

Hmotnostní spektrometrie

RNDr. Alena Mikušková

FN Brno – Pracoviště dětské medicíny, OKB

mikuskovalena@fnbrno.cz

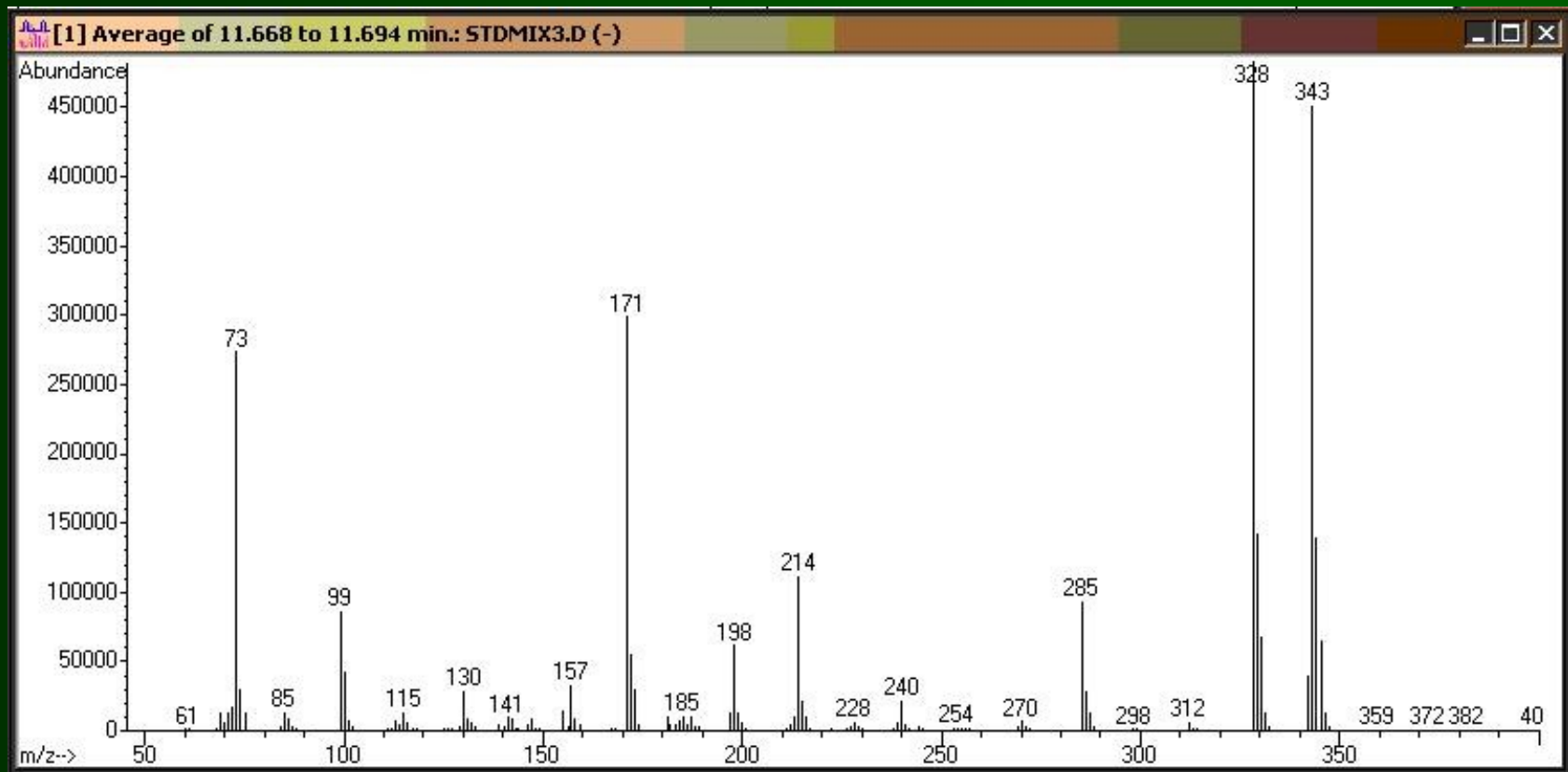
Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)

- Fyzikálně-chemická metoda
 - využívá separace urychlených ionizovaných částic ve vakuu **podle jejich hmotnosti** při jejich průchodu magnetickými a elektrickými poli
- **MS** vyvinuta počátkem 20.století,
 - v klinické biochemii - již několik desetiletí
 - identifikace a stanovení nízkomolekulárních látek na základě měření hmotnosti jejich molekul (detekce látek ve spojení s plynovou chromatografií - GC)
 - První polovina 90. let 20.století - nové techniky
 - umožnily využívat metodu pro LC (i pro látky vysokomolekulární)
 - **MS** - nejdynamičtěji se rozvíjející metodika současné biochemie
 - vedle metod molekulové genetiky

Hmotnostní spektrum

Výstup MS - hmotnostní spektrum

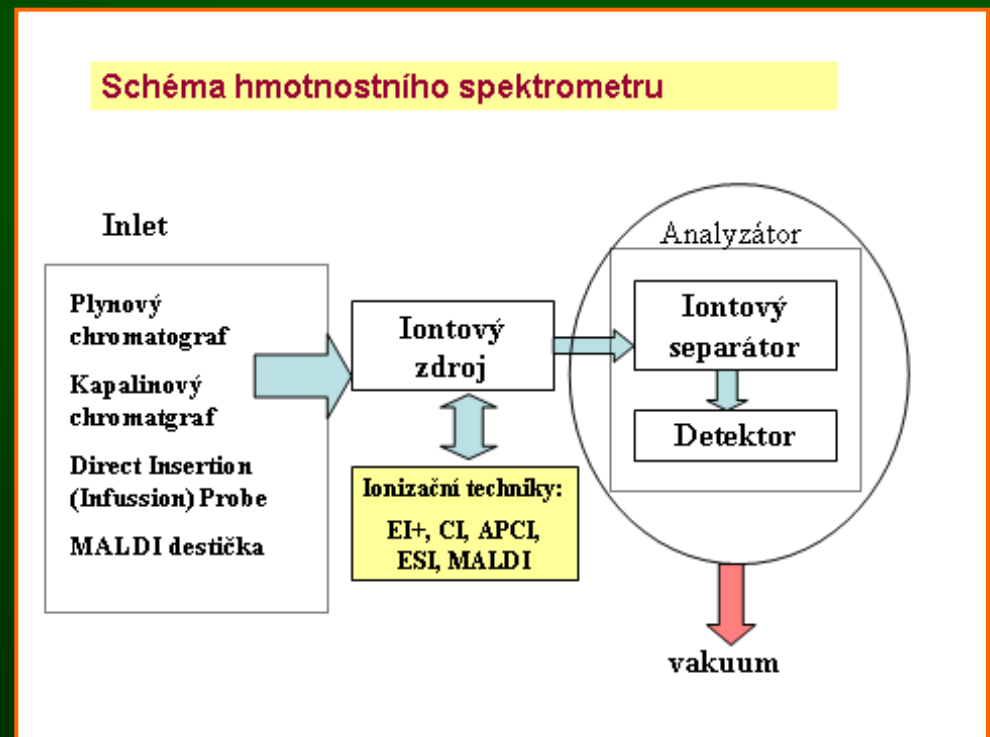
- čarový diagram
 - vodorovná osa - hodnota m/z (hmotnost / náboj iontu)
 - svislá osa - odezva detektoru nebo relativní zastoupení daného iontu



Hmotnostní spektrometr

- tři funkční celky:

- **Iontový zdroj** - ionizace neutrálních molekul měřené směsi:
 - molekula analytu je převedena do plynné fáze (do vysokého vakua)
 - získává charakteristický náboj
- **Iontový separátor**
 - rozdělení iontů různých hmotností
 - ion je urychlen
 - z charakteru jeho pohybu vakuovaným prostorem lze vypočítat jeho m/z
- **Detektor**
 - detekce iontů po jejich separaci podle hodnoty m/z
 - určení relativní intenzity (četnosti) jednotlivých iontů

