



BIOLOGY
CENTRE
CAS

Automatizace Přípravy Vzorků v LC-MS a GC-MS Analýze

Petr Šimek

simek@bclab.eu



BIOLOGY
CENTRE
CAS

LABORATORY OF ANALYTICAL BIOCHEMISTRY & METABOLOMICS





Automatizace přípravy vzorků v MS analýze

Obsah

1. Dílčí, důležité laboratorní operace pro přípravu vzorků
2. Automatizace a robotizace, historie a terminologie
3. Proč automatizace přípravy vzorku
4. Off-line, on-line automatizovaná příprava vzorku
5. Automatizovaná průtoková analýza (FIA)
6. Robotické stanice pro přípravu vzorků: paralelní, sériové
7. Stanice pro sériovou přípravu vzorků, jejich moduly
8. MetaboAuto® - plně automatizovaná GC-MS, LC-MS
> 250 metabolitů v moči, séru, tkáních, buněčných kulturách
9. Vývoj metody pro automatizaci analytického procesu
= jak na to ?



Automatizace v přípravě vzorků

Důležité laboratorní operace

Manipulace kapalin v nádobkách (miniaturizace)





Automatizace v přípravě vzorků

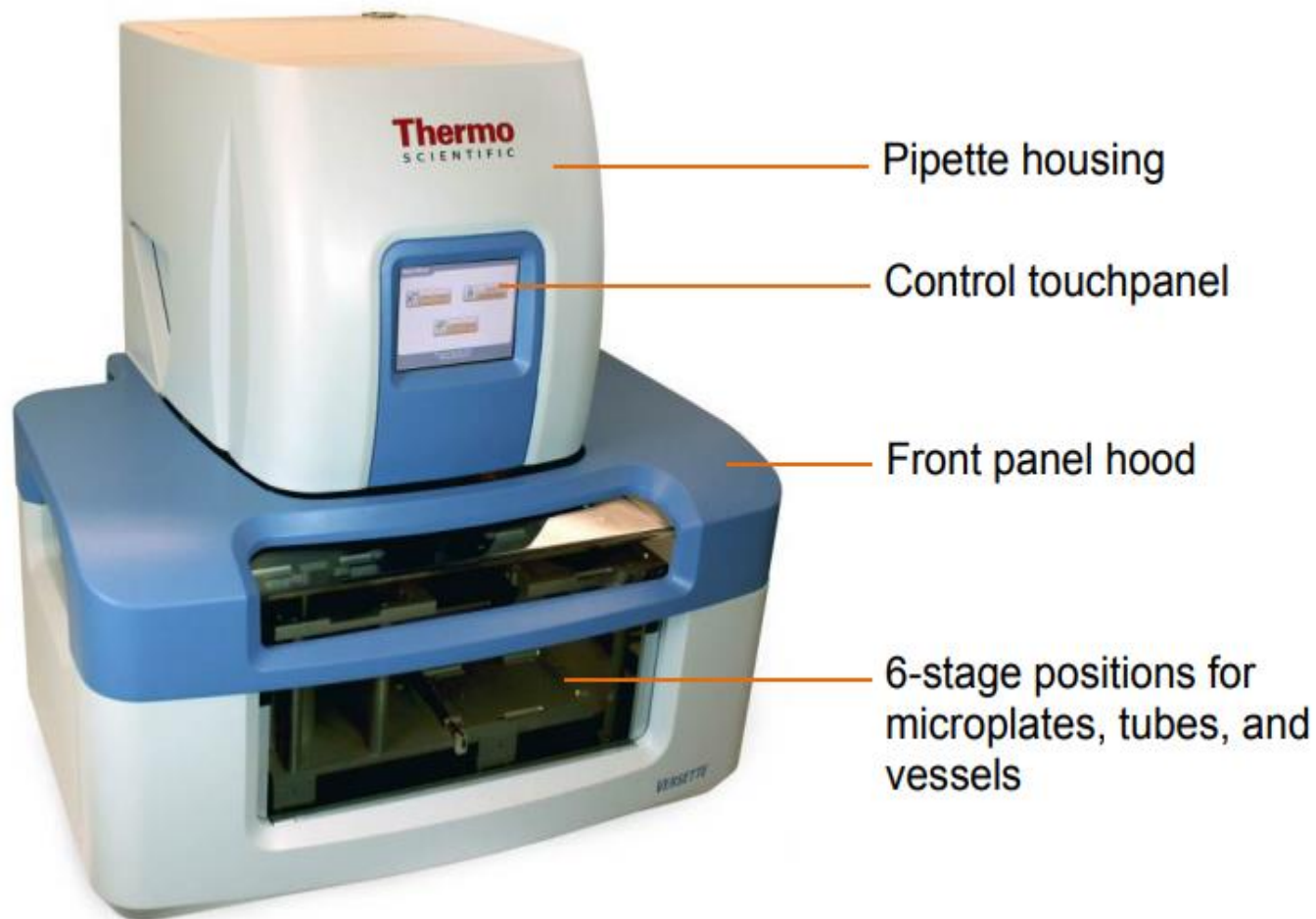
Ruční pipetování a přenos vzorků





Automatizace v přípravě vzorků

Automatické Manipulátory Kapalin (pipetory)



Thermo Versette Liquid Handler: 96-384 dávkovacích kanálů.



