

Hmotnostní spektrometrie....

...co to umí?

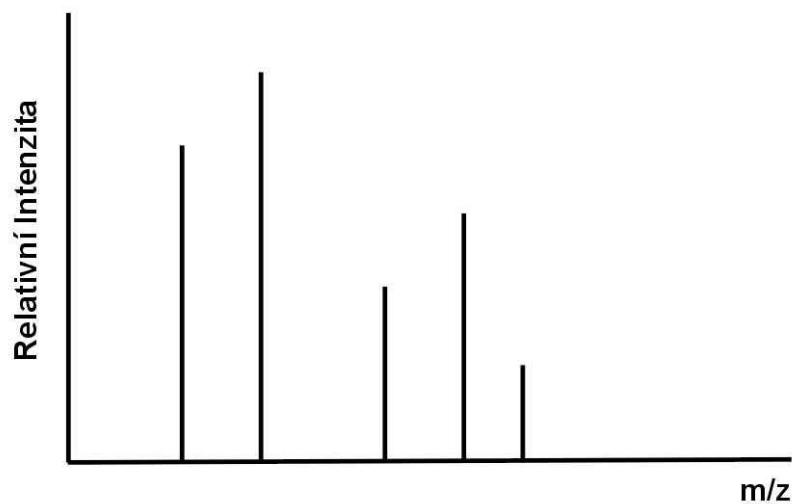
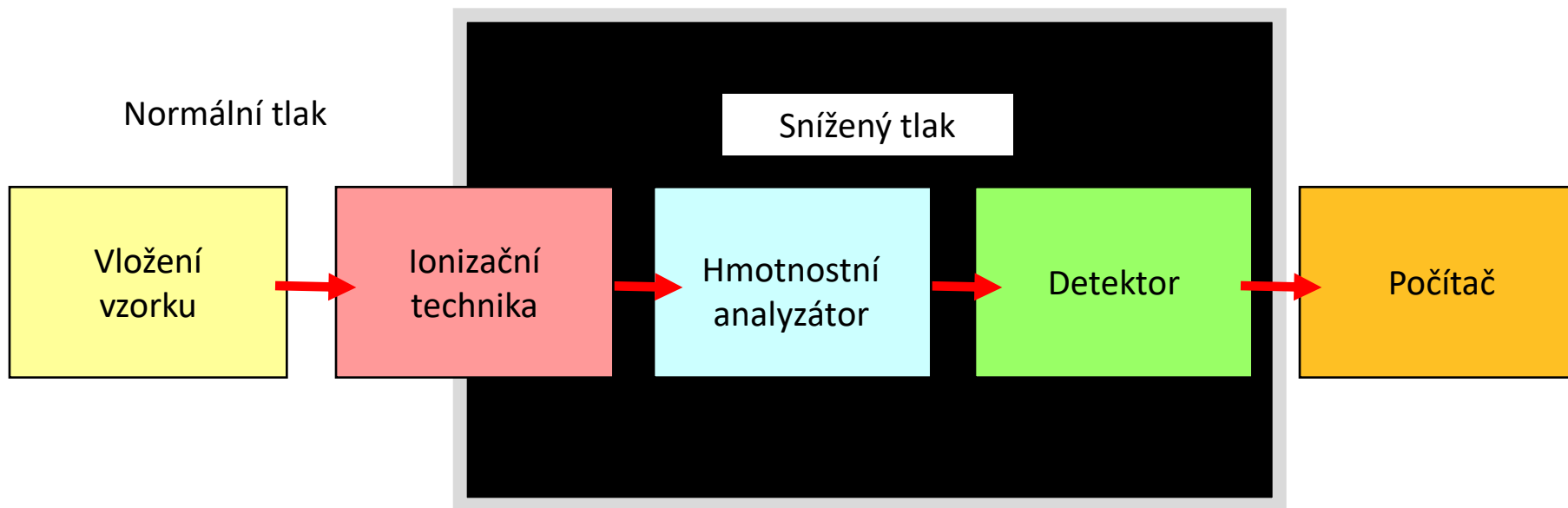
Měřit přesnou molekulovou hmotnost

Určovat izotopové zastoupení

Napomáhat určení struktury

Provádět kvantitativní měření

Hmotnostní spektrometr

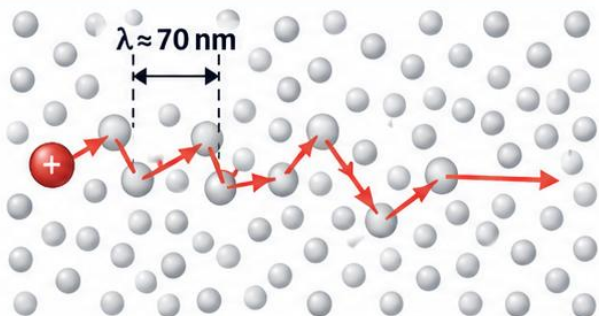


Proč potřebujeme vakuum?

Atmosférický tlak

1000 mbar (10^0 mbar)

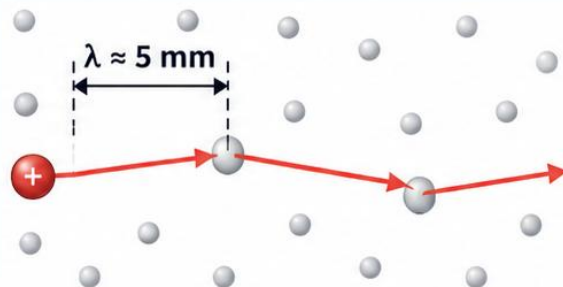
$\lambda \approx 70$ nm



Nižší vakuum

10^{-2} mbar

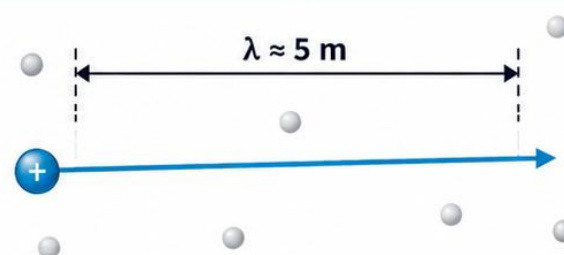
$\lambda \approx 5$ mm



Vysoké vakuum (MS)

10^{-5} mbar

$\lambda \approx 5$ m

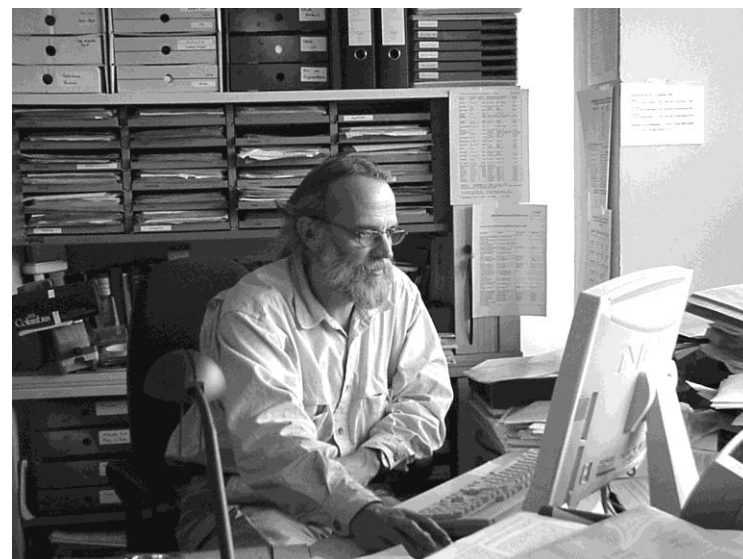


Ionizační techniky

- Převod analytu do plynné fáze a tvorba iontů
- Ionty – manipulace elektrickými a magnetickými poli; separace a detekce podle $m/z = MS$ měří poměr hmotnosti a náboje (m/z), nikoliv přímo hmotnost
- Pozitivní vs. negativní iontový mód - pozitivní: přijetí protonu $[M+H]^+$, negativní: odštěpení protonu $[M-H]^-$, vícenásobné nabití $[M+nH]^{n+}$
- Měkké ionizační techniky: ESI (Electrospray Ionization) a MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)

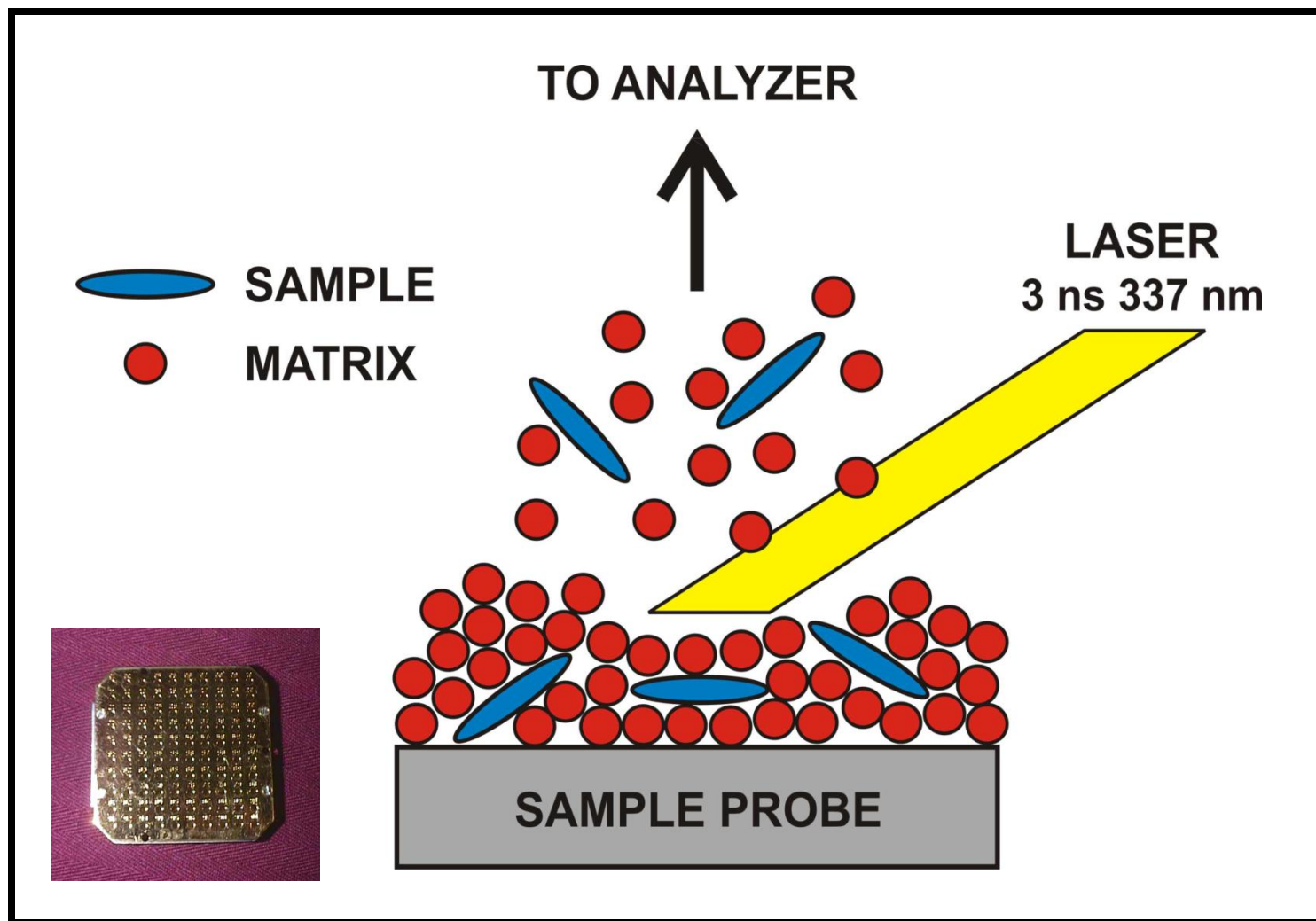
Desorpce laserem za přítomnosti matrice

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.

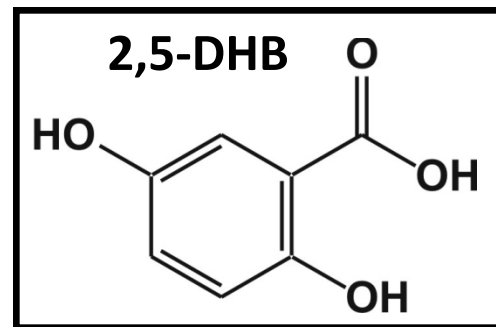
MALDI Ionizační proces



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

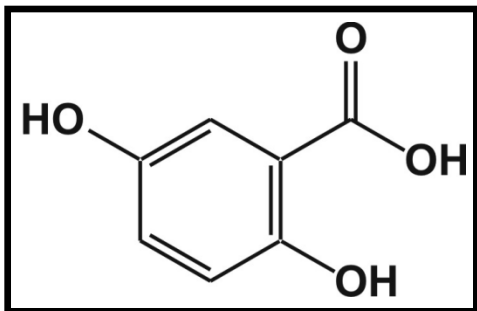
193 nm ArF

IR-MALDI

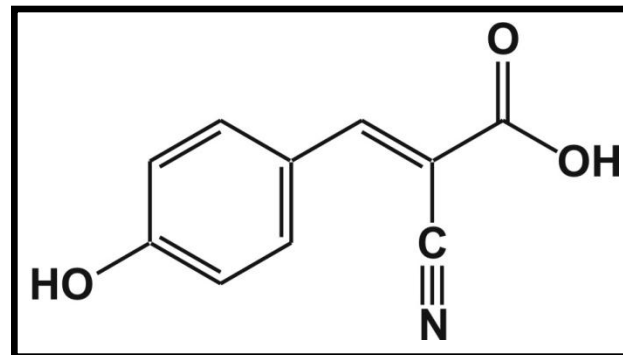
2.94 μ m Er:YAG laser

10.6 μ m CO₂ laser

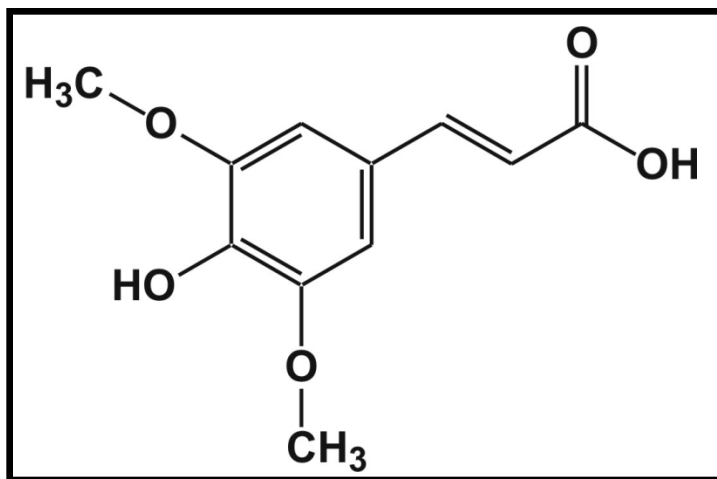
MALDI matrice



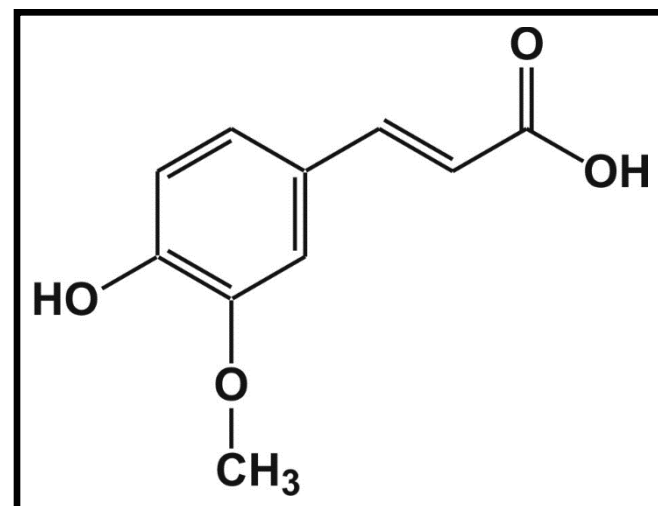
kys. 2,5-dihydroxybenzoová (DHB)



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



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



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

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; $t \sim \text{ns}$
- Nejčastěji spojeno s TOF analyzátozem

