

Úvod do hmotnostní spektrometrie

Friedecký D.^{1,2}, Lemr K.³

¹Laboratoř dědičných metabolických poruch, OKB, Fakultní nemocnice Olomouc

²Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

³RCPTM, Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

SOUHRN

Přehled pojednává o problematice věnované základům hmotnostní spektrometrie. Jsou zde vysvětleny význam a principy fungování jednotlivých částí hmotnostních spektrometrů. Dále jsou uvedena instrumentální uspořádání, která jsou v současnosti používána pro analýzu biologických materiálů.

Klíčová slova: hmotnostní spektrometrie

SUMMARY

Friedecký D., Lemr K.: Introduction to mass spectrometry

The overview is focused on basics of mass spectrometry. Importance and principles of mass spectrometry parts are explained. Different mass spectrometry instruments, which are used for analysis of biological materials, are introduced.

Keywords: mass spectrometry

Úvod

V tomto a následujících dílech se budeme věnovat principu, analytickým parametrům, běžným a speciálním aplikacím a v neposlední řadě také limitám použití hmotnostní spektrometrie při analýze biologických materiálů. V prvním díle je podán ve zkratce princip samotné techniky, uvedena nejčastější uspořádání a stručný výčet aplikací, se kterými se dnes můžeme setkat v rutinních klinických laboratořích. Tento úvod prosím, milí čtenáři, berte pouze jako krátké představení hry s ionty ve vakuu, hry, která vám může poskytnout zajímavé informace o vašich vzorcích. Detailnější seznámení vám podá literatura uvedená na konci článku anebo v případě hlubšího zájmu se můžete obrátit na kolegy, kteří již touto technikou disponují. Protože, pokud je nám známo, společenství „hmotníkářů“ je sdílné na informace a rádo se s vámi podělí o taje této hry.

Takže, přejeme vám příjemné čtení.

Historie

Historie hmotnostní spektrometrie je dlouhá, plná technologických inovací a je doprovázena řadou Nobelových cen. Počátky sahají do konce 19. století, kdy byly prozkoumány principy pohybu nabitých částic v elektrickém a magnetickém poli. Jakožto zakladatel hmotnostní spektrometrie je zmiňován Sir Joseph J. Thomson (1856–1940) se svou prací zaměřenou na analýzu nabitých částic v parabolickém hmotnostním spektrografu, který poprvé předpověděl možné využití této nové techniky v chemické analýze. V následujících dekádách pokračoval vývoj hmotnostní spektrometrie (Aston, Dempster, Bainbridge, Nier a další), v počátcích za účelem objevení nových stabilních izotopů, zjištění jejich zastoupení a přesné atomové hmotnosti, ještě před druhou světovou válkou byla tato technika využita při studiu metabolismu.

Ve 40. letech 20. století našla hmotnostní spektrometrie uplatnění ve vojenství v rámci projektu „Manhattan“ při výrobě atomové bomby a jako analytický nástroj při monitorování produktů ropného průmyslu, což v následujících letech odstartovalo výrobu komerčních hmotnostních spektrometrů především v sektorovém uspořádání. Principy průletových analyzátorů, iontové cyklotronové rezonance a kvadrupólového analyzátoru byly popsány v letech 1946–1953 a tyto přístroje byly také posléze uváděny na trh, i když zpočátku ne vždy úspěšně.

Spojení hmotnostní spektrometrie s plynovou chromatografií v 60. letech a s kapalinovou chromatografií v 70. letech předznamenalo široké využití v multikomponentní analýze složitých směsí organických látek. V tomto období byly také objeveny možnosti tandemového uspořádání pro kvantitativní analýzu. Hlavní problém však spočíval v omezených možnostech ionizačních technik, kdy problémem byla například ionizace velmi polárních látek nebo biomakromolekul. Průlomem bylo zavedení ionizace pomocí elektrospeje nebo MALDI v 80. letech, které rozšířily aplikovatelnost hmotnostní spektrometrie na uvedené typy sloučenin.

