Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Laboratoriotekniikka

2015

Kirsi Rosberg

SISÄISTEN STANDARDIEN PITOISUUSMÄÄRITYKSEN OPTIMOINTI LC-ESI-MSMS -LAITTEISTOLLE

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

Turun ammattikorkeakoulu

Bio- ja elintarviketekniikka | Laboratoriotekniikka

Toukokuu 2015 | 25 sivua

Ohjaajat

Taina Hovinen, lehtori

Marko Ahlas, R&D Chemist

Kirsi Rosberg

SISÄISTEN STANDARDIEN PITOISUUSMÄÄRITYKSEN OPTIMOINTI LC-ESI-MSMS -LAITTEISTOLLE

Opinnäytetyön tavoitteena oli optimoida ja testata menetelmä Sciex API 5000 LC-ESI-MSMS -laitteistolle aminohappojen ja asyylikarnitiinien sisäisten standardien (AA ja AC IS) pitoisuuksien määrittämiseksi.

Sisäisten standardien pitoisuusmääritykset tehdään tällä hetkellä Sciex API 2000 LC-ESI-MSMS -laitteistolla. Laitteisto on jo suhteellisen vanha ja sen suorituskyky on laskussa. Ongelmia on erityisesti asyylikarnitiinimäärityksessä, jossa hajonta ei ole aina hyväksymisrajoissa. Tämän takia menetelmä optimoitiin Sciex API 5000 LC-ESI-MSMS -laitteistolle. Tuotannollisena riskinä on myös, että vanha laitteisto hajoaa ja sitä ei saada korjattua, koska laitteeseen ei enää ole saatavilla varaosia.

Menetelmäparametrit optimoitiin Sciex API 5000 LC-ESI-MSMS -laitteistolle, käyttäen Wallacissa valmistettuja laadunvalvontatesteissä hyväksyttyjä komponentteja. Valmistetut näytteet määritettiin rinnakkain Sciex API 2000 ja Sciex API 5000 LC-ESI-MSMS -laitteistoilla. Saatu data käsiteltiin ja siirrettiin validoituihin tulospohjiin, jonka jälkeen määritysten tuloksia analysoitiin ja verrattiin keskenään.

Kaikki laadunvalvonnan hyväksymiskriteerit täyttyivät molemmilla laitteistoilla. Laitteistoilla saadut pitoisuudet erosivat toisistaan hyvin vähän. Yhteenvetona voitiin todeta, että uusi optimoitu menetelmä oli vastaava kuin vanha menetelmä Sciex API 2000 LC-ESI-MSMS -laitteistolla.

ASIASANAT:

Massaspektrometria, optimointi

BACHELOR´S THESIS | ABSTRACT
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Laboratory Technology

May 2015| 25 pages

Instructors

Taina Hovinen, Senior Lecturer

Marko Ahlas, R&D Chemist

Kirsi Rosberg

OPTIMIZATION OF INTERNAL STANDARD CONCENTRATION ASSAY FOR LC-ESI-MSMS EQUIPMENT

The aim of this Bachelor´s thesis was to optimize and test a method for Sciex API 5000 LC-ESI-MSMS equipment to determine the concentrations of amino acid and acylcarnitine internal standards (AA and AC IS).

At the moment IS concentrations are determined by means of a Sciex API 2000 LC-ESI-MSMS system. The equipment is already relatively old, and its performance is declining. The problem is particularly in the acylcarnitine assay, where within one run the deviation of internal standard is not always within the acceptance limits. This is the reason why this assay was optimized for the Sciex API 5000 LC-ESI-MSMS system. A risk from the production point of view is also that the old system may break down and can not be repaired because there are no spare parts available any longer.

The method parameters were optimized for Sciex API 5000 LC-ESI-MSMS using approved components manufactured by Wallac Oy. Samples were analysed with both Sciex API 2000 LC-ESI-MSMS and Sciex API 5000 LC-ESI-MSMS. The data of both systems were processed and transferred to validated result tables, after which the test results were analyzed and compared.

All quality control acceptance criteria were met with both systems. The results from the assays differed very little between the systems. In summary, the new optimized method using the Sciex API 5000 LC-ESI-MSMS system was equal to the old method with the Sciex API 2000 LC-ESI-MSMS system.

KEYWORDS:

Mass Spectrometry, optimization

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET **6**

1 JOHDANTO **6**

2 MASSASPEKTROMETRIA **8**

2.1 Tandemmassaspektrometria 9

2.1.1 Näytteen ionisointi 11

2.1.2 Ionien detektointi 12

2.1.3 Massaspektri ja tietojen analysointi 13

3 MÄÄRITYKSEN TAUSTAA **13**

4 MENETELMÄN OPTIMOINTI **15**

4.1 Käytetyt laitteet 15

4.2 Työn suoritus 17

4.2.1 Optimointi 18

4.2.2 Optimoidun menetelmän testaus 20

4.3 Tulokset 21

5 YHTEENVETO JA PÄÄTELMÄT **24**

LÄHTEET **25**

KUVAT

Kuva 1. Massaspektrometrialaitteisto. 9
Kuva 2. Tandemmassaspektrometrin toimintaperiaate. 10
Kuva 3. Kolmoiskvadrupoli. 11
Kuva 4. MRM-spektri. 14
Kuva 5. Sciex API 5000 LC-ESI-MSMS -laitteisto. 16
Kuva 6. Sciex API 2000 LC-ESI-MSMS -laitteisto. 17
Kuva 7. Menetelmien AC IS –pitoisuusero (%) laitteiden välillä. 21
Kuva 8. Menetelmien AA IS –pitoisuusero (%) laitteiden välillä. 21
Kuva 9. AC IS -näytteiden pitoisuusmäärityksen toistettavuus yhden levyn sisällä. 22
Kuva 10. AA IS -näytteiden pitoisuusmäärityksen toistettavuus yhden levyn sisällä. 22

TAULUKOT

Taulukko 1. Ionisaatioparametrit ja niiden vaihteluvälit sekä tyypilliset arvot. 19
Taulukko 2. Analyyttispesifiset parametrit ja niiden vaihteluvälit sekä tyypilliset arvot. 20

KAAVAT

Kaava 1. Näytteen pitoisuuden laskeminen. 15

KÄYTETYT LYHENTEET

AA	aminohappo; amino acid
AC	asyylikarnitiini; acylcarnitine
CAD	törmäyskaasun painetta säätelevä parametri. Collision Activated Dissociation
cps	counts per second
CUR	verhokaasua säätelevä parametri. Curtain Gas
DP	suutinaukon ja kartiolevyn välistä jännite-eroa säätelevä parametri. Declustering Potential
EP	parametri, joka kontrolloi jännitettä, joka ohjaa ionit Q0:n läpi. Entrance Potential
ESI	sähkösumutusionisaatio; electrospray ionisation
GS1	sumutuskaasua säätelevä parametri. Gas 1
GS2	apukaasua säätelevä parametri. Gas 2
HPLC	korkean suorituskyvyn nestekromatografia; High Performance Liquid Chromatography
Ihe	liitososan lämmitystä säätelevä parametri. Interfase Heater
IS	ionsaationeulan jännitettä säätelevä parametri. IonSpray Voltage
IS	sisäinen standardi; Internal Standard
m/z	massan ja varauksen suhde; mass-to-charge ratio
MRM	useiden reaktioiden seuranta; Multiple reaction monitoring
MSMS	tandemmassaspektrometria; tandem mass spectrometry
TEM	ionisaation lämpötilaa säätelevä parametri. Temperature

1 JOHDANTO

Opinnäytetyön tavoitteena oli optimoida ja testata menetelmä Sciex API 5000 LC-ESI-MSMS –laitteistolle aminohappo- ja asyylikarnitiinisisäisten standardien (AA ja AC IS) pitoisuuksien määrittämistä varten. Tarkoitus oli tehdä alustava testaus laitteiston soveltuvuudesta tähän käyttöön. Mikäli menetelmä todettaisiin tarkoitukseen sopivaksi, se voitaisiin tulevaisuudessa verifioida ja ottaa tuotantokäyttöön.

