

A feladatra legalkalmasabb készülék kiválasztásának szempontjai

Szabó Pál
MTA TTK

Szemponatok

2

-
- Feladat
 - Ionizáció
 - Analizátor
 - Felbontás
 - Tandem funkció
 - Tömegtartomány
 - Sebesség/kromatográfia
 - Optikai detektorok
 - Beépített egységek
 - Dinamikus tartomány
 - Szelektivitás
 - Komponensszám
 - Spektrumkönyvtár
 - Érzékenység
 - Robusztusság
 - Szerviz/Szupport

Köszönöm a figyelmet



Feladat

4

- Mit akarunk mérni:
 - Illékony/nem illékony
 - Kis móltömegű/nagy móltömegű
 - Azonosítás/mennyiségi meghatározás

Ionizáció

- Elektronionizáció (EI)
- Léggöri nyomású (API)
 - Elektroporlasztás (ESI), nanospray
 - Léggöri nyomású kémiai ionizáció (APCI)
 - Fotoionizáció (APPI)
- MALDI

Analizátor

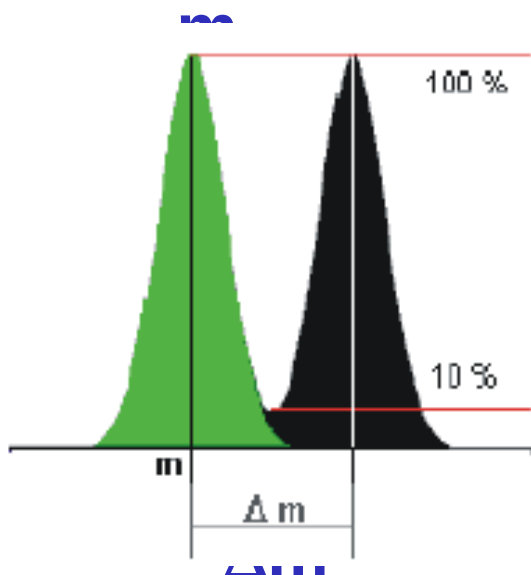
- Szektor (E,B)
- Kvadrupol (Q)
- Ioncsapda (Trap)
- Lineáris ioncsapda (QTrap)
- Repülési idő (TOF)
- Fourier transzformációs (FT-ICR)
- Orbitrap (OT)

Felbontás

7

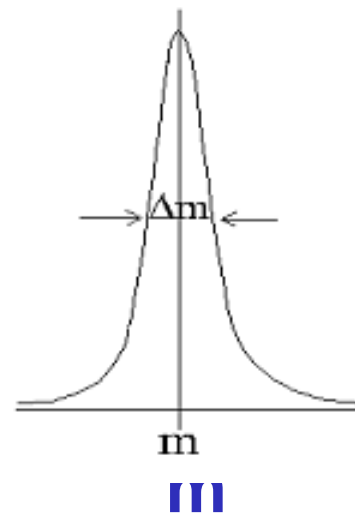
Felbontás: $R = \frac{m}{\Delta m}$

10 % völgy



Full Width at Half Mass

Δm (50%
magasságnál)



Felbontás

8

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

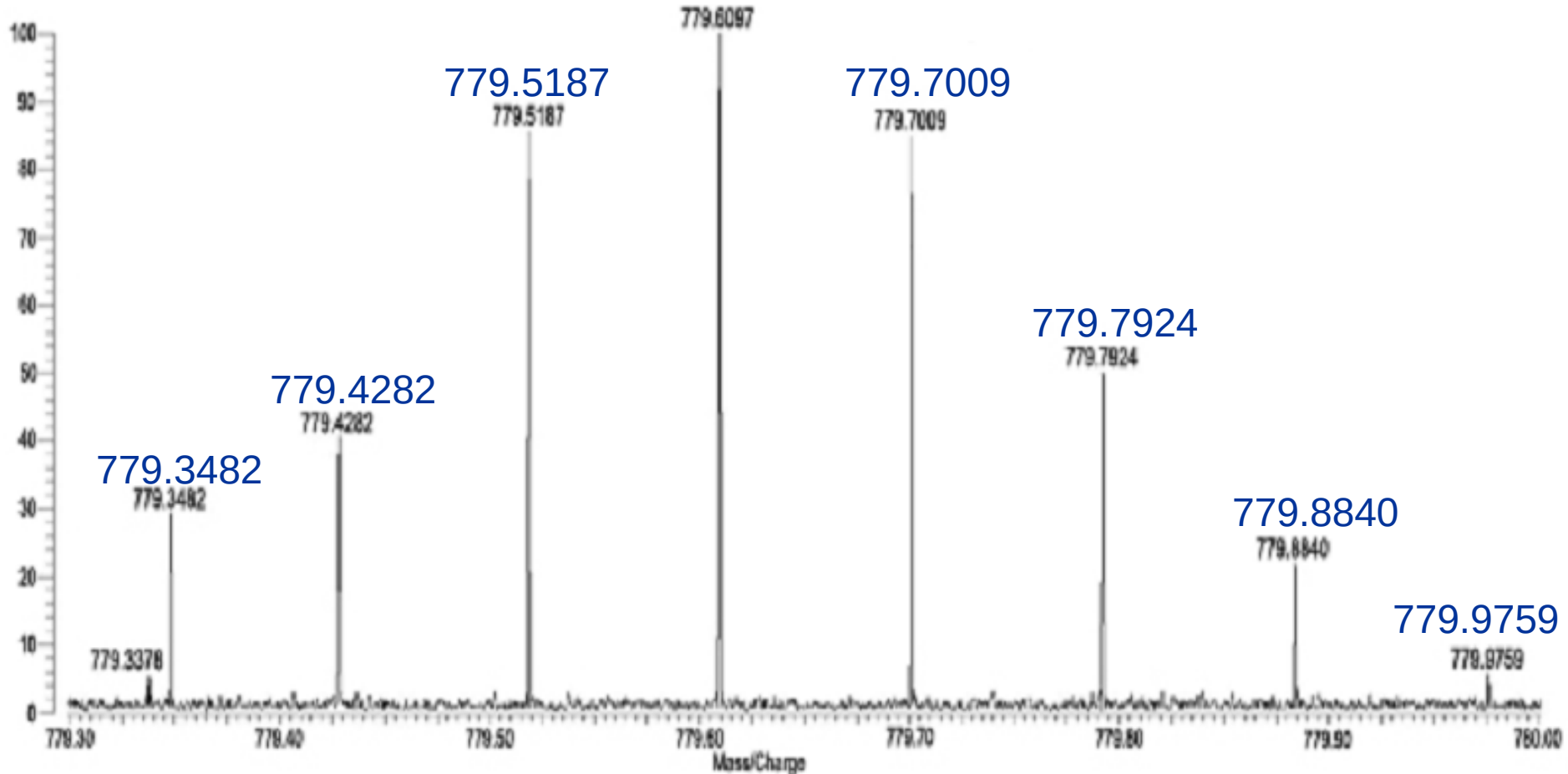
Az FT-ICR felbontása

9

11+

779.6097

R=1,040,000 !!!



