

Metabolomika kryminalistyczna

ĆWICZENIA LABORATORYJNE DLA STUDENTÓW II ROKU STUDIÓW II STOPNIA
KIERUNKU CHEMIA I TOKSYKOLOGIA SĄDOWA

Opracował: dr Remigiusz Bąchor

Harmonogram ćwiczeń laboratoryjnych

1. Przygotowanie znakowanych izotopowo standardów kreatyniny do analizy ilościowej metodą wysokosprawnej chromatografii ciekowej sprzężonej ze spektrometrią mas w próbkach biologicznych.
2. Opracowaniem metody MRM dla kreatyniny. Analiza izotopologów kreatyniny metodą LC-MS z zastosowaniem chromatografii oddziaływań hydrofilowych. Przygotowanie krzywej kalibracyjnej.
3. Przygotowanie próbki biologicznej do analizy ilościowej kreatyniny metodą LC-MS/MRM z zastosowaniem znakowanego izotopowo standardu. Wykonanie analiz metodą LC-MS/MRM z zastosowaniem chromatografii oddziaływań hydrofilowych. Analiza uzyskanych wyników.
4. Opracowaniem metody MRM dla nikotyny. Przygotowanie krzywej kalibracyjnej.
5. Przygotowania próbki włosów ludzkich do analizy ilościowej nikotyny metodą LC-MS/MRM. Wykonanie analiz metodą LC-MS/MRM z zastosowaniem chromatografii oddziaływań hydrofilowych. Analiza uzyskanych wyników.

Warunki zaliczenia zajęć laboratoryjnych z przedmiotu Metabolomika kryminalistyczna

Warunkiem zaliczenia ćwiczeń laboratoryjnych jest uczestnictwo w zajęciach, wykonanie eksperymentu, przedstawienie indywidualnego sprawozdania z zgodnie z wytycznymi oraz uzyskanie pozytywnej oceny z kartkówki sprawdzającej wiedzę przeprowadzonej na zajęciach. Ocenie podlega także praca laboratoryjna, jej odpowiednia organizacja oraz przestrzeganie zasad BHP.

Uwagi ogólne i zasady BHP obowiązujące na wszystkich ćwiczeniach:

BEZPIECZEŃSTWO W LABORATORIUM CHEMICZNYM

Uwaga: Przed rozpoczęciem prac laboratoryjnych należy zapoznać się i zrozumieć poniżej przedstawione zasady pracy w laboratorium chemicznym. Zostaną one dodatkowo przedstawione przez osobę prowadzącą zajęcia laboratoryjne.

1. Student ma obowiązek nosić fartuch i okulary ochronne (tradycyjne okulary korekcyjne nie stanowią alternatywy dla okularów ochronnych), w trakcie całego pobytu na pracowni.
2. Zaleca się używanie rękawic ochronnych (np. lateksowych, nitylowych) w trakcie wszystkich prac z odczynnikami chemicznymi. Jeśli związek chemiczny przeniknął przez rękawicę, należy ją zdjąć a rękę umyć pod bieżącą wodą.
3. Wszystkie czynności z odczynnikami żrącymi, toksycznymi i drażniącymi wykonywane są pod wyciągiem.
4. Mycie szkła laboratoryjnego należy początkowo prowadzić pod wyciągiem a następnie w zlewie na sali laboratoryjnej.
5. Operowanie aparaturą badawczą odbywa się wyłącznie pod nadzorem prowadzącego.

W trakcie zajęć laboratoryjnych każdy student przeprowadza eksperyment zgodnie z dołączoną do ćwiczenia instrukcją. Przed przystąpieniem do ćwiczenia student ma obowiązek zapoznać się dokładnie z jej treścią oraz zagrożeniami związanymi ze stosowanymi odczynnikami chemicznymi.

Zajęcia laboratoryjne są obowiązkowe.

ĆWICZENIE 1

Analiza poziomu kreatyniny w próbkach biologicznych z zastosowaniem metody rozcieńczeń izotopowych i wysokosprawnej chromatografii ciekowej sprzężonej ze spektrometrią mas w trybie monitorowania wybranych reakcji fragmentacji

Przedstawiona instrukcja bazuje na wynikach badań własnych autora i stanowi jego własność intelektualną.

