

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

Jan Preisler

Oddělení analytické chemie Ústavu chemie, 312C14, PŘF 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 pasti) a nejnovější vývoj v oboru.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

1

Plán přednášek

Přednášky se konají v pondělí v 9:00-10:50 v učebně 207C14, případné změny budou ohlášeny předem.

Plán přednášek „Sylabus C7895 MSBio 2024.pdf“, učební materiál „MS Bio CZ 2024.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.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

2

2

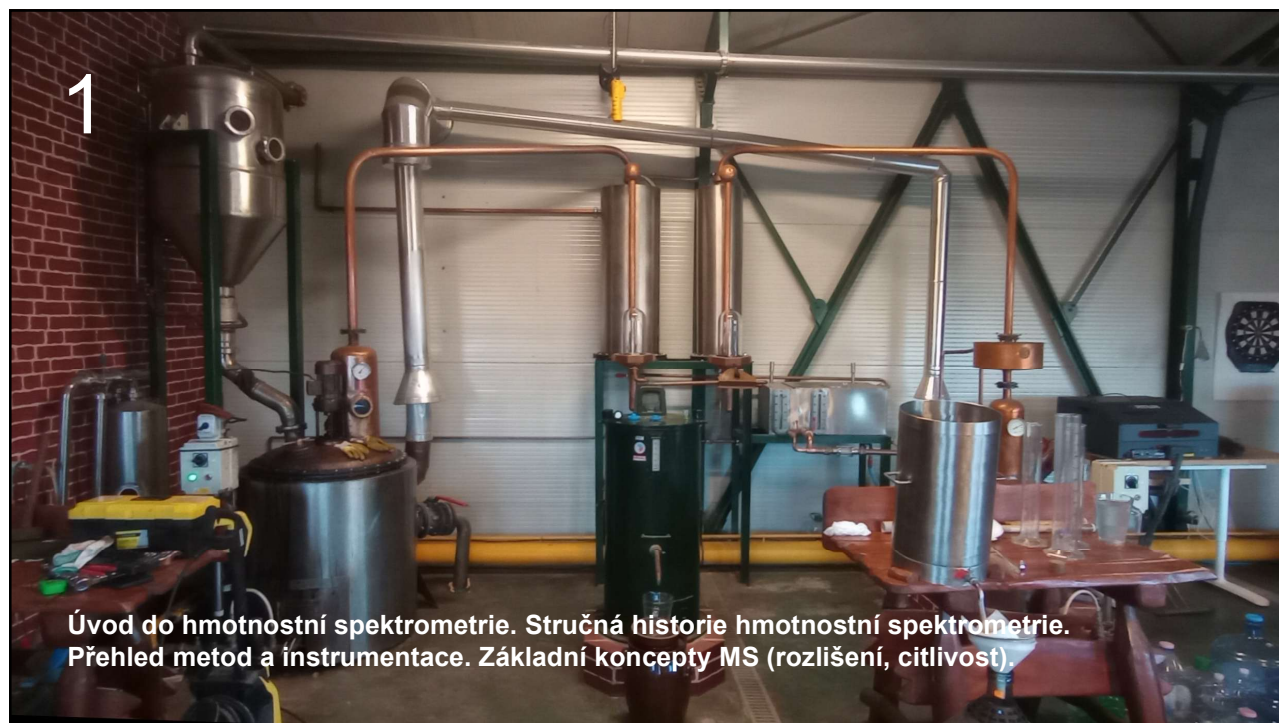
Obsah

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

3

3



4

I. Úvod

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

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 hmotností spektrometrie se zaměřením na analýzu biomolekul.

Školy hmotnostní spektrometrie.

Internet

- České muzeum hmotnostní spektrometrie, <https://www.ms-museum.org/>
 - Youtube: shortchemistry, např. excelentní video o kvadrupólovém filtru: <https://www.youtube.com/watch?v=vuLrmgmJ54E>
 - <http://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php>
 - Chem. Listy 114, 126–132 (2020)
 - Učebnice <http://www.ms-textbook.com/>
 - <http://terminologie-ms.sci.muni.cz/>
- aj.

Další zdroje informací

Doplňková literatura (příklady knih v knihovně MU)

- Mass spectrometry: a textbook, Jürgen H. Gross, 2017
- Introduction to Mass Spectrometry of Biomolecules, Marko Jovanović, 2016
- Mass spectrometry for the novice, John Greaves, 2014
- aj.

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

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)
Ambientní ionizační techniky (DESI, DART, LAESI...)
Spojení separace a hmotnostní spektrometrie (on-line, off-line, čipy).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

8

8

Hmotnostní spektrometry

Základy iontové optiky. Simulace pohybu iontů, Simion

Energetické analyzátoři

Magnetický sektor

Kvadrupólový analyzátoři

Iontový cyklotron (ICR-FT-MS)

Iontová past (IT)

Time-of-flight hmotnostní spektrometr (TOFMS), TOF-TOF, LIFT-TOF

Orbitální past, 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

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

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



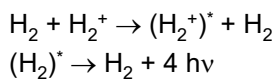
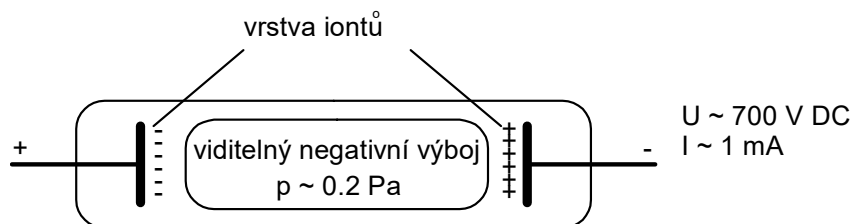
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

11

11

Doutnavý výboj jako iontový zdroj

1880's Crookes: doutnavý výboj



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

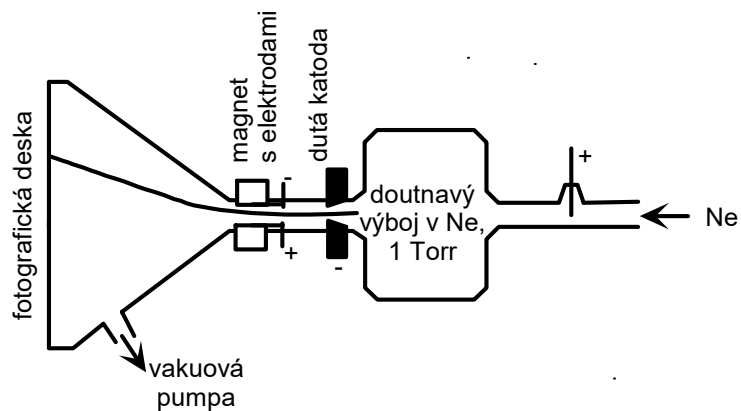
12

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

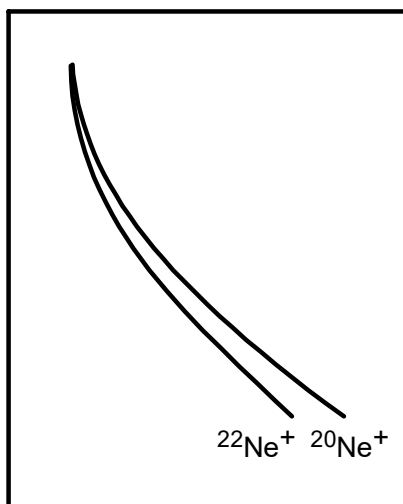
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

13

13

První hmotnostní spektrometr

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



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

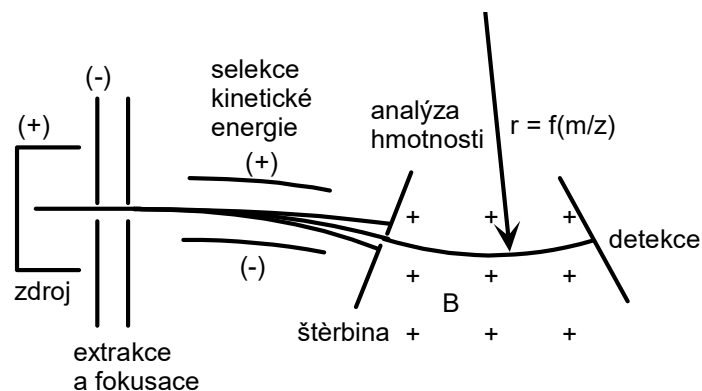
14

14

Magnetický sektor s energetickým analyzátozem

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

Magnetický sektor s energetickým analyzátozem



Většina přírodních izotopů stanovena do r. 1930

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

15

15

Stručná historie MS ve zbytku 20. stol.

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

Struktura organických sloučenin

1950-70 MS používáno ke strukturní analýze organických sloučenin

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

Dnes MS pro kvalitativní, strukturní i kvantitativní analýzu

Široká škála komerčních hmotnostních spektrometrů

MS nezbytná pro analýzu organických a biologických molekul

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

16

16

Základní koncepty hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometr

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

Součásti spektrometru

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

17

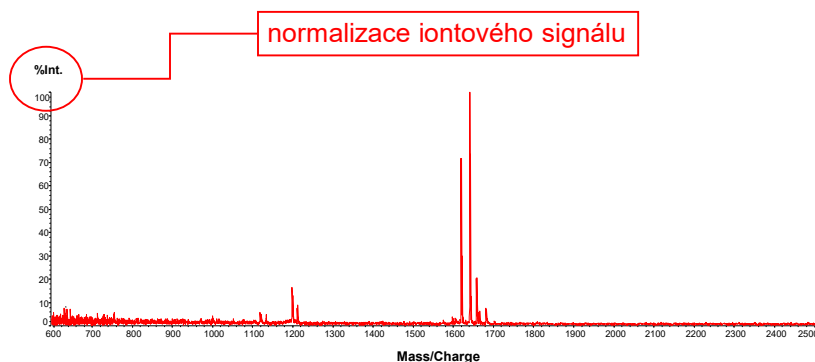
17

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 číselně rovný molární hmotnosti

m/z - účinná hmotnost, Th (Thomson)

Počet nábojů, z

počet elementárních nábojů iontu

obvykle ± 1

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

Ionty: pozitivní a negativní, ne kationty a anionty.

Hmotnostní spektrometrie, ne spektroskopie.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

19

19

Vybrané veličiny v hmotnostní spektrometrii

Hmotnostní rozlišení

Míra separace dvou přilehlých píků.

Dvě definice:

1. FWHM (full width at half maximum), $R = m/\Delta m$
2. 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

Použité zkratky

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

21

21

Použité zkratky

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

Izotopové distribuce v organických molekulách

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

Patern jako funkce počtu uhlíkových atomů v molekule:

C: 99% ^{12}C 1% ^{13}C

C₂: 98% $^{12}\text{C}^{12}\text{C}$ 2% $^{12}\text{C}^{13}\text{C}$ 0.01% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$

C₃: 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

Izotopové distribuce v organických molekulách

Relativní výskyt molekul v %:

C₆₀: $^{12}\text{C}_{60}$ 100

$^{12}\text{C}_{59}^{13}\text{C}$ 66

$^{12}\text{C}_{58}^{13}\text{C}_2$ 21

$^{12}\text{C}_{57}^{13}\text{C}_3$ 4.6

C₁₀₀: $^{12}\text{C}_{100}$ 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 různá R

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

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

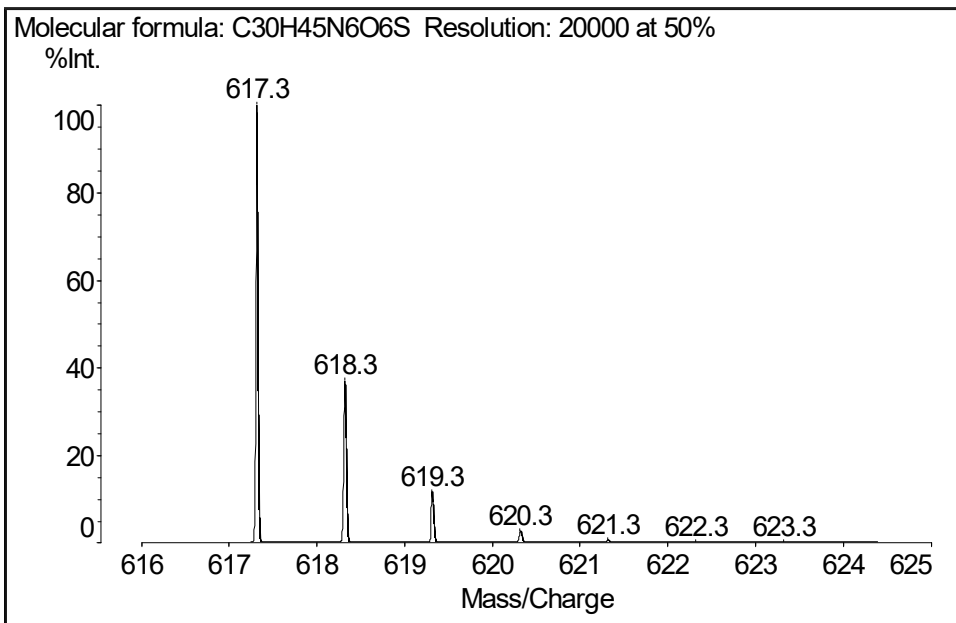
$C_{900}H_{1350}N_{180}O_{180}S_{30}$

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

25

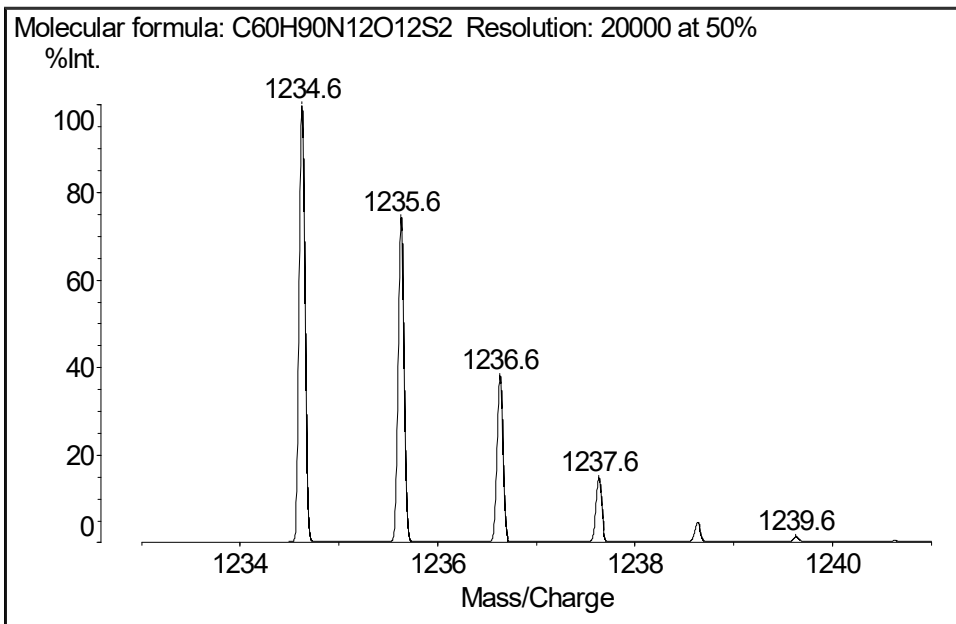
25



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

26

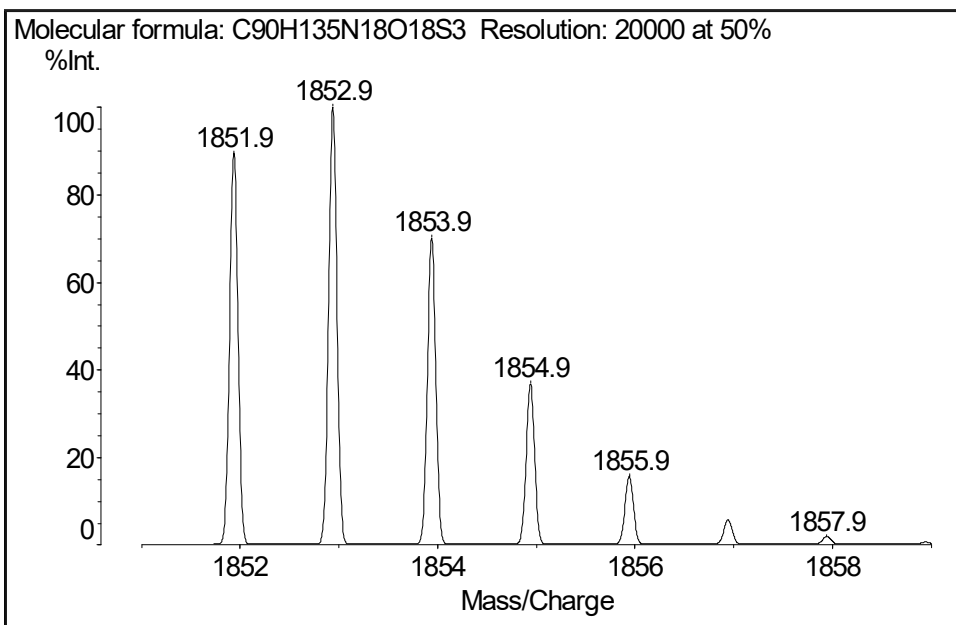
26



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

27

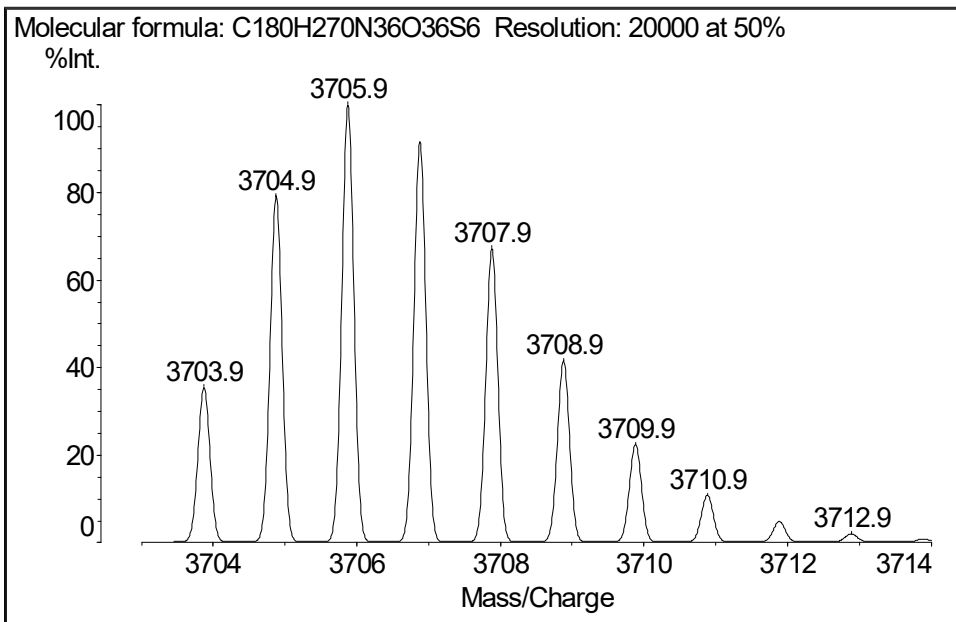
27



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

28

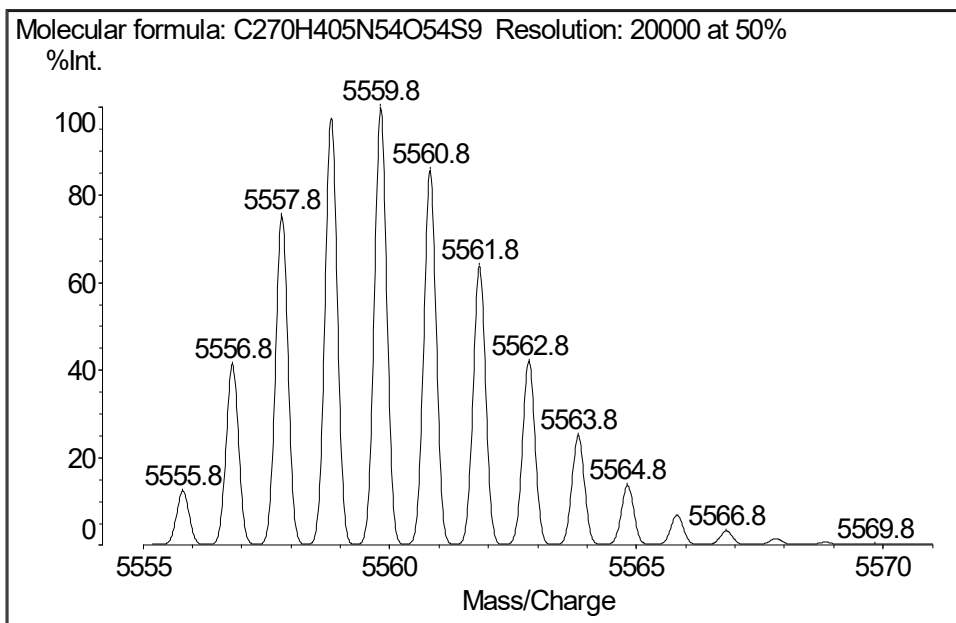
28



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

29

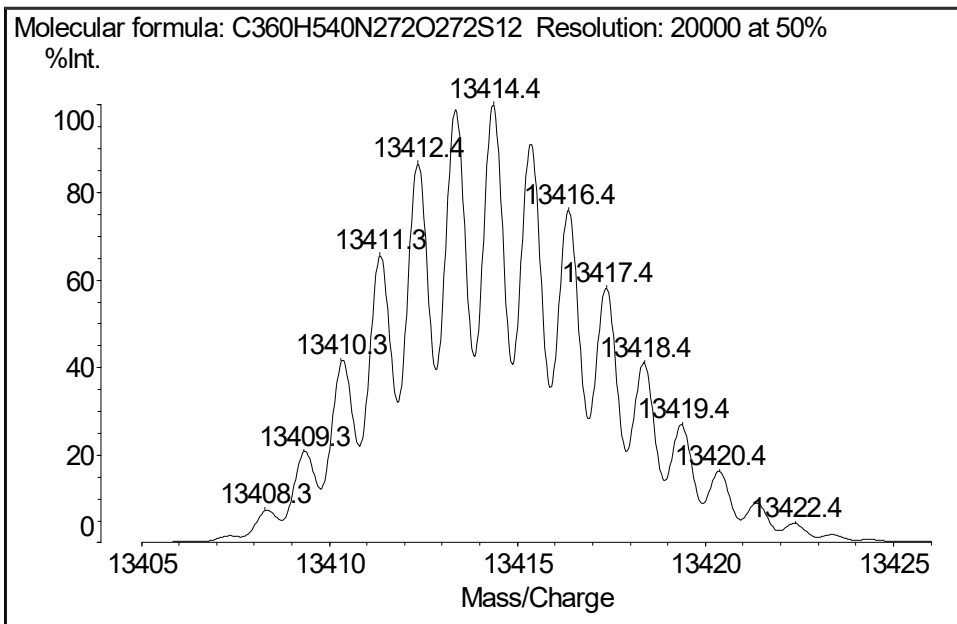
29



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

30

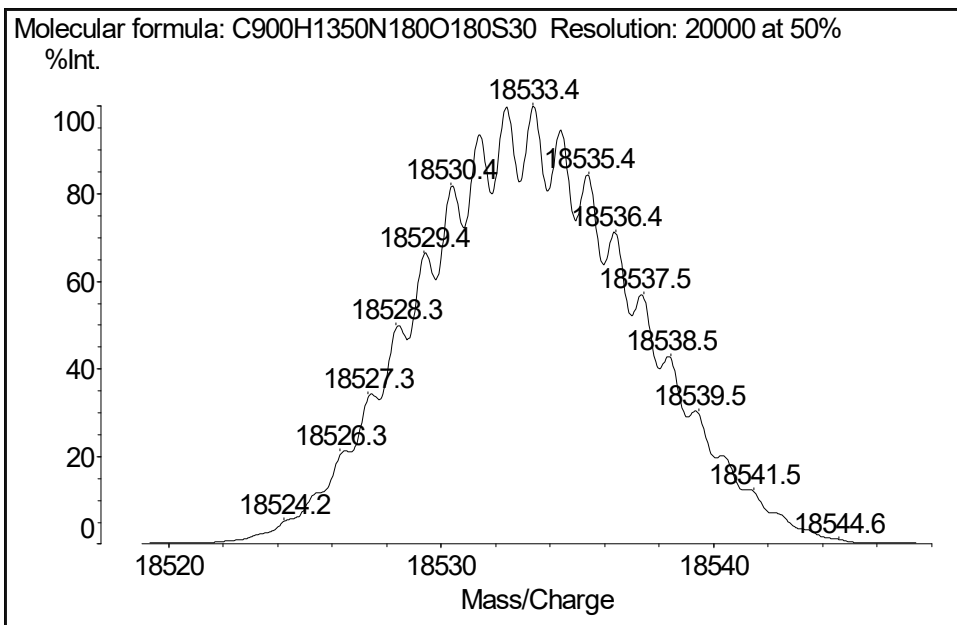
30



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

31

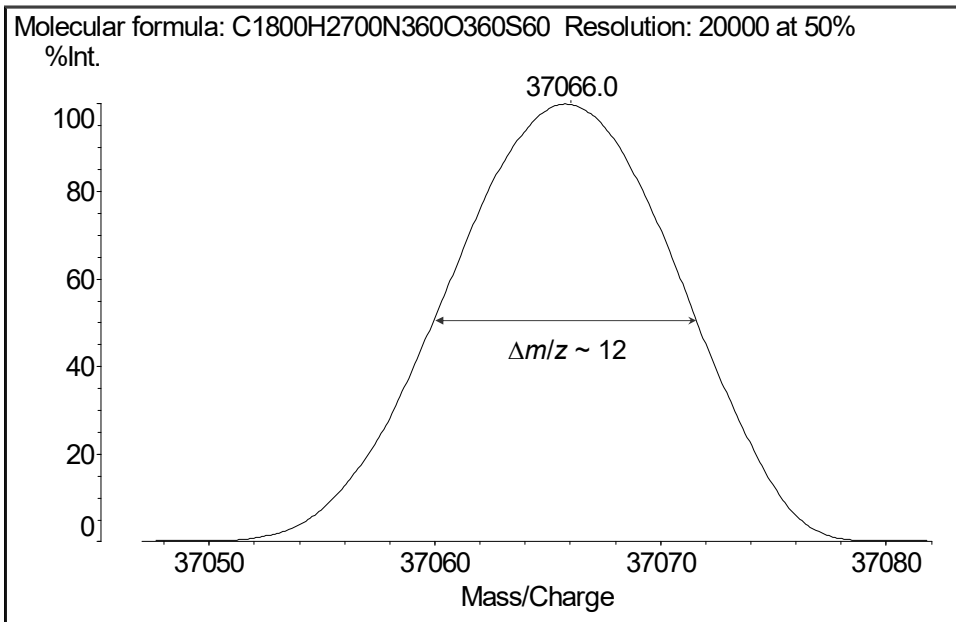
31



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

32

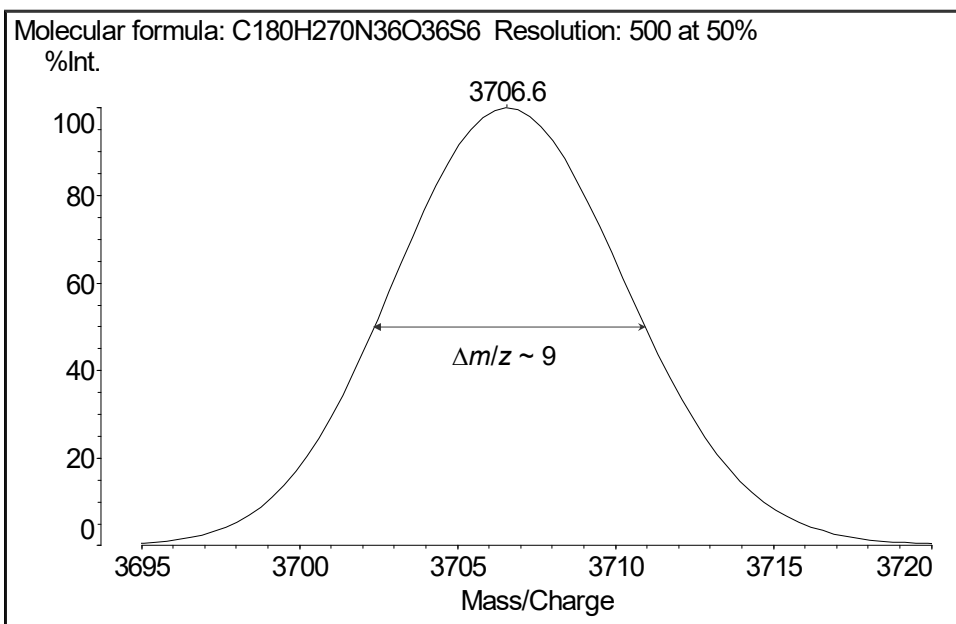
32



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

33

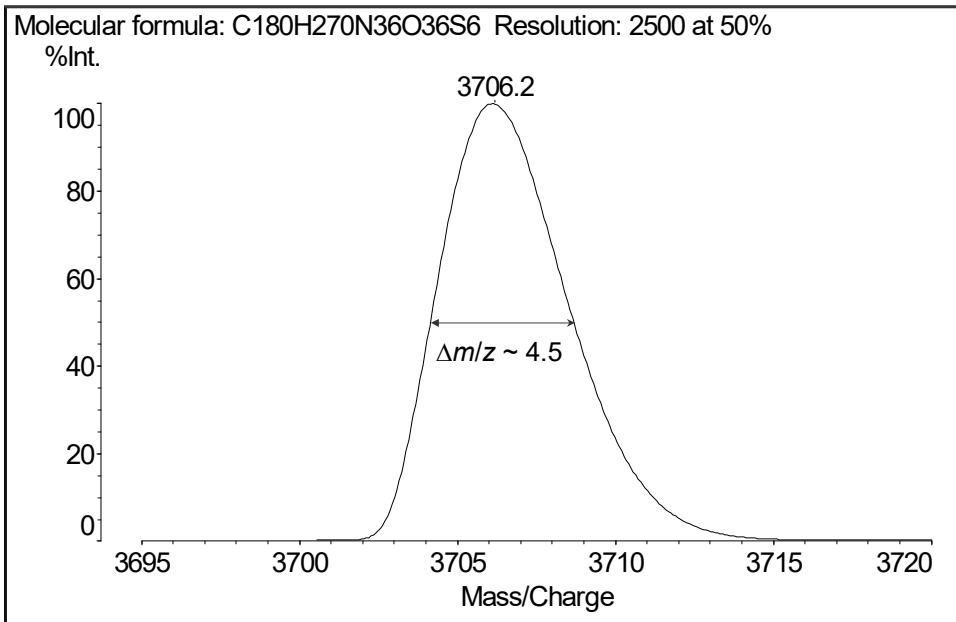
33



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

34

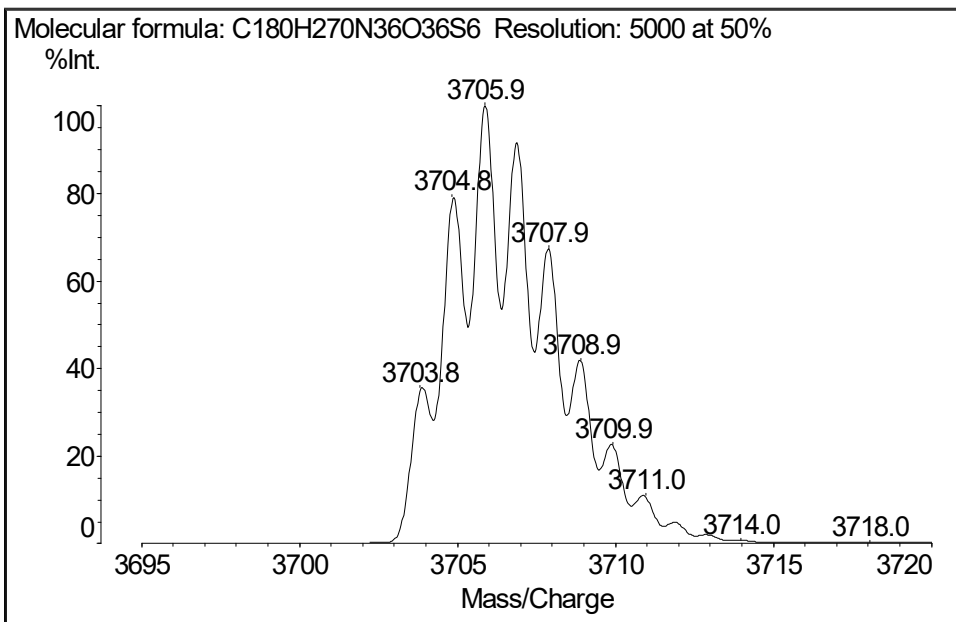
34



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

35

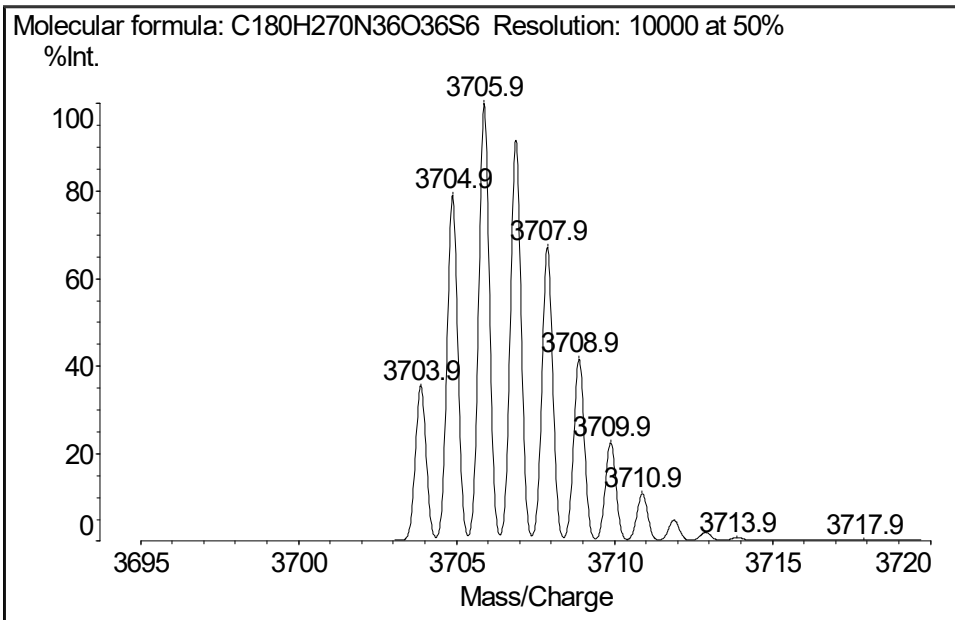
35



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

36

36



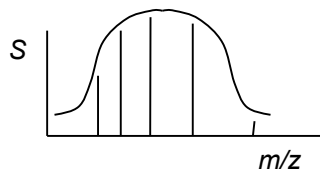
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

37

37

Vícenásobně nabité ionty

- Typický příklad: vícenásobně nabité ionty $[M+zH]^{z+}$ z elektrospreje "Obálka" ve tvaru zvonu.
- Mezery nejsou ekvidistanční (narozdíl od izotopové distribuce).



Př.:

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

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

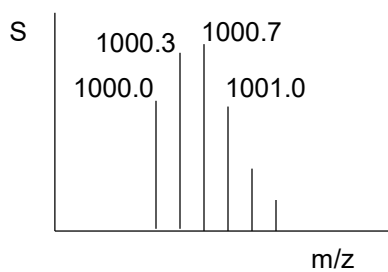
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

38

38

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 .



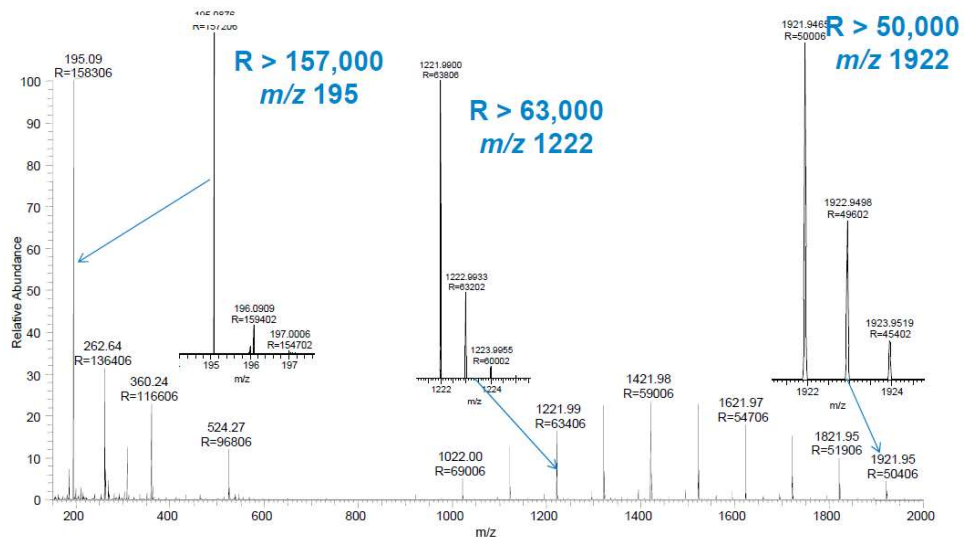
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

39

39

Spektrum s ultravysokou R

infusion-Positive-Cal Mix, Resolution Setting 140k, Q Exactive



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

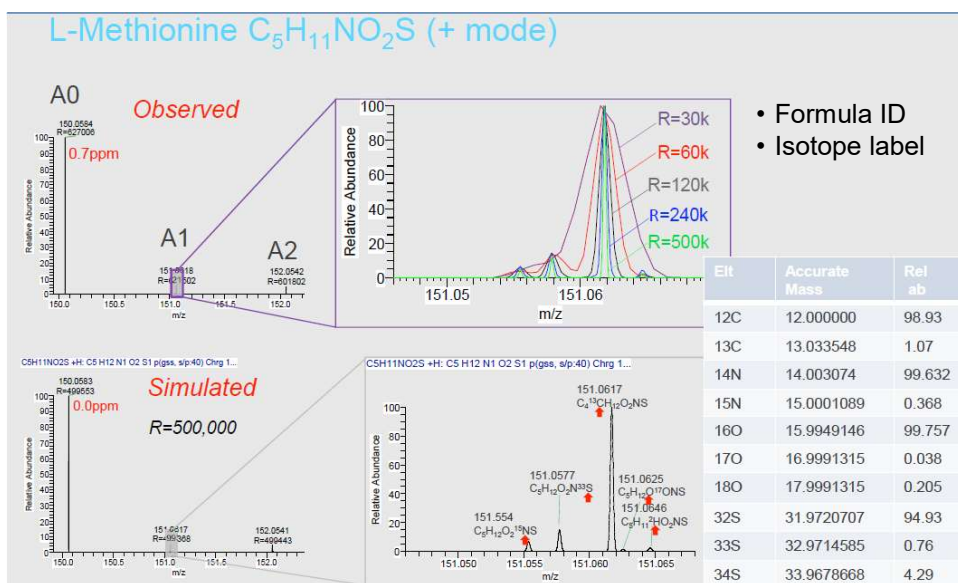
Zdroj: ThermoFisher Scientific

40

40

Ultravysoká R ... nová dimenze v MS

L-Methionine $C_5H_{11}NO_2S$ (+ mode)



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

Zdroj: ThermoFisher Scientific

41

41



2 Ionizační metody a metody zavádění vzorku. Elektronová ionizace (EI) . Chemická ionizace (CI). Doutnavý výboj. Indukčně vázané plazma (ICP). Ionizace rychlými atomy (FAB). Ionizace (SIMS). Fotoionizace (PI). Plazmová Desorpce (PD)

42

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

43

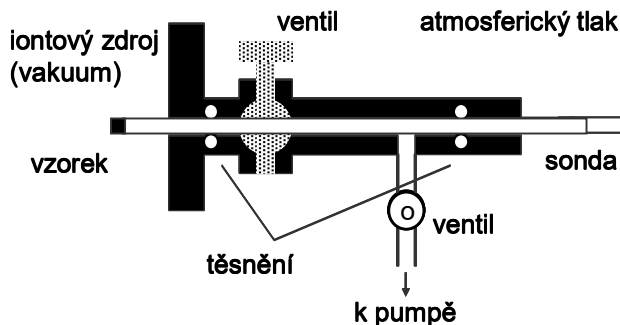
43

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

44

44

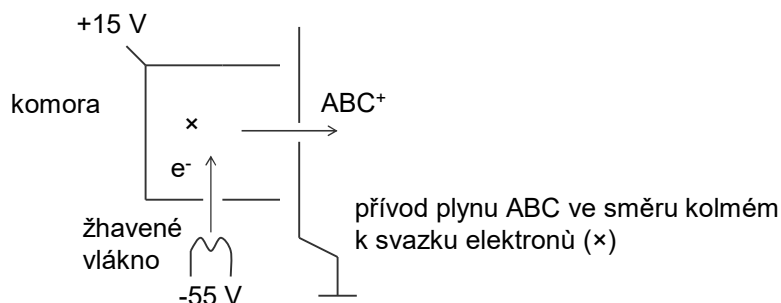
Elektronová ionizace, EI (Electron impact)

Klasická ionizační technika.

Elektrony emitované ze žhavého vlákna jsou urychleny středně velkým napětím.

Energie elektronu, $E(e^-) = \text{urychlovací napětí} \times \text{náboj} (1)$.

Typická energie: 70 eV.



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

45

45

Mechanismus EI

Interakce elektronu s molekulou analytu ABC:

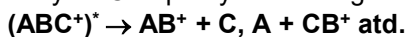


Výsledná rovnice,



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

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



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

a) $E(e^-) \sim \text{ionizační potenciál}$ $\Rightarrow$ tvorba molekulárních iontů.

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

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

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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

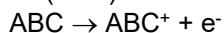
46

46

Mechanismus EI

Prahová energie, AE (appearance energy) při níž se objeví dané fragmenty, nemusí být větší než

$\Delta H(ABC)!$



Ionizační energie ABC, $\Delta H(ABC)$



Prahová energie AB^+ , $AE(AB^+)$



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

Chemická ionizace (CI)

20. léta 20. století A. J. Dempster

Tentýž iontový zdroj jako pro EI plus reaktivní plyn

Reaktivní plyn (RH)

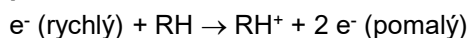
CH_4 , butan, H_2 , NH_3 atd.

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

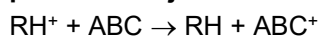
$p(\text{RH}) \sim 0.1 \text{ Pa}$ ($\lambda \sim 0.05 \text{ mm}$, mnoho kolizí ve zdroji)

Mechanismus tvorby iontů

a) produkce RH^+

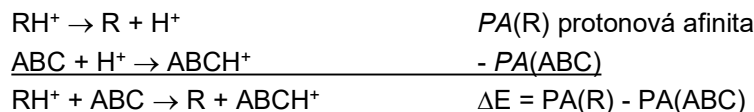


b) přenos náboje



Mechanismus tvorby iontů při CI (pokr.)

c) přenos protonu (běžnější)



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

$\Delta E \ll 0$: přebytek energie $ABC^+ \Rightarrow$ fragmentace ABC^+ , strukturní 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

49

49

Kolize molekul při CI

Střední volná dráha molekuly

Střední dráha, kterou urazí iont mezi 2 srážkami

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

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

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 ~ pg)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

50

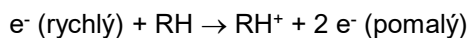
50

Negativní chemická ionizace

Tentýž iontový zdroj jako pro EI plus reaktivní plyn

Mechanismus

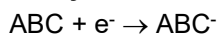
1. Produkce termálních (pomalých) elektronů



$$W(\text{pomalý } e^-) \sim 3/2 kT$$

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

2. Záchyt elektronu



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

$LD \sim \text{pg}$

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

51

51

Zavedení vzorku pro EI/CI

1. Plyn/těkává 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 přerušení

i) *tryskový separátor*

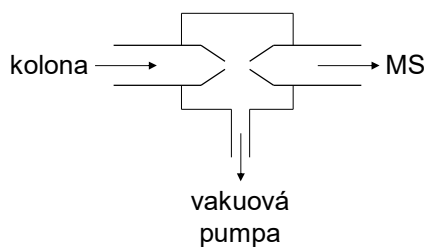
(*particle beam*)

pro obohacení ABC

v nosném plynu

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

... He jako nosný plyn



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

52

52

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.

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 $M < 1000$ Da.

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

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

c) Jiné ionizační techniky

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

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

55

55

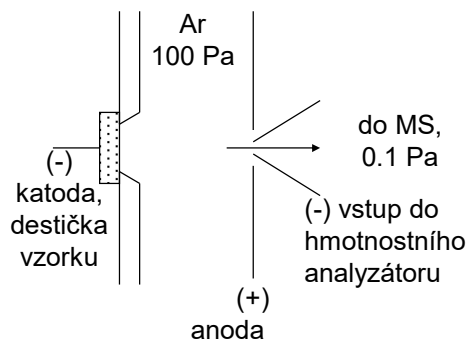
Doutnavý výboj

První iontový zdroj (J. J. Thompson)

Analýza pevných vzorků, obvykle vodivých.

Přesná a celkem citlivá analýza: $RSD \sim 1\%$, $LOD \sim 1$ ppb.

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

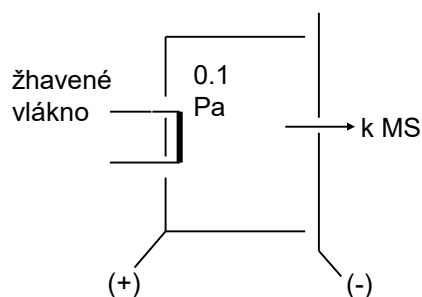


Hmotnostní spektrometrie biomolekul

56

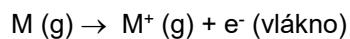
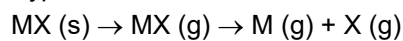
56

Termální ionizace (TI)



Vzorek nanesen na vlákno; vlákno odporově zahříváno.

Vypařování, atomizace a ionizace:

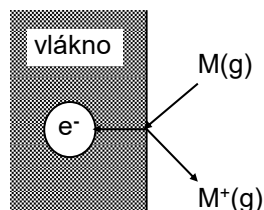


Hmotnostní spektrometrie biomolekul

57

57

Termální ionizace



Saha-Langmuirova rovnice

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

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

Kov	K	Ca	Fe	Zn
$IE \text{ (eV)}$	4.6	6.0	7.8	9.4
$(W - IE) \text{ (eV)}$	-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 $\sim 0.1 \%$!)

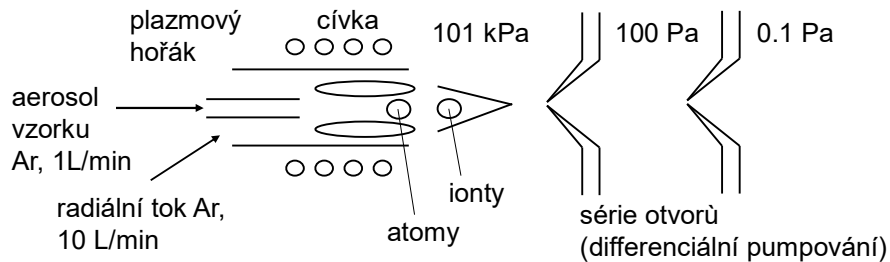
Užitečné pro stanovení izotopového zastoupení.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

58

58

Indukčně vázané plazma (Inductively Coupled Plasma, ICP)



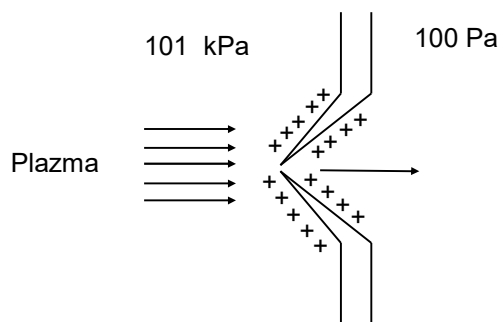
1. Desolvatace MX (aq, aerosol)
2. Vypaření MX (s)
3. Atomizace MX (g): disociace na M(g) a X (g)
4. Ionizace na M⁺ (g)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

59

59

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

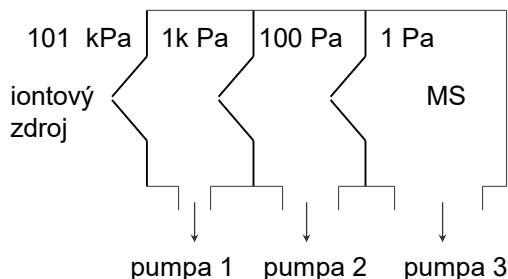
60

60

Diferenciální pumpování

J. Micromech. Microeng. 31 (2021) 045010

S Wright and R R A Syms



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

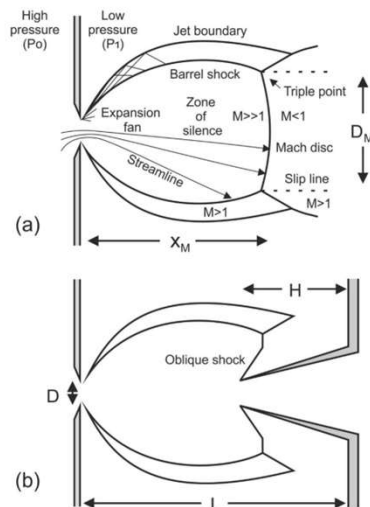


Figure 1. (a) Shock structure of a supersonic free jet expansion. Adapted from [19]. © IOP Publishing Ltd All rights reserved. (b) Sampling of the supersonic flow using a skimmer. Adapted with permission from [23]. Copyright (1984) American Chemical Society.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

61

61

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

62

62

ICP

Detekční limity

1 ppt (kvadrupól)

10 ppq (magnetický sektor)

pro srovnání: ICP-AES a AAS: ppm - ppb

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



Interference

1. Nespektrální

Posun ionizačních rovnováh v důsledku přítomnosti matrice, kyselin, snadno ionizovatelných prvků atd.

