

## Hmotnostní spektrometrie – zdroj analytických informací

Friedecký D.<sup>1,2</sup>, Lemr K.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratoř dědičných metabolických poruch, OKB, Fakultní nemocnice Olomouc

<sup>2</sup>Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

<sup>3</sup>RCPTM, Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

### SOUHRN

Přehled pojednává o kvalitativních a kvantitativních parametrech hmotnostní spektrometrie.

*Klíčová slova:* hmotnostní spektrometrie, parametry měření, kvalitativní a kvantitativní analýza

### SUMMARY

**Friedecký D., Lemr K.: Mass spectrometry – source of analytical information**

The overview is focused on qualitative and quantitative parameters of mass spectrometry.

*Keywords:* mass spectrometry, analysis parameters, qualitative and quantitative analysis

## Úvod

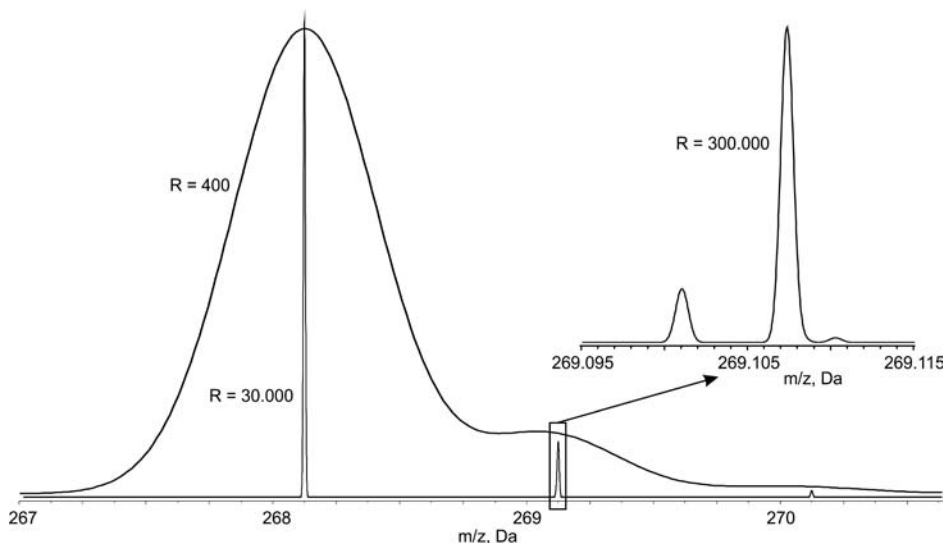
Ve druhém díle se zaměříme na hlavní parametry hmotnostních spektrometrů, možnosti a limity kvalitativní a kvantitativní analýzy. Budou zde popsány základní parametry měření, nastíněno využití fragmentačních spekter, správné hmotnosti měřené s vysokým rozlišením a izotopového složení pro identifikaci studovaných látek. Závěrem budou zmíněny citlivost, lineární rozsah a selektivita hmotnostních spektrometrů ovlivňující jejich využití v kvantitativní analýze.

## Základní parametry hmotnostních spektrometrů

### Rozlišovací schopnost

Rozlišovací schopnost ( $R$ ), jeden z hlavních parametrů, je dnes nejčastěji definována jako poměr  $m/z$  ku šířce hmotnostního píku v polovině jeho výšky. Při

