

ÚVOD DO TANDEMOVÉ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

MARTIN SADÍLEK

University of Washington, Seattle, WA 98195-1700, Spojené státy americké
sadilek@u.washington.edu

Došlo 2.1.20, přijato 7.1.20.

Klíčová slova: tandemová hmotnostní spektrometrie, aktivací metody, mechanismus, přenos energie, disociace srážkami

Obsah

1. Úvod a definice
 - 1.1. Tandemová hmotnostní spektrometrie v prostoru
 - 1.2. Tandemová hmotnostní spektrometrie v čase
2. Přehled aktivacích metod
 - 2.1. Srážková aktivace
 - 2.1.1. Teoretické pojednání srážek
 - 2.1.2. Aktivace a disociace srážkou s povrchem (SID)
 - 2.2. Aktivace snížením náboje prostřednictvím reakce s terčem
 - 2.2.1. ETD v pastích
 - 2.2.2. ECD v ICR celách
 - 2.2.3. Pozorované rozpady
 - 2.2.4. Mechanismus ECD a ETD
 - 2.2.5. Výhody ETD a ECD pro určení struktury peptidů
 - 2.3 Aktivace fotony
 - 2.3.1. Mnohofotonová disociace infračerveným zářením
 - 2.3.2. Termální aktivace
 - 2.3.3. Fotodisociace ultrafialovým zářením
3. Příklady tandemových experimentů
 - 3.1. Přístrojová provedení a jejich specifika
 - 3.2. Studium mechanismu fragmentací a využití isotopového značení
 - 3.3. Výzkumné uplatnění THS
 - 3.3.1. Tandemová hmotnostní spektrometrie s neutralizací a reionizací
 - 3.3.2. Studium elementárních reakcí v paprscích částic
 - 3.3.3. Akční iontová spektroskopie
 - 3.4. Uplatnění THS v kvantitativní analýze
 - 3.4.1. Praktický popis vývoje metody používající k detekci THS v prostoru s dvěma kvadrupoly
4. Závěr

1. Úvod a definice

Lidová moudrost, že „ve dvou se to lépe táhne“, platí i v oblasti hmotnostní spektrometrie. Přístroj, který dovo-luje provést postupnou dvou nebo více-stupňovou hmotnostní analýzu, otevírá široké pole možností, jak studovat ionizované molekuly.

Ruku v ruce se všeobecným rozšířením ionizace elektro-sprejem (electrospray ionization, ESI) a laserové desorpce – ionizace za účasti matrice (MALDI) silně vzrostla potřeba fragmentovat ionty za účelem strukturní analýzy, kvantitativní analýzy a studia fyzikálně-chemických vlastností iontů. Tandemová hmotnostní spektrometrie (THS) dnes zaujímá významné postavení a široké uplatnění v oblasti analytické hmotnostní spektrometrie. Z tohoto důvodu je jí věnován samostatný referát, který přímo navazuje na teoretické i praktické základy z ostatních příspěvků v této publikaci.

Pojem tandemová hmotnostní spektrometrie se používá pro experimenty a výsledky z dvojího typu hmotnostních spektrometrů:

1. Dva hmotnostní analyzáto-ry za sebou – THS v prostoru.
2. Jeden analyzáto-ry, který dovede zachytit specifický ion, následně ho excitovat a změřit hmotnostní spektrum vzniklých produktů – THS v čase.

V literatuře se setkáme s pojmy tandemová hmotnostní spektrometrie (tandem mass spectrometry) nebo také MS/MS, či MSMS, které graficky znázorňují podstatu metody.

V obecném slova smyslu lze koncept THS rozšířit na vícenásobnou fragmentaci, obecně označenou podle počtu stupňů MS^n , kde n vyjadřuje počet tandemových stupňů a tedy i počet hmotnostních analýz. V případě THS v prostoru je praktické omezení na maximálně 4 stupně, neboť iontový proud se snižuje ztrátami při průletu jednotlivými analyzáto-ry. Navíc také roste cena celého přístroje. Nejobvyklejším uspořádáním je dvojstupňový tandemový přístroj, ve kterém je mezi dva hmotnostní analyzáto-ry vložena srážková komora.

Pokud má být provedena tandemová analýza vyššího než druhého stupně, je snazší experimentálně realizovat sekvenční fragmentaci v druhém typu tandemových hmotnostních spektrometrů, kde lze postupně získat až 8 fragmentačních spekter (fragmentační strom).

Chemie iontů v plynné fázi poskytuje základy energetiky iontů a kinetiky rozpadů. Tandemová hmotnostní spektrometrie představuje nejen praktické využití teoretických znalostí o vlastnostech iontů, ale také metodu, která umožňuje tyto fyzikální vlastnosti iontů dále přímo studovat.

Typické měření v tandemové hmotnostní spektrometrii MS/MS (též MS^2) sestává ze tří kroků:

- izolace iontu prekurzoru,
- aktivace, vybudění vnitřní energie iontu (např. srážkou s neutrálním plynem), po které následuje jeho rozpad,
- analýza fragmentů.

Nejběžnější a technicky jednoduše proveditelný způsob vyvolání fragmentace je aktivace srážkami. Aby se rozptylem nesnižovala intenzita částic, jsou v praxi srážky prováděny buď ve srážkových komorách (např. kvadrupolových, hexapolových), které soustřeďují ionty podél osy pomocí radiofrekvenčních polí (THS v prostoru), nebo v iontových pastech (THS v čase).

Pro vybrané molekuly, které absorbují elektromagnetické záření na vhodné vlnové délce, lze vybudit rozpady intenzivním ozářením iontů jak v ultrafialové, tak i infračervené oblasti. Relativně novou metodou indukovaní rozpadů je reakce iontů s elektrony nebo s opačně nabitými ionty. Jak bude vysvětleno dále, rozpady indukované alternativními technikami často poskytují novou a komplementární informaci o složení iontů ve srovnání s nejméně používanými rozpady vyvolanými srážkami.

Pro celkové porozumění hmotnostně spektrometrické analýze je třeba si uvědomit skutečnost, že k aktivaci a rozpadu iontů může docházet i v jiných částech hmotnostního spektrometru, hlavně pak na jeho začátku.

a) Pokud ion molekuly získal vysokou hodnotu vnitřní energie již při ionizaci, rozpad může být spontánní nebo dovršený srážkami. Příkladem je klasická elektronová ionizace, fragmentace při fotoionizaci nebo fragmentace v důsledku srážek a reakcí s molekulami matrice při MALDI¹.

b) U zdrojů, kde k ionizaci dochází za atmosférického tlaku, je značná pravděpodobnost srážkové aktivace při přechodu do vakuové komory analyzátoru, kde je stále relativně vysoký tlak. Tento rozpad ve zdroji (in-source fragmentation) může odebrat celkovému signálu, ale může být také využit jako další stupeň aktivace, zejména u tandemových přístrojů v prostoru.

Moderní hmotnostní spektrometry složené ze dvou či více různých analyzátorů (hybridní hmotnostní spektrometry) jako např. kvadrupól – TOF, kvadrupól – iontová mobilita – TOF, kvadrupól – iontová past – elektrostatická past s vysokým rozlišením, dovolují provádění často složitých experimentů. V tomto referátu uvedené koncepty spojené s THS slouží jako vhodný základ k porozumění i pokročilým aplikacím současným a budoucím.

1.1. Tandemová hmotnostní spektrometrie v prostoru

Toto uspořádání využívá dvou hmotnostních analyzátorů v sérii, první analyzátor vybírá prekurzorový ion a druhý skenuje produkty vzniklé po aktivaci ve srážkové komoře naplněné neutrálním plynem (nejčastěji argonem nebo dusíkem) umístěné v oblasti mezi analyzátory. Za tímto účelem jsou spojovány různé principy hmotnostních analyzátorů. Nejběžnějšími kombinacemi jsou dva kvadrupóly, kvadrupól s analyzátorem doby letu, kvadrupól s elektrostatickou pastí s vysokým rozlišením,

dva analyzátory doby letu nebo dva sektorové analyzátory.

