

A tömegspektrometria alapjai és alkalmazási köre a laboratóriumi diagnosztikában

Dr. Karvaly Gellért Balázs
SE Laboratóriumi Medicina Intézet

tömegspektrográfia

→ ez az „ős”.

tömegspektroszkópia

→ elavult kifejezés

320. mass spectrometry

Obsolete: mass spectroscopy

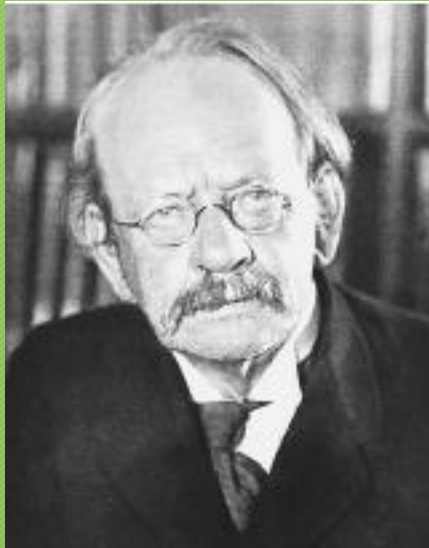
Study of matter through the formation of gas-phase *ions* that are characterized using *mass spectrometers* by their mass, charge, structure, and/or physico-chemical properties.

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

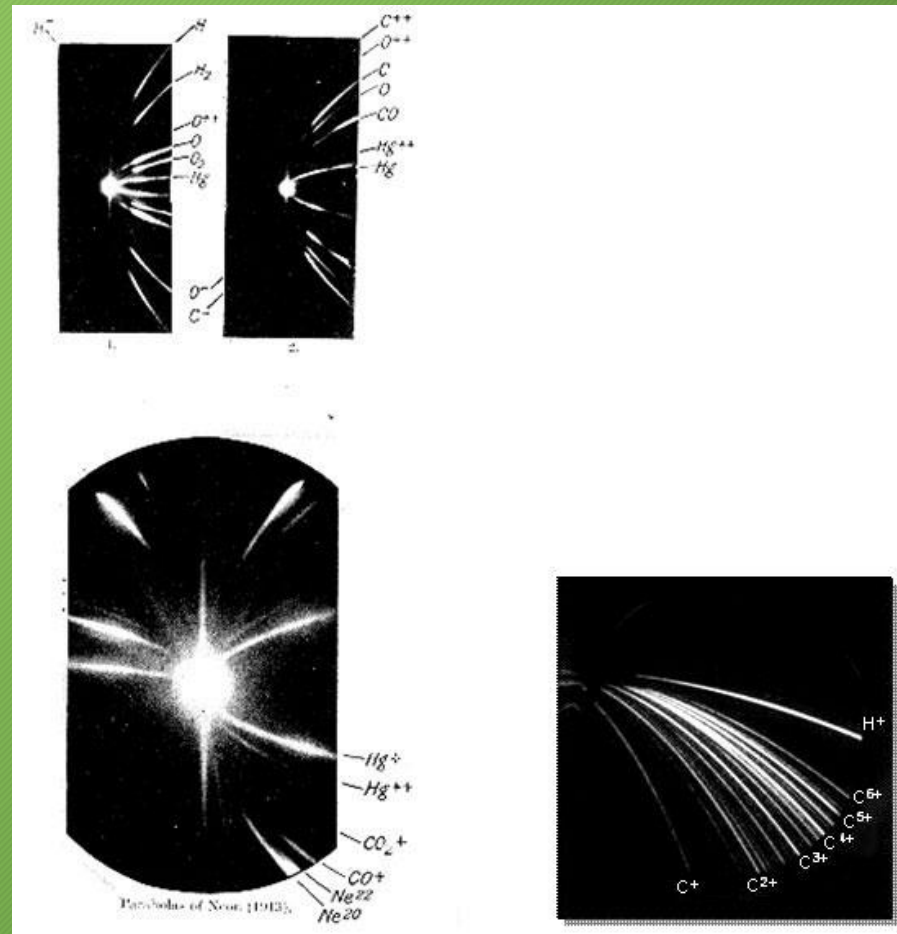
Note 2: *Mass spectroscopy* is an obsolete synonym for *mass spectrometry* that should not be used to avoid confusion with spectroscopies in which the measured quantity is the absorption or emission of electromagnetic radiation.

From [5,6].

Sir J. J. Thomson: a töltéssel rendelkező izotópok elektromágneses térben egyedi módon mozognak



Sir Joseph John Thomson
(1856-1940)



F. W. Aston: az első tömegspektrográf



The Nobel Prize in Chemistry 1922 was awarded to Francis W. Aston "for his discovery, by means of his mass spectrograph, of isotopes, in a large number of non-radioactive elements, and for his enunciation of the whole-number rule". <http://www.nobelprize.org>

A.O.C. Nier: tömegspektrométerek építése, stabil izotópok vizsgálata

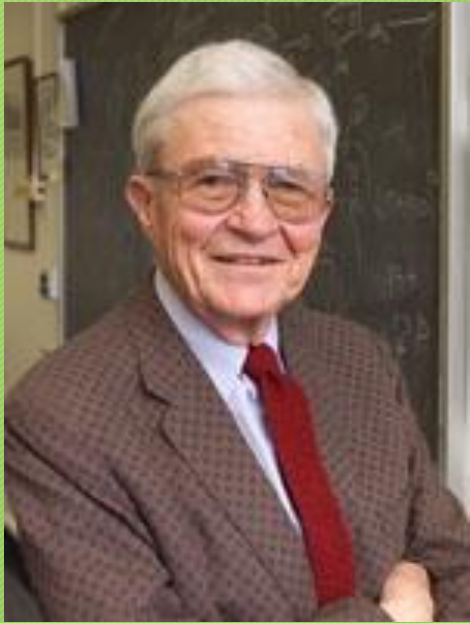


Alfred O.C. Nier

Alfred Otto Carl Nier
(1911-1994)

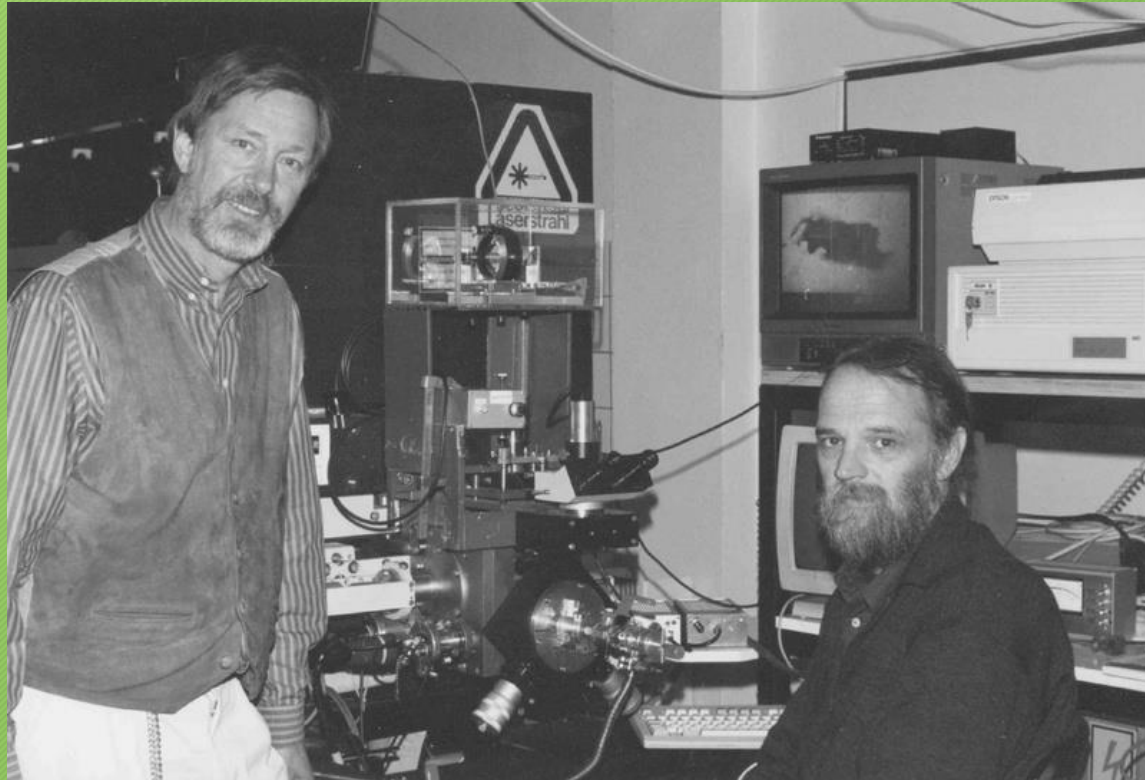






Fred McLafferty
(1923)

elektron ionizációval
kapott
tömegspektrumok
értelmezése,
adatbázisba foglalása



Franz Hillenkamp (1936-2014) és Michael Karas (1952)