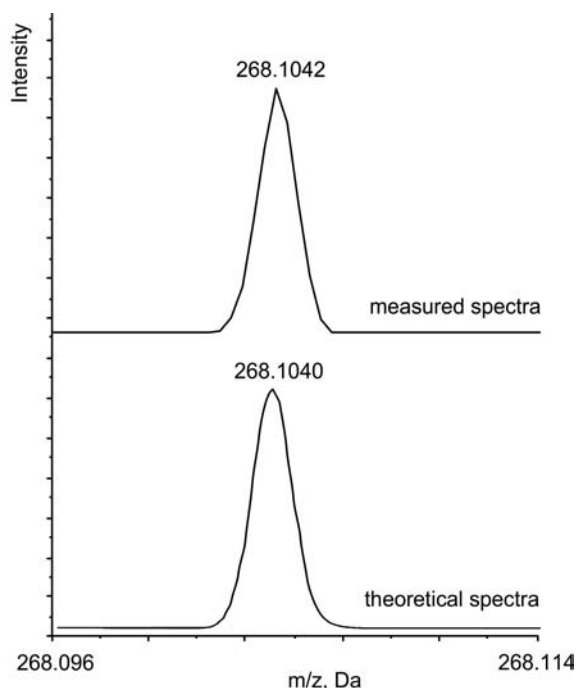
stejně šířce píku  $R$  klesá se snižující se hodnotou  $m/z$ . Jiným přístupem je definovat  $R$  jako schopnost rozpoznat dvě molekuly s blízkými hodnotami  $m/z$ . Hmotnostní spektrometry můžeme podle tohoto parametru rozdělit do dvou skupin. Do první patří přístroje někdy označované jako přístroje s „jednotkovým rozlišením“ (např. kvadrupóly a iontové pasti), které dosahují rozlišovací schopnosti  $10^2$  až  $5 \times 10^3$  a šířky píku v rozmezí  $0,2 - 1,0$   $m/z$ . Druhou skupinu zahrnují přístroje s hodnotou  $R$  v rozmezí  $10^4$  až  $10^6$ , kam se řadí průletové analyzátoři, sektorové přístroje, orbitrap a iontová cyklotronová rezonance (obr. 1). Přístroje s vysokou rozlišovací schopností obvykle současně dovolují měření hodnoty  $m/z$  s vyšší přesností a správností (na větší počet desetinných míst). Zatímco u kvadrupólů je obvyklé měření s přesností na jedno desetinné místo, u vysokorozlišujících systémů lze získat spolehlivé hodnoty  $m/z$  s přesností na tři či čtyři desetinná místa. Vysoká rozlišovací schopnost dovoluje odlišit ionty s velmi blízkými hodnotami  $m/z$ .



**Fig. 1.** Unit resolution of quadrupole analysers ( $R = 400$ ) and high resolution of time-of-flight analysers ( $R = 30.000$ ) and orbitrap ( $R = 300.000$ ) for protonated molecule ion  $[M+H]^+$  of adenosine and its isotopes.

## Správnost měření m/z

Lze si sice představit přístroj pracující s nízkou rozlišovací schopností a poskytující správné hodnoty m/z, ale malé rozlišení iontů přináší větší riziko interferencí, a tím zkreslení naměřené hodnoty. Dnešní přístroje s vysokou rozlišovací schopností obvykle nabízí i možnost získat správné hodnoty m/z. Chyba měření je definována v ppm odchylky naměřené od teoreticky spočítané hodnoty m/z z elementárního složení. Jedná se tedy o relativní chybu, která dává informaci o správnosti měření. Často se však i v souvislosti s volnějším překladem anglických textů lze setkat s nepřesným pojmem „přesná hmotnost“, velmi častý je tento pojem v žargonu hmotnostních spektrometrů. V případě instrumentace s nízkým rozlišením je dostačující relativní chyba cca 100 ppm, což při velikosti iontu m/z = 1000 znamená odchylku 0,1 Da. Zatímco v případě měření dat při vysokém rozlišení lze za minimální požadavek označit chybu nejvýše 5 ppm, což je odchylka 0,005 Da při m/z = 1000. V nabídce dodavatelů hmotnostních spektrometrů však dnes nejsou výjimkou přístroje se specifikací chyby 1 ppm a menší (obr. 2). Dosažená hodnota samozřejmě závisí na stavu přístroje, provedené kalibraci, ale také se mění s velikostí m/z, proto by vždy mělo být uvedeno, pro jaký ion je chyba přístroje deklarována.



**Fig. 2.** Protonated molecule ion  $[M+H]^+$  of adenosine; measured spectra (Orbitrap Elite) and simulation at resolution of 120.000; error = 0.7 ppm (268.1040 vs. 268.1042).

## Rychlost měření hmotnostních spekter

V současné době rychlých separací na vysoce účinných chromatografických kolonách vzrůstá požadavek na rychlost hmotnostních spektrometrů za účelem dostatečného „vykreslení“ chromatografických píků pro správnou kvantifikaci analytu. V případě rychlých analýz se dostáváme k šířce píků řádově v sekundách, což přináší požadavek na vysokou frekvenci sběru dat.

Už z principu uspořádání analyzátorů jsou diametrální rozdíly v rychlosti mezi měřením SRM (selective reaction monitoring) nebo spekter v jednotkovém nebo vysokém rozlišení. V případě SRM trvá měření jednoho bodu (dwell time) v rozmezí 1–500 ms. Avšak spodní limit je v praxi použitelný pouze u nejvyšší řady přístrojů, kde nedochází k dramatickému poklesu poměru signálu ku šumu. Obvyklé hodnoty jsou 10–100 ms pro měření jednoho SRM přechodu pro jeden analyt (obr. 3). Pro multikomponentní analýzu je třeba čas vypočítat jako sumu všech měřených SRM přechodů, přičemž být krátký, ale přece jen jistý čas je třeba na přepínání mezi jednotlivými přechody. Jistou možností, jak zrychlit měření, je časové programování SRM přechodů, kdy se příslušný přechod měří pouze v časovém okně, které odpovídá chromatografickému píku sledované látky. Tento přístup umožňuje významně zvýšit počet měřených přechodů během chromatografické analýzy anebo prodloužit čas měření přechodu za účelem zvýšení citlivosti.

