

# Hmotnostní spektrometrie

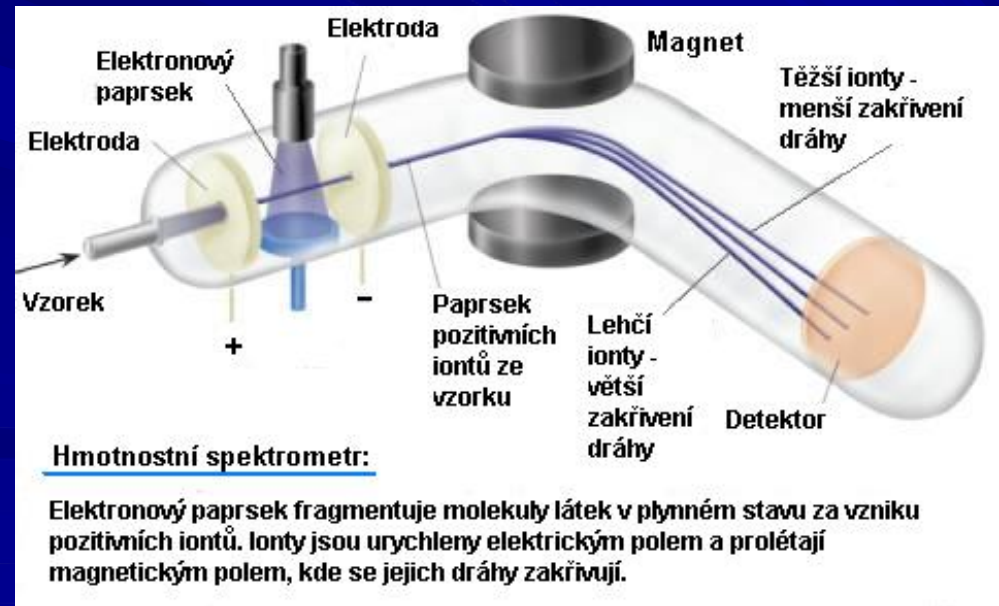
RNDr. Alena Mikušková

FN Brno – Pracoviště dětské medicíny, OKB

[amikuskova@fnbrno.cz](mailto:amikuskova@fnbrno.cz)

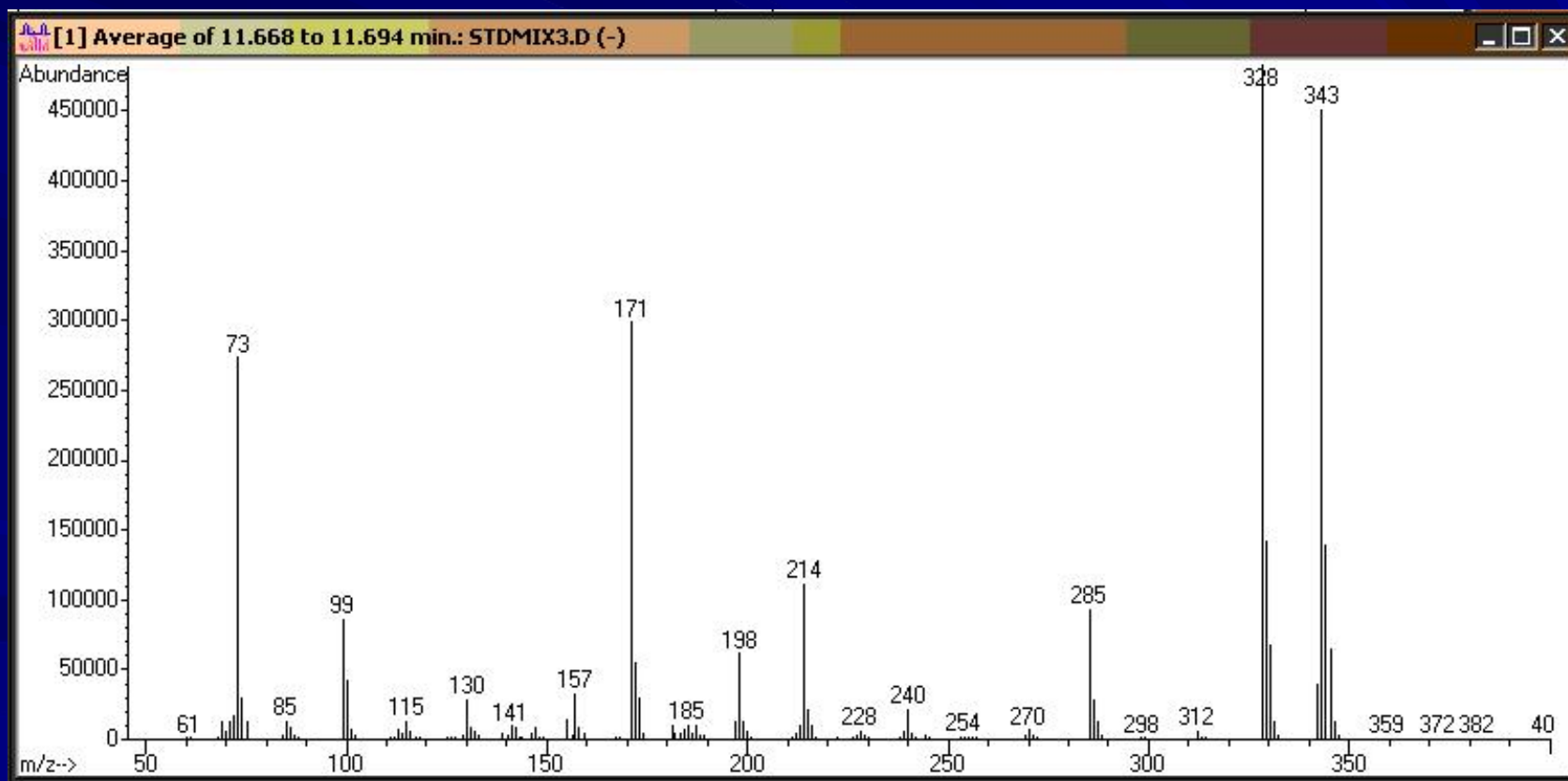
# Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)

- fyzikálně-chemická metoda, využívá separace urychlených ionizovaných částic ve vakuu **podle jejich hmotnosti** při jejich průchodu magnetickými a elektrickými poli.
- **MS** vyvinuta počátkem 20.století, v klinické biochemii se užívá již několik desetiletí pro identifikaci a stanovení nízkomolekulárních látek na základě měření hmotnosti jejich molekul (detekce látek ve spojení s plynovou chromatografií)
- V první polovině 90. let 20.století - nové techniky, které umožnily využívat metodu i pro látky vysokomolekulární
- **MS** se stala nejdynamičtěji se rozvíjející metodikou současné biochemie (vedle metod molekulové genetiky)



