

Bölüm 1

KÜTLE SPEKTROMETRESİ VE KLİNİK LABORATUVAR UYGULAMALARI

Duygu ERYAVUZ ONMAZ¹

GİRİŞ

Kütle spektrometresi bir numuneden üretilen gaz fazındaki yüklü partiküllerin kütle/yük (m/z) oranlarını kullanarak numunede bulunan analitlerin identifikasyonu ve kantitasyonunda kullanılan güçlü bir analitik tekniktir (1). 1900'lü yıllara kadar kullanılan analitik yöntemler elektroforetik, kromatografik yöntemler veya ultrasantrifügasyon gibi yöntemlerle sınırlıyken, kütle spektrometresinin geliştirilmesiyle birlikte kullanımı giderek artmış ve günümüzde kütle spektrometreleri biyomoleküllerin analizinde "altın standardı" ('gold standart') yöntemlerden birisi haline gelmiştir (2).

Kütle spektrometresinin keşfi 1886 yılında Eugen Goldstein'in kanal ışınlarını keşfinin ardından 1898 yılında Wilhelm Wien'in kanal ışınlarının güçlü elektrik ve manyetik alanlarda saptırılabileceğini göstermesi ve kanal ışınlarını m/z oranlarına göre ayırmayı sağlayan bir cihaz geliştirmesine dayanmaktadır (3). İyonların m/z oranlarını ölçen ve parabol spektrografi olarak adlandırılan ilk kütle spektrometresi ise J.J. Thomson tarafından 1913 yılında geliştirilmiştir. Modern kütle spektrometresi teknikleri ise sırasıyla 1918 ve 1919'da Arthur Jeffrey Dempster ve F.W. Aston tarafından geliştirilmiştir. Kalutron olarak adlandırılan ilk sektör kütle spektrometresi ise uranyum izotoplarını ayırmak amacıyla Manhattan Projesi sırasında Ernest O. Lawrence tarafından geliştirilmiştir. 1940'lı yıllarda ise kütle spektrometresinin ticari amaçlarla kullanımı başlamış olup özellikle kimyagerler tarafından petrol endüstrisinde yaygın olarak kullanılmıştır (4). 1955 yılından sonra kütle spektrometreleri ile organik bileşiklerin çalışılması mümkün olmuş ve kütle spektrometreleri biyokimya alanında da kullanılmaya başlanmıştır. 1959 yılında peptit ve oligonükleotit sekans analizinde, 1962 yılında nükleotitlerin yapısının aydınlatılmasında kütle spektrometrelerinden yararlanılmaya başlanmıştır (5). 1966 yılında Tanaka ve ark. tarafından gaz kromatografisi kütle spektrometresi ile izovalerik asideminin tanımlanmasıyla birlikte kütle spektrometreleri

¹ Arş. Gör. Dr., Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD, duygu_eryavuz@hotmail.com

metabolik hastalıkların teşhisinde kullanılmaya başlanmış, 1990'larda tandem kütle spektrometresi ile kan açılıkarnitin ve amino asit düzeylerinin ölçülmesiyle birlikte yenidoğan taramalarında dönüm noktası yaşanmıştır. Kütle spektrometresi günümüzde hem klinik laboratuvarlarda hem de araştırma çalışmalarında vazgeçilmez yöntemlerden birisi haline gelmiştir ve bilinmeyen analitlerin identifikasyonu, bilinen bileşiklerin kantitasyonu, moleküllerin yapısal ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi gibi amaçlarla yaygın olarak kullanılmaktadır (2, 6).

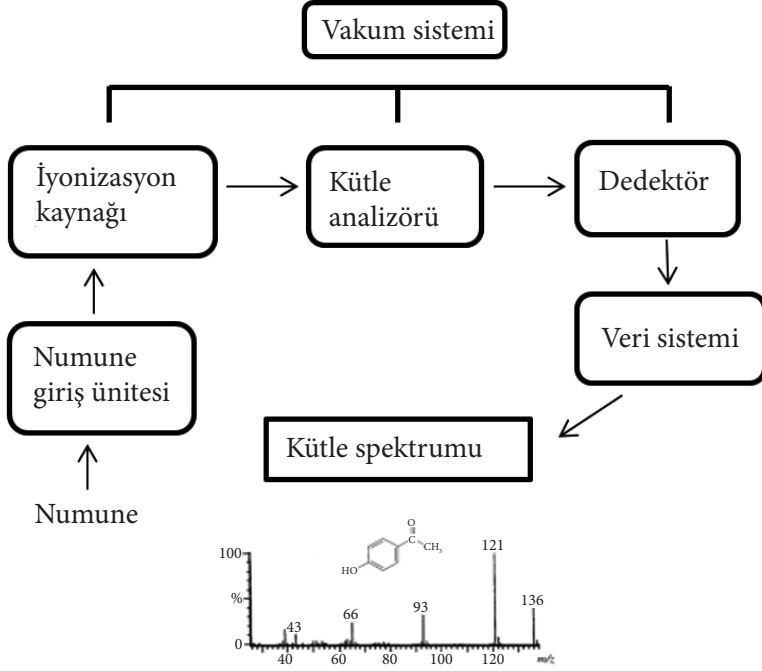
TEMEL PRENSİBİ

Kütle spektrometresi temel olarak bir elektrik ya da manyetik alan boyunca hareket eden yüklü partiküllerin m/z oranlarına göre ayrılmaları prensibine dayanan bir analitik tekniktir. Dolayısıyla kütle spektral analiz gaz fazında iyonla dönüştürülmüş analitlerin ölçülmesiyle gerçekleştirilir (1).

Sıvı kromatografi, gaz kromatografi, katı prob, kapiller elektroforez gibi numune giriş sistemlerinden birisiyle ön işlemden geçirilmiş örneğin sisteme girişi sağlandıktan sonra analitler iyonizasyon kaynağına aktarılır. Normalde yüksüz yani nötr halde olan ve numuneyi oluşturan moleküller iyonizasyon kaynağında çeşitli tekniklerle yüklü iyonlar haline getirilir. Nötral moleküllerle kıyaslandığında iyonize türler manyetik ve elektrostatik alandan etkilendikleri için daha kolay manipüle edilebilirler ve böylece yüksek bir özgüllükle izole edilebilirler. Gaz halindeki yüklü iyonlar kütle analizörüne aktarılır ve burada elektriksel ve manyetik alanların manipülasyonu ile m/z oranlarına göre izole edilerek ayrılırlar. İyonların kütle analizöründe bir yerden diğer yere transferini ise vakum sağlarken aynı zamanda vakum sayesinde üretilen iyonların başka iyonlarla ya da moleküllerle çarpışması neredeyse imkânsız hale gelir. Kütle analizöründe m/z oranlarına göre ayrılan iyonlar dedektör tarafından algılanır ve iyon dedektörü tarafından üretilen elektriksel sinyaller kütle spektrumunu oluşturmak üzere işlenir. Böylece, iyonun göreceli bolluğunun veya yoğunluğunun (intensitesinin) m/z 'ye karşı grafiğe geçirilmesiyle birlikte kütle spektrumu elde edilir (7, 8).

