



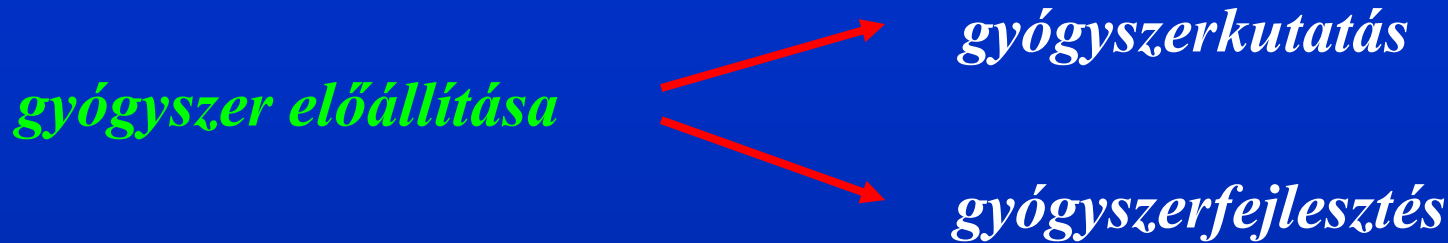
Elválasztástechnikai módszerek, azok kapcsolt technikái a gyógyszerek kutatásában és fejlesztésében

**A programot „Az SZTE Kutatóegyetemi Kiválósági Központ
tudásbázisának kiszélesítése és hosszú távú szakmai
fenntarthatóságának megalapozása a kiváló tudományos
utánpótlás biztosításával” című TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-
0012 projekt támogatja.**

Tartalom

- Bevezetés
- Mintaelőkészítés
- Kromatográfiás alapismeretek
- Tömegspektrométer felépítése: ionforrás, analizátor, tandem MS
- Kapcsolt technikák
- Kvantitatív tömegspektrometria (validálás)
- Összefoglalás: készülék kiválasztásának szempontjai
- Példák

Bevezetés



A gyógyszer forgalomba kerüléséhez, bizonyítani kell, hogy a gyógyszer

- megfelelő minőségű (kémiai analízis)
- hatékony (klinikofarmakológiai és biokémiai vizsg.)
- alkalmazása biztonságos (leghosszabb és legköltségesebb feladat)

1. Gyors, tájékozódó, screening vizsgálatok
2. Állatkísérletek
3. Humán vizsgálatok

Mennyiségi és minőségi analitika

A kis anyagmennyiségek és a komplex mátrixok/minták vizsgálatának eszközei:

•Mintaelőkészítés

- Elválasztási módszerek
- Extrakció
- Kromatográfiás eljárások
 - Gázkromatográfia**
 - Folyadékkromatográfia**
 - Rétegekromatográfia
 - Elektroforézis, kapilláris elektroforézis
- Klasszikus analitikai módszerek
 - Csapadékképzésen alapuló
 - Titrimetriás (térfogatos)
 - Sav-bázis titrálások
 - Redox titrálások
 - Komplexometria

- Spektroszkópai módszerek
 - Atomspektroszkópia
 - Molekulaspektroszkópia
 - Ultraibolya- és látható spektroszkópia
 - Infravörös spektroszkópia
 - Tömegspektrometria**
- Elektroanalitikai módszerek
 - Potenciometria
 - Voltametria
 - Elektrogravimetria
 - Coulometria
 - Vezetőképesség mérési módszerek

Mintaelőkészítés

Fizikai/mechanikai

- mintavétel, minta bemérés
- aprítás, őrlés, homogenizálás
- szitálás, szűrés, ultra(molekula)szűrés, dialízis
- centrifugálás, ultracentrifugálás
- töményítés, szárítás (vákuum bepárlás, liofilizálás, exszikkátor, vákuum-exikkátor)
- **extrakció** (mintaelőkészítő és elválasztó művelet)

Kémiai műveletek

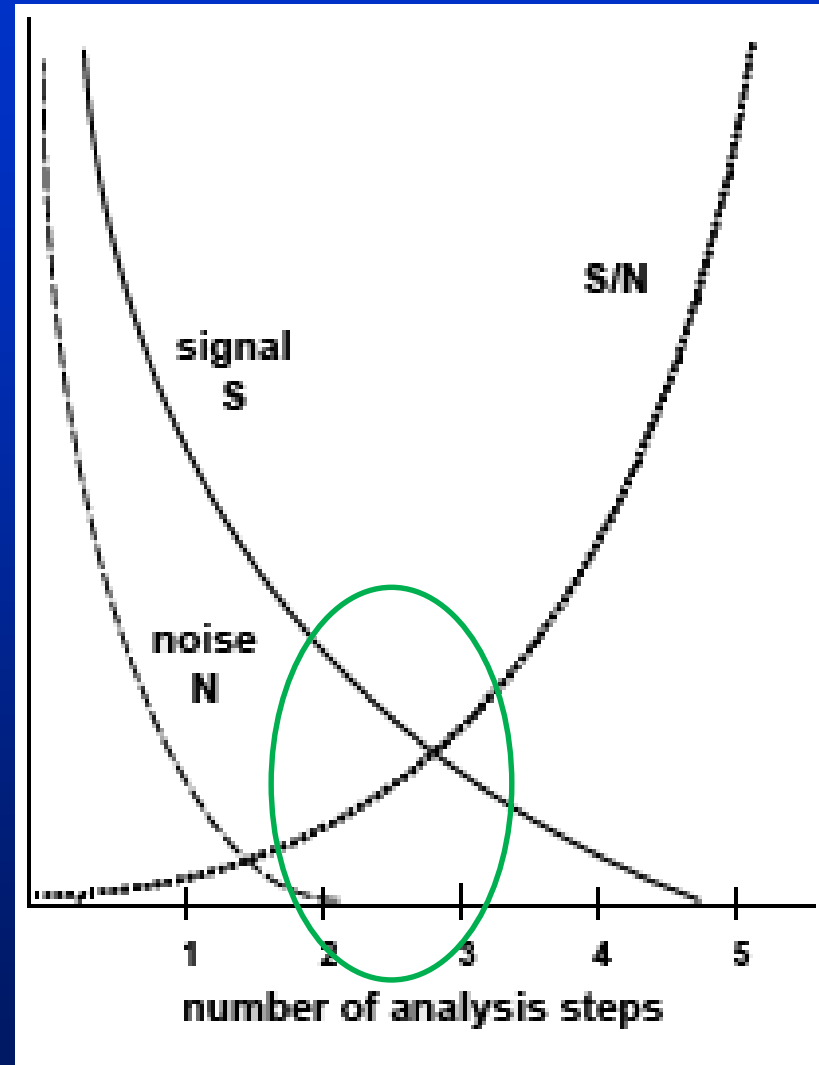
- hígítás, ionerősség, pH, polaritás változtatása, ion-párképzők, detergenssek, stb. hozzáadása
- enzimatis, savas, lúgos hidrolízis
- származékképzés (szililezés, metilezés, UV-elnyelő, fluoreszkáló származékok)
- speciális kémiai kölcsönhatások (affinitási, immunológiai, fém- zárvány stb. komplexek)

Az "ideális" mintaelőkészítés

- Idő és költségtakarékos
- Szelektív a molekulák széles spektrumára (csökkenti az interferenciákat, általános "screenelésre" is alkalmas)
- Környezetbarát: minimális vagy oldószer felhasználás nélkül (1 L nagy tisztaságú diklórometán ~40 USD; hulladék megsemmisítése ~ 100 USD)
- On-line (egy rendszerben történik az extrakció, kromatográfia, szerkezet meghatározás)

Mintaelőkészítési módszerek

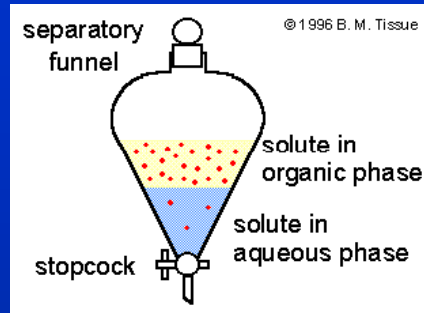
- **Extrakció**
(SPE, SPME, foly.foly., zip tip)
- **Dialízis** (μL mennyiségű minták tisztítására)
- **Fehérje kicsapás**
- **Koncentráálás, sómentesítés**



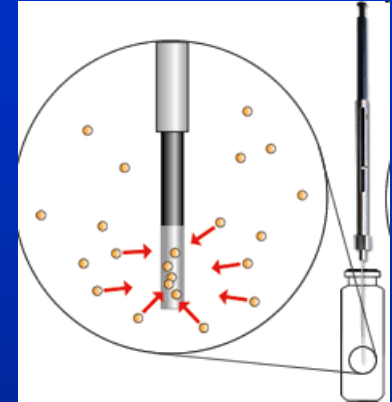
Extrakció

Folyadék-folyadék

www.chemicool.com



Gáz-szilárd (SPME)



www.overbrookscientific.com

Folyadék-szilárd (SPE) ioncserélő vagy fordított fázisú töltettel

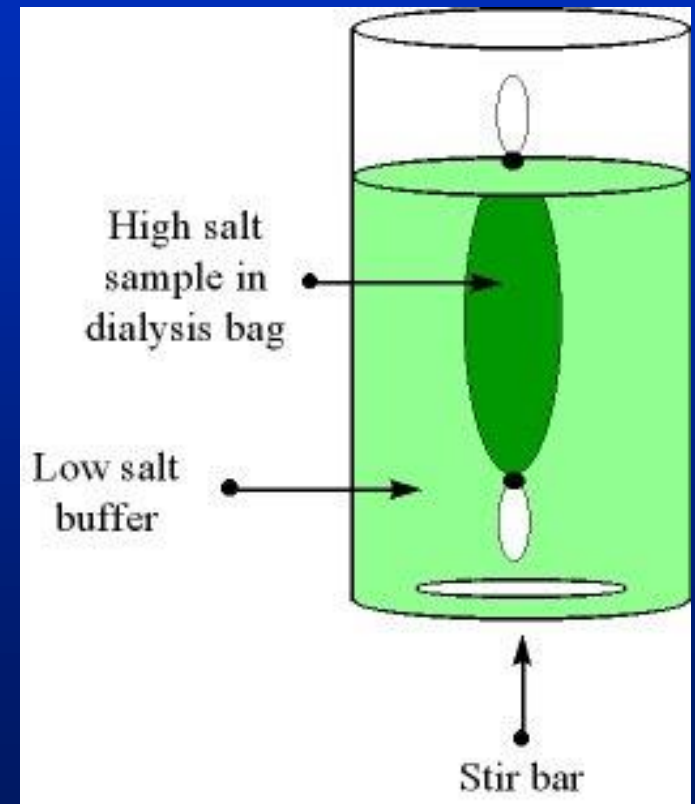
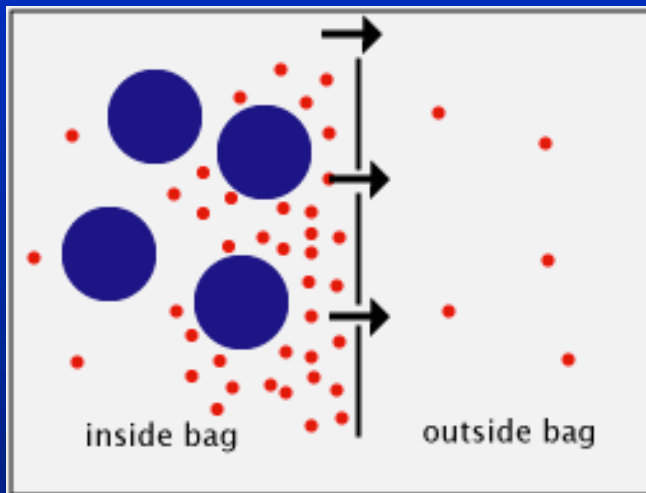
Mintaelőkészítés lépései:

- kondicionálás
- equilibrálás
- minta felvitele
- mosás
- szárítás
- minta eluálása



Dialízis

- Membrán: különböző molekulatömeg tartomány
- 0,1- 0,5 mL mintamennyiség



Biológiai minták előkészítése

Fehérjekicsapás

Nehezen reprodukálható – a kicsapott fehérje abszorbeálhatja és adszorbeálhatja a komponenseket...

TFA, TClA, aceton, etanol, stb.

Koncentráció és sómentesítés membránszűréssel

Molekulatömeg szerinti elválasztás és a minta koncentrációja

(Vivaspin 1-10 kDa cellulóz alapú membránszűrő, Millipore Microcon centrifuga filter (1-10 kDa), Ultracel YM membrán)



Gélkromatográfia

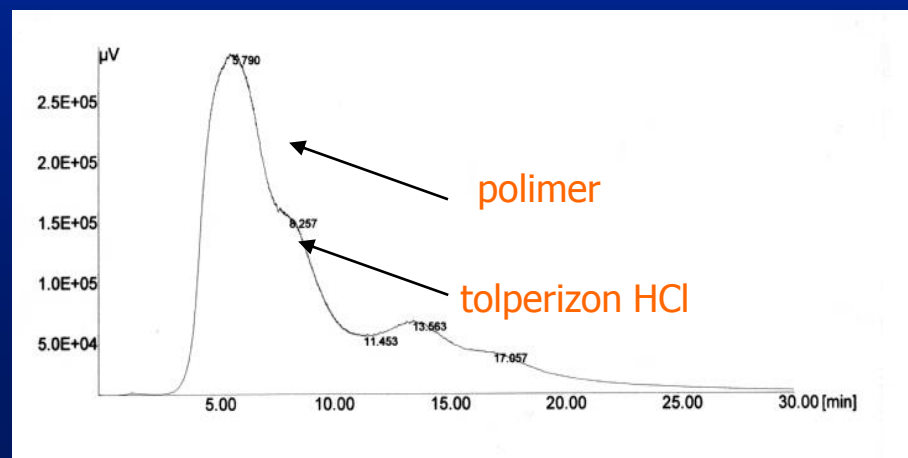
Molekulaméret szerinti elválasztás

Példa:

- Sephadex G 25 (polidextrán) oszlop
- 10 cm x 1 cm töltetű oszlop
- áramlási sebesség: 1ml/perc
- UV-detektálás: $\lambda=260\text{nm}$
- eluens: HPLC víz
- $\text{MW} < 5000 \text{ Da}$

Felvitt minta:

- tolperizon HCl : PEO = 3:1
- vizes oldat (3000 $\mu\text{g/ml}$ tolperizon)



Kromatográfiás módszerek

- **az áramló fázis halmazállapota szerint:** gáz-, gőz-, folyadék- és szuperkritikus
- **az állófázis térbeli elrendezése alapján:** oszlop- és planáris (réteg)
- elválasztandó anyag és az álló fázis között kialakuló kölcsönhatások (**elválasztási mechanizmusok**) **szerint:** folyadék-folyadék (megoszlási) vagy folyadék-szilárd (pl. adszorpció, normál és fordított fázisú, ioncserélő, gélfiltráció, affinitási, hidrofób kölcsönhatású, egyéb (pl. zárványképzéses, fémkomplex-képzéses, stb.))
- **a kifejlesztés módszere alapján:** elúciós, frontális és kiszorításos
- **a mozgó fázis összetételének időbeni változása alapján:** izokratikus és gradiens

Kromatográfia

- Kromatogram
- Kromatogram jellemzése:
retenciós adatok
kromatográfiás adatok
elválasztási adatok

Kromatogram

t_R : csúcs retenció ideje

t_M (t_0): holtidő

k' : retenció tényező

($1 \leq k' \leq 5$)

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

N : elméleti tányérszám

$$N = 5,55 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

A_s : szimmetria faktor

($0,8 \leq k' \leq 1,2$)

d : csúcsfélszélesség

$w_{0,05}$: csúcsmagasság 20%-ánál mért csúcsszélesség

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

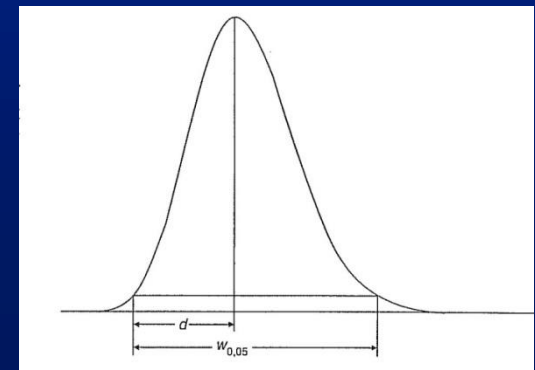
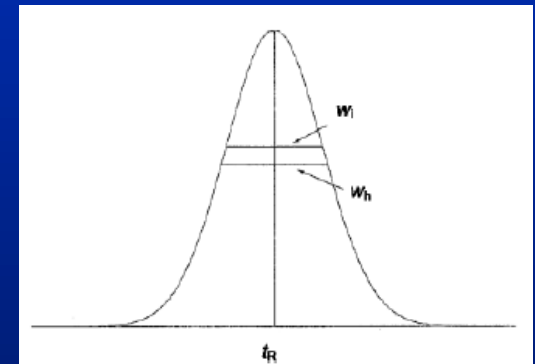
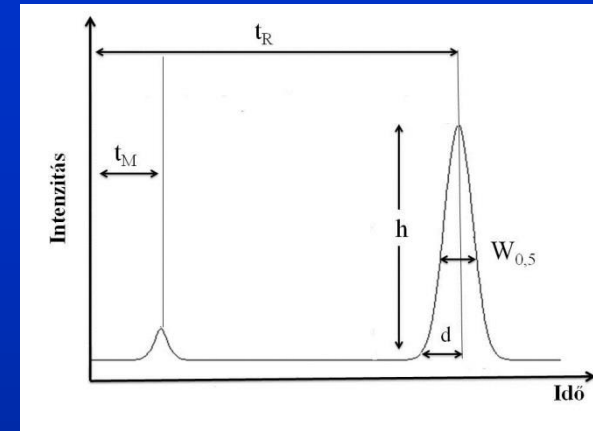
α : szelektivitás ($\alpha > 1$)

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A}$$

R : felbontás ($R \geq 1,5$)

w_{h1} és w_{h2} : csúcsmagasságok felénél mért csúcsszélességek

$$R_s = \frac{1,18(t_{r1} - t_{r2})}{w_{h1} + w_{h2}}$$



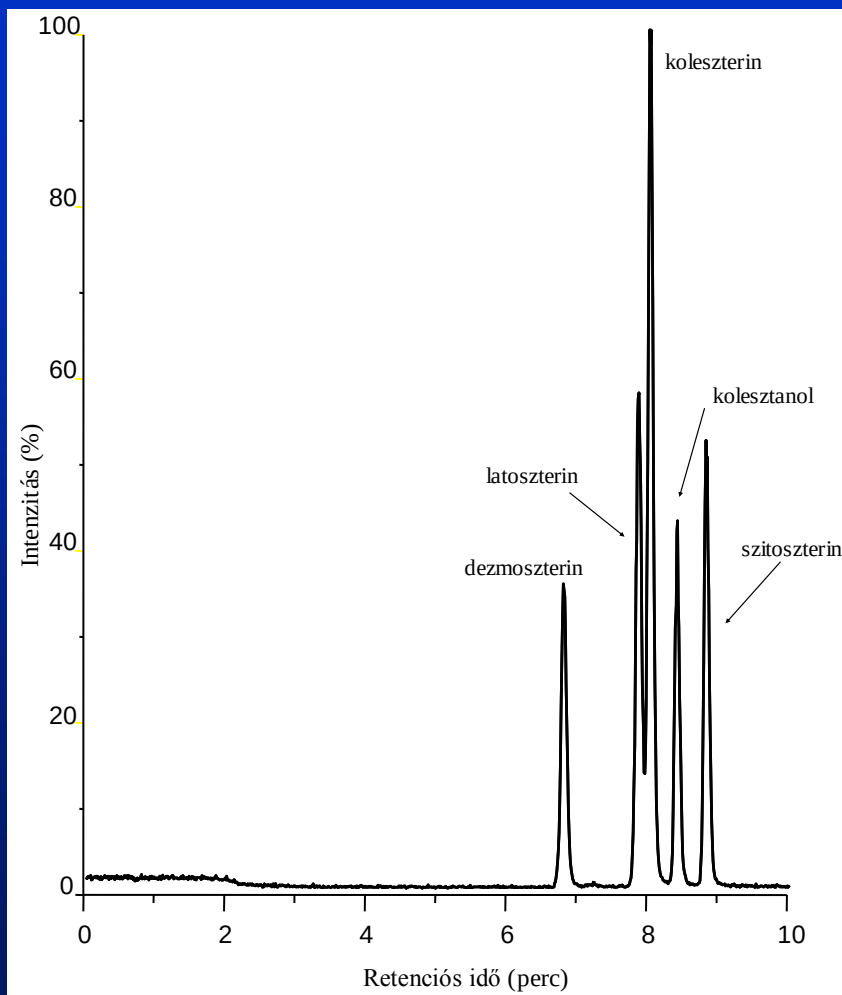
Kromatogramok értékelése

- **minőségi azonosítás** retenciós idő, standard addíció, relatív retenció, retenciós index ill. spektrum alapján
- **menyiségi meghatározás** terület %, külső standard ill. belső standard módszerrel (deuterált ill. izotóp jelzett std.)

