
LC-MS/MS alapú mennyiségi meghatározások elmélete és megvalósítása

Szabó Pál

MTA TTK

Követelmények

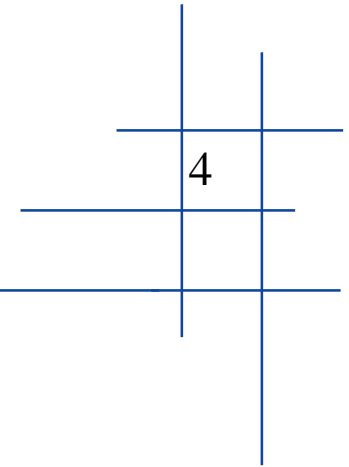
- Érzékenység
- Szelektivitás
- Gyorsaság
- Magas komponensszám/injektálás

Mennyiségi meghatározások

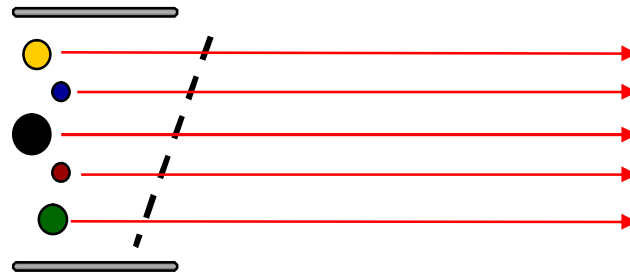
3

- Egyszeres kvadrupol
 - Full scan mód
 - Selected Ion Monitoring (SIM)
- Hármás kvadrupol
 - Reakciócsatornák figyelése (MRM)
- QTrap: MS/MS/MS
- Nagyfelbontású MS

Egyszeres kvadrupol



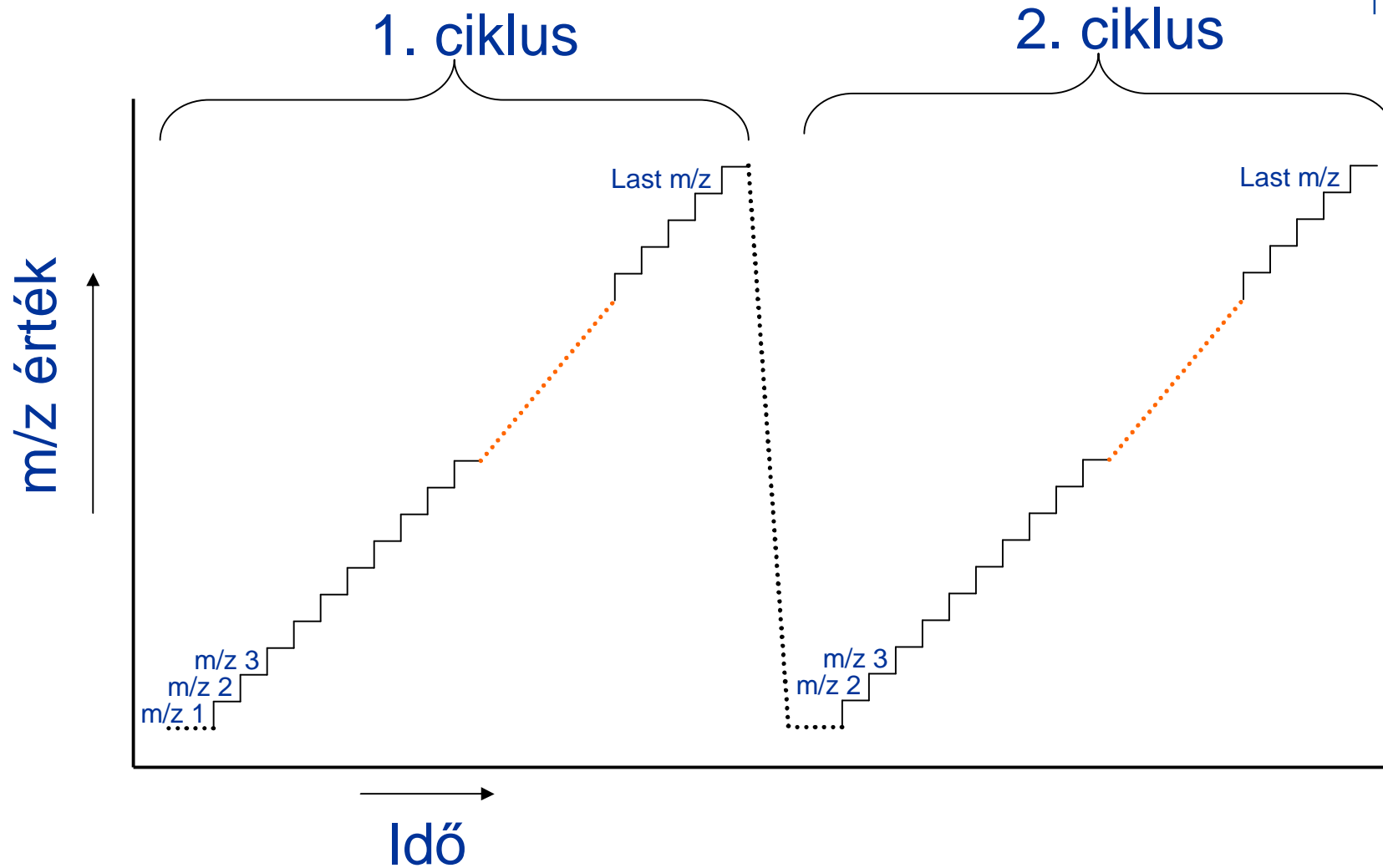
Q1 full scan



Minden iont figyel

Egyszeres kvadrupol

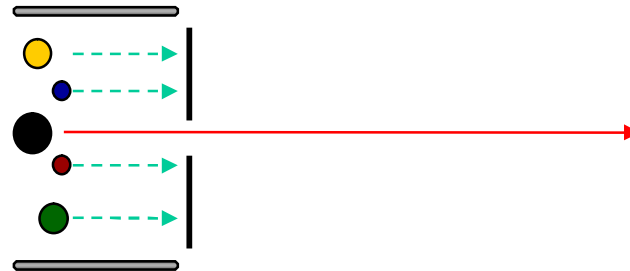
5



Egyszeres kvadrupol

6

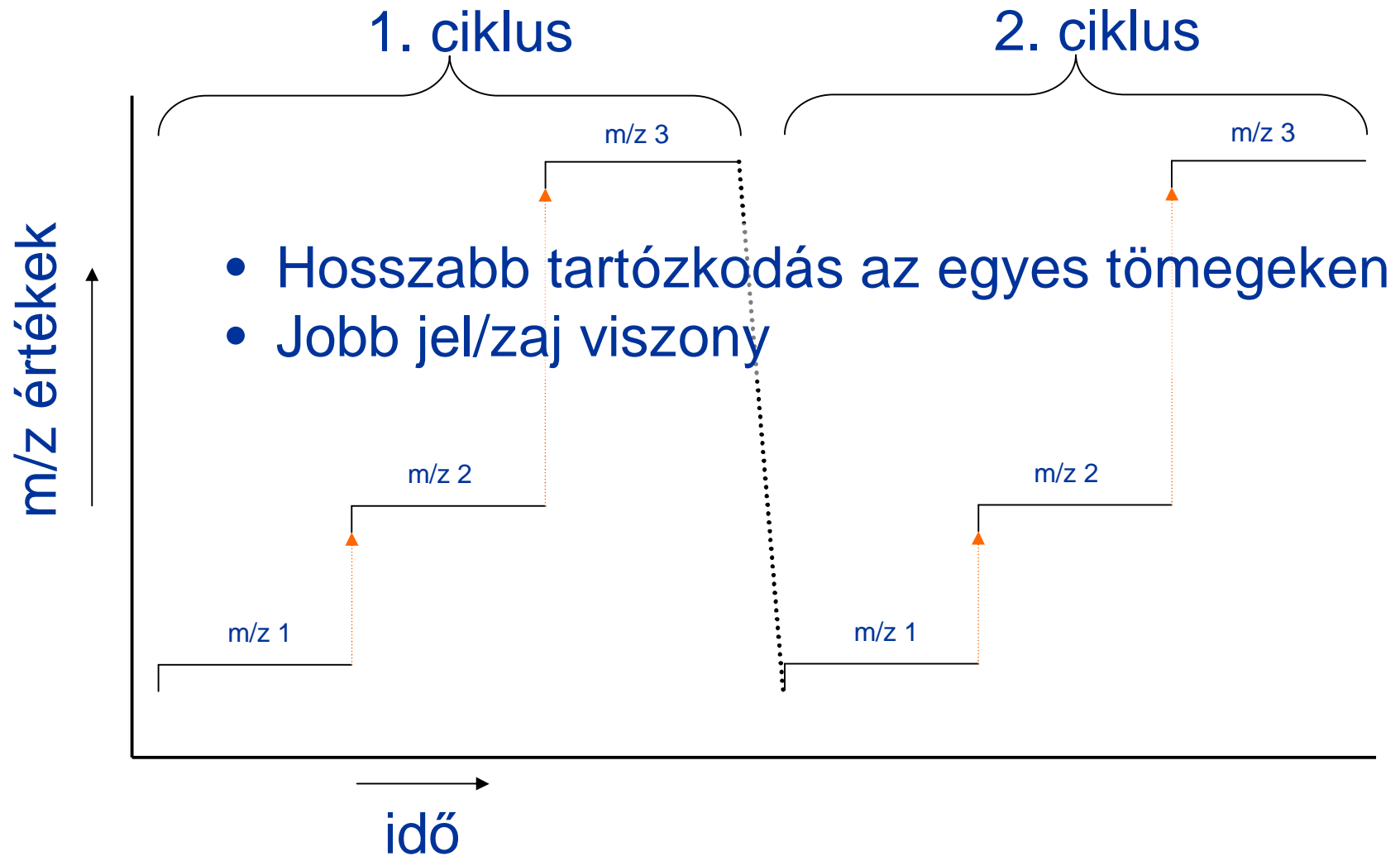
Selected Ion Monitoring (SIM)



Csak a kiválasztott ionokat figyeli

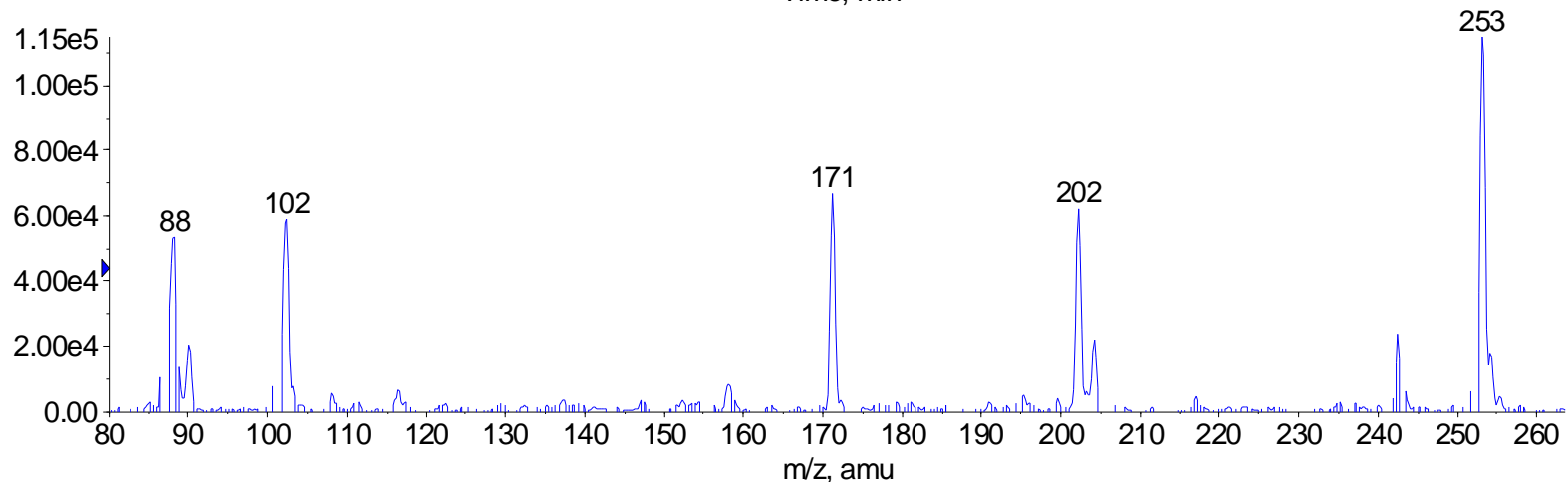
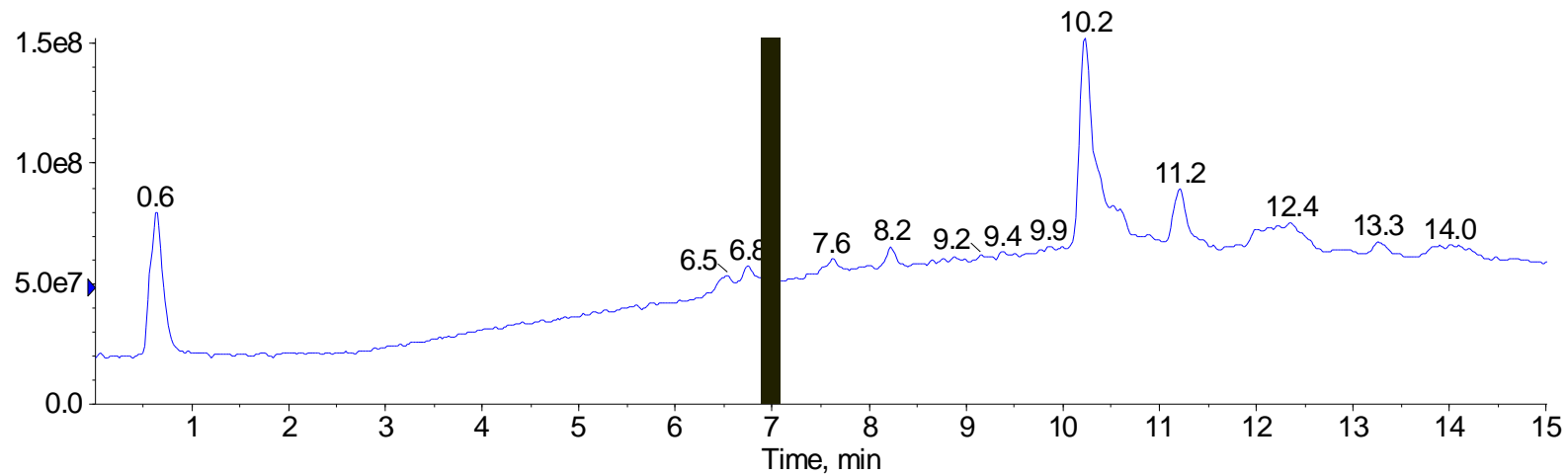
Egyszeres kvadrupol

