

Kõrglahutusega Massispektromeetria (FT-massispektromeetria)

FT-ICR ja FT-Orbitrap: Kõrgeima massilahutuse ja madalaima m/z mõõtmise määramatusega massispektrometri tüübid

11.05.2015

1

Aatommassid

- Aatommassi ühik on 1/12 ^{12}C isotoobi massist
- Aatomi **aatommassiks** A_r (molekuli molekulmassiks M_r) nimetatakse aatomi (või isotoobi või siis molekuli või ka iooni) massi suhet 1/12 süsiniku ^{12}C isotoobi massisse
 - Definitsiooni järgi: $A_r(^{12}\text{C}) = 12.00000$
 - Alaindeks r: tegu on suhtelise suurusega, st ühikuta
 - Siiski on justkui ka kaks ühiku nime: *Dalton* ja *amu* (*atomic mass unit*)

11.05.2015

2

Aatommassid

- Elementide isotoopide aatommassid on **enam vähem** tuuma prootonite ja neutronite arvude kordsed, **kuid mitte täpselt!**
 - $A_r(^{12}\text{C}) = 12.000000$ amu
 - $A_r(^{13}\text{C}) = 13.003360$ amu
 - $A_r(^{14}\text{N}) = 14.003069$ amu
 - $A_r(^{16}\text{O}) = 15.994920$ amu

 - $A_r(e^-) = 0.0005486$ amu

11.05.2015

3

Elementide aatommassid

- Looduslikud elemendid on enamasti **isotoopide segud**
- Loodusliku C aatommass $A_r(\text{C}) = 12.011$
 - u. 1% looduslikust süsinikust on ^{13}C
- Loodusliku Cl aatommass $A_r(\text{Cl}) = 35.453$
 - u. 75% looduslikust kloorist on ^{35}Cl ja ca 25% on ^{37}Cl
- **Massispektromeeter võimaldab need isotoobid lahutada**
 - Cl korral on kaks joont
 - m/z erinevus on u. 2 amu
 - Intensiivsused suhtuvad kui 75 : 25

11.05.2015

4

Aatommassid

- **Nominaalne aatommass:** aatomituuma prootonite ja neutronite arvu summa
 - See on see, mida väikeste ja keskmise suurusega molekulide korral näitab madala lahutusvõimega MS
 - Molekulis olevate aatomite nominaalsete aatommasside summa on **nominaalne molekulmass**
- **Täpne aatommass:** aatomi massi suhe 1/12 süsiniku ^{12}C isotoobi massisse

11.05.2015

5

Näide: CO, N₂ ja C₂H₄

- CO, N₂ ja C₂H₄ nominaalne molekulmass on 28
- Põhilistest isotoopidest koosnevate molekulide täpsed molekulmassid:
 - CO: 27.994920 amu (täpsemalt: $^{12}\text{C}^{16}\text{O}$)
 - N₂: 28.006150 amu (täpsemalt: $^{14}\text{N}_2$)
 - C₂H₄: 28.031300 amu (täpsemalt: $^{12}\text{C}_2^1\text{H}_4$)
- Vastavad molekulaarioonid:
 - CO⁺: 27.994371
 - N₂⁺: 28.005601
 - C₂H₄⁺: 28.030752
 - Elektroni mass 0.0005486 amu

Neid ioone nimetatakse isobaarideks

11.05.2015

6

Massispektromeetri lahutusvõime

- On väljendatav:
 - Vähiama Δm väärtusena, mida veel eristada saab
 - Võib olla esitatud suhtena $\Delta m/m \cdot 1\,000\,000$
 - Ühik: ppm
 - R kaudu: $R = m / \Delta m$
- Paljude massisanalüsaatorite korral
 - $\Delta m \sim m$, seega Δm ei ole konstantne kogu massiskaala ulatuses
 - R on suures plaanis konstantne kogu massiskaala ulatuses

Kõiki „m“-e siin slaidil tuleb interpreteerida kui „m/z“-sid.