Gázkromatográfia

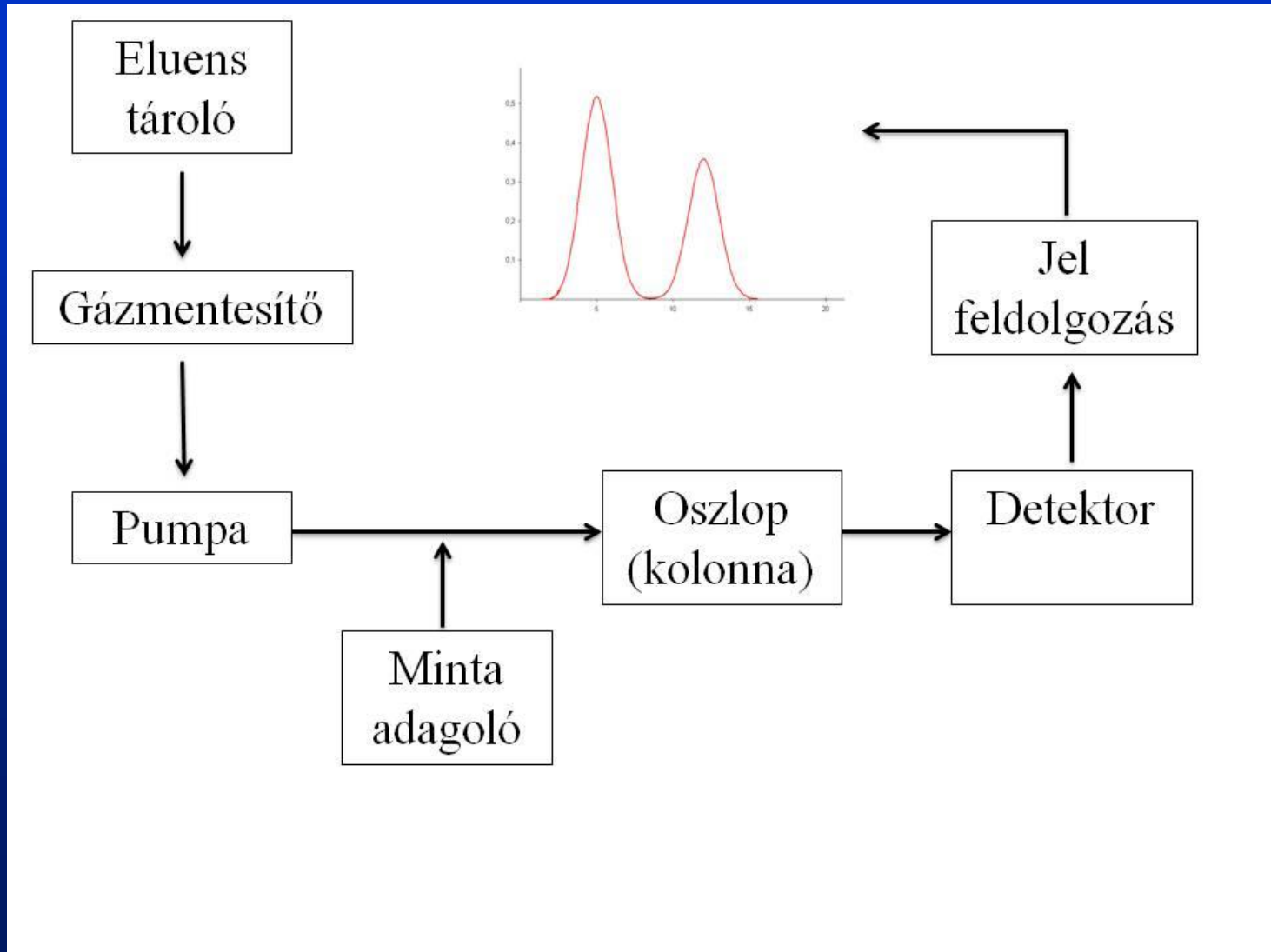
- Gáz-szilárd (állófázis adszorbens, adszorpciós-deszorpciós megoszlás)
- Gáz-folyadék (állófázis folyadék fázisú polimer)
- **Oszlop:** töltetes vagy **kapilláris**
- Detektorok (hővezetőképeségi, lángionizációs, elektronbefogásos, nitrogén-foszfor szelektív, **MS**)
- **Mennyiségi-minőségi meghatározás**

Folyadékkromatográfia



- Legelterjedtebb a **normál és fordított fázisú kromatográfia**
- Mennyiségi-minőségi meghatározás
- Detektorok
(UV/VIS, fluoreszcencia, törésmutató, fényszórás, radioaktivitás, **MS**)

HPLC készülék



Vizsgálni kell a hatóanyag szerkezetét, tisztaságát, a gyógyszer szervezeten belüli változását (felszívódás, megoszlás, kiürülés, fehérjékhez való kötődés, metabolizmus folyamata)



farmakokinetika és szerkezetkutatás

Kis anyagmennyiségek komplex biológiai mátrixban (egér, patkány, kutya, törpesertés, humán epe, vizelet, széklet, vérplazma): kvalitatív és kvantitatív analízis:

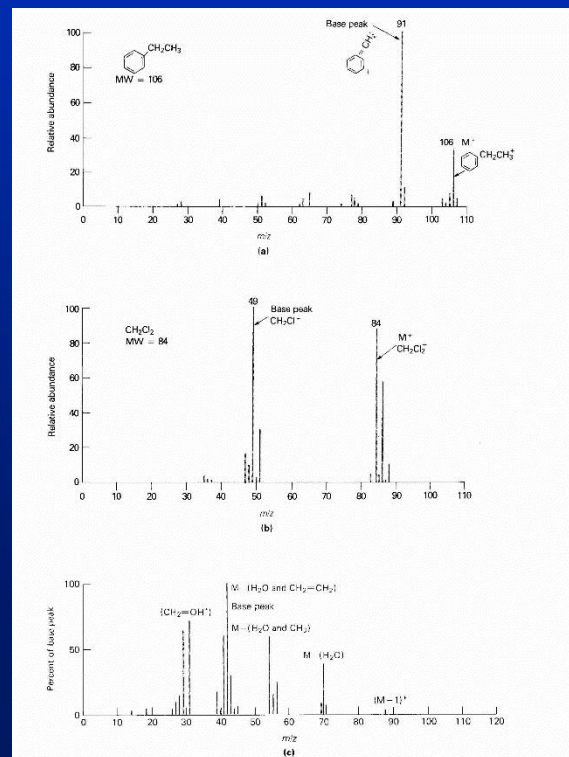
Tömegspektrometria

Tömegspektrometria

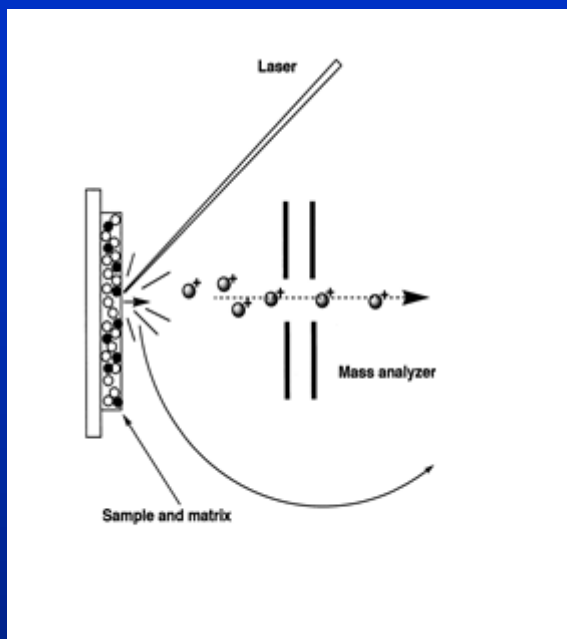
- mintabevitel
- ionizálás
- molekulák töredezése (fragmentáció)
- gyorsítás
- szétválasztás tömeg/töltés alapján
- ionok detektálása
- m/z értékek és jel intenzitás mérése
- spektrum értékelés

tömegspektrum:

intenzitás vs. (tömeg/töltés)



MS - alapfolyamatok



fragmentáció

Molekulaion
Fragments ionok

Molekula ion (M^+ , $M^{+\bullet}$)

Protonált/kationizált molekula ion ($M+H^+$, $M+Na^+$, stb.)

(kvázi molekulaionok)

MS - milyen információkat kaphatunk?

Szerkezetmeghatározás

- **Molekulatömeg:** *nominális tömeg* ($C=12, H=1, Cl=35$), *monoizotópos tömeg* ($C=12,011, H=1,0079, Cl=35,453$), *átlagtömeg* (összes izotóp, pl. $C^{12}, C^{13}, Cl^{35}, Cl^{37}$)
- Pontos tömeg: **elemi összetétel**
Felbontás **kis felbontás** (egységnyi)
nagy felbontás ($>5-10.000$)
 $\sim 1-5$ ppm pontosság
- Információ a **molekulaszerkezetéről**
 - fragmentációs szabályok
 - spektrum könyvtárak
 - izotópcsúcsok

Mennyiségi meghatározás

- Kromatográfiával kapcsolt MS detektálás: **szelektivitás, érzékenység**
- Egy ion vagy fragmentációs utak monitorozása
- **Validálás** (**LOQ**, *kimutatási határ*: $\text{jel/zaj} > 10$, LOD, *detektálási határ*: $\text{jel/zaj} > 3$)

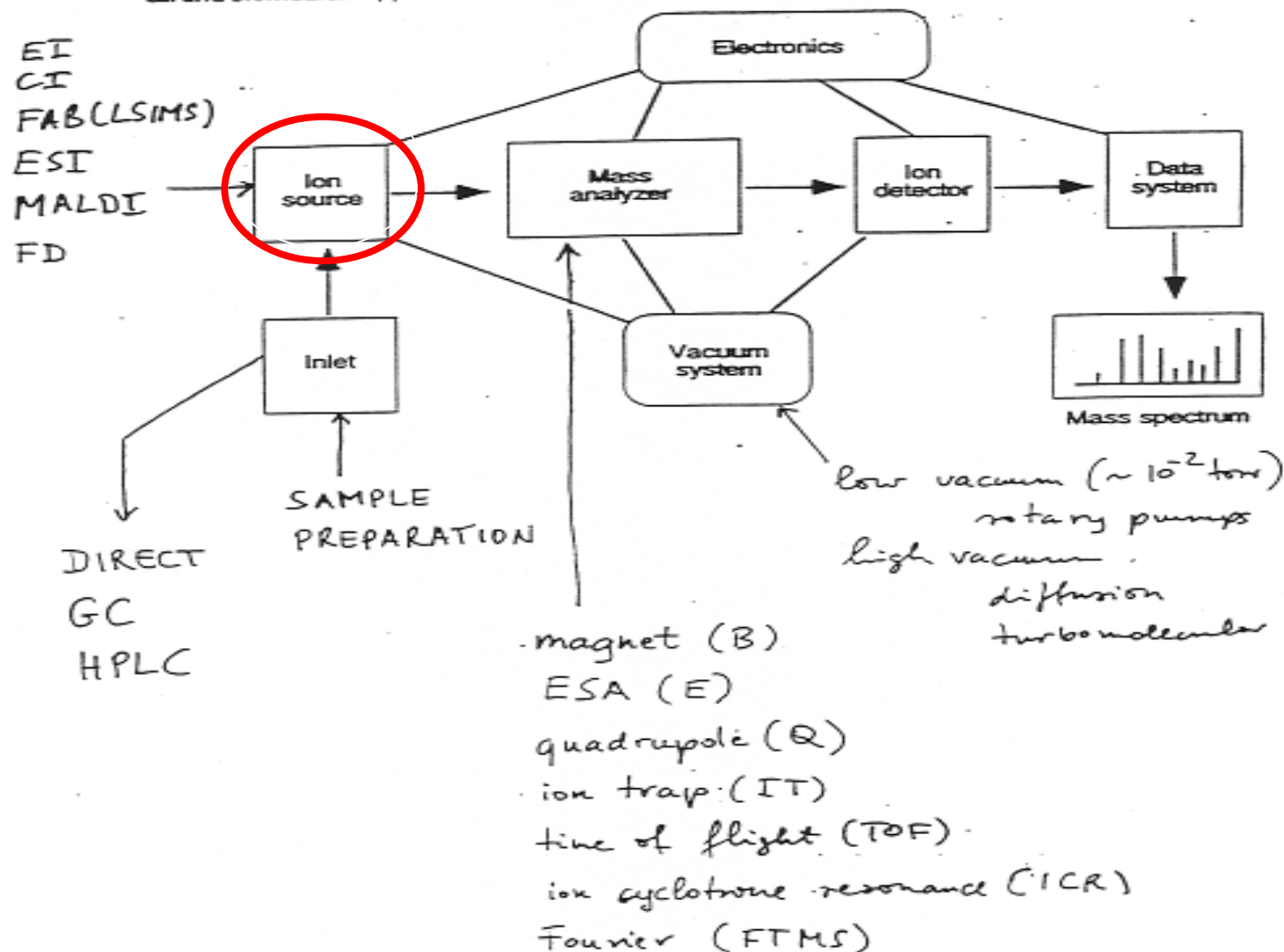
Termodinamikai paraméterek: ionizációs energia, megjelenési energia, entalpia, entrópia

MS - előnyök/hátrányok

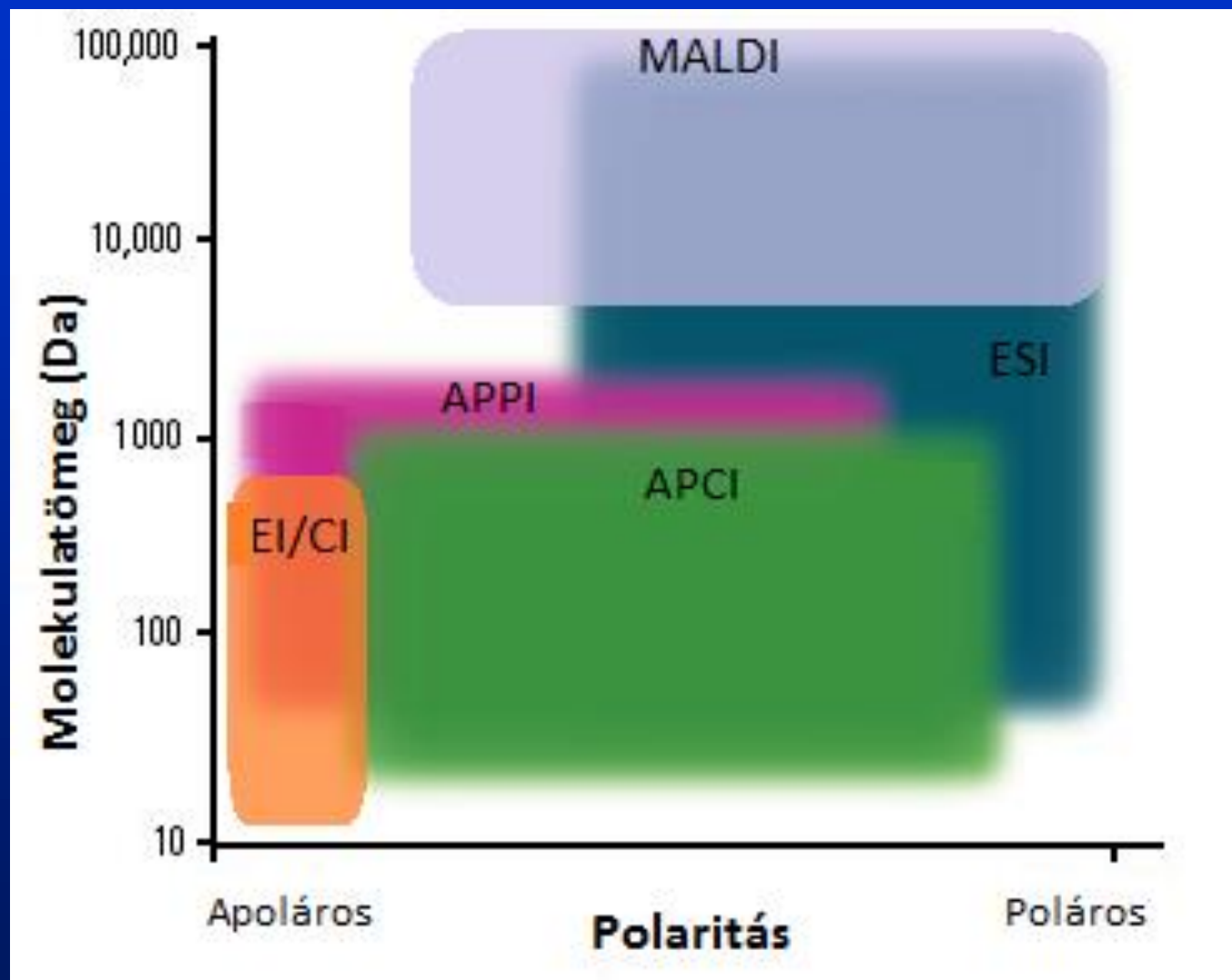
- 😊 **Nagy érzékenység**
 10^{-15}g , 10^{-21} mol detektálható
- 😊 **Gyors** - 10 spectrum/sec,
minta/min
- 😊 Könnyen kapcsolható
kromatográfiával
- 😊 Hatékony
egyszerű mintaelőkészítés
- 😊 **Minőségi és mennyiségi**
információ
- 😊 Flexibilis
szelektív/univerzális
- 😊 "Easy to get a job" MS
gyakorlással
- 😞 **Drágák** a készülékek
100.000-1.000.000 Euro
- 😞 Spektrumokat nehéz értelmezni
- **MS "szakember"**
- 😞 **Izomereket nehéz meg-**
különböztetni
- 😞 Sok **gyakorlati probléma**
készülék tisztítás, karbantartás,
javítás

Ionizáció

Figure 33.5 Schematic of a mass spectrometer. (From C. Dass, in D. M. Desiderio, ed., *Mass Spectrometry, Clinical and Biomedical Applications*, vol. 2, New York: Plenum Press, 1994, pp. 1-52. Reprinted with permission.)



