

Hmotnostní spektroskopie

Princip – separace iontů podle hmotnosti a náboje

- Fáze
- ionizace
 - urychlení iontů
 - analýza dráhy
 - detekce iontů
 - vyhodnocení

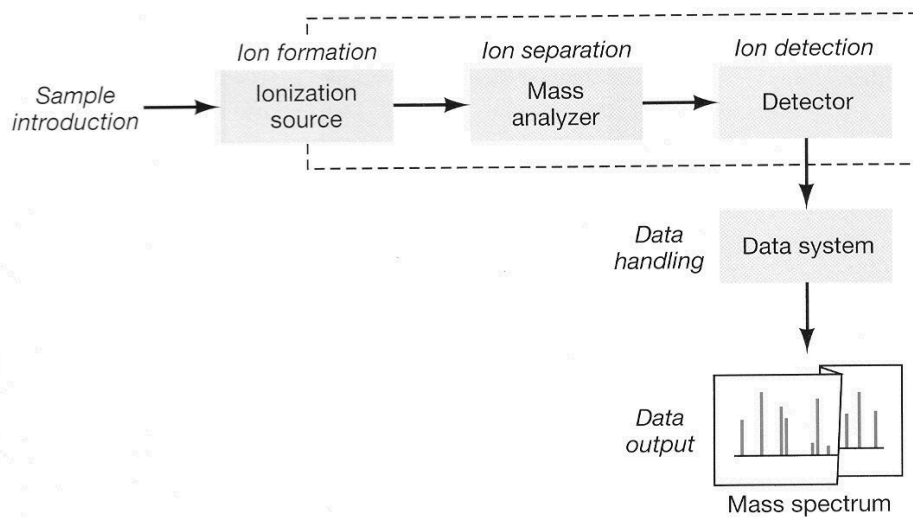
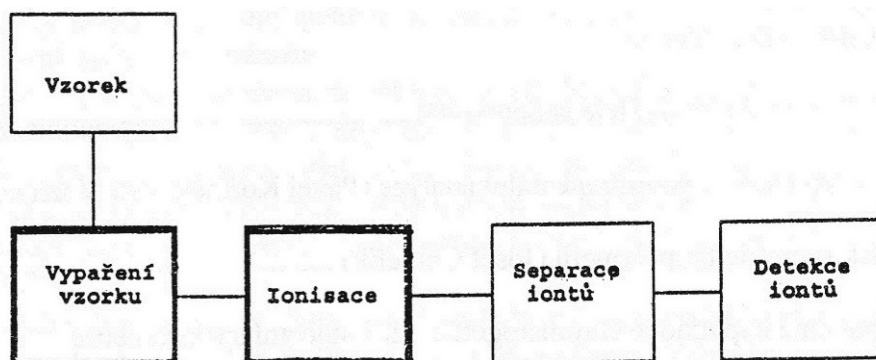
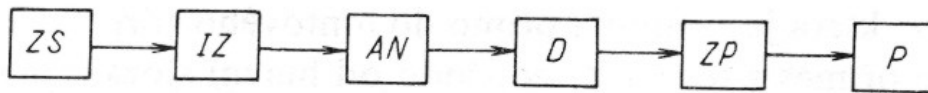


FIGURE 8.2. Modular components of a mass spectrometer. (Adapted, with permission, from www.asms.org [Fig 1] the American Society for Mass Spectrometry [©1998 ASMS; What is Mass Spectrometry, 3rd edition].)





Obr. 3.110 Blokové schéma hmotnostního spektrometru

ZS — zaváděcí systém, IZ — iontový zdroj, AN — analyzátor, D — detektor, ZP — zapisovač, P — počítač

Zavádění

Těkávké kapaliny – 2l nádoba, nástřík přes fritu či membránu, odpaření
– molekulový otvor ca 10 μm

Málo těkávké v kapiláře do iontového zdroje

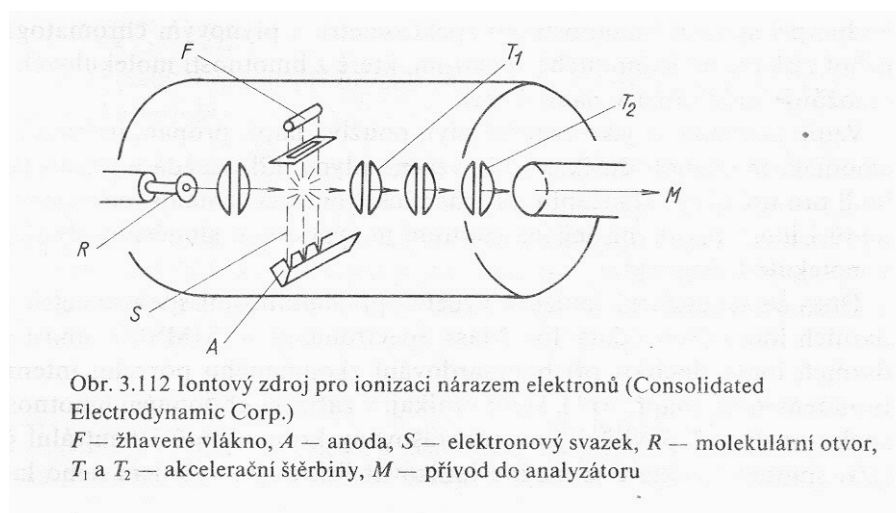
Spray (ESI)

Biopolymery – matrice

Spojení s CG i LC – separátory – oddělení mobilní fáze

Ionisace

EI – ionizace dopadem elektronů



Obr. 3.112 Iontový zdroj pro ionizaci nárazem elektronů (Consolidated Electrodynamic Corp.)

