

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

Jan Preisler

Oddělení analytické chemie Ústavu chemie, 312A14, PfF UKB MU
tel.: 54949 6629, preisler@chemi.muni.cz

Kurs C7895 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 (TOF, iontové a orbitální pastě) a nejnovější vývoj v oboru.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

1



Úvod do hmotnostní spektrometrie. Stručná historie hmotnostní spektrometrie: přehled metod a instrumentace. Základní koncepty MS (rozišení, citlivost).

Ionizační metody a metody zavádění vzorku: Elektronová ionizace (EI)

4

Plán přednášek

Přednášky se konají online v úterý 10:00-11:50, případné změny budou ohlášeny předem.

Plán přednášek „Sylabus C7895 MSBio 2020.pdf“, učební materiál „MS Bio CZ 2020.pdf“ a „MS Bio ENG 2018.pdf“ jsou k dispozici na <http://bart.chemi.muni.cz/index.php/cs/teaching>

Učební materiál je pouze osnovou k probírané látce. Doporučuji si jej tisknout postupně předem a doplňovat do něj poznámky na přednášce. Učební materiál i sylabus mohou být průběžně aktualizovány.

Doplňkové učebnice:

- <http://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php>
- Chem. Listy 114, 126–132 (2020)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

2

2

I. Úvod

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

5

5

Obsah

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

3

3

Studijní materiál

Poznámky z přednášek

Materiály použité při přednášce lze stáhnout z informačního systému nebo <http://bart.chemi.muni.cz>

a používat při přednášce.

Neexistuje souhrnná česká učebnice nebo skripta moderní hmotnostní 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 spektrometrie biomolekul

6

6

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

7

7

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...

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

10

10

Ionizační metody a metody zavádění vzorku

Doutnavý výboj (GD)

Elektronová ionizace (EI)

Chemická ionizace (CI)

Indukčně vázané 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, čipy).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

8

8

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



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

11

11

Hmotnostní spektrometry

Základy iontové optiky. Simulace pohybu iontů, Simion

Energetické analyzáto

Magnetický sektor

Kvadrupolový analyzáto

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)

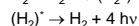
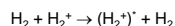
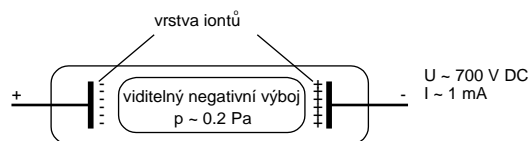
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

9

9

Doutnavý výboj jako iontový zdroj

1880's Crookes: doutnavý výboj



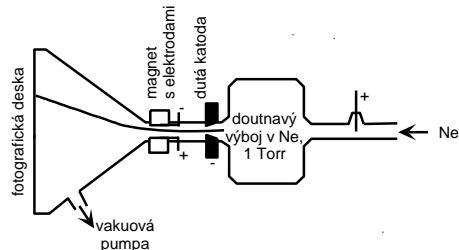
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

12

12

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

13

13

Stručná historie MS ve zbytku 20. stol.

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

1950-70 MS používáno ke strukturální analýze organických sloučenin

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

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

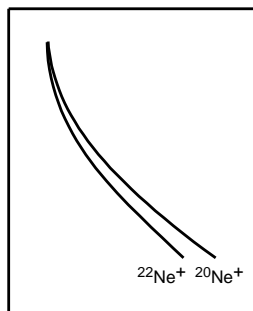
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

16

16

První hmotnostní spektrometr

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



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

14

14

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 vakuuum)
4. Řídicí a vyhodnocovací elektronika, software

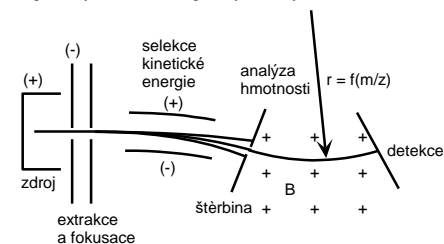
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

17

17

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 mrtvá, vše hotovo ..."

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

15

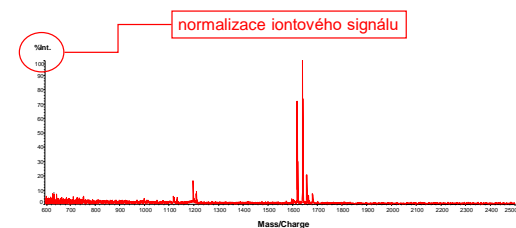
15

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

18

18

Hmotnostní spektrum

Hmotnost, m

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

m/z - účinná hmotnost, Th (Thomson)

Počet nábojů, z

počet elementárních nábojů iontu
obvykle ± 1
výjimky, např. elektrosprej: $|z| \gg 1$

lonty: pozitivní a negativní, ne kationty a anionty.

Hmotnostní spektrometrie, ne spektroskopie.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

19

19

Použité zkratky

n	číslná koncentrace (m^{-3})
I	proud (A), tok (m^{-2})
T	teplota (K)
p	tlak (Pa, Torr)
R	rozlíšení (-)
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

22

22

Vybrané veličiny v hmotnostní spektrometrii

Hmotnostní rozlišení

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

20

20

Izotopové patery 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

23

23

Použité zkratky

m	hmotnost molekuly (u, a.m.u., Da)
z	počet náboj; (-)
m/z	účinná hmotnost (Th, Thomson), <i>slang</i> : hmotnost, hmota
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	redukovaná hmotnost (a.m.u., Da, kg)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

21

21

Izotopové patery organických molekul

Relativní výskyt molekul v %:

C_{60} :	$^{12}\text{C}_{60}$	100
	$^{12}\text{C}_{59}^{13}\text{C}$	66
	$^{12}\text{C}_{58}^{13}\text{C}_2$	21
C_{100} :	$^{12}\text{C}_{57}^{13}\text{C}_3$	4.6
	$^{12}\text{C}_{100}$	100
	$^{12}\text{C}_{99}^{13}\text{C}$	110
	$^{12}\text{C}_{98}^{13}\text{C}_2$	60
	$^{12}\text{C}_{97}^{13}\text{C}_3$	22

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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

24

24

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

$R = 20\ 000$

$C_{30}H_{45}N_6O_6S$

$C_{60}H_{90}N_{12}O_{12}S_2$

$C_{90}H_{135}N_{18}O_{18}S_3$

$C_{180}H_{270}N_{36}O_{36}S_6$... navíc ukázán pro různou R

$C_{270}H_{405}N_{54}O_{54}S_9$

$C_{360}H_{540}N_{72}O_{72}S_{12}$

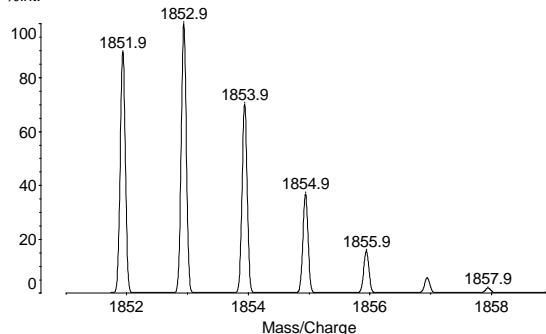
$C_{900}H_{1350}N_{180}O_{180}S_{30}$

$C_{1800}H_{2700}N_{360}O_{360}S_{60}$

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

25

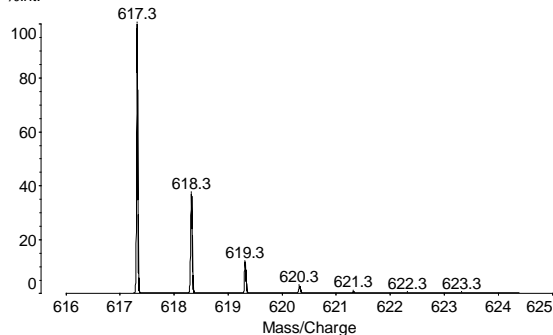
Molecular formula: $C_{90}H_{135}N_{18}O_{18}S_3$ Resolution: 20000 at 50%
%Int.



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

28

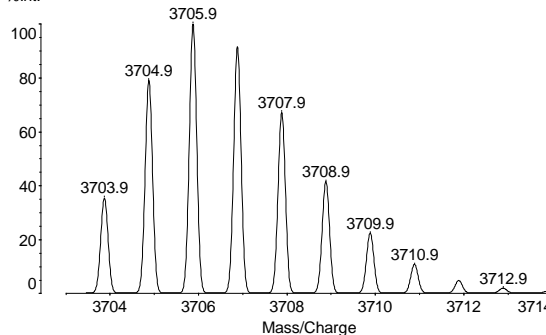
Molecular formula: $C_{30}H_{45}N_6O_6S$ Resolution: 20000 at 50%
%Int.



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

26

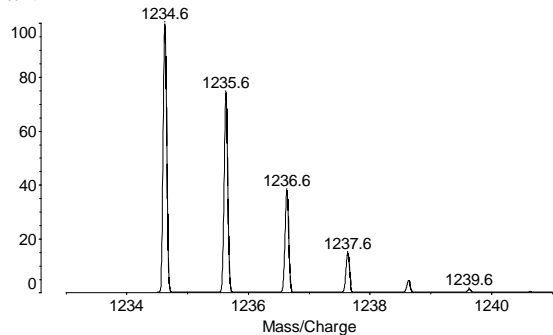
Molecular formula: $C_{180}H_{270}N_{36}O_{36}S_6$ Resolution: 20000 at 50%
%Int.



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

29

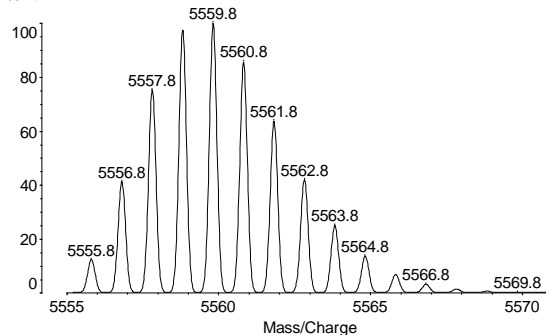
Molecular formula: $C_{60}H_{90}N_{12}O_{12}S_2$ Resolution: 20000 at 50%
%Int.



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

27

Molecular formula: $C_{270}H_{405}N_{54}O_{54}S_9$ Resolution: 20000 at 50%
%Int.



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

30

25

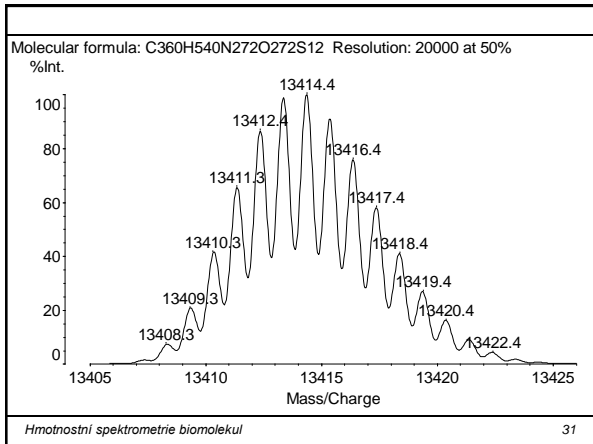
28

26

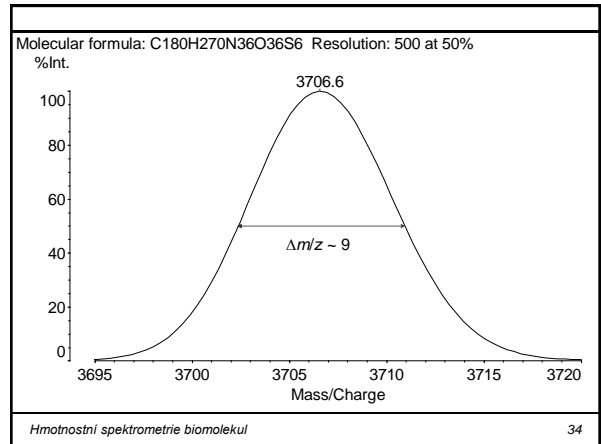
29

27

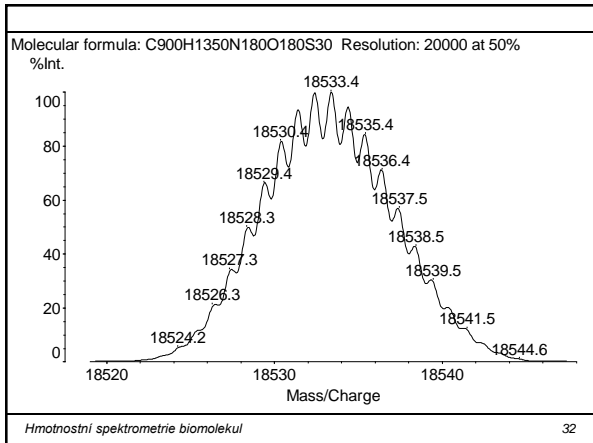
30



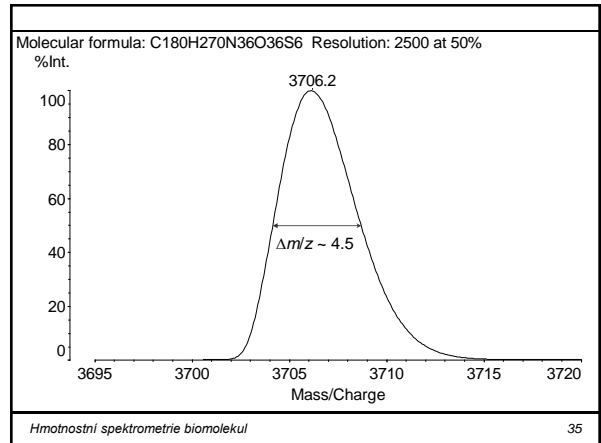
31



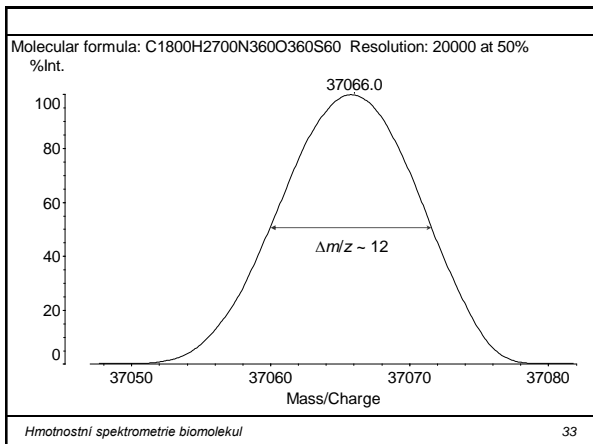
34



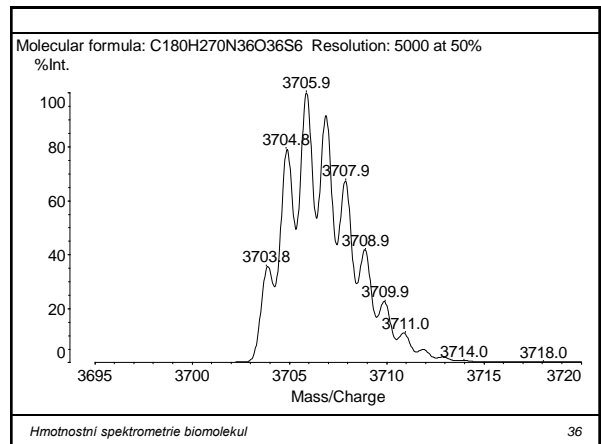
32



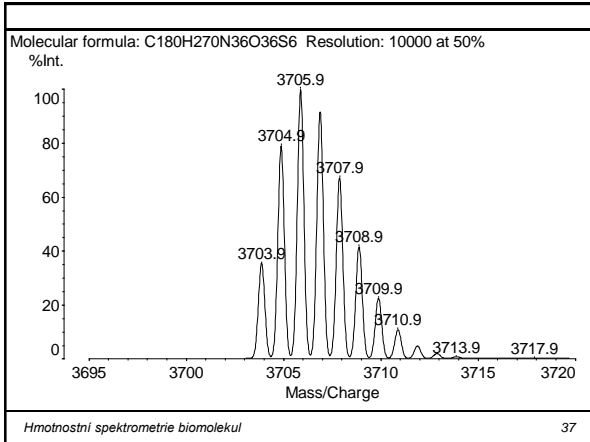
35



33



36



37

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)

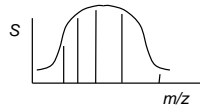
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

40

40

Vicenásobně nabitě ionty

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



Př.:

$m = 10\,000$ Da									
z	4	5	6	7	8	9	10		
m/z	2501	2001	1668	1429	1251	1112	1001		

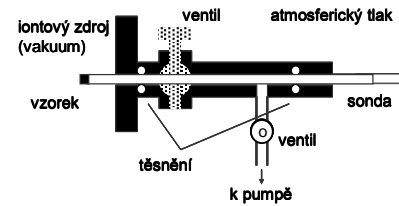
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

38

38

Zavádění vzorků

- Off-line
- On-line
- In-line



Počet zaváděných vzorků

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

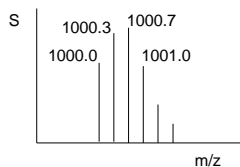
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

41

41

Co můžete říci o tomto spektru?

Pozn: Jedná se o část hmotnostního spektra jediné organické sloučeniny. Hodnoty m/z byly určeny s tolerancí ~ 0.1.



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

39

39

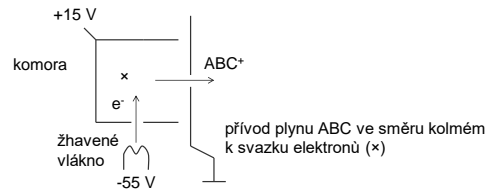
Elektronová ionizace, EI (Electron impact)

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.



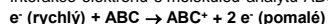
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

42

42

Mechanismus EI

Interakce elektronu s molekulou analytu ABC:

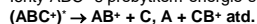


Výsledná rovnice,



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. Knihočný spekter ($> 100\,000$ spekter).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

43

43

Chemická ionizace (CI)

20. léta 20. století A. J. Dempster

Tentýž iontový zdroj jako pro EI plus reaktivní plyn

Reaktivní plyn (RH)

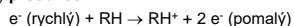
CH_4 , butan, H_2 , NH_3 atd.

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

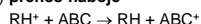
$\rho(\text{RH}) \sim 0.1$ Pa ($\lambda \sim 0.05$ mm, mnoho kolizí ve zdroji)

Mechanismus tvorby iontů

a) produkce RH^+



b) přenos náboje



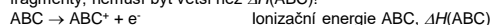
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

46

46

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

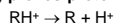
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

44

44

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

$\Delta E < 0$: 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

47

47

2

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



45

45

Kolize molekul při CI

Střední volná dráha molekuly

Střední dráha, kterou urazí iont mezi 2 srážkami

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

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

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 \sim pg)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

48

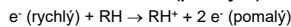
48

Negativní chemická ionizace

Tentýž iontový zdroj jako pro EI plus reaktivní plyn

Mechanismus

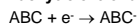
1. Produkce termálních (pomalých) elektronů



$$W(\text{pomalý } e^-) \sim 3/2 kT$$

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

2. Záchyt elektronu



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

LD ~ pg

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

49

49

Zavedení vzorku pro EI/CI (pokr.)

3. Netěkavé látky

- Velké molekuly
- Molekuly s mnoha polárními skupinami
- ... mnoho zajímavých sloučenin (proteiny, DNA, sacharidy)

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

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



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

52

52

Zavedení vzorku pro EI/CI

1. Plyn/těkavá 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

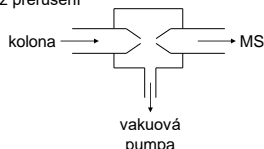
i) tryskový separátor (particle beam)

pro obohacení ABC

v nosném plynu

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

... He jako nosný plyn



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

50

50

Anorganické iontové zdroje

Doutnavý výboj

Termální ionizace

Indukčně vázané plasma

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

53

53

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. Těkavý, 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

51

51

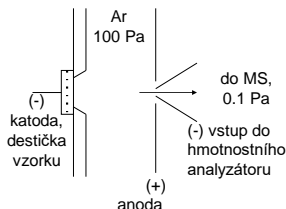
Doutnavý výboj

První iontový zdroj (J. J. Thompson)

Analýza pevných vzorků, obvykle vodivých.

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

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

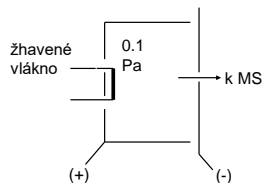


Hmotnostní spektrometrie biomolekul

54

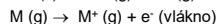
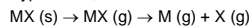
54

Termální ionizace (TI)



Vzorek nanesen na vlákno; vlákno odporově zahříváno.

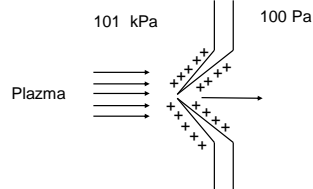
Vypařování, atomizace a ionizace:



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

55

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.

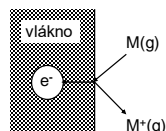
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

58

55

58

Termální ionizace



Saha-Langmuirova rovnice
 $n(M^+)/n(M) \propto \exp[(W - IE)/(kT)]$
 Pracovní funkce kovu (vlákno), $W \sim 4 \text{ eV}$

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

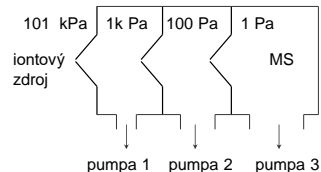
- Tři vlákna (s rozdílnou teplotou): Náhrada jednoho vlákna, které odpařuje a ionizuje vzorek příliš rychle.
 Stabilnější iontový tok (RSD pouze ~ 0.1 %!)
 Užitečné pro stanovení izotopového zastoupení.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

56

56

Diferenciální pumpování



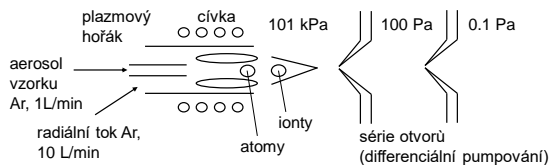
- často používaný koncept v MS
- použit u technik ionizace při atmosferickém tlaku

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

59

59

Indukčně 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

57

57

ICP

Supersonická tryska

Žhavá plazma (5000 K) proudí dovnitř otvorem a expanduje nadzvukovou rychlostí. Náhodný pohyb atomů na atmosferické 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

60

60

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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

61

61

Ionizace polem (Field Ionization, FI)

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

64

64

Spektrální interference v ICP

Tvorba molekulárních iontů v ICP

- Plyn plazmatu a jeho reakční produkty (Ar^+ , Ar^{2+} , ArH^+ , ArO^+ , ArC^+ , ArN^+ atd.)
- Vzorek nebo solvent (hydridové ionty, OH^+ , ClO^+ , NO^+ , CaO^+ , LaO^+ atd.)
- Chemická ionizace plynů pozadí (H_2O^+ , H_3O^+ , C_xH_y^+ atd.)

Odstranění spektrálního rušení

- Matematické korekce (např. ze známé distribuce izotopů)
- Desolvatace aerosolu (např. vymrazení v kapalném N_2)
- Studené plazma (relativní změny ionizačního stupně)
- Kolizní cela (termalizace iontů, posun reakčních rovnováh)
- Spektrometr s vysokým rozlišením

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

62

62

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

65

65

Spektrální interference v ICP

Příklady izobarických iontů a rozlišení potřebného k jejich stanovení.

