

1

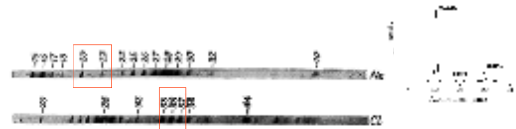
Tömegspektrometria

Szabó Pál
MTA Természettudományi Kutatóközpont
(szabo.pal@tk.mta.hu)

Kezdetek

2

- **J. J. Thomson**, 1910, 1912
 - Kisülési csőbe különböző gázokat vezetett
 - $^{20}\text{Ne}/^{22}\text{Ne}$ Izotópok létezésének bizonyítéka



Kezdetek

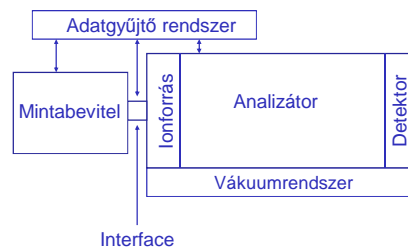
3

- **F. W. Aston**, 1919
 - Első spektrográf
 - Ne, Cl, Hg, N izotópok



Az MS felépítése

4



Ionforrás

5

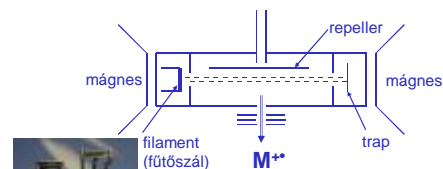
Cél: Töltött részecskék előállítása

Ionizációs módok:

- elektron ionizáció (EI)
- kémiai ionizáció (CI)
- gyors atom bombázás (FAB)
- lézeresztorpció (LDI, MALDI)
- ionizáció légköri nyomáson (API)
 - electrospray ionizáció (ESI)*
 - légköri nyomású kémiai ionizáció (APCI)*
 - légköri nyomású photoionizáció (APPI)*
 - deszorpció electrospray (DESI)*

Elektron ionizáció

6



Filament (fűtőszál): W, Re
 $T_{fil} = 2000\text{ °C}$

Kamra: $p = 10^{-5}$ Torr
 $T = 100\text{-}200\text{ °C}$
Repeller: $U = \text{néhány V}$

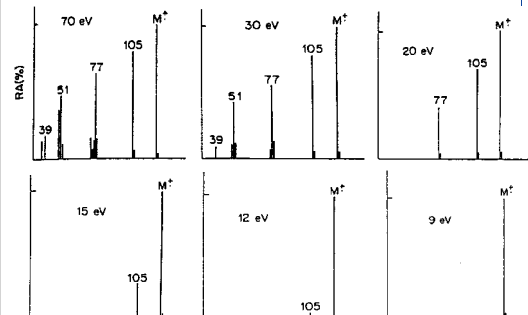
Elektronionizáció

7

- **Vizsgálhatóság feltétele:** illékonyság
- **Tömeghatár:** 1000 Dalton (Da)
- **Kationok, gyökkationok képződnek**
- **Fragmentáció:** gyakori és jellegzetes (spektrumkönyvtár)
- **Sok esetben nincs molekulaion**
- **Az elektron energiának a szerepe**

Az elektronenergia hatása

8



Kémiai ionizáció

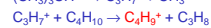
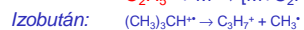
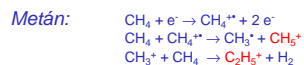
9

- **CI forrás:** az EI forrásnál zártabb
- **Reagens gáz:** metán, izobután, ammónia
- **Nyomás:** ≈ 0.1 Torr (EI $\approx 10^{-6}$ Torr)
- **Minta parciális nyomása:** $\approx 10^{-4}$ Torr
- **Lágy ionizáció**
- **Fragmentáció:** elhanyagolható
- **Kvazi-molekulaion**

Kémiai ionizáció

10

Ion-molekula reakciók:



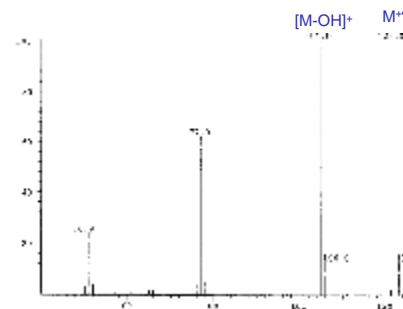
CI reagens gázok

11

- Metán:**
- szerves vegyületekre általánosan jó
 - $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ $[\text{M}+\text{C}_2\text{H}_5]^{+}$ ionokat ad
 - az adduktok intenzitása kicsi
- Izobután:**
- enyhe fragmentáció figyelhető meg
 - $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ $[\text{M}+\text{C}_4\text{H}_9]^{+}$ ionokat ad
 - az adduktok intenzitása nagy
 - nem olyan univerzális, mint a metán
- Ammónia:**
- fragmentáció nincs
 - bázikus molekuláknál $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ iont ad
 - poláris vegyületeknél $[\text{M}+\text{NH}_4]^{+}$ iont ad
 - egyéb vegyületekre nem jó

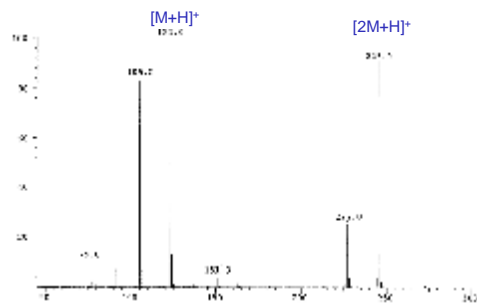
Tipikus EI spektrum

12



Tipikus CI spektrum

13



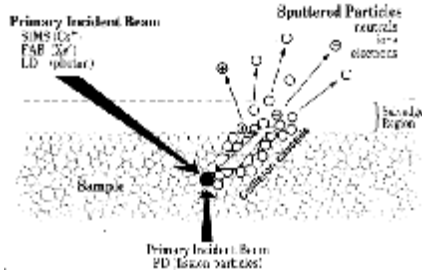
Gyors atom bombázás

14

- **Cél:** kiterjeszteni a vizsgálható vegyületek körét
- **Megoldás:** mátrix bevonása az ionképzésbe
- **Mátrix:** glicerín, NOBA
- **Tömeghatár:** \approx néhány ezer Da
- **Fragmentáció:** kismértékű
- **Gyors atom/ion:** Xe, Cs⁺
- **Kvázi-molekulaion:** [M+H]⁺, [M+Na]⁺,

Gyors atom bombázás

15

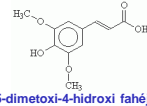
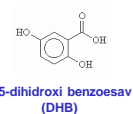
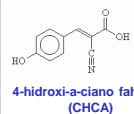


Lézerdeszorpció

16

Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry

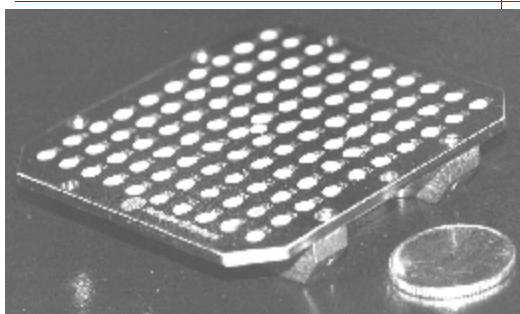
Leggyakoribb mátrixok:



Mátrix-minta kristályok a targeten

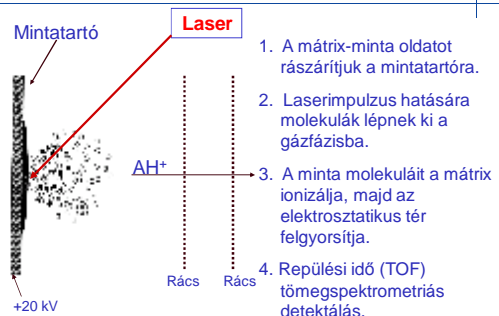
Mintatartó

17



MALDI ionképződés

18



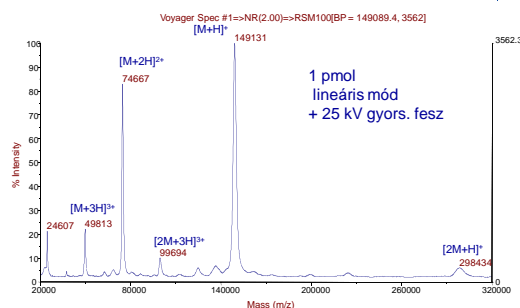
A MALDI előnye

19

- Lágú ionizáció: intakt biomolekulák vizsgálata lehetséges
- Széles tömegtartomány: nagy móltömegű biomolekulák (> 300 kDa) vizsgálata
- Keverékek egyidejű vizsgálata lehetséges, nem igényel bonyolult tisztítást, elválasztást
- Nagy érzékenység (fmol tartomány)
- Könnyen értelmezhető spektrumok (kis töltöttség)
- Sók, pufferek hatása kisebb
- Gyors

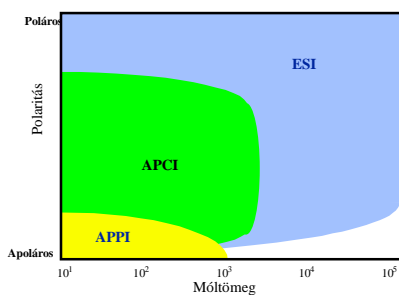
Tipikus MALDI spektrum

20



Ionizáció légköri nyomáson

21



Electrospray ionizáció

22

IonSpray: Pneumatikusan segített **electrospray**
Nagyfeszültség (5-6 kV) hatására töltött cseppek kerülnek a gázfázisba (koncentrációérzékeny!).

Ionforrások koncentrációtartományai:

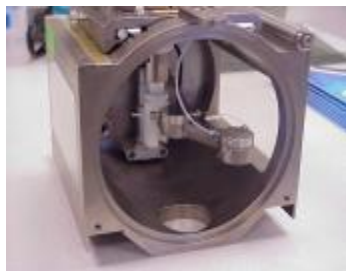
- TurboV (2µL/min—3mL/min)
- Turbo-IonSpray (2µL/min—1mL/min)
- IonSpray (2 to 200µL/min)
- Micro-IonSpray (50 to 1000 nL/min)
- NanoSpray (~1µL-5µl in tip, 20-50 nL/min)

Kis áramlás ® nagyobb érzékenység!

IonSpray™

23

Áramlási tartomány: 2 – 200 µ L/min



TurbolonSpray™

24

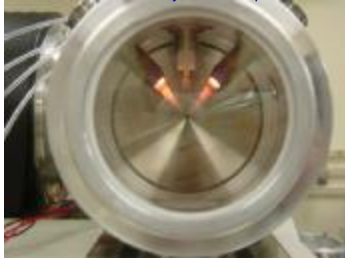
Áramlási tartomány: 2 – 1000 µ L/min



Turbo VTM

25

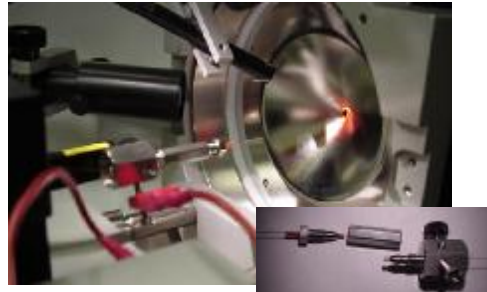
Áramlási tartomány: 2 – 3000 μ L/min



Microelectrospray

26

Áramlási tartomány: 50 – 1000 nL/min



Nanospray

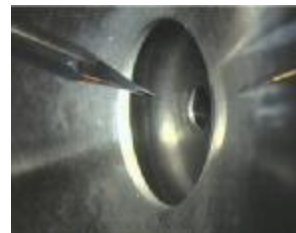
27

Áramlási tartomány: 20 – 50 nL/min



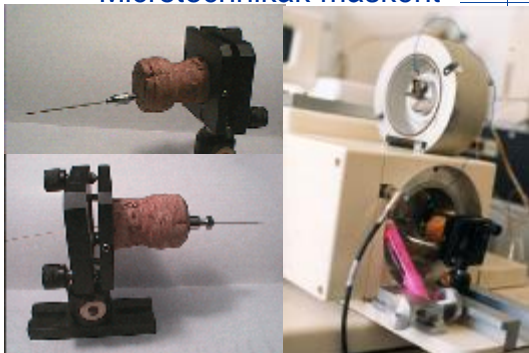
Nanospray

28



Microtechnikák másként

29



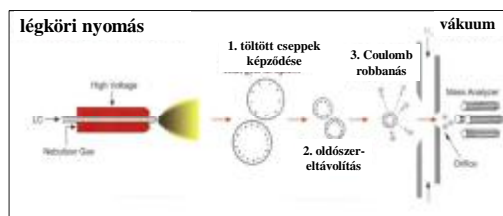
Második generáció

30



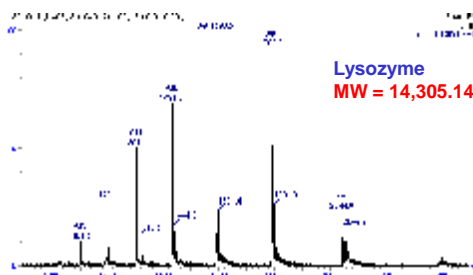
Sprayképződés

31



Többszörösen töltött ionok

32



Móltömegszámítás

33

minden egyes csúcsra igaz:

$$m/z = \frac{(MW + nH^+)}{n}$$



m/z = tömeg/töltés értékek a spektrumban
 MW = a fehérje móltömege
 n = töltésszám (egész)
 H⁺ = a hidrogén ion tömege (1.008 Da)