2. Spektrální

Ionty izotopů

Izobarické molekulární ionty

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

63

63

Spektrální interference v ICP

Tvorba molekulárních iontů v ICP

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

Odstranění spektrálního rušení

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

64

64

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

65

65

Ionizace polem (Field Ionization, FI)

Vysoké elektrické pole mezi ostrými hroty, $E > 10^9 \text{ V/m}$

Odstranění elektronu vnitřním tunelovým jevem.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

66

66

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

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 emitör, žhavené kovové vlákno se speciálně upraveným povrchem.

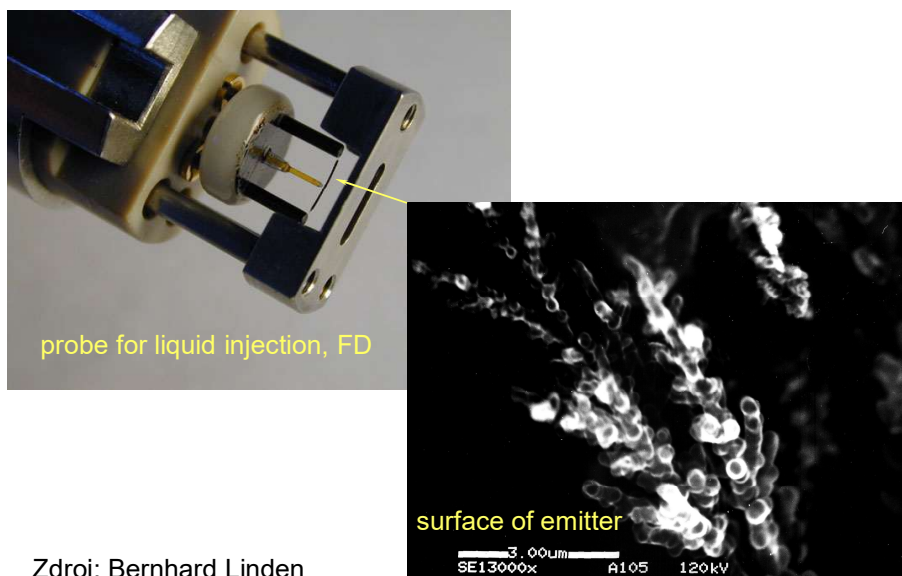
Analyty jsou tvořeny ve velmi vysokém elektrickém poli mezi ostrými hroty, $E > 10^9$ V/m; elektrony jsou odstraněny vnitřním tunelovým efektem.

Často lze sledovat doprovodné ionizační mechanismy:

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

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

Field Ionization. Field Desorption



Zdroj: Bernhard Linden

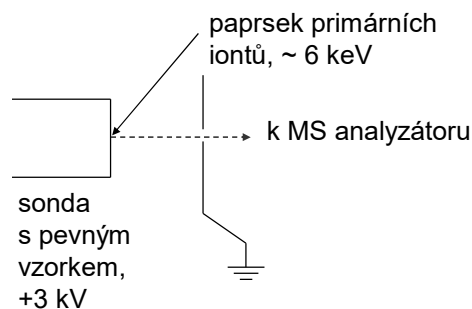
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

69

69

MS sekundárních iontů (Secondary Ion Mass Spectrometry, SIMS)

... Ionizace ionty



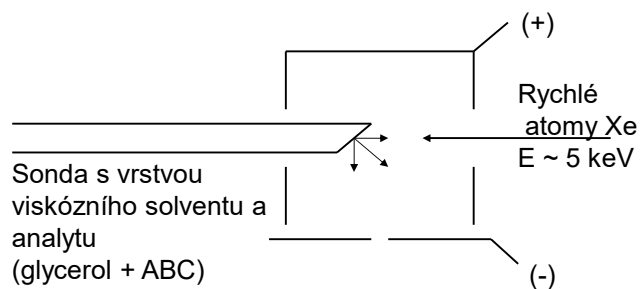
- Primární iontový svazek může být skenován, výsledkem je topografie prvků vzorku, "MS image". Rozlišení vyšší než u optického skenování (svazek primárních iontů lze lépe zaostřit, ~nm).
- Produkty ... především atomy a neutrální molekuly, též ionty. Případná postionizace možná, např. fotoionizace pomocí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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

70

70

Ionizace nárazem rychlých atomů (Fast Atom Bombardment, FAB)



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

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

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

Obvykle $z = \pm 1$.

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

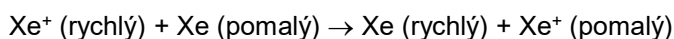
71

71

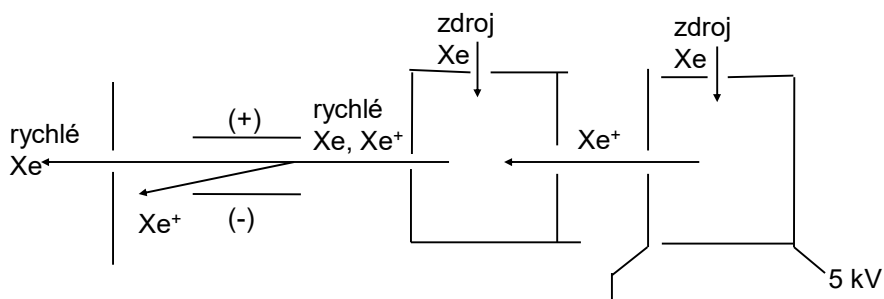
Produkce rychlých atomů (Xe) pro FAB

1. Produkce rychlých iontů Xe^+

2. Konverze Xe^+ na Xe:



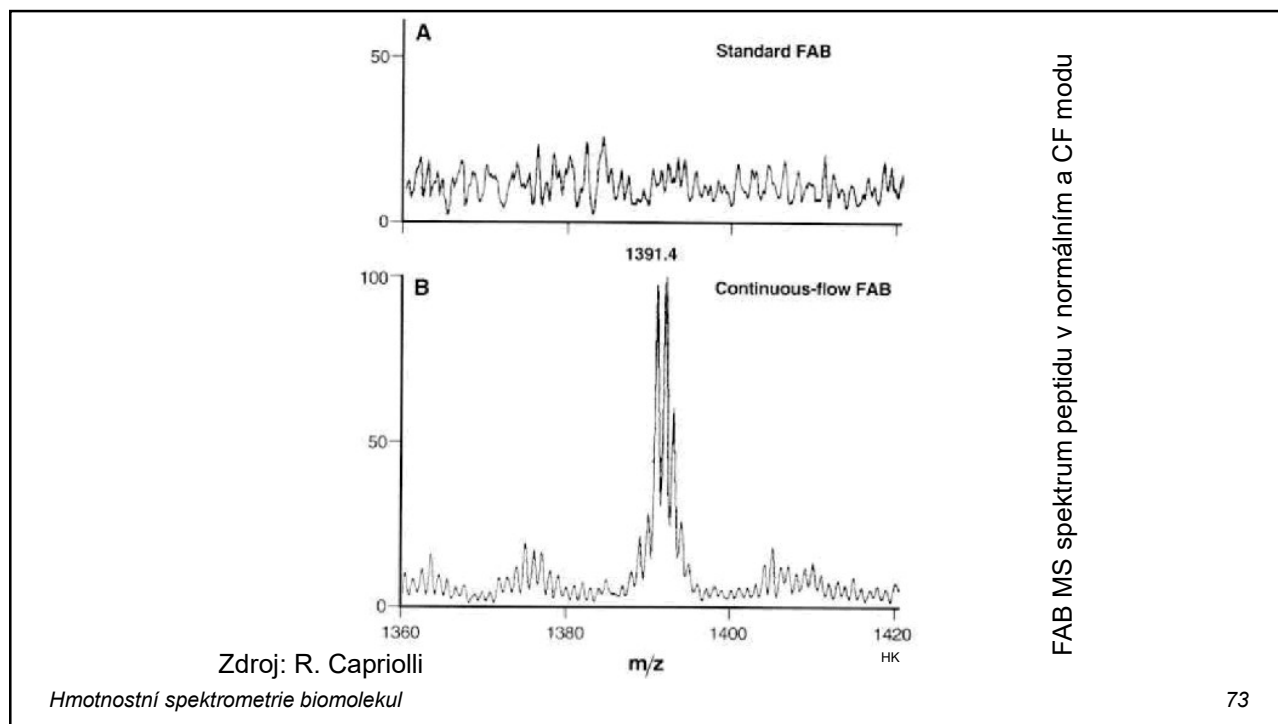
3. Eliminace (odklon) Xe^+



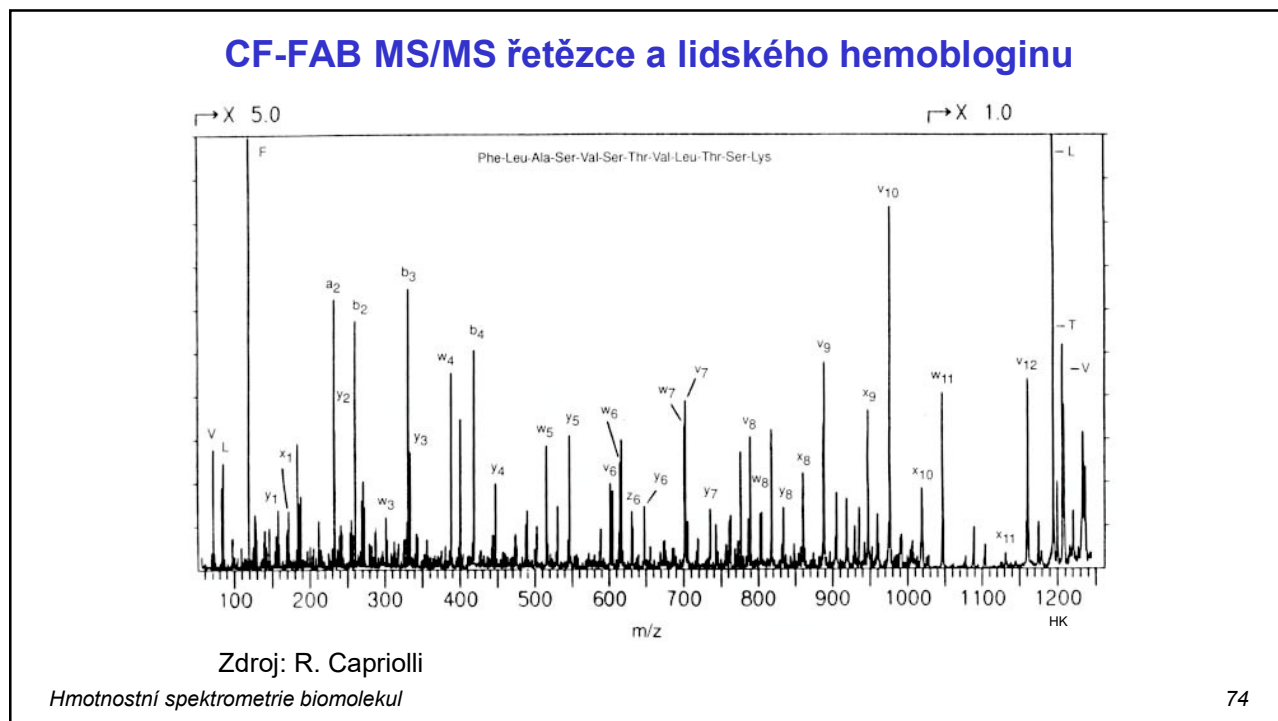
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

72

72

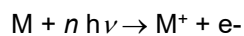


73



74

Fotoionizace (Photoionization, PI)



Nutná podmínka: $n h\nu > IE(M)$

Typy fotoionizace

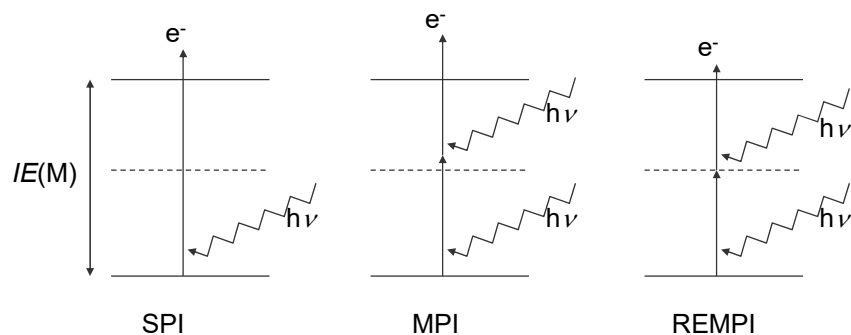
1. Jednofotonová ionizace (single photon ionization, SPI) $n = 1$
2. Multifotonová ionizace (multiple photon ionization, MPI) $n > 1$
 - neselektivní analýza vhodná pro anorganické analyty
3. Rezonanční multifotonová ionizace (REMPI) $n > 1$
 - pokud $h\nu = W$ (energie elektronového přechodu M)
 - velmi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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

75

75

Mechanismy fotoionizace



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

76

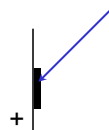
76

PI

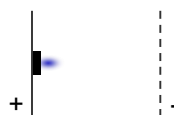
Příklad uspořádání: LD-PI

PI jako postionizace pro laserovou desorpci

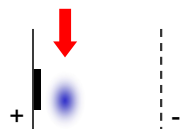
1. Puls desorpčního laseru



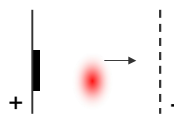
2. Desorpce obláčku (přev. neutralů)



3. Puls ionizačního laseru



4. Extrakce iontů



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

77

77

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.)

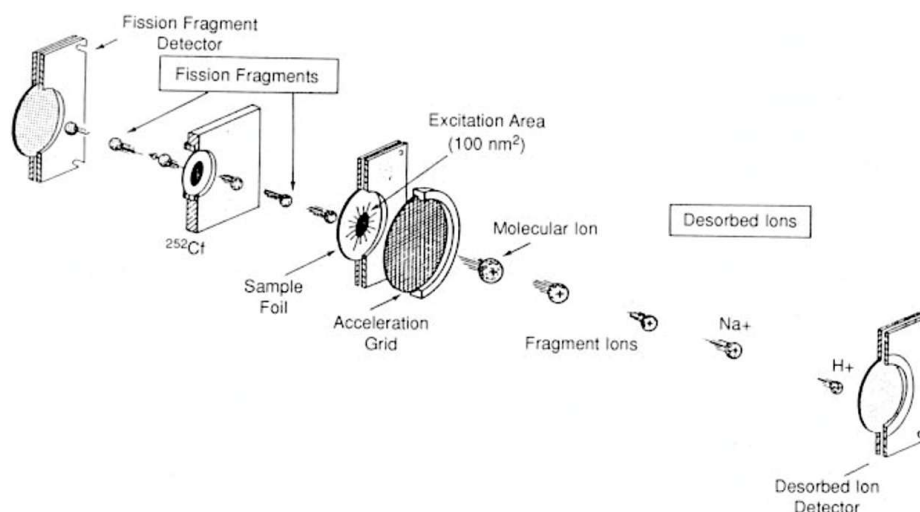
- První technika použitá k ionizaci relativně velkých organických molekul (~tisíce Da , př. inzulin, 5735 Da).
- Štěp z radioaktivního zdroje narazí do vzorku naneseného na fólii.
- Jiný štěp uvolněný z rozpadu téhož atomu ^{252}Cf nastartuje záznam signálu.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

78

78

Experimentální uspořádání PD



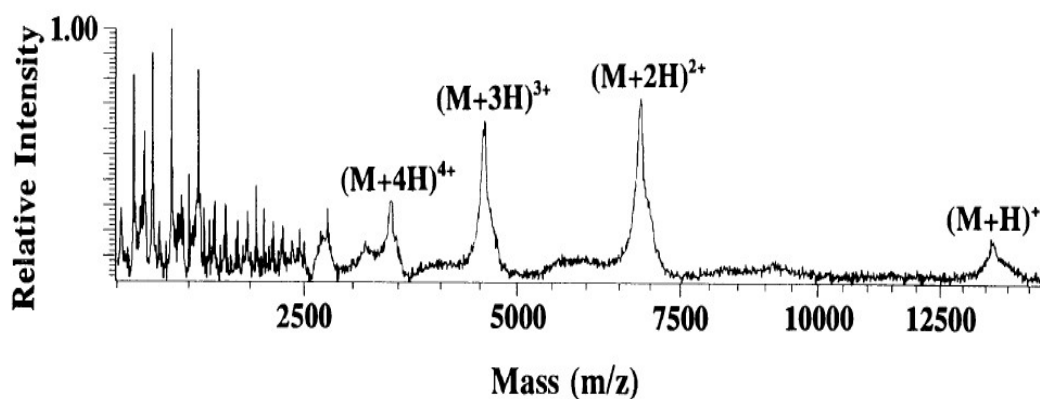
Zdroj: R. D. Macfarlane, R. P. Skowronski, D. F. Torgerson, "New approach to the mass spectrometry of nonvolatile compounds", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60, 616-621, (1974).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

79

79

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

80

80

Charakteristika PD

- Radioaktivní zdroj kalifornia ^{252}Cf . Energie fragmentů $\sim\text{MeV}$.
- Tvorba molekulárních iontů, iontových klastrů 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.

3

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

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.



The Nobel Prize in Chemistry 2002

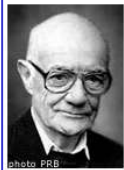
"for the development of methods for identification and structure analyses of biological macromolecules"

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

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

MALDI

ESI



John B. Fenn

1/4 of the prize

USA

Virginia Commonwealth University
Richmond, VA, USA

b. 1917



Koichi Tanaka

1/4 of the prize

Japan

Shimadzu Corp.
Kyoto, Japan

b. 1959



Kurt Wüthrich

1/2 of the prize

Switzerland

Eidgenössische Technische Hochschule (Swiss Federal Institute of Technology)
Zürich, Switzerland;
The Scripps Research Institute
La Jolla, CA, USA

b. 1938

Zdroj:
www.nobel.se
October 9, 2002

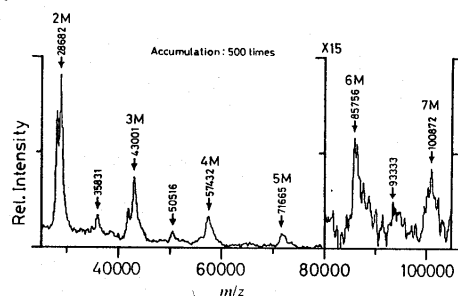
Hmotnostní spektrometrie biomolekul



1987 Karas & Hillenkamp

mellitin
kyselina nikotinová
 $m/z = 2845$

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



1988 Tanaka

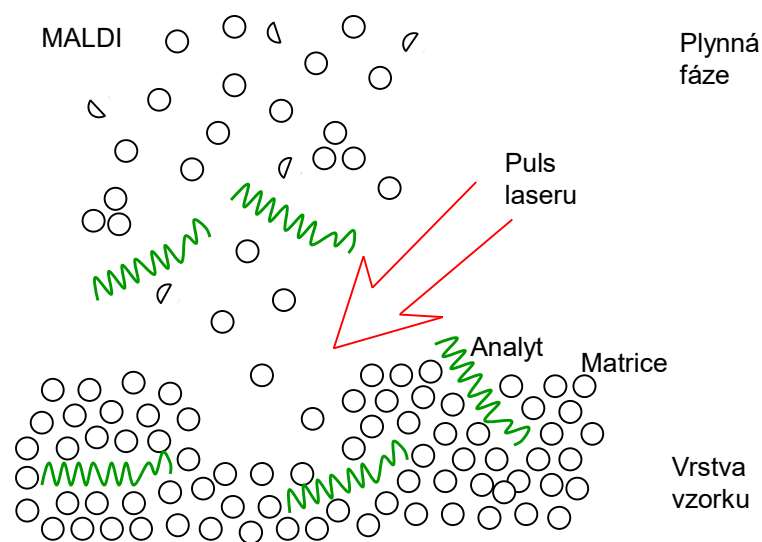
lysozym
Co/glycerol
 $m/z = 100\ 872$ (heptamer)

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

85

85

Schema MALDI (detail)

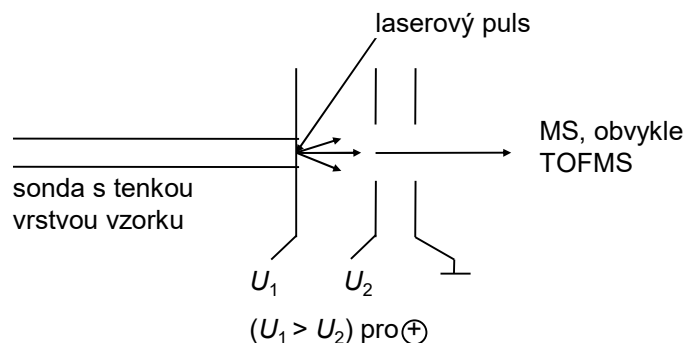


Hmotnostní spektrometrie biomolekul

86

86

Schema LDI (MALDI)



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

87

87

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_{vib} na E_{trans} (collisional cooling).
- Energie je absorbována** převážně **matricí** (M), ne analytem.
 $\varepsilon(\text{matrice}) \gg \varepsilon(\text{analytu})$, $c(\text{matrice}) \gg c(\text{analytu})$
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

88

88

Požadavky na matrici (MALDI)

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

Typy matricí

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

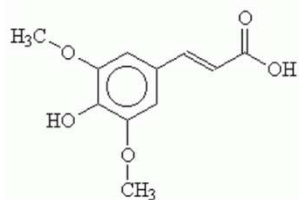
89

89

Běžné matrice pro MALDI

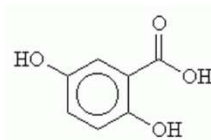
sinapinic acid (SA)

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



gentisic acid (DHB)

(2,5-dihydroxybenzoic acid)

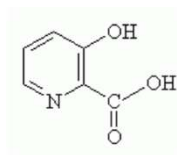
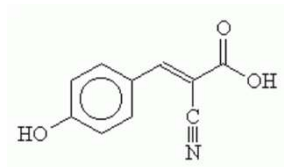


α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)

3-hydroxypicolinic acid (HPA)

pyridinecarboxylic acid)

(3-hydroxy-2-



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

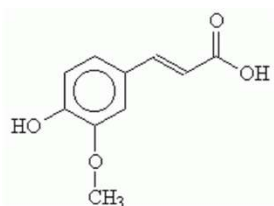
90

90

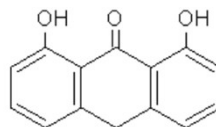
Běžné matrice pro MALDI

ferulic acid

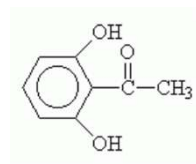
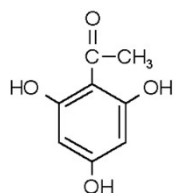
(4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid)



dithranol (DIT)



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



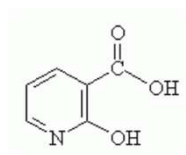
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

91

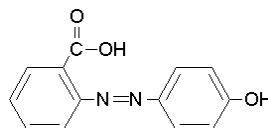
91

Běžné matrice pro MALDI

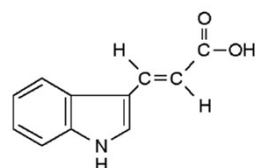
nicotinic acid-N-oxide



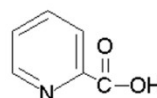
2,-(4-hydroxy-phenylazo)-benzoic acid (HABA)



trans-3-indoleacrylic acid (IAA)



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



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

92

92

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

93

93

Vlastnosti matrice

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

DHB: „studená“ matrice
univerzální použití

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

94

94

Lasery

UV-MALDI

337 nm dusíkový laser (nejlevnější a nejběžnější)

355 nm Nd:YAG (3xf)

266 nm Nd:YAG (4xf)

193 nm ArF ... fragmentace!

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

IR MALDI

2.94 μm Er:YAG laser

10.6 μm CO₂ laser

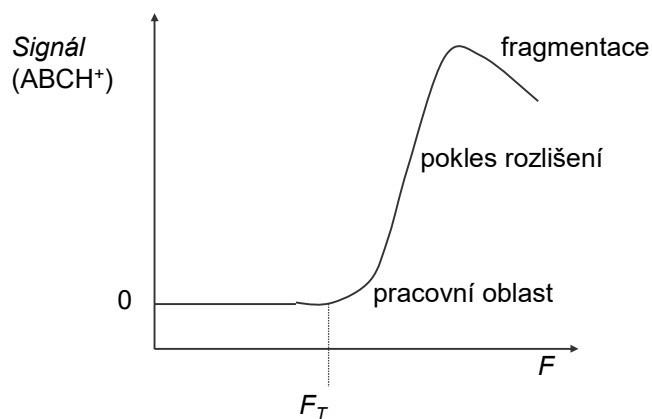
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

95

95

Vliv energie laseru

Velmi výrazná závislost spekter na energii laseru, přesněji na energii vztažené na plochu, tzv. hustotě energie (fluence, F), nebo výkonu vztaženém na plochu, tzv. hustotě výkonu (power density, PD).



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

96

96

Vliv energie laseru

Prahová hustota fluence, F_T ... energie laseru vztažená na plochu, při které se začínají objevovat píky iontů analytu ve spektru.

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

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

V praxi obvykle během měření pomalu zvyšujeme energii laserového pulzu 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.

Akumulace spekter

zpravidla zaznamenáváme průměr z 100 – 1000 desorpcí (pulzů laseru)
zvýšení odstupu signálu od šumu a reprodukovatelnosti

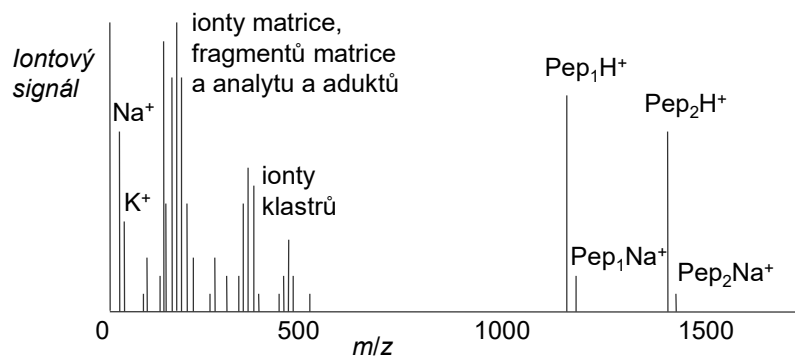
signál, $S \propto n$

šum, $N \propto \sqrt{n}$

signál/šum, $S/N \propto \sqrt{n}$

Hmotnostní spektrum MALDI

Modelové hmotnostní spektrum vzorku 2 peptidů, Pep₁ a Pep₂



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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

99

99

Charakteristika MALDI

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

100

100

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

101

101

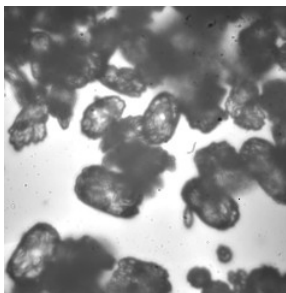
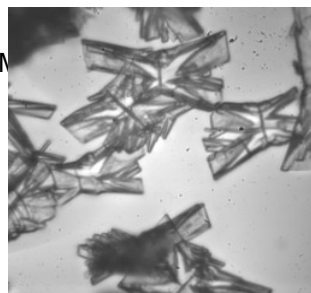
Příprava MALDI vzorků

MALDI vzorek = analyt + matrice

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

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

terčák: ocel, Al, syntetické polymery



vzorku

www.srsmaldi.com

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

102

102

Zásady při přípravě MALDI vzorků

- Rekrystalizace matrice
- Čerstvý roztok matrice
- Vhodná volba solventu (ACN, EtOH, MetOH, 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
- Nanesené vzorky jsou obvykle stabilní (skladování terčů se vzorky)
- Dokonalé očištění terčů

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

103

103

Metody přípravy vzorků

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

104

104

Další metody přípravy vzorků

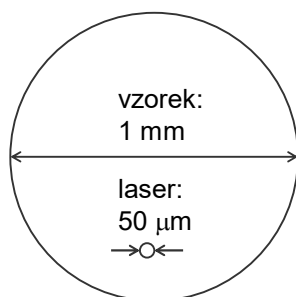
speciální metody (ES, nanášení ve vakuu, MALDI MS z aerosolu ...)

mikrometody

mikroterčičky, piezoelektrické pipetory, nanášení z kapiláry

velikost ohniska $\approx$ velikost vzorku $\Rightarrow$ maximální citlivost

vyšší hustota vzorků na terčičku



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

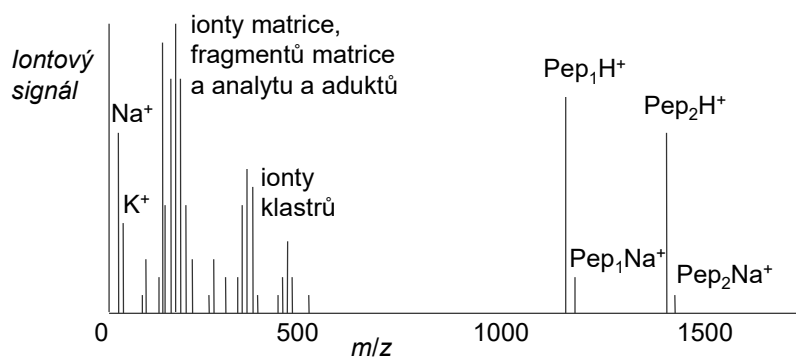
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

105

105

Vliv přítomnosti solí

Hmotnostní spektrum MALDI vzorku peptidu v přítomnosti solí Na a K



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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

106

106

Redukce vlivu solí

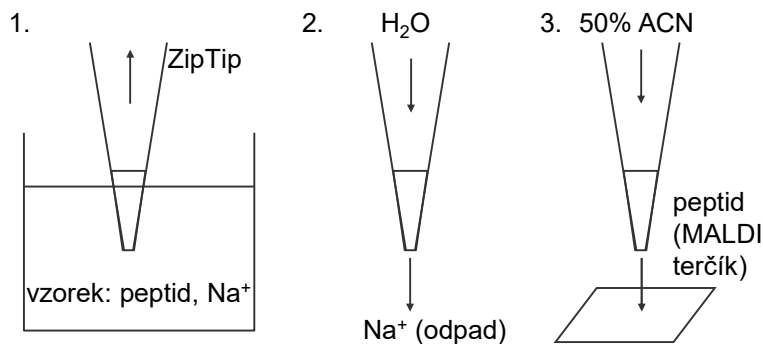
segregace na terčíku ... výběr vhodného krystalu pro desorpci

přídavek kyselin (TFA, HCOOH, HCl), NH_4 solí

opláchnutí krystalů na terčíku

katex na terčíku

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



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

107

107

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

108

108

MALDI MS početných sérií biologických vzorků

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



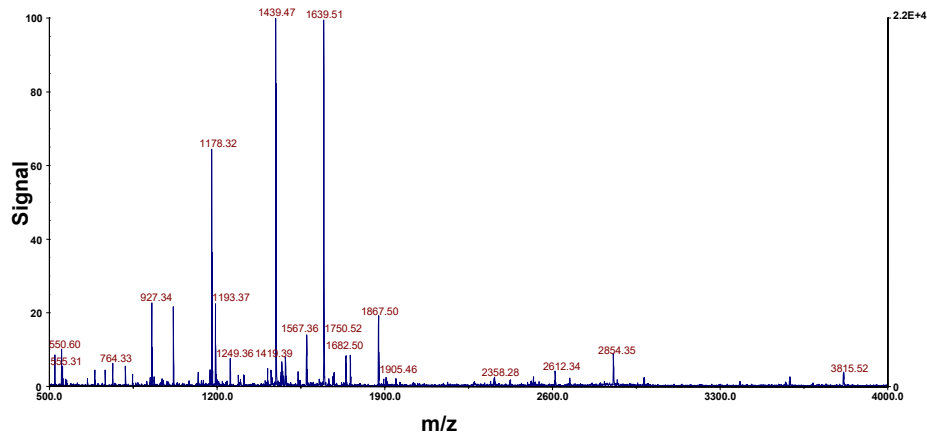
384 vzorků/terčík

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

109

109

MALDI MS identifikace hovězího albuminu z produktů enzymatického štěpení



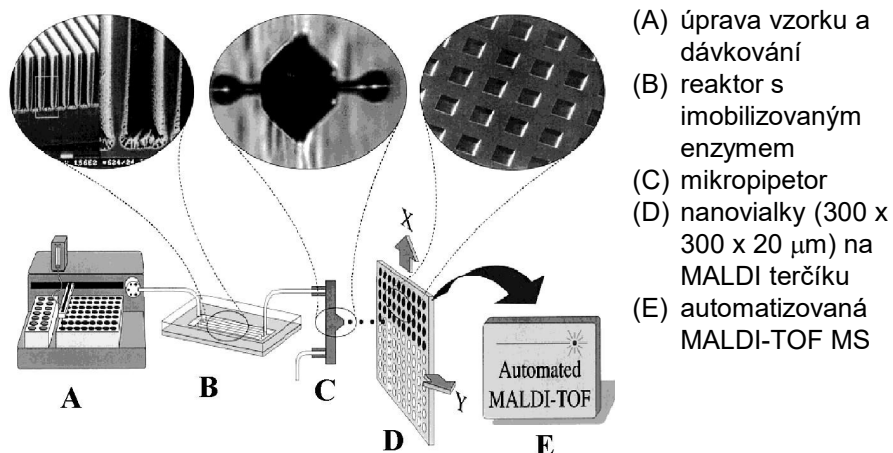
Analyt: 1 pmol tryptického digestu BSA, odsoleno pomocí ZipTip_{C18}
 Matrice: 10 mg/ml CHCA v ACN/0.1% TFA : 70/30
 Příprava vzorku: dried-droplet.
 MS: Voyager DE-STR

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

110

110

Mikrometody - příklad



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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

111

111

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

112

112

On-line ionizační techniky

Ionizace za atmosferického tlaku

(Atmospheric Pressure Ionization, API, též sprejové ionizační metody)

Společné znaky

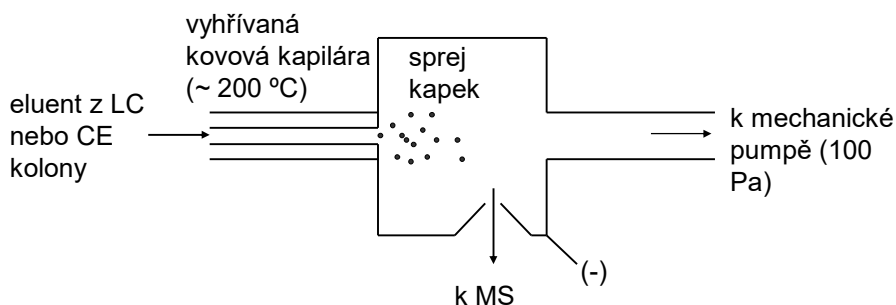
- Analyt: často polární, ionizovaný v roztoku
- Vyhřívané kapiláry a jiné elementy iontového zdroje (stovky °C)
- Přídavné elementy pro zvýšení ionizační účinnosti (svazek elektronů, el. oblouk)
- Diferenciální pumpování
- Často po předcházející separaci ... 2D separace (MS jako druhý rozměr).
- Fáze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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

113

113

Termosprej (TSI)



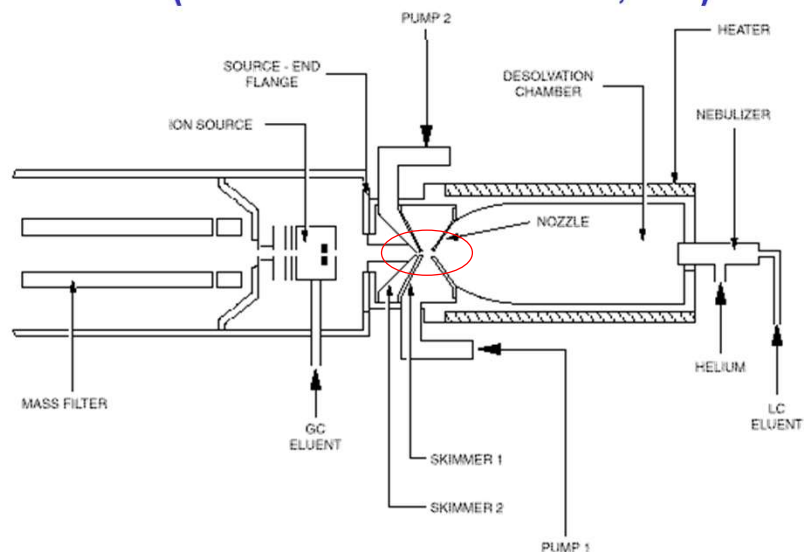
- Roztok vře ve špičce kapiláry, tvoří se kapky, později suchý aerosol a ionty MH^+ . Spektra podobná jako u CI, převládají molekulární ionty. Do zdroje mohou být vloženy elektrody – přídavný výkon – vyšší účinnost ionizace.
- Elektronegativní sloučeniny mohou tvořit negativní ionty. (Do komory může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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

114

114

Ionizace svazkem částic (Particle Beam Ionization, PBI)



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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

115

115

Ionizace svazkem částic (Particle Beam Ionization, PBI)

Princip

- Odvozen od "generátoru monodisperzního aerosolu" : R. C. Willoughby, R. F. Browner, "", *Anal. Chem.*, **56**, 2626-2631, (1984)
- Velmi podobné TSI a vyhřívanému 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

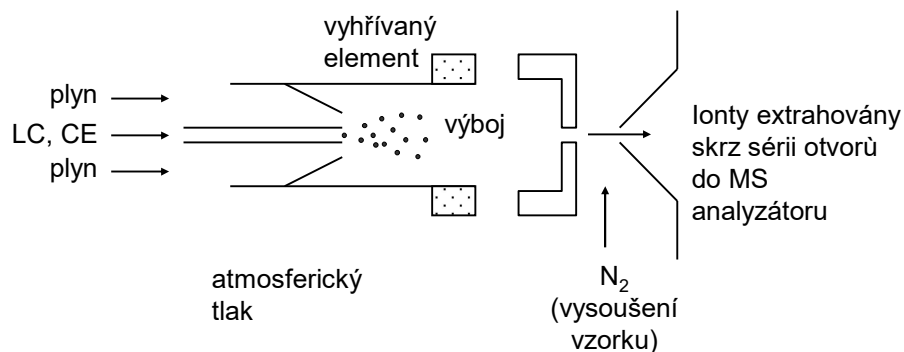
- Spektra podobná jako v případě TSI. Více fragmentů.
- Méně citlivý než TSI a ESI.
- Vhodný pro tepelně stálé, neiontové sloučeniny s nepříliš vysokou hmotností.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

116

116

Vyhříváný nebulizér



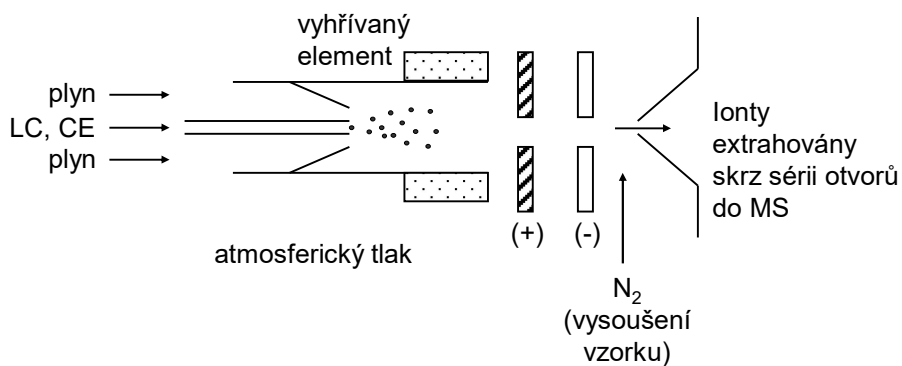
- Spektra podobná CI, obvykle záchyt 1 protonu ($[M+H]^+$).
- Nízké procento fragmentace (měkká ionizace).
- Vhodné pro střední hmotnosti (~ 2000 Da).
- Struktura? ... Nutno použít přídatnou kolizní celu (MS/MS).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

117

117

Iontový sprej (Ion Spray, IS)

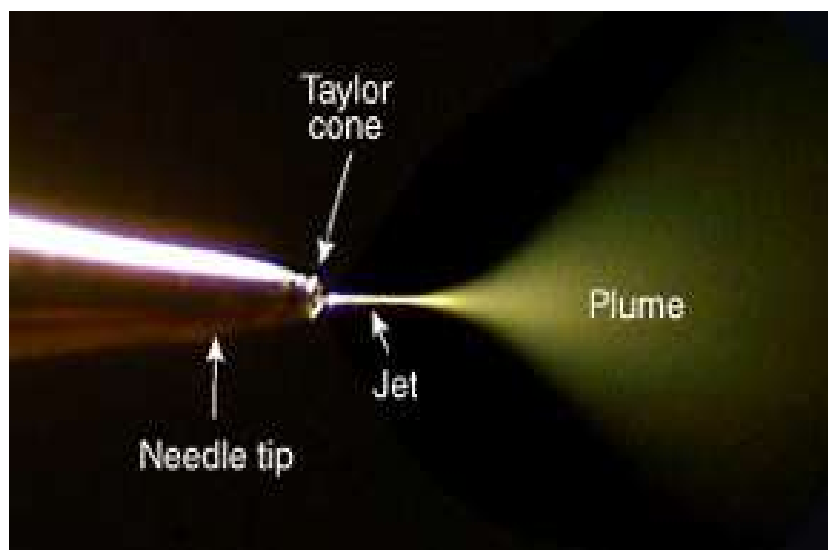


- Pouze pozitivní ionty proniknou přes elektrody, negativní jsou odstraněny.
- Vícenásobně nabitě ionty $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[M+3H]^{3+}$, $[M+4H]^{4+}$ atd.
- Plněné LC kolony se splitterem, mikrokolony, kapilární kolony.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

118

118



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

121

121

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

122

122

Provedení ESI

- Přídavný plyn – proud N_2 , vyhřívána kapilára za otvorem: dokonalejší desolvatace, zabránění tvorby klastrů.
- Koaxiální proud kapaliny možný (... přídavná koaxiální kapilára).
- Rozměry jehly: i.d. < 100 μm , o. d. 100 μm – 1 mm, hrot < 100 μm .
- Vzdálenost hrotu od protielektrody: 1 – 3 cm. Tok < 10 mL/min.
- Nanoelektrosprej: menší rozměry, bez přídavné koaxiální kapaliny a nuceného pumpování, tok < 100 nL/min.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

123

123

Provedení ESI

- **Uspořádání sprejovací jehly a vstupu do analyzátoru v ... oddělení iontů od balastu**

v ose (on-axis)



mimo osu (off-axis)



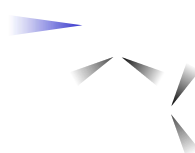
diagonální (tilted)



kolmé (orthogonal)



Z-sprej



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

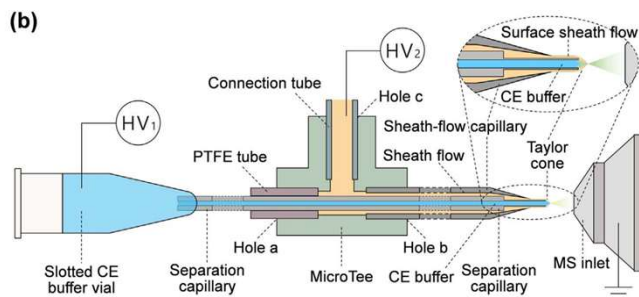
124

124

Provedení ESI

• Připojení el. napětí

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



Pan Fang et al., A robust and extendable sheath flow interface with minimal dead volume for coupling CE with ESI-MS, *Talanta* 2018 (180), 376-382.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

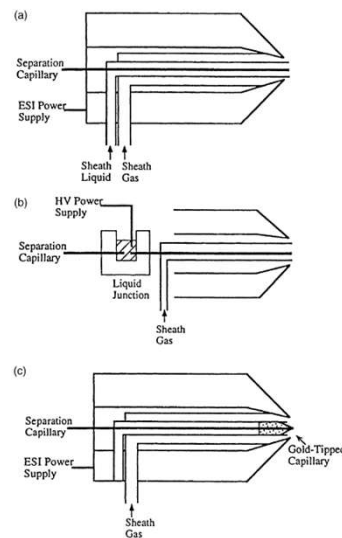


Fig. 2. Schematic of CE-MS interfaces to an ESI source: coaxial sheath flow interface (a); liquid junction interface (b); and sheathless interface (c). From [52] with permission.

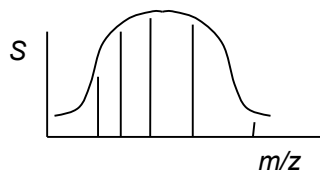
Christian W Klampff, Review coupling of capillary electrochromatography to mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 2004 (1044), 131-144

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 mezi píky nejsou ekvidistantní (na rozdíl od izotopové distribuce).



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

126

126

Tvorba vícenásobně nabitých iontů

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

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

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

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

+ Ovlivnění náboje z ?

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

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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

127

127

ESI

- Aplikace elektrického pole (nozzle-skimmer) $\Rightarrow$ fragmentace ve zdroji.
- K objasnění struktury - přídavná 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 $\propto c(\text{analyt})$ ($10^{-7} - 10^{-3}$ M), při vyšších c se růst zpomaluje (plato).
- Nanosprej (nanospray) ... komerční název

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

128

128

Faktory ovlivňující ESI

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

129

129

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 $\text{p}K_a(\text{elektrolyt}) < \text{p}K_a(\text{analyt}) - 2$
- Pro negativní ionizaci $\text{p}K_b(\text{elektrolyt}) < \text{p}K_b(\text{analyt}) - 2$
- Důkladná příprava vzorku = snazší analýza
odsolení, odstranění surfaktantů a dalších příměsí

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 přídatné elementy
- APLI: budícím zdrojem je laser

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

131

131

Ambientní ionizační techniky

- Ambientní = okolní; přirozené, běžné prostředí
- Vhodná pro ionizaci vzorků bez jakékoli úpravy
- Široká skupina ionizačních technik
 - DESI
 - DART
 - LAESI
 - MALDESI
 - aj.



MS Copilot

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

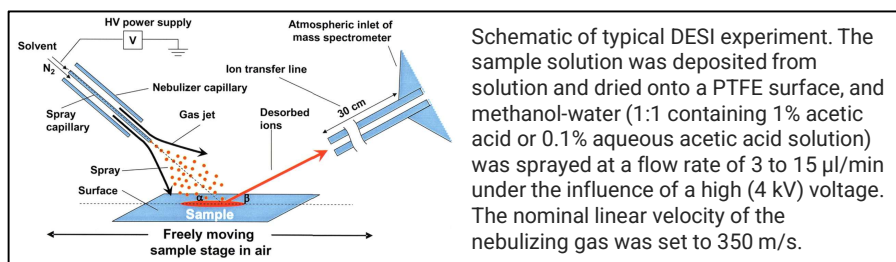
132

132

DESI

Desorption electrospray ionization

- elektrosprej v desorpčním provedení
- interakce generovaných iontů s povrchem
- příklady aplikací: léčiva v tabletách
kokain na bankovkách
metabolity na pokožce



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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

133

133

DART

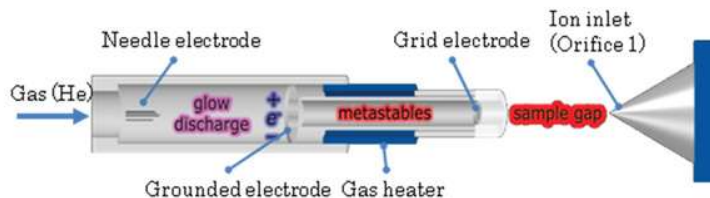
Direct Analysis in Real Time (DART)

ionizace pevných, kapalných i plynných vzorků

Proud nosného plynu (He nebo N_2) je ionizován doutnavým výbojem a produkuje excitované metastabilní atomy a molekuly.