Automatizace v přípravě vzorků

Rotační Mikrofiltrace





Automatizace v přípravě vzorků

Mikrocentrifugace





Automatizace v přípravě vzorků

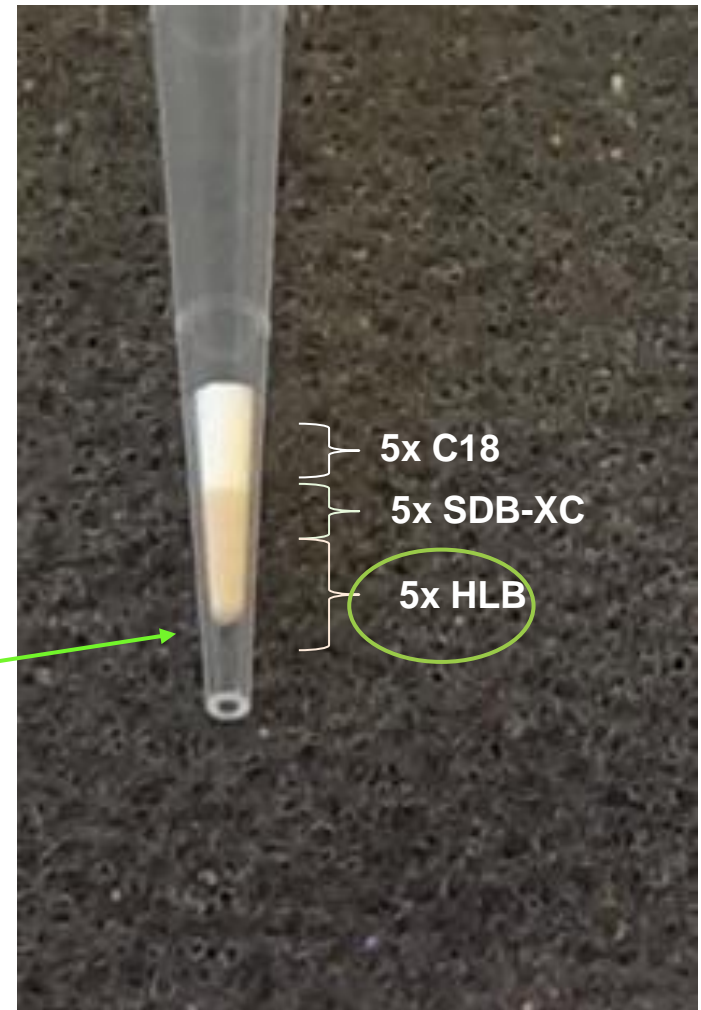
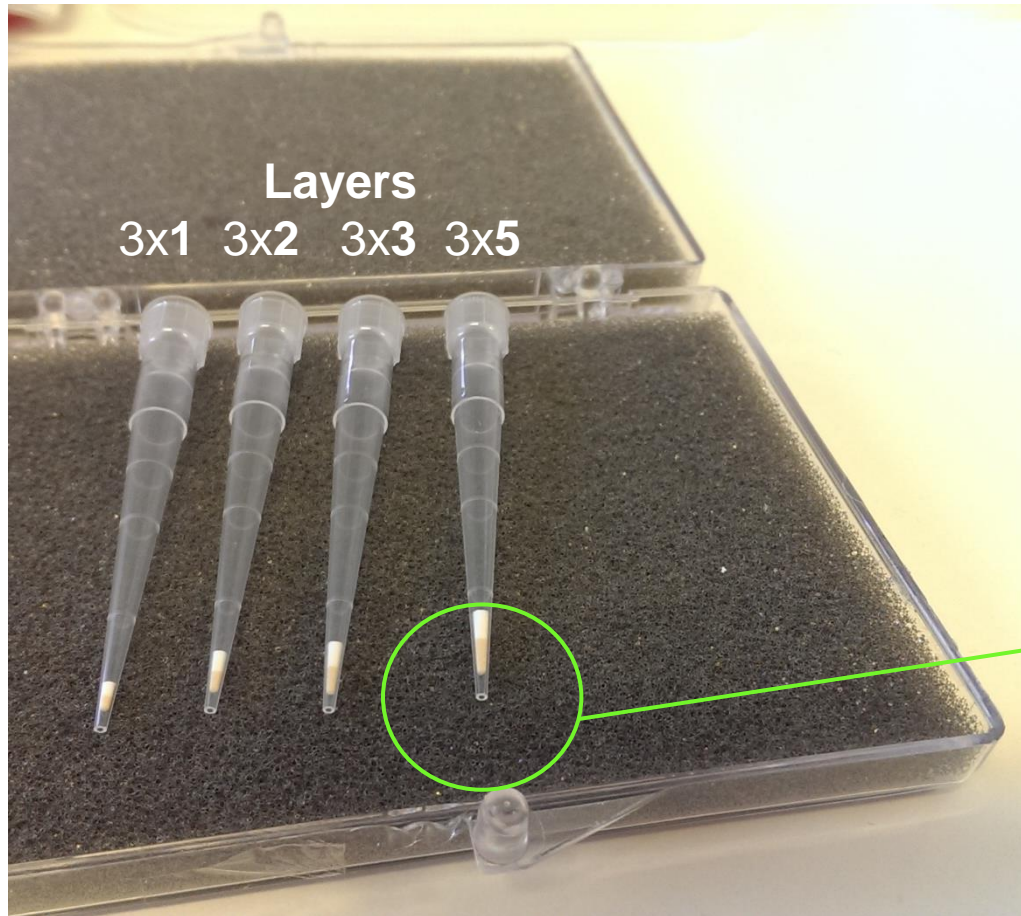
Vakuová rotační centrifugace





Pipette Tip MSPE-PT

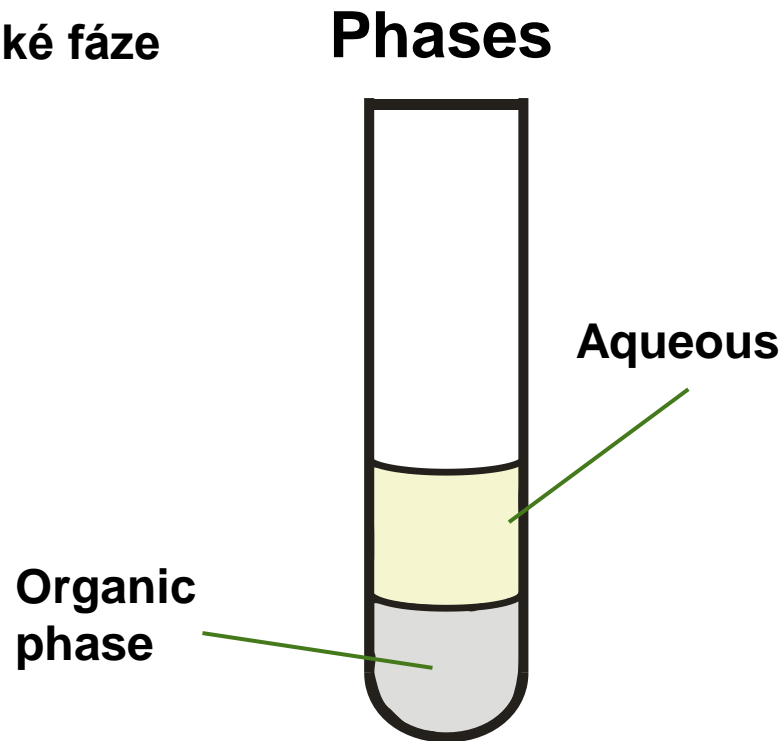
Mixed-sorbent SPE



LLME + Derivatizace

Derivatizace alkyl chlorformiáty (RCF) + LLME

- Reakce in situ, vodná matrice
- < 5 sekund, disperze uvolňovaným CO₂
- Microextrakce metabolitů do organické fáze
- BCLAB, databáze > 250 metabolitů





Automatizace přípravy vzorků v LC-MS a GC-MS

Automatizace

< 80 % doby
celkové analýzy

Achilova pata
mnoha metod

Instrumentální analýza



Robotizace

Vzorkování



Příprava vzorku

Off-line

On-line

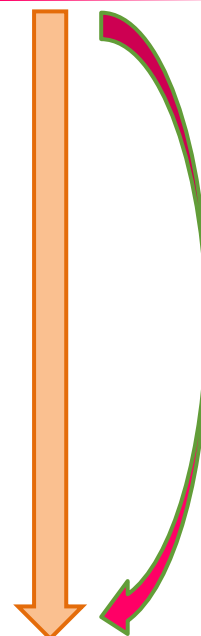
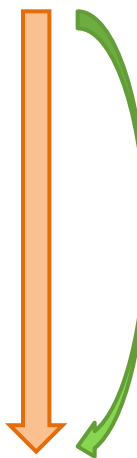
Separace analytů



Detekce (MS)



Zpracování analytických dat





Automatizace přípravy vzorků

Historie a terminologie

Mechanizace procesu (x,yz)

- ⊙ Lidská činnost - ruční manipulace vzorků - injekční stříkačka, pipeta,

Automatizace procesu

Starořecké „automaton“ = vše, co se hýbe samo, vykonávající některé lidské činnosti

Proces postupného vyřazování člověka z příslušného výrobního (měřicího) procesu

Historie vývoje v oblasti analýzy látek

- ⊙ Automatický dávkovač (autosampler)
- ⊙ Automatizace jednotlivých kroků přístrojové analýzy
- ⊙ Automatizace přístrojové části analýzy včetně zpracování dat



Robotizace – Průmysl 4.0



Automatizace přípravy vzorků

Historie a terminologie

Robotizace procesu

- ⊙ **Proces přípravy (a měření vzorku) zcela bez účasti člověka (zadáva jen úkol a celkové podmínky)**

Norma ISO 8373, definice termínu robot:

„automaticky řízený, opětovně programovatelný, víceúčelový manipulátor pro činnost ve třech nebo více osách, který může být buď pevně upevněn na místě, nebo mobilní k užití v průmyslových automatických aplikacích.“

Robot - autor termínu Josef Čapek; Karel Čapek, R.U.R)

(termíny robota, roboty, roboti - androidi)

Robot – android (skloňování podle vzoru pán)

Robot - průmyslový (skloňování podle vzoru les)



Automatizace přípravy vzorků v LC-MS a GC-MS

Proč automatizace procesu přípravy vzorku ?

Proč celého analytického procesu ?

