

Hmotnostní spektrometrie...

...co to umí?

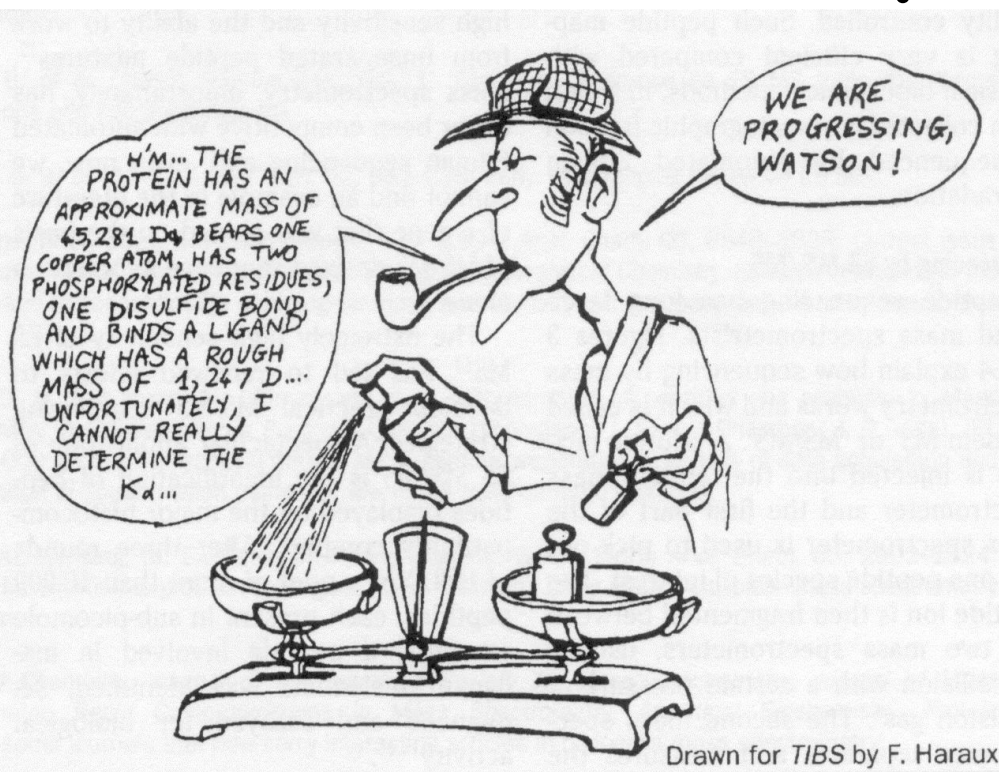
Měřit přesnou molekulovou hmotnost

Určovat izotopové zastoupení

Napomáhat určení struktury

Provádět kvantitativní měření

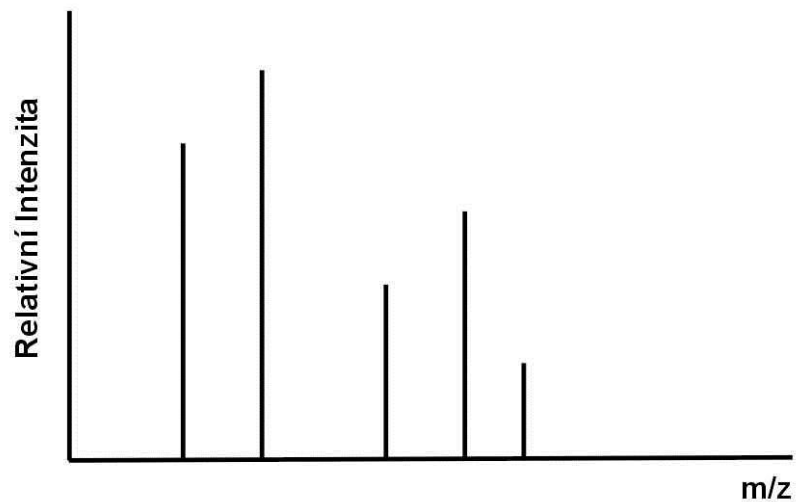
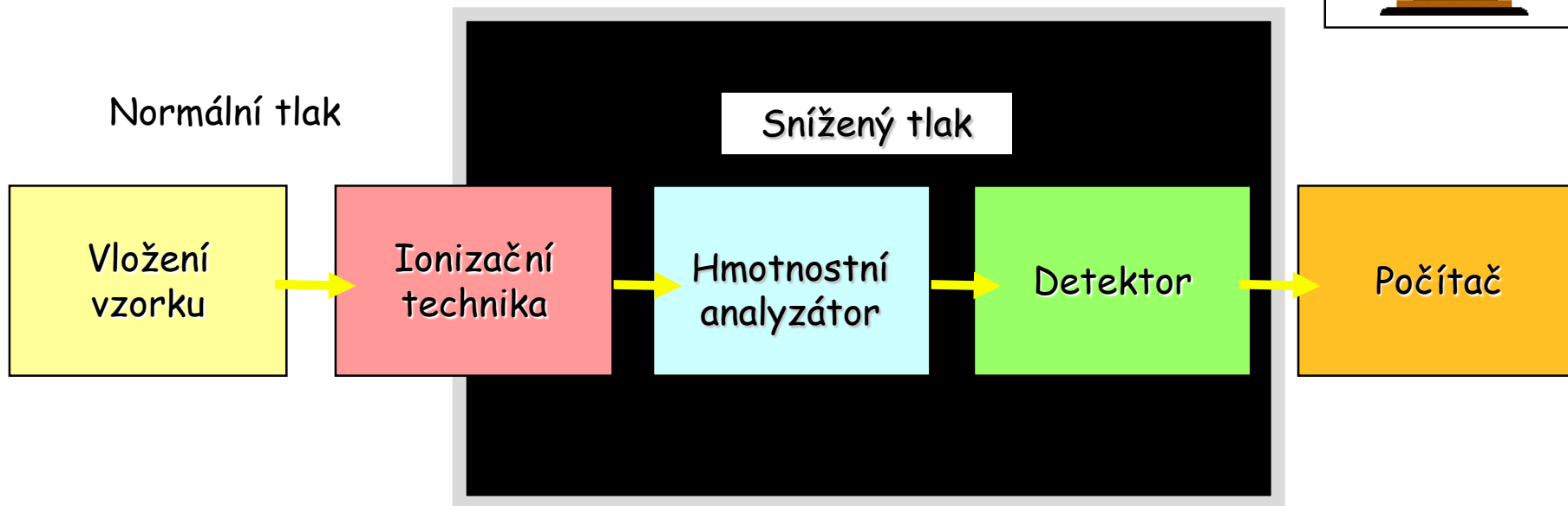
Hmotnostní spektrometrie...



...co se s tím dělá?

- Monitoruje kvalita vzduchu
- Zkoumá složení vesmíru
- Sledují reakce v plynné fázi
- Farmakokinetika
- Analýza dechu
- Stopová analýza
- Detekce drog a výbušnin
- Analýza ropy, vod, potravin, ...
-
- Identifikace bakterií
- Identifikace proteinů a peptidů
- Charakterizace modifikací proteinů
- Kvantifikace proteinů
- Strukturní změny proteinů i nukleových kyselin
- Konformace proteinů a NK
- Neoptické zobrazování v tkáních
- Studium interakcí proteinů

Hmotnostní spektrometr

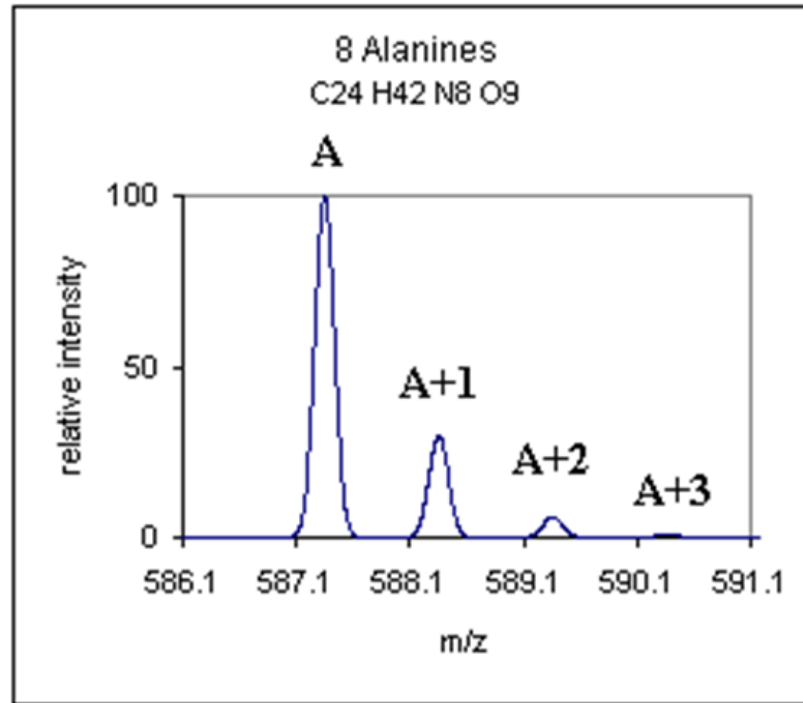


Atomové hmotnosti

Monoizotopická a průměrná...

Symbol	M_{nom}	M_{mono}	%
C	12	12.00000	98.9300
	13	13.00336	1.0700
H	1	1.00783	99.9885
	2	2.01411	0.1150
N	14	14.00307	99.6320
	15	15.00011	0.3680
O	16	15.99492	99.7570
	17	16.99913	0.0380
	18	17.99916	0.2050
S	32	31.97207	94.9300
	33	32.97146	0.7600
	34	33.96787	4.2900
	36	35.96708	0.0200
P	31	30.97376	100.0000

Přítomnost izotopů (^{13}C , ^{15}N , ^{18}O , ...) se projeví na tvaru píku.

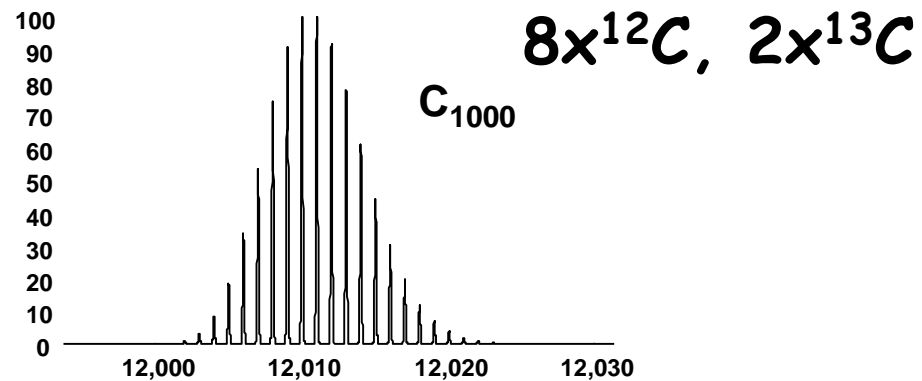
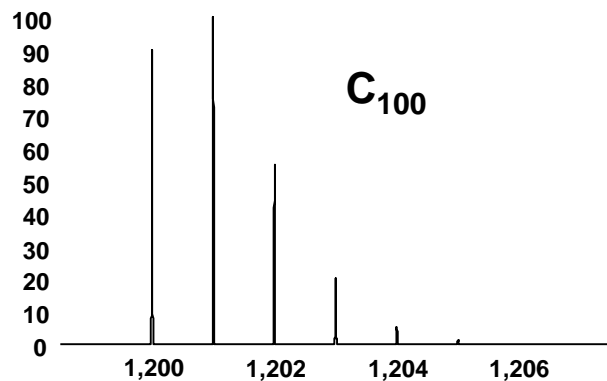
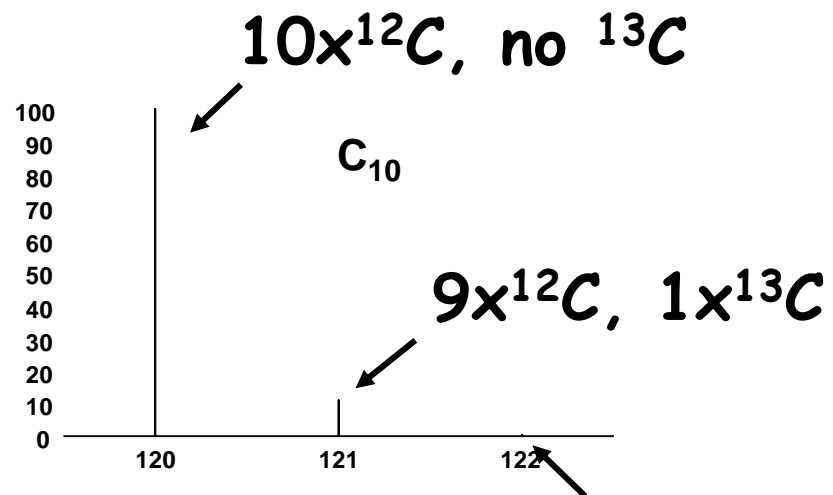
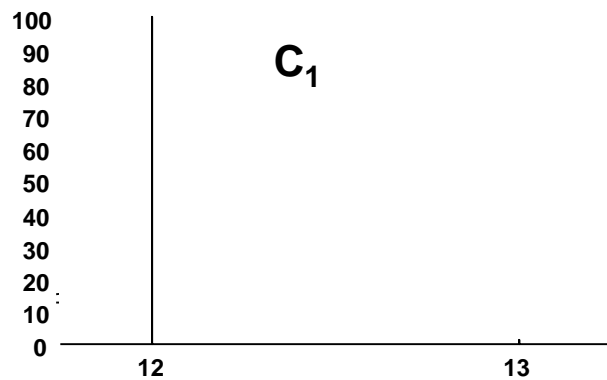


^{13}C je 1.1%, tj. na každých 100 uhlíků je o jeden ^{13}C více -> více ^{13}C , to se projeví na tvaru píku
Intenzita druhého izotopu je $1.1 \times \text{počet C} \Rightarrow$
získáme % intenzity prvního píku, atd.

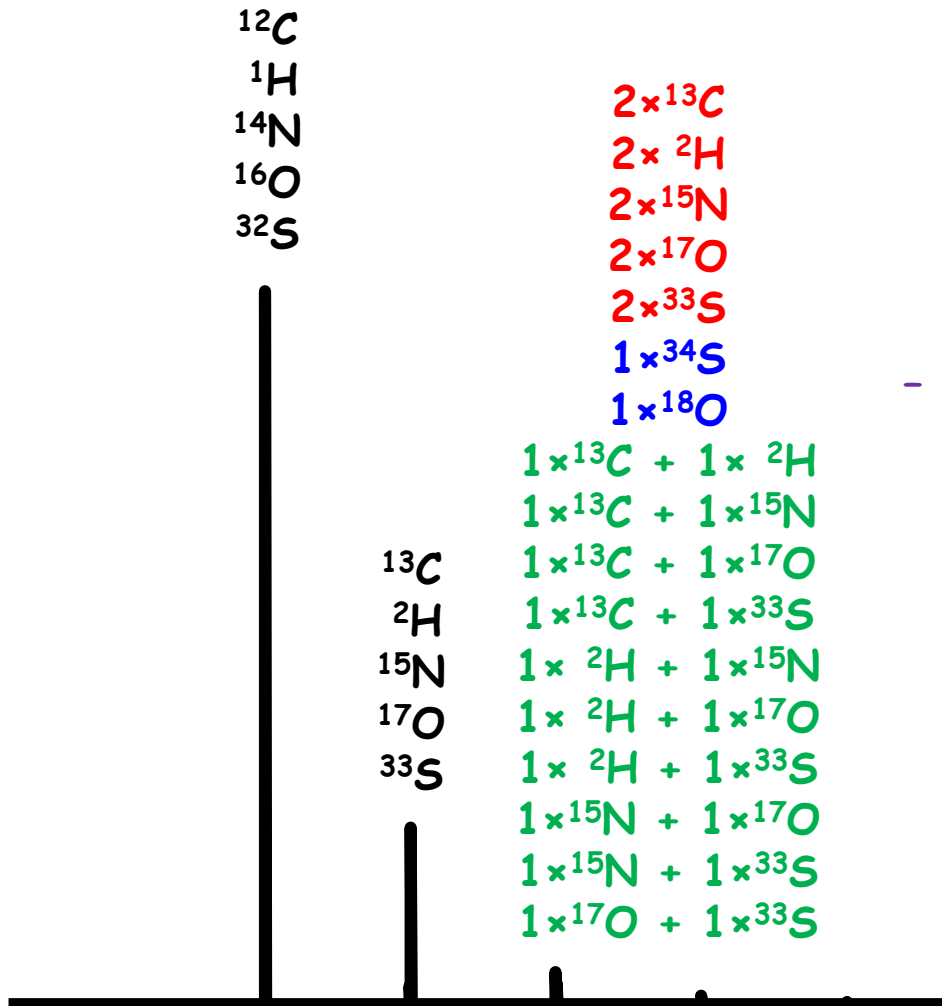
Izotopický klastr

^{12}C : 98.90%

^{13}C : 1.10 %



Přítomnost izotopů (^{13}C , ^{15}N , ^{18}O , ...) se projeví na tvaru píku.