11.05.2015

7

Kõrglahutusega massispektromeetria

- Massispektromeetria, mis võimaldab
 - sama **nominaalse** massiga kuid erineva **täpsete** massidega ionide vahel vahet teha ja
 - määrata kõrge täpsusega (*accuracy*) m/z väärtusi
- Selle tulemusena on võimalik:
 - Ainete eristamine keerukates segudes eelneva lahutamisetä
 - Ainete identifitseerimine väga kõrge selektiivsusega

11.05.2015

8

Kõrglahutusega massispektromeetria

- CO^+ ja N_2^+ vahel vahe tegemiseks pole vaja väga kõrget lahutusvõimet, sest
 - m/z on madalad ja
 - m/z erinevus on suur: 0.01123 amu (400 ppm)
 - Vajalik lahutus: $R = 28 / 0.0112 = 2500$
- CO^+ ja C_2H_4^+ ?

11.05.2015

9

Lahutusvõime vs Mass Accuracy

- **Lahutusvõime**
 - Kuivõrd MS suudab vahet teha lähedaste m/z suhetega ionide vahel
 - Ei tähenda tingimata, et m/z oleks väga lähedane tegelikusele
- m/z väärtuse **täpsus** (*Accuracy*)
 - Kuivõrd mõõdetud m/z väärtus on lähedane tegelikule
 - Üldiselt eeldab ka kõrget lahutust

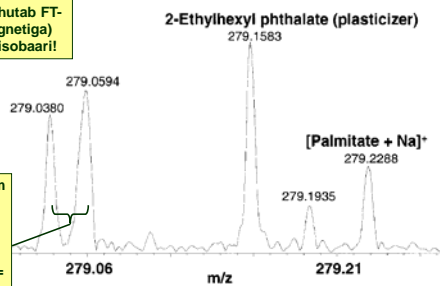
11.05.2015

10

Mida suurem M, seda kõrgem lahutusvõime on vajalik

Keerukas orgaaniliste ainete segu
Nagu näha, lahutab FT-ICR (10T magnetiga) kõik viis 279 isobaari!

Erinevus 75 ppm
Saavutatud lahutusvõime kõrgem kui $R = 279 / 0.021 = 13285$



11.05.2015

11

FT-Massispektromeetria

- FT rakendamine massispektromeetrias võimaldab saavutada
 - kõrget **massilahutust** (*mass resolution*)
 - mitusadatuhat kuni 1.N miljonit
 - kõrget massimõõtmise **täpsust** (*mass accuracy*)
 - Tava: 2-10 ppm, parim: 1 ppm ja alla
 - teatud määral ka madalat avastamispiiri
 - Signaal on saadaval kuni mõnesajast ionist
 - võimalust uurida gaasifaasilisi ion-molekul reaktsioone (ICR)

11.05.2015

12

FT-Massispektromeetrite tüübid

Kaks tüüpi FT-MS aparate:

- **FT-ICR** (*Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*)
 - Klassikaline FT-MS
 - Parima suutlikkusega
 - Võimaldab uurida ioon-molekul reaktsioone
- **FT-Orbitrap**
 - Põhimõtteliselt uut tüüpi massispektromeeter
 - Välja töötatud viimaste aastate jooksul
 - Veidi madalama suutlikkusega, aga ka odavam ja lihtsam

11.05.2015

13

FT-ICR põhimõte

- 1. Ioonid tekitatakse mõne tavapärase ionisatsioonimeetodi abil
 - ESI levinuim
- 2. Ioonid juhitakse nn ICR rakku
 - Raku seinad on (lihtsustatult) kondensaatori plaadid
 - Rakk asub **ülitugevas magnetväljas**
 - Ülijuhtmagnet, enamasti 4 kuni 12 Teslat
 - Rakk asub **kõrges vaakumis**
 - Olenevalt rakendusest $n \cdot 10^{-7}$ kuni (kõrglahutuse jaoks) $n \cdot 10^{-10}$ torr
 - Molekuli vaba tee pikkus $5 \cdot 10^{-9}$ torr juures ca 10 km!