KÜTLE SPEKTROMETRESİNİN BÖLÜMLERİ

Kütle spektrometrelerinin bölümleri Şekil 1'de gösterildiği gibi numune giriş ünitesi, iyonizasyon kaynağı, kütle analizörü, dedektör, vakum kaynağı ve veri sistemi (bilgisayar, kütüphane) bölümlerinden oluşmaktadır.



Şekil 1. Kütle spektrometresi bölümlerinin şematik gösterimi.

NUMUNE GİRİŞ SİSTEMİ

Numune girişi doğrudan giriş sistemleri ile sağlanabileceği gibi sıvı kromatografi, gaz kromatografi, kapiller elektroforez gibi sistemlerle de sağlanabilmektedir. Sisteme numune girişi sağlandıktan sonra kromatografik ve elektroforetik sistemlerde numune bir aktarım hattı ile iyonizasyon kaynağına aktarılmaktadır. Direkt giriş sistemlerinde örnekler doğrudan iyonizasyon kaynağına verilmektedir.

DOĞRUDAN GİRİŞ SİSTEMLERİ

Katı prob (direkt prob, direct insertion probe, DIP) aracılığıyla örneğin sisteme verilmesi kütle spektrometresine numune girişinin sağlanmasının en basit yoludur. Bununla birlikte otomasyon eksikliğinden dolayı bu yöntemin kullanımı kısıtlı olmuştur ve separasyon eksikliği de diğer bir dezavantajdır. Bu yöntem buhar basıncı düşük olan sıvıların ve katı örneklerin (doku vb.) kütle spektrometresine verilmesinde tercih edilen bir yöntemdir. Bu yöntemde katı proba yerleştirilen numuneler probun yüksek sıcaklıkta ısıtılmasıyla birlikte gaz haline getirilerek çoğunlukla bir vakum valfi vasıtasıyla direkt olarak iyonizasyon kaynağına veri-

lir. Bu yöntem, adli numuneler, doku örnekleri gibi matrislerdeki katı bileşiklerin veya eser bileşenlerin hızlı analizi için kullanılabilir. Direkt prob yönteminin bir varyantı olan direct insertion probe (DEP) yöntemi ise aynı prensibe dayanmaktadır ve termal olarak labil ve polar bileşiklerin sisteme girişine olanak sağlamaktadır. Bu yöntemde ince filamentlere yerleştirilmiş genellikle 1-2 mikrolitre hacminde sıvı örnek buharlaştırılarak iyonizasyon kaynağına aktarılır. Bu metod özellikle uygun bir solventte çözülmüş katı maddelerin moleküler ağırlığının hızlı konfirmasyonu için ideal bir yöntemdir.

GAZ KROMATOĞRAFİSİ

Gaz kromatografisi kütle spektrometresine örnek girişinin sağlanmasında en yaygın kullanılan yöntemlerden birisidir. Bir GC-MS tipik olarak taşıyıcı yani mobil faz olarak kullanılan helyum (daha yaygın), azot, hidrojen gibi inert bir gaz, numune enjeksiyon portu, kapiler (yaygın olarak) veya dolgu kolon, kütle spektrometresi, vakum sistemi ve dedektör ile veri analiz sisteminden oluşur. Gaz kromatografisi yıllardır bileşikler analiz etmek için kullanılmıştır ve kütle spektrometresinin yanı sıra alev iyonizasyon, azot-fosfor ve elektron yakalama dedektörleri gaz kromatografisiyle birlikte en yaygın kullanılan diğer dedektörlerdir. Bu dedektörlerin her biri ayrı avantajlara sahip olmasına rağmen kütle spektrometresi diğer dedektörlere göre önemli bir avantaj sağlamaktadır. Gaz kromatografisi kütle spektrometresine örnek girişini sağlamadan önce analitlerin kromatografik olarak ayırımına olanak vermesi bakımından avantajlıdır. Ayrıca gaz kromatografisi kütle spektrometresine saf bir bileşik sağlayarak spektral analizi kolaylaştırmaktadır. Kompleks karışımlar gaz kromatografisi sayesinde ayrılır ve kütle spektrometresi ile her bir komponentin identifikasyonu ve kantitasyonu sağlanır (9, 10).

Gaz kromatografi-kütle spektrometresinin önemli limitasyonlarından birisi analiz edilecek bileşiklerin sıvı fazdan taşıyıcı gaza transferinin ve kolondan dedektöre akışının sağlanabilmesi için yeterli uçuculuğa sahip olması gerekliliğidir. Birçok biyolojik bileşik gaz kromatografi ile kromatografik ayırma uygun olsa da diğer birçok bileşik bu teknikle analiz edilemeyecek kadar büyük ya da polardır. Çoğu durumda uçucu bileşikler elde etmek için kimyasal türevlendirme gereklidir. Tipik olarak analiz, bir numuneden analit ekstraksiyonu, ekstraktın konsantrasyonu, ilgilenilen bileşik uçucu değilse veya termal olarak kararlı ise numunenin türevlendirilmesi ve GC-MS'e enjeksiyonunu içerir. Dolayısıyla ideal olarak GC-MS, uçucu, polar olmayan ve termal olarak kararlı olan küçük moleküllerin analizi için uygundur. Limitasyonlarına rağmen, GC-MS kapiller kolonlar saye-

sinde yüksek verimlilikle separasyonu sağlaması, ideal kantitasyon limiti (yüksek sensitivitesi), numune bileşenlerinin identifikasyonu için ticari kütle spektral kütüphanelerin kullanımına olanak sağlaması, organik asitler gibi bazı analitler için LC-MS gibi yumuşak iyonizasyon tekniklerine göre yüksek özgüllüğe sahip olması açısından oldukça avantajlıdır (11, 12).

SIVI KROMATOĞRAFİSİ

Bir sıvı kromatografisi ile kütle spektrometresinden oluşan sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS) ya da sıvı kromatografisi- tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) teknikleri son yıllarda küresel çapta metabolomik alanında en yaygın kullanılan yöntemlerden birisi haline gelmiştir. Bu yöntemde öncelikle sıvı kromatografisiyle analitlerin ayrımı sağlanmakta, daha sonrada kütle spektrometresi ile analitler dedekte edilmektedir. Bu sistemler günümüzde özellikle amino asit, protein, hormon analizlerinde ve toksikoloji alanında oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. GC-MS sistemleriyle kıyaslandığında LC-MS sistemlerinde analiz edilecek bileşiklerin uçucu olma gereksinimi kalkmıştır ve taşıyıcı faz gaz yerine sıvıdır. Likit kromatografisi ile birleşik kütle spektrometrik sistemler gaz kromatografisi ile birleşik sistemlerle kıyaslandığında birçok yönden daha avantajlıdır. LC-MS sistemleri GC-MS'den farklı olarak termal olarak kararsız olan ve zor türevlenen bileşiklerin analizi için de uygundur ve bu da çok fazla sayıda analitin analizine olanak sağlayarak LC-MS'in uygulama alanını genişletmiştir. Ön işlem basamakları çoğunlukla türevlendirme gerektirmemektedir, daha basit ön işlem basamaklarıyla numune analize hazır hale getirilebilmektedir, bu da bir yandan ekstraksiyon basamaklarının maliyetini azaltırken, diğer yandan zamandan ve iş gücünden tasarruf sağlamaktadır. Bununla birlikte GC-MS'e göre elde edilen kütle spektrumlarının tekrarlanabilirliği daha azdır ve LC bazlı sistemlerde büyük hacimde solvent mobil faz olarak kullanılmakta ve analiz sonunda atık haline gelmektedir (13).