Teoreticky možné kombinace
... vidíme ale méně
- důležité je i % zastoupení izotopů

Theoretical Isotope Peaks for Peptides of Masses 1000-4000 Da

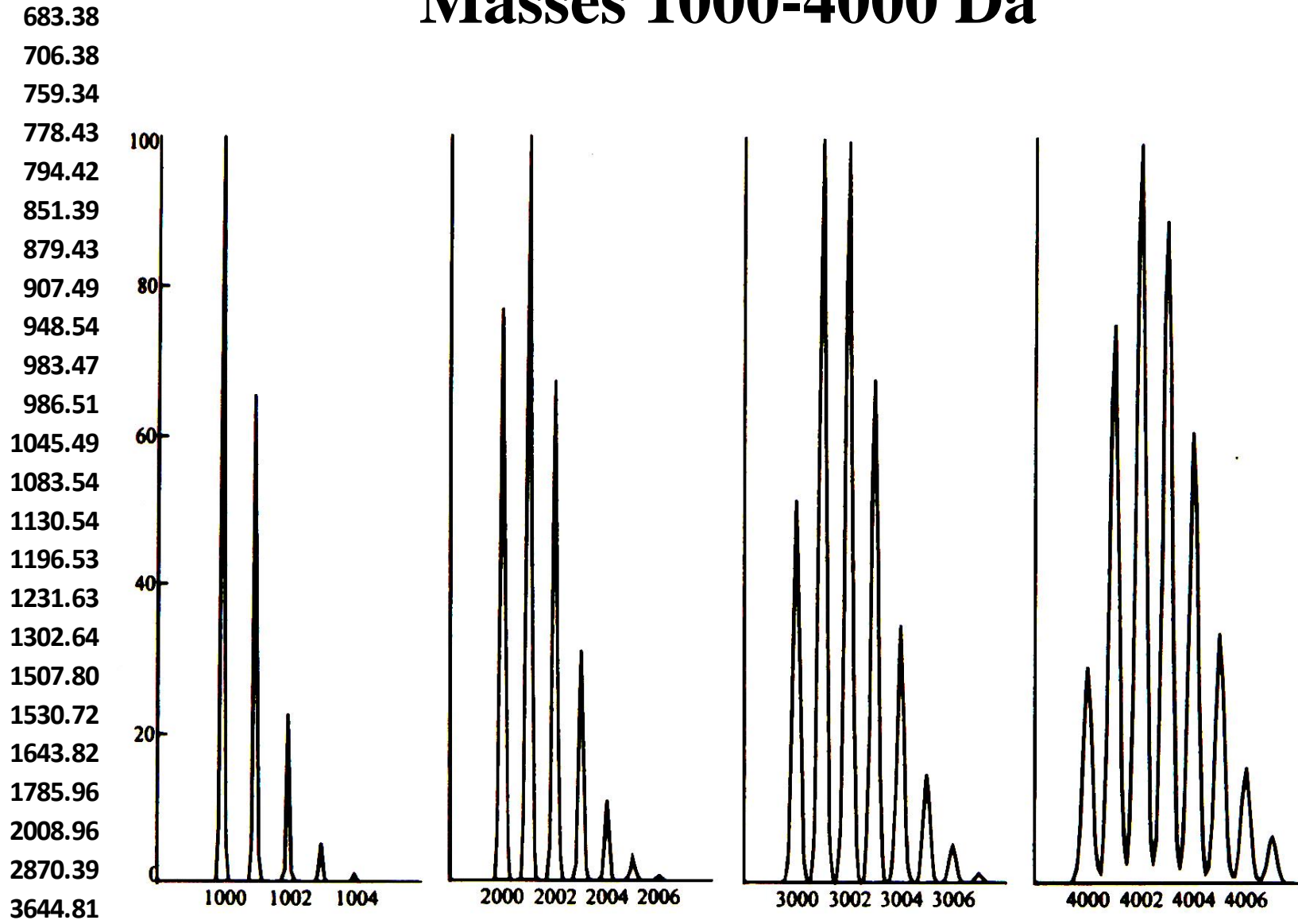
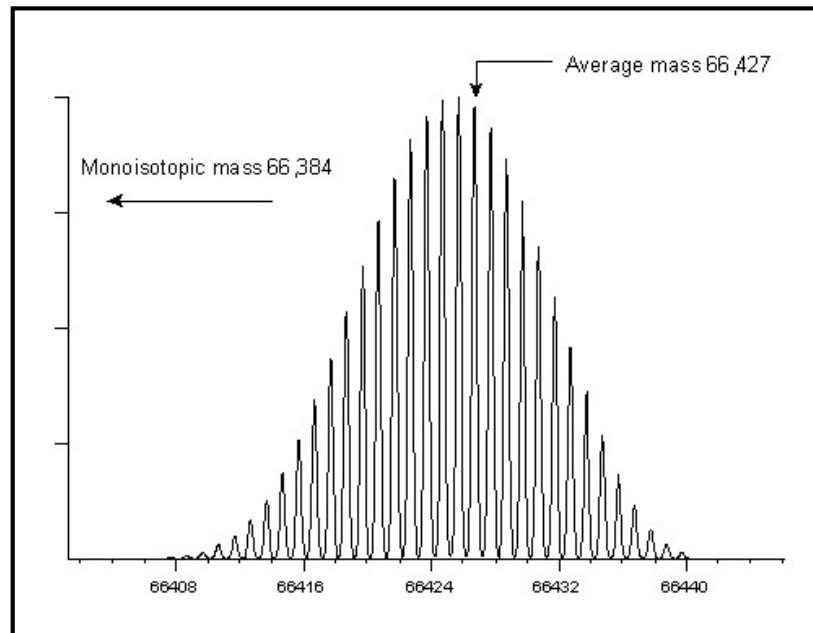
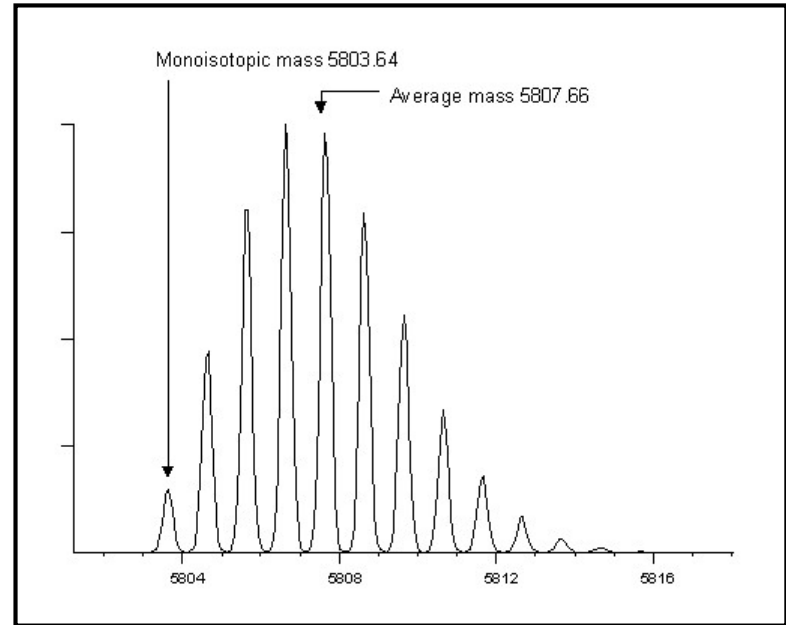
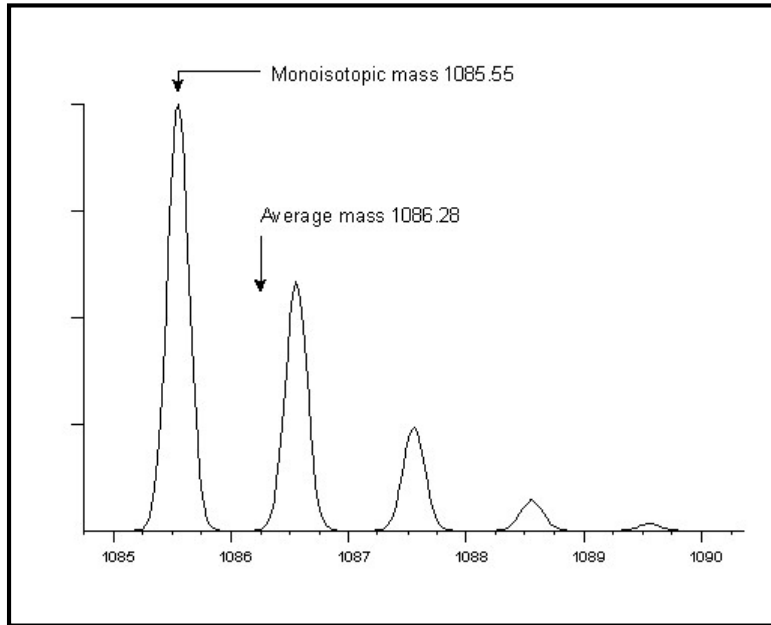


Figure 4. Theoretical isotope distributions of peptides of 1000, 2000, 3000 and 4000 Da.

Kolik hmotností máme?



1 atm = 101325 Pa

1 Torr = 133 Pa

1 bar = 10^5 Pa

Vakuum

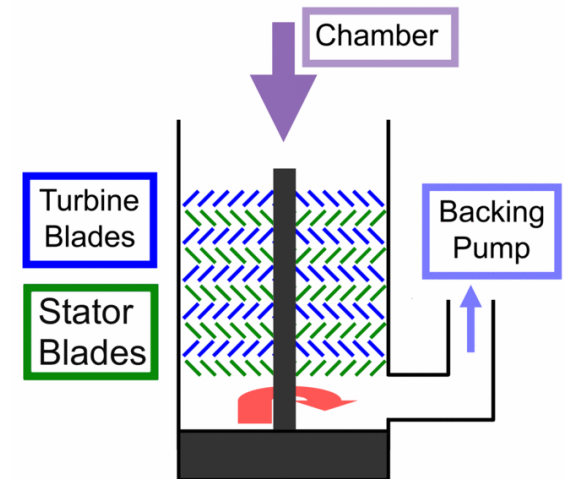
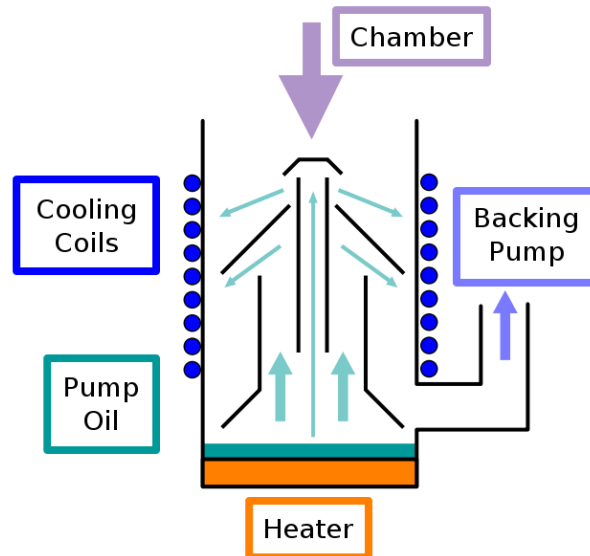
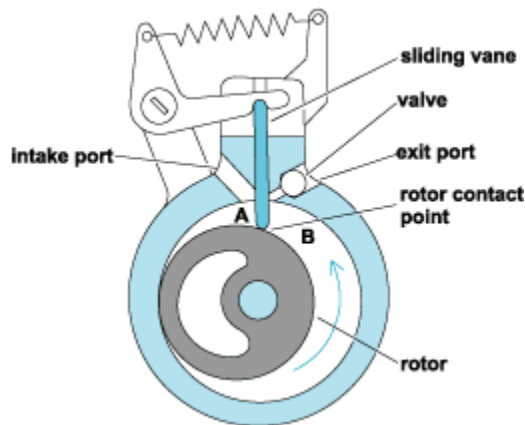
Proč?

Střední volná dráha molekuly (střední dráha mezi dvěma následnými srážkami) závisí na hustotě prostředí (zde tlaku/vakuu)

Např. pro N_2 : atmosf. tlak - $10e^{-8}m$, $10e^{-3}Pa$ - metry, $10e^{-8}Pa$ - $10e^5m$

Jak?

Diferenční pumpování - rotační pumpy ($10e^{-3}mbar$) difuzní ($10e^{-10}mbar$) a turbomolekulární pumpy ($10e^{-8}mbar$)

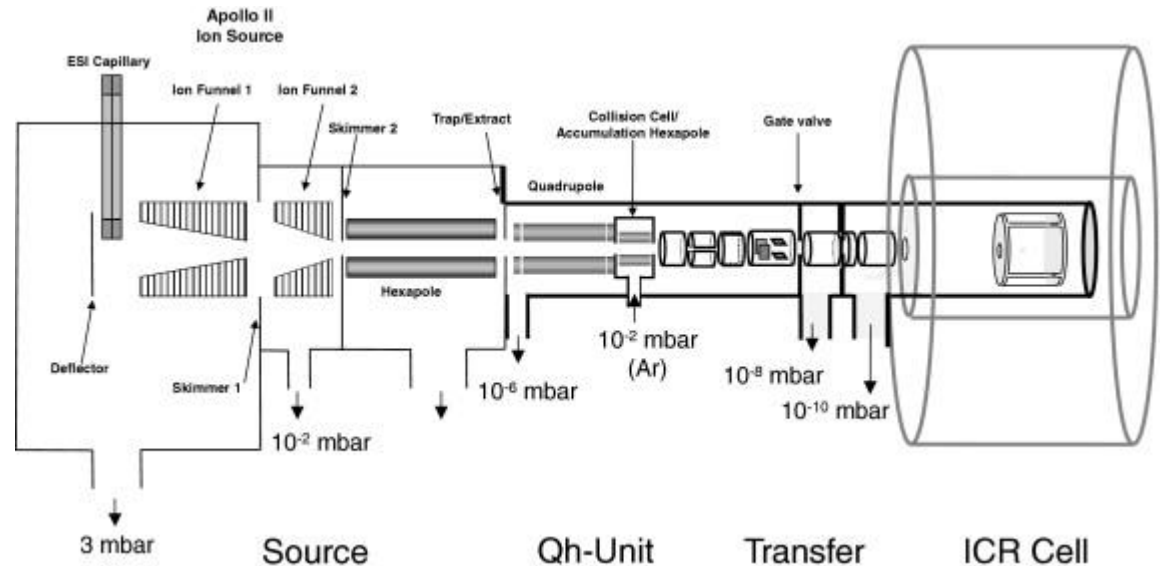
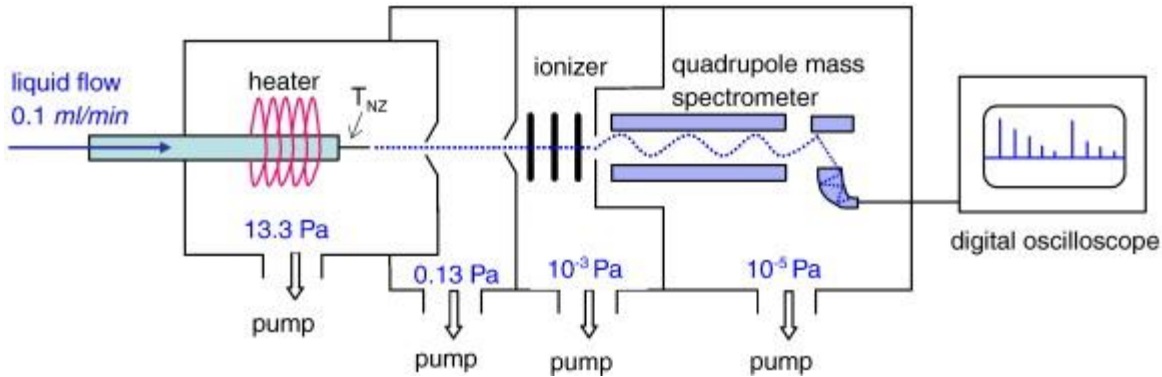


Vakuum

1 atm = 101325 Pa

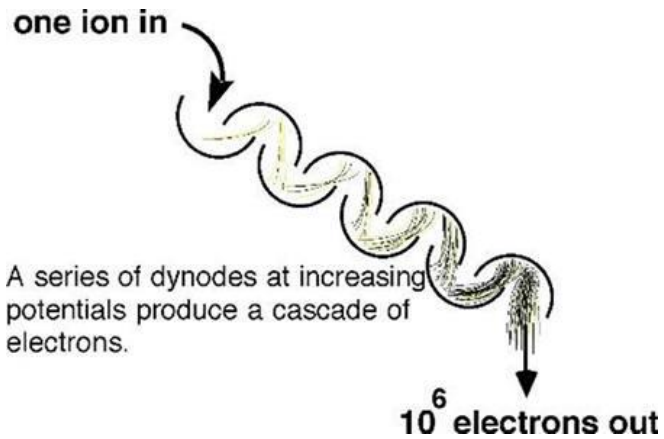
1 Torr = 133 Pa

1 bar = 10^5 Pa

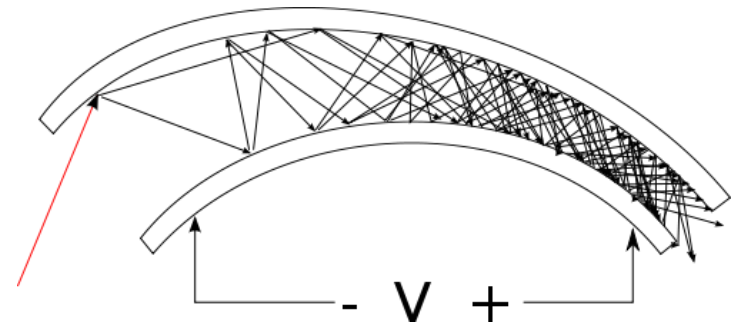


Detekce

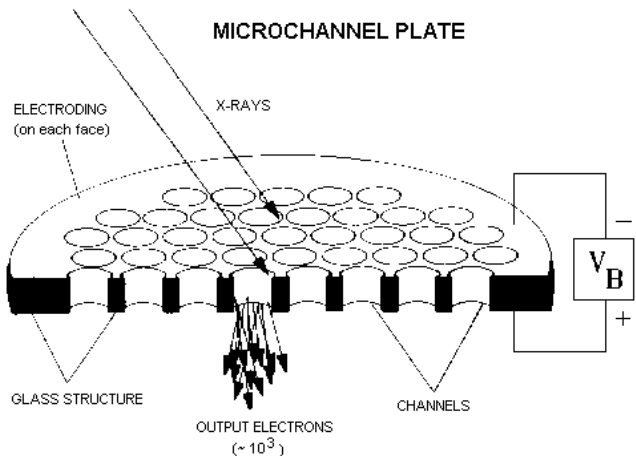
Elektronový násobič



Channelotron



Multikanálová destička (MCP)



Indukce (Orbitrap, ICR)

MS spektrum - osa y
??? Napětí, počet iontů, náboj, proud ???
=> a.u., R.I.

Ionizační techniky.

Převod z tuhé/kapalné/plynné fáze do plynné a tvorba iontů

měkké X tvrdé

vakuum X atmosferický tlak (ambientní ionizace) - API

Negativní X pozitivní mód

Měkké ionizační techniky - hlavně pseudomolekulární ionty - přidání/odtržení protonu $M+H^+$ / $M-H^+$ - také nabití pomocí kationtů (Na^+ , K^+ , ... či aniontů v negativním iontovém módu)

Tvorba aduktů - solvent, matrice, nečistoty, sám se sebou,...

Ionizační techniky.