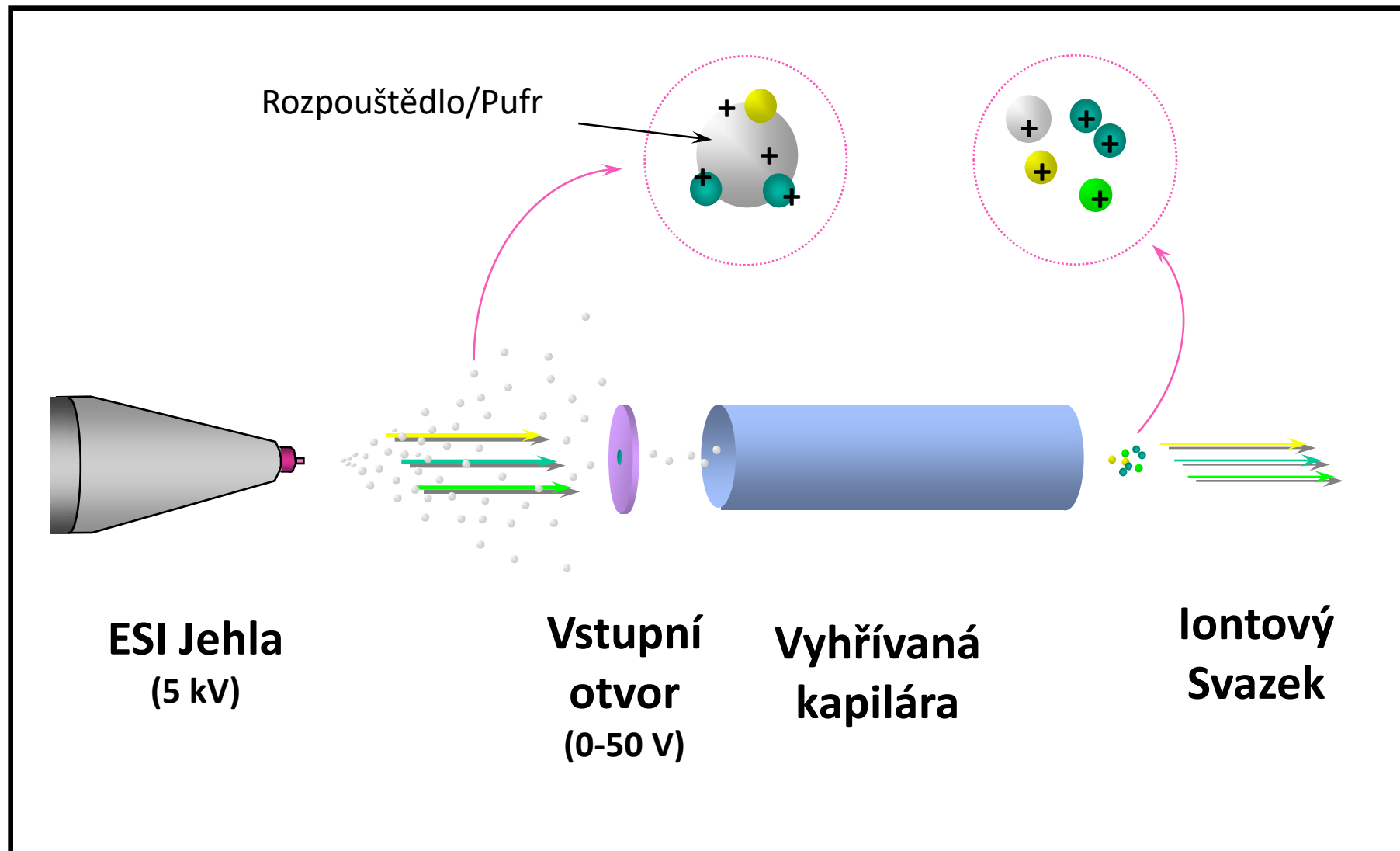
Elektrosprej – J. B. Fenn



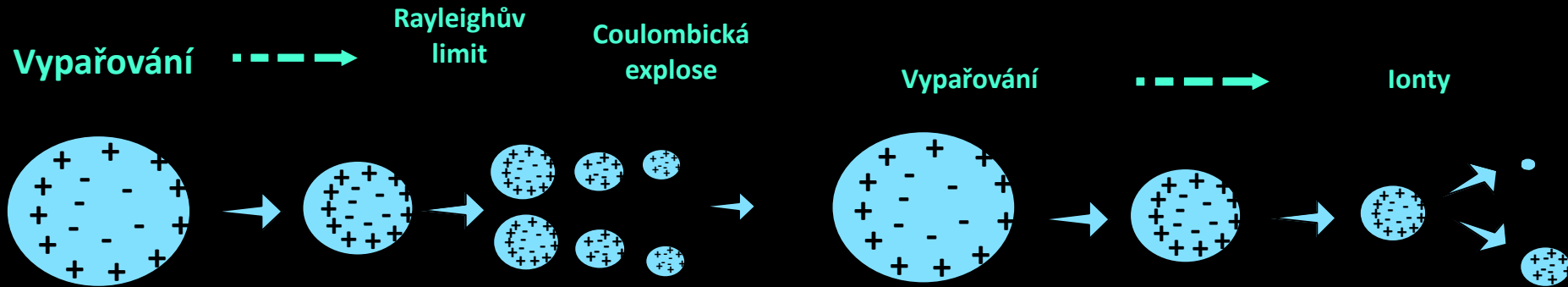
1994 – nanoelektrosprej –
M. Mann a M. Wilm

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

Ionizace elektrospejem



Princip ionizace elektrospřejem



<http://www.youtube.com/watch?v=palklu1-ChA>

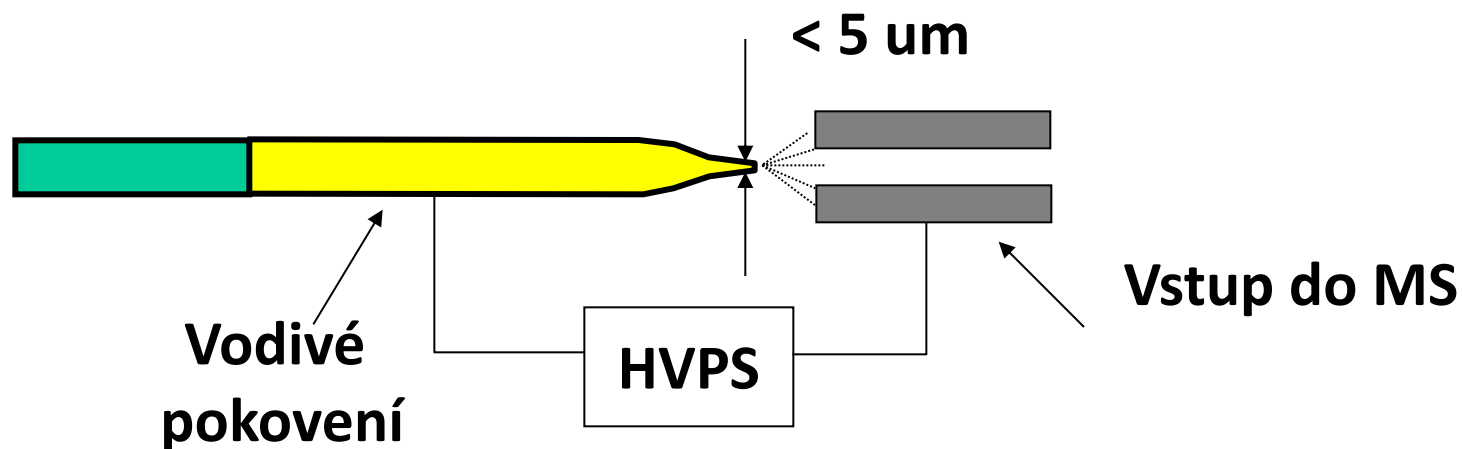


<http://www.youtube.com/watch?v=YukX2s1kuYc>

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)

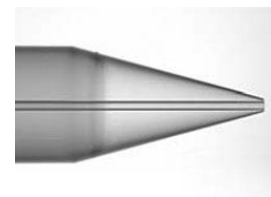
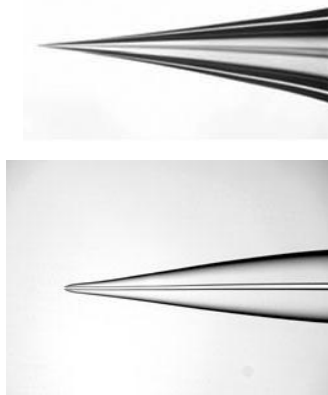
Velmi malé kapky < 200 nm

Průtoky v řádu 25 nl/min

Mnohem vyšší účinnost ionizace

Miniaturní spotřeby vzorku

Větší tolerance k solím



Analyzátory

statické - dynamické

Typ

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)

dobu letu

Cyklotronová rezonance (ICR)

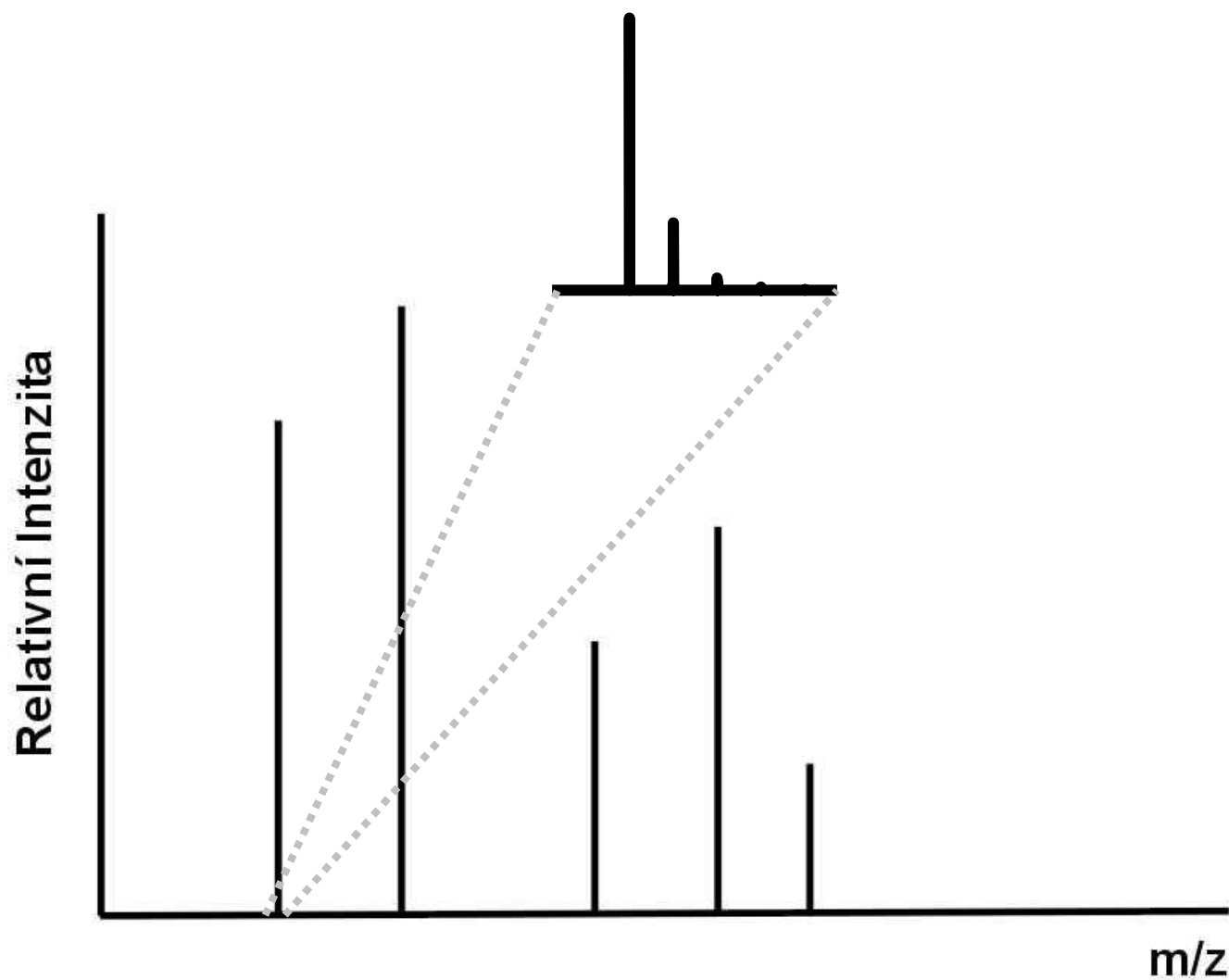
m/z rezonanční frekvence

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 _{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.

^{12}C
 ^1H
 ^{14}N
 ^{16}O
 ^{32}S

$2 \times ^{13}\text{C}$

$2 \times ^2\text{H}$

$2 \times ^{15}\text{N}$

$2 \times ^{17}\text{O}$

$2 \times ^{33}\text{S}$

$1 \times ^{34}\text{S}$

$1 \times ^{18}\text{O}$

$1 \times ^{13}\text{C} + 1 \times ^2\text{H}$

$1 \times ^{13}\text{C} + 1 \times ^{15}\text{N}$

$1 \times ^{13}\text{C} + 1 \times ^{17}\text{O}$

$1 \times ^{13}\text{C} + 1 \times ^{33}\text{S}$

$1 \times ^2\text{H} + 1 \times ^{15}\text{N}$

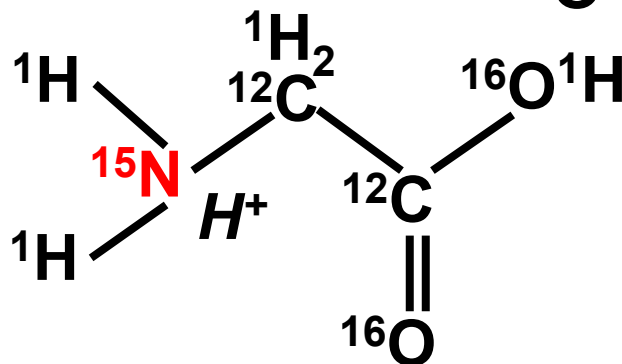
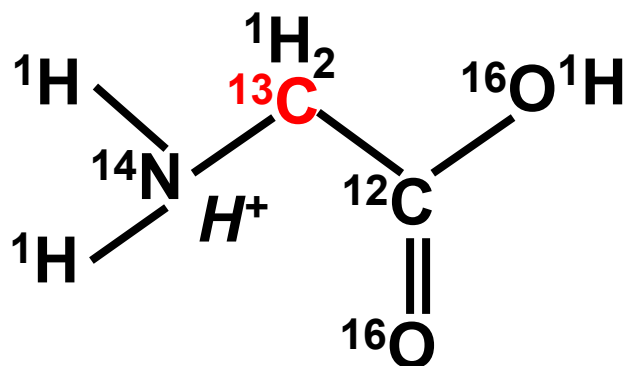
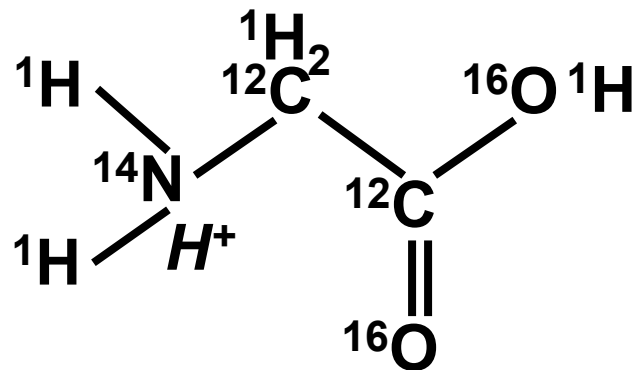
$1 \times ^2\text{H} + 1 \times ^{17}\text{O}$

$1 \times ^2\text{H} + 1 \times ^{33}\text{S}$

$1 \times ^{15}\text{N} + 1 \times ^{17}\text{O}$

$1 \times ^{15}\text{N} + 1 \times ^{33}\text{S}$

$1 \times ^{17}\text{O} + 1 \times ^{33}\text{S}$



Teoretická izotopová obálka peptidy s m/z 1000-4000 Da

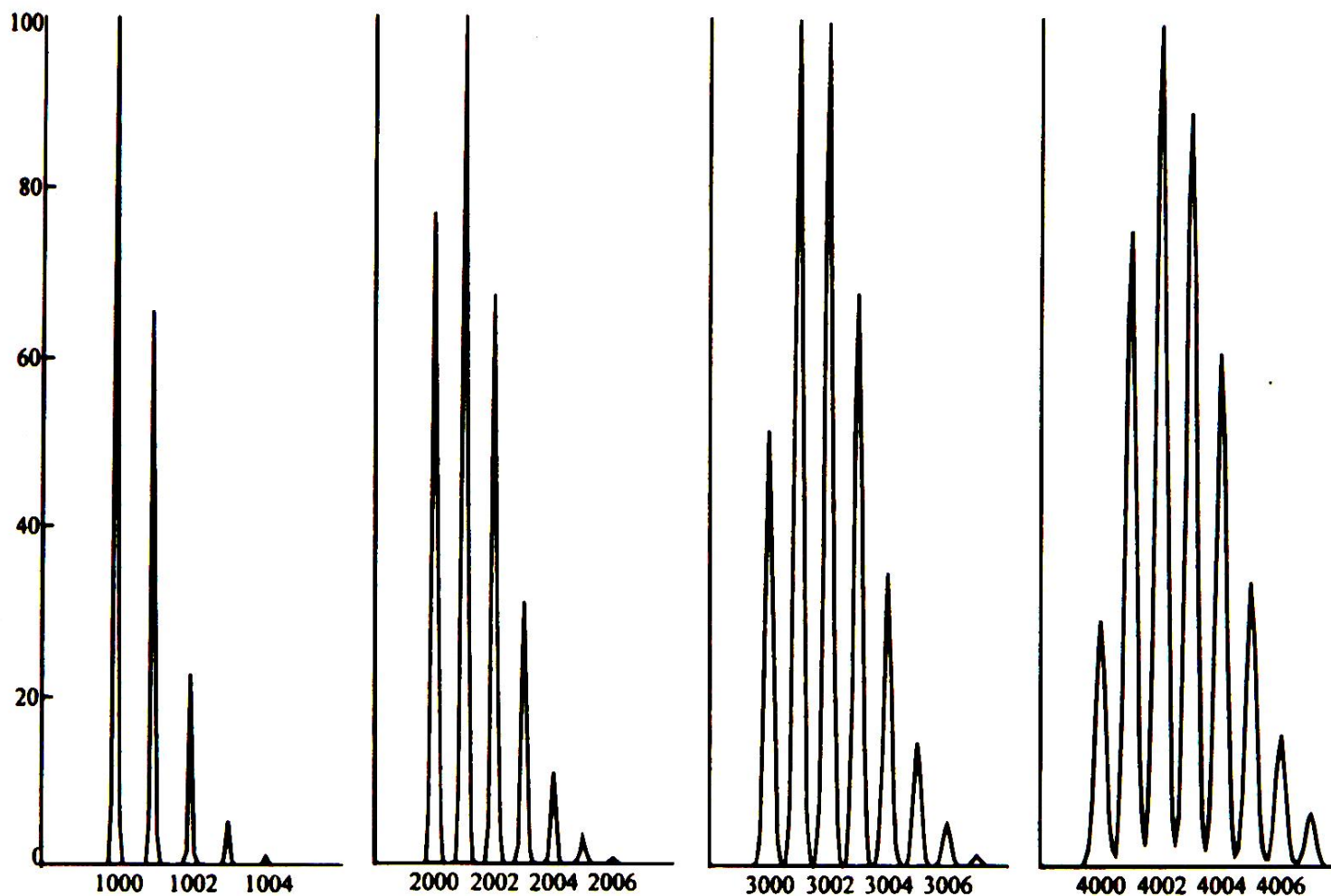


Figure 4. Theoretical isotope distributions of peptides of 1000, 2000, 3000 and 4000 Da.