F — žhavené vlákno, A — anoda, S — elektronový svazek, R — molekulární otvor, T₁ a T₂ — akcelerační štěrby, M — přívod do analyzátoru

ESI – ionizace elektrosprejem

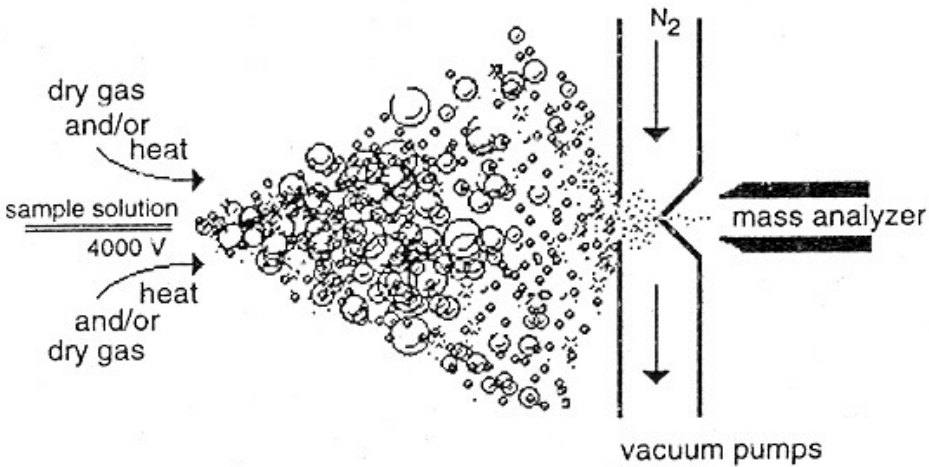
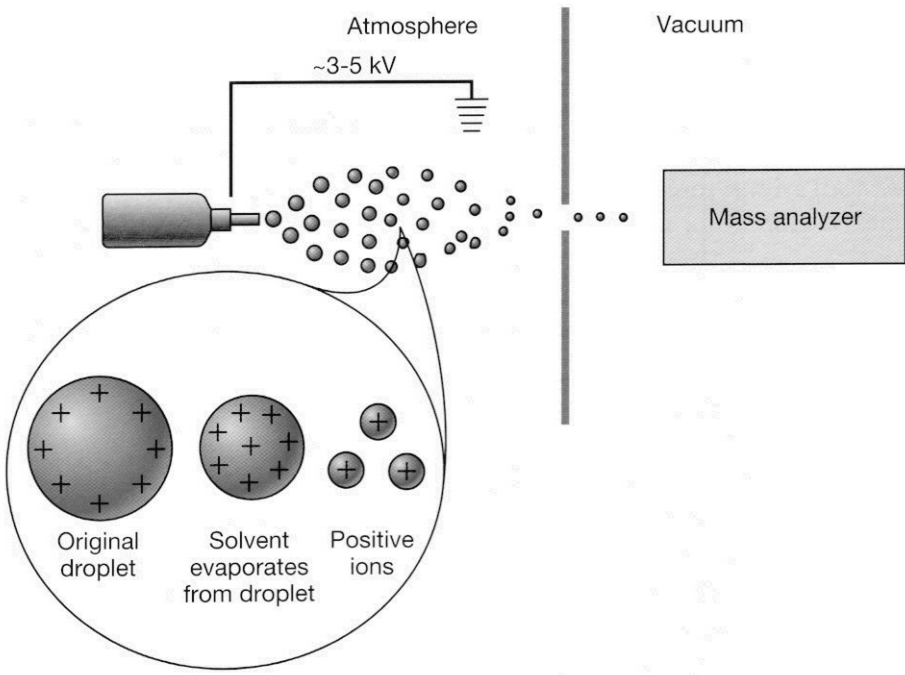


FIG. 1. ESI source.



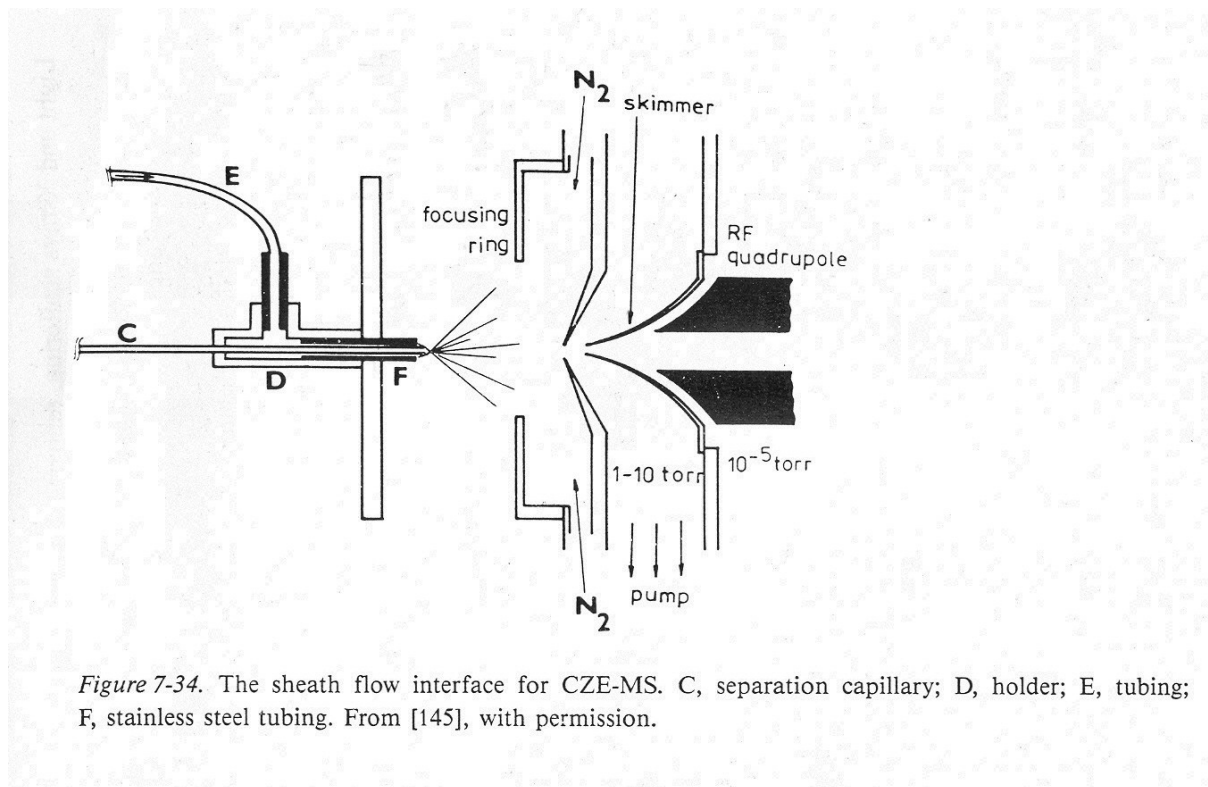


Figure 7-34. The sheath flow interface for CZE-MS. C, separation capillary; D, holder; E, tubing; F, stainless steel tubing. From [145], with permission.