# Hmotnostní spektrum

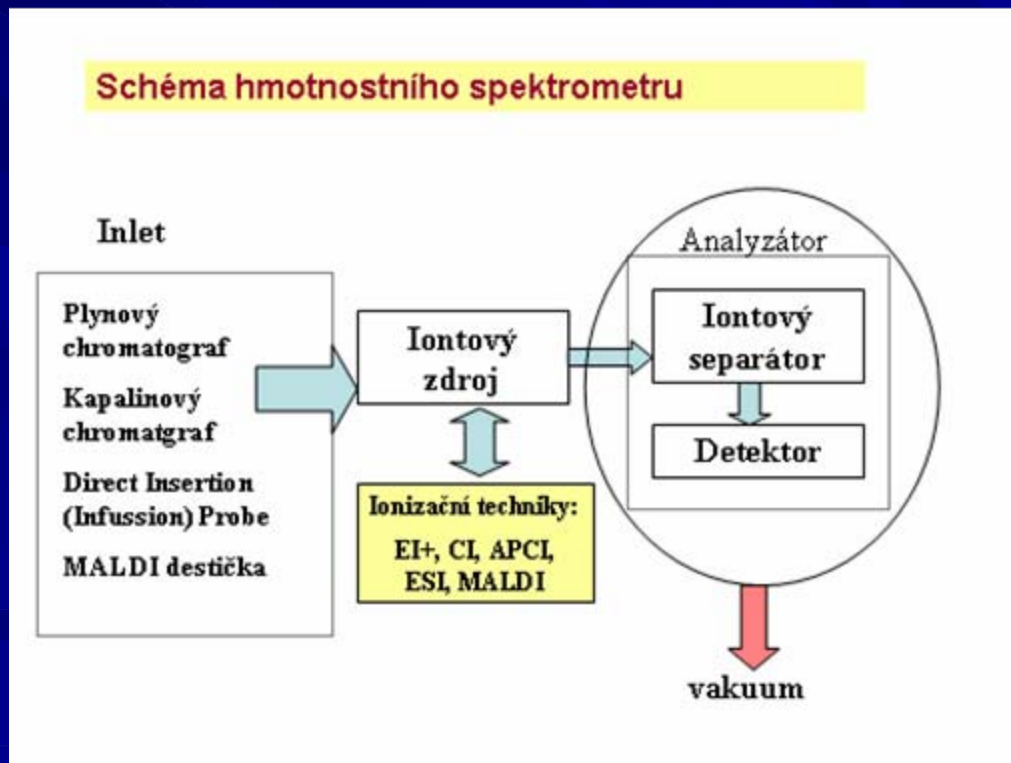
Výstupem MS je hmotnostní spektrum – čarový diagram, na jehož vodorovné ose je hodnota  $m/z$  (hmotnost / náboj iontu) a na svislé ose odezva detektoru nebo relativní zastoupení daného iontu:



# Hmotnostní spektrometr

Složený ze tří funkčních celků:

- **Iontový zdroj:** ionizace neutrálních molekul měřené směsi: molekula analytu je převedena do plynné fáze (do vysokého vakua), přičemž získává charakteristický náboj.
- **Iontový separátor:** rozdělení iontů různých hmotností - ion je urychlen a z charakteru jeho pohybu vakuovaným prostorem lze vypočítat poměr jeho hmotnosti a náboje  $m/z$
- **Detektor:** detekce iontů po jejich separaci podle hodnoty  $m/z$  a určení relativní intenzity (četnosti) jednotlivých iontů



# Iontový zdroj - Ionizační techniky

- Existuje celá řada ionizačních technik, cílem je vždy vytvořit nabitou částici, která je následně analyzována
- Použitá ionizační technika záleží na tom, na jakou separační metodu je MS napojen (GC/MS, LC/MS, bez napojení na separační techniku)

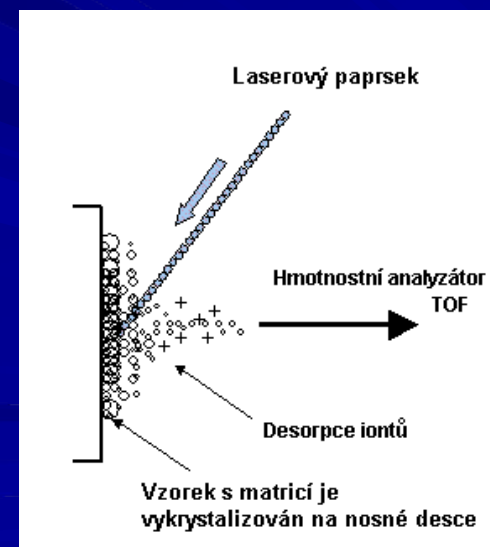
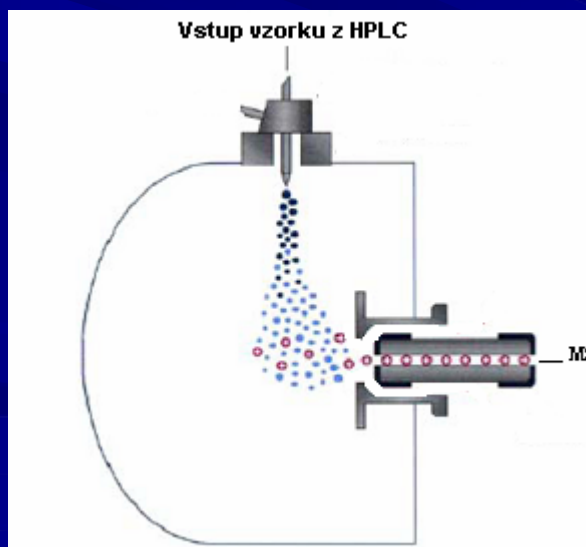
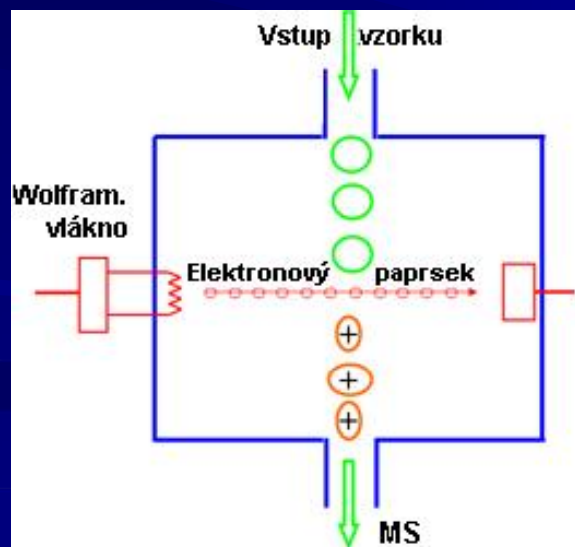
GC/MS:

- Elektronová ionizace **EI**
- Chemická ionizace **CI**

LC/MS, CE/MS,

- MS s přímým nástřikem
- Elektrospray **ESI**

**MALDI (SELDI)**

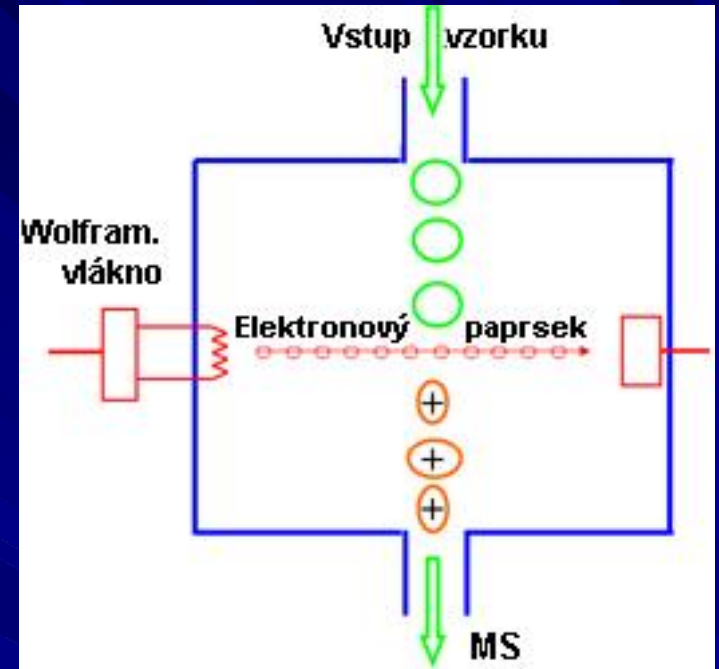


# Elektronová ionizace, EI

- V iontovém zdroji dochází k ionizaci molekul analytu v plynném stavu pomocí proudu elektronů:
  - Z molekuly je při srážce s paprskem elektronů odtržen elektron (molekula získává kladný náboj)
  - Následně dochází k fragmentaci (rozpadu) molekuly přebytkem energie

