

# Tömegspektrometria

Szabó Pál

MTA Természettudományi Kutatóközpont

*(szabo.pal@ttk.mta.hu)*

## 1910

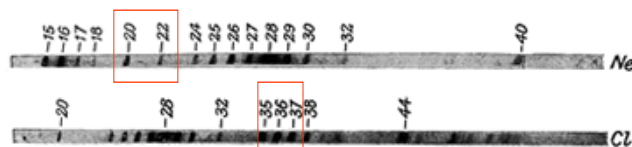
- **Wanger Vilmos**

- Diósgyőr-Vasgyári Testgyakorlók Köre



- **J. J. Thomson, 1910**

- Kisülési csőbe különböző gázokat vezetett
- $^{20}\text{Ne}/^{22}\text{Ne}$  Izotópok létezésének bizonyítéka



## Kezdetek

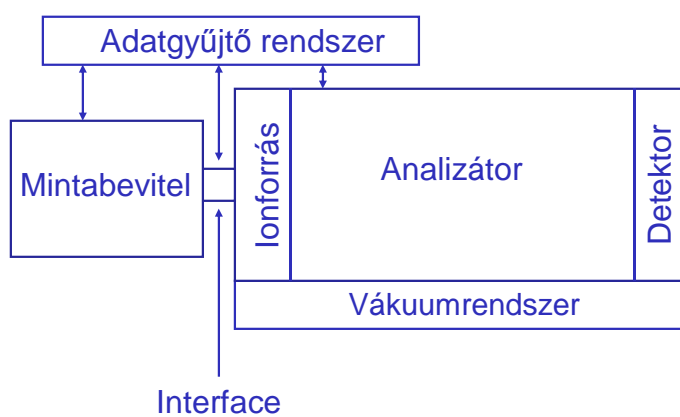
3

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



## Az MS felépítése

4



# Ionforrás

5

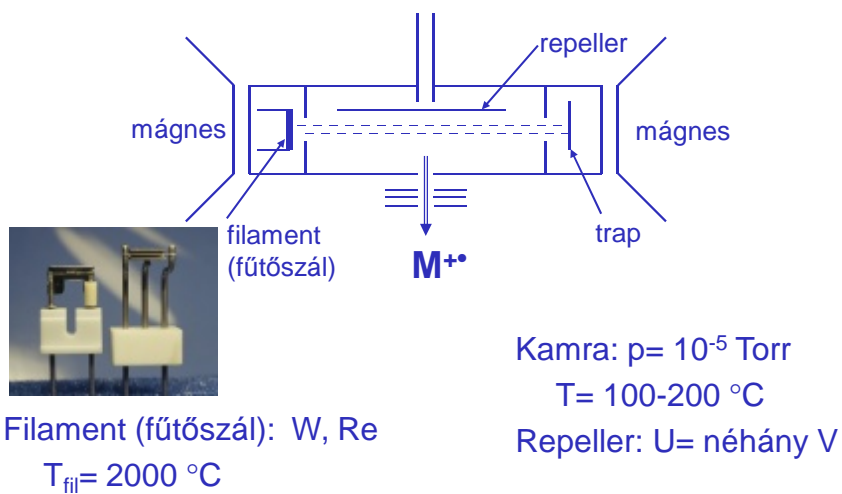
## Cél: Töltött részecskék előállítása

Ionizációs módok:

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

# Elektron ionizáció

6



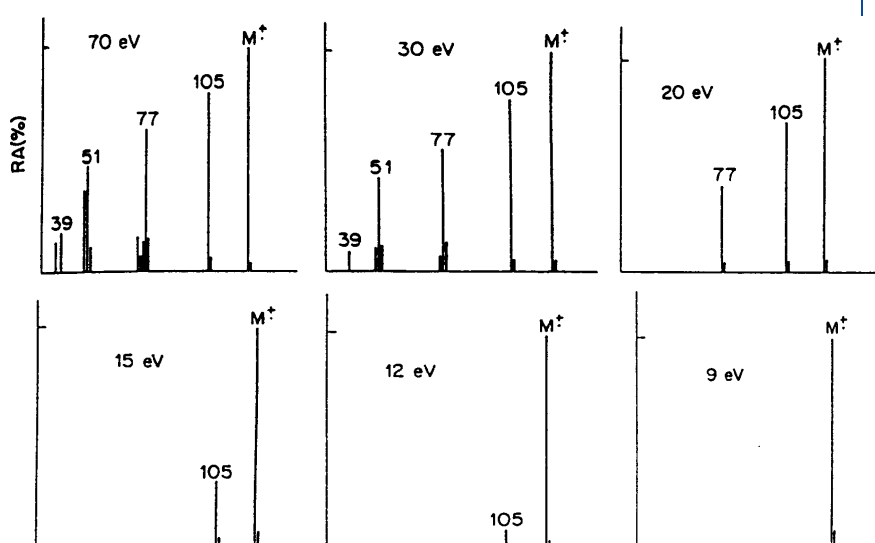
## Elektronionizáció

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

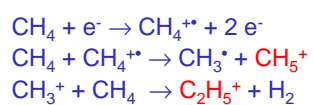
- **CI forrás:** az EI forrásnál zártabb
- **Reagens gáz:** metán, izobután, ammónia
- **Nyomás:**  $\approx 0.1$  Torr (EI  $\approx 10^{-6}$  Torr)
- **Minta parciális nyomása:**  $\approx 10^{-4}$  Torr
- **Lágy ionizáció**
- **Fragmentáció:** elhanyagolható
- **Kvázi-molekulaion**

## Kémiai ionizáció

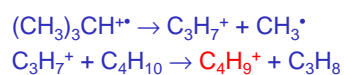
10

### Ion-molekula reakciók:

*Metán:*



*Izobután:*



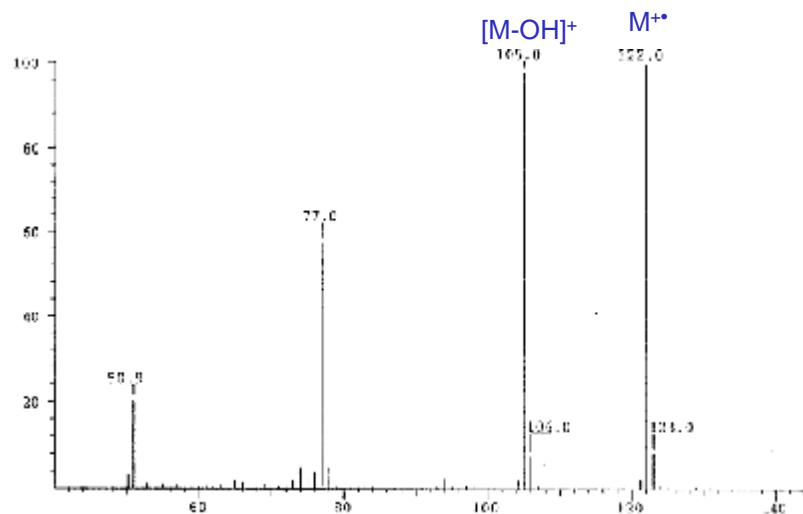
## CI reagens gázok

11

- Metán:**
- szerves vegyületekre általánosan jó
  - $[M+H]^+$   $[M+C_2H_5]^+$  ionokat ad
  - az adduktok intenzitása kicsi
- Izobután:**
- enyhe fragmentáció figyelhető meg
  - $[M+H]^+$   $[M+C_4H_9]^+$  ionokat ad
  - az adduktok intenzitása nagy
  - nem olyan univerzális, mint a metán
- Ammónia:**
- fragmentáció nincs
  - bázikus molekuláknál  $[M+H]^+$  iont ad
  - poláris vegyületeknél  $[M+NH_4]^+$  iont ad
  - egyéb vegyületekre nem jó

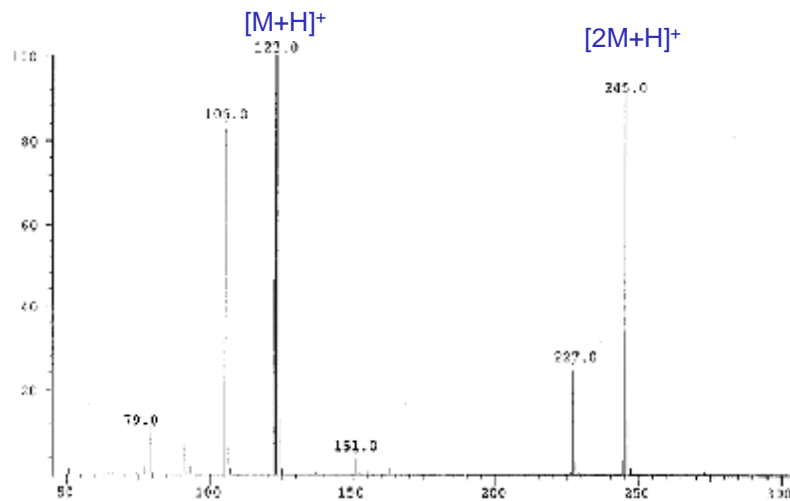
## Tipikus EI spektrum

12



## Tipikus CI spektrum

13



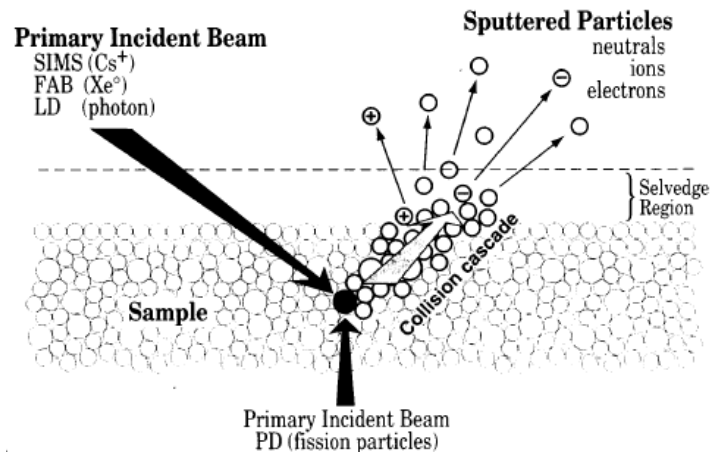
## Gyors atom bombázás

14

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

# Gyors atom bombázás

15

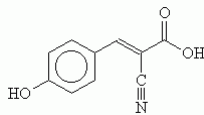


# Lézerdeszorpció

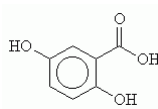
16

## Matrix Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight Mass Spectrometry

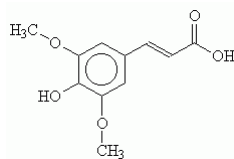
### Leggyakoribb mátrixok:



4-hidroxi-a-ciano fahéjsav  
(CHCA)



2,5-dihidroxi benzoésav  
(DHB)



3,5-dimetoxi-4-hidroxi fahéjsav (SA)

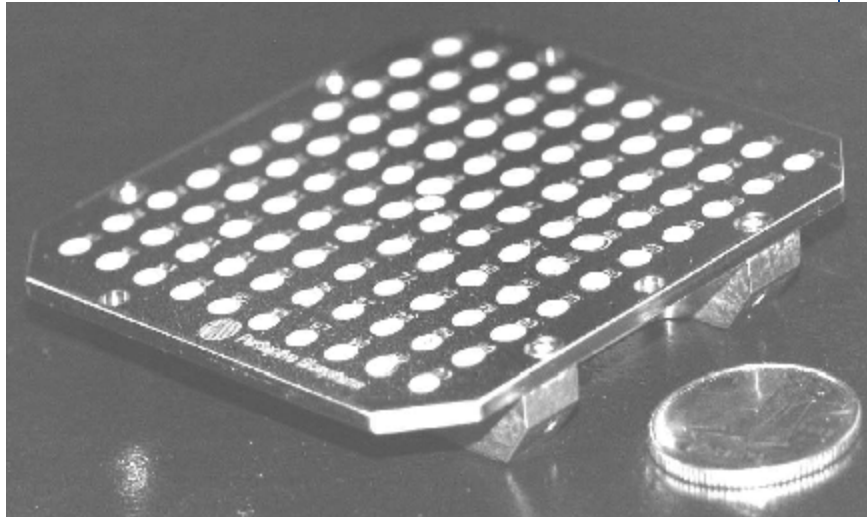


Mátrix-minta kristályok a targeten



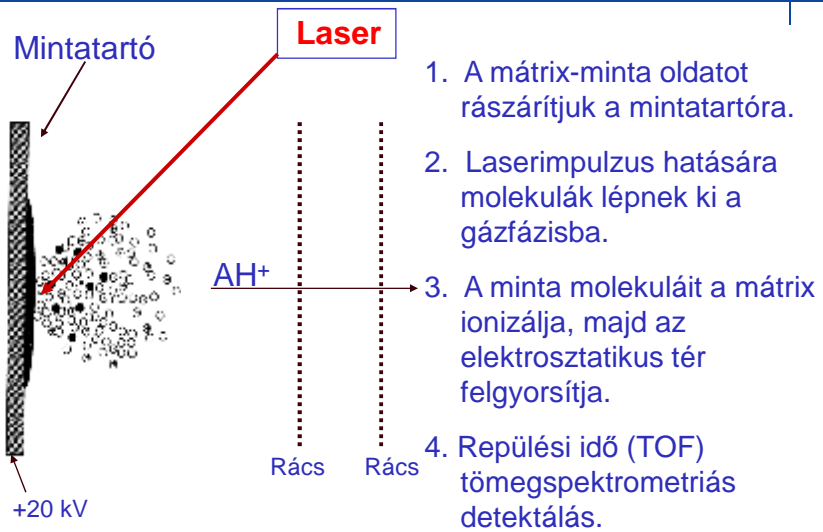
## Mintatartó

17



## MALDI ionképződés

18



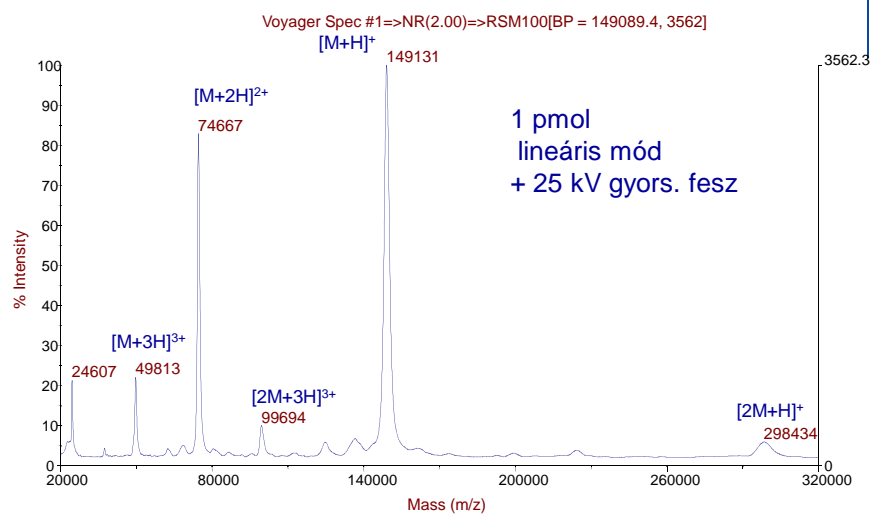
## A MALDI előnyei

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

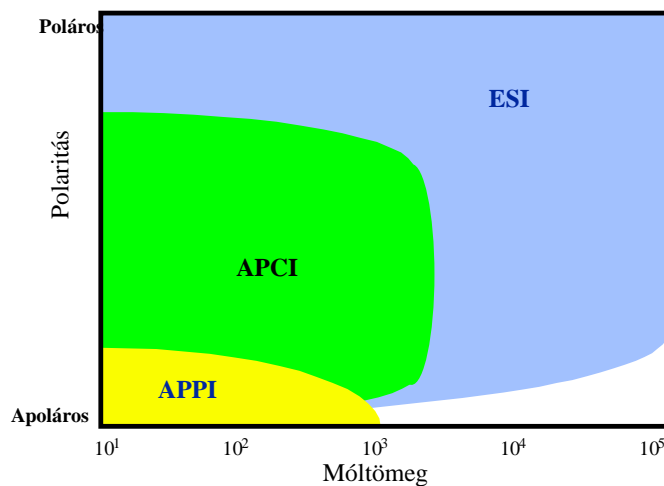
## Tipikus MALDI spektrum

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:**

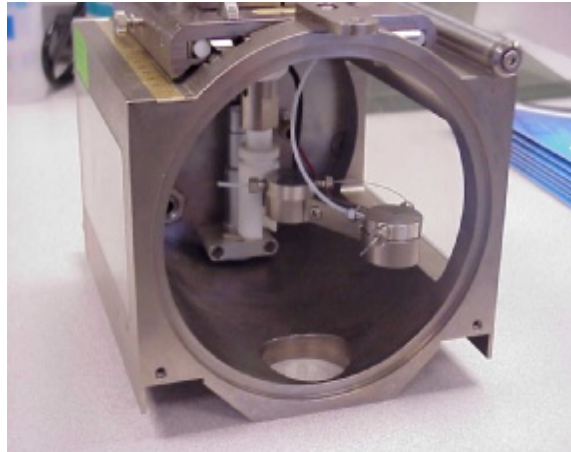
- **TurboV** (2 $\mu$ L/min—3mL/min)
- **Turbo-IonSpray** (2 $\mu$ L/min—1mL/min)
- **IonSpray** (2 to 200 $\mu$ L/min)
- **Micro-IonSpray** (50 to 1000 nL/min)
- **NanoSpray** (~1 $\mu$ L-5 $\mu$ l in tip, 20-50 nL/min)

**Kis áramlás ® nagyobb érzékenység!**

## IonSpray™

23

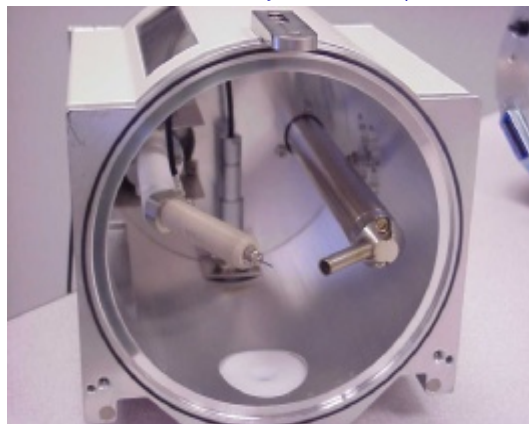
Áramlási tartomány: 2 – 200  $\mu$  L/min



## TurbolonSpray™

24

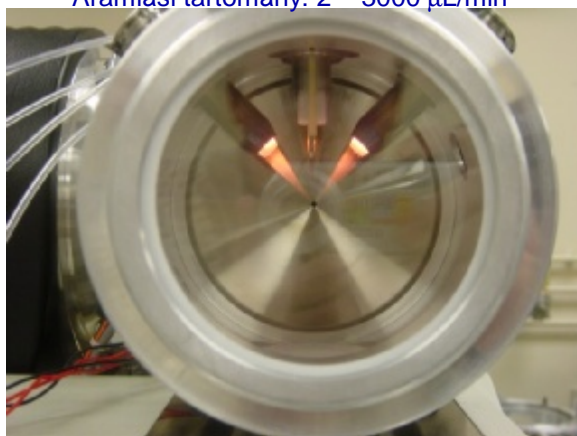
Áramlási tartomány: 2 – 1000  $\mu$  L/min



## Turbo V<sup>TM</sup>

25

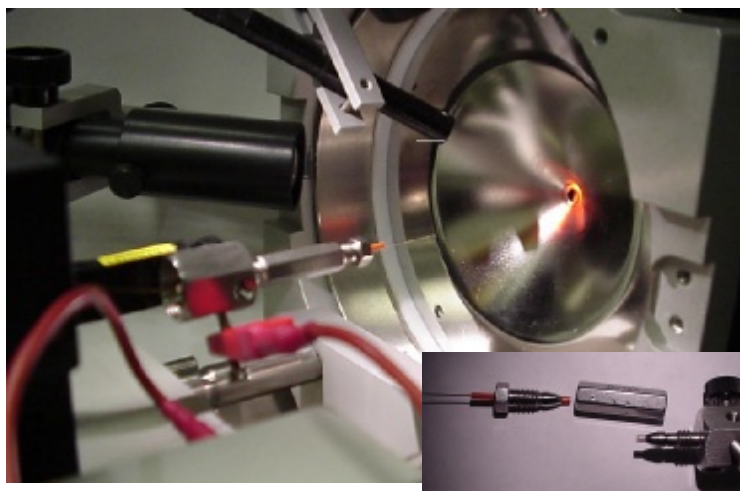
Áramlási tartomány: 2 – 3000  $\mu\text{L}/\text{min}$