Atomové hmotnosti

Monoizotopická a průměrná...

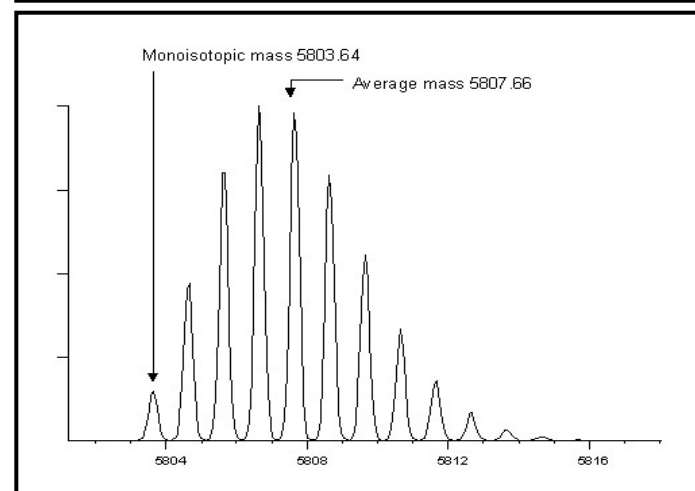
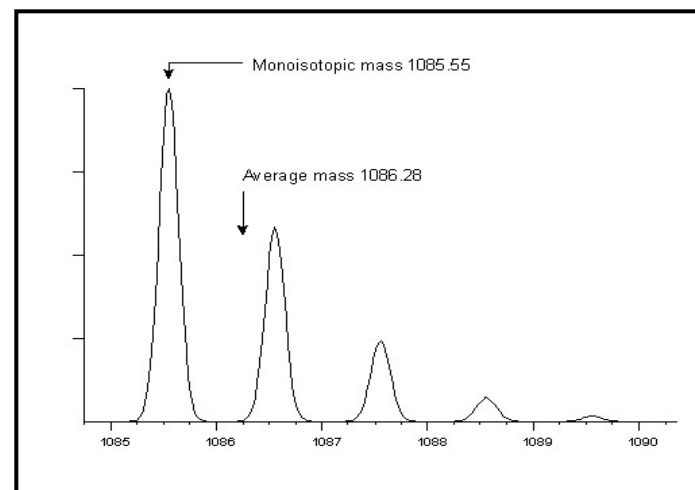
C 12.000 12.011

H 1.0078 1.008

N 14.003 14.007

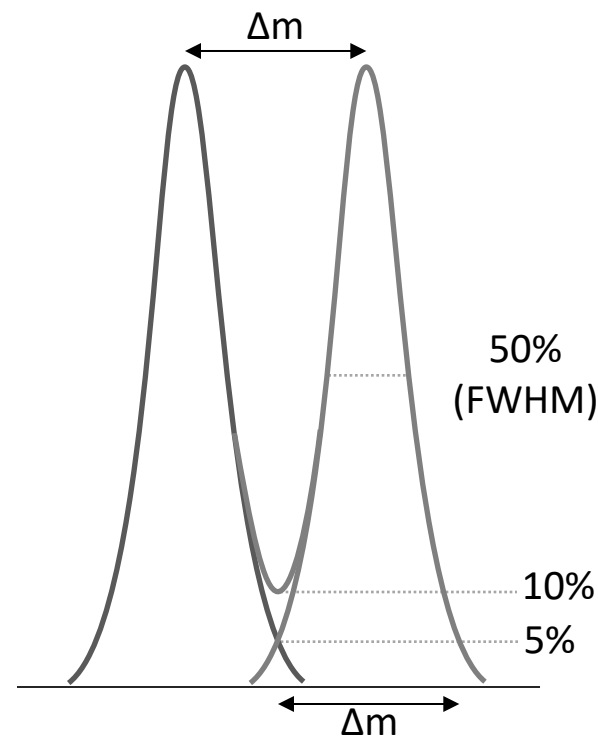
O 15.995 15.999

P 30.974 30.974



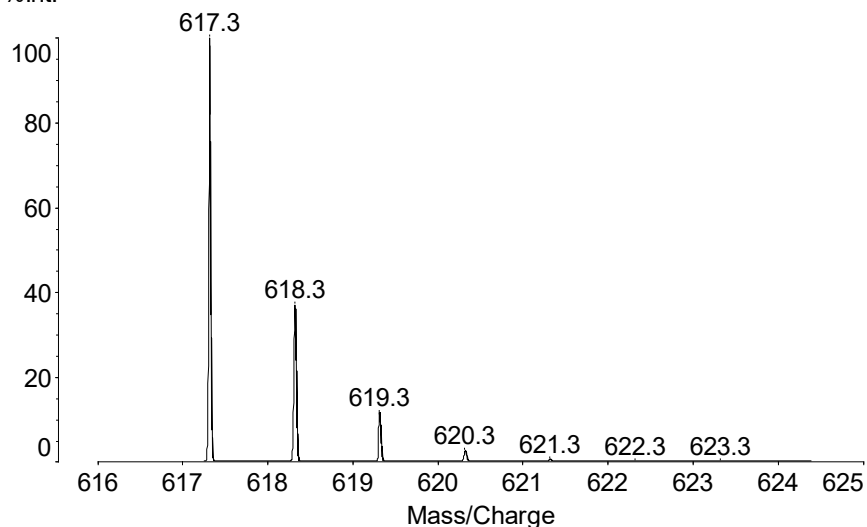
Rozlišení

- 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

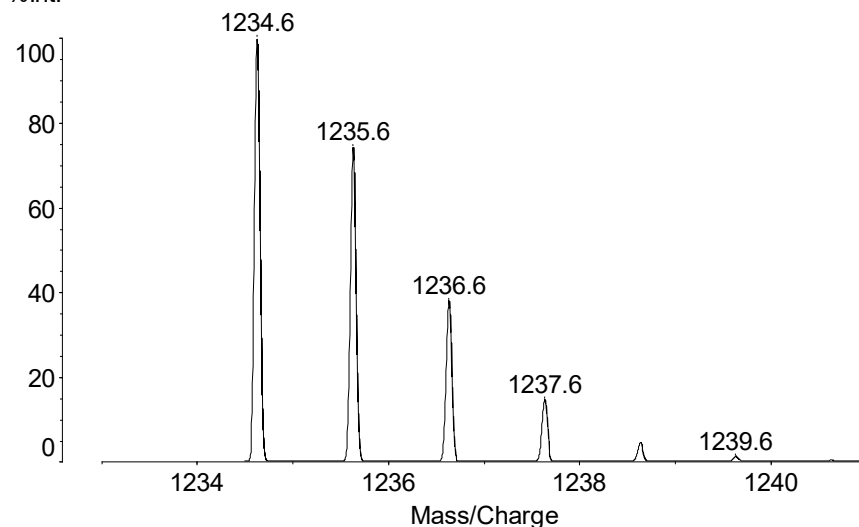


FWHM = Full Width at Half Maximum

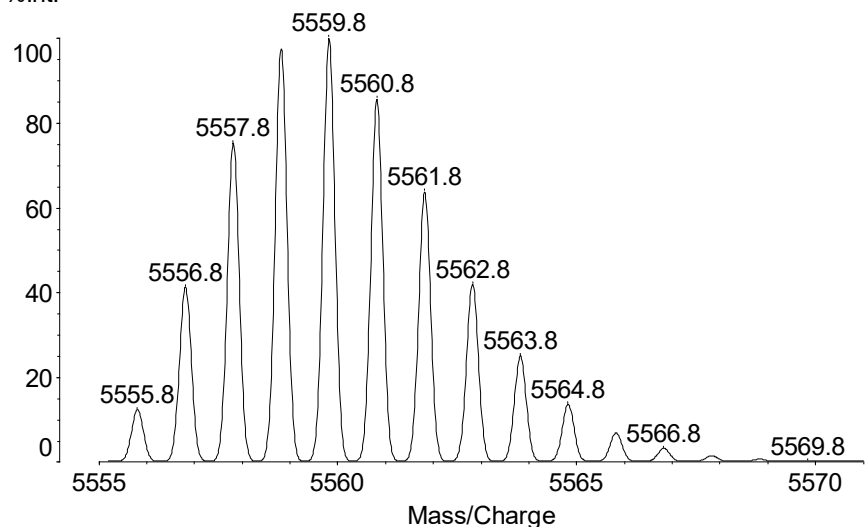
Molecular formula: C₃₀H₄₅N₆O₆S Resolution: 20000 at 50%
%Int.



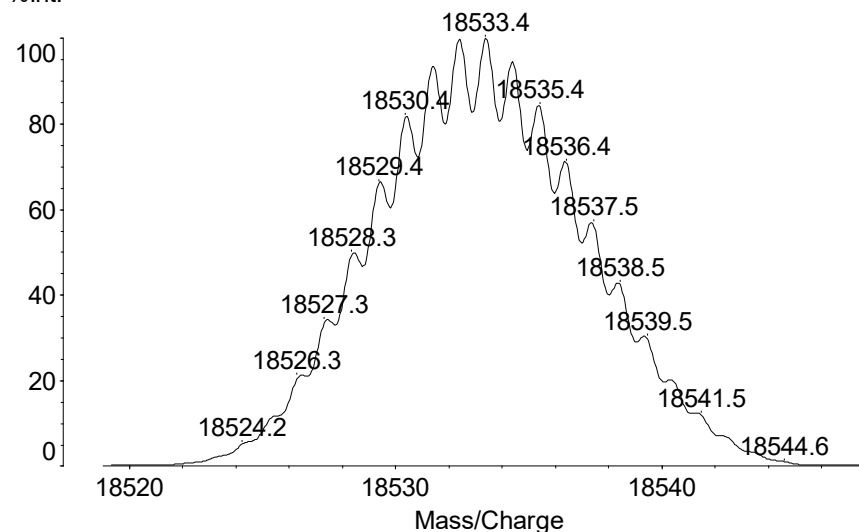
Molecular formula: C₆₀H₉₀N₁₂O₁₂S₂ Resolution: 20000 at 50%
%Int.



Molecular formula: C₂₇₀H₄₀₅N₅₄O₅₄S₉ Resolution: 20000 at 50%
%Int.

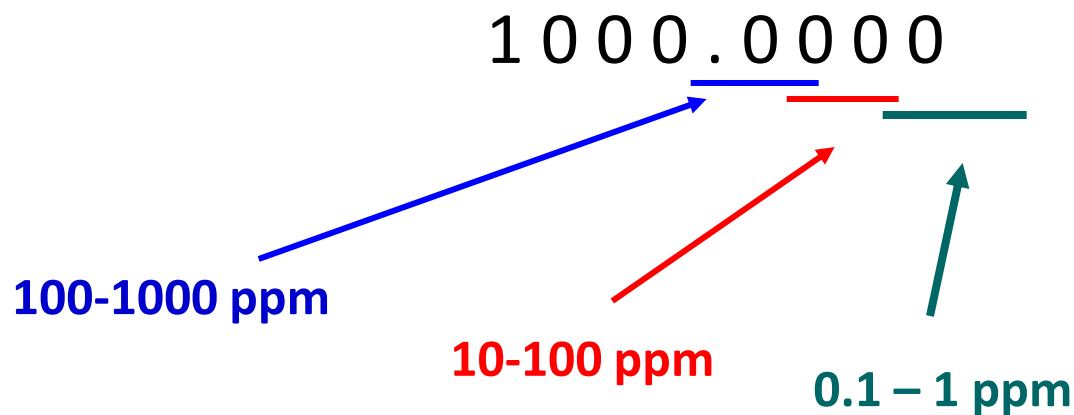


Molecular formula: C₉₀₀H₁₃₅₀N₁₈₀O₁₈₀S₃₀ Resolution: 20000 at 50%
%Int.

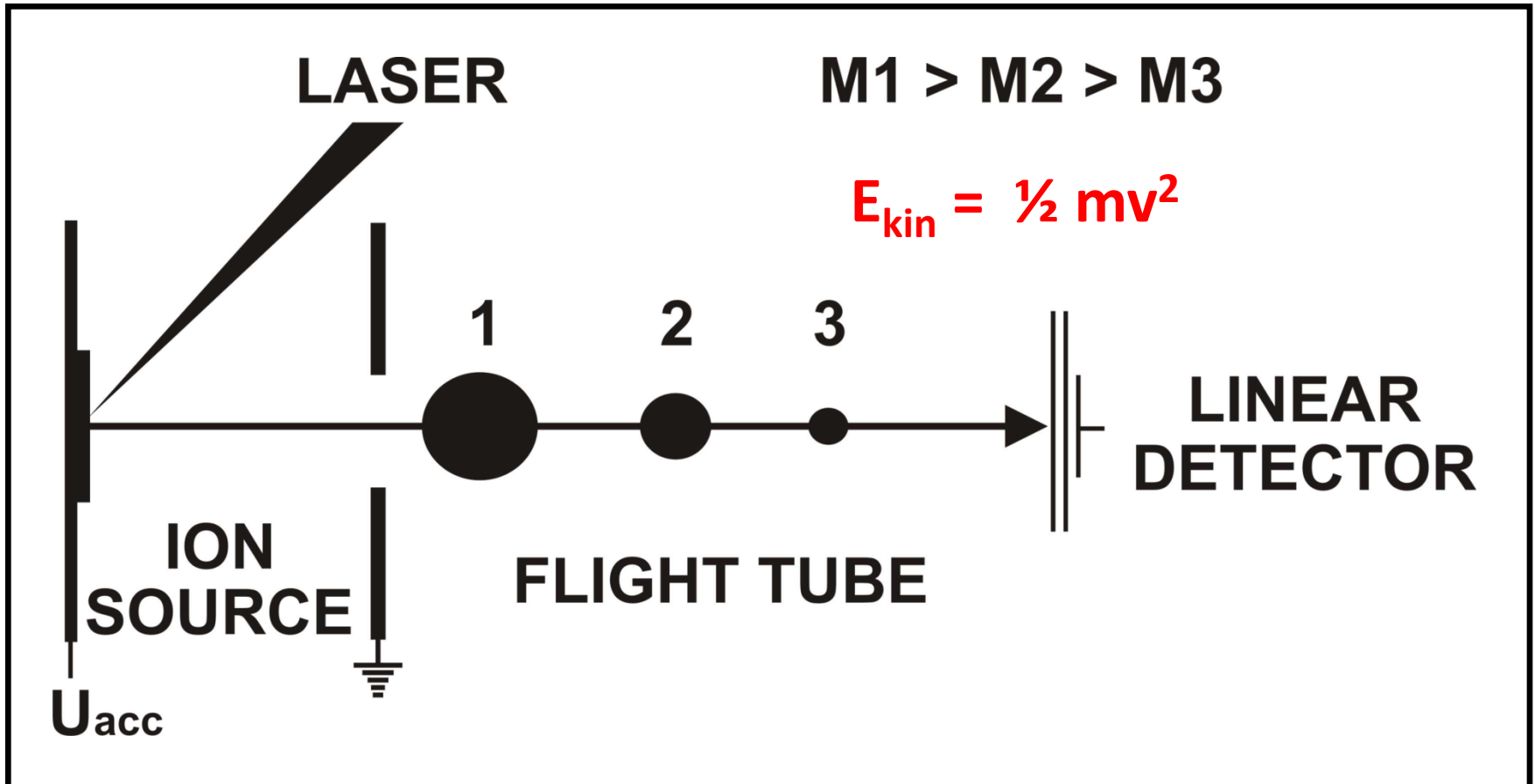


Chyba měření

- 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
- %

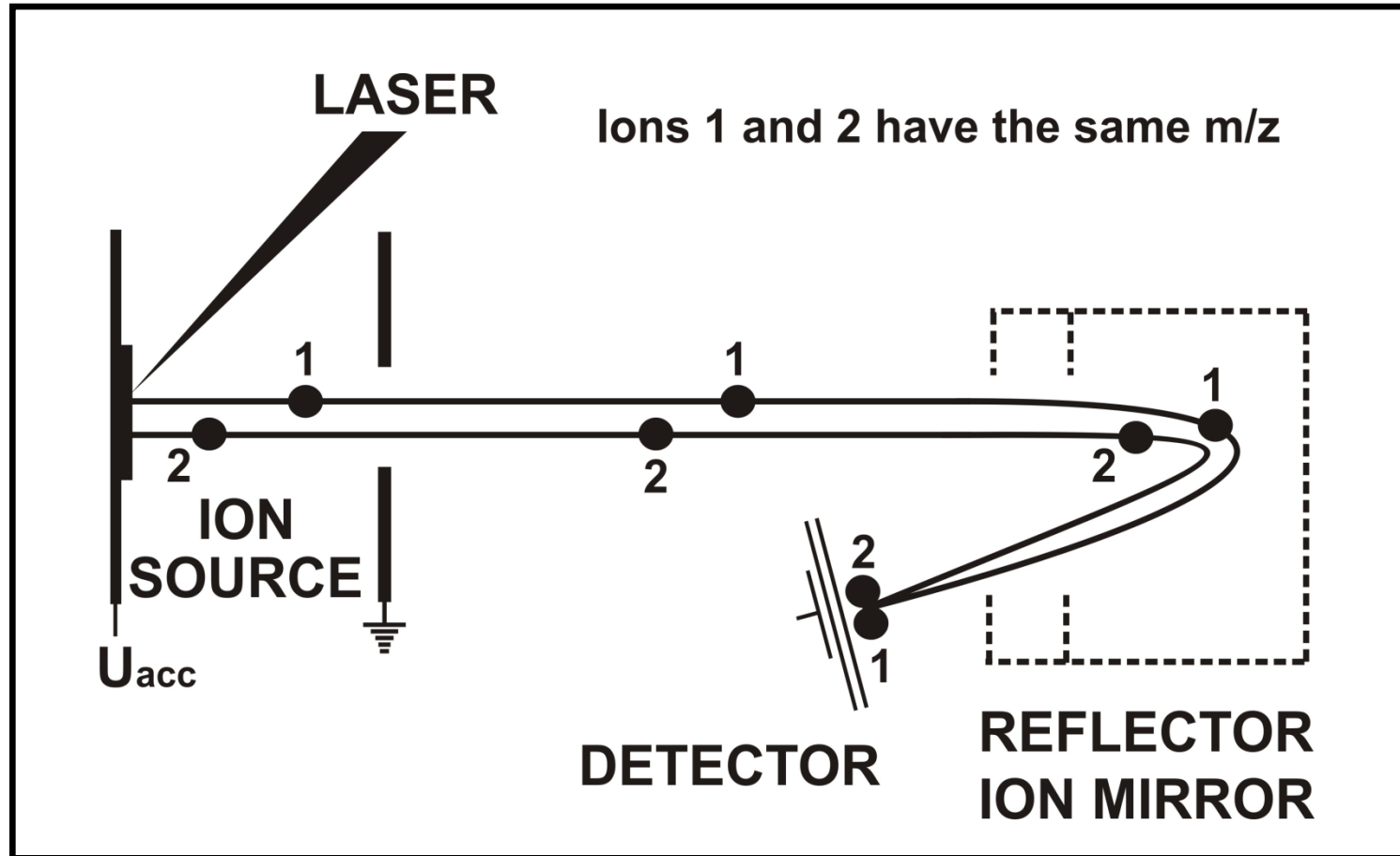


Time Of Flight (TOF) Analyzátor



Time Of Flight (TOF) - reflekttron

R 10^4
1ppm

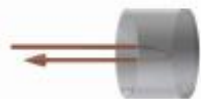


Time Of Flight (TOF) - design

(a) Linear TOF-MS



(b) Reflector-TOF-MS



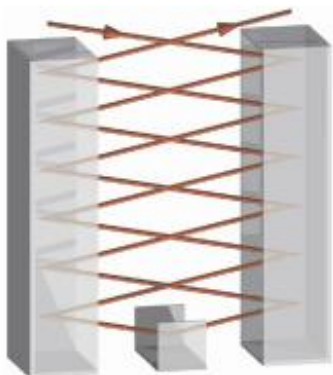
(c) Multiple-Reflection TOF-MS (closed Path)