MALDI

(matrice - kys. 2,5-dihydroxybenzoová, 5-chlorsalicylová, α -kyano-4-hydroxykořicová, nikotinová, apod.)

-směs na Ag plíšku

mechanismus – adice či eliminace H^+ - možnosti 2 módů – A^- nebo B^+

Hmotnostní limity ESI-MS: 200 000 (prakt 70000), MALDI-MS > 300 000 (150 000)

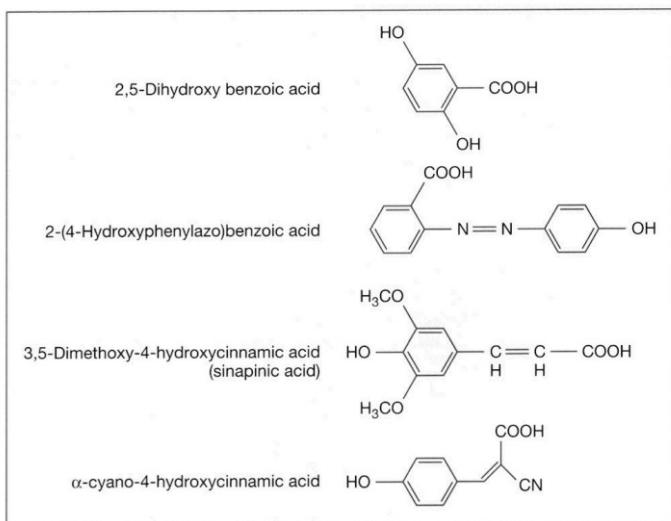
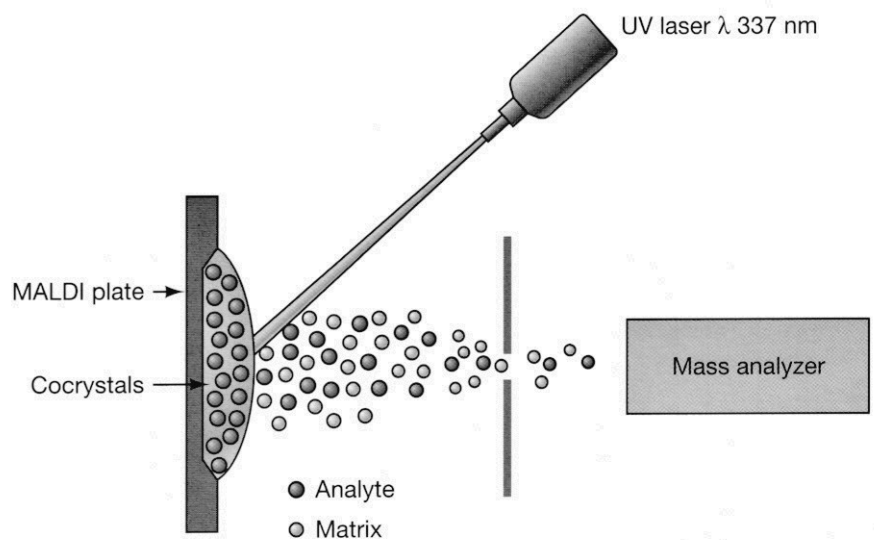


FIGURE 8.7. Chemical structures of some commonly used matrices.

Separace iontů

Urychlení - elektrody

Rozdělení částic (iontů) prostorové nebo časové – analýza dráhy

Způsoby analýzy:

Typ	Zkratka	Princip
Magnetický sektor	B	Zahnutí kontinuálního paprsku iontů v magnetickém poli, separace působením Lorentzových sil
Doba letu (Time-of-flight)	TOF	Měření doby letu pulsu paprsků, separace díky rozdílné rychlosti
Lineární kvadrupól	Q	Průchod kontinuálního paprsku radiofrekvenčním kvadrupólovým polem, separace stabilními trajektoriemi
Lineární kvadrupólová iontová past	LIT	Kontinuální paprsek a zachycené ionty; zachycení a separace v lineárním radiofrekvenčním kvadrupólovém poli díky stabilním trajektoriím
Kvadrupólová iontová past	QIT	Zachycené ionty; separace v trojrozměrném radiofrekvenčním kvadrupólovém poli díky stabilním trajektoriím
Iontová cyklotronová resonance	ICR	Zachycené ionty; separace cyklotronovou frekvencí (Lorentzovými silami) v magnetickém poli

Zakřivení dráhy v elektrickém a magnetickém poli

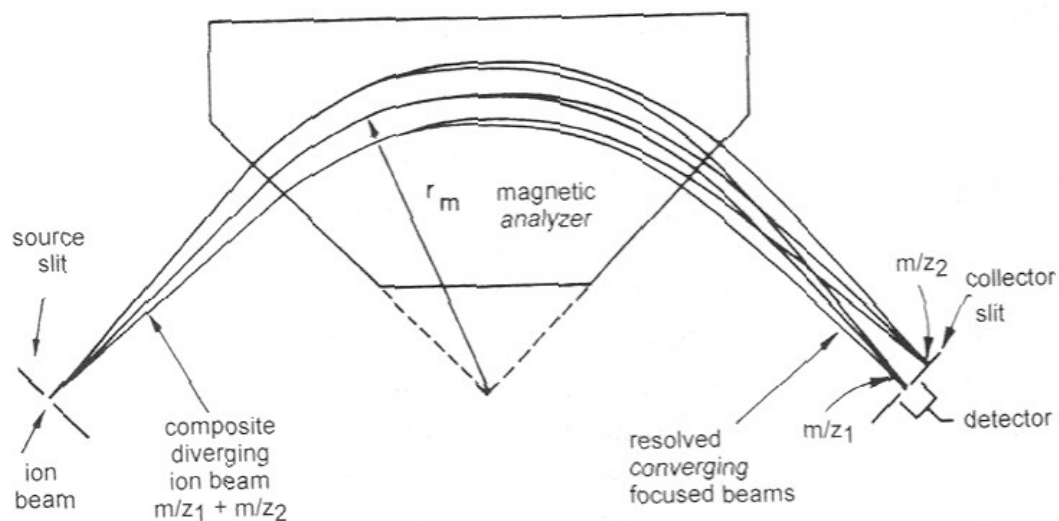


Fig. 4.19. A 90° magnetic sector illustrating m/z separation and direction focusing in a plane (angles are shown exaggerated). Reprinted from Ref. [1] with permission. © American Association for the Advancement of Science, 1979.