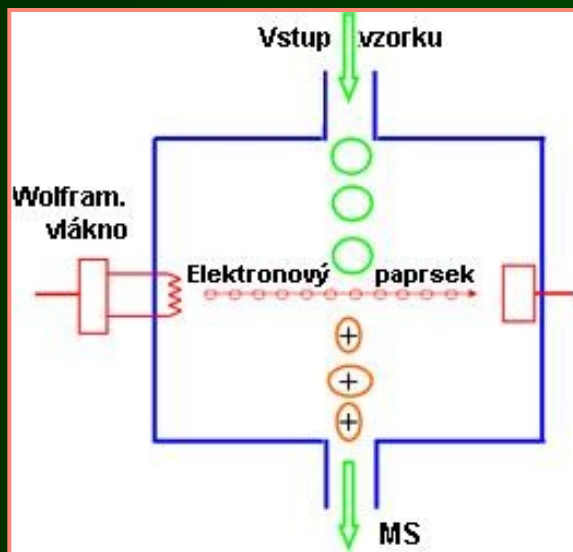


Iontový zdroj - Ionizační techniky

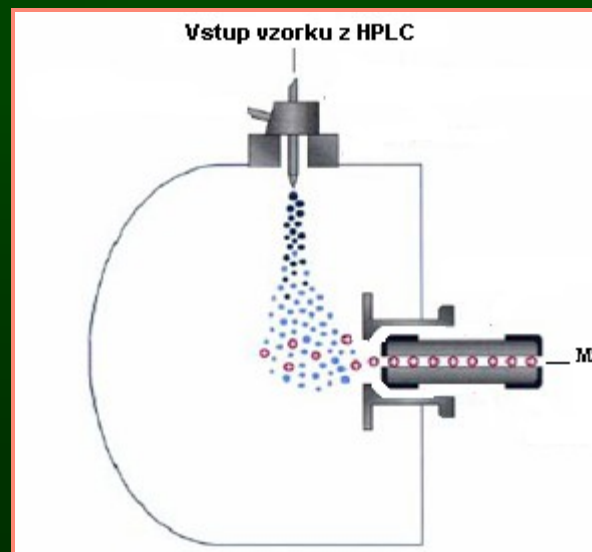
- Existuje celá řada ionizačních technik
- Cíl: vytvoření nabité částice, která je následně analyzována
- Použitá technika záleží na
 - charakteru analyzovaných látek
 - separační metodě, na kterou je MS napojen (GC/MS, LC/MS, bez napojení na separaci)

GC/MS:

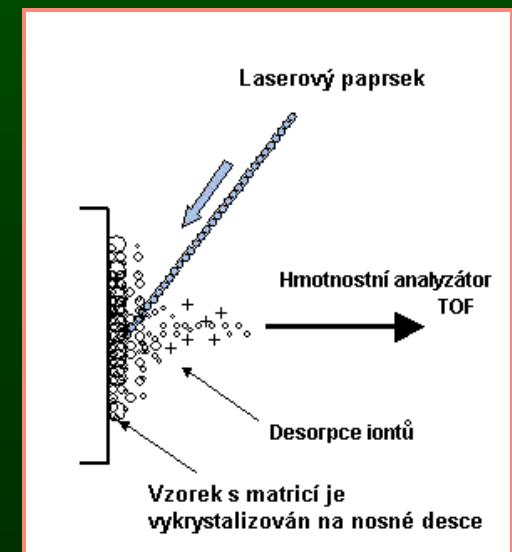
- Elektronová ionizace **EI**
- Chemická ionizace **CI**



- LC/MS, CE/MS,
MS s přímým nástřikem
- Elektrospray **ESI**



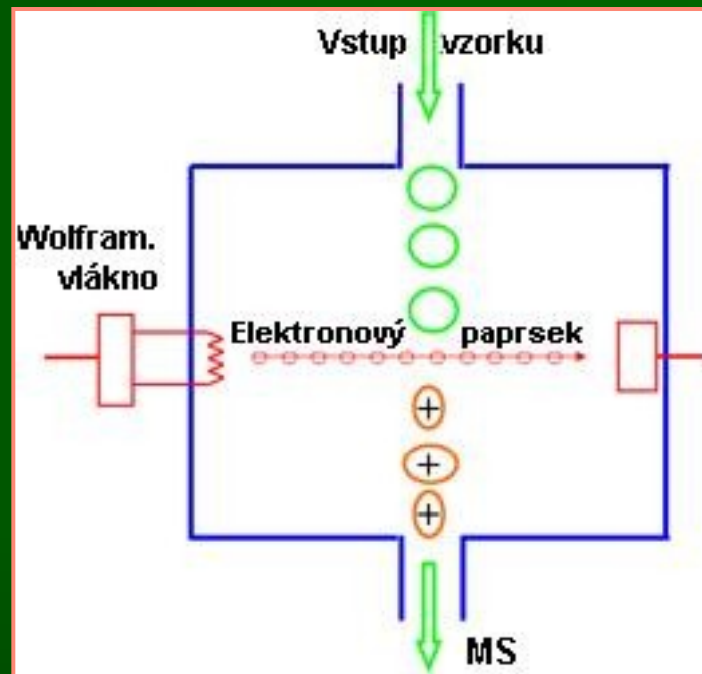
MALDI



Elektronová ionizace, EI

- Iontový zdroj - ionizace molekul analytu v plynném stavu pomocí proudu elektronů

- Z molekuly při srážce s paprskem elektronů odtržen elektron
 - molekula získává kladný náboj
- Následná fragmentace (rozpad) molekuly přebytkem energie

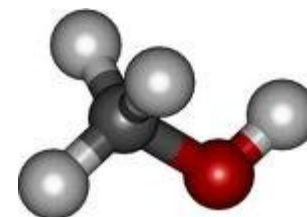
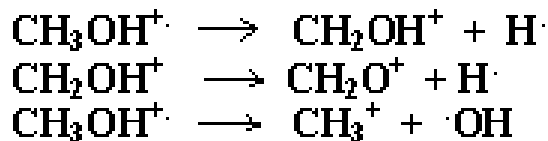


EI - tvrdá ionizační technika (fragmentace)

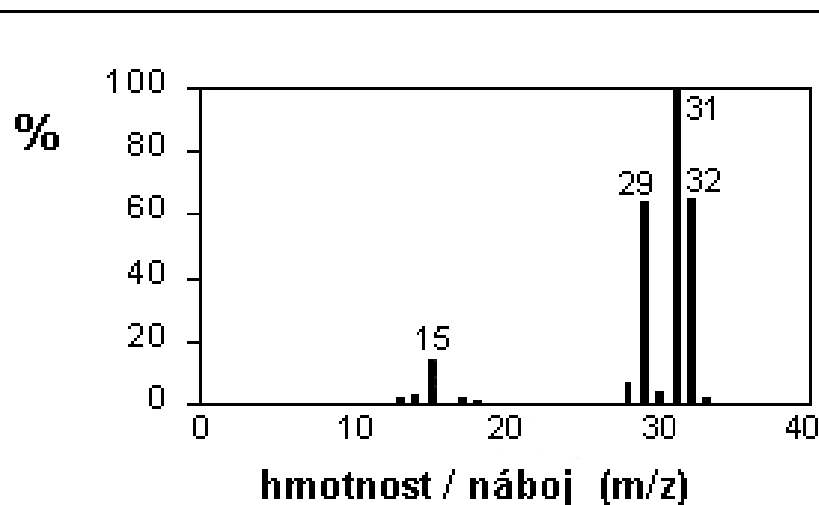
- fragmenty rozděleny v další části analyzátoru dle hodnoty m/z a detegovány
 - separace magnetickým analyzátozem, kvadrupólem
- Pouze pro teplotně stálé nízkomolekulární látky (50 – 800 Da)
 - Dalton – jednotka molekulové hmotnosti



Elektronová ionizace (fragmentace)



ions	m/z
$\text{CH}_3\text{OH}^{+\cdot}$	32
$\text{H}_2\text{C}=\text{OH}^+$	31
$\text{HC}\equiv\text{O}^+$	29
H_3C^+	15

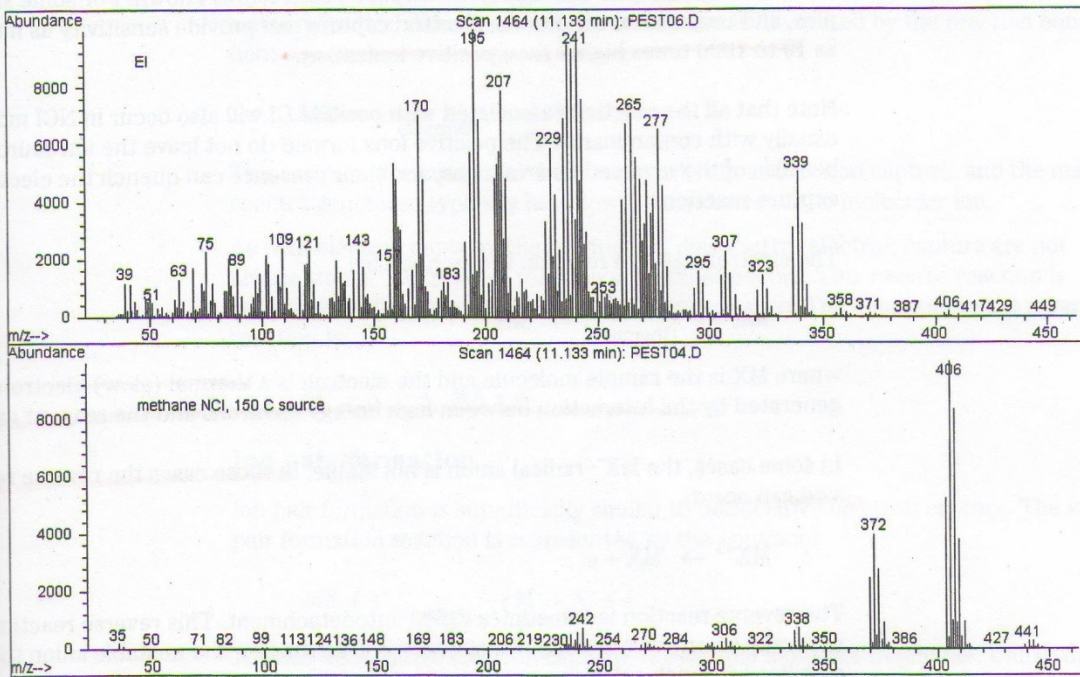


- Hmotnostní spektrum metanolu

Chemická ionizace CI

- „Měkčí“ varianta elektronové ionizace
- Do iontového zdroje přiváděn ionizační plyn (př. metan)
 - proud elektronů ionizuje nejdříve molekuly tohoto plynu
 - tyto teprve předávají energii molekule analytu
 - šetrnější, nedochází k tak rozsáhlé fragmentaci

