

Identifikace molekul a kvantitativní analýza pomocí MS

Identifikace molekul

- snaha určit molekulovou hmotnost, sumární složení, strukturní části molekuly (funkční skupiny, aromatická jádra, alifatické části, atd.) a kompletní strukturu molekuly
- **molekulová hmotnost** - určení na základě M^+ , $[M+H]^+$, $[M-H]^-$ iontů nebo aduktů s molekulou $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+CH_3COO]^-$, $[M+Cl]^-$, atd.
 - závislé na použité ionizační technice - někdy je vhodné kombinovat více technik
 - pokud zcela chybí molekulární ion použít šetrnější ionizaci (ESI, MALDI), snaha o tvorbu molekulárních aduktů na základě přidavku vhodného iontu (NH_4^+ , Na^+ , K^+ , Ag^+ , Li^+ , CH_3COO^- , Cl^- , atd.), změna napětí na vstupních elektrodách, změna průtoků sušících a zmlžujících plynů, změna teploty iontového zdroje
- **sumární složení** - z kolika atomů jakého druhu je molekula složena
 - charakteristické zastoupení M a M+2 izotopů - Cl (3:1), Br (1:1)
 - charakteristická izotopická obálka některých atomů - Sn, Hg, atd.
 - využití analyzátoru s vysokou správností určení hmoty - čím menší chyba, tím je menší počet možných kombinací atomů pro danou m/z, návrhy pomocí softwaru, které jsou běžně dostupné
 - analyzátor s vysokou RP - lze určit náboj iontu podle difference mezi izotopickými píky 1/z, tzn. 1/2 pro dvakrát nabitý ion, 1/3 třikrát nabitý
 - FT-ICR, orbitrap, QqTOF

Identifikace molekul

určení náboje
 $M_R = 180$

$[M+H]^+$
 $\Delta m/z = 1/1$

$[M+2H]^{2+}$
 $\Delta m/z = 1/2$

$[M+3H]^{3+}$
 $\Delta m/z = 1/3$

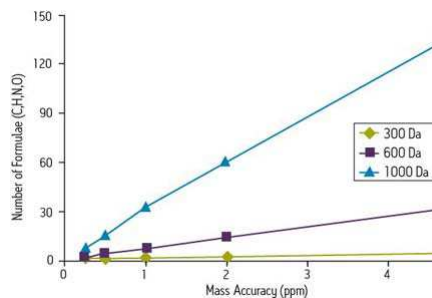
kalkulace teor. hmotnosti, zastoupení izotopů

#	m/z	Abundance
1	5804.644524	15.472
2	5805.647784	48.600
3	5806.650096	82.733
4	5807.652084	100.000
5	5808.653856	95.490
6	5809.655475	76.241
7	5810.656983	52.707
8	5811.658412	32.302
9	5812.659781	17.848
10	5813.661109	9.005
11	5814.662406	4.189
12	5815.663685	1.811
13	5816.664952	0.733
14	5817.666214	0.279

charakteristické složení izotopů

Identifikace molekul

počet teoretických kombinací vs. správnost určení m/z [ppm]



www.waters.com

Identifikace molekul

výpočet sumárního složení

34 možnosti

Identifikace molekul

- **strukturní části molekuly** - určení na základě fragmentových iontů
 - funkční skupiny - většinou poskytují charakteristické ztráty (např. -OH: $\Delta m/z=18$, -COOH: $\Delta m/z=44$)
 - větší celky molekuly - např. postranní řetězce, neutrální ztráty mastných kyselin z esterů (cholesterolestery), atd.
 - využití tandemové hmotnostní spektrometrie - pro strukturní analýzu jsou vhodné analyzátoři, kde je možné dělat tandemová hmotnostní spektra do vyššího stupně, především pasti, případně hybridní analyzátoři
- **kompletní struktura molekuly**
 - ve většině případů nelze pomocí MS rozlišit izomery (polohové, optické, atd.)
 - u polohových izomerů někdy rozdílné intenzity fragmentových iontů, využití vysokoenergetických kolízi (určení poloh dvojných vazeb, větvení) nebo speciálních aduktů, které poskytují charakteristické fragmentové ionty (Li^+)
 - nutná kombinace s dalšími spektrálními technikami, které dokážou rozlišit izomerie, uspořádání v prostoru, atd. - NMR, rentgenová krystalografie, UV, IČ
 - kombinace se separačními technikami (t_R , retenční chování) - separace izomerů

Kvantitativní analýza pomocí MS

- výhodou je vysoká selektivita (pro MS/MS experimenty) a citlivost
- je třeba vyvarovat se potlačení odezvy konkurenční ionizací (další látky, matrice)
- důležitá je volba standardu, nezbytné je použití vnitřního (interního) standardu pro potlačení vlivu matrice či kontaminace na účinnost ionizace analytu, použití vnějšího standardu není vhodné a většinou je nepřijatelné
- nejpřesnější postup je pomocí **izotopicky značeného standardu** analytu
- izotopicky značený standard obsahuje atomy s těžšími izotopy, které způsobují posun m/z ve spektru a tím odlišení signálu od neznačené látky
 - látky mají stejné chemicko-fyzikální vlastnosti
 - nejčastěji deuterace (2D), ^{13}C , ^{15}N
 - doporučený posun alespoň +3 jednotky m/z
 - vysoká cena izotopicky značených standardů
- pokud je izotopicky značených standard nedostupný, pak lze jako interní standard alternativně volit **analogickou sloučeninu** nebo **homolog**
- tento interní standard nesmí být přítomen ve vzorku, musí mít podobné vlastnosti jako sledovaný analyt (struktura, ionizační účinnost, účinnost extrakce, atd.)
- většinou se přidává již při zpracování vzorku a koriguje i účinnost extrakce

Kvantitativní analýza pomocí MS

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

Využití MS skenů v identifikaci a kvantitativní analýze molekul

Typy MS skenů

- použití skenů pro identifikaci látek a kvantitativní analýzu (zlepšení citlivosti, selektivity)