Günümüzde LC-MS bazlı metabolomik analizlerde en yaygın olarak C8 ya da C18'den oluşan ters faz sıvı kromatografi (RPLC) kolonları kullanılmaktadır. Bu teknikte, polar bir mobil faz (su, metanol, asetonitril) ile non-polar stasyonier faz arasında bileşiklerin polarite farklarına bağlı olarak ayrımları sağlanmaktadır. Non-polar bileşiklerin stasyonier fazla etkileşimleri daha fazla olduğu için kolonda daha fazla tutulurken, daha polar bileşikler daha hızlı elüe olmaktadır. Ancak, polaritesi yüksek bileşiklerin RPLC kolonlarında tutulumu ve bu yöntemle analizleri zordur. Bu durumu aşabilmek için mobil faz karışımına iyon eşleştirme ajanları eklenerek iyon eşleştirme kromatografisi uygulanabilmektedir. Bu yön-

temde mobil faza hedeflenen metabolitlerle zıt yük taşıyan bir iyon eşleştirme ajanı eklenmektedir. Bu ajan sabit faz tarafından adsorbe edilmekte ve iyonize olmuş analitler bu ajanla iyonik etkileşime girerek ayrılmaktadır. Bu sayede, kationların anyonlarla eşleşmesi sağlandığında elektrik yükleri nötralize edilerek kolonda tutulumları arttırılmaktadır. Kationların analizi için hidroklorik asit, perklorik asit, pentan sülfonik asit, perflorokarboksilik asit gibi ajanlar kullanılabilirken, anyonların analizi içinse tetrametilamonyum, tetraetilamonyum, tetrabütülin, heksilamin gibi ajanlar kullanılabilir. Ancak bu yöntem, hedef metabolitle eşleşmemiş kalan iyon çifti ajanı iyon kaynağını kontamine ederek kütle spektral analizinin sensitivite ve tekrarlanabilirliğinde azalmaya yol açabilmesi açısından dezavantajlıdır (14, 15).

Normal faz kromatografisi, ters faz kromatografisinin tam tersidir, polar bir stasyoneryer faz ve non-polar mobil faz kullanılarak gerçekleştirilir. Bu teknikte polar bileşiklerin kolonla etkileşimi ve retansiyon süresi daha fazladır. Alkali hidrokarbonların stasyoneryer faz olarak tercih edildiği RPLC'nin aksine, bu teknikte sabit faz silika ya da silikanın siyano, amino ve diol gibi gruplarla modifiye olduğu polar bir maddedir. Mobil faz olarak genellikle heksan ya da heksan ile karışım halinde polaritesi heksandan çok az daha yüksek olan izopropanol, etilasetat ya da kloroform gibi solventler kullanılır. Hidrofilik etkileşim kromatografisi (HILIC) ise normal faz kromatografisinin bir varyantıdır ve prensibi aynıdır. HILIC-MS genel olarak RPLC-MS'yi tamamlayıcı olarak kolon tutulumu zayıf olan küçük, polar analitlerin analizinde tercih edilmektedir. Ancak, HILIC genellikle RPLC'den daha geniş pikler oluşturur, bu da daha pik kapasitesi ve kütle spektrometresinin pik rezolüsyonuna bağlılığında artışa yol açar (16, 17).

Ayrıca, 2004 yılında ultra performanslı likit kromatografisi (UPLC) sistemlerinin geliştirilmesiyle birlikte kromatografik analizlerin rezolüsyonu, hızı ve sensitivitesinde önemli bir artış sağlanmış ve UPLC sistemleri de kütle spektral analizleri geliştirmek amacıyla kütle spektrometreleriyle birlikte kullanılmıştır. UPLC sistemlerinde HPLC sistemlerinden farklı olarak stasyoneryer faz yani kromatografi kolonlarının kaplanması kullanılan partiküllerin çapı önemli ölçüde azaltılmıştır (2 µm altı ya da 2.6–2.8 µm arası partiküller). Böylece UPLC-MS bazlı sistemlerde taşıyıcı fazın akış hızı artış ve yüksek basınç sayesinde analiz süresi kısaltılmış, piklerin genişliği azaltılarak, rezolüsyon, pik kapasitesi arttırılmış, moleküllerin iyonizasyonu geliştirilmiş ve kütle spektral çakışma olasılığının azalmasıyla birlikte yapısal aydınlatma ve doğrulama geliştirilmiştir. UPLC-MS sistemleriyle birlikte HPLC-MS sistemlerine göre analiz edilebilen metabolitlerin çeşitliliğinin %20 oranında arttığı belirtilmiştir (15).

İYONİZASYON KAYNAĞI

İyonizasyon nötral bir atom ya da molekülden iyonizasyon kaynağında gaz fazında pozitif ya da negatif yüklü iyonlar üretilmesidir. Çeşitli iyonizasyon tekniklerinin geliştirilmesi kütle spektrometrelerinin analitik kapasitesini oldukça genişletmiştir.

Klinik kimyada kütle spektrometresi cihazlarında en yaygın kullanılan iyonizasyon metodu molekül üzerindeki temel bölgelere bir ya da daha fazla protonun eklenmesiyle gerçekleşen pozitif modda iyonizasyondur. Bu metod protonasyon olarak adlandırılır ve pozitif yüklü iyonların oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Bu yöntemde oluşan iyonun kütlesi eğer moleküle bir proton eklendiyse ana molekülden 1 Da daha büyüktür. Eğer birden fazla proton eklendiyse eklenen proton sayısı kadar daha büyük kütleyle sahip iyon elde edilir. Peptitler genellikle protonasyon metoduyla iyonize edilirlerken, karbonhidratlar için stabilizasyon sorunundan dolayı bu yöntem çok uygun değildir. Deprotonasyonda ise molekülden bir protonun uzaklaştırılmasıyla negatif yüklü iyonlar üretilmektedir. Bu yöntem özellikle fenoller, karboksilik asitler, sülfonik asitler gibi asidik türlerin iyonizasyonunda oldukça kullanışlıdır ve hem protonasyon hem de deprotonasyon elektrosprey iyonizasyon (ESI), atmosferik basınçta kimyasal iyonizasyon (APCI) veya matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyonu (MALDI) gibi çok çeşitli iyonizasyon kaynakları ile sağlanabilmektedir.

Katyonizasyon nötral bir moleküle pozitif yüklü iyonların nonkovalent eklenmesi sonucu pozitif yüklü komplekslerin üretilmesi ile gerçekleşen iyonizasyon metodudur. Katyonizasyon da protonasyondan farklı olarak moleküle proton yerine alkali ya da amonyum grupları gibi bir katyon eklenmektedir. Ayrıca, katyonizasyonun protonasyona karşı kararsız moleküller için faydalı olduğu bilinmektedir. Moleküle katyon ilavesi proton ilavesinden daha az kovalent olduğundan oluşan iyonlardaki yük katyon üzerinde lokalizedir. Buda yükün delokalizasyonunu ve moleküllerin fragmentasyonunu azaltmaktadır. Katyonizasyonda yaygın olarak MALDI, ESI ve APCI ile kullanılmaktadır. Karbonhidratların Na^+ ilavesiyle katyonizasyon mekanizmasıyla iyonizasyonu bu metodun en karakteristik örneklerinden birisidir. Tandem kütle spektrometrik yöntemlerde ise öngörülemeyen fragmentasyon paterni nedeniyle bu metodun kullanımı oldukça sınırlıdır.

