

# Tandemová hmotnostní spektrometrie v klinické biochemii



D. Friedecký, T. Adam

LDMP, OKB, FN a UP Olomouc

# Historie MS v analýze biologických materiálů

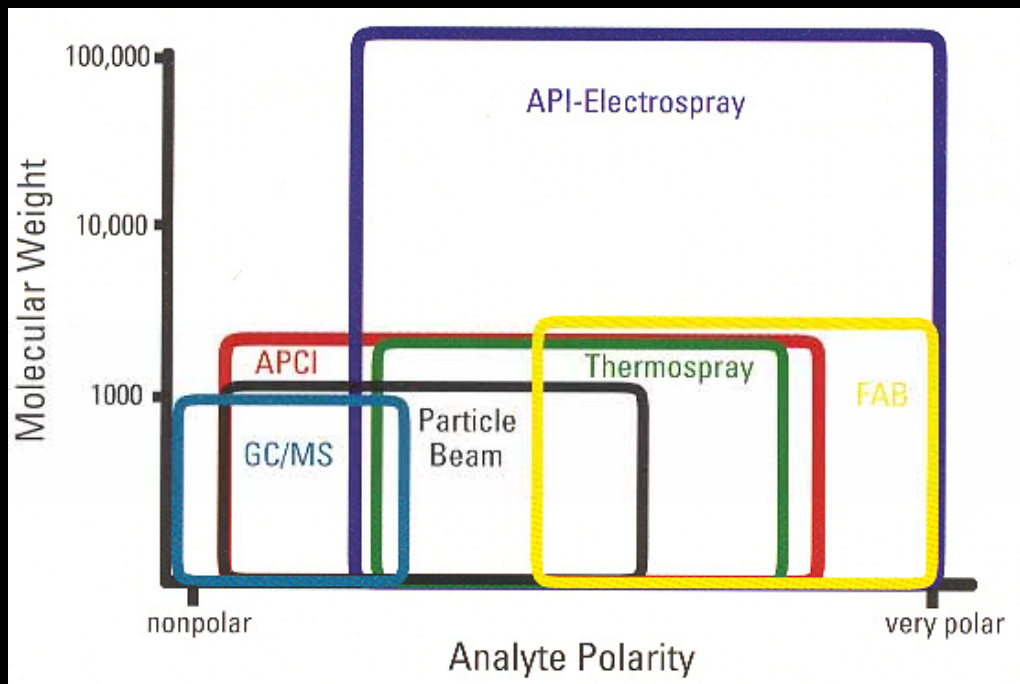
1970 – GC-MS (EI)

1980 – LC-MS (API)

1990 – OK, FIA-MS/MS - NS

2000 – TDM, NS

2009 – ???



=> nízko/vysoko Mr – identifikace/kvantifikace – ne/polární/iontové

=> Q, QqQ, QqTrap, IT, QqTOF, TOF/TOF, FT-ICR, sektory...

=> GC, HPLC, UPLC, 2D-HPLC, IEC, GPC, ITP, CE, MEKC, MALDI, FIA

## Výhody QqQ

- Vysoká specificita ve spojení se separační technikou
- Široký rozsah analytů/markerů (neomezený na volatilní látky)
- Flexibilita při zavádění nových metod (in-house v krátkém čase)
- Informačně bohatá detekce (vhodné pro multianalytové metody)
- Vysoký průstup vzorků

## Nevýhody QqQ

- Příprava vzorků – deproteinace, odsolení, přečištění
- Volba IS pro přesnou a správnou kvantifikaci
  - => potlačení iontové supprese
  - => Vyloučení interferencí se stejnou hmotou prekurzoru a produktu

Požadavek na personál

# Přístroje QqQ

Výrobci: MDS-Sciex, Thermo-Fischer, Waters // Agilent, Varian, GSG

Komponenty:

analyzátor	3 – 10 MKč
vakuová pumpa	
zdroj dusíku (průtoky, bezolejový)	0.3 – 0.5 MKč
separační systém (HPLC/UPLC)	0.5 – 1.5 MKč
UPS, klimatizace, odvod tox. par	0.2 – 0.5 MKč

Životnost: ~ 10 let

Obsluha: sofistikovaný systém – vyškolený VŠ + LAB

Servis: 1 - 2 %  
kontrakt < 48 h => 5 - 10 % / rok => záložní stroj???

