

C7895 Hmotnostní spektrometrie biomolekul

Jan Preisler

Oddělení analytické chemie Ústavu chemie, A14-312, tel.: 549496629, preisler@chemi.muni.cz. Konzultace dle domluvy v kanceláři.

Kurs poskytne základy hmotnostní spektrometrie: přehled ionizačních metod, hmotnostních analyzátorů, vybraných technik a aplikací. Důraz bude kladen na hmotnostní spektrometrii biologických látek (ionizační metody MALDI, ESI), moderní instrumentaci v hmotnostní spektrometrii (TOFMS, iontové pasti, FT-ICR-MS) a nejnovější vývoj v oboru.

Plán přednášek pro rok 2010

Přednášky se konají v učebně A14-207 každou středu, 14:00 – 15:50; změny budou ohlášeny předem.

Sylabus a časový plán může být ještě mírně upraven v průběhu semestru.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

1

Předběžný plán přednášek pro rok 2007

7. 3. 11. Time-of-Flight hmotnostní spektrometr (TOFMS). Metody zvýšení rozlišení TOF MS (reflektor, zpožděná a ortogonální extrakce).
8. 10. 11. Kolizně indukovaná disociace (CID). Tandemová MS (MS/MS). Další možnosti disociace (ECD, ETD, fragmentace ve zdroji a za zdrojem – ISD a PSD). Techniky TOF-TOF, LIFT. Ion mobility spectrometry (IMS).
9. 17. 11. Detektory a detekční elektronika. Principy vakuové techniky. Spojení separace a hmotnostní spektrometrie: instrumentace (on-line, off-line, čipy)
10. 24. 11. Biologické aplikace MS: proteomika. Separační techniky. Enzymatické štěpení proteinů. Identifikace proteinů: mapování peptidů, sequence tag, accurate mass tag.
11. 3. 12. Aplikace: proteiny a peptidy. Izotopové značení. Metoda ICAT. Stanovení sekvence. Post-translační modifikace.
12. 10. 12. Analýza S-S můstku. Proteiny. MS databáze. DNA, sacharidy, syntetické polymery.
13. 17.12. Konzultační vánoční besídka (s příklady otázek u zkoušek).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

4

Obsah

- I. Úvod
- II. Ionizační metody a metody zavádění vzorku
- III. Hmotnostní analyzátoři
- IV. Biologické aplikace MS
- V. Otázky

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

2



Úvod do hmotnostní spektrometrie: Stručná historie. Přehled metod a instrumentace. Základní koncepty MS (rozlišení, citlivost). Izotopové patery organických molekul

Ionizační metody a metody zavádění vzorku: Ionizace elektronovým nárazem (EI)

Předběžný plán přednášek pro rok 2007

1. 22. 9. Stručná historie hmotnostní spektrometrie: Přehled metod a instrumentace. Základní koncepty MS (rozlišení, citlivost). Ionizační metody a metody zavádění vzorku: Elektronová ionizace (EI).
2. 29. 9. Chemická ionizace (CI). Doutnavý výboj. Indukčně vázané plazma (ICP). Ionizace rychlými atomy (FAB). Ionizace (SIMS). Fotoionizace (PI). Plazmová Desorpce (PD).
3. 6. 10. Laserová Desorpce (LD). Laserová desorpce za účasti matrice (MALDI).
4. 13. 10. Termosprej (TS). Ionsprej (IS). Elektrosprej (ES). Analyzátoři. Základy iontové optiky. Weinův Filtr. Energetické analyzátoři (E).
5. 20. 10. Hmotnostní analyzátoři. Magnetický sektor (B). Kvadrupólový filtr (Q). Iontová past (IT).
6. 27. 10. Lineární past (LT). Iontový cyklotron (FT-ICR-MS). Orbitrap. Elektrostatická past. Simion: příklady.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

3

I. Úvod

- Zdroje informací o hmotnostní spektrometrii
- Stručná historie hmotnostní spektrometrie, přehled metod a instrumentace
- Základní koncepty hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

6

Studijní materiál

Poznámky z přednášek

Materiály použité při přednášce lze stáhnout z: <http://bart.chemi.muni.cz> a používat při přednášce.

Neexistuje souhrnná česká učebnice nebo skripta moderní hmotností spektrometrie se zaměřením na analýzu biomolekul.

Školy hmotnostní spektrometrie a HPLC-MS.

Doplňková literatura

- Robert J. Cotter: *Time-of-Flight Mass Spectrometry - Instrumentation and Applications in Biological Research*, American Chemical Society, 1997.
- Richard B. Cole et al.: *Electrospray Ionization Mass Spectrometry - Fundamentals, Instrumentation & Applications*, John Wiley & Sons, Inc., 1997.

Hmotnostní spektrometry

Základy iontové optiky. Simulace pohybu iontů, Simion
Energetické analyzátoři
Magnetický sektor
Kvadrupólový analyzátoři
Iontový cyklotron (ICR-FT-MS)
Iontová past (IT)
Time-of-flight hmotnostní spektrometr (TOFMS)
Nové hmotnostní spektrometry: Orbitrap, TOF-TOF, LIFT-TOF.
Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS, MSⁿ)
Kolizně indukovaná disociace (CID)
Povrchově indukovaná disociace (SID)
Fragmentace ve zdroji (ISF) a mimo zdroj (PSD).
Principy vakuové techniky
Detektory a detekční elektronika
Chromatografie - MS (on-line, off-line, in-line MS)

Další zdroje informací

Internet

Učebnice <http://www.ms-textbook.com/> nebo

http://www.spectroscopynow.com/Spy/basehtml/SpyH/1,1181,4-14-9-0-0-education_dets-0-68,00.html

Souborný zdroj informací www.spectroscopynow.com

Protein Prospector prospector.ucsf.edu

Komerční společnosti, např. <http://www.matrixscience.com/>

atd. atd.

Specializované časopisy

International Journal of Mass Spectrometry
Journal of Mass Spectrometry
Journal of the American Society for Mass Spectrometry
Mass Spectrometry Reviews
Rapid Communications in Mass Spectrometry

Aplikace MS

Analýza biologických látek:

- Proteiny, mapování peptidů, peptidové databáze, nové metody (ICAT)
- Analýza peptidů (disulfidové můstky, post-translační modifikace)
- Nukleové kyseliny
- Sacharidy

Analýza syntetických polymerů

A další...

Ionizační metody a metody zavádění vzorku

Doutnavý výboj (GD)
Elektronová ionizace (EI)
Chemická ionizace (CI)
Indukčně vázaná plazma (ICP)
Ionizace rychlými atomy (FAB)
Ionizace (SIMS)
Thermosprej (TSI)
Ionsprej (IS)
Elektrosprej (ESI)
Plazmová Desorpce (PD)
Laserová Desorpce (LD)
Laserová desorpce za účasti matrice (MALDI)
Spojení separace a hmotnostní spektrometrie (on-line, off-line, čípy).

Stručná historie hmotnostní spektrometrie

1803 Daltonova atomová teorie

"hmota se skládá z atomů; všechny atomy mají stejnou hmotu"

... ne tak docela: izotopy

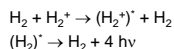
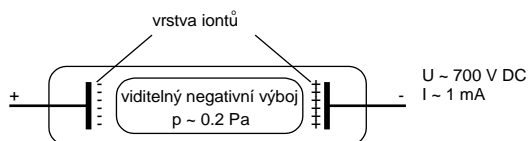
Důkaz izotopů:

- spektroskopie: nepatrný posun čar
- ... vyžaduje kvalitní přístroj
- MS: snadné stanovení



Doutnavý výboj jako iontový zdroj

1880's Crookes: doutnavý výboj



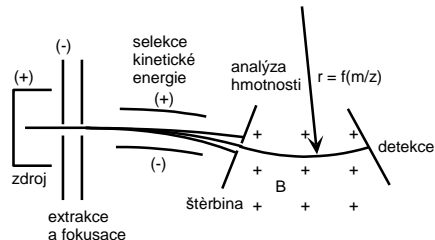
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

13

Magnetický sektor s energetickým analyzátozem

1919 F. W. Aston: Mass Spectrograph (*Phil. Mag.* 1919, 38, 209)

Magnetický sektor s energetickým analyzátozem



Většina přírodních izotopů stanovena do r. 1930

Nobelova cena za projev v r. 1934: "MS mrtva, vše hotovo ..."

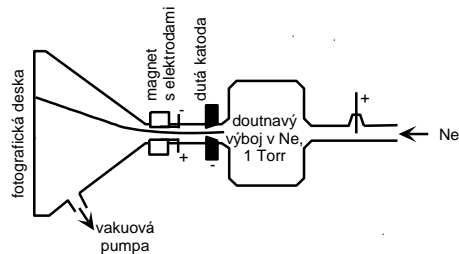
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

16

První hmotnostní spektrometr

1911 J. J. Thomson: Parabola MS (*Phil Mag.* 1911, 21, 225)

"Paprsky pozitivní elektřiny" 1913



Doutnavý výboj v Ne při 1 Torr, dutá katoda, magnet

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

14

Stručná historie MS ve zbytku 20. stol.

1940 C. Berry: Elektronová ionizace (Electron Impact, EI)
Struktura organických sloučenin

1950-70 MS používáno ke strukturní analýze organických sloučenin

1980+ Analýza těžkých a velmi těžkých molekul díky novým ionizačním metodám: FAB, PD, ESI a MALDI

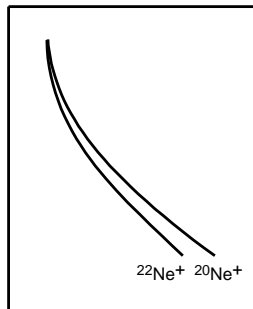
2005 MS pro kvalitativní, strukturní i kvantitativní analýzu
Široká škála komerčních hmotnostních spektrometrů
MS nezbytná pro analýzu organických a biologických molekul

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

17

První hmotnostní spektrometr

Fotografická deska jako detektor: čáry ^{20}Ne a ^{22}Ne na fotografické desce



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

15

Základní koncepty hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometr

přístroj, který z analyzované látky produkuje ionty a stanovuje jejich hmotnost, přesněji poměr hmotnosti a náboje

Součásti spektrometru

1. Komora s iontovým zdrojem (zařízení na zavádění vzorku, iontová optika)
2. Hmotnostní analyzátor (iontová optika, magnet, detektor)
3. Vakuové pumpy (nízké, vysoké a ultra vysoké vakuum)
4. Řídící a vyhodnocovací elektronika, software

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

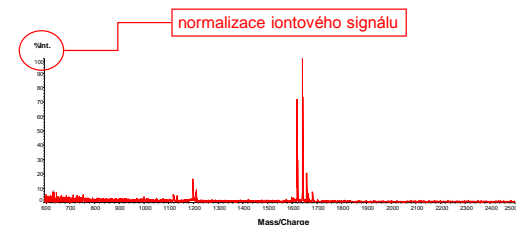
18

Hmotnostní spektrum

Iontový signál vs. m/z

Iontový signál

proud, často převeden na napětí, libovolné jednotky
normalizace signálu: intenzita nejvyššího píku = 100%



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

19

Použité zkratky

m	hmotnost molekuly (u, a.m.u., Da)
z	počet náboj; (-)
m/z	účinná hmotnost (Th, Thomson), <i>slang: hmotnost, hmota</i>
e	elementární náboj ($1.6 \times 10^{-19} \text{C}$)
U	napětí (V)
E	intenzita elektrického pole (V/m, N/C)
W	energie, práce (eV, J)
v	rychlost iontu (m/s)
r	poloměr zakřivení (m)
L	dráha (m)
λ	střední volná dráha molekuly
t	čas, doba (s)
σ	srážkový průměr (m)
σ^2	srážkový průřez (m^2)
μ	redukováná hmotnost (a.m.u., Da, kg)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

22

Hmotnostní spektrum

Hmotnost, m

a.m.u., u, Da (Dalton), počet atomových hmotnostních jednotek
číselně rovný molární hmotnosti

m/z - účinná hmotnost, Th (Thomson)

Počet nábojů, z

počet elementárních nábojů iontu
obvykle ± 1

výjimky, např. elektrosprej: $|z| \gg 1$

Ionty: **pozitivní a negativní, ne kationty a anionty.**

Hmotnostní spektrometrie, **ne spektroskopie.**

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

20

Použité zkratky

n	číselná koncentrace (m^{-3})
I	proud (A), tok (m^{-2})
T	teplota (K)
p	tlak (Pa, Torr)
R	rozišení (-)
f	frekvence (Hz)
ω	úhlová frekvence (rad/s , s^{-1})
α	znak přímé úměry
LD	detekční limit, též LOD , limit of detection (obvykle mol, g, M)
S/N	poměr signálu k šumu (signal-to-noise ratio)
RSD	relativní směrodatná odchylka (relative standard deviation)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

23

Vybrané veličiny v hmotnostní spektrometrii

Hmotnostní rozišení

Míra separace dvou přilehlých píků.

Dvě definice:

- FWHM (full width at half maximum), $R = m/\Delta m$
- Max. hmotnost, při které lze ještě rozlišit píky s jednotkovým rozdílem hmotností.

Energie iontu

- Joule, J
- elektronvolt, eV**
atomy místo molů ... elektronVolty místo Joulů. $1 \text{ eV} = 1.6 \times 10^{-19} \text{ J}$
jednoduchost: urychlovací napětí = 100 V, náboj = 1 ... $E = 100 \text{ eV}$
vhodné pro srovnání s energií ionizační, vazebnou, s energií fotonu atd.

Tlak, p

1 atm = 760 Torr = 101 325 Pa = 1,01325 bar = 14,70 PSI

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

21

Izotopové paternity organických molekul

Izotopy uhlíku: 99% ^{12}C , 1% ^{13}C

Patern jako funkce počtu uhlíkových atomů v molekule:

C_1 : 99% ^{12}C 1% ^{13}C
 C_2 : 98% $^{12}\text{C}^{12}\text{C}$ 2% $^{12}\text{C}^{13}\text{C}$ 0.01% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$
 C_3 : 97% $^{12}\text{C}^{12}\text{C}^{12}\text{C}$ 3% $^{12}\text{C}^{12}\text{C}^{13}\text{C}$ 0.04% $^{12}\text{C}^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ 10⁻⁴ % $^{13}\text{C}^{13}\text{C}^{13}\text{C}$

Binomická řada

Relativní výskyt lehkého izotopu, a

Relativní výskyt těžkého izotopu, b

Počet atomů, n

Např. pro $n = 2$: $(a+b)^2 = a^2 + 2ab + b^2$

Monoizotopická molekula obsahuje dané atomy ve formě jediného izotopu (u org. molekul obvykle atomy C - pouze izotopy ^{12}C)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

24

Izotopové patrný organických molekul

Relativní výskyt molekul v %:

C₆₀:	¹² C ₆₀	100
	¹² C ₅₉ ¹³ C	66
	¹² C ₅₈ ¹³ C ₂	21
	¹² C ₅₇ ¹³ C ₃	4.6
C₁₀₀:	¹² C ₁₀₀	100
	¹² C ₉₉ ¹³ C	110
	¹² C ₉₈ ¹³ C ₂	60
	¹² C ₉₇ ¹³ C ₃	22

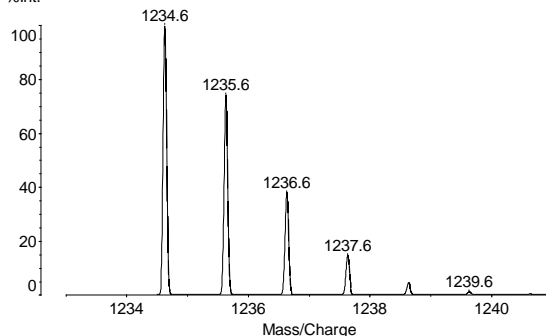
(normalizováno na výskyt monoizotopické molekuly /pouze ¹²C/ = 100 %)

Se stoupajícím *n* přestává být monoizotopická forma dominantní a intenzity různých forem jsou porovnatelné (široká obálka) ... viz příklad dále.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

25

Molecular formula: C₆₀H₉₀N₁₂O₁₂S₂ Resolution: 20000 at 50%
%Int.



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

28

Praktický dopad výskytu izotopů

- Snížení citlivosti
- Nutnost vysokého *R* při vysoké *m/z* pro správné stanovení *m/z*

+ Použití izotopových vnitřních standardů

Příklad:

5 peptidů/proteinů s poměrem zastoupení prvků

C : H : N : O : S = 30 : 45 : 6 : 6 : S

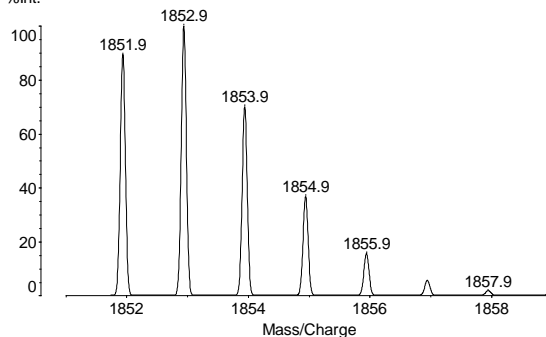
R = 20 000

C ₃₀ H ₄₅ N ₆ O ₆ S	C ₆₀ H ₉₀ N ₁₂ O ₁₂ S ₂
C ₉₀ H ₁₃₅ N ₁₈ O ₁₈ S ₃	C ₁₈₀ H ₂₇₀ N ₃₆ O ₃₆ S ₆ ... navíc ukázán pro různá <i>R</i>
C ₂₇₀ H ₄₀₅ N ₅₄ O ₅₄ S ₉	C ₃₆₀ H ₅₄₀ N ₇₂ O ₇₂ S ₁₂
C ₉₀₀ H ₁₃₅₀ N ₁₈₀ O ₁₈₀ S ₃₀	C ₁₈₀₀ H ₂₇₀₀ N ₃₆₀ O ₃₆₀ S ₆₀

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

26

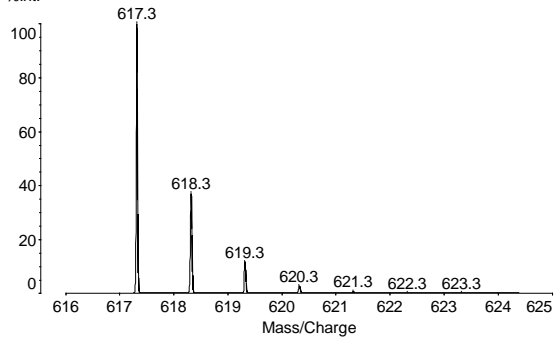
Molecular formula: C₉₀H₁₃₅N₁₈O₁₈S₃ Resolution: 20000 at 50%
%Int.



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

29

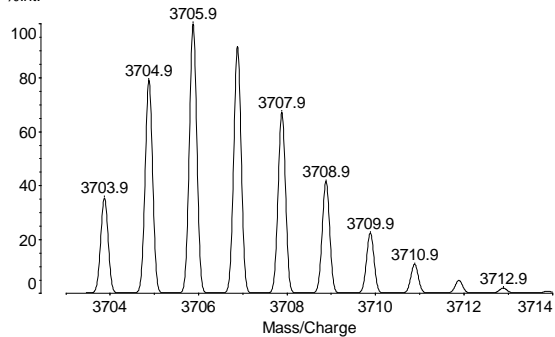
Molecular formula: C₃₀H₄₅N₆O₆S Resolution: 20000 at 50%
%Int.



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

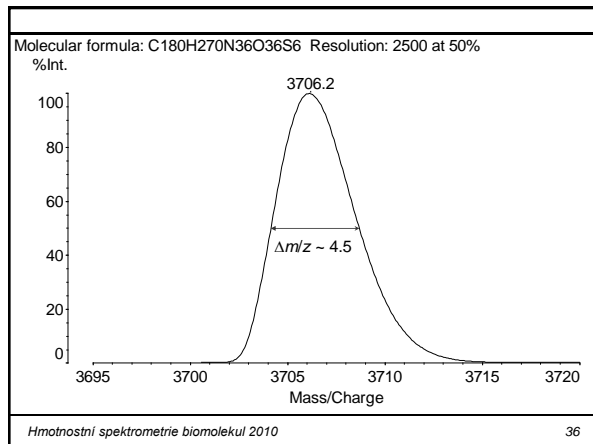
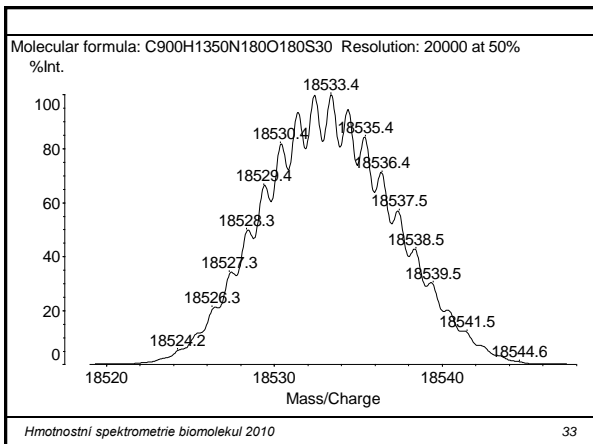
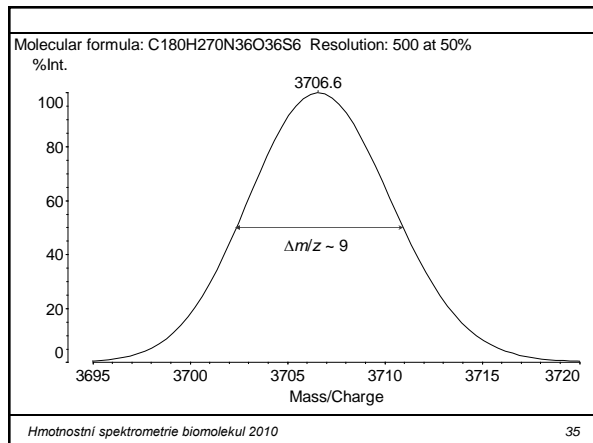
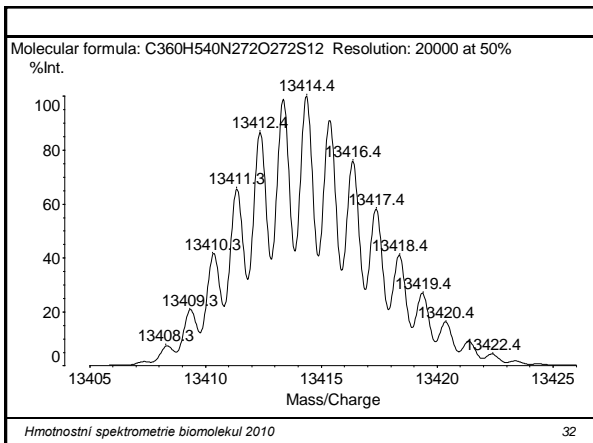
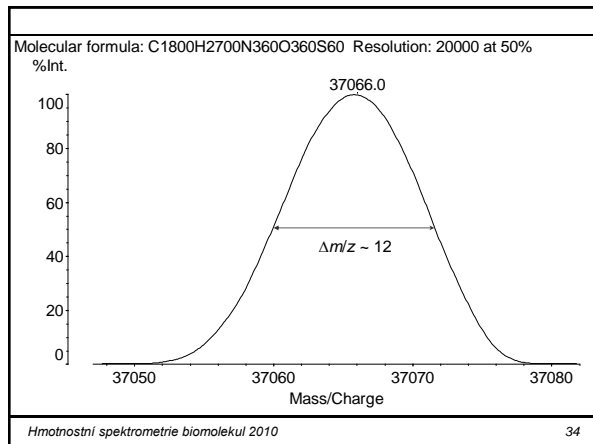
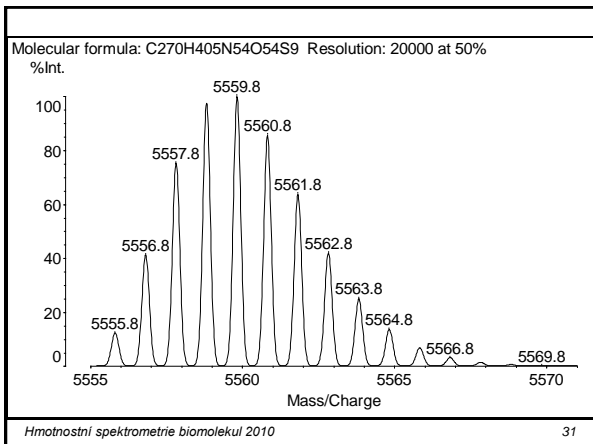
27

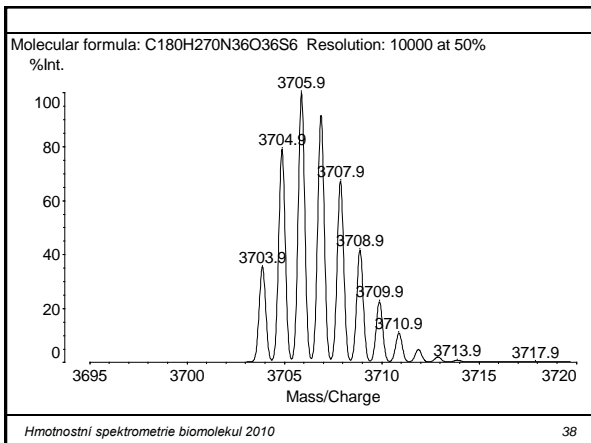
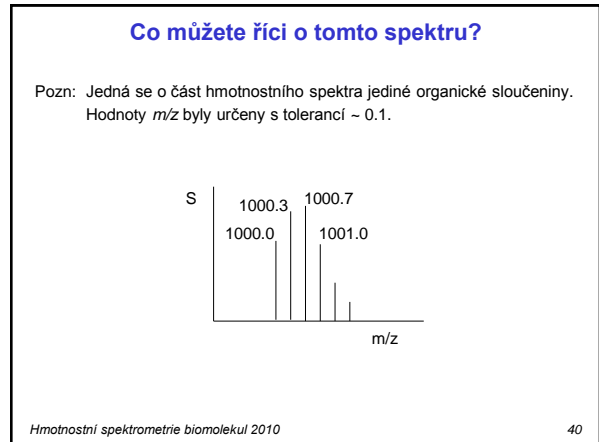
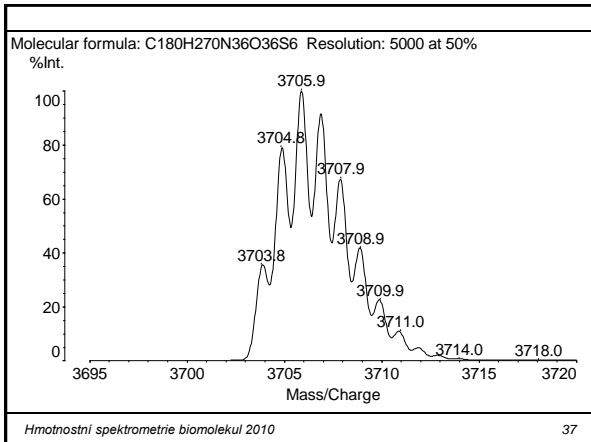
Molecular formula: C₁₈₀H₂₇₀N₃₆O₃₆S₆ Resolution: 20000 at 50%
%Int.



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

30





II. Ionizační techniky a zavádění vzorku

vzorek (atm. tlak) → vzorek (vakuum)

Nežádoucí jevy

- nárůst tlaku v iontovém zdroji
- ochlazování a mrznutí vzorku v důsledku vypařování
- adsorpce látek ze vzduchu (např. vody) na stěny iontového zdroje

Rozdělení vzorků podle skupenství

- **Tekuté vzorky**
 - plynné vzorky
 - kapalné vzorky (kapalný analyt, rozpuštěný analyt)
- **Tuhé vzorky**
 - těkavé (lehké sloučeniny)
 - netěkavé (polární, polymerní látky)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010 41

Vícenásobně nabitě ionty

- Typický příklad: vícenásobně nabitě ionty $[M+zH]^z+$ z elektrospřeje "Obálka" ve tvaru zvonu.
- Mezery nejsou ekvidistantní (narozdíl od izotopového paternu).

Př.:

<i>m</i>	= 10 000 Da						
<i>z</i>	4	5	6	7	8	9	10
<i>m/z</i>	2501	2001	1668	1429	1251	1112	1001

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010 39

Zavádění vzorků

Off-line
On-line
In-line

Počet zaváděných vzorků

- 1 vzorek
- Více vzorků
 - sériově (diskrétní vzorky nebo spojitý tok)
 - paralelně

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010 42

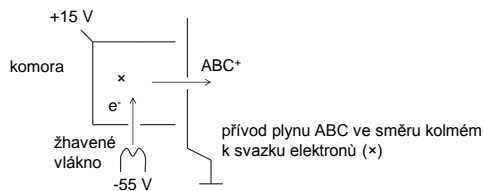
Elektronová ionizace, EI (Electron impact)

Klasická ionizační technika.

Elektrony emitované ze žhavého vlákna jsou urychleny středně velkým napětím.

Energie elektronu, $E(e^-)$ = urychlovací napětí x náboj (1).

Typická energie: 70 eV.



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

43

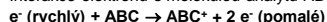


2

Chemická ionizace (CI). Douhnavý výboj. Indukčně vázané plazma (ICP). Ionizace rychlými atomy (FAB). Ionizace (SIMS). Fotoionizace (PI). Plazmová Desorpce (PD)

Mechanismus EI

Interakce elektronu s molekulou analytu ABC:

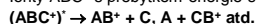


Výsledná rovnice,



je charakterizována ionizační energií ABC, $\Delta H(\text{ABC})$.

Ionty ABC^+ s přebytkem energie se mohou dále rozpadnout:



Stupeň fragmentace závisí na energii elektronů, $E(e^-)$ a na struktuře analytu:

a) $E(e^-)$ ~ ionizační potenciál \Rightarrow tvorba molekulárních iontů.

Ionizační potenciál jednoduchých organických molekul $\sim 10 - 12$ eV.

b) $E(e^-) \gg$ ionizační potenciál \Rightarrow fragmentace.

Typ fragmentace závisí na struktuře analytu; sloučeniny s podobnou strukturou mají podobná fragmentační spektra.

Interpretace spekter. Knižovny spekter ($> 100\,000$ spekter).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

44

Chemická ionizace (CI)

20. léta 20. století A. J. Dempster

Tentýž iontový zdroj jako pro EI plus reaktivní plyn

Reaktivní plyn (RH)

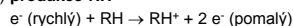
CH_4 , butan, H_2 , NH_3 atd.

$p(\text{ABC}) < 10^{-4}$ Pa

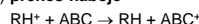
$p(\text{R}) \sim 0.1$ Pa ($\lambda \sim 0.05$ mm, mnoho kolizí ve zdroji)

Mechanismus tvorby iontů

a) produkce RH⁺



b) přenos náboje

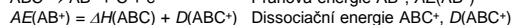
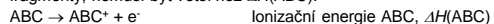


Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

47

Mechanismus EI

Prahová energie, AE (appearance energy) při níž se objeví dané fragmenty, nemusí být větší než $\Delta H(\text{ABC})!$



Absorpce elektronů při průchodu plynem ionizované látky

Úbytek proudu elektronů, dI při průchodu infinitesimálně tenkou vrstvičkou analytu:

$$dI = -\alpha c I dx,$$

po integraci:

$$I = I_0 e^{-\alpha c x}.$$

I proud elektronů (A)

c koncentrace molekul ABC, (cm^{-3}) ($c = p/RT$)

x tloušťka vrstvy (cm)

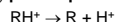
α průřez (cm^2) ... analogie koeficientu ϵ v Lambert-Beerově zákonu

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

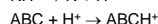
45

Mechanismus tvorby iontů při CI (pokr.)

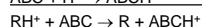
c) přenos protonu (běžnější)



$PA(\text{R})$ protonová afinita



$- PA(\text{ABC})$



$\Delta E = PA(\text{R}) - PA(\text{ABC})$

$\Delta E < 0$: exotermní, preferovaná reakce

$\Delta E \ll 0$: přebytek energie $\text{ABC}^+ \Rightarrow$ fragmentace ABC^+ , strukturální analýza

$\Delta E < 0, \Delta E \rightarrow 0$: ABC^+ a ABCH^+ převládají:

+ kvantitativní analýza

+ molekulová hmotnost ABC

+ vysoká ionizační účinnost (ABC)

- žádná informace o struktuře

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

48

Kolize molekul při CI

Střední volná dráha molekuly

Střední dráha, kterou urazí iont mezi 2 srážkami

$$\lambda = (\sqrt{2} \pi \sigma^2 n)^{-1}$$

$$\lambda_i(\text{cm}) = 0.66/p(\text{Pa}) \quad (\text{pouze hrubý odhad})$$

Počet kolizí

$$z = \pi \sigma^2 (8kT/(\pi \mu))^{1/2}$$

μ redukovaná hmotnost, $\mu = (m_1^{-1} + m_2^{-1})^{-1}$

σ kolizní průměr

σ^2 průřez molekuly

CI: 10^{15-16} kolizí, vysoká ionizační účinnost (ABC)

Porovnání CI vs EI

+ silnější signál

- vyšší šum

+ celkově vyšší poměr S/N (LOD organických látek ~ pg)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

49

Zavedení vzorku pro EI/CI (pokr.)

ii) *membránové interface* - zavedení analytu přes membránu, oddělení nosného plynu pomocí membrány

c) *přímý vstup z kapilární GC kolony* (nižší tok nosného plynu, He)

2. Těkvavý, termálně stabilní pevný vzorek

Přímé vložení vzorku na sondě (sklo, keramika, ocel). Po vložení vzorku do spektrometru dochází k jeho odpařování a ionizaci v plynné fázi.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

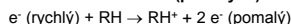
52

Negativní chemická ionizace

Tentýž iontový zdroj jako pro EI plus reaktivní plyn

Mechanismus

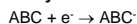
1. Produkce termálních (pomalých) elektronů



$$W(\text{pomalý } e^-) \sim 3/2 kT$$

$$T \sim 400 \text{ K} \Rightarrow E \sim 0.1 \text{ eV}$$

2. Záchyt elektronu



Přednostně u sloučenin s elektronegativními skupinami (PCB, NO_3^- atd.)

LD ~ pg

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

50

Zavedení vzorku pro EI/CI (pokr.)

3. Netěkavé látky

- Velké molekuly

- Molekuly s mnoha polárními skupinami

... mnoho zajímavých sloučenin (proteiny, DNA, sacharidy)

a) *Příprava těkvavých derivátů* a následná standardní ionizace (EI, CI).

Vhodné pro molekuly s $M < 1000 \text{ Da}$.

Příklad: esterifikace, $\text{RCOOH} + \text{CH}_3\text{OH} \rightarrow \text{RCOOCH}_3$

b) Použití klasické ionizace v desorpčním provedení. Vzorek nanesený na sondě je vsunut do iontového zdroje, kde dochází k přímé interakci elektronů se vzorkem v kondenzované formě.

c) *Jiné ionizační techniky*

"Měkká" ionizace: produkce molekulárních iontů aniž by došlo k jejich tepelnému rozkladu: FAB, Elektrosprej, Laserové desorpční metody

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

53

Zavedení vzorku pro EI/CI

1. Plyn/těkvavá kapalina

• **Analýza zbytkových plynů** ("residual gas analysis"):

otevřený iontový zdroj v komoře s plynem: $p(\text{komoře}) = p(\text{plyn})$

• **Eluent ze separační kolony** (GC-MS)

Problém: Vysoký proud plynu z klasických kolon GC

a) *oddělení a sběr frakcí* (split, splitter)

b) *rozhraní (interface)* pracující bez přerušování

i) *tryskový separátor*

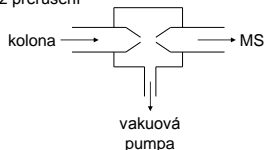
(*particle beam*)

pro obohacení ABC

v nosném plynu

vyžaduje $M(\text{ABC}) \gg M(\text{nosič})$

... He jako nosný plyn



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

51

Anorganické iontové zdroje

Doutnavý výboj

Termální ionizace

Indukčně vázané plasma

Další techniky vhodné pro analýzu anorganických vzorků, např. laserové desorpce, jsou použitelné i pro organické látky a biomolekuly a budou zmíněny později

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

54

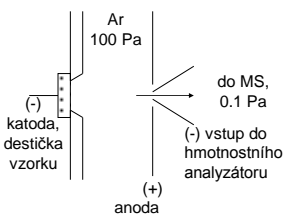
Doutnový výboj

První iontový zdroj (J. J. Thompson)

Analýza pevných vzorků, obvykle vodivých.

Přesná a celkem citlivá analýza: RSD ~1%, LOD ~1 ppb.