7



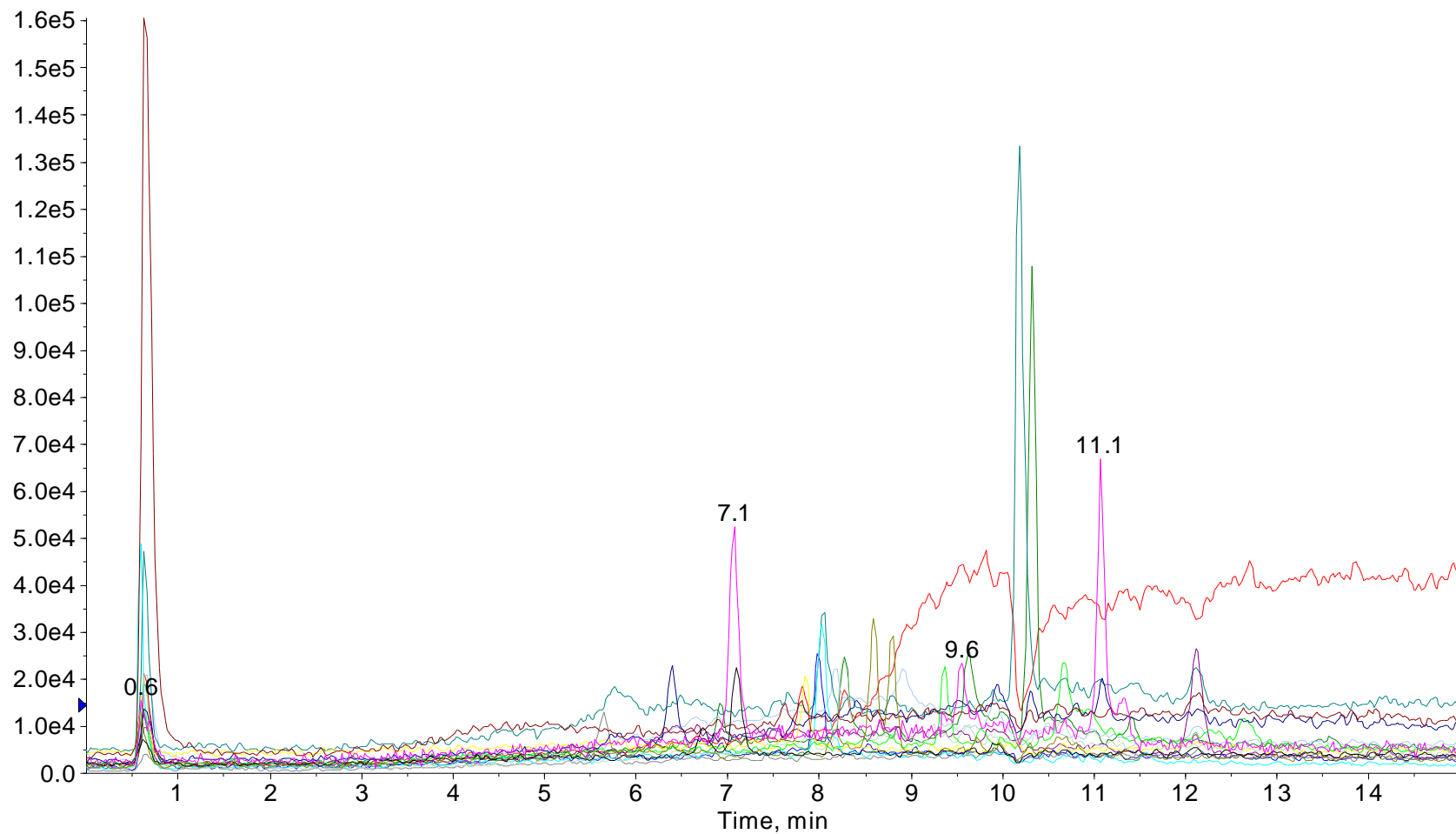
Egyszeres kvadrupol Full Scan

8



Egyszeres kvadrupól SIM

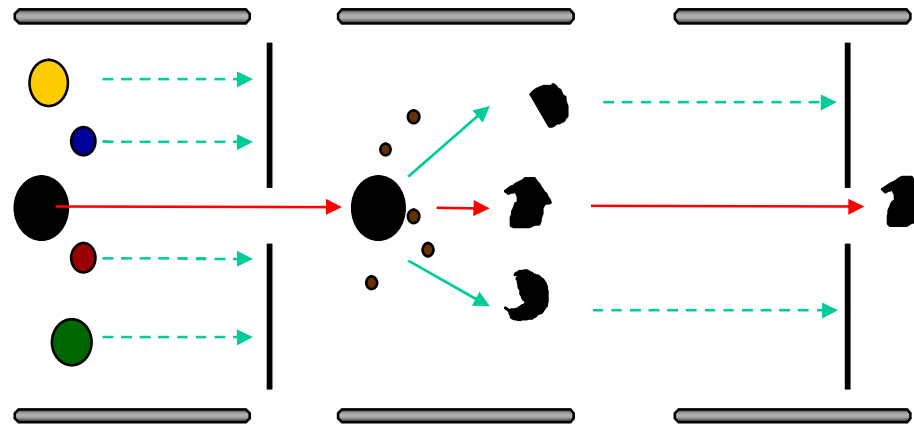
9



Hármas kvadrupol

10

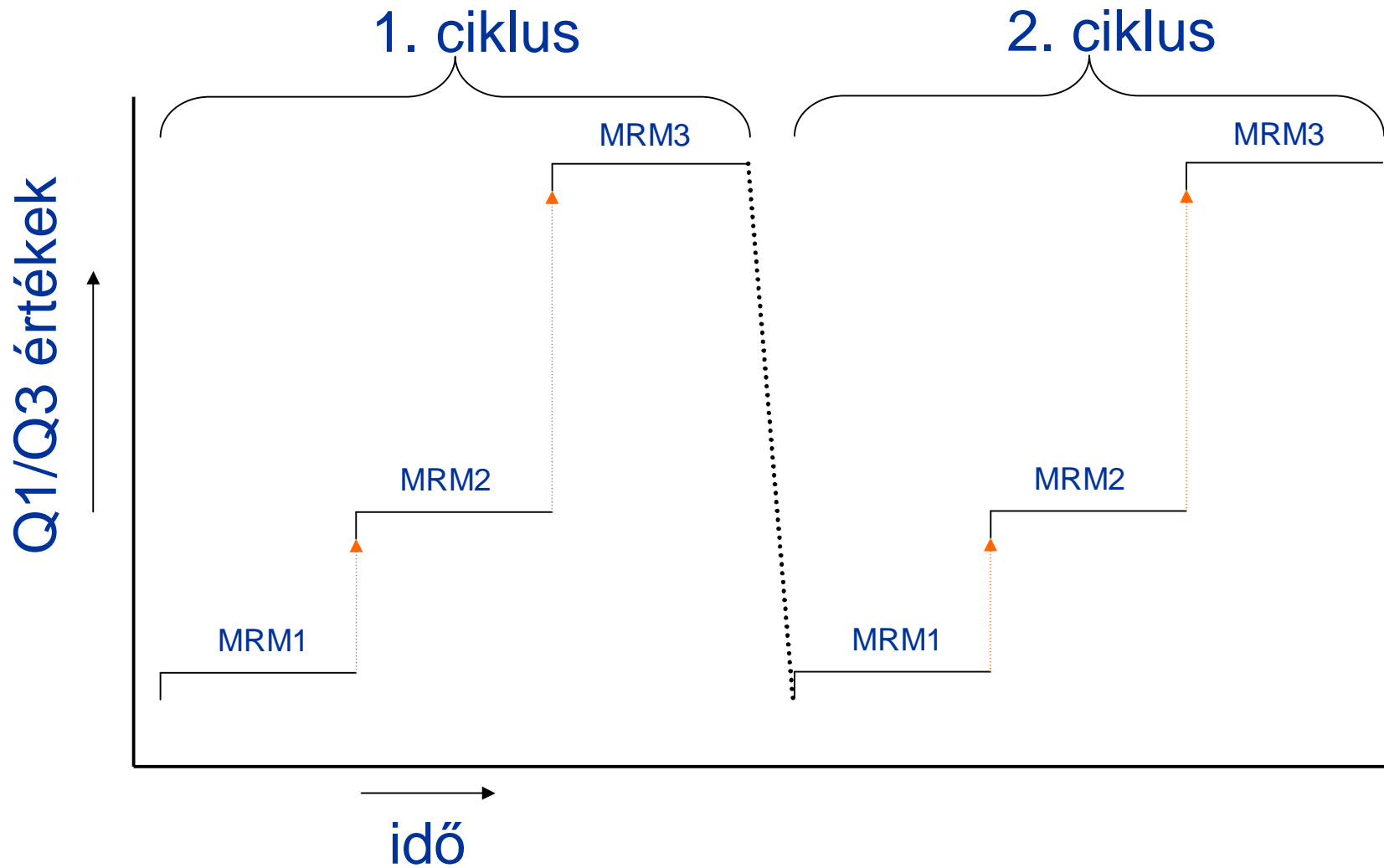
*Reakciócsatornák
követése (MRM)*



Q1: kiválaszt (anyaion)
Q3: kiválaszt (fragmension)