# Aplikace QqQ v klinické biochemii - dnes

Novorozenecký screening dědičných metabolických poruch

- aminokyseliny, acylované karnitiny

Terapeutické monitorování léků

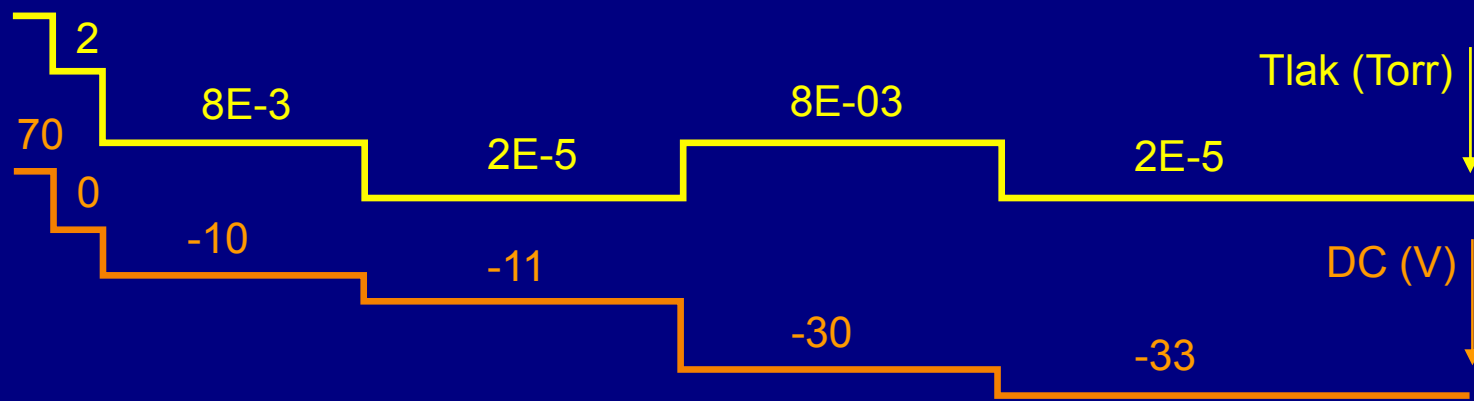
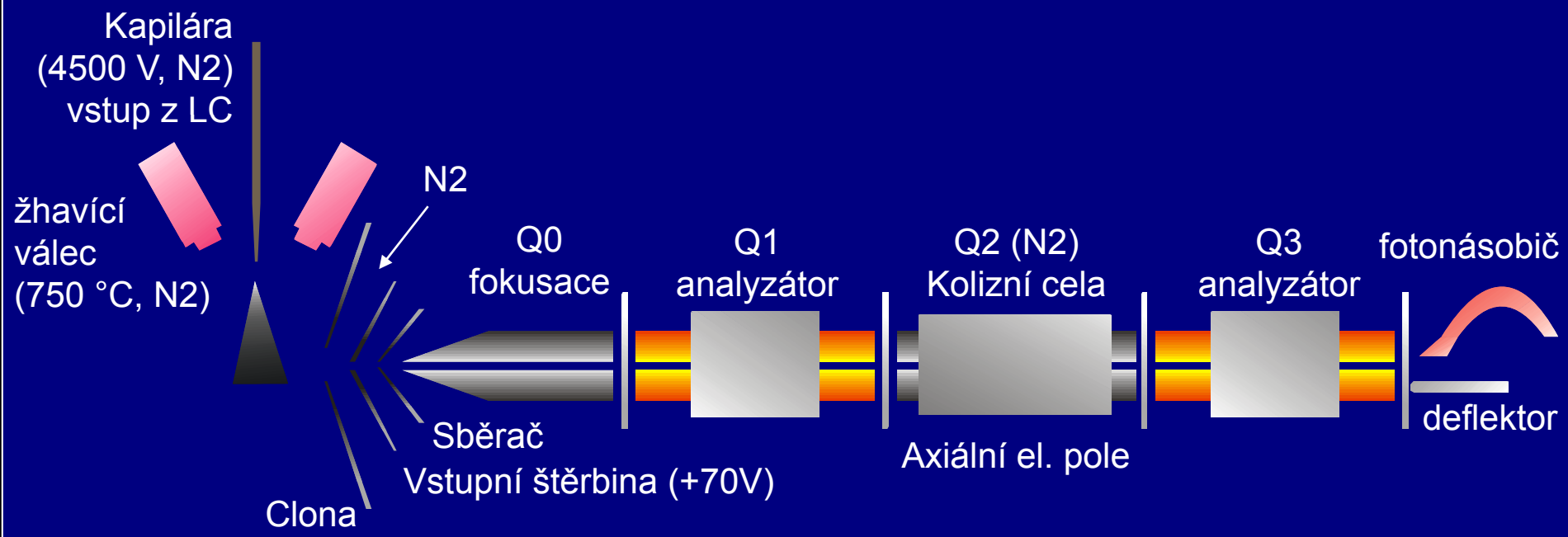
- imunosupresiva, antipsychotika, antikonvulsiva, kancerostatika

