

Endogén szteroidprofil vizsgálata folyadékkromatográfiával és tandem tömegspektrométerrel

Karvaly Gellért

Miért hasznos a vegyületprofilok vizsgálata?

- 1 mintából, kis mintatérfogatból, gyorsan nyerhető klinikai információ
- vegyületek hiánya a betegmintában azonnal és egyértelműen észlelhető
- mennyiségi arányok gyorsan meghatározhatók



Flexar FX-10 UHPLC



Sciex 5500QTRAP MS

tömegspektrográfia → ez az „ős”.

tömegspektroszkópia → elavult kifejezés

320. mass spectrometry

Obsolete: mass spectroscopy

Study of matter through the formation of gas-phase *ions* that are characterized using *mass spectrometers* by their mass, charge, structure, and/or physico-chemical properties.

Note 1: The term is a misnomer because it is m/z rather than mass that is the independent variable in a *mass spectrum*.

Note 2: *Mass spectroscopy* is an obsolete synonym for *mass spectrometry* that should not be used to avoid confusion with spectroscopies in which the measured quantity is the absorption or emission of electromagnetic radiation.

From [5,6].

A folyadékkromatográfiás elválasztás lényege

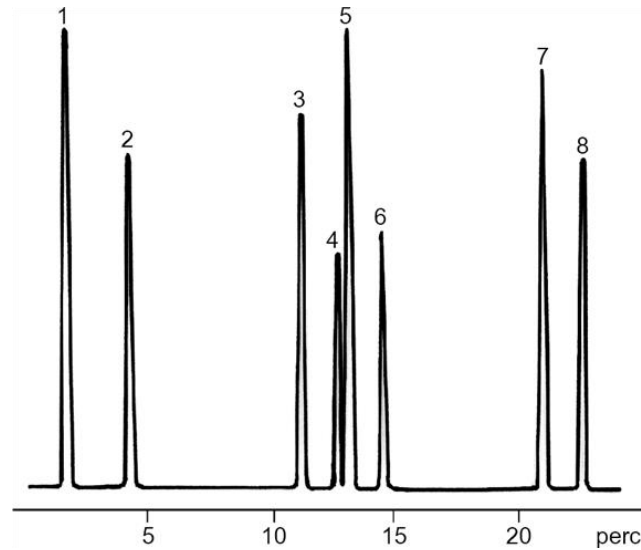
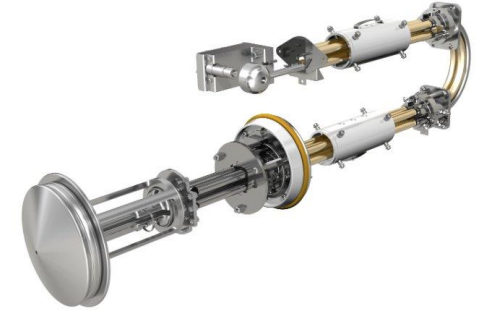
eluenstartály



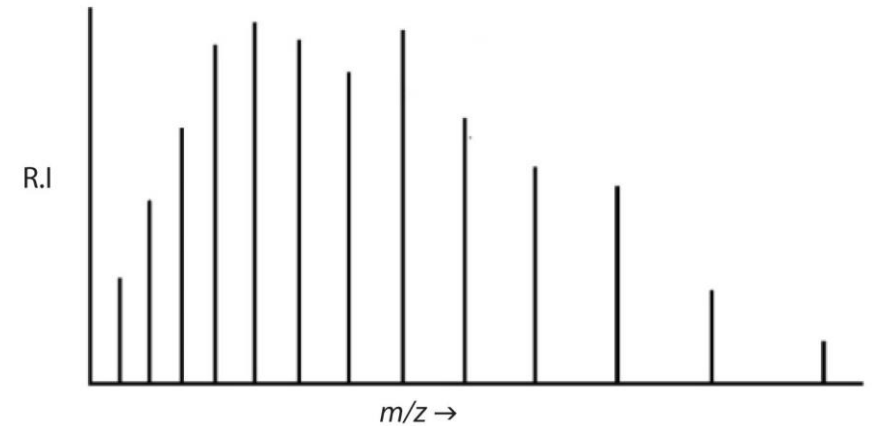
HPLC pumpa



mintabeviteli
egység



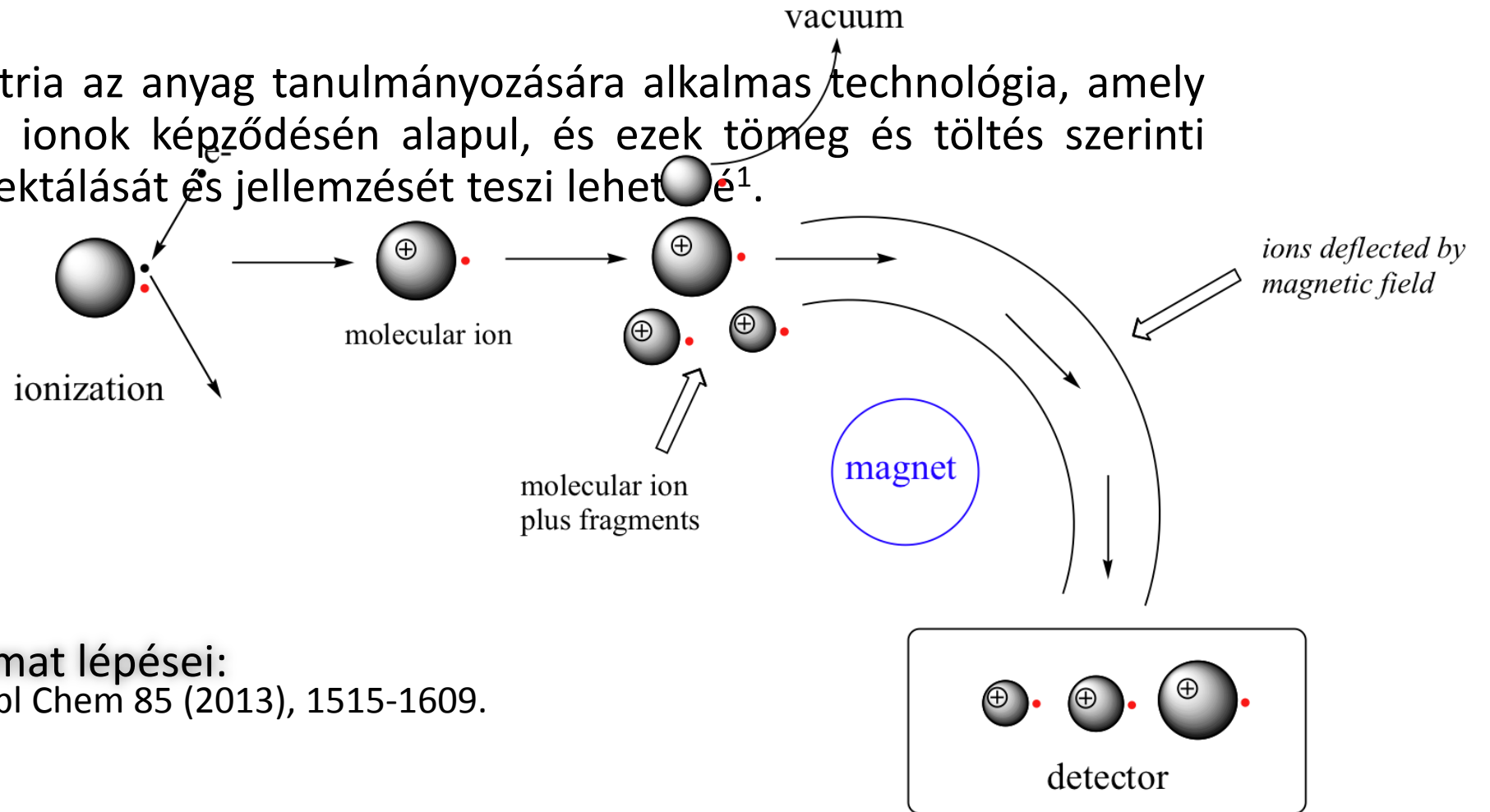
állófázis:
komponensek elválasztása



tömegspektrométer:
komponensek detektálása

A tömegspektrometria alapjelenségei

- A tömegspektrometria az anyag tanulmányozására alkalmas technológia, amely gáz halmazállapotú ionok képződésén alapul, és ezek tömeg és töltés szerinti szétválasztását, detektálását és jellemzését teszi lehetővé¹.

