

Hmotnostní spektrometrie biomolekul

Jan Preisler

Oddělení analytické chemie Ústavu chemie, 312A14, 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 pastě, FT-ICR, orbitrap) a nejnovější vývoj v oboru.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013



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

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

Plán přednášek pro rok 2013

Přednášky se konají v učebně 235A11 v úterý, 17:00 – 18:50; případné změny budou ohlášeny předem.

Plán přednášek je uveden v separátním souboru „Sylabus C7895 MSBio 2013.pdf“ a může být v průběhu semestru upraven.

Učební materiál (MS Bio CZ 2012.pdf nebo MS Bio ENG 2012.pdf) je k dispozici na ISu MU a na bart.chemi.muni.cz.

Učební materiál je pouze osnovou k probírané látce. Doporučuji si jej vytisknout předem a doplňovat do něj poznámky na přednášce.

Učební materiál může být průběžně aktualizován.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

2

I. Úvod

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

5

Obsah

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

3

Studijní materiál

Poznámky z přednášek

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

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

Školy hmotnostní spektrometrie a HPLC-MS.

Doplňková literatura

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

6

Další zdroje informací

Internet

Učebnice <http://www.ms-textbook.com/> nebo http://www.spectroscopynow.com/Spy/basehtml/SpyH/1,1181,4-14-9-0-0-education_dets-0-68,00.html

Souborný zdroj informací www.spectroscopynow.com
Protein Prospector prospector.ucsf.edu
Komerční společnosti, např. <http://www.matrixscience.com/>
atd. atd.

Specializované časopisy

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

7

Aplikace MS

Analýza biologických látek:

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

Analýza syntetických polymerů

A další...

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

10

Ionizační metody a metody zavádění vzorku

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

8

Stručná historie hmotnostní spektrometrie

1803 Daltonova atomová teorie

"hmota se skládá z atomů; všechny atomy mají stejnou hmotu"
... ne tak docela: izotopy



Důkaz izotopů:

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

11

Hmotnostní spektrometry

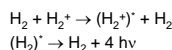
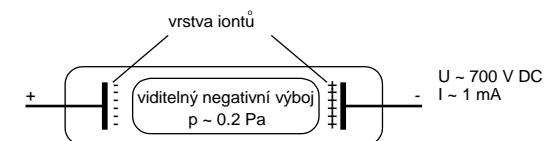
Základy iontové optiky. Simulace pohybu iontů, Simion
Energetické analyzátoři
Magnetický sektor
Kvadrupólový analyzátoři
Iontový cyklotron (ICR-FT-MS)
Iontová past (IT)
Time-of-flight hmotnostní spektrometr (TOFMS)
Nové hmotnostní spektrometry: Orbitrap, TOF-TOF, LIFT-TOF.
Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS, MSⁿ)
Količně 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 2013

9

Doutnavý výboj jako iontový zdroj

1880's Crookes: doutnavý výboj

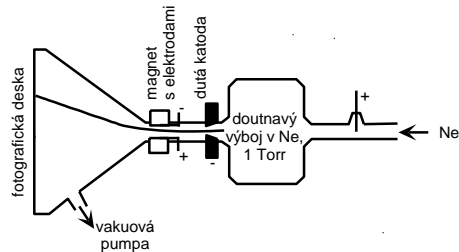


Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

12

První hmotnostní spektrometr

1911 J. J. Thompson: Parabola MS (*Phil. Mag.* 1911, 21, 225)
"Paprsky pozitivní elektřiny" 1913



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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

13

Stručná historie MS ve zbytku 20. stol.

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

1950-70 MS používáno ke strukturální analýze organických sloučenin

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

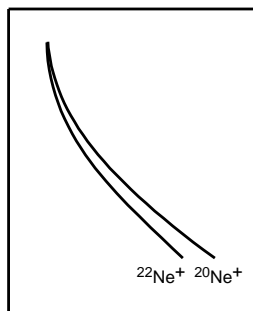
2005 MS pro kvalitativní, strukturální i kvantitativní analýzu
Široká škála komerčních hmotnostních spektrometrů
MS nezbytná pro analýzu organických a biologických molekul

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

16

První hmotnostní spektrometr

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



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

14

Základní koncepty hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometr

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

Součásti spektrometru

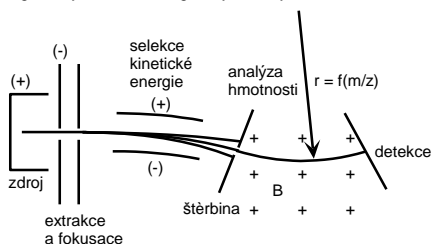
1. Komora s iontovým zdrojem (zařízení na zavádění vzorku, iontová optika)
2. Hmotnostní analyzátor (iontová optika, magnet, detektor)
3. Vakuové pumpy (nízké, vysoké a ultra vysoké vakuuum)
4. Řídicí a vyhodnocovací elektronika, software

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

17

Magnetický sektor s energetickým analyzátozem

1919 F. W. Aston: Mass Spectrograph (*Phil. Mag.* 1919, 38, 209)
Magnetický sektor s energetickým analyzátozem



Většina přírodních izotopů stanovena do r. 1930
Nobelova cena za projev v r. 1934: "MS mrtva, vše hotovo ..."

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

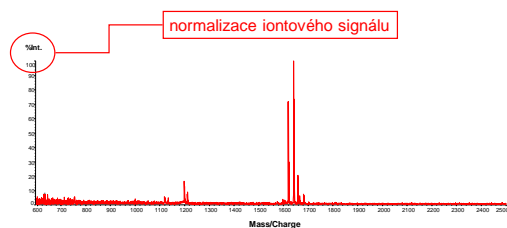
15

Hmotnostní spektrum

iontový signál vs. m/z

iontový signál

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



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

18

Hmotnostní spektrum

Hmotnost, m

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

m/z - účinná hmotnost, Th (Thomson)

Počet nábojů, z

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

lonty: pozitivní a negativní, ne kationty a anionty.

Hmotnostní spektrometrie, ne spektroskopie.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

19

Použité zkratky

n	číslná 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 2013

22

Vybrané veličiny v hmotnostní spektrometrii

Hmotnostní rozlišení

Míra separace dvou přilehlých píků.

Dvě definice:

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

Energie iontu

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

Tlak, p

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

20

Izotopové patery organických molekul

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

Patern jako funkce počtu uhlíkových atomů v molekule:

C : 99% ^{12}C 1% ^{13}C
 C_2 : 98% $^{12}\text{C}^{12}\text{C}$ 2% $^{12}\text{C}^{13}\text{C}$ 0,01% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$
 C_3 : 97% $^{12}\text{C}^{12}\text{C}^{12}\text{C}$ 3% $^{12}\text{C}^{12}\text{C}^{13}\text{C}$ 0,04% $^{12}\text{C}^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ 10^{-4} % $^{13}\text{C}^{13}\text{C}^{13}\text{C}$

Binomická řada

Relativní výskyt lehkého izotopu, a
Relativní výskyt těžkého izotopu, b
Počet atomů, n
Např. pro $n = 2$: $(a+b)^2 = a^2 + 2ab + b^2$

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

23

Použité zkratky

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

21

Izotopové patery organických molekul

Relativní výskyt molekul v %:

C_{60} :	$^{12}\text{C}_{60}$	100
	$^{12}\text{C}_{59}^{13}\text{C}$	66
	$^{12}\text{C}_{58}^{13}\text{C}_2$	21
C_{100} :	$^{12}\text{C}_{99}^{13}\text{C}$	110
	$^{12}\text{C}_{98}^{13}\text{C}_2$	60
	$^{12}\text{C}_{97}^{13}\text{C}_3$	22
	$^{12}\text{C}_{96}^{13}\text{C}_4$	10

(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 2013

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

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

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

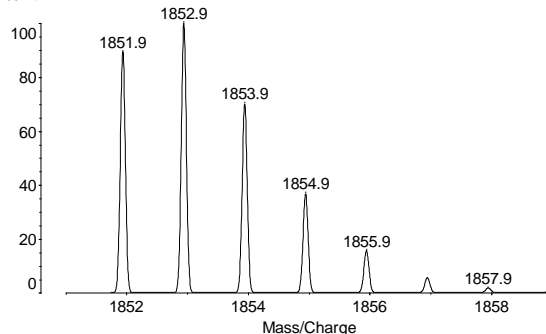
$C_{900}H_{1350}N_{180}O_{180}S_{30}$

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

25

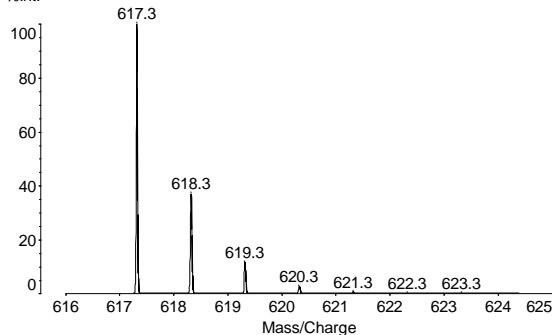
Molecular formula: $C_{90}H_{135}N_{18}O_{18}S_3$ Resolution: 20000 at 50%
%Int.



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

28

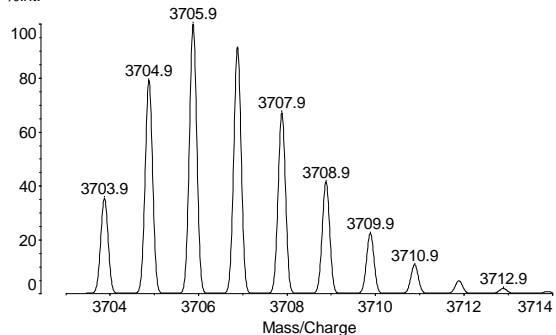
Molecular formula: $C_{30}H_{45}N_6O_6S$ Resolution: 20000 at 50%
%Int.



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

26

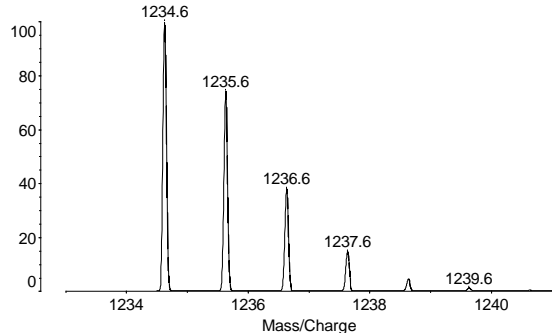
Molecular formula: $C_{180}H_{270}N_{36}O_{36}S_6$ Resolution: 20000 at 50%
%Int.



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

29

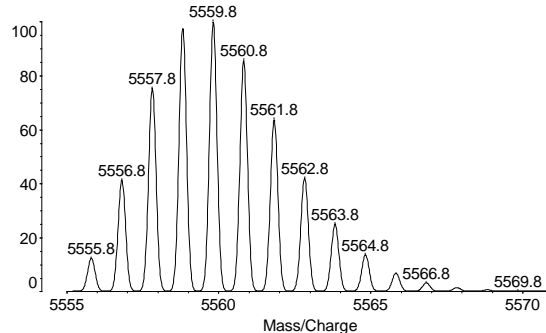
Molecular formula: $C_{60}H_{90}N_{12}O_{12}S_2$ Resolution: 20000 at 50%
%Int.



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

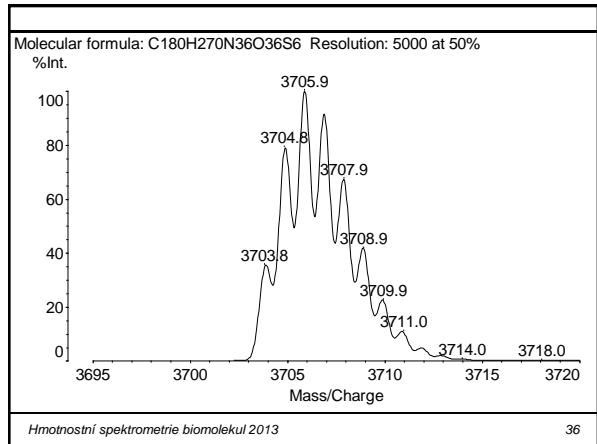
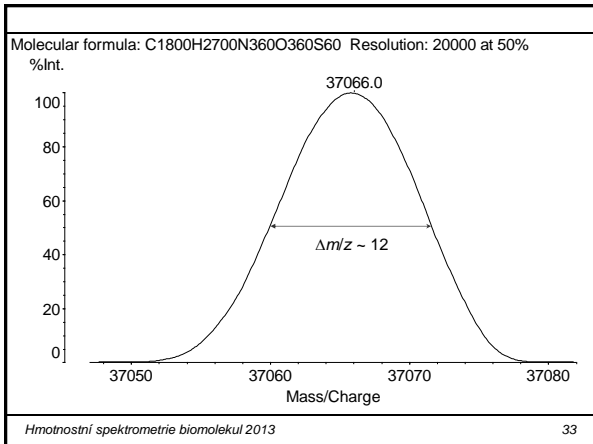
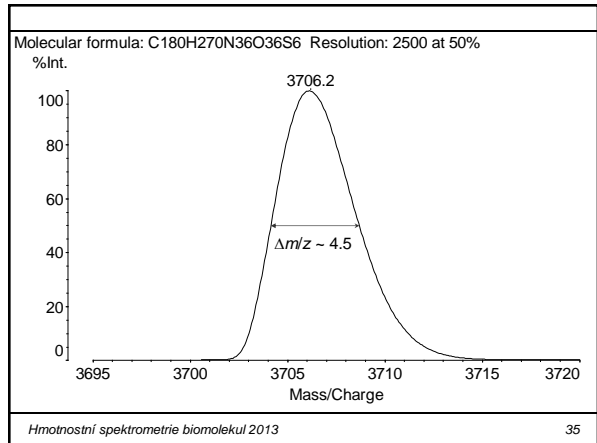
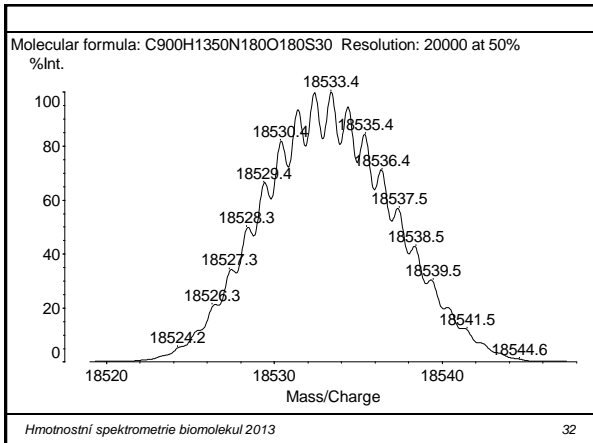
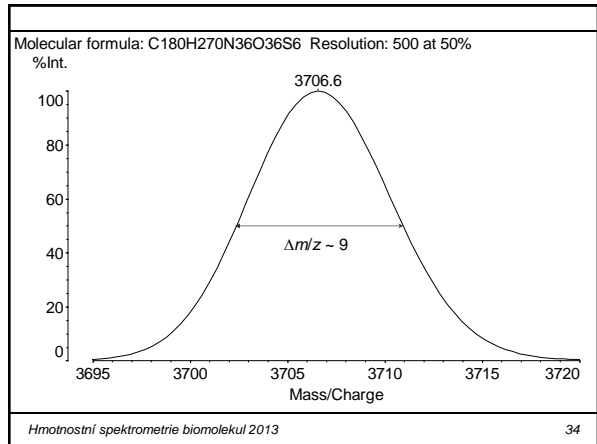
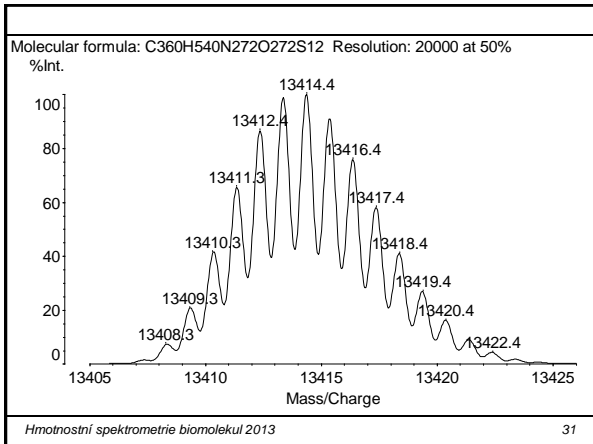
27

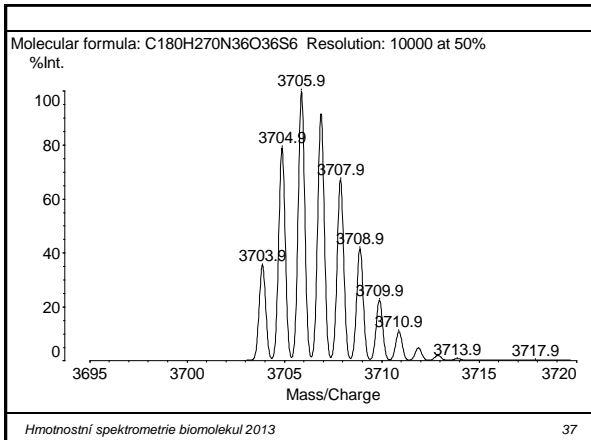
Molecular formula: $C_{270}H_{405}N_{54}O_{54}S_9$ Resolution: 20000 at 50%
%Int.



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

30





II. Ionizační techniky a zavádění vzorku

vzorek (atm. tlak) → vzorek (vakuum)

Nežádoucí jevy

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

Rozdělení vzorků podle skupenství

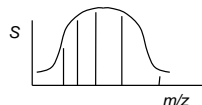
- **Tekuté vzorky**
 - plynné vzorky
 - kapalné vzorky (kapalný analyt, rozpuštěný analyt)
- **Tuhé vzorky**
 - těkavé (lehké sloučeniny)
 - netěkavé (polární, polymerní látky)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

40

Vícenásobně nabitě ionty

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



Př.:

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

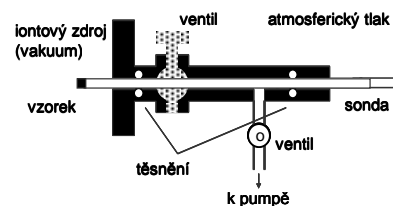
38

Zavádění vzorků

Off-line

On-line

In-line



Počet zaváděných vzorků

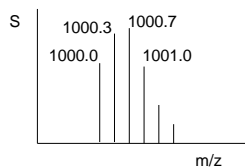
- 1 vzorek
- Více vzorků
 - sériově (diskrétní vzorky nebo spojitý tok)
 - paralelně

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

41

Co můžete říci o tomto spektru?

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



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

39

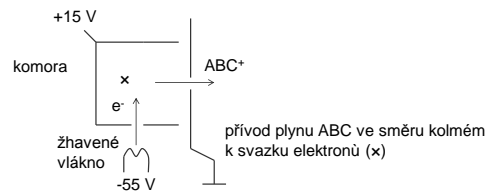
Elektronová ionizace, EI (Electron impact)

Klasická ionizační technika.

Elektrony emitované ze žhavého vlákna jsou urychleny středně velkým napětím.

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

Typická energie: 70 eV.

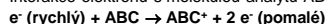


Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

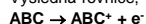
42

Mechanismus EI

Interakce elektronu s molekulou analytu ABC:

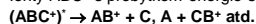


Výsledná rovnice,



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

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



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

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

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

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

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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

43

Chemická ionizace (CI)

20. léta 20. století A. J. Dempster

Tentýž iontový zdroj jako pro EI plus reaktivní plyn

Reaktivní plyn (RH)

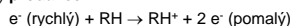
CH_4 , butan, H_2 , NH_3 atd.

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

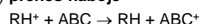
$\rho(\text{R}) \sim 0.1$ Pa ($\lambda \sim 0.05$ mm, mnoho kolizí ve zdrojích)

Mechanismus tvorby iontů

a) produkce RH^+



b) přenos náboje

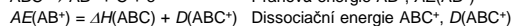
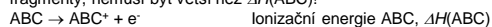


Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

46

Mechanismus EI

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



Absorpce elektronů při průchodu plynem ionizované látky

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

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

po integraci:

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

I proud elektronů (A)

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

x tloušťka vrstvy (cm)

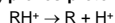
α průřez (cm^2) ... analogie koeficientu ϵ v Lambert-Beerově zákonu

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

44

Mechanismus tvorby iontů při CI (pokr.)

c) přenos protonu (běžnější)



$PA(\text{R})$ protonová afinita



$- PA(\text{ABC})$

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

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

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

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

+ kvantitativní analýza

+ molekulová hmotnost ABC

+ vysoká ionizační účinnost (ABC)

- žádná informace o struktuře

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

47

2

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

Kolize molekul při CI

Střední volná dráha molekuly

Střední dráha, kterou urazí iont mezi 2 srážkami

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

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

Počet kolizí

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

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

σ kolizní průměr

σ^2 průřez molekuly

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

Porovnání CI vs EI

+ silnější signál

- vyšší šum

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

48



Negativní chemická ionizace

Tentýž iontový zdroj jako pro EI plus reaktivní plyn

Mechanismus

1. Produkce termálních (pomalých) elektronů

e^- (rychlý) + RH \rightarrow RH $^+$ + 2 e^- (pomalý)

W (pomalý e^-) \sim 3/2 kT

$T \sim 400$ K $\Rightarrow E \sim 0.1$ eV

2. Záchyt elektronu

ABC + e^- \rightarrow ABC $^-$

Přednostně u sloučenin s elektronegativními skupinami (PCB, NO $_3^-$ atd.)