Toxikologie

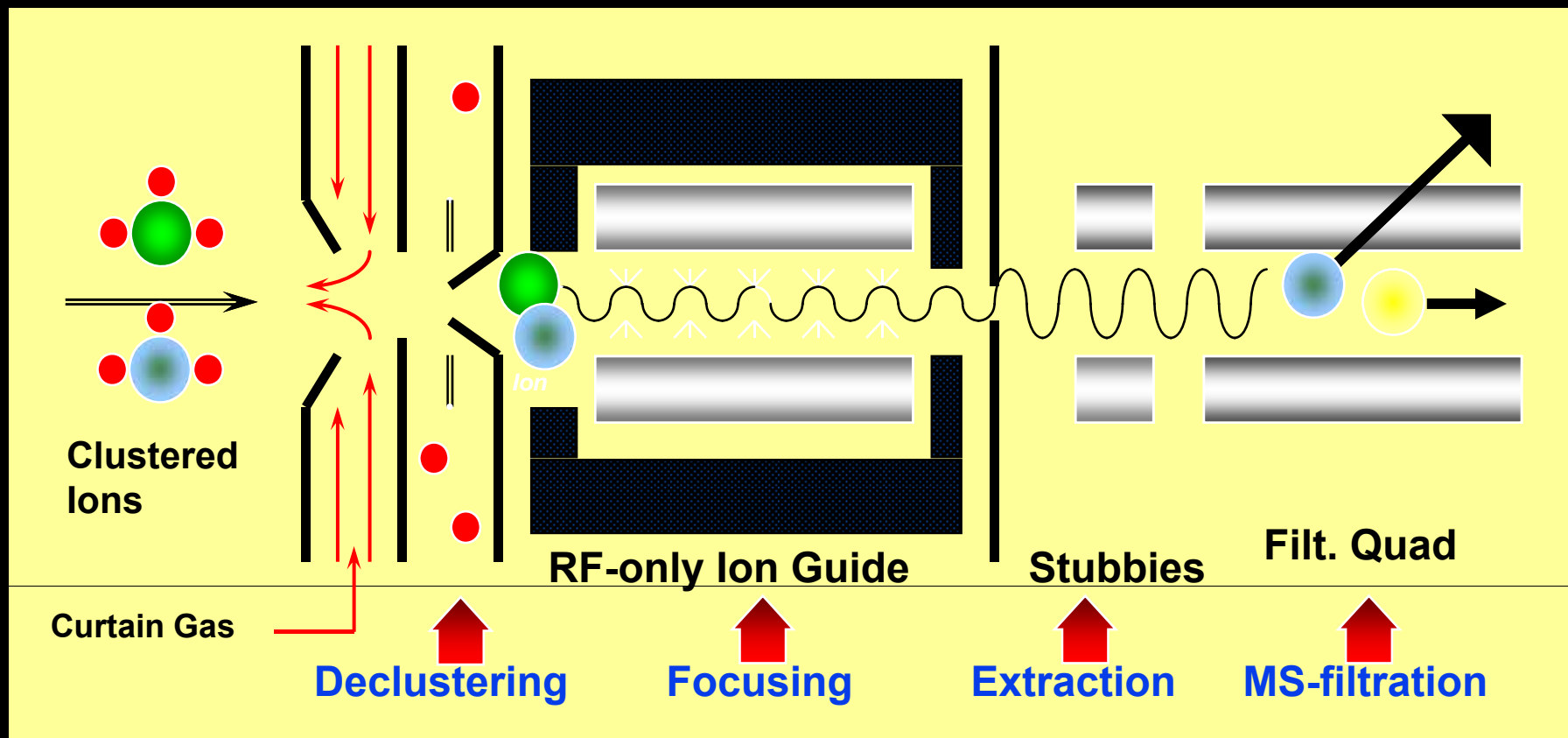
- zneužívané léky, drogy

Endokrinologie

**PRINCIP QqQ**

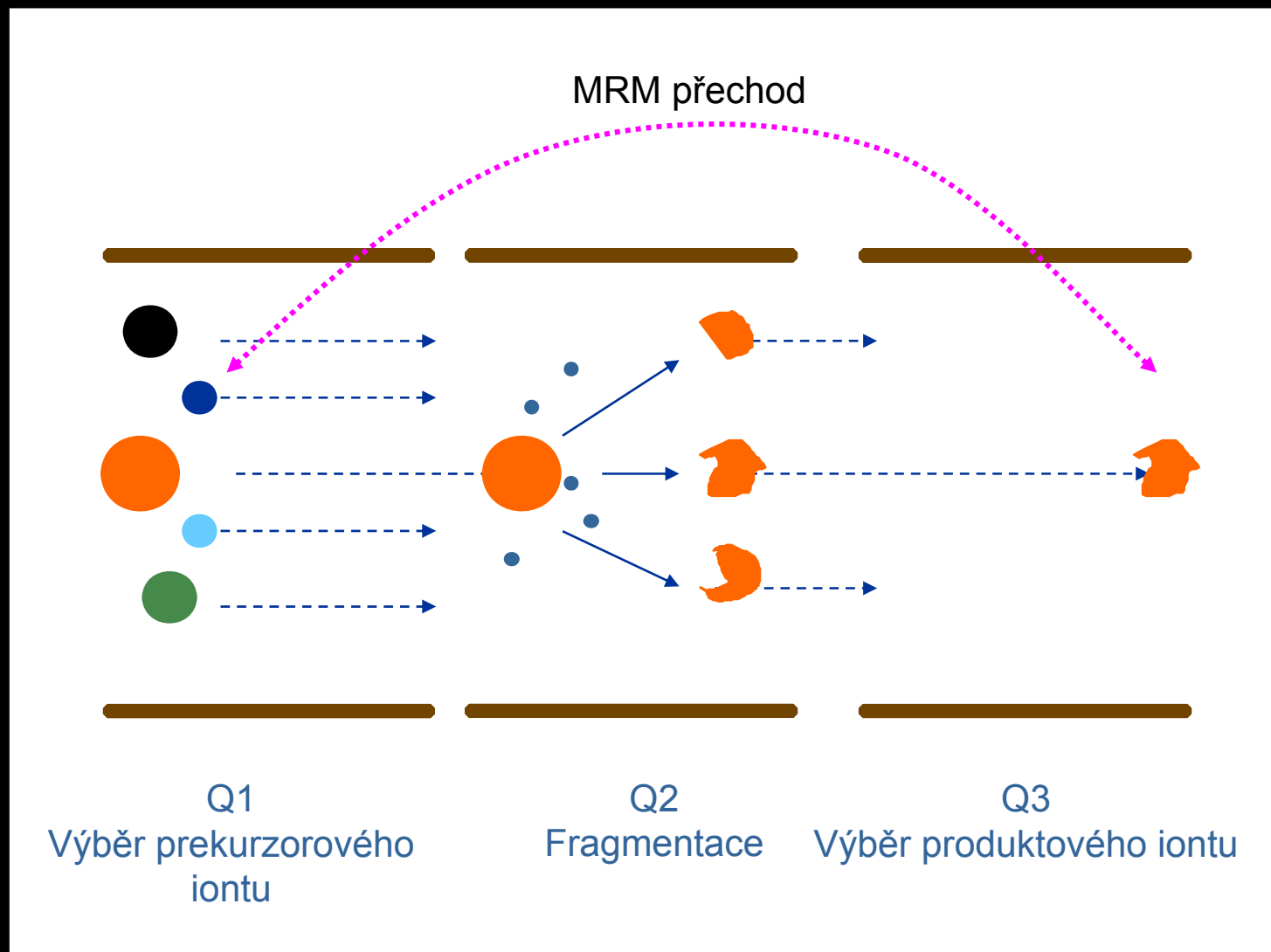


# Princip QqQ - pohyb iontů





# Princip QqQ – MRM = multiple-reaction monitoring



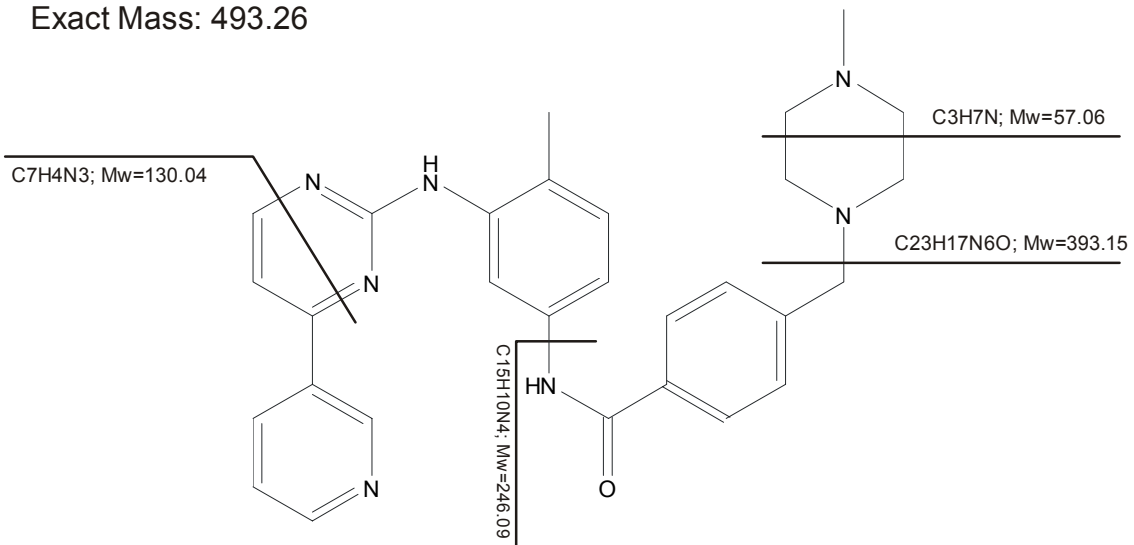
Precursor ion scan, Product ion scan, Neutral loss