Skenovací funkce používané v THS

Spojení dvou hmotnostních analyzátorů v prostoru umožňuje několik unikátních skenovacích postupů (funkcí), která nelze provést s jednotlivým analyzátorem. To je výhodné pro různá uplatnění THS.

1. **Sledování produktových iontů** neboli sken produktů (product scan), někdy také sken dceřiných iontů (daughter ion scan). Tato skenovací funkce umožňuje získat informaci o produktech specifického prekurzoru. První analyzátor je nastaven na m/z prekurzoru a druhý analyzátor skenuje celý rozsah a měří plné spektrum fragmentových iontů vzniklých z prekurzoru aktivovaného srážkami.
2. **Sledování neutrální ztráty** neboli sken neutrální ztráty (neutral loss scan). Toto měření poskytuje informaci o všech iontech, které se zmenší o stejnou nominální hodnotu hmotnosti (např. ztráta molekuly vody odpovídá snížení o 18 Da). V tomto případě skenují oba analyzátory, a to s konstantním rozdílem m/z .
3. **Sledování prekurzorových iontů** neboli sken prekurzoru (precursor scan), poskytuje informaci o všech iontech, které po aktivaci vytvoří fragment se stejnou hodnotou m/z . První analyzátor skenuje celé spektrum, zatímco druhý je nastaven pouze na hodnotu společného produktového iontu.
4. **Sledování vybraných reakcí** (SRM – selected reaction monitoring), také v literatuře popisované jako sledování mnoha reakcí (MRM – multiple reaction monitoring). V tomto případě jsou po určitý časový úsek oba analyzátory fixovány, první na m/z prekurzoru a druhý na m/z produktu, a v případě sledování více než jedné fragmentační reakce rychle přeskakují na další páry iontů podle potřeby experimentu. Protože ani jeden analyzátor nemusí skenovat plné spektrum, může být více času vyhrazeno akumulaci signálu. Tato skenovací funkce je obdobou sledování vybraných iontů ve standardní hmotnostní spektrometrii s jediným analyzátorem (selected ion monitoring, SIM), ale díky zaměření na fragmentační reakci je dosaženo vyšší citlivosti a specificity.

Sledování prekurzoru nebo neutrální ztráty lze výhodně použít při analýzách směsí, neboť umožňují zaměřit se na specifickou detekci podskupiny látek. Příkladem mohou být fosfolipidy s cholinovou skupinou, nebo fosforylované peptidy vzniklé enzymovým štěpením proteinů. Tyto skeny jsou přímo proveditelné pouze na hmotnostních spektrometrech s hmotnostními filtry, které lze zafixovat na určité hodnotě m/z (kvadrupól, sektor).

Sledování vybraných reakcí je využíváno pro cílenou analýzu jednoho či více analytů (malých molekul <1000 Da, i peptidů). Sledování mnoha SRM kanálů ve spojení s chromatografií (zejména LC a GC) je dnes standardní kvantifikační metodou v mnoha aplikačních oblastech, především pak ve farmaceutickém průmyslu, při sledování životního prostředí, kvality potravin nebo v klinické chemii.

1.2. Tandemová hmotnostní spektrometrie v čase

Druhým způsobem uskutečnění tandemového hmotnostně-spektrometrického experimentu je postupné manipulování iontů v iontových pastech (radiofrekvenčních a iontové cyklotronové rezonanci, FT-ICR-MS). Ionty přivedené z iontového zdroje naplní past a jsou zachycené v periodickém radiofrekvenčním elektromagnetickém poli. Izolaci prekurzoru lze dosáhnout různými způsoby, všechny ale zahrnují změnu výsledného pole, aby si pouze ionty prekurzoru zachovaly stabilní trajektorii. K následné aktivaci dochází násobnými srážkami s plynem přítomným v pasti (většinou inertní helium). U iontových pastí jsou produkty zachyceny a postupně vypuzeny do detektoru. V případě FT-ICR-MS lze ionty aktivovat srážkami s pulzně přidaným plynem nebo v dnešní době běžnější srážkovou aktivací situovanou před ICR celou. Cyklický pohyb iontů indukuje proměnný signál, který je převeden Fourierovou transformací z časové domény do domény frekvence a výsledek je použit na zobrazení hmotnostního spektra s vysokým rozlišením. Pro úplnost je třeba doplnit, že detekce iontu sledováním indukovaného proudu je možná i v radiofrekvenčních pastech, ale toto uspořádání se v praxi ukázalo jako technicky nevýhodné.

THS v čase je obvykle cenově dostupnější, protože je zapotřebí pouze jediného hmotnostního analyzátoru. Další výhodou je možnost provedení vícenásobného opakování izolace-fragmentace a vytváření fragmentačního stromu, charakterizujícího ion a jeho strukturu. Podle intenzity signálu v jednotlivých krocích je možné dosáhnout až 8 fragmentačních kroků. Pro interpretaci dat je potřeba zohlednit známé omezení radiofrekvenčních iontových pastí, že nezachycují produkty v oblasti zhruba pod jednu třetinu m/z prekurzoru (low mass cutoff). Toto je výrazným nedostatkem například při *de novo* interpretaci spekter neznámých peptidů.

Některé výše uvedené skeny možné pro THS v prostoru, konkrétně sken neutrální ztráty a sken prekurzoru, nelze u THS v čase provést přímo. Byla ale zavedena softwarová řešení, která umožňují fragmentovat všechny ionty, a poté z matice dat extrahovat výsledek ztráty neutrální částice nebo prekurzory se společným produktem. Zjevnou slabinou tohoto přístupu je nutnost posbírat velké množství dat, což i při rychlém skenu způsobuje časové omezení, citelné obzvláště u spojení hmotnostní detekce se separací pomocí chromatografie.

2. Přehled aktivizačních metod

K aktivaci (vybuzení vnitřní energie) a rozpadu iontů dochází při interakci iontu s jinou částicí (molekulou, iontem, elektronem) ve formě srážkové nebo také reaktivní aktivace. Další možností je vybuzení iontu účinkem elektromagnetického záření (fotoaktivace).

K cílené aktivaci dochází v tandemové hmotnostní spektrometrii ve vymezeném prostoru, ve srážkové komoře (THS v prostoru) nebo v iontové pasti (THS v čase).

Experimentální schopnost pozorovat rozpady závisí na kombinaci vnitřní energie iontů, jejich stabilitě a na přístroji, kterým jev pozorujeme. Nejrychlejší rozpady iontů se odehrají ještě v iontovém zdroji. Střednědobé rozpady se odehrají během průletu iontů hmotnostním spektrometrem. Takovým iontům se někdy říká metastabilní. Dostatečně stabilní ionty se potom dají fragmentovat kontrolovaně ve srážkové komoře. Tabulka I shrnuje aktivizační metody a přístroje, kde jsou metody uplatněny v praxi². V následujících odstavcích budou podrobněji popsány jednotlivé způsoby aktivace a případné důsledky těchto aktivací na tandemový experiment.

2.1. Srážková aktivace

Nejsnazším a nejrozšířenějším způsobem je aktivace iontu prekurzoru srážkami. Rozpad vyvolaný srážkami (collision induced dissociation, CID) a rozpad po aktivaci srážkami (collisionally activated dissociation, CAD) jsou pojmy používané zaměnitelně³ a charakterizují nejvíce využívaný výsledek srážkové aktivace. Podrobné informace o mechanismu rozpadů jsou získávány z vědeckých experimentů, např. srážkových experimentů v paprscích částic.

Podle průběhu srážky (energičnosti a těsnosti srážek) dochází k rozptylu částic, jejich aktivaci a následnému rozpadu, ale může také dojít k deaktivaci nebo chemickým reakcím. K reaktivním srážkám dochází v různých energetických režimech a mechanismus záleží na srážkové energii a přístrojovém uspořádání. Při vysokoenergetických srážkách (tisíce eV) a srážkách při středních energiích (stovky eV) může navíc docházet k rychlým procesům typu:

- snížení náboje,
- neutralizace,
- přenos náboje,
- inverze náboje,
- disociace se separací náboje,
- přenos atomu nebo iontů (aktivace reakcí).