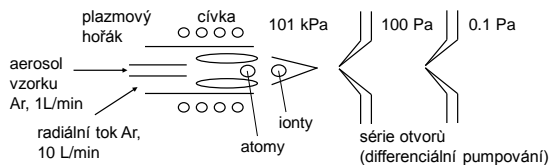
Výboj v Ar ($p \sim 100$ Pa): Ar⁺ vyrážejí atomy kovu M z destičky vzorku a později je ionizují na M⁺.



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

55

Induktivně vázané plazma (Inductively Coupled Plasma, ICP)

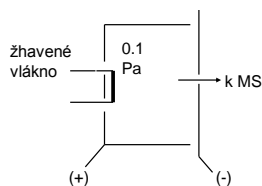


1. Desolvace MX (aq, aerosol)
2. Vypaření MX (s)
3. Atomizace MX (g): disociace na M(g) a X (g)
4. Ionizace na M⁺ (g)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

58

Termální ionizace (TI)



Vzorek nanesen na vlákno; vlákno odporově zahříváno.

Vypařování, atomizace a ionizace:

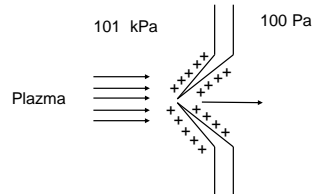
MX (s) → MX (g) → M (g) + X (g)

M (g) → M⁺ (g) + e⁻ (vlákno)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

56

ICP

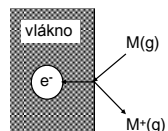


- Obvykle 3 vakuové stupně (diferenciální pumpování).
- Velmi účinná ionizace, $n(M^+)/n(M_{\text{total}}) = 90 - 100\%$.
- Ionty s jedním nábojem převládají.
- Nerovnovážný systém.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

59

Termální ionizace



Saha-Langmuirova rovnice

$$n(M^+)/n(M) \propto \exp[(W - IE)/(kT)]$$

Pracovní funkce kovu (vlákno), $W \sim 4$ eV

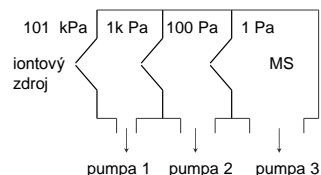
Kov	K	Ca	Fe	Zn
IE (eV)	4.6	6.0	7.8	9.4
(W - IE) (eV)	-0.5	-1.5	-3.9	-5.4
	účinné			slabé

- Tři vlákna (s rozdílnou teplotou): Náhrada jednoho vlákna, které odpařuje a ionizuje vzorek příliš rychle.
Stabilnější iontový tok (RSD pouze ~ 0.1 % !)
Užitečné pro stanovení izotopového zastoupení.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

57

Diferenciální pumpování



- často používaný koncept v MS
- použit u technik ionizace při atmosferickém tlaku

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

60

ICP

Supersonická tryska

Žhavá plazma (5000 K) proudí dovnitř otvorem a expanduje nadzvukovou rychlostí. Náhodný pohyb atomů na atmosférické straně je charakterizován širokou distribucí kinetické energie (5000 K) a relativně nízkou střední translační rychlostí. Uvnitř se atomy pohybují nadzvukovými rychlostmi s velmi úzkou energetickou distribucí ... supersonické ochlazení (~300 K). Distribuce je později narušena srážkami s okolním plynem (*barrel shock*, *Machův disk*).

Účinná ionizace

90 - 100 % většiny prvků ionizováno (velmi uniformní ionizace). Vhodné pro stanovení izotopového zastoupení (nízká systematická odchylka).

Nevýhody

- nevhodné pro určování struktury molekul
- interference

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

61

Spektrální interference v ICP

Příklady izobarických iontů a rozlišení potřebného k jejich stanovení.

Izotop	Rušící iont	Rozlišení
³⁹ K	³⁸ Ar ¹ H ⁺	5690
⁴⁰ Ca	⁴⁰ Ar ⁺	71700
⁴¹ K	⁴⁰ Ar ¹ H ⁺	4890
⁴⁴ Ca	¹⁴ N ¹⁴ N ¹⁶ O ⁺	970
	¹² C ¹⁶ O ¹⁶ O ⁺	1280
⁵² Cr	⁴⁰ Ar ¹² C ⁺	2380
⁵⁶ Fe	⁴⁰ Ar ¹⁶ O ⁺	2500
⁷⁵ As	⁴⁰ Ar ³⁵ Cl ⁺	7770
⁸⁰ Se	⁴⁰ Ar ⁴⁰ Ar ⁺	9690

Pozn.: vyšší rozlišení často znamená nižší citlivost.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

64

ICP

Detekční limity

1 ppt (kvadrupól)
10 ppq (magnetický sektor)
pro srovnání: ICP-AES a AAS: ppm - ppb

ppm	ppb	ppt	ppq
million 10 ⁶	billion 10 ⁹	trillion 10 ¹²	quadrillion 10 ¹⁵

Interference

1. Nespektrální
Posun ionizačních rovnováh v důsledku přítomnosti matrice, kyselin, snadno ionizovatelných prvků atd.
2. Spektrální
Ionty izotopů
Izobarické molekulární ionty

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

62

Ionizace polem (Field Ionization, FI)

Vysoké elektrické pole mezi ostrými hroty, $E > 10^9$ V/m
Odstranění elektronu vnitřním tunelovým jevem.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

65

Spektrální interference v ICP

Tvorba molekulárních iontů v ICP

1. Plyn plazmatu a jeho reakční produkty (Ar⁺, Ar²⁺, ArH⁺, ArO⁺, ArC⁺, ArN⁺ atd.)
2. Vzorek nebo solvent (hydrdivé ionty, OH⁺, ClO⁺, NO⁺, CaO⁺, LaO⁺ atd.)
3. Chemická ionizace plynů pozadí (H₂O⁺, H₃O⁺, C_xH_y⁺ atd.)

Odstranění spektrálního rušení

1. Matematické korekce (např. ze známé distribuce izotopů)
2. Desolvatace aerosolu (např. vymrazení v kapalném N₂)
3. Studené plazma (relativní změny ionizačního stupně)
4. Kolizní cela (termalizace iontů, posun reakčních rovnováh)
5. Spektrometr s vysokým rozlišením

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

63

Desorpční ionizační techniky

LDI	Laser Desorption/Ionization 1963 R. Honig
FD	Field Desorption 1969 H. D. Beckey
PD	Plasma Desorption 1974 R. D. MacFarlane
FAB	Fast Atom Bombardment 1981 M. Barber
SIMS	Secondary Ion Mass Spectrometry 1976 A. Benninghoven
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization 1988 M. Karas & F. Hillenkamp, K. Tanaka

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

66

Desorpce polem (Field Desorption, FD)

H. D. Beckey, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*, **1969**, 2, 500-503

Vzorek je nasměrován (g) nebo nanešen (l, g) na emitor, žhavené kovové vlákno se speciálně upraveným povrchem.

Analyty jsou tvořeny ve velmi vysokém elektrickém poli mezi ostrými hroty, $E > 10^9$ V/m; elektrony jsou odstraněny vnitřním tunelovým efektem.

Často lze sledovat doprovodné ionizační mechanismy:

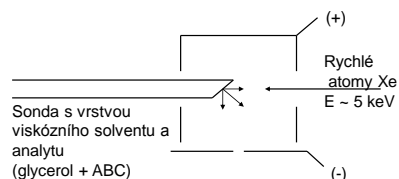
- termální ionizaci
- elektrosprej ... během nanášení kapalných vzorků

Vhodné pro analýzu organických analytů s *M.W.* < 2 kDa

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

67

Ionizace nárazem rychlých atomů (Fast Atom Bombardment, FAB)



Ionizace podobná CI (organické molekuly, malé peptidy...).

Sestava: off-line i on-line (průtoková sonda; tzv continuous flow, CF-FAB).

Max. hmotnost ~ 10 000 Da. LOD ~ 10 pmol nebo až < 1 pmol (CF-FAB)

Obvykle $z = \pm 1$.

Vzniklé ionty: $ABCH^+$, $[ABC+N_2]^+$, $[ABC+K]^+$, $[ABC+H]^+$; fragmenty.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

70

Field Ionization. Field Desorption



Zdroj: Bernhard Linden

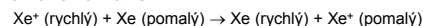
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

68

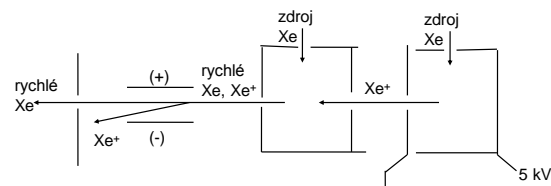
Produkce rychlých atomů (Xe) pro FAB

1. Produkce rychlých iontů Xe^+

2. Konverze Xe^+ na Xe:



3. Eliminace (odklon) Xe^+

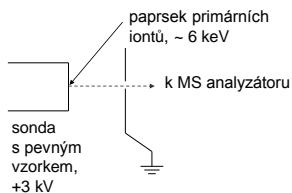


Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

71

MS sekundárních iontů (Secondary Ion Mass Spectrometry, SIMS)

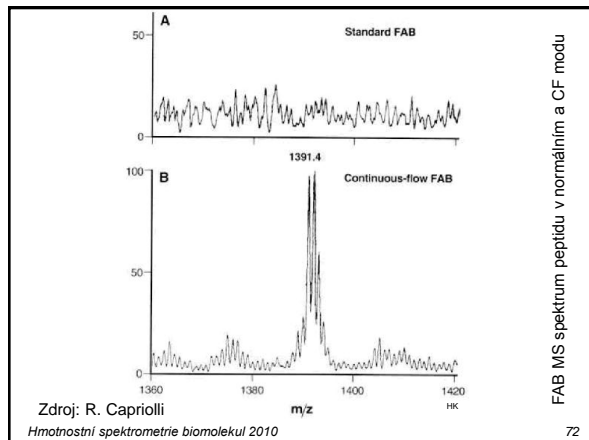
... Ionizace ionty



- Primární iontový svazek může být skenován, výsledkem je topografie prvků vzorku, "MS image". Rozlišení vyšší než u optického skenování (svazek primárních iontů lze lépe zaostřit, ~nm).
- Produkty ... především atomy a neutrální molekuly, též ionty. Případná postionizace možná, např. fotoionizace pomocí laseru.
- Anorganická i organická analýza, v poslední době i lehčí biopolymery za účasti matrice, "matrix-assisted SIMS".

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

69



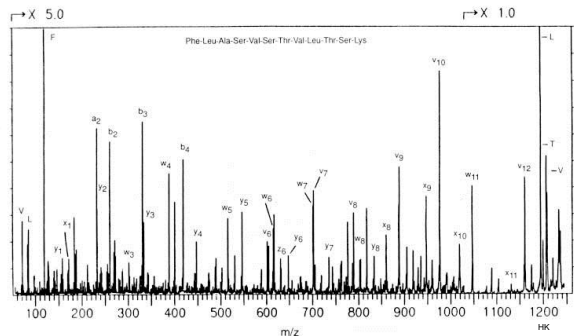
Zdroj: R. Caprioli

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

FAB MS spektrum peptidu v normálním a CF modu

72

CF-FAB MS/MS řetězce a lidského hemoglobinu



Zdroj: R. Caprioli

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

73

PI

Příklad uspořádání: LD-PI

PI jako postionizace pro laserovou desorpci

1. Puls desorpčního laseru
2. Desorpce obláčku (přev. neutralů)



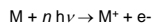
3. Puls ionizačního laseru
4. Extrakce iontů



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

76

Fotoionizace (Photoionization, PI)



Nutná podmínka: $n h\nu > IE(M)$

Typy fotoionizace

1. Jednofotonová ionizace (single photon ionization, SPI) $n = 1$
2. Multifotonová ionizace (multiple photon ionization, MPI) $n > 1$
 - neselektivní analýza vhodná pro anorganické analyty
3. Rezonanční multifotonová ionizace (REMPI) $n > 1$
 - pokud $h\nu = W$ (energie elektronového přechodu M)
 - velmi selektivní a velmi citlivé stanovení
 - aromatické molekuly, barviva, léky

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

74

Plazmová desorpce (PD)

1974 Ronald D. Macfarlane

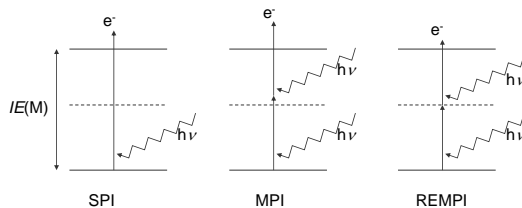
(R. D. Macfarlane, R. P. Skowronski, D. F. Torgerson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1974**, 60, 616.; R. D. Macfarlane, D. F. Torgerson *Science* **1976**, 191, 920.)

- První technika použitá k ionizaci relativně velkých organických molekul (~tisíce Da, pf. inzulin, 5735 Da).
- Štěp z radioaktivního zdroje narazí do vzorku naneseného na fólii.
- Jiný štěp uvolněný z rozpadu téhož atomu ^{252}Cf nastartuje záznam signálu.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

77

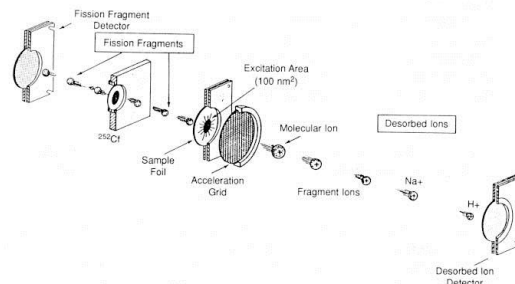
Mechanismy fotoionizace



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

75

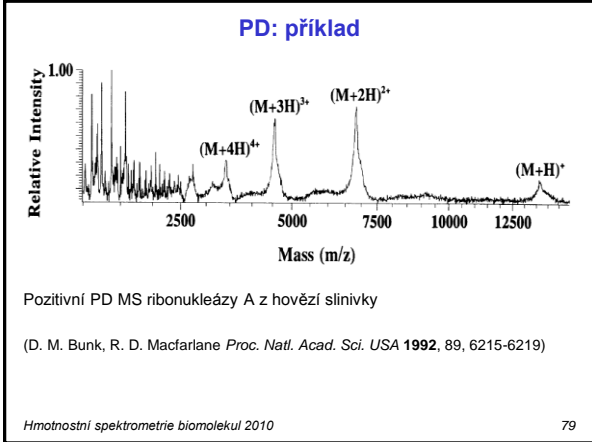
Experimentální uspořádání PD



Zdroj: R. D. Macfarlane, R. P. Skowronski, D. F. Torgerson, "New approach to the mass spectrometry of nonvolatile compounds", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60, 616-621, (1974).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

78



LDI, MALDI

Laserová desorpce/ionizace (Laser Desorption/Ionization, LDI)
S objevem laseru v 60. letech 20. století
Zpočátku anorganické (R. Honig, *Appl. Phys. Lett.* **1963**, 2, 138-139),
později organické látky (M. A. Posthumus, P. G. Kistemaker, H. L. C. Meuzelaar, M. C. ten Neuver de Brauw, *Anal. Chem* **1978**, 50, 985).

Laserová desorpce/ionizace za účasti matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI)
Vhodná pro těžší analyty, polymery, biomolekuly.
Karas, M; Bachmann, D.; Bahr, U.; Hillenkamp, F. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **1987**, 78, 53 - 68.
Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, 2, 151.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010 82

Charakteristika PD

- Radioaktivní zdroj kalifornia ^{252}Cf . Energie fragmentů –MeV.
- Tvorba molekulárních iontů, iontových klastřů a iontů s více náboji.
- Vhodné i pro těžké analyty
- Nevýhody
 - radioaktivní zdroj
 - zdlouhavá akumulace signálu
- Pro ionizaci těžkých analytů dnes upřednostňovány MALDI a ESI.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010 80

The Nobel Prize in Chemistry 2002


MALDI

ESI


"for the development of methods for identification and structure analyses of biological macromolecules"

"for their development of soft desorption ionisation methods for mass spectrometric analyses of biological macromolecules"


"for his development of nuclear magnetic resonance spectroscopy for determining the three-dimensional structure of biological macromolecules in solution"



John B. Fenn
© 1/4 of the prize
USA
Virginia Commonwealth University
Richmond, VA, USA



Koichi Tanaka
© 1/4 of the prize
Japan
Shimadzu Corp.
Kyoto, Japan



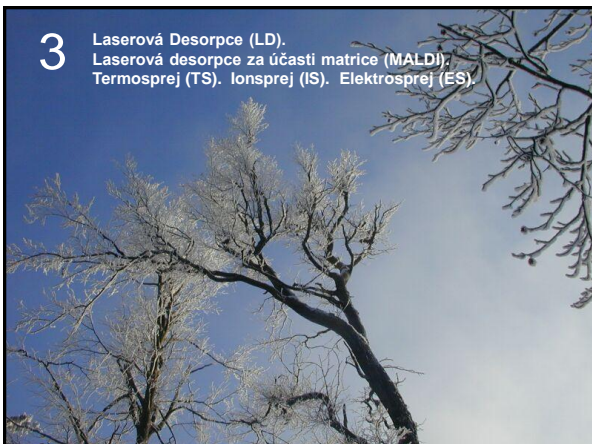
Kurt Wüthrich
© 1/2 of the prize
Switzerland
Eidgenössische Technische Hochschule (Swiss Federal Institute of Technology)
Zürich, Switzerland;
The Scripps Research Institute
La Jolla, CA, USA

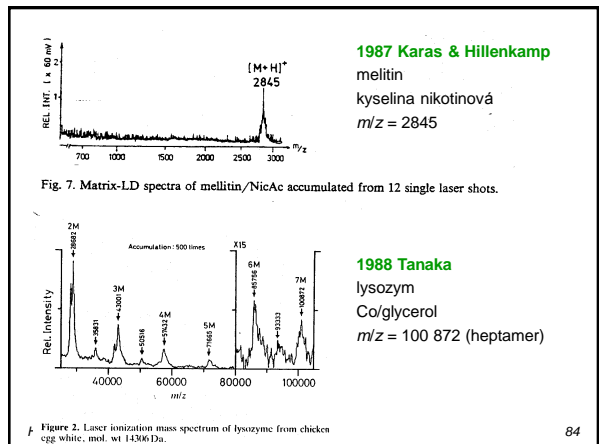
Zdroj: www.nobel.se
October 9, 2002

Hmotnostní spektrom 83

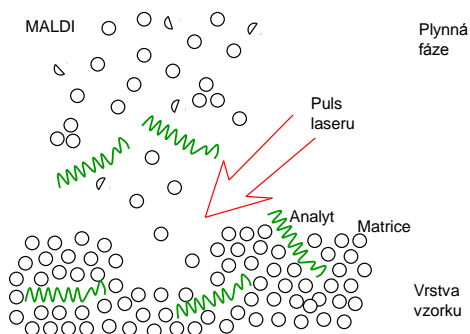
3

Laserová Desorpce (LD).
Laserová desorpce za účasti matrice (MALDI).
Termosprej (TS). Ionsprej (IS). Elektrosprej (ES).





Schema MALDI (detail)



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

85

Požadavky na matrici (MALDI)

1. Absorbce při vlnové délce použitého laseru (UV, IR).
2. Tvorba žádoucích krystalů s analytem (empirie).
3. Obvykle kyselina (účinný přenos protonu na analyt).
4. Stabilitní, nereagující s analytem, nepřilíš těkává.

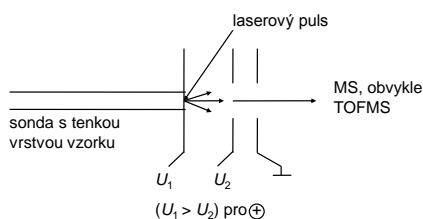
Typy matricí

- aromatické kyseliny (Karas & Hillenkamp)
- glycerol s přidávkem jemného kobaltového prášku (Tanaka)
- modifikovaný povrch, např. Si - DIOS (Siuzdak), SELDI

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

88

Schema LDI (MALDI)



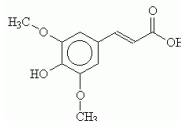
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

86

Běžné matrice pro MALDI

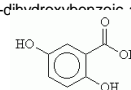
sinapinic acid (SA)

(3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid)



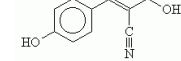
gentisic acid (DHB)

(2,5-dihydroxybenzoic acid)

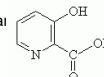


α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)

(IPA)



pyridinecal



3-
(3-

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

89

Princip LDI a MALDI

1. **Velmi krátký puls laseru**, typicky $t \sim ns$ (LDI, MALDI), max. μs . Molekuly se odpaří dříve, než se rozloží. Ochlazení expanzí: konverze E_{vib} na E_{trans} (collisional cooling).
2. **Energie je absorbována** převážně **matricí (M)**, ne analytem. ϵ (matrice) $\gg \epsilon$ (analytu), c (matrice) $\gg c$ (analytu). Matrice $\rightarrow MH^+$, M^+ , M^* , fragmenty, ionty fragmentů. Analyt, rozptýlený v matrici, se odpařuje spolu s matricí.
3. **Matrice se podílí na ionizaci analytu ABC**. Matrice je excitována po absorpci jednoho či více fotonů. Dominantní ionizační mechanismus = **přenos protonu**: $MH^+ + ABC \rightarrow M + ABCH^+$.

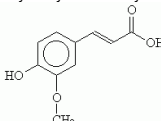
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

87

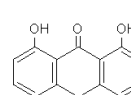
Běžné matrice pro MALDI

ferulic acid

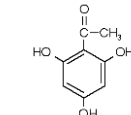
(4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid)



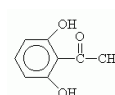
dithranol (DIT)



2',4'-trihydroxyacetophenone (THAP)



2'-6'-dihydroxyacetophenone

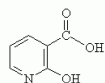


Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

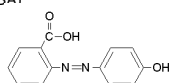
90

Běžné matrice pro MALDI

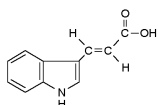
nicotinic acid-N-oxide



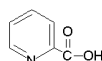
2,-(4-hydroxy-phenylazo)-benzoic acid (HABA)



trans-3-indoleacrylic acid (IAA)



picolinic acid (PA)
(2-pyridine carboxylic acid)



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

91

Lasery

UV-MALDI

337 nm dusíkový laser (nejlevnější a nejběžnější)

355 nm Nd:YAG (3xf)

266 nm Nd:YAG (4xf)

193 nm ArF

... fragmentace!

Pozn.: YAG lasery jsou dražší, ale mají delší životnost a dosahují vyšších frekvencí (kHz vs. Hz).

IR MALDI

2.94 μm Er:YAG laser

10.6 μm CO₂ laser

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

94

Matrice - aplikace

peptidy < 10 000

CHCA, DHB

peptidy, proteiny > 10 000

SA, DHB

oligonukleotidy < 3 kDa

THAP

nukleové kyseliny > 3 kDa

HPA

syntetické polární polymery

DHB

syntetické polární polymery

DIT, IAA

karbohydráty

DHB, CHCA, THAP

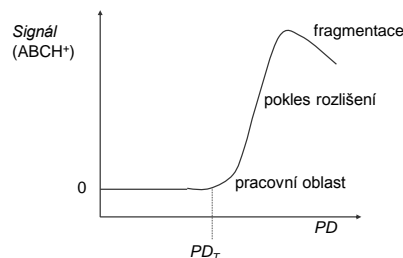
Přidávky komaticí (např. monosacharidů) – zlepšení krystalizace, homogenity vzorku, rozlišení, potlačení fragmentace

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

92

Vliv energie laseru

Velmi výrazná závislost spekter na energii laseru, přesněji na výkonu vztáženém na plochu, tzv. hustotě výkonu (power density, PD).



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

95

Vlastnosti matrice

CHCA:

„horká“ matrice

peptidy < 10 000 Da

vhodná pro PSD (strukturní analýza)

DHB:

„studená“ matrice

univerzální použití

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

93

Vliv energie laseru

Prahová hustota výkonu, PD_T ... výkon laseru vztážený na plochu, při kterém se začínají objevovat píky iontů analytu ve spektru.

Při $PD > PD_T$: Signál ($ABCH^+$) = $k \cdot PD^n$, kde $n = 4 - 6$.

Malá změna energie vede k velké změně signálu iontu $ABCH^+$.

V praxi obvykle během měření pomalu zvyšujeme energii za současného posouvání terčiku se vzorkem a sledujeme spektra z jednotlivých laserových pulsů. Po zjištění prahové energie nastavíme energii asi 10–30% nad prahovou hodnotou a akumulujeme spektra (10-100) za občasného posouvání terčiku.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

96

Akumulace spekter

zpravidla zaznamenáváme průměr z 10 – 100 desorpcí
zvýšení odstupu signálu od šumu a reprodukovatelnosti

signál, $S \propto n$

šum, $N \propto \sqrt{n}$

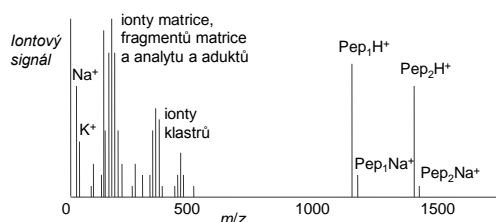
signál/šum, $S/N \propto \sqrt{n}$

Charakteristika MALDI

- obtížná kvantifikace (nutnost vnitřního standardu)
- hledání pravého místa na vzorku
- často intenzivní pozadí v oblasti nízkých m/z (matrice, fragmenty a klastry matrice)
- vzájemné rušení analytů

MALDI MS spektrum

Modelové spektrum vzorku 2 peptidů, Pep₁ a Pep₂



$[ABC+H]^+$, $[ABC+2H]^{2+}$, dimer $[(ABC)_2+H]^+$
adukty s alkalickými kovy a matricí $[ABC+Na]^+$, $[ABC+K]^+$, $[ABC+MH]^+$
fragmenty matrice a analytu, iontové klastry, např. $[M_2+Na]^+$
Potlačení matrice – v ideálním případě pouze pík analytu.

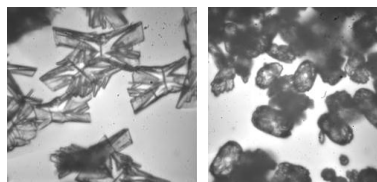
Příprava MALDI vzorků

MALDI vzorek = analyt + matrice

$c(\text{analyt}) = 0.1\text{--}10 \mu\text{M}$

$c(\text{matrice}) = 1\text{--}100 \text{ mM}$

terčik: ocel, Al, syntetické polymery



Charakteristika MALDI

- + jedna ze dvou nejpoužívanějších metod pro biopolymery (vedle ESI)
- + měkká ionizace
- + jednoduchá spektra, většinou $z = +1$ nebo $z = -1$
- + pulsní ionizace (předurčena ke spojení s TOFMS)
- + limit detekce ~ amol (peptidy, při vhodné přípravě)
- + rychlá příprava a analýza vzorků

Zásady při přípravě MALDI vzorků

- Rekrystalizace matrice
- Čerstvý roztok matrice
- Vhodná volba solventu (ACN, EtOH, MeOH, aceton, voda)
- pH matrice < 4 (úprava např. 0.1 % TFA)
- Analyt musí být rozpuštěný
- Purifikace analytu před MALDI analýzou
- Neznámý analyt – příprava série roztoků o různých koncentracích
- Nanosené vzorky jsou obvykle stabilní (skladování terčů se vzorky)
- Dokonalé očištění terčů

Metody přípravy vzorků

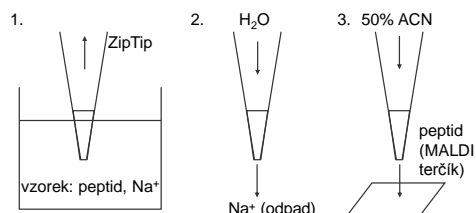
- vysušení kapky směšného roztoku (**dry droplet**)
- smíchání a vysušení na terčiku (**quick & dirty**)
- urychlení vysoušení ve vakuu (**vacuum drying**)
- nejprve vrstva matrice v těkavém solventu (**fast evaporation**)
- vrstva matrice, pak vrstva matrice s analytem (**overlayer**)
- vrstvy: matrice, analyt, matrice (**sandwich**)
- krystaly rozdrceny, převrstveny roztokem vzorku (**crushed crystals**)
- rozpuštění vzorku v kapce acetonu (**acetone redeposition**)
- nanášení na rotující terčik (**spin coating**)
- pomalý růst krystalů (**slow crystallization**)
- nanášení elektrosprejem (**electrospray deposition**)
- modifikované terčiky - hydrofilní/hydrofobní rozhraní

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

103

Redukce vlivu solí

segregace na terčiku ... výběr vhodného krystalu pro desorpci
přídavek kyselin (TFA, HCOOH, HCl), NH₄ soli
opláchnutí krystalů na terčiku
katex na terčiku
odsolení vzorku před nanášením: separace, dialýza, ZipTip (C₁₈)



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

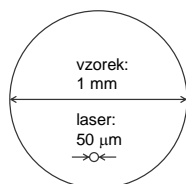
106

Další metody přípravy vzorků

speciální metody (ES, nanášení ve vakuu, MALDI z aerosolu ...)

mikrometody

mikroterčiky, piezoelektrické pipety, nanášení z kapiláry
velikost ohniska ≈ velikost vzorku ⇒ maximální citlivost
vyšší hustota vzorků na terčiku



$$\frac{S_{\text{laser}}}{S_{\text{vzorek}}} = \frac{50^2}{1000^2} = 0.25\%$$

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

104

Perspektiva MALDI

MS analýza početných sérií biologických vzorků

- peptidové mapování pro identifikaci proteinů (MALDI MS produktů enzymatického štěpení proteinů)
- peptidy, proteiny, oligonukleotidy, sacharidy

Mikrometody

Spojení se separačními technikami

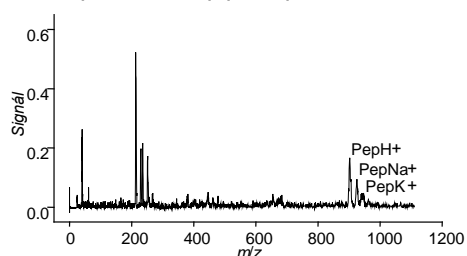
- výhoda archivování vzorků na MALDI terčiku
- uvedení dostupných MS/MS spektrometrů pro MALDI
- doplňková technika k ESI (odlišná ionizační účinnost pro různé analyty)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

107

Vliv přítomnosti solí

MALDI spektrum vzorku peptidu v přítomnosti solí Na a K



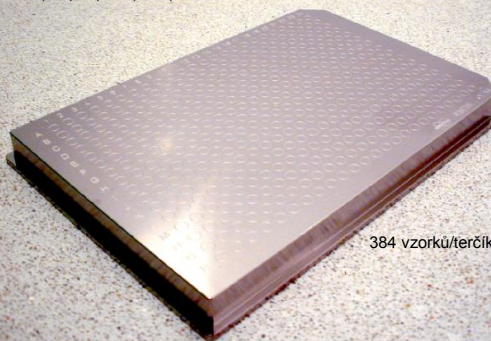
odsolení vzorku nutné (přítomnost solí ⇒ tvorba aduktů ↑, citlivost ↓)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

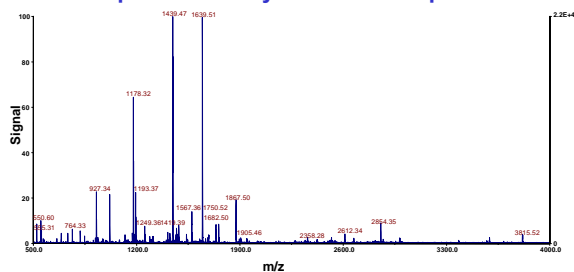
105

MS analýza početných sérií biologických vzorků

1, 10, 96, 100, 384, 1536 ... vzorků/terčik



MALDI MS identifikace hovězího albuminu z produktů enzymatického štěpení



Analyt: 1 pmol tryptického digestu BSA, odsoleno pomocí ZipTip_{C18}
 Matrice: 10 mg/ml CHCA v ACN/0.1% TFA : 70/30
 Příprava vzorku: dried-droplet.
 MS: Voyager DE-STR

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

109

On-line ionizační techniky Ionizace za atmosferického tlaku (Atmospheric Pressure Ionization, API, též sprejové ionizační metody)

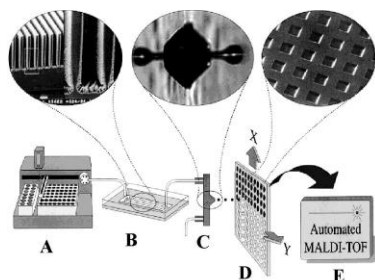
Společné znaky

- Analyt: polární, často ionizovaný v roztoku.
- Vyhřívání kapiláry a jiné elementy iontového zdroje (stovky °C)
- Přídavné elementy pro zvýšení ionizační účinnosti (svazek elektronů, el. oblouk)
- Diferenciální pumpování
- Často po předcházející separaci ... 2D separace (MS jako druhý rozměr).
- Fáze ionizačního procesu:
 - 1) tvorba kapek aerosolu
 - 2) odpařování rozpouštědla
 - 3) analýza iontů

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

112

Mikrometody - příklad



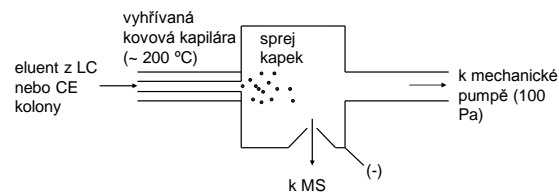
- úprava vzorku a dávkování
- reaktor s imobilizovaným enzymem
- mikropipetor
- nanovialky (300 x 300 x 20 μm) na MALDI terčiku
- automatizovaná MALDI-TOF MS

Ekstrom, S., Onnerfjord, P., Nilsson, J., Bengtsson, M., Laurell, T., Marko-Varga, G. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 286-93

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

110

Termosprej (TSI)



- Roztok vře ve špičce kapiláry, tvoří se kapky, později suchý aerosol a ionty MH^+ . Spektra podobná jako u CI, převládají molekulární ionty. Do zdroje mohou být vloženy elektrody – přídavný výkon – vyšší účinnost ionizace.
- Elektronegativní sloučeniny mohou tvořit negativní ionty. (Do komory může být vložen přídavný zdroj elektronů, aby zvýšil tvorbu negativních iontů M^- .)
- Použití těkavých pufrů - prevence zacpávání špičky kapiláry (NH_4Ac).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

113

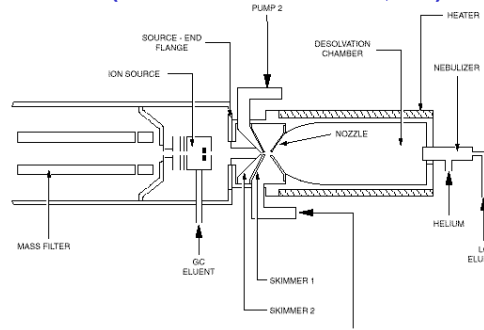
Srovnání LDI a MALDI

	LDI	MALDI
Ionizace	relativně tvrdá	měkká
Vzorek	pouze analyt	analyt v přebytku matrice
Max. m (Da)	<10 000	10^6
Typický analyt	malé organické molekuly, malé peptidy, syntetické polymery	peptidy, proteiny, malé peptidy, syntetické polymery, DNA, sacharidy, syntetické polymery

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

111

Ionizace svazkem částic (Particle Beam Ionization, PBI)



Typická sestava PBI pro GC a LC. (zdroj: www.micromass.co.uk)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

114

Ionizace svazkem částic (Particle Beam Ionization, PBI)

Princip

- Odvozen od "generátoru monodisperzního generátoru" aerosolu: R. C. Willoughby, R. F. Browner, "", *Anal. Chem.*, **56**, 2626-2631, (1984)
- Velmi podobné TSI a vyhřívánému zmlžovači. Příkladový zdroj svazku částic, obvykle He. Separátor He od iontů.
- Příkladový EI zdroj může být použit = výsledkem jsou EI spektra (s vyšším šumem v důsledku přítomnosti iontů a molekul rozpouštědla).

Charakteristika

- Spektra podobná jako v případě TSI. Více fragmentů.
- Méně citlivý než TSI a ESI.
- Vhodný pro tepelně stálé, neiontové sloučeniny s nepřilíš vysokou hmotností.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

115

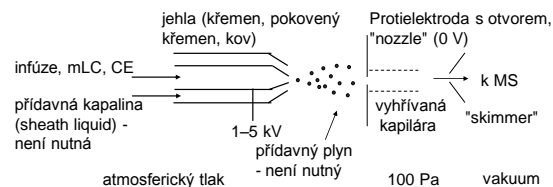
Elektrosprej (ESI)*, Nanosprej*

* Yamashita, M; Fenn, J. B. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 4451.

* Yamashita, M; Fenn, J. B. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 4671.

* Wilm, M. S.; Mann, M. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1994**, *136*, 167.