LD ~ pg

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

49

Zavedení vzorku pro EI/CI (pokr.)

3. Netěkavé látky

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

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

Vhodné pro molekuly s $M < 1000$ Da.

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

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

c) Jiné ionizační techniky

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

52

Zavedení vzorku pro EI/CI

1. Plyn/těkavá kapalina

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

otevřený iontový zdroj v komoře s plynem: p (komoře) = p (plyn)

• Eluent ze separační kolony (GC-MS)

Problém: Vysoký proud plynu z klasických kolon GC

a) oddělení a sběr frakcí (split, splitter)

b) rozhraní (interface) pracující bez přerušování

i) tryskový separátor

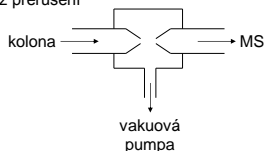
(particle beam)

pro obohacení ABC

v nosném plynu

vyžaduje $M(ABC) \gg M(\text{nosič})$

... He jako nosný plyn



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

50

Anorganické iontové zdroje

Doutnavý výboj

Termální ionizace

Indukčně vázané plasma

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

53

Zavedení vzorku pro EI/CI (pokr.)

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

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

2. Těkavý, termálně stabilní pevný vzorek

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

51

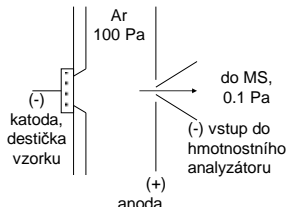
Doutnavý výboj

První iontový zdroj (J. J. Thompson)

Analýza pevných vzorků, obvykle vodivých.

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

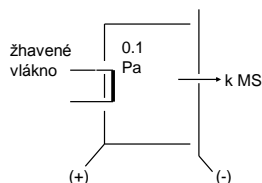
Výboj v Ar ($p \sim 100$ Pa): Ar $^+$ vyražejí atomy kovu M z destičky vzorku a později je ionizují na M $^+$.



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

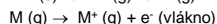
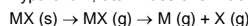
54

Termální ionizace (TI)

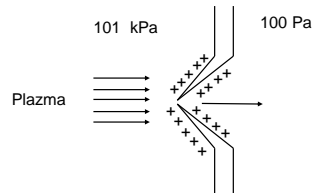


Vzorek nanesen na vlákno; vlákno odporově zahříváno.

Vypařování, atomizace a ionizace:

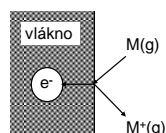


ICP



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

Termální ionizace



Saha-Langmuirova rovnice

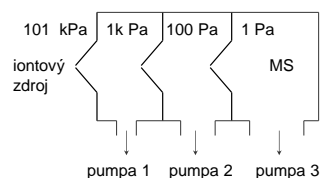
$$n(\text{M}^+)/n(\text{M}) \propto \exp\left(\frac{W - IE}{kT}\right)$$

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

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

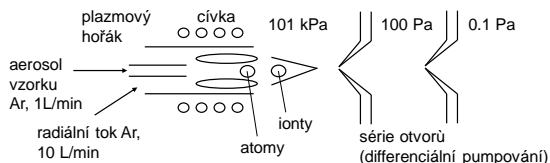
- Tři vlákna (s rozdílnou teplotou): Náhrada jednoho vlákna, které odpařuje a ionizuje vzorek příliš rychle.
Stabilnější iontový tok (RSD pouze ~ 0.1 %!)
Užitečné pro stanovení izotopového zastoupení.

Diferenciální pumpování



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

Induktivně vázané plazma (Inductively Coupled Plasma, ICP)



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

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

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 rovňav v důsledku přítomnosti matrice, kyselin, snadno ionizovatelných prvků atd.

2. Spektrální

ionty izotopů
izobarické molekulární ionty

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

61

Ionizace polem (Field Ionization, FI)

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

64

Spektrální interference v ICP

Tvorba molekulárních iontů v ICP

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

Odstranění spektrálního rušení

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

62

Desorpční ionizační techniky

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

65

Spektrální interference v ICP

Příklady izobarických iontů a rozlišení potřebného k jejich stanovení.

Izotop	Rušící iont	Rozlišení
³⁹ K	³⁹ Ar ¹ H ⁺	5690
⁴⁰ Ca	⁴⁰ Ar ⁺	71700
⁴¹ K	⁴⁰ Ar ¹ H ⁺	4890
⁴⁴ Ca	¹⁴ N ¹⁴ N ¹⁶ O ⁺	970
	¹² C ¹⁶ O ¹⁸ O ⁺	1280
⁵² Cr	⁴⁰ Ar ¹² C ⁺	2380
⁵⁶ Fe	⁴⁰ Ar ¹⁶ O ⁺	2500
⁷⁵ As	⁴⁰ Ar ³⁵ Cl ⁺	7770
⁸⁰ Se	⁴⁰ Ar ⁴⁰ Ar ⁺	9690

Pozn.: vyšší rozlišení často znamená nižší citlivost.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

63

Desorpce polem (Field Desorption, FD)

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

Vzorek je nasměrován (g) nebo nanešen (l, g) na 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:

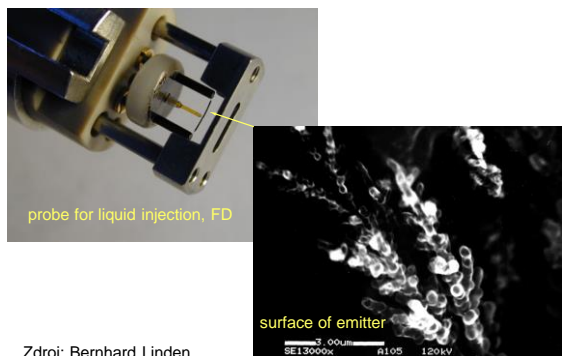
- termální ionizaci
- elektrosprej ... během nanášení kapalných vzorků

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

66

Field Ionization. Field Desorption



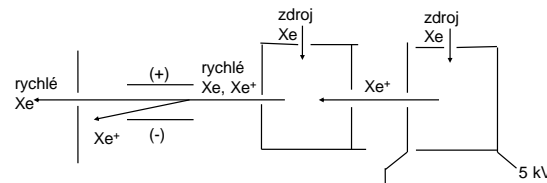
Zdroj: Bernhard Linden

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

67

Produkce rychlých atomů (Xe) pro FAB

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

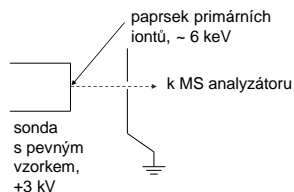


Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

70

MS sekundárních iontů (Secondary Ion Mass Spectrometry, SIMS)

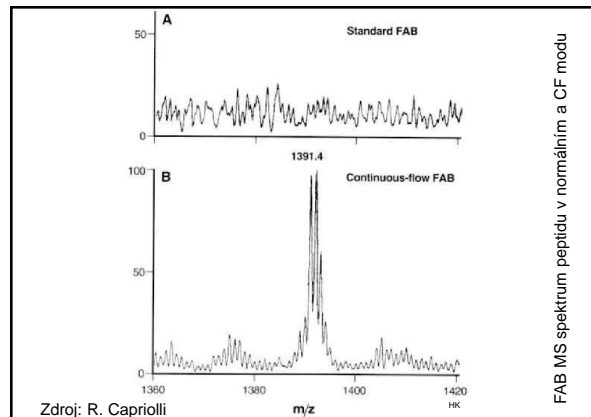
... Ionizace ionty



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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

68



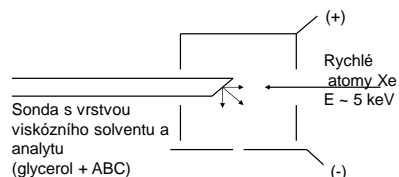
Zdroj: R. Caprioli

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

FAB MS spektrum peptidu v normálním a CF modu

71

Ionizace nárazem rychlých atomů (Fast Atom Bombardment, FAB)

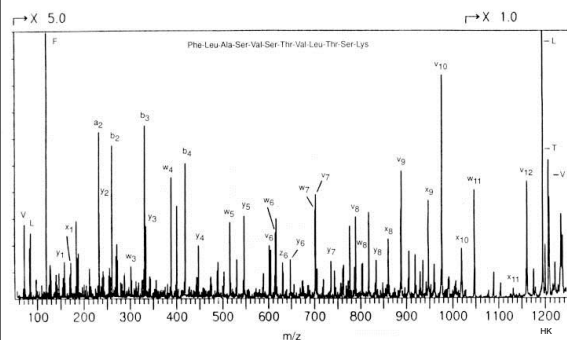


- Ionizace podobná CI (organické molekuly, malé peptidy...).
- Sestava: off-line i on-line (průtoková sonda; tzv continuous flow, CF-FAB).
- Max. hmotnost ~ 10 000 Da. LOD ~ 10 pmol nebo až < 1 pmol (CF-FAB)
- Obvykle z = ± 1.
- Vzniklé ionty: ABCH⁺, [ABC+N₂]⁺, [ABC+K]⁺, [ABC+H]⁺, fragmenty.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

69

CF-FAB MS/MS řetězce a lidského hemoglobinu

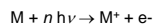


Zdroj: R. Caprioli

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

72

Fotoionizace (Photoionization, PI)



Nutná podmínka: $n h\nu > IE(M)$

Typy fotoionizace

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

73

Plazmová desorpce (PD)

1974 Ronald D. Macfarlane

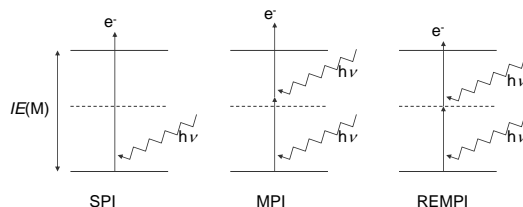
(R. D. Macfarlane, R. P. Skowronski, D. F. Torgerson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1974**, 60, 616.; R. D. Macfarlane, D. F. Torgerson *Science* **1976**, 191, 920.)

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

76

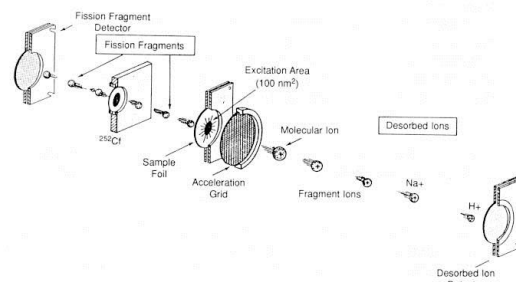
Mechanismy fotoionizace



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

74

Experimentální uspořádání PD



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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

77

PI

Příklad uspořádání: LD-PI

PI jako postionizace pro laserovou desorpci

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



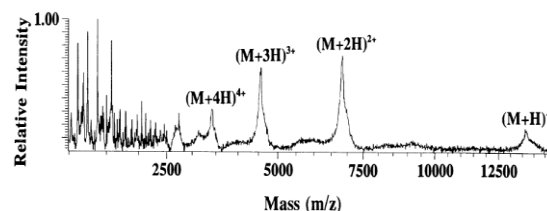
3. Puls ionizačního laseru
4. Extrakce iontů



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

75

PD: příklad



Pozitivní PD MS ribonukleázy A z hovězí slinivky

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

78

Charakteristika PD

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

The Nobel Prize in Chemistry 2002

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

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

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

MALDI
ESI



John B. Fenn $\text{€ } 1/4$ of the prize
USA

Koichi Tanaka $\text{€ } 1/4$ of the prize
Japan

Kurt Wüthrich $\text{€ } 1/2$ of the prize
Switzerland

Virginia Commonwealth University
Richmond, VA, USA

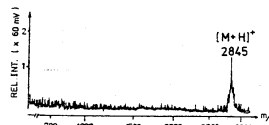
Shimadzu Corp.
Kyoto, Japan

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

Zdroj:
www.nobel.se
October 9, 2002

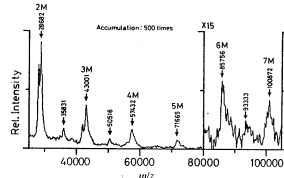
3

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



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)

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

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).

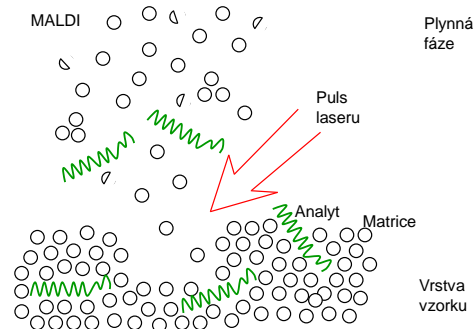
Laserová desorpce/ionizace za účasti matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI)

Vhodná pro těžší analyty, polymery, biomolekuly.

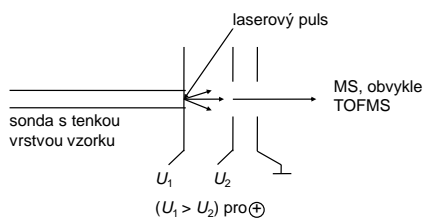
Karas, M.; Bachmann, D.; Bahr, U.; Hillenkamp, F. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **1987**, 78, 53 - 68.

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

Schema MALDI (detail)



Schema LDI (MALDI)



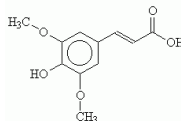
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

85

Běžné matrice pro MALDI

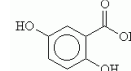
sinapino acid (SA)

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

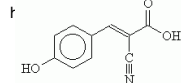


gentisic acid (DHB)

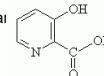
(2,5-dihydroxybenzoic acid)



α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)



pyridinecal



3-(3-

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

88

Princip LDI a MALDI

- Velmi krátký puls laseru**, typicky $t \sim$ ns (LDI, MALDI), max. μ s. 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. ϵ (matrice) \gg ϵ (analytu), c (matrice) \gg c (analytu). Matrice \rightarrow 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**: $MH^+ + ABC \rightarrow M + ABCH^+$.

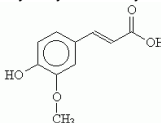
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

86

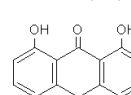
Běžné matrice pro MALDI

ferulic acid

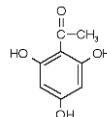
(4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid)



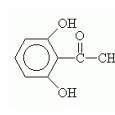
dithranol (DIT)



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



2',6'-dihydroxyacetophenone



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

89

Požadavky na matrici (MALDI)

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

Typy matricí

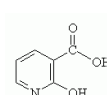
- aromatické kyseliny (Karas & Hillenkamp)
- glycerol s přidavkem jemného kobaltového prášku (Tanaka)
- modifikovaný povrch, např. Si - DIOS (Siuzdak), SELDI

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

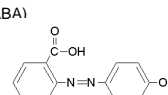
87

Běžné matrice pro MALDI

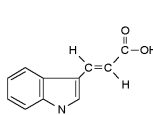
nicotinic acid-N-oxide



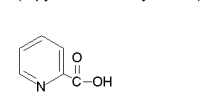
2,-(4-hydroxy-phenylazo)-benzoic acid (HABA)



trans-3-indoleacrylic acid (IAA)



picolinic acid (PA)



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

90

Matrice - aplikace

peptidy < 10 000	CHCA, DHB
peptidy, proteiny > 10 000	SA, DHB
oligonukleotidy < 3 kDa	THAP
nukleové kyseliny > 3 kDa	HPA
syntetické polární polymery	DHB
syntetické polární polymery	DIT, IAA
karbohydráty	DHB, CHCA, THAP

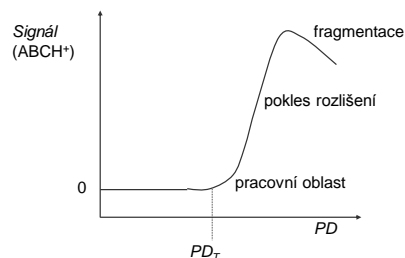
Přidávky komaticí (např. monosacharidů) – zlepšení krystalizace, homogenity vzorku, rozlišení, potlačení fragmentace

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

91

Vliv energie laseru

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



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

94

Vlastnosti matrice

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

DHB: „studená“ matrice
univerzální použití

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

92

Vliv energie laseru

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

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

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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

95

Lasery

UV-MALDI

337 nm dusíkový laser (nejlevnější a nejběžnější)

355 nm Nd:YAG (3xf)

266 nm Nd:YAG (4xf)

193 nm ArF ... fragmentace!

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

IR MALDI

2.94 μm Er:YAG laser

10.6 μm CO₂ laser

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

93

Akumulace spekter

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

signál, $S \propto n$

šum, $N \propto \sqrt{n}$

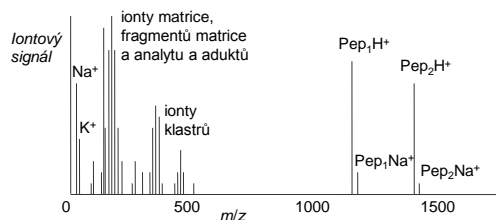
signál/šum, $S/N \propto \sqrt{n}$

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

96

MALDI MS spektrum

Modelové spektrum vzorku 2 peptidů, Pep₁ a Pep₂



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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

97

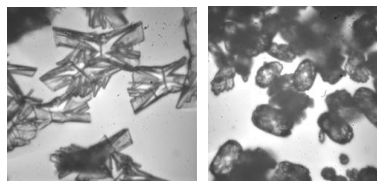
Příprava MALDI vzorků

MALDI vzorek = analyt + matrice

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

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

terčik: ocel, Al, syntetické polymery



www.srsaldi.com

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

100

Charakteristika MALDI

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

98

Zásady při přípravě MALDI vzorků

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

101

Charakteristika MALDI

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

99

Metody přípravy vzorků

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

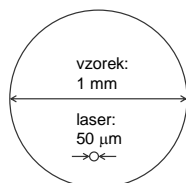
102

Další metody přípravy vzorků

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

mikrometody

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



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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

103

Perspektiva MALDI

MS analýza početných sérií biologických vzorků

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

Mikrometody

Spojení se separačními technikami

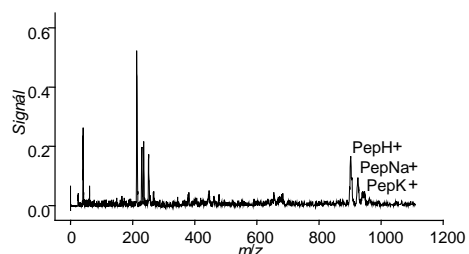
- výhoda archivování vzorků na MALDI terčičku
- uvedení dostupných MS/MS spektrometrů pro MALDI
- doplňková technika k ESI (odlišná ionizační účinnost pro různé analyty)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

106

Vliv přítomnosti solí

MALDI spektrum vzorku peptidu v přítomnosti solí Na a K



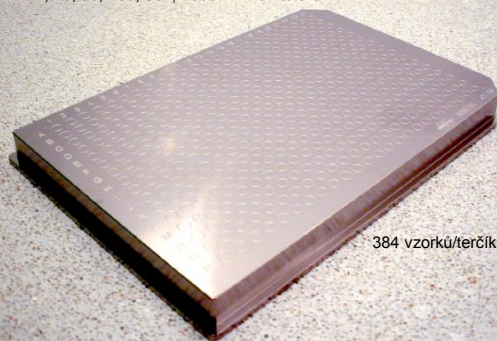
odsolení vzorku nutné (přítomnost solí \Rightarrow tvorba aduktů \uparrow , citlivost \downarrow)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

104

MS analýza početných sérií biologických vzorků

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

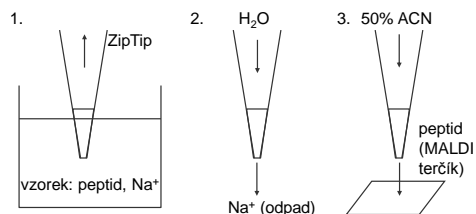


384 vzorků/terčička

Redukce vlivu solí

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

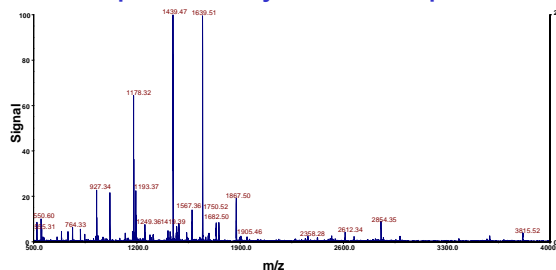
odsolení vzorku před nanesením: separace, dialýza, ZipTip (C_{18})