Proud plynu je zahříván (až 500°C) – lepší desorpce těkavých a částečně těkavých sloučenin ze vzorku.

Proud excitovaného plynu interaguje s atmosférickou vlhkostí a okolními plyny, tvoří se vytvoření reaktivní ionty, které pak interagují se vzorkem (např. přenos náboje, protonace nebo deprotonace).



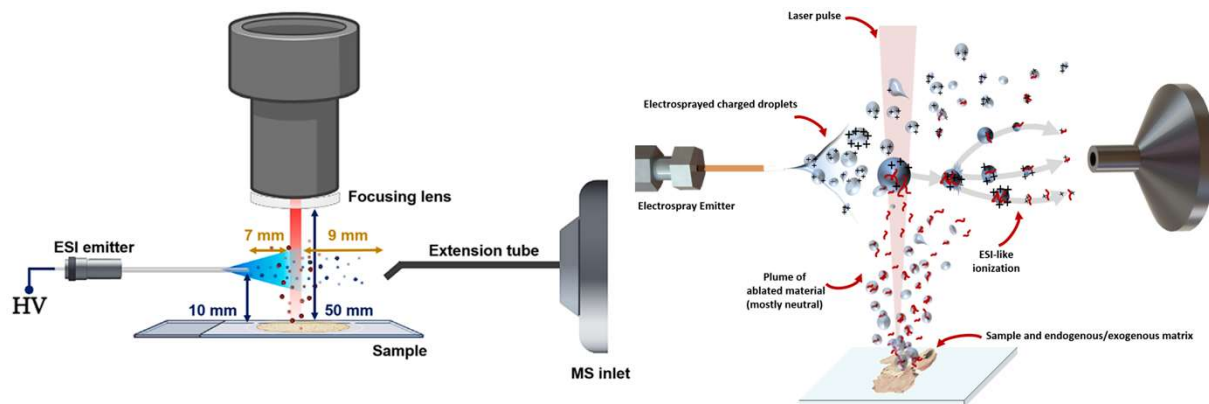
jeol.com

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

134

134

LAESI, MALDESI



Gesiane da Silva Lima et al. *Food Chemistry* 373 (2022) 131490.

wikipedia.org

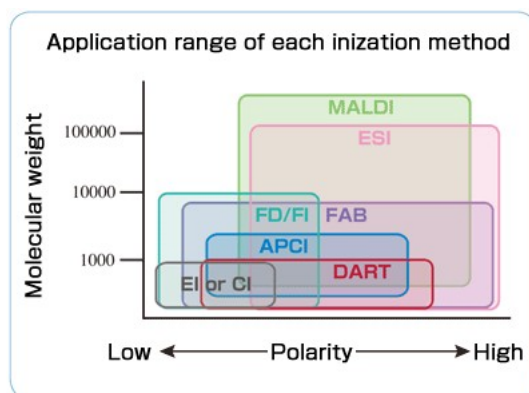
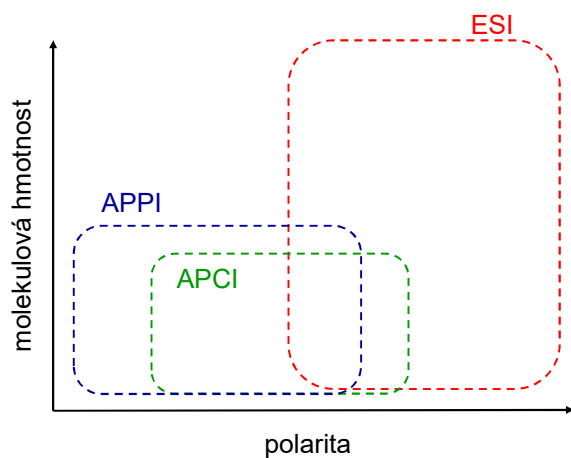
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

135

135

Použití ESI, APCI a APPI a dalších ionizačních technik

Schematické znázornění aplikačního použití



jeol.com

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

136

136



137

III. Hmotnostní analyzátory

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

138

138

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

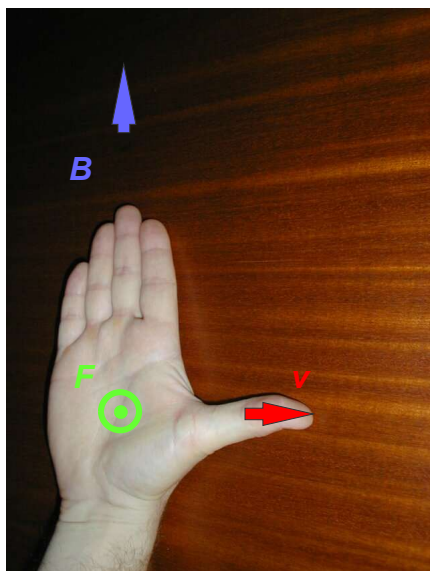
vlnová délka, λ	kinetická energie, W_{kin} hmotnost/náboj, m/z
index lomu neměnný	možné ladění elektr. nebo magn. pole časově proměnná pole během experimentu
nezávislé na intenzitě	vzájemné odpuzování iontů

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

139

139

Lorentzova a Coulombova síly



Magnetické pole o indukci B :

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

Coulombova síla v el. poli E :

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

Celkově:

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

Pro jednoduchost dále pouze:

$$F_{\text{el.}} = zeE$$

$$F_{\text{magn.}} = zevB$$

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

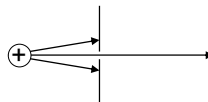
140

140

Elementy iontové optiky

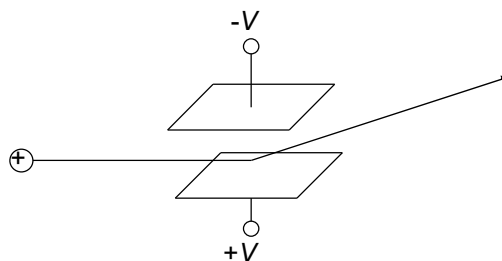
Štěrbina

- vymezení paprsku
- vymezení vs. propustnost



Deflektor

- odklonění iontů
- 2 deflektory pro x, y skenování

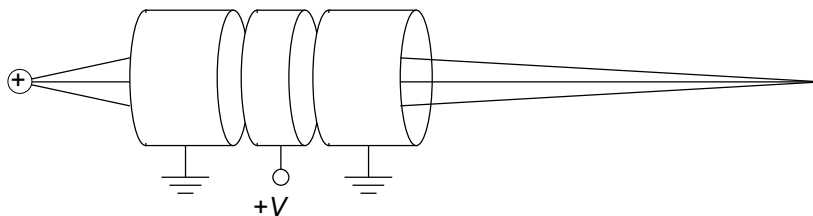


Hmotnostní spektrometrie biomolekul

141

141

Čočka (unipotenciálová, elektrostatická, einzel lens)



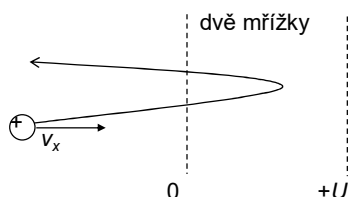
- analogie klasické čočky
- ohnisková vzdálenost může být změněna změnou napětí V
- vyšší iontová propustnost ve srovnání se štěrbinou
- fokální vzdálenost není funkcí m/z (pro ionty ze stejného iontového zdroje)
- ideální funkce pouze pro ionty o stejné kinetické energii - pokud je vzájemné odpuzování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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

142

142

Iontové zrcadlo (reflektor, reflekttron)



Kinetická energie iontu vs. potenciální energie elektrického pole:

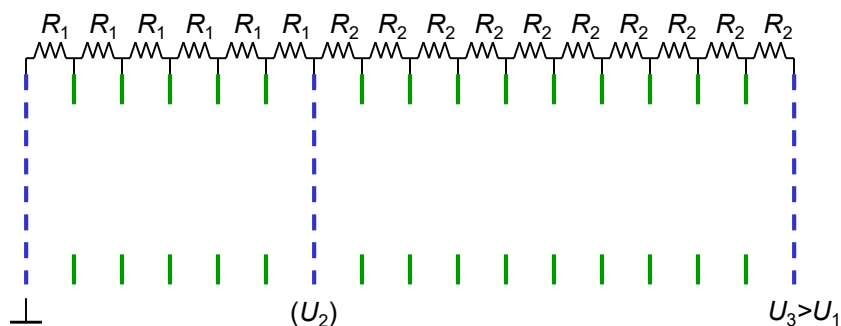
1) $\frac{mv_x^2}{2} < zeU$ *iontové zrcadlo*: iont se vrací stejnou rychlostí, jakou pronikl přes vstupní mřížku

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.

Konstrukce iontového zrcadla se 2 stupni



mřížky: definice ekvipotencionálních rovin

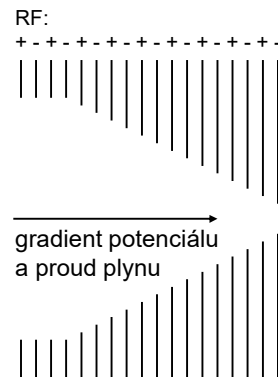
prstence: elektrostatické **stínění** potenciálu okolí (vakuové aparatury)
potenciály prstenců a mřížek jsou definovány pomocí série rezistorů a U_3
 U_1 ... urychlovací napětí

Iontová nálevka

Ion funnel

1997 Richard Smith

- série prstenců s klesajícím vnitřním průměrem
- kombinace RF a gradientu potenciálu
- proud plynu, vyšší tlak (~hrubé vakuum)
- na vstupu hmotnostních analyzátorů pro vyšší iontovou transmissi



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

145

145

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 , α

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

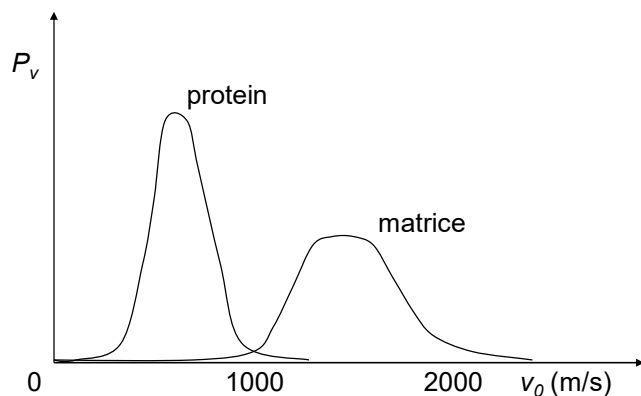
146

146

Vlastnosti iontů

Př.: Distribuce počáteční rychlosti při MALDI

(P_v ... pravděpodobnost výskytu molekuly o rychlosti v)

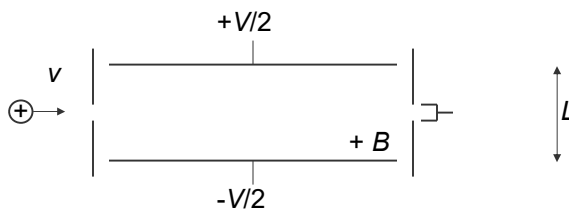


Hmotnostní spektrometrie biomolekul

147

147

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

148

148

Wienův rychlostní filtr

Pro iont letící středem filtru platí:

$$eE = zevB$$

$$(E = \frac{V}{L})$$

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

... prolétají pouze ionty o určité rychlosti.

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

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

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

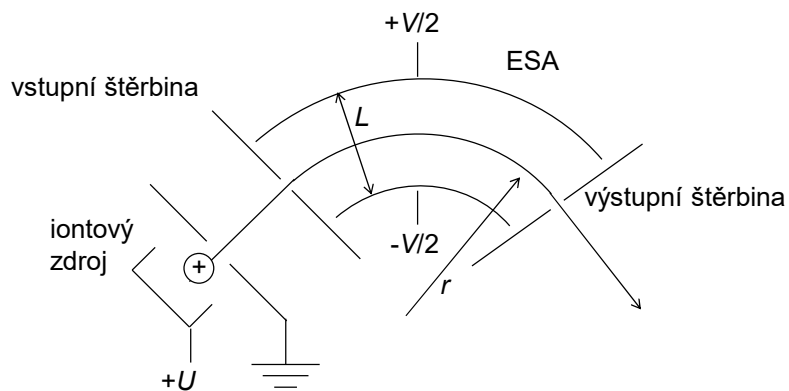
... Wienův filtr lze použít k analýze hmotnosti (m/z).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

149

149

Energetický analyzátor; elektrostatický analyzátor (ESA, E)



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

150

150

Energetický analyzátor

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

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

Poloměr zakřivení: $r = \frac{U}{E}$

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

151

151

Hmotnostní analyzátory

Magnetický sektor (MAG, B)

Quadrupólový analyzátor (Q, q)

Iontový cyklotron (ICR-FT-MS)

Iontová past (IT)

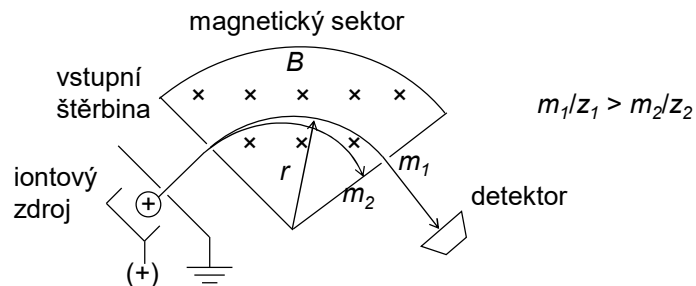
Analyzátor doby letu, Time-of-flight (TOFMS)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

152

152

Magnetický sektor (MAG, B)



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

Princip magnetického sektoru

1.) Lorentzova síla = dostředivá síla:

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

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

2.) Kinetická energie = urychlovací energie:

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

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

Princip magnetického sektoru

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

Způsoby skenování spektra:

- Posunem výstupní štěrbiny, 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.

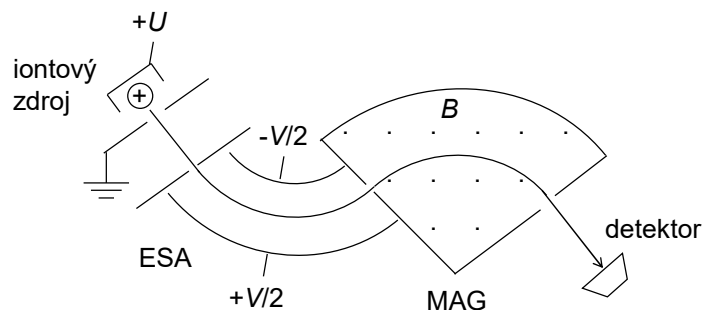
Peak switching

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

Tandem elektrostatický analyzátor - magnetický sektor

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

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



Tandem EB

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

Praktické geometrie EB:

1. Nier-Johnsonova

90° ESA + 60° MAG

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

2. Mattauch-Herzogova

31.8° ESA + 90° MAG

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

3. Matsudova

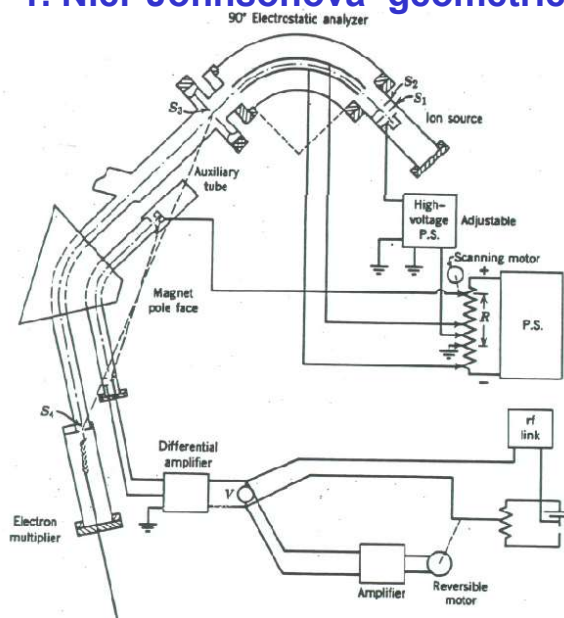
vhodná pro kompaktní přístroje

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

157

157

1. Nier-Johnsonova geometrie

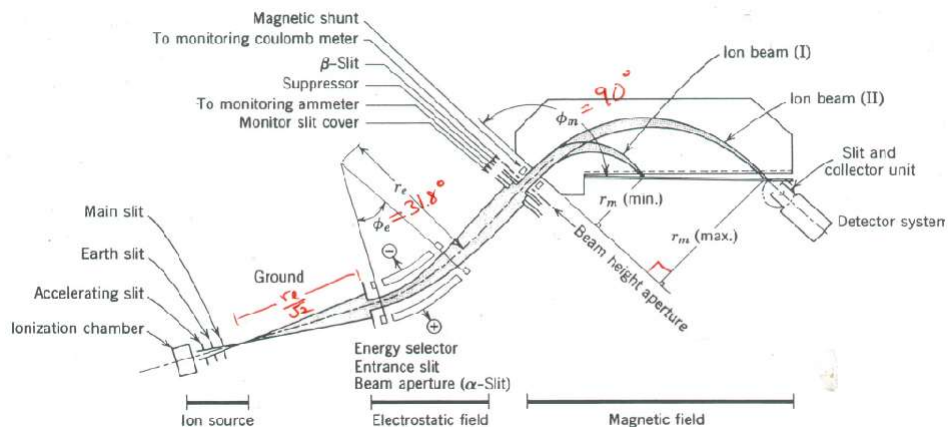


Hmotnostní spektrometrie biomolekul

158

158

2. Mattauch-Herzogova geometrie



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

159

159

Další kombinace E a B

Reversní geometrie (Reverse-geometry, BE)

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

MIKES (Mass-Analyzed Ion Kinetic Energy Spectrometry)

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

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

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

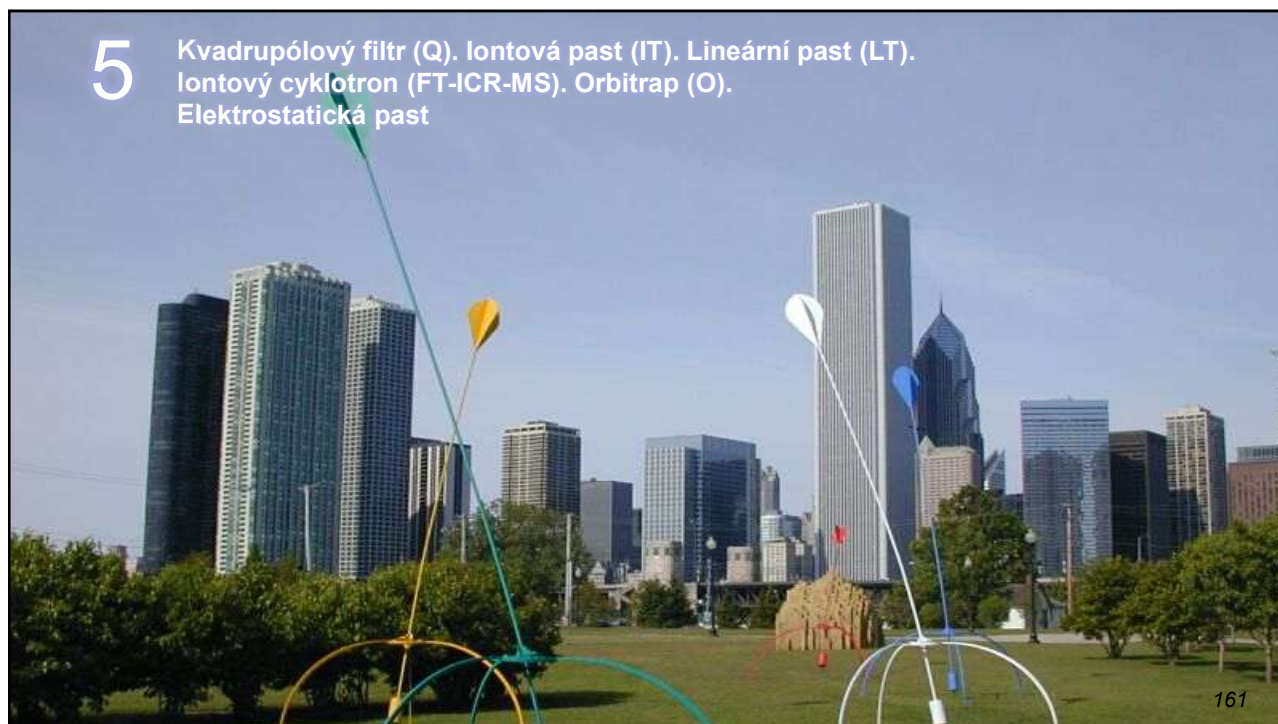
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

160

160

5

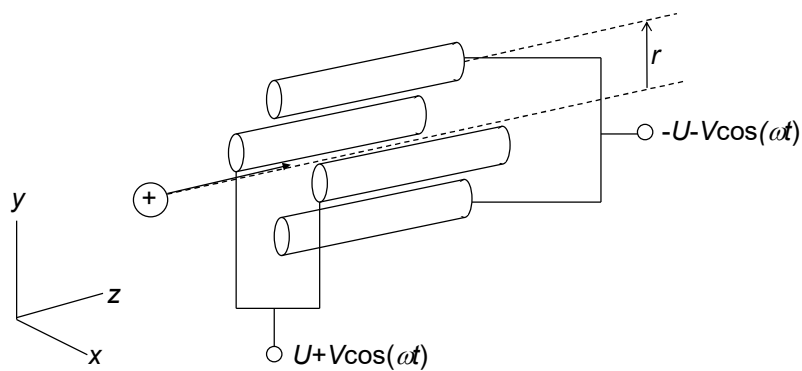
Kvadrupólový filtr (Q). Iontová past (IT). Lineární past (LT).
Iontový cyklotron (FT-ICR-MS). Orbitrap (O).
Elektrostatická past



161

161

Kvadrupólový hmotnostní filtr (Quadrupole MS, Q, q)



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

U ... DC složka napětí

V ... AC (RF) složka napětí

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

162

162

Kvadrupólový hmotnostní filtr

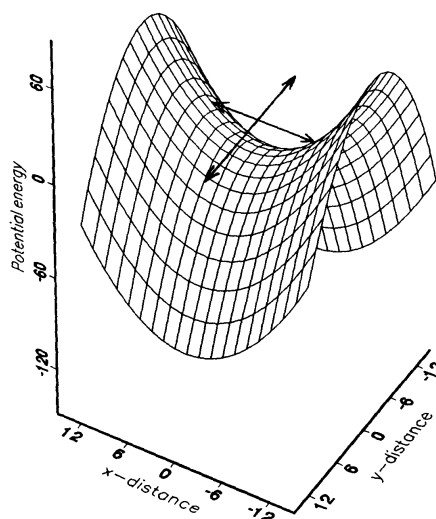
Rovina xz: těžké ionty procházejí

Rovina yz: lehké ionty procházejí

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

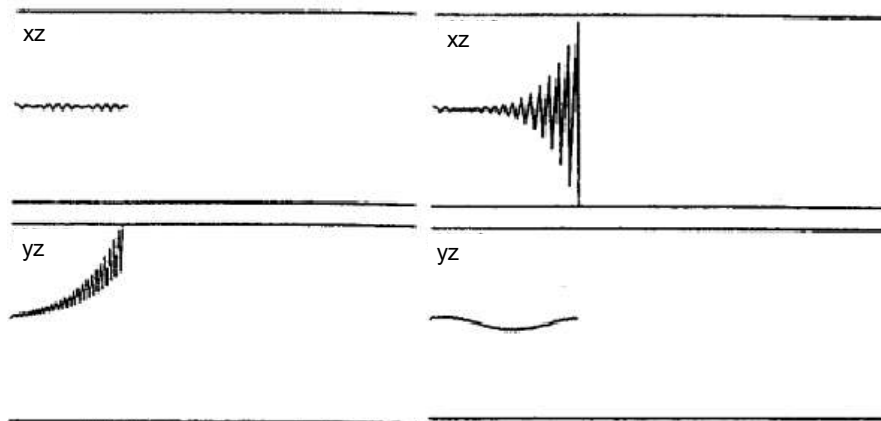
163

Quadrupole field



164

Trajektorie iontů v kvadrupólovém filtru



Heavy Ions

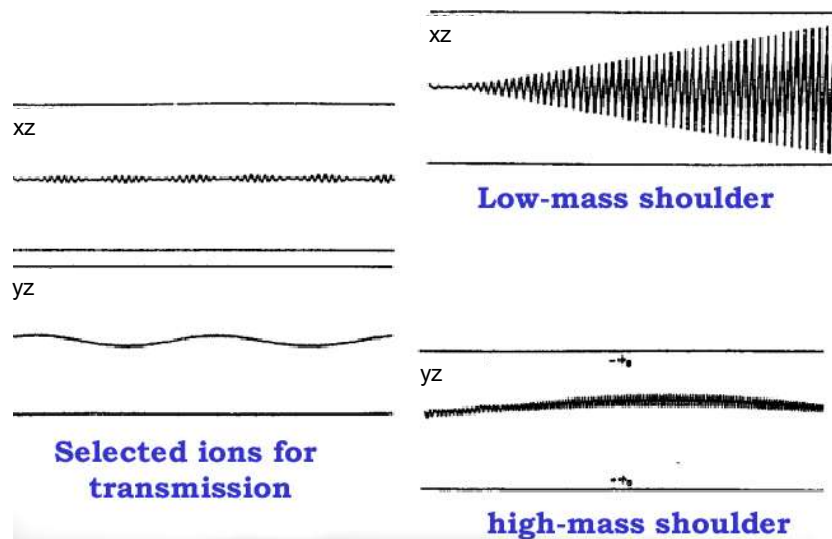
Light Ions

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

165

165

Trajektorie iontů v kvadrupólovém filtru



**Selected ions for
transmission**

Low-mass shoulder

high-mass shoulder

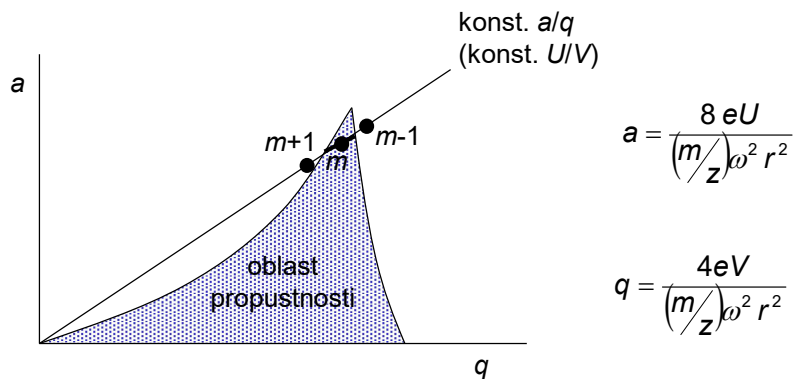
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

166

166

Diagram stability

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



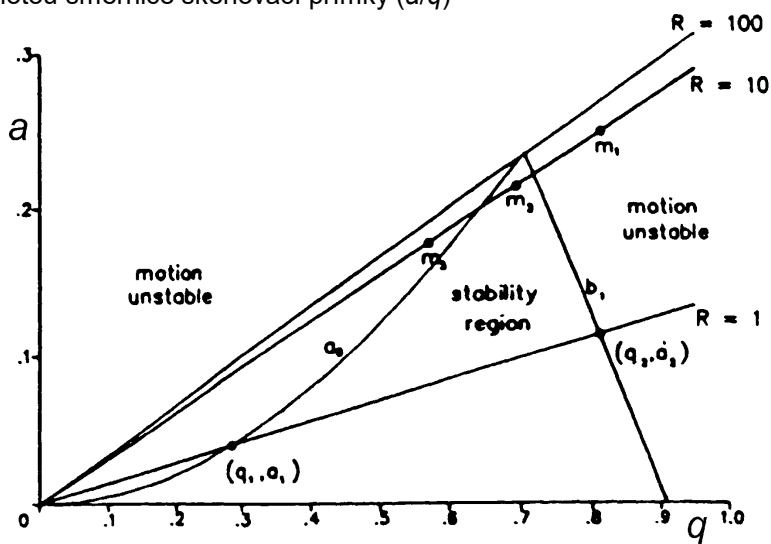
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

167

167

Rozlišení

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



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

168

168

Vlastnosti kvadrupólového filtru

Zaznamenávání spektra

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

Limit max. hmotnosti $\sim 2\,000$.

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

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

Rozlišovací schopnost

řádově $\sim 10^3$

podobné pro všechny kvadrupólové analyzátory

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

169

169

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

170

170

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 ... iontové vodič)

Trojité kvadrupól (QqQ)

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

171

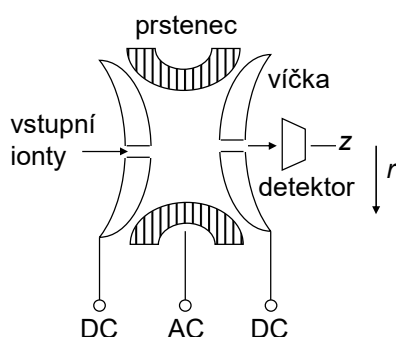
171

Kvadrupólová iontová past (Ion trap, IT)

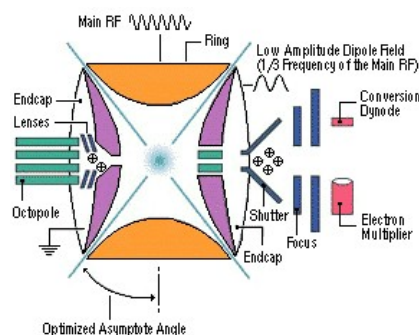
1953 Wolfgang Paul (Paulova past) - téměř bez povšimnutí
1983 Finnigan - komerční přístroj (dnes nejprodávanější MS)

Schema iontové pasti

Bruker, Model ESQUIRE-LC



DC: nejčastěji uzeměné
AC: střídavé napětí, $V \cos(\omega t)$

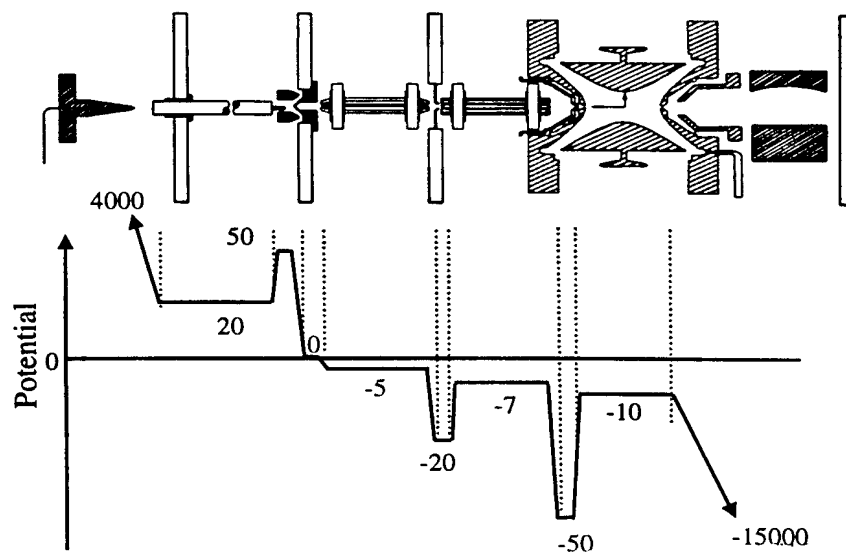


Hmotnostní spektrometrie biomolekul

172

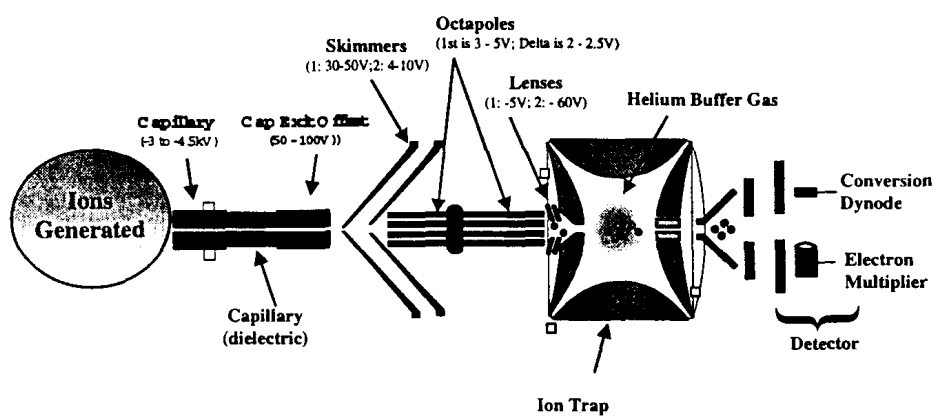
172

Potential Energy Diagram for LCQ_{Deca}



173

LC MSD Ion Trap: Ion Path

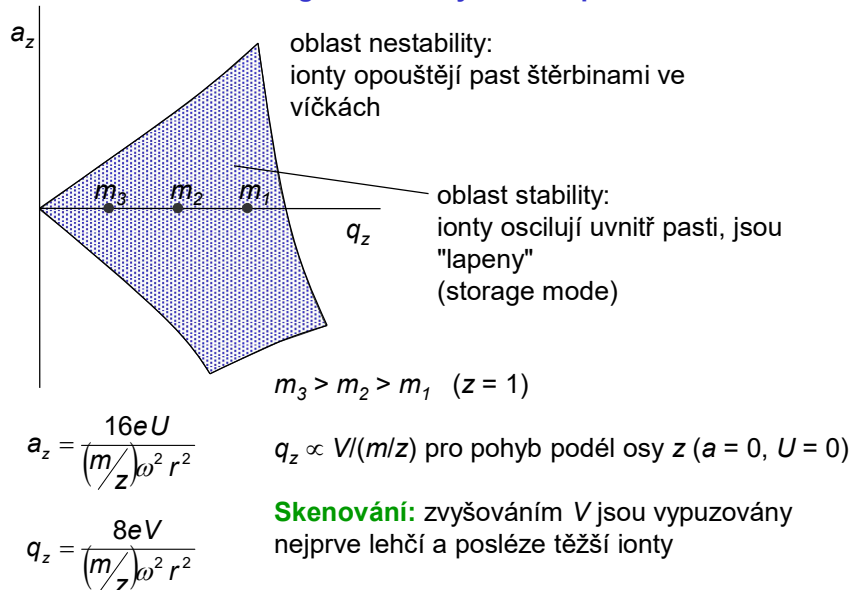


Hmotnostní spektrometrie biomolekul

174

174

Diagram stability iontové pasti



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

175

175

Iontová past

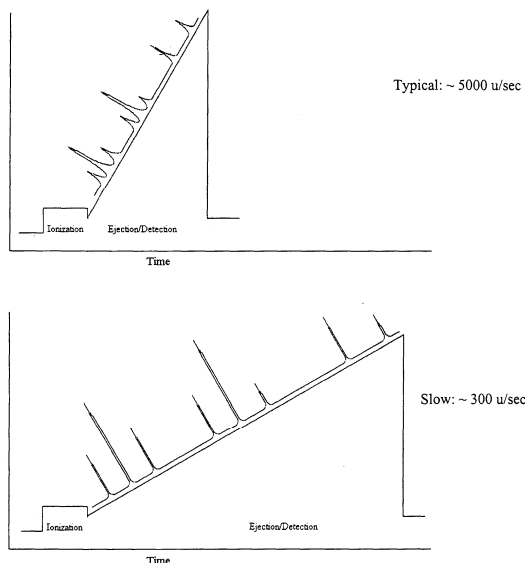
- Experiment zahrnuje fáze ionizace, akumulace, sken a detekce.
- Akumulace ionů:** ionty lze sbírat i během ionizačního pulsu - výsledkem jsou velmi nízké detekční limity. Doba cyklu akumulace - detekce závisí na požadavcích:
Vyšší citlivost ... delší akumulace.
Širší rozsah m/z , vyšší m ... delší sken.
Vyšší R ... pomalejší sken.
- Rezonanční vypuzení** (resonant ejection)
iontů o specifické m/z – přivedením přídavného 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

176

176

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 spektrometrie biomolekul

177

177

Iontová past

- **MS/MS** - past může nahradit tandem 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 $\sim 70\,000$ (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

178

178

Iontová past

- **Iontová transmise**

polovina iontů může být detekována

- **Fyzická omezení**

volba rozměrů, napětí a frekvence omezena

- **Maximální dynamický rozsah** (10^6 pro 1 druh iontu) omezen:

- minimum citlivostí (i 1 iont může být detegován)

- maximum max. množství lapených iontů: pro vyšší množství iontů (nábojů) než 10^6 přestává past postupně fungovat - vzájemné odpuzování iontů. Pozor, jde o sumu iontů všech m/z ! A některé mohou být vícenásobně nabitě!

Lineární past

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

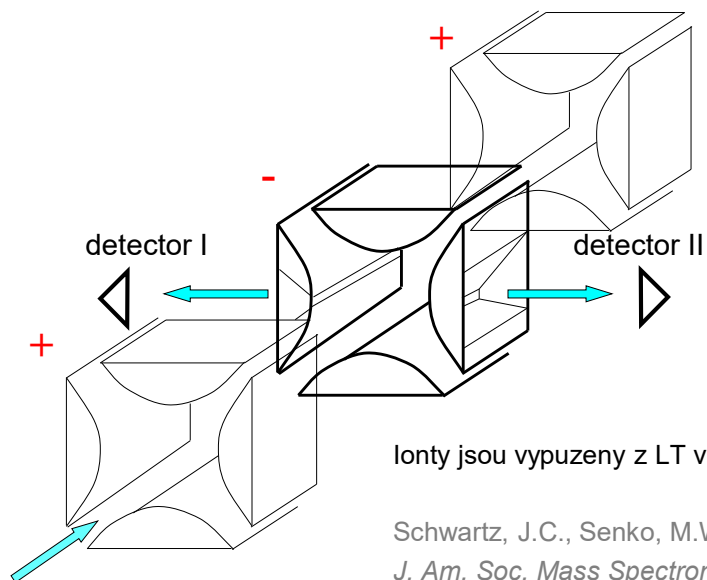
Ionty jsou injektovány do RF (RF-only) kvadrupólu a poté zadrženy zvýšením potenciálu na postranních víčcích, takže oscilují v potenciálové jámě kvadrupólu. Později jsou ionty postupně vypuzovány otvory v tyčích nebo víčcích a detekovány.

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.

Lineární past s radiálním vypuzením



Ionty jsou vypuzeny z LT v radiálním směru.

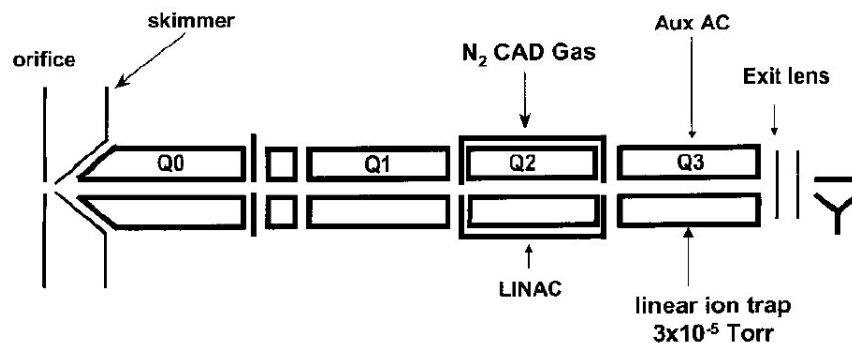
Schwartz, J.C., Senko, M.W., Syka, J.E.P.,
J. Am. Soc. Mass Spectrom. 13, 2002, 659.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

181

181

Lineární past s axiálním vypuzením



Ionty jsou vypuzeny z LT podél osy kvadrupólu.

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

182

182

Výhody 2D vs. 3D pasti

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

Účinnost extrakce: 25-50% (3-D : 20%)

Citlivost: 5-10 – násobný vzrůst

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

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

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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

183

183

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

184

184

Srovnání kvadrupólových analyzátorů

	QIT	QQQ	LQIT
Citlivost	++	-	++
Dynamický rozsah	-	++	+
Rozsah m/z	-	+	+
MS³	++	-	++
Neutral loss sken/Precursor sken	-	+	+
Správnost m/z	+	-	+
Rozlišovací schopnost	+	-	+

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

185

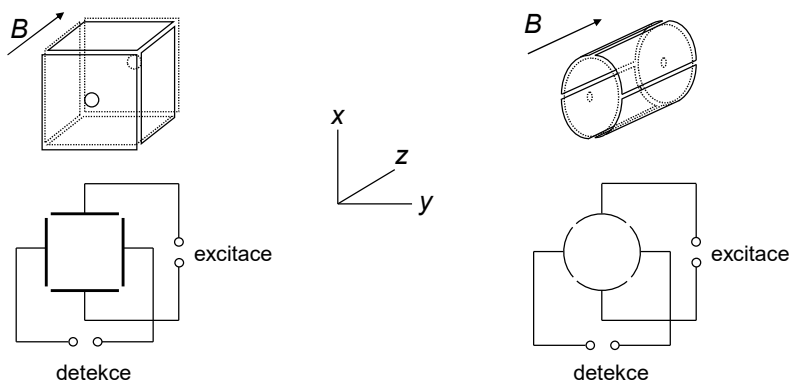
185

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:



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

186

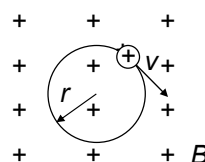
186

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:

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

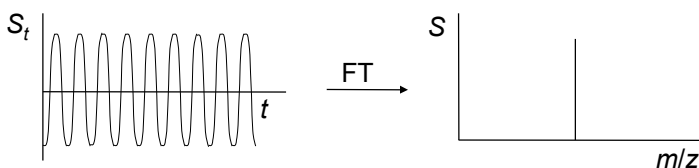
Vlastnosti FT-ICR-MS

- (supravodivý) magnet s velkou magnetickou indukcí $B \sim 10$ Tesla
- velmi nízký tlak, $p < 10^{-7}$ Pa (UHV, ultra high vacuum) ... velmi dlouhá dráha letu (až $\sim 10^2$ km)
- 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 $n = 1$

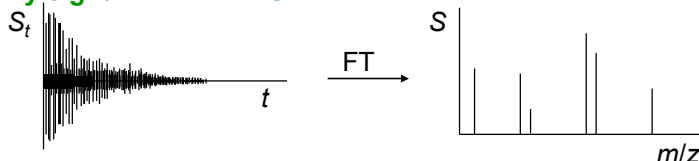
Fourierova transformace

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

Netlumený pohyb iontů o jedné m/z



Reálný signál z FT ICR MS



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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

189

189

Princip FT-ICR-MS

Ionizace pro FT MS

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

Excitace

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

190

190

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
- Fast Fourier Transform ... zrychlení zpracování dat
- Segmentované cely (E. Nikolajev), detekce při vyšších harmonických frekvencích
... $R \sim 4 \cdot 10^7$

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

191

191

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 přidavném 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

192

192

FT-ICR-MS

Rozlišení

$$\frac{m}{\Delta m} \propto \frac{Bt}{m/z}$$

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

který pre-excituje ionty, vyjádříme

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

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

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

Hmotnostní spektrometr budoucnosti?

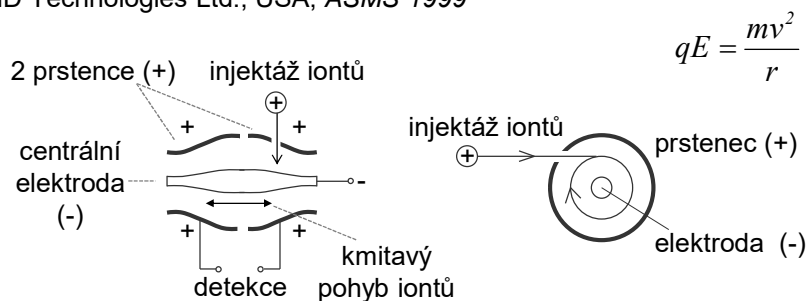
... neexistuje jediné nejlepší řešení

Trendy

- **Ústup magnetických sektorů**
- **Hybridní spektrometry**
Rozšiřování moderních spektrometrů a jejich hybridů (iontové pasti, ortogonální TOF analyzátory).
- **Nové spektrometry**
Elektrostatická orbitální past "Orbitrap"
Multireflexní TOF MS

Elektrostatická orbitální past, "Orbitrap" (OT, O)

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

195

195

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 u FT-ICR-MS, λ až ~ 10 km
- Náročná injektáž iontů do OT:
... pomocí iontové pasti ve tvaru C (C-trap)

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

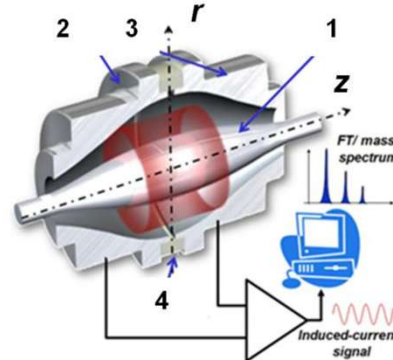


Figure 1. Design of the Orbitrap mass analyzer. 1 – central electrode ($\varphi = -V_c$), 2,3 – two halves of the outer electrode ($\varphi \approx 0$) isolated by a quartz ring 4. The induced current is amplified and digitally processed to obtain a mass spectrum of the trapped ions.

D. Grinfeld, A. Makarov et al., Microscopy and Microanalysis 2015, 21,176-181

196

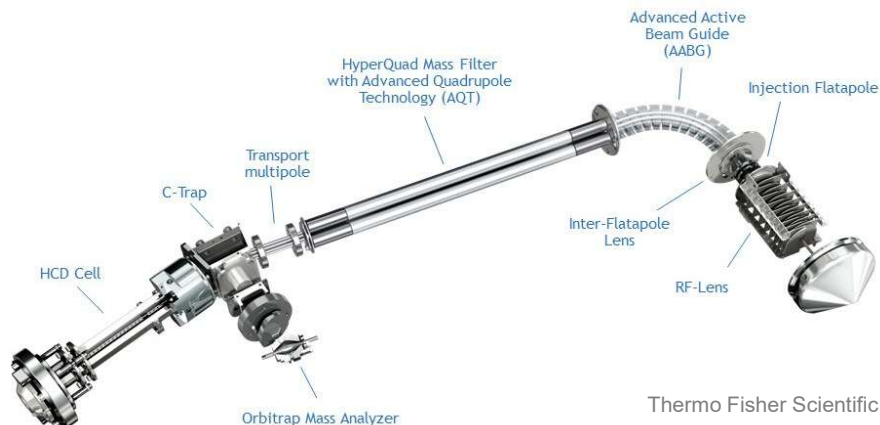
196

Orbitální past

Orbitální past se silnějším elektrickým polem ... vyšší rychlost záznamu spekter

V praxi součást hybridních MS (s Q, LIT, TOF).

Celá řada hybridních analyzátorů s OT, např.:

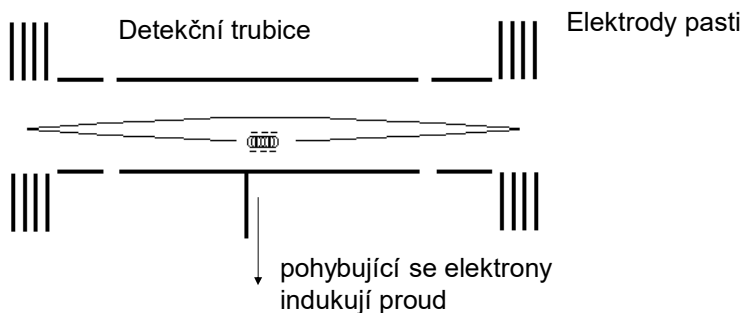


Hmotnostní spektrometrie biomolekul

197

197

Lineární elektrostatická past



Detekovaná frekvence = $f(m/z)$

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

198

198

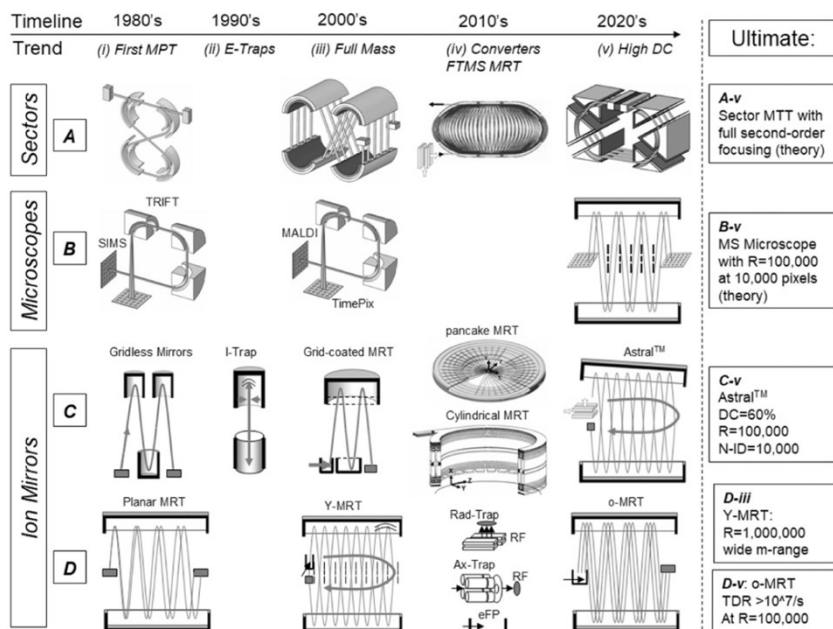
Multi-pass analyzátoři doby letu

multireflexní TOF, mrTOF

- výrazně delší dráha letu (desítky m)
- $R \sim 10^6$
- $f \sim$ stovky Hz

Verenchikov, A.N. et al. Mass Spectrometry Reviews, 45: 476-506.