2.1.1. Teoretické pojednání srážek

V prvním kroku srážkového procesu se ionty s určitou kinetickou a vnitřní energií srážejí s neutrálním plynem. V případě, že dojde k pružné srážce, ionty se rozptýlí a změní pouze směr letu – podobně jako koule při kulečnicku. Dojde-li k nepružné srážce, kinetická energie se přeměňuje částečně na energii vnitřní a může také dojít k reakci. Aktivovaný ion se pak rozpadá s kinetikou reakce prvního řádu. Na výsledek srážky má vliv pohybová i vnitřní energie prekurzoru a rovněž hmotnost a chemické složení obou srážkových partnerů. Přitom pro soustavu platí zákon zachování energie. Výsledek srážky je ovlivněn následujícími parametry, které budou dále diskutovány v textu:

- dobou aktivace vzhledem k rozpadovým procesům a počtu srážek,
- účinností CID procesu (reakční průřez a rychlostní konstanta),
- množstvím přenesené energie,

Tabulka I

Stručný přehled aktivačních procesů používaných v THS (upraveno podle citace²⁾)

Aktivační metoda	Rozsah energií	Hmotnostní spektrometr	Popis aktivačního procesu
PSD	nízký	re TOF	Metastabilní nebo srážkou vyvolaný rozpad v analyzátoru doby letu.
CID	nízký	QqQ, IT, QqTOF, QqLIT, FTICR	Rozpad vyvolaný srážkou prekursoru s inertním plynem ve srážkové komoře, energie 1–100eV.
SID	vysoký	tandem TOF, sektor	CID se srážkovými energiemi v keV oblasti.
	nízký	QqQ, IT, FTICR, hybrid sektor-Q	Prekuzor naráží na povrch (pevný nebo samouspořádané monovrstvy) a dochází k rozpadům nebo vedlejším reakcím.
	vysoký	tandem TOF, re TOF	Totéž při vyšších srážkových energiích (podle přístroje).
ECD	nízký/střední	FTICR	Záchyt nízkoenergetických elektronů kladně nabitým prekuzorem následovaný rozpadem iontu radikálovým mechanismem.
ETD	nízký-střední	iontová past	Přenos elektronu z aniontu na kation vedoucí k rozpadu radikálovým mechanismem.
IRMPD	nízký	FTICR, iontová past	Souvislé ozářování iontu infračerveným zářením způsobí jeho vybuzení absorpcí mnoha fotonů a následuje rozpad iontu.
Termální aktivace	nízký	FTICR, iontová past	Souvislé tepelné ohřívání iontů vhodné zejména ke zjišťování energetických prahů a termodynamických vlastností iontů.

PSD – rozpad za zdrojem (post source decay)

reTOF – TOF s reflektorem

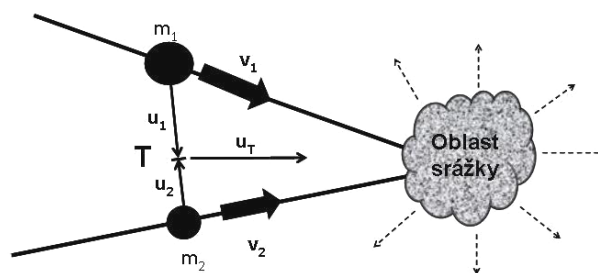
- přerozdělením energie,
- proměnlivostí rozdělení energie,
- mechanismem excitace (elektronická, rovibronická),
- časovou osou použitého přístroje (oknem pro rozpad).

Srážky si můžeme představit na příkladu motorových vozidel. Pohybují-li se dva automobily podobnou rychlostí ve stejném směru, jejich vzájemná kolize způsobí malou škodu, protože jejich relativní pohybová energie je malá. V případě, kdy tyto automobily jedou proti sobě, srážka povede k výraznému poškození vozidel. Z příkladu je zřejmé, že ne veškerá pohybová energie je k dispozici k přeměně na energii vnitřní. Podobně je tomu při srážkách částic (obr. 1). Z pozice vnějšího pozorovatele můžeme tedy popsat srážku v laboratorní souřadnicové soustavě (lab). V této soustavě souřadnic se částice pohybují rychlostí v . Rozhodující pro energetiku srážky je ale jejich relativní pohyb rychlostí u . Výhodně se proto srážkové jevy popisují v těžišťové soustavě souřadnic, kde sledujeme srážku relativně vůči těžišti T interagujících partnerů³.

Maximální množství pohybové energie **přeměnitelné** na vnitřní je dáno srážkovou energií v této těžišťové soustavě E_T a zbylá energie je neměnná kinetická energie těžiště $E(T)$. Energie soustavy se zachovává:

$$E_{\text{lab}} = E_T + E(T) \quad (1)$$

V tandemové hmotnostní spektrometrii se jako srážkového terče využívá plyn s termálním rozložením kinetické energie s průměrnou hodnotou $E = 3/2 RT = 3,7 \text{ kJ mol}^{-1}$ při 298 K, kterou můžeme považovat za zanedba-



Obr. 1. Pohyb dvou částic o hmotnosti m_1 a m_2 vedoucí ke srážce. Laboratorní rychlost v , rychlost v těžišťové soustavě u , rychlost těžiště u_T , poloha těžiště T

telnou vzhledem ke kinetické energii iontu ($E_{\text{lab}} \sim E_{\text{lab}}$ (ion)).

Rovnici pro rozdělení energie lze odvodit ve tvaru:

$$E_T = E_{\text{lab}} \cdot m_2 / (m_1 + m_2) \quad (2)$$

kde m_1 je hmotnost iontu a m_2 je hmotnost srážkového terče (neutrálního plynu, např. Ar, N₂).

Z rovnice je vidět, že čím větší je hmotnost terče, tím větší část energie se předá sledovanému iontu. Maximální možná energie přenesená srážkou je součtem energií obou kolizních partnerů v těžišťové soustavě. Rovnice (2) také ukazuje, že s rostoucí hmotností iontu se účinnost přenosu energie snižuje.

Energie předaná k vybuzení iontů se projevuje v časovém průběhu rozpadu iontů a výsledné spektrum závisí na kinetice rozpadu⁴. V závislosti na experimentálním měření jsou vzorkována různá časová období života iontů. V hmotnostní spektrometrii rozlišujeme dva hlavní energetické režimy. Vysokoenergetický režim (tisíce elektronvoltů) je běžný u sektorových přístrojů a analyzátorů doby průletu. Nízkoenergetický režim, kdy se srážkové energie pohybují v rozsahu 1–100 eV, je dostupný v kvadrupolech nebo iontových pastech.

S vysokoenergetickou aktivací je možné pozorovat rychlé rozpady a přímá štěpení silných vazeb, vyžadující vysokou prahovou energii. K aktivaci dochází často při podmínkách jediné nebo nízkého počtu srážek. Naopak s použitím mírné a postupné aktivace je detegován výsledek přesmyků a pomalých rozpadů typických pro iontově-molekulové komplexy, ale je zapotřebí vícenásobných srážek k dosažení energetického prahu těchto reakcí.

K největší účinnosti aktivace dochází, když je doba interakce při aktivaci srovnatelná s periodou excitovaného pohybu. Například vibrační pohyb s dobou trvání 10^{-14} s je vybuzen srážkami, které trvají řádově 10^{-14} až 10^{-12} s (cit.³). Excitace rotačně-vibračních stavů jsou právě dostupné při nízkoenergetických srážkách. Ukazuje se, že pro fragmentaci aplikovatelnou pro získání strukturální analytické informace se lépe hodí vícenásobné, nízkoenergetické srážky v radiofrekvenčních analyzátoch než jednotlivé, vysokoenergetické srážky v průletových analyzátoch.

Stejně jako v příkladu srážky dvou vozidel, kdy je rozdíl, dojde-li k čelní srážce nebo bočnímu dotyku, je dalším aspektem srážky její těsnost. Kvantitativně mluvíme u částic o srážkovém průřezu σ (collisional cross-section). Tato veličina hraje roli v účinnosti srážky a souvisí s intenzitou iontového proudu produktů v hmotnostní spektrometrii. Hodnoty se vyjadřují často v Å^2 (čtvereční angströmy, $100 \text{ Å}^2 = 1 \text{ nm}^2$) a jsou v rozmezí 10–200 Å^2 pro malé molekuly, ale dosahují hodnoty tisíců Å^2 pro proteiny (cit.⁵). Srážkový průřez záleží na velikosti molekuly, ale také na elektrostatických a slabých interakcích mezi molekulou a terčem. Technika iontové pohyblivosti využívá těchto vlastností jak ke studiu účinných průřezů ionizovaných molekul, tak i k separaci identických molekul s různou trojrozměrnou strukturou, např. konformerů bílkovin nebo isomerů.