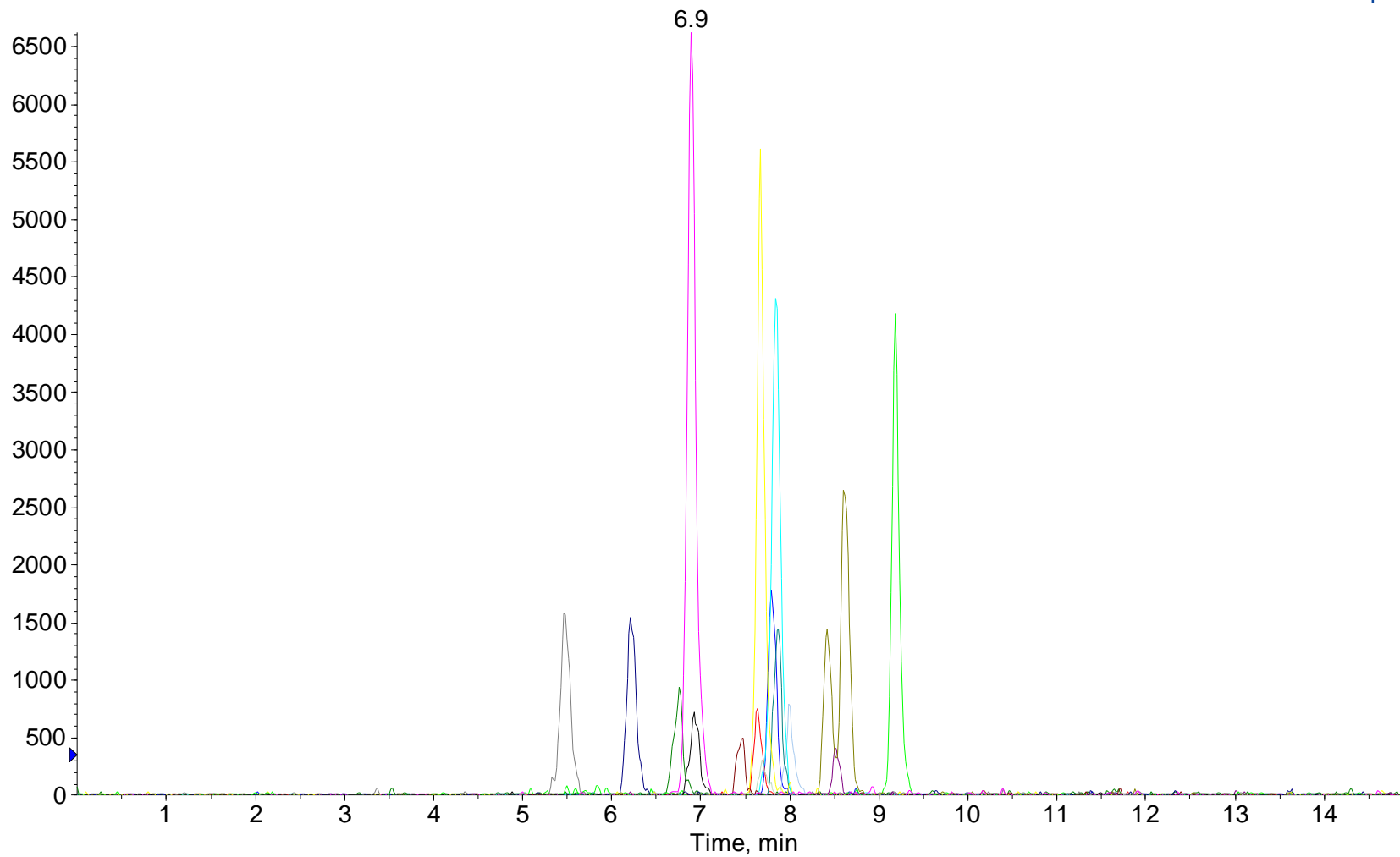
MRM mód

11



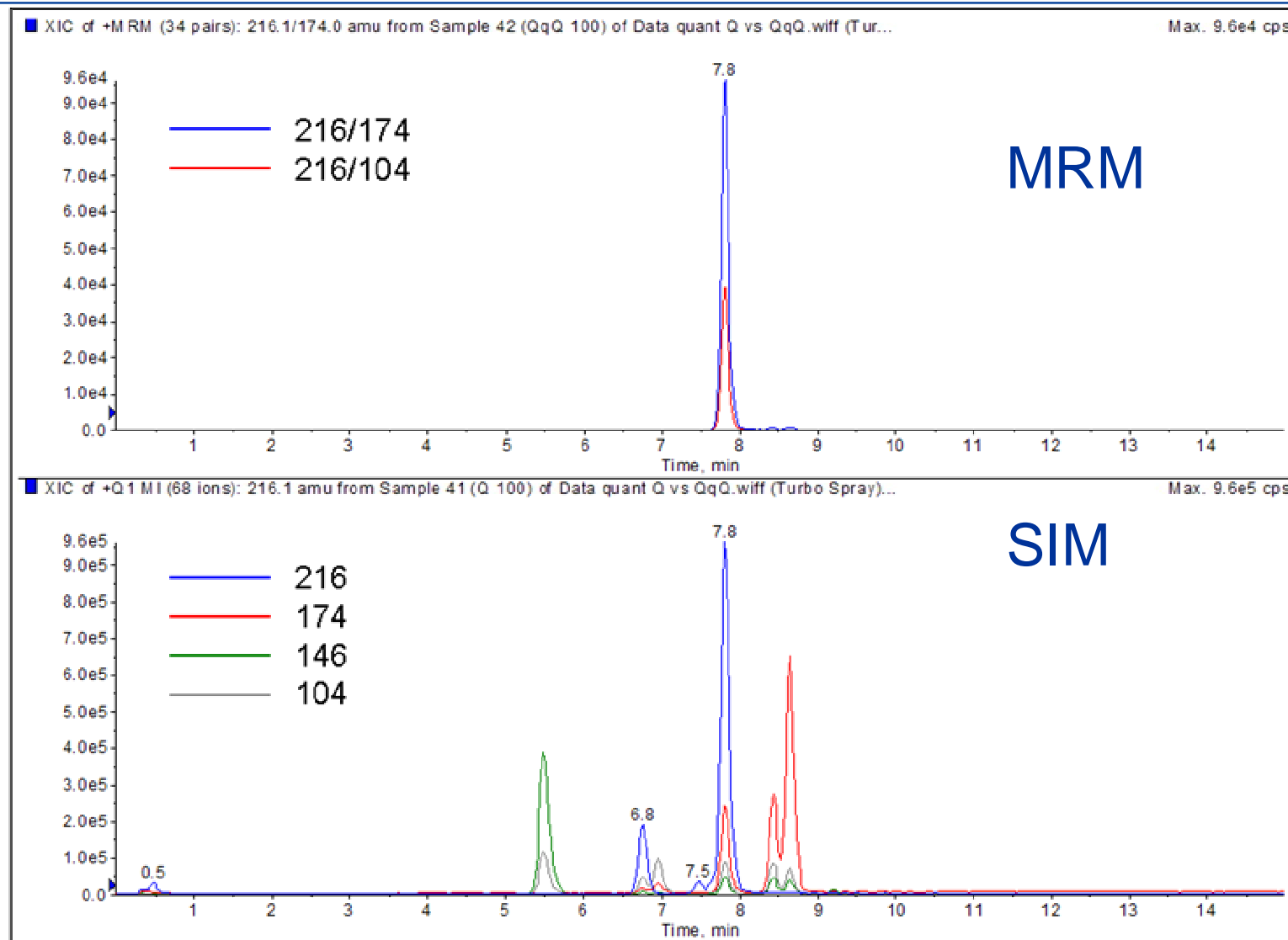
Hármas kvadrupol MRM

12



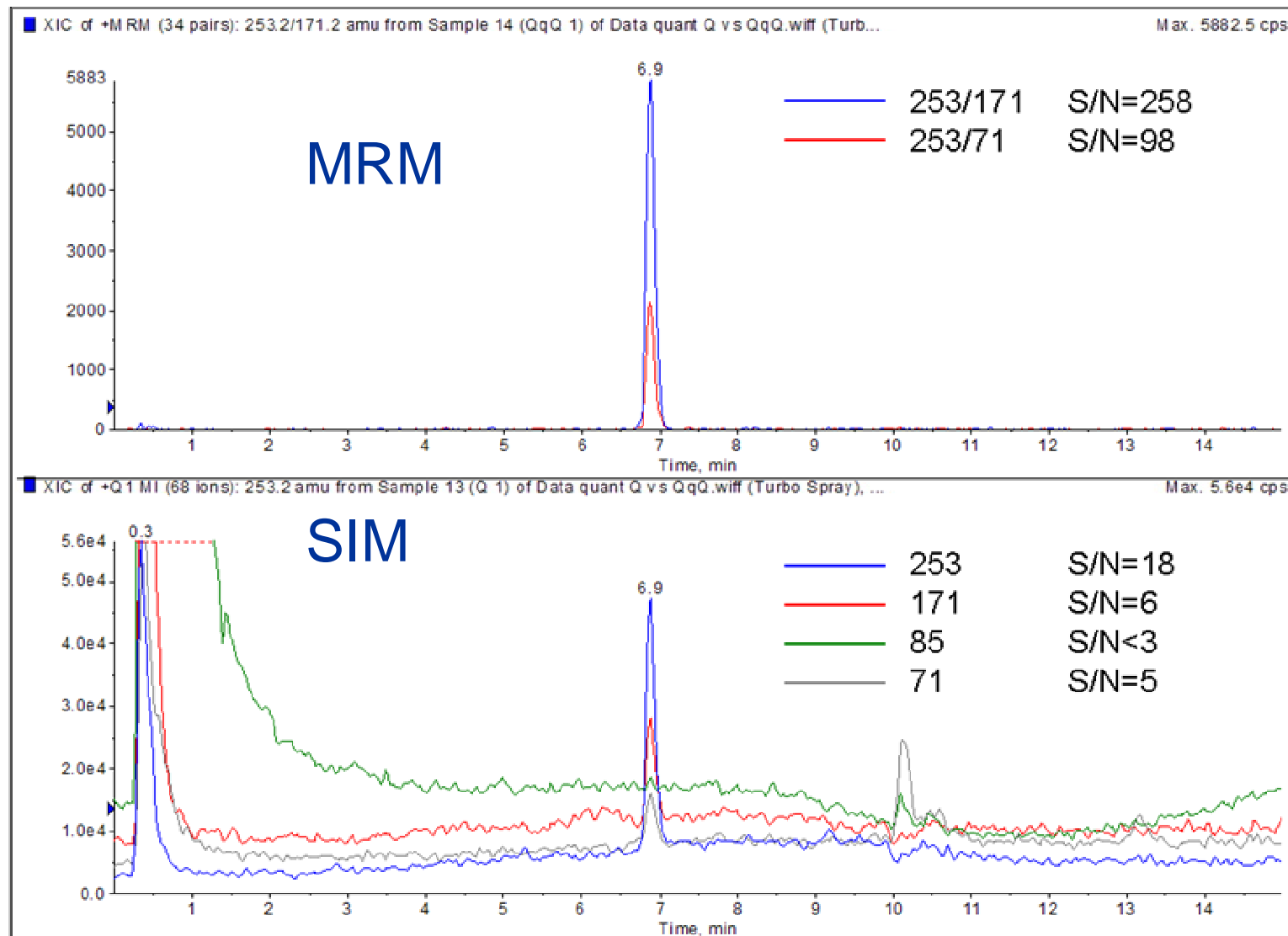
Szelektivitás (100 μ g/L)

13



Érzékenység (1 µg/L)

14



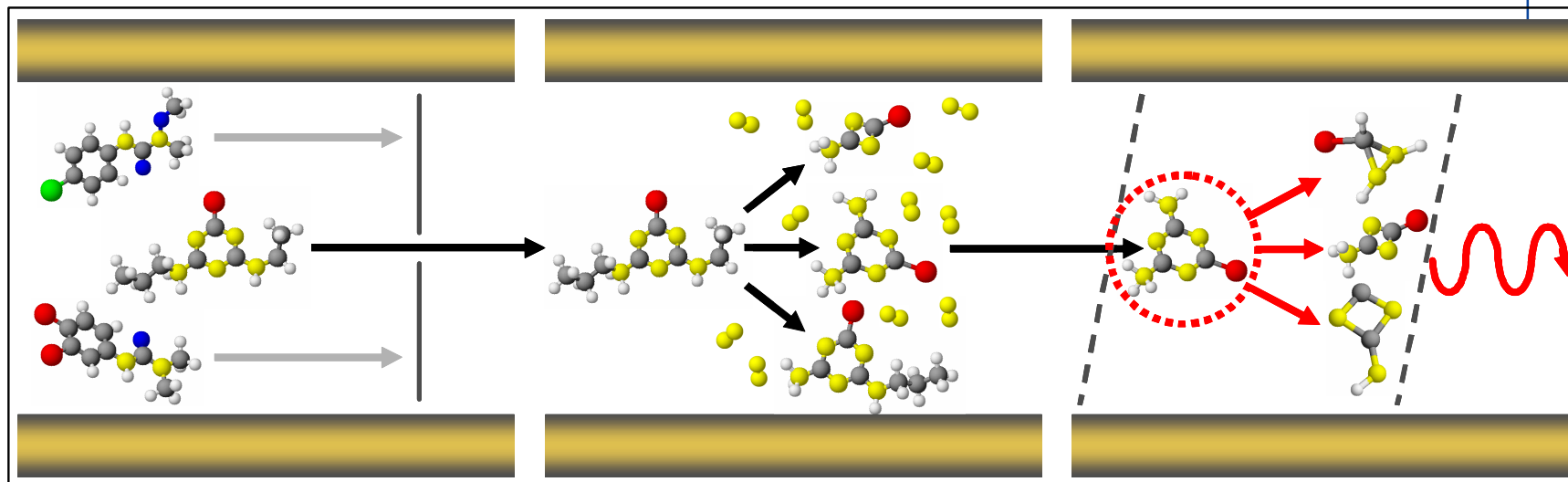
QTRAP

15

-
- Gyakran előfordulhat, hogy zavaró interferenciák lépnek fel a hagyományos MRM átmenetek során
 - Az MS³ (MS/MS/MS) a szelektivitás egy újabb lehetőségét kínálja

