



Masena spektrometrija- savremeni trendovi

Doktorske studije-
Nove fizičko-hemijske metode

Maj 2017

Ivanka Holclajtner-Antunović

Uvod

Jonski izvor:

- MALDI i SALDI
- SIMS-Masena spektrometrija sa sekundarnim jonima

Analizatori:

- Jonski trap-kvistor
- Orbitrap
- Jon ciklotron rezonancija - ICR i FT ICR

Tandem masena spektrometrija

Primena

Istraživač	Doprinos	Nobelova nagrada	
Thomson		1897 otkriće elektrona i 1912 prvi maseni spektar	1906 Fizika
Dempster		1918 jinizacija elektronima i fokusiranje magnetom	
Aston		1919 određivanje atomske mase i izotopskog sastava pomoću MS	1922 Hemija
Stephens		1946 TOF (Time-of-flight) MS	
Hipple, Sommer, i Thomas		1949 Jon-ciklotron rezonanca (ICR)	
Johnson i Nier		1953 Dvostruko fokusirajući MS	
Paul and Steinwedel		1953 Quadrupolni analizatori	1989 Fizika
Beynon		1956 MS visoke rezolucije	

Istrživač	Doprinos	Nobelova nagrada
Munson i Field	1966 Hemijska jonizacija	
Dole	1968 Elektrosprej (ESI)	
Beckey	1969 Desorpcija poljem (FDI)	
MacFarlane i Torgerson	1974 Plazma desorpcija (PDI)	
Comisarow i Marshall	1974 FT-ICR MS	
Yost i Enke	1978 Triple quadrupole MS	
Barber	1981 Bombardovanje brzim atomima (FAB)	
Tanaka, Karas, i Hillenkamp	1983 Desorpcija laserom iz matrice (MALDI)	2002 Hemija
Fenn	1984 ESI za biomolekule	2002 Hemija

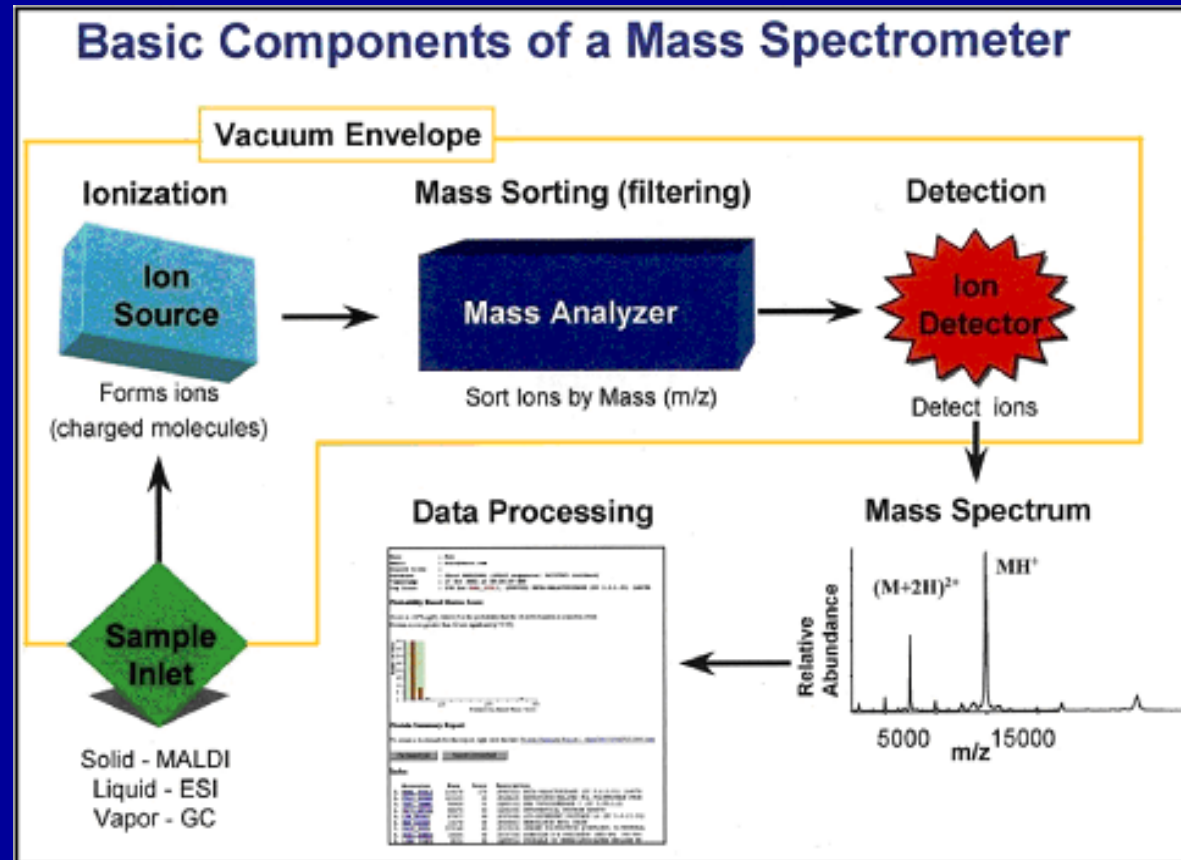


Nove “meke” tehnike jonizacije FAB, ESI i MALDI su omogućile ispitivanje:

- biomolekula (proteina, peptida, ugljenih hidrata, oligonukleida, metabolita i lekova kao i bioloških fluida)
- informacije o strukturi gigantskih molekula
- minimalna pripremom uzoraka
- granice detekcije od pikomola do femtomola
- preciznost određivanja molarne mase reda $\pm 0,01\%$

Maseni spektrometar

$$\lambda(cm) = \frac{0,66}{P(Pa)}$$



Svi instrumenti imaju:

1. Unošenje uzorka
2. Jonski izvor
3. Maseni analizator
4. Detektor
5. Sistem za obradu

Jonizacione metode

Neke od jonizacionih metoda su vrlo energične i pored jonizacije izazovaju znatnu fragmentaciju. Druge su mekše i proizvode jone molekulskih vrsta.

Izbor zavisi od vrste uzorka.

Metode u gasnoj fazi

- Elektronska jonizacija (EI)
- Hemijska jonizacija (CI)

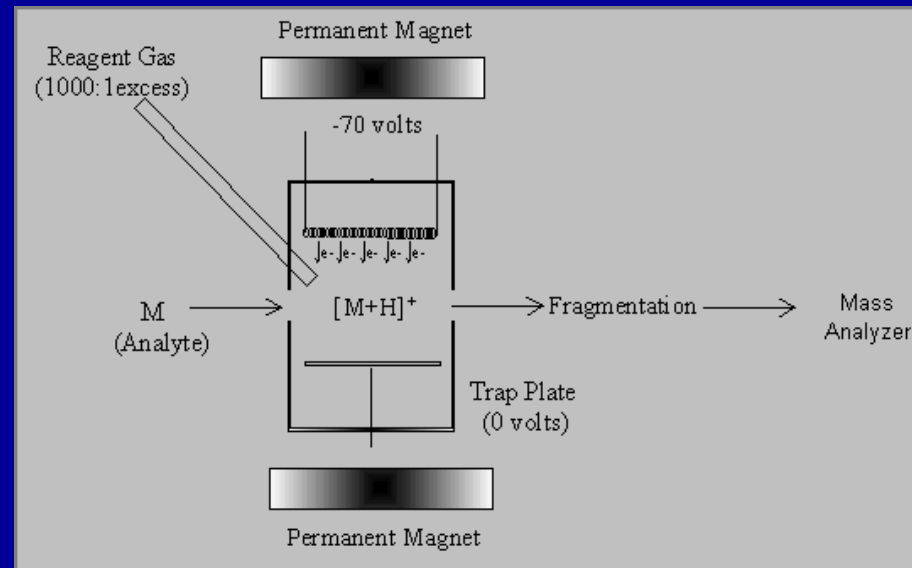
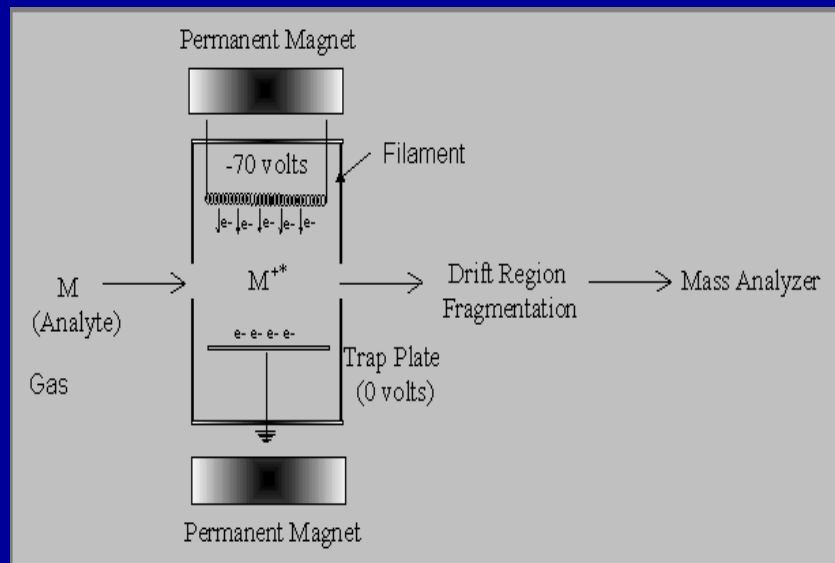
Desorpcioni izvori

- **Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) i SALDI**
- Fast Atom Bombardment (FAB)
- Desorpcija plazmom, poljem

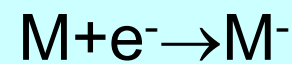
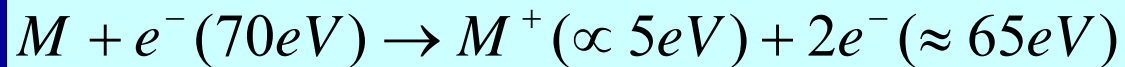
Aerosol rastvora (Spray Methods)

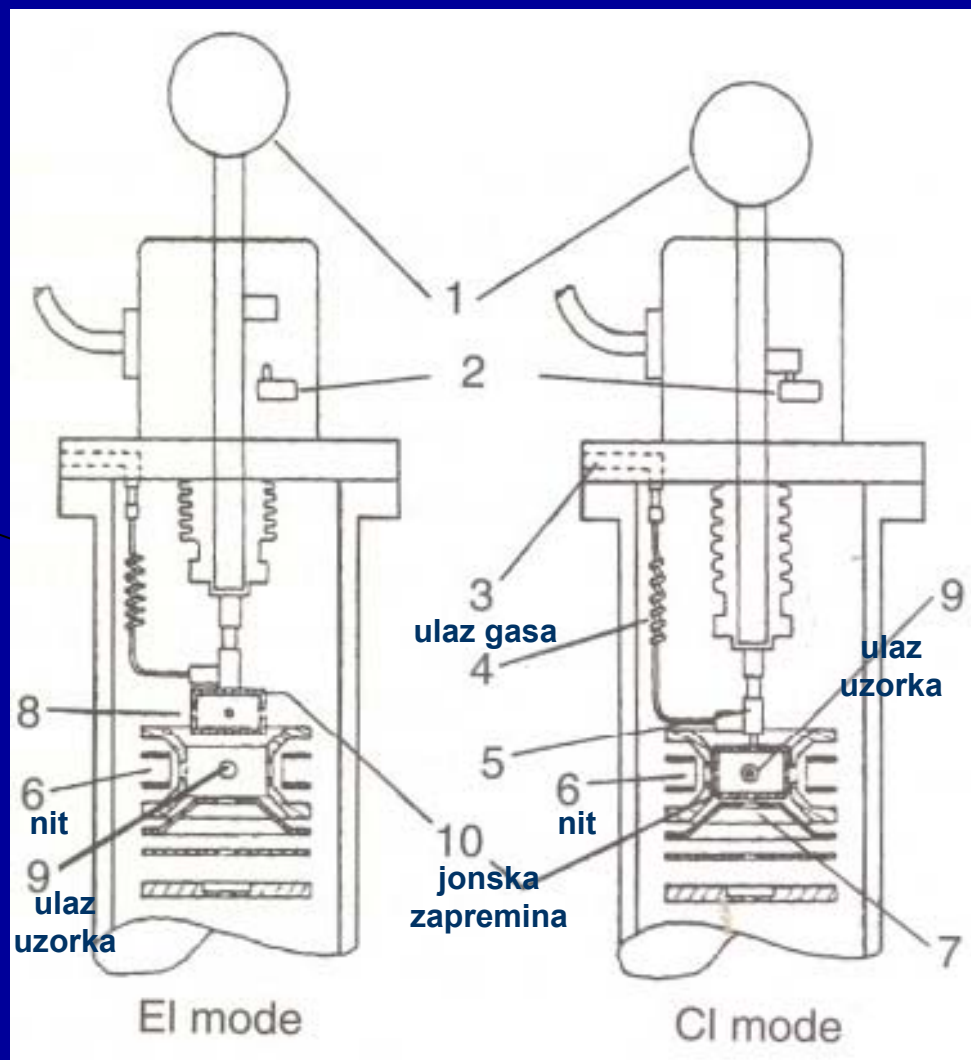
- **Electrosprej (ESI)**
- Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)
- Termosprej jonizacija

Elektronska i hemijska jonizacija

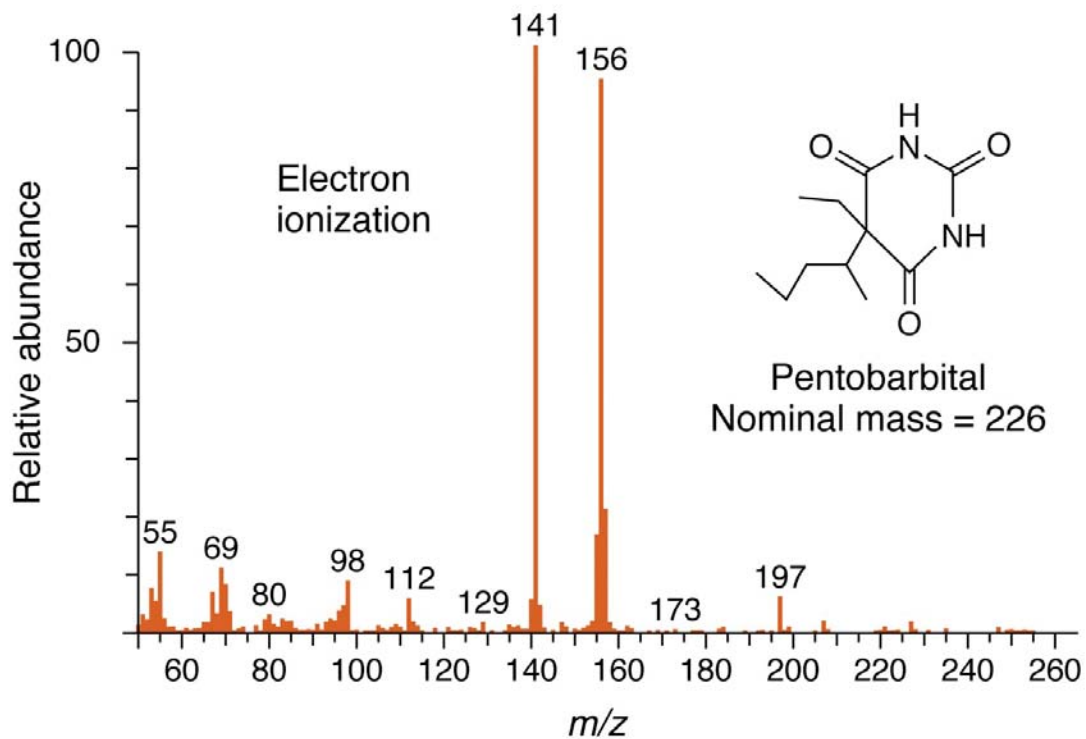


EI igra važnu ulogu u rutinskim analizama malih organskih molekula.

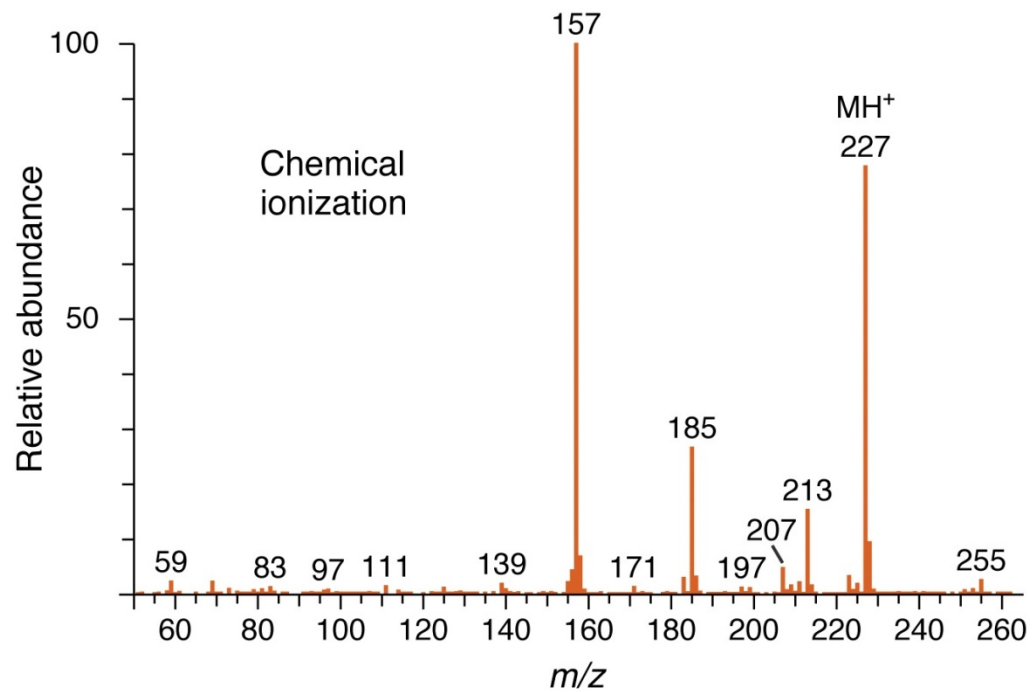




U kutiji se održava pritisak od 60 Pa,
dok je okolo pritisak u izvoru oko 10^{-3} Pa.



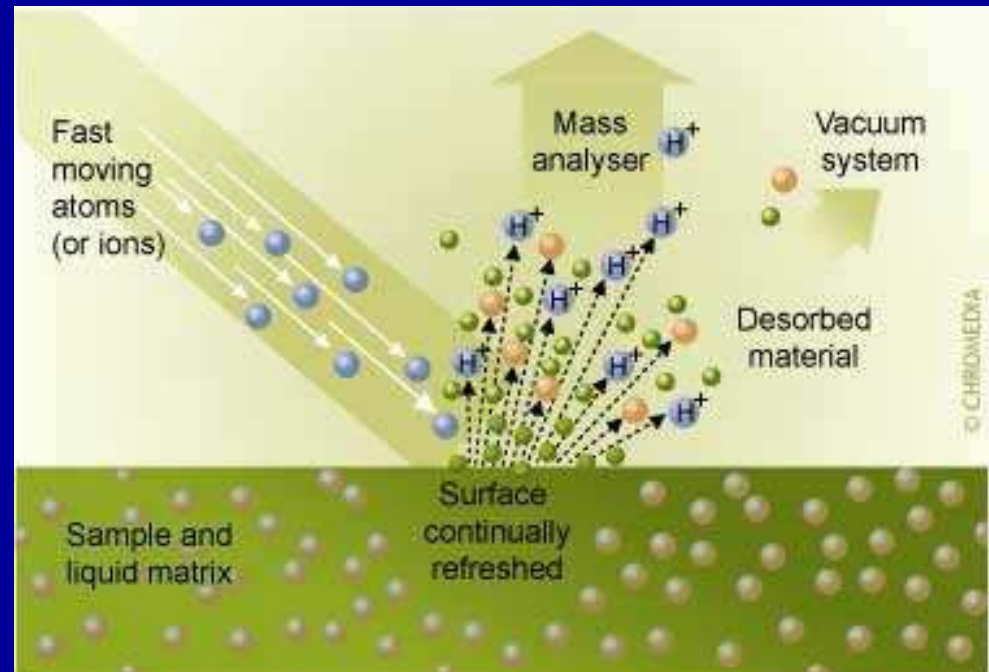
Poređenje spektra
dobijenog EI i CI



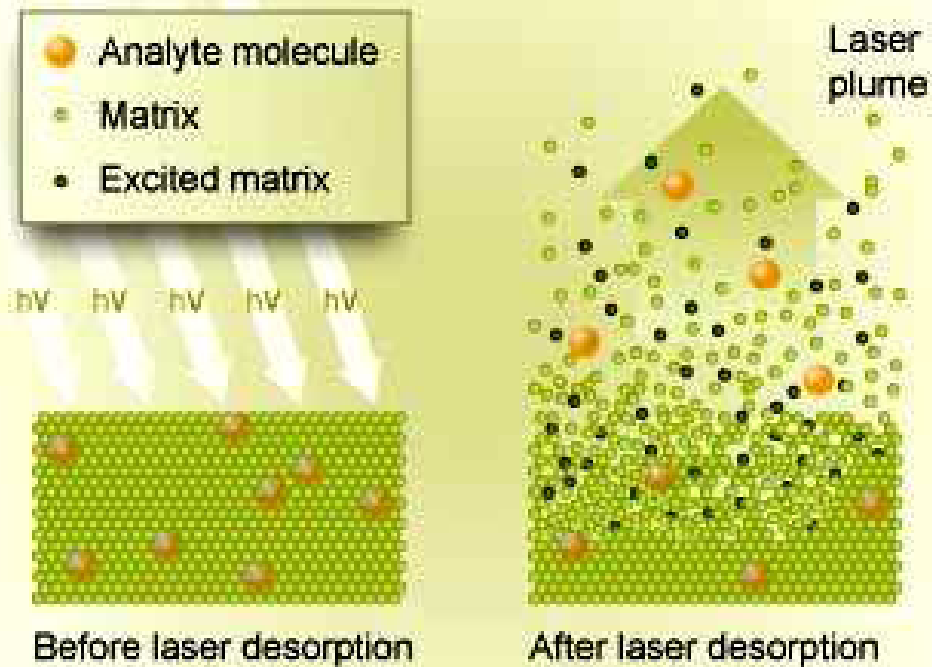
Desorpcione metode jonizacije su: termalna jonizacija-DCI, desorpcija poljem-FD, brzo atomsko/jonsko bombardovanje i MALDI

Brzo atomsko/jonsko bombardovanje- FAB i FIB

FAB zahteva direktno unošenje probe u jonski izvor i korišćenje visokoenergetskih snopova **Xe atoma, jona Cs^+ ili masivnih glicerol- NH_4^+ klastere** (MCI) da bi se raspršavali (spaterovali) uzorak i matriks sa površine probe (**m-nitrobenzil alkohol (NBA) i glicerol**).