mátrix-asszisztált
lézer deszorpciós ionizáció (MALDI)
feltalálása



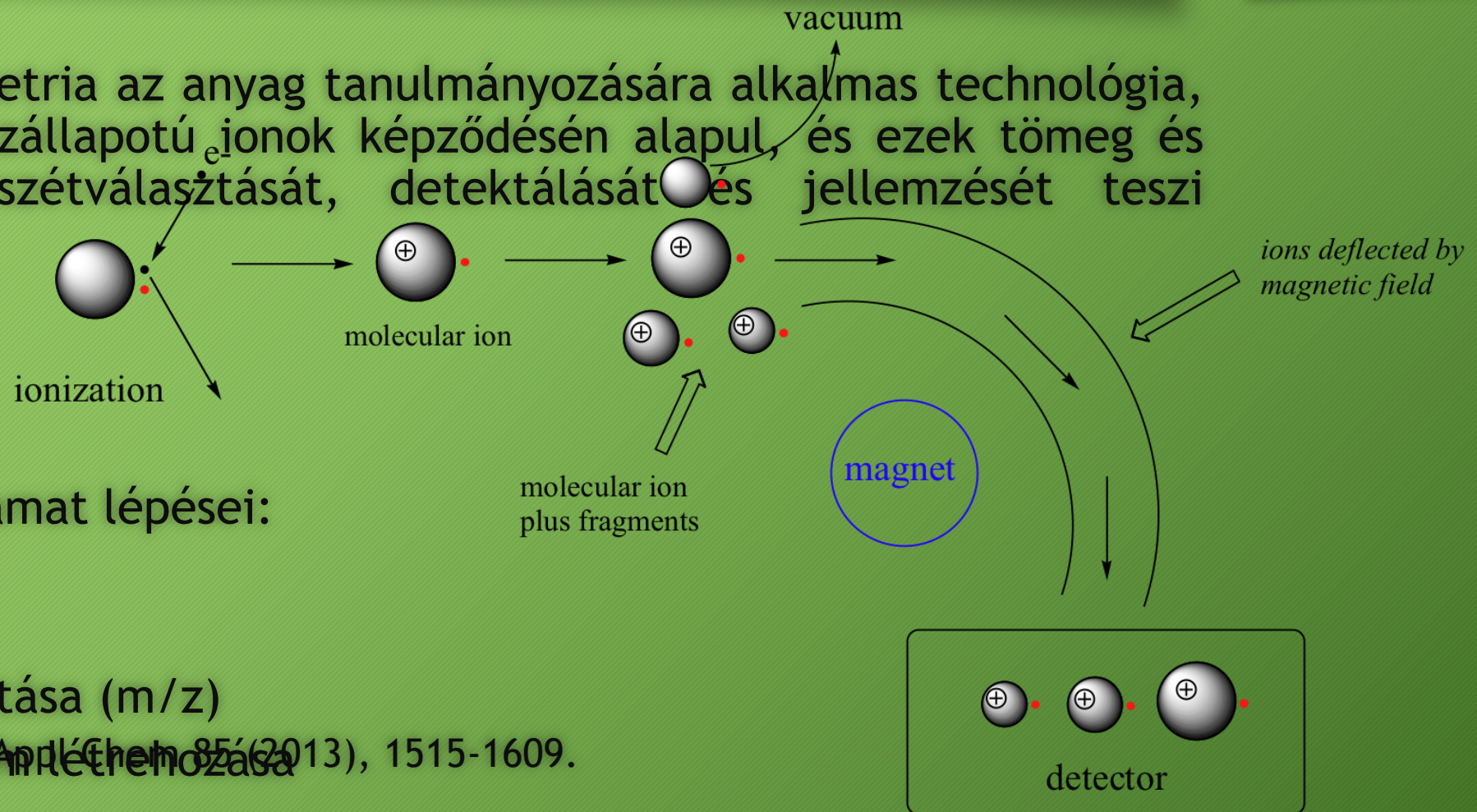
John Fenn (1917-2010)

elektrospray ionizáció
(ESI) feltalálása

Elméleti áttekintés

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:
 - ionizáció
 - fragmentáció
 - ionok kiválasztása (m/z)

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

A tömegspektrométer felépítése

mintabeviteli egység
(inlet)

a.) közvetlen

b.) csatolt:

- folyadékkromatográf
- gázkromatográf
- kapilláris elektroforézis

nagyvákuum tér

ionforrás

tömeganalizátor

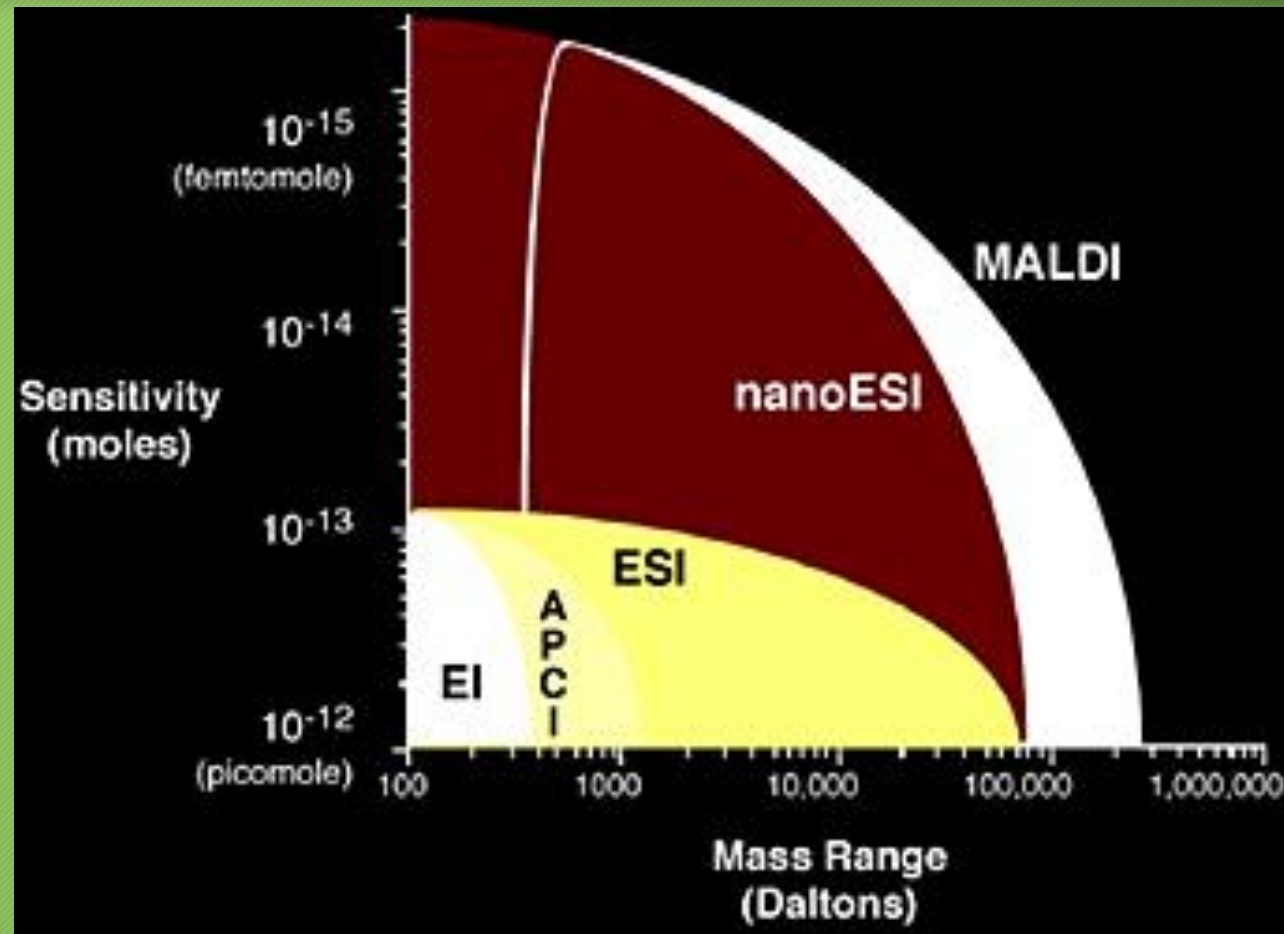
elektronsokszorozó

detektor

megjelenítés/adatfeldolgozás

Ionforrások	Tömeganalizátorok
<i>Elektroporlasztásos ionizáció (ESI)</i>	<i>Kvadrupol</i>
Atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció	Ioncsapda
Atmoszférikus nyomású fotoionizáció	Lineáris ioncsapda
Elektron ionizáció	Quadropole-ioncsapda
Kémiai ionizáció	<i>Repülési idő analizátor</i>
Nanospray ionizáció	Mágneses kettős fókuszálású analizátor
Szikra ionizáció	Radiofrekvenciás tömeganalizátor
Termospray ionizáció	Fourier transzformációs tömeganaizátor
Field ionizáció	Mágneses szektor analizátor
Field deszorpció	Ion ciklotron rezonancia analizátor
Gyors atom bombázás	Fordított geometriájú analizátor
Multifoton ionizáció	Hibrid
Plazma deszorpció	Elektronikus szektor
Lézer deszorpció (<i>MALDI</i> , SELDI, infravörös)	Orbitrap
Korona kisülés ionizáció	

