

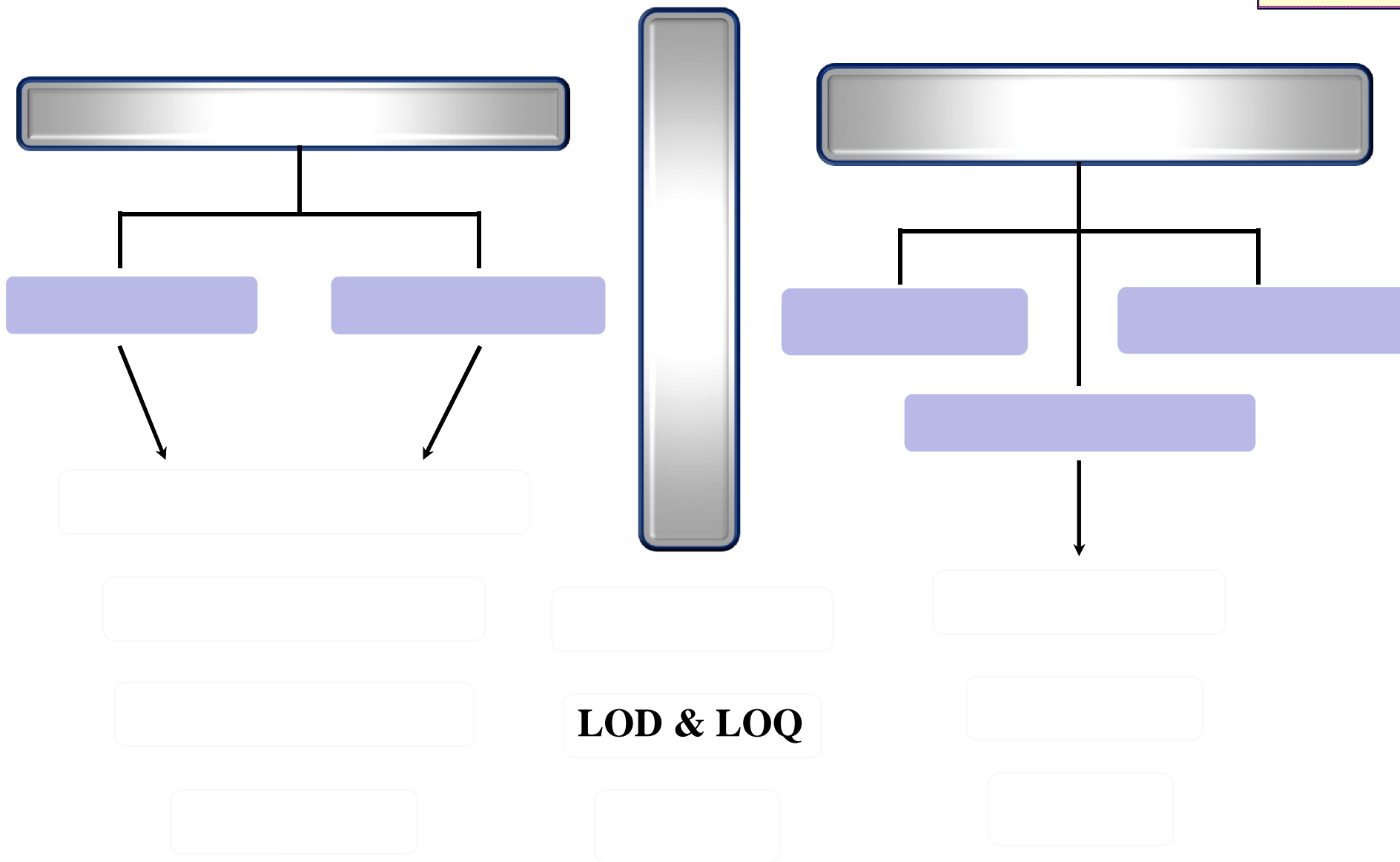
# HPLC      UPLC-MS-MS

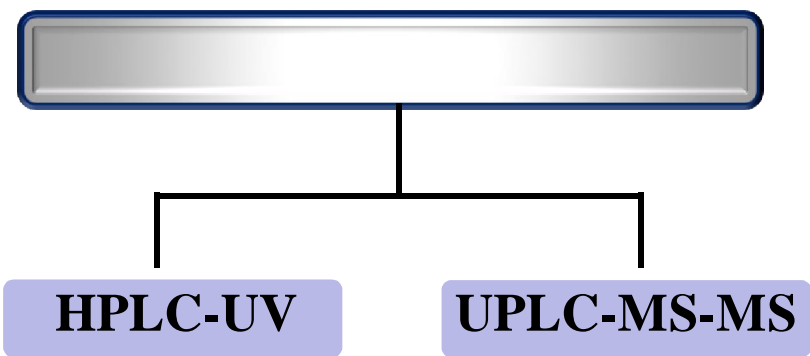
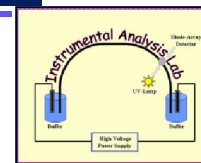
Κωνσταντίνα Καπνίση-Χριστοδούλου

«

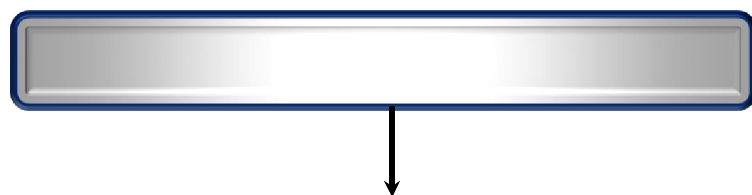
»