- ⊙ **Minimalizace stereotypní, často úmorné laboratorní práce**
- ⊙ **Minimalizace náhodných a systematických chyb**
- ⊙ **24h/7d, produktivita, rychlost analýz**
- ⊙ **Lepší reprodukovatelnost, robustnost metody**
- ⊙ **Ekonomicky efektivní využití analytických přístrojů**
- ⊙ **Nízké spotřeby rozpouštědel, reagensií, vzorku**
- ⊙ **Minimalizace kontaktu s nebezpečnými materiály**



Automatizace přípravy vzorků v LC-MS a GC-MS

Vzorek – tuhá, kapalná, plynná fáze

Off-line automatizovaná příprava vzorku – neomezený počet metod
na principech SPE, LLE, precipitace, QuEChERS atd.

On-line automatizovaná příprava vzorku – kapilární průtokové
technologie

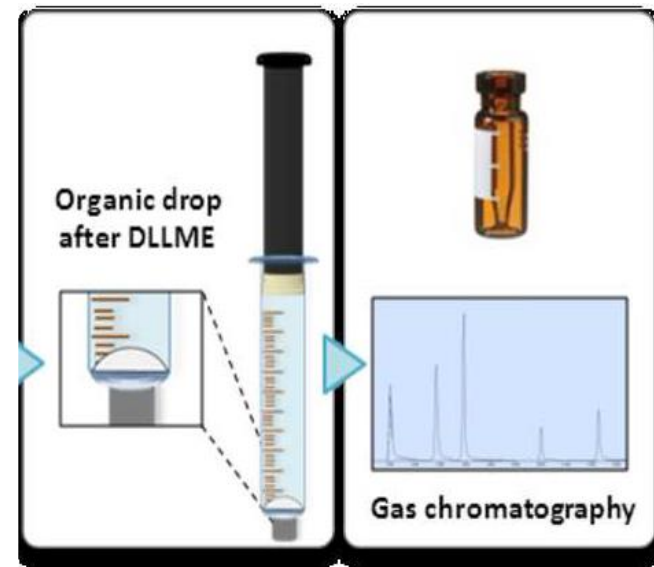
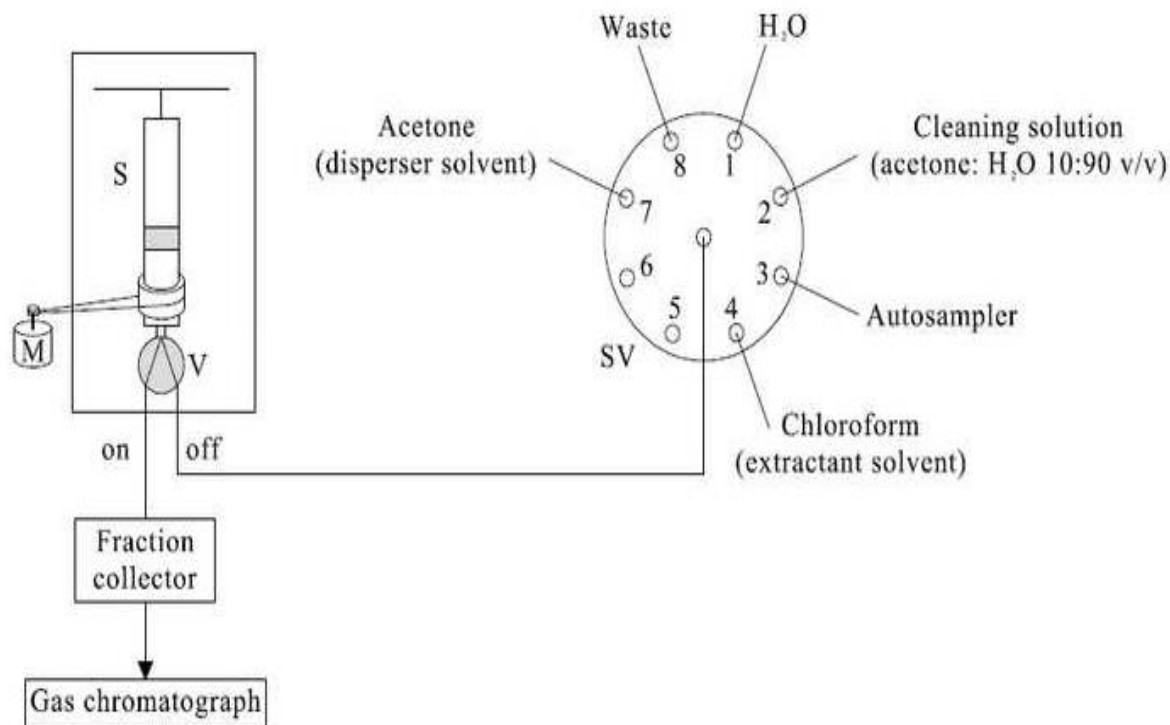
**Dávkování vzorku a reagensů do nosného proudu kapaliny
tekoucí do detektoru**

Tok kapaliny diskontinuální, usměrňovaný podle potřeby

Základní přednosti:

- **Modularita, nevyčerpatelné množství řešení**
- **Excelentní nástroj pro manipulace s roztoky kapalin a propojení jednotlivých kroků analýzy látek**

Off-line automatizovaná FIA - mikroextrakce kapalina-kapalina (FIA-LLME)



- **LLME v injekční stříkačce s magnetickým míchadlem uvnitř**
- **Rozdělení dvou fází, spodní fáze kapka, která se vytěsňuje do vialky**
- **Off-line GC-MS nebo LC-MS analýza**
- **Př. analýza estrogenů v odpadních vodách**

Cerda V et al, J Chromatogr A 1413 (2015), 1-8



FIA - mikroextrakce kapalina-kapalina (LLME)



Stavebnicové řešení FIA-LLME, komponenty firmy Sciware Systems (ES)



Pokročilá řešení pro automatickou přípravu vzorků

Robotické stanice (sample preparation robotic workstations = rws)

- Pipetování/dávkování vzorků, reagensů, transport vzorků
- Manipulace se vzorky v 3D prostoru
- 96-400 jamkové destičky, vialky
- Propojení s různými moduly
- Modularita řešení (stavebnice)
- Řídící SW

Technická řešení (uspořádání)

- **Paralelní** (typicky současné zpracování 96 vzorků)
off-line s instrumentací
vysoká pořizovací cena
- **Sériové** (zpracování vzorků jeden za druhým)
on-line s instrumentací, modularita
přiměřená pořizovací cena

A. Paralelní řešení

Liquid Handling Systems EVO

Liquid Handling Systems Vantage

Liquid Handling Workstation Quadra 4

Liquid Handlers Biomek NX ws

Tecan

Hamilton

TOMTEC

Beckman-Coulter



B. Sériové řešení

B. Sériové řešení

PAL RTC sample preparation and handling platform

Sample preparation robot, multipurpose sampler

FIA LLME

CTC Analytics

Gerstel

Sciware Systems





Robotické stanice pro sériovou přípravu vzorků

Technologická základna CTC Analytics: **Autosampler** řízený programem

- ⊙ Přepínací ventil
- ⊙ Vyměnitelná injekční stříkačka
- ⊙ Přenos vzorku v prostoru x,y,z
- ⊙ Vybavení různými moduly
- ⊙ Řídící SW

do přesně definovaných pozic
stavebnicové řešení



RTC (robotic tool change)

Uspořádání: Stand-alone ws
LC-MS autosampler
GC-MS autosampler



Pracovní Stanice pro Přípravu Vzorků

Moduly – stavebnicové řešení

- CTC
- Jiní komerční dodavatelé
- In-house

Park station (CTC)

- Up to 3 exchangeble syringes



Vortex mixture module (CTC)

- Mixing 2, 10, 20 ml vials
- Mixing up to 2000 rpm





Pracovní Stanice pro Přípravu Vzorků

Moduly – stavebnicové řešení

Bar code reader module (CTC)



Peltier stack with 6 racks (CTC)