## Microelectrospray

26

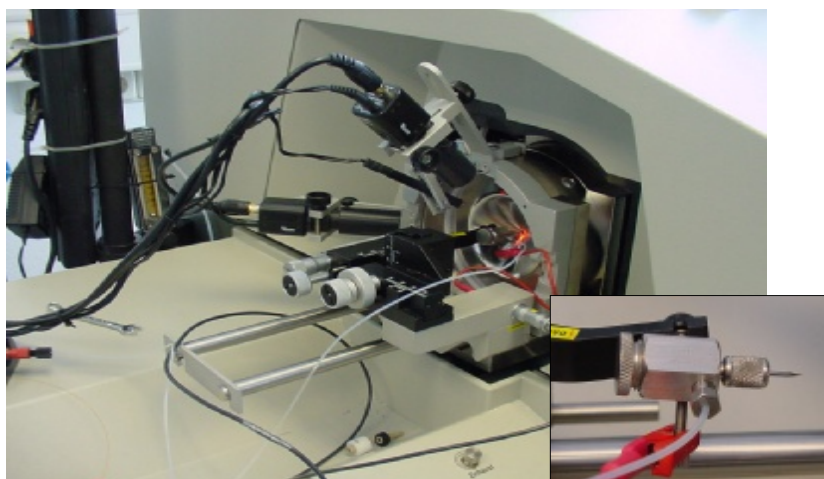
Áramlási tartomány: 50 – 1000 nL/min



# Nanospray

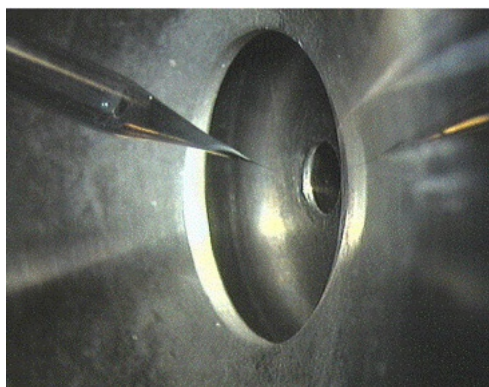
27

Áramlási tartomány: 20 – 50 nL/min



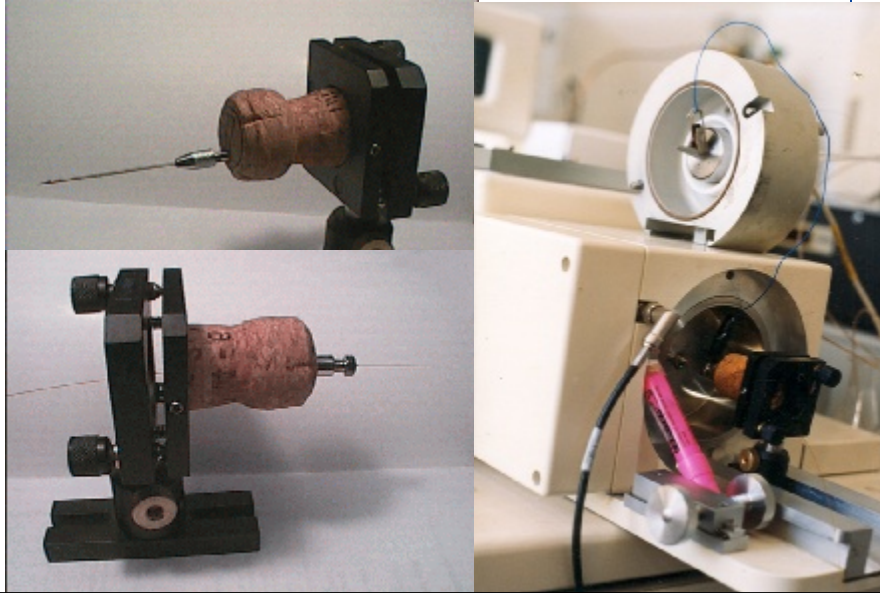
# Nanospray

28



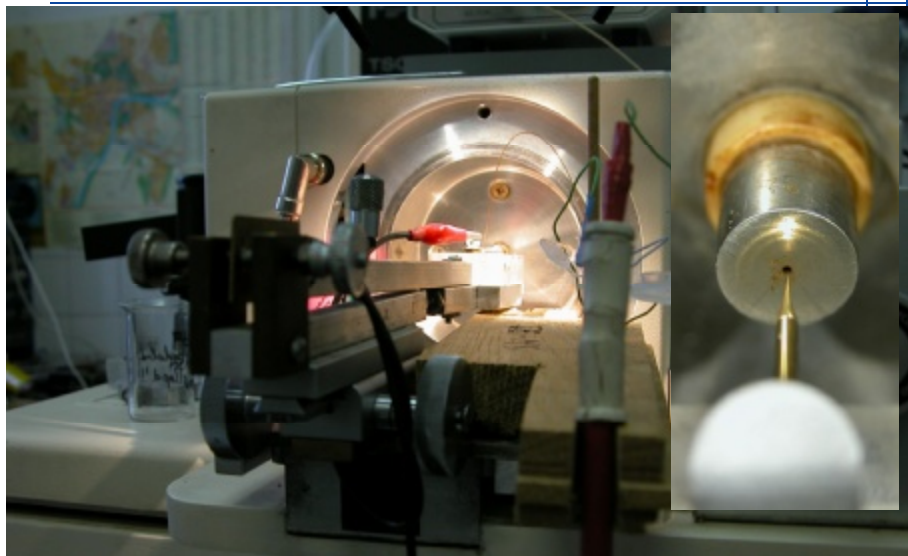
## Microtechnikák másként

29



## Második generáció

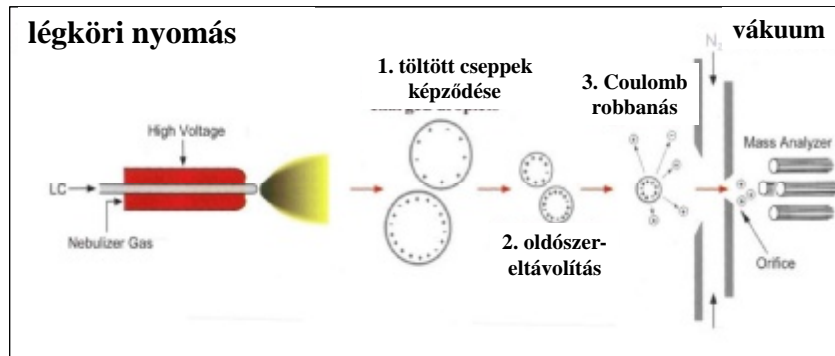
30





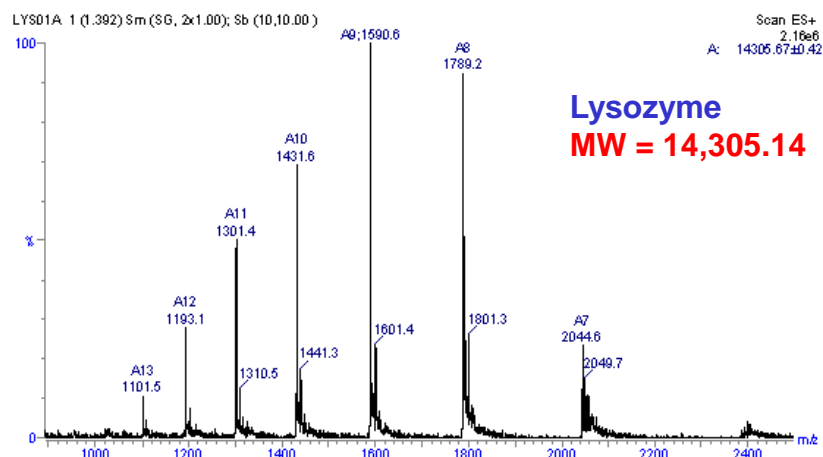
# Sprayképződés

31



# Többszörösen töltött ionok

32



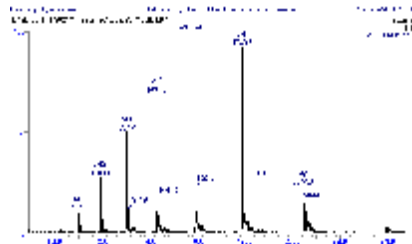


## Móltömegszámítás

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

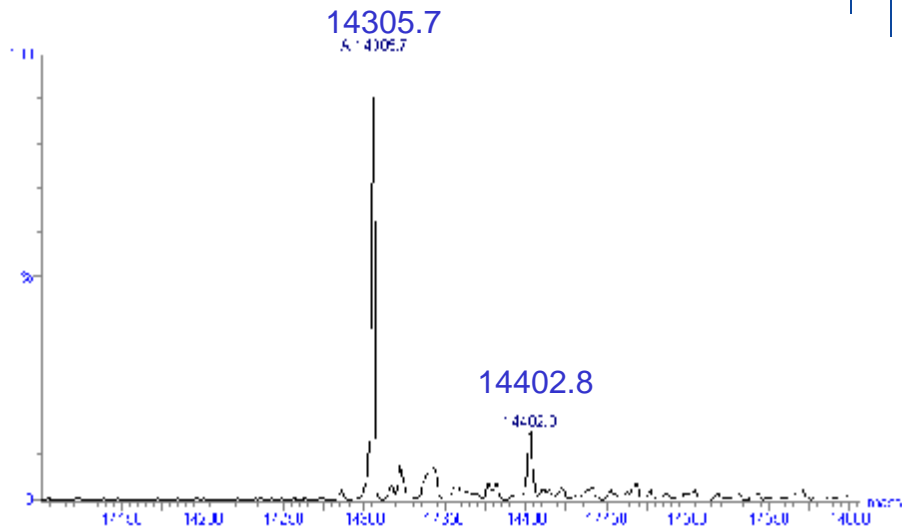
$$n = 1300.4/130.2 = 10$$

majd behelyettesítve a móltömeg:

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

## Rekonstruált tömegspektrum

35



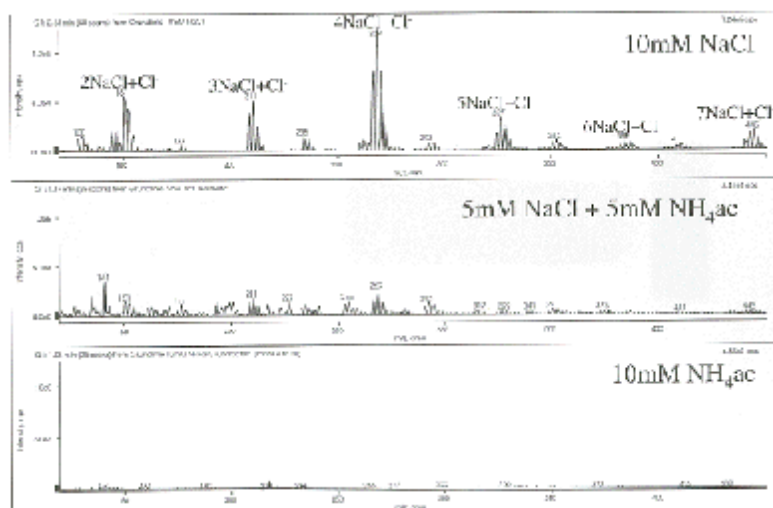
## Eluensmódosítók

36

- Szerves savak (hangyasav, ecetsav) elősegítik a bázikus vegyületek ( $sp^3$  N- tartalmú) protonálódását.
- Semleges együletek kationok (alkálifém, ammónium) segítségével is képezhetnek ionokat.
- 0.1 % hangyasav vagy ecetsav a legjobb adalék pozitív módban peptidek, fehérjék vizsgálatára, a 0.1% TFA HPLC-MS méréseknél kedvelt.
- Ammónium-formiát vagy-acetát javasolt puffernek 2-10 mM koncentrációban.
- Foszfátpuffer, TEA kerülendő!!!

## Sóhatás

37



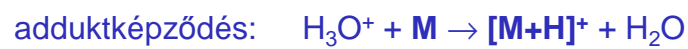
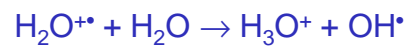
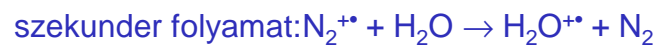
## APCI

38

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

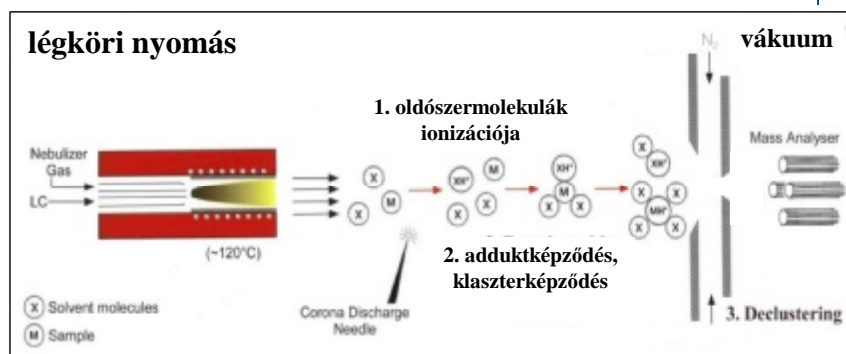
## Ionképzés mechanizmusa

39



## APCI ionképződés

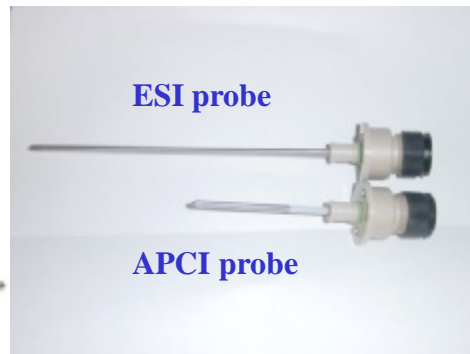
40



## Kombinált forrás

41

**Forrásház**



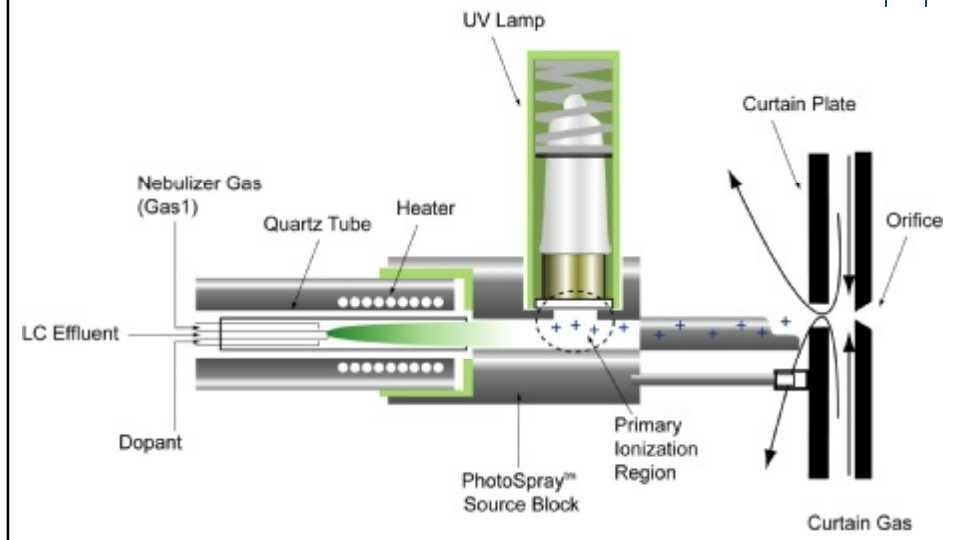
## Légköri nyomású fotoionizáció

42

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

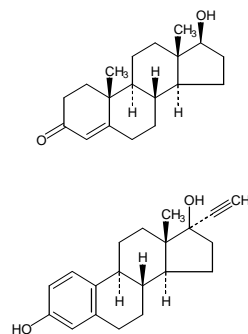
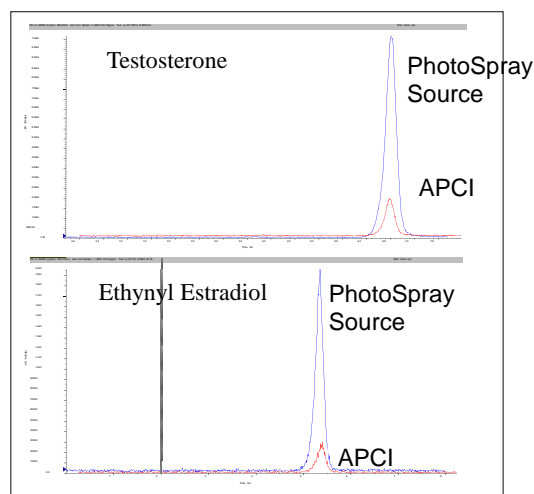
# Photospray forrás

43



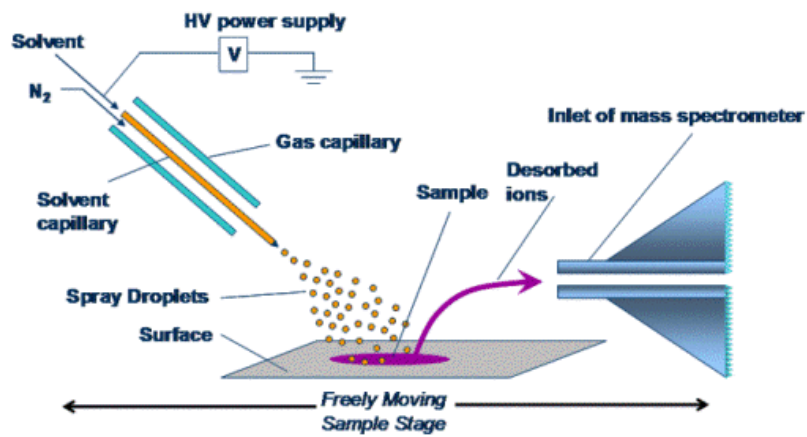
# PSI alkalmazás

44



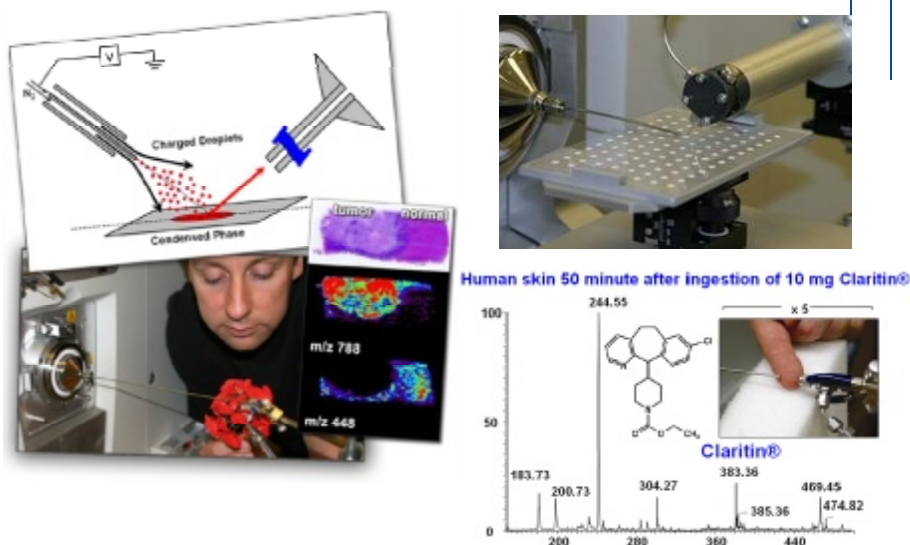
# Deszorpciós Electrospray

45



# DESI alkalmazások

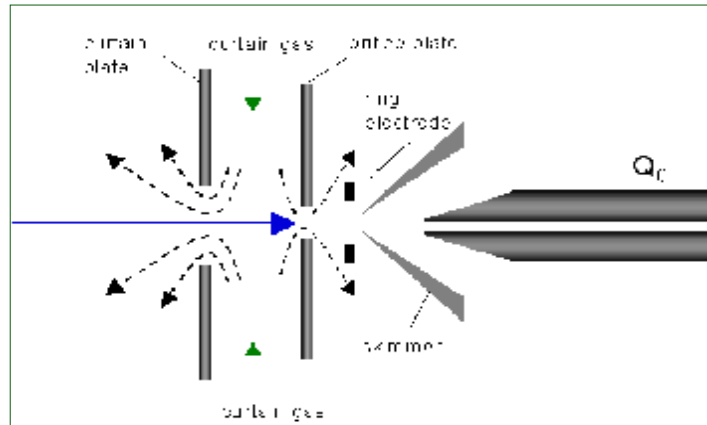
46



# Oldószereltávolítás

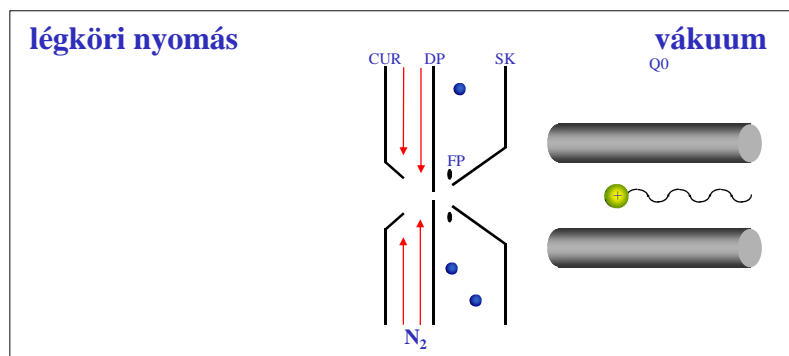
47

## Nitrogén gázfüggöny



## Gázfüggöny interface

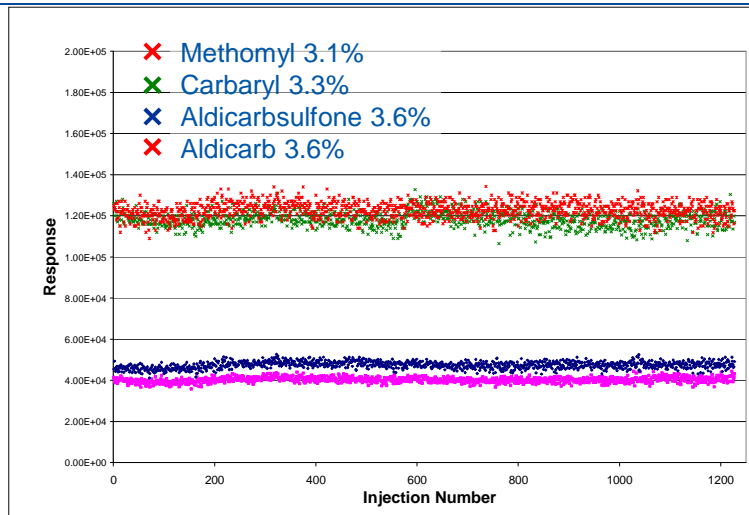
48





## Robusztusság

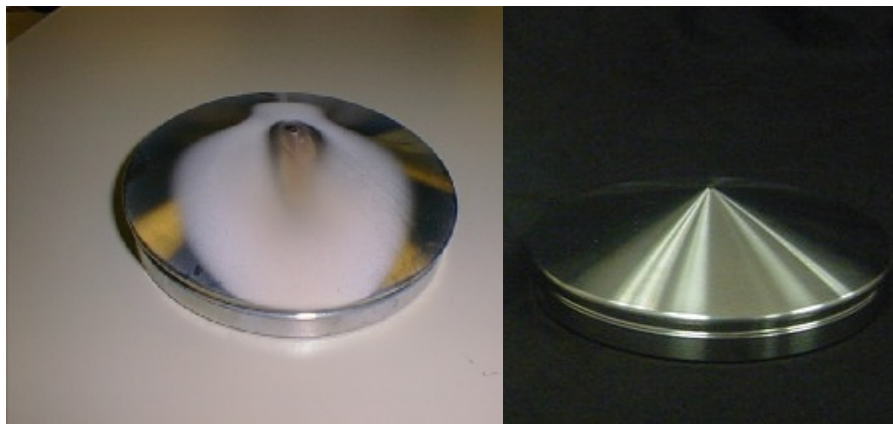
49



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

## Karbantartás

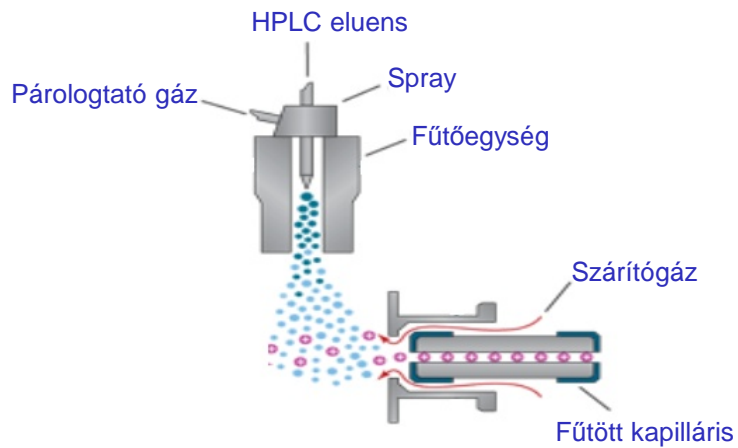
50



## 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.  $\Rightarrow$

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

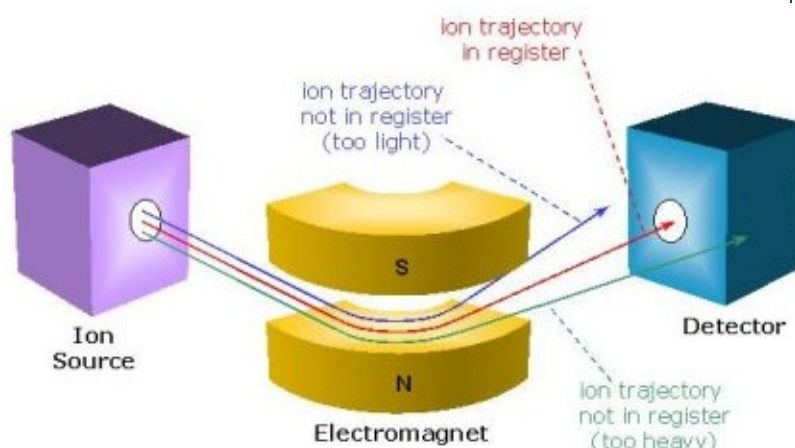
Tömegspektrometria alapegyenlete

### Pásztázás (scan) :

- mágnesáram
- gyorsító feszültség

## Mágneses analizátor

54



# Elektrosztatikus analizátor

55

Szektormező



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

2.  $mv^2/R = eE$

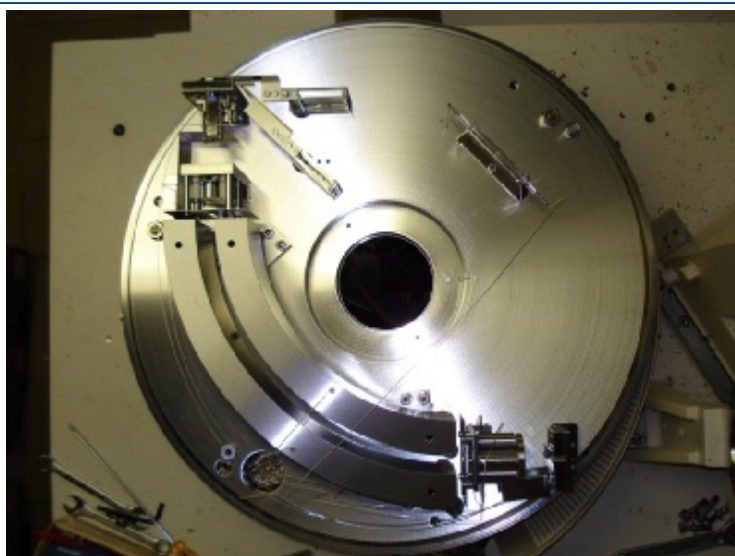
1. + 2.  $\cancel{v^2}$

$$R = 2U / E$$

Független a tömegtől!!!