2015





**(COPs)**

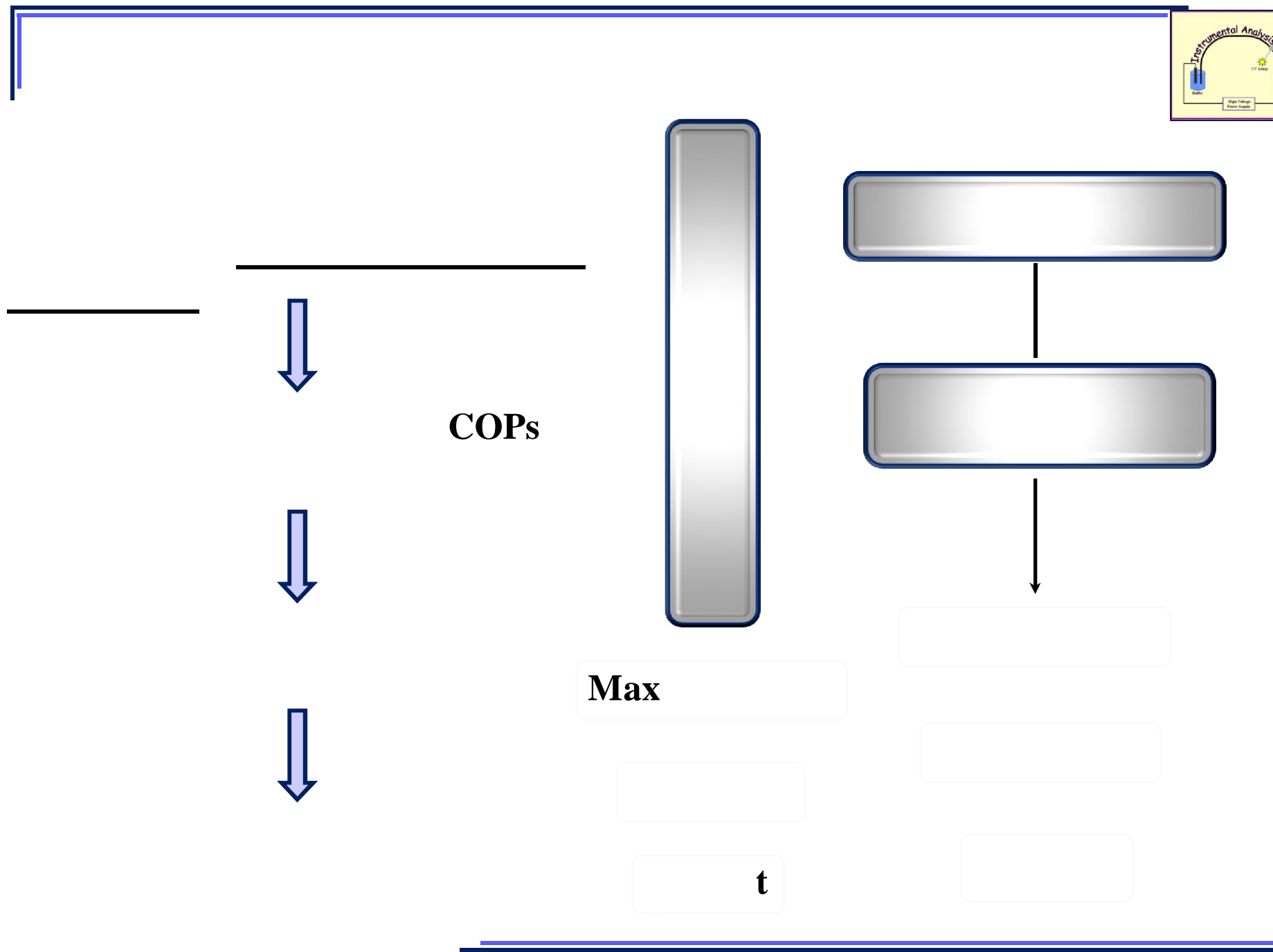
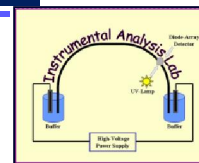


**LOD & LOQ**

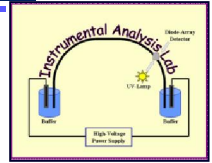


Τεκμηριώνεται πειραματικά η καταλληλότητα της μεθόδου

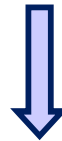
Εξασφαλίζεται η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων



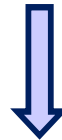
# COPs



•  $\xrightarrow{[O]}$  (COPs)



- μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον λόγω των επιπτώσεων στην ανθρώπινη υγεία
- ενοχοποιούνται για , και

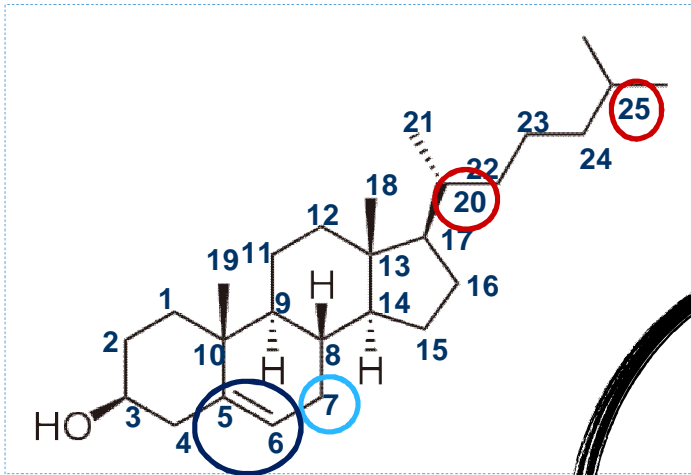
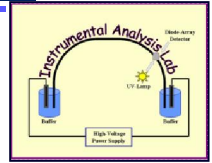


( Chol)



COPs

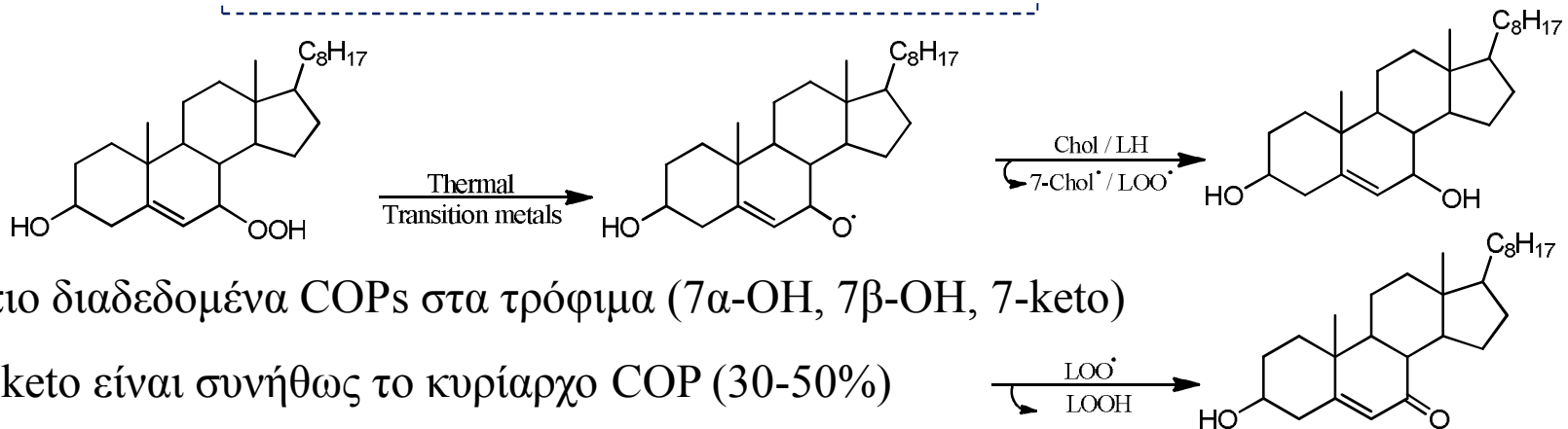
# COPs



- ευνοείται θερμοδυναμικά
- αλυσιδωτή αντίδραση ελευθέρων ριζών
- απόσπαση του ασταθούς υδρογόνου του C-7
- αντίδραση με O<sub>2</sub>
- σχηματισμός των 7α- και 7β-υδροϋπεροξειδίων