Móltömegszámítás

34

A töltés és a móltömeg is ismeretlenek
 Két szomszédos csúcs töltöttségi foka közti különbség: 1

$$1431.6 = \frac{(MW + nH^+)}{n} \quad 1301.4 = \frac{(MW + [n+1]H^+)}{[n+1]}$$

2 ismeretlen két egyenlet – először n-re oldjuk meg

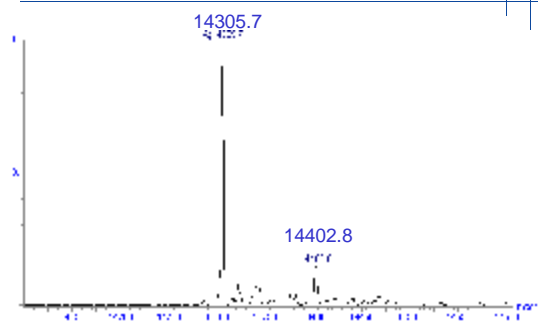
$$n = 1300.4/130.2 = 10$$

majd behelyettesítve a móltömeg:

$$MW = 14316 - (10 \times 1.008) = 14305.9 \quad 14,305.14$$

Rekonstruált tömegspektrum

35



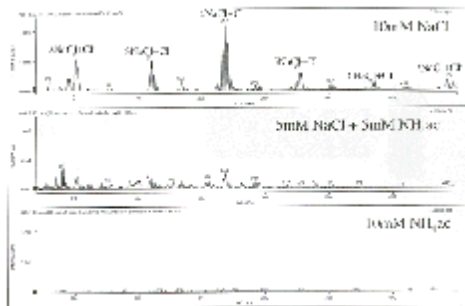
Eluensmódosítók

36

- Szerves savak (hangyasav, ecetsav) elősegítik a bázikus vegyületek (sp³ N- tartalmú) protonálódását.
- Semleges együletek kationok (alkálifém, ammónium) segítségével is képezhetnek ionokat.
- 0.1 % hangyasav vagy ecetsav a legjobb adalék pozitív módban peptidok, fehérjék vizsgálatára, a 0.1% TFA HPLC-MS méréseknél kedvelt.
- Ammónium-formiát vagy-acetát javasolt puffernek 2-10 mM koncentrációban.
- Foszfátbuffer, TEA kerülendő!!!

Sóhatás

37



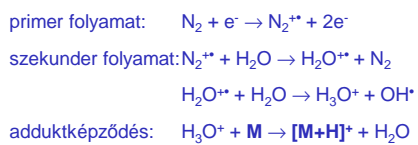
APCI

38

- Az APCI nagy áramlást is (0.1-2.0 mL/min.) tolerál
- Poláros, termikusan stabil vegyületek vizsgálatára
- Molekulatömeg MW < 1000 Da
- Intenzív fűtés hatására az oldószer elpárolog
- Porlasztó- és segédgáz alkalmazása szükséges
- Korona kisülés hatására következik be az ionizáció

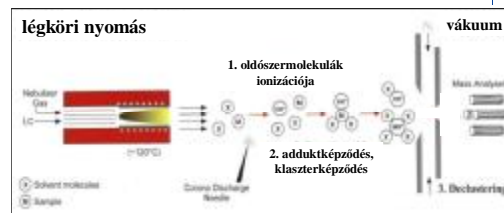
Ionképzés mechanizmusa

39



APCI ionképződés

40



Kombinált forrás

41

Forrásház



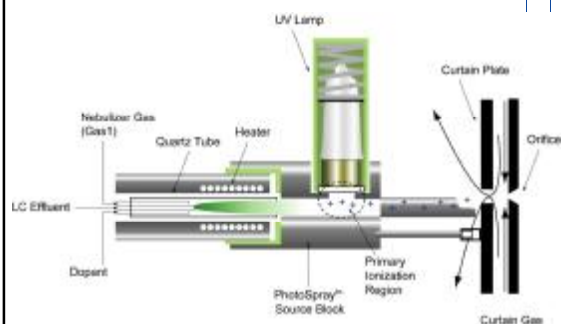
Légköri nyomású fotoionizáció

42

- Eluens áramlási sebessége: 100 µL-2 mL/min
- Fordított fázis
 - MeOH/víz előnyös
 - ACN csökkenti az érzékenységet
- Normál fázis
 - Izooktán/Izopropanol/Diklórometán
- Dopant: Toluol (HPLC grade) 5-15% külön pumpával
- Hőmérséklet: 300-450 °C (APCI)

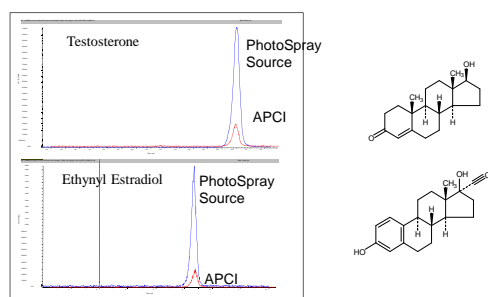
Photospray forrás

43



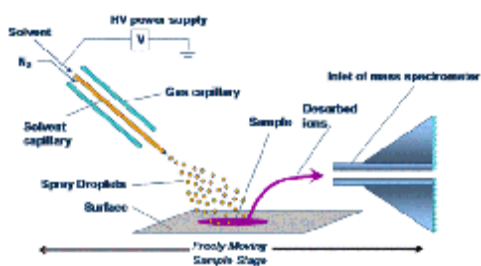
PSI alkalmazás

44



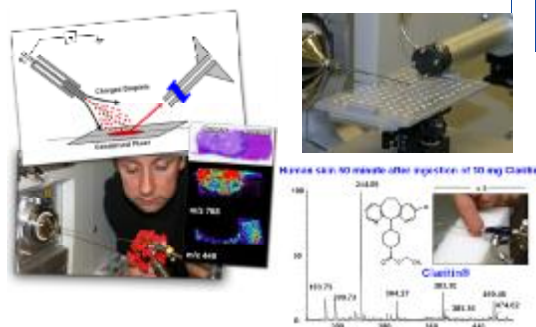
Deszorpciós Electrospray

45



DESI alkalmazások

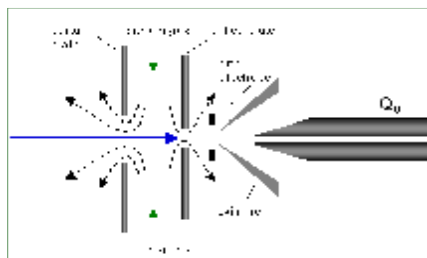
46



Oldószereltávolítás

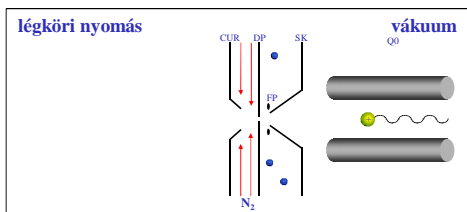
47

Nitrogén gázfüggöny



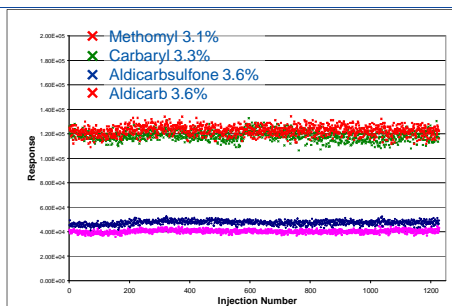
Gázfüggöny interface

48



Robusztusság

49



Szpjákkolt talajminta (50ng/mL); 1200 injektálás (3.5nap)

Karbantartás

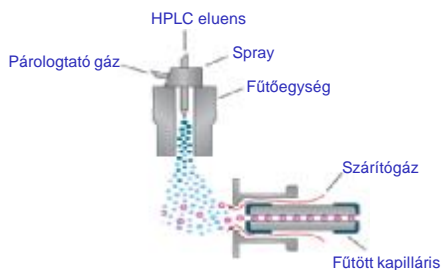
50



Oldószereltávolítás

51

Fűtött kapilláris



Analizátorok

52

Cél: Töltött részecskék szétválasztása

Analizátor típusok:

- mágnes (B)
- elektrosztatikus (ESA)
- kvadrupól (Q)
- ioncsapda (trap)
- repülési idő (TOF)
- lineáris ioncsapda (LIT)
- Fourier transzformációs ion ciklotron rezonancia MS (FT-ICR)
- Orbitrap

Mágneses analizátor

53

Lorentz erő:

1. $\frac{1}{2} mv^2 = eU$
 2. $veB = mv^2/R \Rightarrow v = eRB/m$
1. + 2. \Rightarrow

$$\frac{m}{e} = \frac{B^2 R^2}{2U}$$

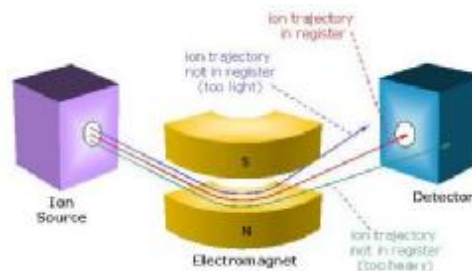
Tömegspektrometria alapegyenlete

Pásztázás (scan) :

- mágnesáram

Mágneses analizátor

54



Elektrosztatikus analizátor

55

Szektormező



1. $\frac{1}{2} mv^2 = eU$
2. $mv^2/R = eE$

1. + 2. $\cancel{v^2}$

$$R = 2U / E$$

Független a tömegtől!!!

Kettős fókuszálás

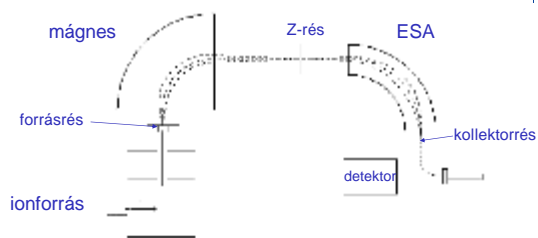
56

Cél: a mágnes és az ESA kölcsönös hiányosságainak kiküszöbölése

- A forrásból kilépő ionok sebesség- és irányszóródást szenvednek
- **Mágnes:** impulzus szerint szeparál. Azonos tömeg, különböző energia \Rightarrow kiszélesedik a csúcs
- **Rések:** érzékenység csökken
- **Nagyfelbontás!!**

Kettős fókuszálás

57

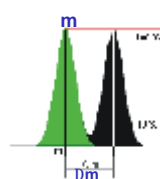


Felbontás

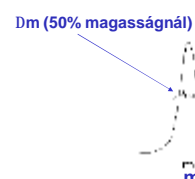
58

Felbontás: $R = \frac{m}{\Delta m}$

10 % völgy



Full Width at Half Mass



Felbontás

59

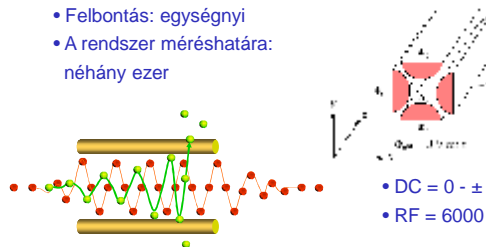
Minimálisan szükséges felbontás

Ar	39.96239	}	580
C ₃ H ₄	40.03130		
N ₂	28.00615	}	1100
C ₂ H ₄	28.03130		
CO	27.99491	}	2490
N ₂	28.00615		
¹³ CC ₆ H ₇	92.05813	}	20600
C ₇ H ₈	92.06260		

Kvadrupol analizátor

60

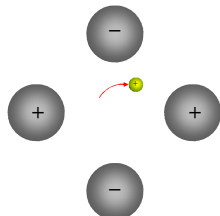
- Felbontás: egységnyi
- A rendszer méréshatára: néhány ezer



- DC = 0 - ± 500 V
- RF = 6000 V

Kvadrupol analízátor

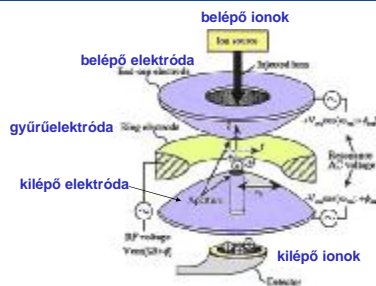
61



Egy adott AC / DC érték esetében csak egy ion számára stabil az ionpálya.

Ioncsapda analízátor

62

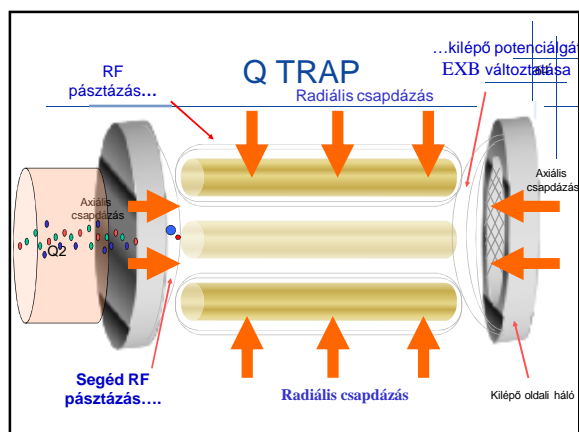


Előny: érzékenység, kis méret, MSⁿ

Ioncsapda analízátor

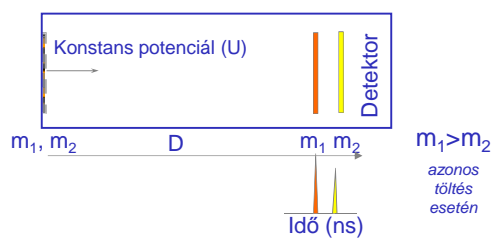
63

- **Ionok mozgása:** az elektródákra kapcsolt egyen- illetve váltófeszültség hatására
- Az összes ion egyszerre tartózkodik a csapdában
- Kis méret, könnyű kezelhetőség
- MSⁿ funkció (n=10, elméletileg!)