- **jednoduché skeny:**

- základní sken, sken v určitém rozsahu
- selektivní záznam vybraného iontu

- **MS/MS skeny:**

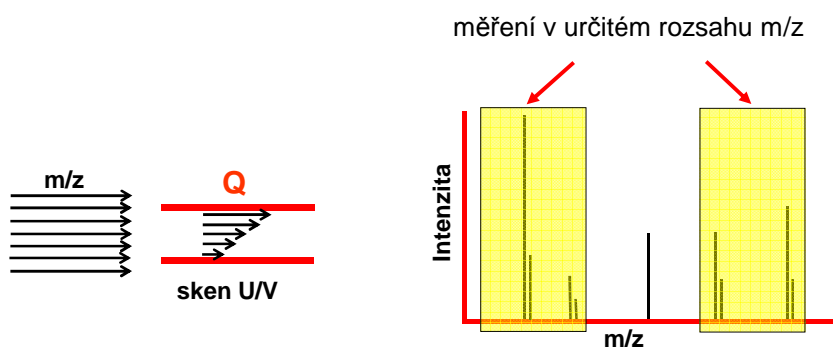
- sken produktových iontů
- sken iontů prekurzoru
- sken neutrálních ztrát
- sken jedné nebo více iontových reakcí

Základní sken

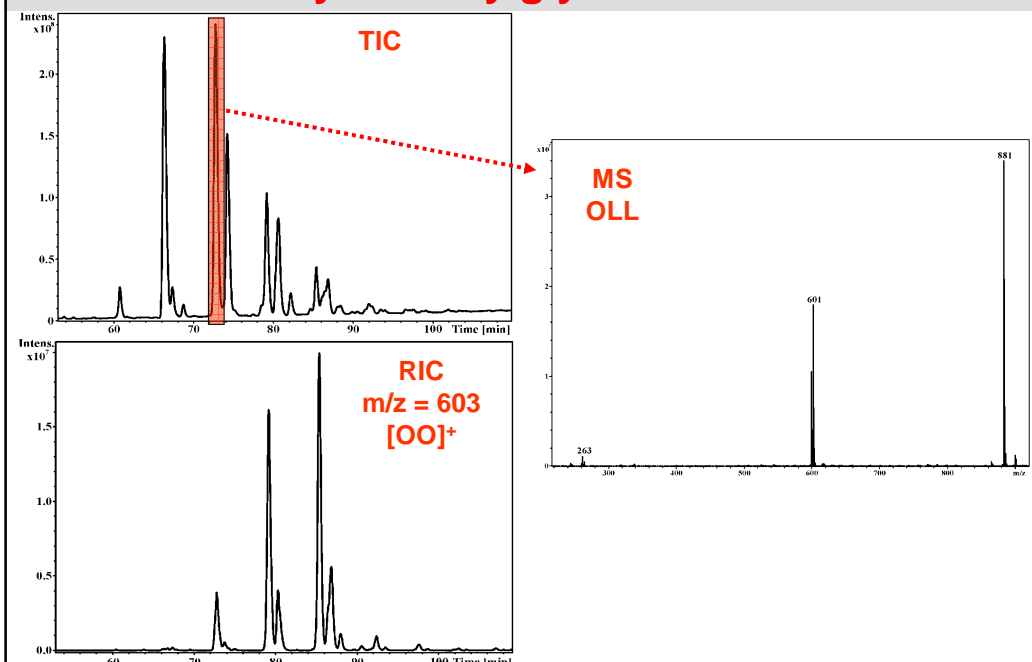
Full scan

- měření hmotnostních spekter v **plném rozsahu m/z**
 - kompletní informace o iontech analyzované látky
 - možnost vyvolání spektra v určitém čase
 - průměrování spekter za určitý čas
 - záznam intenzity vybrané m/z v čase (Reconstructed ion current, RIC)
 - všechny typy analyzátorů
 - velké množství dat
- měření hmotnostních spekter v **omezeném rozsahu m/z**
 - vyšší rychlost
 - vyšší citlivost
 - menší objem dat