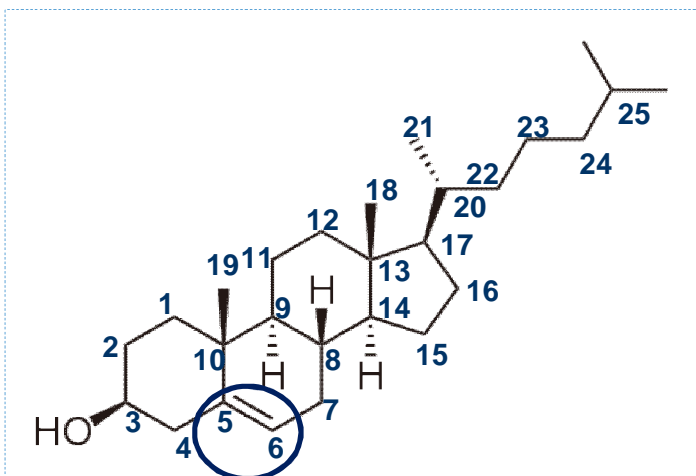
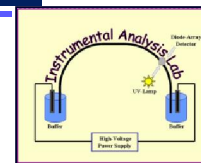
C-7

5,6



- τα πιο διαδεδομένα COPs στα τρόφιμα (7α-OH, 7β-OH, 7-keto)
- η 7-keto είναι συνήθως το κυρίαρχο COP (30-50%)
- αποτελεί δείκτης του βαθμού οξείδωσης της Chol

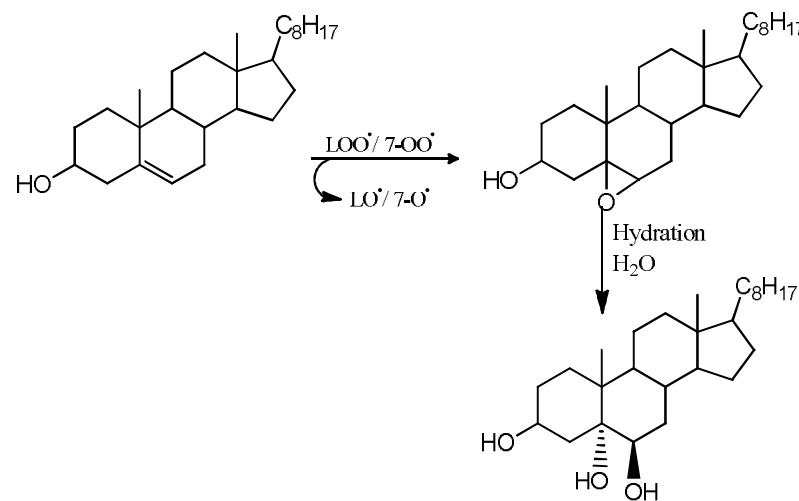
# COPs



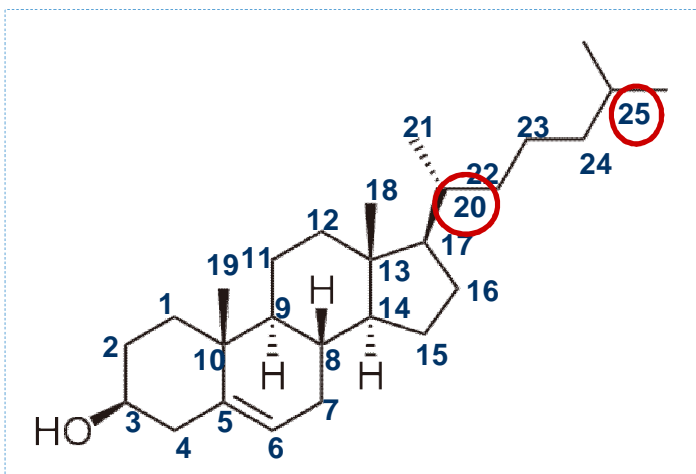
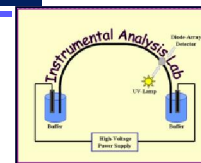
C-7

5,6

- πραγματοποιείται με μικρότερο ρυθμό
- αντίδραση του  $\Delta_{5,6}$  με ρίζες υπεροξειδίου
- σχηματισμός των 5,6α- και 5,6β-εποξειδία
- διάνοιξη δακτυλίου με ενυδάτωση
- σχηματισμός της τριόλης



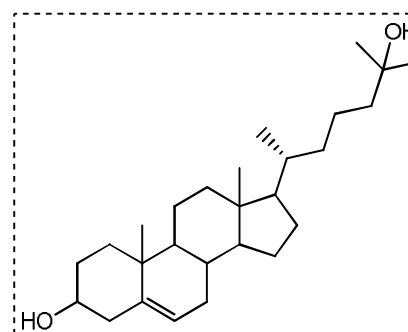
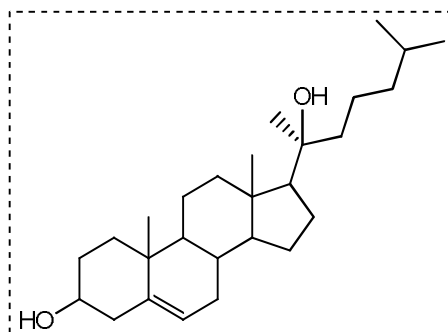
# COPs



C-7

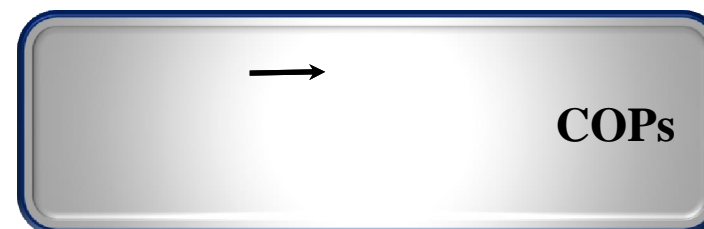
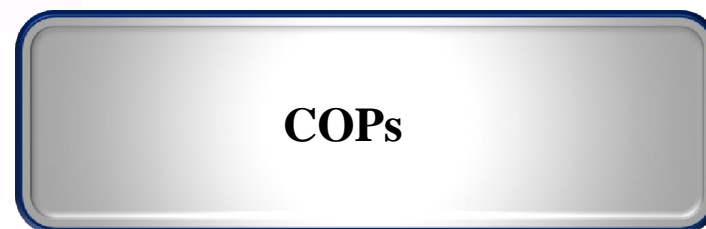
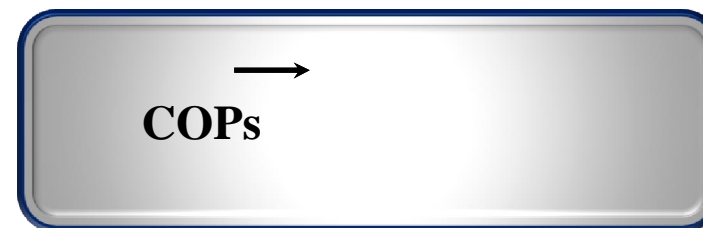
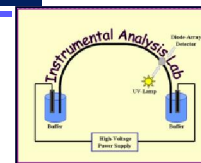
5,6

