

# Hmotnostní spektrometrie....

...co to umí?

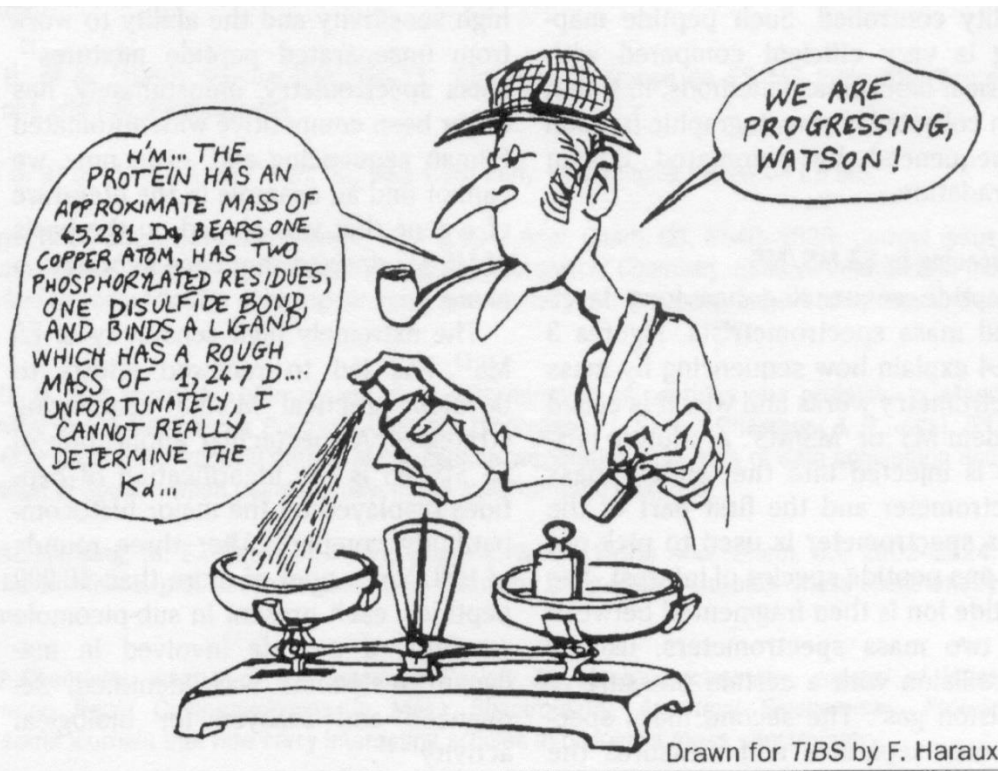
**Měřit přesnou molekulovou hmotnost**

**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

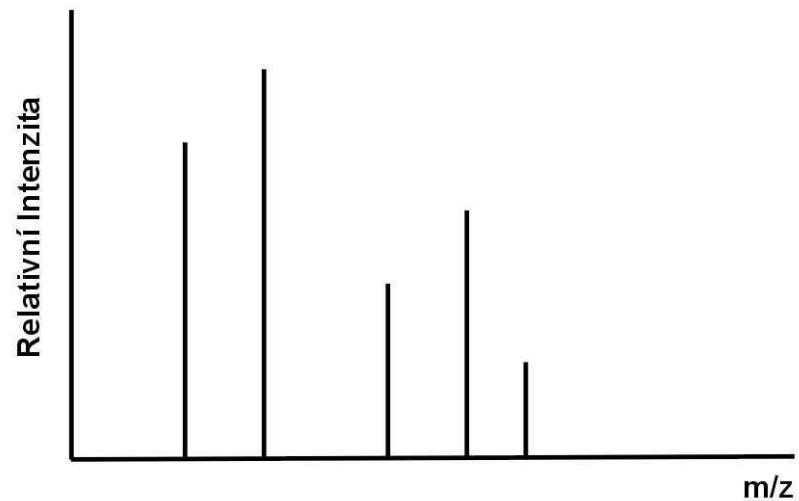
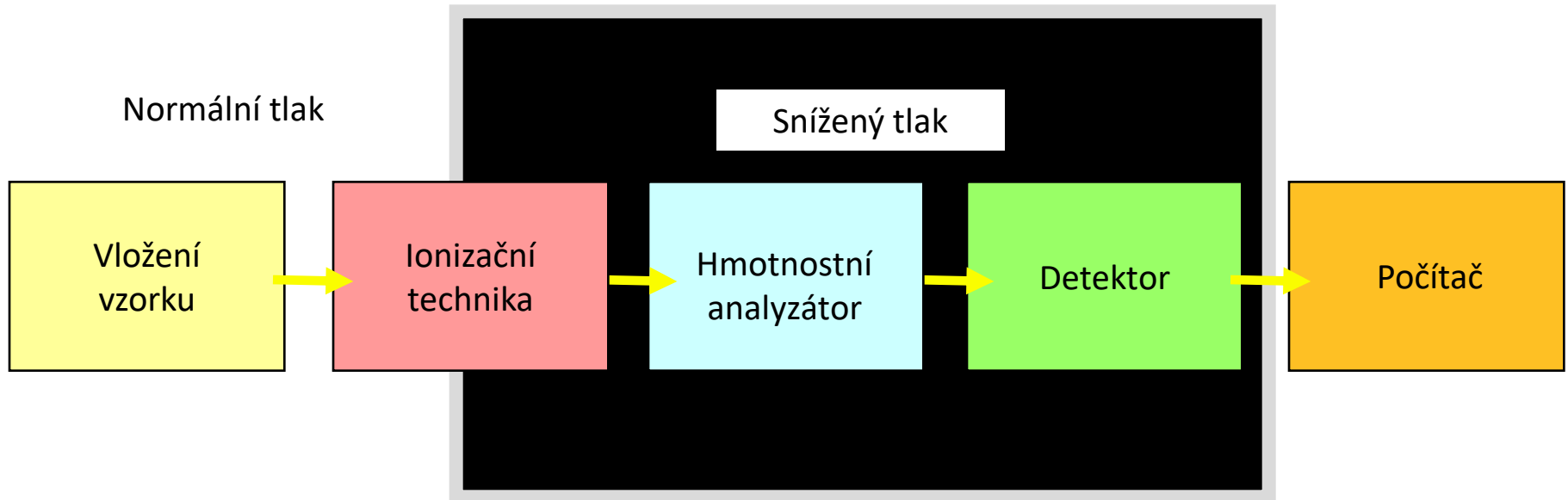
Strukturní změny proteinů i nukleových kyselin

Konformace proteinů a NK

Neoptické zobrazování v tkáních

Studium interakcí proteinů

# Hmotnostní spektrometr



# 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.

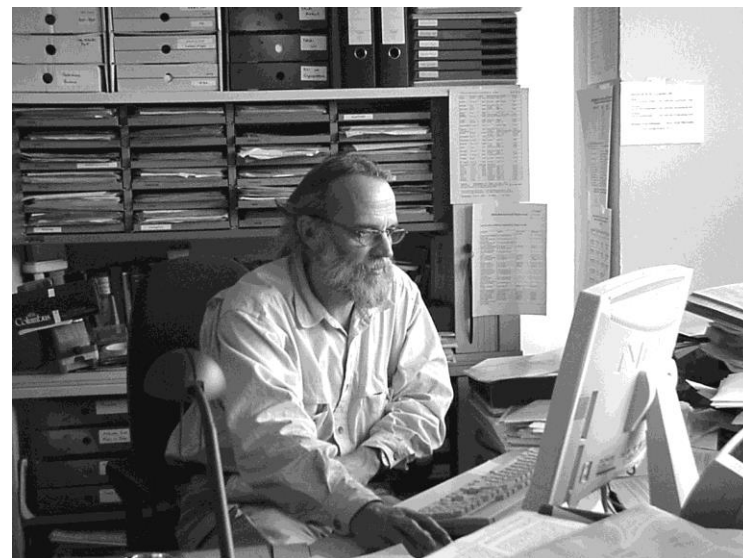
## ESI – Electrospray Ionization

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

## MALDI – Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization

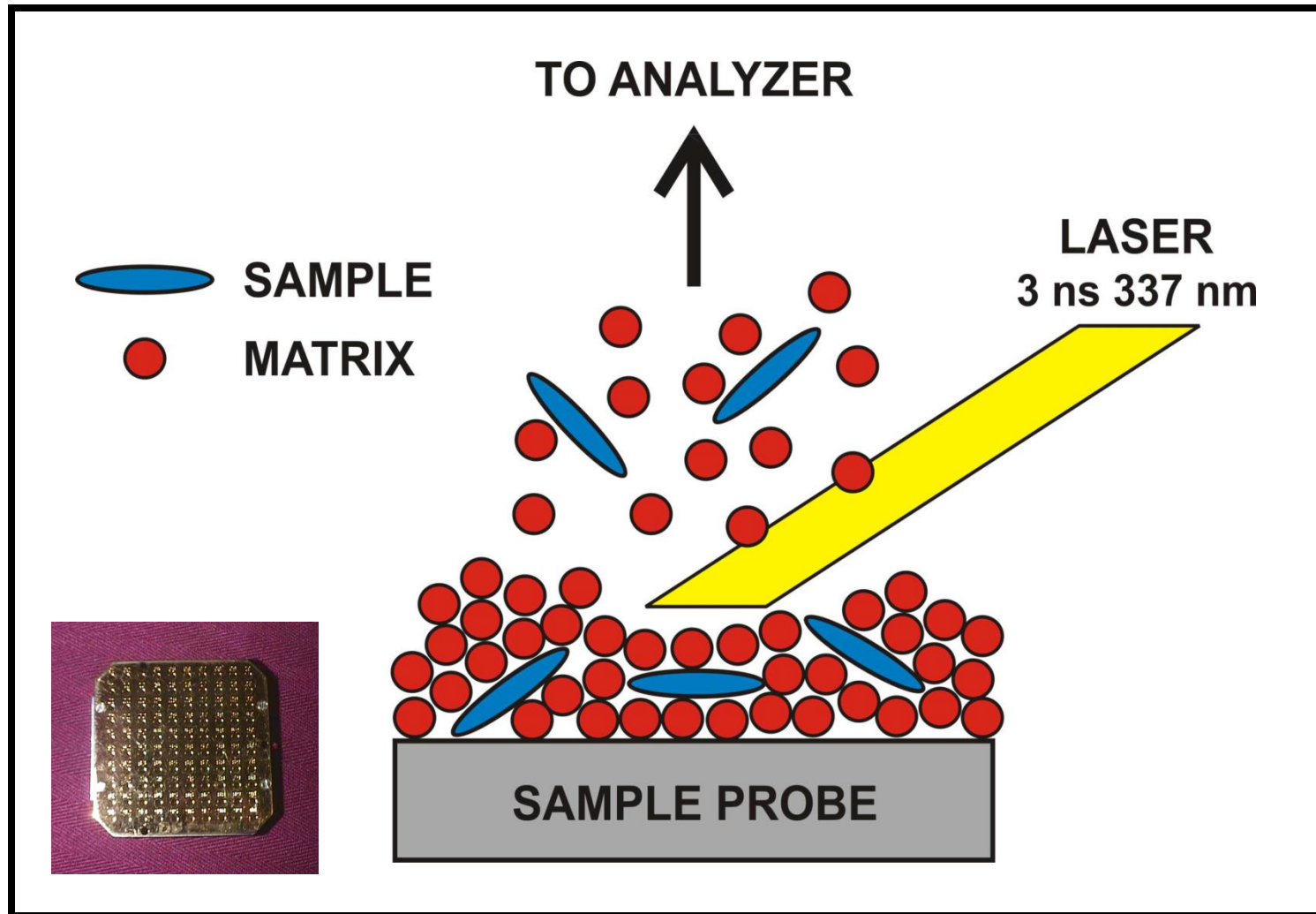
- LDI – Laser Desorption/Ionization
- NALDI – Nano Assisted Laser Desorption/Ionization  
(Nanostructured / Nanowire)
- DIOS - Desorption Ionization On Silicon
- SELDI – Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization
  - SEND – surface enhanced neat desorption (DIOS)
  - SEPAR – surface enhanced photolabile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

# 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.

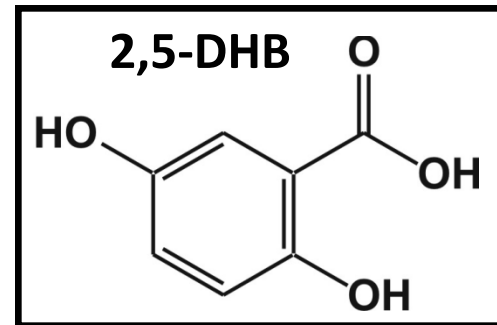
# MALDI Ionizační proces



# 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, H<sub>2</sub>O, THF, aceton ...

## UV-MALDI

337 nm dusíkový laser

355 nm Nd:YAG

266 nm Nd:YAG

193 nm ArF

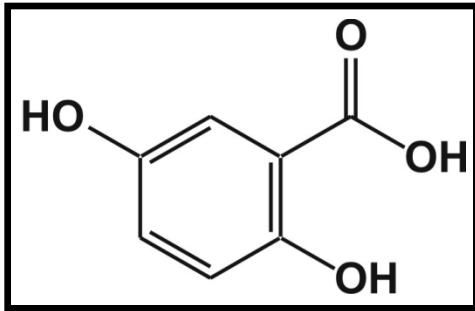
## IR-MALDI

2.94  $\mu$ m Er:YAG laser

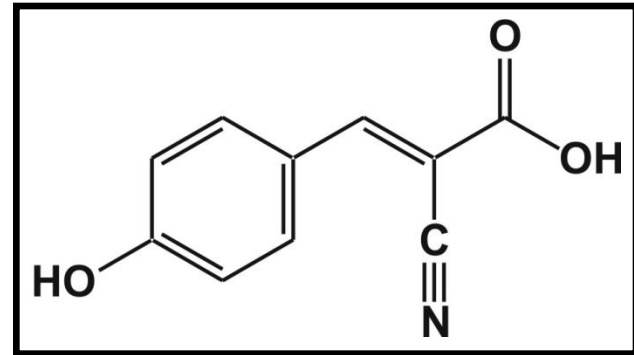
10.6  $\mu$ m CO<sub>2</sub> laser



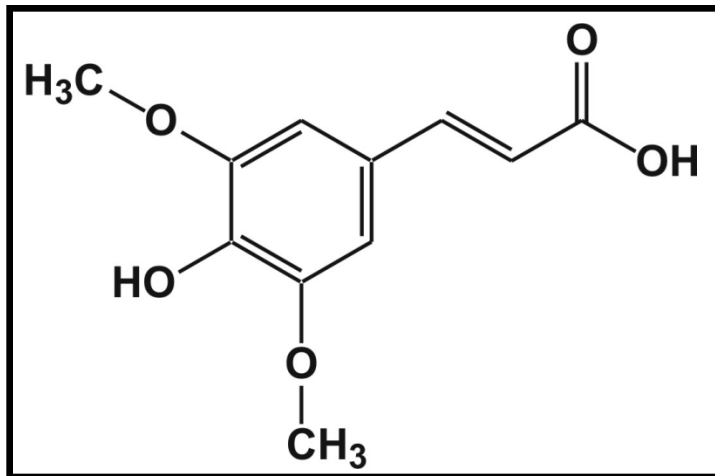
# MALDI matrice



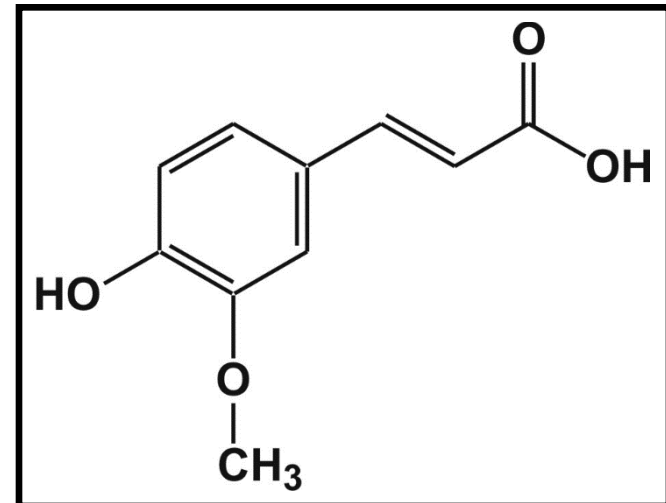
kys. 2,5-dihydroxybenzoová (DHB)



kys.  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová (CCA)



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

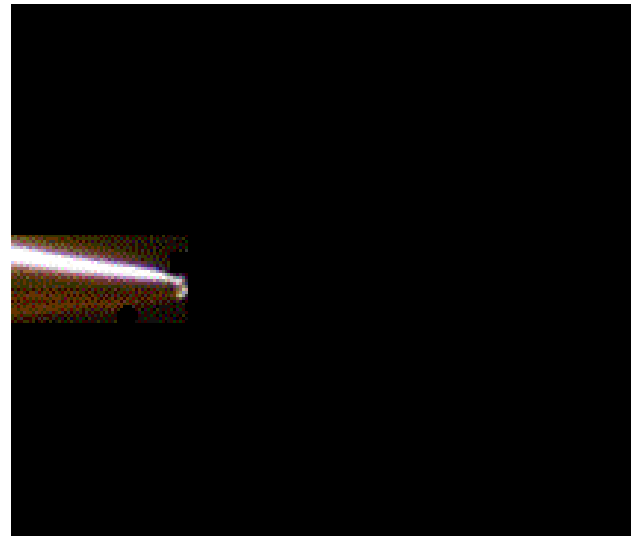


kys. ferulová (FA)  
(kys. 4-hydroxy-3-methoxyskořicová)

# 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...
- Krátké laserové pulsy;  $t \sim ns$
- Nejčastěji spojeno s TOF analyzátozem