Repülési idő analízátor

65



Repülési idő analízátor

66

$$\begin{aligned} \frac{1}{2} m v^2 &= eU & m_1 &\rightarrow v_1 \\ v &= (2eU/m)^{1/2} & m_2 &\rightarrow v_2 \\ t &= D/v = (D^2 m / 2eU)^{1/2} \Rightarrow \end{aligned}$$

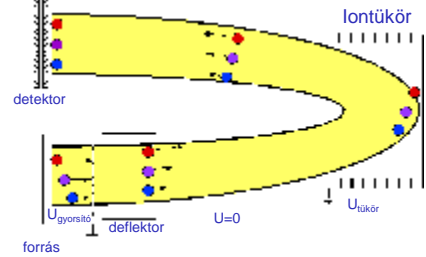
$$m = \frac{2U}{D^2} t^2$$

Az ionok energiaszórása miatt a felbontás kicsi

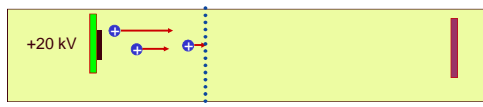
Felbontást növelő megoldások 67

- Az ionképződés helyének szórása
 - Lontükör (Reflectron)
- Sebességeloszlás (energiaszórás)
 - Delayed extraction (MALDI)
 - orthogonal TOF

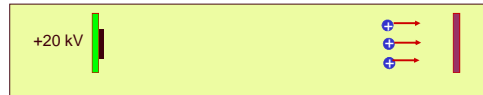
Lontükör 68



Delayed Extraction (DE) 69

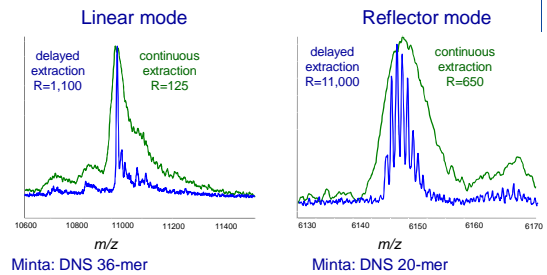


A potenciálgradiens a lassabb ionokat jobban gyorsítja



A detektorig a lassabb ion utóléri a gyorsabbat

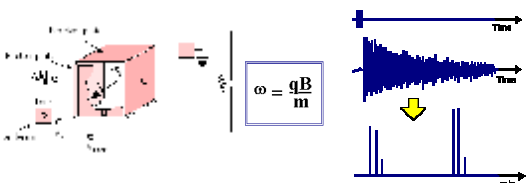
A DE hatása a felbontásra 70



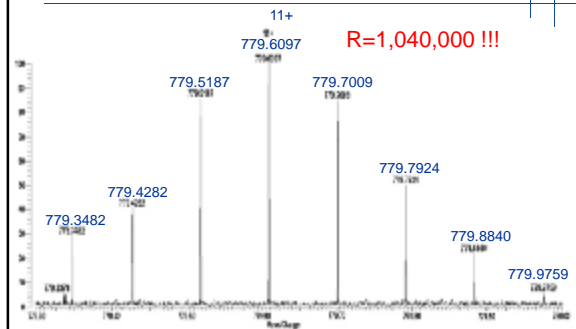
FT-ICR MS 71

A cellába bejuttatott és a nagy mágneses tér erő hatására körpályára kényszerített ionok által indukált áramot méri.

- óriási felbontás
- tág időskála (nem destruktív detektálás)



Az FT-ICR felbontása 72



Orbitrap

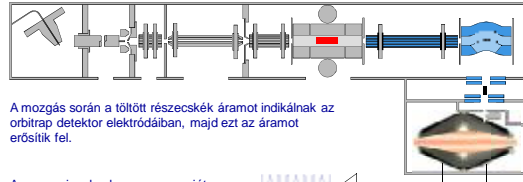
73



LTQ Orbitrap Működése

74

1. Az ionokat a lineáris ionscsapdában tároljuk
2. Majd axiálisan kieresztjük
3. És a C-csapdában ismét csapódzunk
4. Onnan egy csomagban átküldjük az Orbitrap analizátorba
5. Ahol elektrosztatikusan csapódzónak, és a központi elektróda körül keringva oszcilláló mozgást végeznek



A mozgás során a töltött részecskék áramot indukálnak az orbitrap detektor elektródáiban, majd ezt az áramot erősítik fel.

Az egyes ionoknak megvan a sajátos hulláma.

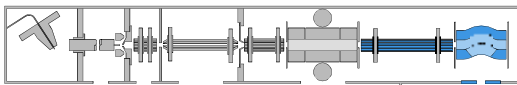


Körfrekvenciák és a tömegek

75

Az axiális oszcilláció frekvenciája:
 Ahol w = oszcillációs körfrekvencia
 k = készülékállandó
 m/z = A hön áhitott tömeg!

$$w = \sqrt{\frac{k}{m/z}}$$

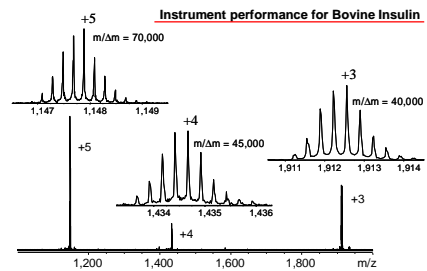


Minden ionnak megvan a maga körfrekvenciája, mely egy eredő áramot indukál. Ebből az egyes komponenseket Fourier Transzformációval kapjuk meg.



Teljesítőképesség

76



Analizátorok felbontása

77

- | | | |
|---------------------------|----------------------------|------------|
| • szektor (E,B) | nagy | >10,000 |
| • kvadrupol (Q) | egységnyi | (kivétel!) |
| • ionsapda (trap) | nagy (de: tömegpontosság?) | |
| • repülési idő (TOF) | nagy | >10,000 |
| • lineáris ionsapda (LIT) | közepes | <10,000 |
| • orbitrap | nagy | > 200,000 |
| • FT-ICR | nagy!!! | >1,000,000 |

Csak a nagyfelbontás??!

78

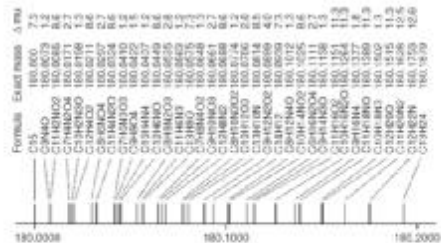
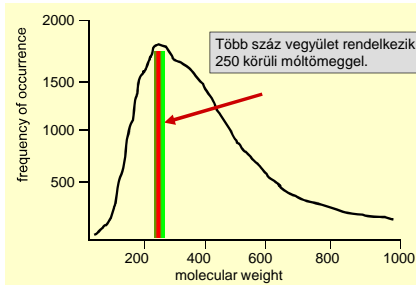


Figure 6.3
 ENZYME MASS AND CORRESPONDING FORMULAE FOR VARIOUS POSSIBLE IONS OF m/z 180 CONTAINING ONLY CARBON, HYDROGEN, NITROGEN AND OXYGEN ATOMS IN INTACT NUMBER (C, H, N, O).

Elegendő-e egy egyszerű LC/MS?

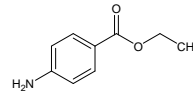
79



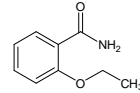
Szerkezeti információ nyerése

80

Benzocaine



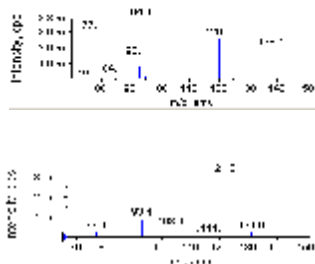
Ethenzamide



- Egyező összegképlet : $C_9H_{11}NO_2$
- Egyező tömeg : 165.19 dalton
- Egyező számú kettős kötés : 4

MSMS spektrumok

81



Tandem tömegspektrometria

82

Célok:

- szerkezeti információ nyerése
- érzékenység növelése
- szelektivitás növelése

Megvalósítás:

- szektor: kombináció (EBE, BEB)
- kvadrupol: QqQ
- ioncsapda: MS^n
- TOF: Post Source Decay (PSD), TOF/TOF
- hibrid: BEqQ, Q-Trap, Q-TOF,

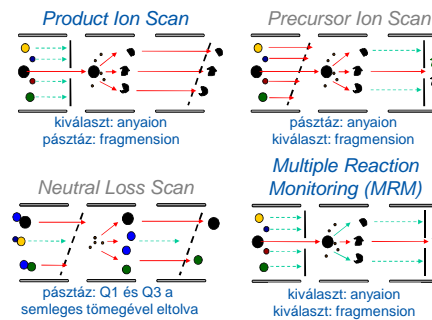
Triple quadrupol felépítése

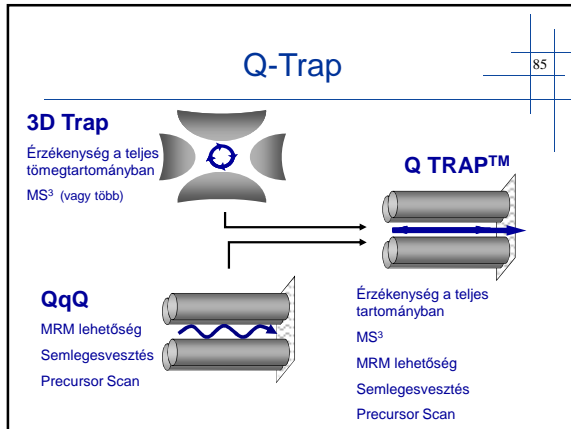
83



Lehetséges scanfunkciók

84





Ha akarom: hármaskvadrupol...

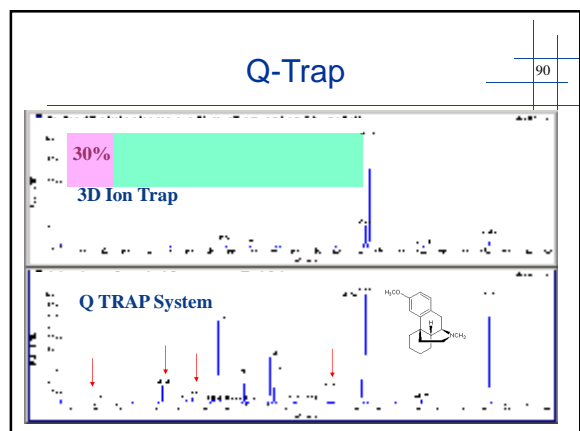
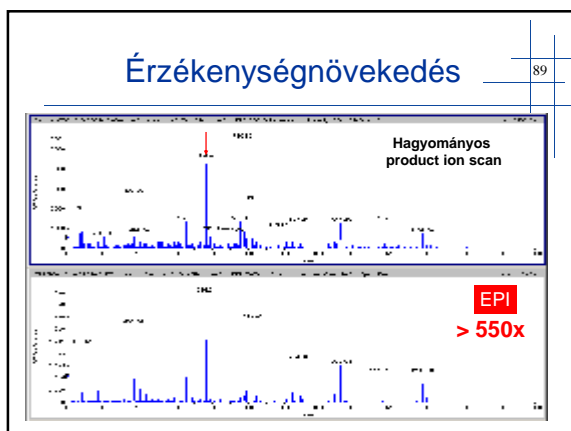
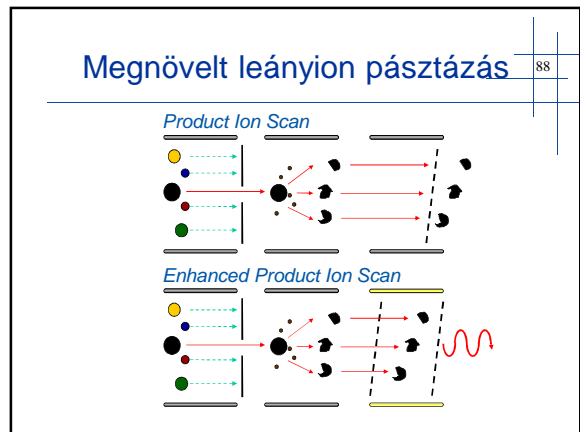
Megtartva minden hagyományos funkciót :

- Single MS scans (Q1 and Q3 scans)
- Product Ion Scan (MS2)
- Precursor Ion Scan (Prec)
- Neutral Loss Scan (NL)
- **Multiple Reaction Monitoring scan (MRM)**

...ha akarom ioncsapda

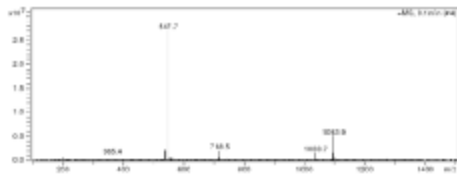
Új pásztázási módokkal :

- Enhanced single MS scan (EMS)
- Enhanced Resolution scan (ER)
- **Enhanced Product Ion scan (EPI)**
- Enhanced Multiply Charged scan (EMC)
- Time Delayed Fragmentation scan (TDF)
- **MS/MS/MS scan (MS3)**



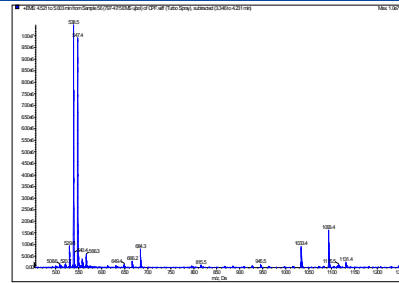
MS1 (3D trap)

91



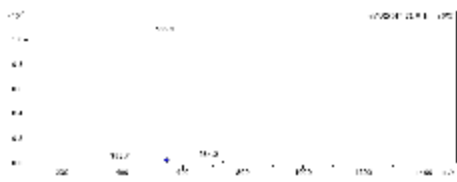
EMS (QTrap)