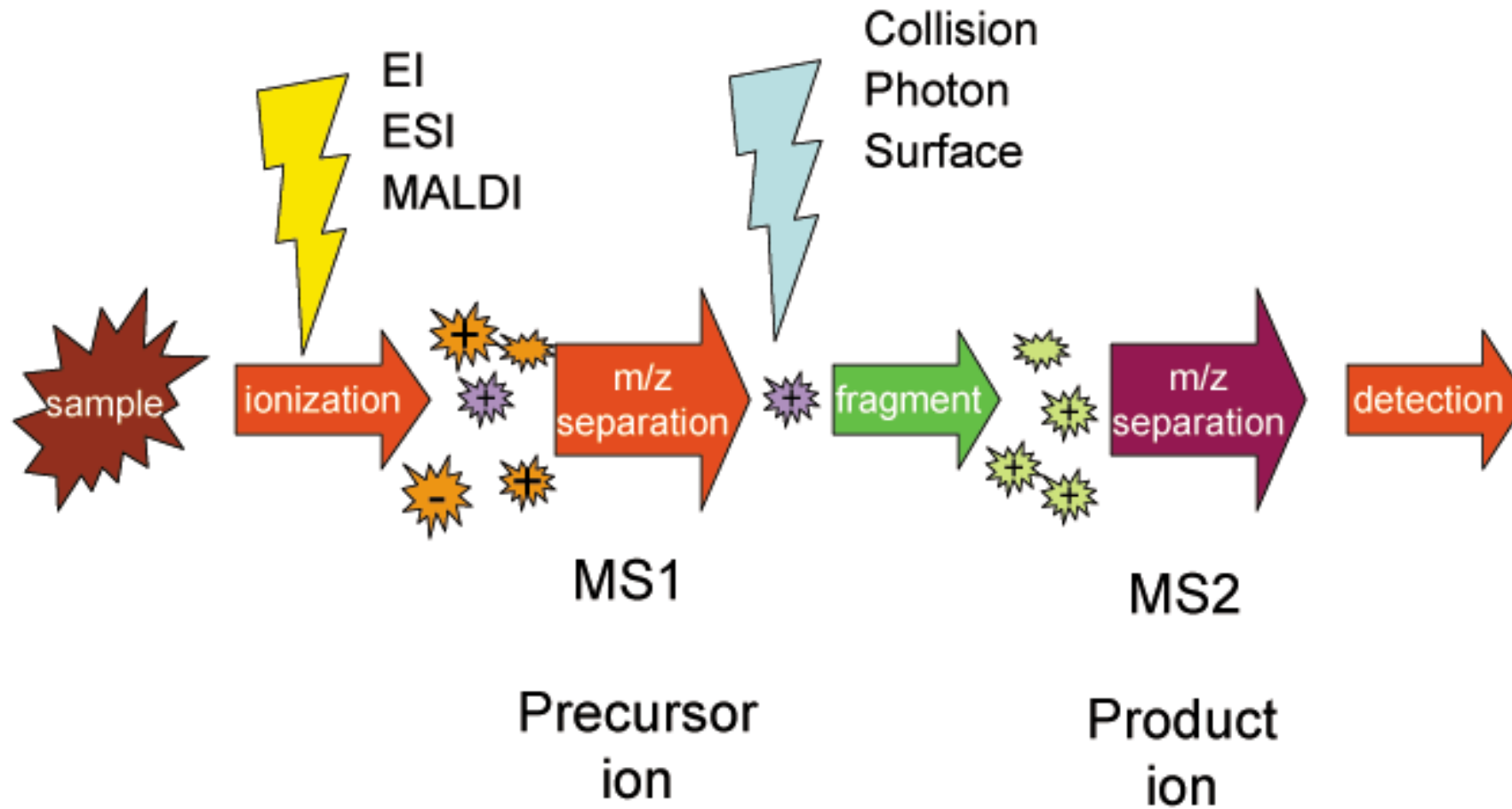


- A kimutatási folyamat lépései:

¹ Murray.KK et al.: Pure Appl Chem 85 (2013), 1515-1609.

- ionizáció
- fragmentáció
- ionok kiválasztása (m/z)
- tömegspektrum létrehozása

A tandem tömegspektrometria elve



Az LC-MS/MS vizsgálat folyamata

a minta komponenseit folyadékkromatográfiával elválasztjuk



a komponenseket ionizáljuk: a molekulaion jellemző a szerkezetre



a molekulaiont fragmentáljuk: kiválaszthatóak a szerkezetre
nagymértékben vagy egészében specifikus ionok



elvégezzük a mennyiségi analízist

Az LC-MS/MS technika használatának előnyei

- kiemelkedő érzékenység, szelektivitás, reprodukálhatóság és kimutatási specifikusság
- gyors mérések → nagy áteresztőképesség
- rugalmas vizsgálati spektrum: bővíthető, átalakítható a klinikusi igényekhez igazodva

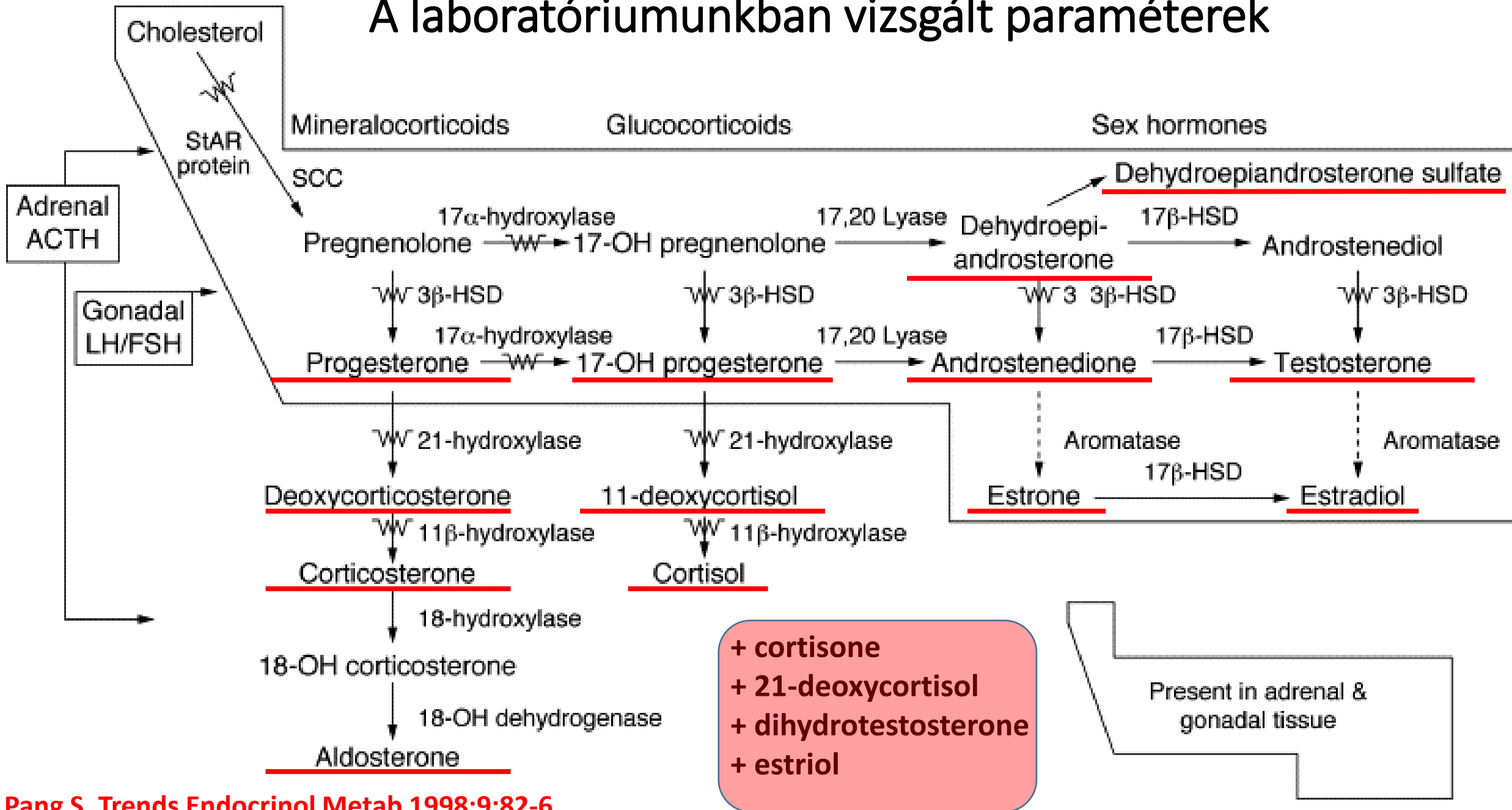
Tömegspektrometria vs immunoassay

szempont	tömegspektrometria	immunoassay
érzékenység	<1 nmol/l	<1 nmol/l
specifikusság	kontrollálható	nem kontrollálható
módszer testreszabása	lehetséges	nem lehetséges
gyári reagenskészlet	nem jellemző	jellemző
mátrix	változatos	nem kontrollálható
megbízhatóság	megfelelő, kontrollálható	nem kontrollálható
üzemben tartási költség	magas	közepes
egy paraméterre eső költség	0,5 – 50 USD	széles tartományban változó
a vizsgálatok elvégzése szakembert igényel	igen	nem
bekerülési költség	magas	alacsony vagy nincs