ESI - Electrospray Ionization

- DESI - Desorption Electrospray Ionization
- nESI - nano ESI
- paper spray

MALDI - Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization

- LDI - Laser Desorption/Ionization
- NALDI - Nano Assisted Laser Desorption/Ionization
(Nanostructured / Nanowire)
- DIOS - Desorption Ionization On Silicon
- SELDI - Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization
 - SEND - surface enhanced neat desorption (DIOS)
 - SEPAR - surface enhanced photolabile attachment and release
 - SEAC - surface enhanced affinity capture

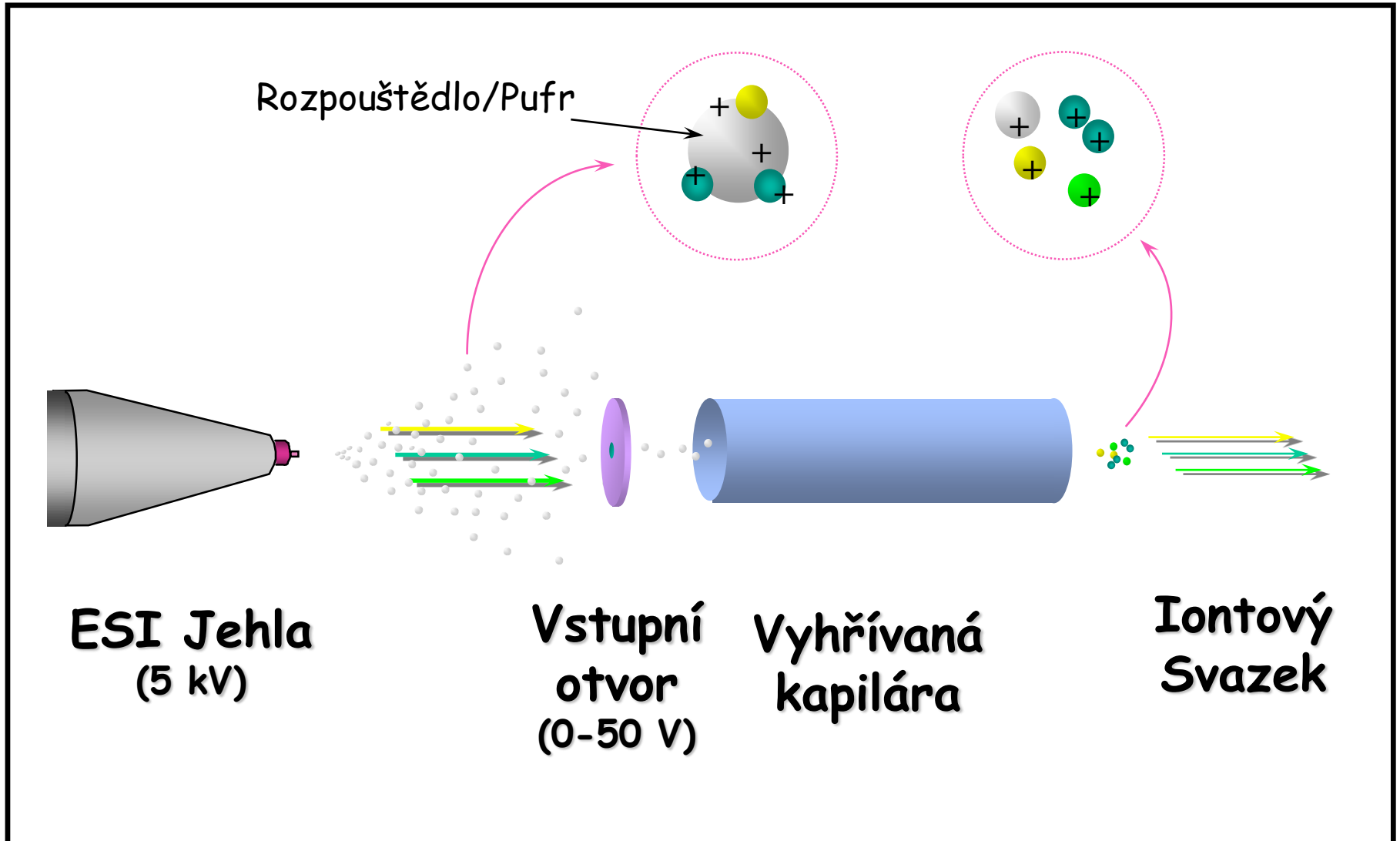
Elektrosprej - J. B. Fenn



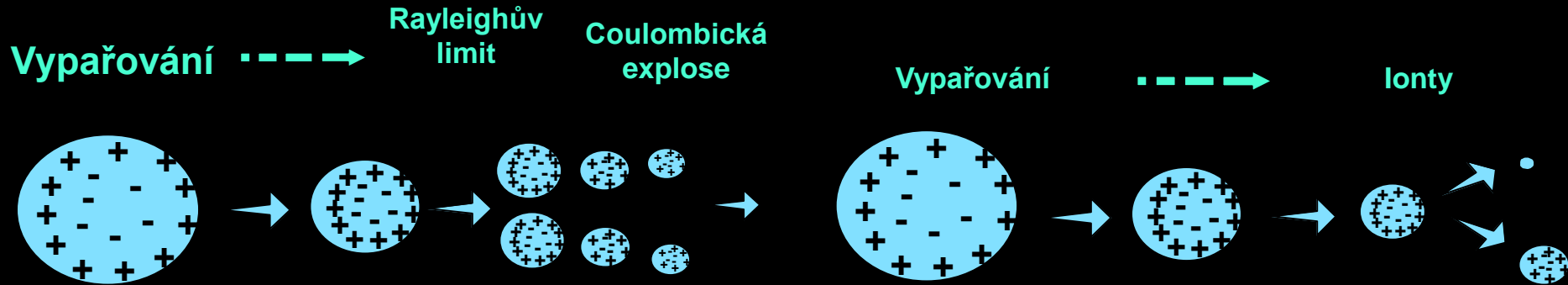
1994 - nanoelektrosprej -
M. Mann a M. Wilm

Fenn JB; Mann M; Meng CK; Wong SF; Whitehouse CM: *Science* 1989, 246, 64.

Ionizace elektrospejem



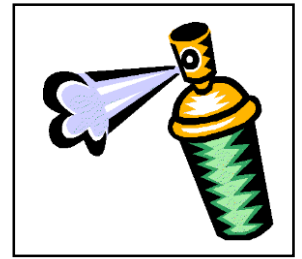
Princip ionizace elektrosprejem



<http://www.youtube.com/watch?v=palKlu1-ChA>

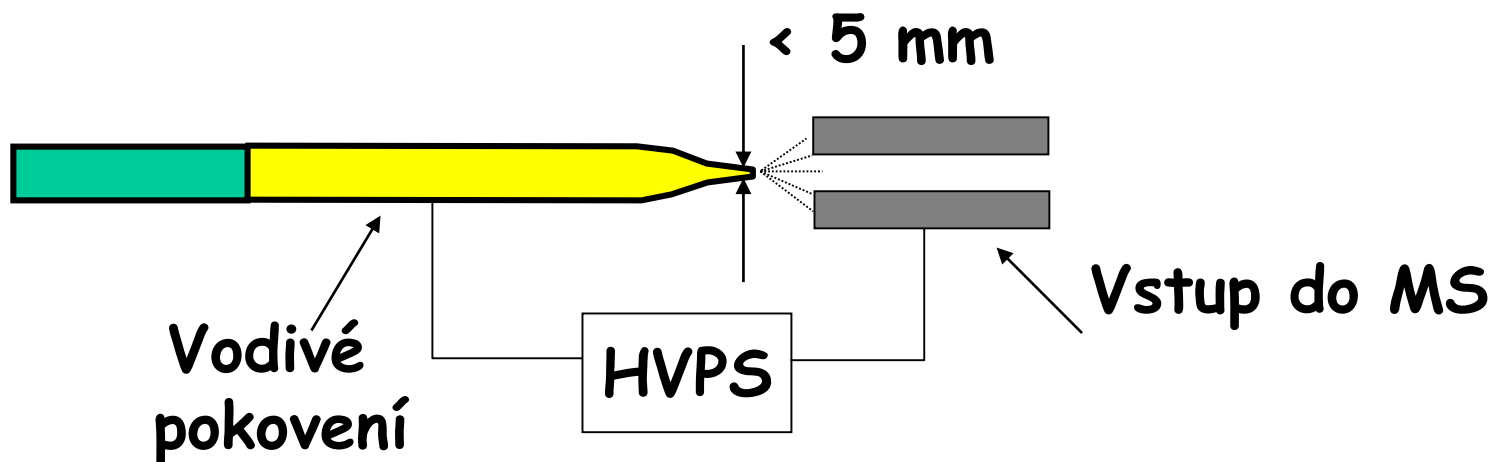
<http://www.youtube.com/watch?v=YukX2s1kuYc>

Ionizace elektrosprejem



- Velmi měkká ionizace
- Mnohonásobně nabité ionty - 1, 2, 3, ...60x
- Malá nebo téměř žádná fragmentace
- proteiny, peptidy, oligosacharidy, nukleotidy, syntetické polymery ...
- Nekovalentní komplexy (proteinové komplexy, komplexy protein-ligand, atd.)
- Vysoká náročnost na čistotu
- Napojitelné na LC

Nanospray - nESI



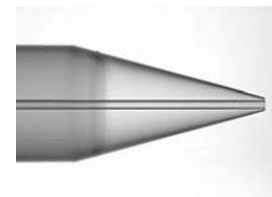
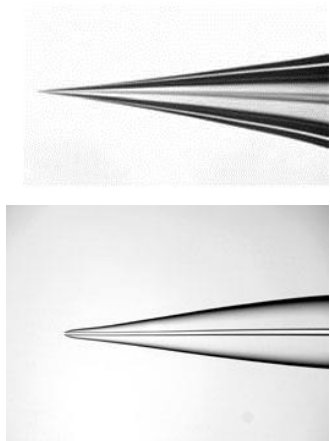
Křemenná kapilára vytažená/zbroušená do špičky
($< \mu\text{m}$)

Velmi malé kapky $< 200 \text{ nm}$

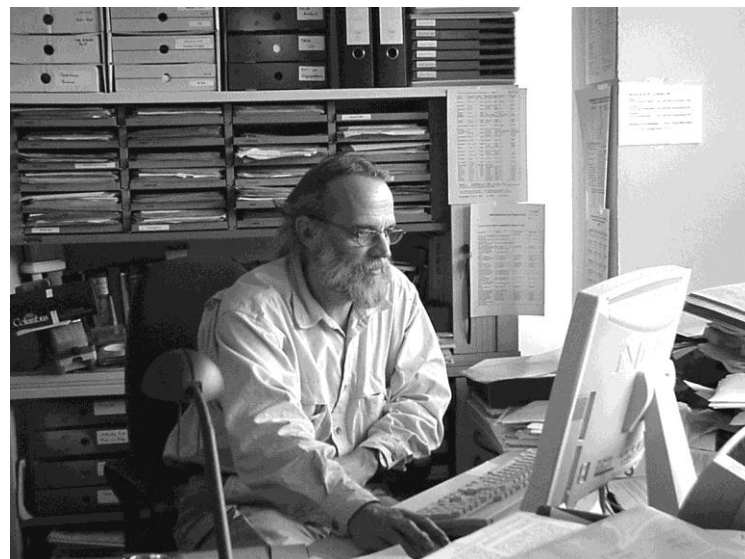
Průtoky v řádu 25 nl/min

Mnohem vyšší účinnost ionizace

Miniaturní spotřeby vzorku

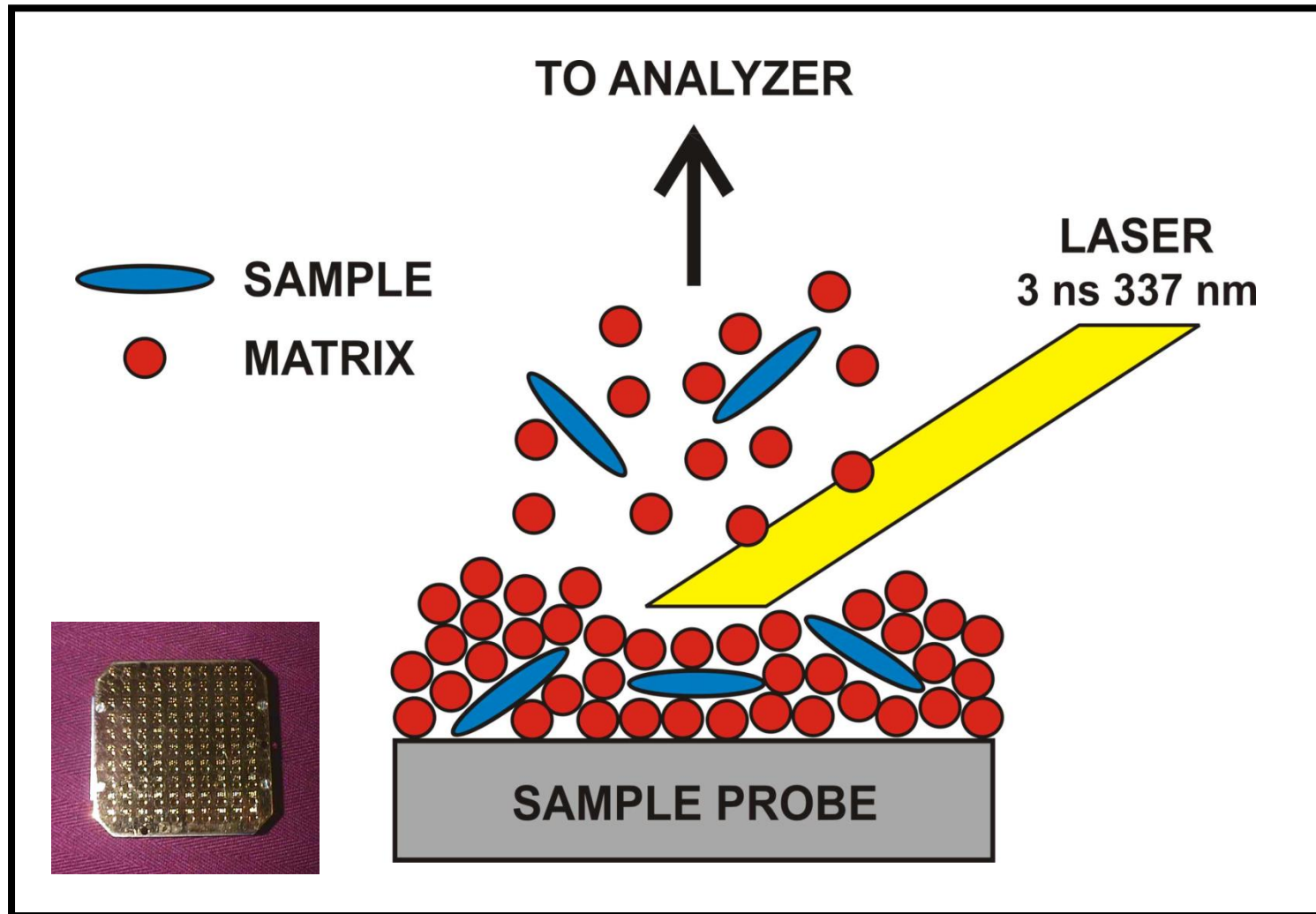


Desorpce laserem za přítomnosti matrice K. Tanaka / M. Karas, F. Hillenkamp



Karas M; Bachmann D; Bahr U; Hillenkamp F: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1987, 78, 53.
Tanaka K; Waki H; Ido Y; Akita S; Yoshida Y; Yoshida T: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1988, 2, 151.

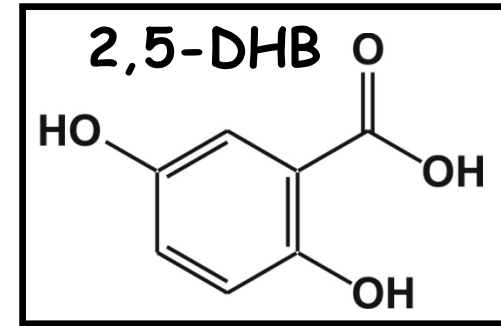
MALDI Ionizační proces



MALDI Ionizační proces

MALDI matrice

dobrá absorpce za použité vlnové délky
stabilita ve vakuu, netěkavá
přenos protonu



vzorek : matrice = 1 : 10^4 - 10^5

mísitelné se vzorkem v tuhé fázi

solventy: MeOH, EtOH, MeCN, H₂O, THF, aceton ...

UV-MALDI

337 nm dusíkový laser

355 nm Nd:YAG

266 nm Nd:YAG

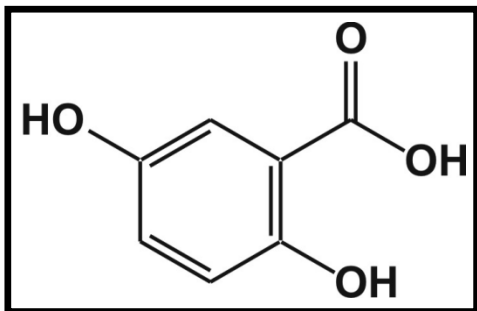
193 nm ArF

IR-MALDI

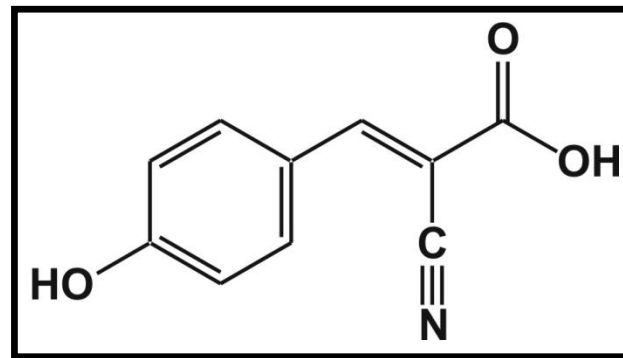
2.94 μ m Er:YAG laser

10.6 μ m CO₂ laser

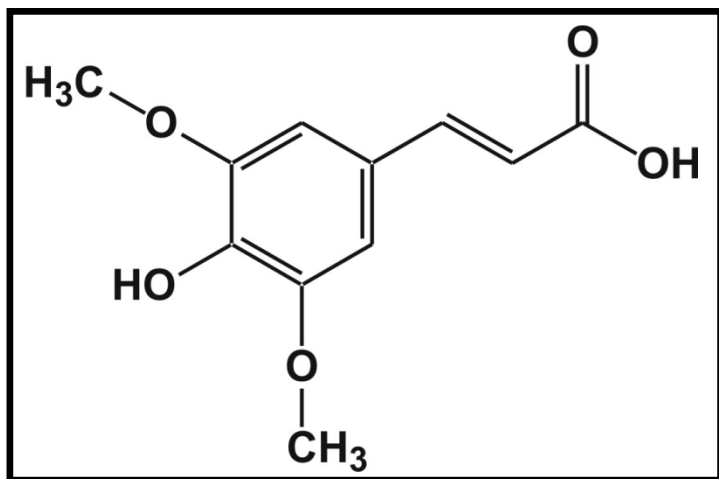
MALDI matrice



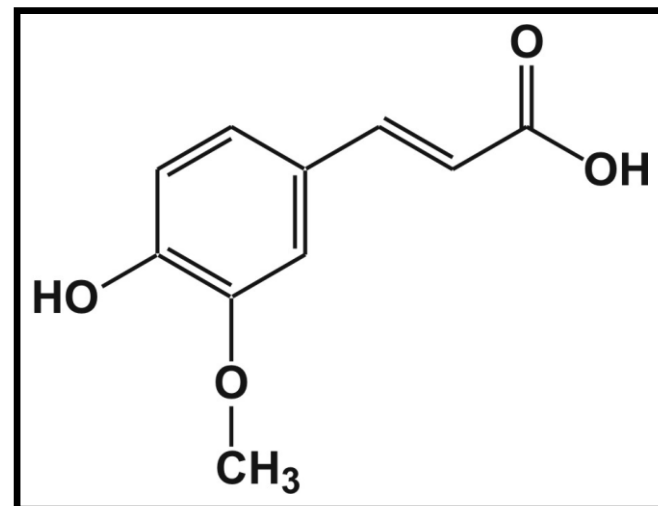
kys. 2,5-dihydroxybenzoová (DHB)



kys. α -kyano-4-hydroxyskořicová (CCA)



kys. sinapová (SA)
(kys. 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová)



kys. ferulová (FA)
(kys. 4-hydroxy-3-methoxyskořicová)