## EI - tvrdá ionizační technika (fragmentace)

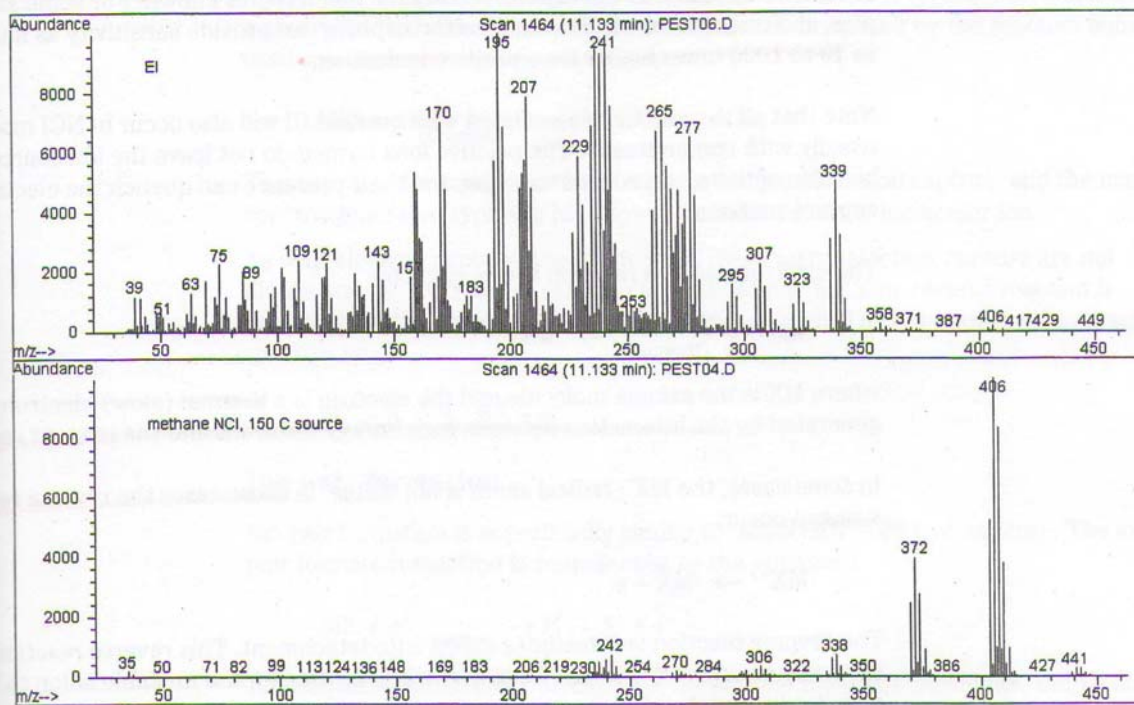
- fragmenty jsou rozděleny v další části analyzátoru podle hodnoty  $m/z$  a detegovány (separace magnetickým analyzátozem, kvadrupólem)
- Pouze pro teplotně stálé nízkomolekulární látky



# Chemická ionizace CI

- „Měkčí“ varianta elektronové ionizace
- Do iontového zdroje je přiváděn ionizační plyn (př. metan). Proud elektronů ionizuje nejdříve molekuly tohoto plynu a tyto teprve předávají energii molekule analytu – šetrnější, nedochází k tak rozsáhlé fragmentaci

Endosulfan I (MW = 404): EI and methane NCI

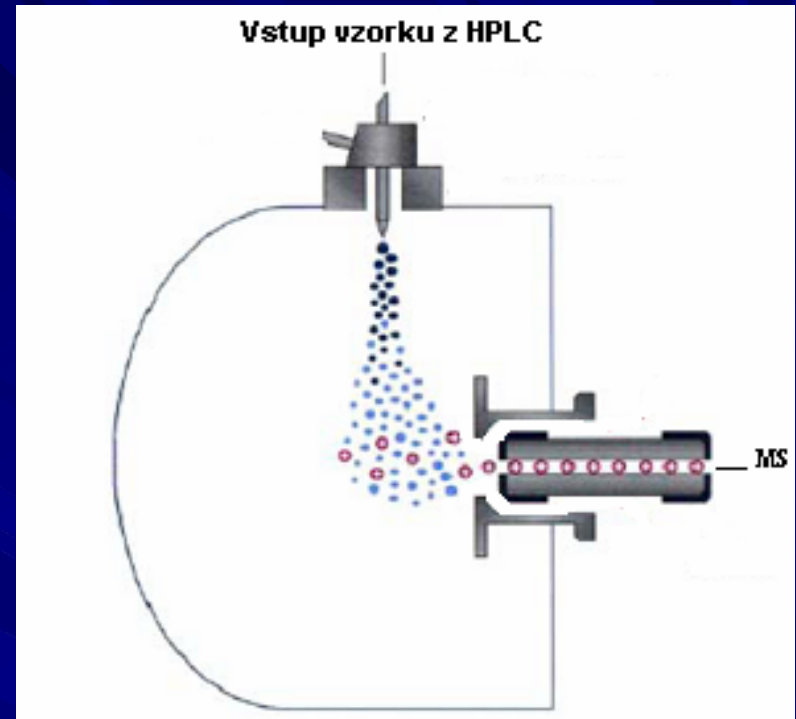
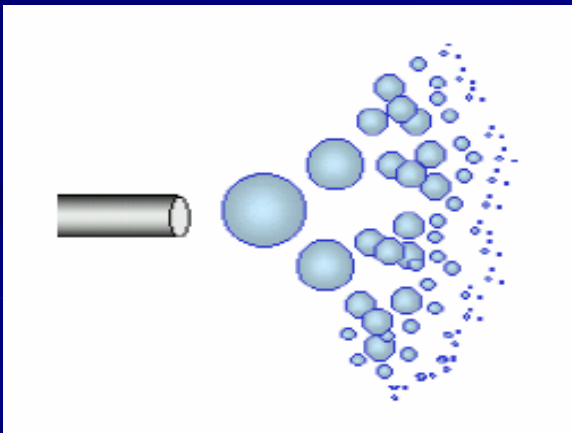