Sisäisten standardien pitoisuusmääritykset tehdään tällä hetkellä Sciex API 2000 LC-ESI-MSMS -laitteistolla. Laitteisto on jo suhteellisen vanha ja sen suorituskyky on laskussa. Ongelmia on erityisesti asyylikarnitiinimäärityksessä, jossa menetelmän toistettavuus ei ole aina hyväksymisrajoissa. Tuotannollisena riskinä on myös, että vanha laitteisto hajoaa ja sitä ei saada korjattua, koska laitteistoon ei enää ole saatavilla varaosia.

AA ja AC –sisäisiä standardeja käytetään yhdessä ihmisen kokoverestä valmistettujen kontrollien kanssa aminohappojen ja asyylikarnitiinien pitoisuuksien määrittämiseen vastasyntyneiden kantapäästä otetusta verinäytteestä. Kantapääverinäyte otetaan 3-5 päivän ikäisestä lapsesta. Näistä kantapääverinäytteistä voidaan määrittää useita erilaisia rasvahappo- ja aminohappoaineenvaihduntahäiriöitä. Aineenvaihduntahäiriöt ovat yleensä helposti hoidettavissa, mikäli ne havaitaan riittävän aikaisessa vaiheessa.

Opinnäytetyössä valmistettiin näytteet kullekin aminohapolle ja asyylikarnitiinille sekä optimoitiin niille parhaat mahdolliset ajo-olosuhteet. Kun parametrit oli optimoitu, ajettiin molemmilla laitteistoilla samat näytteet ja verrattiin tuloksia keskenään. Näin varmistettiin luodun menetelmän toimivuus Sciex API 5000 LC-ESI-MSMS -laitteistolla.

Opinnäytetyö tehtiin Wallac Oy:ssa, joka on osa maailmanlaajuista PerkinElmer-konsernia. PerkinElmer-konsernilla on toimipisteitä yli 150 maassa. Wallac Oy kehittää, tuottaa ja markkinoi mittalaitteita, reagensseja ja ohjelmistoja lääkeainekehitykseen ja tutkimukseen sekä diagnostisia

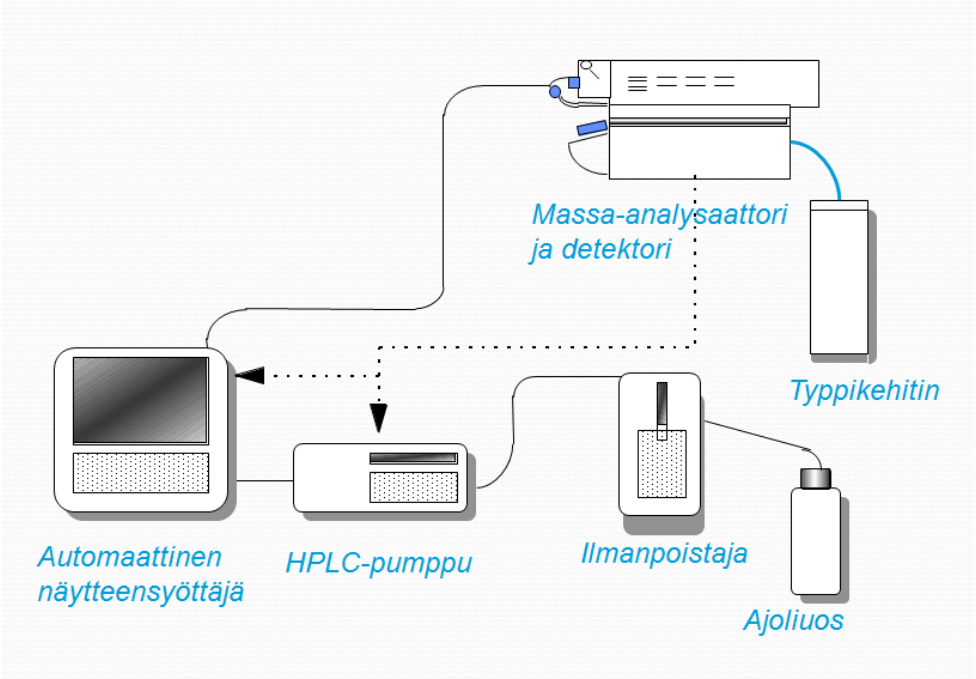
testausjärjestelmiä kliiniseen diagnostiikkaan ja joukkoseulontaan. Wallac Oy on perustettu vuonna 1950 ja työllistää tälllä hetkellä noin 530 henkeä.

Kymmenen vuotta sitten siirrettiin ensimmäiset vastasyntyneiden seulontaan tarkoitetut MSMS-teknologiaan perustuvat reagenssikitit Yhdysvalloista Turkuun tuotettaviksi. Kymmenessä vuodessa MSMS-tuotelinja on kasvanut lähes 20% vuositasolla ja on tänä päivänä yksi PerkinElmer-konsernin merkittävimpiä tuotelinjoja. MSMS-tuotannossa työskentelee tällä hetkellä linjavastaava ja neljä tuotantolaboranttia.

2 MASSASPEKTROMETRIA

Massaspektrometria on menetelmä, jossa tutkittavat molekyylit ionisoidaan ja näin muodostuneet ionit erotellaan ja detektoidaan niiden massa/varaus-suhteen (m/z) mukaisesti. Ionien pitoisuudet lasketaan analyysin tuloksena saatavasta massaspektristä. Massaspektrometrin toiminta voidaan jakaa neljään osaan. Nestefaasissa olevat molekyylit saatetaan kaasufaasiin ja ne ionisoidaan. Muodostuneet ionit erotellaan niiden massa/varaus-suhteen perusteella ja viimeiseksi ionit detektoidaan. (Riekkola & Hyötyläinen 2002)

Massaspektrometrialaitteisto muodostuu näytteensyöttösysteemistä, ionisaatiokammiosta, analysaattorista ja detektorista. Näytteensyöttösysteemi koostuu ilmanpoistajasta, HPLC-pumpusta (High Performance Liquid Chromatography, korkean suorituskyvyn nestekromatografia) ja näytteensyöttäjästä, kuva 1 (Kottonen 2005). HPLC-pumppu kuljettaa ajoliuosta ja näytettä massa-analysaattoriin. Ajoliuos kulkee ilmanpoistajan kautta, jotta liuoksesta saadaan pois mahdollisimman paljon ilmaa. Määritettävät näytteet ovat 96-kuoppalevyillä, joista automaattinen näytteensyöttäjä annostelee näytteet analysaattoriin yhdessä ajoliuoksen kanssa. Näyteliuos kuljetetaan ionilähteeseen, jossa molekyylit saatetaan kaasufaasiin ja ionisoidaan. Ionit ohjataan analysaattoriin. Analysaattori on aina alipaineessa, jotta analyyttien ja ilmamolekyylien väliset törmäykset voidaan minimoida. Näytteet myös höyrystyvät ja poistuvat laitteistosta paremmin alhaisessa paineessa. (Riekkola & Hyötyläinen 2002)