11.05.2015

14

FT-ICR Rakk



11.05.2015

15

Ülijuhtmagnet

Jahutatakse vedela heeliumi ja vedela lämmastikuga



11.05.2015

FT-ICR põhimõte

- 3. Ioonid hakkavad piki raku keskosa **tsüklotroonima**
 - Ioonid hoiab raku:
 - Külje suunas magnetväli
 - Otsa suunas plaatide polaarsus, mis on sama märgiga, mis ioonide laeng
 - tsüklotronliikumise raadius kaugelt alla 1 mm
 - ioonid on "faasist väljas"

11.05.2015

17

FT-ICR põhimõte

- Tsüklotronliikumise ringsagedus (resonantssagedus):

$$\omega = \frac{B}{m/z}$$

z – iooni laeng, m – iooni mass, B – magnetvälja tugevus

- Sagedus sõltub massi ja laengu suhtest ning magnetvälja tugevusest
 - m/z suhte täpseks mõõtmiseks on vaja mõõta täpselt sagedust
 - See on teoreetiline võrrand, praktikas keerukam ja kasutatakse massikalibreerimist

11.05.2015

18

FT-ICR põhimõte

- 4. Tsüklotroonimise ajal on vajadusel võimalik
 - rakus olevate ionidega reaktsioone teostada
 - raku lastakse sisse mõnda gaasi, mille molekulidega need ioonid põrkuvad
 - neid ioone fragmenteerida
 - neist ionidest vaid valikuliselt mõne m/z väärtusega ioonid raku alles jätta ja ülejäänud eemaldada
- Need on kõik aluseks MS/MS võimalustele

11.05.2015

19

FT-ICR põhimõte

- 5. Ioonide detekteerimiseks nad **ergastatakse**
 - Ühele külgmiste plaatide paarile rakendatakse keeruline pingepulss, mis sisaldab kõikide ionide sagedusi
 - Ioonid lähevad kõik üle suuremate raadiustega orbiitidele
 - olenevalt raku mõõtmetest mitu cm
 - Sama m/z suhtega ioonid on nüüd "samas faasis"

11.05.2015

20

FT-ICR põhimõte

- 6. Faasis ionide tsüklotroonimisel kondensaatori plaatide vahel tekib neil plaatidel keeruka kujuga pingepulss
 - Sisaldab **kõikide rakus leiduvate ionide sagedusi**
 - Iga sagedus on esindatud seda tugevamini, mida rohkem vastavat iooni raku on
- Impulssi kogutakse kuni mõne sekundi jooksul
 - Mida pikem kogumisaeg, seda
 - kõrgem lahutusvõime
 - kõrgem m/z mõõtmise täpsus
 - Pika kogumisaja jaoks on vaja kõrget vaakumit

11.05.2015

21

FT-ICR põhimõte

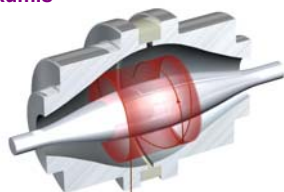
- 7. Kogutud impulsile rakendatakse **Fourier' teisendust**
- Saadakse sagedusspekter, millest eelmainitud valemi abil kerge vaevaga saab massispektri

11.05.2015

22

Orbitrap'i põhimõte

- 1. Ioonid tekitatakse mõne tavapärase ionisatsioonimeetodi abil
 - ESI levinuim
- 2. Ioonid juhitakse spetsiaalsesse raku
 - Raku seinad on (lihtsustatult) kondensaatori plaadid
 - Rakk asub **kõrges vaakumis**
 - Ca $n \cdot 10^{-10}$ torr
 - **Magnetvälja pole vaja**



11.05.2015

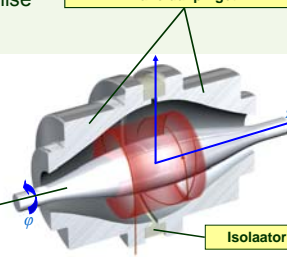
Orbitrap'i tööpõhimõte

- Vaatleme positiivseid ioone
- Ioonid
 - Tiirlevad ümber keskmise elektroodi
 - Ostsilleerivad z telje sihis
 - Ioonid on raku sisenedes faasis

Kaks elektroodi, millele
1. on rakendatud konstantne
positiivne potentsiaal ja
2. millele vahelduvpinget

Konstantse negatiivse
potentsiaaliga elektrood

Isolaator



11.05.2015

Orbitrap'i tööpõhimõte

- Z-telje sihis ostsilleerimise ringsagedus:

$$\omega_z = \sqrt{\frac{k}{m/z}}$$

- k on aparatuurne konstant, sõltub geometriast ja rakendatud potentsiaalidest
- Samamoodi kui ICR korral tekib keerukas pingeimpulss, mida töödeldakse FT abil
- Praktikas: massikalibreerimine