Ionizációs technikák



‘Hard’ ionizáció

- elektronütközéses (EI)

‘Soft’ ionizációs módszerek

I. Részecskeütközésen alapuló

- Kémiai ionizáció (CI)
- Szekunderion/atom tömegspektrometria: Gyors atom/ion bombázás (FAB; FIB)

II. Párologtatáson/porlasztáson alapuló

- Electrospray (ESI):
- Atmoszférikus nyomáson történő kémiai ionizáció (APCI);
- Fotoionizáció (APPI); $(M+H)^+$

III. Deszorpciós ionizáció

- Mátrix segített lézer deszorpció és ionizáció (MALDI)

Elektronütközéses /kémiai ionizáció (EI/CI)

Kombinált EI/CI forrás

EI: spektrumkönyvtári keresés

univerzális GC detektor

molekulaion

termikus bomlás-fragmentáció

CI: ion-molekula ütközések a reagens gáz molekulák és minta molekulái között (metán, i-bután, ammónia)

kíméletes ionizáció

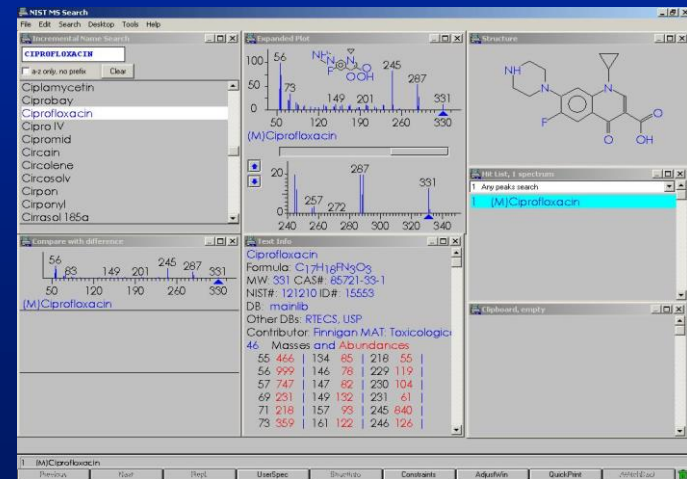
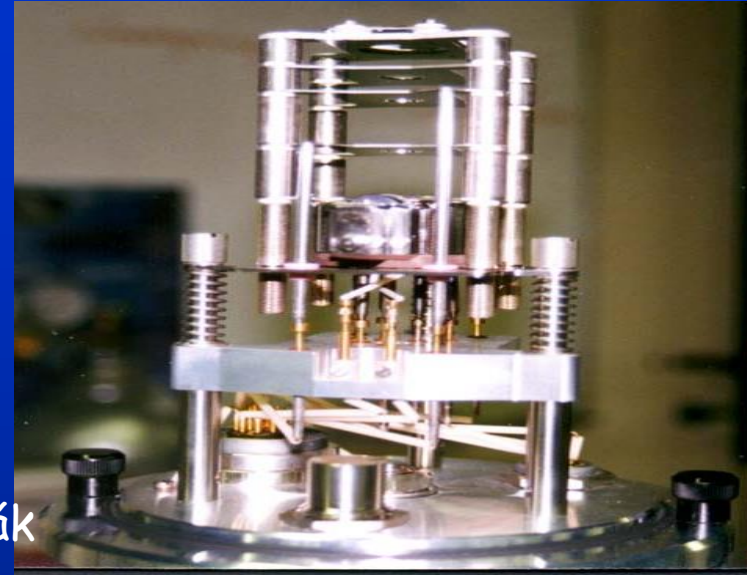
$$(M+H)^+, (M+NH_4)^+, (M+K)^+$$

gyenge fragmentáció, kvázi molekulaion

Gyógyszertechnológiai alkalmazás:

Oldószermaradványok meghatározása

Apoláros kis molekulák



NIST-EPA-NIH adatbázis: ~150,000 komponens

Kapcsolt technika: GC-MS

1950-



commons.wikimedia.org

Agilent Technologies Inc.

GC-MS

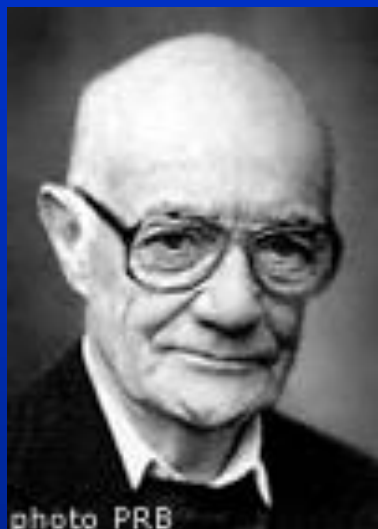
- Töltött és **kapilláris oszlopok**: jó felbontás (sokkomponensű keverékek vizsgálatára)
- Kis átmérőjű oszlopok: kis anyagmennyiség (pg-fg), mennyiségi meghatározás
- Wide-bore oszlopok: nagyobb mintamennyiség, split-splitless injektálás
- **EI/CI ionizáció**
- Optimális körülmények: - nagytisztaságú vivőgáz (hélium)
 - tömítések, liner
 - interface hőmérséklet
 - származékképzés (szililezés, metilezés, stb.)
- **Spektrumkönyvtárak**

Porlasztásos technikák (HPLC-MS)

Történeti áttekintés

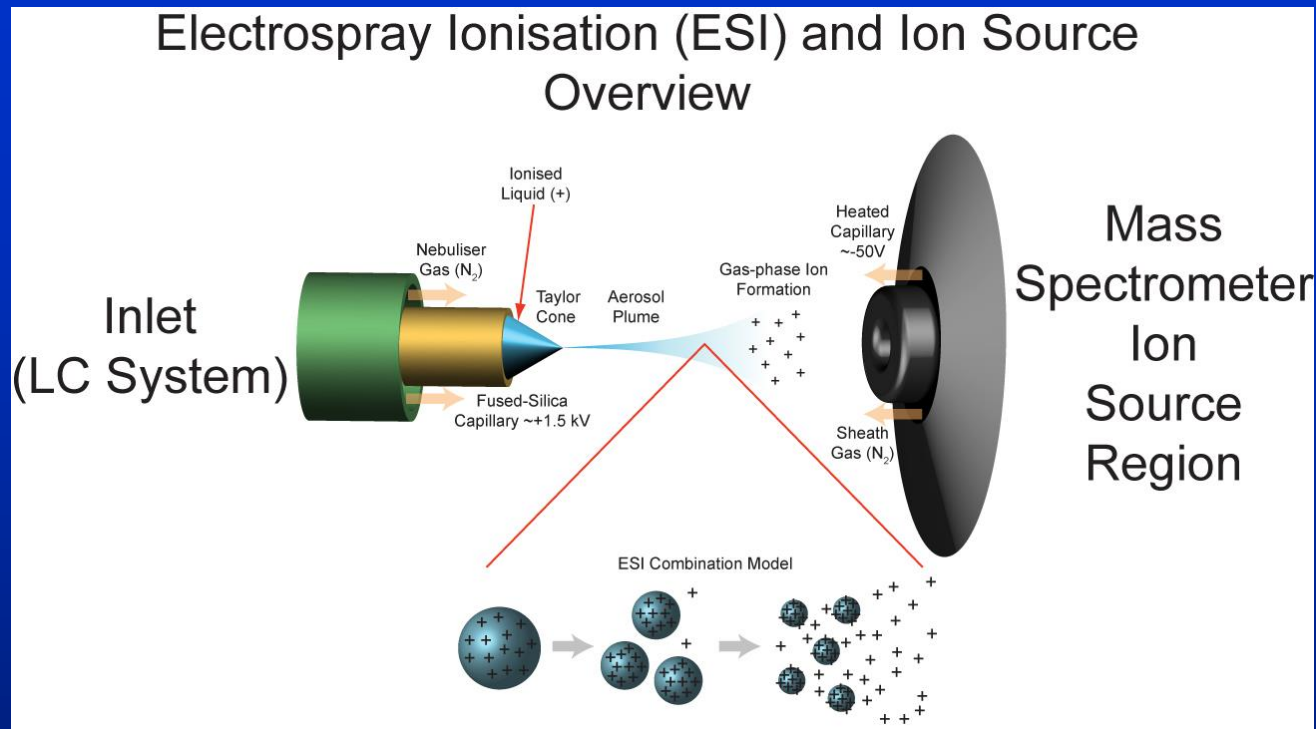
- 1965:** Atmoszférikus nyomású ionizáció β -emitter ^{63}Ni ill. korona kisüléssel (Shahin)
- 1966:** Kémiai ionizáció (Munson and Field)
- 1968:** Polisztrén molekulák vizsgálata az *electrospray* „ősével” (Dole)
- 1973:** API kapcsolása nagyvákuum tömegspektrométerrel (Horning)
- 1974:** API LC-MS kapcsolás (Horning)
- 1982:** API LC-MS-MS kapcsolás (Henion)
- 1985:** **Electrospray** ionforrás kifejlesztése (Whitehouse és Fenn)
- 1988:** Első kereskedelmi **APCI interface**
Többszörös töltésű ionok vizsgálata ESI-vel (Fenn)
- 1993–:** Gyakorlati alkalmazások robbanásszerű elterjedése (>35 % ESI)
- 2000:** **APPI** (Robb, Covey, Bruins)

Spray ionizáció – Electrospray (ES, ESI)



J. B. Fenn

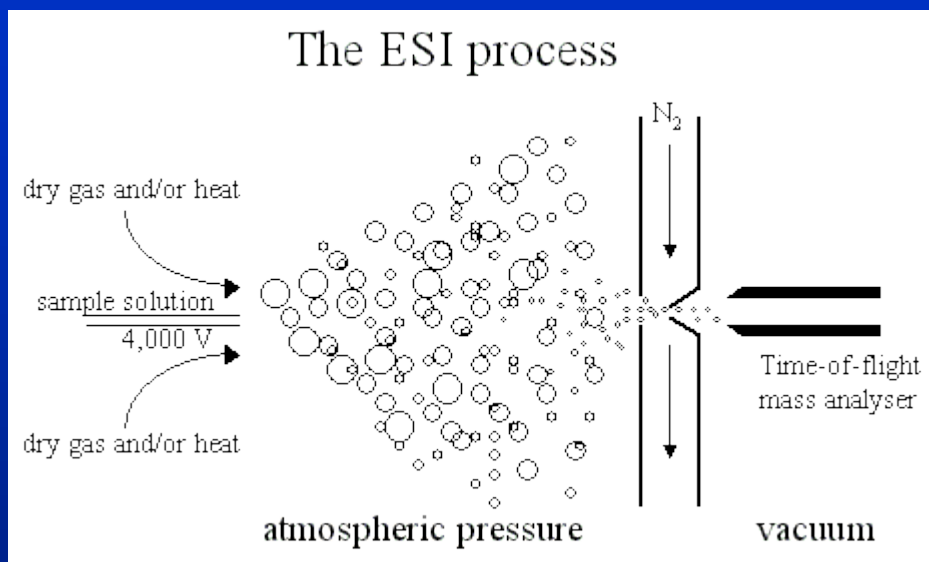
Kémiai Nobel
díj
2002



www.LamondLab.com

"for the development of methods for identification and structure analyses of biological macromolecules"

Electrospray

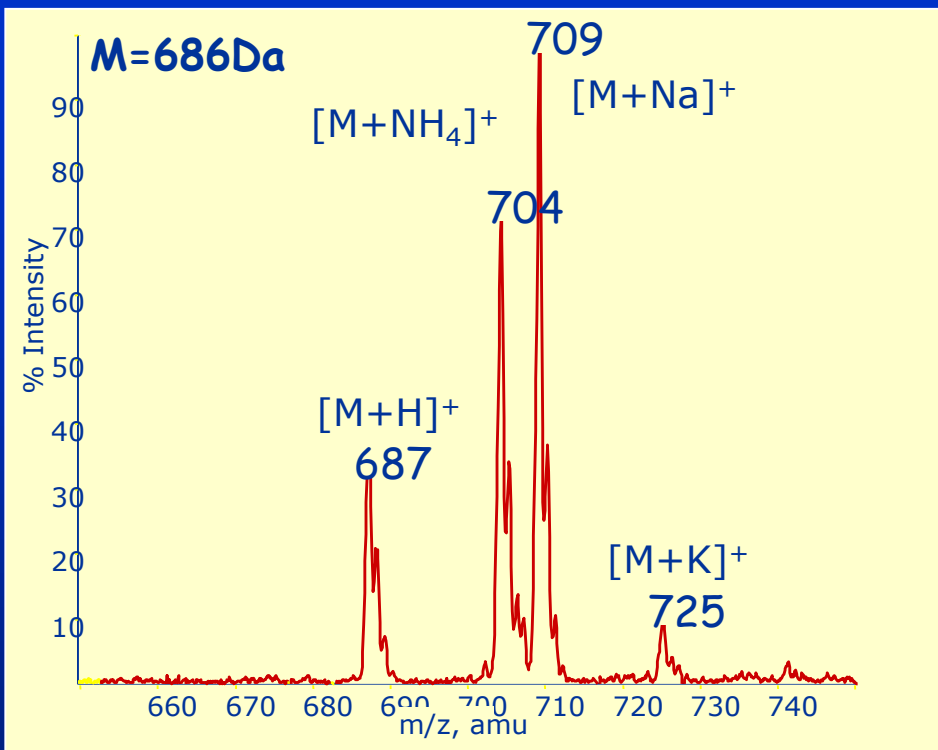


- spray nagy feszültség alatt: **többszörösen töltött aeroszol cseppek, ionok keletkeznek**
- Porlasztó gáz és fűtés segíti az ionizációt
- **Coulomb robbanás:** a töltéssel rendelkező aeroszol cseppek párolognak és a kritikus méretet elérve a töltéstaszítás hatására „szétrobbannak”: ionok és kisebb töltött aeroszol cseppek keletkeznek

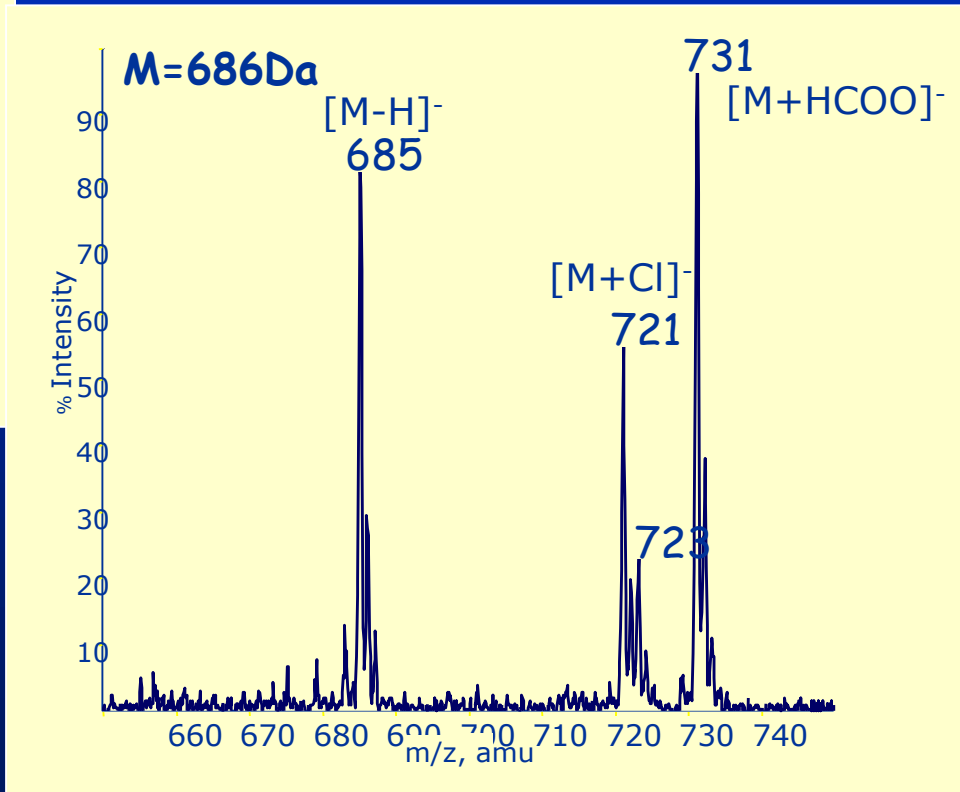
Charge residue modell: az aeroszol csepp „beszárad” (elpárolog az összes oldószer)

Ion evaporation modell: az instabil töltött csepp iont lök ki magából (töltéstaszítás miatt)

Electrospray – ionok



Protonált/deprotonált molekulaion
addukt ionok



Kapcsolt technika: HPLC-MS

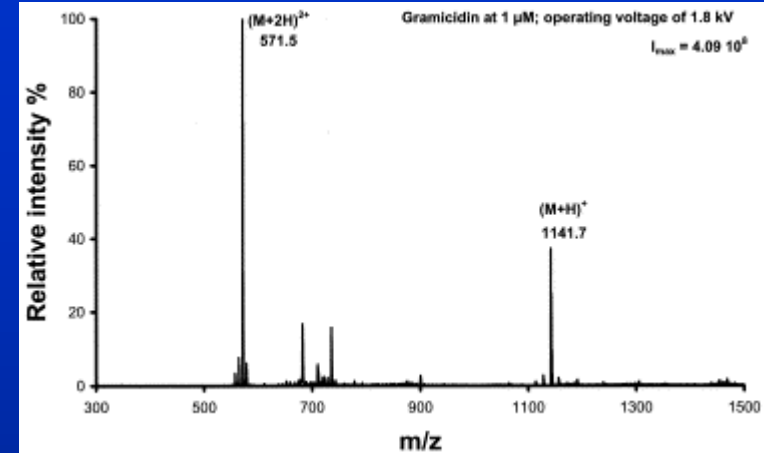
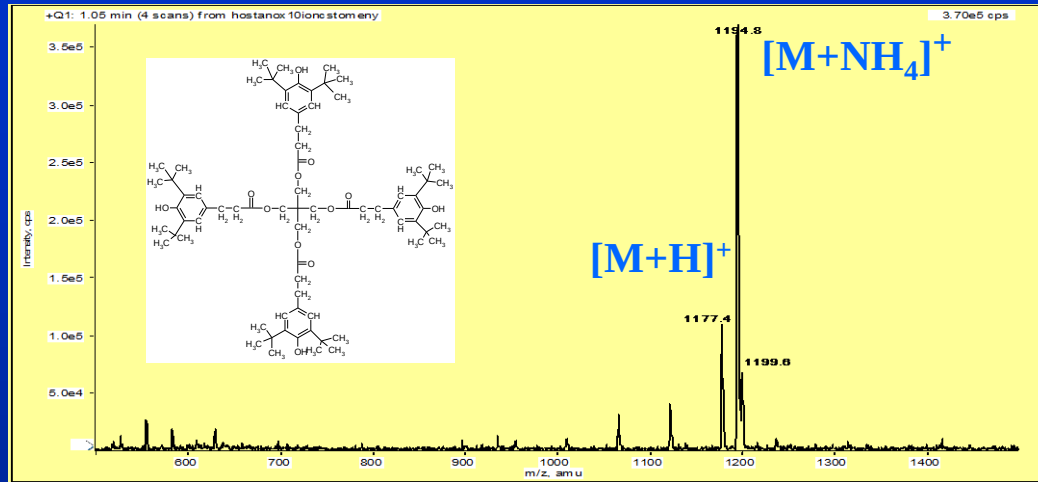
1980-



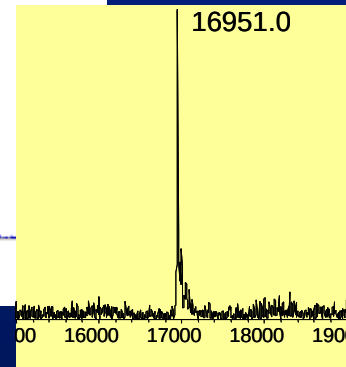
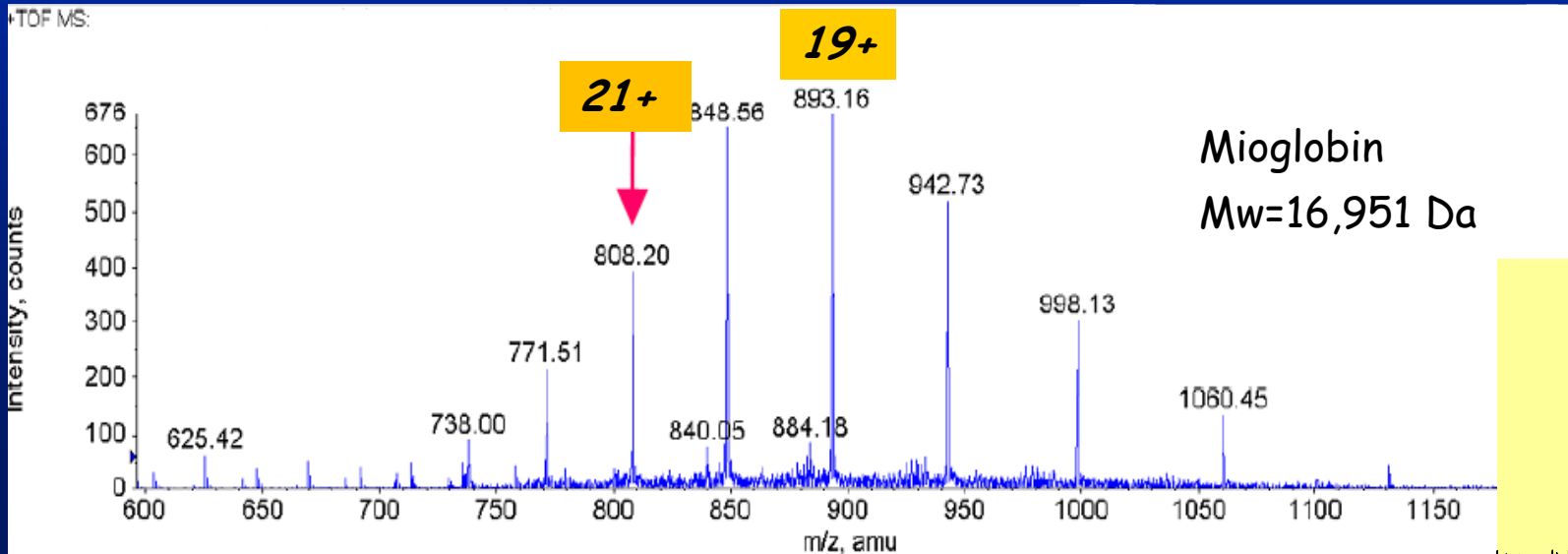
HPLC-MS

- **ionképződés légköri nyomáson**
- MS információ: kvázi molekulaion/**többszörös töltésű ionok** (fragmensek)
- **poláros/ionos anyagok** vizsgálhatók
- nagyon érzékeny, ($\sim 10^{-12}$ – 10^{-15} mol, 0,1-5 pg)
- pozitív/negatív töltésű ionok
- kis és **nagy tömegű molekulák** is vizsgálhatók
- egyszerűen kapcsolható HPLC-vel (5-1000 μ l/perc áramlási sebesség, vizes/szerves eluens)
- pontos tömegmérés megfelelő analizátorral
- kevésbé tolerálja a sókat és egyéb szennyezőket (**csak illékony puffer** használható!!!)
- alkalmazás: proteinek, glikoproteinek, oligonukleotidok, poláris metabolitok, komplexek és nem-kovalens interakciók, stb.