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

Pozn.: vyšší rozlišení často znamená nižší citlivost.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

63

63

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

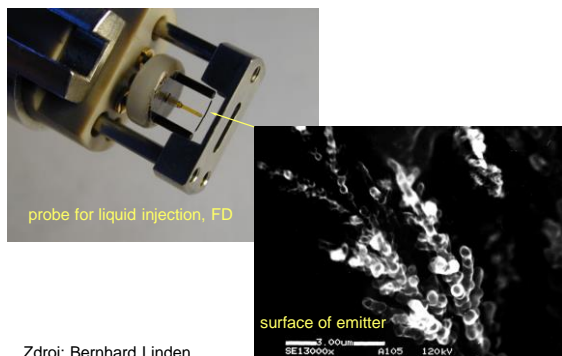
Vhodné pro analýzu organických analytů s $M.W. < 2$ kDa

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

66

66

Field Ionization. Field Desorption



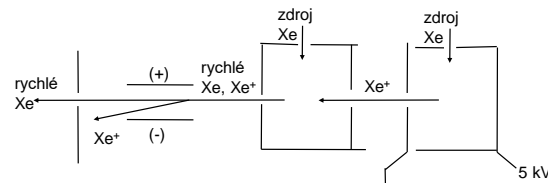
Zdroj: Bernhard Linden
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

67

67

Produkce rychlých atomů (Xe) pro FAB

1. Produkce rychlých iontů Xe⁺
2. Konverze Xe⁺ na Xe:
Xe⁺ (rychlý) + Xe (pomalý) → Xe (rychlý) + Xe⁺ (pomalý)
3. Eliminace (odklon) Xe⁺



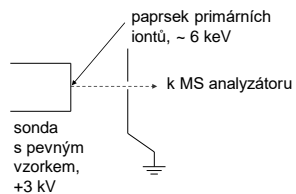
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

70

70

MS sekundárních iontů (Secondary Ion Mass Spectrometry, SIMS)

... Ionizace ionty

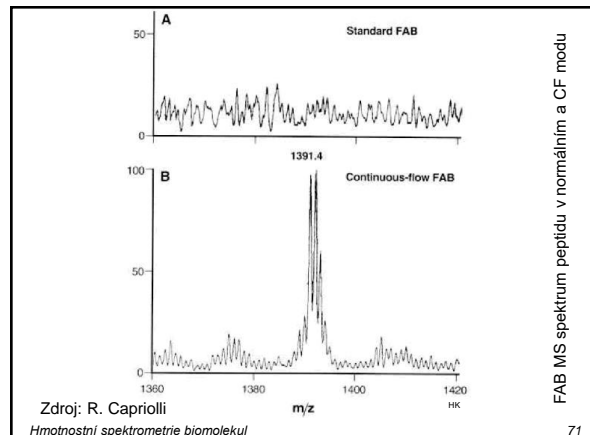


- Primární iontový svazek může být skenován, výsledkem je topografie prvků vzorku, "MS image". Rozlišení vyšší než u optického skenování (svazek primárních iontů lze lépe zaostřit, ~nm).
- Produkty ... především atomy a neutrální molekuly, též ionty. Případná postionizace možná, např. fotoionizace pomocí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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

68

68



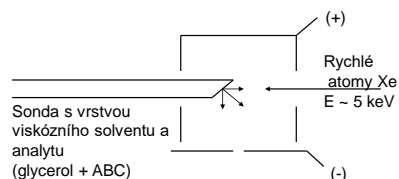
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

FAB MS spektrum peptidu v normálním a CF modu

71

71

Ionizace nárazem rychlých atomů (Fast Atom Bombardment, FAB)



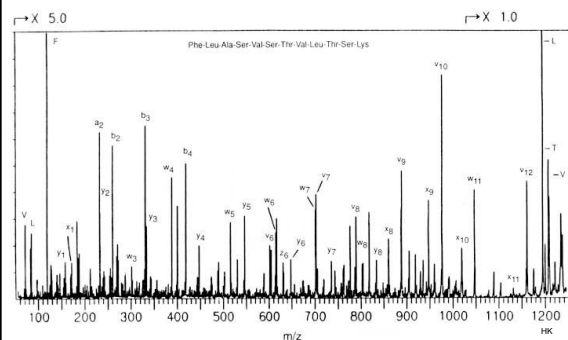
Ionizace podobná CI (organické molekuly, malé peptidy...)
Sestava: off-line i on-line (průtoková sonda; tzv continuous flow, CF-FAB).
Max. hmotnost ~ 10 000 Da. LOD ~ 10 pmol nebo až < 1 pmol (CF-FAB)
Obvykle z = ± 1.
Vzniklé ionty: ABCH⁺, [ABC+N₂]⁺, [ABC+K]⁺, [ABC+H]⁺, fragmenty.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

69

69

CF-FAB MS/MS řetězce a lidského hemoglobinu

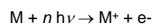


Hmotnostní spektrometrie biomolekul

72

72

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

73

73

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.)

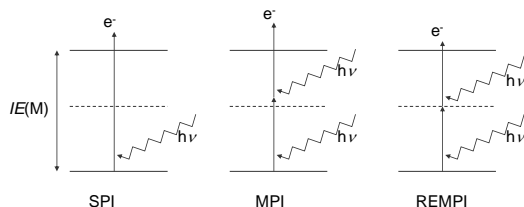
- První technika použitá k ionizaci relativně velkých organických molekul (~tisíce Da, př. inzulin, 5735 Da).
- Štěp z radioaktivního zdroje narazí do vzorku naneseného na fólii.
- Jiný štěp uvolněný z rozpadu téhož atomu ^{252}Cf nastartuje záznam signálu.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

76

76

Mechanismy fotoionizace

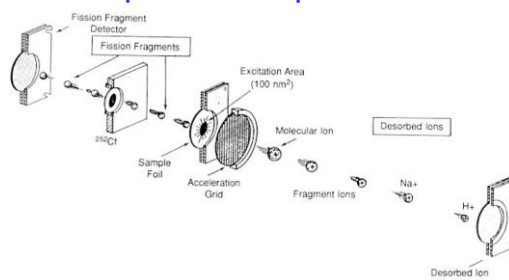


Hmotnostní spektrometrie biomolekul

74

74

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

77

77

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

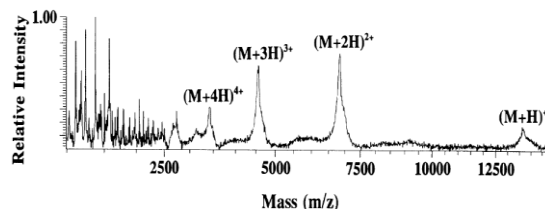


Hmotnostní spektrometrie biomolekul

75

75

PD: příklad



Pozitivní PD MS ribonukleázy A z hovězí slinivky

(D. M. Bunk, R. D. Macfarlane *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 6215-6219)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

78

78

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

79

79

The Nobel Prize in Chemistry 2002

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

"for their development of soft desorption ionization 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"

MALDI
ESI



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

USA



Kurt Wüthrich

1/2 of the prize

Switzerland

Eidgenössische Technische Hochschule (Swiss Federal Institute of Technology)

Dürren, Switzerland

USA

National Institute of Health, Bethesda, MD, USA

Zdroj:
www.nobel.se
October 9, 2002

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

b. 1917

b. 1959

b. 1938

82

82

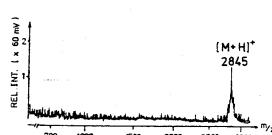
3

Laserová desorpce/ionizace (LDI).
Laserová desorpce/ionizace za účasti matrice (MALDI).
Sprejové ionizace: Termosprej (TSI), Ionsprej (ISI).
Elektrosprej (ESI). Desorpční elektrosprej (DESI)



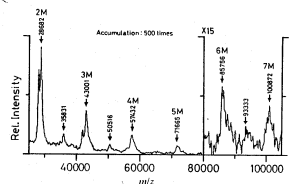
80

80



1987 Karas & Hillenkamp
melitin
kyselina nikotinová
 $m/z = 2845$

Fig. 7. Matrix-LD spectra of melittin/NicAc accumulated from 12 single laser shots.



1988 Tanaka
lysozym
Co/glycerol
 $m/z = 100\ 872$ (heptamer)

Fig. 2. Laser ionization mass spectrum of lysozyme from chicken egg white, mol. wt 14306 Da.

83

83

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.

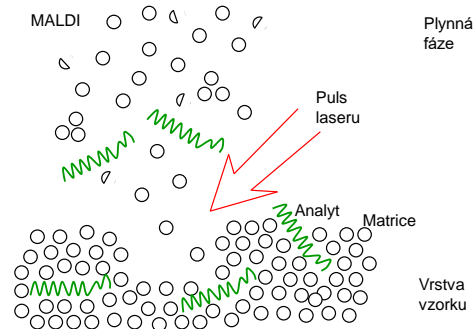
Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, 2, 151.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

81

81

Schema MALDI (detail)

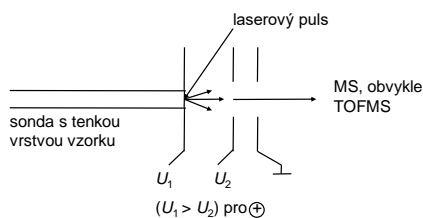


Hmotnostní spektrometrie biomolekul

84

84

Schema LDI (MALDI)



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

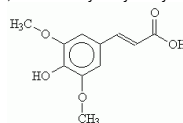
85

85

Běžné matrice pro MALDI

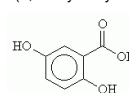
sinapinic acid (SA)

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

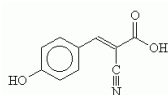


gentisic acid (DHB)

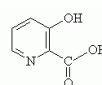
(2,5-dihydroxybenzoic acid)



α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) (HPA)



3-hydroxypicolinic acid (3-hydroxy-2-pyridinecarboxylic acid)



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

88

88

Princip LDI a MALDI

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

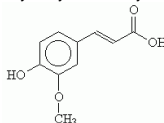
86

86

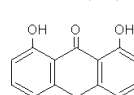
Běžné matrice pro MALDI

ferulic acid

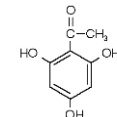
(4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid)



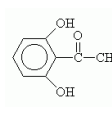
dithranol (DIT)



2',4' 6'-trihydroxyacetophenone (THAP)



2'-6'-dihydroxyacetophenone



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

89

89

Požadavky na matrici (MALDI)

- Absorbce při vlnové délce použitého laseru (UV, IR).
- Tvorba žádoucích krystalů s analytem (empirie).
- Obvykle kyselina (účinný přenos protonu na analyt).
- Stabilní, nereagující s analytem, nepřilís těkává.

Typy matricí

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

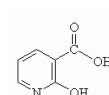
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

87

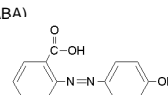
87

Běžné matrice pro MALDI

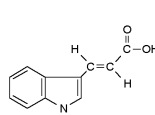
nicotinic acid-N-oxide



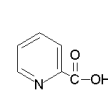
2, -(4-hydroxy-phenylazo)-benzoic acid (HABA)



trans-3-indoleacrylic acid (IAA)



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



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

90

90

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

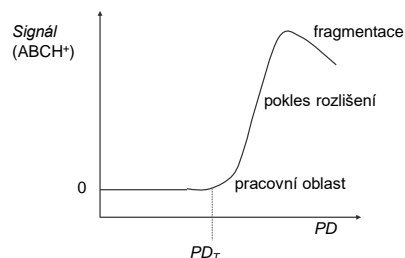
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

91

91

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

94

94

Vlastnosti matrice

CHCA: „horká“ matrice
peptidy < 10 000 Da
vhodná pro PSD (strukturní analýza)

DHB: „studená“ matrice
univerzální použití

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

92

92

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 terčíku se vzorkem a sledujeme spektra z jednotlivých laserových pulsů. Po zjištění prahové energie nastavíme energii asi 10–30% nad prahovou hodnotou a akumulujeme spektra (100–1000) za občasného posouvání terčíku.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

95

95

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 μ m Er:YAG laser

10.6 μ m CO₂ laser

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

93

93

Akumulace spekter

zpravidla zaznamenáváme průměr z 100 – 1000 desorpcí
zvýšení odstupu signálu od šumu a reprodukovatelnosti

signál, $S \propto n$

šum, $N \propto \sqrt{n}$

signál/šum, $S/N \propto \sqrt{n}$

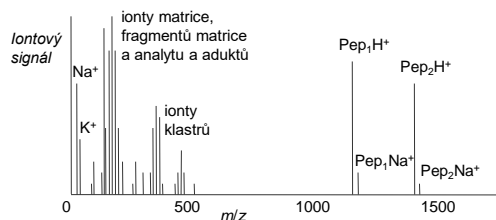
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

96

96

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 $[ABC+Na]^+$, $[ABC+K]^+$, $[ABC+MH]^+$
fragменты matrice a analytu, iontové klastry, např. $[M_2+Na]^+$
Potlačení matrice – v ideálním případě pouze pík analytu.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

97

97

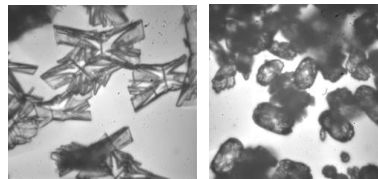
Příprava MALDI vzorků

MALDI vzorek = analyt + matrice

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

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

terčik: ocel, Al, syntetické polymery



www.srsmaldi.com

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

100

100

Charakteristika MALDI

- + jedna ze dvou nepoužívanějších 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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

98

98

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 terčiků se vzorky)
- Dokonalé očištění terčiku

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

101

101

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

99

99

Metody přípravy vzorků

- vysušení kapky směsného roztoku (**dry droplet**)
- smíchání a vysušení na terčiku (**quick & dirty**)
- urychlení vysušení 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 elektrospřemem (**electrospray deposition**)
- modifikované terčiky - hydrofilní/hydrofobní rozhraní

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

102

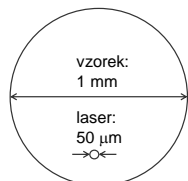
102

Další metody přípravy vzorků

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

mikrometody

mikroterčičky, piezoelektrické pipety, nanášení z kapiláry
velikost ohniska \approx velikost vzorku \Rightarrow maximální citlivost
vyšší hustota vzorků na terčičku



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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

103

103

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 terčičku
- uvedení dostupných MS/MS spektrometrů pro MALDI
- doplňková technika k ESI (odlišná ionizační účinnost pro různé analyty)

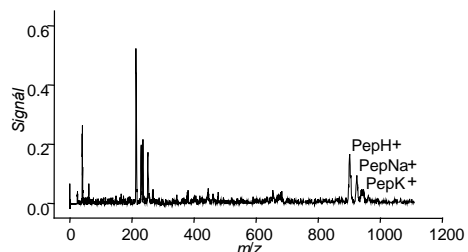
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

106

106

Vliv přítomnosti soli

MALDI spektrum vzorku peptidu v přítomnosti solí Na a K



odsolení vzorku nutné (přítomnost solí \Rightarrow tvorba aduktů \uparrow , citlivost \downarrow)

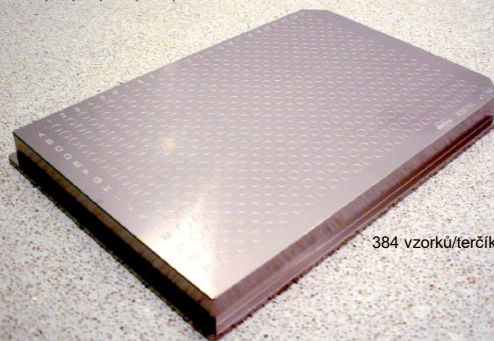
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

104

104

MS analýza početných sérií biologických vzorků

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



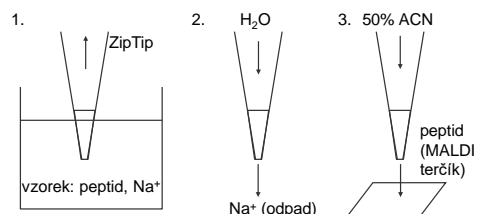
107

107

Redukce vlivu solí

segregace na terčičku ... výběr vhodného krystalu pro desorpci
přidavek kyselin (TFA, HCOOH, HCl), NH_4 solí
opláchnutí krystalů na terčičku
katex na terčičku

odsolení vzorku před nanesením: separace, dialýza, ZipTip (C_{18})

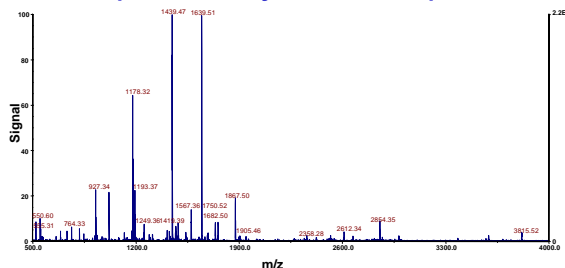


Hmotnostní spektrometrie biomolekul

105

105

MALDI MS identifikace hovězího albuminu z produktů enzymatického štěpení



Analyt: 1 pmol tryptického digestu BSA, odsoleno pomocí ZipTip C_{18}
Matrice: 10 mg/ml CHCA v ACN/0.1% TFA : 70/30
Příprava vzorku: dried-droplet.
MS: Voyager DE-STR

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

108

108

Mikrometody - příklad

(A) úprava vzorku a dávkování
 (B) reaktor s imobilizovaným enzymem
 (C) mikropipetor
 (D) nanoválky (300 x 300 x 20 μm) na MALDI terčiku
 (E) 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 109

109

Termosprej (TSI)

eluent z LC nebo CE kolony → vyhříváná kovová kapilára (~ 200 °C) → sprej kapek → k MS (-) → k mechanické pumpě (100 Pa)

- 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 – přidavný výkon – vyšší účinnost ionizace.
- Elektronegativní sloučeniny mohou tvořit negativní ionty. (Do komory může být vložen přidavný zdroj elektronů, aby zvýšil tvorbu negativních iontů M^- .)
- Použití těkavých pufrů - prevence zacpávání špičky kapiláry (NH_4Ac).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 112

112

Srovnání LDI a MALDI

	LDI	MALDI
Ionizace	relativně tvrdá	měkká
Vzorek	pouze analyt	analyt v přebytku matrice
Max. m (Da)	<2 000	10^6
Typický analyt	malé organické molekuly, malé peptidy, syntetické polymery	peptidy, proteiny, DNA, sacharidy, syntetické polymery

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 110

110

Ionizace svazkem částic (Particle Beam Ionization, PBI)

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 113

113

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

Společné znaky

- Analyt: polární, často ionizovaný v roztoku.
- Vyhříváné 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 111

111

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. Přídavný zdroj svazku částic, obvykle He. Separátor He od iontů.
- Přídavný 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 nepříliš vysokou hmotností.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 114

114

Vyhříváný nebulizér

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 115

115

Princip ESI

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 118

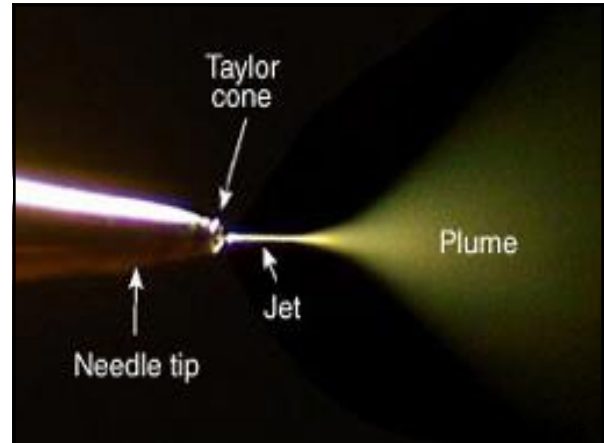
118

Iontový sprej (Ion Spray, IS)

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 116

116



119

Elektrosprejová ionizace (ESI)

Electrospray, Nanoelektrospray

* 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 117

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 120

120

Provedení ESI

- Příkladný plyn – proud N_2 , vyhřívána kapilára za otvorem: dokonalejší desolvatace, zabránění tvorby klastřů.
- Koaxiální proud kapaliny možný (... přídatná koaxiální kapilára).
- Rozměry jehly: i.d. < 100 μm , o. d. 100 μm – 1 mm, hrot < 100 μm .
- Vzdálenost hrotu od protelektrody: 1 – 3 cm. Tok < 10 mL/min.
- Nanoelektrosprej: menší rozměry, bez přídatné koaxiální kapaliny a nuceného pumpování, tok < 100 nL/min.
- Note: Nanospray = registrované komerční označení

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

121

121

Tvorba vícenásobně nabitých iontů

- + Vyšší z snižuje $m/z \Rightarrow$ lze použít hmotnostní analyzátor s nižším limitem max. hmotností i pro ionty o velmi vysoké hmotnosti.
- + Ke zjištění m a z stačí pouze 2 sousední píky:
 $(m/z)_n = (m+n)/n$
 $(m/z)_{n+1} = (m+n+1)/(n+1)$
- + Ovlivnění náboje z ?
 - pH roztoku: $pH \downarrow \Rightarrow z \uparrow$
 $pH \uparrow \Rightarrow z \downarrow$, 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 píků ve spektru ... komplexní spektra, snížená citlivost.
- Často další píky, např. adukty $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ atd.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

124

124

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 přídatnou kapalinu (sheath flow)
 - kapalinový spoj (liquid junction)
 - pokovený hrot kapiláry (sheathless interface)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

122

122

ESI

- Aplikace elektrického pole (nozzle-skimmer) \Rightarrow fragmentace ve zdroji.
- K objasnění struktury - přídatná komora pro kolizní disociaci za prvním MS.
- Signál v ESI je závislý na koncentraci analytu, $c(\text{analyt})$; při velmi nízkých koncentracích je závislý na látkovém množství analytu (nanoelektrosprej).
- Signál $\alpha c(\text{analyt})$ (10^{-7} – 10^{-9} M), při vyšších c se růst zpomaluje (plato).
- Nanosprej (nanospray) ... komerční název

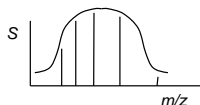
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

125

125

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 (narozdíl od izotopového paternu).



Př.:

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

123

123

Faktory ovlivňující ESI

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

126

126

Zásady v ESI

- Použití těkavých pufrů:
 - CH_3COOH
 - HCOOH
 - TFA (kyselina trifluoroctová)
 - NH_4^+ 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_b (analyt) – 2
- Pro negativní ionizaci pK_b (elektrolyt) < pK_a (analyt) – 2
- Důkladná příprava vzorku = snazší analýza
odsolení, odstranění surfaktantů a dalších příměsí

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

127

127

DESI

Desorption electrospray ionization

- elektrosprej v desorpčním provedení
- interakce s povrchem
- příklady aplikací: léčiva v tabletách
kokain na bankovkách
metabolity na pokožce
- široká skupina ambientních technik (DART, MALDESI, LAESI ...)

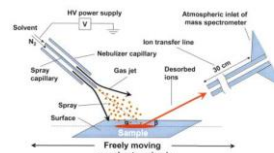


Fig. 1. Schematic of typical DESI experiment. The sample solution was deposited from solution and dried onto a PTFE surface, and methanol-water (1:1 containing 1% acetic acid or 0.1% aqueous acetic acid solution) was sprayed at a flow rate of 3 to 15 $\mu\text{l}/\text{min}$ under the influence of a high (4 kV) voltage. The nominal linear velocity of the nebulizing gas was set to 350 m/s.