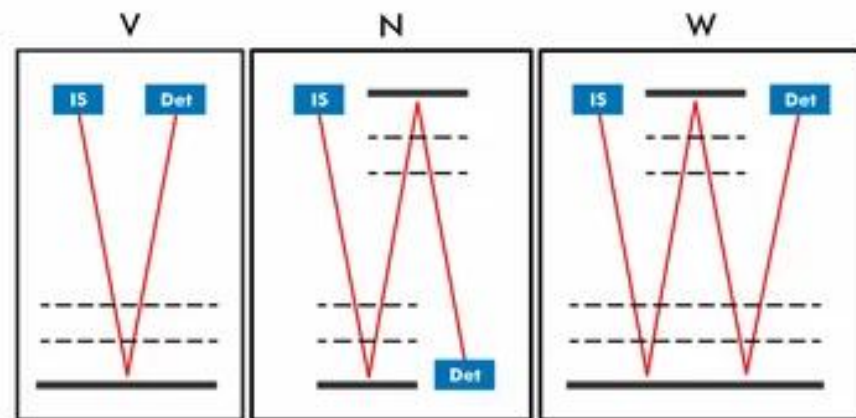
(d) Multiple-Turn TOF-MS (closed path)



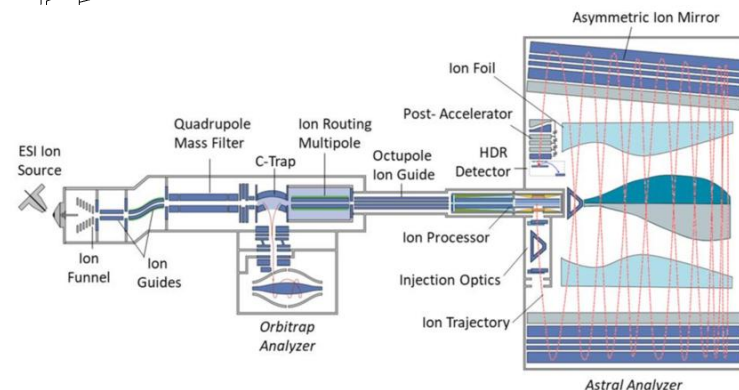
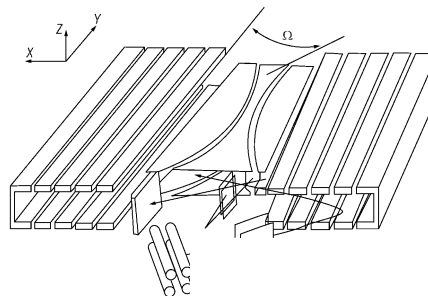
(e) Multiple-Reflection TOF-MS (open Path)



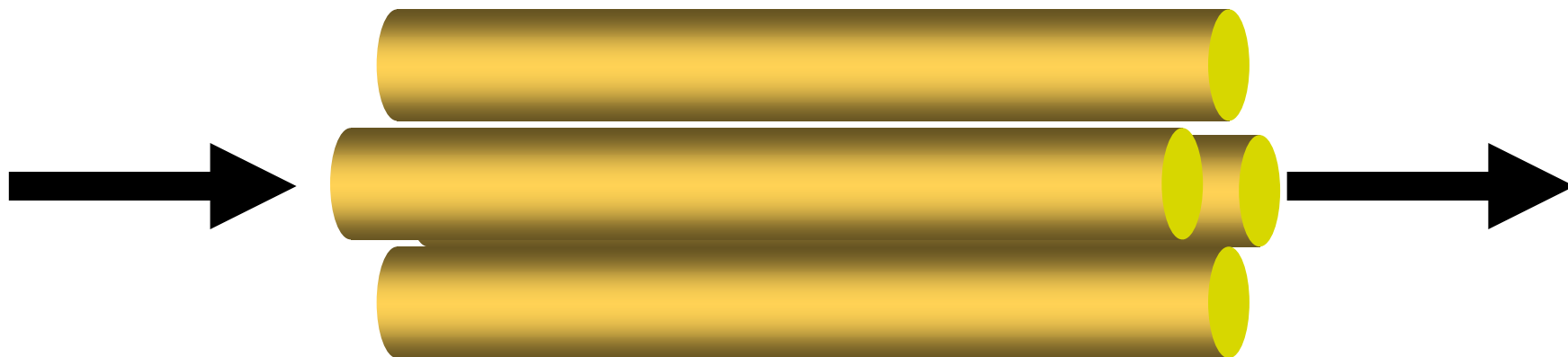
(f) Multiple-Turn TOF-MS (open path)



mrTOF ASTRAL (Thermo)



Kvadrupólový analyzátor

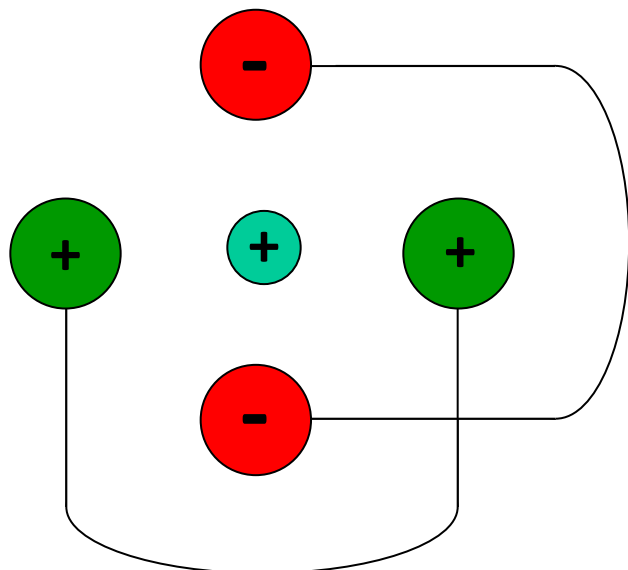


Čtyři paralelní elektrody (tyče) – máme ale i hexapól, oktapól

Protilehlé tyče mají stejný potenciál, sousední dvojice opačný

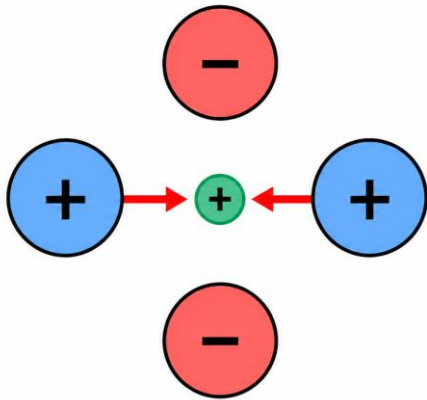
Kombinace stejnosměrného (DC) a vysokofrekvenčního střídavého (RF) napětí

Stabilita trajektorie iontů závisí na jejich m/z



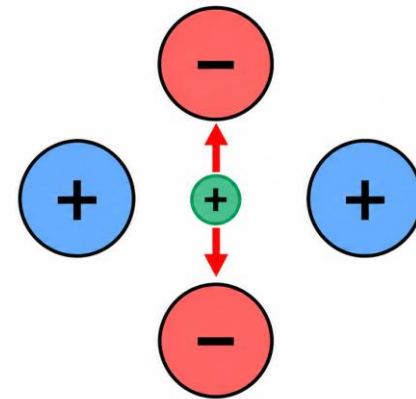
Kvadrupólový analyzátor

Vliv stejnosměrného napětí DC (zde pro kladné ionty)



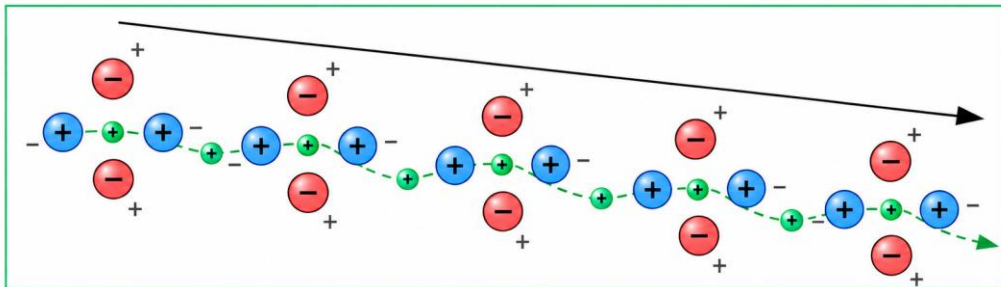
Stabilizace

Destabilizace



Kvadrupólový analyzátor

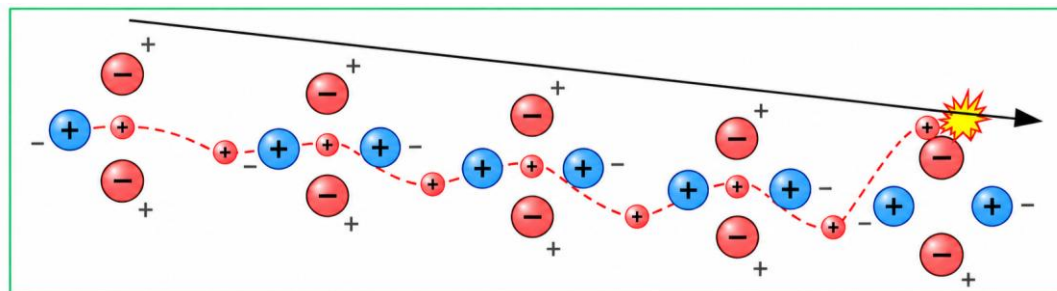
Vliv RF složky – pohyb iontů kvadrupólem



$R \cdot 10^3$
100ppm

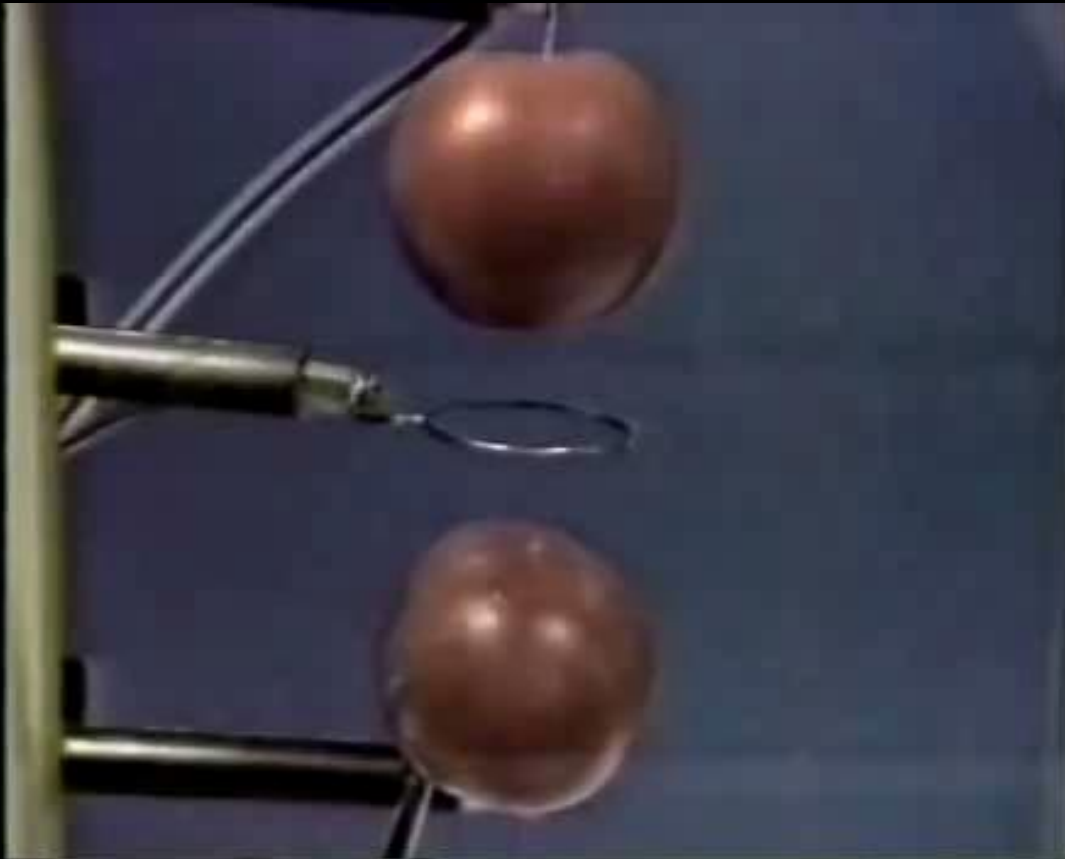
Střídání polarity elektrod - ionty jsou střídavě přitahovány a odpuzovány

Při vhodné frekvenci a amplitudě RF je pohyb iontu stabilní
Iont osciluje kolem osy kvadrupólu a prochází analyzátozem

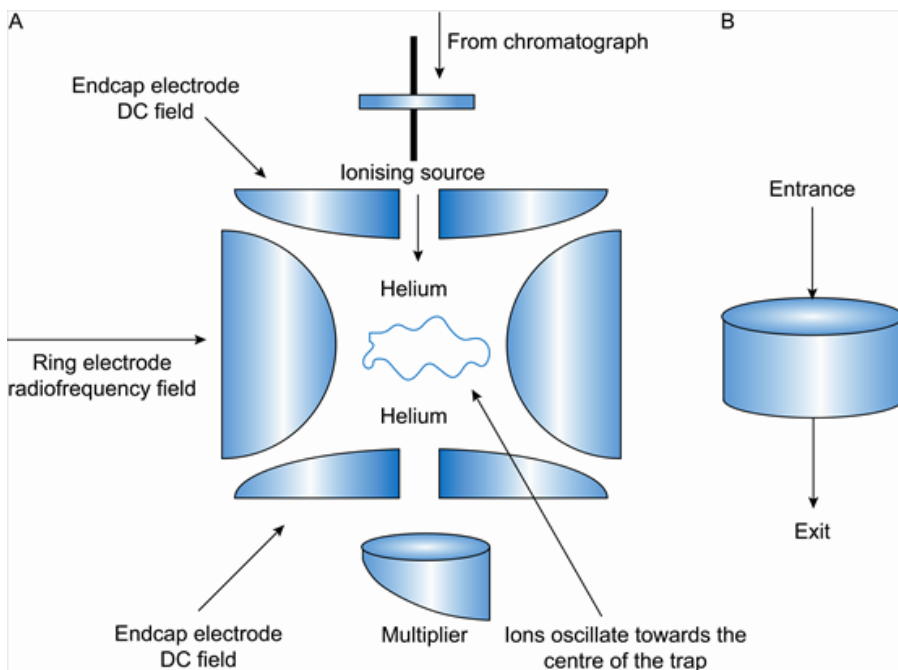


Kombinace DC a RF umožňuje selekci iontů podle m/z
Ionty mimo vybraný rozsah m/z mají nestabilní trajektorii
Amplituda oscilací narůstá - ionty narážejí na elektrody

lontová past

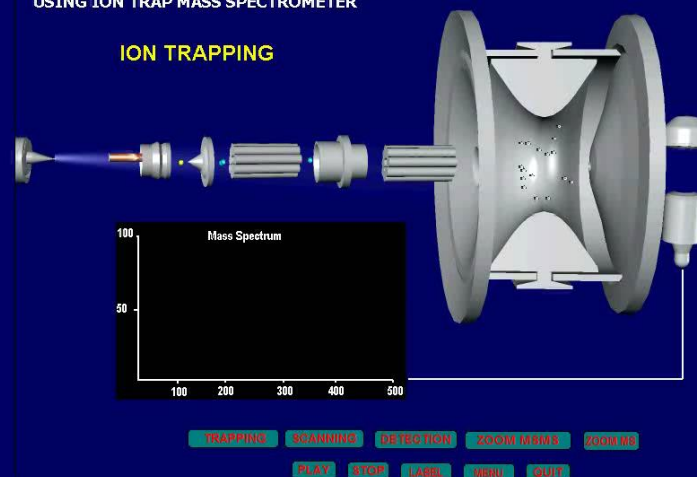


Iontová past



OVERVIEW OF AN ELECTROSPRAY IONIZATION USING ION TRAP MASS SPECTROMETER

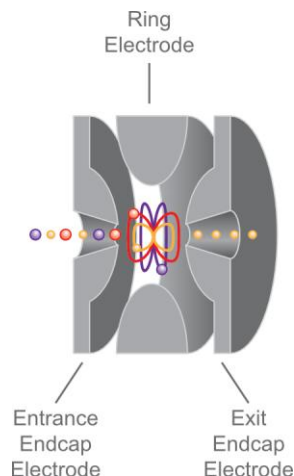
ION TRAPPING



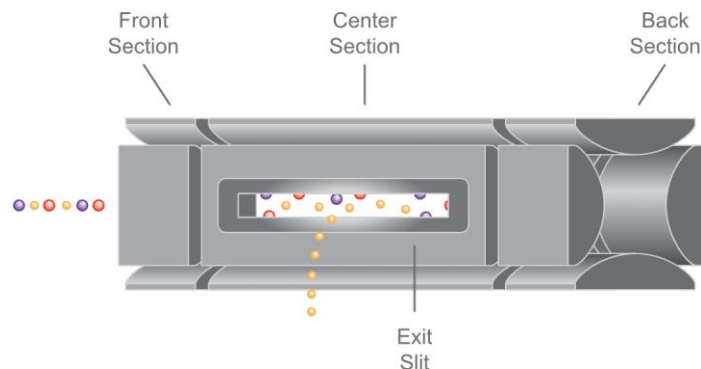
Iontové pasti

R 10³
100ppm

3D (sférická) iontová past



2D (lineární) iontová past



Konstrukce

Udržení iontů

Prostor pro ionty

Kapacita iontů

Prostorový náboj

Citlivost a dynamický rozsah

Hlavní výhoda

Prstencová elektroda + 2 koncové elektrody

RF pole ve 3 rozměrech

Malý

Nižší

Výraznější vliv

Obvykle nižší

Kompaktní konstrukce

4 paralelní tyče + koncové elektrody

RF radiálně, axiálně DC bariéry

Větší

Vyšší

Menší vliv díky většímu objemu

Obvykle vyšší

Vyšší kapacita a účinnost zachycení iontů

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:

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

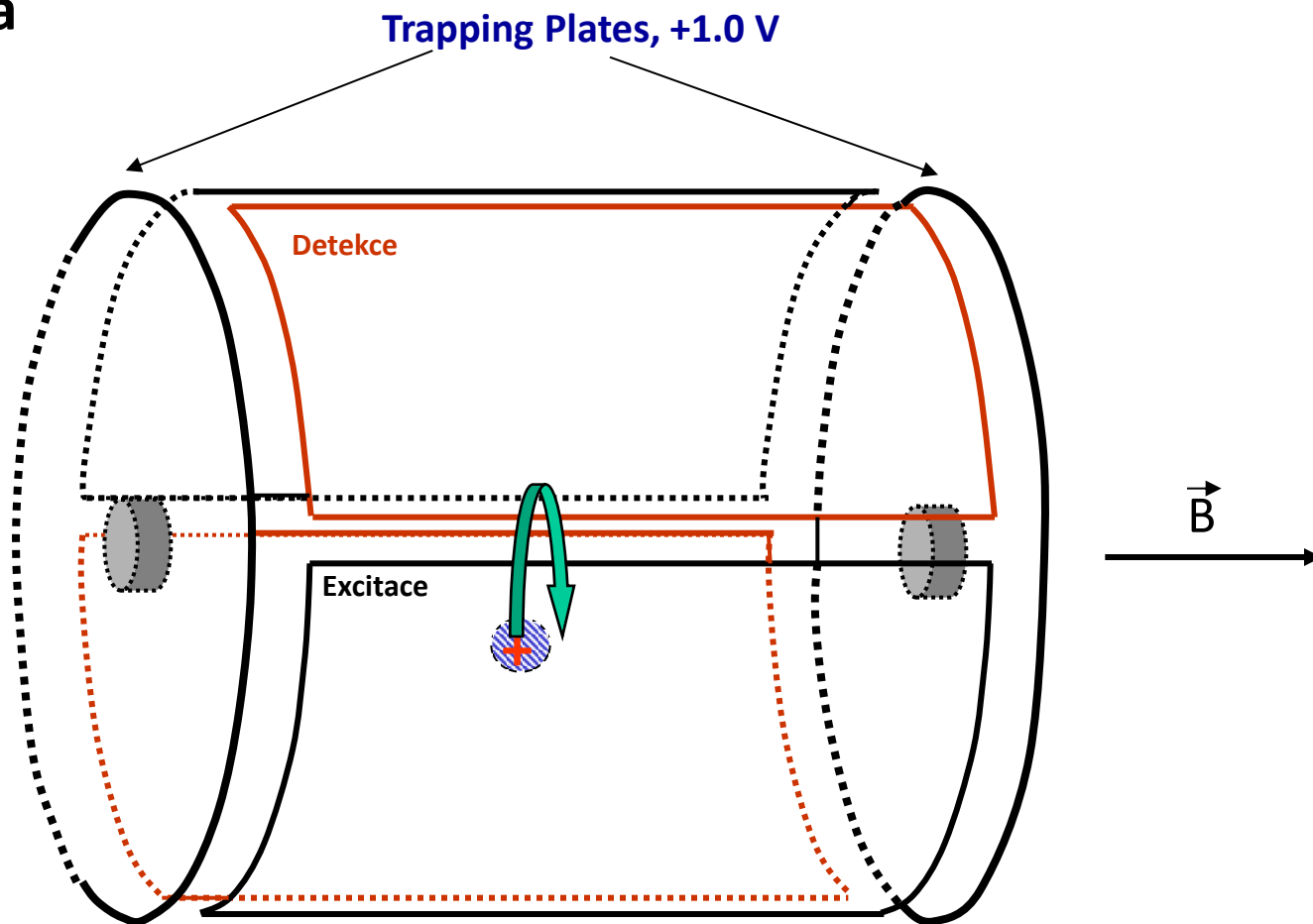
Poloměr běžné cely: 1-3 cm

Počáteční poloměr pohybu iontu: 0.01 - 0.1 mm

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

Pohyb iontů v magnetickém poli

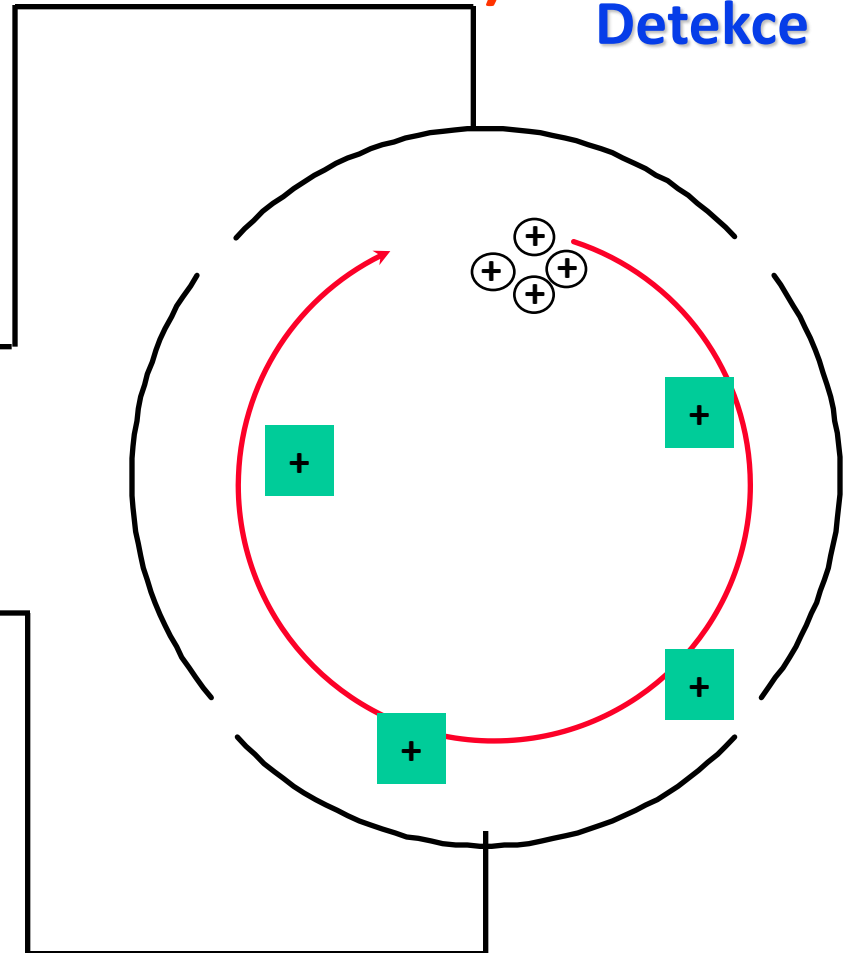
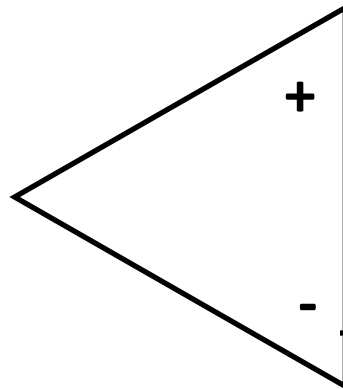
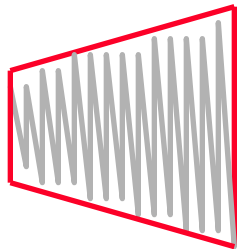
FTMS cela



Fourierova transformace

(Iontově Cyklotronová Resonance)

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

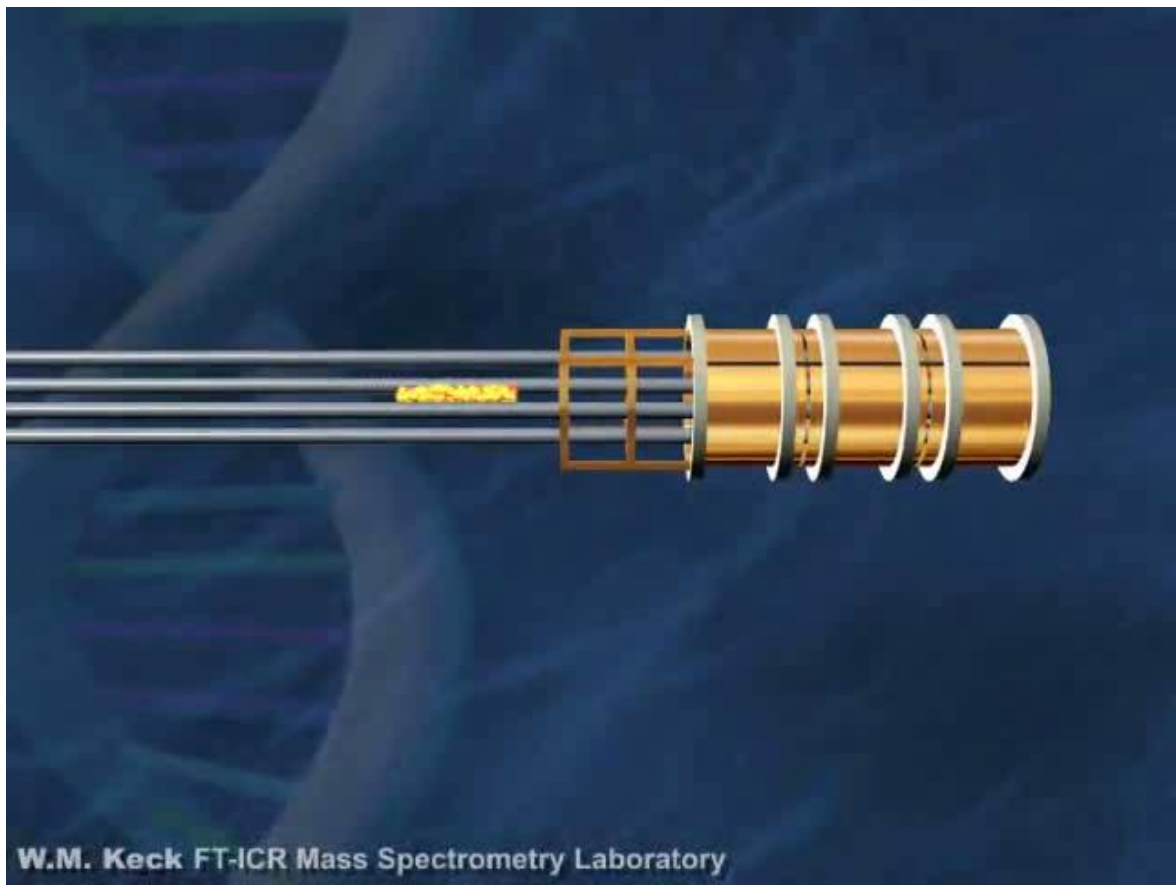


Koherentní cyklotronový pohyb indukuje „proudový obraz“, který je amplifikován a detekován.

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
0.1ppm

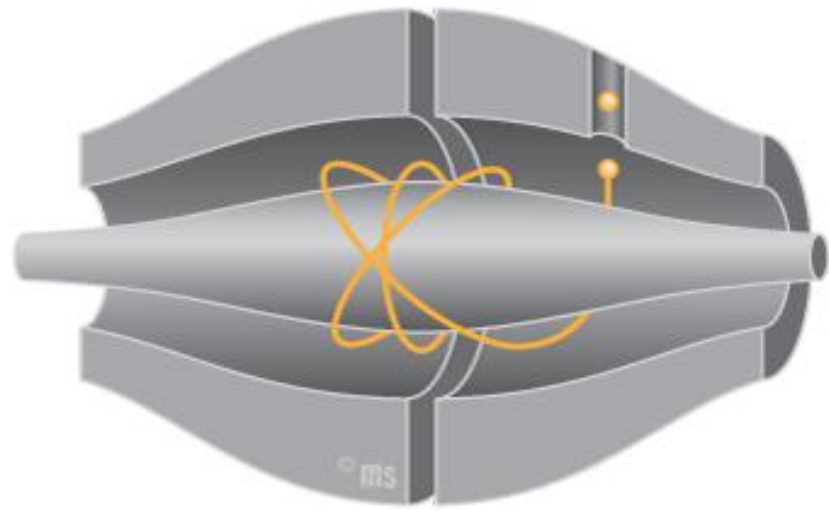


ORBITRAP

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

Rozlišení (R)

Správnost měření (mass accuracy)

Rychlost (scan rate)

Citlivost

Rozsah m/z

Dynamický rozsah

schopnost rozlišit ionty s blízkým m/z

jak blízko je naměřené m/z skutečné hodnotě

kolik spekter lze získat za sekundu; důležitá pro LC-MS

schopnost detekovat malé množství iontů

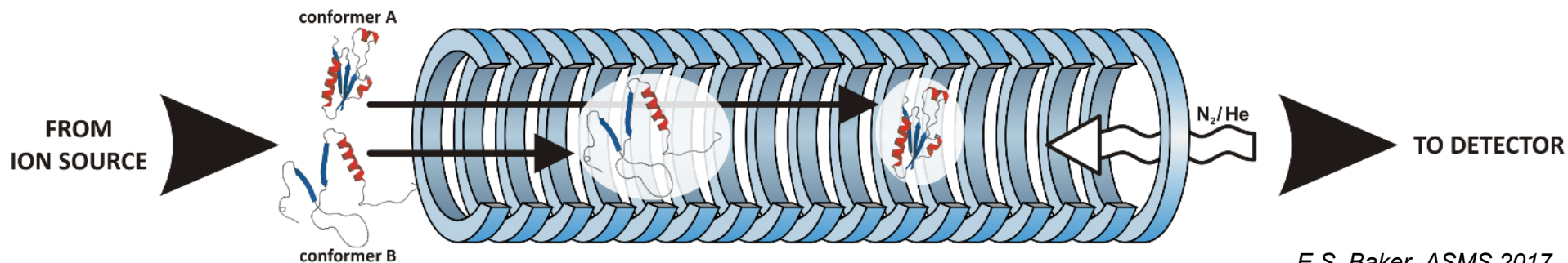
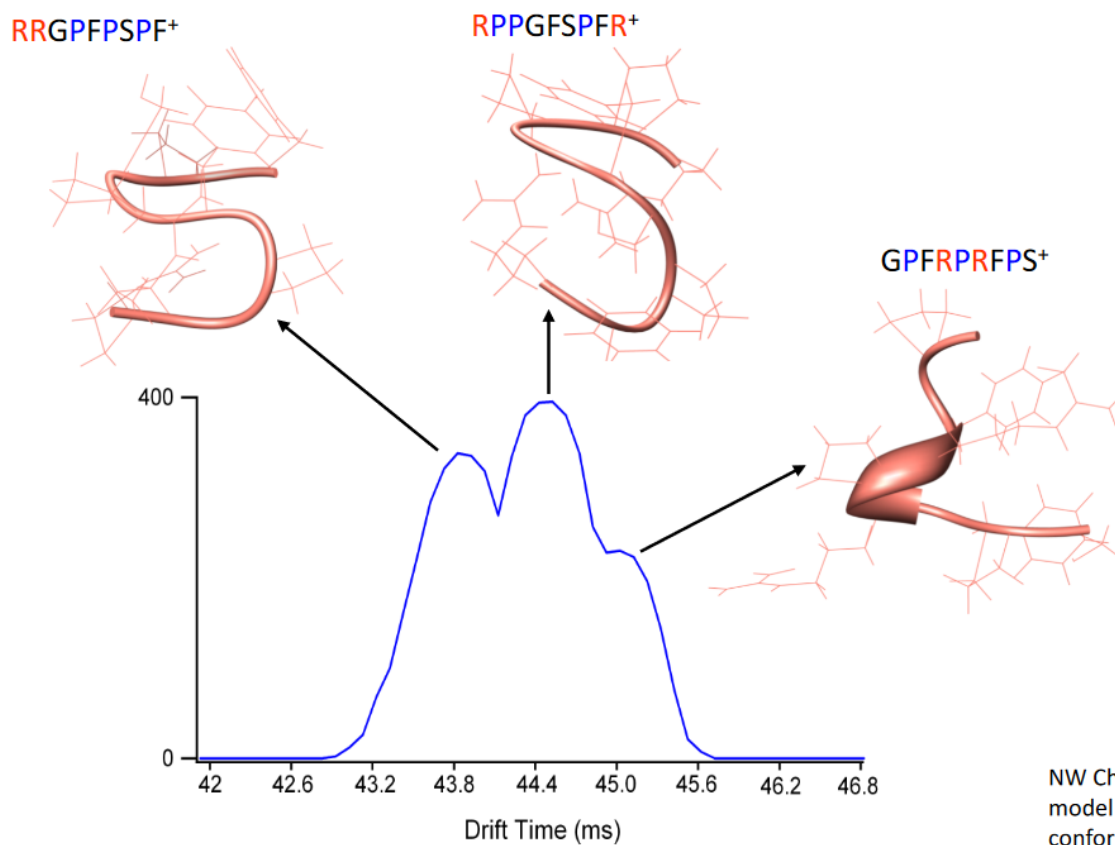
jaké hodnoty m/z lze analyzovat

poměr mezi nejvyšší a nejnižší intenzitou signálu, které lze v jednom měření kvantifikovat

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

Rozlišení VS rychlost skenu!