V posledních dvou dekádách se rozvíjí i možnosti hmotnostních analyzátorů (separace iontů), do praxe byly zavedeny technologie na principu iontové cyklotronové rezonance s Fourierovou transformací, orbitrap, lineární iontové pasti a rozšířily se i přístroje s hybridním tandemovým uspořádáním, například spojení kvadrupólu a průletového analyzátoru. Hmotnostní spektrometrie doznala výrazných pokroků ve zlepšení citlivosti měření a především v robustnosti, která je nezbytná pro dlouhodobý a bezporuchový provoz v rutinních laboratořích. A tak se v současnosti široce využívá v mnoha oblastech zahrnujících průmysl, zemědělství, laboratoře pro kontrolu potravin, životního prostředí i v lékařství.

Princip

Ačkoliv to není na první pohled úplně zřejmé, je hmotnostní spektrometrie svoji podstatou separační technikou podobně jako chromatografické či elektro-migrační techniky. Hlavní rozdíl spočívá v prostředí, ve kterém dochází k separaci. Chromatografie je typicky prováděna v kapalině nebo plynu a dochází k separaci analytů na základě interakce se stacionární fází. Elektroforéza využívá rozdílů v rychlosti pohybu nabitých částic v základním elektrolytu při aplikaci stejnosměrného elektrického pole. Hmotnostní spektrometrie je založena na interakci nabitých částic s elektrickým nebo magnetickým polem ve vakuu. V současné době se komerčně používá několik technických řešení, z nichž každé má pozitiva i negativa, a tudíž je vhodné pro daný typ ať už kvalitativní nebo kvantitativní analýzy. Všechny hmotnostní spektrometry se však skládají ze tří základních částí – iontový zdroj, analyzátor a detektor částic.

Iontové zdroje

Nezbytnou součástí každého hmotnostního spektrometru je iontový zdroj, kde se „vyrábí“ ionty v plynné fázi, které se případně po svém vzniku rozpadají (fragmentují). Z analytů vstupujících do iontového zdroje společně s matricí (např. mobilní fáze z kapalinového chromatografu, doprovodné složky vzorku) vznikají kladně nebo záporně nabitě ionty molekulární (M^+ , M^-), aduktové ($[M+H]^+$, $[M-H]^-$, $[M+CH_5]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+HCOO]^-$ ap.) nebo v některých případech méně stabilních látek i fragmenty ionizované molekuly. Iontových zdrojů lze v současné době napočítat desítky, avšak obecně je můžeme rozdělit do dvou skupin na základě množství dodané energie při ionizaci na tzv. „tvrdé“ a „měkké“.

Elektronová ionizace

Typickým zástupcem skupiny zdrojů s „tvrdou“ ionizací je elektronová ionizace (EI, Electron Ionization) (obr. 1), která je založena na principu předávání energie letících elektronů molekulám analytu. Nejčastěji získáváme kladně nabitý radikál molekuly a jeho bohaté fragmentační spektrum. Jedná se o ionizaci v plynné fázi často využívanou pro spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS). Ve srovnání s „měkkou ionizací“ (např. chemická ionizace) je předností „tvrdé ionizační techniky“ vznik bohatých fragmentačních spekter umožňujících identifikaci analyzované sloučeniny. S výhodou se využívají knihovny spekter, které tvoří nezbytnou součást vyhodnocení a interpretace (NIST ap.) a jsou navíc univerzální pro přístroje různých firem. Použití elektronové ionizace omezuje požadavek na těkavost molekuly a také v případě GC/MS samotná plynová chromatografie, která je z principu schopná separovat pouze volatilní látky. V řadě případů se musí analyty derivatizovat (trimethylchlorsilan, chloroformiát ap.), což má za následek horší analytické parametry především v případech kvantitativních multikomponentních me-

tod. Problémem při identifikaci může být úplný rozpad molekulového iontu ve zdroji, a tím ztráta informace o molekulové hmotnosti.