Tandem funkció

10

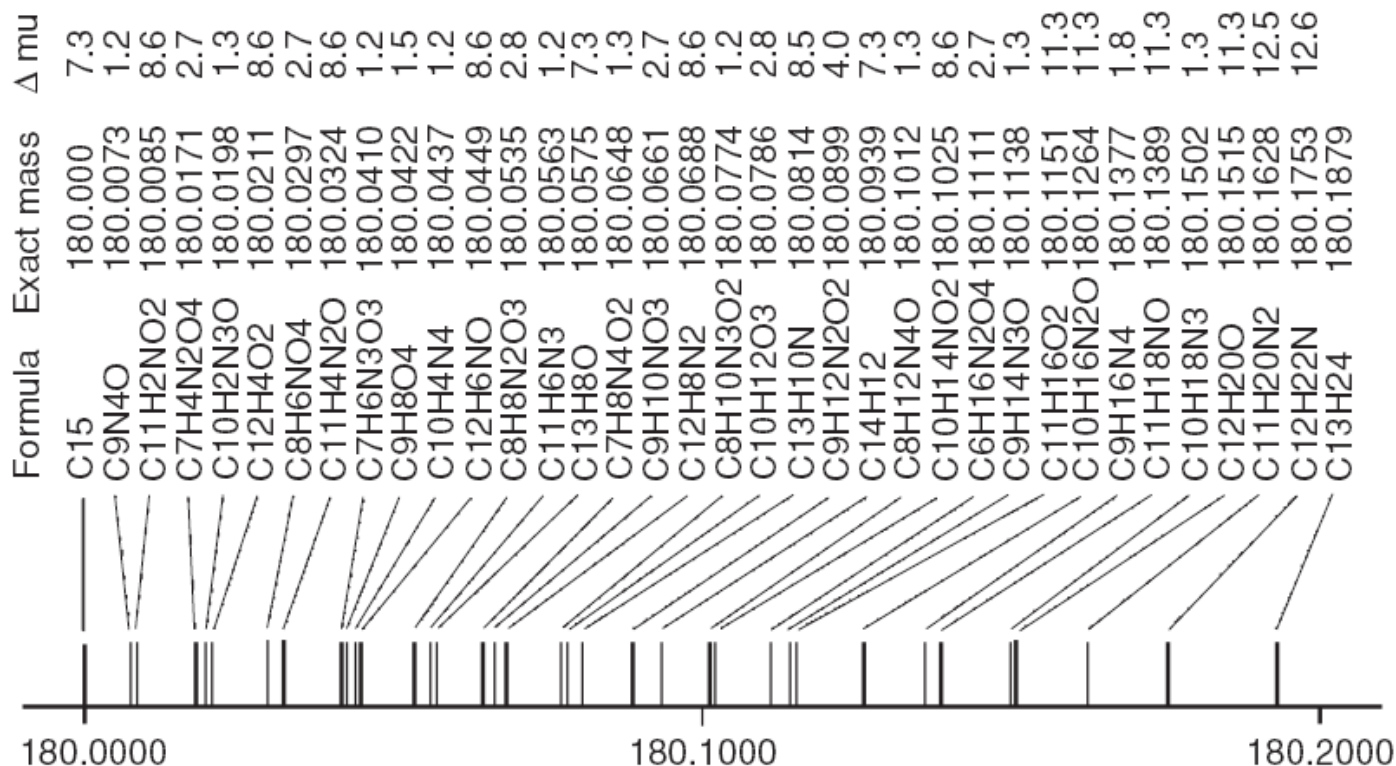
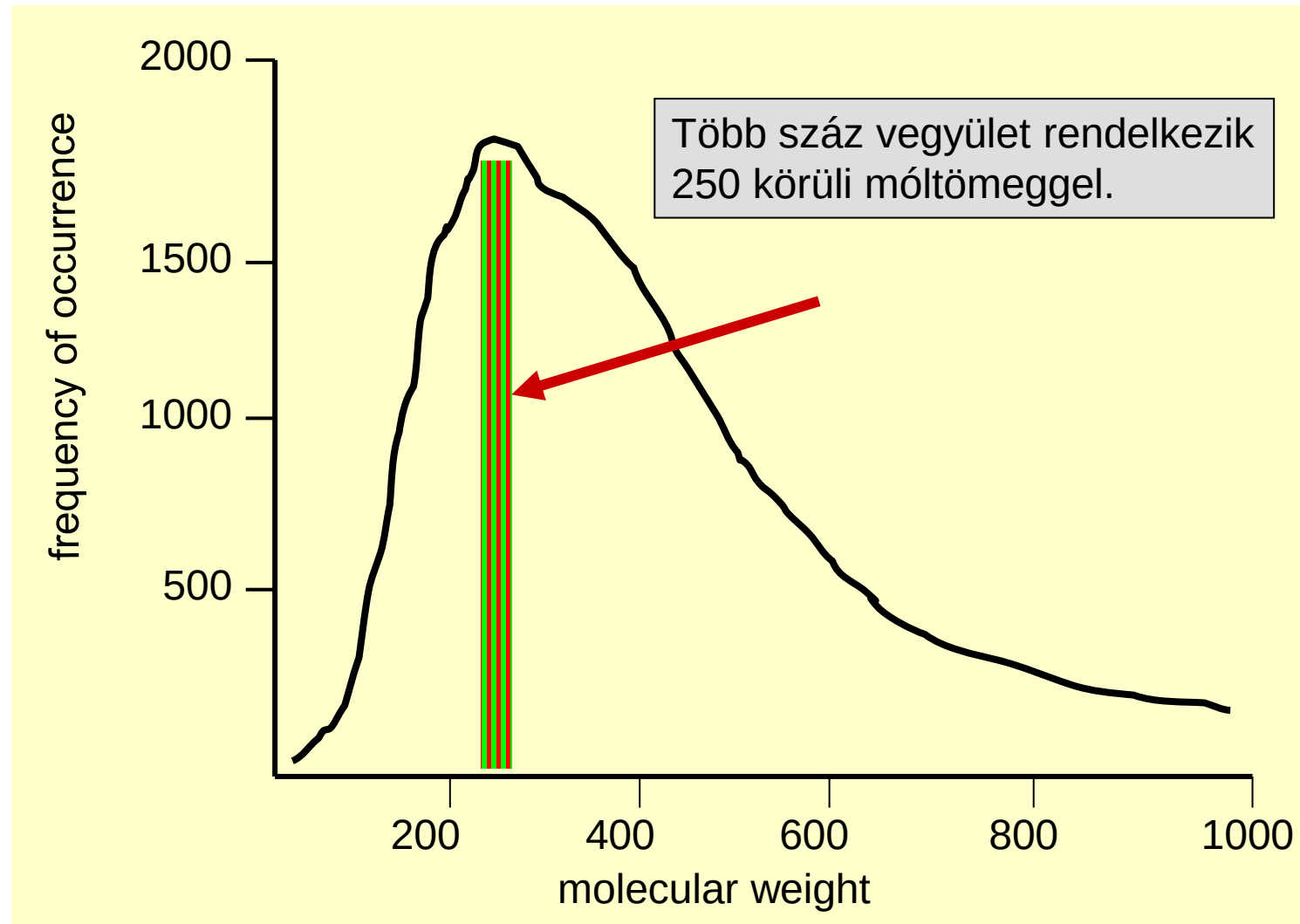


Figure 6.3

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}).

Single/Tandem

11



Tandem tömegspektrometria

12

- Célok
 - Szerkezeti információ nyerése
 - Érzékenység növelése
 - Szelektivitás növelése
- Megvalósítás
 - Szektor (EBE, BEBE)
 - Kvadrupol (QqQ)
 - Ioncsapda (MS^n)
 - Repülési idő (TOF/TOF)
 - Hibrid (QTrap, QTof)

