

Úvod do hmotnostní spektrometrie

Zkráceno dle http://holcapek.upce.cz/teaching/01_Uvod.pdf

a

http://holcapek.upce.cz/teaching/Holcapek_EMSV_MS.pdf

Úvod do hmotnostní spektrometrie

- **Hmotnostní spektrometrie (MS)** je analytická metoda využívající převedení molekul na ionty, rozlišení těchto iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) a následný záznam relativních intenzit jednotlivých iontů
- **Hmotnostní spektrometr** je iontově-optické zařízení, které rozlišuje ionty podle poměru jejich m/z
 - + vysoká citlivost
 - + kvalitativní analýza - určení M_R a dalších strukturních informací
 - + kvantitativní analýza - odezva je závislá na koncentraci
 - + minimální spotřeba vzorku
- destruktivní metoda
- vysoké pořizovací a provozní náklady

Hmotnostní spektrometrie

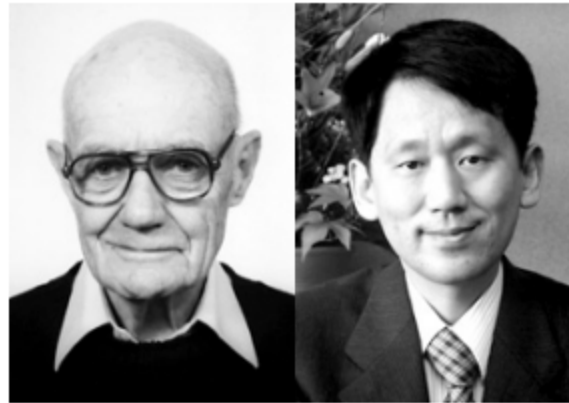
Držitelé Nobelových cen za chemii nebo fyziku



Francis William Aston (1922, chemie)
hmotnostní spektrometrie izotopů



Wolfgang Paul (1989, fyzika)
popis iontové pasti



John B. Fenn (elektrosprej) a Koichi Tanaka (MALDI) (2002, chemie)
vývoj měkkých ionizačních technik pro hmotnostní spektrometrii biomakromolekul

Základní termíny

- **hmotnostní spektrometrie** (MS) - obor zabývající se hmotnostními spektrometry a jejich výsledky
 - zkratku MS nelze využívat jako zkratku pro hmotnostní spektrometr
 - nepoužívat hmotnostní spektroskopie nebo hmotnostní spektroskop - využívají pro detekci iontů fotografickou desku
- **hmotnostní spektrometr** - zařízení, které měří m/z hodnoty a zaznamenává jejich intenzitu
 - ~~ne hmotnostní spektroskop, hmotnostní spektrofotometr, atd.~~
- **hmotnostní spektrum** - graf závislosti intenzity iontů (absolutní/relativní) na jejich m/z
 - ne chromatogram

Základní termíny

- **m/z** - bezrozměrná veličina získaná vydělením hmotnosti iontu nábojovým číslem (počtem elementárních nábojů, bez ohledu na polaritu)
- **základní pík** spektra - pík s největší intenzitou ve spektru
- **molekulární ion** - ion vzniklý odebráním nebo přidáním jednoho a více elektronů za vzniku kladného nebo záporného iontu
- **protonovaná molekula** - ion vzniklý interakcí molekuly s protonem, $[M+H]^+$
- **deprotonovaná molekula** - ion vzniklý odštěpením protonu, $[M-H]^-$

Základní části hmotnostního spektrometru

1/ iontový zdroj - slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice (tzv. ionizace), konstrukce se liší podle použité ionizační techniky

2/ hmotnostní analyzátor - slouží k rozdělení iontů v plynné fázi za vysokého vakua podle poměru hmotnosti a náboje (m/z)

3/ detektor - slouží k detekci iontů po jejich rozdělení podle m/z a k určení relativní intenzity (četnosti) jednotlivých iontů

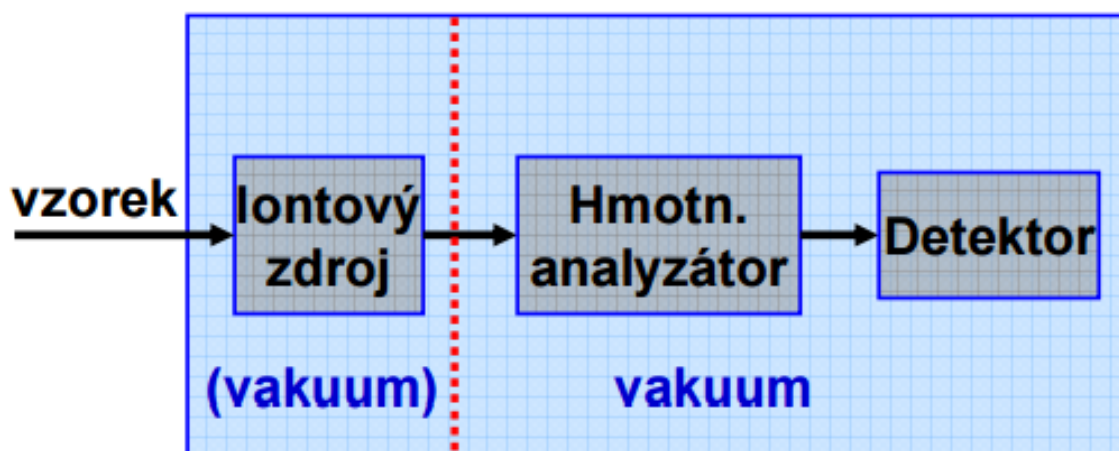
• další důležité části přístroje:

- vakuový systém

- iontová optika sloužící k urychlení a fokusaci iontů

- počítač na ovládání a ladění přístroje, sběr, ukládání a zpracování dat, porovnání spekter s knihovnou

Hmotnostní spektrometr



Ionizační techniky (= tvorba iontů)

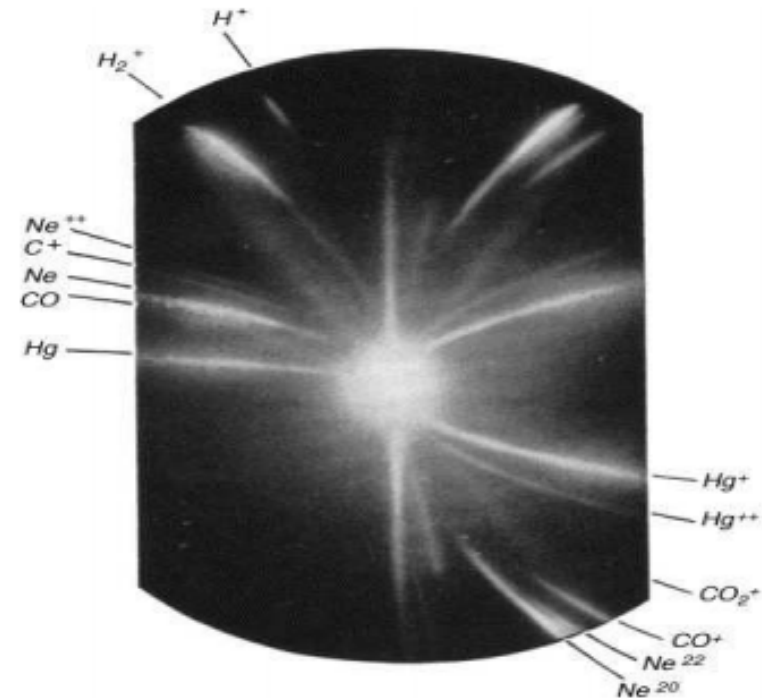
- iontový zdroj hmotnostního spektrometru slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice (ionty)
- tvrdé ionizační techniky (EI) - ionizovaná molekula při ionizaci získá nadbytek vnitřní energie, což se projeví fragmentací molekulového iontu na menší části (tzv. fragmentové ionty)
- měkké ionizační techniky - (šetrné) ionizovaná molekula získá mnohem menší množství energie oproti EI, proto ve spektrech pozorujeme zejména (de)protonované molekuly a minimum fragmentových iontů
- ionizace může probíhat za sníženého tlaku (EI, CI, MALDI, atd.) nebo za atmosférického tlaku (ESI, APCI, APPI)
- volba ionizační techniky podle povahy analytu (M_R , polarita), příp. podle použité separační techniky (GC - EI, CI; HPLC - ESI, APCI, APPI)
- zavádění vzorku do iontového zdroje - přímá infúze, separační technika, odpařování z kapiláry, atd.