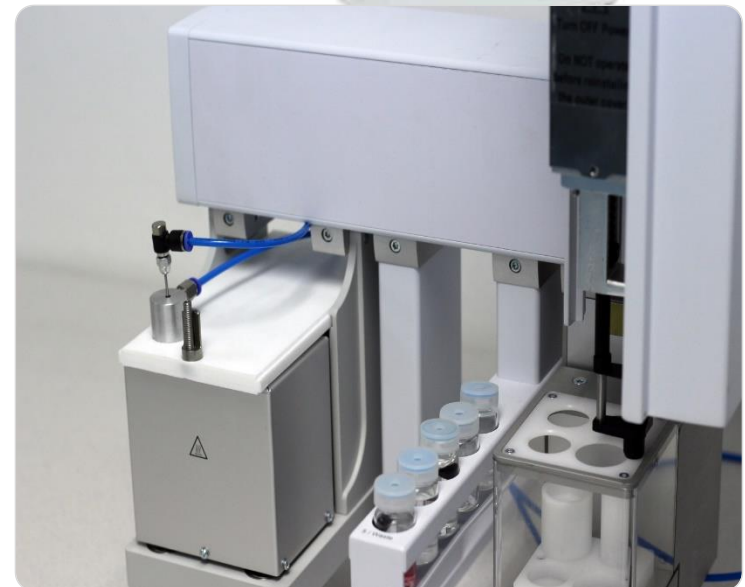
Pracovní Stanice pro Přípravu Vzorků

Moduly – stavebnicové řešení

Agitator module (CTC)

- 6 position, 2- 10 ml vials
- 40-200 °C
- 250-750 rpm

Nitrogen needle module (Pragolab s.r.o., Prague) K. Petrus



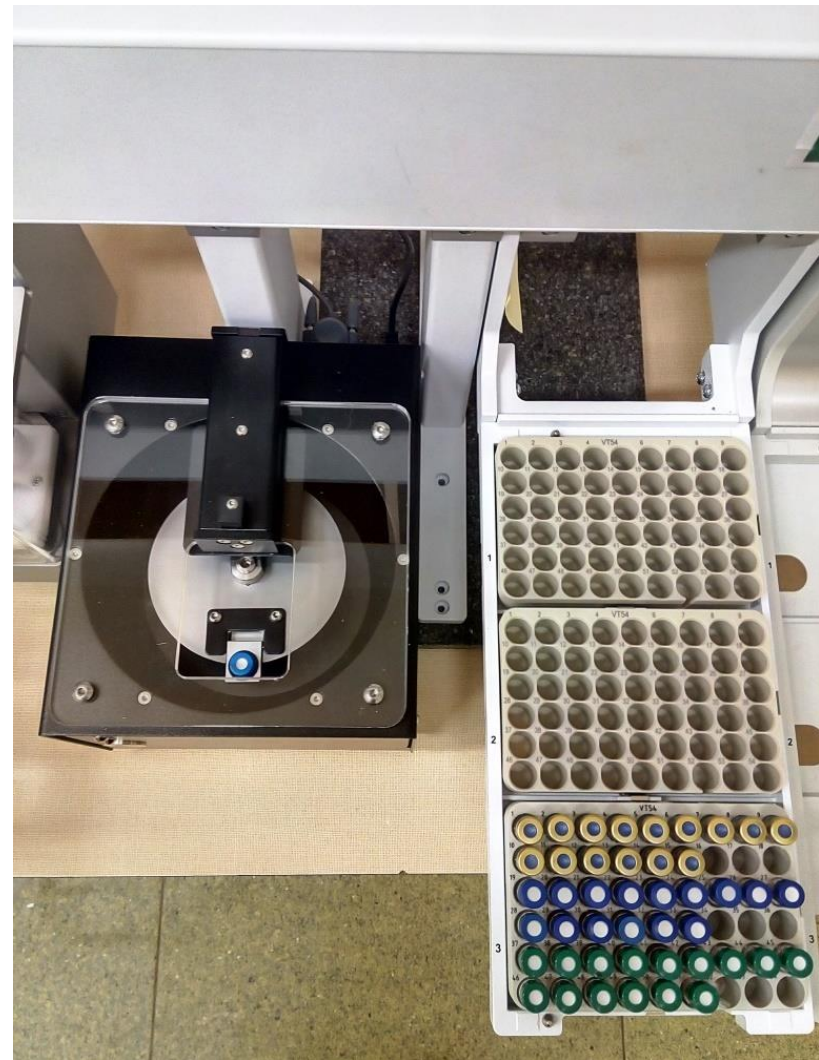


Pracovní Stanice pro Přípravu Vzorků

Moduly – stavebnicové řešení

Mikrocentrifuga (ProLab)

- 2 místná





Roboty pro sériovou přípravu vzorků

Ucelená platforma pro cílenou metabolomickou analýzu
> 250 metabolitů



Pro GC-MS analýzu

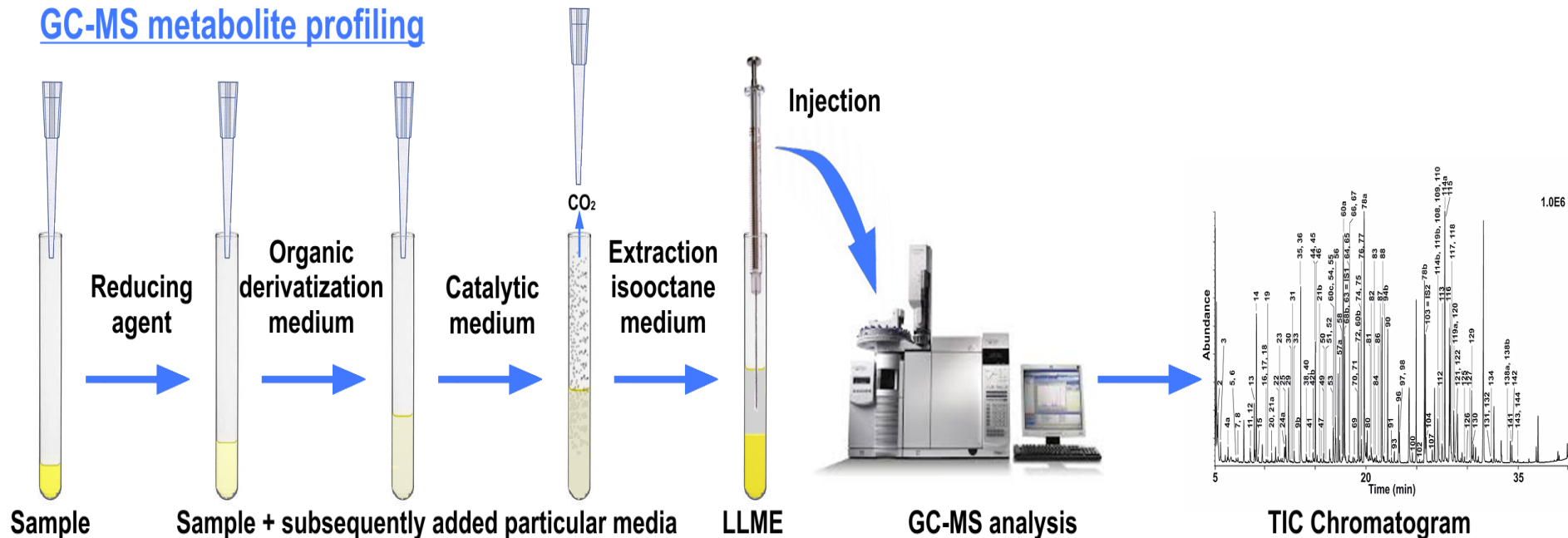
- Screening ca 250 protických metabolitů

Pro LC-MS analýzu

- Screening ca 200 protických metabolitů

The Manual Sample Preparation Workflow

GC-MS metabolite profiling



- **Precipitation** (Hušek P, Šimek P et al, JPBA 2012)
- **Reducing the disulfide bonds** (release of thiols, Švagera Z et al, ABC 2012)
- **Derivatization conditions** (Hušek P, Šimek P et al, JCA 2011)
- **Extraction** (Řimnáčová L, Šimek P et al, JCA 2014, JCA 2016)