11.05.2015

25

TOF

- Massilahutus halvem
- Massiõigsus ka, aga mitte nii palju
- Suur eelis on kiirus
 - Reaalaja-LC režiim pole probleem



11.05.2015

Parameeter	FT-ICR	Orbitrap	TOF
Lahutusvõime	Kuni 1.N mln	Kuni paar-sada tuhat	Kuni mõni-kümmend tuhat
m/z täpsus (accuracy)	≤ 1 ppm	2 ppm	2-10 ppm
Magnet vajalik	Jah	Ei	Ei
Maksimaalne m/z	Ca 5000	Ca 5000	Ca 100 000
MS ⁿ võimalus	Jah	Vaid hübriid-süsteemidel	Vaid hübriid-süsteemidel
Ioon-molekul reaktsioonid	Jah	Ei	Ei
Kiirus	Aeglane	Aeglane	Väga kiire
Ioonallikad	ESI (MALDI)	ESI	MALDI (ESI)

11.05.2015

27

Massitelje kalibreerimine

- Eeltoodud teoreetilised valemid pole piisavalt täpsed, et saada õigeid m/z väärtusi
- Massitelge on vaja täiendavalt justeerida
- Selleks kasutatakse aineid, mis annavad hästi teada olevate m/z väärtustega ioone

11.05.2015

28

Rakendused

- Eeskätt sellised, kus kasutatakse ära kõrget lahutusvõimet ja m/z mõõtmise õigsust
 - Ainete täpsete molekulmasside määramine
 - Sünteesiproduktide identiteedi kinnitamine
 - Ainete identifitseerimine
 - m/z väärtuse, isotoopmustrid ja vajadusel MS/MS info abil
 - "Mis ained on üldse meie proovis sees?" –tüüpi analüüs
- Proteoomika, metabloomika, ...
- Samuti gaasifaasiliste ioon-molekul reaktsioonide uurimine (FT-ICR)

11.05.2015

29

Mida kõrgem m/z, seda rohkem isobaare!

Mass	Theoretical Mass	[ppm]	Delta	[mmu]	RDB	Composition
516.76671	516.76671	0.0	0.0	21.0	C ₄₀ H ₇₁ O ₁₂	N ₁₃
	516.76647	0.5	0.2	15.0	C ₄₀ H ₇₀ O ₁₁	N ₉ S ₂
	516.76638	0.6	0.3	12.0	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₄	N ₁₅ S ₁
	516.76705	-0.7	-0.3	11.5	C ₄₃ H ₇₇ O ₁₅	N ₁₂ S ₁
	516.76604	1.3	0.7	16.0	C ₄₀ H ₇₀ O ₁₆	N ₉
	516.76738	-1.3	-0.7	20.5	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₃	N ₁₀
	516.76604	1.3	0.7	21.5	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₁	N ₁₆
	516.76580	1.8	0.9	15.5	C ₄₇ H ₇₇ O ₁₀	N ₁₂ S ₂
	516.76772	-2.0	-1.0	16.5	C ₄₄ H ₇₃ O ₁₁	N ₁₆ S ₁
	516.76773	-2.0	-1.0	11.0	C ₄₅ H ₇₀ O ₁₆	N ₉ S ₁
	516.76805	-2.6	-1.3	25.5	C ₅₂ H ₈₉ O ₁₄	N ₁₄
	516.76537	2.6	1.3	16.5	C ₄₄ H ₇₃ O ₁₅	N ₁₂
	516.76807	-2.6	-1.4	7.0	C ₃₈ H ₇₀ O ₁₄	N ₁₅ S ₂
	516.76513	3.0	1.6	10.5	C ₄₆ H ₈₁ O ₁₄	N ₈ S ₂
	516.76513	3.1	1.6	16.0	C ₄₅ H ₇₅ O ₉	N ₁₅ S ₂
	516.76839	-3.3	-1.7	16.0	C ₄₆ H ₇₅ O ₁₂	N ₁₃ S ₁
	516.76479	3.7	1.9	20.0	C ₅₂ H ₇₉ O ₁₁	N ₉ S ₁
	516.76872	-3.9	-2.0	25.0	C ₅₄ H ₈₁ O ₁₀	N ₁₁
	516.76470	3.9	2.0	17.0	C ₄₄ H ₇₁ O ₁₄	N ₁₅
	516.76874	-3.9	-2.0	6.5	C ₄₀ H ₈₁ O ₁₅	N ₁₂ S ₂
	516.76446	4.3	2.2	11.0	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₃	N ₁₁ S ₂
	516.76897	-4.4	-2.3	12.5	C ₄₀ H ₇₃ O ₁₆	N ₁₆
	516.76907	-4.6	-2.4	15.5	C ₄₈ H ₇₇ O ₁₃	N ₁₀ S ₁