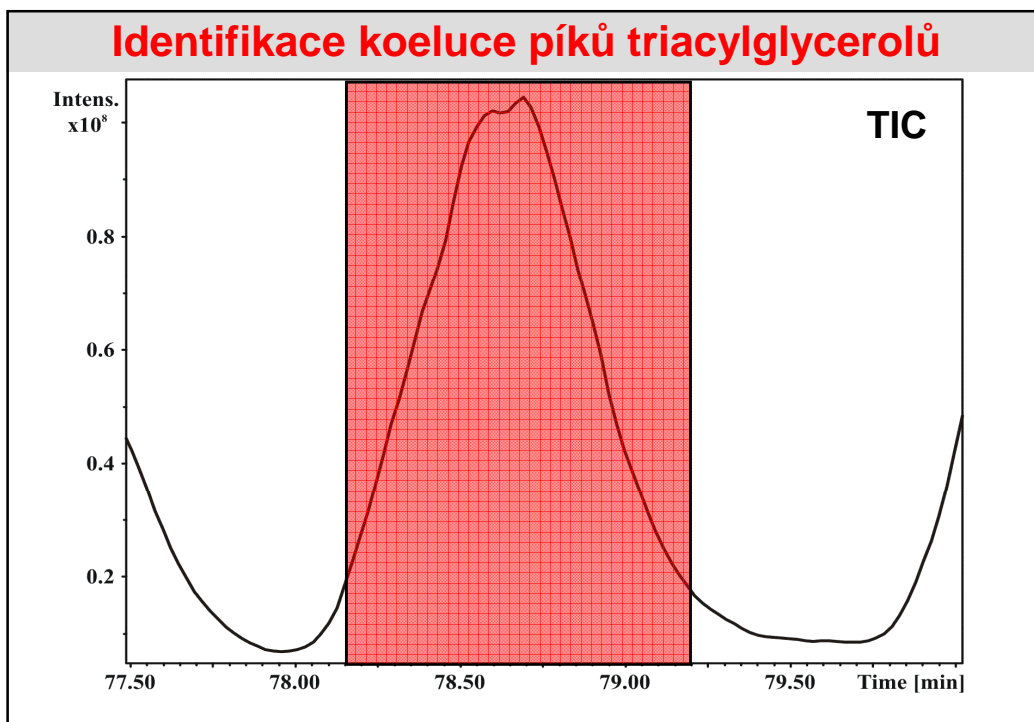
Základní sken



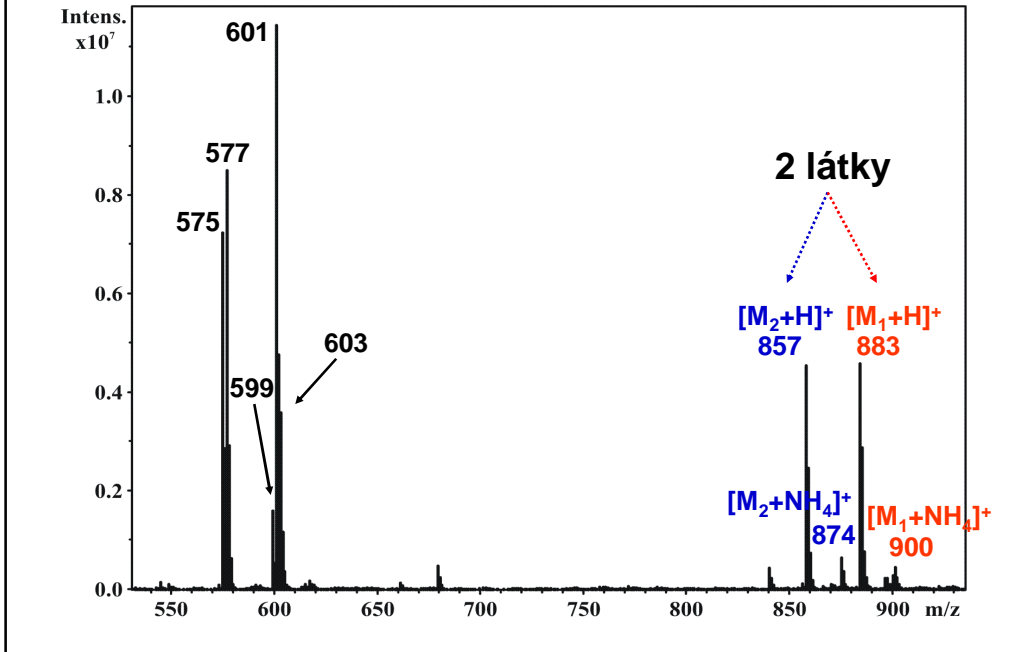
HPLC/MS analýza triacylglycerolů - základní sken



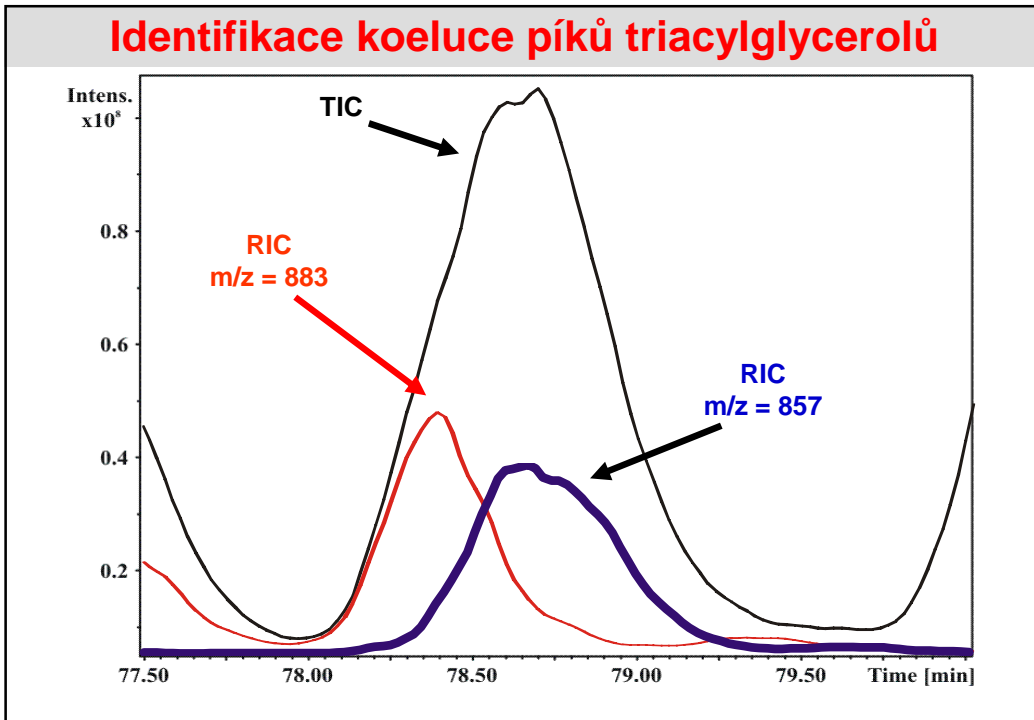
Identifikace koeluční píky triacylglycerolů