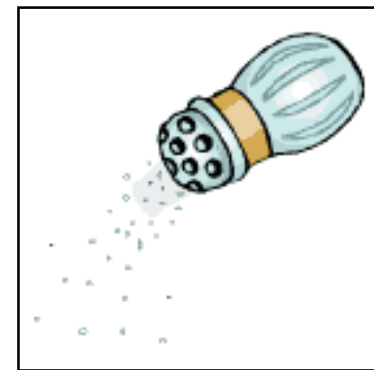
Matrice - aplikace

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

Přídavky aditiv (např. monosacharidy, alkylglykosidy, lithné kationty,...) - zlepšení krystalizace, homogenity vzorku, rozlišení, potlačení fragmentace, preferenční tvorba aduktů

MALDI Ionizační proces

- Měkká ionizace
- Malá nebo žádná fragmentace, jednoduchá interpretace
- Jednonásobně nabitě ionty $[M+H]^+$; $[M-H]^-$
- Rychlá a jednoduchá příprava
- Proteiny, peptidy, oligosacharidy, nukleotidy syntetické polymery ...
- Tolerantní k detergentům, solím... **ALE...**
- Krátké laserové pulsy; $t \sim ns$
- Nejčastěji spojeno s TOF analyzátozem



Analyzátoary

Typ

statické - dynamické
separace

Magnetický sektor (B)

magnetický moment

Elektrický sektor (E)

kinetická energie

Kvadrupól (q)

m/z stabilita trajektorie

Iontová past (IT)
(kvadrupólová-sférická / lineární)

m/z rezonanční frekvence

Průletový (ToF)

doaa letu

Cyklotronová rezonance (ICR)

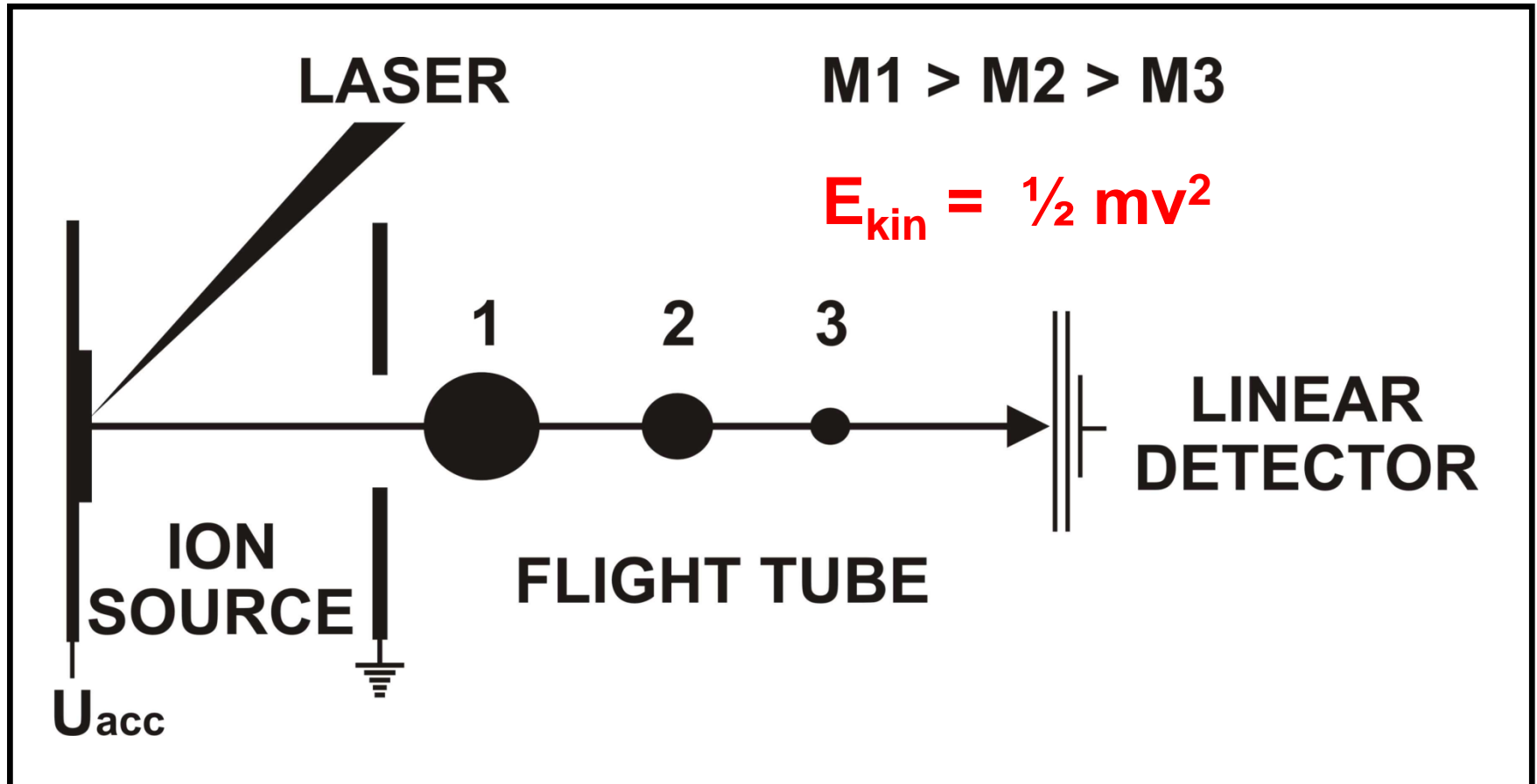
m/z rezonanční frekvence

Orbitální past (OT)

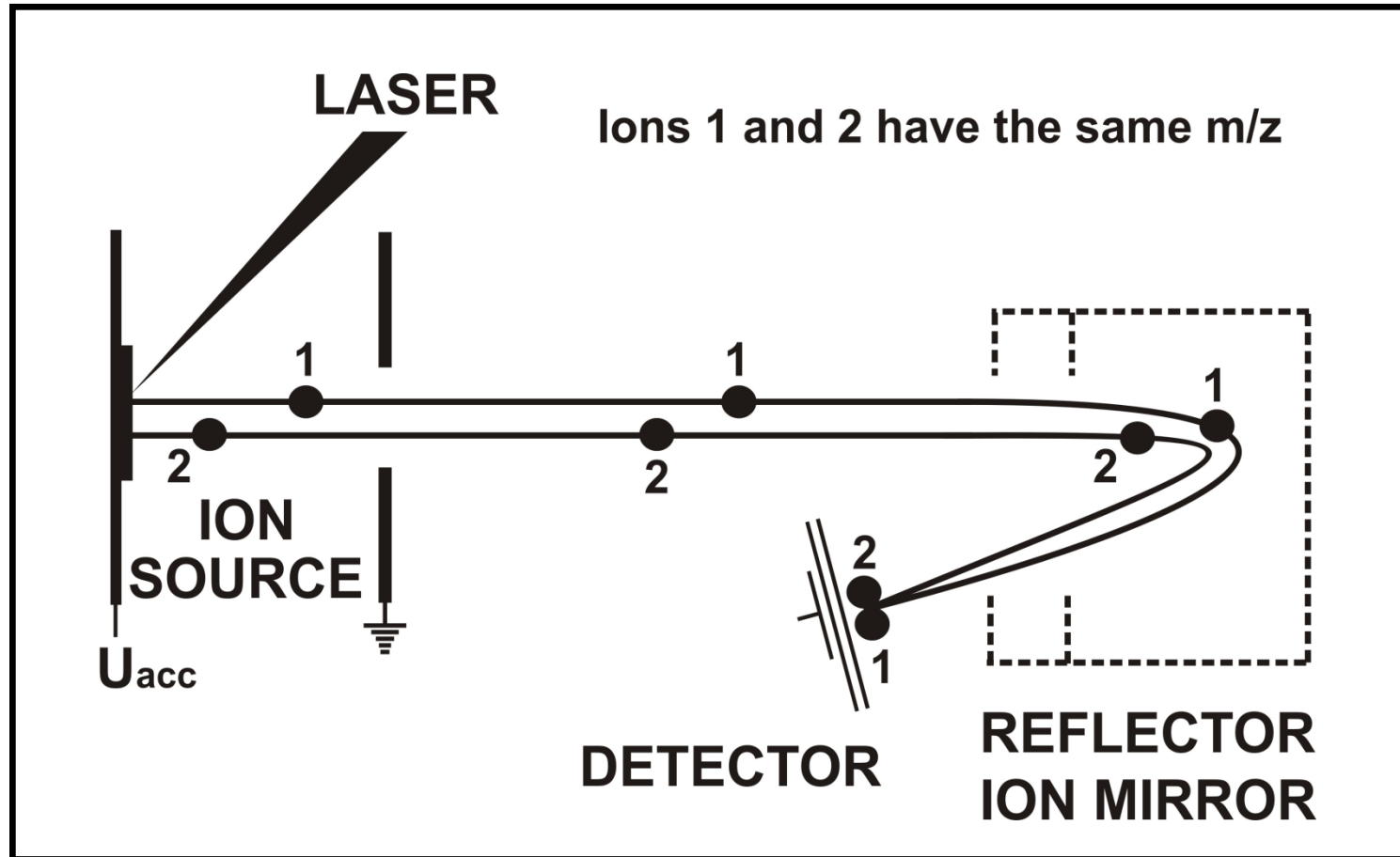
m/z rezonanční frekvence

... a hybridy (qTOF, TOFTOF, QqQ, Q-FT-ICR, IIT-OT, etc.)

Time Of Flight (TOF) Analyzátor

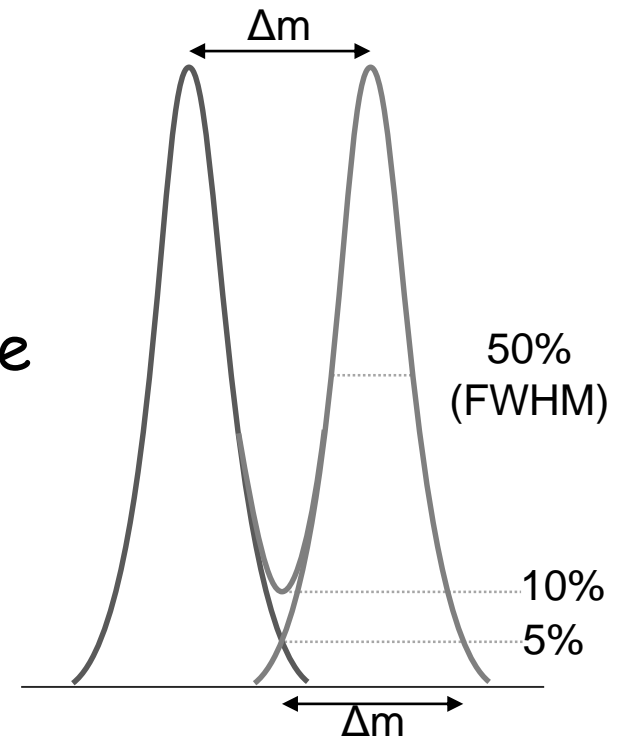


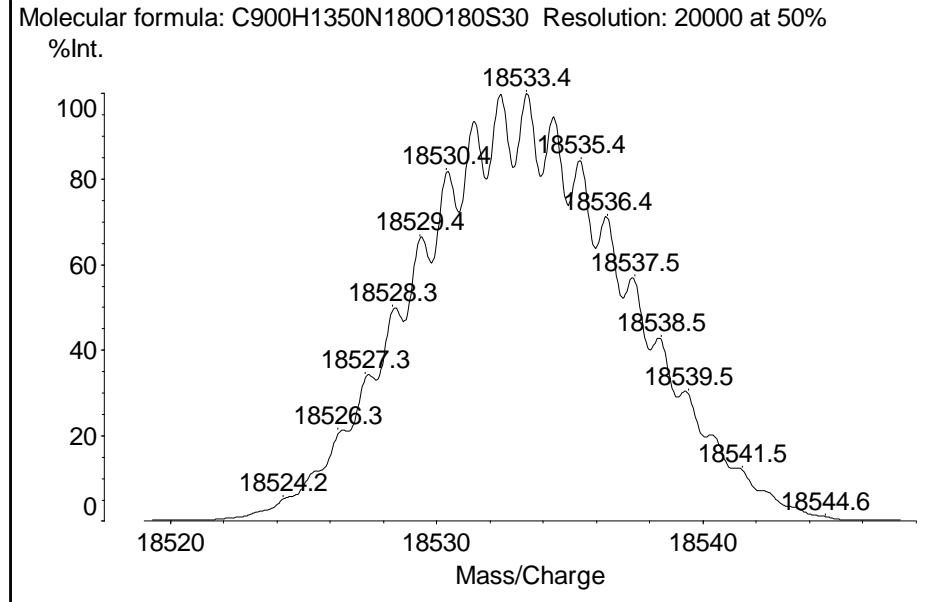
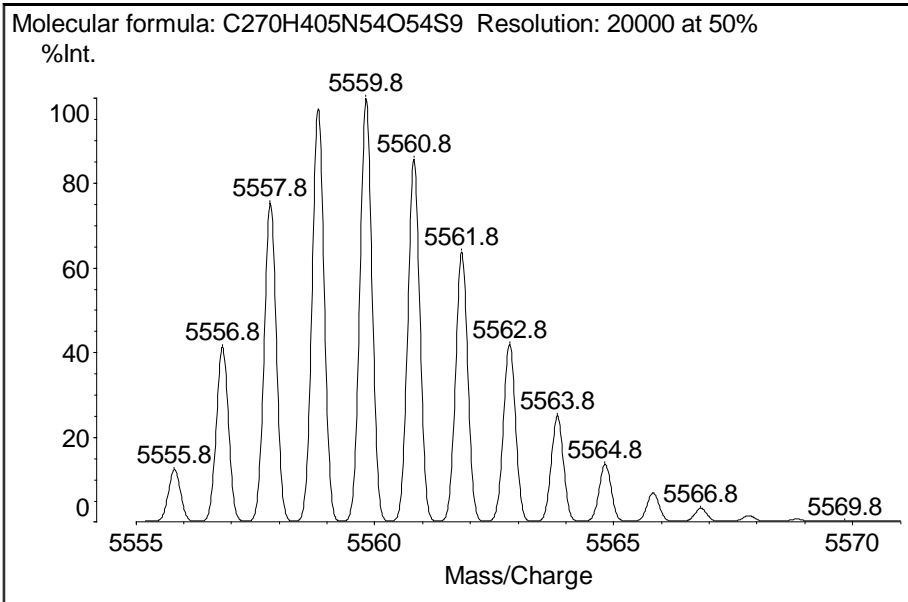
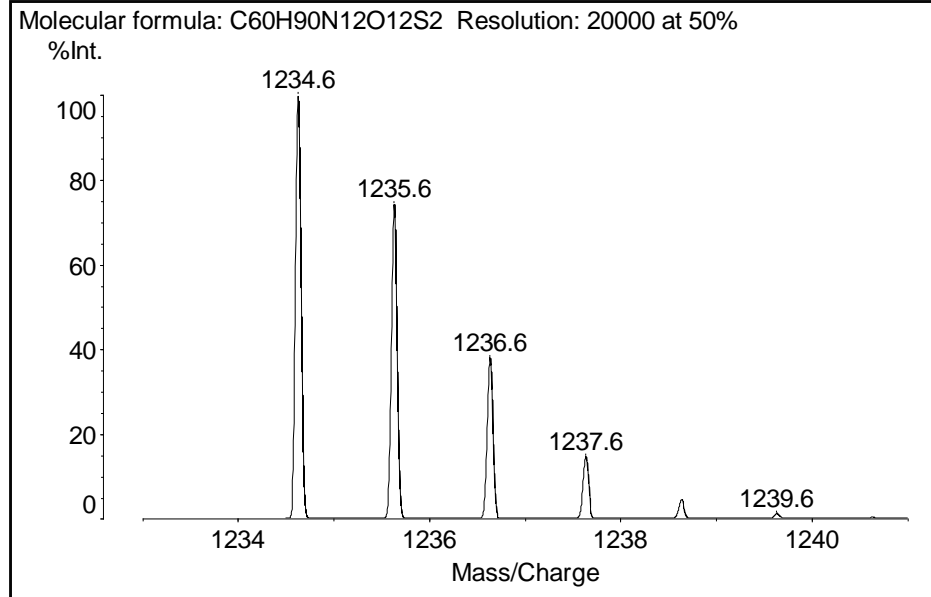
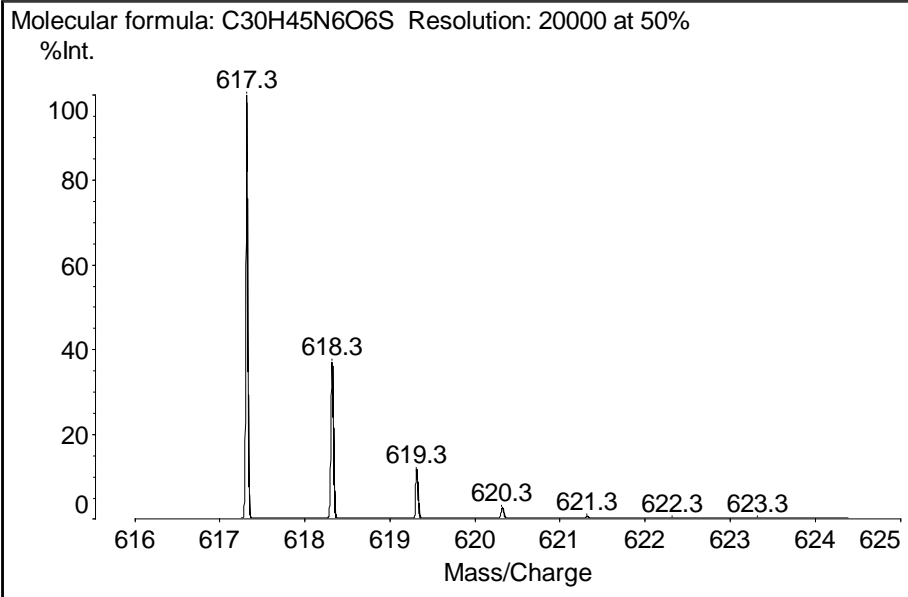
Time Of Flight (TOF) - reflekttron