MALDI-Laserska desorpcija/ionizacija potpomognuta matriksom



Brza osetljiva metoda za analizu makromolekula masa većih od 700Da (proteini, peptidi, nukleinske Kiseline, sintetički polimeri).

$$h\nu \sim 10\text{-}50\text{MW/cm}^2$$

Type of laser	Wavelength (nm)	Pulse Width (nsec)	Photon Energy	
			kcal/mol	eV
Nitrogen	337	>1	85	3.68
Nd:YAG (4x)	266	5	107	4.66
Excimer (ArF)	193	15	148	6.42
CO ₂	10,600	100	2.7	0.12

UV ili IR zračenje lasera u kratkim impulsima (od 1-100nsec) fokusirano na malu površinu čvrstog rastvora dovodi do desorpcije i jonizacije.

Laserski snop proizvodi neutrane analita i matriksa kao i jone matriksa:

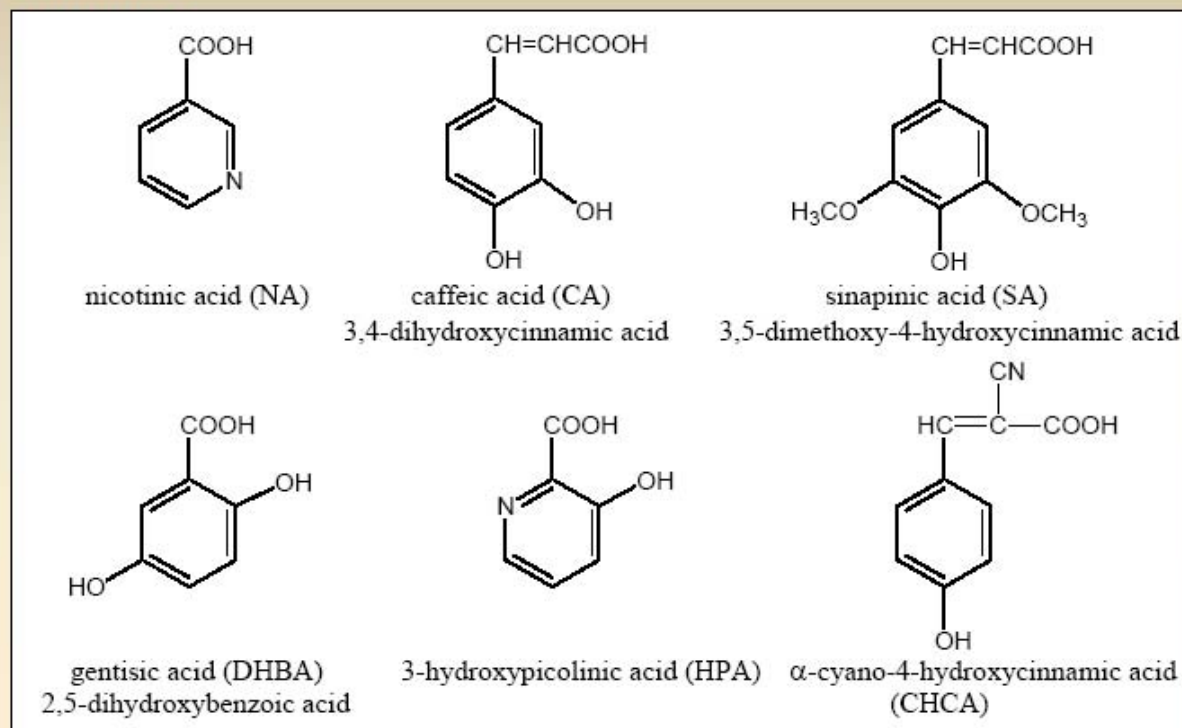


Analit (A) se jonizuje prenosom protona u gasnoj fazi:



Izbor matriksa je ključni momenat za dobijanje MS

d. matrices



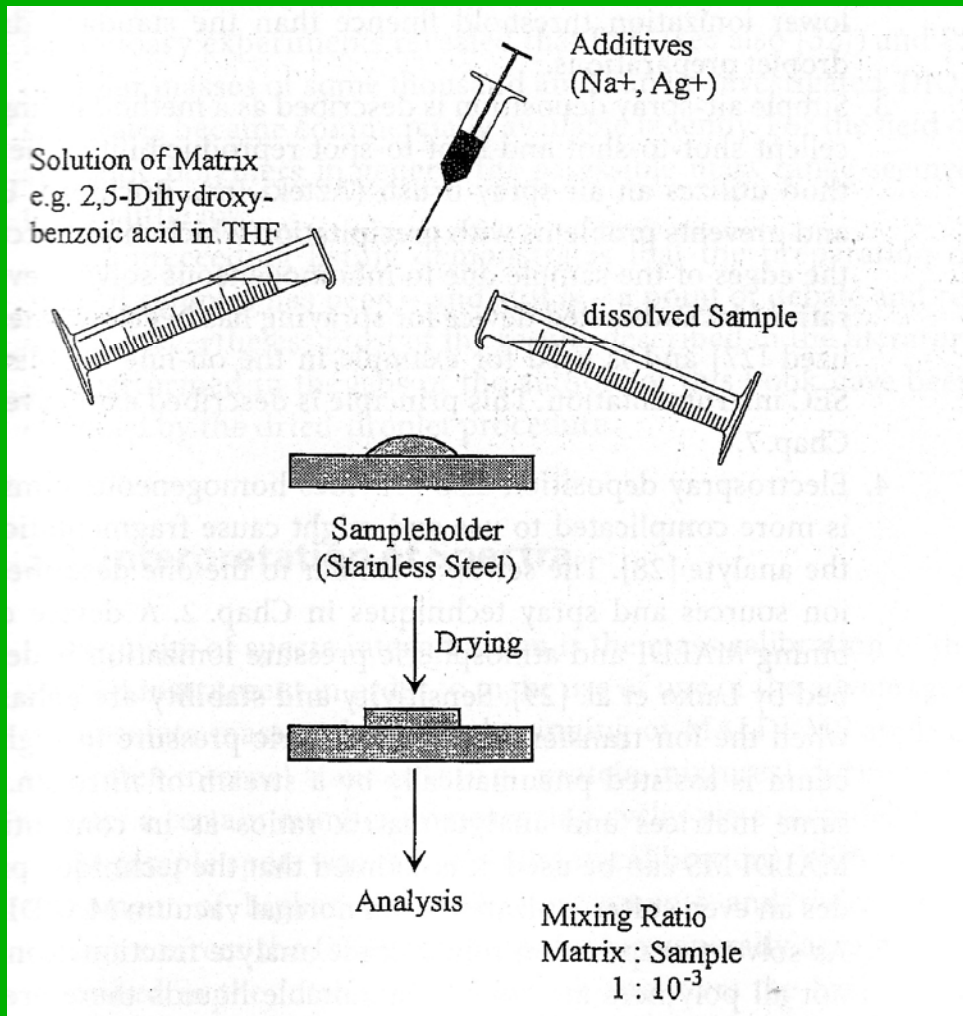
Middle Atlantic
Mass Spectrometry Laboratory

ME 330.80: Role of Chromatography & Mass Spectrometry in Biological Research
<http://www.hopkinsmedicine.org/mams/>

Ugljenični nanomaterijali (dijamant, grafit, C nano cevi i fulereni se koriste kao matriksi ili se dodaju matriksu kod analize manjih molekula.

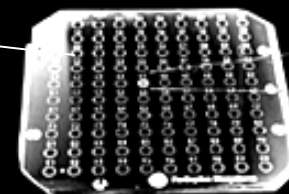
(J. Biochem. Biophys. Methods 70 (2007) 319–328)

Priprema probe



- Uzorak se prvo rastvara u pogodnom rastvaraču zajedno sa matriksom To je jak apsorber laserskog zračenja i to su najčešće derivati cimetne ili benzoeeve kiseline. Matriks se dodaje u 1000 puta većoj količini od analita. Može se prvo naneti uzorak pa matriks ili obrnuto ili kao sendvič matriks pa uzorak pa opet matriks.

Otvori dijametra $\sim 1\mu\text{m}$ i $1\mu\text{L}$ ←



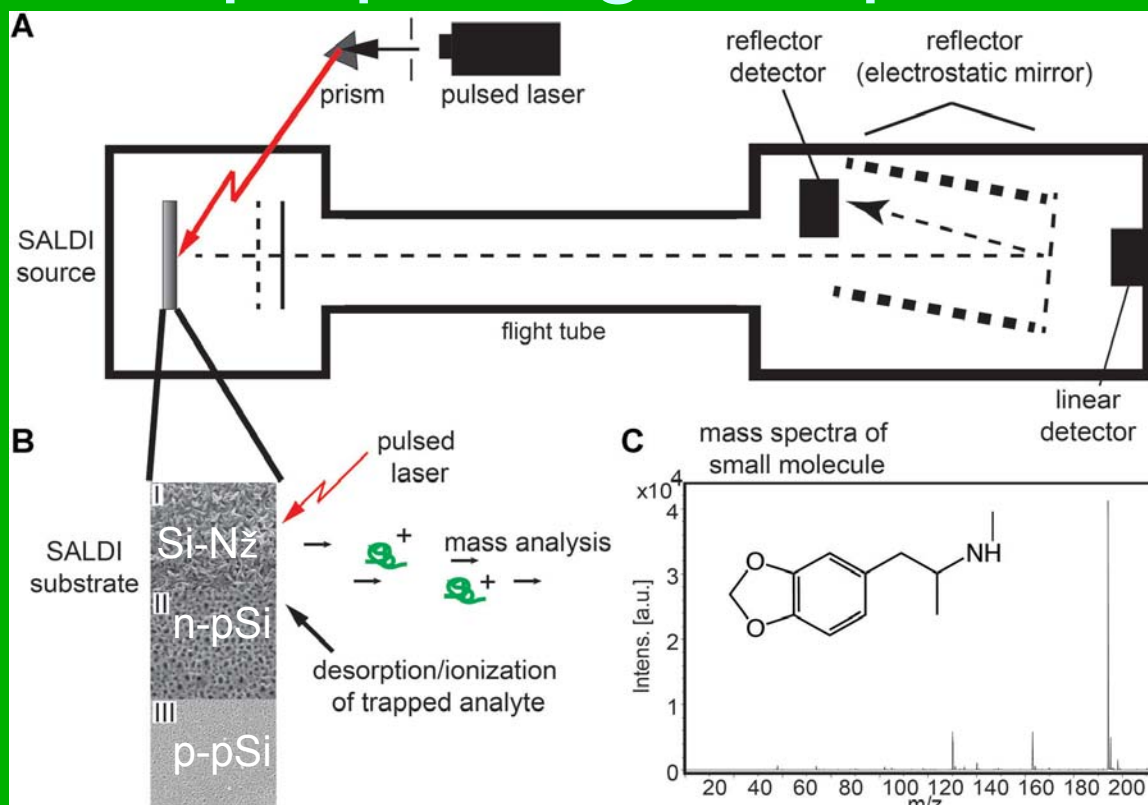
45

MALDI solid matrix contains microcrystals of the matrix with the sample embedded in the crystals.

Prednosti i nedostaci MALDI jonizacije

Prednosti	Nedostaci
<p>Meka jonizacija sa neznatnom ili nikakvom fragmentacijom</p> <p>Praktčna oblast masa do 300 000Da, čak i viših</p> <p>Tipična osetljivost je od femtomola do pikomola a čak postoje radovi u kojima se određivanja vrše na nivou atomola</p> <p>Tolerancija na prisustvo soli u mmol/L koncentracijama</p> <p>Pogodno za analizu kompleksnih smeša</p>	<p>Postoji pozadina od matriksa, kao i adukata koji mogu stvarati probleme za jedinjenja čije su mase ispod 700Da. Ove pozadinske interferencije su veoma zavisne od materijala matriksa.</p> <p>Mogućnost fotodegradacije laserskom desorpcijom /jonizacijom</p> <p>Za razliku od ESI nema višestruko naelektrisanih jona jer se oni teže desorbuju i nestabilni su u gasnoj fazi.</p>

SALDI-Laserska desorpcija/ionizacija potpomognuta površinom

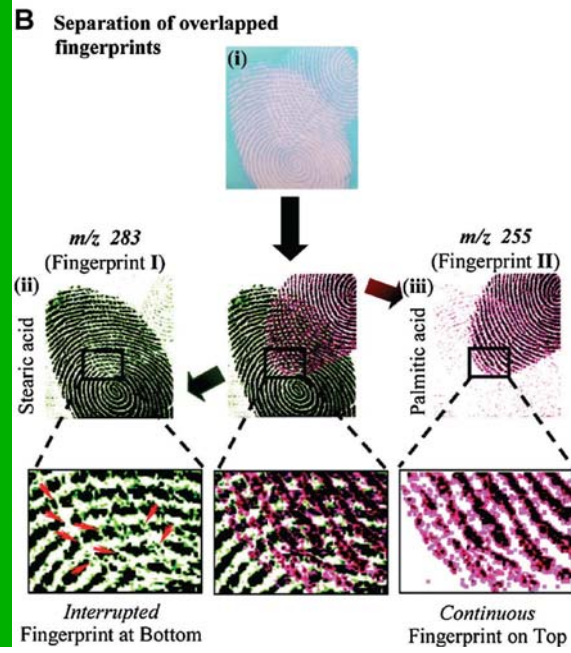
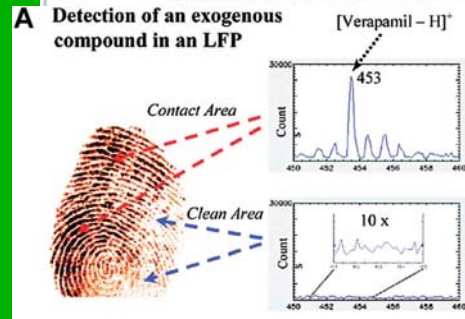
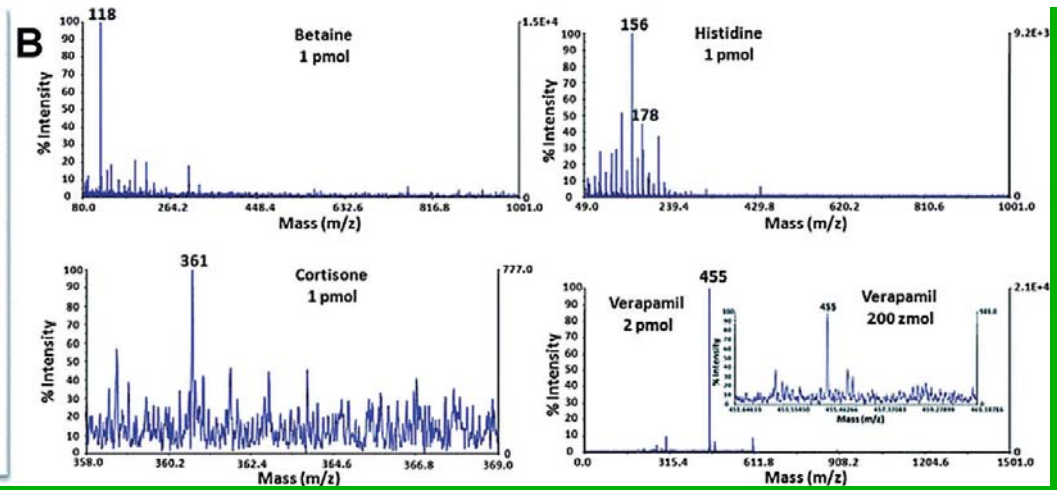
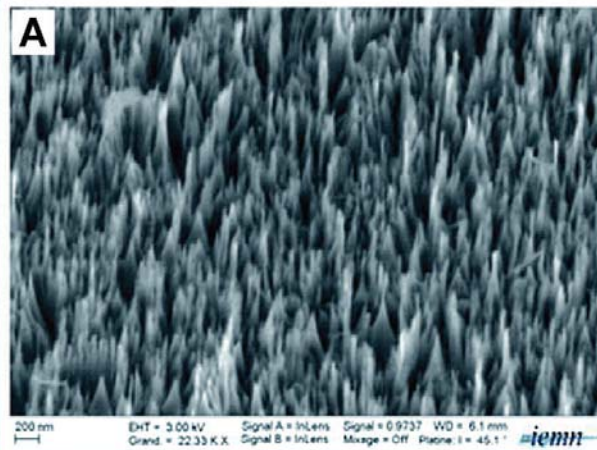


SALDI:

DIOS (porozni Si)
NIMS (nano inicirana)
NALDI (nano potpomognuta)

MDMA (3-4 methylene dioxymethamphetamine)
ekstazi

Nano-strukturirani supstrati koji olakšavaju desorpciju i jonizaciju bez matriksa. Metoda pogodna za analizu malih organskih molekula (<700Da).
Supstrati: Au, TiO₂, F₂O₃ i Se (NČ), CdTe (KT), Pt (nanosundēri) i ugljeniĉni nanomaterijali (MWCNT, HOPG, fuleren, nanoporozni grafit, nano dijamant)



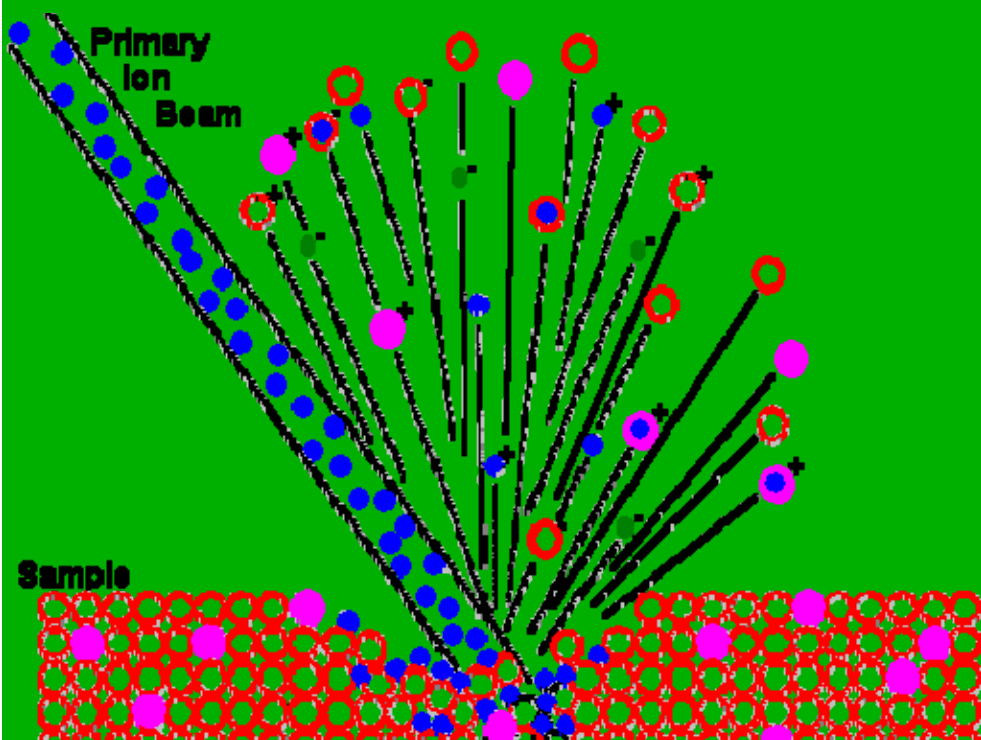
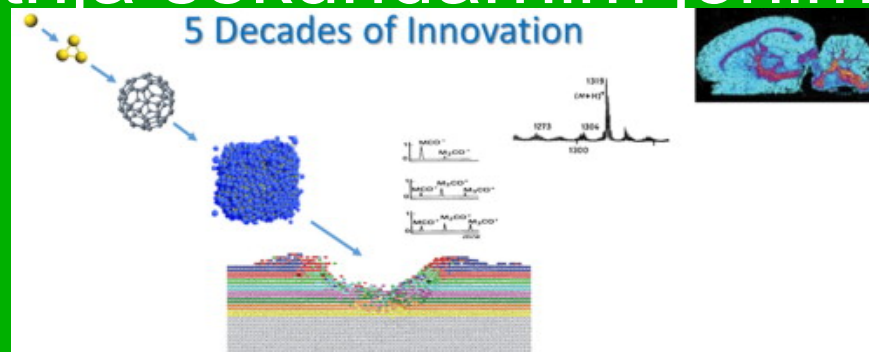
Supstrat-Au nano žice dobijene iz nano dijamanta dopiranog borom za analizu peptida (50 fmol) i malih molekula (verapamil-200 zmol, betain, histidin i kortizon-1pmol)

Imidžing droga i metabolita pomoću SALDI MS koji je poslužio za identifikaciju dva otiska prsta na osnovu spektra stearinske kiseline sa m/z na 283 i palmitinske kiseline na 255. (supstrat Au NČ).