Další Inovace

Náhrada Phenomenex EZ-Faast™ Kitu

Použití nových typů derivatizačních činidel

Fluoroalkyl chlorformiáty

- **Chirální analytika**

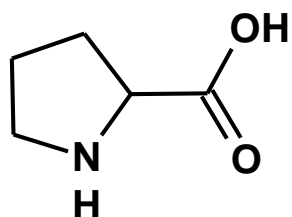
Chlorformiáty značené stabilními izotopy

- **Identifikace, kvantitativní analytika**

Derivatizace alkyl chlorformiáty (RCF) + LLME

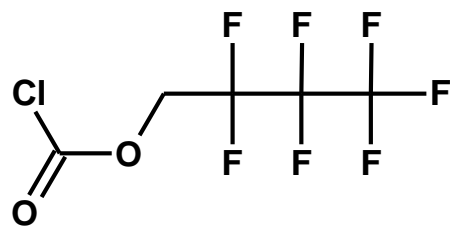
- Reakce in situ, vodná matrice
- 5 sekund, disperze uvolňovaným CO₂
- Microextrakce metabolitů do organické fáze
- BCLAB, databáze > 250 metabolitů

Heptafluorobutylchloroformiát (HFBCF)



Analyt
Prolin

+

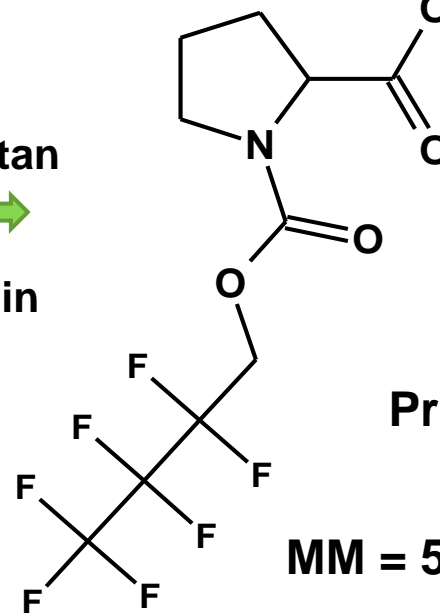


HFBCF

Izooktan

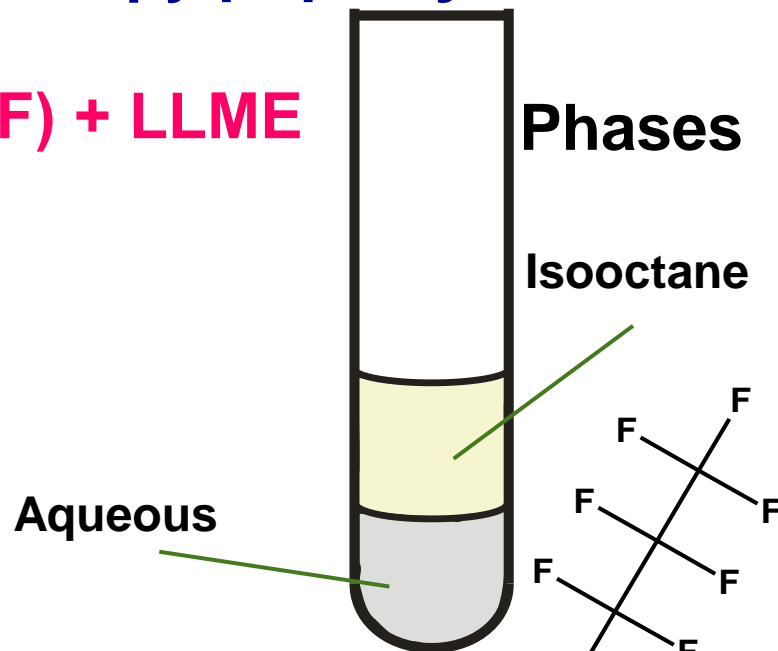


Pyridin



Produkt

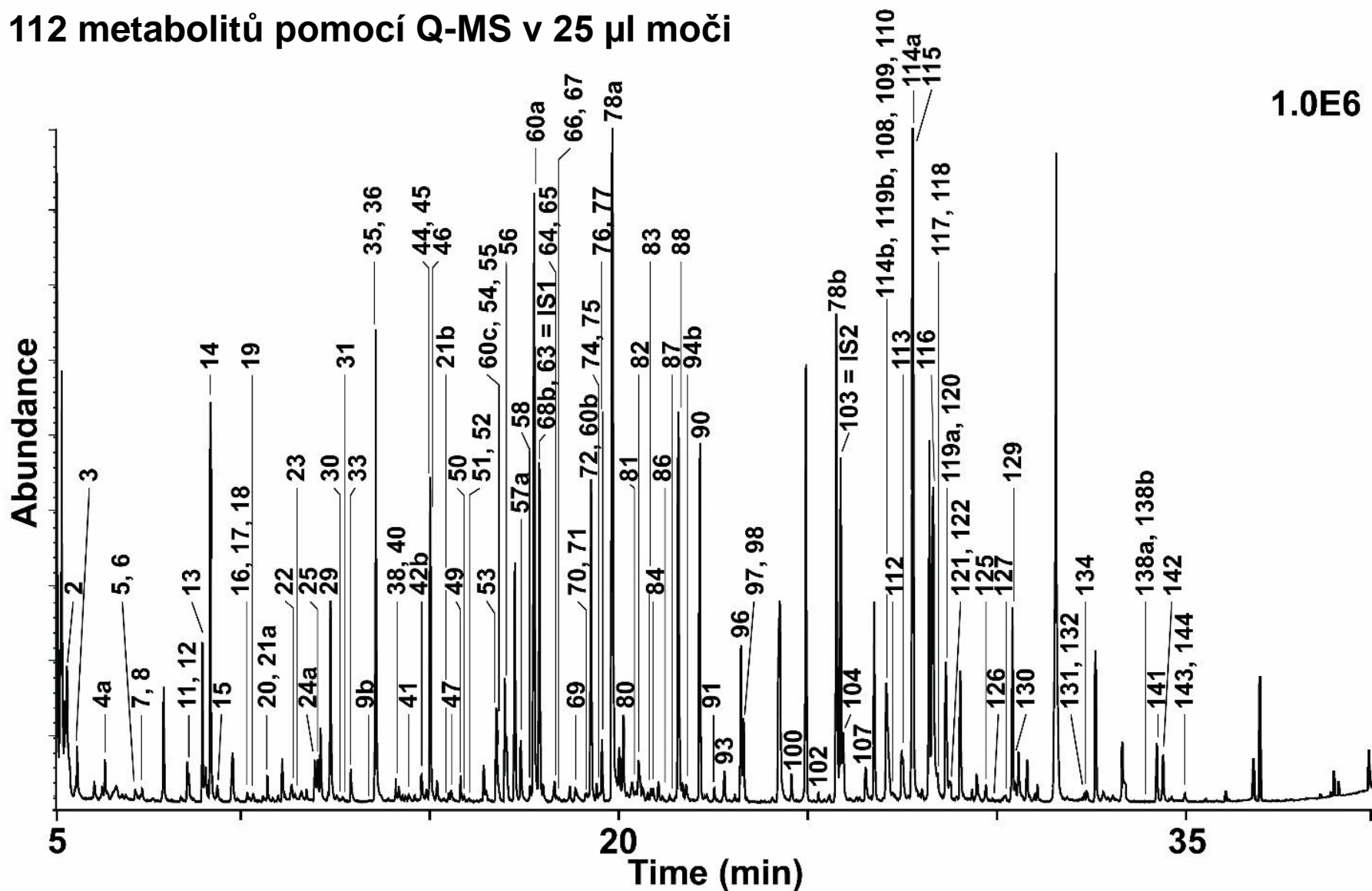
MM = 523.046453





GC-MS metabolická analýza moči

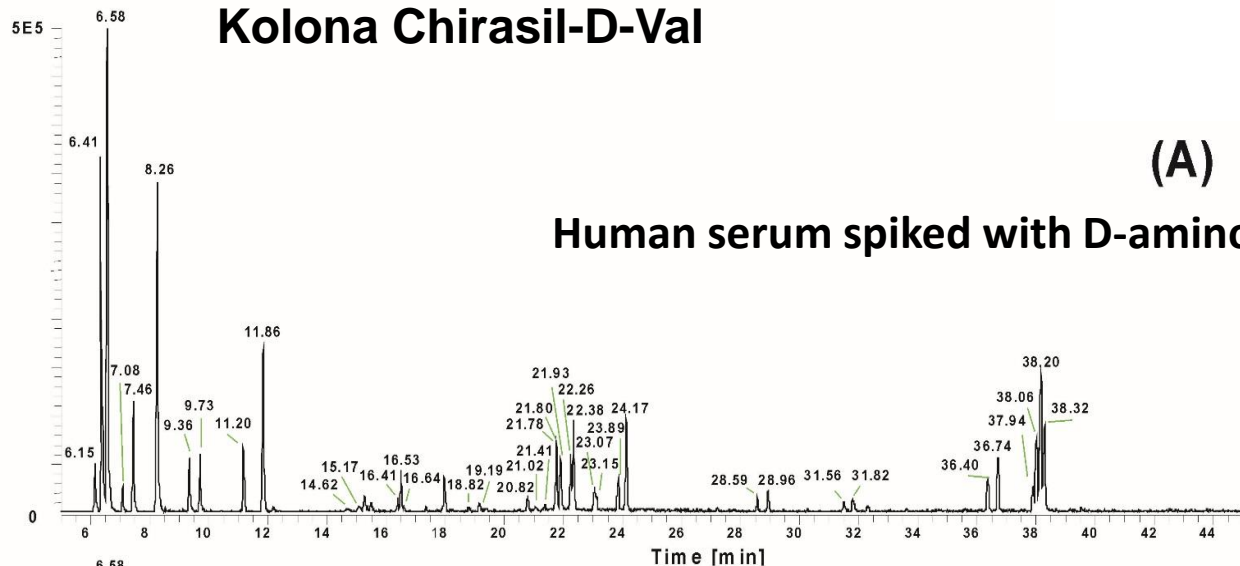
112 metabolitů pomocí Q-MS v 25 μ l moči





Chirální Analytika Metabolitů

Kolona Chirasil-D-Val



Added D-amino acids:

RT (min) - Name

6.15 - D-Ala

7.08 - D-Val

9.36 - D-Ile

11.20 - D-Leu

14.62 - D-Thr

16.41 - D-Asp

18.82 - D-Ser

20.84 - D-Met

21.02 - D-Gln

22.26 - D-Glu

22.38 - D-Phe

23.07 - D-Asn

23.89 - D-Cys

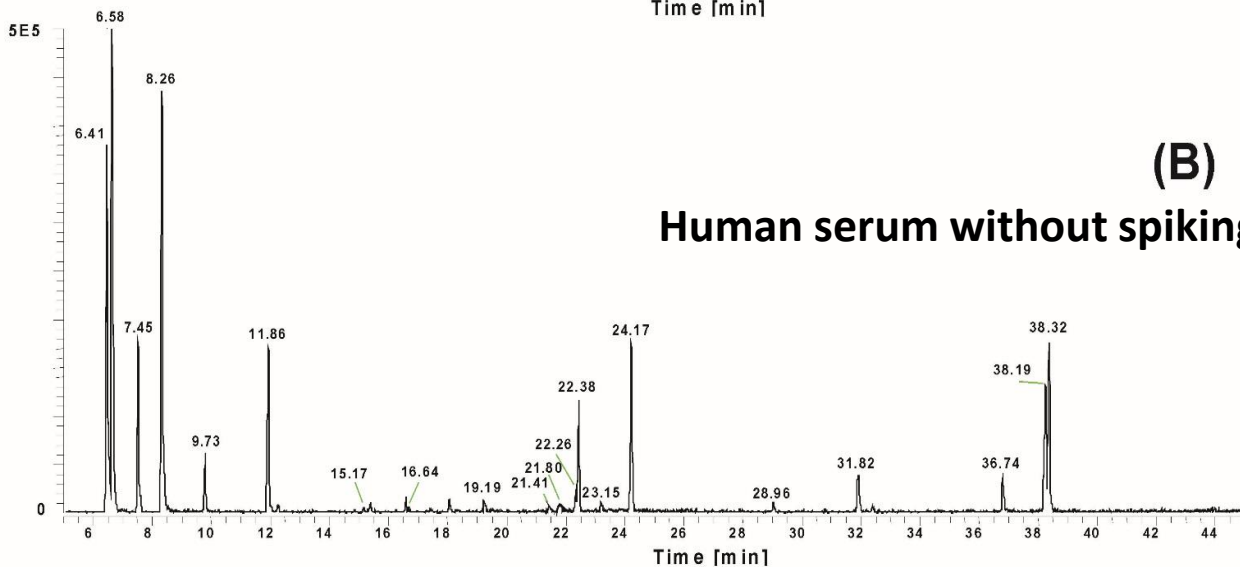
28.59 - D-HCy

31.56 - D-His

36.40 - D-Orn

37.97 - D-Lys

46.85 - D-Trp





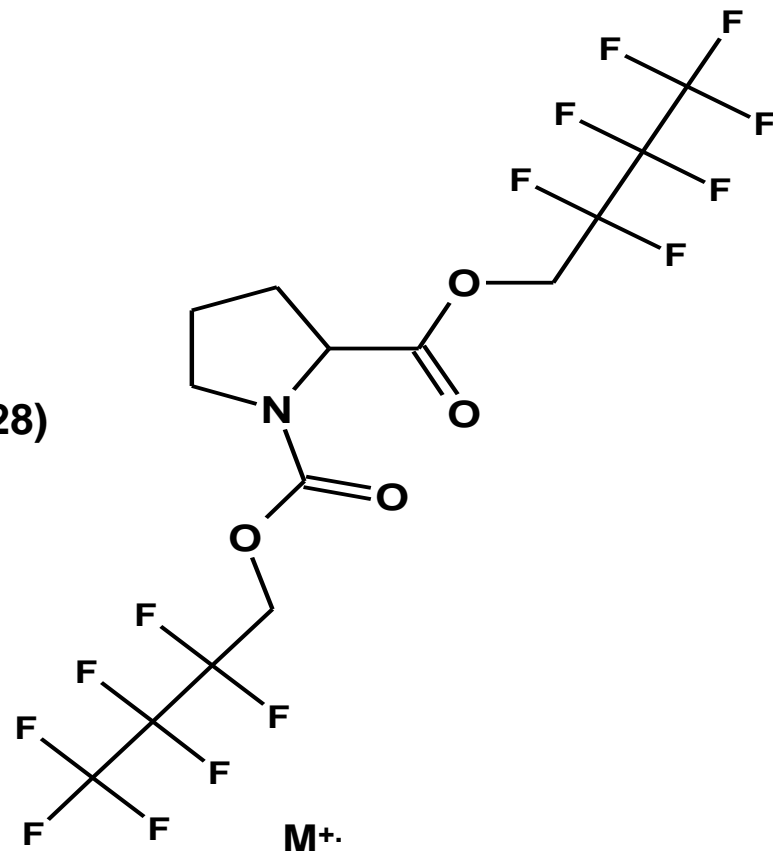
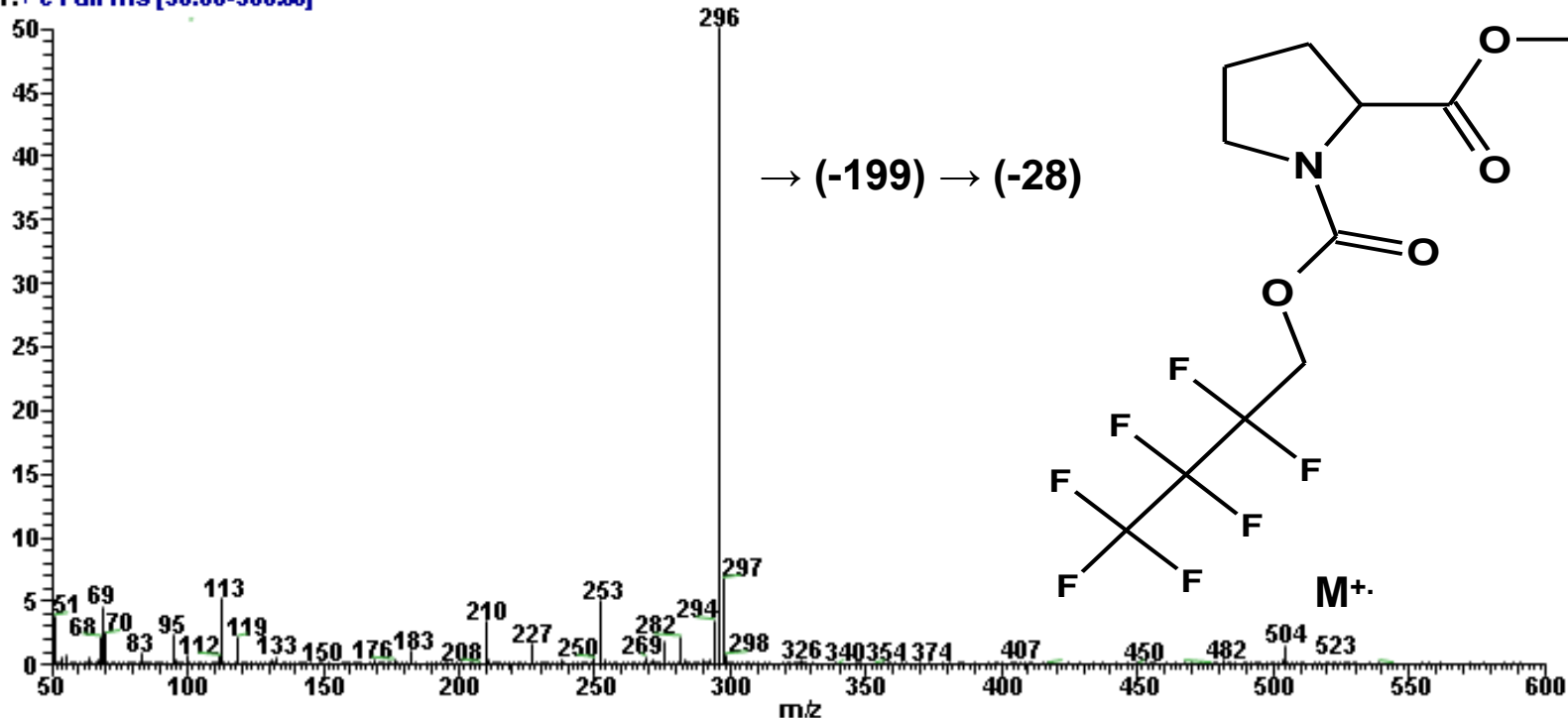
Ionizace a detekce analytů

Elektronová ionizace (EI)

Prolin- (N-heptafluorbutoxycarbonyl-O-heptafluorobutylester

MM = 523.046453

E:\HFB_Database\...A1_A5_120As_120213_2/13/2012 4:47:12 PM
VF17ms 30x0.25, 0.25, 0.5uT, 85needle, inj 200, IS200, 60/2/10/100/0/25/330/0 He 1.1
A1_A5_120As_120213_RT8.38-8.38V2 158.28-8.34, NL3.64E7
T:+c Full ms [50.00-900.00]