Bir diğer iyonizasyon metodu bir solüsyon içinde yüklü olan bileşiklerin kondanse fazdan gaz fazına desorpsiyonu ya da püskürtülmesidir. Ancak bu yöntem önceden yüklenmiş iyonlar için kullanışlıdır. En yaygın ESI ve MALDI ile bu teknik kullanılmaktadır.

Bu yöntemler dışında molekülden bir ya da daha fazla elektron uzaklaştırılmasıyla pozitif yüklü iyonlar oluşturulabilir. Yaygın olarak elektron iyonizasyon (EI) kaynakları ile sağlanan bu metotla genellikle fazla sayıda fragman iyon ürettiği bilinen göreceli olarak non-polar, düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin iyonizasyonu sağlanmaktadır. Bu yöntemle moleküler ağırlık ve fragmentasyon bilgisi sağlanabilmesine rağmen, çok fazla fragmentasyona neden olması ve en yüksek m/z oranına sahip iyonun moleküler iyon mu yoksa fragment iyon mu olduğunun belirsizliği dezavantajlarıdır. Moleküle elektron ilavesiyle negatif yüklü iyonların üretilmesi ise nadir kullanılan bir yöntemdir ve halojen bileşikleri gibi yüksek elektron afinitesine sahip bileşiklerin iyonizasyonunda tercih edilmektedir (18).

Yukarıda bahsedilen iyonizasyon metotları iyonizasyon mekanizmasını ifade ederken, iyonizasyon kaynağı ise iyonizasyonun gerçekleştiği mekanik cihazı ifade etmektedir. Analizin sensitivitesi çoğunlukla iyonizasyon kaynağındaki iyonizasyonun etkinliğine bağlı olduğundan iyonizasyon kaynağı kütle spektrometrelerinin kalbi olarak kabul edilmektedir. Kütle spektrometrelerinde çeşitli iyonizasyon kaynakları kullanılmaktadır. 1980'li yıllara kadar EI ve kimyasal iyonizasyon (CI) en yaygın kullanılan iyonizasyon kaynaklarıydı. Daha sonra genellikle gaz fazındaki iyonların sıklıkla bir gaz kromatografiden çok düşük basınçta çalıştırılan iyonizasyon kaynağına verilmesinde kullanıldılar. Bu teknikler, uçucu ve düşük molekül ağırlıklı (1000 Da altı) bileşiklerin iyonizasyonu için uygun olması bakımından sınırlayıcıydı. Bunun üzerine uçucu olmayan ya da büyük moleküllerin analizini gerçekleştirebilmek için hızlı atom/ion bombardımanı (FAB), MALDI, ESI, APCI ve atmosferik basınçta fotoiyonizasyon (APPI) gibi yeni iyonizasyon teknikleri geliştirilmiştir. Bunlardan ESI, APCI ve APPI iyon kaynakları sıklıkla HPLC-MS sistemlerinde kullanılmakta ve bu tekniklerde iyonizasyon atmosferik basınçta gerçekleştirilmektedir. Tüm bu teknikler arasında ESI ve MALDI mükemmel kütle aralığı ve sensitivitesi nedeniyle günümüzde biyomoleküler analizde en yaygın kullanılan iyonizasyon teknikleri haline gelmiştir (8).

ELEKTRON İYONİZASYON (EI) KAYNAĞI

Bu yöntemde gaz fazındaki moleküller, iyonizasyon kaynağında ısıtılmış tungsten veya renyum gibi bir flamanndan yayılan elektron demeti tarafından bombardımana tutulur ve bir kollektör elektroda çekilir. Flaman oksidasyonunu önlemek ve elektron demetinin saçılmasını engellemek için bu işlemin yüksek vakum (10^{-5} torr) altında gerçekleştirilmesi gereklidir. EI tipik olarak 70 eV kinetik enerjiye sahip elektronlar kullanılarak gerçekleştirilir; böyle bir enerjiye sahip elektronların organik moleküllerle çarpışması pozitif yüklü bir iyon ve bir radikal oluşumuyla sonuçlanır. Pozitif yüklü iyonlar bir elektriksel alan tarafından iyonizasyon

çemberinden çekilir ve böylece pozitif yüklü iyonlar elektrostatik olarak odaklandıktan sonra kütle analizörüne verilir. EI sert bir iyonizasyon tekniğidir ve primer olarak GC-MS sistemlerinde iyonizasyon kaynağı olarak kullanılmaktadır. EI tekniğiyle üretilen fragman iyonlar bir molekül için karakteristik olup oluşan iyonlar ve bunların göreceli oranları tekrarlanabilir. Dolayısıyla bu teknikle bilinmeyen bileşiklerin identifikasyonu sağlanabilir. Bu teknik yüksek sensitivitesi, bir molekül için karakteristik fragmantasyon paterni üretmesi bakımından avantajlı olsa da, uçucu ve küçük molekül ağırlıklı bileşikler için uygunluğu sınırlıdır (19, 20).

KİMYASAL İYONİZASYON (CI) KAYNAĞI

Kimyasal iyonizasyon metan, amonyak, izobütan veya su gibi reaktif bir gaz molekülü tarafından, analiz edilmek istenilen gaz fazındaki bir moleküle proton transferi ya da uzaklaştırılması yoluyla gerçekleştirilen yumuşak bir iyonizasyon tekniğidir. Reaktif gaz, yaklaşık 0.1 torr'luk bir basınçta CI iyon kaynağına gönderilmektedir. Bu yöntemde yüksek enerjili elektronlar doğrudan analiti iyonlaştırmak yerine iyonizasyon kaynağına giren reaktif gazı iyonlaştırmaktadır. Böylece, analit molekülleri iyonize reaktif gaza maruz kaldığında, analitlerin kendileri de iyonize olur ve moleküler iyonlara dönüşür. Eklenen reaktif gaz nedeniyle, CI kaynağındaki vakum EI'de tipik olarak görülenden daha düşüktür, bu durum analit molekülünün bir reaktif gaz iyonu ile çarpışma olasılığını artırmaktadır. Analit moleküllerinin reaktif gaz tarafından iyonizasyonu çok daha az enerjili bir işlemdir. Dolayısıyla, bu tip iyonizasyon, analit molekülünün EI'den daha az parçalanmasına neden olur ve çoğu durumda kütle spektrumlarında yalnızca moleküler iyon gözlemlenir, bu da sensitivitenin artmasını sağlar. İyonizasyon en yaygın olarak iyonize reaktif gazdan analit molekülüne bir proton transferinden kaynaklanır. CI ile negatif iyonizasyon önemli derecede sensitivite kaybına yol açtığından çok tercih edilmemektedir (21).