Endosulfan I (MW = 404): EI and methane NCI

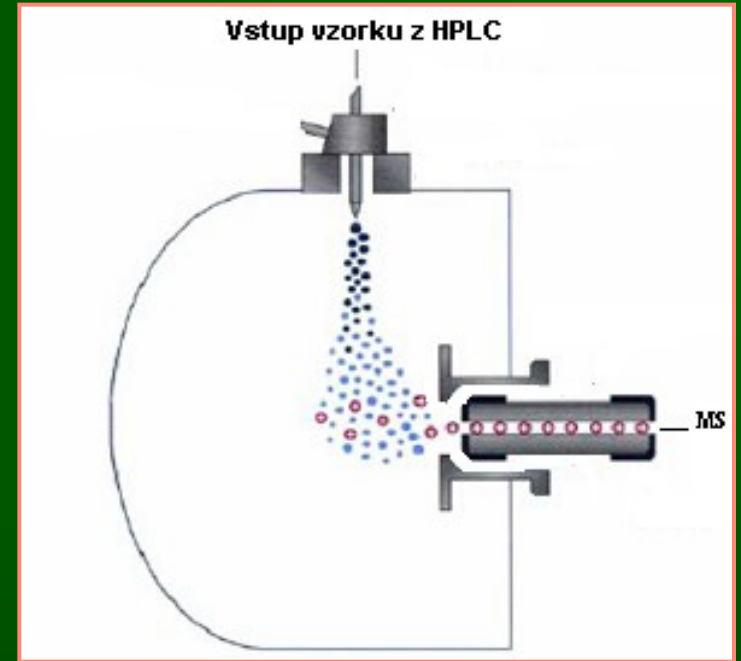
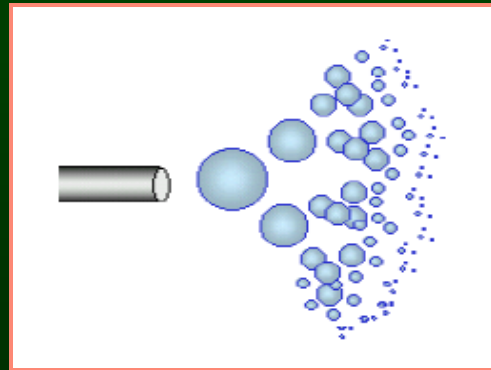


← Srovnání hmotnostního spektra s elektronovou ionizací a chemickou ionizací



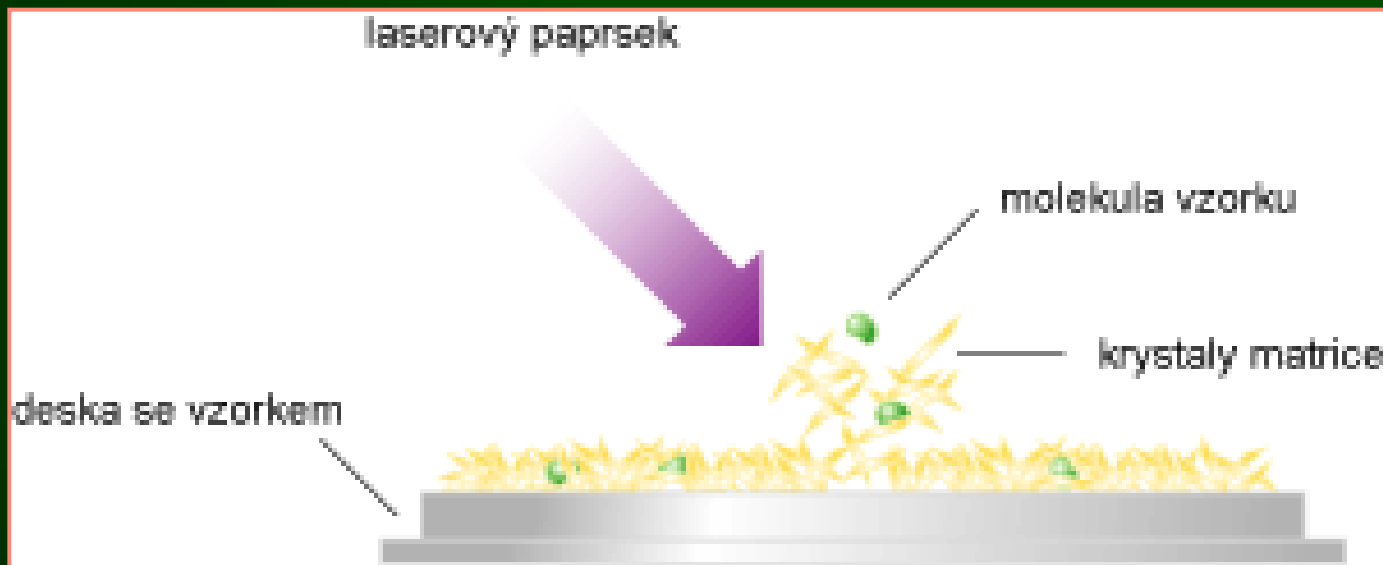
Elektrospray ionizace, ESI

- Eluát prochází kapilárou, na ni vloženo vysoké napětí
 - vzniká sprej vysoce nabitých kapiček
 - následný postupný odpar rozpouštědla
 - vznikají ionty (i vícenásobně nabité)
 - jsou dále separovány (kvadrupól, TOF)
- **Měkká ionizační technika** (bez fragmentace)
- Vhodné pro nízko- i vysokomolekulární látky (peptidy, sacharidy, proteiny, nukleové kyseliny,...)



Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - MALDI

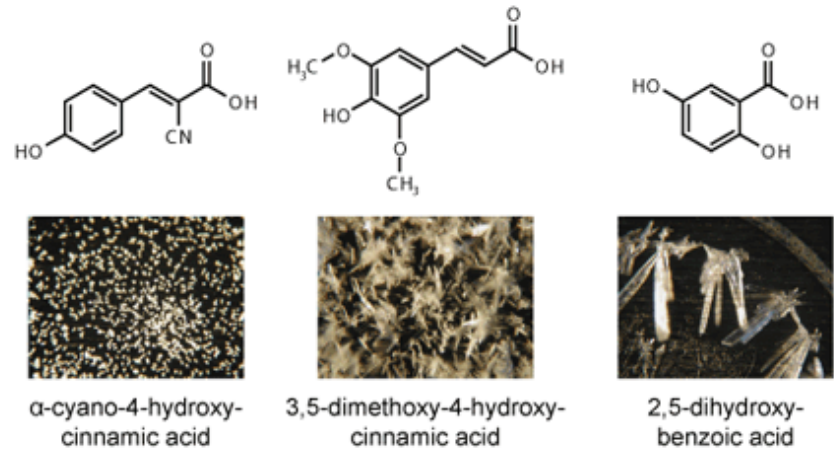
- Vzorek v roztoku smíchán s matricí
 - matrice - deriváty nízkomolekulárních aromatických kyselin
 - absorbují energii laserového záření ve VIS nebo blízké UV oblasti
- Roztok nakápnut a vysušen (vykrystalizován) na MALDI destičce
- Pulzní ozáření směsných krystalů zábleskem laseru
 - prudké odpaření látek do vakua
 - ionizovaná matrice strhává sebou molekulu analytu a ionizuje ji
 - ionty urychleny stejnosměrným elektrickým polem do TOF analyzátoru



MALDI - Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization

- Velmi měkká, šetrná technika – i pro vysokomolekulární látky (proteiny, peptidy, oligosacharidy, nukleotidy)
- Ionty dále separovány analyzátozem TOF