Dostatečná aktivace záleží také na počtu srážek, který souvisí se střední volnou dráhou iontů a je závislý na hustotě plynu. Zeslabení signálu prekurzoru a nárůst signálu fragmentů souvisí tedy s počtem srážek určeným tlakem ve srážkové komoře⁶. V případě kvadrupólového tandemového hmotnostního spektrometru jsou analyzátoři diferenčně čerpány, a proto ve srážkové komoře může být dosažen zhruba 100× vyšší tlak ($\sim 0,3 \text{ Pa}$) než ve vakuových regíonech, ve kterých jsou umístěny kvadrupólové hmotnostní analyzátoři. Vyšším tlakem je dosaženo podmínek pro mnohonásobné srážky jak prekurzoru, tak produktů. Kombinací nastavení hustoty (tlaku) plynu a srážkové energie se potom optimalizuje signál vybraného fragmentu nebo reprezentativního spektra. Z praktického hlediska je zvyšování hustoty plynu omezené, neboť může

způsobit i opačný efekt, a to deaktivaci srážkami, tedy ochlazení vnitřní energie iontů. Parametry nastavuje operátor, a proto standardizace tandemových hmotnostních spekter z THS v prostoru pro vytvoření databází sloužících k určení neznámých sloučenin není snadná.

Standardizace MS/MS spekter je jednodušší, byla-li změřena v iontových pastech, protože tam dochází k aktivaci pouze prekurzoru a tlak je podobný u všech pastí. Po izolaci prekurzorového iontu dochází převážně k jeho rezonanční aktivaci prostřednictvím mnohanásobných srážek s plynem (nejčastěji heliem). V důsledku toho se izolovaný a aktivovaný ion rozpadá monomolekulárním procesem. Takto vzniklé fragmenty nejsou již dále vybuzeny srážkami, jsou mimo rezonanční energetické okno. Proto tandemová hmotnostní spektra z iontových pastí od různých výrobců a uživatelů si jsou více podobná a byla použita do databází spekter⁷. Tato charakteristika však může být nevýhodou, je-li cílem kontrola intenzity produktů (optimalizace produktů).

Pro praktické uplatnění hmotnostní spektrometrie, zvláště pro kvantitativní analýzu, je důležitý vliv výše uvedených parametrů na celkový iontový proud.

U THS v prostoru platí obdobná závislost, jaká je vyjádřena Lambertovým-Beerovým zákonem pro absorpci světla⁸:

$$I = I_0 \cdot \exp(-\sigma \cdot n \cdot l) \quad (3)$$

kde I je intenzita iontů s plynem a I_0 je intenzita prekurzoru bez plynu, σ je srážkový průřez, n hustota částic srážkového plynu a l délka srážkové komory. Množství plynu a délka srážkové cely jsou konstantní pro daný přístroj a srážkový průřez je stálý pro studovanou fragmentaci. Platnost této rovnice má významný důsledek pro užití v kvantitativní hmotnostní spektrometrii. Ukazuje, že pro stanovení koncentrace je možné použít měření I místo přímého měření I_0 .

U THS v čase (v iontových pastech) dochází rovněž k mnohonásobným srážkám a tudíž násobné aktivaci. Intenzita vytvořených produktů je tedy úměrná celkové rychlosti konstantě pro fragmentaci, ztráty iontů k a době excitace t :

$$I = I_0 \cdot \exp(-n \cdot k \cdot t) \quad (4)$$

V těchto přístrojích je také možné měřit informaci o množství stanovené sloučeniny, ale většinou s menším dynamickým rozsahem koncentrací.

2.1.2. Aktivace a disociace srážkou s povrchem (SID)

Z rovnice (2) vyplývá, že teoretické maximální aktivace lze dosáhnout zvyšováním hmotnosti terče. Extrapolací tohoto vztahu je zjevné, že k dosažení maximálního přenosu energie dojde v případě, kdy terčem bude pevný povrch, tedy terč, který má vůči iontu v podstatě nekonečnou hmotnost. Aktivace a disociace srážkou s povrchem (surface-induced dissociation, SID) tak vylepšuje zejména aktivaci pro velké biomolekuly⁹.

Srážky iontů s povrchy jsou ovšem fundamentálně složitější než s molekulami kolizního plynu. Výsledkem srážky s povrchem může být nejen účinná disociace, ale také neutralizace náboje či reaktivní srážka a může dojít

i k rozprašování (sputtering) povrchových částic. Chování povrchu je ovlivněno materiálem a jeho povrchovou úpravou. Používá se kov, oxidy kovů, samouspořádané monovrstvy organických molekul na zlatě či křemíku (self-assembled monolayers) nebo diamantový povrch.

Disociace (aktivace) srážkou s povrchem¹⁰ je technika, která maximalizuje vybuzení vnitřních energií při srážce. Kinetické energie jsou nízké, řádově pod 100 eV, ale míra konverze je vysoká. Experiment také umožňuje ladění aktivace tak, aby výsledek odpovídal více nízkoenergetickým nebo vysokoenergetickým srážkám. Nevýhodou pro praktické rozšíření je nízká citlivost z důvodů nízké účinnosti sběru signálu fragmentových iontů a také skutečnost, že konfigurace hmotnostního spektrometru pro SID nedovoluje snadné přecházení na další druhy aktivace¹¹.

2.2. Aktivace snížením náboje prostřednictvím reakce s terčem

Poměrně nový typ aktivace využívá rekombinační energie uvolněné při reakci iontu s terčem^{12–14}. Metodologie fragmentace pomocí snížení náboje byla původně zavedena na základě objevu disociace záchytem elektronu (electron capture dissociation, ECD) v ICR hmotnostních spektrometrech. Dnes tato oblast zahrnuje i další techniky disociace vícenásobně nabitých iontů. Pro kationty se dále používá disociace přenosem elektronu (electron transfer dissociation, ETD). Srovnatelnými procesy pro anionty jsou disociace odstraněním elektronu (electron detachment dissociation, EDD) nebo disociace přenosem protonu (proton transfer dissociation, PTD). V praxi se ale používají téměř výhradně metody pro kationty. ETD je v současné době nejrozšířenější, neboť experiment lze mnohem lépe a efektivněji zavést do běžných hmotnostních spektrometrů.

Při neutralizační reakci s opačně nabitým kolizním partnerem A ztrácí vícenásobně nabitý ion M jeden náboj: $(M + nH)^{n+} + A^{-} \rightarrow (M + nH)^{n-1+} + A + \text{vnitřní energie}$ (5)

Vznikne radikál-kation a uvolněná rekombinační energie se přeměňuje v energii vnitřní. Proces snižování náboje probíhá ve srážkovém komplexu, kde si konkurují s přenosem protonu. Přenos protonu je energeticky výhodnější než přenos elektronu, který ale probíhá na větší vzdálenost, a proto má obvykle větší srážkový průřez. Aktivace ECD/ETD, stejně tak jako aktivace pomocí fotonů (viz dále) může vést i k elektronicky vzbuzeným stavům. Energeticky jsou proto velmi často dostupné odlišné reakce a produkty než při aktivaci srážkami.

Hmotnostní spektrometry také dovolují přídavnou aktivaci srážkami, které dále rozštěpí nekovalentně spojené produkty aktivace ECD nebo ETD, a výrazně se tak zvyšuje intenzita pozorovaných fragmentů.