$$E = mv^2/2 = q \cdot U$$

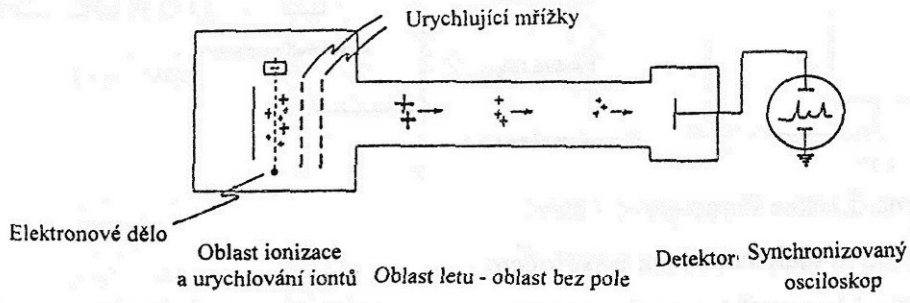
$$F = mv^2/r = B \cdot q \cdot v$$

$$m/q = r^2 \cdot B^2 / 2U$$

Přeletový – měření času letu (TOF – time of fly)

$$E = mv^2/2 = q \cdot U$$

$$m/q = 2U/v^2 = 2Ut^2/l^2$$



OBR.10. Schema hmotnostního spektrometru TOF

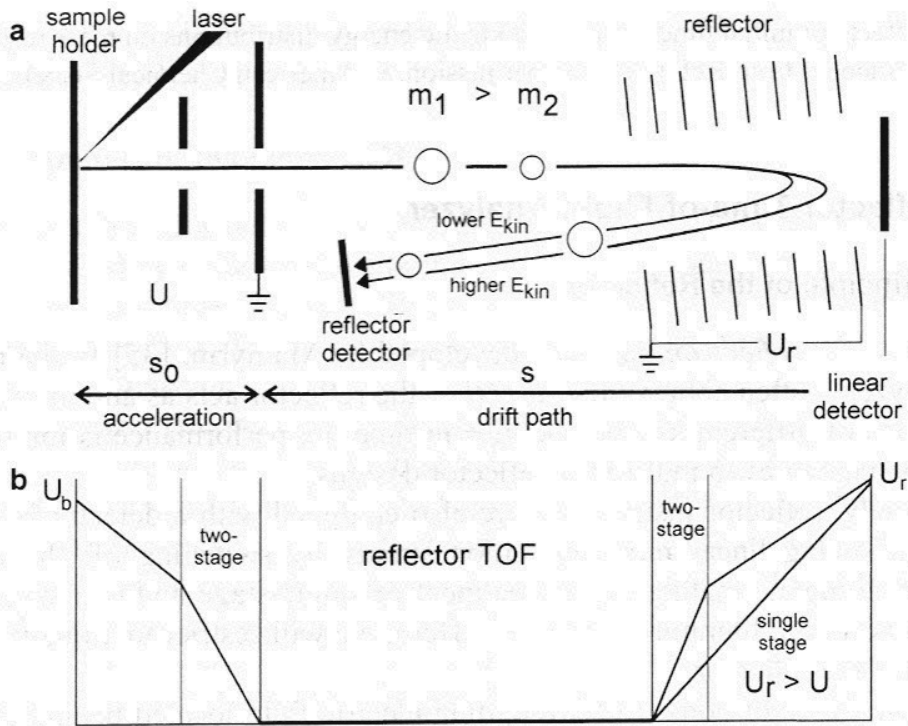
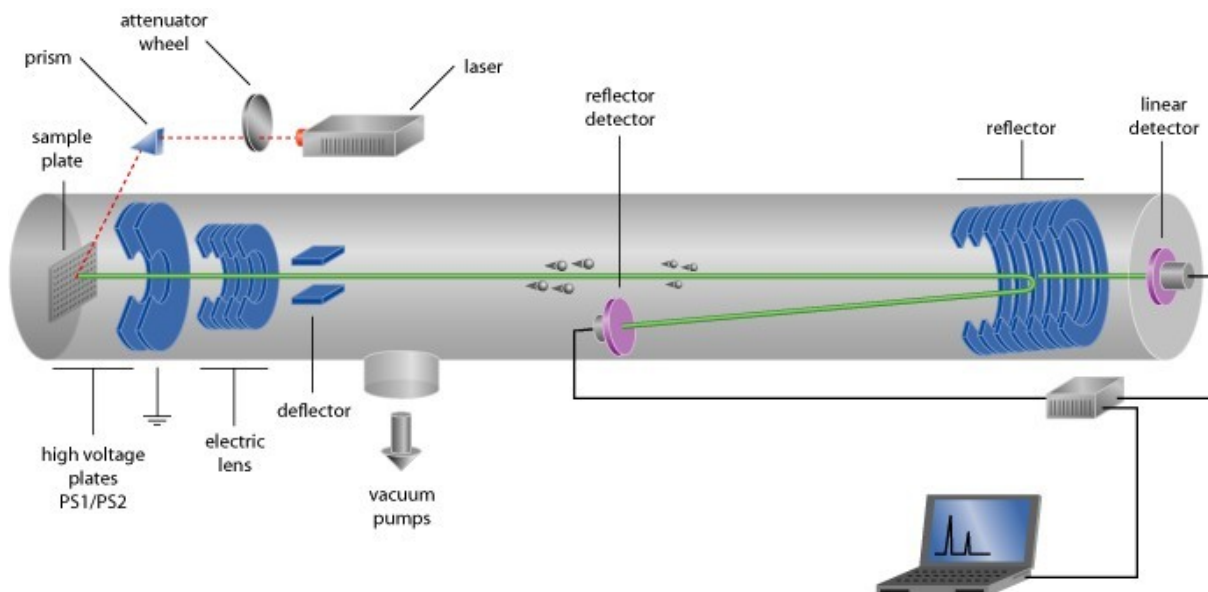
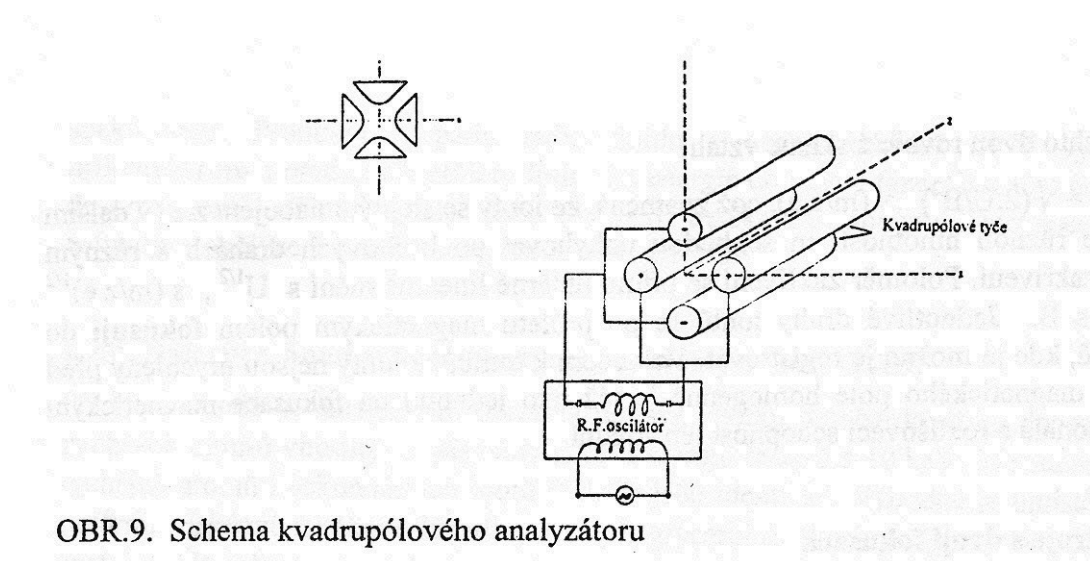