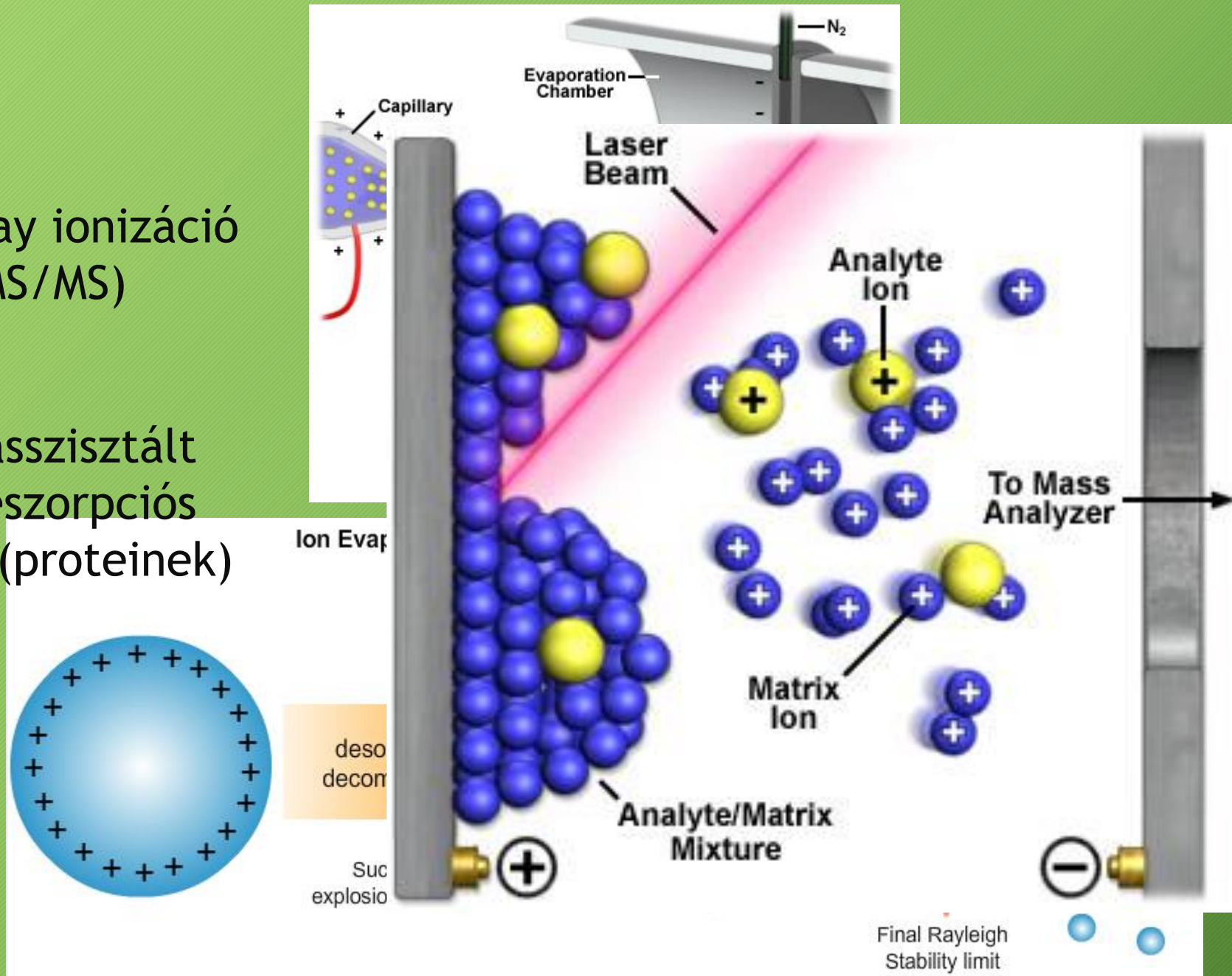
Különböző ionizációs technikákkal vizsgálható tömegtartományok és az elérhető érzékenység



https://masspec.scripps.edu/mshistory/whatisms_details.php

Elektrospray ionizáció (LC-MS/MS)

Mátrix-asszisztált lézer deszorpció ionizáció (proteinek)



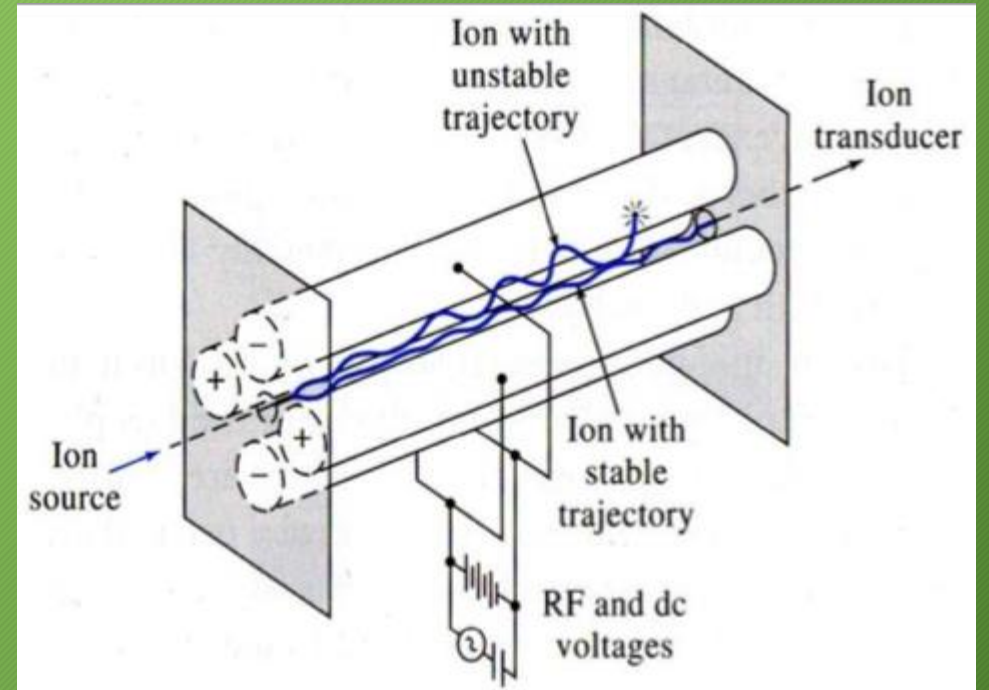


FIGURE 11-6 A quadrupole mass spectrometer.