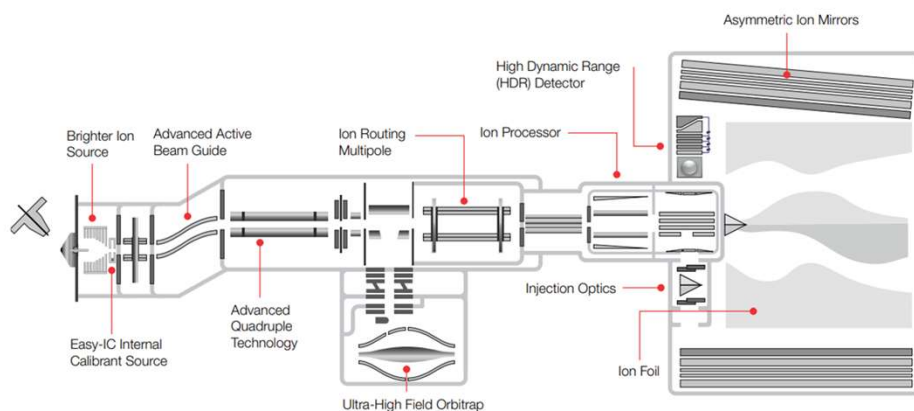
Hmotnostní spektrometrie biomolekul



199

Další hybridní MS

Hybrid orbitální pasti s multireflexním analyzátořem TOF



Thermo Fisher Scientific

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

200

200



6 Time-of-flight hmotnostní spektrometr (TOF MS). Metody zvýšení rozlišení TOF MS (reflektor, zpožděná a ortogonální extrakce)

201

201

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 $W(el.)$
 $W(el.) = W(kin.)$
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

202

202

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. Mamyryin, 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

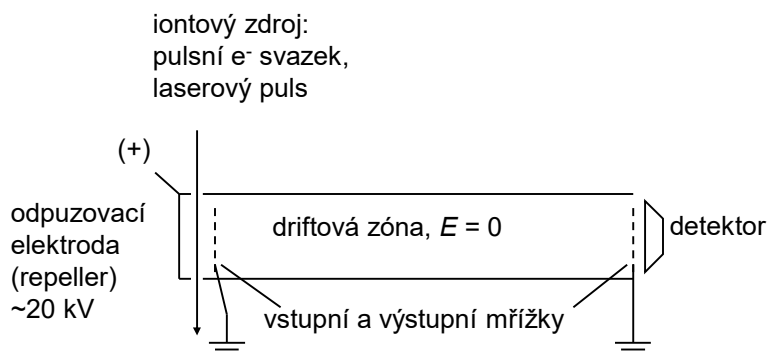
Brown, R. S.; Lennon, J. J., *Anal. Chem.* **1995**, 67, 1998-2003

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

Geometrie TOFMS

Lineární geometrie

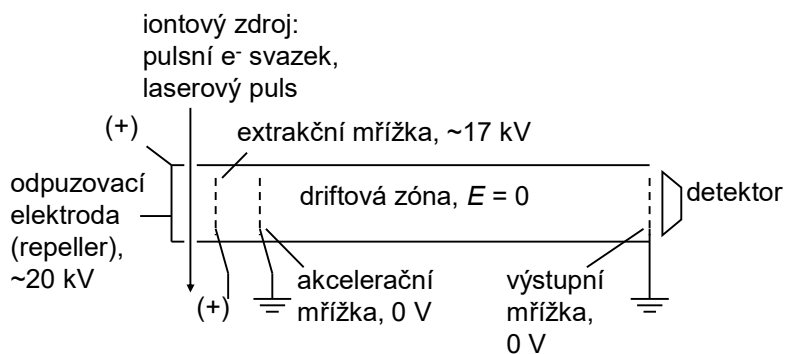
... nejjednodušší sestava



Geometrie TOFMS

Wiley-McLarenova lineární geometrie (1955)

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



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

205

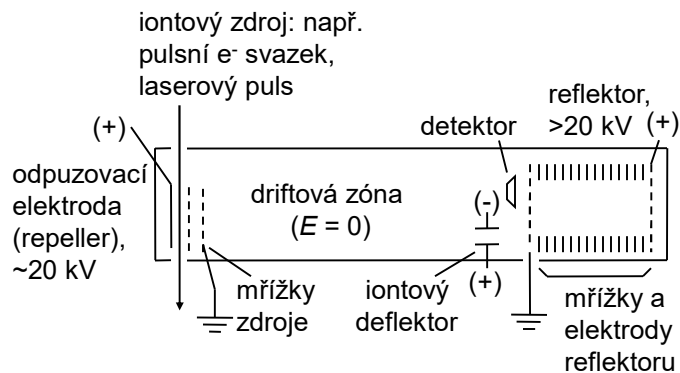
205

Geometrie TOFMS

TOF MS s iontovým zrcadlem (reflektorem)

... dosažení lepších parametrů spekter

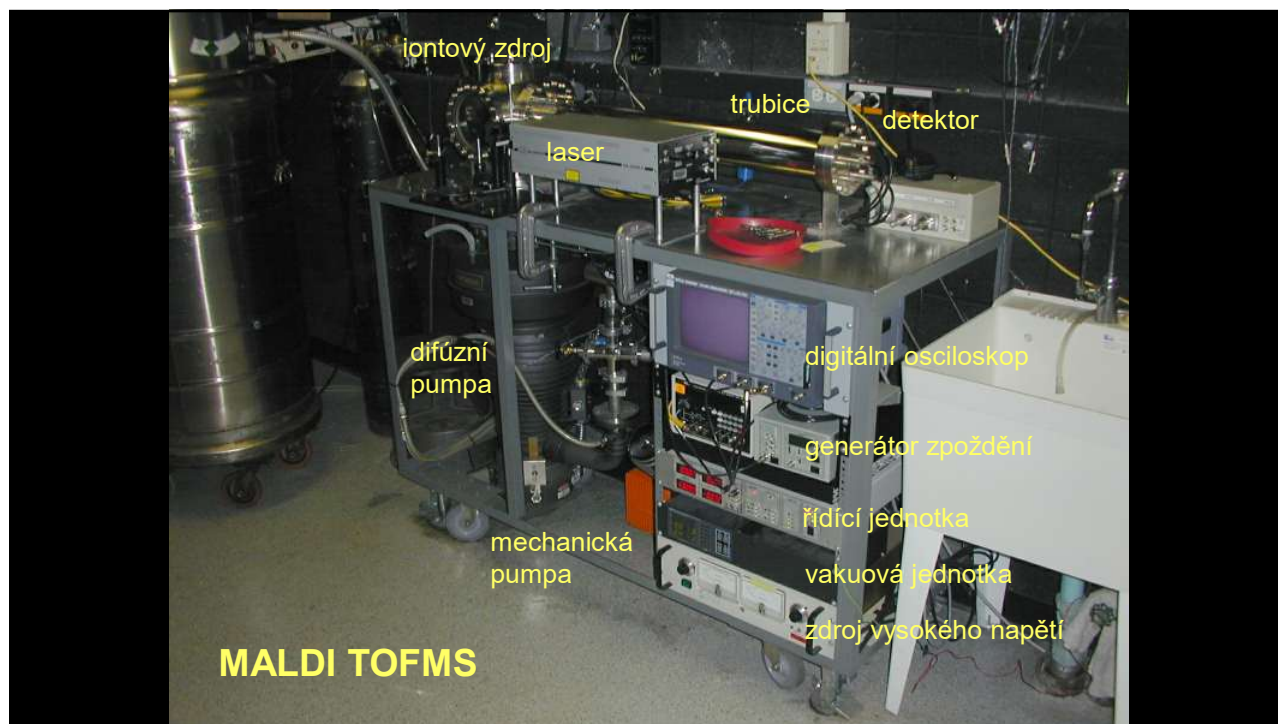
... možnost strukturní analýzy (PSD)



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

206

206



207

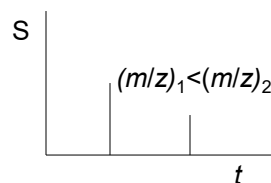
Princip TOFMS

1. Pulsní ionizace (doba pulsu $\sim$ 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

$v = \frac{L}{t}$ — délka driftové zóny
 — doba letu

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



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

208

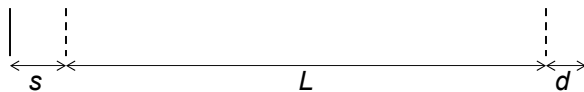
208

Princip TOFMS

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

napětí: U_s 0 U_d

vzdálenosti:



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

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

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

TOF: kalibrace m/z

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

↓

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

↓

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

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

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

korekce spuštění záznamu dat

korekce poč. rychlosti iontů před extrakčním pulsem

korekce neideálního tvaru extrakčního pulsu

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

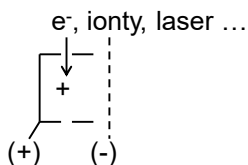
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

211

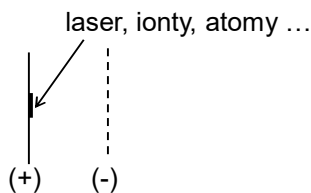
211

Iontové zdroje pro TOFMS

1. Zdroj pro plynné vzorky



2. Zdroj pro tuhé vzorky (desorpce)



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

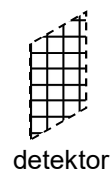
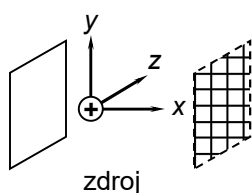
212

212

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

213

213

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:

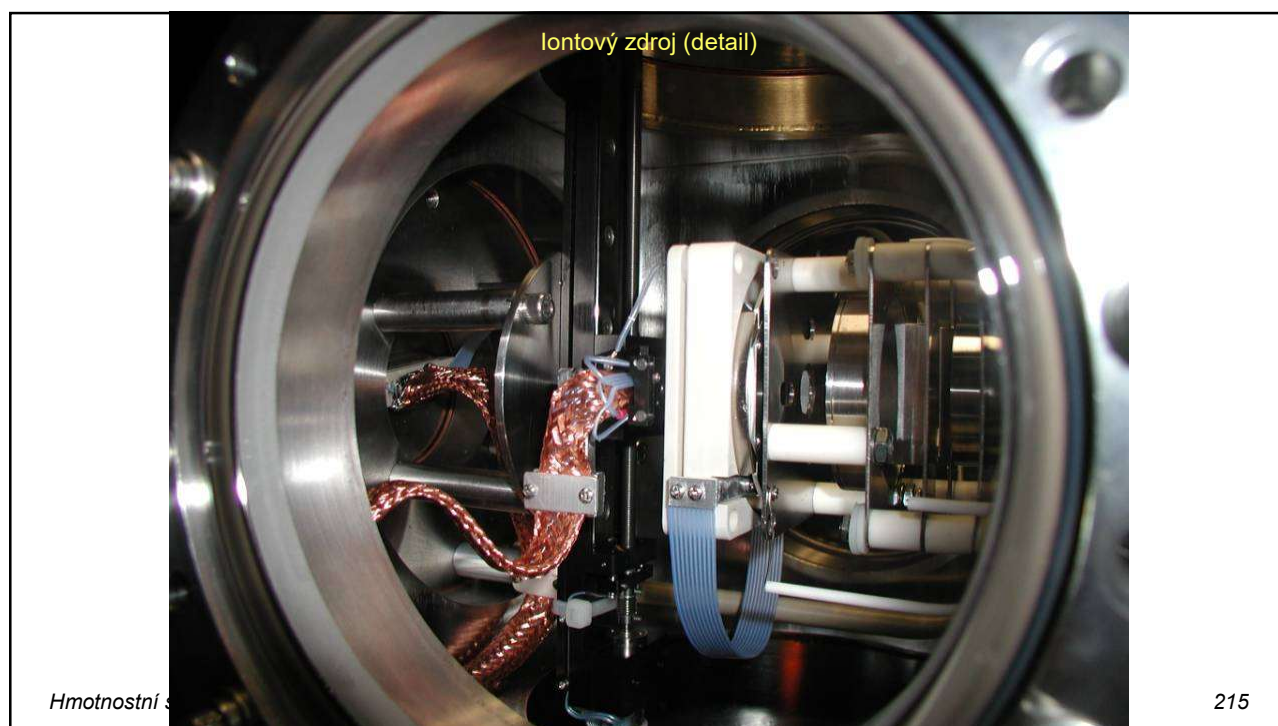
nastavením napětí na střední mřížce umožňuje kompromis distribuce v y a x za účelem dosažení optimálního rozlišení

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

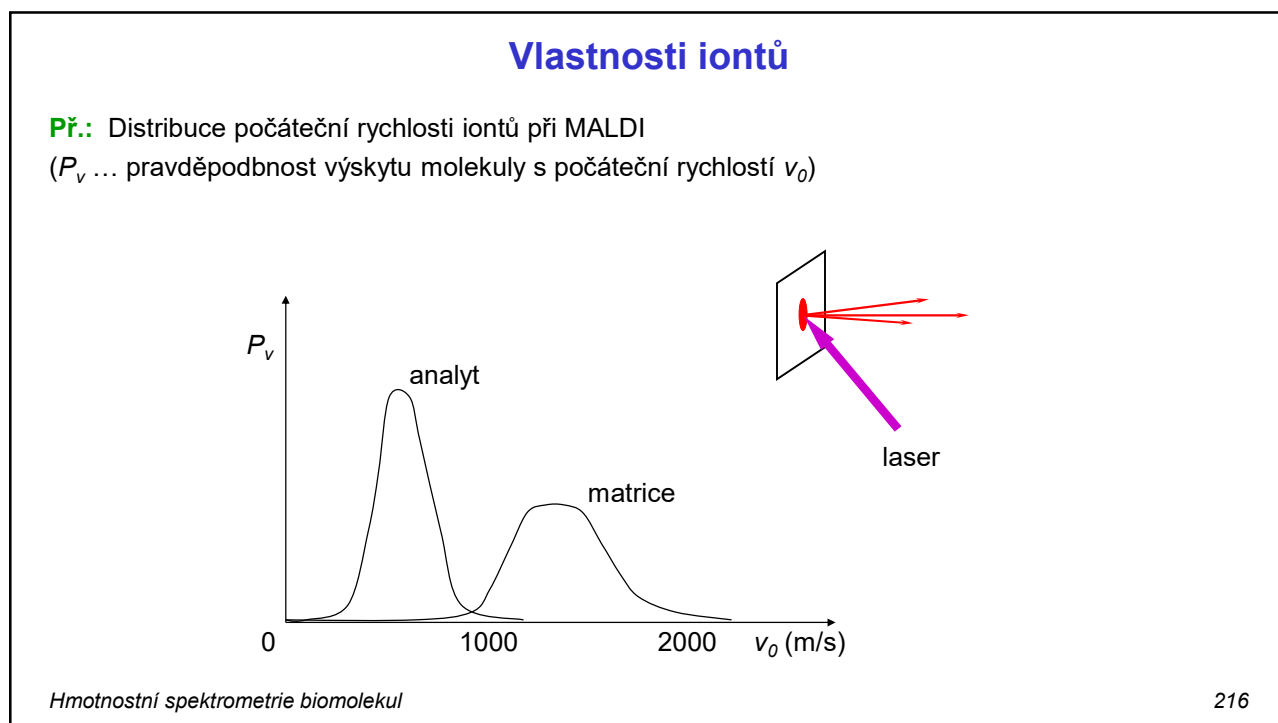
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

214

214



215



216

Spojení MALDI-TOF MS?

Desorpční metody (MALDI, LDI) - speciální případ:

$\Delta t_0 \sim \text{ns}$ zanedbatelné; (velmi krátký laserový puls)
 $\Delta x_0 \sim \mu\text{m}$ zanedbatelné; (tenká vrstva, malé krystalky vzorku)
 $\Delta z_0, y_0 \sim 50 \mu\text{m}$ 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 ($v \sim 1000 \text{ m/s}$, $\Delta v > 500 \text{ m/s}$) způsobí, že ionty o stejném m/z přiletí k detektoru v různou dobu.

Jak zvýšit rozlišení (MALDI-TOFMS)?

1. Vysoké extrakční napětí v lineárním TOF MS.

2. Reflektor.

3. Pulsní extrakce.

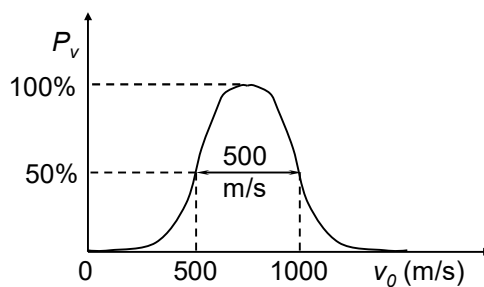
1. Vysoké urychlovací napětí

$$\frac{mv^2}{2} = \frac{mv_0^2}{2} + zeU \quad \Rightarrow \quad v = \sqrt{\underbrace{v_0^2}_{\text{příspěvek desorpce}} + \underbrace{\frac{2zeU}{m}}_{\text{příspěvek el. pole}}}$$

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

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: $t_1 = 101.673 \mu\text{s}$, $t_2 = 101.284 \mu\text{s}$

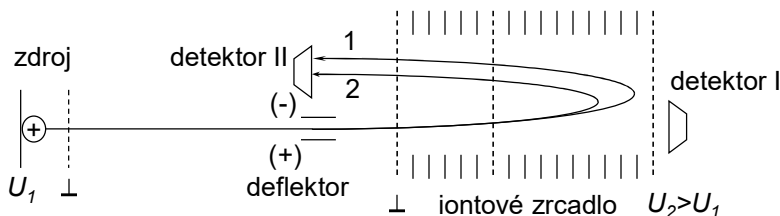
$R \sim 130$

$U = 10$ kV: $t_1 = 32.190 \mu\text{s}$, $t_2 = 32.177 \mu\text{s}$

$R \sim 1300$

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

221

221

Konstrukce reflektoru

Lineární reflektor ... E je konstantní podél osy reflektoru

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

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

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

Nelineární reflektor ... E se mění podél osy reflektoru

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

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

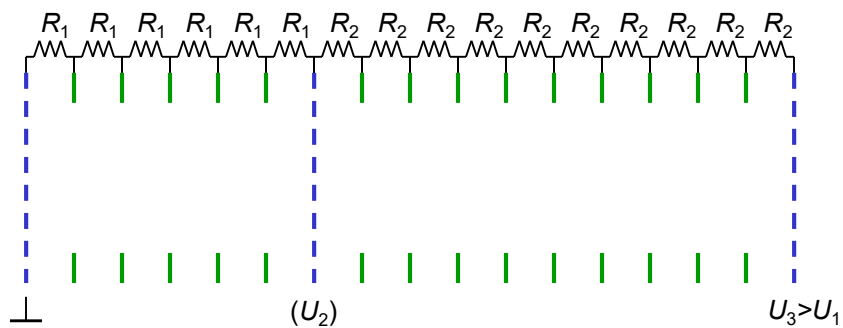
+ dřívější patenty (Japonsko, SSSR)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

222

222

Konstrukce reflektoru



mřížky: definice ekvipotenciálové plochy

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

223

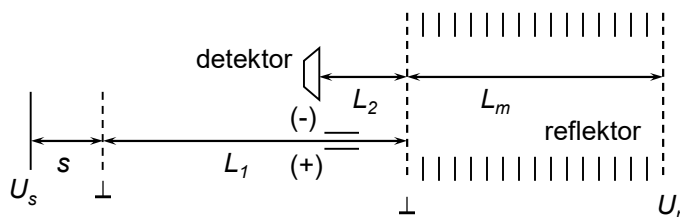
223

Příklad konstrukce reflektoru



224

Reflektor s jedním stupněm



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

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

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

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

a ... zrychlení ve zdroji, $a=qE_s/m$

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

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

Reflektor se dvěma stupni

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

Pro kladné ionty:

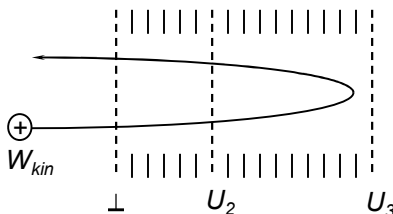
s pozitivním potenciálem na prostřední mřížce, $0 > U_2 > U_3$

- různá uspořádání s poměry délek stupňů $\sim 1:2$, $\sim 2:3$ aj.
- použití krátkého 1. stupně s vyšší intenzitou elektr. pole umožňuje zkrátit celkovou délku reflektoru

s negativním potenciálem na druhé mřížce:

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

Reflektor se dvěma stupni



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

energetická disperze ... hlavní příčina snížení rozlišení R

Mamyrin:

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

Reflektor se dvěma stupni

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

Reflektor s nelineárním polem

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 $\neq f(W_{kin0})$

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.)

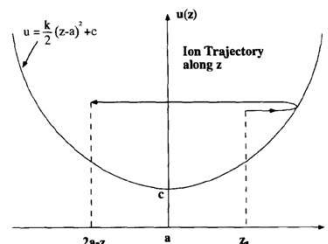


Fig. 1. Potential distribution in quadratic fields along the optical axis. z_0 is the initial coordinate (starting point) of an ion. $2a - z_0$ is the coordinate of ideal time-focusing.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

229

229

Reflektor s nelineárním polem

Další prakticky využitelná pole:

osově symetrický hyperbolický potenciál

planární hyperbolický potenciál

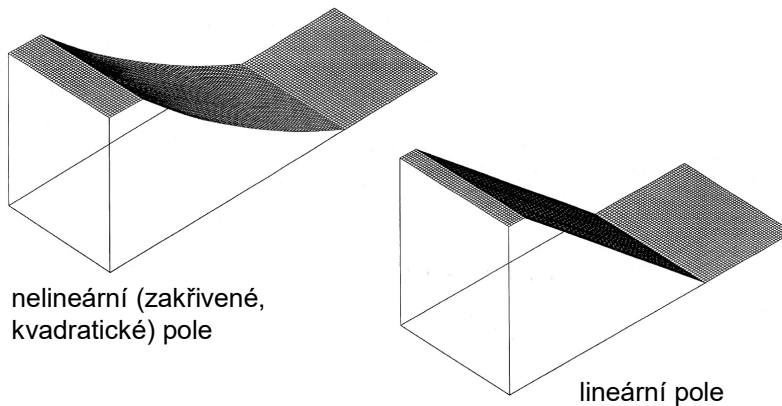
osově symetrický hyperlogaritmický potenciál

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

230

230

Reflektor s nelineárním polem



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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

231

231

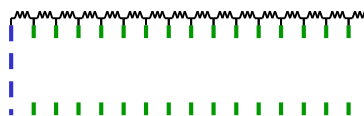
Reflektor s nelineárním polem

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 zdrojem PSD, pro všechny m/z
- složitější kalibrace
- ideální jen pro ionty pohybující se po ose reflektoru
... v praxi omezené R

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

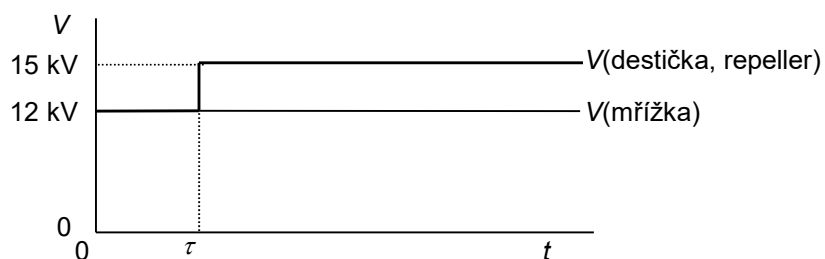
232

232

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 ($t = \tau$)



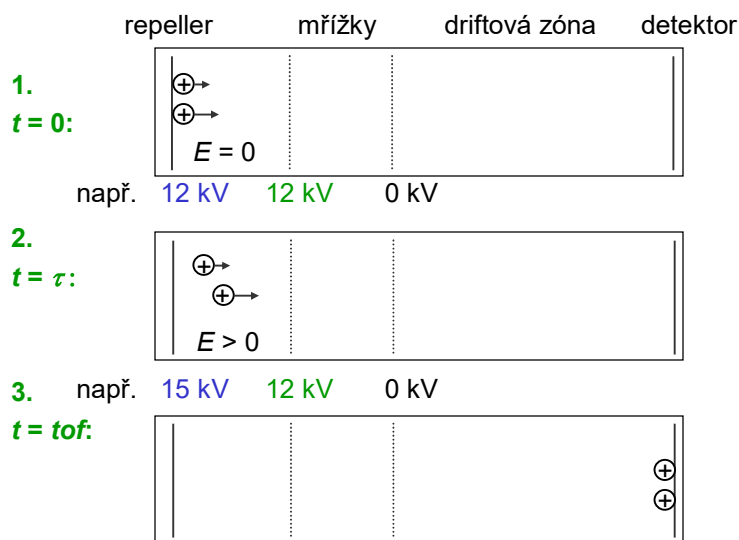
(Brown, R. S.; Lennon, J. J.; Anal. Chem. 1995, 67, 1998)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

233

233

Pulsní (zpožděná) extrakce



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

234

234

Pulsní tvorba iontů pro TOFMS

1. Extrakce konstantním elektrickým polem (DC)

pulsní ionizační paprsek + konstantní extrakční pole

2a. Pulsní extrakce, zpožděná extrakce

(pulsed extraction, PE; delayed extraction, DE)

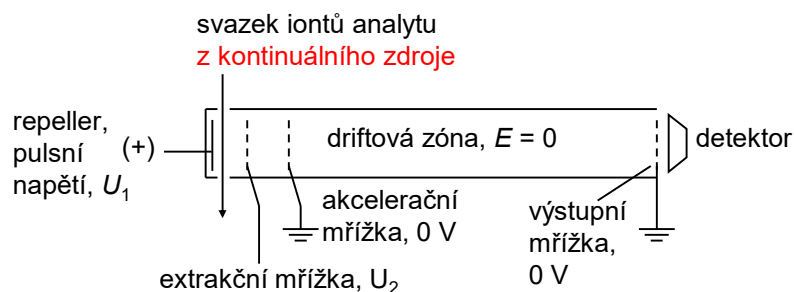
pulsní ionizační paprsek + pulsní extrakční pole

2b. o-TOFMS s pulsní extrakcí

(orthogonal extraction, kolmá extrakce)

souvislá tvorba (přívod) iontů + pulsní extrakční pole

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 ($\Delta v_0 \sim 0$)

Obvykle reflektor pro dosažení vyššího rozlišení

Další faktory ovlivňující rozlišení TOFMS

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

Př. vliv kolísání urychlovacího napětí:

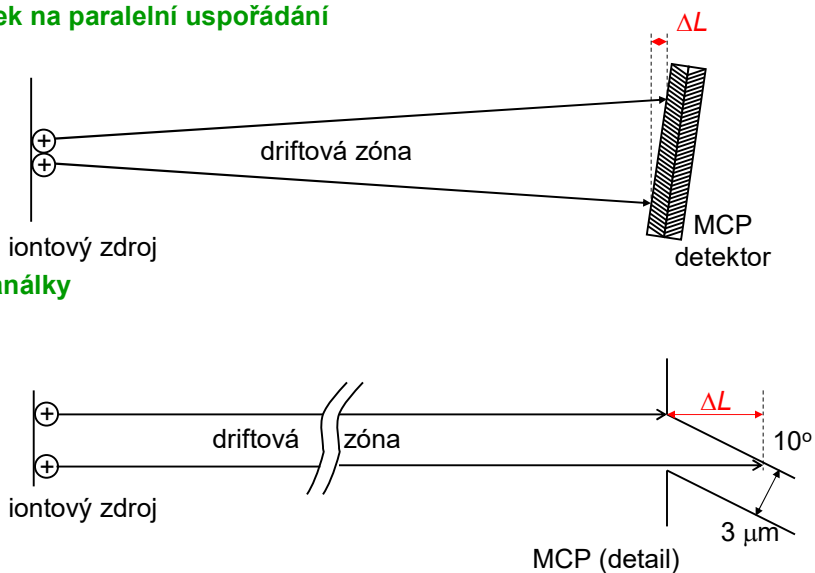
$$m = \text{const. } U t^2 \Rightarrow R^{-1} = \frac{dm}{m} = \text{const.} \left(\frac{dU}{U} + 2 \frac{dt}{t} \right)$$

dt dáno max. frekvencí AD převodníku, rychlostí detektoru a časovou disperzí tvorby iontů
 dU určeno driftu a kolísáním zdroje vysokého napětí

Vliv uspořádání na rozlišení

Striktní požadavek na paralelní uspořádání

MCP s úzkými kanálky



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 $L = 3\text{ m}$:

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

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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

239

239

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

240

240

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

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

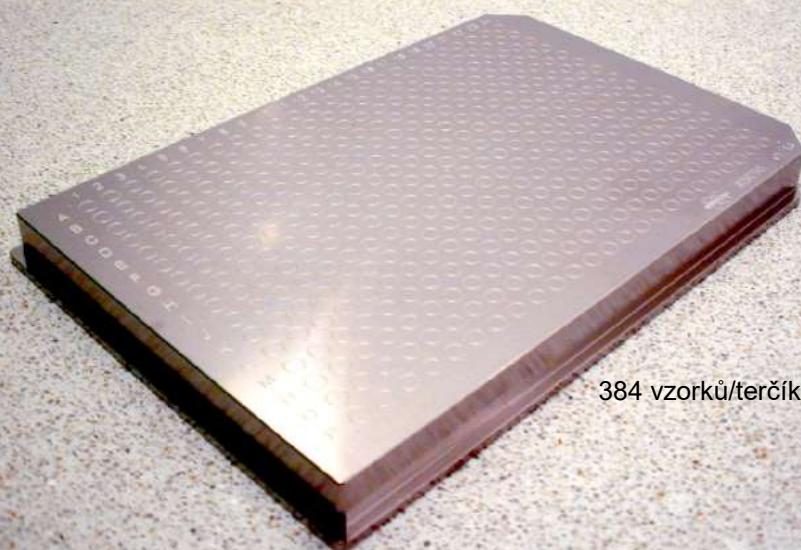
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

241

241

MALDI analýza početných sérií vzorků

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



384 vzorků/terčik

242

Srovnání rozlišení systémů TOFMS

system	geometrie	extrakce	<i>R</i>
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

$R \sim 100\,000$ v komerčně dostupných přístrojích

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

243

243

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).
Př.: 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

244

244

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

245

245

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 řádové odchylky).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

246

246

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 (nákres 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).

Simion

Příklad: Simulace elektrostatické čočky pomocí programu Simion.

Čočka: 3 segmenty

průměr, $d = 36$ mm

délky segmentů, $y_1 = 28$ mm, $y_2 = 26$ mm, $y_3 = 32$ mm

mezery mezi segmenty, $l = 2$ mm

počátek v xyz [0, 0, 0] mm

potenciály, $U_1 = 0$; $U_2 =$ proměnné; $U_3 = 0$

Ionty: počet, $n = 5$

hmotnost, $m = 100$

kinetická energie, $W_0 = 100$ eV

souřadnice xyz [0, -30, 0] mm

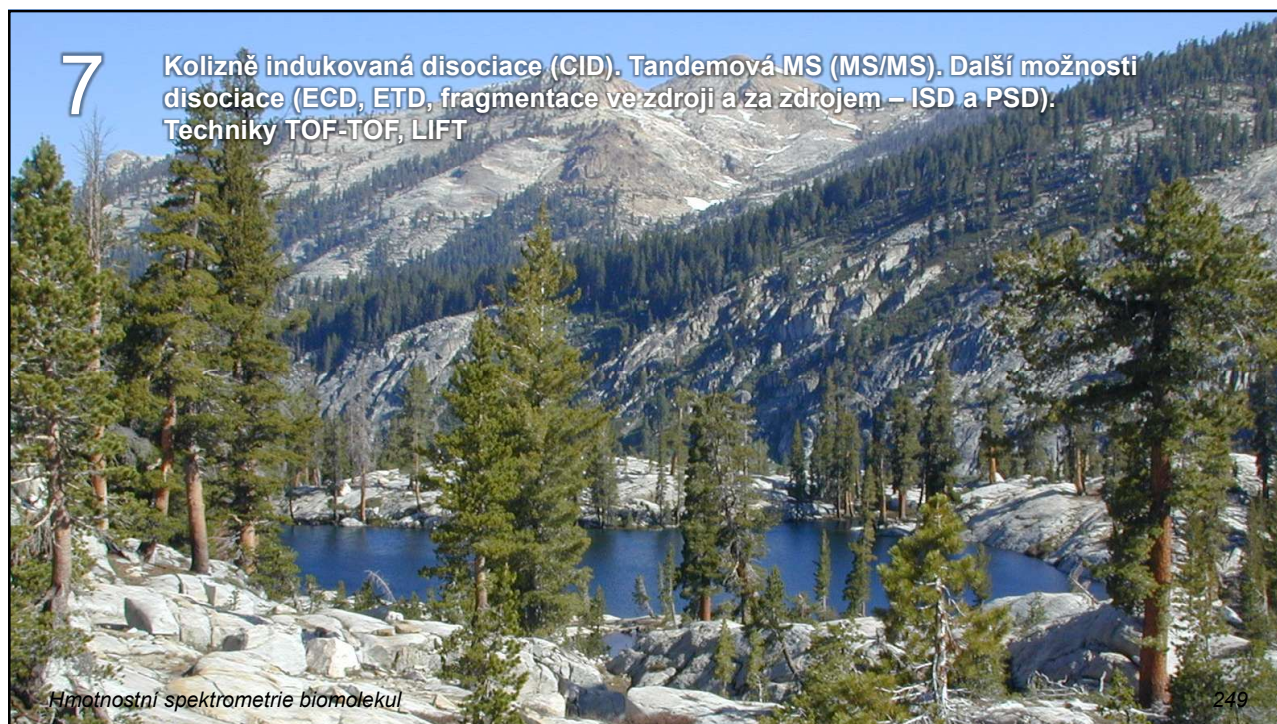
$\alpha_0(i) = (-4 + 2i)^\circ$, kde $i = 0 \dots n - 1$

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

Řešení: Viz přílohy

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



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

249

249

Sken: záznam hmotnostního spektra

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

Skenující přístroje

magnetový sektor (B)

B, U

Doba skenu

~ 1 s

kvadrupólový 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

250

250

Jednoduchá hmotnostní spektrometrie

Záznam „celého“ spektra



... „kompletní“ informace

www.jimkellyjr.com/2008_07_01_archive.html

Záznam části spektra (**zoom scan**)



... vybraný interval m/z

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

251

251

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

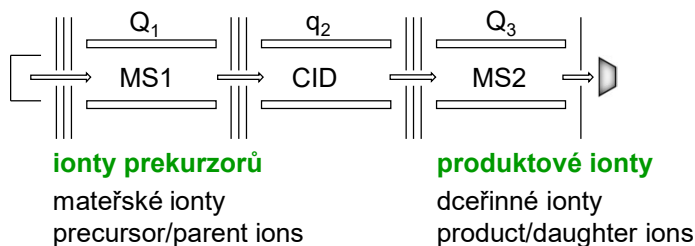
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

252

252

Tandemová hmotnostní spektrometrie

Analýza iontů → fragmentace → analýza iontů



Klasický přístroj pro nízkoenergetickou CID:

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

Q₁: 1. analyzátor (MS1)

q₂: kolizní cela (pouze RFQ)

Q₃: 2. analyzátor (MS2)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

253

253

Základní typy MS/MS

1. **Skenování iontů produktů**, dceřinných iontů
Product ion scan, daughter ion scan, fragment ion scan
 Nastavení MS1, skenování MS2
2. **Skenování iontů prekurzorů**, výchozích látek, mateřských iontů
Precursor ion scan, parent ion scan
 Skenování MS1, nastavení MS2
3. **Skenování ztráty neutrální částice**
Neutral loss scan
 Skenování MS1 a MS2 zároveň, $\Delta m/z = \text{konst.}$
4. **Monitorování vybrané reakce/vybraných reakcí**
Selected reaction monitoring/multiple reaction monitoring
 Nastavení MS1 a MS2 na vybrané m/z

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

254

254

Př.: skenování produktových iontů

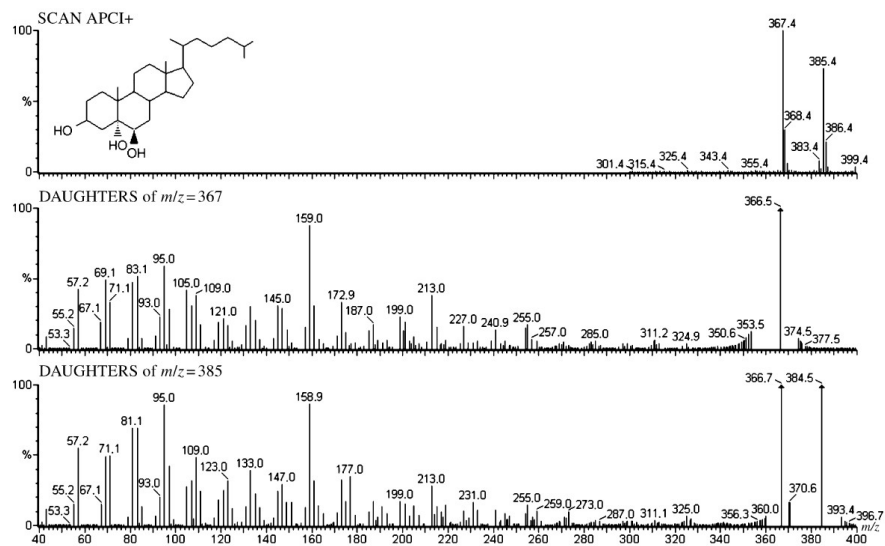


Fig. 2. Daughter ions of cholestanetriol. $c(\text{Triol})$: $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, scan APCI+: $300\text{--}500 \text{ } m/z$ (V_{inj} : 50 mm^3), daughter ion scan: $40\text{--}400 \text{ } m/z$

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

257

257

Skenování iontů prekurzorů (Precursor ion scan)

Skenování MS1: spektrum iontů prekurzorů

Nastavení MS2: detekce produktových iontů o dané m/z

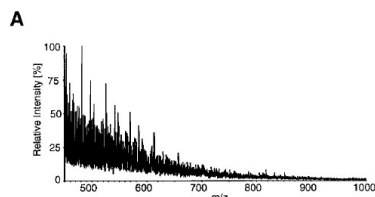
- ... pro identifikaci skupiny podobných sloučenin, sloučenin s totožnou funkční skupinou nebo stejným strukturním motivem
- ... zjednodušení spektra
- ... zvýšení S/N

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

258

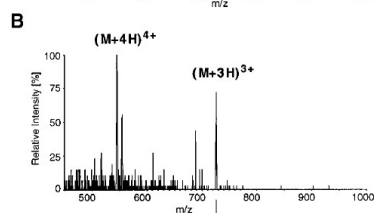
258

Př.: skenování iontů prekurzorů



Parent ion scans of unseparated peptide mixtures

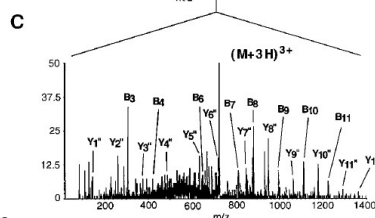
M. Wilm, G. Neubauer, M. Mann *Anal. Chem.* 68, 527-33 (1996)



MS peptidu GLHINDYALNITKSFLLDK

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

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



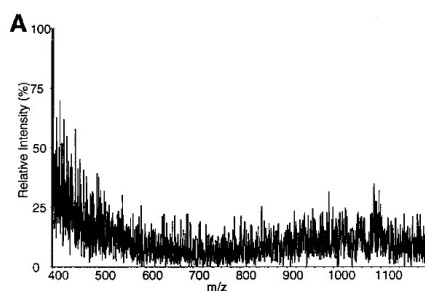
(C) Sken produktových iontů $[M+3H]^{3+}$

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

259

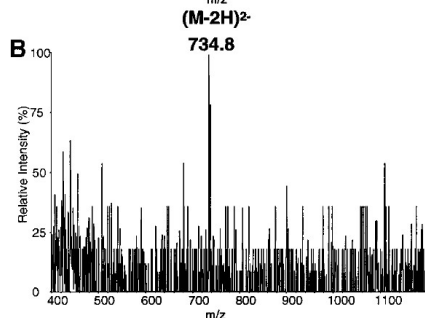
259

Př.: skenování iontů prekurzorů



Parent ion scans of unseparated peptide mixtures

M. Wilm, G. Neubauer, M. Mann *Anal. Chem.* 68, 527-33 (1996)



(A) Pozitivní MS fosopeptidu

EPQY^PEEIPIYL,

$M_{r,mono} = 1471,6$; $c = 1 \text{ fmol}/\mu\text{L}$.

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

260

260

Skenování ztráty neutrální částice (Neutral loss scan)

Současné skenování MS1 a MS2

Konstantní rozdíl m/z propouštěných MS1 a MS2

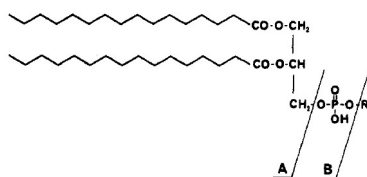
- ... ztráta stejné neutrální částice
- ... vhodné pro látky se stejnou funkční skupinou
- ... zjednodušení spektra
- ... zvýšení S/N

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

261

261

Př.: skenování ztráty neutrální částice



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

D. N. Heller, C. M. Murphy, R. J. Cotter, C. Fenselau, O. M. Uy

Anal Chem 60, 2787 - 2791 (1988)

R	
-CH ₂ CH ₂ NH ₂	PE
-CH ₂ CHOH-CH ₂ OH	PG
-CH ₂ CHOH-CH ₂ O-LYSINE	LPG
-INOSITOL	PI
-CH ₂ CH ₂ NHCH ₃	MMPE
-CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	DMPE

fosfoethanolamin: $\Delta m/z = 141$

fosfoglycerol: $\Delta m/z = 172$

metilfosfoethanolamin: $\Delta m/z = 155$

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

262

262

Př.: skenování ztráty neutrální částice

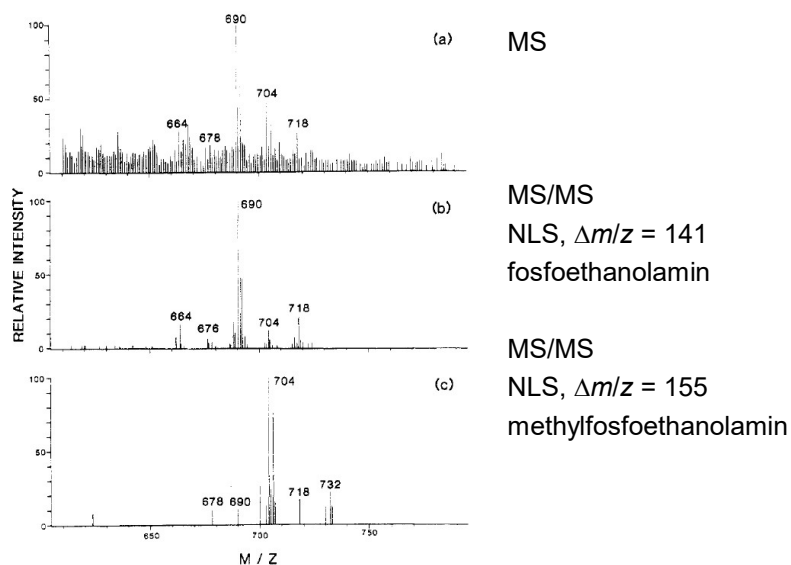


Figure 4. Positive ion fast atom bombardment mass spectra for *P. vulgaris*: (a) normal scan, (b) constant neutral loss of 141 mass units, and (c) constant neutral loss of 155 mass units.

263

263

Př.: skenování ztráty neutrální částice

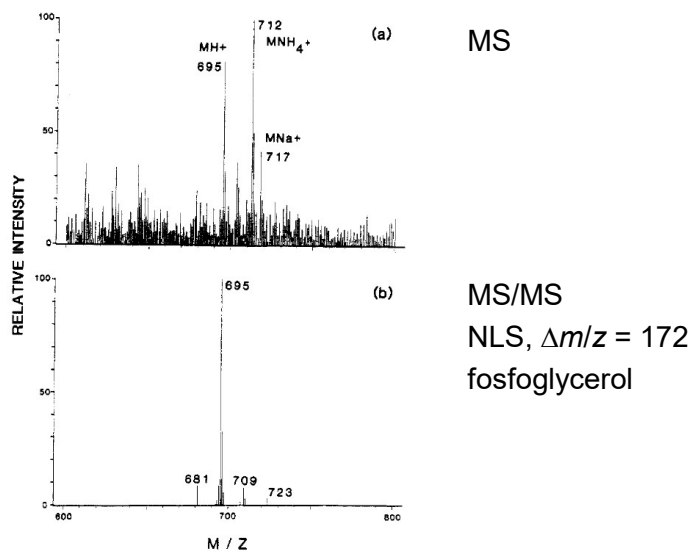


Figure 5. Positive ion fast atom bombardment mass spectra for the lipid extract from 30 μg of *M. luteus* cells: (a) normal magnetic scan and (b) constant neutral loss of 172 mass units.

264

264

Monitorování vybrané reakce/vybraných reakcí

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

Monitorování vybrané reakce (selected reaction monitoring, SRM)

Nastavení MS1: ionty prekursoru 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 prekursorů 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

265

265

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

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

Celkový iontový proud (Total ion current, TIC)

... monitorování širokého intervalu m/z (stovky a.m.u.)