Electrospray - példák



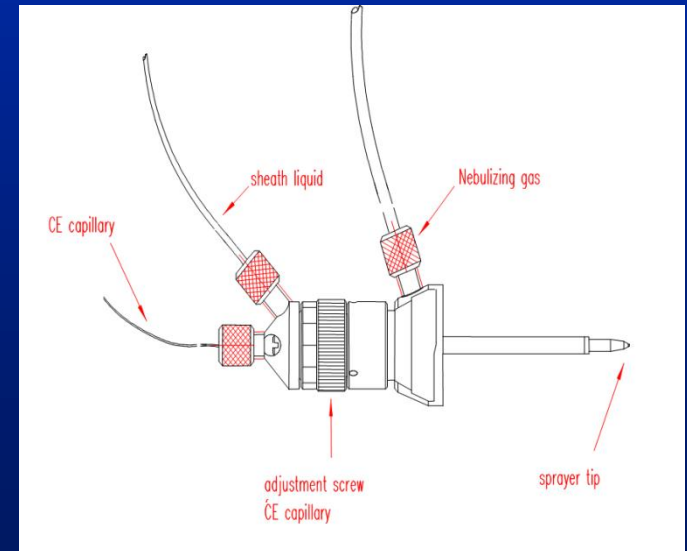
J. Am. Soc. Mass Spectrom., 15, 3, 409-412 (2003)



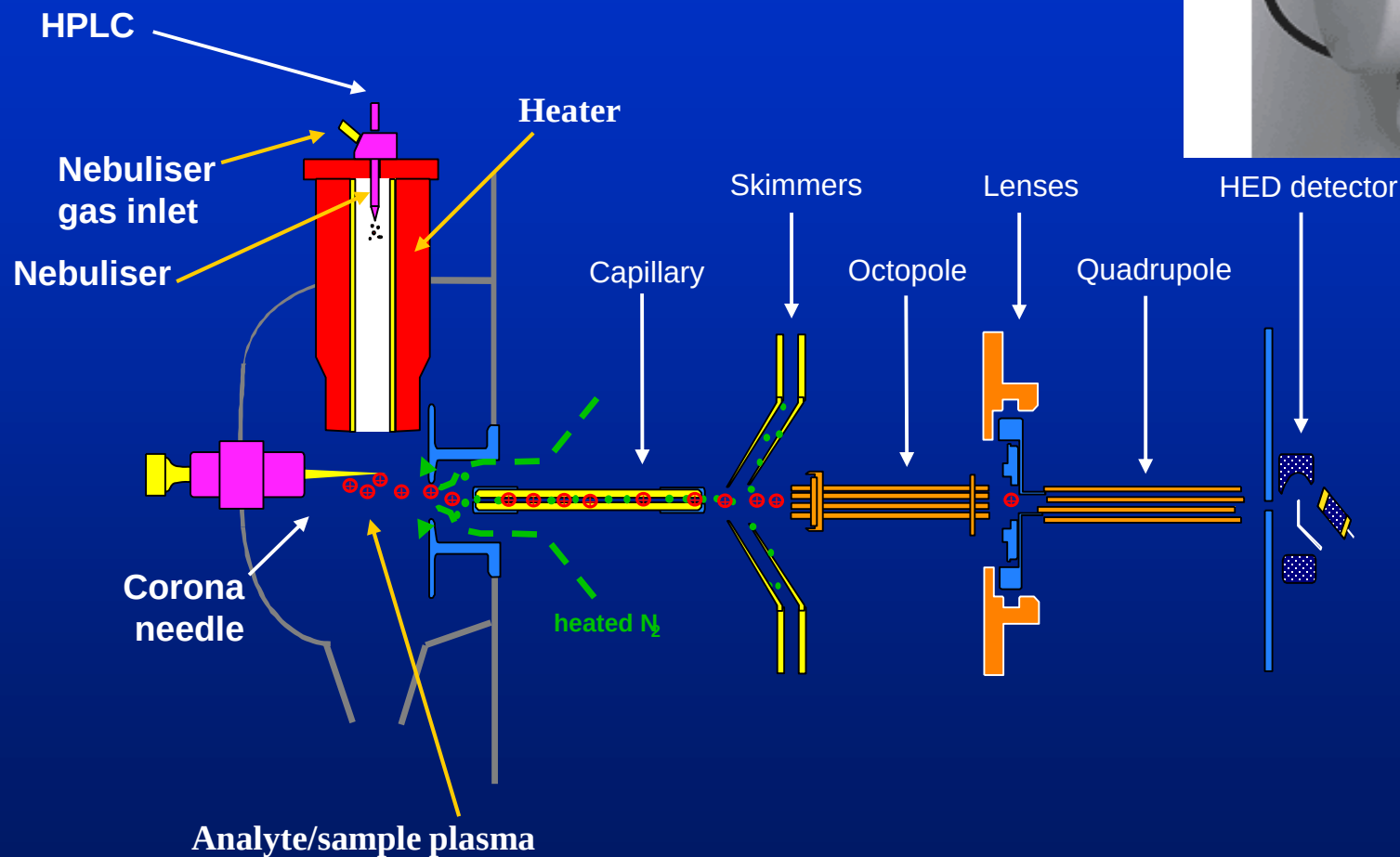
Kapcsolt technika: CE-MS

1990-

- Érzékeny, nagyfelbontású elválasztás ionos, kisebb (közepes) méretű vegyületek esetén (puffer, pH, kapilláris, feszültség hatása)
- ESI interface: optimális áramlási sebesség (kiegészítő folyadék - sheath flow)
- Illékony CE puffer
- **Nem rutin analitika!**



Atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció (APCI)



APCI LC-MS Interface előnyei és hátrányai

- 😊 Kíméletes ionizáció: **molekulatömeg**
- 😊 Pozitív és negatív ionok, közepesen **poláros komponensek**
- 😊 Nincs nemkívánatos fragmentáció
- 😊 **Kvalitatív és kvantitatív** meghatározás
- 😊 0,2-2 ml/perc áramlási sebesség
- 😊 pH nem befolyásolja az ionizációt
- 😊 Jobban tolerálja a sót, mint az ESI (nagyobb érzékenység)
- 😊 Könnyű installálni és üzemeltetni
- 😊 **Egyszerűen kapcsolható HPLC-vel**
- 😞 Nincs fragmentáció
- 😞 **Hőbomlás** lehet
- 😞 Csak illékony pufferek
- 😞 **Egyszeres töltésű ionok:** tömegtartományt az analizátor szabja meg
- 😞 Nem alkalmas apoláros molekulák vizsgálatára

Gyakorlati példa: Hosszú láncú zsírsavak meghatározása

- eltérés peroxisomális zavarok esetén
- szokásos: extrakció, származékképzés, GC-MS
hosszadalmas, munkaigényes
- fejlesztés:
származékképzés nélkül, HPLC-MS
gyors, hatékony, érzékeny
alkalmas legyen vér analízisére
(szűrőpapírra szárított vércsepp)

általános tendencia: áttérés GC-MS → HPLC-MS

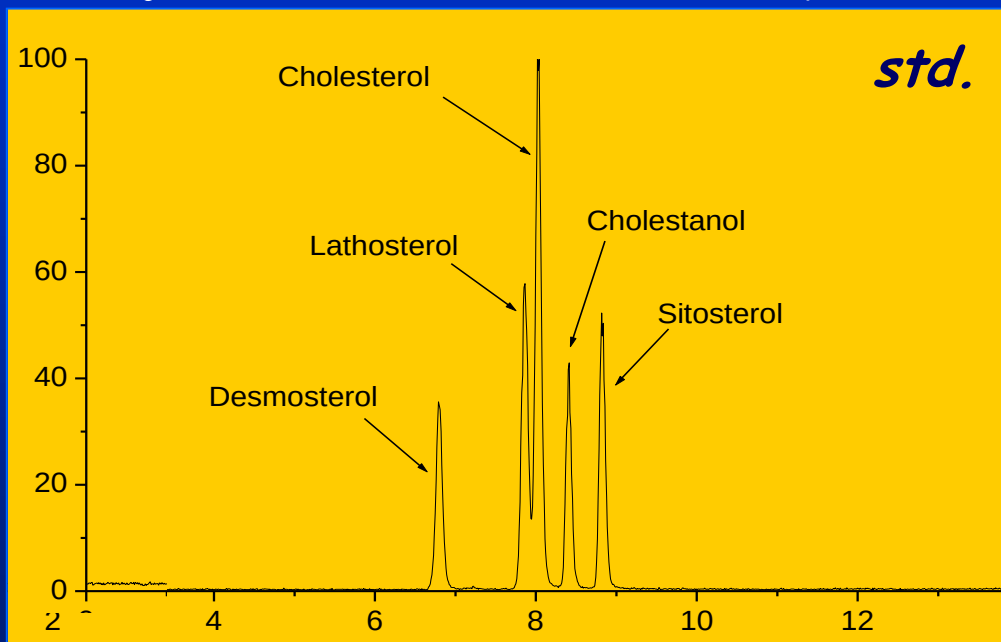


PE Sciex triple Q

K. Nagy et al., Anal Chem 76, 1935 (2004)
K. Nagy et al., J. Chrom. A 1078, 90 (2005)

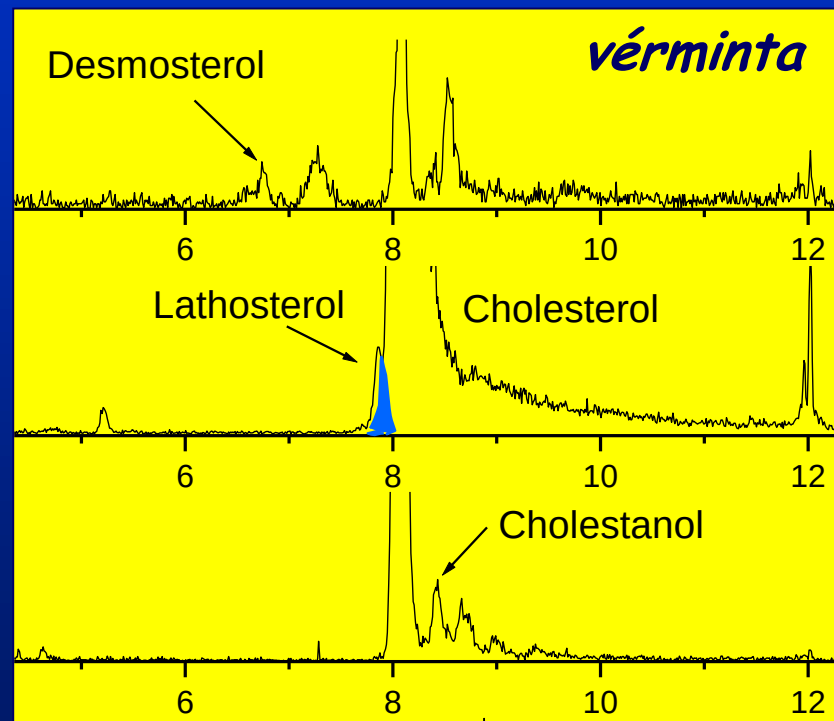
Gyakorlati példa: Szterinek meghatározása

- szokásos: munkaigényes származékképzés, GC-MS
- fejlesztés: származékképzés nélkül, gyors HPLC-MS/MS



HPLC-MS/MS

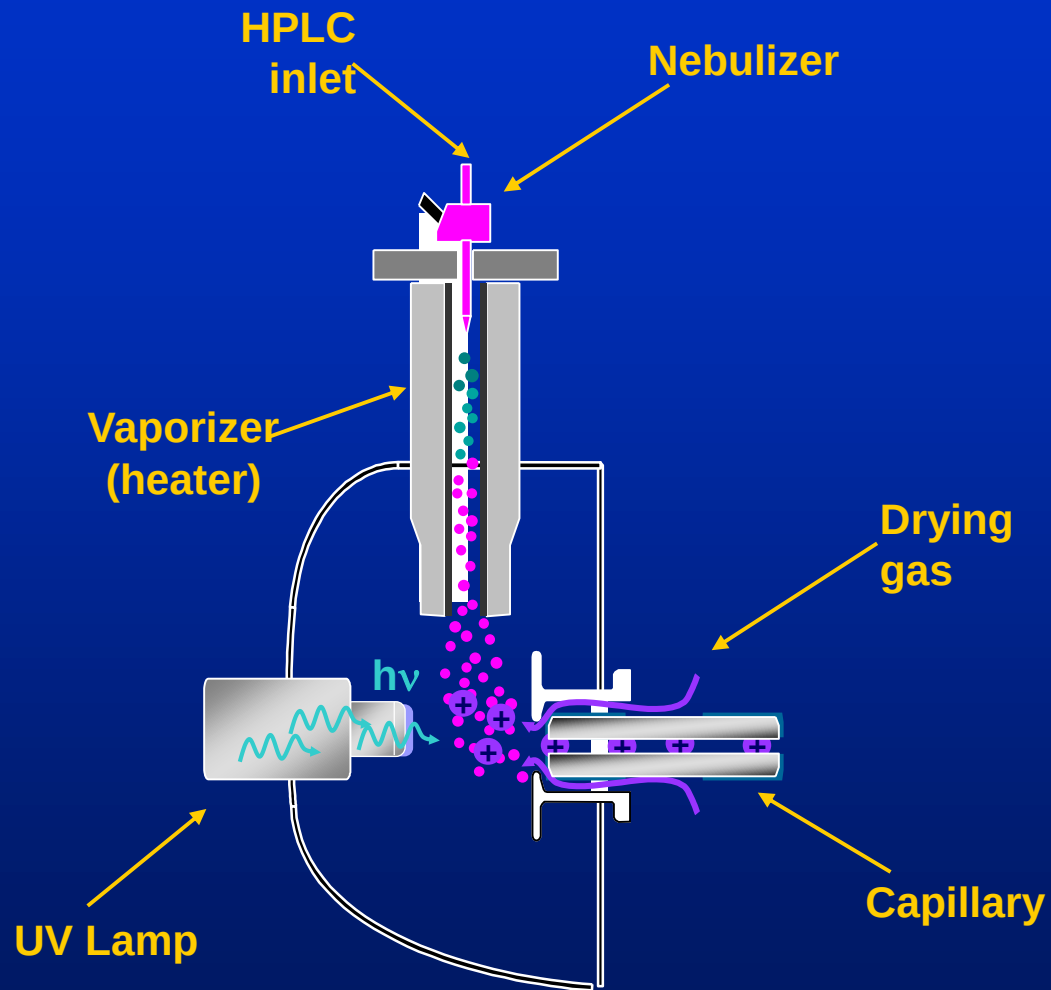
víz-metanol-hexán-aceton



koleszterin: 1000 µg/ml

lathoszterin: 1 µg/ml

Atmoszférikus nyomású fotoionizáció (APPI)



Fotoionizáció elve

Direkt fotoionizáció



Dopant-közvetített fotoionizáció (toluol, aceton):
ionizáció hatékonysága növelhető



Lámpa

Ionizációs potenciál: Ar (11.2eV) > Kr (10.0eV) > Xe (8.4eV)

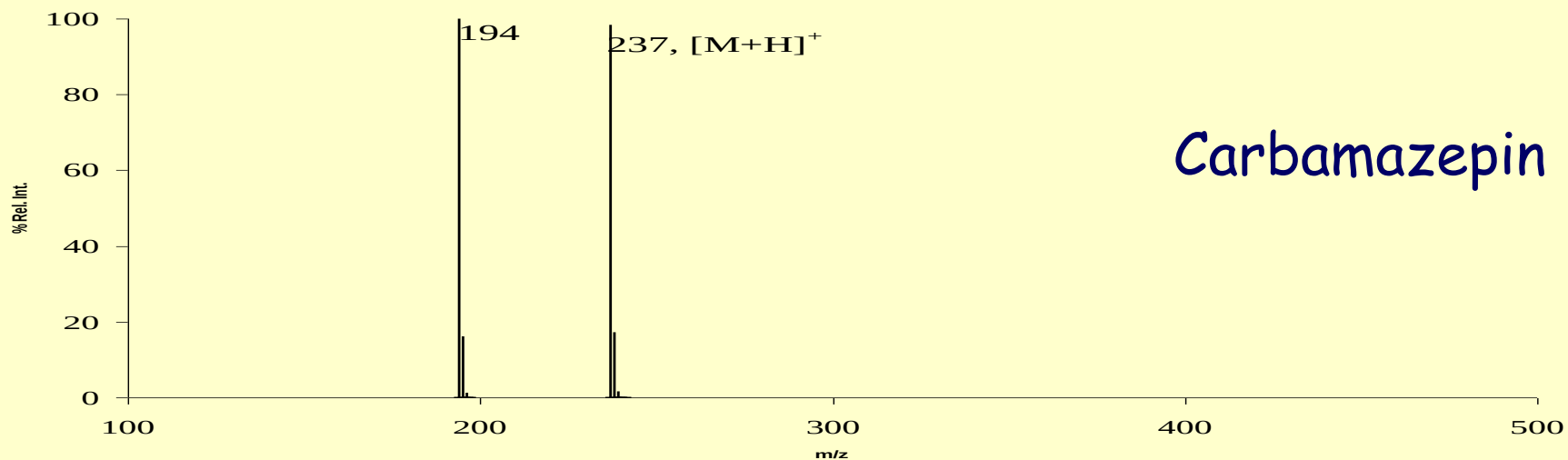
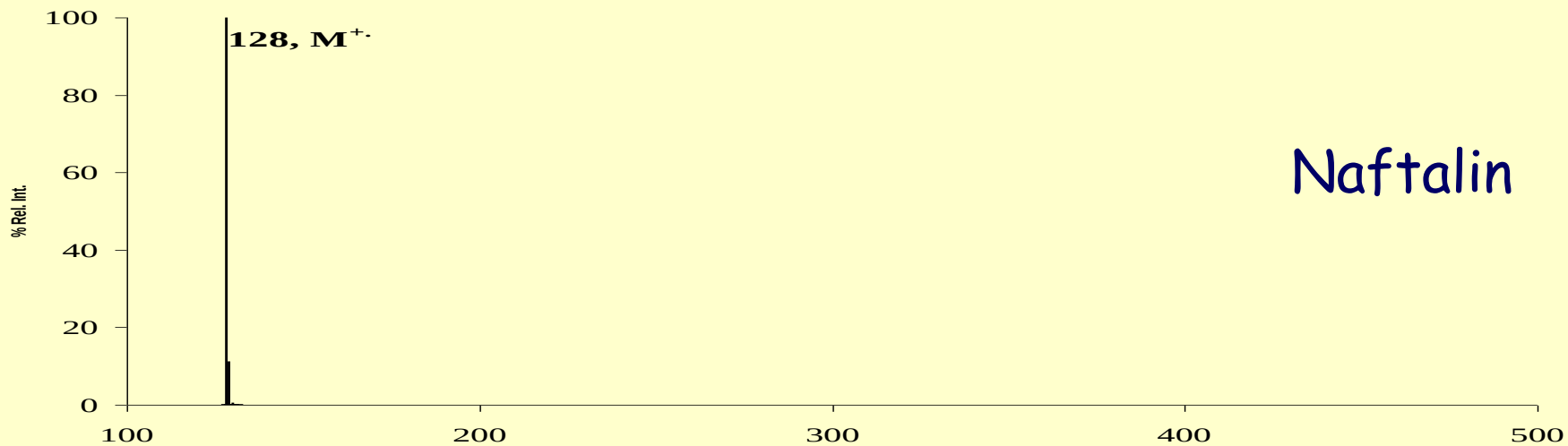
Tipikus HPLC oldószerek IP > 10 eV