Hmotnostní analyzátory (= dělení iontů)

- hmotnostní analyzátor slouží k dělení iontů v plynné fázi za vakua podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z)
- analyzátor je umístěn za iontovým zdrojem (tzn. molekuly již byly převedeny na ionty) a před detektorem (před detekcí musíme ionty rozdělit podle m/z)
- dělení iontů v analyzátoru probíhá za vysokého vakua (cca. 10^{-3} - 10^{-11} Pa, podle typu analyzátoru)
- dělení iontů podle m/z lze dosáhnout na základě různých fyzikálních principů:
 - 1/ zakřivení dráhy letu iontů v magnetickém nebo elektrickém poli (magnetický nebo elektrostatický analyzátor)
 - 2/ různá stabilita oscilací iontů v dvoj- nebo trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí (kvadrupól nebo iontová past)
 - 3/ různá doba rychlosti letu iontů (analyzátor doby letu – TOF)
 - 4/ různá frekvence harmonických oscilací v Orbitrapu
 - 5/ různá absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli (iontová cyklotronová resonance – ICR)

Detekce iontů

- detektory iontů používají všechny analyzátory kromě FTICR a Orbitrap, kde je v analyzátoru prováděna zároveň detekce
- ionty po rozdělení v hmotnostním analyzátoru dopadají na detektor iontů, který generuje signál z dopadajících iontů
 - tvorba sekundárních elektronů, které se následně zesilují
 - indukce proudu po dopadu iontů
- dříve využití fotografické desky, kde ionty o určité m/z dopadají na jedno místo desky a vytvářejí body, intenzita iontů je dána intenzitou zbarvení bodu



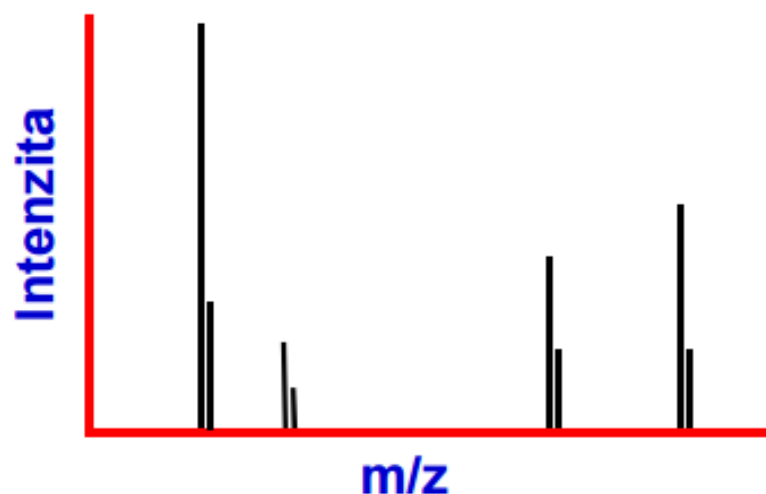
Fotografická deska Thompsonova spektroskopu (1907)

Vakuová technika

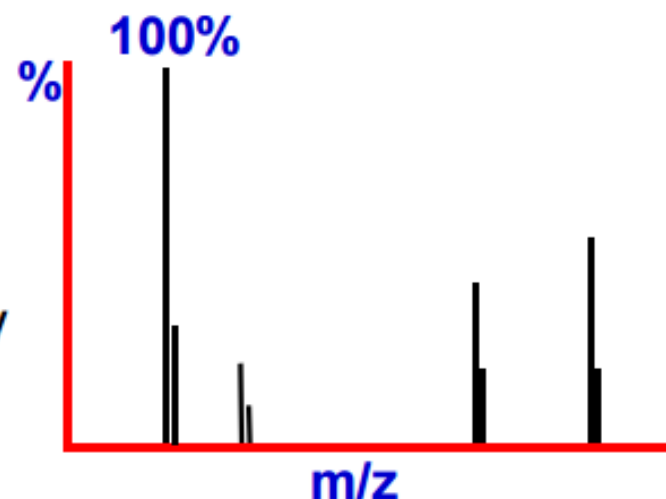
- různé požadavky na hodnotu vakua v různých částech hmotnostního spektrometru
 - iontový zdroj - za atmosférického tlaku (API - ESI, APCI, APPI) nebo vakua (EI, CI, MALDI)
 - hmotnostní analyzátor - vždy pracuje za vysokého vakua, hodnota vakua se liší podle typu analyzátoru ca. 10^{-3} až 10^{-11} Pa
 - detektor - vakuum
- k získání vysokých hodnot vakua je obvykle potřeba dvou- nebo třístupňové čerpání velmi výkonnými vakuovými pumpami
 - 1. stupeň čerpání - rotační olejové, spirálové a membránové pumpy (výkon 80 l/s)
 - 2. stupeň čerpání - turbomolekulární nebo difúzní pumpy (výkon 250 l/s)
- proč vysoké vakuum? ionty musí mít dostatečně dlouhou střední dráhu a nesmí docházet ke kolizním srážkám s neutrálními atomy

Hmotnostní spektrum

- **Základní veličiny** – intenzita (absolutní, relativní), poměr hmotnosti a náboje (m/z)