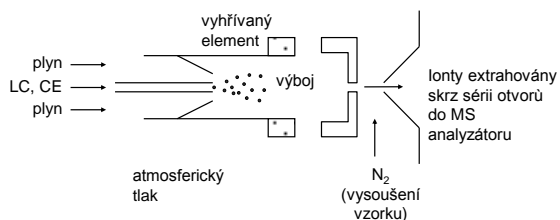
Schema



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

118

Vyhřívávaný nebulizér

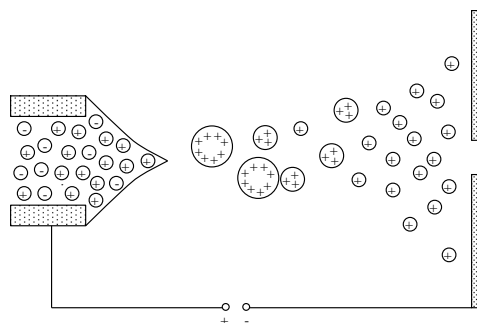


- Spektra podobná CI, obvykle záchyt 1 protonu ($[M+H]^+$).
- Nízké procento fragmentace (měkká ionizace).
- Vhodné pro střední hmotnosti (~2000 Da).
- Struktura? ... Nutno použít přídatnou kolizní celu (MS/MS).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

116

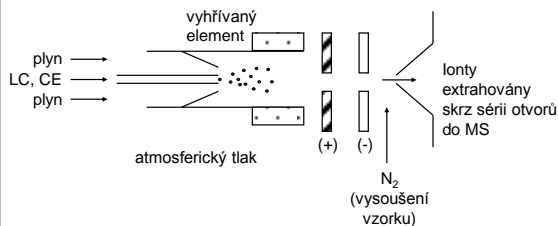
Princip ESI



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

119

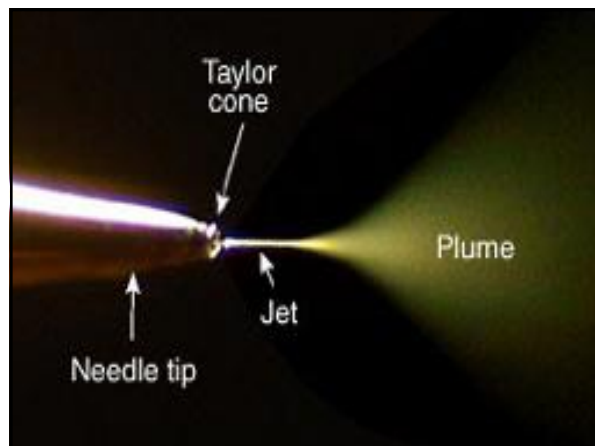
Iontový sprej (Ion Spray, IS)



- Pouze pozitivní ionty proniknou přes elektrody, negativní jsou odstraněny.
- Vícenásobně nabití ionty $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[M+3H]^{3+}$, $[M+4H]^{4+}$ atd.
- Plněné LC kolony se splitterem, mikrokolony, kapilární kolony.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

117



Princip ESI

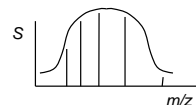
- Tvorba Taylorova kužele vlivem elektrického pole. Koncentrace kladného náboje v kuželi, destabilizace menisku a emise kapek s nadbytkem kladného náboje.
- Snižování objemu a zvyšování hustoty povrchového náboje kapek díky vypařování rozpouštědla.
- Nesymetrické štěpení nabitých kapek (Rayleighův limit stability); výchozí kapka ztrácí ~15% náboje ale jen 2% objemu.
- Velikost kapek: $\mu\text{m} \rightarrow \text{nm}$. Počet nábojů v kapce: $10^5 \rightarrow 10$. (Velikost makromolekuly ~ nanometry.)
- Vznik iontů v plynné fázi.
- Sekundární reakce v plynné fázi.
- Transfer iontů do komory MS.
- Nedochází k výboji; výboj je nežádoucí.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

121

Vlastnosti ESI

- Velmi "měkká" ionizace vhodná pro biomolekuly.
- Velmi vysoký limit max. hmotnosti, $m \sim 10^6$ (m/z mnohem menší). Ionizace těžkých polymerů (i celého viru).
- Tvorba vícenásobně nabitých iontů $[M+zH]^{z+}$
"Obálka" ve tvaru zvonu. Typické pro iontový sprej či elektrosprej. Mezery nejsou ekvidistantní (narozdí od izotopového paternu).



Př.:

$m = 10\,000 \text{ Da}$

z	4	5	6	7	8	9	10
m/z	2501	2001	1668	1429	1251	1112	1001

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

124

Provedení ESI

- Přídavný plyn – proud N_2 , vyhřívána kapilára za otvorem: dokonalejší desolvatace, zabránění tvorby klastřů.
- Koaxiální proud kapaliny možný (... přídavná koaxiální kapilára).
- Rozměry jehly: i.d. < 100 μm , o. d. 100 $\mu\text{m} - 1 \text{ mm}$, hrot < 100 μm .
- Vzdálenost hrotu od protielektrody: 1 – 3 cm. Tok < 10 mL/min.
- Nanosprej: menší rozměry, bez přídavné koaxiální kapaliny a nuceného pumpování, tok < 100 nL/min.
- Uspořádání trysky a otvoru (... oddělení iontů od balastu):

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

122

Tvorba vícenásobně nabitých iontů

+ Vyšší z snižuje $m/z \Rightarrow$ lze použít hmotnostní analyzátor s nižším limitem max. hmotnosti i pro ionty o velmi vysoké hmotnosti.

+ Ke zjištění m a z stačí pouze 2 sousední piky:

$$(m/z)_n = (m+n)/n$$

$$(m/z)_{n+1} = (m+n+1)/(n+1)$$

+ Ovlivnění náboje z ?

- pH roztoku: $\text{pH} \downarrow \Rightarrow z \uparrow$
 $\text{pH} \uparrow \Rightarrow z \downarrow$, negativní náboj převládá
- β^- zářič, jiný zdroj e^- (záchyt e^- analytem $\Rightarrow z \downarrow$)

- Spektrum směsi složitější (ale může být vyhodnoceno). Jedna látka je přítomna v několika formách a dává několik piků ve spektru ... komplexní spektra, snižena citlivost.

- Často další piky, např. adukty $[M+\text{Na}]^+$, $[M+\text{K}]^+$ atd.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

125

Provedení ESI

- **Uspořádání trysky a otvoru**
... oddělení iontů od balastu
 - v ose (on-axis)
 - mimo osu (off-axis)
 - diagonální (tilted) a kolmé (orthogonal)
 - Z-sprej
- **Připojení el. napětí**
 - přes přídavnou kapalinu (sheath flow)
 - kapalinový spoj (liquid junction)
 - pokovený hrot kapiláry (sheathless interface)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

123

ESI

- Aplikace elektrického pole (nozzle-skimmer) \Rightarrow fragmentace ve zdroji.
- K objasnění struktury - přídavná komora pro kolizní disociaci za prvním MS.
- Příbuznost ESI s dalšími API:
 - APCI = Atmospheric Pressure Chemical Ionization (solvent působí jako reakční plyn ... ionizace podobná CI)
 - jehla je vyhřívána
 - nulové napětí na jehle
 - přídavné elementy:
 - elektroda pro výboj před vstupním odporem
 - piezoelektrický element ke zlepšení zmlžnění
 - zmlžovač (iontový sprej někdy označován jako pneumatický ESI)
- Signál v ESI je závislý na koncentraci analytu, $c(\text{analyt})$; při velmi nízkých koncentracích je závislý na látkovém množství analytu (nanosprej).
- Signál $\propto c(\text{analyt})$ ($10^{-7} - 10^{-3} \text{ M}$), při vyšších c se růst zpomaluje (plato).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

126

Faktory ovlivňující ESI

- Typ analytu
- Jehla, sprejovací špička (rozměry, uspořádání)
- Napětí mezi jehlou a protielektrodou
- Spotřeba roztoku (solventy, additiva, soli, iontově párovací reagenty)
- Průtok vzorku, přídavné kapaliny a sušícího plynu
- Teplota ústí kapiláry

III. Hmotnostní analyzátoři

- **Základy iontové optiky. Simulace pohybu iontů.**
- **Energetický analyzátoř**
- **Hmotnostní analyzátoři**
- **Detekce iontů**
- **Základy vakuové techniky**
- **Spojení separace – MS. Čipy**
- **Nové techniky/technologie**

Zásady v ESI

- Použití těkavých pufrů:
 - CH₃COOH
 - HCOOH
 - TFA (kyselina trifluoroctová)
 - NH₄⁺ soli těkavých kyselin
- Koncentrace solí < 20 mM
- Vystříhat se použití síranů, fosfátů
- Pravoúhlý nebo Z sprej mohou částečně pomoci v případech, kde se nelze řídit výše uvedenými zásadami.
- Pro pozitivní ionizaci pK_a (elektrolyt) < pK_a (analyt) – 2
- Pro negativní ionizaci pK_a (elektrolyt) < pK_a (analyt) – 2
- Důkladná příprava vzorku = snazší analýza
 - odsolení, odstranění surfaktantů a dalších příměsí

Základy iontové optiky

Analogie se světelnou optikou

štěrba	štěrba
čočka	čočka
hranol, mřížka	W _{kin} : energetický analyzátoř, deflektor
	m/z: hmotnostní analyzátoř
zrcadlo	iontové zrcadlo
optické vlákno	iontový vodič

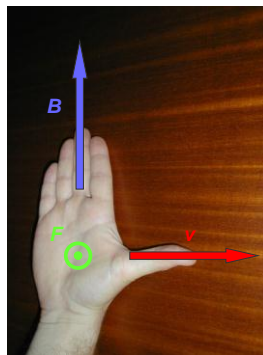
Odišnosti od světelné optiky

vlnová délka, λ	kinetická energie, W _{kin}
	hmotnost/náboj, m/z
index lomu neměnný	možné ladění elektr. nebo magn. pole
	časově proměnná pole během experimentu
nezávislé na intenzitě	vzájemné odpuzování iontů

- 4 Analyzátoři. Základy iontové optiky. Weinův Filtr. Energetické analyzátoři (E). Hmotnostní analyzátoři. Magnetický sektor (B). Kvadrupólový filtr (Q). Iontová past (IT).



Lorentzova a Coulombova síly



Magnetické pole o indukci B:

$$\vec{F}_{magn.} = ze (\vec{v} \times \vec{B})$$

Coulombova síla v el. poli E:

$$F_{el.} = ze\vec{E}$$

Celkově:

$$\vec{F} = ze (\vec{E} + \vec{v} \times \vec{B})$$

Pro jednoduchost dále pouze:

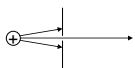
$$F_{el.} = zeE$$

$$F_{magn.} = zevB$$

Elementy iontové optiky

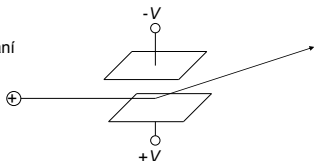
Štěrbin

- vymezení paprsku
- vymezení vs. propustnost



Deflektor

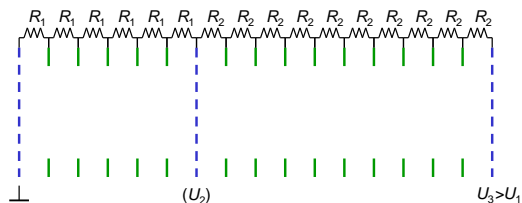
- odklonění iontů
- 2 deflektory pro x, y skenování



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

133

Konstrukce iontového zrcadla se 2 stupni



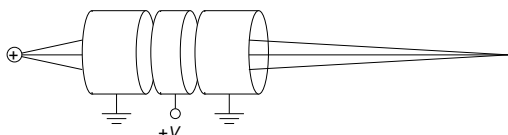
mřížky: definice ekvipotenciálních rovin

prstence: elektrostatické **stínění** potenciálu okolí (vakuové aparatury)
potenciály prstenců a mřížek jsou definovány pomocí série rezistorů a U_3
 $U_1 \dots$ urychlovací napětí

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

136

Čočka (elektrostatická, Einzelova čočka)



- analogie klasické čočky
- ohnisková vzdálenost může být změněna změnou napětí V
- vyšší iontová propustnost ve srovnání se štěrbinou
- fokální vzdálenost není funkcí m/z (pro ionty ze stejného iontového zdroje)
- ideální funkce pouze pro ionty o stejné kinetické energii - pokud je vzájemné odpuzování iontů zanedbáno (space-charge effect)
- zobrazená čočka je jen jednou z mnoha možných sestav

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

134

Vlastnosti iontů

Vlastnosti iontu

m/z	hmotnost/náboj
v	rychlost (kinetická energie, $W = mv^2/2$)
t	čas
x, y, z	souřadnice
α	úhel (směr)
t_0	čas zrodu (index ₀ ... zrod iontu)

Vlastnosti skupin iontů

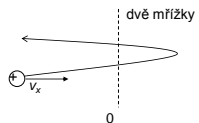
(nejčastěji o totožném m/z)

... popsány disperzemi, distribucemi $v(W), x, y, z, t_0, \alpha$

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

137

Iontové zrcadlo (reflektor, reflektor)



Kinetická energie iontu vs. potenciální energie elektrického pole:

1) $\frac{mv_x^2}{2} < zeU$ **iontové zrcadlo:** iont se vrací stejnou rychlostí, jakou pronikl přes vstupní mřížku

2) $\frac{mv_x^2}{2} > zeU$ **energetický filtr:** dostatečně rychlé ionty pronikají druhou mřížkou ... polopropustné zrcadlo

Iontová zrcadla: s mřížkami a bez mřížek, různý průběh E

Použití: např. ke korekci počáteční energetické disperze v TOF MS.

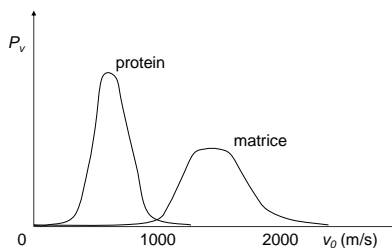
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

135

Vlastnosti iontů

Př.: Distribuce počáteční rychlosti při MALDI

($P_v \dots$ pravděpodobnost výskytu molekuly o rychlosti v)



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

138

Weinův rychlostní filtr



- Příčné elektrické pole mezi dvěma plochými elektrodami
- Příčné magnetické pole
- Vektor intenzity elektrického pole E je kolmý na vektor magnetické indukce B
- Na iont působí opačně orientované el. a magn. síly

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

139

Energetický analyzátor

Zrychlení: $\frac{mv^2}{r} = zeE$, kde $E = \frac{2V}{L}$

Energie: $\frac{mv^2}{2} = zeU$

Poloměr zakřivení: $r = \frac{2U}{E}$

- Poloměr zakřivení je přímo úměrný kinetické energii iontu.
- Ve vztahu nehraje roli m/z .
- I tlustější rovnoběžné svazky iontů jsou zaostřeny.
- Zaostření může být optimalizováno v obou dimenzích, použije-li se plechů zakřivených v obou rozměrech (i axiálně).
- Sektor – tvar výřezu z kruhu

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

142

Weinův rychlostní filtr

Pro iont letící středem filtru platí:

$$zeE = zevB \quad (E = \frac{V}{L})$$

$$v = \frac{E}{B}$$

... prolétají pouze ionty o určité rychlosti.

V případě, že všechny ionty byly urychleny napětím U , platí

$$\frac{mv^2}{2} = zeU$$

$$\frac{m}{z} = \frac{eB^2}{E^2} 2U$$

... Weinův filtr lze použít k analýze hmotnosti (m/z).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

140

Hmotnostní analyzátořy

Magnetický sektor (MAG, B)

Quadrupólový analyzátoř (Q, q)

Iontový cyklotron (ICR-FT-MS)

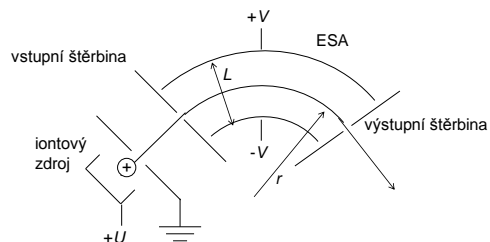
Iontová past (IT)

Průletový, Time-of-flight (TOFMS)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

143

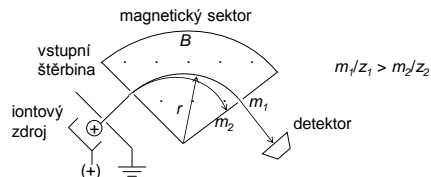
Energetický analyzátoř; elektrostatický analyzátoř (ESA, E)



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

141

Magnetický sektor (MAG, B)



Vektor intenzity magnetického pole B je kolmý k vektoru rychlosti iontů proudících do sektoru z iontového zdroje.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

144

Princip magnetického sektoru

1.) Lorentzova síla = odstředivá síla:

$$Bzev = \frac{mv^2}{r}$$

$$\frac{m}{z} = \frac{eBr}{v}$$

2.) Kinetická energie = urychlovací energie:

$$\frac{mv^2}{2} = zeU$$

$$\frac{m}{z} = \frac{eB^2 r^2}{2U}$$

Tandem EB

- Disperze vlastností iontů (v , x , α) a nestabilita polí (B , U) ovlivňují kvalitu spekter.
- Zařazení ESA před MAG řeší problém disperze rychlosti v (kinetické energie W_{kin}) iontů vstupujících do magnetického sektoru.

Praktické geometrie EB:

1. Nier-Johnsonova

90° ESA + 60° MAG

výstup stále zaostřen pro daný poloměr, r
vhodná pro skenovací spektrometry

2. Mattauch-Herzogova

31.8° ESA + 90° MAG

jedna fokální rovina pro ionty o různých hmotnostech
vhodná pro plošný detektor (fotodeska, pole)

3. Matsudova

vhodná pro kompaktní přístroje

Princip magnetického sektoru

$$\frac{m}{z} = \frac{eB^2 r^2}{2U}$$

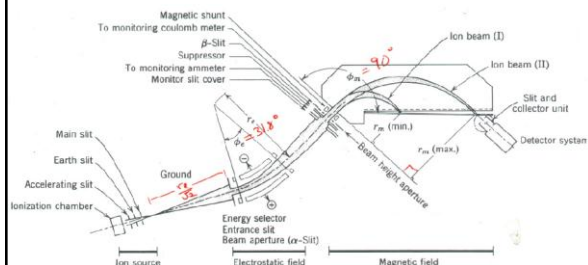
Způsoby skenování spektra:

- Posunem výstupní štěrbinu, r . Konst. U , B .
- Změnou U , konst. B . Problémy s nízkou extrakční účinností při nízkých hodnotách U .
- Změnou B , konst. U . Dříve obtížné, nyní převládající řešení.

Peak switching

Skoková změna některé z proměnných. Vhodné pro monitorování omezeného počtu druhů iontů (např. přepínáním U).

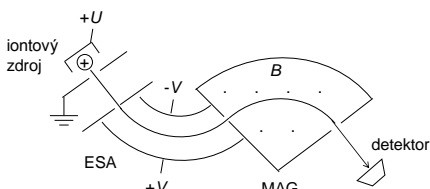
Mattauch-Herzogova geometrie



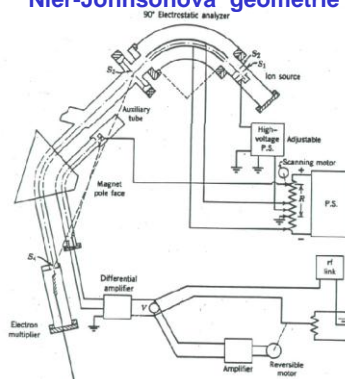
Tandem elektrostatický analyzátor - magnetický sektor

Přímá geometrie (Forward-geometry, ESA-MAG, EB)

1. energetický analyzátor: výběr iontů se specifickou kinetickou energií
2. magnetický sektor: hmotnostní analýza



Nier-Johnsonova geometrie



Další kombinace E a B

Reversní geometrie (Reverse-geometry, BE)

1. **magnetický sektor:** hmotnostní filtr
2. **energetický analyzátor:** analýza iontů podle kinetické energie

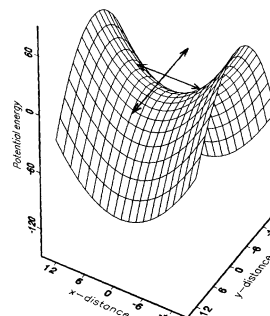
MIKES (Mass-Analyzed Ion Kinetic Energy Spectrometry)

první MS/MS technika, tandemová hmotnostní spektrometrie (1973)

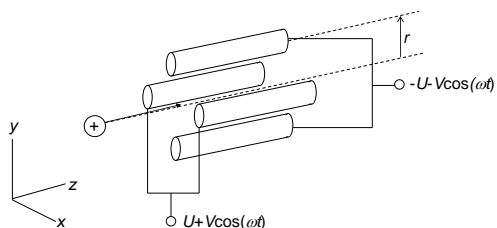
1. Magnetický sektor propustí ionty o určité hmotnosti.
2. Metastabilní ionty se rozpadnou v oblasti mezi magnetickým a energetickým analyzátozem.
3. Dceřinné ionty vzniklé z rozpadu se rozdělí podle kinetické energie v energetickém analyzátozem.

Celá řada **hybridních přístrojů** založených na E a B: EBE, BEB, EBEB, BEBE ...

Quadrupole field



Kvadrupolový hmotnostní filtr (Quadrupole MS, Q, q)



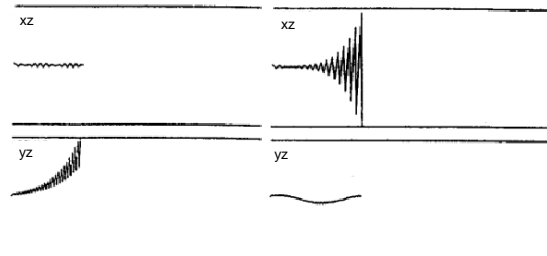
4 tyče hyperbolického (též kruhového, čtvercového nebo jiného) průřezu

U ... DC složka napětí

V ... AC (RF) složka napětí

ω ... úhlová frekvence, $\omega = 2\pi f$, $f = 1 - 3$ MHz, fázový posun 180°

Trajektorie iontů v kvadrupolovém filtru



Heavy Ions

Light Ions

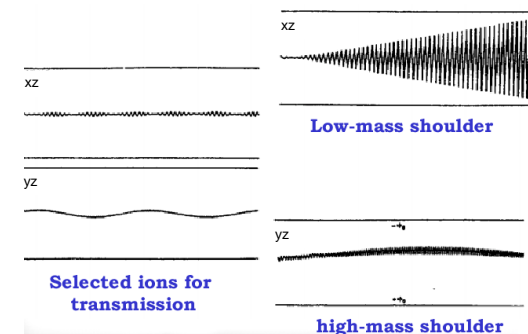
Kvadrupolový hmotnostní filtr

Rovina xz: těžké ionty procházejí

Rovina yz: lehké ionty procházejí

... pouze ionty o specifické m/z projdou kvadrupolovým filtrem, ostatní ionty jsou odchýleny.

Trajektorie iontů v kvadrupolovém filtru

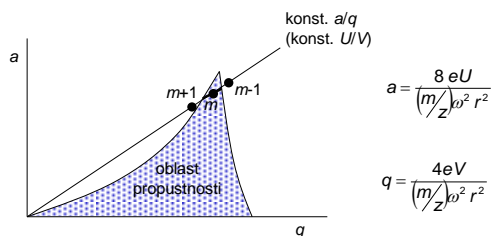


Selected ions for transmission

high-mass shoulder

Diagram stability

... grafická reprezentace řešení Mathieuových rovnic, které popisují pohyb iontů v kvadrupólovém filtru.



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

157

Vlastnosti kvadrupólového filtru

Zvýšení rozlišení. (Rozlišení, $R < 10\,000$, obvykle $R < 2\,000$.)

• Pro urychlovací napětí, U_{acc} (směrem do kvadrupólu):

$$\frac{m}{Z} = \frac{2eU_{acc}}{v^2} \quad v = \frac{l}{t}$$

$$t = \sqrt{\frac{l^2 \frac{m}{Z}}{2eU_{acc}}}$$

Pro danou délku kvadrupólu, l , musí být napětí U_{acc} dostatečně malé, aby iont strávil v kvadrupólu desítky - stovky cyklů ω během doby průletu t .

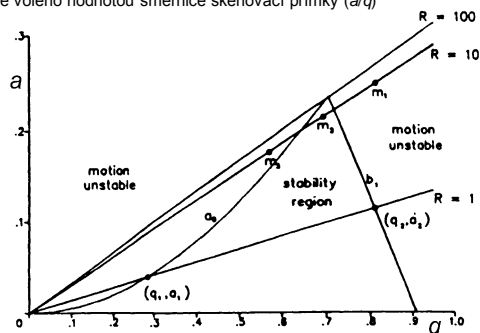
• Zvýšení rozlišení též přesnější mechanickou výrobou.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

160

Rozlišení

... je voleno hodnotou směrnice skenovací přímky (a/q)



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

158

Kvadrupólový filtr

Externí zdroj

• problémy s okrajovým polem (fringe field), nestabilní dráhy; významné % iontů se nedostane dovnitř

• hmotnostní diskriminace - těžké ionty, které stráví delší dobu v okrajovém poli, jsou více ovlivněny

• řešení:

- vstupní elektrostatická čočka

- vstupní RF kvadrupól (q), hexapól nebo oktupól

(pouze RF složka: $a = 0, U = 0 \Rightarrow$ neselektivní filtr propouštějící všechny $m/z \dots$ iontový vodič)

Trojité kvadrupól (QqQ)

• populární tandemový hmotnostní spektrometr pro CID

• prostřední kvadrupól (q , pouze RF složka) slouží jako kolizní cela

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

161

Vlastnosti kvadrupólového filtru

Zaznamenávání spektra

r a f obvykle konst., současné skenování U a V při konst. U/V .

Limit max. hmotnosti 2 000 - 4 000.

$$\max\left(\frac{m}{Z}\right) \sim \frac{0.316V}{r^2 f^2} \quad [V, \text{cm}, \text{MHz}]$$

Zvýšení limitu m/z : $V \uparrow, r \downarrow, f \downarrow$.

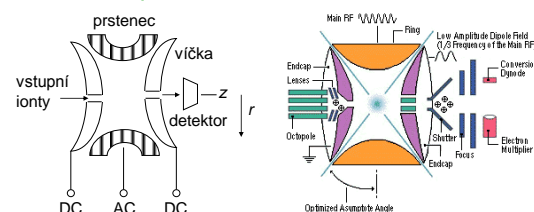
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

159

Kvadrupólová iontová past (Ion trap, IT)

1953 Wolfgang Paul (Paulova past) - téměř bez povšimnutí
1983 Finnigan - komerční přístroj (dnes nejprodávanější MS)

Schema iontové pasti

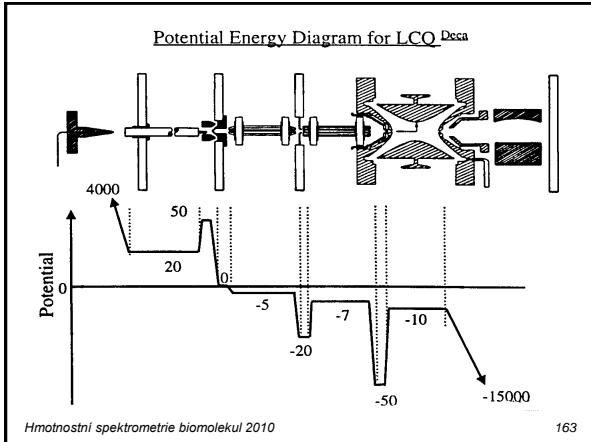


DC: stejnosměrné napětí nebo zem

AC: stejnosměrné + střídavé napětí, $U + V\cos(\omega t)$

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

162



Iontová past

- Experiment zahrnuje fáze ionizace, akumulace, sken a detekce.
- Akumulace ionů:** ionty lze sbírat i během ionizačního pulsu - výsledkem jsou velmi nízké detekční limity. Doba cyklu akumulace - detekce závisí na požadavcích:
 - Vyšší citlivost ... delší akumulace.
 - Širší rozsah m/z , vyšší m ... delší sken.
 - Vyšší R ... pomalejší sken.
- Rezonanční vypuzení** (resonant ejection) iontů o specifické m/z - přivedením přídatného RF signálu na víčka pasti. Vytvoření "díry" v oblasti stability. (1983, G. Stafford: "mass selective instability mode")
- Pufrovací plyn** (o nízké hmotnosti: He, 1 mTorr)
 - Mnohem lepší výsledky než pouze pro samotný analyt.
 - Srážky analytu s pufrovacím plynem vedou k lepší distribuci energie mezi molekulami analytu. Výhodné pro spojení GC-MS.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010 166

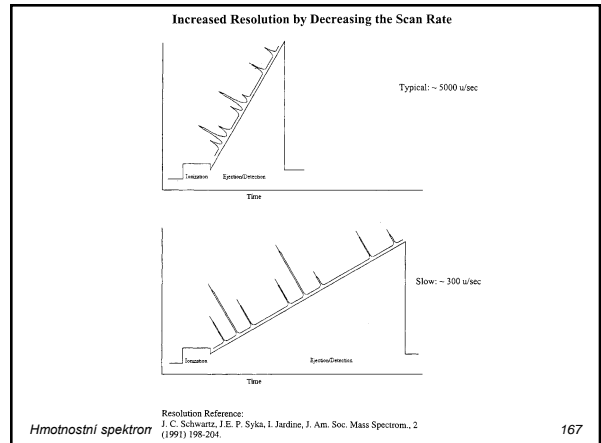
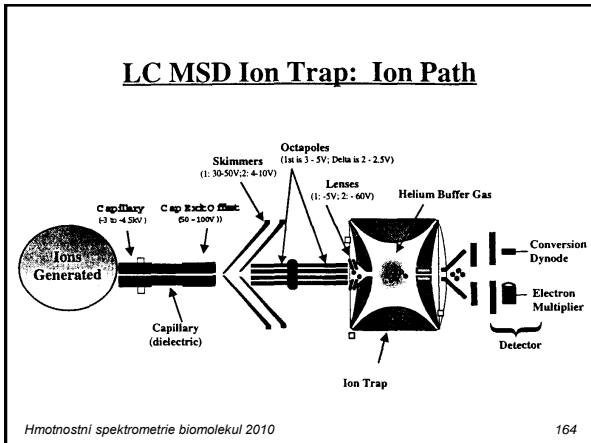


Diagram stability iontové pasti

oblast nestability: ionty opouštějí past štěrbinami ve víčkách

oblast stability: ionty oscilují uvnitř pasti, jsou "lapané" (storage mode)

$m_3 > m_2 > m_1$ ($z = 1$)

$$a_z = \frac{16eU}{(m/z)^2 r^2}$$

$$q_z \propto V/(m/z) \text{ pro pohyb podél osy } z \text{ (} a = 0, U = 0 \text{)}$$

$$q_z = \frac{8eV}{(m/z)^2 r^2}$$

Skenování: zvyšováním V jsou vypuzovány nejprve lehčí a posléze těžší ionty

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010 165

Iontová past

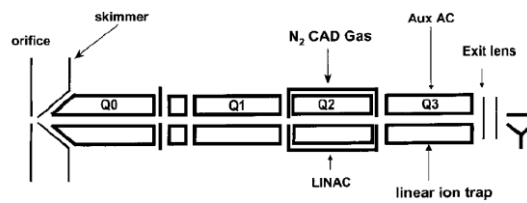
- MS/MS** - past může nahradit tandemem dvou spektrometrů srážkově indukovaná (aktivovaná) disociace, většinou s He
CID, CAD: collisionally induced (activated) dissociation
- Vysoké R** ... v praxi $< 10\,000$, obvykle $\sim 5\,000$
- Max. hmotnost**, $m/z_{max} \sim 70\,000$ (rezonanční vypuzení)
- Miniaturizace:** iontová mikropast, past na čipu (i pro kvadrupolový filtr)
 - + celková velikost 1 cm
 - + vhodné např. pro vesmírný výzkum
 - mnohem náročnější tolerance, obtížná výroba
 - horší parametry (R , m/z_{max})

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010 168

Iontová past

- **Iontová transmisie**
polovina iontů může být detegována
- **Fyzická omezení**
volba rozměrů, napětí a frekvence omezena.
- **Maximální dynamický rozsah** (10^6 pro 1 druh iontu) omezen:
 - minimum citlivostí (i 1 iont může být detegován)
 - maximum max. množstvím lapaných iontů: pro vyšší množství iontů než 10^6 přestává past postupně fungovat - vzájemné odpuzování iontů. Pozor, jde o sumu iontů všech m/z!

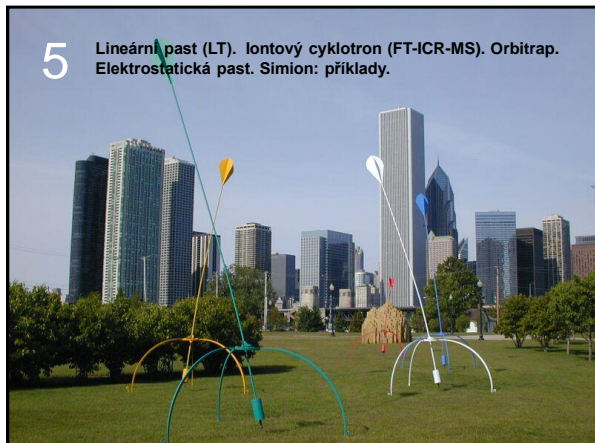
Lineární past s axiálním vypuzením



Ionty jsou vypuzeny z LT podél osy kvadrupólu.

(Zdroj: J. C. Y. Le Blanc *et al. Proteomics* 3, 2004, 859-869.)

5 Lineární past (LT). Iontový cyklotron (FT-ICR-MS). Orbitrap. Elektrostatická past. Simion: příklady.



Výhody 2D vs. 3D pasti

Účinnost zachycení: 50-75% (3-D: 5% - 20%, a závisí na hmotnosti)

Účinnost extrakce: 25-50% (3-D : 20%)

Citlivost: 5-10 – násobný vzrůst

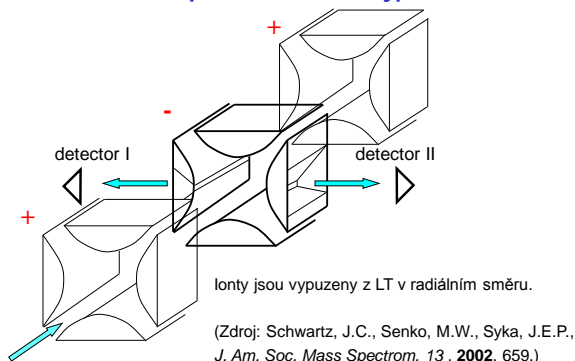
Iontová kapacita: 20 - 30 x vyšší než u 3-D

Lineární rozsah vzrostl o více než 2 řády až na 10^6

Rozlišení: ~10 000 při rychlosti skenu 300 a.m.u./s

Širší možnosti manipulací s ionty (akumulace, skeny...)

Lineární past s radiálním vypuzením



Ionty jsou vypuzeny z LT v radiálním směru.

(Zdroj: Schwartz, J.C., Senko, M.W., Syka, J.E.P., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13, 2002, 659.)

Rozdíly mezi kvadrupólovým filtrem a pastmi

Kvadrupólový filtr

- nezachytává ionty
- pouze iont s jistou hodnotou m/z může projít filtrem v daném okamžiku

... skenující přístroj znamená ztrátu iontů a tím i nižší citlivost

(vyjma režimu single ion monitoring, kdy je výhodnější)

... "space charge" jevy jsou mnohem méně výrazné, což vede k vyššímu dynamickému rozsahu

Srovnání kvadrupólových analyzátorů

	QIT	QQQ	LQIT
Citlivost	++	-	++
Dynamický rozsah	-	++	+
Rozsah m/z	-	+	+
MS ³	++	-	++
Neutral loss sken/Precursor sken	-	+	+
Správnost m/z	+	-	+
Rozlišení	+	-	+

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

175

FT-ICR-MS

Pohyb iontu v magnetickém poli:

$$Bzev = \frac{mv^2}{r}$$



Úhlová (cyklotronová) frekvence:

$$\omega = \frac{v}{r} = \frac{Be}{\left(\frac{m}{z}\right)}$$

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

178

Lineární past

Lineární past neboli "2D past" vychází z kvadrupólového filtru/iontového vodiče. Iontová past popsána dříve je někdy označována jako "3D past".

Ionty jsou injektovány do RF (RF-only) kvadrupólu a poté zadrženy zvýšením potenciálu na postranních víčkách, takže oscilují v potenciálové jámě kvadrupólu. Později jsou ionty postupně vypuzovány otvory v tyčích nebo víčkách a detekovány.

