



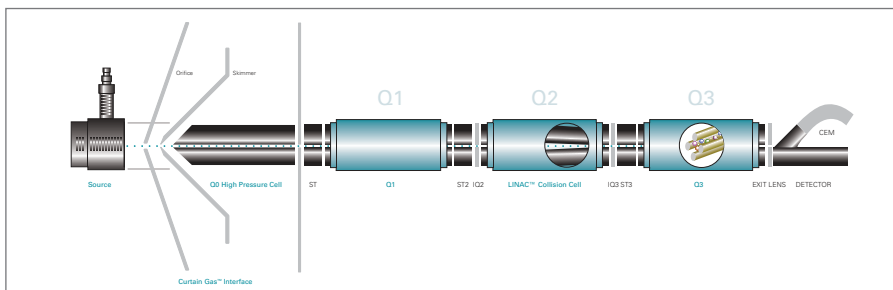
Wyższy stopień potwierdzania obecności związku w badaniach przesiewowych i analizie ilościowej pestycydów w próbkach owoców i warzyw dzięki systemom QTRAP® LC/MS/MS

Możliwości systemów QTRAP® LC/MS/MS w porównaniu z systemami opartymi na potrójnym kwadrupolu:

- Selektywność i czułość trybu MRM w analizie ilościowej, najniższe granice wykrywalności, doskonała powtarzalność wyników i liniowy zakres dynamiczny.
- Szybkość i wysoka czułość skanowania liniowej pułapki jonowej do analizy jakościowej i potwierdzania obecności danego analitu.
- Bogate widma MS/MS, uzyskane dzięki fragmentacji jonów w komorze zderzeń LINAC® i wykorzystaniu techniki rozszerzenia zakresu energii zderzeń (*Collision Energy Spread*).
- Brak opóźnienia w przełączaniu pomiędzy funkcjami potrójnego kwadrupola i systemu QTRAP® w eksperymentach IDA, pozwalający na analizę ilościową i potwierdzenie obecności danego analitu za pomocą widm MS/MS podczas jednego cyklu LC.
- Wyższy stopień potwierdzania obecności danego agalitu, uzyskany dzięki przeszukiwaniu bibliotek widm fragmentacyjnych minimalizuje ryzyko uzyskania wyników fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych.



3200 QTRAP® LC/MS/MS System



Rycina 1. Ścieżka jonowa w systemie QTRAP® LC/MS/MS

Zarys

Niniejszy dokument przedstawia wykorzystanie systemów QTRAP® sprzężonych z chromatografem cieczowym w badaniach przesiewowych i potwierdzaniu obecności pestycydów w próbkach owoców i warzyw. Porównano selektywność, czułość i dokładność detekcji przy użyciu systemu QTRAP® w odniesieniu do konwencjonalnego spektrometru mas z potrójnym kwadrupolem. Podkreślono, że wyższy stopień potwierdzenia obecności związku w systemie QTRAP® został osiągnięty dzięki skanowaniu MS/MS za pomocą liniowej pułapki jonowej i odniesieniu tak uzyskanych wyników do danych zgromadzonych w bibliotece widm fragmentacyjnych. Takie podejście minimalizuje potencjalne ryzyko otrzymania wyników fałszywie dodatnich i ujemnych.

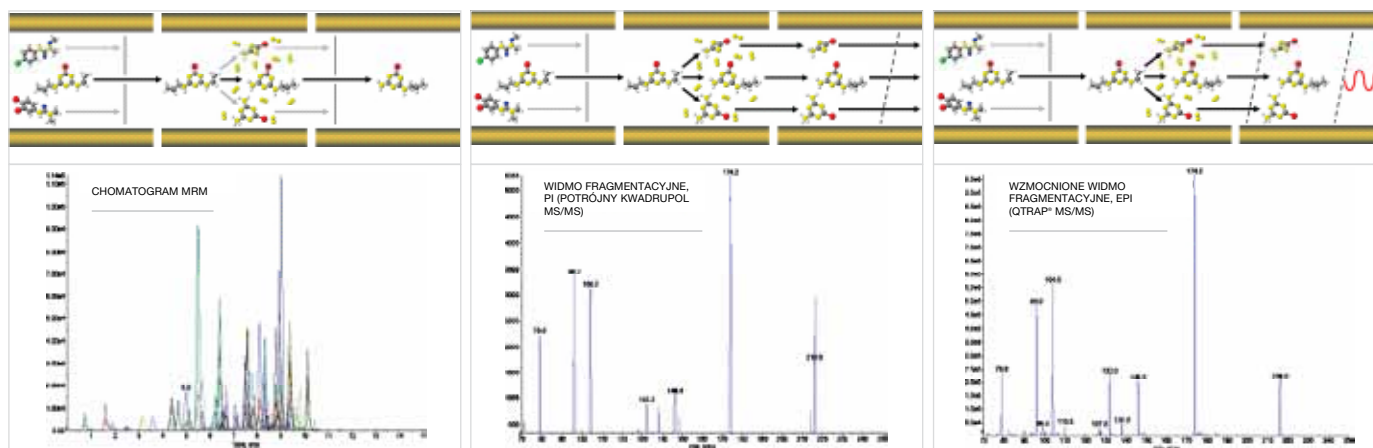
Wstęp

Chromatografia cieczowa (LC) w połączeniu z tandemowym spektrometrem masowym (MS/MS) jest potężnym narzędziem analitycznym wykorzystywanym w wielu laboratoriach badających żywność, prowadzących badania środowiska naturalnego i zajmujących się medycyną sądową, stosowanym do wykrywania obecności pestycydów, narkotyków, steroidów, farmaceutyków, produktów higieny osobistej oraz wielu innych zanieczyszczeń występujących w śladowych stężeniach.

Zakres stosowanych źródeł jonów obejmuje jonizację elektrosprej (ESI), jonizację chemiczną pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) i fotojonizację pod ciśnieniem atmosferycznym (APPI, *Atmospheric Pressure Photo Ionization*). Zapewniają one jonizację zarówno związków polarnych jak i niepolarnych. Wytworzone w źródle jony przemieszczają się przez średniociśnieniowy łącznik dalej do analizatora mas.