Pokud se měří celé spektrum, ať již s nízkým nebo vysokým rozlišením, jsou typické časy měření pro dosažení dostatečné citlivosti 0,1–1,0 s. Moderní průletové analyzátoři měří rychlostí až 50 Hz avšak při R maximálně cca  $3 \times 10^4$ . Orbitrap a iontově cyklotronová rezonance potřebují pro dosažení vysokého rozlišení  $2,5 \times 10^5$  až  $1 \times 10^6$  čas delší než 1 s. Při nutnosti rychlejšího měření spekter je třeba počítat s poklesem rozlišovací schopnosti, která se však i tak pohybuje v desítkách tisíc.

## Rozsah měřených hodnot m/z

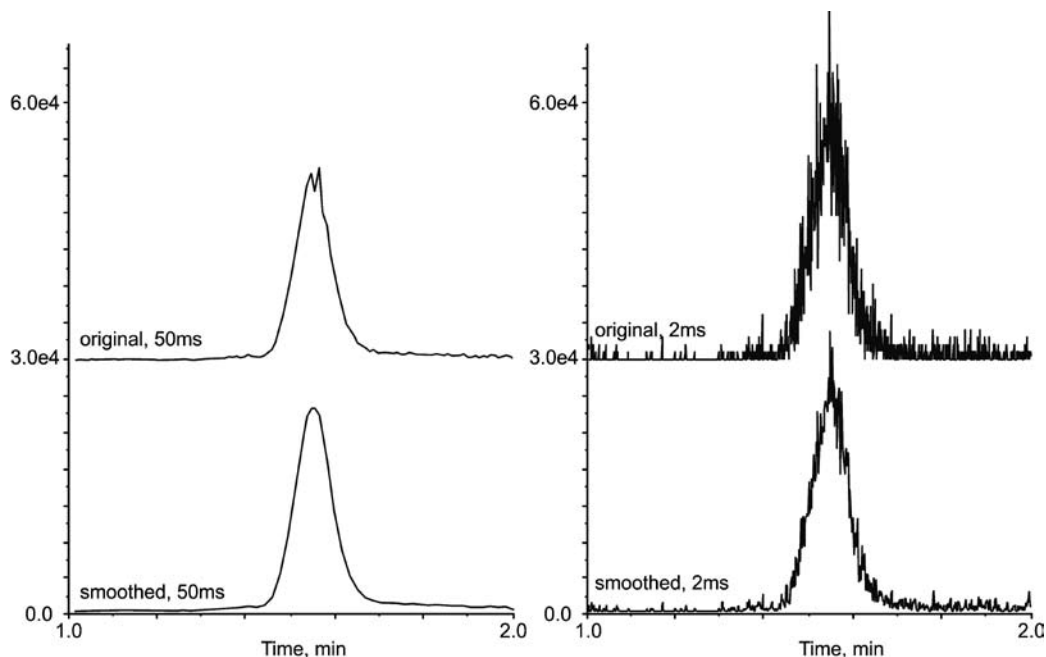
Mimo výše uvedené parametry se hmotnostní spektrometry od sebe liší také rozsahem m/z, ve kterém měří ionty. Tento parametr je často opomíjen při výběru, avšak je třeba brát v potaz velikost studovaných analytů, která může v některých případech překročit měřicí rozsah m/z instrumentace (např. antibiotika, imunosupresiva).

Kvadrupólové analyzátoři mají typický rozsah od 5 do 3000 m/z. Ovšem není výjimkou, že nejvyšší řady přístrojů mají nižší rozsah měřených m/z (např. 5–1500) z důvodu optimalizace maximální citlivosti, rychlosti a robustnosti přístrojů. Průletové analyzátoři jsou schopny měřit hodnoty m/z v řádu desítek až statisíců, čehož se s výhodou využívá pro měření vysokomolekulárních látek (např. proteiny). V případě proteinů však lze použít pro měření i analyzátoři s malým rozsahem (např. trojitě kvadrupóly) v kombinaci s elektrosprejem, který produkuje více násobně nabitě ionty s adekvátně nižší hodnotou m/z.