← Srovnání hmotnostního spektra s elektronovou ionizací a chemickou ionizací



# Elektrospray ionizace, ESI

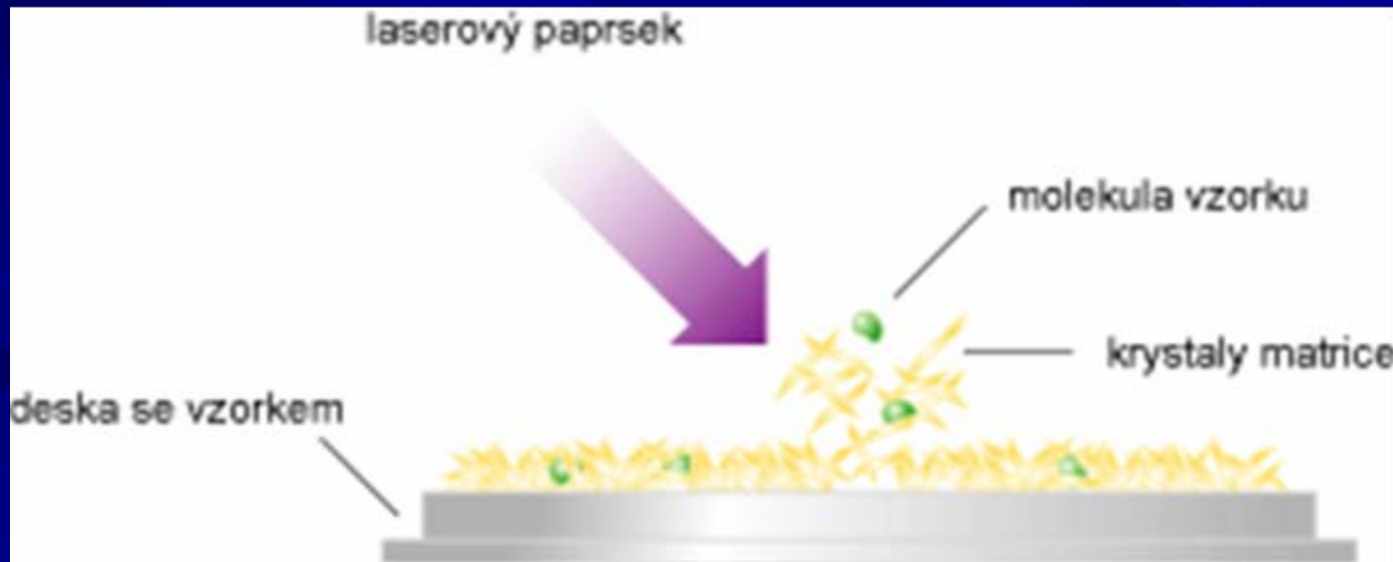
- Eluát prochází kapilárou, na niž je vloženo vysoké napětí – vytváří se sprej vysoce nabitých kapiček. Následným postupným odpařením rozpouštědla vznikají ionty (i vícenásobně nabité), jsou dále separovány (kvadrupól, TOF)
- **Měkká ionizační technika** (bez fragmentace)
- Vhodný pro nízkomolekulární i vysokomolekulární látky (peptidy, sacharidy, proteiny, nukleové kyseliny,...)





# MALDI - Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization

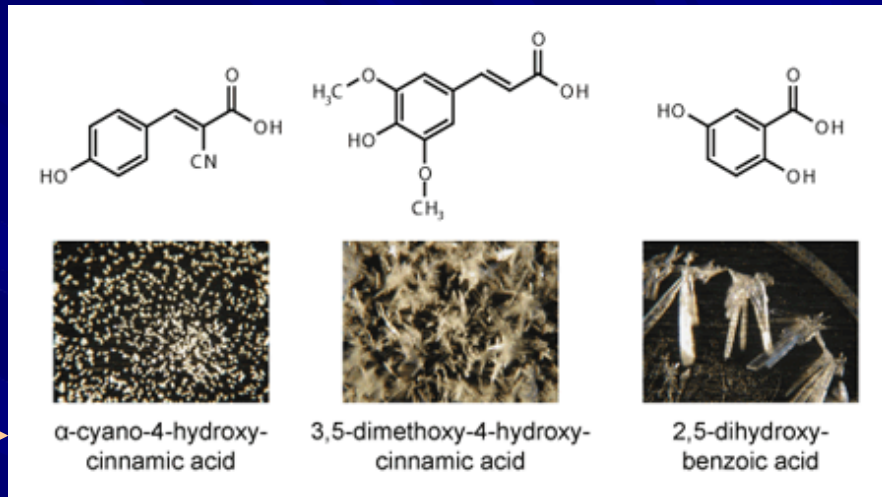
- Vzorek je v roztoku smíchán s matricí - deriváty nízkomolekulárních aromatických kyselin, které mohou absorbovat energii laserového záření ve viditelné nebo blízké ultrafialové oblasti. Roztok je nakápnut a vysušen (vykrystalizován) na MALDI destičce.
- Po pulsním ozáření směsných krystalů zábleskem laseru se látky prudce odpaří do vakua - ionizovaná matrice strhne sebou molekulu analytu a ionizuje ji, ionty studovaných látek se pak již pohybují samostatně, urychleny stejnsměrným elektrickým polem do TOF analyzátoru



# MALDI - Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization

- Velmi měkká, šetrná technika – i pro vysokomolekulární látky (proteiny, peptidy, oligosacharidy, nukleotidy)
- Ionty jsou dále separovány analyzátozem TOF

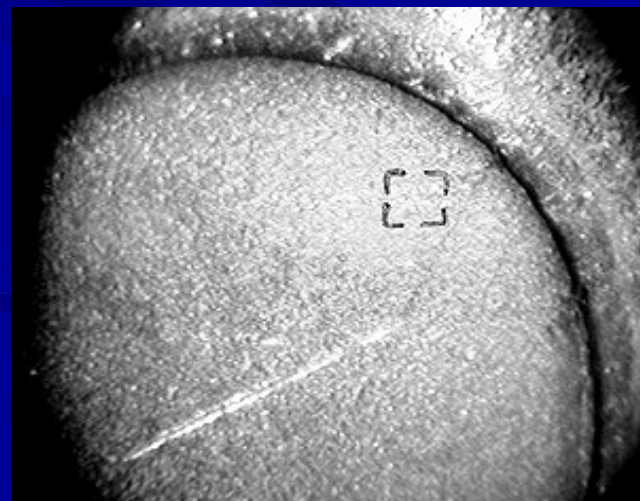
Matrice →



Spotovací destička



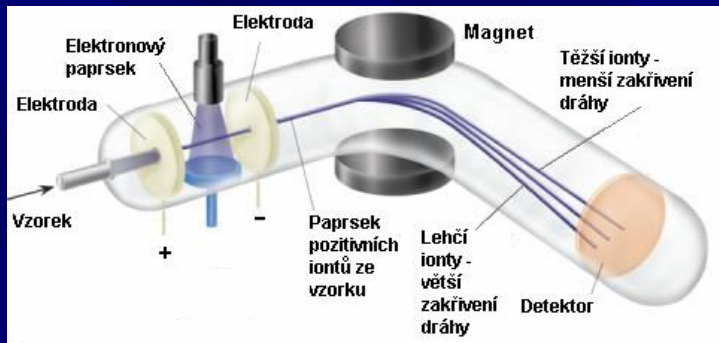
Spotovací destička na monitoru



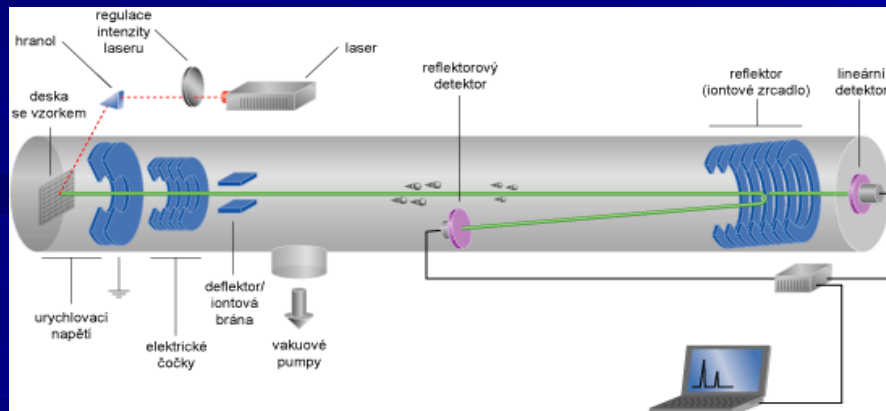
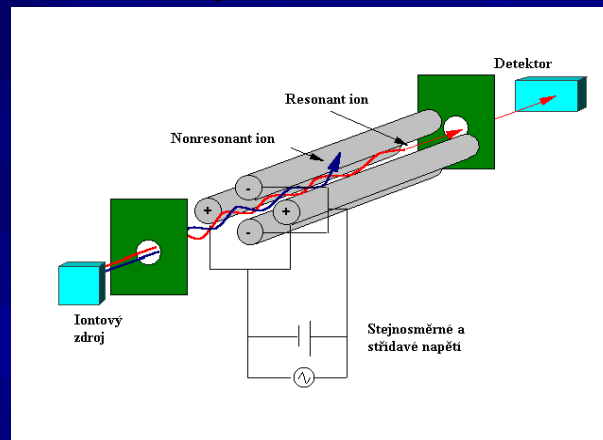
# MS – separace iontů