Analizator mas typu potrójny kwadrupol (QqQ) pracujący w trybie monitorowania reakcji wielokrotnych (MRM, *Multiple Reaction Monitoring*) jest wykorzystywany głównie do celowanej analizy ilościowej. W trybie MRM, pierwszy kwadrupol filtruje specyficzny jon macierzysty, który w komorze zderzeń (drugi kwadrupol) rozpada się wskutek zderzeń na jony fragmentacyjne (jony potomne), a te są następnie filtrowane przez trzeci kwadrupol (rycina 2).

W roku 2002 firma Applied Biosystems/ MDS Analytical Technologies (obecnie firma AB SCIEX) wprowadziła nową generację systemów LC/MS/MS - hybrydowych spektrometrów z potrójnym kwadrupolem i liniową pułapką jonową z osiowym usuwaniem jonów (System QTRAP®). System QTRAP® zapewnia unikalne możliwości dzięki technologii łączącej eksperymenty celowane właściwe dla potrójnego kwadrupola takie jak MRM, skanowanie jonów



Rycina 2. Badanie przesiewowe i potwierdzenie obecności pestycydów przy pomocy potrójnego kwadrupola oraz systemu QTRAP[®] LC/MS/MS. Diagram po lewej: wykrywanie 150 par MRM w celu poszukiwania pestycydów. Diagram środkowy: Widmo fragmentacyjne otrzymane w potrójnym kwadrupolu. Diagram po prawej: Wzmocnione widmo fragmentacyjne otrzymane w systemie QTRAP[®] w celu potwierdzenia obecności wykrytych pestycydów. (Proszę zauważyć, że czułość widma QTRAP[®] MS/MS jest ponad 100 krotnie wyższa niż czułość widma otrzymanego w potrójnym kwadrupolu).

macierzystych (*Precursor Ion*, PI), utrata obojętnej cząsteczki (*Neutral Loss*, NL), z funkcjami skanowania o dużej czułości pułapki jonowej, takimi jak wzmocnione MS (*Enhanced MS*, EMS), wzmocnione skanowanie jonów potomnych (*Enhanced Product Ion*, EPI), skanowanie w podwyższonej rozdzielczości (*Enhanced Resolution*, ER), wzmocnione skanowanie jonów wielokrotnie naładowanych (*Enhanced Multiple Charge*, EMC) oraz MS/MS/MS²⁻⁴.

Technologia systemu QTRAP[®]

Analizator mas systemu QTRAP[®] oparty jest na konwencjonalnej ścieżce jonowej spektrometru mas typu potrójny kwadrupol. W porównaniu do systemów QqQ, trzeci kwadrupol (Q3) systemu QTRAP[®] może być wykorzystany jako kwadrupol lub jako liniowa pułapka jonowa (LIT, ang. linear ion trap). Podwójna funkcjonalność Q3 pozwala osiągnąć systemowi QTRAP[®] pełne możliwości spektrometru masowego typu QqQ, w tym monitorowanie wielu reakcji (MRM) do selektywnej i czulej analizy ilościowej oraz dodatkowe funkcje LIT. Nowe możliwości skanowania LIT znacznie zwiększają wydajność badań przesiewowych, potwierdzania obecności i identyfikacji związków.

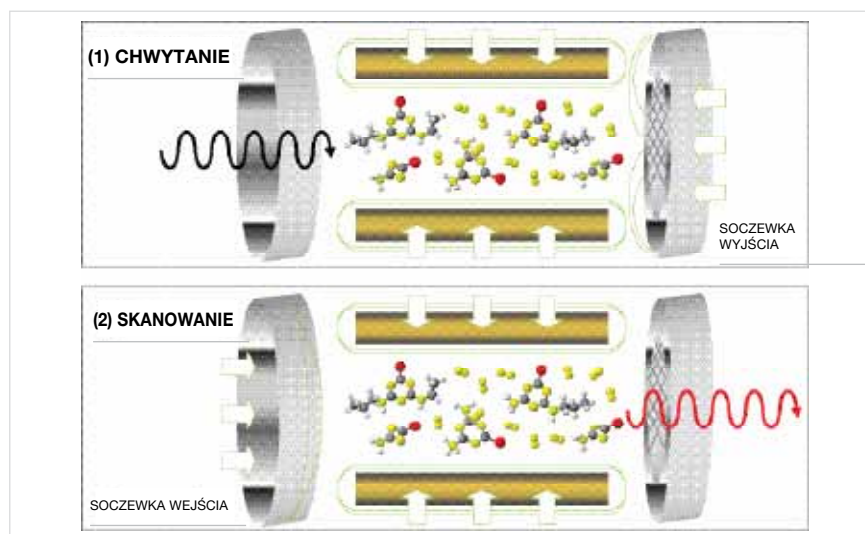
Działanie Q3 jako LIT można podzielić na dwa podstawowe etapy: (1) chwytnie i (2) skanowanie, co pokazano na rycinie

3. W pierwszym etapie, w zależności od wybranego trybu skanowania, jony macierzyste i/lub jony potomne opuszczają komorę zderzeń i zostają wprowadzone do Q3 działającego w trybie LIT. Tam, za pomocą przyłożonego prostopadłe napięcie RF i odpychającego napięcia DC przyłożonego do soczewki wyjścia, jony zostają uwięzione. Po trwającym zazwyczaj kilka milisekund akumulowaniu jonów, soczewka wejścia zablokowuje dostęp do Q3 dla kolejnych jonów. Uwięzione w pułapce jony są przez krótki czas „schładzane” a następnie, przy użyciu napięcia pomocniczego przykadanego jednocześnie z napięciem RF, wyprowadzane osiowo z LIT do detektora.

Najważniejsze tryby skanowania LIT stosowane w badaniach przesiewowych, potwierdzaniu obecności i identyfikacji związków to: wzmocnione MS (*Enhanced MS*, EMS), skanowanie w podwyższonej rozdzielczości (*Enhanced Resolution*, ER) oraz wzmocnione skanowanie jonów potomnych (*Enhanced Product Ion*, EPI).

W trybie EMS, pułapka jonowa wypełniana jest jonami wygenerowanymi przez źródło jonów co pozwala na przeprowadzenie identyfikacji związków.