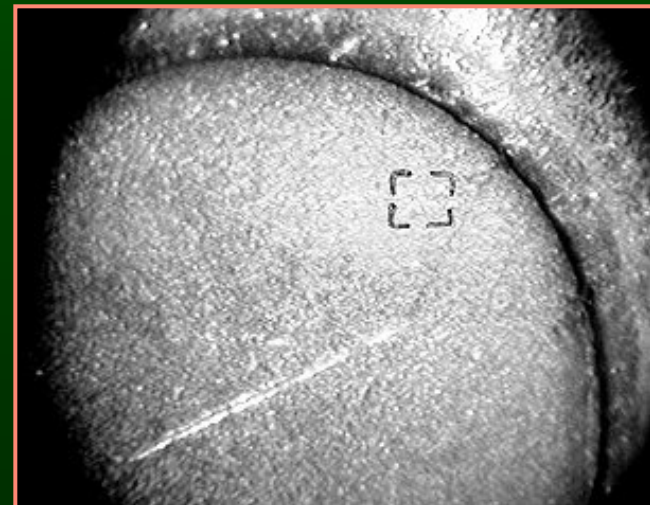
Matrice →



Spotovací destička



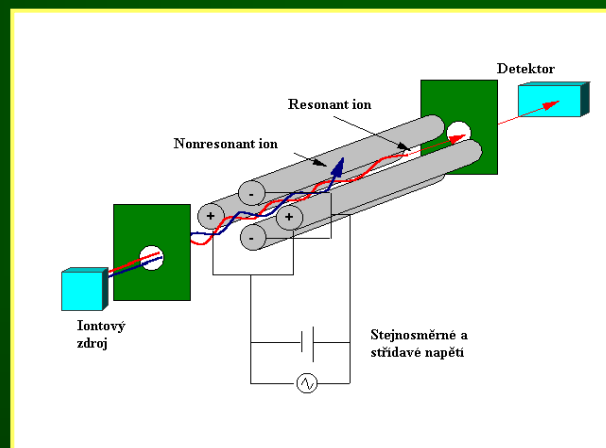
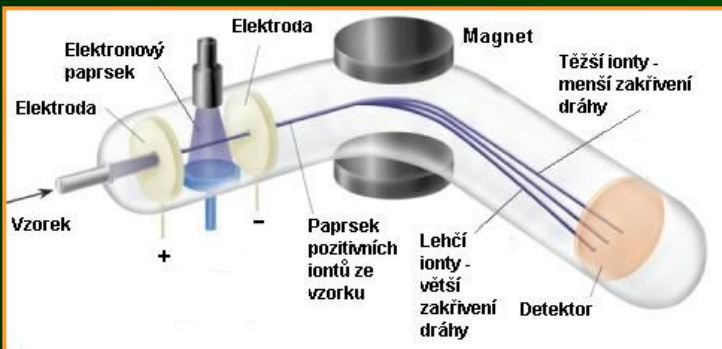
Spotovací destička na monitoru



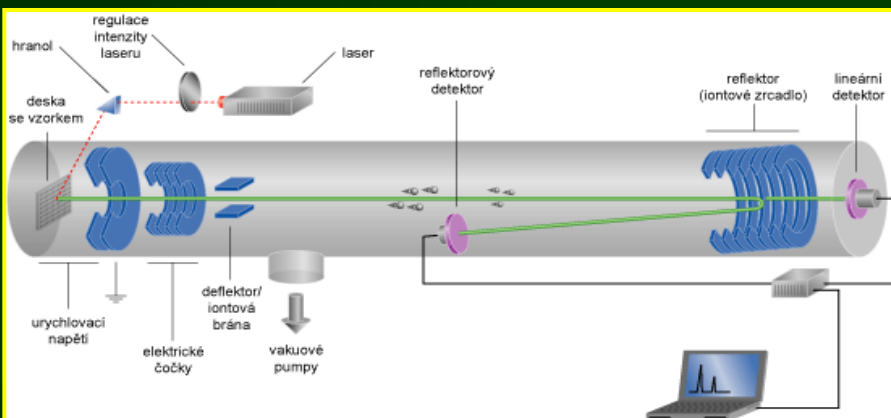
MS – separace iontů

- **Iontový separátor:** rozdělení iontů různých hmotností
 - ion je urychlen
 - z charakteru jeho pohybu vakuovaným prostorem lze vypočítat poměr jeho hmotnosti a náboje m/z

Magnetický sektorový analyzátor



Kvadrupól



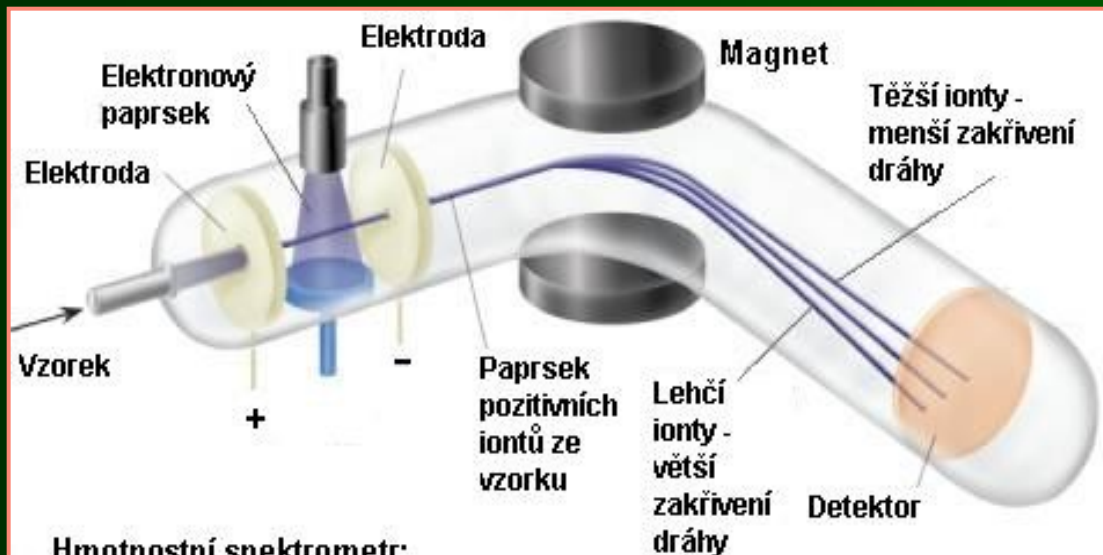
TOF

Iontová past



Magnetický sektorový analyzátor

- Nejdéle používaný a nejlépe prozkoumaný, stále se vyvíjí
- Klasický typ detektoru, využívá skutečnosti, že dráha nabité částice se v magnetickém poli zakřivuje tím více, čím má vyšší náboj a nižší hmotnost
- Malé molekuly – pouze GC/MS (EI)
- Velmi přesný, ve své moderní verzi velmi nákladný (v klin. biochemii není používán)



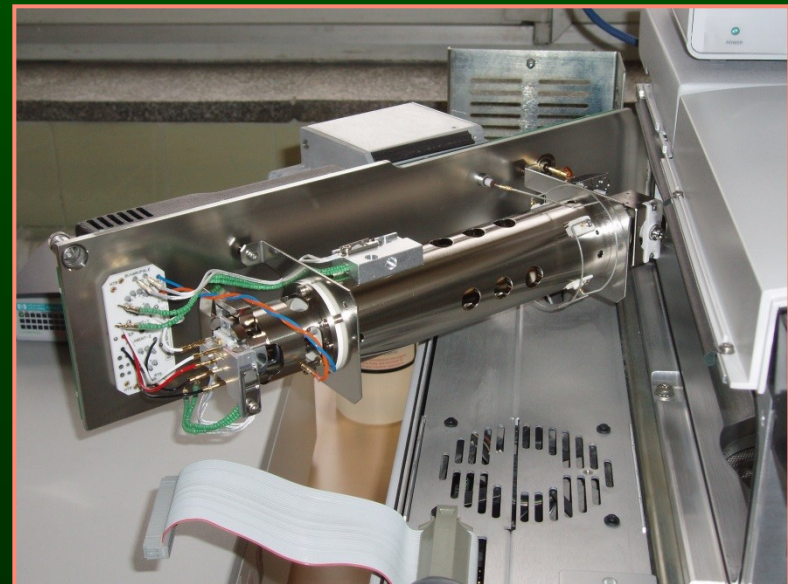
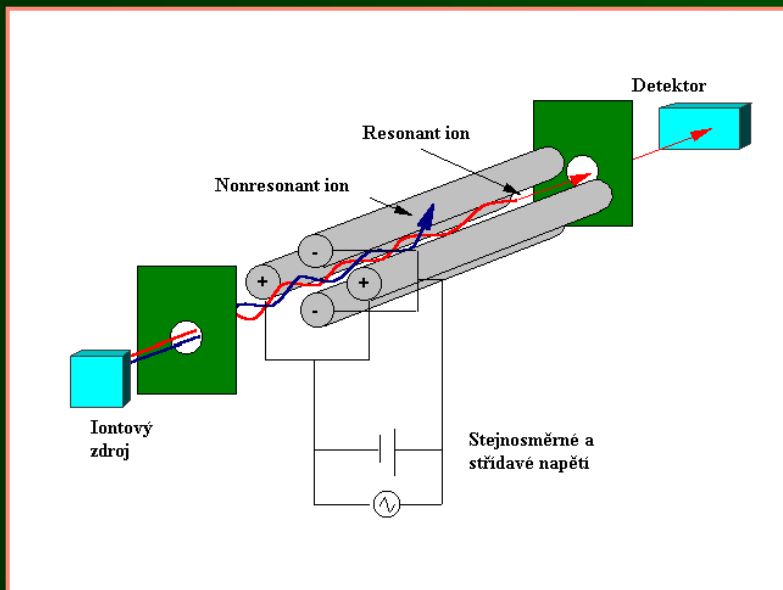
Hmotnostní spektrometr:

Elektronový paprsek fragmentuje molekuly látek v plynném stavu za vzniku pozitivních iontů. Ionty jsou urychleny elektrickým polem a prolétají magnetickým polem, kde se jejich dráhy zakřivují.