- λαμβάνει χώρα κυρίως στους 3<sup>ο</sup> ταγής C
- σχηματισμός των 20- και 25-OH

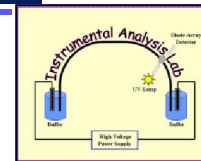




# COPs



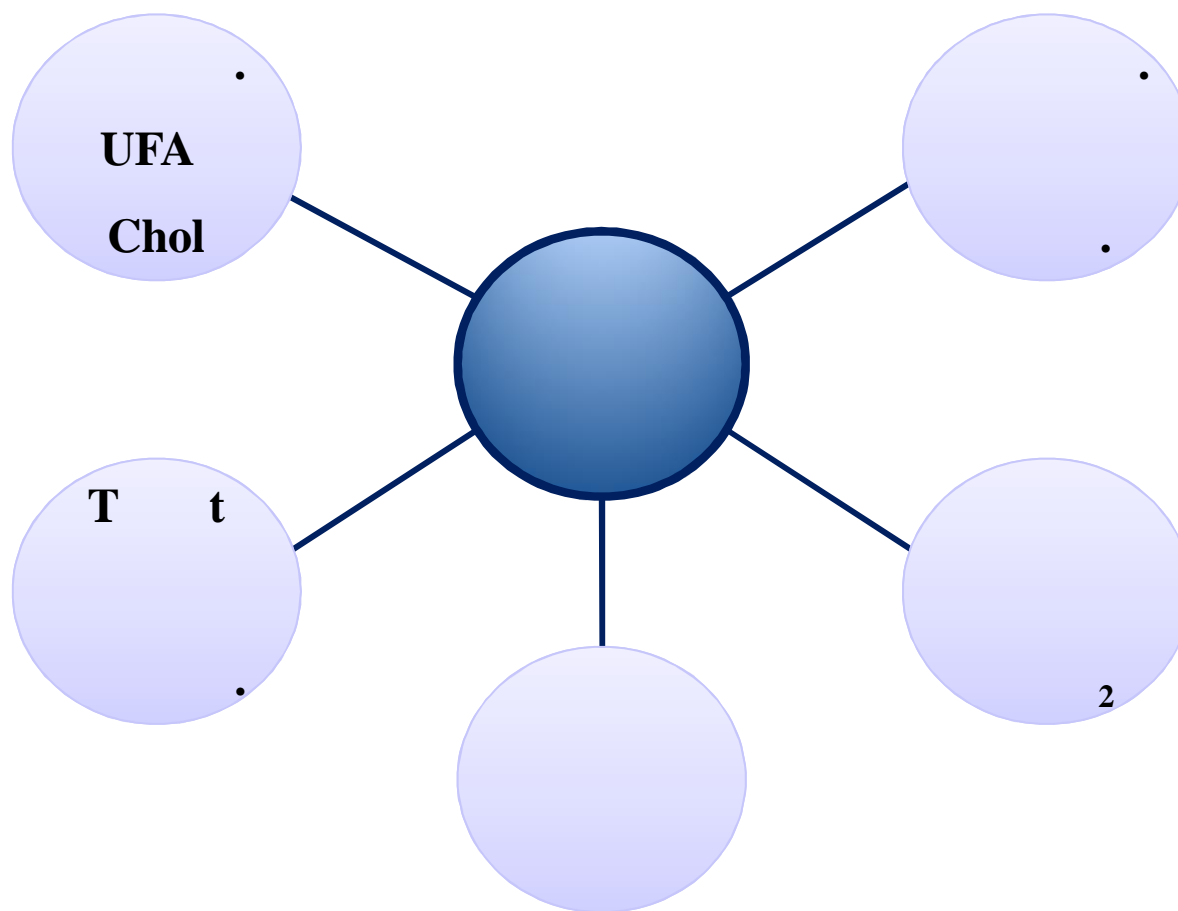
# COPs



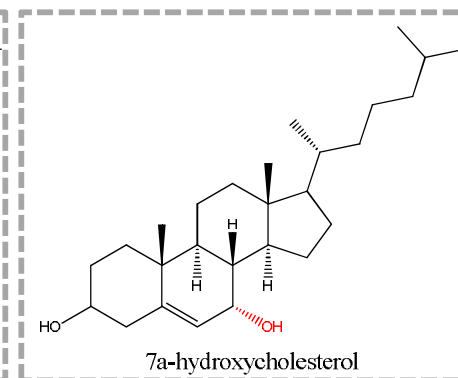
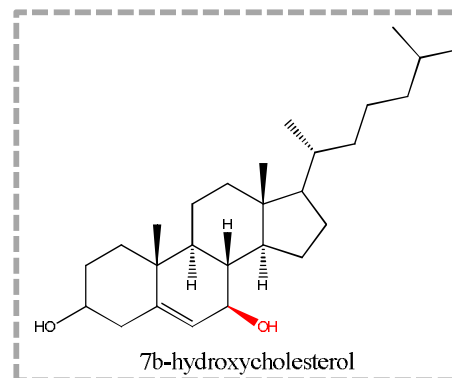
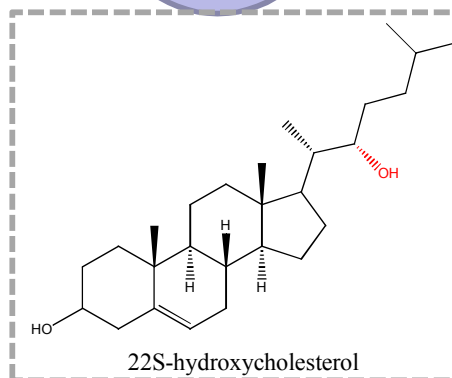
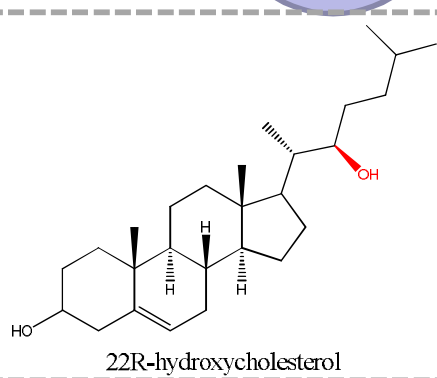
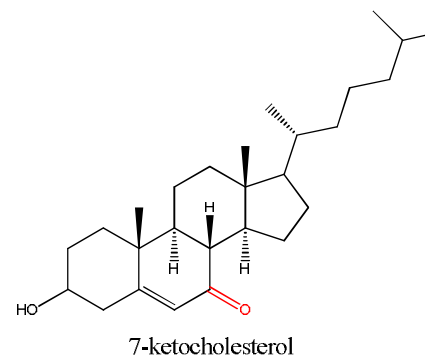