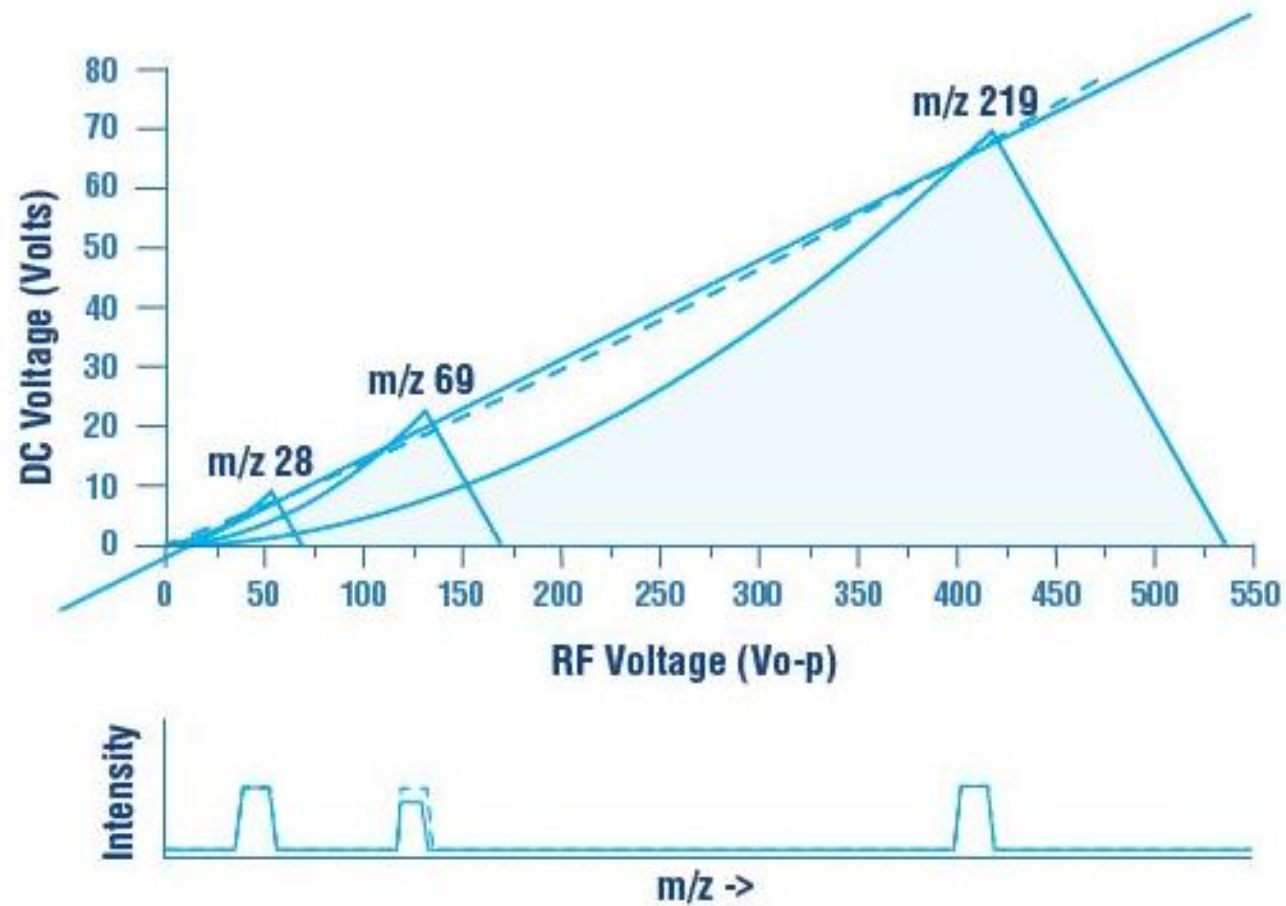
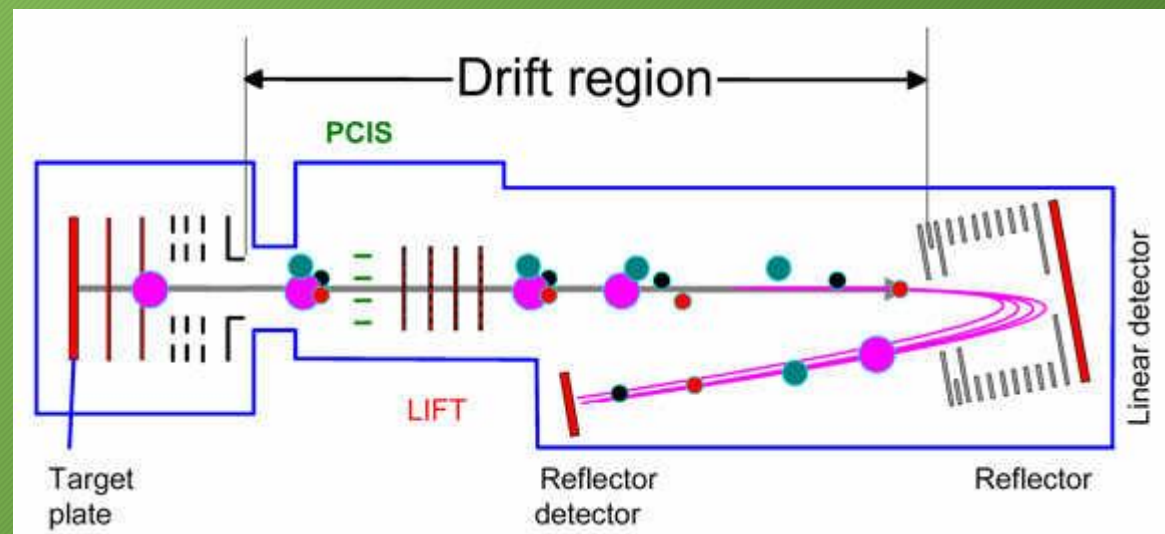
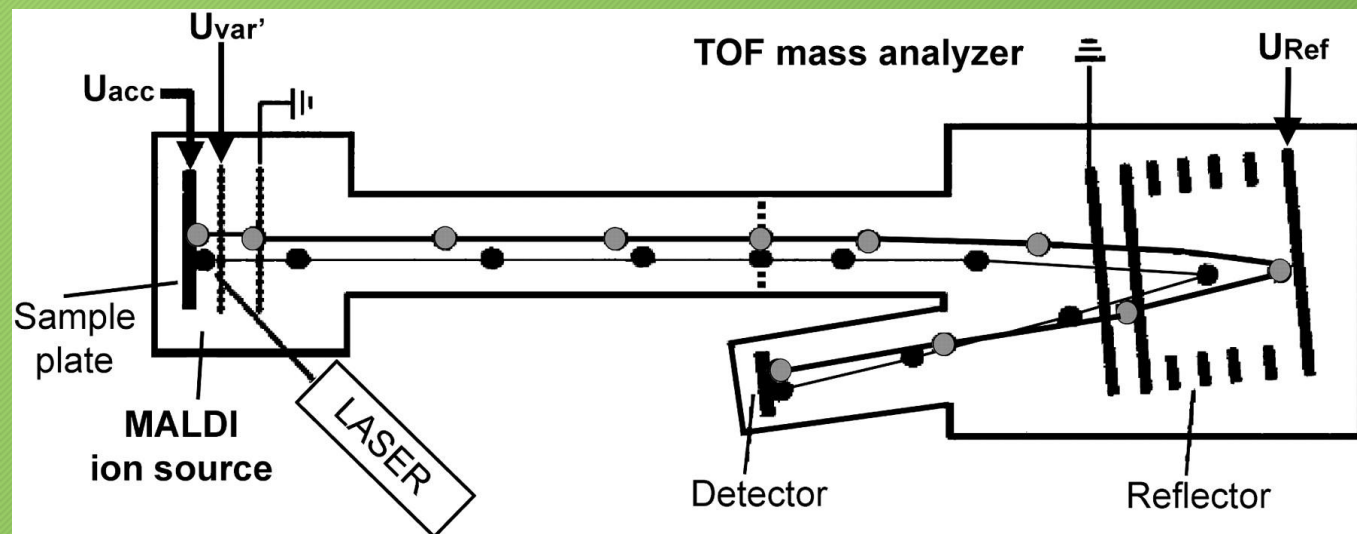
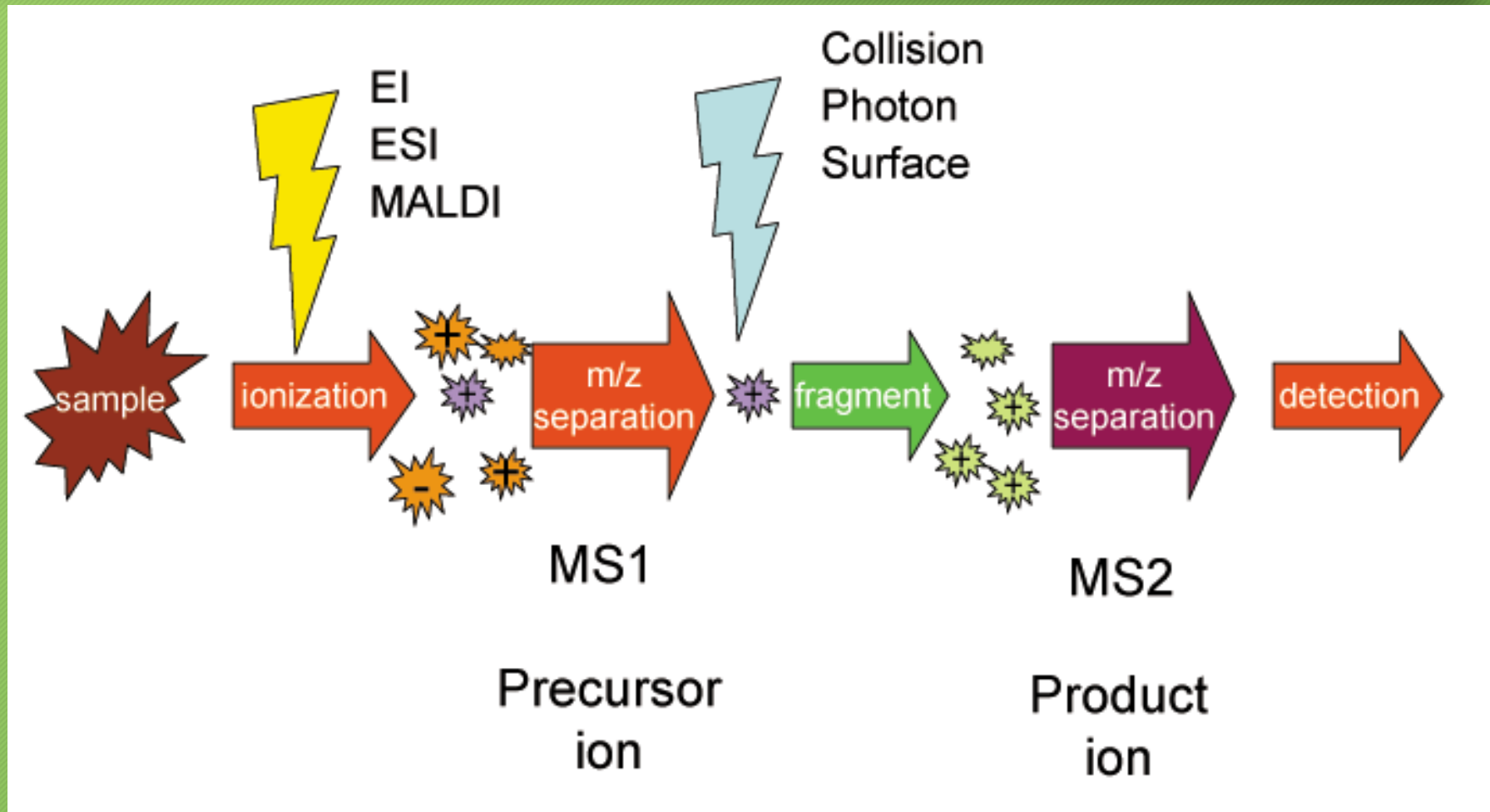


Figure 8. In order to achieve constant peak width across the mass range, a scan line that goes through the origin must be a curve with an increase in the DC to RF voltage ratio with increasing mass.