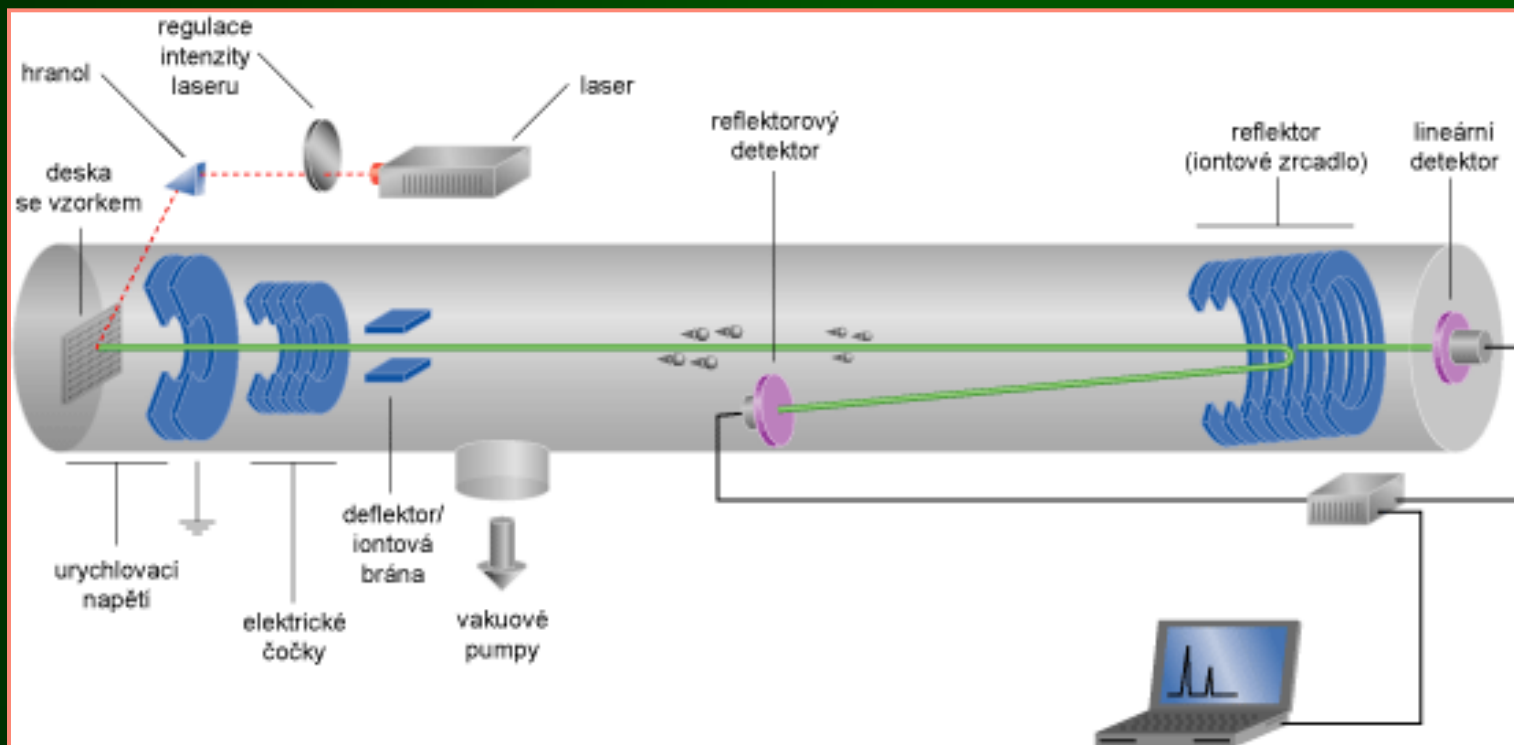
Kvadrupol

- Konstrukce - 4 kovové tyče, na ně vloženo stejnosměrné a střídavé napětí
 - Ionty, které vlétnou do prostoru mezi tyčemi, začnou oscilovat
 - Při vhodné kombinaci obou složek napětí prochází kvadrupolem pouze ionty o určitém poměru m/z
 - změnou vkládaných napětí je možné nechat projít kvadrupolem postupně ionty v celém rozsahu m/z
 - Lze použít pro GC/MS i LC/MS (v kombinaci s EI, CI, ESI,...),
 - pouze pro menší molekuly



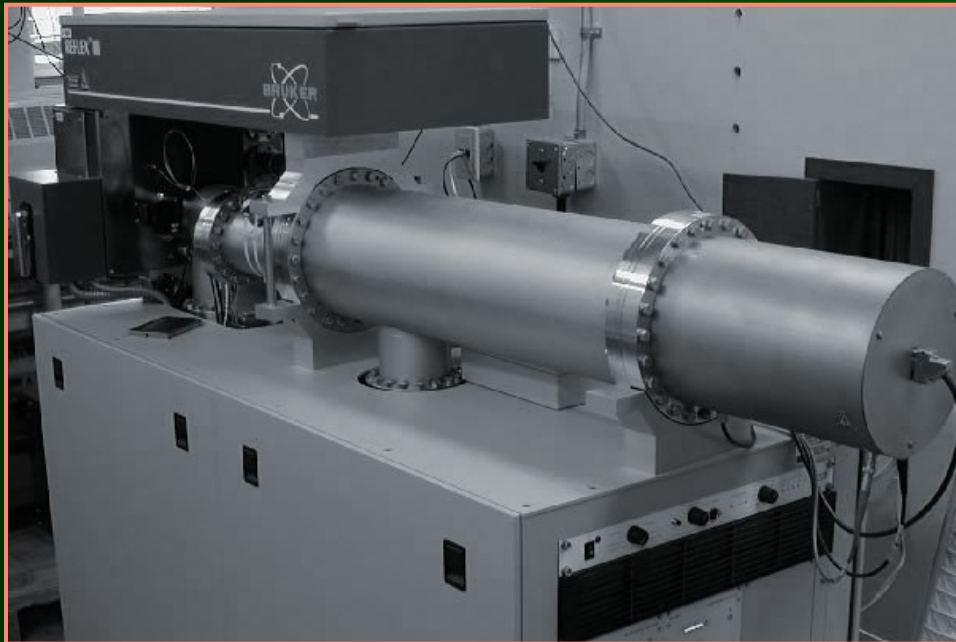
TOF — analyzátor „Time of Flight“ (průletový)

- Deteguje hmotnosti ionizovaných molekul na základě doby jejich letu evakuovanou trubicí
- rychlosti letu závisí na hodnotách efektivní hmotnosti m/z
 - lehčí molekula letí rychleji
- Lineární nebo refletronový mód (reflektron - vyšší rozlišovací schopnost)