Tryb skanowania ER służy do pomiaru masy jonów z wyższą dokładnością. Tryb ten może zostać użyty do określenia krotności ładunku jonu oraz do oceny profilu izotopowego. Wreszcie tryb EPI



Rycina 3: Chwytnie i skanowanie jonów w liniowej pułapce jonowej (LIT)

może być wykorzystany do potwierdzenia tożsamości wykrytych związków przez interpretację widm fragmentacyjnych lub przez przeszukiwanie bibliotek widm.

Wzmocnione skanowanie jonów potomnych (EPI) w systemach QTRAP®

ma wiele zalet wyróżniających je na tle trybów skanowania jonów fragmentacyjnych w spektrometrach mas typu QqQ. Są to m.in.:

- Znacznie wyższa czułość widm uzyskanych w trybie wzmocnionego skanowania jonów potomnych (EPI), uzyskana dzięki akumulacji jonów w LIT (patrz rycina 2).
- Więcej jonów fragmentacyjnych uzyskanych w pojedynczym widmie MS/MS, dzięki zastosowaniu rozszerzenia zakresu energii zderzeń (*Collision Energy Spread*)
- Niższy czas trwania cykli pracy dzięki szybszemu skanowaniu liniowej pułapki jonowej

Wzmocnione skanowanie jonów potomnych (EPI) w systemach QTRAP®

ma wiele zalet wyróżniających je na tle tradycyjnych spektrometrów mas z pułapką jonową. Są to m.in.:

- Widma MS/MS bogate we fragmenty są charakterystyczne dla dysocjacji indukowanej zderzeniami (CID, *Collision Induced Dissociation*), w przeciwieństwie do widm uzyskanych w wyniku wzbudzenia rezonansowego
- Dzięki powstawaniu fragmentów w komorze kolizyjnej nie ma typowego dla pułapki jonowej odcięcia niskich mas.
- Niższy czas trwania cykli w porównaniu z długością cykli w tradycyjnych pułapkach jonowych uzyskany dzięki jednoczesnemu wyborowi jonu macierzystego i fragmentacji w czasie, gdy system QTRAP® jest wypełniony
- Nadzwyczajna oporność LIT na efekt ładunku przestrzennego, dzięki czemu nie obserwuje się przesunięcia mas i nieprawidłowych profili izotopowych w otrzymanym widmie²⁻³

Część eksperymentalna

W eksperymencie obejmującym badanie przesiewowe i potwierdzenie obecności pestycydów wykorzystano system 3200 QTRAP® LC/MS/MS ze źródłem jonów Turbo V™ i sondą ESI w trybach potrójnego kwadrupola i QTRAP®.

Próbki

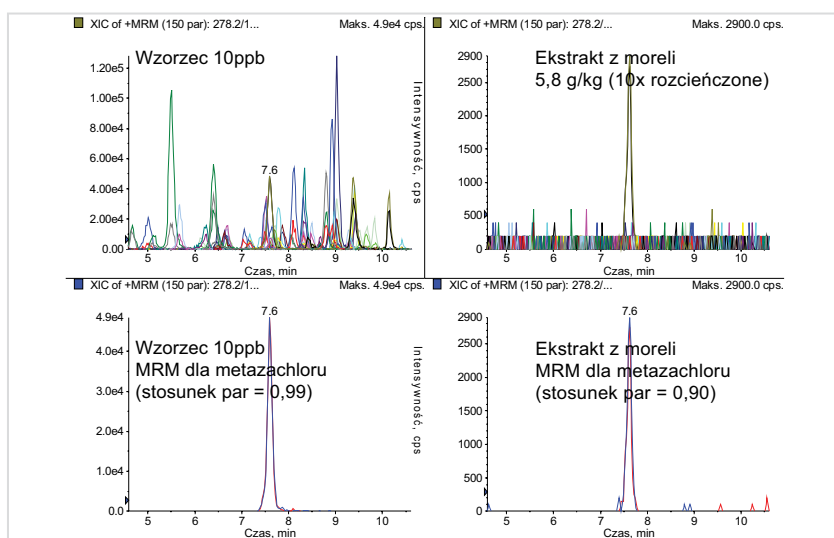
Próbki owoców i warzyw (jabłko, morela, banan, ogórek, winogrono, grejpfrut, kiwi, cytryna, pomarańcza, gruszka, papryka, rodzynki, truskawki, herbata i pomidor) zostały wyekstrahowane przy pomocy zmodyfikowanej procedury QuEChERS (skrót od „*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*”, czyli szybko, prosto, tanio, wydajnie, niezawodnie i bezpiecznie).¹⁶

HPLC

Wykorzystano system firmy Shimadzu Prominence zawierający kontroler systemu CBM-20A, 2 pompy LC-20 AD, degazer DGU-20A3, automatyczny podajnik próbek SIL-AC i piec do kolumn CTO-20AC. Rozdział prowadzono na kolumnie Phenomenex Synergi 4u Fusion-RP 80A 50x2 mm w gradiencie eluentu A (woda z 5 mM mrówczanem amonu) i eluentu B (metanol z 5 mM mrówczanem amonu) zmienianym od 80/20 do 10/90 (A/B) w ciągu 8 minut. Kolumnę utrzymywano temperaturze 25 °C. Wprowadzono 20 µL próbki.

Detekcja MS/MS

W trybie QqQ, w jonach dodatnich, wykorzystując 2 pary MRM dla każdego związku wykryto 75 pestycydów. W tabeli 1 wymieniono wykryte w czasie analizy pary MRM (*quantifier/qualifier*) wraz z odpowiednimi stosunkami tych par. Wszystkie parametry zależne od związków zostały całkowicie zoptymalizowane, w celu wykrycia każdego z pestycydów z najwyższą czułością. Czas trwania każdego przejścia MRM (*dwell time*) wynosił 5ms. Typowy eksperyment z wykorzystaniem potrójnego kwadrupola porównano z unikalną technologią warunkowego zbierania danych QTRAP® (*Information Dependent Acquisition, IDA*), w której dla każdego ze związków monitorowano tylko jedno, trwające 10ms przekształcenie MRM. Jeśli dla którejkolwiek z par MRM uzyskano sygnał powyżej 500 zliczeń na sekundę, automatycznie uruchamiane było wzmocnione skanowanie jonów potomnych (EPI). Widma EPI rejestrowano w zakresie 50 do 550 amu przy prędkości skanowania 4000 amu/s i energii zderzeń (*Collision Energy, CE*) równej 35 V, z rozszerzonym zakresem energii zderzeń (*Collision Energy Spread, CES*) wynoszącym 15V. Ponadto, w celu zminimalizowania ryzyka utraty jednocześnie wymywanych związków, aktywowany został tryb dynamicznego wykluczania.