1. CEL: Celem ćwiczenia jest otrzymanie znakowanych izotopowo standardów kreatyniny oraz ich zastosowanie w analizie ilościowej tego metabolitu w próbkach biologicznych metodą wysokosprawnej chromatografii ciekowej sprzężonej ze spektrometrią mas w trybie monitorowania wybranych reakcji fragmentacji.

2. ZAKRES OBOWIĄZUJĄCEGO MATERIAŁU:

- podstawy spektrometrii mas oraz metody sprzężonej LC-MS
- chromatografia ciekowa w odwróconym układzie faz, chromatografia ciekowa oddziaływań hydrofilowych
- monitorowanie wybranych reakcji fragmentacji, spektrometr masowy typu qqq
- spektrometria mas w analizie ilościowej związków organicznych, metoda rozcieńczeń izotopowych
- zastosowanie standardów znakowanych izotopowo, podstawienie izotopowe, efekt izotopowy
- kreatynina i jej znaczenie jako metabolitu

3. LITERATURA:

1. „Podstawy chromatografii” Z. Witkiewicz, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2005.
2. „Proteomika i metabolomika” A. Kraj, A. Drabik, J. Silberring, Wydawnictwa Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa 2010.
3. „Spektrometria mas” P. Suder, A. Bodzoń-Kuślakowska, J. Silberring, Wydawnictwo AGH, Kraków 2016.
4. Hou, H., *et al.* LC-MS-MS measurements of urinary creatinine and the application of creatinine normalization technique on cotinine in smokers' 24 hour urine. *J. Anal. Methods Chem.* 2012:245415 (2012).
5. Bąchor, R., Setner, B., Kluczyk, A., Stefanowicz, P., Szewczuk Z. The unusual hydrogen-deuterium exchange of α -carbon protons in N-substituted glycine containing peptides. *J. Mass Spectrom.* **49**, 43-49 (2014).
6. Bąchor, R., Rudowska, M., Kluczyk, A., Stefanowicz, P., Szewczuk. Z. Hydrogen-deuterium exchange of α -carbon protons and fragmentation pathways in N-methylated glycine and alanine-containing peptides derivatized by quaternary ammonium salts. *J. Mass Spectrom.* **49**, 529-536 (2014).
7. Bąchor, R., Kluczyk, A., Stefanowicz, P. Szewczuk. Z. Facile synthesis of deuterium-labeled denatonium cation and its application in the quantitative analysis of Bitrex by liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 6557-6561 (2015).
8. Bąchor, R., Kluczyk, A., Stefanowicz, P. Szewczuk. Preparation of novel deuterated cyclosporin A standards for quantitative LC-MS analysis. *J. Mass Spectrom.* **52**, 817-822 (2017).
9. Suzuki, M., *et al.* Determination of creatinine-related molecules in saliva by reversed-phase liquid chromatography with tandem mass spectrometry and the evaluation of hemodialysis in chronic kidney disease patients. *Anal. Chim. Acta* **911**, 92-99 (2016).
10. Huang, K., *et al.* Accurate quantification of creatinine in serum by coupling a measurement standard to extractive electrospray ionization mass spectrometry. *Sci. Rep.* **6**, 19283; 10.1038/srep19283
11. Nakano, M., *et al.* Development of tandem mass spectrometry-based creatinine measurement using dried blood spot for newborn mass screening. *Pediatr. Res.* **82**, 237-243 (2017).

4. PRZEBIEG ĆWICZENIA

4.1. Materiały, odczynniki oraz sprzęt niezbędny do wykonania ćwiczenia

Kreatynina ($\geq 98\%$), woda ciężka (D_2O , czystość 99.9%), N,N,N-trietyloamina (TEA), acetonitryl (MeCN, czystość LC-MS).

Kolumna chromatograficzna HILIC Luna ($3.0\ \mu m$, $50\ mm \times 2.1\ mm$, PHENOMENEX).

Eluenty: A: 10 mM $HCOONH_4/H_2O$ (pH = 3,2), B: MeCN + 10% 100 mM $HCOONH_4/H_2O$ o pH = 3,2.

Spektrometr masowy LC-MS 8050 firmy Shimadzu wyposażony w moduł chromatograficzny.