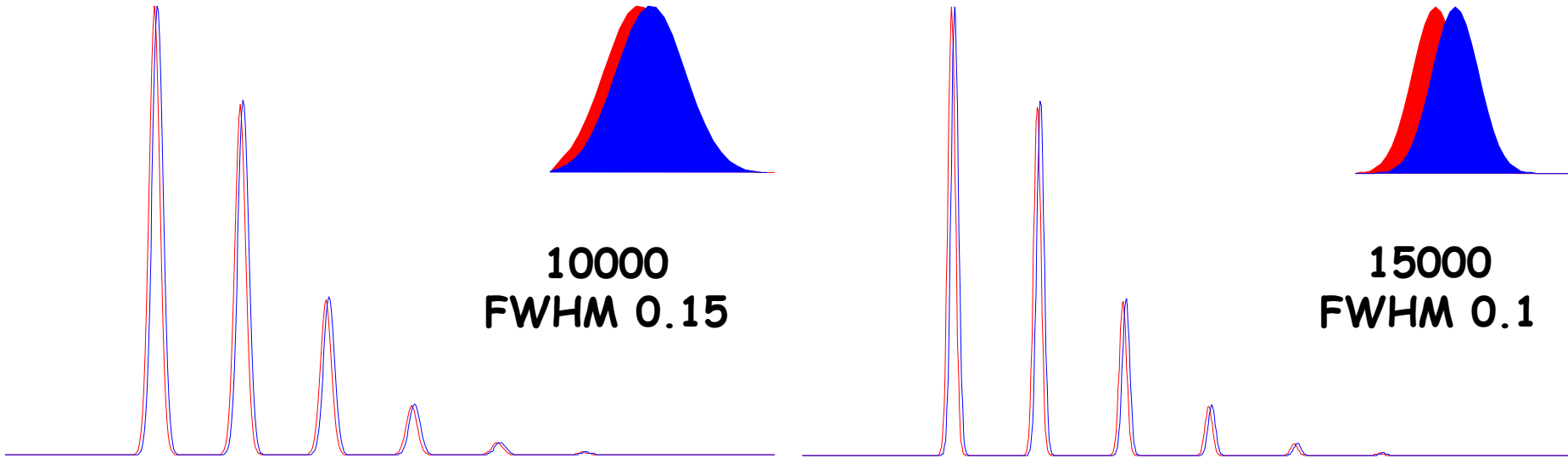
Rozlišení

- Rozlišení / rozlišovací schopnost
- IUPAC: $R = m/\Delta m$
(R - resolving power, Δm - resolution)
- Záleží jak je definováno Δm
 - šířka jednotlivého píku v určité výšce (5%, 50% - FWHM)
 - 10% údolí mezi dvěma píky



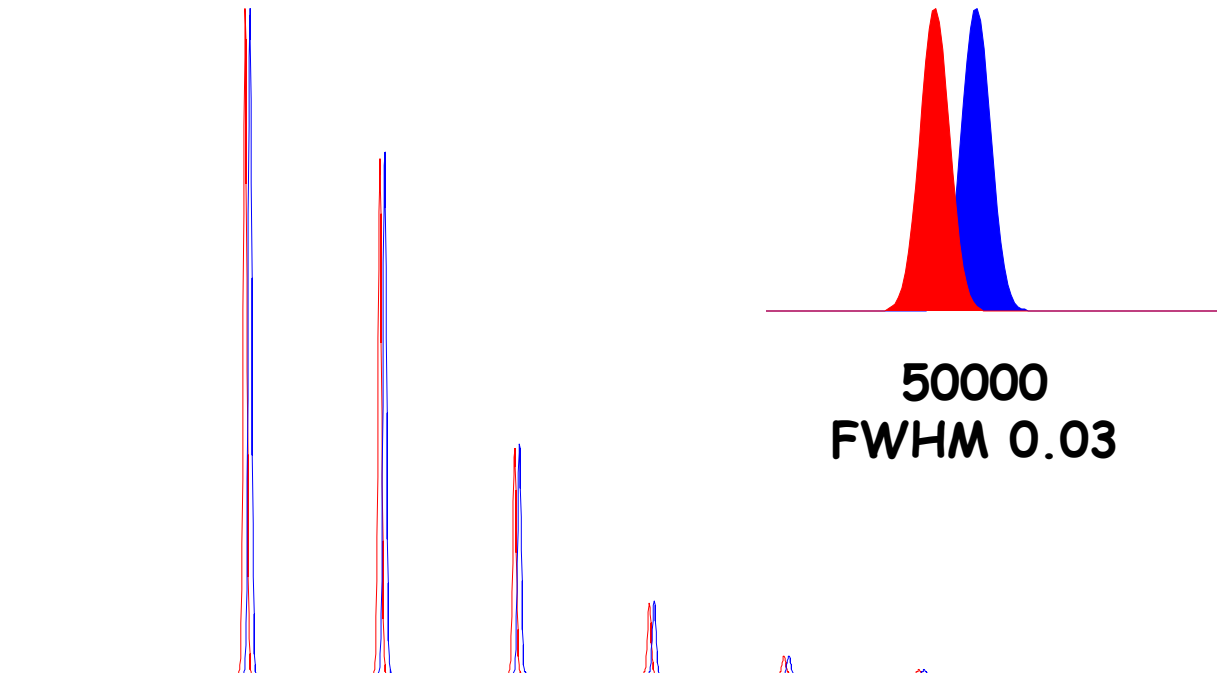


Rozlišení

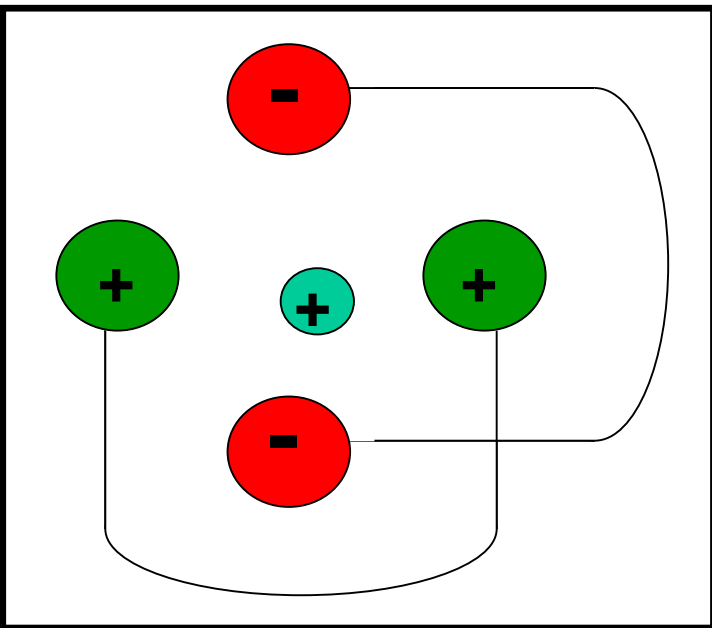
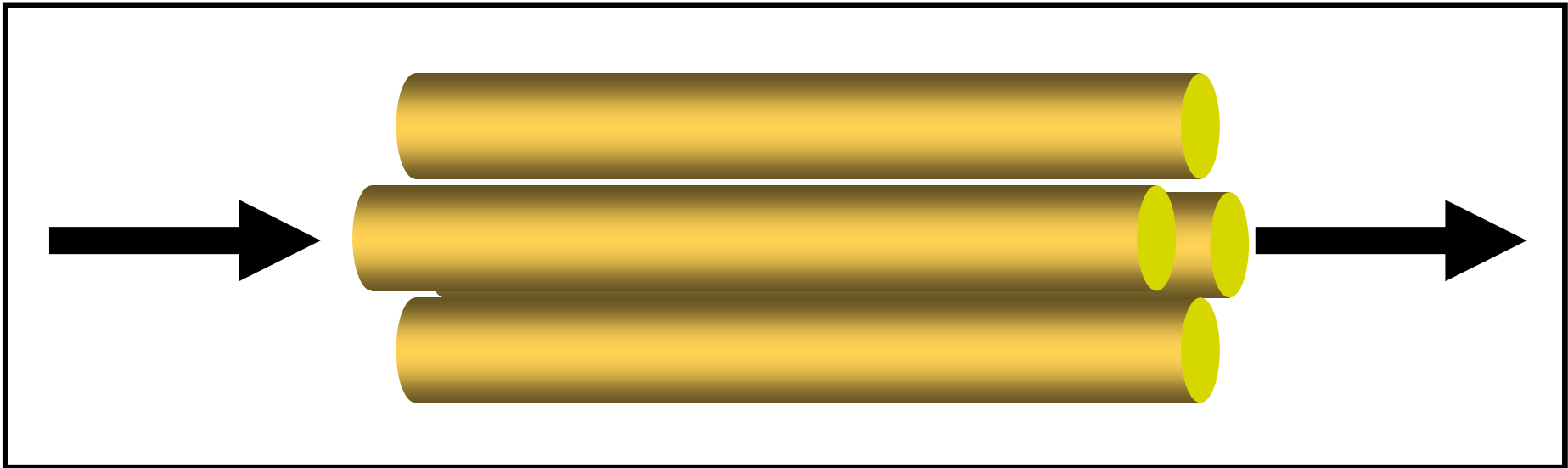


WELLQQVDTSTR
C64H102N18O22
1475.74888

FLEQQNQVLQTK
C65H106N18O21
1475.78527



Kvadrupólový analyzátor



Tyče optimálně hyperbola, reálně kruhový průřez.

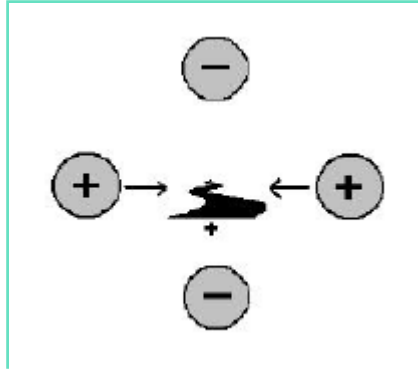
Stejně polarity na protilehlých tyčích.

Stejnoseměrné a střídavé vysokofrekvenční napětí - DC a RF

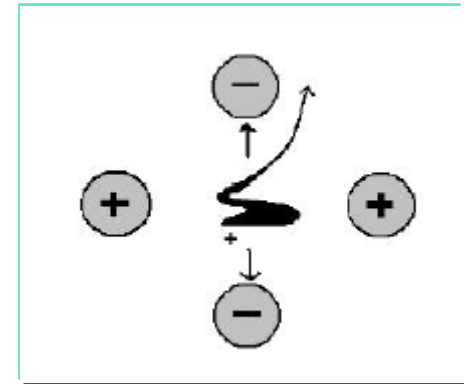
Rozdílný pohyb „velkých“ a „malých“ iontů

Kvadrupólový analyzátor

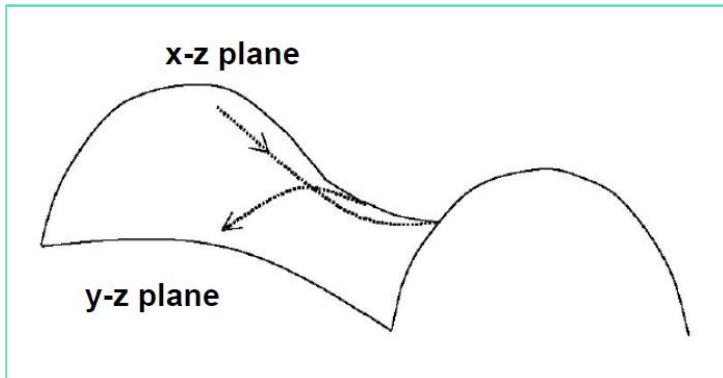
Vliv stejnosměrného napětí (platí pro + ionty)



Stabilizace



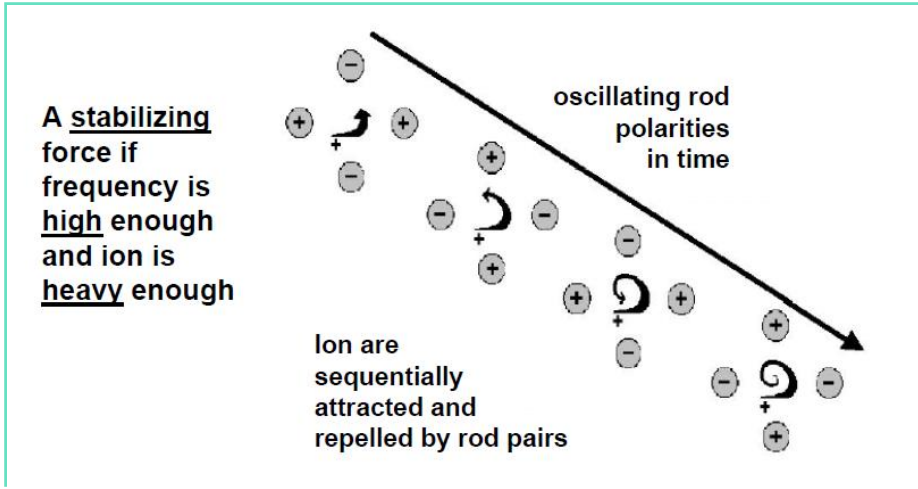
Destabilizace



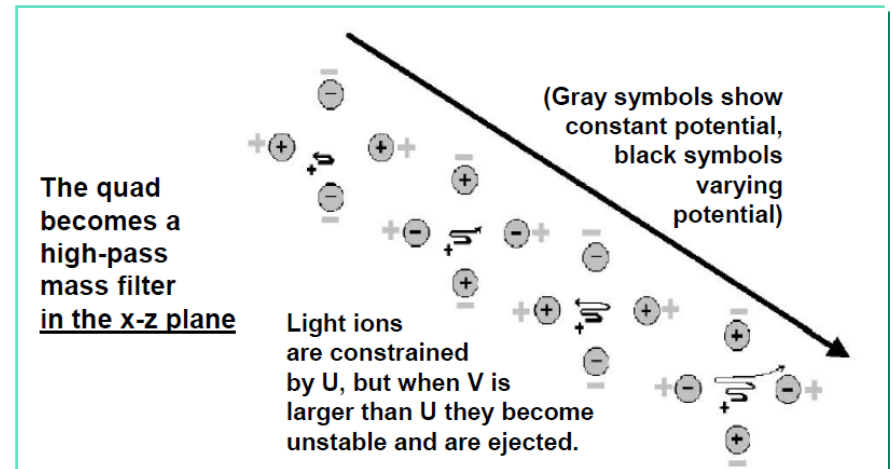
Potenciálová plocha - přiblížení -
tvar sedla

Kvadrupólový analyzátor

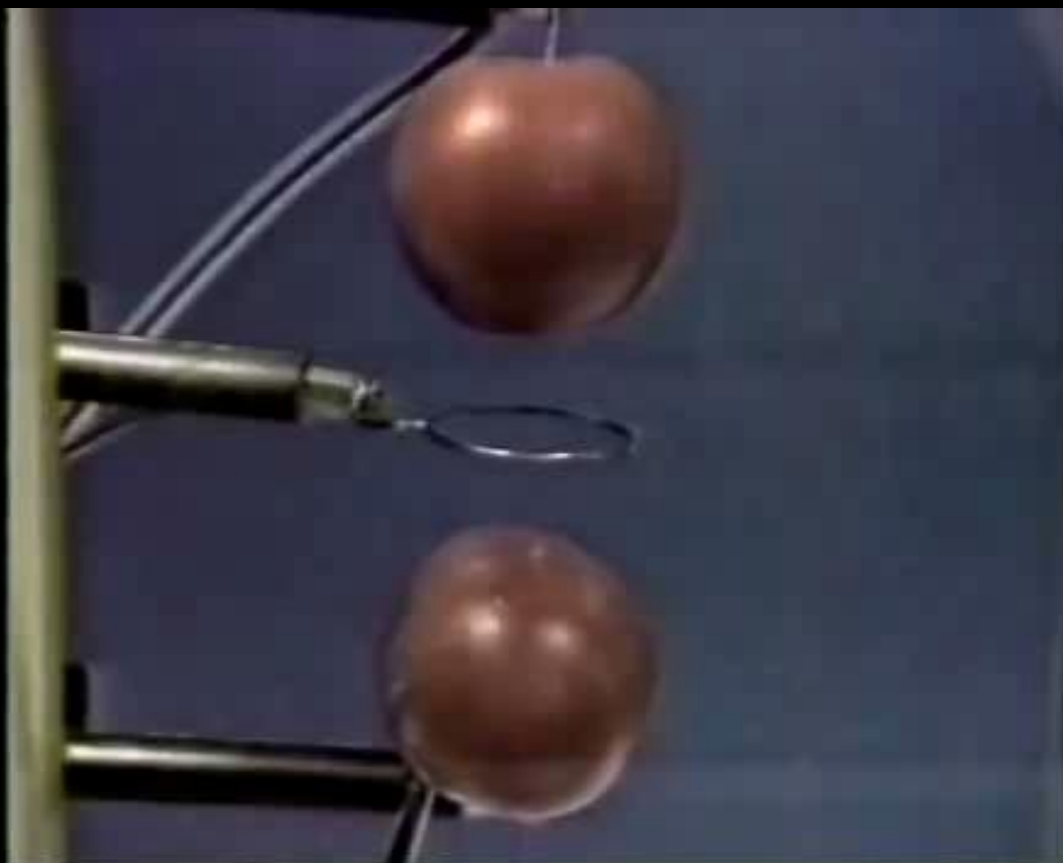
Vliv RF složky - pohyb iontů kvadrupólem