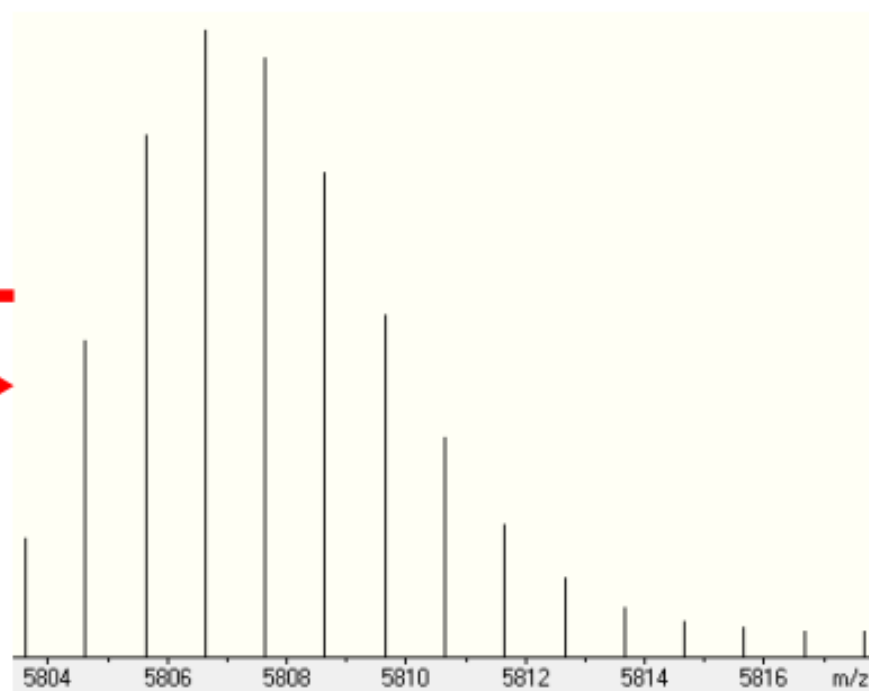
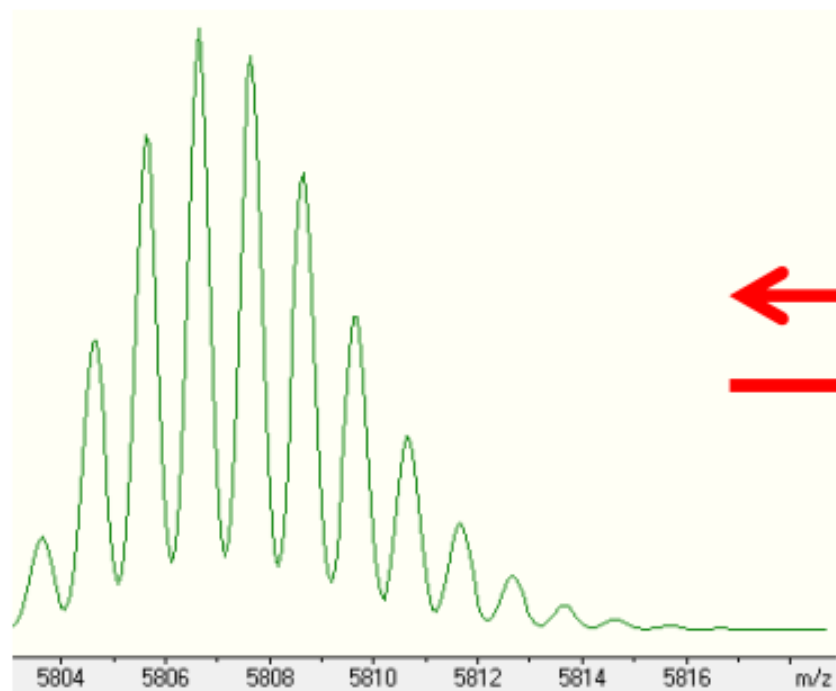


- měří se intenzita iontů v závislosti na m/z :
 - skenování = změna skenované veličiny (U, V, B) – Q , sektorové analyzátory, IT
 - záznam signálu v čase – TOF, FTICR, Orbitrap
- normalizace spekter:
 - převedení absolutních intenzit na relativní
 - intenzita osy y je v rozsahu 0-100%
 - intenzita základního píku spektra je 100% a intenzity ostatních píků jsou k ní vztaženy



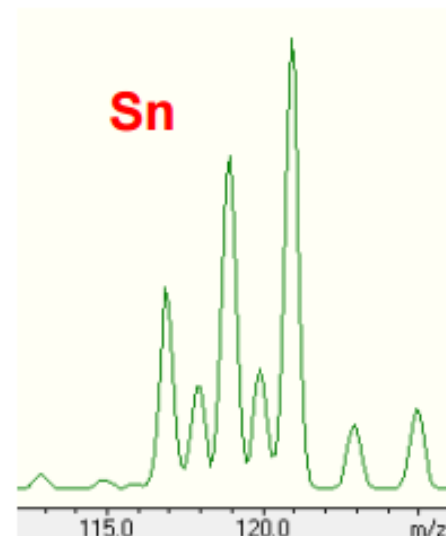
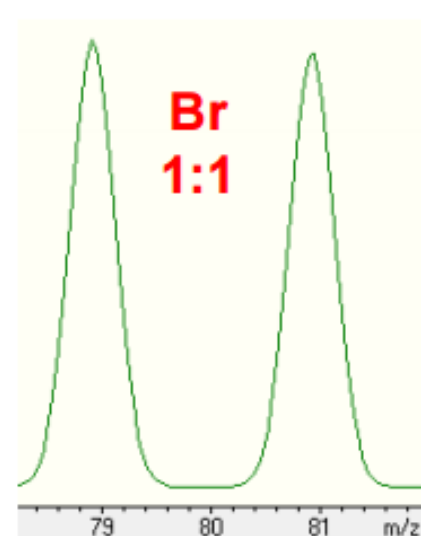
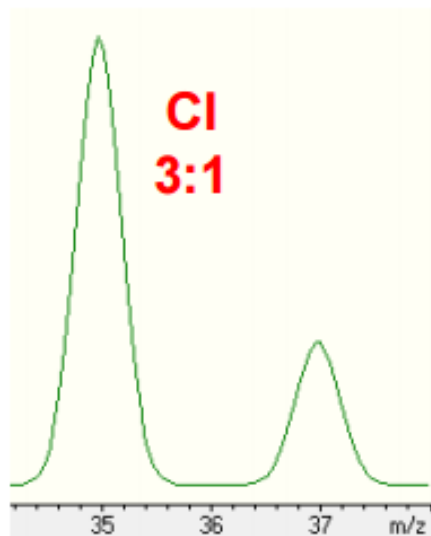
Hmotnostní spektrum

- profilové spektrum (kontinuální) - profil složený z naměřených bodů, gaussovský tvar píků, vhodné pro kontrolu kvality píků, velké množství dat
- čárové spektrum (centroidální) - píky převedené na čáry, které odpovídají jejich středu, intenzita odpovídá výšce nebo ploše píku, menší množství dat, nelze převést zpětně na profilové spektrum!



Ionty v hmotnostních spektrech

- závislé na typu použité ionizace
- ionty s **lichým počtem elektronů** - M^+ , především elektronová ionizace
- ionty se **sudým počtem elektronů** - spektra měkkých ionizačních technik
- ionty **(de)protonovaných** molekul - $[M+H]^+$, $[M-H]^-$, určení molekulové hmotnosti (M_R)
- **adukty** molekul - $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$, s mobilní fází, atd., ověření M_R
- **fragmentové** (produktové) ionty – strukturní informace, fragmentace funkčních skupin, částí molekuly, atd.
- ionty **izotopů** - atomy chemického prvku, které mají stejný počet protonů, ale rozdílný počet neutronů, tedy stejné atomové číslo a rozdílnou atomovou hmotnost



