiwania czułych procedur analitycznych, pozwalających na rozdzielenie badanej próbki na poszczególne składniki oraz ich jednoznaczną identyfikację [1-8]. Te wszystkie kryteria spełniają techniki sprzężone (łączone), rozumiane, jako połączenia co najmniej dwóch wzajemnie uzupełniających się technik badawczych. Różne metody wytwarzania jonów, rozdzielania, zbierania i przetwarzania danych świadczą o szybkim postępie w dziedzinie spektrometrii mas, co przekłada się na rozwój wciąż nowych urządzeń badawczych. W prezentowanej pracy przedstawiono podstawowe zagadnienia chromatografii cieczowej. Omówiono budowę i zasadę działania wysokosprawnej

chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym układem spektrometrów masowych (LC-MS/MS). Przedstawione zostały również możliwości aplikacyjne techniki LC-MS/MS.

2. TECHNIKA LC-MS JAKO PRZYKŁAD TECHNIKI ŁĄCZONEJ

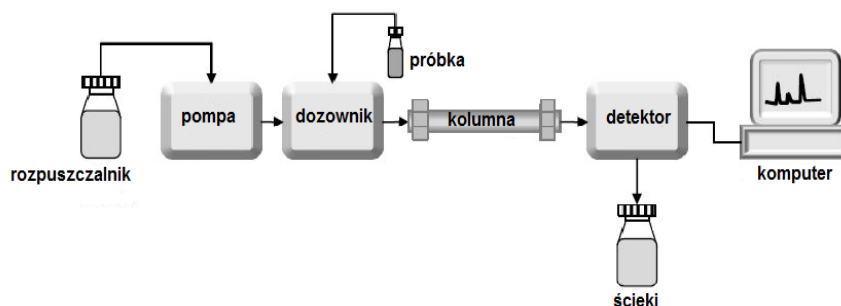
Chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS, *ang. Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*) lub tandemowa spektrometria mas (LC-MS/MS) jest dynamicznie rozwijającą się techniką łączoną, która znajduje szerokie zastosowania w analizie jakościowej i ilościowej złożonych próbek biologicznych. Niewątpliwą zaletą LC-MS/MS jest poprawa specyficzności analizy chromatograficznej w porównaniu do chromatografii z pojedynczym detektorem MS [1-7,9]. W połączeniu ze spektrometrami masowymi używa się dwóch chromatograficznych technik: wysokosprawnej chromatografii cieczowej – HPLC (*z ang. High Performance Liquid Chromatography, HPLC*) oraz ultra wysokosprawnej chromatografii cieczowej – UHPLC (*z ang. Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC*) [1-8,10,11].

2.1. Podstawy chromatografii cieczowej

We wszystkich rodzajach analiz chromatograficznych rozdzielanie poszczególnych składników próbki polega na wykorzystaniu różnic w ich właściwościach fizykochemicznych. Różne grupy związków posiadają różne powinowactwo do wypełnienia kolumny, adsorbując się na nim z różną siłą. Składniki słabiej zaadsorbowane w fazie stacjonarnej (wypełnienie kolumny) będą szybciej wymywane przez fazę ruchomą (eluent), zaadsorbowane mocniej będą wymywane wolniej. Dzięki temu składniki różniące się znacznie właściwościami mogą być łatwiej i dokładniej rozdzielone [1-6]. W przypadku chromatografii cieczowej fazę ruchomą stanowi ciecz a fazę stacjonarną ciało stałe (chromatografia adsorpcyjna) lub ciecz osadzona na nośniku (chromatografia podziałowa). W celu rozdzielania składników mieszaniny, chromatografia cieczowa wykorzystuje różnice w oddziaływaniu analizowanych związków z fazą stacjonarną. Dla sprawnej analizy ważny jest dobór wypełnienia kolumn: polarnego (chromatografia w normalnym układzie faz NP) lub niepolarnego (chromatografia w odwróconym układzie faz) oraz rozpuszczalników o odpowiednio dobranej mocy elucji [1-6]. Dla mieszaniny związków o różnych grupach funkcyjnych, a więc różniących się polarnością, wystarczającą techniką rozdzielania jest niskociśnieniowa chromatografia cieczowa. W tej metodzie, jako fazę stacjonarną, stosuje się zazwyczaj żel krzemionkowy $\text{SiO}_2 \times n\text{H}_2\text{O}$, będący fazą polarną. Podczas przepuszczania mieszaniny przez kolumnę, najpierw wymywane są składniki mniej polarne. Zastosowanie bardziej polarnego eluenta będzie przyspieszało proces wymywania. Obecnie chromatografia niskociśnieniowa jest stosowana głównie jako chromatografia preparatywna [1-6, 11].

Zazwyczaj mamy jednak do czynienia z próbkami zawierającymi składniki o podobnej polarności. W celu rozdzielania takiej mieszaniny, konieczne jest zastosowanie wysokosprawnej (HPLC) lub ultrasprawnej chromatografii ciekowej (UHPLC). Zasadniczą różnicą chromatografii wysokosprawnej w stosunku do chromatografii adsorpcyjnej niskociśnieniowej jest rozmiar kolumny, ziaren wypełnienia i ciśnienia. Długość kolumn stosowanych w HPLC wynosi 10-30 cm, podczas gdy w chromatografii niskociśnieniowej od 10-100 cm. Z kolei wielkość ziaren wypełnienia wynosi odpowiednio 3-6 μm dla chromatografii wysokosprawnej oraz 100-600 μm dla niskociśnieniowej. W przypadku chromatografii ultrasprawnej rozmiary ziaren i długości kolumny są jeszcze mniejsze. Długość kolumn nie przekracza 2,5 cm, a cząstki wypełnienia mają średnicę poniżej 2 μm [3,6]. Zastosowanie małych rozmiarów ziaren poprawia sprawność kolumny, ze względu na zmniejszenie się dyfuzji wirowej, która ma miejsce w kolumnach o większych rozmiarach ziaren. Tak małe wymiary ziaren wymagają jednak zastosowania wysokiego ciśnienia, aby wymusić przepływ fazy ruchomej przez kolumnę. W wysokosprawnej chromatografii ciekowej stosuje się ciśnienia rzędu 5-20 MPa [1-6], przy zastosowaniu nowoczesnych kolumn nawet do 100 MPa. Ze względu na mechanizm separacji w chromatografii wysokosprawnej można wyróżnić chromatografię adsorpcyjną, chromatografię podziałową, chromatografię jonową, chromatografię wykluczania, chromatografię powinowactwa [3,6]. Dla większości analizowanych mieszanin związków organicznych stosuje się chromatografię podziałową w odwróconym układzie faz. Rozdzielane składniki ulegają podziałowi między fazę stacjonarną i ruchomą. Cechą tego rodzaju chromatografii jest podział składników między ciecz-ciecz (z ang. *Liquid-Liquid Chromatography, LLC*). Niepolarna faza stacjonarna, w tym przypadku jest cieczą związaną chemicznie z ciałem stałym, którym jest modyfikowany żel krzemionkowy. Na powierzchni żelu krzemionkowego znajdują się grupy silanolowe ($\equiv\text{Si-OH}$), które są poddawane modyfikacji chemicznej. W wyniku reakcji, grupy hydroksylowe obecne na powierzchni żelu krzemionkowego są zastępowane innymi grupami: alkilowymi, fenyłowymi, cyjanopropyłowymi lub propyloaminowymi. Ponieważ część grup silanolowych nie zostaje zastąpiona grupami niepolarnymi, dlatego rozdział chromatograficzny zachodzi przez podział ciecz-ciecz, ale również przez procesy adsorpcyjne [2-6,10,11]. W typowej chromatografii HPLC, w odwróconym układzie faz najczęściej stosowana jest niepolarna faza stacjonarna tzw. faza oktadecylosilanowa (oznaczenie C_{18}). Fazę tę tworzą 18-to węglowe grupy alkilowe utworzone na nośniku z żelu krzemionkowego [2-4,6,10]. Zastosowanie chromatografii w odwróconym układzie faz powoduje, że związki bardziej hydrofobowe są silniej zatrzymywane w fazie stacjonarnej. Zwiększenie zawartości rozpuszczalnika polarnego w fazie ruchomej spowoduje wolniejsze wymywanie poszczególnych składników [3,6,10]. W układzie do chromatografii ciekowej zawsze można wyróżnić: zbiornik fazy ruchomej, pompę, dozownik, kolumnę (Rys.1). Po wyjściu z kolumny, próbka jest kierowana do odpowiedniego detektora. W przypadku techniki sprzężonej LC-MS lub tandemowej spektrometrii mas do spektrometru masowego a następnie rejestratora wyników. Faza ruchoma jest pobierana przez pompę ze zbiorników (np. metanol: woda) i następnie tłoczona pod ciśnieniem poprzez dozownik do

kolumny chromatograficznej. Próbkę jest wprowadzona automatycznie przez mikrostrzykawkę do strumienia fazy ruchomej w dozowniku, który umożliwia wprowadzenie próbek znajdujących się pod ciśnieniem atmosferycznym do kolumny pracującej pod ciśnieniem od kilku do kilkudziesięciu MPa. Składniki próbki wraz z fazą ruchomą przedostają się do kolumny, gdzie są rozdzielane. Kolumna może być termostatowana.



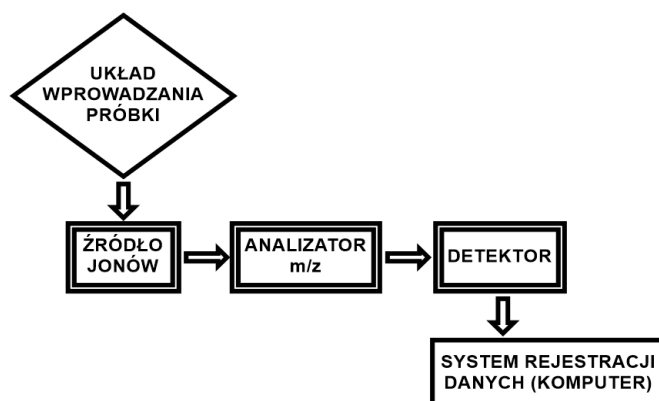
Rys. 1 Schemat blokowy chromatografu cieczowego [12].

W przypadku zastosowaniu chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas, zaleca się stosowanie rozpuszczalników (lub mieszaniny rozpuszczalników) o wysokiej czystości, wysokiej polarności oraz zdolności rozpuszczania wielu różnych związków. Najczęściej stosowanymi rozpuszczalnikami są: acetonitryl, metanol, woda, 2-propanol. Do przygotowywania buforów, zaleca się używać mrówczanu amonu, octanu amonu, wodorowęglanu amonu, węglanu amonu oraz modyfikatorów fazy ruchomej. Modyfikatorami są kwas mrówkowy (0,1–1%), kwas octowy (0,1–1%), gdy układ pracuje w trybie jonów dodatnich oraz amoniak (0,1–1%) gdy pracuje w trybie jonów ujemnych. Zastosowanie modyfikatorów ma na celu zwiększenie czułości metody oraz poprawę jonizacji próbki [13]. Aby rozpuszczalnik mógł zostać użyty jako eluent, konieczne jest jego odgazowanie. Zapobiega to powstawaniu w cieczy pęcherzyków gazu, które mogłyby wpływać na sprawność kolumny, retencję, w wyniku czego mogą przeszkadzać w detekcji.

2.2. Zasada działania spektrometru masowego

Spektrometria mas (z ang. *Mass Spectrometry*, *MS*) jest techniką analityczną, która opiera się na pomiarze stosunku masy do ładunku badanego jonu (m/z). Pierwszy spektrometr mas zbudowany został w 1911r. przez J.J. Thompsona [7]. Obecnie istnieje wiele odmian tej techniki, z których każda posiada inne możliwości aplikacyjne i wymaga sprzętu o odpowiedniej konstrukcji [1-11,13]. Niezależnie od rodzaju, każdy spektrometr mas składa się z pięciu podstawowych elementów: układu wprowadzania próbki, źródła jonów, analizatora, detektora i rejestratora. Ogólny schemat budowy

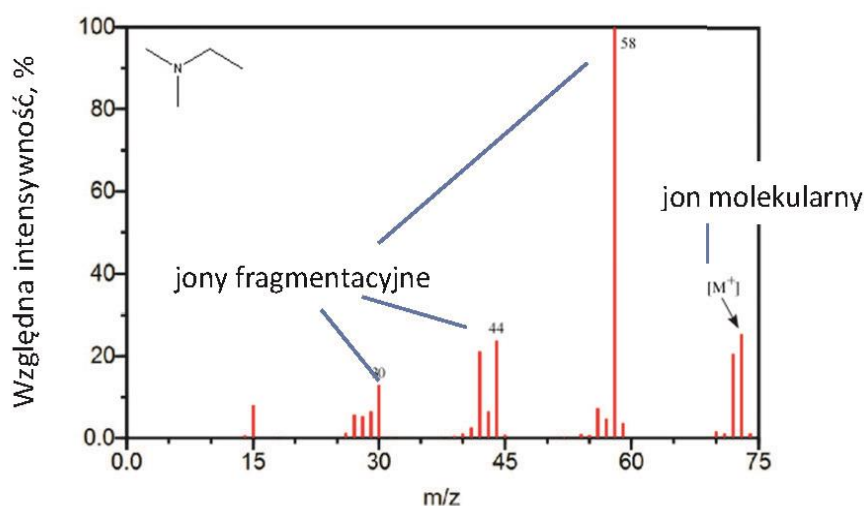
spektrometru mas przedstawiono na Rysunku 2. Układem wprowadzania próbek jest chromatograf gazowy lub cieczowy.



Rys.2 Schemat blokowy spektrometru masowego.

Podstawą działania każdego spektrometru masowego, jest jonizacją i ewentualna fragmentacja cząsteczek badanej substancji, zachodząca pod różnym ciśnieniem od atmosferycznego po wysoką próżnię w zależności od sposobu jonizacji. Powstałe w komorze jonizacyjnej jony, przyspieszane w polu elektrostatycznym, są kierowane przez szczelinę ogniskującą do analizatora mas pracującego pod wysoką próżnią. Wskutek oddziaływania pola elektrycznego i magnetycznego, jony są rozdzielane na podstawie ich stosunku m/z . Jony po rozdzieleniu trafiają do detektora. Docierając do detektora, wywołują przepływ prądu o natężeniu proporcjonalnym do ich ilości. Zmiany te przedstawiane są graficznie w postaci wykresu – widma masowego, na którym na osi rzędnych zaznaczana jest intensywność sygnałów, a na osi rzędnych wartość stosunku m/z , z dokładnością odpowiadającą rozdzielczości danego typu aparatu. Informacja uzyskana na podstawie widma masowego jest zależna od rodzaju zastosowanej jonizacji [1-11,13]. Wyróżnić można dwa rodzaje jonizacji tzw. „miękką” i „twardą”. W jonizacji „miękkiej” tworzy się tylko jon molekularny (cząsteczkowy) bez fragmentacji cząsteczki. W jonizacji „twardej” oprócz jonu molekularnego cząsteczka rozpada się na jony fragmentacyjne, dając charakterystyczne dla danego związku masowe widmo fragmentacyjne. Zatem jonizacja „miękka” pozwala tylko ustalić masę cząsteczkową analitu. Jonizacja „twarda” oprócz informacji o masie cząsteczkowej może ponadto dostarczyć dane na temat struktury związku [3,6-11,13]. W przypadku zastosowania jonizacji umożliwiającej powstanie jonów fragmentacyjnych otrzymane widmo masowe badanego związku jest jednocześnie widmem fragmentacyjnym, umożliwiającym identyfikację związku (Widmo fragmentacyjne istotnie zwiększa prawdopodobieństwo identyfikacji i oznaczenia związku w próbkach o niskim stężeniu). Metody chromatograficzne wyposażone w inne niż spektrometr detektory, pozwalają na identyfikację związku tylko na podstawie jego czasu retencji. Konieczne jest również wcześniejsze ustalenie tego czasu dla

substancji wzorcowych. Zastosowanie spektrometru mas jako detektora w analizie chromatograficznej daje dodatkową, możliwość identyfikacji składników próbki bez konieczności zastosowania wzorców. Rysunek 3 przedstawia przykładowe widmo fragmentacyjne N,N-dimetyloetyloaminy uzyskane w detektorze masowym, gdzie zastosowano jonizację cząsteczek strumieniem elektronów (z ang. *Electron Impact, EI*). Na podstawie takiego widma, przez porównanie go z widmami substancji wzorowych, zapisanych w bibliotece, możliwa jest identyfikacja badanego związku (Rys.3).

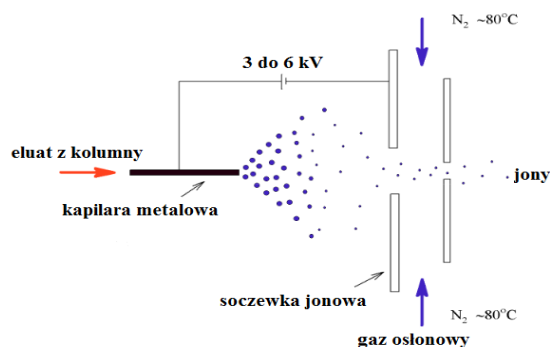


Rys.3 Widmo masowe (fragmentacyjne) N,N-dimetyloetyloaminy, po jonizacji EI [14].