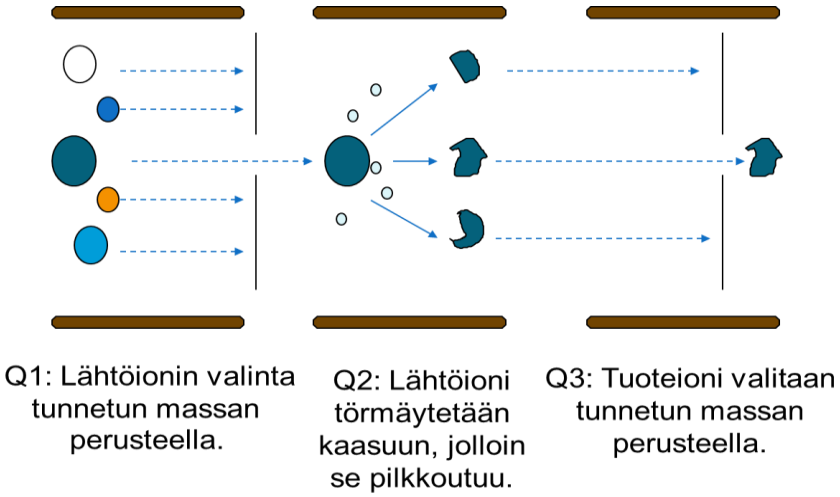


Kuva 1. Massaspektrometrialaitteisto.

Massaspektrometrian tärkeimmät sovellusalueet ovat yhdisteiden identifiointi, rakennemääritys ja kvantitatiivinen orgaaninen analytiikka. (Riekkola & Hyötyläinen 2002)

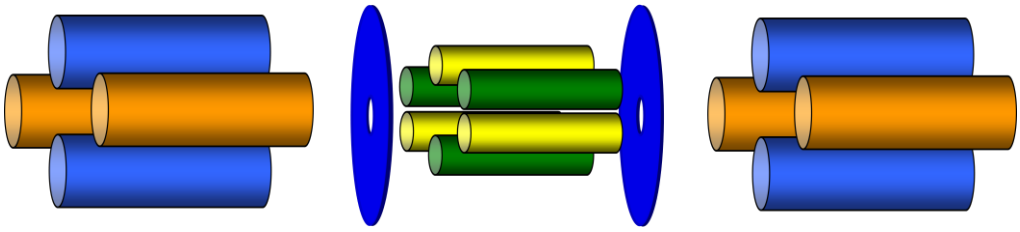
2.1 Tandemmassaspektrometria

Tandemmassaspektrometri on kahden massa-analysaattorin yhdistelmä (MSMS). Tandemmassaspektrometrin toimintaperiaate on esitetty kuvassa 2 (Joutsamo 2005). Kahden massa-analysaattorin yhdistelmä tekee laitteesta pelkkää massaspektrometria herkemmän ja tarkemman. MSMS-yhdistelmän avulla valitaan lähtöioni, joka törmäytetään reagoimattomaan kaasuun ja näin muodostuvat tuoteionit analysoidaan. (Riekkola & Hyötyläinen 2002)



Kuva 2. Tandemmassaspektrometrin toimintaperiaate.

API 5000 -kolmoiskvadropolimassaspetrometrissä on kaksi samanlaista massasuodatin kvadrupolia (Q1 ja Q3), joiden välissä on törmäyskammio (Q2), kuva 3 (Kottonen 2005). Kvadrupoli muodostuu neljästä samansuuntaisesta metallisauvasta. Vastakkaiset sauvat on kytketty toisiinsa sähköisesti. Toiseen sauvapariin on kytketty positiivinen jännite ja toiseen pariin negatiivinen jännite. Sauvastossa on tasajännite sekä radiotaajuudella muuttuva vaihtojännite. Sauvojen keskelle muodostuu sähkökenttä, joka ohjaa ionien kulkeutumista eteenpäin. Radiotaajuinen vaihtojännite aiheuttaa ionien värähtelyn poikkisuuntaisesti kvadrupoliin nähden. Sopivilla tasa- ja vaihtojännitteillä tietyn massa/varaus –suhteen omaavat ionit lentävät sauvaston läpi ja muut törmäävät sauvoihin. Massaspektrin mittauksen aikana muutetaan sekä tasajännitettä että vaihtojännitettä. Pienillä jännitteillä kevyet ionit lentävät analysaattorin läpi ja suurilla jännitteillä raskaat ionit. Laitteen sisällä on alipaine, jonka avulla voidaan varmistaa, ettei hallitsemattomia ionien törmäyksiä tapahdu. CAD-parametri (Collision Activated Dissociation) säätelee törmäyskaasun painetta törmäyskammiossa. (Jaarinen & Niiranen 2000; Riekkola & Hyötyläinen 2002; Downard 2004; API 5000 Tuning, Calibration, and Optimization Guide 2005)



MS1 (Q1) Törmäyskammio (Q2) MS2 (Q3)

Kuva 3. Kolmoiskvadrupoli.

Näytteen ionisointi tapahtuu normaalissa ilmanpaineessa, suihkuttamalla ionisaattoriin syötettyä näytettä typpikaasulla. Typpikaasu yhdessä ionisaatiojännitteen kanssa sopivassa lämpötilassa saa aikaan näytteen ionisoitumisen ja kaasuuntumisen, jolloin näyte pilkkoutuu osittain. (Ketola ym. 2010)

Ionisoinnin jälkeen näyte ohjataan ensimmäiselle massa-analysaattorille eli kvadrupolille, jossa tapahtuu haluttujen lähtöionien valinta. Lähtöioni valitaan massa-varaussuhteen perusteella, muut ionit törmäävät kvadrupolin sauvoihin eivätkä siis pääse jatkamaan seuraavalle kvadrupolille. Törmäyskammiossa lähtöionit törmäytetään argon- tai typpikaasun kanssa, jolloin ne pilkkoutuvat. Näin saadaan aikaan lukuisia erilaisia tuoteioneja. Törmäyskammiosta tuoteionit jatkavat kolmanteen kvadrupoliin, jonka sähkökenttä muuttaa ionien kulkurataa niin, että tietyillä jännitearvoilla vain halutun massa/varaus-suhteen omaavat ionit pääsevät hallitusti detektorille ja niiden massoista saadaan mitattua massaspektri. (Ketola ym. 2010)