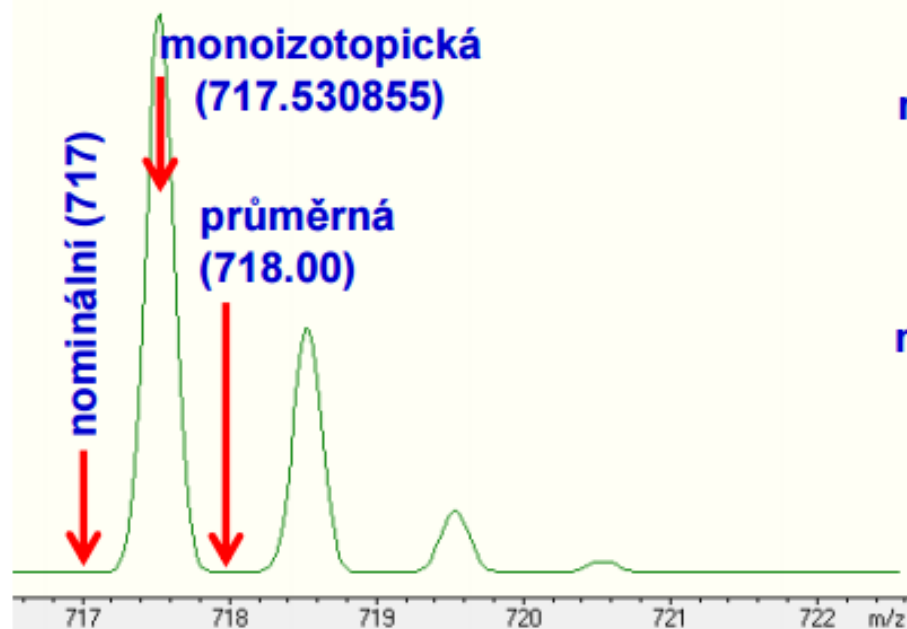
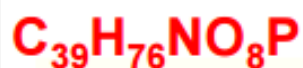
Přírodní zastoupení izotopů běžných organických prvků

Prvek	"M"		"M+1"		"M+2"		Typ prvku
	m/z	%	m/z	%	m/z	%	
H	1	100	2	0.015			"M"
C	12	100	13	1.1			"M+1"
N	14	100	15	0.37			"M+1"
O	16	100	17	0.04	18	0.2	"M+2"
F	19	100					"M"
Si	28	100	29	5.1	30	3.4	"M+2"
P	31	100					"M"
S	32	100	33	0.79	34	4.4	"M+2"
Cl	35	100			37	32	"M+2"
Br	79	100			81	97.3	"M+2"
I	127	100					"M"

Hmotnosti iontů ve spektru

- **nominální hmotnost:** hmotnost vypočítaná z celočíselných hmotností prvků
 $\text{CO}_2: 1 \times 12 + 2 \times 16 = 44$
- **monoizotopická hmotnost:** hmotnost vypočítaná z přesných hmotností prvků
 $\text{CO}_2: 1 \times 12.0000 + 2 \times 15.9949 = 43.9898$
- **průměrná hmotnost:** vážený průměr hmotností jednotlivých izotopů
 $\text{CO}_2: 1 \times 12.01 + 2 \times 16 = 44.01$

Fosfoethanolamin - PE(16:0/18:1)

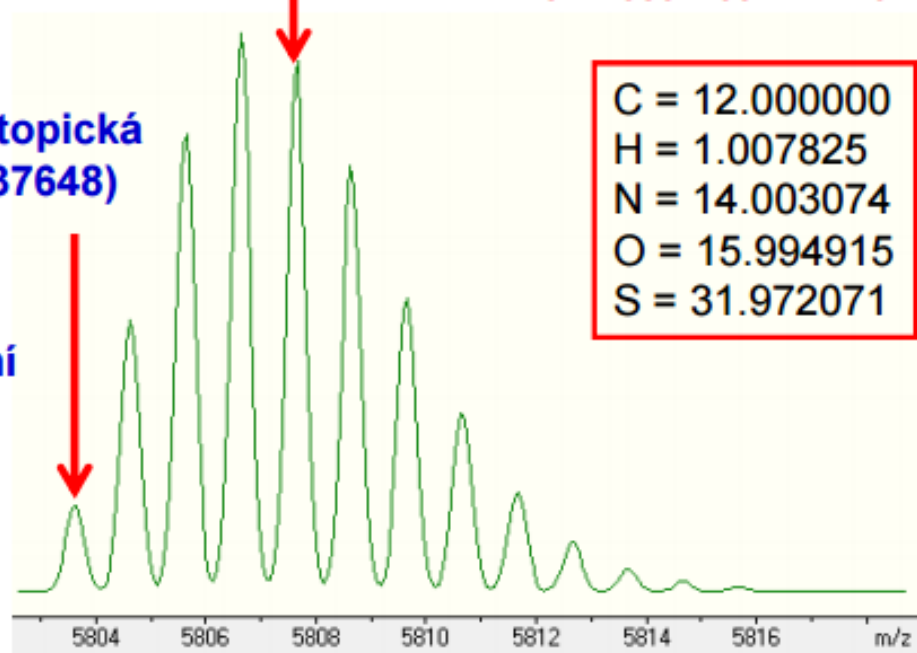


**průměrná
(5807.59)**

Inzulín
 $\text{C}_{257}\text{H}_{383}\text{N}_{65}\text{O}_{77}\text{S}_6$

monoizotopická
(5803.637648)

nominální
(5801)



C = 12.000000
H = 1.007825
N = 14.003074
O = 15.994915
S = 31.972071

Ionizační techniky

- neexistuje univerzální ionizační technika pro všechny látky, které se mohou lišit z různých chemických hledisek, proto je vždy třeba vybrat optimální způsob ionizace pro danou látku
- celá řada ionizačních technik, některé ionizační techniky byly nahrazeny novými a dnes se nevyužívají
- podle množství vnitřní energie po ionizaci lze dělit na "tvrdé" a "měkké"
- mohou pracovat za atmosférického nebo sníženého tlaku
- dnes největší praktický význam:
 - ESI, APCI, APPI - pro spojení HPLC/MS
 - ESI, MALDI - analýza biomolekul, nejšetrnější ionizační techniky
 - EI - GC/MS, možnost porovnání s knihovny spekter, strukturní informace, dobře popsaná pravidla fragmentace
 - MALDI, DESI, SIMS - pro MS zobrazování
 - DESI, DART - desorpční ambientní techniky

MALDI

(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)

MALDI-TOF nastudovat z URL:

http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano/0214/pdf/d-microbial_identification_by_maldi-tof_ms.pdf

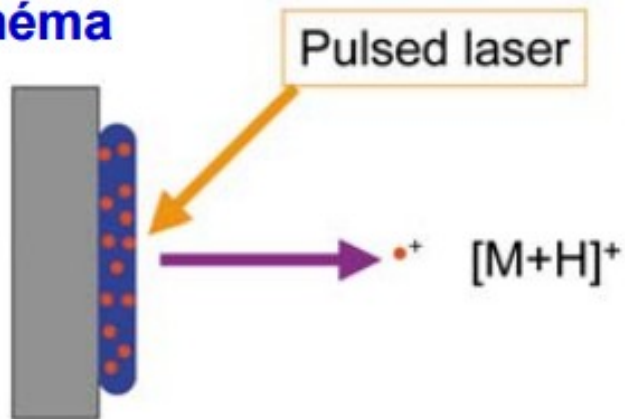
Ionizace laserem za účasti matrice

- ionizace molekul s velkou molekulovou hmotností - biopolymery a syntetické polymery (desítky až stovky tisíc Da, existují aplikace i přes milión Da)
 - proteiny, oligonukleotidy, lipidy, polymery
- pro látky **nepolární** až **polární**
- ionizace může probíhat za různých tlaků
 - nízkotlaké MALDI (klasické) - ionizace probíhá za vakua (<1 Pa)
 - středně tlaké MALDI - ionizace za sníženého tlaku
 - atmosférické MALDI (AP-MALDI) - pracuje za okolního tlaku, jiné ionty ve spektrech, nižší citlivost
- **měkká** ionizační technika, většinou jednou či dvakrát nabité ionty
 - $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[M-H]^-$
 - adukty s alkalickými kovy
- spojení s HPLC v **off-line** uspořádání - nanášení spojité stopy na terčik nebo sběr frakcí
- možnost archivace vzorku a jeho opětovné přeměření
- obtížná kvantitativní analýza
- ionty matrice ve spektrech