Fig. 4.6. Schematic of a ReTOF (a) and potentials along the instrument (b).



Radiofrekvenční – kvadrupólový, iontové pasti

$$m/q = 266 \cdot 10^9 U / f^2$$



OBR.9. Schema kvadrupólového analyzátoru

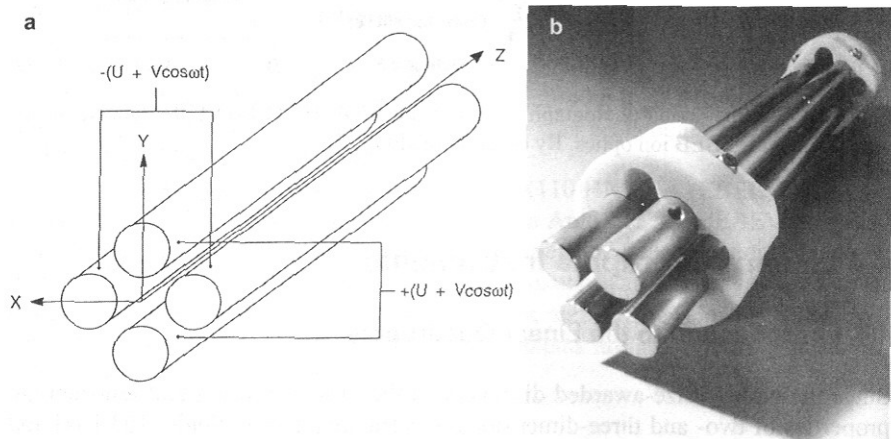
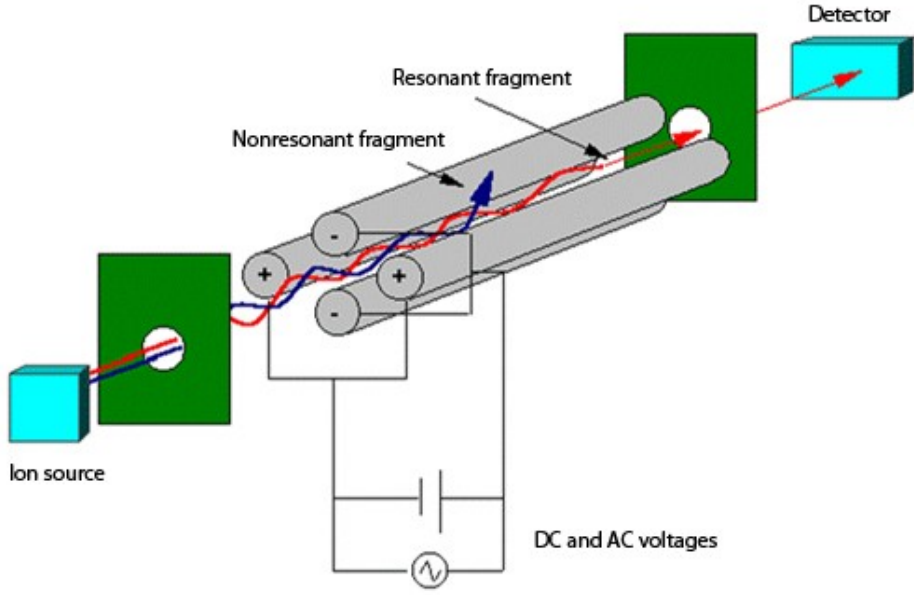


Fig. 4.32. Schematic (a) and photograph (b) of a linear quadrupole mass analyzer. By courtesy of JEOL, Tokyo (a) and Waters Corp., MS Technologies, Manchester, UK. (b).



Detektory

Fotocitlivá vrstva

Faradayova klec

Spojité dynodový elektronový násobič

Kanálový elektronový násobič

Mikrokanálové destičky

Konversní dynody

Diodové pole

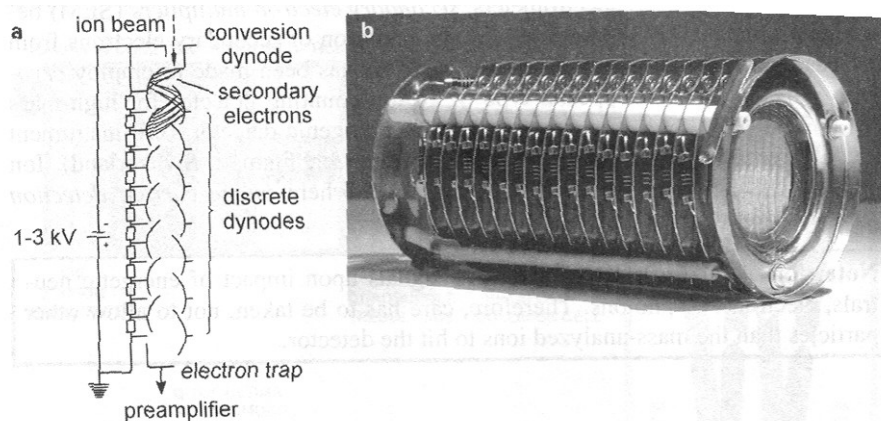


Fig. 4.57. Discrete dynode electron multipliers. **(a)** Schematic of a 14-stage SEM. **(b)** Photograph of an old-fashioned 16-stage Venetian blind-type SEM clearly showing the resistors and ceramics insulators between the stacking dynodes at its side. **(a)** Adapted from Ref. [238] by permission. © Springer-Verlag Heidelberg, 1991.