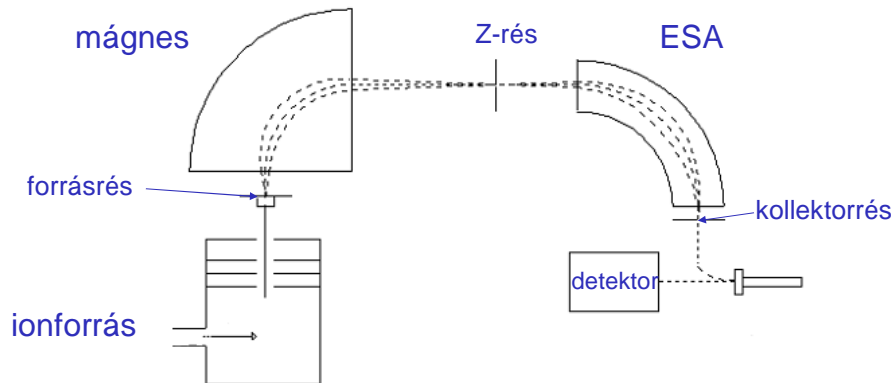
# ESA

56



## Kettős fókuszlás

57



## Kettős fókuszlás

58

**Cél:** a mágnés és az ESA kölcsönös hiányosságainak kiküszöbölése

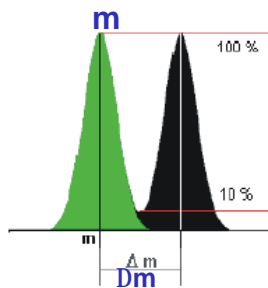
- A forrásból kilépő ionok sebesség- és irányszóródást szenvednek
- **Mágnés:** impulzus szerint szeparál. Azonos tömeg, különböző energia  $\Rightarrow$  kiszélesedik a csúcs
- **Rések:** érzékenység csökken
- **Nagyfelbontás!!**

# Felbontás

59

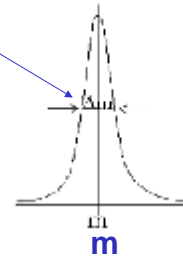
$$\text{Felbontás: } R = \frac{m}{\Delta m}$$

10 % völgy



Full Width at Half Mass

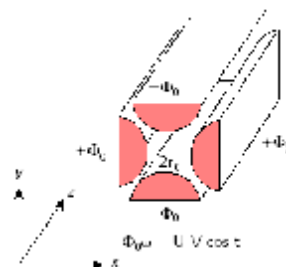
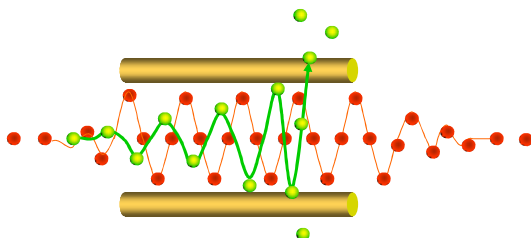
$\Delta m$  (50% magasságnál)



# Kvadrupol analizátor

60

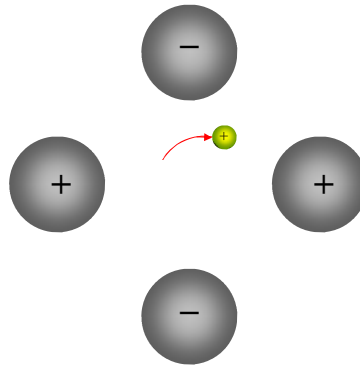
- Felbontás: egységnyi
- A rendszer méréshatára: néhány ezer



- DC = 0 - ± 500 V
- RF = 6000 V

## Kvadrupol analizátor

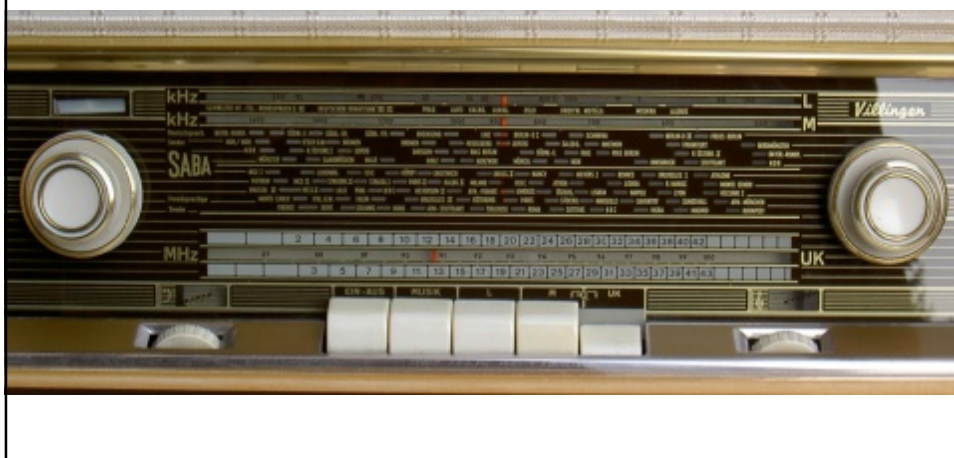
61



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

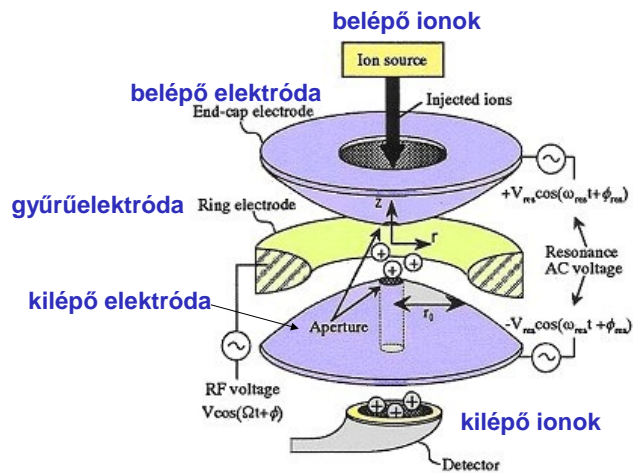
## Kvadrupol analizátor

62



## Ioncsapda analizátor

63



**Előny: érzékenység, kis méret, MS<sup>n</sup>**

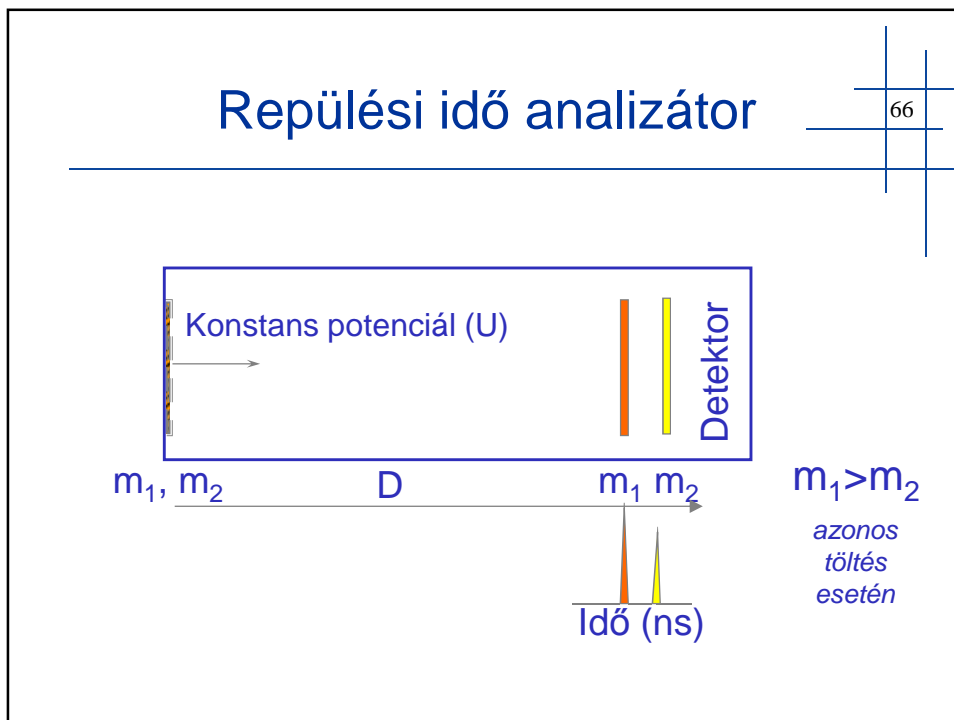
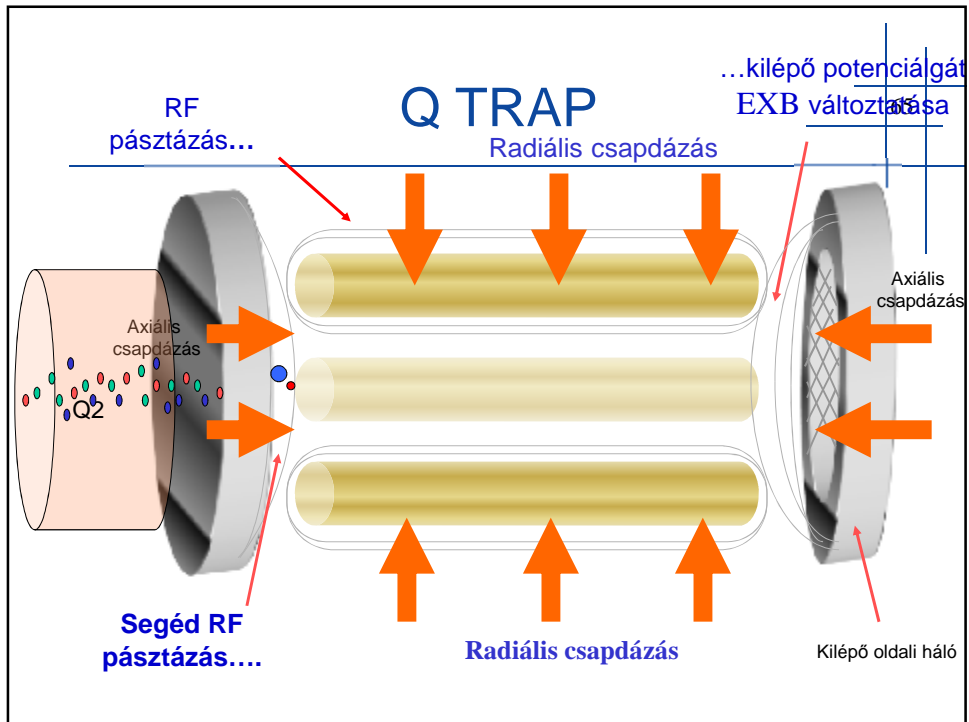
## Ioncsapda analizátor

64

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







# Repülési idő analízátor

67

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

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

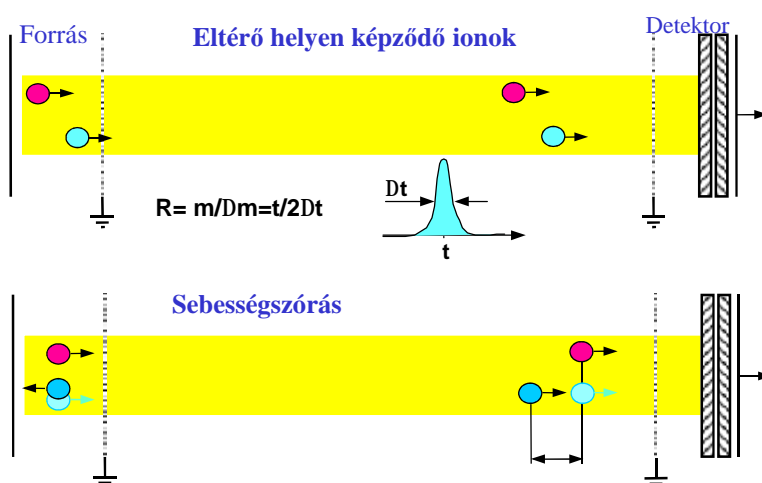
Az ionok energiaszórása miatt a felbontás kicsi

## Megoldás:

- iontükör (reflektor)
- késleltetett ionkieresztés (delayed extraction)

# A felbontást befolyásoló tényezők

68



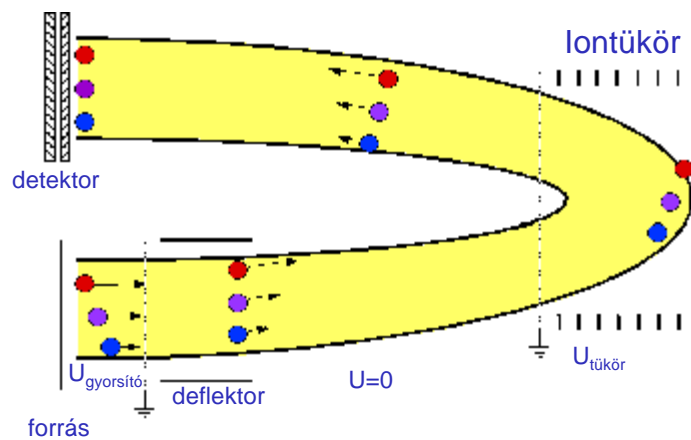
## Felbontást növelő megoldások

69

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

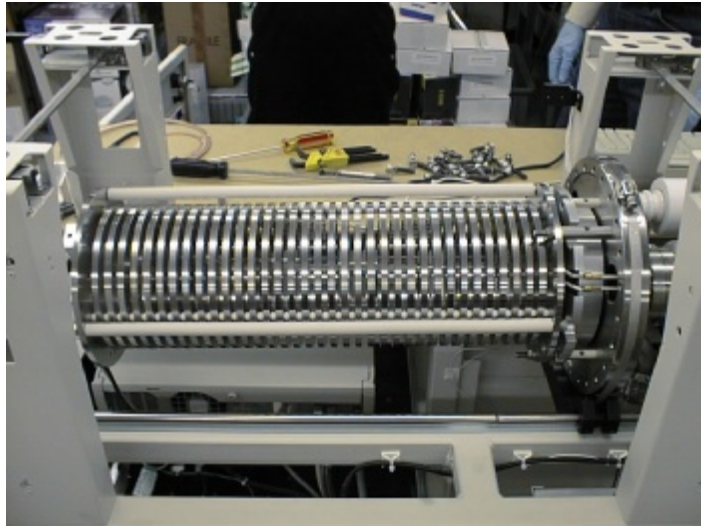
## Iontükör

70



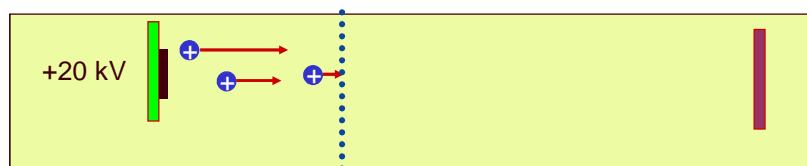
## Iontükör a valóságban

71

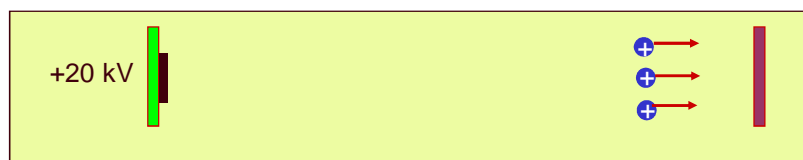


## Delayed Extraction (DE)

72



A potenciálgradiens a lassabb ionokat jobban gyorsítja

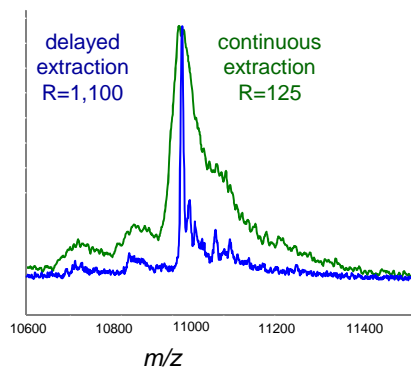


A detektorig a lassabb ion utóléri a gyorsabbat

## A DE hatása a felbontásra

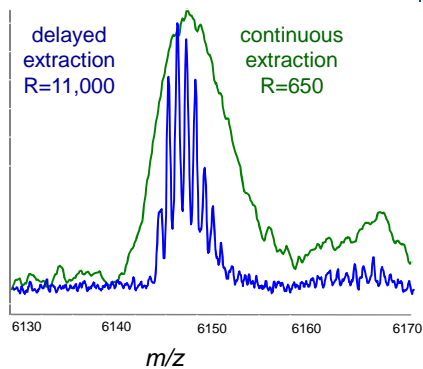
73

### Linear mode



Minta: DNS 36-mer

### Reflector mode



Minta: DNS 20-mer

## Felbontás

74

### Minimálisan szükséges felbontás

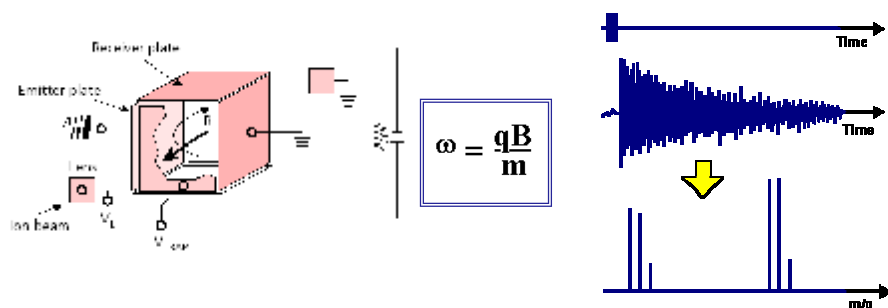
Ar	39.96239	}	580
C <sub>3</sub> H <sub>4</sub>	40.03130		
N <sub>2</sub>	28.00615	}	1100
C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	28.03130		
CO	27.99491	}	2490
N <sub>2</sub>	28.00615		
<sup>13</sup> CC <sub>6</sub> H <sub>7</sub>	92.05813	}	20600
C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	92.06260		

# FT-ICR MS

75

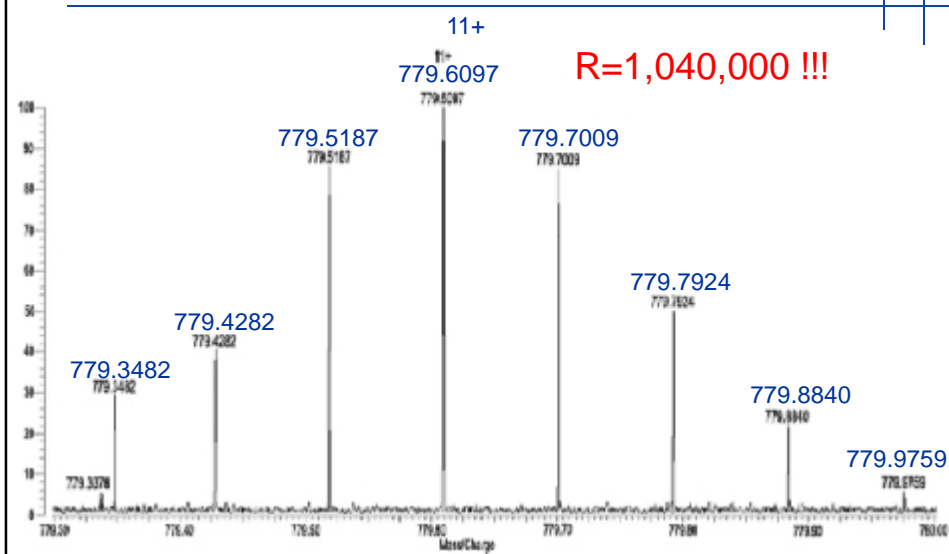
A cellába bejuttatott és a nagy mágneses térerő hatására körpályára kényszerített ionok által indukált áramot méri.

- óriási felbontás
- tág időskála (nem destruktív detektálás)



# Az FT-ICR felbontása

76



# Orbitrap

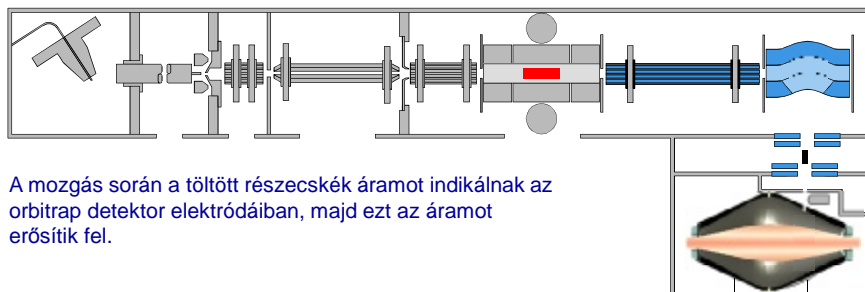
77



# LTQ Orbitrap Működése

78

1. Az ionokat a lineáris ioncsapdában tároljuk
2. .... Majd axiálisan kieresztjük
3. .... És a C-csapdában ismét csapdázzuk
4. .... Onnan egy csomagban átküldjük az Orbitrap analizátorba
5. .... Ahol elektrosztatikusan csapdázzódnak, és a központi elektróda körül keringve 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.

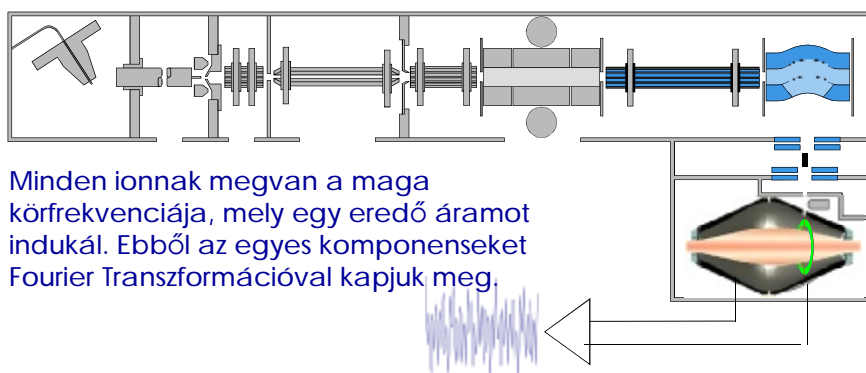


## Körfrekvenciák és a tömegek

79

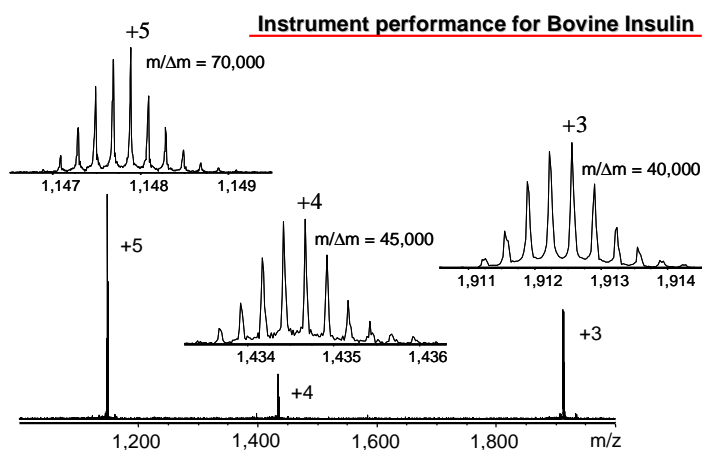
Az axiális oszcilláció frekvenciája:  
 Ahol  $w$  = oszcillációs körfrekvencia  
 $k$  = készülékállandó  
 $m/z$  = ... A hõn áhitott tömeg!

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



## Teljesítõképesség

80





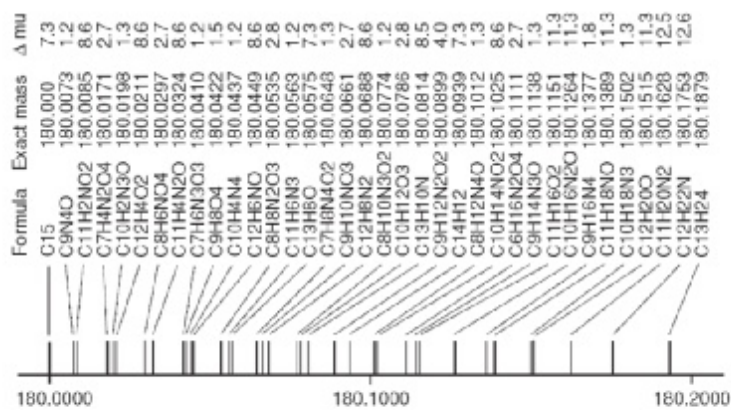
# Analizátorok felbontása

81

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

# Csak a nagyfelbontás??!

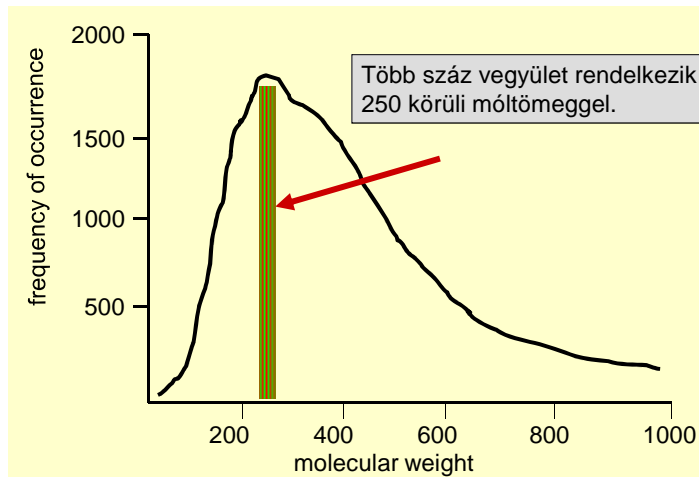
82



**Figure 6.3**  
Exact masses and corresponding formulae for various possible ions of  $m/z$  180 containing only carbon, hydrogen, nitrogen and oxygen atoms in limited number ( $C_{6-15}$ ,  $H_{0-24}$ ,  $N_{0-4}$  and  $O_{0-4}$ ).