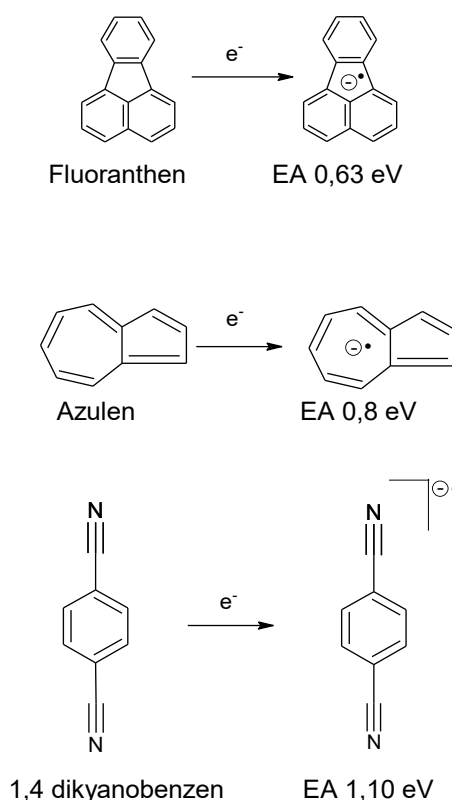
2.2.1. ETD v pastích

Provedení disociace přenosem elektronu v iontových pastích je umožněno reakcí kationtu s aniontem. Na prodáváných přístrojích se nejčastěji používá anion fluoranthenu připravený chemickou ionizací, ale existují i další slouče-

niny (obr. 2). Iontové pasti výhodně umožňují manipulace s nabitými částicemi, a proto jsou pro ETD experimenty obzvláště vhodné. Past se naplní kationty prekurzoru a následně ionty reaktantů, které jsou potom smíchány s prekurzorem vyrovnáním elektrostatických potenciálů¹⁵. Reakční doba se optimalizuje s tím, že obecně účinnost přenosu náboje roste s kvadrátem náboje kationtu. Výrobci se liší technologickým řešením zavádění reagentu do pasti – mohou být kolineární spolu s hlavním iontovým svazkem (a tedy s využitím stejné iontové optiky jako pro prekurzor) nebo z opačné strany pomocí samostatné optiky. Podobně tandemový hmotnostní spektrometr v prostoru může využívat oblast srážkové komory jako iontovou past a provádět v ní ETD reakce.

2.2.2. ECD v ICR celách

Provedení neutralizace náboje v ICR celách je založeno na přímém záchytu elektronů vytvořených například žhavenou katodou. Největší pravděpodobnost záchytu mají elektrony s nízkou pohybovou energií (< 0,2 eV)². Stejně tak prostorový překryv elektronového oblaku s iontovým je klíčovým pro účinnost ECD procesu. Metodologie fragmentace pomocí snížení náboje byla původně zavedena na základě objevu ECD v ICR hmotnostních spektrometrech, ale v poslední době se od ECD techniky spíše ustupuje. Důvodem je obecně malá účinnost ECD. V současnosti se



Obr. 2. Běžné reagenty pro ETD s hodnotami elektronové afinity EA

i v ICR hmotnostních spektrometrech používá více účinné externí ETD. To se provádí v iontové radiofrekvenční pasti umístěné před magnetickým polem ICR komory. Vytvořené iontové fragmenty se pak ve FT-ICR hmotnostním spektrometru analyzují s vysokým rozlišením a přesnou hmotou.

2.2.3. Pozorované rozpady

ETD a ECD našlo významné uplatnění v biologické analýze peptidů a bílkovin. Ionty biomolekul vytvořené elektrospřejem jsou často vícenásobně nabitě a snížení náboje stále zanechává jeden nebo více nábojů potřebných k analýze produktů pomocí hmotnostní spektrometrie. Energeticky bohatý iontový radikál se může rozpadat procesy poskytující u peptidů informaci nejen o sekvenci, ale i o strukturních prvcích, které nejsou zjistitelné disociací srážkami. Například se jedná o odlišení aminokyselin s různými postranními řetězci (Leu, Ile) nebo o informaci o post-translačních úpravách bílkovin (post translational modifications)¹⁶. Obě disociační techniky tak poskytují novou informaci o struktuře a modifikacích makromolekul.

2.2.4. Mechanismus ECD a ETD

Hlavní mechanismus fragmentace peptidového řetězce je v současné době vysvětlován primárním záchytem elektronu v Rydbergově orbitalu molekuly a jeho energetické relaxaci s přechodem do π^* orbitalu na amidové vazbě. Následuje štěpení N–C α vazby. Současně dochází k přenosu vodíkového atomu nebo protonu a vzniku c, z iontů. Možné fragmentace u peptidů jsou shrnuty v obr. 3. Výsledky fragmentace jsou citlivé na přítomnost vodíkových vazeb, na elektronickou strukturu a tvar molekul. Na procesu se mohou podílet jak základní, tak i excitované elektronické stavy iontů¹⁶.

2.2.5. Výhody ETD a ECD pro určení struktury peptidů

Tato technika poskytuje účinnou aktivaci pro běžné přístroje s jemnou ionizací (elektrospřejem) a omezeným rozsahem srážkových energií pro CID. Například byl pozorován výrazný rozdíl v rozpadech v peptidovém řetězci s přítomným prolinem („prolinový efekt“). Při srážkové aktivaci je fragmentace velmi snadná na amidové straně prolinu, a proto ve spektrech tyto ionty dominují. Naopak u ETD a ECD se fragmentace na prolinu zastaví. Amidový dusík je součástí kruhu a po záchytu elektronu dojde pouze k otevření tohoto kruhu, ale ne k přerušení peptidového řetězce¹⁷.

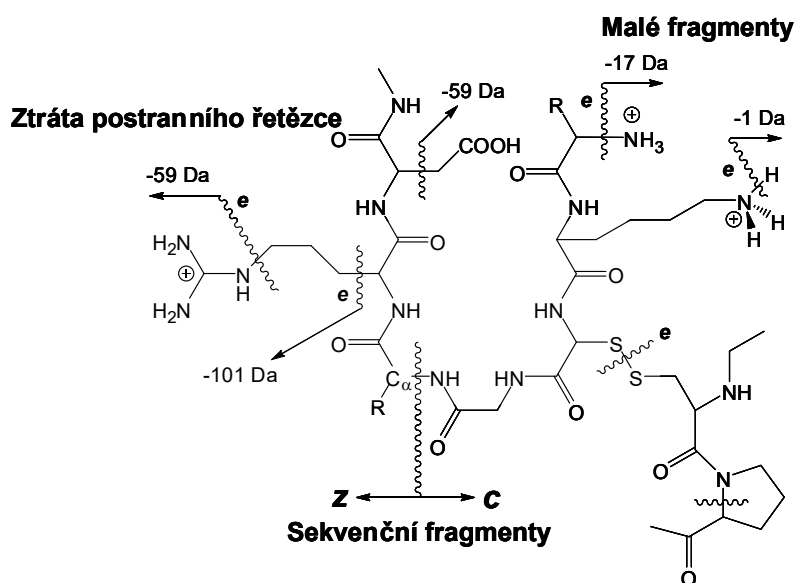
Dalším příkladem může být fragmentace fosforylovaných peptidů, které při srážce snadno ztrácí molekulu kyseliny fosforečné, ale při ETD a ECD aktivaci dochází převážně ke štěpení peptidových vazeb, čímž je informace o poloze fosfokupiny zachována.

Významné výhody ECD/ETD aktivací techniky je možné shrnout do těchto bodů:

- úspěšné sekvenování celých proteinů (shora),
- zachování posttranslačních úprav proteinů,
- rovnoměrnější rozdělení fragmentů a z toho vyplývající lepší pokrytí peptidové sekvence,
- selektivní štěpení disulfidických můstků.

2.3. Aktivace fotony

Fotodisociace iontů nabízí rozmanité použití a byla vyvinuta pro celé optické spektrum od VUV, UV, přes VIS až po IČ (cit.^{18,19}). Společným požadavkem všech fotodisociačních metod je přítomnost chromoforu (funkční skupiny), který absorbuje vlnovou délku záření z vhodného a dostatečně intenzivního zdroje.