Rycina 4: Analiza ilościowa i potwierdzenie na podstawie stosunku dwóch par MRM (278/134 i 278/210) obecności 5,8µg/kg metazachloru w ekstrakcie z moreli



TABELA 1. PRZEJŚCIA MRM DLA 75 BADANYCH PESTYCYDÓW, ODPOWIEDNIE STOSUNKI PAR MRM, GRANICE WYKRYWALNOŚCI LOD (S/N=6) ORAZ WSPÓŁCZYNNIKI ZMIENNOŚCI (%CV) DLA STĘŻENIA 10 NG/ML (N=3)

Pestycyd	MRM	stosunek par	LOD (ng/mL)	%CV (n=3)	Pestycyd	MRM	stosunek par	LOD (ng/mL)	%CV (n=3)
Acetamidopryd	223/126 223/99	0,20	0,2	4,7	Irgarol	254/198 254/83	0,14	0,05	2,2
Aldikarb	208/89 208/116	0,60	1	8,5	Izoproturon	207/72 207/46	0,25	0,2	3,9
Atrazyna	216/174 216/104	0,51	0,1	5,5	Lenacyl	235/153 235/136	0,24	0,2	5,0
Azoksystrobina	404/372 404/344	0,45	0,05	1,5	Linuron	249/160 249/182	0,98	1	8,5
Benalaksyl	326/148 326/91	0,97	0,1	3,3	Lufenuron	511/141 511/158	0,50	5	11,9
Bendiokarb	224/109 224/167	0,95	0,5	7,9	Malation	331/127 331/99	0,42	0,2	2,7
Bromokonazol	378/159 378/161	0,77	0,5	4,5	Mebendazole	296/164 296/105	0,26	0,2	1,1
Buprofezyna	306/201 306/116	0,71	0,2	4,9	Metalaksyl	280/220 280/192	0,79	0,5	4,9
Karbaryl	202/145 202/127	0,40	0,2	5,4	Metamitron	203/175 203/104	0,72	0,2	4,3
Karbenazym	192/160 192/132	0,17	0,05	3,1	Metazachlor	278/134 278/210	0,98	0,1	2,4
Karbofuran	222/165 222/123	0,44	0,2	3,3	Metabenzotiazuron	222/165 222/150	0,35	0,1	3,5
Chlorfenwinfos	359/99 359/155	0,90	0,5	5,5	Metydation	303/145 303/85	0,93	0,5	4,7
Chlorotoluron	213/72 213/46	0,21	0,2	3,2	Metiokarb	226/169 226/121	0,96	0,5	3,3
Chlorpyrifos-metyl	322/125 324/125	0,71	1	8,4	Metomyl	163/88 163/106	0,77	1	7,0
Cyjanazyna	241/214 241/104	0,24	0,5	6,9	Metolachlor	284/252 284/176	0,29	0,1	2,2
Cyprokonazol	292/125 292/70	0,95	0,5	7,2	Metolkarb	166/109 166/94	0,30	0,5	3,8
Cyromazyna	167/85 167/68	0,45	0,5	4,2	Metrybuzyna	215/187 215/84	0,70	1	8,2
Dezetyl-atrazyna	188/146 188/104	0,40	0,5	7,7	Molinat	188/126 188/55	0,52	2	7,9
Dezizopropyl-atrazyna	174/104 174/96	0,77	1	6,7	Monolinuron	215/126 215/99	0,68	0,5	6,0
Diazynon	305/169 305/97	0,94	0,1	3,1	Monuron	199/72 199/126	0,16	0,1	1,6
Dichlorfos	221/109 223/109	0,55	1	4,6	Nitenpyram	271/126 271/237	0,78	0,5	4,1
Difenokonazol	406/251 408/253	0,56	0,2	2,8	Oksadiksyl	279/219 279/132	0,51	0,5	0,7
Difenoksuron	287/72 287/123	0,65	0,5	2,0	Pendymetalin	282/212 282/194	0,18	1	8,7
Diflubenzuron	311/141 311/158	0,70	1	6,6	Prochloraz	376/308 376/70	0,26	0,2	2,8
Dimetenamid	276/244 276/168	0,24	0,1	3,2	Profenofos	375/305 373/303	0,87	1	1,9
Dimetoat	230/125 230/199	0,76	0,2	2,8	Promekarb	208/109 208/151	0,94	1	6,4
Dimetomorf	388/301 388/165	0,52	0,5	4,3	Prometon	226/142 226/86	0,29	0,1	3,2
Diuron	233/72 235/72	0,70	0,5	5,1	Prometryna	242/158 242/200	0,43	0,2	0,2
Etiofenkarb	226/107 226/77	0,62	0,5	6,7	Propachlor	212/170 212/94	0,72	0,2	3,7
Fenamifos	304/217 304/202	0,59	0,1	2,6	Propanil	218/127 218/162	0,96	1	3,6
Flufenacet	364/194 364/152	0,71	0,2	3,4	Propikonazol	342/159 342/69	0,25	0,5	1,0
Flufenoksuron	489/141 489/158	0,51	1	7,6	Prosulfokarb	252/91 252/128	0,21	0,2	7,3
Fluoksypyr	255/209 255/181	0,74	5	10,4	Simazyna	202/132 202/124	0,90	0,5	3,1
Heksaflumuron	461/158 461/141	0,59	5	9,0	Spiroksamina	298/144 298/100	0,66	0,2	3,4
Imazalil	297/159 299/161	0,37	0,5	8,5	Terbutryn	242/186 242/68	0,18	0,02	2,0
Imazapyr	262/217 262/149	0,54	0,2	3,0	Tiabendazol	202/175 202/131	0,62	0,1	1,6
Imazakwin	312/199 312/267	0,99	0,5	4,5	Tiaklopid	253/126 253/99	0,32	0,2	6,7
Imidaklopid	256/175 256/209	0,73	1	4,6					

Wyniki

Selektywność MRM

Detekcja związków w trybie monitorowania reakcji wielokrotnych (MRM) przy użyciu systemów QTRAP® i potrójnego kwadrupola pozwala osiągnąć najwyższą selektywność dzięki podwójnemu filtrowaniu mas przez analizator mas. Dzięki temu doskonale nadaje się do poszukiwania znanych i nieznanych związków w złożonych próbkach, takich jak ekstrakty owoców czy warzyw. Rycina 4 prezentuje przykład detekcji w trybie MRM 5,8 µg/kg metazachloru w ekstrakcie z moreli. Wysoka selektywność trybu MRM chroni przed nakładaniem się sygnałów pochodzących z matrycy na sygnał badanego związku.