## Kvalitativní analýza

### Fragmentační spektra

Jak již bylo zmíněno v prvním díle [1], hmotnostní spektrometry umožňují fragmentaci nabitých molekul. Energie jim může být dodána při ionizaci (tvrdá elektronová ionizace, EI), kolizí indukovanou disociací (CID) v iontovém zdroji nebo v dalším stupni v kolizní cele či jinou v rutinních laboratořích méně obvyklou technikou (ECD-electron capture dissociation, ETD-electron

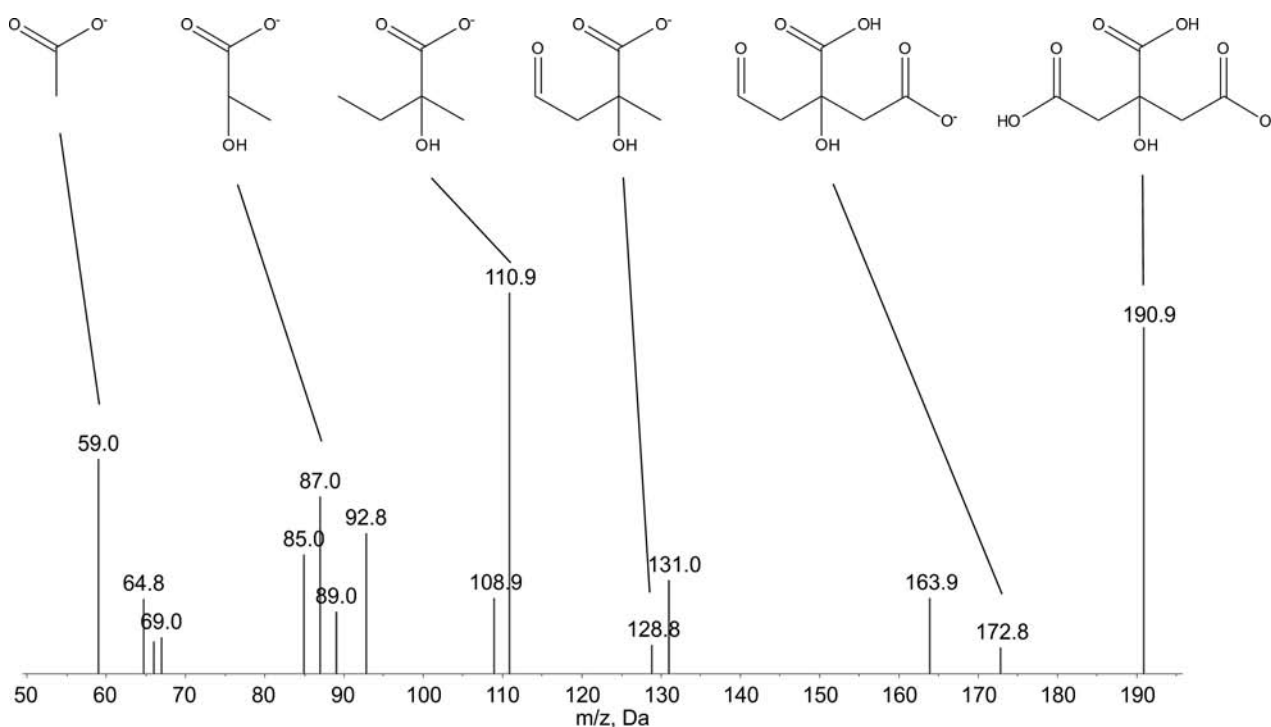


**Fig. 3.** Analysis of cyclosporine on triple quadrupole analyser ( $c = 50 \text{ ng/mL}$ , API4000, AB Sciex), SRM 1219.9  $\Rightarrow$  1184.9, ESI+, dwell time 50 and 2 ms, respectively.

transfer dissociation). Fragmentací vzniklé ionty lze s výhodou použít pro kvalitativní analýzu a strukturální identifikaci analytů. Existuje řada pravidel fragmentačního chování určitých typů látek, ale tato problematika je natolik obsáhlá, že překračuje rámec tohoto příspěvku. Pro predikci fragmentace se dá využít speciální software (Mass Frontier, Thermo nebo MS Fragmentator, ACDLabs). Na obrázku 4 je příklad fragmentace kyseliny citronové v negativním ionizačním módu pomocí kolizí indukované disociace v kolizní cele. Můžeme zde vysledovat postupnou fragmentaci molekuly na jednotlivé fragmenty až na fragment kyseliny octové.