2.1.1 Näytteen ionisointi

Näytteen ionisaatio tehdään normaalissa ilmanpaineessa (ionisaatio ilmanpaineessa, atmospheric pressure ionisation, API). Tarkoituksena on ionisoida tutkittava yhdiste mahdollisimman tehokkaasti, poistaa ilman ja liuottimen sisältämät molekyylit sekä siirtää muodostuneet ionit ilmanpaineesta vakuumiin ja massa-analyysiin. Tutkittava näyte tuodaan eluentin mukana

ionilähteeseen, jossa ne ionisoidaan ja saatetaan kaasufaasiin ilmanpaineessa. Näin muodostuneet kaasufaasi-ionit ovat vielä usein liuotinmolekyylien ympäröimiä. Näitä molekyylejä kutsutaan ryväsioneiksi (cluster ions). (Riekkola & Hyötyläinen 2002; API 5000 Tuning, Calibration, and Optimization Guide 2005; Ketola ym. 2010)

Sähkösumutusionisaatiossa (ESI) näyte on eluenttiliuoksessa, jota pumpataan ionilähteen kautta jatkuvana pienenä sumuna. Näytevirtaus kulkee ohuen teräsputken lävitse. Putki ja sitä ympäröivä elektrodi on kytketty eri jännitteisiin. GAS1-parametri (GS1) säätelee sumutuskaasua, joka virtaa putken ja elektrodin välissä. Kapillaariin kytketty sähkövirta saa näyteliuoksen ionit jakautumaan varauksensa mukaan. Kapillaarin jännitteellä voidaan valita tutkitaanko positiivisia vai negatiivisia ioneja. IonSpray Voltage -parametri (IS) säätelee ionisaationeulan jännitettä. Aerosolisumu muodostuu, kun varautunut kapillaari työntää saman merkkisesti varautunutta liuosta poispäin itsestään. Näin muodostuu pieniä varautuneita pisaroita. Pisaroista haihtuu neutraaleja liuotinmolekyylejä ja pisaran koko pienenee ja varaustiheys kasvaa. Lopulta varaustiheys käy liian tiheäksi, jolloin varautuneet ionit alkavat hylkiä toisiaan ja pisara hajoaa. Muodostuneet ionit kerätään keräyslevyn (curtain plate) ja suutinaukon (orifice) avulla ionilähteen sisään. Keräyslevyn ja suutinlevyn välistä syötetään verhokaasua, eli typpeä. Ioneiden törmätessä typpimolekyyleihin liuotinmolekyylit irtoavat ja analyyttimolekyyli jatkaa matkaa massa-analysaattoriin. Curtain Gas -parametri (CUR) säätelee verhokaasua. (Riekkola & Hyötyläinen 2002; API 5000 Tuning, Calibration, and Optimization Guide 2005)

2.1.2 Ionien detektointi

Detektorina käytetään elektronimonistinta, jossa ionivirta muutetaan sähköiseksi vasteeksi, joka mitataan. Elektronimonistimen sisäpintaan törmäävät ionit irrottavat elektroneja, jotka lentävät elektronimonistimen perää kohti ja törmäävät pian uudelleen seinämään. Uudessa törmäyksessä vapautuu lisää

elektroneja. Tämä signaali vahvistetaan ja se on verrannollinen alalysaattorin läpi tulevien ionien määrään. (Jaarinen & Niiranen 2000)

2.1.3 Massaspektri ja tietojen analysointi

Massaspektrometrisen analyysin tuloksena syntyy massaspektri. Massaspektrissä kunkin ionin suhteellinen osuus esiteään massa/varaus-suhteen funktiona. Spektri yleensä normitetaan, eli runsaimmin esiintyvän ionin intensiteetiksi asetaan arvo 100 ja muiden yhdisteiden intensiteetti suhteutetaan siihen. Kukin molekyyli pilkkoutuu sille ominaisella tavalla samoissa olosuhteissa, joten massaspektriä voidaan käyttää yhdisteen identifiointiin. (Riekkola & Hyötyläinen 2002)

3 MÄÄRITYKSEN TAUSTAA

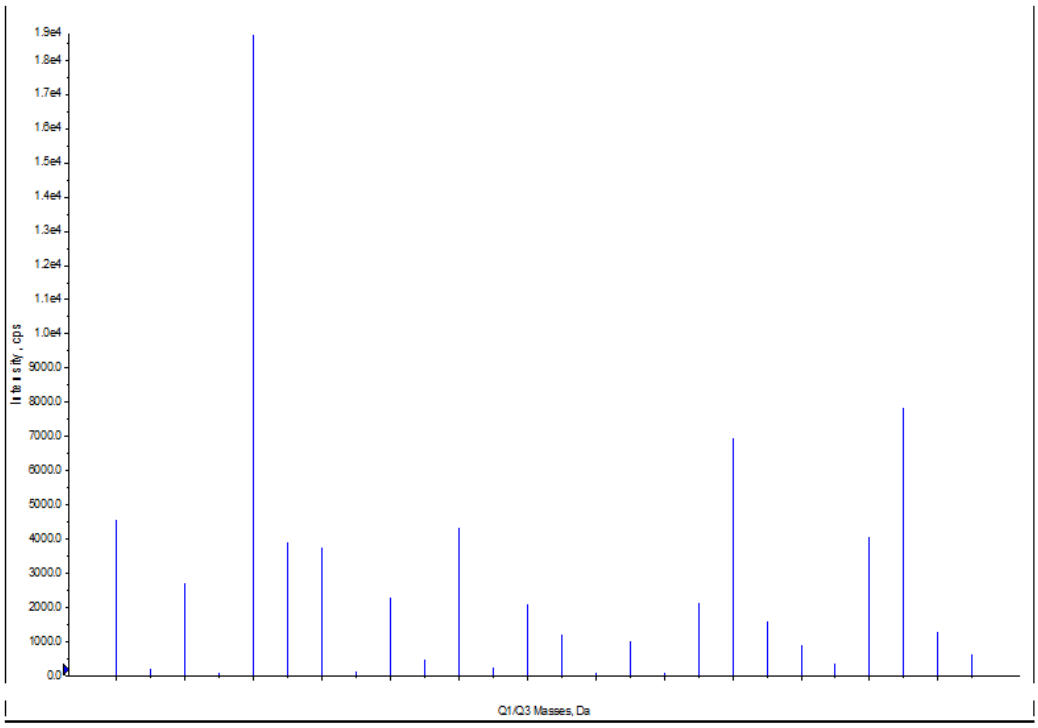
Sisäinen standardi tarkoittaa reagenssia, jota lisätään analyysissä sama määrä kaikkiin näytteisiin, sekä kalibrointinäytteisiin että tuntemattomiin näytteisiin. Sisäisen standardin tulisi olla mahdollisimman paljon analyytin kaltainen. (Ketola ym. 2010). AA ja AC IS:t ovat stabiileilla isotoopeilla (hiili-13 tai deuterium) leimattuja analyyttejä. Käytännössä Wallac Oy:ssä valmistetut AC ja AA IS:t ovat pienessä lasipullossa, joka sisältää joko 12 erilaista isotooppileimattua asyylikarnitiinia sekä vapaan isotooppileimatun karnitiinin tai 12 erilaista isotooppileimattua aminohappoa. Sisäisiä standardeja käytetään yhdessä ihmisen kokoverestä valmistettujen kontrollien kanssa aminohappojen ja asyylikarnitiinien pitoisuuksien määrittämiseen vastasyntyneiden kantapäästä otetusta verinäytteestä. Näistä näytteistä määritetään erilaisia rasvahappo- ja aminohappoaineenvaihduntahäiriöitä.