Obr. 3. Možné fragmentace peptidu po ETD (ECD) aktivaci (laskavě poskytl F. Tureček)

2.3.1. Mnohofotonová disociace infračerveným zářením (IRMPD)

Mnohofotonová disociace infračerveným (IČ) zářením (infrared multiphoton dissociation, IRMPD) je v komerčních hmotnostních spektrometrech nabízena pro uspořádání, které umožňuje záchyt iontů (past'ové analyzátoři). Většinou se používá laserů s vlnovou délkou 10,6 μm a výkonem 25–50 W. Intenzivní laserové záření postupně excituje absorbující vazby v molekule a během 10–300 ms dojde k jejich štěpení. Účinnost excitace závisí na elektronické struktuře molekul a účinné absorpci IČ záření. Disociace je více selektivní než při srážkové aktivaci. Aby bylo dosaženo měřitelného signálu, ionty jsou nejdříve nashromážděny v iontové pasti nebo ICR cele, a potom vystaveny fotonům IČ záření. U FT-ICR-MS je disociace pomocí IRMPD zvláště výhodná, neboť je možno sbírat spektra rychleji než při srážkové aktivaci s pulzním napouštěním plynu.

2.3.2. Termální aktivace (BIRD)

U disociace způsobené ozařováním černým tělesem (black body infrared radiative dissociation, BIRD) je v principu využíváno IČ záření jako u IRMPD, ale záření vychází ze stěn zahřáté komory hmotnostního spektrometru¹⁸. Potřeba dlouhodobého záchytu iontů i na desítky sekund vyžaduje použití ICR cely. BIRD dovoluje přesnou kontrolu vnitřní energie iontů a studium disociační kinetiky bez srážek (při velmi nízkém tlaku). Technika byla uplatněna při studiu kinetiky rozpadu molekul, komplexů nebo solvatovaných molekul. Z těchto dat je možné např. odvodit aktivační energie pro fragmentaci studovaných systémů.

2.3.3. Fotodisociace ultrafialovým zářením (UVPD)

V ultrafialové oblasti VUV a UV jsou nejčastěji používány vlnové délky excimerových (157, 193 nm) nebo YAG laserů (266, 351 a 355 nm). Aktivace dovoluje dosáhnout energií dostatečných např. k vytvoření fragmentů *a*, *b*, *c*, *x*, *y*, *z* u peptidů. Na rozdíl od CID nebyla při disociaci laserem pozorována závislost na náboji prekurzoru¹⁹.

3. Příklady tandemových experimentů

3.1. Přístrojová provedení a jejich specifika

Protože způsob aktivace je často diktován typem hmotnostního spektrometru, cílem této části textu je přiblížit aktivaci optimální pro různé typy přístrojů a způsoby měření hmotnostního spektra.

Tandemové hmotnostní spektrometry, které vznikly spojením magnetického či elektrostatického sektoru nebo také magnetického sektoru s následným kvadrupólem, patří k prvním přístrojům použitým pro THS. V tomto uspořádání jsou ionty tvořeny s laboratorní kinetickou energií řádově v kiloelektronvoltech, aktivační srážky jsou tedy vysokoenergetické a pro rozpady je dosažitelná i energie k přímému štěpení silných vazeb. První fragmentace peptidů byly naměřeny při vysokých srážkových ener-

giích, kdy dochází jak ke štěpení peptidové vazby, tak i ke ztrátě postranního řetězce. V dnešní době se v tandemové hmotnostní spektrometrii sektorové přístroje prakticky nepoužívají.

Podobná oblast energií je dosažitelná v analyzátořech doby letu (TOF). Tyto hmotnostní spektrometry jsou navíc vhodnější pro aplikace v oblasti analýzy polárních molekul díky výrazně snazším spojením analyzátoru s MALDI a ESI ionizacemi.

Fragmentace v obou výše uvedených hmotnostních spektrometrech probíhají za vysokých srážkových energií a spektra jsou dobře reprodukovatelná. Relativní nevýhodou je nízký výtěžek produktových iontů a tím způsobená nízká citlivost a omezení na rozpadové procesy s kinetikou $10^4 - 10^6 \text{ s}^{-1}$.

Kvadrupólové tandemové spektrometry monitorují nízkoenergetické rozpady po aktivaci mnohonásobnými srážkami a je u nich možné snadno kontrolovat fragmentační podmínky jako tlak plynu nebo srážkovou energii. Tyto přístroje jsou v praxi mnohem četnější, neboť vyžadují méně místa v laboratoři.

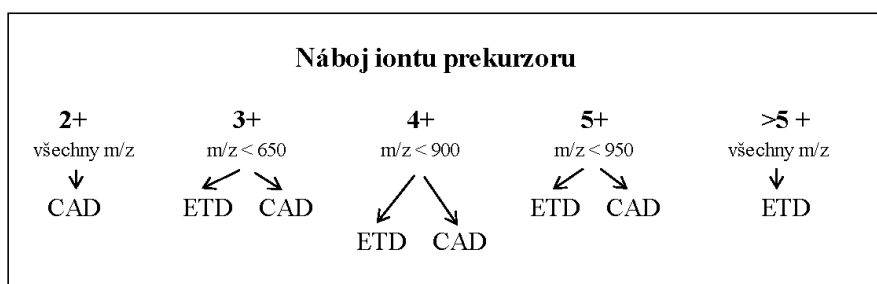
Bylo ukázáno, že ve FT-ICR-MS lze dosáhnout vyššího vybuzení použitím excitační frekvence mírně nižší nebo vyšší než je rezonanční frekvence pro daný ion. Tato prodloužená nerezonanční excitace (sustained off-resonance irradiation, SORI) dovoluje delší interakci s připuštěným plynem, aniž by došlo k předčasnému vypuzení iontů z pasti.

Stejně jako výrobci hmotnostních analyzátorů kombinují koncepty a sestavují hybridní přístroje, také kombinování typů aktivace má své uplatnění. Rychlé procesory dovolují vybírat v reálném čase optimální fragmentační metodu na základě náboje molekuly, a tak získat maximální informaci ze vzorků, jehož množství je omezené. Příkladem tohoto rozhodovacího postupu je použití při sekvenování peptidů v pastech²⁰, schéma 1. Prekurzory se dvěma náboji jsou podrobeny pouze CAD, zatímco šestkrát a vícekrát nabití ionty jsou štěpeny pouze pomocí ETD. Peptidy s nábojem 3^+ , 4^+ a 5^+ jsou štěpeny oběma metodami. Současné použití vysokého rozlišení pro prekurzor dovoluje přidělení aktivační metody na základě určeného náboje a změření přesné hmotnosti prekurzoru.

3.2. Studium mechanismu fragmentací a využití isotopového značení

Rozpady iontů aktivované elektronovou ionizací byly detailně studovány pro mnoho molekul. Pravidla odvozená z těchto prací jsou základem interpretace spekter neznámých sloučenin²¹.

Podobným přístupem jsou vysvětlována spektra z tandemových experimentů. Využívá se např. isotopických satelitů v molekule. Při studiu sloučeniny obsahující atom chloru (např. pesticidů) je ve spektru výrazný M+2 isotopomer obsahující ^{37}Cl . Srovnání posunů signálů při fragmentaci M a M+2 iontů dovoluje rozlišit všechny fragmenty obsahující atom chloru. Podobný přístup je uplatňován i při záměrném značení deuteriem nebo uhlíkem ^{13}C a pozorování posunů ve fragmentačních spektrech.

Schéma 1. Rozhodovací postup pro sekvenování peptidů v pastech (upraveno podle cit.¹⁸)

Tyto studie často vyžadují syntézu značených molekul i modelových sloučenin. Výsledky jsou doplňovány teoretickými výpočty struktur přechodových stavů i stálých fragmentů. Isotopové značení je rovněž využíváno pro upřesnění nebo potvrzení struktury neznámé sloučeniny.

Praktické použití nacházejí značení v roztoku při studiu sekundární struktury proteinů pomocí výměny vodíků za deuterium. Ve styku s okolním rozpouštědlem jsou vyměnitelné vodíky nahrazeny deuterii, zatímco chráněné vodíky zůstávají nevyměněny.