### Správná hmotnost molekulárního iontu měřená s vysokým rozlišením

Správné měření hmotnosti lze využít k určení elementárního složení přesněji sumárního vzorce molekuly. Princip spočívá ve skutečnosti, že relativní hmotnosti izotopů kromě uhlíku  $^{12}\text{C}$  nejsou celá čísla (Tabulka 1) a při měření hodnot  $m/z$  na dostatečný počet desetinných míst lze odlišit molekuly se stejnou nominální molekulovou hmotností (uváděna na jednotky), ale různým zastoupením jednotlivých atomů. Například adenosin trifosfát ( $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3$ ) lze odlišit od fosfoadenylyl sulfátu ( $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_2\text{S}$ ), i když mají oba relativní moleku-



**Fig. 4:** Fragmentation spectra of deprotonated molecular ion of citric acid  $[\text{M-H}]^-$  in triple quadrupole analyser by CID fragmentation.

lovou hmotnost 507. Při měření v ESI negativním módu však dostáváme dva hmotnostní píky s m/z 505.9885, resp. 505.9790, jejich rozdíl je 18 ppm.

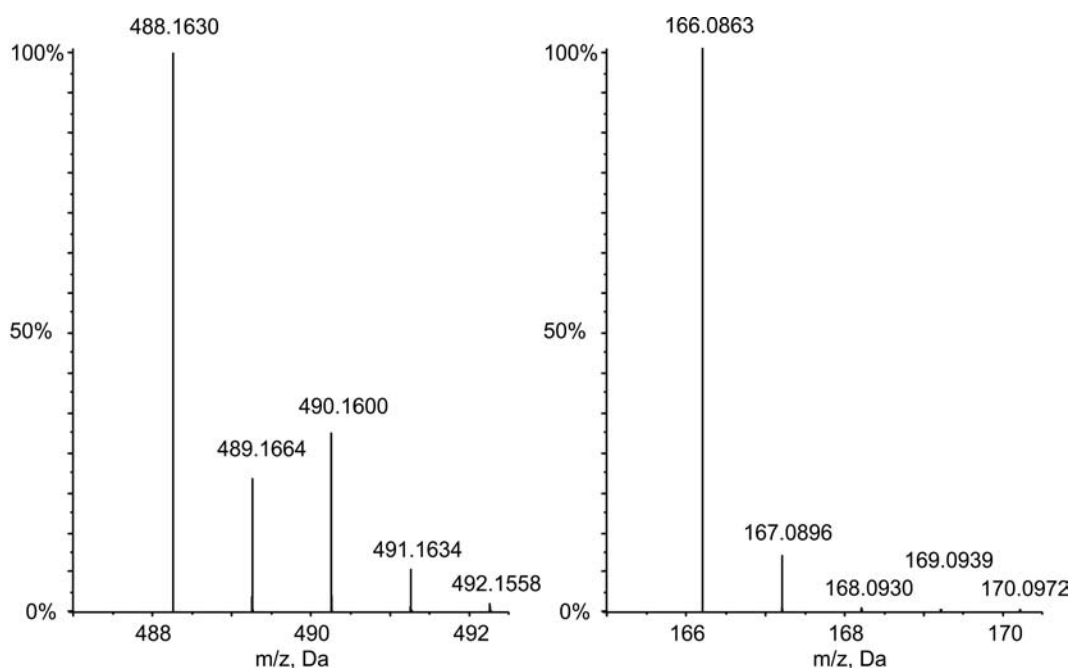
S rostoucí molekulovou hmotností roste počet možných kombinací prvků (sumárních vzorců), a tím i nároky na měření. Popsaný přístup samozřejmě nedovoluje odlišit látky se stejným sumárním vzorcem a zde řešením může být studium jejich fragmentace. Například pokud bychom v ESI + módu naměřili m/z 166.0863, získáme sumární vzorec  $C_9H_{11}NO_2$ . V online databázích však najdeme pod tímto složením nejen pro klinické laboratoře běžný fenylalanin, ale také dalších deset strukturně odlišných sloučenin (např. benzocain, tricain, metolcarb a další). V případě simulací všech možných potenciálních kombinací sumárních vzorců bychom se dostali k ještě vyššímu počtu variant. Na druhou stranu nejbližší molekula s jiným sumárním vzorcem je metylguanin  $C_6H_7N_5O$  s m/z 166.0723, což představuje rozdíl od fenylalaninu 84 ppm. Takový rozdíl je velmi snadno zjištěitelný pomocí hmotnostních spektrometrů s vysokým rozlišením.