Määritys tehdään uuttamalla imupaperille kuivattua vastasyntyneen verinäytettä uuttoliuoksessa, johon on lisätty stabiileja leimattuja analyyttejä. Tuntemattoman näytteen pitoisuus määritetään vertaamalla sisäisen standardin vastetta näytteen vasteeseen tai vertaamalla standardin ja analyytin piikkien korkeutta. Menetelmän satunnaiset ja systemaattiset virheet voidaan korjata

käyttämällä sisäistä standardia, koska nämä virheet vaikuttavat samalla tavalla sekä sisäiseen standardiin että tutkittavaan analyyttiin. (Ketola ym. 2010)

Näytteet määritetään MRM-pyyhkäisynä (useiden reaktioiden seuranta, Multiple reaction monitoring). Tässä menetelmässä molemmat massa-analysaattorit on tarkennettu valituille massoille. Ensimmäisestä analysaattorista valitut lähtöionit havaintaan vain mikäli ne tuottavat tietyn valitun tuoteionin. MRM-mittaus pienentää taustasta johtuvaa häiriötä. (Ketola ym. 2010)

Kuvassa 4 on esimerkki MRM-spektristä Sciex API 5000 LC-ESI-MSMS –laitteistolta.



Kuva 4. MRM-spektri.

Saadusta spektristä lasketaan näytteen pitoisuus käyttäen kaavaa 1 (Kottonen 2005).

$$\frac{\text{Analyytin intensiteetti (cps)}}{\text{IS intensiteetti (cps)}} * \frac{\text{Uuttotilavuus (µl)} * \text{ IS pitoisuus (µM)}}{\text{Näytteen tilavuus (µl)}} = \text{Analyytin pitoisuus (µM)}$$

Kaava 1. Näytteen pitoisuuden laskeminen.

MRM-spektristä saadaan analyytin ja sisäisen standardin intensiteetit cps-yksikköinä (counts per second). Näytteessä oleva sisäisen standardin pitoisuus tiedetään. Käytännössä tämä laskenta tapahtuu laitteistossa olevalla ohjelmistolla.

4 MENETELMÄN OPTIMOINTI

MSMS-laitteiston optimointi tarkoittaa ionisaatioparametrien ja analyyttispesifisten parametrien säätämistä niin, että instrumentti antaa näytteelle suurimman mahdollisen vasteen. (API 5000 Tuning, Calibration, and Optimization Guide 2005) Tässä opinnäytetyössä pyrittiin luomaan ja testaamaan kvantitatiivinen menetelmä, jolla tutkittavat analyytit voidaan määrittää Sciex API 5000 LC-ESI-MSMS -laitteistolla. Menetelmän testaus sisälsi massaspektrometrin asetusten optimoinnin ja alustavien testausajojen tekemisen.

Sisäisten standardien pitoisuusmääritykset tehdään tällä hetkellä Sciex API 2000 LC-ESI-MSMS -laitteistolla. Laitteisto on jo suhteellisen vanha ja sen suorituskyky on laskussa. Tämä näkyy muun muassa ongelmina määritysten toistettavuudessa, varsinkin asyylikarnitiinimäärityksessä. Lisäksi kaikki tuotannolliset määritykset pitäisi olla tehtävissä vähintään kahdella laitteistolla, jotta tuotanto ei häiriinny, mikäli yksi laite on pois käytöstä.

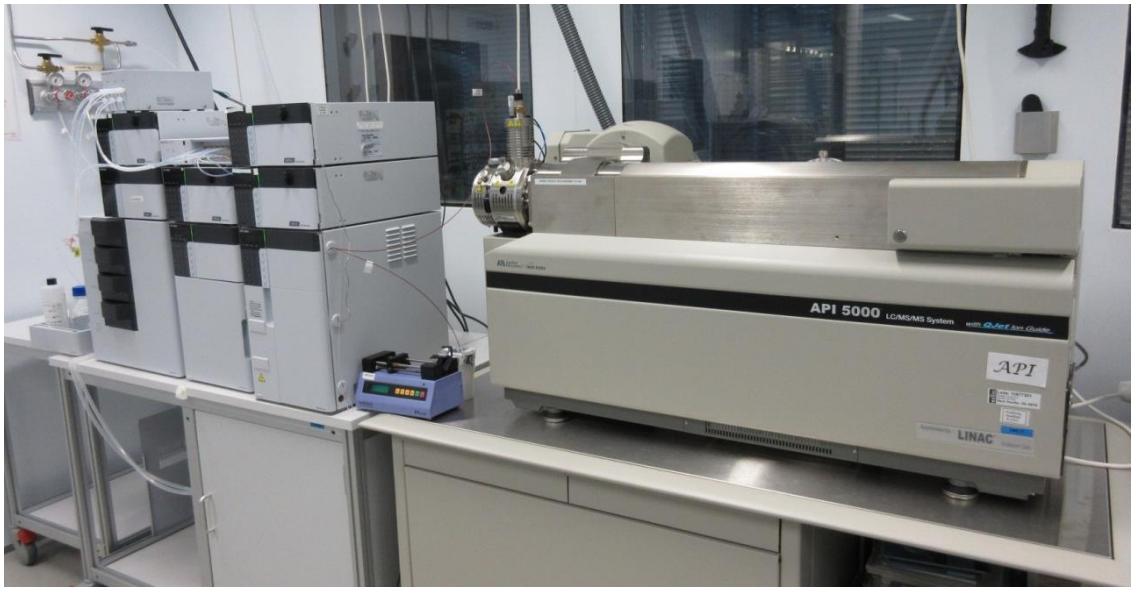
4.1 Käytetyt laitteet

Käytetyt MSMS-laitteistot koostuvat automaattisesta näytteensyöttäjästä, pumpusta, ilmanpoistajasta, typpikehittimestä ja massa-analysaattorista.

MSMS-laitteistot

Sciex API 5000 LC-ESI-MSMS –laitteisto (Kuva 5) sisältää seuravat osat:

- Massa-analysaattori: Sciex API5000 Tandem Mass Spectrometry
- Pumppu: Shimadzu LC-20AD pump
- Ilmanpoistaja: Shimadzu DGU-20A5 Vacuum Degasser
- Automaattinen näytteensyöttäjä: Shimadzu SIL-20AC Autosampler sekä Shimadzu Rack changer
- Kolonniuuni: Shimadzu CTO-20AC Column oven
- Typpikehitin: Parker Balston N2-22 Nitrogen Generator



Kuva 5. Sciex API 5000 LC-ESI-MSMS -laitteisto.

Sciex API 2000 LC-ESI-MSMS-laitteisto (Kuva 6) sisältää seuraavat osat:

- Massa-analysaattori: Wallac MS2 1445-001 Tandem Mass Spectrometer
- Pumppu: PerkinElmer Series 200 LC Pump

- Ilmanpoistaja: PerkinElmer Series 200 Vacuum Degasser
- Automaattinen näytteensyöttäjä: Gilson Autosampler 215
- Typpigeneraattori: Peak Scientific Gas Generator API Systems

Kuva 6. Sciex API 2000 LC-ESI-MSMS -laitteisto.