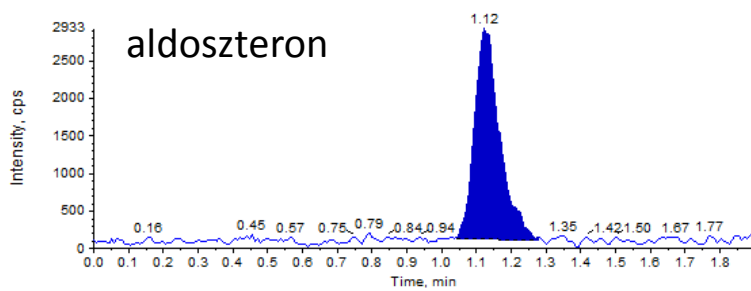
A szteroid profil felvételének jelentősége

- Szűrés, diagnózis és az állapot, illetve a terápia nyomon követése:
- kongenitális adrenális hiperplázia
- policisztás ovárium szindróma
- Cushing-kór
- Addison-kór
- az HPA tengely és a gonádok egyéb funkciózavarai
- gyógyszeres kezelések mellékhatásai

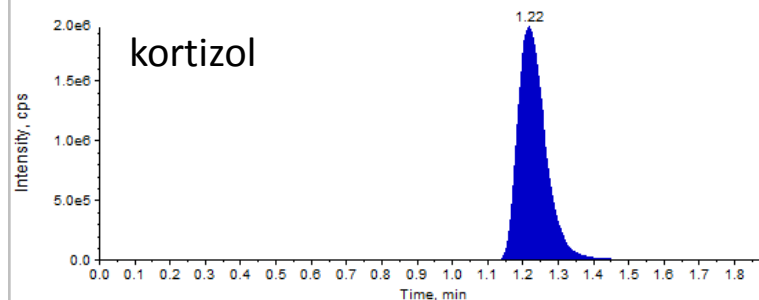
A laboratóriumunkban vizsgált paraméterek



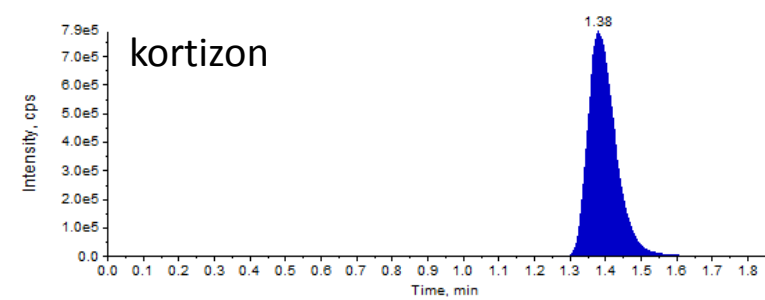
LO2A5-1 - ALDO-2 (Unknown) 359.100/189.000 Da - sample 10 of 56 from 20150803.wiff
Area: 1.41e+004 counts Height: 2.81e+003 cps RT: 1.12 min



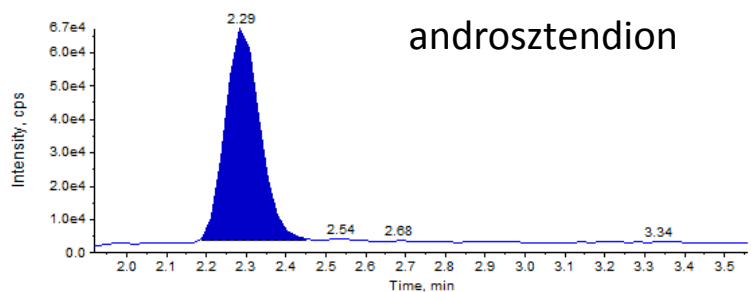
LO2A5-1 - cortisone (Unknown) 405.200/328.900 Da - sample 10 of 56 from 20150803.wiff
Area: 1.00e+007 counts Height: 1.90e+006 cps RT: 1.22 min



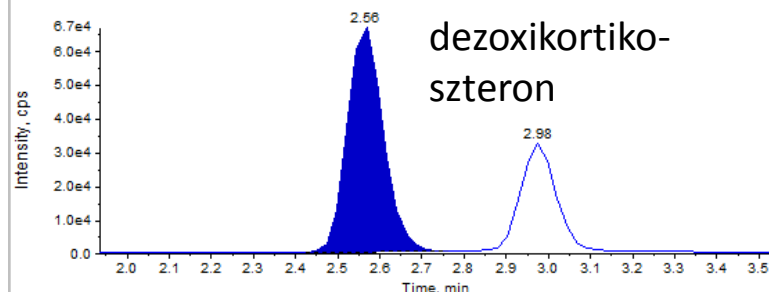
LO2A5-1 - cortisol-2 (Unknown) 407.200/282.000 Da - sample 10 of 56 from 20150803.wiff
Area: 4.20e+006 counts Height: 7.89e+005 cps RT: 1.38 min



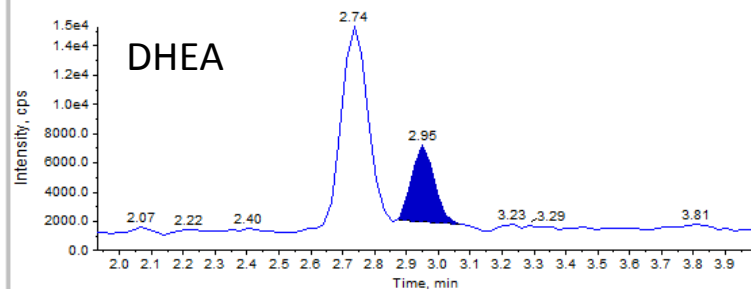
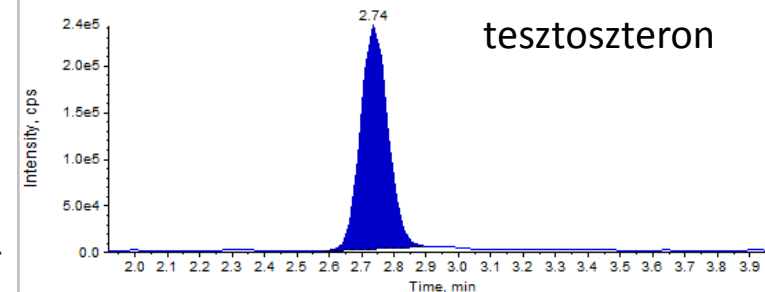
LO2A5-1 - AD (Unknown) 287.300/97.000 Da - sample 10 of 56 from 20150803.wiff
Area: 3.83e+005 counts Height: 6.39e+004 cps RT: 2.29 min



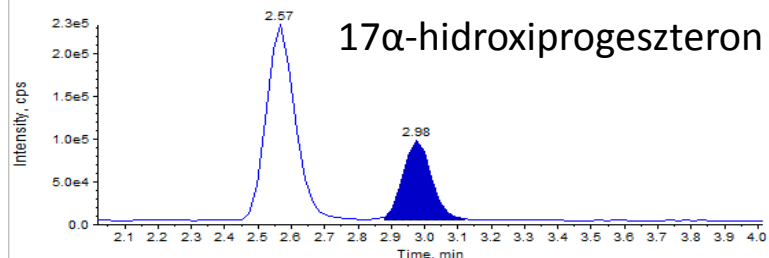
LO2A5-1 - DOC (Unknown) 331.100/79.000 Da - sample 10 of 56 from 20150803.wiff
Area: 3.96e+005 counts Height: 6.70e+004 cps RT: 2.56 min