## Elegendő-e egy egyszerű LC/MS?

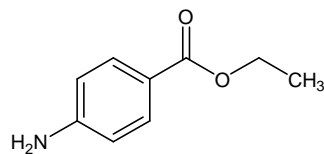
83



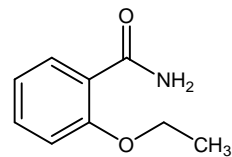
## Szerkezeti információ nyerése

84

Benzocaine



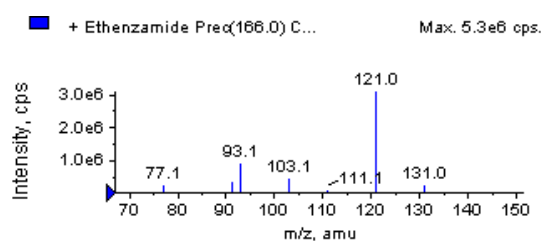
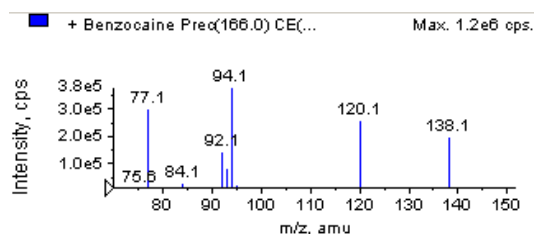
Ethenzamide



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

## MSMS spektrumok

85



Eltérő  
fragmensek

## Tandem tömegspektrometria

86

### Célok:

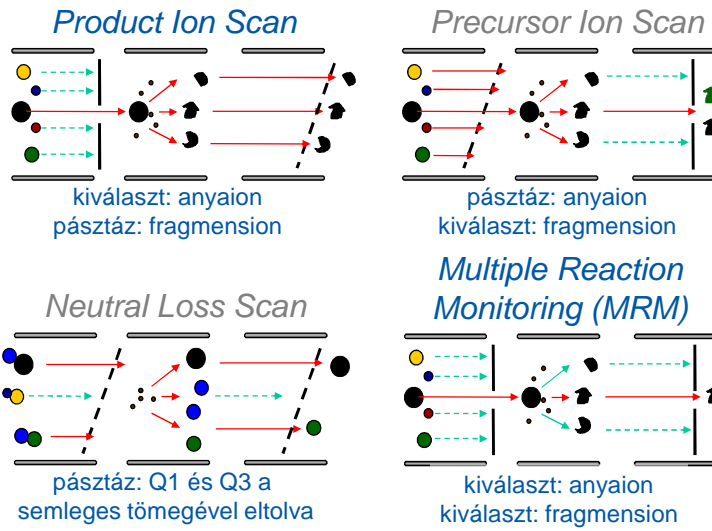
- szerkezeti információ nyerése
- érzékenység növelése
- szelektivitás növelése

### Megvalósítás:

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

# Lehetséges scanfunkciók

87

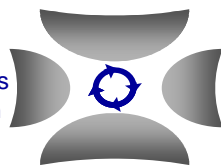


# Q-Trap

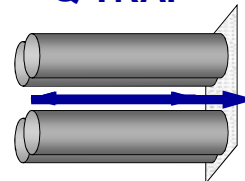
88

## 3D Trap

Érzékenység a teljes tömegtartományban  
 MS<sup>3</sup> (vagy több)

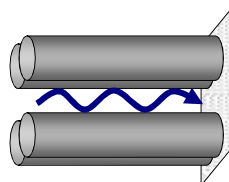


## Q TRAP™



## QqQ

MRM lehetőség  
 Semlegesvesztés  
 Precursor Scan



Érzékenység a teljes tartományban  
 MS<sup>3</sup>  
 MRM lehetőség  
 Semlegesvesztés  
 Precursor Scan

## Ha akarom: hármaskvadrupol... 89

---

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 90

---

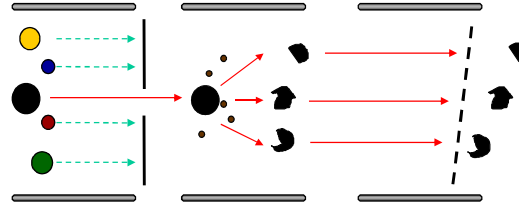
Új pásztázási módokkal :

- 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)

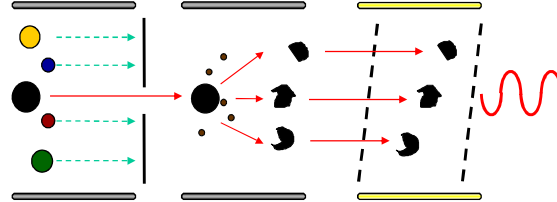
# Megnövelt leányion pásztázás

91

## Product Ion Scan

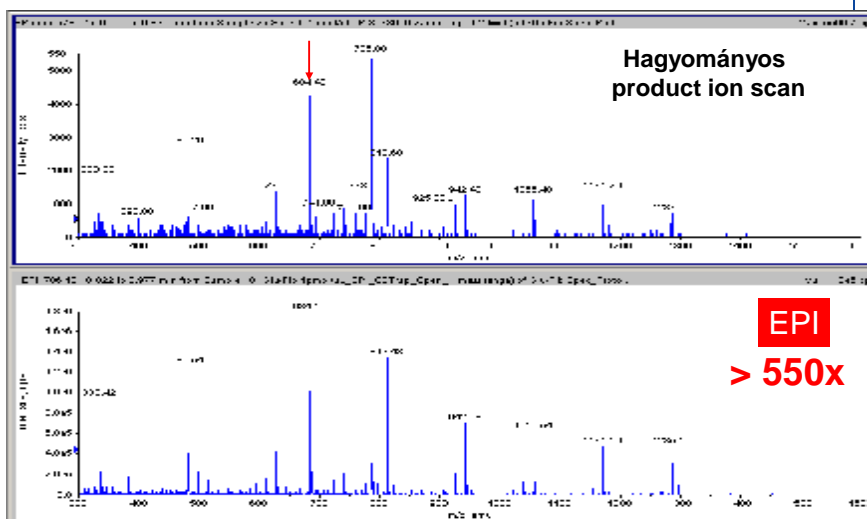


## Enhanced Product Ion Scan



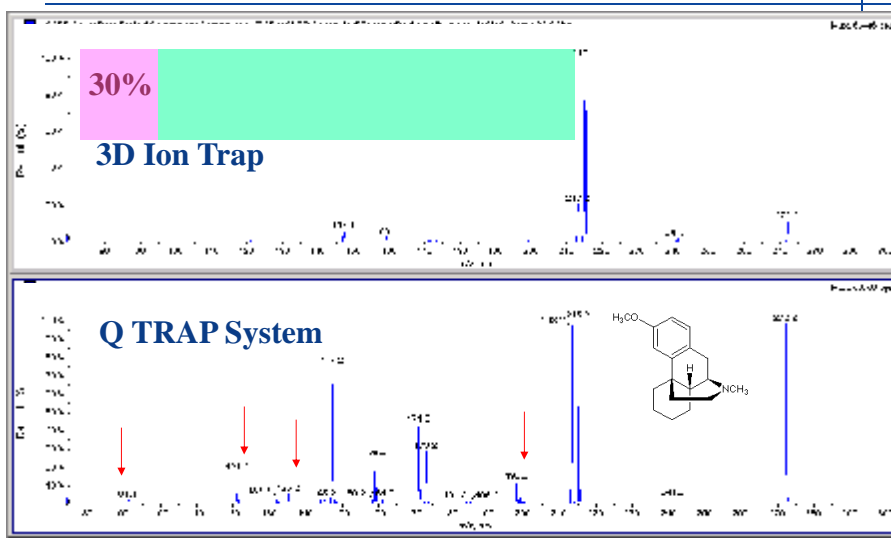
# Érzékenységnövekedés

92



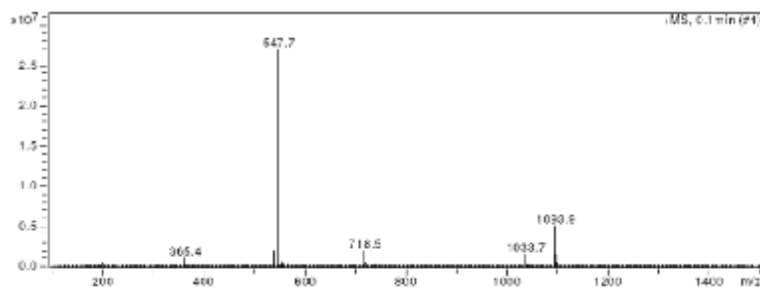
# Q-Trap

93



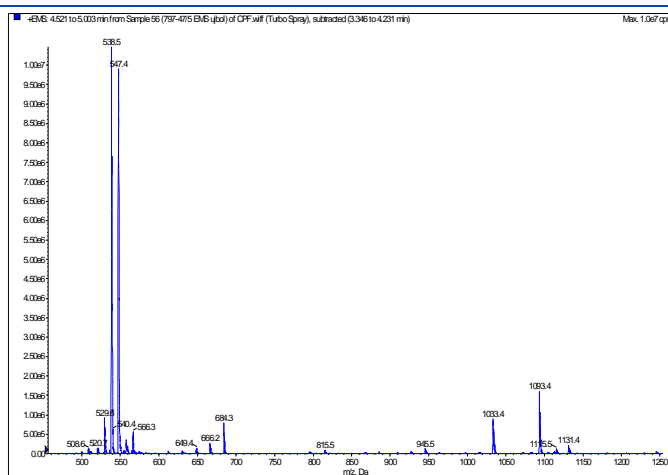
# MS1 (3D trap)

94



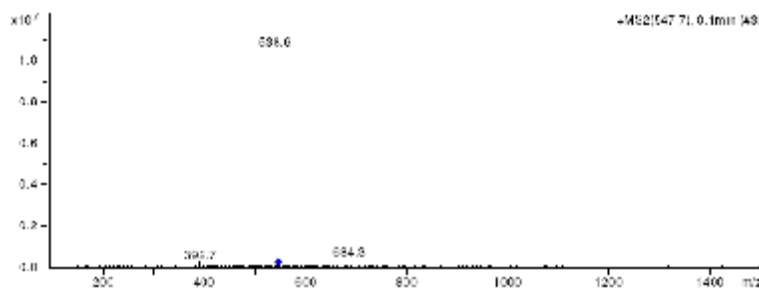
# EMS (QTrap)

95



# MS2 547

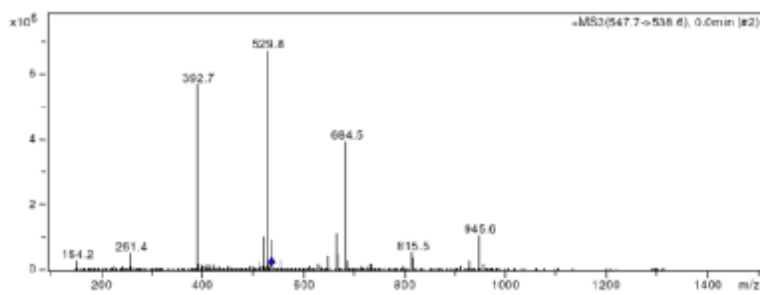
96





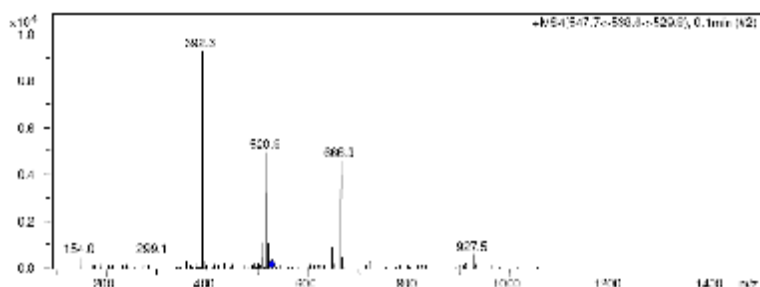
# MS3 547/538

97



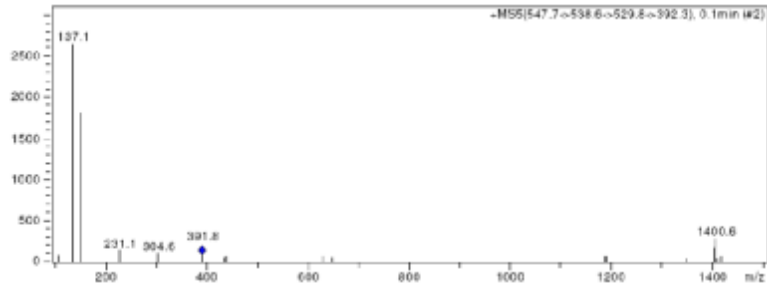
# MS4 547/538/529

98



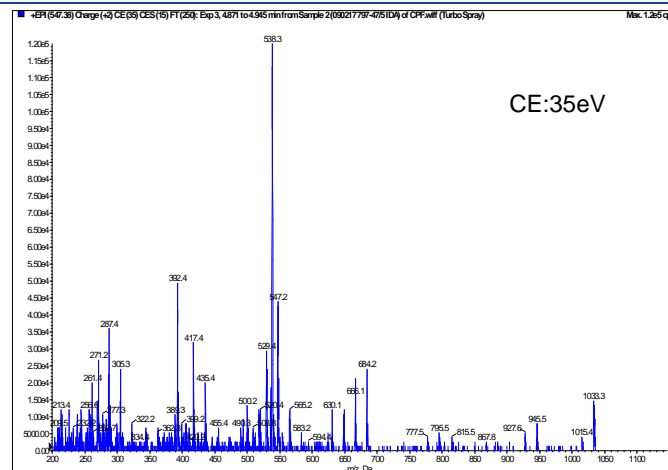
# MS5 547/538/529/392

99



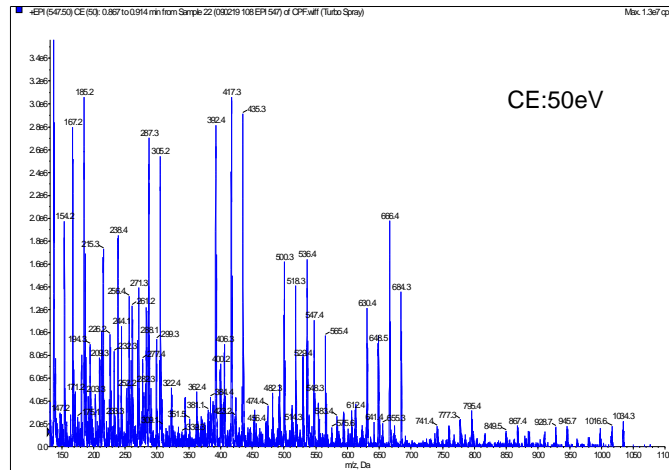
# EPI 547

100



# EPI 547

101



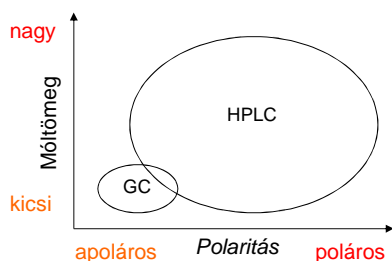
# Csatolt technikák

102

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

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

# GC vs. HPLC (MS)



GC: gáz/gőz minta, hőterhelés

HPLC: folyadék/oldat minta

LC/MS

széleskörű alkalmazás,  
móltömeg információ

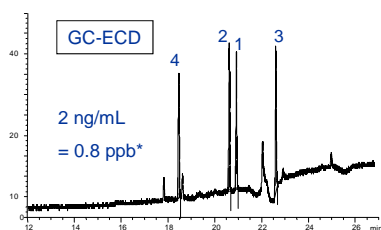
## Chemical Abstracts entry compounds

Total ; 9,000,000

GC applicable 130,000 (1.4%)

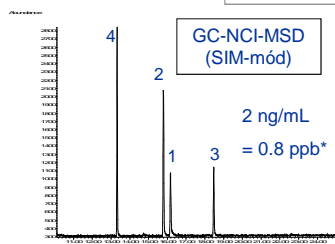
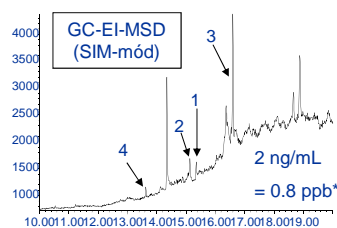
target compounds for HPLC 8,870,000 (98.6%)

## Az LC-MS/MS rendszerek érzékenysége

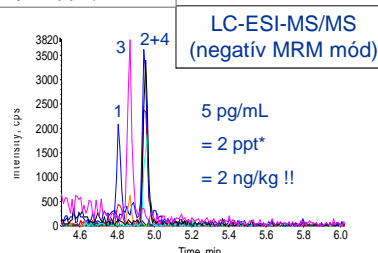


- 1 Fipronil
- 2 Fipronil-sulfide
- 3 Fipronil-sulfone
- 4 Fipronil-desulfinyl

Háttér: az egyre szigorodó EU normák következtében a bébiételekben 28 peszticid szermaradvány maximális értéke 10 ppb alá került (pl: fipronil és metabolitja 4 ppb)



\* 50g mintatömegre vonatkoztatva



## GC-MS

105

Illékony minták jöhetnek szóba: EI/CI ionizáció

Az analizátor sebességének szerepe

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

A vivőgáz és a vákuumrendszer egymással ellentétes

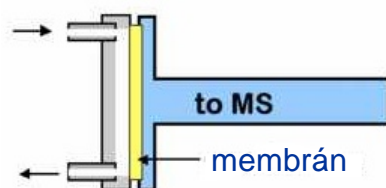
- töltött kolonna: nagy gázáram  $\Rightarrow$  szeparátor
- kapilláris kolonna: kis gázáram  $\Rightarrow$  direktbe

A kapott spektrumok könyvtárból jól kereshetők

## GC-MS szeparátorok

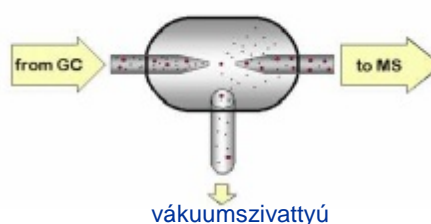
106

Membránszeparátor



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

Jetszeparátor



- Megbízható

## GC-MS tanácsok

107

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

## HPLC-MS

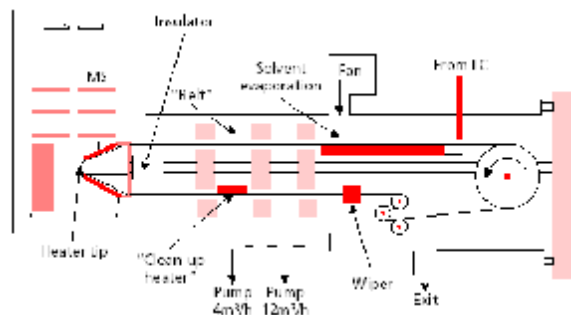
108

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

109

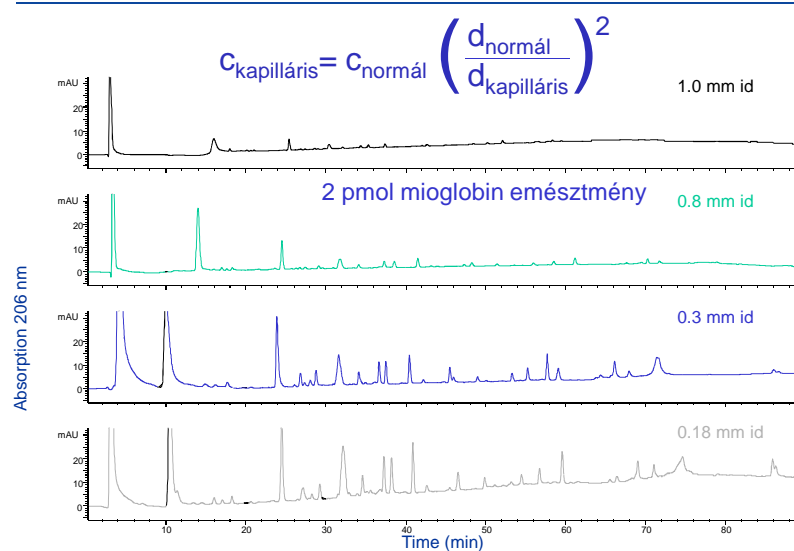
## Különböző oszlopátmérőkhöz tartozó áramlás

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

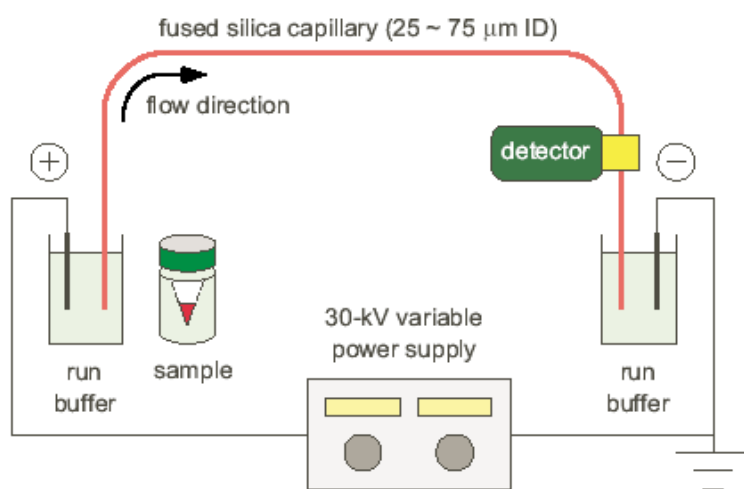
## Kolonnaátmérő vs. érzékenység

110



## CE rendszer

111

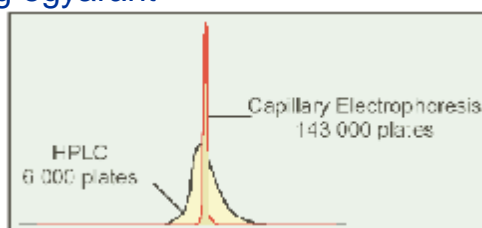


## Kapilláris elektroforézis

112

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

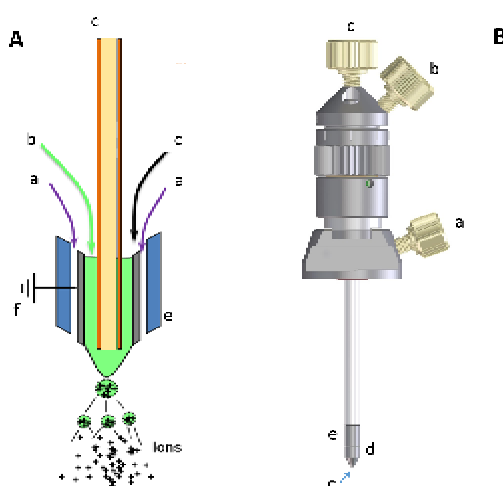
113

Nehézségek:

- Elektromos kapcsolat megvalósítása egy pufferedénnyel
- 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

114



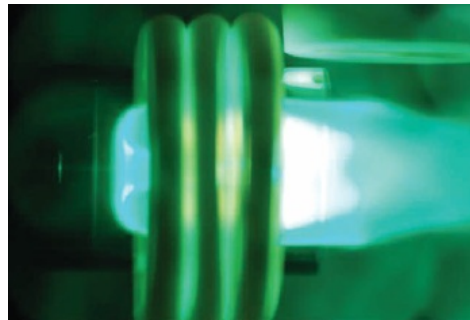
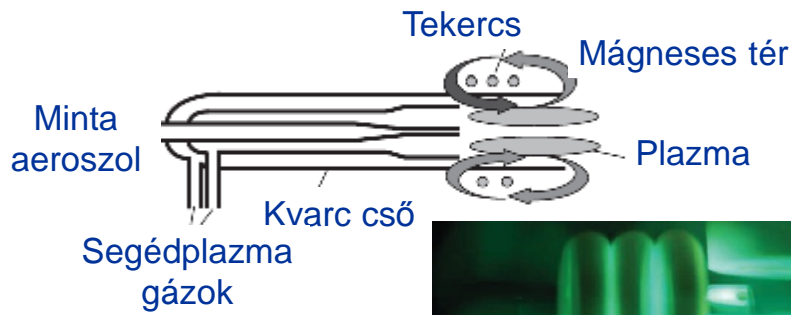
## ICP-MS

## ICP-MS Felépítés

- Ionforrás: ICP plazma
- Ionoptika
- Reakciócella
- Analizátor: Q, szektor
- Detektor

## ICP sugárforrás

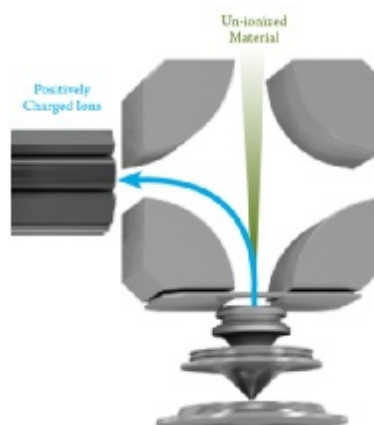
117



## Quadrupole ion deflector

118

- Kis kvadrupol
- 90 fokos eltérítés töltött részecskék esetén
- A semlegesek a vákuumtérbe kerülnek



## Interferencia csökkentése

119

- ütközési cella (nem reaktív gáz)
  - kinetikus energia és szórásának csökkentése, valamint ütközési disszociáció
- reakciócella (reaktív gáz)
  - Elektron- vagy protontranszfer, oxidáció
  - $\text{Ar}^+ + \text{NH}_3 \Rightarrow \text{Ar} + \text{NH}_3^+$
- dinamikus reakciócella (reaktív és nem reaktív)
  - nagy sávszélességű kvadrupol csak adott m/z tartományú molekulák vesznek részt a reakcióban

## Analizátor I.

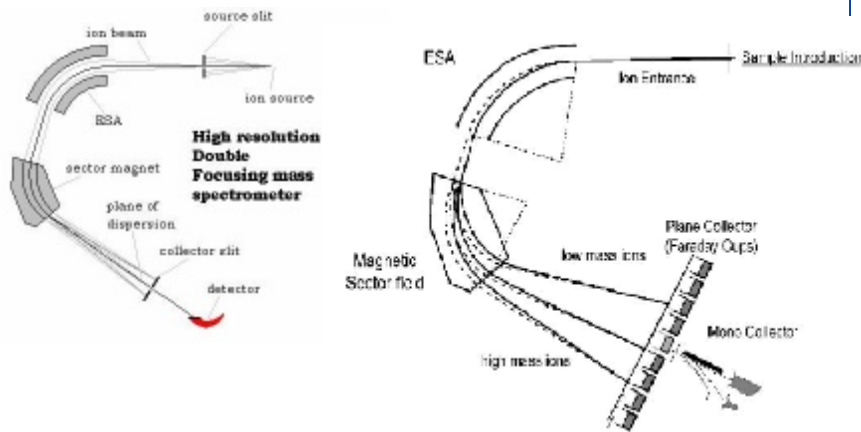
120

- Pásztázó kvadrupol 5000 amu/sec pásztázási sebességgel „peak hopping” módban páratlan gyorsaság.