Muut työssä käytetyt laitteet:

- Ruiskupumppu: Harvard Apparatus 11plus
- Inkubaattori: Thermo Electron Corporation NCS Incubator
- Levyhaihdutin: Apricot Designs Evaporex EVX-192
- Kuumasaumaaja: Abgene Combi Thermo-sealer
- Pipetit: Thermo Electron Corporation 1-5 ml, 200-1000 µl, 20-200 µl. Labsystems 50-300 µl. Eppendorf Multipette® Xstream

4.2 Työn suoritus

Työ aloitettiin valmistamalla näyteliuokset optimointiliuoksista, joissa on sekä leimattuja että leimaamattomia aminohappoja ja asyylikarnitiineja. Liuokset

valmistettiin liuottamalla kuivatut näytteet orgaanista liuotinta sisältävään liuokseen. Näytteet käsiteltiin ohjeituksen mukaan, jonka jälkeen niitä voitiin käyttää menetelmän optimointiin. Sciex API 5000 LC-ESI-MSMS -laitteiston HPLC-pumppuun tehtiin tarvittavat kytkennät, jotta näyte voitiin syöttää suoraan massaspektrometriin. Muissa tällä laitteistolla tehtävissä määrityksissä käytetään kolonnia, jota tässä määrityksessä ei tarvita. Näytteet syötettiin massaspektrometriin käyttäen HPLC-pumppua ajoliuoksen virtauksen säätöön ja ruiskupumppua näyteliuoksen syöttämiseen.

Optimointi tehtiin kullekin analyytille erikseen. Analyyttien ensimmäisen kvadrupolin ja kolmannen kvadrupolin massat olivat tiedossa. Optimointi tehtiin syöttämällä näyteliuosta ensin Q1-pyyhkäisynä. Q1-pyyhkäisyllä voidaan varmistaa, että kaikki tutkittavat analyytit ovat näyteliuoksessa. Tämän jälkeen aloitettiin varsinainen menetelmän optimointi. (Analyst Software 1.1, Operator´s Manual 2000)

4.2.1 Optimointi

Menetelmän optimointi aloitettiin ionisaatioparametreista. Ionisaatioparametrit ovat kaikille menetelmässä oleville analyyteille yhteiset ja niitä on yhteensä kuusi. Ionisaatioparametrit sekä niiden vaihteluvälit ja tyypilliset arvot on esitetty taulukossa 1. Gas 1 –parametri (GS1) säätelee sumutuskaasua. Sumutuskaasu auttaa muodostamaan näytevirtauksesta pieniä pisaroita ja vaikuttaa näytesuihkun stabilisuuteen. Gas 2 –parametri (GS2) säätelee apukaasua. Apukaasu auttaa haihduttamaan näytesuihkupisaroita ja estää liuottimen pääsyn instrumenttiin. GS2-parametri toimii yhdessä suorasyöttökärjen (probe) lämpötilaa säätelevän TEM-parametrin kanssa. Paras herkkyys saavutetaan, kun GS2 ja lämpötila aiheuttavat liuottimen lähes täydellisen haihtumisen. Suorasyöttöjärjen lämmitys haihduttaa liuotinta, jotta näyte saadaan kaasufaasiin. Curtain Gas–parametri (CUR) säätelee verhokaasua, joka virtaa keräyslevyn ja suutinaukon välissä. Verhokaasu estää liuotinpisaroiden pääsyn ionioptiikkaan. Liuotinpisaroiden pääsy optiikkaan pitää estää, koska ne voivat kontaminoida ionioptiikan. IonSpay Voltage –parametri (IS) säätelee

ionisaationeulan jännitettä. IS-parametrin arvo riippuu polaarisuudesta, negatiivisella puolella arvo on negatiivinen ja positiivisella puolella positiivinen. Interfase Heater -parametri (ihe) käynnistää ja sammuttaa liitososan lämmityksen. Liitososan lämmitys auttaa maksimoimaan ionisignaalin ja estää ionioptiikan kontaminaatiota. (API 5000 Tuning, Calibration, and Optimization Guide 2005)

Taulukko 1. Ionisaatioparametrit ja niiden vaihteluvälit sekä tyypilliset arvot.

Parametri	Vaihteluväli	Tyypilinen arvo
GS1 (Gas 1)	0-90	20-60
GS2 (Gas 2)	0-91	30-70
TEM (Temperature)	0-750	600
CUR (Curtain Gas)	10-50	20
IS (IonSray Voltage)	-4500 - 5500	-4000 negatiivisella puolella 5000 positiivisella
Ihe (Interfase Heater)	0 (pois päältä) / 1 (päällä)	1

Seuraavaksi optimoitiin analyyttispesifiset parametrit, jotka voivat vaihdella analyytista toiseen. Optimoitavia analyyttispesifisiä arvoja on viisi. Analyyttispesifiset parametrit sekä niiden vaihteluvälit ja tyypilliset arvot on lueteltu taulukossa 2. Collisionally Activated Dissociation –parametri (CAD) säätelee törmäyskaasun painetta törmäyskammiossa MSMS-pyyhkäisyjen aikana. Törmäyskaasun tehtävä on pilkkoa lähtöionit. Declustering Potential –parametri (DP) kontrolloi jännite-eroa suutinaukon ja maadoitetun kartiolevyn välillä. Mitä suurempi DP-arvo, sitä enemmän energiaa siirretään ioneihin hajottamaan liuotin- ja vesimolekyylisidoksia, eli hajotetaan ryväsioneja. Riittävän korkea jännite-ero voi hajottaa kovalenttisia sidoksia ja muodostaa pilkkoutuneita ioneita ennen kuin ionit pääsevät ensimmäiseen massa-analysaattoriin. Entrance Potential –parametri (EP) kontrolloi jännitettä, joka ohjaa ionit Q0:n, eli ionilähteen läpi. Collision Cell Exit Potential –parametri (CXP) kontrolloi törmäyskammiosta poistumisen jännitettä. Tämä jännite keskittää ja kiihdyttää ionit pois törmäyskammiosta. Collision Energy –parametri (CE) kontrolloi Q0:n ja Q2:n välistä jännite-eroa. CE-parametri säätelee siis

energiaa, jonka lähtöionit saavat, kun ne kiihdytetään törmäyskammioon. (API 5000 Tuning, Calibration, and Optimization Guide 2005)

Taulukko 2. Analyyttispesifiset parametrit ja niiden vaihteluvälit sekä tyypilliset arvot.

Parametri	Vaihteluväli	Tyypilinen arvo
CAD (Collisionally Activated Dissociation Gas)	0-12	6
DP (Declustering Potential)	0-400	positiivisella puolella 20 negatiivisella -20
EP (Entrance Potential)	2-15	10 positiivisille ioneille -10 negatiivisille
CXP (Collision Cell Exit Potential)	0-55	positiivisille ioneille 15 negatiivisille -15
CE (Collision Energy)	0-200	20-50

Menetelmän optimoinnin tuloksena saatin kullekin analyytille parhaat mahdolliset arvot ionisaatioparametreille sekä analyyttispesifisille parametreille. Kaikki arvot sijoittuivat kunkin arvon vaihteluvälille. Menetelmän optimointi saatiin siis suoritettua onnistuneesti.