Tandem tömegspektrometria



Az MS csatolása kromatográfiás berendezésekkel

mintabeviteli
egység



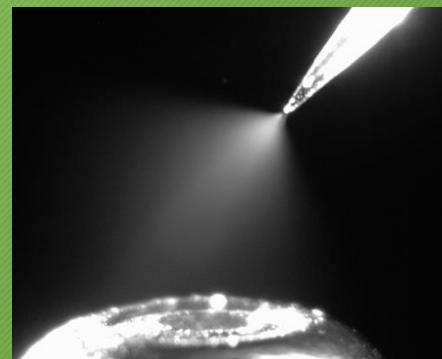
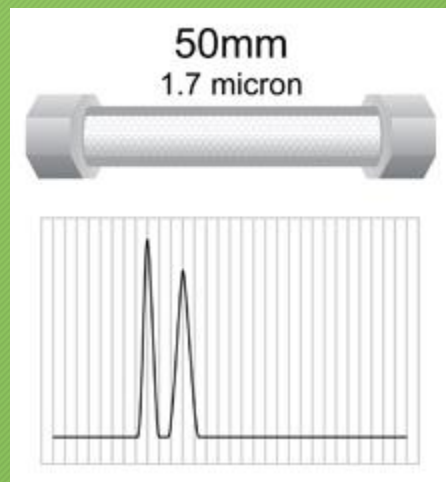
kromatográfiás
oszlop



ionforrás

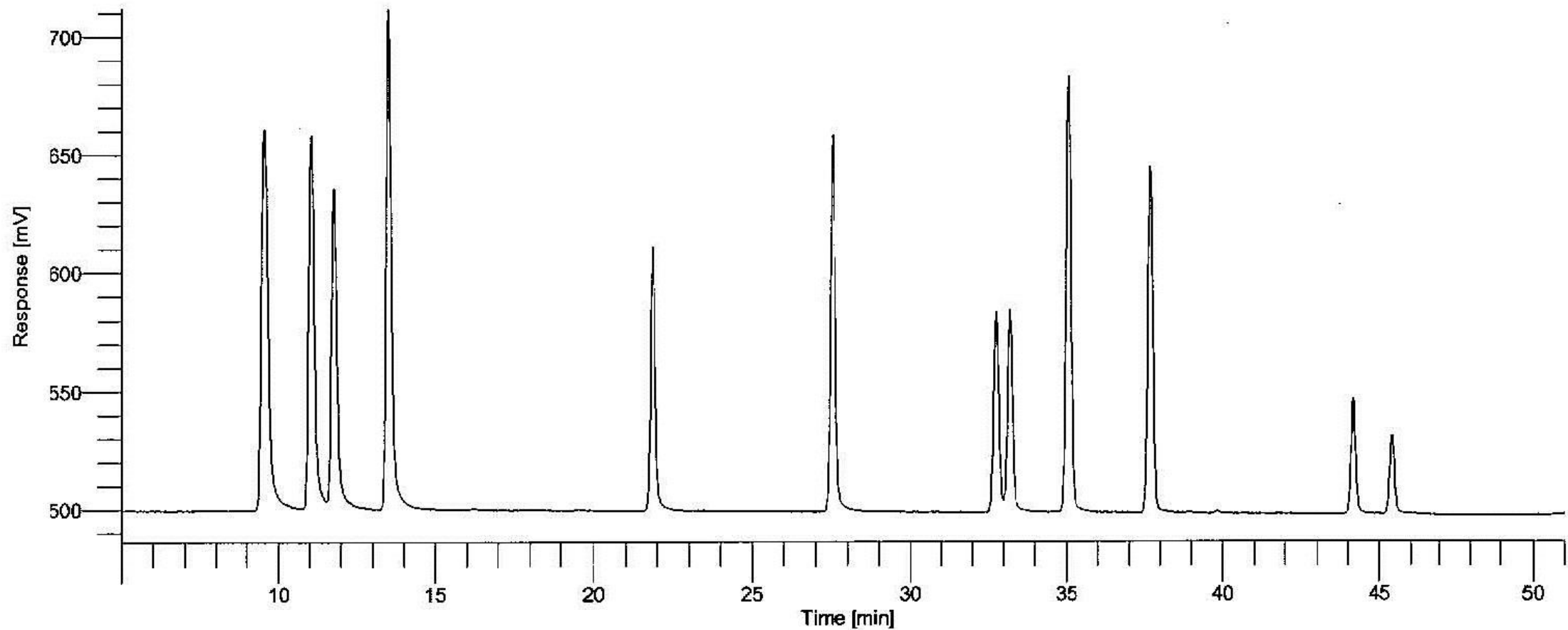


MS



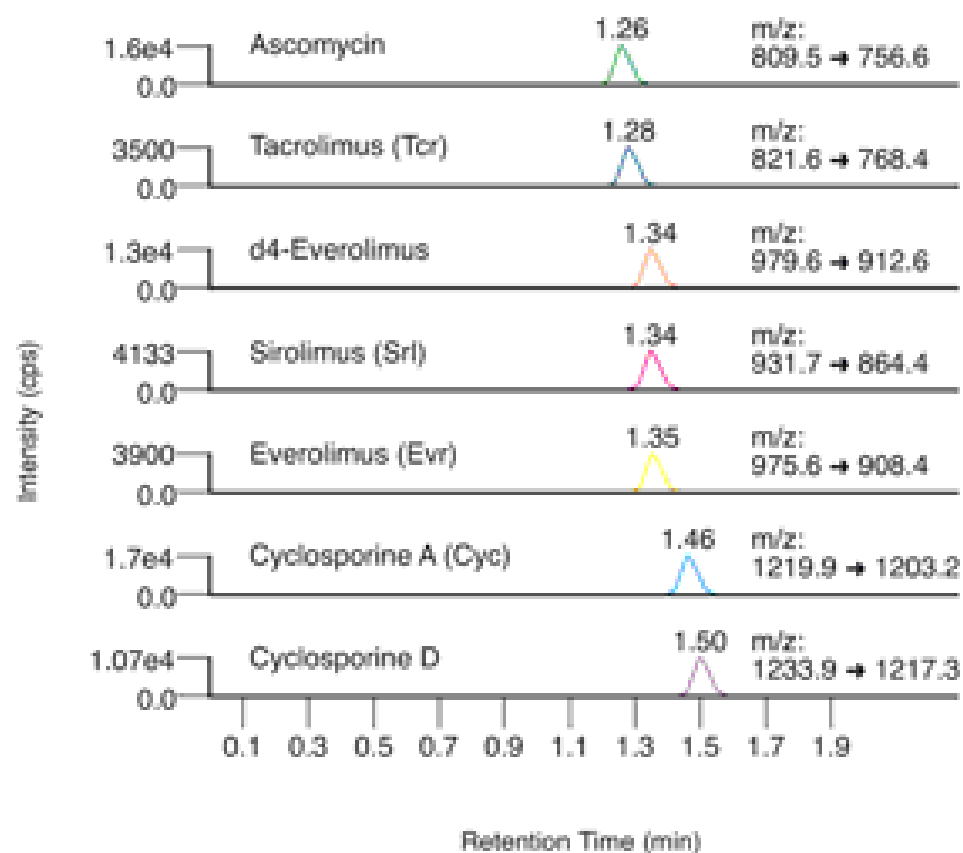
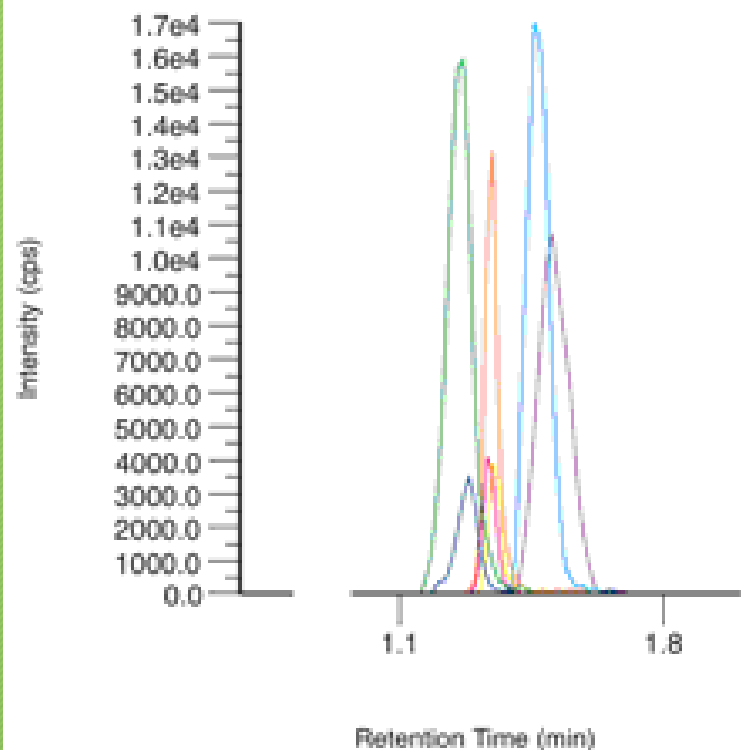
ALL IMAGES COURTESY OF AB SCIEX

A kromatográfia segítségével nagyszámú anyag nagyon kis mennyisége egymástól elválasztható.