# Analizátor II.

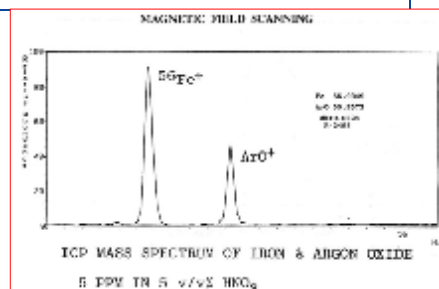
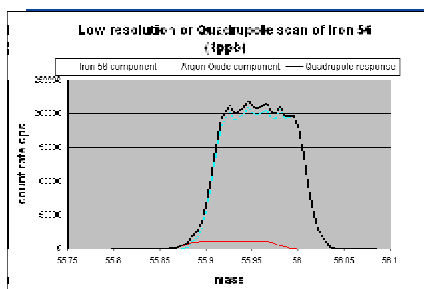
121

- Nagyfelbontású szektorok.



# LR vs HR ICP MS

122



$^{56}\text{Fe}$ : Környezeti mintákban kis koncentrációban előfordul.  
A  $^{56}\text{Fe}$  és az  $\text{ArO}$  ( $^{40}\text{Ar}+^{16}\text{O}$ ) azonos tömegű Quadrupole készülék =INTERFERENCIA!

HR-ICPMS mérések = megkülönböztethető a  $^{56}\text{Fe}$  az  $\text{ArO}$ -tól  
**FONTOS!** az elemek többsége egyszerű kvadrupollal is megkülönböztethető

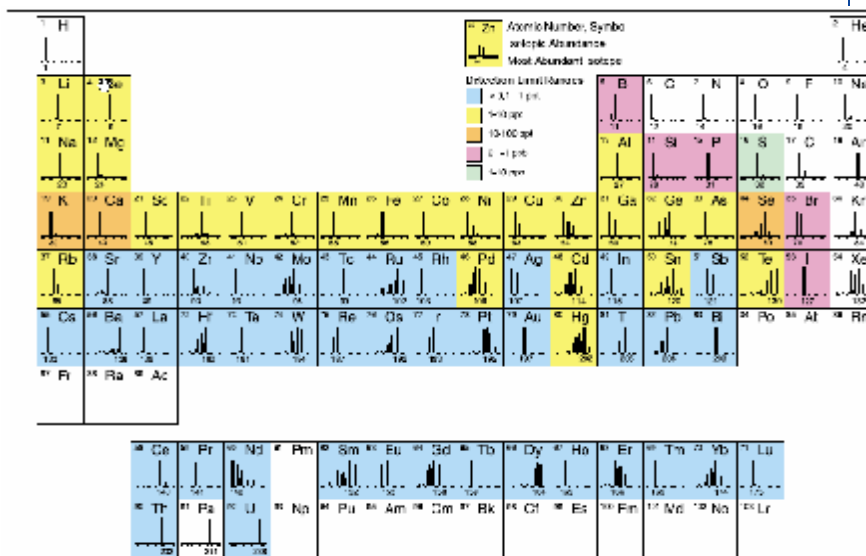
# Detektor

123

- Szimultán analóg-digitális detektornak köszönhetően 9 nagyságrend dinamikus tartomány is elérhető.

# Kimutatási határok

124



## Speciációs vizsgálatok

125

- GC-vel, HPLC-vel összekapcsolva módosulatanalitikai vizsgálatok elvégzése lehetséges.

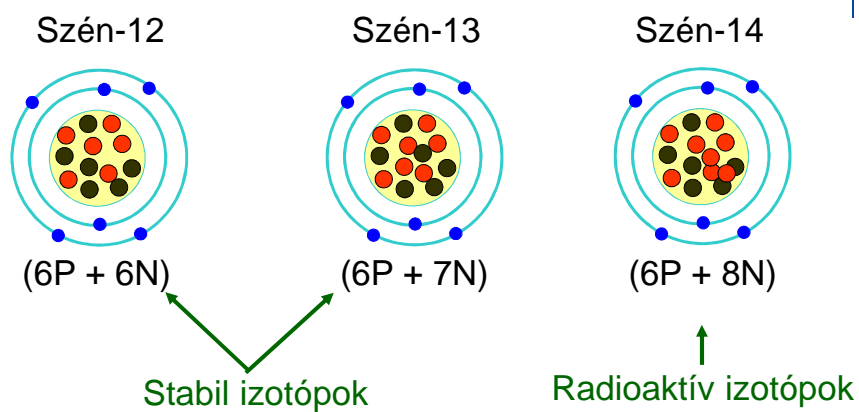


126

## Izotóparány-mérés

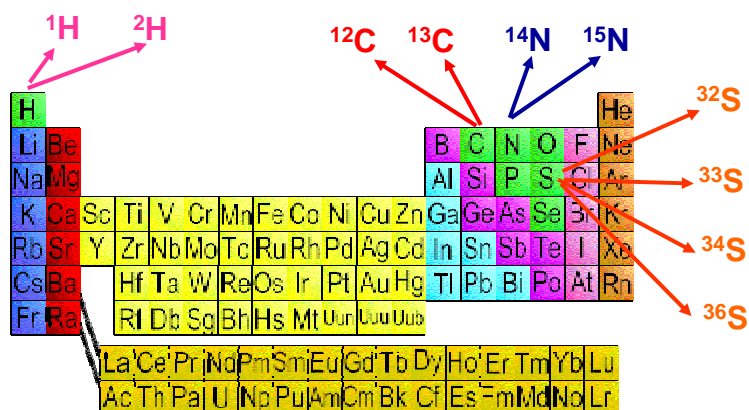
## Stabil izotóparány mérése

127



## A periódusos rendszer

128





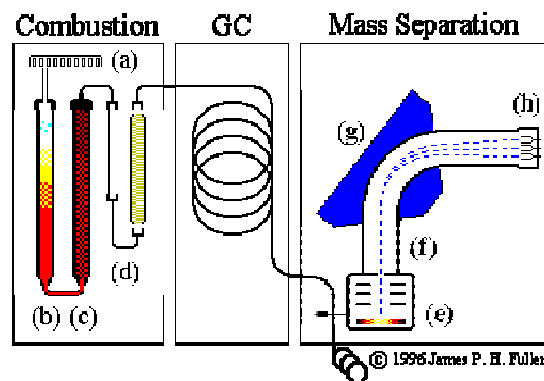
# Előfordulások

129

Element	Isotopes	Abundance
Hydrogen	$^1\text{H}$ , $^2\text{H}$	$^1\text{H} = 99.985\%$ $^2\text{H} = 0.015\%$
Carbon	$^{12}\text{C}$ , $^{13}\text{C}$	$^{12}\text{C} = 98.89\%$ $^{13}\text{C} = 1.11\%$
Nitrogen	$^{14}\text{N}$ , $^{15}\text{N}$	$^{14}\text{N} = 99.633\%$ $^{15}\text{N} = 0.366\%$
Oxygen	$^{16}\text{O}$ , $^{17}\text{O}$ , $^{18}\text{O}$	$^{16}\text{O} = 99.759\%$ $^{17}\text{O} = 0.037\%$ $^{18}\text{O} = 0.204\%$
Sulfur	$^{32}\text{S}$ , $^{33}\text{S}$ , $^{34}\text{S}$ , $^{36}\text{S}$	$^{32}\text{S} = 95.00\%$ $^{33}\text{S} = 0.76\%$ $^{34}\text{S} = 4.22\%$ $^{36}\text{S} = 0.014\%$

# SIRMS

130



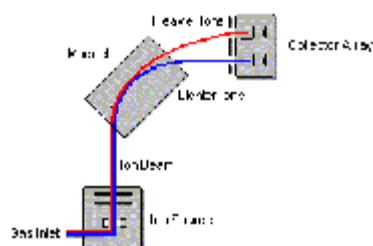
## Izotóparány mérése

131

- $^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = 0.011225$
- $^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = 0.011071$
- $^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = 0.010918$

- Az eredményeket átszámolják delta ( $\delta$ ) értéké:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{sample}} = \frac{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{sample}} - ^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{standard}}}{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{standard}}} \times 1000$$



## IRMS alkalmazások

132

- Kormeghatározás
- Eredetvizsgálat (borok, kábítószeresek stb)
- Helicobacter
- Doppinganalitika

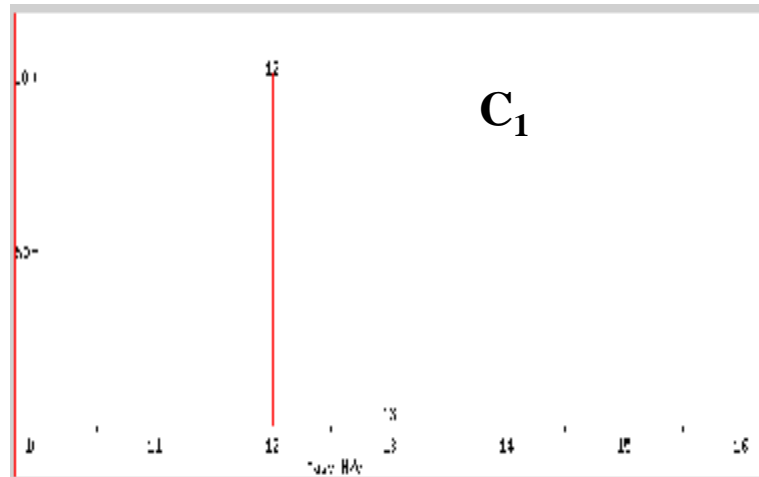
## Mérési technikák

## Izotópok fajtái

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

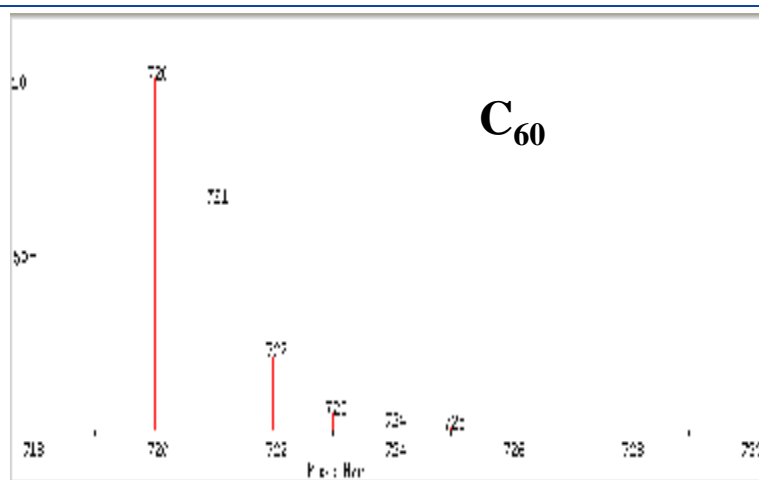
## Móltömeg megadása

135



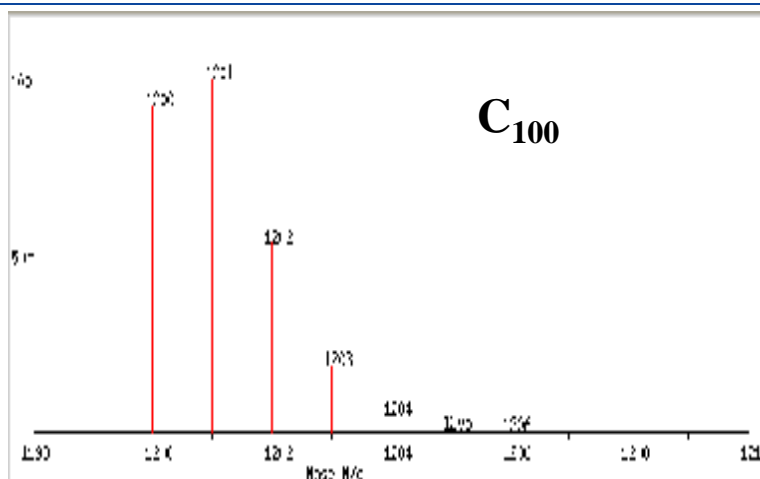
## Móltömeg megadása

136



## Móltömeg megadása

137



## Móltömeg megadása

138

monoizotópos tömeg

556.277

átlagos (kémiai)

tömeg 556.64

nominál tömeg 556

Leu-enkefalin

$C_{28}H_{38}N_5O_7$

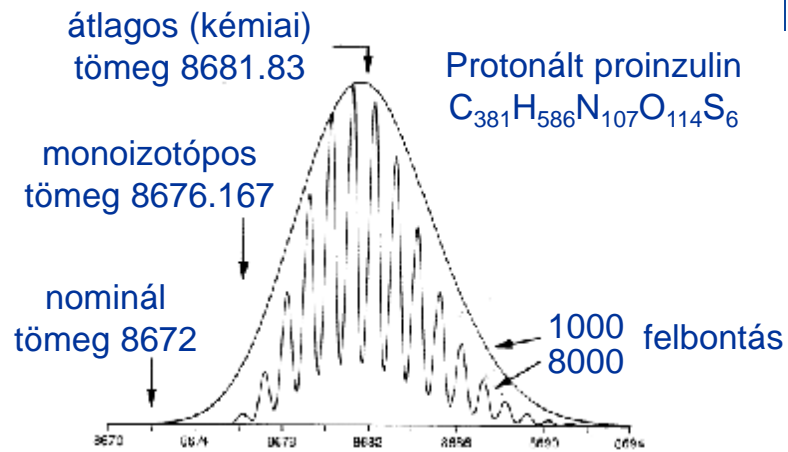
felbontás

250  
1000

554 556 558 560 562

## Móltömeg megadása

139

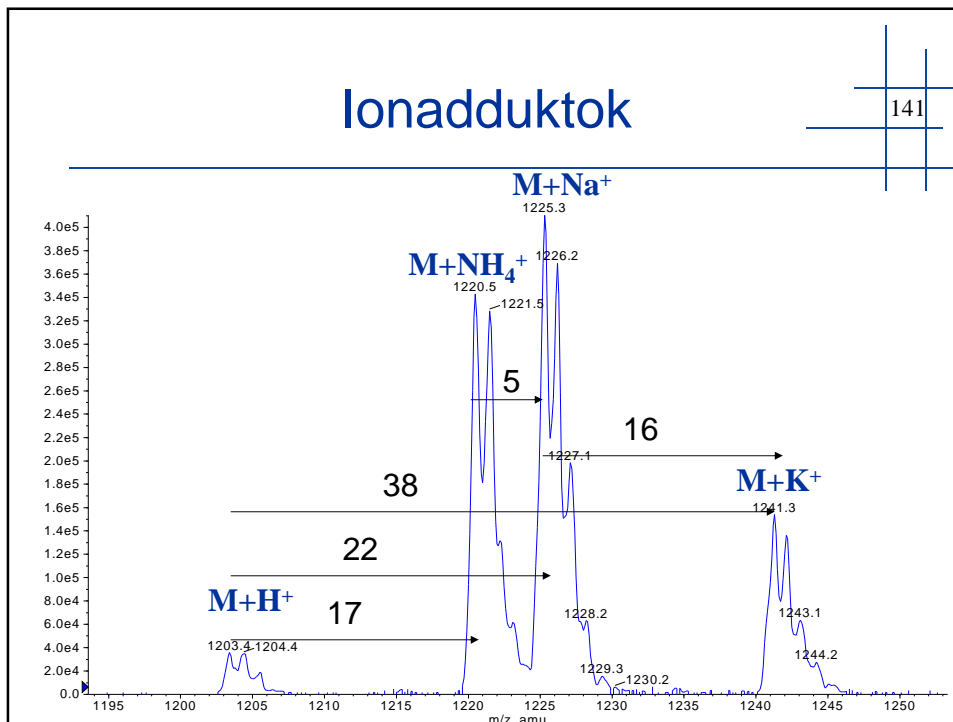


140

## Móltömeg meghatározása

## Ionadduktok

141



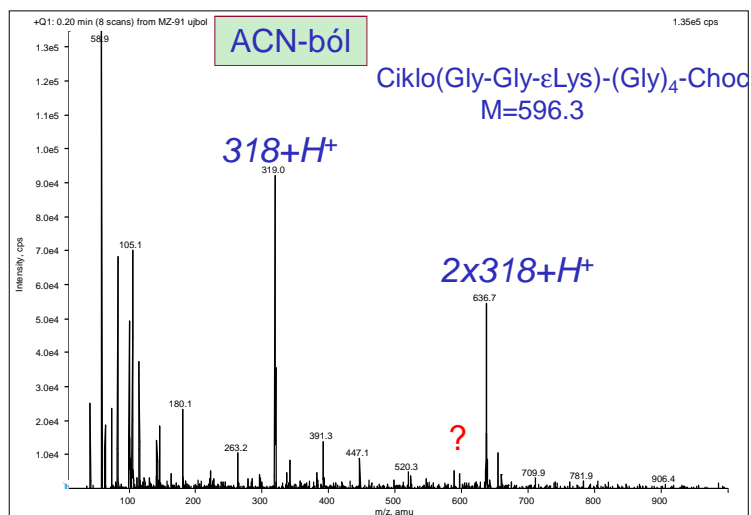
## Ionadduktok, tömegkülönbségek

142

- APCI pos: +H
- APCI neg: -H
- ESI pos: H,  $NH_4$ , 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