Ionizace laserem za účasti matrice

- vzorek je společně s matricí nanesen na MALDI terčik
- energie krátkého laserového pulsu je absorbována matricí
- následně dojde k lokální desorpci matrice a analytu (vznikají klastry matrice a analytu)
- excitované molekuly matrice jsou stabilizovány přenosem protonu na analyt nebo dochází ke kationizaci molekul analytu za vzniku iontů analytu
- ionty jsou následně urychleny do hmotnostního analyzátoru

Schéma



MALDI terčik



Ambientní ionizační techniky

- ionizační techniky pracující mimo hmotnostní spektrometr
- ionizace neprobíhá v iontovém zdroji jako třeba u ESI, ale **v otevřeném prostoru**
 - lze analyzovat i objekty neobvyklého tvaru a velikosti
- umožňují přímou analýzu vzorků s **minimální** nebo **žádnou** přípravou vzorku
- jsou použitelné jako zdroj iontů pro většinu hmotnostních analyzátorů
- jsou to **měkké** a velmi **šetrné** ionizační techniky - vnitřní energie vzniklých iontů by měla být srovnatelná nebo nižší než při použití ESI, APCI, APPI
- využívají principy běžných ionizačních technik, ale v otevřeném prostoru
 - ESI, CI, fotoionizace, atd.
- lze využít i pro **hmotnostně spektrometrické zobrazování** - nižší prostorové rozlišení v porovnání se SIMS a MALDI

Praktické ukázky DESI

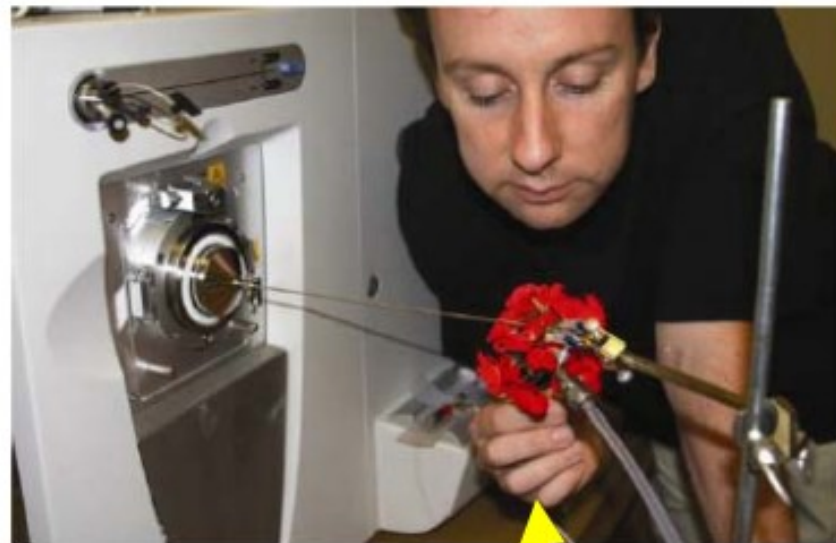
- živočišná tkáň (prst živého člověka)



Photograph S3 Aqueous alcohol being sprayed onto outer skin surface to detect compounds including drugs and metabolites by DESI

- bez jakékoliv úpravy vzorku!

- rostlinná tkáň (kytka)



Hmotnostní analyzátory

Podle způsobu dělení iontů:

- **skenující** - postupně mění skenovanou veličinu (U, V, B) a propouští ionty o určité m/z (kvadrupólový analyzátor, sektorový magnetický analyzátor)
- **iontové pasti** - zadržuje ionty pomocí napětí na elektrodách a následně je analyzuje (iontová past, orbitrap, FT-ICR)
- **průletový** - měří čas iontů potřebný pro překonání určité vzdálenosti (TOF)
- analyzátory **pohyblivosti iontů** - dělení iontů podle jejich velikosti a tvaru

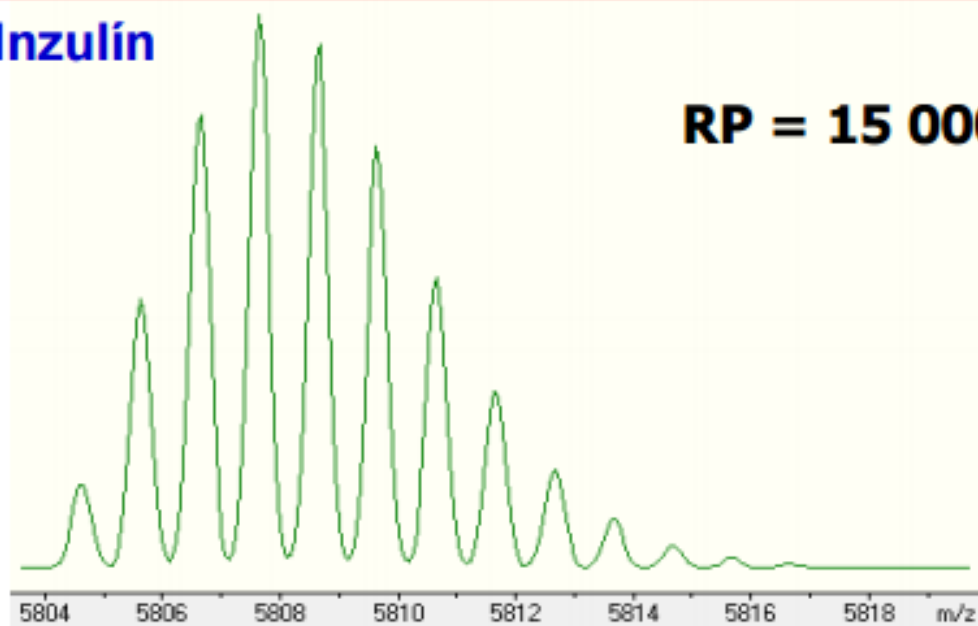
Základní parametry hmotnostních analyzátorů:

- **rozlišovací schopnost (rozlišení)** – schopnost analyzátoru poskytnout rozlišené signály pro ionty s podobnou m/z
- **správnost určení m/z** - míra schopnosti analyzátoru určit správnou hodnotu m/z
- **hmotnostní rozsah** – rozsah m/z hodnot, přes který analyzátor může zaznamenat spektra
- **dynamický rozsah** - rozmezí koncentrací, v nichž je odezva (lineárně) závislá na koncentraci
- **rychlost** – rychlost záznamu spekter