MS/MS/MS elve

16



Első anyaiion kiválasztása: Q1

Fragmentáció: Q2

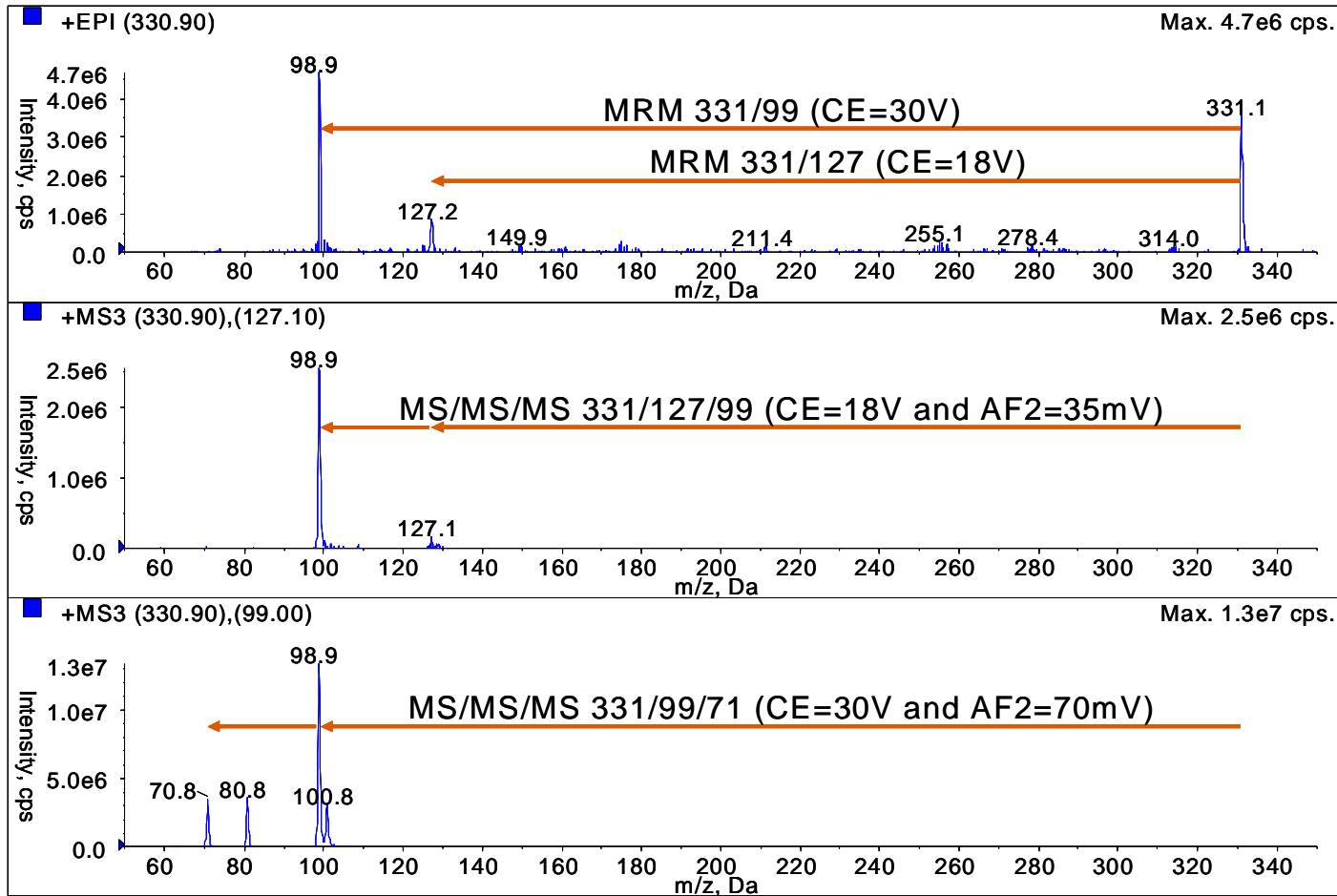
Fragmensionok csapdázása Q3 (Lineáris Ioncsapda LIT)

Második anyaiion kiválasztása: LIT

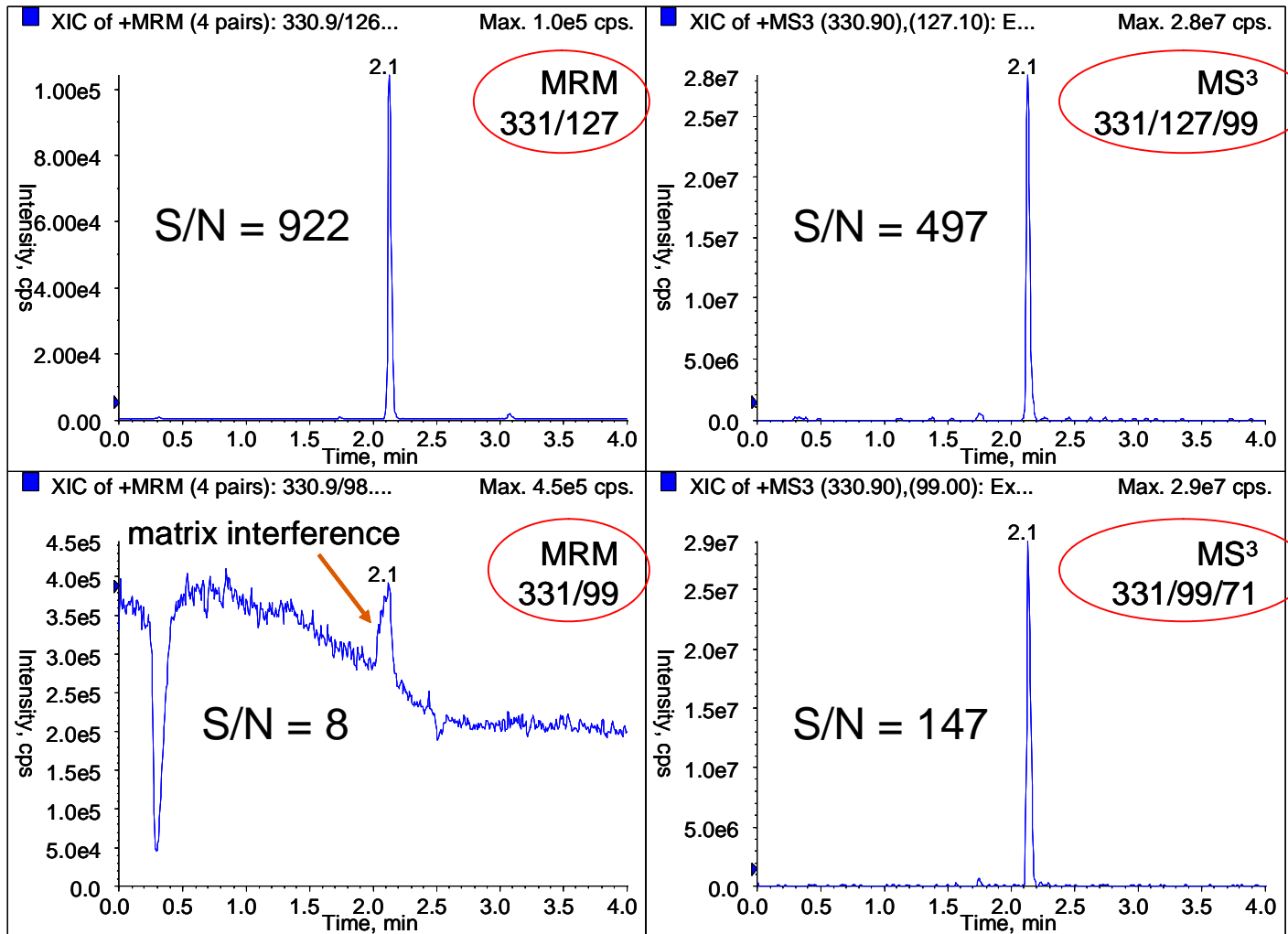
Fragmentálás: LIT

Második generációs fragmenseg detektálása

MS³ kvantitálás



MS³ kvantitálás



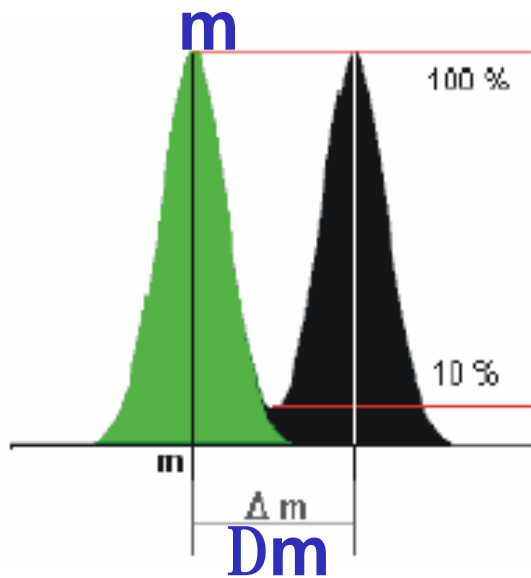
10 μ g/kg mátrixból (MS3: %CV<5, accuracy 90-110%)

Felbontás

19

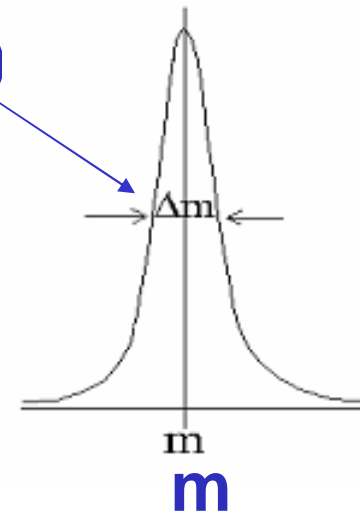
$$\text{Felbontás: } R = \frac{\bar{m}}{\Delta m}$$

10 % völgy



Full Width at Half Mass

Dm (50% magasságnál)



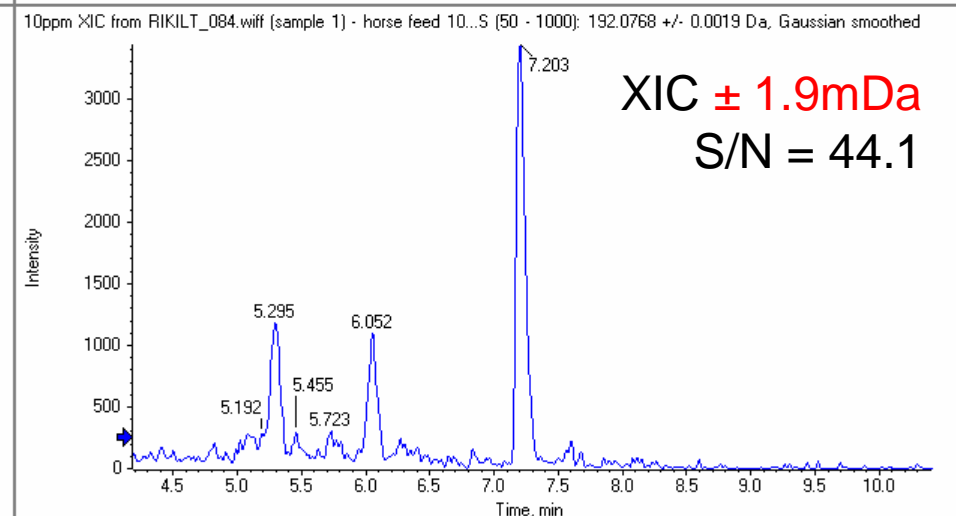
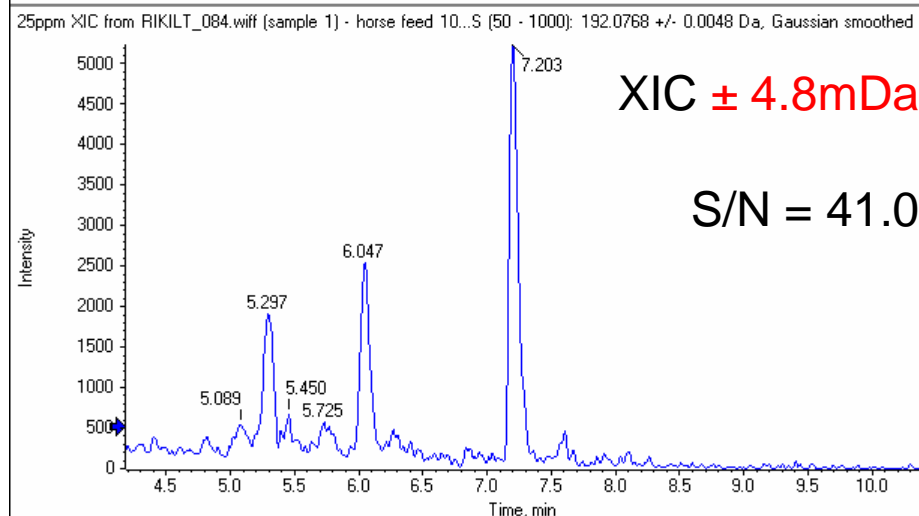
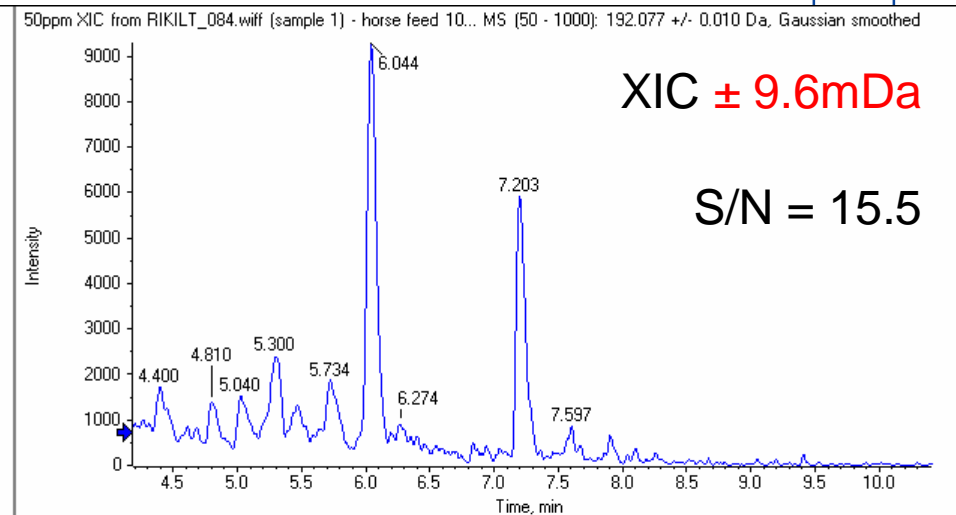
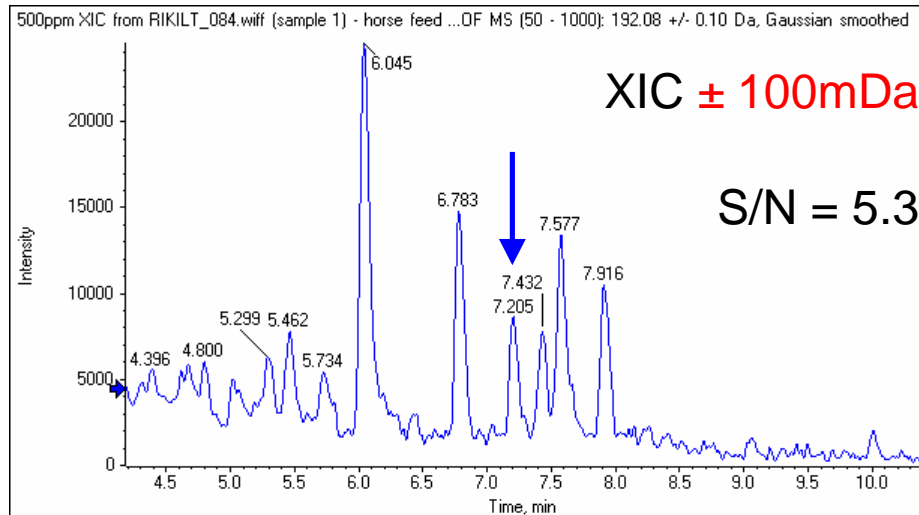
Nagyfelbontású analizátorok