Schema a fotografie dynodového elektronového násobiče

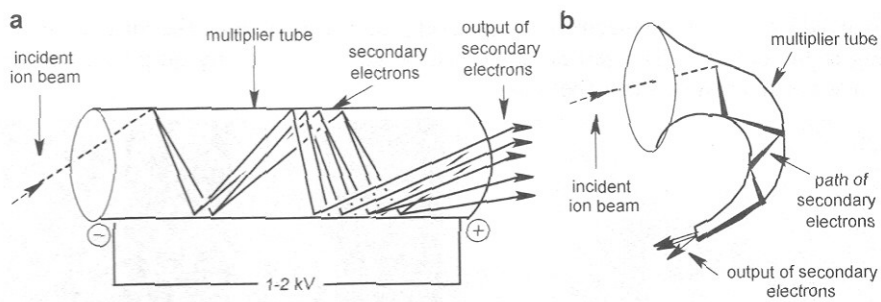


Fig. 4.58. Schematic of linear channel electron multiplier (a) and curved channel electron multiplier (b). By courtesy of Waters Corporation, MS Technologies, Manchester, UK..

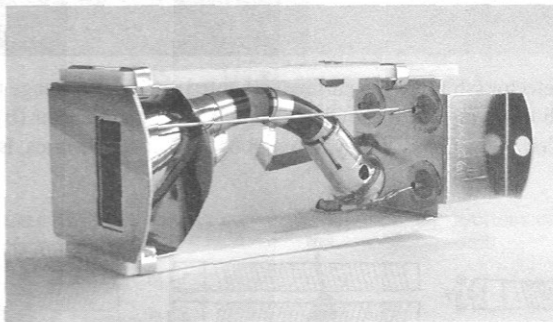


Fig. 4.59. Photograph of a channeltron multiplier.

Kanálový elektronový násobič

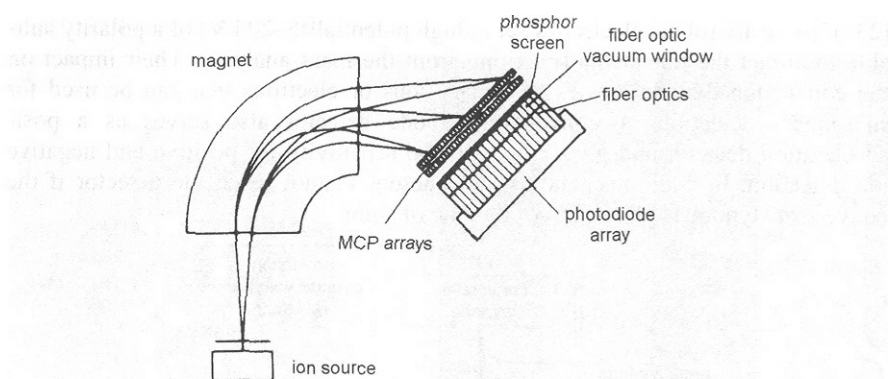


Fig. 4.63. Array detector in the focal plane of a magnetic sector to detect a small mass range simultaneously. By courtesy of Thermo Electron (Bremen) GmbH.

Detektor s diodovým polem

Využití

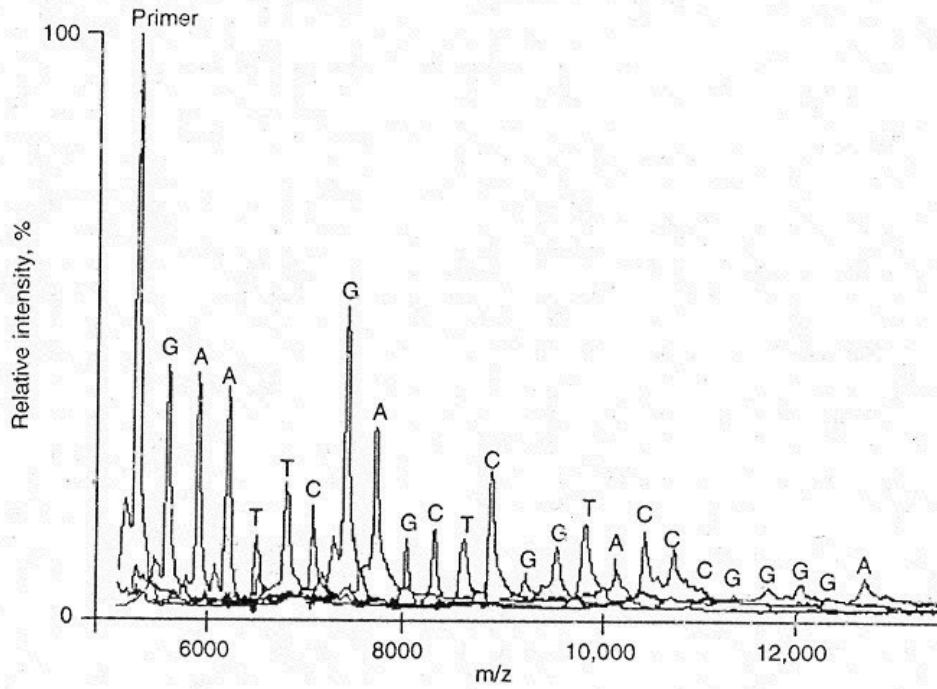


FIG. 12. Negative-ion MALDI mass spectra of synthetic oligonucleotides corresponding to mock A, C, G, and T sequencing reactions. The order of the peaks corresponds to the sequence. Reproduced with permission from ref. 64 (copyright Wiley, Sussex, U.K.).