Dva způsoby vypuzení iontů z LT:

A. Schwartz, J.C., Senko, M.W., Syka, J.E.P., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13, 2002, 659.

B. Hager, J.W., *Rapid Comm. Mass Spec.* 16, 2000, 512.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

176

Vlastnosti FT-ICR-MS

- (supravodivý) magnet s velkou magnetickou indukci $B \sim 10$ Tesla
- velmi nízký tlak, $p < 10^{-7}$ Pa (UHV, ultra high vacuum)
- vysoká cena $\sim 25\,000\,000$ Kč
- omezený dynamický rozsah $\sim 10^3$, 100 až 10^5 iontů

- + velmi vysoká přesnost a správnost m/z , \sim ppm
- + velmi vysoké rozlišení, $R \sim 10^6$
- + multiplexová (Felgettova) výhoda FT ... všechny m/z se měří po celou dobu \rightarrow zlepšení S/N 10^3 x, zvýšení rychlosti získávání 10^6 x
- + vhodné k MSⁿ (CID, CAD), běžně $n = 2$ až 3, demonstrováno i $n = 1$

Další geometrie pasti: cylindrická, hyperbolická (Penningova)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

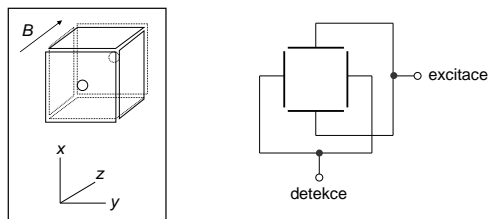
179

Iontový cyklotron (FT-ICR-MS)

(Fourier transform - ion cyclotron resonance - mass spectrometer)

...typ iontové pasti

Kubická past tvořena dvěma páry elektrod a dvěma víčky



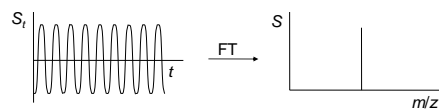
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

177

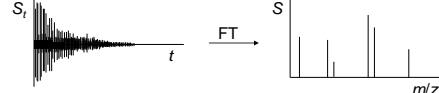
Fourierova transformace

... transformace signálu z časové do frekvenční (m/z) domény

Netlumený pohyb iontů o jedné m/z



Reálný signál z FT ICR MS



- Srážky s molekulou plynu a nehomogenita magnetického pole způsobují pozvolný pokles signálu. Vyšší tlak \Rightarrow více srážek \Rightarrow nižší rozlišení.
- Lorentzovský tvar píku.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

180

Princip FT-ICR-MS

Ionizace pro FT MS

1. **ionizace uvnitř**: analyzátor = zdroj (např. EI, LDI)
2. **externí zdroj** a zavedení do cely
 - iontové vodiče, kvadrupóly, elektrostatická čočka
 - diferenciálně pumpované cely (iont se tvoří v první cele při vyšším tlaku a poté je zaveden do detekční cely otvorem podél osy z)

Excitace

1. **Impuls** ... vysoká amplituda, krátké trvání
2. **Chirp** ... rychlý sken frekvencí v požadovaném intervalu frekvencí
3. **SWIFT** ... Stored Waveform Inverse Fourier Transform
excitační profil získaný iFT zvoleného profilu m/z
(iFT = inverzní FT, transformace z frekvenční (m/z) do časové domény)

FT-ICR-MS

Rozlišení

$$\frac{m}{\Delta m} \propto \frac{Bt}{mz}$$

Max. hmotnost. Ze vztahu pro střední kvadratickou rychlost termálního pohybu,

$$v = \sqrt{\frac{2kT}{m}}$$

který pre-excituje ionty, vyjádříme

$$r = \frac{mv}{zeB} = \frac{\sqrt{2mkT}}{zeB}$$

V pasti s danými parametry (B , r) nemohou být uchovány ionty s hmotností vyšší než

$$m = \frac{(zeBr)^2}{2kT}$$

Princip FT-ICR-MS

Detekce

1. **indukční** - ionty indukují náboj v detekčních destičkách při průletu okolo: nedestruktivní detekce (FT cyklotron)
2. **destruktivní** - ionty narazí do detekčních destiček (prostý cyklotron)

Záznam dat

- vyšší frekvence vzorkování \Rightarrow vyšší horní limit m/z .
Nyquistovo kritérium: nejvyšší detegovaná frekvence = vzorkovací frekvence/2
- delší doba záznamu, $t \Rightarrow$ vyšší rozlišení a nižší dolní limit m/z .
- Důsledek ... nutnost uchování velkého množství dat
 - heterodyne, frekvenční směřovač (frekvenční posun signálu směrem dolů umožní použít nižší vzorkovací frekvence)

Hmotnostní spektrometr budoucnosti?

... neexistuje jediné nejlepší řešení

Trendy

- **Ústup magnetických sektorů**
- **Hybridní spektrometry**
Rozšiřování moderních spektrometrů a jejich hybridů (iontové pasti, ortogonální TOF analyzátoři).
- **Nové spektrometry**
Elektrostatická past "Orbitrap"
Lineární pasti kvadrupólového typu

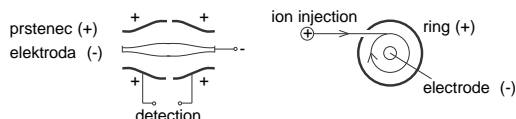
Princip FT-ICR-MS

Z-trapping

- Na víčka je vloženo napětí 1-5 V, aby ionty neopustily past ve směru osy z.
- V přídatném poli dochází k oscilaci iontů a rozštěpení původně jediného pohybu na pohyb cyklotronový a magnetronový. Důsledkem jsou komplikovanější kalibrace, posun piků a vyšší ztráta těžších iontů.

Elektrostatická past "Orbitrap"

A. Makarov, HD Technologies Ltd., USA, ASMS 1999



Princip

- Ionty jsou injektovány do axiálně symetrického elektrostatického pole tvořeného centrální elektrodou a prstencem; a krouží kolem elektrody.
- Oscilace iontů podél osy elektrody jsou detekovány, $f \Rightarrow$ indukční detekce.
- MS spektra jsou získána pomocí Fourierovy transformace $f = f(m/z)$

Vlastnosti Orbitrapu

- + Velmi vysoké rozlišení jako u FT-ICR-MS ($R = 50\,000 - 500\,000$).
- + Velmi vysoká přesnost a správnost ... jako u FT-ICR-MS.
- + Nepotřebuje magnet.
- + Nepotřebuje RF generátory.
- Vyžaduje velmi nízké tlaky ... jako FT-ICR-MS.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

187

Průletový analyzátor (Time-of-flight MS, TOFMS)

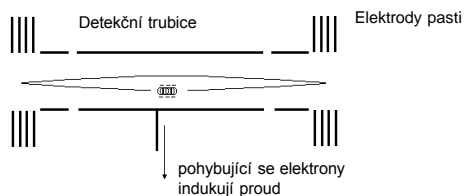
Princip: m/z vypočten z doby letu iontů

1. Urychlení iontů
Stejná urychlovací energie pro všechny ionty $W(el.)$
 $W(el.) = W(kin.)$
2. Drift (let) iontů: separace iontů podle m/z
 $W(kin.) = mv^2/2$
3. Záznam iontového signálu v čase, $I(t)$
4. Stanovení m/z doby letu: transformace $I(t) \rightarrow I(m/z)$

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

190

Lineární elektrostatická past



Detekovaná frekvence = $f(m/z)$

Benner, *Anal. Chem.* 1997, 69, 4162-4168

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

188

Historie TOFMS

1946 princip TOF

W. E. Stephens, *Phys. Rev.*, 1946, 69, 691

1948 první TOF spektrometr (ion velocitron)

A. E. Cameron, D. F. Eggers, *Rev. Sci. Instrum.* 1948, 19, 605

1955 iontový zdroj se 2 stupni; zpožděná extrakce (time-lag focusing)

Wiley, W. C.; McLaren, I. H.; *Rev. Sci. Instrum.*, 1955, 26, 1150

1973 iontové zrcadlo

B. A. Mamyrin, V. I. Karataev, D. V. Schmikk, and V. A. Zagulin, *Sov. Phys. JETP* 1973, 37, 45

1995 pulsní extrakce („time-lag focusing“ v praxi)

Whittal, R. M.; Li, L., *Anal. Chem.* 1995, 67, 1950-1954

Brown, R. S.; Lennon, J. J., *Anal. Chem.* 1995, 67, 1998-2003

Vestal, M. L.; Juhasz, P.; Martin, S. A., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1995, 9, 1044-1050

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

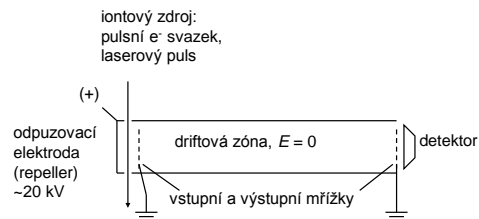
191



Geometrie TOFMS

Lineární geometrie

... nejjednodušší sestava



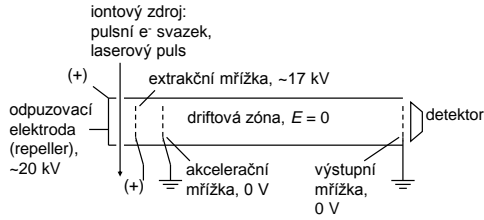
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

192

Geometrie TOFMS

Wiley-McLarenova lineární geometrie (1955)

... nastavení extračního el. pole nezávislé na celkovém urychlovacím napětí, optimalizace spekter



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

193

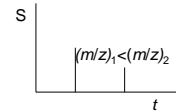
Princip TOFMS

1. Pulsní ionizace (doba pulsu ~ ns): rychlé vytvoření obláčku iontů (EI, LD, MALD, PD ...)
2. Extrakce a urychlení iontů v elektrickém poli
3. Separace iontů v driftové zóně při $E = 0$ (field-free region, flight tube)
4. Detekce iontů, záznam signálu, transformace do m/z domény

urychlovací energie $zeU = \frac{mv^2}{2}$ kinetická energie

$$v = \frac{L}{t} \quad \begin{array}{l} \text{— délka driftové zóny} \\ \text{— doba letu} \end{array}$$

$$\frac{m}{z} = 2eU \frac{t^2}{L^2}$$



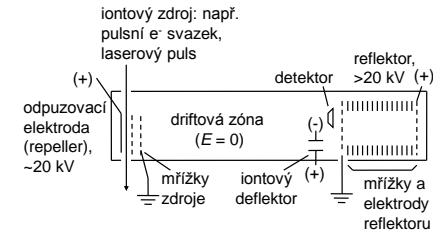
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

196

Geometrie TOFMS

TOF MS s iontovým zrcadlem (reflektorem)

... dosažení lepších parametrů spekter
... možnost strukturální analýzy (PSD)



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

194

Princip TOFMS

Přesnější vztah zahrnuje i čas strávený v prostoru iontového zdroje a detektoru:



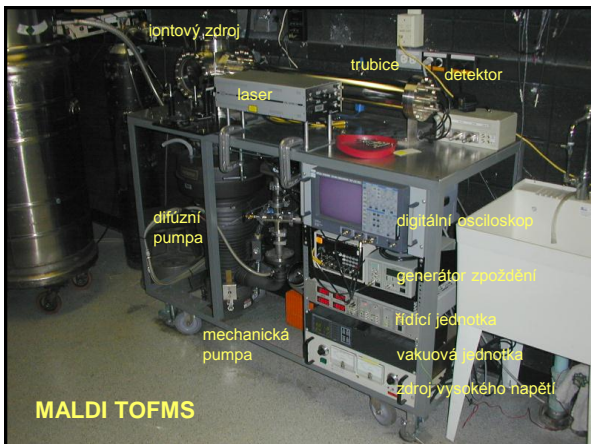
$$t_{TOF} = t_s + t_L + t_d$$

$$t_s = \sqrt{\frac{2ms^2}{zeU_s}} \quad t_L = \sqrt{\frac{mL^2}{2zeU_s}} \quad t_d = \frac{d}{U_d} \sqrt{\frac{m}{2ze}} (\sqrt{U_s} + \sqrt{U_s + 4U_d})$$

Pozn.: 1) t_s , t_L , t_d a tedy i t_{TOF} jsou přímo úměrné $(m/z)^{1/2}$
2) pro hrubý odhad t_{TOF} : $t_{TOF} \sim t_L$ ($L \gg s, d$)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

197



MALDI TOFMS

TOF: kalibrace m/z

$$\begin{aligned} m/z &= (2eUL^2)t^2 \\ &\Downarrow \\ m/z &= k_1(t-t_0)^2 \\ &\Downarrow \\ t &= c_0 + c_1(m/z)^{1/2} \\ t &= c_0 + c_1(m/z)^{1/2} + c_2(m/z) \\ t &= c_0 + c_1(m/z)^{1/2} + c_2(m/z)^{1/2} + c_3(m/z) \end{aligned}$$

korekce spuštění záznamu dat
korekce poč. rychlosti iontů před extračním pulsem
korekce neideálního tvaru extračního pulsu

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

198

Principiální výhody a vlastnosti TOFMS

- Teoreticky neomezený rozsah m/z
- Ideální pro pulsní ionizaci
- Fellgettova výhoda: pro každý puls zaznamenáno celé spektrum, není třeba skenovat
- Velmi krátká doba záznamu spektra ($\sim 10^{-4}$ s)
- Vysoká propustnost iontů ... předpoklad vysoké citlivosti
- Jednoduchost

Reálný zdroj iontů pro TOFMS

Ionty jsou charakterizovány distribucemi:

- doby vzniku t_0 ,
- místa vzniku x_0, y_0, z_0 ,
- počáteční rychlosti v_0 (energie W_{kin0}),
- a směru pohybu α (odchylka od osy letu x).

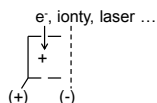
Důsledek: snížení rozlišení, R

Wiley-McLarenův zdroj pro plynné vzorky:

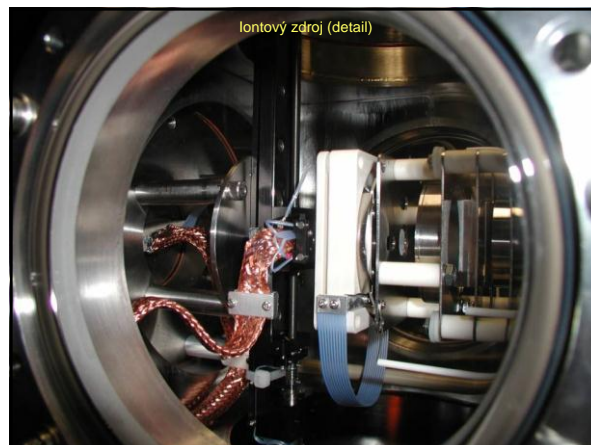
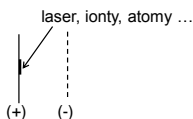
nastavením napětí na střední mřížce umožňuje kompromis distribuce v a x za účelem dosažení optimálního rozlišení (Wiley, W. C.; McLaren, I. H.; Rev. Sci. Instrum., 1955, 26, 1150)

Iontové zdroje pro TOFMS

1. Zdroj pro plynné vzorky



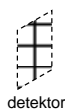
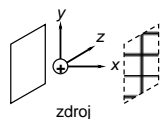
2. Zdroj pro tuhé vzorky (desorpce)



Ideální zdroj iontů pro TOFMS

Všechny ionty jsou vytvořeny:

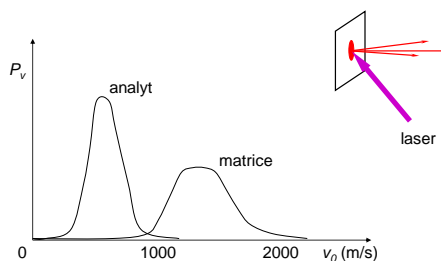
- v čase t_0 (doba tvorby, $\Delta t = 0$)
- ve vzdálenosti x_0 (x ... osa letu TOFMS)
(nejlépe v jednom bodě [x_0, y_0, z_0])
- se stejnou rychlostí v_{x0} (, která nemusí být nulová,) podél osy x .
(nejlépe s $v_{y0} = 0$ a $v_{z0} = 0$)



Vlastnosti iontů

Př.: Distribuce počáteční rychlosti iontů při MALDI

(P_v ... pravděpodobnost výskytu molekuly s počáteční rychlostí v_0)



Spojení MALDI-TOF MS?

Desorpční metody (MALDI, LDI) - speciální případ:

Δt_0 - ns zanedbatelné; (velmi krátký laserový puls)
 Δx_0 - μm zanedbatelné; (tenká vrstva, malé krystalky vzorku)
 $\Delta z_0, \Delta y_0$ - 50 μm zanedbatelné; (zaostřený laserový paprsek)

$\Delta v_0 > 100 \text{ m/s}$ nejvýznamnější příčina nízkého rozlišení

$\Delta \alpha_0 \sim 10^\circ$ přispívá k dalšímu rozšíření distribuce v

Energetická distribuce ($v \sim 700 \text{ m/s}$, $\Delta v > 500 \text{ m/s}$) způsobí, že ionty o stejném m/z přiletí k detektoru v různou dobu.

1. Vysoké urychlovací napětí

$$\frac{mv^2}{2} = \frac{mv_0^2}{2} + zeU \Rightarrow v = \sqrt{v_0^2 + \frac{2zeU}{m}}$$

příspěvek desorpce příspěvek el. pole

Zvýšením příspěvku elektrického pole se sníží vliv disperze počáteční rychlosti iontů analytu.

Pulsní tvorba iontů pro TOFMS

Extrakce konstantním elektrickým polem (DC)

pulsní ionizační paprsek + konstantní extrakční pole

2a. Pulsní extrakce, zpožděná extrakce

(pulsed extraction, PE; delayed extraction, DE)

pulsní ionizační paprsek + pulsní extrakční pole

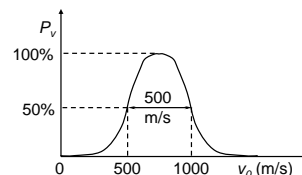
2b. o-TOFMS s pulsní extrakcí

(orthogonal extraction, kolmá extrakce)

souvislá tvorba (přívod) iontů + pulsní extrakční pole

Vliv urychlovacího napětí

Př.: MALDI TOF peptidu o $m = 2000 \text{ Da}$, $z = 1$, $v_0 = 750 \text{ m/s}$, $\Delta v_0(\text{FWHM}) = 500 \text{ m/s}$, $L = 1 \text{ m}$. (2 ionty: $v_{01} = 500 \text{ m/s}$, $v_{02} = 1000 \text{ m/s}$.)



$U = 1 \text{ kV}$: $t_1 = 101.673 \mu\text{s}$, $t_2 = 101.284 \mu\text{s}$ $R \sim 130$
 $U = 10 \text{ kV}$: $t_1 = 32.190 \mu\text{s}$, $t_2 = 32.177 \mu\text{s}$ $R \sim 1300$

Jak zvýšit rozlišení (MALDI-TOFMS)?

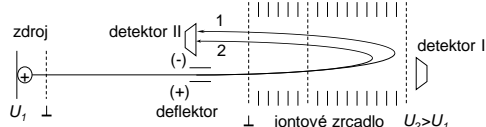
1. Vysoké extrakční napětí v lineárním TOF MS.

2. Reflektor.

3. Pulsní extrakce.

2. Reflektor

(reflektor, iontové zrcadlo, rTOFMS)



- Ionty 1 a 2 o stejném m/z a různých rychlostech v_1 a v_2 : Rychlejší iont pronikne hlouběji do iontového zrcadla a jeho dráha je delší. Za určitých podmínek dorazí oba ionty k detektoru II současně.
- Možnost použít více reflektorů (vícenásobný odraz).

(Mamyřin, B. A.; Shmikk, D. V.; Sov. Phys. **1979**, 49, 762)

Konstrukce reflektoru

Lineární reflektor ... E je konstantní podél osy reflektoru

Jeden stupeň ... intenzita elektr. pole, E je konstantní v celém reflektoru (Alikhnov)

Dva stupně ... reflektor je rozdělen na 2 zóny s různou E

(B. A. Mamyrin, V. I. Karataev, D. V. Schmikk, V. A. Zagulin, *Sov. Phys. JETP* 1973, 37, 45)

Nelineární reflektor ... E se mění podél osy reflektoru

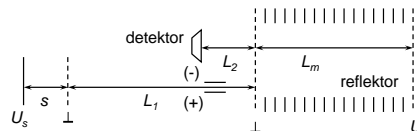
Kvadratické pole (D. R. Jardine, J. Morgan, D. S. Alderdice, P. J. Derrick, *Org. Mass Spectrom.* 1992, 27, 1077)

Zakřivené pole (T. J. Cornish, R.J.Cotter, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1993, 7, 1037-1040)
+ dřívější patenty (Japonsko, SSSR)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

211

Reflektor s jedním stupněm



$t_{TOF} = t_s + t_L + t_r$... součet časů ve zdroji, driftové zóně a reflektoru

$$t_{TOF} = t_0 - \frac{V_0}{a} + \frac{1}{2} \sqrt{\frac{2s}{a}} \left(1 - \frac{L}{2s} + \frac{2a}{a_r} \right) \frac{V_0^2}{2as} - \frac{1}{8} \sqrt{\frac{2s}{a}} \left(1 - \frac{3L}{2s} + \frac{2a}{a_r} \right) \left(\frac{V_0^2}{2as} \right)^2 + \dots$$

$$t_0 = \sqrt{\frac{2s}{a}} \left(1 + \frac{L}{2s} + \frac{2a}{a_r} \right)$$

$L = L_1 + L_2$... driftová zóna, $E=0$

a ... zrychlení ve zdroji, $a=qE_s/m$

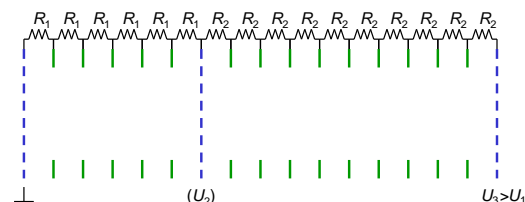
a_r ... zrychlení v reflektoru, $a=qE_r/m$

(Moskovets, E. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2000, 14, 150-155)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

214

Konstrukce reflektoru



mřížky: definice ekvipotenciálové plochy

prstence: elektrické stínění stěn vakuového systému
potenciál na prstencích definován sérií rezistorů

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

212

Reflektor se dvěma stupni

Reflektor se 2 stupni ... reflektor je rozdělen na 2 zóny s různou E

Pro kladné ionty:

- s pozitivním potenciálem na prostřední mřížce, $0 > U_2 > U_3$
- různá uspořádání s poměry délek stupňů $\sim 1:2$, $\sim 2:3$ aj.
- použití krátkého 1. stupně s vyšší intenzitou elektr. pole umožňuje zkrátit celkovou délku reflektoru

s negativním potenciálem na druhé mřížce:

- vytvoření prostorového zaostření v prvním stupni
- různá hloubka průniku v druhém stupni (energetické zaostření)

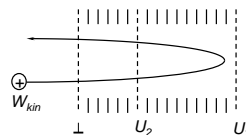
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

215

Příklad konstrukce reflektoru



Reflektor se dvěma stupni



$$t_{TOF} = f(W_{kin}, U_2, U_3)$$

energetická disperze ... hlavní příčina snížení rozlišení R

Mamyrin:

$$\text{Řešení } \frac{\partial}{\partial W_{kin}} f(W_{kin}, U_2, U_3) = 0 \quad \text{a} \quad \frac{\partial^2}{\partial W_{kin}^2} f(W_{kin}, U_2, U_3) = 0$$

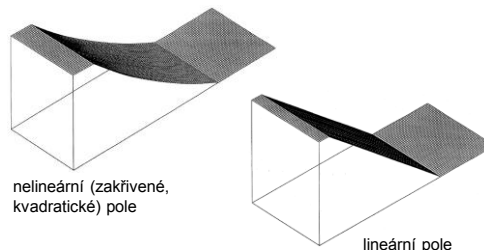
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

216

Reflektor se dvěma stupni

- + Vhodné pro energetickou disperzi do ~20%.
Např. pro energetickou disperzi 5% teoretické rozlišení až ~100 000
- Pouze ionty, které proniknou do hloubi reflektoru (85-100%) jsou zaostřeny.
- K získání spektra iontů s vyšší energetickou disperzí je třeba zaznamenat sérii spekter pro několik hodnot potenciálu reflektoru a výsledné spektrum složit z kusů těchto spekter.

Reflektor s nelineárním polem



nelineární (zakřivené, kvadratické) pole

lineární pole

(T. J. Cornish, R. J. Cotter "Non-linear field reflector", US Patent 5 464 985)

Reflektor s nelineárním polem

Cíl: t_{TOF} pro ionty všech m/z nezávislý na jejich W_{kin}

V kvadratickém poli $U(z) = \frac{k}{2}(z-a)^2 + C$

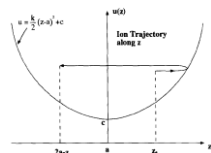


Fig. 1. Potential distribution in quadratic fields along the optical axis. z_0 is the initial coordinate (starting point) of an ion. z_1 is the coordinate of ideal time-focusing.

odraz iontu $\neq f(W_{kin})$

z ... osa změny potenciálu

a ... minimum paraboly

k a C ... konstanty

f ... frekvence oscilací

(Převzato z: A. A. Makarov, E. N. Raptakis, and P. J. Derrick, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1995**, 146/147, 165.)

Reflektor s nelineárním polem

Zpravidla kvadratické pole nebo jeho aproximace



Tvorba nelineárního pole

pomocí nesterajných rezistorů v sérii

pomocí nesterajných odstupů mezi prstenci či mřížkami

+ současné zaostření iontů s širokou disperzí W_{kin} , jako např. produktů rozpadu za zdrojem PSD, pro všechny m/z

- složitější kalibrace

- ideální jen pro ionty pohybující se po ose reflektoru

... v praxi omezené R

Reflektor s nelineárním polem

Další prakticky využitelná pole:

osově symetrický hyperbolický potenciál

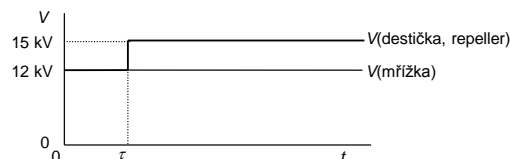
planární hyperbolický potenciál

osově symetrický hyperlogaritmický potenciál

3. Pulsní (zpožděná) extrakce Pulsed (delayed) extraction, Time-lag focusing

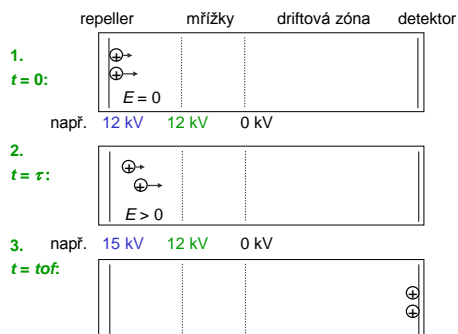
Opožděné zapnutí extrakčního napětí:

1. Puls laseru ($t = 0$)
2. Expanze iontů při vypnutém extrakčním poli po dobu τ (delay)
3. Rychlé zapnutí extrakčního pole ($t = \tau$)



(Brown, R. S.; Lennon, J. J.; *Anal. Chem.* **1995**, 67, 1998)

Pulsní (zpožděná) extrakce

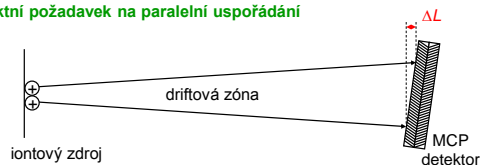


Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

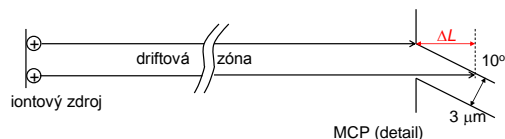
223

Vliv uspořádání na rozlišení

Striktní požadavek na paralelní uspořádání



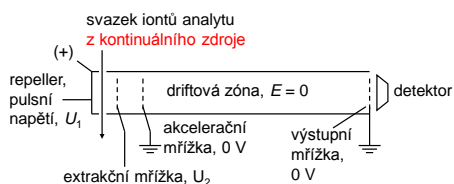
MCP s úzkými kanálky



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

226

Ortogonalní extrakce (oTOFMS)



Pulsní extrakce pro kontinuální iontový zdroj

Proud iontů analytu je extrahován pulsním extrakčním polem kolmým (ortogonálním) k vstupnímu iontovému svazku.

Ionty mají zpravidla stejnou v_x ($\Delta v_x = 0$)

Obvykle reflektor pro dosažení vyššího rozlišení

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

224

Vliv uspořádání na rozlišení

Rozlišení:

$$R = \frac{m}{\Delta m}$$

$$R = \frac{t}{2\Delta t}$$

$$R = \frac{L}{2\Delta L}$$

$$\frac{m}{z} = 2eU \frac{t^2}{L^2}$$

$$t = L/v$$

Např. pro $R = 15\,000$ a $L = 3$ m:

$$\Delta L \leq 100 \mu\text{m}$$

Pozn: MCP s úhly kanálek 10° a průměrem $10 \mu\text{m}$:

$$\Delta L = 10 \mu\text{m} / \tan(10^\circ) = 57 \mu\text{m}$$

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

227

Další faktory ovlivňující rozlišení TOFMS

- neideální iontový zdroj
- iontová optika
- dilatace letové trubice
- vlastnosti detektoru
- vzorkovací frekvence A/D převodníku
- příprava vzorku
- stabilita urychlovacího napětí

Př. vliv kolísání urychlovacího napětí:

$$m = \text{const. } U^e \Rightarrow R^{-1} = \frac{dm}{m} = \text{const.} \left(\frac{dU}{U} + 2 \frac{dt}{t} \right)$$

dt dáno max. frekvencí AD převodníku, rychlostí detektoru a časovou disperzí tvorby iontů

dU určeno drifts a kolísáním zdroje vysokého napětí

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

225

Vliv mřížek

Mřížky ... elektrody transparentní pro ionty
... v iontovém zdroji, reflektoru a před detektorem

MS s mřížkami

- + přesná definice potenciálu
- ztráty na mřížkách (náraz, odklonění, reakce)
- tvorba sekundárních iontů z materiálu mřížek

MS bez mřížek

- vyšší rozlišení, beze ztrát na mřížkách
- komplikovanější návrh (extra zakřivení drah iontů jako u čočky)

Více podrobností např. v: T. Bergmann, T. P. Martin, H. Schaber Rev. Sci. Instrum. 1989, 60, 347.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

228

Další parametry TOFMS

Terčik (MALDI): až 384 vzorků na terčiku o velikosti titrační destičky, dostatečná plocha pro sběr eluentu z několika separací

Axiální ozáření vzorku laserem ⇒ vyšší rozlišení

Kolizní cela v iontovém zdroji ⇒ zvýšení výtěžku fragmentace

Délka driftové zóny (letové trubice): typicky 1-2 m, ale i 10 cm nebo 5 m

Iontový vodič – může být umístěn v trubici pro zvýšení propustnosti iontů

Detektor: mikrokanálková destička (MCP)
elektronové násobiče
hybridní detektory (scintilační vrstva + fotonásobič)

Detekční elektronika: AD převodník (8 bitů, 0.5 - 4 GS/s)
TD převodník + segmentovaný detektor

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

229

Vlastnosti TOFMS

1. Max. m/z teoreticky neomezená. Praktický limit: účinnost ionizace a detekce, rozklad iontů během letu.
2. Celé spektrum je zaznamenáno najednou
3. Vysoká rychlost záznamu spektra (desítky μ s).
Př.: inzulin ($m/z = 5735$) urychlený 15 kV překoná 1-metrovou driftovou zónu za $\sim 50 \mu$ s.
4. Vysoká propustnost iontů (desítky %).
5. Vysoké rozlišení ($R > 10\,000$).
6. Jednoduchost a relativně nízká cena.
7. Dostupné techniky pro MS/MS

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

232

MALDI analýza početných sérií vzorků

1, 10, 96, 100, 384, 1536 ... vzorků/terčik



384 vzorků/terčik

Shrnutí výhod TOF MS

Výhodné vlastnosti

max. m/z , rychlost a počet analyzovaných vzorků za čas, transmise, rozlišení, relativně nízká cena

Obrovský rozmach TOF MS v poslední dekádě

MALDI + PE TOF, rTOF MS

API + oTOF MS

Nové techniky pro MS/MS (TOF-TOF, LIFT, QTOF)

Konkurenční techniky

LT, FT-ICR a hybridní MS

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

233

Srovnání rozlišení systémů TOFMS

systém	geometrie	extrakce	R
TOFMS	lineární	DC	500
DE-TOFMS	lineární	pulsní	5 000
rTOFMS	reflektor	DC	10 000
DE-rTOFMS	reflektor	pulsní	20 000
orTOFMS	reflektor	pulsní	10 000

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

231

Srovnání běžných hmotnostních spektrometrů

MS	max. m/z	R
kvuadrupólový filtr	4 000	2 000
magnetický sektor	20 000	50 000
iontové pasti	10 000	5 000
FT-ICR-MS	100 000	100 000
TOFMS	1 000 000	10 000

Pozn:

Hodnoty v tabulce jsou pouze přibližné a vztahují se k běžným přístrojům, parametry některých vědeckých nebo nových komerčních přístrojů mohou být výrazně vyšší (i řádové odchylky).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

234

Simulace pohybu iontů

- Exaktní výpočet pohybu iontů složitý i pro poměrně jednoduchá elektrická a magnetická pole.
- Simulace iontového pohybu: program **Simion**

Postup při řešení konfigurace iontové optiky pomocí programu Simion:

1. Zadání geometrie (náčrt elektrod).
2. Zadání potenciálů elektrod, definice magnetického pole.
3. Definice iontů (počet n , v_0 , x_0 , y_0 , z_0 , α_0 , ϕ_0).
4. Simulace \Rightarrow výsledek (grafická reprezentace, text).

Sken: záznam hmotnostního spektra

$$S(m/z) = f(X) = f(t)$$

Skenující přístroje	Skenovaná veličina	Doba skenu
magnetový sektor (B)	B, U	~ 1 s
kvadrupolový filtr (Q)	$U+V, f$	~ 0.1 s
iontové pasti (IT, LT)	U, V, f	~ 1 s

Neskenující přístroje (přímý záznam signálu v čase):

průletový analyzátor (TOF)	~ 100 μ s
iontový cyklotron (FT-ICR)	~ 1 s
orbitrap (O)	~ 1 s

Další neskenující přístroje mohou používat plošné detektory (array).

Simion

Příklad: Simulace elektrostatické čočky pomocí programu Simion.

Čočka: 3 segmenty
 průměr, $d = 36$ mm
 délky segmentů, $y_1 = 28$ mm, $y_2 = 26$ mm, $y_3 = 32$ mm
 mezery mezi segmenty, $l = 2$ mm
 počátek v $xyz [0, 0, 0]$ mm
 potenciály, $U_1 = 0$; $U_2 =$ proměnné; $U_3 = 0$

Ionty: počet, $n = 5$
 hmotnost, $m = 100$
 kinetická energie, $W_0 = 100$ eV
 souřadnice $xyz [0, -30, 0]$ mm
 $\alpha_i(l) = (-4 + 2i)^\circ$, kde $i = 0 \dots n - 1$

Úkol: Ověřte funkci čočky při napětí na prostředním prstenci, $U_2 = 0, 85, 100, 120$ a 133 V.

Řešení: Viz přílohy

Jednoduchá hmotnostní spektrometrie

Záznam „celého“ spektra



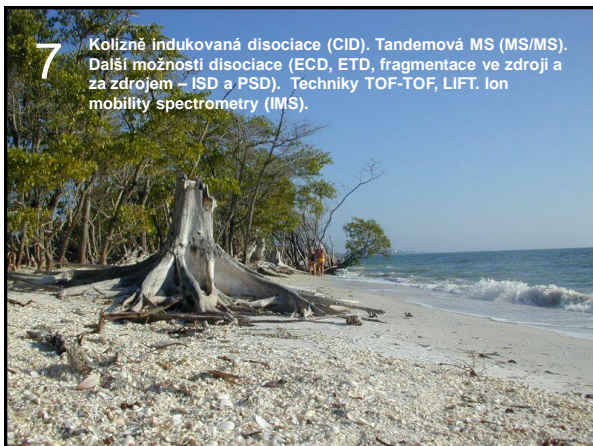
... „kompletní“ informace www.jimkellyjr.com/2008_07_01_archive.html

Záznam části spektra (**zoom scan**)



7

Kolizně indukovaná disociace (CID). Tandemová MS (MS/MS). Další možnosti disociace (ECD, ETD, fragmentace ve zdroji a za zdrojem – ISD a PSD). Techniky TOF-TOF, LIFT. Ion mobility spectrometry (IMS).