- **Iontový separátor:** rozdělení iontů různých hmotností - ion je urychlen a z charakteru jeho pohybu vakuovaným prostorem lze vypočítat poměr jeho hmotnosti a náboje  $m/z$

## Magnetický sektorový analyzátor



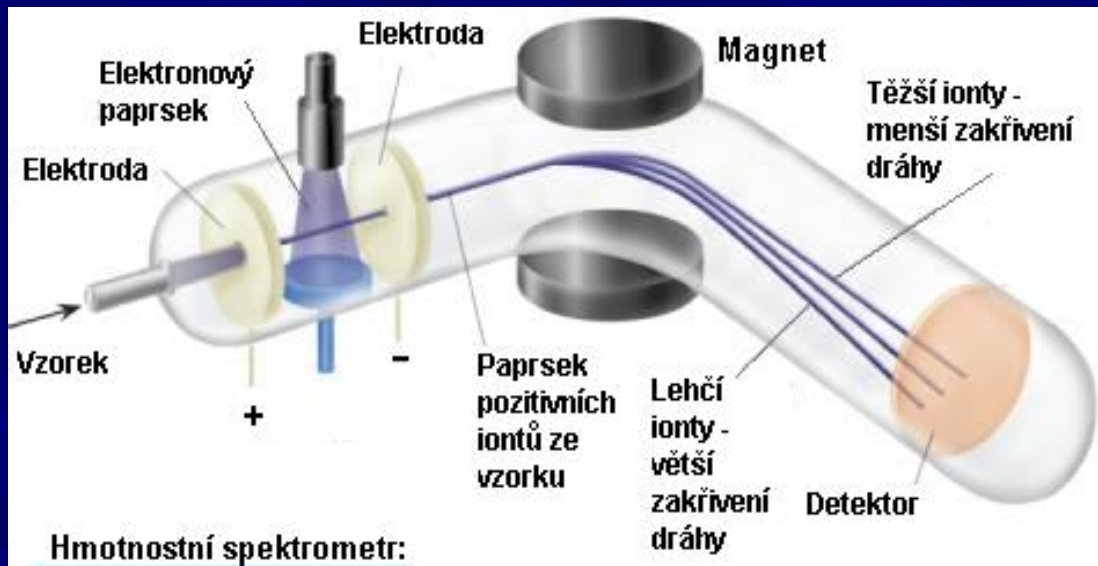
## Kvadrupól



TOF

# Magnetický sektorový analyzátor

- Nejdéle používaný a nejlépe prozkoumaný, stále se vyvíjí
- Klasický typ detektoru, využívá skutečnosti, že dráha nabité částice se v magnetickém poli zakřivuje tím více, čím má vyšší náboj a nižší hmotnost.
- Malé molekuly – pouze GC/MS (EI)
- Velmi přesný, ve své moderní verzi velmi nákladný (v klin. biochemii není běžně používaný)



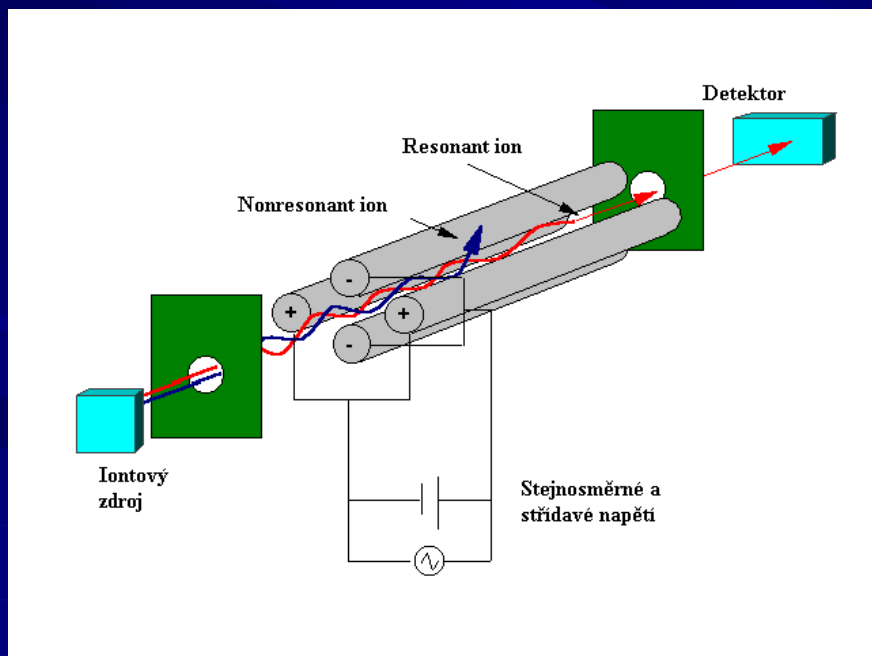
## Hmotnostní spektrometr:

Elektronový paprsek fragmentuje molekuly látek v plynném stavu za vzniku pozitivních iontů. Ionty jsou urychleny elektrickým polem a prolétají magnetickým polem, kde se jejich dráhy zakřivují.