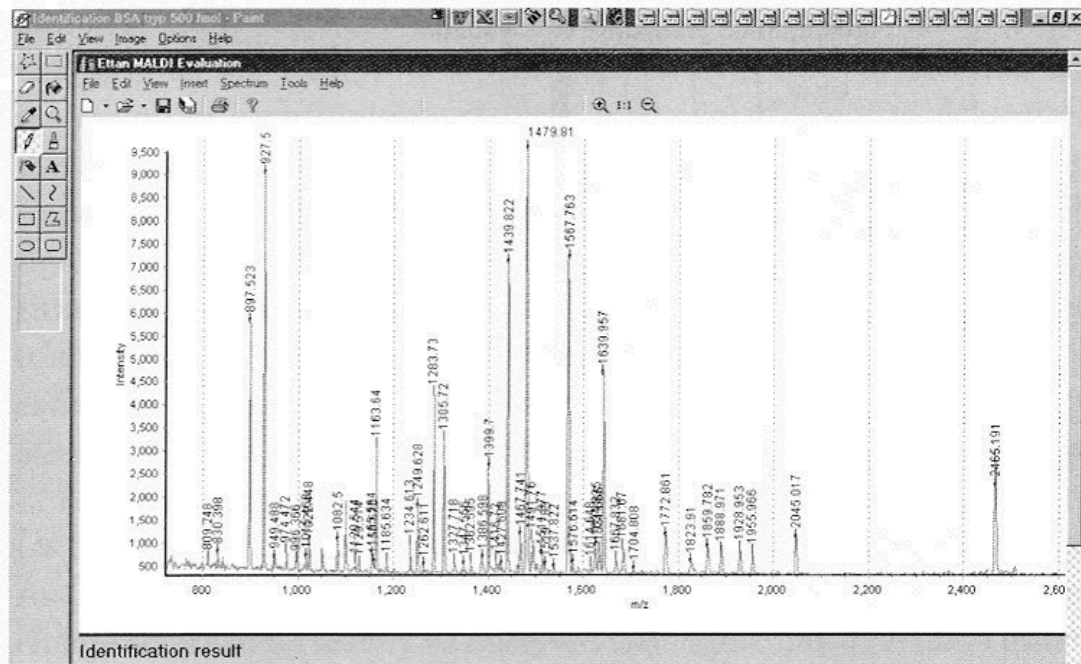


Fig. 53: MALDI in positive ion mode for the analysis of a tryptic digest of myoglobin. The spectrum was acquired using α -cyano-4-hydroxycinnamic acid as the matrix. Each of the peptide

signals observed in the mass range m/z 800–2500 exist as the $[M+H]^+$ molecular ion, where M is the mass of the peptide. A MALDI-ToF spectrum of a BSA tryptic digest.

Databáze

SEQUEST - fields.scripps.edu/sequest/index.html

MASCOT, SONAR - www.proteometrics.com

MS-TAG - prospector.ucsf.edu

Vazba ligandů

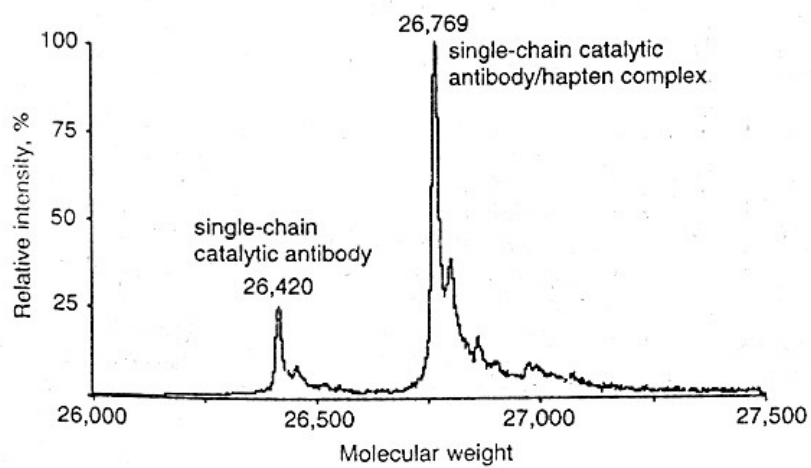
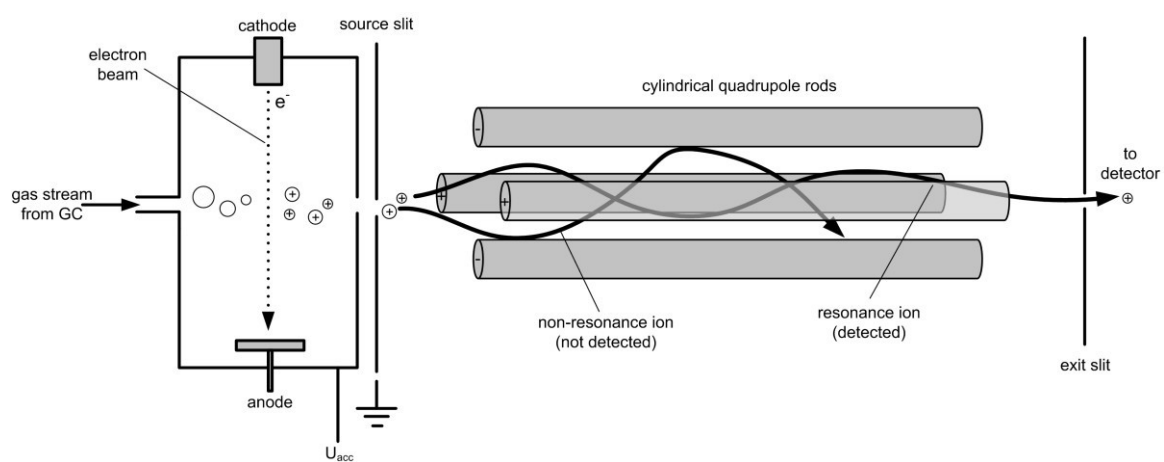


FIG. 8. Noncovalent single-chain catalytic antibody-hapten complex as observed with chemically assisted electrospray (ion spray) mass analysis. Reproduced with permission from ref. 34 (copyright American Chemical Society, Washington, DC).