Legtöbb szerves vegyület IP < 10 eV

APPI LC-MS Interface előnyei és hátrányai

- 😊 Pozitív/negatív ionok, **apoláros komponensek**
- 😊 **Molekulatömeg** információ
- 😊 **Minimális háttér-interferencia**, szelektív ionizáció
- 😊 Könnyű installálni
- 😊 Egyszerűen kapcsolható HPLC-vel
- 😞 Új technika...
- 😞 **Gyökion vagy protonált molekulaion?**
- 😞 Nem illékony pufferek???
- 😞 Nem alkalmas poláros molekulák vizsgálatára

APPI - példák



LC/MS alkalmazása a gyógyszerkutatásban

Proteomics

Protein Expression Profiling

Quantitation

Glycoprotein Mapping

Natural Products Dereplication

Lead Identification Screening

Bioaffinity Screening

Combinatorial Library Screening

Open-Access LC/MS

Structure Confirmation

High Throughput

Purification

Combinatorial Mixture Screening

In Vivo Drug Screening

Pharmacokinetics

In Vitro Drug Screening

Metabolic Stability Screening

Membrane Permeability

Drug-Drug Interaction

Metabolite Identification

Preclinical Development

Metabolite Identification

Impurity Identification

Degradant Identification

Clinical Development

Quantitative Bioanalysis—Selected Ion Monitoring

Quantitative Bioanalysis—Selected Reaction Monitoring

Quantitative Bioanalysis—Automated Solid-Phase Extraction

Quantitative Bioanalysis—Automated On-Line Extraction

Metabolite Identification

Degradant Identification

Manufacturing

Impurity Identification Using Data-Dependent Analysis

Peptide Mapping in Quality Control

Patent Protection

photo PRB

- Mátrix: pl. nikotin-sav, dihidro-benzoészav hidroxifáéjsav**

Kémiai Nobel Díj 2002



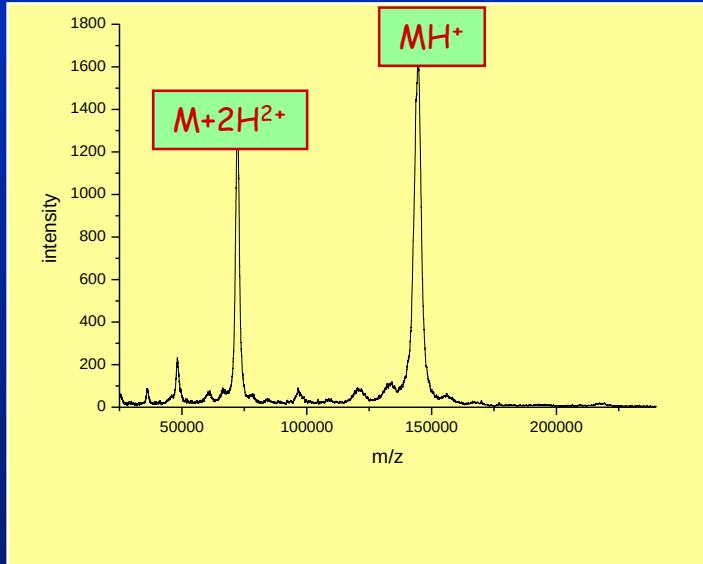
MALDI

- legérzékenyebb MS módszer, 10^{-15} – 10^{-21} mol
- Pozitív/negatív ionok
- közepes és **nagy tömegű molekulák** vizsgálatára is alkalmas
~ **3-400 - 200.000 Da** rutin technika
- toleráns sószennyezésre (mmol conc.)
(ESI kevésbé)
- alkalmas keverékek **direkt analízisére**
- pontos tömegmérés megfelelő analizátorral
- alap ionizációs technika peptidek és proteinek vizsgálatára
 - **Nem kapcsolható on-line kromatográfiával**
 - Nagy tömegű molekulák esetén (> 30 kDa) a molekulacsúcs széles lehet (pontos tömeg - átlagtömeg?)
 - **Mennyiségi meghatározásra csak korlátozottan alkalmas** (kristályosítás!)

MALDI

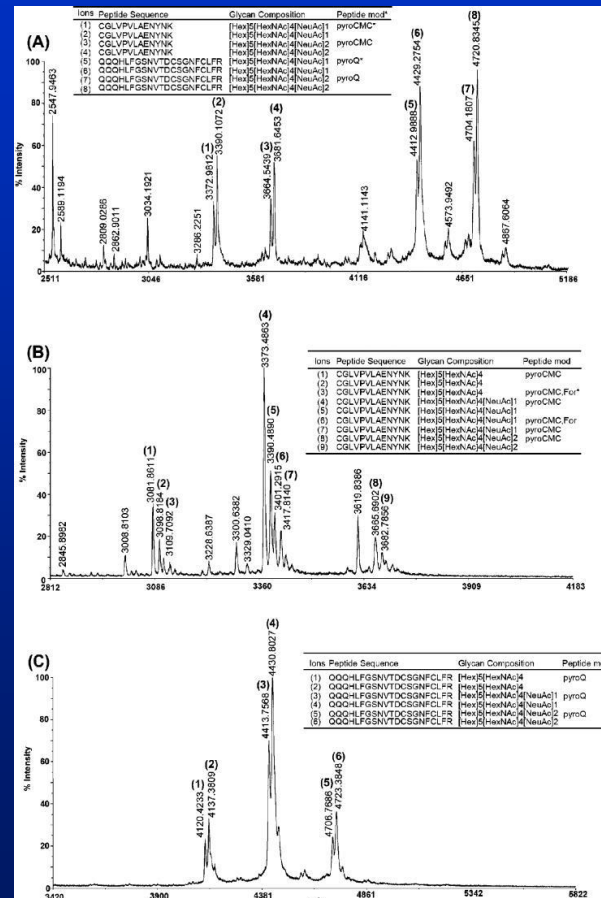
Intakt molekula ill. peptidkeverékek vizsgálata:

- egyszeres, ill.kétszeres töltésű ionok
 $(M+Na)^+$, $(M+K)^+$
- gyenge fragmentáció



Intakt antitest (IgG)

Anal. Biochem., 368, 2, 214-221 (2007)



Anal. Chem., 80, 3144-3158 (2008)

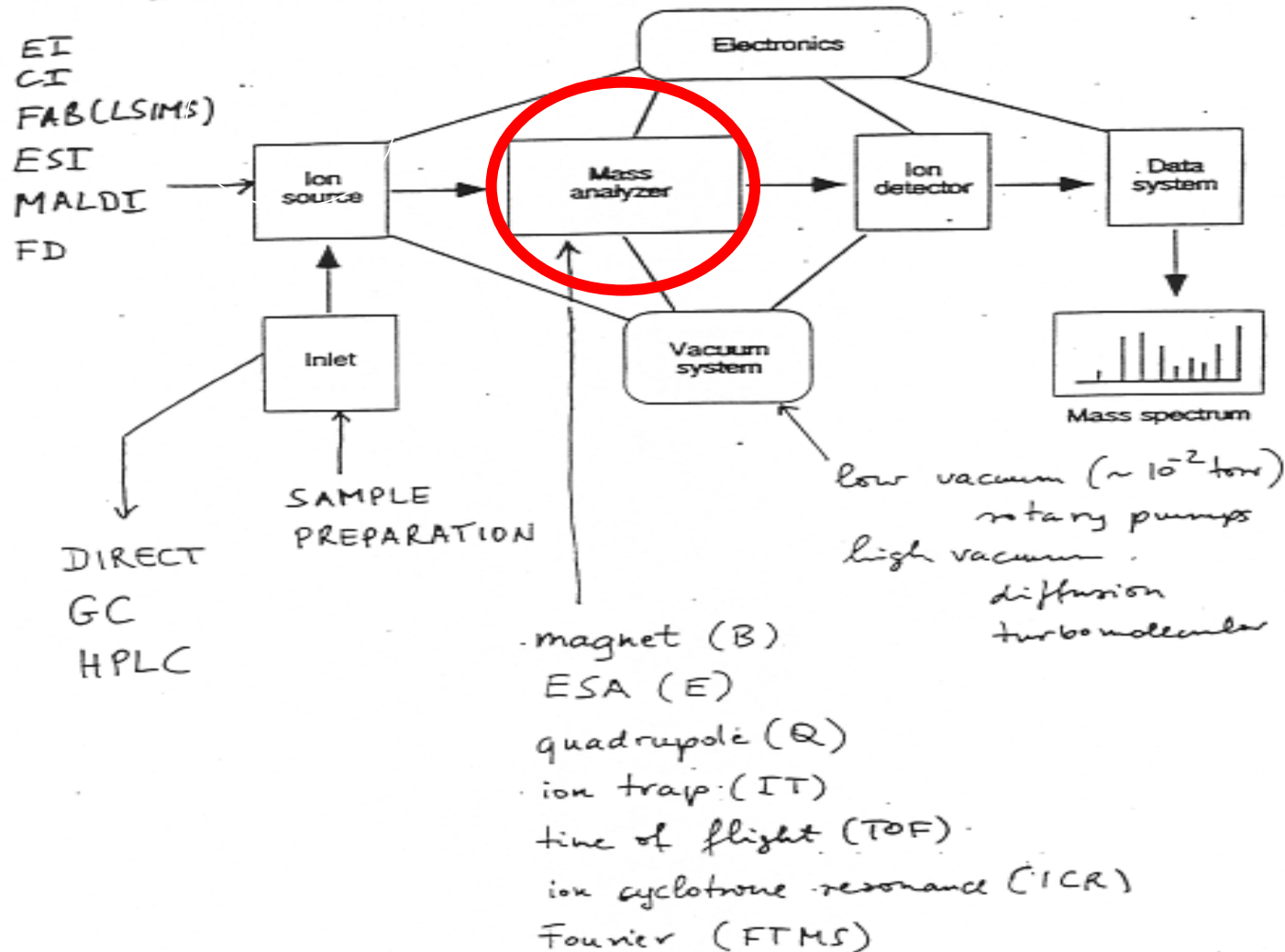


www.ms-textbook.com

glikopeptid
(human transferrin)

Készüléktípusok/analizátorok

Figure 33.5 Schematic of a mass spectrometer. (From C. Dass, in D. M. Desiderio, ed., *Mass Spectrometry, Clinical and Biomedical Applications*, vol. 2, New York: Plenum Press, 1994, pp. 1-52. Reprinted with permission.)



Iontranszport:

Kvadrupól & hármaskvadrupól készülékek

- tipikus 'workhorses', MS/MS scan

Repülési idő

- tömegtartományuk nem limitált
- karbantartásuk egyszerű, olcsó

Szektor készülékek

- érzékenyek, nagy felbontás, ionkémiai vizsgálatok
- drágák, nehezen automatizálhatók

Iontárolás:

Ioncsapda

- olcsó, érzékeny készülék
- MS^n , nagyfelbontás
- mennyiségi meghatározásra csak korlátozottan alkalmas

FT-ICR készülékek (orbitrap, FT-MS)

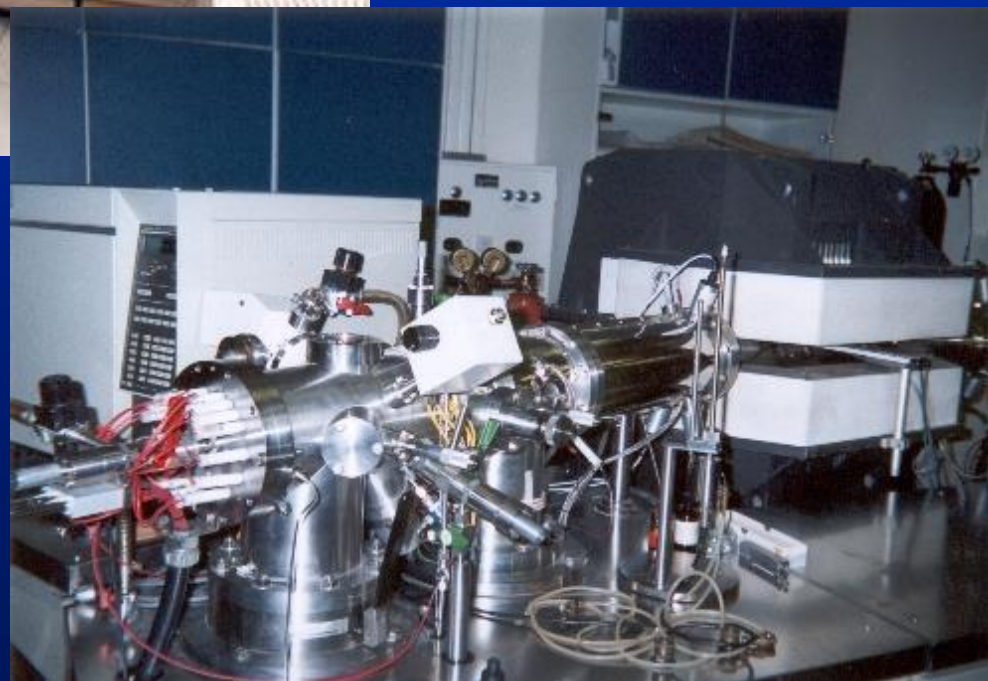
- 'high quality', "MS szakember", kromatográfiás kapcsolat

Hibrid készülékek (QTOF, QTrap)



Szektor készülék
VG ZAB 2SEQ

Múlt...



Kvadrupól készülék

- Molekulatömeg tartomány
 - Kvalitatív/Kvantitatív vizsgálatokra
- PE Sciex hármás kvadrupól MS



Waters Co.

Jelen...



Repülési idő (Time of Flight) készülékek

- Molekulatömeg tartomány: 100.000 Da fölött is



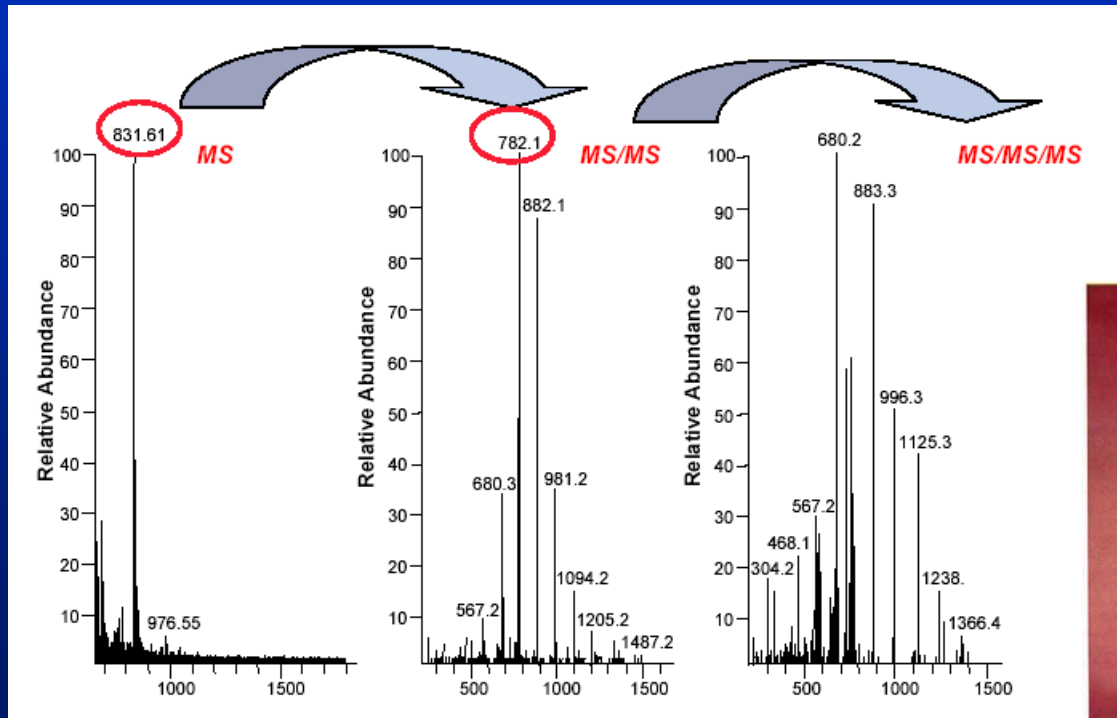
Bruker MALDI-TOF

Jelen...

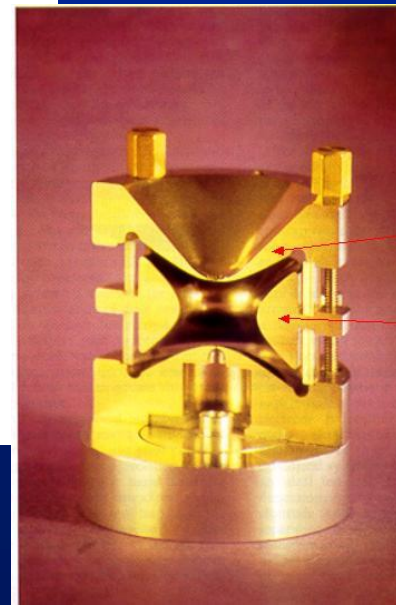


Ion csapda (Ion trap) készülékek

- **Szerkezeti információ:** többszörös ütközések, MS^n
- Kvantitatív vizsgálatokra csak szűk (1-2 nagyságrend) linearitási tartományban



Jelen...



Cross section of ion trap,
along z-axis

End Cap Electrode

Ring Electrode

See R. March, *K. Mass Spectrom.*,
32, 351-369, 1997.

“Hybrid” készülékek, FT-ICR

- Q/TOF
- Qtrap
- FT-MS nagyfelbontás (“high quality” kutatás)

Jelen... és Jövő...

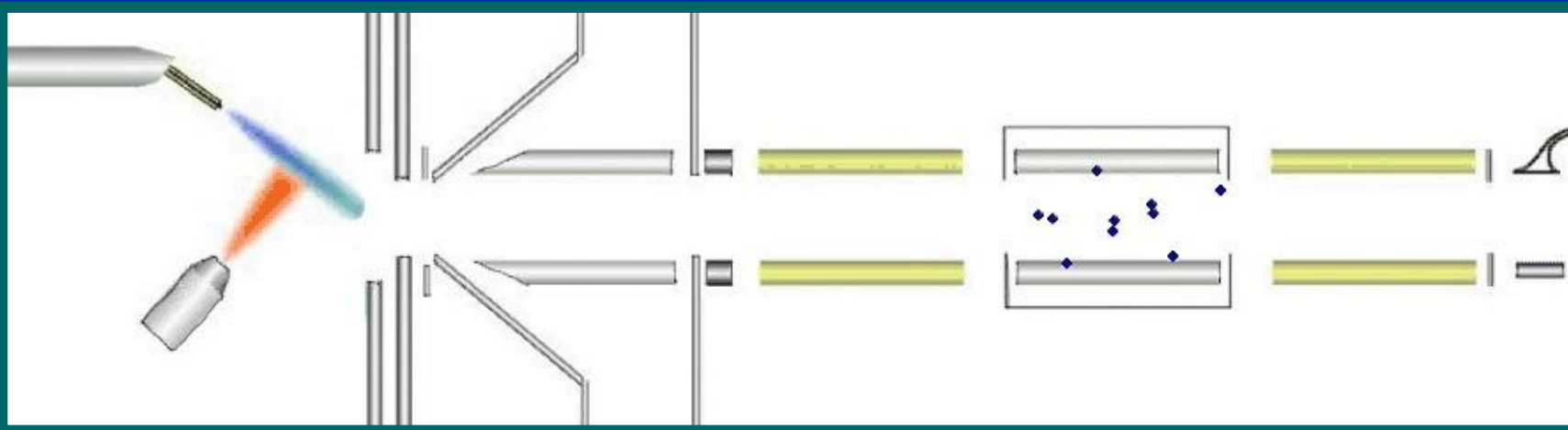
Waters Q/TOF

Bruker FT-MS



Tandem tömegspektrometria

- Gázfázisú fragmentációs folyamatokban anyaiion-leányion kapcsolat határozható meg.
- Az ionizációt követően a tömeganalízis során a kiválasztott iont újabb reakcióba visszük és az így nyert fragmenseket tömeg/töltés értékük szerint szétválasztjuk.



ionizáció

tömegszelekció

gerjesztés

tömegszelekció

detektálás

Miért fontos?