Z. Takáts, J. M. Wiseman, B. Gologan, R. G. Cooks Science 306, 471 (2004)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

130

130

Přehled nejpoužívanějších API technik

- Nejpoužívanější API techniky v organické analýze: **ESI**, **APCI** a **APPI**
- **APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)**
 - pneumatický zmlžovač
 - reagent = solvent (mobilní fáze), aditiva ... podobné CI
 - energie pro uskutečnění reakce:
 - elektroda pro koronový výboj před vstupním otvorem
 - vyhřívaný zdroj
 - nulové napětí na jehle (rozdíl oproti ESI)
- **APPI (Atmospheric Pressure Photoionization)**
 - pneumatický zmlžovač
 - UV výbojka (např. kryptonová) pro fotoionizaci
 - nulové napětí na jehle (oproti ESI)
 - vyhřívaný zdroj, případně další přídavné elementy
 - APLI: budícím zdrojem je laser

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

128

128

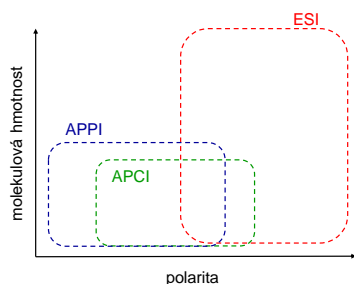
4 Analyzátoři. Základy iontové optiky. Wienův Filtr. Energetické analyzátoři (E). Hmotnostní analyzátoři. Magnetický sektor (B)



131

Použití ESI, APCI a APPI

Schematické znázornění aplikačního použití



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

129

129

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**

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

132

132

Základy iontové optiky

Analogie se světelnou optikou

štěrbina	štěrbina
čočka	čočka
hranol, mřížka	W_{kin} : energetický analyzátor, deflektor
	m/z : hmotnostní analyzátor
zrcadlo	iontové zrcadlo
optické vlákno	iontový vodič

Odlišnosti 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

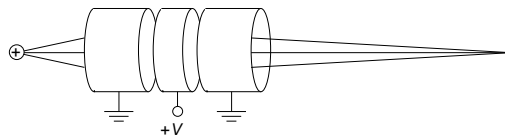
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

133

133

Čočka

(unipotenciálová, elektrostatická, einzel lens)



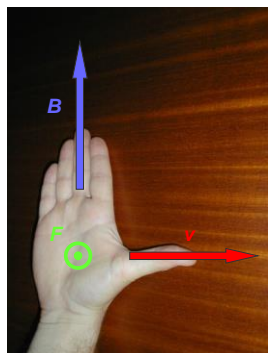
- analogie klasické čočky
- ohnisková vzdálenost může být změněna změnou napětí V
- vyšší iontová propustnost ve srovnání se štěrbinou
- fokální vzdálenost není funkcí m/z (pro ionty ze stejného iontového zdroje)
- ideální funkce pouze pro ionty o stejné kinetické energii - pokud je vzájemné odpuzování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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

136

136

Lorentzova a Coulombova síly



Magnetické pole o indukci B :

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

Coulombova síla v el. poli E :

$$\vec{F}_{el.} = ze\vec{E}$$

Celkově:

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

Pro jednoduchost dále pouze:

$$\vec{F}_{el.} = ze\vec{E}$$

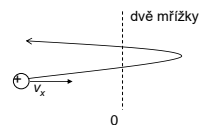
$$\vec{F}_{magn.} = zev\vec{B}$$

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

134

134

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

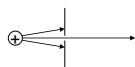
137

137

Elementy iontové optiky

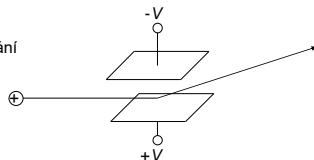
Štěrbina

- vymezení paprsku
- vymezení vs. propustnost



Deflektor

- odklonění iontů
- 2 deflektory pro x, y skenování

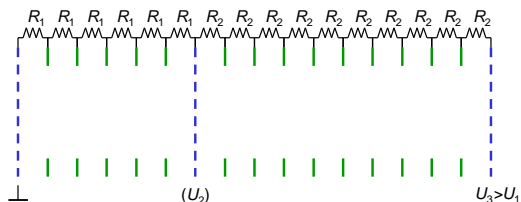


Hmotnostní spektrometrie biomolekul

135

135

Konstrukce iontového zrcadla se 2 stupni



mřížky: definice ekvipotencionálních rovin

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

138

138

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

139

139

Wienův rychlostní filtr

Pro iont letící středem filtru platí:

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

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

... prolétají pouze ionty o určité rychlosti.

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

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

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

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

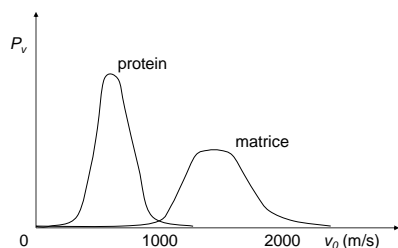
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

142

142

Vlastnosti iontů

Př.: Distribuce počáteční rychlosti při MALDI
 (P_v ... pravděpodobnost výskytu molekuly o rychlosti v)

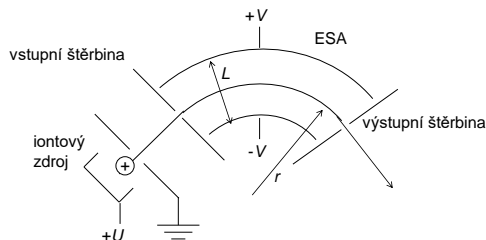


Hmotnostní spektrometrie biomolekul

140

140

Energetický analyzátor; elektrostatický analyzátor (ESA, E)



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

143

143

Wienův 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

141

141

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 nehráje 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

144

144

Hmotnostní analyzátoři

Magnetický sektor (MAG, B)

Quadrupólový analyzátoř (Q, q)

Iontový cyklotron (ICR-FT-MS)

Iontová past (IT)

Analyzátoř doby letu, Time-of-flight (TOFMS)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

145

145

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

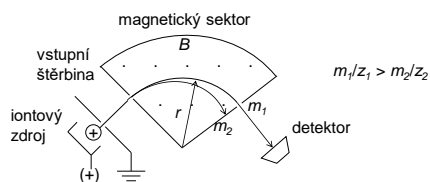
Skoková změna některé z proměnných. Vhodné pro monitorování omezeného počtu druhů iontů (např. přepínáním U).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

148

148

Magnetický sektor (MAG, B)



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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

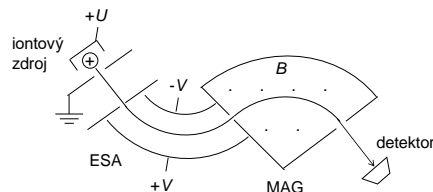
146

146

Tandem elektrostatický analyzátoř - magnetický sektor

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

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



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

149

149

Princip magnetického sektoru

1.) Lorentzova síla = odstředivá síla:

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

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

2.) Kinetická energie = urychlovací energie:

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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

147

147

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.

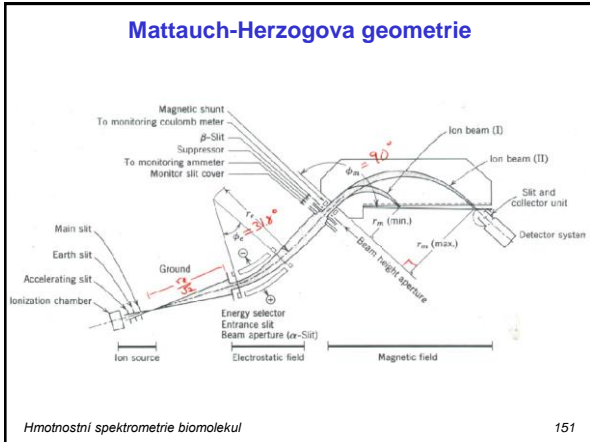
Praktické geometrie EB:

1. Nier-Johnsonova
90° ESA + 60° MAG
výstup stále zaostřen pro daný poloměr, r
vhodná pro skenovací spektrometrie
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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

150

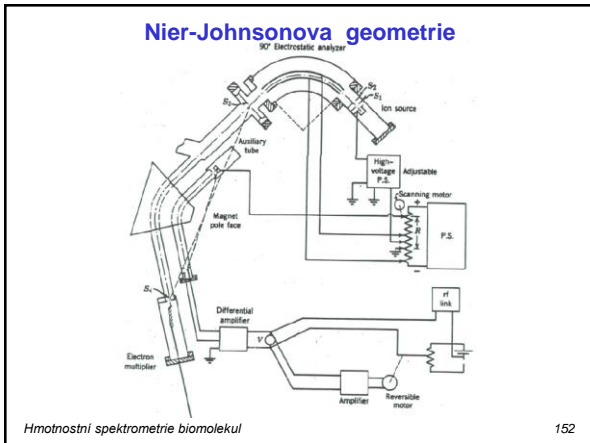
150



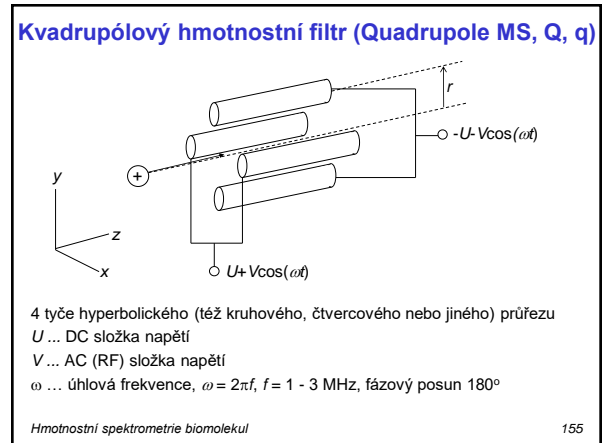
151



154



152



155

Další kombinace E a B

Reversní geometrie (Reverse-geometry, BE)

- magnetický sektor:** hmotnostní filtr
- energetický analyzátor:** analýza iontů podle kinetické energie

MIKES (Mass-Analyzed Ion Kinetic Energy Spectrometry)
první MS/MS technika, tandemová hmotnostní spektrometrie (1973)

- Magnetický sektor propustí ionty o určité hmotnosti.
- Metastabilní ionty se rozpadnou v oblasti mezi magnetickým a energetickým analyzátozem.
- 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 ...

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 153

153

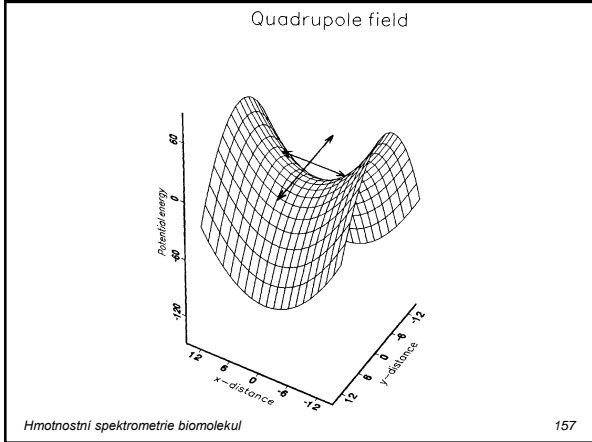
Kvadrupólový hmotnostní filtr

Rovina xz: těžké ionty procházejí
Rovina yz: lehké ionty procházejí

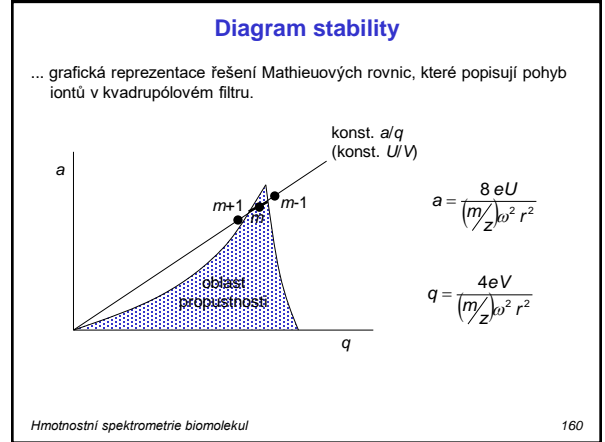
... pouze ionty o specifické *m/z* projdou kvadrupólovým filtrem, ostatní ionty jsou odchýleny.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 156

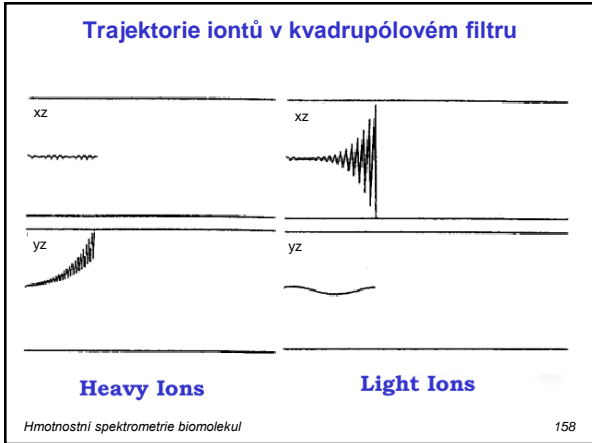
156



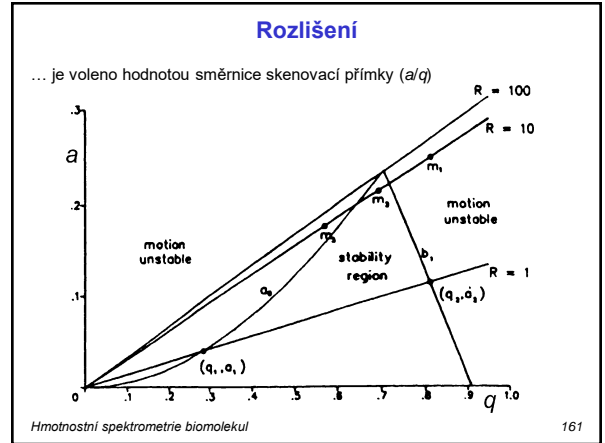
157



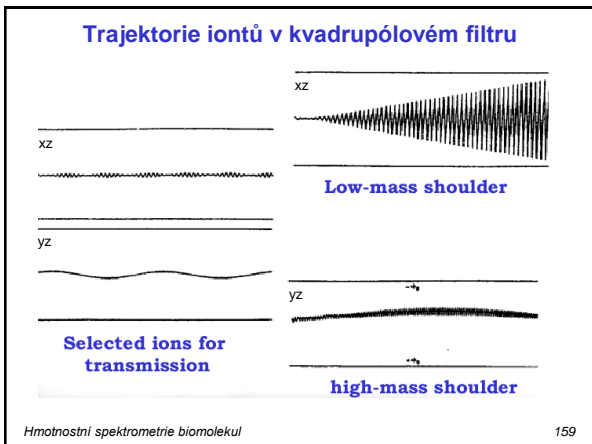
160



158



161



159



162

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 o frekvenci ω během doby průletu t .

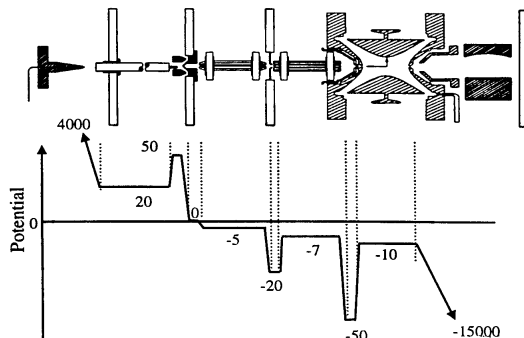
- Zvýšení rozlišení též přesnější mechanickou výrobou.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

163

163

Potential Energy Diagram for LCQ^{DSca}



166

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

Trojité kvadrupól (QqQ)

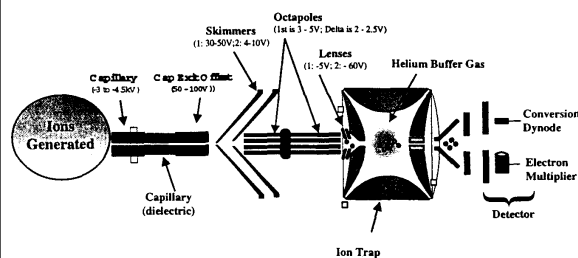
- populární tandemový hmotnostní spektrometr pro CID
- prostřední kvadrupól (q, pouze RF složka) slouží jako kolizní cela

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

164

164

LC MSD Ion Trap: Ion Path



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

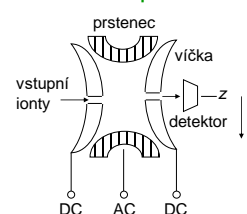
167

167

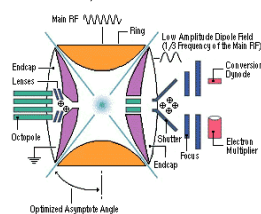
Kvadrupólová iontová past (Ion trap, IT)

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

Schema iontové pasti



Bruker, Model ESQUIRE-LC



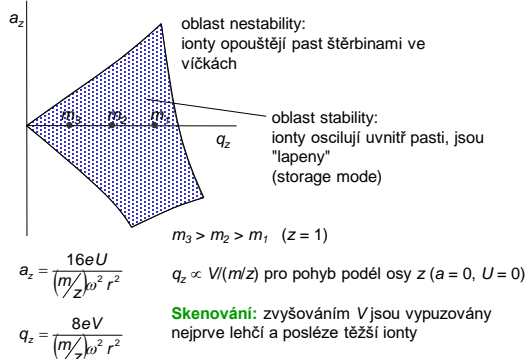
DC: stejnosměrné napětí nebo zem
AC: stejnosměrné + střídavé napětí, $U + V \cos(\omega t)$

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

165

165

Diagram stability iontové pasti



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

168

168

Iontová past

- Experiment zahrnuje fáze ionizace, akumulace, sken a detekce.
- **Akumulace iontů:** 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

169

169

Iontová past

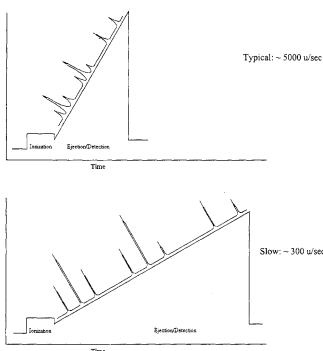
- **Iontová transmise**
polovina iontů může být detegována
- **Fyzická omezení**
volba rozměrů, napětí a frekvence omezena.
- **Maximální dynamický rozsah** (10^6 pro 1 druh iontu) omezen:
- minimum citlivosti (i 1 iont může být detegován)
- maximum max. množství lapaných iontů: pro vyšší množství iontů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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

172

172

Increased Resolution by Decreasing the Scan Rate



Resolution Reference:
J. C. Schwartz, J.E. P. Syka, I. Jardine, J. Am. Soc. Mass Spectrom., 2
(1991) 198-204.

Hmotnostní spektrum

170

170

Lineární past

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

Ionty jsou injektovány do RF (RF-only) kvadrupólu a poté zadrženy zvýšením potenciálů 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

173

173

Iontová past

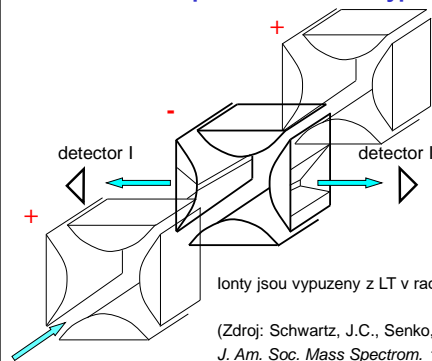
- **MS/MS** - past může nahradit tandemem dvou spektrometrů srážkově indukovaná (aktivovaná) disociace, většinou s He
CID, CAD: collisionally induced (activated) dissociation
- **Vysoké R** ... v praxi řádově 10^3 , obvykle do 5 000
- **Max. hmotnost,**
 m/z_{max} řádově 10^3 , ale i ~ 70 000 (rezonanční vypuzení)
- **Miniaturizace:** iontová mikropast, past na čipu (i pro kvadrupólový filtr)
+ celková velikost 1 cm
+ vhodné např. pro vesmírný výzkum
- mnohem náročnější tolerance, obtížná výroba
- horší parametry (R , m/z_{max})

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

171

171

Lineární past s radiálním vypuzením



Ionty jsou vypuzeny z LT v radiálním směru.

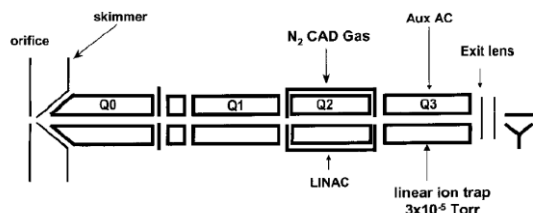
(Zdroj: Schwartz, J.C., Senko, M.W., Syka, J.E.P., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13, 2002, 659.)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

174

174

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.)

175

Srovnání kvadrupólových analyzátorů

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

178

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 10⁶

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

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

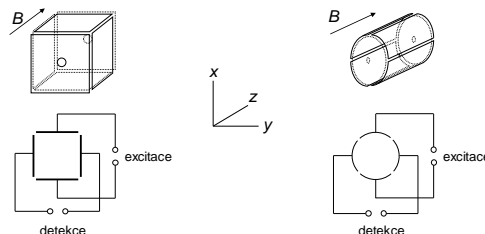
176

Iontový cyklotron (FT-ICR-MS)

(Fourier transform - ion cyclotron resonance - mass spectrometer)

- typ iontové pasti
- geometrie: kubická, cylindrická, hyperbolická

Past se skládá z dvou párů elektrod a dvou víček:



179

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

177

FT-ICR-MS

Ionty jsou zavedeny do pasti podél osy z (rovnoběžně s vektorem B), lapeny v potenciálové jámě (zvýšením potenciálu na víčkách), excitovány elektrickým polem kolmým k vektoru B a indukčně detekovány.

Pohyb iontu v magnetickém poli:

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

Úhlová (cyklotronová) frekvence:

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

180

Vlastnosti FT-ICR-MS

- (supravodivý) magnet s velkou magnetickou indukcí $B \sim 10$ 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 (Fellgettova) 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 MS^n , běžně $n = 2$ až 3 , demonstrováno i $n = 1$

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

181

181

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 směšovač (frekvenční posun signálu směrem dolů umožňuje použití nižší vzorkovací frekvence)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

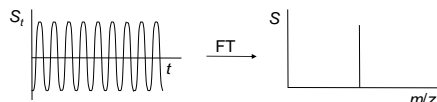
184

184

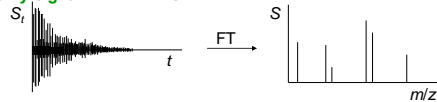
Fourierova transformace

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

Netlumený pohyb iontů o jedné m/z



Reálný signál z FT ICR MS



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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

182

182

Princip FT-ICR-MS

Z-trapping

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

185

185

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
 - diferenciallyně 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)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

183

183

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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

186

186

Hmotnostní spektrometr budoucnosti?