2.2.1. Rodzaje jonizacji

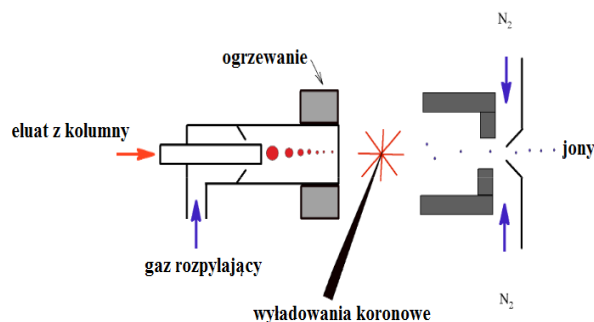
W dostępnych na rynku systemach LC-MS/MS wykorzystywane są trzy sposoby: jonizacja metodą elektrorozpylania (ESI), jonizacja przy ciśnieniu atmosferycznym (APCI) oraz fotosprej (APPI) [6-8,11,15-20]. **Jonizacja metodą elektrorozpylania** - „elektrosprej” (z ang. *Electro Spray Ionization, ESI*) jest najczęstszą metodą jonizacji stosowaną w układzie LC-MS/MS. Elektrorozpylanie polega na rozpylaniu pod ciśnieniem atmosferycznym eluatu zawierającego anality z kapilary, do której przyłożone jest wysokie napięcie (1-6 kV). W wyniku podgrzewania oraz suszenia gazem następuje odparowanie rozpuszczalnika i wzrost gradientu potencjału przy powierzchni kropli. W rezultacie następuje wybuch kulombowski i desorpcja jonów z kropli. Wydajność elektrorozpylania jest tym większa, im związek jest bardziej polarny. Gaz osłonowy N₂ o temperaturze 80°C jest stosowany, jako gaz osuszający (rys.4). ESI należy do łagodnych metod jonizacji dlatego powoduje niewielką fragmentację jonów. Zaletą tej techniki jest zjawisko wielokrotnego protonowania jonu molekularnego. Efekt ten sprawia, że nawet wysokocząsteczkowe związki mogą być analizowane przy odpowiednio niższych wartościach m/z. Dlatego metoda ESI jest bardzo często stosowana w badaniach związków wysokocząsteczkowych (białka, peptydy) o masie

cząsteczkowej nawet rzędu 100 – 300 tys. Da. i związków termolabilnych. Zastosowanie źródła jonów ESI zapewnia wysoką czułość.



Rys. 4 Schemat jonizacji ESI [20].

Jonizacja chemiczna przy ciśnieniu atmosferycznym (z ang. *Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI*) polega na przeniesieniu protonu między jonem pierwotnym a cząsteczką analitu [19,20]. Jonizacja jest prowadzona pod ciśnieniem atmosferycznym, następuje przez wyładowanie koronowe. W przypadku układu LC-MS reakcja przeniesienia protonu zachodzi między jonem pierwotnym powstałym z eluentu a cząsteczką analitu. Z kolumny eluent i anality trafiają do ogrzewanej rurki, gdzie powstaje aerozol. Zaostrzona elektroda, tzw. igła wyładowcza, wytwarza gradient potencjału, wystarczający dla jonizacji. Wyładowanie koronowe powoduje jonizację składników aerozolu, zawierającego również azot i wodę. W takim aerozolu, jony pierwotne powstają dość łatwo. W reakcji przeniesienia protonu powstają protonowane jony molekularne. Mimo słabej fragmentacji możliwe jest uzyskanie informacji o strukturze związku.



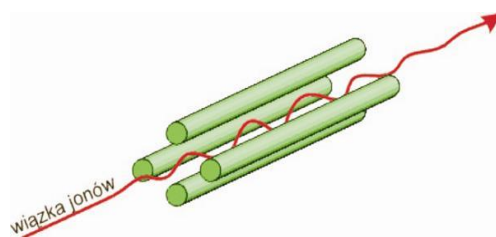
Rys.5 Schemat źródła jonów APCI [20].

Z uwagi na fakt, że APCI nie generuje jonów o wielu ładunkach i jest przeprowadzane w wyższych temperaturach, ten typ jonizacji jest używany do analizowania mniejszych, termicznie stabilnych

polarnych i niepolarnych związków. Źródło APCI jest czułe i wydajne. Podobnie jak ESI, może generować jony dodatnie lub ujemne. Metodę jonizacji typu APCI stosuje się np. w oznaczaniu witaminy D₃ [21,22]. O roli oznaczania witaminy D₃, mowa będzie w podrozdziale dotyczącym aplikacji LC-MS/MS (rozdział 4). **Fotosprej** (z ang. *Atmospheric Pressure Photo Ionization, APPI*) jest metodą umożliwiającą zjonizowanie najmniej polarnych związków, jak np. poliaromatyczne węglowodory. Metoda APPI jest dogodną metodą dla związków, które gorzej ulegają jonizacji metodą elektrorozpylania (ESI) lub jonizacji chemicznej pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI). Dla niektórych związków, jak: tetrahydrokanabinol, kwas benzoesowy czy witaminy rozpuszczalne w tłuszczach, ten typ jonizacji zapewnia lepszą czułość niż ESI, czy APCI. Głównym kryterium, jakim należy kierować się przy wyborze właściwej metody jonizacji jest polarność związku i jego masa cząsteczkowa. Technika ESI jest najczęściej stosowana dla jonizacji związków polarnych, natomiast dla średniopolarnych i mniej polarnych związków lepszą metodą jest jonizacja APCI. Porównując APCI i APPI należy zauważyć, że w obu metodach w pierwszym etapie ma miejsce odparowanie rozpuszczalnika, co ogranicza zakres stosowalności tych metod jonizacji tylko do związków termicznie stabilnych i maksymalnej masie do ok. 1000 Da. Wybierając odpowiednią metodę jonizacji należy również pamiętać, że większość związków jonizuje się przy wykorzystaniu wszystkich trzech metod [6,8,11,13].

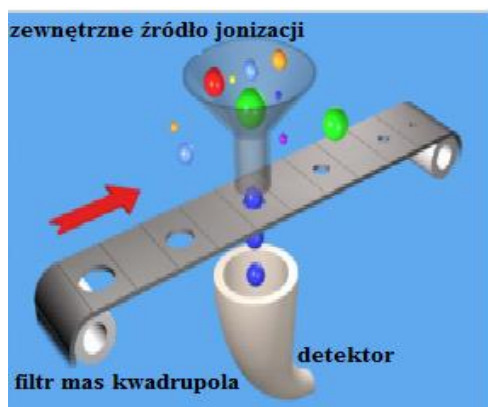
2.2.2. Rodzaje analizatorów mas

Z wielu dostępnych na rynku analizatorów mas najpopularniejszymi są: kwadrupolowe analizatory mas (z ang. *Quadrupole, Q*), pułapki jonowe (z ang. *Ion Trap, IT*) oraz analizatory czasu przelotu (z ang. *Time of Flight, TOF*) [6-11,13,20, 23-24]. **Kwadrupolowy analizator mas** jest najczęściej spotykanym analizatorem. Działa jak filtr masy, przepuszczając w sposób ciągły tylko jony o ściśle określonym stosunku masy do ładunku (m/z). Kwadrupolowy analizator mas, składa się najczęściej z czterech równolegle ułożonych prętów, do których przyłożone jest napięcie. Pod wpływem pola elektrycznego, jony poruszające się między elektrodami, zaczynają oscylować. Oscylacja odbywa się pomiędzy prętami o przeciwnej polarności. Tylko jony o określonym stosunku (m/z) mają stabilny tor i docierają do detektora, pozostałe rozładują się i osadzają na elementach analizatora [2-6,9,20]. Budowa kwadrupolowego analizatora mas została przedstawiona na Rysunku 6.



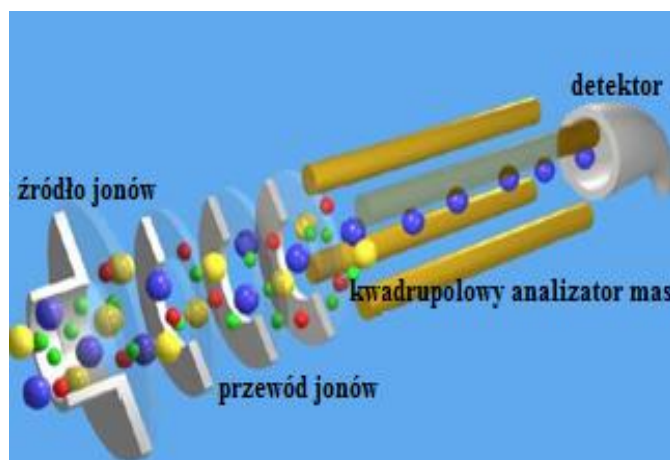
Rys.6 Schemat kwadrupolowego analizatora mas [9].

Kwadrupol może pracować w dwóch trybach: pełnego skanowania (SCAN), gdzie wykonywane jest pełne widmo oraz w trybie obserwacji wybranych jonów, gdzie rejestrowana jest intensywność wybranego jonu w czasie (z ang. *Selected Ions Mode, SIM*). Tryb SIM jest najczulszym trybem pracy spektrometrów mas. Poniżej przedstawiono diagramy ilustrujący pracę kwadrupola w obu trybach. Rysunek 7 przedstawia tryb pracy SCAN [23]. Jony wytworzone w komorze jonizacyjnej przedstawione są w postaci kolorowych kulek o różnych rozmiarach, co obrazuje różne m/z . Ruchomy pasek z otworami o różnej średnicy, jest wyobrażeniem kwadrupola o zmiennym napięciu między prętami, przepuszczającym tylko wybrane jony (różne m/z = różne otwory). Do detektora wpadają kolejne jony skanowane w pełnym, zadanym zakresie mas.



Rys.7 Diagram ilustrujący ideę pracy pojedynczego kwadrupolowego analizatora masy w trybie SCAN [23].

W przypadku techniki SIM pojedynczy kwadrupol skanuje tylko wybrany m/z . Dlatego wykrywalność sygnału od szukanego związku wynosi prawie 100%. Ideę pracy kwadrupolowego analizatora masy w trybie SIM ilustruje diagram (Rysunek 8) [23].



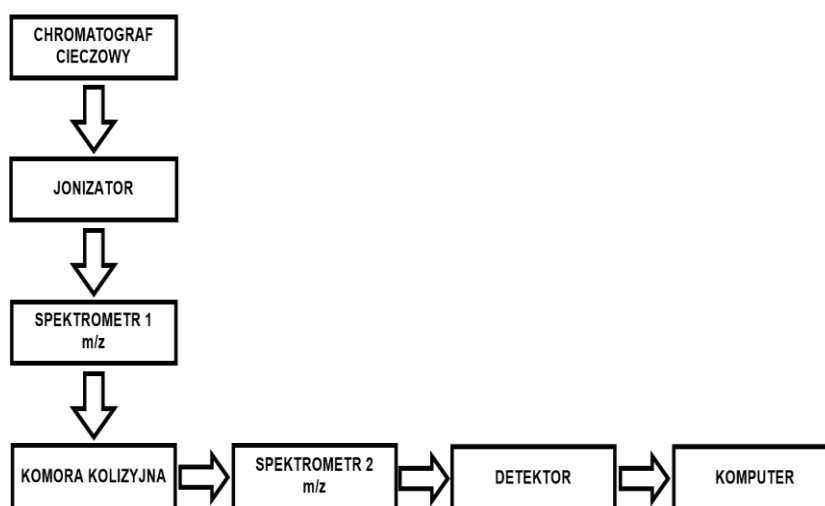
Rys.8 Diagram ilustrujący pracę pojedynczego kwadrupolowego analizatora masy w trybie SIM [23].

Pułapka jonowa (IT) jest analizatorem zbudowanym z trzech elektrod, wytwarzających pole elektryczne. Pole to umożliwia przechowywanie jonów w komorze. W momencie, kiedy jony zostają uwięzione w komorze przez oscylujące pola elektryczne, niektóre z jonów będą miały stabilne trajektorie i pozostaną w pułapce, inne jony zaś o niestabilnych trajektoriach są wyrzucane z pułapki, odpowiednio względem ich m/z , a następnie rejestrowane. Cały cykl działania pułapki jonowej opiera się na wytworzeniu porcji jonów, uwięzieniu wszystkich jonów, a następnie przez zmianę potencjału, wywołanie niestabilnych ruchów jonów i skierowanie ich do detektora, zgodnie z wartościami m/z . Przy bardzo szybkim sposobie skanowania, wielokrotne powtarzanie takiego cyklu pracy pułapki jonowej, umożliwia zarejestrowanie widm masowych. Dzięki zastosowaniu pułapki jonowej w spektrometrze mas, bardzo dużą czułość przy bardzo dobrej rozdzielczości [6,8,11,13,24]. Pułapka jonowa charakteryzuje się wysoką czułością skanowania. Doskonale sprawdza się w analizie jakościowej związków na niskim poziomie stężeń, natomiast nie nadaje się do analizy ilościowej. **QTRAP** jest typem potrójnego kwadrupola, w którym drugi z analizatorów masy może pracować, zarówno jak kwadrupol, jaki pułapka jonowa. Spektrometry z **analizatorem czasu przelotu** (z ang. *Time of Flight, TOF*) obecnie wykorzystywane są w coraz szerszym zakresie do analizy lotnych związków organicznych. Rozdzielanie jonów jest oparte na pomiarze ich czasu przelotu, czyli prędkości uzyskanych po przyspieszeniu w polu elektrycznym. Jony wyrzucane są z komory jonizacyjnej do rury przelotowej, na końcu, której znajduje się detektor. Im większa jest masa pojedynczo naładowanego jonu, tym dłuższy jest czas jego przelotu. Do detektora docierają, więc jony w kolejności od najlżejszych do najcięższych, w odstępie czasu poniżej 10^{-7} s. Analizatory TOF cechują się umiarkowaną czułością, krótkim czasem odpowiedzi detektora oraz wysoką rozdzielczością [9,20,25,26]. **QTOF – spektrometr mas kwadrupolem i analizatorem czasu przelotu**, charakteryzuje się dobrą rozdzielczością i dokładnym pomiarem masy. Odmianą spektrometru z analizatorem czasu przelotu jest spektrometr hybrydowy QqTOF, będący połączeniem potrójnego kwadrupola ze spektrometrem typu TOF, czyli trzeci kwadrupol został zastąpiony analizatorem czasu przelotu. Tego typu spektrometry znajdują szczególne zastosowanie przy identyfikacji zanieczyszczeń [26,27].

2.2.3. Tandemowe spektrometry masowe

Wśród analizowanych związków wiele może charakteryzować się identyczną lub prawie identyczną masą, dlatego sam pomiar masy cząsteczkowej często nie pozwala na identyfikację związku. Również sam pomiar masy nie dostarcza zbyt wielu informacji na temat struktury chemicznej związku. Dopiero fragmentacja badanych cząsteczek i pomiar mas fragmentów tych cząsteczek dostarcza dużo większej ilości informacji o strukturze związku, co w wielu przypadkach

przekłada się na jego wiarygodne zidentyfikowanie. Sama fragmentacja cząsteczek w źródle jonów spektrometru mas pozwala na efektywne badanie stosunkowo czystych związków lub prostych mieszanin. Podczas analizy mieszaniny cząsteczek fragmentowanych w źródle jonów, można zobaczyć wiele pików odpowiadających masom fragmentów pochodzących od różnych związków. Próba określenia, od którego z badanych związków chemicznych pochodzą fragmenty, których masy zostały zmierzone przez spektrometr, jest bardzo trudne, wręcz niemożliwe. Nasuwa się więc pytanie, w jaki sposób można zatem poprawić zdolność rozdzielczą danego spektrometru. Rozwiązaniem, jest zastosowanie tandemowej spektrometrii mas (MS/MS), czyli połączenie spektrometru z innym analizatorem. W tandemowej spektrometrii mas występują dwa analizatory i komora zderzeń [6-8,11,13,28,29]. Ogólny schemat blokowy układu LC-MS/MS przedstawiono na Rysunku 9.



Rys. 9 Schemat blokowy układu LC-MS/MS.

Powstające w źródle jony pierwotne są rozdzielane w pierwszym spektrometrze (MS1). Następnie jony o wybranym stosunku m/z trafiają do komory kolizyjnej, gdzie w zależności od warunków ulegają rozpadowi lub pozostają niezmienione. W wyniku rozpadu jonów, (fragmentacji), powstają jony potomne. W drugim spektrometrze (MS2), jony są ponownie rozdzielane ze względu na stosunek masy do ładunku. Te z nich, które przejdą przez drugi spektrometr, trafiają do detektora. Pokonując odległość z MS1 poprzez komorę kolizyjną do MS2, część jonów o wybranym stosunku m/z ulega rozproszeniu, przez co maleje wysokość sygnału pochodzącego od badanego związku. Intensywność szumów w MS2 jest jednak o kilka rzędów wielkości mniejsza niż w MS1, przez co stosunek sygnału do szumu rośnie wielokrotnie. To sprawia, że czułość układu tandemowego MS/MS jest znacznie większa niż samego układu MS [3,11,13]. Najpopularniejszymi spektrometrami

umożliwiający pracę w systemie MS/MS są: potrójny kwadrupol, pułapka jonowa oraz tzw. QTRAP i QqTOF.