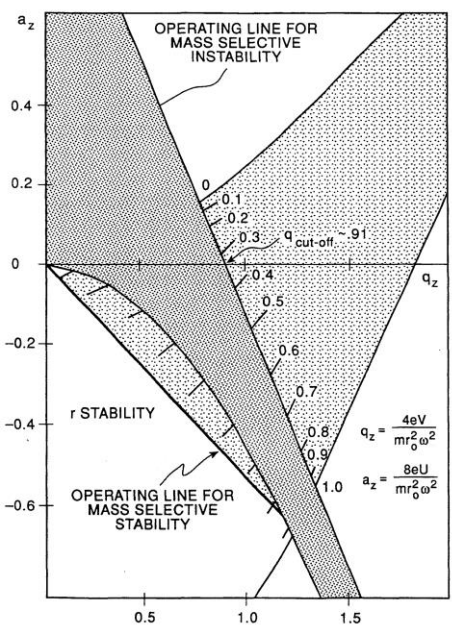
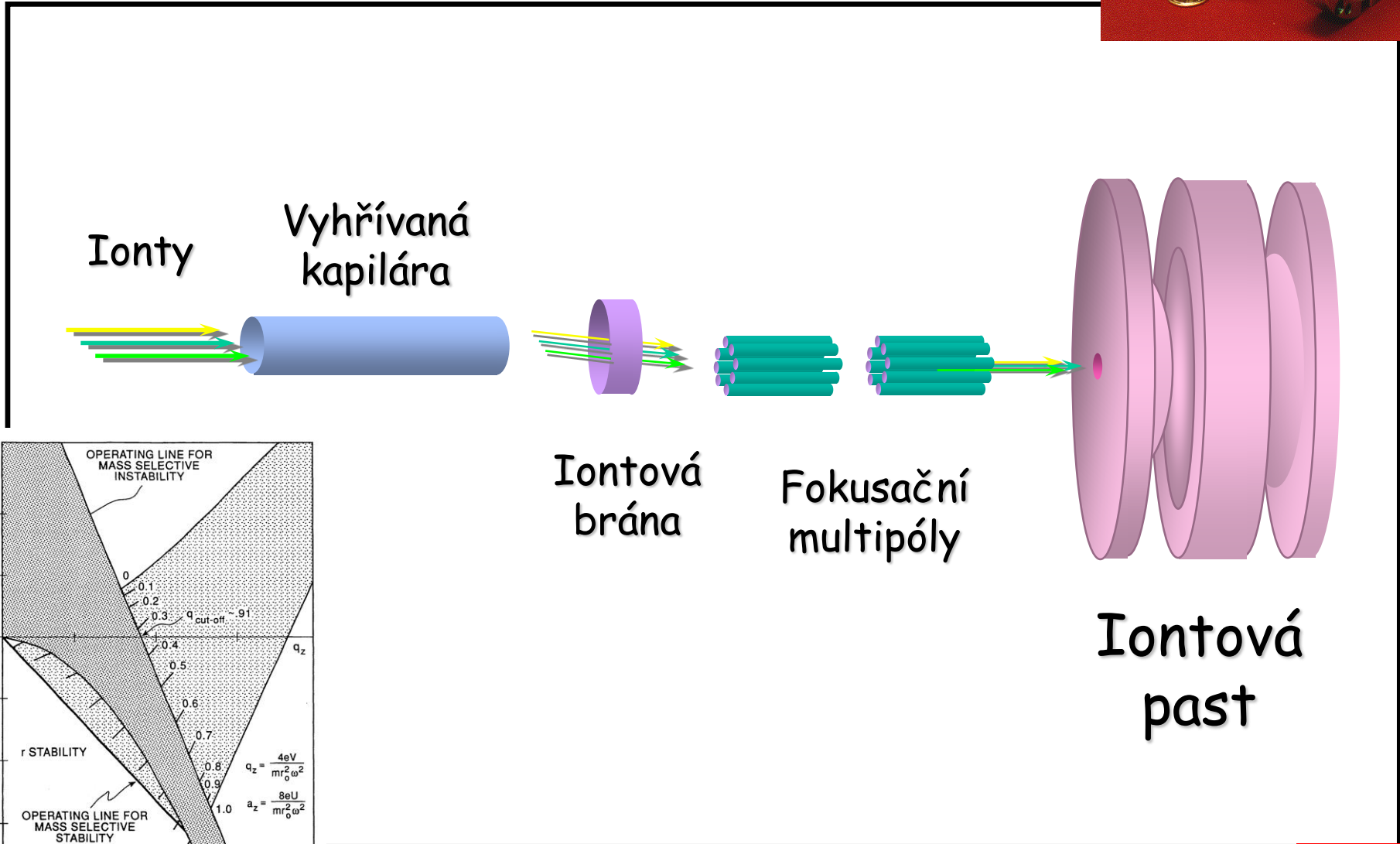
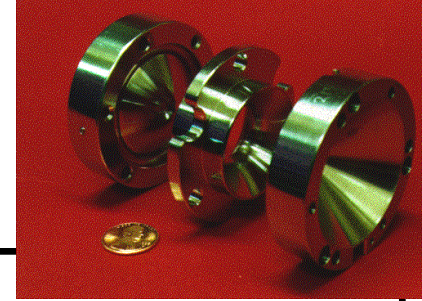
Vliv RF složky - pohyb iontů kvadrupólem



Iontová past

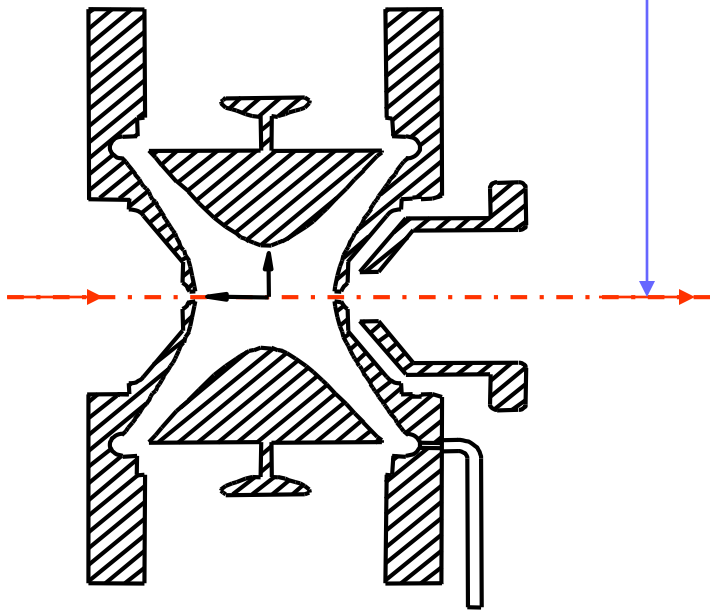


Iontová past

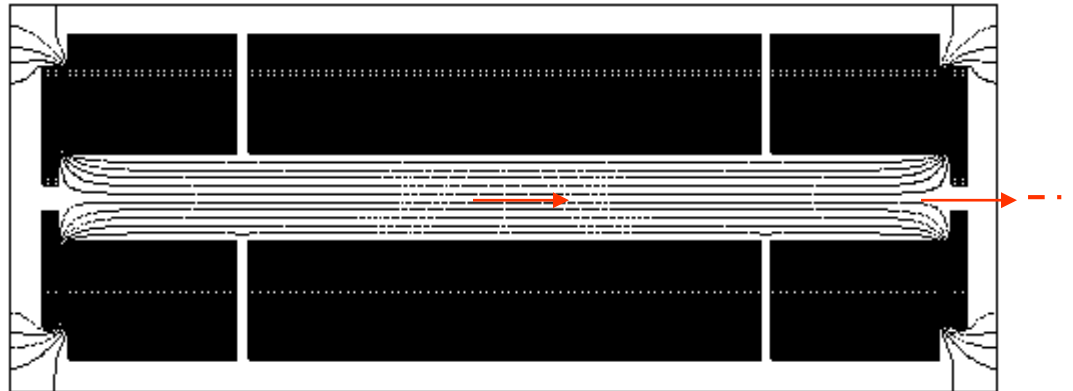


Iontové pasti

Osa pohybu iontů (z)



3D (sférická) iontová past



2D (lineární) iontová past

FT-ICR - Iontově cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací

Pohyb iontů v magnetickém poli - iont s hmotností m , pohybující se s rychlostí v v homogenním magnetickém poli se silou B :

$$\mathbf{F} = q\mathbf{v} \times \mathbf{B}$$

Iont pohybující se po **cyklotronové** orbitě s frekvencí danou vztahem:

$$2\pi f = \frac{qB}{m}$$

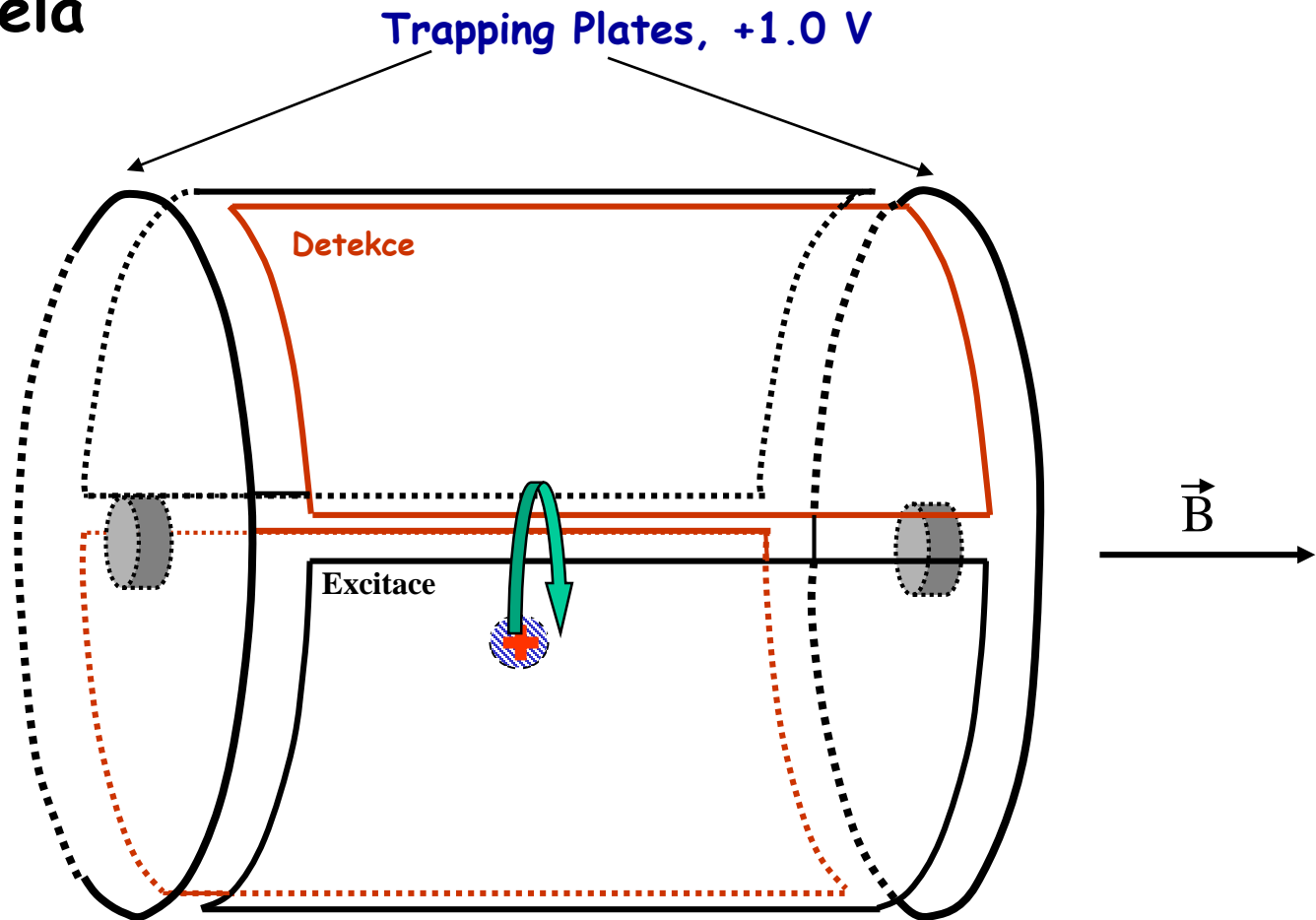
Poloměr běžné cely: 1-3 cm

Počáteční poloměr pohybu iontu: 0.01 - 0.1 mm

Běžná síla magnetického pole: 1-15(21) Tesla

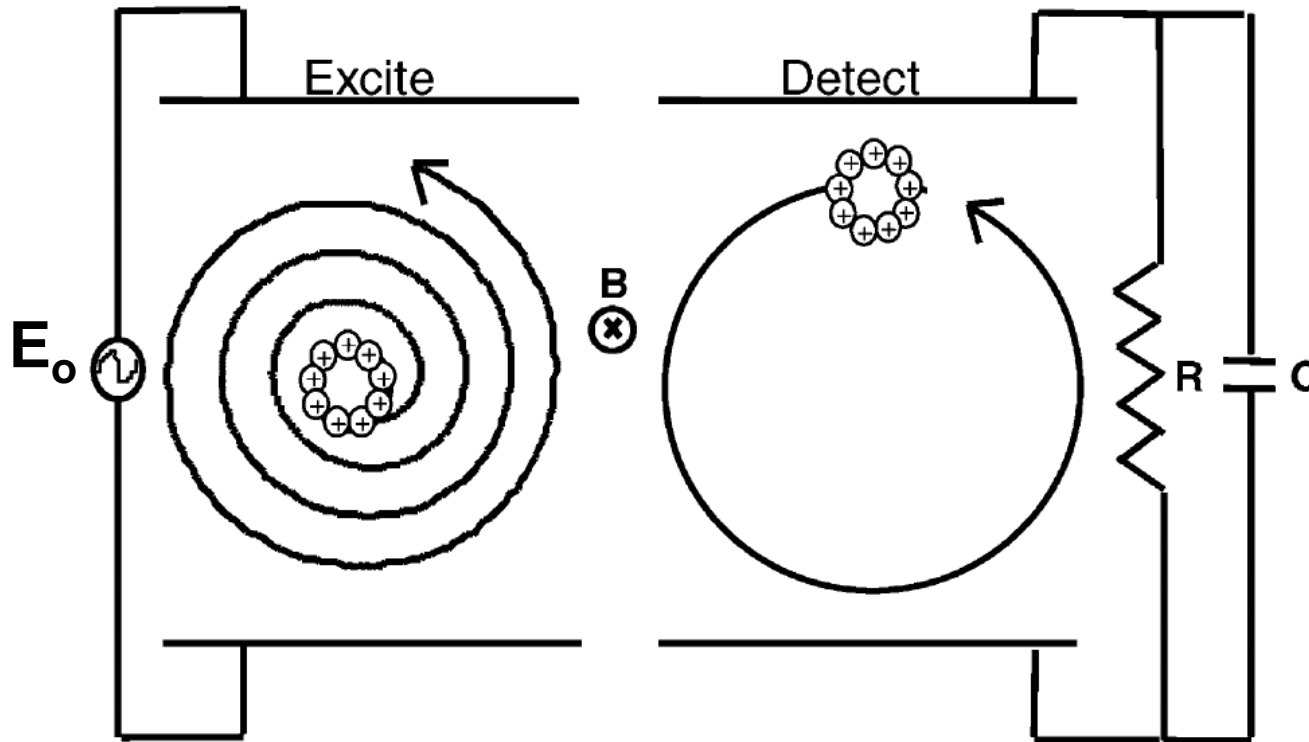
Pohyb iontů v magnetickém poli

FTMS cela



Excitace a detekce iontů

$$r = \frac{E_o T_{exc.}}{2B}$$



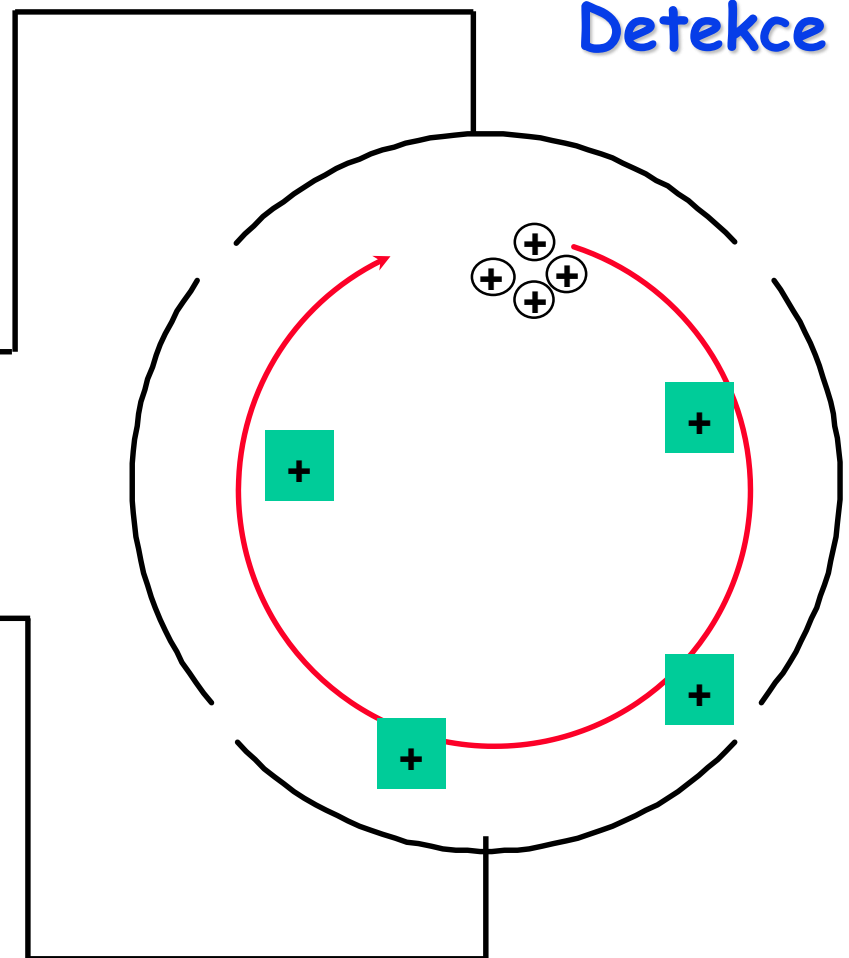
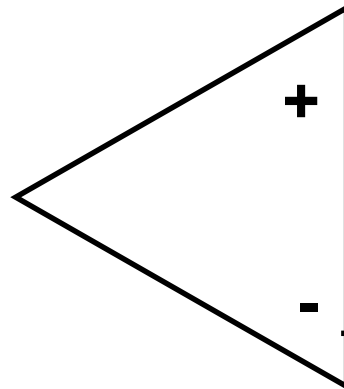
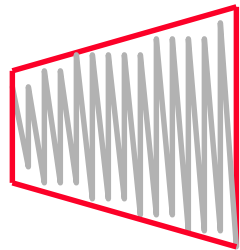
Signál $\propto N_{ions}$

Signál $\propto r$

Působením rezonančního dipolárního pole jsou ionty „přinuceny“ pohybovat se po cyklotronových drahách s větším poloměrem pohybu. Finální r nezávisí na m/z .