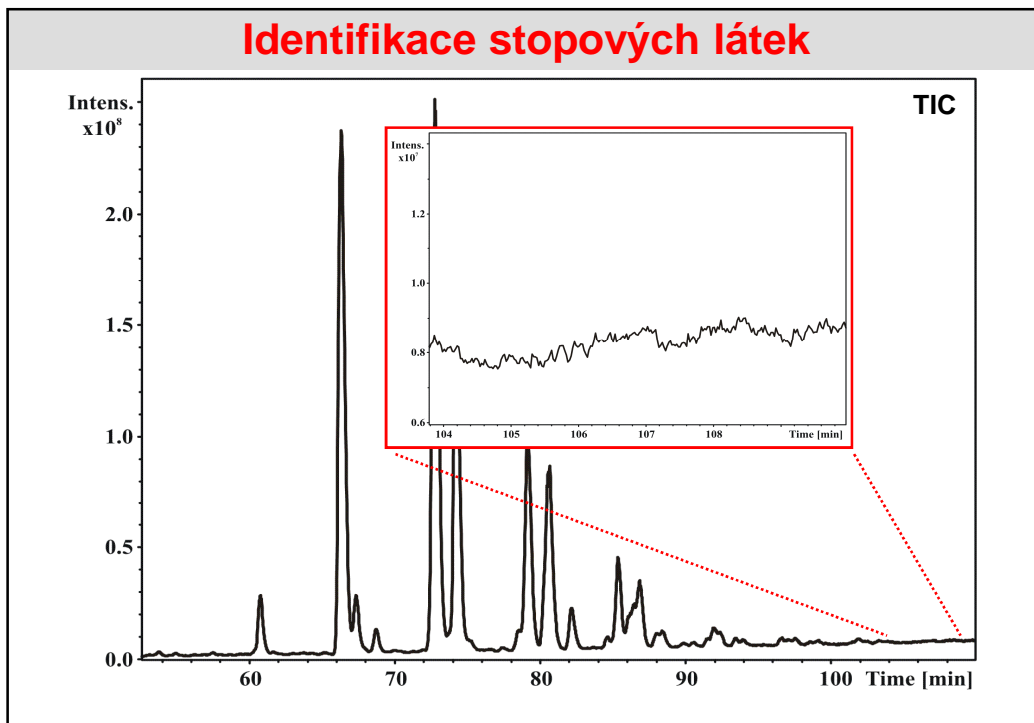
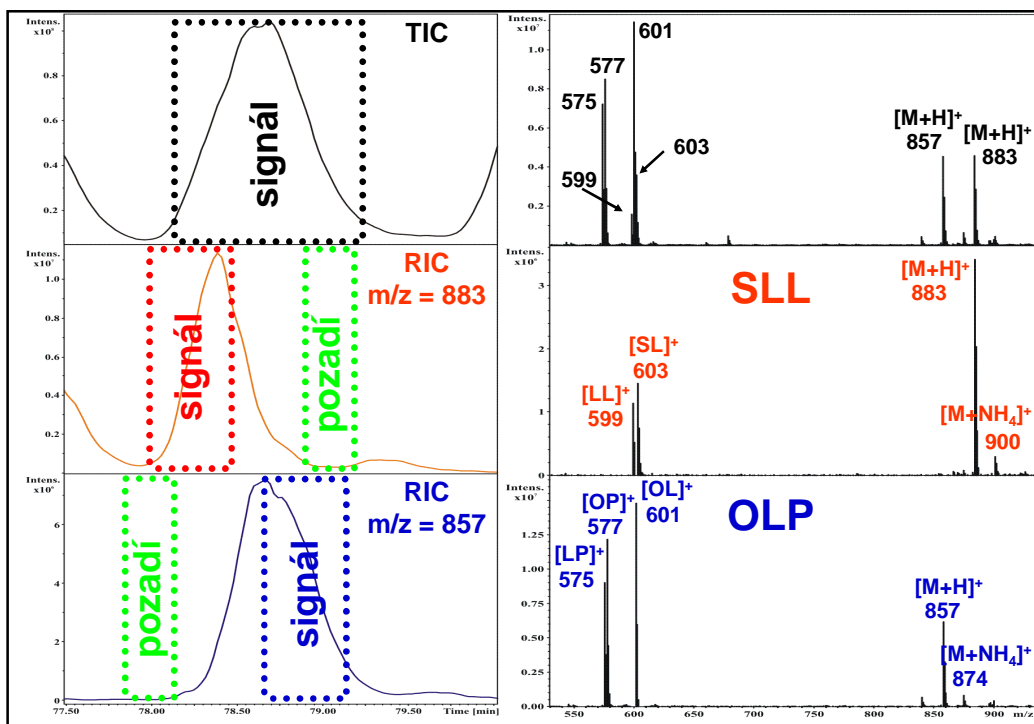


Identifikace koeluční píků triacylglycerolů

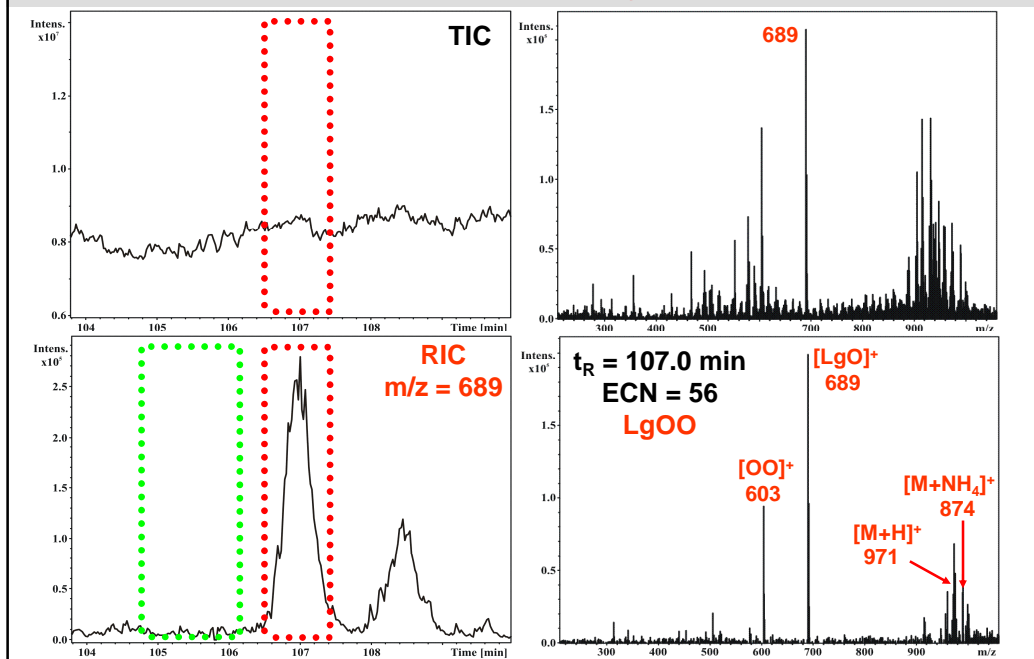


Identifikace koeluční píků triacylglycerolů





Identifikace stopových látek



Selektivní záznam vybraného iontu

Selected Ion Monitoring - SIM

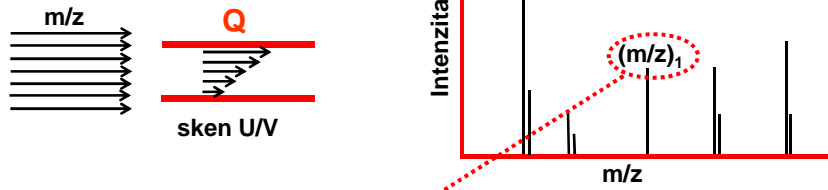
- výběr (filtr) jednoho iontu pomocí nastavených parametrů (U, V, B)
- stále je měřena intenzita pouze jednoho iontu, ostatní ionty nejsou zaznamenány
- výrazné zvýšení citlivosti oproti základnímu skenu, vhodné pro kvantitativní analýzu

pro Q platí: $m/z = 1$ až 1 000 → 1/1 000 času na 1 ion, SIM = 100% času na 1 ion