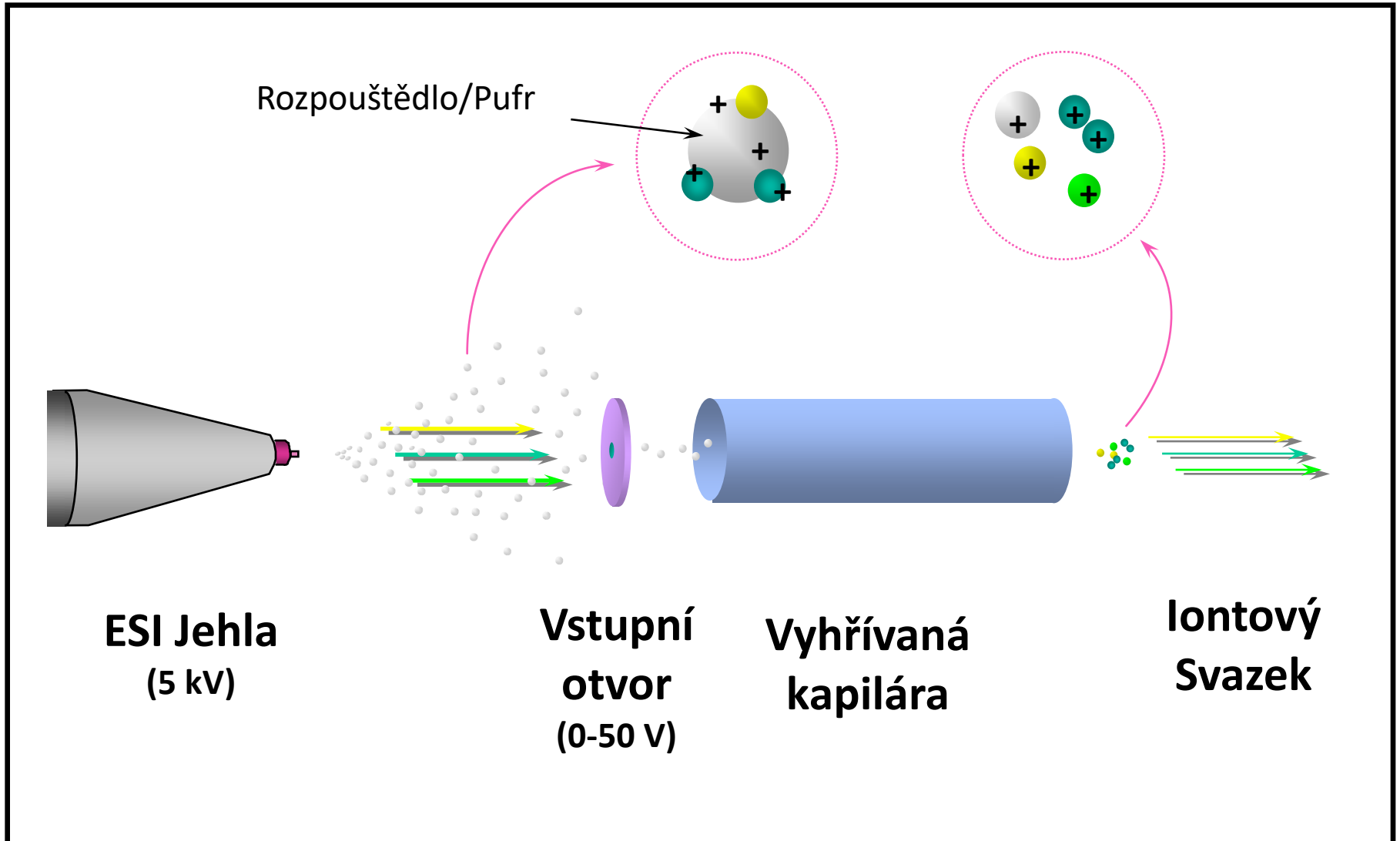
# Elektrosprej – J. B. Fenn



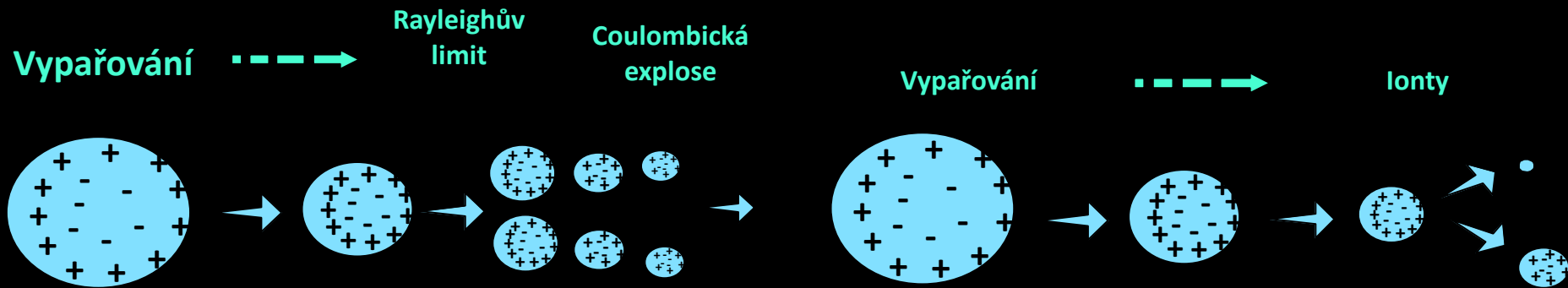
1994 – nanoelektrosprej –  
M. Mann a M. Wilm

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>

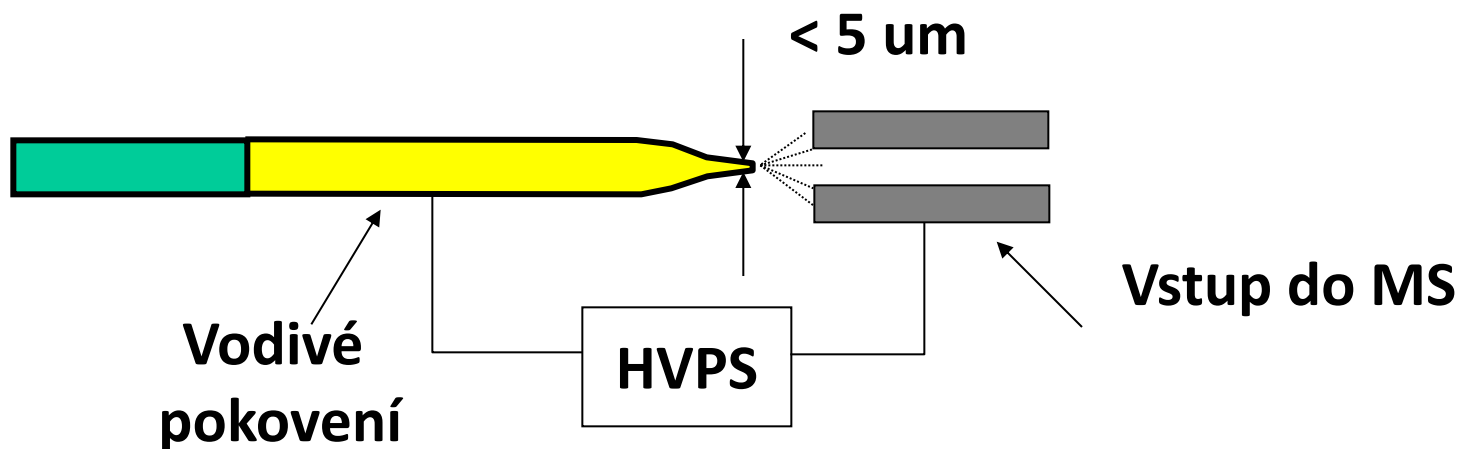


<http://www.youtube.com/watch?v=YukX2s1kuYc>

# 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 (<um)**

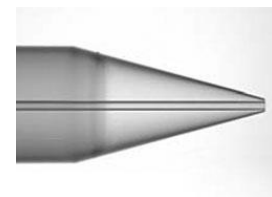
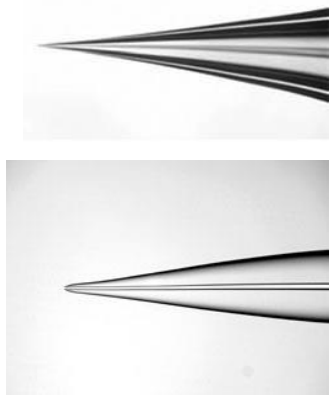
**Velmi malé kapky < 200 nm**

**Průtoky v řádu 25 nl/min**

**Mnohem vyšší účinnost ionizace**

**Miniaturní spotřeby vzorku**

**Větší tolerance k solím**



# Analyzátoary

statické - dynamické

Typ

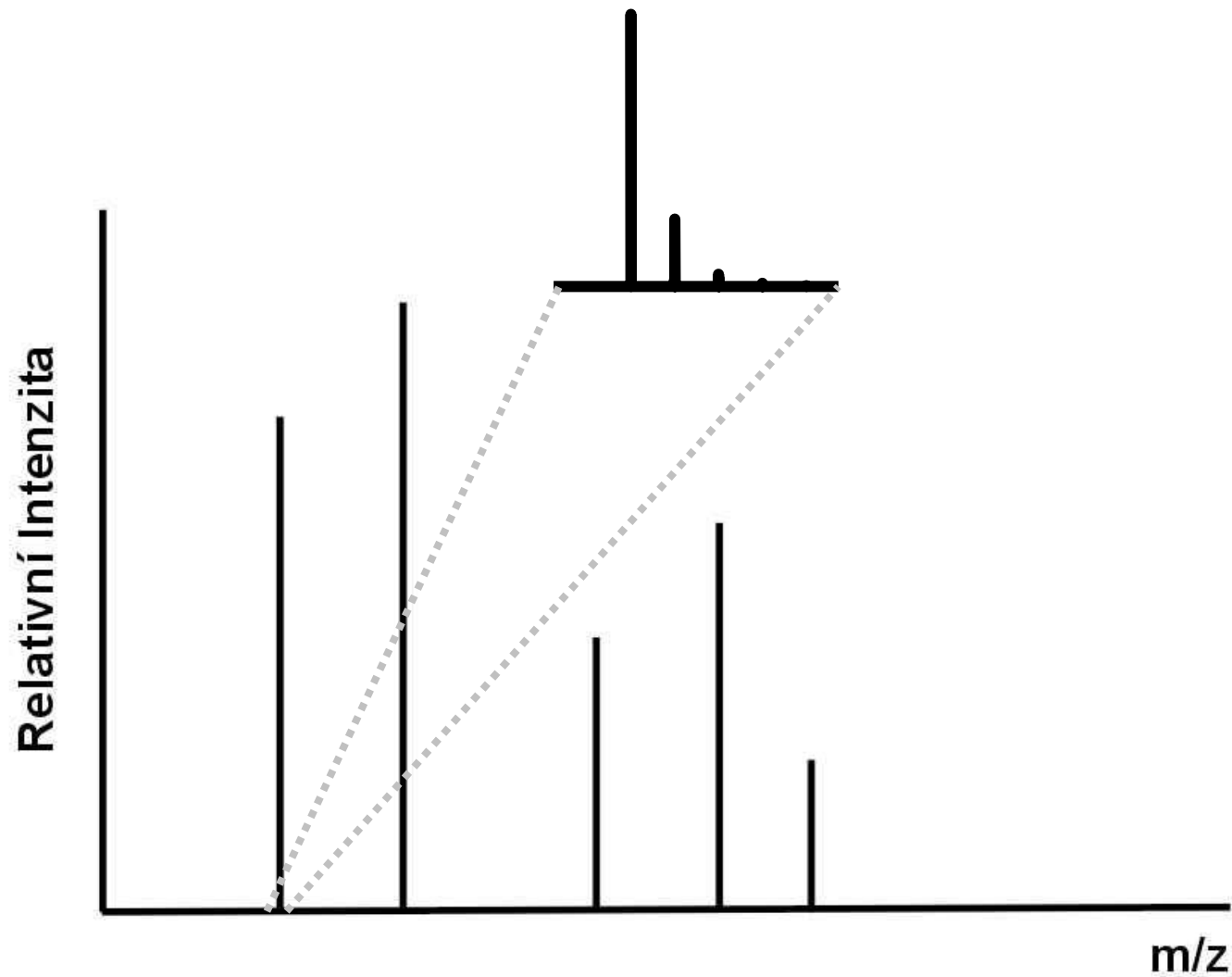
separace

Magnetický sektor	(B)	magnetický moment
Elektrický sektor	(E)	kinetická energie
Kvadrupól	(q)	m/z stabilita trajektorie
Iontová past (kvadrupólová-sférická / lineární)	(IT)	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.)



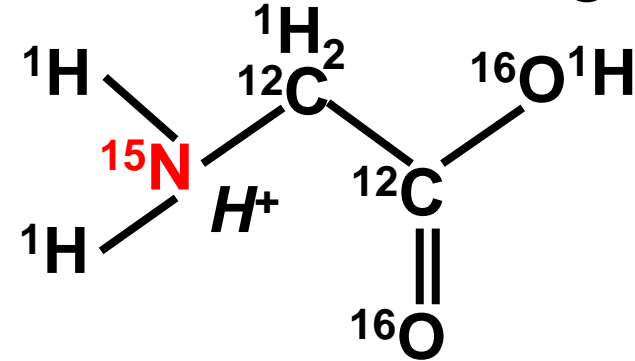
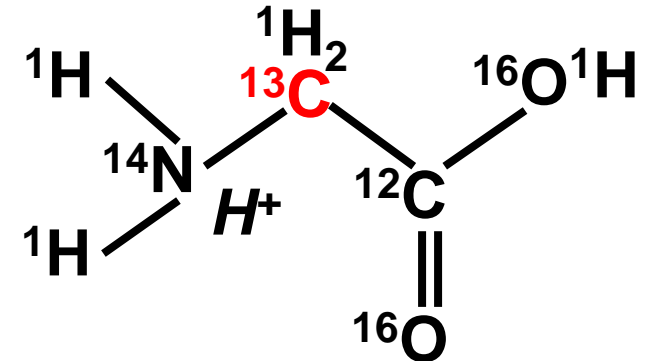
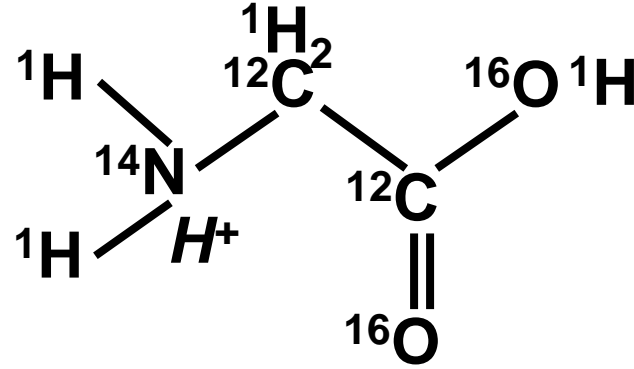
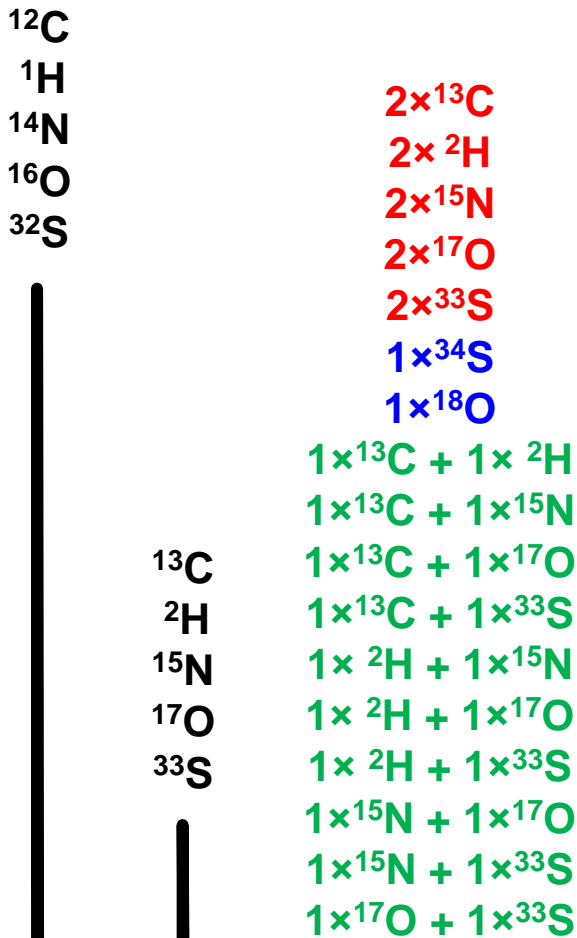
# Bližší pohled na MS spektrum



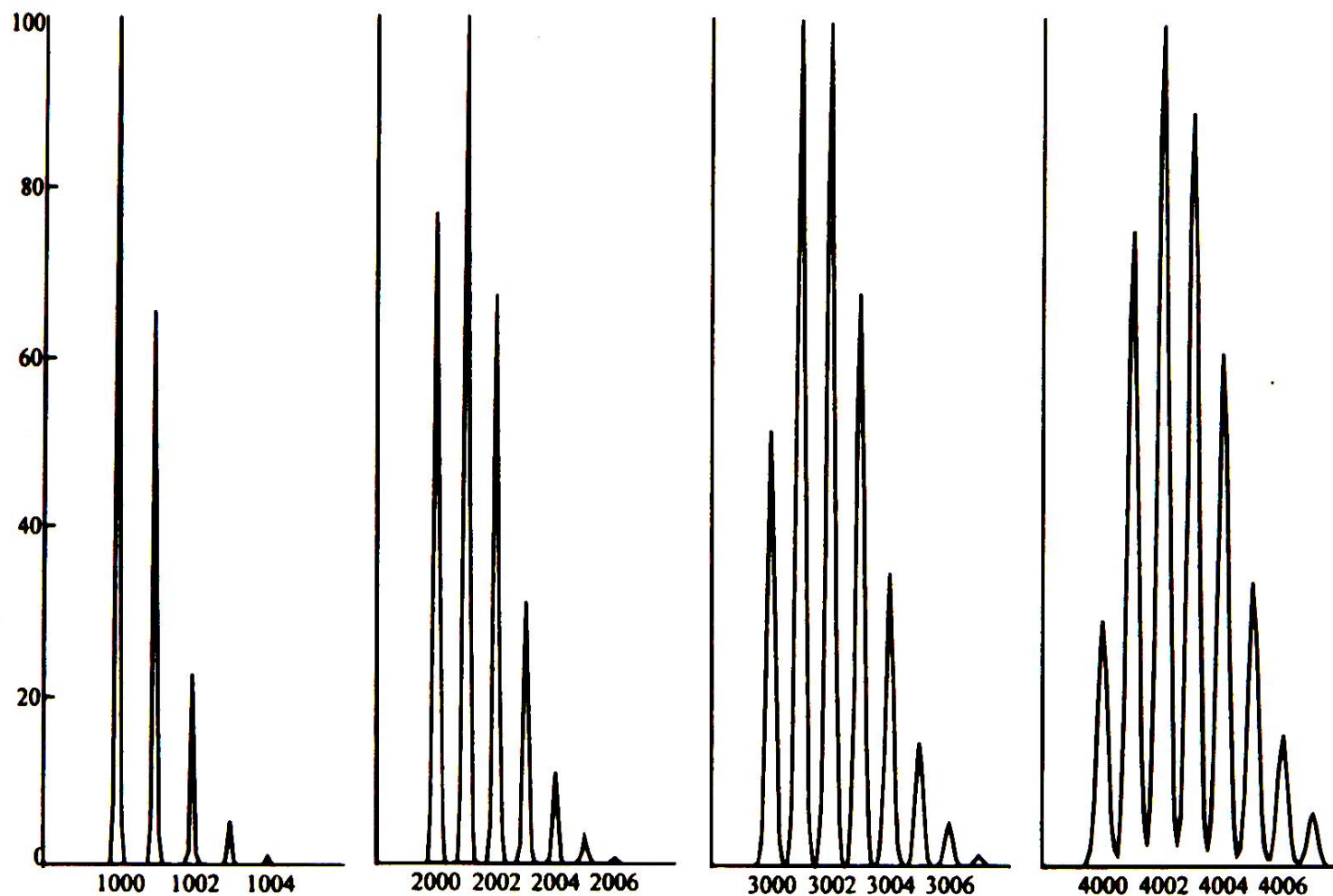
# Atomové hmotnosti

Symbol	$M_{\text{nom}}$	$M_{\text{mono}}$	%
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 ( $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ , $^{18}\text{O}$ , ...) se projeví na tvaru píku.