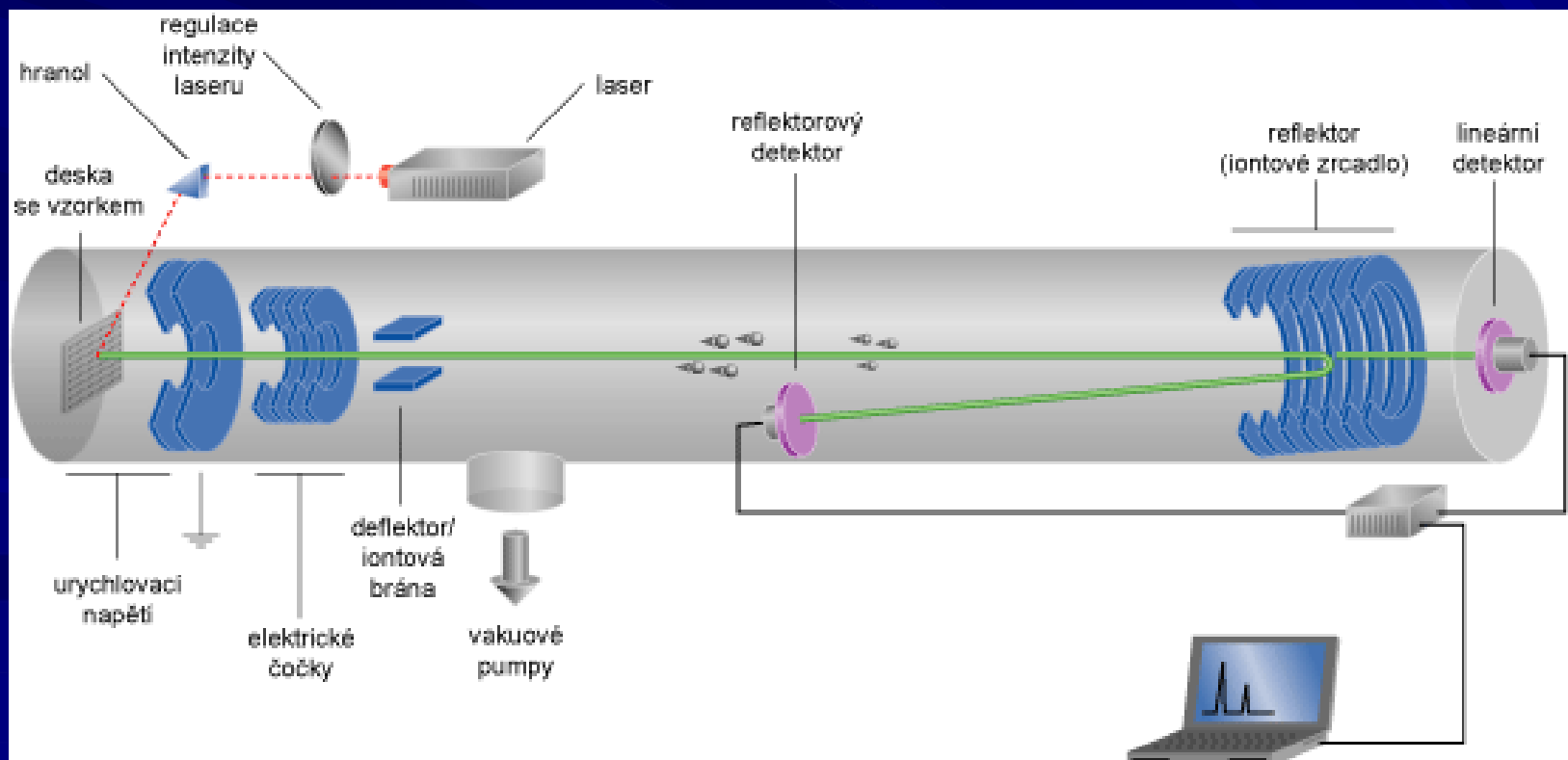
# Kvadrupol

- Konstrukčně se jedná o 4 kovové tyče připojené ke zdrojům stelnosměrného a střídavého napětí. Ionty, které vletnou do prostoru mezi tyčemi, začnou oscilovat
- Při vhodné kombinaci obou složek napětí projdou kvadrupolem pouze ionty o určitém poměru  $m/z$  (změnou vkládaných napětí je možné nechat projít kvadrupolem postupně ionty v celém rozsahu  $m/z$ )
- Lze použít pro GC/MS i LC/MS (v kombinaci s EI, CI, ESI,...), pro LC/MS však pouze pro menší molekuly



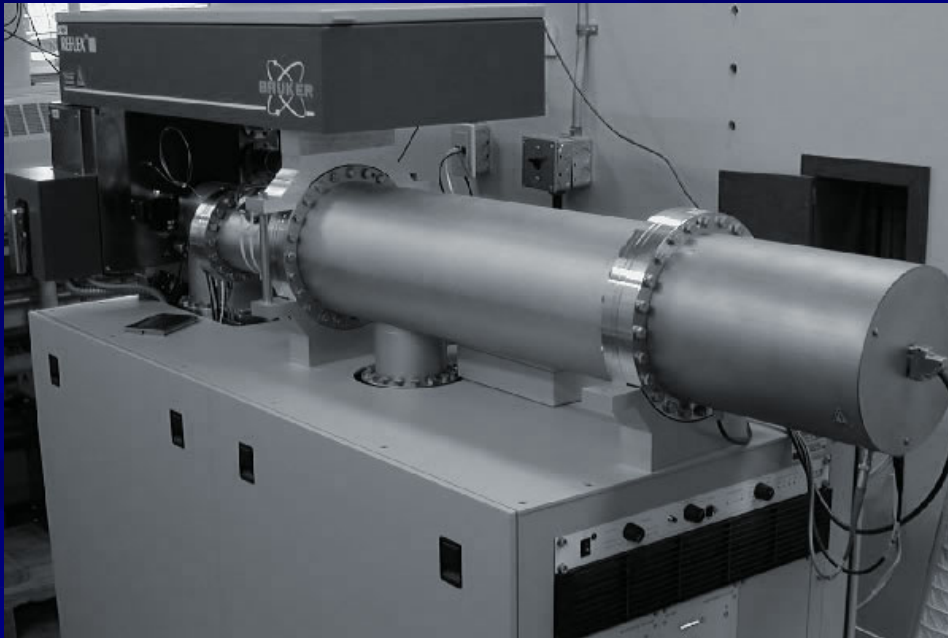
# TOF — analyzátor „Time of Flight“ (průletový)

- Deteguje hmotnosti ionizovaných molekul na základě doby jejich letu evakuovanou trubicí - rychlosti letu závisí na hodnotách efektivní hmotnosti  $m/z$  – lehčí molekula letí rychleji
- Lineární nebo refletronový mód (reflektron - vyšší rozlišovací schopnost)



# TOF — analyzátor „Time of Flight“ (průletový)

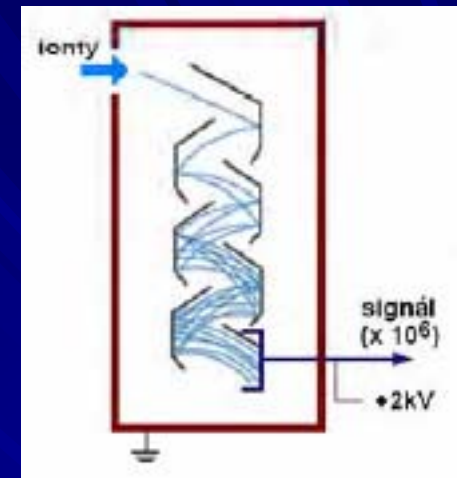
- TOF má teoreticky neomezený rozsah hmotností, pro které se dá používat, v praxi se mu však dává přednost pouze pro velké molekuly
- V kombinaci s MALDI (SELDI), ESI



# Detektor

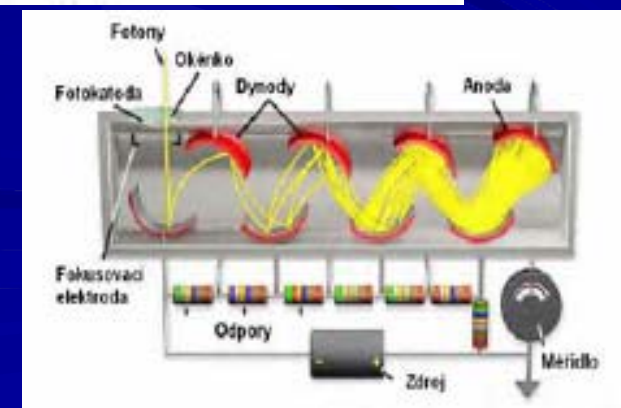
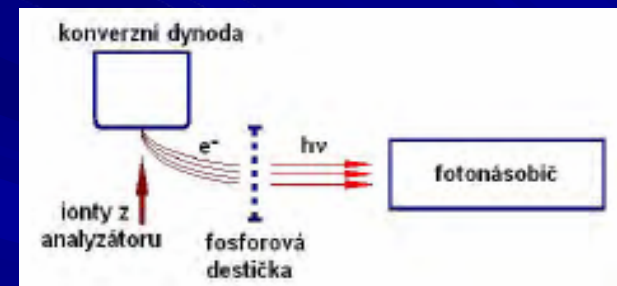
detekce iontů po jejich separaci podle hodnoty  $m/z$  a určení relativní intenzity (četnosti) jednotlivých iontů

- **Elektronový násobič** obsahuje sérii dynod se vzrůstajícím potenciálem. Ion narazí na povrch první dynody, dojde k emisi elektronu. Po jeho dopadu na další dynodu dojde k vícenásobné emisi. Kaskádovitým efektem vznikne velké množství elektronů, které jsou detekovány.



- **Fotonásobič**

Před vlastním fotonásobičem je umístěna fosforová destička. Na ni dopadají částice z konverzní dynody a dochází k emisi fotonů. Ty dopadají na fotokatodu, kde fotoelektrickým jevem dojde k emisi elektronů. Ty jsou dále zmnoženy stejně jako v elektronovém násobiči.