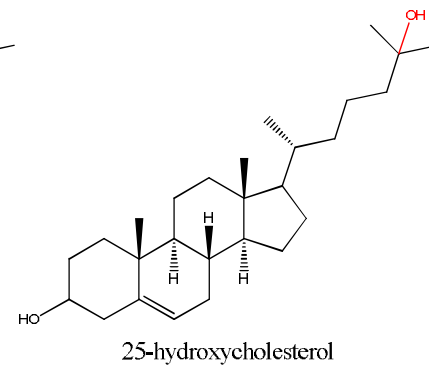
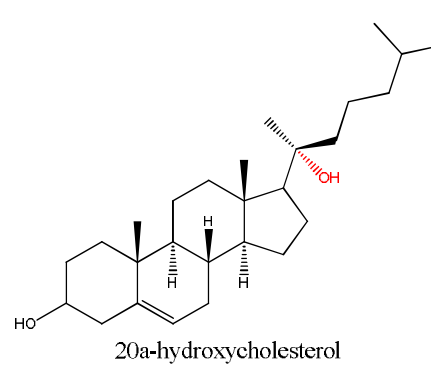
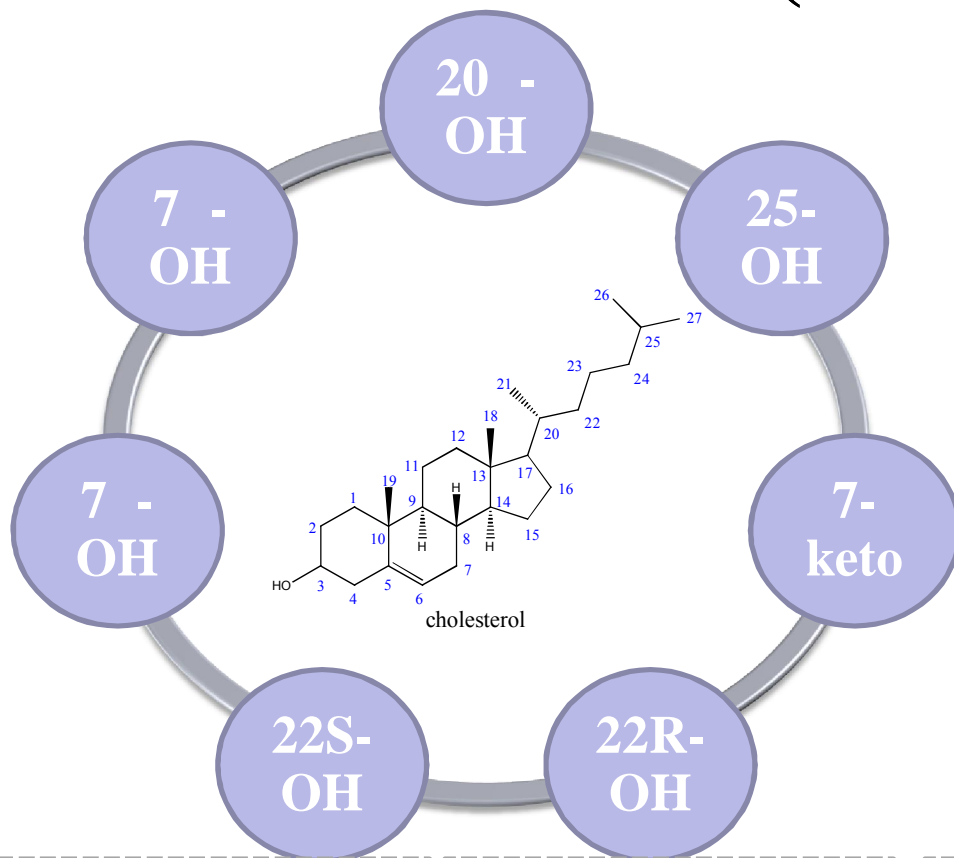
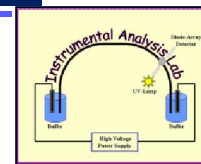
é 1%

Chol

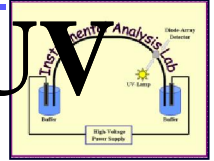
COPs



# (HPLC/UV)



# HPLC/UV



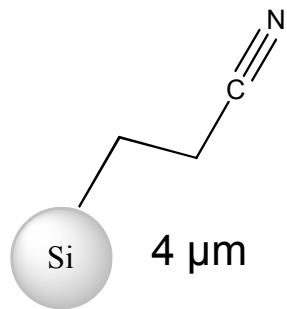
:  $-(CH_2)_3CN$

: 12-

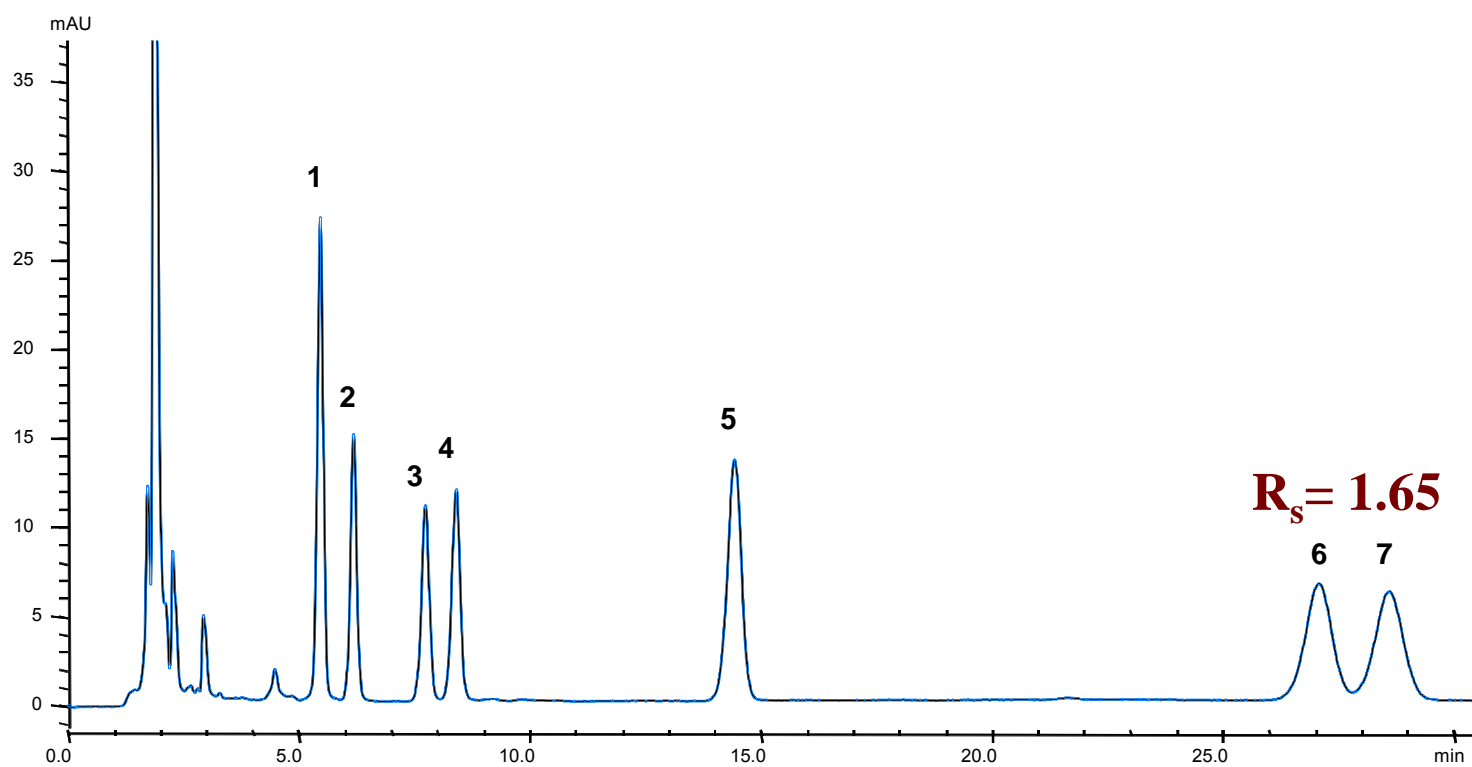
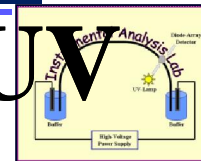
(97:1.5:1.5, v/v)

