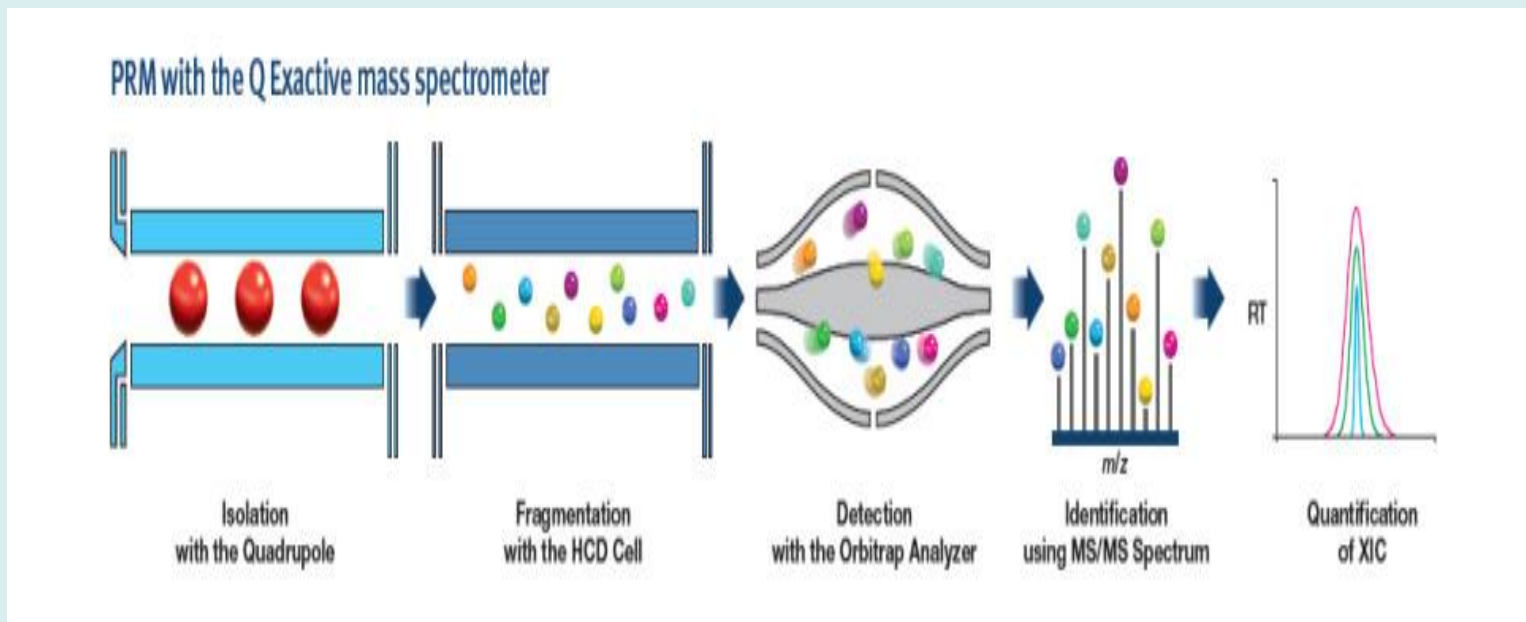
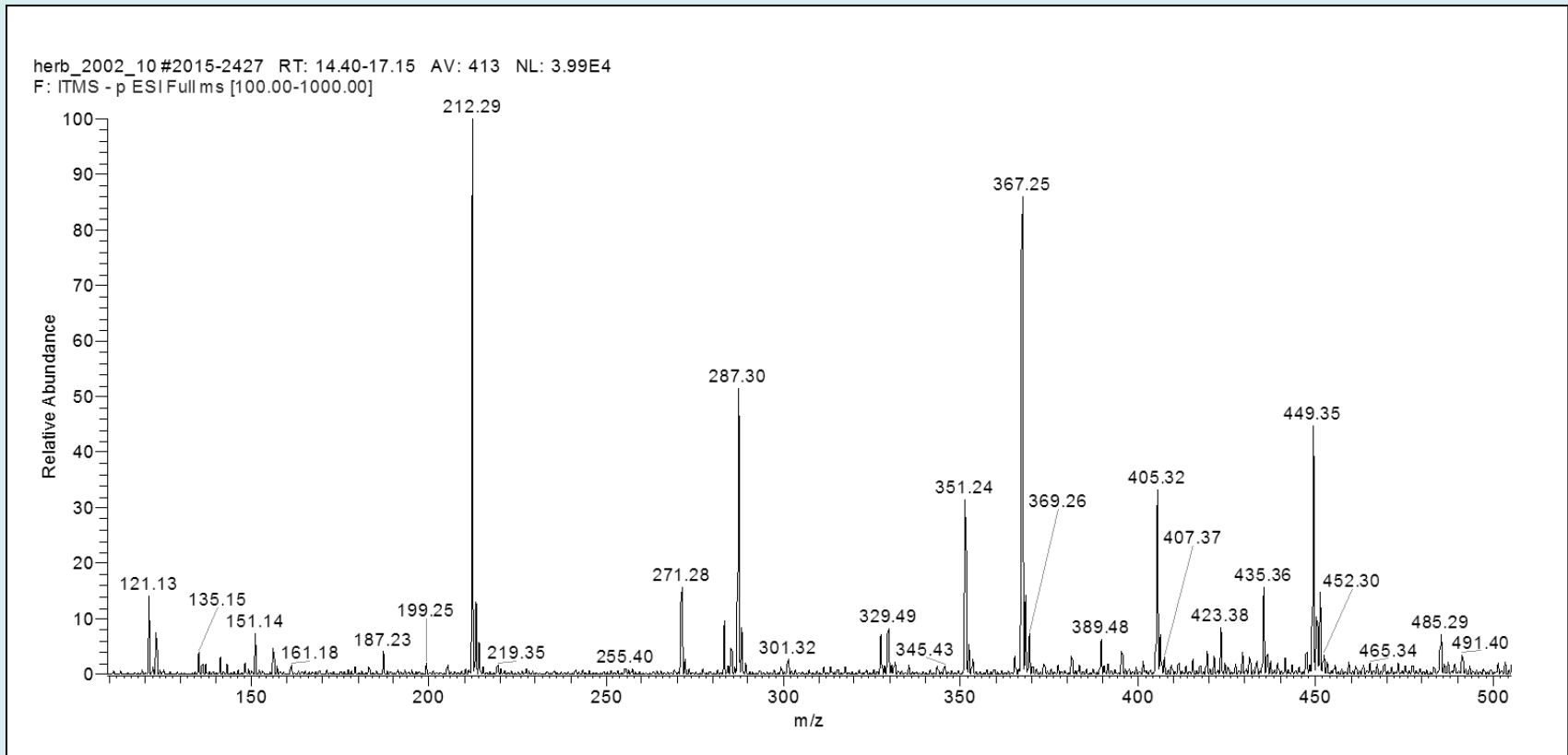


Приложение на високоразделителни течна хроматография и мас спектроскотия за охарактеризиране на биологично активни вещества, природни продукти и функционални храни



Акад. Проф. Ваньо Митев дм, дбн
Доц. инж. Валентин Лозанов дб
МУ-София, Катедра Медицинска Химия и Биохимия

Аналитичен метод за измерване на молекулното маса на вещество



X – m/z

m = молекулна маса

z = заряд на молекулата

Y – относителна интензивност

Какво прави мас спектрометъра?

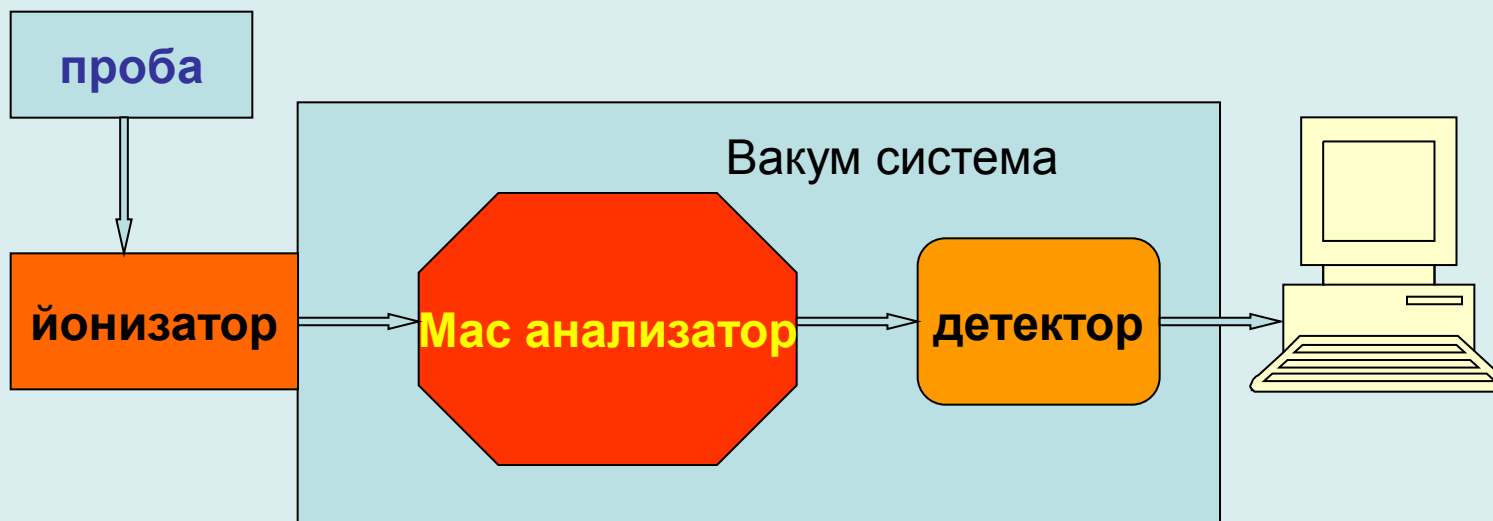
- измерва молекулната маса най-прецизно от всички други техники.
- дава информация за химичната структура на изследваното вещество (проба)

За какво може да се използва мас спектрометъра?

- **За идентификация, потвърждение и количествено определяне на:** метаболити, протеини, вещества изолирани от естествен източник, пептиди, захариди, липиди, нуклеотиди, лекарствени вещества, синтетични органични вещества, полимери
всички органични вещества които могат да се йонизират

КАК РАБОТИ МАС СПЕКТРОМЕТЪРА ?

- Въвеждане на пробата в апарата
- Генериране на йони в газова фаза
- Разделяне на йоните в мас анализатора на база m/z
- Детектиране на йоните
- Обработка на резултата



КАК СЕ ДЕФИНИРА МАСА?