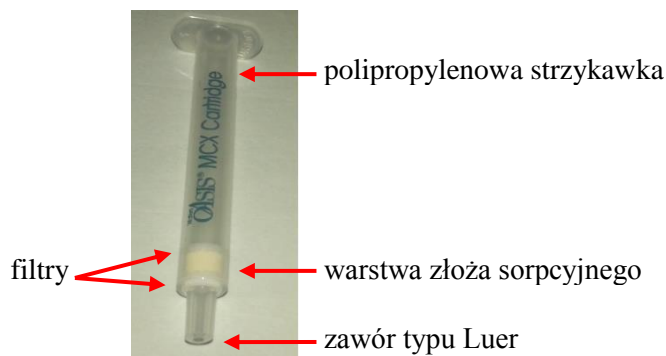
3. PRZYGOTOWANIE PRÓBEK DO ANALIZY

Biorąc pod uwagę fakt, że analizowane substancje występują na poziomie śladów i ultraśladów, szczególną rolę odgrywa etap przygotowania próbek do analizy, w szczególności etap izolacji (usunięcia składników interferujących) oraz wzbogacania. Pobieranie próbki i jej przygotowanie jest bardzo ważnym etapem, rzutującym na całościowy wynik analizy. Procedury pobierania i przygotowywania próbek do analizy są czasochłonne, wymagają dużego nakładu pracy, często również i wysokich kosztów. Celem, właściwego przygotowania próbki do analizy chromatograficznej jest: polepszenie wykrywalności (wzbogacenie próbki), selektywne oddzielenie analitów od innych składników próbki, oraz zmniejszenie obciążenia układu chromatograficznego przez matrycę i zanieczyszczenia [1-5,10,30,31]. Wieloetapowy proces przygotowywania próbek, często powoduje straty analitów, co jest poważnym źródłem błędów, zasadnym więc jest stosowanie takich technik przygotowania próbek, które w jednym etapie obejmują zarówno izolację, jak i wzbogacenie [1-3,30-32]. Próbki ciekłe można przygotować do analizy wykorzystując takie techniki, jak: ekstrakcja ciecz – ciecz (z ang. *Liquid – Liquid Extraction, LLE*) [1,3,6-8,10,30,33], ekstrakcja ciecz - gaz (*Head Space, HS*) [1,3,6-8,30,33], ekstrakcja ciecz- ciało stałe (z ang. *Solid Phase Extraction, SPE*) [3-6,8,30,33], mikroekstrakcja do fazy stałej (z ang. *Solid Phase Microextraction, SPME*) [3-6,30-37] oraz tzw. technika Quechers (z ang. *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) [38-41]. W ostatnim czasie szczególnego znaczenia nabrała technika SPE, która stała się coraz częściej wybieraną techniką w różnorodnych zastosowaniach.

3.1. Ekstrakcja do fazy stałej

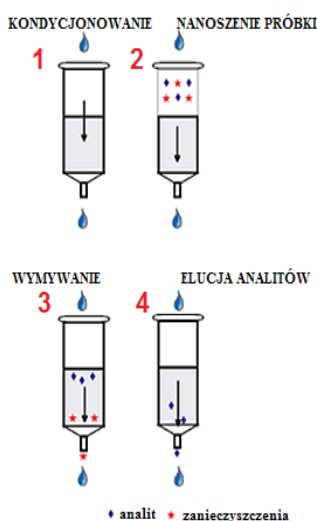
Ekstrakcja do fazy stałej (z ang. *Solid Phase Extraction, SPE*) stanowi doskonałą alternatywę do ekstrakcji w układzie ciecz-ciecz [3-6,8,30,33,42-44]. Łączy ze sobą trzy ważne aspekty: izolację analitów z próbki, wzbogacenie oraz oczyszczanie ekstraktów i usunięcie z nich substancji przeszkadzających (interferentów). Technika SPE polega na przepuszczeniu ciekłej analizowanej próbki przez złożę sorbentu umieszczone w kolumnie ekstrakcyjnej i adsorpcji oznaczanych związków na cząsteczkach złoża. Zaadsorbowane na złożu anality wymywa się niewielką ilością odpowiedniego rozpuszczalnika (metanol, acetonitryl, octan etylu, aceton). Otrzymany po ekstrakcji roztwór poddaje się analizie chromatograficznej. Sorbenty stosowane w technice SPE mogą być umieszczone w kolumnkach ekstrakcyjnych lub w tzw. krążkach ekstrakcyjnych. Zdecydowanie

najwięcej aplikacji jest z zastosowaniem sorbentów umieszczonych w kolumnkach ekstrakcyjnych. Schemat przykładowej kolumnki SPE wykonanej z polipropylenu, przedstawiono na Rysunku 10.



Rys. 10 Schemat kolumnki do SPE na przykładzie Oasis MCX Cartridge.

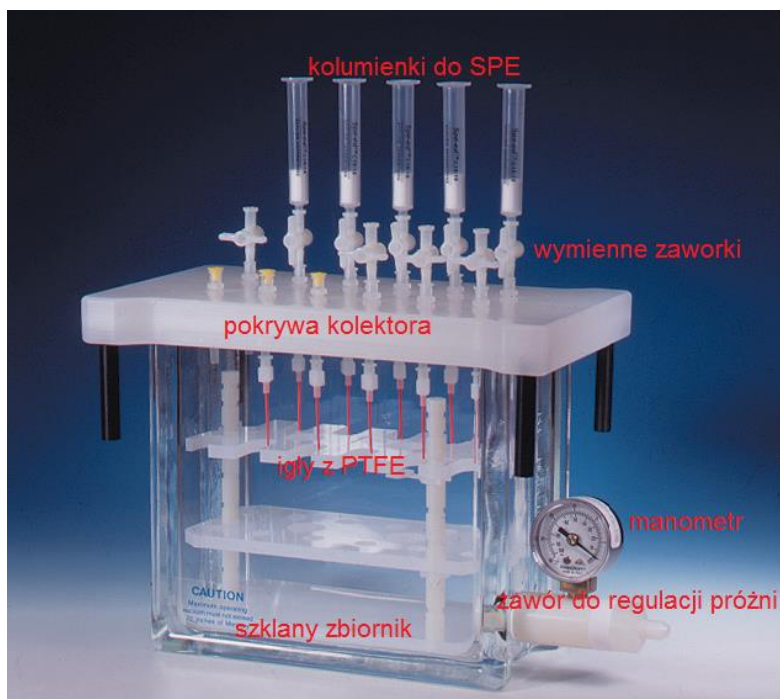
Najczęściej używane są fazy stałe, np. Florisil (SiO_2 , MgO) C18 (oktadecyl na żelu krzemionkowym) oraz żel krzemionkowy. Przy opracowywaniu metodyki ważny jest wybór odpowiedniego sorbenta oraz rodzaju rozpuszczalnika. Poszczególne etapy techniki SPE z zastosowaniem kolumnek ekstrakcyjnych, zilustrowano na Rysunku 11.



Rys.11 Schemat ekstrakcji w układzie cieczi- ciało stałe [42].

Kondycjonowanie ma na celu zaktywowanie złoża przed nałożeniem próbki. Polega na przepuszczeniu przez kolumnkę określonej ilości rozpuszczalnika. Należy uważać, aby nie dopuścić do wyschnięcia złoża pomiędzy etapem kondycjonowania a nałożeniem próbki. Przed nałożeniem próbki na kolumnkę, próbki należy odfiltrować lub odwirować. Natężenie przepływu przez złoże waha się w granicach 5ml/min, w praktyce najczęściej wymuszany jest poprzez zastosowanie podciśnienia. Po przemyciu kolumnki, w celu usunięcia zaadsorbowanych zanieczyszczeń,

zaadsorbowane na złożu anality wymywa się rozpuszczalnikiem. Aby uzyskać wyższy stopień odzysku analitów, rozpuszczalnik dozuje się kilkoma mniejszymi porcjami. Zestaw kilku/ kilkunastu kolumnenek SPE montowany jest w specjalnych urządzeniach do ekstrakcji ciała stałe – ciecz (Rys. 12).



Rys.12 Schemat urządzenia do ekstrakcji wg [45].

System ekstrakcyjny SPE umożliwia równoczesne prowadzenie 12 lub 24 ekstrakcji z zastosowaniem 12 lub 24 kolumnenek SPE. Wszystkie istotne części zestawu wykonane są z PTFE (politetrafluoroetylenu) lub szkła boro krzemianowego. Technika SPE jest tania, łatwa i możliwa do wykonania przy użyciu prostej aparatury i małej ilości rozpuszczalników. Dodatkowo, technika SPE umożliwia uzyskanie niższych wartości LOD (z ang. *Limit of Detection*), lepszego oddzielenia analitów od matrycy organicznej oraz uzyskanie ekstraktu bardziej zateżonego niż w przypadku ekstrakcji ciecz-ciecz. Wszystkie te cechy powodują, że technika ekstrakcji do fazy stałej jest coraz częściej wykorzystywana do przygotowywania próbek. Dzięki odpowiedniemu dobraniu złoża oraz parametrów procesu ekstrakcji, możliwe jest uzyskanie wysokich wartości odzysków i zadowalającego stopnia separacji analitów od matrycy [2-3,6-8,42,43].

3.2. Technika QuECHERS

Technika QuEChERS została opracowana w 2003 roku, dla potrzeb oznaczania pozostałości pestycydów w próbkach owoców i warzyw o dużej zawartości wody. Z założenia ma to być: szybka, prosta, tania, efektywna i bezpieczna (QuEChERS, z ang. *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) [38-41]. Zaletą tej techniki jest niewielkie zużycie próbki (ok. 5-10 g) i odczynników, w tym również szkodliwych dla zdrowia rozpuszczalników. Jest to stosunkowo prosta i szybka technika, w której wykorzystuje się jedynie wytrząsanie i wirowanie. Technika ta charakteryzuje się dobrymi efektami w usuwaniu matrycy i wysokimi odzyskami analitów [47].

Technika QuEChERS opiera się na następujących etapach:

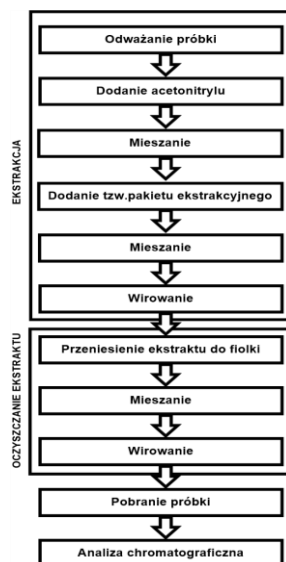
I. Etap ekstrakcji

1. Homogenizacja próbki
2. Odważenie próbki
3. Dodanie acetonitrylu (ok 10 ml)
4. Intensywne mieszanie
5. Dodatek tzw. pakietu ekstrakcyjnego (ok 1g NaCl, 4 g MgSO₄, cytrynian i wodorocytrynian). NaCl – daje efekt wysalania, MgSO₄ – usuwa nadmiar wody, cytrynian i wodorocytrynian działają jako bufor.
6. Intensywne mieszanie
7. Wirowanie

II. Etap oczyszczania ekstraktu

1. Przeniesienie ekstraktu do fiolki ze złożem sorbentu (tzw. dyspersyjna wersja techniki SPE). Najczęściej sorbentem jest PSA (25mg na 1ml roztworu)
2. Dodatek 5% roztworu kwasu mrówkowego w acetonitrylu, celem osiągnięcia pH około 5
3. Intensywne mieszanie
4. Wirowanie
5. Pobranie próbki ekstraktu
6. Analiza chromatograficzna na HPLC lub GC

Schemat techniki QuEChERS został przedstawiony na Rysunku 13



Rys. 13 Schemat techniki QuEChERS wg[47].

W typowych aplikacjach technikę QuEChERS, wykorzystuje się w połączeniu z takimi technikami sprzężonymi, jak: GC-MS lub HPLC-MS/MS [47]. Zastosowanie techniki QuEChERS umożliwia jednoznaczną identyfikację i oznaczanie badanych związków w matrycach, w których znajdują się liczne związki interferujące. Obecnie za pomocą techniki QuEChERS oznaczane są m.in. pozostałości leków weterynaryjnych w mleku, jajach, mięsie, mikotoksyny, różnego rodzaju leki, trihalometany w glebie, pozostałości pestycydów w ryżu, soku owocowym, winie, przetworach dla dzieci itp. produktach [47,48,49,50].

4. MOŻLIWOŚCI APLIKACYJNE CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ SPRZĘŻONEJ ZE SPEKTROMETRIĄ MAS

Technika LC-MS/MS dzięki wysokiej selektywności i dużej czułości spełnia ważną rolę w obszarze współczesnych badań naukowych. O tym, że jest to jedna z najbardziej uniwersalnych technik, o dużym znaczeniu analitycznym, świadczą liczne przykłady jej zastosowań. Najważniejsze z nich to: zastosowanie w diagnostyce medycznej, farmacji, kontrola antydopingowa i narkotykowa, badania dotyczące bezpieczeństwa żywności oraz ocena ryzyka narażenia zawodowego i środowiskowego na różnorodne substancje [3,8,15].

4.1. Zastosowanie techniki LC-MS/MS w diagnostyce medycznej i farmacji

Technika LC-MS/MS zyskała ogromne zainteresowanie w analityce medycznej ze względu na tak istotne cechy, jak: wysoka czułość, dokładność i selektywność. Dodatkowo tandemowa spektrometria mas umożliwia ilościowe oznaczanie związków mało i średnicząsteczkowych w złożonych matrycach, bez konieczności ich wcześniejszego rozdzielania na kolumnie analitycznej. Fakt ten ma szczególne znaczenie przy oznaczaniu śladowych ilości analitów we krwi, moczu, czy innych płynach ustrojowych [15,16,51-54]. Tandemowa spektrometria mas zyskała przewagę nad klasycznymi testami wykrywającymi **wady metaboliczne**, dzięki możliwości równoczesnego oznaczania wielu różnorodnych parametrów w czasie jednej analizy. Dzięki temu możliwe staje się badanie w kierunku grupy wad na podstawie analizy z jednej próbki krwi. Jedną z najpopularniejszych aplikacji diagnostycznych wykorzystujących technikę LC-MS/MS są badania przesiewowe noworodków. Zastosowanie tandemowej spektrometrii mas w **badaniach przesiewowych noworodków** umożliwia oznaczanie profilu estrów karnityny i wybranych aminokwasów, które są nieprawidłowe w ponad 20 wrodzonych chorobach metabolicznych. Analiza takich aminokwasów, jak: fenyloalanina, leucyna, metionina, tyrozyna, czy też homocysteina, stosowana jest do diagnostyki tyrozydemii, choroby syropu klonowego, czy diagnostyki hiperfenyloalaninemii [8,28]. Należy podkreślić, że tandemowa spektrometria mas, jako jedyna technika umożliwia oznaczanie estrów karnityny w celu wykrycia deficytu dehydrogenazy CoA średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych (MCAD) dość częstej, (ok 1: 10000) wady genetycznej, która może prowadzić do zgonu. Szerokie zastosowanie techniki LC-MS/MS w badaniach przesiewowych wynika również z faktu, że do wykonania badania potrzebna jest bardzo mała ilość próbki (kilka kropli krwi) [28]. **Terapeutyczne monitorowanie leków** w płynach ustrojowych jest jednym z ważnych obszarów zastosowań techniki LC-MS/MS. Terapia monitorowana stężeniem leku we krwi (z ang. *Therapeutic Drug Monitoring, TDM*) zwana również terapeutycznym monitorowaniem leków, to działanie, które ma na celu optymalizację dawkowania leku indywidualnie u każdego pacjenta. Ma to szczególne znaczenie w przypadku leków nowo wprowadzonych, których właściwości oraz farmakokinetyka nie są do końca poznane. Terapia monitorowana pozwala śledzić postępy leczenia i indywidualnie dostosowywać dawkowanie, z uwagi na międzyosobnicze różnice w metabolizmie leków [55]. Koncepcja medycyny spersonalizowanej (z ang. *Personalised Healthcare lub Personalised Medicine*), opiera się na zrozumieniu różnic między pacjentami chorującymi na tę samą chorobę i poznawaniu złożonych mechanizmów różnych schorzeń. Wymagania i oczekiwania względem medycyny spersonalizowanej są bardzo duże, toteż wprowadzenie w życie tej koncepcji, wiąże się z dużym wyzwaniem dla chemików analityków. Zastosowanie TDM w warunkach klinicznych, wymaga zastosowania specyficznych i selektywnych metod pobierania i przygotowywania próbek oraz sprzężonych technik analitycznych [15,16]. Większość procedur wykorzystywanych do oznaczania leków i ich metabolitów w próbkach