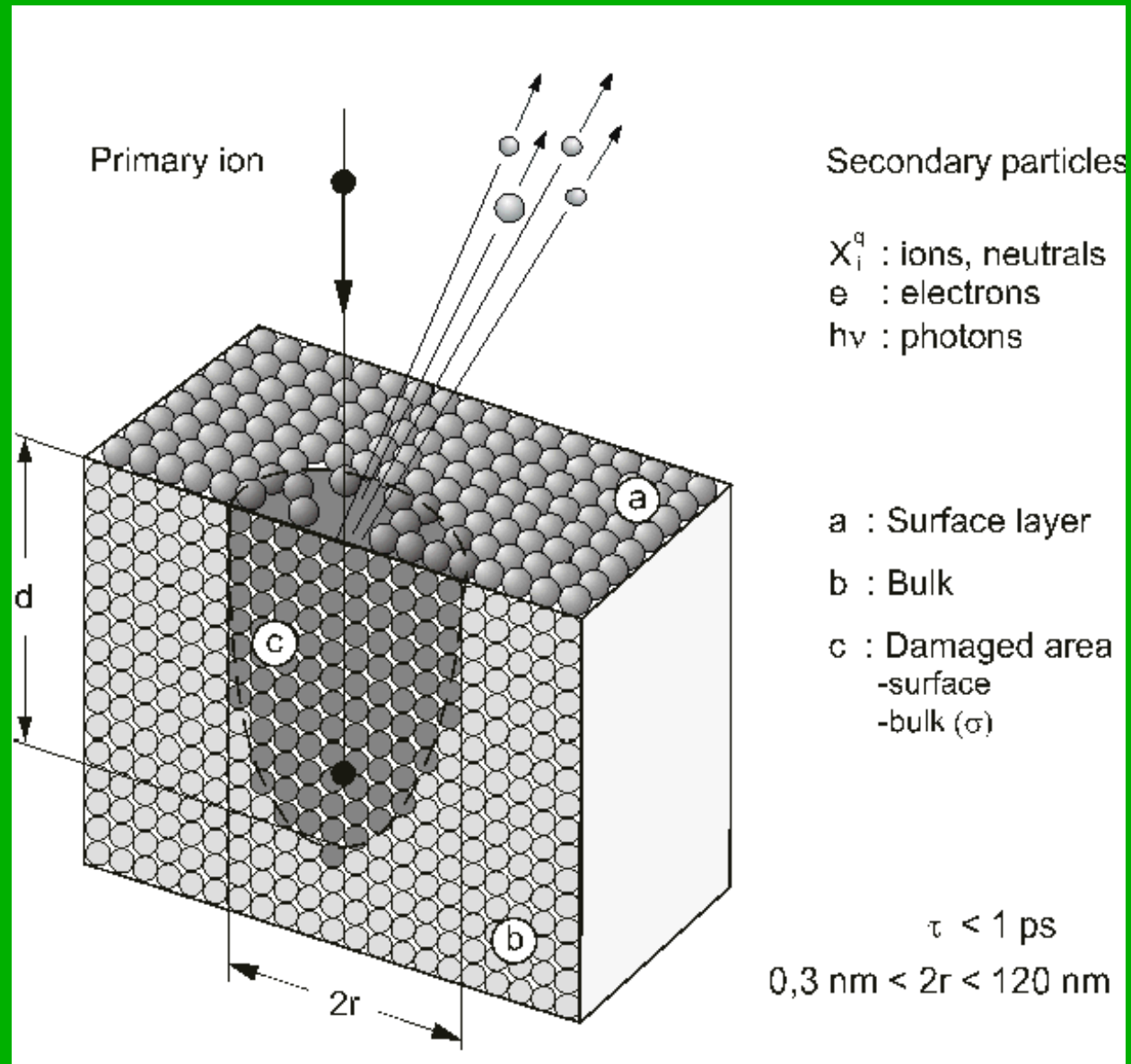
Mass Spectrometry Reviews 2015, 34, 627–640

SIMS-Secondary Ion Mass Spectrometry

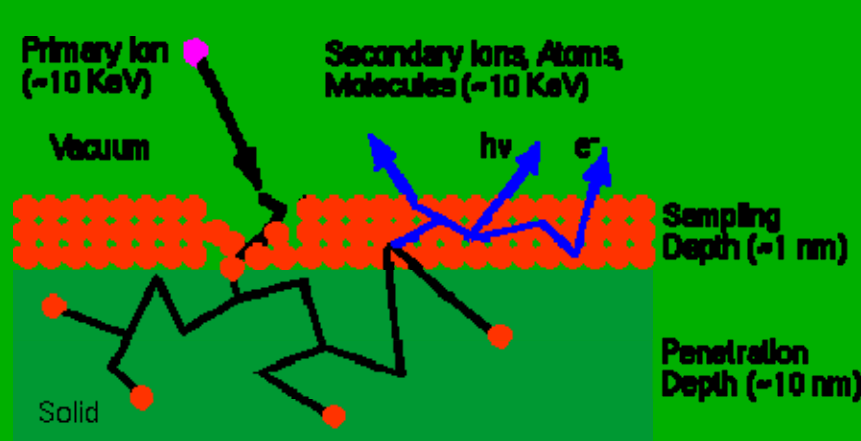
Masena spektrometrija sekundarnim jonima



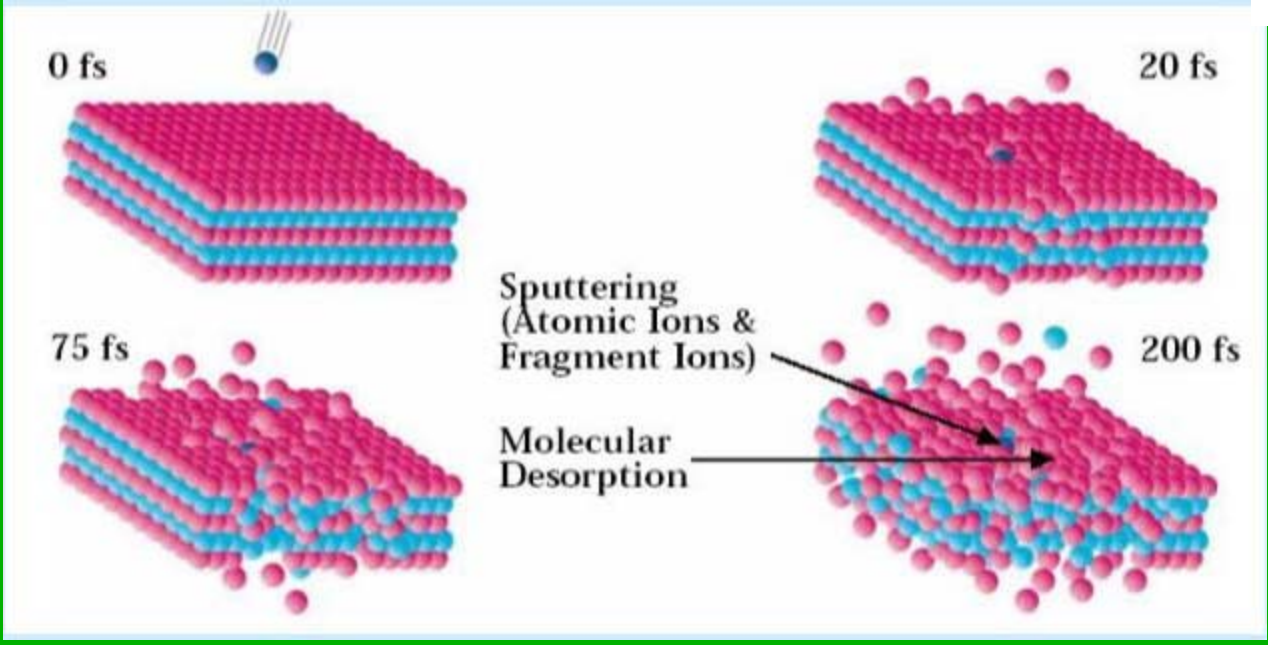
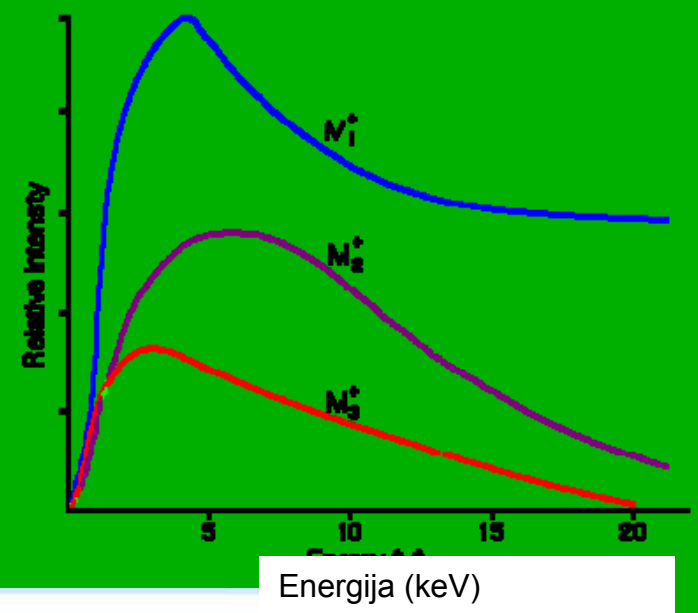
- Elementi od H to U mogu biti detektovani ali i organski molekuli.
- Većina elemenata može da se detektuje do koncentracija od 1ppm do 1 ppb.
- Izotopski odnosi mogu da se mere sa preciznošću od 0.5 do 0.05%.
- Sastav i struktura može da se određuje u površinama do 1nm i tankim filmovima.
- Pošto su joni emitovani vrlo blizu udara primarnih jona to se može analizirati odabrana površina (lokalna mikro analiza).
- Mogu da se dobiju 2D i 3D raspodele.



Spaterovanje-raspršivanje



Energetska raspodela sekundarnih jona



Energija (keV)

Tipične brzine smaterovanja 0.5 do 5 nm/s
Tipični prinosi od 5 do 15
Nema posebne pripreme uzorka

Uzorci, geometrije, način rada

▶ Analizirani materijali

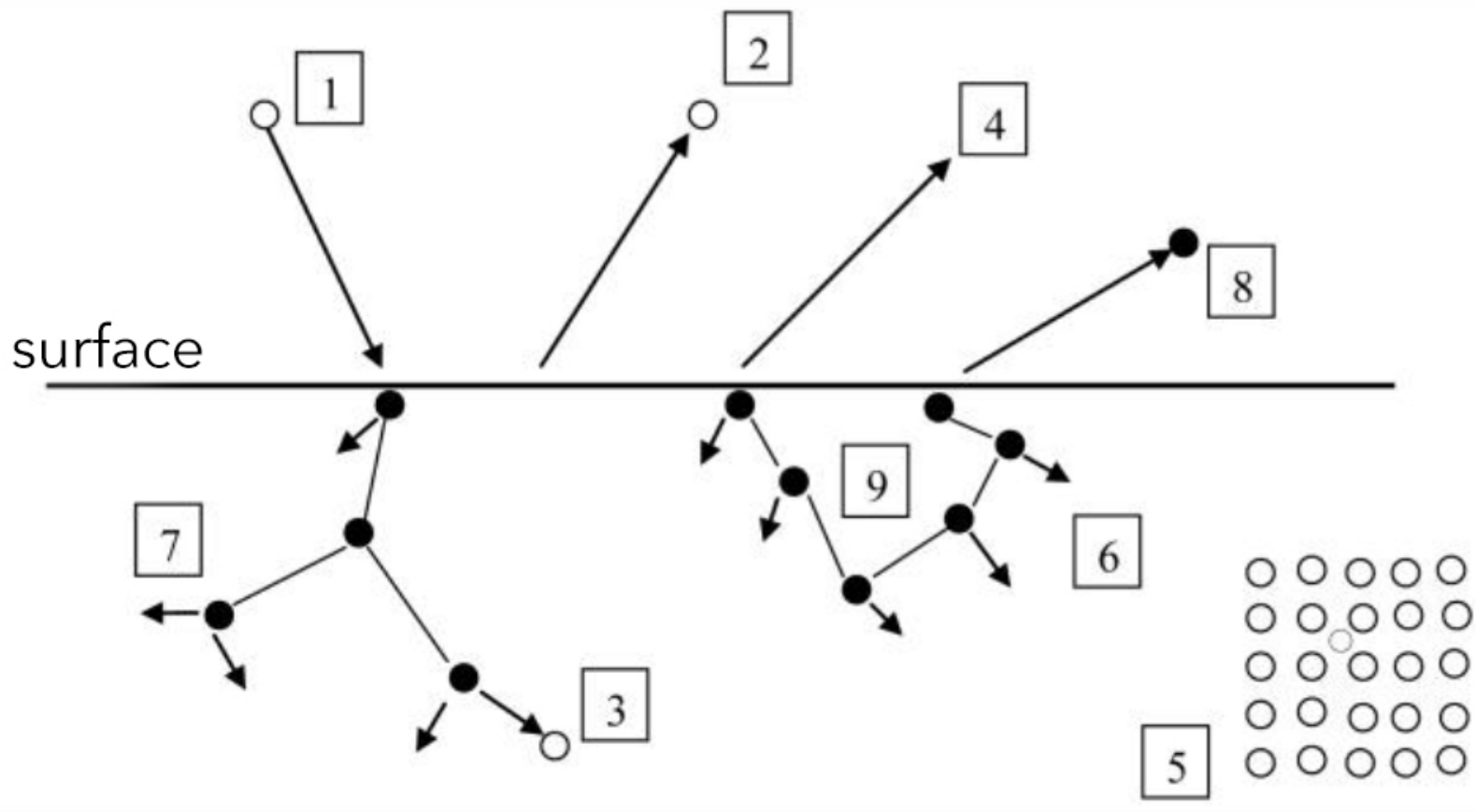
- Metali, Poluprovodnici, Oksidi
- Stakla, Keramike,
- Polimeri, Aditivi, Biopolimeri, Biomolekuli,
- Biološka tkiva

▶ Geometrija uzoraka

- Površine, Monoslojevi, Čestice, Vlakna,

▶ Način rada (statički i dinamički)

- Spektroskopija
- Imidžing (mapiranje)
- Profil dubine
- 3D-analiza



	Au^+	Au_2^+	Au_3^+	C_{60}^+
Removed # of H ₂ O Equivalents	100	575	1190	2510

$$Y = \frac{3\alpha}{4\pi^2} \frac{4M_1M_2E}{(M_1 + M_2)U_o}$$

Jonski prinos

$\text{Ar}^+, \text{Cs}^+, \text{Ga}^+, \text{O}_2^+, \text{O}^-,$
 $\text{SF}_5^+, \text{Au}_n^+, \text{Bi}_n^+, \text{Ar}_{2500}^+, \text{C}_{60}^+$

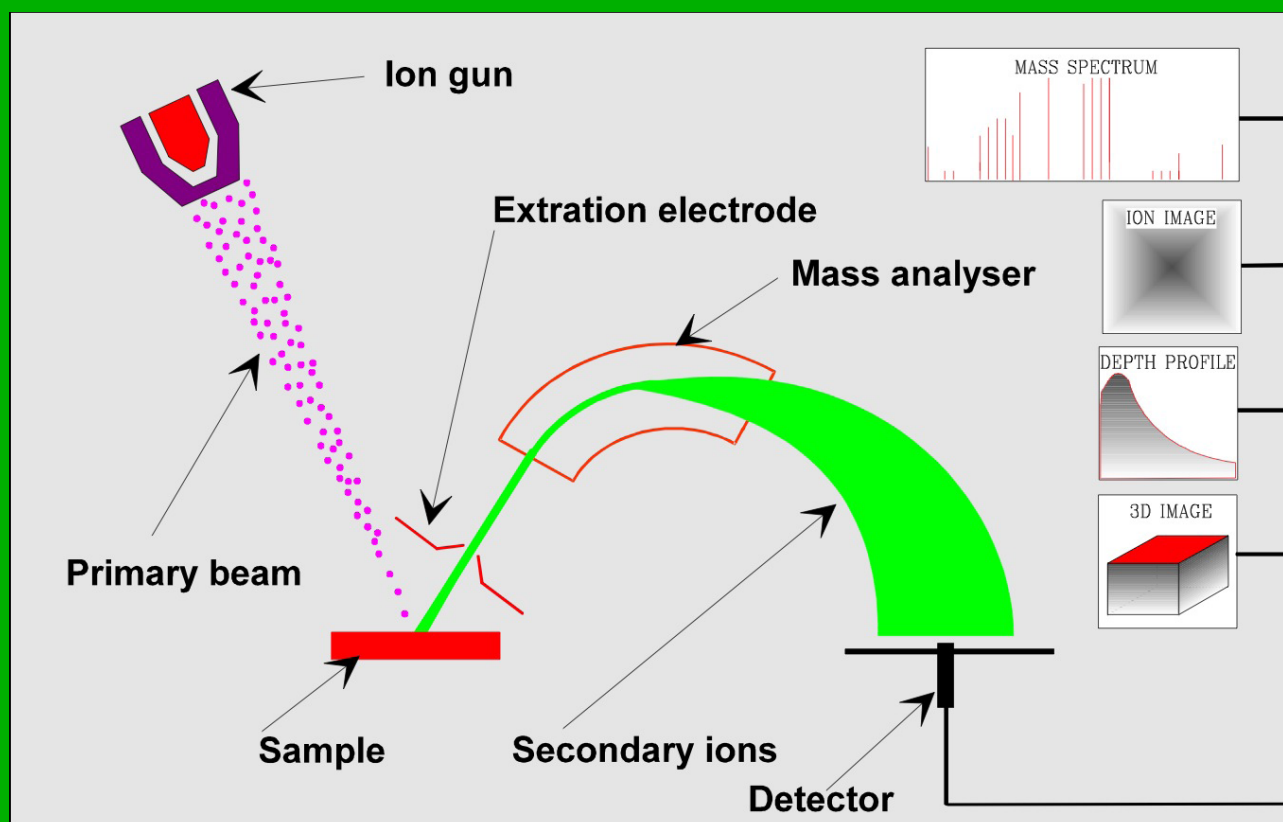
Faktori relativne osetljivosti u pozitivnom modu sa O⁻ primarnim jonijma (osnova Si)

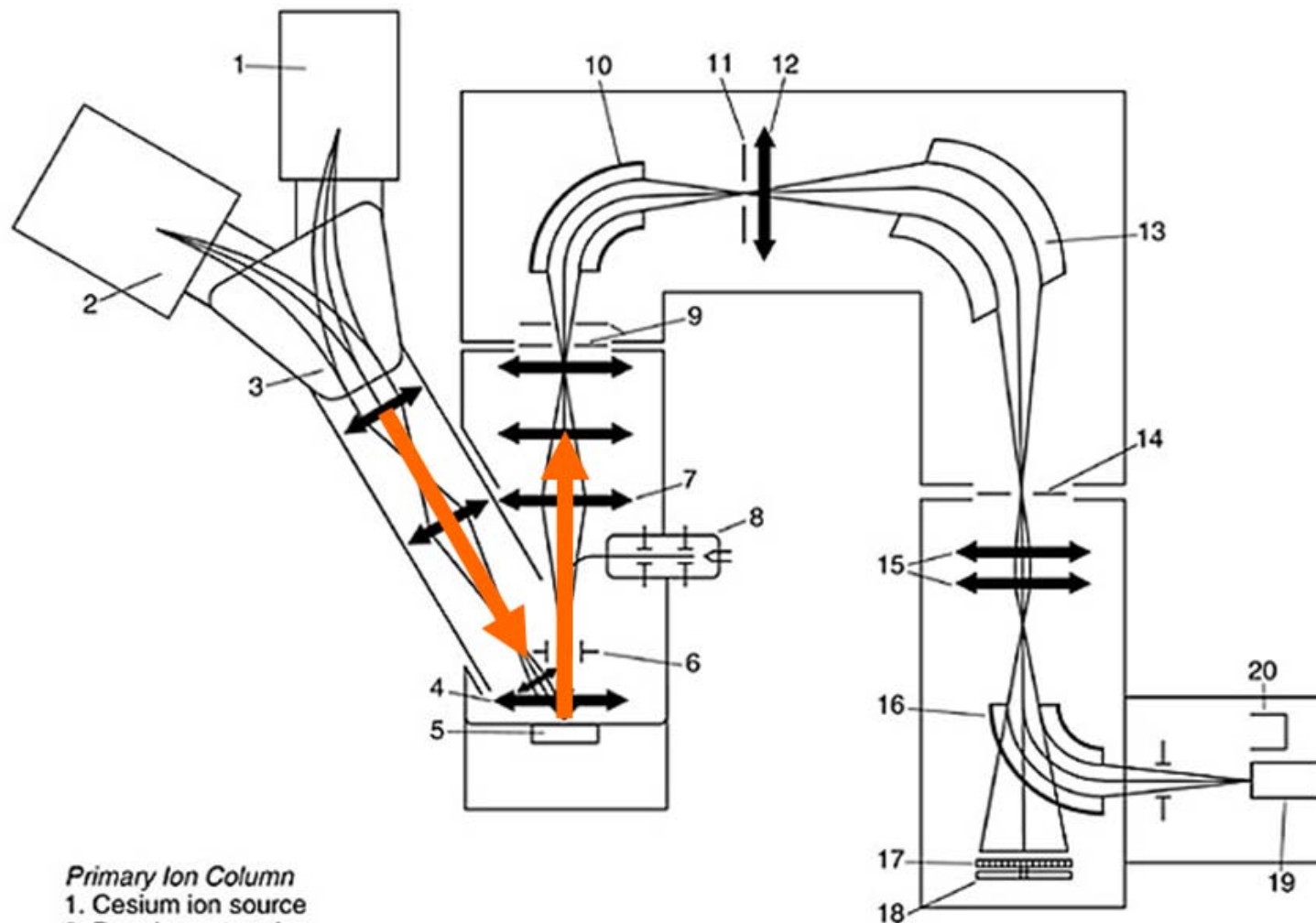
RSF Ranges (atom/cc)

H																	He
E24																	E27
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
E20	E22											E22	E24	E25	E25	E23	E27
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
E20	E21											E21	E22	E24	E24	E24	E26
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
E20	E21	E21	E21	E21	E21	E22	E22	E22	E22	E22	E24	E21	E23	E24	E24	E24	E25
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
E20	E21	E21	E21	E22	E22		E22	E22	E23	E22	E23	E21	E22	E23	E24	E24	E25
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
E20	E21	E21	E22	E22	E23	E24	E23	E23	E24	E24	E24	E21	E22	E23			
Fr	Ra	Ac															
			Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu	
			E21	E21	E21		E21	E21	E21	E21	E21	E21	E21	E21	E21	E21	
			Th	Pa	U												
			E22		E21												

$$C_E = RSF \frac{I_E}{I_M}$$

Shematski prikaz glavnih komponenti SIMS tehnike





Primary Ion Column

- 1. Cesium ion source
- 2. Duoplasmatron ion source
- 3. Primary beam mass filter
- 4. Immersion lens

Secondary Ion Extraction System

- 5. Specimen
- 6. Dynamic transfer system
- 7. Transfer optical system
- 8. Electron flood gun

Mass Spectrometer

- 9. Entrance slit, Field aperture
- 10. Electrostatic analyzer
- 11. Energy slit
- 12. Spectrometer lens
- 13. Electromagnet
- 14. Exit slit

Detection System

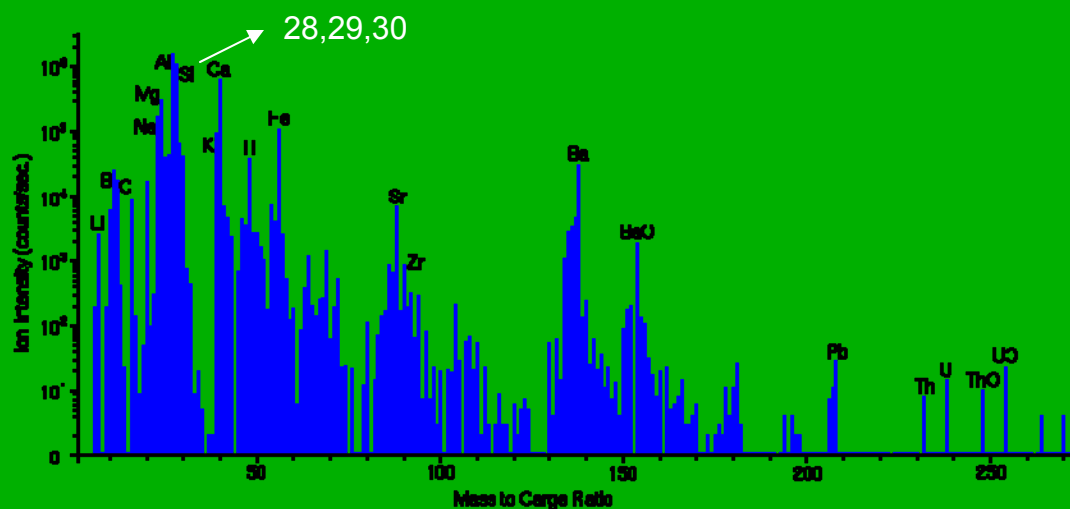
- 15. Projection lenses
- 16. Electrostatic sector
- 17. Channel-plate
- 18. Fluorescent screen
- 19. Electron multiplier
- 20. Faraday cup

Prema energiji i struji primarnih jona SIMS metoda može biti u dva moda:

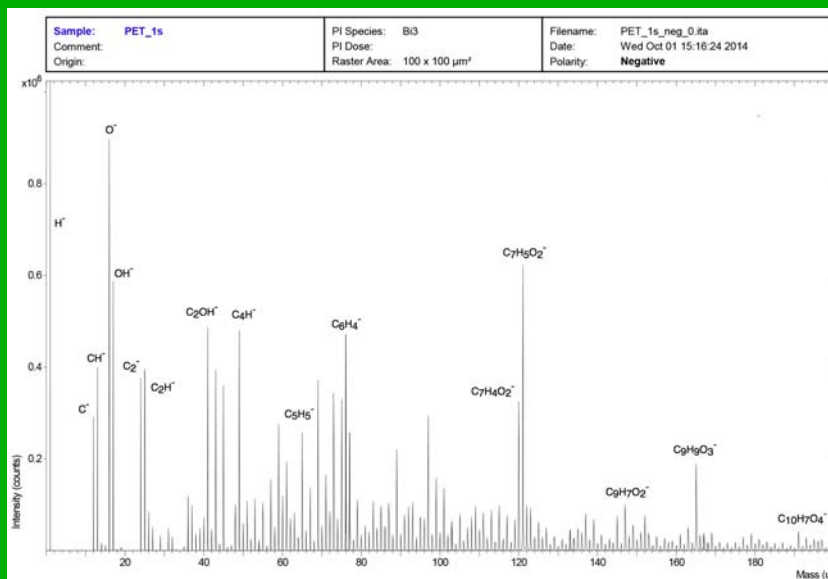
Statički SIMS: primenjuju se primarni joni energije od 0,1 do 10 keV sa površinskom gustinom struje od nA/cm². Za potpunu eroziju prvog mono sloja su potrebni sati. Pri takvim uslovima verovatnoća za stvaranje molekulskih i kvazi molekulskih jona je velika, a fragmentacija krajnje ograničena.