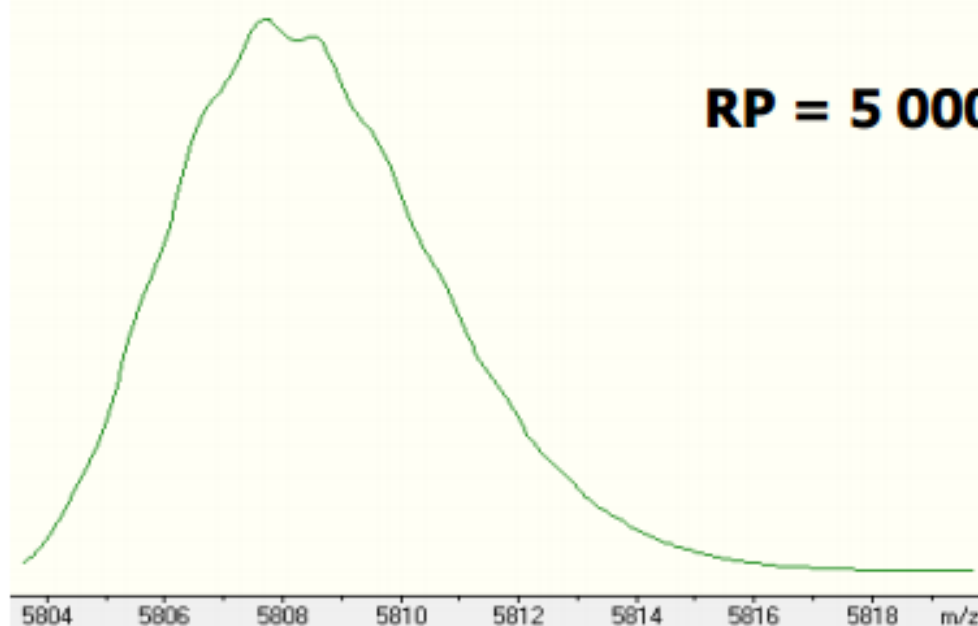
Vysoká a nízká rozlišovací schopnost

Inzulín

RP = 15 000



RP = 5 000

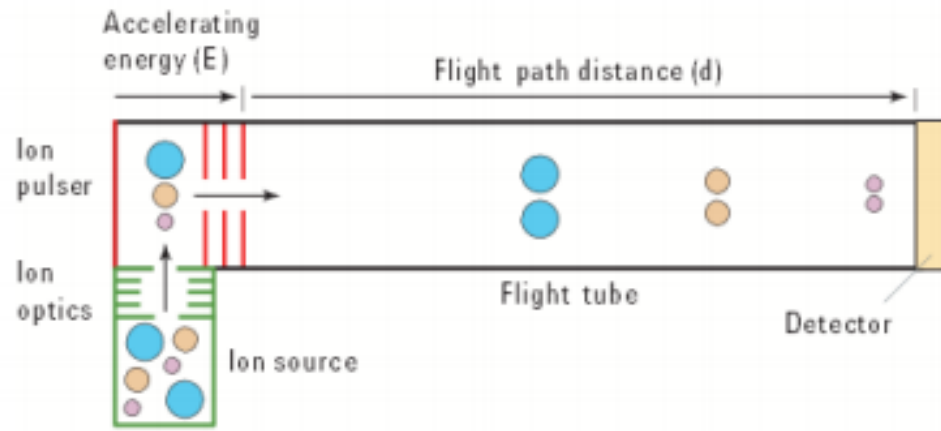


Analyzátor doby letu

(Time-of-Flight, TOF)

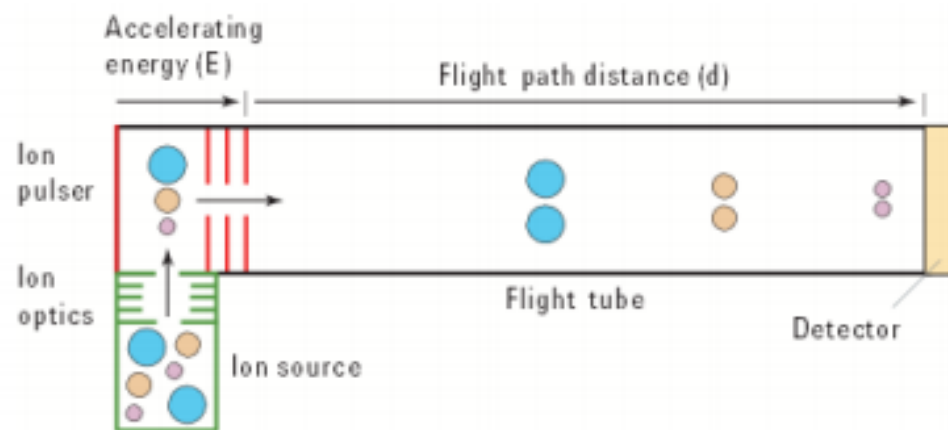
Analyzátor doby letu

- RP: 10 000 - 60 000
- správnost určení hmotnosti: 1 - 5 ppm
- hmotnostní rozsah: až 10^5 (až 10^6 bez reflektoru, 20 000 pro QqTOF spektrometr)
- skenovací rychlost: 10 - 50 Hz
- hmotnostní analyzátor s teoreticky neomezeným hmotnostním rozsahem
- pulzní analyzátor - často s MALDI ionizací



Analyzátor doby letu

- měří **dobu letu iontů** potřebnou pro překonání určité dráhy
- ionty jsou urychleny napěťovým pulsem do **letové trubice** (oblast bez pole), kde letí různou rychlostí v závislosti na jejich m/z a dopadají na detektor v různém čase
 - ionty s menší hodnotou m/z o stejné kinetické energii se pohybují rychleji, takže se rychleji dostanou na detektor (“malé ionty letí rychleji”)
- měření spekter je velice rychlé a hmotnostní rozsah m/z není teoreticky omezen, záleží pouze na době, po kterou budeme čekat na dopad iontů (lze $m/z > 10^6$)
- jedná se o typicky pulzní hmotnostní analyzátor, protože nejdříve jsou velmi krátkým pulzem ionty urychleny na vstupu do analyzátorové trubice a potom se přesně měří čas (řádově ns – μ s), za který ionty “dolétnou” k detektoru, podle čehož se určí jejich m/z



Zvýšení rozlišení u TOF analyzátoru

- rozlišovací schopnost lineárního TOF analyzátoru není příliš vysoká (cca. 1 000 – 3 000), použitím dále uvedených technik lze výrazně zvýšit RP až na ca. 15 - 25 000, ve speciálním případě prodloužené letové trubice až 60 000

1/ Analyzátor doby letu s reflektorem (rTOF)