# Princip QqQ - animace

**APLIKACE QqQ  
V KLINICKÉ BIOCHEMII**

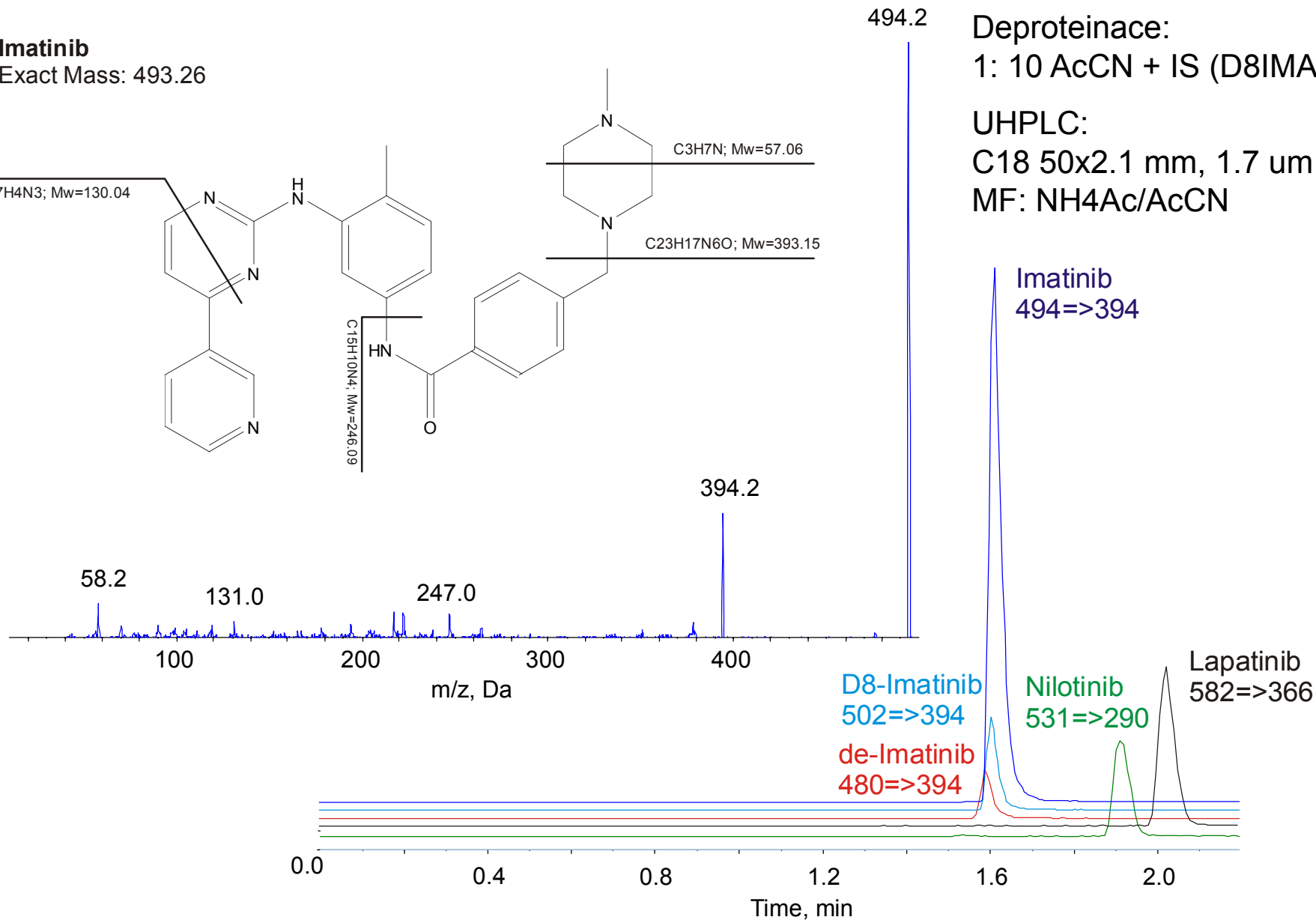
# TDM – tyrosinkinázové inhibitory v plasmě

**Imatinib**  
Exact Mass: 493.26



Deproteinace:  
1: 10 AcCN + IS (D8IMA)