biologicznych, opiera się na wykorzystaniu technik wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej, sprzężonej ze spektrometrią mas. Wysoka czułość i selektywność techniki, pozwala na oznaczanie bardzo małych stężeń leków w próbkach biologicznych o małej objętości [8,13,51,54,55-57]. Ten aspekt jest szczególnie ważny u dzieci, gdzie często pobranie większej ilości krwi jest dużym problemem. Obecnie technikę LC-MS/MS szeroko wykorzystuje się w terapii monitorowanej leków immunosupresyjnych, leków przeciwwirusowych, przeciwnowotworowych oraz substancji psychoaktywnych [8,55-57]. Spośród podstawowych leków immunosupresyjnych, inhibitory kalcyneuryny – cyklosporyna (CSA) i takrolimus (TAC) oraz inhibitory mTOR – ewerolimus (EWE) i syrolimus (SYR), wymagają oznaczania stężenia we krwi pełnej, natomiast kwas mykofenolowy (MPA), powinien być oznaczany w osoczu. Obecnie pomiar stężenia leków immunosupresyjnych, opiera się na metodykach immunochemicznych. Największym problemem metod immunochemicznych jest brak wystarczającej specyficzności, jak również wysoka cena stosowanych odczynników. Doskonałą alternatywą wydają się być techniki chromatograficzne. W Pracowni Farmakologii Klinicznej i Terapii (PFKiT) została wdrożona technika ultrasprawnej chromatografii cieczerwowej połączonej z tandemową spektrometrią mas, umożliwiającą jednoczesną analizę CSA, TAC, EWE i SYR w próbkach krwi pełnej. Opracowana metoda została zwalidowana, a uzyskane parametry walidacji (specyficzność, liniowość, powtarzalność), spełniły wymogi stawiane metodom bioanalitycznym przez EMA – Europejską Agencję Leków [56]. Technika LC-MS/MS stosowana jest również do oznaczenia w osoczu 17 alfa-hydroksyprogesteronu (metabolicznego prekursora kortyzolu), którego podniesione poziomy są markerami wrodzonego przerostu nadnerczy. Choroba ta może prowadzić do śmierci, tylko wcześnie postawiona diagnoza niesie nadzieję na jej wyleczenie. Czułość i specyficzność techniki LC-MS/MS, sprawia, że otrzymane wyniki są dokładniejsze niż badania biochemiczne, wykonywane w kierunku wykrycia tej choroby [8]. **Witamina D**, występuje w dwóch formach, jako witamina D₂ (ergokalcysterol) i D₃ (cholekalcyferol). Witamina D₂ występuje w roślinach i grzybach, natomiast witamina D₃ jest wytwarzana w organizmach zwierzęcych. Witamina D, oprócz swej sztanarowej roli w układzie kostno - szkieletowym, bierze udział w wielu procesach metabolicznych. Zapobiega chorobom układu sercowo-naczyniowego, chorobom autoimmunologicznym, nowotworom, a także niektórym chorobom psychicznym [8,21,22]. Wykazano, że aktywna postać witaminy D może wpływać na ekspresję ponad 200 genów. Głównymi metabolitami witaminy D, jest 25(OH) witamina D, czyli 25(OH) cholekalcyferol i 25(OH) ergokalcysterol oraz 1,25 (OH)₂ witamina D₃ (kalcytriol). Obecnie większość oznaczeń witaminy D, przeprowadza się z użyciem metod immunoenzymatycznych, które pozwalają oznaczyć całkowity poziom 25(OH) cholekalcyferolu i ergokalcysterolu lub tylko formy D₃. Złotym środkiem okazuje się być technika LC-MS/MS zapewniająca większą precyzję pomiarów i co najważniejsze oznaczenie obu form witaminy niezależnie. Oznaczenie witaminy D, której stężenie w surowicy krwi jest na poziomie ng/ml, jest wykonywane na większości dostępnych obecnie na rynku potrójnych kwadrupoli. W Tabeli 1 podano zakresy stężeń 25 (OH) witaminy D₃ w surowicy krwi [21,22].

Tab. 1 Zakresy stężeń 25 (OH) witaminy D₃

Zakresy stężeń 25(OH) witaminy D ₃ w surowicy		
	[ng/ml]	[nmol/l]
deficyt	0-10	0-25
niedobór	> 10-20	> 25 - 50
hipowitaminoza	> 20-30	> 50-75
stężenie zalecane	> 30-80	> 75-200

Badania z ostatnich lat wykazały, że dodatkowo u niemowląt występuje forma epimeryczna C-3 hydroksy epimer 25(OH) witaminy D₃. Rutynowe oznaczanie tego epimeru u niemowląt, możliwe jest tylko dzięki zastosowaniu techniki LC-MS/MS z trybem MRM. Warto wspomnieć, że istnieją takie jednostki chorobowe, w których powinno się oznaczać nie 25 (OH) witaminę D, a 1,25(OH)₂ witaminę D lub oba te związki równocześnie. Dotyczy to np. niewydolności nerek, w której dochodzi do spadku stężenia 1,25(OH)₂ witaminy D₃ (kalcytriolu). W zależności od metody oznaczenia i norm laboratoryjnych wartości prawidłowe kalcytriolu wahają się w granicach 50-150 pmol/l tj. 20-60 pg/ml. Z uwagi na fakt, że zakres stężenia 1,25(OH)₂ witaminy D₃ jest na poziomie pg/ml (tj 1000 razy niższym niż dyskutowane wcześniej metabolity), oznaczenie tego metabolitu możliwe jest tylko na najczulszych systemach LC-MS/MS [21,22]. Technika LC-MS/MS znalazła zastosowanie do oznaczania szerokiego spektrum **leków przeciwdepresyjnych** (amitryptyliny, chlorpromazyny, klomipraminy, doksepinu, fluoksetyny, lewomepromazyny, maprotyliny, paroksetyny, perazyny, promazyny, sertraliny, tiorydazyny) we krwi [52-54]. Takie wielokierunkowe badania, na oznaczenie w jednym toku analitycznym więcej niż jednego leku, znajdują zastosowania w toksykologii klinicznej, gdzie materiał przekazywany do badań dostarczany jest często w niewielkich ilościach. Metody oznaczania wybranych leków przeciwdepresyjnych z zastosowaniem techniki LC-MS/MS pozwalają na wykrycie w/w związków na poziomie ng/mL [52-54]. Wykazano również możliwość wykorzystania paznokci, jako materiału alternatywnego do oznaczania leków przeciwdepresyjnych (na przykładzie flupentixolu) z zastosowaniem techniki LC-MS/MS [52-53]. Technika LC-MS/MS jest również wykorzystywana do wykrywania benzodiazepin (grupy leków o działaniu przeciwlękowym, uspokajającym, nasennym) w moczu [15,16, 57-59]. Inne obszary zastosowań techniki LC-MS/MS to **diagnostyka chorób układu pokarmowego** [3,8,15,16], **diagnostyka chorób neurodegradacyjnych, w tym choroby Alzheimera** [3,8]. Omawiając zastosowania techniki LC-MS/MS nie sposób pominąć, aplikacji w terapii chorób alergicznych, do jednoczesnej identyfikacji w osoczu pseudoefedryny i cetyryzyny, substancji czynnych leków przeciw

histaminowych [3,8]. Technika LC-MS/MS doskonale sprawdza się w oznaczeniach leków przeciwwirusowych. **Analizy leków przeciwwirusowych** są trudnymi analizami z uwagi na podobieństwo struktury chemicznej leku i substancji produkowanych w organizmie. Rozróżnienie leku od substancji endogennych, wymaga stosowania czułych i selektywnych metod. Takie kryteria spełnia LC-MS/MS, którą stosuje się m.in. w analizie leku o nazwie valganciclovir oraz jego aktywnego metabolitu gancicloviru [3,8,15,16]. Valganciclovir jest lekiem przeciwwirusowym, stosowanym u osób z obniżoną odpornością. Technika LC-MS/MS znajduje również zastosowanie w **kontroli dopingowej**, przede wszystkim ze względu na uzyskiwanie niskich granic wykrywalności [3,8]. Metoda LC-MS/MS sprawdza się w oznaczaniu takich zakazanych substancji jak: amfetamina, metamfetamina, czy kokaina [3].

4.2. Zastosowanie techniki LC-MS/MS w analizach środowiskowych

Rozwój nowych, czułych technik analitycznych, pozwalających na wykrywanie i oznaczanie związków chemicznych na coraz to niższym poziomie stężeń, odbija się echem w badaniach środowiskowych. Uwaga naukowców skupia się na tzw. nowopojawiających się **zanieczyszczeniach środowiska**. Mowa tutaj o związkach wchodzących w skład produktów używanych w życiu codziennym: leki i ich metabolity, związki powierzchniowo czynne i ich pochodne, środki higieny osobistej, środki odkażające, dodatki do benzyny [3,13,15,60]. Dużym problemem wydają się być antybiotyki, (ze względu na ich potencjalny wpływ na zmiany genetyczne opornych im bakterii) oraz związki zakłócające równowagę hormonalną (z ang. *Endocrine Disrupting Compounds, EDC's*) [3,13,15,60]. W/w klasy związków, są przedmiotem zainteresowania ze strony naukowców ze względu na wprowadzanie do środowiska znacznych ilości tych substancji, jak również z uwagi na ich aktywność biologiczną. Los farmaceutyków w środowisku jest bardzo skomplikowany, a potencjalnych możliwości narażenia człowieka jest wiele. Farmaceutyki mogą przekształcać się w toksyczne metabolity na drodze skomplikowanych reakcji, a te z kolei mogą dalej ulegać transformacjom w związki, które mogą być jeszcze bardziej szkodliwe. Z uwagi na niski poziom stężeń farmaceutyków i ich metabolitów (poziom $\mu\text{g/l}$, a nawet ng/l), konieczny jest etap wzbogacania. Procedury wykorzystywane do oznaczania farmaceutyków w wodach i ściekach, najczęściej uwzględniają ekstrakcję do fazy stacjonarnej na etapie przygotowania próbki oraz chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas na etapie badań końcowych. Również pod względem właściwości fizykochemicznych w/w związków (polarność, hydrofilowość) technika LC-MS/MS wydaje się być najbardziej odpowiednią. Istnieją procedury analityczne z zastosowaniem techniki LC-MS/MS, które umożliwiają oznaczenie farmaceutyków nawet na poziomie pg/l [15,54,60-61]. Ogromną zaletą wykorzystania tandemowego spektrometru mas jest możliwość ilościowego

oznaczania związków bez konieczności ich rozdzielania. Technika LC-MS/MS wykorzystywana jest również w badaniach środowiskowych do oznaczania **biomarkerów narażenia zawodowego** np. na benzen, czy styren w próbkach moczu [62]. Technika LC-MS/MS znajduje szerokie zastosowanie w analizach związanych z **kontrolą jakości pożywienia**, np. pod kątem zawartości mikotoksyn, pestycydów, czy też akryloamidu [15,63].

4.3. Zastosowanie techniki LC-MS/MS w badaniu ekstraktów roślinnych

Kolejnym z obszarów badawczych, gdzie obserwuje się wzrost zapotrzebowania na czułe, szybkie, selektywne i wiarygodne metody analityczne i gdzie technika LC-MS/MS odgrywa kluczową rolę, jest analiza substancji pochodzenia roślinnego [64]. Analiza metabolomów tkanek roślin nie jest łatwym zadaniem, wymaga skomplikowanej obróbki badanych tkanek, o czym mowa w rozdziale 6. W literaturze znajduje się wiele doniesień o zastosowaniu techniki LC-MS/MS w analizie takich fitohormonów roślinnych jak: kwas jasmonowy (JA), kwas salicylowy (SA) i kwas abscysynowy (ABA). Związki te występują w tkankach roślinnych w niewielkich ilościach i są zaliczane do endogennych regulatorów wzrostu i rozwoju roślin [65-68]. W ciągu ostatnich lat nowoczesne metody chromatograficzne, w tym technika LC-MS/MS znalazły również zastosowanie w analizach flawonoidów i saponin. Saponiny i flawonoidy są bioaktywnymi składnikami roślin, posiadającymi szereg właściwości przeciwutleniających, przeciwbakteryjnych oraz owadobójczych [64]. Również w badaniach proteomicznych, technika LC-MS/MS ma swój znaczący udział [1,69-72]. Brak kompletnie zsekwencjonowanych genomów roślinnych, będących obiektem zainteresowań naukowców, utrudnia identyfikację wyizolowanych już białek. Do identyfikacji białek, oprócz klasycznej metody degradacji Edmana, wykorzystuje się techniki oparte na spektrometrii mas, w tym LC-MS/MS wyposażony w źródło jonizacji poprzez elektrorozpraszanie (ESI) [1,70-72]. Proteomiczna analiza ziaren słonecznika z użyciem techniki LC-MS/MS posłużyła do wyselekcjonowania odmian odpowiednich do uprawy pod względem zawartości olejów [70]. Badania wykazały, że zawartość olejów związana jest z metabolizmem węglowodorów i syntezą białek. Autorzy pracy [71] badali zmiany w proteomie rzepaku. Stosując technikę MALDI oraz LC-MS/MS zidentyfikowali grupę ponad 500 białek, co wskazywało, że z rozwojem nasion rzepaku, związane są zmiany wielu szlaków metabolicznych, głównie cukrów. Jeszcze innym obszarem zastosowań proteomiki jest badanie alergenów w żywności. Porównawcza analiza białek zawartych w nasionach różnych genotypów jest kluczowa dla identyfikacji i eliminacji potencjalnych alergenów. Wykorzystując technikę LC-MS/MS w nasionach soi wykryto i zidentyfikowano podjednostki α i β – konglicynin, których zawartość była różna w zależności od odmiany. Wykazano również, jakie białka są odpowiedzialne za reakcje alergiczne [72].

5. AGILENT 6460 TRIPLE QUAD LC/MS

W pracy przedstawiona zostanie budowa jednego z najnowocześniejszych systemów reprezentujących techniki sprzężone – chromatografii ciekowej z tandemowym układem spektrometrów mas. W Zakładzie Fizykochemii Ekosystemów IFJ PAN Kraków, pracuje układ *Agilent 6460 Triple Quad LC/MS*, połączony z ultrasprawnym chromatografem ciekowym *Agilent 1290 Infinity* (Rys.14). Poniżej omówiono warunki pracy tych urządzeń oraz tryby pracy potrójnego kwadrupola MS.



Rys.14 Układ LC-MS/MS pracujący w Zakładzie Fizykochemii Ekosystemów IFJ PAN.

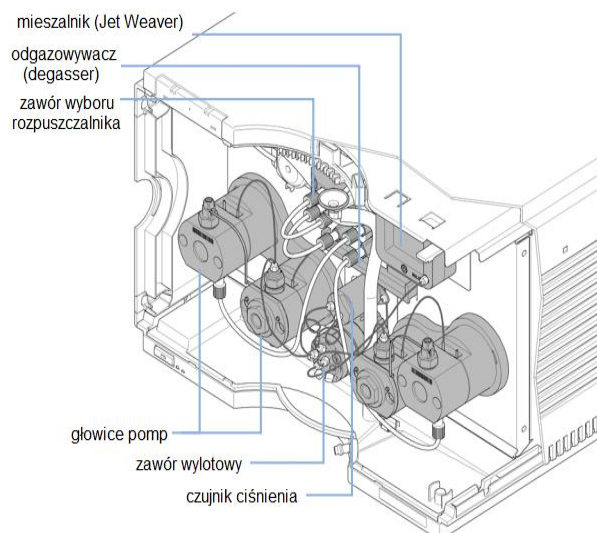
5.1. Ultrasprawnym chromatograf ciekowy *Agilent 1290 Infinity*

System *Agilent 1290 Infinity* jest ultrasprawnym chromatografem ciekowym, składającym się z następujących modułów: wysokociśnieniowa pompa podwójna (*binary pump*), automatyczny podajnik próbek (*autosampler*), termostat kolumn oraz na samej górze – nadstawka na butelki z rozpuszczalnikami. Układ modułów w systemie *Agilent 1290 Infinity* w IFJ PAN Kraków zaprezentowano na Rysunku 15.



Rys 15. Agilent 1290 Infinity

System *1290 Infinity*, jako ultrasprawy chromatograf cieczowy, może pracować pod ciśnieniem do 1200 barów, przy przepływie do 5ml/min. Wysoka wartość osiąganego ciśnienia pozwala na szybkie chromatografowanie z użyciem krótkich kolumn. Długie kolumny z mniejszym uziarnieniem charakteryzują się lepszą sprawnością i wyższą rozdzielczością, co ma istotne znaczenie w analizie złożonych próbek. System wyposażony jest w termostat kolumn tzw. *Thermostatted Column Compartment (TCC)* zapewniający możliwość regulacji w zakresie od 10°C poniżej temperatury otoczenia, do 80°C (przy przepływie 5 ml/min) do nawet 100°C (przy przepływie rzędu 2.5 ml/min). System zawiera automatyczny podajnik próbek do dozowania małych objętości, co zapewnia małą objętość martwą. Nowe, inertne materiały, pomagają w osiągnięciu niskiego efektu przenoszenia między poszczególnymi dozowaniami. Na podstawie danych literaturowych, szacuje się, że w przypadku potrójnego kwadrupola, efekt przenoszenia nie powinien być większy niż 0,002 %. System *Infinity*, pobiera dokładnie nastawioną objętość próbki bez żadnych strat w zakresie dozowania od 1 do 40µl. Standardowo instalowana kapilara pozwala na nastrzyk do 20µl. Tacka na próbki w podajniku zawiera 10 stałych miejsc na fiołki oraz układ dwóch wymiennych tacek na 54 fiołki o objętości 2ml. Podajnik próbek może być dodatkowo termostatowany. System *Agilent 1290 Infinity Binary Pump*, zawiera w jednej obudowie: system dwóch identycznych pomp wysokociśnieniowych, dwukanałowy odgazowywacz (z ang. *degasser*), czterokanałowy zawór wyboru rozpuszczalnika oraz mieszalnik typu *Jet Weaver* o małej objętości. System *Agilent 1290 Infinity Binary Pump* (Rys. 16).