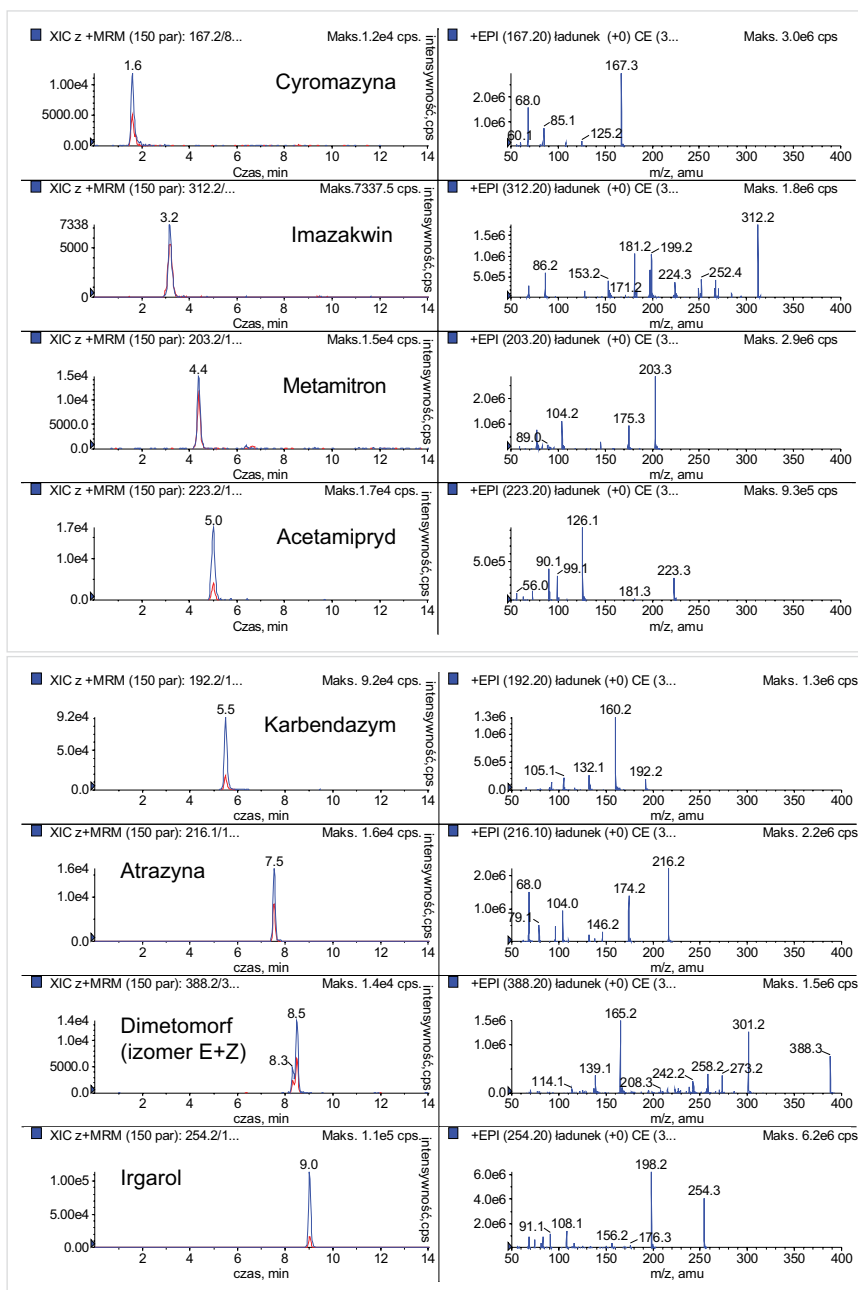
Czułość MRM

Pracując w trybie MRM systemy QTRAP® i potrójny kwadrupol pozwalają na przeprowadzenie analizy ilościowej substancji występujących w stężeniach śladowych i uzyskanie najwyższej czułości pomiaru. W tabeli 1 zebrano uzyskane granice wykrywalności (LOD) dla 75 pestycydów.

Na rycinie 5 zamieszczono przykładowe chromatogramy wybranych pestycydów dodanych do ekstraktu z pomidora na poziomie 10 ng/ml. Wszystkie przejścia MRM w prezentowanym badaniu przesiewowym rejestrowano przy zastosowaniu krótkiego czasu trwania (*dwell time*) wynoszącym 5 ms. Komora zderzeń z akceleracją liniową (LINAC®) pozwala na stosowanie tak krótkiego czasu bez strat czułości.