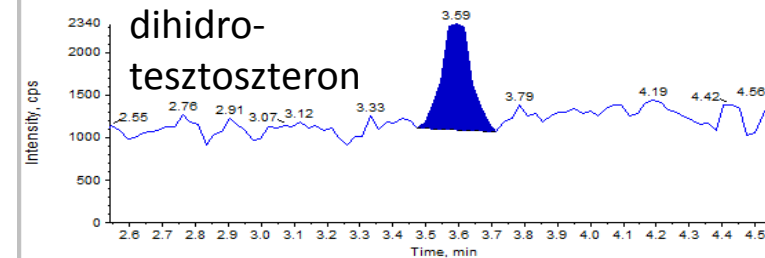
LO2A5-1 - T (Unknown) 289.300/97.100 Da - sample 10 of 56 from 20150803.wiff
Area: 1.39e+006 counts Height: 2.40e+005 cps RT: 2.74 min



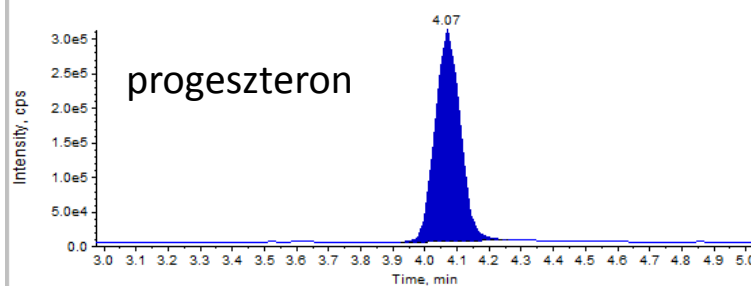
LO2A5-1 - OHP (Unknown) 331.100/97.100 Da - sample 10 of 56 from 20150803.wiff
Area: 5.35e+005 counts Height: 9.31e+004 cps RT: 2.98 min



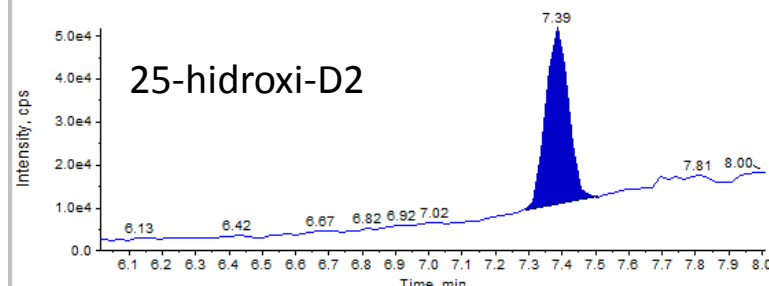
LO2A5-1 - DHT (Unknown) 291.100/105.000 Da - sample 10 of 56 from 20150803.wiff
Area: 7.93e+003 counts Height: 1.25e+003 cps RT: 3.59 min



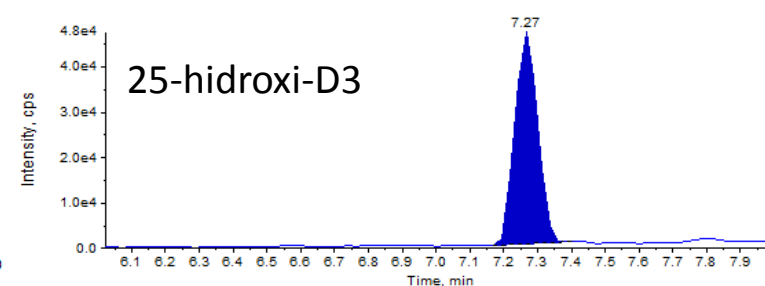
LO2A5-1 - PROG (Unknown) 315.200/97.100 Da - sample 10 of 56 from 20150803.wiff
Area: 1.62e+006 counts Height: 3.06e+005 cps RT: 4.07 min



LO2A5-1 - OHD-2 (Unknown) 413.300/395.200 Da - sample 10 of 56 from 20150803.wiff
Area: 1.93e+005 counts Height: 4.10e+004 cps RT: 7.39 min



LO2A5-1 - OHD-3 (Unknown) 401.300/365.100 Da - sample 10 of 56 from 20150803.wiff
Area: 2.23e+005 counts Height: 4.67e+004 cps RT: 7.27 min



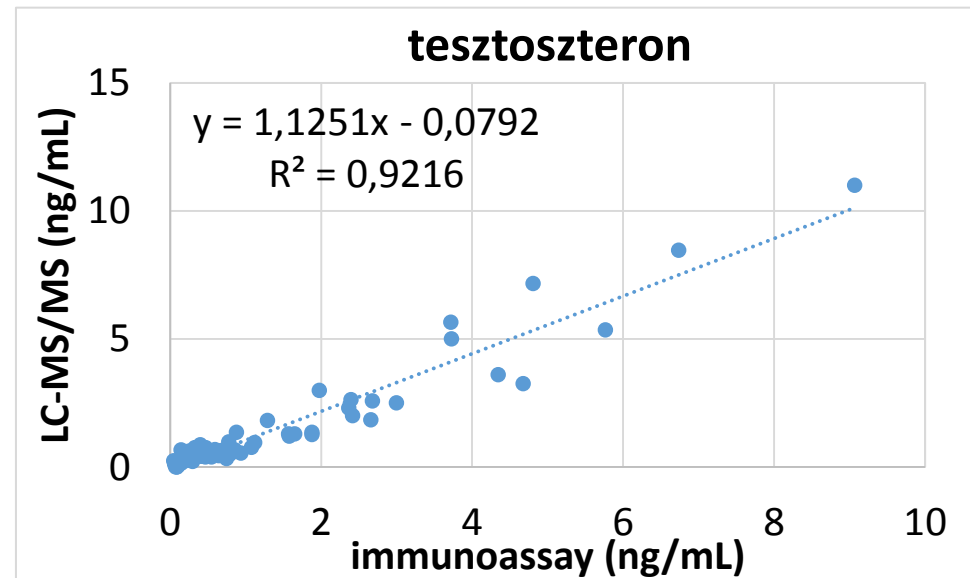
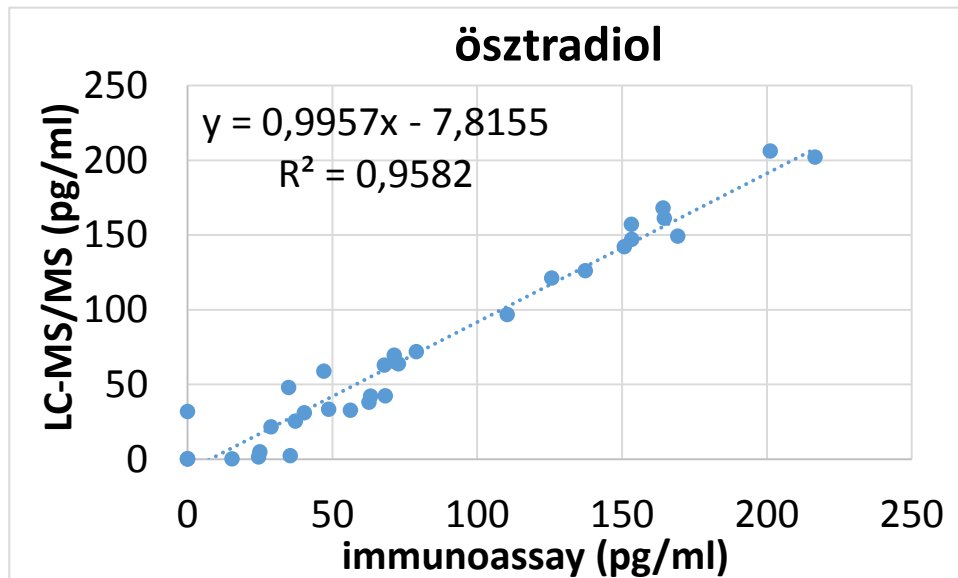
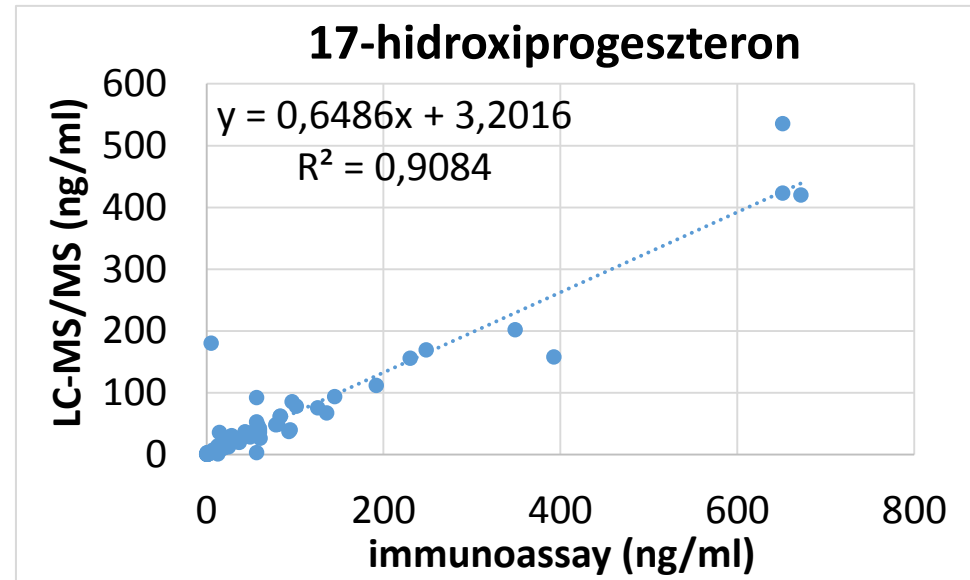
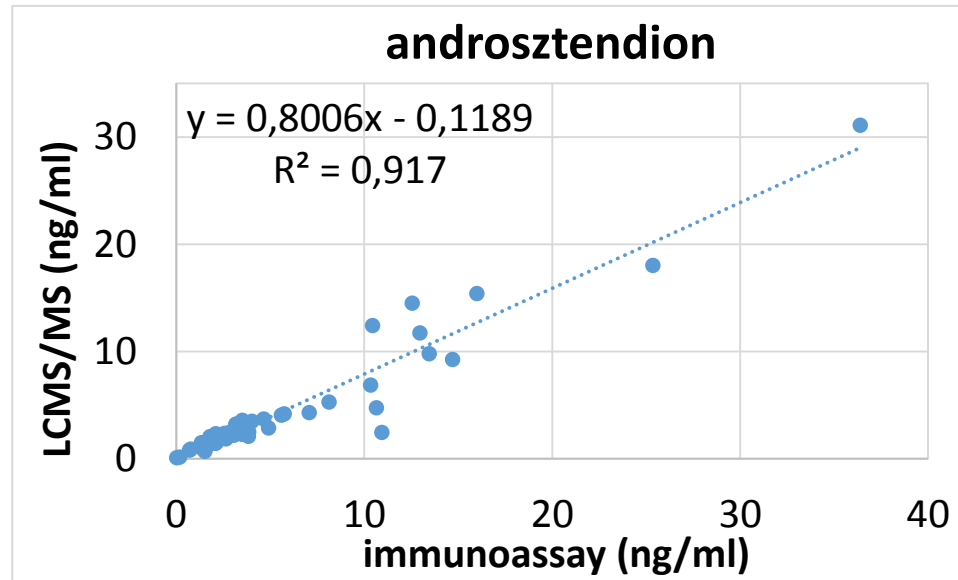
Vizsgálati stratégia

