

Лабораторный практикум по хромато-масс спектрометрии низкомолекулярных соединений.

Необходимые материалы:

1. Исследуемое вещество (преднизолон в ампулах, производитель «Никомед»)
2. Буфер А (состав: 0,1% р-р муравьиной кислоты в воде), буфер В (состав: ацетонитрил)
3. Пробирка эппендорф (для ПЦР, объемом- 200 μ л; если предусмотрено смешение образца с буфером – то понадобятся пробирки эппендорф для приготовления раствора, объемом 1,5 – 2 мл)
4. Автоматические пипетки (пипетки эппендорф с диапазонами 0,5 -10 μ л, 2-20 μ л; при разведение буфером понадобится 20-200 μ л)
5. Хроматограф Agilen 1100
6. Масс-спектрометрическая ловушка Esquire 3000
7. Мешалка типа Vortex - Yellow line
8. Центрифуга Eppendorf, либо Hettich Zentrifugen пробирок 0,2-1,5 мл

Приготовление раствора.

Вскрыть ампулу преднизолона, автоматической пипеткой отобрать 10 μ л на исследование, поместить отобранную фракцию в пробирку эппендорфа (объем 200 μ л).

При необходимости развести преднизолон в буфере А (состав: 0,1% р-р муравьиной кислоты в воде), разведение 5 μ л преднизолона на 45 μ л буфера А (разведение на один порядок). Полученную смесь перемешать с помощью мешалки (для эппендорфов Yellow line, 2200 оборотов/мин в течение 0,5-1 минуты). Отцентрифугировать образец (данная операция необходима для того, чтобы образец не остался на стенках пробирки. Уравновесить и центрифугировать (Hettich Zentrifugen) при мощности 40% в течение 1 минуты). Автоматической пипеткой отобрать 10 μ л на исследование, поместить отобранную фракцию в пробирку эппендорфа (объем 200 μ л).

Общее описание прибора и программного обеспечения.

Прибор включается в следующем порядке: сначала запускается масс-спектрометрическая ловушка, затем последовательно включаются все составные части хроматографа (пять кнопок).