Szerkezeti információ (nem csak molekulatömeg):

- szerkezetmeghatározás
- alkalmazás pl. peptidszekvenálás, izomerek, metabolitkutatás, stb.

Szelektivitás növelése:

- hatékonyabb mintaelválasztás:
a kromatográfiát kiegészíti ill. helyettesítheti
- a kémiai zajszintet csökkenti

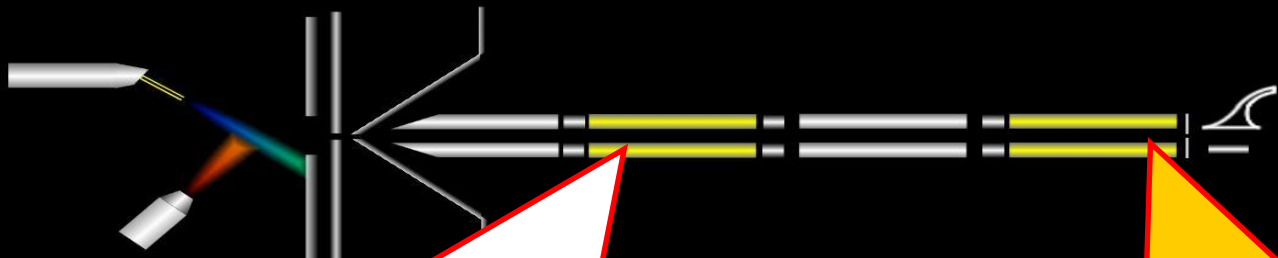
Másodlagos gerjesztés

Ha a belsőenergia nem elég a fragmentációhoz: másodlagos gerjesztés, ütköztetés

- Gáz molekulákkal (CID, collision induced dissociation)
- Felülettel (SID, surface induced dissociation)
- Fotonokkal (PID, photon induced dissociation)
- Elektronokkal (ECD, electron capture dissociation)

MS mérési technikák

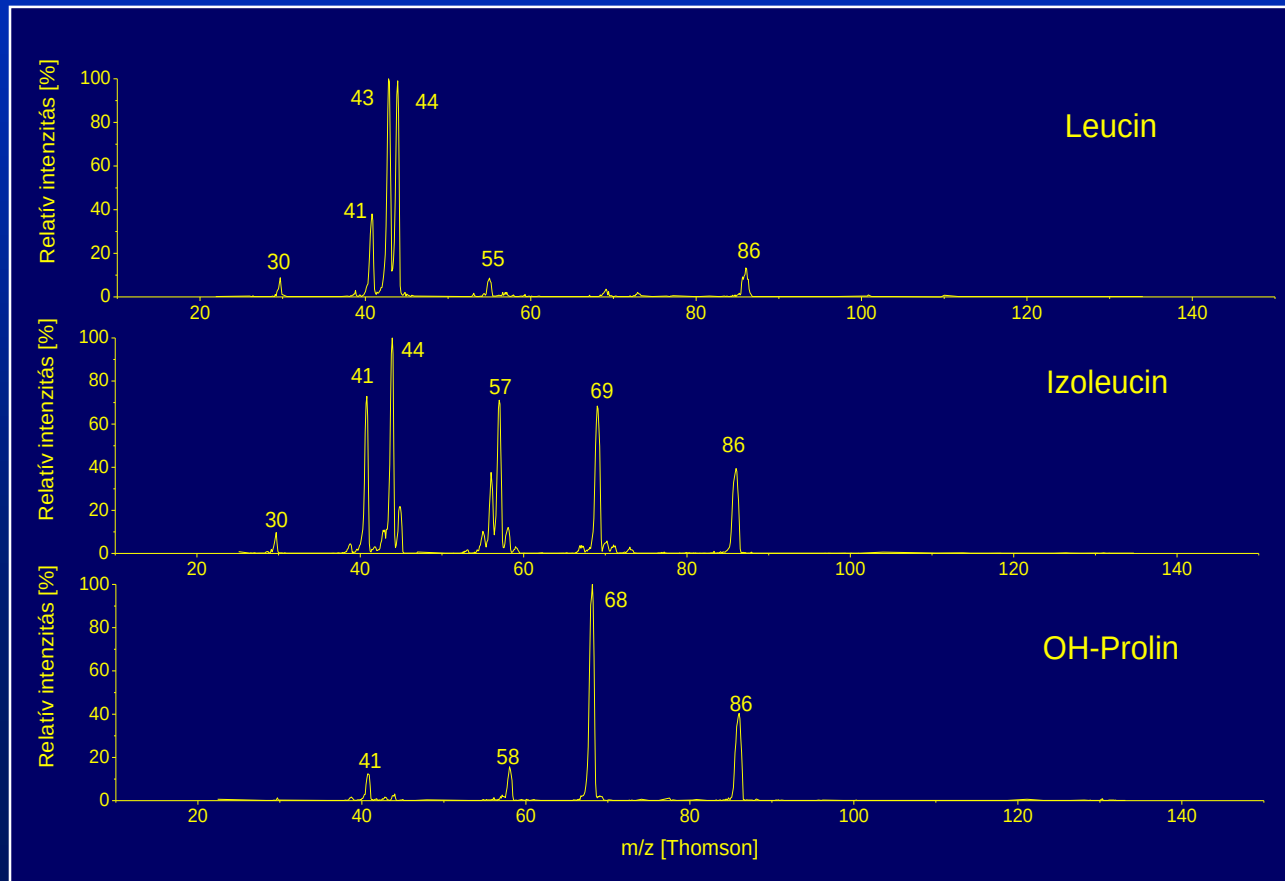
- Normál spektrum molekulatömeg információ
- Selected Ion Recording szerkezetkutatási célokra nem előnyös
- Product Ion Scan szerkezetigazolás!
- Precursor Ion Scan molekulaion keresés
- Neutral Loss jellegzetes változások (konjugátumok keresése)
- Multiple Reaction Monitoring (MRM) lehetséges szerkezetek monitorozása

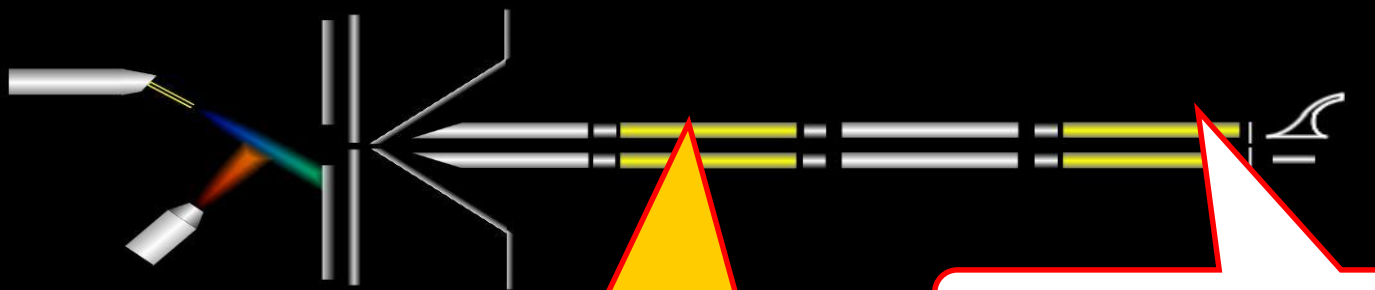


vizsgálandó ion kiválasztása

*SCAN:
framensek meghatározása*

Product ion scan anyaion spektrum



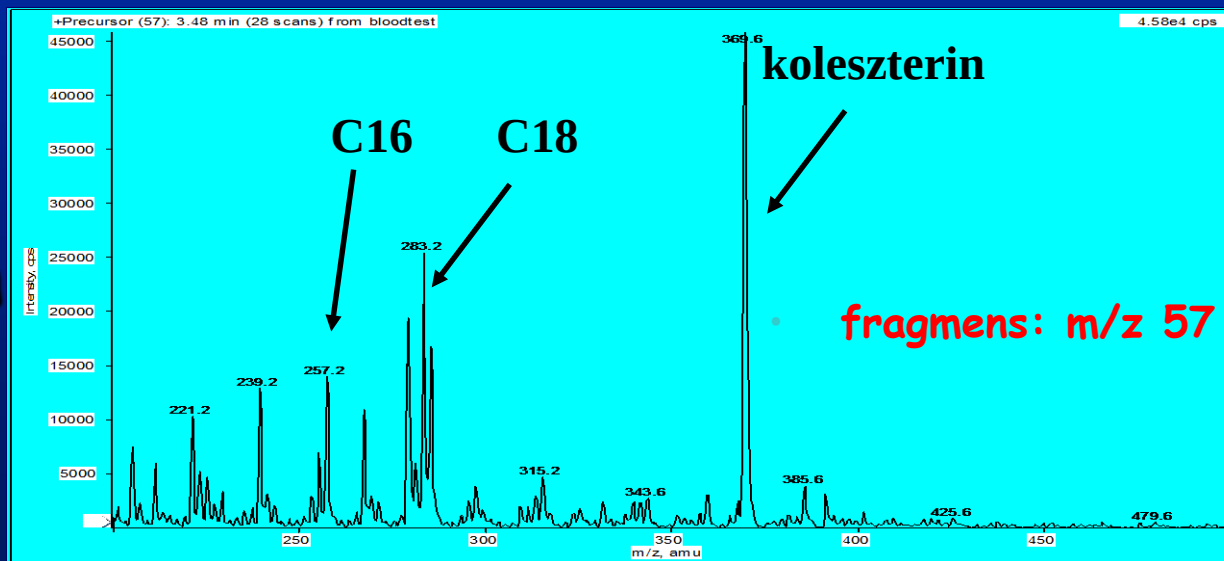


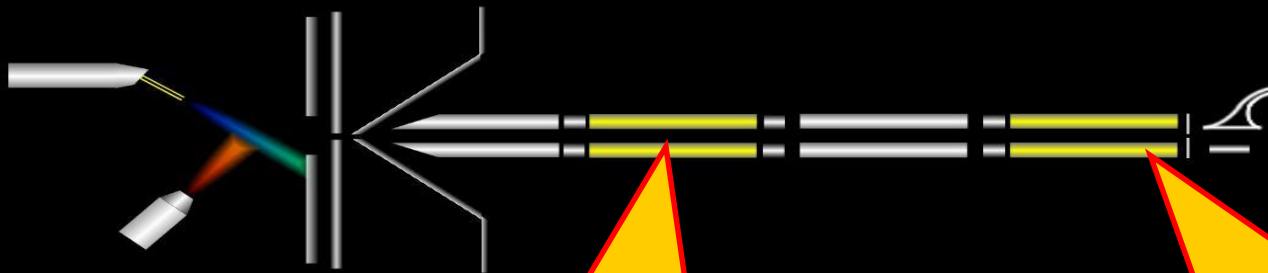
SCAN:
a lehetséges anyaiionok
meghatározása

*fragmentation
kiválasztása*

- Vércseppből szabad zsírsav meghatározása származékképzéssel, kromatográfia nélkül

Precursor ion scan
leányion spektrum





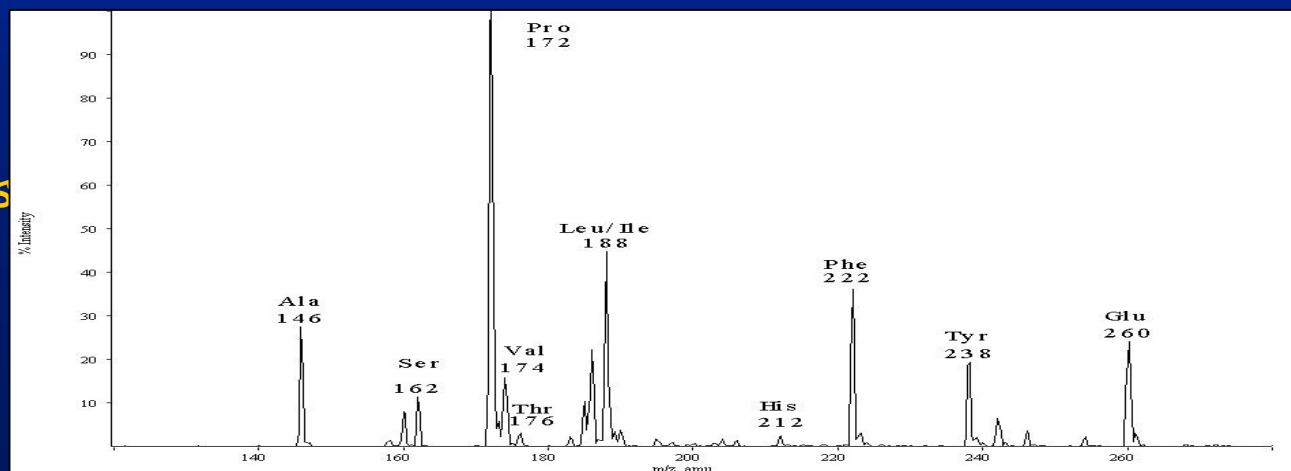
SCAN:
a lehetséges anyaiakonok
meghatározása

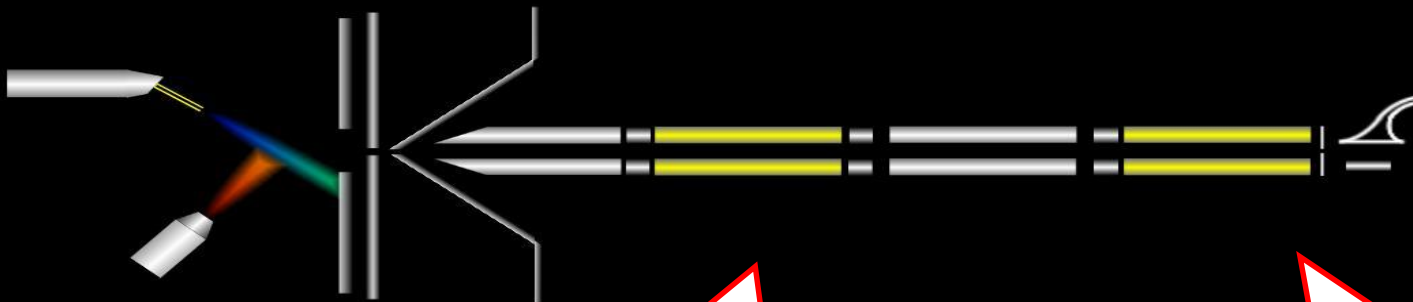
**SCAN, pl. 18 Da-nal kisebb
tömegnél:**
viz elimináció detektálása

Aminosavak meghatározása vércseppből: m/z 102 (butilészter) vesztes
detektálás - csecsemő anyagcserebetegség szűrés

K.Nagy et al., Rapid Commun. Mass Spectrom., 17, 9, 879-1006 (2003)

Neutral loss
semleges molekula vesztes



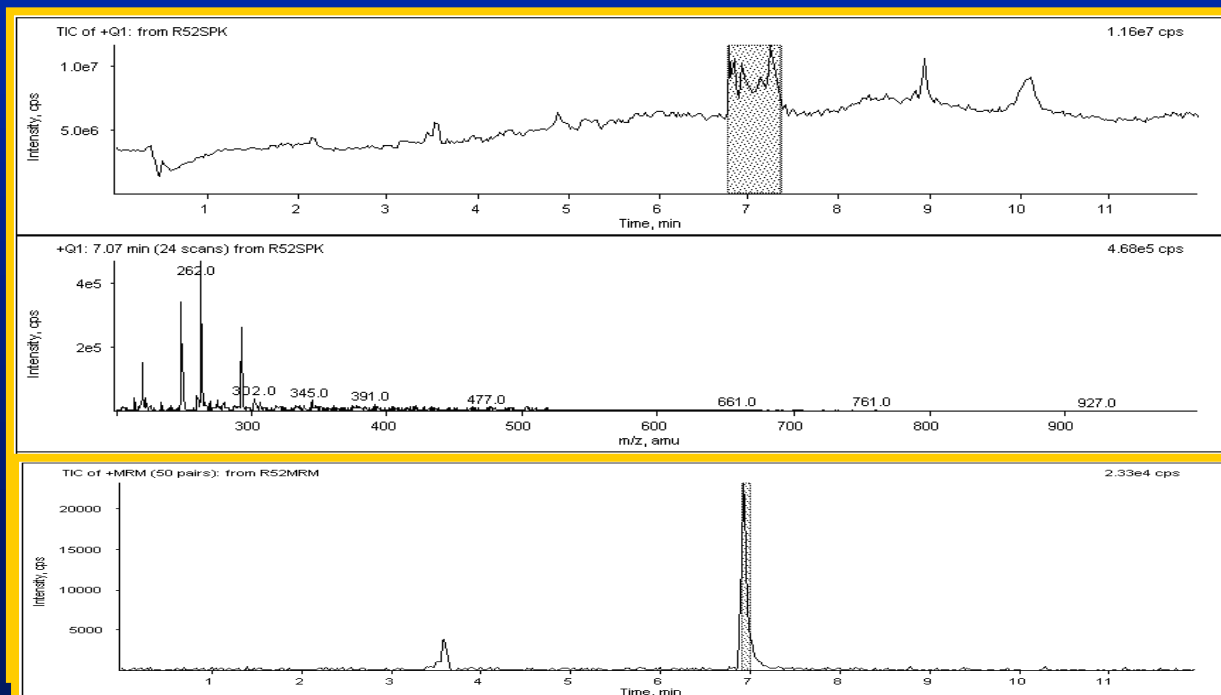


Prekurzor ion kiválasztása

fragmens ion kiválasztása

Szelektivitás növelése

multiple reaction
monitoring
MRM



Metabolitok szerkezetének meghatározása (kis mennyiségű anyagok vizsgálata)

Metabolitok keresése komplex keverékben

1. kis mennyiségek meghatározása (ng, pg)
2. Komplex mátrixban (plazma, agy, vizelet, széklet)

Keresés stratégiája:

1. **Metabolomika**: nagyszámú HPLC-MS kromatogram alapján (gyors screen, tájékoztató vizsgálat)
2. **Pontos szerkezetazonosítás** a vegyületcsalád kromatográfiás/MS viselkedése alapján (mintaelőkészítés, analitikai jellemzés)
3. A már **ismert szerkezetű metabolitok azonosítása** egyéb mátrixokban speciális HPLC-MS/MS technikák segítségével

Ismert szerkezetű metabolitok azonosítása

Kérdés: néhány mérésre elegendő, nagyon híg mintával
milyen mérések végezzünk?

Kompromisszum!