... neexistuje jediné nejlepší řešení

Trendy

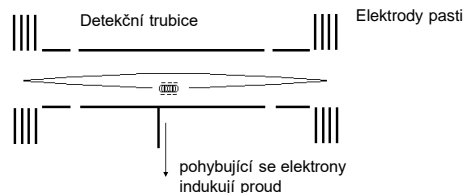
- Ústup magnetických sektorů
- Hybridní spektrometry
Rozšiřování moderních spektrometrů a jejich hybridů (iontové pasti, ortogonální TOF analyzátoři).
- Nové spektrometry
Elektrostatická past "Orbitrap"
Lineární pasti kvadrupólového typu

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

187

187

Lineární elektrostatická past



$$\text{Detekovaná frekvence} = f(m/z)$$

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

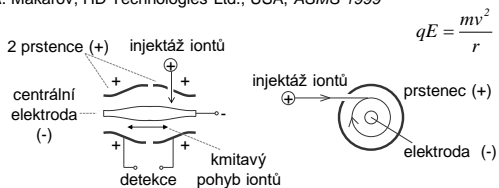
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

190

190

Elektrostatická orbitální past, "Orbitrap"

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



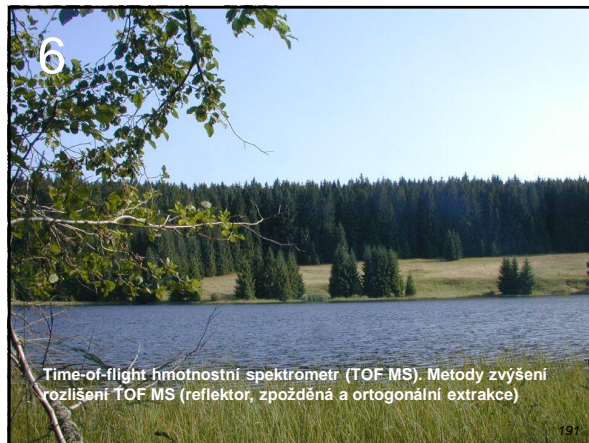
Princip

- Injektované ionty jsou lapeny v radiálním elektrostatickém poli mezi centrální vřetenovitou elektrodou a dvěma prstenci, krouží kolem elektrody.
- Ionty zároveň oscilují podél osy elektrody a jsou indukčně detekovány.
- MS spektra jsou získána pomocí Fourierovy transformace signálu zaznamenaného v čase; m/z je určeno z frekvence oscilací.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

188

188



191

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.
- Náročná injektáž iontů do orbitrapu.

V současnosti velmi rychle se rozšiřující spektrometr, existuje několik variant ve spojení s kvadrupólovými analyzátoři

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

189

189

Analyzátor doby letu (Time-of-flight MS, TOFMS)

Princip: m/z vypočten z doby letu iontů

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

192

192

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

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

193

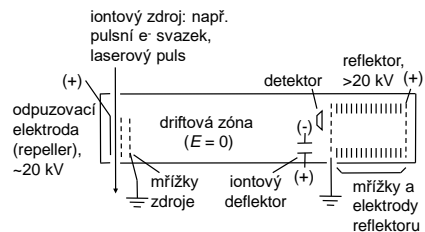
193

Geometrie TOFMS

TOF MS s iontovým zrcadlem (reflektorem)

... dosažení lepších parametrů spekter

... možnost strukturální analýzy (PSD)



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

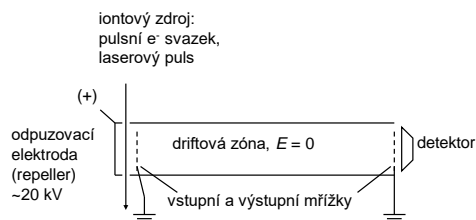
196

196

Geometrie TOFMS

Lineární geometrie

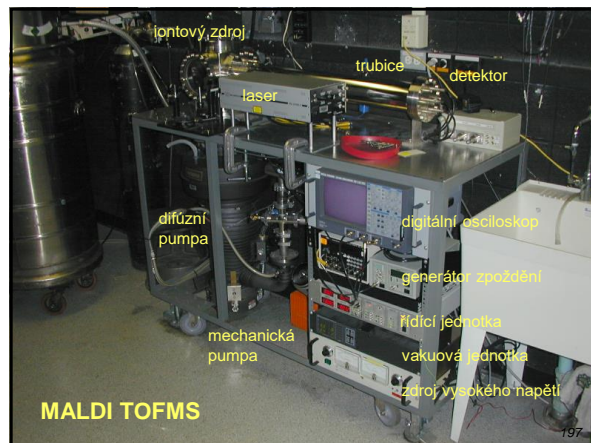
... nejjednodušší sestava



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

194

194



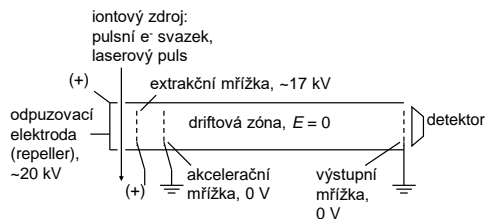
MALDI TOFMS

197

Geometrie TOFMS

Wiley-McLarenova lineární geometrie (1955)

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



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

195

195

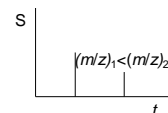
Princip TOFMS

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

198

198

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} : $t_{TOF} \sim t_L$ ($L \gg s, d$)

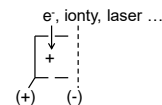
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

199

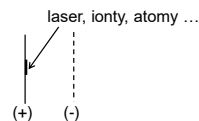
199

Iontové zdroje pro TOFMS

1. Zdroj pro plynné vzorky



2. Zdroj pro tuhé vzorky (desorpce)



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

202

202

TOF: kalibrace m/z

$$m/z = (2eU/L^2)t^2$$

$$\downarrow$$

$$m/z = k_1(t - t_0)^2$$

$$\downarrow$$

$$t = c_0 + c_1(m/z)^{1/2}$$

$$t = c_0 + c_1(m/z)^{1/2} + c_2(m/z)$$

$$t = c_0 + c_1(m/z)^{1/2} + c_2(m/z)$$

korekce spuštění záznamu dat

korekce poč. rychlosti iontů před extrakčním pulsem

korekce neideálního tvaru extrakčního pulsu

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

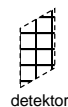
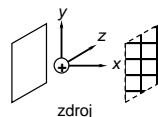
200

200

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 $v_{z0} = 0$)



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

203

203

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

201

201

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:

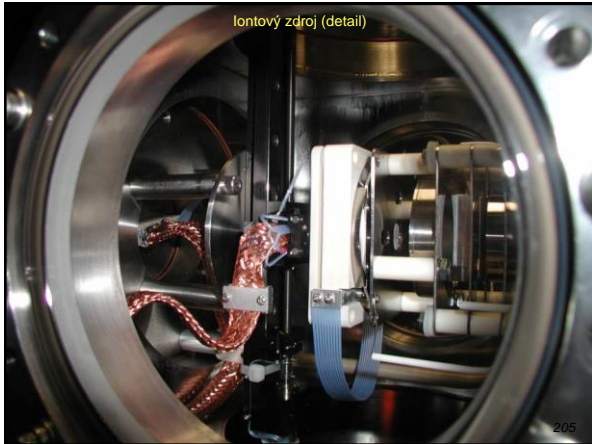
nastavením napětí na střední mřížce umožňuje kompromis distribuce v x za účelem dosažení optimálního rozlišení

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

204

204



205

Pulsní tvorba iontů pro TOFMS

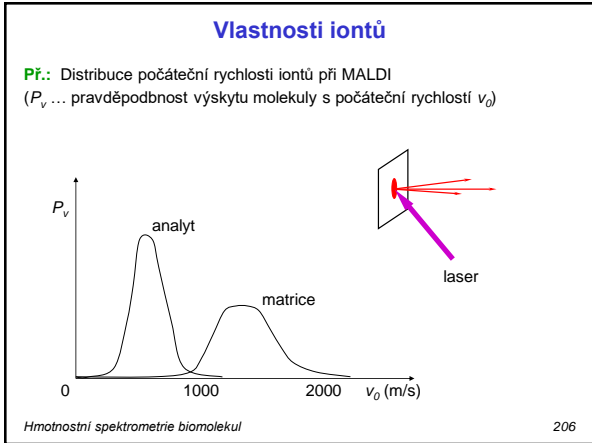
Extrakce konstantním elektrickým polem (DC)
pulsní ionizační paprsek + konstantní extrakční pole

2a. Pulsní extrakce, zpožděná extrakce (pulsed extraction, PE; delayed extraction, DE)
pulsní ionizační paprsek + pulsni extrakční pole

2b. o-TOFMS s pulsni extrakcí (orthogonal extraction, kolmá extrakce)
souvislá tvorba (přívod) iontů + pulsni extrakční pole

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 208

208



206

Jak zvýšit rozlišení (MALDI-TOFMS)?

1. **Vysoké extrakční napětí v lineárním TOF MS.**
2. **Reflektor.**
3. **Pulsní extrakce.**

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 209

209

Spojení MALDI-TOF MS?

Desorpční metody (MALDI, LDI) - speciální případ:

$\Delta t_0 \sim ns$	zanedbatelné; (velmi krátký laserový puls)
$\Delta x_0 \sim \mu m$	zanedbatelné; (tenká vrstva, malé krystalky vzorku)
$\Delta z_0, \Delta v_0 \sim 50 \mu m$	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.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 207

207

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

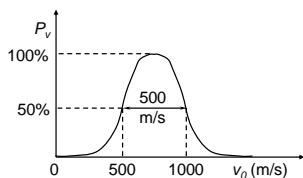
Zvýšením příspěvku elektrického pole se sníží vliv disperze počáteční rychlosti iontů analytu.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 210

210

Vliv urychlovacího napětí

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



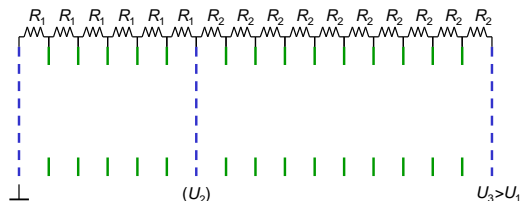
U = 1 kV: $t_1 = 101.673 \mu\text{s}$, $t_2 = 101.284 \mu\text{s}$ **R ~ 130**
U = 10 kV: $t_1 = 32.190 \mu\text{s}$, $t_2 = 32.177 \mu\text{s}$ **R ~ 1300**

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

211

211

Konstrukce reflektoru



mřížky: definice ekvipotenciálové plochy
prstence: elektrické stínění stěn vakuového systému
 potenciál na prstencích definován sérií rezistorů

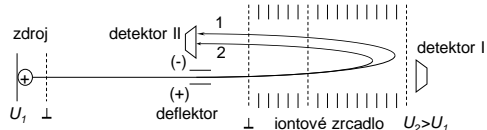
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

214

214

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).

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

212

212

Příklad konstrukce reletoru



215

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. Shmikk, 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)

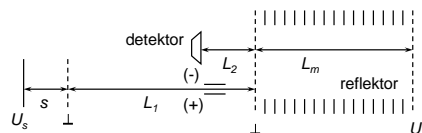
+ dřívější patenty (Japonsko, SSSR)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

213

213

Reflektor s jedním stupněm



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

$$t_{\text{TOF}} = t_0 - \frac{v_0}{a} + \frac{1}{2} \sqrt{\frac{2s}{a}} \left(1 - \frac{L}{2s} + \frac{2a}{a} \right) \frac{v_0^2}{2as} - \frac{1}{8} \sqrt{\frac{2s}{a}} \left(1 - \frac{3L}{2s} + \frac{2a}{a} \right) \left(\frac{v_0^2}{2as} \right)^2 + \dots$$

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

$L = L_1 + L_2$... 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

216

216

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 ~1:2, ~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

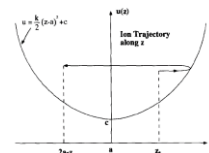
217

217

Reflektor s nelineárním polem

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

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



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

z ... osa změny potenciálu
a ... minimum paraboly

k a C ... konstanty

f ... frekvence oscilací

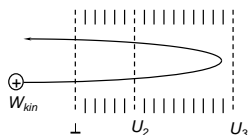
(Převzato z: A. A. Makarov, E. N. Raptakis, and P. J. Derrick, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1995**, 146/147, 165.)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

220

220

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

218

218

Reflektor s nelineárním polem

Další prakticky využitelná pole:

- osově symetrický hyperbolický potenciál
- planární hyperbolický potenciál
- osově symetrický hyperlogaritmický potenciál

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

221

221

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.

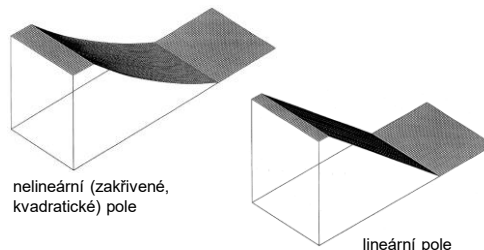
- K získání spektra iontů s vyšší energetickou disperzí je třeba zaznamenat sérii spekter pro několik hodnot potenciálu reflektoru a výsledné spektrum složit z kusů těchto spekter.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

219

219

Reflektor s nelineárním polem



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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

222

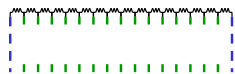
222

Reflektor s nelineárním polem

Zpravidla kvadratické pole nebo jeho aproximace

Tvorba nelineárního pole

pomocí nestejných rezistorů v sérii
pomocí nestejných odstupů mezi prstenci či mřížkami



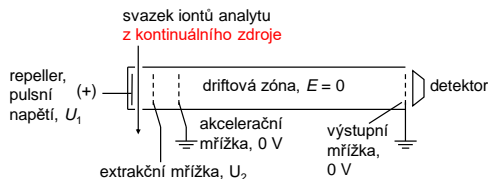
- + současné zaostření iontů s širokou disperzí W_{kin} , jako např. produktů rozpadu za zdroj PSD, pro všechny m/z
- složitější kalibrace
- ideální jen pro ionty pohybující se po ose reflektoru
... v praxi omezené R

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

223

223

Ortogonalní extrakce (oTOFMS)



Pulsní extrakce pro kontinuální iontové zdroje
Proud iontů analytu je extrahován pulsním extrakčním polem kolmým (ortogonálním) k vstupnímu iontovému svazku.
Ionty mají zpravidla stejnou v_x ($\Delta v_x \sim 0$)
Obvykle reflektor pro dosažení vyššího rozlišení

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

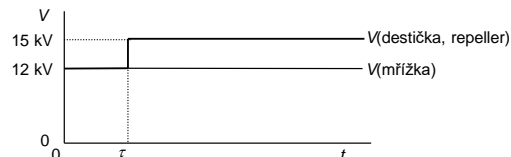
226

226

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)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

224

224

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:

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

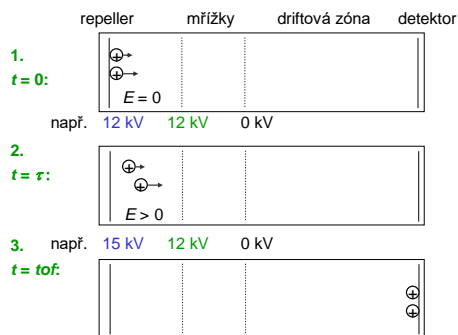
d τ dáno max. frekvencí AD převodníku, rychlostí detektoru a časovou disperzí tvorby iontů
d U určeno driftou a kolísáním zdroje vysokého napětí

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

227

227

Pulsní (zpožděná) extrakce



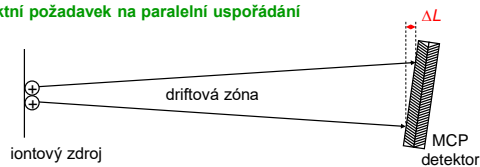
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

225

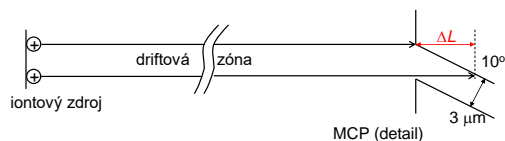
225

Vliv uspořádání na rozlišení

Striktní požadavek na paralelní uspořádání



MCP s úzkými kanálky



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

228

228

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 $L = 3\text{ m}$:

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

Pozn: MCP s úhly kanálků 10° a průměrem $10\ \mu\text{m}$:
 $\Delta L = 10\ \mu\text{m}/\tan(10^\circ) = 57\ \mu\text{m}$

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

229

229

MALDI analýza početných sérií vzorků

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



232

232

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

230

230

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

R ~ 100 000 v komerčně dostupných přístrojích

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

233

233

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 \Rightarrow vyšší rozlišení

Kolizní cela v iontovém zdroji \Rightarrow 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

231

231

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 μs).
 Příklad: inzulin ($m/z = 5735$) urychlený 15 kV překoná 1-metrovou driftovou zónu za $\sim 50\ \mu\text{s}$.
4. Vysoká propustnost iontů (desítky %).
5. Vysoká rozlišovací schopnost ($R > 10\,000$).
6. Jednoduchost a relativně nízká cena.
7. Dostupné techniky pro MS/MS

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

234

234

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 posledních dekádách

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

235

235

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; $U_3 = 0$

lonty: počet, $n = 5$

hmotnost, $m = 100$

kinetická energie, $W_0 = 100$ eV

souřadnice xyz [0, -30, 0] mm

$\alpha_i(i) = (-4 + 2i)^\circ$, 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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

238

238

Srovnání běžných hmotnostních spektrometrů

MS	max. m/z [Da]	R	správnost m/z [Da]	náklady
Q	10^3	10^3	0,1	☹☹
IT, LIT	10^3	10^3	0,1	☹
B	10^4	10^4	0,01	☹
TOF	10^5	10^4	0,01	☹
O	10^3	10^5	0,001	☹
FT-ICR	10^4	10^6	0,0001	☹☹

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 řádově odchytky).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

236

236



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

239

239

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 (náčrty 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).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

237

237

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).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

240

240

Jednoduchá hmotnostní spektrometrie

Záznam „celého“ spektra



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

Záznam části spektra (zoom scan)



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

241

241

Základní typy MS/MS

- 1. Skenování iontů produktů, dceřiných 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 MS2 na vybrané m/z

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

244

244

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

242

242

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

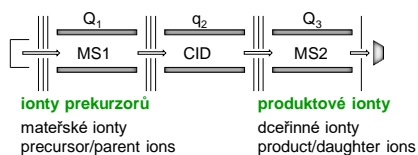
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

245

245

Tandemová hmotnostní spektrometrie

Analýza iontů → fragmentace → analýza iontů



Klasický přístroj pro nízkoenergetickou CID:

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

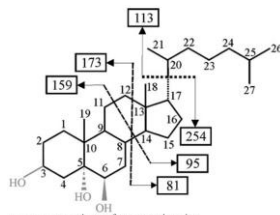
- Q₁:** 1. analyzátor (MS1)
- q₂:** kolizní cela (pouze RFQ)
- Q₃:** 2. analyzátor (MS2)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

243

243

Př.: skenování produktových iontů



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

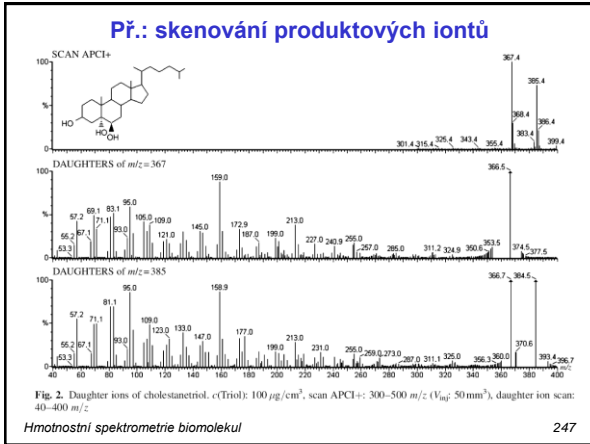
APCI QqQ
 toxikologicky relevantní produkty oxidace cholesterolu

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

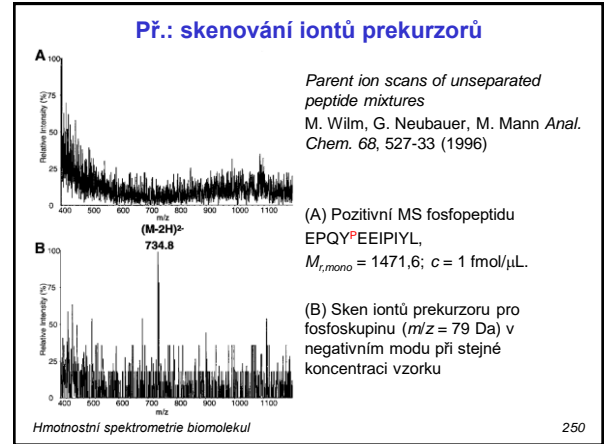
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

246

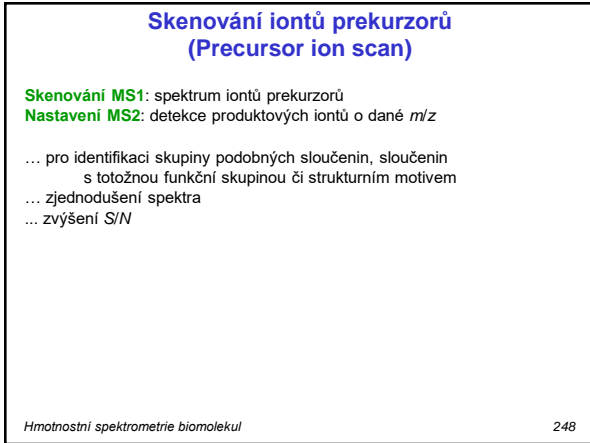
246



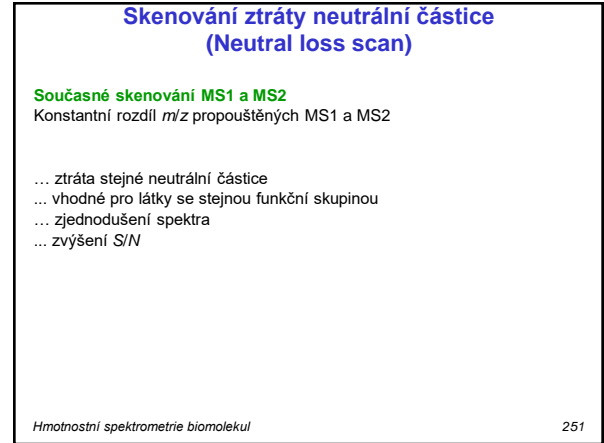
247



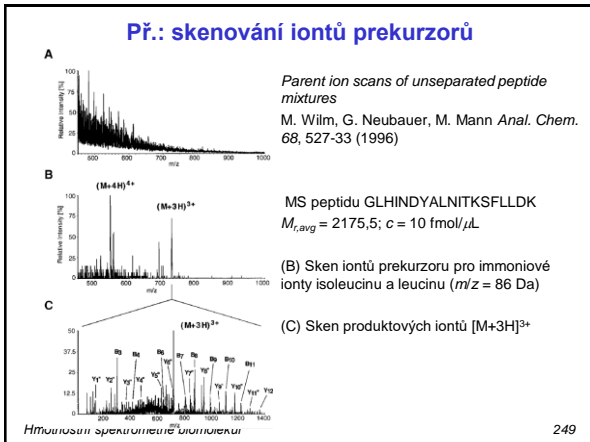
250



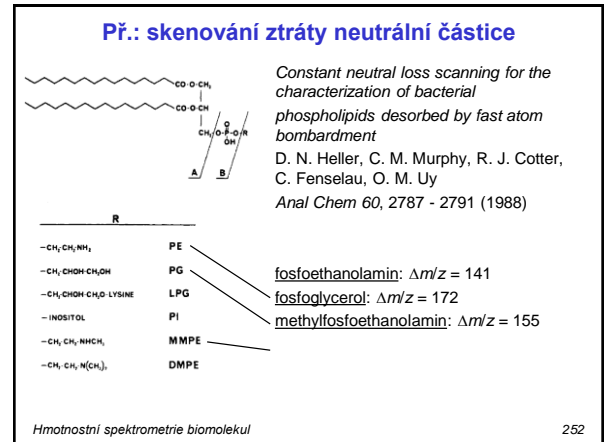
248



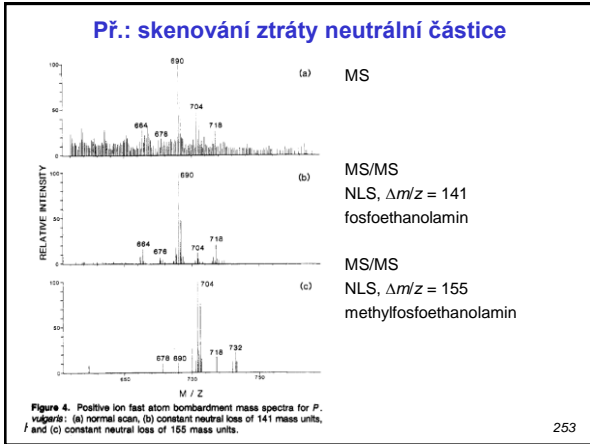
251



249



252



253

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

... záznam intenzity iontů 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 pík
... nevhodný při analýze komplexních směsí