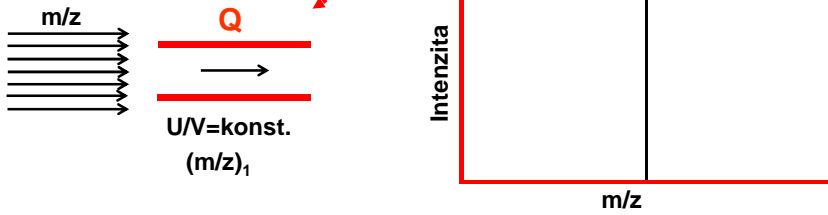
- možnost výběru několika iontů (peak switching) – úměrné snížení citlivosti!
- Q, sektorové analyzátory
- nelze použít analyzátory na principu pasti
- nelze zpětně vyvolat spektrum

Selektivní záznam vybraného iontu

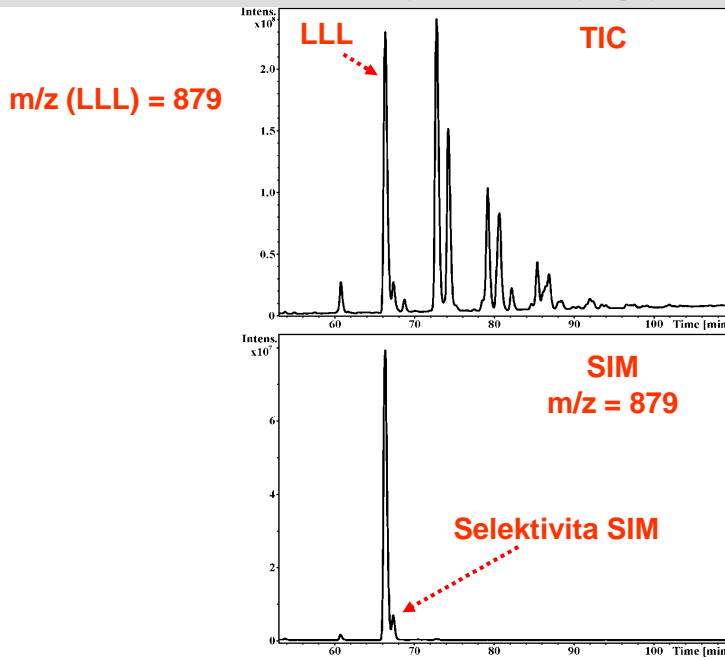
Základní sken



SIM



HPLC/MS analýza triacylglycerolů - SIM



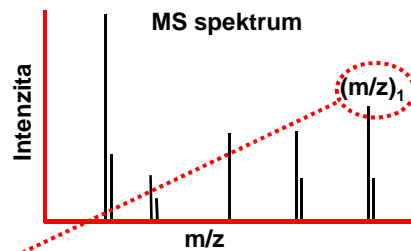
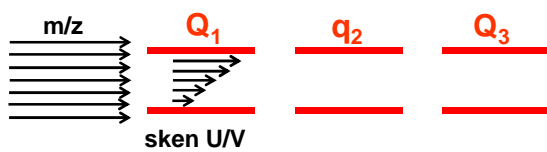
Sken produktových iontů

Product Ion Scan - PR

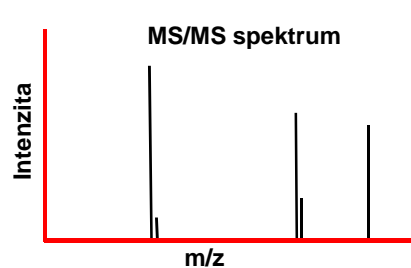
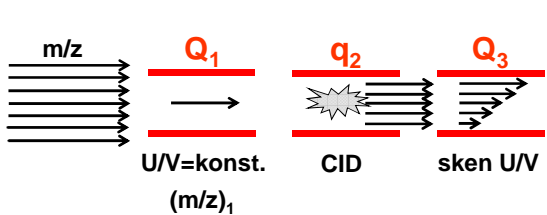
- zastaralý název sken dceřiných (Doughter ion scan) nebo fragmentových (Fragment ion scan) iontů
- měří se produktové ionty po fragmentaci vybraného iontu prekurzoru
- jedná se o měření MS/MS nebo MSⁿ spekter z vybraných iontů
- manuálně nebo plně automaticky v průběhu HPLC/MS analýzy
- informace o struktuře látky, identifikace
- všechny analyzátoři s možností MS/MS (QqQ, IT, sektorové analyzátoři, hybridní analyzátoři, atd.)