Potwierdzenie obecności związku za pomocą stosunku par MRM

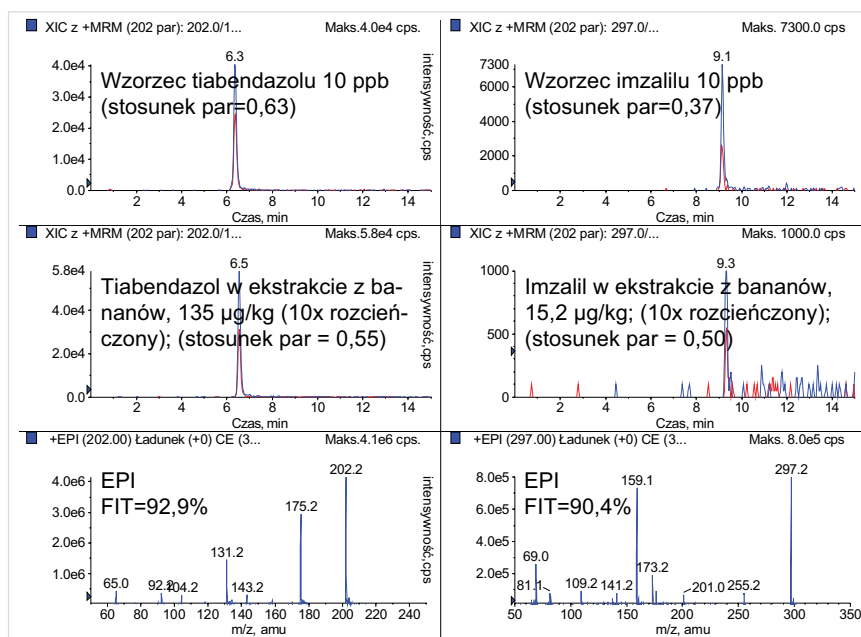
Pomimo wysokiej selektywności detekcji w trybie MRM zawsze istnieje ryzyko otrzymania wyniku fałszywie dodatniego lub ujemnego z powodu nakładających się sygnałów matrycy. W związku z tym, wyniki badania przesiewowego wymagają potwierdzenia. Zazwyczaj monitorowana jest druga para MRM dla danego agalitu (*qualifier*), a uzyskany stosunek par MRM porównywany jest ze współczynnikiem MRM dla próbek wzorcowych. Poziom tolerancji współczynnika MRM niezbędny



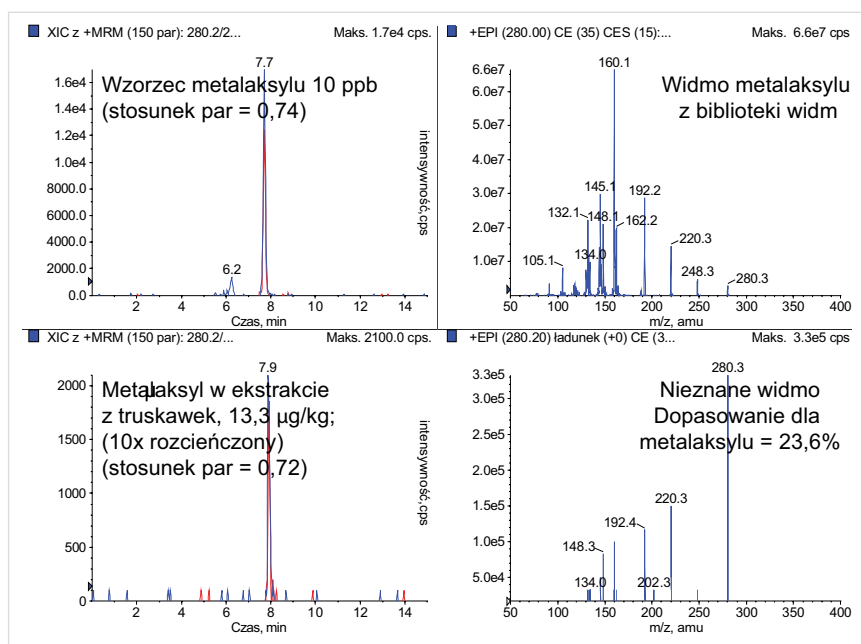
Rycina 5: Przykładowe chromatogramy wybranych pestycydów dodanych do ekstraktu z pomidora na poziomie 10 ng/ml (po lewej) z odpowiadającymi im widmami EPI w tym samym stężeniu (po prawej).

TABELA 2. TOLERANCJA DLA STOSUNKÓW PAR MRM ZGODNIE Z ZALECENIAMI 2002/657/EO¹⁷

Względna intensywność MRM	Maksymalna tolerancja
> 0,5	± 20%
0,2 – 0,5	± 25%
0,1 – 0,2	± 30%
< 0,1	± 50%



Rycina 6: Analiza ilościowa 135µg/kg tiabendazolu i 15,2µg/kg imazalilu w ekstrakcie z bananów z dodatnim potwierdzeniem obecności tiabendazolu (0,55 z tolerancją 0,50-0,76) i ujemnym potwierdzeniem obecności imazalilu (0,50 z tolerancją 0,28-0,46). Wykorzystując potwierdzenie oparte na skanowaniu w trybie EPI i przeszukiwanie bibliotek można uniknąć otrzymania wyniku fałszywie ujemnego (FIT – dopasowanie do widma z biblioteki).



Rycina 7: Analiza ilościowa 13,3 µg/kg metalaksylu w ekstrakcie z truskawek. Wyniki potwierdzono poprzez obliczenie współczynnika MRM (0,72 z tolerancją 0,59-0,89), ale przeszukiwanie biblioteki widm wykazało, że jest to wynik fałszywie dodatni

dla potwierdzenia obecności związku określany jest przez różne wytyczne, m.in. przez rozporządzenie Komisji Europejskiej 2002/657/EC (tabela 2). Rycina 4 prezentuje przykład potwierdzenia obecności związku w oparciu o stosunek par MRM dla 5,8µg/kg metazachloru, wykrytego w ekstrakcie z moreli.

Potwierdzenie obecności związku za pomocą QTRAP® MS/MS i funkcji przeszukiwania bibliotek widm fragmentacyjnych
 Alternatywnie, potwierdzenie można przeprowadzić przy pomocy pełnego skanowania MS/MS i przeszukiwania bibliotek, w celu porównania uzyskanego

widma z widmem wzorca. Jak pokazano na rycinie 2, potwierdzenie obecności związku w oparciu o widma MS/MS jest dużo skuteczniejsze przy użyciu systemów QTRAP® niż na spektrometrach mas QqQ, ze względu na wyższą czułość i szybsze skanowanie tych pierwszych. Ponadto, w porównaniu z tradycyjnymi pułapkami jonowymi, systemy QTRAP® zapewniają szybsze otrzymanie bardziej charakterystycznych widm MS/MS.