UHPLC:  
C18 50x2.1 mm, 1.7  $\mu$ m  
MF: NH4Ac/AcCN

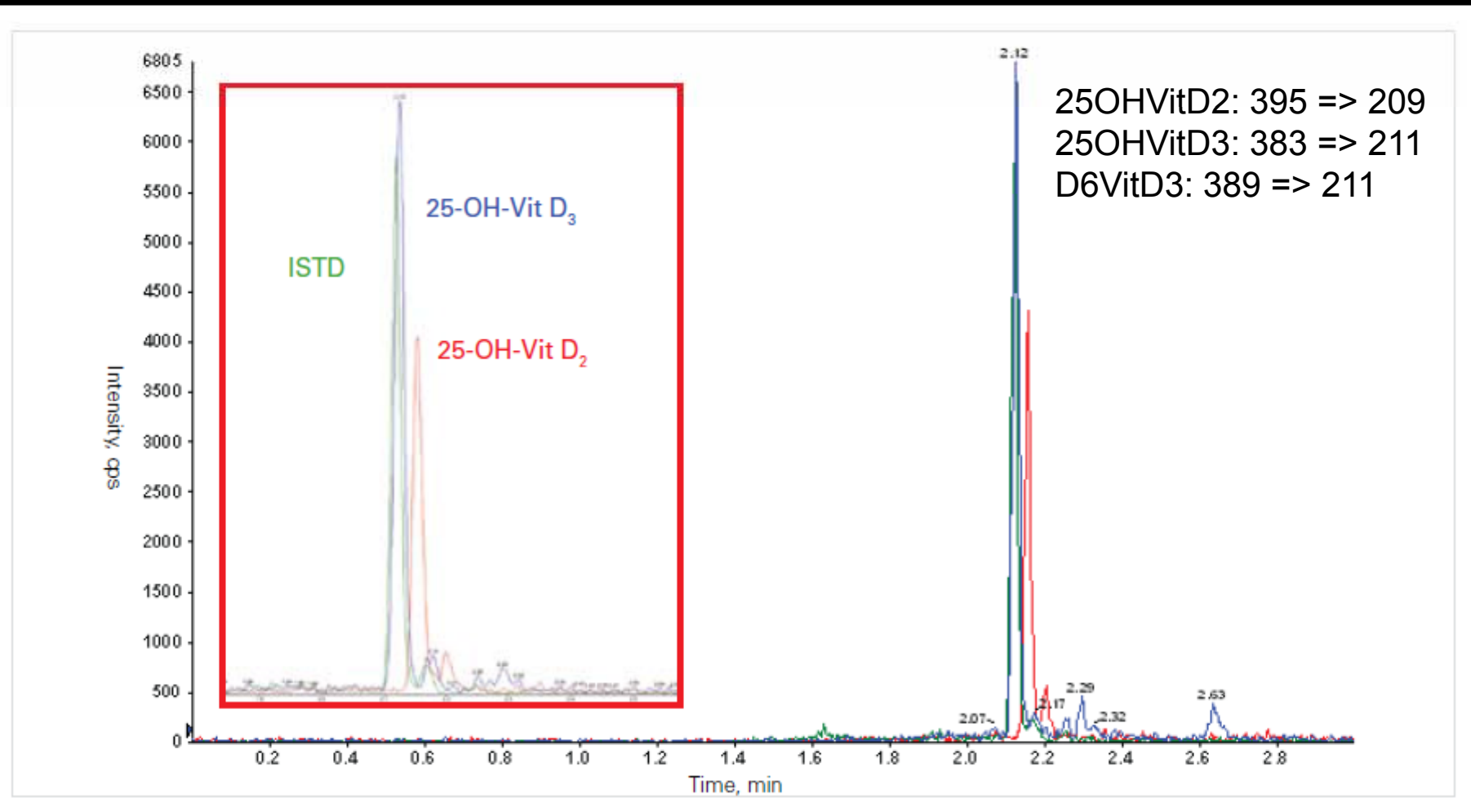


# 25-OH-Vitamin D2 a 25-OH-Vitamin D3 v séru

Deproteinace: AcCN + IS

HPLC: C8 50 x 2.1 mm, 5  $\mu$ m; MF: 0.1% FA/MeOH, 45°C, 0.7ml/L

c = 10 ng/ml (LOQ: 1ng/ml)

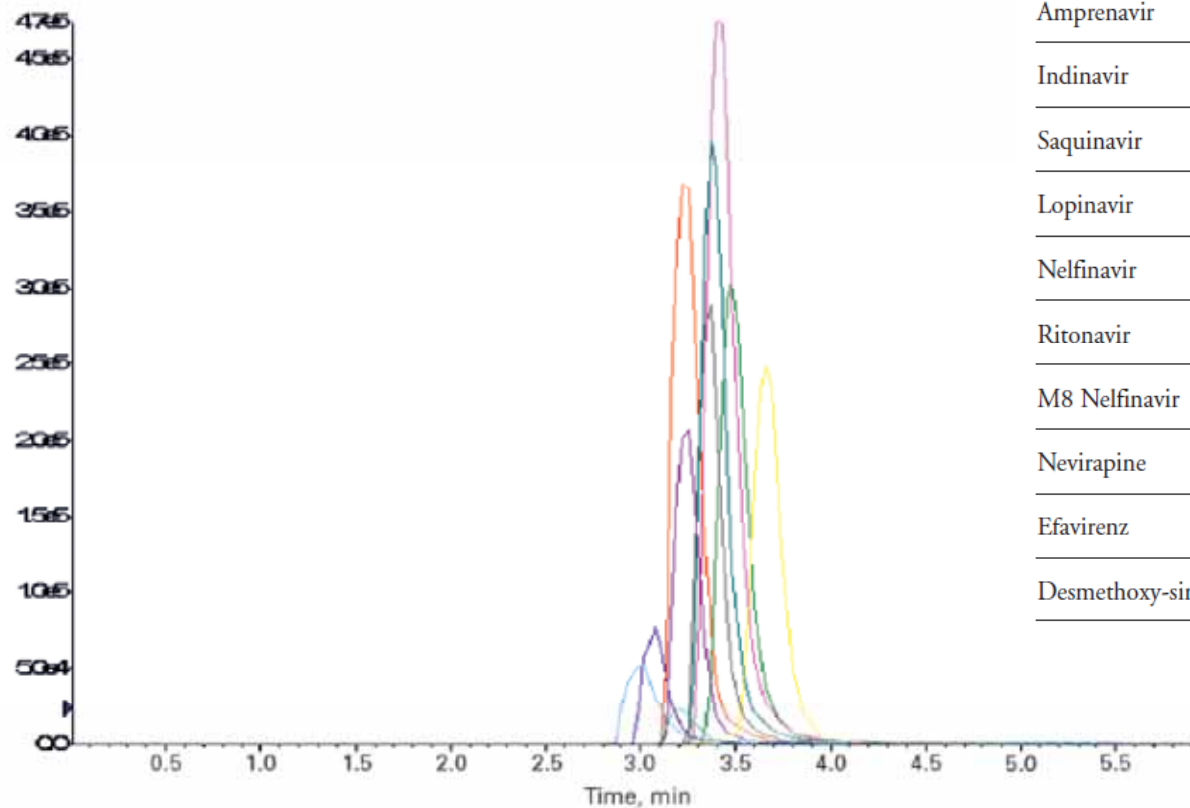


# Antiretrovirotika v séru

Deproteinace: AcCN + IS

2D-HPLC: Poros R1/20 30 x 2.1 mm – C18 Phenyl-Hexyl, 50 x 2.1 mm, 5µm

MS: QqQ - MRM



Amprenavir	506.3/245.1
Indinavir	614.3/421.3
Saquinavir	671.5/570.2
Lopinavir	629.3/447.1
Nelfinavir	568.3/330.4
Ritonavir	721.2/296.2
M8 Nelfinavir	584.1/330.1
Nevirapine	267.1/226.1
Efavirenz	316.1/244.1
Desmethoxy-sirolimus	901.5/816.6 (IS)