Tömegtartomány

13

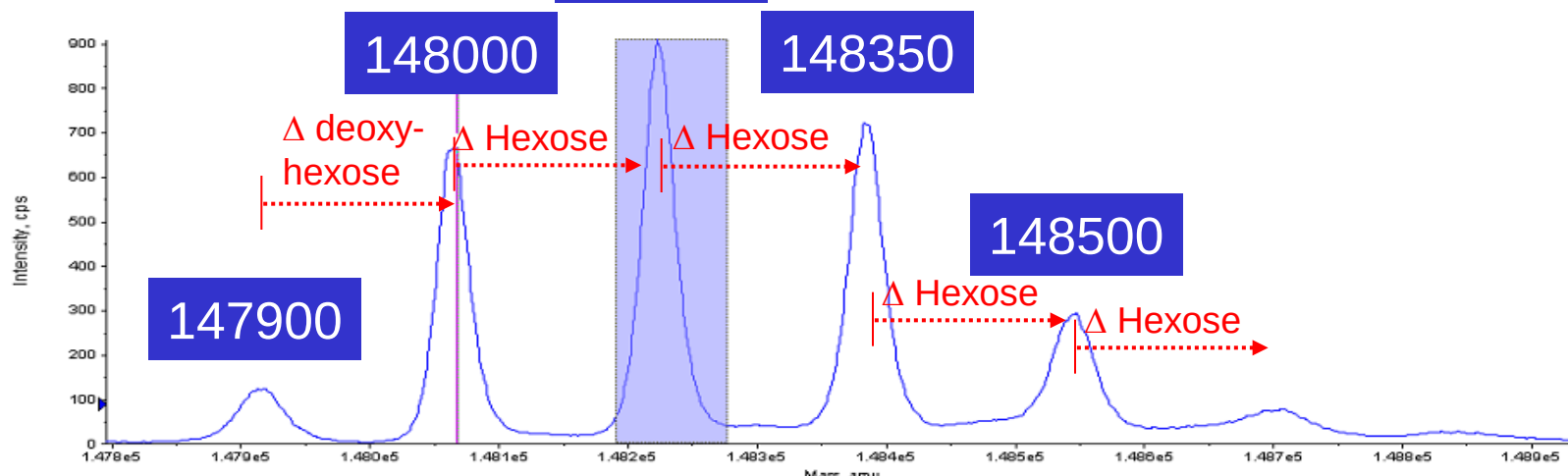
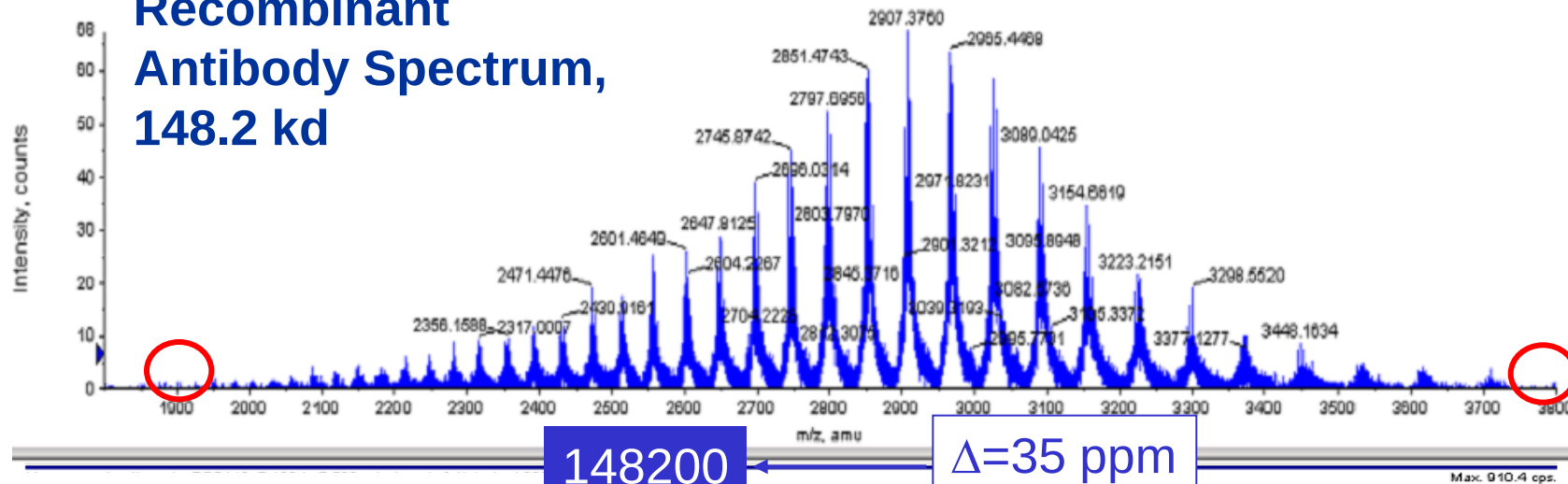
- Alsó érték: 0-5
- Felső érték:
 - „Teres” analizátorok: néhány ezer
 - TOF: >10 000
- LMR/HMR: 1250/2000

Tömegtartomány

14

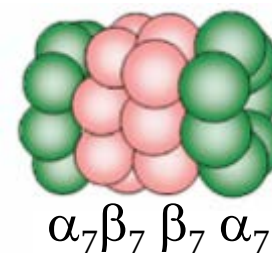
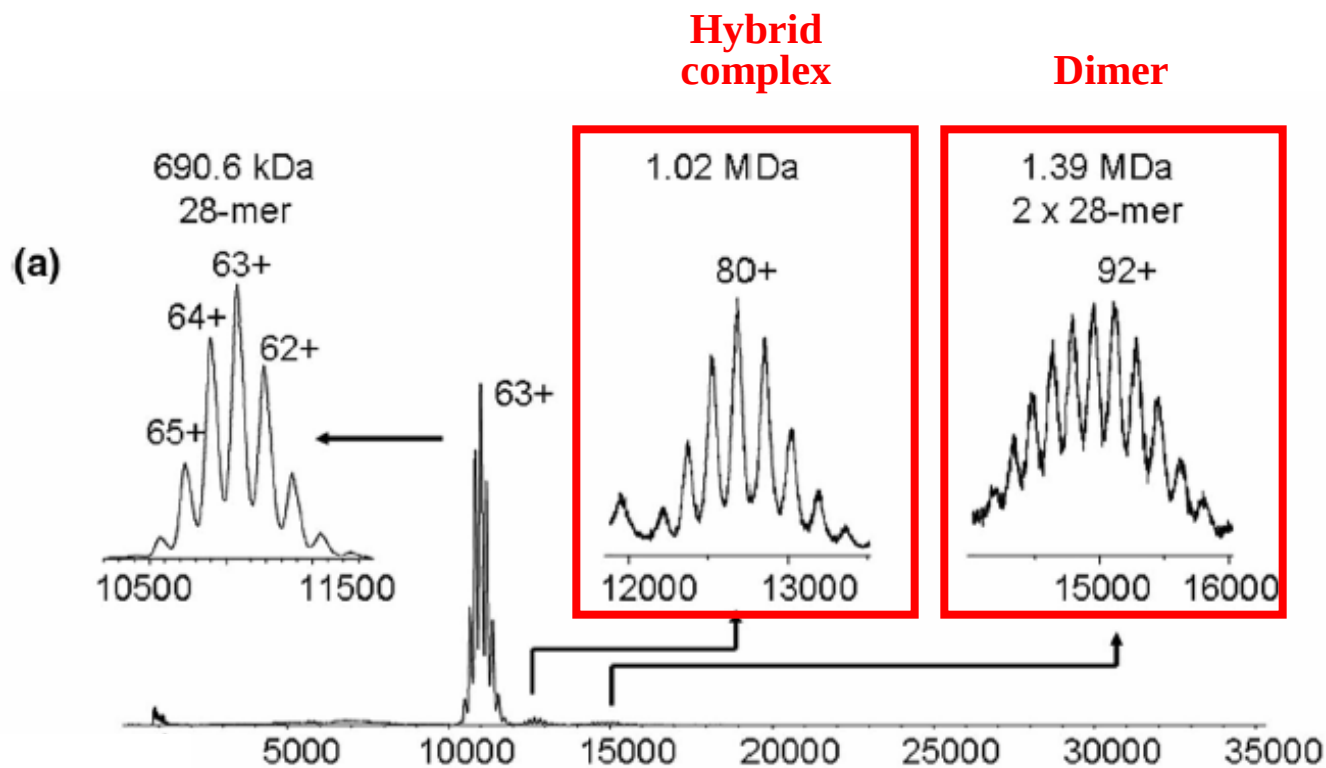
Max. 57.7 counts

Recombinant Antibody Spectrum, 148.2 kd



Tömegtartomány

15



Sebesség/kromatográfia

16

- GC, HPLC, UHPLC
- Dwell time
- Ciklusidő
- Komponensszám

Optikai detektorok

17

- UV/VIS
- DAD

Vegyük figyelembe az érzékenységbeli különbségeket!

Beépített egységek

18

- Fecskendőpumpa (optimáláshoz)
- Váltószelep (Injektor/diverter mód)