Rys.16 System Agilent 1290 Infinity Binary Pump [64].

Mieszalnik typu *Jet Weaver* jest nowoczesnym systemem mieszania rozpuszczalników w oparciu o technologię mikroprzepływów. Poprzez zastosowanie odgazowywacza zyskuje się większą stabilność przepływu oraz zwiększenie czułości detektora. Pompa tworzy mieszanekę dwóch różnych rozpuszczalników z wybranych kanałów A i B. Ważne jest, aby nie mieszać dwóch rozpuszczalników z kanału A, ani dwóch z kanału B. W przypadku złożonych próbek wykorzystuje się metody gradientowe. W wielu aplikacjach stosuje się szeroki gradient od 5 do 95 % rozpuszczalnika organicznego, aby zapewnić możliwie jak największą elastyczność próbek o nieznanym składzie. W Tabeli 2 zestawiono parametry techniczne systemu *Agilent 1290 Infinity*.

Tab. 2 Parametry techniczne systemu *Agilent 1290 Infinity*

Chromatograf cieczowy Agilent 1290 Infinity	
zakres przepływu	0,001-5,000 ml/min
precyzję przepływu	0,07% RSD
dokładność przepływu	0,001ml/min
maksymalne ciśnienie	1200bar
zakres dozowania próbki	od 1 – 40 μ l
precyzja dozowania próbki	0,25% RSD
błąd przenoszenia próbki (<i>carry over</i>)	0,002%
zakres termostatowania próbek	4 – 40°C
zakres termostatowania kolumny	od 10 – 100°C
ilość próbek autosamplera	układ 2 tacek na 54 fiołki

5.2. Potrójny kwadrupol MS firmy Agilent

Agilent Triple Quad LC/MS może pracować w konfiguracji z różnymi źródłami jonów: ESI lub APCI (stosowane wymiennie). Spektrometr wyposażony w źródło ESI zapewnia czułość na poziomie femtogramów. W tabeli 3 zestawiono parametry techniczne sprzętu LC-MS/MS.

Tab. 3 Parametry techniczne LC-MS/MS

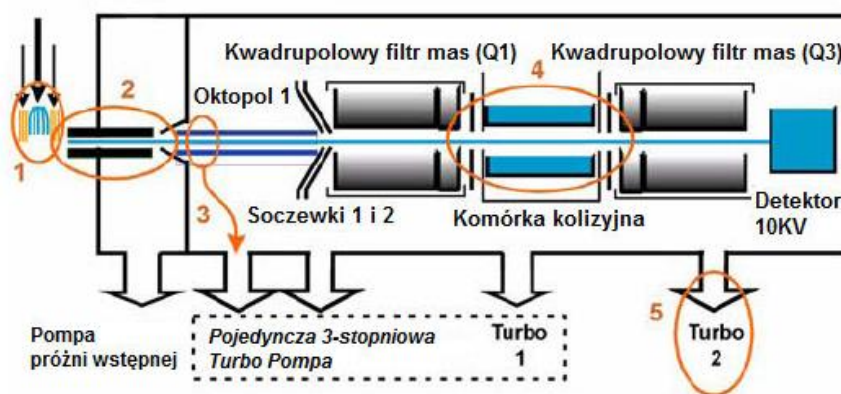
Spektrometr masowy Agilent 6460 Triple Quad LC/MS	
czułość S/N (peak to peak)	7394,1
rozdzielczość masowa	0,7 amu/FWHM
stabilność mas	0,1 amu w ciągu 24h
zakres mas	5-3000 amu
zakres dynamiczny	6,0·10 ⁶
szybkość skanowania	5200 amu/s
czas MRM [dwell time]	1ms
czas zmiany polaryzacji	30ms
dokładność masowa	0,1 amu dla zakresu 5-1000 amu

Agilent Triple Quad LC/MS, sterowany jest programem *Agilent Mass Hunter Workstation*, składającym się z trzech podprogramów:

- *Data Acquisition* – do zbierania danych
- *Quantitative Analysis* – do analizy ilościowej
- *Qualitative Analysis* – do analizy jakościowej

Potrójny kwadrupol spektrometru mas składa się ze źródła jonów, systemu soczewek, który kieruje jony do pierwszego kwadrupola (Q1 (MS1)) ze źródła jonów (ESI lub APCI) (rys. 15). Kwadrupol stanowi układ czterech równoległych, hiperbolicznych prętów, przez które filtrowane są jony o wybranym stosunku m/z, przed wejściem do komórki kolizyjnej. Rolę komórki kolizyjnej może spełniać kwadrupol, heksapol, oktopol. W prezentowanym urządzeniu komórkę kolizyjną zwyczajowo nazywana jest drugim kwadrupolem (Q2), ale w rzeczywistości jest heksapolem - układem sześciu prętów pokrytych opornym materiałem, używanym do generowania różnicy potencjałów. Heksapol jest optymalnym rozwiązaniem zarówno dla skupiania, jak i przesyłania jonów. Aby zapewnić ruch

jonów prekursorowych w stronę trzeciego kwadrupola (Q3 (MS2)), napięcie na komórce kolizyjnej musi być inne niż na kwadrupolach. Komórka kolizyjna wypełniona jest gazem inertnym, takim samym, jaki jest używany w źródle jonów – azotem lub argonem. W przypadku układu pracującego w IFJ PAN Kraków jest to azot 6.0 (*Linde gas*). Napięcie generujące energię kolizyjną powoduje powstawanie fragmentów jonów. Powstające w komórce kolizyjnej fragmenty jonów, są kierowane do trzeciego kwadrupola (Q3 (MS2)), gdzie odbywa się etap filtrowania. Filtrowanie jonów w trzecim kwadrupolu umożliwia izolację i badanie wielu przemian jonów prekursorowych do jonów potomnych (tryb pracy MRM). Schemat budowy potrójnego kwadrupola MS firmy Agilent przedstawiono na Rysunku 17.



Rys. 17 Schemat potrójnego kwadrupola MS 6460 firmy Agilent. Nowatorskie rozwiązania firmy Agilent w stosunku do poprzedniego modelu urządzenia zaznaczono numerami od 1-5 (wyjaśnienie w tekście)[23]

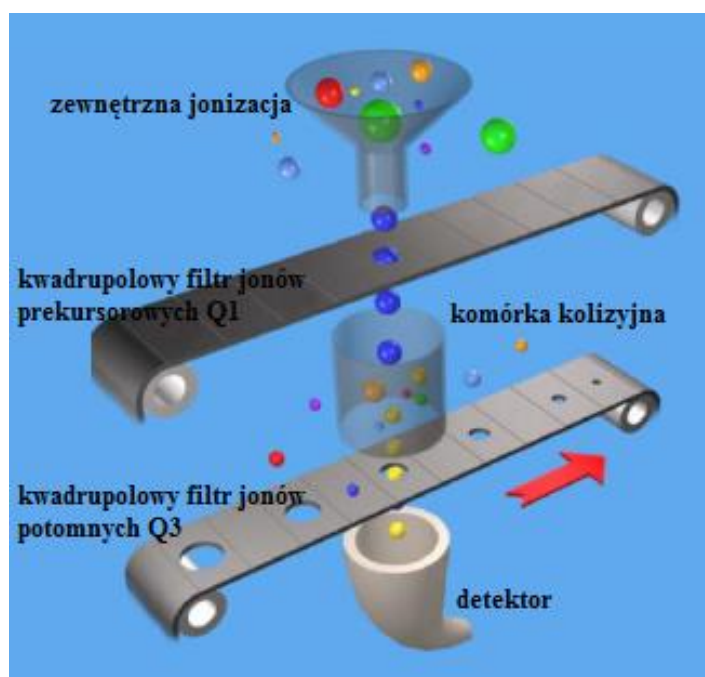
W stosunku do wcześniejszego modelu potrójnego kwadrupola, firma Agilent wprowadziła nowe rozwiązania (Rys. 17).

- 1.** Agilent Triple Quad 6460 jest kwadrupolem, w którym wykorzystywana jest technologia *Jet Stream*, ułatwiająca oddzielenie rozpuszczalnika od analitu. Zastosowanie technologii *Jet Stream* zapewnia maksymalną jonizację, w wyniku czego większa ilość jonów dostaje się do kapilary próbującej, co w rzeczywistości przekłada się na lepszy stosunek sygnału do szumów (S/N).
- 2.** Po jonizacji jony wchodzi do spektrometru mas, poprzez nowatorski, przewód kapilarny, co usprawnia przepływ jonów oraz natychmiastowe przełączanie polarności.
- 3.** Jony, po przejściu przez trzeci kwadrupol są wykrywane z wykorzystaniem detektora o wysokiej energii. W układzie Agilent Triple Quad 6460 dodana została druga turbo pompa, aby zwiększyć szybkość pompowania oraz zwiększyć próżnię, co skutkuje zwiększeniem poziomu detekcji oraz poprawia stosunek sygnału do szumu.

4. Komórka kolizyjna, po nowatorskich rozwiązaniach firmy Agilent posiada przyspieszenie osiowe dla dużych prędkości analizy MS/MS.
5. Została dodana druga turbo pompa, aby zwiększyć prędkość pompowania jonów do trzeciego kwadrupola. Rozwiązanie to poprawia stosunek sygnału do szumów i zwiększa limit detekcji potrójnego kwadrupola.

5.3. Tryby pracy potrójnego kwadrupola MS

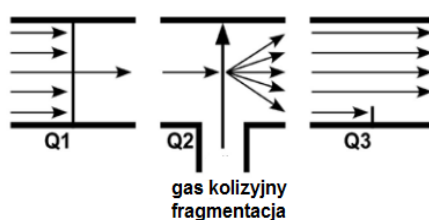
Potrójny kwadrupol może pracować w różnych trybach. Rysunek 18 przedstawiający ideowy schemat pracy potrójnego kwadrupola pozwalający zrozumieć poszczególne tryby pracy urządzenia. Kwadrupolowe analizatory mas zostały przedstawione jako ruchome pasy. W ten sposób zilustrowano zmianę potencjałów prętów kwadrupolowych i możliwość przepuszczenia tylko określonych jonów. Między dwoma pasami przedstawiającymi kwadrupole Q1(MS1) i Q3 (MS2), znajduje się komórka kolizyjna Q2, w której zachodzi fragmentacja jonów.



Rys.18 Model działania potrójnego kwadrupola MS [23].

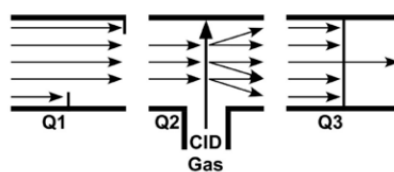
W trybie **MS2 SCAN** wyłączony jest pierwszy kwadrupol Q1(MS1) i komora kolizyjna. Na trzecim kwadrupolu Q3(MS2) zachodzi skanowanie wszystkich jonów. W trybie **MS2 SIM** – wyłączony jest pierwszy kwadrupol i komora kolizyjna, na trzecim kwadrupolu Q3 (MS2) zachodzi skanowanie wybranego jonu o konkretnym m/z. Tryb **Product Ion Scan** jest najmniej czułym trybem pracy potrójnego kwadrupola. W trybie *Product Ion Scan* – w pierwszym kwadrupolu Q1(MS1)

wybiera się/skanuje jeden konkretny jon macierzysty (prekursorowy) o zdefiniowanej wartości m/z (zatrzymany pas Q1 – skanowanie jednego jonu (rys.18)), w celi kolizyjnej, wypełnionej gazem, następuje jego fragmentacja (z ang. *Collision Induced Dissociation, CID*), na trzecim kwadrupolu Q3 (MS2) (ruchomy pas Q3 (rys.18)) zachodzi skanowanie wszystkich powstałych jonów potomnych. Otrzymuje się widmo jonów potomnych. Celem stosowania trybu *Product Ion Scan* jest poszukiwanie produktów fragmentacji jonu macierzystego. Ten tryb pracy określany jest również jako tryb pełnego skanowania MS/MS. Schemat pracy potrójnego kwadrupola w trybie *Product Ion Scan* zilustrowano na Rysunku 19.



Rys.19 Diagram trybu pracy *Product Ion Scan* [16].

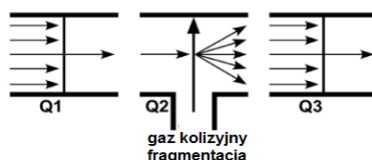
W trybie *Precursor Ion Scan* - w pierwszym kwadrupolu odbywa się skanowanie wszystkich jonów macierzystych (ruchomy pas Q1 (Rys.18)), w celi kolizyjnej zachodzi ich fragmentacja, na trzecim kwadrupolu zachodzi skanowanie jonu potomnego o zdefiniowanej wartości m/z (zatrzymany pas Q3 – nastawiony na konkretną wartość m/z (Rys.18)). Otrzymuje się widmo jonów macierzystych. Celem stosowania trybu *Precursor Ion Scan* jest poszukiwanie jonów macierzystych generujących konkretny produkt. Schemat trybu *Precursor Ion Scan* zilustrowano na Rysunku 20.



Rys. 20 Diagram trybu pracy *Precursor Ion Scan* [16].

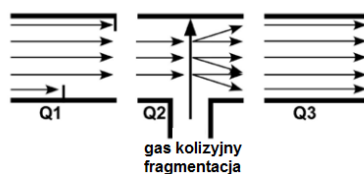
Tryb *Selected Reaction Monitoring (SRM)* to tryb śledzenia wybranych reakcji fragmentacji. Jest najbardziej czułym trybem działania potrójnego kwadrupola, w którym monitoruje się tylko pojedynczy jon prekursorowy i pojedynczy jon potomny. W warunkach normalnej pracy, potrójny kwadrupol przeprowadza kilka SRM dla tych samych jonów prekursorowych i wówczas ten tryb pracy nosi nazwę monitorowaniem wielu reakcji (z ang. *Multiple Reaction Monitoring, MRM*). W trybie SRM kwadrupol działa z największą wydajnością. Jest to przypadek, który można zilustrować zatrzymaniem obu pasów, przedstawiających kwadruple Q1 i Q3, na konkretnej wartości m/z

(Rys.18). W pierwszym kwadrupolu wybiera się/skanuje jeden konkretny jon macierzysty (prekursorowy) o zdefiniowanym stosunku m/z. W komorze kolizyjnej następuje wysokoenergetyczna i wydajna fragmentacja. Na trzecim kwadrupolu zachodzi skanowanie jonu potomnego o ściśle zdefiniowanej wartości m/z. Schemat pracy potrójnego kwadrupola w trybie MRM/SRM, zilustrowano na Rysunku 21.



Rys.21 Diagram trybu pracy MRM/SRM [16].

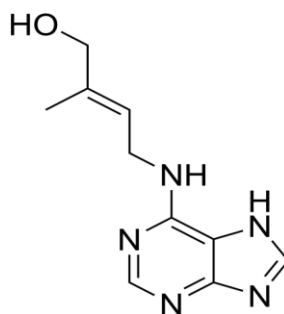
Tryb MRM dotyczy sytuacji, gdzie potrójny kwadrupol przeprowadza kilka reakcji SRM dla tych samych jonów prekursorowych. Tryb MRM zapewnia najlepszą selektywność, intensywność sygnału jest duża, a wartość szumów niska. Tylko w trybie MRM możliwe jest uzyskanie najlepszych wartości stosunku sygnału do szumu (S/N), a więc osiągnięcie najlepszych poziomów wykrywalności (*LOD – Limit of Detection*) lub oznaczalności (*LOQ – Limit of Quantitation*). Tryb MRM jest zdecydowanie najlepszym trybem do pomiarów ilościowych. Do większości analiz ilościowych, które przeprowadzane są w trybie MRM stosowane są wzorce znakowane izotopowo. W trybie *Neutral Loss Scan* – skanowanie w pierwszym i trzecim kwadrupolu ze stałą różnicą masy. Otrzymuje się widmo jonów tracących fragment obojętny o stałej masie. Jest to tryb obserwowania reakcji fragmentacji, w których powstaje obojętna cząsteczka. Schemat trybu *Neutral Loss Scan* przedstawiono na Rysunku 22.



Rys. 22 Diagram trybu pracy Neutral Ion Scan [16].