# Imunosupresiva

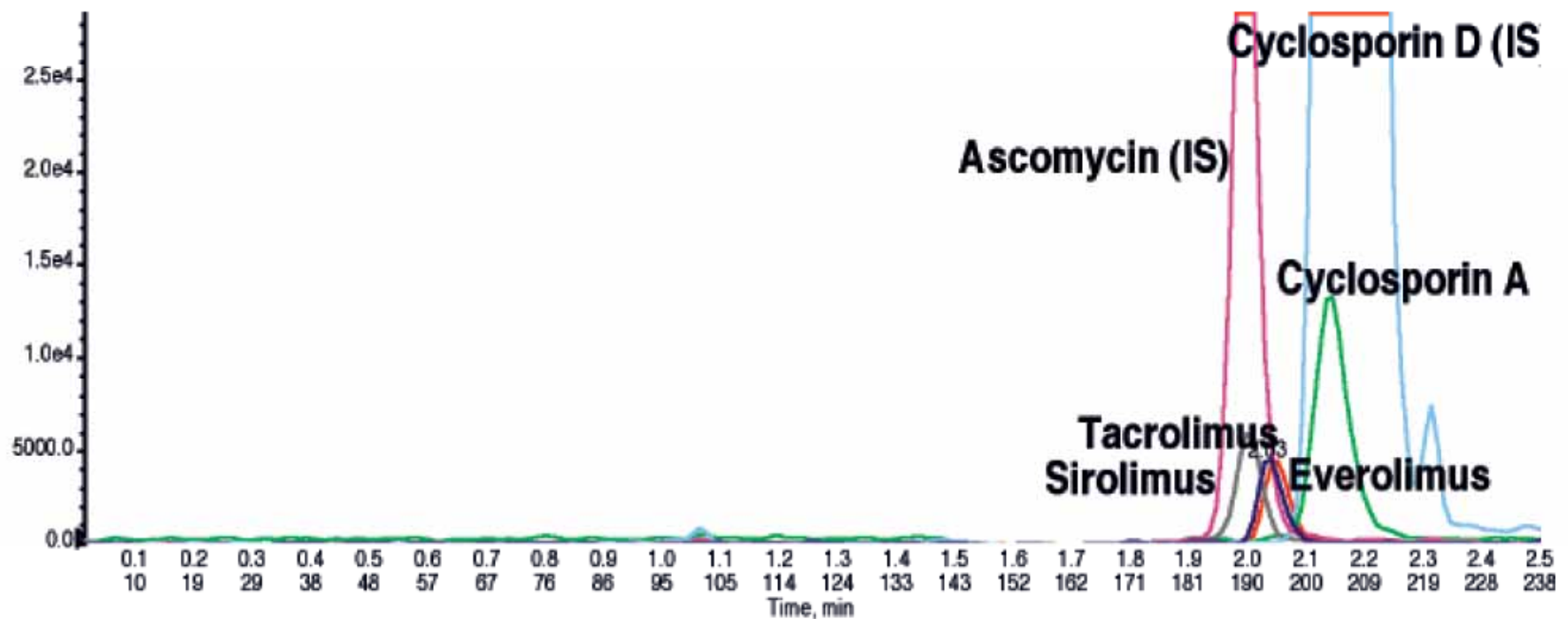
Deproteinace: 80% MeOH + 1% ZnSO<sub>4</sub> + IS

2D-HPLC: Poros R1/20 30 x 2.1 mm – C18 Phenyl-Hexyl, 50 x 2.1 mm, 5µm

MS: QqQ - MRM

■ XIC of +MRM (14 pairs): 931.6/864.8 amu from Sample 10 (E2) of Calibration in Matrix.wiff (Turbo Spray), Smoothed, Smoothed

Max. 4570.3 cps.