ELEKTROSPRAY İYONİZASYON (ESI) KAYNAĞI

ESI kütle spektrometresine girmeden önce bir numunenin atmosferik basınçta iyonize edildiği yumuşak bir iyonizasyon tekniğidir. ESI sıvı haldeki örnekten gaz halinde yüklü iyonlar üretir. Bir ayırma cihazından tipik olarak HPLC'den çıkan elüent 1-5 kV'luk voltajın uygunlandığı dar bir metal ya da silika kapilerden geçirilir. Uygulanan bu elektriksel potansiyel ise kapilerin ucuna gelen numune damlacıklarının yüklenmesine, Taylor konisinin oluşumuna ve sonuç olarak yüklü damlacıkların kapilerin ucunda oluşan Taylor konisinden püskürtülmesine ne-

den olur. Böylece bir elektrik alan varlığında yüksek oranda yüklü damlacıklardan oluşan ince bir sprey oluşturulur. ESI'nin birçok varyasyonunda, bir koaksiyel nebulize edici gaz, nebulizasyona yardımcı olur ve yüklü damlacıkların karşı elektrota doğru yönlendirilmesine katkı sağlarken, aynı zamanda buharlaşma sürecini hızlandırır. Damlacıklar atmosferik basınç bölgesinden geçerken, ısı ve kurutucu gaz uygulanarak solvent molekülleri buharlaştırılır. Damlacıklar küçüldükçe benzer yükler arasındaki karşılıklı Coulombic itme o kadar büyük olur ki, yüzey gerilimi kuvvetlerini aşar ve iyonlar damlacıktan dışarı yüklü analit iyonları olarak atılır ve böylece yine Taylor konisi vasıtasıyla bu sefer iyonlar damlacıklardan serbest bırakılır. Diğer bir olasılık da damlacıkların patlamasıyla analit iyonlarının serbest kalmasıdır. Oluşan iyonlar bir numune alma konisinden ve bir veya daha fazla ekstraksiyon konisinden geçerek odaklanma voltajlarının yardımıyla kütle analizörünün yüksek vakumlu bölgesine girer. ESI rutin olarak peptit, protein, enzim, karbonhidratların, küçük oligonükleotitlerin, lipitlerin ve sentetik polimerlerin iyonizasyonunda kullanılmaktadır. ESI özellikle polar ve uçucu olmayan bileşikler için ideal bir iyonizasyon metodudur. En yumuşak iyonizasyon tekniği olması, birden fazla yük taşıyan iyonlar oluşturabilmesi nedeniyle protein, enzimler gibi makro moleküllerin analizine olanak sağlaması, likit kromatografisi, tandem kütle analizörlerine kolayca adapte edilebilmesi, 100 kDa'dan büyük kütleli moleküllerin analizine olanak sağlaması, yüksek sensitivitesi, matris interferansının düşük olması açısından avantajlıdır. Ancak en efektif 1 ml/dak altındaki akış hızı ile çalışması, üzerinde sensitivite kaybı görülmesi, non-polar bileşikler için efektif bir iyonizasyon sağlamaması, kompleks karışımlarda mültepleks olarak analitlerin analizinde sensitivite kaybı yaşanabilmesi, tuzların varlığında sensitivite kaybı görülmesi ve numune saflığının önemli olması dezavantajlarıdır (8, 22).

ATMOSFERİK BASIÇTA KİMYASAL İYONİZASYON (APCI) KAYNAĞI

APCI iyonizasyonun atmosferik basınçta gerçekleşmesi, nebulizasyon ve desolvasyon aşamalarını içermesi bakımından ESI'ye benzemektedir. Ayrıca iyon ekstraksiyon konisinin tasarımı ESI ile benzerdir. İki teknik arasındaki en büyük fark iyonizasyon modundadır. APCI'da giriş kapilerine yüksek voltaj uygulanmaz. Bunun yerine separasyon cihazından gelen mobil faz yüksek sıcaklık ve nebulizer azot gazı sayesinde pnömatik bir nebulizöre verilerek buharlaştırılır ve gaz fazındaki solvent ve analit molekülleri korona deşarj elektrotundan geçerken iyonlaştırılır (23). Korona deşarj tarafından üretilen iyonlar CI'dekine benzer şekilde çeşitli iyon-molekül reaksiyonlarına girer. Buharlaştırılmış mobil fazdan oluşan solvent molekülleri (metanol, su, asetonitril vb.), buharda numune bileşenlerine

göre göreceli olarak bol bulduklarından iyon-molekül reaksiyonlarının erken safhasında baskın olarak iyonize olurlar, analit moleküllerini iyonize etmek için bir reaktif gaz gibi davranırlar ve sekonder olarak reaksiyona girerler. Analit iyonları daha sonra iyon transfer bölgesine geçer ve buradan da iyon odaklama lensleri aracılığıyla kütle analizörüne taşınır. APCI de ESI gibi yumuşak bir iyonizasyon tekniğidir, ancak APCI'da daha yüksek sıcaklık uygulanır. EI ile karşılaştırıldığında, APCI, ESI ve diğer yumuşak iyonizasyon teknikleri tarafından üretilen kütle spektrumları tipik olarak daha az fragmana sahiptir ve kütle spektral parmak izi ile analit tanımlaması için yararı daha azdır. APCI ve diğer yumuşak iyonizasyon kaynakları, tandem kütle spektrometresine kolayca adapte edilebilmektedir. APCI ve ESI kantitatif analizde en yaygın kullanılan iyonizasyon teknikleridir. Ancak steroidler, lipitler, yağda çözünen vitaminler ve bazı ilaç molekülleri gibi polar olmayan ve molekül ağırlığı 1500 Da'dan küçük bileşiklerin analizinde APCI genellikle ESI'den daha verimli bir iyon kaynağıdır. Ayrıca APCI'nin yüksek akış hızında sensitivitesi, tuz ve tamponlara ve numune matrisine karşı toleransı ESI'den daha iyidir (18).

ATMOSFERİK BASINÇTA FOTOİYONİZASYON (APPI) KAYNAĞI

APPI, klinik kimyada ESI veya APCI'ye tamamlayıcı olarak rol oynayan nispeten yeni ve daha az kullanılan bir iyon kaynağıdır. Bir APPI kaynağının fiziksel konfigürasyonu APCI kaynağındakine benzerdir, ancak gaz fazında iyonlar üretmek için bir korona deşarj iğnesi yerine bir ultraviyole foton akımı (tipik olarak 10 eV'de foton yayan Kripton lambası) kullanılır. APPI, APCI'ye benzer bir uygulama aralığına sahiptir ve bazı steroidler gibi çok düşük polariteye sahip bileşikler için APCI'den daha faydalı olabilir (8).

MATRİKS DESTEKLİ LAZER DESORPSİYON İYONİZASYON (MALDI) KAYNAĞI

MALDI, tipik olarak tek yüklü iyonlar üreten başka bir yumuşak iyonizasyon yöntemidir. MALDI ve ilgili teknikler, iyon üretimi için darbeli bir lazer ışınından numuneye enerji aktarım süreçlerine dayanır.