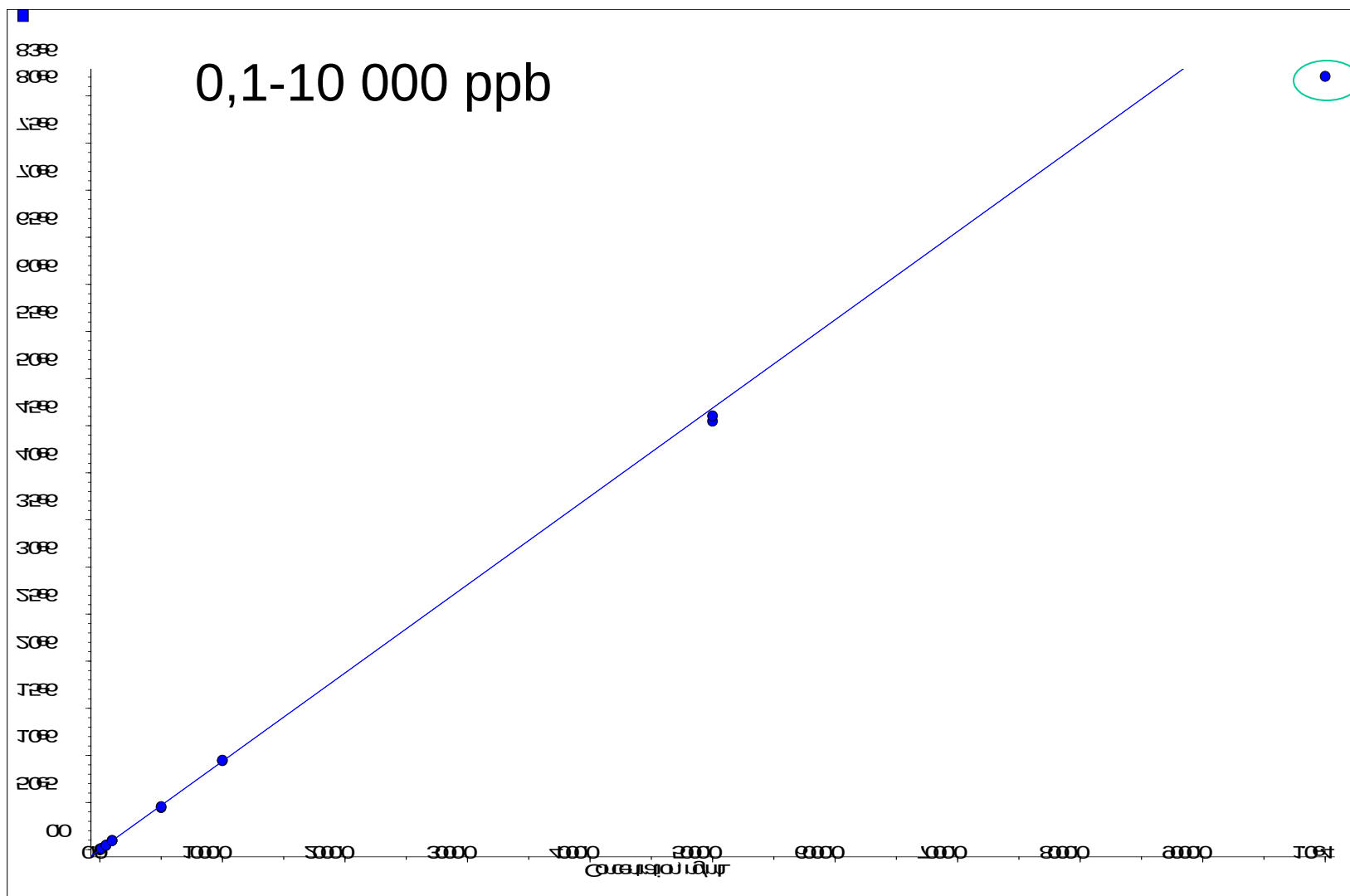
Dinamikus tartomány

19

	Sample Name	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Concentration (ng/ml)	Use Record	Record Modified	Calculated Concentration (ng/ml)	Accuracy (%)
1	blanc	1.97e+001	0.00		☐	N/A	N/A
2	0.1 ppb	8.45e+001	0.100	☒	☒	0.0950	95.0
3	0.1 ppb	8.31e+001	0.100	☒	☒	0.0936	93.6
4	0.25 ppb	2.47e+002	0.250	☒	☒	0.269	108.
5	0.25 ppb	2.50e+002	0.250	☒	☐	0.271	108.
6	0.5 ppb	4.96e+002	0.500	☒	☒	0.534	107.
7	0.5 ppb	5.14e+002	0.500	☒	☒	0.553	111.
8	1 ppb	1.04e+003	1.00	☒	☐	1.11	111.
9	1 ppb	9.94e+002	1.00	☒	☒	1.07	107.
10	5 ppb	4.52e+003	5.00	☒	☐	4.83	96.5
11	5 ppb	4.35e+003	5.00	☒	☐	4.65	92.9
12	10 ppb	9.26e+003	10.0	☒	☐	9.89	98.9
13	10 ppb	9.61e+003	10.0	☒	☐	10.3	103.
14	50 ppb	4.39e+004	50.0	☒	☐	46.9	93.7
15	50 ppb	4.56e+004	50.0	☒	☐	48.6	97.2
16	100 ppb	9.61e+004	100.	☒	☐	102.	102.
17	100 ppb	9.33e+004	100.	☒	☐	99.5	99.5
18	500 ppb	4.45e+005	500.	☒	☐	475.	94.9
19	500 ppb	4.55e+005	500.	☒	☐	486.	97.1
20	1 ppm	9.43e+005	1000.	☒	☐	1010.	101.
21	1 ppm	9.48e+005	1000.	☒	☐	1010.	101.
22	5 ppm	4.55e+006	5000.	☒	☐	4850.	97.0
23	5 ppm	4.60e+006	5000.	☒	☐	4910.	98.2
24	10 ppm	8.21e+006	10000.	☒	☐	8760.	87.6

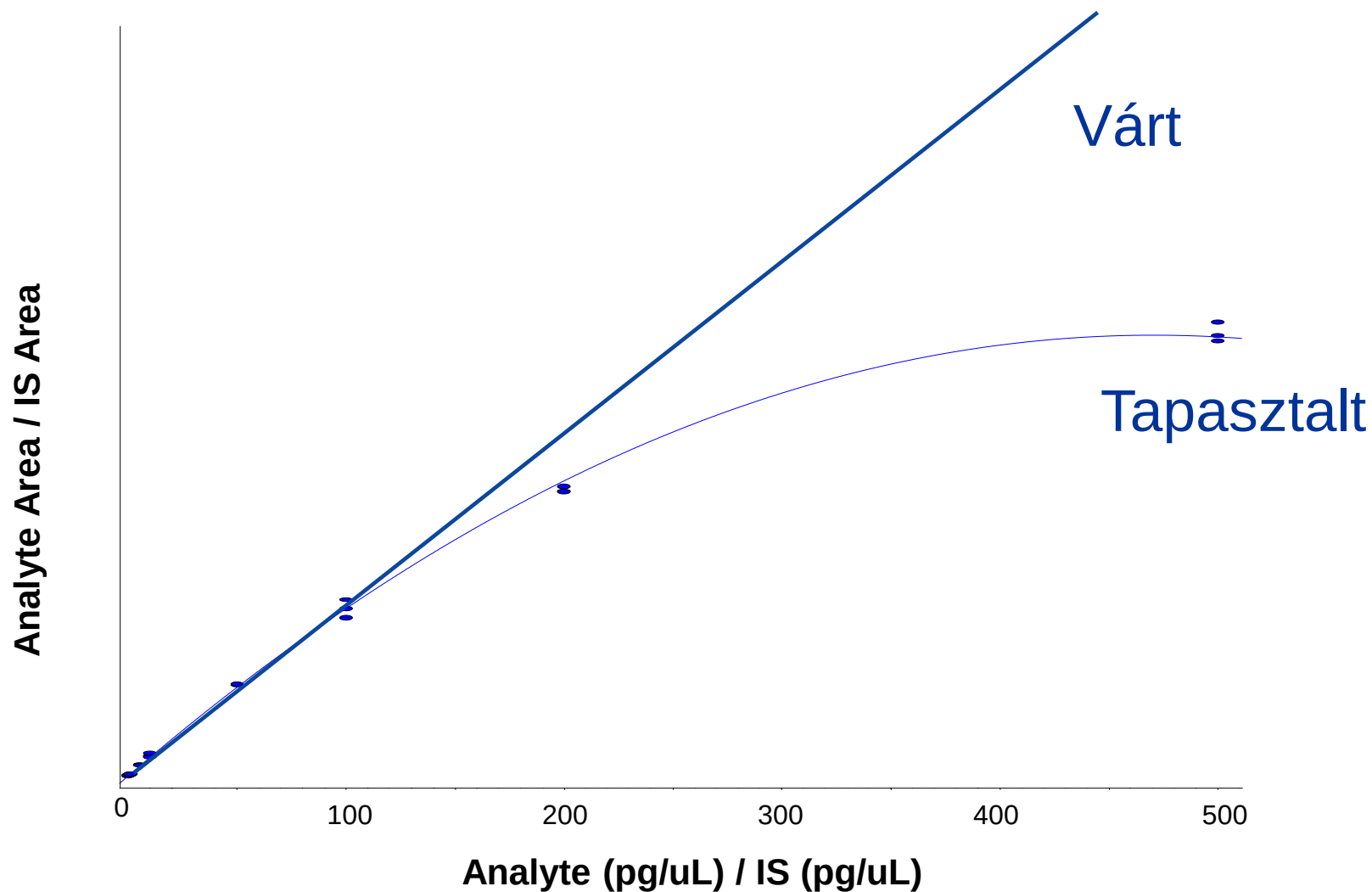
Dinamikus tartomány

20



Dinamikus tartomány

21



Spektrumkönyvtár

22

- Mi szükséges egy LCMS spektrumkönyvtárhoz?
 - Hármass kvadrupól alapú MSMS (fragmensekben gazdag)
 - Gyors MSMS scan
 - Nagy érzékenység

Ez pont a QTrap!!!