20

- Repülési idő analizátor (TOF)
- Q-TOF

Nagyfelbontás (TOF)

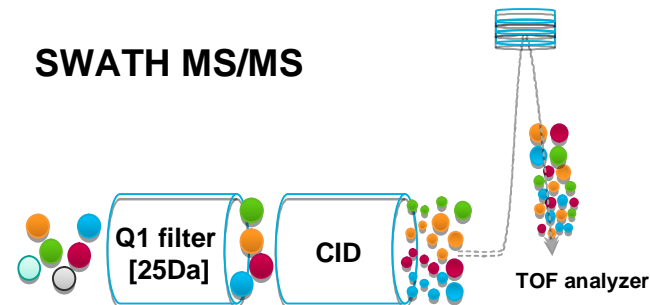
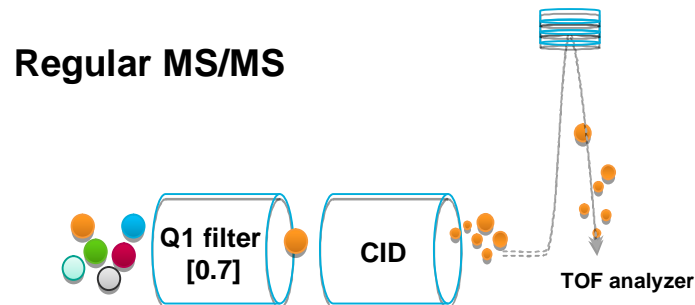
21