Klinikai alkalmazás

A tömegspektrometria klinikai alkalmazásai: terápiás gyógyszer szint monitorozás

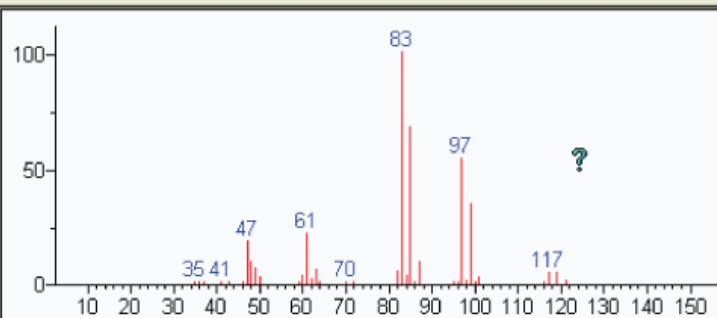


A tömegspektrometria klinikai alkalmazásai: klinikai toxikológia

- Jellemzően kis molekulatömegű vegyületek kimutatása a cél
- GC-EI-MS: azonosítás tömegspektrum egyezés alapján (scan mód), saját vagy publikus könyvtári összehasonlítással
- LC-ESI-MS/MS: azonosítás retenciós paraméter + ionátmenet egyezés alapján, saját könyvtári összehasonlítással
- LC-HRMS (TOF, QTOF, Orbitrap): azonosítás pontos molekulatömeg meghatározás alapján (min. 4 tizedesig)

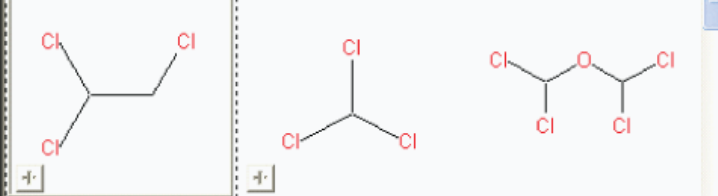
1. Scan 372 (6.199 min): 50P0830D.D\data.ms

#	Src.	Name
1	L	Scan 372 (6.199 min): 50P0830D.D\data.ms
2	L	Scan 372 (6.199 min): 50P0830D.D\data.ms
3	L	Dimethyl sulfone
4	ni	Dimethyl sulfone
5	L	Pest03 469 (8.624)
6	L	Scan 372 (6.199 min): 50P0830D.D\data.ms
7	L	Scan 372 (6.199 min): 50P0830D.D\data.ms
8	L	Caffeine

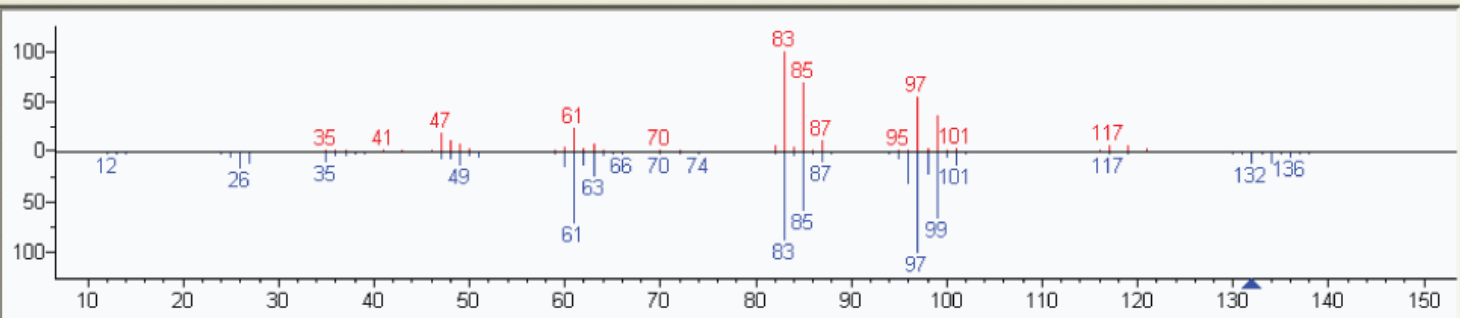


Name: Scan 372 (6.199 min): 50P0830D.D\data.ms
 MW: N/A ID# 1 DB: Spec. List
 Comment: 50 PPB METH 524.2 STD MIX, PURGE & TRAP
 10 largest peaks:
 83 999 | 85 677 | 97 537 | 99 345 | 61 221 |
 47 183 | 48 97 | 87 97 | 49 68 | 63 65 |
 Synonyms:
 no synonyms.

1 (M) Ethane, 1,1,2-tri...	2 (M) Trichloromethane	3 (M) Methane, oxybis...
713 717R 68.6P	680 894R 18.0P	660 897R 8.18P

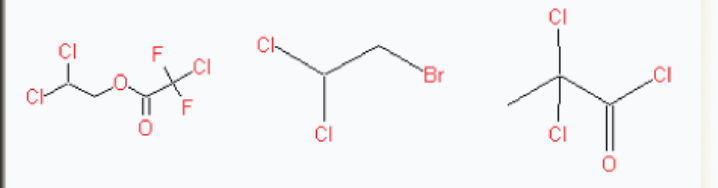


(Spec. List) Scan 372 (6.199 min): 50P0830D.D\data.ms

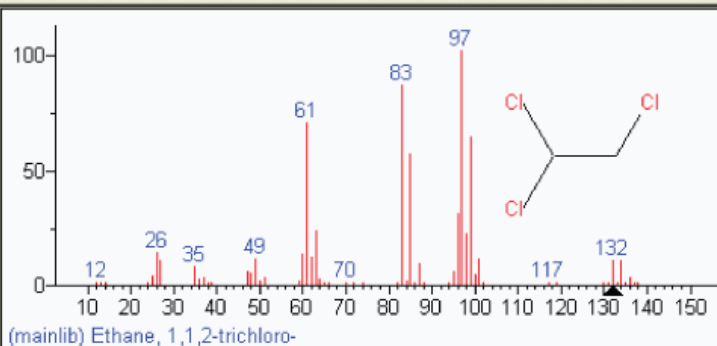
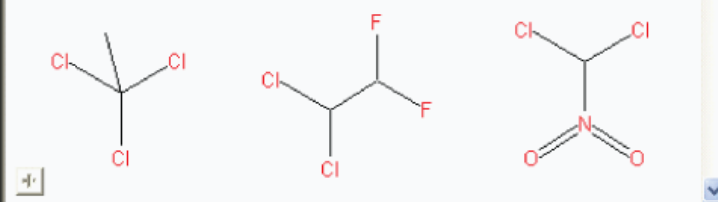


Scan 372 (6.199 min): 50P0830D.D\data.ms Head to Tail MF=713 RMF=717 Ethane, 1,1,2-trichloro- 713 717R 68.6P

4 (M) 2,2-Dichloroetha...	5 (M) Ethane, 2-bromo...	6 (M) Propanoyl chlori...
605 614R 1.58P	596 608R 1.15P	594 627R 1.06P



7 (M) Ethane, 1,1,1-tri...	8 (M) Ethane, 1,1-dich...	9 (M) Methane, dichlor...
566 574R 0.30P	558 558R 0.22P	550 752R 0.17P



Name: Ethane, 1,1,2-trichloro-
 Formula: C₂H₃Cl₃
 MW: 132 Exact Mass: 131.930033 CAS#: 79-00-5 NIST#: 291343 ID#: 6371
 Other DBs: Fine, TSCA, RTECS, EPA, HODOC, NIH, EINECS, IRDB
 Contributor: NIST Mass Spectrometry Data Center, 1998.
 10 largest peaks:
 97 999 | 83 852 | 61 688 | 99 632 | 85 566 |
 96 306 | 63 230 | 98 215 | 26 140 | 60 132 |
 Synonyms:
 1. β-T
 2. β-Trichloroethane
 3. Trichloroethane