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

105

MALDI MS identifikace hovězího albuminu z produktů enzymatického štěpení

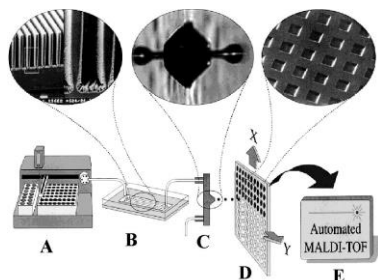


Analyt: 1 pmol tryptického digestu BSA, odsoleno pomocí ZipTip C_{18}
Matrice: 10 mg/ml CHCA v ACN/0.1% TFA : 70/30
Příprava vzorku: dried-droplet.
MS: Voyager DE-STR

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

108

Mikrometody - příklad



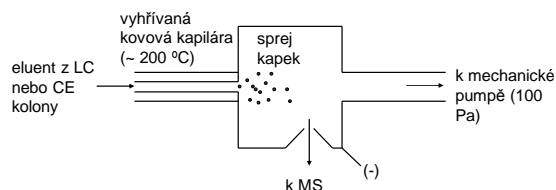
- (A) úprava vzorku a dávkování
 (B) reaktor s imobilizovaným enzymem
 (C) mikropipetor
 (D) nanoválky (300 x 300 x 20 μm) na MALDI terčiku
 (E) automatizovaná MALDI-TOF MS

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

109

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

112

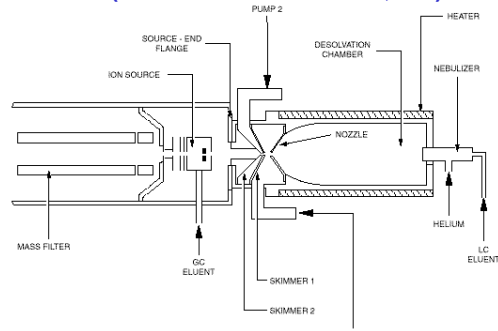
Srovnání LDI a MALDI

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

110

Ionizace svazkem částic (Particle Beam Ionization, PBI)



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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

113

On-line ionizační techniky Ionizace za atmosferického tlaku

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

Společné znaky

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

111

Ionizace svazkem částic (Particle Beam Ionization, PBI)

Princip

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

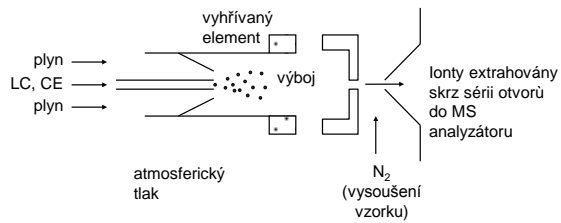
Charakteristika

- 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 2013

114

Vyhříváný nebulizér

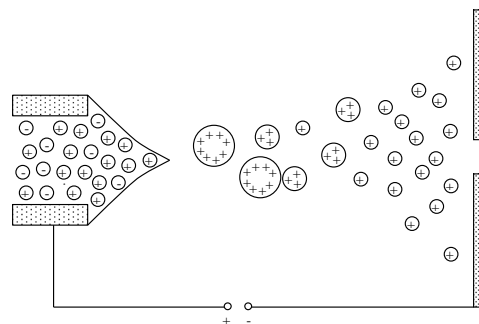


- Spektra podobná CI, obvykle záchyt 1 protonu ($[M+H]^+$).
- Nízké procento fragmentace (měkká ionizace).
- Vhodné pro střední hmotnosti (~2000 Da).
- Struktura? ... Nutno použít přídavnou kolizní celu (MS/MS).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

115

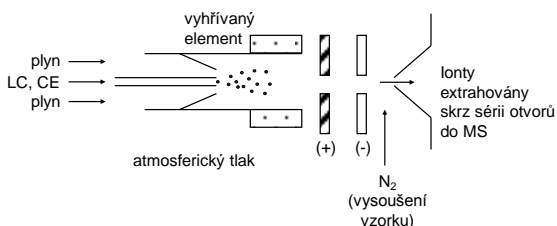
Princip ESI



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

118

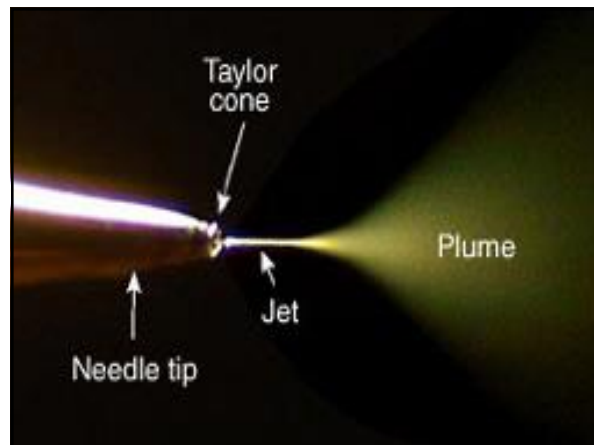
Iontový sprej (Ion Spray, IS)



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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

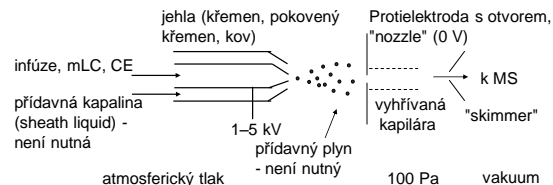
116



Elektrosprej (ESI)*, Nanosprej*

- * Yamashita, M; Fenn, J. B. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 4451.
- * Yamashita, M; Fenn, J. B. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 4671.
- * Wilm, M. S.; Mann, M. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1994**, *136*, 167.

Schema



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

117

Princip ESI

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

120

Provedení ESI

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

Tvorba vícenásobně nabitých iontů

- + Vyšší z snižuje $m/z \Rightarrow$ lze použít hmotnostní analyzátor s nižším limitem max. hmotností i pro ionty o velmi vysoké hmotnosti.
- + Ke zjištění m a z stačí pouze 2 sousední píky:

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

$$(m/z)_{n+1} = (m+n+1)/(n+1)$$
- + Ovlivnění náboje z ?
 - pH roztoku: $\text{pH} \downarrow \Rightarrow z \uparrow$
 $\text{pH} \uparrow \Rightarrow z \downarrow$, 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 $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ atd.

Provedení ESI

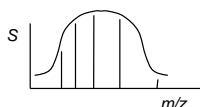
- **Uspořádání trysky a otvoru**
... oddělení iontů od balastu
 - v ose (on-axis)
 - mimo osu (off-axis)
 - diagonální (tilted) a kolmé (orthogonal)
 - Z-sprej
- **Připojení el. napětí**
 - přes přídavnou kapalinu (sheath flow)
 - kapalinový spoj (liquid junction)
 - pokovený hrot kapiláry (sheathless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

ESI

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

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 elektrospřej. Mezery nejsou ekvidistantní (narozdíil od izotopového paternu).



Př.:

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

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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

127

III. Hmotnostní analyzáto

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

130

DESI

Desorption electrospray ionization

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

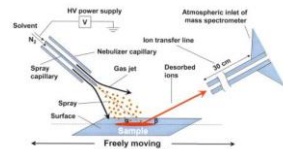


Fig. 1. Schematic of typical DESI experiment. The sample solution was deposited from solution and dried onto a PTFE surface, and methanol-water (1:1 containing 1% acetic acid or 0.1% aqueous acetic acid solution) was sprayed at a flow rate of 3 to 15 $\mu\text{l}/\text{min}$ under the influence of a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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

128

Základy iontové optiky

Analogie se světelnou optikou

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

Odišnosti od světelné optiky

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

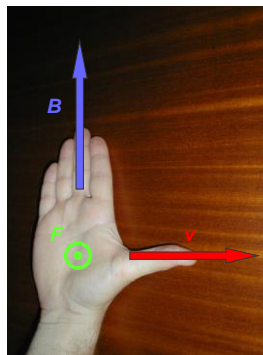
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

131

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



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:

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

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

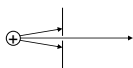
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

132

Elementy iontové optiky

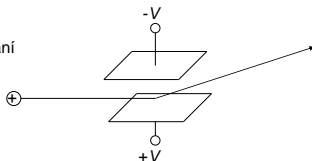
Štěrbina

- vymezení paprsku
- vymezení vs. propustnost



Deflektor

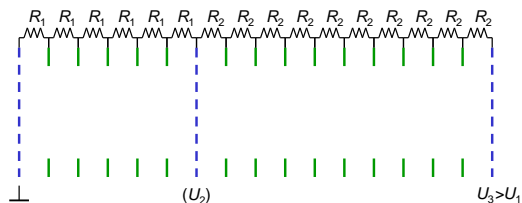
- odklonění iontů
- 2 deflektory pro x, y skenování



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

133

Konstrukce iontového zrcadla se 2 stupni



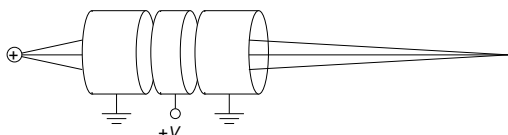
mřížky: definice ekvipotenciálních rovin

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

136

Čočka (elektrostatická, Einzelova čočka)



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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

134

Vlastnosti iontů

Vlastnosti iontu

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

Vlastnosti skupin iontů

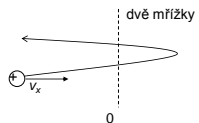
(nejčastěji o totožném m/z)

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

137

Iontové zrcadlo (reflektor, reflektor)



Kinetická energie iontu vs. potenciální energie elektrického pole:

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

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

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

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

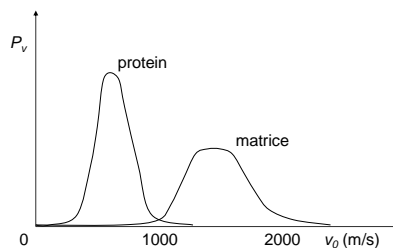
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

135

Vlastnosti iontů

Př.: Distribuce počáteční rychlosti při MALDI

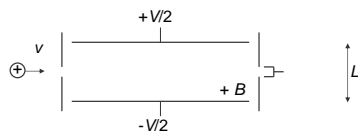
($P_v \dots$ pravděpodobnost výskytu molekuly o rychlosti v)



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

138

Weinův rychlostní filtr



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

Energetický analyzátor

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

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

Poloměr zakřivení: $r = \frac{2U}{E}$

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

Weinův rychlostní filtr

Pro iont letící středem filtru platí:

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

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

... prolétají pouze ionty o určité rychlosti.

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

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

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

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

Hmotnostní analyzátořy

Magnetický sektor (MAG, B)

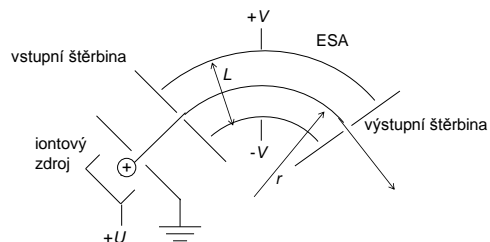
Quadrupólový analyzátoř (Q, q)

Iontový cyklotron (ICR-FT-MS)

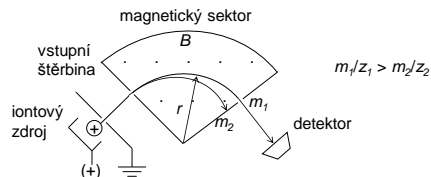
Iontová past (IT)

Průletový, Time-of-flight (TOFMS)

Energetický analyzátoř; elektrostatický analyzátoř (ESA, E)



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 = odstředivá síla:

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

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

2.) Kinetická energie = urychlovací energie:

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

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

Tandem EB

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

Praktické geometrie EB:

1. Nier-Johnsonova

90° ESA + 60° MAG

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

2. Mattauch-Herzogova

31.8° ESA + 90° MAG

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

3. Matsudova

vhodná pro kompaktní přístroje

Princip magnetického sektoru

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

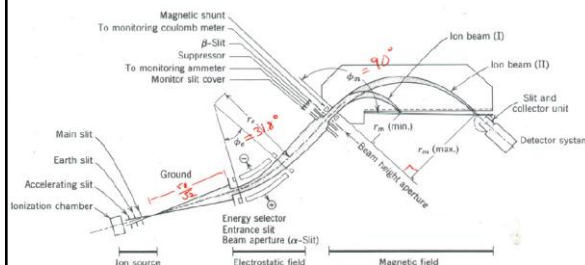
Způsoby skenování spektra:

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

Peak switching

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

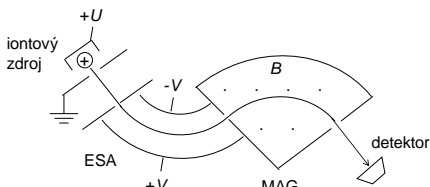
Mattauch-Herzogova geometrie



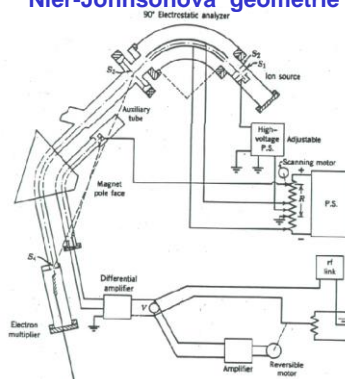
Tandem elektrostatický analyzátor - magnetický sektor

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

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



Nier-Johnsonova geometrie



Další kombinace E a B

Reversní geometrie (Reverse-geometry, BE)

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

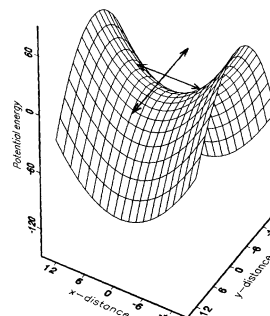
MIKES (Mass-Analyzed Ion Kinetic Energy Spectrometry)

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

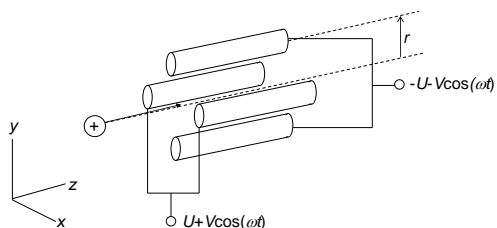
1. Magnetický sektor propustí ionty o určité hmotnosti.
2. Metastabilní ionty se rozpadnou v oblasti mezi magnetickým a energetickým analyzátozem.
3. Dceřinné ionty vzniklé z rozpadu se rozdělí podle kinetické energie v energetickém analyzátozu.

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

Quadrupole field



Kvadrupolový hmotnostní filtr (Quadrupole MS, Q, q)



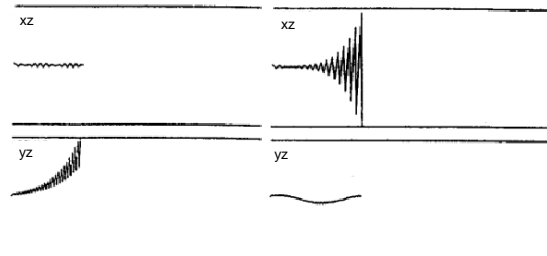
4 tyče hyperbolického (též kruhového, čtvercového nebo jiného) průřezu

U ... DC složka napětí

V ... AC (RF) složka napětí

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

Trajektorie iontů v kvadrupolovém filtru



Heavy Ions

Light Ions

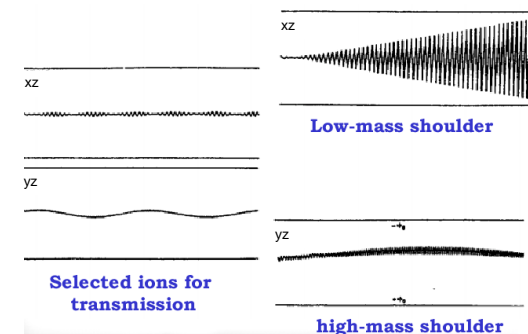
Kvadrupolový hmotnostní filtr

Rovina xz: těžké ionty procházejí

Rovina yz: lehké ionty procházejí

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

Trajektorie iontů v kvadrupolovém filtru



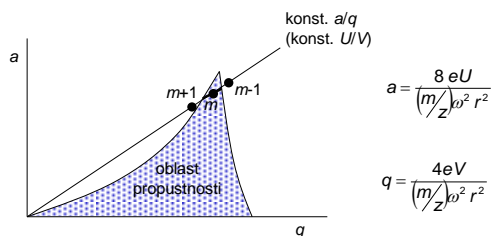
Selected ions for transmission

Low-mass shoulder

high-mass shoulder

Diagram stability

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



Vlastnosti kvadrupólového filtru

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

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

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

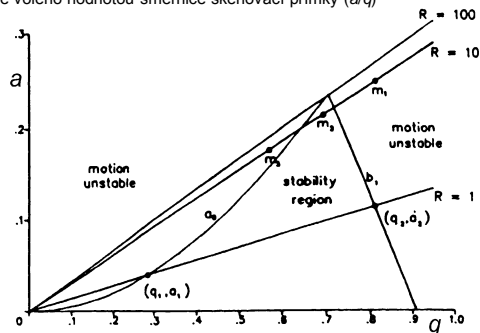
$$t = \sqrt{\frac{l^2 \frac{m}{Z}}{2eU_{acc}}}$$

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

- Zvýšení rozlišení též přesnější mechanickou výrobou.

Rozlišení

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



Kvadrupólový filtr

Externí zdroj

- problémy s okrajovým polem (fringe field), nestabilní dráhy; významné % iontů se nedostane dovnitř
 - hmotnostní diskriminace - těžké ionty, které stráví delší dobu v okrajovém poli, jsou více ovlivněny
 - řešení:
 - vstupní elektrostatická čočka
 - vstupní RF kvadrupól (q), hexapól nebo oktupól
- (pouze RF složka: $a = 0, U = 0 \Rightarrow$ neselektivní filtr propouštějící všechny m/z ... iontový vodič)

Trojité kvadrupól (QqQ)

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

Vlastnosti kvadrupólového filtru

Zaznamenávání spektra

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

Limit max. hmotnosti 2 000 - 4 000.