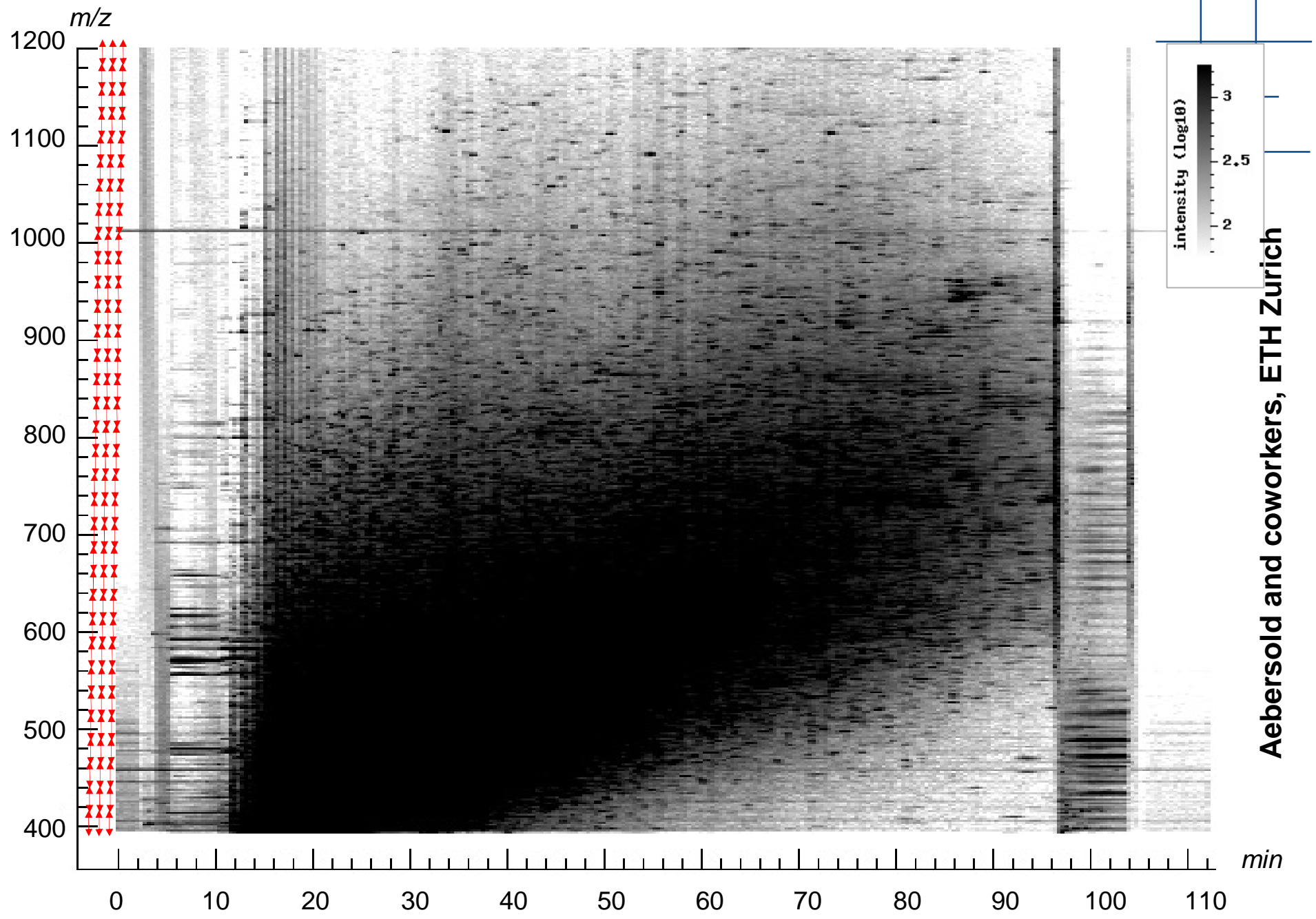
Triple TOF: SWATH™

22

- „**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}

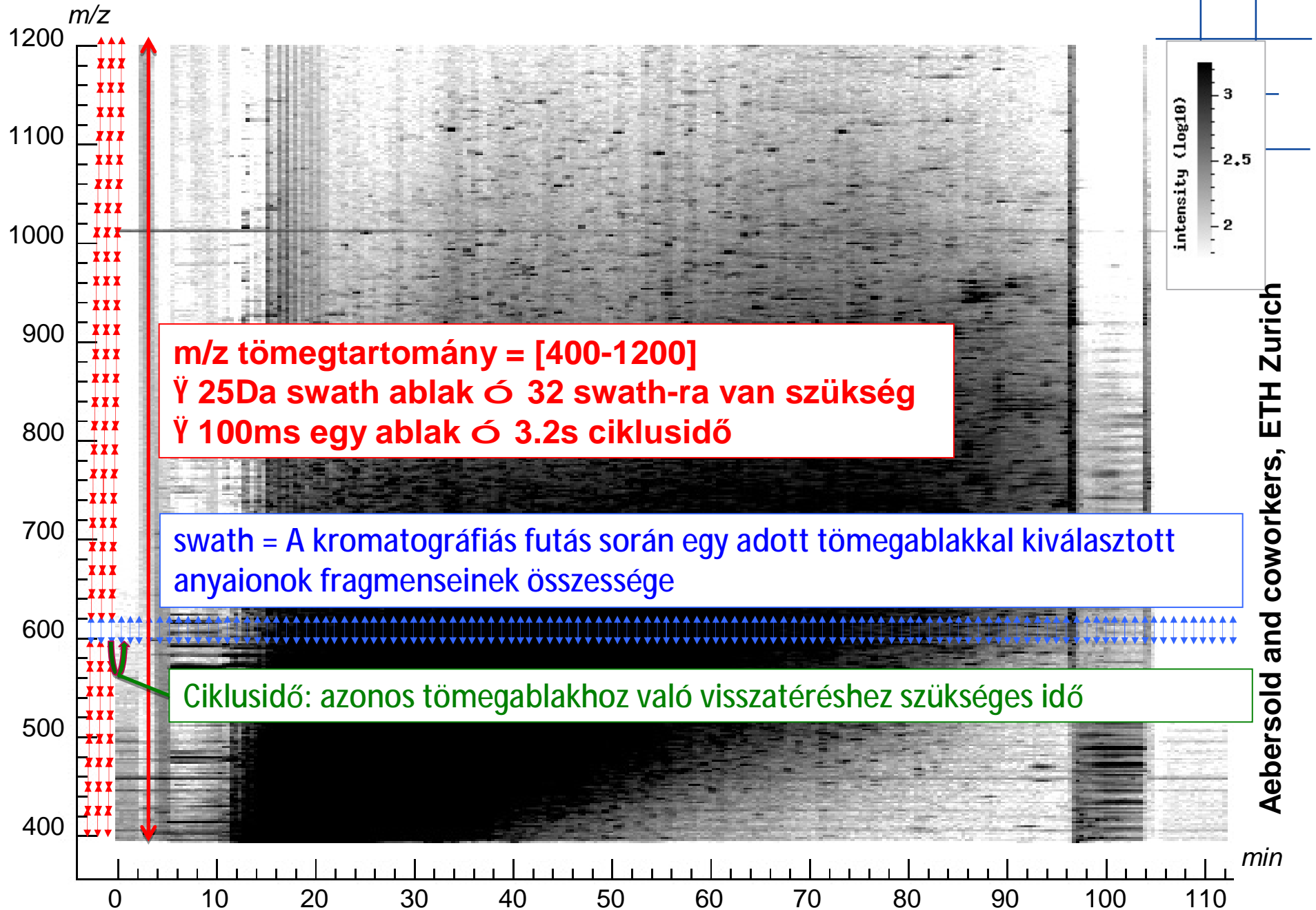


SWATH-MS Adatgyűjtés elmélete

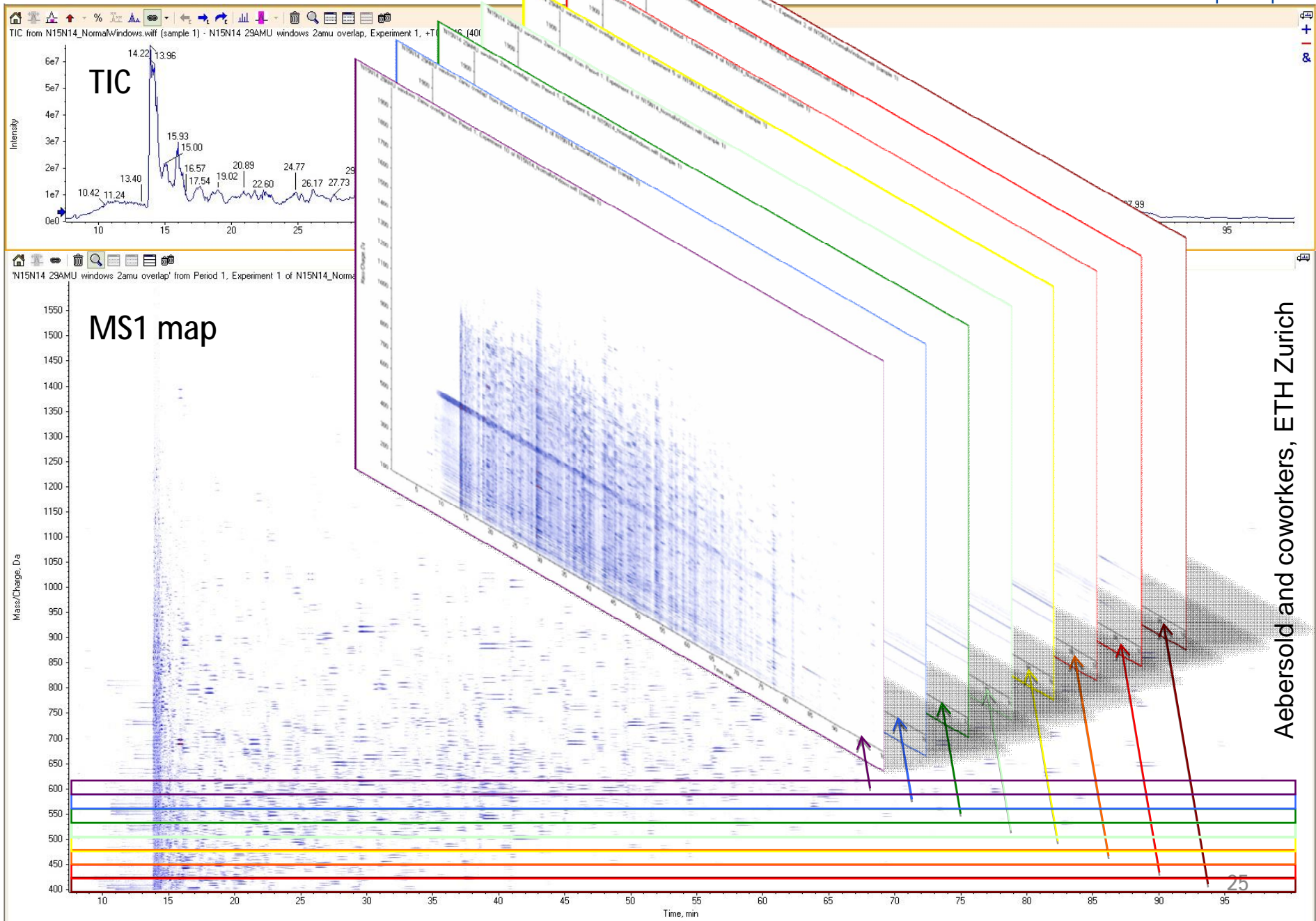


Aebersold and coworkers, ETH Zurich

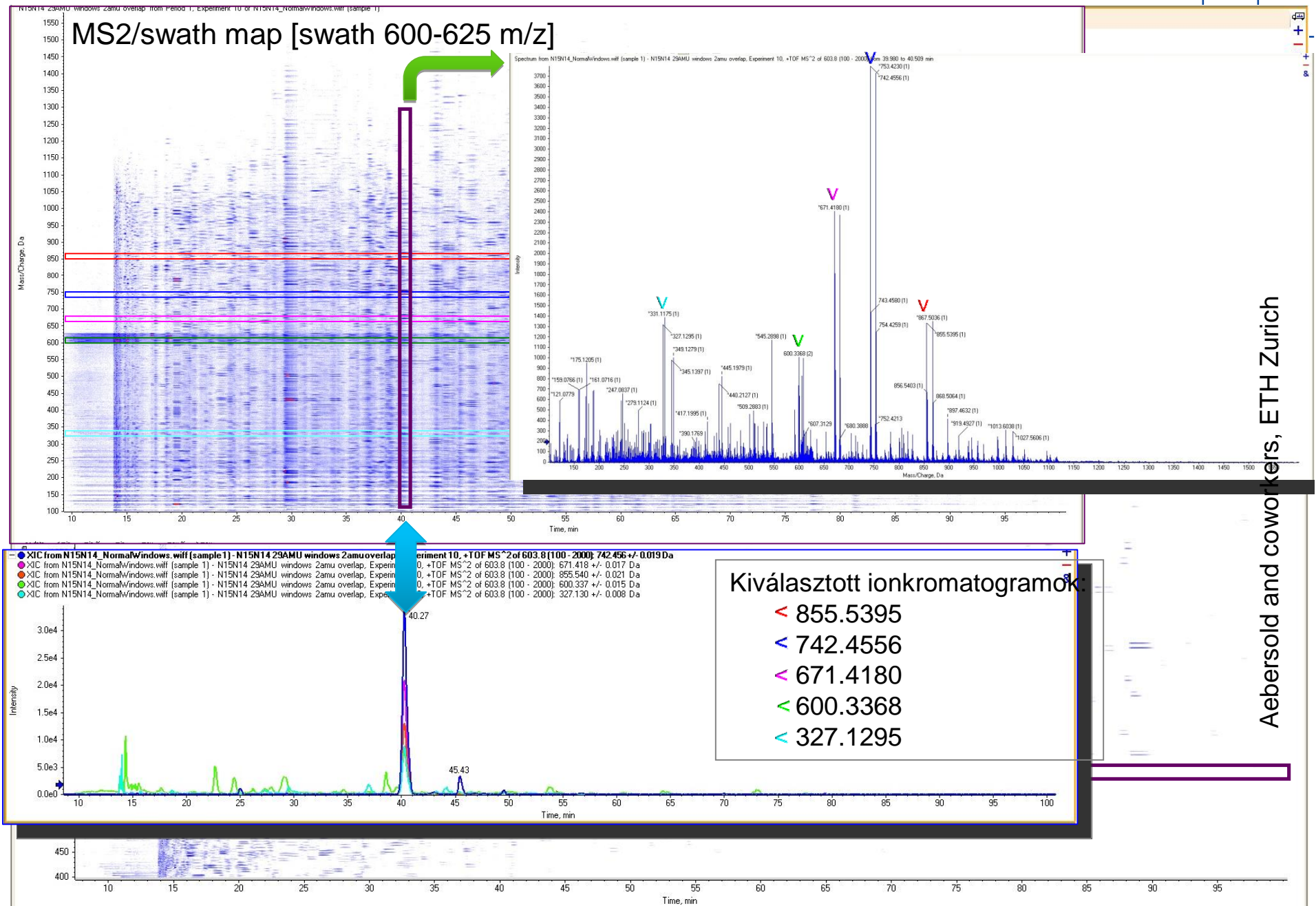
SWATH-MS Adatgyűjtés elmélete



SWATH-MS adatgyűjtés elmélete: adatok gyűjtése és értékelés



SWATH-MS adatgyűjtés elmélete: Adatgyűjtés és értékelés



Aebersold and coworkers, ETH Zurich

SWATH előnyei

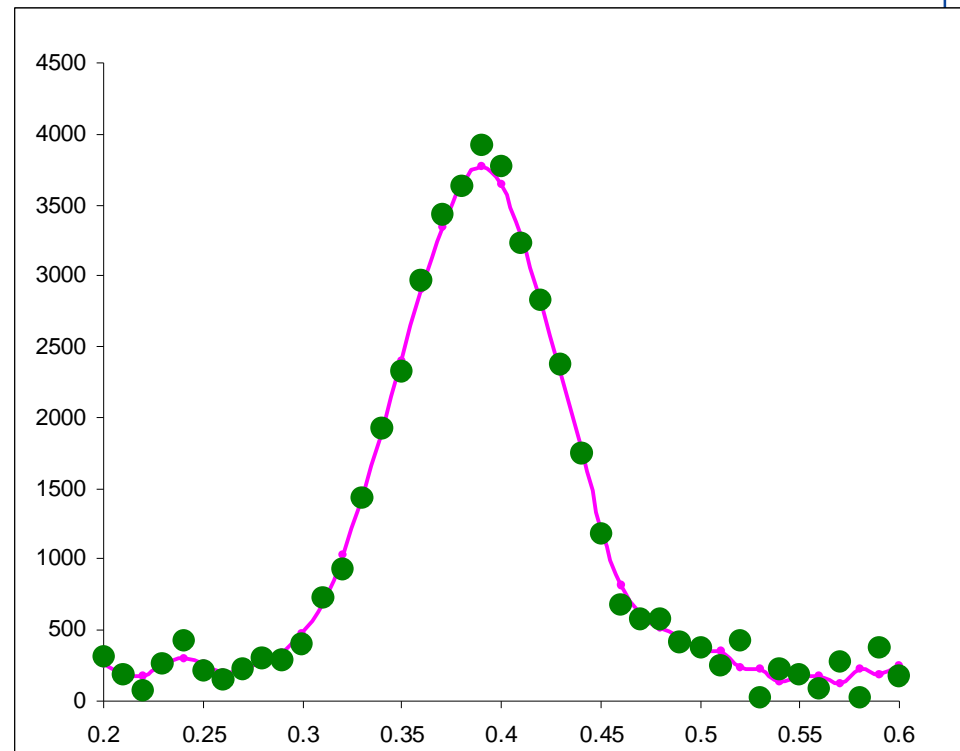
27

- 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)

Hány komponens mérhető egy
injektálásból?

Egy csúcs jellemzése

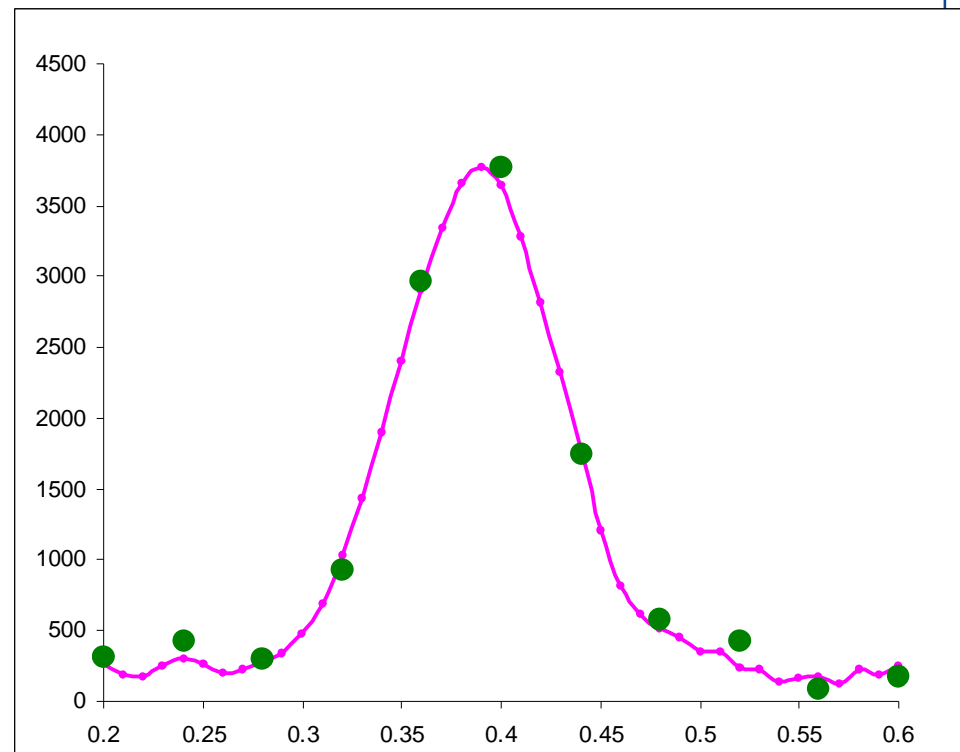
- A pontok számának csökkenésével a csúcs ábrázolása torzul
- S/N viszony nő a csúcsszélesség csökkenésével
- A kvantitáláshoz minimálisan szükséges pontok száma:6-20