Fourierova transformace (Iontově Cyklotronová Resonance)

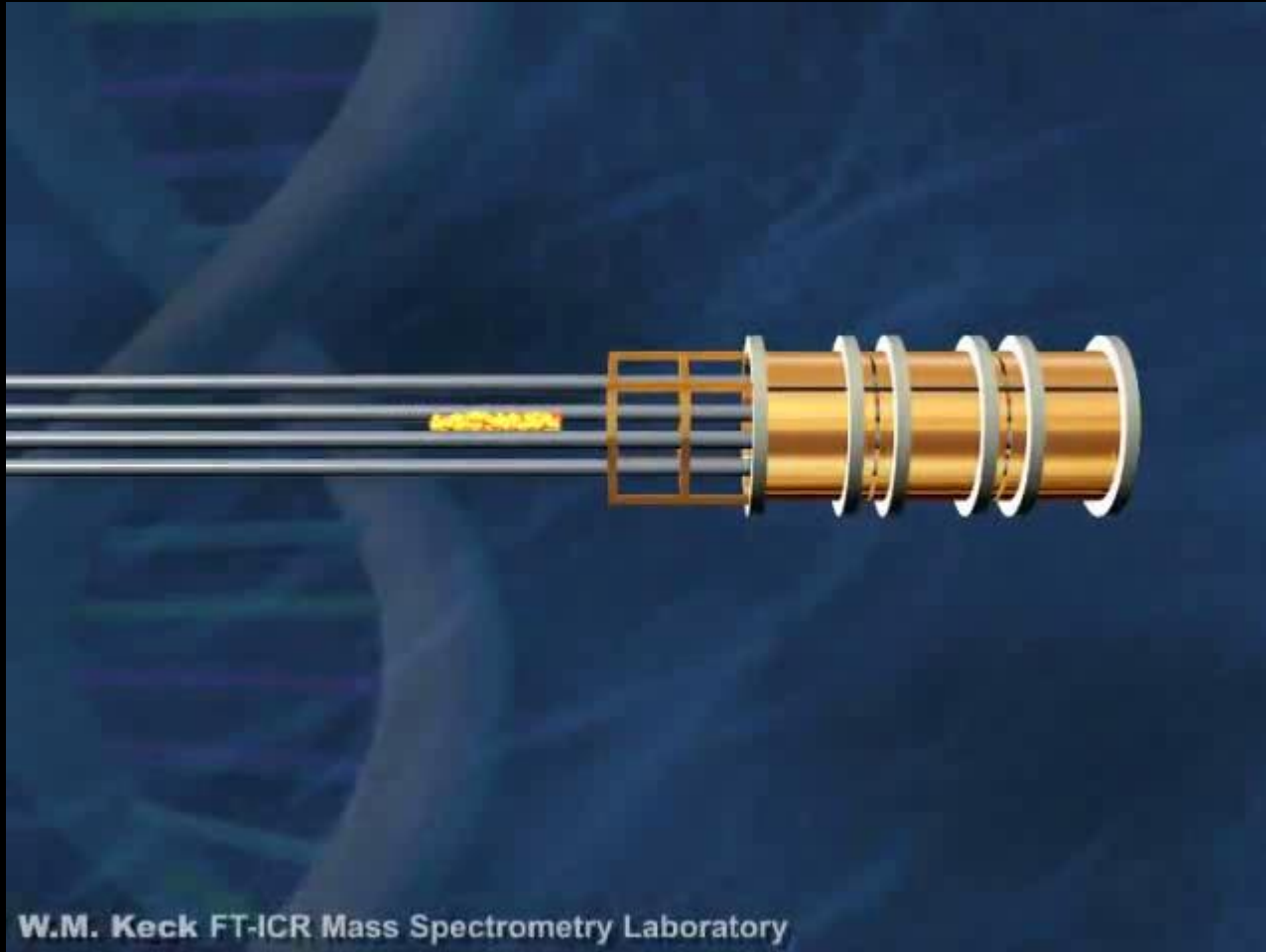
$$f = \frac{qB}{2\pi m}$$



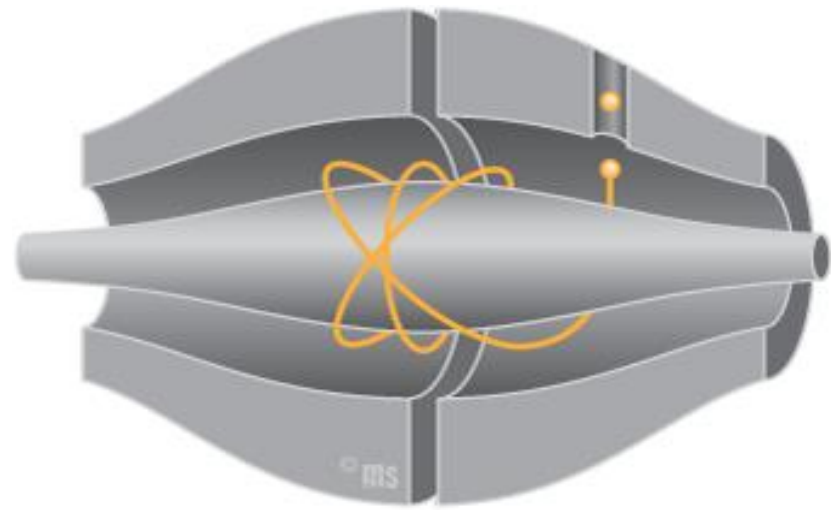
Koherentní cyklotronový pohyb indukuje „prokový obraz“, který je amplifikován a detekován.

Přítomnost iontů s různými m/z se projeví jako superpozice sinusoidálních signálů na Detektoru.

Fourierova transformace (Iontově Cyklotronová Resonance)



ORBITRAP



- Alexander A. Makarov
- Elektrostatická past
- Ionty rotují kolem centrální elektrody + harmonické oscilace podél této elektrody
- Indukce proudu - FT - MS



Fragmentace - cesta ke struktuře / sekvenci

Dochází k fragmentaci během-následkem ionizace

EI, FAB

ISD, ISF - In-Source Decay/Fragmentation

PSD - Post-Source Decay

Fragmentaci cíleně indukujeme

- vysoko- VS. nízkoenergetická

- srážky s plynem (He, Ar, N₂) - CID - Collision Induced Dissociation, CAD - Collisionally Activated Dissociation (SORI - sustained off-resonance irradiation)

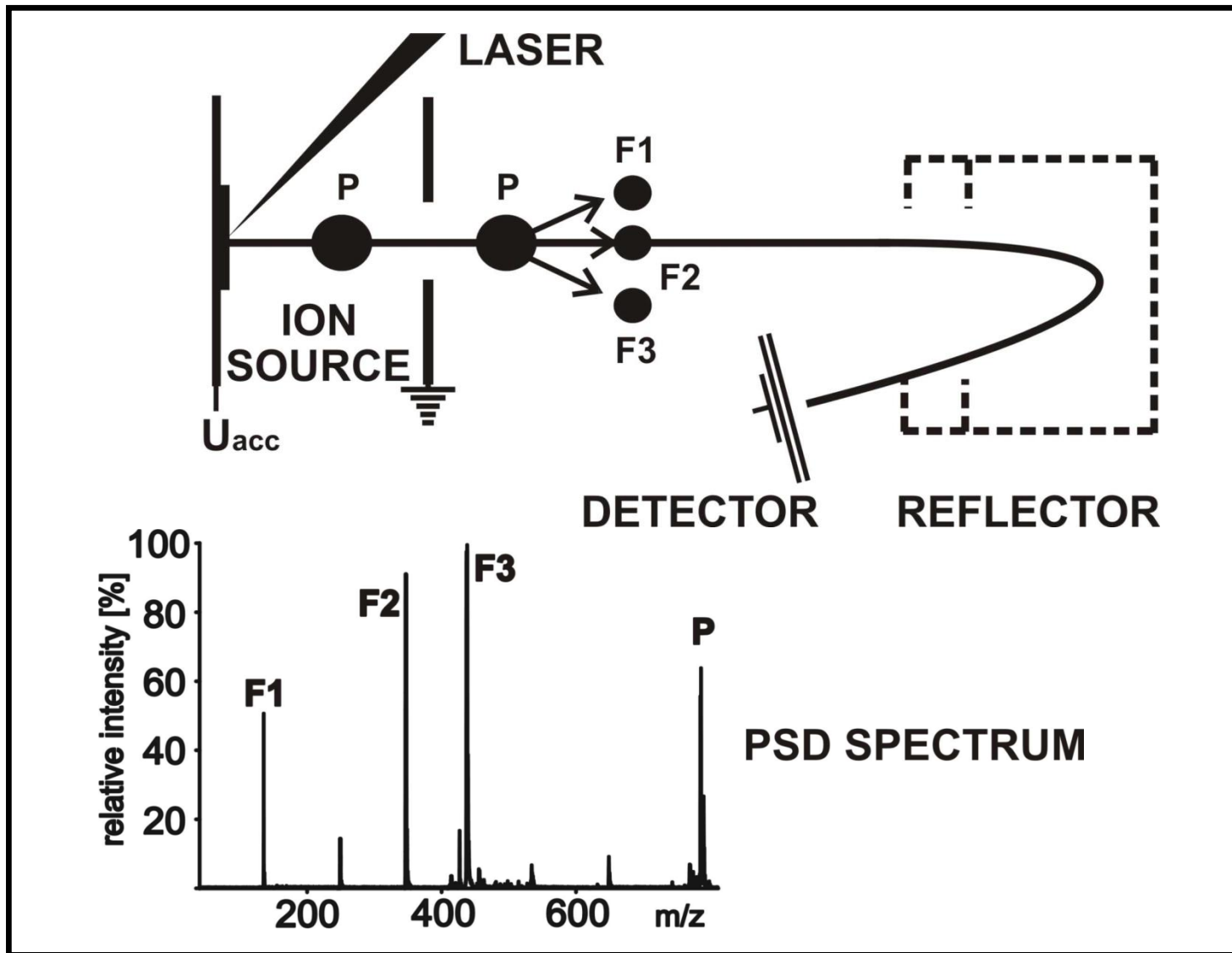
- záchyt / transfer elektronu ECD / ETD / EDD - Electron Capture / Transfer / Detachment Dissociation

- indukovaná laserem - IRMPD - Infrared Multi-Photon Dissociation, LID - Laser Induced Dissociation

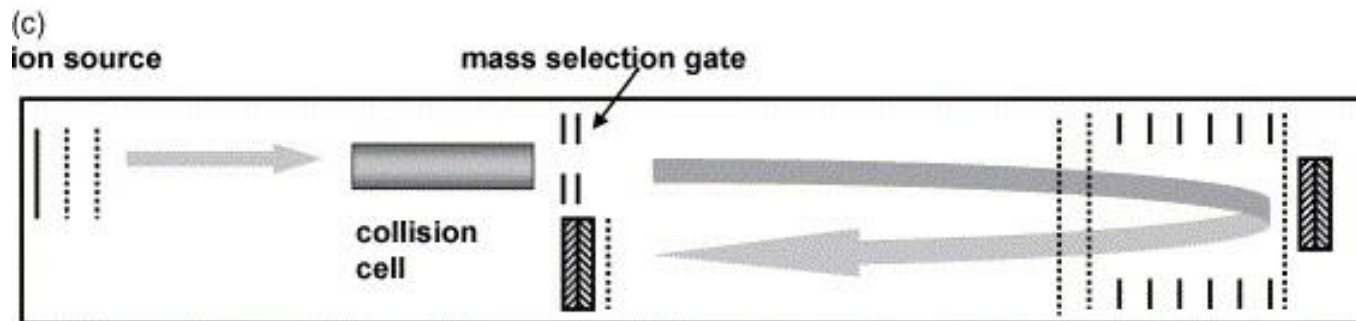
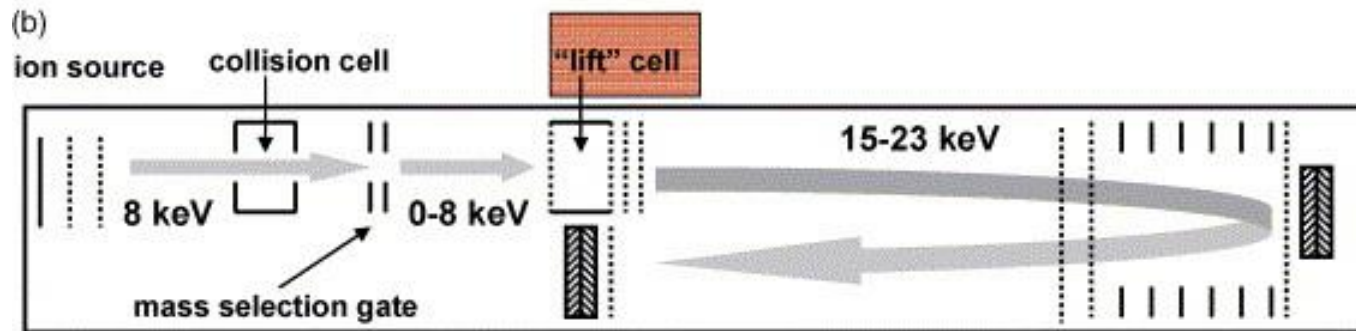
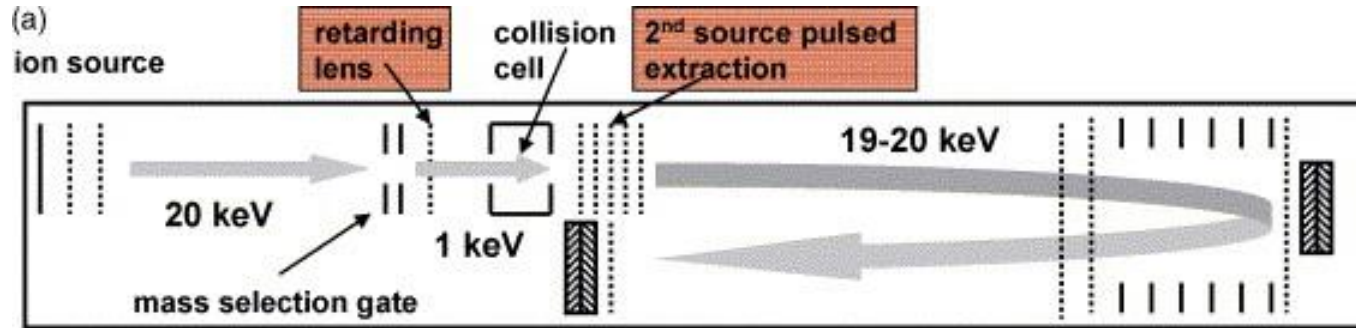
Hovoříme o MS/MS, MS², MS²

...případně o MSⁿ

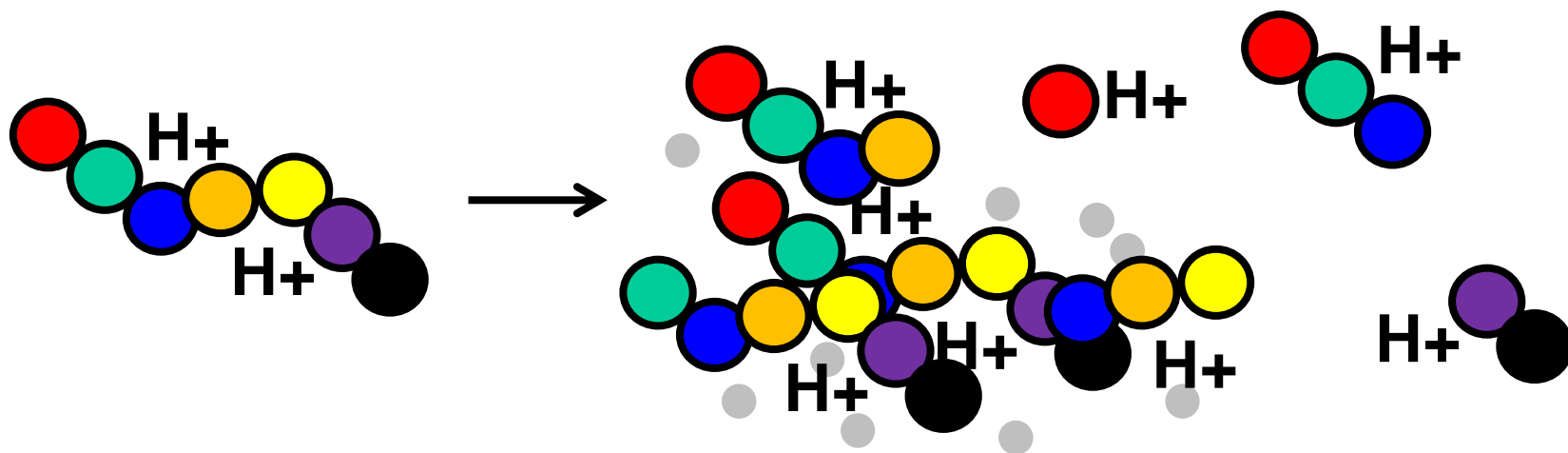
Post-Source Decay (PSD)