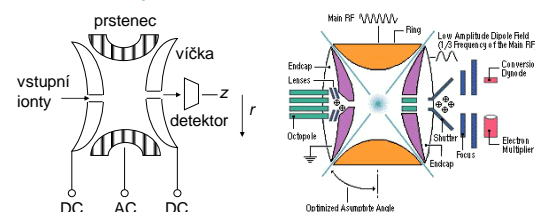
$$\max\left(\frac{m}{Z}\right) \sim \frac{0.316V}{r^2 f^2} \quad [V, \text{cm}, \text{MHz}]$$

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

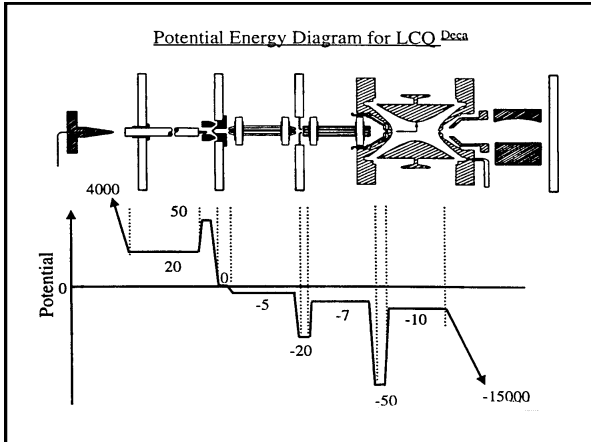
Kvadrupólová iontová past (Ion trap, IT)

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

Schema iontové pasti



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



Iontová past

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013 166

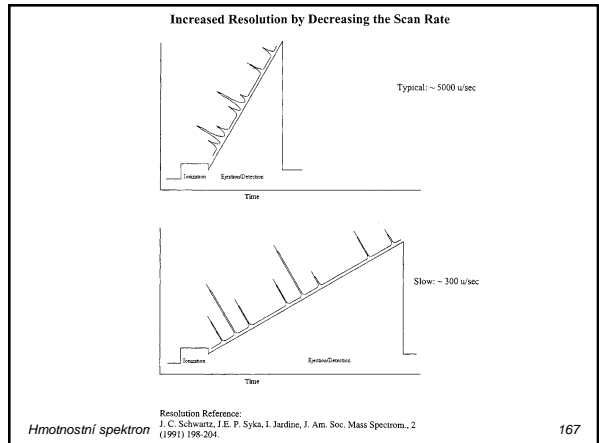
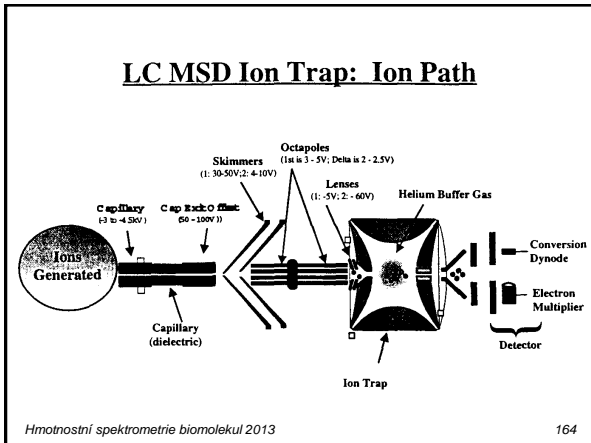


Diagram stability iontové pasti

oblast nestability: ionty opouštějí past štěrbinami ve víčkách

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

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

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

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

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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013 165

Iontová past

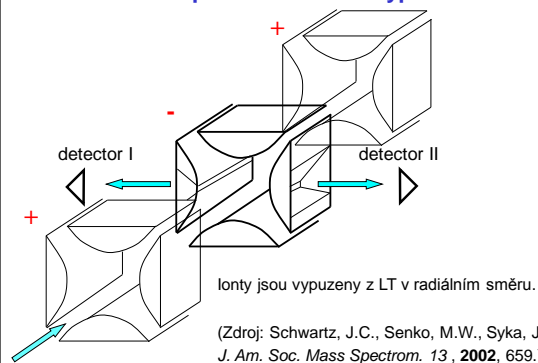
- MS/MS** - past může nahradit tandem dvou spektrometrů srážkově indukovaná (aktivovaná) disociace, většinou s He
CID, CAD: collisionally induced (activated) dissociation
- Vysoké R** ... v praxi < 10 000, obvykle ~ 5 000
- Max. hmotnost**, $m/z_{max} \sim 70\,000$ (rezonanční vypuzení)
- Miniaturizace:**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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013 168

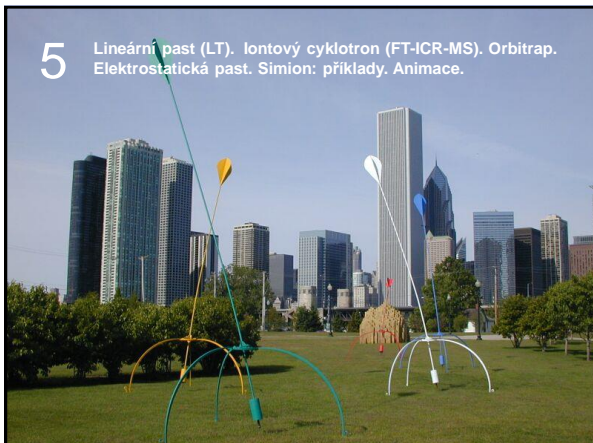
Iontová past

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

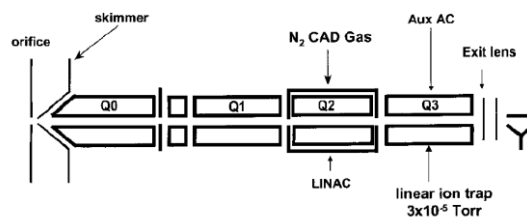
Lineární past s radiálním vypuzením



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



Lineární past s axiálním vypuzením



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.

Výhody 2D vs. 3D pasti

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

Účinnost extrakce: 25-50% (3-D : 20%)

Citlivost: 5-10 – násobný vzrůst

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

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

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

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

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

FT-ICR-MS

Pohyb iontu v magnetickém poli:

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



Úhlová (cyklotronová) frekvence:

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

Srovnání kvadrupólových analyzátorů

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

Vlastnosti FT-ICR-MS

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

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

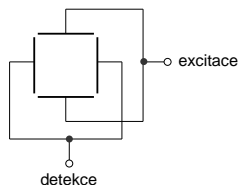
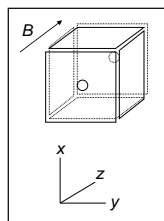
Další geometrie pastí: cylindrická, hyperbolická (Penningova)

Iontový cyklotron (FT-ICR-MS)

(Fourier transform - ion cyclotron resonance - mass spectrometer)

...typ iontové pasti

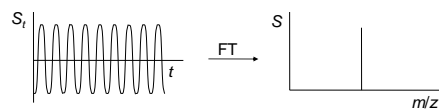
Kubická past tvořena dvěma páry elektrod a dvěma víčky



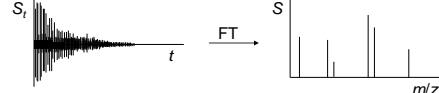
Fourierova transformace

... 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.

Princip FT-ICR-MS

Ionizace pro FT MS

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

Excitace

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

FT-ICR-MS

Rozlišení

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

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

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

který pre-excituje ionty, vyjádříme

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

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

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

Princip FT-ICR-MS

Detekce

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

Záznam dat

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

Hmotnostní spektrometr budoucnosti?

... neexistuje jediné nejlepší řešení

Trendy

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

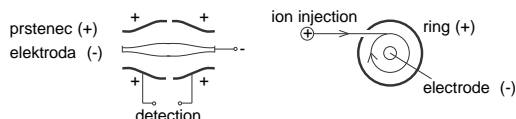
Princip FT-ICR-MS

Z-trapping

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

Elektrostatická past "Orbitrap"

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



Princip

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

Vlastnosti Orbitrapu

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

187

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

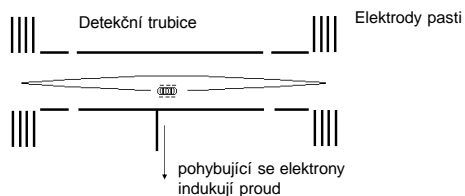
Princip: m/z vypočten z doby letu iontů

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

190

Lineární elektrostatická past



Detekovaná frekvence = $f(m/z)$

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

188

Historie TOFMS

1946 princip TOF

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

1948 první TOF spektrometr (ion velocitron)

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

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

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

1973 iontové zrcadlo

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

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

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

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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

191

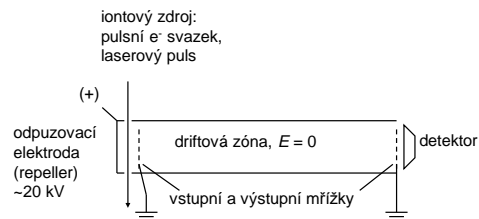


6
Time-of-flight hmotnostní spektrometr (TOF MS). Metody zvýšení rozlišení TOF MS (reflektor, zpožděná a ortogonální extrakce).

Geometrie TOFMS

Lineární geometrie

... nejjednodušší sestava



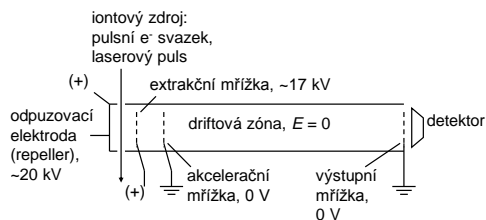
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

192

Geometrie TOFMS

Wiley-McLarenova lineární geometrie (1955)

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



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

193

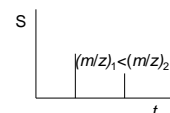
Princip TOFMS

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

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

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

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



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

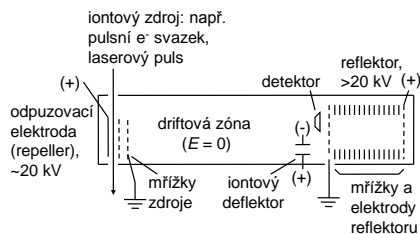
196

Geometrie TOFMS

TOF MS s iontovým zrcadlem (reflektorem)

... dosažení lepších parametrů spekter

... možnost strukturální analýzy (PSD)



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

194

Princip TOFMS

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



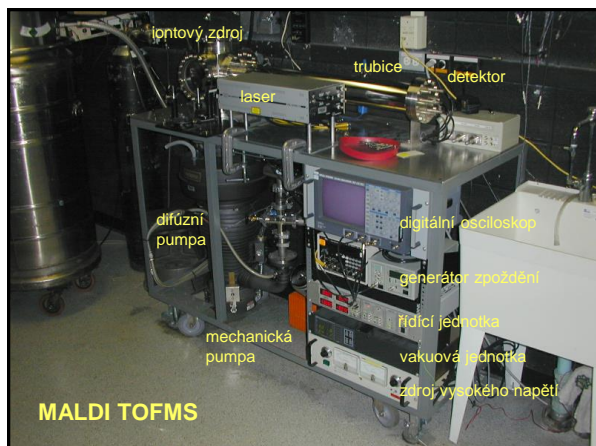
$$t_{TOF} = t_s + t_L + t_d$$

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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

197



MALDI TOFMS

TOF: kalibrace m/z

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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

198

Principiální výhody a vlastnosti TOFMS

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

Reálný zdroj iontů pro TOFMS

Ionty jsou charakterizovány distribucemi:

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

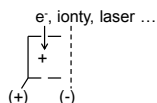
Důsledek: snížení rozlišení, R

Wiley-McLarenův zdroj pro plynné vzorky:

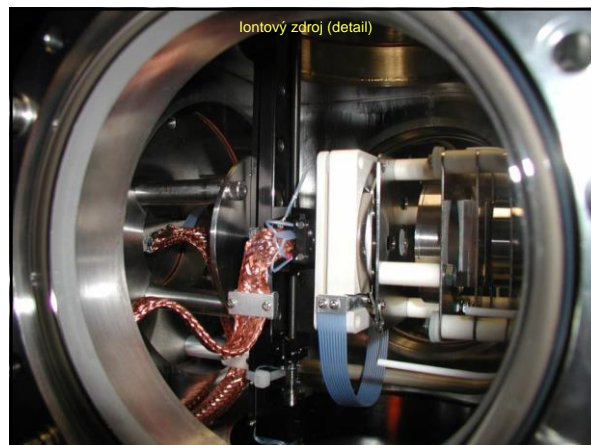
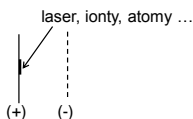
nastavením napětí na střední mřížce umožňuje kompromis distribuce v a x za účelem dosažení optimálního rozlišení (Wiley, W. C.; McLaren, I. H.; Rev. Sci. Instrum., 1955, 26, 1150)

Iontové zdroje pro TOFMS

1. Zdroj pro plynné vzorky



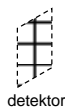
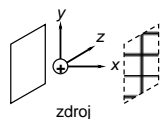
2. Zdroj pro tuhé vzorky (desorpce)



Ideální zdroj iontů pro TOFMS

Všechny ionty jsou vytvořeny:

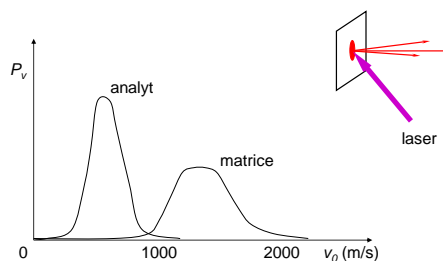
- v čase t_0 (doba tvorby, $\Delta t = 0$)
- ve vzdálenosti x_0 (x ... osa letu TOFMS) (nejlépe v jednom bodě $[x_0, y_0, z_0]$)
- se stejnou rychlostí v_{x0} (, která nemusí být nulová,) podél osy x . (nejlépe s $v_{y0} = 0$ a $v_{z0} = 0$)



Vlastnosti iontů

Př.: Distribuce počáteční rychlosti iontů při MALDI

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



Spojení MALDI-TOF MS?

Desorpční metody (MALDI, LDI) - speciální případ:

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

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

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

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

1. Vysoké urychlovací napětí

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

příspěvek desorpce příspěvek el. pole

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

Pulsní tvorba iontů pro TOFMS

Extrakce konstantním elektrickým polem (DC)

pulsní ionizační paprsek + konstantní extrakční pole

2a. Pulsní extrakce, zpožděná extrakce

(pulsed extraction, PE; delayed extraction, DE)

pulsní ionizační paprsek + pulsní extrakční pole

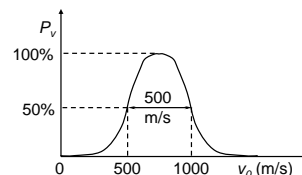
2b. o-TOFMS s pulsní extrakcí

(orthogonal extraction, kolmá extrakce)

souvislá tvorba (přívod) iontů + pulsní extrakční pole

Vliv urychlovacího napětí

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



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

Jak zvýšit rozlišení (MALDI-TOFMS)?

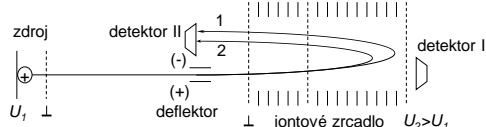
1. Vysoké extrakční napětí v lineárním TOF MS.

2. Reflektor.

3. Pulsní extrakce.

2. Reflektor

(reflektor, iontové zrcadlo, rTOFMS)



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

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

Konstrukce reflektoru

Lineární reflektor ... E je konstantní podél osy reflektoru

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

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

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

Nelineární reflektor ... E se mění podél osy reflektoru

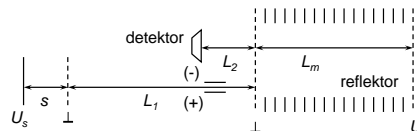
Kvadratické pole (D. R. Jardine, J. Morgan, D. S. Alderdice, P. J. Derrick, *Org. Mass Spectrom.* 1992, 27, 1077)

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

211

Reflektor s jedním stupněm



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

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

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

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

a ... zrychlení ve zdroji, $a=qE_s/m$

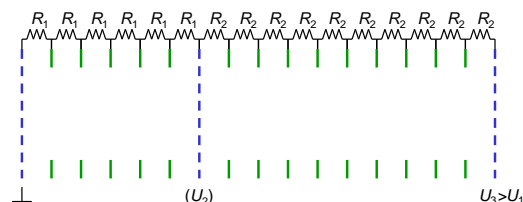
a_r ... zrychlení v reflektoru, $a=qE_r/m$

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

214

Konstrukce reflektoru



mřížky: definice ekvipotenciálové plochy

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

212

Reflektor se dvěma stupni

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

Pro kladné ionty:

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

- různá uspořádání s poměry délek stupňů $\sim 1:2$, $\sim 2:3$ aj.

- použití krátkého 1. stupně s vyšší intenzitou elektr. pole umožňuje zkrátit celkovou délku reflektoru

s negativním potenciálem na druhé mřížce:

- vytvoření prostorového zaostření v prvním stupni

- různá hloubka průniku v druhém stupni (energetické zaostření)

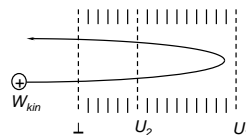
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

215

Příklad konstrukce reflektoru



Reflektor se dvěma stupni



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

energetická disperze ... hlavní příčina snížení rozlišení R

Mamyrin:

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

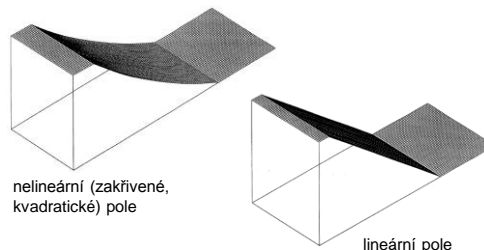
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

216

Reflektor se dvěma stupni

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

Reflektor s nelineárním polem



nelineární (zakřivené, kvadratické) pole

lineární pole

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

Reflektor s nelineárním polem

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

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

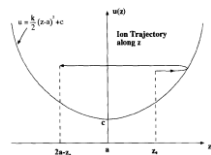


Fig. 1. Potential distribution in quadratic fields along the optical axis. z_0 is the initial coordinate (starting point) of an ion. $2a - z_0$ is the coordinate of ideal time-focusing.

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

z ... osa změny potenciálu

a ... minimum paraboly

k a C ... konstanty

f ... frekvence oscilací

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

Reflektor s nelineárním polem

Zpravidla kvadratické pole nebo jeho aproximace



Tvorba nelineárního pole

pomocí nesterajných rezistorů v sérii

pomocí nesterajných odstupů mezi prstenci či mřížkami

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

- složitější kalibrace

- ideální jen pro ionty pohybující se po ose reflektoru

... v praxi omezené R

Reflektor s nelineárním polem

Další prakticky využitelná pole:

osově symetrický hyperbolický potenciál

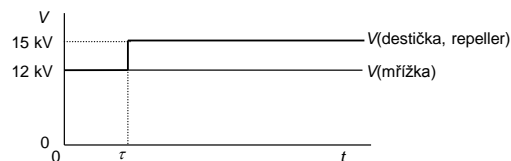
planární hyperbolický potenciál

osově symetrický hyperlogaritmický potenciál

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

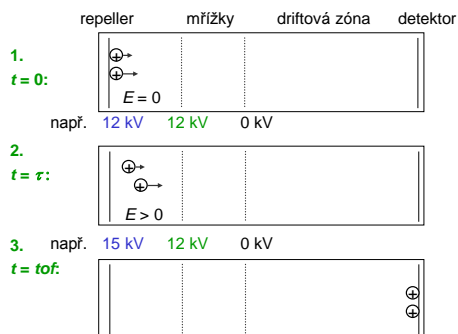
Opožděné zapnutí extrakčního napětí:

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



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

Pulsní (zpožděná) extrakce

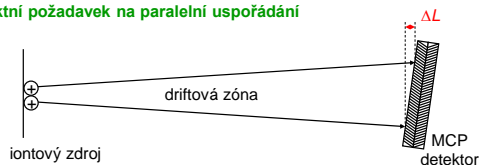


Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

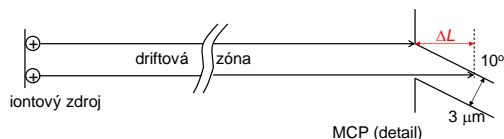
223

Vliv uspořádání na rozlišení

Striktní požadavek na paralelní uspořádání



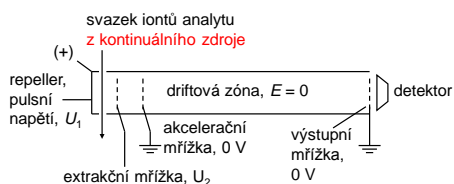
MCP s úzkými kanálky



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

226

Ortogonalní extrakce (oTOFMS)



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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

224

Vliv uspořádání na rozlišení

Rozlišení: $R = \frac{m}{\Delta m}$ $\frac{m}{z} = 2eU \frac{t^2}{L^2}$
 $R = \frac{t}{2\Delta t}$ $t = L/v$
 $R = \frac{L}{2\Delta L}$

Např. pro $R = 15\,000$ a $L = 3$ m:

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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

227

Další faktory ovlivňující rozlišení TOFMS

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

Př. vliv kolísání urychlovacího napětí:

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

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

dU určeno drifts a kolísáním zdroje vysokého napětí

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

225

Vliv mřížek

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

MS s mřížkami

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

MS bez mřížek

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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

228

Další parametry TOFMS

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

Axiální ozáření vzorku laserem ⇒ vyšší rozlišení

Kolizní cela v iontovém zdroji ⇒ zvýšení výtěžku fragmentace

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

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

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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

229

Vlastnosti TOFMS

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

232

MALDI analýza početných sérií vzorků

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



384 vzorků/terčik

Shrnutí výhod TOF MS

Výhodné vlastnosti

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

Obrovský rozmach TOF MS v poslední dekádě

MALDI + PE TOF, rTOF MS

API + oTOF MS

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

Konkurenční techniky

LT, FT-ICR a hybridní MS

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

233

Srovnání rozlišení systémů TOFMS

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

231

Srovnání běžných hmotnostních spektrometrů

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

Pozn:

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

234

Simulace pohybu iontů

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

Postup při řešení konfigurace iontové optiky pomocí programu Simion:

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

Sken: záznam hmotnostního spektra

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

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

Neskenující přístroje (přímý záznam signálu v čase):

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

Další neskenující přístroje mohou používat plošné detektory (array).

Simion

Příklad: Simulace elektrostatické čočky pomocí programu Simion.

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

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

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

Řešení: Viz přílohy

Jednoduchá hmotnostní spektrometrie

Záznam „celého“ spektra



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

Záznam části spektra (**zoom scan**)



7

Kolizně indukovaná disociace (CID). Tandemová MS (MS/MS). Další možnosti disociace (ECD, ETD, fragmentace ve zdroji a za zdrojem – ISD a PSD). Techniky TOF-TOF, LIFT. Spektrometrie iontové mobility (IMS). Zobrazovací hmotnostní spektrometrie (MSI).