Probówki Eppendorfa (1,5 mL).

Pipety automatyczne, fiolki szklane (1,5 mL).

4.2 Wykonanie

Przygotowanie standardu znakowanego izotopowo

W próbce Eppendorfa o pojemności 1,5 mL należy rozpuścić 1 mg kreatyniny w 1 mL wody ciężkiej (D_2O). Tak uzyskany roztwór należy podzielić na dwie części o równej objętości. Do jednej z nich dodaje się następnie 10 μL N,N,N-trietyloaminy (TEA) w celu przeprowadzenia reakcji wymiany izotopowej. Mieszaninę inkubuje się w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Uzyskane roztwory (próbka bez dodatku TEA i po wymianie izotopowej) należy zliofilizować a suchą pozostałość użyć do kolejnych eksperymentów.

Analiza standardu znakowanego izotopowo

Próbkę deuterowanej i niedeuterowanej kreatyniny należy rozpuścić w 500 μL mieszaniny zawierającej 90% acetonitrylu i 10% wodnego roztworu buforowego ($NH_4^+HCOO^-$), o stężeniu 10 mM i pH 3,2. Tak przygotowane próbki poddaje się analizie metodą spektrometrii mas w celu potwierdzenia przebiegu reakcji wymiany izotopowej i uzyskania standardu znakowanego izotopowo. Uzyskane związki należy poddać analizie metodą tandemowej spektrometrii mas. Należy zoptymalizować metodę MRM.

Analiza czasu retencji izotopologów kreatyniny

W celu określenia czasu retencji formy deuterowanej i niedeuterowanej kreatyniny należy pobrać po 5 μL roztworów kreatyniny i kreatyniny deuterowanej (przygotowanych wcześniej w 500 μL mieszaniny zawierającej 90% acetonitrylu i 10% wodnego roztworu buforowego ($\text{NH}_4^+\text{HCOO}^-$), o stężeniu 10 mM i pH 3,2), przenieść do fiolki szklanej o pojemności 1,5 mL i rozcieńczyć roztworem wyjściowym do objętości 300 μL . Tak przygotowaną próbkę poddaje się analizie metodą LC-MS na kolumnie chromatograficznej HILIC Luna (3.0 μm , 50 mm \times 2.1 mm, PHENOMENEX) w temperaturze pokojowej (24 $^\circ\text{C}$) stosując jako elenty: A: 10 mM $\text{HCOONH}_4/\text{H}_2\text{O}$ (pH = 3,2) oraz B: MeCN + 10% 100 mM $\text{HCOONH}_4/\text{H}_2\text{O}$ o pH = 3,2. Analizę prowadzimy metodą gradientową w zakresie od 92 to 82% B w czasie 10 minut. Objętość przepływu 0.1 mL/min, objętość nastrzyku 0.1 μL .

Przygotowanie krzywej kalibracyjnej

W celu przygotowania krzywej kalibracyjnej należy sporządzić serię rozcieńczeń roztworu wyjściowego standardu znakowanego izotopowo kreatyniny o stężeniu 0,5 mg/mL, rozpuszczonego w 500 μL mieszaniny zawierającej 90% acetonitrylu i 10% wodnego roztworu buforowego ($\text{NH}_4^+\text{HCOO}^-$), o stężeniu 10 mM i pH 3,2, uzyskując stężenia 30, 50, 90 oraz 100 mg/dL. Tak przygotowaną próbkę poddaje się analizie metodą LC-MS na kolumnie chromatograficznej HILIC Luna (3.0 μm , 50 mm \times 2.1 mm, PHENOMENEX) w temperaturze pokojowej (24 $^\circ\text{C}$) stosując jako elenty: A: 10 mM $\text{HCOONH}_4/\text{H}_2\text{O}$ (pH = 3,2) oraz B: MeCN + 10% 100 mM $\text{HCOONH}_4/\text{H}_2\text{O}$ o pH = 3,2. Analizę prowadzimy metodą gradientową w zakresie od 92 to 82% B w czasie 10 minut. Objętość przepływu 0.1 mL/min, objętość nastrzyku 0.1 μL .