# Theoretical Isotope Peaks for Peptides of Masses 1000-4000 Da

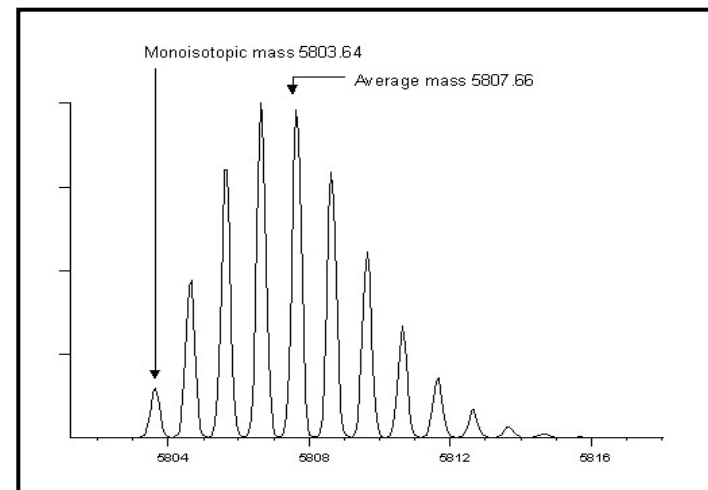
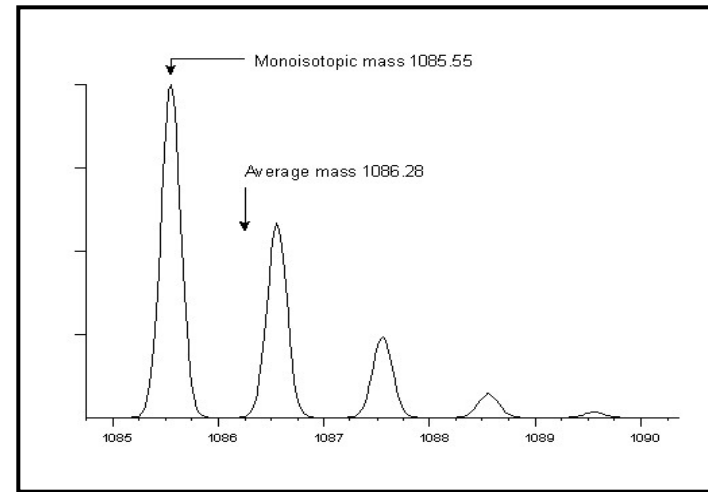


**Figure 4.** Theoretical isotope distributions of peptides of 1000, 2000, 3000 and 4000 Da.

# Atomové hmotnosti

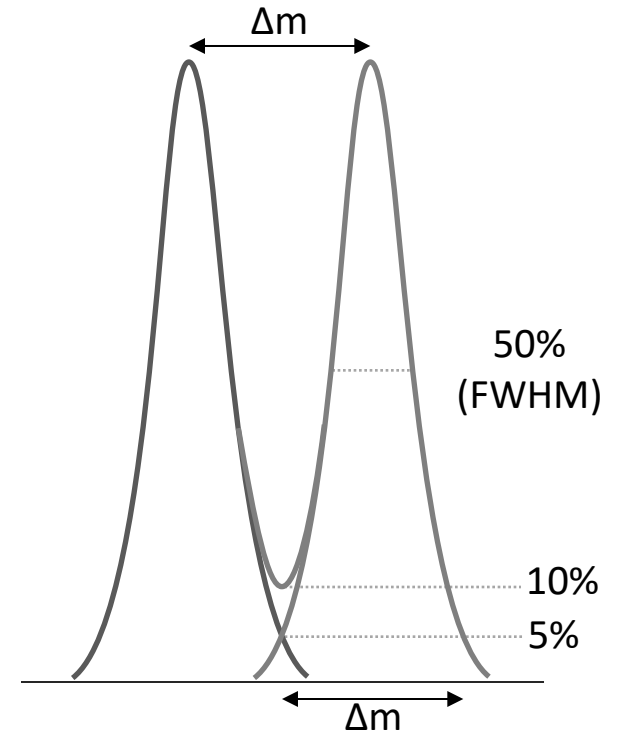
## Monoizotopická a průměrná...

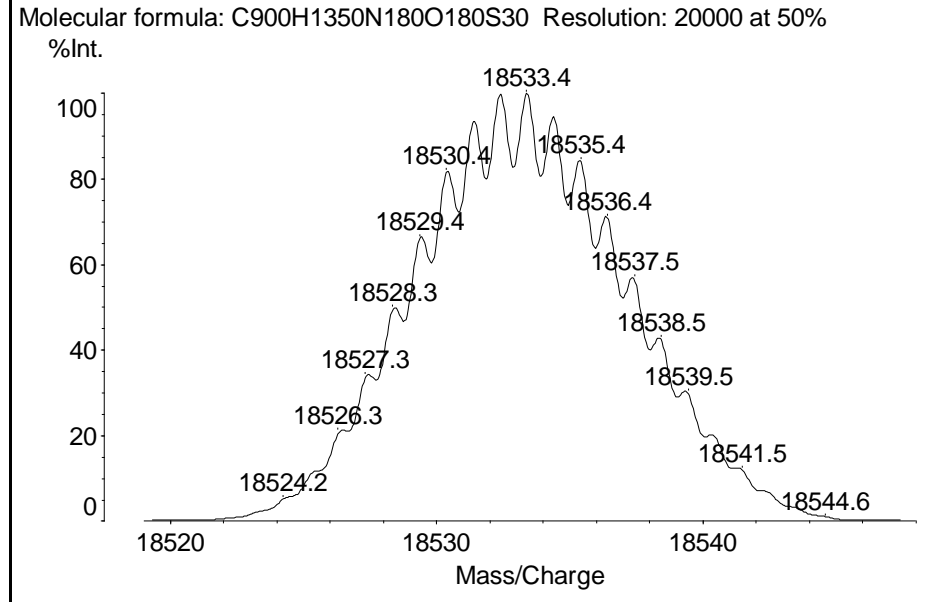
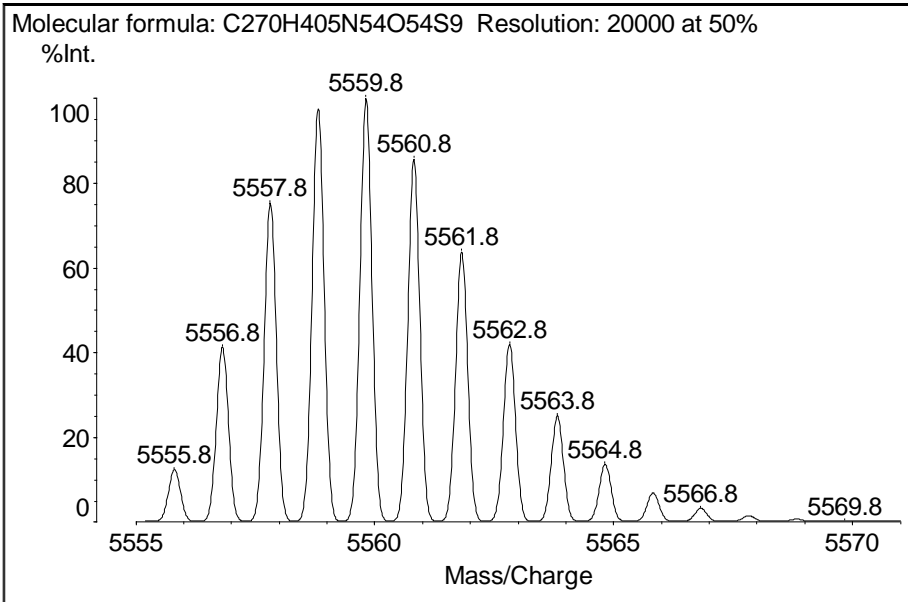
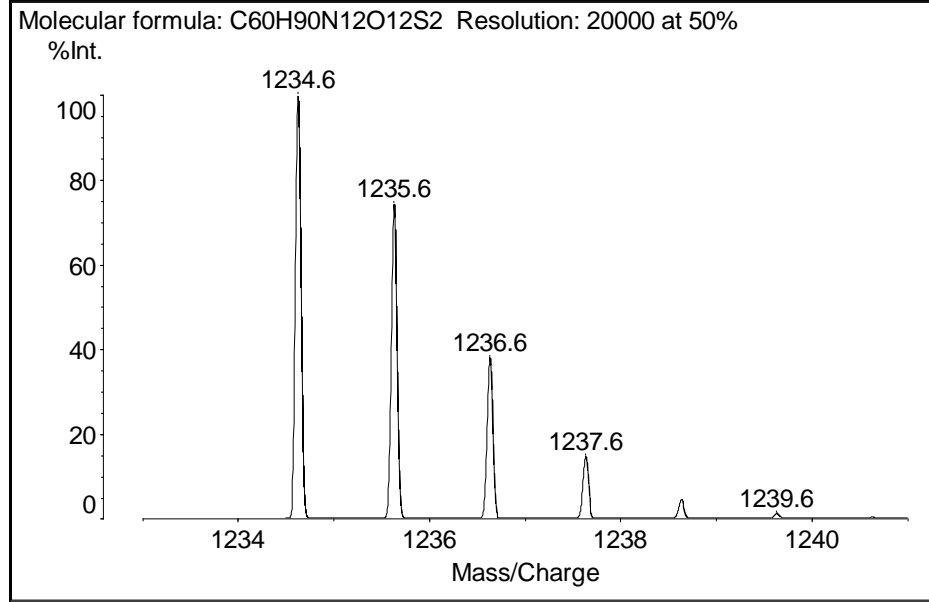
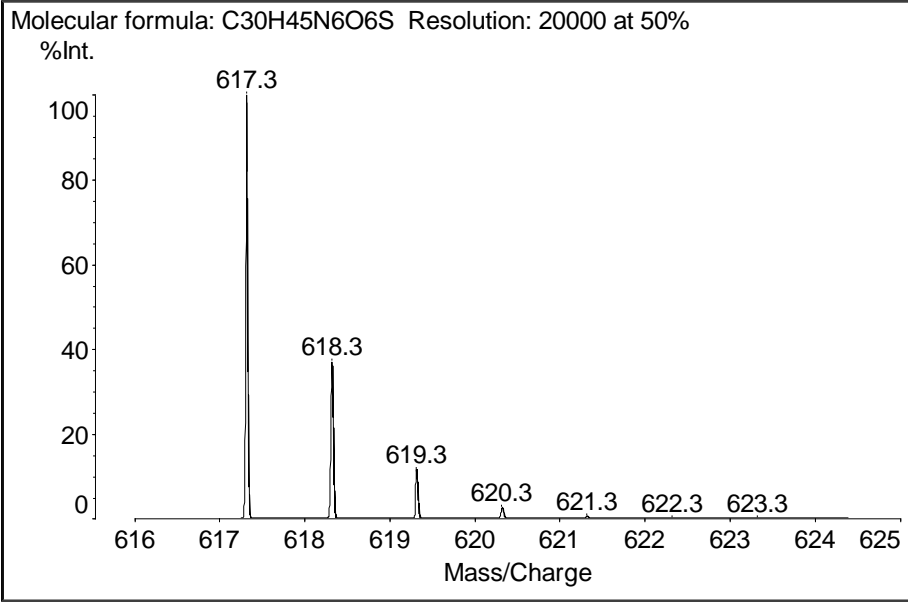
<b>C</b>	<b>12.000</b>	<b>12.011</b>
<b>H</b>	<b>1.0078</b>	<b>1.008</b>
<b>N</b>	<b>14.003</b>	<b>14.007</b>
<b>O</b>	<b>15.995</b>	<b>15.999</b>
<b>P</b>	<b>30.974</b>	<b>30.974</b>



# Rozlišení

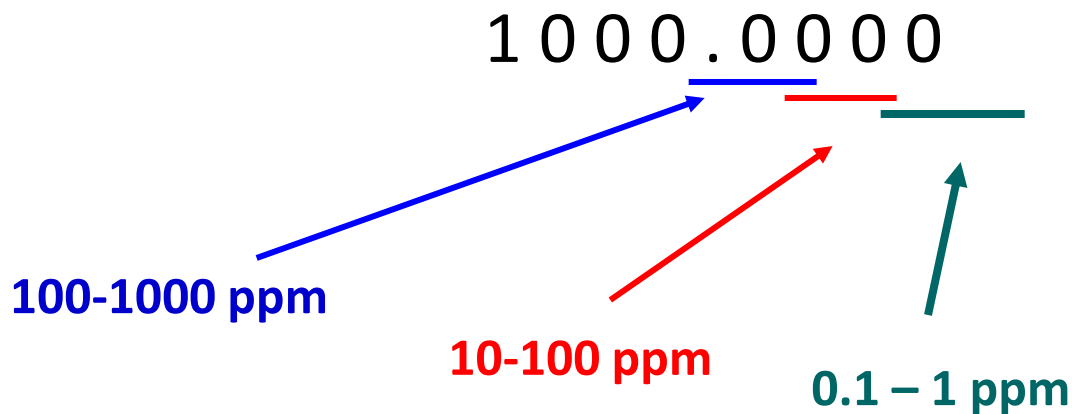
- Rozlišení / rozlišovací schopnost
- IUPAC:  $R = m/\Delta m$   
( $R$  – resolving power,  $\Delta m$  - resolution)
- Záleží jak je definováno  $\Delta m$ 
  - šířka jednotlivého píku v určité výšce (5%, 50% - FWHM)
  - 10% údolí mezi dvěma píky





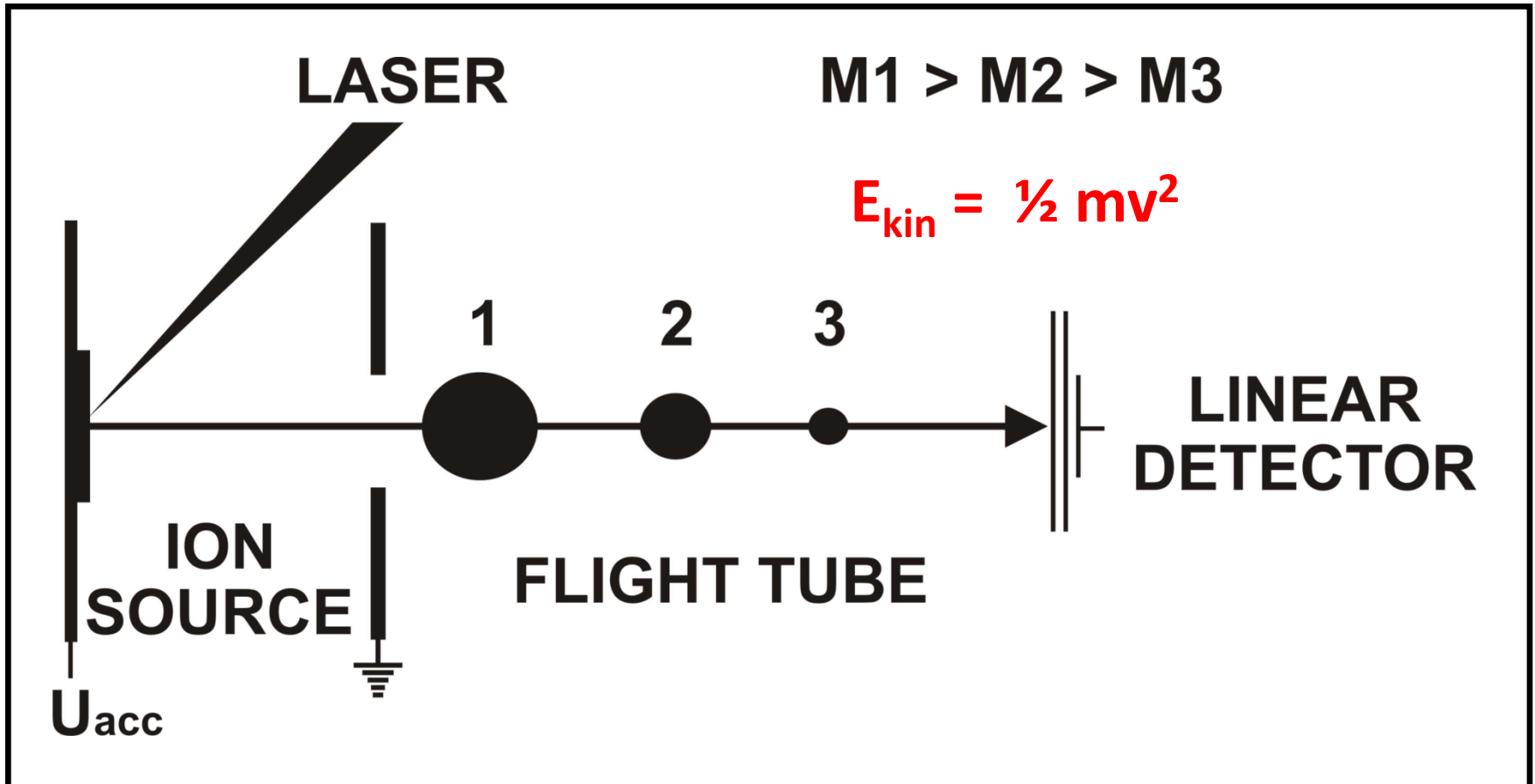
# Chyba měření

- Da – Dalton - 0.1 – 0.0001
- Th – Thompson – 0.1 – 0.0001
- ppm – parts per million – 100 – 0.1  
*ppm chyba = 1e6x(naměřená M-teoretická M)/teoretická M*
- %