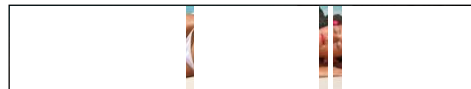


Jednoduchá hmotnostní spektrometrie

Záznam signálu vybraného iontu (**selected ion monitoring, SIM**)



Záznam signálu vybraných iontů (**peak switching**)

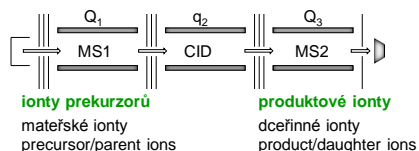


Techniky 2, 3 a 4:

- ... úspora dat, vyšší frekvence (spektra/s)
- ... významné uplatnění v chromatografii s MS detekcí

Tandemová hmotnostní spektrometrie

Analýza iontů → fragmentace → analýza iontů



Klasický přístroj pro nízkoenergetickou CID:

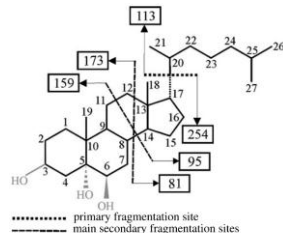
trojitý kvadrupolový filtr (triple quad, TQ, QQQ, QqQ, Q3)

Q₁: 1. analyzátor (MS1)

q₂: kolizní cela (pouze RFQ)

Q₃: 2. analyzátor (MS2)

Př.: skenování produktových iontů



MS–MS Fragmentation Patterns of
Cholesterol Oxidation Products
B. Rossmann, K. Thurner, W. Luf
Monatsh Chem 138, 437–444 (2007)

APCI QqQ
toxikologicky relevantní produkty
oxidace cholesterolu

Fig. 1. Main fragments of sterols. The fragmentation process is demonstrated here by using cholesterol as a representative for the other COPS

Základní typy skenů v MS/MS

Skenování iontů produktů, dceřinných iontů

Product ion scan, daughter ion scan, fragment ion scan

Nastavení MS1, skenování MS2

2. Skenování iontů prekurzorů, výchozích látek, mateřských iontů

Precursor ion scan, parent ion scan

Skenování MS1, nastavení MS2

3. Skenování ztráty neutrální částice

Neutral loss scan

Skenování MS1 a MS2 zároveň, $\Delta m/z = \text{konst.}$

4. Monitorování vybrané reakce/vybraných reakcí

Selected reaction monitoring/multiple reaction monitoring

Nastavení MS1 a MS3 na vybrané m/z

Př.: skenování produktových iontů

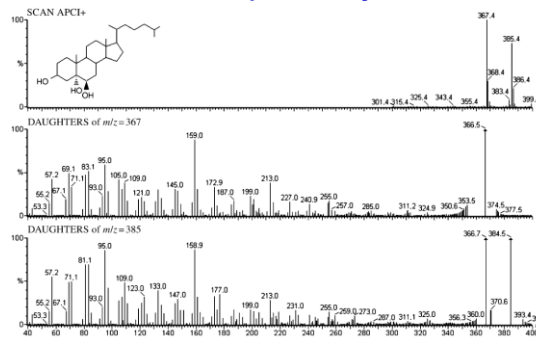


Fig. 2. Daughter ions of cholesterol. c(Triol): 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, scan APCI+: 300–500 m/z (V_{HP} : 50 mm^3), daughter ion scan: 40–400 m/z

Skenování produktových iontů (Product ion scan)

Nastavení MS1: propustit ionty o vybrané m/z

Skenování MS2: spektrum produktů vybraného prekurzoru

... užitečné při objasňování struktury
... fingerprint analyzované sloučeniny
... zjednodušení spektra
... zvýšení poměru signálu k šumu (S/N)

... pozor: MS1 není zárukou izolace jediného výchozího iontu

MSⁿ ... hmotnostní spektrometrie n-tého stupně

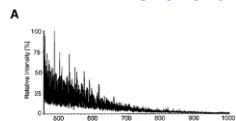
Skenování iontů prekurzorů (Precursor ion scan)

Skenování MS1: spektrum iontů prekurzorů

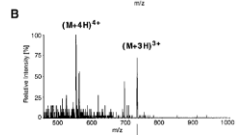
Nastavení MS2: detekce produktových iontů o dané m/z

... pro identifikaci skupiny podobných sloučenin, sloučenin
s totožnou funkční skupinou či strukturálním motivem
... zjednodušení spektra
... zvýšení S/N

Př.: skenování iontů prekurzorů

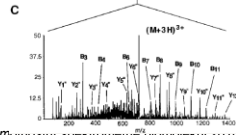


Parent ion scans of unseparated peptide mixtures
M. Wilm, G. Neubauer, M. Mann *Anal. Chem.* 68, 527-33 (1996)



MS peptidu GLHINDYALNITKSFLLDK
 $M_{r,avg} = 2175,5$; $c = 10 \text{ fmol}/\mu\text{L}$

(B) Sken iontů prekurzoru pro immoniové ionty isoleucinu a leucinu ($m/z = 86 \text{ Da}$)

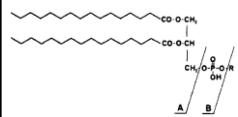


(C) Sken produktových iontů $[M+3H]^{3+}$

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

247

Př.: skenování ztráty neutrální částice



Constant neutral loss scanning for the characterization of bacterial phospholipids desorbed by fast atom bombardment

D. N. Heller, C. M. Murphy, R. J. Cotter, C. Fenselau, O. M. Uy
Anal Chem 60, 2787 - 2791 (1988)

- | | |
|---|------|
| -CH ₂ CH ₂ NH ₂ | PE |
| -CH ₂ CHOHCH ₂ OH | PG |
| -CH ₂ CHOHCH ₂ LYSINE | LPG |
| -INOSITOL | PI |
| -CH ₂ CH ₂ NHCH ₃ | MMPE |
| -CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂ | DMPE |

fosfoethanolamin: $\Delta m/z = 141$

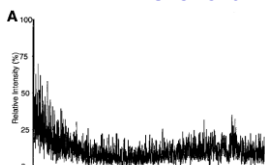
fosfoglycerol: $\Delta m/z = 172$

methylfosfoethanolamin: $\Delta m/z = 155$

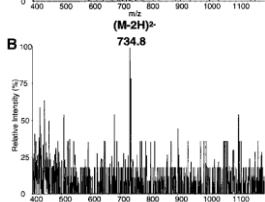
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

250

Př.: skenování iontů prekurzorů



Parent ion scans of unseparated peptide mixtures
M. Wilm, G. Neubauer, M. Mann *Anal. Chem.* 68, 527-33 (1996)



(A) Pozitivní MS fosfopeptidu EPQY^FE EIPIYL,
 $M_{r,mono} = 1471,6$; $c = 1 \text{ fmol}/\mu\text{L}$.

(B) Sken iontů prekurzoru pro fosfoskupinu ($m/z = 79 \text{ Da}$) v negativním modu při stejné koncentraci vzorku

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

248

Př.: skenování ztráty neutrální částice

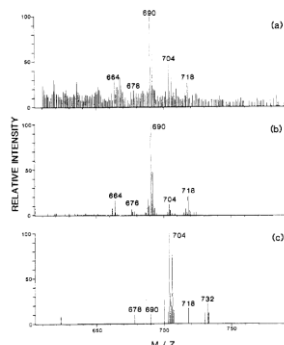


Figure 4. Positive ion fast atom bombardment mass spectra for *P. vulgaris*: (a) normal scan, (b) constant neutral loss of 141 mass units, (c) constant neutral loss of 155 mass units.

MS

MS/MS
NLS, $\Delta m/z = 141$
fosfoethanolamin

MS/MS
NLS, $\Delta m/z = 155$
methylfosfoethanolamin

251

Skenování ztráty neutrální částice (Neutral loss scan)

Současné skenování MS1 a MS2

Konstantní rozdíl m/z propouštěných MS1 a MS2

- ... ztráta stejné neutrální částice
- ... vhodné pro látky se stejnou funkční skupinou
- ... zjednodušení spektra
- ... zvýšení S/N

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

249

Př.: skenování ztráty neutrální částice

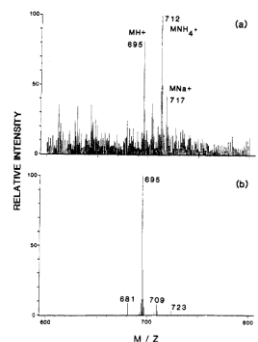


Figure 5. Positive ion fast atom bombardment mass spectra for the lipid extract from 30 μg of *M. luteus* cells: (a) normal magnetic scan, (b) constant neutral loss of 172 mass units.

MS

MS/MS
NLS, $\Delta m/z = 172$
fosfoglycerol

252

Monitorování vybrané reakce/vybraných reakcí

... analogie SIM a peak switching v MS/MS

Monitorování vybrané reakce (selected reaction monitoring, SRM)

Nastavení MS1: ionty prekurzoru o dané m/z
Nastavení MS2: produktové ionty o dané m/z
... velmi selektivní důkaz analytu, resp. jeho reakce

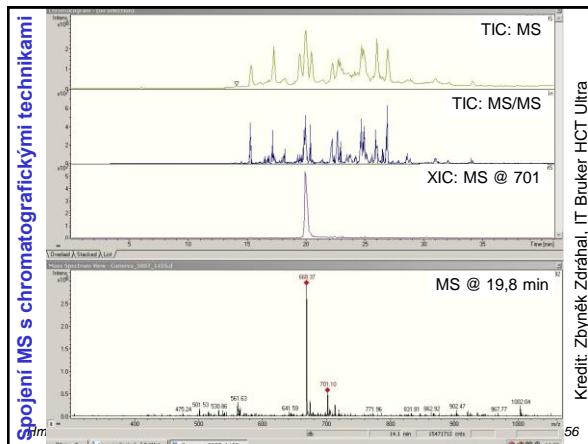
Monitorování více reakcí (multiple reaction monitoring, MRM)

Nastavení MS1: peak switching – ionty prekurzorů o daných m/z
Nastavení MS2: peak switching – produktové ionty o daných m/z
... velmi selektivní důkaz analytů, resp. jejich reakcí

Vysoký S/N , používáno v kombinaci s chromatografickými technikami

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

253



Spojení MS s chromatografickými technikami (MS chromatogram, ion chromatogram)

... záznam intenzity iontu(ů) v průběhu separace

Celkový iontový proud (Total ion current, TIC)

... monitorování širokého intervalu m/z (stovky a.m.u.)
... vhodný pro celkový obrázek o chromatografii a nalezení nových píků
... nevhodný při analýze komplexních směsí

Monitorování vybraného iontu (Selected ion monitoring, SIM)

... detekce při vybrané m/z
... pro experiment navržený pro monitorování pouze vybraného iontu
... pro více iontů **peak switching**

Monitorování vybrané reakce (Selected reaction monitoring, SRM)

... analogie SIM s využitím tandemové MS
... pro více reakcí **multiple reaction monitoring, MRM**

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

254

Př.: Monitorování více reakcí, MRM

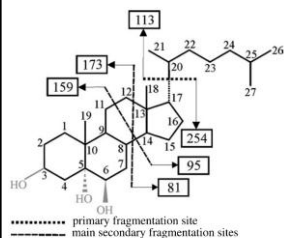


Table 1. Overview of the daughter ions with the highest intensity

COP	Molecular mass	Parent ion mass (m/z) Da	Parent ion [formations]	Daughter ions with the highest intensity (m/z)
Triol	420.6	367.4 [MH-3H ₂ O]	159.0	95.0
		385.4 [MH-2H ₂ O]	158.9	95.0
7-OH	402.6	367.4 [MH-2H ₂ O]	158.9	81.1
25-OH	402.6	367.4 [MH-2H ₂ O]	81.1	95.0
7-Keto	400.6	383.4 [MH-H ₂ O]	81.1	95.0
5,6-Ep	402.6	401.4 [MH]	95.1	81.1
		367.4 [MH-2H ₂ O]	158.9	95.0
19-OH	402.6	385.4 [MH-H ₂ O]	159.0	95.0
		367.4 [MH-2H ₂ O]	95.0	159.0
		355.4 [MH-12] ⁺	147.0	95.0

Fig. 1. Main fragments of sterols. The fragmentation process is demonstrated here by using cholesterol as a representative for the other COPs

Triol cholesteroltriol, 7-OH 7-hydroxycholesterol, 25-OH 25-hydroxycholesterol, 7-Keto 7-ketocholesterol, 5,6-Ep 5,6-epoxycholesterol, 19-OH 19-hydroxycholesterol

B. Rossmann, K. Thurner, W. Luf *Monatsh Chem* 138, 437- 444 (2007)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

257

Spojení MS s chromatografickými technikami

Při vícerozměrných analýzách (LC-MS, GC-MS, CE-MS) jsou často zaznamenávána celá spektra v průběhu separace. Z těchto dat pak může být získán celkový proud, průběh intenzity pro daný m/z

Extracted ion chromatogram, XIC, EIC Reconstructed ion chromatogram, RIC

„Rekonstruovaný“ chromatogram je obvykle horší kvality než „pravý“ SIM, resp. MRM získaný na Q, resp. QqQ

Base peak intensity chromatogram, BPC

... intenzita dominantního píku vs. retenční čas
... může vypadat přehledněji než TIC díky ignorování sumy minoritních píků

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

255

Př.: HPLC – APCI – SRM

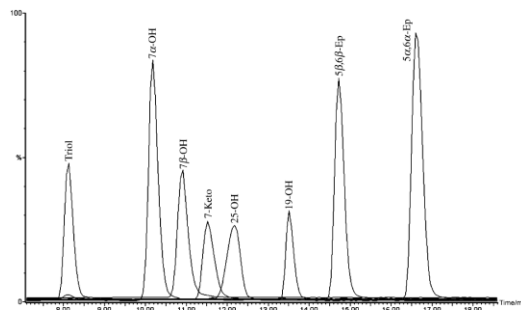


Fig. 8. MRM chromatograms of 8 single standards (overlaid), c(standard): 5000 ng/cm³, V_{inj}: 50 nm³

SRM pro dominantní reakce z předchozí tabulky

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

258

Př.: HPLC – APCI – MRM

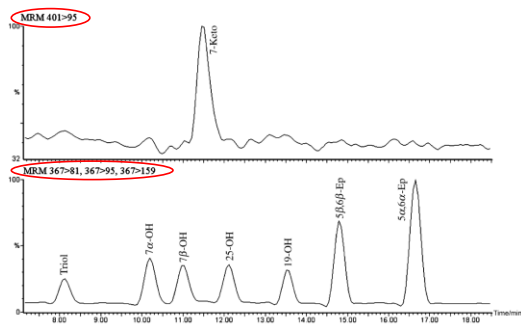


Fig. 9. MRM chromatogram of a standard mixture (7 COFs and 19-hydroxycholesterol the prospective internal standard). (standard): 5000 ng/cm³. V_{inj}: 50 nm³

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

259

Hmotnostní spektrometrie pro MS/MS

Trojité kvadrupólový filtr (QqQ)

iontové pasti (IT, LT, O, FT ICR)

Dvojitý magnetický sektor s obrácenou geometrií (BE, MAG-ESA)

Průletový analyzátor (TOF)

Hybridní spektrometrie – kombinace výše uvedených, např. LT - FT ICR

Klasifikace tandemové spektrometrie

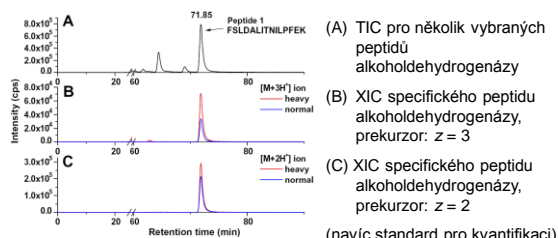
fragmentace v prostoru: 1, 3, 4, 5

fragmentace v čase: 2

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

262

MRM: TIC a XIC



(navíc standard pro kvantifikaci)

A multiple reaction monitoring method for absolute quantification of the human liver alcohol dehydrogenase ADH1C1 isoenzyme

D. J. Janecki, K. G. Bemis, T. J. Tegeler, P. C. Sanghani, L. Zhaib, T. D. Hurley, W. F. Bosron, M. Wang, *Anal. Biochem.* 369, 18-26 (2007)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

260

Další hmotnostní spektrometrie pro MS/MS

Dvojitý magnetický sektor s obrácenou geometrií (BE, MAG-ESA)

Izolace mateřského iontu, fragmentace v kolizní cele

Analýza kinetické energie, W

Pro dceřinné ionty platí $W = f(m/z)$

První technika MS/MS

(MIKES, Mass-Analyzed Ion Kinetic Energy Spectrometry)

Dokonalejší varianty: EBE, EBEB

EBqQ

EB: dokonalá selekce výchozího produktu

q₁: kolizní cela

Q₂: selekce produktů

Tandem kvadrupólový filtr - oTOF (QTOF)

TOF-TOF

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

263

Skenování v MS/MS

Objasnění struktury organických sloučenin

Analýza směsí analytů jako náhrada spojení separace - MS

- Při MS/MS se všechny analyty ionizují současně, izoluje se jeden analyt po druhém (MS1) a po fragmentaci (CID) se identifikují (MS2).
- Pozor! U složitých směsí dochází k vzájemnému rušení při ionizaci.

Zlepšení poměru signálu k šumu, S/N

- Zvýšení selektivity ⇒ snížení šumu
- Zjednodušení spekter
- Všechny druhy skenů MS/MS
- Monitorování vybrané reakce/vybraných reakcí

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

261

Další hmotnostní spektrometrie pro MS/MS

Tandem kvadrupólová iontová past - TOFMS (IT-TOFMS)

IT: možnost akumulace a MSⁿ v prvním stupni.

TOF: citlivý detektor s vysokým rozlišením jako koncový stupeň.

iontové pasti: kvadrupólová IT a FT-ICR-MS

možnost MSⁿ

tentýž spektrometr jako pro MS, pouze jiný software

Postup:

izolace výchozího iontu (po akumulaci všech iontů)

excitace výchozího iontu (zvýšení amplitudy) po delší dobu

sken produktů (případně zpět k bodu 1 pro MSⁿ, n > 2)

Tandem LT – FT-ICR-MS

mnoho možných režimů skenů

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

264

Typy disociace

Disociace ... monomolekulární reakce, $f(\text{indukce}) \ll f(\text{disociace})$

Fragmentace může být způsobena:

1. **Kolizí** s atomem nebo molekulou
kolizně indukovaná disociace (collision-induced dissociation, CID)
2. **Kolizí** s povrchem
povrchem indukovaná disociace (surface-induced dissociation, SID)
3. **Fotonem** - fotodisociace (photodissociation, PD)
např. infrared multiphoton dissociation, IRMPD
4. **Elektronem**
disociace v důsledku záchytu e^- (electron capture dissociation, ECD a electron transfer dissociation, ETD)

Pozn.: Určení hlavní příčiny fragmentace někdy není jednoznačné, např. fragmentace během MALDI (ISD and PSD) může být indukován jak fotony, tak i kolizemi.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

265

Srážky iontů

Fragmentace

- cílená fragmentace za účelem studia struktury iontu
- obvykle s molekulami vzácných plynů – He, Ar

Elastické srážky

Kinetická energie zůstává zachována.

Neelastické srážky

Část kinetické energie se po srážce přemění na vnitřní energii iontu:

$$E_m \leq E(M_i/(M_i + M))$$

$t = \text{terčik (target)}, i = \text{ion}$

Těžší terčik \Rightarrow možné přenést více energie na iont

1 eV/iont \sim 100 kJ/mol (100kJ/5 g oplatků)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

268

Typy disociace

1. **srážky s molekulami okolního plynu v kolizní cele** při zvýšeném tlaku, $p \sim 100$ Pa
CID/CAD collisionally induced/activated dissociation
2. **srážky s povrchem: SID**, surface induced dissociation
- *povrch*: vrstva organické látky (polymer nebo monovrstva malých organických molekul, např. alkanthiolů) na vhodném substrátu (Au)
- *srážky v důsledku urychlení el. polem*, př.: napětí *nozzle-skimmer*
3. **fotodisociace**
RMPI, resonant multiphoton ionization
4. **záchyt elektronu**
ECD, Electron capture dissociation
ETD, Electron transfer dissociation
5. **nadměrná excitace při ionizaci** (např. vysoká energie při LDI a MALDI)
ISF, in-source fragmentation (fragmentace ve zdroji) ... v TOF MS
PSD, post-source decay (rozklad vně zdroje) ... v TOF MS

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

266

Nízkoenergetické srážky iontů

Energie srážek: 1 – 100 eV

vibrační charakter excitace, interakce mezi iontem a terčem $\sim 10^{-14}$ s

Účinnost srážek

obvykle dostatečná díky mnoha srážkám iontu v kolizní cele

Instrumentace

trojitý kvadrupólový filtr, iontové pasti, hybridní přístroje

V současnosti nejrozšířenější technika, nízkooenergetická CID

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

269

Stabilita iontů

1. **Stabilní:** poločas rozpadu, $\tau > 10^6$ s
iont prolétne celým MS, aniž by se rozložil.
2. **Metastabilní:** poločas rozpadu, $\tau \sim 10^7 - 10^6$ s
iont se rozkládá v průběhu letu hmotnostním spektrometrem.
3. **Nestabilní:** poločas rozpadu, $\tau < 10^7$ s
iont se rozloží ještě ve zdroji.

Historické rozdělení - časy podle doby pobytu v magnetickém sektoru

Reakce: unimolekulární, bimolekulární

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

267

Vysokoenergetické srážky iontů

Energie srážek: keV

elektronový charakter excitace, interakce mezi iontem a terčem $\sim 10^{-15}$ s
přeměněná energie $\sim 1 - 3$ eV

Účinnost srážek

He – snižuje úhlový rozptyl produktů
Ar, Xe – umožňuje účinnější konverzi energie

Instrumentace

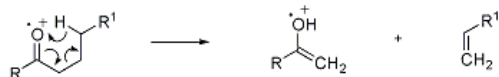
hybridní sektorové přístroje, TOF-TOF

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

270

Příklad: McLaffertyho přesmyk

Štěpení karbonylových sloučenin s vodíkem v γ pozici na enolický fragment a olefin indukované EI:



F. W. McLafferty, *Anal. Chem.* **31**, 82 (1959).

D. G. I. Kingston *et al.*, *Chem. Rev.* **74**, 215 (1974); K. Biemann, *Mass Spectrometry* (New York, 1962) p 119;

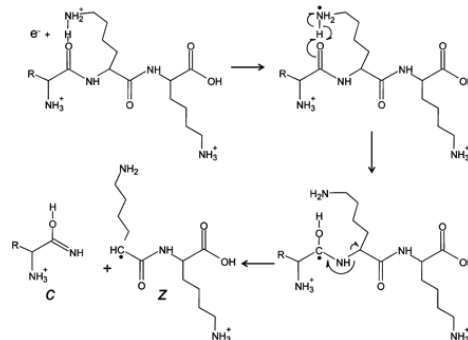
Djerassi *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 817 (1965); **91**, 2069 (1969); **94**, 473 (1972)

M. J. Lacey *et al.*, *Org. Mass Spectrom.* **5**, 1391 (1971); G. Eadon, *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 8938 (1972); F. Turecek, V. Hanus, *Org. Mass Spectrom.* **15**, 8 (1980).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

271

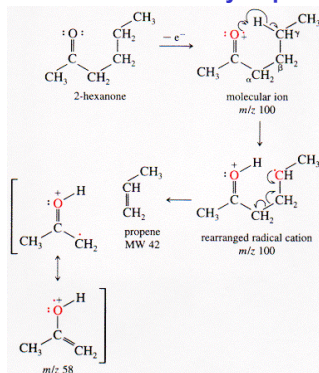
ECD



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

274

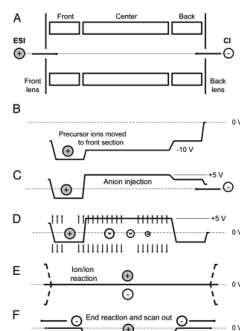
Mechanismus McLaffertyho přesmyku



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

272

ETD



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

275

ECD, ETD

Electron capture dissociation

- interakce iontů s termálními elektrony (nízká E)
- aplikace: fragmentace peptidů (ionty c, z), vede k fragmentaci bočního řetězce
- FT-ICR-MS

Electron transfer dissociation

- transfer elektronu z reagentu
- tentýž charakter fragmentace jako ECD
- kvadrupólové pasti

(Syka J.E.P., Coon J.J., Schroeder M.J., Shabanowitz J., Hunt D.F. *PNAS* **101**, 9528-9533, **2004**)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

273

Fragmentace ve zdroji In-Source Fragmentation (ISF), In-Source Decay (ISD)

Využívaná zejména v MALDI TOFMS peptidů.

Zvýšení energie laseru při MALDI vede k nadměrnému "zahřátí" molekul/iontů analytu (vibrace) a fragmentaci analytu přímo v iontovém zdroji.

Intenzita fragmentů << intenzita mateřského iontu ($[M+H]^+$).

Pulsní metody (Delayed Extraction) nutně pro:

dosažení dostatečné citlivosti

prodloužení délky pobytu iontů v iontovém zdroji (více srážek).

Převážně monomolekulární reakční mechanismus (narozdí od CID).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

276

Charakteristika ISD

- + Není třeba reflektor.
- Vyžaduje pulsní extrakci.
- Příprava čistého analytu nutná (chybí možnost izolace výchozího iontu).
- Může vyžadovat speciální přípravu vzorku (např. zvýšenou koncentraci solí).

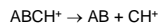
Použití: MALDI TOFMS peptidů, sacharidů.
Převážně monomolekulární reakční mechanismus (narozdíl od CID).

Fragmentace za zdrojem (Post-Source Decay, PSD)

Iontový selektor (ion gate): výběr výchozího iontu (m/z interval 1 - 20 Da).

Analýzu produktů v reflektoru:

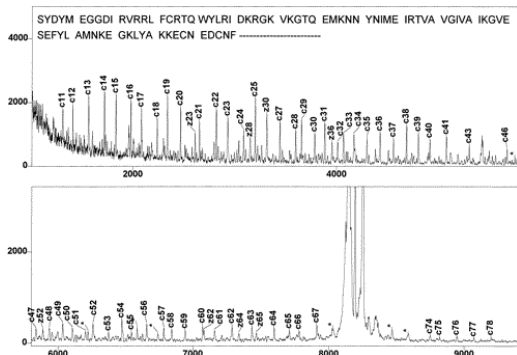
Ionty fragmentů analytu se tvoří během letu driftovou zónou (v důsledku nadměrné excitace), např.:



Bilance kinetické energie pro první rovnici:

$$m_{ABCH}v^2/2 = m_{AB}v^2/2 + m_{CH}v^2/2.$$

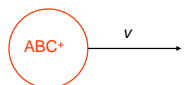
Čím těžší je fragmentový iont, tím vyšší má kinetickou energii a tím hlouběji pronikne do reflektoru \rightarrow delší doba letu.



ISD. Analyt: 20 pmol KGF analogu. Matrice: kyselina sinapová. Laser: N₂.
(V. Katta, D. T. Chow, M. F. Rohde *Anal. Chem.*, **70**, 4410-4416, 1998.)

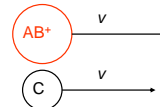
Fragmentace za zdrojem

Prekursor ABC⁺

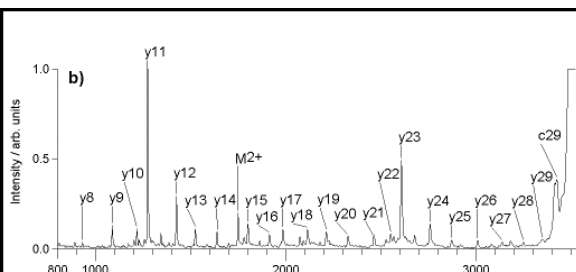
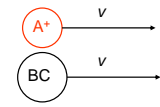


$$\frac{m_{ABC^+}v^2}{2} > \frac{m_{AB^+}v^2}{2} > \frac{m_{A^+}v^2}{2}$$

Fragmentace 1



Fragmentace 2

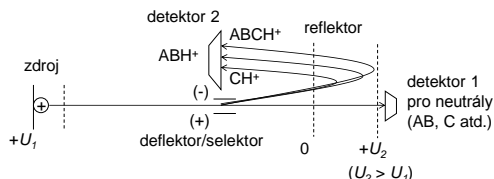


ISD

Analyt: oxidovaný B řetězec hovězího inzulínu
Matrice: thiomocovina
Laser: Er:YAG ($\lambda = 2936 \text{ nm}$)

(<http://medweb.uni-muenster.de/institute/impb/research/hillenkamp/publicat/abs-cm99.html>)

PSD: reflektor jako analyzátor energie a m/z



Klasický reflektor umožňuje zaostřit ionty produktů s disperzí energie (a m/z) $< 20\%$. Celkové PSD spektrum je proto nutné složit z více PSD spekter získaných při různém potenciálu reflektoru.

Kvadratický reflektor umožňuje zaostřit ionty v širokém intervalu m/z .

TOF s CID?

CID (používané v QqQ, IT...) \neq ISD nebo PSD
Fragmentace v důsledku kolize iontu prekursoru s molekulou plynu

Kolizní komora Collision chamber

- přídatná kolizní komora ve zdroji TOF má zanedbatelný vliv

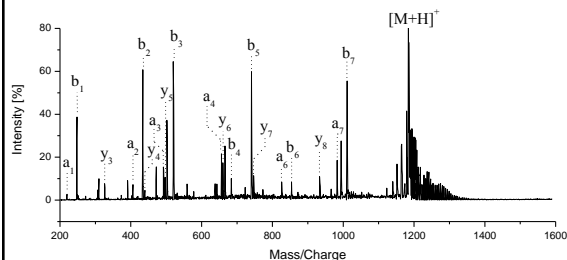
Dva způsoby CID v TOF

1. QTOF (přesněji QqTOF)
2. TOF/TOF

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

283

MALDI PSD peptidu

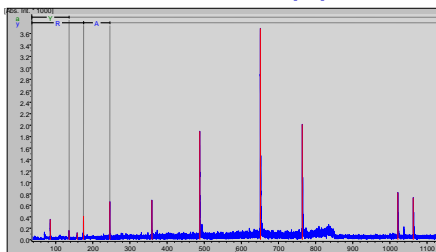


pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂
MALDI PSD – reflektor s kvadratickým polem.
(O. Šedo et al. *Anal. Chim. Acta* **2004**, 515, 261-269)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

286

MALDI PSD derivatizovaného peptidu YLYELAR



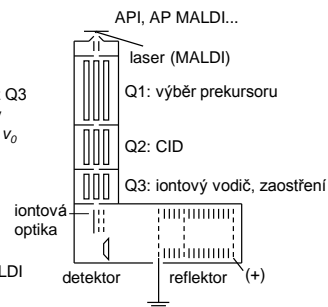
Spektrum složeno z několika spekter získaných při různém potenciálu reflektoru. Zaostřeny pouze píky iontů, které pronikly hlouběji do reflektoru. Použití reflektoru se 2 stupni. (Zdroj: Z. Zdráhal)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

284

Ortogonalní TOF: QTOFMS

- Nejběžnější příklad oTOF
- Vhodný pro MS/MS (nízkoenergetické CID)
- Svazek iontů je po výstupu z Q3 široký (disperze x_0), ale ionty mají zanedbatelnou disperzi v_0 ve směru letu v TOF

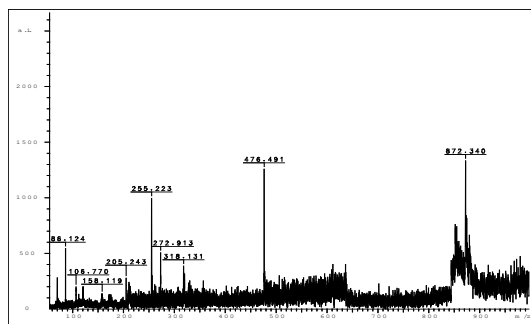


orthogonalní TOF:
typický pro API, ale i pro MALDI
axiální TOF:
typický pro MALDI

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

287

MALDI PSD peptidu



MALDI PSD – reflektor se 2 stupni. (Zdroj: Z. Zdráhal)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

285

QTOFMS: hybridní TOF MS

Využití výhod obou analyzátorů

Q: vhodné pro 1. MS, jako kolizní cela a pro úpravu iontového svazku
TOF: dobré parametry pro 2. MS

Výměnný iontový zdroj

oddělení ionizace od analyzátoru

vhodné pro kontinuální, kvazikontinuální i pulsní ionizační techniky

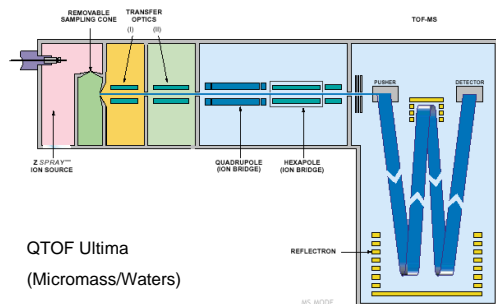
Př.: QTOFMS: API (kontinuální iontový zdroj)

AP MALDI (pulsní, kvazikontinuální iontový zdroj)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

288

Hybridní instrument pro API a MALDI



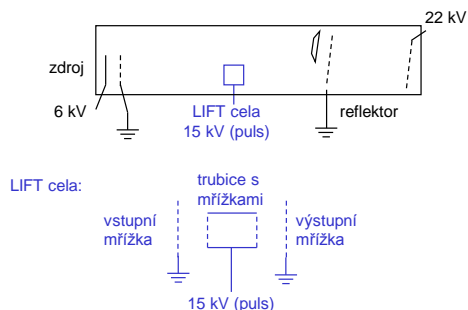
QTOF Ultima
(Micromass/Waters)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

289

LIFT TOF MS

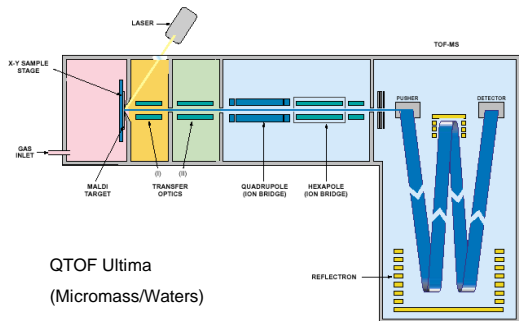
MS-MS s využitím TOF principu, dokonalejší PSD (LIFT)



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

292

Hybridní instrument pro API a MALDI



QTOF Ultima
(Micromass/Waters)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

290

Ion mobility spectrometry (IMS)

1970 Cohen, Karasek

Charakteristika

- Technika na pomezí hmotnostní spektrometrie a chromatografie
- Separace v důsledku tření iontů s okolním prostředím
- Ionty neseparovány podle m/z , ale podle své mobility
- Dokáže rozlišit i izomerii nebo počet nábojů (odlišná migrace M^+ a M_2^{2+})
- Nízké rozlišení IMS
- V praxi často použita jako jedna z technik multidimenzionální analýzy, např. ve spojení s běžnou MS

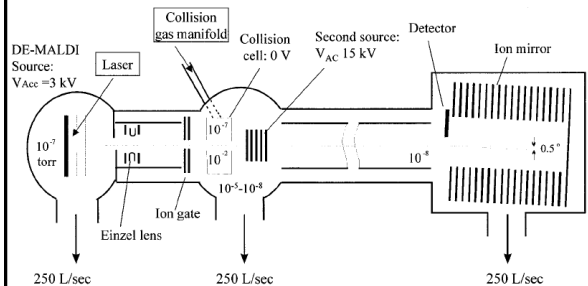
Aplikace

- bezpečnost (výbušniny), vojenské aplikace (jednoduchá přenosná zařízení)
- studium konformace proteinů a jiných látek v plynném stavu

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

293

TOF-TOF

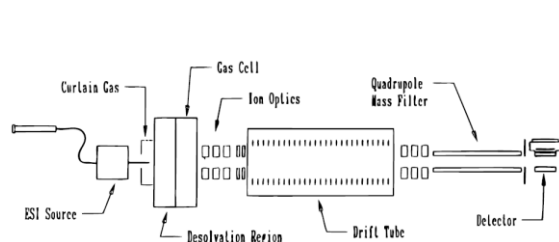


(Medzihradzsky, K. F.; Campbell, J. M.; Baldwin, M. A.; Falick, A. M.; Juhasz, P.; Vestal, M. L.; Burlingame, A. L. Anal. Chem. 2000, 72, 552).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

291

Příklad instrumentace IMS - QMS



Clemmer D. E., Jarrold J. F. Mass Spectrom 1997, 32, 577-592.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

294

IM spektra lysozimu v závislosti na jeho konformaci

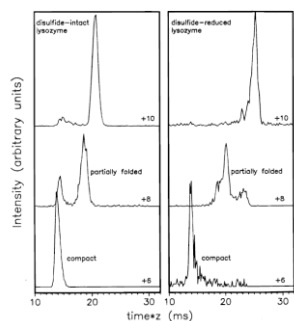


Figure 11. Drift time distributions recorded for the +6, +8 and +10 charge states of lysozyme that were electrosprayed from disulfide-intact (left) and disulfide-reduced (right) solutions. The +8 and +10 disulfide-intact ions were obtained by direct electrospray ionization. All other charge states were obtained by proton stripping higher charge states with a base in the desolvation region.