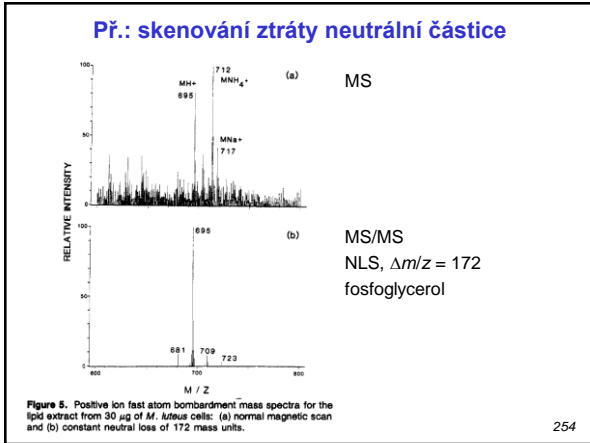
Monitorování vybraného iontu (Selected ion monitoring, SIM)
... detekce při vybrané m/z
... pro experiment navržený pro monitorování pouze vybraného iontu
... pro více iontů **peak switching**

Monitorování vybrané reakce (Selected reaction monitoring, SRM)
... analogie SIM s využitím tandemové MS
... pro více reakcí **multiple reaction monitoring, MRM**

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

256

256



254

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

257

257

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

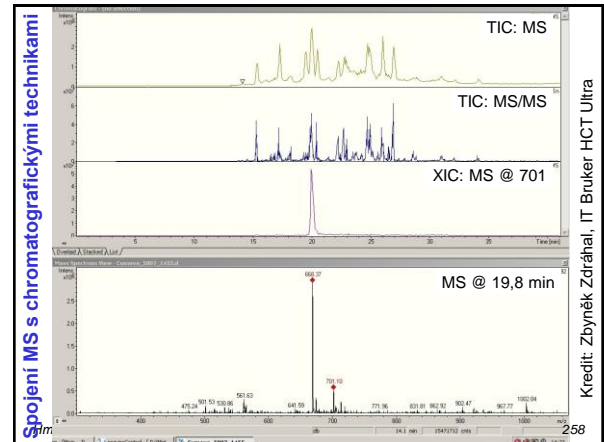
Monitorování více reakcí (multiple reaction monitoring, MRM)
Nastavení MS1: peak switching – ionty prekurzorů o daných m/z
Nastavení MS2: peak switching – produktové ionty o daných m/z
... velmi selektivní důkaz analytů, resp. jejich reakcí

Vysoký S/N, používáno v kombinaci s chromatografickými technikami

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

255

255



258

Př.: Monitorování více reakcí, MRM

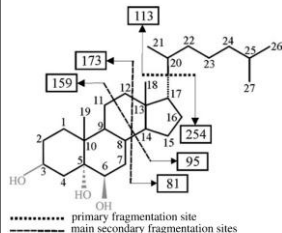


Table 1. Overview of the daughter ions with the highest intensity

COP	Molecular mass Da	Parent ion mass (<i>m/z</i>) formation	Daughter ions with the highest intensity (<i>m/z</i>)
Triol	420.6	367.4 [MH-3H ₂ O]	159.0 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
19-OH	402.6	367.4 [MH-2H ₂ O]	158.9 95.0
		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 cholestanetriol as a representative for the other COPs. *Triol*: cholestanetriol, *7-OH*: 7-hydroxycholesterol, *25-OH*: 25-hydroxycholesterol, *7-Keto*: 7-ketocholesterol, *5,6-Ep*: 5,6-epoxycholesterol, *19-OH*: 19-hydroxycholesterol

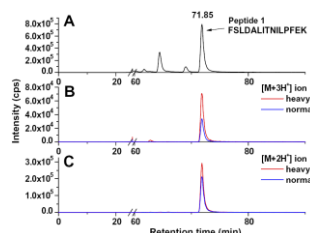
B. Rossmann, K. Thurner, W. Luf *Monatsh Chem* 138, 437- 444 (2007)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

259

259

MRM: TIC a XIC



(A) TIC pro několik vybraných peptidů alkoholdehydrogenázy

(B) XIC specifického peptidu alkoholdehydrogenázy, prekurzor: z = 3

(C) XIC specifického peptidu alkoholdehydrogenázy, prekurzor: z = 2

(navíc standard pro kvantifikaci)

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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

262

262

Př.: HPLC – APCI – SRM

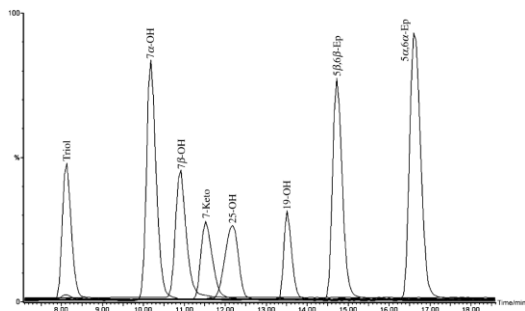


Fig. 8. MRM chromatograms of 8 single standards (overlaid). (standard: 5000 ng/cm³, V_{inj}: 50 nm³)

SRM pro dominantní reakce z předchozí tabulky

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

260

260

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

263

263

Př.: HPLC – APCI – MRM

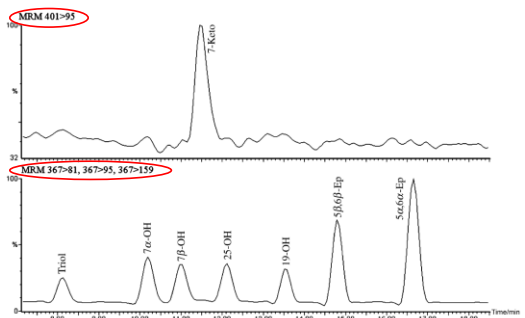


Fig. 9. MRM chromatogram of a standard mixture (7 COPs and 19-hydroxycholesterol the prospective internal standard). (standard: 5000 ng/cm³, V_{inj}: 50 nm³)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

261

261

Hmotnostní spektrometry 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 spektrometry – kombinace výše uvedených, např. LT - FT ICR

Klasifikace tandemové spektrometrie

- fragmentace v prostoru: 1, 3, 4, 5
- fragmentace v čase: 2

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

264

264

Další hmotnostní spektrometry 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 iontu

q_1 : kolizní cela

Q_2 : selekce produktů

Tandem kvadrupólový filtr - oTOF (QTOF)

TOF-TOF

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

265

265

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

268

268

Další hmotnostní spektrometry pro MS/MS

Tandem kvadrupólová iontová past - TOFMS (IT-TOFMS)

IT: možnost akumulace a MS^n v první stupni.

TOF: citlivý detektor s vysokým rozlišením jako koncový stupeň.

Iontové pasti: kvadrupólová IT a FT-ICR-MS

možnost MS^n

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 MS^n , $n > 2$)

Tandem LT – FT-ICR-MS

mnoho možných režimů skenů

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

266

266

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 rozládá 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

269

269

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

267

267

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:

$$E_m \ll E(M_i(M_t + M_i))$$

t = terčik (target), i = ion

Těžší terčik \Rightarrow možné přenést více energie na iont

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

270

270

Nízkoenergetické srážky iontů

Energie srážek: 1 – 100 eV

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

Účinnost srážek

obvykle dostatečná díky mnoha srážkám iontu v kolizní cele

Instrumentace

trojitý kvadrupólový filtr, iontové pasti, hybridní přístroje

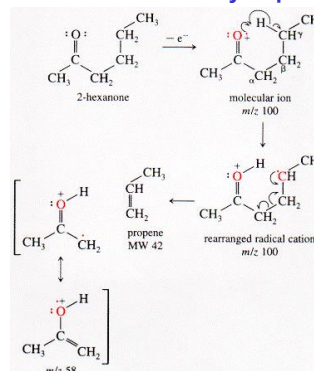
V současnosti nejrozšířenější technika, nízkoenergetická CID

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

271

271

Mechanismus McLaffertyho přesmyku



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

274

274

Vysokoenergetické srážky iontů

Energie srážek: keV

elektronový charakter excitace, interakce mezi iontem a terčem – 10^{-15} s
přeměněná energie – 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

272

272

ECD, ETD

Electron capture dissociation

- interakce iontů s termálními elektrony (nízká E)
- aplikace: fragmentace peptidů (ionty c, z), nevede 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)

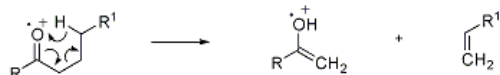
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

275

275

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.*

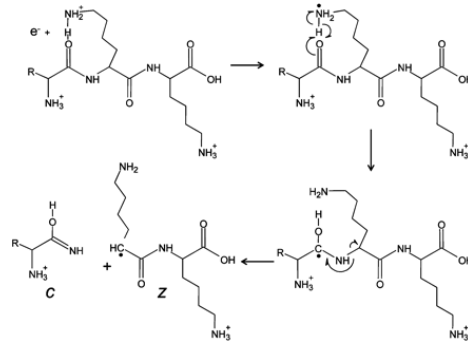
Soc. **94**, 8938 (1972); F. Turecek, V. Hanus, *Org. Mass Spectrom.* **15**, 8 (1980).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

273

273

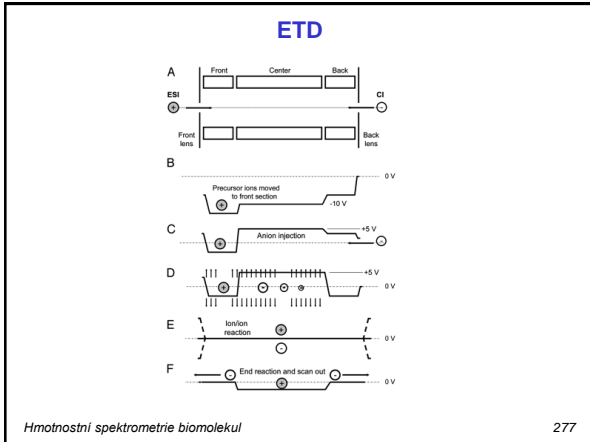
ECD



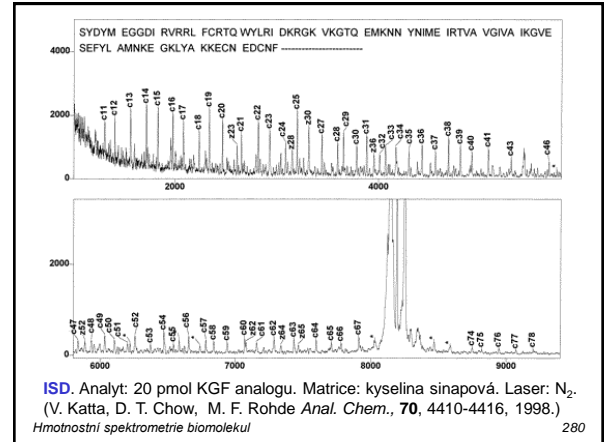
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

276

276



277



280

Fragmentace ve zdroji

In-Source Fragmentation (ISF), In-Source Decay (ISD)

Využívána 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]⁺).

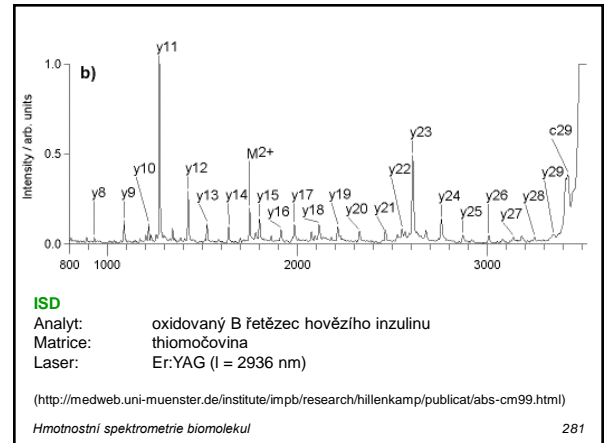
Pulsní metody (Delayed Extraction) nutné pro:

- dosažení dostatečné citlivosti
- prodloužení délky pobytu iontů v iontovém zdroji (více srážek).

Převážně monomolekulární reakční mechanismus (narozdíl od CID).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 278

278



281

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).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 279

279

Fragmentace za zdrojem

(Post-Source Decay, PSD)

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

Analýza produktů v reflektoru:

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

ABC⁺ → AB⁺ + C
ABC⁺ → A⁺ + BC atd.

Bilance kinetické energie pro první rovnici:

$$m_{ABC}v^2/2 = m_{AB}v^2/2 + m_Cv^2/2.$$

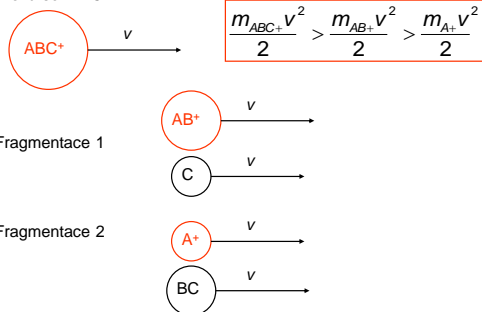
Čím těžší je fragmentový iont, tím vyšší má kinetickou energii a tím hlouběji pronikne do reflektoru → delší doba letu.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 282

282

Fragmentace za zdrojem

Prekursor ABC⁺

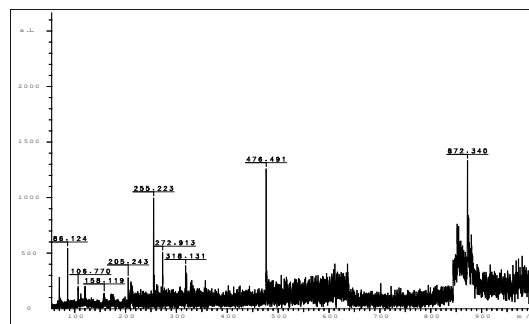


Hmotnostní spektrometrie biomolekul

283

283

MALDI PSD peptidu



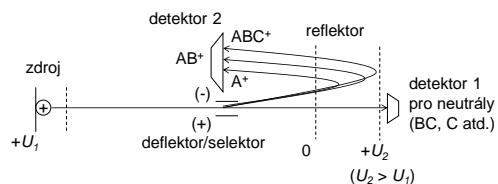
MALDI PSD – reflektor se 2 stupni. (Zdroj: Z. Zdráhal)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

286

286

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.

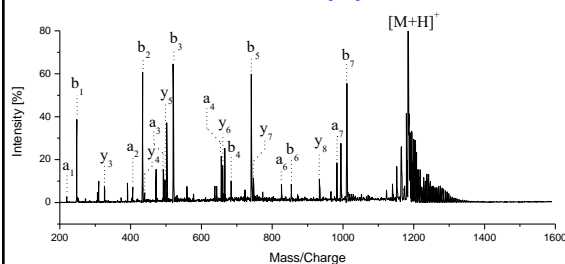
Kvadratický reflektor umožňuje zaostřit ionty v širokém intervalu m/z .

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

284

284

MALDI PSD peptidu



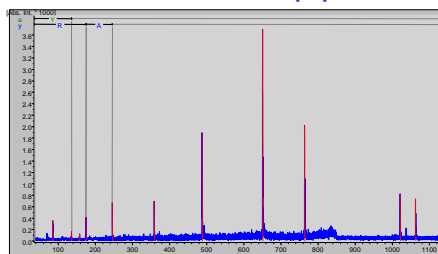
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂
MALDI PSD – reflektor s kvadratickým polem.
(O. Šedo et al. *Anal. Chim. Acta* **2004**, 515, 261-269)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

287

287

MALDI PSD derivatizovaného peptidu YLYELAR



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

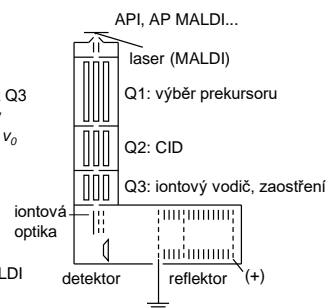
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

285

285

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



ortogonalní TOF:
typický pro API, ale i pro MALDI

axiální TOF:
typický pro MALDI

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

288

288

TOF s CID?

CID (používané v QqQ, IT...) ≠ 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

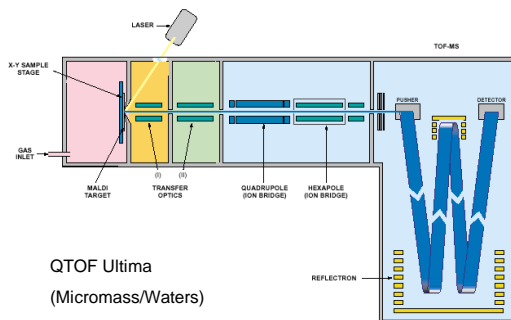
1. QTOF (přesněji QqTOF)
2. TOF/TOF

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

289

289

Hybridní instrument pro API a MALDI



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

292

292

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

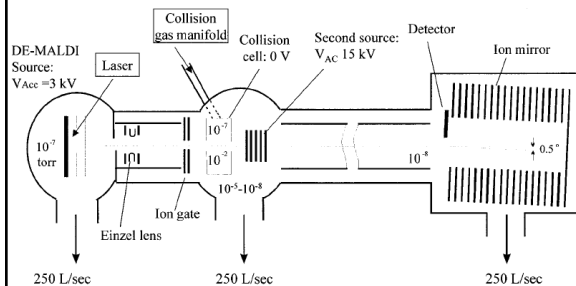
Př.: QTOFMS: API (kontinuální iontový zdroj)
AP MALDI (pulsní, kvazikontinuální iontový zdroj)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

290

290

TOF-TOF

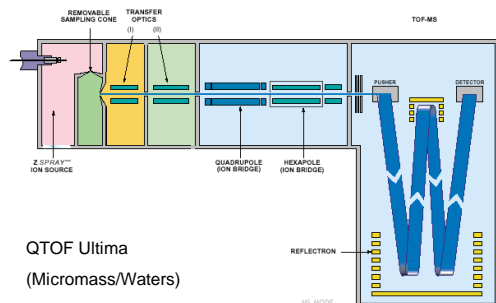


Hmotnostní spektrometrie biomolekul

293

293

Hybridní instrument pro API a MALDI



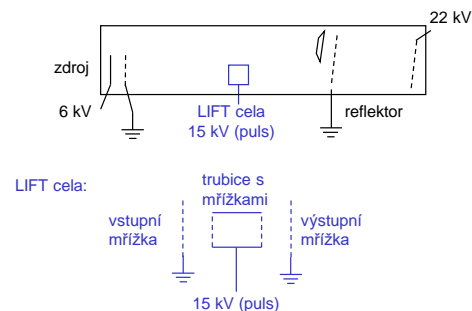
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

291

291

LIFT TOF MS

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



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

294

294



8

Detektory a záznam dat. Principy vakuové techniky.
Spojení separace a hmotnostní spektrometrie (on-line, off-line, čipy)

295

Elektronový násobič

- Obdoba fotonásobiče: konverzní elektroda se sérií dynod (s potenciálem vzrůstajícím zleva doprava) a kolektorem. Elektronový násobič není zapouzdřen ve skleněné baňce.
- Konverze iontu na elektron(y) na první elektrodě (např. Cu-Be). Z násobování elektronů na dynodách. Záchyt elektronů na kolektoru, vznik proudu.
- Zisk $\sim 10^6$

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 298

298

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 296

296

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 299

299

Faradayův pohár (Faraday cup)

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 297

297

Mikrokanálová destička (microchannel plate, MCP)

Rozměry MCP

- tloušťka ~ 1 mm
- průměr 1 - 10 cm.

Mikrokanálky

- orientovány šikmo,
- průměr $\sim 3 - 20 \mu\text{m}$.
- Chevronová struktura v sestavách více MCP.
- pokryté polovodičovou vrstvou PbO, ... vznik gradientu napětí podél mikrokanálky (kontinuální dynoda, násobení elektronů)

Plošný detektor vhodný pro TOFMS
Zisk jednoho MCP $\sim 10^3$, dvojitého MCP $\sim 10^6$.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 300

300

"Daly" detektor

vyleštěná kovová elektroda, -30 kV
tenký kovový film
vrstvička fosforu
fotonásobič

Iont → elektron(y) → 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 301

301

Záznam dat v MS

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

Skenující přístroje	Skenovaná veličina	Doba skenu
MAG magnetický sektor	B, U	~ 1 s
Q kvadrupólový filtr	U, V, f	~ 0.1 s
IT, LT iontové pasti	U, V, f	~ 1 s

Přímý záznam v čase:

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

Další neskenující přístroje mohou používat plošné detektory (array).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 304

304

Plošné multikanálové detektory (Array detectors)

... např. pro magnetický sektor

Fotografická deska
- historický detektor, zdlouhavé zpracování

Kombinace MCP a diodového pole (MCP-diode array)

fosfor
diodové pole
2 MCP
svazek optických vláken

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 302

302

Signál v MS

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

a.u. (arbitrary units) nebo relativní intenzita

normalizace iontového signálu

Massa/Charge

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 305

305

Záznam dat v MS

ionty
↓
náboj, q
konverze (konverzní účinnost, amplifikace)
elektrony
↓
 $I = q/t$ (t ... čas)
proud
↓
 $U = IR$ (R ... impedance)
napětí
↓
záznamové zařízení

Odlišná schemata pro fotografickou desku a scintilační detektory

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 303

303

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 fotoaparátém (historický)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 306

306

Detekční elektronika - A/D převodník

Měření (digitalizace) napětí

Základní parametry

počet bitů (rozdílení převodníku)
vzorkovací frekvence, počet vzorků za sekundu [vz/s, sample/s]

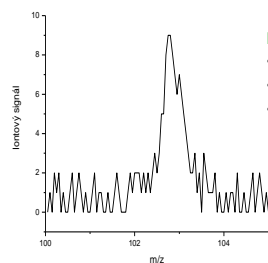
max. frekvence (cut-off frequency)
polarita: unipolární (negativní), bipolární
rozsah vstupního napětí
max. vstupní napětí
počet bodů (délka paměti, velikost pufru)
stabilita
aj.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

307

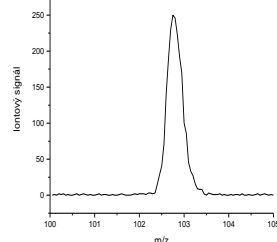
307

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

310

310

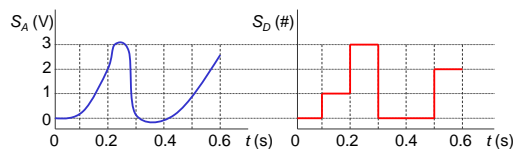
A/D převodník (analog/digital)

Př.:

2-bitový převodník s rozsahem 0-3V a vz. frekvencí 10 vz/s
počet úrovní = 2²:

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

308

308

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 $m/z = 200 - 2000$, >10 bodů/pík. Minimální vzorkovací frekvence?

min. vzorkovací frekvence = $(2000-200) \times 10 / 0.1 = 180$ ksamplinge/s

délka paměti = $(2000-200) \times 10 = 18000$ vz.