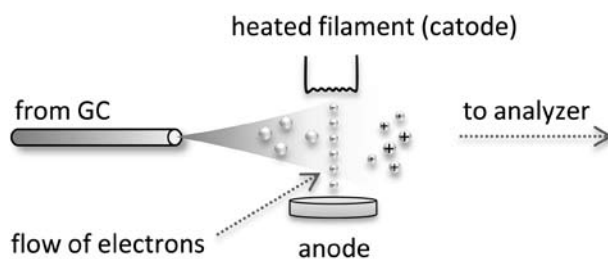


Fig. 1. Electron Ionization

Tento problém lze řešit využitím „měkké“ ionizační techniky, v případě spojení GC/MS např. chemickou ionizací. U této techniky je nejprve ionizován reakční plyn, např. methan, a až následně molekuly analytu. Těm je při ionizaci předáváno méně energie a nedochází k tak rozsáhlé fragmentaci jako u EI. Ve spektru lze pozorovat většinou ion $[M+H]^+$ a získat tak molekulovou hmotnost sledované sloučeniny. Existuje řada dalších ionizačních technik, kdy k ionizaci dochází za pomoci např. vysokého napětí (elektrosprej, ESI), UV záření (APPI) nebo elektrického výboje (APCI). Dále lze provádět desorpci analytů z pevných povrchů za pomoci laseru (MALDI), desorpčního elektrospreje (DESI), metastabilního plynu (DART) apod. Na rozdíl od „tvrdých“ ionizačních technik tyto poskytují převážně molekulární ionty, případně adukty se složkami mobilní fáze nebo matrice.

Elektrosprej

V současné době se pro analýzu biologických vzorků široce používá ionizace elektrosprejem a MALDI. Elektrosprej (ESI, ElectroSpray Ionization) (obr. 2) je poměrně univerzální a dovoluje ionizaci od středně polárních molekul až po ionty. Ionizace probíhá aplikací silného elektrického pole na elektrodu (napětí 2-5 kV) za atmosferického tlaku. Proces zahrnuje tvorbu nabitých kapiček – aerosolu na hrotu elektrody/kapiláry, do které vstupuje roztok, např. mobilní fáze s analyty. Tvorba aerosolu je podporována koaxiálně proudícím zmlžujícím plynem. Rozpouštědlo je z nabitých kapiček během velmi krátkého času postupně odpařováno obvykle proudem plynu o zvýšené teplotě, čímž se zvyšuje jejich povrchový náboj. Coulombické odpuzování v jistém okamžiku překoná povrchové napětí a dochází k explozi nabitě kapičky. Při zmenšení kapiček na jistou mez již nevede odpuzování stejně nabitých iontů k rozpadu kapek, ale ionty jsou uvolňovány z jejich povrchu do plynné fáze. Elektrosprej se vyznačuje vysokou robustností v rutinním použití, lze jej využít i při vysokých průtocích mobilní fáze více než 1 ml/min. Avšak poměrně zásadní negativum je potlačení tvorby iontů (ion suppression) analytu v případě, že ve stejném okamžiku vznikají konkurenční ionty z látek, které jsou přítomny v řádově vyšších koncentracích (např. soli ze vzorků). Tento jev je nezbytné eliminovat vhodnou separací analytu od složek snižujících iontový výtěžek, např. za pomoci kapalinové chromatografie, a současně, pokud je to možné, použít stabilními izotopy značené interní

standards pro správnou kvantifikaci. Ve snaze umožnit analýzu i v přítomnosti elektrolytů v mobilní fázi byla vyvinuta řada řešení (mimoosové či ortogonální uspořádání, z-spray a pod.) jak převést ionty z iontového zdroje, aniž by se vstup do vakuované části přístroje či analyzátor kontaminovaly balastními látkami či ionty. Reálně se totiž do analyzátoru transportuje pouze 1 až 3 % vzniklých iontů.