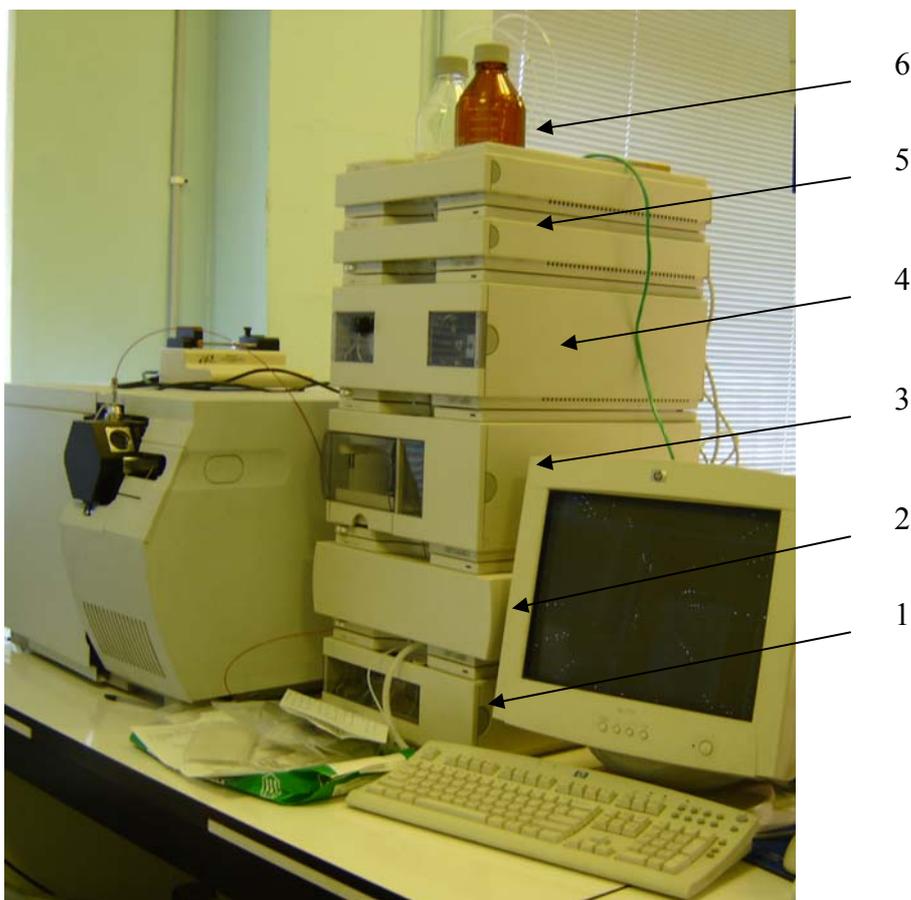


Рис. 1 Внешний вид хромато-масс-спектрометра. Стрелками указаны основные элементы прибора.

- 1 – масс-спектрометрическая ловушка
- 2 – хроматограф
- 3 – термостат
- 4 – колонка хроматографа
- 5 – дегазатор
- 6 – емкости для буфера А и В.

После включения прибора необходимо запустить соответствующие программное обеспечение – программу «Instrument Online» (иконка программы находится на рабочем столе присоединенного к прибору компьютера), подпрограмму «Method & Run Control». После загрузки программы оператору становятся доступны 3 рабочих окна:

- 1. – окно контроля общей схемы прибора (Method & Run Control)
- 2. – окно контроля масс-спектрометрии (Esquire Control)
- 3. – окно для анализа данных (Data Analysis)

а) Окно «контроль общей схемы прибора»

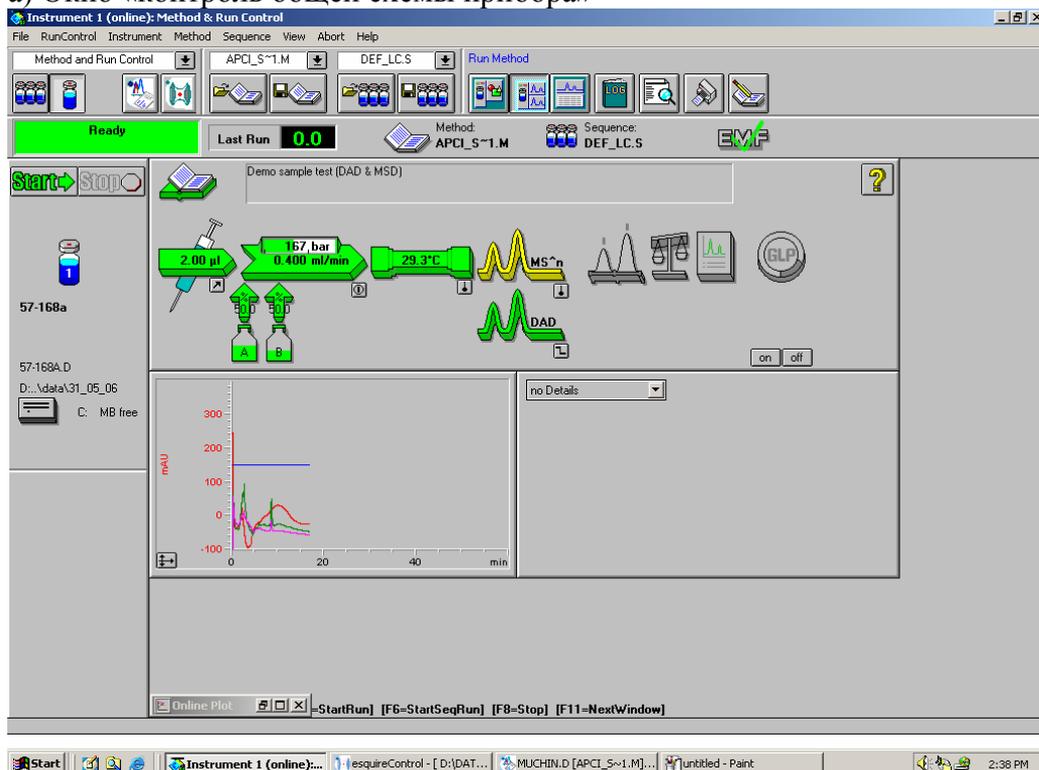


Рис 2. Окно контроля общей схемы прибора (Method & Run Control).