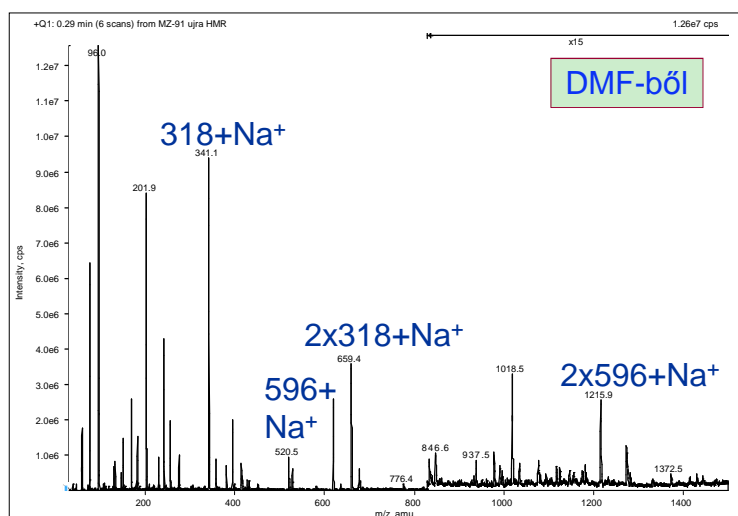
# Móltömeg meghatározás I

143



# Móltömeg meghatározása I

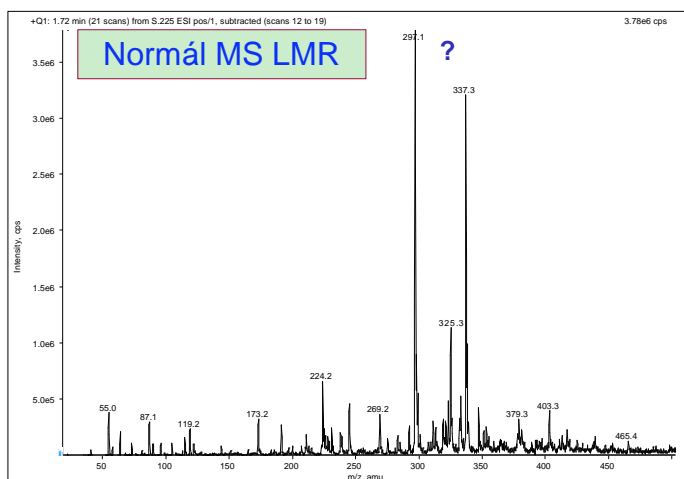
144





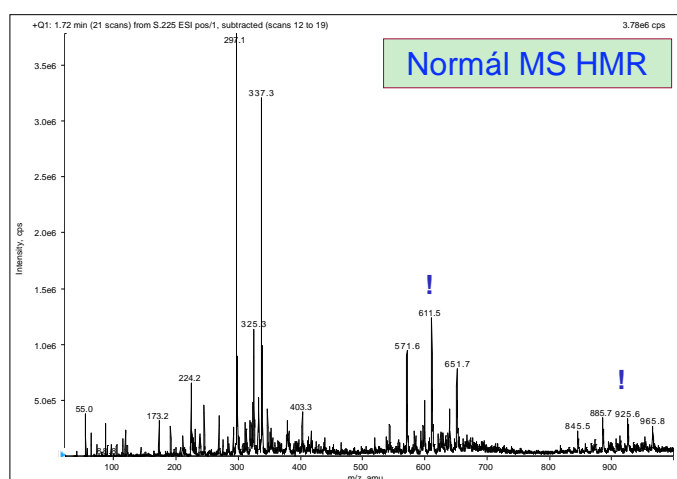
## Móltömeg meghatározása II

145



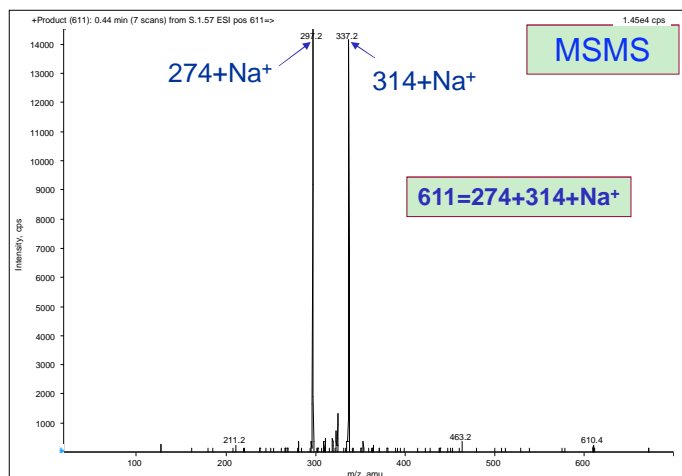
## Móltömeg meghatározás II

146



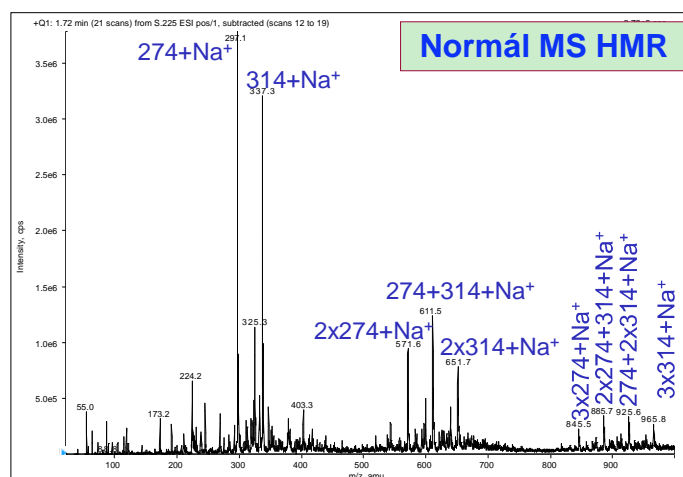
# Móltömeg meghatározása II

147



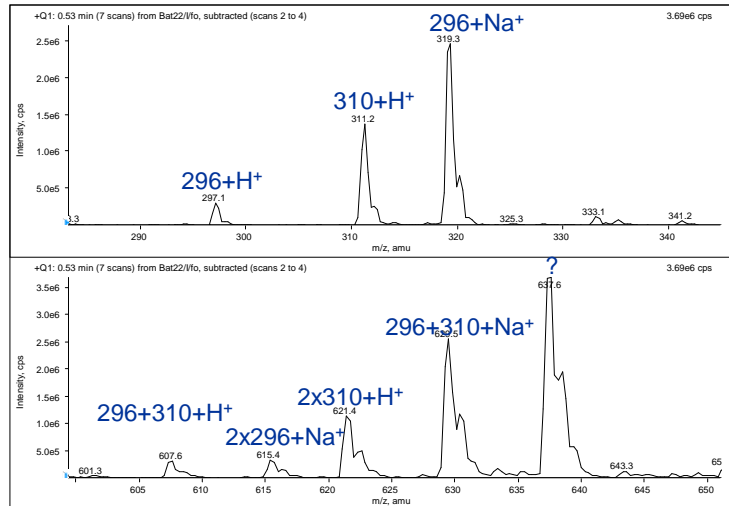
# Móltömeg meghatározása II

148



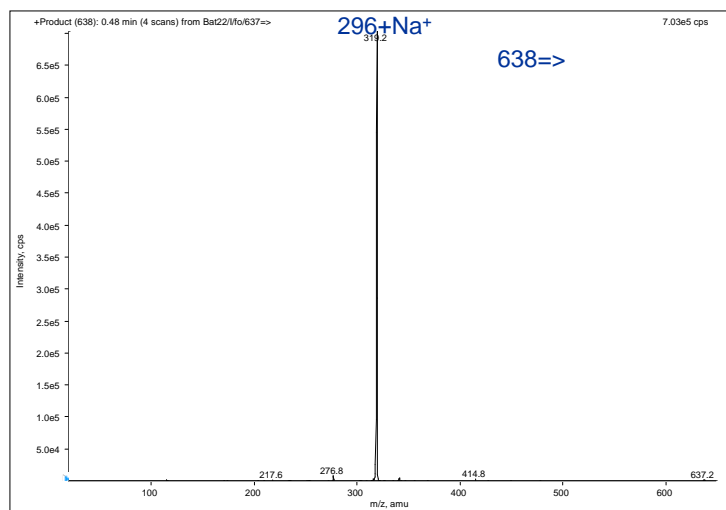
# Móltömeg meghatározása III

149



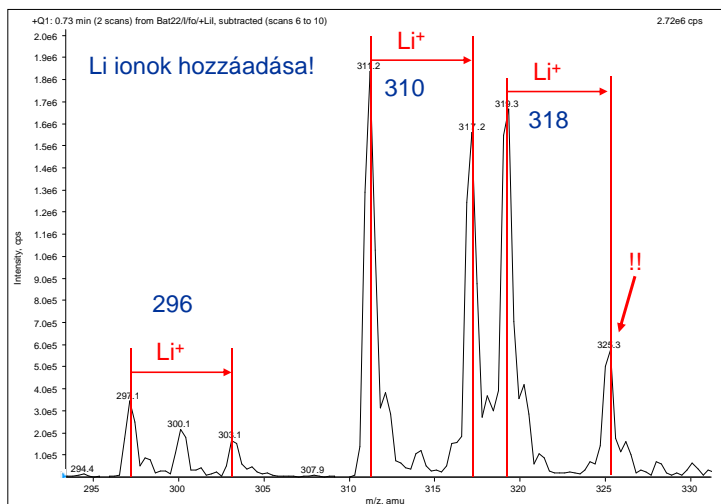
# Móltömeg meghatározása III

150



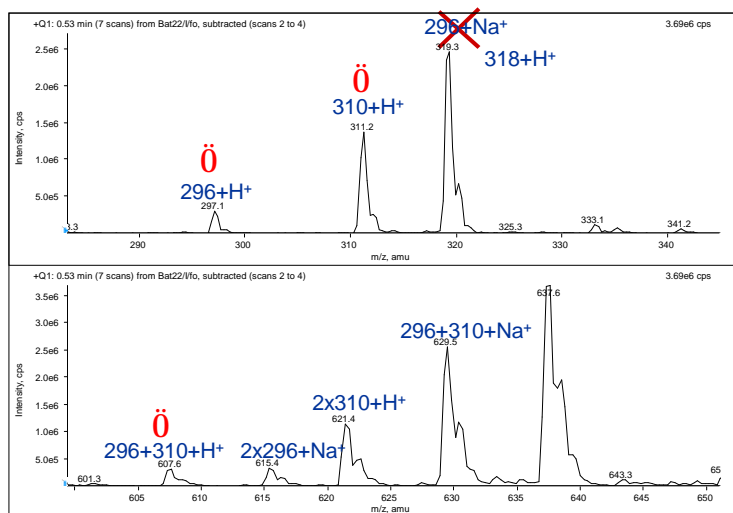
# Móltömeg meghatározása III

151



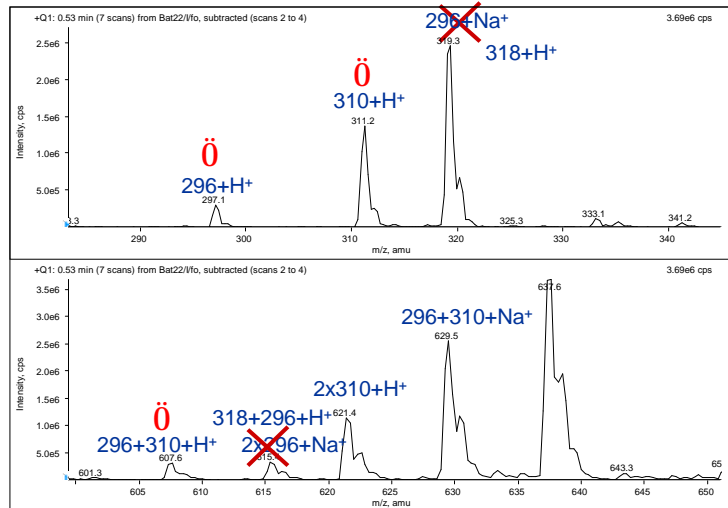
# Móltömeg meghatározása III

152



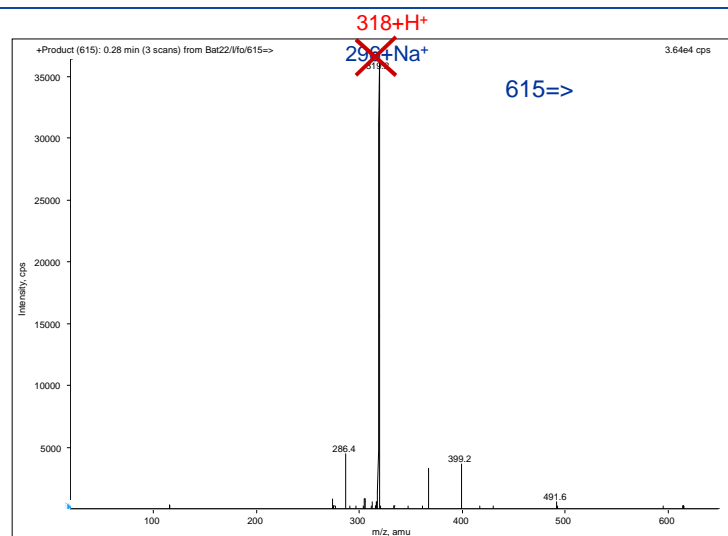
# Móltömeg meghatározása III

153



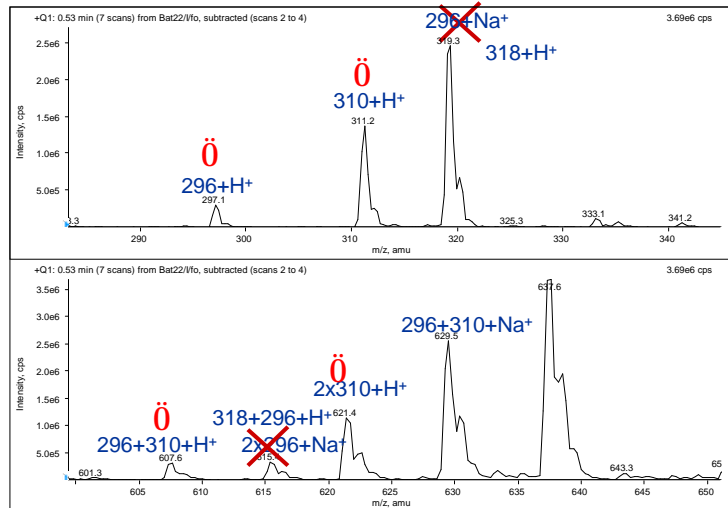
# Móltömeg meghatározása III

154



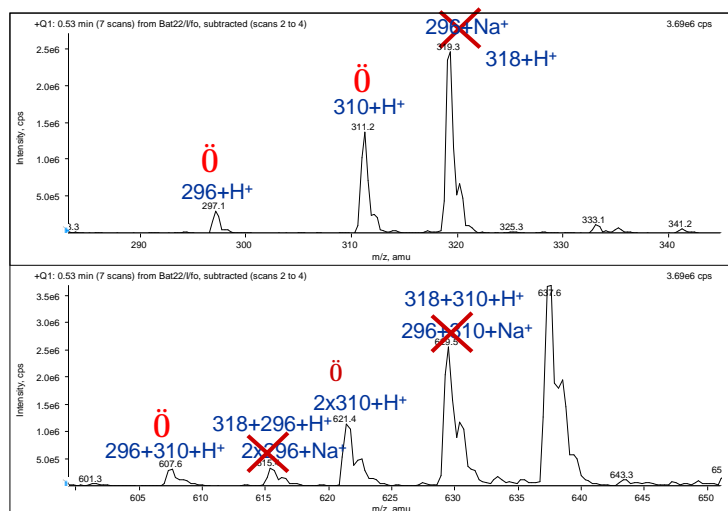
# Móltömeg meghatározása III

155



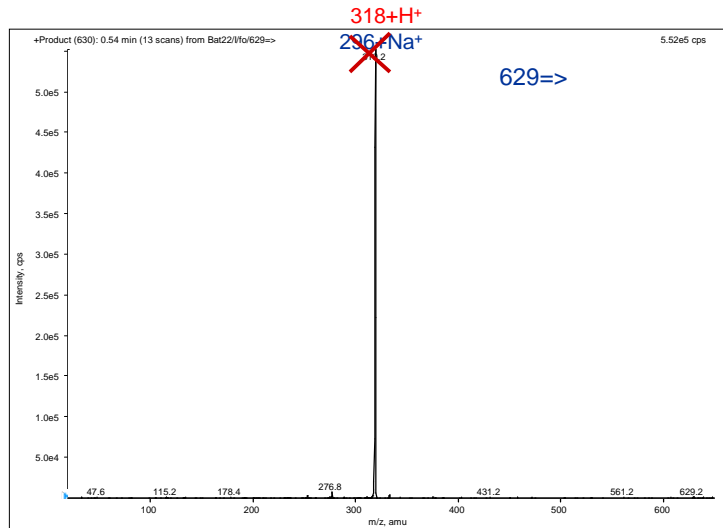
# Móltömeg meghatározása III

156



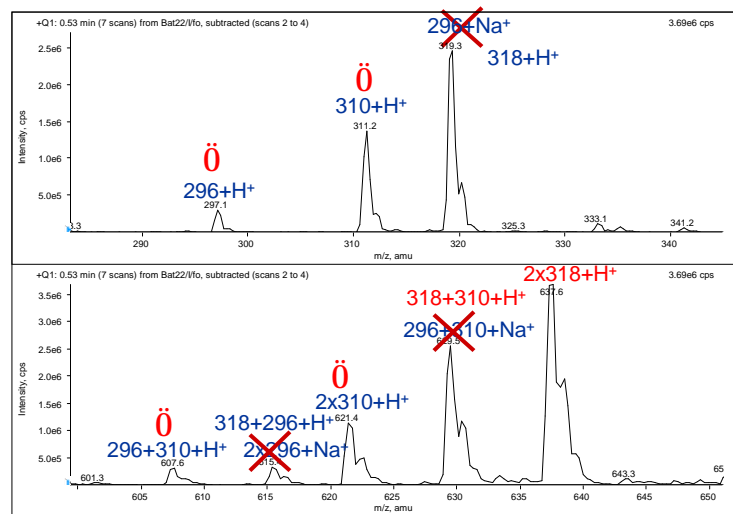
# Móltömeg meghatározása III

157



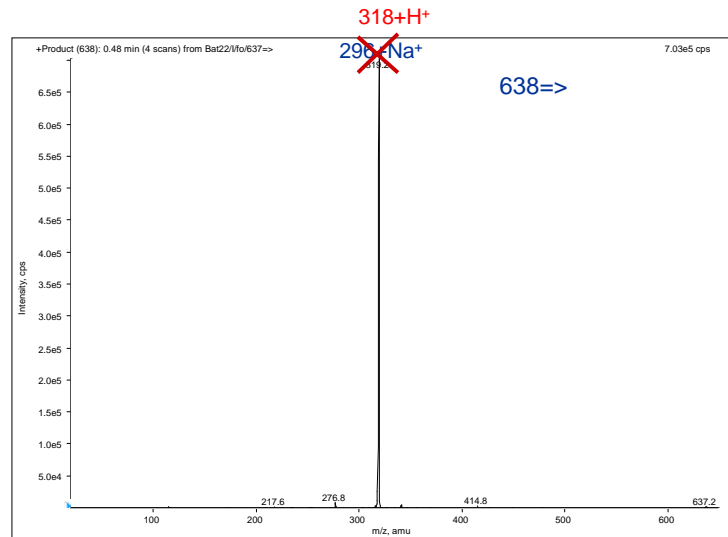
# Móltömeg meghatározása III

158



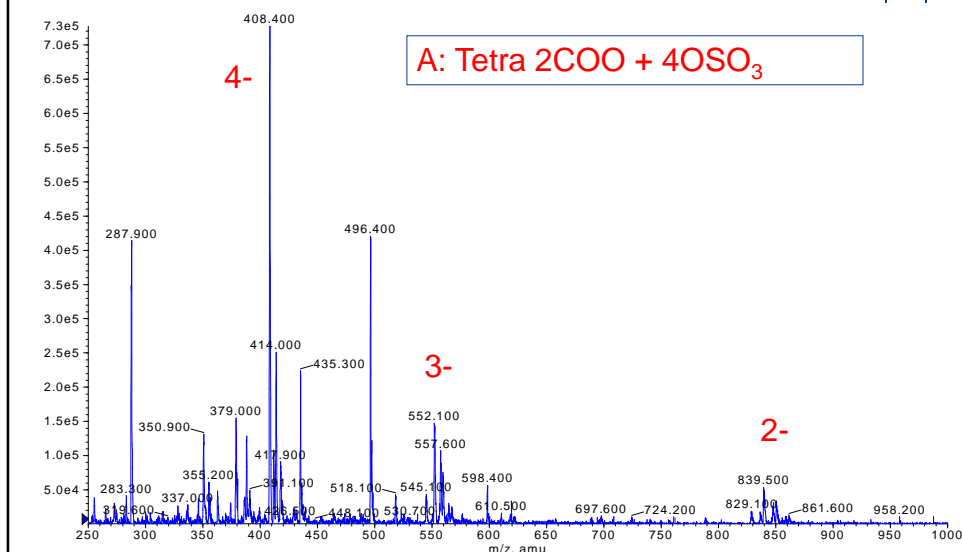
## Móltömeg meghatározása III

159



## Móltömeg meghatározása IV

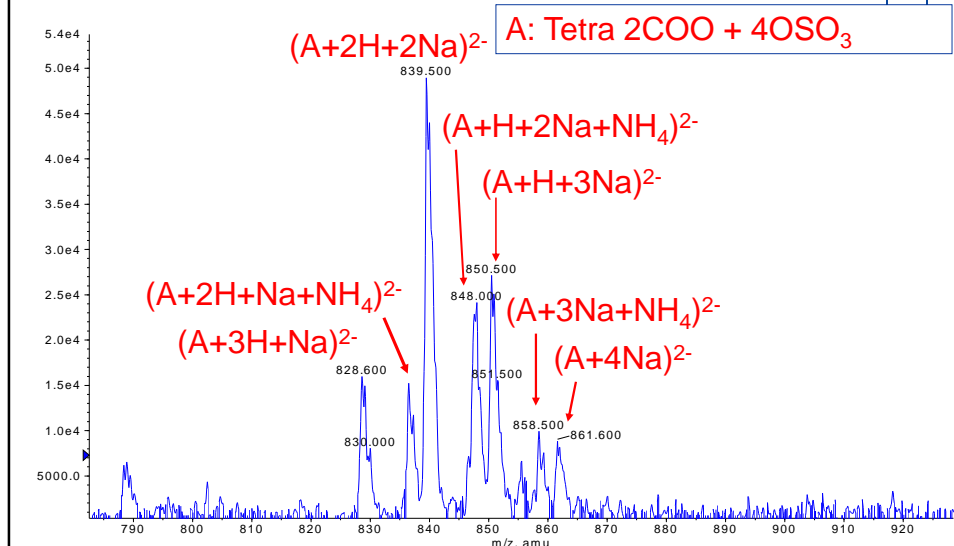
160





## Móltömeg meghatározása IV

161



## Mennyiségi meghatározások

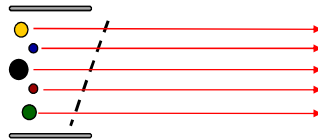
162

- Egyszeres kvadrupol
  - Full scan mód
  - Selected Ion Monitoring (SIM)
- Hármes kvadrupol
  - Reakciócsatornák figyelése (MRM)
- Nagyfelbontású MS

# MS pásztázási módok

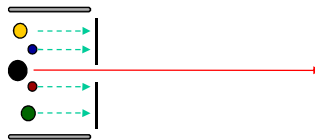
163

## Q1 full scan



Minden iont figyel

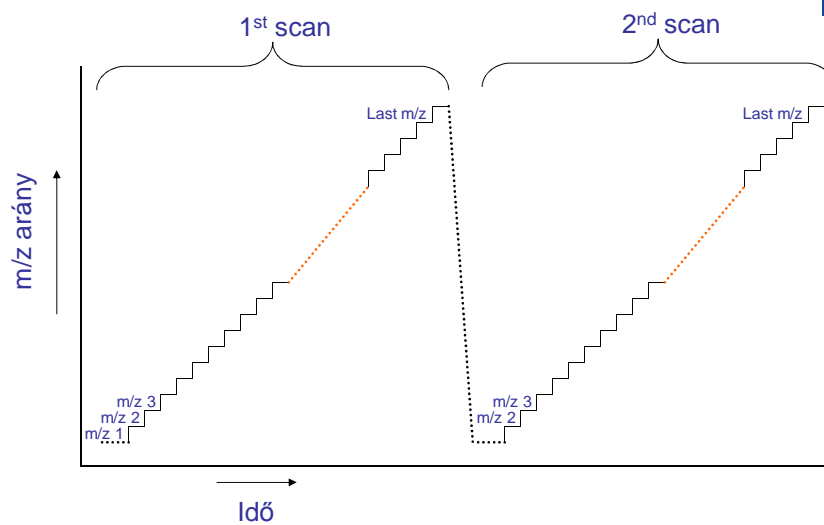
## Selected Ion Monitoring (SIM)