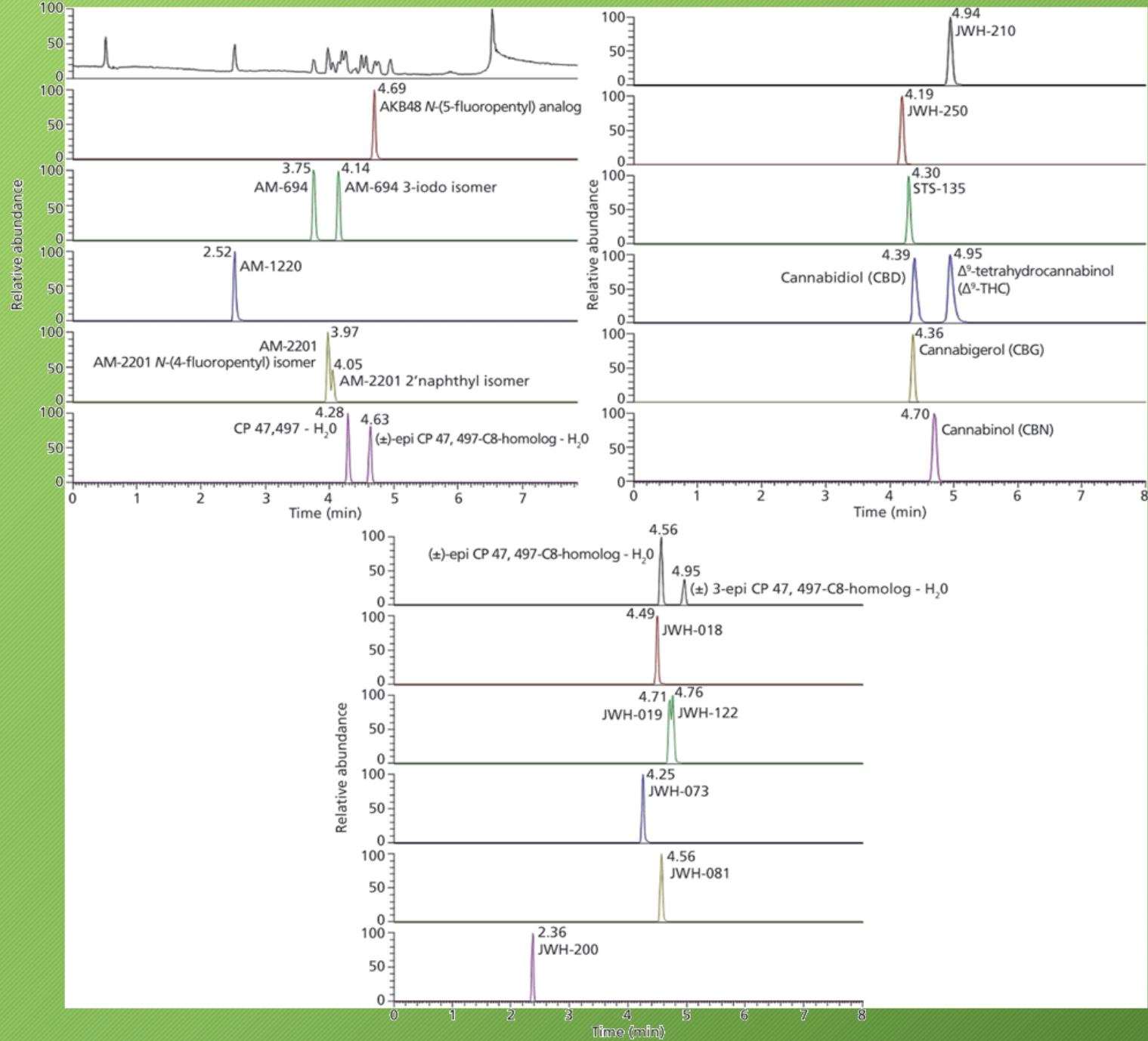


Table 1

Target compounds, elemental composition, exact mass and mean measured mass of MH⁺ ions, mean expected retention times (RT, min), mean mass accuracy (ppm), and corresponding internal standards (IS) (n = 10).

Compound	Elemental composition (MH ⁺)	Exact mass (MH ⁺) m/z	Measured mass (MH ⁺) m/z	RT (min)	ppm	IS	
1	MOR	C ₁₇ H ₂₀ O ₃ N	286.14377	286.14330	5.4	1.6	COC-d3
2	COD	C ₁₈ H ₂₂ O ₃ N	300.15942	300.15885	7.3	1.9	COC-d3
3	6-MAM	C ₁₉ H ₂₂ O ₄ N	328.15433	328.15365	9.1	2.1	COC-d3
4	AMP	C ₉ H ₁₄ N	136.11208	136.11161	9.5	3.4	MDPA
5	MDA	C ₁₀ H ₁₄ O ₂ N	180.10191	180.10149	9.7	2.3	MDPA
6	MA	C ₁₀ H ₁₆ N	150.12773	150.12723	10.2	3.3	MDPA
7	MDMA	C ₁₁ H ₁₆ O ₂ N	194.11756	194.11714	10.3	2.2	MDPA
8	BZE	C ₁₆ H ₂₀ O ₄ N	290.13868	290.13812	10.7	1.9	BZE-d3
9	MDEA	C ₁₂ H ₁₈ O ₂ N	208.13321	208.13280	11.2	1.9	MDPA
10	OLZ	C ₁₇ H ₂₁ N ₄ S	313.14814	313.14749	11.2	2.1	MDPA
11	NK	C ₁₂ H ₁₄ ONCl	224.08336	224.08200	11.2	2.3	MDPA
12	K	C ₁₃ H ₁₇ ONCl	238.09932	238.09885	11.5	1.9	MDPA
13	COC	C ₁₇ H ₂₂ O ₄ N	304.15433	304.15372	15.0	2.0	COC-d3
14	7-ACLZP	C ₁₅ H ₁₃ ON ₃ Cl	286.07417	286.07368	15.1	1.7	NDZ-d5
15	NBUP	C ₂₅ H ₃₆ O ₄ N	414.26389	414.26277	16.0	2.7	BUP-d4
16	ZPD	C ₁₉ H ₂₂ ON ₃	308.17574	308.17509	16.1	2.1	COC-d3
17	VEN	C ₁₇ H ₂₈ O ₂ N	278.21146	278.21089	16.3	2.0	COC-d3
18	7-AFNTZ	C ₁₆ H ₁₅ ON ₃ F	284.11937	284.11882	17.0	1.9	NDZ-d5
19	BUP	C ₂₉ H ₄₂ O ₄ N	468.31084	468.30952	19.2	2.8	BUP-d4
20	AMI	C ₂₀ H ₂₄ N	278.19033	278.18968	20.3	2.3	COC-d3
21	FLU	C ₁₇ H ₁₉ ONF ₃	310.14133	310.14083	20.5	1.6	COC-d3
22	EDDP	C ₂₀ H ₂₃ N	278.19033	278.19066	20.6	1.6	COC-d3
23	MTD	C ₂₁ H ₂₈ ON	310.21654	310.21587	20.6	2.1	COC-d3
24	OXZ	C ₁₅ H ₁₂ O ₂ N ₂ Cl	287.05818	287.05776	21.0	1.5	NDZ-d5
25	LRZP	C ₁₅ H ₁₁ O ₂ N ₂ Cl ₂	321.01921	321.01849	21.4	2.2	NDZ-d5
26	ALPZ	C ₁₇ H ₁₄ N ₄ Cl	309.09015	309.08956	21.4	1.9	NDZ-d5
27	NDZ	C ₁₅ H ₁₂ ON ₂ Cl	271.06327	271.06282	22.6	1.6	NDZ-d5
28	DIAZ	C ₁₆ H ₁₄ ON ₂ Cl	285.07892	285.07841	24.0	1.8	NDZ-d5
IS1	BZE-d3	C ₁₆ H ₁₇ D ₃ O ₄ N	293.15751	293.15700	10.7	1.8	//
IS2	MDPA	C ₁₃ H ₂₀ O ₂ N	222.14886	222.14850	13.5	1.6	//
IS3	COC-d3	C ₁₇ H ₁₉ D ₃ O ₄ N	307.17316	307.17299	15.0	2.2	//
IS4	BUP-d4	C ₂₉ H ₃₈ D ₄ O ₄ N	472.33594	472.33521	19.2	1.5	//
IS5	NDZ-d5	C ₁₅ H ₇ D ₅ ON ₂ Cl	276.09465	276.09432	22.5	1.2	//

Tömegspektrometria vs immunoassay

Szempont	MS	IA
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

Alkalmazás: újszülöttkori anyagcsere szűrés

- SE 1. sz. Gyermekgyógyászati Klinika, SZTE Gyermekgyógyászati Klinika
- ESI-flow injection-MS/MS módszerrel végzik
- 26 betegség szűrése történik szárított vércsepp mintából
- Újszülöttkori anyagcserebetegség incidenciája: kb. 1:3000 - 1:4000