11.05.2015

Massi mõõtmise täpsus ± 5 ppm

- Eelmine slaid vastab parimate tava-massispektromeetrite võimekusele
- 23 kandidaadi seast on kaunis raske ära arvata, millise ainega tegelikult tegu on!
- Identifitseerimine raske!

11.05.2015

31

Massi mõõtmise täpsus ± 1 ppm

- See slaid vastab FT-ICR võimekusele

Mass	Theoretical Mass	[ppm]	Delta [mmu]	Delta	RDB	Composition
516.76671	516.76671	0.0	0.0	21.0	C ₂₉ H ₇₁ O ₂ N ₃	
	516.76647	0.5	0.2	15.0	C ₂₉ H ₇₃ O ₁ N ₃ S ₂	
	516.76638	0.6	0.3	12.0	C ₂₁ H ₃₅ O ₁₄ N ₁₅ S ₁	
	516.76705	-0.7	-0.3	11.5	C ₄₃ H ₇₇ O ₁₅ N ₁₂ S ₁	

Instrument	LTO-FT 7 T magnet
Mass Error	1 ppm
# of Proposals m/z 516.76671	4

- Nelja kandidaadi hulgast on märksa lihtsam selgitada, milline on õige aine!

- Vajadusel kasutatakse täiendava identifitseerimise jaoks MSⁿ eksperimente

11.05.2015

<http://www.thermo.com/>

Brutovalem vs struktuur

- Massispektrist saab vaid molekuli brutovalemi
- Struktuuri teadasaamiseks:
 - MSⁿ
 - Sõltumatu info
 - looniikuvusspektroskoopia

11.05.2015

33

Nafta analüüs

Acc. Chem. Res. 2004, 37, 53-59

Kõrglahutusega FT-ICR annab võimaluse identifitseerida naftas ka madalas sisalduses esinevad ja heteroaatomeid sisaldavad koostisosad

Neid aineid on ca 20 000

Lisaks lahutusvõimele ja m/z õigsusele on oluline see, kuidas ioniseerida

Ultrahigh-resolution Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry has recently revealed that petroleum crude oil contains heteroatom-containing (N,O,S) organic components having more than 20 000 distinct elemental compositions (C_cH_hN_nO_oS_s).

It is therefore now possible to contemplate the ultimate characterization of all of the chemical constituents of petroleum, along with their interactions and reactivity, a concept we denote as "petroleomics".

Such knowledge has already proved capable of distinguishing petroleum and its distillates according to their geochemical origin and maturity, distillation cut, extraction method, catalytic processing, etc.

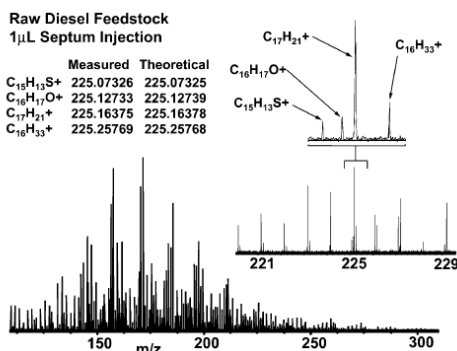
11.05.2015

34

Nafta analüüs: näidis-spekter (5.6 T magnet)

Raw Diesel Feedstock
1 µL Septum Injection

	Measured	Theoretical
C ₁₉ H ₁₃ S ⁺	225.07326	225.07325
C ₁₈ H ₁₇ O ⁺	225.12733	225.12739
C ₁₇ H ₂₁ ⁺	225.16375	225.16378
C ₁₆ H ₃₃ ⁺	225.25769	225.25768