- За определяне на числената стойност на присъщото свойство на веществата "маса" като отправна точка се използва въглерод-12, ^{12}C .
- Единицата за маса се изразява в Далтон (Dalton, Da).
- **ЕДИН ДАЛТОН СЕ ДЕФИНИРА КАТО 1/12 ОТ МАСАТА НА ЕДИН АТОМ ВЪГЛЕРОД - 12.**
- Така, един въглероден атом (C) има маса от 12.0000 Da.

Element	Mass	Abundance
H	1.0078	99.985%
	2.0141	0.015
C	12.0000	98.89
	13.0034	1.11
N	14.0031	99.64
	15.0001	0.36
O	15.9949	99.76
	16.9991	0.04
	17.9992	0.20

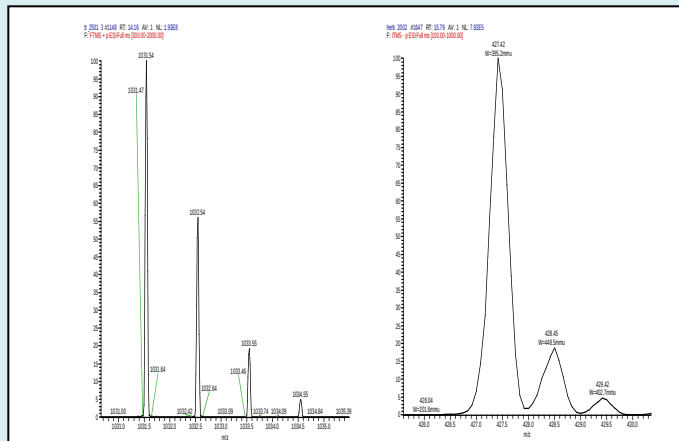
ИЗОТОПИ

- Повечето елементи имат повече от един стабилен изотоп

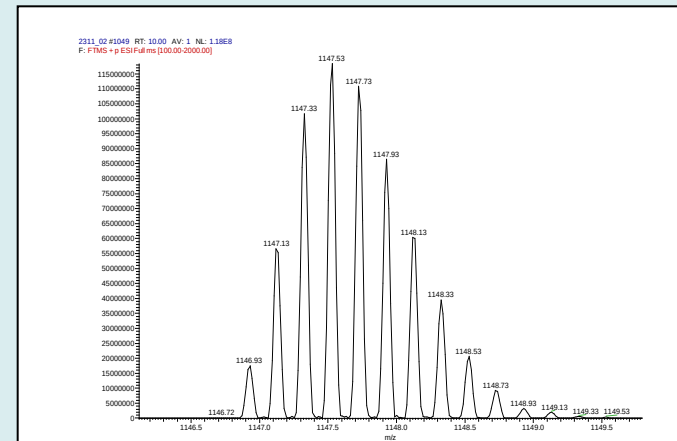
ЗАЩО ТОВА Е ВАЖНО ?

Мас спектрометъра може да “види” тези изотопи ако има достатъчно висока разделителна способност.

Колкото по-висока е разделителна способност на мас спектрометъра толкова по-прецизно е измерването.



Моноизотопна маса



Средна маса

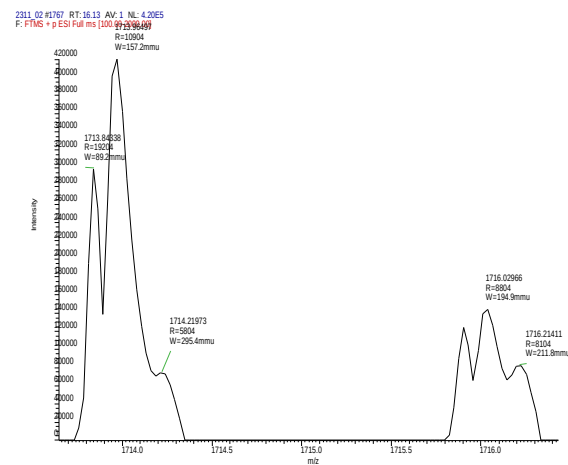
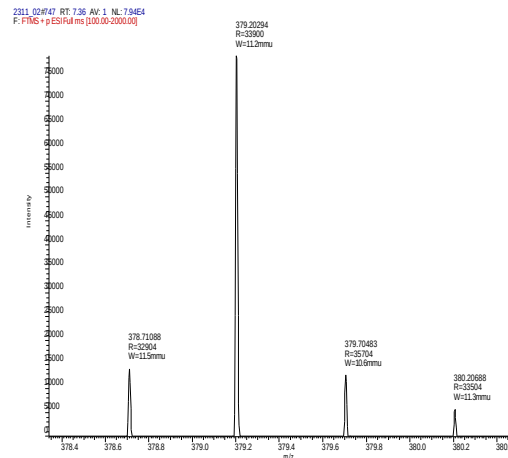
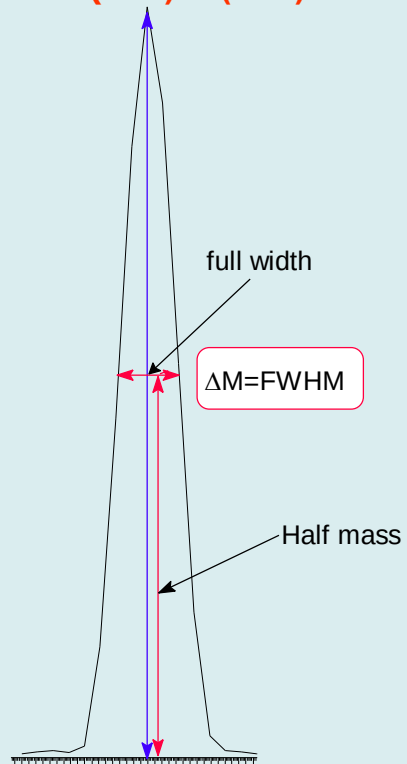
Няколко важни характеристики

- **Масов обхват (Mass range):** Какъв обхват от маси може да се измерят?
- **Разделителна способност (Resolution):** Колко добре са разделени масовите пикове?
- **Точност на измерване на масата (Mass accuracy):** Колко точно е измерена дадена маса спрямо теоретичната?
- **Динамичен обхват (Dynamic range):** Каква е разликата между най-ниско и най-високо интензивните масови пикове, които могат да се измерят в единичен скан?
- **Чувствителност (Sensitivity):** Колко е най-малкото количество вещество което може да се измери

Разделительная способность

$$R = M / \Delta M$$

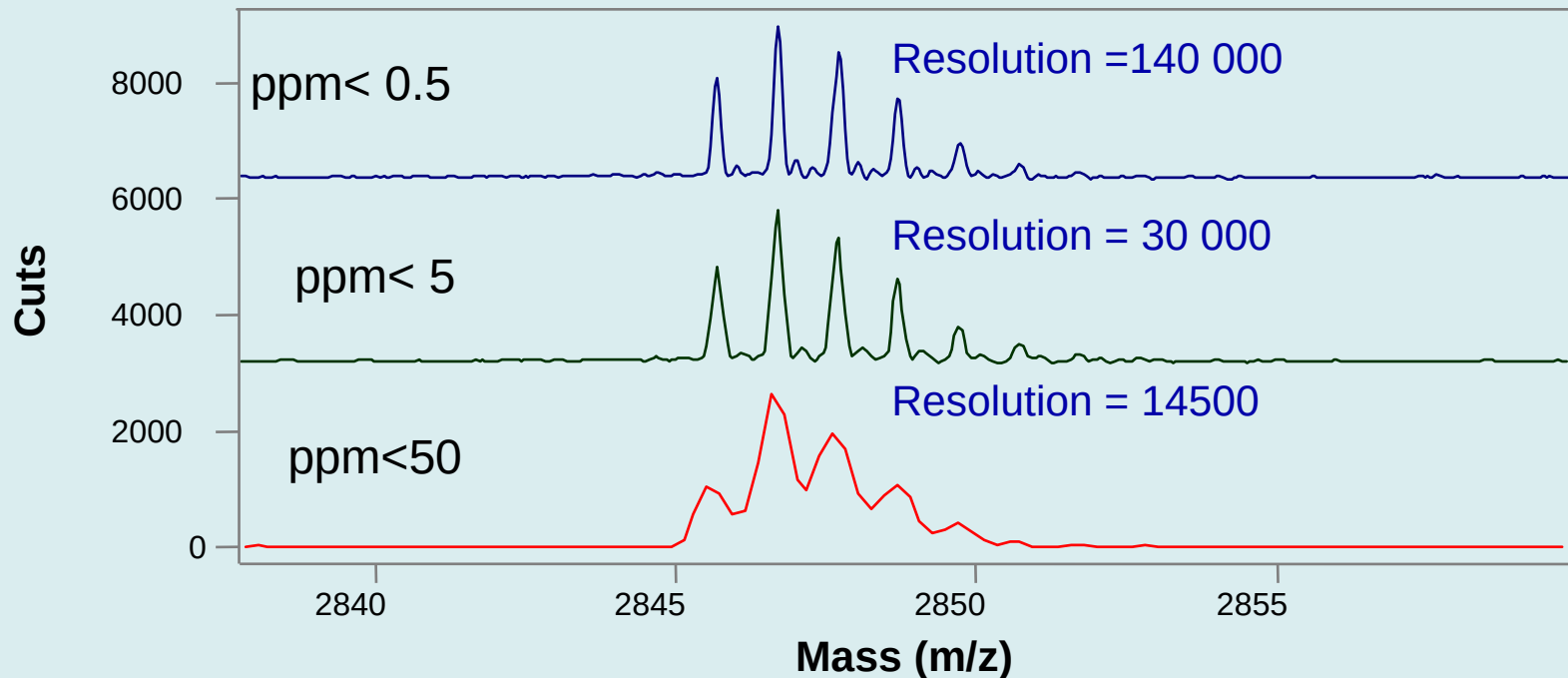
$$(m/z) / \Delta(m/z)$$



Точност на измерване

$$\text{ppm} = (M_{\text{измерена}} - M_{\text{теоретична}}) / M_{\text{теоретична}} \times 10^6$$

Точността на измерената маса пряко зависи от разделителната способност. Колкото е по-висока разделителната способност толкова по-точно се измерва масата.