Spektrumkönyvtár

23

Add a Record

Mass Spectral Information | General Information

Identification:

Compound Name: Glafenin

Synonyms: Glifanin; Glifan; Privadol

Formula: C₁₉H₁₇ClN₂O₄ Molecular Weight: 372.0876849 amu

CAS Number: 101-9781 Compound Class: Comp. ID:

User Value: 0 Keyword: ☐ Internal Standard

Comment 1:

Intensity, cps

Max. 1.1e7 cps.

73.0 144.2 246.2 280.9 299.1 373.1

m/z, amu

	m/z (amu)	Intensity (cps)
1	50.0600	0.0000
2	50.0600	256.4102
3	50.1200	256.4102
4	50.3600	256.4102
5	50.4800	256.4102
6	50.6000	512.8205
7	51.0800	256.4102

Current Spec.: + Precursor Mass=373.0 CE=35.0 RT=0.4

Database: LocalDB

Mass Spec Data

Instrument Model: QTrap Ion Source: Turbo Spray

Polarity: Positive ScanType: EPI

1st Precursor m/z: 373 amu Collision Energy: 35 Charge State 1: +1

2nd Precursor m/z: 0 amu Excitation Energy: 0 Charge State 2: 0

CAD Gas Type: N₂ CAD Gas Value: 3 Retention Time: 0.43500 min Resolution: unit

Comment 2:

Comment 3:

OK Cancel Print Help

Add a Record

Mass Spectral Information | General Information

Open Molecular Structure File

C:\pe sciex data\Chem Structures\Mole files\glafenir

Browse... Launching Editor Delete Structure

UV time Offset: 0 Apply

Import Text UV Delete UV

UV Spec Info.

DAD Spectral Data: ... Max. 3998.6 mAU.

Absorbance, mAU

3999

600.0

WaveLength, nm

WaveLength Region From: 0 To: 0

	Wave Length	Absorbance (mAU)
1		
2		

Other Information:

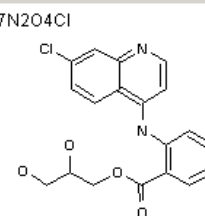
Chemist Name:

Project Name:

Workbook Name:

Workbook Page:

OK Cancel Print Help



Komponensszám

24

- 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:
$$= 21 \text{ sec/csúcs} \div 10 \text{ pont/csúcs} \div 7 \text{ msec/pont} = \mathbf{300}$$

Komponensszám

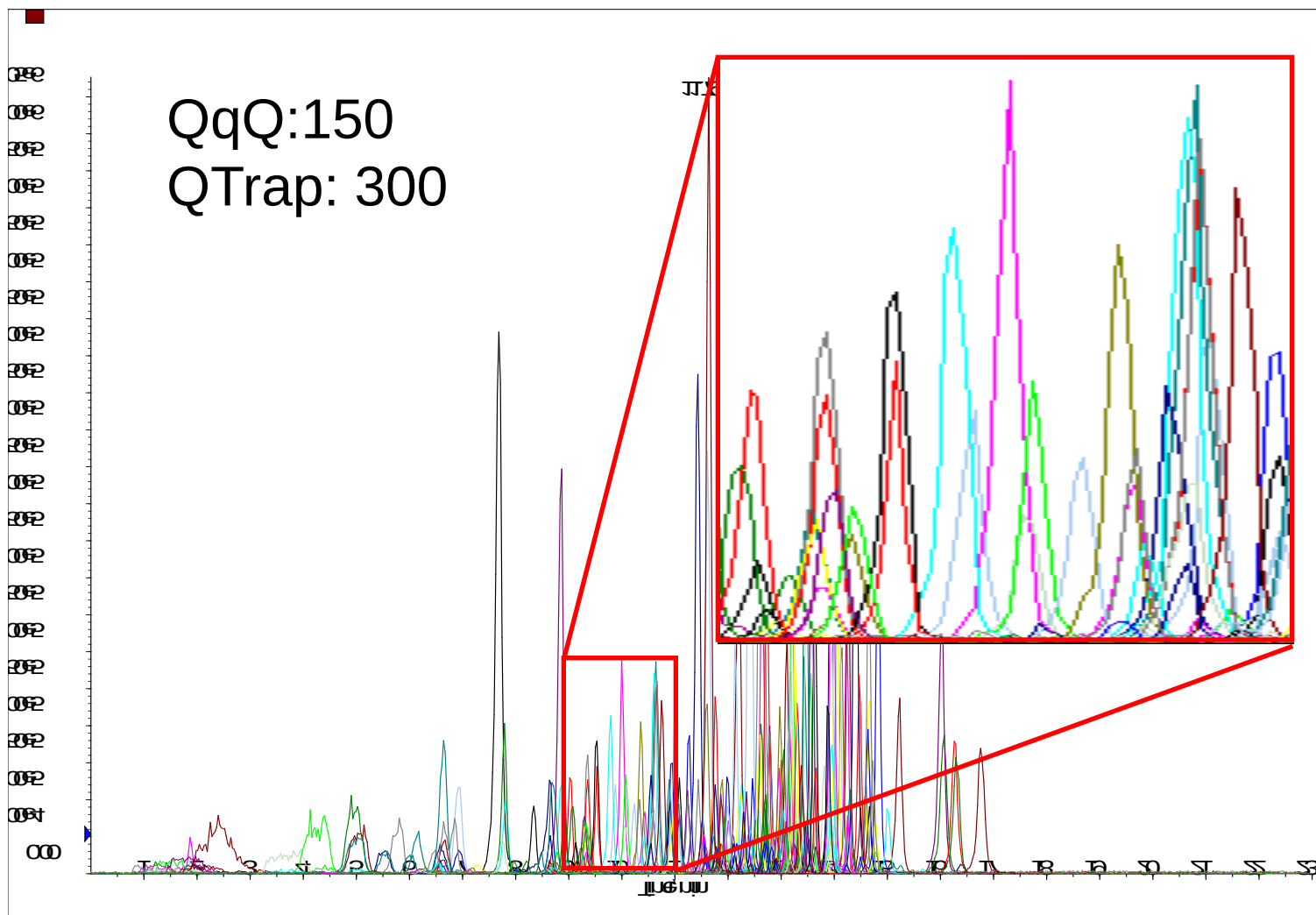
25

- 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)