Dinamički SIMS: energije od 10 do 30 keV sa površinskom gustinom reda μA do mA/cm². Pri takvim uslovima uzorak kontinualno erodira i može se vršiti profilisanje po dubini.

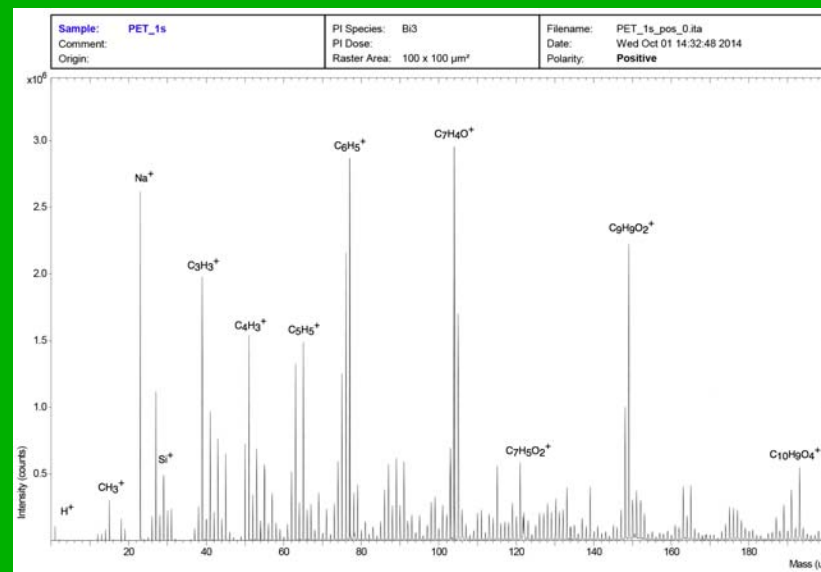
Maseni spektri



Maseni spektar pepela uglja



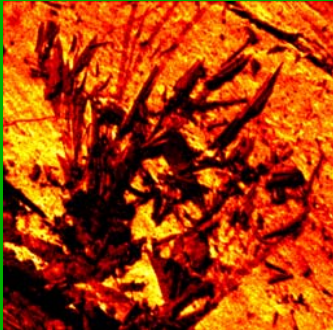
SIMS spektar PET ($(\text{C}_{10}\text{O}_4\text{H}_8)_n$) u negativnom modu



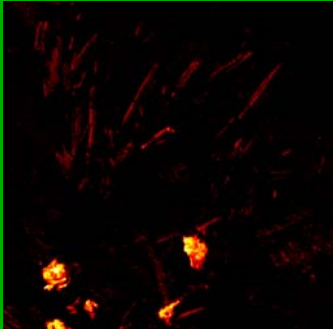
SIMS spektar PET u pozitivnom modu

Imidžing-mapiranje

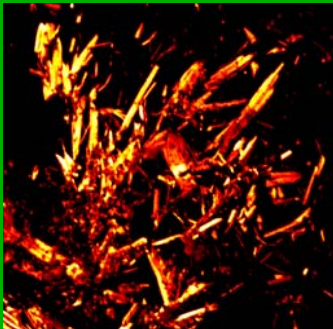
Oblast posmatranja: 284 x 284 μm^2



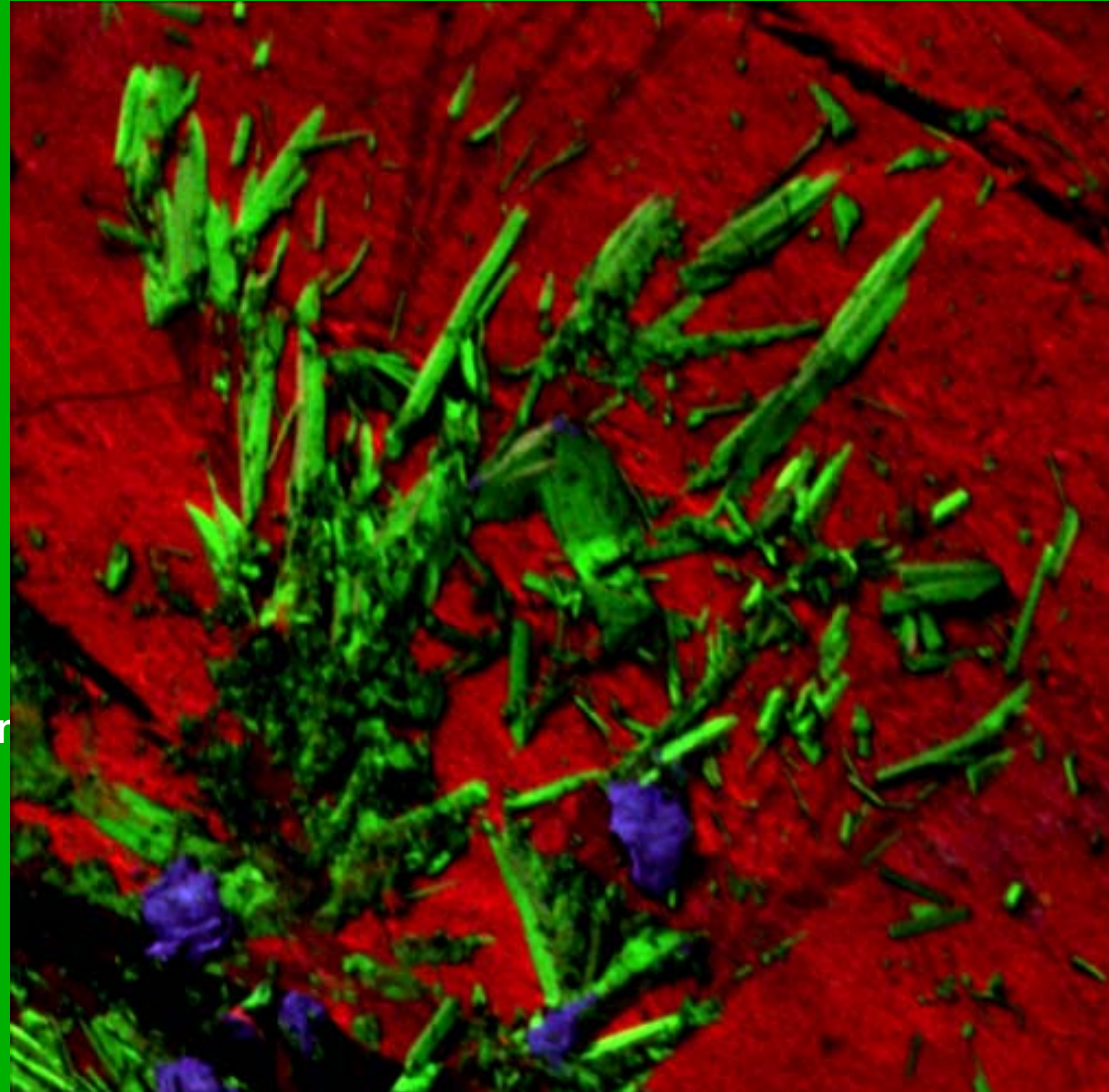
Polimer (PP)



Stabilizator topljer



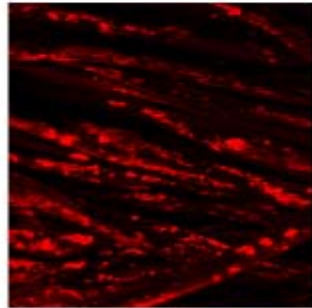
Antioksidant



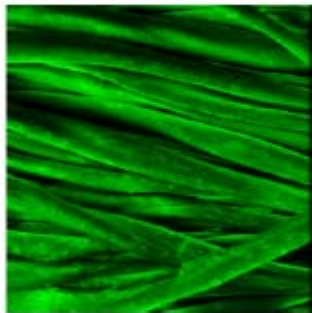
Polimer, Stabilizator, Antioksidant

field of view: 150 x 150 μm^2

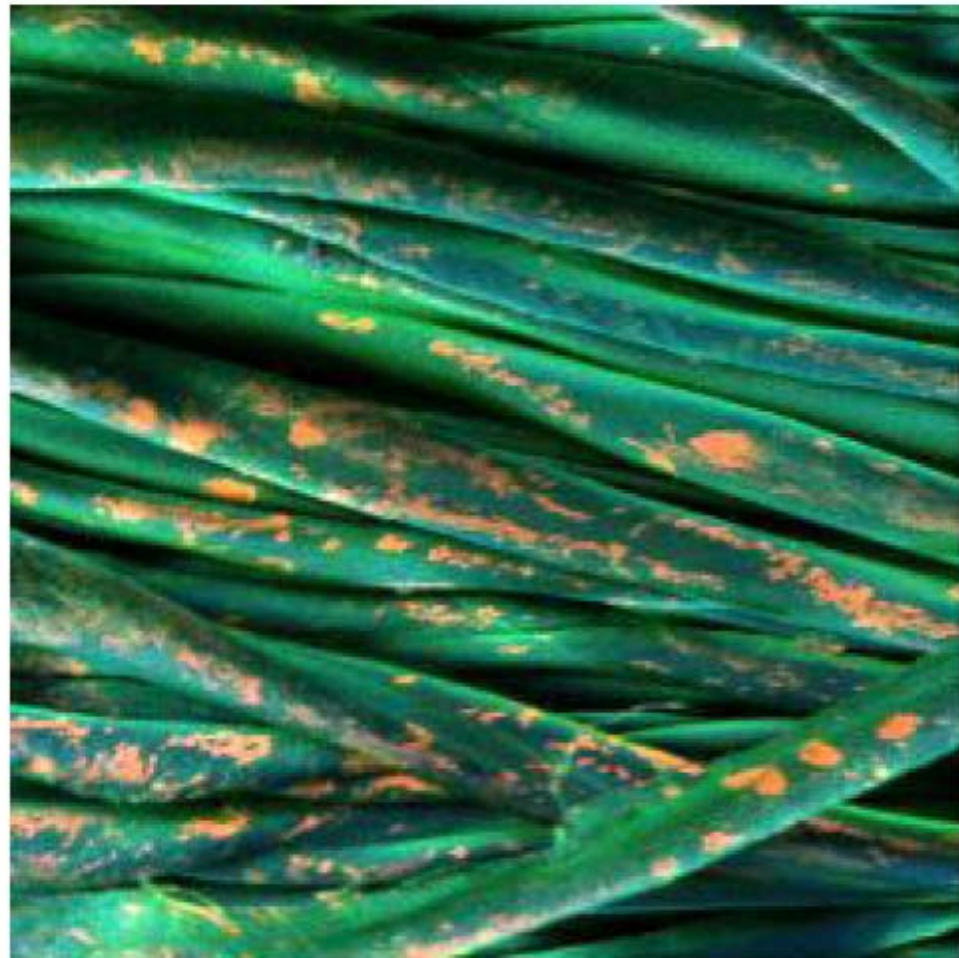
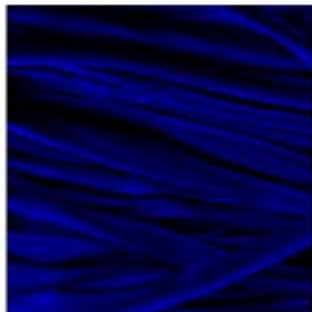
Si_xO_y



Fluorcarbon

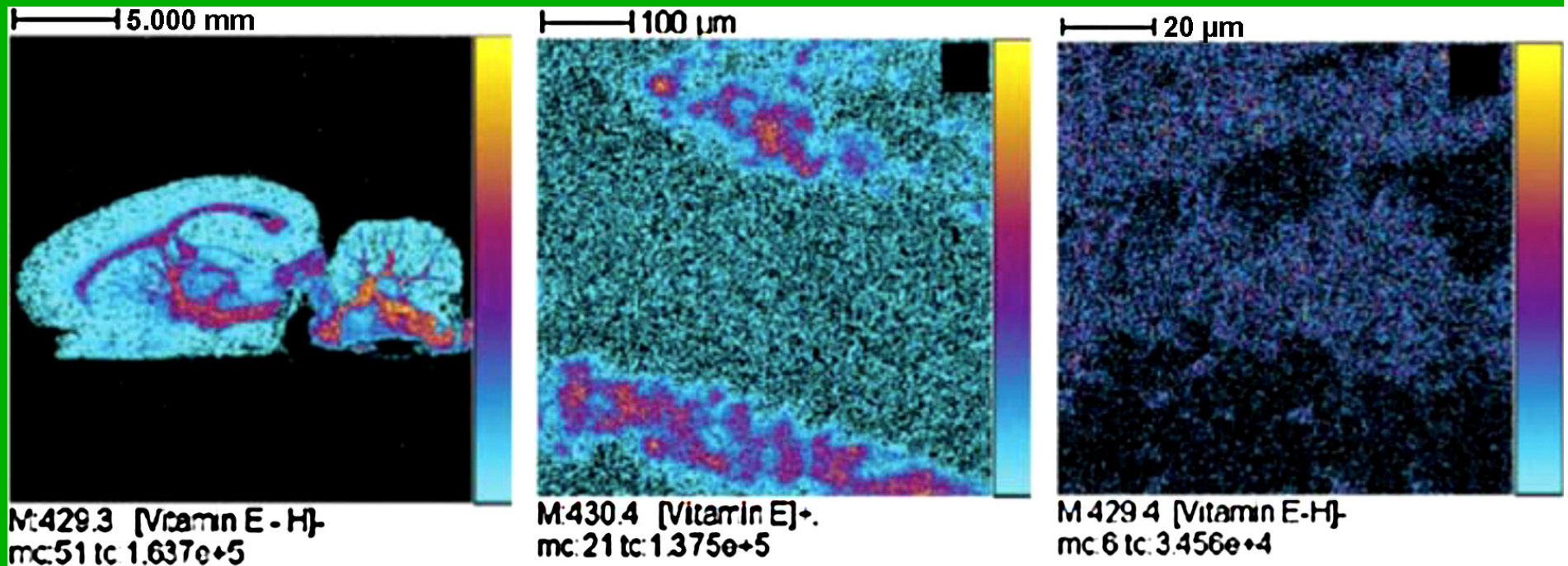


Aliphatic hydrocarbons



TOF-SIMS dobijen sa pamučnih vlakana tretiranih fluoroalkilsilanom. 25 keV Bi^{3+}

Sagitalni isečak mozga pacova pri različitim prostornim rezolucijama na $m/z=430,4$ -vitamin E



Određivanje m/e odnosa

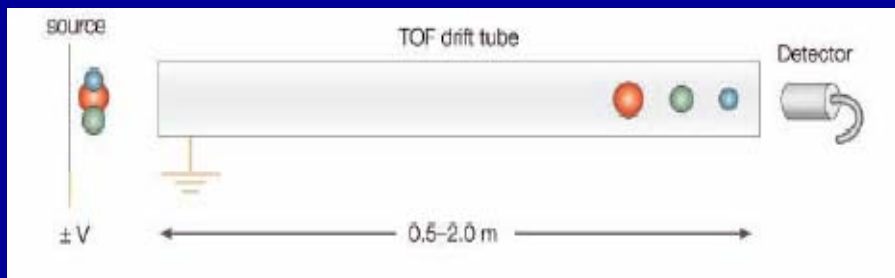
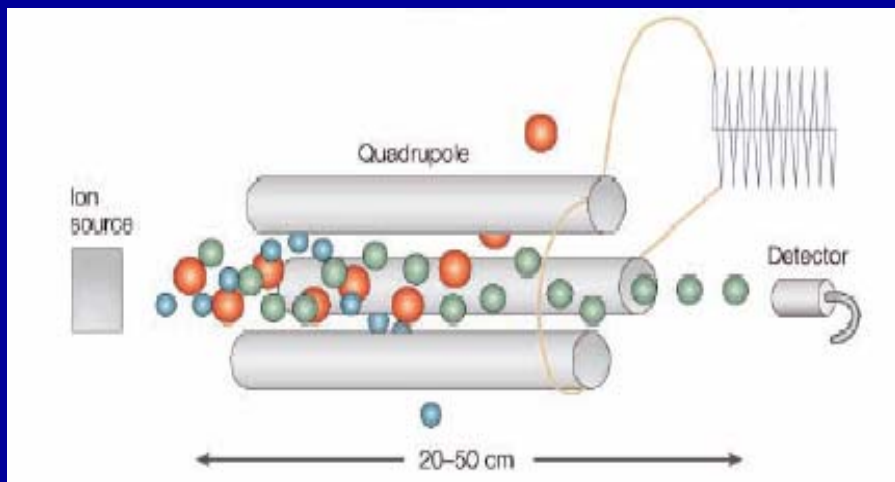
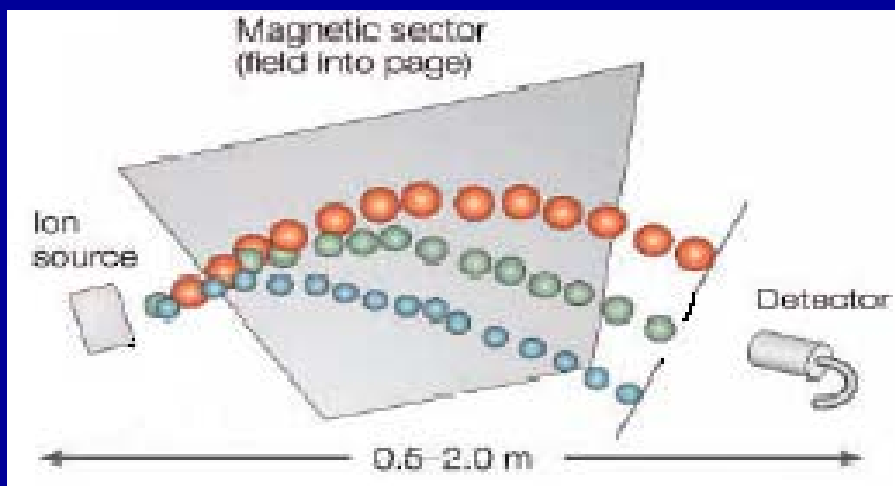
Merenjem:

- Momenta u magnetnim sektorima
- Kinetičke energije u elektrostatičkim sektorima
- Putanje stabilnosti u linearnim kvadrupolima
- Kružne frekvencije u jon ciklotronskoj rezonanciji i jonskom trapu
- Brzine u analizatorima na bazi vremena preleta (TOF)

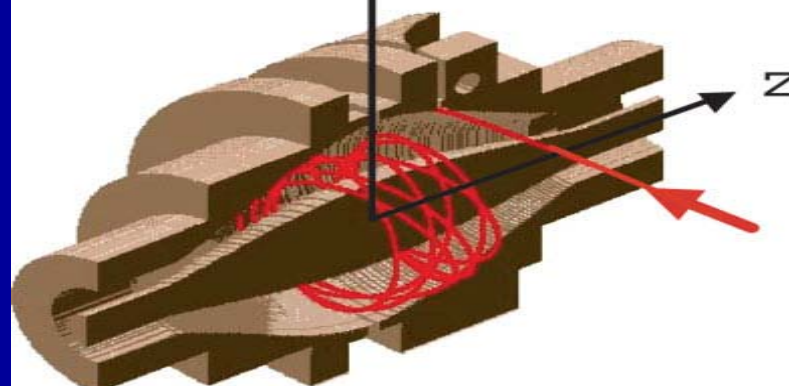
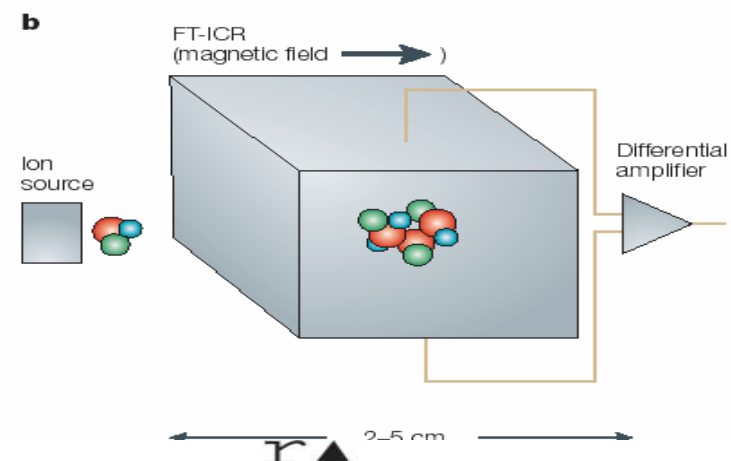
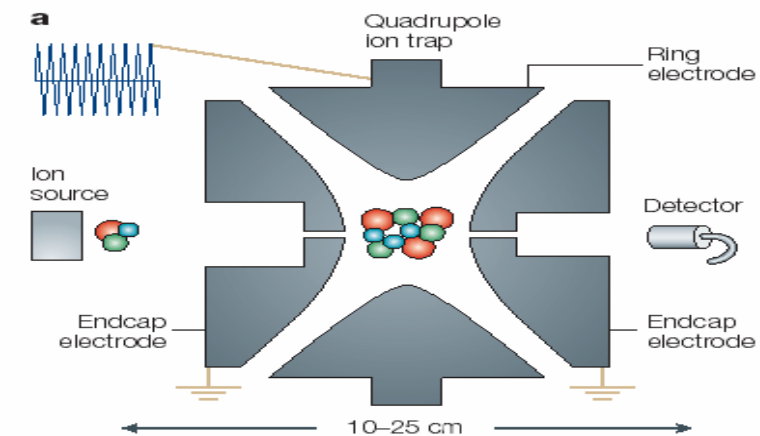
Maseni analizatori

- Magnetski sektor i dvostruko fokusirajući analizator
- Kvadrupolni analizatori
- Linearni Time-of-Flight (TOF)
- Reflektronski TOF
- **Kvadrupolni jonski trap**
- **Forije Transform Jon Ciklotron Rezonanca (FT-ICR-MS)**
- **Orbitrap**