ТИПОВЕ МАС СПЕКТРОМЕТРИ

- Йонизатор

- ESI

- MALDI

- CI

- APCI

- APPI

- EI

- PD

- FAB

- SELDI

- Мас анализатор

- Magnetic Sector

- Time of flight (TOF)

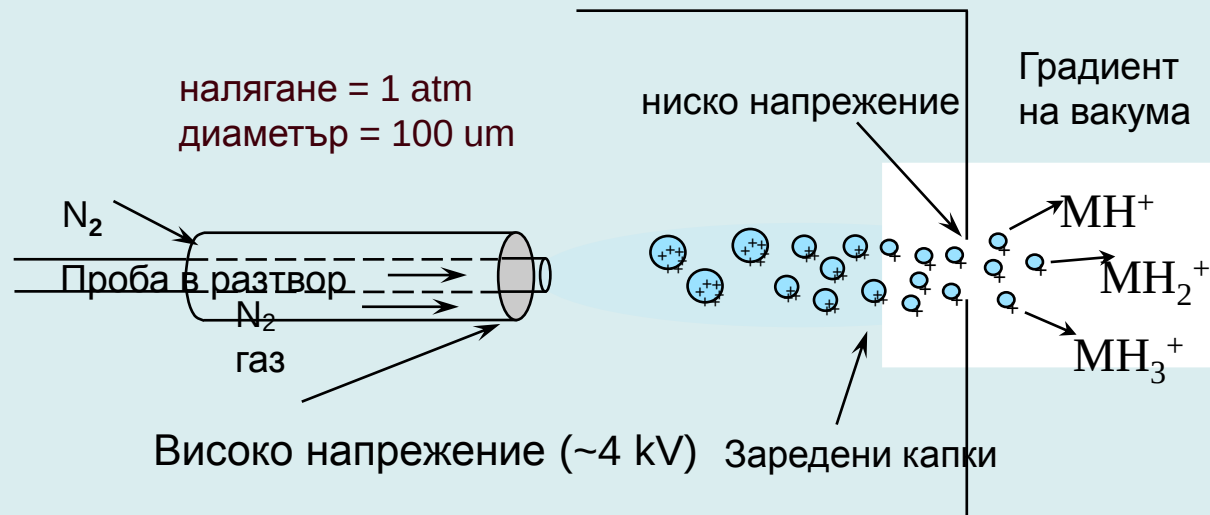
- Quadrupole

- Ion Trap

- Linear Ion Trap

- Orbitrap

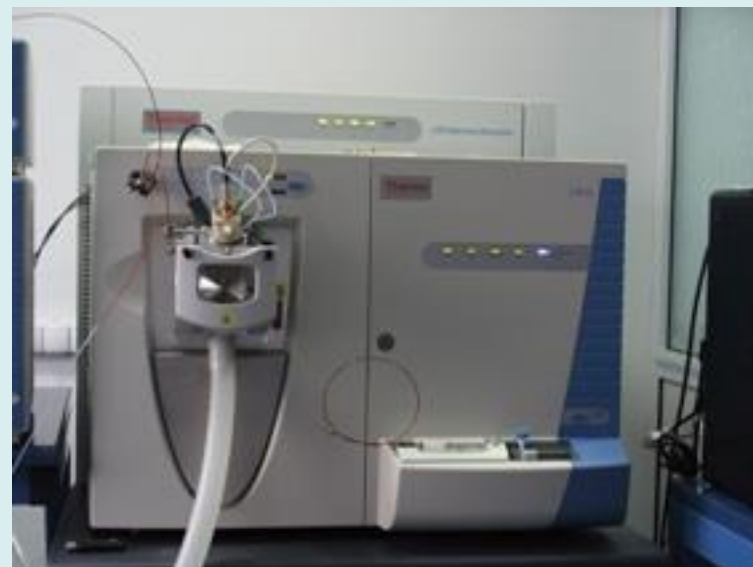
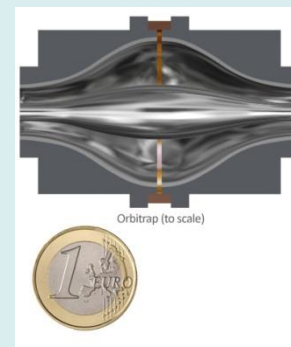
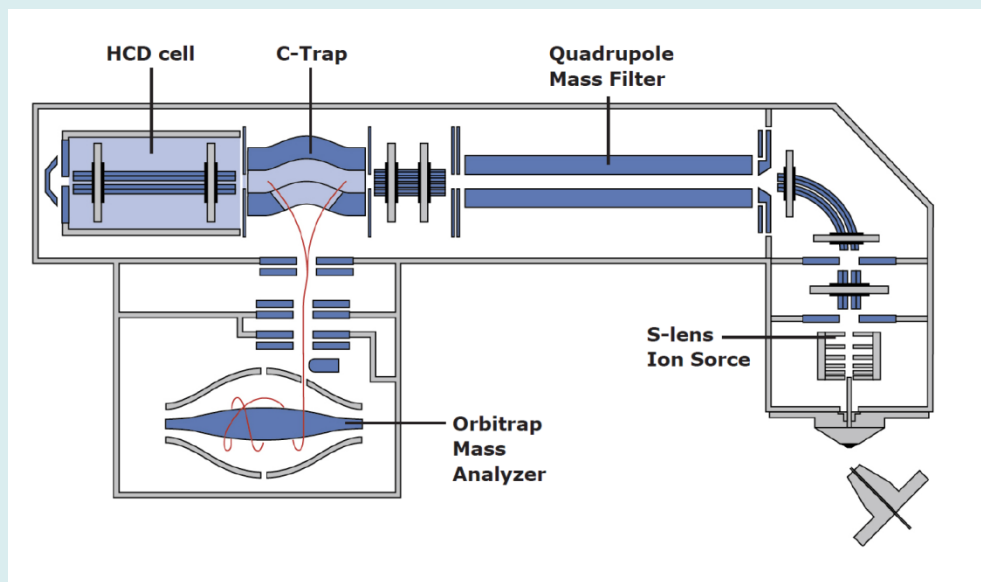
Электроспрей йонизация (EI)



	нано спрей						
диаметър на колоната	4.6 mm	3.0 mm	2.1 mm	1.0 mm	300 μ m	180 μ m	75 μ m
скорост на потока	1.0 ml/min	0.5 ml/min	0.2 ml/min	50 μ l/min	3.0 μ l/min	700 nl/min	200 nl/min
	1	2.3	5	21	235	653	3765

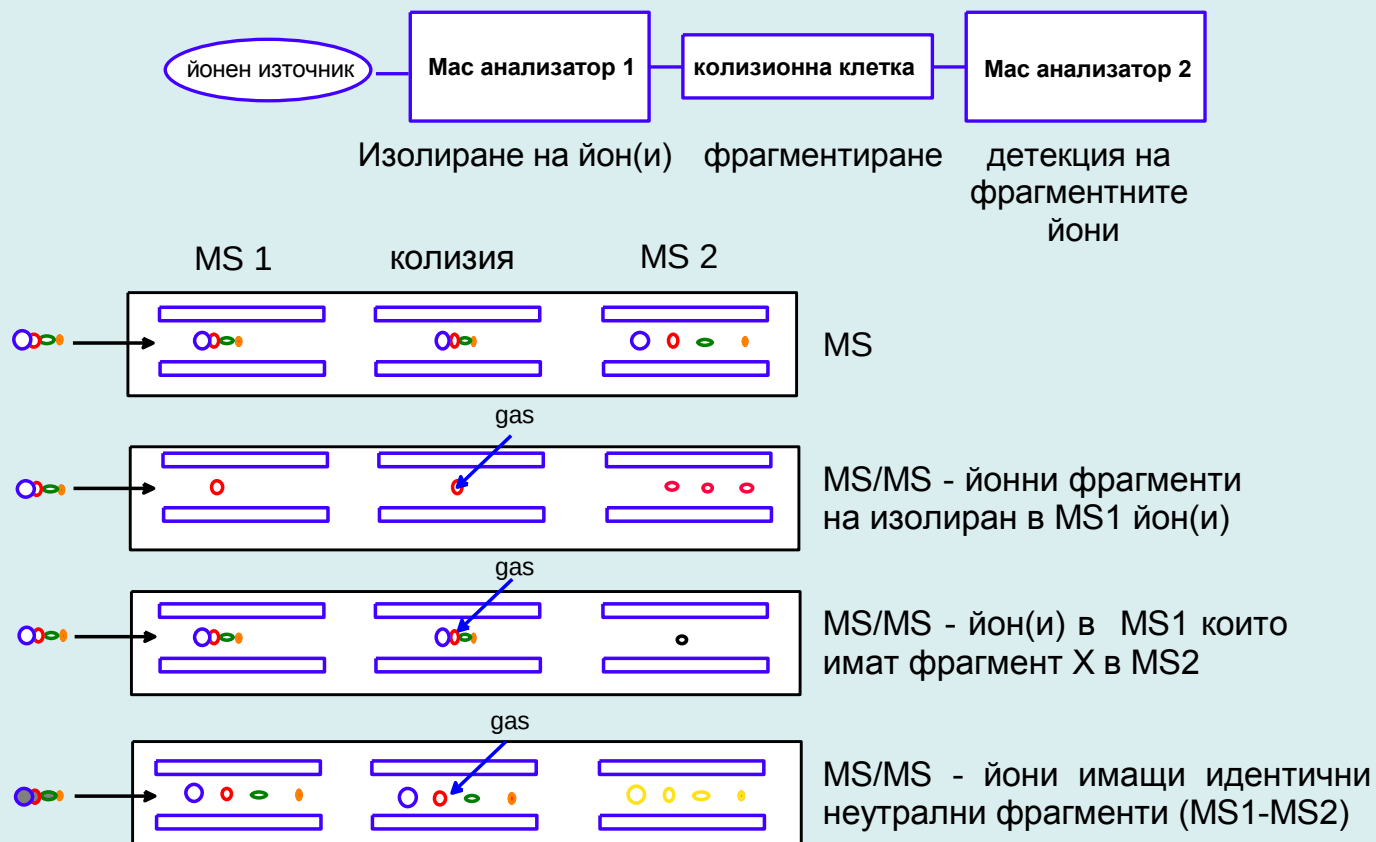
теоретично повишение на концентрацията

Orbitrap – принцип на работа



Makarov A. *Anal. Chem.* 2000, 72, 1156-1162 - теоретична обосновка
2005г - LTQ Orbitrap Discovery® първият търговски апарат на пазара.