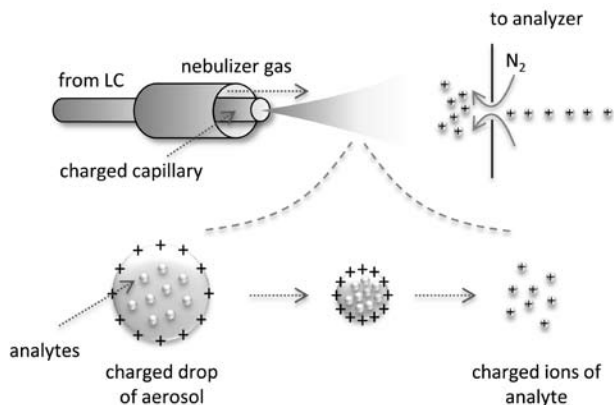


Fig. 2. Electrospray Ionization

MALDI

Pro analýzu proteinů a jiných makromolekul se velmi často používá desorpční ionizace vzorku laserem za asistence matrice (MALDI, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) (obr. 3). Před samotnou ionizací se vzorek smíchá obvykle s organickou kyselinou, která snadno absorbuje energii laseru, a posléze se vysuší. Proces ionizace zahrnuje krátký intenzivní puls laseru, který zahřeje a desorbuje matrici a analyty. Současně dochází k ionizaci matrice (organická kyselina), která předává náboj analytu. Celý proces probíhá ve vakuu, odpadá tedy problém přenosu iontů mezi atmosférickým tlakem a provozním vakuem analyzátoru, i když i tuto ionizaci lze realizovat za atmosférického tlaku.

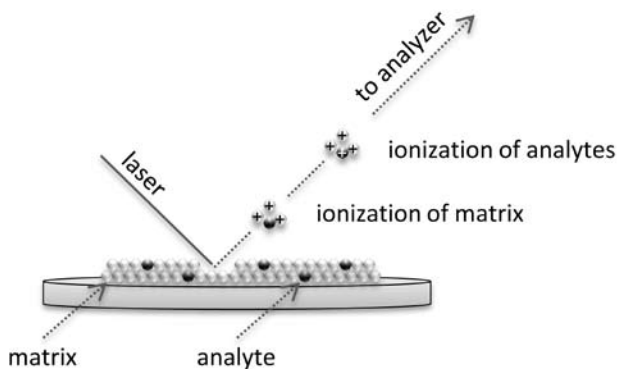


Fig. 3. Matrix Assisted Laser Desorption Ionization

Hmotnostní analyzátoři

Klíčovou součástí hmotnostního spektrometru je analyzátor, ve kterém dochází za vakua k separaci iontů na základě poměru hmotnosti ku náboji (m/z). Byla vyvinuta celá řada analyzátorů, avšak všechny využívají statické nebo dynamické elektrické nebo magnetické pole, případně jejich kombinace. Analyzátoři můžeme rozdělit do několika skupin. První zahrnuje skenující

analyzátoři, které kontinuálně v čase separují a vysílají k detektoru ionty s určitou hodnotou m/z . Typickými zástupci jsou kvadrupólové analyzátoři nebo sektorové přístroje. Druhou skupinu zahrnují analyzátoři s transmisí všech iontů současně do letové trubice, kde pak dochází k jejich separaci díky rozdílné době letu k detektoru (TOF, Time of Flight – průletové analyzátoři). Další skupinu tvoří analyzátoři zachycující ionty v cele či pasti (iontové pasti, iontové cyklotronová rezonance (ICR) nebo elektrostatická iontová past (Orbitrap)). ICR a orbitrap využívají Fourierovu transformaci a představují kombinaci analyzátoru a detektoru v jedné měřící cele.

Kvadrupól

Pravděpodobně nejvíce rozšířeným hmotnostním analyzátořem je v současnosti kvadrupól (obr. 4). Jeho výhodou je relativně nižší pořizovací cena. Jedná se o kombinaci čtyř tyčí, na které je přivedena kombinace střídavého a stejnosměrného napětí (elektrody naproti sobě mají vždy stejnou polaritu). Na základě velikosti stejnosměrného napětí a amplitudy střídavého napětí v daném okamžiku se ionty s určitou hodnotou m/z pohybují po stabilní trajektorii dále k detektoru, popř. další části analyzátoru. Ionty s nestabilní trajektorií jsou vychýleny a na detektor nedopadnou. Let iontů ve směru axiální osy je zajištěn gradientem napětí napříč jednotlivými částmi hmotnostního spektrometru. Samotný analyzátor může pracovat ve dvou režimech. Budto ve skenovacím, kdy se kontinuálně mění elektrické pole, což umožňuje proměřit všechny hodnoty m/z v krátkém časovém úseku (např. 1 s). Anebo se nastaví elektrické pole kvadrupólu tak, aby procházely ionty pouze s příslušnou velikostí m/z – tzv. SIM, single ion monitoring. První režim je méně citlivý, ale umožňuje sledování všech iontů vzniklých v iontovém zdroji. Druhý režim se naopak využívá pro citlivou kvantifikaci předem zvolených látek.