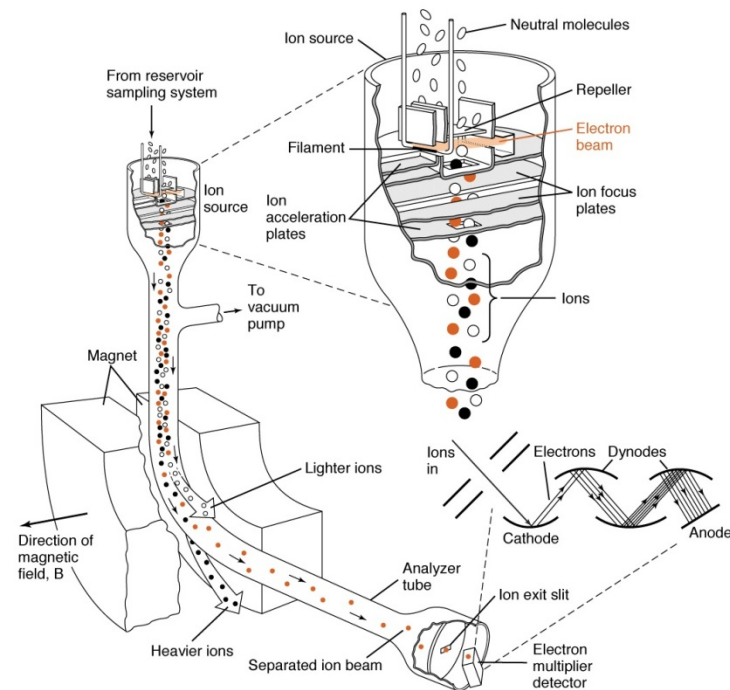
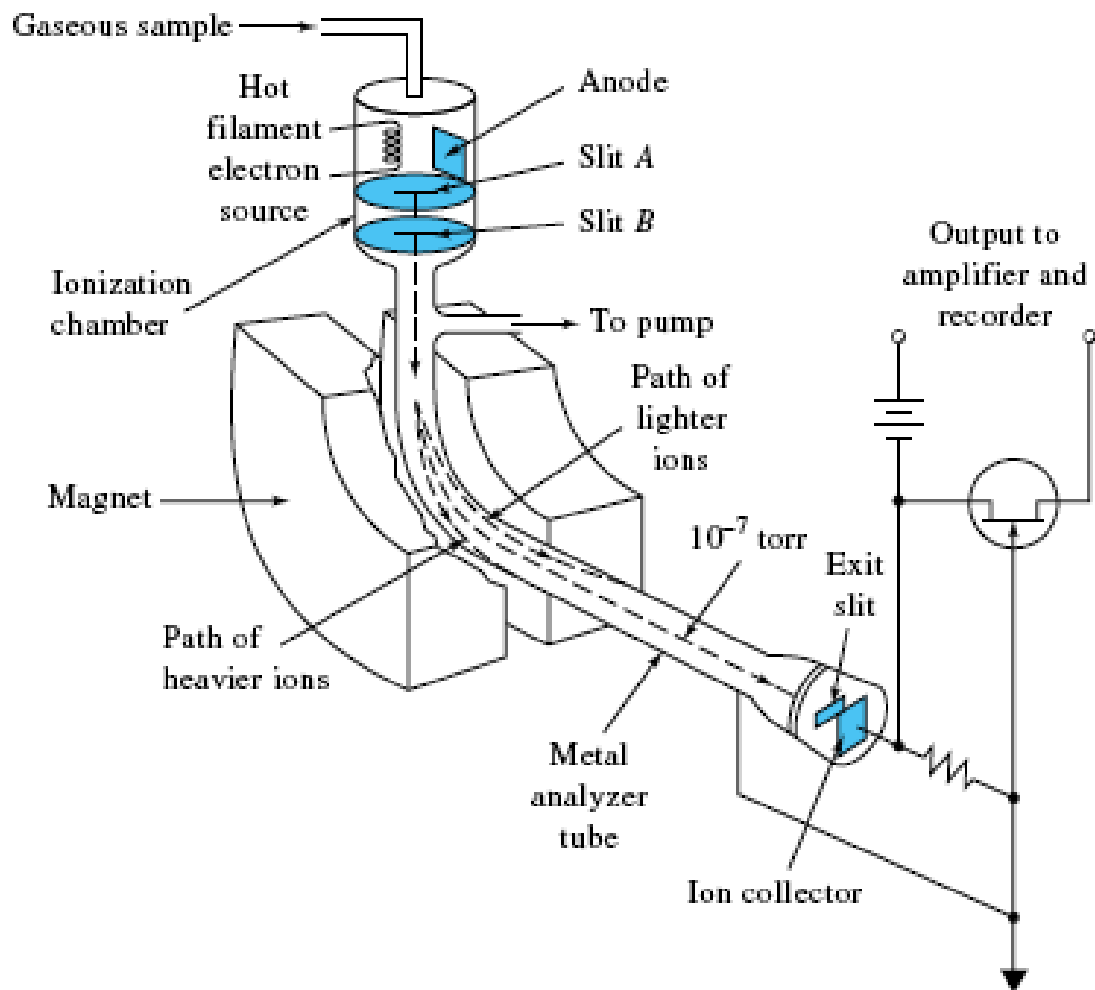
Instrumenti sa snopom



Trap instrumenti



Magnetni sektor



$$Bzev = \frac{mv^2}{r} \Rightarrow v = \frac{Bzer}{m}$$

$$E_k = zeV = \frac{1}{2}mv^2 = \frac{1}{2}m\left(\frac{Bzer}{m}\right)^2 \Rightarrow \frac{m}{z} = \frac{B^2 r^2 e}{2V}$$

Dvostruko fokusirajući analizator

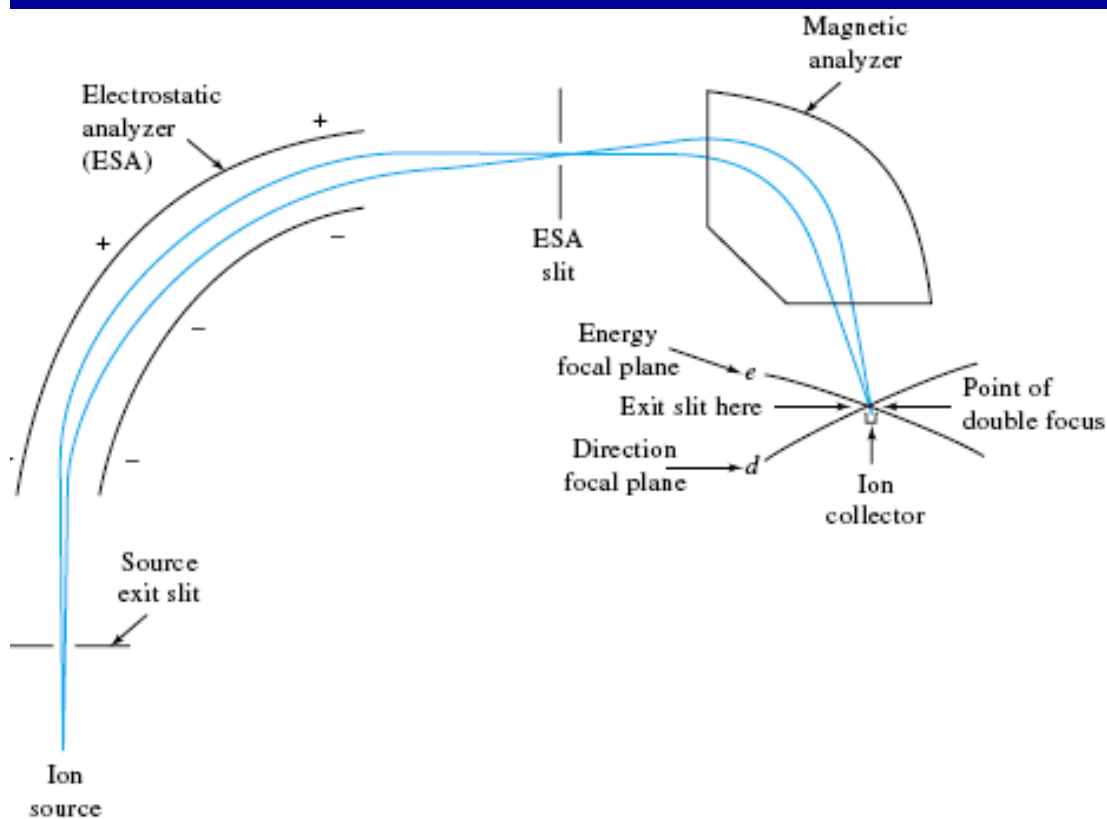
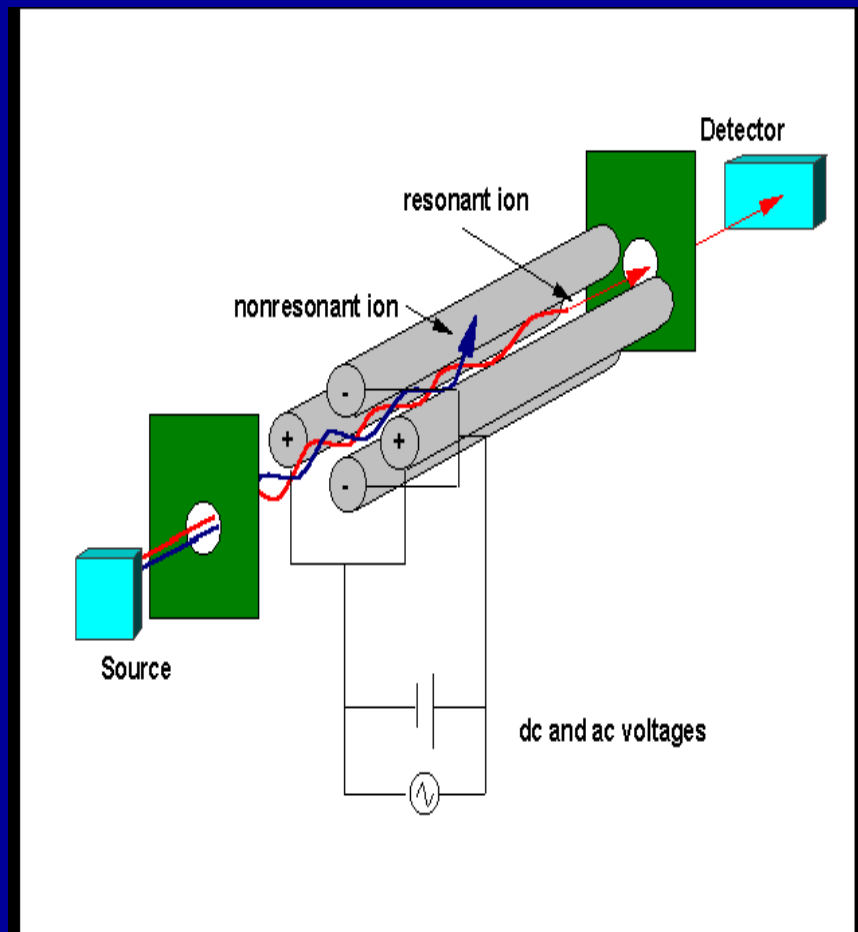


FIGURE 20-14 Nier-Johnson design of a double-focusing mass spectrometer.

- Visoka rezolucija (10^5)
- velika preciznost
- oblast masa 10000
- skup
- ne povezuje se sa ESI

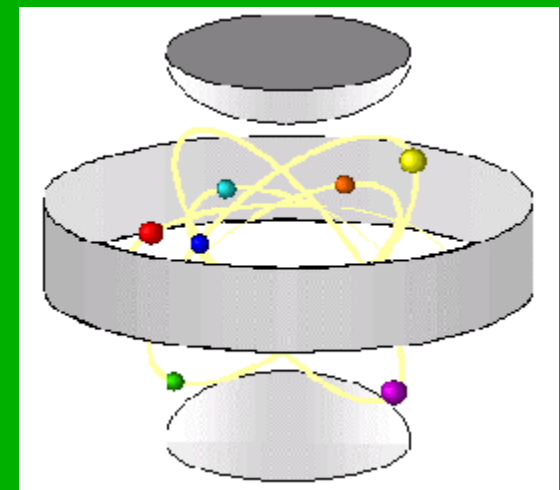
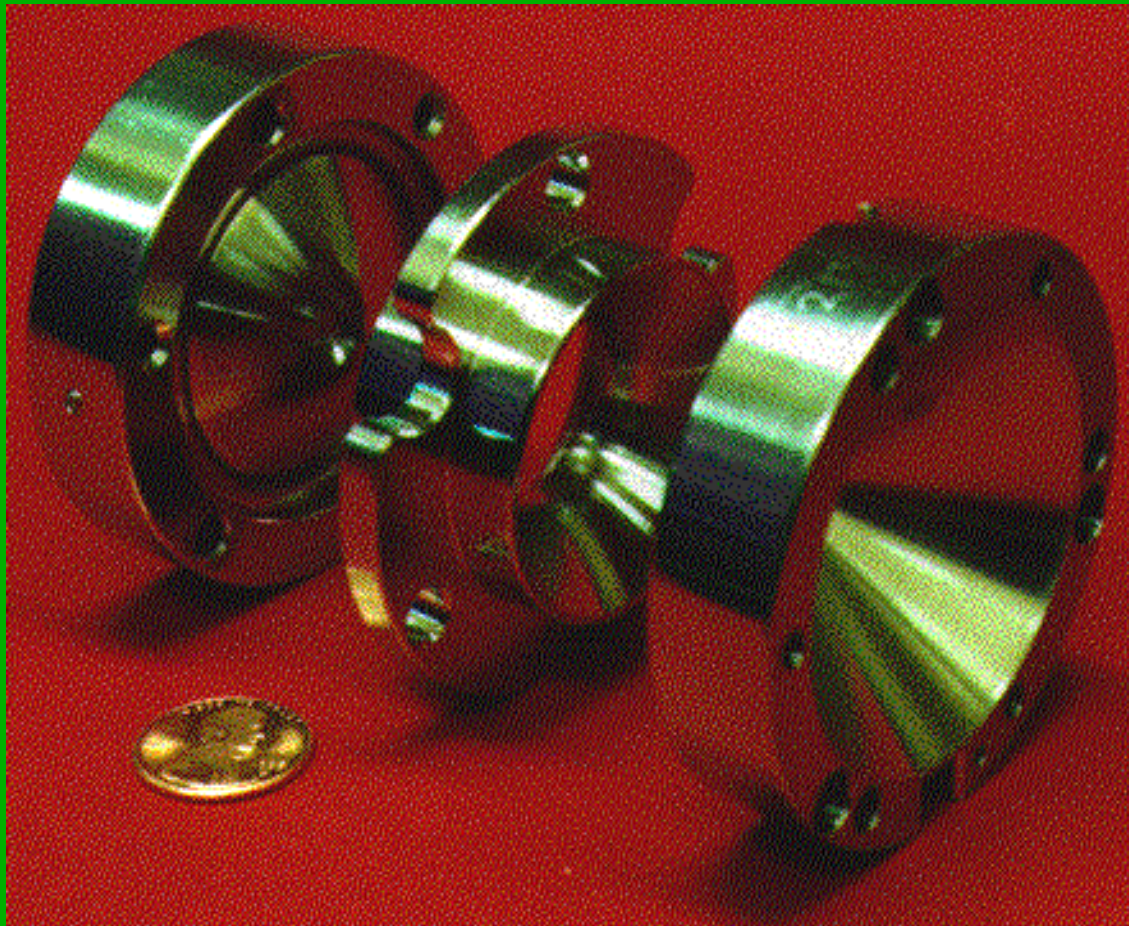
Kvadrupolni maseni analizator

- koristi se od 1950-tih
- danas najčešće korišćen
- naziva se i “maseni filter” jer propušta samo jone jednog odnosa m/z
- sastoji se od 4 paralelne metalne šipke ili elektrode
- set suprotnih elektroda ima potencijal $[U+V\cos(\omega t)]$
- drugi set ima potencijal $- [U+V\cos \omega t]$
- $U =$ DC napon (500-2000V), $V =$ AC napon (0 do 3000V), $\omega =$ ugaona brzina naizmjeničnog napona

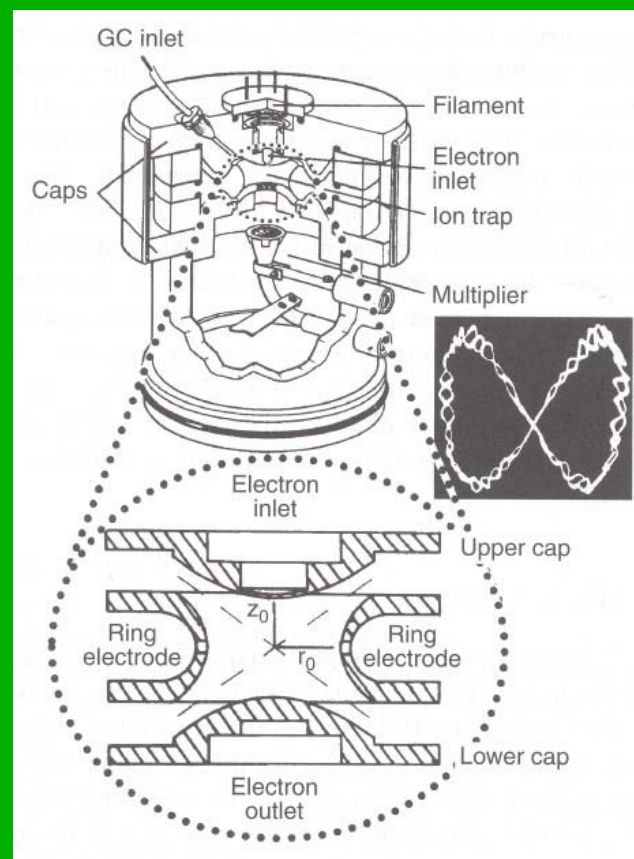
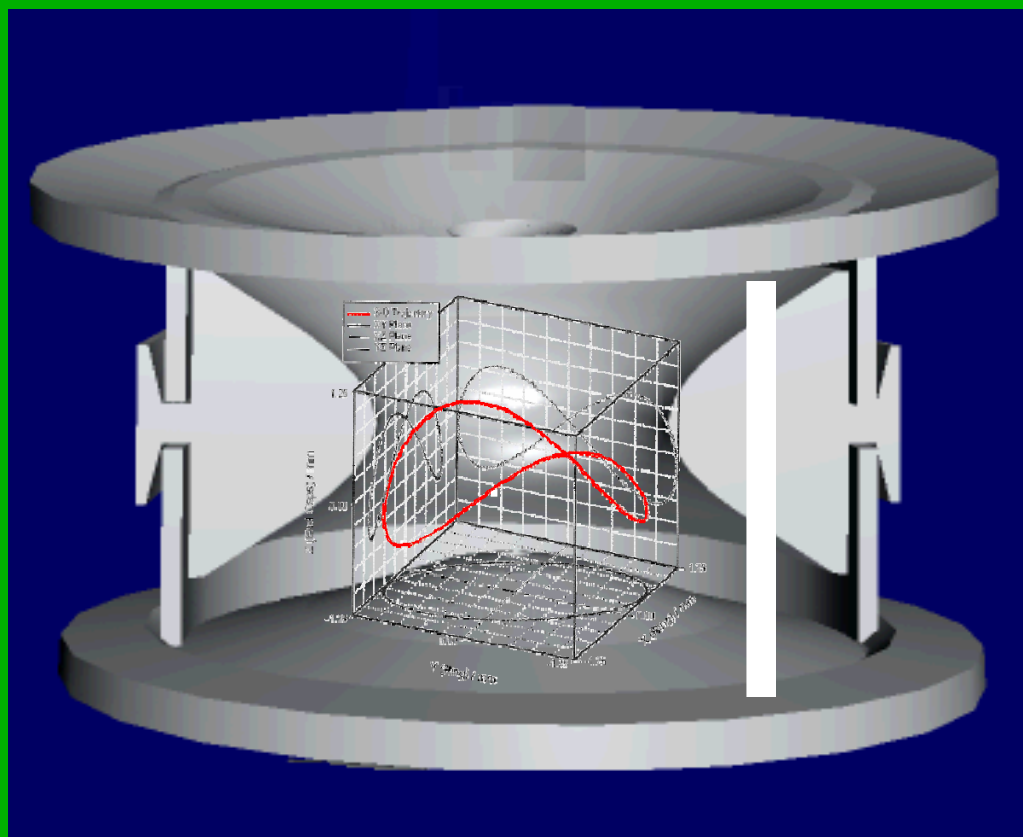


JONSKI TRAP-kvistor

- prstenasta elektroda
- dve kupaste elektrode-poklopci



Jonska putanja u trapu



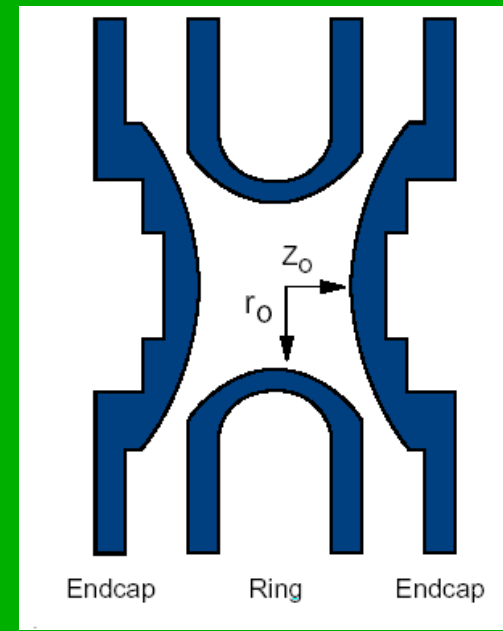
He se dodaje kao puferski gas (10^{-3} torr)

Teorija

Kretanje jona u kvadrupolnom polju može da se opiše Metjuovom jednačinom (Mathieu 1869).