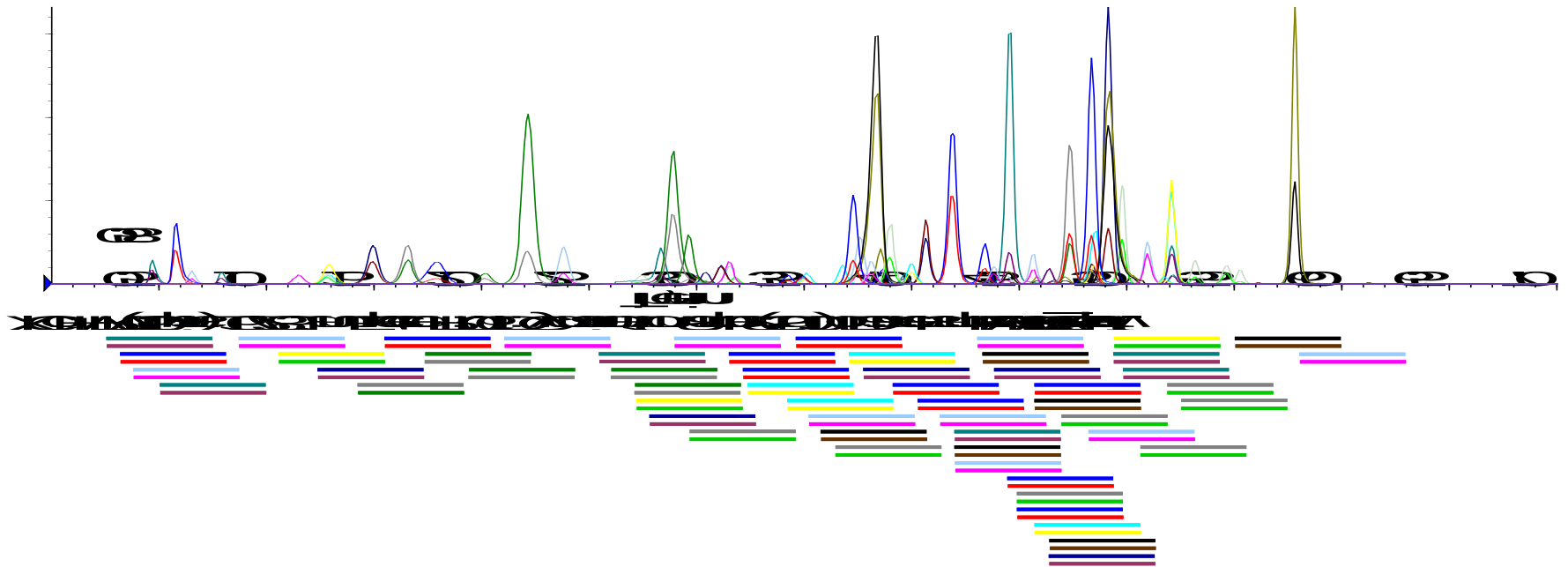
Komponensszám

26



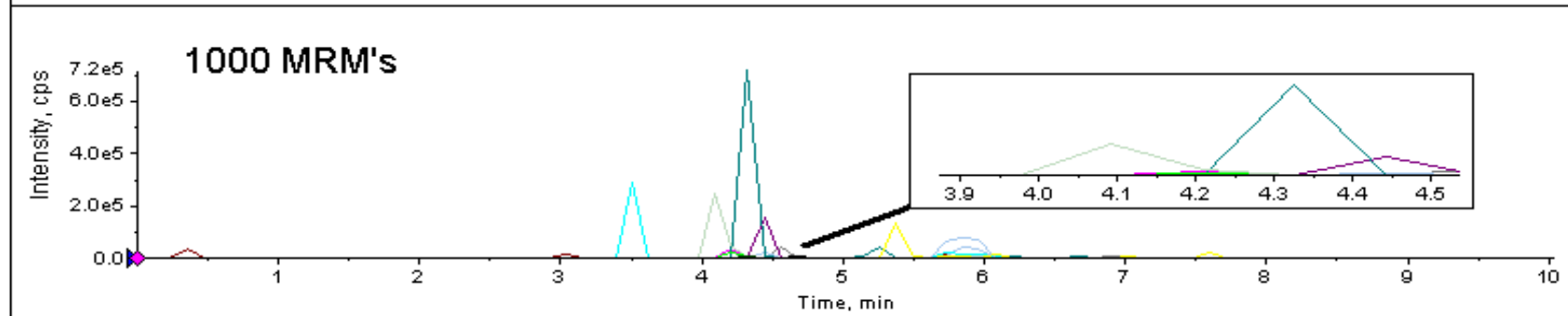
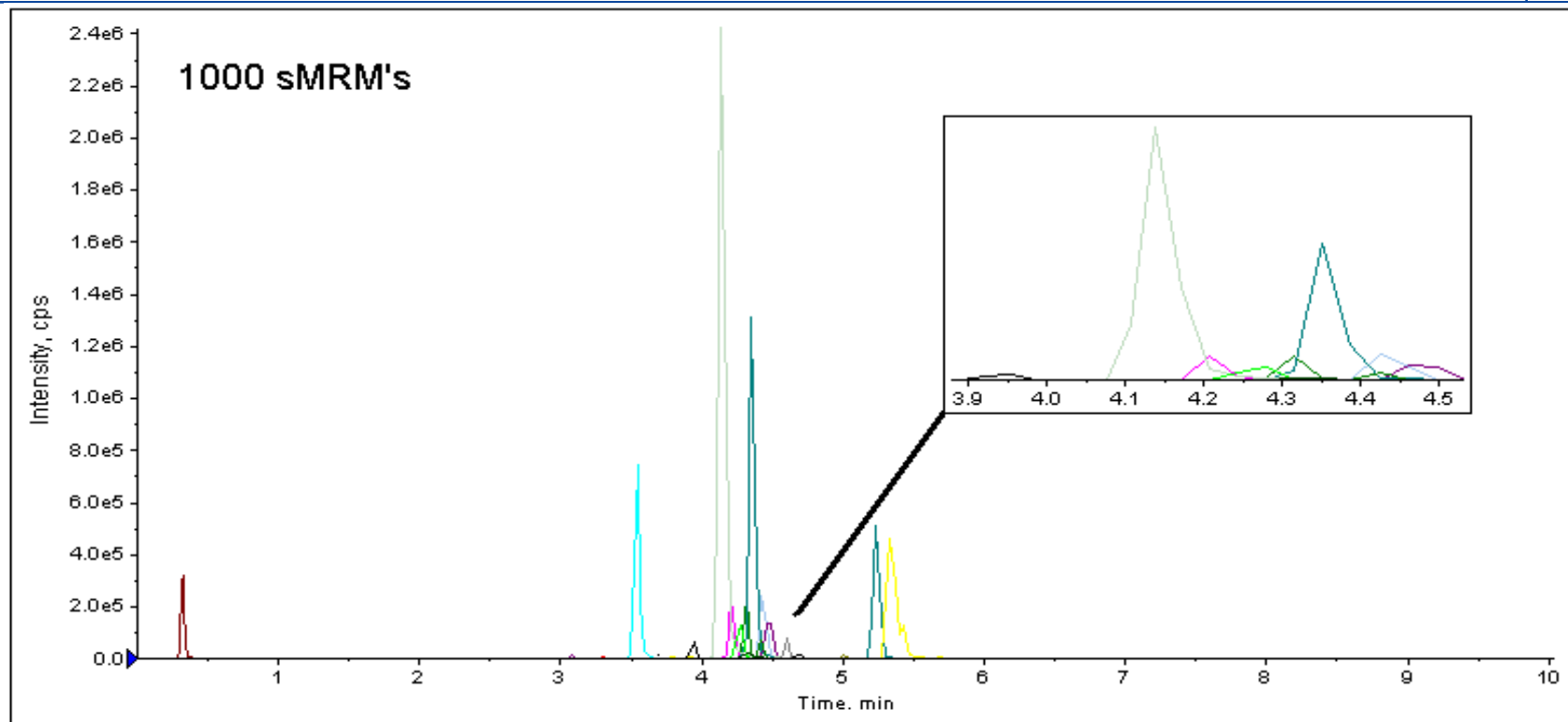
Komponensszám