Průletový analyzátor

V tomto případě jsou ionty v pulzech akcelerovány elektrickým polem do vakuované trubice, kde se pohybují směrem k detektoru (obr. 5). Separace je založena na vztahu mezi rychlostí pohybu iontů a m/z . Hodnota m/z je vypočtena z doby letu mezi zdrojem a detektorem. Průletové analyzátoři mohou nabídnout lepší rozlišovací schopnost iontů než kvadrupólové analyzátoři. Často se využívá uspořádání za použití tzv. reflektromu (iontového zrcadla), které otáčí směr letu o téměř 180°, čímž se prodlouží dráha a i doba letu a zároveň kompenzují rozdíly v hodnotách kinetické energie iontů dané látky, což významně zlepšuje rozlišení iontů (v ideálním případě by ionty dané hodnoty m/z měly mít stejnou kinetickou energii, a tím stejnou rychlost).

Tandemové uspořádání

V posledních letech se v rutinních laboratořích rozšiřují kombinace hmotnostních analyzátorů, které mají řadu výhod. Typické jsou kombinace dvou kvadrupólů (QqQ), kvadrupólu s průletovým analyzátořem (QqTOF), kvadrupólu s orbitrapem, iontové pasti s iontovou cyk-

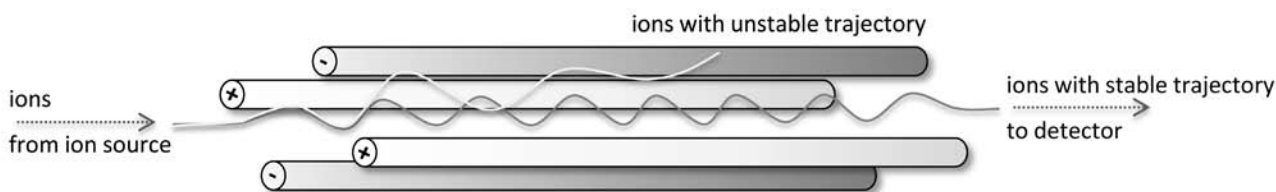


Fig. 4. Quadrupole Analyzer

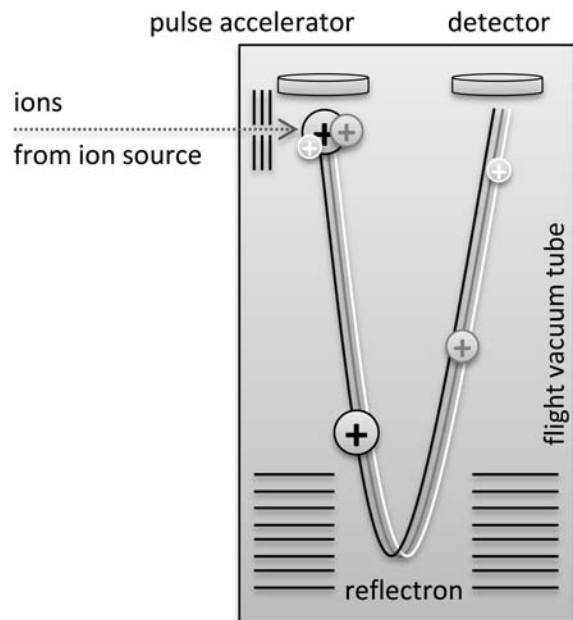


Fig. 5. Time of Flight Analyzer

lotronovou rezonancí (IT-ICR) a další. Tato uspořádání nacházejí značné uplatnění při fragmentačních experimentech především ve spojení s měkkými technikami, kde v iontovém zdroji získáváme pouze molekulární ion (popř. adukt). Pro úplnost je třeba uvést tzv. tandemové uspořádání v čase - v iontové pasti je v jednom místě, ale v různých okamžicích prováděna izolace iontu, jeho fragmentace a proměření spektra produktů, lze provádět experimenty MS2 a více.