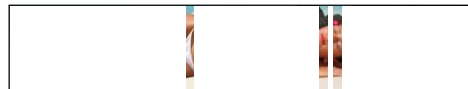


Jednoduchá hmotnostní spektrometrie

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



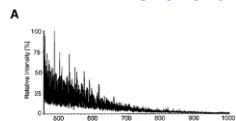
Záznam signálu vybraných iontů (**peak switching**)



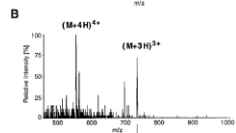
Techniky 2, 3 a 4:

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

Př.: skenování iontů prekurzorů

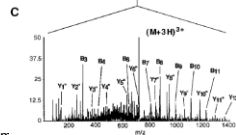


Parent ion scans of unseparated peptide mixtures
M. Wilm, G. Neubauer, M. Mann *Anal. Chem.* 68, 527-33 (1996)



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 ($m/z = 86 \text{ Da}$)

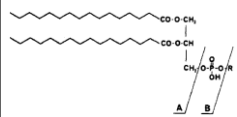


(C) Sken produktových iontů $[M+3H]^{3+}$

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

247

Př.: skenování ztráty neutrální částice



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

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

- CH₂CH₂NH₂ PE
- CH₂CHOHCH₂OH PG
- CH₂CHOHCH₂LYSINE LPG
- INOSITOL PI
- CH₂CH₂NHCH₃ MMPE
- CH₂CH₂N(CH₃)₂ DMPE

fosfoethanolamin: $\Delta m/z = 141$

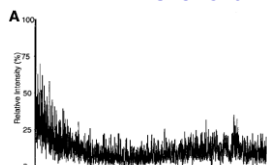
fosfoglycerol: $\Delta m/z = 172$

methylfosfoethanolamin: $\Delta m/z = 155$

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

250

Př.: skenování iontů prekurzorů

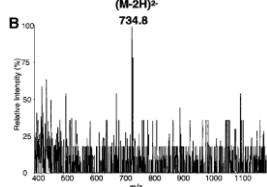


Parent ion scans of unseparated peptide mixtures
M. Wilm, G. Neubauer, M. Mann *Anal. Chem.* 68, 527-33 (1996)

(A) Pozitivní MS fosfopeptidu

EPQY^FEELPIYL,

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



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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

248

Př.: skenování ztráty neutrální částice

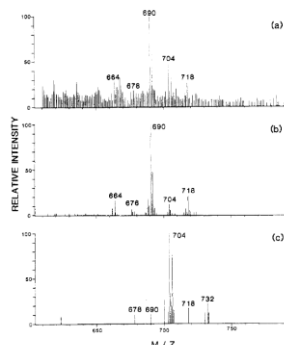


Figure 4. Positive ion fast atom bombardment mass spectra for *P. vulgaris*: (a) normal scan, (b) constant neutral loss of 141 mass units, (c) constant neutral loss of 155 mass units.

MS

MS/MS

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

MS/MS

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

251

Skenování ztráty neutrální částice (Neutral loss scan)

Současné skenování MS1 a MS2

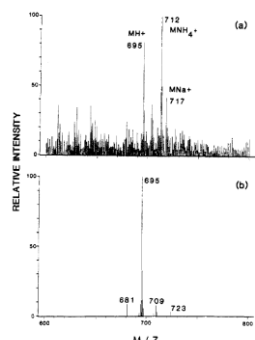
Konstantní rozdíl m/z propouštěných MS1 a MS2

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

249

Př.: skenování ztráty neutrální částice



MS

MS/MS

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

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.

252

Monitorování vybrané reakce/vybraných reakcí

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

Monitorování vybrané reakce (selected reaction monitoring, SRM)

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

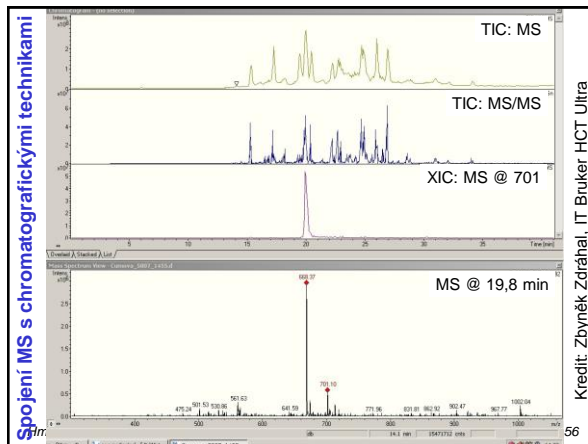
Monitorování více reakcí (multiple reaction monitoring, MRM)

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

Vysoký S/N , používáno v kombinaci s chromatografickými technikami

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

253



Spojení MS s chromatografickými technikami

Kredit: Zbyněk Zoráhal, IT Bruker HCT Ultra

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 piků
... 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 2013

254

Př.: Monitorování více reakcí, MRM

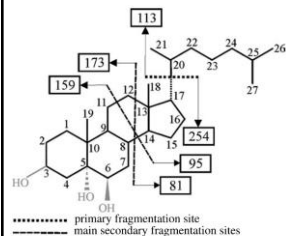


Table 1. Overview of the daughter ions with the highest intensity

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

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

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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

257

Spojení MS s chromatografickými technikami

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

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

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

Base peak intensity chromatogram, BPC

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

255

Př.: HPLC – APCI – SRM

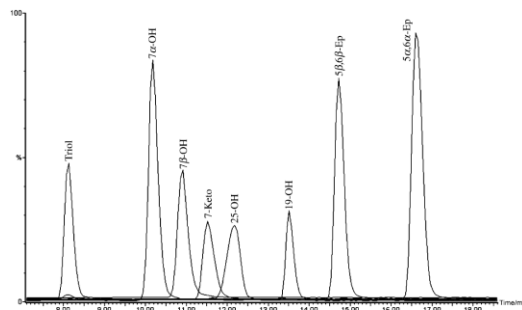


Fig. 8. MRM chromatograms of 8 single standards (overlaid), c(standard): 5000 ng/cm³, V_{ag}: 50 nm³

SRM pro dominantní reakce z předchozí tabulky

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

258

Př.: HPLC – APCI – MRM

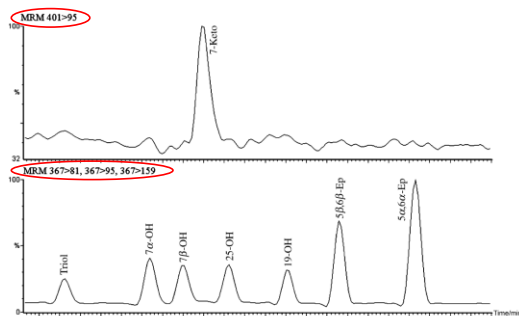


Fig. 9. MRM chromatogram of a standard mixture (7 COFs and 19-hydroxycholesterol the prospective internal standard). (standard): 5000 ng/cm³, V_{inj}: 50 nm³
 Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013 259

Hmotnostní spektrometrie pro MS/MS

Trojité kvadrupólový filtr (QqQ)

Iontové pasti (IT, LT, O, FT ICR)

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

Průletový analyzátor (TOF)

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

Klasifikace tandemové spektrometrie

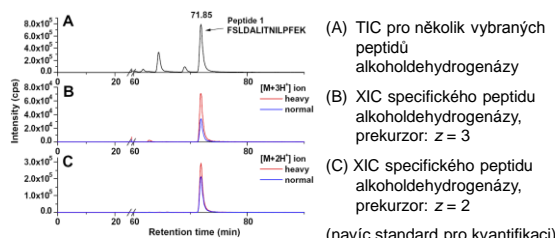
fragmentace v prostoru: 1, 3, 4, 5

fragmentace v čase: 2

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

262

MRM: TIC a XIC



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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

260

Další hmotnostní spektrometrie pro MS/MS

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

Izolace mateřského iontu, fragmentace v kolizní cele

Analýza kinetické energie, W

Pro dceřinné ionty platí $W = f(m/z)$

První technika MS/MS

(MIKES, Mass-Analyzed Ion Kinetic Energy Spectrometry)

Dokonalejší varianty: EBE, EBEB

EBqQ

EB: dokonalá selekce výchozího iontu

q_1 : kolizní cela

Q_2 : selekce produktů

Tandem kvadrupólový filtr - oTOF (QTOF)

TOF-TOF

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

263

Skenování v MS/MS

Objasnění struktury organických sloučenin

Analýza směsí analytů jako náhrada spojení separace - MS

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

Zlepšení poměru signálu k šumu, S/N

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

261

Další hmotnostní spektrometrie pro MS/MS

Tandem kvadrupólová iontová past - TOFMS (IT-TOFMS)

IT: možnost akumulace a MSⁿ v prvním stupni.

TOF: citlivý detektor s vysokým rozlišením jako koncový stupeň.

Iontové pasti: kvadrupólová IT a FT-ICR-MS

možnost MSⁿ

tentýž spektrometr jako pro MS, pouze jiný software

Postup:

izolace výchozího iontu (po akumulaci všech iontů)

excitace výchozího iontu (zvýšení amplitudy) po delší dobu

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

Tandem LT - FT-ICR-MS

mnoho možných režimů skenů

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

264

Typy disociace

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

Fragmentace může být způsobena:

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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

265

Srážky iontů

Fragmentace

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

Elastické srážky

Kinetická energie zůstává zachována.

Neelastické srážky

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

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

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

Těžší terčik \Rightarrow možné přenést více energie na iont

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

268

Typy disociace

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

266

Nízkoenergetické srážky iontů

Energie srážek: 1 – 100 eV

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

Účinnost srážek

obvykle dostatečná díky mnoha srážkám iontu v kolizní cele

Instrumentace

trojitý kvadrupólový filtr, iontové pasti, hybridní přístroje

V současnosti nejrozšířenější technika, nízkooenergetická CID

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

269

Stabilita iontů

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

Historické rozdělení - časy podle doby pobytu v magnetickém sektoru

Reakce: unimolekulární, bimolekulární

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

267

Vysokoenergetické srážky iontů

Energie srážek: keV

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

Účinnost srážek

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

Instrumentace

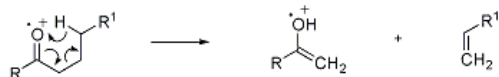
hybridní sektorové přístroje, TOF-TOF

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

270

Příklad: McLaffertyho přesmyk

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



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

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

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

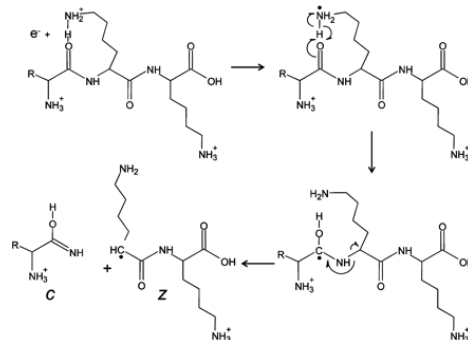
M. J. Lacey *et al.*, *Org. Mass Spectrom.* **5**, 1391 (1971); G. Eadon, *J. Am. Chem.*

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

271

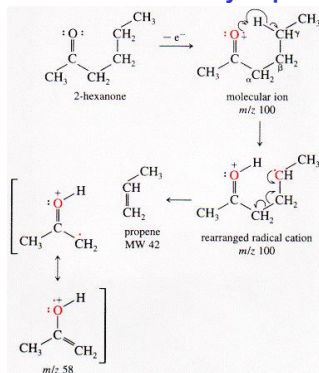
ECD



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

274

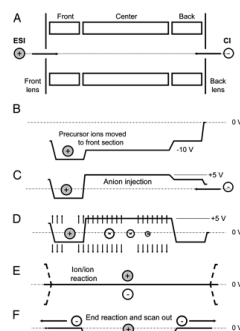
Mechanismus McLaffertyho přesmyku



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

272

ETD



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

275

ECD, ETD

Electron capture dissociation

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

Electron transfer dissociation

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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

273

Fragmentace ve zdroji

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

Využívaná zejména v MALDI TOFMS peptidů.

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

Intenzita fragmentů \ll 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 (narozdí od CID).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

276

Charakteristika ISD

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

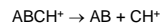
Použití: MALDI TOFMS peptidů, sacharidů.
Převážně monomolekulární reakční mechanismus (narozdíl od CID).

Fragmentace za zdrojem (Post-Source Decay, PSD)

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

Analýzu produktů v reflektoru:

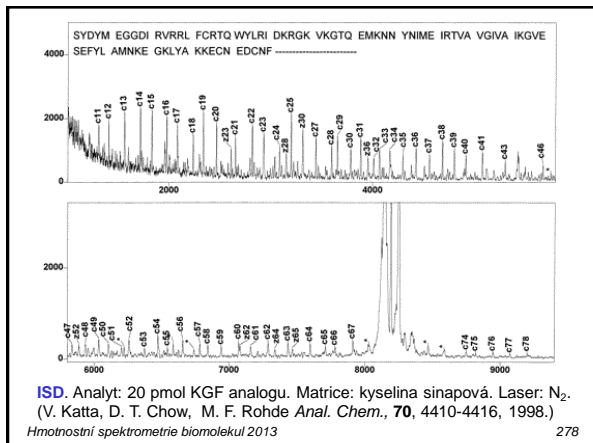
Ionty fragmentů analytu se tvoří během letu driftovou zónou (v důsledku nadměrné excitace), např.:



Bilance kinetické energie pro první rovnici:

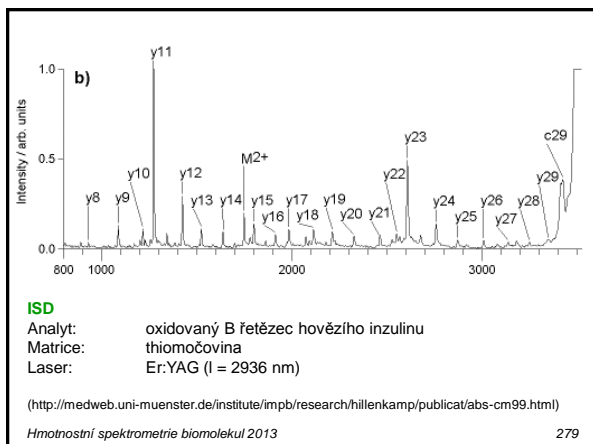
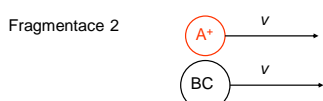
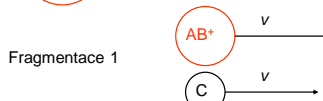
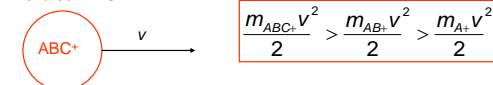
$$m_{ABCH}v^2/2 = m_{AB}v^2/2 + m_{CH}v^2/2.$$

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

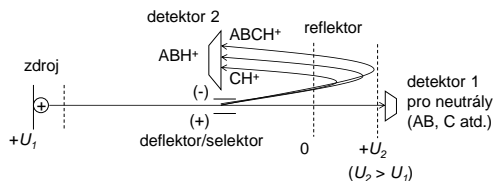


Fragmentace za zdrojem

Prekursor ABC⁺



PSD: reflektor jako analyzátor energie a m/z



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

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

TOF s CID?

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

Kolizní komora Collision chamber

- přídatná kolizní komora ve zdroji TOF má zanedbatelný vliv

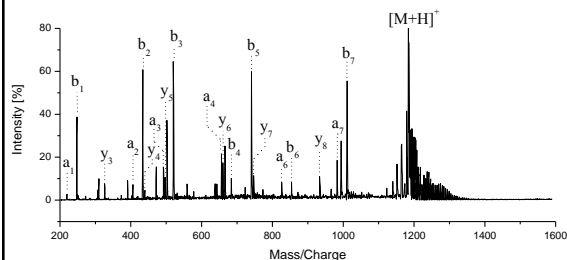
Dva způsoby CID v TOF

1. QTOF (přesněji QqTOF)
2. TOF/TOF

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

283

MALDI PSD peptidu

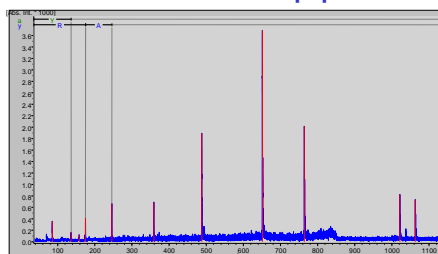


pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂
MALDI PSD – reflektor s kvadratickým polem.
(O. Šedo et al. *Anal. Chim. Acta* **2004**, 515, 261-269)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

286

MALDI PSD derivatizovaného peptidu YLYELAR



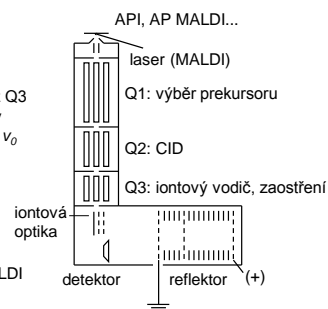
Spektrum složeno z několika spekter získaných při různém potenciálu reflektoru. Zaostřeny pouze píky iontů, které pronikly hlouběji do reflektoru. Použití reflektoru se 2 stupni. (Zdroj: Z. Zdráhal)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

284

Ortogonalní TOF: QTOFMS

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

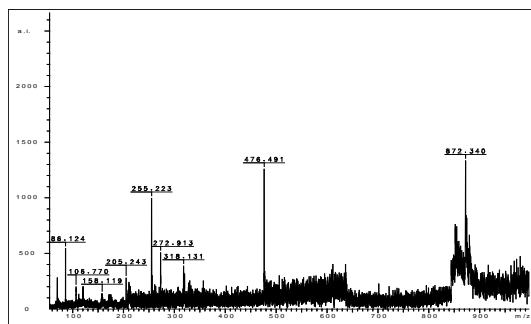


orthogonalní TOF:
typický pro API, ale i pro MALDI
axiální TOF:
typický pro MALDI

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

287

MALDI PSD peptidu



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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

285

QTOFMS: hybridní TOF MS

Využití výhod obou analyzátorů

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

Výměnný iontový zdroj

oddělení ionizace od analyzátoru

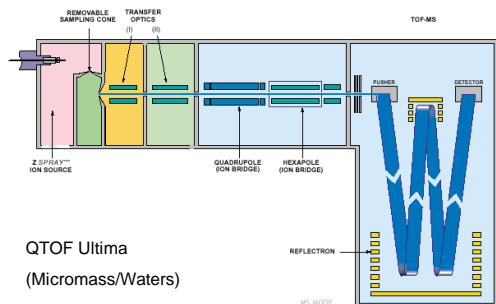
vhodné pro kontinuální, kvazikontinuální i pulsní ionizační techniky

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

288

Hybridní instrument pro API a MALDI



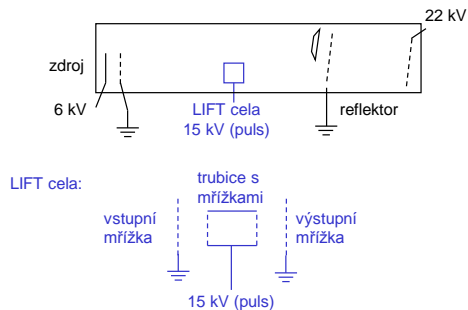
QTOF Ultima
(Micromass/Waters)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

289

LIFT TOF MS

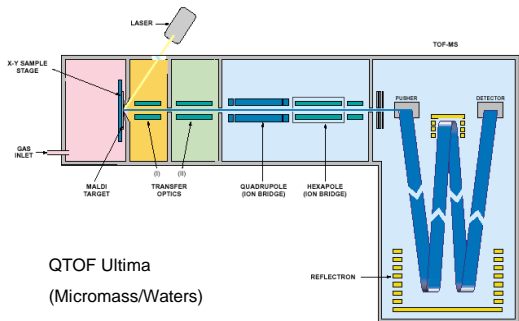
MS-MS s využitím TOF principu, dokonalejší PSD (LIFT)



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

292

Hybridní instrument pro API a MALDI



QTOF Ultima
(Micromass/Waters)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

290

Spektrometrie iontové mobility Ion mobility spectrometry (IMS)

1970 Cohen, Karasek

Charakteristika

- Technika na pomezí hmotnostní spektrometrie a chromatografie
- Separace v důsledku tření iontů s okolním prostředím
- Ionty nesepravovány 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

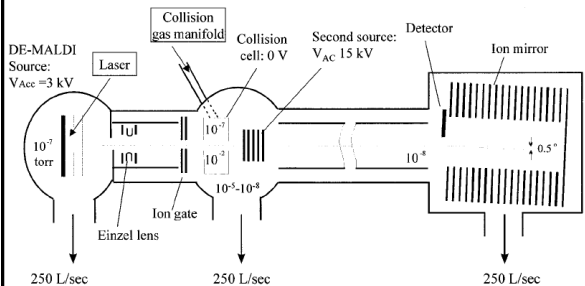
Aplikace

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

293

TOF-TOF



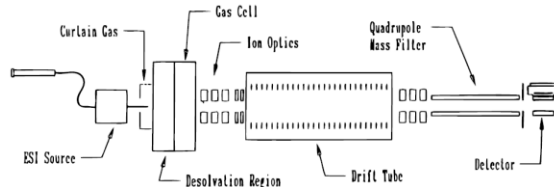
(Medzihradsky, K. F.; Campbell, J. M.; Baldwin, M. A.; Falick, A. M.; Juhasz, P.; Vestal, M. L.; Burlingame, A. L. Anal. Chem. 2000, 72, 552).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

291

Př. 1: IMS – Q

Driftová trubice: rovnováha elektrické a třecí síly
prstence s klesajícím napětím podobně jako v reflektoru
zvýšený tlak
 $p \sim 10 \text{ Torr (He, Ar, N}_2)$, $E \sim 10\text{-}50 \text{ V/cm}$, $l \sim 10\text{-}100 \text{ cm}$