... vhodný pro celkový obrázek o chromatografii a nalezení nových píků

... nevhodný při analýze komplexních směsí

Monitorování vybraného iontu (Selected ion monitoring, SIM)

... detekce při vybrané m/z

... pro experiment navržený pro monitorování pouze vybraného iontu

... pro více iontů **peak switching**

Monitorování vybrané reakce (Selected reaction monitoring, SRM)

... analogie SIM s využitím tandemové MS

... pro více reakcí **multiple reaction monitoring, MRM**

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

266

266

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

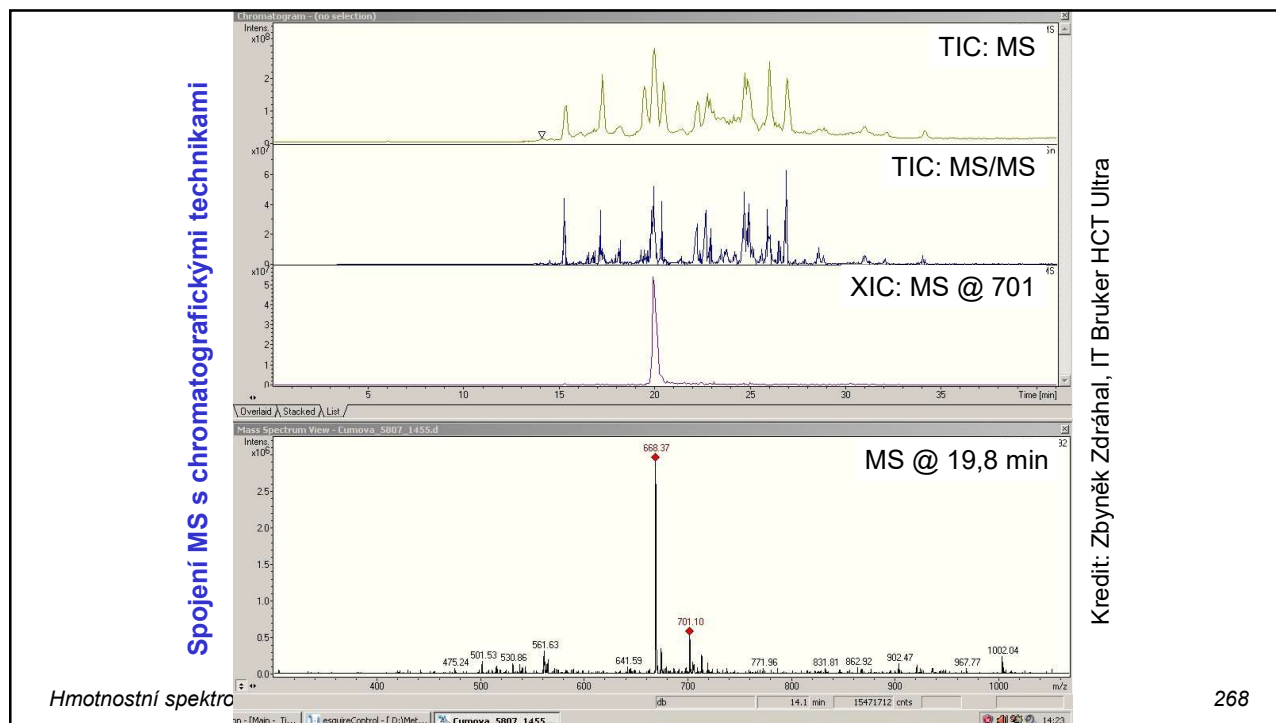
... intenzita dominantního píku vs. retenční čas

... může vypadat přehledněji než TIC díky ignorování sumy minoritních píků

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

267

267



268

Př.: Monitorování více reakcí, MRM

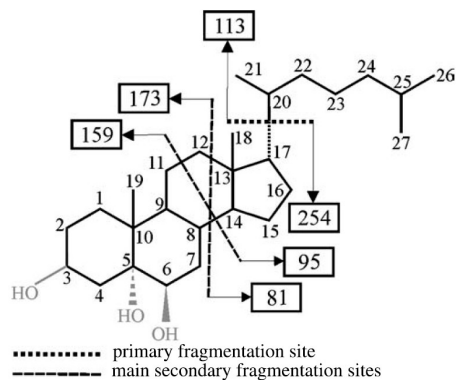


Fig. 1. Main fragments of sterols. The fragmentation process is demonstrated here by using cholestanetriol as a representative for the other *COP*s

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

<i>COP</i>	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
		385.4 [MH-2H ₂ O]	158.9	95.0
7-OH	402.6	367.4 [MH-2H ₂ O]	158.9	81.1
25-OH	402.6	367.4 [MH-2H ₂ O]	81.1	95.0
7-Keto	400.6	383.4 [MH-H ₂ O]	81.1	95.0
		401.4 [MH] ⁺	95.1	81.1
5,6-Ep	402.6	367.4 [MH-2H ₂ O]	158.9	95.0
		385.4 [MH-H ₂ O]	159.0	95.0
19-OH	402.6	367.4 [MH-2H ₂ O]	95.0	159.0
		355.4 [MH-12] ⁺	147.0	95.0

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

269

269

Př.: HPLC – APCI – SRM

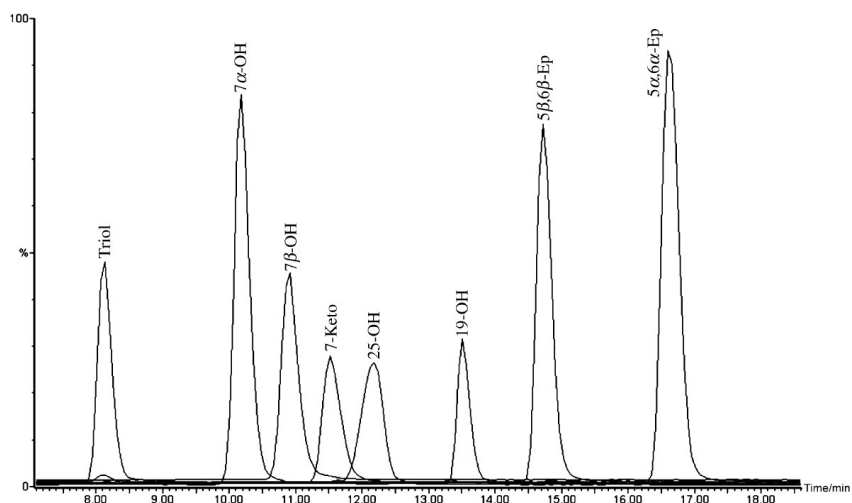


Fig. 8. MRM chromatograms of 8 single standards (overlaid). *c*(standard): 5000 ng/cm³, *V*_{inj}: 50 mm³

SRM pro dominantní reakce z předchozí tabulky

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

270

270

Př.: HPLC – APCI – MRM

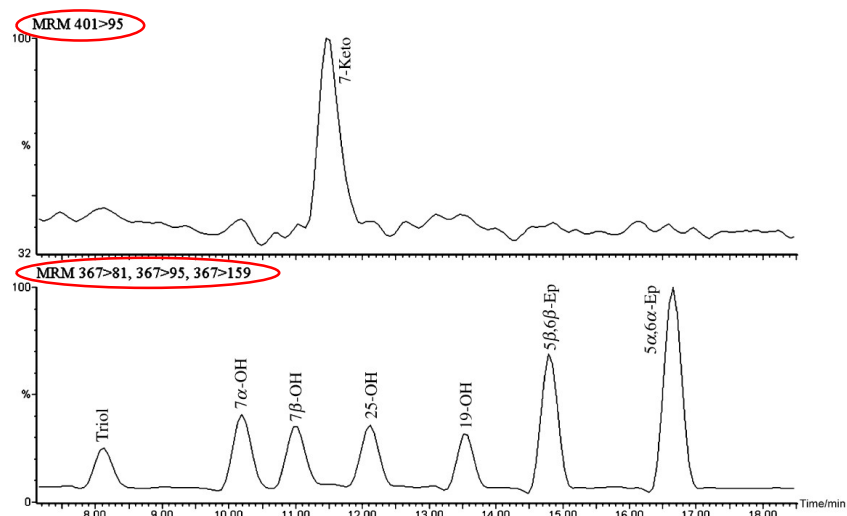


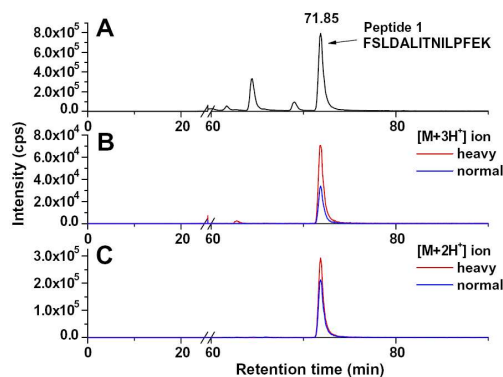
Fig. 9. MRM chromatogram of a standard mixture (7 COPS and 19-hydroxycholesterol the prospective internal standard).
c(standard): 5000 ng/cm³, V_{inj}: 50 mm³

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

271

271

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. Janecki, 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

272

272

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 $\Rightarrow$ snížení šumu
- Zjednodušení spekter
- Všechny druhy skenů MS/MS
- Monitorování vybrané reakce/vybraných reakcí

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

273

273

Hmotnostní spektrometry pro MS/MS

Trojité kvadrupólový filtr (QqQ)

Iontové pastě (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

274

274

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

275

275

Další hmotnostní spektrometry pro MS/MS

Tandem kvadrupólová iontová past - TOFMS (IT-TOFMS)

IT: možnost akumulace a MS^n v prvním 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

276

276

Typy disociace

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

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

277

277

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

278

278

Stabilita iontů

1. Stabilní: poločas rozpadu, $\tau > 10^{-6}$ s

Iont prolétne celým MS, aniž by se rozložil.

2. Metastabilní: poločas rozpadu, $\tau \sim 10^{-7} - 10^{-6}$ s

Iont se rozkládá v průběhu letu hmotnostním spektrometrem.

3. Nestabilní: poločas rozpadu, $\tau < 10^{-7}$ s

Iont se rozloží ještě ve zdroji.

Historické rozdělení - časy podle doby pobytu v magnetickém sektoru

Reakce: unimolekulární, bimolekulární

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

279

279

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:

$$E_{in} \leq E(M_t/(M_t + M_i))$$

t = terčík (target), i = ion

Těžší terčík $\Rightarrow$ možné přenést více energie na iont

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

280

280

Nízkoenergetické srážky iontů

Energie srážek: 1 – 100 eV

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

Účinnost srážek

obvykle dostatečná díky mnoha srážkám iontu v kolizní cele

Instrumentace

trojitý kvadrupólový filtr, iontové pasti, hybridní přístroje

V současnosti nejrozšířenější technika, nízkoenergetická CID

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

281

281

Vysokoenergetické srážky iontů

Energie srážek: keV

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

Účinnost srážek

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

Instrumentace

hybridní sektorové přístroje, TOF-TOF

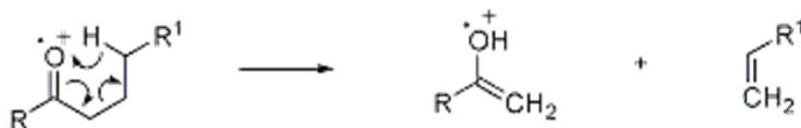
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

282

282

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)

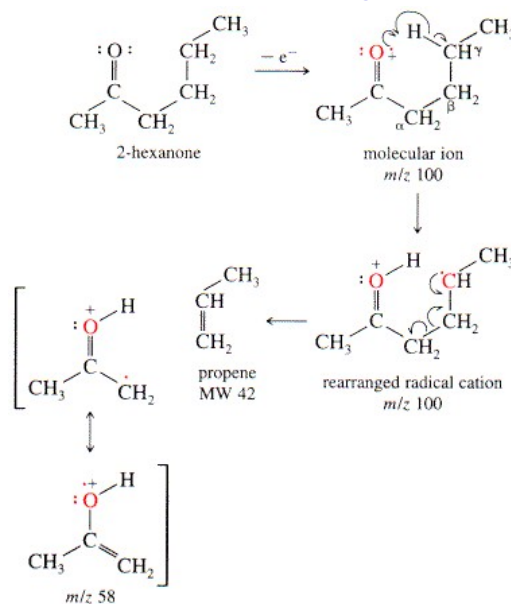
M. J. Lacey *et al.*, *Org. Mass Spectrom.* **5**, 1391 (1971); G. Eadon, *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 8938 (1972); F. Turecek, V. Hanus, *Org. Mass Spectrom.* **15**, 8 (1980).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

283

283

Mechanismus McLaffertyho přesmyku



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

284

284

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

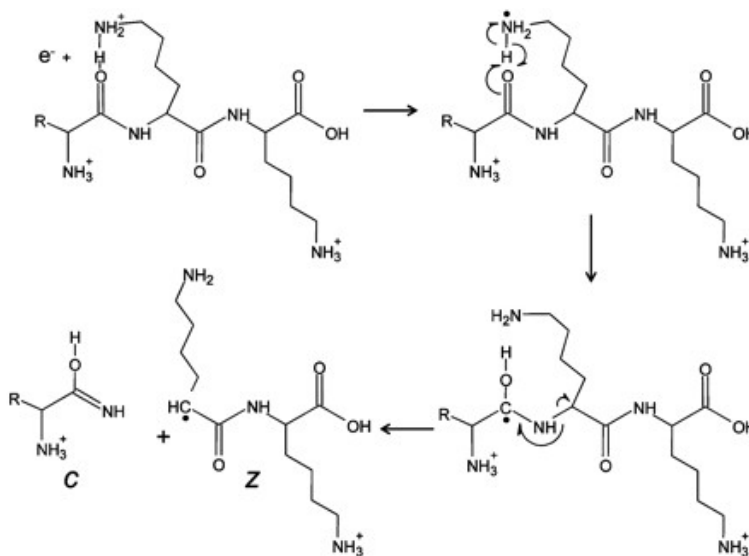
(Syka J.E.P., Coon J.J., Schroeder M.J., Shabanowitz J., Hunt D.F. *PNAS* 101, 9528-9533, 2004)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

285

285

ECD

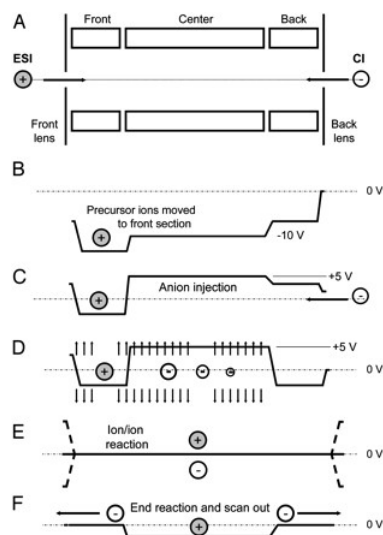


Hmotnostní spektrometrie biomolekul

286

286

ETD



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

287

287

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

Využívaná zejména v MALDI TOFMS peptidů.

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

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

Pulsní metody (Delayed Extraction) nutné pro:

- dosažení dostatečné citlivosti

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

Převážně monomolekulární reakční mechanismus (narozdíl od CID).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

288

288

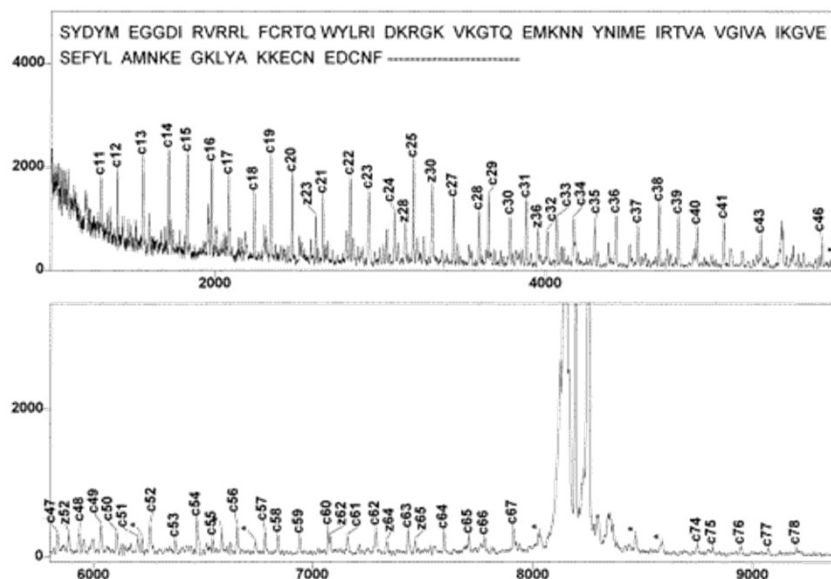
Charakteristika ISD

- + 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.

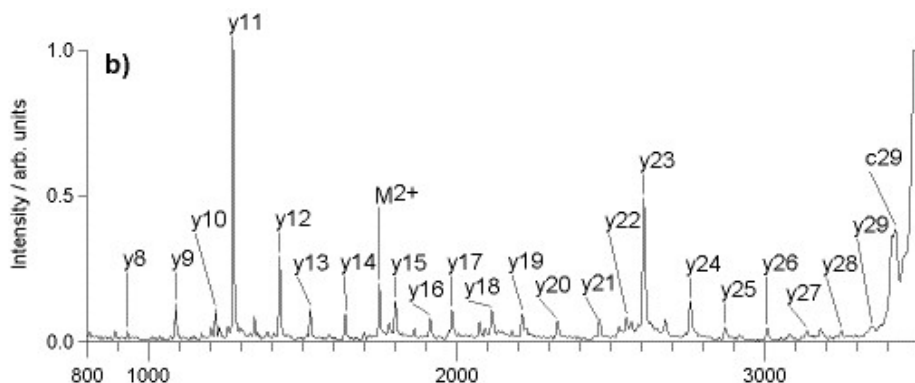
Převážně monomolekulární reakční mechanismus (narozdíl od CID).

289



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

290



ISD

Analyt: oxidovaný B řetězec hovězího inzulinu

Matrice: thiomocovina

Laser: Er:YAG ($\lambda = 2936 \text{ nm}$)

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

291

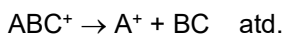
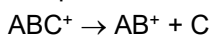
291

Fragmentace za zdrojem (Post-Source Decay, PSD)

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

Analýzu produktů v reflektoru:

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



Bilance kinetické energie pro první rovnici:

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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

292

292

Fragmentace za zdrojem

Prekursor ABC^+



v

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

Fragmentace 1



v



v

Fragmentace 2



v



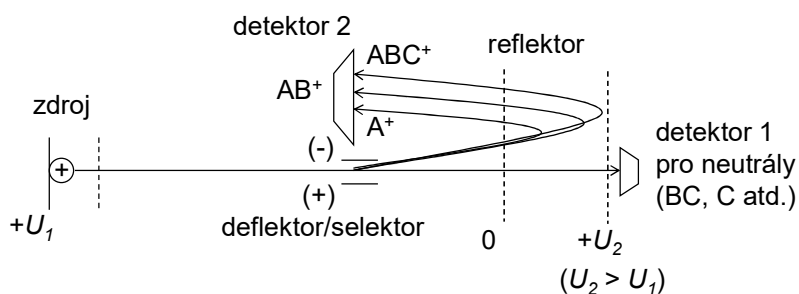
v

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

293

293

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.

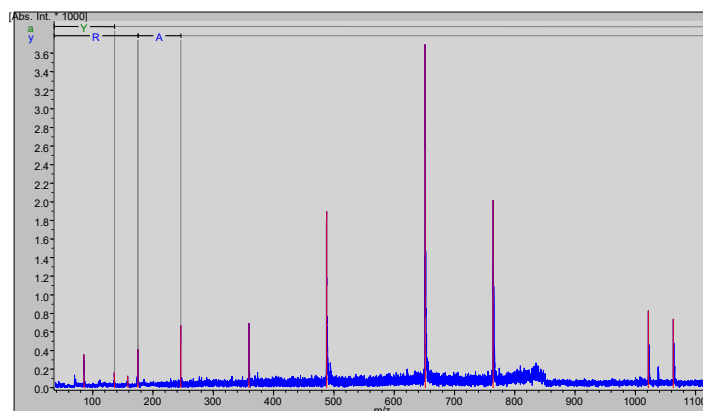
Kvadratický reflektor umožňuje zaostřit ionty v širokém intervalu m/z .

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

294

294

MALDI PSD derivatizovaného peptidu YLYELAR



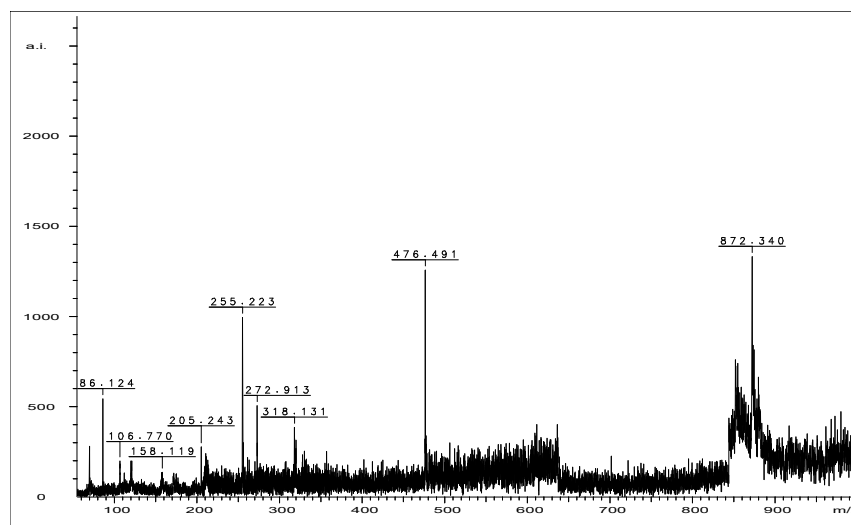
Spektrum složeno z několika spekter získaných při různém potenciálu reflektoru. Zaostřeny pouze píky iontů, které pronikly hlouběji do reflektoru. Použit reflektor se 2 stupni. (Zdroj: Z. Zdráhal)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

295

295

MALDI PSD peptidu



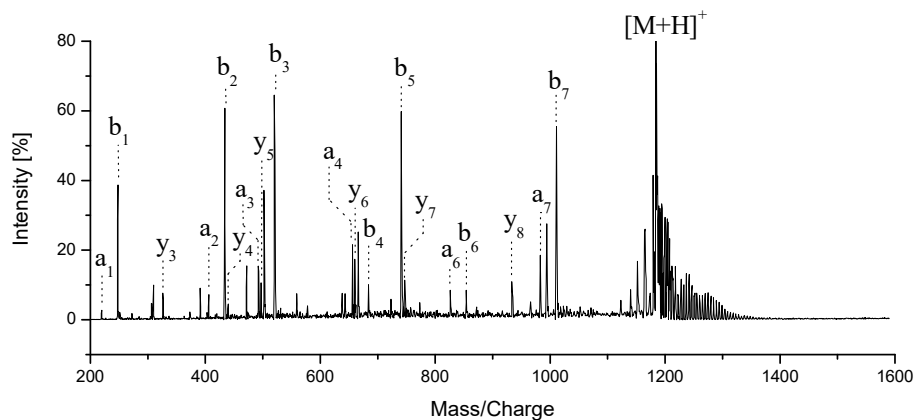
MALDI PSD – reflektor se 2 stupni. (Zdroj: Z. Zdráhal)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

296

296

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

297

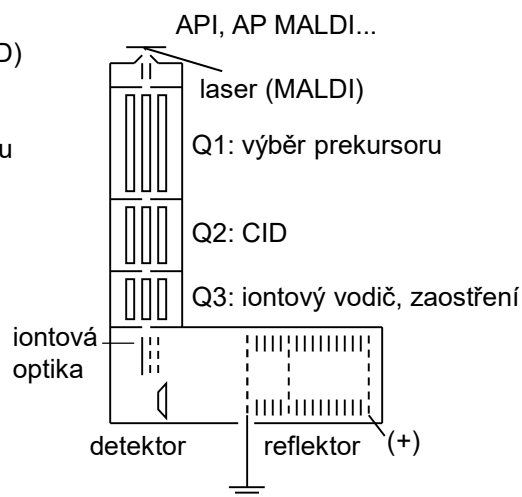
297

Ortogonalní TOF: QTOFMS

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

orthogonalní TOF:
typicky pro API, ale i pro MALDI

axiální TOF:
typicky pro MALDI



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

298

298

TOF s CID?

CID (používané v QqQ, IT...) $\neq$ ISD nebo PSD

Fragmentace v důsledku kolize iontu prekursoru s molekulou plynu

Kolizní komora Collision chamber

- přídavná kolizní komora ve zdroji TOF má zanedbatelný vliv

Dva způsoby CID v TOF

1. QTOF (přesněji QqTOF)
2. TOF/TOF

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

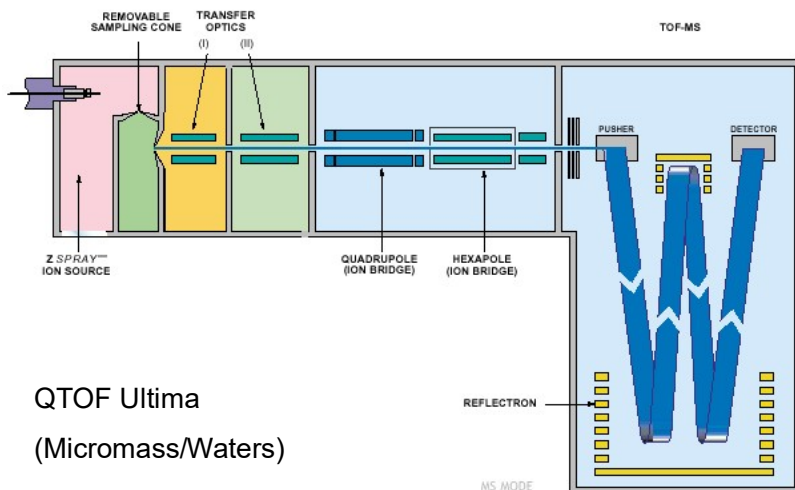
Výměnný iontový zdroj

oddělení ionizace od analyzátoru

vhodné pro kontinuální, kvazikontinuální i pulsní ionizační techniky

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

Hybridní instrument pro API a MALDI



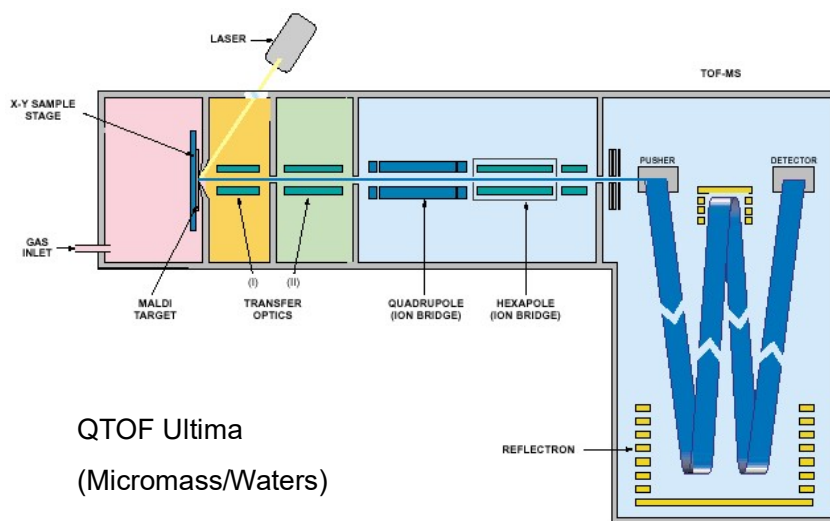
QTOF Ultima
(Micromass/Waters)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

301

301

Hybridní instrument pro API a MALDI



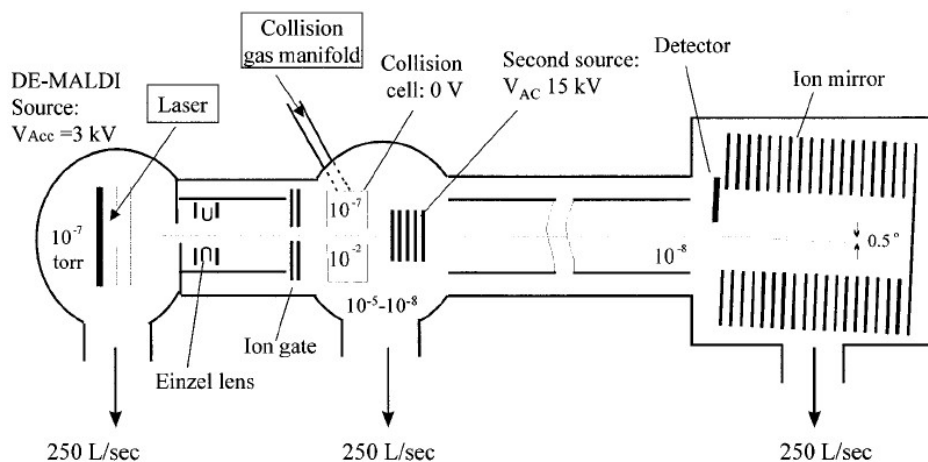
QTOF Ultima
(Micromass/Waters)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

302

302

TOF-TOF



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

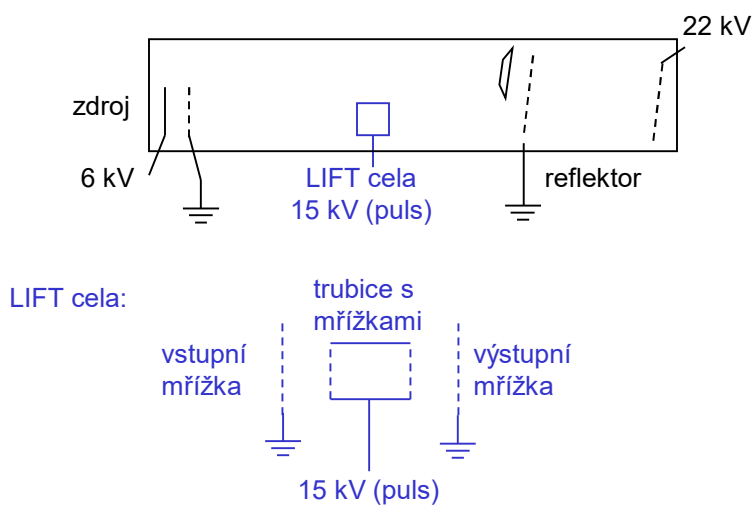
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

303

303

LIFT TOF MS

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



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

304

304



8

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

305

305

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)

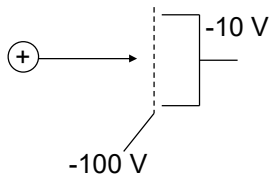
aj...

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

306

306

Faradayův pohár (Faraday cup)



- Velmi malé proudy

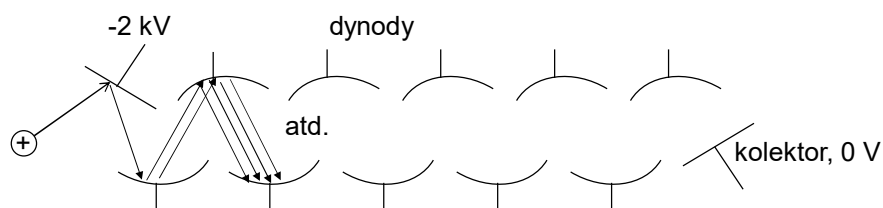
Př.: 100 iontů/s $\Rightarrow 1.6 \times 10^{-17}$ A

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

307

307

Elektronový násobič



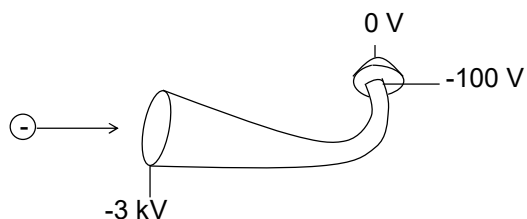
- Obdoba fotonásobiče: konverzní elektroda se sérií dynod (s potenciálem vzrůstajícím zleva doprava) a kolektorem. Elektronový násobič není zapouzdřen ve skleněné baňce.
- Konverze iontu na elektron(y) na první elektrodě (např. Cu-Be). Znásobování elektronů na dynodách. Záchyt elektronů na kolektoru,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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

308

308

Channeltron



- Skleněná trubice s vrstvou polovodivého PbO uvnitř. Proud tekoucí polovodivou 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

309

309

Mikrokanálová destička (microchannel plate, MCP)

Rozměry MCP

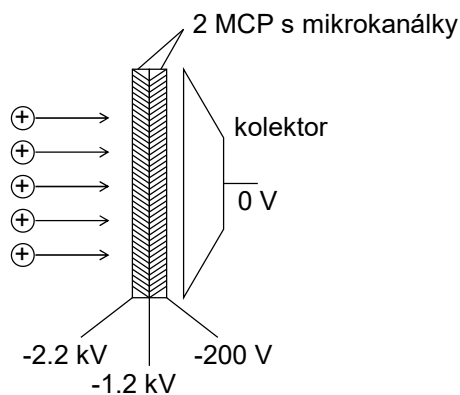
- tloušťka ~ 1 mm
- průměr 1 - 10 cm.

Mikrokanálky

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

Plošný detektor vhodný pro TOFMS

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

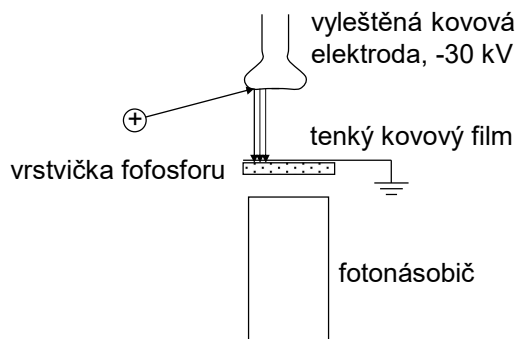


Hmotnostní spektrometrie biomolekul

310

310

"Daly" detektor



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

+ Velmi nízký šum.

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

- Ruší světlo.

- Vyžaduje nízké tlaky ($p < 10^{-5}$ Pa).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

311

311

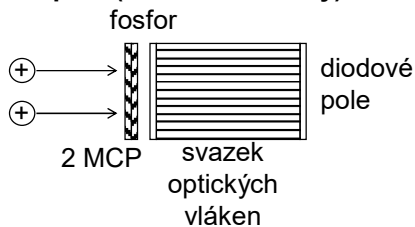
Plošné multikanálové detektory (Array detectors)

... např. pro magnetický sektor

Fotografická deska

- historický detektor, zdlouhavé zpracování

Kombinace MCP a diodového pole (MCP-diode array)



Zařazení optických vláken umožňuje dosažení vyššího plošného rozlišení.

Další detektory ... kombinace výše uvedených detektorů

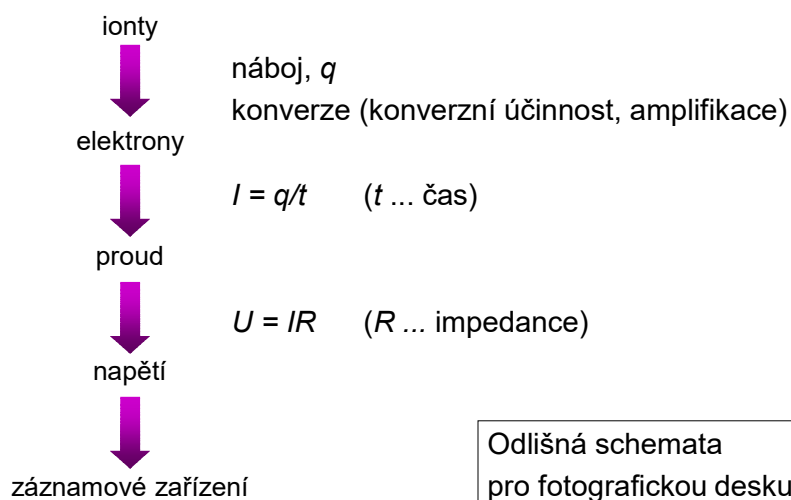
Př.: MCP a fosforový scintilátor ... izolace vysokého napětí

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

312

312

Záznam dat v MS



Odlišná schemata
pro fotografickou desku
a scintilační detektory

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

313

313

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

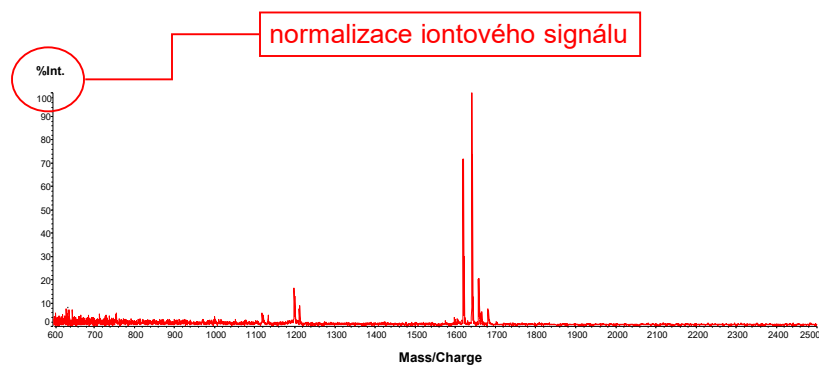
314

314

Signál v MS

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

a.u. (arbitrary units) nebo relativní intenzita



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

315

315

Záznamová zařízení

digitální převodníky

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

fotografická deska (historický)

zapisovač signálu (historický)

analogový osciloskop s fotoaparátem (historický)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

316

316

Detekční elektronika - A/D převodník

Měření (digitalizace) napětí

Základní parametry

počet bitů (rozlišení 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

317

317

A/D převodník (analog/digital)

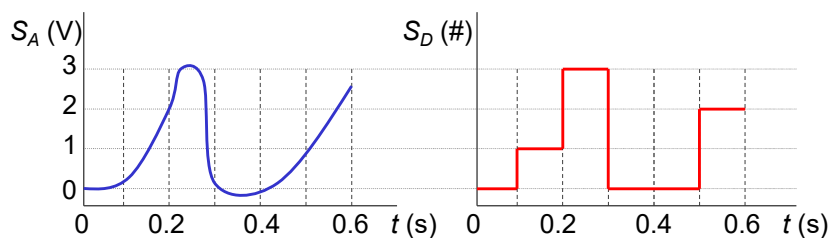
Př.:

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

počet úrovní = 2^2 :

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

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



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

318

318

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 $> 0,5/(\text{počet úrovní} - 1) = 0,5/255 \sim 0.2 \%$

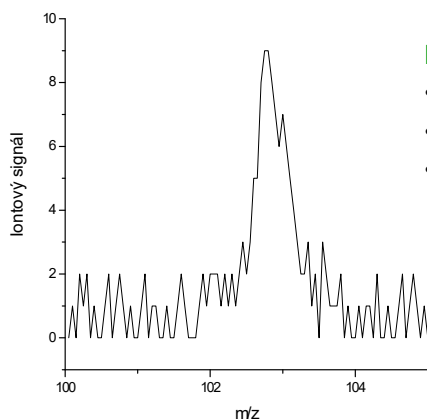
počet bitů	1	8	12	16	24
počet úrovní	2	256	4 096	65 536	16 777 216
min. rel. chyba (%)	50	0.2	0.01	8×10^{-4}	3×10^{-6}
dyn. rozsah (rel. chyba < 10%)	-	50	800	13 000	3 000 000

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

319

319

Volba A/D převodníku

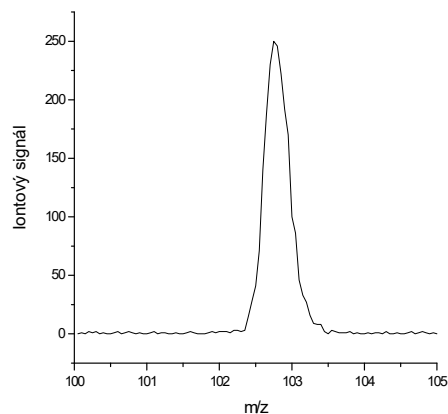


Příčiny:

nízká úroveň signálu
převodník s nízkým počtem bitů

Řešení:

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



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

320

320

Rychlost záznamu spektra

... dána vzorkovací frekvencí AD převodníku

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

Př. 1:

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

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

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

... pro 16-bitový převodník 36 kByte

Rychlost A/D převodníku

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

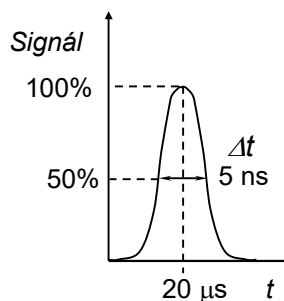
$t = 20 \mu\text{s}$, $R = 2\,000$

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

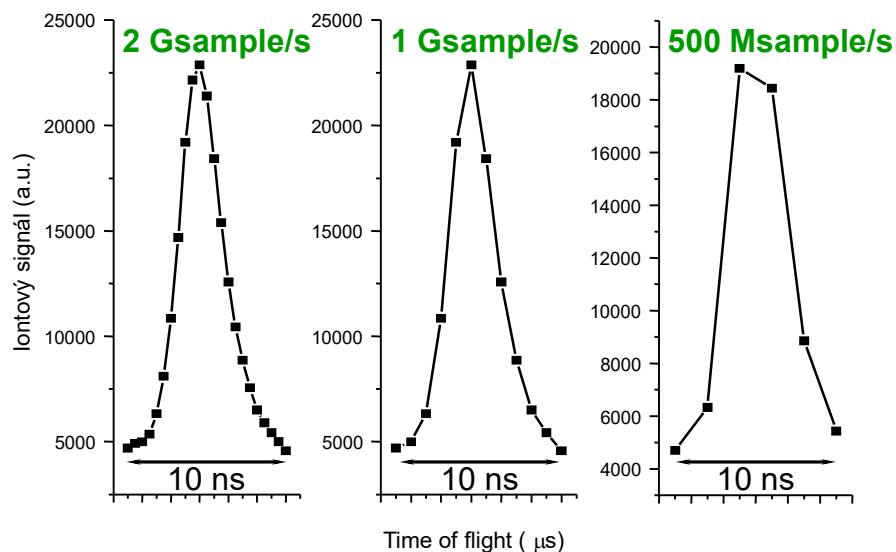
$$\Delta t = t/2R = 20 \mu\text{s}/4000 = 5 \text{ ns} \quad (\text{FWHM})$$

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

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



Vliv vzorkovací frekvence AD převodníku (TOFMS)



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

323

323

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

324

324

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

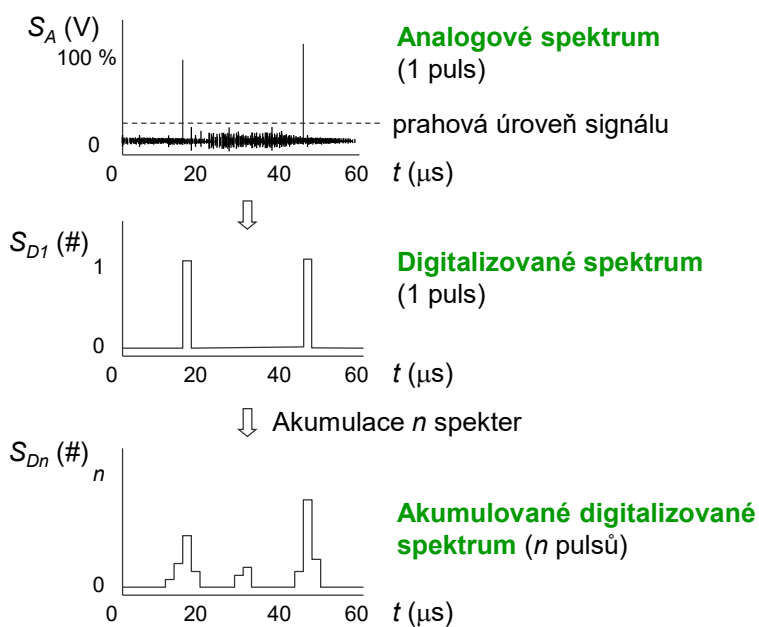
(počet kanálů)

aj.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

325

325



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

326

326

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

327

327

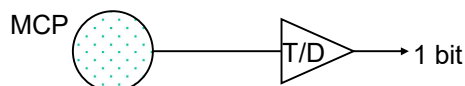
T/D převodník (time/digital)

Vícekanálové T/D převodníky

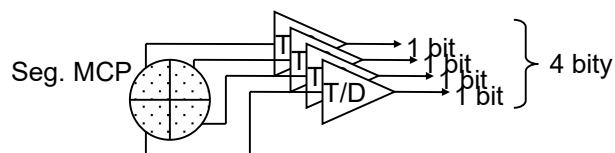
... ke zvýšení dynamického rozsahu

... pomocí skupiny T/D převodníků se segmentovaným detektorem

Klasický TOF detektor



Segmentovaný TOF detektor



Ionty dopadají na čtyři segmenty se stejnou pravděpodobností

...celkový tok iontů může být vyšší

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

328

328

Informatika

Hardware: nejrozšířenější PC (IBM)

Software: Windows XP

Exponenciální růst výkonnosti: Mooreův zákon

Př.:

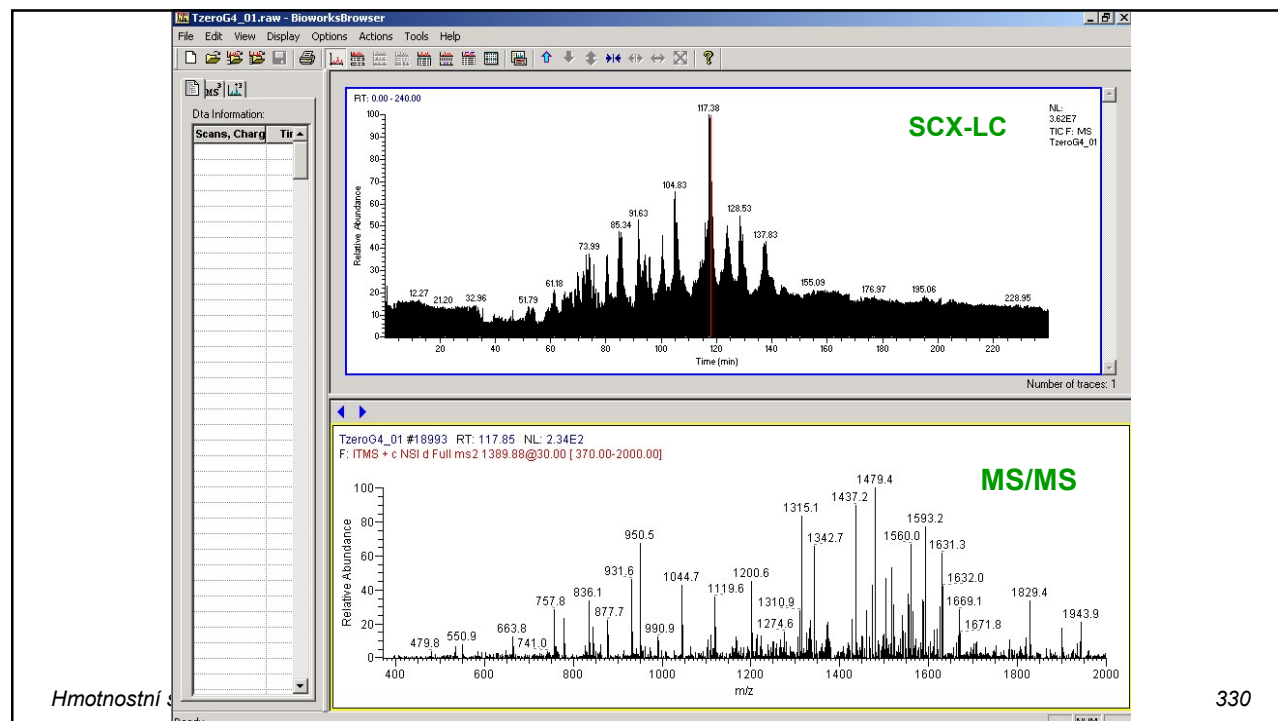
Vyhodnocení MS/MS spekter programem SEQUEST

SCX - LC - MS/MS digestu směsi proteinů (Y2H kvasnice)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

329

329



Hmotnostní

330

330

Př.: klastr 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

331

331

Základy vakuové techniky

Evangelista Torricelli (1608-1647)

Jednotka tlaku: 1 Torr = 1 mm Hg

Tlak, p

p = síla/plocha [Pa, N/m²]

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

1 Torr = 133 Pa

Vakuum

stav plynu s $p < 101325$ Pa

Střední volná dráha molekuly

Střední dráha, kterou urazí iont mezi 2 srážkami

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

$\lambda(\text{cm}) = 0.66/p(\text{Pa})$... pouze hrubý odhad pro vzduch při 25°C

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

332

332

Režimy toku plynu

1. Turbulentní tok. ($p > 10 \text{ kPa}$)

velmi malá λ

mnoho srážek mezi molekulami

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

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

stále mnohem menší než rozměry vakuových aparatur

více kolizí molekula - molekula než molekula - stěna

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

$\lambda > \text{m}$:

převládají kolize molekul se stěnami vakuové aparatury

obvyklá situace v hmotnostním spektrometru

pozn.: UHV = ultra high vacuum

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

333

333

Průtok plynu

Průtok plynu, Q

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

$C \dots$ 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 :

$C \propto D^3/L$ (aproximace)

Při viskózním toku C závisí na tlaku p :

$C \propto pD^4/L$ (aproximace)

Návrh vakuových aparatur

- Krátké tlusté spoje $\Rightarrow C \uparrow \Rightarrow$ rychlejší dosažení požadovaného tlaku.
- Sériové spojení trubic - nejúžší místo omezuje celý systém:

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

334

334

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

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

Pozn.:

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

335

335

Vakuové pumpy

Mechanická pumpa

Difúzní pumpa

Turbomolekulární pumpa

Kryopast

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

336

336

Mechanická pumpa

- Jedno- a vícestupňové.
- Rotor v oleji
 - min. tlak omezen vypařováním oleje
 - nutná past na olejové páry
 - nutné výměny oleje
- Tlak > 0.1 Pa ... "hrubé" vakuum.
- Rychlost pumpování, S: typicky 1 – 500 L/s
- Běžná pumpa v komerčních systémech.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

337

337

Turbomolekulární pumpa

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

338

338

Difúzní pumpa

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

Kryopast

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

339

339

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

340

340

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

341

341

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, zachytu iontů na drátu a měření proudu. $p = f(\text{proud})$. Pozor, proud je funkcí složení plynu!
- Rozsah p : 10^{-2} - 10^{-10} Pa (vysoké vakuum, UHV)

Penning: iontová trubice se studenou katodou.

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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

342

342

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:

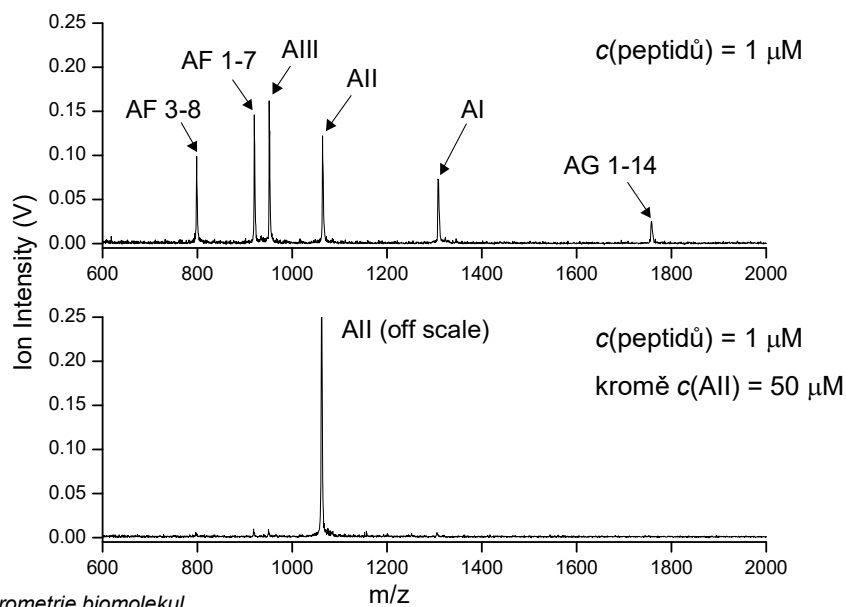
- vysoká pravděpodobnost výskytu 2 nebo více analytů o stejné m/z
- překryv izotopických obálek analytů s blízkou m/z
- vzájemné rušení analytů
- omezený dynamický rozsah hmotnostního spektrometru
- rozlišení 1. stupně při MS/MS často nedostatečné ($R_1 \sim 500$)
- odstranění nečistot
- zdroj dalších informací o analytech

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

343

343

Vzájemné rušení MALDI signálu ve směsi peptidů



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

344

344

Typy interface

Plyn → vakuum

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

Kapalina → vakuum

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

345

345

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 analysis (DDA)

... 1 MS sken následován několika MS/MS skeny

(podrobněji v části o aplikacích)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

346

346

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

347

347

Interface pro MALDI

Obvyklý postup:

- Nanesení kapalného vzorku na terčik
- Vysušení vzorku
- Vložení terčíku 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. Nanesení roztoku na terčik pokrytý vrstvičkou matrice

Sběr eluentu

1. Diskrétní frakce
2. Spojitá stopa

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

348

348

Interface pro MALDI

Off-line

Terčičky s hydrofilními místy (anchorchip).