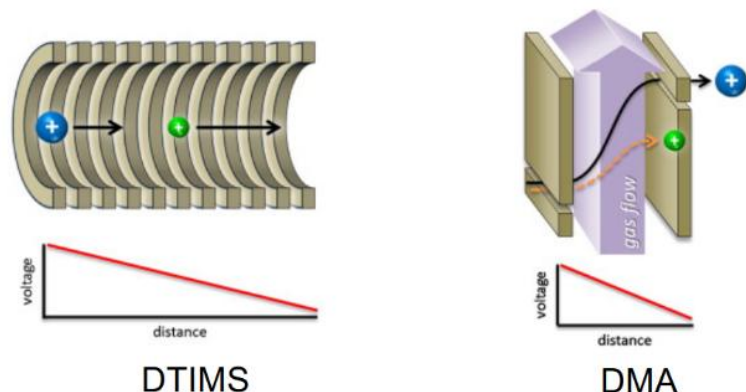
Iontová mobilita – rozdělení dle konformace



Iontová mobilita – různá uspořádání

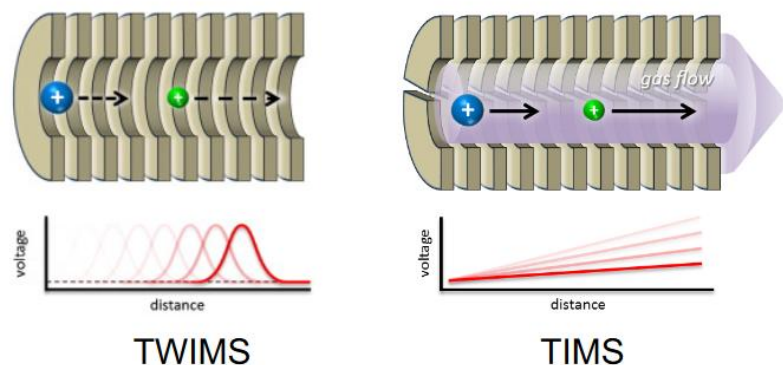
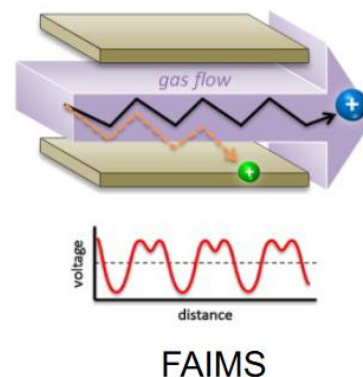
Statické pole

- 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

1. Fragmentace během ionizace / ve zdroji

- *fragmentace bez předchozí selekce iontů*

ISD, ISF - In-Source Decay/Fragmentation

PSD - Post-Source Decay

2. Cíleně indukovaná fragmentace (MS/MS)

– fragmentaci předchází selekce prekursorového iontu = „čisté“ MS/MS spektrum

Mechanismus

kolizní aktivace

elektronové procesy

absorpce fotonů

Techniky

CID / HCD / (SID)

ECD / ETD / EDD

IRMPD / UVPD

Princip

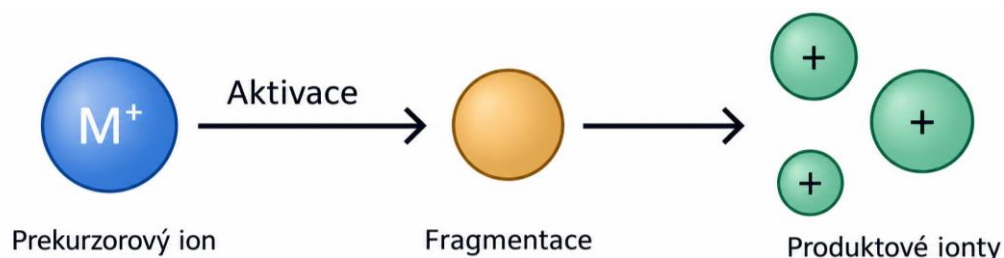
Srážky s plynem (nebo povrchem) – He, Ar, N₂

Záchyt, přenos nebo odtržení elektronu

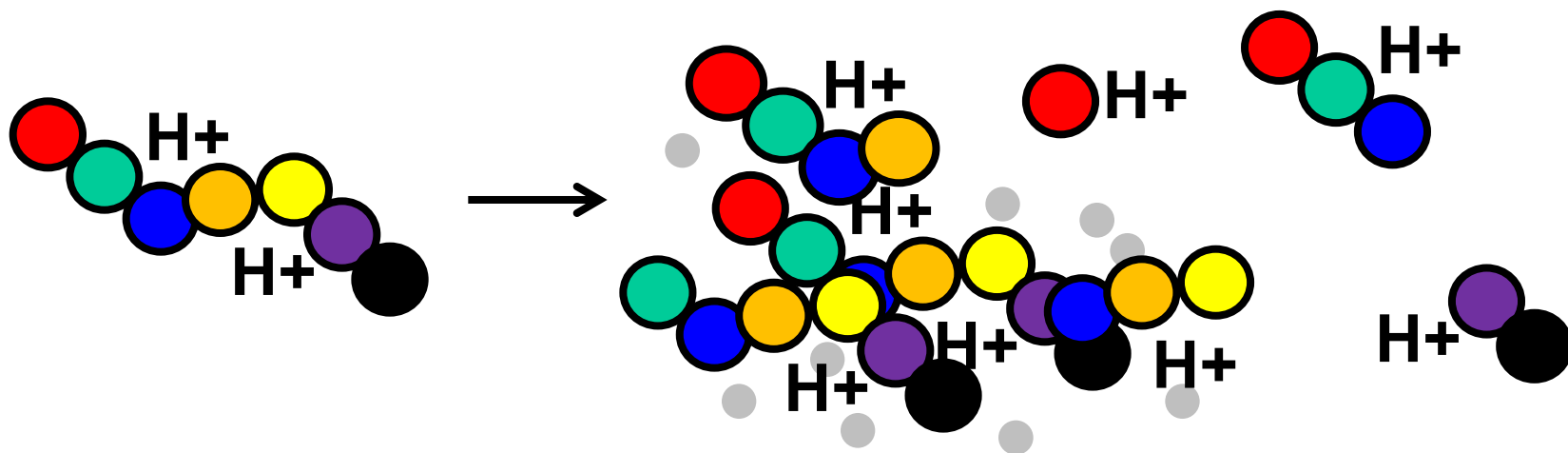
Aktivace infračerveným nebo UV zářením

MS/MS: výběr prekursorového iontu → fragmentace → analýza produktových iontů

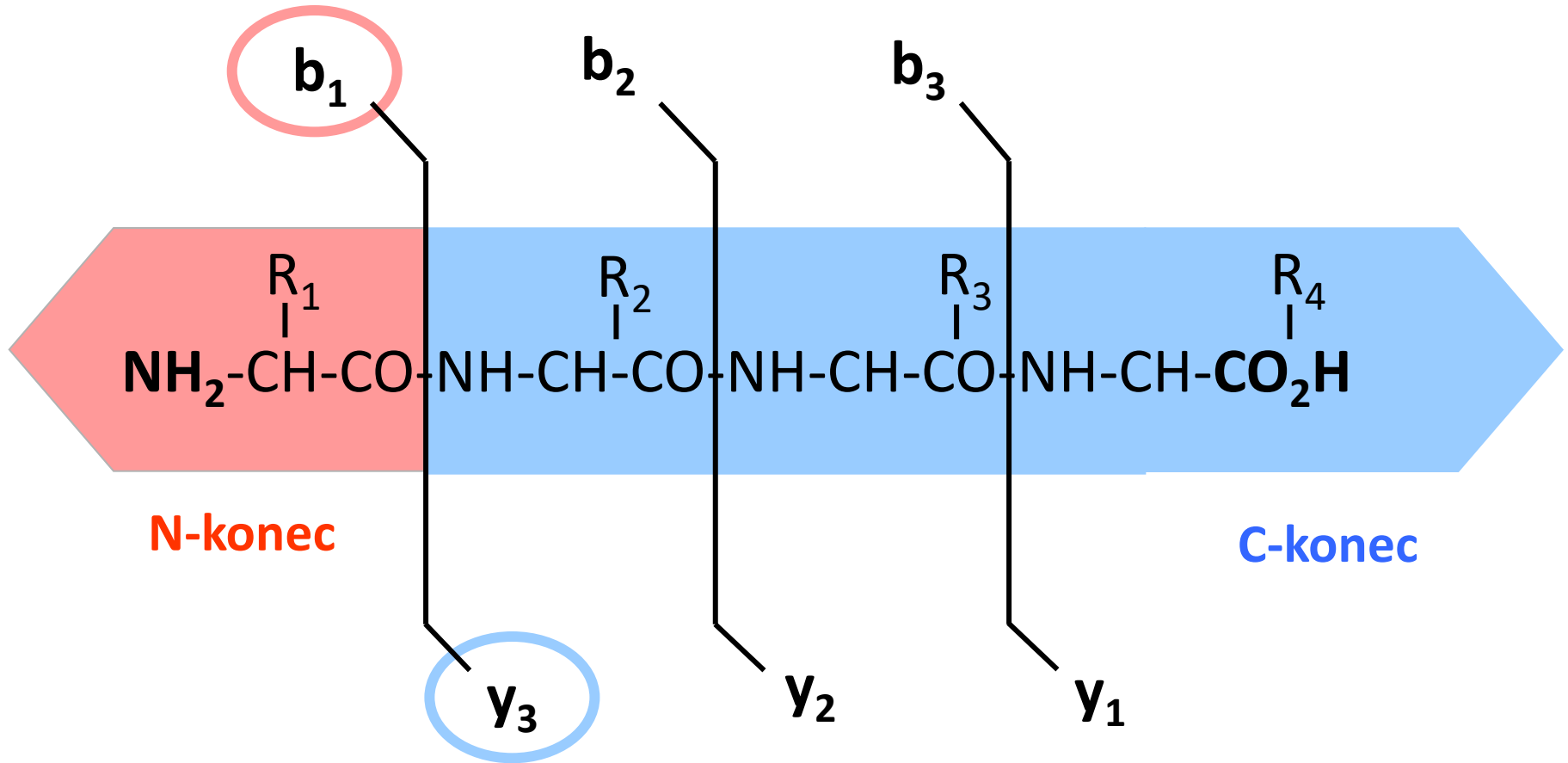
(Hovoříme o MS/MS, MS₂, MS² ...případně o MSⁿ)



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

b-ions⁺

88.1	S	PAFDSIMAETLK
185.2	SP	AFDSIMAETLK
256.3	SPA	FDSIMAETLK
403.5	SPAF	DSIMAETLK
518.5	SPAFD	SIMAETLK
605.6	SPAFDS	IMAETLK
718.8	SPAFDSI	MAETLK
850.0	SPAFDSIM	AETLK
921.1	SPAFDSIMA	ETLK
1050.2	SPAFDSIMAE	TLK
1151.3	SPAFDSIMAET	LK
1264.4	SPAFDSIMAETL	K

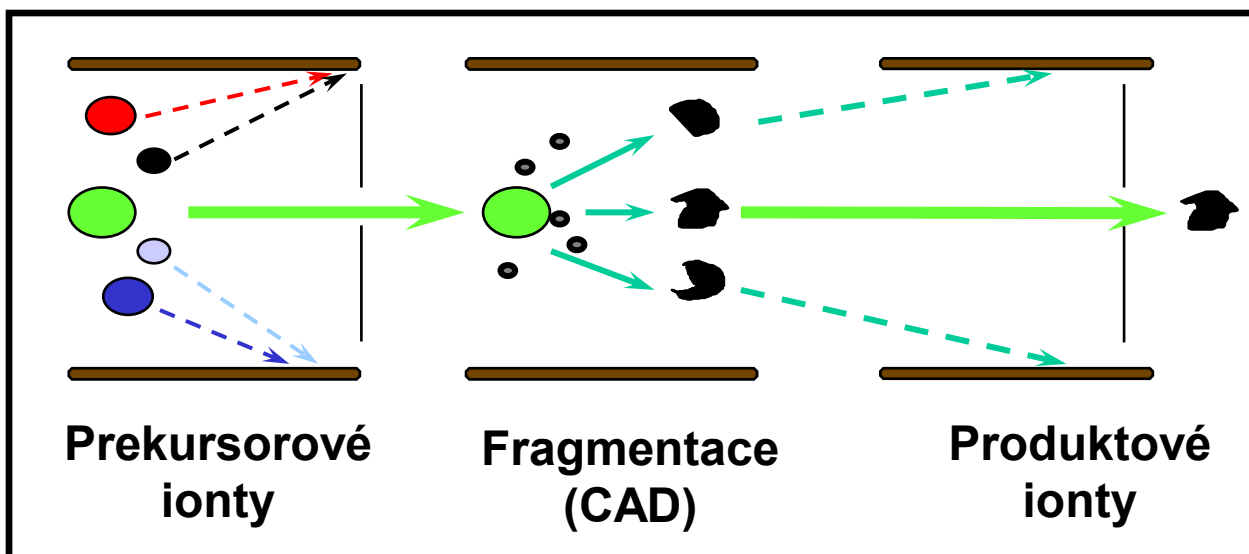
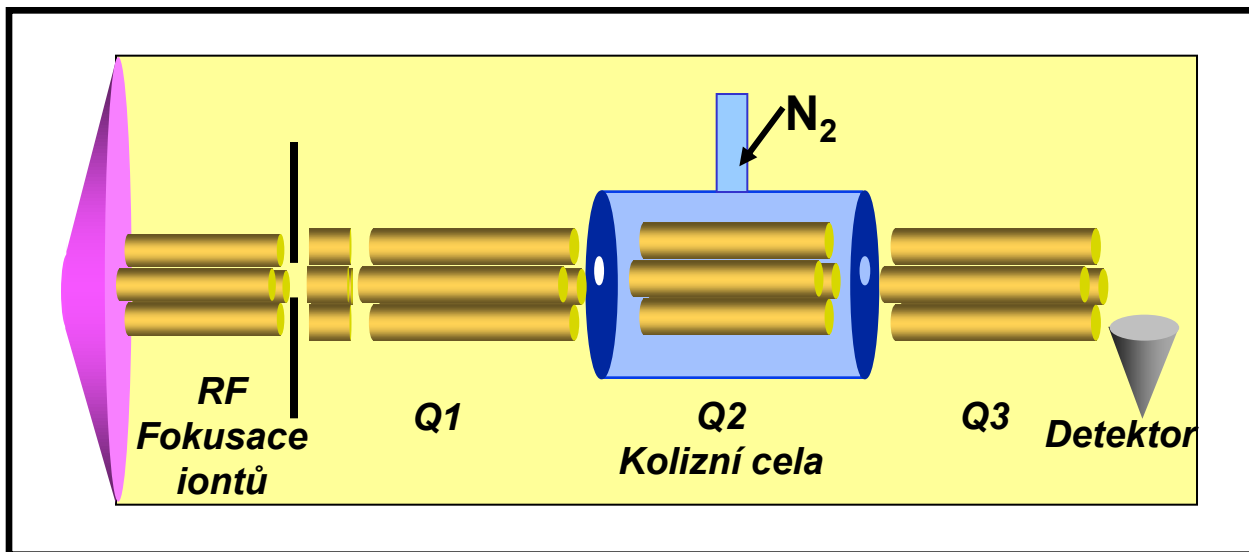
y-ions⁺