... pro 16-bitový převodník 36 kByte

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

311

311

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 $> (2 \times (\text{počet úrovní} - 1))^{-1} = (1/2 \times 255)^{-1} \sim 0.2\%$

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

309

309

Rychlost A/D převodníku

Př. 2: Jak rychlý musí být A/D převodník pro TOFMS, abychom zaznamenali iont letící 20 μ s s rozlišením 2 000, chceme-li definovat pík 10 body?

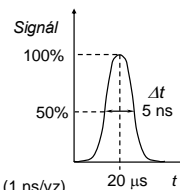
$t = 20 \mu\text{s}$, $R = 2000$

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

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

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

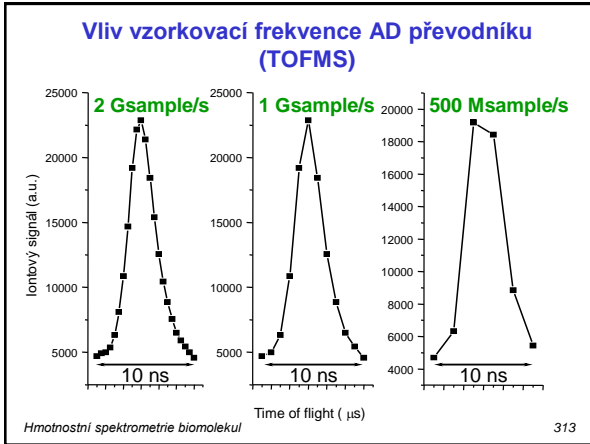
vzorkovací frekvence, $f = 1/t_{\text{sample}} = 1 \text{ Gsample/s}$



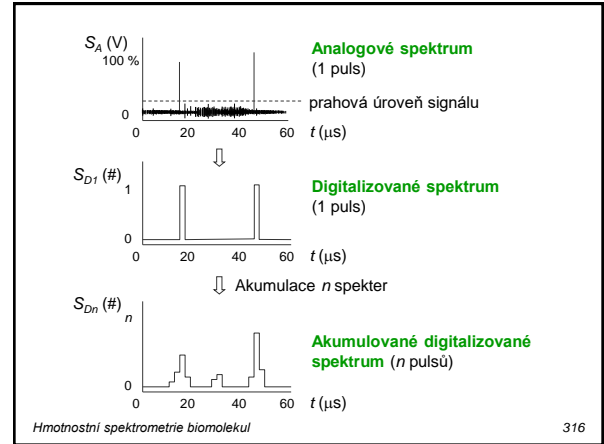
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

312

312



313



316

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 314

314

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 317

317

T/D převodník (T/D converter, TDC)

Počítání pulsů
 Náraz iontu na detektor → puls → zesilovač → diskriminátor → čítač

T/D převodník (time to digital)
 1-bitový A/D převodník
 2 úrovně: 0 a 1

Parametry:
 časové rozlišení
 (počet kanálů)
 aj.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 315

315

T/D převodník (time/digital)

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

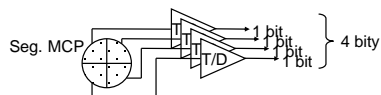
Klasický TOF detektor

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 318

318

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

319

319

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

322

322

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

320

320

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

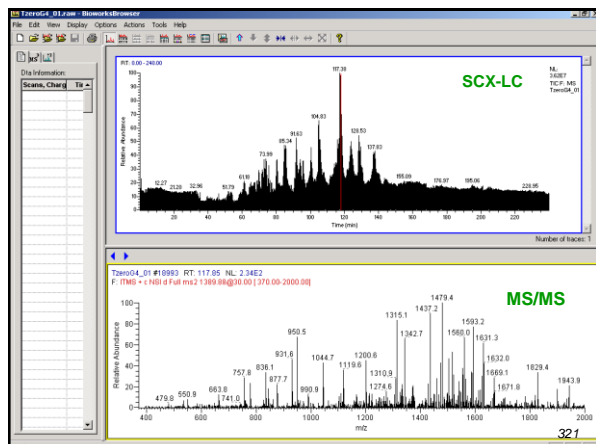
$\lambda = (\sqrt{2}n\sigma)^{-1}$

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

323

323



321

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 kolíí molekula - molekula než molekula - stěna

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

$\lambda > \text{m}$:
převládají kolíie molekul se stěnou vakuové aparatury
obvyklá situace v hmotnostním spektrometru
pozn.: UHV = ultra high vacuum

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

324

324

Průtok plynu

Průtok plynu, Q

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

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

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

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 - nejužší místo omezuje celý systém:

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

325

325

Mechanická pumpa

- Jedno- a vícestupňové.

- Rotor v oleji
 - min. tlak omezen vypařováním oleje
 - nutná past na olejové páry
 - nutné výměny oleje

- Tlak $> 0.1 \text{ Pa}$... "hrubě" vakuum.

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

- Běžná pumpa v komerčních systémech.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

328

328

Rychlost pumpování

Rychlost pumpování, S

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

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

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

ij., 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

326

326

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:

$$\ln(p_{\text{out}}/p_{\text{in}}) \propto \sqrt{m}$$

- UHV pumpa, tlak $> 10^{-8} \text{ Pa}$

- Rychlosti pumpování do $\sim 3000 \text{ L/s}$

- Běžná UHV pumpa v komerčních systémech.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

329

329

Vakuové pumpy

Mechanická pumpa

Difúzní pumpa

Turbomolekulární pumpa

Kryopast

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

327

327

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 $> 10^{-6} \text{ Pa}$.

- Spolehlivá pumpa, nevyžaduje údržbu.

- Pomalý ohřev i chlazení.

Kryopast

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

- Nutnost regenerace.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

330

330

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

331

331

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 ($R_1 \sim 500$)
- odstranění nečistot
- zdroj dalších informací o analytech

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

334

334

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)

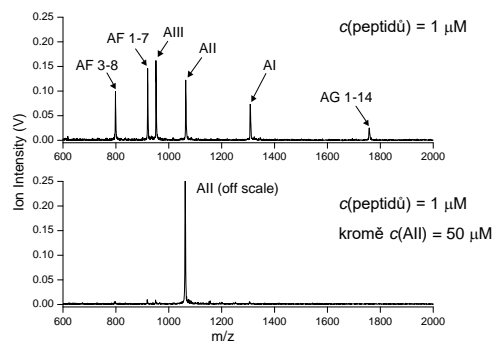
- Bimetalový termočlánek a odporově žhavené vlákno.
- Přenos tepla z vlákna na termočlánek závisí na tlaku a druhu plynu.
- Rozsah p : 100 Pa - 0.1 Pa, u speciální varianty (convectron) 100 kPa - 0.1 Pa.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

332

332

Vzájemné rušení MALDI signálu ve směsi peptidů



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

335

335

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 žhavého vlákna urychleny ke spirále, dochází k ionizaci plynu, záchytu iontů na drátu a měření proudu. $p = I(\text{proud})$. 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 termočláanky a iontové trubice.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

333

333

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 kapalinou 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

336

336

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

337

337

Interface pro MALDI

Off-line

Terčičky s hydrofilními místy (anchorchip).
Mikrometody používající piezoelektrické pipety a mikroterčičky.
Nanášení vzorku pomocí elektrospreje

On-line

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

In-line

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

Off-line vs. on-line

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

340

340

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

338

338

Archivování vzorku (MALDI)

Postup při separaci s MALDI MS a MS/MS detekcí

1. Nanášení eluentu na terčičky
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

341

341

Interface pro MALDI

Obvyklý postup:

- Nanášení kapalného vzorku na terčičky
- Vysušení vzorku
- Vložení terčičku 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. Nanášení roztoku na terčičky pokryté vrstvičkou matrice

Sběr eluentu

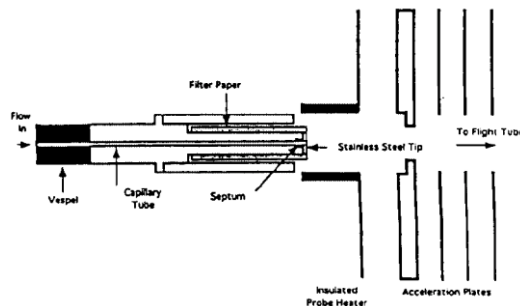
1. Diskrétní frakce
2. Spojitá stopa

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

339

339

Průtoková sonda (on-line)

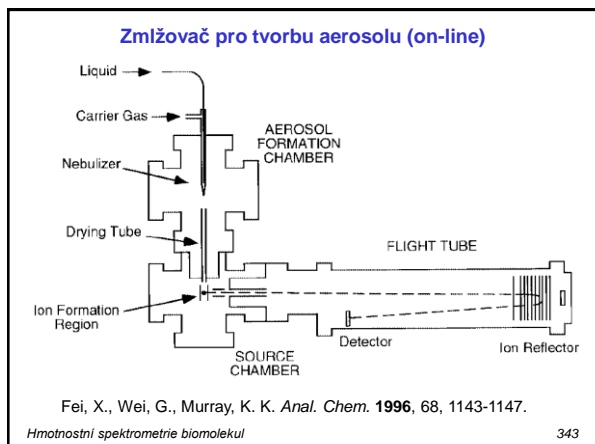


Whittall, R. M., Russon, L. M., Li, L. J. *Chromatogr. A* 1998, 794, 367-375.

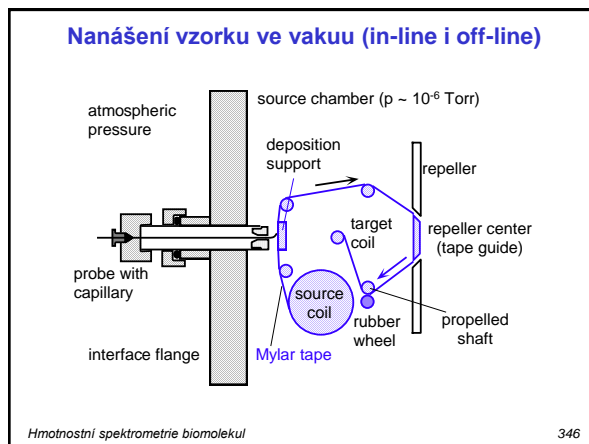
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

342

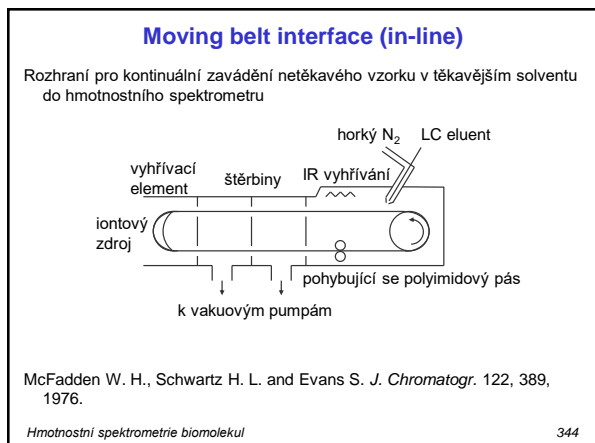
342



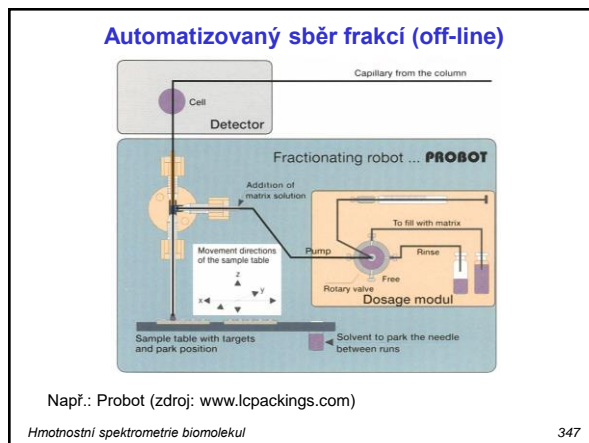
343



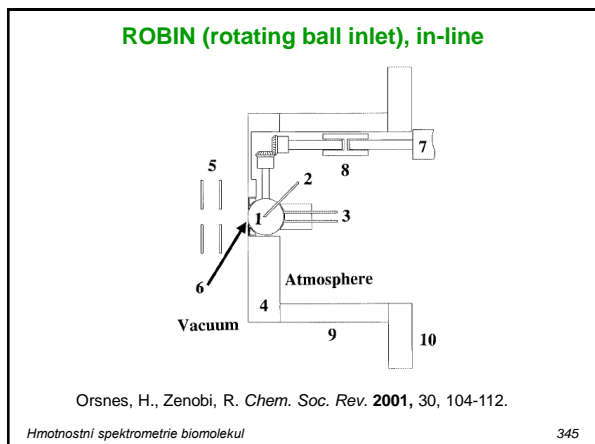
346



344



347



345



348

Mikrometody

Close-up of chip nano vials

Automated MALDI-TOF MS

Microdispenser Nano-vial arrays

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 349

349

9

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

352

352

Příklad návrhu čipu pro paralelní analýzu

infúzní kapilára do sondy

společný kapalinový spoj

separační kanálky

kapilára pro dávkování vzorků z mikrotitrační destičky

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 350

350

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 353

353

Čip vs. konvenční zařízení

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 351

351

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 354

354

IUPAC názvosloví aminokyselin

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

355

355

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

358

358

IUPAC názvosloví aminokyselin

Triviální název	Symboly	Vzorec
Isoleucine	Ile I	$\text{C}_2\text{H}_5\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$
Leucine	Leu L	$(\text{CH}_3)_2\text{CH-CH}_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$
Lysine	Lys K	$\text{H}_2\text{N-}[\text{CH}_2]_4\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$
Methionine	Met M	$\text{CH}_3\text{-S-}[\text{CH}_2]_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$
Phenylalanine	Phe F	$\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$
Proline	Pro P	
Serine	Ser S	$\text{HO-CH}_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

356

356

Současné ionizační techniky v proteomice

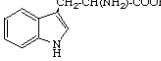
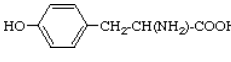
FAB	max. $m \sim 10\,000$ $LD \sim 20\text{ pmol}$ (klasický FAB), $< 1\text{ pmol}$ (CF-FAB)
ESI	max. $m \sim 100\,000\text{ Da}$ ($z \gg 1$) $LD < 10\text{ fmol}$ (rutinní) $LD \sim \text{amol}$ nebo 10^{-9} M (vybrané aplikace)
MALDI	max. $m \sim 10^6$ (prakticky neomezen – TOF analyzátor) relativně nejvíce odolná vůči rušení nečistotami $LD < 10\text{ fmol}$ (rutinní) $LD \sim \text{amol}$ nebo 10^{-9} M (vybrané aplikace)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

359

359

IUPAC názvosloví aminokyselin

Triviální název	Symboly	Vzorec
Threonine	Thr T	$\text{CH}_3\text{-CH}(\text{OH})\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$
Tryptophan	Trp W	
Tyrosine	Tyr Y	
Valine	Val V	$(\text{CH}_3)_2\text{CH-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

357

357

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

360

360

Separační metody v proteomice

GE

gelová elektroforéza na polyakrylamidovém gelu

HPLC

vysoceúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi

IEC

chromatografie na iontoměnících

AC

afinitní chromatografie

CE

kapilární elektroforéza

Centrifugace

běžná centrifugace, gradientová centrifugace

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

361

361

RP HPLC

• Kolona: klasická, kapilární (ϕ 300 μ m) nebo nano LC (ϕ 75 μ m)

• Náplň: C₁₈, velikost nosiče: 3 – 10 μ m (RP ... reverse phase)

• Gradientová eluce, např.:

- start: 10% org fáze + 90% vodné fáze

- konec: 80% org fáze + 20% vodné fáze

- organická fáze: ACN (acetonitril) + 0.1% TFA (kyselina trifluoroctová)

- vodná fáze: 0.1% TFA

• Organický solvent přispívá k rozpustnosti peptidů, umožňuje detekci v UV (230 – 240 nm) a rychle se vypařuje, což je výhodné pro sběr frakcí např. pro MALDI MS.

• Standardní technika kolonové separace pro peptidy a proteiny

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

364

364

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 deseti tisíců 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

362

362

Př.: RP HPLC směsi peptidů (digest BSA)

Sample: Tryptic Digest of BSA

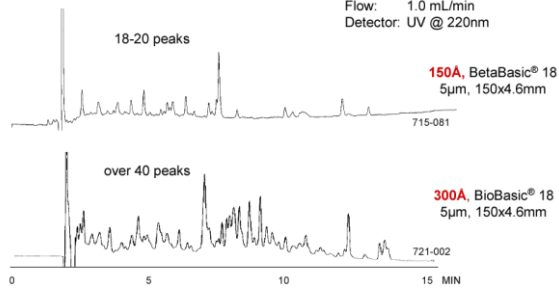
Mobile phase: A - 0.1% TFA in H₂O

B - 0.1% TFA in ACN

Gradient: 10% to 50%B in 20 min.

Flow: 1.0 mL/min

Detector: UV @ 220nm



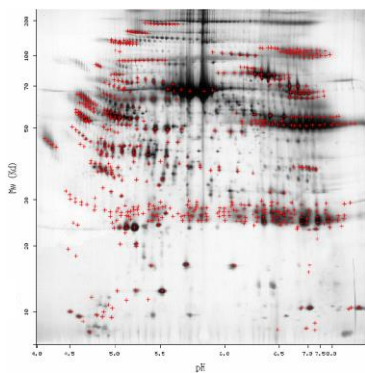
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

Zdroj: ThermoFinnigan 2002

365

365

Př.: 2D GE lidské plazmy



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

Zdroj: Expsy

363

363

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

366

366

Nem...XXX-XXX-Lys-YYY-XXX-XXX...-Cterm*(I) Trypsin cleaves this peptide bond

Enzymatické štěpení proteinů

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

Další enzymy: lysin, chymotrypsin, CNBr aj.

Produkty enzymatického štěpení

- specifické fragmenty analyzovaného proteinu
Např. trypsin štěpí na C-straně aminokyseliny K or R, pokud není soused P. (Skutečná pravidla ještě složitější):
N terminál-X-X-X-X-X-K (nebo R)-Z-Z-Z-Z-Z-Z-C terminál (Z≠P)
- nespecifické fragmenty analyzovaného proteinu
- artefakty (modifikace aminokyseliny, např. oxidací, díky PA gelu atd.)
- fragmenty enzymu (autolýza)
- fragmenty keratinu ($\begin{matrix} \text{S} & \text{S} \\ | & | \\ \text{---} & \text{---} \\ | & | \\ \text{S} & \text{S} \end{matrix}$)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 367

367

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 370

370

Enzymatické štěpení proteinů v 2D gelu

- Wash the gel slices for at least 1 hr in 500 microliters of 100 mM ammonium bicarbonate. Discard the wash.
- Add 150 microliters of 100 mM ammonium bicarbonate and 10 microliters of 45 mM DTT. Incubate at 60 degrees centigrade for 30 min.
- Cool to room temp and add 10 microliters of 100 mM iodoacetamide and incubate for 30 min in the dark at room temperature.
- 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.
- Add 50 microliters of acetonitrile to shrink the gel pieces. After 10-15 min remove the solvent and dry the gel slices in a rotary evaporator.
- 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.
- 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 rotary evaporator.)
- 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/pirprotocol.html>

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 368

368

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 371

371

Strategie analýzy v proteomice

Základní typy analýzy

- Identifikace** (potvrzení přítomnosti známého proteinu ve vzorku)
- Relativní kvantifikace** v diferenciální proteomice
- 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 369

369

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

- 2D GE + X + MS (peptidové mapování)
- 2D GE + X + RP/PLC + MS a MS/MS (sequence tag, AMT)
- X + 2D LC (např. IEC a RP/PLC) + MS a MS/MS
- X + AC (afinitní chromatografie) + MS a MS/MS (IMAC, ICAT)
- Strategie využívající X a izotopové reagenty/standardy
X ... selektivní enzymatické štěpení

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 372

372

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

- sequence tag, MS-tag** - analýza části sekvence (z fragmentace peptidu v plynné fázi)
 - 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

373

373

Příklad hledání v databázích: MS Fit

Zadáni:

The screenshot shows the MS Fit search interface. Key parameters include:

- Database: Uniprot/13
- Instrument: MALDI-TOF
- Search Hit: From: [] To: []
- Species: All
- MW of Protein: from [] Da to [] Da
- Protein pI: from [] to []
- Digest: Trypsin
- Max. # of missed cleavages: []
- Cysteines modified by: Iodoacetamide
- Y terminus: [] C terminus: []
- Sample ID: []
- Max. Reported Hinc: []
- Peptide N-terminal Glu to pyrrolidine
- Oxidation of M: []
- Phosphorylation of S, T and Y: []
- Search mode: Identity
- Min. # matches with NO AA substitutions: []
- Peptide Mass shift: [] Da

 The results table shows a list of peptides with their m/z values and scores.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

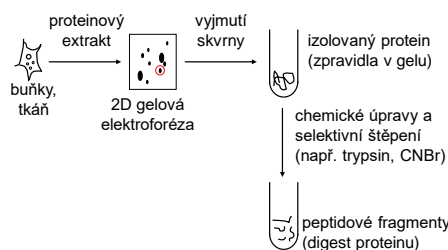
376

376

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

Určení proteinu analýzou produktů enzymatického štěpení

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



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

374

374

Příklad hledání v databázích: MS Fit

Výsledky:

Sample ID (comment): Magic Bullet digest
 Database searched: Uniprot/13
 Molecular weight search (1000 - 100000 Da): score: 408557 entries
 P/I (range: 429404 entries)
 Combined molecular weight and pI searches select: 408557 entries
 MS-FT search select: 615 entries (results displayed for top 5 matches)

Rank	MOWSE Score	% (Mann)	Protein MW (kDa)	Species	Accession #	Protein Name
1	2.02e+007	15.23 (65%)	30271.5	BOS TAURUS	M55870	sp-riboprotein A-1 precursor
2	1.64e+003	4.23 (17%)	3311.9	CATLEPOMER MOSAIC VIRUS	N70949	sp18 transcription factor [caudovirus mosaic virus CAUV, isolate 105-5, sp18 non-transmissible, Peptide Partial, 29 aa]
3	1.56e+003	4.23 (17%)	3475.0	CATLEPOMER MOSAIC VIRUS	N70948	sp18 transcription factor [caudovirus mosaic virus CAUV, isolate 105-5, sp18 non-transmissible, Peptide Partial, 30 aa, region 1 of 2]
4	583	5.33 (21%)	48333.0	ALLO-CHEROMATINUM VIRUS	L12735	The first ATG in the open reading frame was chosen as the start codon.
5	428	6.23 (24%)	64511.6	BLUETONGUE VIRUS	N62735	nonstructural protein NS1