### Izotopové složení

Řada prvků se v přírodě vyskytuje jako směs izotopů. Například uhlík je směs dvou stabilních izotopů,  $^{12}C$  (98,9%) a  $^{13}C$  (1,1%), podobná situace je pro S, Cl a další. Tyto izotopy způsobují vznik klastrů iontů s definovaným poměrem intenzit, které mohou být charakteristické pro přítomnost určitého počtu atomů daného prvku v molekule. Dokonce i bez měření spektra o vysokém rozlišení lze s výhodou použít tohoto kvalitativního údaje pro odhad či potvrzení navrženého elementárního složení. Význam izotopového složení vzrůstá především u sloučenin obsahujících prvky s výrazným zastoupením izotopů, např.  $^{35}Cl$  a  $^{37}Cl$  (Tabulka 1). Na obrázku 5 jsou srovnány izotopové profily dasatinibu a fenylalaninu. U dasatinibu je vidět významný izotopový profil s ionty 489.1664, 490.1600 a 491.1634 v důsledku přítomnosti  $^{37}Cl$  a  $^{34}S$ . Na druhou stranu v případě fenylalaninu, který je složen pouze z uhlíku, vodíku, dusíku a kyslíku, se na izotopovém profilu významně podílí pouze  $^{13}C$  (167.0896).

**Table 1:** Abundance and atomic masses of isotopes

	Abundance (%)	Atomic mass		Abundance (%)	Atomic mass
$^1H$	99.98	1.008	$^{32}S$	95.02	31.972
$^2H$	0.02	2.014	$^{33}S$	0.75	32.971
$^{12}C$	98.90	12.000	$^{34}S$	4.21	33.968
$^{13}C$	1.10	13.003	$^{36}S$	0.02	35.967
$^{14}N$	99.63	14.003	$^{35}Cl$	75.77	34.969
$^{15}N$	0.37	15.000	$^{37}Cl$	24.23	36.966
$^{16}O$	99.76	15.995	$^{39}K$	93.26	38.964
$^{17}O$	0.04	16.999	$^{40}K$	0.01	39.964
$^{18}O$	0.20	17.999	$^{41}K$	6.73	40.962
$^{31}P$	100.00	30.974	$^{79}Br$	50.69	78.918
			$^{81}Br$	49.31	80.916



**Fig. 5.** Isotopic profile of Dasatinib ( $C_{22}H_{26}ClN_7O_2S$ ) and Phenylalanine ( $C_9H_{11}NO_2$ ).

## Kvantitativní analýza

### Meze detekce a stanovitelnosti

Situace v oblasti hmotnostních spektrometrů je poměrně komplikovaná především proto, že neexistuje společná všemi dodavateli používaná metodika stanovení meze detekce/stanovitelnosti. I když se přístroje často testují na poměr odezvy signálu ku šumu reserpinu, tak i v tomto přístupu je několik proměnných. První potíž způsobuje použitá metodika výpočtu z chromatogramu. Obvykle se používá metoda „Peak-to-Peak noise“ anebo „Root-Mean-Square“ (RMS). První zmíněná počítá obvyklý poměr signálu ku šumu, avšak druhá metoda počítá střední relativní odchylku šumu. V praxi se odlišují tyto dvě metody 5–20x ve prospěch RMS. Experimentálně bylo zjištěno, že tato metoda dává v praxi nereálně optimistické výsledky. Proto je doporučeno používat metodu Peak-to-Peak noise [2]. Další zásadní problém je použití odlišných podmínek pro měření reserpinu, a to v celém měřícím řetězci od chromatografické separace (pokud je použita) přes parametry iontového zdroje a samotného analyzátoru. V praxi lze tedy meze detekce/stanovitelnosti uváděné v materiálech hmotnostních spektrometrů vyžadovat při instalaci přístroje, ale pro vzájemné porovnání jsou pouze orientační a je nutno k deklarovaným hodnotám přistupovat s nadhledem. Pokud je diskutované kritérium zásadním parametrem při koupi přístroje, pak je nezbytné nechat provést měření vlastních vzorků a vyhodnotit tyto výsledky.

V současné době se stále na vrcholu drží trojitě kvadrupóly, a to především díky velmi selektivnímu módu SRM (samozřejmě i volba skenovacího módu ovlivňuje dosažené hodnoty LOD a LOQ). Firmy prodávající trojitě kvadrupóly mají v nabídkách několik úrovní přístrojů, které se odlišují především dosahovanými hodnotami poměru signálu k šumu, dále pak rychlostí a samozřejmě cenou. Rozdíly v LOD či LOQ mohou být více než stonásobné, ale samozřejmě rozdíl v ceně může být také výrazný, např. i pětinasobný.