6. ZASTOSOWANIE POTRÓJNEGO KWADRUPOLA MS FIRMY AGILENT W ANALIZIE CYTOKININ W LIŚCIACH ROŚLIN WYŻSZYCH

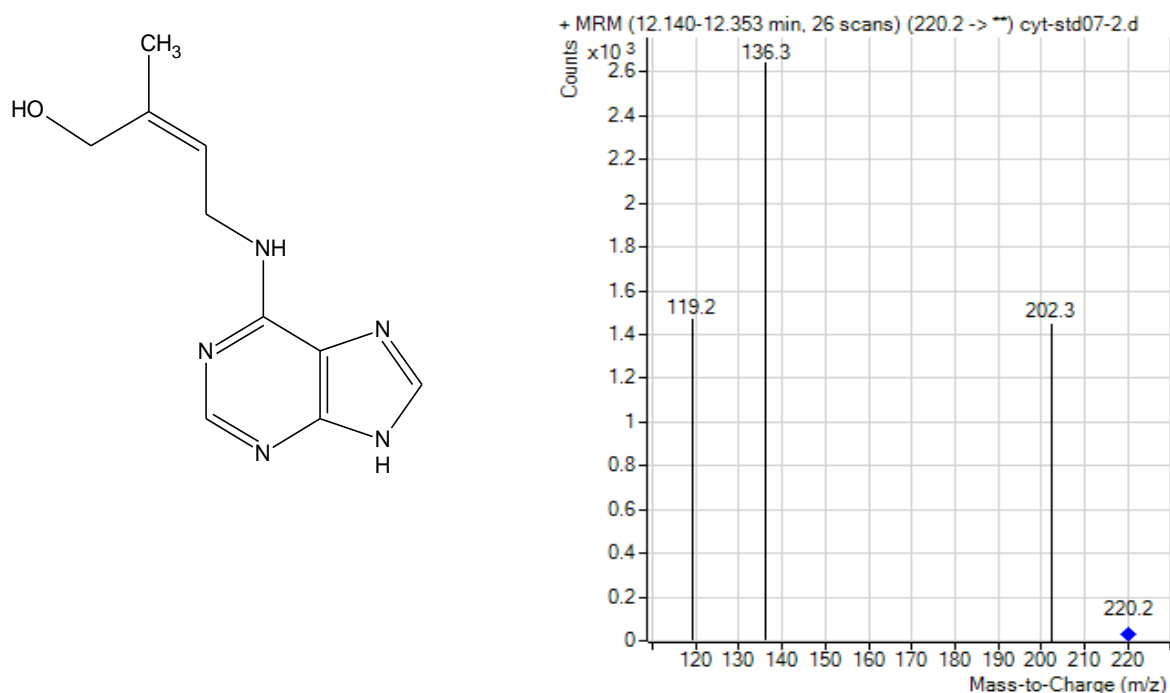
Cytokininy są hormonami roślinnymi o charakterze stymulatorów, które regulują tempo podziałów komórkowych, uczestniczą w różnicowaniu chloroplastów, regulują alokację metabolitów i uczestniczą w wielu innych procesach fizjologicznych. Cytokininy to związki o budowie podobnej do adeniny. Powszechnie występującą w świecie roślin cytokininą jest zeatyna (Rys 23). Zeatyna jest hormonem regulującym wzrost i rozwój roślin. Wyodrębniona została po raz pierwszy z niedojrzałych nasion kukurydzy (*Zea mays*), od której pochodzi jej nazwa.



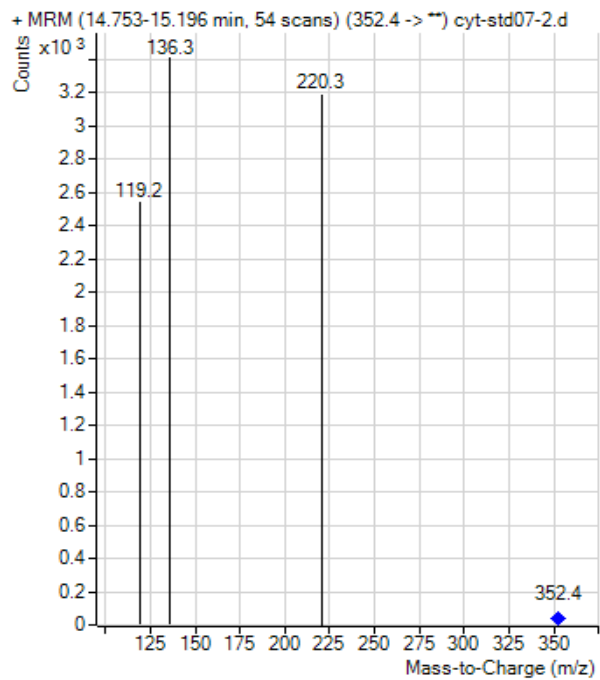
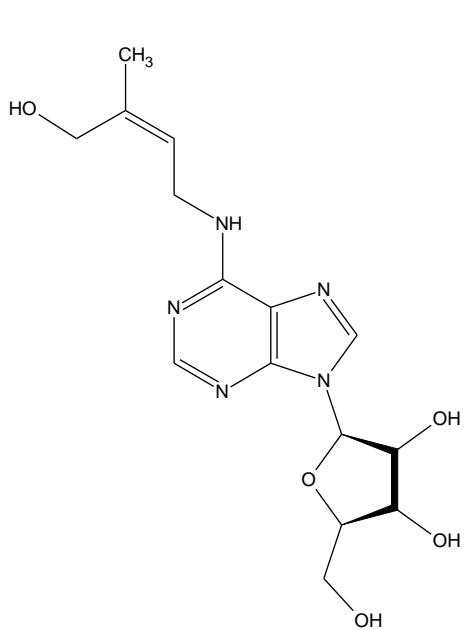
Rys. 23 Budowa chemiczna zeatyny

Głównym problemem analitycznym w przypadku materiału roślinnego jest złożoność składu chemicznego. Materiał roślinny składa się z tysięcy składników o stężeniach różniących się nierzadko kilka rzędów wielkości. Dodatkowo, składniki materiału roślinnego różnią się polarnością. Obok tak wysoce polarnych związków, jak sole mineralne, witaminy grupy B, oraz witamina C, monosacharydy, czy krótkołańcuchowe aminokwasy, występują również związki niepolarne, praktycznie nierozpuszczalne w wodzie, takie jak: tłuszcze i kwasy tłuszczowe, tokoferole, czy karotenoidy. Większość znanych związków roślinnych o charakterze hormonalnym jest dobrze rozpuszczalna w wodzie, w tym również cytokininy. Wyodrębnienie wielu analitów jednocześnie z materiału roślinnego stanowi duże wyzwanie dla chemików analityków. Potrzebne są zatem odpowiednie metody, które pozwalają na uwolnienie danego analitu z dużą wydajnością, przy jednoczesnym zachowaniu jego własności, np. aktywności enzymatycznej, czy struktury. Komórki roślinne posiadają odporną na lizę ścianę komórkową, która utrudnia izolację wybranych składników komórkowych, jak również stanowi przeszkodę dla swobodnej migracji badanych związków do rozpuszczalnika. Aby usprawnić ekstrakcję analitów, próbki tkanek należy najpierw zhomogenizować, a następnie poddać działaniu ultradźwięków. Opisywaną poniżej procedurę przygotowania próbki, zaczerpnięto z pracy Stefancic et al. [74]. Zamrożony materiał (100 mg świeżej masy) został najpierw zhomogenizowany w ciekłym azocie przy użyciu porcelanowego moździerza, a następnie dodano rozpuszczalnik ekstrakcyjny: mieszaninę metanolu, wody i kwasu mrówkowego w stosunku objętościowym 15:4:1. W tym samym czasie dodano izotopowy standard wewnętrzny – roztwór [¹⁵N₄]-kinetyny w metanolu. Dla ułatwienia i przyspieszenia ekstrakcji zawiesinę wytrząsano przez 10 min, a następnie poddawano działaniu ultradźwięków (sonikacja) przez 20 min. Zawiesinę odwirowano (20 000 G przez 15 min) i zebrano supernatant, a następnie procedurę ekstrakcji

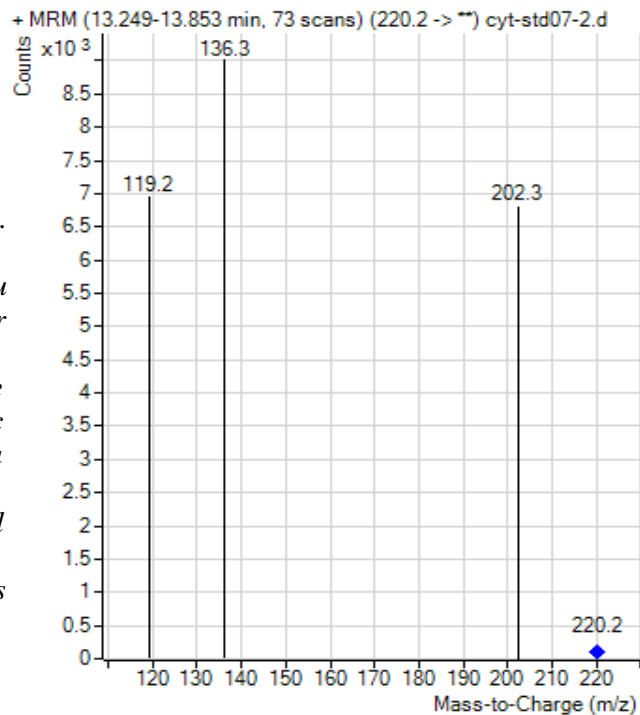
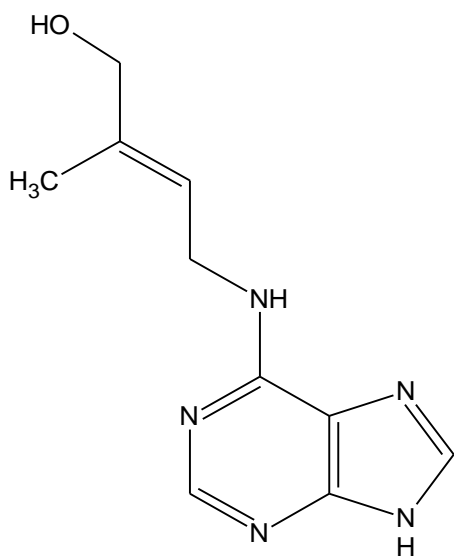
powtórzono (bez dodatku izotopowego standardu wewnętrznego). Supernatanty z obydwu etapów ekstrakcji połączone, a następnie odparowano do sucha w temperaturze 50°C pod strumieniem gazowego azotu. Suchą pozostałość rozpuszczono w roztworze 1 mol/dm³ kwasu mrówkowego w wodzie, a następnie sonikowano przez 10 min. Powstałą mieszaninę odwirowano (20 000 G przez 15 min), a następnie oczyszczono przy użyciu kolumnienek SPE Waters Oasis MCX. Procedura SPE rozpoczęła się od prekondycjonowania kolumnienki metanolem, a następnie roztworem 1 mol/dm³ kwasu mrówkowego, następnie nałożono odwirowany ekstrakt, i kolumnienkę przepłukano kolejno roztworem 1 mol/dm³ kwasu mrówkowego, metanolem, oraz amoniakiem 0,35 mol/dm³. Badane związki wypłukano z kolumnienki roztworem amoniaku 0,35 mol/dm³ w 60% metanolu. Eluat odparowano do sucha w temperaturze 50°C pod strumieniem gazowego azotu, a następnie suchą pozostałość rozpuszczono w metanolu i odwirowano (20 000 G przez 15 min). Gotową próbkę umieszczono w fiołce HPLC i wykonano analizę na układzie Agilent Triple Quad LC/MS w Zakładzie Fizykochemii Ekosystemów IFJ PAN. Zastosowano fazę ruchomą o składzie kwas octowy 0,001% w wodzie (A), oraz kwas octowy 0,001% w acetonitrylu (B), prędkość przepływu wynosiła 0,5 ml/min. Kolumnę analityczną stanowiła kolumna firmy Supelco Ascentis RP-Amide o parametrach (7.5 cm x 2.1 mm, 2.7 μm). Oznaczono zawartość wybranych cytokinin: cis- i trans-zeatyny, ich rybozydów, kinetyny, rybozydu kinetyny, oraz izopentenyladeniny. Oznaczono także zawartość wewnętrznego standardu izotopowego: [¹⁵N₄]-kinetyny. Każdy z tych związków oznaczano według najbardziej obfitego jonu potomnego (MRM), tożsamość potwierdzono na podstawie dwóch kolejnych, pod względem obfitości, jonów.



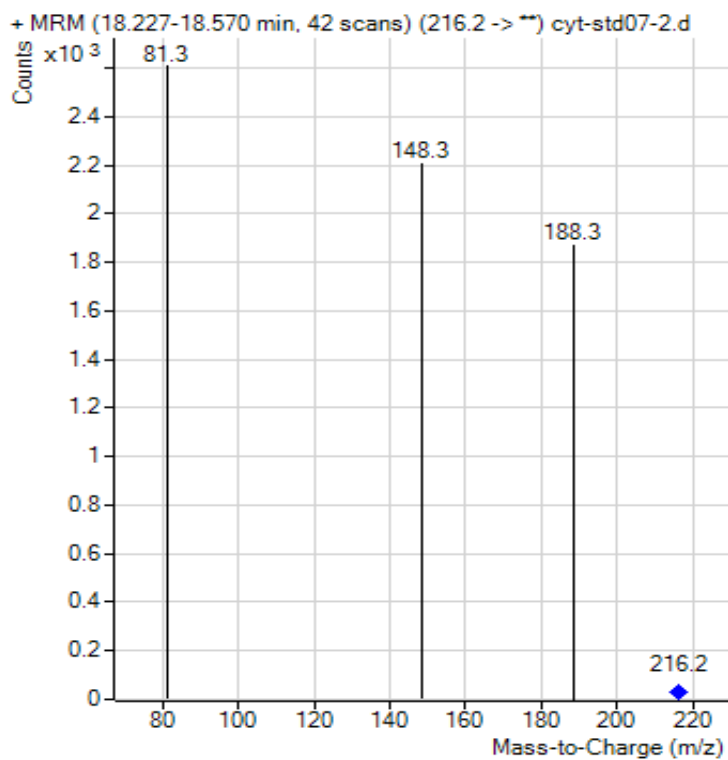
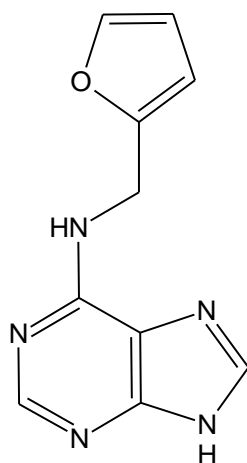
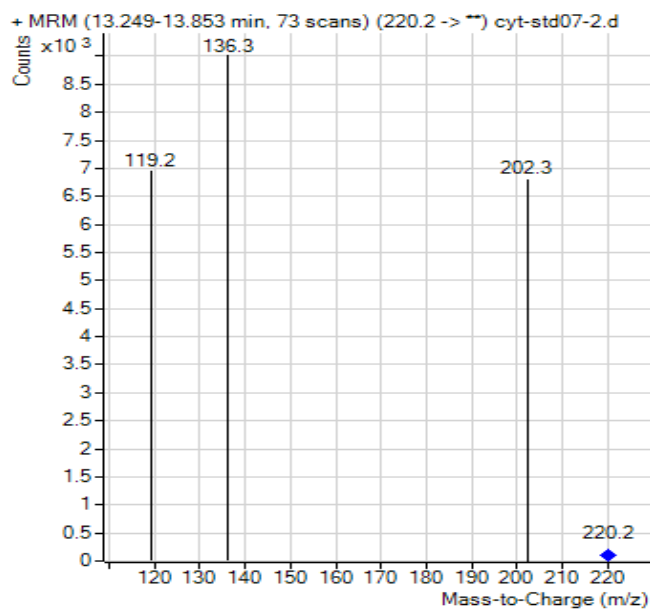
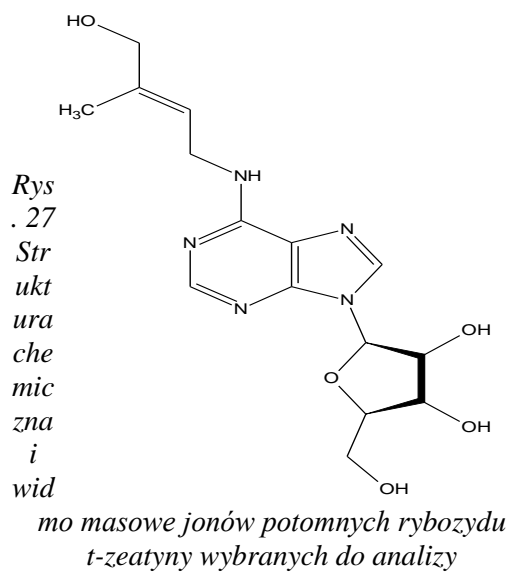
Rys. 24 Struktura chemiczna i widmo masowe jonów potomnych c-zeatyny wybranych do analizy