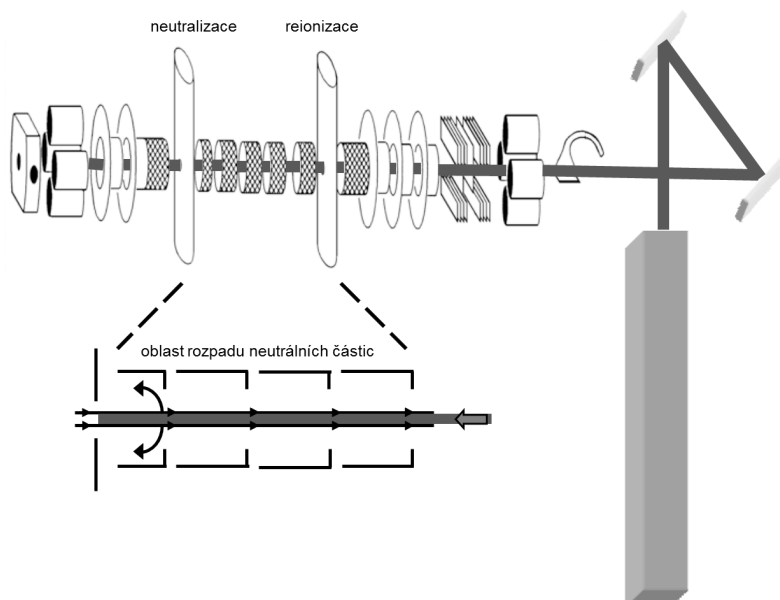
Další důležité uplatnění isotopového značení je při studiu osudu molekul v živých systémech (isotope tracing), např. při studiu farmakokinetiky nebo metabolismu.

3.3. Výzkumné uplatnění THS

3.3.1. Tandemová hmotnostní spektrometrie s neutralizací a reionizací

Zajímavé je uplatnění hmotnostní spektrometrie pro studium nenabitých částic v tandemových experimentech s neutralizací a reionizací (neutralization-reionization mass spectrometry, NRMS)^{22–24}.

Hmotnostní spektrometr představuje účinný reaktor, který připravuje exotické molekuly (např. pětivazný uhlík, nebo čtyřvazný dusík). Trik je v tom, že tyto nestabilní spíše mohou být stabilní ve formě kationtu (chybí jim elektron). Přístroje s velkým urychlením umožňují tyto ionty neutralizovat srážkou s plynem (např. dimetyldisulfidem) a ve vakuu nechat rozpadat nově vzniklý radikál.



Obr. 4. NRMS – schéma experimentálního přístroje s časově rozlišenou a laserovou disociací studovaných neutrálních radikálů (laskavě poskytl F. Tureček)

Následná rychlá srážka s vhodným plynem (např. kyslíkem O₂) znovu ionizuje přeživší radikál i fragmenty a poskytne okno do zhruba mikrosekundového života testovaného radikálu v prostředí bez srážek. Jako doplněk experimentů se provádějí studie rozpadu iontů s *m/z* ekvivalentním možným produktům rozpadu radikálu. To dovolu-uje vyčlenění signálu pocházejícího pouze z rozpadu radi-kálu. Celkový obraz energetiky a kinetiky procesů je do-kreslen teoretickými výpočty. Příklad přístroje, který umožňuje sledovat časový průběh rozpadu nebo ho inicio-vat argonovým laserem, je na obr. 4.

3.3.2. Studium elementárních reakcí v paprscích částic

Co se děje při jednotlivé srážce iontů s neutrálním plynem nebo i povrchem za různých kinetických energií? Co vzniká, jaké je přerozdělení energie a jakým mecha-nismem dochází k reakcím? Na to se snaží najít odpověď experimenty za podmínek jediné srážky, např. ve zkříže-ných paprscích.

Paprsek iontových reaktantů se sráží s expandovaným plynem, dochází k reakci a rozptylu produktů. Vytvořené iontové produkty se měří s úhlovým a energetickým rozli-šením. Výsledný obrázek poskytuje náhled do energetiky, přerozdělení energie a mechanismu elementární reakce²⁵.

3.3.3. Akční iontová spektroskopie

Hmotnostní spektrometrie prolíná do mnoha rozmani-tých zákoutí vědeckého bádání. V oblasti spektroskopie do-voluje použití laserové excitace ve spojení s hmotnostní spektrometrií sledovat fotodisociační kanál(y) iontů v závislosti na vlnové délce záření. Pomocí této akční spektroskopie lze tak zachytit informaci o vibronických stavech studovaného iontu²⁶.

3.4. Uplatnění THS v kvantitativní analýze

Dá se říci, že největším praktickým uplatněním THS u molekul s molekulární hmotností pod 1000 Da je v oblasti citlivé kvantitativní analýzy. Tandemové hmot-nostní spektrometry najdeme např. ve farmaceutickém průmyslu, kde se využívají během celého procesu vývoje léků. V klinických laboratořích do-voluje THS sledovat přesné dávkování léčiv nebo diagnostikovat metabolické poruchy ať vrozené nebo nabyté. Tandemové experimenty jsou klíčové také v oblasti sledování kvality životního prostředí nebo při zjišťování kontaminace potravin.

Hmotnost molekuly je základním kvalifikačním para-metrem v hmotnostní spektrometrii, ale v komplexním prostoru chemických kombinací prvků může existovat řada sloučenin o stejné hmotnosti a s podobným chováním. Jak tuto nejednoznačnost překonat? Jednou možností je postup přípravy analyzovaného vzorku, kdy se kvantifiko-vaná sloučenina (analyt) oddělí co nejlépe od matrice vzorku. K tomuto účelu existuje mnoho separačních metod s využitím extrakčních postupů, chromatografie, nebo elektroforézy. Tyto techniky mohou být oddělené nebo připojeny přímo k hmotnostnímu spektrometru.

Separací krok není častokrát dostatečný. THS dovo-luje přidat další rozměry třídění molekul, první podle *m/z*

prekurzoru a druhý podle *m/z* fragmentu. Aby byla zacho-vána dostatečná citlivost metody, je obvykle vybrán tako-vý fragment, který má co nejvyšší intenzitu signálu. Stejně tak by ale měl být vlastní pouze analyzované molekule. Často se pro zvýšení specifacity sledují poměry intenzit dvou fragmentů daného iontu.

Díky neustálému vylepšování hmotnostně-spektrometrické instrumentace je nyní možné vybrat pro-duktový ion s vyšším rozlišením a přesnější hodnotou *m/z*. To umožňuje oddělit ionty na základě jejich elementárního složení (tedy přesného *m/z*), které jsou při jednotkové šířce píku ve spektru isobarické. V poslední době se také vrací popularita THS v oblasti GC/MS a to ve dvojím provede-ní. V prvním jsou separované molekuly z plynového chro-matografu ionizovány ve zdroji tandemového hmotnostní-ho spektrometru s tradiční elektronovou nebo chemickou ionizací. Ve druhém případě jsou molekuly přivedeny do modifikovaného zdroje s atmosférickou ionizací (chemickou ionizací za atmosférického tlaku, APCI), a poté analyzovány hmotnostním spektrometrem.

3.4.1. Praktický popis vývoje metody používající k detekci THS v prostoru s dvěma kvadrupóly

Oba hmotnostní filtry musí být řádně zkalibrovány, aby *m/z* odpovídaly skutečnosti. Přesnost nastavení *m/z* je v oblasti +/- 0,1 Da. Pro provedení SRM experimentu je možno naladit přechody ručně s použitím infuze vzorku s koncentrací zhruba 100× vyšší, než je konečná citlivost metody. Cílem je získat přesnou experimentální hodnotu *m/z* prekurzoru a produktů typických pro danou látku a poté maximalizovat intenzity dalšími přístrojovými para-metry, které je možno pro nalezené přechody individuálně změnit (typicky napětí na iontovém zdroji a srážková ener-gie). Zbývající přístrojové nastavení je společné a nemě-né pro všechny přechody (např. vysoké napětí elektrospre-je, srážkový plyn, rozlišení kvadrupólů a iontová energie iontů vstupujících do kvadrupólu).

Poslední dobou výrobci hmotnostních spektrometrů poskytují automatizované postupy pro ladění a hledání SRM přechodů. Buď je roztok standardu souvisle napouš-těn do zdroje, nebo je vzorek jednou či opakovaně vstřiko-ván automatickým vzorkováním. Tyto postupy výrazně usnadňují ladění, zvláště když jde o vývoj metody pro měření desítek sloučenin. V každém případě je dobrým zvykem výsledek automatického ladění prověřit.