Mikrometody používající piezoelektrické pipetory 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

349

349

Archivování vzorku (MALDI)

Postup při separaci s MALDI MS a MS/MS detekcí

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

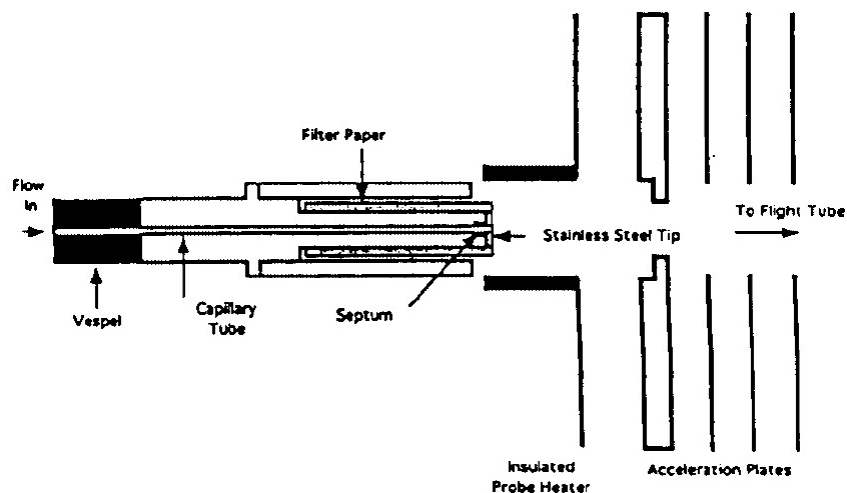
(Po 1. kroku může být postup kdykoli přerušen.)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

350

350

Průtoková sonda (on-line)



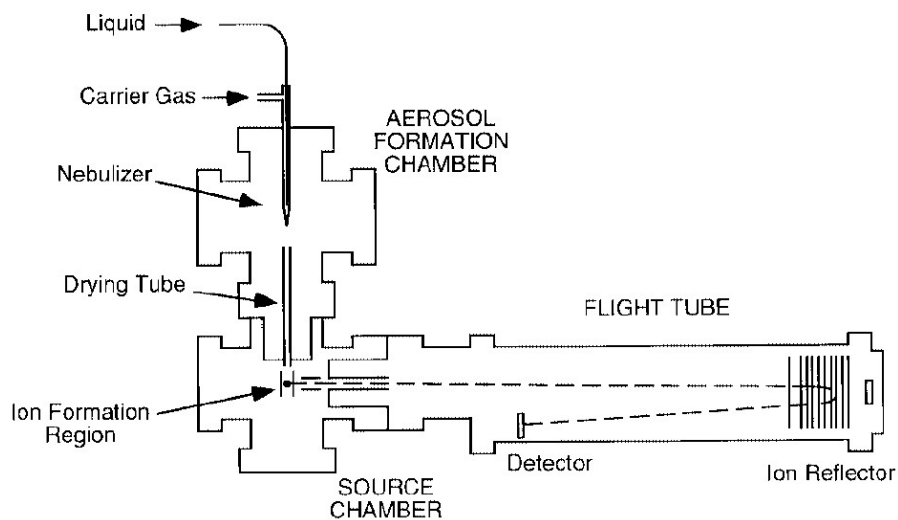
Whittall, R. M., Russon, L. M., Li, L. J. *Chromatogr. A* **1998**, 794, 367-375.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

351

351

Zmlžovač pro tvorbu aerosolu (on-line)



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

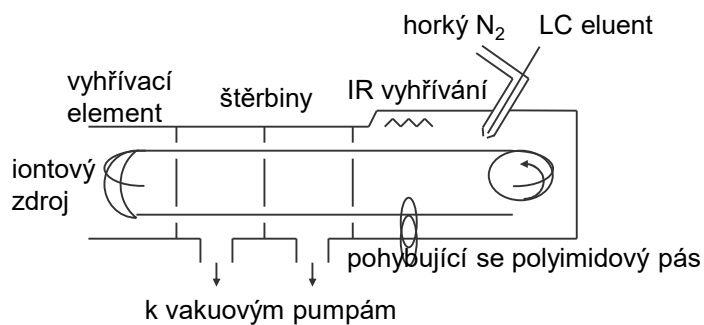
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

352

352

Moving belt interface (in-line)

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



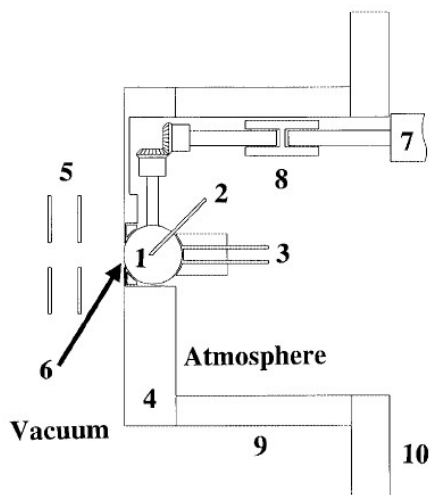
McFadden W. H., Schwartz H. L. and Evans S. J. *Chromatogr.* 122, 389, 1976.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

353

353

ROBIN (rotating ball inlet), in-line



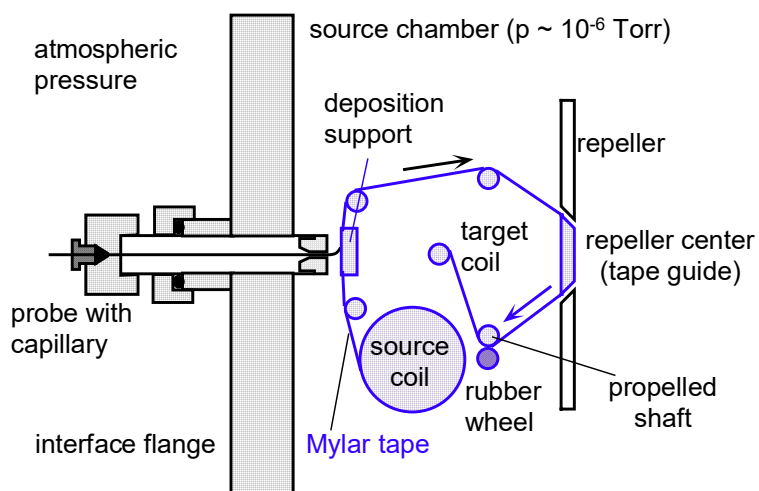
Orsnes, H., Zenobi, R. *Chem. Soc. Rev.* **2001**, 30, 104-112.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

354

354

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

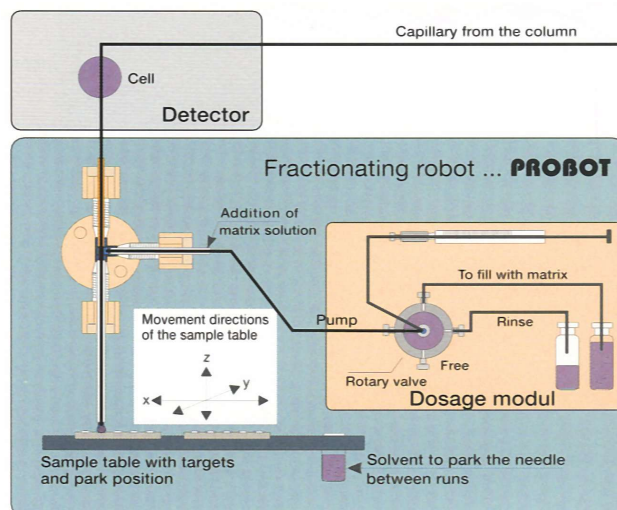


Hmotnostní spektrometrie biomolekul

355

355

Automatizovaný sběr frakcí (off-line)



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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

356

356

Spojení čip – hmotnostní spektrometrie

(čip, mikročip, microfluidic device)

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

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

Základní typy:

1. 2D pole

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

2. Fluidní systém (čipy s kanálky)

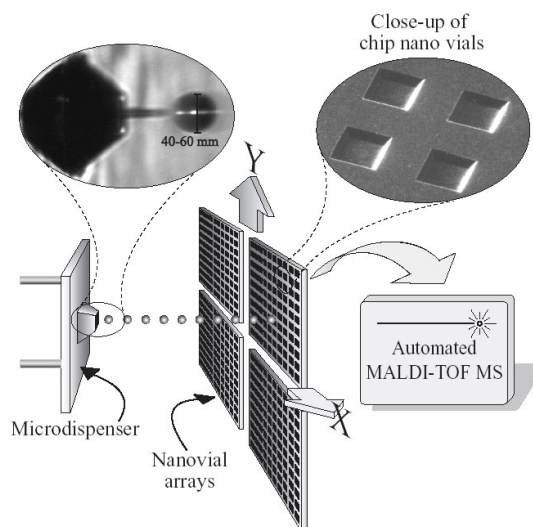
- systémy pro paralelní analýzu– pro ESI, MALDI ...
- systémy integrující několik kroků

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

357

357

Mikrometody



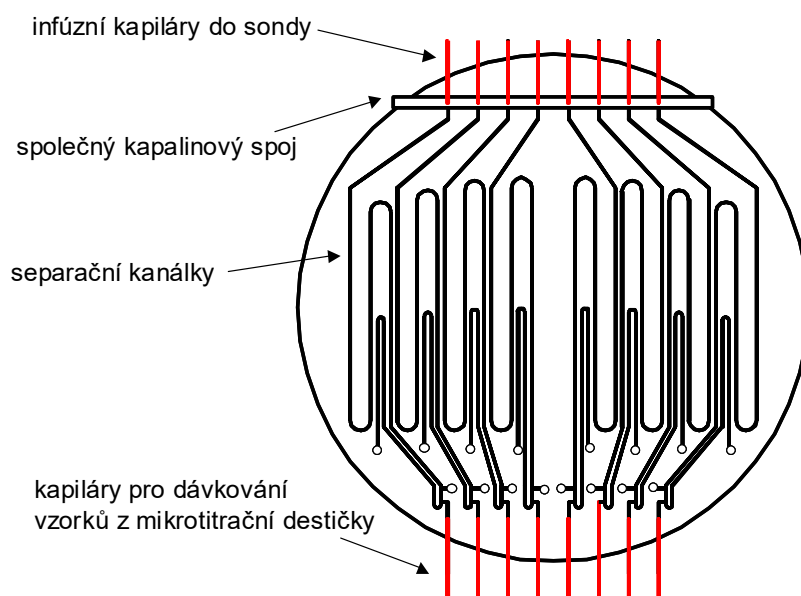
Laurell, T.; Nilsson, J.; Marko-Varga, G. *Trends Anal. Chem.* **2001**, 20, 225-231.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

358

358

Příklad návrhu čipu pro paralelní analýzu

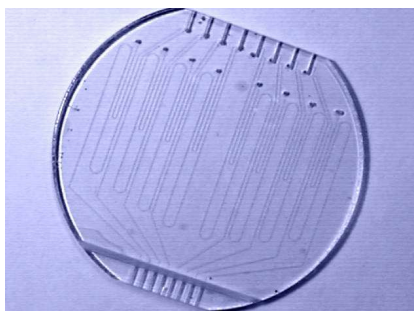


Hmotnostní spektrometrie biomolekul

359

359

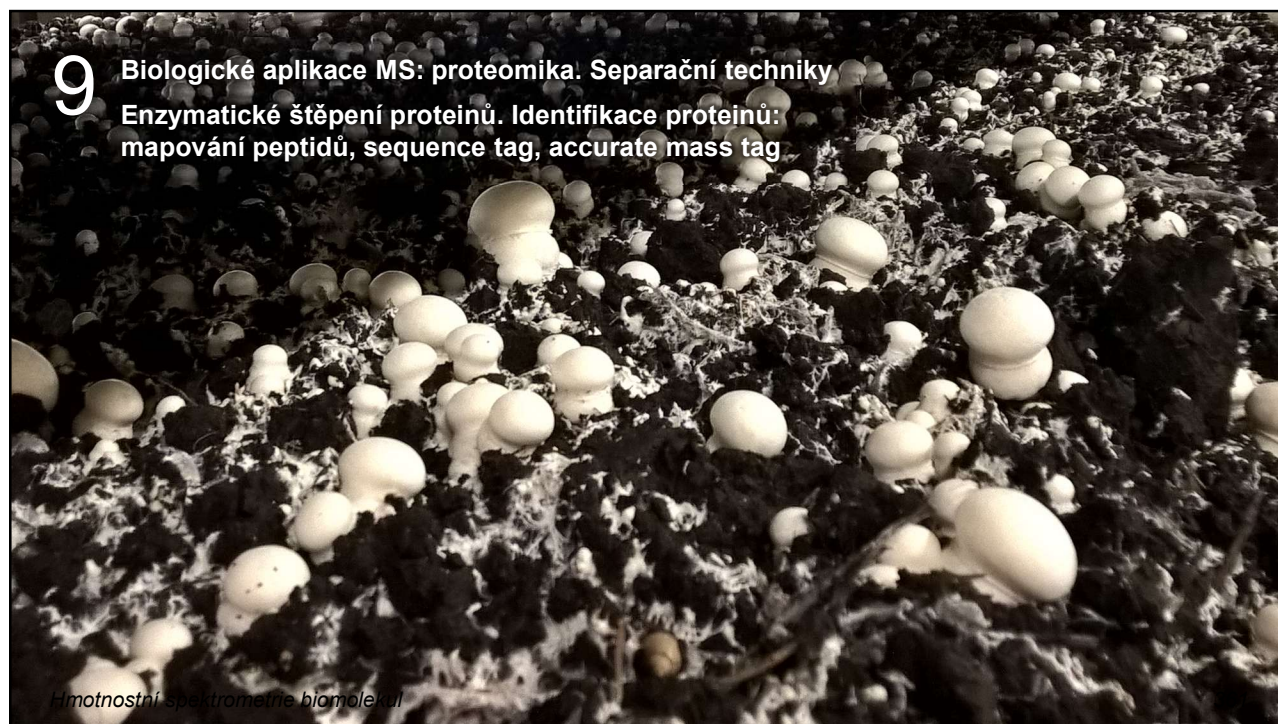
Čip vs. konvenční zařízení



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

360

360



9

Biologické aplikace MS: proteomika. Separační techniky

Enzymatické štěpení proteinů. Identifikace proteinů:
mapování peptidů, sequence tag, accurate mass tag

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

361

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

362

362

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

363

363

IUPAC názvosloví aminokyselin

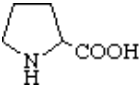
Triviální název	Symboly	Vzorec
Alanine	Ala A	$\text{CH}_3\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$
Arginine	Arg R	$\text{H}_2\text{N-C(=NH)-NH-[CH}_2\text{]}_3\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$
Asparagine	Asn N	$\text{H}_2\text{N-CO-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$
Aspartic acid	Asp D	$\text{HOOC-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

364

364

IUPAC názvosloví aminokyselin

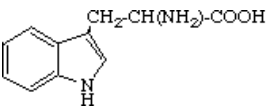
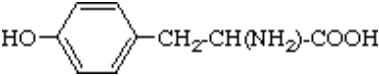
Triviální název	Symboly		Vzorec
Isoleucine	Ile	I	$\text{C}_2\text{H}_5\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$
Leucine	Leu	L	$(\text{CH}_3)_2\text{CH-CH}_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$
Lysine	Lys	K	$\text{H}_2\text{N-}[\text{CH}_2]_4\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$
Methionine	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

365

365

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

366

366

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	Nanoelectrosprej (Wilm, Mann)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

367

367

Současné ionizační techniky v proteomice

FAB

max. $m \sim 10\,000$

$LD \sim 20$ pmol (klasický FAB), < 1 pmol (CF-FAB)

ESI

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

$LD < 10$ fmol (rutinní)

$LD \sim$ amol nebo 10^{-9} M (vybrané aplikace)

MALDI

max. $m \sim 10^6$ (prakticky neomezen – TOF analyzátor)

relativně nejvíce odolná vůči rušení nečistotami

$LD < 10$ fmol (rutinní)

$LD \sim$ amol nebo 10^{-9} M (vybrané aplikace)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

368

368

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

369

369

Separační metody v proteomice

GE

gelová elektroforéza na polyakrylamidovém gelu

HPLC

vysoceúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi

IEC

chromatografie na iontoměničích

AC

afinitní chromatografie

CE

kapilární elektroforéza

Centrifugace

běžná centrifugace, gradientová centrifugace

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

370

370

Gelová elektroforéza (GE)

2D SDS PAGE

2D: 2-rozměrná elektroforéza

1. rozměr: dle pI (izoelektrická fokusace)

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

PA: polyakrylamidový gel jako separační médium

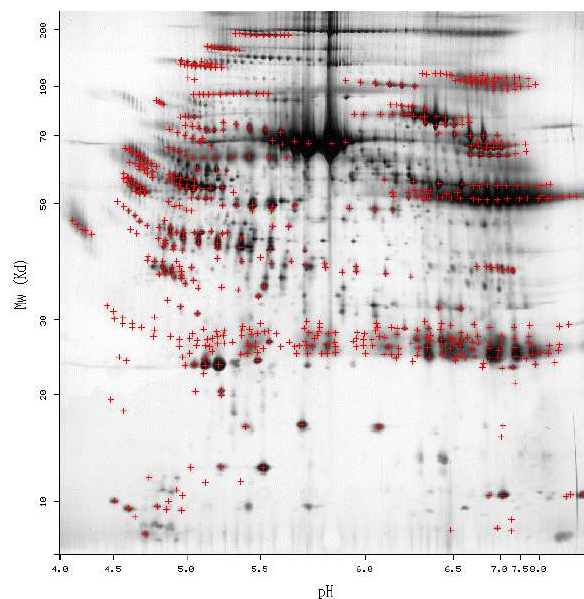
- Vhodná pro separaci tisíců až desetitisíců proteinů, v případě velmi jednoduchých směsí stačí i 1D GE
- Rychlá identifikace a charakterizace proteinů na 2D gelu je nejběžnější analýzou současné proteomiky
- Zhruba 5% proteinů a 30% peptidů migruje anomálně
- PTM ovlivňují zdánlivou m proteinů (chyba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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

371

371

Př.: 2D GE lidské plazmy



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

Zdroj: Expasy

372

372

RP HPLC

- Kolona: klasická, kapilární (ϕ 300 μm) nebo nano LC (ϕ 75 μm)
- Náplň: C_{18} , velikost nosiče: 3 – 10 μm (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

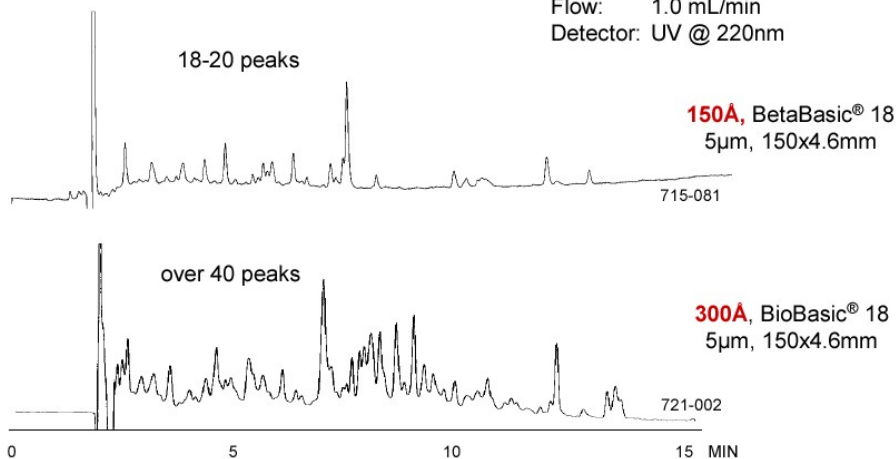
373

373

Př.: RP HPLC směsi peptidů (digest BSA)

Sample: Tryptic Digest of BSA

Mobile phase: A - 0.1% TFA in H_2O
 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

374

374

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

375

375

Enzymatické štěpení proteinů

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

Další enzymy: lysin, chymotrypsin, CNBr aj.

Produkty enzymatického štěpení

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

376

376

Enzymatické štěpení proteinů v 2D gelu

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

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

377

377

Strategie analýzy v proteomice

Základní typy analýzy

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

Vzorek je obvykle směs mnoha proteinů/peptidů

↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓

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

Identifikace

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

378

378

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

379

379

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
<i>in silico</i>	v počítači, počítačový model

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

380

380

Identifikace proteinu

Známé informace:

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

Metody identifikace

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

381

381

Identifikace proteinu

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

Specifická:

1. Analýza více peptidů se vztahem k proteinu

peptidové mapování (**PMF, peptide mapping**), získání peptidového fingerprintu, analýza *m/z* produktů enzymatického štěpení

2. Podrobná analýza jednoho peptidu z proteinu

- a) **sequence tag, MS-tag** - analýza části sekvence (z fragmentace peptidu v plynné fázi)
- b) **accurate mass tag, AMT** – analýza složení části proteinu (z přesné *m* produktu enzymatického štěpení,)
- Vyžaduje vysokou správnost MS analýzy + kvalitní databázi
- Identifikace používající MS jsou výrazně rychlejší a citlivější než chemické metody (Edmanova degradace)
- Negativní výsledek hledání v databázi = nový protein !!!!!

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

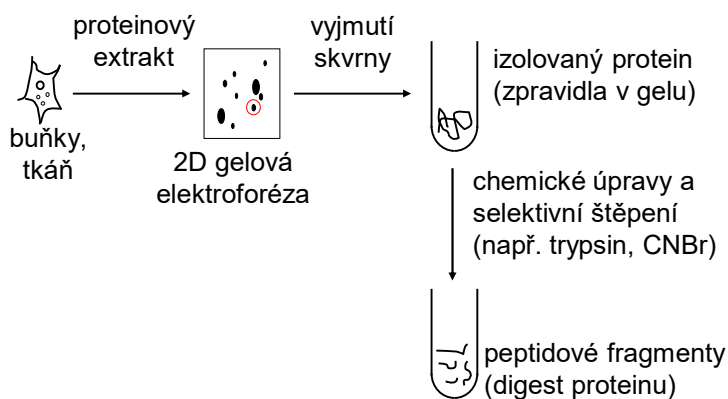
382

382

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

Určení proteinu analýzou produktů enzymatického štěpení

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



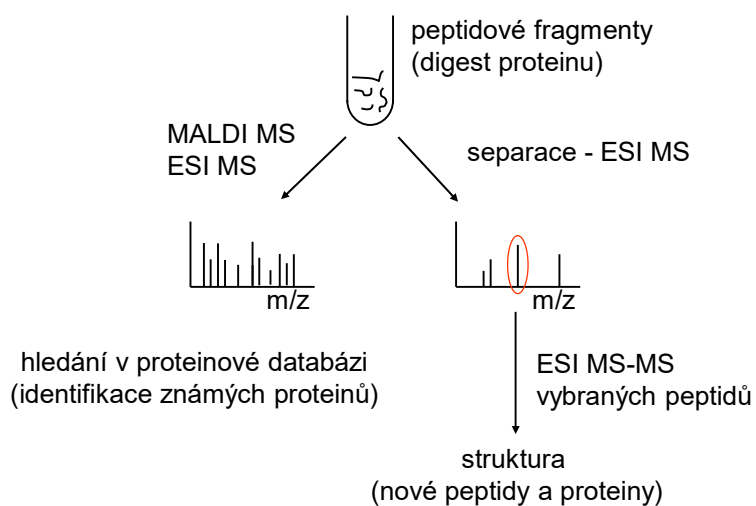
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

383

383

PMF

3. MS analýza a vyhodnocení výsledků



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

384

384

Příklad hledání v databázích: MS Fit

Zadání:

Start Search

Database: Genpeptr113 Instrument: MALDI-TOF

DNA Frame translation: 3

Search Hits: From: msfit Filename: lostres1

Save Hits to file: Filename: lostres1

Species: All

MW of Protein: (from 1000 Da to 100000 Da) All

Protein pI: (from 3.0 to 10.0) All

Digest: Trypsin

Max. # of missed cleavages: 1

Cysteines modified by: acrylamide

N terminus: Hydrogen C terminus: Free Acid

Sample ID (comment): Magic Bullet digest

Max. Reported Hits: 5

Possible Modifications Mode (default)

Peptide N-terminal Gln to pyroGln

Oxidation of M

Protein N-terminus Acetylated

Acrylamide Modified Cys

User Defined Modification 1:

Phosphorylation of S, T and Y

OR

Homology Mode (select any mode but identity)

Search mode: identity

Min. # matches with NO AA substitutions: 1

Peptide Mass shift: +/- 40.1 Da

Peptide masses are: monoisotopic

Min. # peptides required to match: 4

Report MOWSE Scores: Pfactor: 0.4

Peptide Masses

mass tolerance: +/- 50 ppm

Mass (m/z)	Charge (z)
876.3718	
825.4571	
1017.5370	
1026.5964	
1040.6121	
1105.4550	
1196.7132	
1218.5796	
1243.5887	
1255.6538	
1260.5928	
1266.6281	
1276.5836	
1289.6094	
1305.6310	
1368.6975	
1398.6805	
1413.7126	
1420.6741	
1482.8101	
1576.8138	
1932.7067	
2188.0850	

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

385

385

Příklad hledání v databázích: MS Fit

Výsledky:

Sample ID (comment): Magic Bullet digest

Database searched: Genpeptr113

Molecular weight search (1000 - 100000 Da) selects 408557 entries.

Full pI range: 429404 entries.

Combined molecular weight and pI searches select 408557 entries.

MS-Fit search selects 615 entries (results displayed for top 5 matches).

Considered modifications: | Peptide N-terminal Gln to pyroGln | Oxidation of M | Protein N-terminus Acetylated |

Min. # Peptides to Match	Peptide Mass	Peptide Masses	Digest	Max. # Missed Cleavages	Cysteines Modified by	Peptide N terminus	Peptide C terminus	Input #
4	50.000 ppm	monoisotopic	Trypsin	1	acrylamide	Hydrogen (H)	Free Acid (O H)	23

Result Summary

Rank	MOWSE Score	# (%) Masses Matched	Protein MW (Da)/pI	Species	Genpeptr113 Accession #	Protein Name
1	2.02e+007	15/23 (65%)	30271.5 / 5.80	BOS TAURUS	M35870	apolipoprotein A-I precursor
2	1.64e+003	4/23 (17%)	3311.9 / 10.45	CAULIFLOWER MOSAIC VIRUS	S75949	aphid transmission factor [cauliflower mosaic virus CaMV, isolate 11/3-3, aphid non-transmissible, Peptide Partial, 29 aa]
3	1.56e+003	4/23 (17%)	3475.0 / 10.17	CAULIFLOWER MOSAIC VIRUS	S75948	aphid transmission factor [cauliflower mosaic virus CaMV, isolate 11/3-7, aphid non-transmissible, Peptide Partial, 30 aa, segment 1 of 2]
4	583	5/23 (21%)	48333.0 / 6.79	ALLOCHROMATUM VINOSUM	L27275	'The first ATG in the open reading frame was chosen as the start codon.'
5	428	6/23 (26%)	64511.6 / 6.66	BLUETONGUE VIRUS	X56735	nonstructural protein NS1

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

386

386

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

387

387

PMF: teorie vs. praxe

Nadbytečné píky

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

Chybějící píky

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

388

388

Metoda Sequence-Tag (MS-Tag)

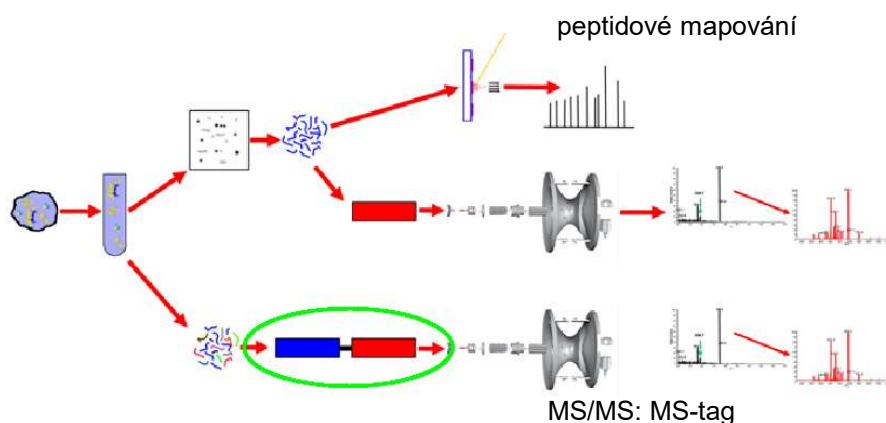
- Identifikace proteinu na základě přesné znalosti malé části jeho sekvence (sequence-tag, MS-tag), zpravidla sekvence jednoho peptidu
- Přesné stanovení sekvence aminokyselin části proteinu (typicky jednoho peptidového fragmentu z enz. štěpení) - obvykle pomocí ESI-MS/MS nebo MALDI-PSD-MS přímo z tabulky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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

389

389

Strategie MALDI MS a LC - ESI MS

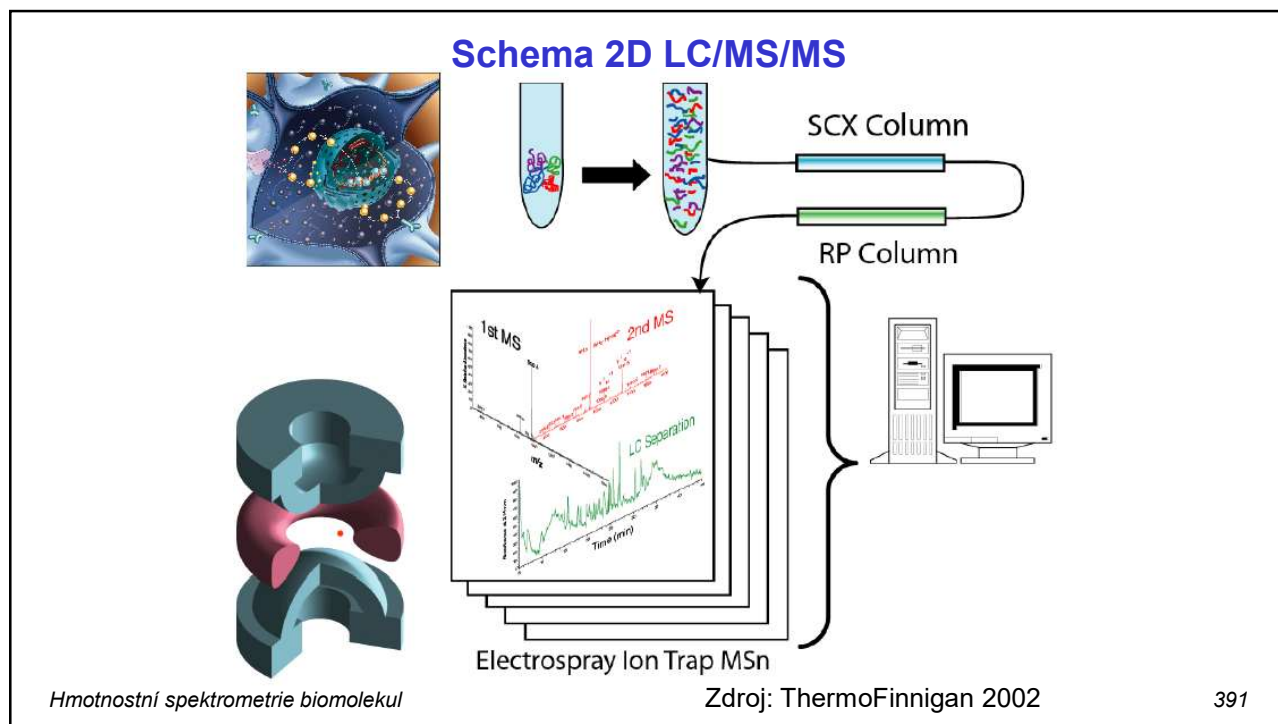


Hmotnostní spektrometrie biomolekul

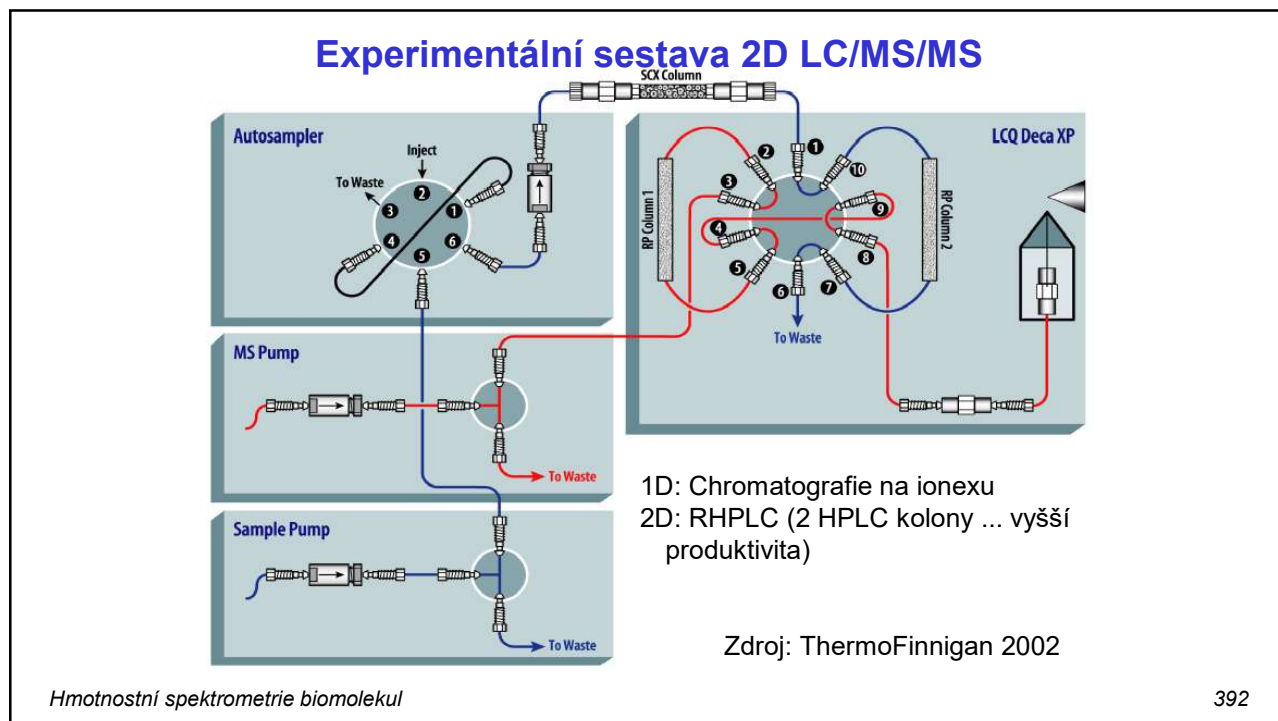
Zdroj: ThermoFinnigan 2002

390

390

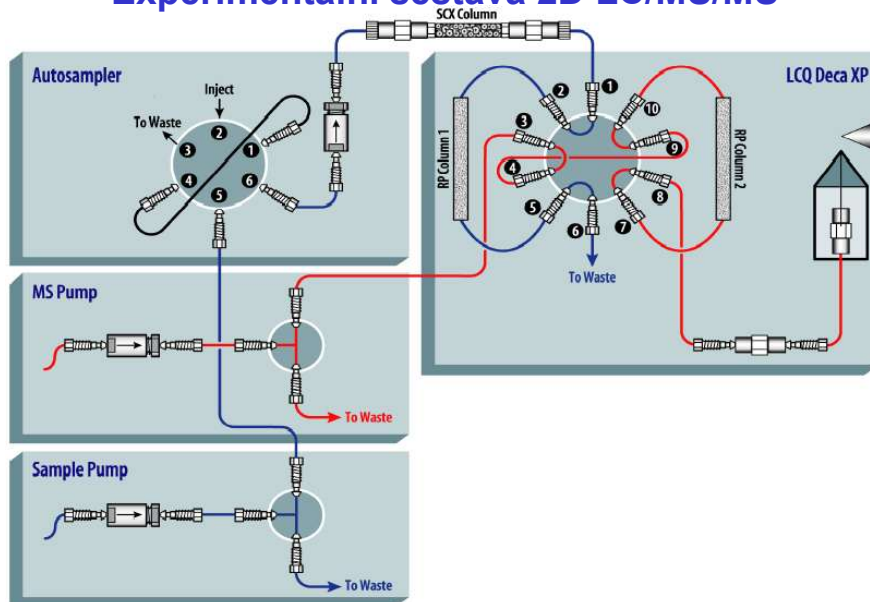


391



392

Experimentální sestava 2D LC/MS/MS



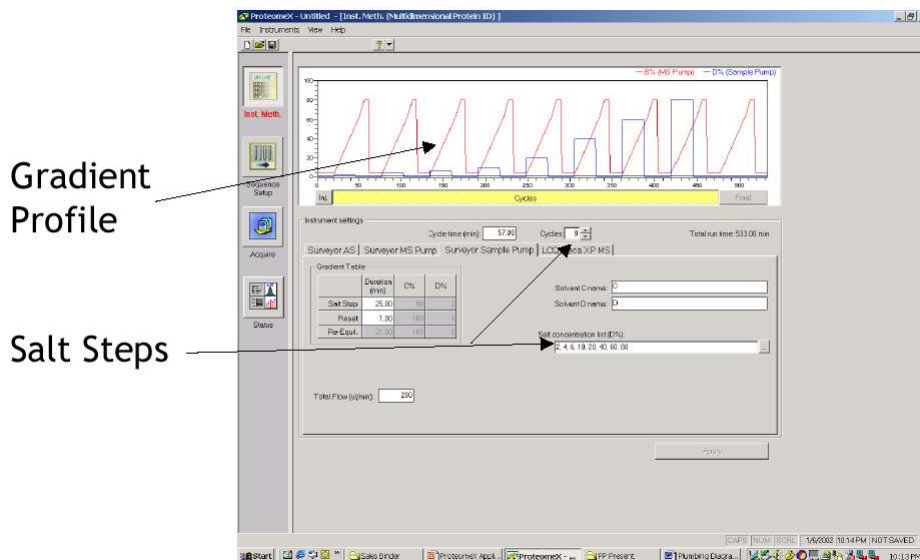
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

Zdroj: ThermoFinnigan 2002

393

393

Řízení 2D LC/MS/MS experimentu



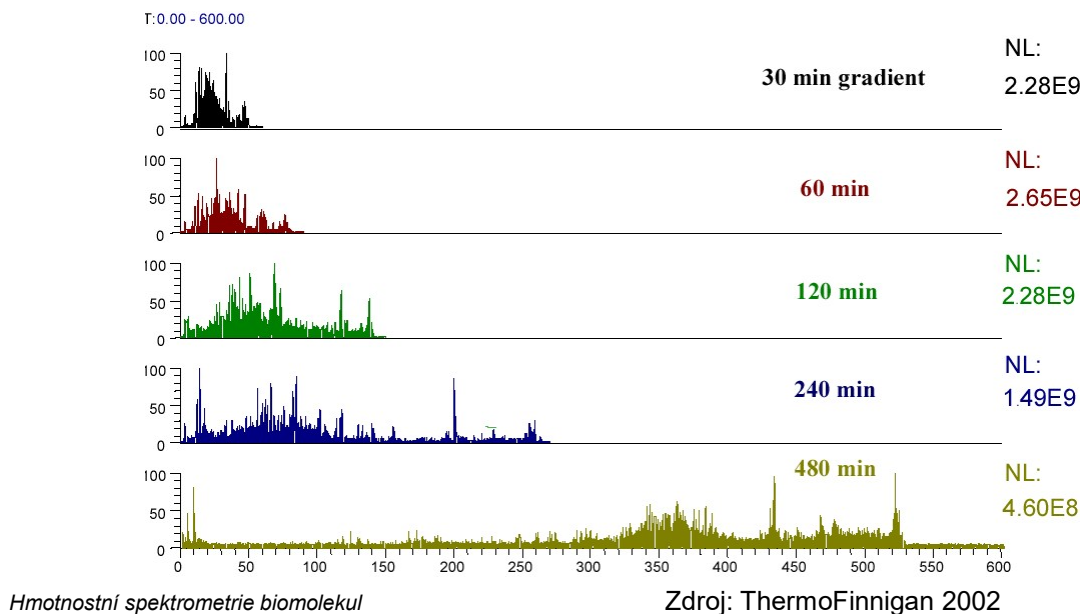
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

Zdroj: ThermoFinnigan 2002

394

394

Výsledky 2D LC/MS/MS experimentu



395

395

LC-ESI MS a MS/MS:

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

- Jeden MS sken následovaný několika MS/MS skeny hlavních prekursorů
- V případě složitějších spekter i následující MS³ skeny (např. pro detekci fosforylací)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

396

396

Accurate mass tag (AMT)

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

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

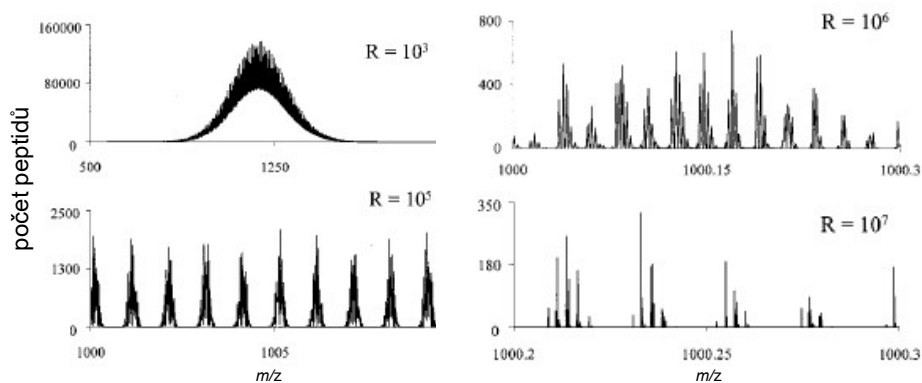
- Typický počet aminokyselin v řetězci peptidu ~ 10 . Přesná hmotnost aminokyselin – např. $m_{\text{mono}}(\text{G})=57.02146$, $m_{\text{mono}}(\text{A})=71.03711$ atd.
- Při správnosti stanovení $m/z < 1$ ppm je vysoká pravděpodobnost, že dané hmotnosti peptidu odpovídá jediné složení aminokyselin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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

397

397

AMT



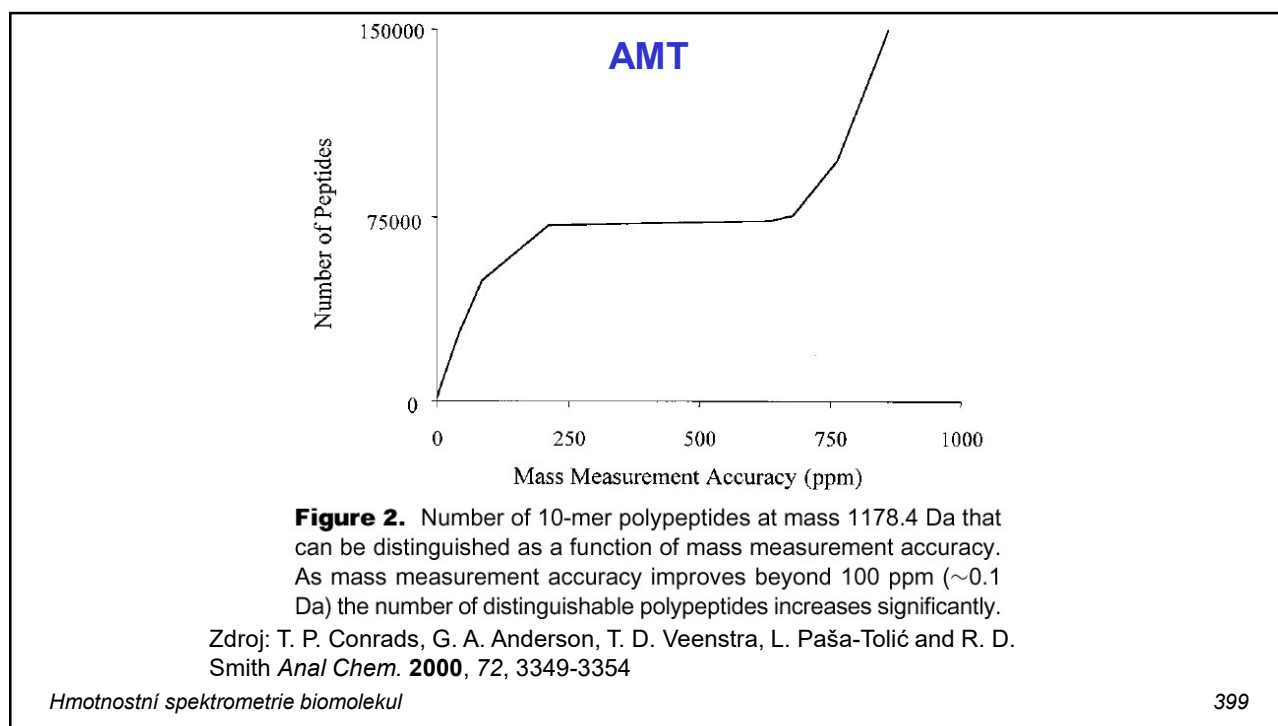
MS směsi všech možných 10-merů peptidů při různých hodnotách R (a správnosti stanovení m/z): 10^3 (1000 ppm) (A), 10^5 (100 ppm) (B), 10^6 (10 ppm) (C), and 10^7 (0.1 ppm) (D).

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

398

398



399



400

Další strategie pro analýzu proteomu

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

401

401

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

402

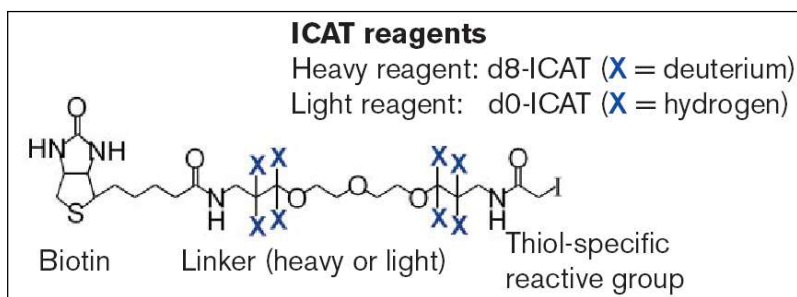
402

Některé zkratky v proteomice

GIST	Global Internal Standard Technology (^2H , ^{13}C , ^{15}N)
ICAT	Isotope-Coded Affinity Tags (cystein)
PhIAT	Phosphoprotein Istopo-coded Afinity Tag (fosforylované peptidy)
IMAC	Ion Metal Afinity 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)

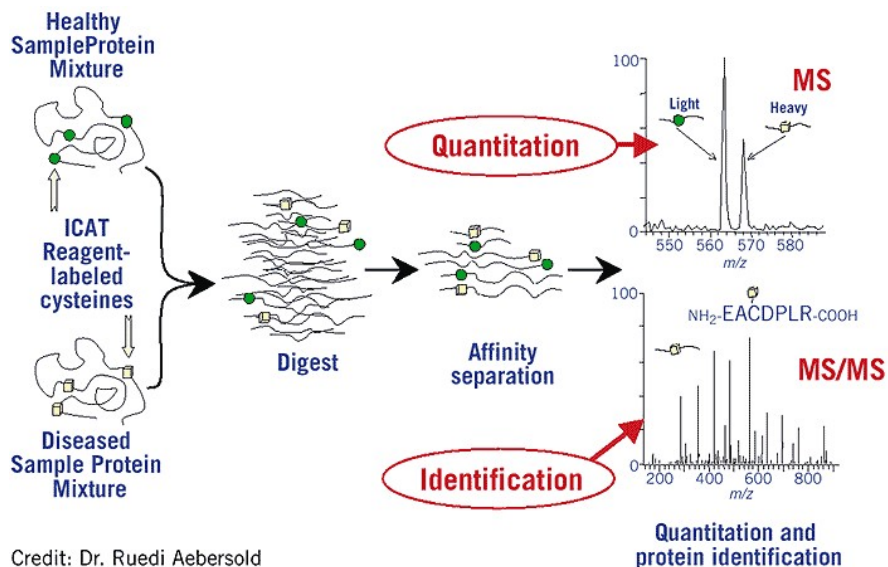
Analýza ICAT (isotope-coded affinity tags)

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



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

Analýza ICAT



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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

405

405

Analýza ICAT

Pozn.