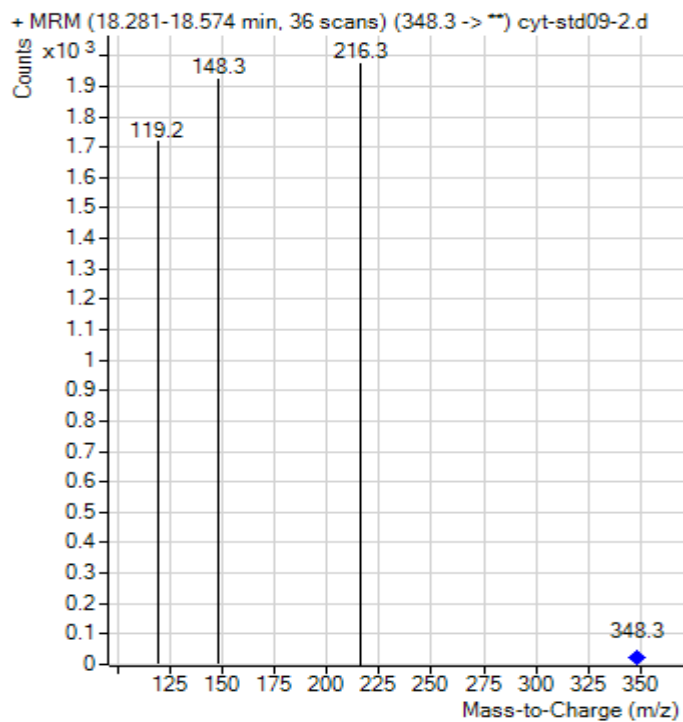
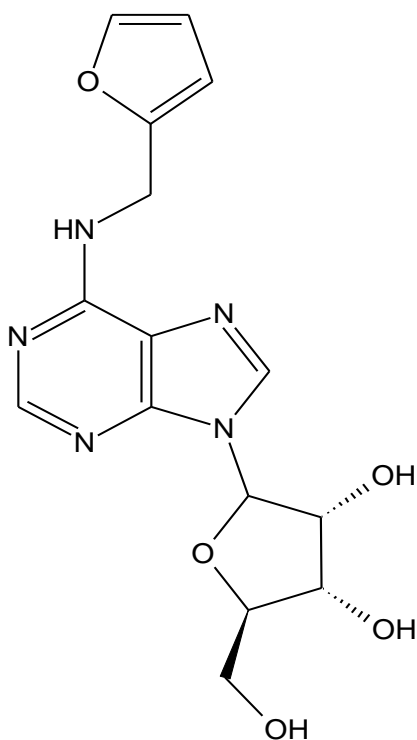
Rys. 25 Struktura chemiczna i widmo masowe jonów potomnych rybozydu c-zeatyny wybranych do analizy



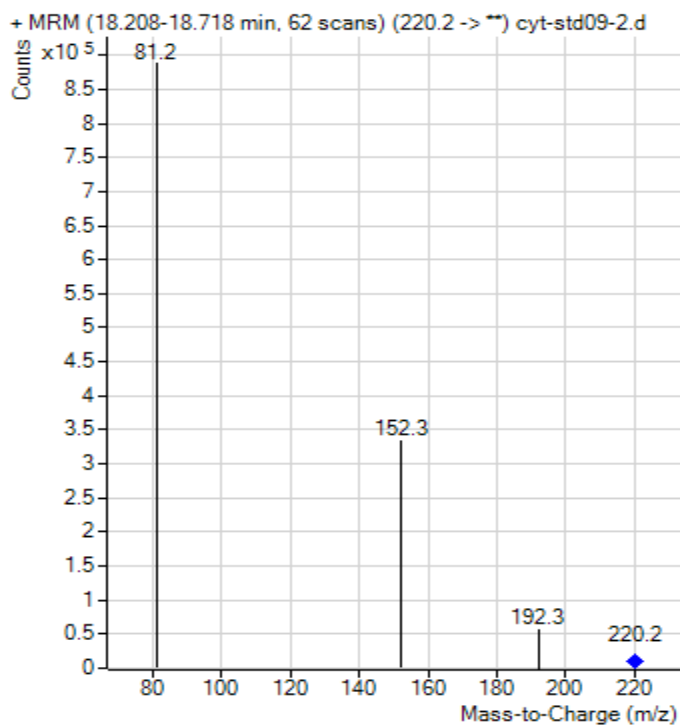
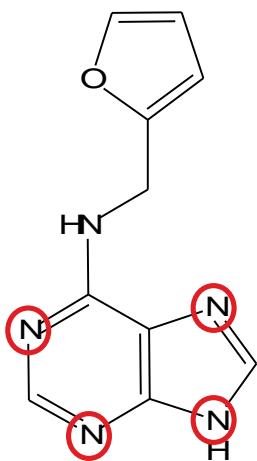
Rys. 26 Struktura chemiczna i widmo masowe jonów potomnych t-zeatyny wybranych do analizy



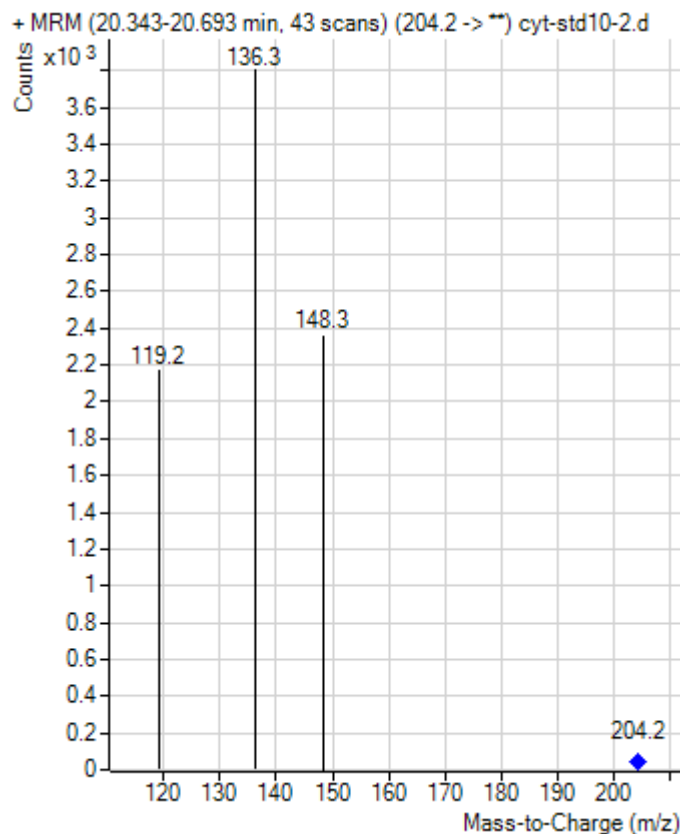
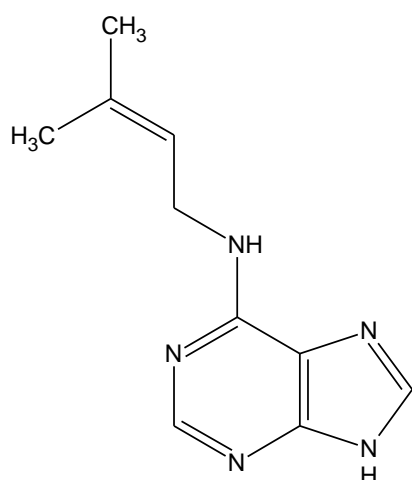
Rys. 28 Struktura chemiczna i widmo masowe jonów potomnych kinetyny wybranych do analizy



Rys. 29 Struktura chemiczna i widmo masowe jonów potomnych rybozydu kinetyny wybranych do analizy

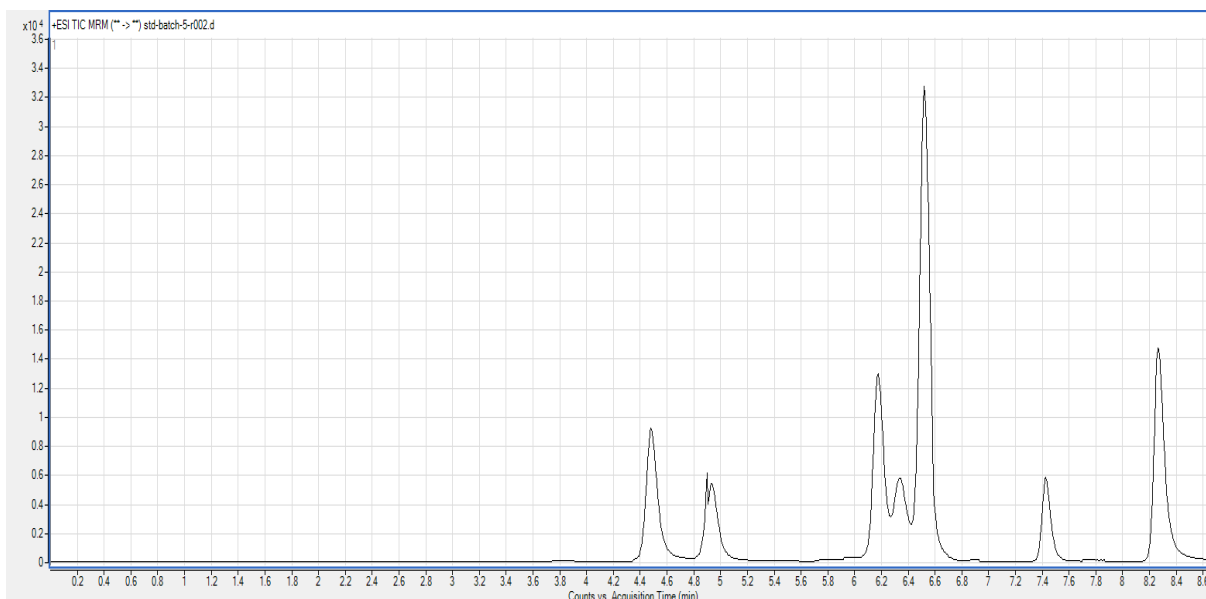


Rys. 30 Struktura chemiczna i widmo masowe jonów potomnych [¹⁵N₄]kinetyny wybranych do analizy. Związek użyto w charakterze izotopowego standardu wewnętrznego.

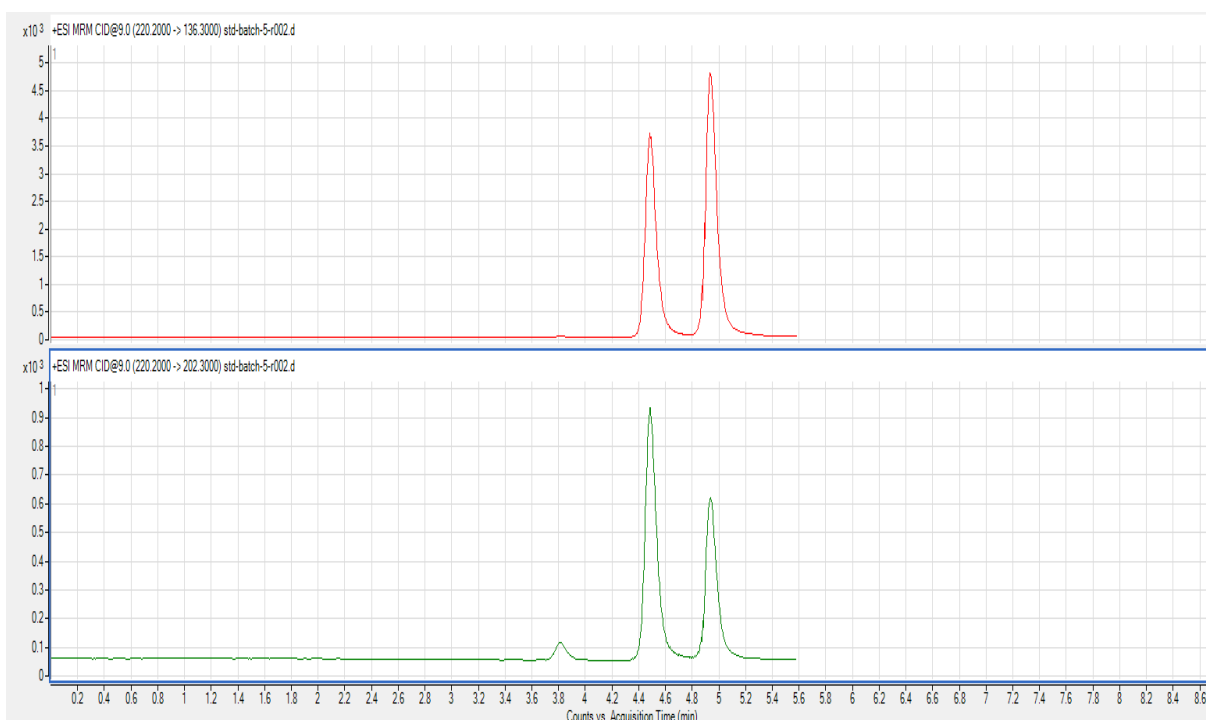


Rys. 31 Struktura chemiczna i widmo masowe jonów potomnych izopentenyladeniny wybranych do analizy

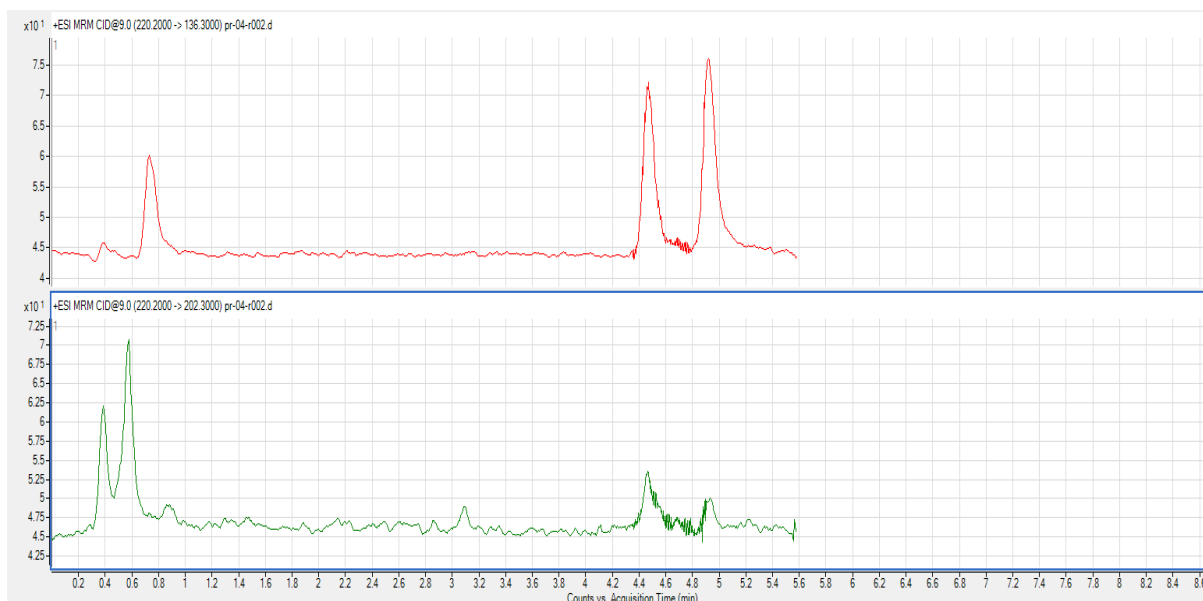
Sporządzono roztwory kalibracyjne w zakresie stężeń 1,95 – 1000 ng/ml w metanolu, sporządzono również krzywe kalibracyjne badanych związków. Związki analizowano w trybie Dynamic MRM, w którym aparat ustawiany jest na wykrywanie kolejnych jonów MRM badanych związków w zakresie 1 minutę przed i 1 minutę po oczekiwanym czasie retencji. Dzięki temu nie monitoruje się wszystkich oczekiwanych jonów przez cały czas analizy, co zwiększa czułość analizy. W urządzeniach z kwadropolowym filtrem masowym czułość zależy bowiem od liczby analizowanych jednocześnie jonów, im jest ich więcej, tym czułość mniejsza. Największą czułość analizy można uzyskać monitorując tylko jeden jon w danym zakresie oczekiwanego czasu retencji, jednak zmniejsza się wtedy pewność potwierdzenia tożsamości analizowanego związku, gdyż nie można porównać między sobą różnych jonów generowanych przez analit. W przypadku tandemowych kwadropolowych spektroskopów masowych rozsądnym kompromisem jest monitorowanie 2-3 jonów dla pojedynczego związku.