Тандем (MS/MS) мас спектроскопия



В зависимост от типа на мас анализаторите има различни типове тандем мас апарати: Triple quadrupole (QqQ; QQQ), Q – TOF, Q – Trap, TOF - TOF

LTQ Orbitrap
Q Orbitrap (QExactive)

Приложение на мас спектроскопия в метаболитни изследвания

- Метаболом – съвкупност от всички метаболити в клетката, тъканите, органите и организма, които са крайни продукти на клетъчни процеси (обикновено се отнася за вещества под 1000 Da) и играят съществена роля за нормално функциониране на живия организъм
- Създаване на “карта - отпечатък” на всички метаболити в конкретен жив организъм - амбициозна цел
- Метаболити - изключително разнообразие от химични вещества (амино киселини, гликозиди, липиди, пурины, фосфати и много други)
- Силно динамична система – променяща се понякога за секунди.
- Липса на универсални подходи за анализ – различните класове химични съединения изискват специфични аналитични подходи
- Голямото разнообразие от вещества и липсата на директна генетична информация затруднява създаването на ефективни бази данни.

Количествен анализ на аминокиселини и биогенни амини чрез мас спектрометрия след дериватизация

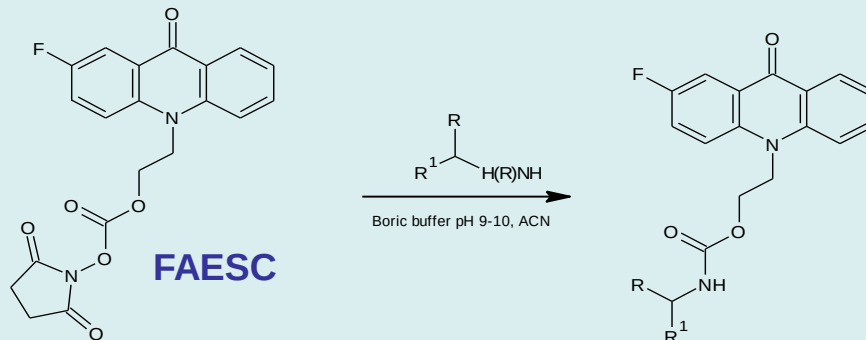
пробоподготовка
екстракция

дериватизация

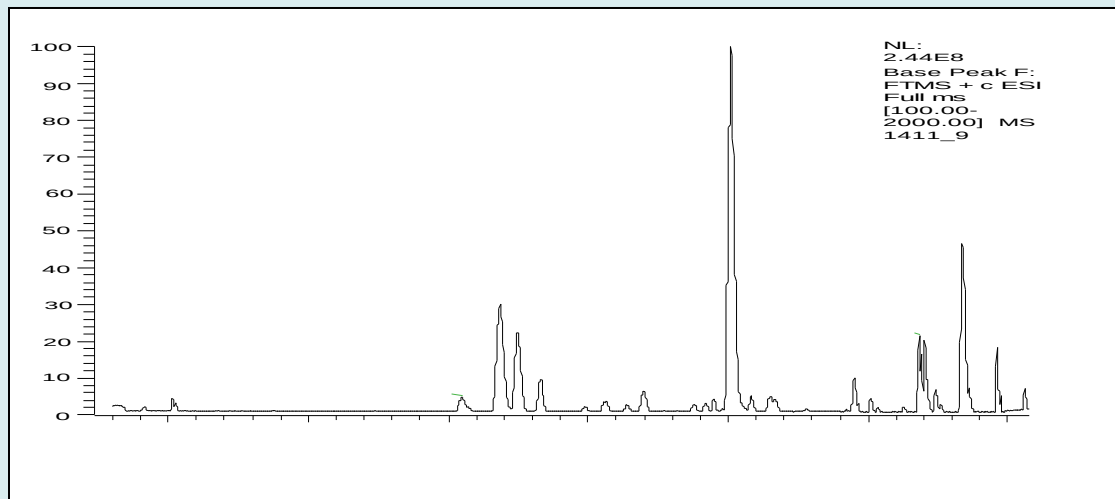
мас анализ MS or MS/MS

компютърен
анализ

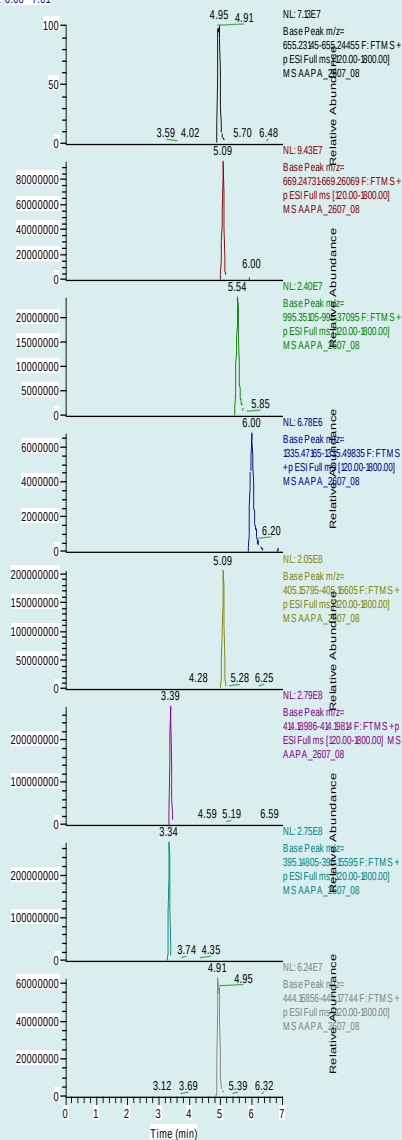
резултати



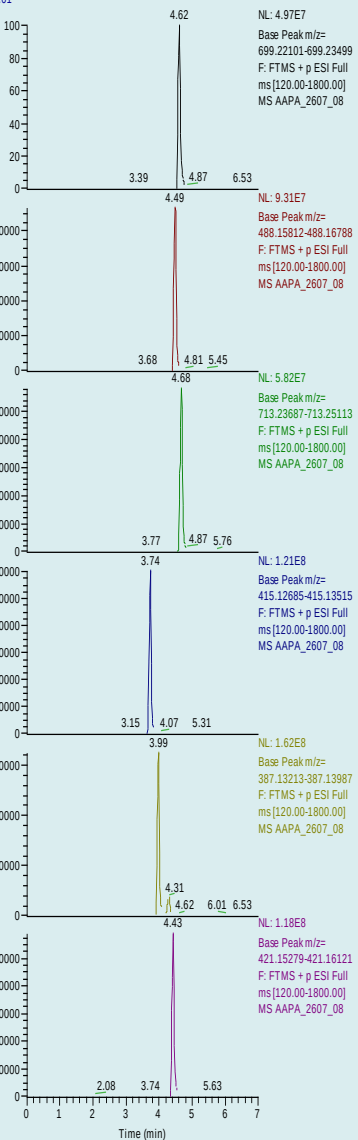
Плазма, урина, клетъчни лизати, тъкани,
продукти от животински и растителен произход