Данное окно предназначено для

- описания пробы – файл с записываемыми данными, название выборки, позиция забора;
- характеристики забора пробы – глубина погружения иглы, кол-во отбираемого вещества;
- характеристики параметров градиента.
- Описание параметров количества буферов (в том случае, если менее 0.1 литра, необходимо перед началом работы восполнить недостающий буфер)

В окне контроля общей схемы прибора в нижнем левом углу представлена хроматограмма

Хроматограмма – ajust – становится видна хроматограмма (красная линия)

В разделе-change – можно задать хроматограмму необходимой длины волны(на рис.2 это линии зеленого и розового цвета)

б) Окно «контроль масс-спектрометрии»

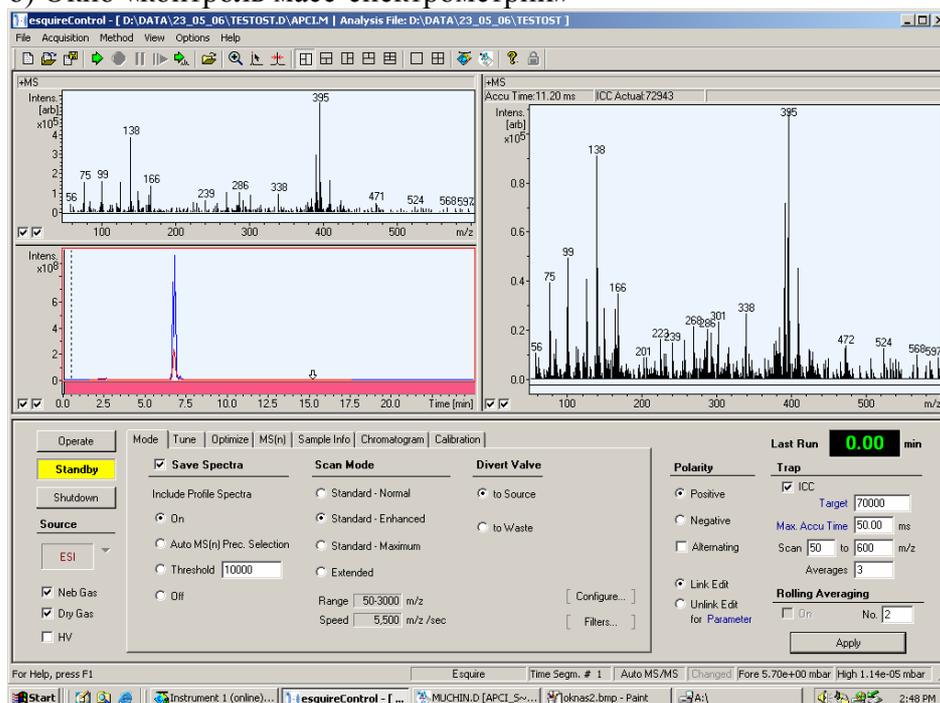


Рис 3. Окно контроля масс-спектрометрии (Esquire Control).

В данном окне представлены следующие поля:

верхнее левое поле – детектируемые массы (M_c , M_c2) это общий (схематичный) вид спектра

нижнее левое поле – хроматограммы (ВРС, ТИС, ЕИС) В данном случае используется для визуализации общего тока, образованного всеми ионами попадающими в детектор (красный график) И оптическая плотность на длине волны 214 нм (в условиях данной работы)

верхнее правое поле – используется для отображения детализированного спектра с высоким разрешением и спектров фрагментации ионов.

нижнее поле – состоит из восьми вкладок с текущими параметрами работы прибора

в) Окно анализа полученных данных.