Clemmer D. E., Jarrold J. F. *Mass Spectrom* 1997, 32, 577-592.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

295

Detekce iontů

- Faradayův pohár, Faradayova miska
- Elektronový násobič**
- Channeltron**
- Mikrokanálová destička (MCP)**
- Indukce (FT-ICR-MS, orbitrap)**
- "Daly" detektor
- Plošné multikanálové detektory (array detectors)
- Fotografická deska
- Kombinace MCP a diodového pole (MCP-diode array)
- aj...

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

298

Př.: ESI - IT - IM - TOFMS digestu koňského albuminu

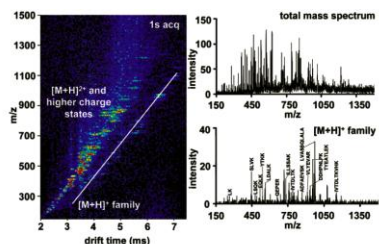


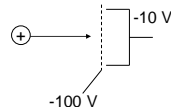
Figure 2. Two-dimensional plot (left) of drift times and m/z ratios for a digest of horse albumin. The intensity of different features is shown using a false color scheme in which the least intense features are represented in blue and the most intense features are represented in red. This data set was acquired upon electrospraying a 1.0 mg mL^{-1} solution of the digest and acquiring data for 100 experimental cycles. The total acquisition time was 1.0 s. As described previously, peaks fall into families of $[M + H]^+$ (the series of relatively faint peaks, delineated by the solid white line) and $[M + 2H]^{2+}$ and higher charge state ions (the more intense features). The spectrum at the top right portion of the plot shows the total mass spectrum obtained by integrating each TOF window over the complete range of drift time bins. The bottom right spectrum corresponds to integration of the narrow range of $[M + H]^+$ ions along the solid white line. We note that even relatively small features are readily observed after only a short acquisition time. In all, ~100 peaks can be observed across the total mass spectrum. The inset shows only a few assignments for the $[M + H]^+$ family of ions. Many other peaks can be assigned to expected $[M + 2H]^{2+}$ and $[M + 3H]^{3+}$ tryptic peptides as well as some missed cleavages. A detailed analysis and assignment has been given previously (see ref 6).

Myung S. et al. *Anal. Chem.* 2003, 75, 5137-5145.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

296

Faradayův pohár (Faraday cup)



- Velmi malé proudy

Př.: 100 iontů/s $\Rightarrow 1.6 \times 10^{-17} \text{ A}$

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

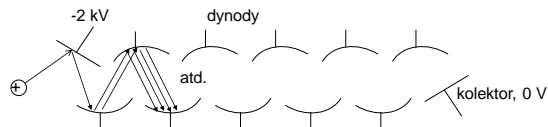
299



8

Detektory a detekční elektronika. Principy vakuové techniky. Spojení separace a hmotnostní spektrometrie: instrumentace (on-line, off-line, čipy)

Elektronový násobič

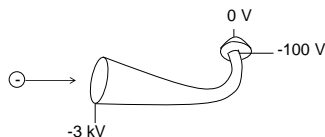


- Obdoba fotonásobiče: konverzní elektroda se sérií dynod (klesající potenciál) a kolektorem. Elektronový násobič není zapouzdřen ve skleněné baňce.
- Konverze iontu na elektron(y) na první elektrodě (např. Cu-Be). Znásobování elektronů na dynodách. Záchyt elektronů na kolektoru, vznik proudu.
- Žisk $\sim 10^6$

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

300

Channeltron



- Skleněná trubice s vrstvou polovodičového PbO uvnitř. Proud tekoucí polovodičovou vrstvou vytváří gradient potenciálu podél trubice (místo dynod s diskretním gradientem). Násobení elektronů jako v elektronovém násobiči.
- Pro detekci kationtů nutná konverzní dynoda.
- Zisk $\sim 10^6$

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

301

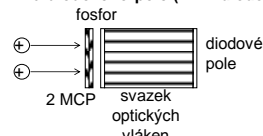
Plošné multikanálové detektory (Array detectors)

... např. pro magnetický sektor

Fotografická deska

- historický detektor, zdlouhavé zpracování

Kombinace MCP a diodového pole (MCP-diode array)



Zařazení optických vláken umožňuje dosažení vyššího plošného rozlišení.

Další detektory ... kombinace výše uvedených detektorů
Př.: MCP a fosforový scintilátor ... izolace vysokého napětí

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

304

Mikrokanálová destička (microchannel plate, MCP)

Rozměry MCP

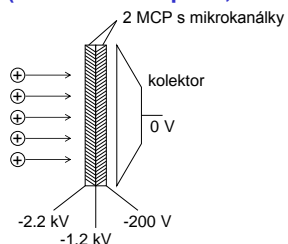
- tloušťka ~ 1 mm
- průměr 1 - 10 cm.

Mikrokanály

- orientovány šikmo,
- průměr $\sim 3 - 20$ μm .
- Chevronová struktura v sestavách více MCP.
- pokryté polovodičovou vrstvou PbO, ... vznik gradientu napětí podél mikrokanálku (kontinuální dynoda, násobení elektronů)

Plošný detektor vhodný pro TOFMS

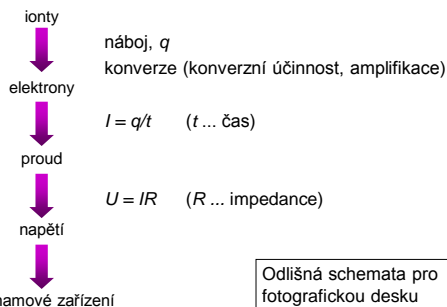
Zisk jednoho MCP $\sim 10^3$, dvojitého MCP $\sim 10^6$.



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

302

Záznam dat v MS

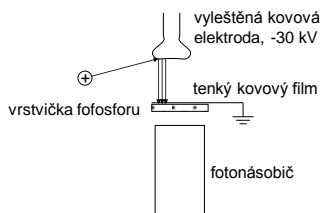


Odlíšná schemata pro fotografickou desku a scintilační detektory

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

305

"Daly" detektor



Iont \rightarrow elektron(y) \rightarrow 4 fotony (fosfor)

+ Velmi nízký šum.

+ Velmi vysoký výkon (fotonásobič obvykle v režimu počítání fotonů).

- Ruší světlo.

- Vyžaduje nízké tlaky ($p < 10^{-6}$ Pa).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

303

Záznam dat v MS

$$I(m/z) = f(X) = f(t)$$

Skenující přístroje

MAG magnetický sektor
Q kvadrupólový filtr
IT, LT iontové pasti

Skenovaná veličina

B, U
 U, V, f
 U, V, f

Doba skenu

~ 1 s
 ~ 0.1 s
 ~ 1 s

Přímý záznam v čase:

TOF ~ 100 μs
FT-ICR iontový cyklotron ~ 1 s

Další neskenující přístroje mohou používat plošné detektory (array).

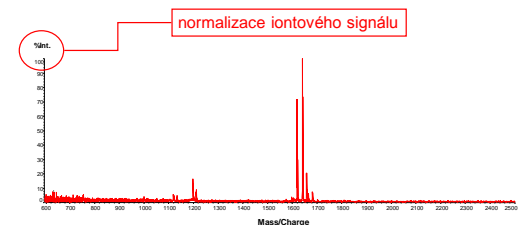
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

306

Signál v MS

Osa y: návoj, proud, napětí, počet iontů???

a.u. (arbitrary units) nebo relativní intenzita



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

307

A/D převodník (analog/digital)

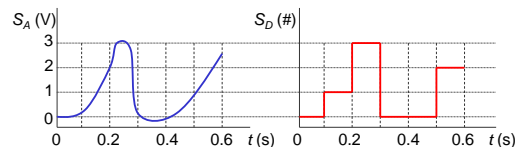
Př.:

2-bitový převodník s rozsahem 0-3V a vz. frekvencí 10 vz/s

počet úrovní = 2^2 :

úroveň	high-bit	low-bit
0	0	0
1	0	1
2	1	0
3	1	1

perioda, $T = 1/10 = 0.1$ s



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

310

Záznamová zařízení

digitální převodníky

- A/D převodník (analog to digital)
- T/D převodník (time to digital)

fotografická deska (historický)

zapisovač signálu (historický)

analogový osciloskop s fotoaparátem (historický)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

308

Přesnost záznamu

Přesnost (a správnost) měření dána počtem bitů AD převodníku

Např. pro 8-bitový převodník $2^8 = 256$ úrovní:

nepřesnost odpovídá 1/2 úrovně

min. rel. chyba $> (2 \times (\text{počet úrovní} - 1))^{-1} = (1/2 \times 255)^{-1} \approx 0.2\%$

počet bitů	1	8	12	16	24
počet úrovní	2	256	4 096	65 536	16 777 216
min. rel. chyba (%)	50	0.2	0.01	8×10^{-4}	3×10^{-6}
dyn. rozsah (rel. chyba < 10%)	-	50	800	13 000	3 000 000

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

311

Detekční elektronika - A/D převodník

Měření (digitalizace) napětí

Základní parametry

počet bitů (rozdílení převodníku)

vzorkovací frekvence, počet vzorků za sekundu [vz/s, sample/s]

max. frekvence (cut-off frequency)

polarita: unipolární (negativní), bipolární

rozsah vstupního napětí

max. vstupní napětí

počet bodů (délka paměti, velikost pufru)

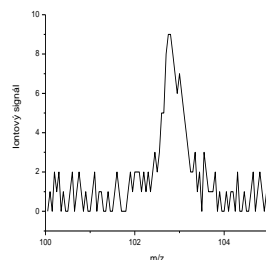
stabilita

aj.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

309

Volba A/D převodníku

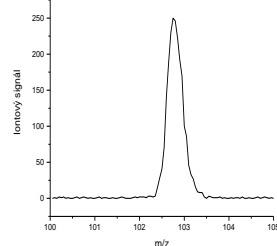


Řešení:

- vyšší zisk detektoru
- převodník s vyšším počtem bitů
- akumulace více spekter (průměrování)

Příčiny:

nízká úroveň signálu
převodník s nízkým počtem bitů



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

312

Rychlost záznamu spektra

... dána vzorkovací frekvencí AD převodníku

Faktory: doba skenu
rozsah skenu
požadované rozlišení
požadovaná kvalita píku (počet bodů/pík)

Př. 1:

Požadavky na Q: doba skenu = 0.1 s, jednotkové rozlišení v rozsahu $m/z = 200 - 2\,000$, >10 bodů/pík. Minimální vzorkovací frekvence?

min. vzorkovací frekvence = $(2\,000 - 200) \times 10 / 0.1 = 180$ ksample/s

délka paměti = $(2\,000 - 200) \times 10 = 18\,000$ vz.

... pro 16-bitový převodník 36 kByte

A/D - současný stav

Vysoký počet bitů: 24 bitů

- ale pouze při nízké vzorkovací frekvenci (1 kHz)

Vysoké vzorkovací frekvence: 20 Gsamples/s

- ale pouze pro nízkobitové A/D (8 bitů)

Vysoký výkon

- akumulace (průměrování) dat přímo v kartě
- komprese v kartě (algoritmy bez ztráty i se ztrátou dat)
- rychlý přenos dat z karty do PC
 - ... PCI karta v počítači, přímé adresování PC paměti

Rychlost A/D převodníku

Př. 2: Jak rychlý musí být A/D převodník pro TOFMS, abychom zaznamenali iont letící $20\ \mu\text{s}$ s rozlišením 2 000, chceme-li definovat pik 10 bodů?

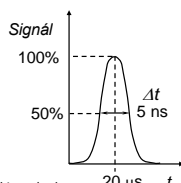
$t = 20\ \mu\text{s}$, $R = 2\,000$

$$R = m/\Delta m = t/(2\Delta t)$$

$$\Delta t = t/2R = 20\ \mu\text{s}/4000 = 5\ \text{ns} \quad (\text{FWHM})$$

celý pik (~10 bodů) ... 10 ns $\Rightarrow t_{\text{sample}} = 1\ \text{ns}$ (1 ns/vz)

vzorkovací frekvence, $f = 1/t_{\text{sample}} = 1\ \text{Gsample/s}$



T/D převodník (T/D converter, TDC)

Počítání pulsů

Náraz iontu na detektor \rightarrow puls \rightarrow zesilovač \rightarrow diskriminátor \rightarrow čítač

T/D převodník (time to digital)

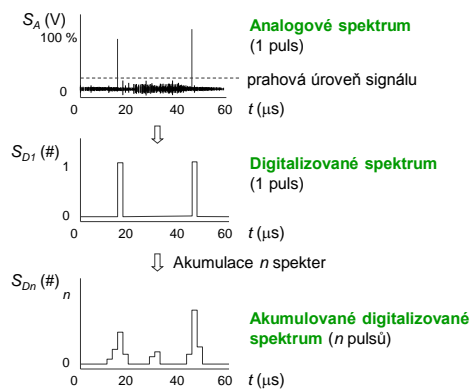
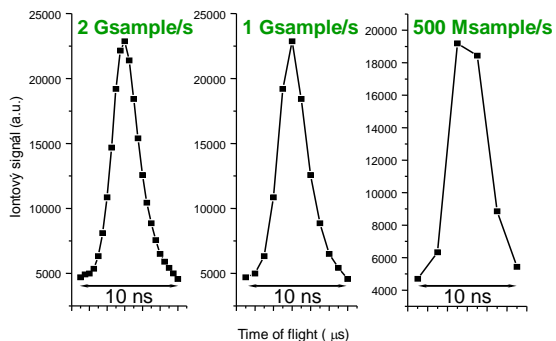
1-bitový A/D převodník

2 úrovně: 0 a 1

Parametry:

- časové rozlišení (počet kanálů)
- aj.

Vliv vzorkovací frekvence AD převodníku (TOFMS)



T/D převodník (time/digital)

Ze skupiny iontů dopadajících na detektor během jedné periody je využit pouze jeden.

Vhodný pro záznam signálu s vysokou opakovací frekvencí přijatelná (statistika po naakumulování dostatečného počtu spekter).

Nižší cena (oproti A/D).

Aplikace:

TOFMS s vysokou frekvencí extrakčních pulsů (>kHz)
ESI - oTOFMS
AP-MALDI – oTOFMS
TOFMS s nízkým počtem iontů
PD – TOFMS

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

319

Informatika

Hardware: nejrozšířenější PC (IBM)

Software: Windows XP

Exponenciální růst výkonnosti: Mooreův zákon

Př.:

Vyhodnocení MS/MS spekter programem SEQUEST
SCX - LC - MS/MS digestu směsi proteinů (Y2H kvasnice)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

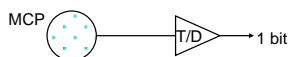
322

T/D převodník (time/digital)

Vícekanálové T/D převodníky

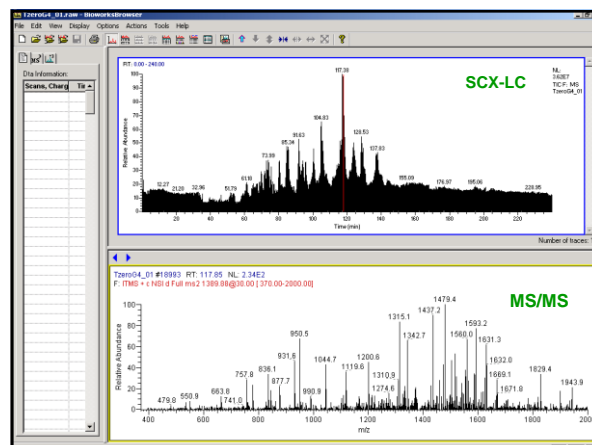
... ke zvýšení dynamického rozsahu
... pomocí skupiny T/D převodníků se segmentovaným detektorem

Klasický TOF detektor



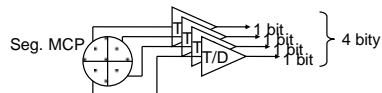
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

320



T/D převodník (time/digital)

Segmentovaný TOF detektor



Ionty dopadají na čtyři segmenty se stejnou pravděpodobností
...celkový tok iontů může být vyšší

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

321

Př.: klastř pro vyhodnocení SCX-LC-MS/MS

1x master PC (2 procesory P4, 3 GHz)
8 x slave PC (2 procesory P4, 3 GHz)
vše propojeno 1-Gbitovou sítí



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

324

Základy vakuové techniky

Evangelista Torricelli (1608-1647)

Jednotka tlaku: 1 Torr = 1 mm Hg

Tlak, p

p = síla/plocha [Pa, N/m²]

1 atm = 760 Torr = 101 325 Pa = 101.325 bar = 14.70 psi

1 Torr = 133 Pa

Vakuum

stav plynu s $p < 101325$ Pa

Střední volná dráha molekuly

Střední dráha, kterou urazí iont mezi 2 srážkami

$$\lambda = (\sqrt{2}\pi\sigma^2n)^{-1}$$

λ (cm) = 0.66/ p (Pa) ... pouze hrubý odhad pro vzduch při 25°C

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

325

Rychlost pumpování

Rychlost pumpování, S

$$S = \frac{Q}{p} \quad [S] = L/s$$

$$1/S_{\text{komora}} = 1/S_{\text{pumpa}} + 1/C_{\text{tot}}$$

Správný návrh: $C_{\text{tot}} > S_{\text{pumpa}}$

tj., nemá smysl koupit výkonnou pumpu a pak omezit celkovou rychlost pumpování komory úzkými spojovacími trubicemi.

Pozn.:

- V režimu molekulového toku pumpa nenasává plyn. Pumpa funguje jako past; molekuly, které dorazí k pumpě, se neodrazí zpět do komory.
- Rychlost pumpování je různá pro různé plyny (klesá s m plynu).
- Tlak v celém systému není stejný, záleží na umístění tlakového čidla.
- Outgassing. Dobu nutnou k dosažení vakua prodlužuje přítomnost plynných a těkavých látek adsorbovaných (vzorek, otisky prstů) a absorbovaných v systému (plyny v těsnění, plastových součástkách).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

328

Režimy toku plynu

1. Turbulentní tok. ($p > 10$ kPa)

velmi malá λ

mnoho srážek mezi molekulami

2. Viskózní, kontinuální tok. ($p = 1000 - 0.1$ Pa, "hrubé" vakuum)

$\lambda = \mu\text{m} - \text{cm}$:

stále mnohem menší než rozměry vakuových aparatur

více kolizí molekula - molekula než molekula - stěna

3. Molekulární tok. ($p < 0.01$ Pa, "vysoké" vakuum, HV, UHV)

$\lambda > m$:

převládají kolize molekul se stěnami vakuové aparatury

obvyklá situace v hmotnostním spektrometru

pozn.: UHV = ultra high vacuum

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

326

Vakuové pumpy

Mechanická pumpa

Difúzní pumpa

Turbomolekulární pumpa

Kryopast

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

329

Průtok plynu

Průtok plynu, Q

$[Q] = \text{Pa m}^3/\text{s}$, Pa L/s

C... konduktance trubice o průměru D a délce L

$$C = f(D, L, p, \text{plyn}, T), [C] = L/s$$

Při molekulárním toku C nezávisí na tlaku p :

$$C \propto D^3/L \quad (\text{aproximace})$$

Při viskózním toku C závisí na tlaku p :

$$C \propto pD^4/L \quad (\text{aproximace})$$

Návrh vakuových aparatur

- Krátké tlusté spoje $\Rightarrow C \uparrow \Rightarrow$ rychlejší dosažení požadovaného tlaku.

- Sériové spojení trubic - nejúžší místo omezuje celý systém:

$$1/C_{\text{tot}} = \sum 1/C_i$$

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

327

Mechanická pumpa

- Jedno- a vícestupňové.

- Rotor v oleji

- min. tlak omezen vypařováním oleje

- nutná past na olejové páry

- nutné výměny oleje

- Tlak > 0.1 Pa ... "hrubé" vakuum.

- Rychlost pumpování, S : typicky 1 – 500 L/s

- Běžná pumpa v komerčních systémech.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

330

Turbomolekulární pumpa

- Série velmi rychle rotujících turbín (až 50 000 rpm). Molekuly plynu jsou odráženy lopatkami turbín. Obvodová rychlost turbíny > rychlost molekul plynu.
- Závislost vstupního a výstupního tlaku na molekulové hmotnosti plynu:
$$\ln(p_{out}/p_{in}) \propto \sqrt{m}$$
- UHV pumpa, tlak > 10^{-8} Pa
- Rychlosti pumpování do ~ 3000 L/s
- Běžná UHV pumpa v komerčních systémech.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

331

Měření tlaku

Hydrostatický tlakoměr

- Stanovení tlaku z rozdílu hladin.
- Rozsah do 1 kPa, u speciálních konstrukcí až do 0.1 Pa.

Mechanické tlakoměry

- Stanovení tlaku podle výchylky pružné membrány.
- Snímání výchylky - mechanické
- kapacitní (rozsah $10^5 - 10^2$ Pa)

Termočlánek (Thermocouple gauge)

- Bimetalový termočlánek a odporově žhavené vlákno.
- Přenos tepla z vlákna na termočlánek závisí na tlaku a druhu plynu.
- Rozsah p : 100 Pa - 0.1 Pa, u speciální varianty (convectron) 100 kPa - 0.1 Pa.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

334

Difúzní pumpa

- Speciální netěkavý olej se zahřívá topnou spirálou v základně, páry oleje stoupají trubicí uprostřed, tryskají šikmo dolů na chlazené stěny a stékají na základnu. Speciální olej letící z trysek strhává molekuly okolního plynu.
- Často přidávána chlazená past (vodou, kapalným N_2) nad pumpu – zachycení příp. úniku oleje.
- UHV (ultra-high vacuum) pumpa, tlak > 10^{-6} Pa.
- Spolehlivá pumpa, nevyžaduje údržbu.
- Pomalý ohřev i chlazení.

Kryopast

- Sorbent (např. dřevěné uhlí) chlazený na 4 K (kapalným He).
- Nutnost regenerace.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

332

Měření tlaku

Iontová trubice (Ion gauge)

Bayard & Alpert: iontová trubice se žhavenou katodou.

- Tři elektrody ve skleněné baňce: spirála (+), drát (-) ve středu spirály a žhavené vlákno (-) vně spirály (žhavná katoda).
- Stejná sestava jako u otevřeného iontového zdroje: elektrony ze žhavného vlákna urychleny ke spirále, dochází k ionizaci plynu, zachytu iontů na drátu a měření proudu. $p = f(\text{proud})$. Pozor, proud je funkcí složení plynu!
- Rozsah p : $10^{-2} - 10^{-10}$ Pa (vysoké vakuum, UHV)

Penning: iontová trubice se studenou katodou.

- K tvorbě iontů je použit výboj.
- Rozsah p : $1 - 10^{-4}$ Pa

Pozn: v komerčních zařízeních se používají termočlánky a iontové trubice.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

335

Ohřev UHV systémů

Molekuly plynu se adsorbují na vnitřní stěny hmotnostního spektrometru. Pomalá desorpce molekul plynu zvyšuje tlak a prodlužuje dobu nutnou k dosažení požadovaného vakua. Dosažení UHV je možné urychlit zahřátím systému (např. odporově vyhřívanou vodivou páskou omotanou kolem systému), což posune rovnováhu od adsorpci směrem k desorpci.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

333

Spojení separace a hmotnostní spektrometrie

Proč separace?

... nutnost analýzy velmi složitých vzorků, směsí mnoha analytů, např. v případě proteomiky vzorek obsahuje běžně $>10^2$ peptidů

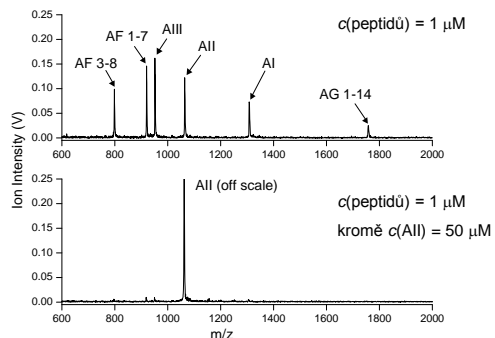
Samotná MS a MS/MS není dostačující z několika důvodů:

- vysoká pravděpodobnost výskytu 2 nebo více analytů o stejné m/z
- překryv izotopických obálek analytů s blízkou m/z
- vzájemné rušení analytů
- omezený dynamický rozsah hmotnostního spektrometru
- rozlišení 1. stupně při MS/MS často nedostatečné (R , ~ 500)
- odstranění nečistot
- zdroj dalších informací o analytech

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

336

Vzájemné rušení MALDI signálu ve směsi peptidů



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

337

Separace biomolekul: MALDI nebo ESI ?

ESI MS

- + Kompatibilní se separací
- + Komerčně dostupný, rutinní použití
- + Možnost MS-MS
- + Vysoká citlivost
- + Snadná automatizace
- Nelze archivovat vzorek
- Minoritní složky neanalyzovány v MS-MS modu
- Kvantifikace vs. MS-MS
- LC gradient často pomalý

MALDI MS

- + Jednodušší spektra
- + Oddělení separace od hmotnostní analýzy
- + Možnost archivování vzorku

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

340

Typy interface

Plyn → vakuum

- tryskový separátor pro obohacení ABC v nosném plynu (particle beam)
- membránové interface
- kapilární kolona (klasická kolona + splitter)

Kapalina → vakuum

- API ionizační metody (ionizace přímo z kapaliny za atmosferického tlaku)
- Průtokové sondy (FAB)
- Nanosení vzorku na tuhý nosič (terčik)
 - pohyblivý pás (nanosení při atmosferickém tlaku – přenos, diferenciální pumpování - ionizace)
 - Sběr frakcí

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

338

Interface pro MALDI

Obvyklý postup:

- Nanosení kapalného vzorku na terčik
- Vysušení vzorku
- Vložení terčiku do spektrometru a analýza

Režim

1. On-line
2. Off-line
3. In-line

Přídavek MALDI matrice

1. Smíchání s roztokem analytu (sheath flow, T, liquid junction)
2. Nanosení roztoku na terčik pokrytý vrstvičkou matrice

Sběr eluentu

1. Diskrétní frakce
2. Spojitá stopa

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

341

Separace - ESI MS

Nejrozšířenější metody:

2D GE - MS

- 2-rozměrná gelová elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
- následné vyříznutí zóny a zpracování proteinu
- běžná planární technika pro separaci proteinů

RPHPLC – ESI MS

- kapalinová chromatografie na reverzní fázi – ESI MS
- běžná kolonová technika pro analýzu peptidů

Data dependent scan ... 1 MS sken následován několika MS/MS skeny

(podrobněji v části o aplikacích)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

339

Interface pro MALDI

Off-line

Terčiky s hydrofilními místy (anchorchip).
Mikrometody používající piezoelektrické pipety a mikroterčiky.
Nanosení vzorku pomocí elektrospřeje

On-line

Průtoková sonda s fritou
Průtoková sonda bez frity
Zmližovač pro tvorbu aerosolu

In-line

Interface ROBIN
Nanosení vzorku na povrch ve vakuu, moving belt interface

Off-line vs. on-line

- + Oddělení separace od hmotnostní analýzy
- + Možnost archivování vzorku

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

342

Archivování vzorku (MALDI)

Postup při separaci s MALDI MS a MS/MS detekcí

1. Nanesení eluentu na terčik
2. MALDI MS analýza (<10% vzorku spotřebováno)
3. Analýza MALDI MS dat
4. MALDI MS-MS vybraných píků (detailní analýza)

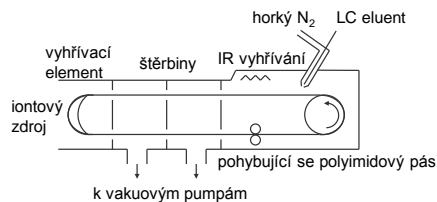
(Po 1. kroku může být postup kdykoli přerušen.)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

343

Moving belt interface (in-line)

Rozhraní pro kontinuální zavádění netěkavého vzorku v těkavějším solventu do hmotnostního spektrometru

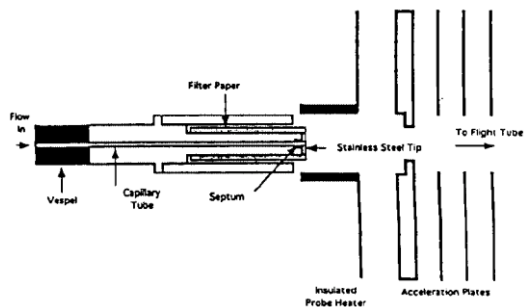


McFadden W. H., Schwartz H. L. and Evans S. J. *Chromatogr.* 122, 389, 1976.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

346

Průtoková sonda (on-line)

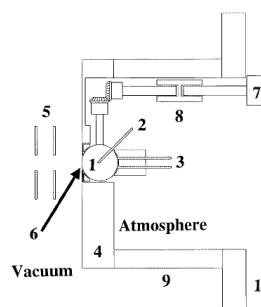


Whittall, R. M., Russon, L. M., Li, L. J. *Chromatogr. A* 1998, 794, 367-375.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

344

ROBIN (rotating ball inlet), in-line

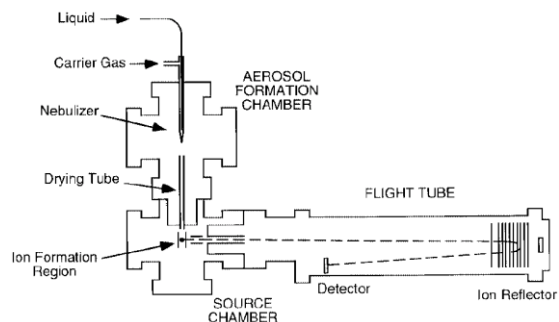


Orsnes, H., Zenobi, R. *Chem. Soc. Rev.* 2001, 30, 104-112.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

347

Zmlžovač pro tvorbu aerosolu (on-line)

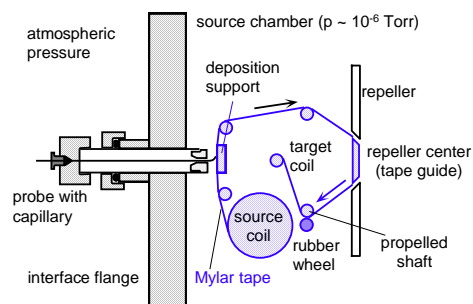


Fei, X., Wei, G., Murray, K. K. *Anal. Chem.* 1996, 68, 1143-1147.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

345

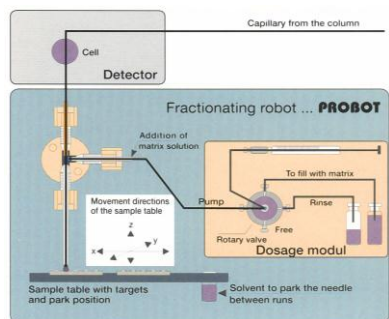
Nanášení vzorku ve vakuu (in-line i off-line)



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

348

Automatizovaný sběr frakcí (off-line)

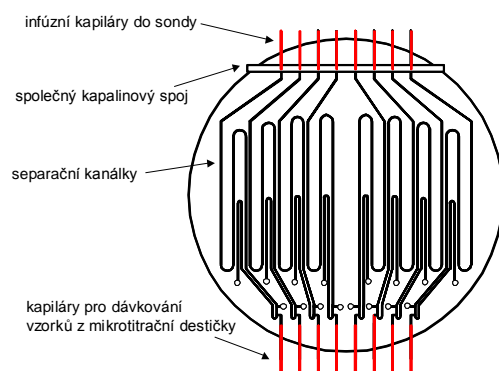


Např.: Probot (zdroj: www.lcpackings.com)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

349

Příklad návrhu čipu pro paralelní analýzu



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

352

Spojení čip – hmotnostní spektrometrie

(čip, mikročip, microfluidic device)

Proč mikro + makro? ... Možné výhody čipu:

- integrace více kroků, "lab on a chip" (dávkování, příprava, separace ...)
- paralelní analýzy (opakující se motiv na jednom čipu)
- nízká cena – čip na jedno použití (při sériové výrobě)
- veškeré úpravy na čipu, MS detektor

Základní typy:

1. 2D pole

- afinitní pole: nejprve zakoncentrování specifických látek, poté MALDI MS přímo z čipu
- pole vialek se špičkami pro ESI: zvýšení reprodukovatelnosti analýzy

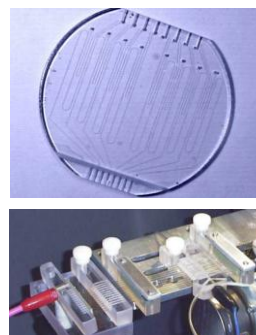
2. Fluidní systém (čipy s kanálky)

- systémy pro paralelní analýzu – pro ESI, MALDI ...
- systémy integrující několik kroků

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

350

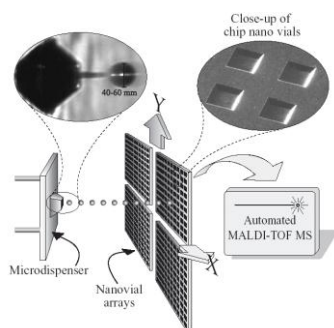
Čip vs. konvenční zařízení



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

353

Mikrometody



Laurell, T.; Nilsson, J.; Marko-Varga, G. *Trends Anal. Chem.* **2001**, *20*, 225-231.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

351

9

Biologické aplikace MS: proteomika. Separační techniky
Enzymatické štěpení proteinů. Identifikace proteinů:
mapování peptidů, sequence tag, accurate mass tag.



IV. Biologické aplikace MS

Genom, proteom, metabolom.

Malé organické molekuly - biomolekuly, léky, petrochemické produkty.

Biopolymery (DNA, proteiny, cukry).

Syntetické polymery.

Proteomika

Charakterizace peptidů a proteinů – proteinového komplementu genomu.

V současnosti hlavní a nejperspektivnější aplikace hmotnostní spektrometrie.


Genom ↔ proteom. Uroveň exprese gen → protein různá.

Genom je v podstatě statický, proteom dynamický: exprese závisí na druhu a funkci proteinu, poloze v buňce, stavu a zdraví buňky. Funkce organismu souvisí bezprostředně s proteomem.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

355

IUPAC názvosloví aminokyselin

Triviální název	Symbole	Vzorec
Isoleucine	Ile I	$C_2H_5-CH(CH_3)-CH(NH_2)-COOH$
Leucine	Leu L	$(CH_3)_2CH-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
Lysine	Lys K	$H_2N-[CH_2]_4-CH(NH_2)-COOH$
Methionine	Met M	$CH_3-S-[CH_2]_2-CH(NH_2)-COOH$
Phenylalanine	Phe F	$C_6H_5-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
Proline	Pro P	
Serine	Ser S	$HO-CH_2-CH(NH_2)-COOH$

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

358

Proteomika

Analýza proteomu složitější než analýza genomu

- více stavebních kamenů, aminokyselin
- variabilita - modifikace aminokyselin
- neexistuje metoda amplifikace proteinu obdobná PCR
- nízká množství mnoha proteinů (např. regulačních proteinů)

Diferenční proteomika

Stanovení rozdílné exprese proteinů (přítomnosti nebo absence) v ovlivněném a zdravém organismu (orgán, tkáň, buňka).