1323.6
1226.4
1155.4
1008.2
893.1
806.0
692.3
561.7
490.6
361.5
260.4
147.2

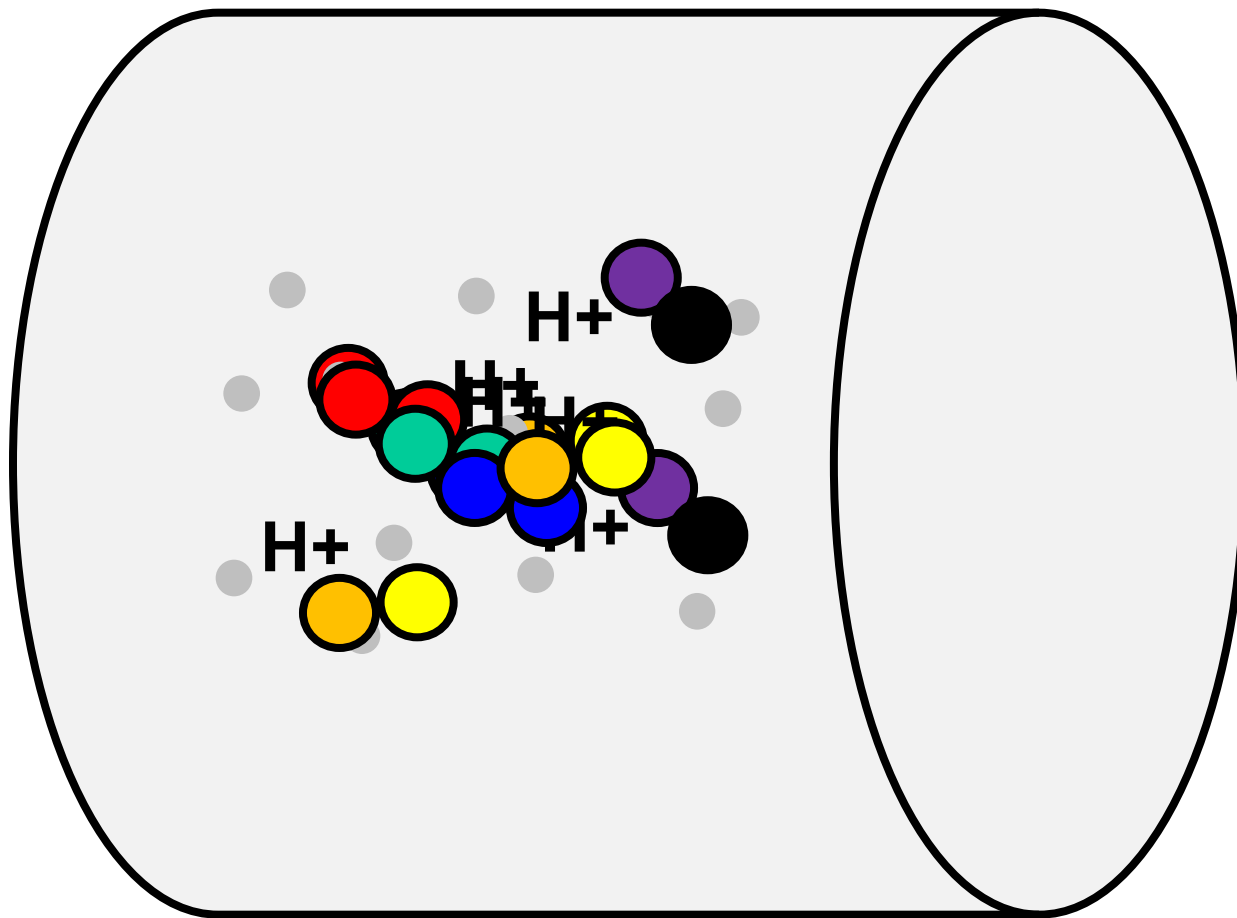
Přehled aminokyselin v číslech

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

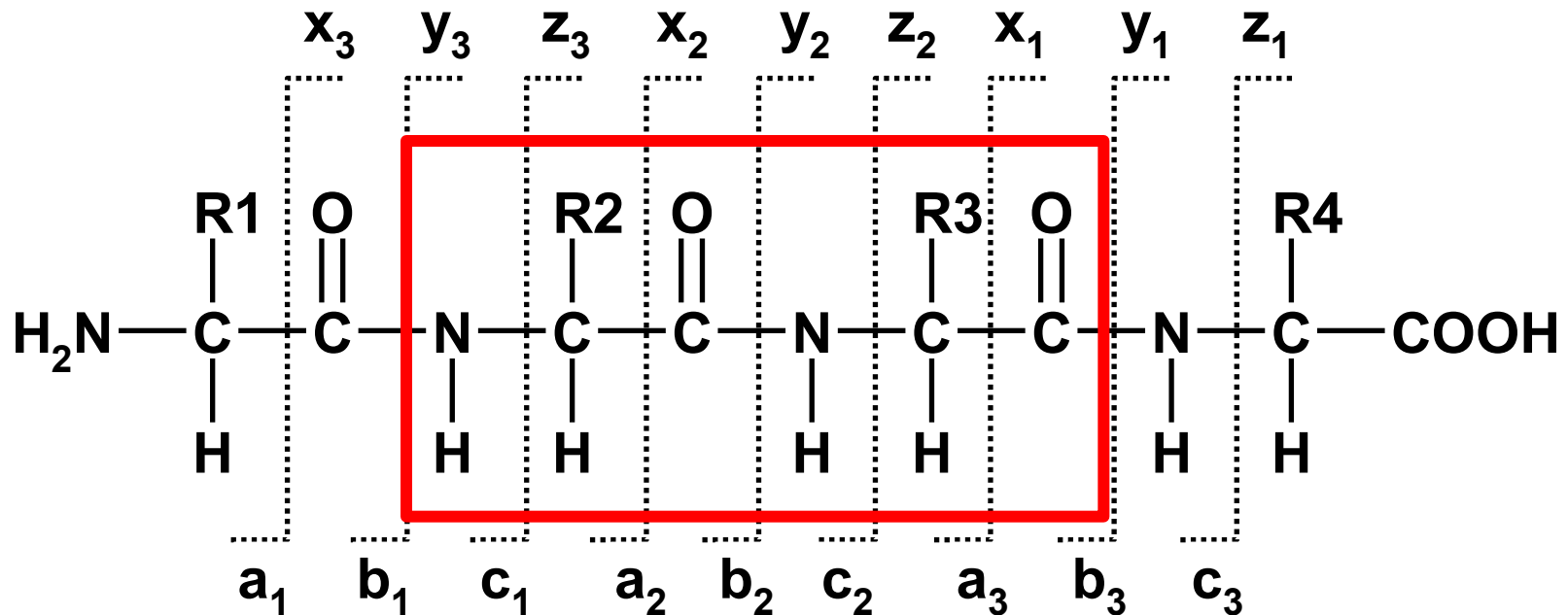
Trojnásobný kvadrupól – MS/MS v prostoru



Iontová past – MS^n v čase



Další typy fragmentací a fragmentových iontů



Interní fragmenty (nemají N- ani C-konec)

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

Electron Capture Dissociation (ECD)

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

Neutralizace H^+ ; $[M+2H]^+$. Vodíkem nabohacený radikálový iont. Štěpení vazby $N-C_\alpha$

Vícenásobně nabité prekurzorové ionty

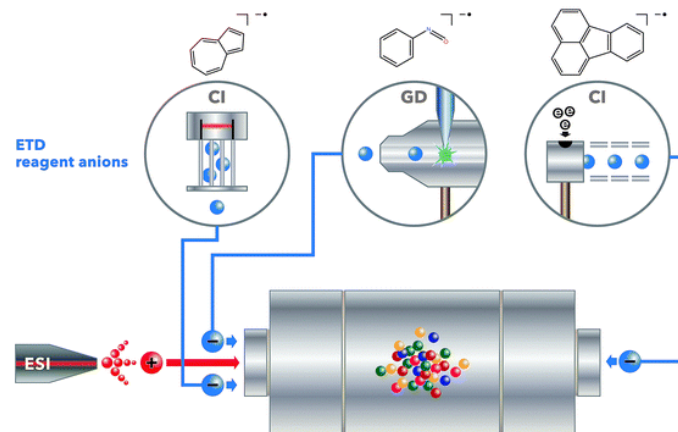
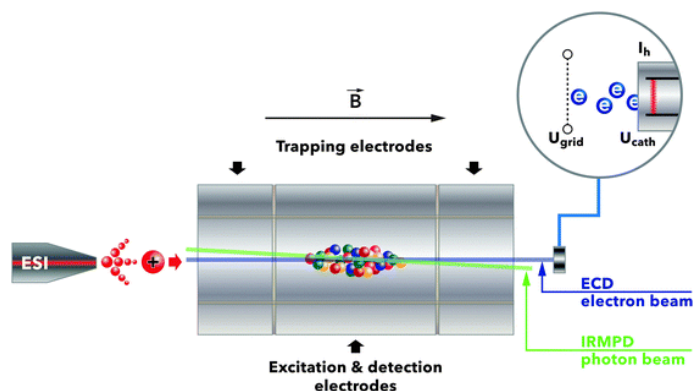
c- a z-iontové série

Electron Transfer Dissociation (ETD)

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

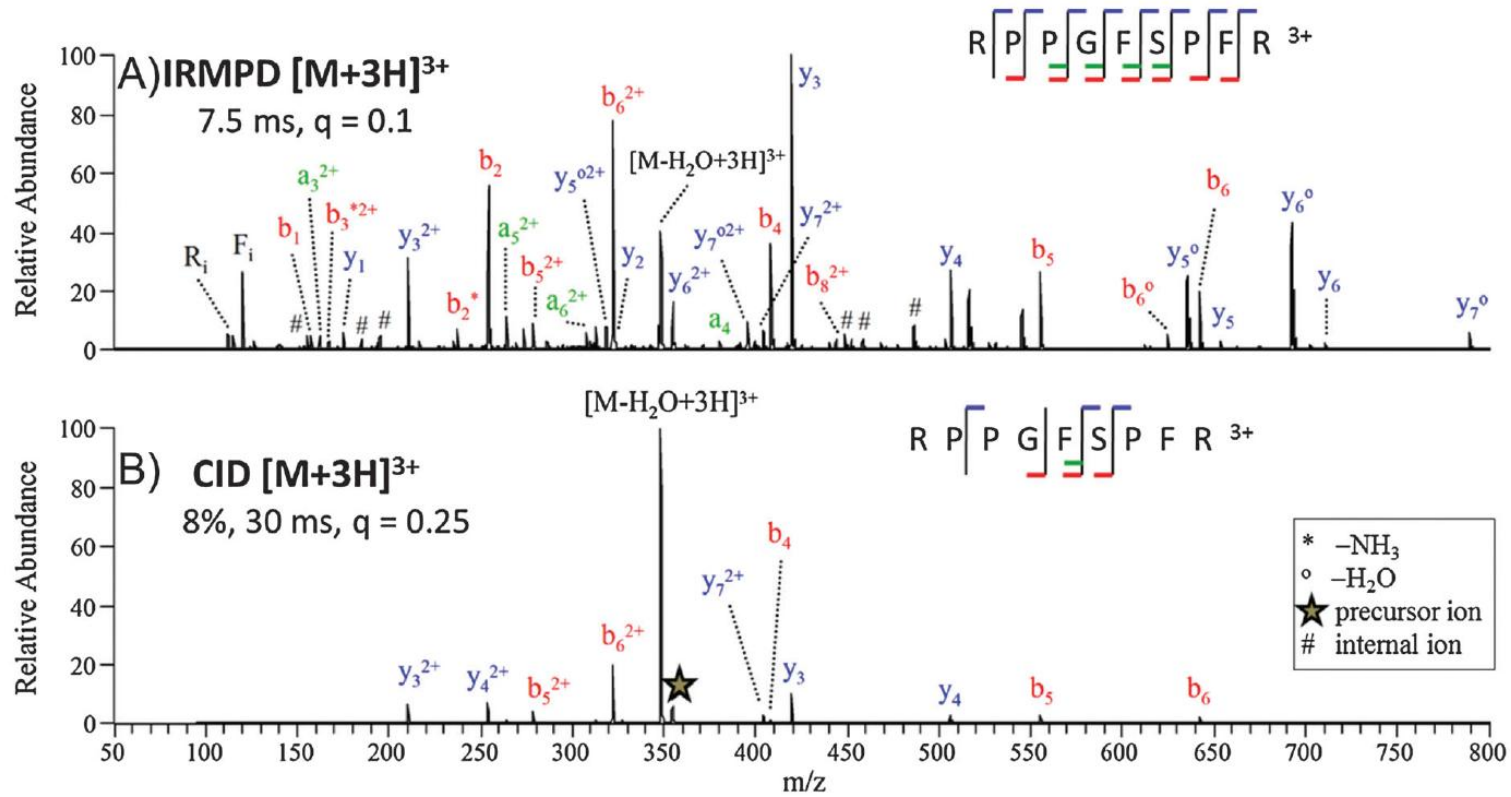
Chemická ionizace = elektron přenáší anion (antracén, azobenzen, metan, fluoranthen...) -> neutralizace náboje a následně také fragmentace.

Vznik iontů c a z



Infrared Multiphoton Dissociation (IRMPD)

- CO₂ laser - absorpce infračervených fotonů
- Vibrační excitace - postupná absorpce více fotonů vede k fragmentaci
- Fragmentace podobná CID - převážně b- a y-ionty, často rozsáhlejší sekundární fragmentace (a-ionty, immoniové ionty, fragmenty s nízkým m/z)
- Řízení fragmentace - výkon laseru a doba ozařování
- Výhoda ve FT-ICR - bez kolizního plynu, zachování vysokého vakua



UltraViolet PhotoDissociation (UVPD)

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

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

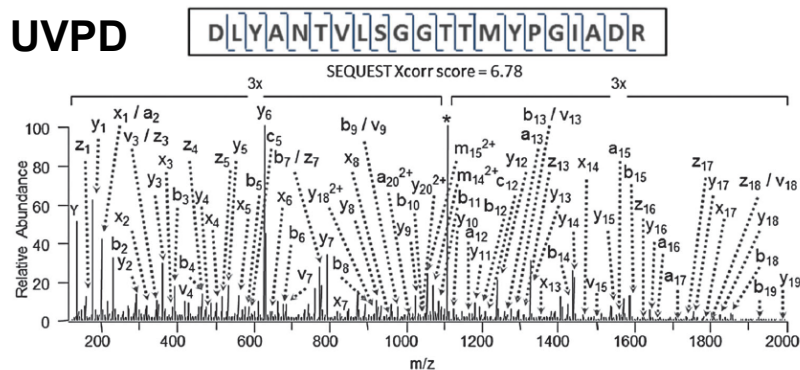
vlnové délky blízke 280nm – fragmentace u aromatických AK

obecně velmi rychlá fragmentace v řádu psec

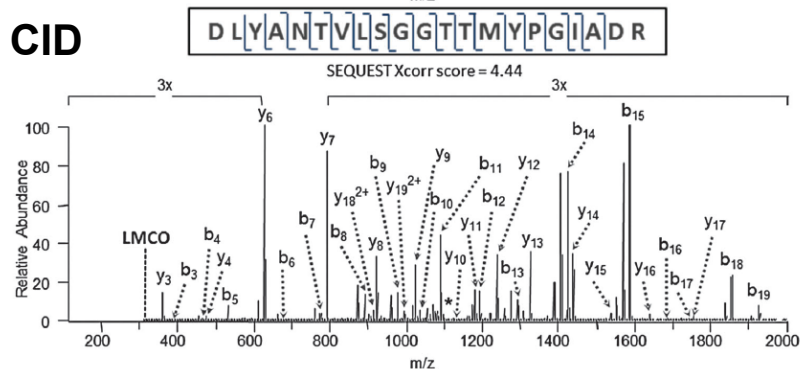
Výsledek podobný ExD, ale nedochází k redukci náboje – aplikovatelné i na 1+

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

UVPD

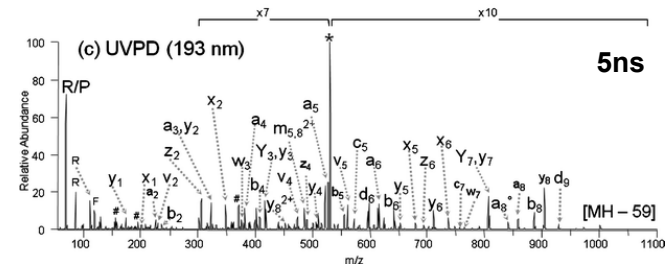
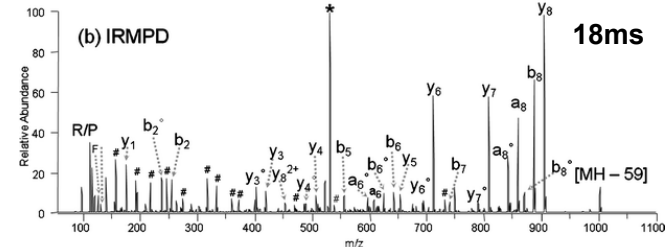
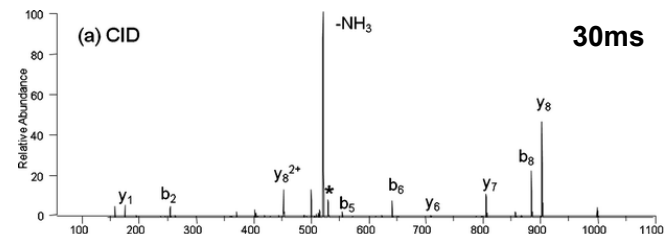


CID



RPPGFSPFR

(m/z 530.7)