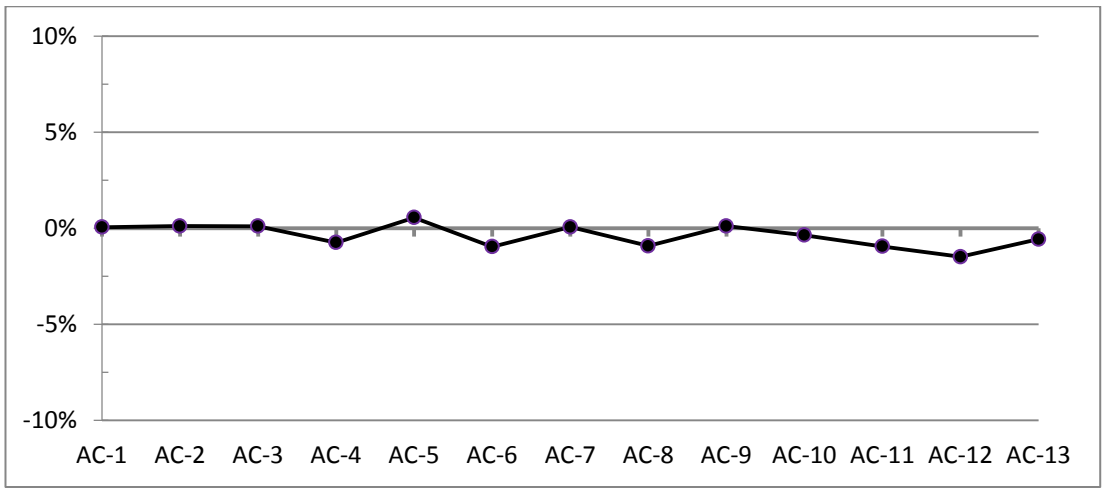
4.2.2 Optimoidun menetelmän testaus

Optimoidun menetelmän testaus tehtiin käyttäen komponentteja, jotka olivat läpäisseet laadunvalvontatestauksen. Näytteenkäsittely tehtiin AA ja AC IS – laadunvalvontaohjeen mukaisesti. Näytteet liuotettiin ensin orgaanisen liuottimen ja veden seokseen, jonka jälkeen valmistettiin seokset, joissa oli leimattuja ja leimaamattomia analyyttejä. Näyteliuokset pipetoitiin 96-kuoppalevyille, joista liuotin haihdutettiin pois levyhaihduttimella. 96-kuoppalevylle jääneiden näytteiden päälle pipetoitiin derivatisointiliuosta ja inkuboitiin vakioitu aika vakiolämpötilassa, jonka jälkeen näytteet jälleen kuivattiin. Kuivattu derivatisoitu näyte liuotettiin uudelleen orgaanisen liuottimen ja veden seokseen. Valmistetut näytteet määritettiin rinnakkain Sciex API 2000

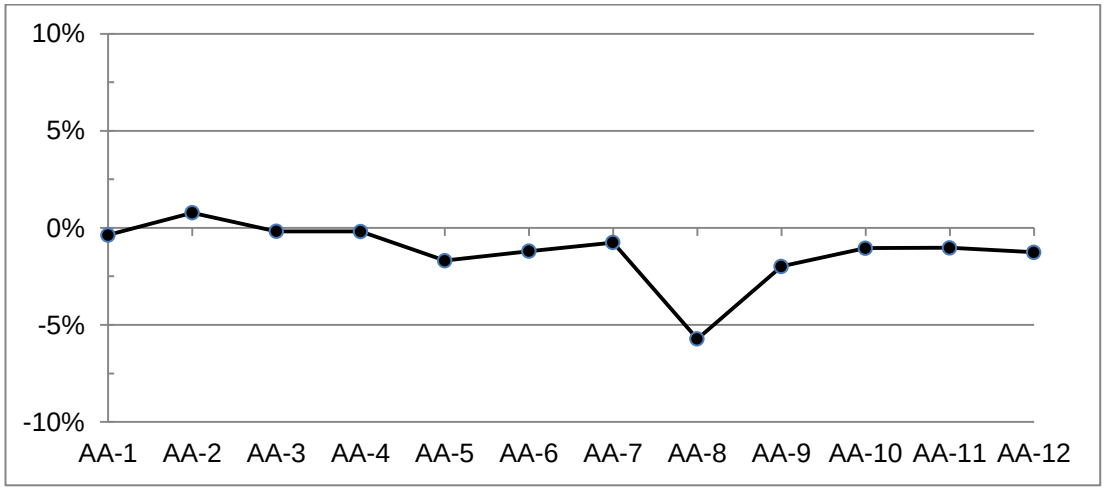
ja Sciex API 5000 LC-ESI-MSMS -laitteistoilla. Saatu data käsiteltiin ja siirrettiin validoituihin tulospohjiin, jonka jälkeen tuloksia verrattiin keskenään.

4.3 Tulokset

Kaikki määritetyt pitoisuudet olivat molemmilla laitteilla hyväksyntärajoissa. Eri laitteistoilla saadut pitoisuudet erosivat toisistaan hyvin vähän. Suurin ero nähtiin aminohapolla AA-8, jolla laitteistoilla saatujen pitoisuuksien välinen ero oli 6 %. Muilla analyyteilla pitoisuudet olivat ± 2 % laitteiden välillä (kuvat 7 ja 8). Hyväksymisraja laitteistojen väliselle pitoisuuserolle oli ± 10 %.

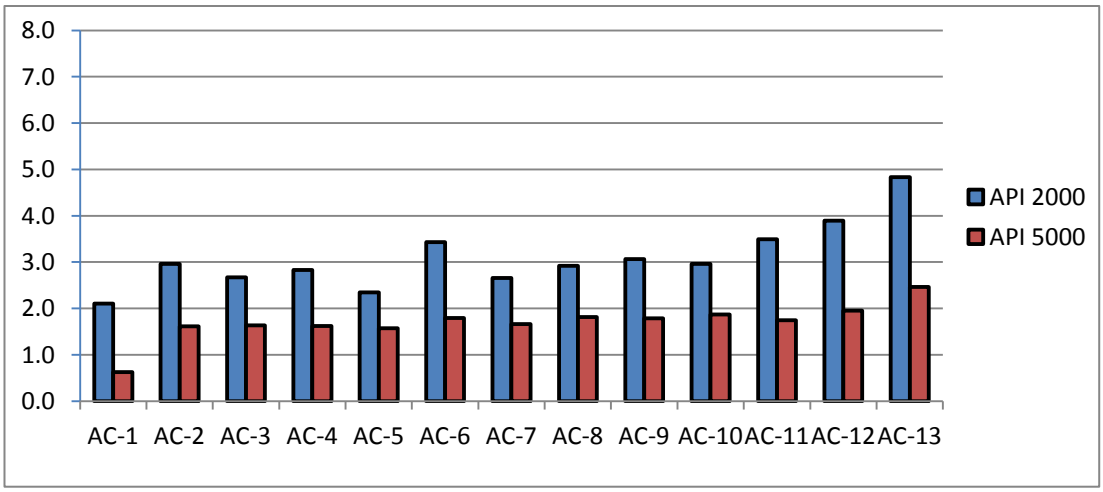


Kuva 7. Menetelmien AC IS –pitoisuusero (%) laitteiden välillä.