Trojité kvadrupól

Velmi populární díky cenové dostupnosti, vysoké citlivosti, specifitě a robustnosti při analýze složitých biologických matric je trojitý kvadrupól. Nachází uplatnění v mnoha směrech rutinní kvantitativní analýzy diagnostických markerů, ať už jednotlivě, nebo v multikomponentní analýze. V principu jsou zde umístěny dva kvadrupóly, které pracují jako hmotnostní analyzátoři. Mezi nimi je kolizní cela (ne nutně na principu kvadrupólu), kde aplikací vyššího tlaku (přivádění kolizního plynu) a urychlení iontů elektrickým polem (kolizní energie) dochází ke srážkám iontů letících z prvního kvadrupólu (prekursorové ionty) s molekulami či atomy kolizního plynu (dusík, argon). Srážky vedou ke zvýšení vnitřní energie iontů, a tím k jejich fragmentaci na specifické fragmenty (produktové ionty), které vstupují následně do druhého kvadrupólu. Jedná se o tzv. kolizně indukovanou disociaci (CID). Trojitý kvadrupól může pracovat ve čtyřech režimech:

Sken produktových iontů

Q1 propouští ion s definovanou hodnotou m/z , který je následně fragmentován v kolizní cele. Q3 pracuje v režimu skenování v definovaném rozsahu m/z . Všechny vzniklé fragmenty jsou zaznamenávány detektorem (obr. 6). Získáváme kompletní informaci o fragmentaci vybraného iontu. Tento režim lze obecně použít pro identifikaci látek nebo pro určení přechodů vhodných pro kvantifikaci v SRM módu (viz níže).

Sken prekursorových iontů

Zde je situace opačná ve srovnání se skenem produktových iontů. Q1 pracuje v režimu skenování m/z , čili postupně propouští do kolizní cely ionty se zvyšující se hodnotou m/z , kde jsou následně fragmentovány. Q3 po celou dobu propouští pouze jeden specifický fragment, který je detekován (obr. 7). Tento přístup je vhodný pro sledování molekul se stejnou funkční skupinou, které odpovídá typická fragmentace (např. fosfát u nukleotidů, ribóza u purinových ribozidů, butenová kyselina u acylovaných karnitinů).

Sken neutrální ztráty

Q1 i Q3 skenují současně ionty s konstantní diferencí m/z , která představuje neutrální fragment vzniklý v kolizní cele (obr. 8). Podobně jako u skenu prekursorů se i zde sledují molekuly se stejnou strukturální částí. Další využití je v případě derivatizace, např. aminokyselin, kdy navázaná funkční skupina zvyšuje ionizaci (a tedy citlivost) a současně při fragmentaci poskytuje neutrální fragment.

Sledování rozpadu iontu

V tomto módu („Selected Reaction Monitoring“, SRM) Q1 slouží k výběru iontu prekursoru, který je v kolizní cele fragmentován za podmínek optimální kolizní energie pro nejintenzivnější produkt, který je vybrán pomocí Q3 (obr. 9). Kvalitativní parametr definovaný dvěma hodnotami m/z odpovídajícími prekursoru a produktu se nazývá hmotnostní přechod (mass transition), např. pro alanin $90,1 \Rightarrow 44,1$. SRM je velmi selektivní a současně mimořádně citlivý mód, který se používá pro kvantifikaci. Další výhodou je vysoká rychlost měření jednoho bodu příslušného hmotnostního přechodu v rozmezí 5–200 ms na přechod. V praxi tedy můžeme v jedné analýze pomocí SRM měřit až stovky analytů, což je poněkud nepřesně označováno jako „Multiple reaction monitoring“ (MRM).