: 1.5 ml/min

: 25 C



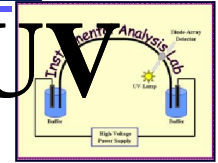
# HPLC/UV



(1) 20 $\alpha$ -OH, (2) 22R-OH, (3) 22S-OH, (4) 25-OH, (5) 7-keto, (6) 7 $\beta$ -OH,

(7) 7 $\alpha$ -OH

# HPLC/UV



	$r^2$	LOD ( g/ml)	LOQ ( g/ml)
20 -	1.0000	0.15	0.45
22R-	1.0000	0.29	0.88
22S-	0.9998	0.63	1.91
25-	0.9999	0.36	1.09
7-keto	0.9999	0.43	1.32
7 -	0.9998	0.57	1.72
7 -	0.9998	0.55	1.67

**LOD & LOQ**

**CN vs C18**



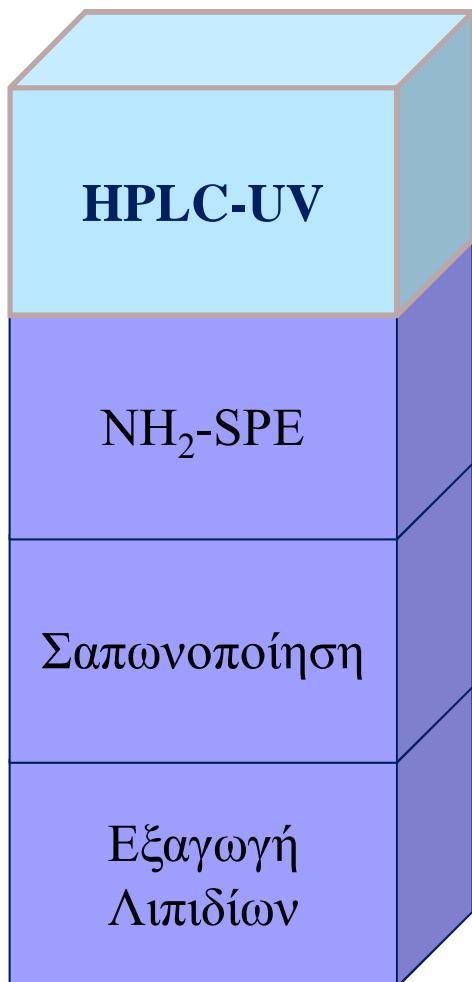
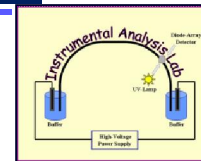
**COPs**

**RSD**



RSD (%)			
	Intraday (n=5)	Interday (n=4)	
$t_R$		$t_R$	
0.17	0.90	1.63	6.90
0.17	0.92	2.00	8.33
0.25	0.92	2.24	7.73
0.19	1.08	2.17	8.55
0.17	0.27	1.01	7.59
0.27	1.48	1.05	8.45
0.42	1.54	0.98	8.33

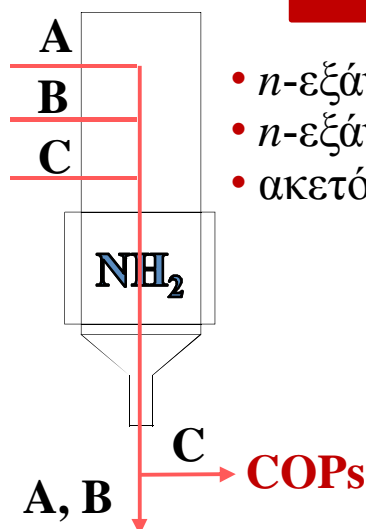
# HPLC/UV



χλωροφόρμιο/μεθανόλη  
(2:1, v/v)

1M KOH αιθανόλη/νερό  
(60:40, v/v) 18h, RT

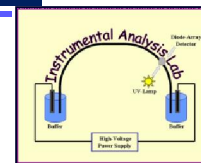
## NH<sub>2</sub> - SPE



- *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας (95:5, v/v)
- *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας (90:10, v/v)
- ακετόνη

Άπολα λιπίδια και χοληστερόλη

# HPLC/UV



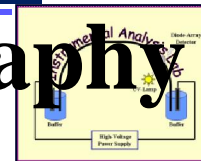
**COPs,**

**( g/g).**

<b>COPs</b>					
<b>20 -OH</b>	0.106	0.147	0.145	-	-
<b>22R-OH</b>	< LOQ	<LOQ	-	-	-
<b>22S-OH</b>	-	-	-	-	-
<b>25-OH</b>	-	-	-	-	-
<b>7-keto</b>	<LOQ	0.133	<LOQ	1.092	<LOQ
<b>7 -OH</b>	0.204	0.220	0.589	2.535	<LOD
<b>7 -OH</b>	<LOQ	<LOQ	0.623	<LOQ	-
<b>TOTAL</b>	0.310	0.500	1.357	3.627	-