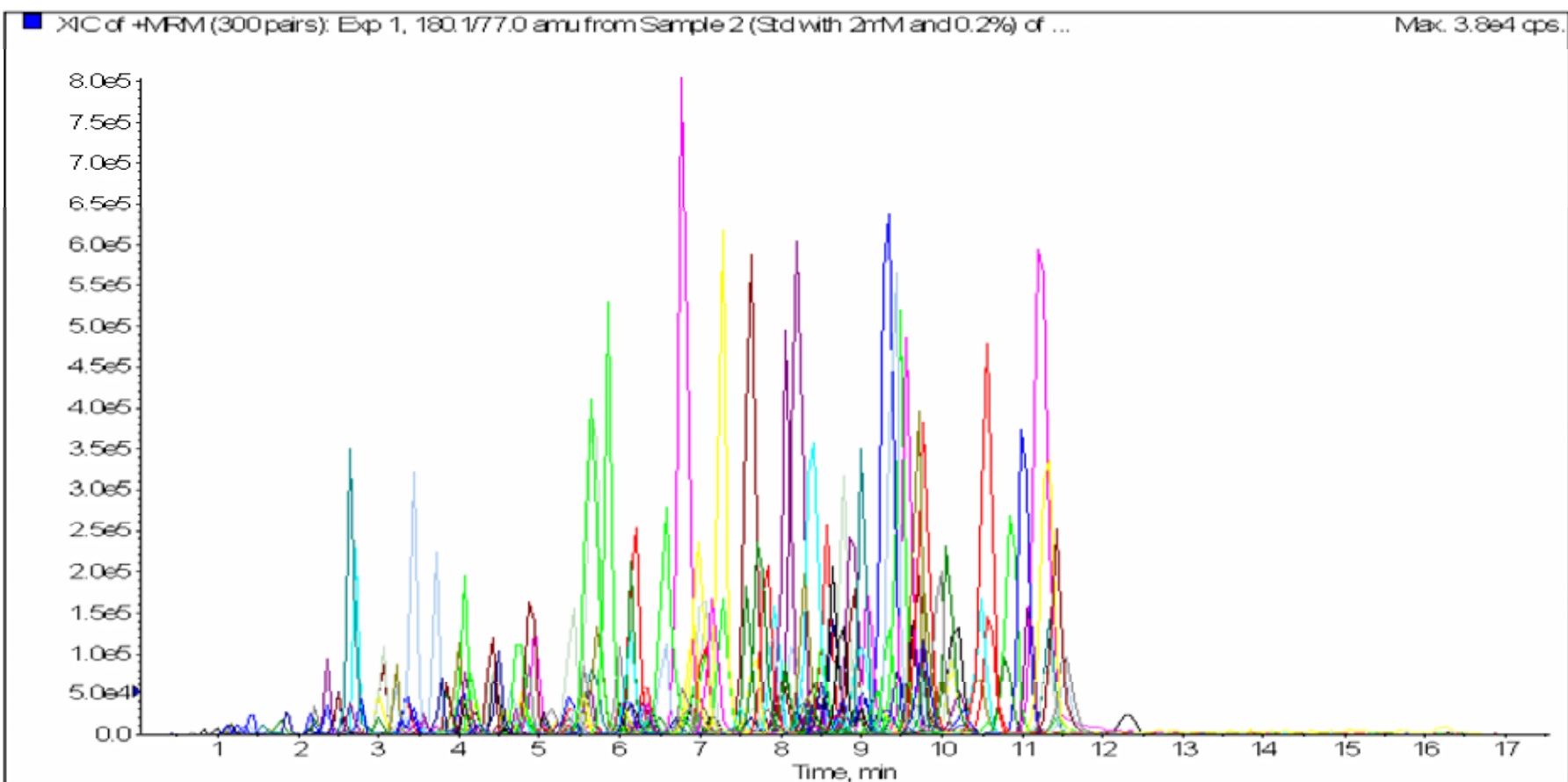
# Toxikologická analýza zneužívaných léků a drog

SPE: Chromabond® Macherey-Nagel

HPLC: PFP Propyl Column, 50 x 2.1 mm, 5 $\mu$ m

MS: QqQ – MRM => QqQtrap - konfirmace MS spektrem

300 => 700 => 1250 analytů



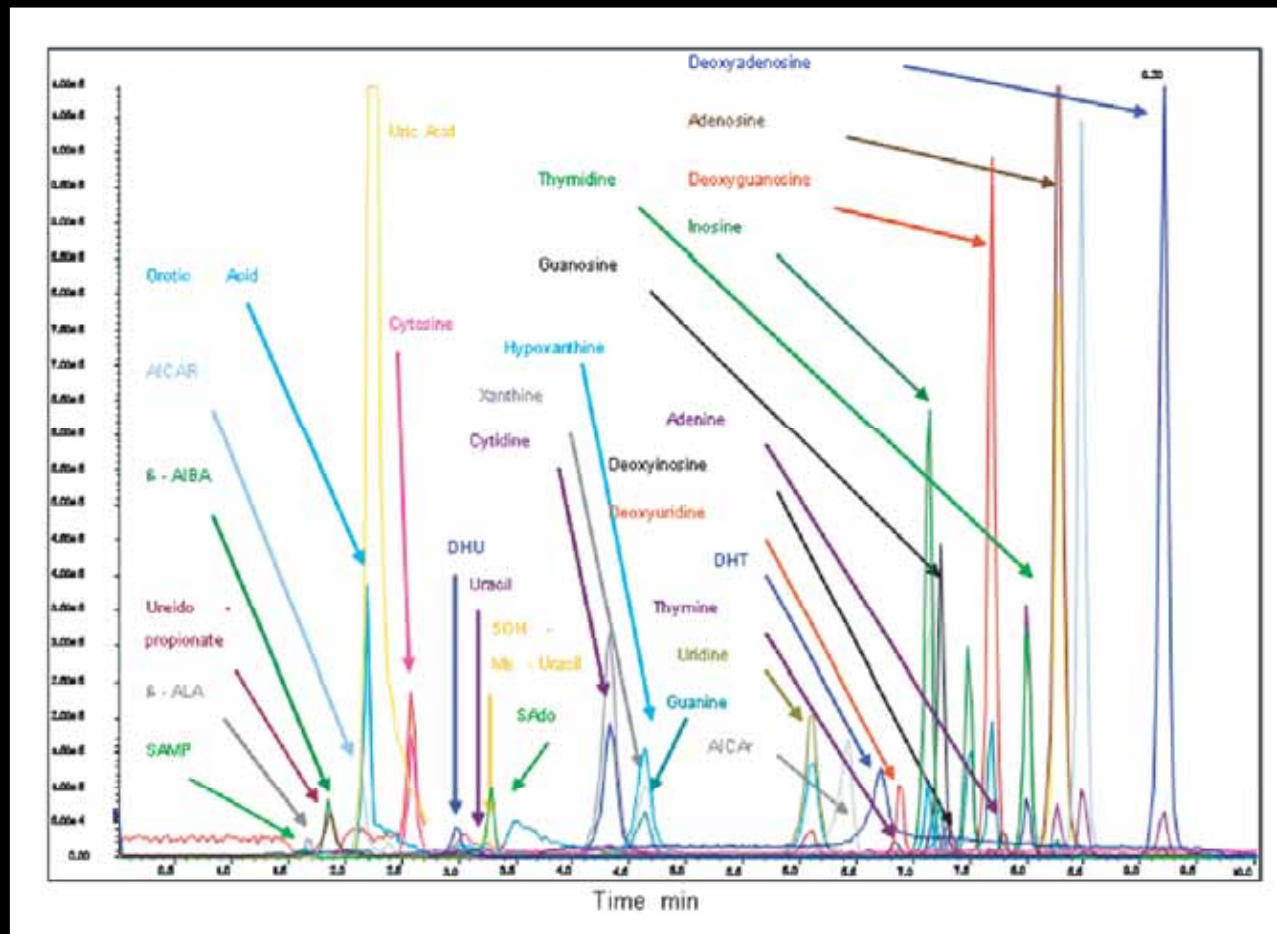


# Analýza purinů a pyrimidinů (bází a ribosidů)

HPLC: Phenomenex Luna C18, 150 x 3.0 mm, 5 μm, 4 x 3.0 mm předkolona

55 °C, 400 μl/min, MF: NH<sub>4</sub>Ac => NH<sub>4</sub>Ac+MeOH (50%)