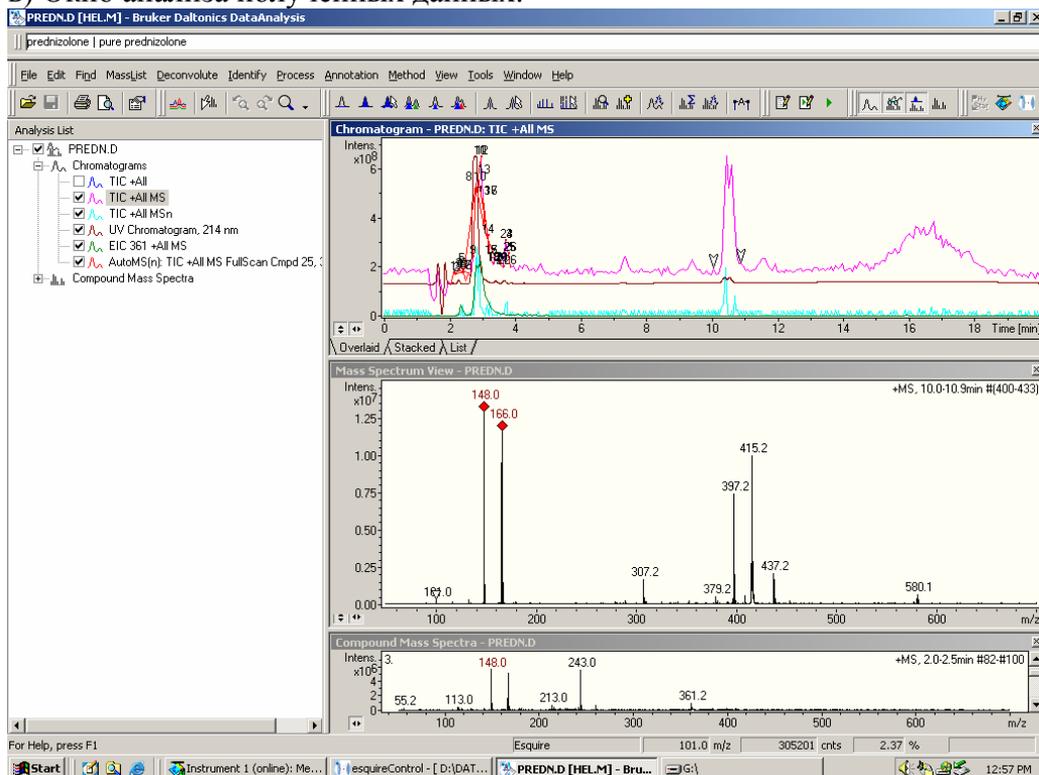


Рис. 4. Окно для анализа данных (Data Analysis).

file-open- открытие записанного файла.

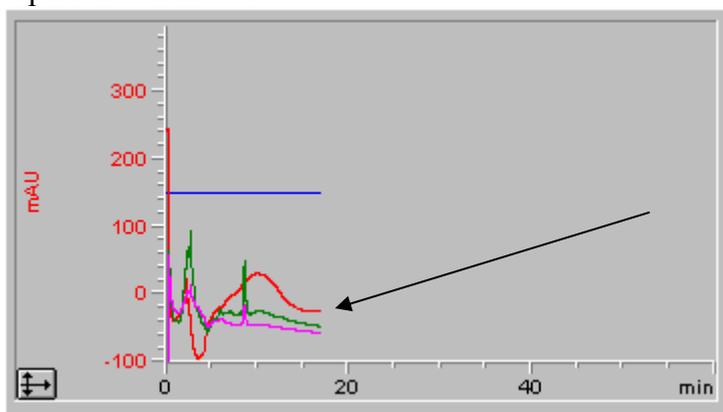
chromatogram- edit – задание параметров отображения хроматограмм (по соответствующей длине волны – UV chromatogram, по искомой массе - EIC)

После выделения правой кнопкой мыши соответствующего пика хроматограммы в нижнем окне отображаются массы, присутствующие в данном пике.

Поиск MC2 – Find-Compound AutoMSn – доступны все MC2 спектры, полученные в автоматическом режиме.

Подготовка к работе

Включить прибор. Дождаться, пока красная линия хроматограммы в окне 1 будет параллельна оси x.