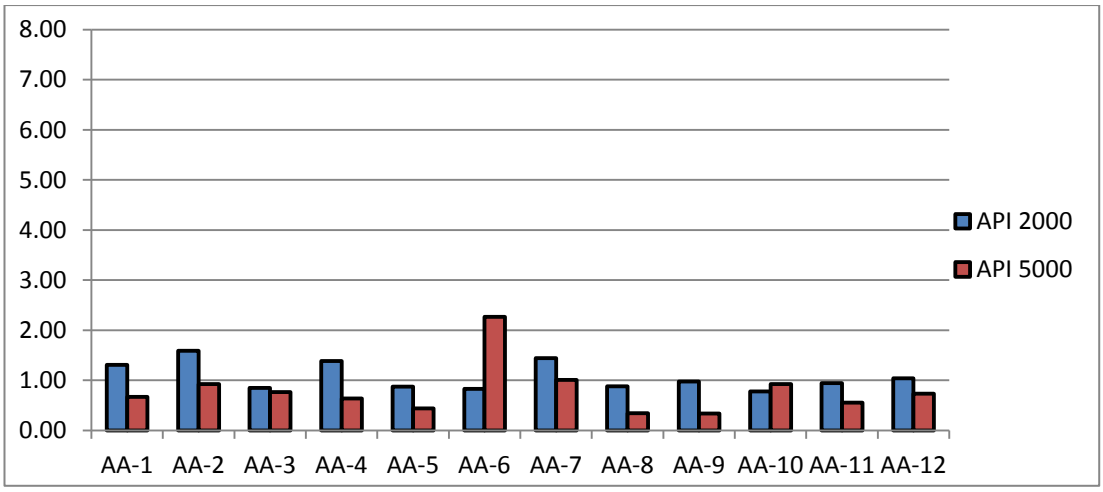


Kuva 8. Menetelmien AA IS –pitoisuusero (%) laitteiden välillä.

Määrityksen toistettavuus yhden levyn sisällä oli myös molemmilla laitteistoilla hyväksymisrajoissa. Kuvasta 9 nähdään, että asyylikarnitiineilla 96-kuoppalevyn sisäinen toistettavuus on Sciex API 5000 LC-ESI-MSMS -laitteistoilla paremmalla tasolla kuin Sciex API 2000 LC-ESI-MSMS -laitteistolla. Aminohappomäärityksessä ei näkynyt yhtä selkeää eroa laitteistojen välillä (Kuva 10). Hyväksymisraja levynsisäiselle toistettavuudelle ≤ 8.0 %. Kaikki tulokset olivat selkeästi alle tämän rajan.



Kuva 9. AC IS -näytteiden pitoisuusmäärityksen toistettavuus yhden levyn sisällä.



Kuva 10. AA IS -näytteiden pitoisuusmäärityksen toistettavuus yhden levyn sisällä.

Rinnakkaisten IS-näytteiden välisen toistettavuuden hyväksymisraja on 7.6 %. Tässä testissä tulokseksi saatiin AA IS –määrityksessä Sciex API 2000 LC-ESI-MSMS –laitteistolla 0.3 – 1.0 % ja Sciex API 5000 LC-ESI-MSMS –laitteistolla 0.1 – 0.9 %. AC IS –määrityksessä vastaavasti 0.4 – 1.7 % ja 0.4 – 1.1 %. Kaikki tulokset olivat selvästi hyväksymisrajoissa. Myös ajokontrollin levyjen välinen toistettavuus oli kaikilla analyyteillä hyväksymisrajoissa.

5 YHTEENVETO JA PÄÄTELMÄT

Opinnäytetyön tavoitteena oli optimoida ja testata menetelmä Sciex API 5000 LC-ESI-MSMS -laitteistolle aminohappojen ja asyylikarnitiinien sisäisten standardien pitoisuuksien määrittämiseksi. Laitteistolle oli tarvetta luoda uusi menetelmä, koska tällä hetkellä sisäisten standardien määritysmenetelmä on vain yhdellä laitteistolla. Tämä laitteisto on jo vanha ja sen suorituskyky on laskussa.

Optimointi suoritettiin kullekin analyytille erikseen. Menetelmän optimointi aloitettiin ionisaatioparametreistä, joita on kuusi (GS1, GS2, TEM, CUR, IS ja ihe). Nämä parametrit ovat jokaiselle analyytille samat menetelmän sisällä. Toisena optimoitiin analyyttispesifiset parametrit, joita on viisi (DP, EP, CAD, CE ja EXP). Nämä parametrit voivat vaihdella analyyttien välillä. Optimoinnin tuloksena saatiin Sciex API 5000 LC-ESI-MSMS -laitteistolle kullekin analyytille parhaat mahdolliset määritysparametrit.

Menetelmän optimointi Sciex API 5000 LC-ESI-MSMS –laitteistolle sujui odotusten mukaan eikä työn suorituksessa tullut eteen ongelmia. Luotu menetelmä testattiin käytössä olevan IS-laadunvalvontaohjeen mukaisesti. Myös tämä testausvaihe sujui hyvin. Kaikki laadunvalvonnan hyväksymiskriteerit täyttyivät molemmilla laitteistoilla. Eri laitteistoilla saadut pitoisuudet erosivat toisistaan hyvin vähän. Suurin ero nähtiin aminohapolla AA-8, jolla laitteistoilla saatujen pitoisuuksien välinen ero oli 6 %. Muilla analyyteilla pitoisuudet olivat ± 2 % laitteiden välillä. Hyväksymisraja laitteistojen väliselle pitoisuuserolle on ± 10 %.

Yhteenvetona voidaan todeta, että uusi optimoitu menetelmä Sciex API 5000 LC-ESI-MSMS –laitteistolla on vastaava kuin vanha menetelmä Sciex API 2000 LC-ESI-MSMS -laitteistolla.

Jatkotoimenpiteenä tälle työlle menetelmälle voidaan tehdä verifiointi. Menetelmää ei tarvitse validoida, koska Sciex API 2000 LC-ESI-MSMS -laitteistolle validoituun testimenetelmään ja näytteen käsittelyyn ei tehdä muutoksia.

LÄHTEET

Analyst Software 1.1, Operator´s Manual. 2000. PE Sciex.

API 5000 Tuning, Calibration, and Optimization Guide. 2005. MDS Sciex.

Downard K. 2004. Mass Spectrometry A Foundation Course. Cornwall: TJ International Ltd.

Jaarinen S. & Niiranen J. 2000. Laboratorion analyysitekniikkka. 3. Painos. Helsinki: Oy Edita AB.

Joutsamo T. 2005. Mass Spectrometry_tjou. PowerPoint-esitys. Wallac Oy

Kottonen M. 2005. Students TMS 221105. PowerPoint-esitys. Wallac Oy.

Riekkola, M-L. & Hyötyläinen, T. 2002. Kolonnikromatografia ja kapillaarieletromigraatiotekniikat. 2. Painos. Helsinki: Yliopistopaino.

Suomen Massaspektrometrian Seura ry. Toim. Ketola, R.; Kostianen R.; Kotiaho T.; Vainiotalo P. 2010. Massaspektrometrian perusteet. Helsinki: Hakapaino.