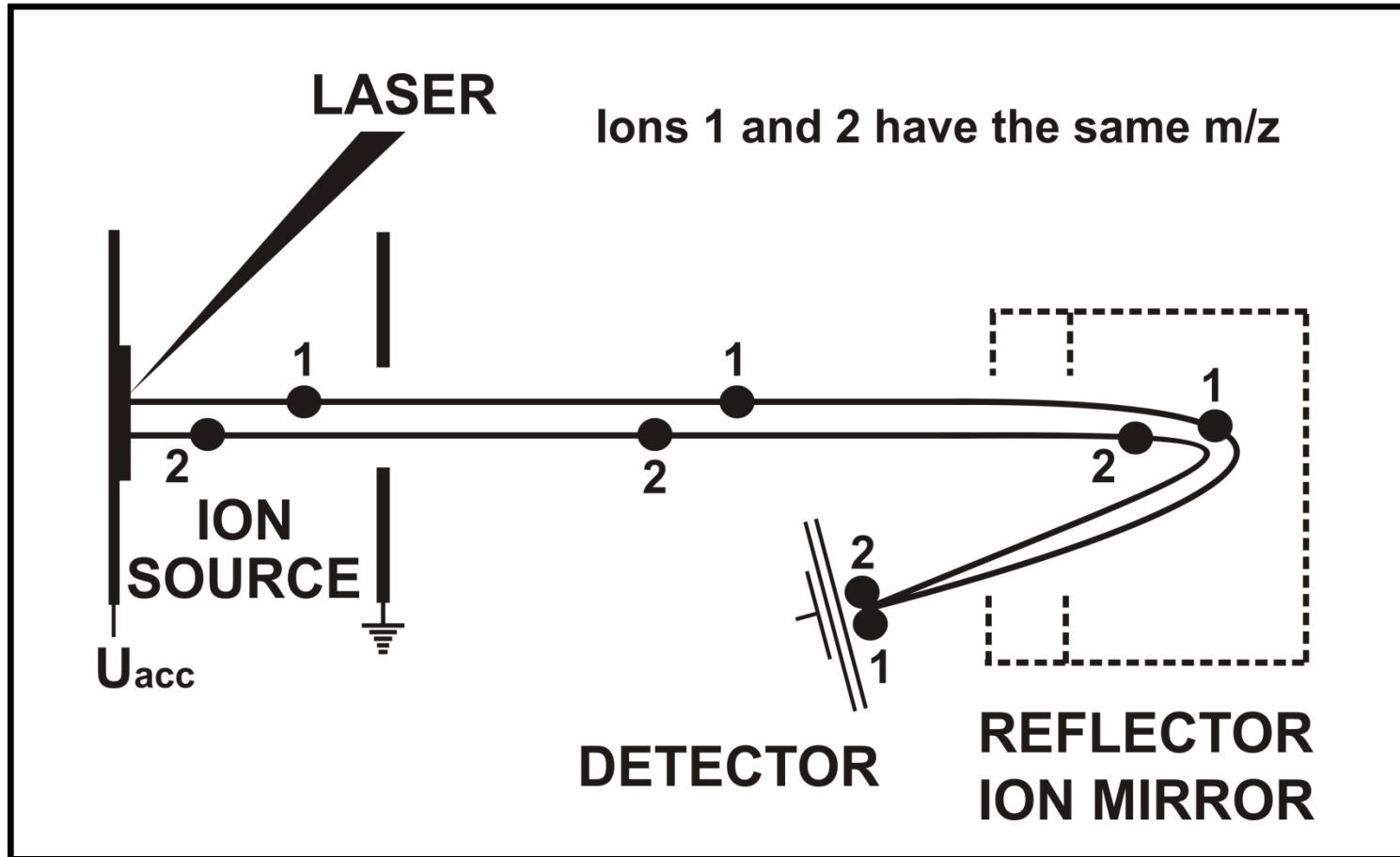


# Time Of Flight (TOF) Analyzátor



# Time Of Flight (TOF) - reflekttron

R  $10^4$   
1ppm



# Time Of Flight (TOF) - design

(a) Linear TOF-MS



(b) Reflector-TOF-MS



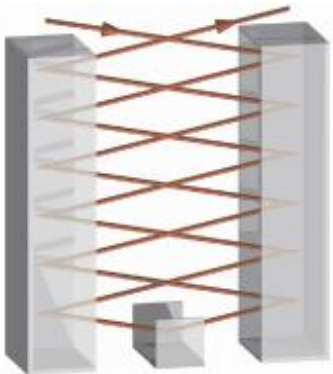
(c) Multiple-Reflection TOF-MS (closed Path)



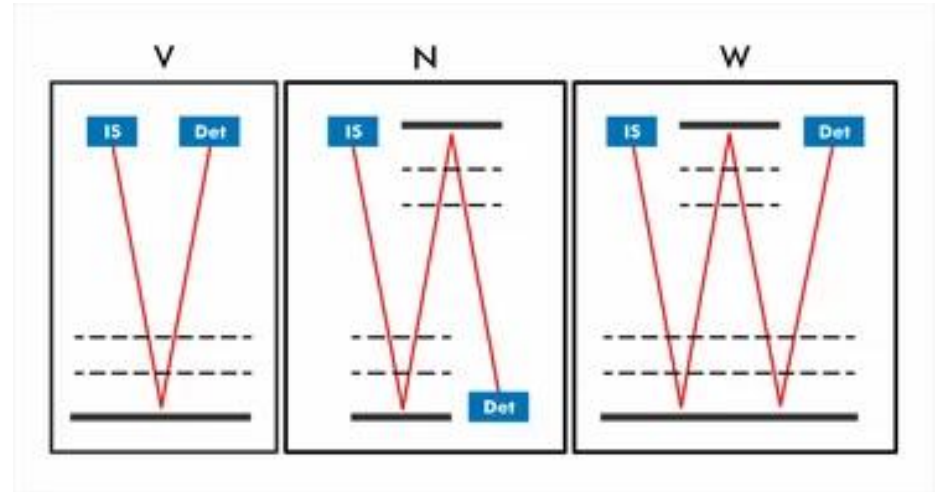
(d) Multiple-Turn TOF-MS (closed path)



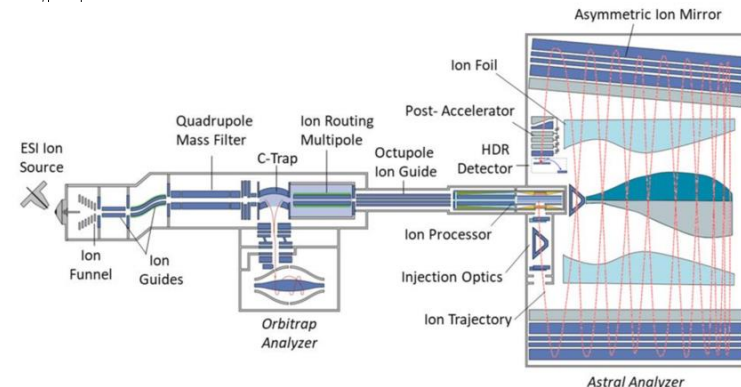
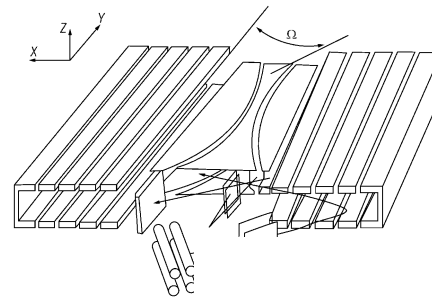
(e) Multiple-Reflection TOF-MS (open Path)



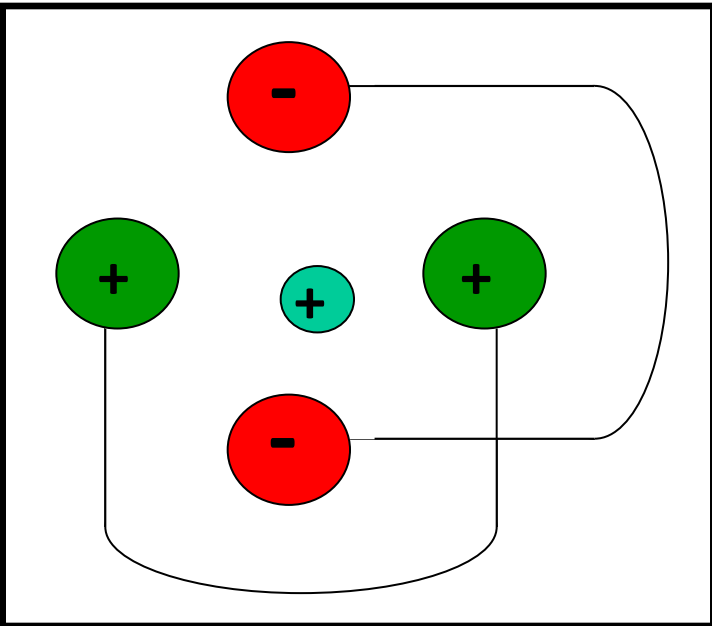
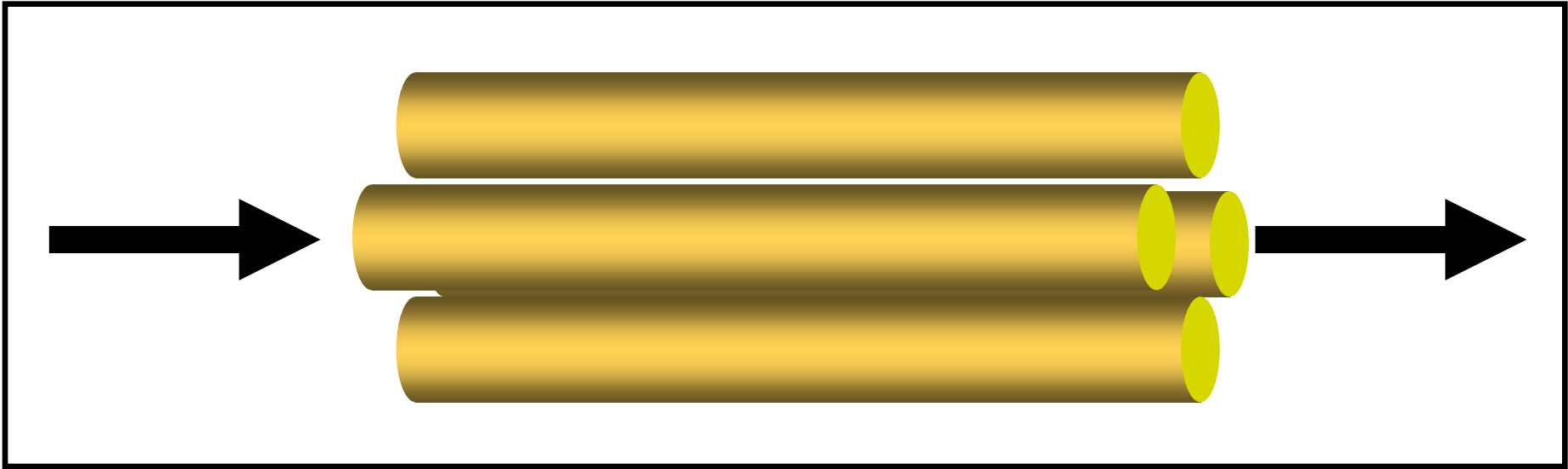
(f) Multiple-Turn TOF-MS (open path)



## mrTOF ASTRAL (Thermo)



# Kvadrupólový analyzátor



Tyče optimálně hyperbola, reálně kruhový průřez.

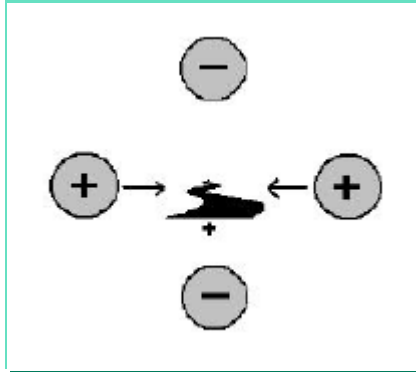
Stejně polarity na protilehlých tyčích.

Stejnoseměrné a střídavé vysokofrekvenční napětí - DC a RF

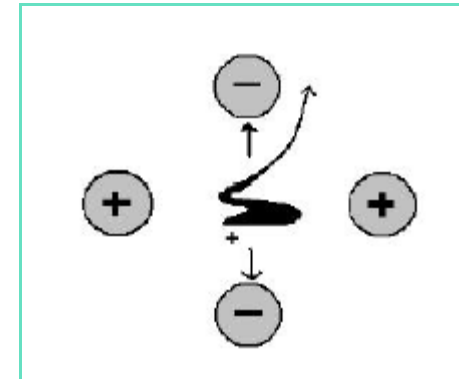
Rozdílný pohyb „velkých“ a „malých“ iontů

# Kvadrupólový analyzátor

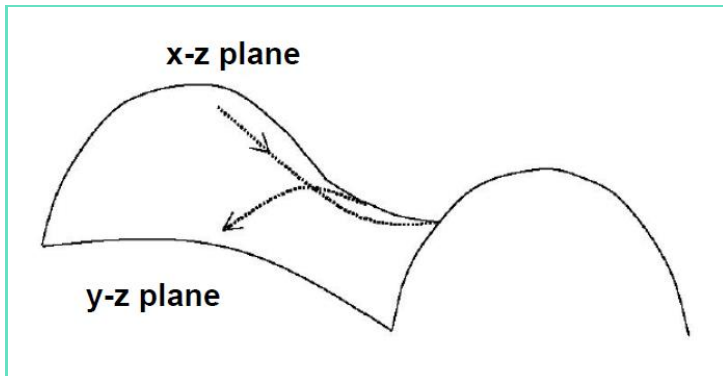
Vliv stejnosměrného napětí (platí pro + ionty)