# Ultra Performance Liquid Chromatography



## UPLC

Μικρότερο μέγεθος υλικού πακεταρίσματος < 1.7 μm

Μεταφορά κινητής φάσης με πιέσεις μέχρι και 15.000 psi

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \frac{k}{(k + 1)}$$

$$N \propto \frac{1}{dp}$$

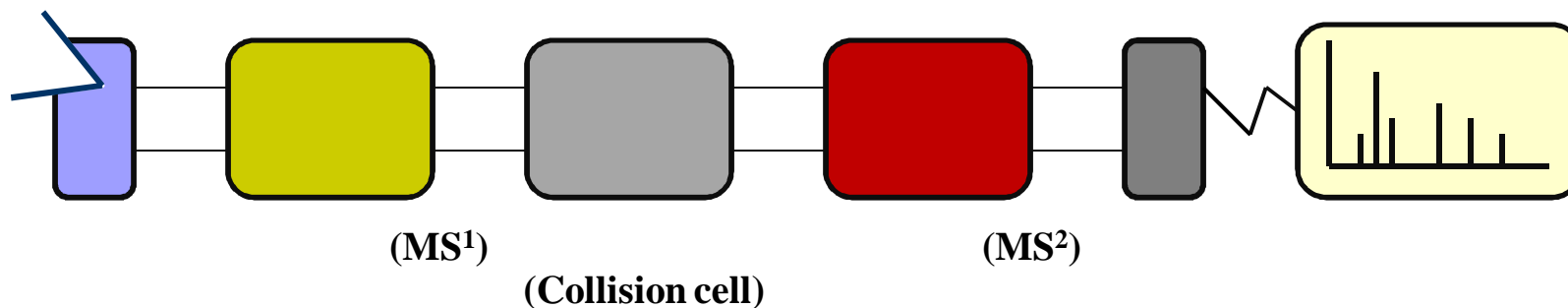
Ανάλυση

Ταχύτητα

Ευαισθησία

$$F_{opt} \propto \frac{1}{dp}$$

↓ dp ⇒ ↑ N ⇒ ↑ ανίχνευση

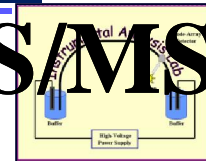


Το μητρικό ιόν (parent ion) που παράγεται από την πηγή ιοντισμού επιλέγεται και διέρχεται στο 1<sup>ο</sup> τετράπολο ( $MS^1$ )

Το μητρικό ιόν στο κελί διάσπασης συγκρούεται με περίσσεια αδρανούς αερίου (συνήθως Ar ) παράγοντας θυγατρικά ιόντα (daughter ions).

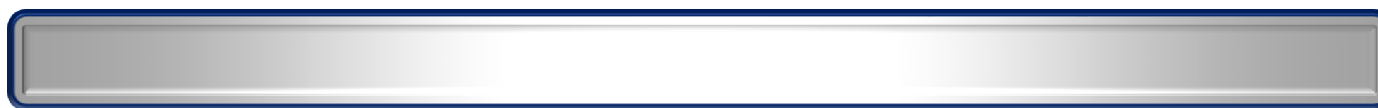
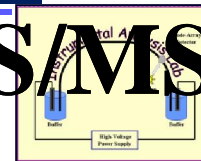
Ο διαχωρισμός και η μέτρηση των θυγατρικών ιόντων γίνεται στο 2<sup>ο</sup> τετράπολο ( $MS^2$ )

# UPLC-MS/MS



- Σύστημα ACQUITY TQD UPLC-MS/MS (Waters)
- Τριπλό τετραπολικό φασματοόμετρο μάζας
  - Πηγή ηλεκτροψεκασμού ESI (+)
- Παράμετροι πηγής ιονισμού
  - capillary voltage, 3.5 kV
  - extractor voltage, 3V
  - desolvation temperature, 200 °C
  - cone gas flow, 50 L/h
- Στήλη BEH Shield RP18
  - 50 x 2.1 mm i.d, 1.7 μm
- Θερμοκρασία
  - στήλης, 40 °C
  - δειγματολήπτη, 10 °C
- Ταχύτητα ροής, 0.4 mL/min
- Δείγματα αναλυτών: 1 mg/mL σε διαλύτη μεθανόλη

# UPLC-MS/MS



## LODs & LOQs

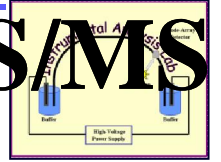


	$R^2$
7-keto	0.9993
5,6-EP	0.9992
7-OH	0.9992
22R-OH	0.9989



LODs (ng mL <sup>-1</sup> )	LOQs (ng mL <sup>-1</sup> )
5.7	17.4
6.4	19.5
5.9	17.9
7.3	22

# UPLC-MS/MS



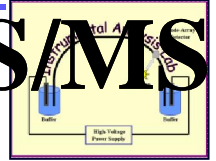
## Intra-day precision

Διαδοχικές πειραματικές μετρήσεις την ίδια ημέρα

## Inter-day precision

Οι μετρήσεις λαμβάνονται σε διαφορετικές ημέρες

	Intra-day precision (n=10)		Inter-day precision (n=3)	
	RSD <sub>tR</sub> (%)	RSD <sub>area</sub> (%)	RSD <sub>tR</sub> (%)	RSD <sub>area</sub> (%)
7-keto	0.14	1.9	0.26	4.1
5,6-EP	0.20	1.3	0.23	1.7
7-OH	0.08	1.9	0.35	2.5
22R-OH	0.17	1.1	0.18	1.5



(Matrix Effect, ME)

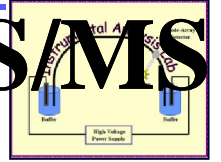


Καταστολή ή ενίσχυση στη μέτρηση του σήματος του αναλύτη που οφείλεται στη συνέκλωση συστατικών της μήτρας