MS Fit - Identifikace proteinu z hmotností peptidových fragmentů pomocí programu na <http://prospector.ucsf.edu/ucs/ftm3.2/msfit.htm>

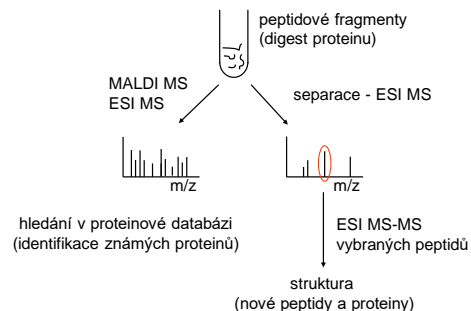
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

377

377

PMF

3. MS analýza a vyhodnocení výsledků



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

375

375

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

378

378

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

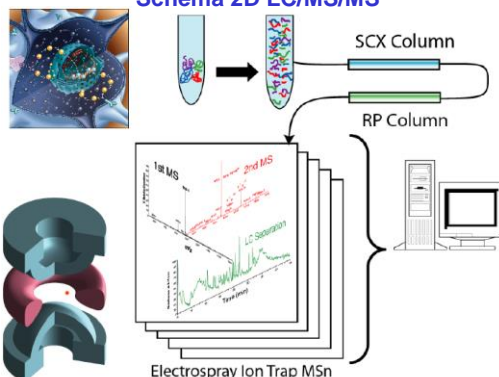
- špatně rozpustné peptidy
- adsorpce peptidů
- vzájemné rušení peptidů
- neselektivní rozštěpení peptidu
- nedostatečné štěpení proteinu (sterické zábrany)
- PTM, artefakty

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

379

379

Schema 2D LC/MS/MS



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

Zdroj: ThermoFinnigan 2002 382

382

Metoda Sequence-Tag (MS-Tag)

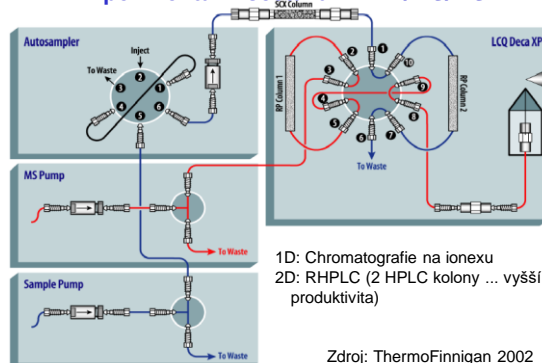
- Identifikace proteinu na základě přesné znalosti malé části jeho sekvence (sequence-tag, MS-tag), zpravidla sekvence jednoho peptidu
- Přesné stanovení sekvence aminokyselin části proteinu (typicky jednoho peptidového fragmentu z enz. štěpení) - obvykle pomocí ESI-MS/MS nebo MALDI-PSD-MS přímo z tabulky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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

380

380

Experimentální sestava 2D LC/MS/MS



1D: Chromatografie na ionexu
2D: RHPLC (2 HPLC kolony ... vyšší produktivita)

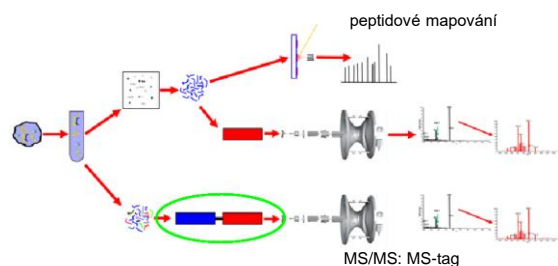
Zdroj: ThermoFinnigan 2002

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

383

383

Strategie MALDI MS a LC - ESI MS

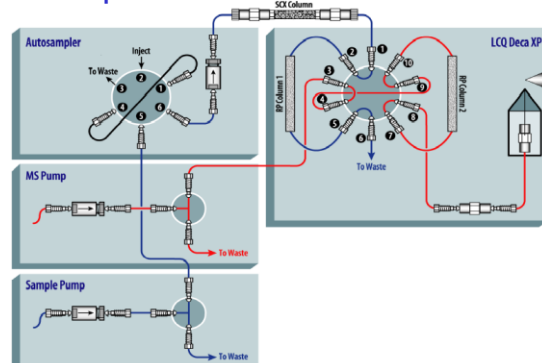


Hmotnostní spektrometrie biomolekul

Zdroj: ThermoFinnigan 2002 381

381

Experimentální sestava 2D LC/MS/MS

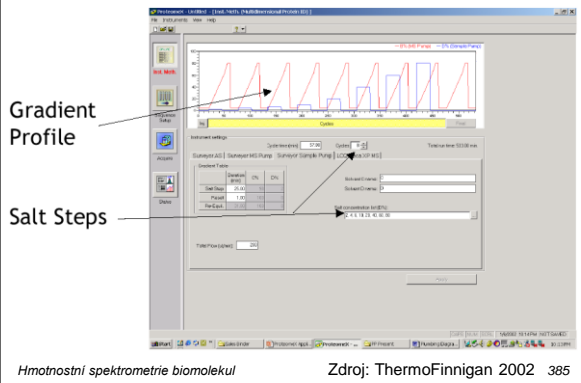


Hmotnostní spektrometrie biomolekul

Zdroj: ThermoFinnigan 2002 384

384

Řízení 2D LC/MS/MS experimentu



385

Accurate mass tag (AMT)

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

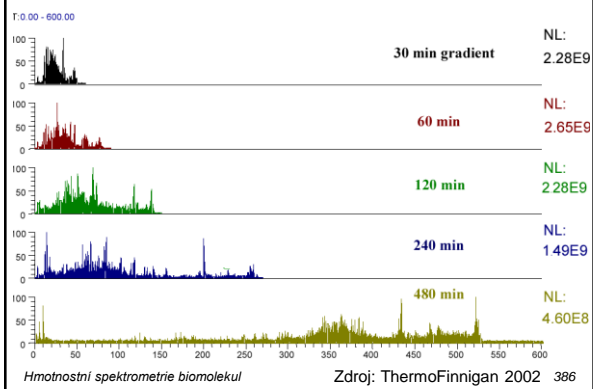
atom	^1H	^{12}C	^{14}N	^{16}O	^{32}S
m [Da]	1.007825	12.000000	14.003074	15.994915	31.972071

- Typický počet aminokyselin v řetězci peptidu ~ 10 . Přesná hmotnost aminokyselin – např. $m_{\text{mono}}(\text{G})=57.02146$, $m_{\text{mono}}(\text{A})=71.03711$ 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

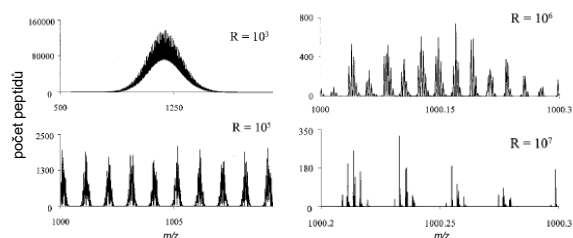
388

Výsledky 2D LC/MS/MS experimentu



386

AMT



MS směsi všech možných 10-merů peptidů při různých hodnotách R (a správnosti stanovení m/z): 103 (1000 ppm) (A), 104 (100 ppm) (B), 105 (10 ppm) (C), and 107 (0.1 ppm) (D).

Zdroj: T. P. Conrads, G. A. Anderson, T. D. Veenstra, L. Paša-Tolić and R. D. Smith *Anal Chem.* 2000, 72, 3349-3354

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

389

LC-ESI MS a MS/MS:

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

- Jeden MS sken následovaný několika MS/MS skeny hlavních prekurzorů
- V případě složitějších spekter i následující MS^3 skeny (např. pro detekci fosforylací)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

387

387

AMT

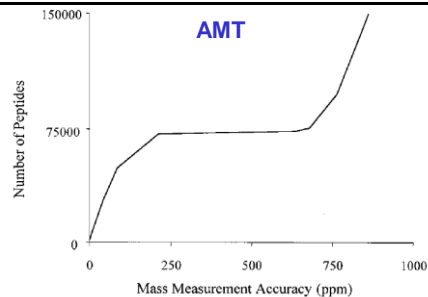


Figure 2. Number of 10-mer polypeptides at mass 1178.4 Da that can be distinguished as a function of mass measurement accuracy. As mass measurement accuracy improves beyond 100 ppm (~ 0.1 Da) the number of distinguishable polypeptides increases significantly.

Zdroj: T. P. Conrads, G. A. Anderson, T. D. Veenstra, L. Paša-Tolić and R. D. Smith *Anal Chem.* 2000, 72, 3349-3354

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

390

390



391

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 – RHPLC – MS/MS)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

394

Další strategie pro analýzu proteomu

- Nejsou pokusem o kompletní analýzu proteomu
- Spoléhají na kolonové separační techniky (místo 2D GE)
- Zahnují 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 přidavné prvky, např. použití izotopových značek, umožňují získat informaci o kvantitě analytu

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

392

Analýza ICAT (isotope-coded affinity tags)

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

ICAT reagents
Heavy reagent: d8-ICAT (X = deuterium)
Light reagent: d0-ICAT (X = hydrogen)

Biotin Linker (heavy or light) Thiol-specific reactive group

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

395

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

393

Analýza ICAT

Credit: Dr. Ruedi Aebersold
Institute for Systems Biology, Seattle, WA

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

396

Analyza ICAT

Pozn.

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

Nedostatky ICAT první generace

- Rozdílná m/z izotopových značek roven 8 \Rightarrow 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 ^{13}C ve spojovacím řetězci (místo 8 atomů D)
- Stejný eluční čas lehké i těžké formy v HPLC

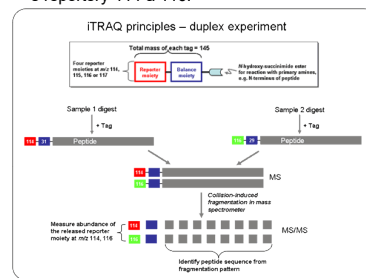
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

397

397

iTRAQ

Příklad dvou derivatizačních činidel s reportéry 114 a 116:



<http://www.proteome.soton.ac.uk/iTRAQ.htm>

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

400

400

Charakteristika ICAT

Výhody

- + Vhodná pro různé vzorky proteinů (tělesné tekutiny, buňky, tkáň, kultury)
- + Značné zjednodušení směsí
- + 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

398

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
- MS^n

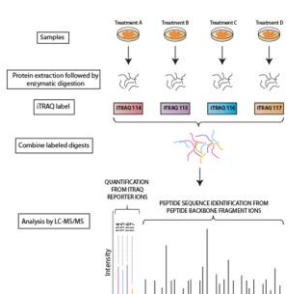
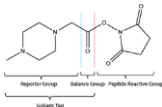
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

401

401

iTRAQ

- další technika diferenciální proteomiky
- vzrůst m/z derivatizovaných peptidů stejná (stejný prekurzor, velmi podobná separace)
- rozdílná m/z produktového iontu
- celkem 4 různá činidla pro derivatizaci peptidů
- celková hmotnost stejná, hmotnost „reporterů“ 114, 115, 116 a 117



<http://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/platforms/proteomics/iTRAQ>

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

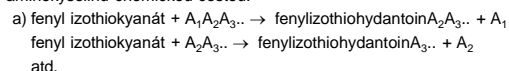
399

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 fenylkarbamátů od každého peptidu

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

2. MALDI MS směsi fragmentů peptidů.

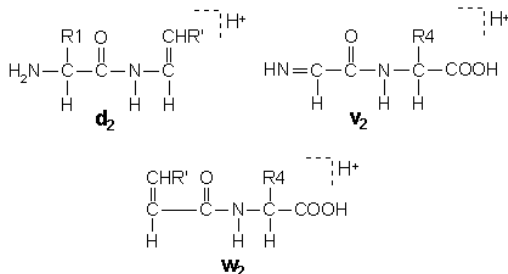
- aminokyselina je určena ze vzdálenosti sousedních piků, sekvence aminokyselin z pořadí piků

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

402

402

Další fragmenty peptidů



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

409

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:

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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

412

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

410

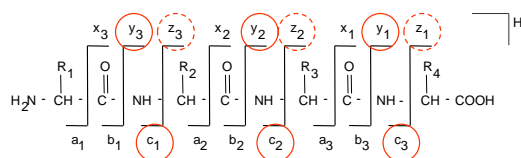
410

ISD fragmenty

Pravidla fragmentace ... dle relativní pevnosti vazeb.

Typické produkty fragmentace peptidů:

c, y, z



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

413

413

Výpočet molekulové hmotnosti peptidu/proteinu

Suma hmotností reziduí aminokyselin

+

Hmotnost koncových skupin:

obvykle 1 Da (H) pro N konec ($-\text{NH}_2$)
a 17 Da (OH) pro C konec ($-\text{COOH}$)

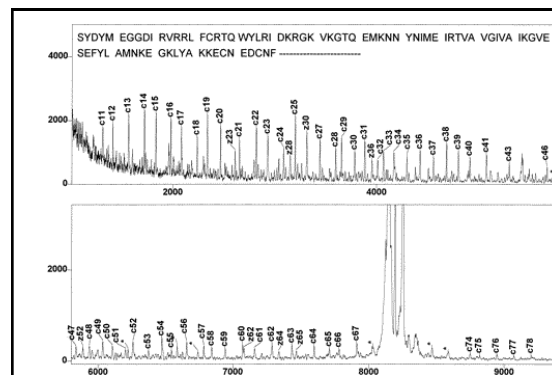
+

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

411

411

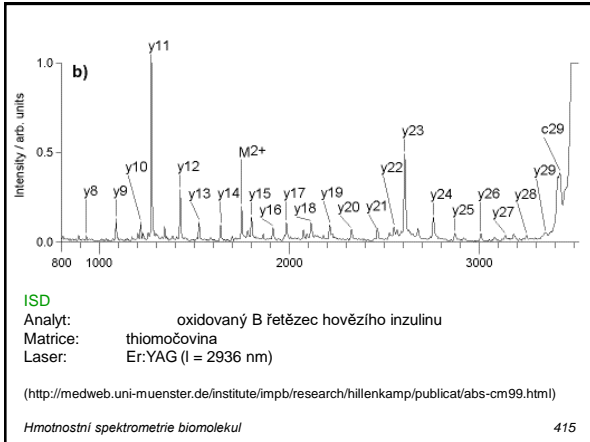


ISD. Analyt: 20 pmol KGF analogu. Matrice: kyselina sinapová. Laser: N_2 . (V. Katta, D. T. Chow, M. F. Rohde *Anal. Chem.*, **70**, 4410-4416, 1998.)

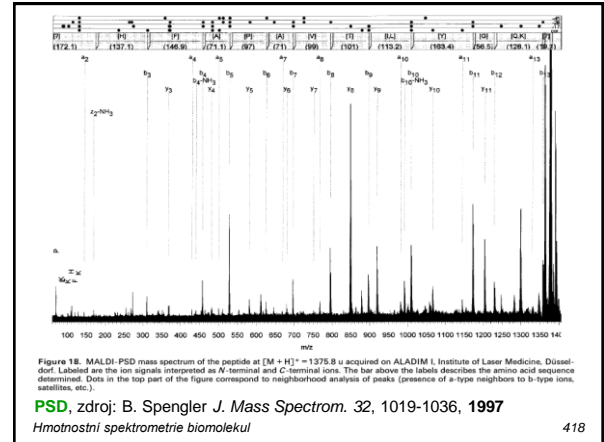
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

414

414



415



418

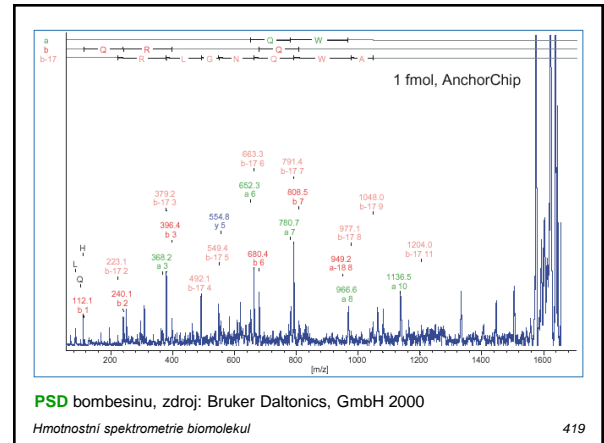
PSD fragmenty

Typické produkty fragmentace peptidů: a, b, y, z, d.
 Doprovodné píky -17 (ztráta NH₃) a -18 (ztráta H₂O).
 Immoniové ionty aminokyselin.
 Interní ionty – zejm. od Pro ve směru C konce

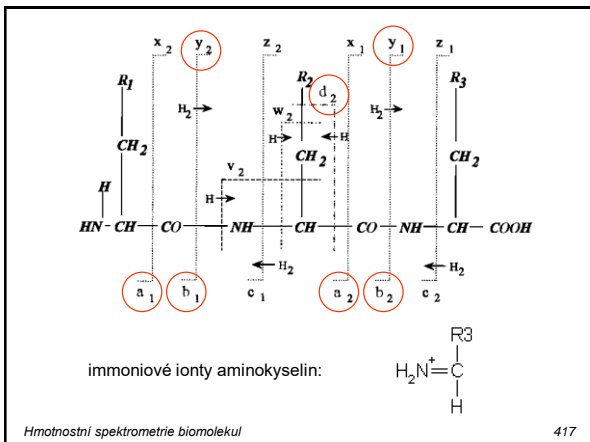
(B. Spengler *J. Mass Spectrom.* 32, 1019-1036, 1997)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 416

416



419



417

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 420

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

421

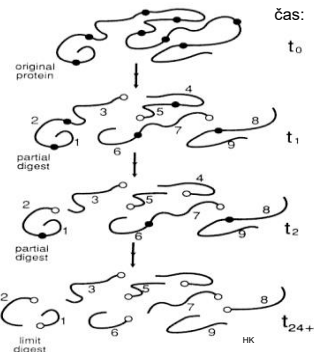
421

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

424

424

Sekvenování proteinu

Postup

1. Enzymatické štěpení

- tvorba více druhů digestů, aby vznikly různé, překrývající se štěpy
- různé 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

422

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

425

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 píky peptidu 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 ($1x^{16}O, 1x^{18}O$) a M+4 ($2x^{18}O$).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

423

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

426

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

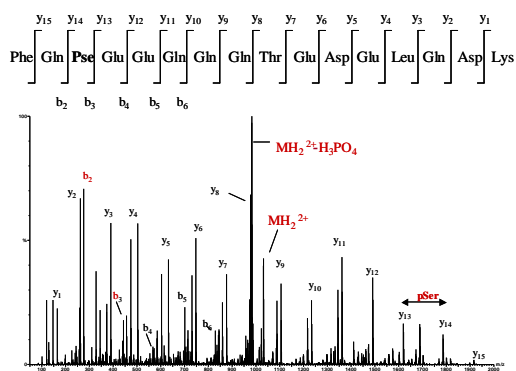
Některé modifikace mohou být značně složité, např. oligosacharidové modifikace glykoproteinů (mnoho druhů cukrů a mnoho míst proteinu, na která se cukry mohou navazovat – O, N). K objasnění slouží kombinované metody používající MSⁿ a enzymatické štěpení (N-glykosidáza, O-glykanáza atd.).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

427

427

Př.: ESI MS/MS oligopeptidu s monofosforylovaným serinem



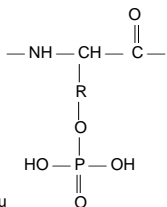
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

430

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

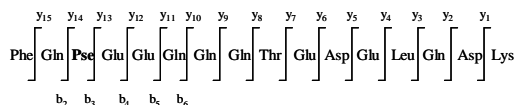
1. Ztráta H_3PO_4 (neutral loss scan: 98 Da) obvykle poskytuje též iont $[\text{M}+\text{H}-98]^+$
2. Detekce iontu PO_3^- (79 Da) v negativním modu skenování výchozích látek pro m/z (produkt) = 79
Další neg. ionty: H_2PO_4^- (97 Da), PO_2^- (63 Da)
3. Posuny píků fragmentů v MS/MS spektrech

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

428

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

431

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_4)
serin	87	167
threonin	107	187
tyrosin	163	243

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

429

429



11

Aplikace: Analýza S-S mŭstků. Proteiny. MS databáze. DNA, sacharidy, syntetické polymery. Spektrometrie iontové mobility (IMS). Zobrazovací hmotnostní spektrometrie (MSI). MS izotopových poměrů, preparativní MS

432

432

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 pik 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

433

433

Příklady: nanosprej MS

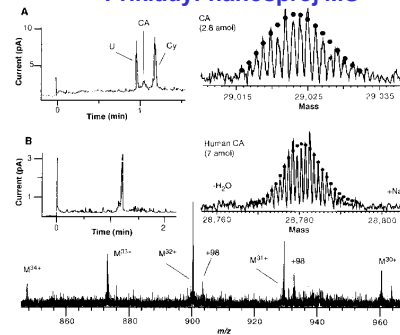


Fig. 1. Total ion electrospray chromatograms (left) from (A) a mixture of 1 μ M cytochrome c (Cy) and 1 μ M equine CA and (B) 7 μ M of human CA from a crude blood isolate. Mass spectra (at right) of (A) and (B) the deconvoluted isotopic regions and (B) (bottom) m/z 860 to 970 from subsequent injections (B) at 63 V/min representing (A) 5.0×10^{-11} mol of bovine CA and (B) 7.1×10^{-11} mol of human CA.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

436

436

Vliv S-S můstků při ESI-MS

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

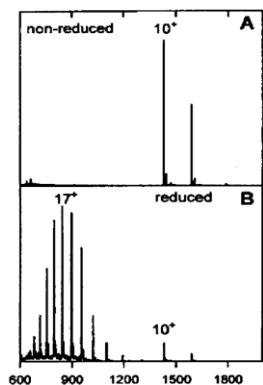
Redukce 1,4-dithioerythritolem (DTT) odstraní S-S můstky



„Unfolded“ protein s více obnaženými bazickými rezidui aminokyselin



Vyšší počet nábojů iontu



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

HK 434

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

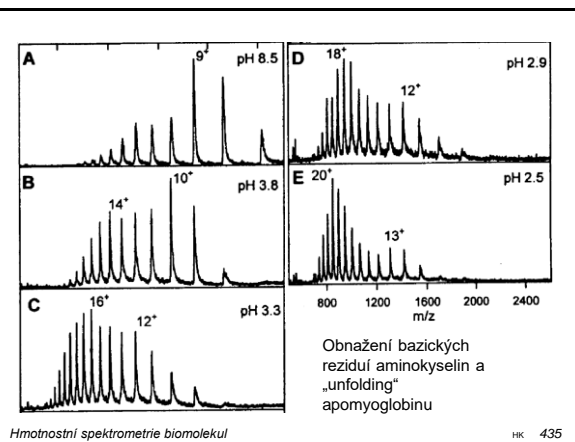
Př.