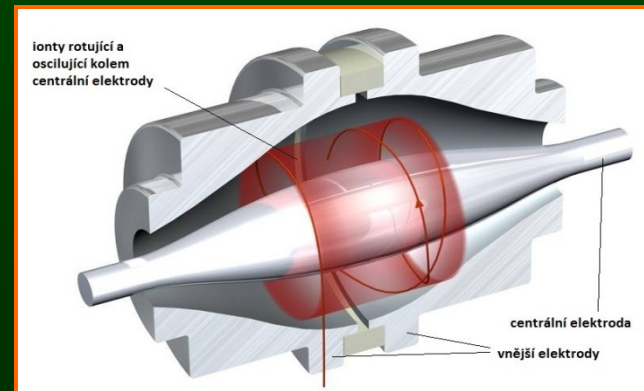
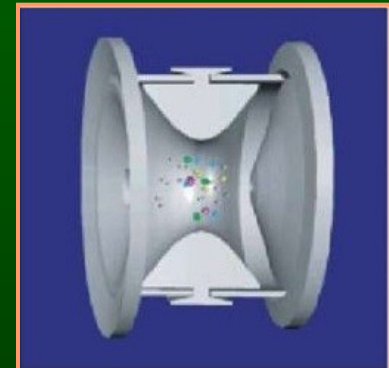
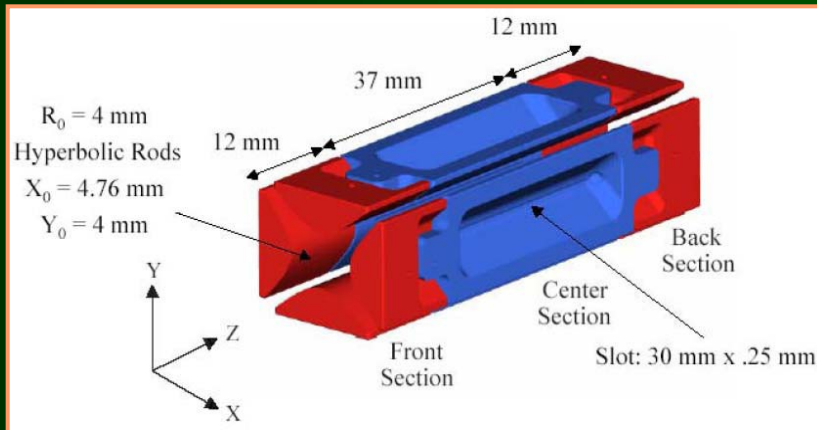
TOF — analyzátor „Time of Flight“ (průletový)

- TOF - teoreticky neomezený rozsah hmotností, pro které se dá používat
 - v praxi se mu dává přednost pouze pro velké molekuly
- V kombinaci s MALDI, ESI



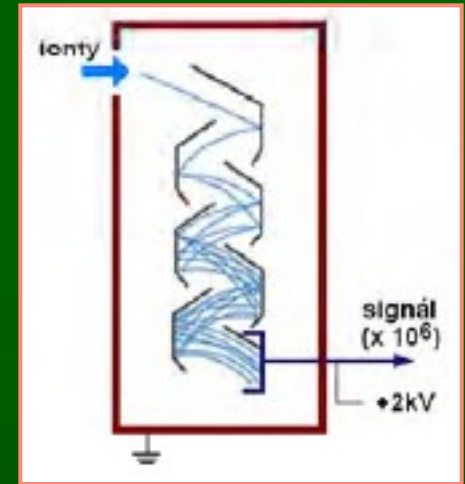
Iontové pasti

- stejné fyzikální principy jako kvadrupól
 - regulace pohybu iontu v určitém prostoru elektrickými poli
- ionty se pohybují po určitou dobu v prostoru iontové pasti
- vypuzovány z pasti selektivně podle hodnoty m/z

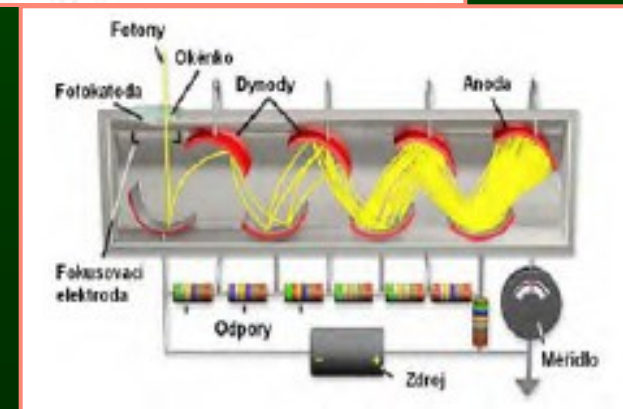
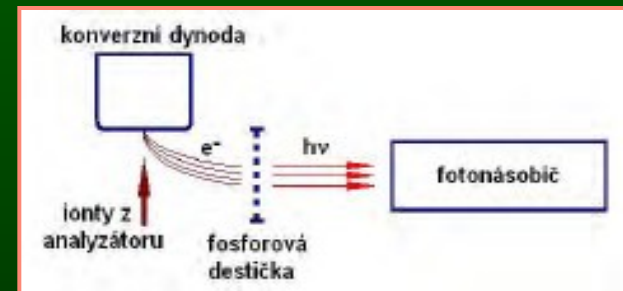


Detektor

- detekce iontů po jejich separaci podle hodnoty m/z
- určení relativní intenzity (četnosti) jednotlivých iontů
- **Elektronový násobič** - série dynod se vzrůstajícím potenciálem
 - ion narazí na povrch první dynody - emise elektronu
 - po jeho dopadu na další dynodu - vícenásobná emise
 - kaskádový efekt - velké množství elektronů
 - detekce

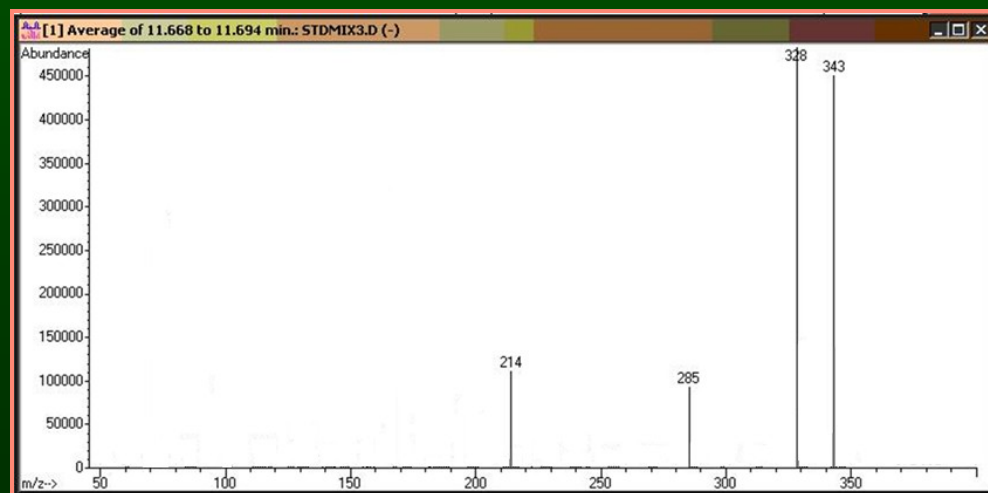
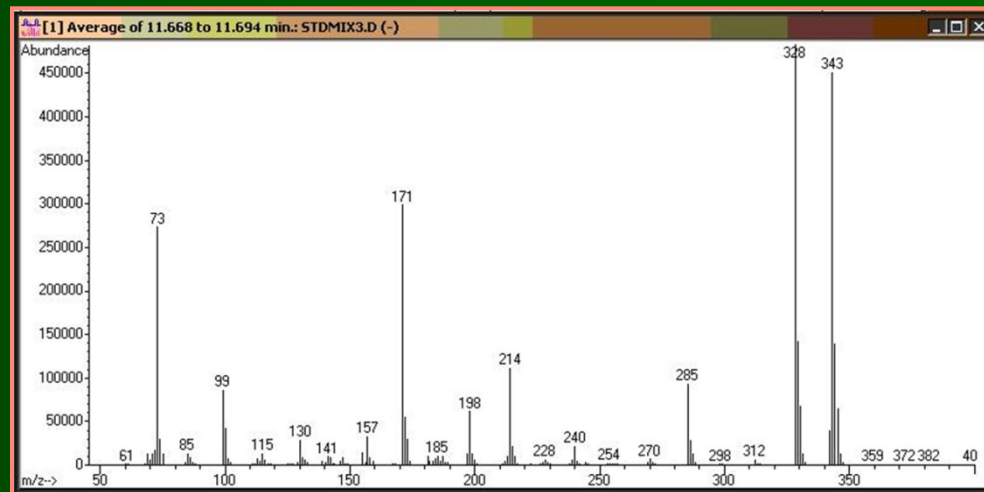


- **Fotonásobič**
 - před vlastním fotonásobičem umístěna fosforová destička
 - na ni dopadají částice z konverzní dynody
 - emise fotonů
 - fotony dopadají na fotokatodu
 - fotoelektrický jev - emise elektronů
 - elektrony zmnoženy stejně jako v elektronovém násobiči



Detekce - hmotnostní spektrum

- **Skenovací mód** = zobrazí všechny fragmenty zvoleného rozmezí m/z
- **SIM mód** (Selection Ion Monitoring) – způsob, kdy přístroj registruje pouze několik zvolených fragmentů (zvýšení citlivosti)