Sken produktových iontů

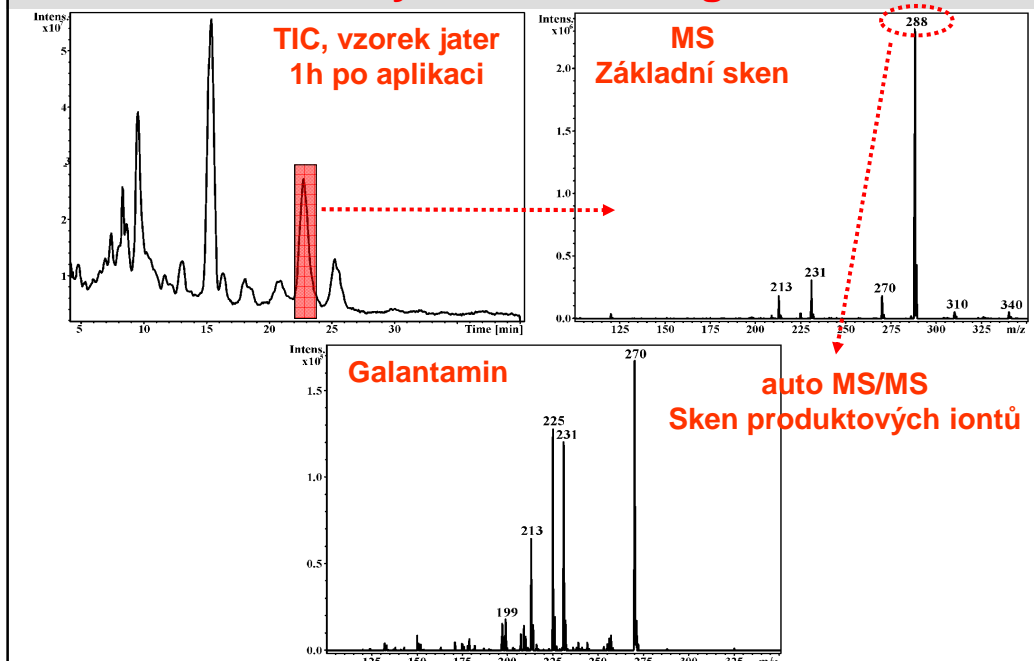
Základní sken



Sken produktových iontů



HPLC/MS analýza metabolitů galantaminu



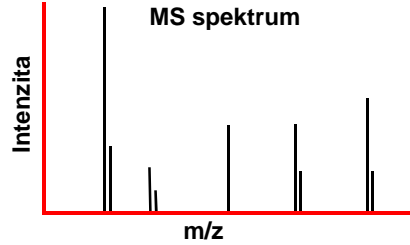
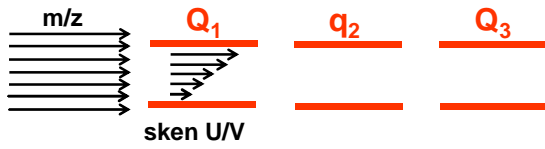
Sken iontů prekurzoru

Precursor Ion Scan - PI

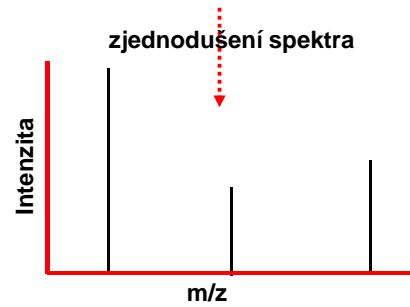
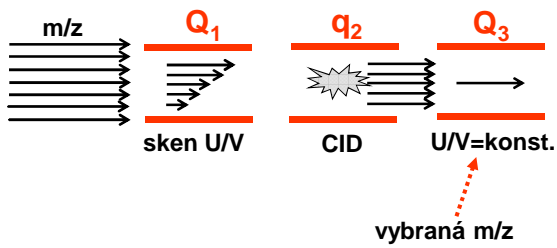
- zastaralý název sken rodičovských iontů (Parent ion scan)
- pro vybraný produktový (fragmentový) iont se zjišťuje původní iont prekurzoru
- poskytuje informace o struktuře látky
- detekce vybrané funkční skupiny nebo detekce tříd sloučenin s podobnou strukturou na základě jejich charakteristického fragmentového iontu
- zjednodušení spekter
- zvýšení S/N
- QqQ, sektorové analyzátoary

Sken iontů prekurzoru

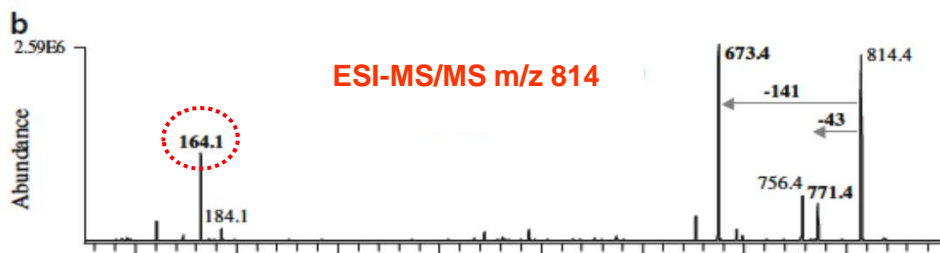
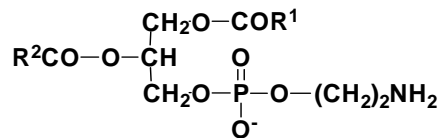
Základní sken



Sken iontů prekurzoru



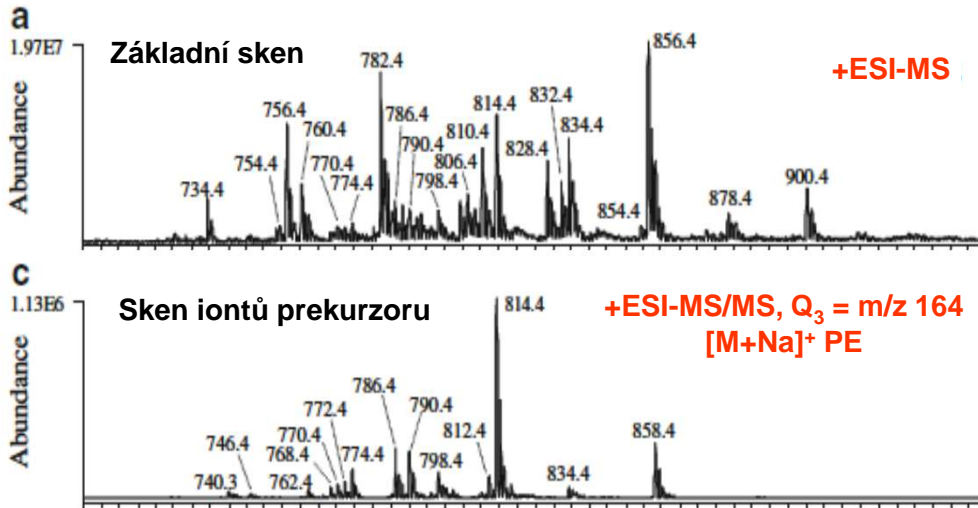
Identifikace fosfoethanolaminů (PE)



Charakteristický fragment všech $[\text{M}+\text{Na}]^+$ PE je $m/z = 164$

Identifikace fosfoethanolaminů (PE)

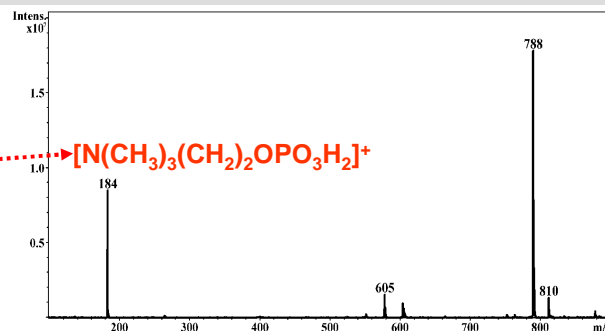
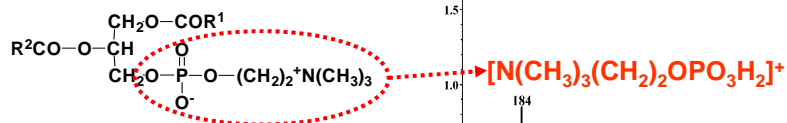
ESI-MS celkového lipidového extraktu