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

437

437

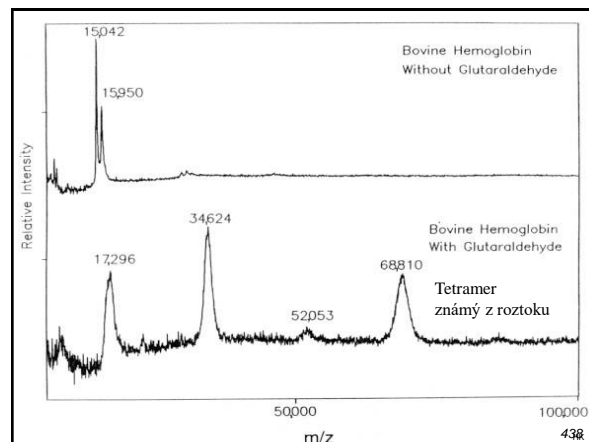


Obnažení bazických rezidui aminokyselin a „unfolding“ apomyoglobinu

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

HK 435

435



438

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

439

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

442

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

440

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, větší problém než u peptidů.
- MALDI těžkých DNA (>100 kDa): lineární přístroj, IR laser, pulsní extrakce

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

443

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

441

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

444

444

MS nukleových 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.

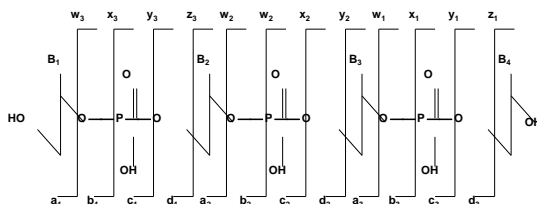
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

445

445

Fragmentace oligonukleotidů v plynné fázi

Schéma fragmentace oligonukleotidů v plynné fázi a značení fragmentů

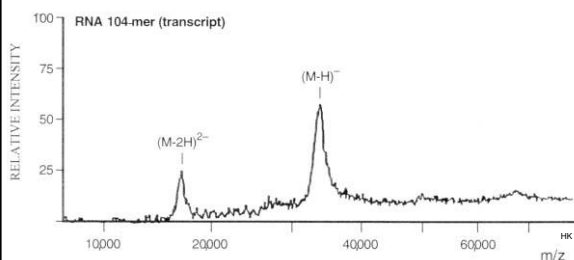


Hmotnostní spektrometrie biomolekul

448

448

IR MALDI MS ribonukleové kyseliny



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

446

446

Analýza sacharidů

- Měkčí ionizační metody: MALDI, ESI. MS^n pro stanovení sekvence a struktury
- Přidavek solí – tvorba iontů kationizací, tvorba aduktů $[M+Na]^+$
- 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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

449

449

Sekvenování NA pomocí exonukleázy a MALDI MS

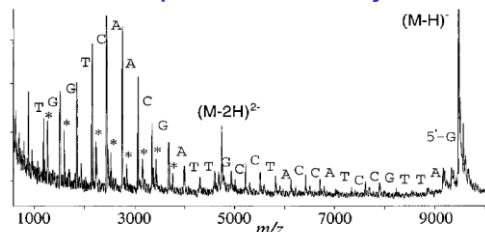


Figure 4. DE MALDI mass spectrum of a crude synthetic DNA 31-mer ($M_r = 9486.2$ calculated). Mass measurements on the failure products define the sequence up the 3' trinucleotide (see Table 1). Asterisks indicate +80-Da satellite peaks: instrument, 1.3 m linear; matrix, 3-HPA.

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

447

447

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.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

450

450

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

457

457

Spektrometrie iontové mobility Ion mobility spectrometry (IMS)

1970 Cohen, Karasek

Charakteristika

- Technika na pomezí hmotnostní spektrometrie a elektroforézy
- 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+})
- Ve srovnání s MS je rozlišení IMS nízké
- V praxi často použita jako jedna z technik multidimenzionální analýzy, např. ve spojení s běžnou MS; lze použít jako náhradu separace; časově vhodně odstupňované: separace: >s, mobilita: >ms, MS: <ms

Aplikace

- bezpečnost (výbušniny), vojenské aplikace (jednoduchá přenosná zařízení)
- studium konformace látek (malé molekuly, proteiny...) v plynném stavu

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

460

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

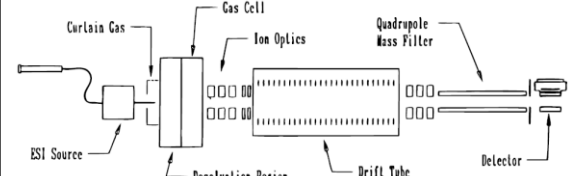
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

458

458

Př. 1: IMS – Q

Driftová trubice: rovnováha elektrické a třecí síly
prstence s klesajícím napětím podobně jako v reflektoru
zvýšený tlak
 $p \sim 10$ Torr (He, Ar, N_2), $E \sim 10-50$ V/cm, $l \sim 10-100$ cm

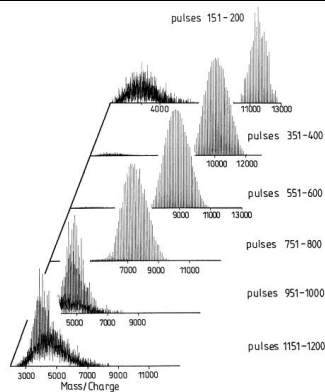


Clemmer D. E., Jarrold M. F. *J. Mass Spectrom* 1997, 32, 577-592.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

461

461



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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

459

459

IM spektra lysozimu v závislosti na jeho konformaci

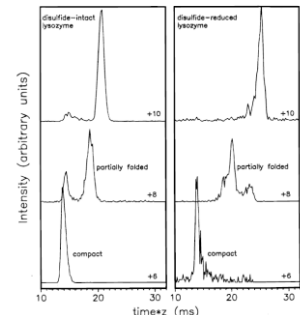


Figure 11. Drift time distributions recorded for the +6, +8 and +10 charge states of lysozyme that were electrospayed from disulfide-intact (left) and disulfide-reduced (right) solutions. The +8 and +10 disulfide-intact ions were obtained by direct electro-spray ionization. All other charge states were 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

462

462

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

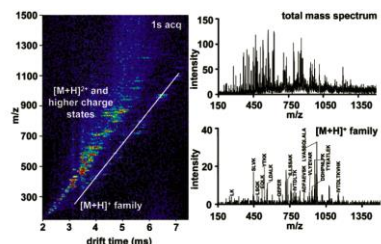


Figure 2. Two-dimensional plot (left) of drift times and m/z ratios for a digest of horse albumin. The intensity of different features is shown using a false color scheme in which the least intense features are represented in blue and the most intense features are represented in red. This data set was acquired upon electrospraying a $1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 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 TOP 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

463

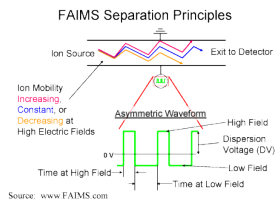
463

Př. 3: DMS, FAIMS

Differential (ion) mobility spectrometry

Field asymmetric waveform ion mobility spectrometry

- zařízení jednoduché celý před vstup do hmotnostního spektrometru
- různá konstrukční řešení celý



Source: www.FAIMS.com

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

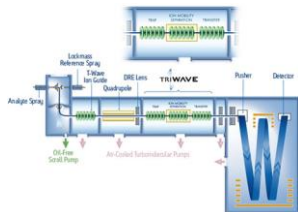
466

466

Př. 2: IMS – TOF

Odlíšné řešení driftové trubice: průběh potenciálu na prstencích připomíná pohyb mořských vln

Menší ionty (s vyšší mobilitou) „surfuji“ ochotněji na „vlnách“ potenciálu a dorazí na konec driftové zóny dříve



Kredit: waters.com

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

464

464

Využití IMS

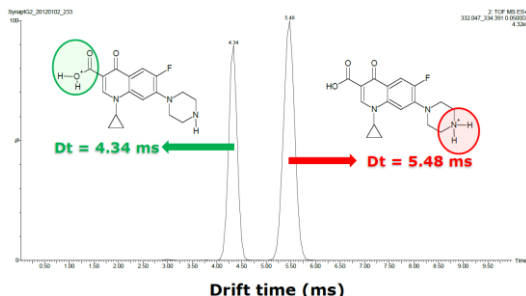
- Separace izomerů, dle konformace
- Odstranění matrice vzorku
- Dostupné v kombinaci s vysoce rozlišujícím MS i MS/MS
- Multidimenzionální analýza
- Jednoznačnější identifikace
- Separace intramolekulárních protonovaných specií
- Studium místa protonace
- Rozdílné typy fragmenatce
- Výpočet kolizního průřezu

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

467

467

IMS - TOF



Triwave: ciprofloxacin, $m/z = 332,141$

Kredit: waters.com

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

465

465

Zobrazovací hmotnostní spektrometrie, MSI

MSI ... mass spectrometry imaging

- přímá vizualizace bez derivatizace
- možnost MS/MS
- analyzátoři: TOF (rychlost), FT-ICR a O (rozlišení)
- rozlišení: laterální, hloubkové a hmotnostní
- 3D MSI

Ionizační techniky (a limit laterálního rozlišení):

- SIMS: nm
- MALDI: μm
- DESI: $100 \mu\text{m}$

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

468

468

Laterální rozlišení v MSI

1873 Ernst Abbe:

difrakční limit

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \theta}$$

$n \sin \theta$ numerická apertura (NA), ~ 1.4 - 1.6 v moderních mikroskopech
Abbeho limit $d \sim \lambda/2 \sim$ stovky nm

Louis de Broglie (1929 Nobelova cena)

dualita částic a vlnění

$$\lambda = \frac{h}{p} = \frac{h}{mv} \sqrt{1 - \frac{v^2}{c^2}}$$

Vis foton ... 400 - 800 nm ... 2 - 3 eV ... optická mikroskopie, LDI, MALDI
e⁻, Xe⁺ ... 5 keV ... 1 nm ... elektronová mikroskopie, SIMS

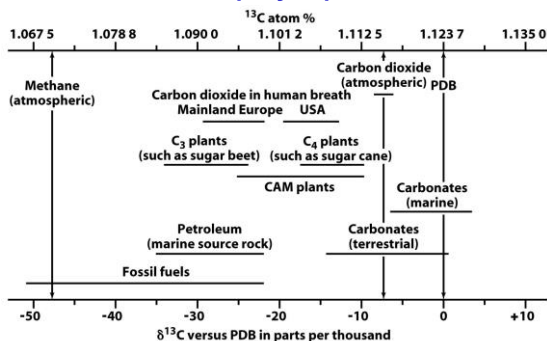
Pozn.: DESI MSI není limitována zaostřením částic ve vakuu

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

469

469

Stanovení izotopových poměrů ¹³C:¹²C

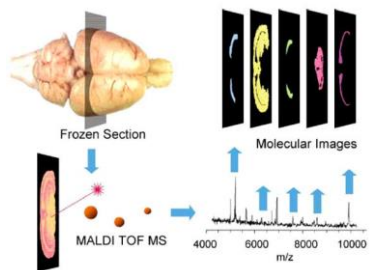


Unnumbered figure pg 482
Quantitative Chemical Analysis, Seventh Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

472

472

MSI



Stoeckli, M.; Staab, D.; Stautenbiel, M.; Wiederhold, K.H. Anal. Biochem., 2002, 311, 33-39

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

470

470

Př.: Preparativní hmotnostní spektrometrie

A. L. Yergey, A. K Yergey: Preparative Scale Mass Spectrometry: A Brief History of the Calutron J. Amer. Soc. Mass Spectrom. 8, 1997, 943-953.

Trocha historie:

- 1931 Ernest Lawrence: cyklotron – urychlovač protonů na 1 MeV
- 1938 Otto Hahn a Fritz Strassman: štěpení atomových jader
- 1939 anexa Rakouska a přepadení Československa, odliv mozků do USA (Leo Szilard, Enrico Fermi, Edward Teller, Eugene Wigner)
- 2. 8. 1939 dopis Alberta Einsteina Franklinu D. Rooseveltovi
- 1. 9. 1939 začátek 2. světové války a emigrace
- 11. 10. 1939 dopis doručen prezidentovi
- 12. 10. 1939 E. Fermi - grant \$3 000 na průzkum interakcí pomalých n⁰ s U
- Alfred O. Nier připravil v MS vzorky ²³⁵U a ²³⁸U
- John Dunning prokázal, že ²³⁵U je zodpovědný za štěpení
- ... položen teoretický základ jaderné bomby

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

473

473

Hmotnostní spektrometrie izotopových poměrů

Isotope-ratio mass spectrometry, IRMS

- přesné měření poměrů „stabilních“ izotopů
- ideálně pomocí multikolektoru, tj. magnetického sektoru se současnou detekcí více m/z
- ionizace: EI, TI, SIMS, ICP
- biovzorky: obvykle plynné analyty, spaliny vzorku aj. (H₂, N₂, CO₂, SO₂)
- standard pro C: Pee Dee Belemnite (PDB), vápencový fosilní belemnit, ¹³C:¹²C = 0.0112372

$$\delta^{13}C_{\text{Sample}} = \left(\frac{^{13}C/^{12}C_{\text{Sample}}}{^{13}C/^{12}C_{\text{PDB}}} - 1 \right) \cdot 1000$$

Příklady

1. radiokarbonová metoda datování, např. ¹⁴C $\frac{1}{7}N + n \rightarrow \frac{1}{6}C + p$
(β čítač, AMS – urychlovací MS)
2. určení původu biologického vzorku z izotopového poměru C (δ¹³C)
metabolismus rostlin: C₃ (85% rostlin: rýže, pšenice, brambory, řepa), C₄ (kukuřice, třtina), CAM (pouštní rostliny)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

471

471

Preparativní hmotnostní spektrometrie

- 1941 Projekt Manhattan - výroba atomové bomby, Oak Ridge, TN
- 1942 E. Lawrence: možnost použití modifikovaného cyklotronu pro separaci izotopů
- Calutron – California University at Berkeley + tron (instrument)
- Homogenní magnetický sektor 180°

Až 208 g >85% ²³⁵U/den ve dvou stupních (přírodní zastoupení 0.72%)
Celkem 43 kg/bomby během 18 měsíců z > 5 tun přírodního uranu
Po r. 1945 na přípravu izotopů pro výzkumné účely

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

474

474

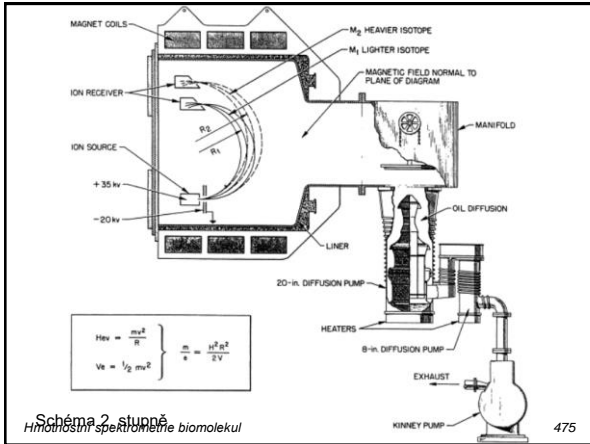


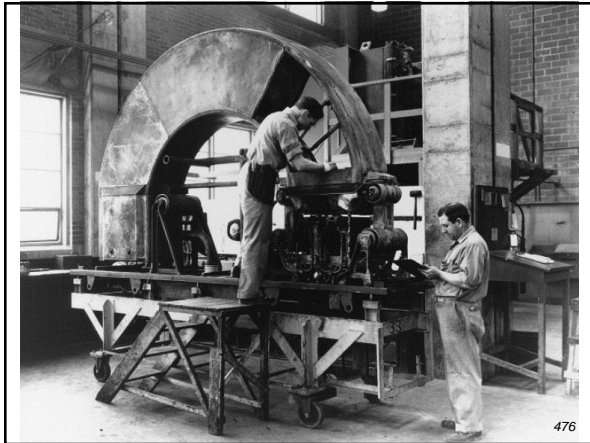
Schéma 2 stupňe
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

475



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

478



476

476

MS s ultravysokým rozlišením

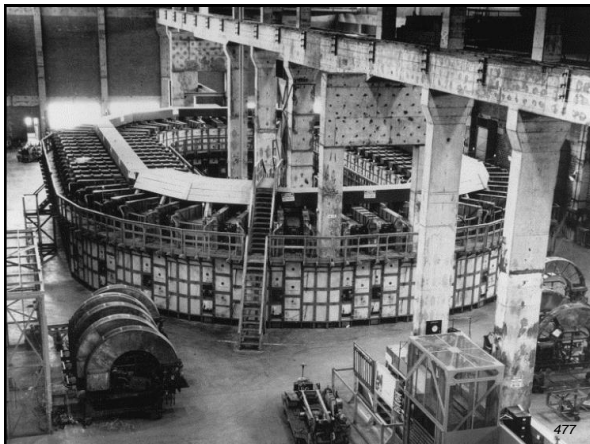
konvence	R	hmotnostní analyzátor
standardní	1 000 – 10 000	Q, IT, LIT
vysoké	10 000 – 100 000	EB, TOF
ultravysoké	100 000 - ...	FT MS (ICR, O)

Pozn:
 rozlišení, rozlišovací schopnost: viz stránky Terminologie MS
<http://terminologie-ms.sci.muni.cz/>
 rozlišovací schopnost je funkcí m/z
 rozlišovací schopnost vs. rychlost skenu (zvlášť pro FT-MS)
 S/N roste s akumulací skenů (všechny MS)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

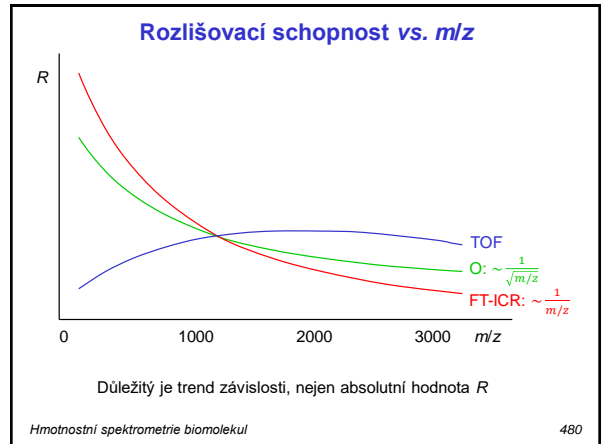
479

479



477

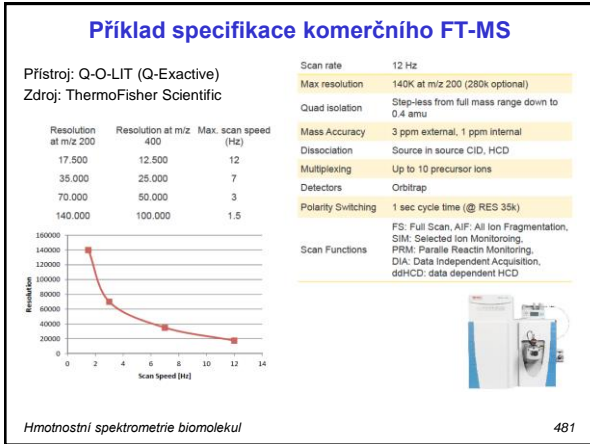
477



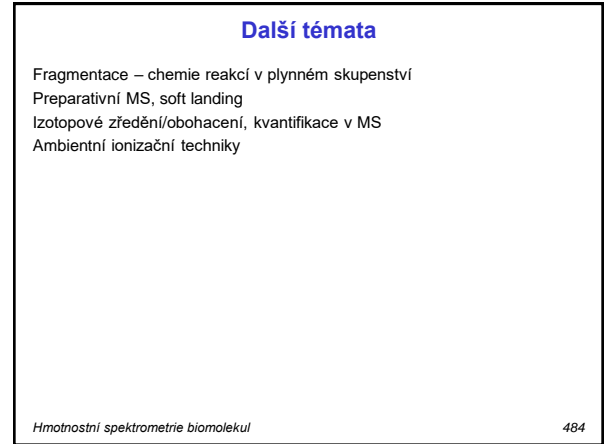
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

480

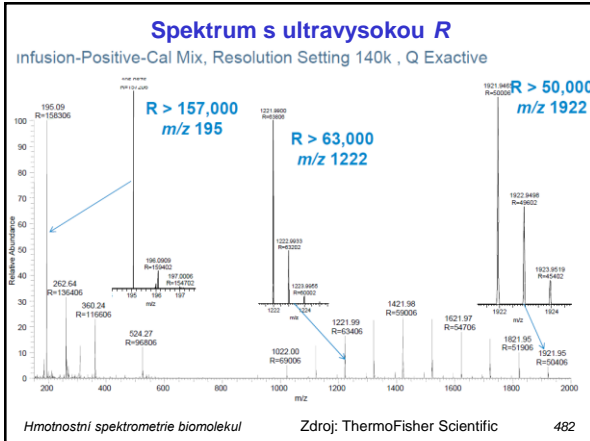
480



481



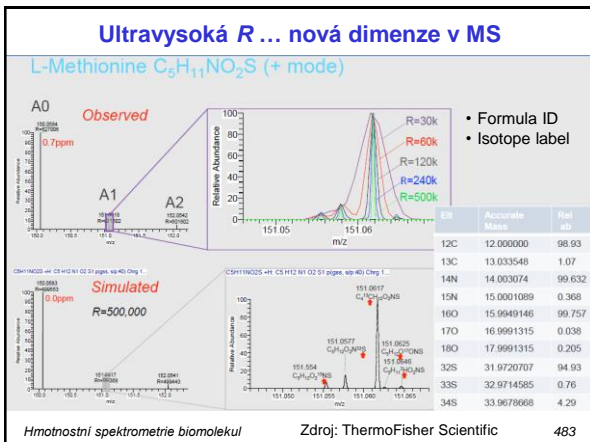
484



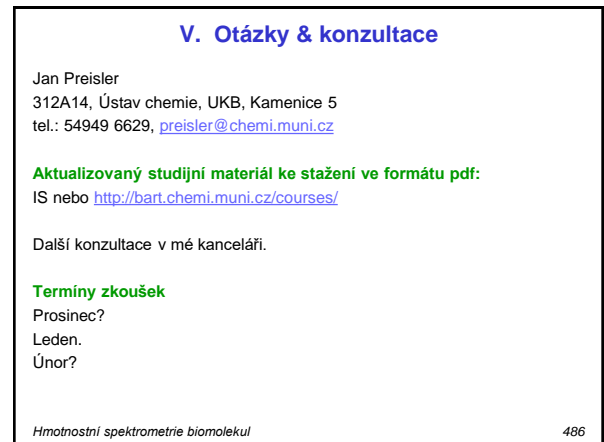
482



485



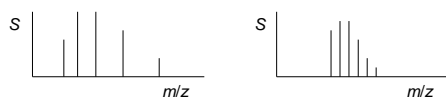
483



486

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 TOF MS? Pozitivní nebo negativní vliv?
6. Porovnejte citlivost IT a Q a) při záznamu spektra pro $m/z = 0 - 1000$, b) v režimu single ion monitoring, c) při produktovém skenu

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

487

487

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? Vysvětlíte 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

490

490

Otázky

7. Proč je výhodné použít při měření izotopového poměru daného prvku přístroj, který stanovuje oba izotopy zároveň?
8. Lze použít kvadrupólový 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

488

488

Otázky

13. Existuje praktický limit maximální m/z TOF MS?
14. Srovnajte možná uskalí stanovení peptidů a oligomerů DNA pomocí MS.
15. Váš úkole je 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 rozlišovací schopnost q TOF?
18. Jaká je m aminokyseliny A, jejího rezidua (v peptidovém řetězci) a jejího immoniového iontu?
19. MSI vs. IMS?
20. Popište krok po kroku postup identifikace izolovaného proteinu, máte-li k dispozici a) MALDI TOF MS, b) ESI Q, c) ESI QqQ

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

489

489