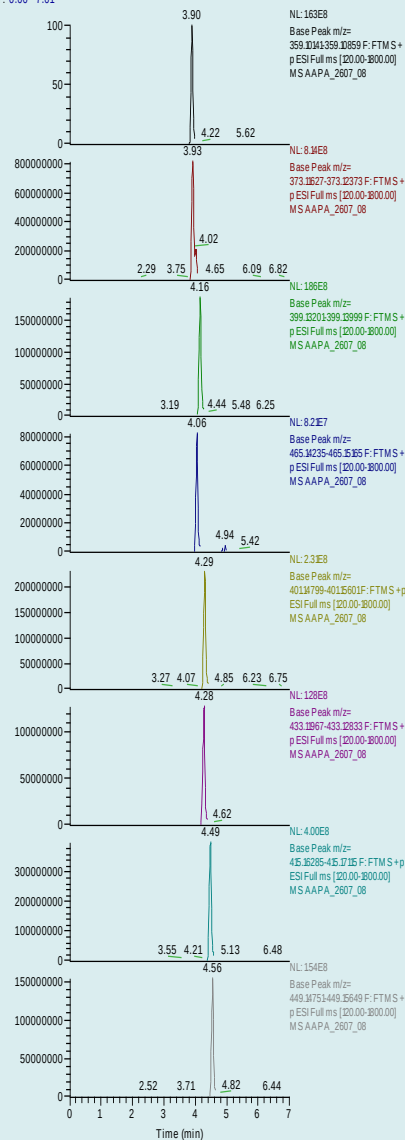
RT: 0.00 - 7.01



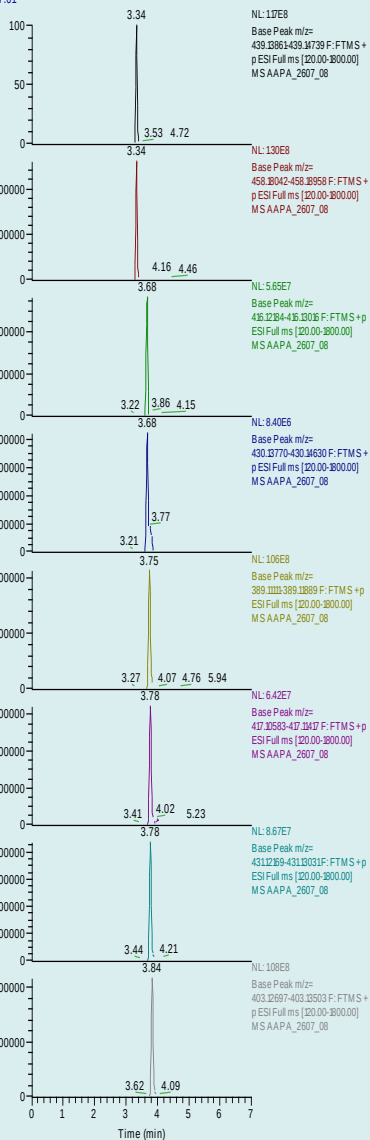
RT: 0.00 - 7.01



RT: 0.00 - 7.01

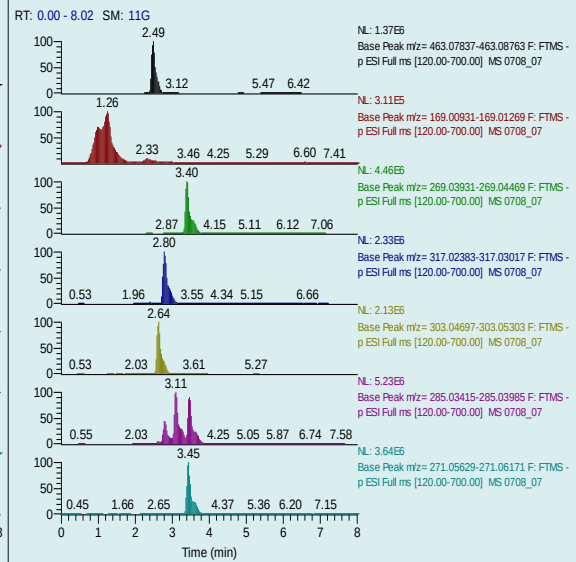
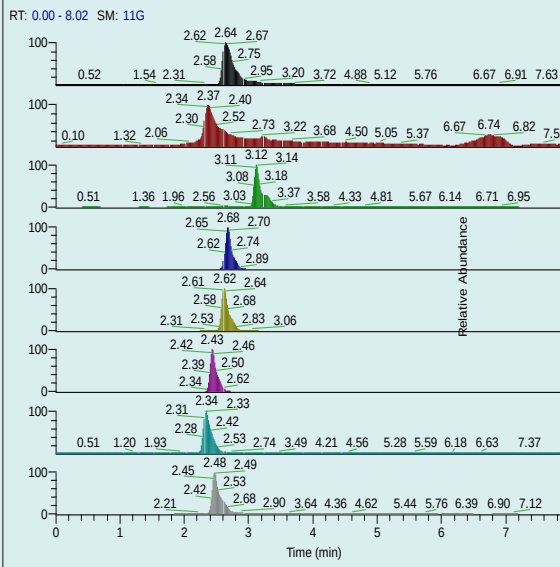
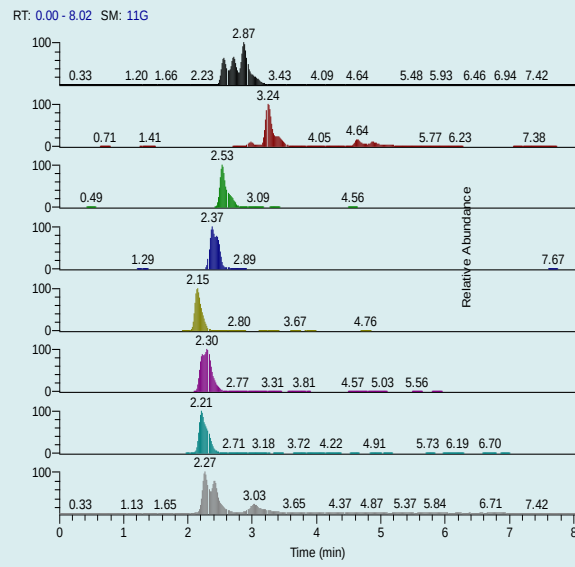
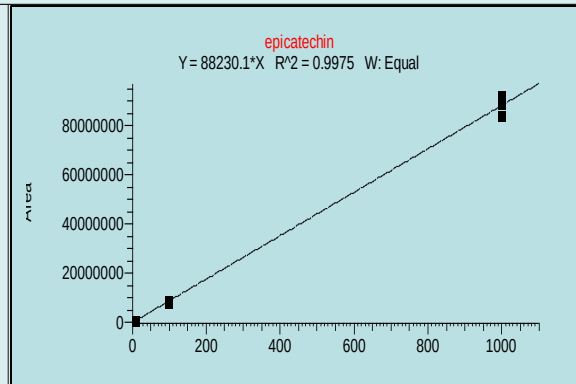
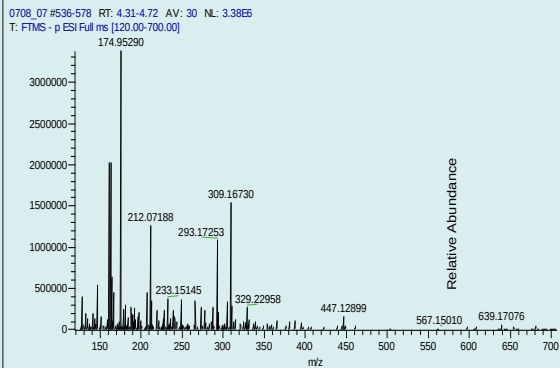
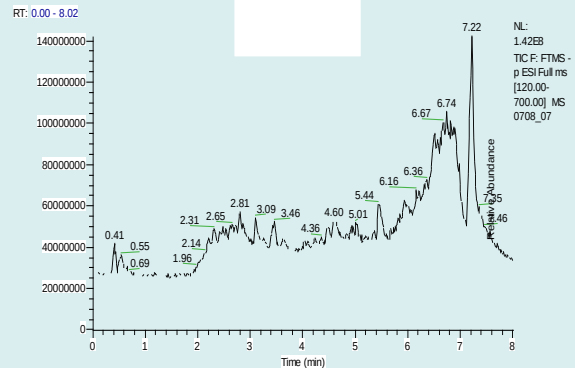


RT: 0.00 - 7.01

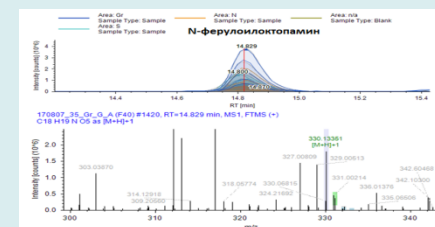
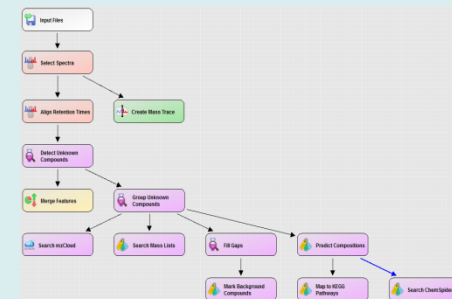
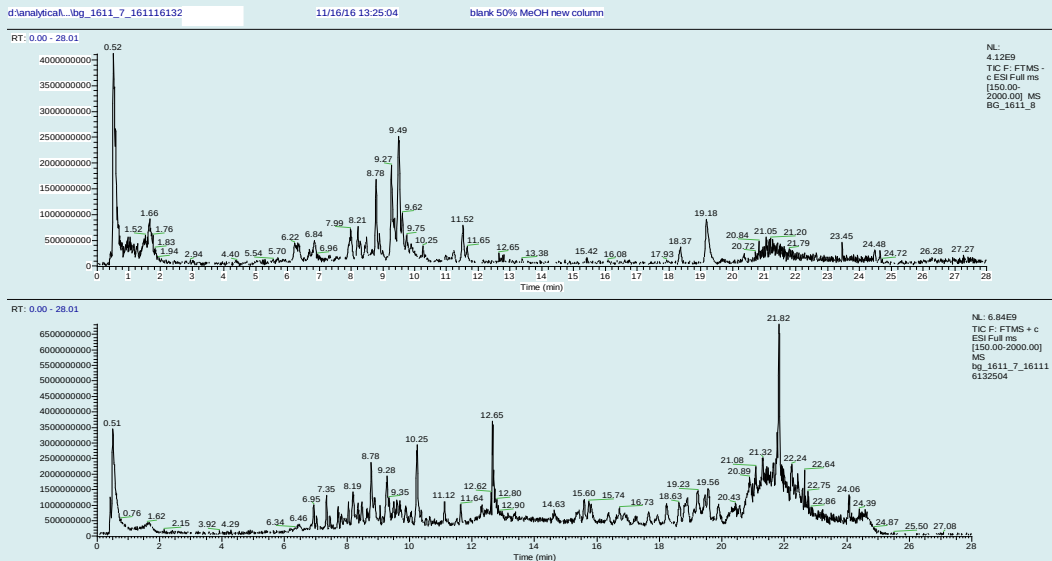


Количествен анализ на антиоксиданти в билкови екстракти чрез LC - HRMS

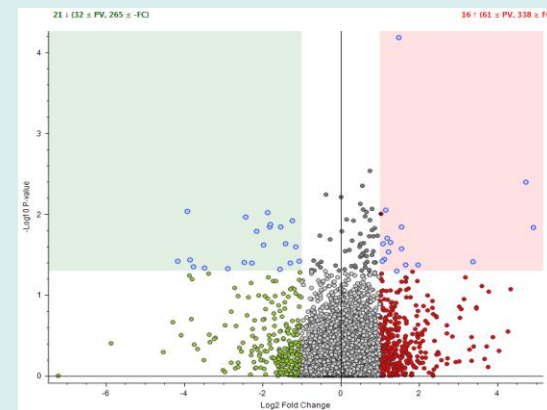
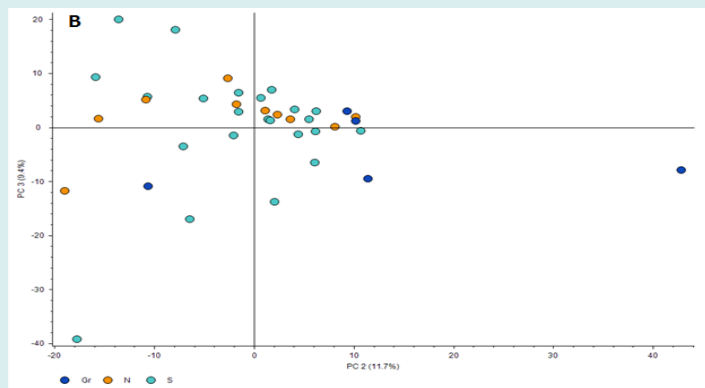
08/07/18 17:59:04



Използване на високоразделителна мас спектрометрия и биоинформатика за доказване на произход на билков екстракт приложение при *Portulaca oleracea* L. (тученица)