Снятие первого спектра blank - без забора материала, пустой прогон. Параметры задаются такие же, как и при дальнейшем снятии. Не указывается позиция забора пробы.

При проведении анализа: чем меньше пиков присутствует на хроматограмме – тем лучше.

Регистрация масс-спектра

Отобранную пробу (10 μ л), вносят в виалу масс-спектрометра, которая помещается в выбранную позицию. При работе с одним образцом помещают в передний левый угол, что соответствует позиции 1.

В окне «Method & Run Control» задают параметры и условия снятия спектра:

1. В первую очередь заполняется поле: записываемыми данными, название выборки, позиция забора, комментарии к образцу

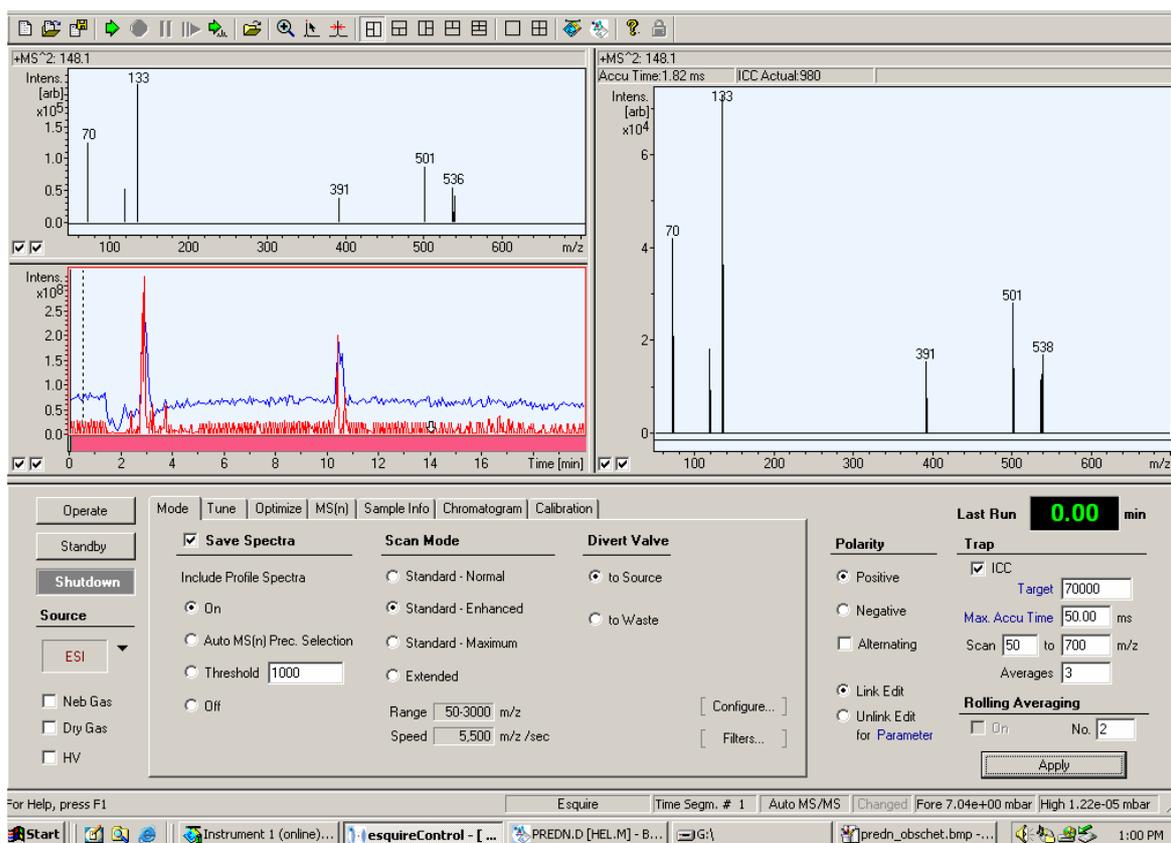
2. Далее заполняется поле, характеризующее забор пробы – глубина погружения иглы, количество отбираемого вещества