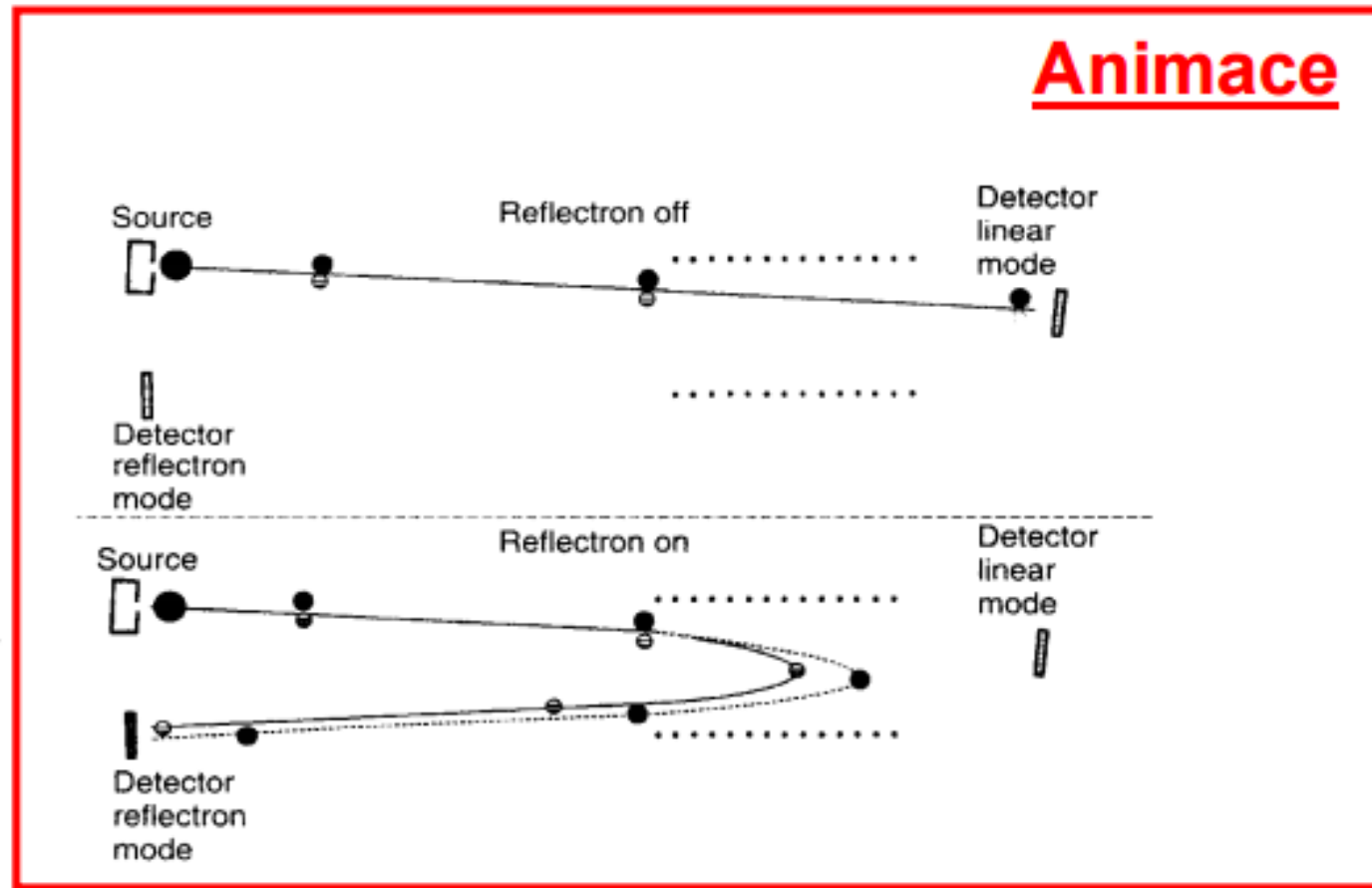
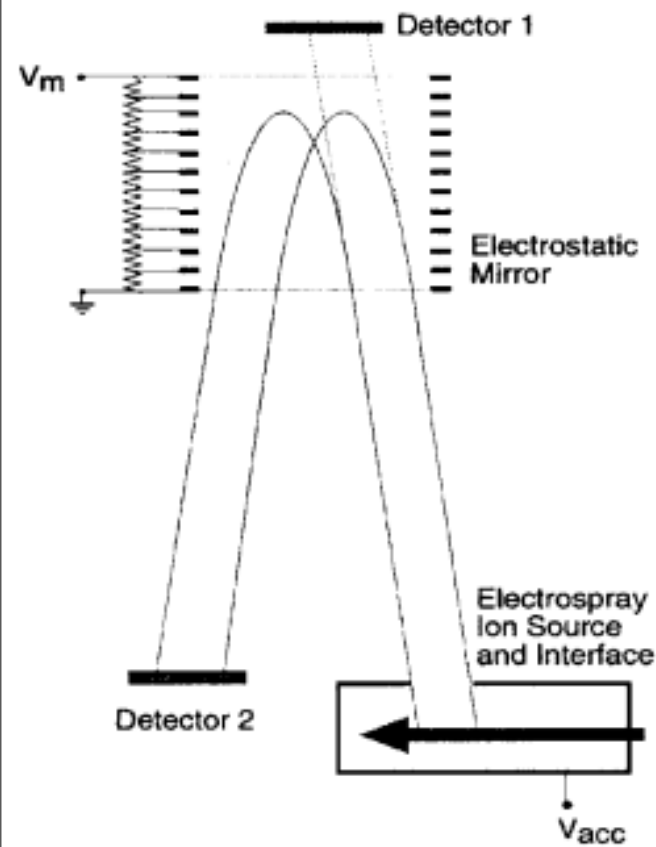
- použití tzv. iontového zrcadla neboli reflektoru, které slouží k vyrovnání různých kinetických energií pro ionty se stejnou hodnotou m/z (při ionizaci získají ionty kinetickou energii s určitou distribucí, což vede k rozšíření jejich píků a tím ke zhoršení RP)

2/ Opožděná extrakce iontů (Delayed Extraction)

- ionty jsou z MALDI zdroje extrahovány s malým zpožděním, čímž dojde díky vzájemným srážkám ke sjednocení jejich kinetických energií

Princip iontového zrcadla (reflektronu)

- ionty s větší kinetickou energií proniknou hlouběji do odrazového elektrického pole reflektoru před jejich odrazem (oproti iontům s nižší E_k), čímž dojde k jejich opoždění oproti iontům s nižší E_k a tím i k vyrovnání celkových drah iontů s různou E_k
- hloubka průniku iontů do elektrického pole reflektoru je úměrná jejich E_k a nezávisí na m/z