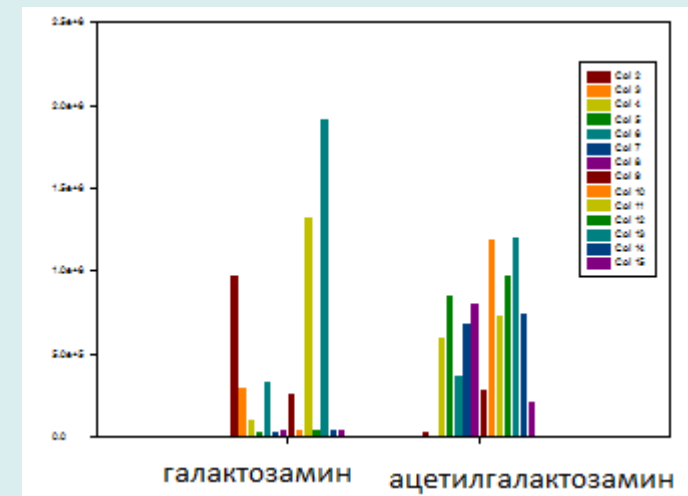
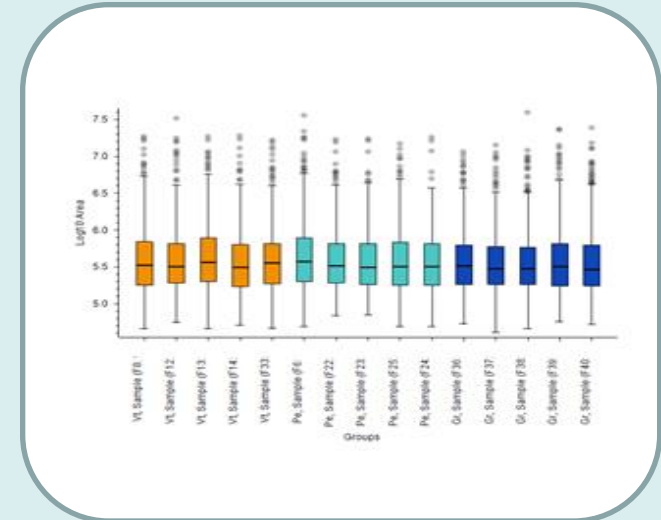
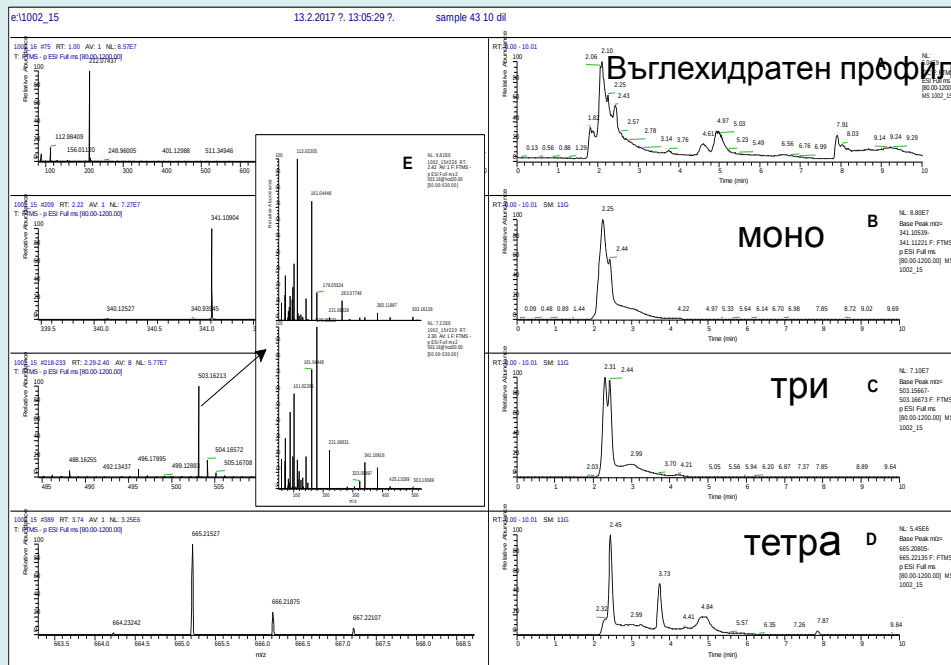
Изследвани 36 проби от различни региони на страната и Гърция
Доказано наличие на **1832** индивидуални вещества в пробите



Сравнителен анализ на кисели млека произведени чрез различни шамове на *Lactobacillus bulgaricus*

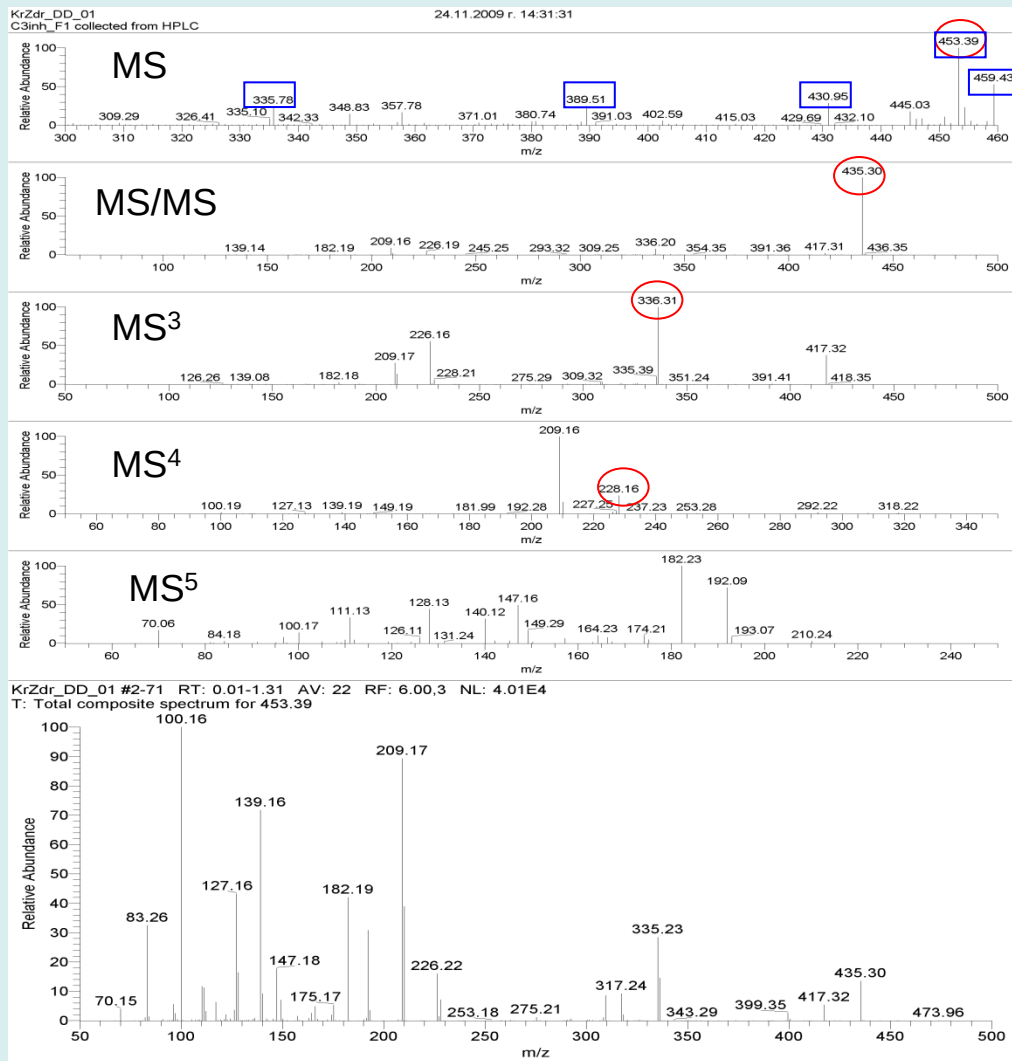
Изследвани 15 проби получени при използване на различни естествени шамове на *Lactobacillus bulgaricus*

Идентифицирани **820** индивидуални вещества

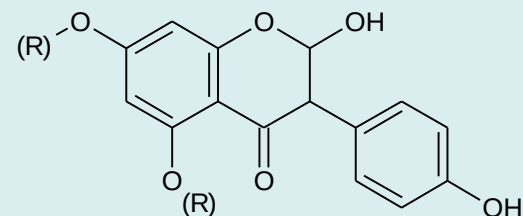
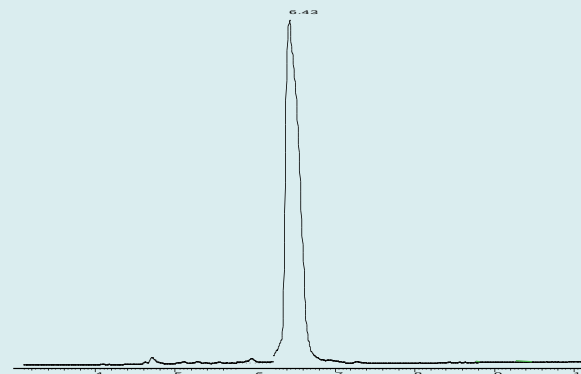


Лактозни изомери при *Lb. bulgaricus* шам 43

Изследване структурата на неизвестни вещества чрез MSⁿ



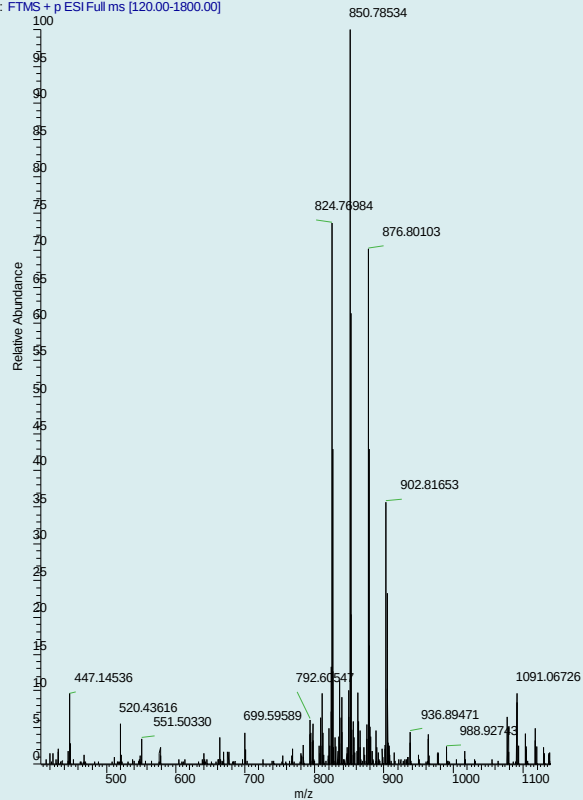
Хроматографски чисто
вещество изолирано от
Geranium sanguineum
(кръвен здравец)
Селективен каспаза-3
инхибитор