Stabilizace



Destabilizace

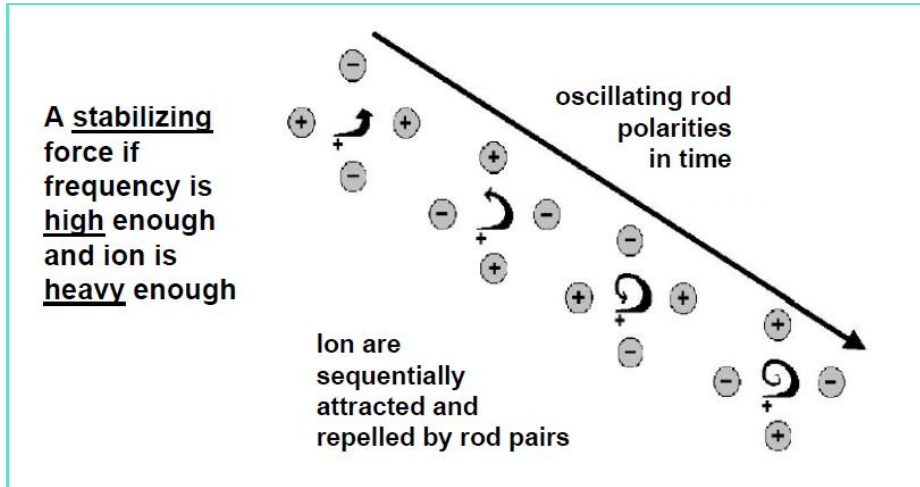


Potenciálová plocha – přiblížení - tvar sedla

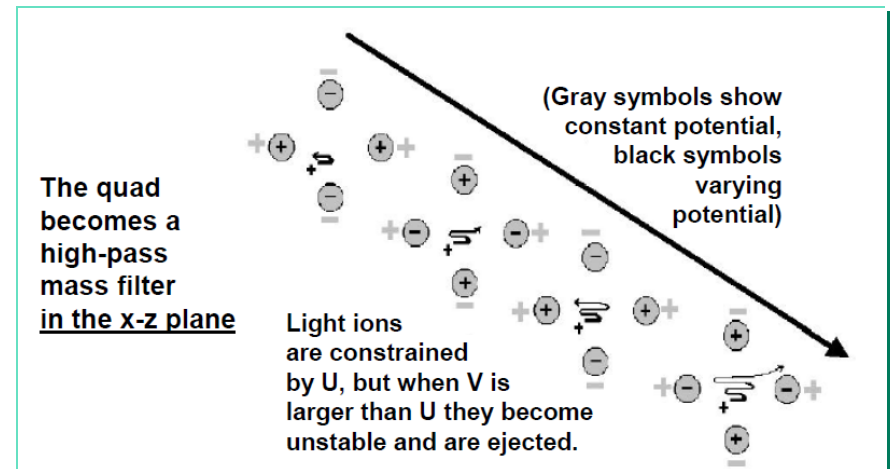
# Kvadrupólový analyzátor

**R 10<sup>3</sup>**  
**100ppm**

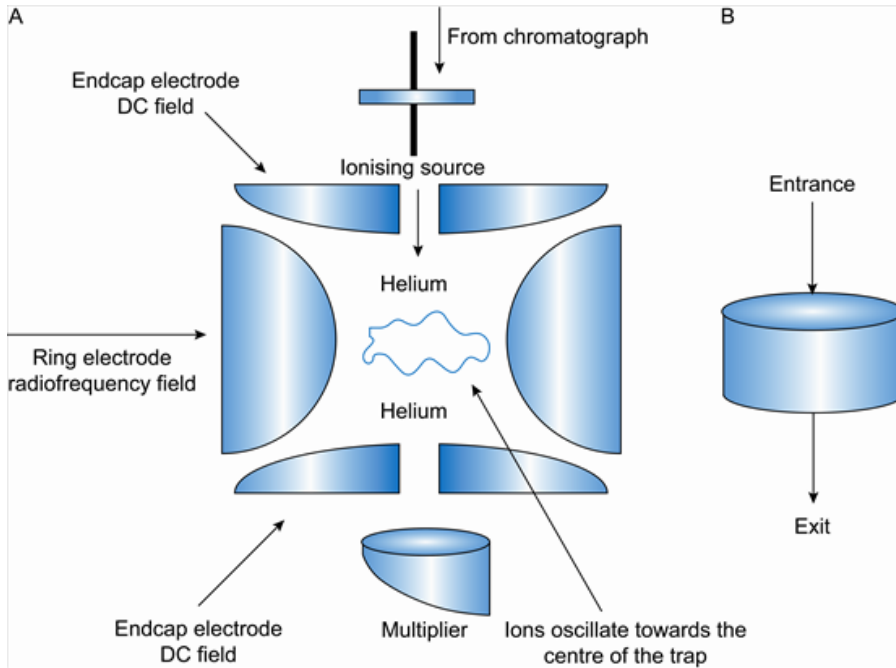
Vliv RF složky – pohyb iontů kvadrupólem



Vliv RF složky – pohyb iontů kvadrupólem



# Iontová past



OVERVIEW OF AN ELECTROSPRAY IONIZATION USING ION TRAP MASS SPECTROMETER

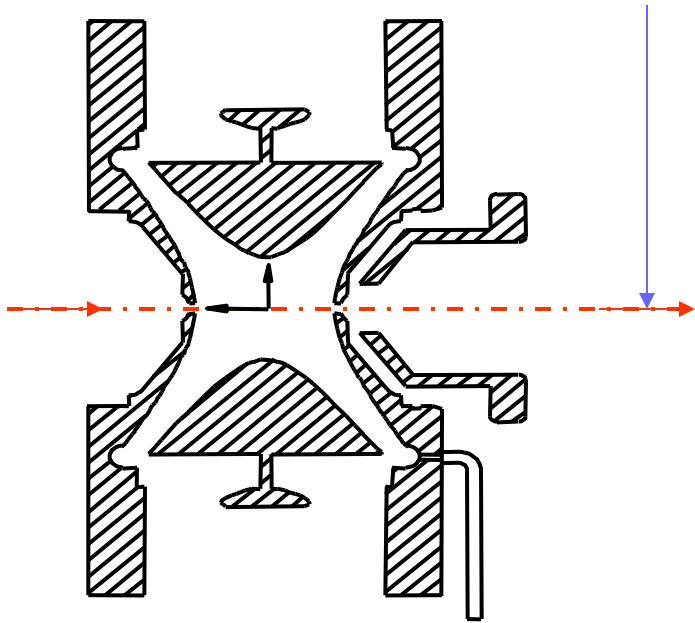
### ION TRAPPING

The 3D schematic shows the ion path from left to right. It starts with an ion source, followed by a series of lenses and a trapping region (the ion trap). The mass spectrum graph shows a peak at approximately 200 m/z. The graph has a y-axis from 0 to 100 and an x-axis from 0 to 500. Below the graph are several control buttons: TRAPPING, SCANNING, DETECTION, ZOOM MS/MS, ZOOM MS, PLAY, STOP, LABEL, VIEW, and QUIT.

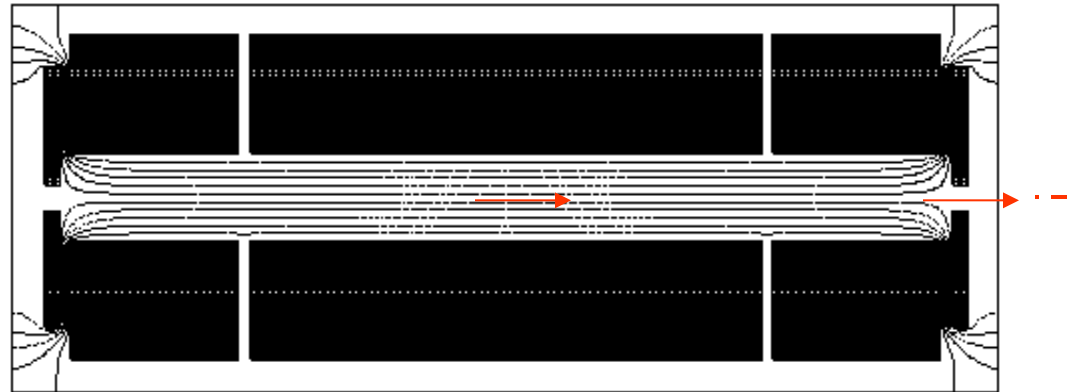
# Iontové pasti

**R 10<sup>3</sup>**  
**100ppm**

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  $\mathbf{v}$  v homogenním magnetickém poli se silou  $\mathbf{B}$ :

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

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

$$2\pi f = \frac{q\mathbf{B}}{m}$$

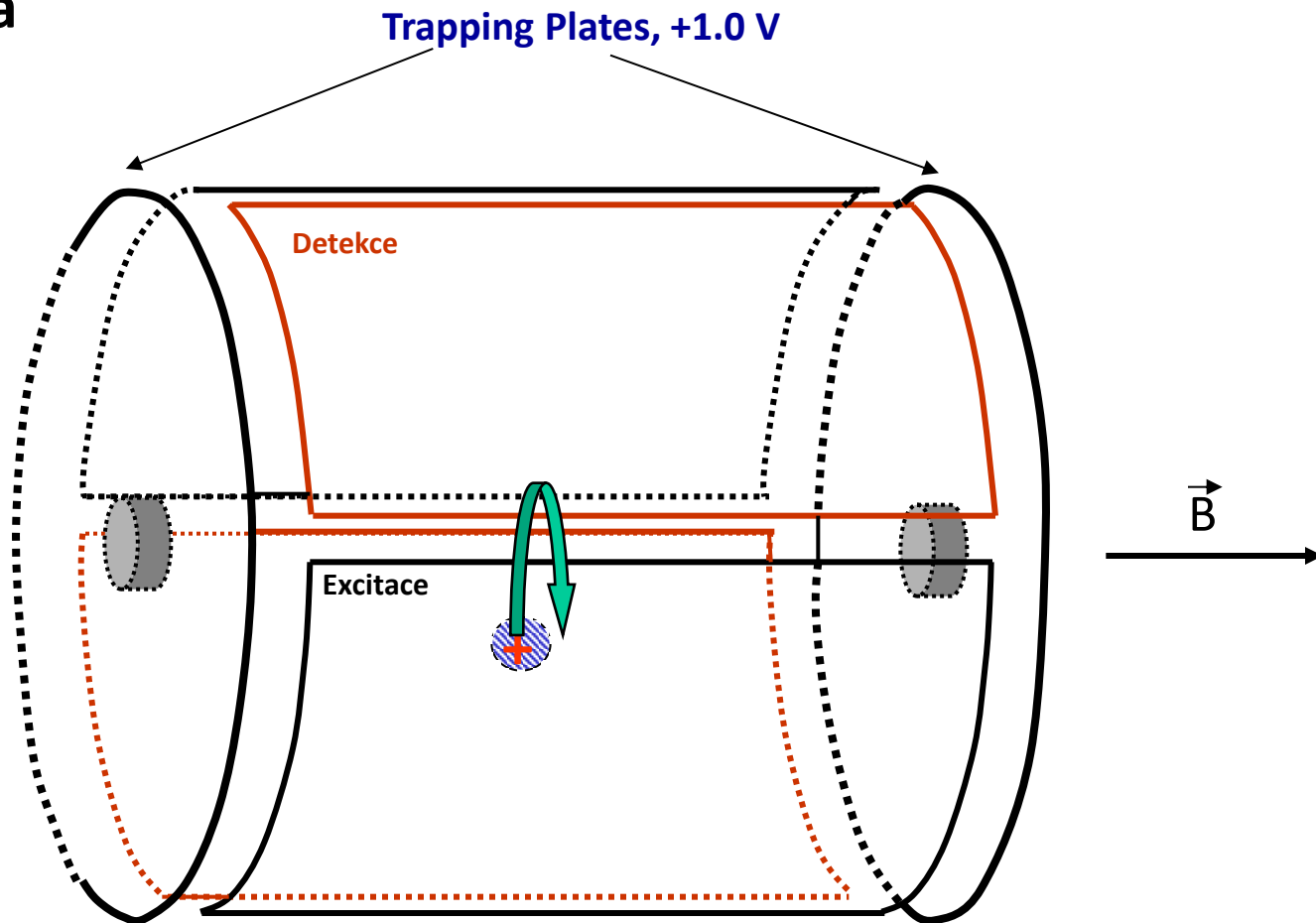
Poloměr běžné cely: 1-3 cm

Počáteční poloměr pohybu iontu: 0.01 - 0.1 mm

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

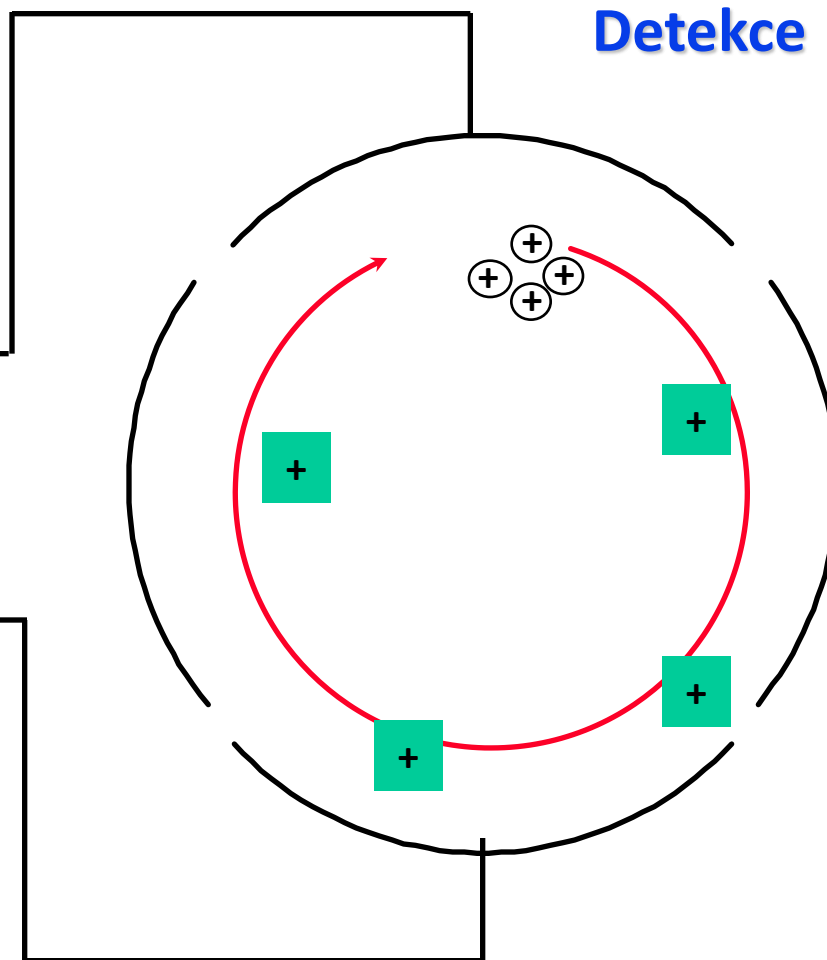
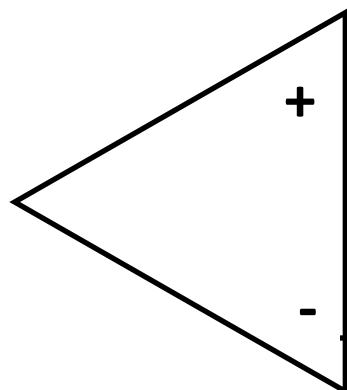
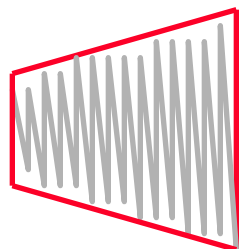
# Pohyb iontů v magnetickém poli

FTMS cela



# Fourierova transformace (Iontově Cyklotronová Resonance)

$$f = \frac{q\mathbf{B}}{2\pi m}$$

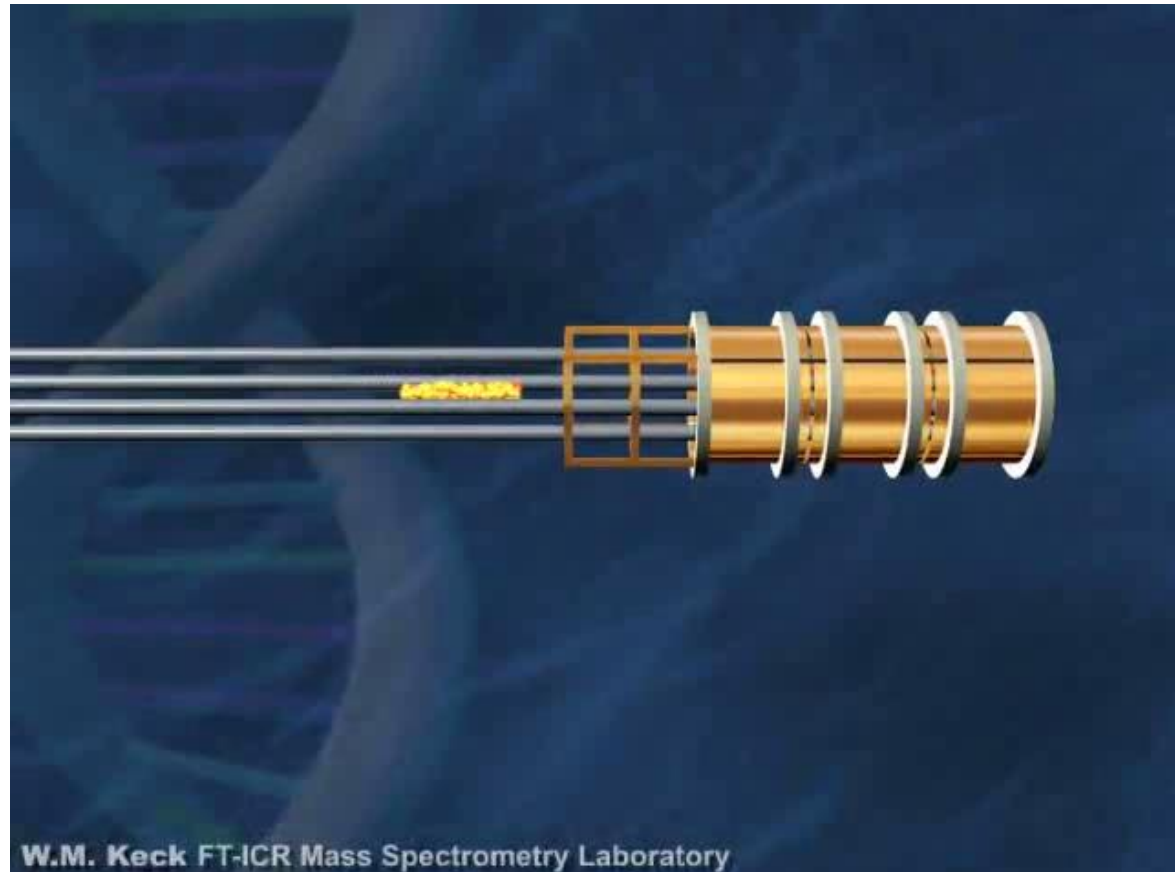


Koherentní cyklotronový pohyb indukuje „proudový obraz“, který je amplifikován a detekován.