Csak a kiválasztott ionokat figyel

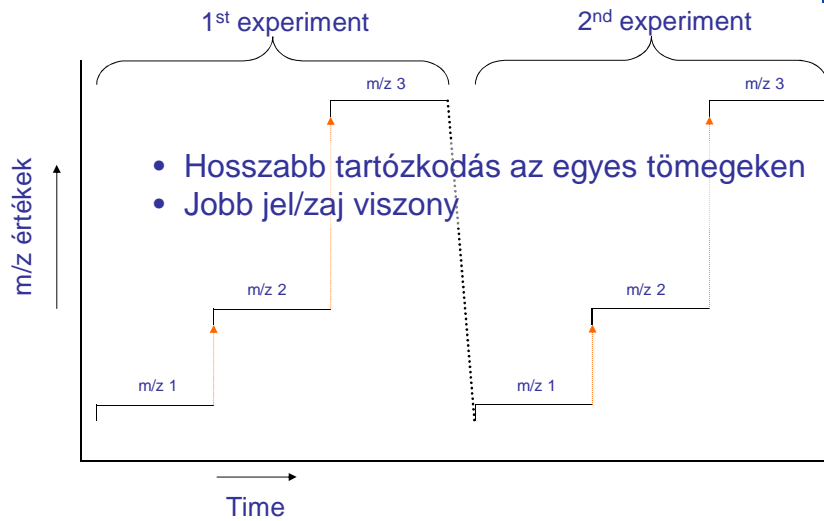
# Q1 Full scan mód

164



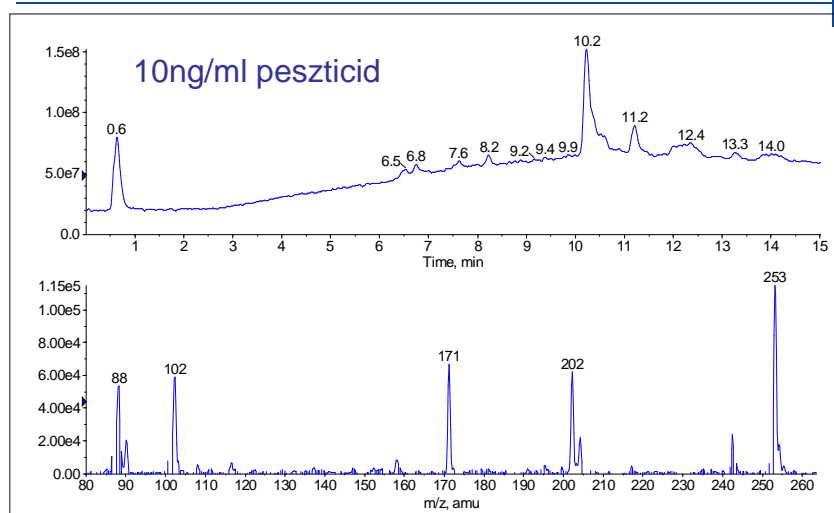
## Q1 SIM mód

165



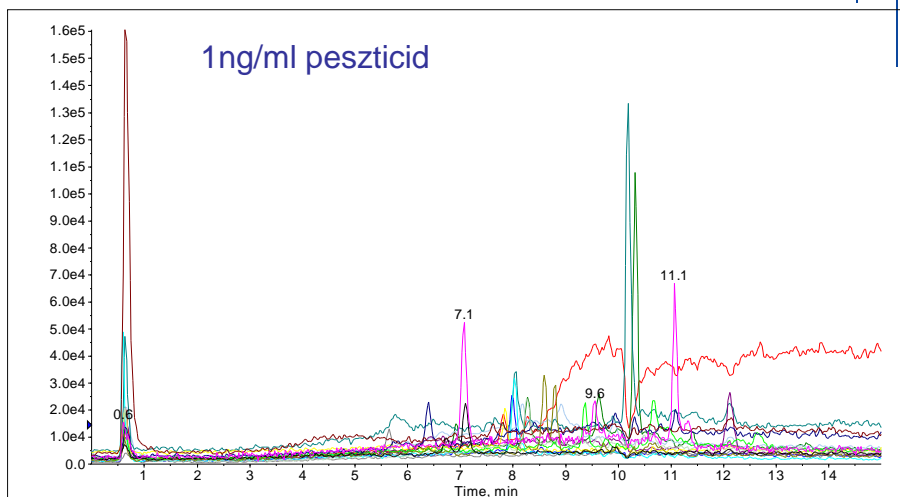
## Single Quad Full Scan

166



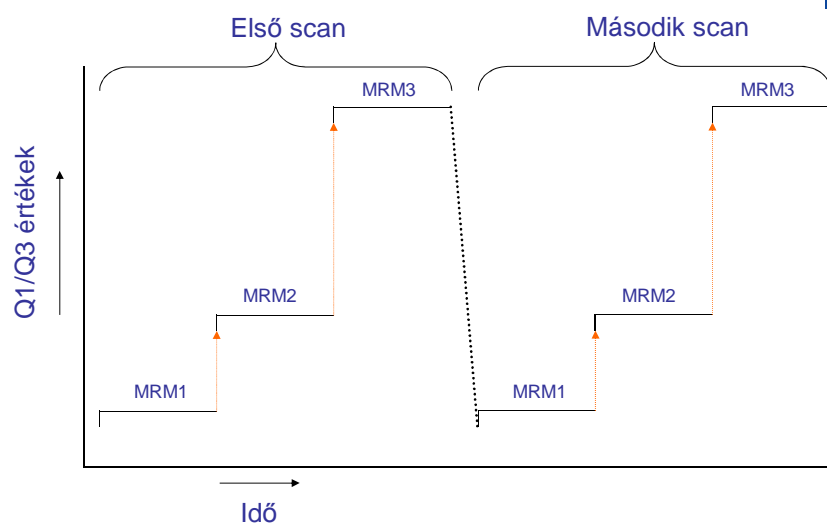
# Single Quad SIM

167



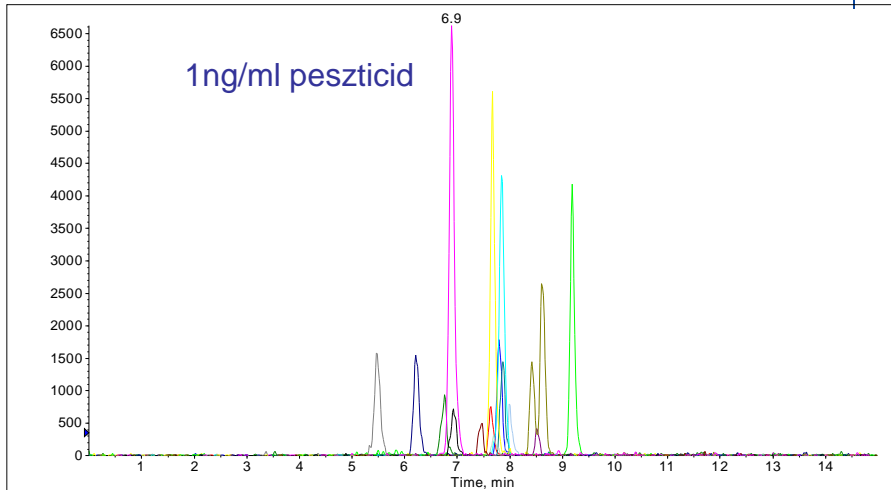
# MRM mód

168



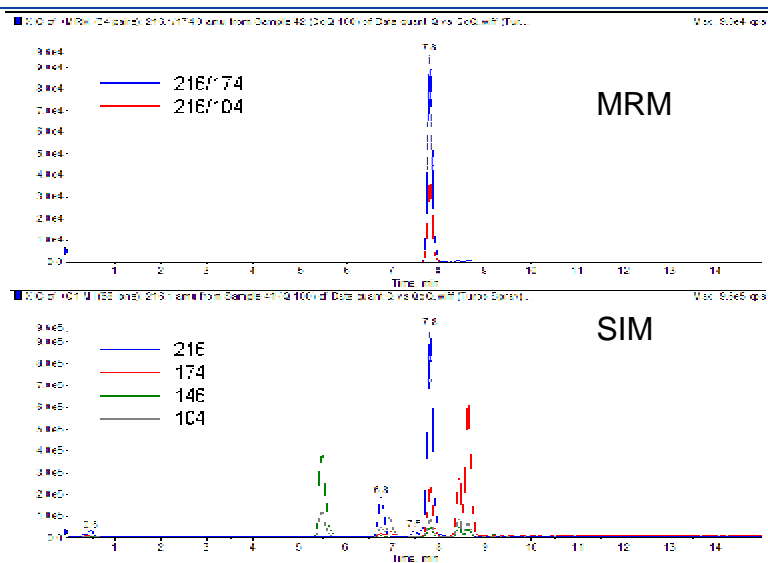
# Triple Quad MRM

169



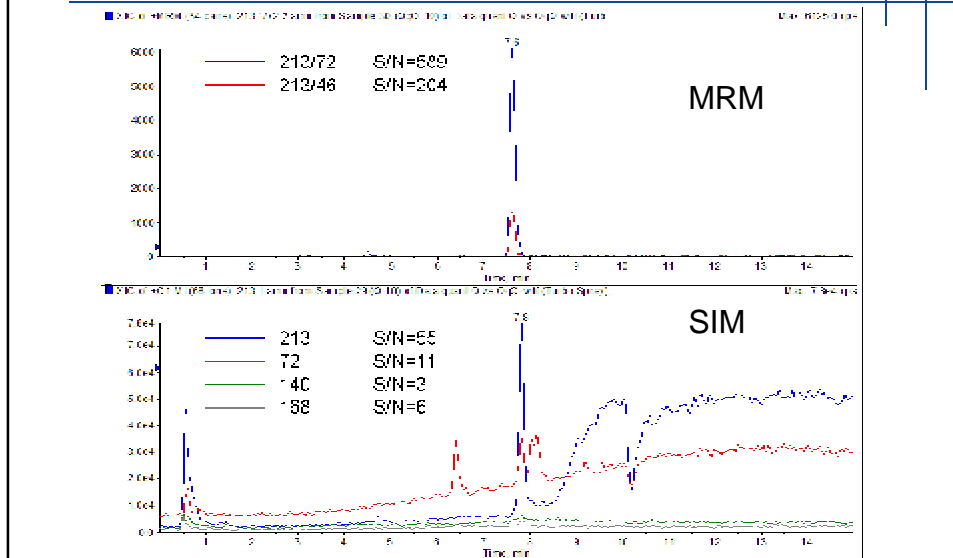
# Szelektivitás: Atrazin 100µg/L

170



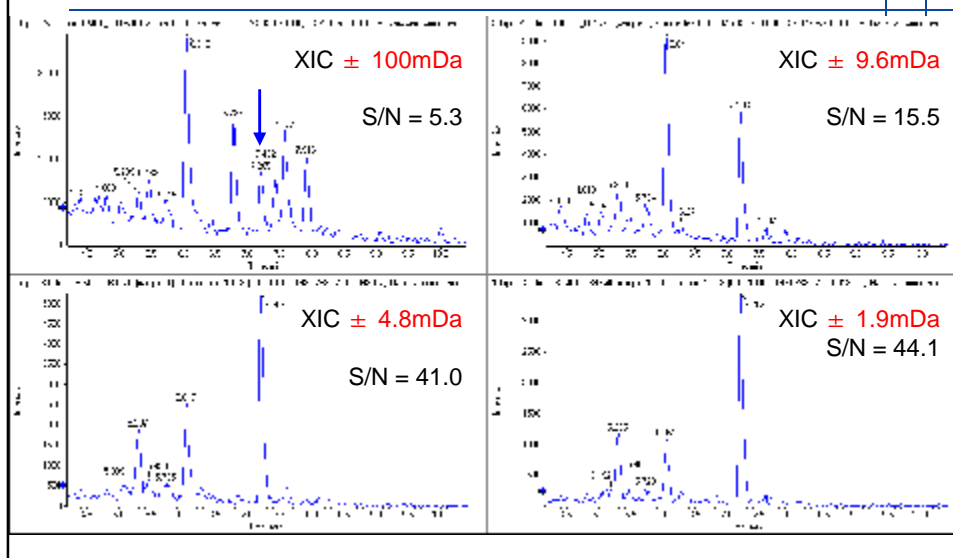
# Érzékenység: Chlortoluron 10µg/L

171



# Nagyfelbontás

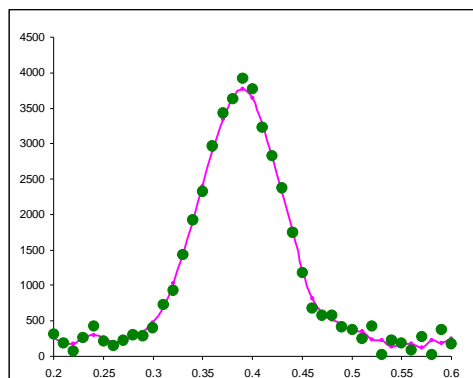
172



## Egy csúcs jellemzése

173

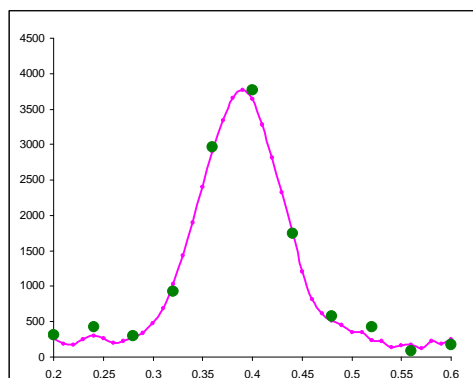
- A pontok számának csökkenésével a csúcs ábrázolása torzul
- S/N viszony nő a csúcsszélesség csökkenésével
- A kvantitáláshoz minimálisan szükséges pontok száma:6-20



## Egy csúcs jellemzése

174

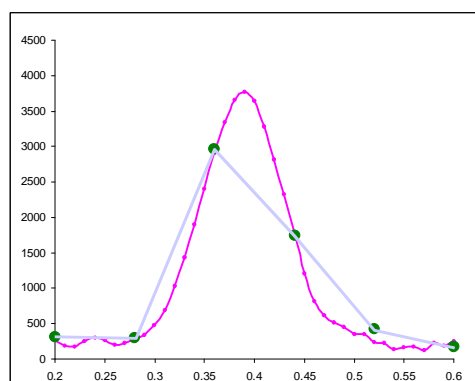
- A pontok számának csökkenésével a csúcs ábrázolása torzul
- S/N viszony nő a csúcsszélesség csökkenésével
- A kvantitáláshoz minimálisan szükséges pontok száma:6-20



## Egy csúcs jellemzése

175

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



## MRM határai

176

- Tipikus csúcsszélesség 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

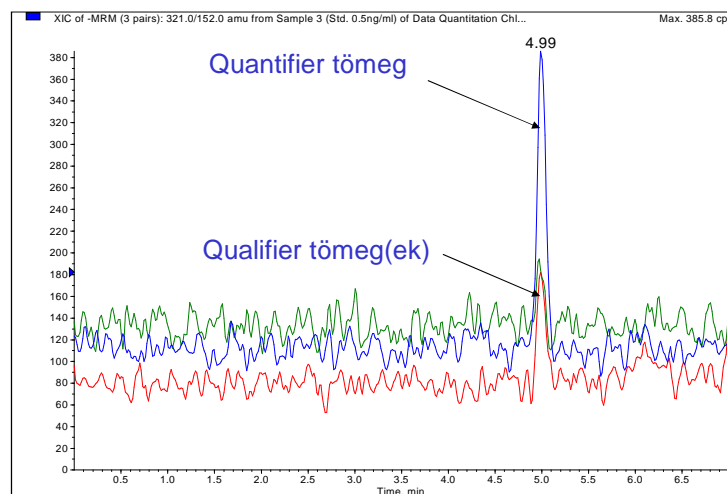
177

- Ajánlás 2002/657/EG
  - SIM és MRM (4 azonosítási pont)
    - MS anyaiion 1.0
    - MS<sup>2</sup> fragmens 1.5

2 MRMs = 4  
(megfelelő ionarány)
  - Full scan spektrum (spektrumkönyvtár)
  - Nagyfelbontású MS (>10 000)

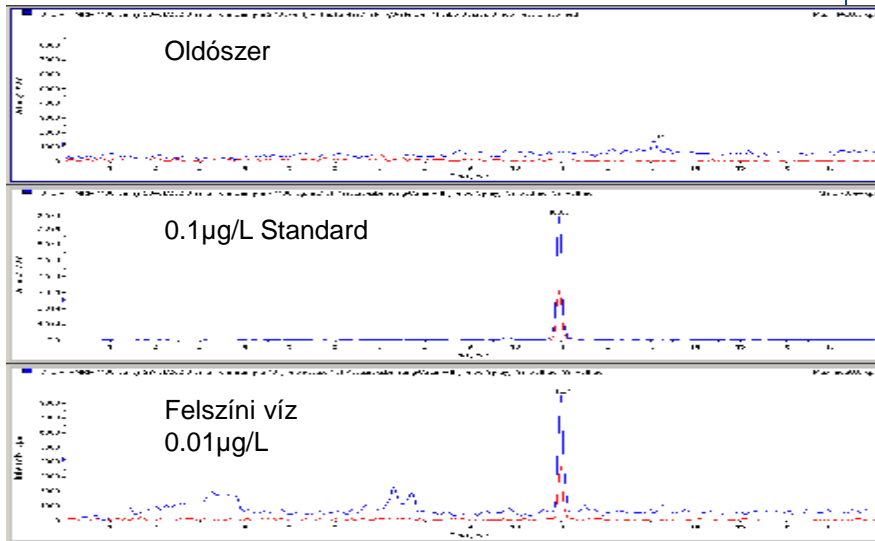
## Célmolekulák MRM átmenetei

178



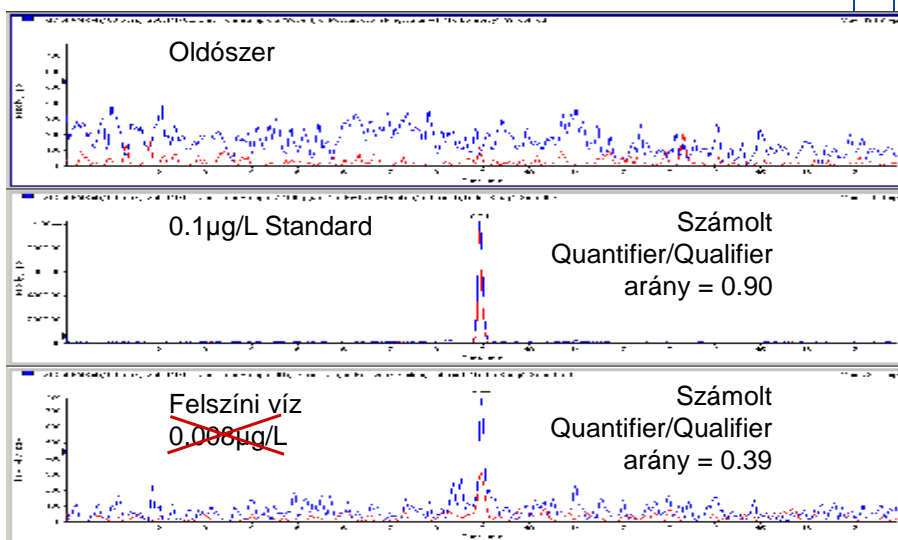
# Metolachlor Pozitív találat

179



# Metobromuron Negatív találat

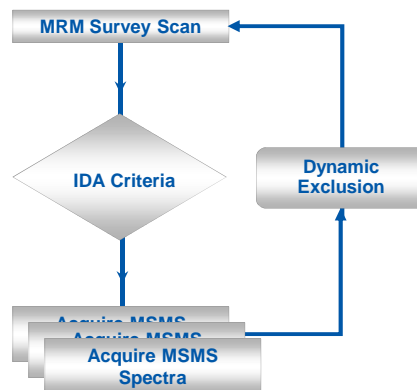
180



## QTrap kínálta screening lehetőség

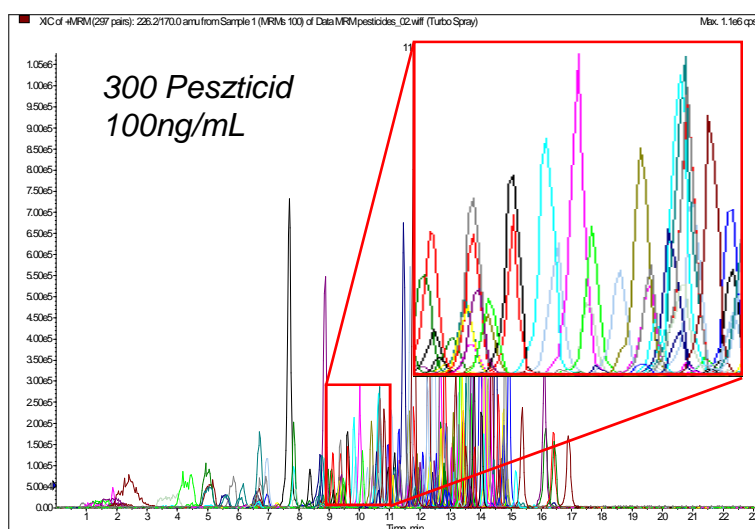
181

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



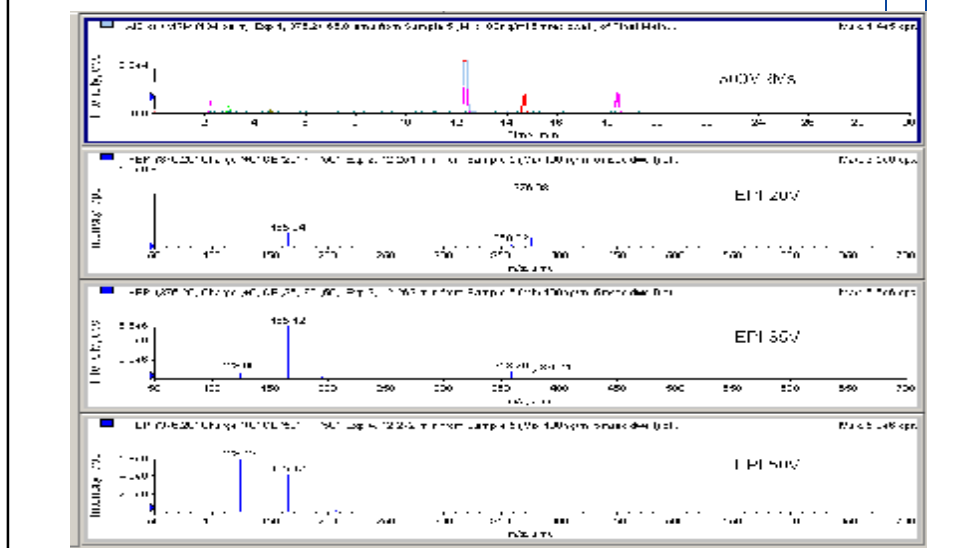
## 300 komponens egyidejű mérése

182



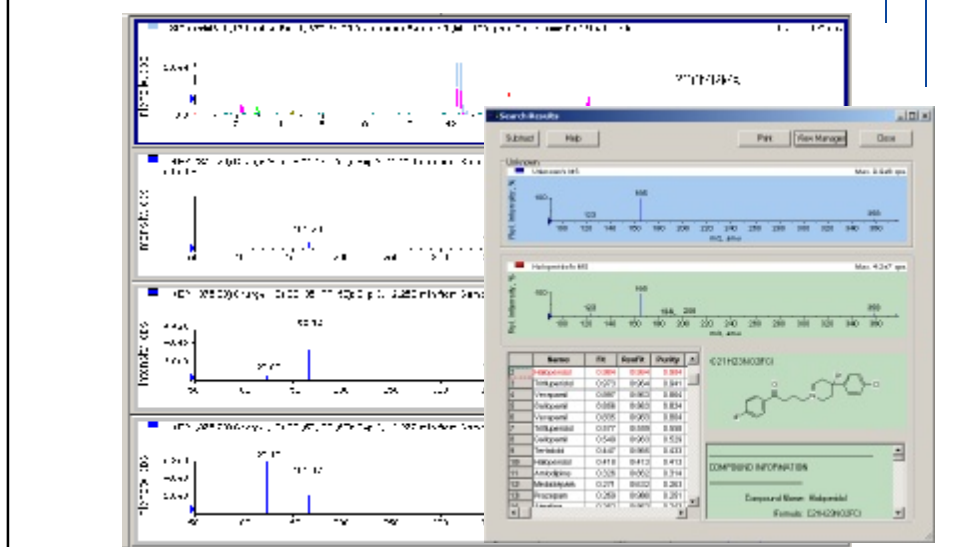
# Multi-target screening

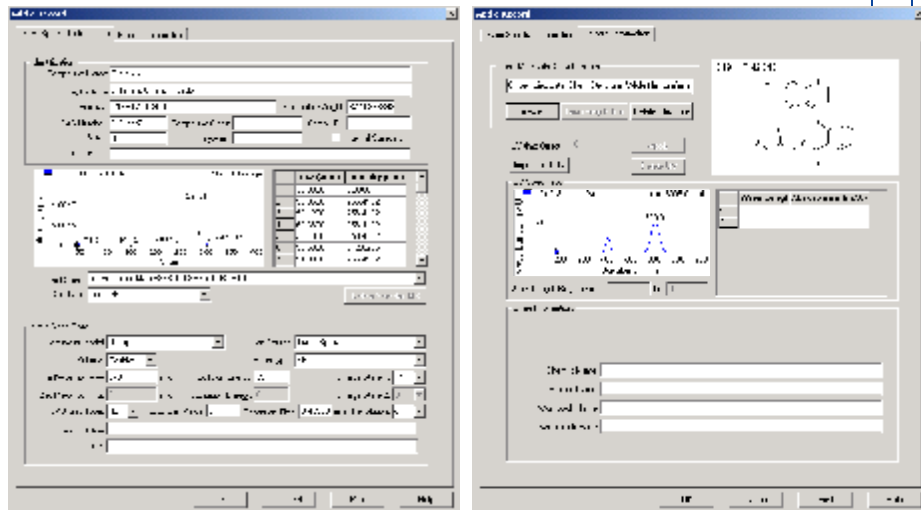
183



# Multi-target screening

184

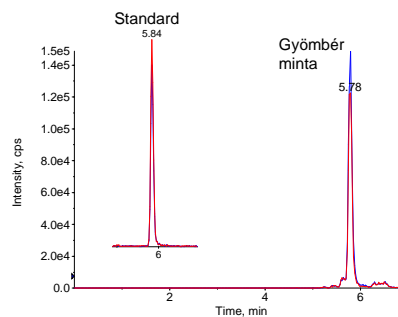




## A QTRAP nyújtotta lehetőségek

### 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**



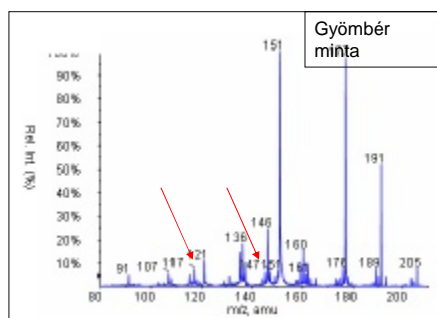
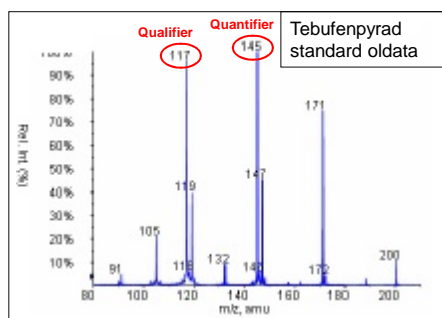
További vizsgálatokat igényelt, mivel gyömbérben még nem fordult elő!

## A QTRAP nyújtotta lehetőségek

187

### 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

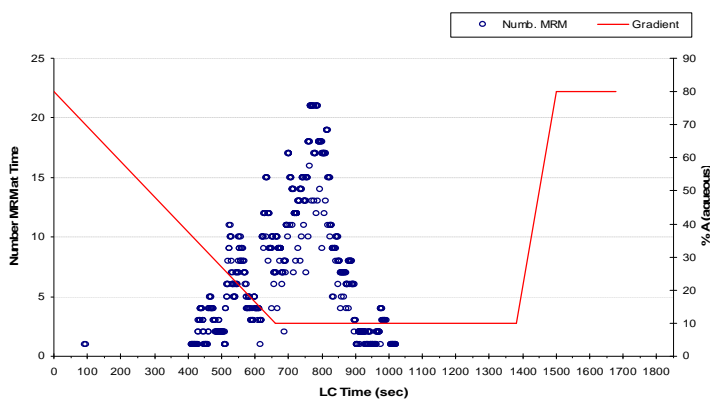
188

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

## Egy tipikus screening mérés

189

- MRM csatornák alakulása az LC mérés során: Csúcsszélesség 10sec, egyszerre vizsgált MRM csatornák átlaga : 7



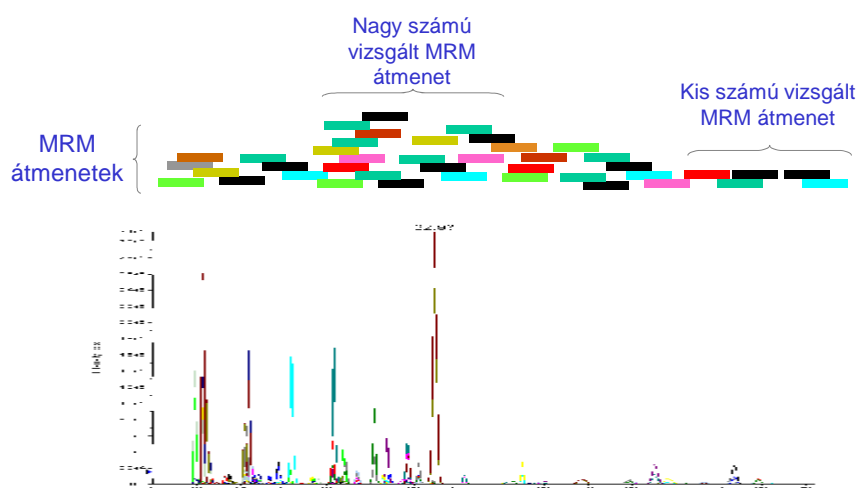
## Scheduled-MRM

190

- 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 metódot
  - Az idők alapján megtervezi az MRM átmeneteket
  - A minimális ciklusidőt VAGY dwell time-ot veszi alapul