92



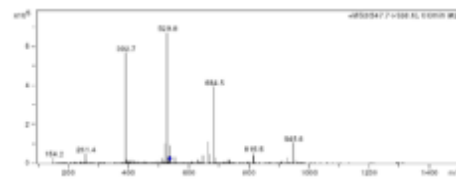
MS2 547

93



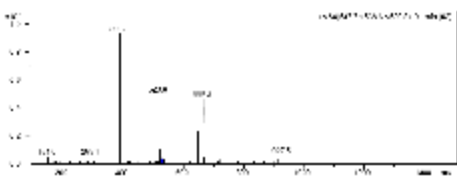
MS3 547/538

94



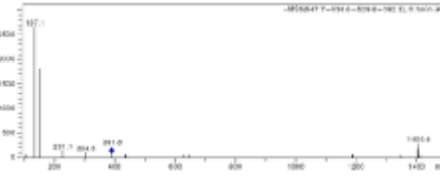
MS4 547/538/529

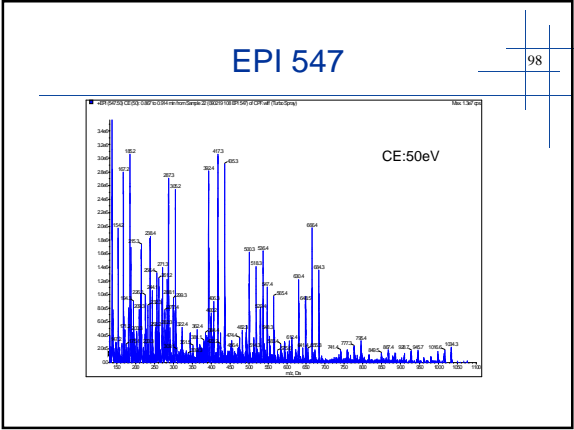
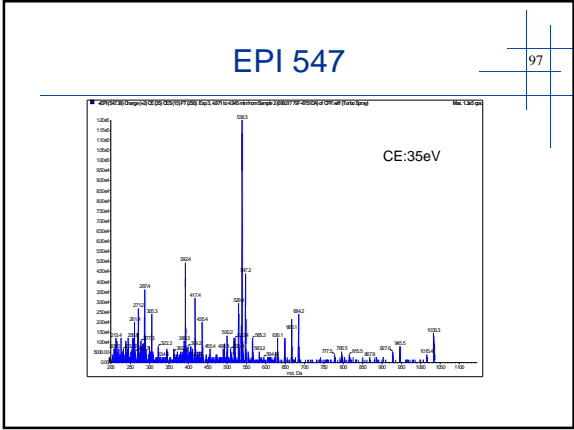
95



MS5 547/538/529/392

96





Csatolt technikák

99

A mintabevétel speciális módja, amikor folyamatosan jut be a minta a készülékbe.

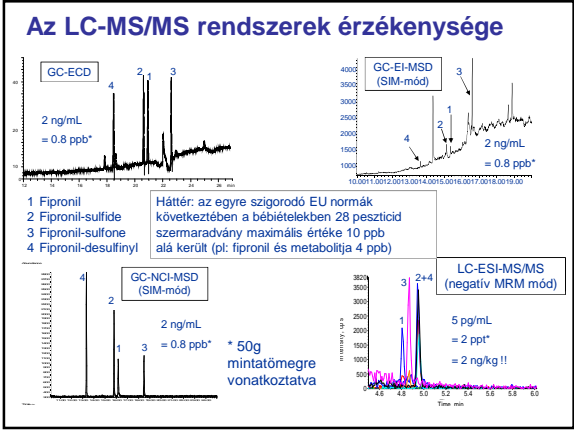
- GC-MS
- HPLC-MS
- CE-MS

GC vs. HPLC (MS)

100

GC: gáz/gőz minta, hőterhelés
HPLC: folyadék/oldat minta
LC/MS széleskörű alkalmazás, móltömeg információ

Chemical Abstracts entry compounds	
Total ; 9,000,000	
GC applicable	130,000 (1.4%)
target compounds for HPLC	8,870,000 (98.6%)



GC-MS

102

Illékony minták jöhetnek szóba: EI/CI ionizáció

Az analizátor sebességének szerepe

- szektor: lassú
- trap és quad közepes
- TOF gyors

A vívógáz és a vákuumszisztéma egymással ellentétes

- töltött kolonna: nagy gázáram ⇒ szeparátor
- kapilláris kolonna: kis gázáram ⇒ direktbe

A kapott spektrumok könyvtárból jól kereshetők

GC-MS szeparátorok

Membránszeparátor

to MS

membrán

Jetszeparátor

to MS

to MS

vákuumszivattyú

- Lassú a válasz
- A komponensek kis része jut be a készülékbe
- A membrán szelektivitása függ a polaritástól és a móltömegtől

- Megbízható

GC-MS tanácsok

- Fokozottan ügyeljünk a vivőgáz tisztaságára
- A kolonna kellően beérjen az ionforrásba
- A GC és az MS közti átmenet "transfer line" fűtött legyen

HPLC-MS

Egyre kisebb a megkötés a vizsgálhatóság szempontjából

Az eluens és a vákuumrendszer méginkább ellenségei egymásnak

A mai ionforrások (API) egyben az interface szerepét is betöltik

Az első interface egyike: moving belt

HPLC

Különböző oszlopátmérekhez tartozó áramlás

elnevezés	ID	áramlás	Ionforrás
Hagyományos	4.6 mm 3.2 mm	1-2 mL/min	Turbolonspray
mikro	1 mm 800 µm	100 µL/min 20 µL/min	Ionspray
kapilláris	500 µm 300 µm 180 µm	10 µL/min 4 µL/min 2 µL/min	Microelectrospray
nano	100 µm 75 µm 50 µm	300 nL/min 180 nL/min 80 nL/min	Nanospray

A forrásoknak széles áramlási tartományban kell dolgozni

Kolonnaátmérő vs. érzékenység

$$C_{\text{kapilláris}} = C_{\text{normál}} \left(\frac{d_{\text{normál}}}{d_{\text{kapilláris}}} \right)^2$$

1.0 mm id

2 pmol mioglobin emésztmény 0.8 mm id

0.3 mm id

0.18 mm id

CE rendszer

fused silica capillary (25 – 75 µm ID)

flow direction

run buffer

sample

30-kV variable power supply

run buffer

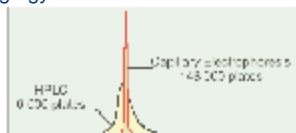
detector

Kapilláris elektroforézis

109

Előnyök:

- Gyors (10-30 perc)
- Kis mintamennyiség (1-50 nL)
- Nagy tányérszám
- Számos mód a szelektivitás fokozására
- Vizes/nemvizes közeg egyaránt
- Egyszerű



CE-MS illesztés

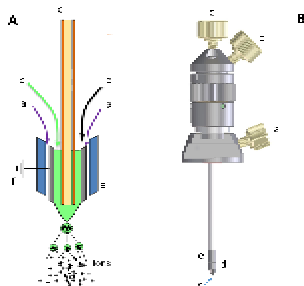
110

Nehézségek:

- Elektromos kapcsolat megvalósítása egy pufferedénnel
- A stabil spray-hez szükséges folyadékáram biztosítása
- Megfelelő puffer kiválasztása, mely nem növeli az ionáramot (0.2 % hangyasav, 15 mM ammóniumacetát)
- Megfelelő mennyiségű minta injektálása
- Az MS és az elválasztás sebességének összehangolása

CE-MS interface

111



Alkalmazások

112

Lehetséges feladatok

113

- Móltömeg meghatározása
- Szerkezetazonosítás
- Mennyiségi meghatározás

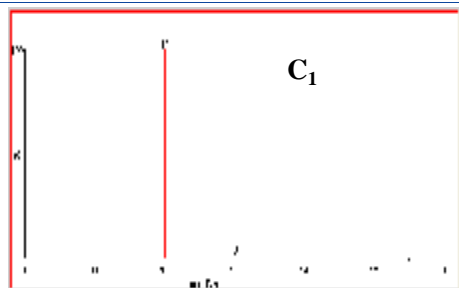
Izotópok fajtái

114

- A: csak egy izotópjja van
 - F, P, I
- A+1: két izotópjja van, mindkettő intenzitása számottevő, tömegkülönbség 1
 - H, C, N
- A+2: két izotópjja van, mindkettő intenzitása számottevő, tömegkülönbség 2
 - Cl, Br, S, O

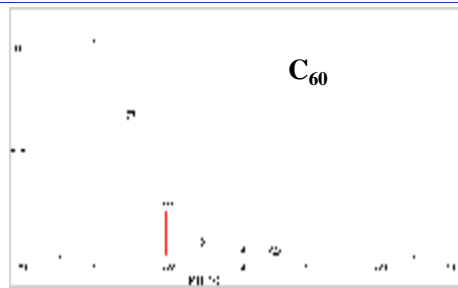
Móltömeg megadása

115



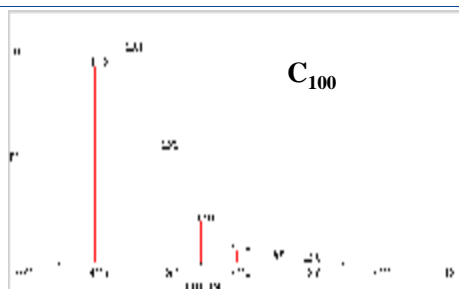
Móltömeg megadása

116



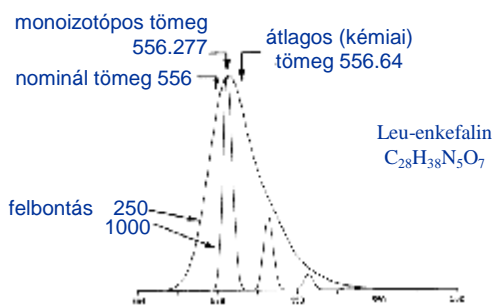
Móltömeg megadása

117



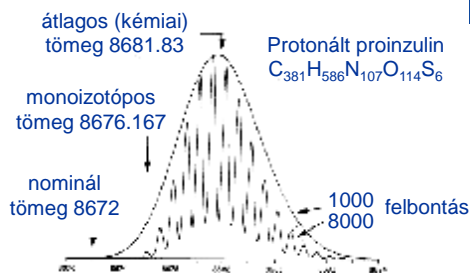
Móltömeg megadása

118



Móltömeg megadása

119

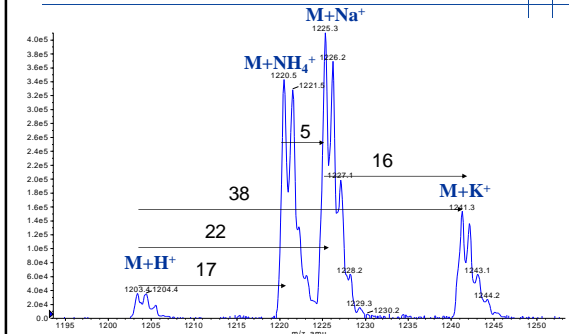


Móltömeg meghatározása

120

Ionadduktok

121



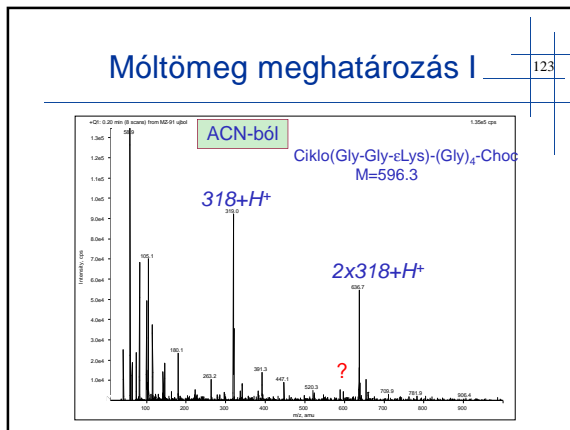
Ionadduktok, tömegkülönbségek

122

- APCI pos: +H
- APCI neg: -H
- ESI pos: H, NH₄⁺, Na, K (1, 18, 23, 39)
- ESI neg: -H, Cl, formiát, acetát, trifluoracetát (-1, 35, 45, 59, 113)
- Leggyakoribb tömegkülönbségek: 38, 22, 17, 5, 2