Detektory

Ionty, které jsou vybrány hmotnostním analyzátořem, jsou detektorem zaznamenány a signál je převeden do digitálního formátu. Obecně lze detektory roz-

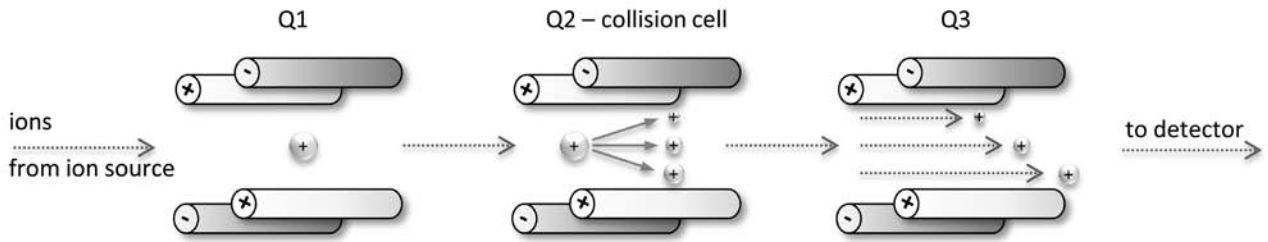


Fig. 6. Product Ion Scan

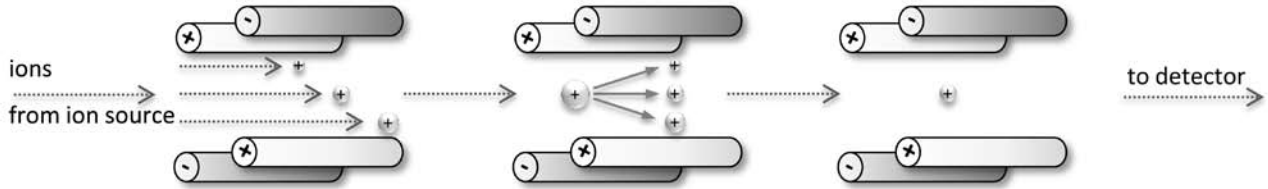


Fig. 7. Precursor Ion Scan

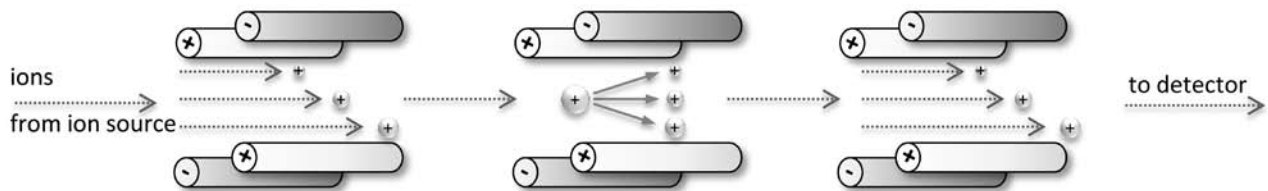


Fig. 8. Neutral Loss Scan

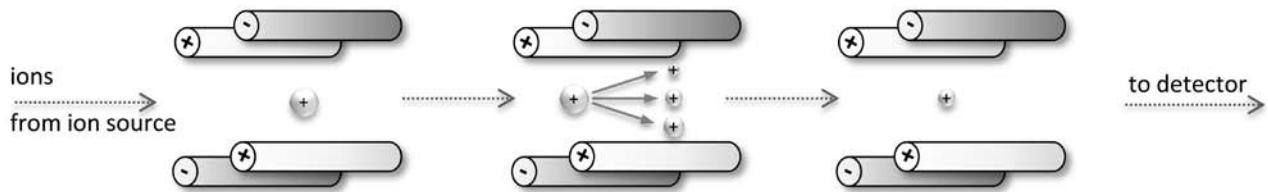


Fig. 9. Single Reaction Monitoring

dělit do dvou skupin podle schopnosti záznamu iontů. Do první skupiny řadíme detektory, které zaznamenávají všechny ionty bez ohledu na velikosti m/z . Tyto detektory jsou založeny na přímém měření elektrického proudu, který vzniká při srážce iontu s dynodou a následně je zesilován pomocí násobičů (viz schéma detektorů). Obvykle se používají elektronové násobiče, které amplifikují elektrony pomocí sady dynod nebo kontinuálním dynodovým elektronovým násobičem

– tzv. „channeltron“ (obr. 10). Do druhé skupiny řadíme detektory, které jsou schopny zaznamenat ionty i ve vztahu k velikosti m/z . Do této skupiny řadíme iontově cyklotronovou rezonanci a orbitrap. Ionty jsou detekovány jako komplexní „proudový obraz“ všech přítomných iontů s různými hodnotami m/z díky indukci proudu v důsledku pohybu iontů v hmotnostním analyzátoru. Následně je signál zpracován Fourierovou transformací.