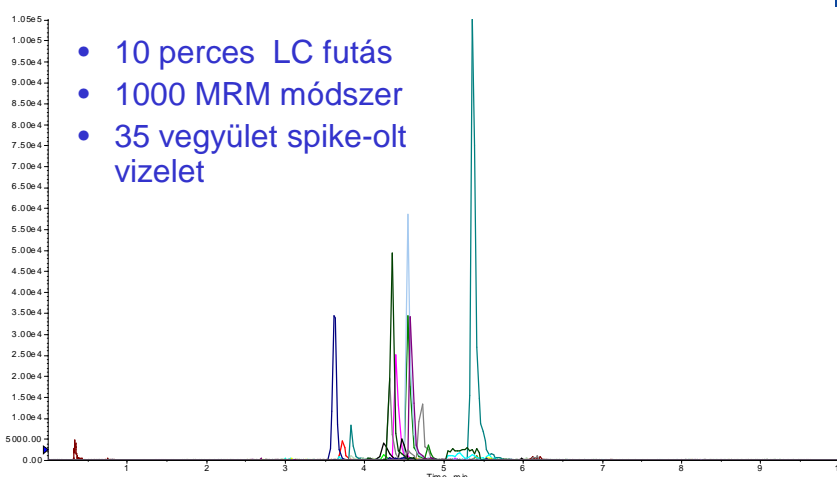
## Scheduled-MRM: a koncepció

191



## High throughput vizsgálat sMRM módszerrel

192

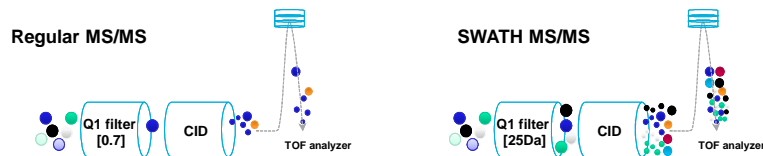




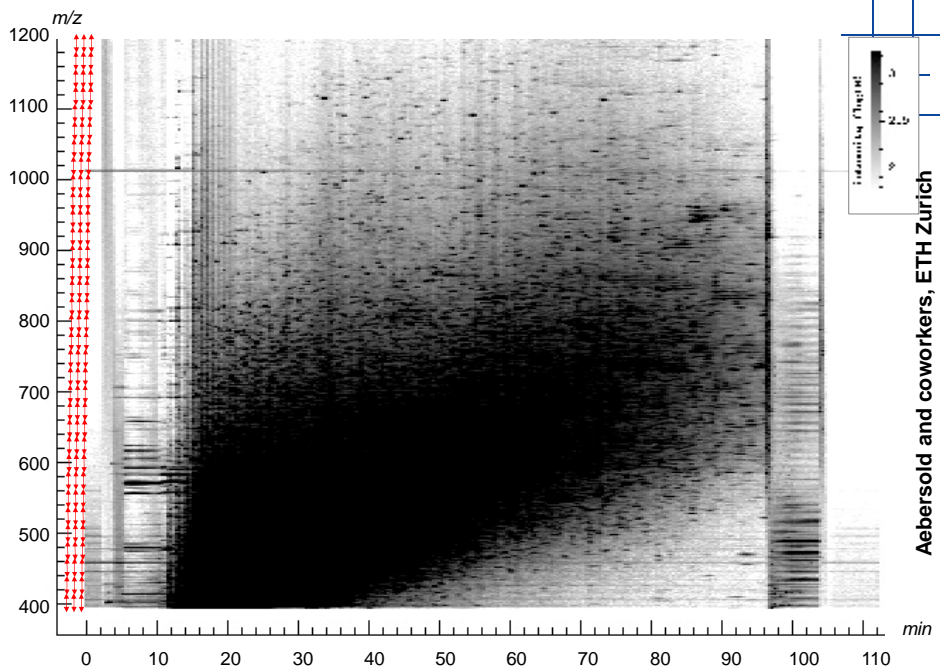
## Nontargeted screening: SWATH™

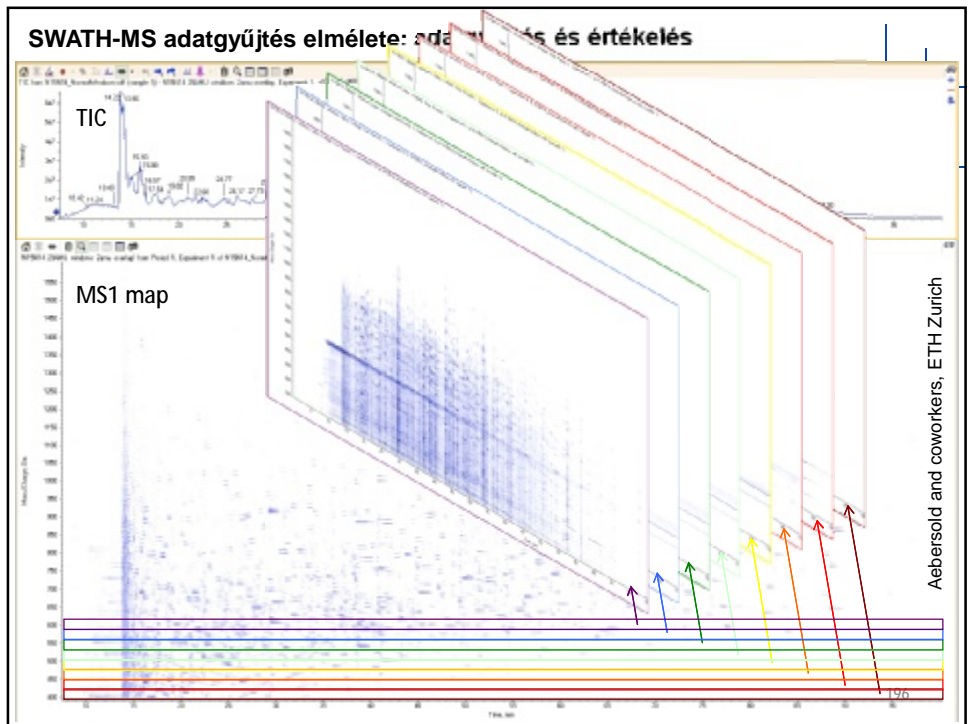
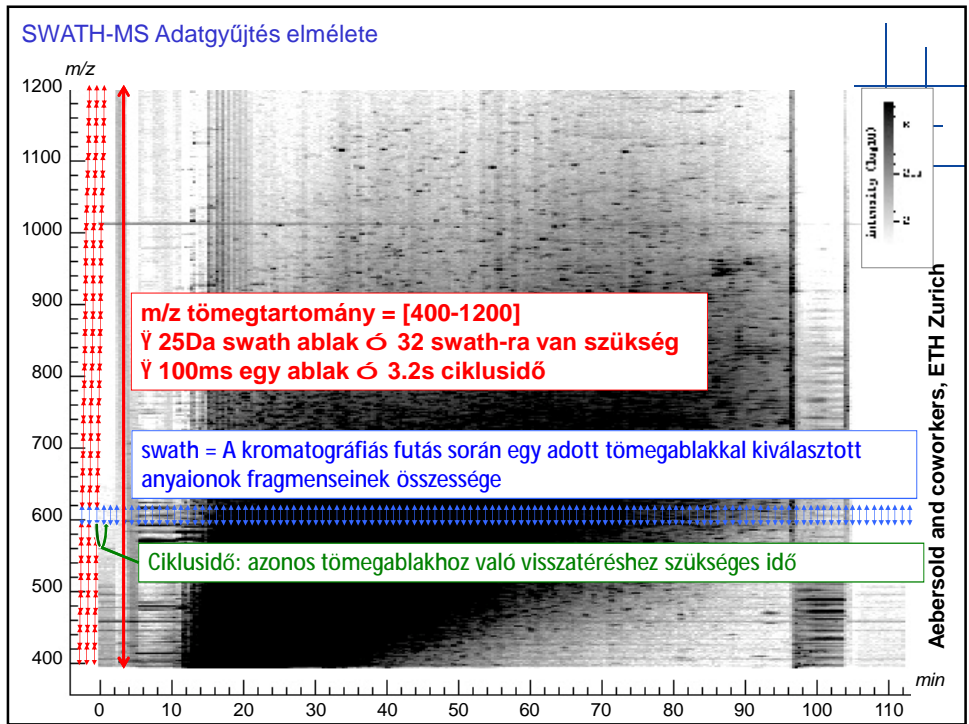
193

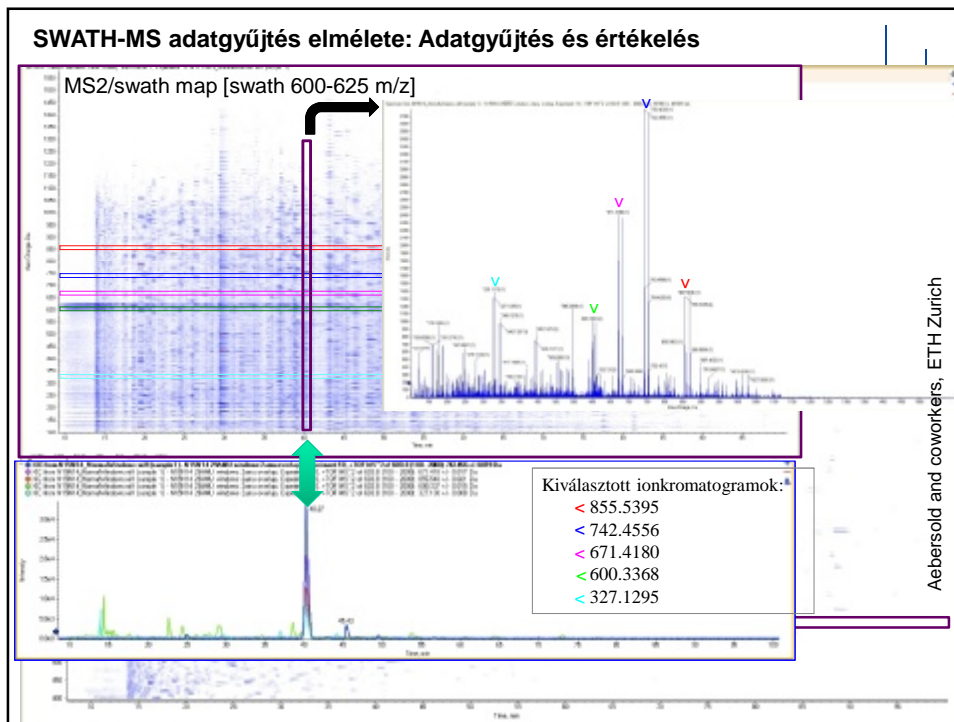
- „**S**equential **W**indowed **A**cquisition of all **T**heoretical mass spectra” lehetővé teszi MS/MS felvételek készítését általános és átfogó módon
  - A Q1 kvadrupólt szélesre nyitjuk és léptetjük a teljes tömegtartományban
  - Data Independent Acquisition (DIA), információtól **független** mérés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



SWATH-MS Adatgyűjtés elmélete







## Mennyiségi meghatározások

	Komp/inj	Érzékenység	Szelektivitás	Retrospektív
Q SIM	<100	-	-	Nem
QqQ MRM	150	+	+	Nem
QTrap MS <sup>3</sup>	<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

199

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

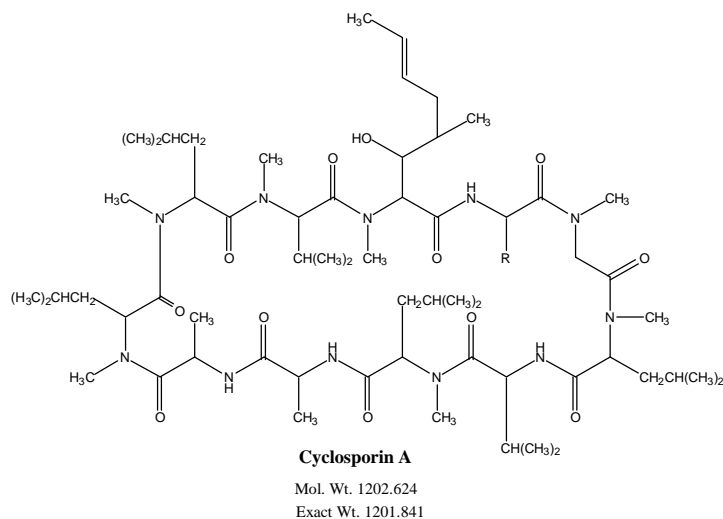
## Immunszuppresszánsok

200

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

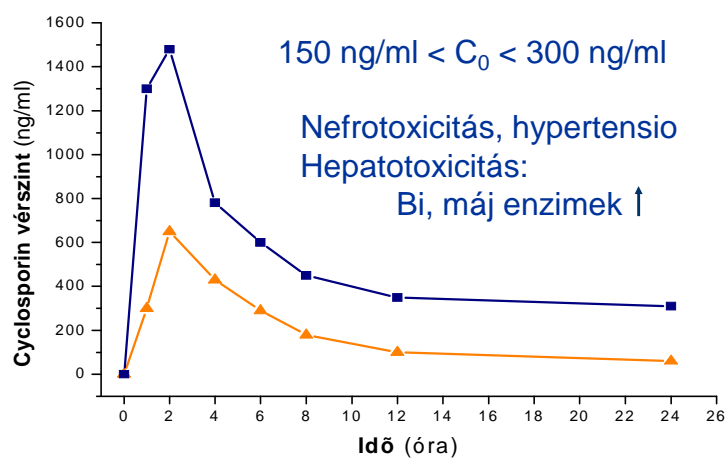
# Immunoszuppresszánsok

201



# Ciklosporin toxicitás

202



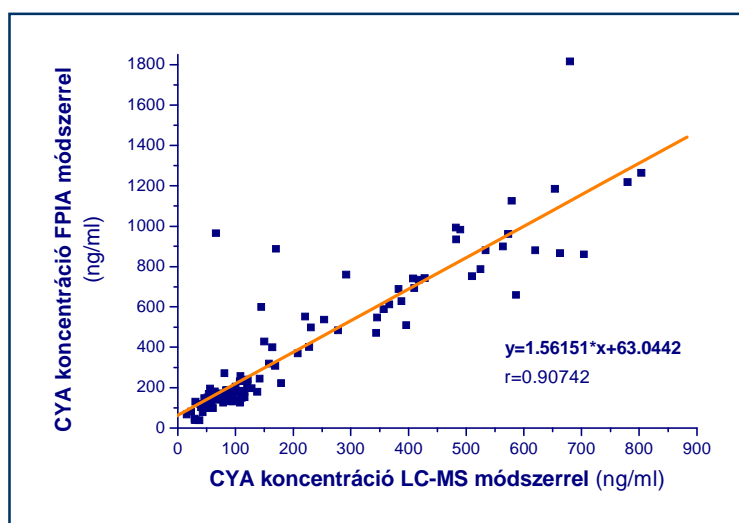
## CSA vérszint meghatározás

203

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

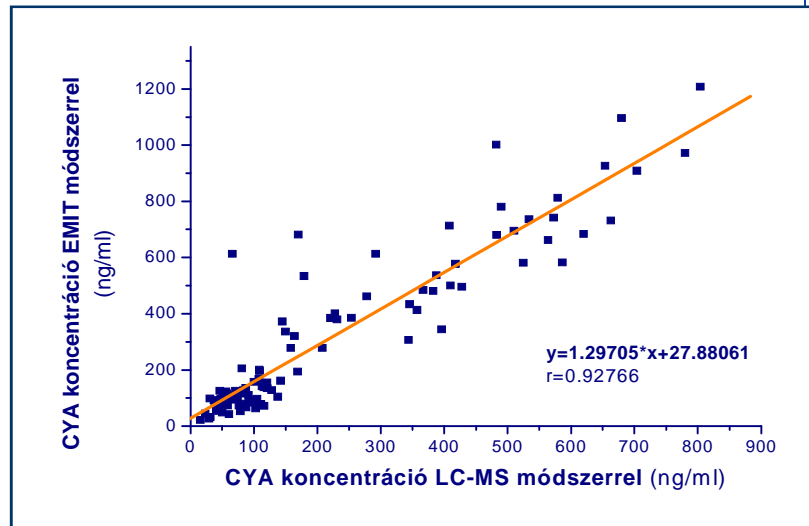
## FPIA vs. LCMS

204



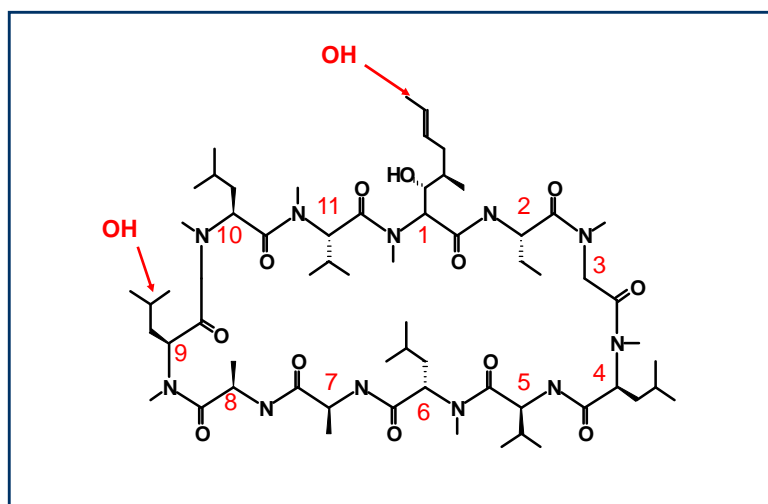
## EMIT vs. LCMS

205



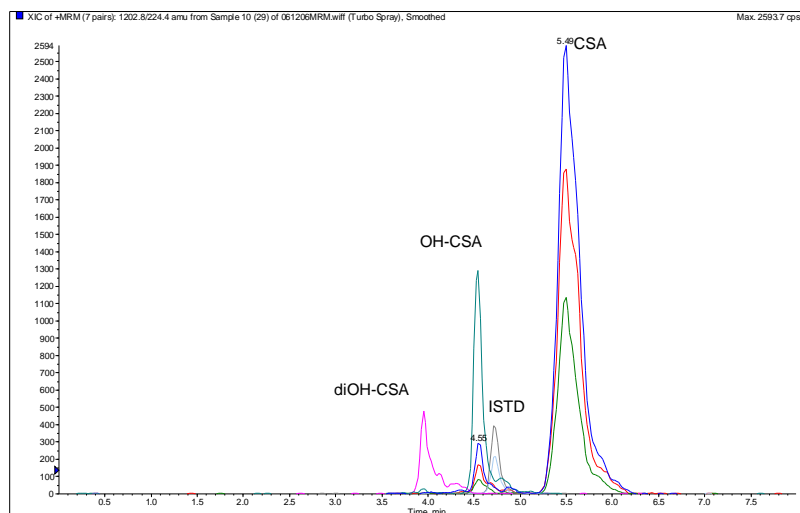
## Ciklosporin metabolizmusa: CYP3A4

206



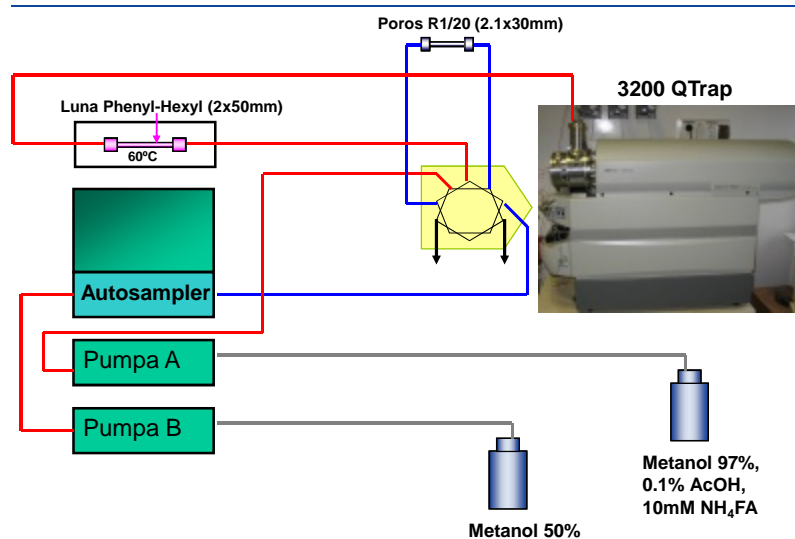
# CSA metabolitjai MRM

207



# 2D LCMS

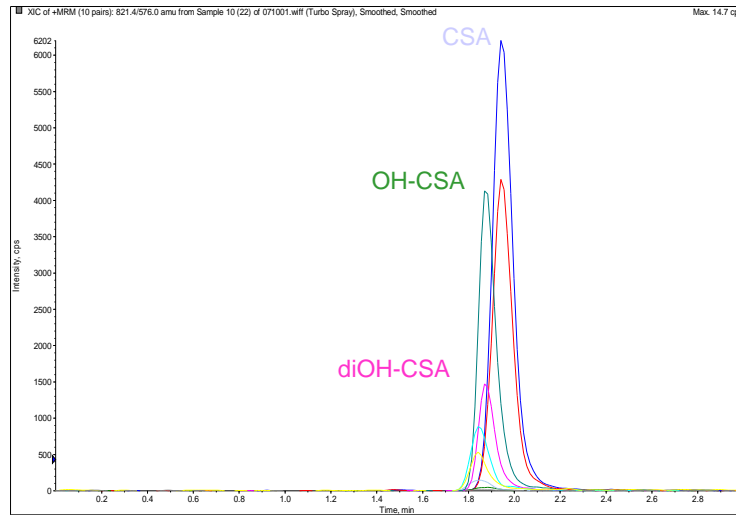
208





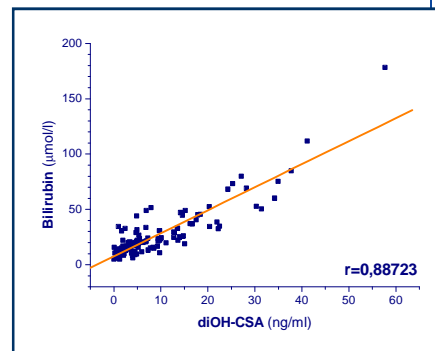
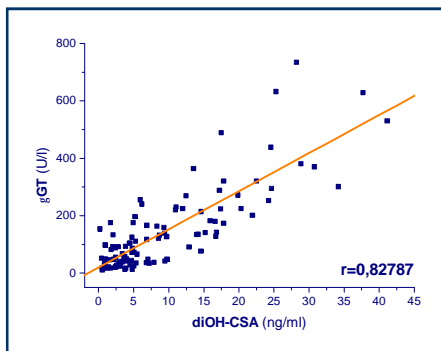
# 2D LC/MS/MS

209



# diOH-ciklosporin vs GGT /se Bi

210

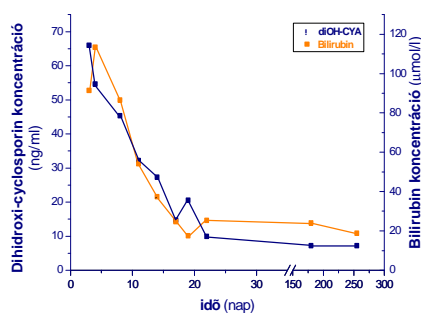
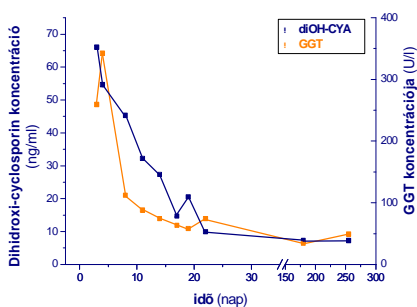


$n=110$

## Dihidroxi-ciklosporin vérszint I.

211

Receptiens: KI 2007.01.03  
45 éves férfi  
HCV

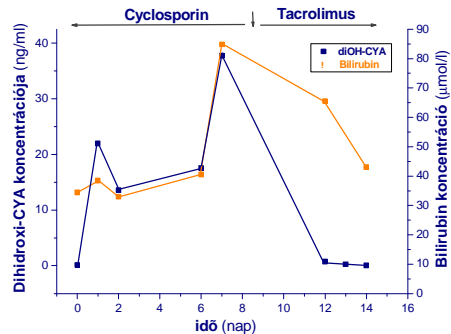
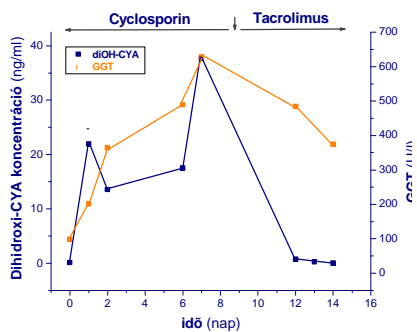


## Dihidroxi-ciklosporin vérszint II.

212

Receptiens: FNGy 2007.09.05  
52 éves férfi  
HBV

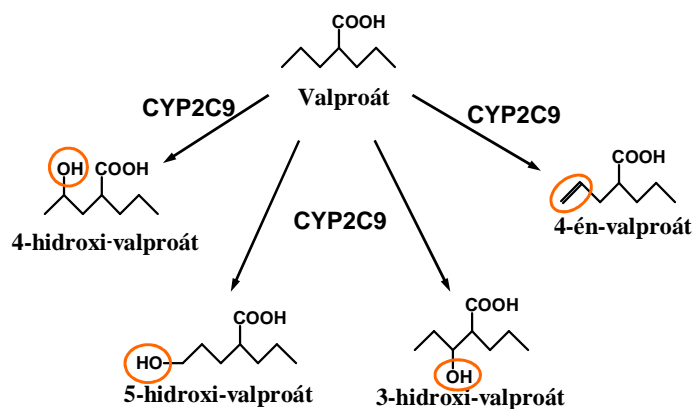
Donor: 52 éves nő  
CYP3A4 aktivitás magas!!



## Egyéni terápia megvalósítása

- Genotipizálás
- Fenotipizálás

## Valproát metabolizmusa



## Genetikai polimorfizmusa

215

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

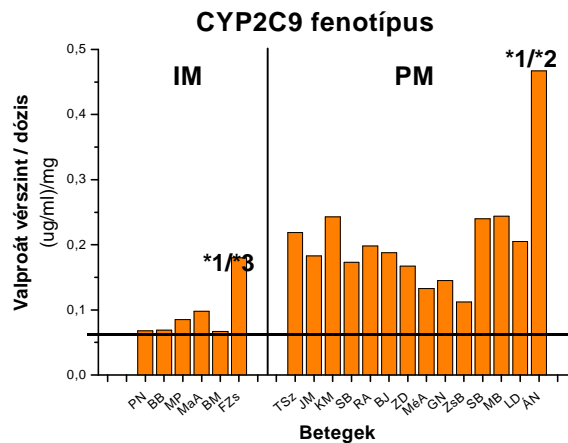
## Esetismertetés

216

- 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

217



## Valproát kezelés a CYP2C9-státus ismeretében

218

- 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