3. На следующем поле заполняются характеристики параметров градиента

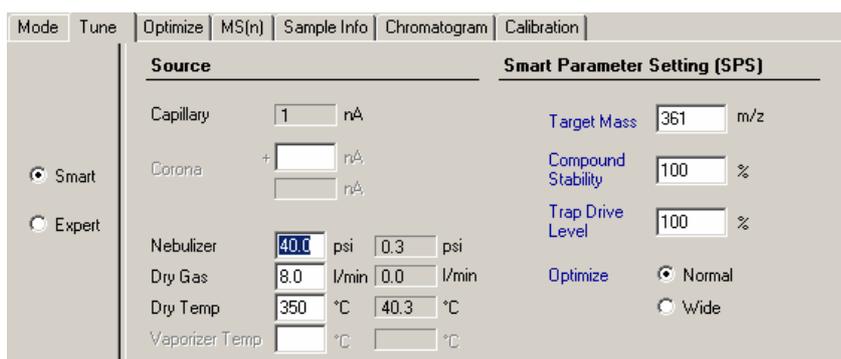
	Time	%B	Flow	Max. Press.
1	2.00	50.0		
2	10.00	80.0		
3	15.00	100.0		
4	18.00	80.0		
5	20.00	50.0		

4. количества буферов (в том случае, если менее 0.1 литра, необходимо перед началом работы восполнить недостающий буфер)

Окно контроля масс-спектрометрии «Esquire Control»



В главном окне программы управления прибором вы увидите
 В правом нижнем углу «Scan» задаем диапазон поиска вещества с молекулярной массой/заряд. В рамках данной работы диапазон от 50 до 700 m/z.



«Target Mass» задается молекулярная масса вещества/заряд вещества. В нашем случае преднизалон, его молекулярная масса 361, заряд 1. Другие параметры в этом окне менять не следует.

Проверить соответствие параметров установленных в используемом приборе приведенным ниже картинкам.

Mode | Tune | Optimize | MS(n) | Sample Info | Chromatogram | Calibration

Smart Ramp Capillary

Target Mass m/z

Add. Monitor Mass m/z

Ramp Range
from to V

Adapt Scan Range Averages

Results

Message List

Previous New

Start Undo

Mode | Tune | Optimize | MS(n) | Sample Info | Chromatogram | Calibration

Auto MS (2) Estimated Cycle Time min [Advanced...]

Auto MS(n)
 Manual MS(n)
 MRM

Precursor Selection

Include No. of Precursor Ions
 Exclude Threshold Abs
Threshold Rel %

Active Exclusion
Excluded after Spectra
Release after min

Prec. Operation

SPS
 Max Res Scan
 Only

Acq. Parameter

MS/MS Frag Ampl V

[Fragmentation...]

Mode | Tune | Optimize | MS(n) | Sample Info | Chromatogram | Calibration

Data File

Prefix/Counter Manual

Filename

Subdirectory

Path

Sample Parameter

Sample Name

Comment

Mode | Tune | Optimize | MS(n) | Sample Info | Chromatogram | Calibration

BPC,MS
TIC,All MS/MS

Add
Change
Delete
Delete All
Reset

Type: Masses: Enable

Color: Filter: Pol:

Mode | Tune | Optimize | MS(n) | Sample Info | Chromatogram | Calibration

Mass List

Auto
 Scan
 Isol
 Frag

Scan Calibration
 Presearch

Isolation Calibration
 Presearch

Fragmentation Calibration
 Presearch

Start Results... Detector...

Анализ полученных данных

Ниже представлено окно для анализа данных (Data Analysis)

В верхнем правом поле представлена хроматограмма, полученная для преднизалона. Выбрав функцию разметка спектра, (показанную стрелочкой). Держа правую кнопку мышки, «зарезаете» интересующий вам участок хроматограммы, при этом в нижнем правом окне появляется MS спектр, соответствующий выбранному участку хроматограммы.

На центральном правом поле масс-спектр Вы увидите детализированный спектр выбранного диапазона, на котором красными ромбами будут отмечены те сигналы, при регистрации которых во время эксперимента были дополнительно зарегистрированы спектры фрагментации.