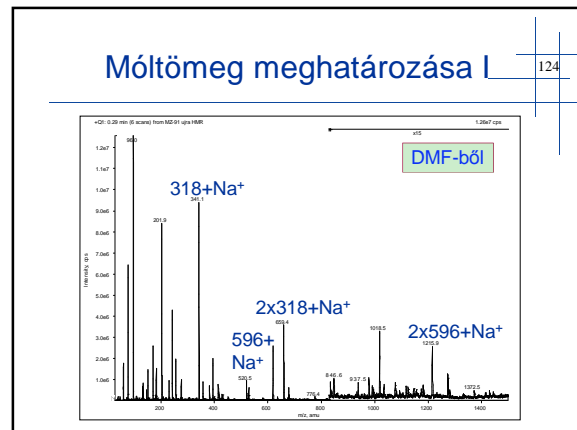
Móltömeg meghatározás I

123



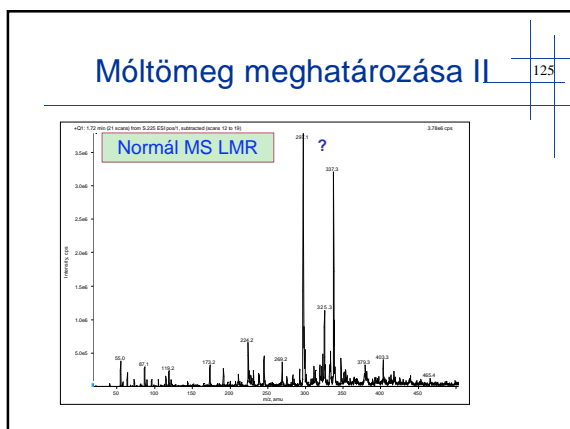
Móltömeg meghatározása I

124



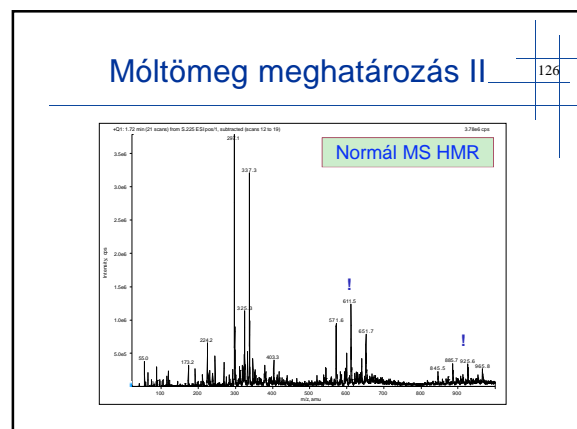
Móltömeg meghatározása II

125

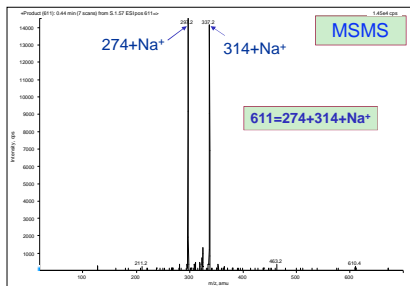


Móltömeg meghatározás II

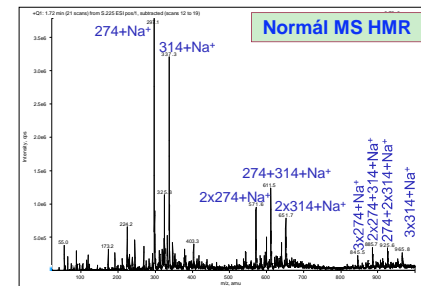
126



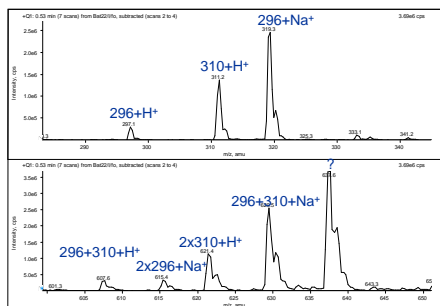
Móltömeg meghatározása II 127



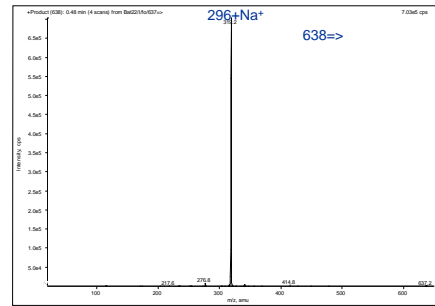
Móltömeg meghatározása II 128



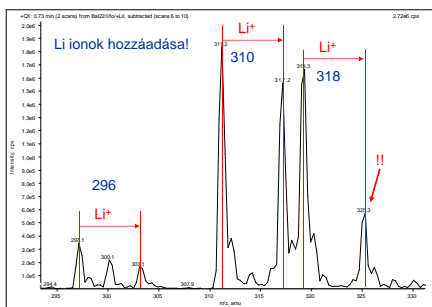
Móltömeg meghatározása III 129



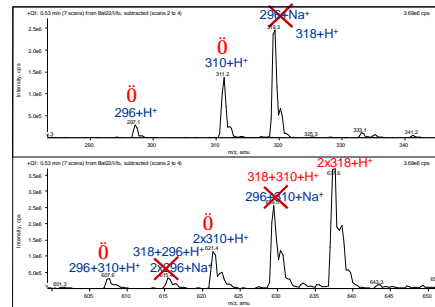
Móltömeg meghatározása III 130



Móltömeg meghatározása III 131

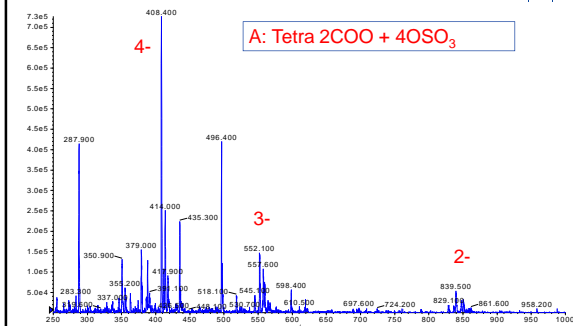


Móltömeg meghatározása III 132



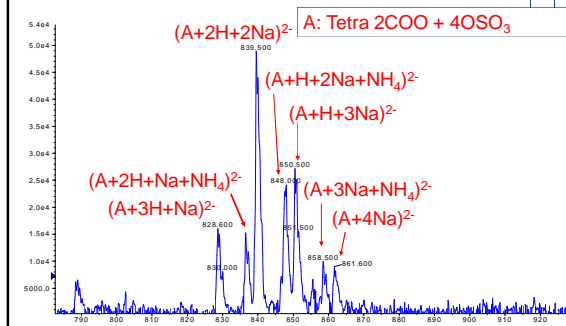
Móltömeg meghatározása IV

133



Móltömeg meghatározása IV

134



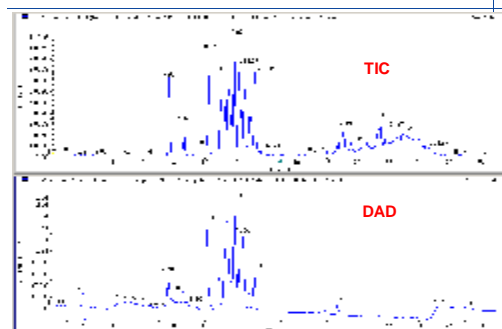
Szerkezetmeghatározás

135

- Kis molekulák azonosítása (metabolitvizsgálat, szennyezésprofil)
- Nagy molekulák azonosítása (proteomika)

Kis molekulák vizsgálata

136



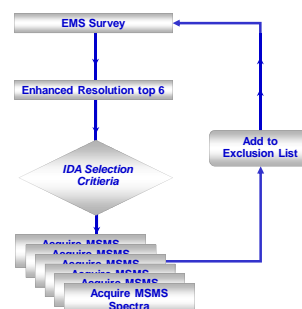
Információfüggő vizsgálat (IDA)

137

- Felhasználása:
 - minden olyan LC-MS mérésnél, ahol előre nem ismert komponensekről kell MSMS felvételeket készíteni, illetve limitált mennyiségű minta áll rendelkezésre (fehérjeazonosítás, metabolitvizsgálatok stb.)

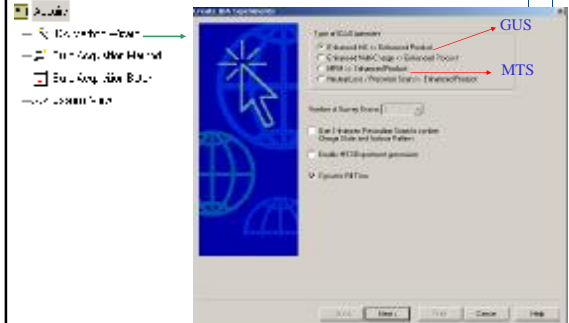
IDA folyamatábra

138



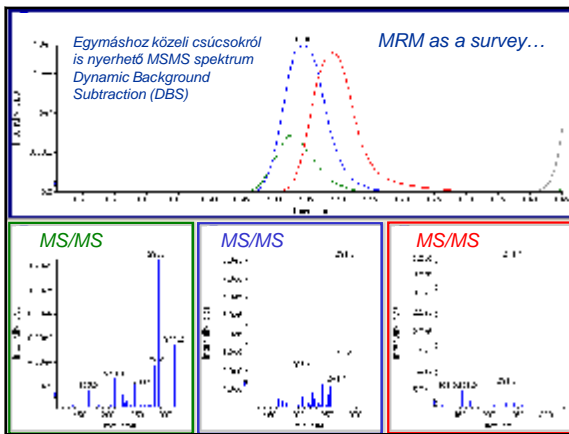
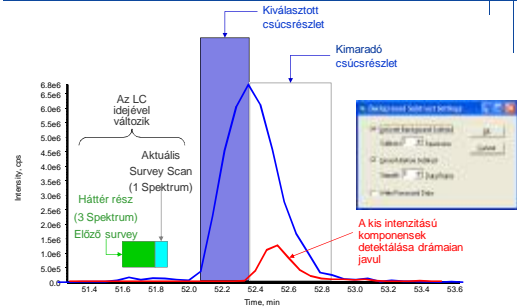
IDA varázsló

139



Dinamikus háttérkivonás (DBS)

140



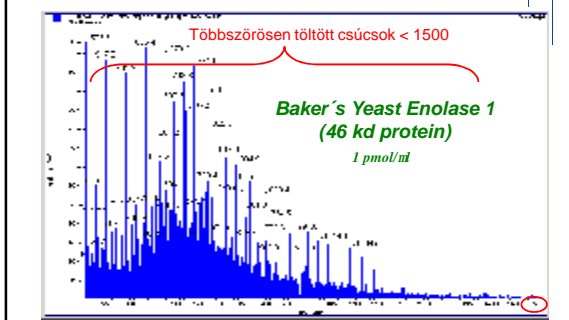
Fehérjevizsgálat

142

- Móltömeg meghatározása
- Szekvenálás

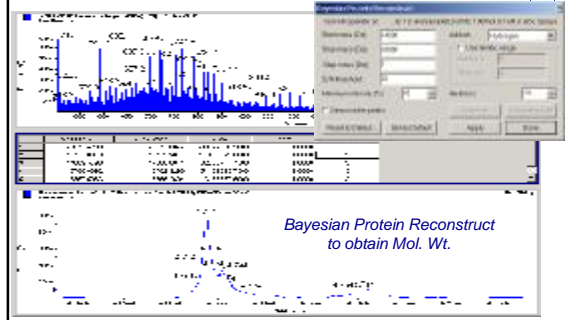
Intakt fehérje ESI spektruma

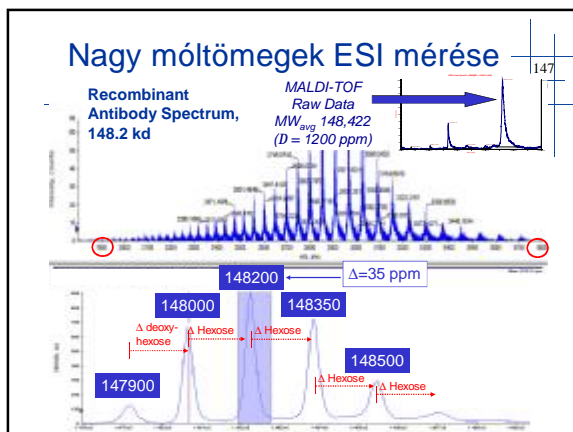
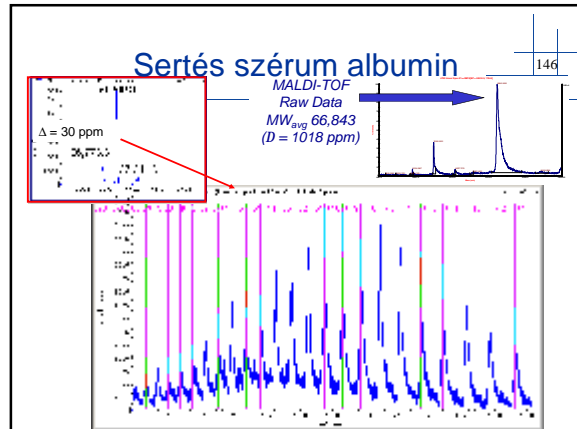
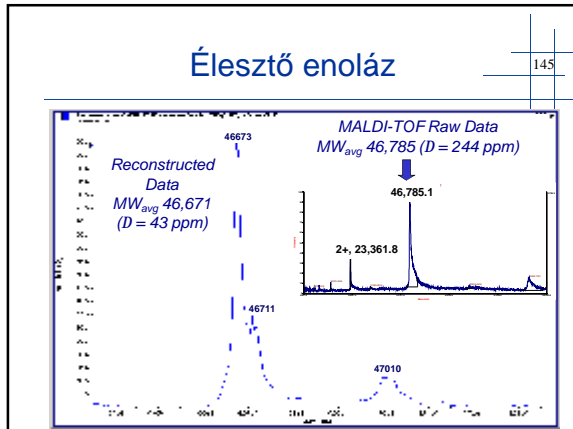
143



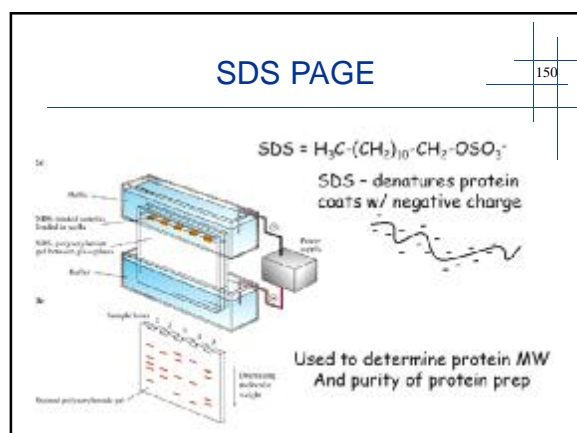
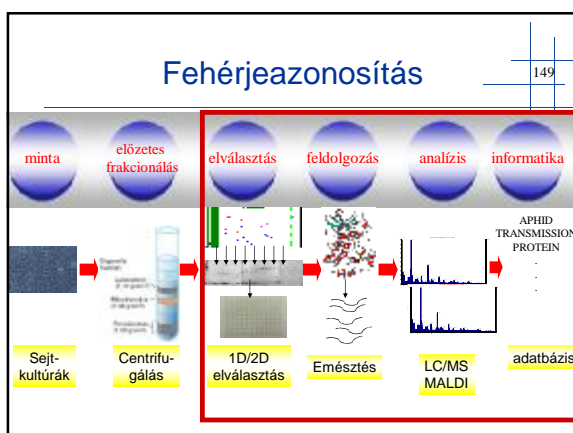
Élesztő enoláz