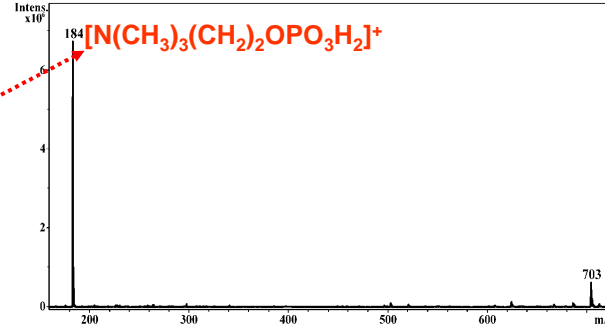
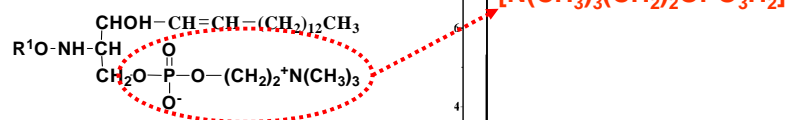
T.A. Lydic a kol., Anal. Bioanal. Chem. 394 (2009) 267

HPLC/MS analýza lipidů

Fosfocholiny (PC)



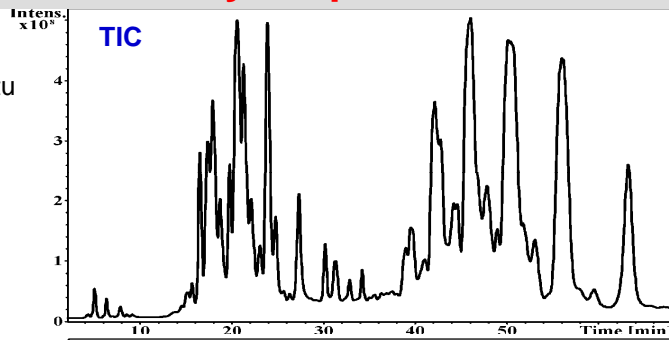
Sfingomyeliny (SM)



HPLC/MS analýza lipidů

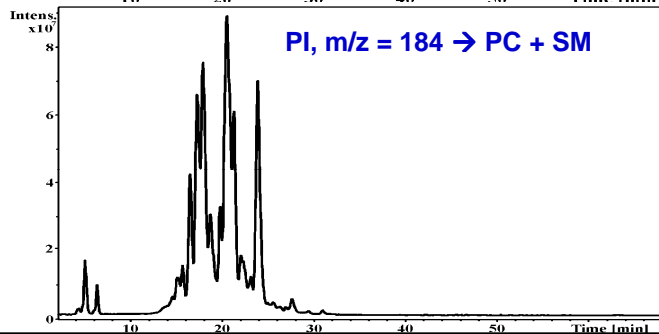
Základní sken

HPLC/MS celkového extraktu
lipidů z vaječného žloutku



Sken ionů prekurzoru

Q₃ = konst. = m/z 184



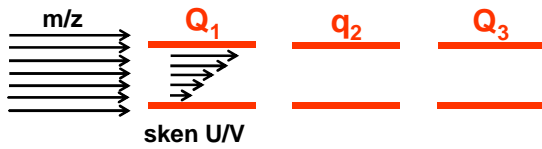
Sken neutrálních ztrát

Neutral Loss Scan - NL

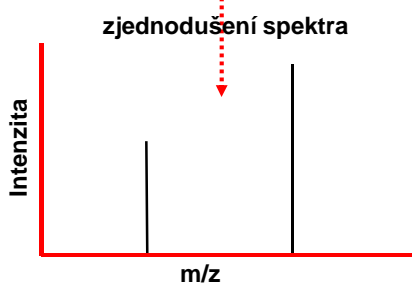
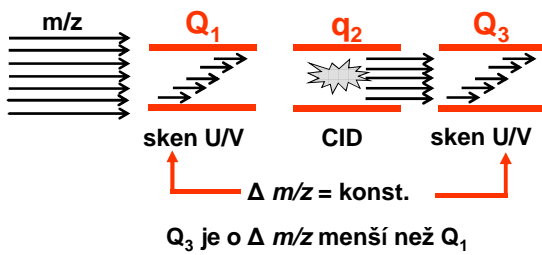
- detekce látek se stejnou funkční skupinou
- ztráta stejné neutrální částice o určité m/z (např. alkoholy $\Delta m/z = 18$)
- zjednodušení spektra
- zvýšení S/N
- QqQ (skenování na obou kvadrupólech se stále stejným $\Delta m/z$), sektorové analyzátory

Sken neutrálních ztrát

Základní sken

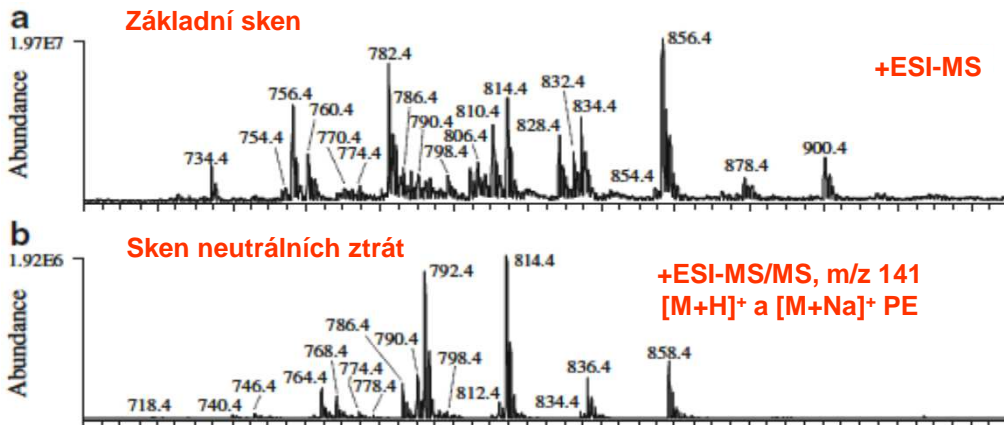
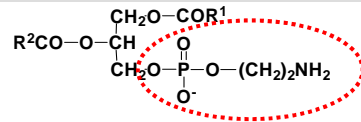