Rys. 32 Chromatogram jednego z roztworów kalibracyjnych. Załamania linii sygnału są wynikiem przełączania między jonami w trybie Dynamic MRM. Linia pokazuje całkowitą ilość jonów w funkcji czasu (TIC – Total Ion Content)



Rys. 33 Sygnał pojedynczych jonów MRM wygenerowany z chromatogramu TIC przedstawionego na Rys. 32. Są to dwa jony generowane przez cis- i trans-zeatynę (związki te są izomerami, ich fragmentacja przebiega więc w podobny sposób, wytwarzając te same jony potomne)



Rys. 34 Chromatogram próbki roślinnej przedstawiony jako ilość zliczeń dwóch wybranych jonów potomnych wygenerowanych przez cis- i trans-zeatynę w trybie Dynamic MRM

Przedstawiony na Rys 34 chromatogram pokazuje, jak selektywną techniką jest chromatografia wysokosprawną sprzężoną z tandemową spektroskopią masową. Interesujące analityka związki chemiczne, mimo obecności dużej ilości innych związków, pojawiają się na praktycznie czystej (od innych pików) linii bazowej. Użyty w pracy spektroskop masowy *Agilent Technologies 6460* pozwolił na bezproblemowe oznaczenie zawartości związków chemicznych już przy stężeniach rzędu 1 ng/g świeżej masy w badanym materiale, z zaledwie 100 mg masy próbki. Na koniec warto nadmienić, iż w opisaney tutaj procedurze wykorzystano także inne frakcje pozyskane dzięki metodzie SPE: z frakcji metanolowej oznaczono zawartość innych hormonów roślinnych: auksyn (kwasu indolilo-3-octowego, indolilo-3-masłowego, oraz absycsynowego), a z frakcji związków nie wiązanych przez kolumnę (*tzw. Flow Through*) oznaczono zawartość cukrów rozpuszczalnych. Technika SPE pozwala więc na analizę wielu różnych związków chemicznych z jednej próbki, nawet gdy ich właściwości chemiczne wykluczają jednoczesną analizę HPLC. Jest to szczególnie ważne w badaniach biologicznych, gdzie pozyskanie każdej dodatkowej próbki nierzadko jest bardzo praco i kosztochłonne, a bywa niemożliwe. Zastosowanie więc opisanych powyżej technik, nie tylko daje możliwość uzyskania lepszych wyników, ale także umożliwia uzyskanie wyników niedostępnych przy użyciu innych technik analitycznych.

7. PODSUMOWANIE

Obserwowany od wielu lat rozwój nowoczesnych technik łączonych opartych na spektrometrii mas, sprawia, że są one czołowymi rozwiązaniami, zapewniającymi jakościowe i ilościowe oznaczanie analitów na bardzo niskim poziomie stężeń – poziomie śladów.

Stworzenie techniki LC-MS/MS, poprzez połączenie efektywnej techniki rozdzielania chromatograficznego (LC) z selektywną techniką detekcji (MS), zrewolucjonizowało analityczne możliwości oznaczeń. Analitycy dostali skuteczne narzędzie do oznaczeń ilościowych, umożliwiających wykrywanie coraz większej liczby związków na coraz niższym poziomie stężeń w coraz to bardziej złożonych matrycach. A wszystko to, w czasie jednej, krótkiej analizy.

W odróżnieniu do techniki GC-MS, technika LC-MS/MS daje analitykom możliwość rozdzielania i oznaczenia polarnych i niepolarnych substancji średnio – i trudno lotnych, a także związków łatwo ulegających rozkładowi termicznemu.

W świetle powyższych rozważań, widać, jak powszechnym, efektywnym i coraz bardziej zyskującym na znaczeniu rozwiązaniem jest wykorzystanie sprzężenia chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas w różnorodnych dziedzinach życia: od przemysłu, poprzez ochronę środowiska, biochemię, genetykę, aż po medycynę.

Należy mieć nadzieję, że dalszy rozwój i opracowywanie nowych metodyk, zaowocuje jeszcze lepszymi możliwościami wykorzystania tak nowoczesnej aparatury w różnorodnych dziedzinach nauki.

8. LITERATURA

1. A. Kraj, A. Drabik, J. Silberring, „*Proteomika i metabolomika*”, Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego 2010,
2. J. Namieśnik, Z. Jamrógiewicz, „*Fizykochemiczne metody kontroli zanieczyszczeń środowiska*”, Wydawnictwo Naukowo Techniczne, Warszawa 1998
3. Z. Witkiewicz, J. Kałużna – Czaplinska, „*Podstawy chromatografii i technik elektromigracyjnych*”, Wydawnictwo Naukowo Techniczne, Warszawa 2012
4. Z. Witkiewicz, „*Podstawy chromatografii*”, WNT, Warszawa 2005
5. K. Hierasimczyk (tłum.), W. Wardencki, J. Namiesnik „*Chemia analityczna, Chromatografia*”, część I-III, Wyd. Wydz. Chem., Politechnika Gdańska 2002
6. P. Stępnowski, E. Synak, B. Szafranek, Z. Kaczyński, (recenzja Wardencki) „*Techniki separacyjne*”, Wyd. Uniwersytetu Gdańskiego, ISBN 978-83-7326-712-1, 152180
7. M. Czerwicka, J. Kumirska, P. Stępnowski, „*Spektrometria mas – uniwersalna technika analityczna*”, Laboratorium, 5-6 (2012) 20-22
8. T. Bienkowski, „*Technika LC-MS/MS i jej zastosowanie w rutynowej diagnostyce medycznej*”, Laborant, 8 (2014) 7-21
9. Robert A.W. Johnstone, E. Rose Malcolm, „*Spektrometria mas*”, PWN, 2001
10. W. Szczepaniak, „*Metody instrumentalne w analizie chemicznej*”, WN PWN, Warszawa 2004
11. A. Wasik, „*Techniki łączone w analizie chemicznej*” Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej, Gdańsk 2004
12. <http://laboratoryinfo.com/hplc/>
13. E.U. Stolarczyk, A. Kutner, „*Zastosowanie spektrometrii mas w analizie farmaceutycznej zanieczyszczeń organicznych*”, Farm Pol. 65(8) (2009) 586-593
14. NIST Chemistry WebBook
15. K.C. Dooley, „*Tandem mass spectrometry in the clinical chemistry laboratory*”, Clinical Biochemistry 36 (2003) 471 – 481
16. S. KG Grebe, R. J. Singh, „*LC-MS/MS in the Clinical Laboratory – where to from here?*” Review Article, Clin Biochem Rev, vol 32(1) (2011) 5 – 31
17. J.B. Fenn, „*Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*”, Science, 246 (1989) 64-71
18. S. Banerjee, S. Mazumdar, „*Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte*”, Int. J. of Anal Chem. 2012 (2012) 1-40
19. J. Beck, C. Smidt, „*Two sources are better than one – more choices for sample ionization with ESI and APCI*”, LC/MS Application Note Agilent Technologies, No 6, September 2003
20. J. Charette, E De Hoffmann, V. Stroobant, „*Spektrometria mas*”, WNT, Warszawa 1998
21. L. Napiórkowska, E. Franek, „*Rola oznaczania witaminy D w praktyce klinicznej*”, Choroby Serca i Naczyń, tom 6, nr 4 (2009) 203 – 210
22. Z. Bartoszewicz, „*Możliwości zastosowania HPLC i LC-MS/MS w rutynowym oznaczaniu metabolitów witaminy D oraz paneli hormonów sterydowych*”, Materiały XVIII Zjazdu Naukowego Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej, Warszawa 15-18 września 2013
23. Agilent Technologies „*Potrójny kwadrupol LC/MS system Agilent Serii 6400*”, Przewodnik po projekcie, Wyd 5, sierpień 2008
24. G. Stafford, „*Ion Trap Mass Spectrometry: A personal Perspective*”, J Am Soc Mass Spectrom, 13 (2002) 589 -596
25. M. Guilhaus, „*Principles and Instrumentation in Time of Flight Mass Spectrometry*”, J of Mass Spectrometry, vol 30 (1995) 1519-1532
26. Agilent Technologies, „*Time of Flight Mass Spectrometry*”, Technical Overview, 2011
27. I.V. Chernushevich, A.V. Loboda, B.A. Thomson, „*An introduction to quadrupole – time of flight mass spectrometry*”, J of Mass Spectrom. 36 (2001) 849-865
28. <http://przesiew.imid.med.pl/tandem.html>
29. E De Hoffmann, „*Tandem Mass Spectrometry*”, J of Mass Spectrom 31 (1996) 129-137

30. J. Namieśnik, Z. Jamrógiewicz, M. Pilarczyk, L. Torres, „Przygotowanie próbek środowiskowych do analizy”, Wydawnictwo Naukowo Techniczne, Warszawa 2000.
31. T. Ligor, „Analityka wydychanego powietrza z zastosowaniem sprzężonych technik chromatograficznych z przeznaczeniem do badań przesiewowych chorób płuc”, Rozprawa habilitacyjna, Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń (2011)
32. M. Skowron, B. Grabowska-Polanowska, J. Faber, J. Śliwka, „Zarys metod analitycznych w badaniach oddechu dla celów diagnostyki medycznej”, Raport IFJ PAN Kraków (2012)
33. A. Kot – Wasik, „Przygotowanie próbek do analizy”, Politechnika Gdańska, Gdańsk, 2007
34. C.L. Arthur, J. Pawliszyn, „Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers”, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 2145 – 2148
35. M. Ligor, B. Buszewski, „SPME as a method for the preparation of environment at samples”, *Pol. J. Environ. Study*, 6 (1997) 5-12
36. S. Ulrich, „Solid phase microextraction in biomedical analysis”, *J. Chromatogr. A.*, 902 (2000) 167 – 194
37. J. Pawliszyn, „Solid phase microextraction theory and practice”, Wiley – VCH, Chichester, UK, 1997
38. S. J. Lehotay, „QuEChERS sample preparation approach for mass spectrometric analysis of pesticide residues in foods”, *Methods Mol Biol.* 747 (2011) 65 – 91
39. T. Rejczak, T. Tuzimski, „A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach”, *Open Chem.*, 13 (2015) 980-1010
40. M.C. Bruzzoniti, L. Checchini, R.M De Carlo, S. Orlandini, L. Rivoira, M. Del Bubba, „QuEChERS sample preparation for the determination of pesticides and other organic residues in environmental matrices: a critical review”, *Anal Bioanal Chem* 406 (2014) 4089-4116
41. M. Anastussides, B. Tasdelen, E. Scherbaum, „New Developments in QuEChERS methodology”, Books of Abstracts, 2006
42. A. Kot – Wasik, „Materiały szkoleniowe – ABC techniki SPE”, Politechnika Gdańska
43. R.E. Majors, „Solid-Phase Extraction” w: J. Pawliszyn, H.L. Lord (red) Handbook of Sample Preparation. John Willey & Sons Inc. Hoboken. 2010
44. Agilent Technologies, „The Secrets of Solid Phase Extraction (SPE) for Sample Preparation”
45. www.bioanalytic.com.pl
46. M. Anastussides, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck, *J. AOAC Intern.*, 86 (412) (2003)
47. A. Zygler, A. Wasik, M. Janicka, A. Kot – Wasik, J. Namieśnik, „Ekstrakcja do fazy stałej niejedno ma imię”, *Analityka*, nr 3 (2012) 12-19
48. T. Snopczyński, P. Struciński, K. Góralczyk, K. Czaja, A. Hernik, W. Korcz, A. Kucharska, J.K. Ludwicki, „Zastosowanie metody QuEChERS w połączeniu chromatografią gazową z detektorem wychwytu elektronów (GC-ECD) w analizie pozostałości pestycydów w żywności”, *Roczn. PZH*, 62 (2011) 145-151
49. A. Sadowska – Rociek, E. Cieślik, „Stosowane techniki i najnowsze trendy w oznaczaniu pozostałości pestycydów w żywności metodą chromatografii gazowej”, *Metrologia*, nr 1-2 (13) (2008) 33- 38
50. A. Stachniuk, „Wieloskładnikowa analiza pozostałości pestycydów w owocach i warzywach metodą LC-MS/MS” Praca Doktorska, Lublin 2014
51. P.J. Rudzki, K. Kobylińska, „Zastosowanie techniki LC-MS/MS do oznaczania stężeń substancji leczniczych w materiale biologicznym”, *Przemysł Chemiczny*, nr 85 (5) (2006) 360-362
52. E. Pufal, M. Sykutera, „Wykorzystanie chromatografii cieczowej z detektorem masowym do oznaczania leków przeciwdepresyjnych we krwi”, *Arch. Med. Sąd. Krym.*, LVIII, (2008) 171- 176
53. E. Pufal, M. Sykutera, P. Piotrowski, „Opracowanie metody oznaczania leków przeciwdepresyjnych w paznokciach i jej wykorzystanie w toksykologii sądowej”, *Arch. Med. Sąd. Krym.*, LVIII, (2008) 167 – 170
54. A. Wilczek, „Metody rozdzielcze w analizie leków i ich metabolitów z różnych grup terapeutycznych”, Praca Doktorska, Politechnika Śląska, Wydział Chemiczny, Katedra Chemii Analitycznej, Gliwice 2011
55. J. Szymura – Oleksiak, A. Cios, A. Gonciarz, „Terapia monitorowana stężeniem leku we krwi u dzieci”, *Pediatr Dypl.* 17(1) (2013) 64-70

56. Materiały XVIII Zjazdu Naukowego Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej, Warszawa 15-18 września 2013
57. P. Kunicki, J. Duda, „*Monitorowanie stężenia leków immunosupresyjnych techniką LC-MS/MS na przykładzie oznaczania ewerolimusu we krwi pacjentów po przeszczepieniach narządowych*”, Diagnostyka Laboratoryjna, vol 48, nr 3 (2012) 265-271
58. E. Gomółka, A. Morawska, „*Zalety i wady szybkich testów, czyli jak oznaczać narkotyki w laboratorium medycznym*”, Diagnostyka Laboratoryjna, vol 2 (47) (2011) 197 – 203
59. S.J. Martin, R. Coles, M. Merrell, G.A. McMillin, „*Quantitation of Benzodiazepines in Urine, serum, Plasma and Meconium by LC-MS/MS*”, J of Anal Toxicology, vol 32 (2008) 491-498
60. A. Jakimska, A. Kot – Wasik, A. Wasik, J. Namieśnik, „*Pozostałości farmaceutyków w środowisku – problem daleki od rozwiązania*”, Analityka, nr 3 (2012) 75 – 80
61. M. J. Lopez de Alda, S. Diaz-Cruz, M. Petrovic, D. Barcelo, „*Oznaczanie pozostałości wybranych środków farmaceutycznych, steroidowych hormonów płciowych oraz alkilofenolowych środków powierzchniowo czynnych w środowisku wodnym z wykorzystaniem technik LC-MS oraz LC-MS/MS*”
62. J. Stagierowicz, K. Mikołajska, M. Zawadzka-Stolarz, D. Ligocka, „*Oznaczanie biomarkerów narażenia zawodowego i środowiskowego na benzen i styren z zastosowaniem techniki LC-MS/MS*”, Medycyna Pracy, 63(5) (2012) 565-572
63. H. Mojska, I. Gielecińska, K. Małecka, „*Oznaczanie zawartości akryloamidu w produktach ziemniaczanych metodą GC-MS/MS oraz LC-MS/MS*”, Roczn. PZH, 61, nr 3 (2010) 237 – 242
64. M. Machowski, D. Kaliszewska, A. Kiss, „*Chromatograficzne metody izolacji i identyfikacji flawonoidów i saponin*”, Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego WUM, nr 4 (2010) 27-37
65. K. Kojima, „*Characteristics of HPLC columns and mass spectra of LC-MS for phytohormone analysis*”, JARQ, 35 (3) (2001) 149 – 154
66. J. Yu, Q. Meng, W. Liu, Y. Lu, X. Ren, „*Analysis of acidic endogenous phytohormones in grapes by using online SPE extraction coupled with LC-MS/MS*”, J of Chromatographic Science, 7 (2013) 1-5
67. G. Balcke, V. Handrick, N. Bergau, M. Fichtner, A. Henning, H. Stellmach, A. Tissier, B. Hause, A. Frolov, „*An UPLC-MS/MS method for highly sensitive high-throughput analysis of phytohormones in plant tissues*”, Plant Methods, 8 (47) (2012) 1-11
68. M. Kallenbach, I. T. Baldwin, G. Bonaventure, „*A rapid and sensitive method for the simultaneous analysis of aliphatic and polar molecules containing free carboxyl groups in plant extract by LC-MS/MS*”, Plant Methods, 5 (17) (2009) 1-11
69. M. Łuczak, M. Figlerowicz, P. Wojtaszek, „*Aspekty metodyczne analiz proteomicznych z wykorzystaniem metod elektroforezy dwukierunkowej i spektrometrii mas*”, Biotechnologia 2 (85) (2009) 7-26
70. T. Pawłowski „*Proteomika nasion*”, Biotechnologia 1(84) (2009) 104 – 118
71. M. Hajduch, J.E. Casteel, K.E. Hurrelmeyer, Z. Song, G.K. Agrawal, J.J. Thelen, „*Proteomic analysis of seed filling in Brassica napus. Developmental characterization of metabolic isozymes using high-resolution two-dimensional gel electrophoresis*”, Plant Physiol., 141(1) (2006) 32-46.
72. Ch. Xu, T.J. Caperna, W.M. Garrett, P. Cregan, H. Bae, D. L. Luthria, S. Natarajan, „*Proteomic analysis of the distribution of the major seed allergens in wild, landrace, ancestral and modern soybean genotypes*” Science of Food and Agriculture 87 (13) (2007) 2511-2518
73. Agilent Technologies, „*Agilent 1290 Infinity Binary Pump*” User Manual, Edition 08 (2012)
74. M. Stefancic, F. Stampar, R. Veberic, G. Osterc, „*The levels of IAA, IAAsp and some phenolics in cherry rootstock ‘GiSela 5’ leafy cuttings pretreated with IAA and IBA*”, Scientia Horticulturae 112 (2007) 399–405