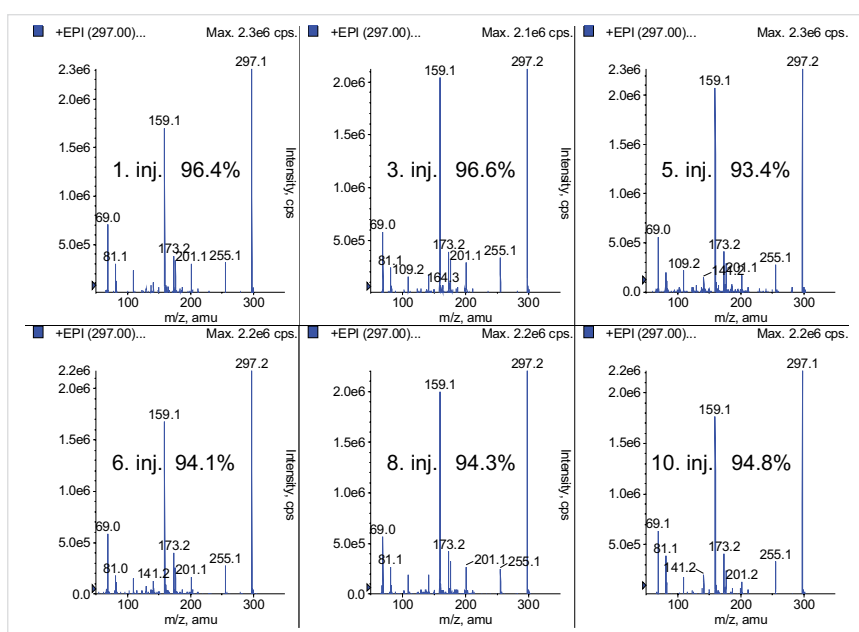
Na rycinie 5 zaprezentowano widma uzyskane w trybie wzmocnionego skanowania jonów potomnych (EPI) wybranych pestycydów dodanych do ekstraktu z pomidora do uzyskania stężenia 10 ng/ml. Widma te zostały zebrane automatycznie przy użyciu IDA, z wykorzystaniem 75 przejść MRM. Uzyskane podczas skanowania EPI widma są wysoce selektywne i stanowią pełny „molekularny odcisk palca” analitu, potrzebny do potwierdzenia jego obecności w próbce. Widma EPI mają również wyższą czułość i można je porównywać z widmami zgromadzonymi w bibliotekach widm fragmentacyjnych.

Opisany wyższy stopień potwierdzania może być wykorzystany do zminimalizowania potencjalnego ryzyka otrzymania na podstawie stosunku par MRM wyniku fałszywie dodatniego lub fałszywie ujemnego. Taki przykład ilustruje rycina 6. Podczas badania ekstraktu z bananów zidentyfikowano i określono stężenie pestycydów tiabendazolu i imazalilu. Mimo to, jedynie obecność tiabendazolu została potwierdzona na podstawie stosunku par MRM, z kolei obecności imazalilu nie mogła zostać potwierdzona (stosunek par MRM 0,50 przy tolerancji 0,28-0,46). Dla porównania, bogate widma EPI użyte do przeszukiwania bibliotek widm jednoznacznie potwierdziły obecność obu zanieczyszczeń, co pozwoliło uniknąć otrzymania fałszywie ujemnego wyniku dla imazalilu.

Rycina 7 prezentuje kolejny przykład ilustrujący zalety przeszukiwania bibliotek MS/MS na etapie potwierdzania. Współczynnik MRM wyraźnie potwierdza obecności metalaksylu

TABLE 3. POWTARZALNOŚĆ WYNIKÓW BADAŃ POTWIERDZAJĄCYCH OPARTYCH NA STOSUNKU PAR MRM I PRZESZUKIWANIU BIBLIOTEK WIDM FRAGMENTACYJNYCH, NA PODSTAWIE POWTARZANYCH NASTRYKÓW FORTYFIKOWANEGO EKSTRAKTU Z POMIDORA (N=10)

Pestycyd	Stosunek par MRM	%CV	Dopasowanie do biblioteki (FIT)	%CV
Azoksystrobin	0,22	8,9	88,8	1,8
Dimetomorf	0,76	8,8	95,7	0,5
Flufenacet	0,90	11,8	91,2	1,3
Imazalil	0,52	13,6	94,7	1,3
Imidaklopyrd	0,39	25,3	78,1	5,5
Metabenzotiazuron	0,47	11,7	95,9	1,0
Tiabendazol	0,66	4,9	91,2	2,4



Rycina 8: Powtarzane analizy ekstraktu z bananów, zawierającego 15,2 µg/kg imazalili – dopasowanie widm EPI do widm z biblioteki wskazują na wysoką powtarzalność takiego sposobu potwierdzania na systemach QTRAP® (inj. - nastrzyk)

w ekstrakcie z truskawek. Natomiast użycie odpowiedniego widma EPI do przeszukiwania biblioteki widm jednoznacznie wykazuje, że jest to wynik fałszywie dodatni. Badana próbka truskawek nie zawierała metalaksylu.

Powtarzalność analizy ilościowej i potwierdzania obecności związków
Przeprowadzenie analizy potwierdzającej obecność związków przy pomocy automatycznie wyzwalanego skanu EPI zamiast opierania się na stosunku par MRM pozwala na zmniejszenie liczby monitorowanych przejść MRM. Dzięki temu, stosując spektrometr mas QTRAP®,

do detekcji i potwierdzenia 75 pestycydów można obserwować jedynie 75, a nie aż 150 par MRM. Zmniejszenie liczby monitorowanych przejść MRM skraca długość cyklu całego eksperymentu MRM (QTRAP®: 1,1 s a QqQ: 1,5s) pomimo zastosowania dłuższego czasu przejścia dla każdej pary MRM. Skrócenie długości cyklu poprawia powtarzalność metody, ponieważ pozwala na uzyskanie większej ilości punktów na obwiedni pików chromatograficznego.

Do ekstraktu z pomidora wprowadzono mieszaninę pestycydów i 10-krotnie przeanalizowano ją przy użyciu

metod QqQ i QTRAP®. Dane przedstawione w tabeli 3 i przykładowe widma przedstawione na rycinie 8 jednoznacznie dowodzą, że widma EPI porównane z danymi z biblioteki widm fragmentacyjnych pozwalają uzyskać wyższą powtarzalność niż obliczanie współczynnika MRM.