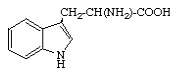
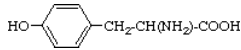
Funkční proteomika

Stanovení všech interakcí (protein-protein, protein-DNA, atd.) v daném organismu (orgán, tkáň, buňka).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

356


IUPAC názvosloví aminokyselin

Triviální název	Symbole	Vzorec
Threonine	Thr T	$CH_3-CH(OH)-CH(NH_2)-COOH$
Tryptophan	Trp W	
Tyrosine	Tyr Y	
Valine	Val V	$(CH_3)_2CH-CH(NH_2)-COOH$

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

359

IUPAC názvosloví aminokyselin

Triviální název	Symbole	Vzorec
Alanine	Ala A	$CH_3-CH(NH_2)-COOH$
Arginine	Arg R	$H_2N-C(=NH)-NH-[CH_2]_3-CH(NH_2)-COOH$
Asparagine	Asn N	$H_2N-CO-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
Aspartic acid	Asp D	$HOOC-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
Cysteine	Cys C	$HS-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
Glutamine	Gln Q	$H_2N-CO-[CH_2]_2-CH(NH_2)-COOH$
Glutamic acid	Glu E	$HOOC-[CH_2]_2-CH(NH_2)-COOH$
Glycine	Gly G	$CH_2(NH_2)-COOH$
Histidine	His H	

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

357

Historický přehled ionizačních metod vhodných pro analýzu peptidů a proteinů

1969 FD	Desorpce polem (Beckey)
1974 PD	Plazmová desorpce (McFarlane)
1976 SIMS	MS sekundárních iontů (Benninghoven)
1981 FAB	Ionizace rychlými atomy (Barber)
1984 ESI	Electrosprej (Fenn)
1987 MALDI	Laserová desorpce za účasti matrice (Karas, Hillenkamp)
1994 nano-ESI	Nanoelektrosprej (Wilm, Mann)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

360

Současné ionizační techniky v proteomice

FAB

max. m ~ 10 000

LD ~ 20 pmol (klasický FAB), < 1 pmol (CF-FAB)

ESI

max. m ~ 100 000 Da ($z \gg 1$)

LD < 10 fmol (rutinní)

LD – amol nebo 10^{-9} M (vybrané aplikace)

MALDI

max. m ~ 10^6 (prakticky neomezen – TOF analyzátor)

relativně nejvíce odolná vůči rušení nečistotami

LD < 10 fmol (rutinní)

LD – amol nebo 10^{-9} M (vybrané aplikace)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

361

Gelová elektroforéza (GE)

2D SDS PAGE

2D: 2-rozměrná elektroforéza

1. rozměr: dle pI (izoelektrická fokusace)

2. rozměr: dle velikosti SDS pro denaturaci (náboj/velikost = konst.)

PA: polyakrylamidový gel jako separační médium

- Vhodná pro separaci tisíců až desetitisíců proteinů, v případě velmi jednoduchých směsí stačí i 1D GE
- Rychlá identifikace a charakterizace proteinů na 2D gelu je nejběžnější analýzou současné proteomiky
- Zhruba 5% proteinů a 30% peptidů migruje anomálně
- PTM ovlivňují zdánlivou m proteinů (chyba až 50%)
- Problematický transport proteinů z gelové matrice (elektroblot na membránu)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

364

Hmotnostní spektrometry v proteomice

MALDI MS

vysoký počet vzorků/čas
TOF

ESI MS-MS

objasnění struktury
QqTOF, IT, FT ICR

Nová instrumentace

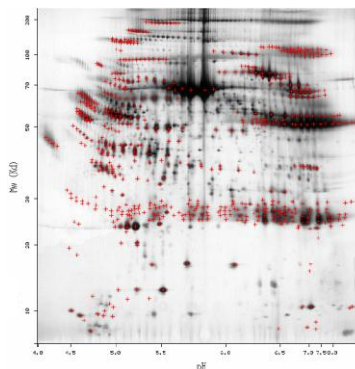
MALDI TOF-TOF, MALDI LIFT TOF
MALDI QqTOF

- rychlá identifikace v MS modu
- možnost detailní analýzy v MS-MS modu později

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

362

Př.: 2D GE lidské plazmy



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

Zdroj: Expasy

365

Separáčnı metody v proteomice

GE

gelová elektroforéza na polyakrylamidovém gelu

HPLC

vysoceúčinná kapalinová chromatografie na reverznı fázı

IEC

chromatografie na iontoměničích

AC

afinitní chromatografie

CE

kapilární elektroforéza

Centrifugace

běžná centrifugace, gradientová centrifugace

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

363

RP HPLC

- Kolona: klasická, kapilární (ϕ 300 μ m) nebo nano LC (ϕ 75 μ m)
- Náplň: C_{18} , velikost nosiče: 3 – 10 μ m (RP ... reverse phase)
- Gradientová eluce, např.:
 - start: 10% org fáze + 90% vodnė fáze
 - konec: 80% org fáze + 20% vodnė fáze
 - organická fáze: ACN (acetonitril) + 0.1% TFA (kyselina trifluoroctová)
 - vodnė fáze: 0.1% TFA
- Organický solvent přispívá k rozpustnosti peptidů, umožňuje detekci v UV (230 – 240 nm) a rychle se vypařuje, což je výhodnė pro sběr frakcí např. pro MALDI MS.
- Standardní technika kolonovė separace pro peptidy a proteiny

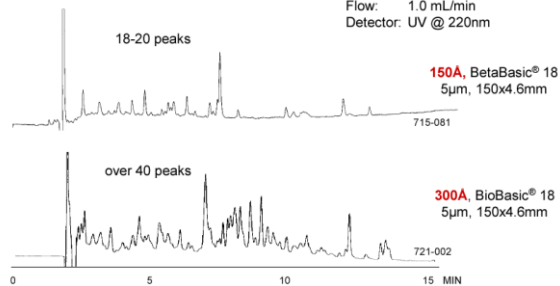
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

366

Př.: RP HPLC směsi peptidů (digest BSA)

Sample: Tryptic Digest of BSA

Mobile phase: A - 0.1% TFA in H₂O
B - 0.1% TFA in ACN
Gradient: 10% to 50%B in 20 min.
Flow: 1.0 mL/min
Detector: UV @ 220nm



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

Zdroj: ThermoFinnigan 2002

367

Enzymatické štěpení proteinů v 2D gelu

1. Wash the gel slices for at least 1 hr in 500 microliters of 100 mM ammonium bicarbonate. Discard the wash.
2. Add 150 microliters of 100 mM ammonium bicarbonate and 10 microliters of 45 mM DTT. Incubate at 60 degrees centigrade for 30 min.
3. Cool to room temp and add 10 microliters of 100 mM iodoacetamide and incubate for 30 min in the dark at room temperature.
4. Discard the solvent and wash the gel slice in 500 microliters of 50% acetonitrile/100 mM ammonium bicarbonate with shaking for 1 hr. Discard the wash. Cut the gel into 2-3 pieces and transfer to a 200 microliter eppendorf style PCR tube.
5. Add 50 microliters of acetonitrile to shrink the gel pieces. After 10-15 min remove the solvent and dry the gel slices in a rotatory evaporator.
6. Re-swell the gel pieces with 10 microliters of 25 mM ammonium bicarbonate containing Promega modified trypsin (sequencing grade) at a concentration such that a substrate to enzyme ratio of 10:1 has been achieved. (If the amount of protein is not known, add 0.1-0.2 micrograms of modified trypsin in 10 microliters of 25 mM ammonium bicarbonate). After 10-15 minutes add 10-20 microliters of additional buffer to cover the gel pieces. Gel pieces need to stay wet during the digest. Incubate 4 hrs to overnight at 37 degrees Centigrade. Proceed to step 8 if further extraction of the gel is desired (recommended)- otherwise continue with step 7.
7. Approximately 0.5 microliters of the supernatant may be removed for MALDI analysis and/or the supernatant acidified by adding 10% TFA to a final concentration of 1% TFA for injection onto a narrow- or microbore reverse phase column. (If necessary the sample's volume may be reduced-1/3 on a rotatory evaporator.)
8. Extraction (Optional) - Save supernatant from step 7 in tube X, and extract peptides from gel twice with 50 microliters of 60% acetonitrile/0.1% TFA for 20 min. Combine all extracts in tube X (using the same pipet tip to minimize losses), and speed vac to near dryness. Reconstitute in 20 microliters of appropriate solvent. Proceed with chromatography or MALDI analysis.

Zdroj: <http://www.abrf.org/ResearchGroups/ProteinIdentification/EPosters/pirgprotocol.html>

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

370

Enzymatické štěpení proteinů



Důvody přechodu z oblasti vysokých m/z do oblasti nízkých m/z :

1. Lepší parametry hmotnostních spektrometrů (vyšší rozlišení, přesnost a správnost stanovení m/z , citlivost)
2. Úžší izotopová obálka (jednodušší spektra, vyšší citlivost)

Pozn.:

digestion = enzymatické štěpení, trávení

digest = směs tryptických fragmentů, produkt enzymatického štěpení

úpravy před štěpením:

- redukce -S-S- můstků: dithiothreitol (DTT)
- alkylace -SH: jodoacetamid (IAA) $\Rightarrow m: + 57$ Da
- důvod: „rozbalení proteinu“ ... lepší přístup enzymu

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

368

Strategie analýzy v proteomice

Základní typy analýzy

1. **Identifikace** (potvrzení přítomnosti známého proteinu ve vzorku)
2. **Relativní kvantifikace** v diferenciální proteomice
3. **Sekvenace** neznámého proteinu/peptidu (de novo sequencing)

Vzorek je obvykle směs mnoha proteinů/peptidů



Analýza založena na použití separací s MS a MS/MS detekcí

Identifikace

Sekvence mnoha proteinů již byla popsána a není nutné ji znovu analyzovat.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

371

Enzymatické štěpení proteinů

Nejčastěji **trypsin** (různě upravený, např. TPCK k potlačení chymotrypsinové aktivity, methyloací aj.).

Další enzymy: lysin, chymotrypsin, CNBr aj.

Produkty enzymatického štěpení

- specifické fragmenty analyzovaného proteinu
Např. trypsin štěpí na C-straně aminokyselin K or R, pokud není soused P. (Skutečná pravidla ještě složitější):
N terminál-X-X-X-X-X-K-Y-Y-Y-Y-Y-C terminál (Y≠P)
- nespecifické fragmenty analyzovaného proteinu
- artefakty (modifikace aminokyselin, např. oxidací, díky PA gelu atd.)
- fragmenty enzymu (autolýza)
- fragmenty keratinu (—S—S—)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

369

Strategie analýzy v proteomice

Top-down

- izolace proteinů
- zpracování proteinů, enzymatické štěpení
- analýza peptidů (MS, MS/MS)

Bottom-up

- enzymatické štěpení
- separace peptidů
- analýza peptidů (MS, MS/MS)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

372

Některé užitečné termíny

<i>genotyp</i>	genetické vybavení organismu, dispozice
<i>fenotyp</i>	skutečný obraz organismu, výsledek interakce s prostředím
<i>in vivo</i>	v žijícím organismu
<i>in vitro</i>	mimo žijící organismus, v umělém prostředí

<http://www.meta-library.net/gengloss>

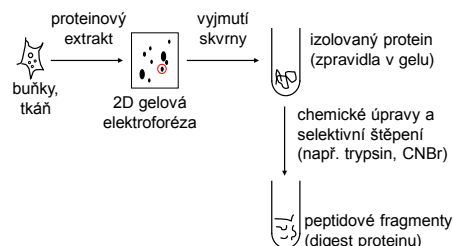
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

373

Mapování peptidů (peptide mapping, peptide mass fingerprinting, PMF)

Určení proteinu analýzou produktů enzymatického štěpení

1. Separace a kvantifikace proteinů: 2D GE
2. Vyříznutí gelu, úprava, enzymatické štěpení



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

376

Identifikace proteinu

Známé informace:

- Původ vzorku (organismus)
- Izoelektrický bod (pI) z 2D PAGE
- Molekulární hmotnost proteinu z 2D PAGE, příp. MALDI TOF MS
- N- a C- část sekvence (Edmanova degradace)
- ... Tyto informace nejsou dostatečné k identifikaci proteinu (nebo je jejich získání nemožné, příp. zdlouhavé)

Metody identifikace

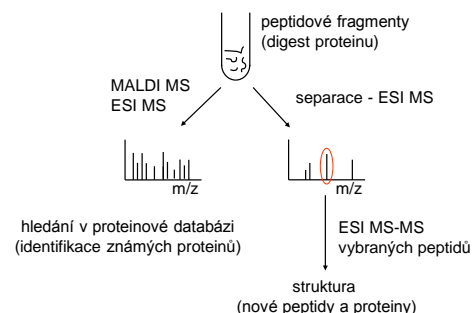
- A. 2D GE + X + MS (peptidové mapování)
- B. 2D GE + X + RPHPLC + MS a MS/MS (sequence tag, AMT)
- C. X + 2D LC (např. IEC a RPHPLC) + MS a MS/MS
- D. X + AC (afinitní chromatografie) + MS a MS/MS (IMAC, ICAT)
- E. Strategie využívající X a izotopové reagenty/standards
X ... selektivní enzymatické štěpení

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

374

PMF

3. MS analýza a vyhodnocení výsledků



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

377

Identifikace proteinu

- Získání specifických informací o proteinu pomocí MS
- Srovnání specifických vlastností analyzovaného proteinu s knihovnou (obsahující specifické vlastnosti) známých proteinů.

Specifická:

1. Analýza více peptidů se vztahem k proteinu
peptidové mapování (PMF, peptide mapping), získání peptidového fingerprintu, analýza m/z produktů enzymatického štěpení
2. Podrobná analýza jednoho peptidu z proteinu
 - a) **sequence tag, MS-tag** - analýza části sekvence (z fragmentace peptidu v plynné fázi)
 - b) **accurate mass tag, AMT** - analýza složení části proteinu (z přesné m produktu enzymatického štěpení.)
- Vyžaduje vysokou správnost MS analýzy + kvalitní databázi
- Identifikace používající MS jsou výrazně rychlejší a citlivější než chemické metody (Edmanova degradace)
- Negativní výsledek hledání v databázi = nový protein !!!!!

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

375

Příklad hledání v databázích: MS Fit

Zadáni:

Mass (m/z)	Charge (z)
676.2788	
825.4571	
1017.5370	
1026.5984	
1040.6121	
1100.8250	
1194.7132	
1218.5794	
1243.5887	
1255.6528	
1260.5928	
1264.6281	
1276.5824	
1288.6024	
1300.6210	
1308.6975	
1308.6865	
1413.7126	
1420.6741	
1482.8421	
1574.8138	
1892.7087	
2188.0850	

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

378

Příklad hledání v databázích: MS Fit

Výsledky:

Sample ID (optional): Magic Bullet digests
 Database searched: Gmseqpt113
 Molecular weight range: 1000 - 100000 Da; offset: 408557 offset
 P/I ratio range: 4250/4 ratio
 Combined molecular weight and p/i matches offset: 408557 offset
 MS/MS search offset: 415 offset (offsets applied for top 4 matches)

Considered modifications: [Peptide N-terminal Cys to glycine] (Validation of M) [Peptide N-terminal Acetylation]

Min # Peptides	Peptide Mass	Peptide Masses	Digest	Max # Missed	Cysteine	Peptide	Peptide	Input #
to Match	Tolerance (ppm)	ppm	Method	Changes	Mod-Mod for	N-Terminal	Chemical	Peptide Masses
4	50000 ppm	mississippi	Trypsin	1	acetylation	Hydrogen (D)	Free Acid (D)	25

Result Summary

Rank	MOWSE Score	# P/I Matched	% P/I	Protein Masses	MW (Da)	Species	Gmseqpt113 Accession #	Protein Name
1	1.02e+007	15123	65%	30271.5	5.88	CAULIFLOWER MOSAIC VIRUS	MS5870	apolyprotein, 5.5 proteinase
2	1.64e+003	423	17%	3311.9	10.48	CAULIFLOWER MOSAIC VIRUS	575949	apical transcription factor (readthrough domain, virus CoMV, isolate 1105-3, apical non-transmissible, Peptide Partid, 29 aa)
3	1.56e+003	423	17%	3475.0	10.17	CAULIFLOWER MOSAIC VIRUS	575948	apical transcription factor (readthrough domain, virus CoMV, isolate 1105-7, apical non-transmissible, Peptide Partid, 30 aa, region 1 of 2)
4	383	523	21%	48333.8	6.79	ALLOCHROMATUM TROGLODITUM	112129	The first ATG in the open reading frame was chosen as the start codon.
5	428	623	26%	44511.6	6.66	HEPATOBLASTUS VERTE	326730	nonstructural protein NS1

MS Fit - Identifikace proteinu z hmotností peptidových fragmentů pomocí programu na <http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml3.2/msfit.htm>

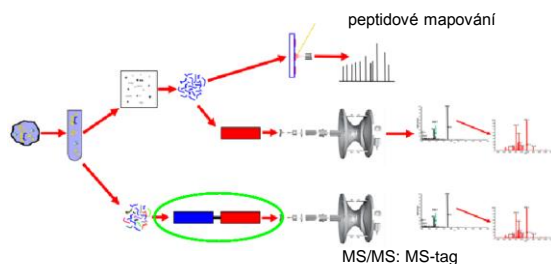
Metoda Sequence-Tag (MS-Tag)

- Identifikace proteinu na základě přesné znalosti malé části jeho sekvence (sequence-tag, MS-tag), zpravidla sekvence jednoho peptidu
- Přesné stanovení sekvence aminokyselin části proteinu (typicky jednoho peptidového fragmentu z enz. štěpení) - obvykle pomocí ESI-MS/MS nebo MALDI-PSD-MS přímo z tabulky píků nebo spektra
- Potřebná délka části sekvence cca. 8-10 aminokyselin
- Čím delší sekvence je známa, tím přesnější je identifikace proteinu
- Známá část sekvence je hledána v proteinových databázích
- Další informace o proteinu: druh organismu, *m* (2D GE), pI atd.

Nedostatky PMF

- Vyžaduje izolaci čistého proteinu, max. 2-3 proteiny před enz. štěpením
- Vyžaduje správnost stanovení $m/z < 100$ ppm, mnohem lépe < 10 ppm
- Vyšší správnost stanovení $m/z \Rightarrow$ jednoznačnější odpověď hledání v databázi
- Nepřítomnost očekávaných peptidů v digestu obvykle menší problém než přítomnost nadbytečných peptidů
- Zpravidla 4-5 peptidů dostačujících k získání spolehlivého výsledku

Strategie MALDI MS a LC - ESI MS



PMF: teorie vs. praxe

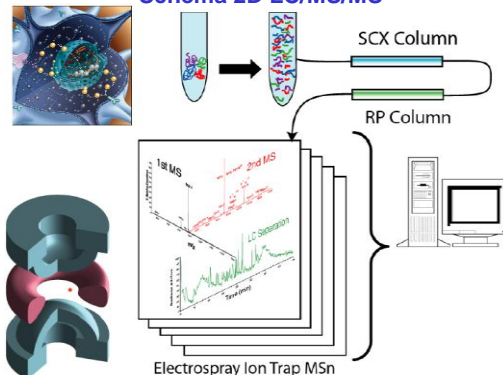
Nadbytečné piky

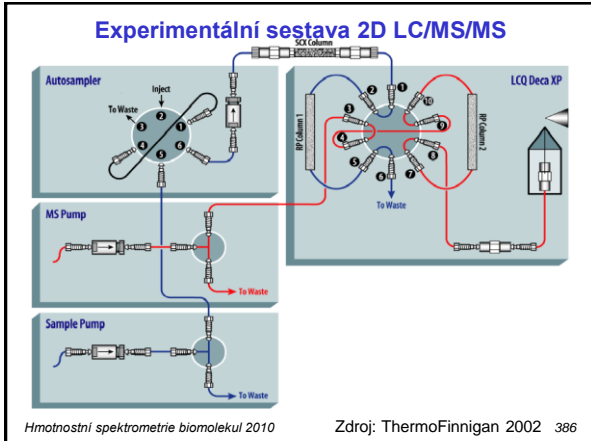
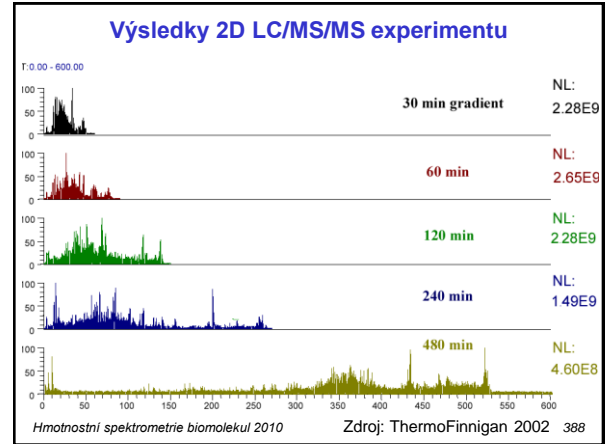
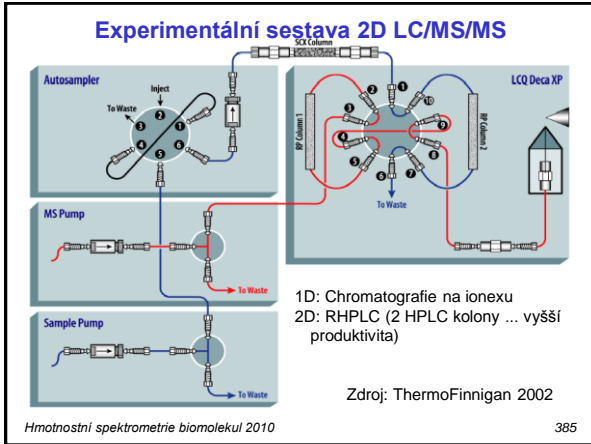
- neselektivní štěpení (např. chymotrypsická aktivita trypsinu)
- nečistoty (např. keratiny)
- nedostatečná separace (další proteiny ve skvrně)
- autolýza enzymu
- post-translační modifikace (PTM), artefakty

Chybějící piky

- špatně rozpustné peptidy
- adsorpce peptidů
- vzájemné rušení peptidů
- neselektivní rozštěpení peptidu
- nedostatečné štěpení proteinu (sterické zábrany)
- PTM, artefakty

Schema 2D LC/MS/MS



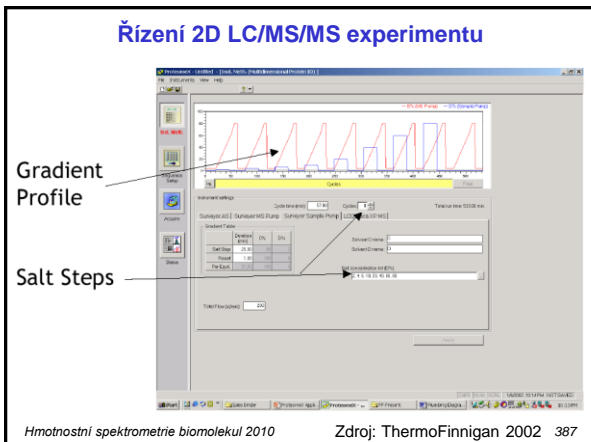


LC-ESI MS a MS/MS:

Dynamická analýza LC-ESI MS/MS (data-dependent analysis):

- Jeden MS sken následovaný několika MS/MS skeny hlavních precursorů
- V případě složitějších spekter i následující MS² skeny (např. pro detekci fosforylací)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010 389



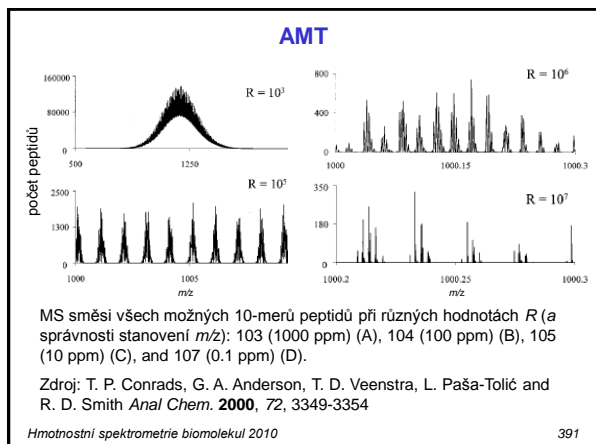
Accurate mass tag (AMT)

- Identifikace proteinu na základě znalosti správné hmotnosti jednoho fragmentu po enzymatickém štěpení
- Správné stanovení hmotnosti proteinu (typicky jednoho peptidového fragmentu z enz. štěpení) – stanovení m pomocí FT ICR MS

atom	¹ H	¹² C	¹⁴ N	¹⁶ O	³² S
m [Da]	1.007825	12.000000	14.003074	15.994915	31.972071

- Typický počet aminokyselin v řetězci peptidu ~ 10. Přesná hmotnost aminokyselin – např. $m_{mono}(G)=57.02146$, $m_{mono}(A)=71.03711$ atd.
- Při správnosti stanovení $m/z < 1$ ppm je vysoká pravděpodobnost, že dané hmotnosti peptidu odpovídá jediné složení aminokyselin – viz. následující obr.

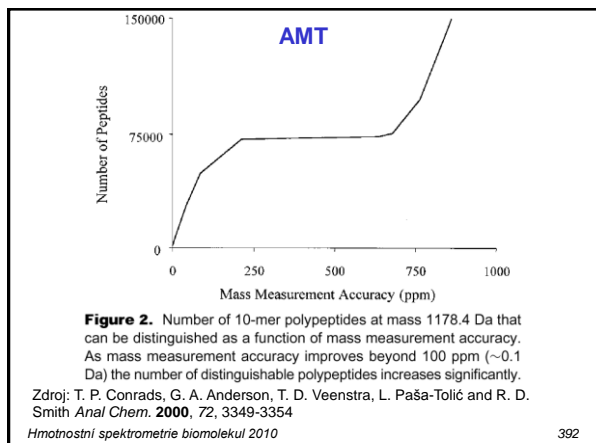
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010 390



Další strategie pro analýzu proteomu

- Nejsou pokusem o kompletní analýzu proteomu
- Spoléhají na kolonové separační techniky (místo 2D GE)
- Zahrnují zjednodušení výchozí směsi – výběr proteinů/peptidů, které obsahují např. cystein (ICAT), fosforylovanou aminokyselinu (IMAC) aj.
- Případné ztráty dané nekompletností analýzy nejsou dramatické a jsou vyváženy relativním zjednodušením směsi a kratší dobou analýzy
- Další přídavné prvky, např. použití izotopových značek, umožňují získat informaci o kvantitě analytu

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010 394



Využití izotopů v hmotnostní spektrometrii

Značení nestabilním izotopem

- použití v radiochemii

Značení stabilním izotopem

- běžně v hmotnostní spektrometrii
- Základní přístupy
 - použití izotopově značených vnitřních standardů
 - zabudování izotopově značených látek do organismů (vhodné pro dif. proteomiku nižších organismů)
 - derivatizace analytu izotopově značeným reagentem

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010 395



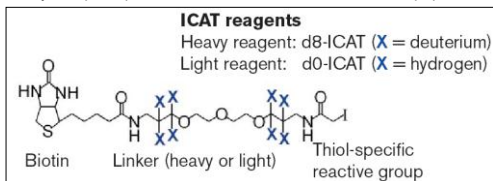
Některé zkratky v proteomice

GIST	Global Internal Standard Technology (^2H , ^{13}C , ^{15}N)
ICAT	Isotope-Coded Affinity Tags (cystein)
PhIAT	Phosphoprotein Isotope-coded Affinity Tag (fosforylované peptidy)
IMAC	Ion Metal Affinity Chromatography (afinitní záchyt fosfopeptidů)
AQUA	Absolute QUAntification (pomocí uměle syntetizovaných izotopicky značených peptidů jako interních standardů)
SILAC	Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture (růst kultury v normálním a obohaceném médiu)
MUDPIT	Multidimensional Protein Identification Technology (SCX – RHPIC – MS/MS)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010 396

Analyza ICAT (isotope-coded affinity tags)

ICAT ... isotope-coded affinity tags (R. Aebersold)
rozdíl v expresi proteinů stanovením relativních intenzit peptidů



1. Frakcionace proteinu
2. Enzymatické štěpení celého vzorku
3. Izotopové značení (ICAT)
4. Smíchání a MS analýza

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

397

Charakteristika ICAT

Výhody

- + Vhodná pro různé vzorky proteinů (tělesné tekutiny, buňky, tkáň, kultury)
- + Značné zjednodušení směsi
- + Kompatibilita s dalšími metodami vhodnými pro analýzu minoritních proteinů

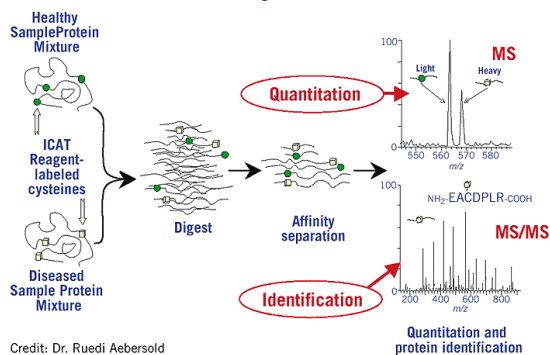
Nevýhody

- Relativně velká značka (~500 Da)
- Nevhodnost pro proteiny bez cysteinu (např. 8% u kvasinek)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

400

Analyza ICAT



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

398

Stanovení sekvence proteinu/peptidu

Klasická analýza

- Edmanovo odbourávání
- Určení koncových skupin (N, C)

Nedostatky: doba analýzy, relativně nízká citlivost

Současná strategie: kombinace více metod

- preparativní separace
- enzymatické štěpení
- MS
- MS/MS, ISF, PSD
- MSⁿ

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

401

Analyza ICAT

Pozn.

- Proteiny lze označit před enzymatickým štěpením (zámena kroku 2 a 3)

Nedostatky ICAT první generace

- Rozdíl *m* izotopových značek roven 8 ⇒ občas interference v MS/MS spektrech
- Nepatrně odlišná retence analytu označovaných lehkou a těžkou formou značky. Důsledek: poměr lehké a těžké formy nelze zjistit z poměru iontových intenzit během HPLC MS/MS; je třeba integrovat celý LC pik

ICAT druhé generace

- Použití 9 atomů ¹³C ve spojovacím řetězci (místo 8 atomů D)
- Stejný eluční čas lehké i těžké formy v HPLC

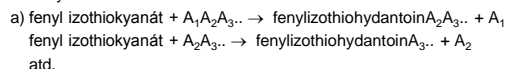
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

399

Stanovení sekvence peptidu MS

Kombinace chemického štěpení a MS

1. Tvorba směsi peptidových fragmentů lišících se o jednu aminokyselinu chemickou cestou:



atd.

fenylizokyanát v malém množství jako terminační činidlo tvoří malou frakci fenylkarbamátu od každého peptidu

- b) alternativní strategie je založena na použití karboxypeptidázy po různé dlouhou dobu nebo v různých množstvích ⇒ vznik několika směsí peptidů

2. MALDI MS směsi fragmentů peptidů.

- aminokyselina je určena ze vzdálenosti sousedních piků, sekvence aminokyselin z pořadí piků

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

402

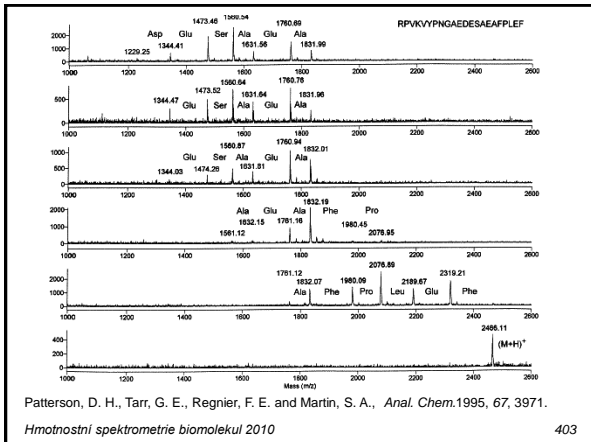
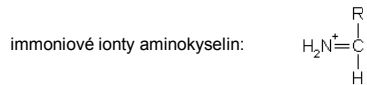
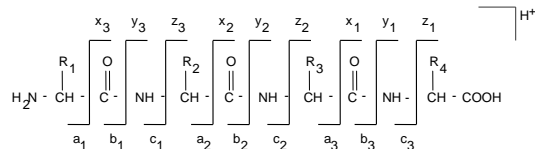


Schéma fragmentace peptidu a značení fragmentů.



Roepstorff & Fohlman, *Biomed. MS* 1984, 11, 601.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

406

Stanovení sekvence peptidu MS/MS

CID

- nízkenergetická CID je v souč. nejrozšířenější metoda fragmentace
- IT, TQ, QTOF

ISD

- vyžaduje izolaci čisté látky
- MALDI TOF

PSD

- horší kvalita spekter než z CID, často nutno spojovat spektrum z více částí
- MALDI TOF

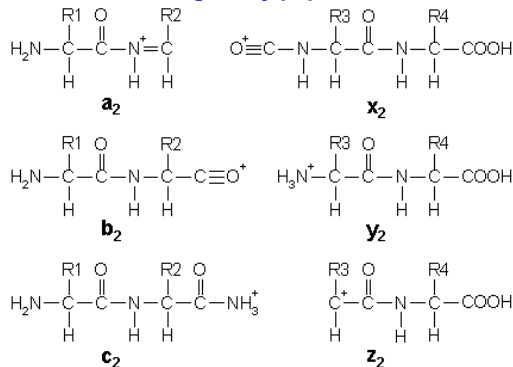
Pozn.

- vysokoenergetická CID, SID, fotodisociace, disociace po nárazu elektronu nejsou používány rutinně
- Leu/Ile ... izomery, Gln/Lys ... izobary

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

404

Fragmenty peptidů



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

407

Fragmentace peptidů

Fragmentace 1 nebo 2 vazeb peptidového řetězce

- fragmenty obsahující N terminál (a, b, c)
- fragmenty obsahující C terminál (x, y, z)
- tyto ionty mohou vzniknout i fragmentací 2 vazeb řetězce
- ztráta NH₃, H₂O, CO₂

Fragmentace bočního řetězce (zbytku aminokyseliny)

- obvykle ztráta části bočního řetězce aminokyseliny
- fragmenty typu d, w, v

Vnitřní fragmenty

- neobsahují N ani C terminál ... menší analytický význam

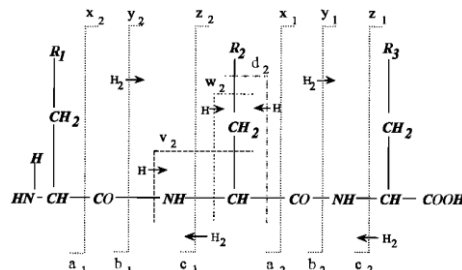
Immoniové ionty

- užitečná informace o aminokyselinách; $m(IM) = m(AKres) - 27$

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

405

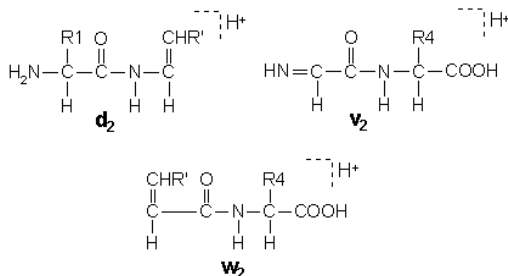
Schéma fragmentace peptidu a značení fragmentů.



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

408

Další fragmenty peptidů



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

409

CID fragmentace

Typy iontů v CID

- série píků iontů **b** a **y**
- doprovodné píky
 - 17, ztráta NH_3 z Gln, Lys, Arg
 - 18, ztráta H_2O ze Ser, Thr, Asp, Glu
 - a (tj. b – 28), satelitní série fragmentů typu b (ztráta CO)
- immoniové ionty aminokyselin.
- interní fragmenty – zejm. od Pro ve směru C konce

Výběr prekurzoru v CID MS/MS:

$$z = 2: [\text{M}+2\text{H}]^{2+}$$

Ion s dvěma náboji poskytuje CID spektra vyšší kvality než při $z = 1$ a 3

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

412

aminokyselina	m (mono)	m (immonium)	m (doprovodné ionty)
A	71.03712	44	
R	156.10112	129	59,70,73,87,100,112
N	114.04293	87	70
D	115.02695	88	70
C	103.00919	76	
E	129.04260	102	
Q	128.05858	101	56,84,129
G	57.02147	30	
H	137.05891	110	82,121,123,138,166
I	113.08407	86	44,72
L	113.08407	86	44,72
K	128.09497	101	70,84,112,129
M	131.04049	104	61
F	147.06842	120	91
P	97.05277	70	
S	87.03203	60	
T	101.04768	74	
W	186.07932	159	77,117,130,132,170,171
Y	163.06333	136	91,107
V	99.06842	72	41,55,69

m ... reziduum

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

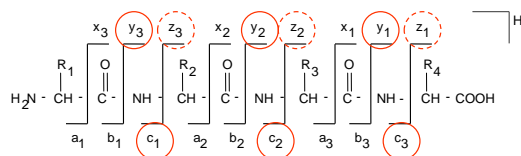
410

ISD fragmenty

Pravidla fragmentace ... dle relativní pevnosti vazeb.