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

Nedostatky ICAT první generace

- Rozdíl m 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 pík

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

406

406

Charakteristika ICAT

Výhody

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

Nevýhody

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

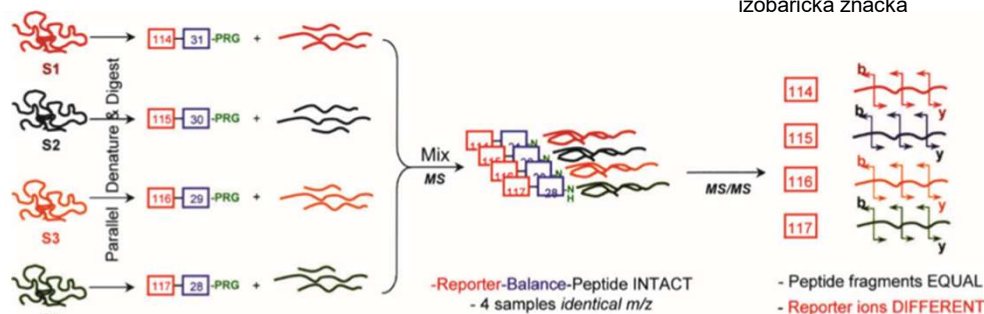
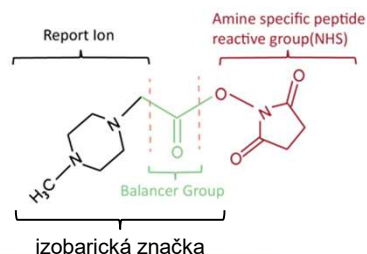
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

407

407

iTRAQ, TMT

- další technika diferenciální proteomiky
- 2D LC (značeny všechny peptidy, komplexní směs) DDA analýza (MS a MS/MS)
- m/z derivatizovaných peptidů stejná (stejný prekurzor, velmi podobná separace)
- různé značky pro derivatizaci peptidů: 4, 8 až 16-plex
- m/z prekurzoru stejná, m/z "reportérů" např. 114, 115, 116 a 117



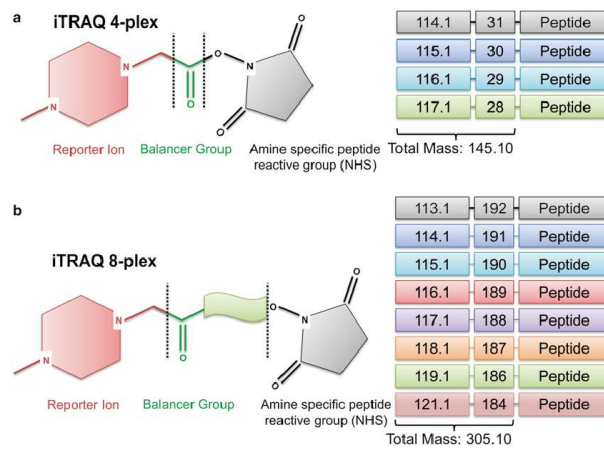
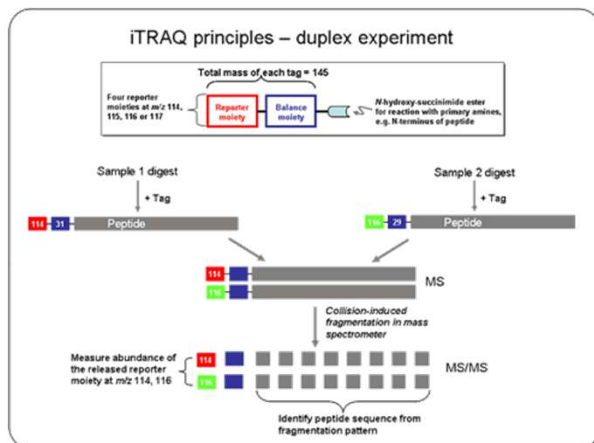
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

www.creative-proteomics.com

408

408

iTRAQ



Příklad dvou derivatizačních činidel s reportéry 114 a 116

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

www.creative-proteomics.com

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

409

409

Stanovení sekvence proteinu/peptidu

Klasická analýza

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

Nedostatky: doba analýzy, relativně nízká citlivost

Současná strategie: kombinace více metod

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

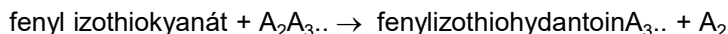
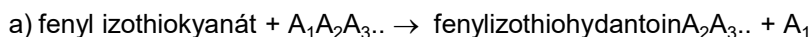
410

410

Stanovení sekvence peptidu MS

Kombinace chemického štěpení a MS

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



atd.

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

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

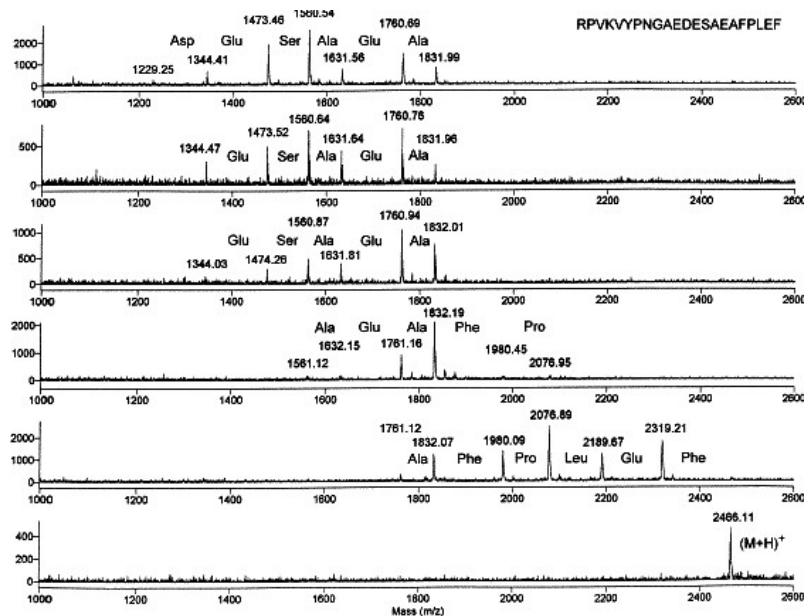
2. MALDI MS směsi fragmentů peptidů.

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

411

411



Patterson, D. H., Tarr, G. E., Regnier, F. E. and Martin, S. A., *Anal. Chem.* 1995, 67, 3971.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

412

412

Stanovení sekvence peptidu MS/MS

CID

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

ISD

- vyžaduje izolaci čisté látky
- MALDI TOF

PSD

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

Pozn.

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

413

413

Fragmentace peptidů

Fragmentace 1 nebo 2 vazeb peptidového řetězce

- fragmenty obsahující N terminál (a, b, c)
- fragmenty obsahující C terminál (x, y, z)
- tyto ionty mohou vzniknout i fragmentací 2 vazeb řetězce
- ztráta NH_3 , H_2O , CO_2

Fragmentace bočního řetězce (zbytku aminokyseliny)

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

Vnitřní fragmenty

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

Immoniové ionty

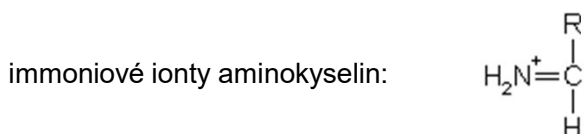
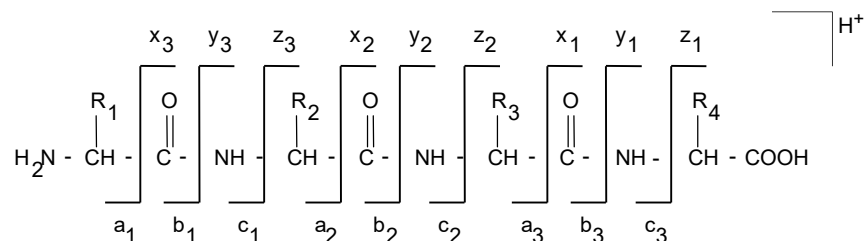
- užitečná informace o aminokyselinách; $m(\text{IM}) = m(\text{AKres}) - 27$

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

414

414

Schéma fragmentace peptidu a značení fragmentů.



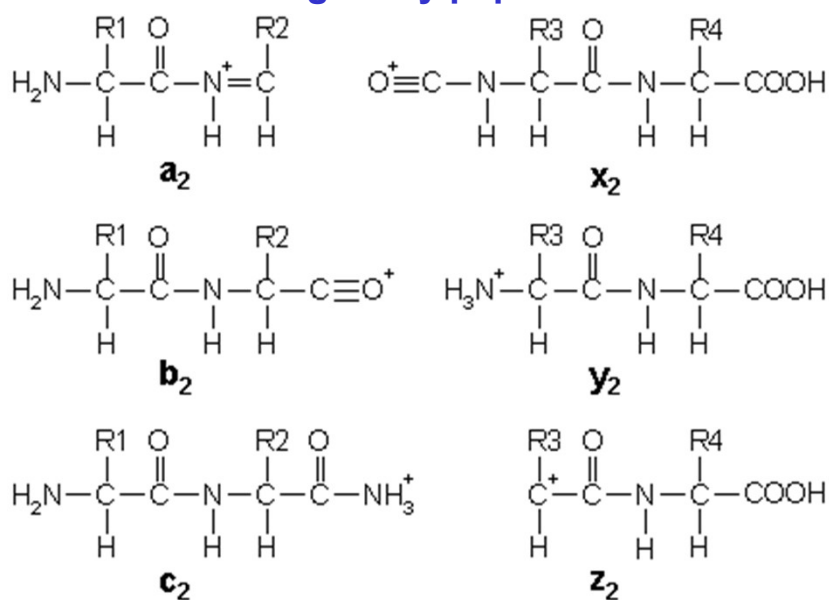
Roepstorff & Fohlman, Biomed. MS 1984, 11, 601.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

415

415

Fragmenty peptidů

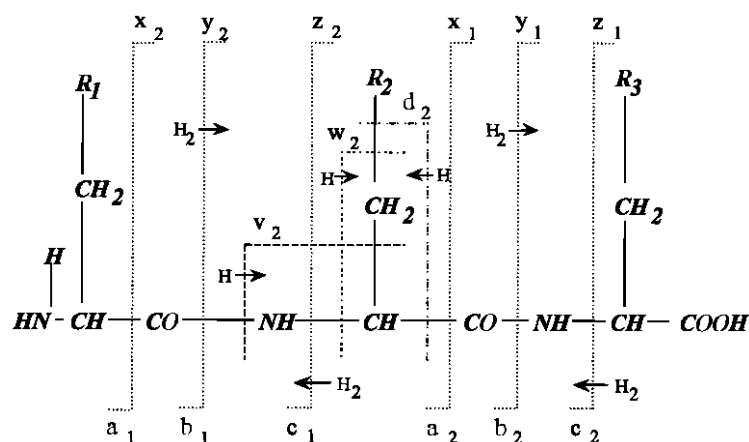


Hmotnostní spektrometrie biomolekul

416

416

Schéma fragmentace peptidu a značení fragmentů.

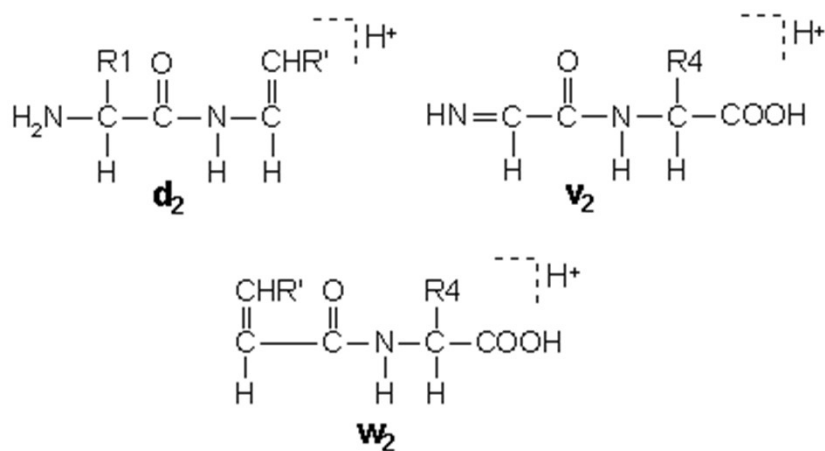


Hmotnostní spektrometrie biomolekul

417

417

Další fragmenty peptidů



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

418

418

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

419

419

Výpočet molekulové hmotnosti peptidu/proteinu

Suma hmotností reziduí aminokyselin

+

Hmotnost koncových skupin:

obvykle 1 Da (H) pro N konec (-NH₂)

a 17 Da (OH) pro C konec (-COOH)

+

Hmotnost protonu 1 Da – iont většinou ve formě [M+H]⁺

(ale i 23 Da pro adukt [M+Na]⁺ atd.)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

420

420

CID fragmentace

Typy iontů v CID

1. série píků iontů **b** a **y**
2. 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)
3. **immoniové ionty** aminokyselin.
4. **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

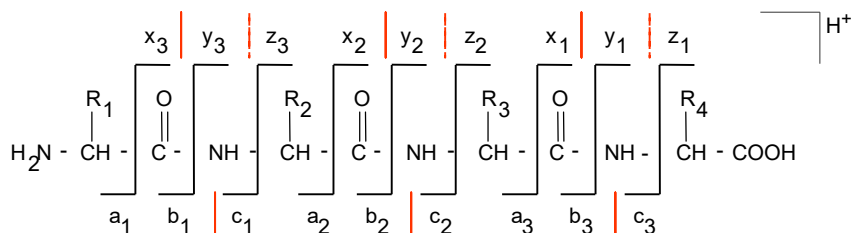
421

ISD fragmenty

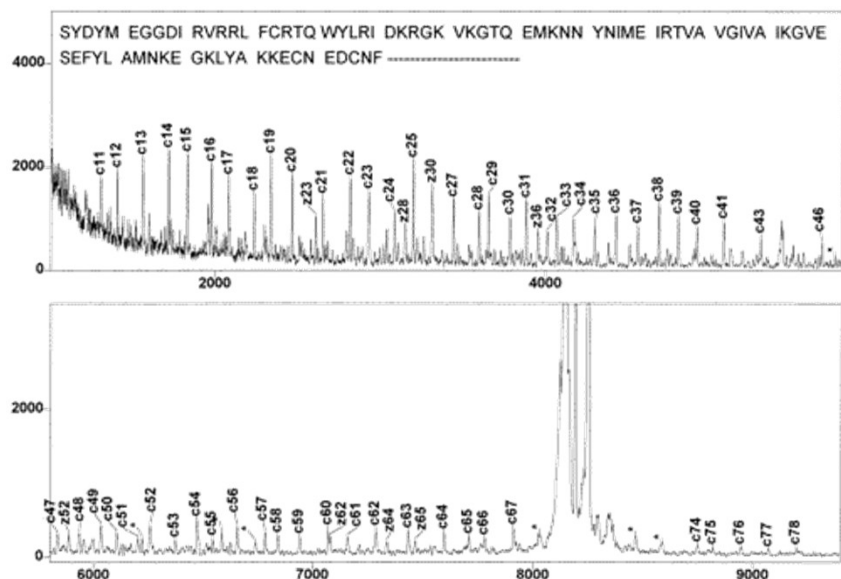
Pravidla fragmentace ... dle relativní pevnosti vazeb.

Typické produkty fragmentace peptidů:

c, y, z



422

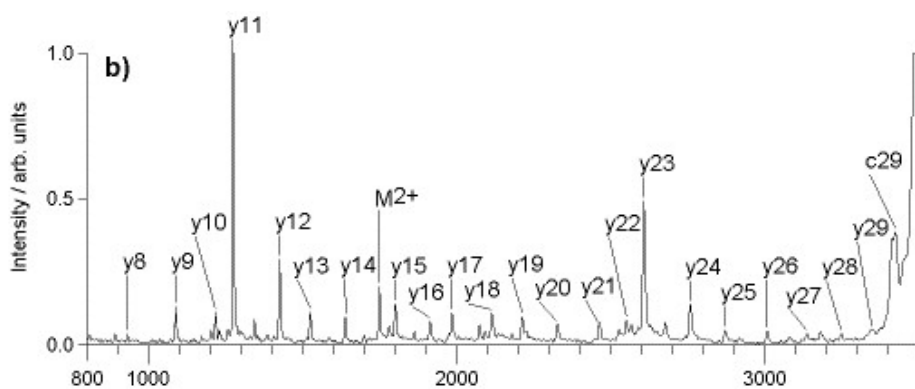


ISD. Analyt: 20 pmol KGF analogu. Matrice: kyselina sinapová. Laser: N₂.
(V. Katta, D. T. Chow, M. F. Rohde *Anal. Chem.*, **70**, 4410-4416, 1998.)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

423

423



ISD
Analyt: oxidovaný B řetězec hovězího inzulínu
Matrice: thiomocovina
Laser: Er:YAG (λ = 2936 nm)

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

424

424

PSD fragmenty

Typické produkty fragmentace peptidů: a, b, y, z, d.

Doprovodné píky –17 (ztráta NH_3) a –18 (ztráta H_2O).

Immoniové ionty aminokyselin.

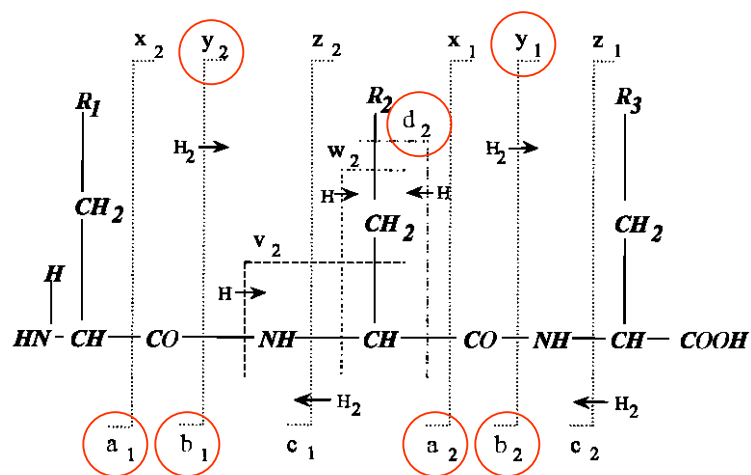
Interní ionty – zejm. od Pro ve směru C konce

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

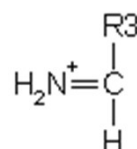
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

425

425



immoniové ionty aminokyselin:



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

426

426

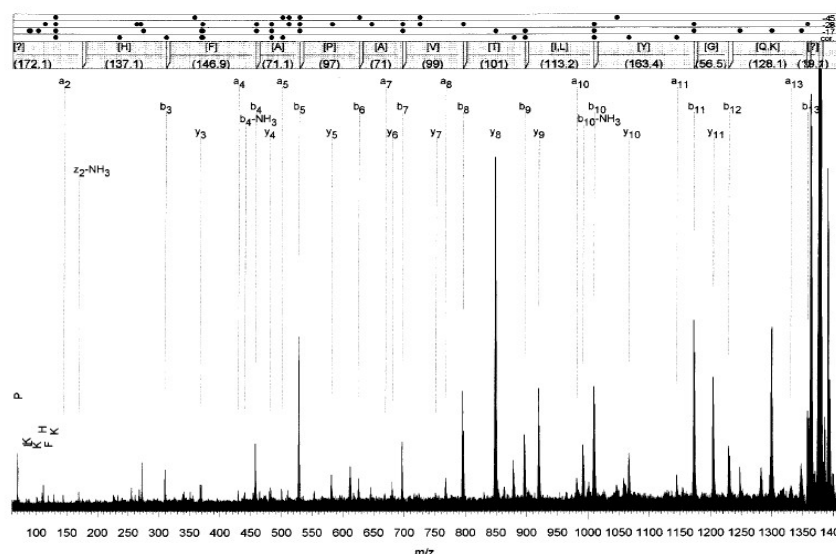


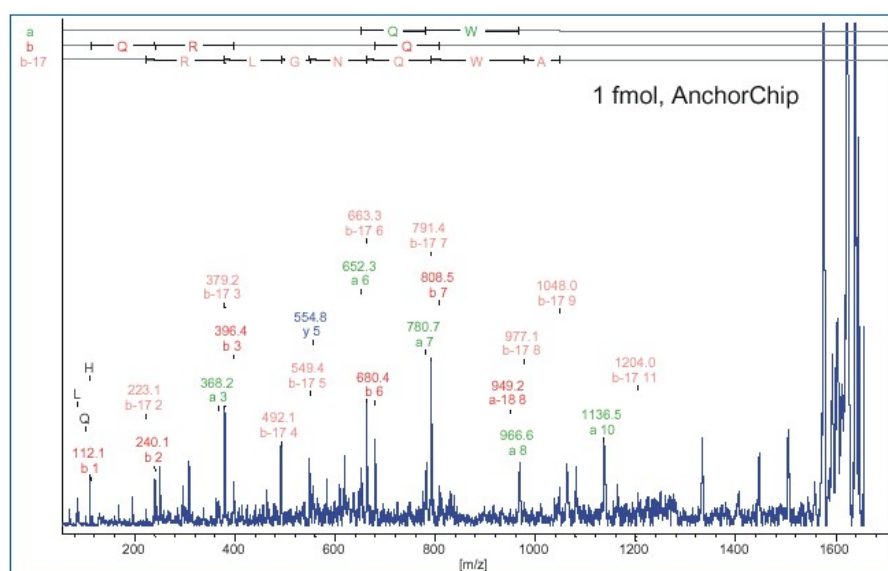
Figure 18. MALDI-PSD mass spectrum of the peptide at $[M + H]^+ = 1375.8$ u acquired on ALADIM I, Institute of Laser Medicine, Düsseldorf. Labeled are the ion signals interpreted as *N*-terminal and *C*-terminal ions. The bar above the labels describes the amino acid sequence determined. Dots in the top part of the figure correspond to neighborhood analysis of peaks (presence of a-type neighbors to b-type ions, satellites, etc.).

PSD, zdroj: B. Spengler *J. Mass Spectrom.* 32, 1019-1036, 1997

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

427

427



PSD bombesinu, zdroj: Bruker Daltonics, GmbH 2000

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

428

428

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

Vyhodnocení MS/MS spekter peptidů

Manuální a semiautomatická dedukce sekvence

- lokalizace iontových sérií typu *b* a *y* (doprovodná série *a*)
 - identifikace immoniových iontů
 - 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

Sekvenování proteinu

Postup

1. Enzymatické štěpení

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

- různě dlouhá doba štěpení
- různé enzymy (trypsin, V8)
- nahodilé štěpení, "shotgun sequencing"

2. Zjištění (alespoň částečné) sekvence štěpů

RPHPLC ESI MS/MS

3. Dedukce sekvence pomocí počítače

celková sekvence stanovena z kombinace sekvencí peptidu

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

431

431

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

432

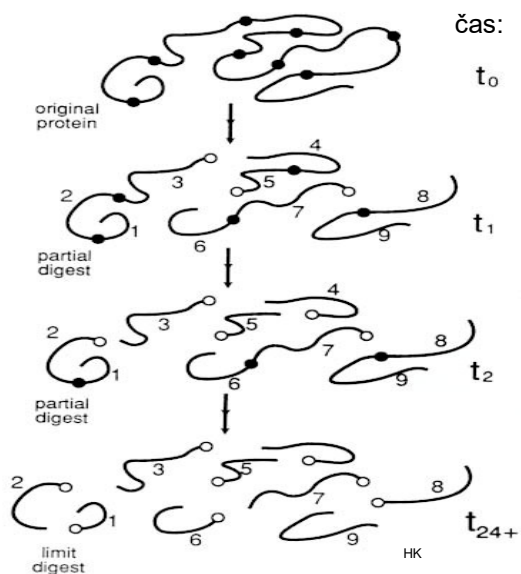
432

Sekvenování proteinu

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

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

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



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

433

433

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 píků

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

434

434

Post-translační modifikace (PTM)

- modifikace po přenosu RNA → 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 ⇒ citlivost
- vyžaduje selektivní izolaci peptidů s modifikovanou aminokyselinou
- vazba mezi peptidem a mod. skupinou často slabá

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

435

435

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.).

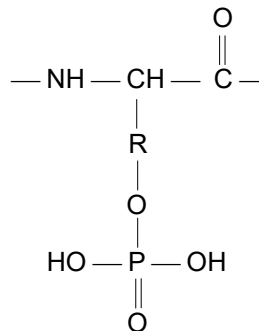
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

436

436

Fosforylace

- reversibilní PTM související s regulačními mechanismy v buňce
 - monoesterická vazba skupiny kyseliny fosforečné k hydroxylu 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

437

437

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)**

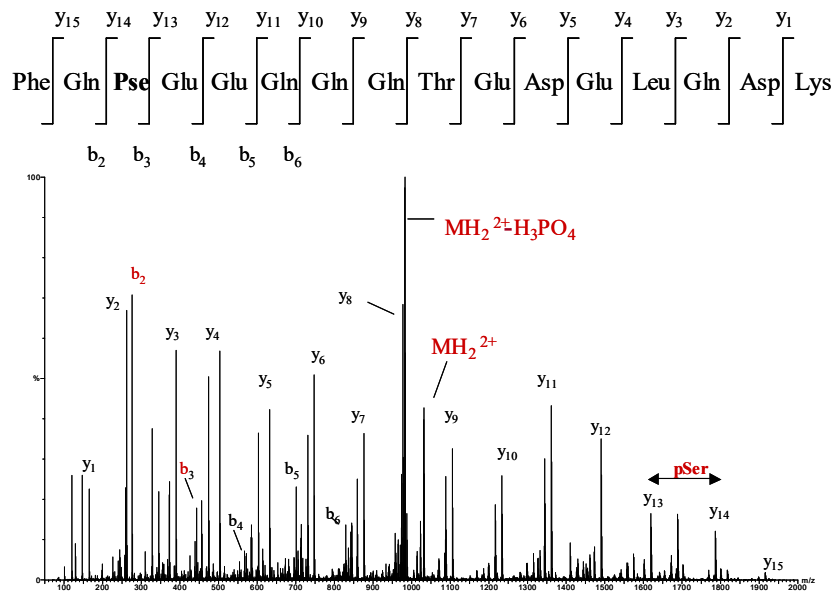
aminokyselina	M (zbytek)	M (monoester H_3PO_4)
serin	87	167
threonin	107	187
tyrosin	163	243

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

438

438

Př.: ESI MS/MS oligopeptidu s monofosforylovaným serinem

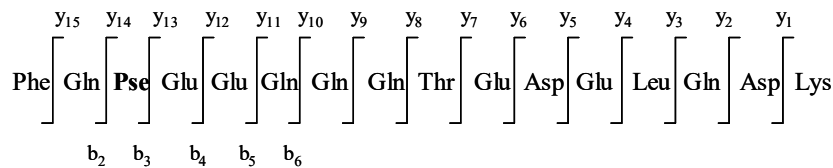


Hmotnostní spektrometrie biomolekul

439

439

Př.: ESI MS/MS oligopeptidu s monofosforylovaným serinem



Zdroje informací:

1. Molekulární píky MH₂²⁺ a (M - H₃PO₄)H₂²⁺, rozdíl $\Delta m = 98$ ($\Delta m/z = 49$)
2. b-ionty: $\Delta m/z$ (b₃-b₂)= 167
3. y-ionty: $\Delta m/z$ (y₁₄-y₁₃)= 167

(kredit: K. R. Jennings)

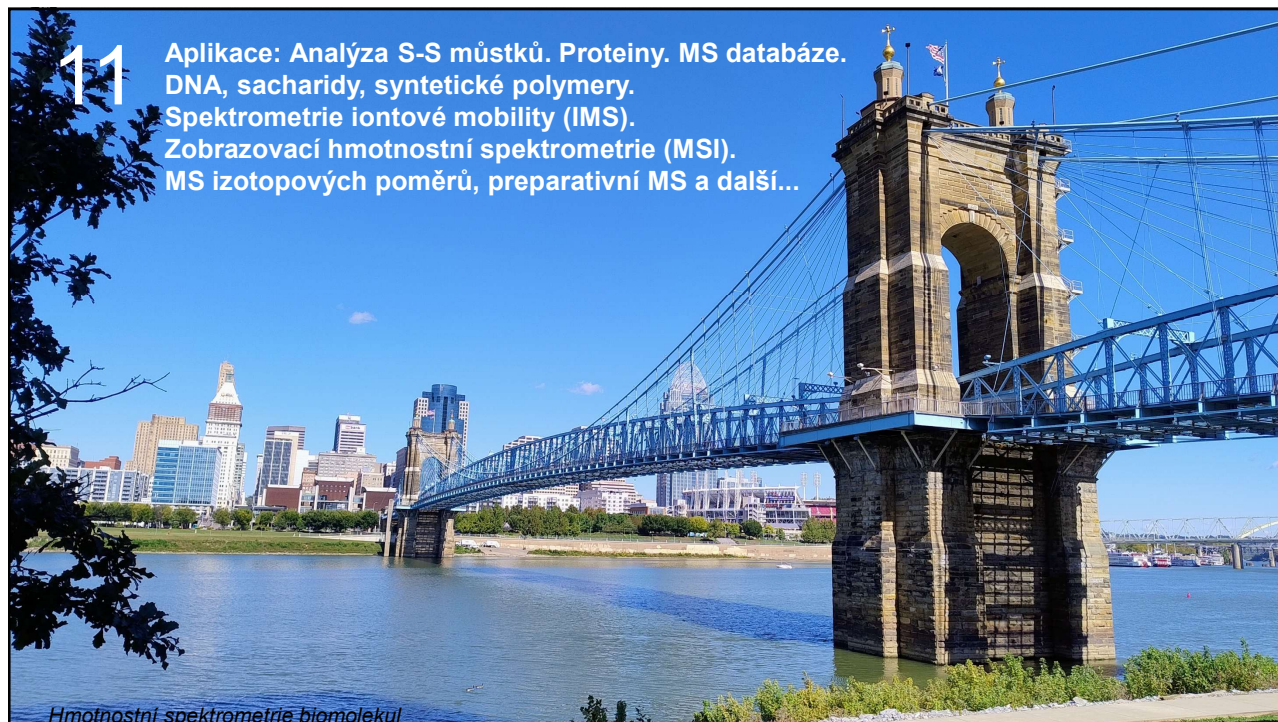
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

440

440

11

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



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

441

Analýza disulfidových můstků

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

Počet cysteinů – pomocí alkylatione cysteinu

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

Lokalizace cysteinů v proteinovém řetězci

Enzymatické štěpení a rozdělení digestu na 2 alikvoty:

1. alikvot ... MS analýza
2. alikvot ... redukce -S-S- (např. dithioerythritolem) a následná MS analýza

Porovnání 2. spektra s 1. spektrem:

1. $\Delta m = 2$ Da ⇒ peptid s **intramolekulární** -S-S- vazbou
 2. první pík zmizí, dva další s nižší m/z se objeví ⇒ **intermolekulární** můstek mezi 2 peptidy
- Znalost sekvence aminokyselin (MS-MS) umožní přesnou lokalizaci -S-S- můstků v proteinovém řetězci.



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

442

442

Vliv S-S můstků při ESI-MS

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

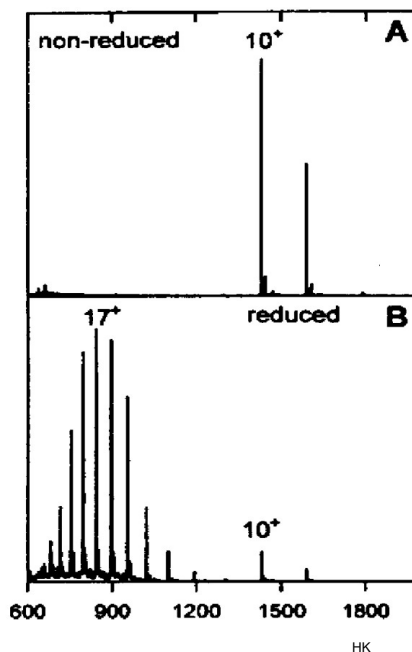
Redukce 1,4-dithiothreolem (DTT)
odstraní S-S můstky



„Unfolded“ protein s více obnaženými
bazickými rezidui aminokyselin



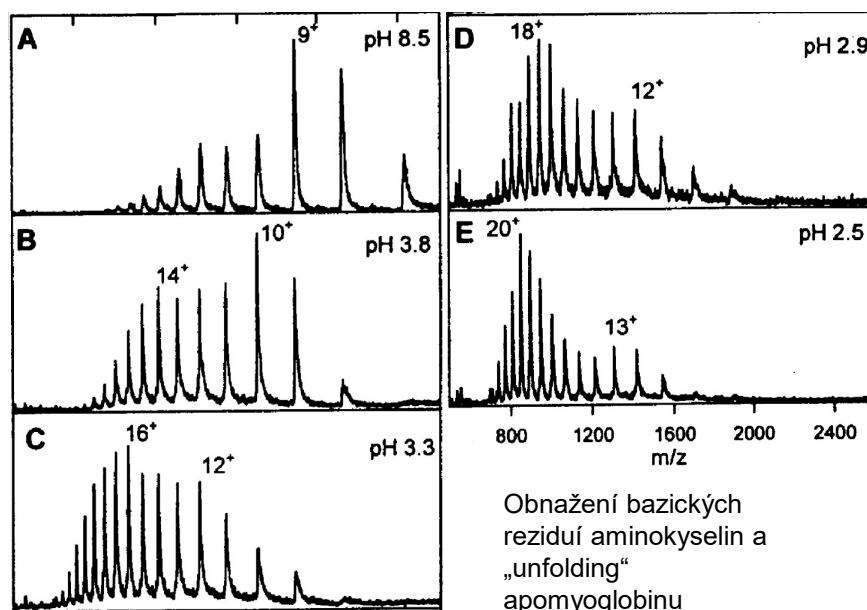
Vyšší počet nábojů iontu



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

443

443



Obnažení bazických
rezidui aminokyselin a
„unfolding“
apomyoglobinu

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

HK

444

444

Příklady: nanoelektrosprej MS

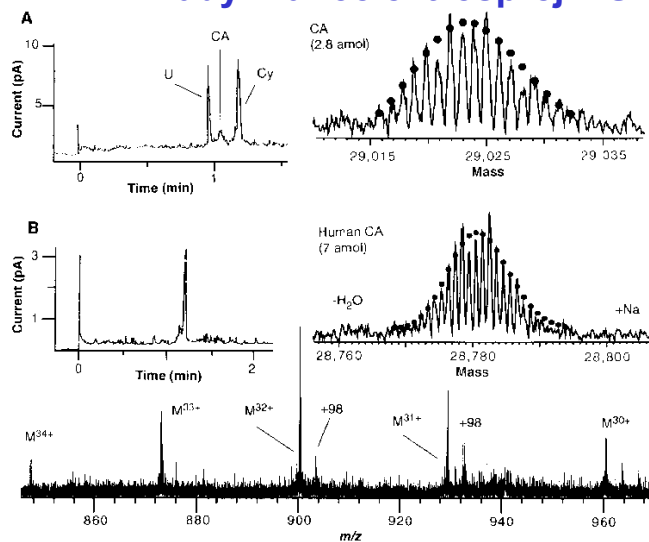


Fig. 1. Total ion electropherograms (at left) from (A) a mixture of 1 μ M bovine U, 50 nM bovine CA, and 1 μ M equine Cy and (B) 7 $\pm$ 2 amol of human CA from a crude blood isolate. Mass spectra (at right) of (A and B) the deconvoluted isotopic regions and (B, bottom) m/z 850 to 970 from subsequent injections (5 s at 63 V/cm) representing (A) 5.6×10^{-11} liter of bovine CA and (B) 7 $\pm$ 2 amol of human CA.

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

445

445

Nekovalentní interakce

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

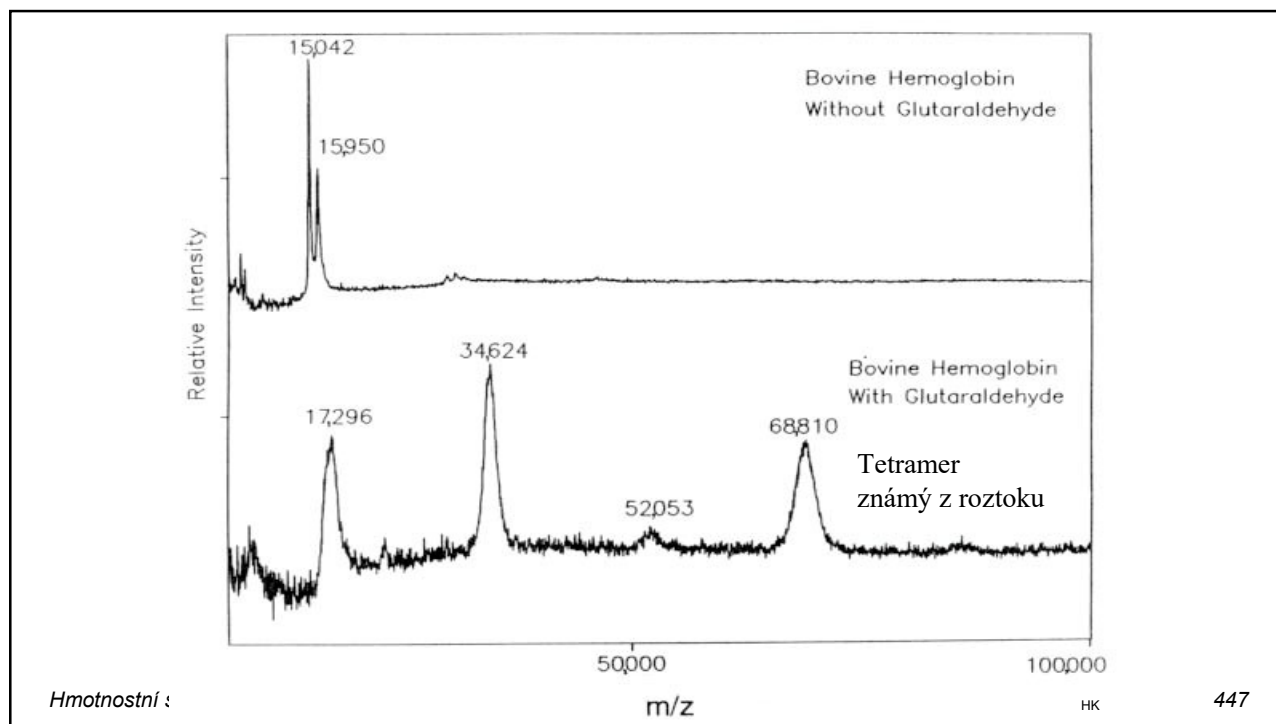
Př.

1. Komplexy hovězího hemoglobinu se stabilizují ve formě tetrameru vazbami (cross-linking) s glutaraldehydem (přemostění mezi lisylovými residui). 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 měkkých extrakčních podmínek, příhodných podmínek pro tvorbu komplexů v roztoku

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

446

446



447

Vědecké databáze na internetu

Uvedené databáze jsou pouze příklady, ne plný výčet.

A odkazy jsou značně proměnlivé v čase...

NCBI (National Center for Biotechnology Information)

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

Databáze pro organickou chemii

NIST Chemistry WebBook (NIST)

Spectra Online (ThermoGalactic)

Spectral Data Base System, SDBS (NI AIST)

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

448

448

Vědecké databáze na internetu

Internetové zdroje pro identifikaci proteinů pomocí MS metod

- Eidgenössische Technische Hochschule (MassSearch)
- European Molecular Biology Laboratory (PeptideSearch)
- Swiss Institute of Bioinformatics (ExPASy) www.expasy.ch/tools
- Matrix Science (Mascot) www.matrixscience.com
- Rockefeller University (PepFrag, ProFound)
- Human Genome Research Center (MOWSE)
- University of California (MS-Tag, MS-Fit, MS-Seq) prospector.ucsf.edu
- Institute for Systems Biology (COMET) www.systemsbiology.org
- University of Washington (SEQUEST)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

449

449

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

450

450

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

451

451

MALDI MS nuklevých 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

452

452

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

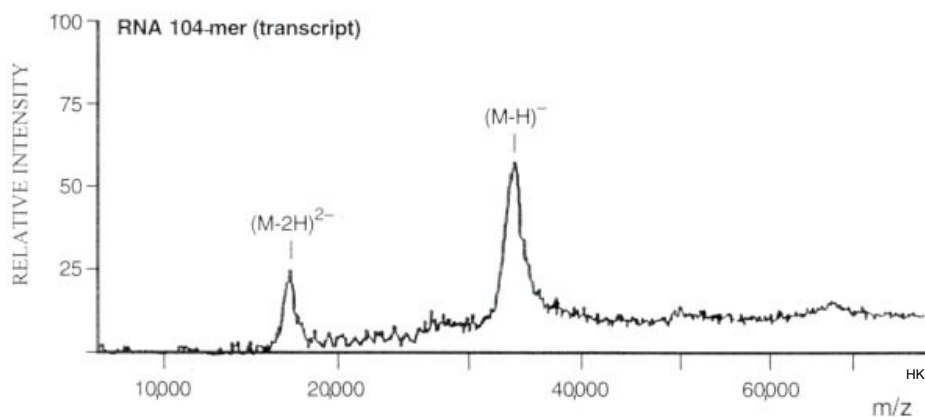
Berkenkamp, S; Kirpekar, F; Hillenkamp, F *Science* **1998**, 281, 260-262.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

453

453

IR MALDI MS ribonukleové kyseliny



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

454

454

Sekvenování NA pomocí exonukleázy a MALDI MS

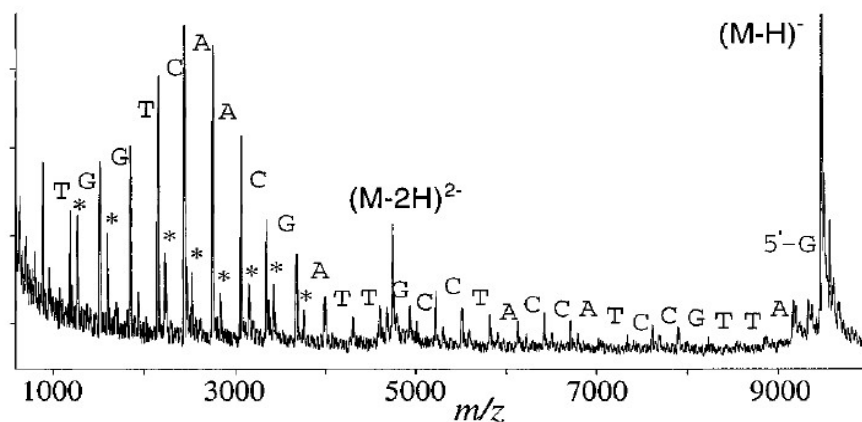


Figure 4. DE MALDI mass spectrum of a crude synthetic DNA 31-mer ($M_r = 9486.2$ calculated). Mass measurements on the failure products define the sequence up the 3' trinucleotide (see Table 1). Asterisks indicate +80-Da satellite peaks: instrument, 1.3 m linear; matrix, 3-HPA.

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

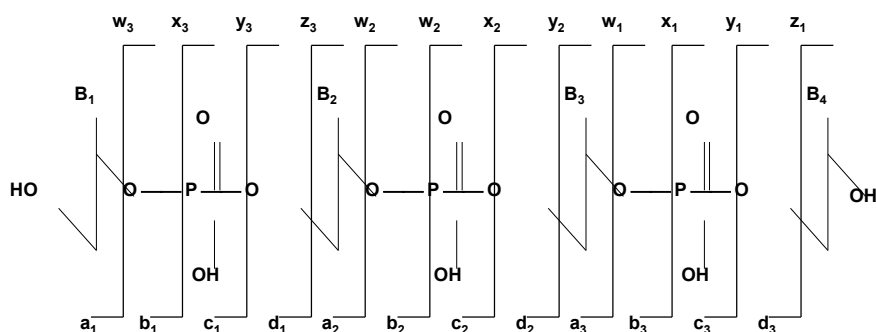
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

455

455

Fragmentace oligonukleotidů v plynné fázi

Schéma fragmentace oligonukleotidů v plynné fázi a značení fragmentů



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

456

456

Analýza sacharidů

- Měkké ionizační metody: MALDI, ESI. MSⁿ pro stanovení sekvence a struktury
- Přídavek soli – 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

457

457

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 glycosidických 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 CrO₃ β-anomeru derivatizovaných hexóz za vzniku ketoesteru.

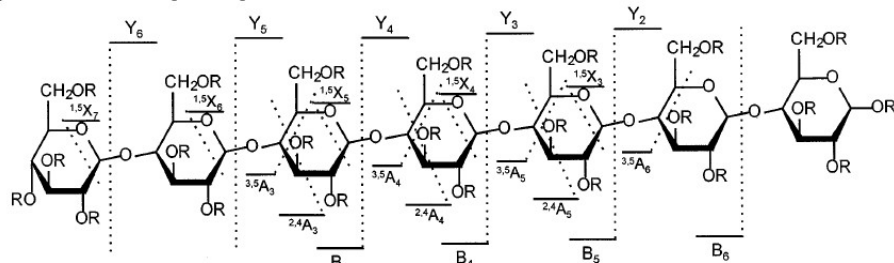
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

458

458

MSⁿ oligosacharidů

a) MS² of 1497.8, [M+Na]⁺ >



Ion fragments produced upon (a) MS², (b) MS³ and (c) MS⁴ of permethylated maltoheptaose.



Maltoheptaose

Zdroj: Weiskopf, A. S.; Vouros, P. and Harvey, D. J. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **1997**, 11, 1493–1504.