$$a_z = \frac{-16zeU}{m(r_0 + 2z_0)\omega^2}$$

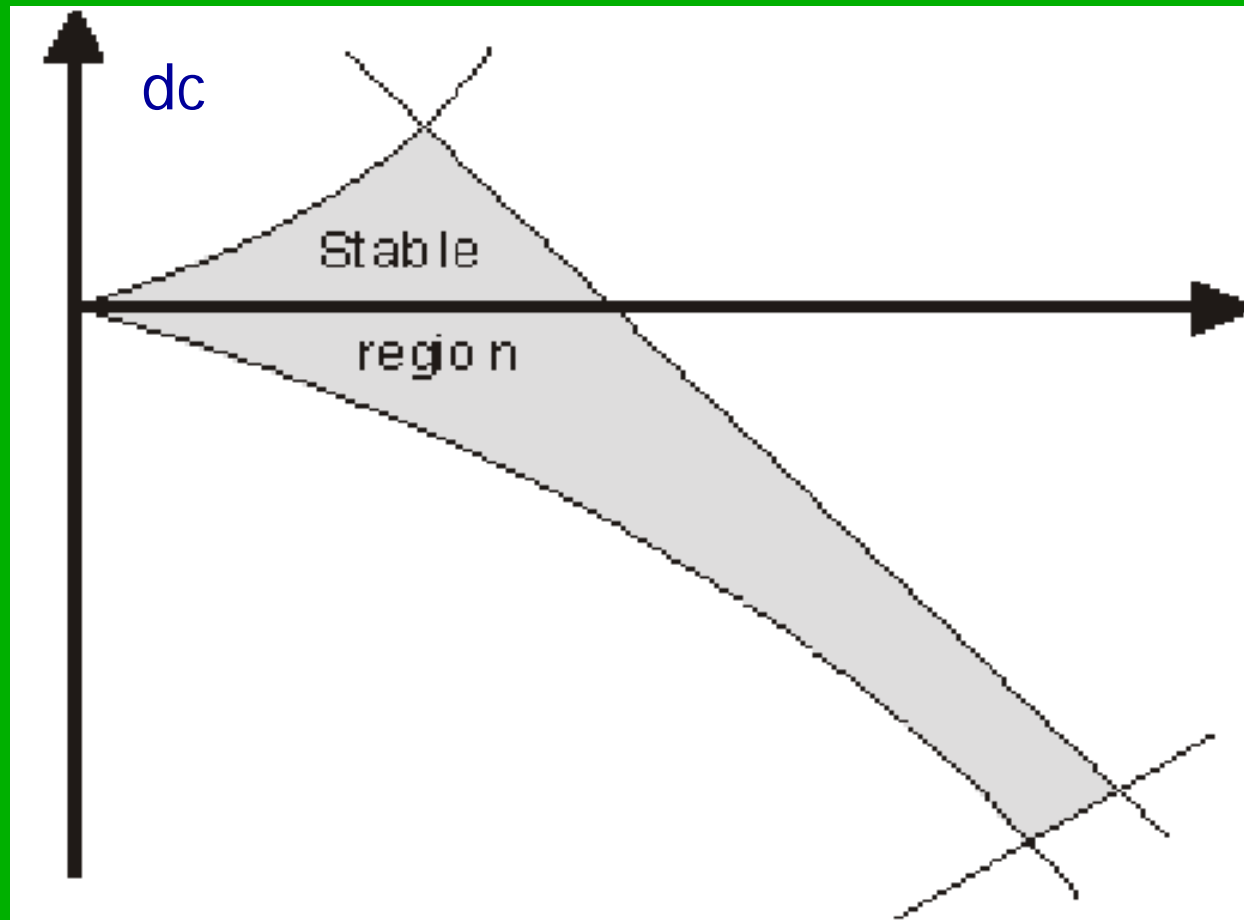
$$q_z = \frac{8zeV}{m(r_0^2 + 2z_0^2)\omega^2}$$

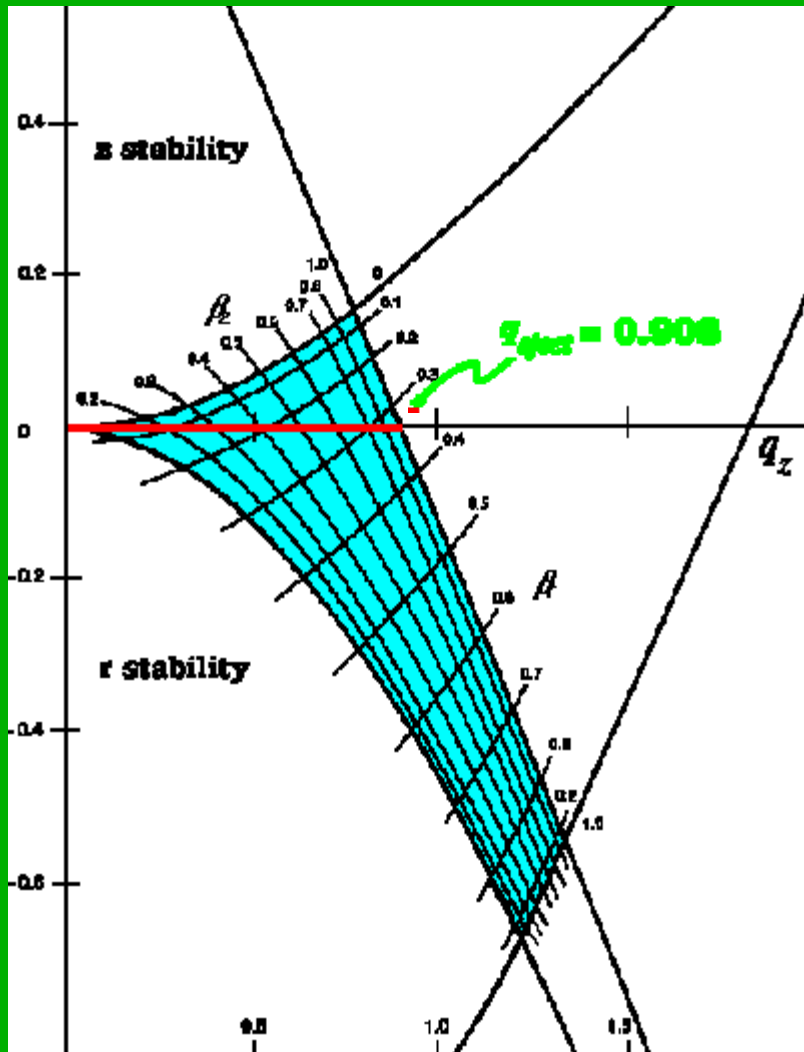


a_z i q_z – Metjuove koordinate
 U – primenjen dc potencijal
 V – primenjen rf potencijal
 ω – ugaona frkfenca rf
 r_0 i z_0 – dimenzije jonskog trapa

Dijagram stabilnosti jona

povezuje primenjen *dc* napon (U) i primenjen *rf* napon (V) i *rf* frekvencu (ω) sa stabilnim i nestabilnim putanjama jona





MSIS

“Mass Selective Instability Scan”

$$a_z = \frac{-16zeU}{m(r_0 + 2z_0)\omega^2} = 0$$

$$q_z = \frac{8zeV}{m(r_0^2 + 2z_0^2)\omega^2}$$

$$\frac{m}{z} = \frac{8eV}{(r_0^2 + 2z_0^2)\omega^2 q_z}$$

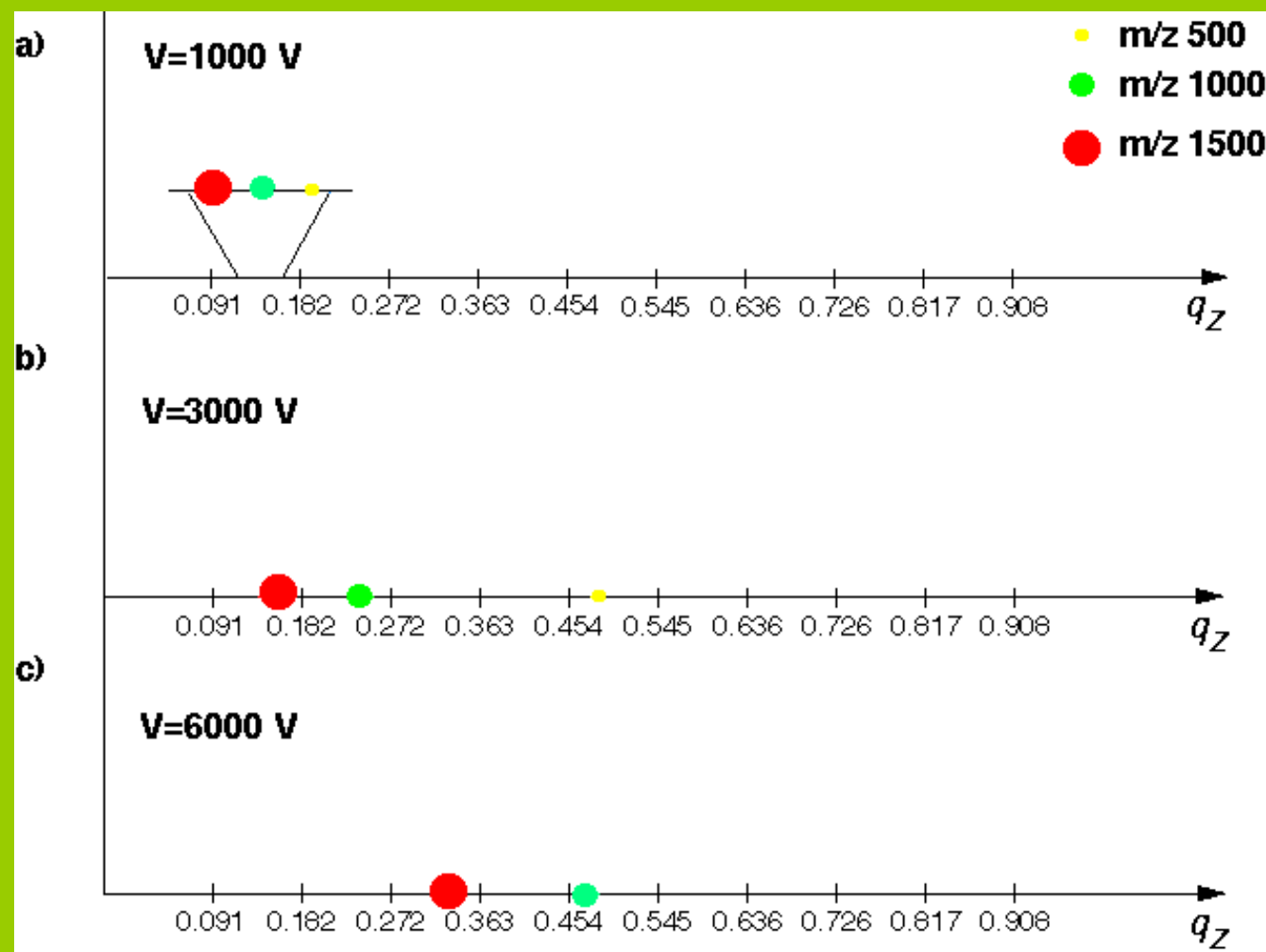
Povećanje opsega m/z

$$\frac{m}{z} = \frac{8eV}{(r_0^2 + 2z_0^2)\omega^2 q_z}$$

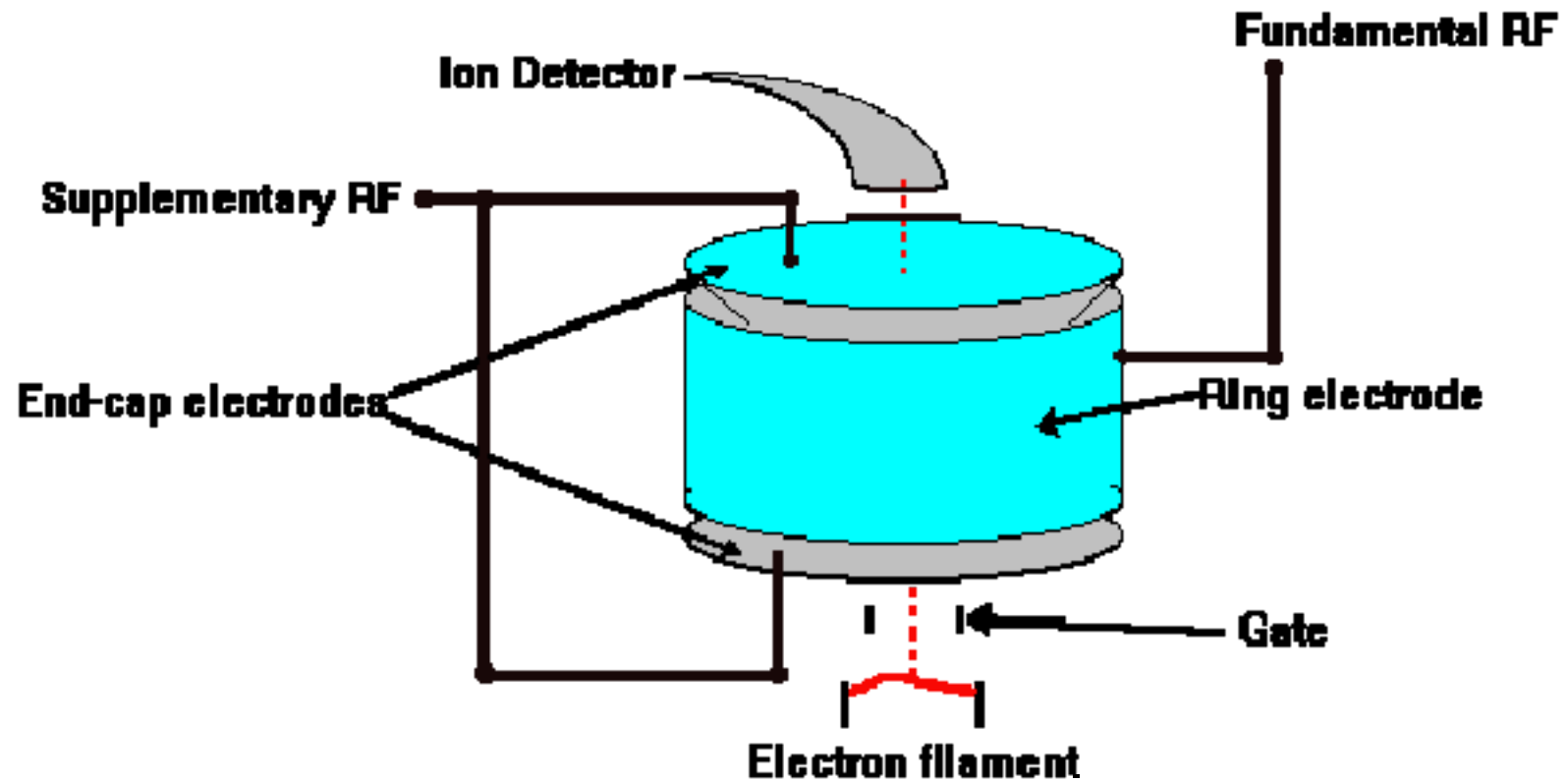
- Rad na višem **rf** naponu ($V_{\max}=15$ keV)
- Primena niže ω ($\omega=1.1$ MHz)
- Korišćenje manjih trapova ($r_0=1$ cm)
- Nestabilnost jona na nižim q_z ($q_z=0.908$)

Za $r_0=7$ mm, $\omega=600$ kHz, $V_{\max}=8000$ V $m/z=3269$ Th.

**Pozicija tri jona sa različitim m/z na $a_z = 0$.
Uticaj promene amplitude rf signala**

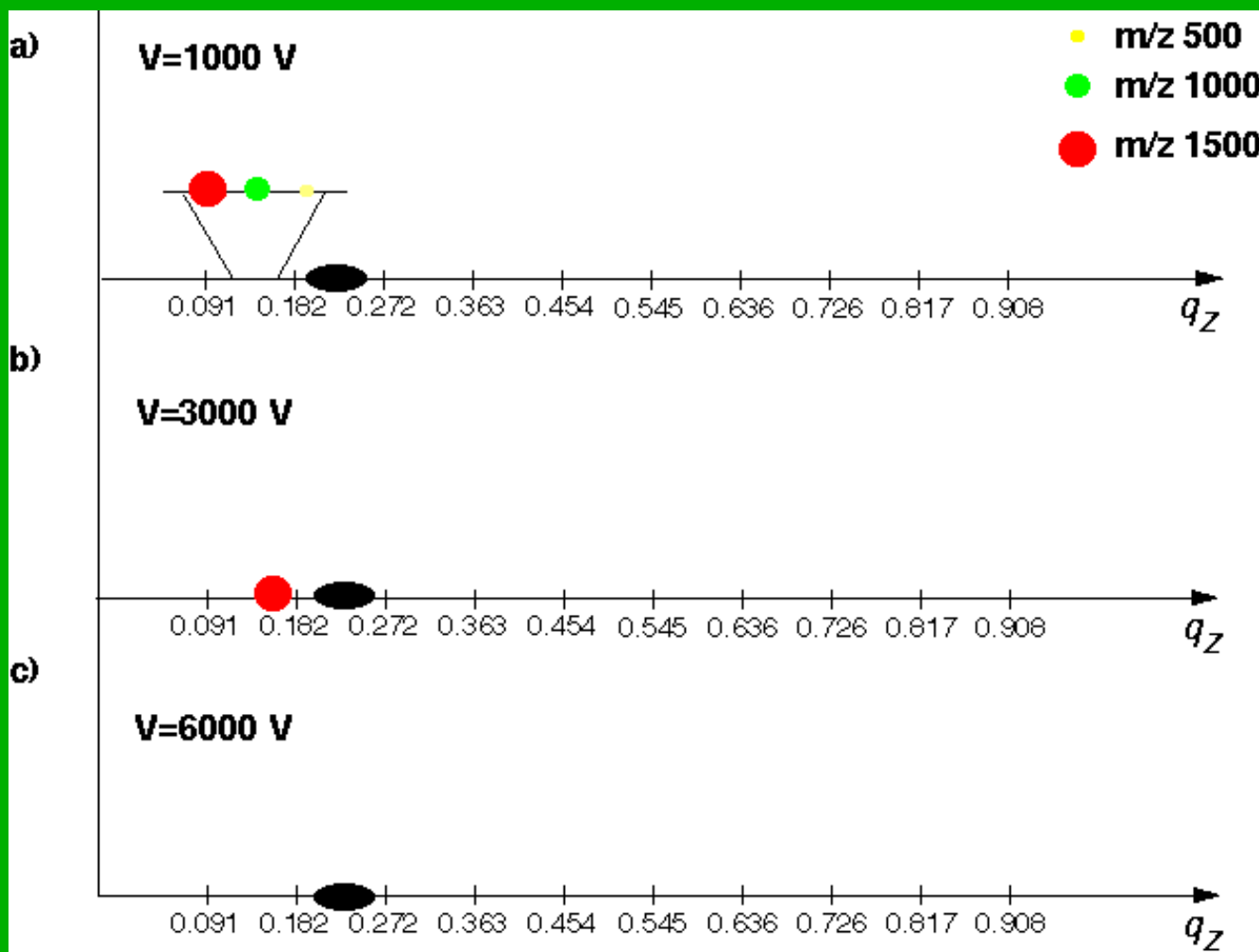


Jonski trap-kvistor



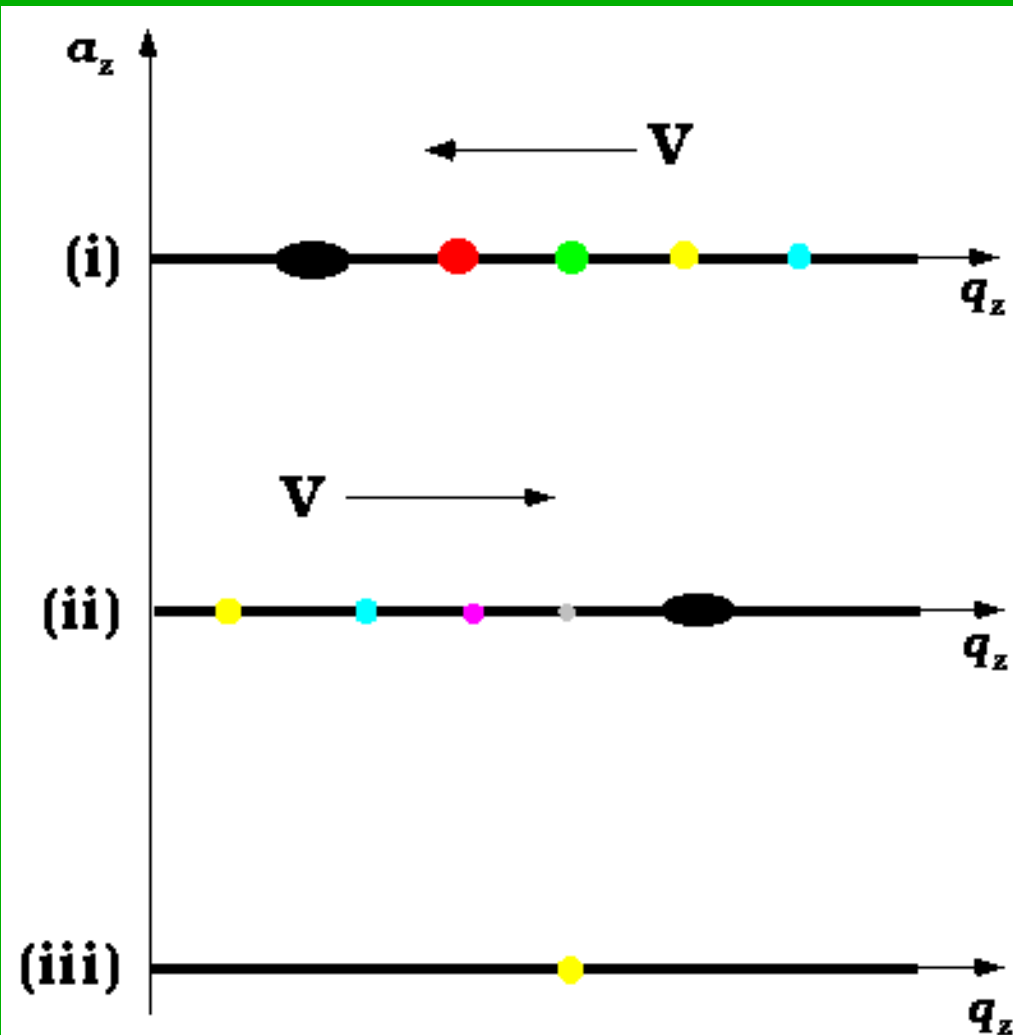
Rezonantno izbacivanje jona "Resonant ejection"

Formira se područje nestabilnosti jona ($q_z = 0.227$) što omogućava izbacivanje jona pri nižem naponu (opseg masa 4X veći)

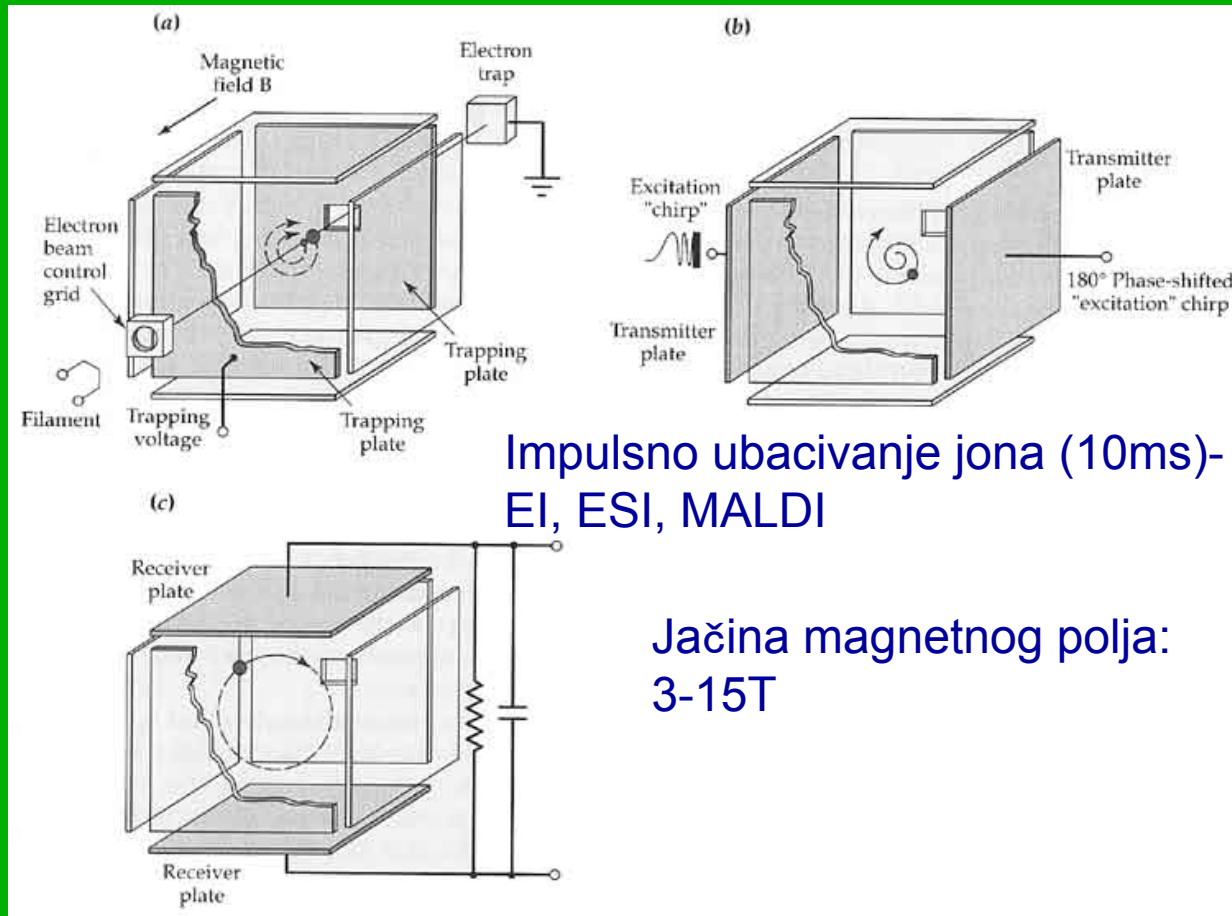


Čuvanje odabranih jona

- (i) Smanjenjem napona izbacuju se joni visoke m/z .
- (ii) Povećanjem napona izbacuju se joni niske mase m/z .
- (iii) Rezultat je izolacija jona određene mase m/z .