33 intermediátů P+P metabolické dráhy + IS



# NS

Věstník 06/2009

celoplošně od 10/2009

endokrinní/metabolická  
onemocnění

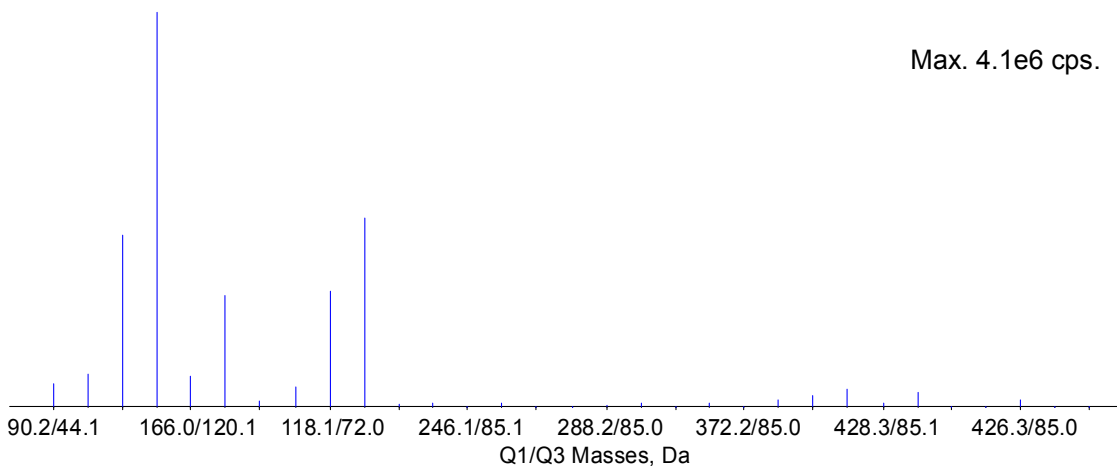
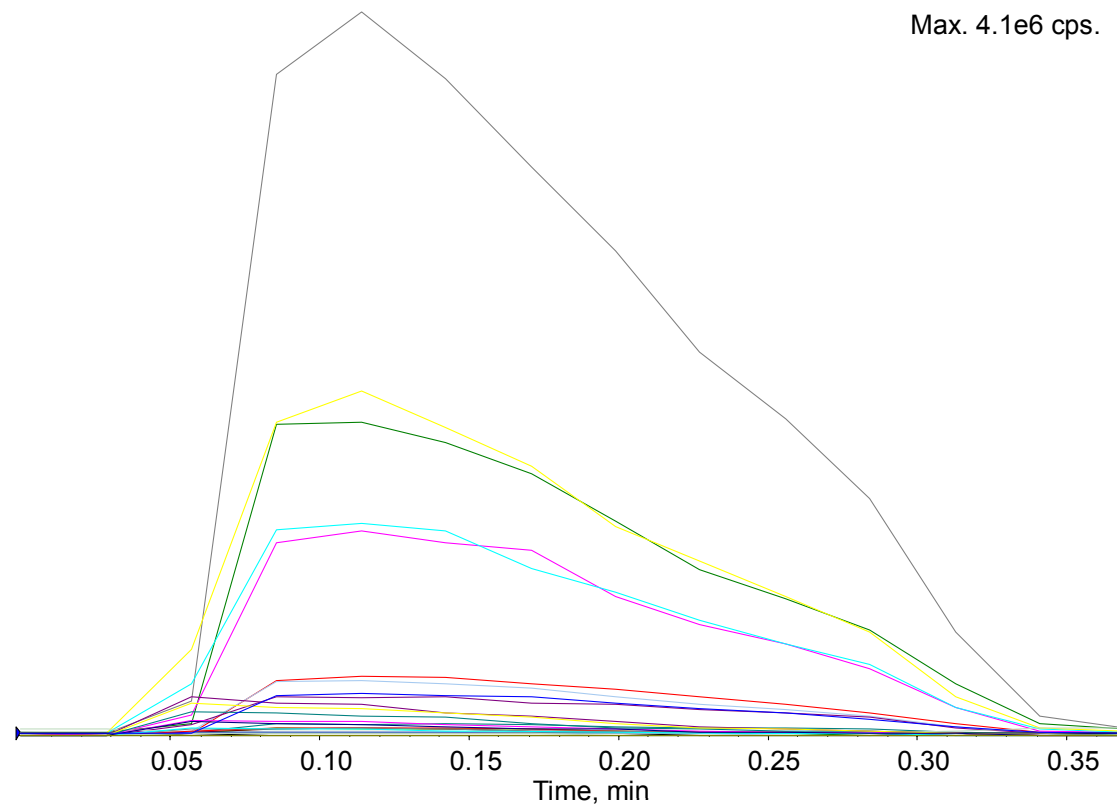
kapilární krev (48-72h)

analýza z krevní skvrny

FIA-QqQ - IDMS

(5AMK + 20AK) x 2 (IS)

vyhodnocovací algoritmy



# Budoucnost QqQ v klinické biochemii

- Multikomponentní analýzy
  - profily cukrů, lipidů, fosfolipidů, organických a aminokyselin
  - skupiny léků v jedné analýze
  - endogenní markery  
(ADMA, HDGA, MMA...)
- Stanovení nízkomolekulárních markerů na úrovni referenčních metod
  - kreatinin, kys. močová, bilirubin, glukosa...
- Metabolomika – nízkomolekulární fenotyp tělních tekutin a buněk

Automatizace HPLC/TMS

Automatizace přípravy vzorků – 2D-HPLC?