MALDI metodolojisi üç aşamalı bir süreçtir. Öncelikle numune uygun bir matris materyali ile karıştırılır ve bir metal plakaya uygulanır. İkinci olarak, darbeli bir lazer örneği ışınlayarak numunenin ve matris malzemesinin ablasyonunu ve desorpsiyonunu tetikler. Son olarak, analit molekülleri, ablasyona uğramış gazların sıcaklığıyla protonasyon ya da deprotonasyon yoluyla iyonlaştırılır ve kütle analizörüne doğru hızlandırılır (24). MALDI sıklıkla uçuş zamanı kütle

spektrometrisi (TOF-MS) (TOF) ile birleşik olarak kullanılmaktadır, fakat HPLC için uygun değildir. Peptitler, proteinler ve diğer birçok biyomolekül (oligonükleotitler, karbonhidratlar, doğal ürünler ve lipitler) için yaygın olarak kullanılmaktadır. MALDI molekül ağırlığı 300 kDa'a kadar olan bileşiklerin iyonizasyonunda kullanılabilmesi, çok az fragmantasyona yol açan ya da hiç fragmantasyona yol açmayan yumuşak bir iyonizasyon tekniği olması, yüksek sensitivitesi ve kompleks bir karışımdaki analitlerin analizinde kullanılabilmesi açısından avantajlıdır (18).

KÜTLE ANALİZÖRLERİ

Nötral moleküller iyonizasyon kaynağında gaz fazında yüklü iyonlar haline dönüştürüldükten sonra kütle analizörüne iletilirler ve burada m/z oranlarına göre seçilerek dedektöre gönderilirler. Kütle spektrometreleri ışın tipi ve tuzak tipi analizörler olmak üzere genel olarak iki gruba ayrılmaktadır. Işın tipi analizörlerde, iyonlar cihazdan geçiş yaptıktan sonra detektöre çarparak tespit edilirler. Bir iyonun analizöre girdiği andan tespit edildiği ana kadarki tüm süreç genellikle mikrosaniye ile milisaniye arasında değişir. Tuzak tipi bir analizörde ise iyonlar, manyetik ve/veya elektrostatik ve/veya radyo frekans elektrik alanlarının bir kombinasyonu yoluyla sınırlı bir bölgede tutularak yakalanır. Yakalama süreleri, milisaniyeden dakikalara kadar değişebilir. Işın tipi kütle spektrometreleri quadrupole, manyetik sektör ve TOF analizörleridir. Tuzak tipi analizörler ise quadrupole iyon tuzak, lineer iyon tuzak, orbitrap ve iyon siklotron rezonans kütle analizörleridir (7, 8).

QUADRUPOLE KÜTLE ANALİZÖRLERİ

Quadrupole kütle analizörleri günümüzde en yaygın kullanılan kütle analizörleridir. Klasik olarak bu analizörler birbirine paralel, elektriksel olarak iletken dört adet çubuktan (rod'dan) oluşmaktadır. Her bir karşıt rod birbirine elektriksel olarak bağlıdır ve bu dört rod iyonların geçebileceği uzun bir kanal oluşturur. İyonlar rodlar arasında kanal boyunca akarken uygulanan sabit doğru akım voltajı ve radyo frekansının kombine etkisiyle ayarlanan yalnızca belirli bir m/z değerine sahip olan iyonlar detektöre ulaşabilirken, diğer iyonların yörüngeleri kararsızdır ve rodlara çarpar. Böylece seçilen m/z değerine sahip iyonlar uygulanan frekans ve voltajlar aracılığıyla detektöre yönlendirilirken, diğerleri rod'lara doğru yönlendirilir. Bu enstrümanlar hassasiyet, üst kütle aralığı (genellikle <4000 m/z), çözünürlük ve kütle doğruluğu açısından manyetik sektör enstrümanlarının gerisinde olsa da, kullanım kolaylığı, çoğu analiz için yeterli performansı, nispeten düşük maliyeti, küçük boyutu, ve oldukça gelişmiş veri toplama yazılım sistemleri açısından avantajlıdır (25, 26).

UÇUŞ ZAMANLI KÜTLE SPEKTROMETRESİ (TOF)

TOF, quadropole kütle analizörünün aksine tek bir m/z değerini ölçmek yerine tüm m/z değerlerinin ölçümüne olanak verir, böylece tam bir kütle spektrumu anlık görüntü olarak elde edilir. TOF'da iyon kaynağında oluşan iyonlar uçuş süresi tüpü olarak adlandırılan bölüme iyon optiği sayesinde odaklanır ve bir elektiriksel potansiyel aracılığıyla hızlandırılır. Böylece iyonlar elektrik alanı olmayan uçuş süresi tüpü olarak adlandırılan bölgeden geçerken hızlarına göre ayrılır ve değişik sürelerde dedektöre ulaşır. Çoğu uçuş tüpünün ucunda aynı ağırlıktaki iyonları odaklamaya ve onları dedektöre yönlendirmeye yardımcı olan bir reflektör bulunur. TOF-MS, özellikle MALDI gibi darbeli iyonizasyon kaynaklarına iyi bir şekilde adapte edilmiştir. Neredeyse sınırsız bir m/z aralığına, yüksek kütle doğruluğuna, yüksek çözünürlüğe, hassasiyete, makul bir maliyete sahip olması bakımından avantajlıdır (8, 27).

İYON TUZAĞI KÜTLE ANALİZÖRLERİ

İyon tuzağı analizörleri statik ve radyo frekans voltajlarını kullanarak iyonları üç boyutlu bir alanda yakalamak için üç hiperbolik elektrot kullanır. Daha sonra iyonlar uygulanan radyo frekansı değiştirilerek m/z oranlarına göre tuzaktan sırasıyla çıkarılırlar. Tuzaktan çıkan iyonlar ve artırılan radyofrekans kalan iyonları stabilize eder, radyofrekans voltajının artırılmasıyla özellikle düşük m/z oranındaki iyonlar daha kararsız hale gelerek tuzaktan çıkar. Radyofrekans voltajı artırılarak istenilen m/z aralığındaki tüm iyonlar tuzaktan çıkarılır ve tuzaktan çıkan iyonlar dedektöre ulaşır. Alternatif olarak, tuzakta belirli bir iyon, diğer iyonlar dışarı atılırken uyarıcı bir voltaj uygulanarak izole edilebilir (9).