Typické produkty fragmentace peptidů:

c, y, z



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

413

Výpočet molekulové hmotnosti peptidu/proteinu

Suma hmotností reziduí aminokyselin

+

Hmotnost koncových skupin:

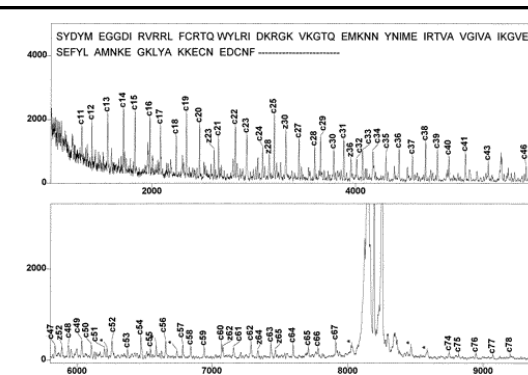
obvykle 1 Da (H) pro N konec (- NH_2)
a 17 Da (OH) pro C konec (-COOH)

+

Hmotnost protonu 1 Da – iont většinou ve formě $[\text{M}+\text{H}]^+$
(ale i 23 Da pro produkt $[\text{M}+\text{Na}]^+$ atd.)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

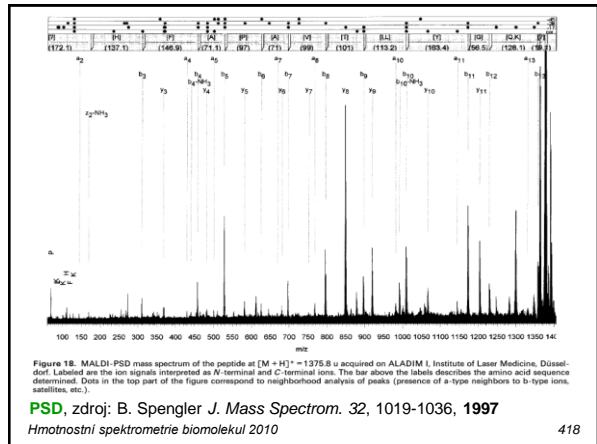
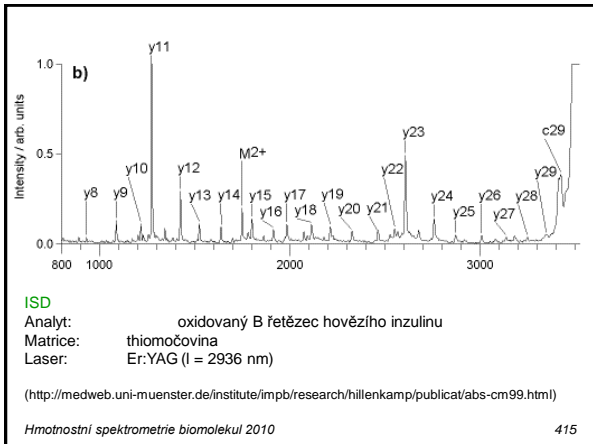
411



ISD. Analyt: 20 pmol KGF analogu. Matrice: kyselina sinapová. Laser: N_2 .
(V. Katta, D. T. Chow, M. F. Rohde *Anal. Chem.*, **70**, 4410-4416, 1998.)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

414

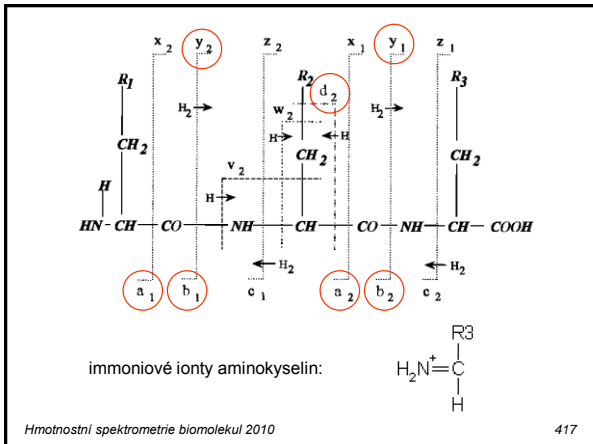
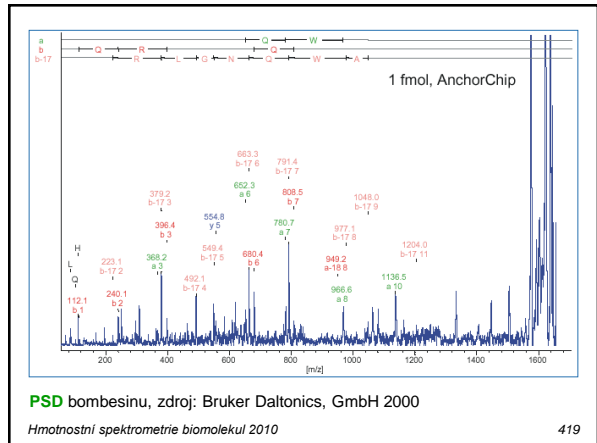


PSD fragmenty

Typické produkty fragmentace peptidů: a, b, y, z, d.
 Doprovodné píky -17 (ztráta NH₂) a -18 (ztráta H₂O).
 Immoniové ionty aminokyselin.
 Interní ionty – zejm. od Pro ve směru C konce

(B. Spengler *J. Mass Spectrom.* 32, 1019-1036, 1997)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010 416



Další typy disociace

Electron capture dissociation, ECD
 Zubarev, R. A.; Kelleher, N. L.; McLafferty, F. W. Electron Capture Dissociation of Multiply Charged Protein Cations - a Nonergodic Process *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 3265-3266.
 McLafferty, F. W.; Turecek, F. Interpretation of Mass Spectra; Fourth ed.; University Science Books: Mill Valley, CA, 1993.

Poskytuje odlišné, často komplementární fragmenty ve srovnání s CID a PSD

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010 420

Vyhodnocení MS/MS spekter peptidů

Manuální a semiautomatická dedukce sekvence

- lokalizace iontových sérií typu *b* a *y* (doprovodná série *a*)
- identifikace immoniových iónů
- identifikace vnitřních fragmentů
- interpretace komplikována výskytem dalších fragmentů
- ne každý peptid po štěpení trypsinem má R a K na C-konci (nespecif.)
- ... stanovení sekvence neznámého peptidu z CID je často nemožné

Automatické stanovení sekvence

- MS/MS spektrum neznámého peptidu porovnává s databází počítačem vygenerovaných spekter všech možných peptidů, které mají hmotnost prekurzoru
- algoritmus Sequest (J. R. Yates III et. al., 1994)
- ... mnohem úspěšnější než deduktivní přístup

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

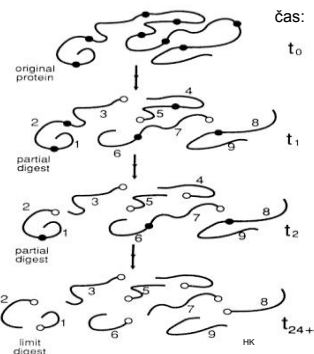
421

Sekvenování proteinu

Př.: využití různě dlouhé doby štěpení se značením terminálu.

Zjištění terminálu:
hydrolyza v $H_2^{18}O$
(C-terminál nebude označen)

Pozn.: výměnná reakce však může probíhat i na C terminálu



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

424

Sekvenování proteinu

Postup

1. Enzymatické štěpení

- tvorba více druhů digestů, aby vznikly různé, překrývající se štěpy
- různě dlouhá doba štěpení
- různé enzymy (trypsin, V8)
- nahodilé štěpení, "shotgun sequencing"

2. Zjištění (alespoň částečné) sekvence štěpů

RPHPLC ESI MS/MS

3. Dedukce sekvence pomocí počítače

celková sekvence stanovena z kombinace sekvencí peptidů

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

422

Detekce mutací

Detekce záměny nebo absence aminokyselin(y) v řetězci proteinu

Postup:

1. Enzymatické štěpení
2. Analýza spekter
 - chybějící peptidy
 - nadbytečné peptidy
3. MS/MS analýza neznámých (nadbytečných) peptidů a jejich srovnání s normálními proteiny/peptidy, analýza posunu pík

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

425

Pomocné metody při sekvenování

Hydrolyza proteinu v $H_2^{18}O$

zjištění terminálu: C-terminál nebude označen

Hydrolyza proteinu ve směsi $H_2^{18}O$ a $H_2^{16}O$ (1:1)

1. MS: dublety tryptických štěpů (vyjma fragmentů s C-koncem proteinu)
2. MS/MS: oba dubletové piky peptidů vybrány jako prekurzor pro MS/MS; pouze štěpy obsahující C konec peptidu budou ve formě dubletu ... přehlednější spektra

Esterifikace (methylace) karboxylových skupin peptidu

$\Delta m = +14$ / karboxylovou skupinu ($-COOH \rightarrow -COOCH_3$)
porovnání spekter původního a methylovaného peptidu
obdobná technika založena na derivatizaci aminoskupin peptidu

Pozn. 1: výměnná reakce však může probíhat i na C terminálu

Pozn. 2: vznikají složitější izotopové patery s hmotnostmi M ($2x^{16}O$), M+2 ($1x^{16}O, 1x 2x^{18}O$) a M+4 ($2x^{18}O$).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

423

Post-translační modifikace (PTM)

- modifikace po přenosu RNA \rightarrow protein uskutečněném na ribozomu
- nedají se objasnit na základě znalosti genomu
- souvisejí významně s funkcí proteinu
- popsáno více než 200 typů PTM (databáze Delta Mass)
- často pouze malá část proteinu modifikována \Rightarrow citlivost
- vyžaduje selektivní izolaci peptidů s modifikovanou aminokyselinou
- vazba mezi peptidem a mod. skupinou často slabá

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

426

Post-translační modifikace (PTM)

Běžné PTM:

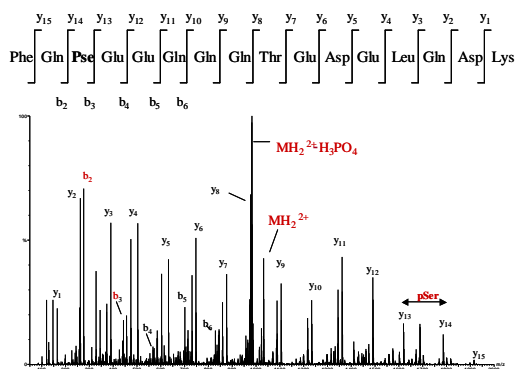
- fosforylace
- glykosylace
- acylace (acyly mastných kyselin, acetyl)
- připojení glykosylfosfatidyl inositolu
- produkty proteolýzy
- karboxylace (kyseliny glutamové)
- deamidace asparaginu a glutaminu

Některé modifikace mohou být značně složité, např. oligosacharidové modifikace glykoproteinů (mnoho druhů cukrů a mnoho míst proteinu, na která se cukry mohou navazovat – O, N). K objasnění slouží kombinované metody používající MSⁿ a enzymatické štěpení (N-glykosidáza, O-glykanáza atd.).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

427

Př.: ESI MS/MS oligopeptidu s monofosforylovaným serinem

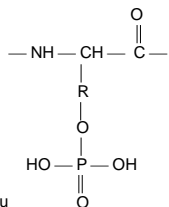


Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

430

Fosforylace

- reversibilní PTM související s regulačními mechanismy v buňce
 - monoesterická vazba skupiny kyseliny fosforečné k hydroxyly v bočním řetězci
1. serinu (167 Da)
 2. threoninu (181 Da)
 3. tyrosinu (243 Da)



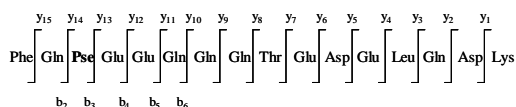
MS/MS identifikace fosforylace

1. Ztráta H_3PO_4 (neutral loss scan: 98 Da) obvykle poskytuje též iont $[\text{M}+\text{H}-98]^+$
2. Detekce iontu PO_3^- (79 Da) v negativním modu skenování výchozích látek pro m/z (produkt) = 79
Další neg. ionty: H_2PO_4^- (97 Da), PO_2^- (63 Da)
3. Posuny píků fragmentů v MS/MS spektrech

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

428

Př.: ESI MS/MS oligopeptidu s monofosforylovaným serinem



Zdroje informací:

1. Molekulární píky MH_2^{2+} a $(\text{M} - \text{H}_3\text{PO}_4)\text{H}_2^{2+}$, rozdíl $\Delta m = 98$ ($\Delta m/z = 49$)
2. b-ionty: $\Delta m/z (b_3-b_2) = 167$
3. y-ionty: $\Delta m/z (y_{14}-y_{13}) = 167$

(kredit: K. R. Jennings)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

431

Fosforylace

Postup při identifikaci:

1. Příprava proteolytické směsi peptidů (obsahující fosfopeptidy)
2. Oddělení fosfopeptidů např. HPLC, CE, afinitní chromatografií, např. *Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC)*, viz. Porath, J. *Protein Expression Purif.* **1992**, 3, 263.
3. MS/MS analýza fosfopeptidů

Relativně stabilní monoesterická vazba

⇒ posun píků v MS/MS spektrech ($\Delta m = + 80$ Da)

aminokyselina	M (zbytek)	M (monoester H_3PO_2)
serin	87	167
threonin	107	187
tyrosin	163	243

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

429



11

Analýza S-S můstků. Proteiny. MS databáze.
Aplikace: DNA, sacharidy, syntetické polymery.

Analyza disulfidových můstků

cystein (-SH) → cystin (-S-S-), intra- a inter- molekulární můstky

Počet cysteinů – pomocí alkylace cysteinu

- např. alkylace jednoho cysteinu vinylpyridinem zvýší hmotnost proteinu o 105 Da → počet cysteinů = $\Delta m/105$

Lokalizace cysteinů v proteinovém řetězci

Enzymatické štěpení a rozdělení digestu na 2 alikvoty:

1. alikvot ... MS analýza
 2. alikvot ... redukce -S-S- (např. dithioerythritolem) a následná MS analýza
- Porovnání 2. spektra s 1. spektrem:
1. $\Delta m = 2$ Da → peptid s **intramolekulární** -S-S- vazbou
 2. první pík zmizí, dva další s nižší *m/z* se objeví → **intermolekulární** můstek mezi 2 peptidy

Znalost sekvence aminokyselin (MS-MS) umožní přesnou lokalizaci -S-S- můstků v proteinovém řetězci.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

433

Příklady: nanosprej MS

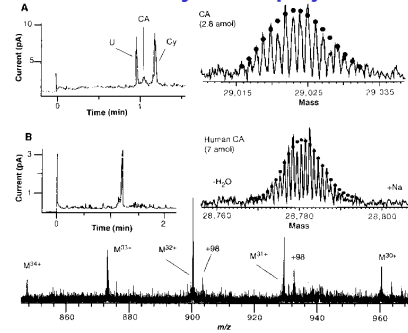


Fig. 1. Total ion electrospray chromatograms (left) from (A) a mixture of 1 μ M cytochrome c (Cy) and 1 μ M carbonic anhydrase (CA) and (B) 7 μ M human CA from a crude blood isolate. Mass spectra (at right) of (A) and (B) the deconvoluted isotopic regions and (B) (bottom) m/z 860 to 970 from subsequent injections (B) at 63 V/min representing (A) 5.0×10^{-10} mol of bovine CA and (B) 7.1×10^{-10} mol of human CA.

CA = carbonic anhydrase, Cy = cytochrome
Valaskovic, G. A.; Kellerer, N. L.; McLafferty, F. W. *Science* 1996, 273, 1199.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

436

Vliv S-S můstků při ESI-MS

Struktury lysozymu (β -sheet a α -helix) stabilizovány 4 S-S můstky

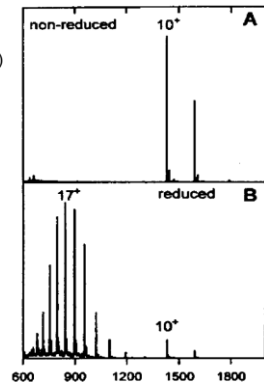
Redukce 1,4-dithioerythritolem (DTT) odstraní S-S můstky

↓

„Unfolded“ protein s více obnaženými bazickými rezidui aminokyselin

↓

Vyšší počet nábojů iontu



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

HK 434

Nekovalentní interakce

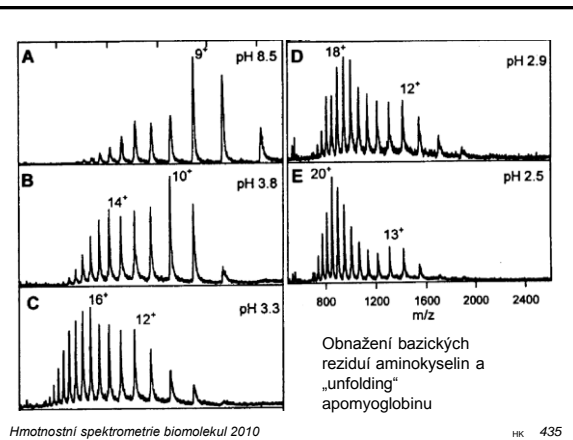
- Interakce s nízkomolekulárními ligandy (+ionty kovů), jinými proteiny, oligomery atd.
- Není vždy jasný vztah mezi výskytem komplexu v (g) a (l)
- Komplexy disociují během ionizace a MS analýzy

Př.

1. Komplexy hovězího hemoglobinu se stabilizují ve formě tetrameru vazbami (cross-linking) s glutaraldehydem (přemostění mezi lisylovými rezidui). Poté MALDI MS (viz obr. dále)
2. ESI pro komplexy proteinu s ligandy (např. metaloproteiny s léky) díky šetrné ionizaci, která sotva stačí k odstranění vody. Obtížnější je výzkum interakce mezi 2 proteiny – použití měkčích extrakčních podmínek, příhodných podmínek pro tvorbu komplexů v roztoku

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

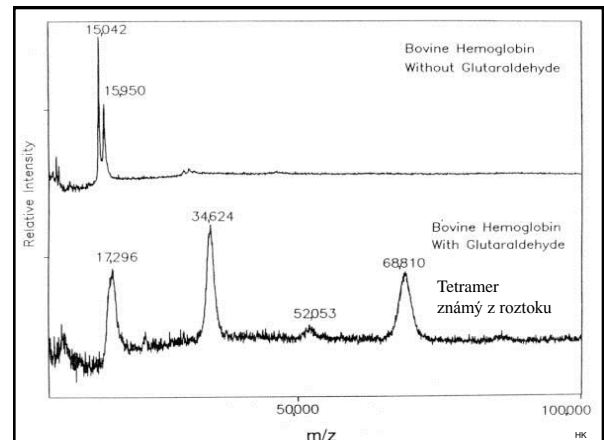
437



Obnažení bazických rezidui aminokyselin a „unfolding“ apomyoglobinu

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

HK 435



Vědecké databáze na internetu

Uvedené databáze jsou pouze příklady, ne plný výčet.

NCBI (National Center for Biotechnology Information)

database Medline: www.ncbi.nlm.nih.gov

Scirus: www.scirus.com

ScienceDirect: www.sciencedirect.com

Databáze pro organickou chemii

NIST Chemistry WebBook (NIST)

Spectra Online (ThermoGalactic)

Spectral Data Base System, SDBS (NI AIST)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

439

Další pomůcky na internetu

Pomůcky

MS-Comp – návrh možných kombinací aminokyselin, tabulka hmot dipeptidů

MS BLAST 2 – krátké sekvence (6 aminokyselin)

BLAST a FASTA – proteinové homology

GlycoSuite DB, GlycoSciences - analýza sacharidů

Další programy

Kalkulátory hmotností (GPMaw, SHERPA, PAWS, MW Calculator)

aj.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

442

Vědecké databáze na internetu

Internetové zdroje pro identifikaci proteinů pomocí MS metod

- Eidgenössische Technische Hochschule (MassSearch) www.cbgr.inf.ethz.ch
- European Molecular Biology Laboratory (PeptideSearch) www.mann.emblheidelberg.de
- Swiss Institute of Bioinformatics (ExPASy) www.expasy.ch/tools
- Matrix Science (Mascot) www.matrixscience.com
- Rockefeller University (PepFrag, ProFound) prowl.rockefeller.edu
- Human Genome Research Center (MOWSE) www.seqnet.dl.ac.uk
- University of California (MS-Tag, MS-Fit, MS-Seq) prospector.ucsf.edu
- Institute for Systems Biology (COMET) www.systemsbio.org
- University of Washington (SEQUEST) thompson.mbt.washington.edu/sequet

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

440

MS nukleových kyselin a oligonukleotidů

- Ionizace: obvykle vyšší výtěžek negativních iontů. Analýza typicky v negativním módu.
- Ionizační technika: **MALDI** (obvykle IR MALDI)
- Méně úspěšná než v případě proteinů a peptidů
- Vyšší stupeň fragmentace a více aduktů
- Důkladné odsolení ... prevence tvorby četných aduktů se sodíkem.
- MALDI těžkých DNA (>100 kDa): lineární přístroj, IR laser, pulsní extrakce

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

443

Vědecké databáze na internetu

Další odkazy:

UMIST (pepMAPPER) wolf.bms.umist.ac.uk/mapper

European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg (PeptideSearch) www.narrador.embl-heidelberg.de

Scripps, ThermoFinnigan (Sequest) fields.scripps.edu/sequest/

Proteometrics (MS/MS Sonar) www.proteometrics.com

Proteinové (peptidové) databáze

Genpept – NCBI GenBank

NBRF - National Biomedical Research Foundation

Swissprot - Swiss Institute of Bioinformatics

Owl - Leeds Molecular Biology Database Group

Delta Mass - databáze posttranslačních modifikací proteinů

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

441

MALDI MS nukleových kyselin a oligonukleotidů

Typické matrice

3-hydroxypikolinová kyselina

2',4',6'-trihydroxyacetofenon

pikolinová kyselina

Typické aplikace

- charakterizace syntetických a biologických oligonukleotidů (stanovení m)
- analýza produktů PCR, analýza mutací (záměna bází)
- DNA sekvenování
 - Sangerovo sekvenování (klasická metoda)
 - Sekvenování pomocí exonukleázy
 - Fragmentace (v plynné fázi)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

444

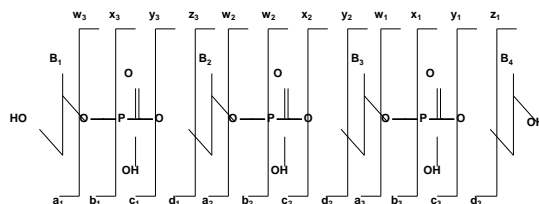
MS nuklevých kyselin a oligonukleotidů

- MALDI MS spektra velmi těžkých NA (>2 tisíce nukleotidů)
- správnost určení $m < 1\%$... nejlepší ze současných metod
- výborná citlivost metody: < 1 fmol

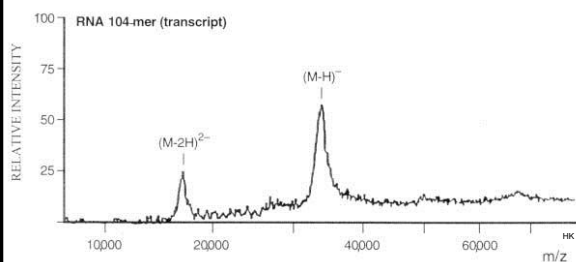
Berkenkamp, S; Kirpekar, F; Hillenkamp, F *Science* **1998**, *281*, 260-262.

Fragmentace oligonukleotidů v plynné fázi

Schéma fragmentace oligonukleotidů v plynné fázi a značení fragmentů



IR MALDI MS ribonukleové kyseliny



Analýza sacharidů

- Měkké ionizační metody: MALDI, ESI. MS^n pro stanovení sekvence a struktury
- Použití enzymů k částečnému štěpení sacharidů před MS analýzou
- Běžné monosacharidy: glukóza, manóza, galaktóza, fukóza, N-acetylglukosamin, N-acetylgalaktosamin a N-acetylneuraminová kyselina (sialic acid).
- Stanovení úplné struktury oligosacharidů je obtížnější než u proteinů a nukleových kyselin
 - důsledek izomerické povahy stavebních kamenů a jejich možného větvení.
 - k objasnění struktury nestačí jen znalost stavebních jednotek a jejich pořadí, ale též způsob větvení, poloha větve a optická konfigurace každé glykosidické vazby

Sekvenování NA pomocí exonukleázy a MALDI MS

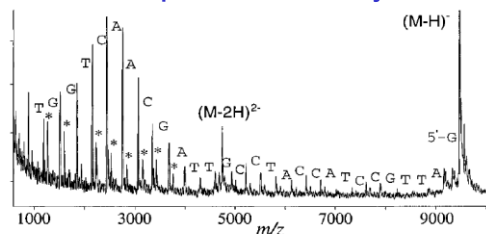
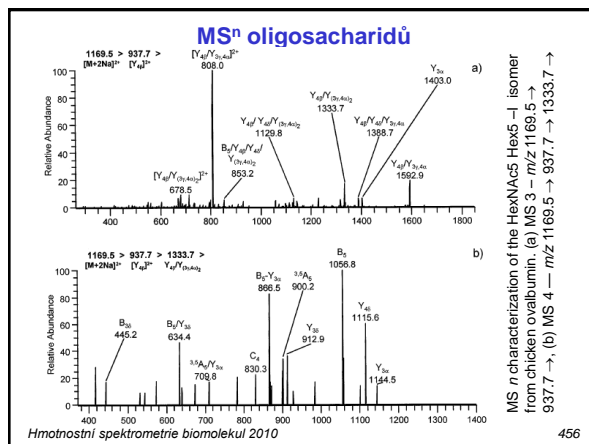
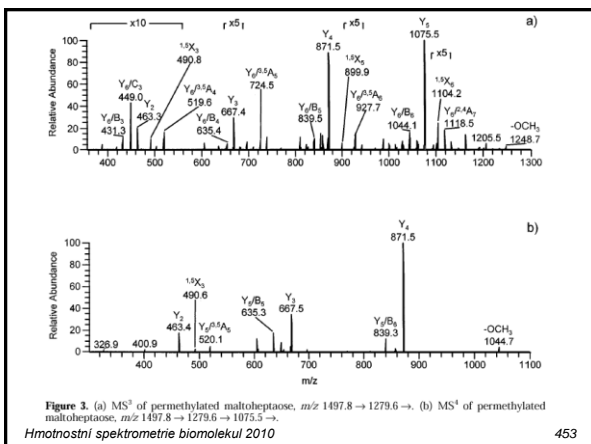
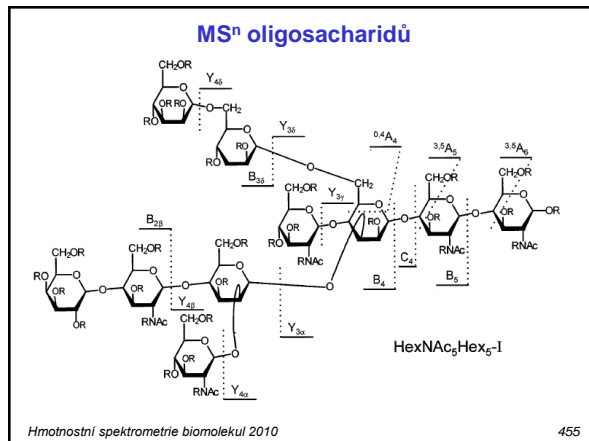
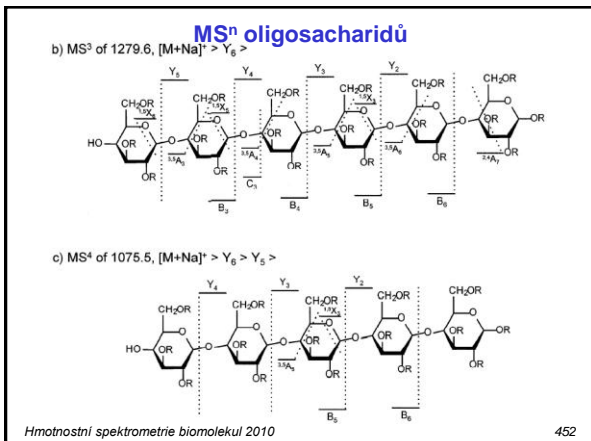
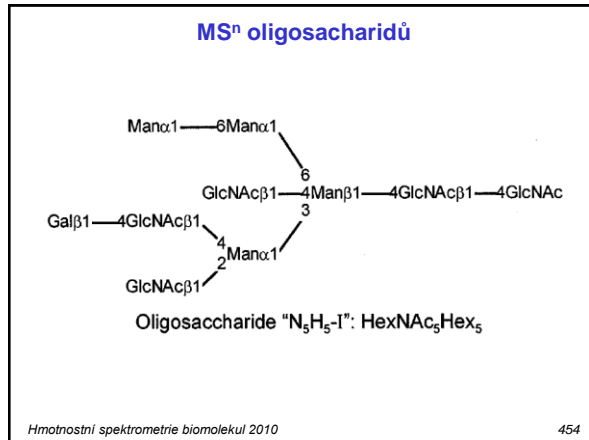
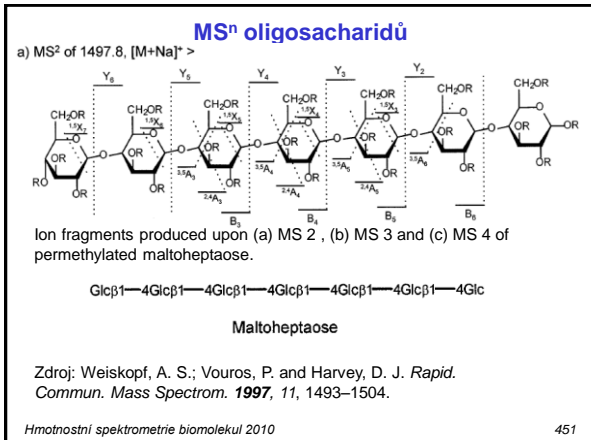


Figure 4. DE MALDI mass spectrum of a crude synthetic DNA 31-mer ($M_r = 9486.2$ calculated). Mass measurements on the failure products define the sequence up the 3' trinucleotide (see Table 1). Asterisks indicate +80-Da satellite peaks: instrument, 1.3 m linear; matrix, 3-HPA.

Zdroj: Juhasz, P.; Roskey, M. T.; Smirnov, I. P.; Haff, L. A.; Vestal, M. L.; Martin, S. A.; *Anal. Chem.* ; **1996**, *68*(6); 941-946

Nomenklatura MS/MS oligosacharidů

- Nomenklatura MS fragmenty s nábojem na neredukující straně: A, B a C; fragmenty s nábojem na redukující straně X, Y a Z podle toho zda štěpí hruh nebo glykosidickou vazbu.
- Spodní index u fragmentů B, C, Y a Z iontů udává počet rozštěpených glykosidických vazeb, horní levý index u fragmentů A a X udává vazby, které byly rozštěpeny. Spodní indexy a, b atd. udávají štěpenou větev u větvených sacharidů.
- Fragmenty B, C, Y a Z spolu s rozdílem hmotností lze použít k určení sekvence a větvení.
- MS umožňuje určení optické izomerie glykosidické vazby. Metoda je založena na selektivní oxidaci CrO_3 β -anomeru derivatizovaných hexóz za vzniku ketoesteru.



Lipidy

Mastné kyseliny, acylglyceroly, deriváty cholesterolu, fosfolipidy a glykolipidy

FAB, DCI (desorpční chemická ionizace) MALDI

Negativní mód ($[M-H]^-$ ionty)

Fragmentace

fosfolipidový anion
fragmentsy sacharidů

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

457

Další témata

(pro zájemce; ne ke zkouškám)

Fragmentace – chemie reakcí v plynném skupenství

Izotopové zředění/obohacení, kvantifikace v MS

Preparativní MS, historie: příprava ^{235}U

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

460

Analýza syntetických polymerů

MALDI TOFMS

vysoká M_{max} , jednoduchá spektra, počet nábojů $z = 1$
alternativa GPC

Analýza

Stavební jednotka (monomer)
Koncové skupiny
Absolutní molekulová hmotnost
Polydisperzita (střední m , rozptyl m)

Komplikace

Tvorba aduktů s Na^+ , K^+
Hmotnostní diskriminace ... ionizační i detekční účinnosti = $f(m)$
Správná transformace z časové do hmotnostní domény

Příklad: Carman Jr, H.; Kilgore, D.; Eastman Chemical Company, USA,
ASMS 1998

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

458

12 Otázky & konzultace



V. Otázky & konzultace

Jan Preisler
Ústav chemie, Komenského nám. 2, kancelář č. 148
tel.: 54949 6629, preisler@chemi.muni.cz

Aktualizovaný studijní materiál ke stažení ve formátu pdf:
<http://bart.chemi.muni.cz/courses/>

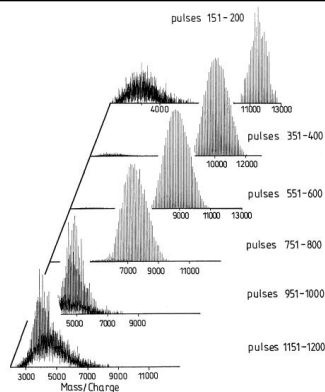
Další konzultace v mé kanceláři.

Termíny zkoušek

Prosinec?
Ledén.
Únor?

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

462



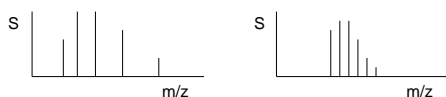
MALDI-TOF spectra of fractions from SEC separation of PMMA 10 900, on-line SEC-MALDI-TOF analysis, matrix: dihydrool, LiCl.
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

459

Zdroj: Esser, E. et al. *Polymer* 2000, 41, 4039-4046

Otázky

1. Srovnajte MALDI a ESI (výhody vs. nevýhody).
2. Co můžete říci o 2 různých spektrech téhož peptidu? (Počátek osy m/z nezačíná v nule, měřítko os jsou různá.)



3. Pro 2 sousední píky téže látky v ESI-hmotnostním spektru byly změřeny tyto hodnoty: $(m/z)_1 = 1000.3$ a $(m/z)_2 = 1500.1$. Určete nominální m analytu.
4. Doba letu iontu $C_2H_8O_2N^+$ v TOFMS je $14.8 \mu s$. Jaká je hmotnost iontu, který dorazil k detektoru za $8.94 \mu s$? O jaký iont může jít?
5. Jaké veličiny mají vliv na rozlišení v TOFMS? Pozitivní nebo negativní vliv?
6. Porovnejte počty iontů, které mohou být detegovány během záznamu jednoho spektra v FT-ICR-MS a v kvadrupolovém filtru?

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

463

Otázky

19. Na grafu počtu peptidů vs. správnost měření m/z (metoda AMT, obr. 301) vysvětlíte přítomnost plata mezi 200 a 700 ppm.
20. Srovnajte výhody a nevýhody 2DGE a kolonových separačních technik v proteomice.
21. Které parametry hmotnostního spektra se mohou zlepšit, budeme-li zaznamenávat signál z a) FT ICR MS, b) TOF MS, c) IT déle?
22. Proč je v hmotnostním spektrometru vakuum?
23. Co je nejvýznamnějším omezením rozlišení v MALDI TOF MS? Vysvětlete princip technik vedoucích k vyššímu rozlišení MALDI TOF MS.
24. Jaký je rozdíl mezi jednotkami u, Da a Th?
25. Jaký je rozdíl mezi energetickou a rychlostní disperzí iontů?
26. Ve které části TOFMS se tvoří analyticky významné fragmenty během a) MALDI ISD, b) MALDI PSD?

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

466

Otázky

7. Proč je výhodné použít při měření izotopového poměru daného prvku přístroj, který stanovuje oba izotopy zároveň?
8. Lze použít kvadrupolový filtr ke stanovení proteinu o hmotnosti 30 000 Da?
9. Jakou ionizační metodu a jaký hmotnostní spektrometr navrhuje použít k:
 - a) detekci výbušnin na letišti
 - b) sekvenování malých peptidů
 - c) semikvantitativnímu rychlému stanovení ~70 prvků v geologickém vzorku
 - d) identifikaci elementárních nečistot v tenké povrchové vrstvičce vzorku
10. Jaký je původ lorentzovského profilu píků v FT-ICR-MS?
11. Jaká je vzájemná orientace ekvipotenciální hladiny U a vektoru intenzity elektrického pole E ?
12. Jaký bude rozdíl rychlosti dvou iontů o $m = 100$ a.m.u., $z = 2$, počáteční rychlosti $v_{01} = 100$ m/s a $v_{02} = 200$ m/s po urychlení potenciálem 1 kV a 10 kV?

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

464

Otázky

13. Existuje praktický limit maximální m/z TOF MS?
14. Srovnajte možná uskalí stanovení peptidů a oligomerů DNA pomocí MS.
15. Máte analyzovat peptidy v polévce. Co nebudete přidávat do polévky před MS analýzou? Jak polévku upravíte a jakou ionizační techniku použijete?
16. Který z detektorů je vhodnější pro iontovou past: MCP, channeltron, elektronový násobič, fotografická deska nebo Faradayův pohár?
17. Jaký je vliv časové disperze (tvorby iontů během delší doby) na rozlišení iontové pasti?
18. Jaká je m aminokyseliny A, jejího rezidua (v peptidovém řetězci) a jejího immoniového iontu?

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2010

465