Egy csúcs jellemzése

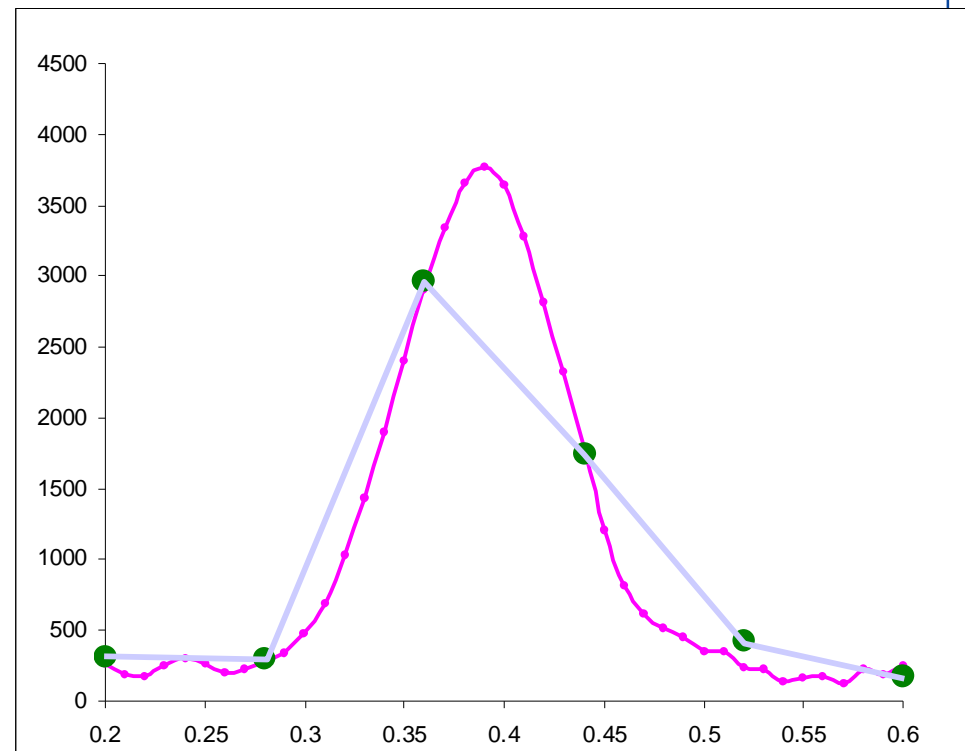
30

- 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

- 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



32

- 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

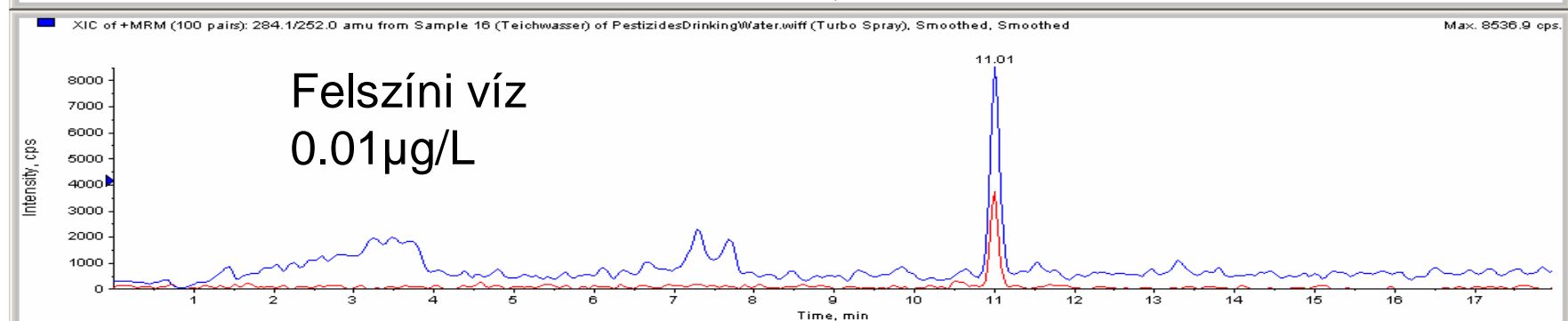
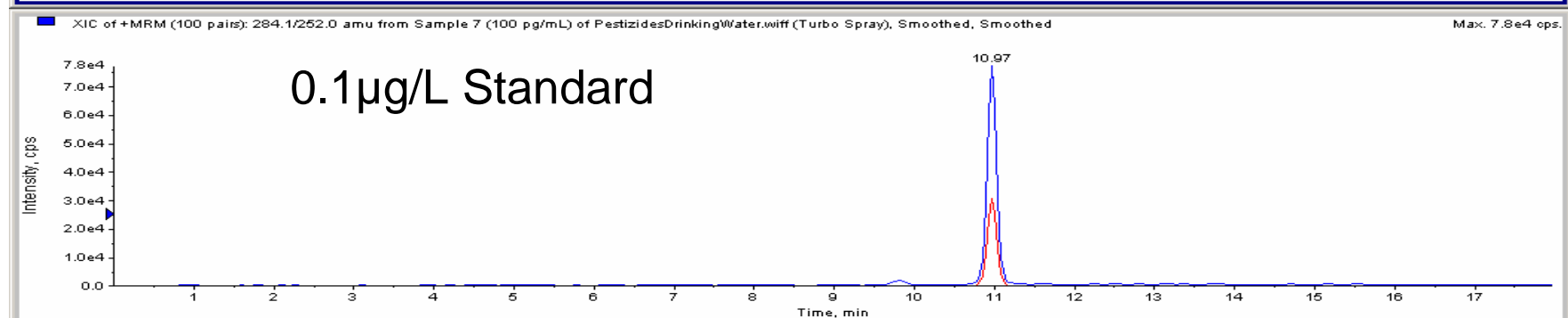
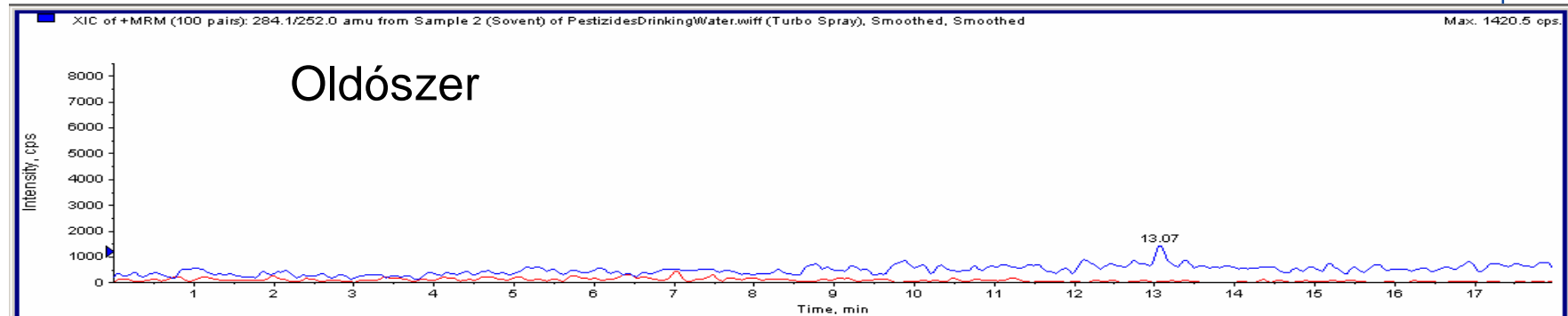
33

- Ajánlás 2002/657/EG
 - SIM és MRM (4 azonosítási pont)
 - MS anyaion 1.0
 - MS² fragmens 1.5

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

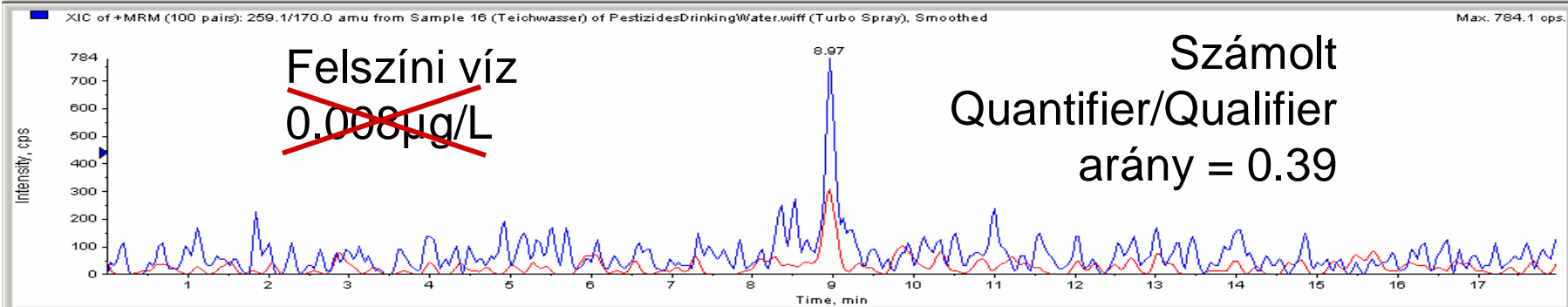
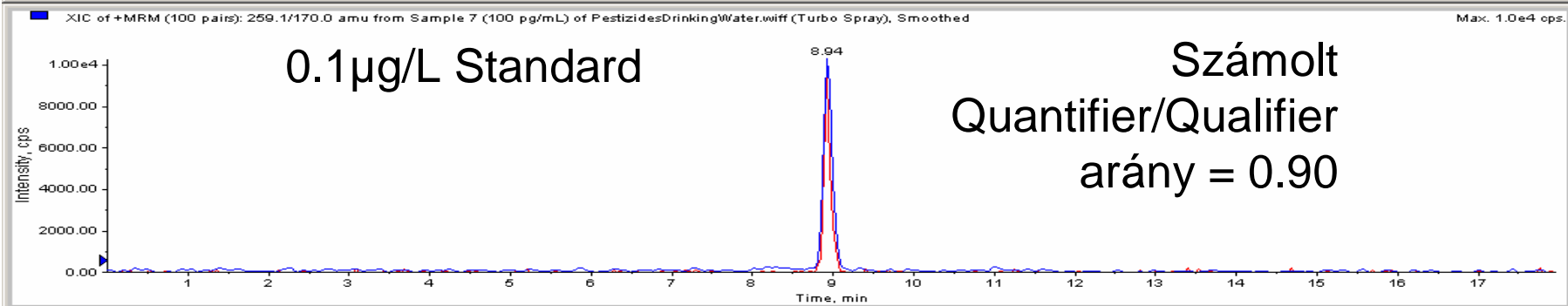
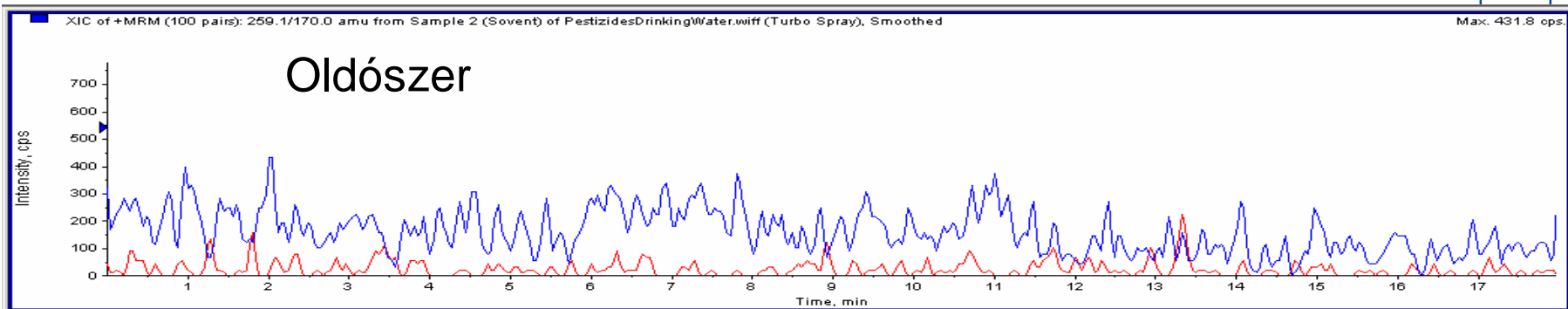
Metolachlor Pozitív találat