144



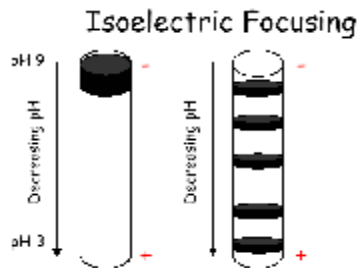


- ### Szekvenálás
- Intakt fehérje
 - Kémiai/enzimikus hasításnak vetjük alá
 - Az emésztés során jellegzetes tömegű peptid darabok képződnek
 - Ezek a tömegek jelentik az egyes fehérjék ujjlenyomatát, mivel más fehérjék hasonló körülmények közt emésztve kis valószínűséggel eredményeznek pont ugyanilyen tömegű peptideket.
- 148



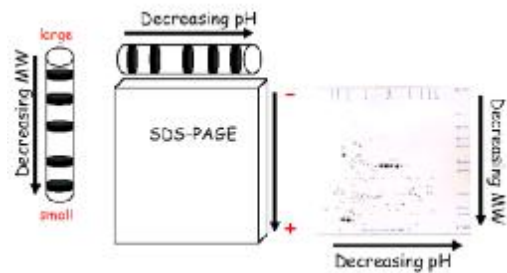
Izoelektromos fókuszálás

151



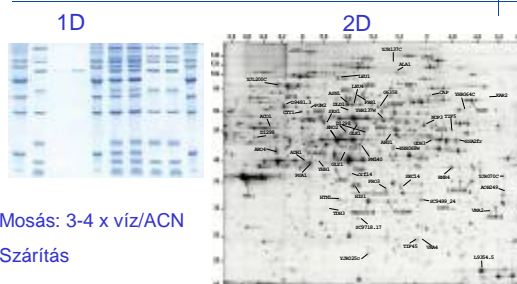
2D elektroforézis

152



1, Gélcsík/pötty kivágása, aprítása, mosása

153



2, Redukálás

154

- 10 mM DTT/0.1 M NH_4HCO_3 ; 30 perc 56 °C
- Centrifugálás
- ACN hozzáadás



3, Alkilálás

155

- 55 mM jódetamid/0.1 M NH_4HCO_3 ; 20 perc szobahőn, sötétben
- Reagens eltávolítása
- Mosás (150-200 μl 0.1 M NH_4HCO_3 15 perc)
- Mosás ACN, szárítás



4, Emésztés gélben

156

- Hidratálás: 50 mM NH_4HCO_3 , 5mM CaCl_2 , 12.5 ng/ μl tripszin 45 perc (a gél teljesen ellepje)
- Reagensfőlöszeg eltávolítása
- 5-25 μl tripszin nélküli pufferben 37 °C, éjszakára

Kémiai reagensek fehérjék hasítására

Tripszin: Lys, Arg C terminális

Termolizin: Leu, Ile, Val, Phe, Met, Ala N terminális

BrCN: Met C terminális

Új felületaktív anyag: RapiGest (Waters)

5, Extrakció

157

- 10-15 µl 25 mM NH₄HCO₃, 37 °C, 15 perc
- Centrifugálás
- ACN (1-2 géltérfogat), 37 °C, 15 perc
- Centrifugálás, felülúszó gyűjtése
- 40-50 µl 5% hangyasav, 37 °C, 15 perc
- Centrifugálás
- ACN (1-2 géltérfogat), 37 °C, 15 perc
- Centrifugálás, felülúszó gyűjtése
- Az extraktok bepárlása

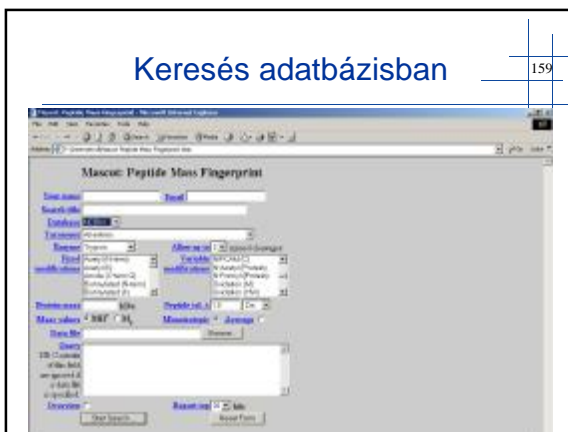
6, MS vizsgálat

158

- MALDI MS
- LC-MS(MS)

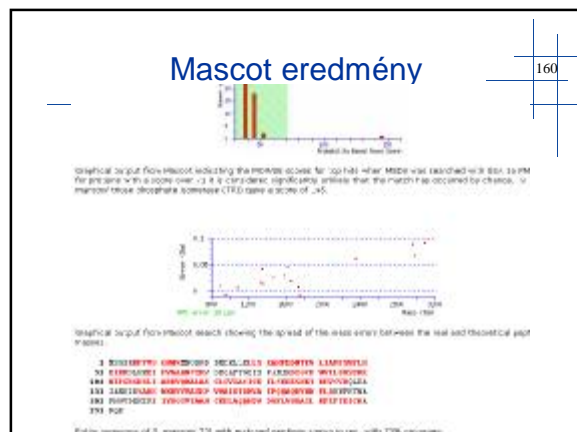
Keresés adatbázisban

159



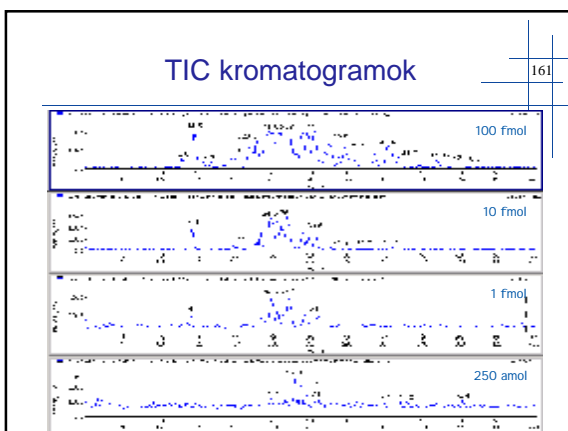
Mascot eredmény

160



TIC kromatogramok

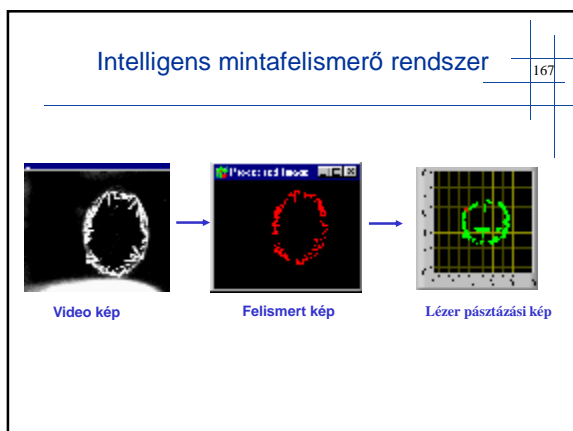
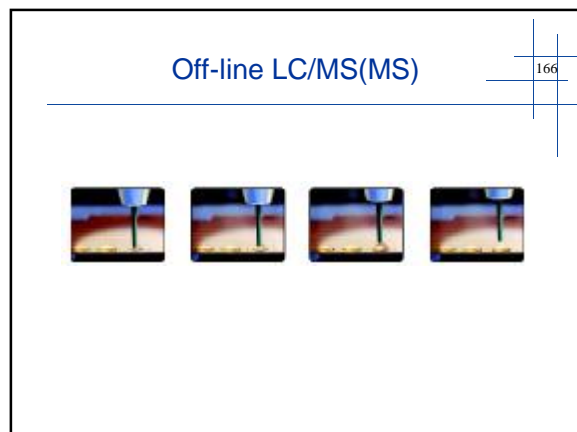
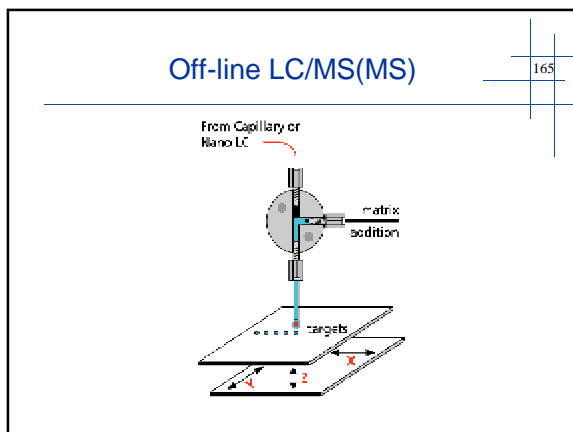
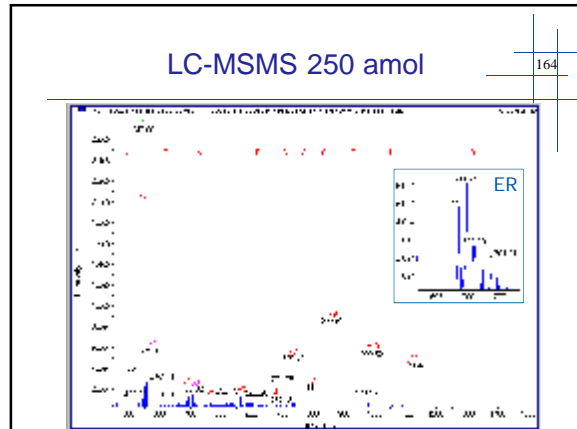
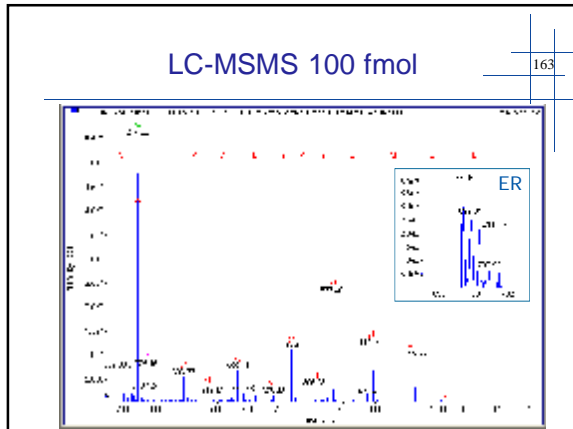
161



LC-MSMS eredmények

162

Protein ID	100 fmol		10 fmol		1 fmol		250 amol	
	Score	SC (%)	Score	SC (%)	Score	SC (%)	Score	SC (%)
Serotransferrin precursor	1880	63	1682	55	845	33	295	14
Bovine Serum Albumin	1570	66	1318	55	679	29	120	8
Lysozyme C	432	63	381	58	308	38	69	8
β-Galactosidase	820	22	441	12	133	1	-	-
Alcohol dehydrogenase	407	34	243	18	227	17	-	-
Cytochrome C	395	65	294	60	227	44	-	-

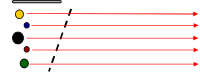


- ### Mennyiségi meghatározások
- 168
- Egyszeres kvadrupol
 - Full scan mód
 - Selected Ion Monitoring (SIM)
 - Hármás kvadrupol
 - Reakciócsatornák figyelése (MRM)
 - Nagyfelbontású MS

MS pásztázási módok

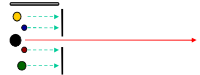
169

Q1 full scan



Minden iont figyel

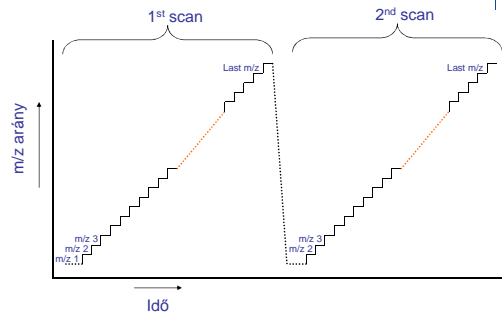
Selected Ion Monitoring (SIM)