- 3 mintából 4 mérést végzünk (összesen **kb. 30 min**)
- a 4 panel külön-külön vizsgálható/kérhető, mérés technikailag nincs összefüggés
- vizsgálati minta: natív szérum, legalább 1,2 ml (részleges profilnál legalább 0,6 ml)
- ahol létezik olyan, független kalibrátorokat és kontrollokat használunk

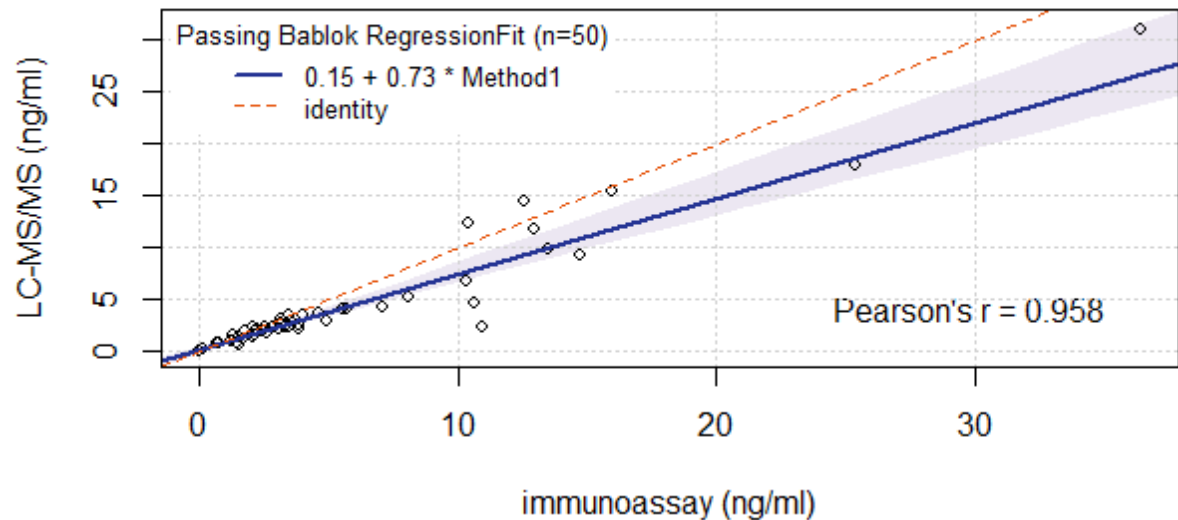
Vizsgálati stratégia

- 1. mérés (1. minta): 4,0 min
 - aldoszteron, androsztendion, dehidroepiandroszteron, dezoxikortikoszteron, dihidrotesztoszteron, 25-hidroxiergokalciferol, 25-hidroxikolekalciferol, 17-hidroxiprogoszteron, progoszteron, tesztoszteron
- 2. mérés (1. minta): 10 min
 - kortikoszteron, 11-deoxikortizol, 21-deoxikortizol
- 3. mérés (2. minta): 3,5 min
 - dehidroepiandroszteron-szulfát, kortizol, kortizon
- 4. mérés (3. minta): 11 min
 - ösztron, ösztradiol, ösztriol

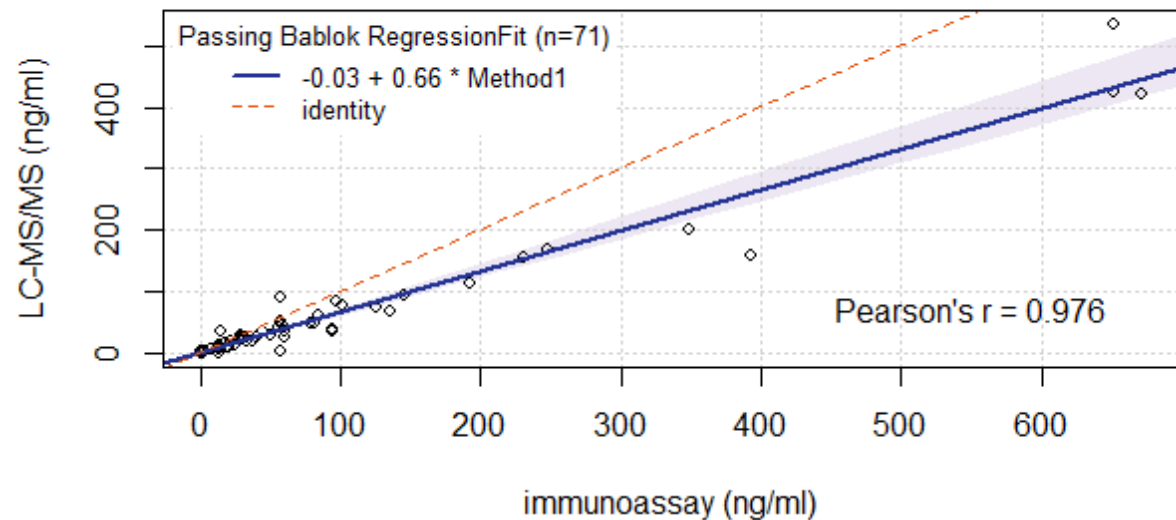
Immunoassay módszerekkel történő összemérések eredményei