34



Metobromuron **Negatív** találat

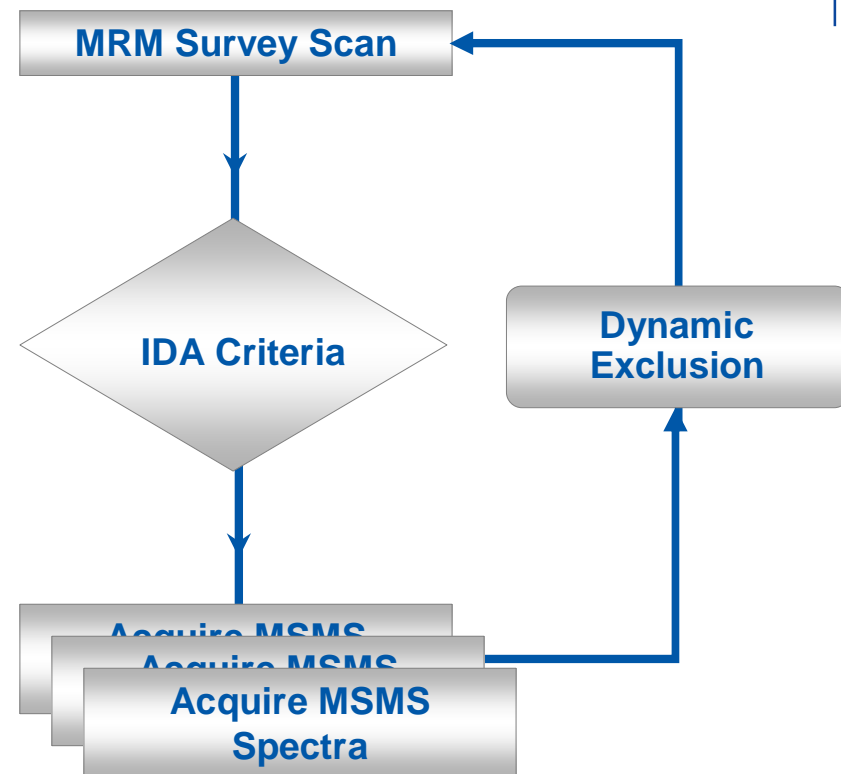
35



QTrap kínálta screening lehetőség

36

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

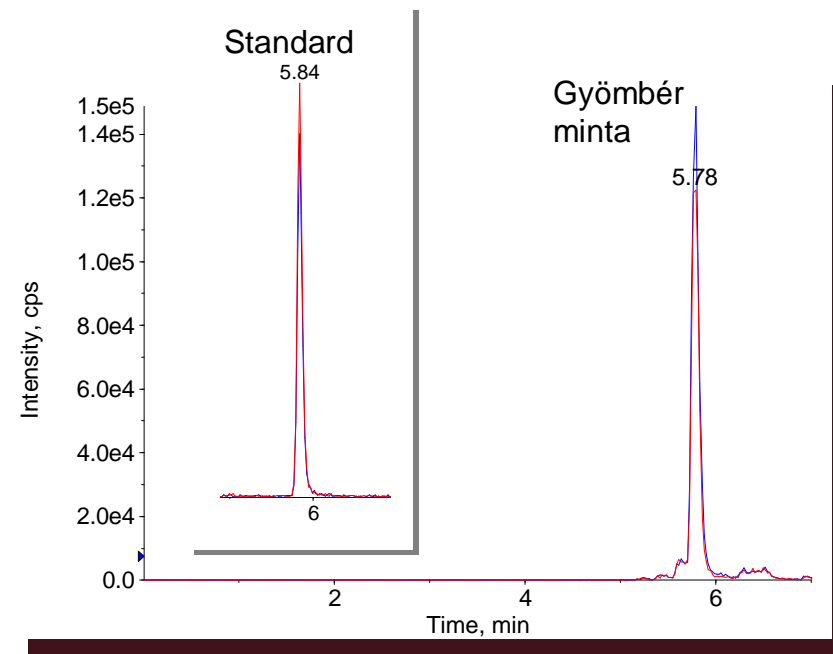


A QTRAP nyújtotta lehetőségek

37

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**



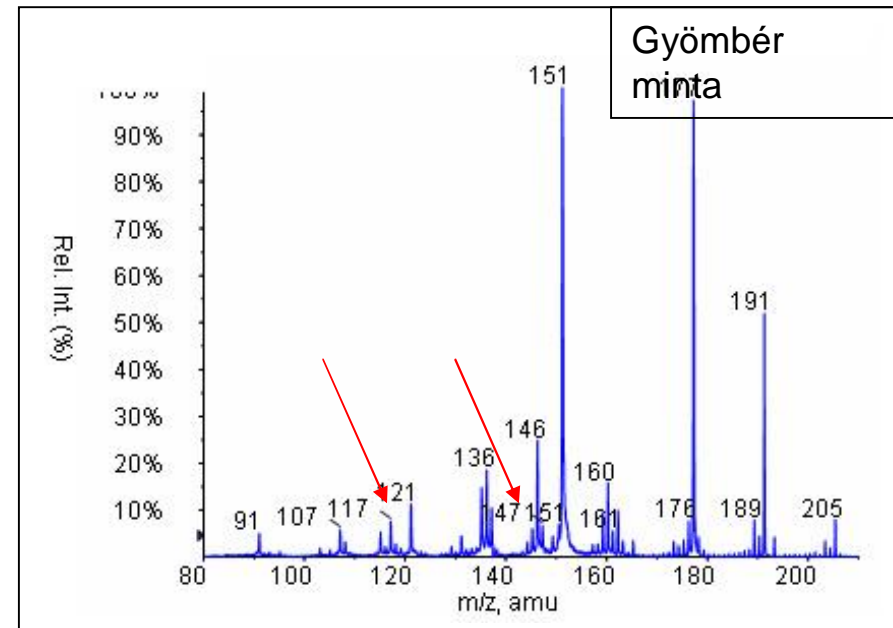
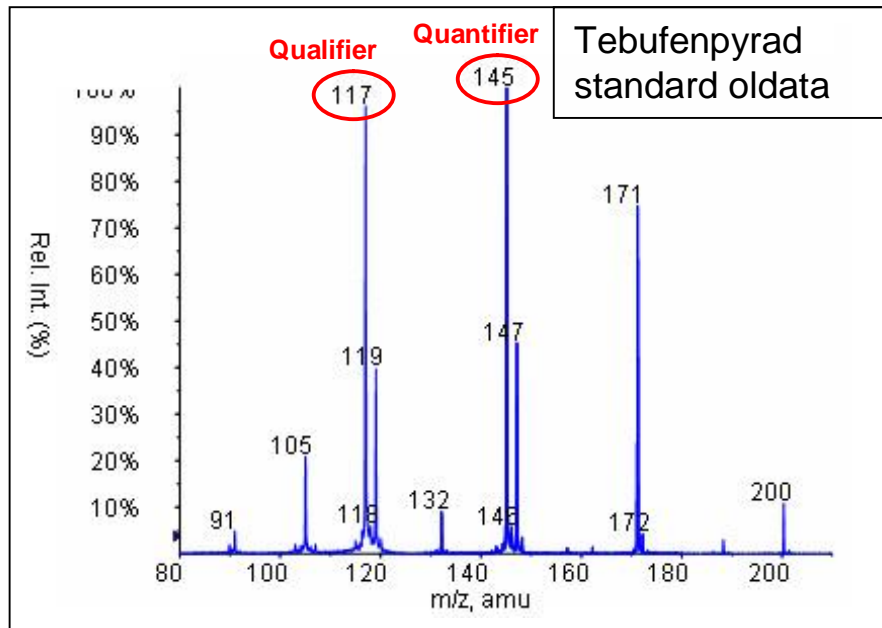
További vizsgálatokat igényelt, mivel gyömbérben még nem fordult elő!

A QTRAP nyújtotta lehetőségek

38

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!

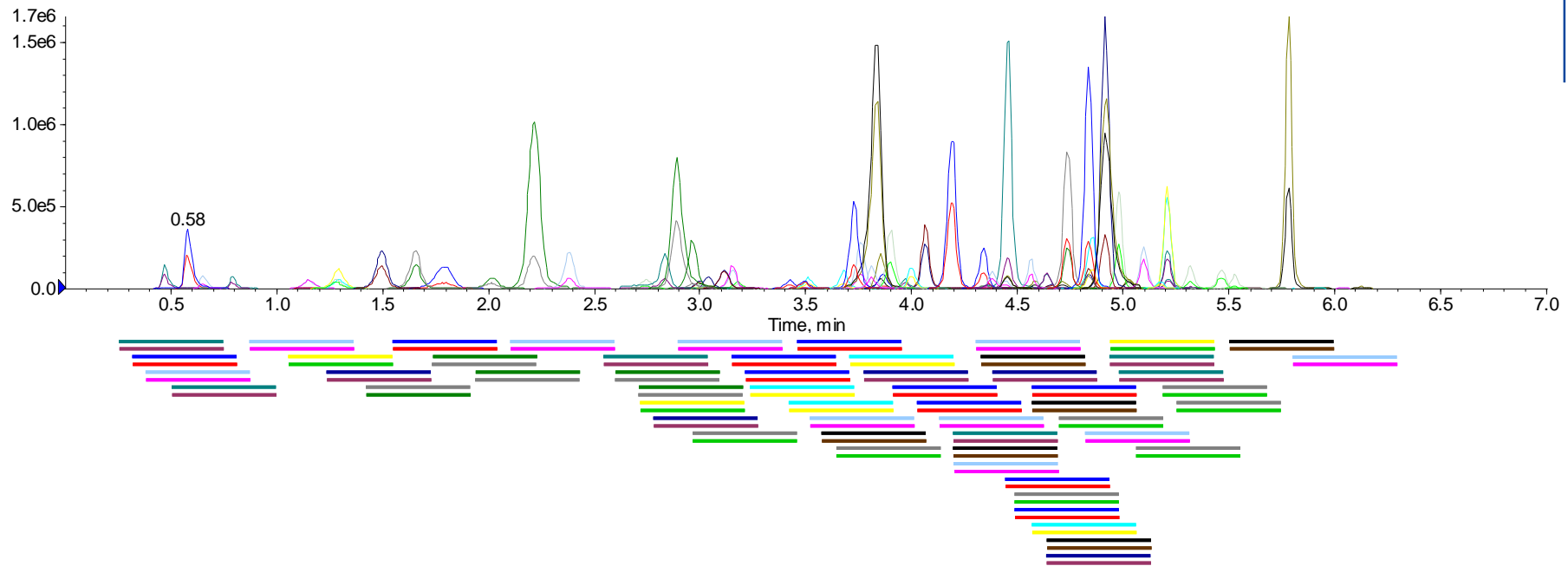
Komponensszám növelése

39

- 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™

40

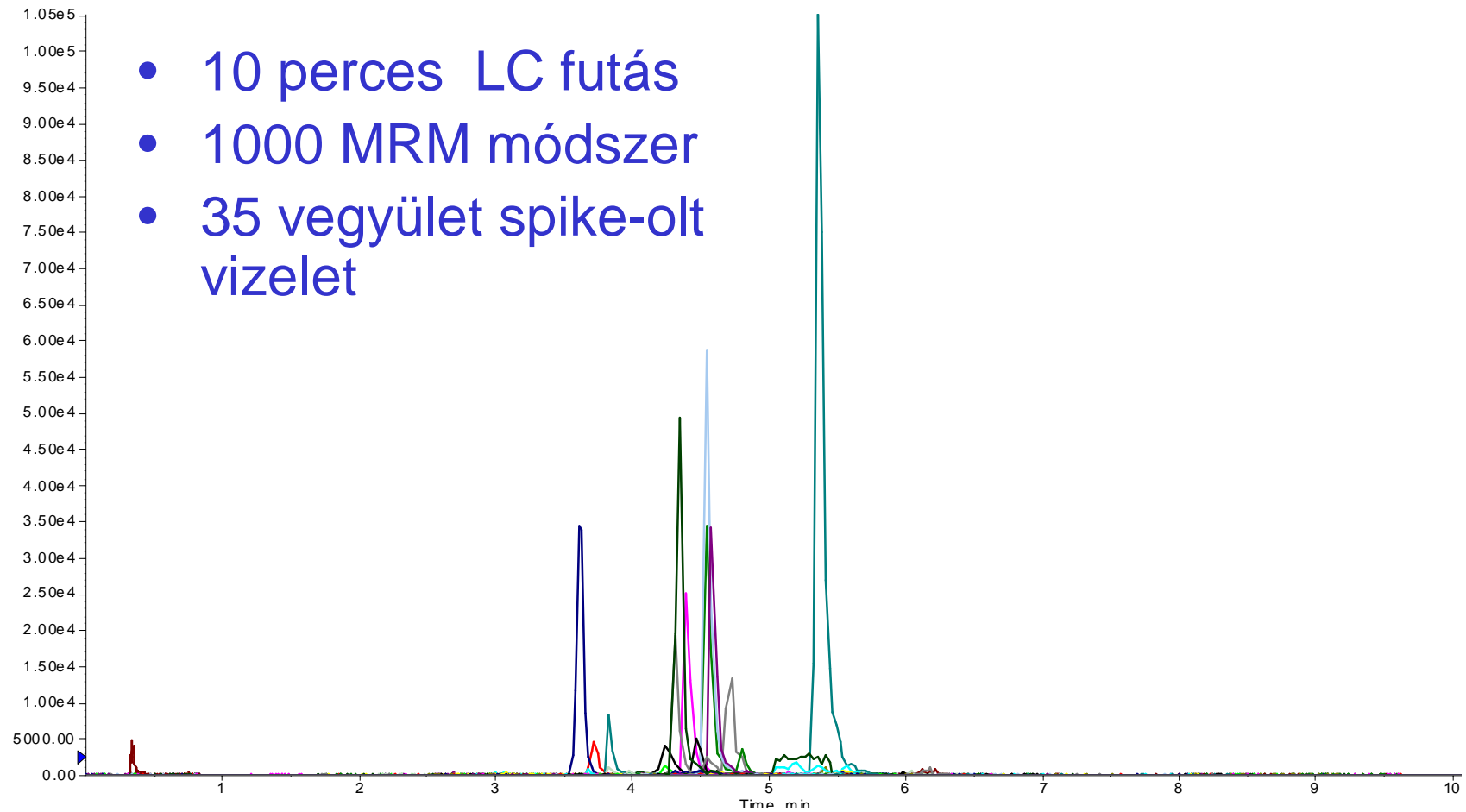


- Lényegesen több komponens egyidejű detektálása lehetséges anélkül, hogy az érzékenység vagy a szelektivitás csökkenne

High throughput vizsgálat sMRM módszerrel

41

- 10 perces LC futás
- 1000 MRM módszer
- 35 vegyület spike-olt vizelet



Összefoglalás

	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