11.05

Proteoomika

- Biokeemilise analüüsi valdkond, mille eesmärk on uurida
 - millised valgud organismi millistes osades sisalduvad
 - nii tuntud valkude identifitseerimine kui ka tundmatute avastamine
 - milline on nende sisaldus ja selle dünaamika
 - millised on nende funktsioonid
- Organismi proteoom on organismis sisalduvate valkude kogum
 - Erinevalt genomist
 - proteoom on erinev organismi erinevates rakkudes
 - proteoom muutub pidevalt
 - Paljusid valke on väga väikestes kogustes

11.05.2015

36

MS – moodsa proteoomika võti

- Proteoomikas kasutatakse erinevaid lähenemisi
 - Suures enamuses nad baseeruvad massispektromeetrial
- Enamasti üks kahest
 - MALDI-TOF v. LC-TOF
 - klassikaline
 - FT-MS
 - kas FT-ICR või Orbitrap
 - uuemal ajal hakanud rohkem levima eeskätt tänu LC-MS arengule
 - MS/MS eksperimendid

11.05.2015

37

MS proteoomika

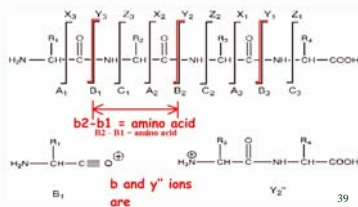
- Igal aminohappefragmendil on unikaalne mass
 - Proliin 97.05276
 - Arginiin 156.10111
 - ...
- Liites aminohapete fragmentide massid kokku ja lisades "otste" massid saame valgu molekulmassi
 - tuleb arvestada protoneerumist ja seda, mitme laenguga ioon on
- Mistahes võimaliku valgu molekulmass on täpselt ennustatav

11.05.2015

38

Valkude fragmentid

- Valke sageli lagundatakse **trüpsiiniga**
 - Katkestab valgu ahela arginiini ja lüsiini juurest
- **MS/MS eksperimendid**
 - See toimub spetsiifiliselt
 - B, C, Y, Z on levinumad



11.05.2015

39

MALDI-TOF proteoomika

- Valgud eraldatakse 2D geel-elektroforeesi abil
- Analüüs MALDI-ToF abil ühel kahest moodusest
 - Vahtult valkude analüüs (**top-down**)
 - Identifitseerimine m/z abil
 - Sageli kõrge m/z piirkonnas pole m/z mõõtmise täpsus piisav identifitseerimise jaoks
 - Valkude hüdrolüüsimine trüpsiini abil ja tekkivate peptiidide identifitseerimine (**bottom-up**)
 - Trüpsiin hüdrolüüsib valkusi arginiini ja lüsiini kõrvalt
 - Tekivad konkreetsete valkude jaoks karakteristikud peptiidide kogumid, mida identifitseeritakse

11.05.2015

40

Bottom-up FT-MS proteoomika

- Valk eraldatakse ja hüdrolüüsitakse trüpsiini abil
- Tekkinud peptiidide segu eraldatakse vedelikkromatograafiliselt ja analüüsitakse FT-MS abil
- Peptiidid identifitseeritakse
 - m/z järgi
 - MS/MS abil
- Peptiidide järgi identifitseeritakse valk

11.05.2015

41

Top-down FT-MS proteoomika

- Kromatograafiliselt eraldatakse terved valgud
- ESI abil tekitatakse kvaasimolekulaarioonid ja juhitakse FT massispektromeetrisse
 - võib mõõta terve valgumolekuli m/z väärtust, aga sellest identifitseerimiseks enamasti ei piisa
 - MS/MS eksperimendid
 - Valgu kvaasimolekulaarioon lõhutakse ICR rakus
 - IRMPD, ECD, SORI-CAD
 - Tekkivad peptiidfragmentid identifitseeritakse m/z väärtuste järgi

11.05.2015

42

Proteoomikast veel

- See siin oli tugevalt lihtsustatud käsitlus
- Reaalsed valgud on sageli mitte lihtsalt peptiidijadad vaid:
 - sisaldavad fosforüül-kõrvalahelaid
 - sisaldavad glükosüül-kõrvalahelaid
 - sisaldavad metallikomplekse
 - ensüümide aktiivsentrid
- Selliseid modifikatsioone nimetatakse *Post-Translational Modifications (PTM)*

11.05.2015

43