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

# FT-ICR – Iontově cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací

**R  $10^5$  a více**  
**0.1 ppm**

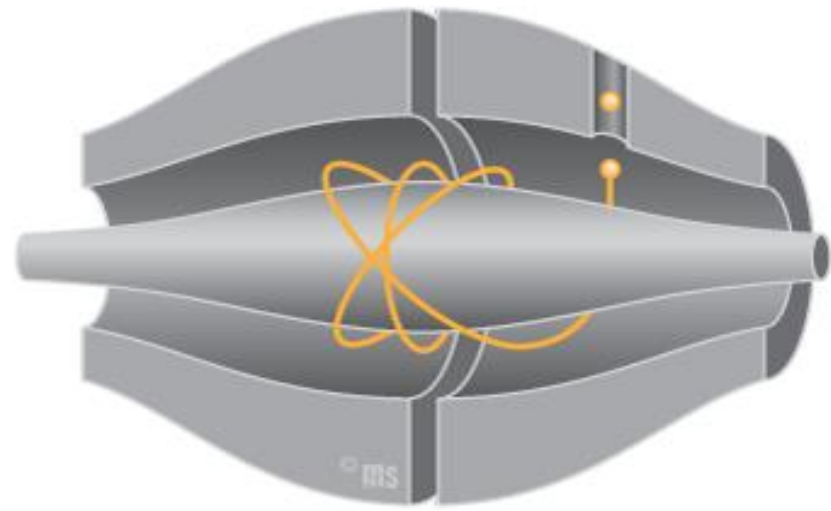


# ORBITRAP

**R  $10^4$  (a více)**

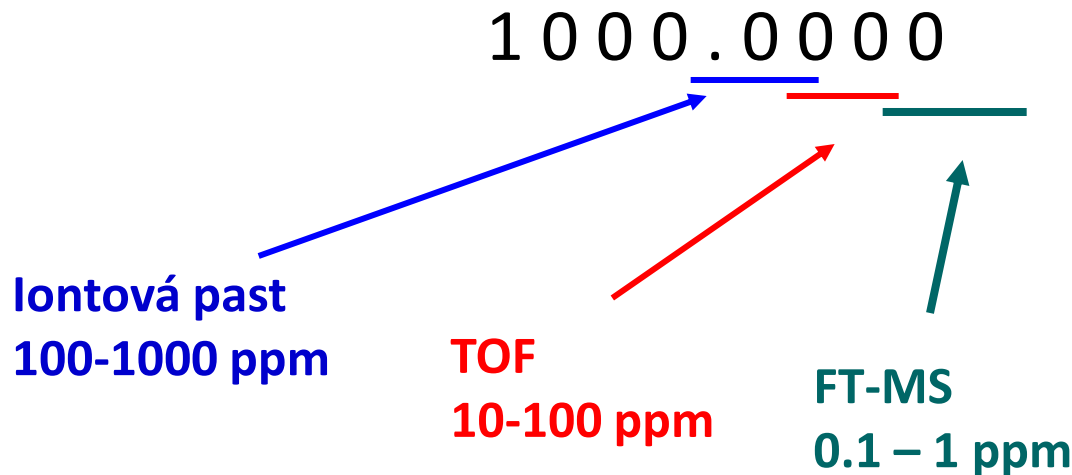
**1ppm**

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



# Srovnání analyzátorů

- Da – Dalton - 0.1 – 0.0001
- Th – Thompson – 0.1 – 0.0001
- ppm – parts per million – 100 – 0.1  
*ppm chyba = 1e6x(naměřená M-teoretická M)/teoretická M*
- %

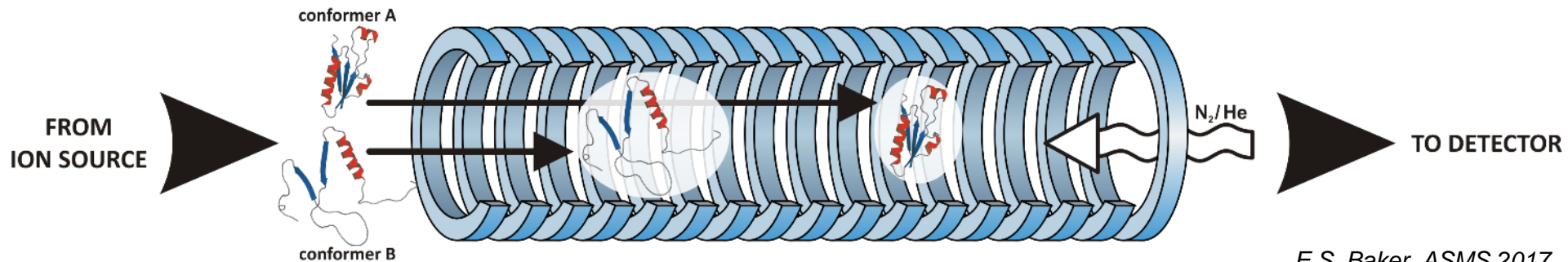
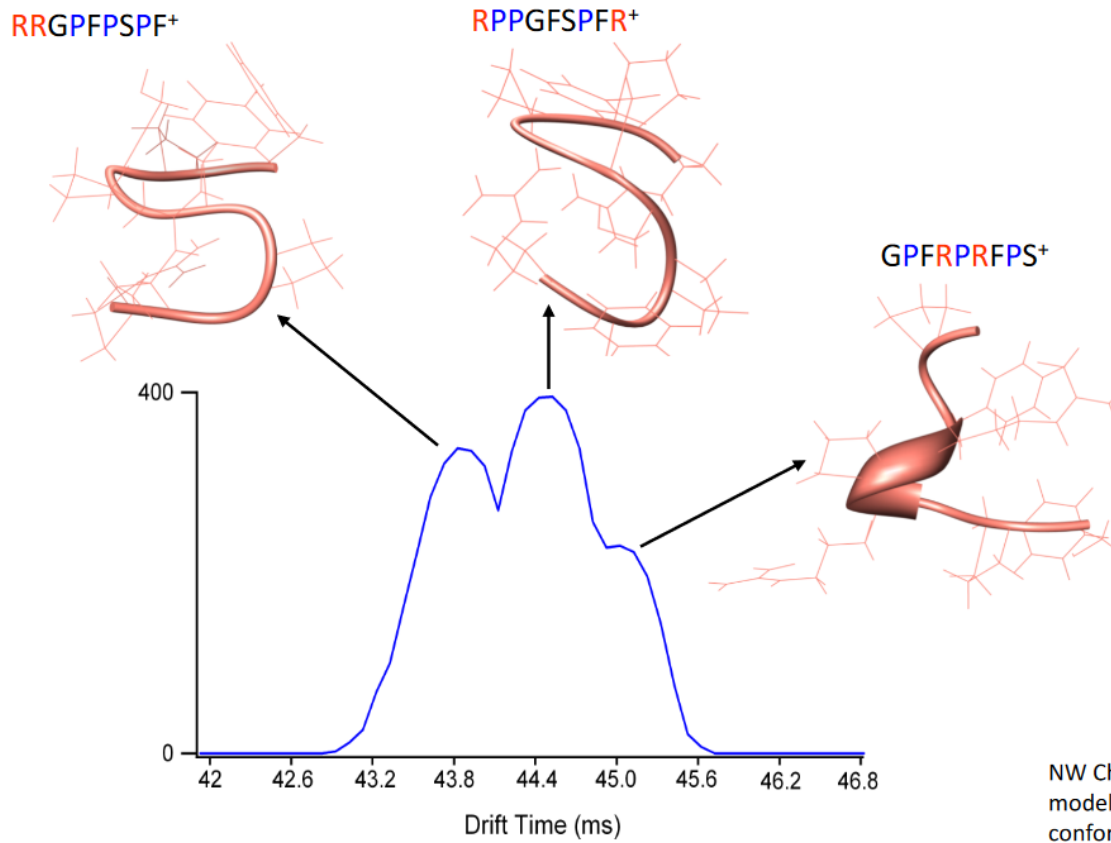


# Srovnání analyzátorů

	mass range	resolution	accuracy	dynamic range
<b>quadrupole</b>	4000	4000	100ppm	1.E+05
<b>Ion Trap</b>	6000	4000	100ppm	1.E+04
<b>TOF</b>	unlimited	50000	5ppm	1.E+04
<b>FT-ICR</b>	10000	>10e7	0.1ppm	1.E+04
<b>Orbitrap</b>	4000	>200000	1ppm	1.E+04
<b>Magnetic sector</b>	10000	100000	10ppm	1.E+07

**Rozlišení VS rychlost skenu!**

# Iontová mobilita – rozdělení dle konformace

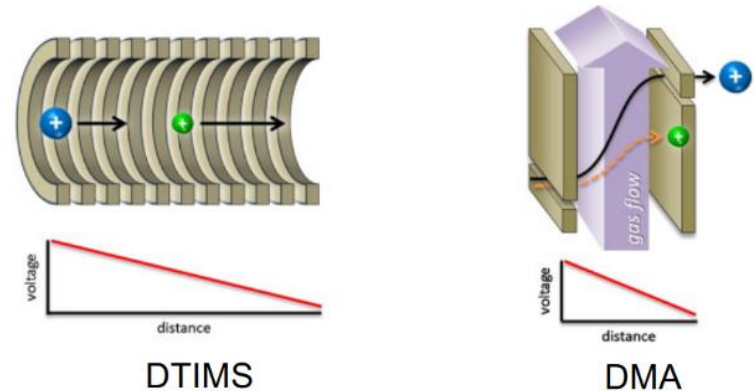




# Iontová mobilita – různá uspořádání

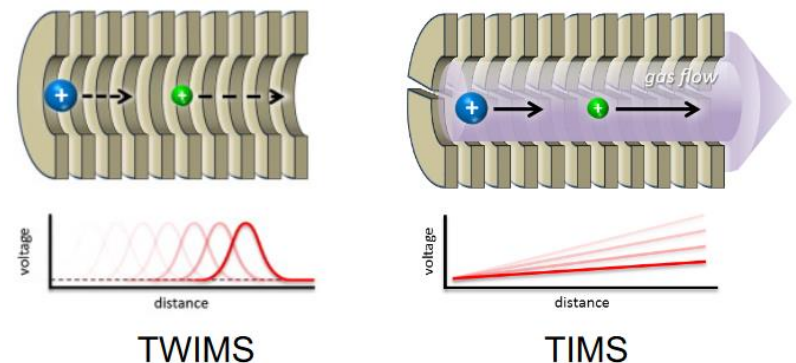
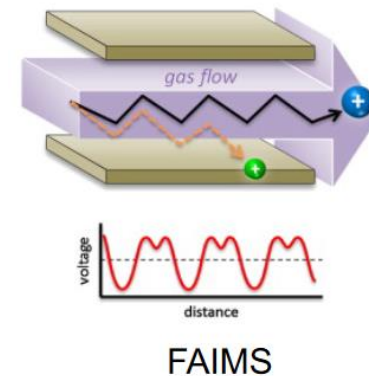
## Statické pole

- Drift Tube IMS (DTIMS)
- Differential Mobility Analyzer (DMA)



## Dynamické pole

- Field Asymmetric IMS (FAIMS)
- Traveling Wave IMS (TWIMS)
- Trapped IMS (TIMS)



# 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, N<sub>2</sub>) - CID – Collision Induced Dissociation, CAD – Collisionally Activated Dissociation (SORI - sustained off-resonance irradiation)

- srážky s povrchem – SID – Surface Induced Dissociation

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

- indukovaná laserem - IRMPD – Infrared Multi-Photon Dissociation, UVPD – UltraViolet PhotoDissociation

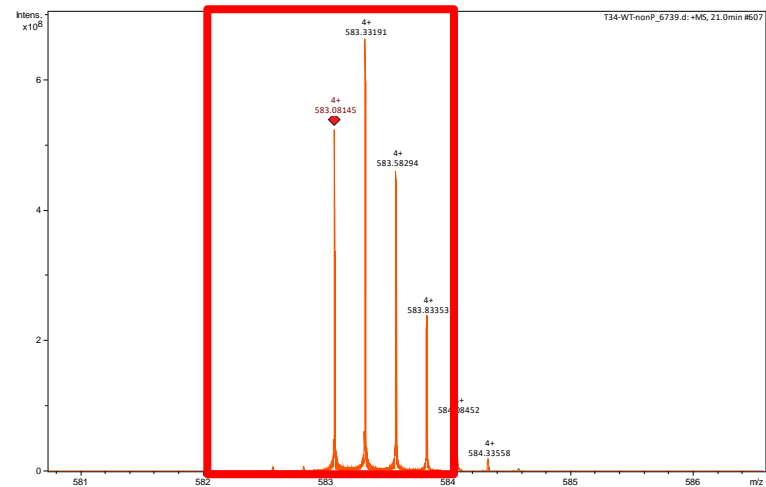
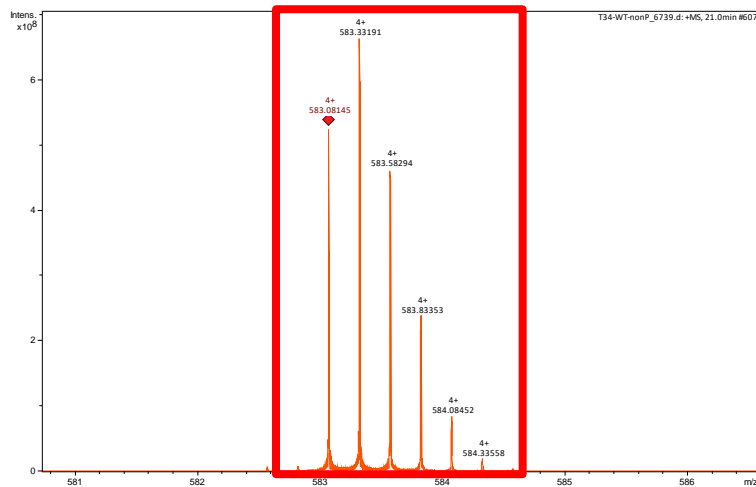
**Hovoříme o MS/MS, MS<sub>2</sub>, MS<sup>2</sup> ...případně o MS<sup>n</sup>**

Prekurzor

Fragmenty /  
produktové ionty

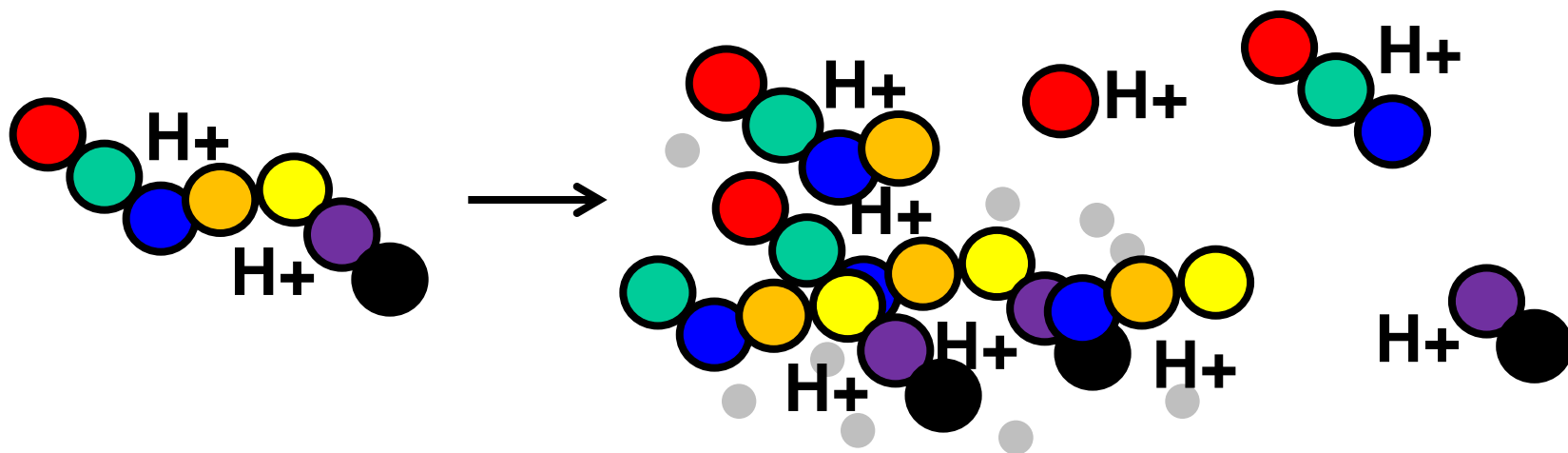
# Cílené disociace

1. Krok – izolace daného  $m/z$  (tzv. izolační okno – 2 a.m.u., 6 a.m.u).  
Pozor na střed izolace – monoizotop nebo průměr!  
“ořez izotopů” / překryvy (ko-fragmentace) / odstup v kvantifikaci