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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

294

IM spektra lysozimu v závislosti na jeho konformaci

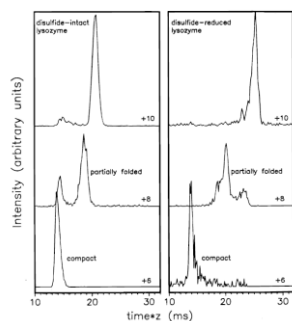


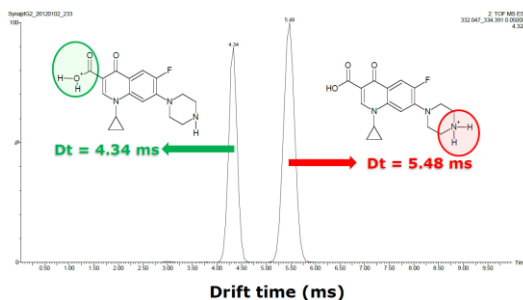
Figure 11. Drift time distributions recorded for the +6, +8 and +10 charge states of lysozyme that were electrosprayed from disulfide-intact (left) and disulfide-reduced (right) solutions. The +8 and +10 disulfide-intact ions were obtained by direct electrospray ionization. All other charge states were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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

295

IMS - TOF



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

Kredit: waters.com

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

298

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

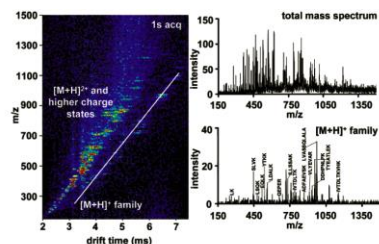


Figure 2. Two-dimensional plot (left) of drift times and m/z ratios for a digest of horse albumin. The intensity of different features is shown using a false color scheme in which the least intense features are represented in blue and the most intense features are represented in red. This data set was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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

296

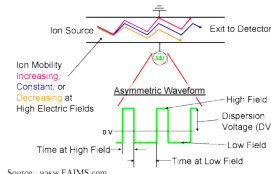
Př. 3: DMS, FAIMS

Differential (ion) mobility spectrometry

Field asymmetric waveform ion mobility spectrometry

- zařazení jednoduché cely před vstup do hmotnostního spektrometru
- různá konstrukční řešení cely

FAIMS Separation Principles



Source: www.FAIMS.com

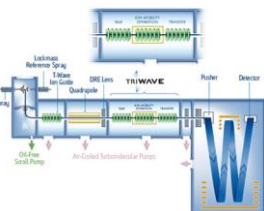
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

299

Př. 2: IMS – TOF

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

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



Kredit: waters.com

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

297

Využití IMS

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

300

Zobrazovací hmotnostní spektrometrie, MSI

MSI ... mass spectrometry imaging

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

Ionizační techniky (a limit laterálního rozlišení):

SIMS (nm), MALDI (μm) ... difrakční limit souvislost s energií

Louis de Broglie

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

DESI (100 μm)

Detekce iontů

Faradayův pohár, Faradayova miska

Elektronový násobič

Channeltron

Mikrokanálová destička (MCP)

Indukce (FT-ICR-MS, orbitrap)

"Daly" detektor

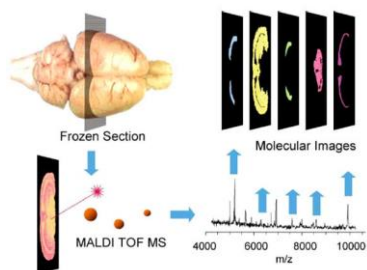
Plošné multikanálové detektory (array detectors)

Fotografická deska

Kombinace MCP a diodového pole (MCP-diode array)

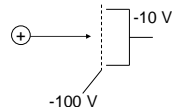
aj...

MSI



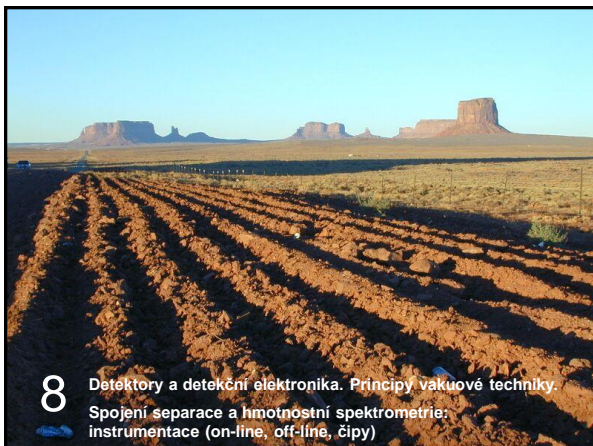
Stoeckli, M.; Staab, D.; Staufienbiel, M.; Wiederhold, K.H. Anal. Biochem., 2002, 311, 33-39

Faradayův pohár (Faraday cup)



- Velmi malé proudy

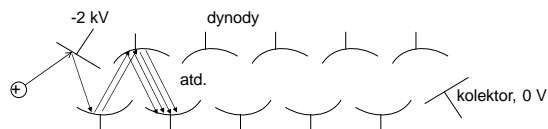
Př.: 100 iontů/s \Rightarrow 1.6×10^{-17} A



8

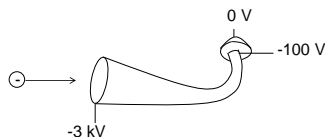
Detektory a detekční elektronika. Principy vakuové techniky.
Spojení separace a hmotnostní spektrometrie:
instrumentace (on-line, off-line, čipy)

Elektronový násobič



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

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 2013

307

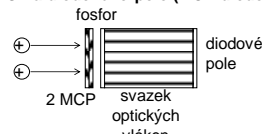
Plošné multikanálové detektory (Array detectors)

... 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 2013

310

Mikrokanálová destička (microchannel plate, MCP)

Rozměry MCP

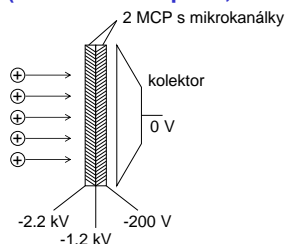
- tloušťka ~ 1 mm
- průměr 1 - 10 cm.

Mikrokanálky

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

Plošný detektor vhodný pro TOFMS

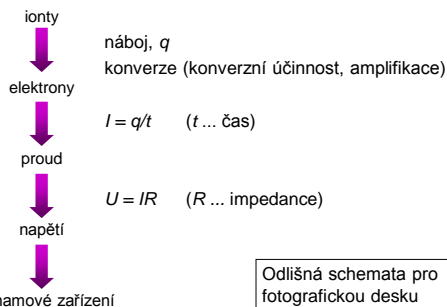
Zisk jednoho MCP $\sim 10^3$, dvojitého MCP $\sim 10^6$.



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

308

Záznam dat v MS

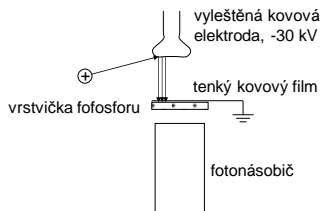


Odlíšná schemata pro fotografickou desku a scintilační detektory

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

311

"Daly" detektor



- Ion \rightarrow elektron(y) \rightarrow 4 fotony (fosfor)
- + Velmi nízký šum.
- + Velmi vysoký výkon (fotonásobič obvykle v režimu počítání fotonů).
- Ruší světlo.
- Vyžaduje nízké tlaky ($p < 10^{-6}$ Pa).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

309

Záznam dat v MS

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

Skenující přístroje

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 μs
FT-ICR iontový cyklotron		~ 1 s

Další neskenující přístroje mohou používat plošné detektory (array).

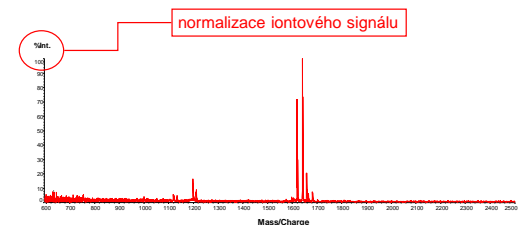
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

312

Signál v MS

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

a.u. (arbitrary units) nebo relativní intenzita



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

313

A/D převodník (analog/digital)

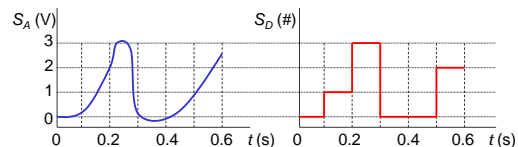
Př.:

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 2013

316

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 2013

314

Přesnost záznamu

Přesnost (a správnost) měření dána počtem bitů AD převodníku

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

nepřesnost odpovídá 1/2 úrovně

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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

317

Detekční elektronika - A/D převodník

Měření (digitalizace) napětí

Základní parametry

počet bitů (rozlíšení 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)

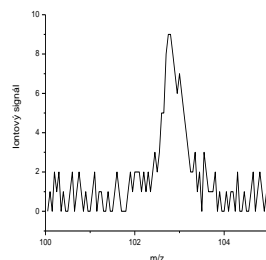
stabilita

aj.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

315

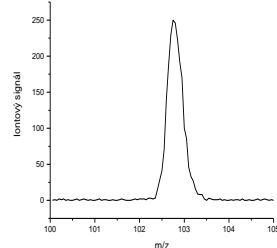
Volba A/D převodníku



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 2013

318

Rychlost záznamu spektra

... dána vzorkovací frekvencí AD převodníku

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

Př. 1:

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

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

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

... pro 16-bitový převodník 36 kByte

A/D - současný stav

Vysoký počet bitů: 24 bitů

- ale pouze při nízké vzorkovací frekvenci (1 kHz)

Vysoké vzorkovací frekvence: 20 Gsamples/s

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

Vysoký výkon

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

Rychlost A/D převodníku

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

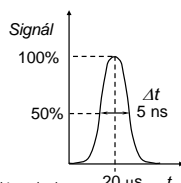
$t = 20\ \mu\text{s}$, $R = 2\,000$

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

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

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

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



T/D převodník (T/D converter, TDC)

Počítání pulsů

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

T/D převodník (time to digital)

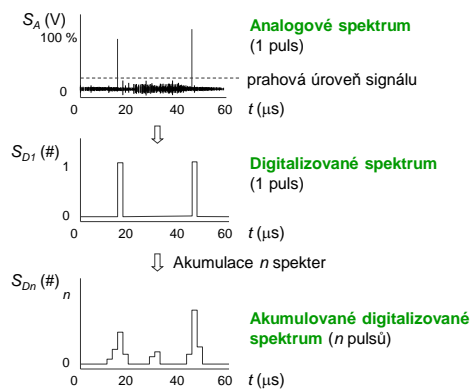
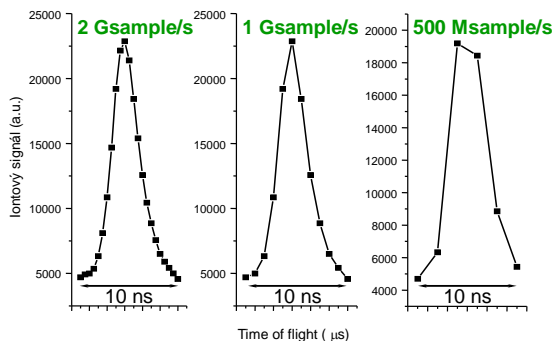
1-bitový A/D převodník

2 úrovně: 0 a 1

Parametry:

- časové rozlišení
- (počet kanálů)
- aj.

Vliv vzorkovací frekvence AD převodníku (TOFMS)



T/D převodník (time/digital)

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

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

Nižší cena (oproti A/D).

Aplikace:

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

Informatika

Hardware: nejrozšířenější PC (IBM)

Software: Windows XP

Exponenciální růst výkonnosti: Mooreův zákon

Př.:

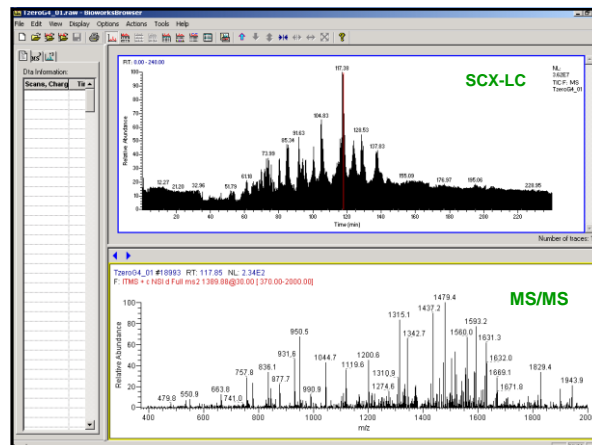
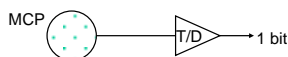
Vyhodnocení MS/MS spekter programem SEQUEST
SCX - LC - MS/MS digestu směsi proteinů (Y2H kvasnice)

T/D převodník (time/digital)

Vícekanálové T/D převodníky

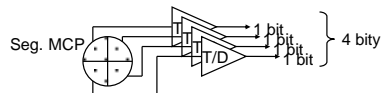
... ke zvýšení dynamického rozsahu
... pomocí skupiny T/D převodníků se segmentovaným detektorem

Klasický TOF detektor



T/D převodník (time/digital)

Segmentovaný TOF detektor



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

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

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



Základy vakuové techniky

Evangelista Torricelli (1608-1647)

Jednotka tlaku: 1 Torr = 1 mm Hg

Tlak, p

p = síla/plocha [Pa, N/m²]

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

1 Torr = 133 Pa

Vakuum

stav plynu s $p < 101325$ Pa

Střední volná dráha molekuly

Střední dráha, kterou urazí iont mezi 2 srážkami

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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

331

Rychlost pumpování

Rychlost pumpování, S

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

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

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

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

Pozn.:

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

334

Režimy toku plynu

1. Turbulentní tok. ($p > 10$ kPa)

velmi malá λ

mnoho srážek mezi molekulami

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

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

stále mnohem menší než rozměry vakuových aparatur

více kolizí molekula - molekula než molekula - stěna

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

$\lambda > m$:

převládají kolize molekul se stěnami vakuové aparatury

obvyklá situace v hmotnostním spektrometru

pozn.: UHV = ultra high vacuum

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

332

Vakuové pumpy

Mechanická pumpa

Difúzní pumpa

Turbomolekulární pumpa

Kryopast

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

335

Průtok plynu

Průtok plynu, Q

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

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

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

Při molekulárním toku C nezávisí na tlaku p :

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

Při viskózním toku C závisí na tlaku p :

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

Návrh vakuových aparatur

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

- Sériové spojení trubic - nejúžší místo omezuje celý systém:

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

333

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 2013

336

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^{-6} Pa
- Rychlosti pumpování do ~ 3000 L/s
- Běžná UHV pumpa v komerčních systémech.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

337

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 2013

340

Difúzní pumpa

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

Kryopast

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

338

Měření tlaku

Iontová trubice (Ion gauge)

Bayard & Alpert: iontová trubice se žhavenou katodou.

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

Penning: iontová trubice se studenou katodou.

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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

341

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 2013

339

Spojení separace a hmotnostní spektrometrie

Proč separace?

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

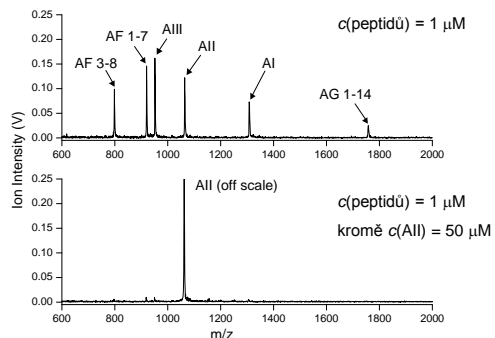
Samotná MS a MS/MS není dostačující z několika důvodů:

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

342

Vzájemné rušení MALDI signálu ve směsi peptidů



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

343

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 2013

346

Typy interface

Plyn → vakuum

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

Kapalina → vakuum

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

344

Interface pro MALDI

Obvyklý postup:

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

Režim

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

Přídavek MALDI matrice

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

Sběr eluentu

1. Diskrétní frakce
2. Spojitá stopa

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

347

Separace - ESI MS

Nejrozšířenější metody:

2D GE - MS

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

RPHPLC – ESI MS

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

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

(podrobněji v části o aplikacích)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

345

Interface pro MALDI

Off-line

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

On-line

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

In-line

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

Off-line vs. on-line

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

348

Archivování vzorku (MALDI)

Postup při separaci s MALDI MS a MS/MS detekcí

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

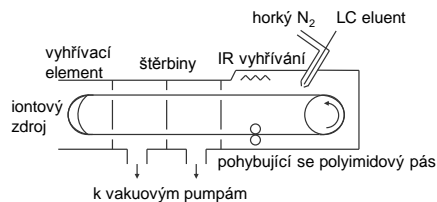
(Po 1. kroku může být postup kdykoli přerušen.)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

349

Moving belt interface (in-line)

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

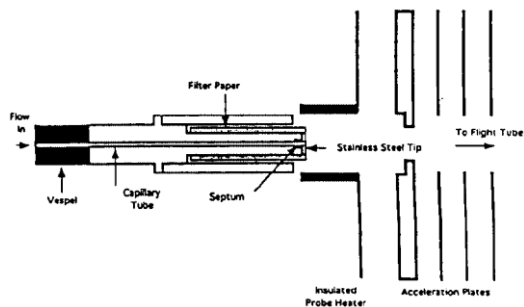


McFadden W. H., Schwartz H. L. and Evans S. J. *Chromatogr.* 122, 389, 1976.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

352

Průtoková sonda (on-line)

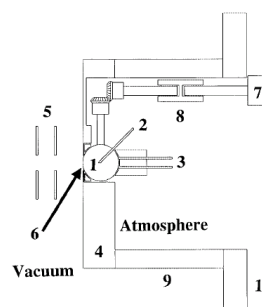


Whittall, R. M., Russon, L. M., Li, L. J. *Chromatogr. A* 1998, 794, 367-375.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

350

ROBIN (rotating ball inlet), in-line

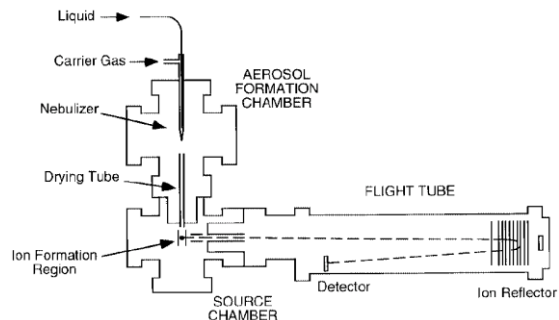


Orsnes, H., Zenobi, R. *Chem. Soc. Rev.* 2001, 30, 104-112.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

353

Zmlžovač pro tvorbu aerosolu (on-line)

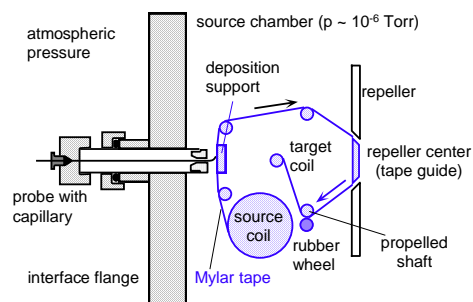


Fei, X., Wei, G., Murray, K. K. *Anal. Chem.* 1996, 68, 1143-1147.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

351

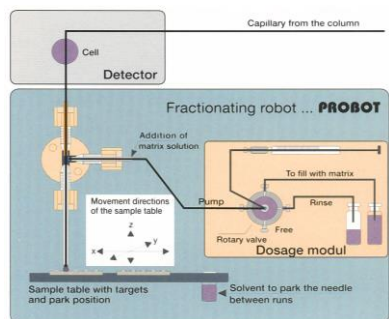
Nanášení vzorku ve vakuu (in-line i off-line)



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

354

Automatizovaný sběr frakcí (off-line)

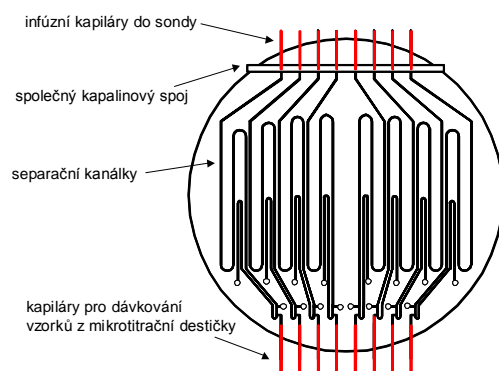


Např.: Probot (zdroj: www.lcpackings.com)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

355

Příklad návrhu čipu pro paralelní analýzu



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

358

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

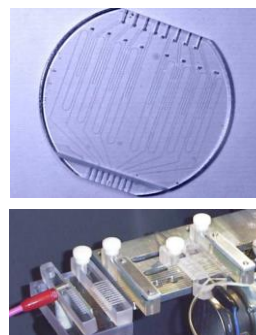
2. Fluidní systém (čipy s kanálky)

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

356

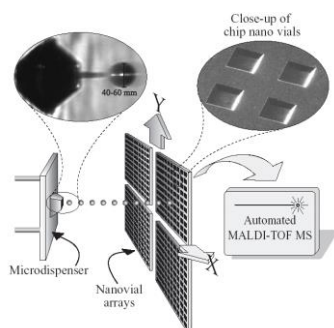
Čip vs. konvenční zařízení



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

359

Mikrometody



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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

357

9

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



IV. Biologické aplikace MS

Genom, proteom, metabolom.