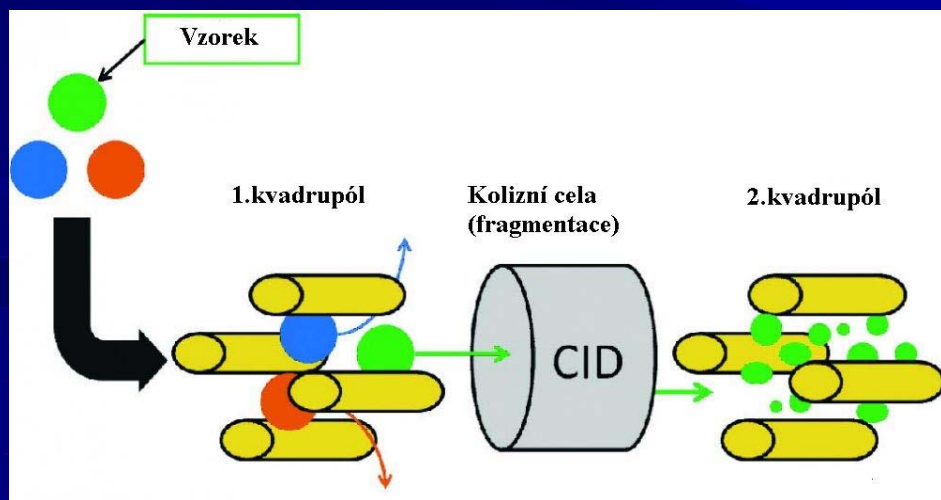


# Tandemová hmotnostní spektrometrie, MS/MS

- Při MS/MS jsou ionty podrobeny dvěma hmotnostním analýzám (zapojení dvou či více iontových separátorů v tandemu)
- MS/MS umožňuje **rychlou** analýzu bez použití separačních metod (GC, LC) ve složité matici, velice **citlivá** metoda

Standardně např. **trojitý kvadrupól QqQ**:

- První kvadrupól vybírá prekursorový ion
- Ve druhé části - kolizní cele - probíhá fragmentace prekursorového iontu (srážkou iontu s atomy inertního plynu)
- Poslední kvadrupól analyzuje fragmenty



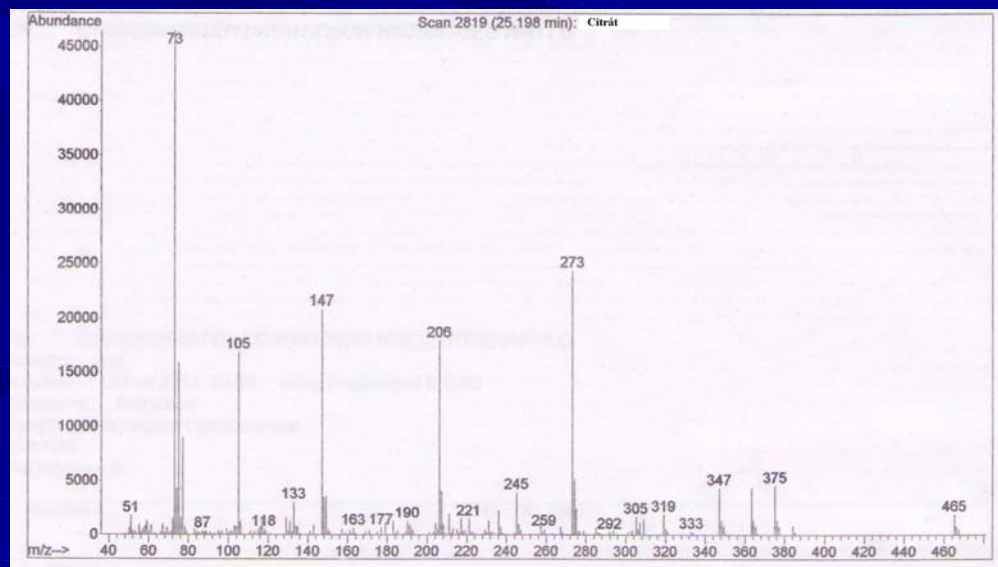
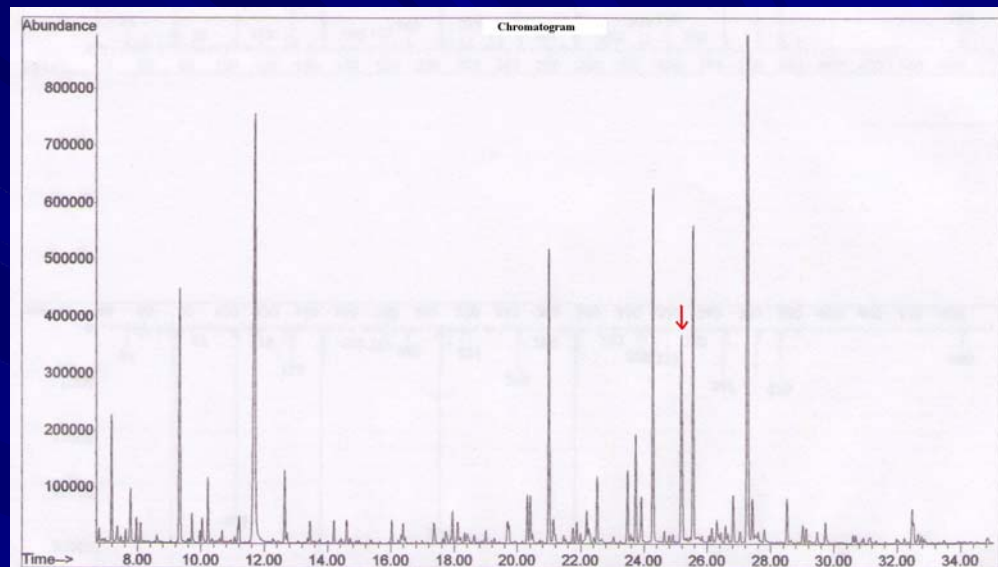
Pozn.: QqQ v kombinaci s ESI (přímý nástřik) se používá pro novorozenecký screening

- Obdobně **TOF-TOF** analyzátor
- Hybridní **Q-TOF** analyzátor (kvadrupól – TOF)

# Příklady použití – GC/MS

- Pro analýzu neznámých složek směsi: pro každou složku směsi se získá hmotnostní spektrum, které se porovná s databází spekter v počítači a takto se daná složka identifikuje
- Potvrzení či vyloučení metabolitů, které svědčí pro určité metabolické onemocnění
- Kvantifikace určitých metabolitů
- Toxikologie – léky, drogy, alkohol