TANDEM KÜTLE SPEKTROMETRELERİ

Tandem kütle spektrometreleri rutin numunelerin kantitatif analizinde yaygın olarak kullanılmakta olup klinik laboratuvarlarda primer kütle spektrometresi tekniği haline gelmiştir. Bununla birlikte, aynı zamanda yapısal karakterizasyon ve bileşiklerin identifikasyonu için de yararlı bir tekniktir. Bu tekniğin en önemli avantajları yüksek selektivitesi, spesifitesi, çok düşük konsantrasyonlarda analiti bile ölçebilmesi, düşük maliyeti, yüksek numune verimliliği ve aynı yöntemle çok sayıda analiti ölçebilme yeteneğidir. İnterferans olasılığı, tandem kütle spektrometreleri özellikle sıvı kromatografisiyle birleştirildiğinde oldukça düşüktür. Bunun nedeni, saptanan bir bileşiğin kromatografik alıkonma süresi, öncü iyon kütlesi ve ürün iyon kütlesi olmak üzere üç fiziksel özellikle ayrılması ve karakterize edilmesidir (28). Tandem kütle spektrometresinin fiziksel prensibi, ardışık iki

kütle filtresi ya da analizörü arasına yerleştirilmiş bir çarpışma hücresinin kullanımına dayanmaktadır. İlk filtre (Q1), belirli bir m/z oranına sahip öncül iyonu seçmek için kullanılır. Seçilen öncül iyon, iyonların gaz molekülleriyle çarpıştırılarak daha küçük fragman iyonlara ayrıldığı çarpışma hücresine (Q2) yönlendirilir. İkinci kütle filtresi (Q3) ise, belli bir m/z değerine sahip ürün iyonlarını seçerek kütle spektrumunun elde edilmesini sağlar. Birçok cihazda geleneksel olarak ardışık yerleştirilen bu analizörler quadropole'dür ve bu cihazlar "triple quadropole" kütle spektrometresi olarak adlandırılır. Ancak günümüzde bu sistemlerde yalnızca quadropole analizörler kullanılmadığından tandem kütle spektrometresi daha uygun bir tanım olmaktadır. Bu sistemlerde Q1; genel olarak bir quadropole analizörden, Q2; quadropole, hezapole, oktapole ya da diğer tasarımlardan, Q3 ise quadropole ya da iyon tuzağı analizörlerinden oluşmaktadır (9).

VAKUM SİSTEMİ

Bazı iyon tuzağı tip kütle spektrometreleri hariç kütle analizöründe iyonların separasyonu iyonların manyetik ya da elektriksel alanlarla etkileşimleri sırasında diğer moleküllerle çarpışmamasını gerektirmektedir. Bu da, kütle analizörü tipine bağlı olarak 10^{-3} ile 10^{-9} torr'luk bir vakum uygulanmasıyla sağlanmaktadır.

DEDEKTÖRLER

İyon siklotron rezonans kütle spektrometreleri (ICR-MS), orbitrap ve bazı ICP-MS cihazları dışında çoğu kütle spektrometresi iyonların dedeksiyonu için elektron multiplier'ları kullanmaktadır. Bu dedektörlerde kendi içinde gruplara ayrılmakla birlikte genel çalışma prensipleri aynıdır. Bu dedektörlerde dynod'lara çarpan iyonlar yüzeyden elektronların ayrılmasına neden olur ve böylece iyonlar elektronlara dönüştürülmüş olur. Bir iyon birinci dynod'a çarptığında, bir veya daha fazla elektronun (ikincil elektronlar) dynod yüzeyinden ayrılmasına neden olur. Bu elektron yaklaşık 100 V'luk bir voltaj farkıyla ikinci dynod'a doğru hızlandırılır. İkinci dynod'a çarptığında, bu elektron tipik olarak 2 veya 3 elektronun daha fırlatılmasına neden olur. İkinci elektron grubu daha sonra üçüncü dynod'a doğru hızlandırılır ve üçüncü dynod'a çarptığında, birkaç elektronun daha fırlatılmasına neden olur. Bu işlem, çoğu tasarım için 12 ila 24 dynod zinciri boyunca tekrarlanır ve böylece iyonlar elektronlara dönüştürülerek elektronlar çoğaltılmış olur. Son olarak dedektörden gelen ham sinyaller elektronik sinyal işleme sistemi sayesinde işlenerek bilgisayarda kütle spektrumları şeklinde depolanır (8).

KLİNİK UYGULAMALARI

Kütle spektrometrelerinin yüksek selektivite, spesifite ve sensitivitesi, kesinliği, kısa analiz süresi, yüksek numune verimliliği gibi avantajlarına bağlı olarak klinik laboratuvarlarda kullanımı giderek artmaktadır. Yakın zamana kadar, kütle spektrometrelerinin klinik uygulamalarının çoğu, küçük moleküllerin analizini kapsamaktaydı. Son yıllarda, proteinler, lipitler, polisakaritler ve DNA gibi büyük moleküllerin analizinde uygulamaları genişlemektedir.

Kütle spektrometrelerinin klinik laboratuvarlarda ilk kullanımlarından biri toksikoloji alanı olmuştur. Klinik veya adli amaçlar için doğrulayıcı idrar ilaç taramalarında GC-MS ve son zamanlarda LC-MS/MS bazı yöntemler yaygın olarak kullanılmıştır ve kullanılmaya devam etmektedir. GC-MS'in en yaygın kullanım alanlarından birisi klinik ya da adli amaçlarla ilaç analizi olmuştur. EI'nun sağladığı öngörülebilir ve tekrarlı fragmentasyon paterni nedeniyle bilinmeyen bileşiklerin tanımlanmasında oldukça yararlı bir yöntemdir. Ayrıca, yüksek kromatografik ayırım gücü, sensitivitesi, spesifiteside diğer önemli avantajlarıdır. Bununla birlikte, GC-MS'in en önemli limitasyonu analiz edilecek bileşiklerin uçucu olması gerekliliği ya da uçucu olmaması durumunda uzun türevlendirme basamaklarını gerektirmesidir. GC-MS, ilaç analizlerinin ötesinde birçok uygulamaya sahiptir. Çok sayıda ksenobiyotik bileşik, GC-MS ile kolayca analiz edilebilmektedir. Anabolik steroidler, pestisitler, çevresel kirleticilerin analizlerinde GC-MS yaygın olarak kullanılmaktadır. GC-MS idrar organik asit analizinde yıllardır kullanılmakta olup, günümüzde bu amaçla hala en yaygın kullanılan yöntemdir ve böylece yenidoğan metabolizma bozukluklarının tanısında faydalıdır. Bunlar dışında GC-MS steroid hormonlar, kolesterol, glukoz, kreatinin, üre azotu gibi klinik olarak ilişkili birçok analitin analizinde kullanılmıştır.

LC-MS/MS'in toksikolojik tarama ve doğrulama alanında kullanımı giderek hız kazanmıştır. Günümüzde LC-MS/MS, kalitatif idrar ilaç taramalarından kantitatif, verimliliği yüksek, ezoterik analizlere kadar günümüzde klinik laboratuvarlarda en yaygın kullanılan yöntemlerden birisi haline gelmiştir. LC-MS/MS terapötik ilaç düzeyi takibi (immünosupresan, antiviral, antiepileptik, psikoaktif ilaçlar vb.), steroid düzeylerinin kantitasyonu (vitaminler, testosteron, androstenedion, 17-hidroksiprogesteron, aldosteron, kortizol, östrojen), yenidoğan metabolizma bozuklukları ve yenidoğan taraması (örneğin amino asitler, karnitin, açilkarnitinler, safra asitleri, pürin ve pirimidinler), endokrinoloji (biyojenik aminler, 5-hidroksiindolasetik asit, insülin, tiroglobulin, tiroit hormonları) alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (8, 29).

MALDI (tipik olarak TOF analizörüyle birlikte) birçok farklı bileşik sınıfını analiz etmek için kullanılır. Özellikle protein ve peptitlerin dedeksiyon ve iden-

tifikasyonu için keşif çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Monoklonal immüoglobulinler, serum serbest hafif zincirler, hemoglobin A1c, insülin benzeri büyüme faktörü-1, C reaktif protein, serum amiloid A, fekal kalprotektin ve sistatin C analizleri MALDI'nin klinik uygulamalarına örnek verilebilir. Mikrobiyoloji alanında ise MALDI antibiyotik ve antifungallerin kantitatif analizlerinde, mikroorganizmaların identifikasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır (30).