Csak a kiválasztott ionokat figyel

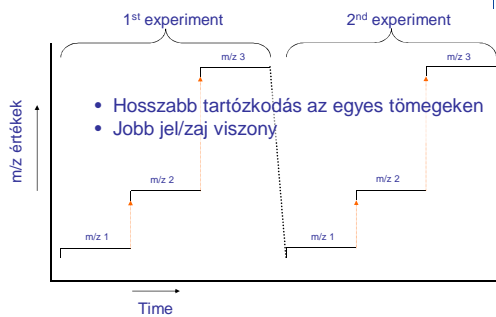
Q1 Full scan mód

170



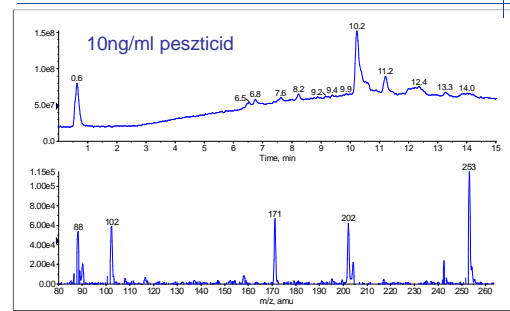
Q1 SIM mód

171



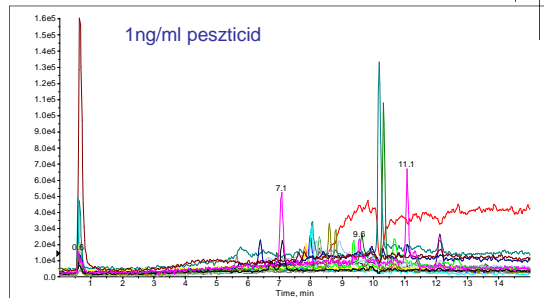
Single Quad Full Scan

172



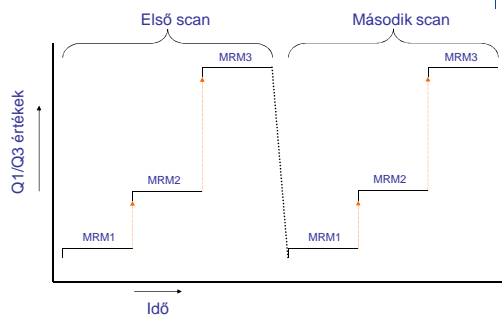
Single Quad SIM

173



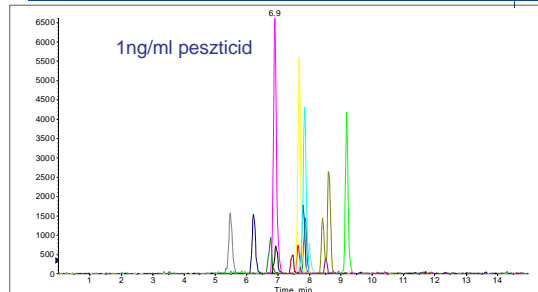
MRM mód

174



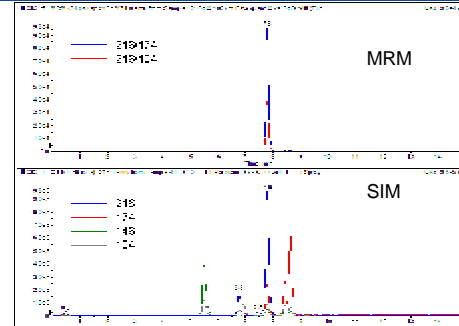
Triple Quad MRM

175



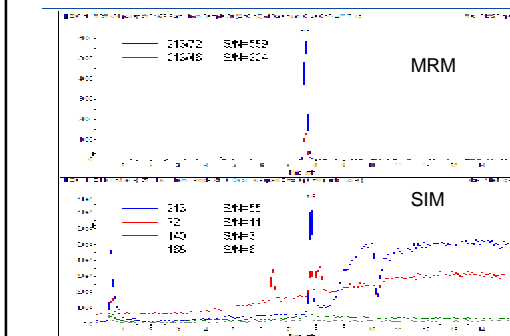
Szelektivitás: Atrazin 100µg/L

176



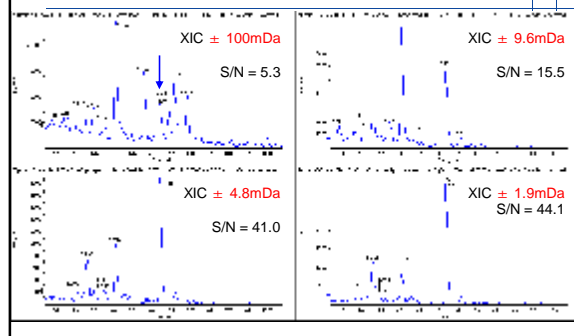
Érzékenység: Chlortoluron 10µg/L

177



Nagyfelbontás

178



Célmolekulák keresése

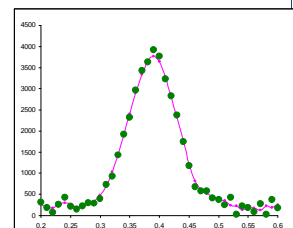
179

- 300 MRM (2MRM/komponens): 150 vegyület
- 300 MRM-en alapuló IDA mérés, mint Survey Scan amit 3 információfüggő EPI scan követ (3 különböző ütközési energián): 300 vegyület
- És ha több komponens van?

Egy csúcs jellemzése

180

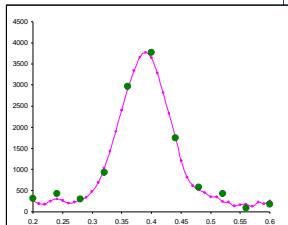
- A pontok számának csökkenésével a csúcs ábrázolása torzul
- S/N viszony nő a csúcshélesség csökkenésével
- A kvantitáláshoz minimálisan szükséges pontok száma: 6-20



Egy csúcs jellemzése

181

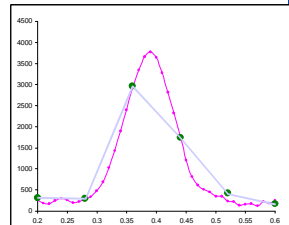
- A pontok számának csökkenésével a csúcs ábrázolása torzul
- S/N viszony nő a csúcshélesség csökkenésével
- A kvantitáláshoz minimálisan szükséges pontok száma: 6-20



Egy csúcs jellemzése

182

- A pontok számának csökkenésével a csúcs ábrázolása torzul
- S/N viszony nő a csúcshélesség csökkenésével
- A kvantitáláshoz minimálisan szükséges pontok száma: 6-20



MRM határai

183

- Tipikus csúcshélesség egy HPLC futás során ~ 21 sec
 - Minimálisan szükséges adatpontok száma ~10
 - Minimális dwell time / ion ~ 5msec
 - Minimális pause time az MRM átmenetek között ~ 2msec
- MRM átmenetek maximális száma:
 - = 21 sec/csúcs ÷ 10pont/csúcs ÷ 7 msec/pont = **300**

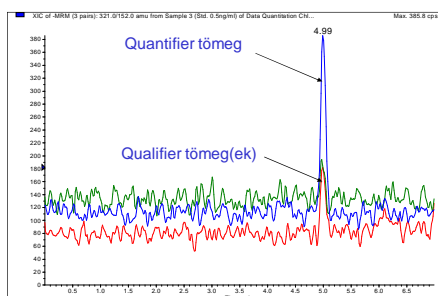
Ajánlás mennyiségi meghatározásokhoz

184

- Ajánlás 2002/657/EG
 - SIM és MRM (4 azonosítási pont)
 - MS anyaiion 1.0
 - MS² fragmens 1.5
 } **2 MRMs = 4 (megfelelő ionarány)**
 - Full scan spektrum (spektrumkönyvtár)
 - Nagyfelbontású MS (>10 000)

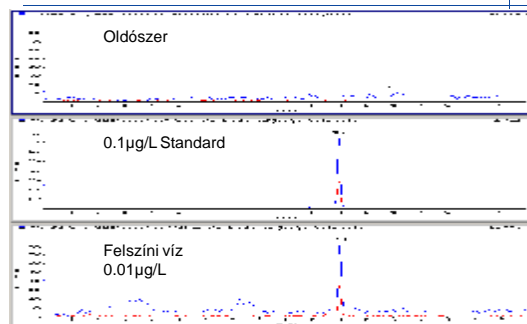
Célmolekulák MRM átmenetei

185



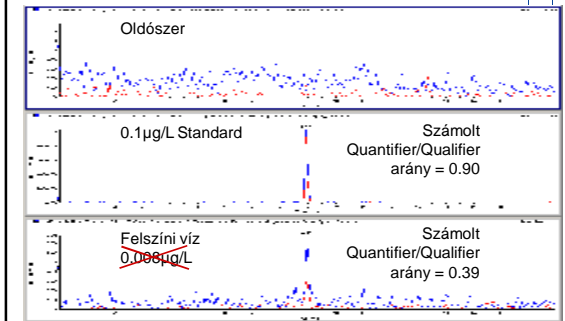
Metolachlor Pozitív találat

186



Metobromuron Negatív találat

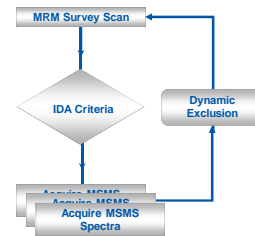
187



QTrap kínálta screening lehetőség

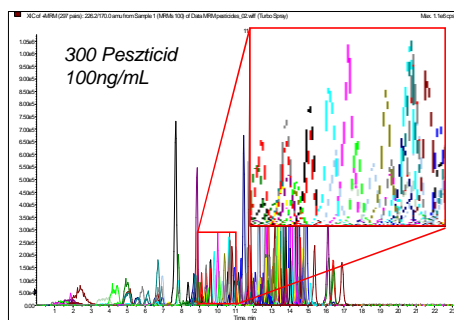
188

- Survey scan: 300 MRM
- IDA kritérium (küszöb...)
- 3 EPI spektrum
- Dinamikus kizárás 60 sec



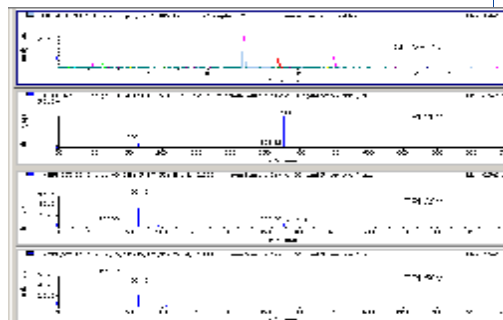
300 komponens egyidejű mérése

189



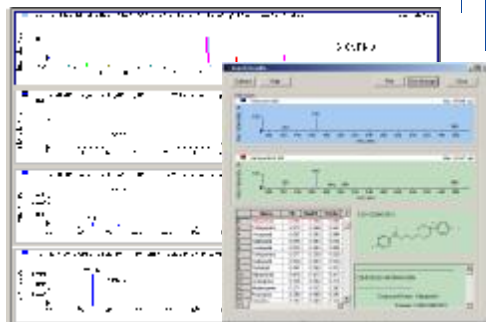
Multi-target screening

190



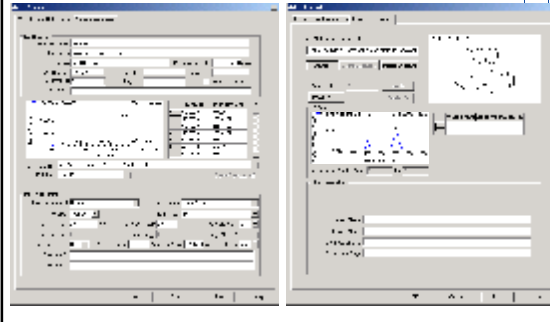
Multi-target screening

191



Spektrumkönyvtár

192

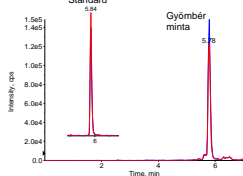


A QTRAP nyújtotta lehetőségek

193

Pozitív Tebufenpyrad találat gyömbérben

- mért koncentráció 0.29 mg/kg
- maximálisan megengedett érték = 0.05 mg/kg
- átlag MRM arány a standard esetében = 0.850 (RSD=8%, n=7)
- MRM arány a mintában = 0.909 **P**
- a standard Rt értéktartománya 5.84 - 5.87 perc (SD=0.01 perc, n=7)



- minta Rt = 5.78 perc **D**

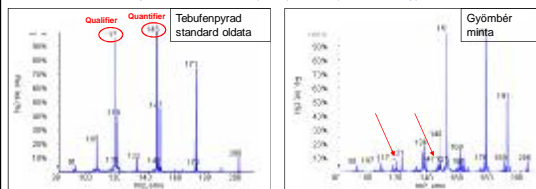
További vizsgálatokat igényelt, mivel gyömbérben még nem fordult elő!

A QTRAP nyújtotta lehetőségek

194

Pozitív Tebufenpyrad találat gyömbérben

- Enhanced Product Ion spektrumok az m/z=334 (M+H⁺) ionokon (API 4000 Qtrap)



Konklúzió: a kapott EPI spektrumok alapján a Tebufenpyrad jelenléte a gyömbérben egyértelműen kizárható!

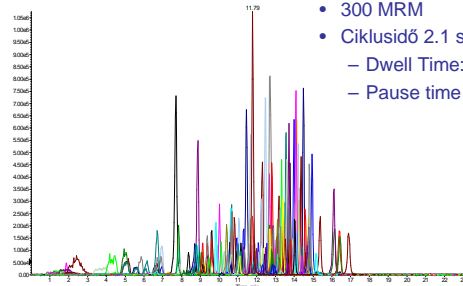
További lehetőségek

195

- Tovább növelni az egy injektálásból vizsgálható célmolekulák számát (1000-köri értékig): Scheduled-MRM

Tipikus Screening kromatogram

196



- 300 MRM
- Ciklusidő 2.1 sec
 - Dwell Time: 5msec
 - Pause time 2msec

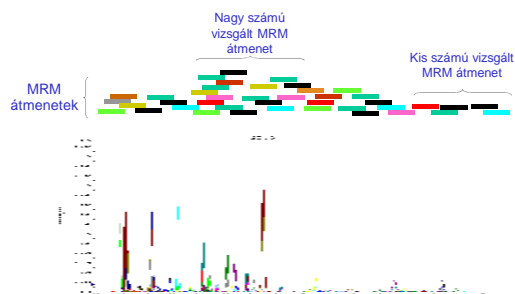
Scheduled-MRM

197

- Csak akkor figyel egy MRM csatornát, amikor ott ion várható
- Minden MRM csatorna esetén meg kell adni
 - Egy várt Rt.
 - Rt. ablak
 - Minimum dwell time
- A program automatikusan felépíti a metódust
 - Az idők alapján megtervezi az MRM átmeneteket
 - A minimális ciklusidőt VAGY dwell time-ot veszi alapul