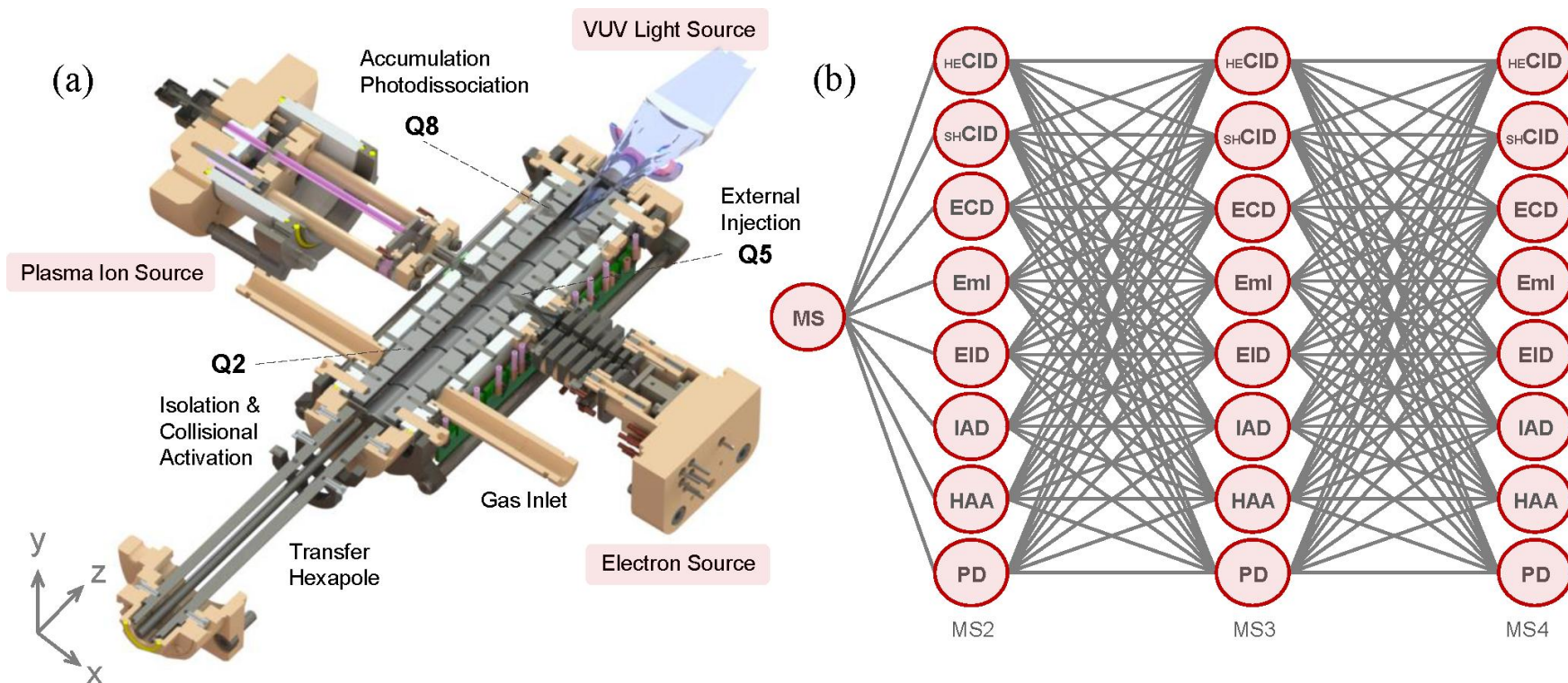


The Age of OmniTrap

Soustava segmentovaných kvadrupólových elektrod

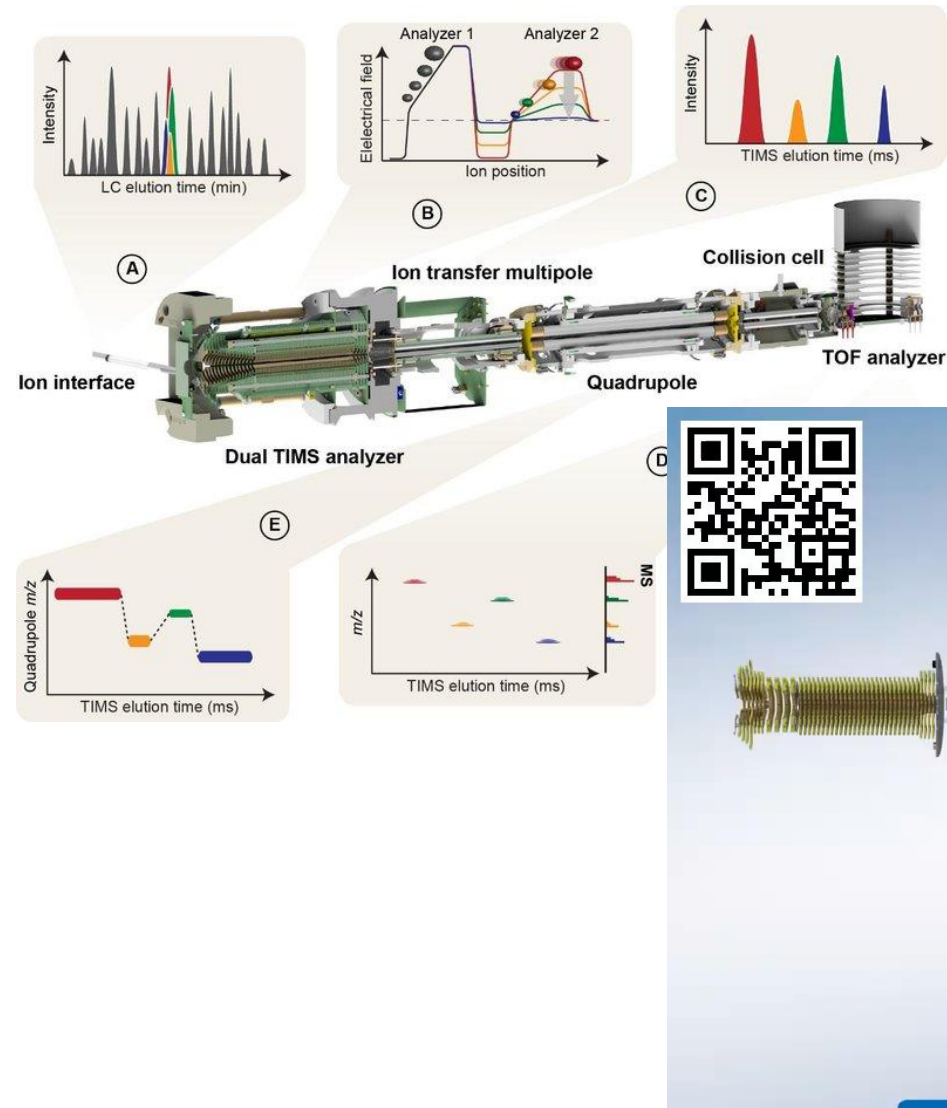
Kombinace různých fragmentačních technik – např. CID, ECD a UVPD (podle konfigurace)

Vícenásobná fragmentace (MS^n) – opakovaná izolace a fragmentace produktových iontů.



timsTOF

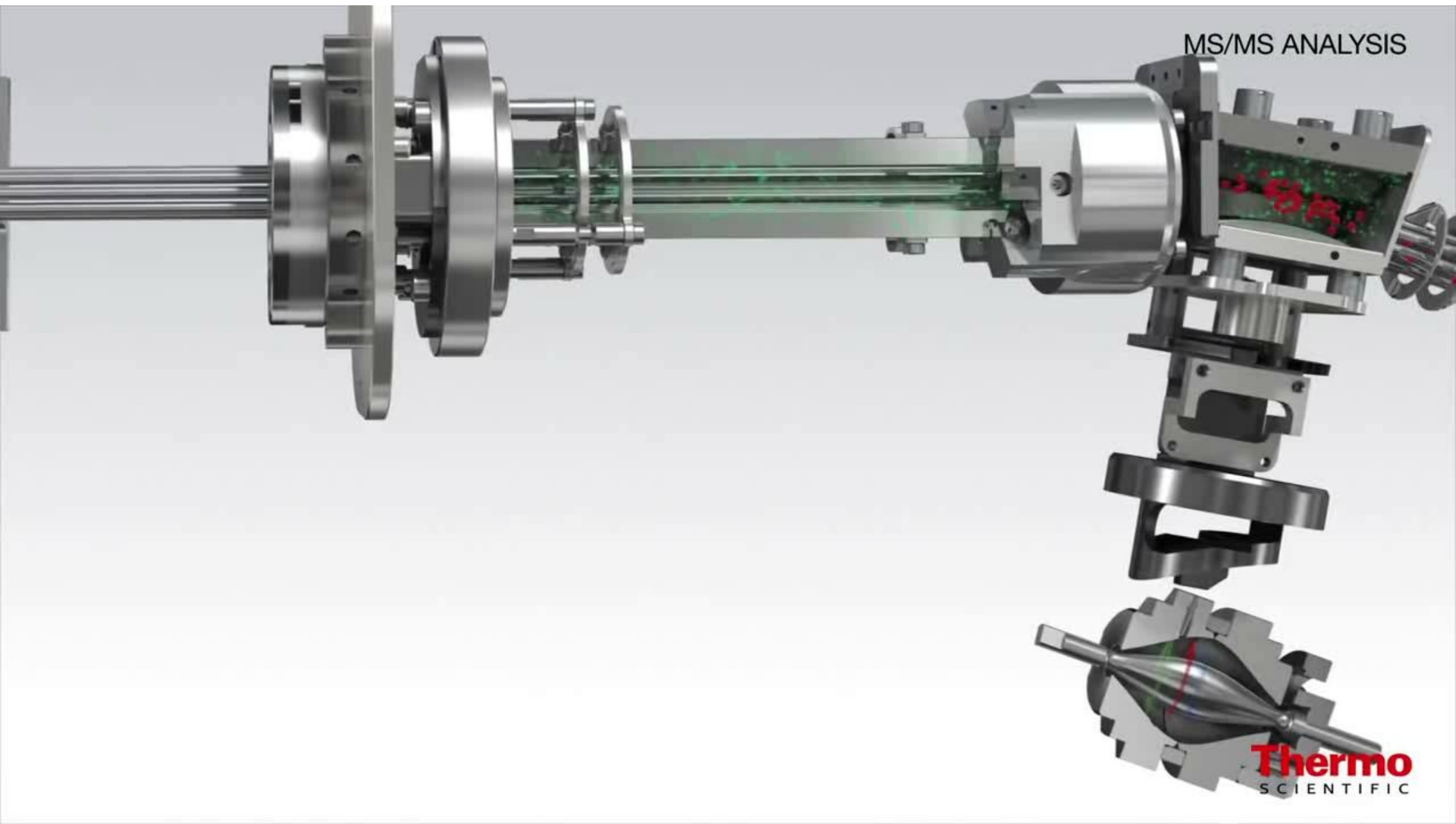
120Hz -> 300Hz



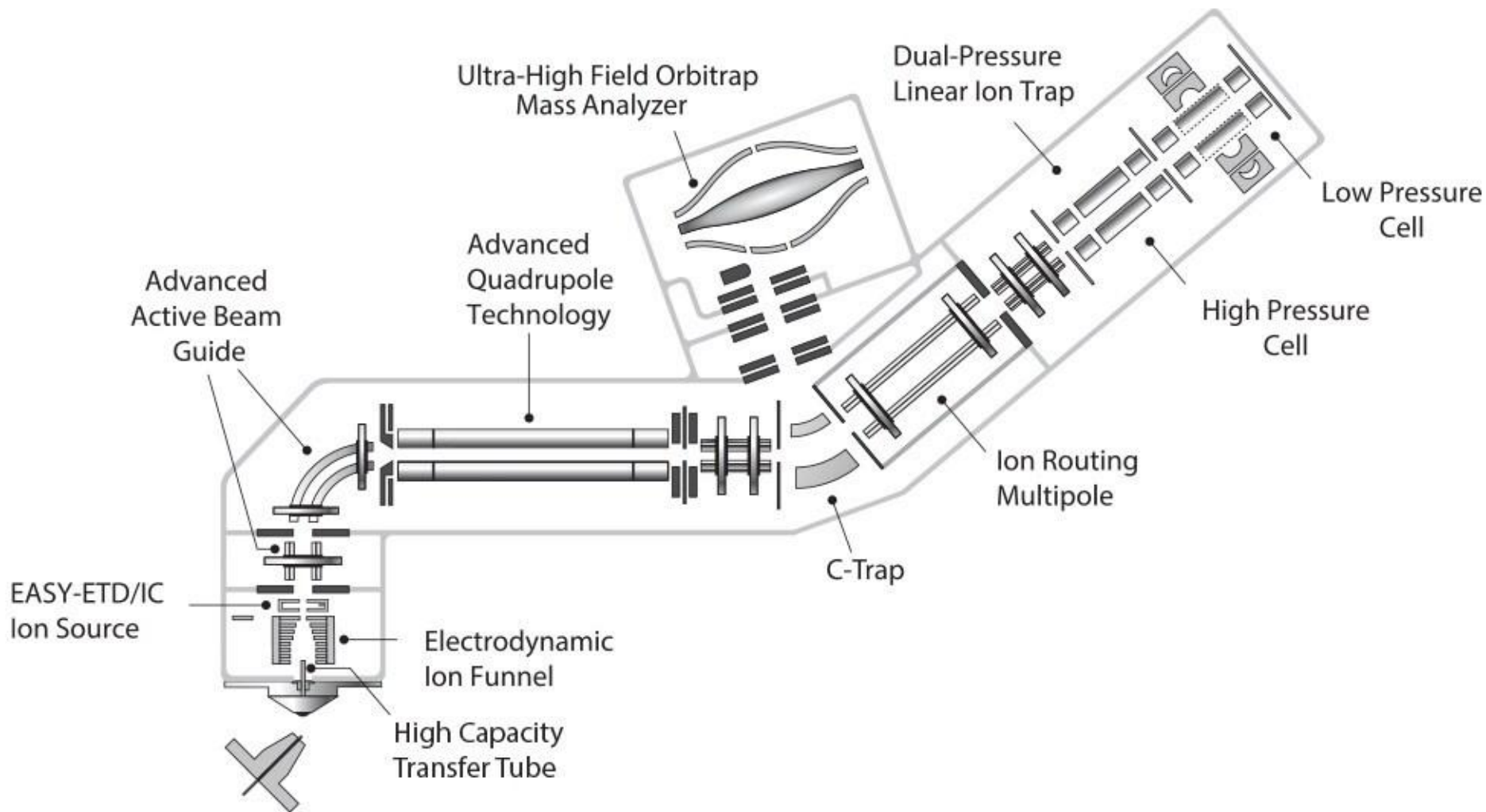
Iontová mobilita (2x tims) + qTOF

Akumulace (tims1), separace (tims2), (fragmentace q), analýza TOF

Orbitrap – iontové pasti



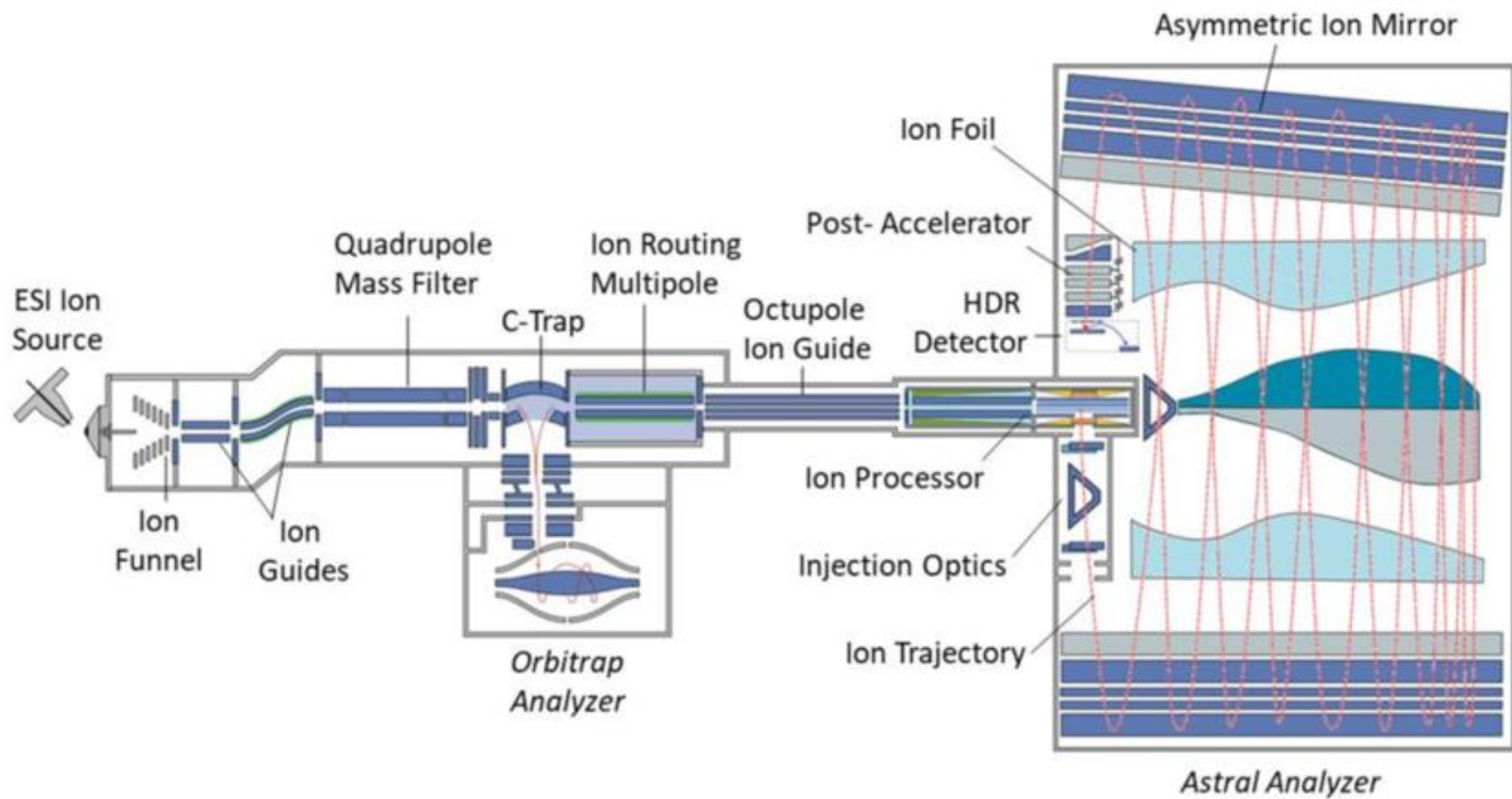
Orbitrap – iontové pasti



Orbitrap ASTRAL

Sběr dat – 200Hz (200 spekter/s)

Orbitrap ASTRAL



Sběr dat – 200Hz (200 spekter/s)