Ionizace a detekce analytů

Chemická ionizace (PCI), reakční plyn isobutan

Prolin- (N-heptafluorbutoxycarbonyl-O-heptafluorobutylester

-HFB\HFB_PIC\HFB-CI01

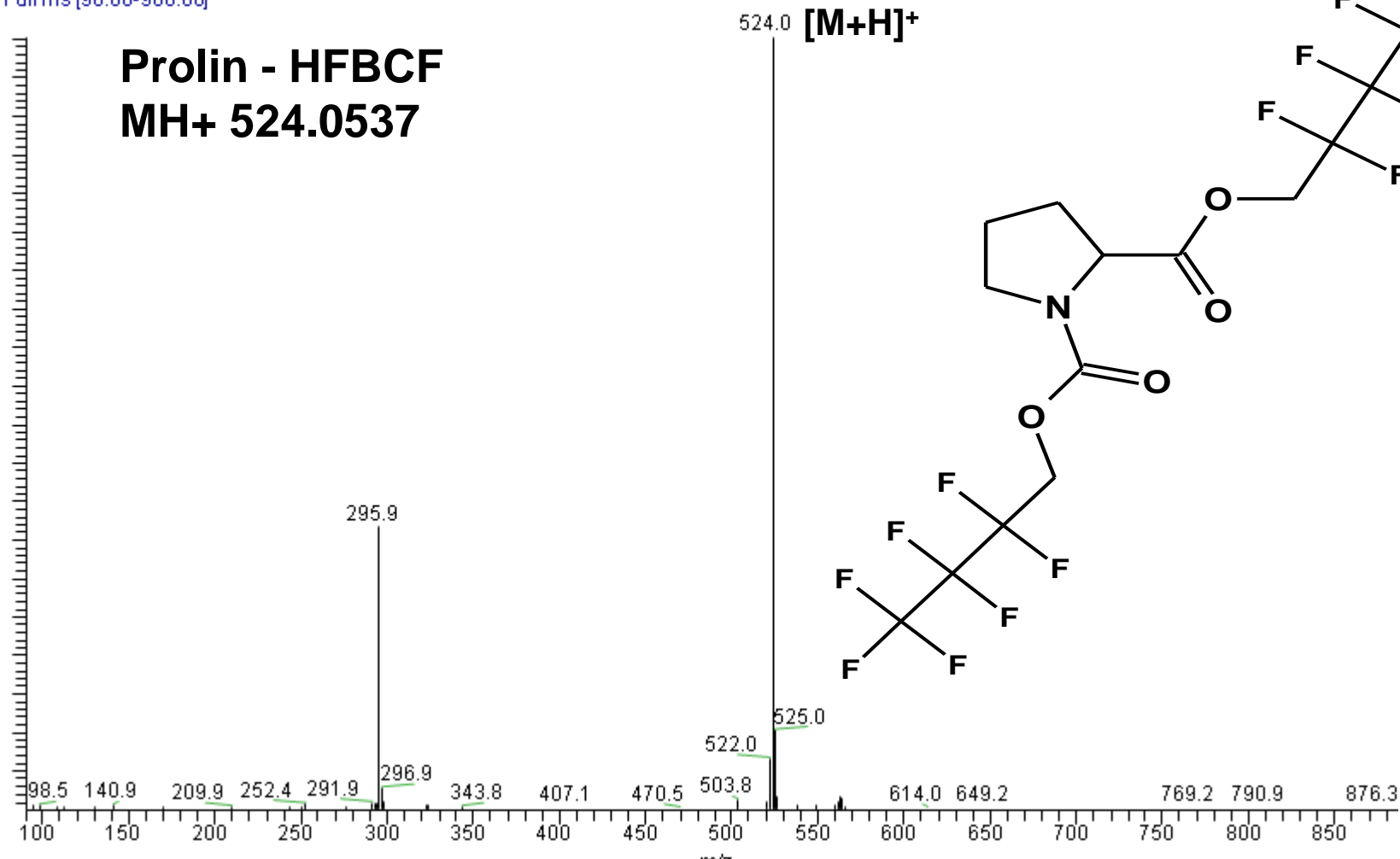
10/2/2008 12:31:25 PM

AA-HFB, A1-A5,10nmol

5,20,170,30,300,inj240,sls/0.8,pg/0.9,TL250,1.4mlm,is180,as1,IB1.5

#01 #882-886 RT: 6.27-6.28 AV: 5 SB: 15 6.20-6.22, 6.32-6.33 NL: 1.14E6

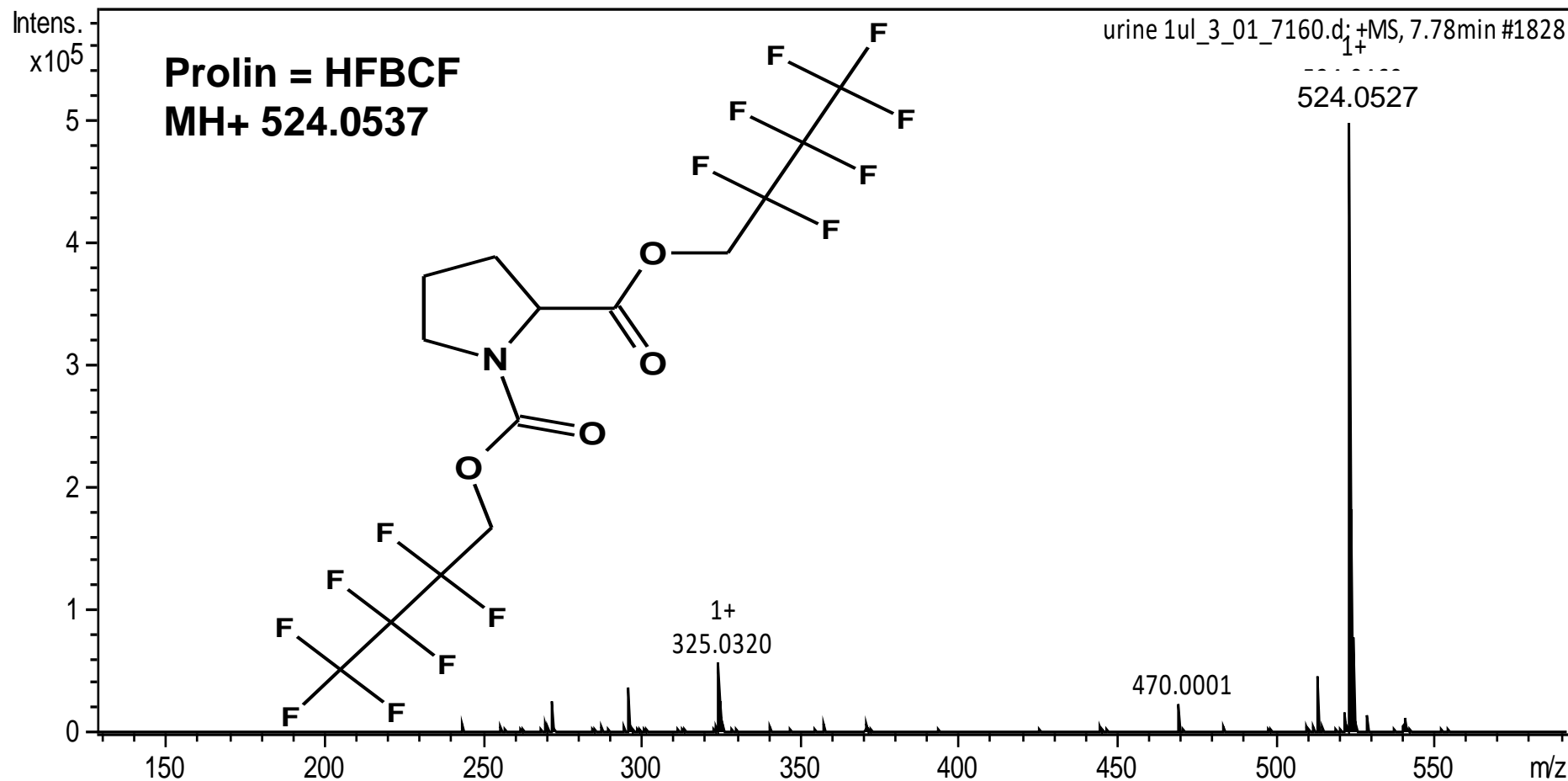
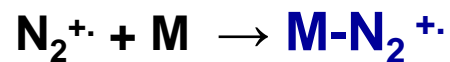
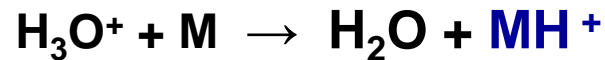
Full ms [90.00-900.00]





Ionizace a detekce analytů

GC-APCI-MS



Prolin = HFBCF
MH⁺ 524.0537

¹⁹F m/z 18.9984
7*F Δ m/z = -11.2 mDa

GC-EI-HRMS



Souhrnné charakteristiky

- **Celý proces je automatizován (příprava vzorku, měření, zpracování dat)**
- **LLME + derivatizace**
- **Minimalizace lidských chyb, lepší RDS o ca 2 % menší**
- **Příprava vzorků pro jakoukoli GC technologii**
EI-MS, APCI-MS, FID atd.
- **24h/7d**
- **On deck, on-line na jakýkoli komerční LC-MS (GC-MS) spektrometr**
- **Pokrytí metabolomu moči > 200 protických metabolitů**



Postup Automatizace Sériové přípravy Vzorku Pomocí Robotické Stanice

- **Modulární stavebnicový systém**
- **Nutno vypracovat chemickou-analytickou metodu**
- **Napsat protokol metody přípravy vzorku**
- **Rozepsat jednotlivé kroky přípravu vzorku pro rws**
- **Sestavit pro analýzu potřebné moduly**
- **Naprogramovat rws**
- **Odladit postup analýzy a program řízení rws**
- **Validovat celý postup analýzy**



Postup Automatizace Sériové Přípravy Vzorku Pomocí Robotické Stanice