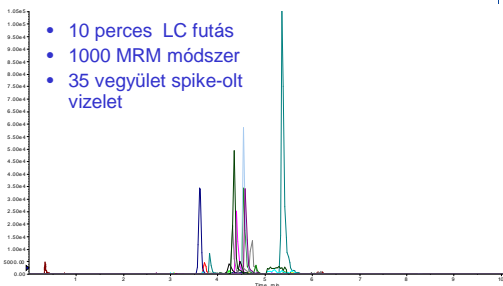
Scheduled-MRM: a koncepció

198



High throughput vizsgálat sMRM módszerrel

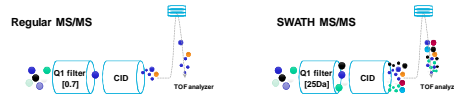
199



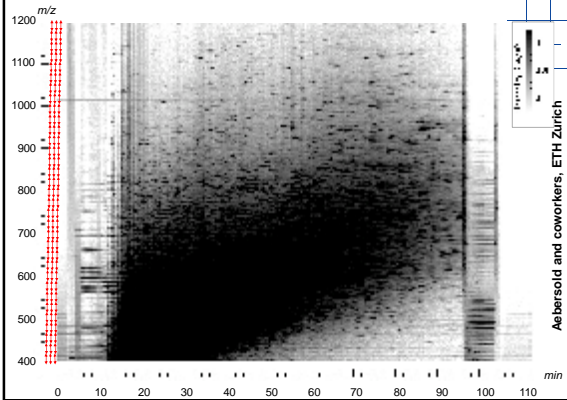
Nontargeted screening: SWATH™

200

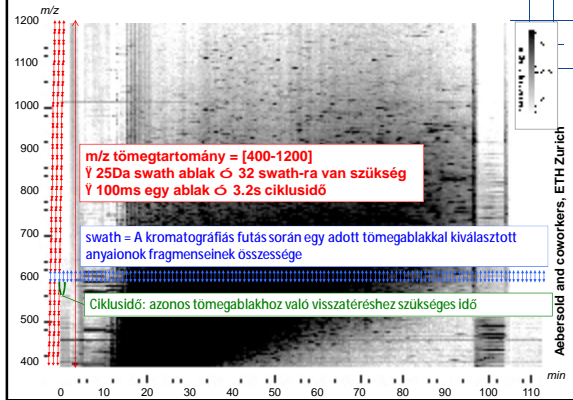
- „**S**equential **W**indowed **A**cquisition of all **T**heoretical mass spectra” lehetővé teszi MS/MS felvételek készítését általános és átfogó módon
 - A Q1 kvadrupólt szélesre nyitjuk és léptetjük a teljes tömegtartományban
 - Data Independent Acquisition (DIA), információtól **független** mérés
 - MS/MS^{ALL}



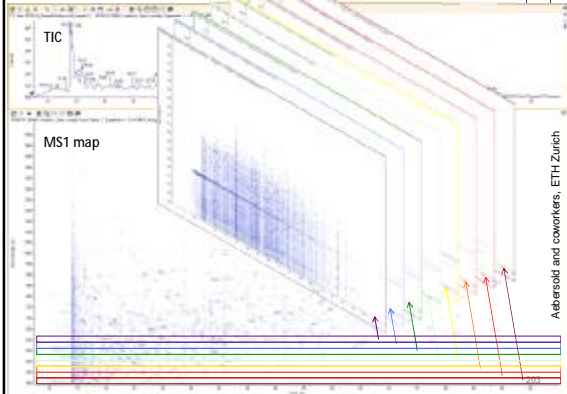
SWATH-MS Adatgyűjtés elmélete



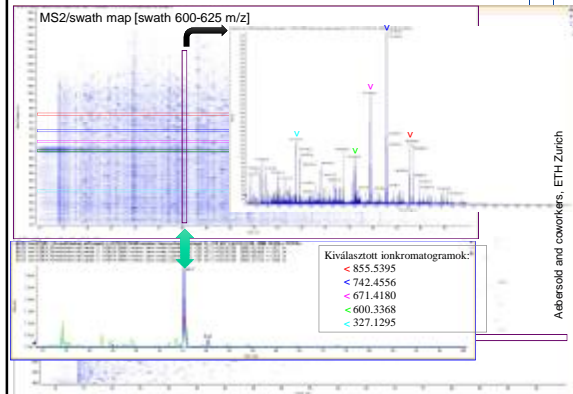
SWATH-MS Adatgyűjtés elmélete



SWATH-MS adatgyűjtés elmélete: Adatgyűjtés és értékelés



SWATH-MS adatgyűjtés elmélete: Adatgyűjtés és értékelés



SWATH előnyei

205

- általános és nem célzott
- nincs módszerfejlesztés!
- Az adatok utólagosan visszanyerhetők (mind MS, MS/MS és XIC)
- A mérési idő nem növekszik a mérendő komponensek számával
- A szelektivitása hasonló MRMHR -hez (a háttér általában magasabb)

Mennyiségi meghatározások

206

	Komp/inj	Érzékenység	Szelektivitás	Retrospektív
Q SIM	<100	-	-	Nem
QqQ MRM	150	+	+	Nem
QTrap MS ³	<100	++	++	Nem
QTrap MRM/EPI	300	+	++	Nem
QTrap sMRM	1000	+	+	Nem
TOF MS	Korlátlan	+	+	Igen
TOF MSMS	<1000	+	++	Nem
TOF MSMS SWATH	Korlátlan	+	++	Igen

Terápiában használt gyógyszerek

207

- Analeptikumok
- Antiarrhythmikumok
- Antibiotikumok
- Antidepresszánsok
- Antiepileptikumok
- Antikoagulánsok
- Antimycotikumok
- Antiretrovirális szerek
- Analgetikumok
- Bronchustágítók
- **Immunszuppresszánsok**
- Narkotikumok
- Cytosztatikumok

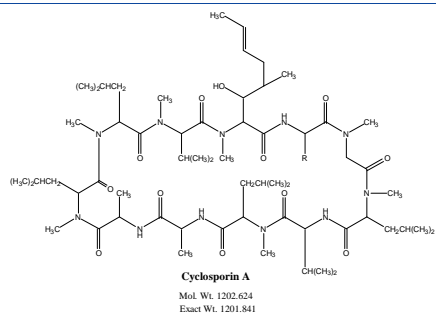
Immunszuppresszánsok

208

- Ciklosporin A
- Rapamycin (Sirolimus)
- Tacrolimus
- Everolimus

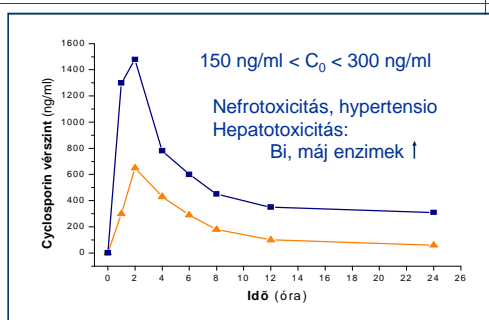
Immunszuppresszánsok

209



Ciklosporin toxicitás

210



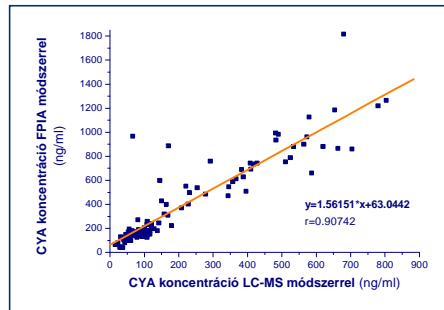
CSA vérszint meghatározás

211

- Immunoassay
 - FPIA: fluorescence polarization immunoassay
 - EMIT: enzyme multiplied immunoassay technique
- HPLC-MS/MS

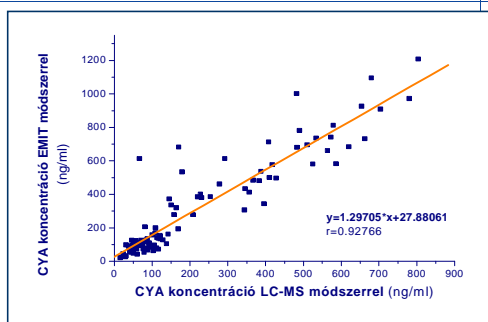
FPIA vs. LCMS

212



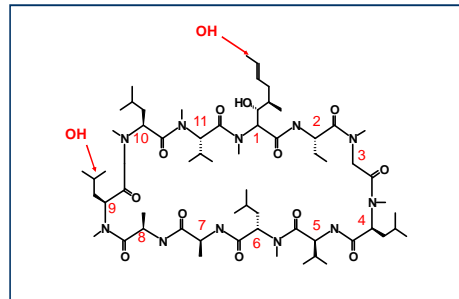
EMIT vs. LCMS

213



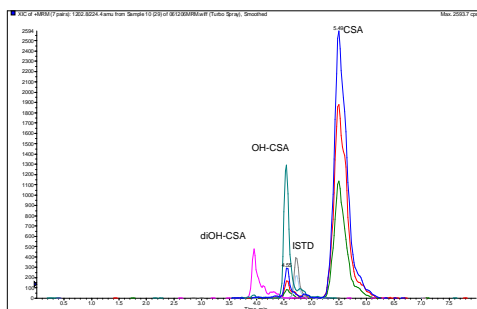
Ciklosporin metabolizmusa: CYP3A4

214



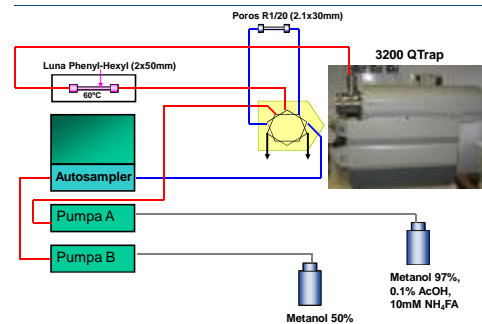
CSA metabolitjai MRM

215



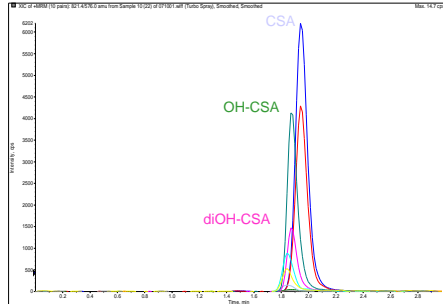
2D LCMS

216



2D LC/MS/MS

217



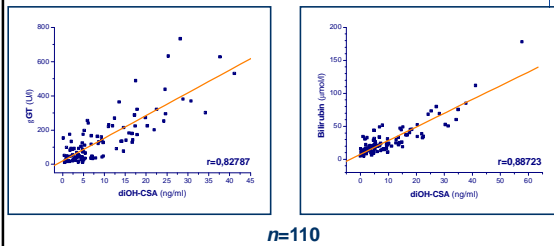
Metabolizmus következménye

218

- Immunszuppresszív hatás csökken
- Metabolitok toxicitása hozzájárulhat az anyavegyület toxicitásához

diOH-ciklosporin vs GGT /se Bi

219

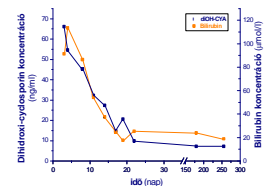
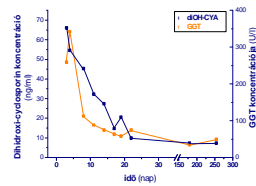


n=110

Dihidroxi-ciklosporin vérszint I.

220

Recipiens: KI 2007.01.03
45 éves férfi
HCV

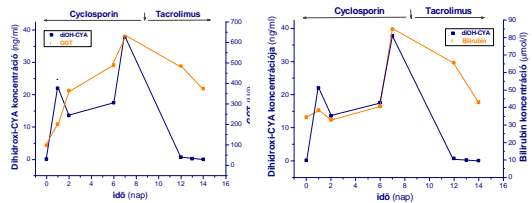


Dihidroxi-ciklosporin vérszint II.

221

Recipiens: FNGy 2007.09.05
52 éves férfi
HBV

Donor: 52 éves nő
CYP3A4 aktivitás magas!!



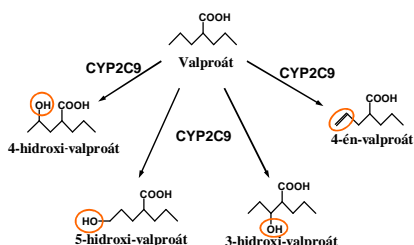
Egyéni terápia megvalósítása

222

- Genotipizálás
- Fenotipizálás

Valproát metabolizmusa

223



Genetikai polimorfizmusa

224

CYP allél	Mutáció	Enzim aktivitás
CYP2C9*2	430C>T	csökkent
CYP2C9*3	1075A>C	csökkent

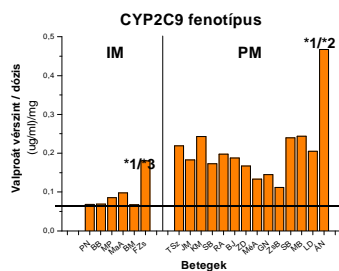
Esetismertetés

225

- 1,5 hónapos koraszülött csecsemő (S.H.)
- epilepsia focalis → valproát kezelés
- toxikus tünetek: leállították a valproát kezelést
- CYP status:
 - **CYP2C9*3/*3 valproát kezelés tilos!!**
- még 5 nappal a valproát kezelés beszüntetése után is magas valproát vérszint
- karbamazepinre váltottak: a beteg állapota normalizálódott

Valproát vérszintek alakulása a CYP2C9-státus függvényében

226



Valproát kezelés a CYP2C9-státus ismeretében

227

- CYP2C9 genotípus és fenotípus együttes figyelembe vétele:
 - CYP2C9 homozigóta mutáns: *2/*2 vagy *3/*3
nem javasolt a valproát alkalmazása
 - CYP2C9 heterozigóta: *1/*2 vagy *1/*3
alacsony dózis javasolt még CYP2C9 IM esetén is
 - CYP2C9 homozigóta vad: *1/*1
a CYP2C9 fenotípus irányadó:
 - CYP2C9 **PM**: alacsony dózis javasolt
 - CYP2C9 **IM**: normál dózis alkalmazható