FT-jon rezonantna ciklotronska masena spektrometrija FT-ICR-MS



Impulsno ubacivanje jona (10ms)-
EI, ESI, MALDI

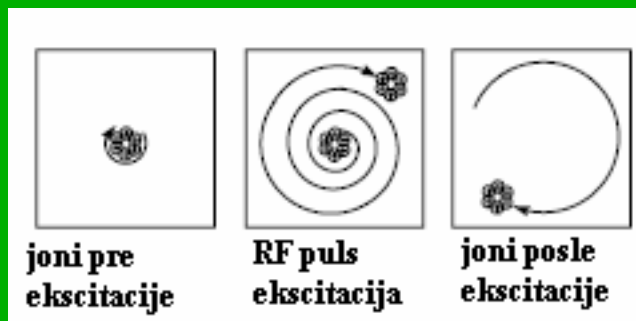
Jačina magnetnog polja:
3-15T

Dve bočne ploče služe za pobuđivanje, dve za zarobljavanje jona i treći par za prikupljanje i detekciju jona.

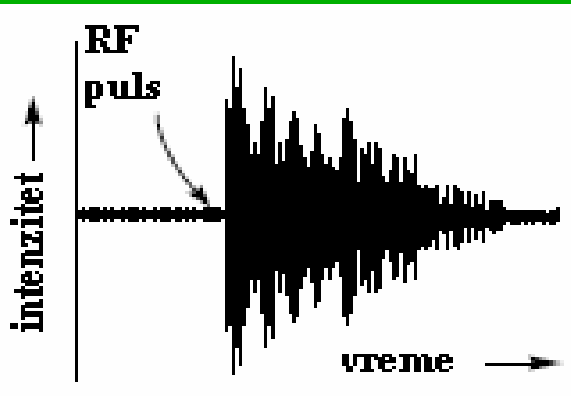
Bez spoljašnjeg električnog polja, joni male energije putuju malim kružnim putanjama (oko 0,1 mm dijametra) zbog sila magnetskog polja (3-15 T).

$$\omega = \frac{v}{r} = \frac{zB}{m}$$

Kada se primeni odgovarajući napon na elektrode za pobuđivanje (ploče sa strane), joni će se naći pod dejstvom oscilujućeg, prostorno usaglašenog (koherentnog) električnog polja.



10^{-5}Pa

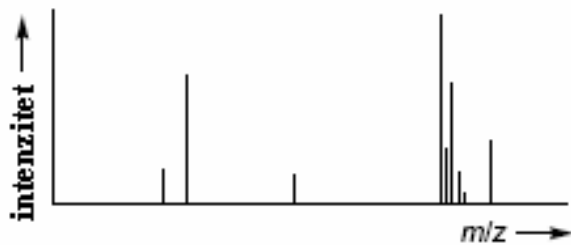


Umesto ekscitacije impulsom jedne frekvencije, primenjuje se brzo skanirajući impuls (1 do 2 ms) frekvencija, ekscitujući sve jone koji imaju ciklotronske frekvencije u oblasti skanirajućih frekvencija na istoj putanji.



Furijeova transformacija

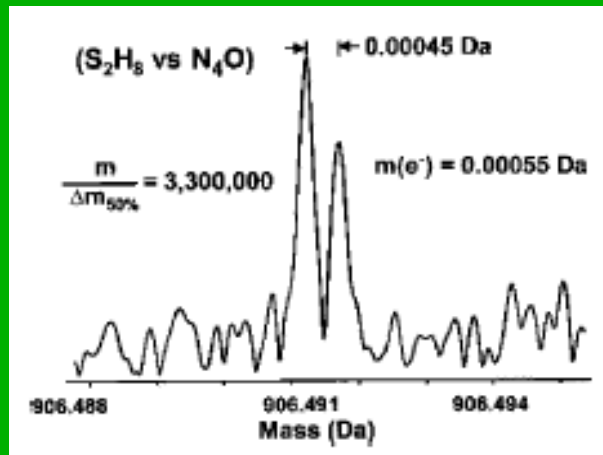
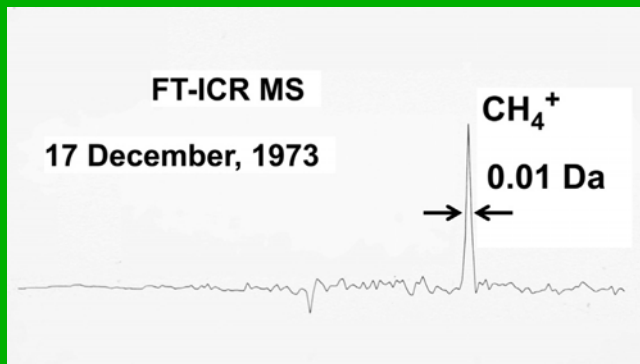
$$r = \frac{V_o T_{exc}}{B_o}$$



Ukupni signal koji izlazi iz ćelije je superpozicija ciklotronskih frekvencija svih jona.

Primenom Furijeove transformacije na složeni signal se dobijaju frekvencije koje odgovaraju ukupnom signalu, a odatle i maseni spektar.

FT-ICR-MS-ogromna rezolucija



Razdvajanje peptida
nom.
mase 906, razlika od
0,00045 Da

Anal. Chem. 73(2001)647

Prednost

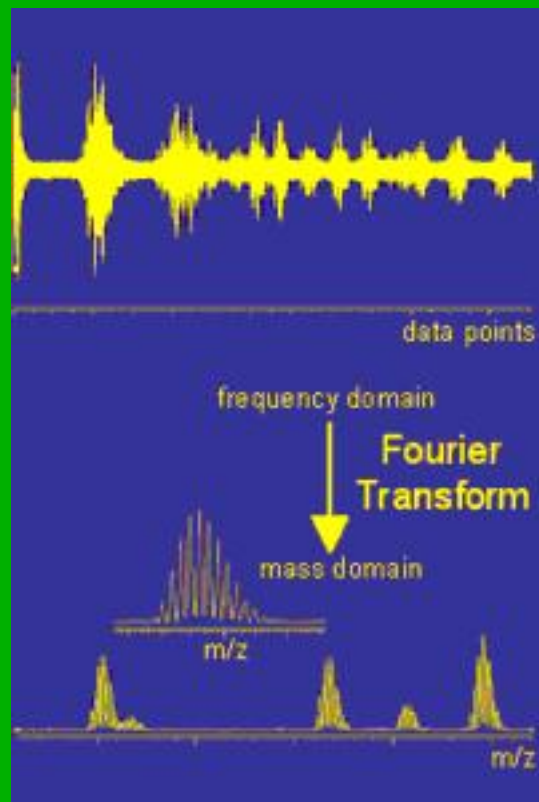
- Ekstremno visoka rezolucija
- Veoma dobra osetljivost (<1 ppm)
- MS/MS

Nedostaci

- Skupa
- Potrebni superprovodni magneti
- Spora MS/MS

International Journal of Mass Spectrometry 377 (2015) 410–420
(40 godina FTICR-MS)

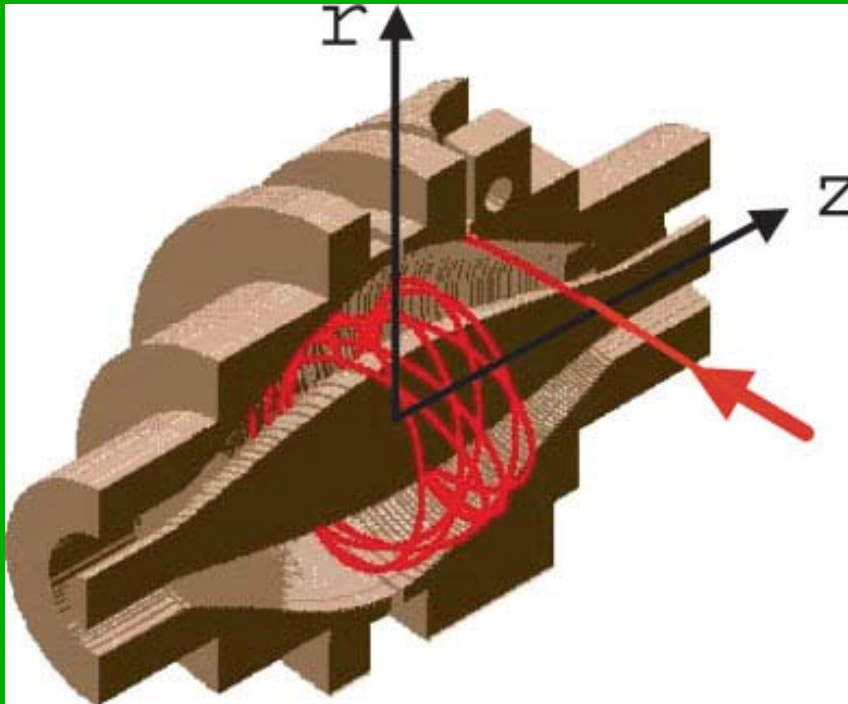
FT-jon ciklotron analizator



Orbitrap maseni analizator

Kingdon 1923

Makarov 1999



Aksijalno simetrične elektrode orbitrapa formiraju kombinovani kvadro-logaritamski elektrostatički potencijal:

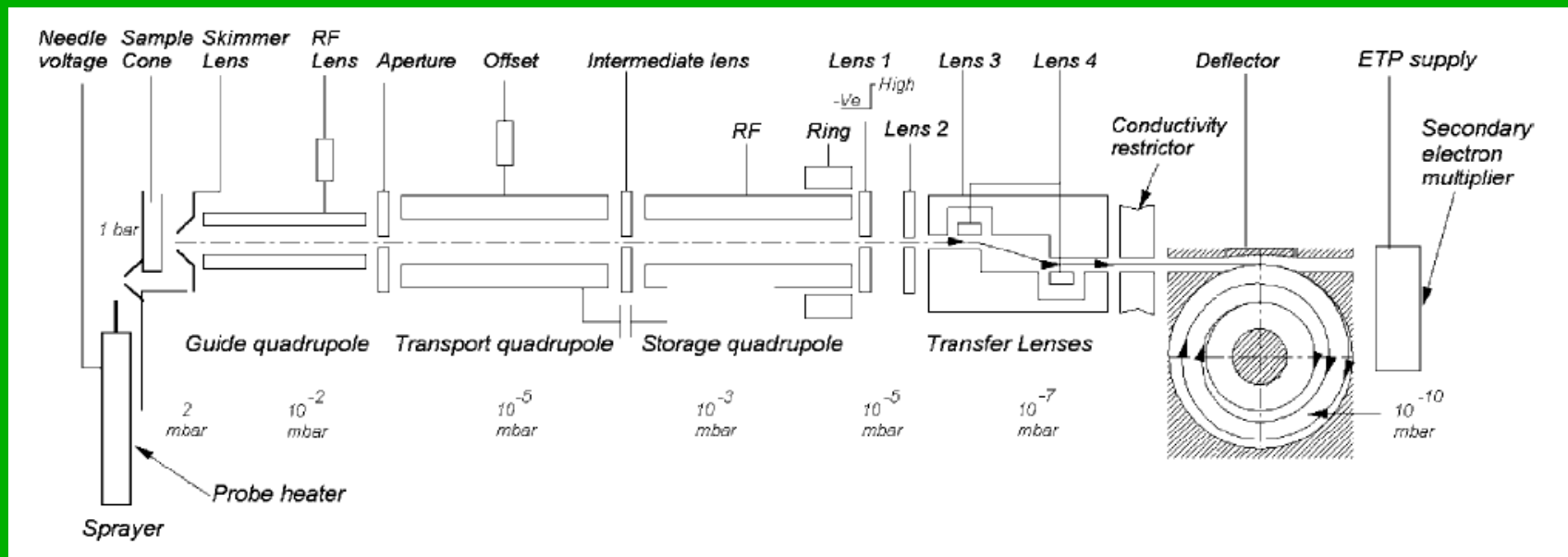
$$U(r, z) = \frac{k}{2} \left\{ z^2 - \frac{r^2}{2} + R_m^2 \ln \left(\frac{r}{R_m} \right) \right\} + C$$

Stabilne trajektorije jona uključuju i orbitalno kretanje *oko* centralne elektrode (r , φ -kretanje) i *simultane* oscilacije u z -pravcu.

Kretanje jona duž z -ose može da se opiše harmonijskim oscilacijama i potpuno je nezavisno od r i φ . Odnos m/z zavisi samo od frekvencije oscilacija jona duž z ose.

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

Primenom Furijeove transformacije iz individualnih frekvencija jona se dobijaju njihovi m/z odnosi.



- Masena rezolucija 150 000
- Visoka masena tačnost (2-5ppm)
- Povećan kapacitet jona većih masa
- Odnos m/z bar 6000
- Dinamička oblast veća od 10^3
- Relativno mala cena

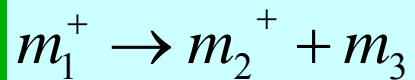
Detektori jona u MS

- Faradejev kavez
- Elektronski multiplikatori
- Mikrokanalske ploče
- Scintilacioni brojači
- Visoko pojačanje
- Brz odgovor
- Nizak šum
- Visoka efikasnost prikupljanja
- Niska cena
- Mala širina signala (odgovora)
- Isti odgovori za sve mase
- Velika dinamička oblast
- Duga stabilnost i vek trajanja
- Mogućnost smeštanja van vakuuma

Tandem Masena Spektrometrija (MS/MS ili MSⁿ)

- Meke jonizacione metode kao npr. ESI ili HI daju samo roditeljske jone iz kojih se ne mogu dobiti strukturne informacije
- Tvrdе metode daju mnoge fragmente ali obično nema roditeljskog jona
- Potrebno je izolovati i roditeljski jon i fragmente

Metastabilni joni

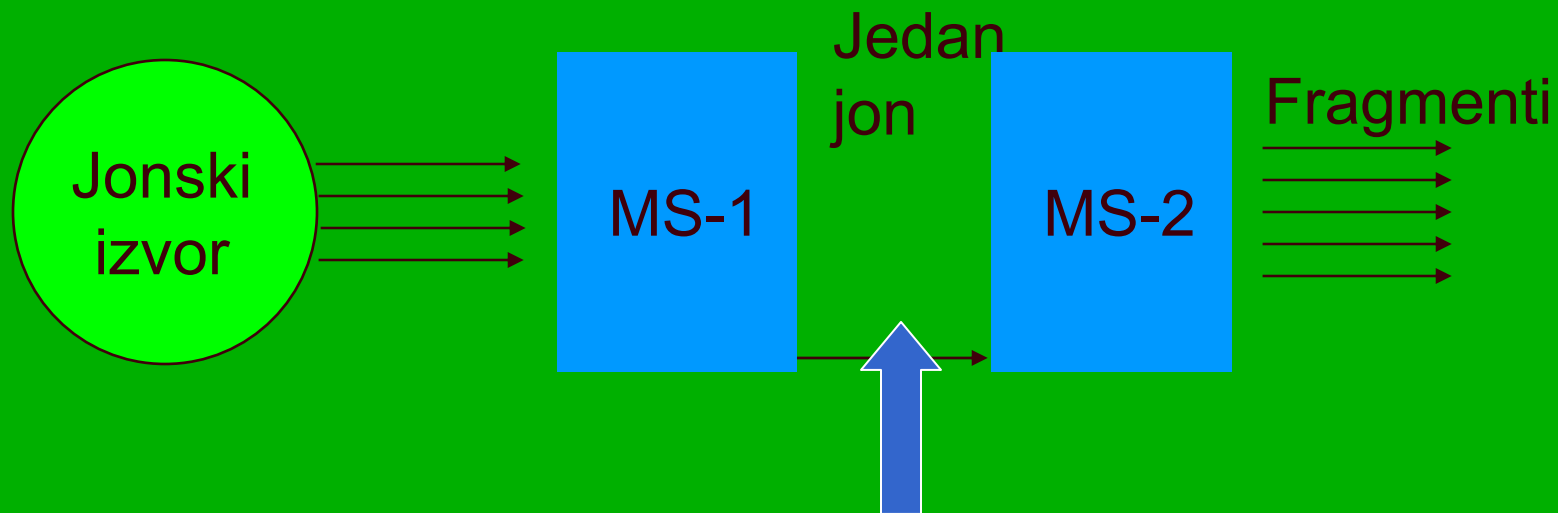


metastabilna fragmentacija: $m^* = \frac{m_2^2}{m_1}$

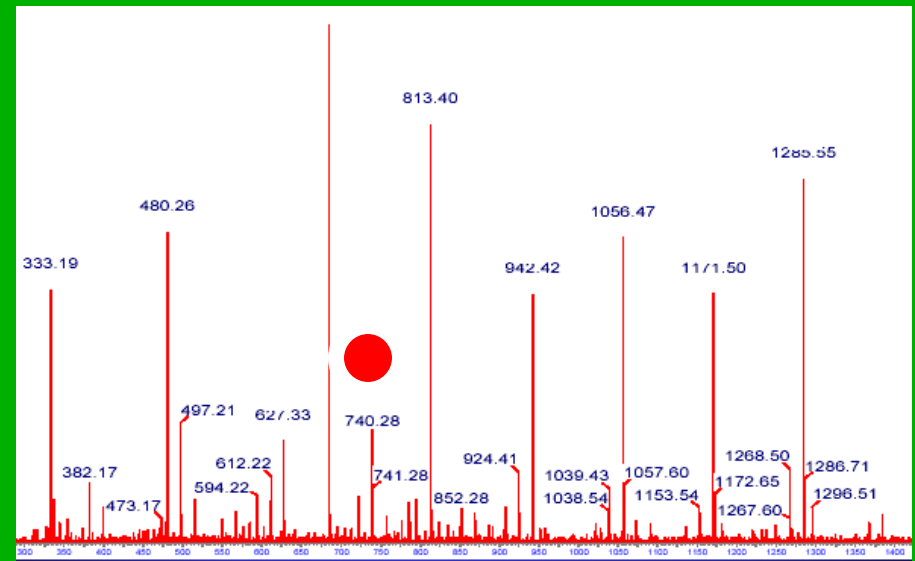
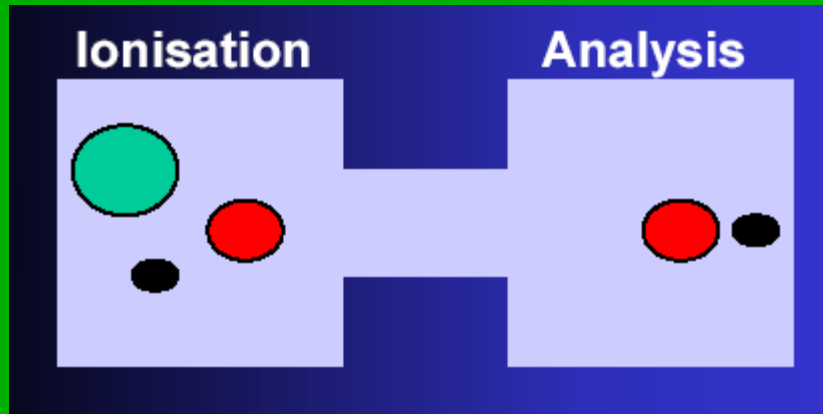
Šta je MS/MS-tandem maseni spektrometar?

MS/MS znači korišćenje dva masena analizatora (kombinovana u jednom instrumentu) da bi se izdvojio jedan analit (jon) iz smeše, onda se stvaraju fragmenti odakle se dobijaju informacije o strukturi.