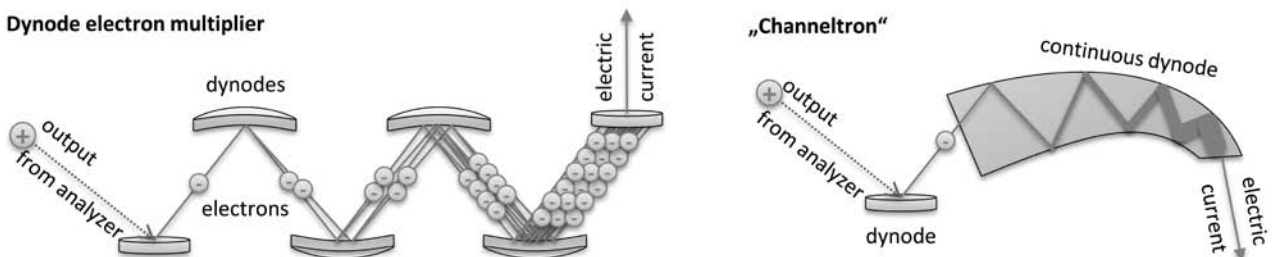


Fig. 10. Detectors

Souhrn aplikací hmotnostní spektrometrie v laboratorní diagnostice

Hmotnostní spektrometrie je dnes široce využívána v mnoha odvětvích lidské činnosti. Zcela nenahraditelná je ve sledování kvality ve farmaceutickém průmyslu, potravinářství, zemědělství, vodárenství a další. Následující výčet je zaměřen pouze na obor laboratorní diagnostiky.

Toxikologie

- Komplexní analýza stovek léků a jejich metabolitů
- Analýza drog - opiáty, kanabinoidy, amfetamin, alkaloidy
- Analýza vybraných skupin látek - benzodiazepiny, apod.

Monitorování terapeutických hladin léků

- analýza vybraných skupin - antidepressiva, antihypertenziva, antiretrovirotika, kancerostatika, antibiotika
- specifická stanovení - metotrexát včetně glukuronidů, homocystein
- léčba leukemií - busulfan, hydroxyurea, TKI inhibitory
- vitaminy - hydroxylované formy vit D
- hormony

Dědičné metabolické poruchy

- stanovení aminokyselin, organických kyselin, purinů a pyrimidinů
- novorozenecký screening dědičných metabolických poruch
- specifická stanovení – kreatin, guanidinoacetát, kys. sialová

Metabolomika, proteomika, lipidomika

- komplexní analýza profilu metabolitů, proteinů a lipidů
- identifikace virů, bakterií

Literatura

1. **De Hoffmann, E., Stroobant, V.** Mass Spectrometry, Principles and Applications, Third Edition, John Wiley & Sons Ltd, England, 2007, ISBN: 978-0-470-03310-4
2. **Dass, Ch.** Fundamentals of contemporary mass spectrometry, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA, 2007, ISBN: 978-0-471-68229-5
3. **Gross, J. H.** Mass Spectrometry, A Textbook, Second Edition, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 2011, ISBN: 978-3-642-10709-2
4. **Cole, R. B. (Ed.)** Electrospray and MALDI Mass Spectrometry, Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications, Second Edition, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, USA, 2010, ISBN: 978-0-471-74107-7

Práce byla podpořena Operačním programem Výzkum a vývoj pro inovace – Evropský fond pro regionální rozvoj CZ.1.05/2.1.00/01.0030 a CZ.1.05/2.1.00/03.0058.

Do redakce došlo 17. 1. 2012

*Adresa pro korespondenci
RNDr. David Friedecký, Ph.D.
Laboratoř dědičných metabolických poruch
Oddělení klinické biochemie,
Fakultní nemocnice Olomouc
I. P. Pavlova 5
775 20 Olomouc
david@friedecky.cz*