Kombinace

Detektory separačních přístrojů

Online detekce – chromatografický detektor – GC-MS

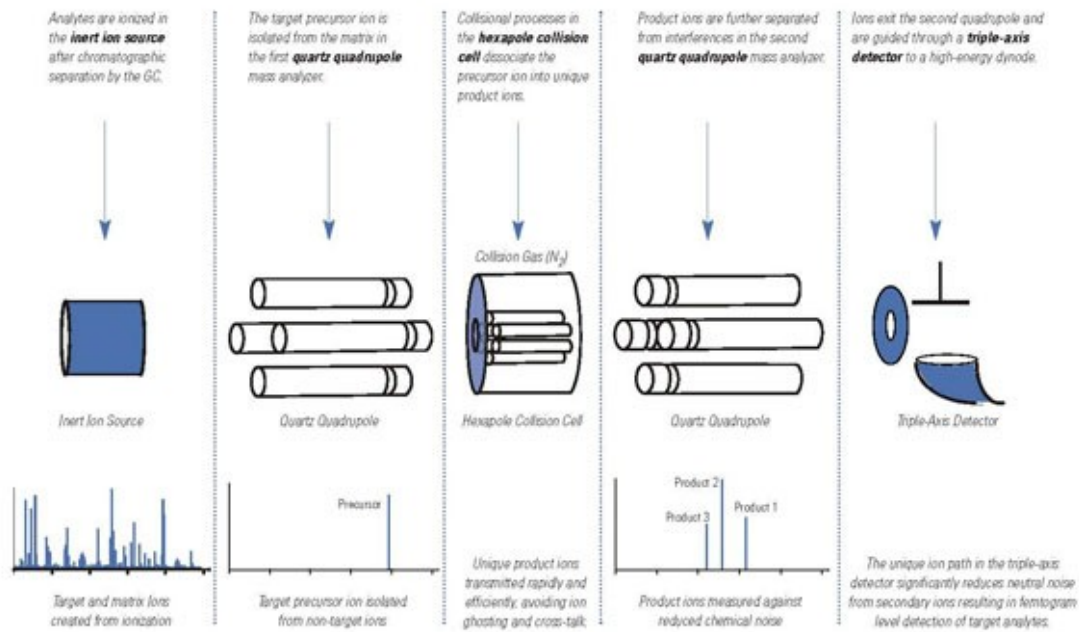


LC-MS, CZE-MS

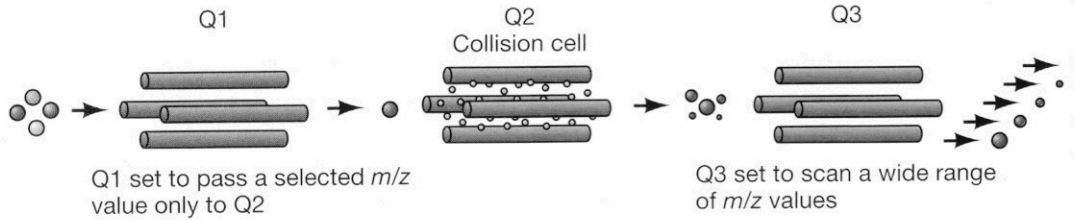
Tandemy

MS/MS – Pestrá experimentální skupina kombinující různým způsobem MS.

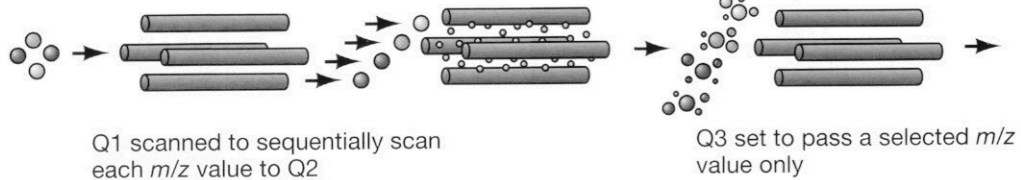
např. sledování mnohočetných a jednoduchých reakcí - multiple-reaction monitoring (MRM) a single-reaction monitoring (SRM), tj. sledování přechodů prekursorových iontů, fragmentací na produkované ionty.



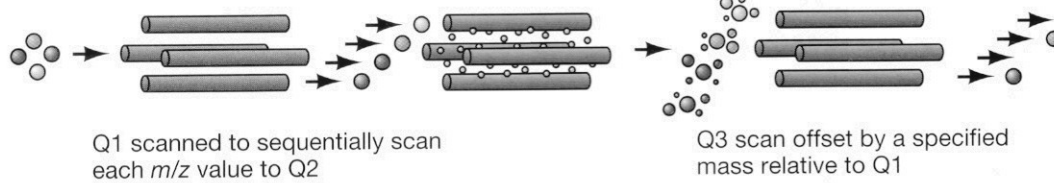
Product ion scan mode



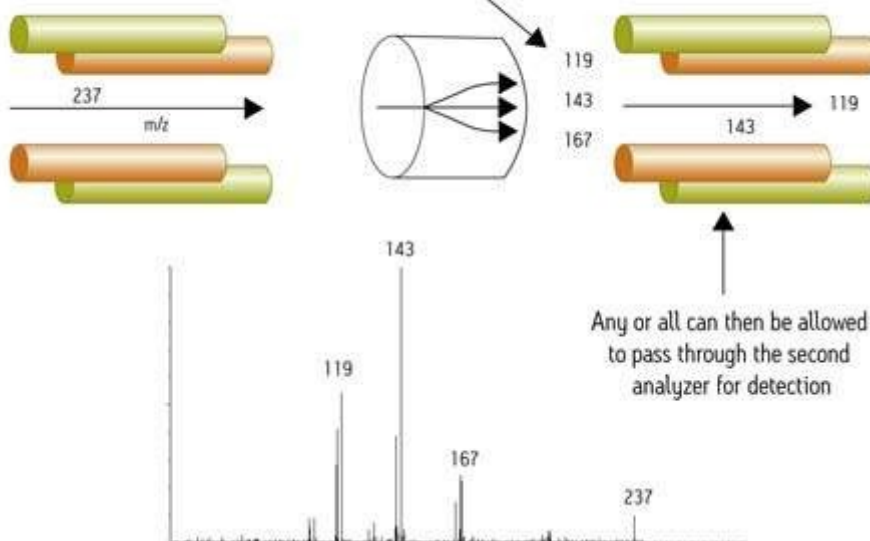
Precursor ion scan mode



Neutral loss scan mode



CID is used to fragment the 237 Da (or m/z) ions peak into these m/z value



The 237-Da precursor ion entering on the left was fragmented in the MS/MS collision cell. The data system can display only fragments of interest (not all fragments produced) yielding a relatively simple spectrum with respect to the full scan MS spectrum. You can control the extent of fragmentation as you can the choice of precursor ion.