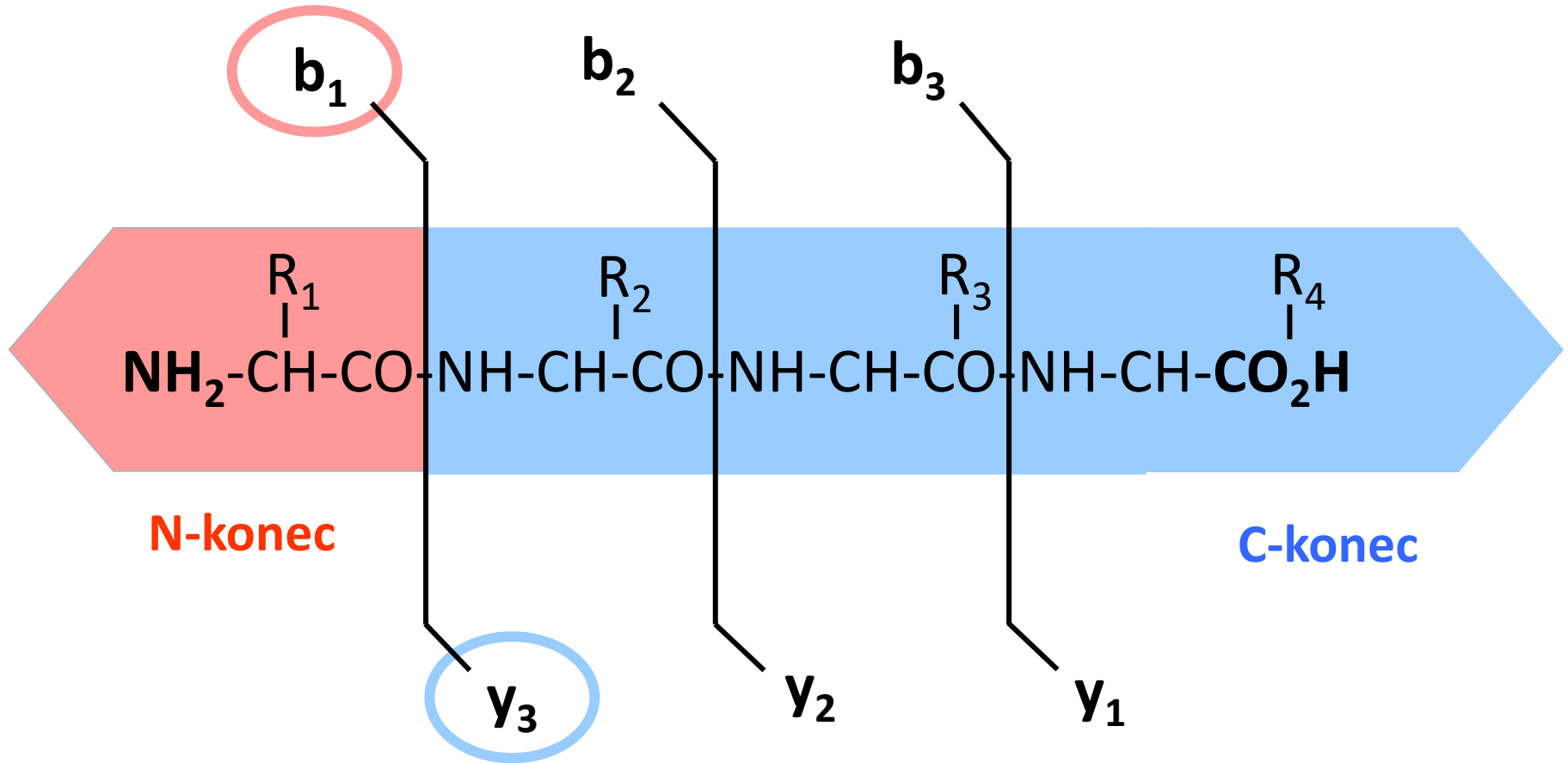


2. Krok - fragmentace

# 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<sup>+</sup> = 1410.6**

## b-ions<sup>+</sup>

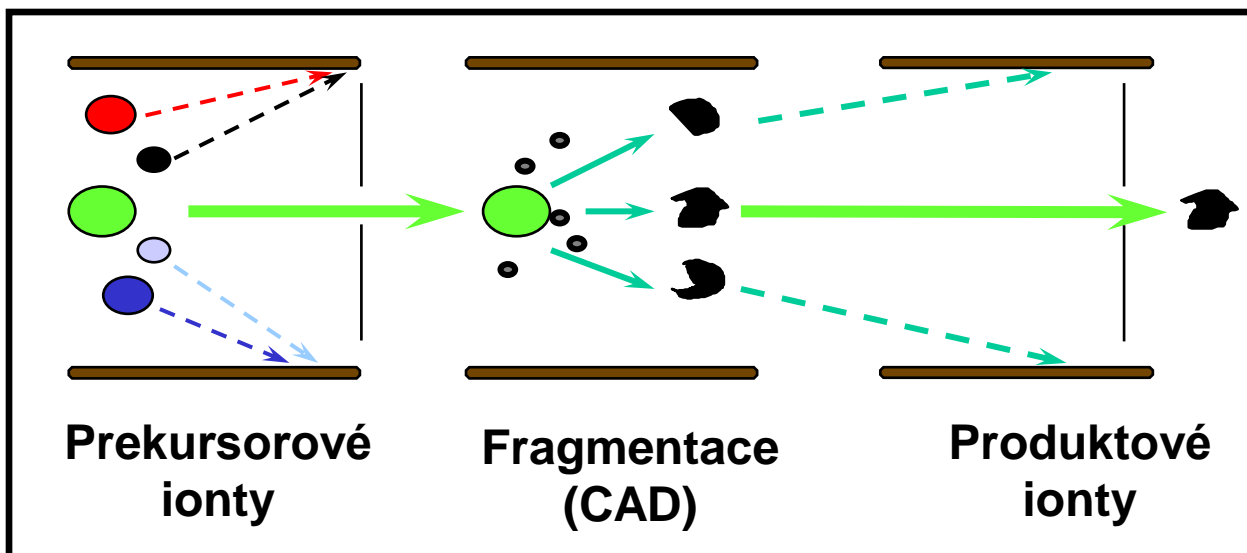
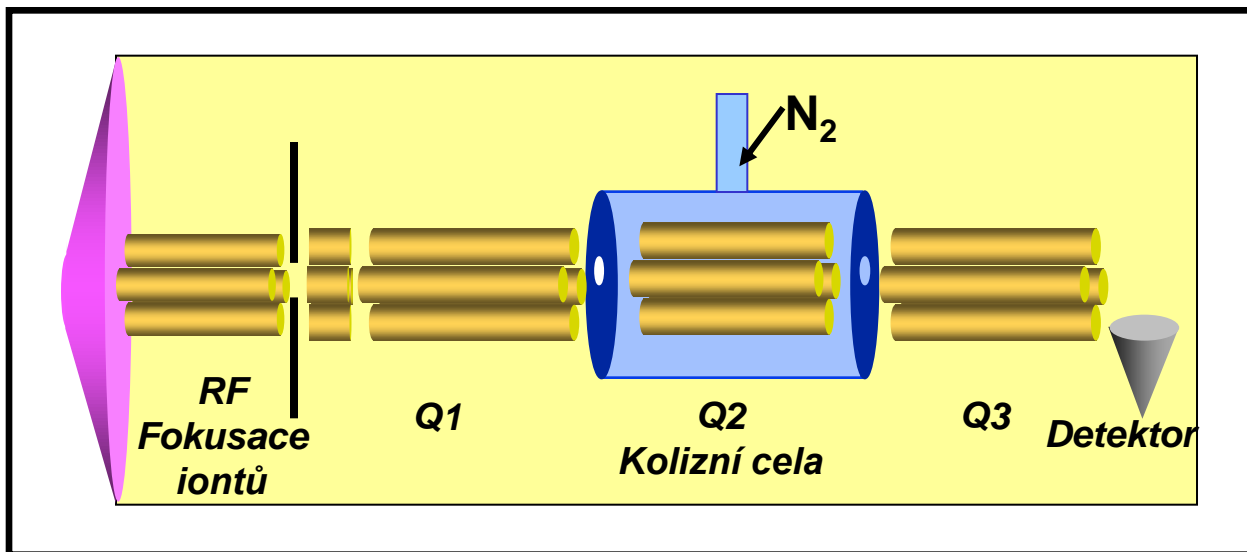
## y-ions<sup>+</sup>

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

# Přehled aminokyselin v číslech

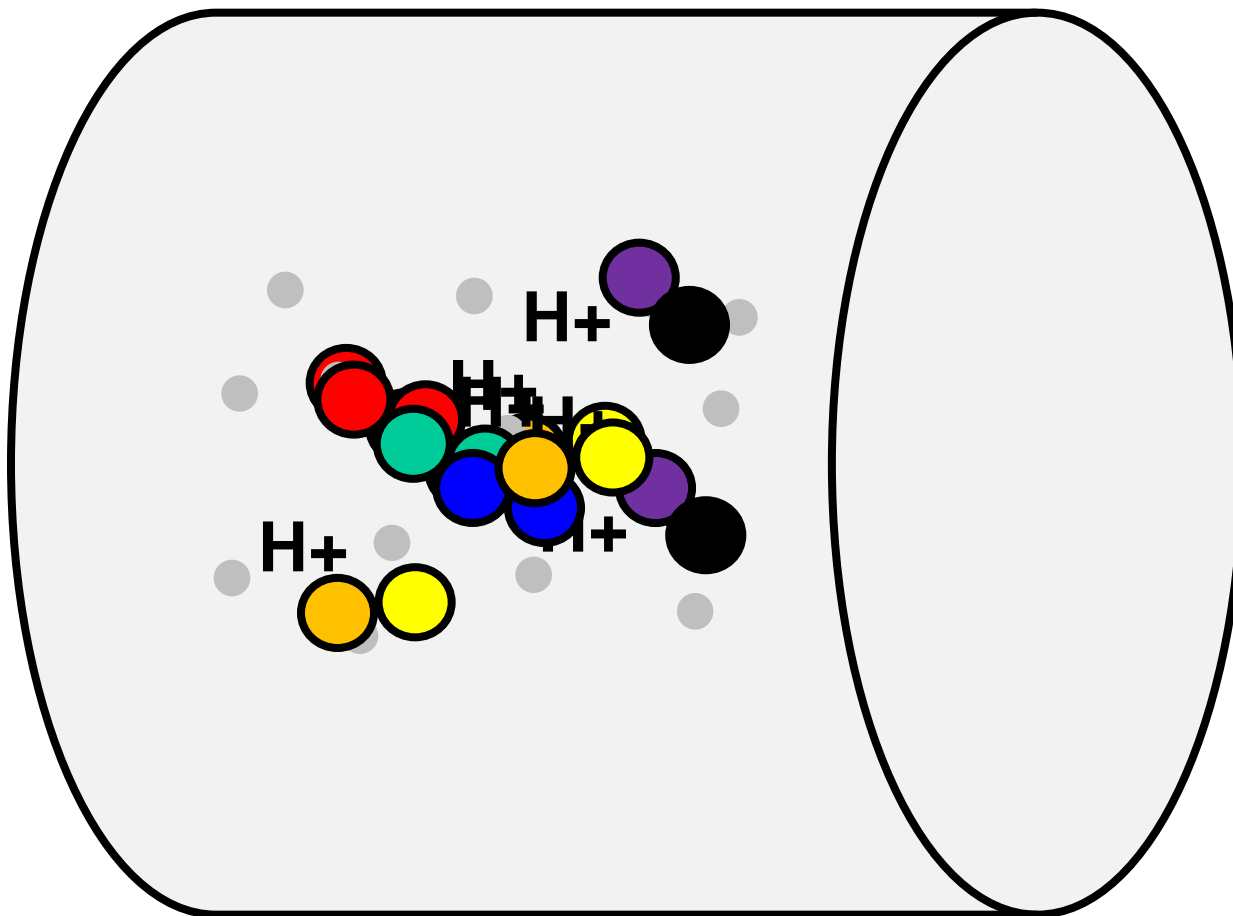
<b>AK</b>		<b>Hmotnost</b>	<b>Boční řetězec</b>	<b>Immoniové ionty</b>
<b>G</b>	<b>Gly</b>	<b>57.02</b>	<b>1</b>	<b>30</b>
<b>A</b>	<b>Ala</b>	<b>71.08</b>	<b>15</b>	<b>44</b>
<b>S</b>	<b>Ser</b>	<b>87.03</b>	<b>31</b>	<b>60</b>
<b>P</b>	<b>Pro</b>	<b>97.05</b>	<b>41</b>	<b>70</b>
<b>V</b>	<b>Val</b>	<b>99.07</b>	<b>43</b>	<b>72</b>
<b>T</b>	<b>Thr</b>	<b>101.05</b>	<b>45</b>	<b>74</b>
<b>C</b>	<b>Cys</b>	<b>103.01</b>	<b>47</b>	<b>76</b>
<b>L</b>	<b>Leu</b>	<b>113.08</b>	<b>57</b>	<b>86(72)</b>
<b>I</b>	<b>Ile</b>	<b>113.08</b>	<b>57</b>	<b>86(72)</b>
<b>N</b>	<b>Asn</b>	<b>114.04</b>	<b>58</b>	<b>87(70)</b>
<b>D</b>	<b>Asp</b>	<b>115.03</b>	<b>59</b>	<b>88</b>
<b>Q</b>	<b>Gln</b>	<b>128.06</b>	<b>72</b>	<b>101(84, 129)</b>
<b>K</b>	<b>Lys</b>	<b>128.09</b>	<b>72</b>	<b>101(129, 112, 84, 70)</b>
<b>E</b>	<b>Glu</b>	<b>129.04</b>	<b>73</b>	<b>102</b>
<b>M</b>	<b>Met</b>	<b>131.04</b>	<b>75</b>	<b>104(61)</b>
<b>H</b>	<b>His</b>	<b>137.06</b>	<b>81</b>	<b>110(166, 138, 123, 121, 82)</b>
<b>F</b>	<b>Phe</b>	<b>147.07</b>	<b>91</b>	<b>120(91)</b>
<b>R</b>	<b>Arg</b>	<b>156.10</b>	<b>100</b>	<b>129(112, 100, 87, 73, 70, 59)</b>
<b>Y</b>	<b>Tyr</b>	<b>163.06</b>	<b>107</b>	<b>136</b>
<b>W</b>	<b>Trp</b>	<b>186.08</b>	<b>130</b>	<b>159</b>

# Trojnásobný kvadrupól – MS/MS v prostoru

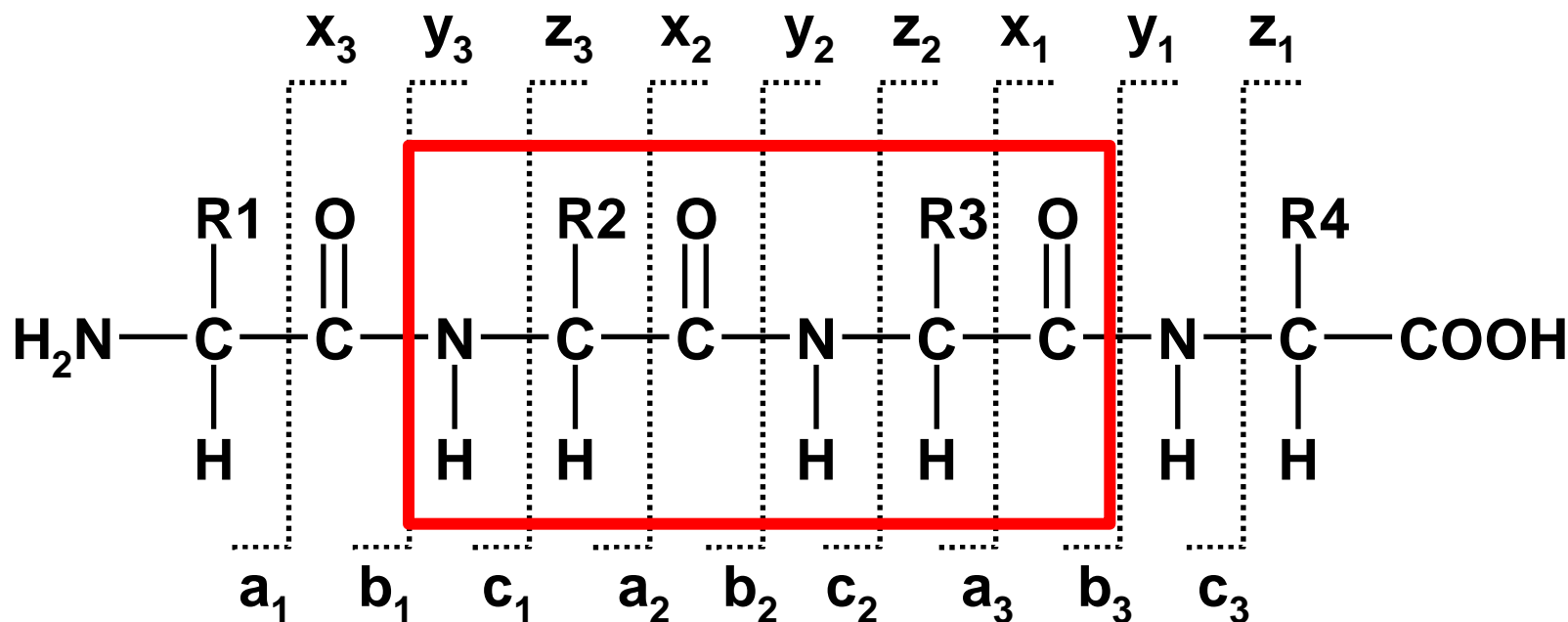




# Iontová past – MS<sup>n</sup> v čase



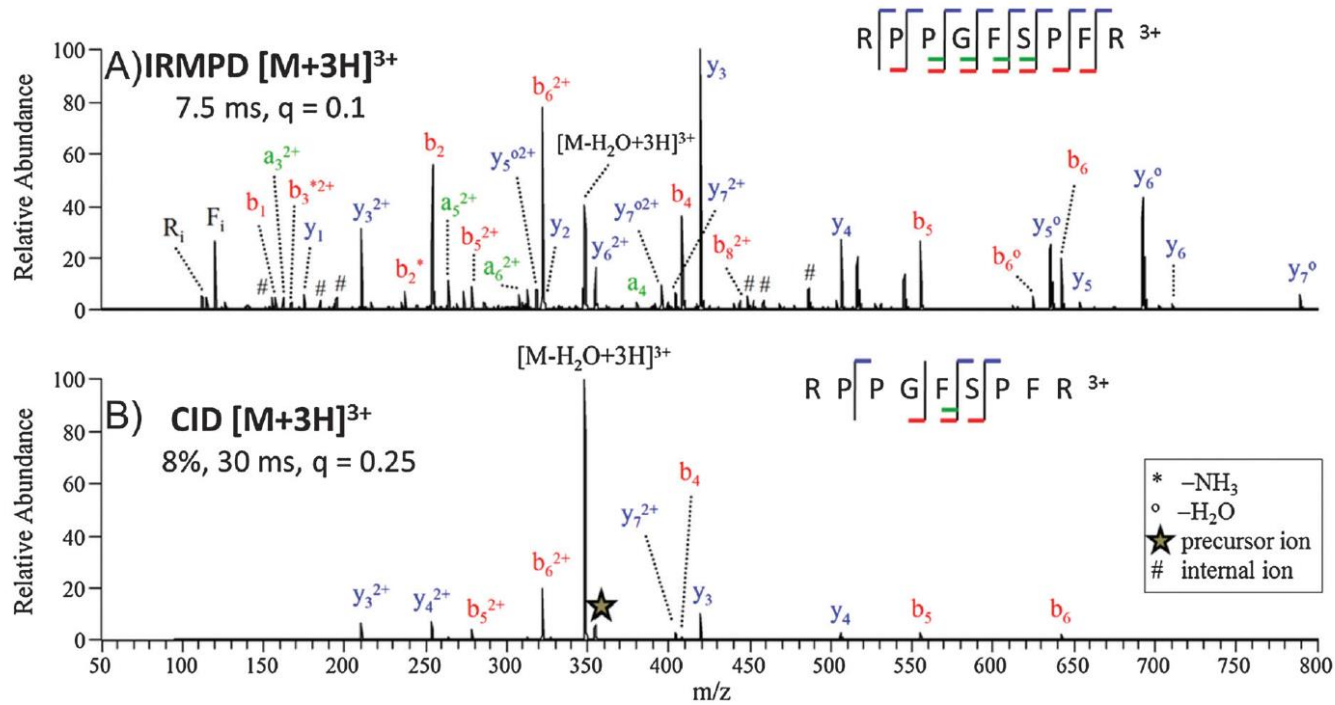
# Další typy fragmentací a fragmentových iontů