Analiza ilościowa kreatyniny w próbce biologicznej metodą LC-MS/MRM

Do 1 mL próbki moczu dodaje się 10 μL kwasu mrówkowego poczym zawartość miesza się na wytrząsarce typu vortex i wiruje (10 000 rpm/10 min). Tak uzyskaną mieszaninę należy przesączyć przez filtr (0.22 μm), pobrać z przesączu 10 μL , przenieść do fiolki szklanej (1,5 mL), dodać 10 μL roztworu zawierającego znakowaną izotopowo kreatyninę (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Uzyskaną próbkę należy rozcieńczyć do 1 mL dodając mieszaninę zawierającą 90% acetonitrylu i 10% wodnego roztworu buforowego ($\text{NH}_4^+\text{HCOO}^-$), o stężeniu 10 mM i pH 3,2 i poddać analizie metodą LC-MS/MRM.

Po przeprowadzonym ćwiczeniu analizie poddaje się wszystkie z uzyskanych danych eksperymentalnych za pomocą odpowiedniego oprogramowania.

5. OPRACOWANIE WYNIKÓW – SPRAWOZDANIE

Każdy student ma obowiązek przedstawić prowadzącemu indywidualnie wykonane sprawozdanie w terminie do 1 tygodnia od dnia zakończenia ćwiczeń i otrzymania wyników analiz LC-MS/MRM.

Sprawozdanie musi zawierać następujące elementy:

- cel ćwiczenia,
- opis wykonanych czynności i poczynione obserwacje,
- analiza i opis uzyskanych danych eksperymentalnych LC-MS/MRM,
- wnioski z przeprowadzonego ćwiczenia.

ĆWICZENIE 2

Identyfikacja nikotyny w próbkach włosów ludzkich metodą wysokosprawnej chromatografii ciekowej sprzężonej ze spektrometrią mas w trybie monitorowania wybranych reakcji fragmentacji

1. CEL: Celem ćwiczenia jest analiza jakościowa i ilościowa nikotyny w próbkach ludzkich włosów z zastosowaniem standardów znakowanych izotopowych i metody wysokosprawnej chromatografii ciekowej sprzężonej ze spektrometrią mas w trybie monitorowania wybranych reakcji fragmentacji.

2. ZAKRES OBOWIĄZUJĄCEGO MATERIAŁU:

- podstawy spektrometrii mas oraz metody sprzężonej LC-MS
- chromatografia ciekowa w odwróconym układzie faz, chromatografia ciekowa oddziaływań hydrofilowych
- monitorowanie wybranych reakcji fragmentacji, spektrometr masowy typu qqq
- spektrometria mas w analizie ilościowej związków organicznych
- zastosowanie standardów znakowanych izotopowo, podstawienie izotopowe, efekt izotopowy
- nikotyna – budowa i funkcje

3. LITERATURA:

1. „Podstawy chromatografii” Z. Witkiewicz, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2005.
2. „Proteomika i metabolomika” A. Kraj, A. Drabik, J. Silberring, Wydawnictwa Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa 2010.
3. „Spektrometria mas” P. Suder, A. Bodzoń-Kułakowska, J. Silberring, Wydawnictwo AGH, Kraków 2016.
4. Hegstad, S., *et al.* Drug screening of hair by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* **32**, 364-372 (2008).
5. Van Bocxlaer, J.F., *et al.* Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic toxicology. *Mass Spectrometry Reviews*, **19**, 165-214 (2000).

4. PRZEBIEG ĆWICZENIA

4.1. Materiały, odczynniki oraz sprzęt niezbędny do wykonania ćwiczenia

Nikotyna, nikotyna d_3 ($\geq 98\%$), acetonitryl (MeCN, czystość LC-MS), izopropanol, bufor fosforanowy (0.01 M, pH = 6), kwas mrówkowy (czystość LC-MS).

Kolumna chromatograficzna Aeris Peptide XB-C18 column (3,6 μm , 50 mm \times 2,1 mm, PHENOMENEX).

Eluenty: A: 0.1% kwas mrówkowy w H_2O oraz B: 0.1% kwas mrówkowy w MeCN.

Spektrometr masowy LC-MS 8050 firmy Shimadzu wyposażony w moduł chromatograficzny.