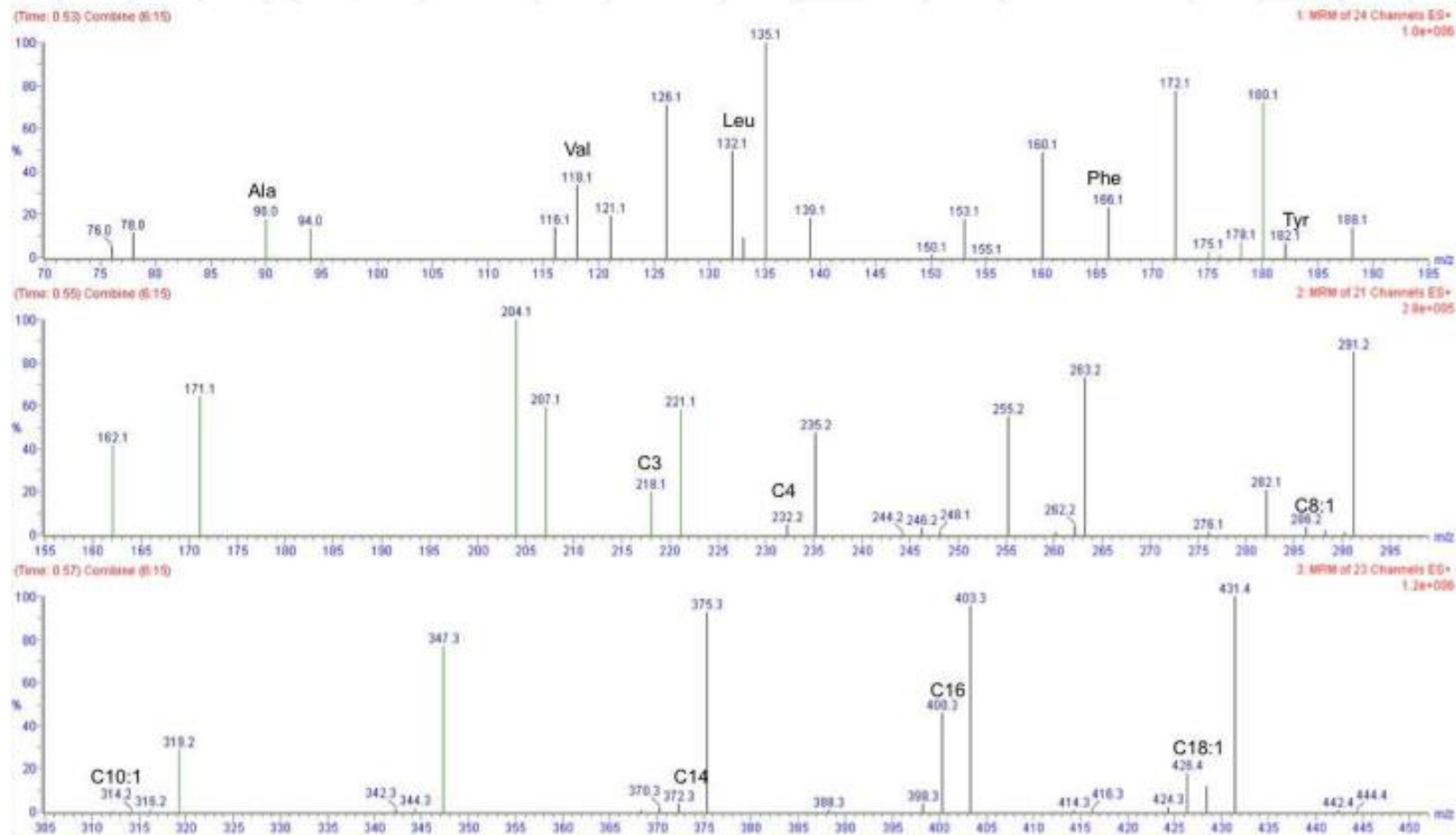


Fig. 6. Typical output for a newborn sample analysed by Multiple Reaction Monitoring (MRM) in MSMS. In this MSMS spectrum, targeted ion masses of interest, corresponding to markers for several inherited metabolic diseases, are divided in three parts : 1 :MRM of 24 aminoacids; 2 : MRM of 21 acyl-carnitines from C0 to C8:1; 3 : MRM of 23 acylcarnitines from C10 to C18OH; x axis = m/z ; y axis = % intensity which relates to each metabolite concentration. Concentrations are compared with cut-offs for each corresponding analyte,

Alkalmazás: mikrobiológiai proteomika

- Kórokozó baktériumok kimutatása és azonosítása genus, species vagy akár törzs szinten
- MALDI-TOF technikával történik, elsősorban vérkultúrából
- Az „ujjlenyomatot” a baktériumra jellemző makromolekulák ionjai hozzák létre
- Rendkívül nagy áteresztő képesség (mérési idő <1 min)
- Korlátai vannak, de dinamikusan fejlődő és nagyon perspektivikus terület

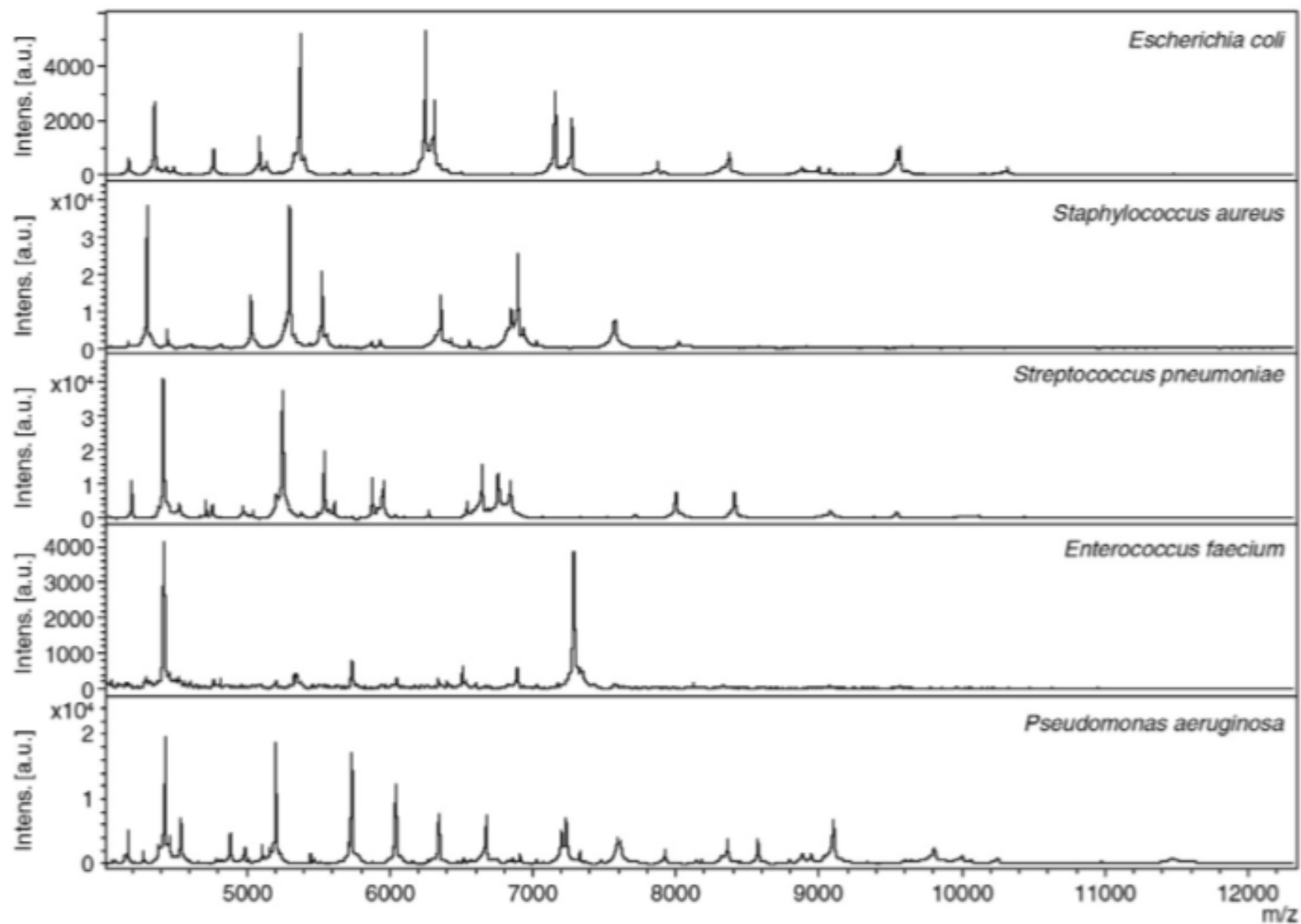
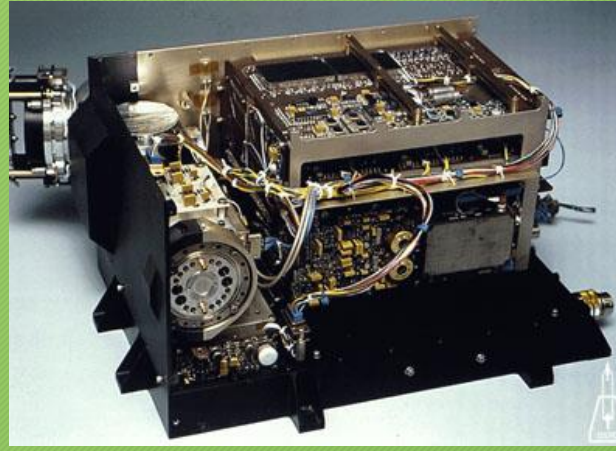


Fig. 1. Spectral fingerprints obtained from whole colonies of five different bacterial species. The matrix used is HCCA.



Köszönöm a figyelmet!

Karvaly Gellért Balázs
SE LMI Központi Izotópdiaosztikai és Endokrin Laboratórium
1088 Bp., Szentkirályi u. 46. (II. Belklinika)
karvaly.gellert@pharma.semmelweis-univ.hu