27



Komponensszám

28



Szelektivitás/komponensszám

29

	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

Érzékenység

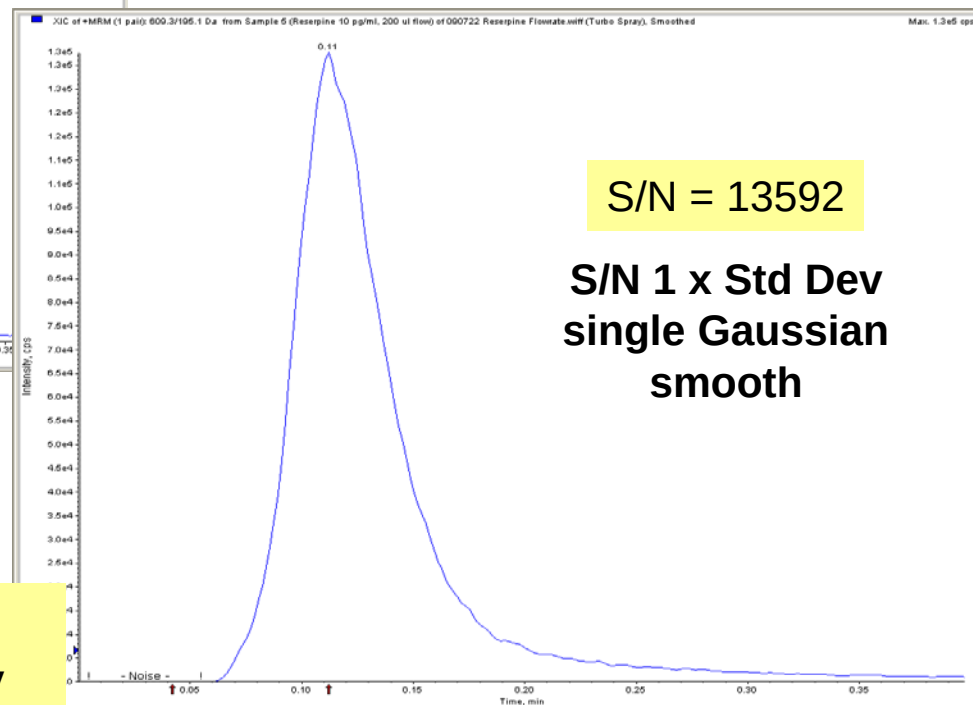
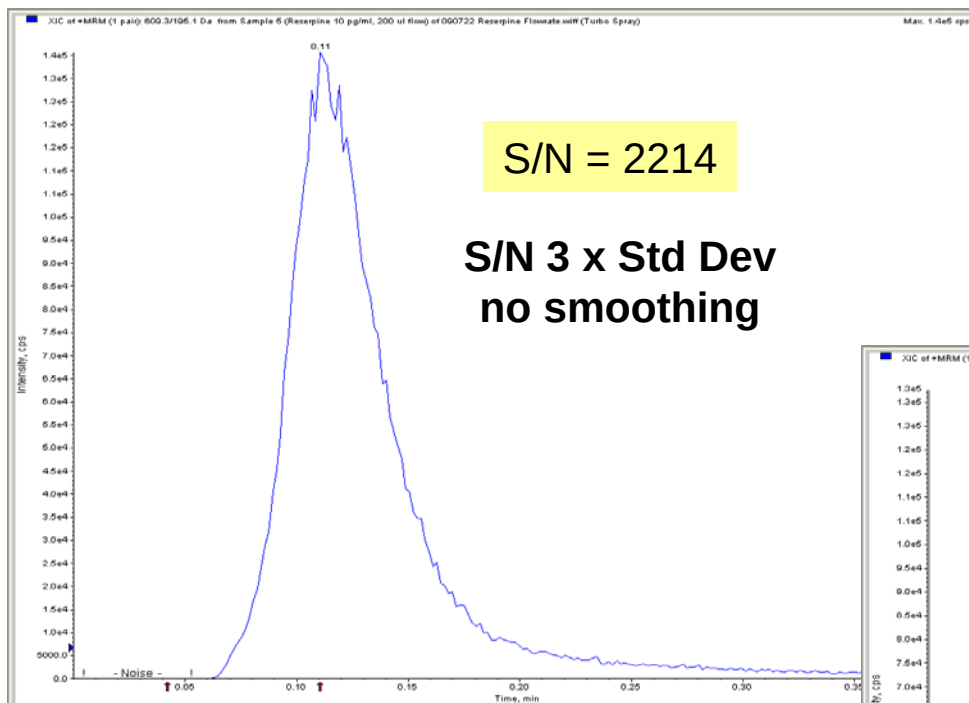
30

- Ionizáció (ESI, APCI, APPI, etc.)
- Készülékparaméterek
 - lencsefeszültségek
 - ütközési energia (MS/MS)
 - felbontásbeállítás
- Minta koncentrációja
- Injektált térfogat
- Minta/mátrix tulajdonsága (friss, régi, pH)
- LC oldószer, gradiens áramlási sebesség
- Detector fajtája
- Matematikai algoritmusok a S/N számolásakor
- ...

- Módszer:
 - API 4000 QqQ
 - Agilent 1200
 - ACN/víz 70:30 + 2mM NH₄OFA
 - Injektált térfogat: 5uL (50 pg on column)
- Változtatott paraméterek:
 - S/N számítási módszer
 - Peak-to-peak, 1SD, 3SD
 - Zaj kiválasztása
 - LC áramlási sebesség: 200ul/perc től 1ml/percig

Érzékenység

32

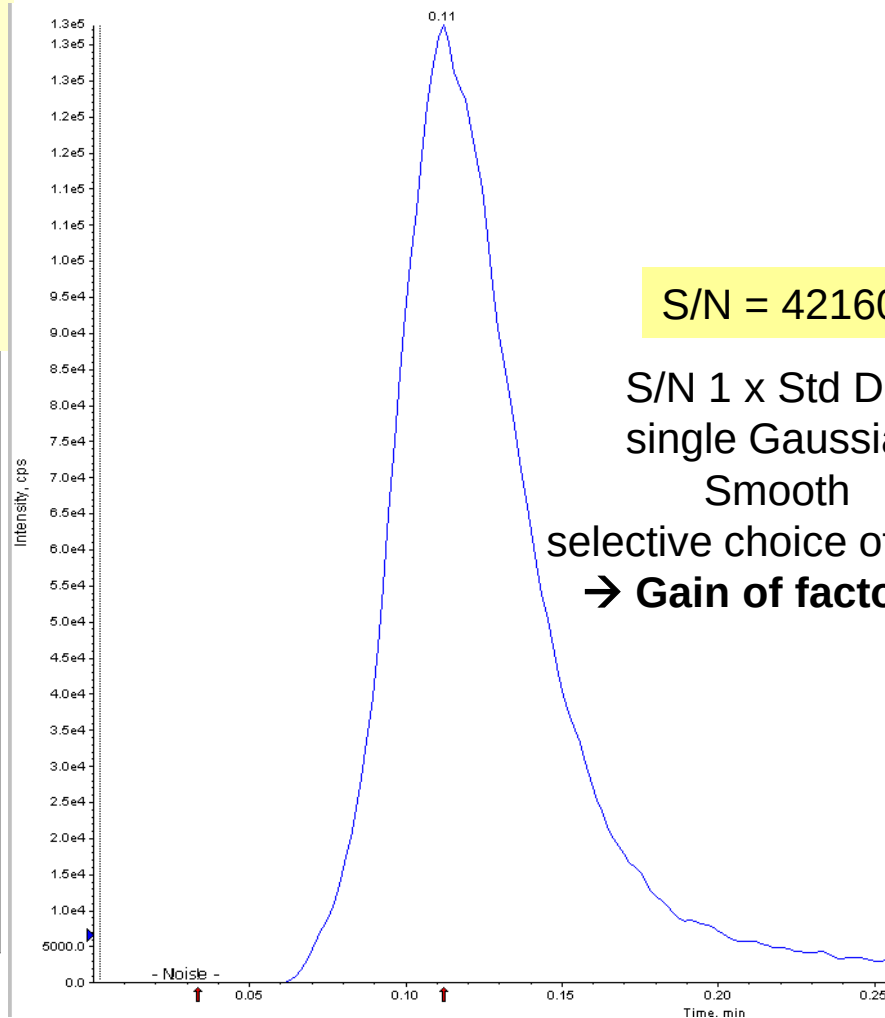


Hatszoros növekedés csupán azzal,
hogy Gaussian smooth és 1x Std Dev

Érzékenység

33

- Egy másik apró trükk: a zajt a „csendesebb” régióból véve 40x jobb a S/N



S/N = 42160

S/N 1 x Std Dev
single Gaussian
Smooth
selective choice of noise
→ **Gain of factor 40**

Érzékenység

34

	Peak - Peak	3 XSD	2 X SD	1 X SD	1 X SD + noise selection
No Smooth	1939.5	2214.4	3321.6	6765.7	-
Single Smooth	3831.4	4104.8	-	12092.2	-
Single Gaussian Smooth	4371.7	-	-	13592.3	42160.4
Double Smooth	4421.5	4654.3	-	15934.9	-
Triple Smooth	4628	5101.2	-	17593.4	-
Quadruple Smooth	4868	5485.6	-	15276.1	-
200 µl/min	1939.5	-	-	-	-
800 µl/min	7670.5	-	-	30983.8 (1x Gauss. smooth)	357870.7 (1x Gauss smooth)