Přednosti modulárního řešení

- **Moduly lze nakoupit od různých dodavatelů**
- **Moduly lze upravit, konstruovat a připojit**
- **Budoucnost má další prohloubení dělby práce:**

Koupit řešení na klíč

**při pořizování přístrojového vybavení současně
plánovat automatizaci metod přípravy vzorku a celé
analýzy pro pořizované zařízení**

- **Úspora nákladů, času, které lze věnovat realizaci
vlastního pracovního záměru a nikoli zdlouhavému
vývoji metod pro pořizované zařízení**



Postup Automatizace Sériové Přípravy Vzorku Pomocí Robotické Stanice

Přednosti modulárního řešení

- Řešení stand-on (on-deck)
- Řešení stand-alone
- Rozšiřující se množství modulů pro automatizaci přípravy vzorků:
 - transfer kapalin, míchání, třepání, ředění, ohřev, chlazení
 - výměna stříkaček pro různá použití
 - centrifugace
 - odpařování vzorku
 - a další



Souhrn

Automatizace přípravy vzorků představuje další nezvratný krok vývoje v oblasti analýzy látek

Aneb směřujeme od zdlouhavých, manuálních laboratorní činností k zadávání úkolů, kontrole jejich plnění, a zejména ke zhodnocení získaných výsledků měření

Dilema:

Vlastní intelektuální investice nebo řešení na klíč ?



Poděkování



M. Moos

**MetaboAuto®
ToxiAuto®**



P. Vodrážka

**GC-MS
metabolomika**



S. Opekar

**Nová
činidla**



H. Zahradníčková

**Dabáze
metabolitů
Chirální
separace**



L. Řimnáčová

**GC-MS
metabolomika**



I. Karlínová

**Značení
stabilními
izotopy**



L. Marešová

**LC-MS
metabolomika**

Děkuji za pozornost !