Malé organické molekuly - biomolekuly, léky, petrochemické produkty.

Biopolymery (DNA, proteiny, cukry).

Syntetické polymery.

Proteomika

Charakterizace peptidů a proteinů – proteinového komplementu genomu.

V současnosti hlavní a nejperspektivnější aplikace hmotnostní spektrometrie.


Genom ↔ proteom. Uroveň exprese gen → protein různá.

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

361

IUPAC názvosloví aminokyselin

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

364

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).

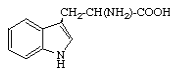
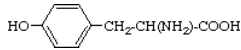
Funkční proteomika

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

362


IUPAC názvosloví aminokyselin

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

365

IUPAC názvosloví aminokyselin

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

363

Historický přehled ionizačních metod vhodných pro analýzu peptidů a proteinů

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

366

Současné ionizační techniky v proteomice

FAB

max. m – 10 000

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

ESI

max. m – 100 000 Da ($z \gg 1$)

LD < 10 fmol (rutinní)

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

MALDI

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

relativně nejvíce odolná vůči rušení nečistotami

LD < 10 fmol (rutinní)

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

367

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 2013

370

Hmotnostní spektrometry v proteomice

MALDI MS

vysoký počet vzorků/čas
TOF

ESI MS-MS

objasnění struktury
QqTOF, IT, FT ICR

Nová instrumentace

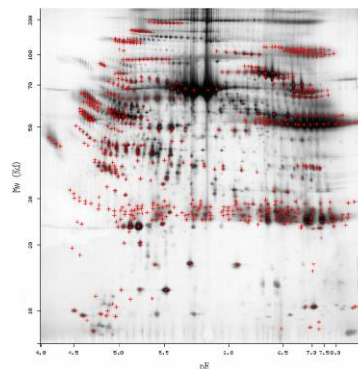
MALDI TOF-TOF, MALDI LIFT TOF
MALDI QqTOF

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

368

Př.: 2D GE lidské plazmy



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

Zdroj: Expasy

371

Separáčnı metody v proteomice

GE

gelová elektroforéza na polyakrylamidovém gelu

HPLC

vysoceúčinná kapalinová chromatografie na reverznı fází

IEC

chromatografie na iontoměničích

AC

afinitní chromatografie

CE

kapilární elektroforéza

Centrifugace

běžná centrifugace, gradientová centrifugace

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

369

RP HPLC

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

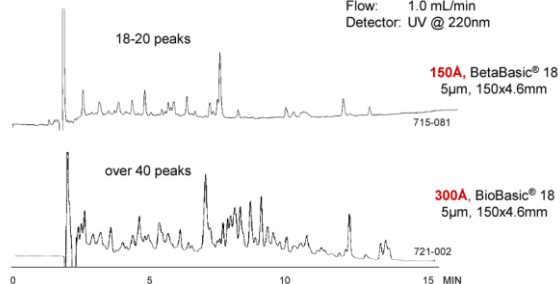
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

372

Př.: RP HPLC směsi peptidů (digest BSA)

Sample: Tryptic Digest of BSA

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



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

Zdroj: ThermoFinnigan 2002

373

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 2013

376

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 2013

374

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 2013

377

Enzymatické štěpení proteinů

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

Další enzymy: lysin, chymotrypsin, CNBr aj.

Produkty enzymatického štěpení

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

375

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 2013

378

Některé užitečné termíny

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

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

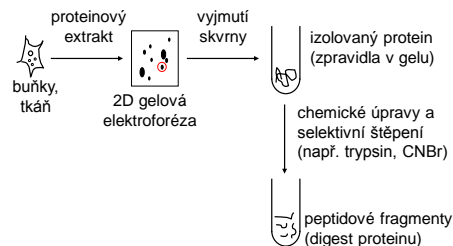
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

379

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 2013

382

Identifikace proteinu

Známé informace:

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

Metody identifikace

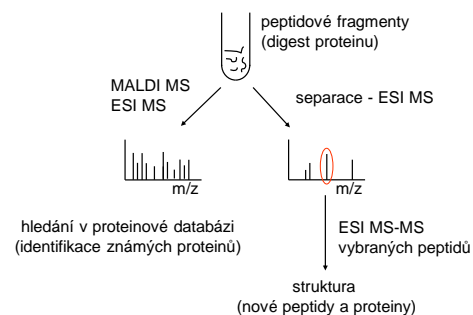
- 2D GE + X + MS (peptidové mapování)
- 2D GE + X + RPHPLC + MS a MS/MS (sequence tag, AMT)
- X + 2D LC (např. IEC a RPHPLC) + MS a MS/MS
- X + AC (afinitní chromatografie) + MS a MS/MS (IMAC, ICAT)
- Strategie využívající X a izotopové reagenty/standards
X ... selektivní enzymatické štěpení

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

380

PMF

3. MS analýza a vyhodnocení výsledků



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

383

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 2013

381

Příklad hledání v databázích: MS Fit

Zadáni:

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

384

Příklad hledání v databázích: MS Fit

Výsledky:

```

Sample ID (optional): Magic Bullet digest
Database searched: Gmpept113
Maximum search score: 1000 (100000 Da) offset: 408557 offset
File size: 429404 bytes
Combined molecular weight and pI search offset: 408557 offset
MS/MS search offset: 415 offset (offset for top 4 quartile)

Considered modifications: [Peptide N-terminal Cys to glycine] [Oxidation of M] [Peptide N-terminus Acetylation]
Min # Peptides: Peptide Mass: Peptide Masses: Digest: Max # Missed: Cysteine: Peptide: Peptide: Digest #
to Match: Tolerance (ppm): aa: Toler: Change: Mod-Mod for: N-terminus: Cysteine: Peptide Masses:
4: 50.000 ppm: mainsequence: Trypsin: 1:
    
```

Rank	MOWSE Score	# P/I Matched	% P/I Matched	Protein MW (Da)	Species	Gmpept113 Accession #	Protein Name
1	1.02e+07	1213	65%	30713.5	5:80	515970	ap-1-peptidase-2.5 precursor
2	1.64e+06	423	17%	33113.9	10:40	575949	ap-1b1 transmembrane factor (radial-gliar neuron, mouse, strain CALY, isolate 1105-3, ap-1b1 non-transmembrane, Peptide Pathid, 29 aa)
3	1.56e+06	423	17%	34750.0	10:17	575948	ap-1b1 transmembrane factor (radial-gliar neuron, mouse, strain CALY, isolate 1105-7, ap-1b1 non-transmembrane, Peptide Pathid, 30 aa, region 1 of 2)
4	383	523	21%	48333.0	6:79	112129	The first ATG in the open reading frame was chosen as the start codon.
5	428	623	26%	44513.6	6:66	326730	non-membranal protein, NC1

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

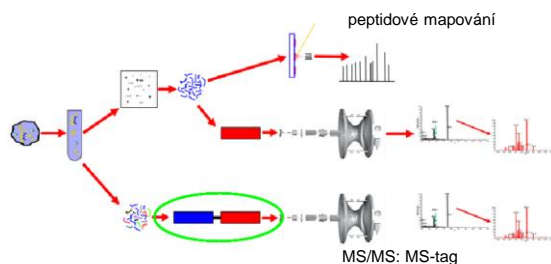
Metoda Sequence-Tag (MS-Tag)

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

Nedostatky PMF

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

Strategie MALDI MS a LC - ESI MS



PMF: teorie vs. praxe

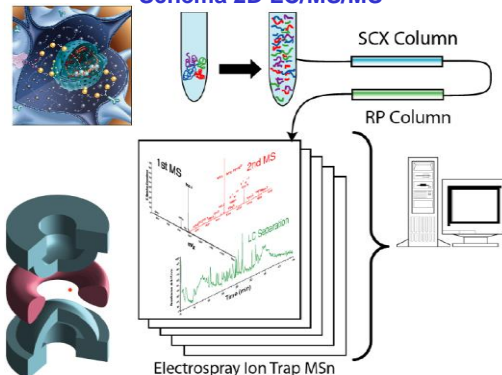
Nadbytečné piky

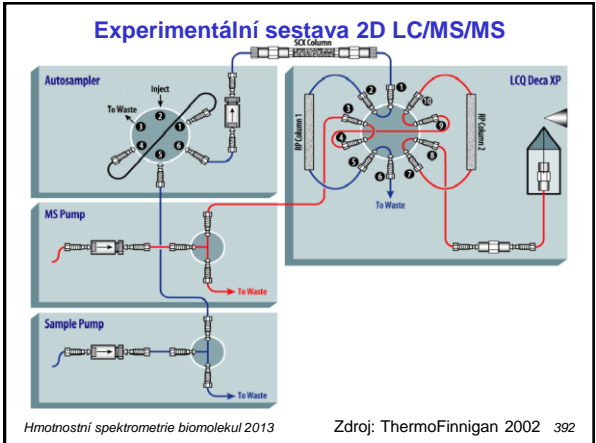
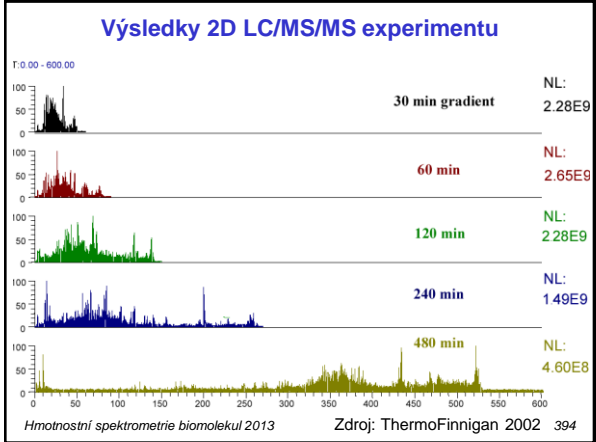
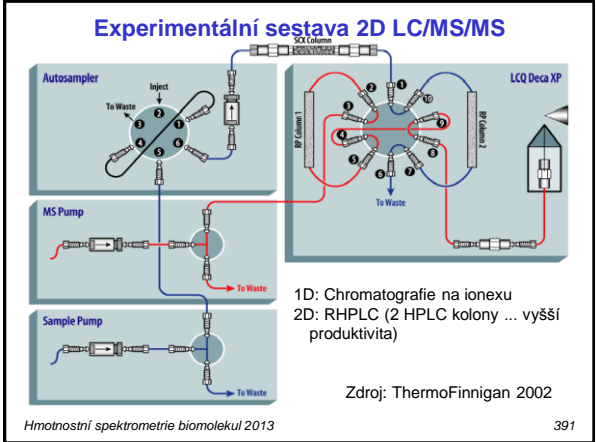
- neselektivní štěpení (např. chymotrypsická aktivita trypsinu)
- nečistoty (např. keratiny)
- nedostatečná separace (další proteiny ve skvrně)
- autolýza enzymu
- post-translační modifikace (PTM), artefakty

Chybějící piky

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

Schema 2D LC/MS/MS



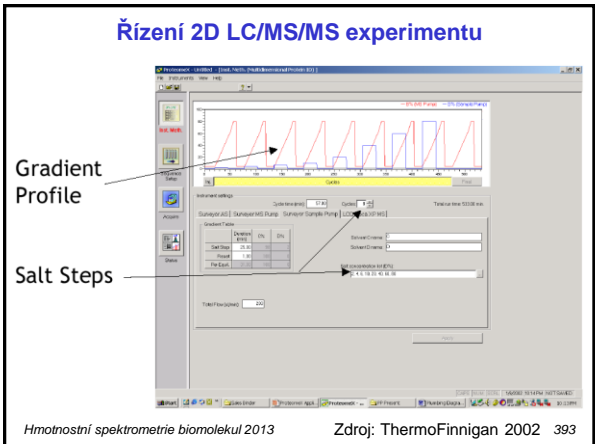


LC-ESI MS a MS/MS:

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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013 395



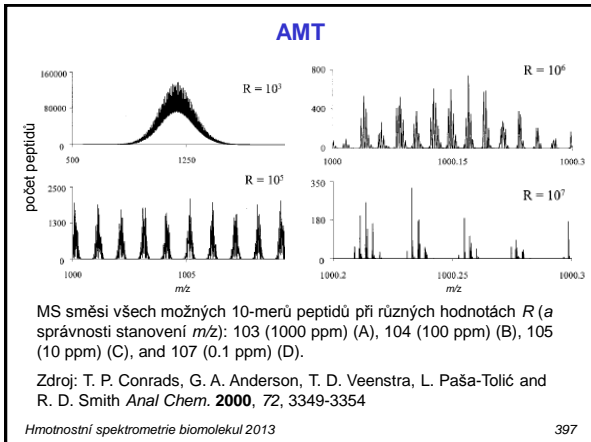
Accurate mass tag (AMT)

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

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

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

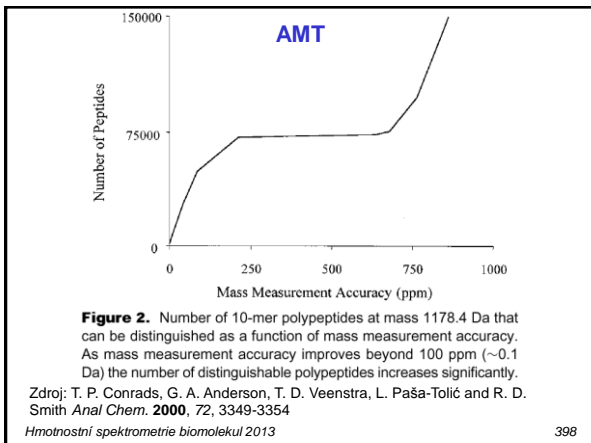
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013 396



Další strategie pro analýzu proteomu

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013 400



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 2013 401



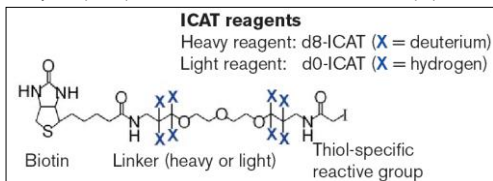
Některé zkratky v proteomice

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013 402

Analyza ICAT (isotope-coded affinity tags)

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



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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

403

Charakteristika ICAT

Výhody

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

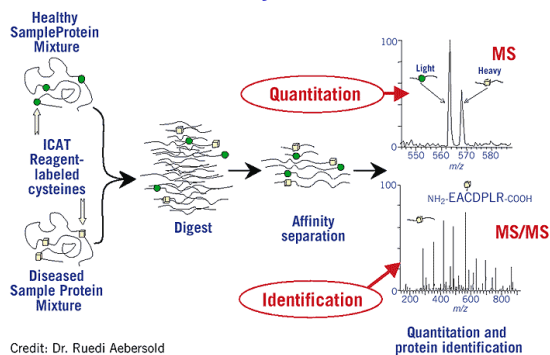
Nevýhody

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

406

Analyza ICAT



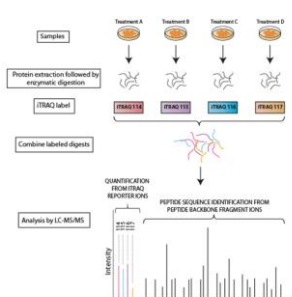
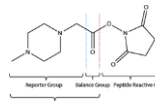
Credit: Dr. Ruedi Aebersold
Institute for Systems Biology, Seattle, WA

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

404

iTRAQ

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



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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

407

Analyza ICAT

Pozn.

- Proteiny lze označit před enzymatickým štěpením (zámena 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 pik

ICAT druhé generace

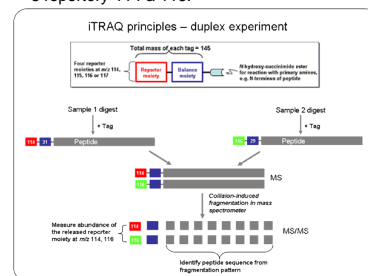
- Použití 9 atomů ^{13}C ve spojovacím řetězci (místo 8 atomů D)
- Stejný eluční čas lehké i těžké formy v HPLC

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

405

iTRAQ

Příklad dvou derivatizačních činidel s reportéry 114 a 116:

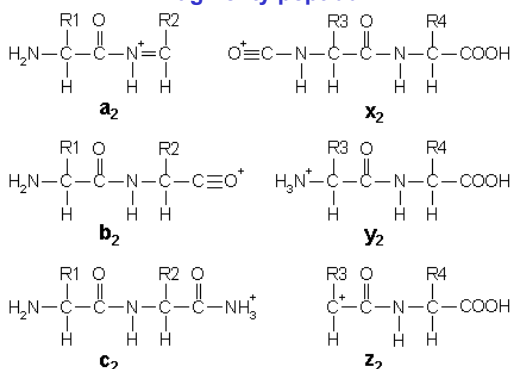


<http://www.proteome.soton.ac.uk/iTRAQ.htm>

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

408

Fragmenty peptidů



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

415

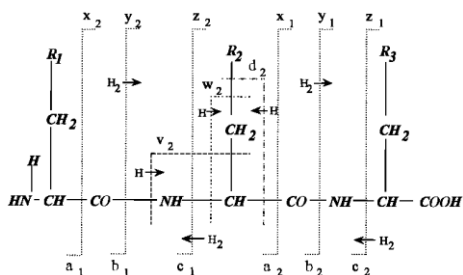
aminokyselina	m (mono)	m (immonium)	m (doprovodné ionty)
A	71.03712	44	
R	156.10112	129	59,70,73,87,100,112
N	114.04293	87	70
D	115.02695	88	70
C	103.00919	76	
E	129.04260	102	
Q	128.05858	101	56,84,129
G	57.02147	30	
H	137.05891	110	82,121,123,138,166
I	113.08407	86	44,72
L	113.08407	86	44,72
K	128.09497	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 2013

418

Schéma fragmentace peptidu a značení fragmentů.



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

416

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)

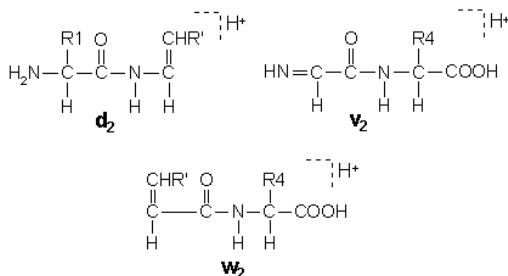
+

Hmotnost protonu 1 Da – iont většinou ve formě [M+H]⁺
(ale i 23 Da pro adukt [M+Na]⁺ atd.)

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

419

Další fragmenty peptidů



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

417

CID fragmentace

Typy iontů v CID

- série píků iontů b a y
- doprovodné píky
-17, ztráta NH₃ z Gln, Lys, Arg
-18, ztráta H₂O ze Ser, Thr, Asp, Glu
a (tj. b – 28), satelitní série fragmentů typu b (ztráta CO)
- immoniové ionty aminokyselin.
- interní fragmenty – zejm. od Pro ve směru C konce

Výběr prekurzoru v CID MS/MS:

z = 2: [M+2H]²⁺

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

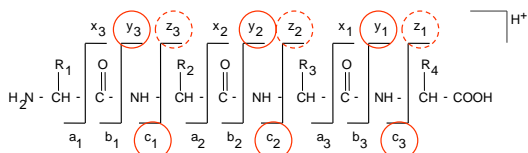
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

420

ISD fragmenty

Pravidla fragmentace ... dle relativní pevnosti vazeb.
Typické produkty fragmentace peptidů:

c, y, z



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

421

PSD fragmenty

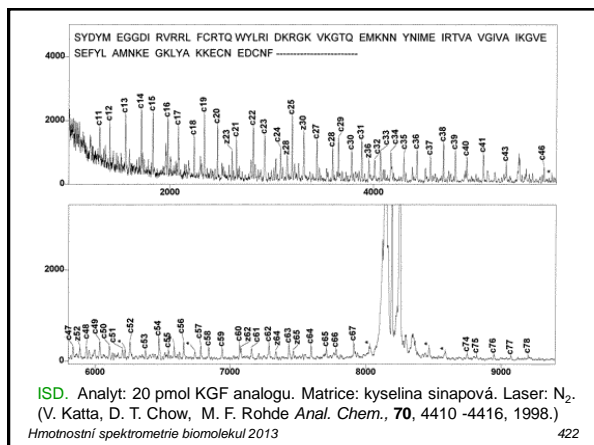
Typické produkty fragmentace peptidů: a, b, y, z, d.
Doprovodné pily -17 (ztráta NH₂) a -18 (ztráta H₂O).
Immoniové ionty aminokyselin.