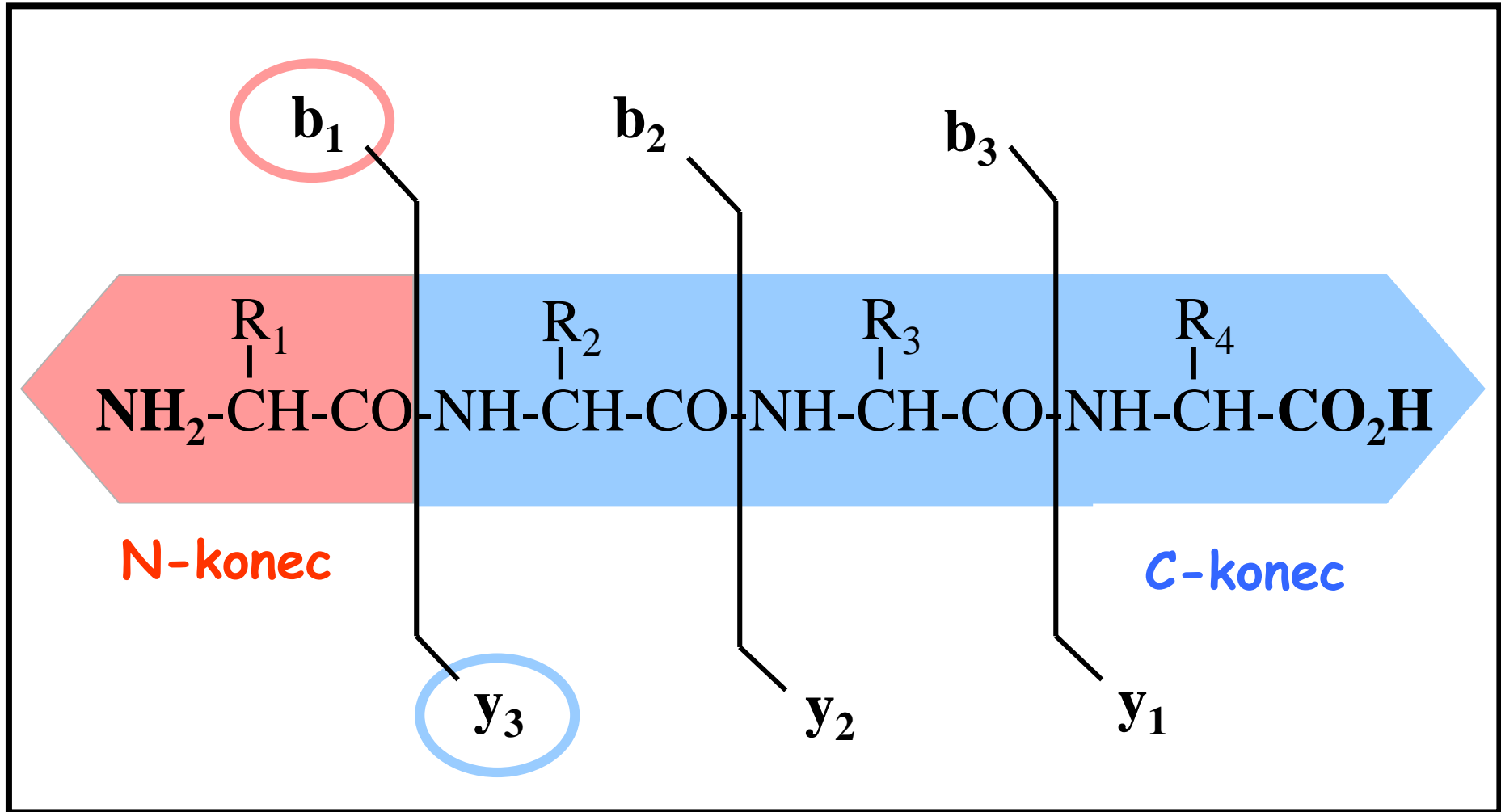
TOF-TOF



CID - collision induced dissociation - kolizně indukovaná disociace



Fragmentace peptidu

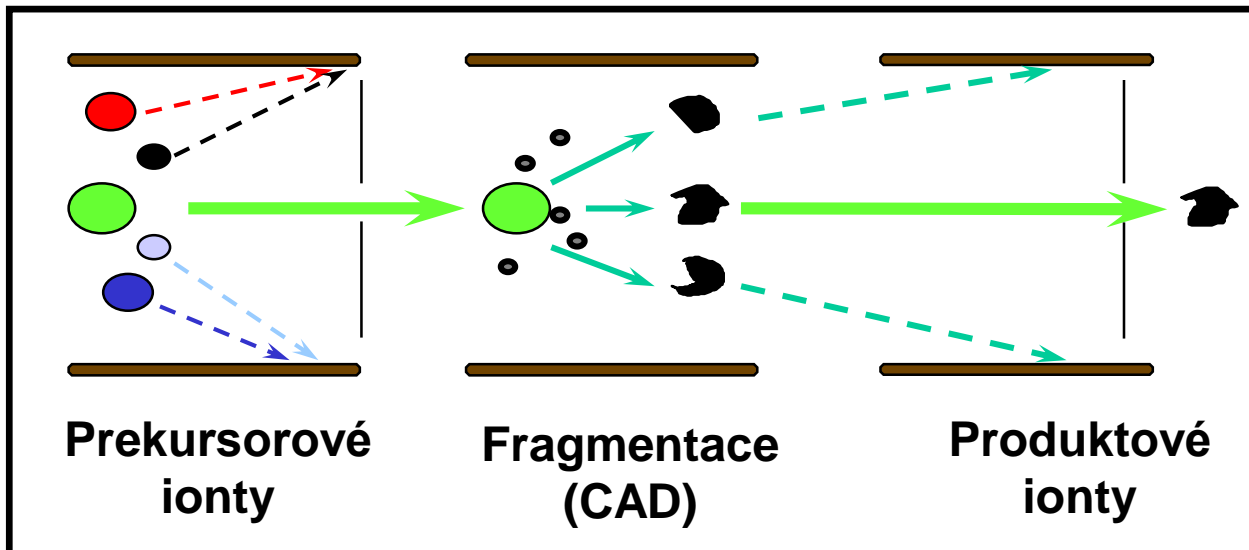
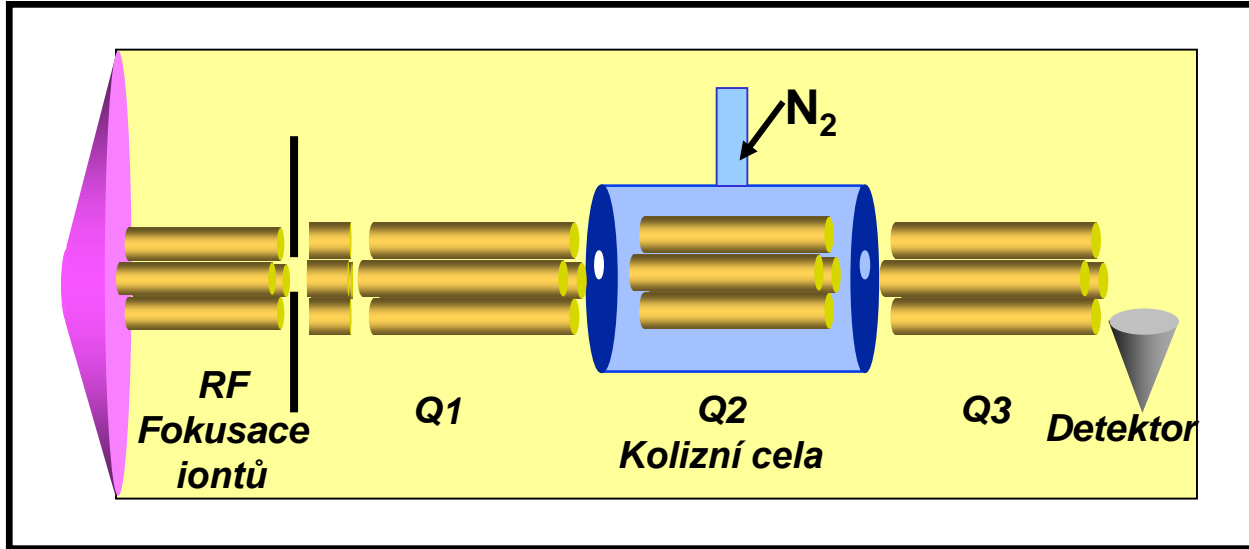


Fragmentace peptidu

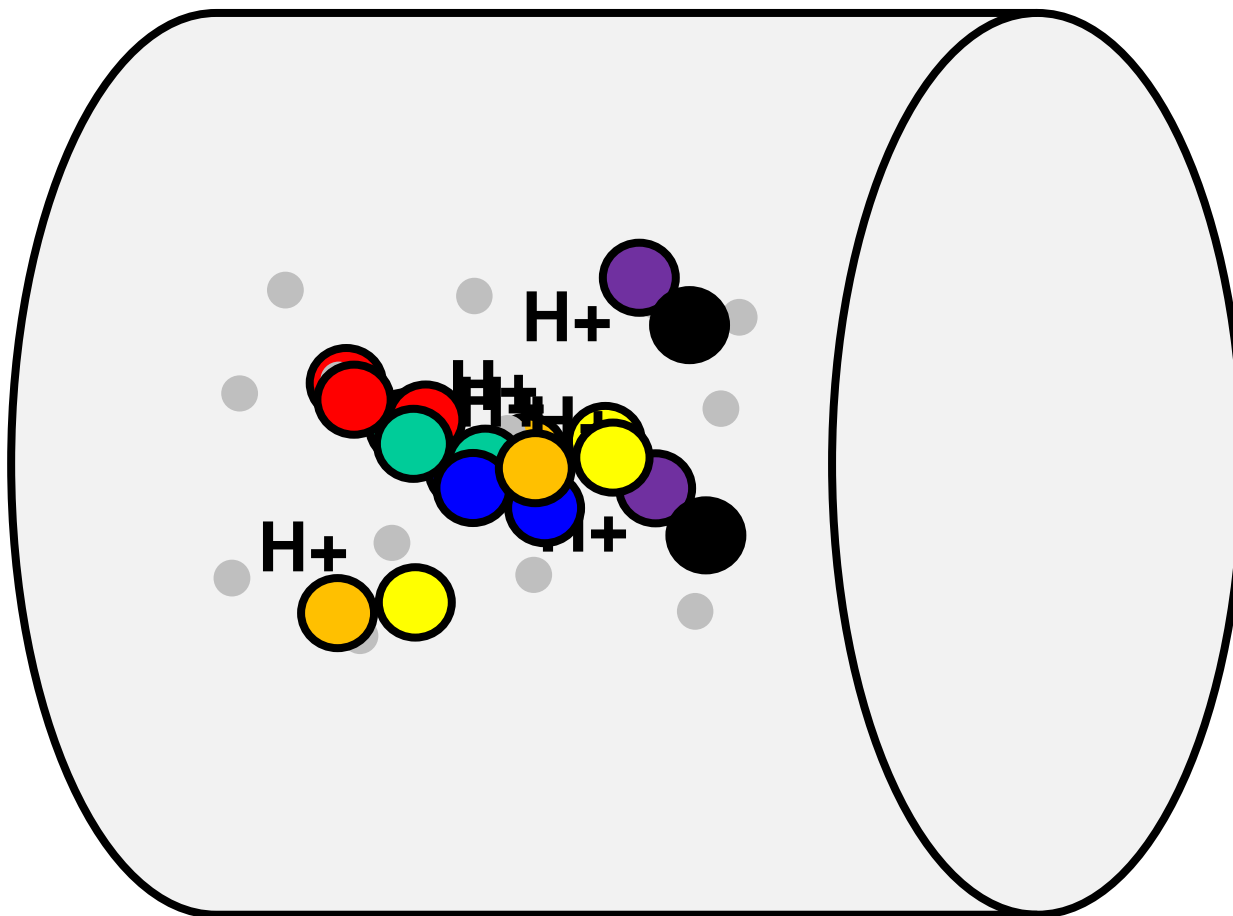
S-P-A-F-D-S-I-M-A-E-T-L-K $MH^+ = 1410.6$

<u>b-ions⁺</u>			<u>y-ions⁺</u>
88.1	S	PAFDSIMAETLK	1323.6
185.2	SP	AFDSIMAETLK	1226.4
256.3	SPA	FDSIMAETLK	1155.4
403.5	SPAF	DSIMAETLK	1008.2
518.5	SPAFD	SIMAETLK	893.1
605.6	SPAFDS	IMAETLK	806.0
718.8	SPAFDSI	MAETLK	692.3
850.0	SPAFDSIM	AETLK	561.7
921.1	SPAFDSIMA	ETLK	490.6
1050.2	SPAFDSIMAE	TLK	361.5
1151.3	SPAFDSIMAET	LK	260.4
1264.4	SPAFDSIMAETL	K	147.2

Trojnásobný kvadrupól - MS/MS v prostoru



Iontová past - MS^n v čase



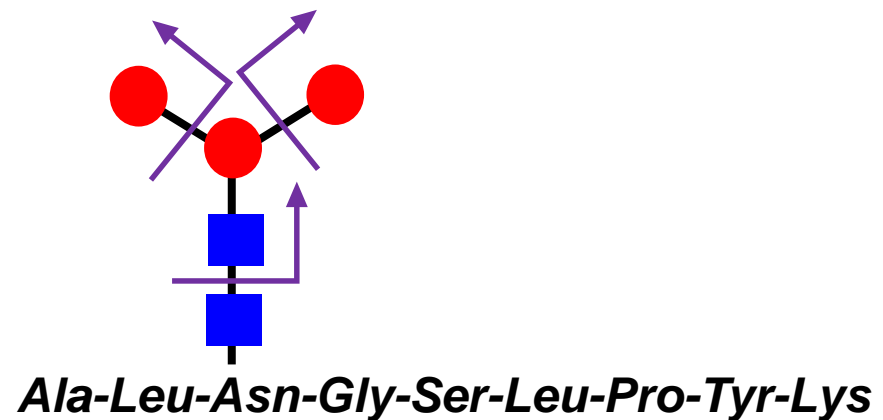
1/3 pravidlo - $m/z < 30\%$ m/z prekurzoru
nejsou stabilní (PQD - pulsed Q dissociation)

Infrared Multiphoton Dissociation (IRMPD)

- CO_2 laserový paprsek
- Vibrační excitace funkčních skupin
OH, COOH, NH_2 ...
- Fragmentace peptidové páteře: *b*- a *y*-iontové série
- Podobné CID, lze jemně ladit energii laser a délku pulsu
- V případě FT-CIR výhoda oproti CID v ICR cele (není třeba napouštět kolizním plynem a tím narušovat vakuum)
 - Lze také využít k mírné aktivaci v kombinaci s ECD

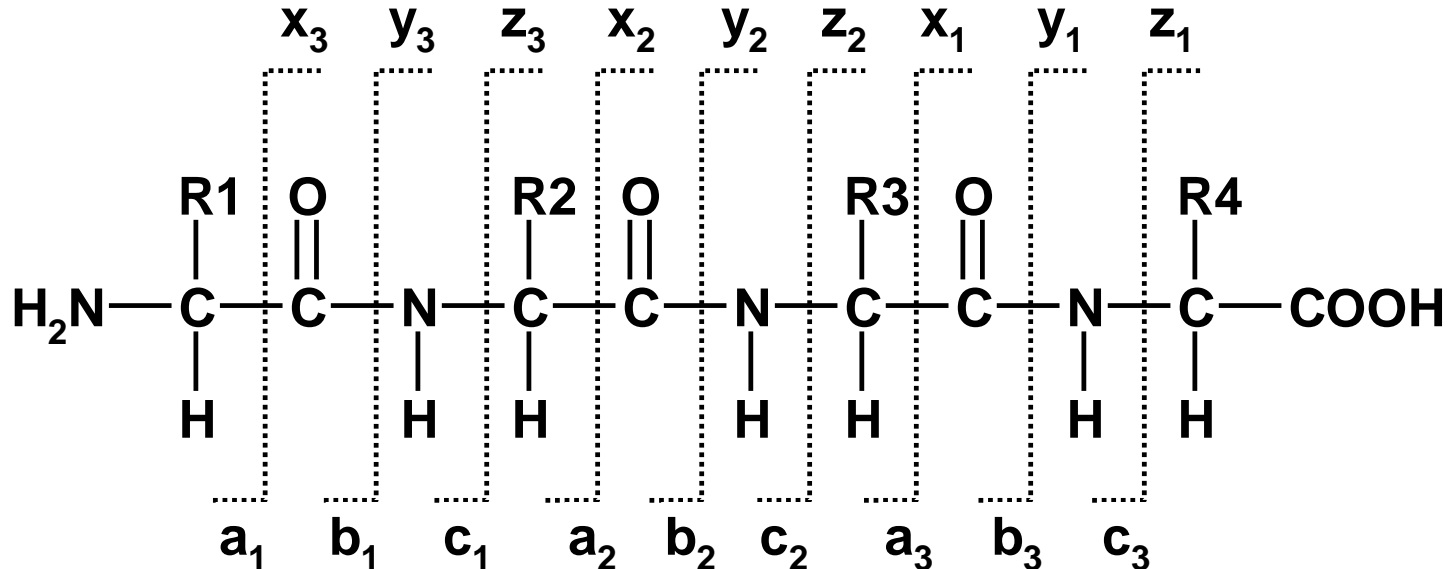
CID/CAD, IRMPD...

... fragmentují peptid v peptidové vazbě, ALE - jsou-li přítomny post-translační modifikace, dojde především k jejich fragmentaci



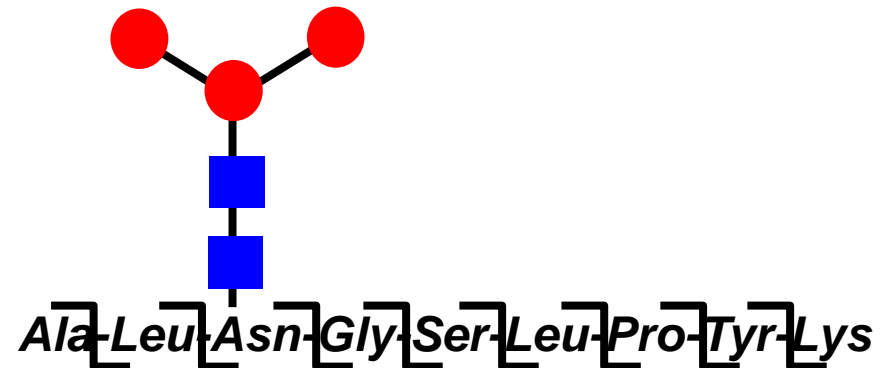
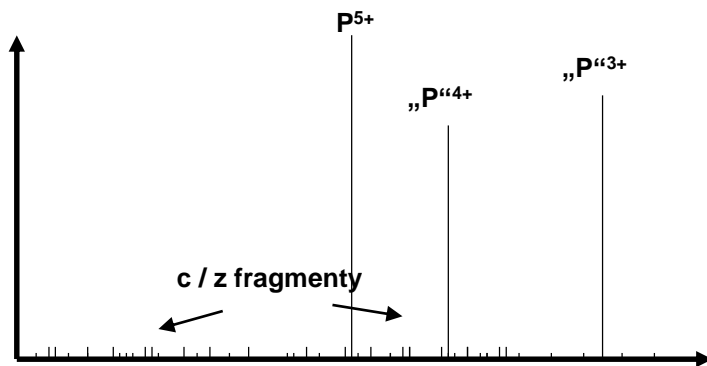
Electron Capture Dissociation (ECD)

- Záchyt „studeného“ elektronu ($E \leq 0.1 \text{ eV}$) - u peptidů preferenčně na S-S můstcích a vazbě N-C $_{\alpha}$
 - Neutralizace H⁺; [M+2H]⁺. Vodíkem nabohacený radikálový iont
 - Vícenásobně nabitě prekurzorové ionty
 - Štěpení vazby N-C $_{\alpha}$; extensivní fragmentace
- c- a z-iontové série; b- a y-ionty chybí (pokud jsou, je to v důsledku fragmentace během izolace prekurzoru)



Electron Capture Dissociation (ECD)

- Preferenční štěpení peptidové vazby, jsou zachovány labilní skupiny modifikací
- „Horké“ ECD (3-13 eV); sekundární fragmentace - z ionty tvoří ionty w
- *Problém jsou proliny a malá výtěžnost fragmentace (hlavní píky ve spektru jsou prekurzor a neutralizace náboje)*



Další disociační techniky založené na záchytu či vytržení elektronu

Electron Transfer Dissociation (ETD)

ECD těžko aplikovatelné na analyzátory s Rf polem (pasti, kvadrupóly) - termální elektron tam rychle ztratí energii a není zachycen.

Chemická ionizace = elektron přenáší anion (antracén, azobenzen, metan, fluoranthen...) -> neutralizace náboje a následně také fragmentace.

Vznik iontů c a z

Electron Detachment Dissociation (EDD)

ECD - vhodné pro bazické peptidy (dobrý záchyt elektronu)

ALE řada biologicky zajímavých molekul je mírně kyselá
energetické elektrony, např. 20eV

srážka aniontu peptidu s elektrony -> vytržení elektronu - vznik látky s elektronovou dírou -> dochází k rekombinaci a tím ke štěpení a vzniku c a z iontů