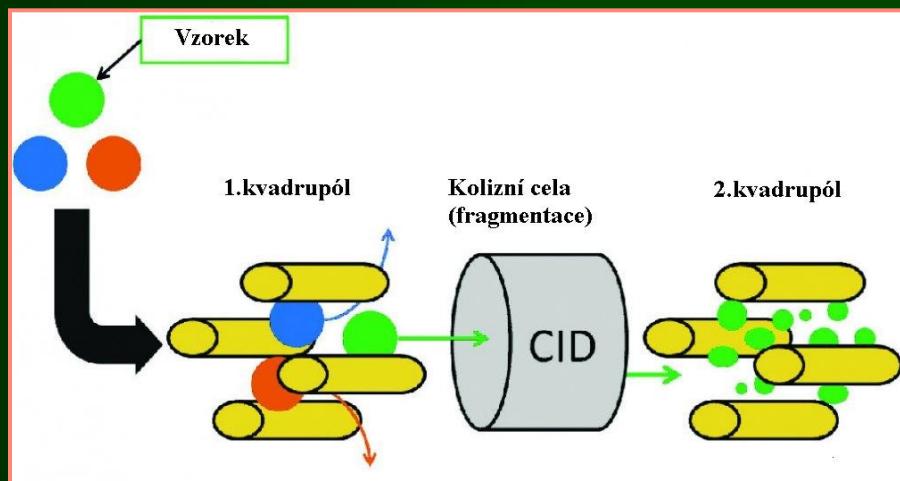


Tandemová hmotnostní spektrometrie, MS/MS

- MS/MS - ionty podrobeny dvěma hmotnostním analýzám (zapojení dvou či více iontových separátorů v tandemu)
- MS/MS umožňuje **rychlou** analýzu bez použití separačních metod (GC, LC) ve složité matici, velice **citlivá** metoda

Standardně např. **trojitý kvadrupól QqQ**:

- První kvadrupól vybírá prekursorový ion
- Ve druhé části - kolizní cele - probíhá fragmentace prekursorového iontu (srážkou iontu s atomy inertního plynu)
- Poslední kvadrupól analyzuje fragmenty



Pozn.: QqQ v kombinaci s ESI (přímý nástřik) se používá pro novorozenecký screening

- Obdobně **TOF-TOF** analyzátor
- Hybridní **Q-TOF** analyzátor (kvadrupól – TOF)

Kvantita v hmotnostní spektrometrii

Kvantifikace látek - metoda vnitřního (interního) standardu (IST)

- IST pro stanovení určité látky - analogická sloučenina nebo homolog
 - co nejpodobnější chemicko-fyzikální vlastnosti jako stanovovaná látka
 - látka, která se v původním zkoumaném vzorku nevyskytuje
- IST se přidává do vzorku již na začátku zpracování
 - pro potlačení vlivu matrice či kontaminace na účinnost ionizace analytu
- IST se přidává do všech vzorků ve stejné koncentraci
- Z MS spektra se po analýze vyhodnocuje **poměr intenzit fragmentů typických pro stanovovanou látku a IST**

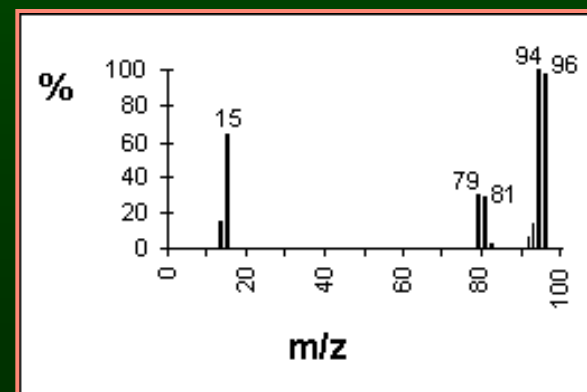
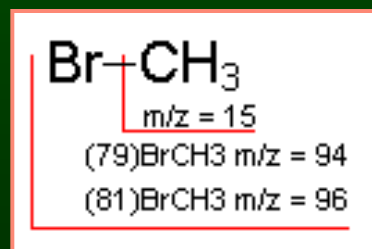
Pozn.: Pro kvantifikaci je vhodné použití selektivního záznamu iontů (**SIM** – Selection Ion Monitoring) – způsob, kdy přístroj registruje pouze několik zvolených fragmentů (zvýšení citlivosti)

nejpřesnější postup:

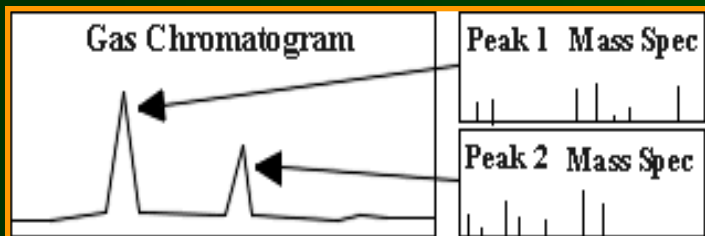
metoda izotopického zředování

IST - izotopicky značený standard stanovované látky

- identické chemicko-fyzikální vlastnosti
- nejčastěji deuterovaný

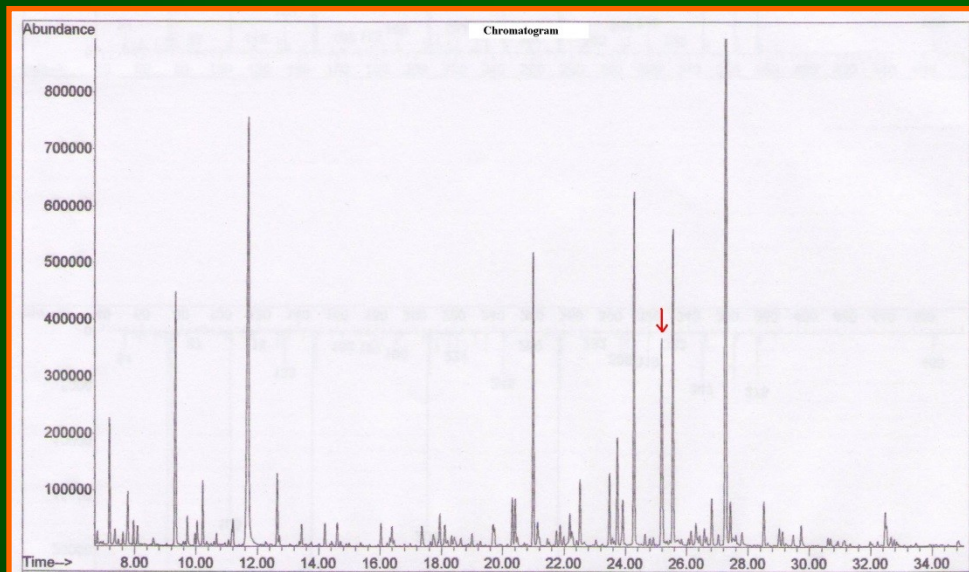


Příklady použití – GC/MS



- Analýza neznámých složek směsi
 - hmotnostní spektrum pro každou složku směsi
 - porovnání s databází spekter v počítači - identifikace
- Potvrzení či vyloučení metabolitů, které svědčí pro určité metabolické onemocnění
- Kvantifikace určitých metabolitů
- Toxikologie – léky, drogy, alkohol

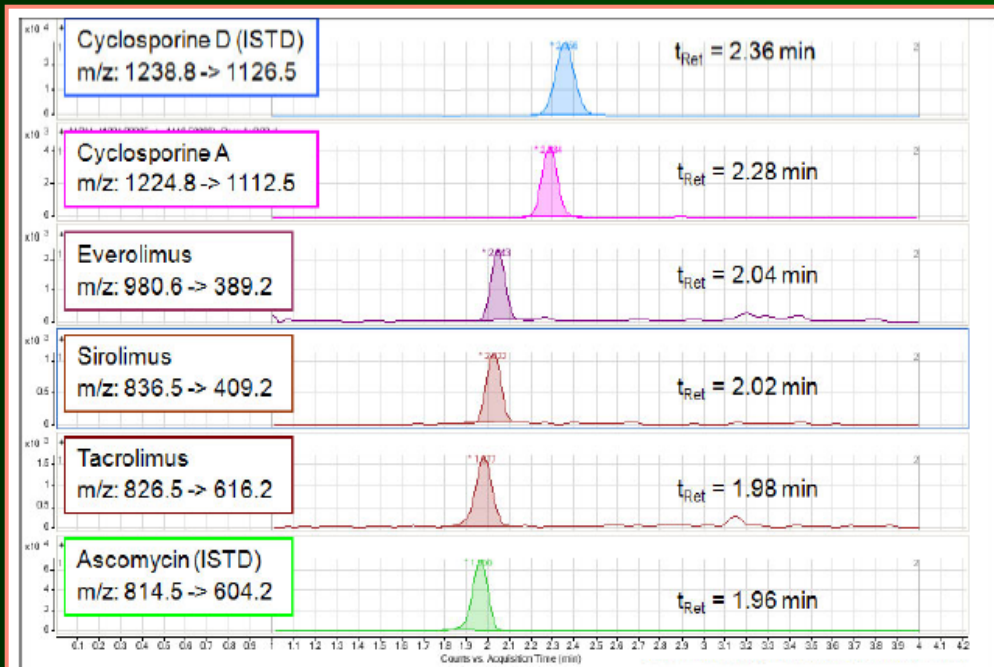
Ukázka – organické kyseliny v moči



Příklady použití - LC/MS, LC/MS/MS

- Toxikologické analýzy
- Farmakokinetické studie, stanovení léků
- Proteomika / metabolomika