Kalibrace hmotnostní stupnice

Kalibrace hmotnostní stupnice

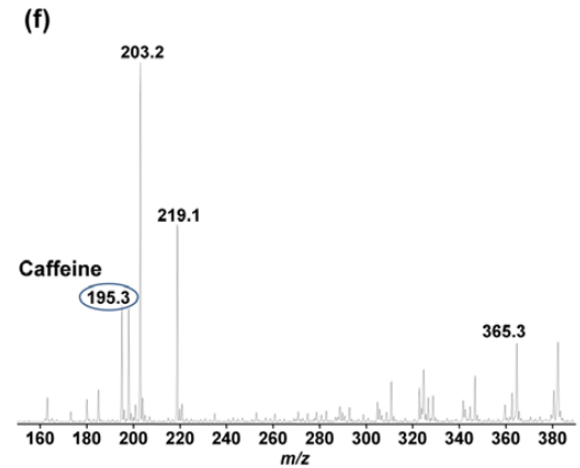
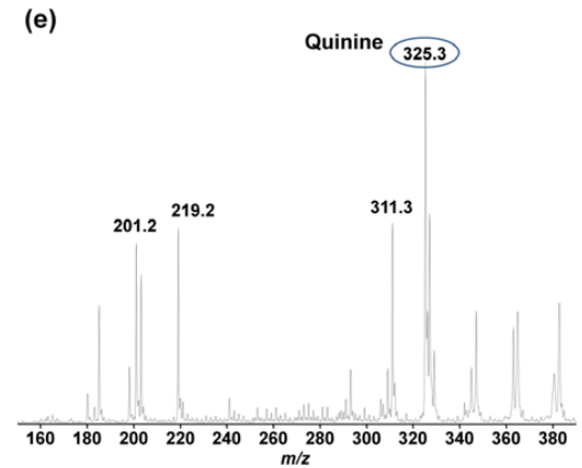
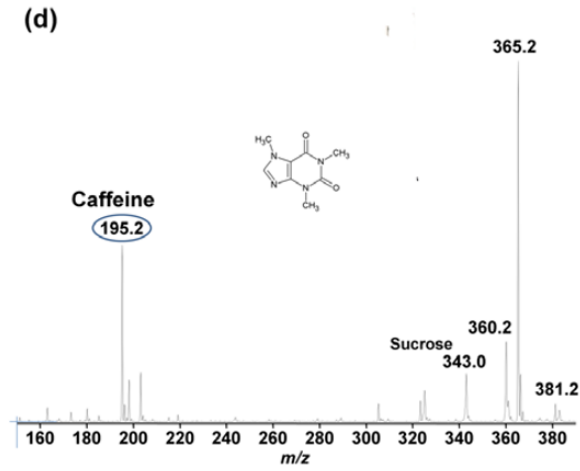
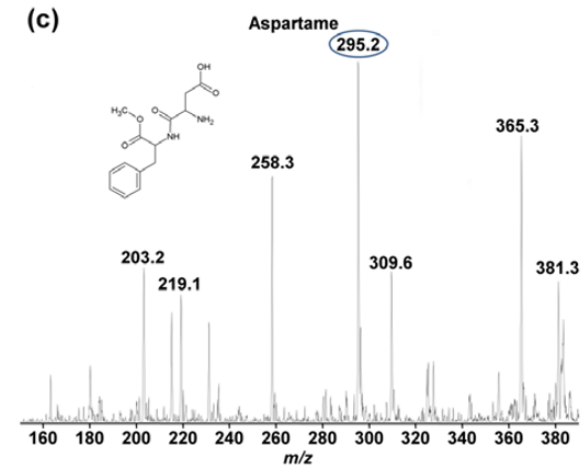
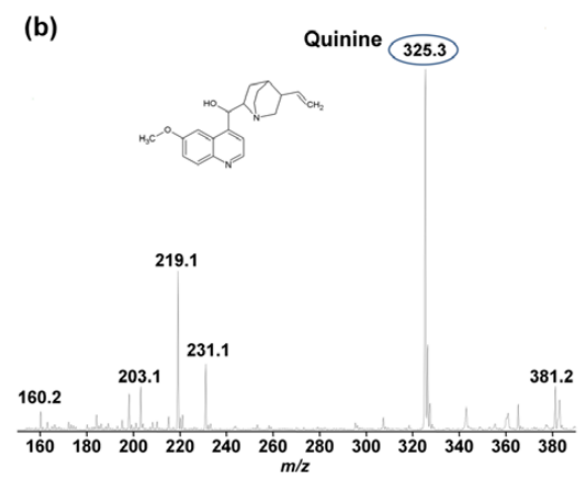
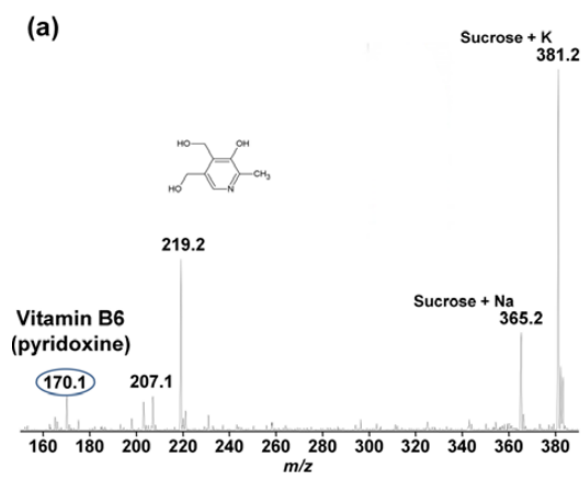
- u všech typů analyzátorů je vždy nutné kalibrovat hmotnostní škálu
- není tak kritické u analyzátorů s nízkým rozlišením / nízkou správností určení hmoty (např. Q, iontové pasti)
 - postačuje správnost ± 0.1 m/z
 - obvykle stabilní poměrně dlouhou dobu, ale i přesto je třeba pravidelně kontrolovat a v případě pochybností kalibrovat
- analyzátoři s vysokou správností určení hmoty (< 5 ppm)
 - vysoké nároky na správnost a přesnost kalibrace, potřebná stabilita a robustnost systému
 - interval kalibrace silně závisí na typu analyzátoru - před každou analýzou (QqTOF), jednou za týden (orbitrap), atd.

Kalibrace hmotnostní stupnice

- **externí kalibrace** – kalibrace a vlastní měření není ve stejný okamžik, nejdříve kalibrace a pak měření (nebo naopak), což někdy může způsobit určitý posun m/z
 - obecně poskytuje mírně horší výsledky oproti interní kalibraci, ale je menší riziko hmotnostních interferencí analytu s kalibrantem
- **interní kalibrace** – kalibrant i analyt jsou do iontového zdroje přivedeny ve stejný okamžik a ve spektru pozorujeme jak analyt tak i kalibrant
 - poskytuje nejpřesnější výsledky, ale hrozí riziko hmotnostních interferencí (tzn. analyt a kalibrant nesmí mít příliš blízké hmotnosti, aby je daný typ analyzátor dokázal spolehlivě rozlišit, pokud by se píky analytu a kalibrantu ovlivnily, pak vzniká chyba)
 - "lock mass" kalibrace - založena na kontinuální kalibraci na vybraný ion pozadí o známém složení nebo sprejování standardu druhým sprejem
- **kalibranty** – musí se jednat o látky s přesně definovaným elementárním složením a známým typem iontu, hodnoty m/z nesmí interferovat s analytem, výhodné může být též blízký strukturní typ analytu (není podmínkou) nebo přítomnost monoizotopických prvků (např. perfluorované látky, CsI)
 - typické kalibranty: syntetické polymery (např. PEG, PPG), klastry solí (např. monoizotopický CsI), směsi peptidů, apod.

Kvantitativní analýza pomocí MS

- kvantitativní výsledky jsou závislé na typu analyzátoru a ionizace
 - QqQ - standard pro kvantitativní analýzu, citlivý, rychlý a vysoká selektivita díky možnosti MS skenů, omezený rozsah a rozlišovací schopnost
 - při správně zvoleném standardu lze použít všechny typy analyzátorů
 - MALDI - obecně horší kvantitativní analýza díky nižší reprodukovatelnosti
- metody kvantitativní analýzy
 - metoda interního standardu, externí se nedoporučuje
 - metoda přímého srovnání - koncentrace je počítána na základě srovnání se standardem o známé koncentraci (pouze jedna koncentrace)
 - metoda kalibrační přímky - kalibrační závislost interního standardu na koncentraci
 - metoda standardního přídatku
- pro zvýšení citlivosti a selektivity se využívají pro kvantitativní analýzu často speciální MS skeny
 - nejčastěji sken iontové reakce - vysoká selektivita



Úkol

- změřit MALDI-TOF spektrum:
 1. Matrice
 2. Čisté sliny s matricí
 3. Coca-Cola s matricí (kofein)
 4. Šípkový čaj s matricí (bez kofeinu)
 5. Černý čaj s matricí (tein + látky typické pro čaj)
 6. Neznámý vzorek (stejná osoba jako v bodě b se napije jednoho z nápojů 3-5 a odevzdá vzorek slin k analýze)
- provést softwarovou kalibraci dat s ohledem na měřený rozsah m/z
- určit, který z nápojů (Coca-Cola, šípkový čaj, černý čaj) konzumovala osoba, jež poskytla vzorek č. 6