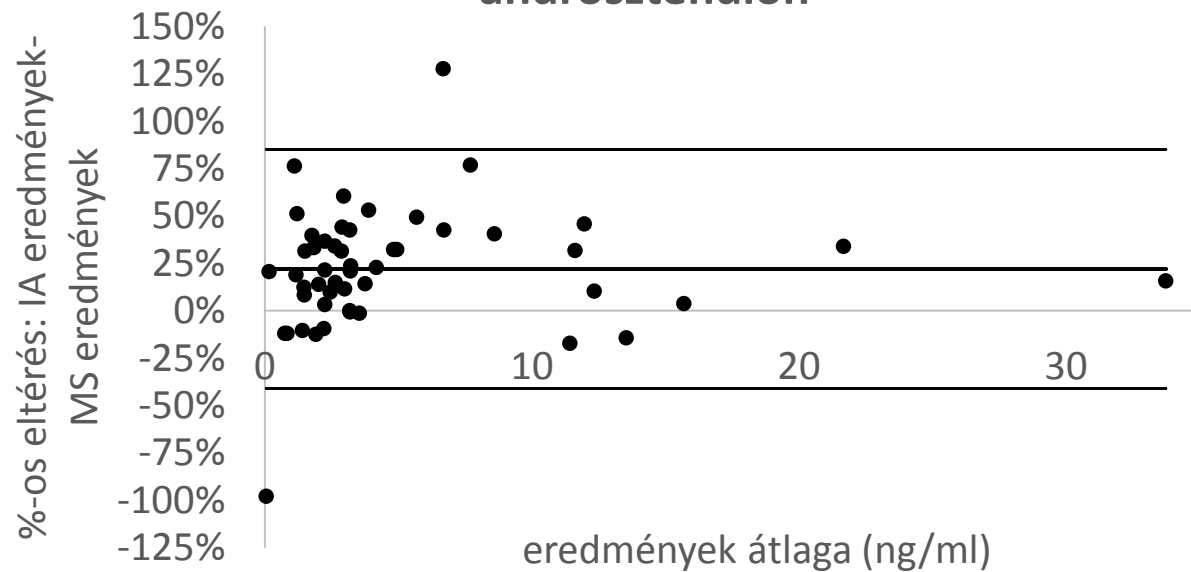
androsztendion



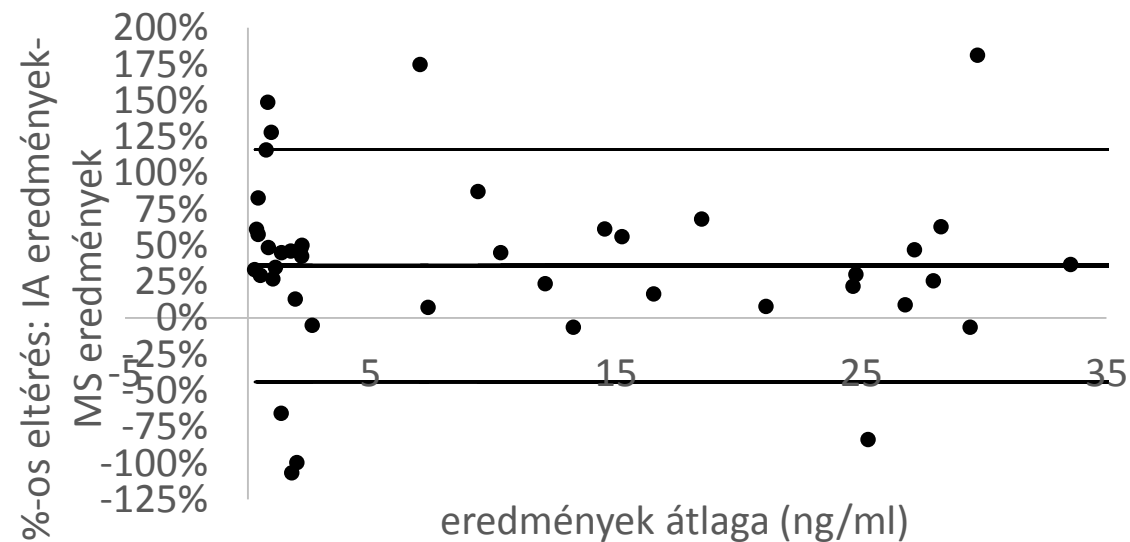
17-hidroxiprogesteron



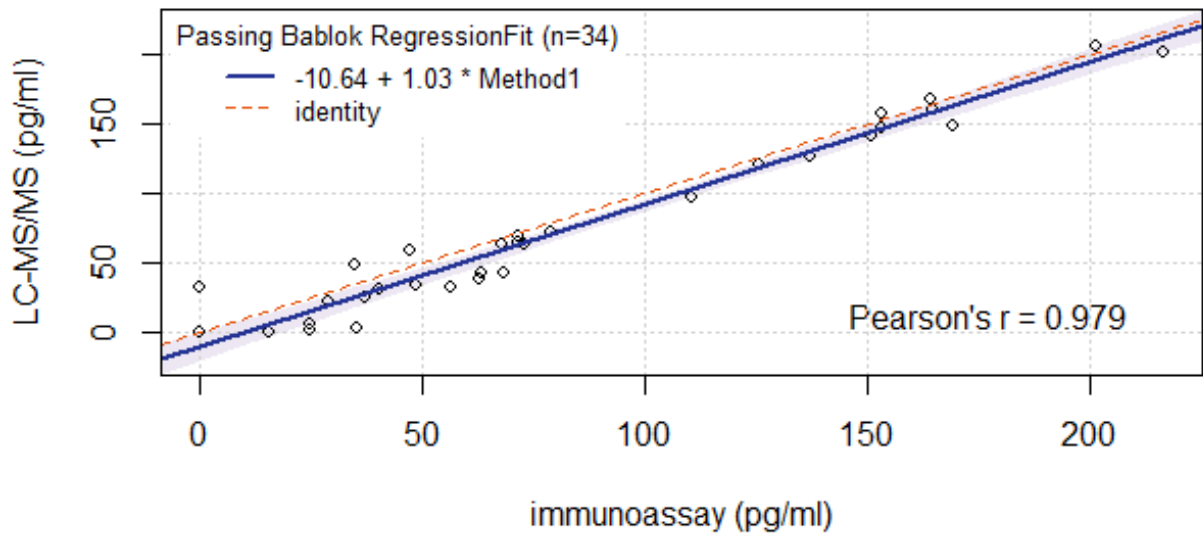
androsztendion



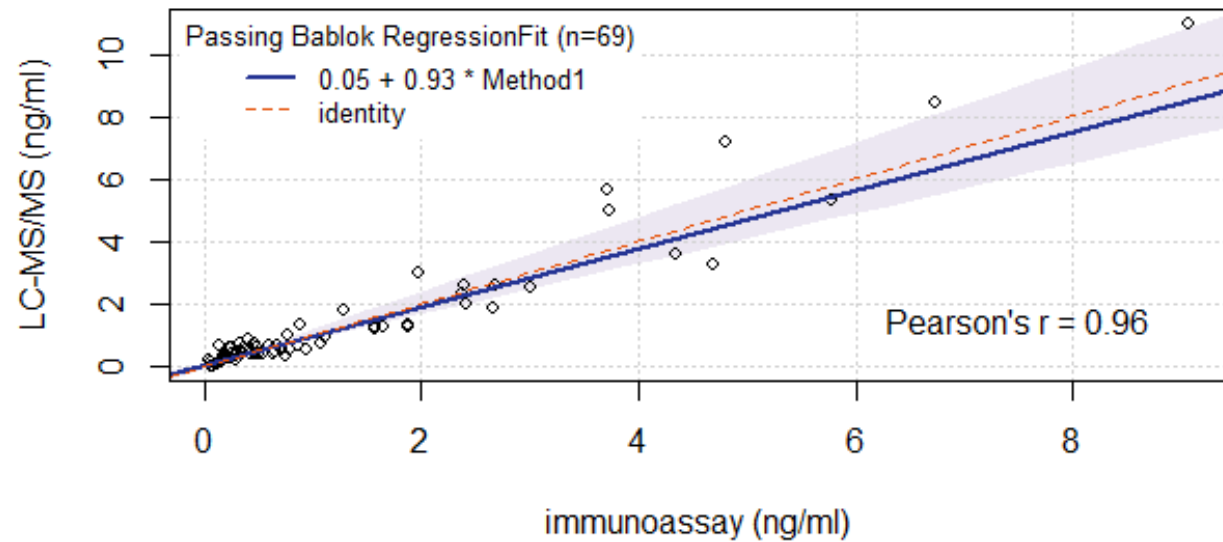
17-hidroxiprogesteron



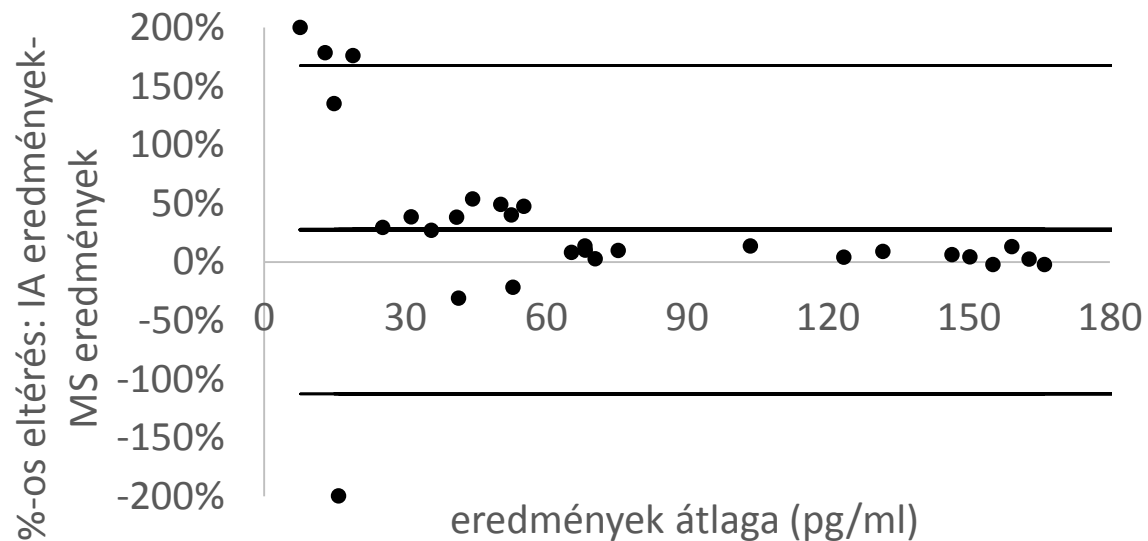
ösztradiol



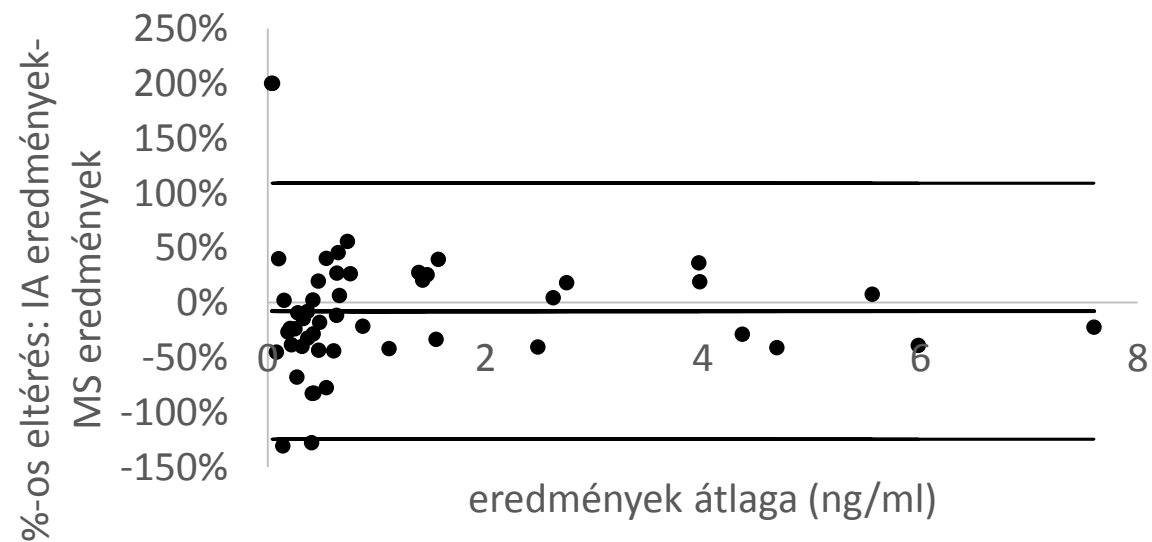