Podle počtu přechodů a skenovacích parametrů je potřeba zvolit dobu, po kterou bude jednotlivý přechod sledován (dwell time), aby byl chromatografický profil pokryt alespoň 10 body (pro kvalitní integraci signálu), a čas mezi jednotlivými kanály zvolen tak, aby nedošlo k překrývání signálu mezi kanály (cross talk), kdy by ion-tové fragmenty z předchozího přechodu přispívaly k signálu současného kanálu.

V rozsáhlých studiích s velkým počtem analyzova-ných sloučenin, v proteomice, metabolomice či v profilech pesticidů, může snadno dojít k situaci, kde není dost času na sbírání signálu. V takových případech lze s výhodou využít znalosti retenčních časů sledovaných molekul a rozdělit chromatogram na časové úseky s menším po-

1. Nalezení optimalizovaných přechodů SRM/MRM.
2. Celkové přístrojové naladění pro maximální citlivost.
3. Optimalizace rychlosti sběru dat (časové úseky).
4. Zkontrolování nulového pronikání signálu mezi kanály.
5. Případné přidání současného sběru dat s negativní i pozitivní ionizací.

Schéma 2. Základní postup vývoje hmotnostně spektrometrické metody s THS detekcí

čtem analytů, a tudíž s delším časem na sledování přechodu (scheduled SRM, MRM). Tento přístup zároveň umožňuje zrychlovat analýzy bez ztráty citlivosti.

Moderní elektronika v hmotnostních spektrometrech rovněž umožňuje rychlé přepínání a sběr dat v pozitivním i negativním ionizačním módu během jediného nástřiku vzorku. Samozřejmě to ubírá z počtu přechodů, které lze pozorovat, ale celkově to dává možnost získat kompletnější obraz o vzorku v kratším čase. Schéma 2 shrnuje základní postup vývoje hmotnostně spektrometrické metody s THS detekcí.

4. Závěr

Referát poskytuje obecný úvod do problematiky tandemové hmotnostní spektrometrie v češtině. Spojením dvou hmotnostních analyzátorů do série vnikl nový nástroj s širokým použitím a uplatněním. V referátu jsou popsány základy tandemové hmotnostní spektrometrie a její provedení v prostoru a v čase. Dále je uveden přehled metod aktivace iontů spolu s teoretickými základy. Příklady aplikací v základním výzkumu i v praxi ilustrují široký záběr a všestrannost techniky. Čtenář má možnost použít další zdroje s hlubším pojednáním tematiky a nejnovějšími poznatky – referenční knihy, učebnice, přehledné články a monografie, které jsou dostupné většinou v angličtině. Názorná, byť častokrát zjednodušená ilustrace konceptů, je také k nalezení na webových stránkách.

Seznam použitých zkratk

BIRD	black body infrared radiative dissociation, disociace způsobená ozařováním černým tělesem
CAD	collisionally activated dissociation, rozpad po aktivaci srážkami
CID	collision induced dissociation, rozpad vyvolaný srážkami
ECD	electron capture dissociation, disociace způsobená záchytem elektronu
EDD	electron detachment dissociation, disociace odstraněním elektronu
ESI	elektrosprejová ionizace
ETD	electron transfer dissociation, disociace způsobená přenosem elektronu
FT-ICR-MS	hmotnostní spektrometr využívající iontovou cyklotronovou rezonanci

ICR	s Fourierovou transformací ion cyclotron resonance, iontová cyklotronová rezonance
IRPMD	infrared multiphoton dissociation, mnohofotonová disociace infračerveným zářením
MALDI	matrix assisted laser desorption ionization, desorpce a ionizace za účasti matrice
MS/MS, MS2	zkratky používaná pro tandemovou hmotnostní spektrometrii
MS _n	n stupňová fragmentace
NRMS	neutralization-reionization mass spectrometry, tandemový experiment s neutralizací a reionizací
PTD	proton transfer dissociation, disociace přenosem protonu
SID	surface induced dissociation, aktivace a disociace srážkou s povrchem
SIM	selected ion monitoring, sledování vybraných iontů
SRM,MRM	selected reaction monitoring, multiple reaction monitoring, sledování vybraných reakcí, sledování více reakcí
THS	tandemová hmotnostní spektrometrie
TOF	time of flight, analyzátor doby letu
UVPD	ultraviolet photodissociation, fotodisociace ultrafialovým zářením
VUV	vacuum ultraviolet, vakuové ultrafialové (spektrum)

LITERATURA

1. Sekiya S., Nagoshi K., Iwamoto S., Tanaka K., Takayama M.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 26, 1588 (2015).
2. Sleno L., Volmer D. A.: *J. Mass Spectrom.* 39, 1091 (2004).
3. McLuckey S. A.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 3, 599 (1992).
4. Wysocki V. H., Kenttamaa H. I., Cooks R. G.: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 75, 181 (1987).
5. Wright P. J., Zhang J., Douglas D. J.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19, 1906 (2008).
6. Holmes J. L.: *Org. Mass Spectrom.* 20, 169 (1985).
7. <https://www.nist.gov/srd/nist-standard-reference-database-1a-v17>, staženo 29. 8. 2019.
8. Gross J. H.: *Mass Spectrometry*, 2. vyd. Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg 2011.

9. Laskin J.: *Eur. J. Mass Spectrom.* 21, 377 (2015).
10. Cooks R. G., Ast T., Mabud Md. A.: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 100, 209 (1990).
11. Nikolaev E. N., Somogyi A., Smith D. L., Gu Ch., Wysocki V. H., Martin C. D., Samuelson G. L.: *Int. J. Mass Spectrom.* 212, 535 (2001).
12. Mikhailov V. A., Cooper H. J.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 20, 763 (2009).
13. Zubarev R. A., Horn D. M., Fridriksson E. K., Kellerher N. L., Kruger N. A., Lewis M. A., Carpenter B. K., McLafferty F. W.: *Anal. Chem.* 72, 563 (2000).
14. Syka J. E. P., Coon J. J., Schroeder M. J., Shabanowitz J., Hunt D. F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 9528 (2004).
15. Schwartz J. C., Senko M. W., Syka J. E. P.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13, 659 (2002).
16. Tureček F., Julian R. R.: *Chem. Rev.* 113, 6691 (2013).
17. Savitski M. M., Kjeldsen F., Nielsen M. L. and Zubarev R. A.: *Angew. Chem., Int. Ed.* 45, 5301 (2006).
18. Dunbar R. C.: *Mass Spectrom. Rev.* 23, 127 (2004).
19. Robotha S. A., Brodbelt J. S.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 26, 1570 (2015).
20. Swaney D. L., McAlister G. C., Coon J. J.: *Nat. Methods* 5, 959 (2008).
21. McLafferty F. W., Tureček F.: *Interpretation of Mass Spectra*, 4. vyd. University Science Books, Mill Valley, CA, 1993.
22. McLafferty F. W.: *Science* 247, 925 (1990).
23. Tureček F., Gu M., Shaffer S. A.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 3, 493 (1992).
24. Schalley C. A., Hornung G., Schröder D., Schwarz H.: *Chem. Soc. Rev.* 27, 91 (1998).
25. Herman Z.: *Int. J. Mass Spectrom.* 212, 413 (2001).
26. Polfer N. C., Dugourd P. (ed.): *Laser Photodissociation and Spectroscopy of Mass-Separated Biomolecular Ions*. Springer, Cham 2013.

M. Sadílek (*University of Washington, Seattle, WA, USA*): **Introduction to Tandem Mass Spectrometry**

Use of two mass analyzers in tandem creates a powerful new tool with a wide range of use and applications. Principles of tandem mass spectrometry in space and in time are presented. Main ion activation methods that lead to dissociation are discussed: collision induced dissociation, surface induced dissociation, electron transfer dissociation and dissociation using light. Examples of applications in fundamental and applied research are briefly described.

Keywords: tandem mass spectrometry, activation methods, mechanism, energy transfer, collision induced dissociation