Sken neutrálních ztrát



ESI-MS celkového lipidového extraktu

Charakteristická ztráta PE je $m/z = 141$

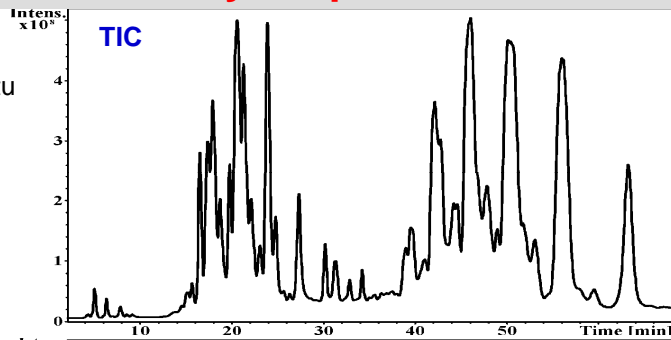


T.A. Lydic a kol., *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 267

HPLC/MS analýza lipidů

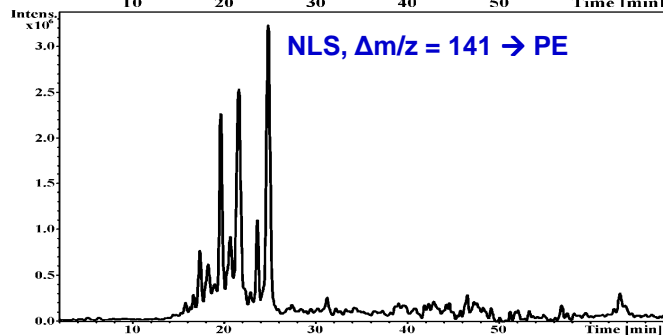
Základní sken

HPLC/MS celkového extraktu
lipidů z vaječného žloutku



Sken neutrálních ztrát

fosfoethanolaminy (PE)
sken Q_1 a Q_3 s $\Delta m/z = 141$

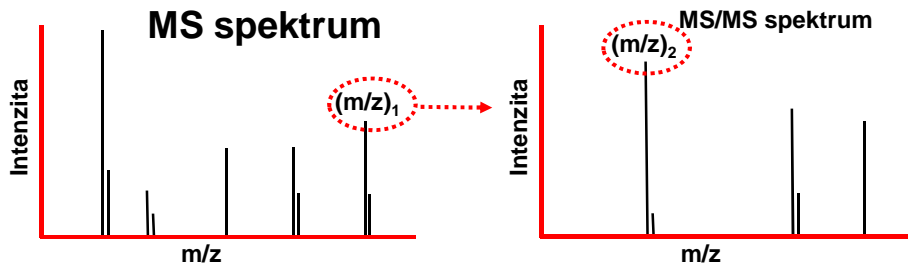


Sken jedné nebo více iontových reakcí

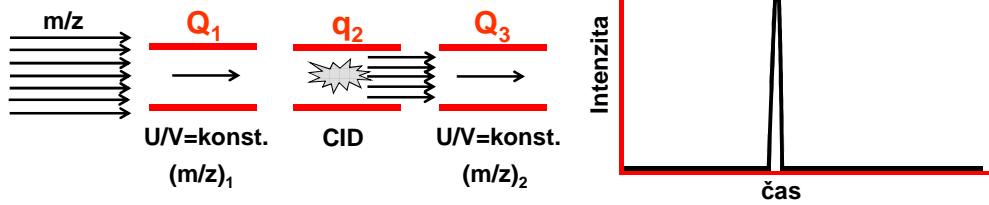
Selected Reaction Monitoring - SRM

- podle IUPAC není označení MRM doporučováno
- podobné skenu iontu prekursoru, ale prekuzory jsou předem známy
- výrazné zlepšení citlivosti, kvantitativní analýza
- oproti SIM výrazné zlepšení selektivity
- QqQ, sektorové analyzátoary

Sken jedné nebo více iontových reakcí



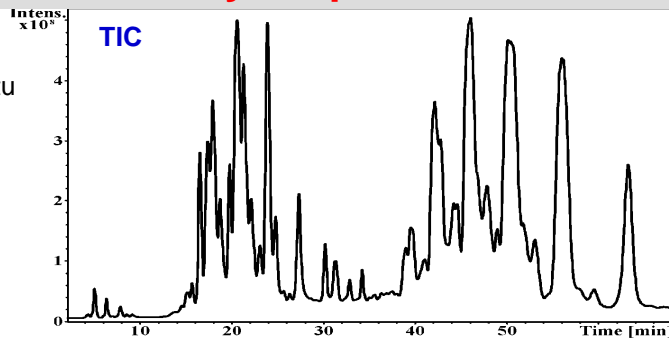
SRM



HPLC/MS analýza lipidů

Základní sken

HPLC/MS celkového extraktu lipidů z vaječného žloutku

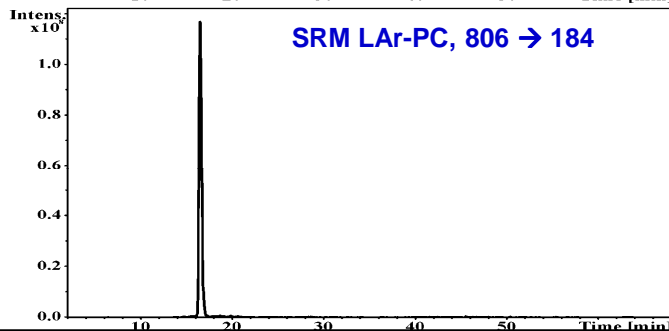


SRM

LAr-PC

$Q_1 = \text{konst.} = m/z 806$

$Q_3 = \text{konst.} = m/z 184$



Porovnání MS skenů

Sken	Q ₁	q ₂	Q ₃
základní sken	sken	-	-
selektivní záznam vybraného iontu (SIM)	konst.	-	-
sken produktových iontů (PR)	konst.	CID	sken
sken iontů prekurzoru (PI)	sken	CID	konst.
sken neutrálních ztrát (NL)	sken	CID	sken (konst. $\Delta m/z$)
sken iontových reakcí (SRM)	konst.	CID	konst.