tesztoszteron



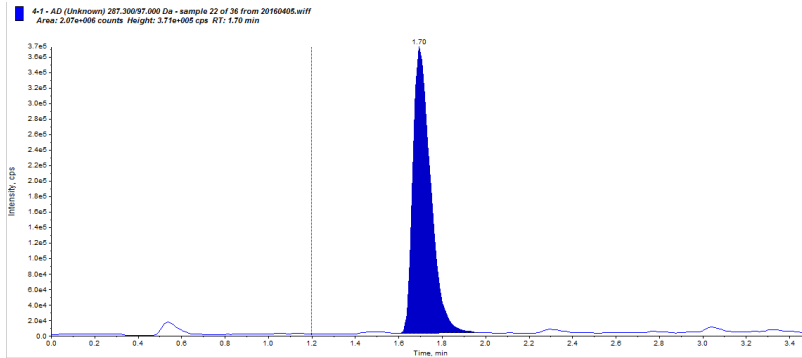
ösztradiol



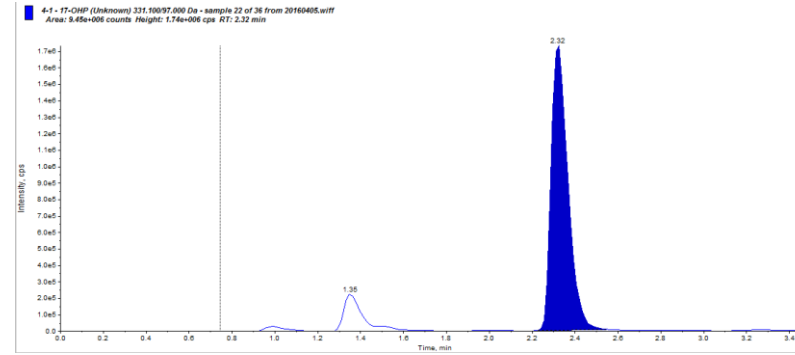
tesztoszteron



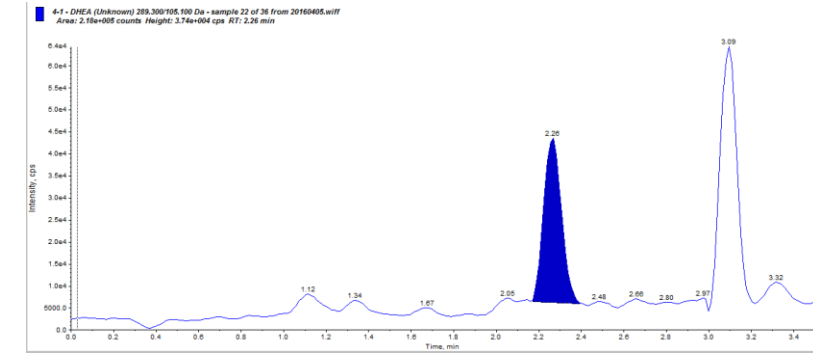
Kongenitális adrenális hiperplázia (21 α -hidroxiláz hiány), 12 éves lány



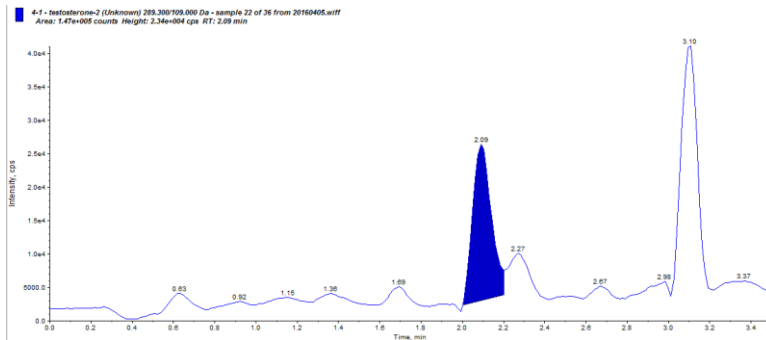
androsztendion:
7,62 ng/ml (<1,9 ng/ml)