SONUÇ

Sonuç olarak kütle spektrometrelerinin temelleri 1900'lü yıllara dayanmasına rağmen günümüze kadar olan süreçte hem teknik olarak, hem de analitik kapasiteleri açısından bu cihazlarda büyük bir gelişme sağlanmıştır. Günümüzde özellikle tandem kütle spektrometreleri tıp alanında oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Özellikle metabolik hastalıklar ve yeni doğan taramalarında kütle spektrometreleri oldukça önemlidir. Kütle spektrometresi bazlı yöntemler, tanısal tıbbın önemli bir bileşenidir ve teknolojik, analitik zorluklar çözüldükçe tıp alanındaki rolü büyümeye devam edecektir.

KAYNAKÇA

1. Urban PL. Quantitative mass spectrometry: an overview. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci.* 2016;374(2079):20150382. doi: 10.1098/rsta.2015.0382.
2. Habib A, Bi L, Hong H, et al. Challenges and strategies of chemical analysis of drugs of abuse and explosives by mass spectrometry. *Frontiers in Chemistry Review.* 2021;8. doi: 10.3389/fchem.2020.598487.
3. Brondz I. The newly launched international journal of analytical mass spectrometry and chromatography. *Int J Anal Mass Spectrom Chromatogr.* 2013;01:1-4. doi: 10.4236/ijamsc.2013.11001.
4. Griffiths J. A brief history of mass spectrometry. *Anal Chem.* 2008;80(15):5678-83. doi: 10.1021/ac8013065.
5. Finehout EJ, Lee KH. An introduction to mass spectrometry applications in biological research. *Biochem Mol Biol Educ.* 2004;32(2):93-100. doi: 10.1002/bmb.2004.494032020331.
6. Matern D, Magera MJ. Mass spectrometry methods for metabolic and health assessment. *J Nutr.* 2001;131(5):1615S-20S. doi: 10.1093/jn/131.5.1615S.
7. Kaklamanos G, Aprea E, Theodoridis G. (2020). Mass spectrometry: principles and instrumentation. Pico Y (Ed.), *Chem Anal Food.* (525-552). London: Academic Press.
8. Rockwood A, Clarke N, Kushnir M. (2017). Mass Spectrometry. Nader Rifai, Carl Wittwer, Rita Horvath (Ed.), *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.* (295-323). St. Louis, Missouri: ELSEVIER.
9. Vorce SP. (2020). Mass Spectrometry. Barry S. Levine, Sarah Kerrigan (Ed.), *Principles of Forensic Toxicology.* (197-220). Switzerland: Springer AC.
10. Forgács E, Cserhádi T. (2003). Gas chromatography. Lees M (Ed.), *Food Authenticity and Traceability.* (197-217). Cambridge, England: Woodhead Publishing.
11. Al-Farga A, Al-Bukhaiti W, Qasim AS, et al. Gas Chromatography: Principles, Advantages and Applications in Food Analysis. *Int J Sci Innovs.* 2017;6 (1):2319-1473.

12. Wong YF, Hartmann C, Marriott PJ. Multidimensional gas chromatography methods for bioanalytical research. *Bioanalysis*. 2014;6(18):2461–2479.
13. Perez ER, Knapp JA, Horn CK, et al. Comparison of LC-MS-MS and GC-MS analysis of benzodiazepine compounds included in the drug demand reduction urinalysis program. *J Anal Toxicol*. 2016;40(3):201-07. doi: 10.1093/jat/bkv140.
14. Ren J, Zhang A, Kong L, et al. (2021). Aihua Zhang, Wanying Wang (Ed.), Multivariate Data Analysis Approach for Mass Spectrometry-Based Metabolomics. *Mass Spectrometry-Based Metabolomics in Clinical and Herbal Medicines: Strategies, Technologies and Applications*. (45-66). Weinheim, Germany: WILEY-VCH.
15. Ren J-L, Zhang A-H, Kong L, et al. Advances in mass spectrometry-based metabolomics for investigation of metabolites. *RSC Advances*. 2018;8:22335-50. doi: 10.1039/C8RA01574K.
16. Jandera P. (2019). Liquid Chromatography Normal Phase. Worsfold P, Poole C, Townshend A, Miró M (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Science*. (162-73). Oxford, United Kingdom: Academic Press.
17. Tang DQ, Zou L, Yin XX, et al. HILIC-MS for metabolomics: An attractive and complementary approach to RPLC-MS. *Mass Spectrom Rev*. 2016;35(5):574-600. doi: 10.1002/mas.21445.
18. Siuzdak G. An introduction to mass spectrometry ionization: an excerpt from the expanding role of mass spectrometry in biotechnology. *J Lab Autom*. 2004;9(2):50-63. doi: 10.1016/j.jala.2004.01.004.
19. Medhe S. Ionization techniques in mass spectrometry: a review. *MS&PT*. 2018;4. doi: 10.4172/2469-9861.1000126.
20. Famigliani G, Palma P, Termopoli V, et al. The history of electron ionization in LC-MS, from the early days to modern technologies: A review. *Anal Chim Acta*, 2021; 1167, 338350. doi:10.1016/j.aca.2021.338350.
21. Sleeman R, Carter JF. (2005). Mass Spectrometry Overview. Worsfold P, Townshend A, Poole C (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Science*. (337-44). Oxford: Elsevier.
22. Wilm M. Principles of electrospray ionization. *Mol Cell Proteomics*. 2011;10(7):M111.009407-M111.07. doi: 10.1074/mcp.M111.009407.
23. Pitt JJ. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin Biochem Rev*. 2009;30(1):19-34.
24. El-Aneel A, Cohen A, Banoub J. Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Appl Spectrosc Rev*. 2009;44:210-30. doi: 10.1080/05704920902717872.
25. Dawson P. Quadrupole mass analyzers: Performance, design and some recent applications. *Mass Spectrom Rev*. 2005;5:1-37. doi: 10.1002/mas.1280050102.
26. Dunn WB. (2011). Mass spectrometry in systems biology: an introduction. Jameson D, Verma M, Westerhoff HV (Ed.), *Methods Enzymol*. (15-35). London, United Kingdom: Academic Press.
27. Aydoğan C. (2020). Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry for the analysis of bioactive natural products. Atta ur R (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry*. (331-353). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
28. van den Ouweland JM, Kema IP. The role of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. *J Chromatogr B*. 2012;883-884:18-32. doi: 10.1016/j.jchromb.2011.11.044.
29. Fung AWS, Sugumar V, Ren AH, et al. Emerging role of clinical mass spectrometry in pathology. *J Clin Pathol*. 2020;73(2):61-69. doi: 10.1136/jclinpath-2019-206269.
30. Gao J, Meyer K, Borucki K, et al. Multiplex Immuno-MALDI-TOF/MS for targeted quantification of protein biomarkers and their proteoforms related to inflammation and renal dysfunction. *Anal Chem*. 2018; 90. doi: 10.1021/acs.analchem.7b04975.