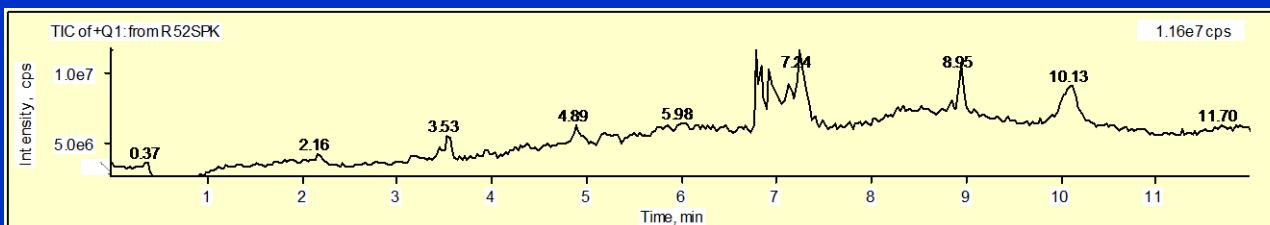
- **MRM monitorozás** (orifice fragmentációval)
- **normál spektrum** (eltérő szerkezetű anyagok keresése)



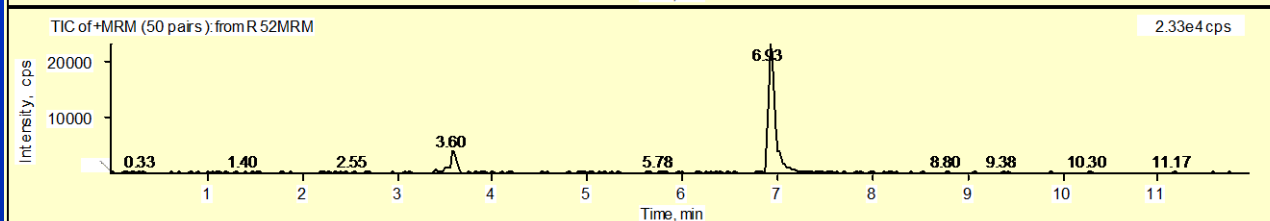
Erdeményektől függően további mérések:

- product ion scan
- precursor ion scan
- neutral loss

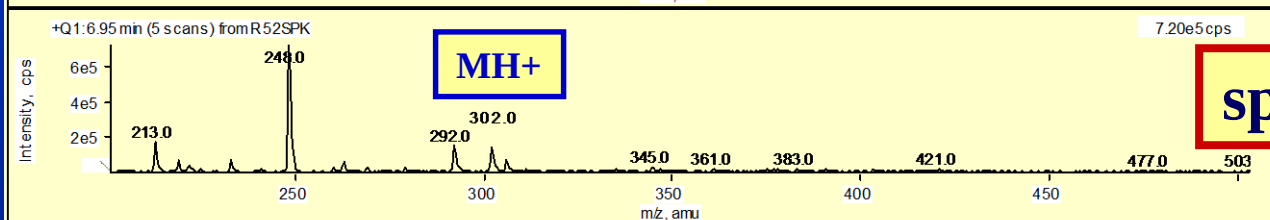
Metabolit azonosítása



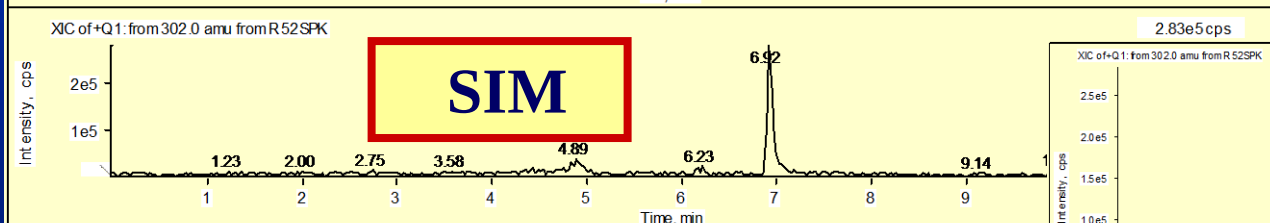
TIC



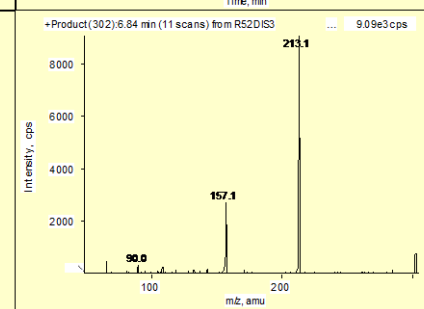
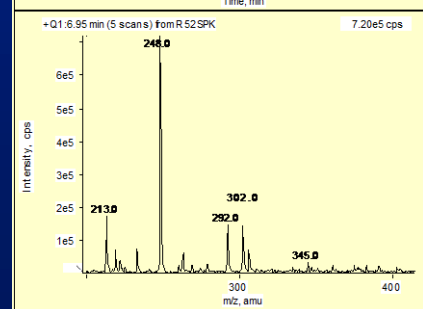
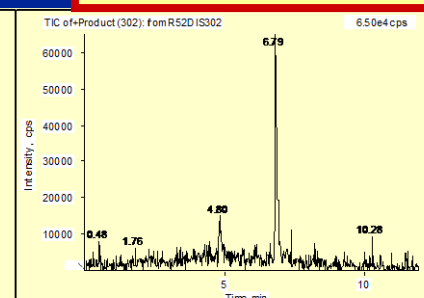
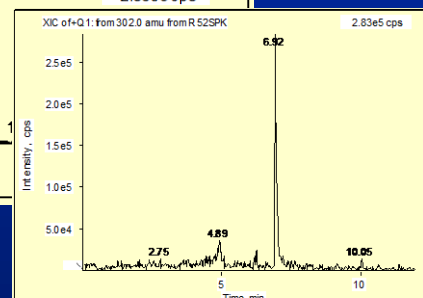
MRM



spektrum



Product ion scan



Mennyiségi meghatározás Validálás

Valid lat, jog érvényes, hatályos, hatályban lévő

(Bakos Ferenc: Idegen szavak és kifejezések szótára, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1986)

„A szabályos gyógyszergyártás, vagyis a cGMP elveivel összhangban végzett bizonyítási eljárás, amelynek segítségével dokumentáltan igazolható, hogy az adott folyamat, művelet, anyag, tevékenység vagy rendszer valóban eleget tesz az előírt kívánalmaknak.”

Fejlesztési, validálási szempontok

- **Célkomponens(ek)**, standard, belső standard
- **Analitikai módszer**
- **Validációs kategória** (hatóanyag-tartalom, bomlástermék, stb.)
- Határidők
- Validálási protokoll; harmonizálás a hatósági és céges protokollokkal, ha ez nem lehetséges az eltérés indoklása szükséges

Validálás

Teljesítmény-jellemzők	Elfogadási kritériumok
<i>Rendszeralkalmassági adatok</i> (QC=mg/ml)	Csúcsszimmetria faktor (T) Elméleti tányérszám (N) Retenciós tényező (k') Rendszerpontosság (RSD %):a rendszeralkalmassági oldat ötszöri injektálásának terület adatai
<i>Specifikusság, szelektivitás</i>	A mintaoldószer (alkalmazott segédanyag rendszer) ne adjon jelet a hatóanyag retenciós idejénél.
<i>Linearitás</i>	koncentráció tartomány (mg/ml) , $r^2 > 0,995$,
<i>Pontosság</i>	Napon belüli szórás (n=3 koncentráció) RSD% Napok közötti szórás (n=3 koncentráció, 6 napon keresztül) RSD%
<i>Torzítatlanság</i>	Napon belüli torzítatlanság (n=3 koncentráció) 98-102 % Napok közötti torzítatlanság (n=3 koncentráció, 6 napon keresztül) 98-102 %
<i>Oldatstabilitás</i>	Standard oldatok (mintaoldat törzsoldat):csúcsterületek RSD%
<i>Meghatározási határ (LLOQ)</i>	S/N=10:1
<i>Kimutatási határ (LOD)</i>	S/N=3:1
<i>Robosztusság</i>	áramlási sebesség $\pm$ ml/perc. szerves fázis mennyisége ± 1 % T, N, k' csúcsterületek (QC)

Extrakciós hatásfok

a vizsgált komponensre és a belső std.-re, definíció szerint

Type of analytical procedure	IDENTIFICATION	TESTING FOR IMPURITIES	ASSAY
characteristics		quantitat. limit	- dissolution (measurement only) - content/potency
Accuracy	-	+ -	+
Precision			
Repeatability	-	+ -	+
Interm.Precision	-	+ (1) -	+ (1)
Specificity (2)	+	+ +	+
Detection Limit	-	- (3) +	-
Quantitation Limit	-	+ -	-
Linearity	-	+ -	+
Range	-	+ -	+

- signifies that this characteristic is not normally evaluated

+ signifies that this characteristic is normally evaluated

(1) in cases where reproducibility (see glossary) has been performed, intermediate precision is not needed

(2) lack of specificity of one analytical procedure could be compensated by other supporting analytical procedure(s)

(3) may be needed in some cases

Ciprofloxacin-tej interakció vizsgálata in vitro kioldódás vizsgálattal

Kioldódás vizsgálat:

- Ciprinol® 500 mg filmtabletta
- forgólapátos kioldódásvizsgáló készülék

Kioldóközeg: pH = 1,2; 4,5; 6,8

Kioldó térfogat: 500 ml kioldóközeg+ 250 ml FDA pohár

Mintaelőkészítés: SPE

Analitika: LC/MS (C8 15 cm x 4,6 mm, 5 µm oszlop)

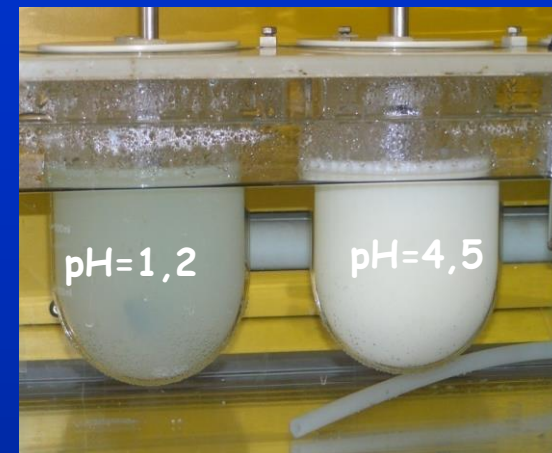
10 µl injektált térfogat

0,5 ml/perc áramlási sebesség

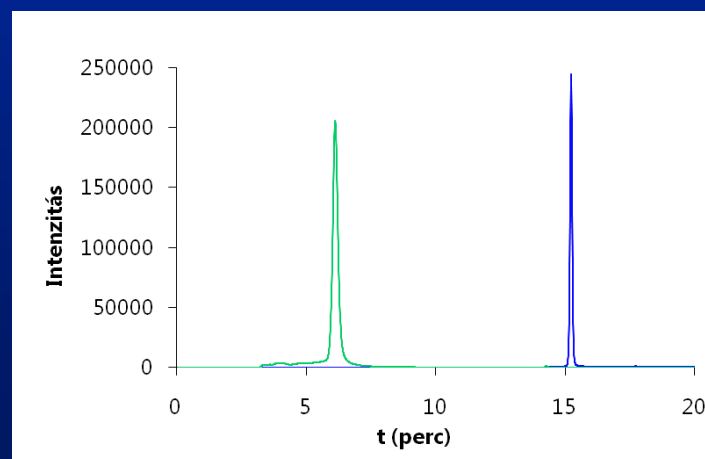
gradiens elúció: 0,02 M ammónium acetát (pH = 2,5)+ACN

elektrospray ionizáció (ESI+)

SIM CPMX (MH=332,1), Bst - Aripiprazol (MH=448,1)



Idő (perc)	A %	B %
0-8,0	80	20
8,0-8,2	40	60
8,2-17,0	40	60
17,0-23,0	80	20



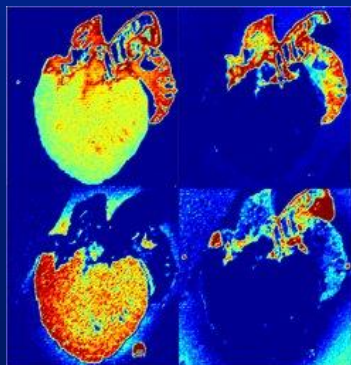
Új trendek: automatizálás és nagy- áteresztőképesség



Cél: Gyorsított (gyógyszer) fejlesztés

Jelen és a jövő:

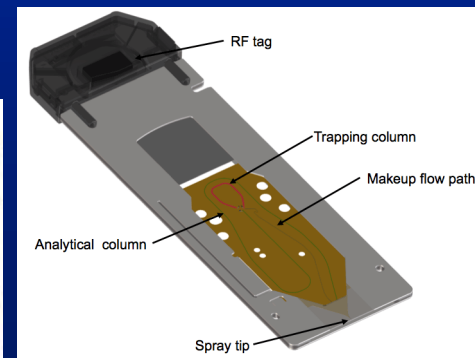
- **Mintaelőkészítés** – egyszerű, robotizált
- **Készülék control** – egyszerű és automatikus
- **Analízisidő** – rövid (kromatográfia!), multidimenziós analízis
- **Adatfeldolgozás** – automatikus számítógépes?, adatbázisok?
- **Miniatürizálás: 'chip' technológia** (-Lab-on-a-chip" kémiai reakciók, mintaelőkészítés, elválasztás és frakcionálás egy mikrochipen)
- **Screening**: metabolomika, proteomika
- **Információ menedzsment**



Prof. R.M.A. Heeren, AMOLF



www.advion.com



Agilent Technologies Inc.

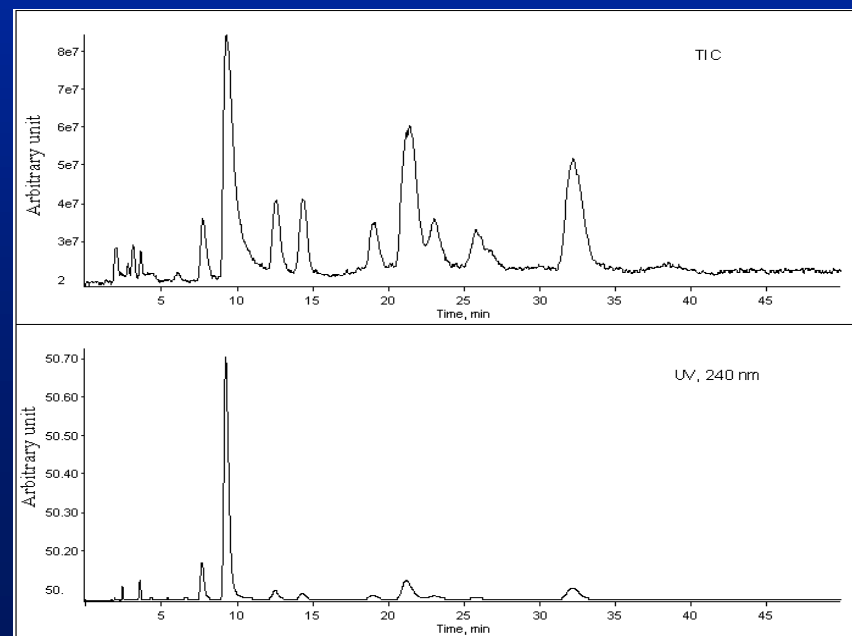
Problémák, tévhitek



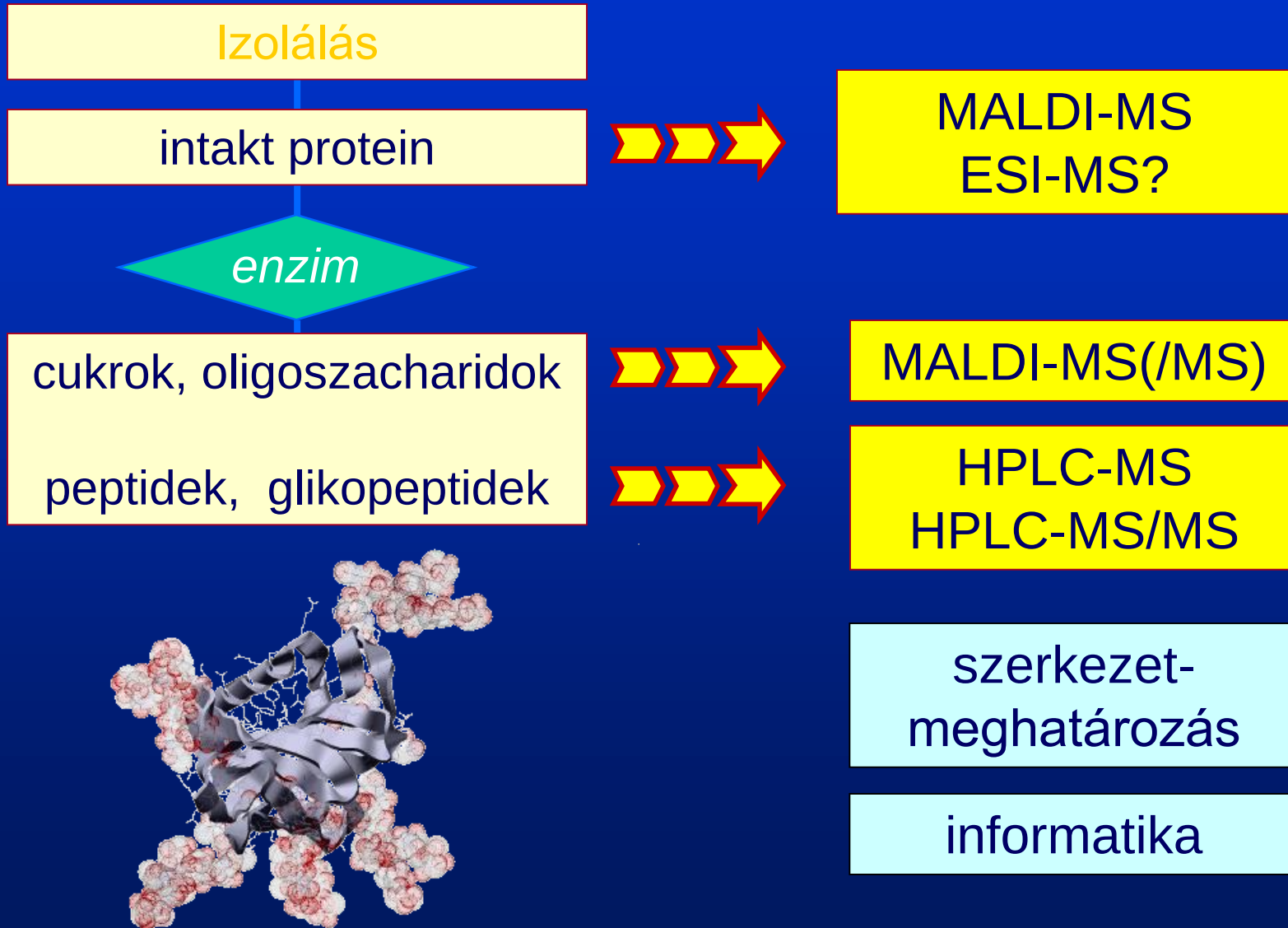
- NEM minden anyag detektálható az MS-ben!
- Jelintenzitás arányos a koncentrációval, de különböző típusú anyagok esetén nagyságrendi különbségek lehetnek (pl. 100 pg peptid vs. 1 μ g oligoszacharid ad azonos intenzitású jelet)
- ✗ Olyan egyszerű, mint a FID vagy UV
- ✗ Nem szükséges érteni hozzá a számítógép mindent megcsinál
- ✗ MS bármilyen kromatográfiás körülményekkel használható

HPLC-MS vs. HPLC-UV

- MS: felbontás lehet rosszabb
- MS: jobb érzékenység, különösen ionkromatogramokat vizsgálva
- UV és MS: eltérő érzékenység

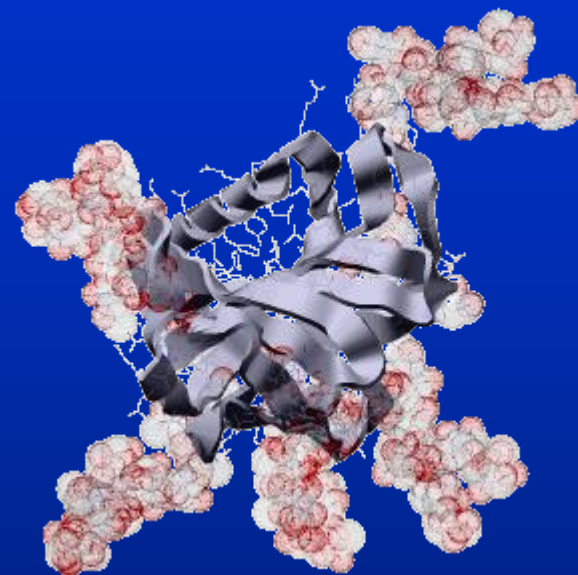


Glikoproteinek vizsgálata



AGP – tumor marker glikoprotein

- alpha-1-savas glikoprotein (több gén kódolja, N-glikozileződés, 5 helyen "komplex" antennáris szerkezet)