Probówki Eppendorfa (1,5 mL), falkony (15 mL).

Pipety automatyczne, fiolki szklane (1,5 mL).

4.2 Wykonanie

Analiza nikotyny metodą spektrometrii mas

Próbkę nikotyny (0,1 mg) należy rozpuścić w 500 μL mieszaniny acetonitryl/25 mM kwas mrówkowy (5:95, v/v) Tak przygotowane próbki poddaje się analizie metodą spektrometrii mas i tandemowej spektrometrii mas w celu przygotowania i optymalizacji metody MRM do analiz ilościowych.

Przygotowanie krzywej kalibracyjnej

W celu przygotowania krzywej kalibracyjnej należy sporządzić serię rozcieńczeń roztworu wyjściowego standardu znakowanego izotopowo nikotyny o stężeniu 0,1 mg/mL, rozpuszczonego w 1000 μ L mieszaniny acetonitryl/25 mM kwas mrówkowy (5:95, v/v), uzyskując stężenia 0,25; 0,5; 1,25 oraz 2,5 ng/mL. Uzyskane próbki poddaje się analizie metodą LC-MS na kolumnie chromatograficznej Aeris Peptide XB-C18 (3.6 μ m, 50 mm \times 2.1 mm, PHENOMENEX) w temperaturze pokojowej (24 $^{\circ}$ C), stosując jako elenty: A: 0.1% kwas mrówkowy w H₂O oraz B: 0.1% kwas mrówkowy w MeCN. Analizę prowadzimy metodą gradientową w zakresie od 2 to 30% B w czasie 10 minut. Objętość przepływu 0.1 mL/min, objętość nastrzyku 0.1 μ L.

Analiza ilościowa nikotyny w próbce włosów metodą LC-MS/MRM

Próbkę pociętych włosów (20 mg) należy umieścić w falkonie plastikowym o pojemności 15 mL i przemyć izopropanolem (2 mL, 3 \times 15 minut), buforem fosforanowym (0.01 M, pH = 6, 2 mL, 1 \times 15 minut) oraz ponownie izopropanolem (2 mL, 1 \times 15 minut). Przemywanie przeprowadzamy w temperaturze 37 $^{\circ}$ C. Następnie do próbki włosów dodaje się 0,45 mL mieszaniny acetonitryl/25 mM kwas mrówkowy (5:95, v/v) oraz 50 μ L roztworu (0,001 mg/mL) standardu nikotyny znakowanej izotopowo. Uzyskaną mieszaninę wiruje się przez 1 minutę 2600 \times g a następnie inkubuje w łaźni wodnej, w temperaturze 37 $^{\circ}$ C przez 18 godzin. Po tym czasie mieszaninę odwirowuje się przez 1 minutę 2600 \times g, supernatant (200 μ L) przenosi się do fiolki szklanej. Tak przygotowaną próbkę poddaje się analizie metodą LC-MS na kolumnie chromatograficznej Aeris Peptide XB-C18 column (3.6 μ m, 50 mm \times 2.1 mm, PHENOMENEX) w temperaturze pokojowej (24 $^{\circ}$ C), stosując jako elenty: A: 0.1% kwas mrówkowy w H₂O oraz B: 0.1% kwas mrówkowy w MeCN. Analizę prowadzimy metodą gradientową w zakresie od 2 to 30% B w czasie 10 minut. Objętość przepływu 0.1 mL/min, objętość nastrzyku 5 μ L.

Po przeprowadzonym ćwiczeniu analizie poddaje się wszystkie z uzyskanych danych eksperymentalnych za pomocą odpowiedniego oprogramowania.

5. OPRACOWANIE WYNIKÓW – SPRAWOZDANIE

Każdy student ma obowiązek przedstawić prowadzącemu indywidualnie wykonane sprawozdanie w terminie do 1 tygodnia od dnia zakończenia ćwiczeń i otrzymania wyników analiz LC-MS/MRM.

Sprawozdanie musi zawierać następujące elementy:

- cel ćwiczenia,
- opis wykonanych czynności i poczynione obserwacje,
- analiza i opis uzyskanych danych eksperymentalnych LC-MS/MRM,
- wnioski z przeprowadzonego ćwiczenia.