Podsumowanie

Ze względu na nieporównywalną selektywność i czułość najpopularniejszą metodą stosowaną w badaniach przesiewowych analitów oraz w analizie ilościowej jest monitorowanie reakcji wielokrotnych (MRM, *Multiple reaction Monitoring*) możliwe do wykonania za pomocą potrójnego kwadrupola lub systemów QTRAP® LC/MS/MS. Stanowiąc trzon tej metody, podwójne filtrowanie masy w analizatorze mas pozwala na uzyskanie najlepszego stosunku sygnału do szumu (S/N) i najniższych granic wykrywalności (LOD), przy jednoczesnym zachowaniu doskonałej powtarzalności i liniowego zakresu dynamicznego.

W przypadku wielu zastosowań, takich jak analiza żywności, badania środowiska i badania kryminalistyczne, do potwierdzenia obecności wykrytych analitów formalnie wymagane są dodatkowe informacje spektrometryczne. Zazwyczaj potwierdzenie wykonywane jest poprzez monitorowanie dwóch przejść MRM dla każdego związku i obliczenie stosunku par MRM.

Jednakże rosnące wymagania dotyczące badania coraz większej liczby zanieczyszczeń przy coraz większym różnicowaniu próbek powodują, że wymagana liczba przejść MRM przekracza możliwości nawet najbardziej nowoczesnych spektrometrów mas typu potrójny kwadrupol takich jak urządzenia firmy AB SCIEX z opatentowaną komorą zderzeń z akceleracją liniową (LINAC). Powoduje to ograniczenie liczby związków, które mogą być ujęte w pojedynczym badaniu przesiewowym i/lub zmniejsza to powtarzalność i dokładność pomiaru ze względu na niedostateczną liczbę punktów uzyskanych na obwiedni pików chromatograficznego.



Dzięki połączeniu selektywnego wykrywania MRM z wysoce czułym skanowaniem MS/MS za pomocą Q3 jako liniowej pułapki jonowej przedstawiony tu hybrydowy system z potrójnym kwadrupolem i liniową pułapką jonową (QTRAP[®]) dostarcza zupełnie nowych możliwości w badaniach przesiewowych i przy potwierdzaniu obecności analitu w analizach wielozwiązkowych. Zastosowanie warunkowego zbierania danych (IDA) pozwala na automatyczne rejestrowanie widma EPI wykonywane w wyniku wykrycia sygnału MRM powyżej ustalonej liczby zliczeń jonów. W wyniku selekcji jonu macierzystego w Q1, jonom fragmentacyjnym tworzonemu w komorze zderzeń oraz gromadzeniu jonów w LIT, otrzymywane widma EPI są tak czułe i selektywne jak sygnały MRM i zawierają pełny „molekularny odcisk palca” analitu. Ponieważ fragmentacji jonu macierzystego zachodzi w komorze zderzeń, powstałe widma są niezwykle bogate i jako takie mogą być używane do przeszukiwania bibliotek widm fragmentacyjnych.

Informacje otrzymane podczas pełnego skanowania widm MS/MS pozwalają potwierdzać obecność związku z wysokim prawdopodobieństwem, minimalizując ryzyko uzyskania wyniku fałszywie dodatniego lub fałszywie ujemnego. Ponadto, skrócony czas

całkowitego cyklu dla wszystkich przejść MRM pozwala na wydłużenie czasu pojedynczych przejść MRM (*dwell time*), co poprawia stosunek S/N i skutkuje lepszą powtarzalnością i dokładnością otrzymywanych wyników. Zastosowanie potwierdzania poprzez widno EPI pozwala również na zwiększenie ilości związków monitorowanych za pomocą skanowania wstępnego w trybie MRM.

Bibliografia

1. Nota techniczna „Zalety zastosowania potrójnego kwadrupola w porównaniu do spektrometru mas z pojedynczym kwadrupolem do analizy ilościowej i potwierdzenia obecności pestycydów w próbkach wody i gleby” #114AP55-01
2. J. W. Hager: Rapid Commun. Mass Spectrom. 16 (2002) 512-526
3. J. W. Hager and J. C. Y. Le Blanc: Rapid Commun. Mass Spectrom. 17 (2003) 1056-1064
4. B. A. Collings et al.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. 14 (2003) 622-634
5. P. Marquet et al.: J. Chromatogr. B 789 (2003) 9-18
6. C. A. Mueller et al.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 19 (2005) 1332-1338
7. S.M.R Stanley et al.: J. Chromatogr. B 836 (2006) 1-14
8. H. D. Hernando et al.: Anal. Bioanal. Chem. 389/6 (2007) 1815-1831
9. M. J. M. Bueno et al.: Anal. Chem. 79/24 (2007) 9372-9384
10. M. Gros et al.: J. Chromatogr. A (2007) w druku
11. Hongying Gao et al.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 21 (2007) 3683-3693
12. R. D. Unwin et al.: Molecular and Cellular Proteomics 4/18 (2005) 1134-1144
13. E. Ciccimaro et al.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 20 (2006) 3681-3692
14. L. Anderson et al.: Molecular and Cellular Proteomics 5/4 (2006) 573-588
15. J. R. Whiteaker et al.: J. Proteome Research 6/10 (2007) 3962-3975
16. M. Anastassiades et al.: J. AOAC Int. 86 (2003) 412-431
17. Decyzja komisji europejskiej nr 2002/657/EC

Author

André Schreiber (Applied Biosystems, Concord, Ontario, Canada)

Wylącznie do celów naukowych. Nie stosować w diagnostyce laboratoryjnej.

a QTRAP, Analyst i LINAC są zastrzeżonymi znakami towarowymi firmy AB Sciex. Wszystkie pozostałe znaki towarowe są wyłączną własnością odpowiednich właścicieli
Publikacja nr 114AP75-01



AB SCIEX
71 Four Valley Dr., Concord, Ontario, Canada. L4K 4V8.
AB SCIEX LP is ISO 9001 registered.

Dział Sprzedaży Międzynarodowej
Informacje na temat lokalnych biur sprzedaży można uzyskać telefonicznie w centrali lub na naszej stronie internetowej: www.absciex.com.cfm