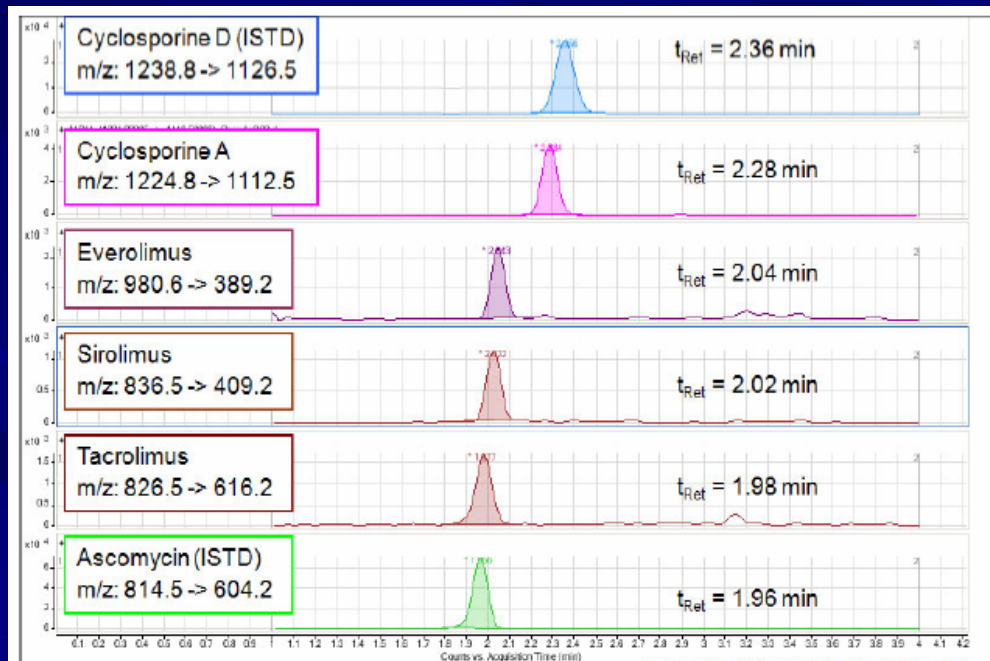
Ukázka – organické kyseliny v moči →



# Příklady použití - LC/MS, LC/MS/MS

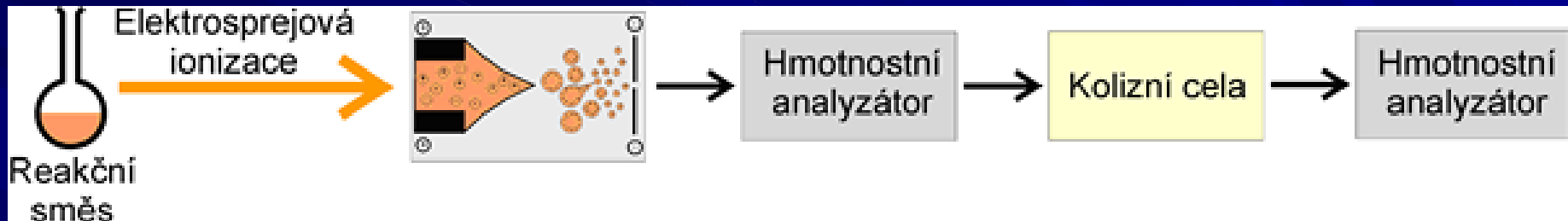
- Toxikologické analýzy
- Farmakokinetické studie, stanovení léků
- Proteomika / metabolomika

## Stanovení léků LC/MS/MS



# Příklady použití – MS/MS

- MS/MS analýza bez použití separační metody (GC, LC)
  - uspořádání ESI – trojitý kvadrupol:



## Novorozenecký screening dědičných poruch metabolismu

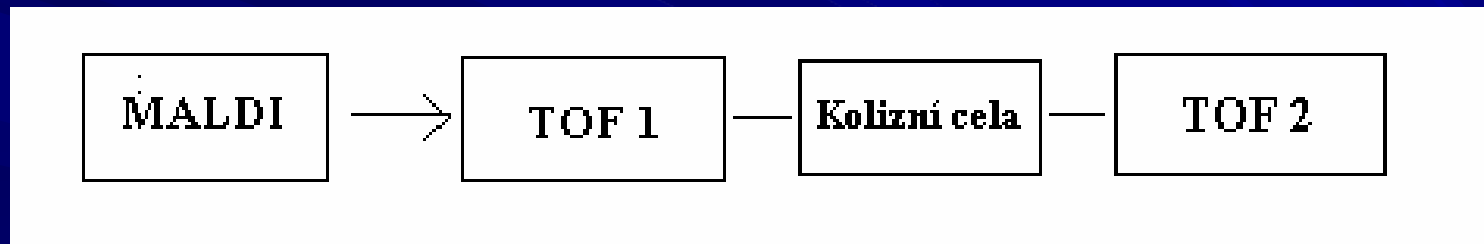
- Stanovení koncentrací aminokyselin a acylkarnitinů v suché krevní kapce (10 různých metabolických poruch, např. fenylketonurie)



# MALDI - TOF - TOF

Analýza neznámého proteinu:

- Protein (vyseparovaný ze směsi např. dvourozměrnou ELFO) se rozštěpí enzymem (např. trypsinem) na směs peptidů.
- Směs peptidů se nechá vykristalizovat s matricí na MALDI destičce



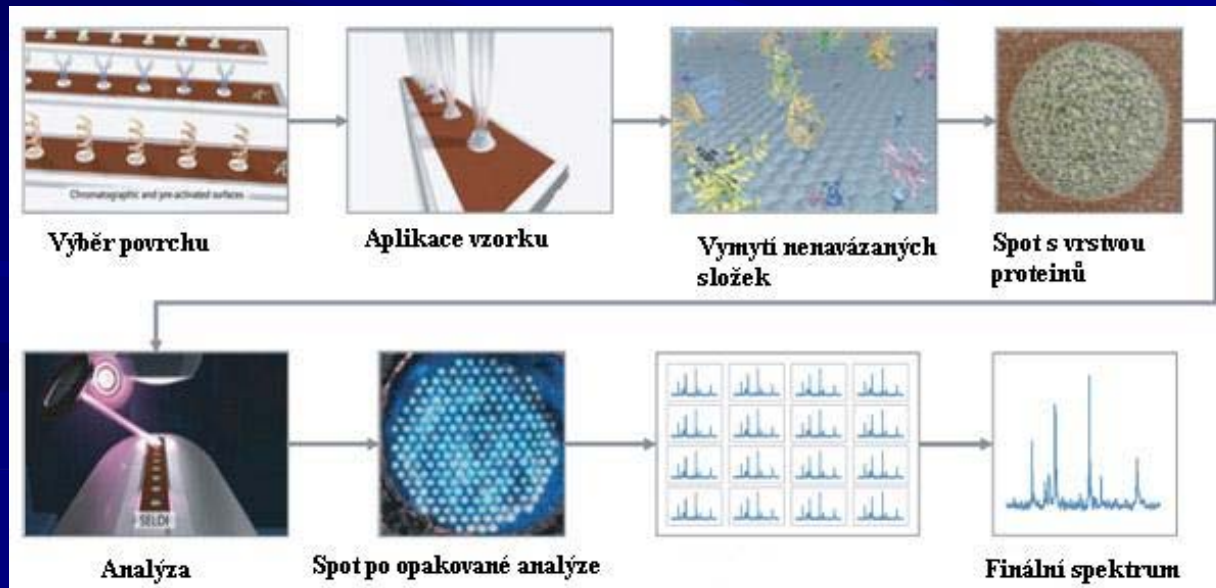
- První TOF analyzátor vybírá prekursorový ion, který vstupuje do kolizní cely. V kolizní cele dojde k fragmentaci iontu - peptidu na jednotlivé aminokyseliny (srážkou iontu s atomy inertního plynu) a spektrum fragmentů je měřeno druhým TOF analyzátozem.



# SELDI – Surface Enhanced Laser Desorption Ionization

## Analýza proteinů pomocí vazby na předpřipravený povrch pevné fáze proteinového čipu

- Povrch čipu může být tvořený protilátkou, receptorem, ligandem, může být chemickým způsobem upravený
- Po nanesení vzorku se proteiny navážou k povrchu adsorbci, elektrostatickou interakcí, na afinitním principu,...
- Promytím mikročipu se odstraní nenavázané složky
- Analýza – viz MALDI - TOF



- Vzorek komplexní směsi proteinů může být analyzován současně na několika různých sorbentech, aby byly navázány a analyzovány veškeré proteiny ve vzorku
- Čipy mohou být vyrobeny dle požadavku zákazníka

**Děkuji za pozornost ...**