Stanovení léků LC/MS (LC/MS/MS)

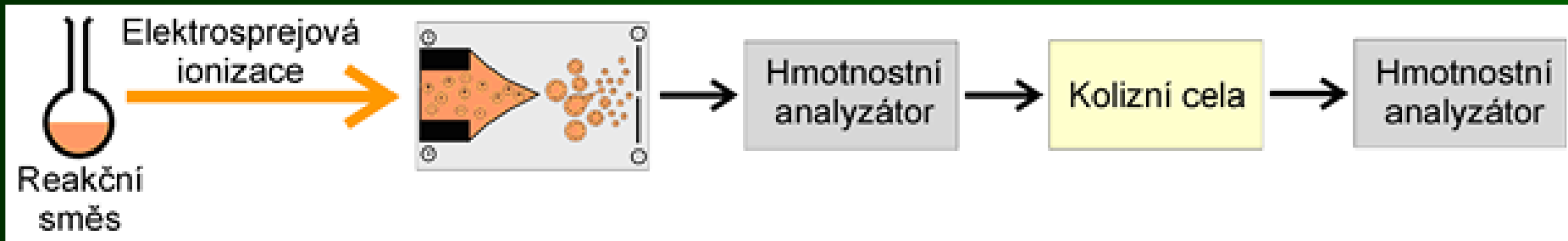


Pozn.: přístroj registruje pouze dva fragmenty typické pro danou molekulu (=selektivní záznam iontů = Selection Ion Monitoring = **SIM**)



Příklady použití – MS/MS

- MS/MS analýza bez použití separační metody (GC, LC)
 - uspořádání ESI – trojitý kvadrupol:



Novorozenecký screening dědičných poruch metabolismu

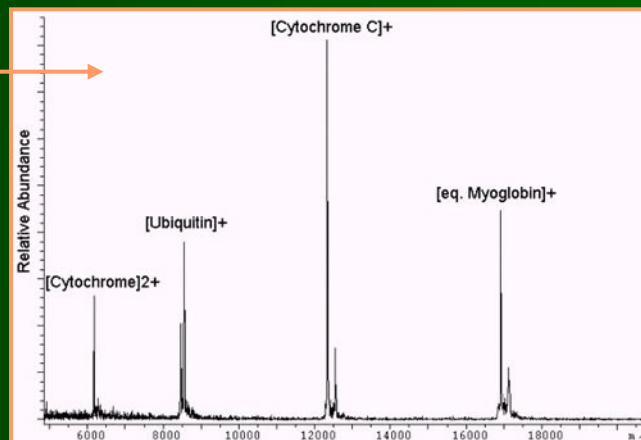
- Stanovení markerů dědičných poruch metabolismu aminokyselin a mastných kyselin ze suché krevní kapky (15 různých metabolických poruch, např. fenylketonurie)



Příklady použití - MALDI-TOF

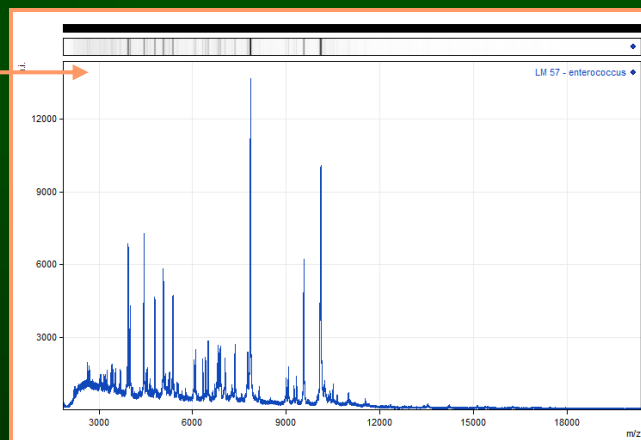
■ Analýza biomolekul

- proteiny
- peptidy
- oligosacharidy
- nukleotidy...

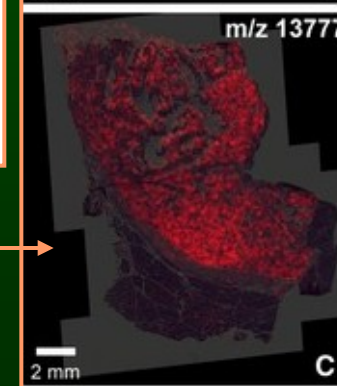
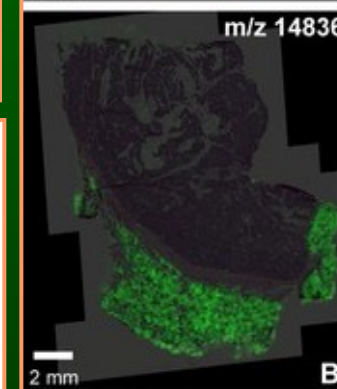
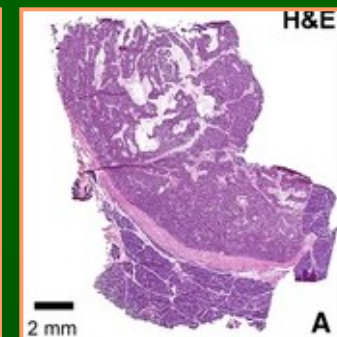


■ Identifikace mikroorganismů

po extrakci proteinů z bakterií nebo i metodou celých buněk



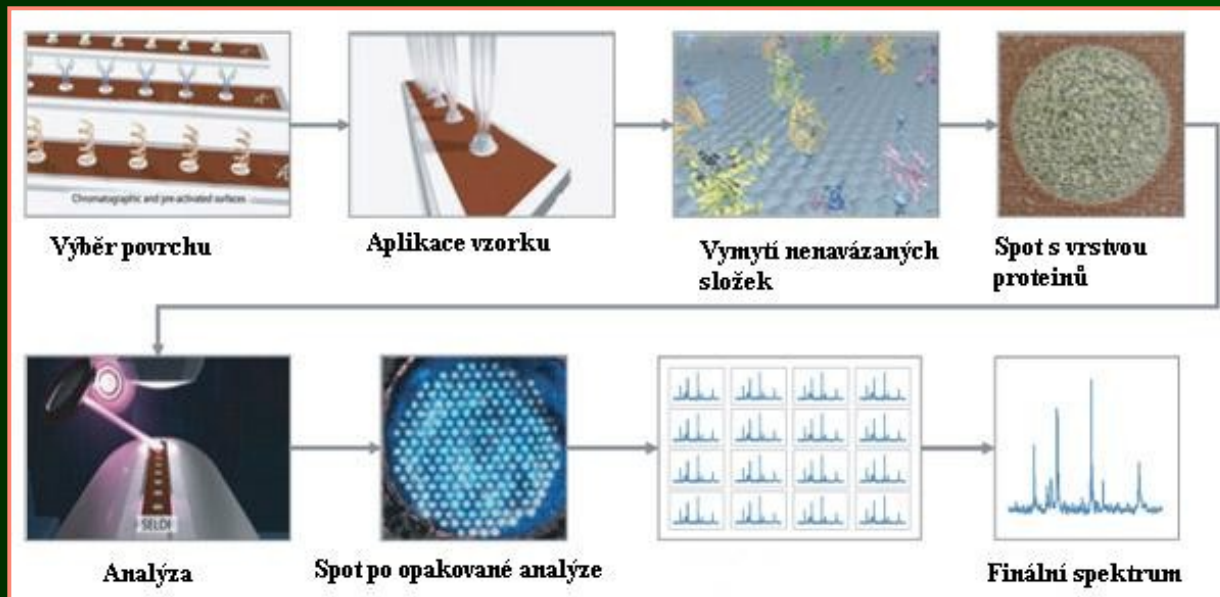
- MALDI - IMS (imaging mass spectrometry) zobrazení rozložení proteinů i nízkomolekulárních látek ve tkáních přímou „in-situ“ analýzou



SELDI – Surface Enhanced Laser Desorption Ionization

Analýza proteinů pomocí vazby na předpřipravený povrch pevné fáze proteinového čipu

- Povrch čipu - tvořený protilátkou, receptorem, ligandem, chemickou úpravou
- Po nanesení vzorku - navázání proteinů k povrchu adsorpcí, elektrostatickou interakcí, na afinitním principu,...
- Promytí mikročipu - odstranění nenavázané složky
- Analýza – viz MALDI - TOF



- Vzorek komplexní směsi proteinů lze analyzovat současně na několika různých sorbentech, aby byly navázány veškeré proteiny ze vzorku
- Čipy mohou být vyrobeny dle požadavku zákazníka

Děkuji za pozornost...