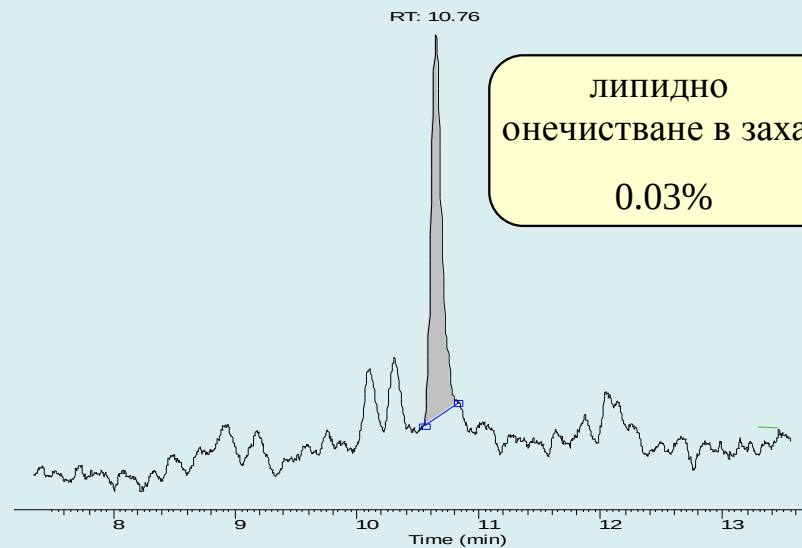
2-hydroxy-2,3-dihydrogenistein
R = H, pentose

Идентификация на онечиствания и замърсявания в търговски продукти

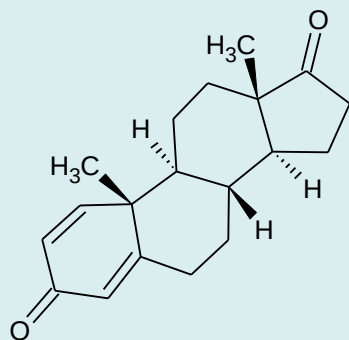
bnj_58_1512-04#713 RT: 9.53 AV: 1 NL: 7.56E7
T: FTMS + p ESI Full ms [120.00-1800.00]



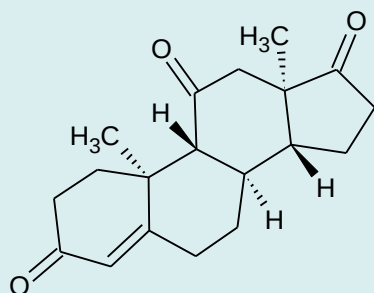
„лош“ търговски вид на спиртна напитка
(опалесценция (утайка))



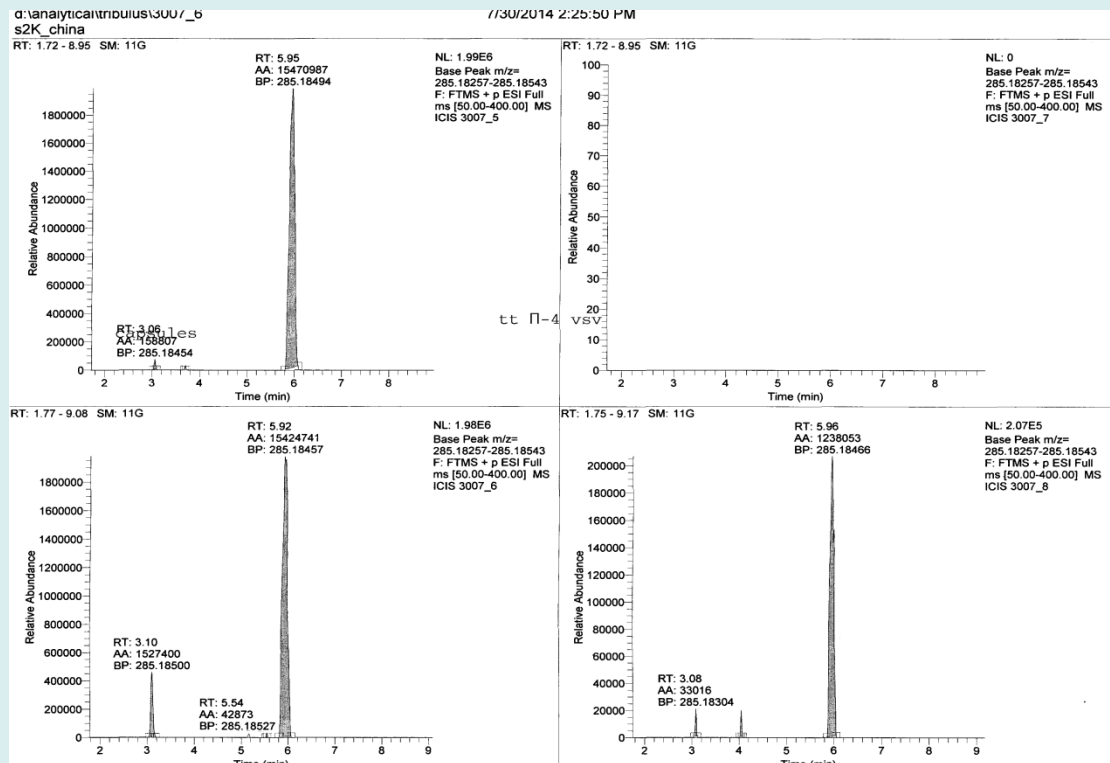
Идентификация на известни вещества в сложни смеси (анаболни вещества в хранителни добавки)



1,4-Androstadiene-3,17-dione

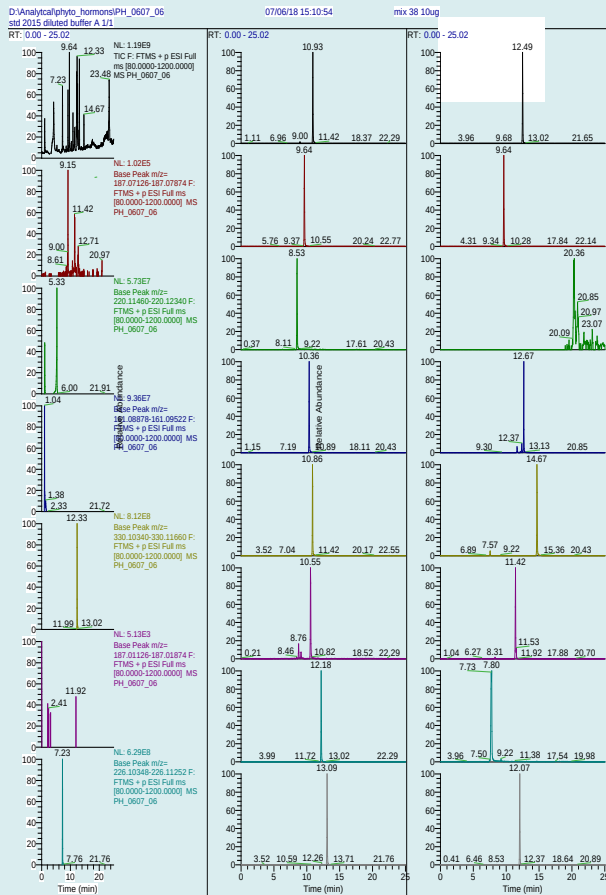
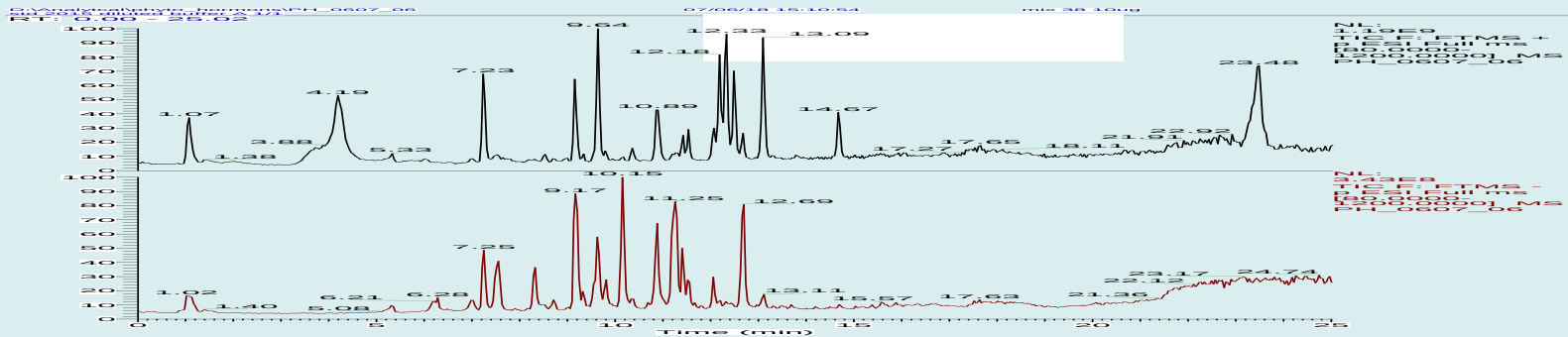


Androstenedion

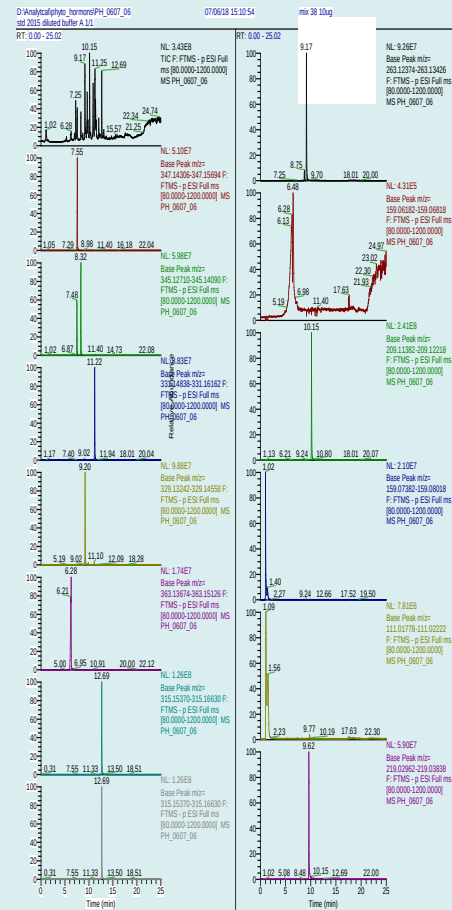


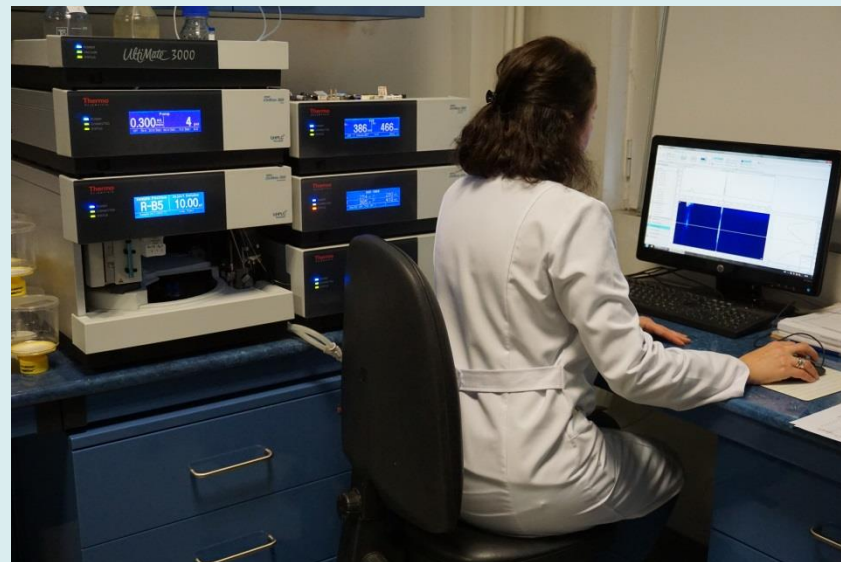
sample	androstenedion	1,4-androstadien-3,17-dione
Π-Ccj120140523	detected*	detected
Π-Ccj120140111	detected*	detected
tt Π-4 vsv	n. d.	n. d.
Capsules [#]	detected*	detected
Gul - 1305022	n. d.	n.d.
Guggul(synth) 140101	n. d	n. d
NSU 05122-LCE	n. d	n. d