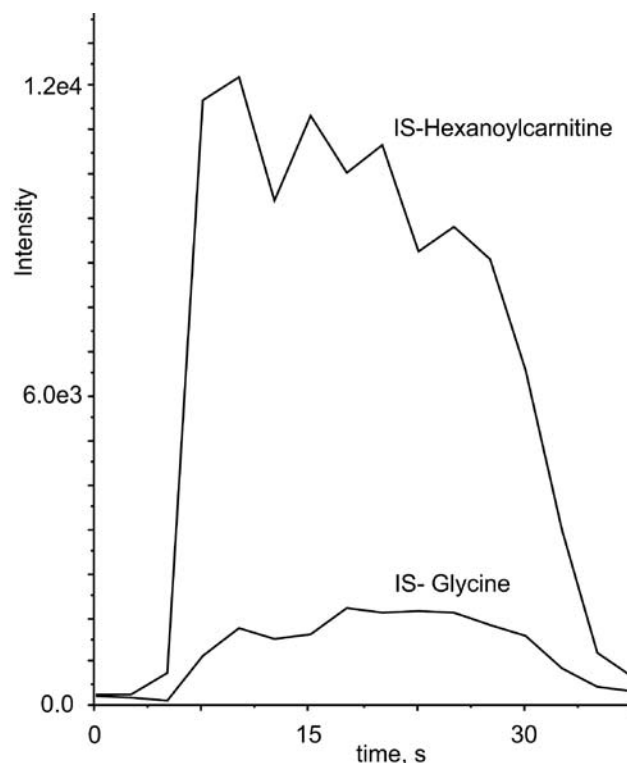
Dosažované hodnoty LOD a LOQ samozřejmě závisí na vlastnostech analyzované látky či zvolené ionizační technice. Dobře ionizovatelné látky (popř. s fragmentací vhodnou pro zlepšení S/N) mohou být detegovány i v koncentračních hladinách méně než 1 nmol/l (např. acylované karnitiny). Na druhé straně jsou nízkomolekulární látky s kyselým charakterem, které je někdy problém detegovat v koncentracích 10  $\mu\text{mol/l}$  (např. glycin, obr. 6). Důležitou roli hraje také iontová suprese, čili matrice vzorku a složení mobilní fáze, které mohou zvýšit LOQ resp. LOD i o více než řád.

Pokud budeme srovnávat analyzátor mezi sebou vzájemně, tak se v současnosti možnosti analyzátorů měřících správnou hmotnost přibližují ke trojitým kvadrupólům.

### Lineární rozsah

Jedním z limitů hmotnostních spektrometrů je rozsah množství iontů, které je možno v daném čase ionizovat v iontovém zdroji a následně detegovat s lineární odezvou. Lineární dynamický rozsah měření je určován jed-

nak ionizační technikou, jednak použitým hmotnostním analyzátozem. Uvažujeme-li o linearitě v rámci kalibrační závislosti, narazíme většinou na limit ionizační techniky. Uvažujeme-li rozsah linearity v rámci jednoho spektra, lze nejšířší rozsahu až  $10^6$  dosáhnout kvadrupólovými analyzátozem. Průletové analyzátozem, iontové pasti, orbitrap nebo iontová cyklotronová rezonance jsou o 1–2 řády horší. V případě jednodimenzionální analýzy to nemusí představovat problém, ale při multidimenzionální analýze látek s koncentračními hladinami rozdílnými o více než tři řády již ano. Ve stejném spektru pak máme nízký i o mnoho řádů větší signál. Příkladem je analýza imunosupresiv. Zatímco hladina cyklosporinu může být až 1000 ng/ml, tak např. tacrolimus je třeba měřit i v jednotkách ng/ml. Ještě více komplikací můžeme očekávat např. u ambulantních odběrů antihypertenziv, kde může být rozdíl hladin napříč léky a pro různé doby odběru od dávky i více než čtyři řády. Na druhé straně lze zmínit velmi dobře fungující systém novorozeneckého screeningu dědičných metabolických poruch, ve kterém se současně stanovují aminokyseliny v rozsahu 10–1000  $\mu\text{mol/l}$  a acylované karnitiny v rozsahu 0,001–100  $\mu\text{mol/l}$ , což je rozdíl 6 řádů. Zásadní rozdíl je právě ve dvou skupinách analytů. Aminokyseliny jsou podstatně hůře ionizovatelné a i v koncentracích stovek  $\mu\text{mol/l}$  poskytují intenzity menší než  $10^6$ . Vedle toho acylované karnitiny jsou velmi dobře ionizovatelné, a tudíž i stanovitelné v nanomolárních hladinách.