Interní ionty – zejm. od Pro ve směru C konce

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

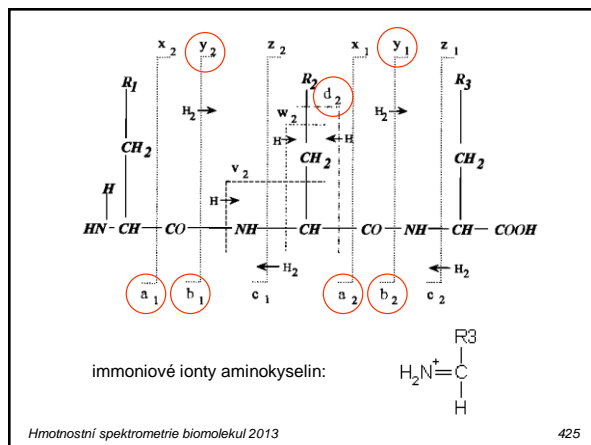
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

424



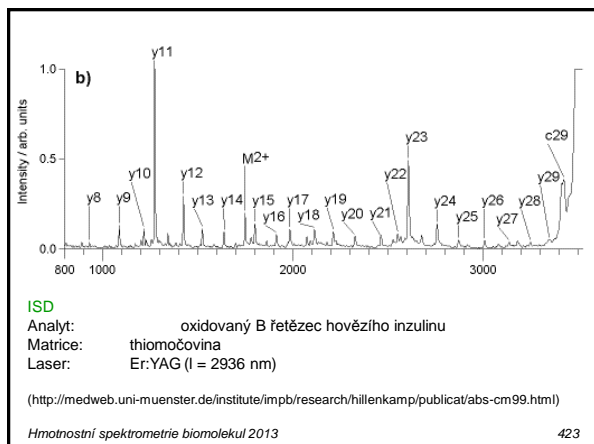
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

422



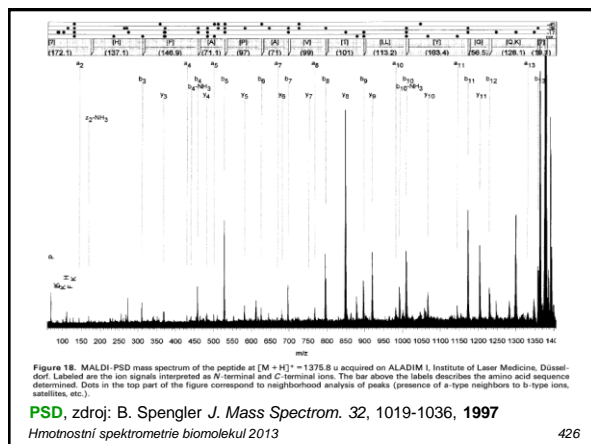
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

425



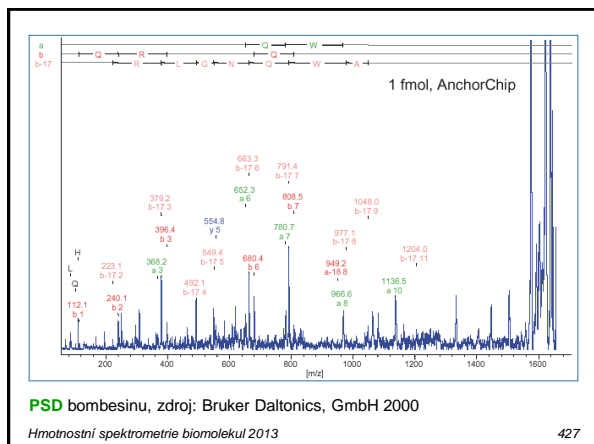
Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

423



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

426



Sekvenování proteinu

Postup

- Enzymatické štěpení**
tvorba více druhů digestů, aby vznikly různé, překrývající se štěpy
- různé dlouhá doba štěpení
- různé enzymy (trypsin, V8)
- nahodilé štěpení, "shotgun sequencing"
- Zjištění (alespoň částečné) sekvence štěpů**
RPHPLC ESI MS/MS
- Dedukce sekvence pomocí počítače**
celková sekvence stanovena z kombinace sekvencí peptidů

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013 430

Další typy disociace

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

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013 428

Pomocné metody při sekvenování

Hydrolyza proteinu v H₂¹⁸O
zjištění terminálu: C-terminál nebude označen

Hydrolyza proteinu ve směsi H₂¹⁸O a H₂¹⁶O (1:1)
1. MS: dublety tryptických štěpů (vyjma fragmentů s C-koncem proteinu)
2. MS/MS: oba dubletové piky peptidů vybrány jako prekurzor pro MS/MS; pouze štěpy obsahující C konec peptidu budou ve formě dubletu ... přehlednější spektra

Esterifikace (methylace) karboxylových skupin peptidů
 $\Delta m = +14$ / karboxylovou skupinu (-COOH → -COOCH₃)
porovnání spekter původního a metylovaného peptidu
obdobná technika založena na derivatizaci aminoskupin peptidů

Pozn. 1: výměnná reakce však může probíhat i na C terminálu
Pozn. 2: vznikají složitější izotopové patery s hmotnostmi M (2x¹⁶O), M+2 (1x¹⁶O, 1x 2x¹⁸O) a M+4 (2x¹⁸O).

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013 431

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 porovnáno s databází počítačem vygenerovaných spekter všech možných peptidů, které mají hmotnost prekurzoru
- algoritmus Sequest (J. R. Yates III et. al., 1994)

... mnohem úspěšnější než deduktivní přístup

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013 429

Sekvenování proteinu

Př.: využití různých dlouhých dob štěpení se značením terminálu.

Zjištění terminálu:
hydrolyza v H₂¹⁸O
(C-terminál nebude označen)

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013 432

Detekce mutací

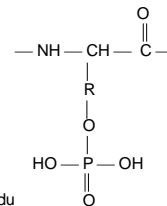
Detekce záměny nebo absence aminokyselin(y) v řetězci proteinu

Postup:

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

Fosforylace

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



MS/MS identifikace fosforylace

1. Ztráta H_3PO_4 (neutral loss scan: 98 Da) obvykle poskytuje též iont $[\text{M}+\text{H}-98]^+$
2. Detekce iontu PO_3^- (79 Da) v negativním modu skenování výchozích látek pro m/z (produkt) = 79
Další neg. ionty: H_2PO_2^- (97 Da), PO_2^- (63 Da)
3. Posuny píků fragmentů v MS/MS spektrech

Post-translační modifikace (PTM)

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

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

\Rightarrow 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

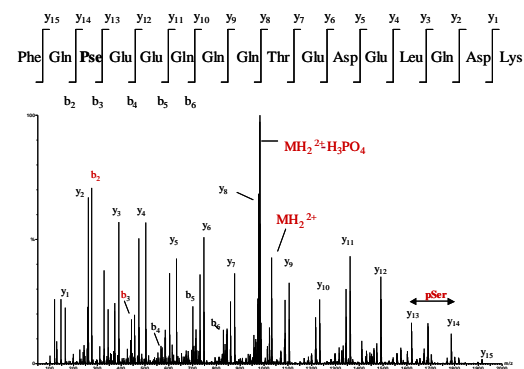
Post-translační modifikace (PTM)

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.).

Př.: ESI MS/MS oligopeptidu s monofosforylovaným serinem



Př.: ESI MS/MS oligopeptidu s monofosforylovaným serinem



Zdroje informací:

1. Molekulární piky MH_2^{2+} a $(M - H_3PO_4)H_2^{2+}$, rozdíl $\Delta m = 98$ ($\Delta m/z = 49$)
2. b-ionty: $\Delta m/z (b_3 - b_2) = 167$
3. y-ionty: $\Delta m/z (y_{14} - y_{13}) = 167$

(kredit: K. R. Jennings)

Vliv S-S můstků při ESI-MS

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

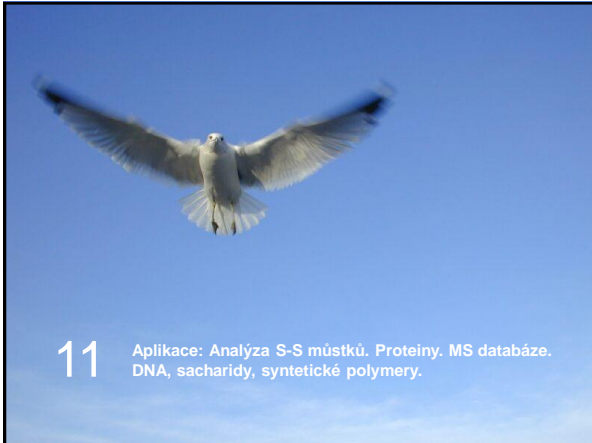
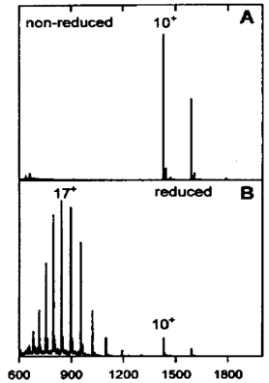
Redukce 1,4-dithiothreolem (DTT) odstraní S-S můstky



„Unfolded“ protein s více obnaženými bazickými rezidui aminokyselin

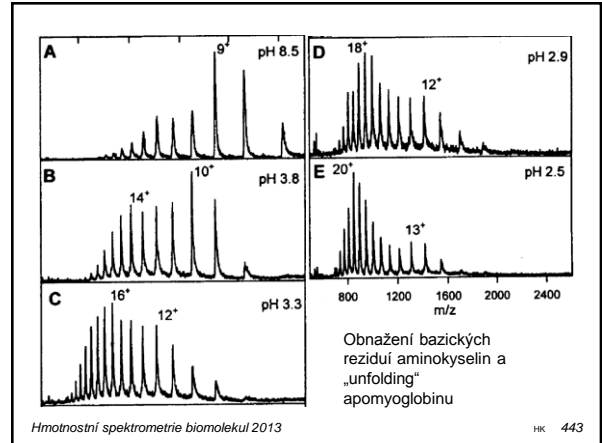


Vyšší počet nábojů iontu



11

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



Obnažení bazických reziduí aminokyselin a „unfolding“ apomyoglobinu

Analýza disulfidových můstků

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

Počet cysteinů – pomocí alkylatione cysteinu

- např. alkylatione jednoho cysteinu vinylypyridinem 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. dithioerythreolem) a následná MS analýza

1. $\Delta m = 2$ Da → peptid s **intramolekulární** -S-S- vazbou
2. první pik zmizí, dva další s nižší m/z se objeví → **intermolekulární** můstek mezi 2 peptidy

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

Příklady: nanosprej MS

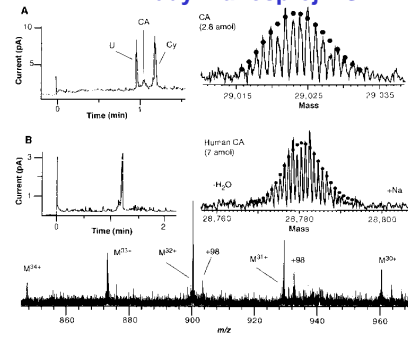


Fig. 1. Total ion electropherograms (left) from (A) a mixture of 1 μ M bovine CA, 50 nM bovine CA, and 1 μ M equine CA and (B) 7 + 2 μ M of human CA from a cloudy blood sample. Mass spectra (at right) (A and B) the deconvoluted isotopic regions and (B, bottom, m/z: 860 to 940) from subsequent injections (b s at 63 V/cm) representing (A) 5.0 \times 10⁻¹¹ liter of bovine CA and (B) 1.2 μ mol of human CA.

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

Nekovalentní interakce

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

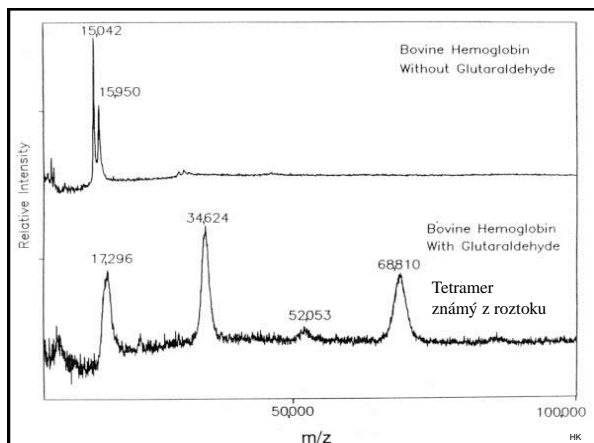
Př.

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

Vědecké databáze na internetu

Internetové zdroje pro identifikaci proteinů pomocí MS metod

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



Vědecké databáze na internetu

Další odkazy:

- UMIST (pepMAPPER) wolf.bms.umist.ac.uk/mapper
- European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg (PeptideSearch) www.narrador.embl-heidelberg.de
- Scripps, ThermoFinnigan (Sequest) fields.scripps.edu/sequest/
- Proteomics (MS/MS Sonar) www.proteomics.com

Proteinové (peptidové) databáze

- Genpept – NCBI GenBank
- NBRF - National Biomedical Research Foundation
- Swissprot - Swiss Institute of Bioinformatics
- Owl - Leeds Molecular Biology Database Group
- Delta Mass - databáze posttranslačních modifikací proteinů

Vědecké databáze na internetu

Uvedené databáze jsou pouze příklady, ne plný výčet.

- NCBI (National Center for Biotechnology Information) database Medline: www.ncbi.nlm.nih.gov
- Scirus: www.scirus.com
- ScienceDirect: www.sciencedirect.com

Databáze pro organickou chemii

- NIST Chemistry WebBook (NIST)
- Spectra Online (ThermoGalactic)
- Spectral Data Base System, SDBS (NI AIST)

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.

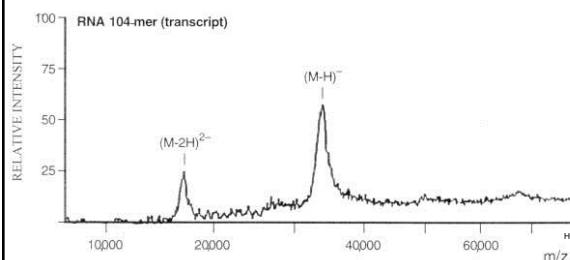
MS nukleových kyselin a oligonukleotidů

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

451

IR MALDI MS ribonukleové kyseliny



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

454

MALDI MS nukleových kyselin a oligonukleotidů

Typické matrice

3-hydroxypikolinová kyselina
2',4',6'-trihydroxyacetofenon
pikolinová kyselina

Typické aplikace

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

452

Sekvenování NA pomocí exonukleázy a MALDI MS

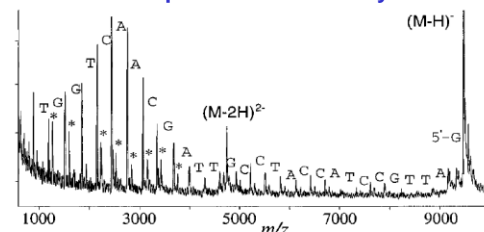


Figure 4. DE MALDI mass spectrum of a crude synthetic DNA 31-mer ($M_r = 9486.2$ calculated). Mass measurements on the failure products define the sequence up to the 3' trinucleotide (see Table 1). Asterisks indicate +80-Da satellite peaks: instrument, 1.3 m linear; matrix, 3-HPA.

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 2013

455

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

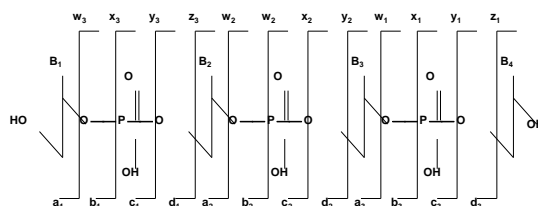
Berkenkamp, S; Kirpekar, F; Hillenkamp, F *Science* **1998**, *281*, 260-262.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

453

Fragmentace oligonukleotidů v plynné fázi

Schéma fragmentace oligonukleotidů v plynné fázi a značení fragmentů



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

456

Analyza sacharidů

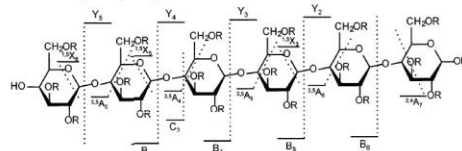
- Měkké ionizační metody: MALDI, ESI. MSⁿ pro stanovení sekvence a struktury
- Použití enzymů k částečnému štěpení sacharidů před MS analýzou
- Běžné monosacharidy: glukóza, manóza, galaktóza, fukóza, N-acetylglukosamin, N-acetylgalaktosamin a N-acetylneuraminová kyselina (sialic acid).
- Stanovení úplné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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

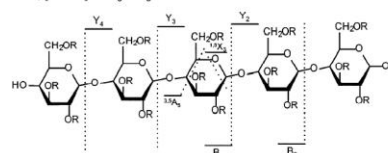
457

MSⁿ oligosacharidů

b) MS³ of 1279.6, [M+Na]⁺ > Y₆ >



c) MS⁴ of 1075.5, [M+Na]⁺ > Y₆ > Y₅ >



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

460

Nomenklatura MS/MS oligosacharidů

- Nomenklatura MS fragmentů s nábojem na neredukující straně: A, B a C; fragmenty s nábojem na redukcující straně X, Y a Z podle toho zda štěpí hruh nebo glykosidickou vazbu.
- Spodní index u fragmentů B, C, Y a Z iontů udává počet rozštěpených glykosidických vazeb, horní levý index u fragmentů A a X udává vazby, které byly rozštěpeny. Spodní indexy a, b atd. udávají štěpenou větev u větvených sacharidů.
- Fragmenty B, C, Y a Z spolu s rozdílem hmotností lze použít k určení sekvence a větvení.
- MS umožňuje určení optické izomerie glykosidické vazby. Metoda je založena na selektivní oxidaci CrO₃ β-anomeru derivatizovaných hexóz za vzniku ketoesteru.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

458

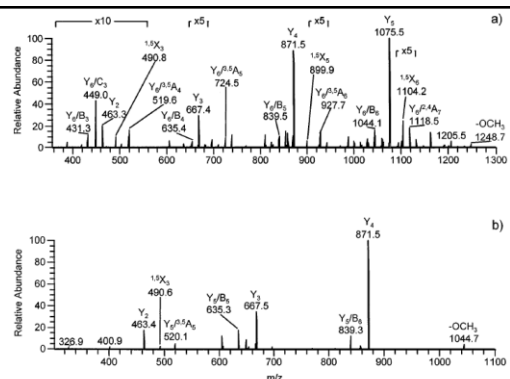


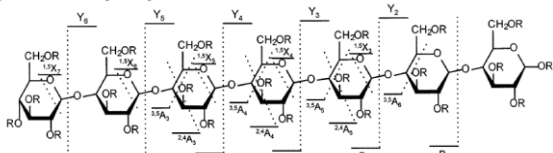
Figure 3. (a) MS³ of permethylated maltoheptaose, m/z 1497.8 → 1279.6 →. (b) MS⁴ of permethylated maltoheptaose, m/z 1497.8 → 1279.6 → 1075.5 →.

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

461

MSⁿ oligosacharidů

a) MS² of 1497.8, [M+Na]⁺ >



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



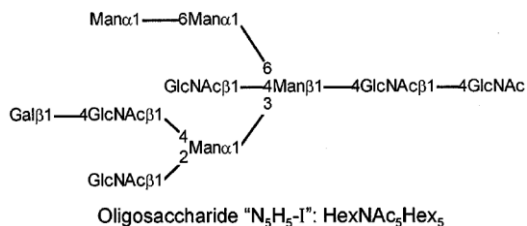
Maltoheptaose

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

459

MSⁿ oligosacharidů



Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

462

12 Otázky & konzultace



Otázky

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

472

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.

Termíny zkoušek

Prosinec?
Leden?
Únor?

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

470

Otázky

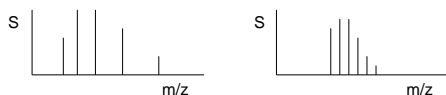
- Existuje praktický limit maximální m/z TOF MS?
- Srovnajte možná uskalí stanovení peptidů a oligomerů DNA pomocí MS.
- Máte analyzovat peptidy v polévce. Co nebudete přidávat do polévky před MS analýzou? Jak polévku upravíte a jakou ionizační techniku použijete?
- Který z detektorů je vhodnější pro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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

473

Otázky

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



- 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.
- Doba letu iontu $C_2H_8O_2N^+$ v TOFMS je 14.8 μ s. Jaká je hmotnost iontu, který dorazil k detektoru za 8.94 μ s? O jaký iont může jít?
- Jaké veličiny mají vliv na rozlišení v TOFMS? Pozitivní nebo negativní vliv?
- Porovnejte počty iontů, které mohou být detegovány během záznamu jednoho spektra v FT-ICR-MS a v kvadrupólovém filtru?

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

471

Otázky

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

Hmotnostní spektrometrie biomolekul 2013

474