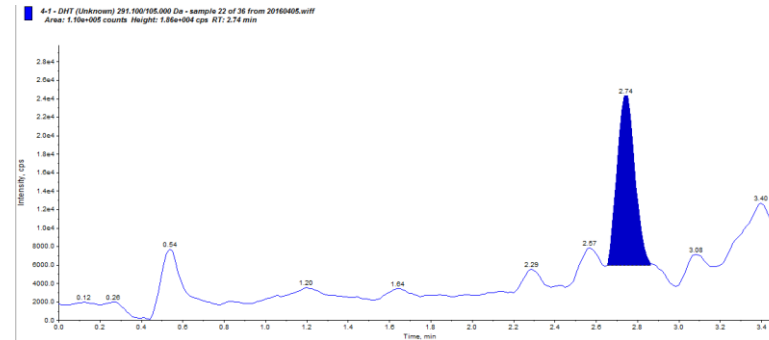
17 α -hidroxiprogesztéron:
93,2 ng/ml (<0,8 ng/ml)



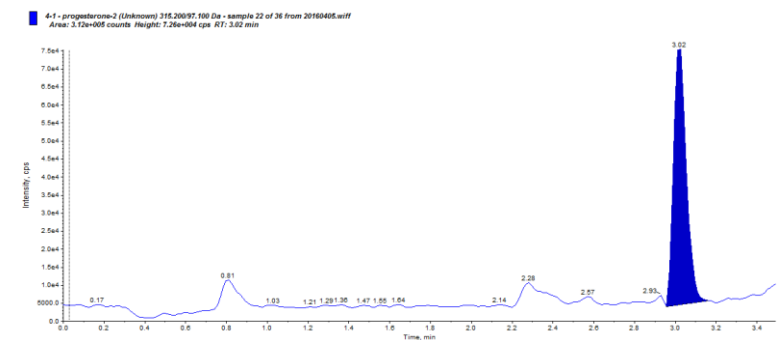
DHEA:
34,8 ng/ml (2-6 ng/ml)



tesztoszteron:
0,742 ng/ml (<7-75 ng/ml)

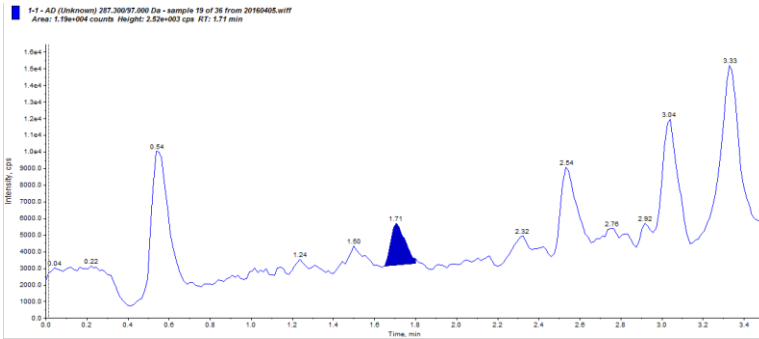


5-dihidrotesztoszteron:
7,43 ng/ml (<0,3 ng/ml)

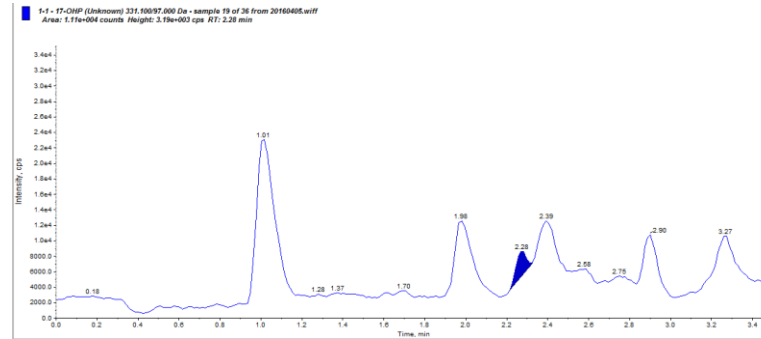


progesztéron:
1,57 ng/ml (5-20 ng/ml)

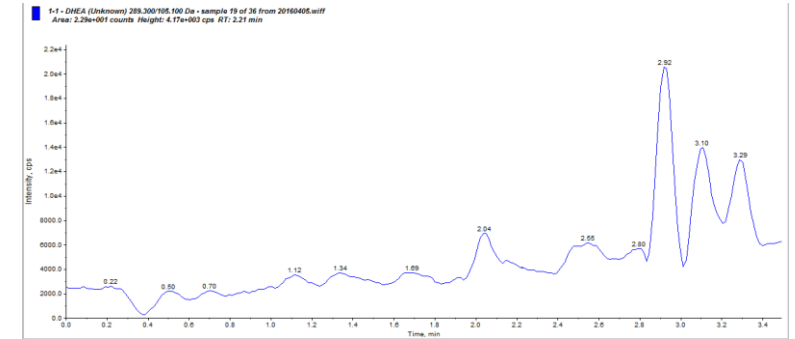
Gyógyszeres kezeléssel kontrollált kongenitális adrenális hiperplázia (21 α -hidroxiláz hiány), 2 éves fiú



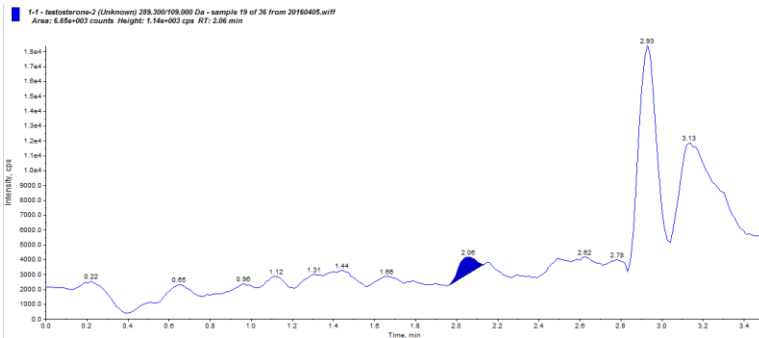
androsztendion:
<0,18 ng/ml (<0,5 ng/ml)



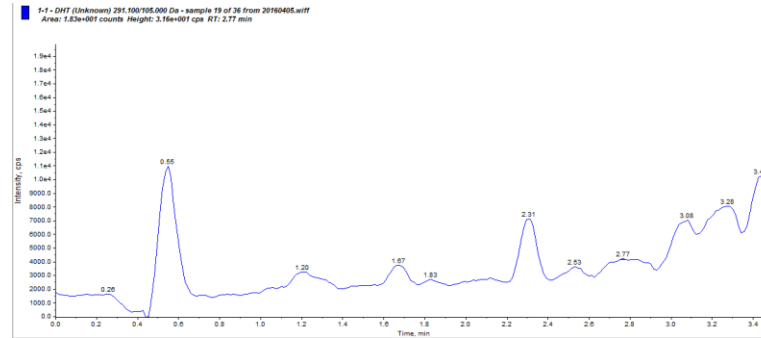
17 α -hidroxiprogesztéron:
<0,1 ng/ml (<1,1 ng/ml)



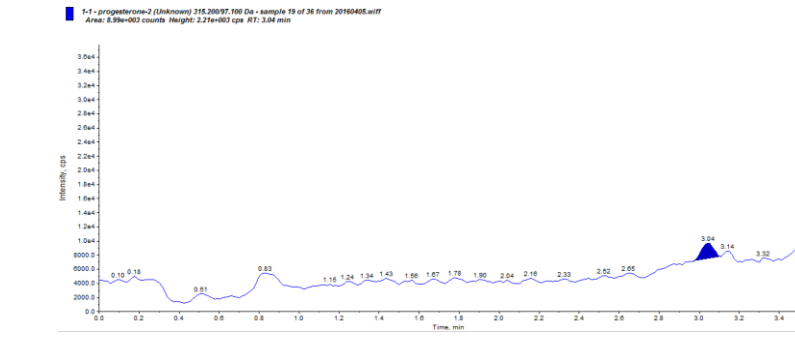
DHEA:
nincs csúcs (<6,3 ng/ml)



tesztoszteron:
<0,05 ng/ml (<0,2 ng/ml)



5-dihidrotesztoszteron:
nincs csúcs (<0,05 ng/ml)



progesztéron:
<0,15 ng/ml (<0,15 ng/ml)

Köszönöm a figyelmet!