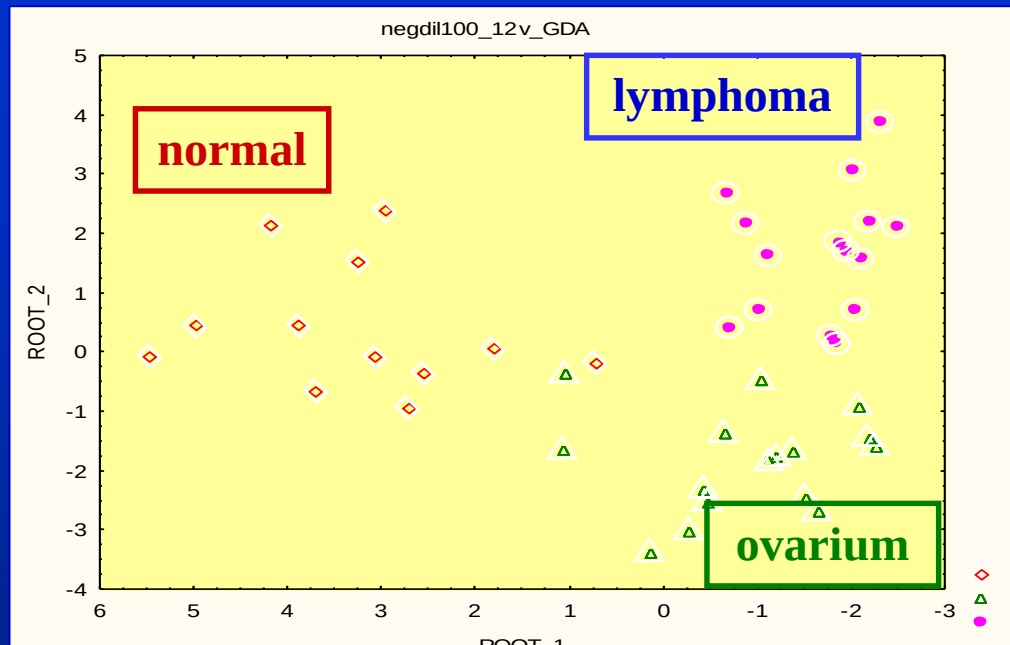
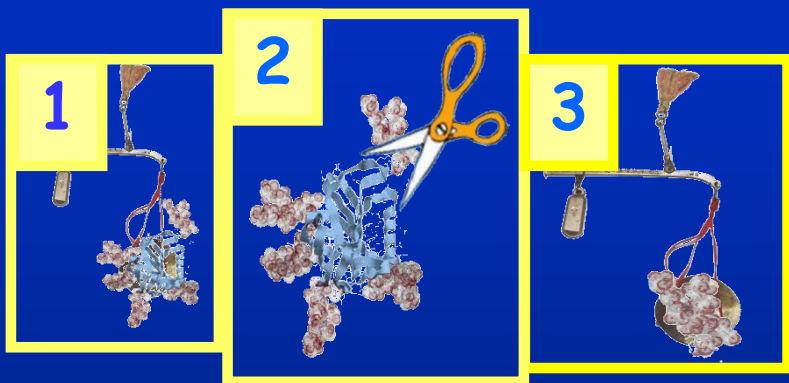


- szérumfehérje
- változatos biológiai funkció
- igen heterogén szerkezet
- potenciális onkomarker

**egészséges és rákos
esetek összehasonlítása**

MALDI: oligoszaccharid szerkezetek

~ 40 különböző cukor szekvencia



**Csúcs-
Intenzitások
értékelése**

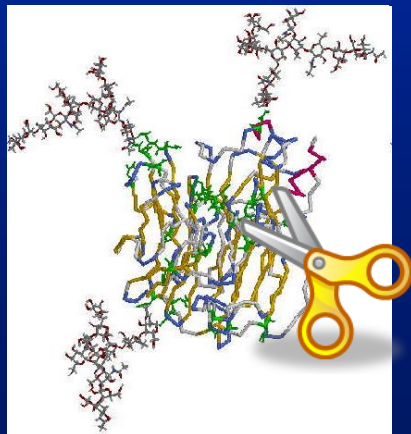
4

kemometria



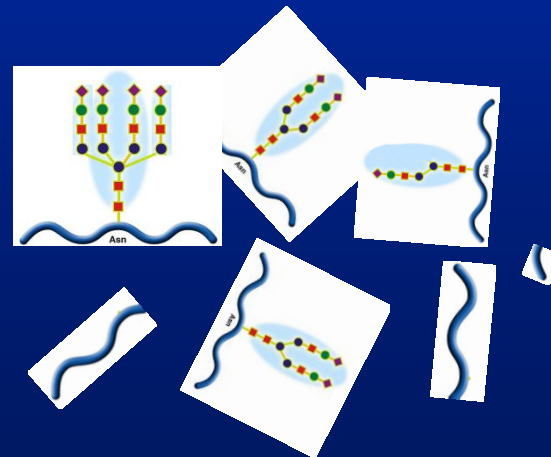
Tripszines emésztés

- Glikoprotein → glikopeptidek ill. peptidek
- Glikopeptidek peptid szekvenciájának azonosításával: **helyspecifikus glikoziláció**
- **Protokoll:**
 - Redukálás, alkilálás, emésztés tripszinnel + 2x1 perc mikrohullám (glikoproteineknél jobb emésztés)



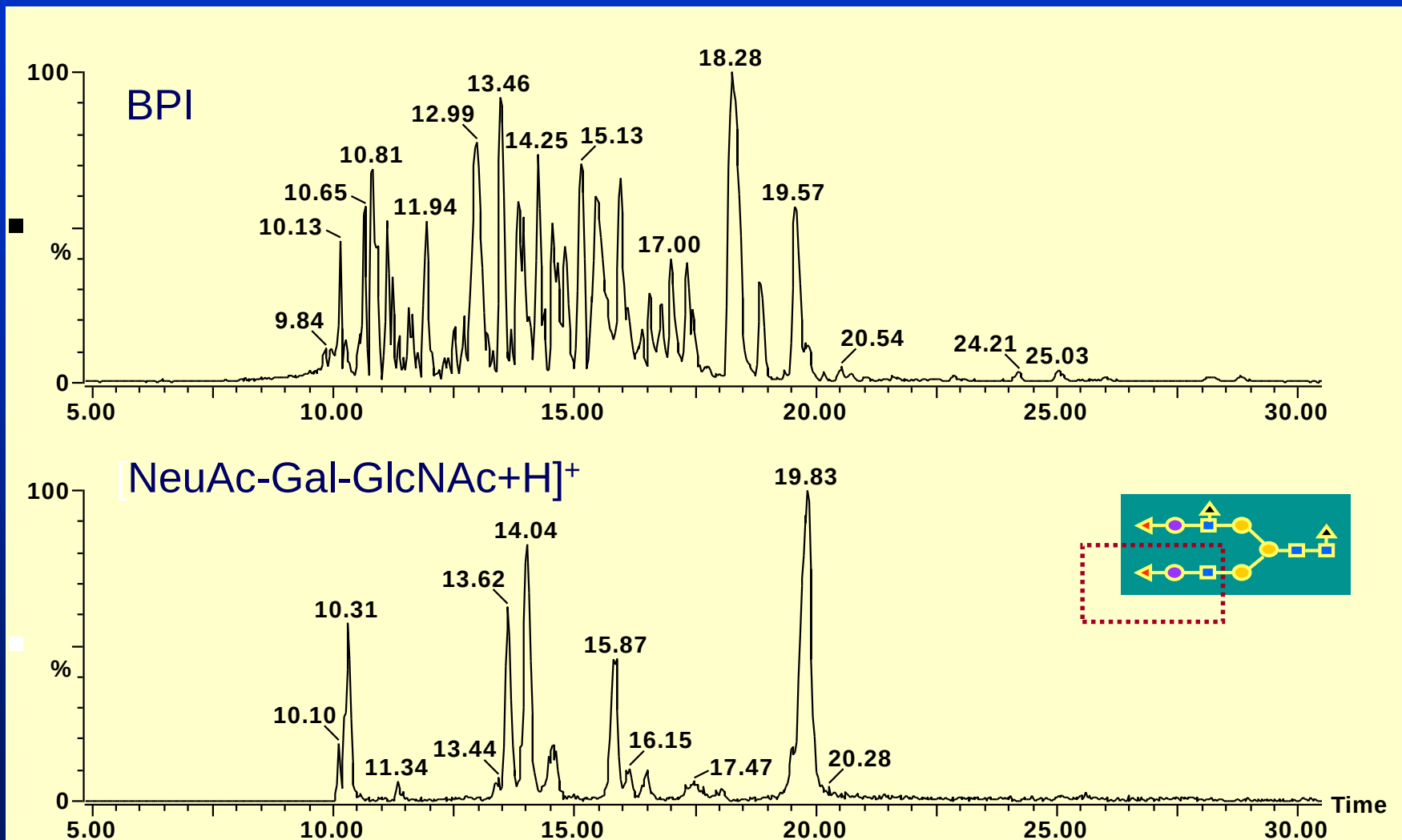
glikoprotein

emésztés



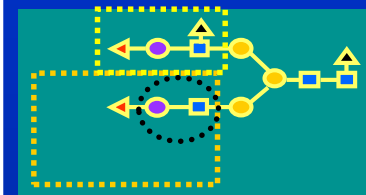
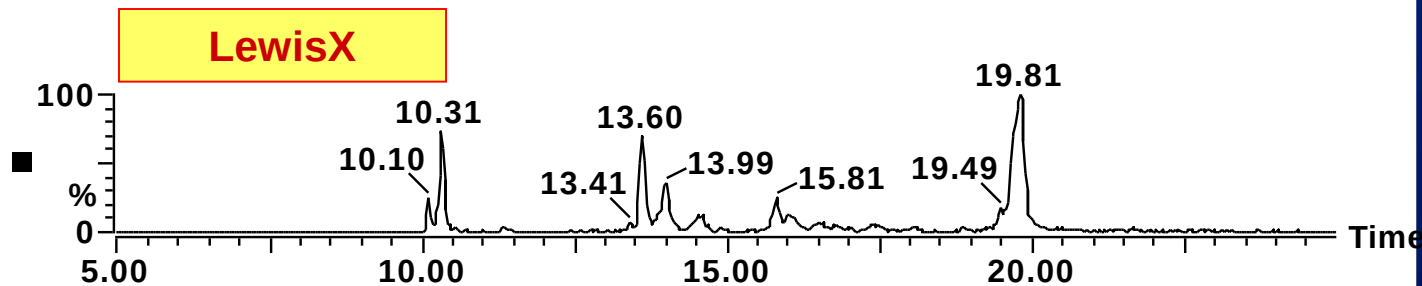
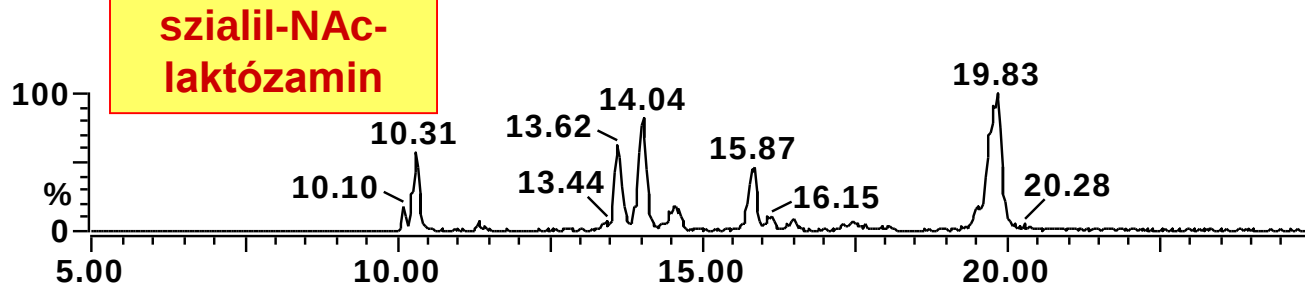
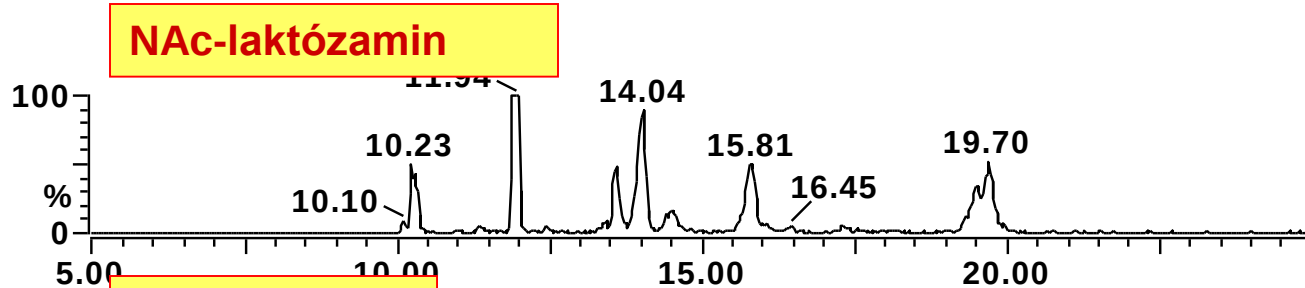
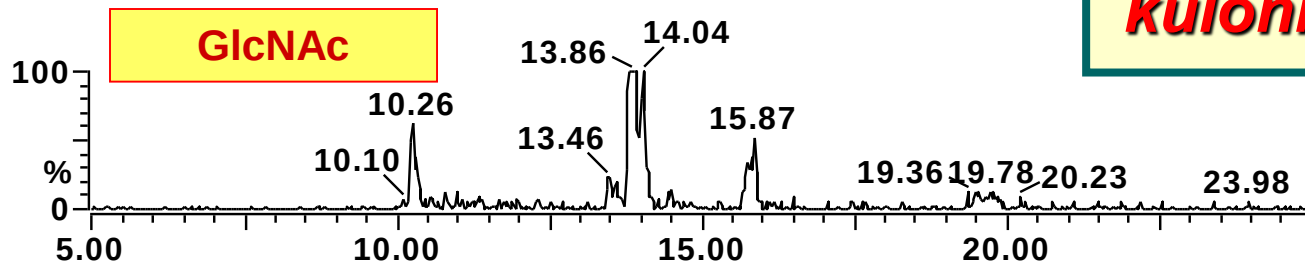
peptidek, glikopeptidek

AGP emésztmény: ionkromatogram



AGP emésztmény: ionkromatogramok

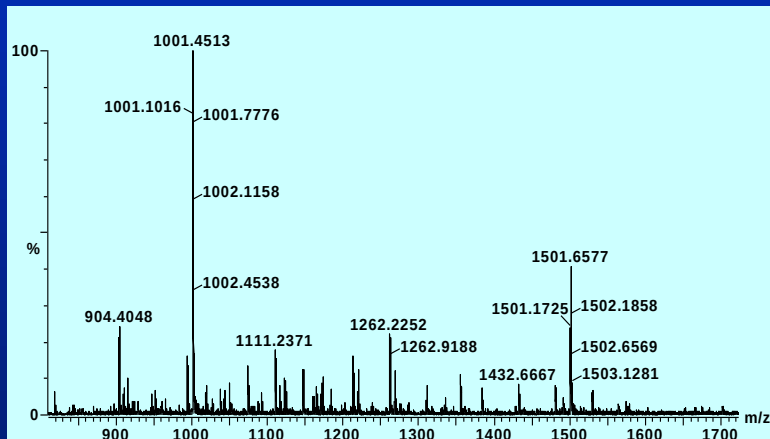
különböző cukrok



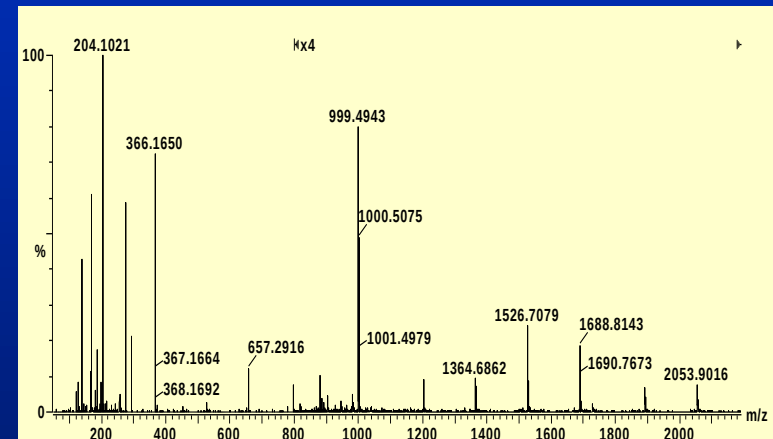
Glikopeptidek szerkezetének meghatározása

- Szerkezetazonosításhoz **tandem tömegspektrum** szükséges, de melyik tömegről?
- Jellegzetes **cukor fragmentek** figyelésével, a glikopeptidek MS/MS spektrumának felvétele automatizálható

10.23 percnél eluálódó csúcs tömegspektruma



[1001]3+ glikopeptid MS/MS spektruma

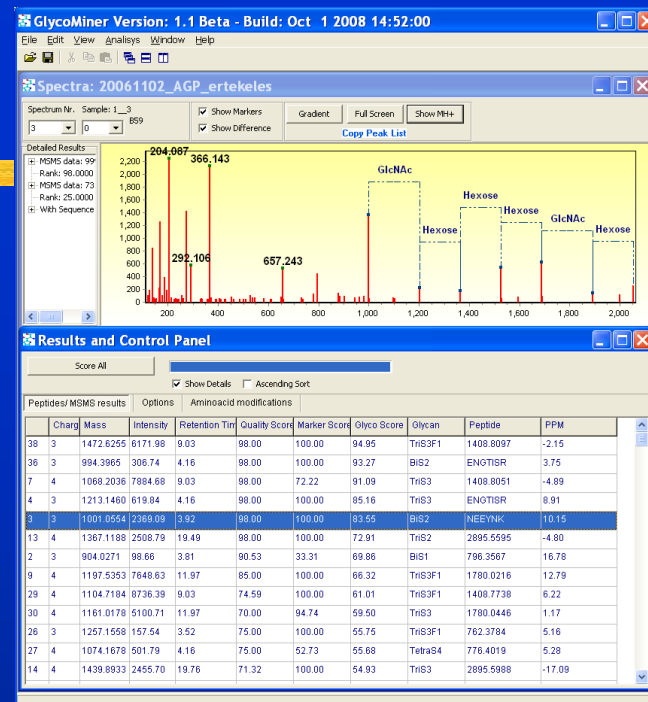


- Probléma: peptidfragmensek nem láthatók
- A proteomikában használt adatbáziskeresők (MASCOT, PLGS) nem tudják a glikopeptidek MS/MS spektrumát értékelni
- Ha ismerjük a peptid szekvenciáját (tömegét) a cukorrész azonosítható. Ha nem ismerjük??? Algoritmus!!!

GlycoMiner – Dr. Ozohanics Olivér, Dr. Drahos László

- Új algoritmus és számítógépes program:
 - Glikopeptidekre jellemző spektrumok felismerése
 - N-glikopeptidek szerkezetazonosítása (aminosav- és szacharid összetétel)
 - Alacsony ál-pozitív/negatív arányok (0.1%)

w3.chemres.hu/ms/glycominer



Spectrum Nr.	Charge	Mass	Intensity	Retention Time	Quality Score	Marker Score	Glyco Score	Glycan	Peptide	PPM
38	3	1472.626	6172	9.03	98.00	100.00	94.95	TriS3F1	LVPVPITNATLDR	-2.15
							93.27	BiS2	ENGTVSR	3.75
							91.09	TriS3	LVPVPITNATLDR	-4.89
							85.16	TriS3	ENGTVSR	8.91
							83.55	TriS2	EEYNNK	10.15
							66.32	TriS3F1	1780.0216	12.79
							63.08	TetraS4	ENGTVSR	7.04
							61.76	TriS3F1	1780.0216	5.17
							61.01	TriS3F1	LVPVPITNATLDR	6.22
							59.5	TriS3	1780.0446	1.17
							54.93	TriS3	SVQEIQATFFYFTPKNKTEDTIFLR	-17.09
							53.38	TetraS4F1	ENGTVSR	
							48.42	BiS2	1780.0446	-0.09
							46.96	TriS3F1	2125.1633	-16.84
							42.22	TetraS3F1	SVQEIQATFFYFTPKNKTEDTIFLR	-2.62
							29.35	BiS2	2125.1633	-28.15
42	4	1567.691	2205	19.49	55.00	100.00				
31	4	1083.224	843	12.96	48.10	43.94				