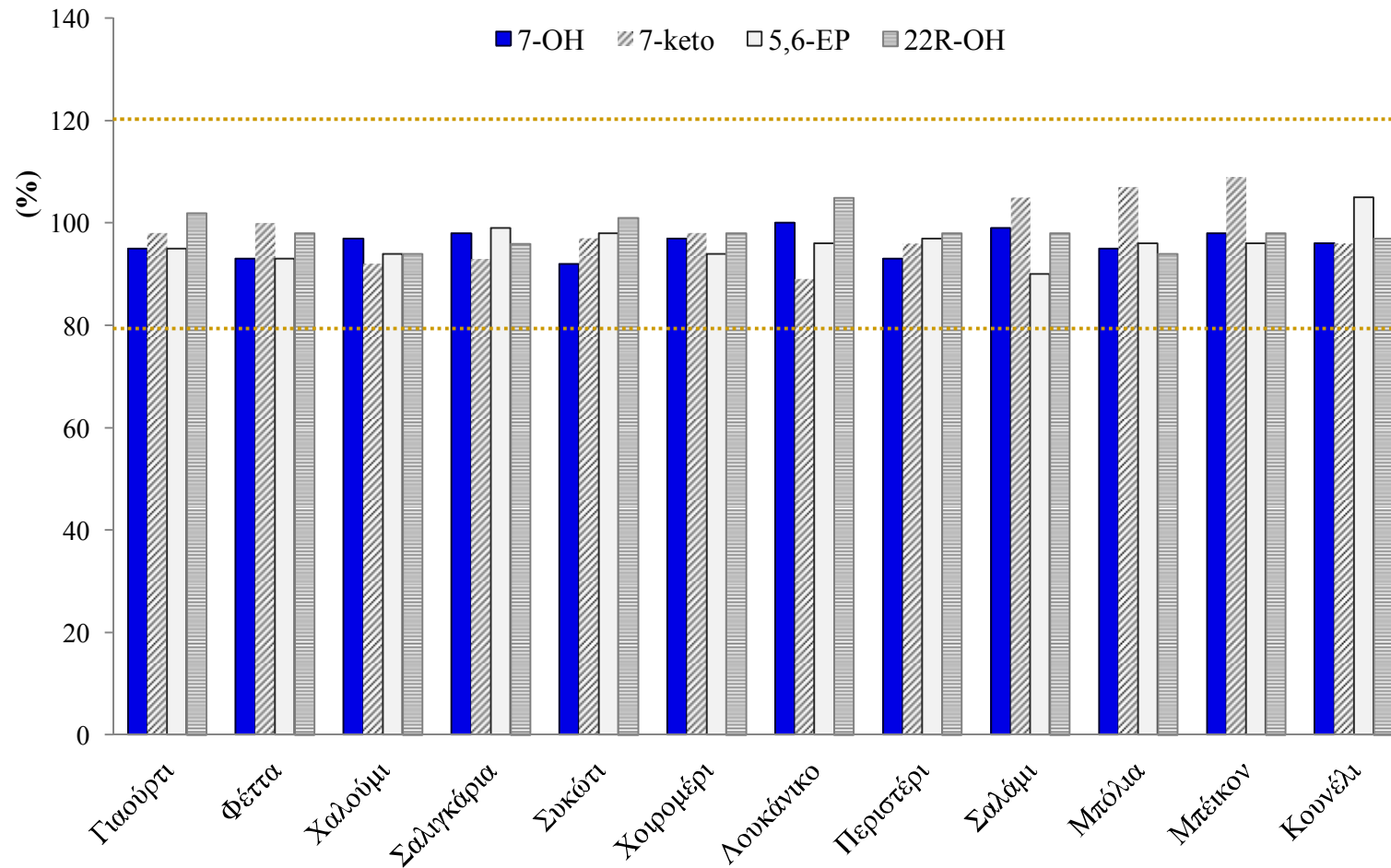
Ποσοτική εκτίμηση

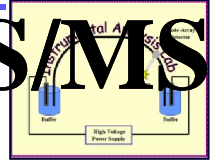
$$\%ME = (As \text{ ó } Ans) / Ass \times 100$$

*As & Ans*: η απόκριση του αναλύτη σε εμβολιασμένο & μη εμβολιασμένο δείγμα  
*ss*: η απόκριση του αναλύτη από ένα πρότυπο διάλυμα με την ίδια συγκέντρωση



## (Matrix Effect, ME)





Η επεξεργασία του δείγματος αποτελεί το  
στάδιο ενός αναλυτικού πρωτοκόλλου



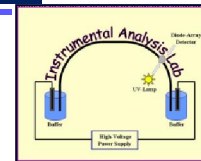
Μεγάλη ανάκτηση αναλύτη από τη μήτρα

	(ng/mL)	(%)
	100	86 - 96
	500	89 - 98
	1500	89 -98

- Αποτελεσματική εκχύλιση των αναλυτών από το μητρικό υλικό
- Συγκρίσιμες τιμές και για τα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων
- Εξωτερική βαθμονόμηση είναι μια έγκυρη στρατηγική ποσοτικοποίησης



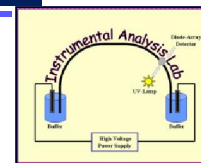
# UPLC-MS/MS



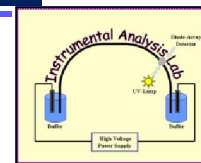
	COPs (ng/250mg of fat)			
	7-OH	7-keto	5,6-EP	COPs
Γιαούρτι	< LOQ	45 (5.2)	204 (1.7)	249
Τυρί φέττα	1479 (2.8)	52 (2.8)	n.d	1531
Τυρί χαλούμι	1451 (1.1)	81 (3.0)	n.d	1532
Σαλιγκάρια	4368 (1.8)	345 (2.8)	n.d	4713
Συκώτι	< LOQ	73 (5.5)	50 (1.8)	123
Χοιρομέρι	24 (2.2)	59 (2.8)	102 (2.7)	185
Λουκάνικα	1842 (1.7)	225 (4.7)	n.d	2067
Περιστέρι	2348 (2.3)	472 (2.2)	1745 (2.7)	4565
Σαλάμι	4202 (2.5)	194 (2.7)	121 (3.0)	4517
Μπόλια	164 (1.7)	152 (3.6)	231 (2.3)	547
Μπέικον (ωμό)	67 (1.5)	57 (3.0)	n.d	124
Μπέικον (τηγανητό)	278 (3.0)	81 (2.2)	50 (2.8)	409
Κουνέλι (τηγανητό)	279 (1.8)	177 (1.4)	121 (1.9)	577
Κουνέλι (στο φούρνο)	2716 (0.3)	220 (1.8)	1077 (3.9)	4013

n.d., μη ανιχνεύσιμο, οι τιμές RSD δίνονται στη παρένθεση (n=4)

# UPLC-MS/MS

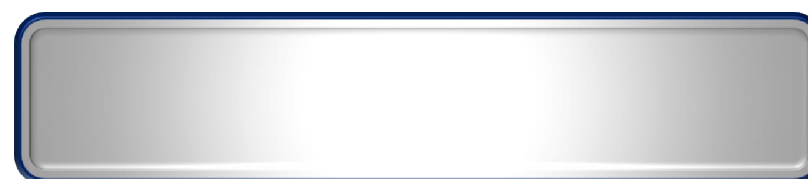


	<b>COPs (ng/250mg of fat)</b>			
	<b>7-OH</b>	<b>7-keto</b>	<b>5,6-EP</b>	<b>COPs</b>
Αυγό #1	2546	155	n.d.	2701
Αυγό #2	2604	150	n.d.	2754
Αυγό #3	2146	126	n.d.	2272
Αυγό #4	1645	98	111	1854
Αυγό #5	1756	106	123	1985
Πράσινο αυγό #1	266	80	n.d.	346
Πράσινο αυγό #2	312	96	n.d.	408
Πράσινο αυγό #3	298	91	n.d.	389
Πράσινο αυγό #4	295	86	n.d.	381
Πράσινο αυγό #5	324	114	n.d.	438



**COPs**

-



**( R<sup>2</sup> > 0.99 )**

↑

→ ↑

**COPs**

**(RSD<sub>area</sub> % < 5 & RSD<sub>tR</sub> % < 1)**

**COPs**

**(ng) → UPLC**

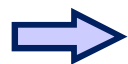
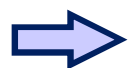
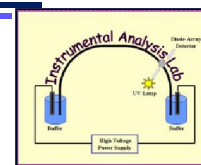
**UV**

**COPs (↑ LOD & LOQ)**



**COPs**

**(7-keto & 7-OH)**



**(MSc)**