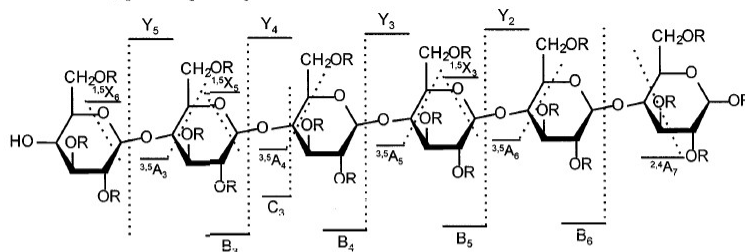
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

459

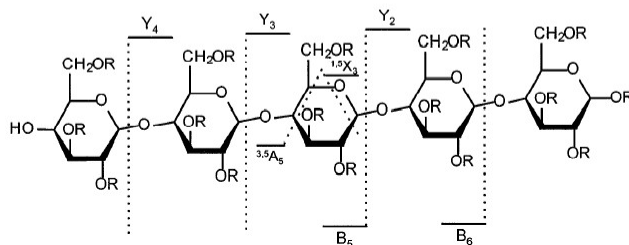
459

MSⁿ oligosacharidů

b) MS³ of 1279.6, [M+Na]⁺ > Y₆ >



c) MS⁴ of 1075.5, [M+Na]⁺ > Y₆ > Y₅ >



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

460

460

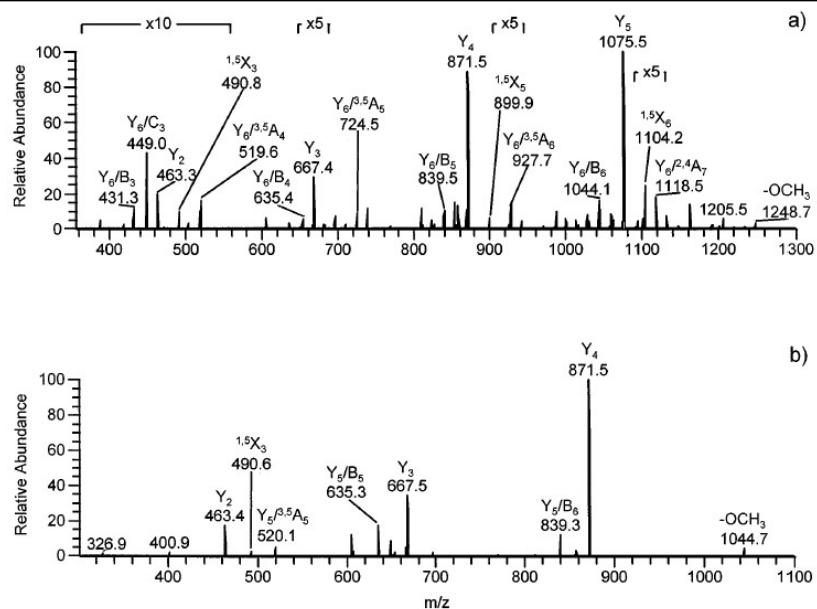


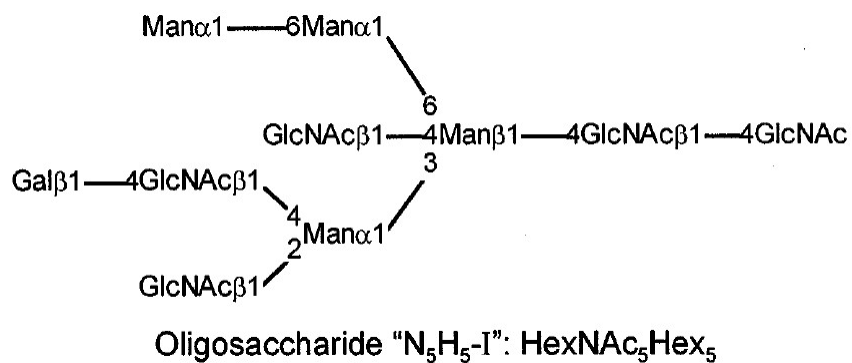
Figure 3. (a) MS³ of permethylated maltoheptaose, m/z 1497.8 $\rightarrow$ 1279.6 $\rightarrow$. (b) MS⁴ of permethylated maltoheptaose, m/z 1497.8 $\rightarrow$ 1279.6 $\rightarrow$ 1075.5 $\rightarrow$.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

461

461

MSⁿ oligosacharidů

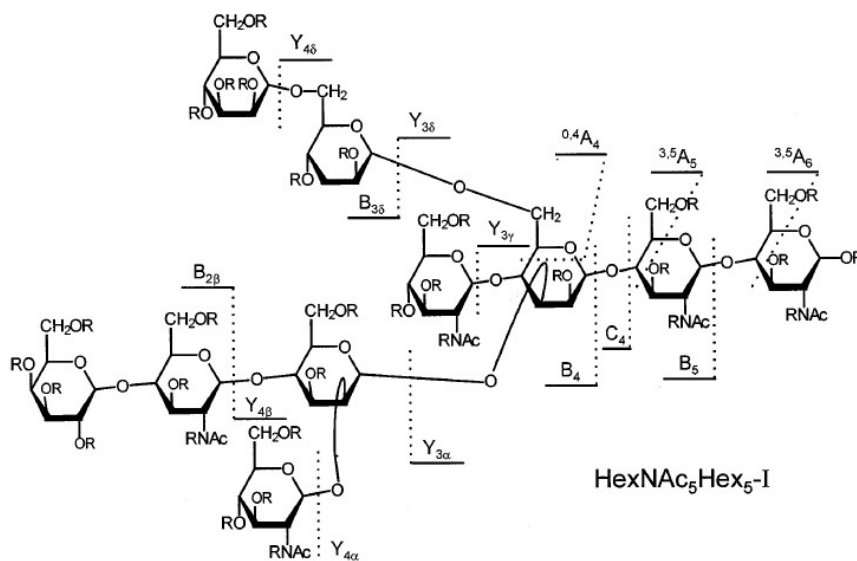


Hmotnostní spektrometrie biomolekul

462

462

MSⁿ oligosacharidů



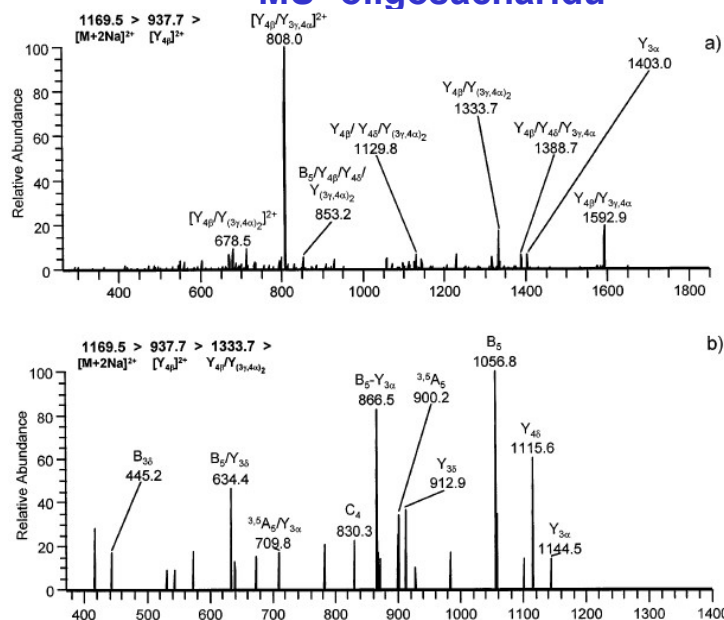
HexNAc₅Hex₅-I

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

463

463

MSⁿ oligosacharidů



MSⁿ characterization of the HexNAc₅Hex₅-I isomer from chicken ovalbumin. (a) MS 3 — m/z 1169.5 → 937.7 →, (b) MS 4 — m/z 1169.5 → 937.7 → 1333.7 →

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

464

464

Lipidy

Lipidomika

- analýza lipidů: mastné kyseliny, acylglyceroly, deriváty cholesterolu, fosfolipidy a glykolipidy...
- podmnožina metabolomiky
- ESI, APCI, MALDI, FAB, DCI (desorpční chemická ionizace)
- Negativní ($[M-H]^-$ ionty), příp. pozitivní mód
- LC-MS/MS², SFC-MS/MS²

Fragmentace

fosfolipidový anion

fragmenty sacharidů

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

465

465

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

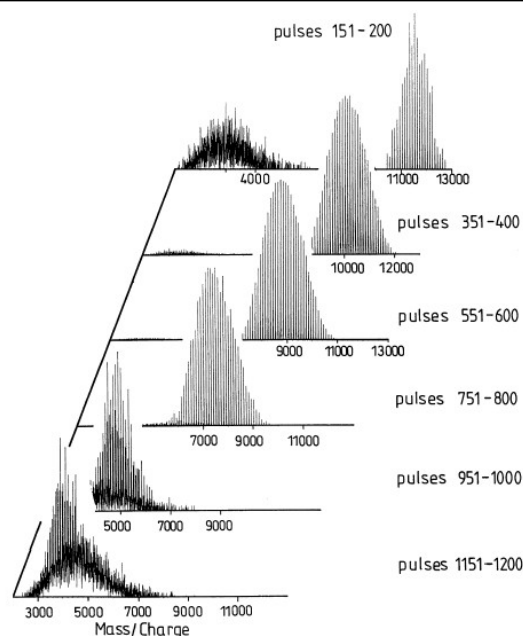
Tvorba aduktů s Na^+ , K^+
Hmotnostní diskriminace ... ionizační i detekční účinnosti = $f(m)$
Správná transformace z časové do hmotnostní domény

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

466

466



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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

467

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

467

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

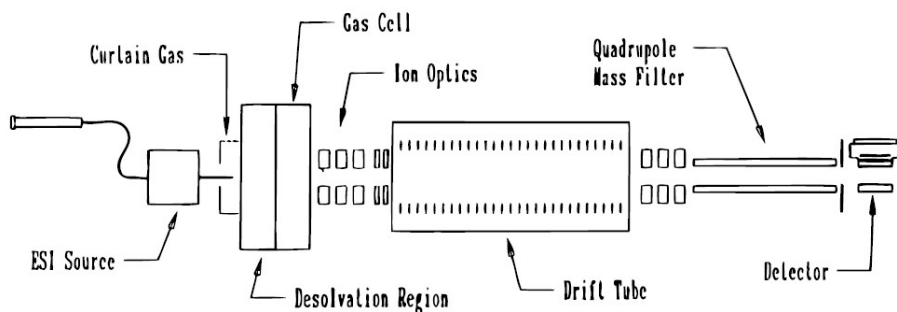
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

468

468

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, N₂), $E \sim 10$ -50 V/cm, $l \sim 10$ - 100 cm



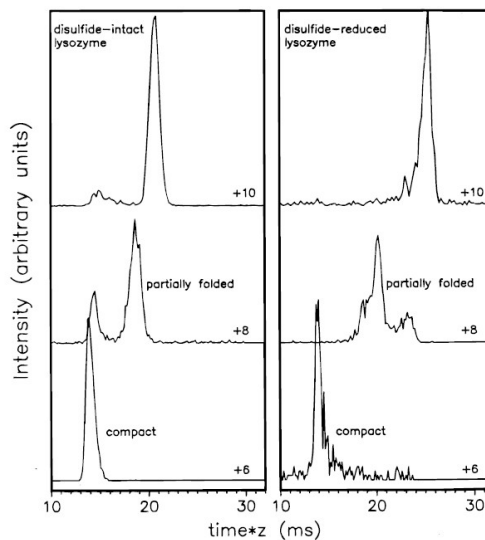
Clemmer D. E., Jarrold M. F. *J. Mass Spectrom* **1997**, *32*, 577-592.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

469

469

IM spektra lysozymu v závislosti na jeho konformaci



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

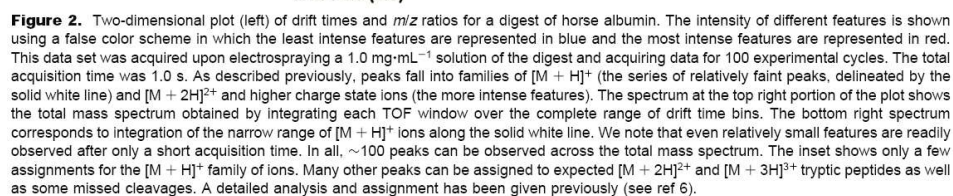
Figure 11. Drift time distributions recorded for the +6, +8 and +10 charge states of lysozyme that were electrosprayed from disulfide-intact (left) and disulfide-reduced (right) solutions. The +8 and +10 disulfide-intact ions were obtained by direct electrospray ionization. All other charge states were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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

470

470

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



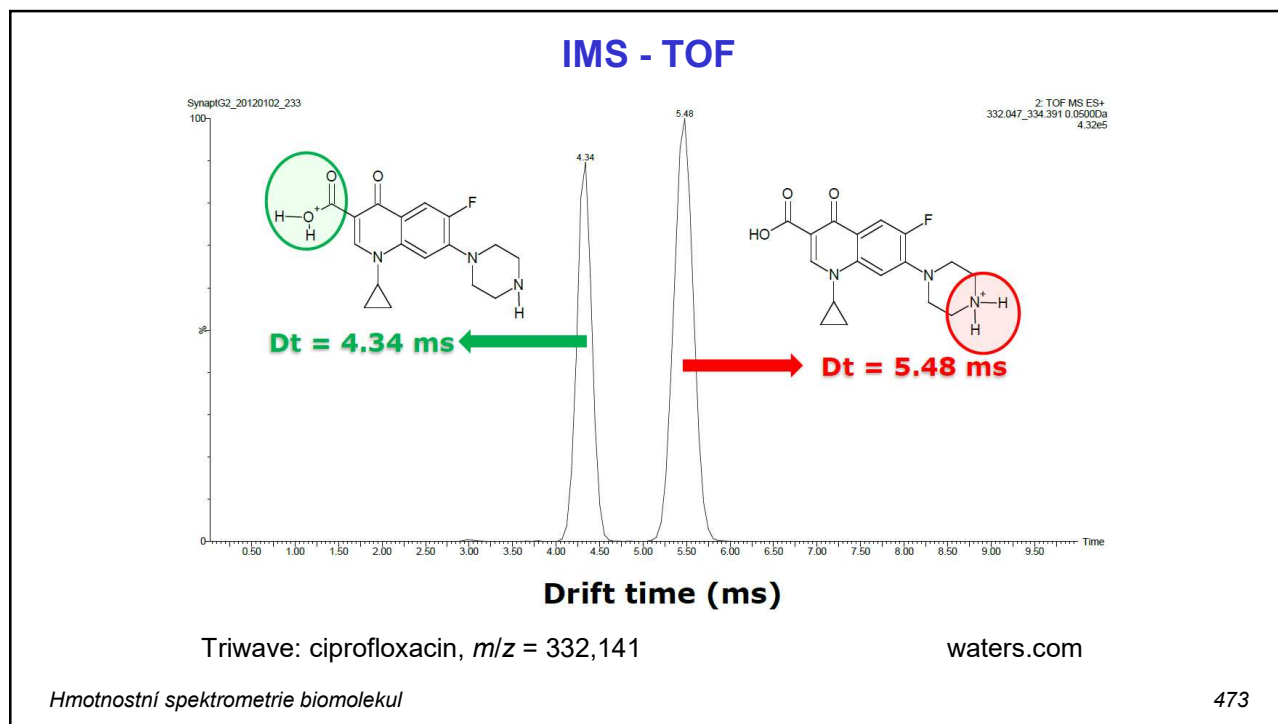
471

Př. 2: IMS – TOF

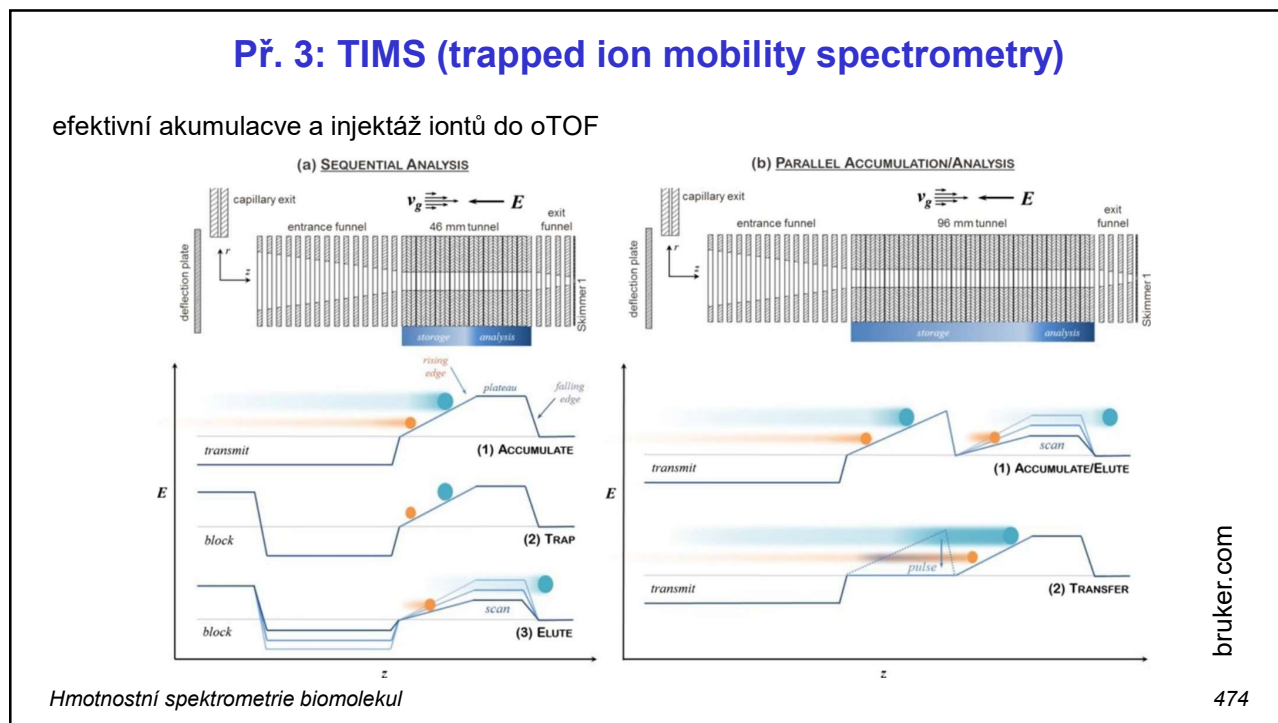
The diagram illustrates the components and layout of a hybrid ion-TOF-MS instrument. The ion path starts with an **Analyte Spray** and a **Reference Spray** entering a **T-Wave Ion Guide**. The ions then pass through a **Quadrupole** mass filter, a **DRE Lens**, and a **TRIMWAVE** ion mobility separation region. This region includes a **TRAP**, **ION MOBILITY SEPARATION**, and **TRANSFER** stage. The ions are then pushed by a **Pusher** into a **Detector**. The system is maintained by an **Oil-Free Scroll Pump** and **Air-Cooled Turbomolecular Pumps**.

472

236



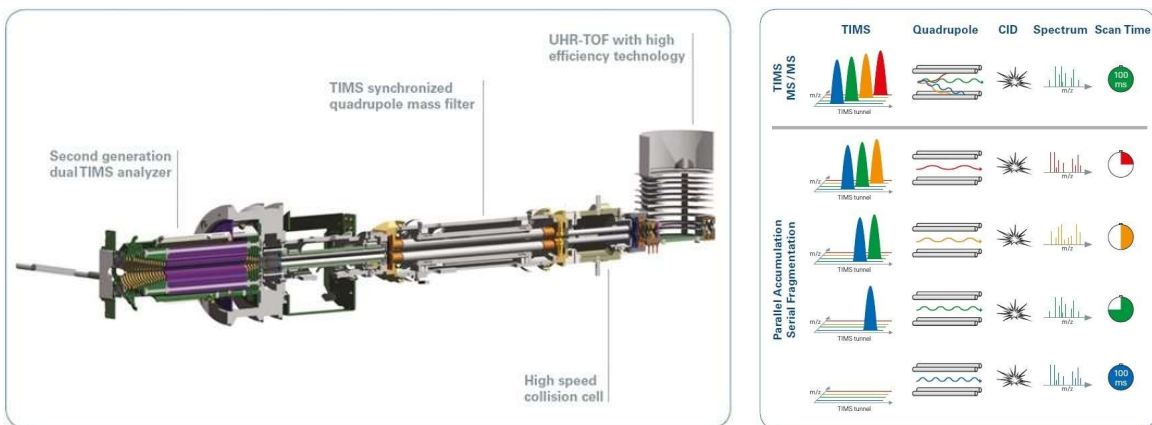
473



474

TIMS - PASEF

parallel accumulation serial fragmentation - trapped ion mobility spectrometry



bruker.com

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

475

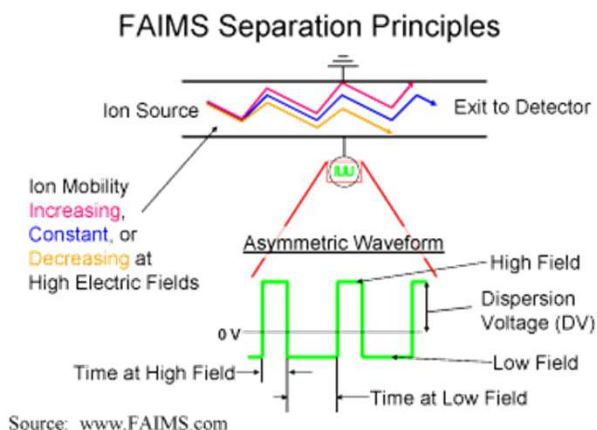
475

Př. 4: DMS, FAIMS

Differential (ion) mobility spectrometry

Field asymmetric waveform ion mobility spectrometry

- zařazení jednoduché cely **před** vstup do hmotnostního spektrometru
- různá konstrukční řešení cely
- vhodné jako úprava před MS



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

476

476

Využití IMS

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

477

477

Zobrazovací hmotnostní spektrometrie, MSI

MSI ... mass spectrometry imaging

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

Ionizační techniky (a limit laterálního rozlišení):

- SIMS: 10 nm
- MALDI: μm
- DESI: 100 μm

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

478

478

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

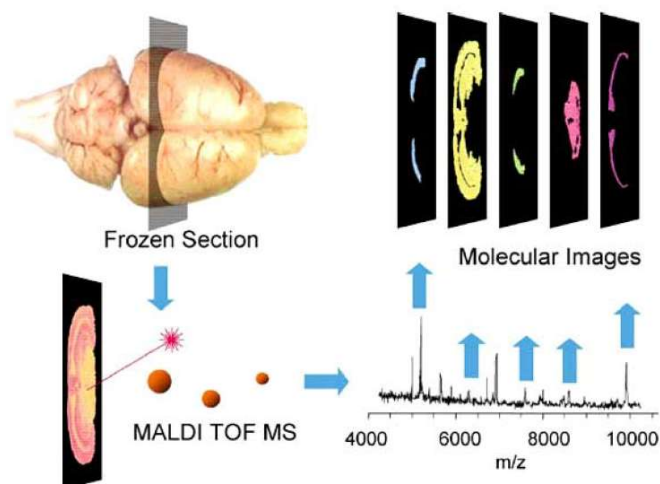
Pozn.: DESI MSI není limitována zaostřením částic ve vakuu

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

479

479

MSI



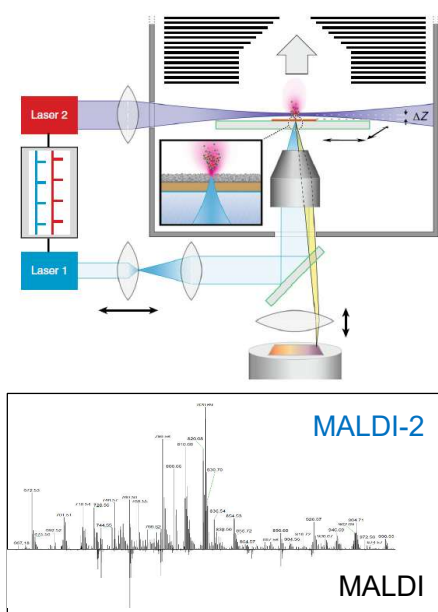
Stoeckli, M.; Staab, D.; Staudenbiel, M.; Wiederhold, K.H. Anal. Biochem., 2002, 311, 33-39

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

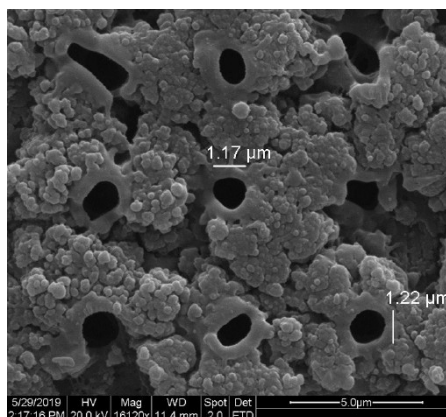
480

480

MALDI-2 MSI v transmisním modu



Desorpční laser
Fotoionizační laser
Obrácená (transmisní) geometrie



SEM 6μm řezu myšního mozku

M. Niehaus, J. Soltwisch, M. E. Belov, K. Dreisewerd:
Transmission-mode MALDI-2 mass spectrometry imaging
of cells and tissues at subcellular resolution, *Nature
Methods* 2019, 16, 925-931.

481

481

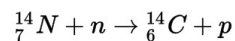
Hmotnostní spektrometrie izotopových poměrů

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. (H_2 , N_2 , CO_2 , SO_2)
- standard pro C: *Pee Dee Belemnite* (PDB), vápencový fosilní belemnit, $^{13}C:^{12}C = 0.0112372$

Příklady

1. radiokarbonová metoda datování, např. $\delta^{13}C_{Sample} = \left(\frac{^{13}C/^{12}C_{Sample}}{^{13}C/^{12}C_{PDB}} - 1 \right) \cdot 1000$
(β čítač, AMS – urychlovací MS)



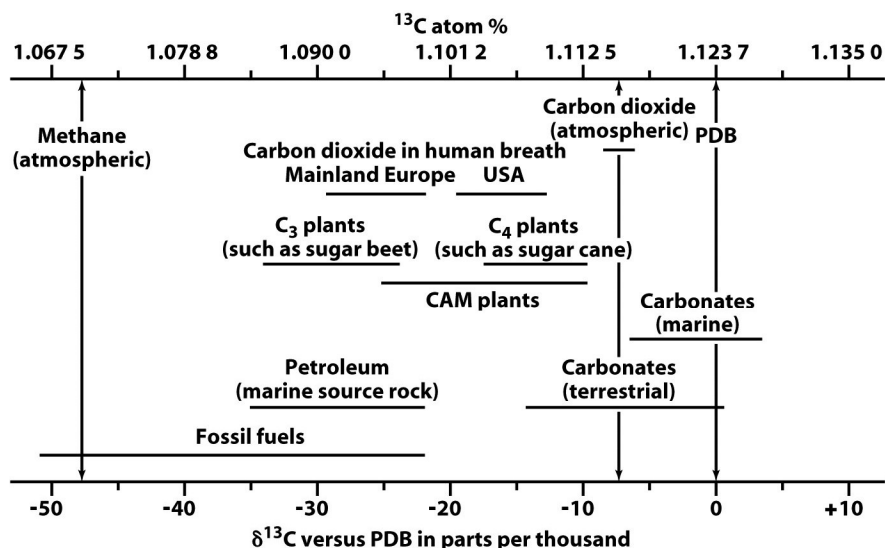
2. určení původu biologického vzorku z izotopového poměru C ($\delta^{13}C$)
metabolismus rostlin: C_3 (85% rostlin: rýže, pšenice, brambory, řepa), C_4 (kukuřice, třtina), CAM (pouštní rostliny)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

482

482

Stanovení izotopových poměrů $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$



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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

483

483

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 anexe 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 n^0 s U

Alfred O. Nier připravil v MS vzorky ^{235}U a ^{238}U

John Dunning prokázal, že ^{235}U je zodpovědný za štěpení

... položen teoretický základ jaderné bomby

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

484

484

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% ^{235}U /den ve dvou stupních (přírodní zastoupení 0.72%)

Celkem 43 kg/bombu během 18 měsíců z > 5 tun přírodního uranu

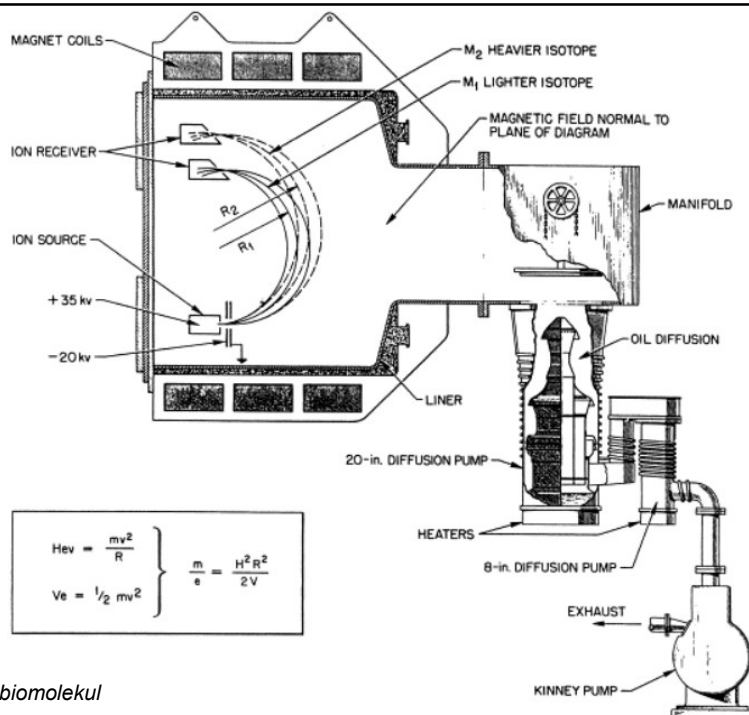
Po r. 1945 na přípravu izotopů pro výzkumné účely

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

485

485

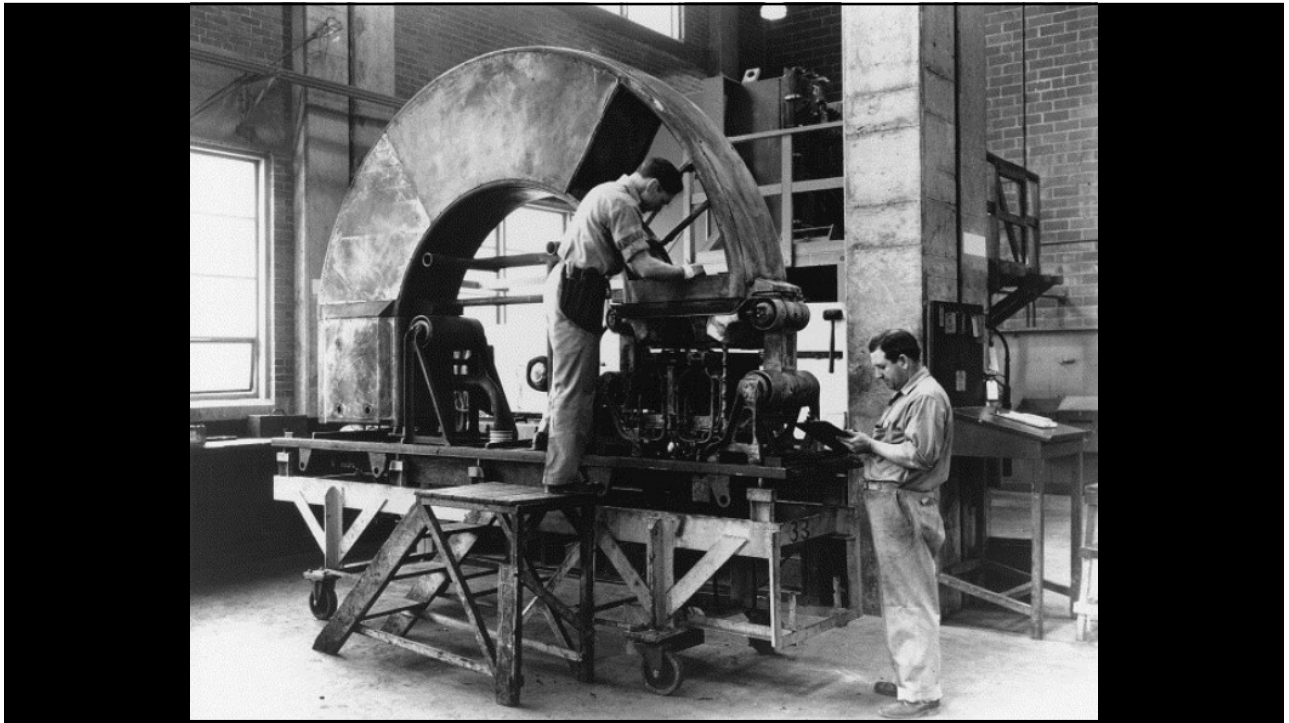
Schéma 2. stupně



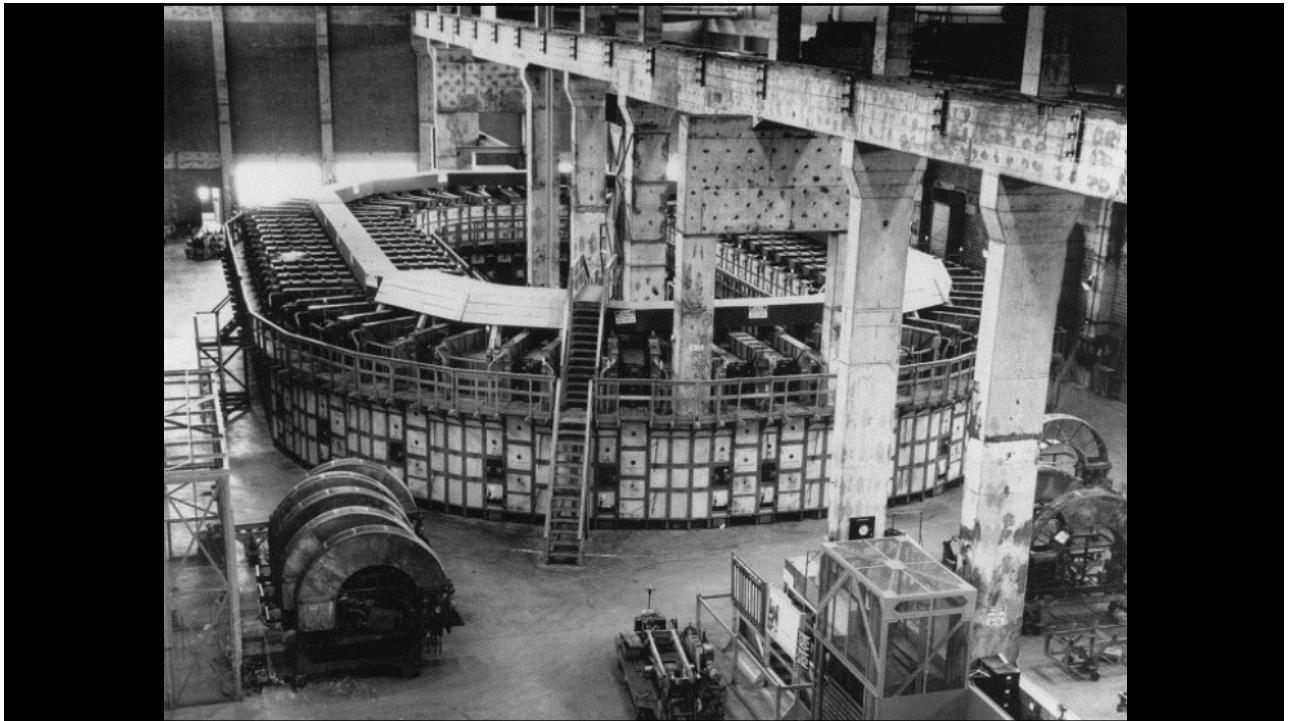
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

486

486



487



488



489

MS s ultravysokým rozlišením

konvence	<i>R</i>	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/>

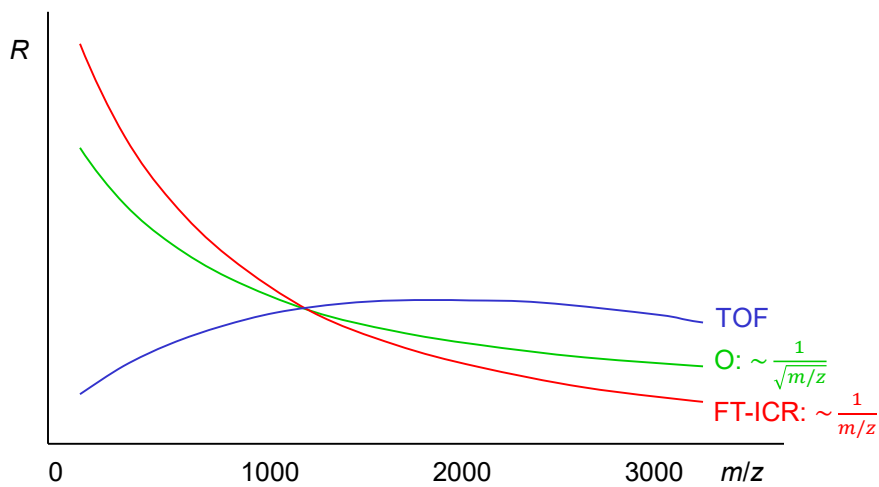
rozlišovací schopnost je funkcí m/z

rozlišovací schopnost vs. rychlost skenu (zvlášť pro FT-MS)

S/N roste s akumulací skenů (všechny MS)

490

Rozlišovací schopnost vs. m/z



Důležitý je trend závislosti, nejen absolutní hodnota R

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

491

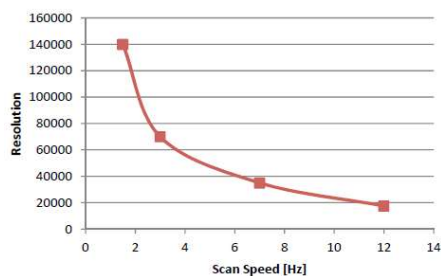
491

Příklad specifikace komerčního FT-MS

Přístroj: Q-O-LIT (Q-Exactive)

Zdroj: ThermoFisher Scientific

Resolution at m/z 200	Resolution at m/z 400	Max. scan speed (Hz)
17.500	12.500	12
35.000	25.000	7
70.000	50.000	3
140.000	100.000	1.5



Scan rate	12 Hz
Max resolution	140K at m/z 200 (280k optional)
Quad isolation	Step-less from full mass range down to 0.4 amu
Mass Accuracy	3 ppm external, 1 ppm internal
Dissociation	Source in source CID, HCD
Multiplexing	Up to 10 precursor ions
Detectors	Orbitrap
Polarity Switching	1 sec cycle time (@ RES 35k)
Scan Functions	FS: Full Scan, AIF: All Ion Fragmentation, SIM: Selected Ion Monitoring, PRM: Parallel Reaction Monitoring, DIA: Data Independent Acquisition, ddHCD: data dependent HCD

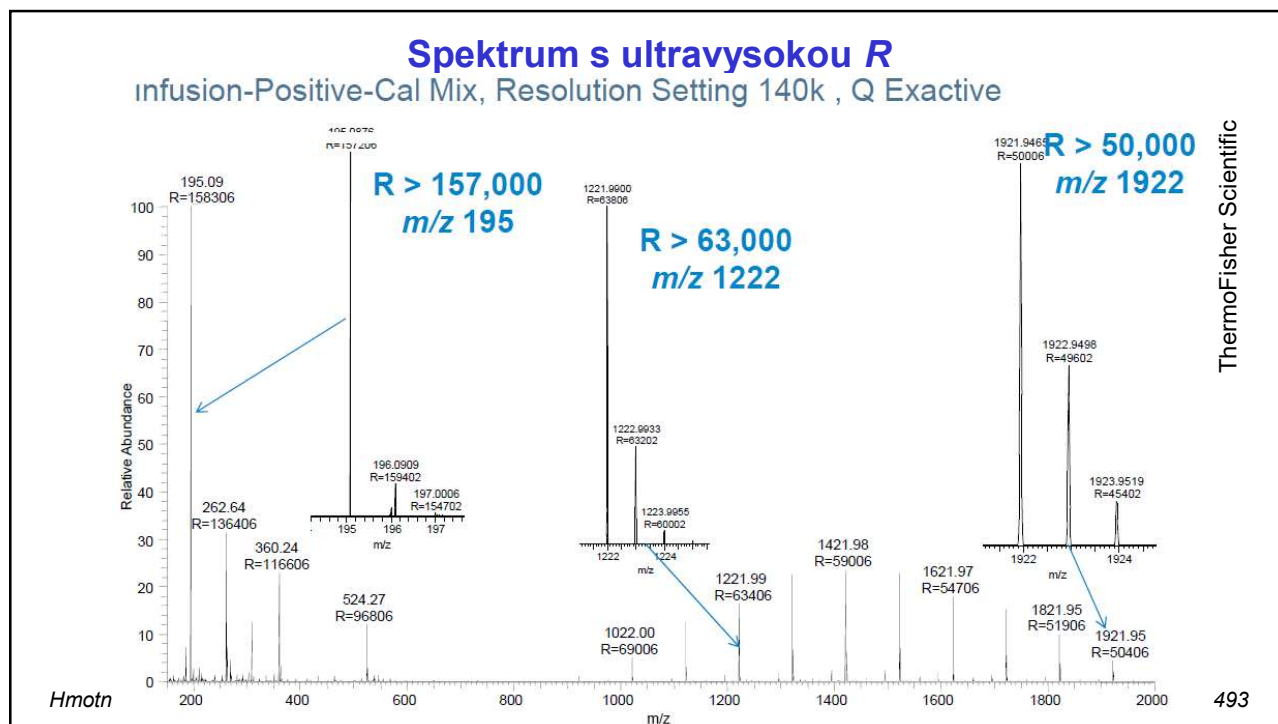


ThermoFisher Scientific

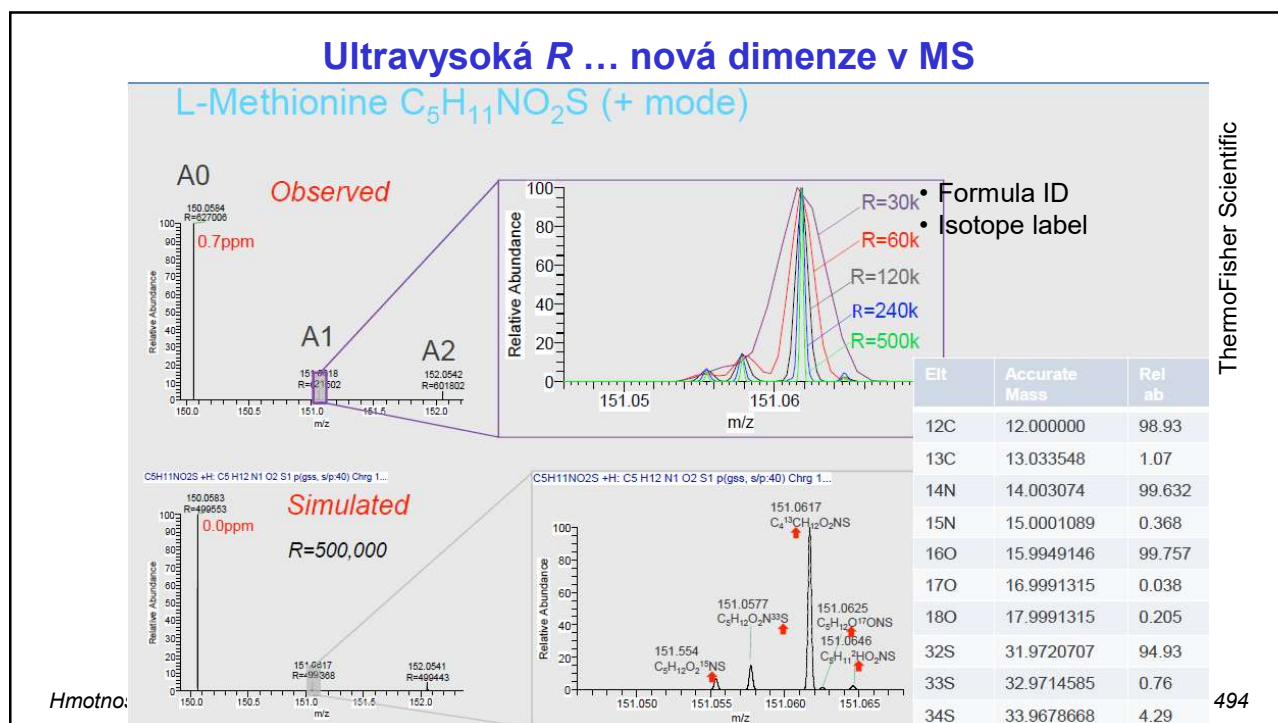
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

492

492



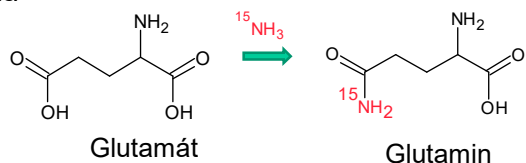
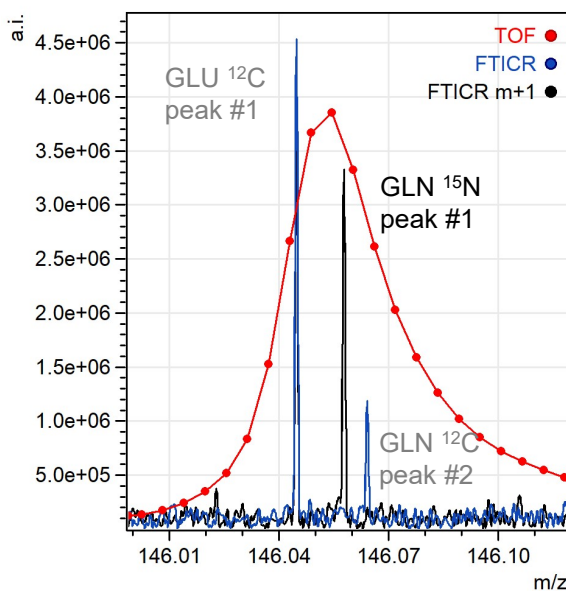
493



494

Rozlišení

Metabolizace volného amoniaku



GLU - Glutamát

$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$ [M-H]⁻ 146.045881

GLN - Glutamin

$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$ [M-H]⁻ 145.061866

$^{13}\text{C}_4\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$ [M-H]⁻ 146.0645

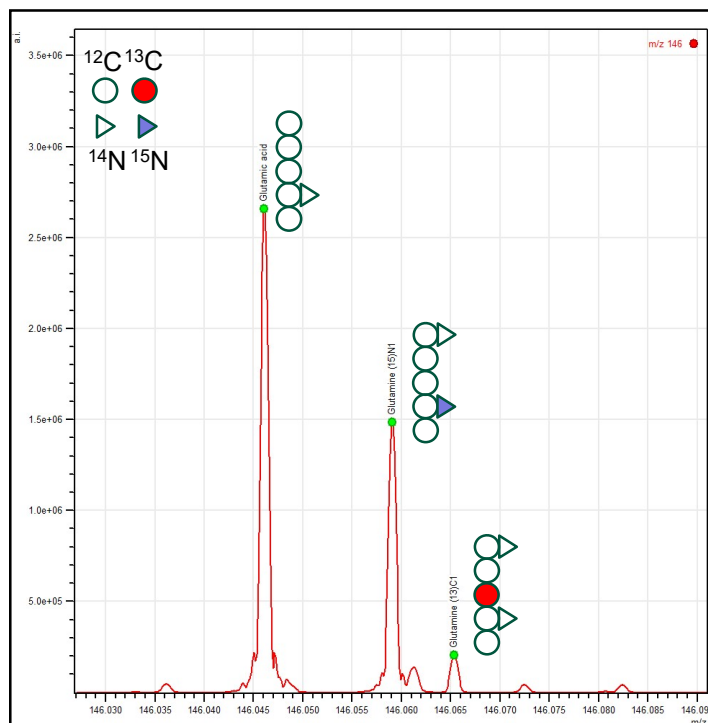
^{15}N GLN - ^{15}N Glutamin

$\text{C}_5\text{H}_{10}^{15}\text{NNO}_3$ [M-H]⁻ 146.058901

Kredit: Lukáš Kučera, Petr Pompach, Jiří Neužil a Renata Zobalová (Biocev, AV ČR)

495

495



Metabolizace $^{13}\text{C}_5$ $^{15}\text{N}_2$ glutaminu
v citrátovém cyklu

FTICR data – MSI jater

Lukáš Kučera, Petr Pompach, Jiří
Neužil a Renata Zobalová (Biocev,
AV ČR)

496

PASEF (Parallel Accumulation–Serial Fragmentation)

Metoda záznamu dat pomocí **timsTOF**.

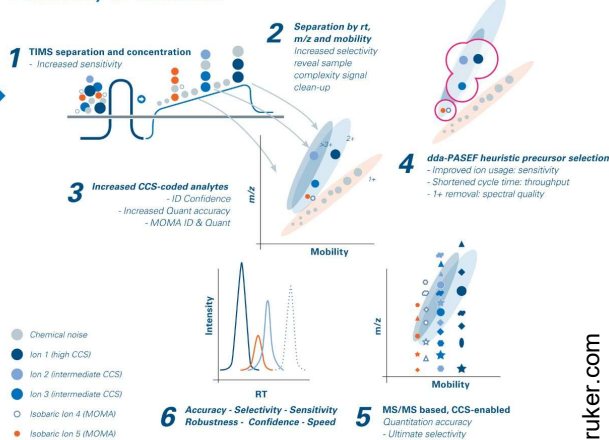
Paralelní akumulace: V první části duální cely TIMS se přicházející ionty průběžně zachycují a akumulují. Nedochozí tak k žádným ztrátám vzorku během fragmentace předchozích iontů.

Sériová fragmentace: Ve druhé části cely se ionty postupně uvolňují na základě své iontové mobility. Během jednoho uvolňovacího cyklu (cca 100 ms) dokáže rychlý kvadrupól přepínat a postupně izolovat několik různých prekurzorů, které jsou poté fragmentovány.

Frekvence MS/MS záznamu ~100 Hz.

dda-PASEF

Powered by 4D-Multimics



bruker.com

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

497

497

12 Otázky & konzultace



Hmotnostní spektrometrie biomolekul

498

498

V. Otázky & konzultace

Jan Preisler

312A14, Ústav chemie, UKB, Kamenice 5

tel.: 54949 6629, preisler@chemi.muni.cz

Aktualizovaný studijní materiál ke stažení ve formátu pdf:

IS nebo <http://bart.chemi.muni.cz/courses/>

Další konzultace v mé kanceláři po domluvě.

Termíny zkoušek

Prosinec?

Leden.

Únor?

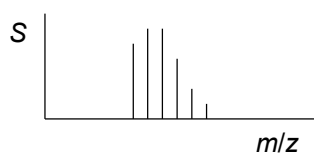
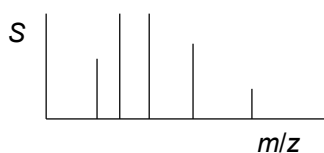
Hmotnostní spektrometrie biomolekul

499

499

Příklady otázek

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 $m/z = 0 - 1\,000$, b) v režimu single ion monitoring, c) při produktovém skenu

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

500

500

Příklady otázek

7. Proč je výhodné použít při měření izotopového poměru daného prvku přístroj, který stanovuje oba izotopy zároveň?
8. Lze použít kvadrupólový filtr k analýze proteinu o hmotnosti 30 000 Da?
9. Jakou ionizační metodu a jaký hmotnostní spektrometr navrhujete 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 rychlostí dvou iontů o $m = 100$ a.m.u., $z = 2$, počátečních rychlostí $v_{01} = 100$ m/s a $v_{02} = 200$ m/s po urychlení potenciálem 1 kV a 10 kV?

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

501

501

Příklady otázek

13. Existuje praktický limit maximální m/z TOF MS?
14. Srovnejte možná uskalí stanovení peptidů a oligomerů DNA pomocí MS.
15. Vaším úkolem 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 qTOFu?
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

502

502

Příklady otázek

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