Количествен анализ на фито хормони и растежни регулатори

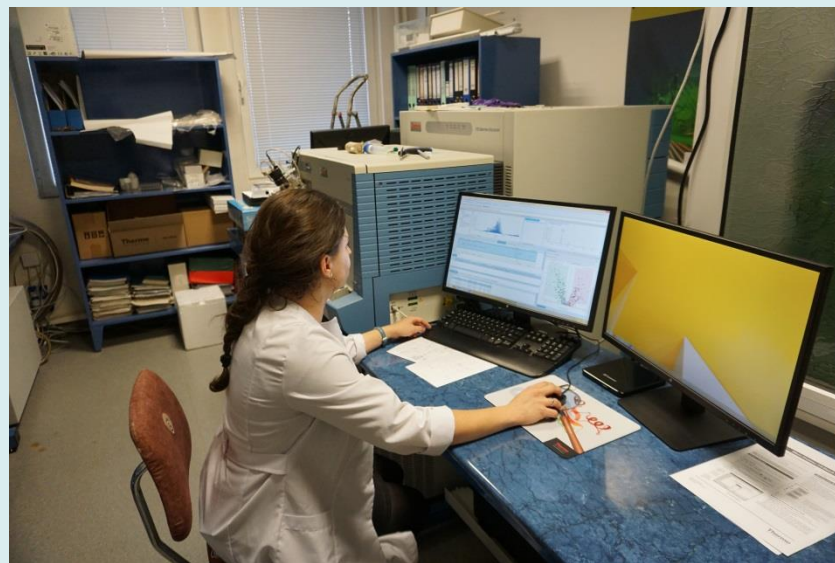
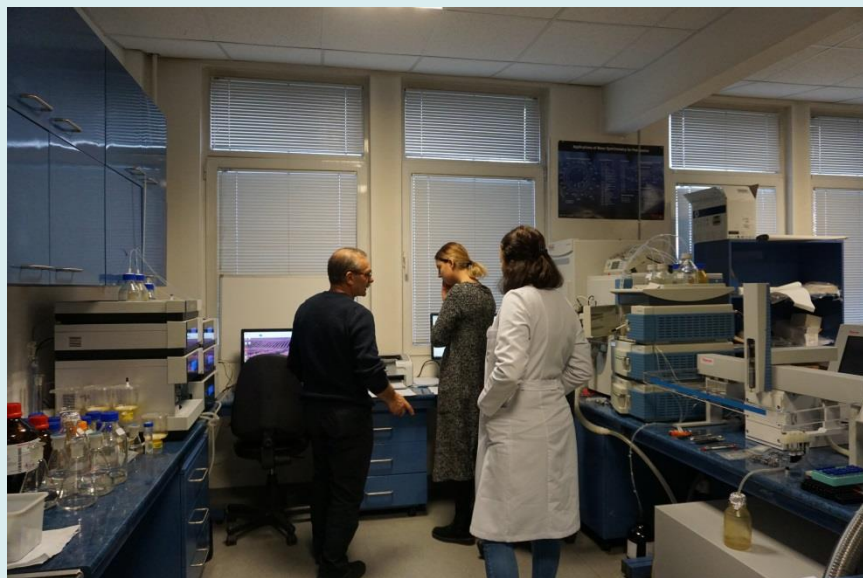


No	Compound	MW	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
1	GIBBERELLIN A1	348.40	348.164565	347.150012
2	GIBBERELLIC ACID (GA3)	346.38	347.148915	345.134362
3	GIBBERELLIN A4	332.40	333.16985	331.155087
4	GIBBERELLIN A5	330.38	331.154	329.139447
5	GIBBERELLIN A6	346.38	347.148915	345.134362
6	GIBBERELLIN A7	330.38	331.154	329.138447
7	GIBBERELLIN A8	364.40	365.15948	363.144927
8	GIBBERELLIN A9	316.40	317.174736	315.160183
9	α -NAPHTHALENEACETIC ACID (NAA)	186.21	187.07336	185.060803
10	N-2-CHLORO-4-PYRIDYL-N-PHENYLUREA	247.69	248.05616	246.043963
11	THIAZURON (TZ)	220.25	221.049157	219.034604
12	TRIS-ZEATIN (dZ)	219.25	219.119286	218.104734
13	($\pm$)-cis-trans-ABSCISIC ACID (ABA)	264.32	265.14346	263.128883
14	INDOLE-3-ACETIC ACID (IAA)	175.19	176.070605	174.056052
15	INDOLE-3-BUTYRIC ACID (IBA)	203.24	204.10196	202.087352
16	MEPIQUAT CHLORIDE	149.66	114.127726	-
17	DAMINOZIDE (Alar, B-Nine)	160.17	161.092069	159.077516
18	INDOLE-3-PROPIONIC ACID (IPA)	189.22	190.06035	188.071702
19	PACLOBUTRAZOLE	293.80	294.136766	292.122214
20	UNICONAZOLE	291.78	292.121116	290.106563
21	FLURPRIMIDOL	312.29	313.115839	311.101286
22	ANCYMIDOL	256.31	257.128454	255.113901
23	1-TRICANTANOL	438.82	439.487343	437.47279
24	($\pm$)-JASMONIC ACID (JA)	210.28	211.132871	209.118138
25	L- α -(2-AMINOETHOXY)VINYLGLYCINE (AVG)	160.17	161.092069	159.077516
26	ERGOSTEROL (ERG)	396.66	397.346492	395.331914
27	EPIBRASSINOLIDE (EBI)	400.69	481.352366	479.337813
28	FLURIDONE	329.32	330.110025	328.095472
29	MALEIC HYDRAZIDE	112.09	113.034554	111.020001

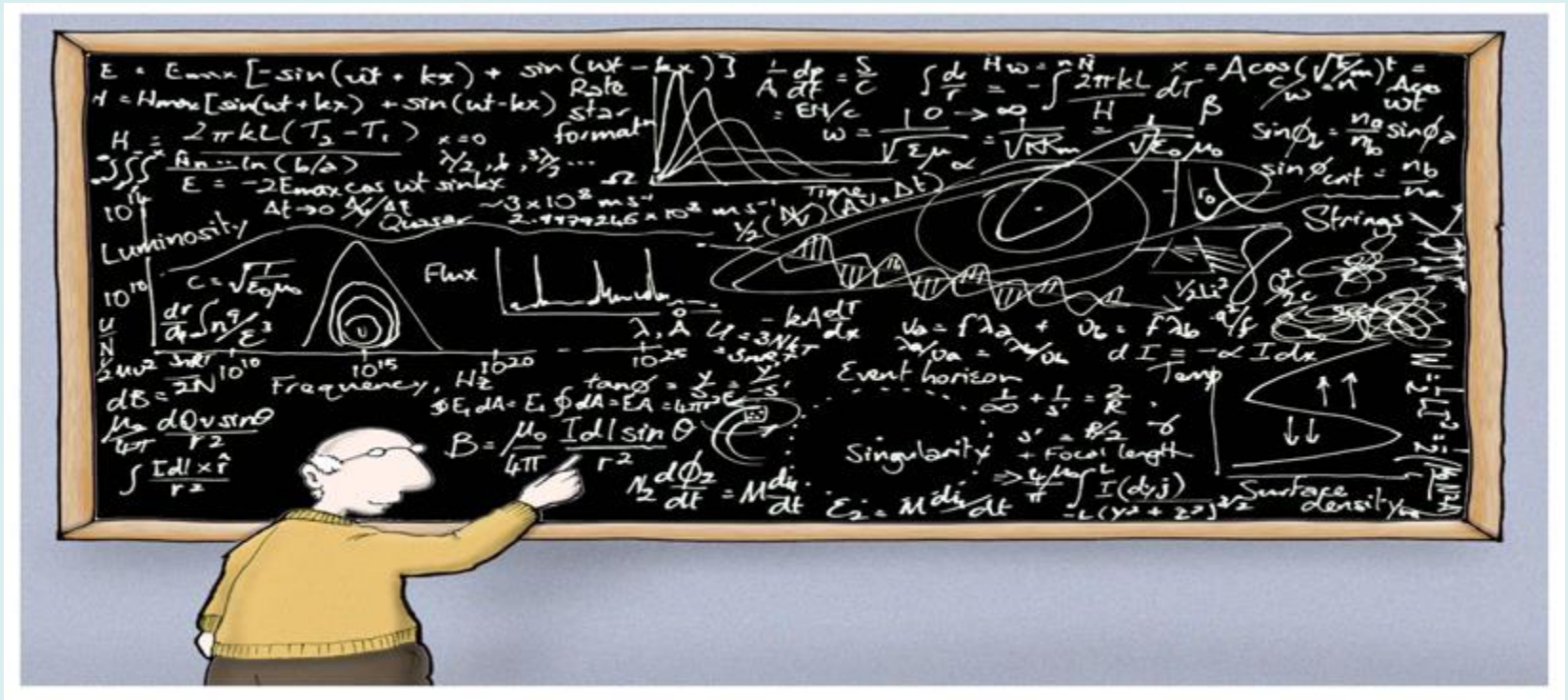




БЛАГОДАРЯ ЗА ВНИМАНИЕТО



Всичко е ясно !?



Някакви въпроси ?