S/N increase > 160 x

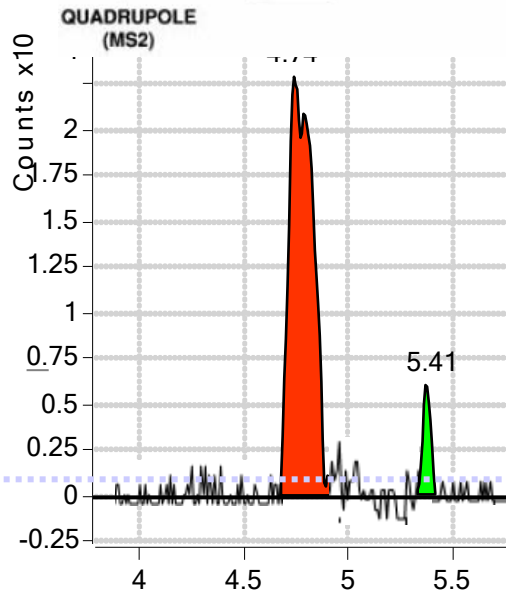
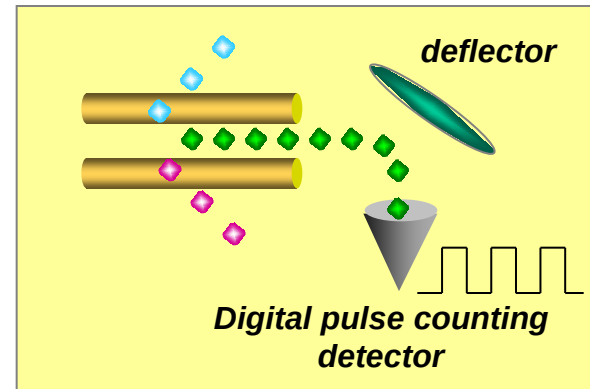
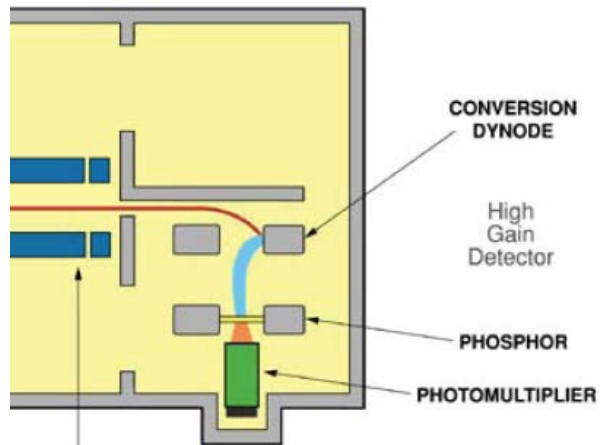
Érzékenység

35

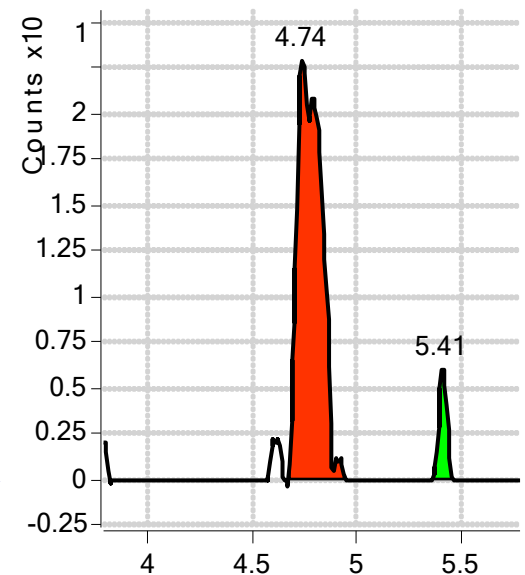
-
- Eladó: Mennyit tetszik kérni?
 - Vevő: 1939,5-öt!
 - Eladó: 357 870,7 lett! Maradhat?

Érzékenység

36



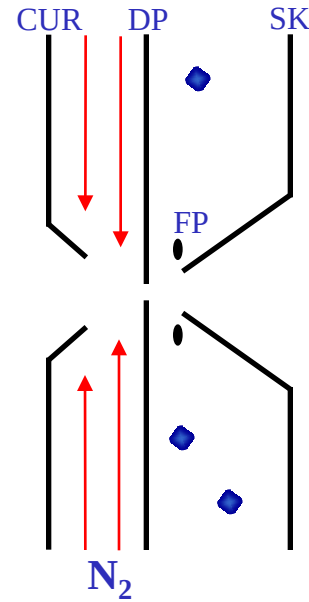
The effect of the noise discrimination threshold used with analog detectors



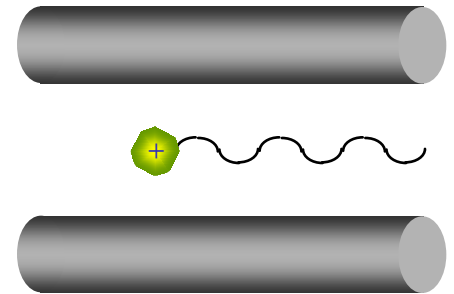
Robusztusság

37

légtörny nyomás



vákuum
Q0



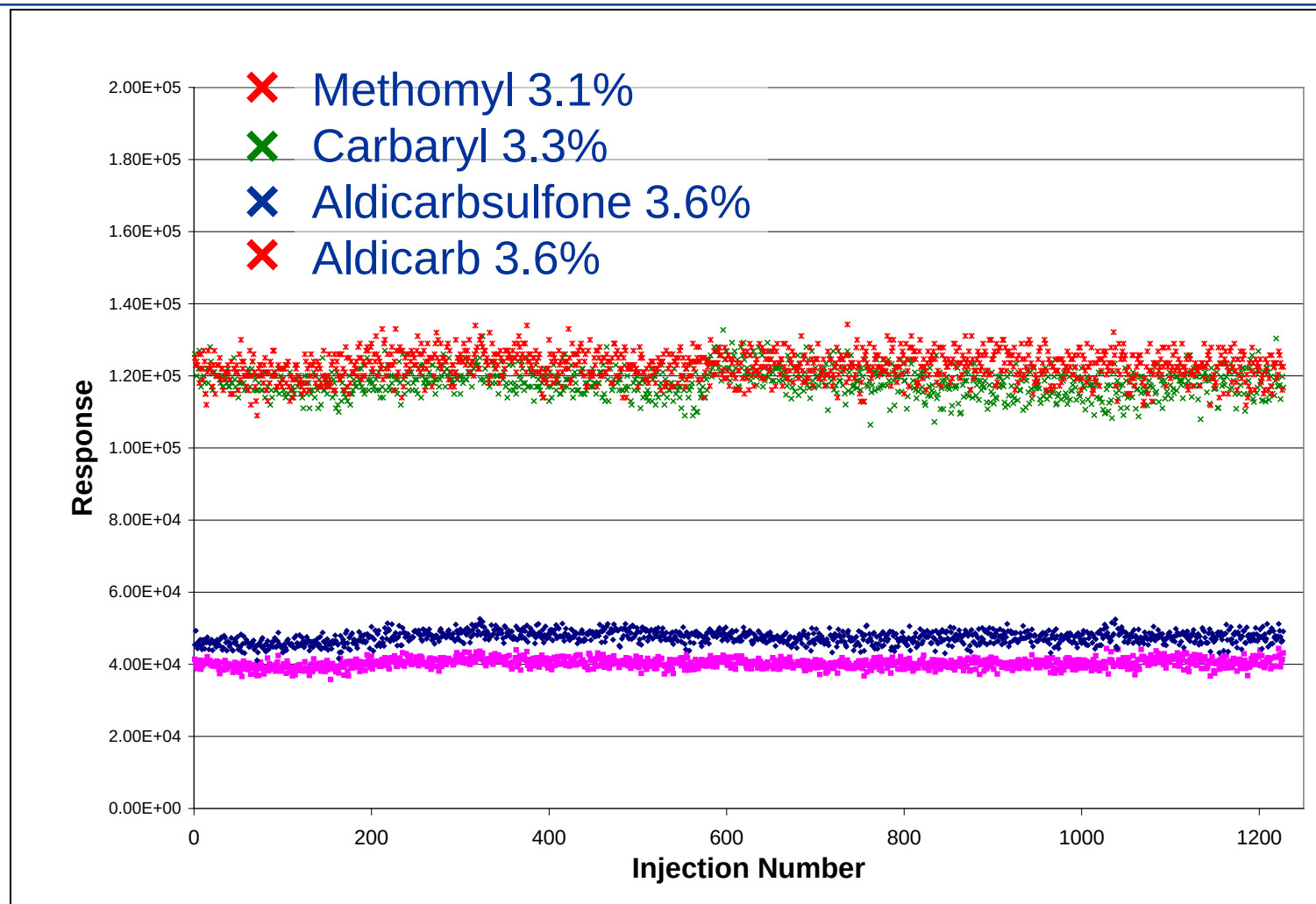
Robusztusság

38



Robusztusság

39



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

Szerviz/Szupport

40

- Előkészítés
- Installálás
- Verifikálás
- Hibakeresés
- Javítás
- Karbantartás
- Képzés
- Betanítás
- Tréning
- Alkalmazások
- Segítségnyújtás



www.perforum.hu

Pénz

41

- A legjobb MS-t vegyük, ami kijön!
- Utólag az LC mindig fejleszthető!



Most legyünk okosak!

42