**Fig. 6.** Analysis of aminoacids and acylcarnitines by flow injection analysis; Internal standards of glycine (SRM 79 => 32.1;  $c = 23.50 \mu\text{mol/L}$ ) and hexanoylcarnitine (SRM 263.1 => 85.2;  $c = 0.05 \mu\text{mol/L}$ )

### Selektivita

Jak bylo uvedeno výše, hmotnostní spektrometrie disponuje širokými identifikačními schopnostmi. V případě kvantitativní analýzy, kdy známe analyzovanou

látku a její očekávanou koncentraci, můžeme pro vyloučení možných interferencí aplikovat různé přístupy v závislosti na použité technologii:

- 1) Pro analýzu GC/MS, kde se měří fragmentační spektra, můžeme látku kvantifikovat na obvykle nejintenzivnější fragment a potvrdit dalším charakteristickým fragmentem. Případně pro confirmaci identity srovnat fragmentační spektrum s knihovnou.
- 2) V případě analýzy LC/MS na trojitém kvadrupólu se s výhodou používá kombinace měření kvantifikačního a confirmačního SRM přechodu. Identitu můžeme také potvrdit závislým MS/MS fragmentačním skenem nebo pomocí izotopového profilu. Vzhledem k tomu, že známe molekulovou hmotnost analytu, můžeme jej měřit současně s kvantifikací během jedné analýzy. Pro eliminaci interferencí lze navíc použít poměr mezi SRM přechody.
- 3) Analýza látek pomocí přístroje s vysokým rozlišením nám sama o sobě omezuje množství interferencí. Následně identitu můžeme opět potvrdit izotopovým profilem nebo závislým MS/MS skenem.

Další možnosti zvýšení selektivity spočívají v přečištění vzorku, derivatizaci nebo volbě jiné ionizační techniky. Vzhledem k vysoké selektivitě samotné hmotnostní spektrometrie můžeme v některých případech stanovit látku přímo bez jakékoli předseparace či analytické separace. Je však třeba mít na paměti potenciální problém iontové suprese, zejména u analýz komplexního biologického materiálu. Ani hmotnostní spektrometrie není vše řešící technika. Obecně nelze touto technikou od sebe odlišit optické a také často polohové či jiné izomery. Potřebnou selektivitu analytického měření může v takových případech poskytnout vhodná chromatografická nebo elektroforetická separace.

## Závěr

Z výše uvedených kapitol vyplývá, že v hmotnostní spektrometrii pracujeme s řadou analytických parametrů, které významně ovlivňují kvalitu naměřených dat,

a to navíc v závislosti na typu hmotnostního analyzátoru. V následujícím díle se již zaměříme na rutinní aplikace hmotnostní spektrometrie ve spojení s kapalinovou a plynovou chromatografií pro měření diagnosticky významných markerů a terapeutické monitorování léků v oblasti klinické biochemie.

## Literatura

1. **Friedecký, D., Lemr, K.** Úvod do hmotnostní spektrometrie, *Klin. Biochem. Metab.* 2012, 20 (41), No. 3, p. 152-157, ISSN: 1210-7921.
2. **Boyd, R. K., Basic, C., Bethem, R. A.** Trace Quantitative Analysis by Mass Spectrometry, John Wiley & Sons, 2008, ISBN: 978-0-470-05771-1, p. 163, chpt. 4.4.8.
3. **De Hoffmann, E., Stroobant, V.** Mass Spectrometry, Principles and Applications, Third Edition, John Wiley & Sons Ltd, England, 2007, ISBN: 978-0-470-03310-4.
4. **Dass, Ch.** Fundamentals of contemporary mass spectrometry, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA, 2007, ISBN: 978-0-471-68229-5.
5. **Gross, J. H.** Mass Spectrometry, A Textbook, Second Edition, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 2011, ISBN: 978-3-642-10709-2.
6. **Cole, R. B. (ed.)** Electrospray and MALDI Mass Spectrometry, Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications, Second Edition, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, USA, 2010, ISBN: 978-0-471-74107-7.

*Práce byla podpořena Operačním programem Výzkum a vývoj pro inovace – Evropský fond pro regionální rozvoj CZ.1.05/2.1.00/01.0030 a CZ.1.05/2.1.00/03.0058.*

Do redakce došlo 7. 10. 2012

*Adresa pro korespondenci:  
RNDr. David Friedecký, Ph.D.  
Laboratoř dědičných metabolických poruch  
Oddělení klinické biochemie,  
Fakultní nemocnice Olomouc  
I. P. Pavlova 5  
775 20 Olomouc  
e-mail: david@friedecky.cz*