**Interní fragmenty (nemají N- ani C-konec)**

# Infrared Multiphoton Dissociation (IRMPD)

- CO<sub>2</sub> laserový paprsek
- Vibrační excitace funkčních skupin  
OH, COOH, NH<sub>2</sub>...
- Podobné CID - fragmentace peptidové páteře: *b*- a *y*-iontové série, ale extenzivnější fragmentace, přítomnost immoniových a *a*-iontů a fragmentů s nízkou *m/z*
- Lze jemně ladit energii laser a délku pulsu
- V případě FT-ICR výhoda oproti CID v ICR cele (není třeba napouštět kolizním plynem a tím narušovat vakuum)



# Electron Capture/Transfer Dissociation ECD/ETD(/EDD) = ExD

Záchyt elektronu ( $E \leq 0.1$  eV) - u peptidů preferenčně na S-S můstcích a vazbě N-C $_{\alpha}$

Neutralizace H<sup>+</sup>; [M+2H]<sup>+</sup> Vodíkem nabožený radikálový iont. Štěpení vazby N-C $_{\alpha}$

Vícenásobně nabitě prekurzorové ionty

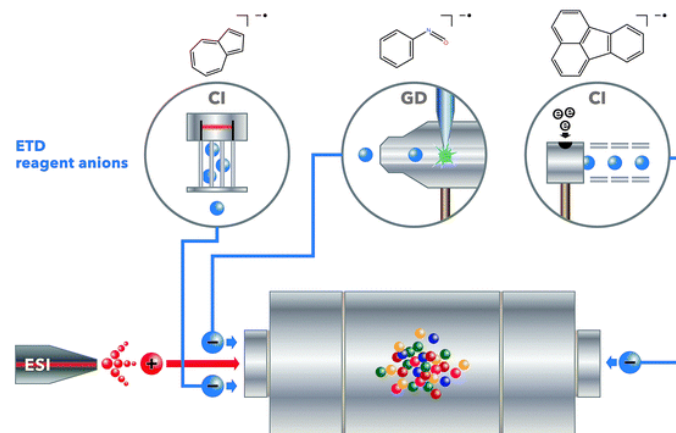
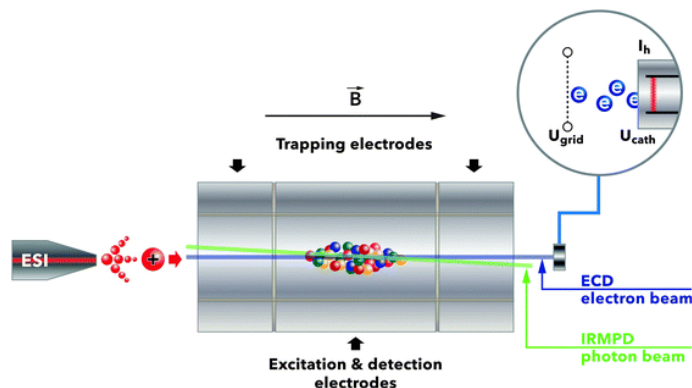
**c- a z-iontové série**

## Electron Transfer Dissociation (ETD)

ECD těžko aplikovatelné na analyzátoři s Rf polem (pasti, kvadrupóly)

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

Vznik iontů c a z



# UltraViolet PhotoDissociation (UVPD)

UV lasery – Nd:YAG a excimer ArF, KrF,..

vlnové délky: 157nm, 193nm (peptidová vazba), 213nm, 266nm,...

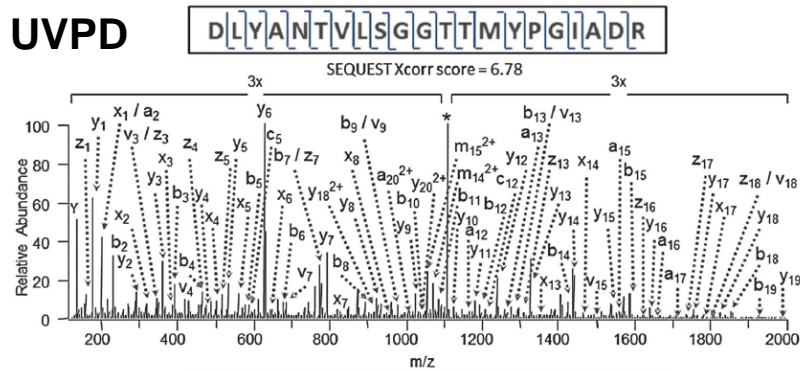
vlnové délky blízke 280nm – fragmentace u aromatických AK

obecně velmi rychlá fragmentace v řádu psec

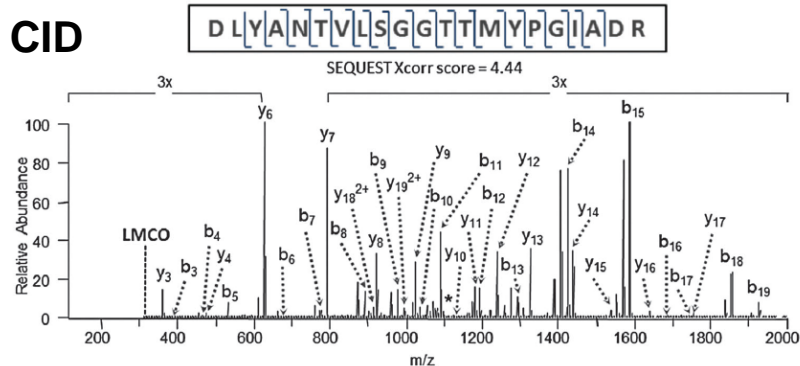
Výsledek podobný ExD, ale nedochází k redukci náboje – aplikovatelné i na 1+

a/x, c/z, ale i b/y ionty a také fragmentace bočních řetězců

UVPD

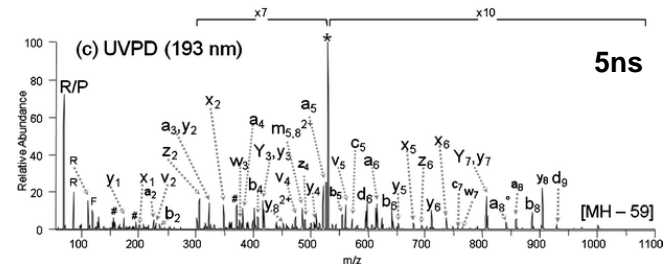
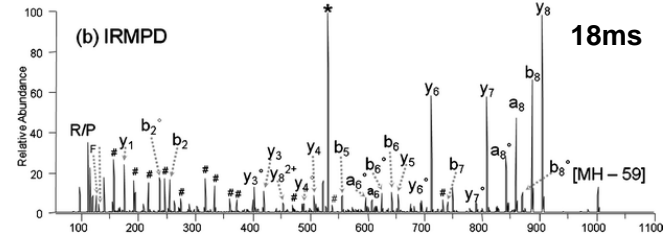
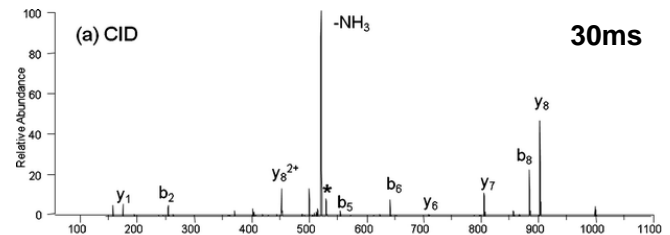


CID



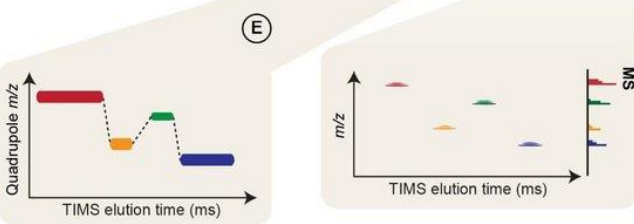
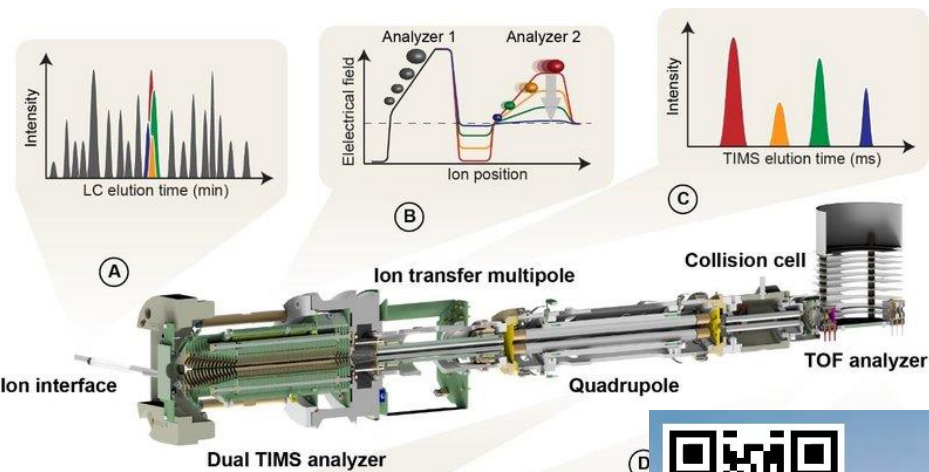
RPPGFSPFR

(m/z 530.7)



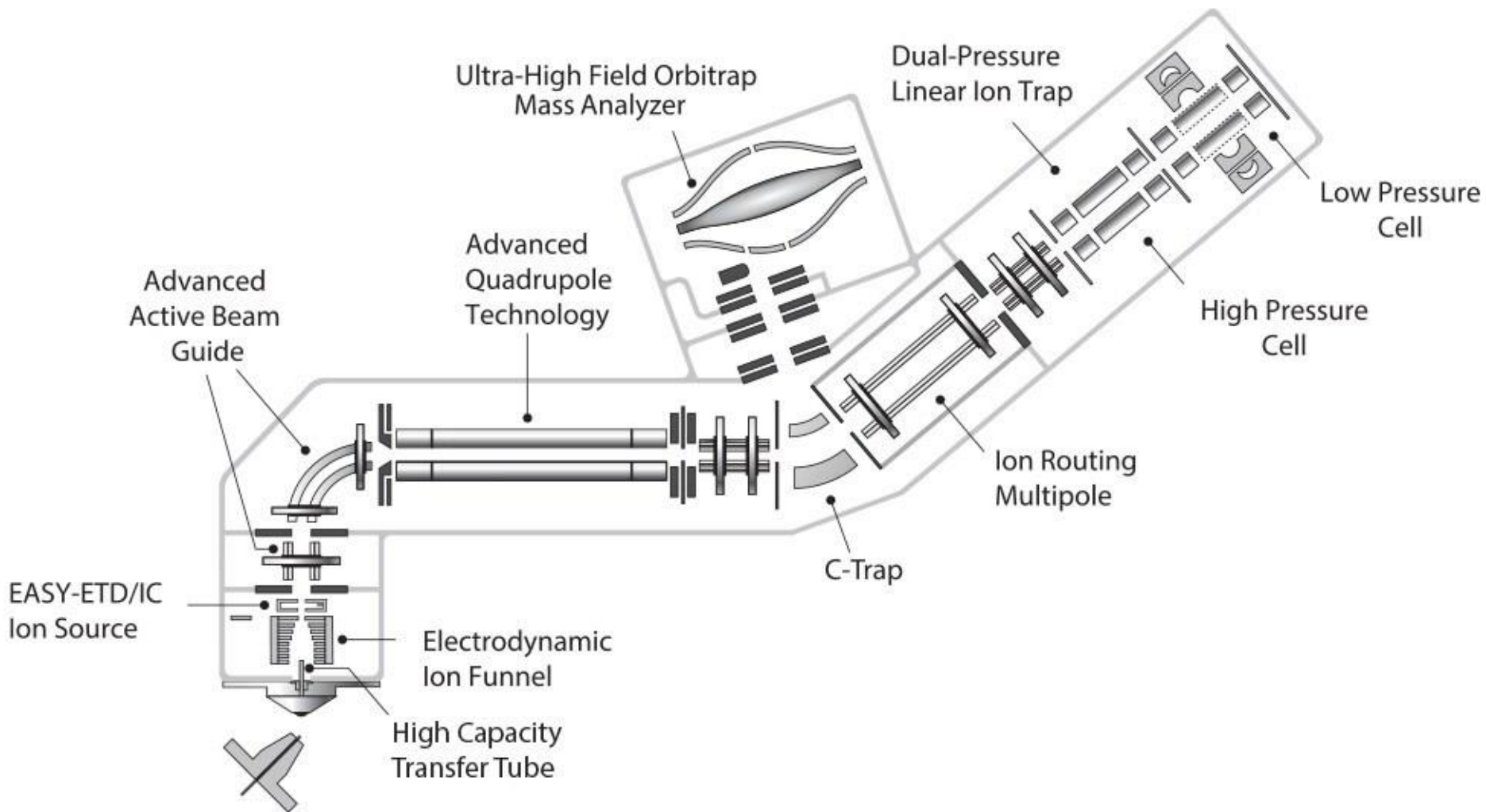
# timsTOF

120Hz -> 300Hz

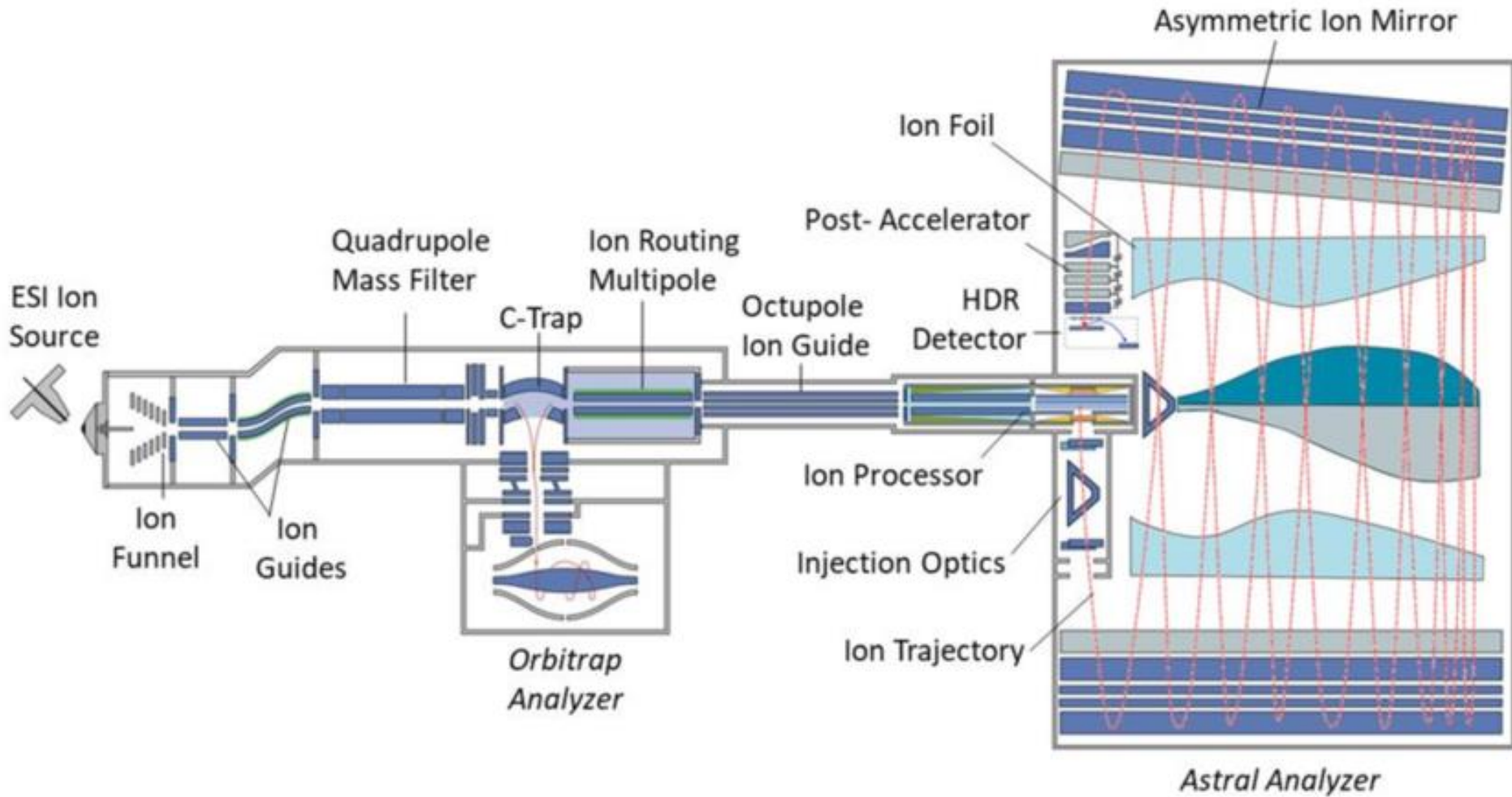


Ionová mobilita (2x tims) + qTOF  
Akumulace (tims1), separace (tims2), (fragmentace q), analýza TOF

# Orbitrap – iontové pasti



# Orbitrap ASTRAL



Sběr dat – 200Hz (200 spekter/s)