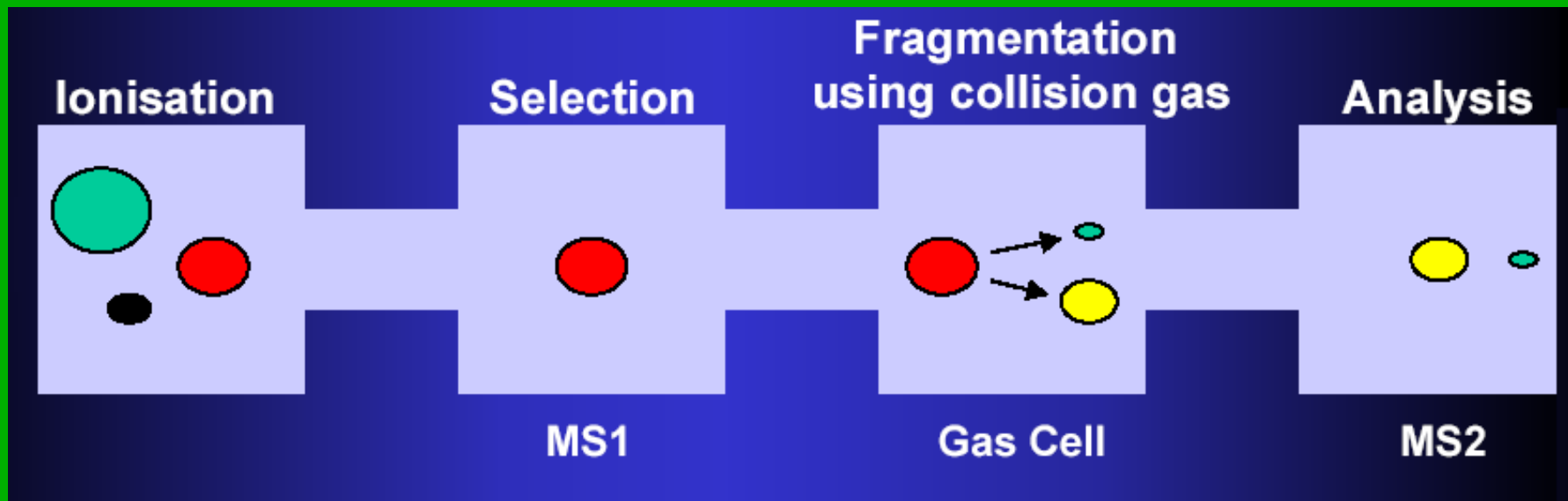
Smeša jona



MS

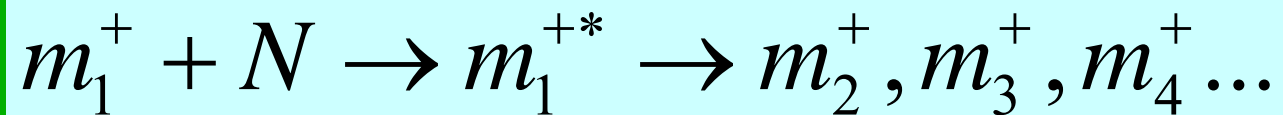
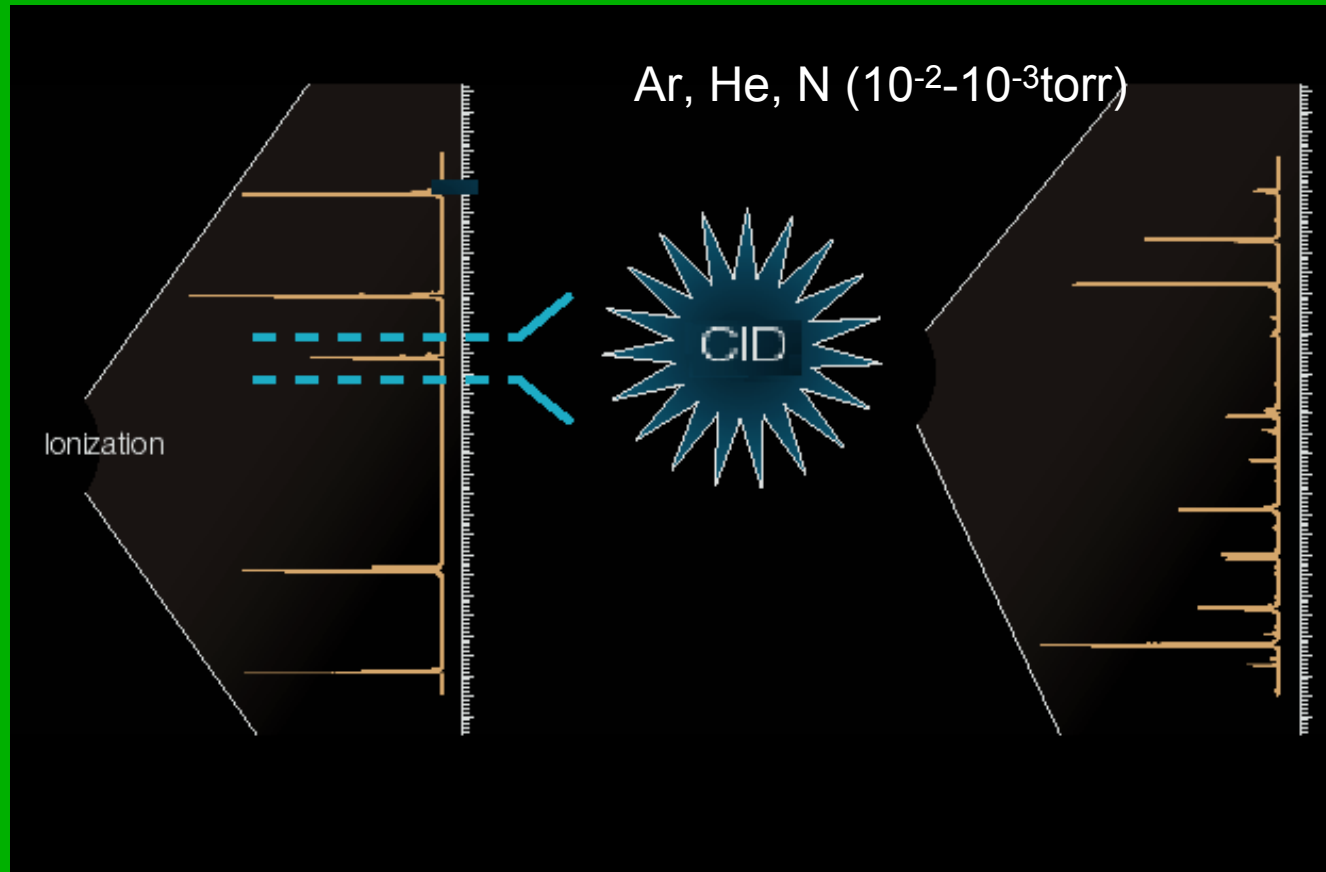


MS/MS



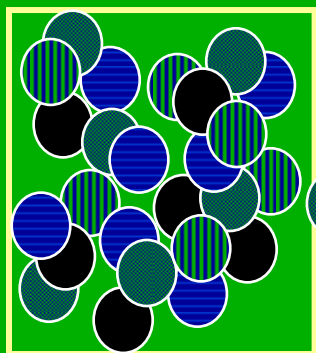
MS/MS-CID

(*Collision Induced Dissociation*)

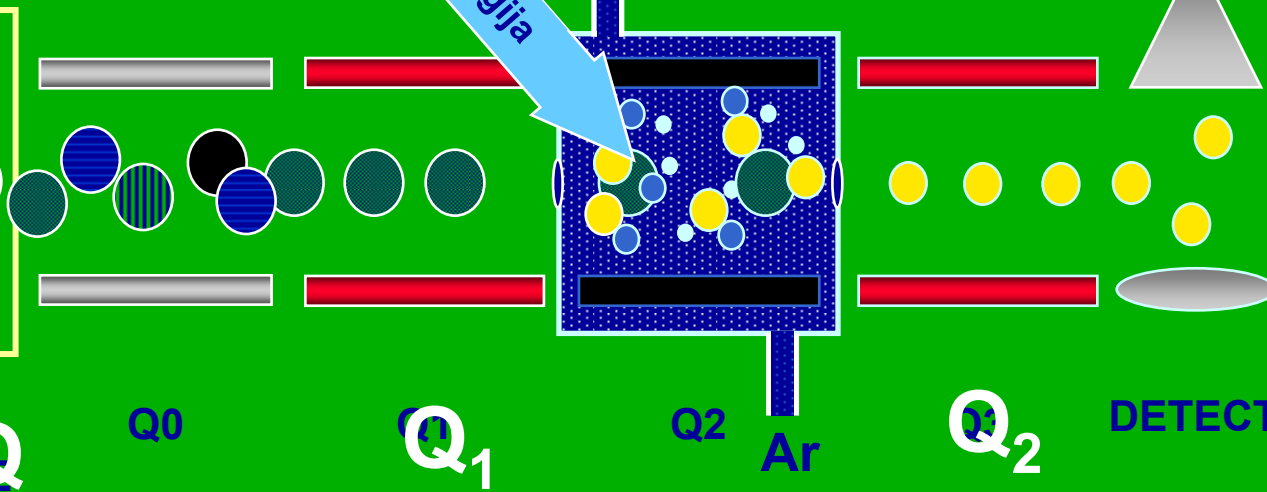


KVADRUPOLNI MS/MS (u prostoru):

QQ, BE

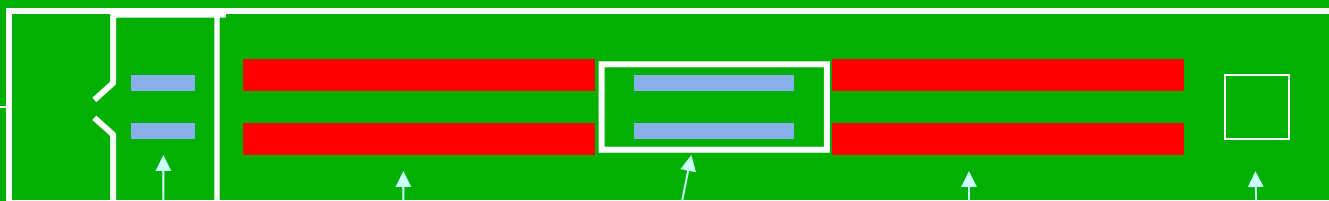


QQQ



DETEKTOR

Ulaz uzorka



Jonsko sočivo

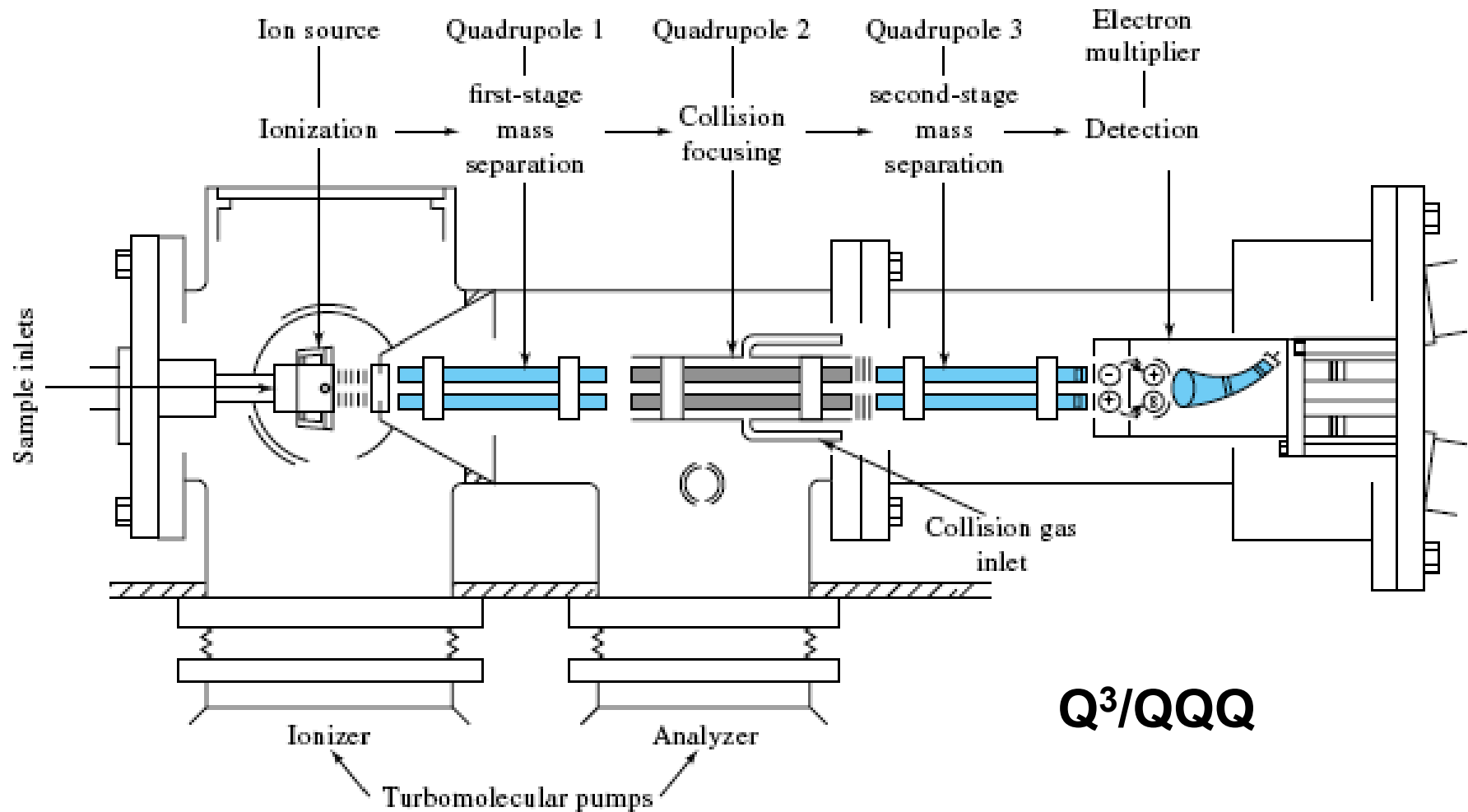
Q2
(Koliziona ćelija)

EM
Detektor

Q1

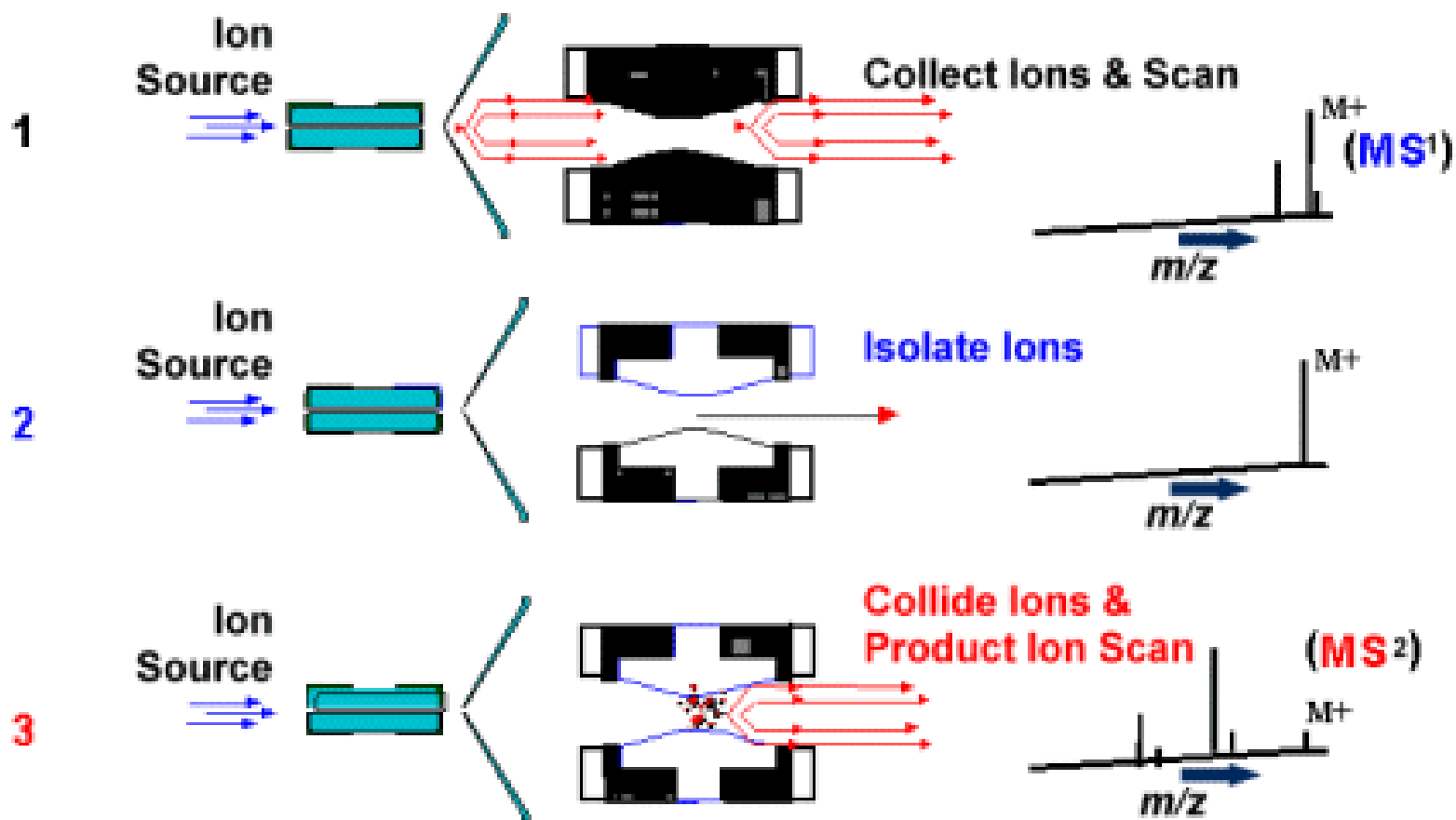
Q3

Tandem MS/MS u prostoru najčešće koriste magnetne (B), elektrostatičke (E) ili kvadrupolne (Q) analizatore



Tandem MS/MS u vremenu

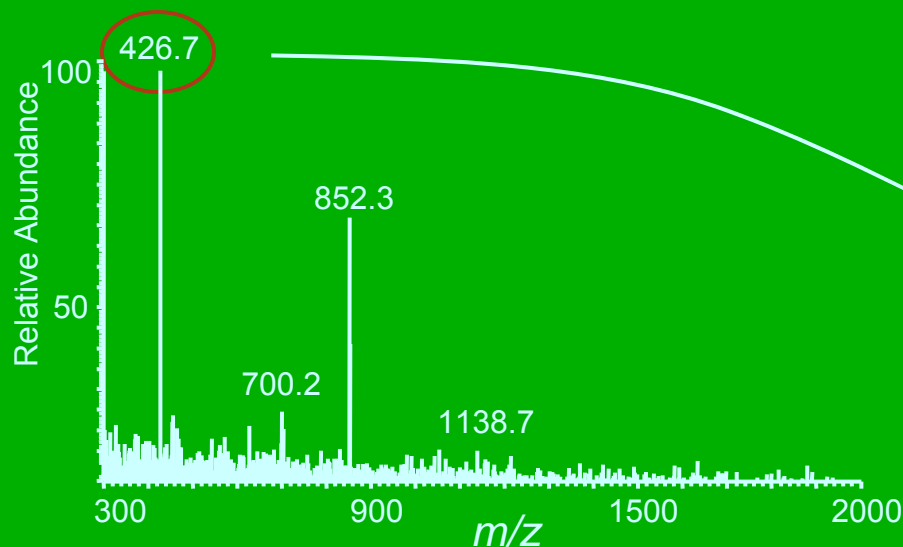
Ion Trap MS



do MS^{10}

Tandem Masena spektrometrija sa jonskim trapom

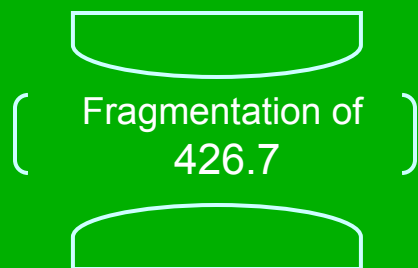
1) Meri se čitav spektar



2) Izoluje se roditeljski jon:
tj., prekursor m/z 426.7 ± 1.5

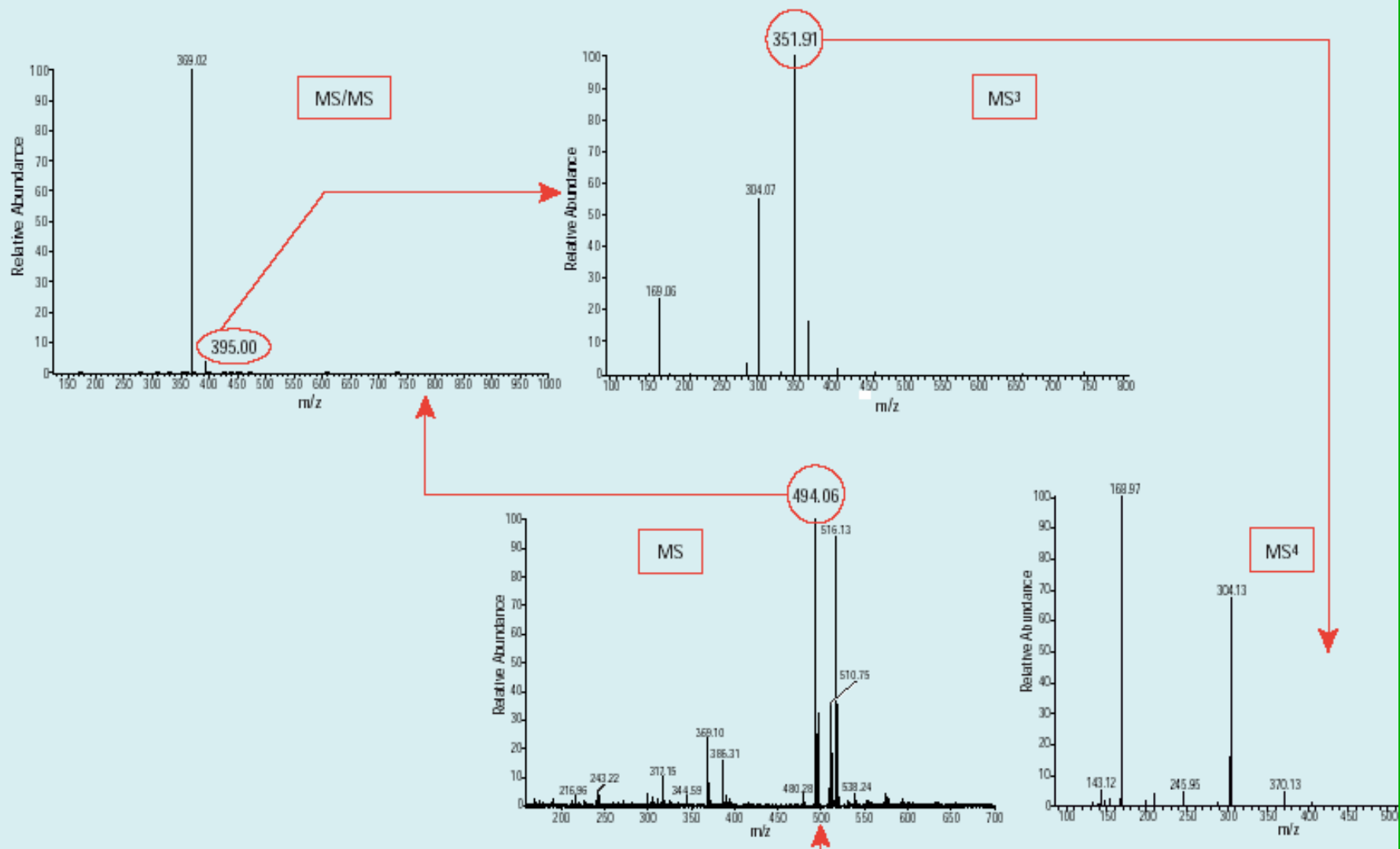


3) Dodaje mu se energija u sudarima



4) Meri se m/z of fragmentnih jona
[za peptide SLNVALR]

SLNVAL	R
SLNVA	LR
SLNV	ALR
SLN	VALR
SL	NVALR
S	LNVALR



Načini aktivacije jona

- **Disocijacija izazvana sudarima (CID/CAD)**
- Disocijacija izazvana sudarima sa površinom (SID)
- Disocijacija izazvana zahvatom elektrona (ECD, $<0,2\text{eV}$)
- Infracrvena multifotonska disocijacija (IRMPD)
- Disocijacija izazvana IR zračenjem crnog tela (BIRD)
- Disocijacija prenosom elektrona (ETD)

MS 1

COLLISION CELL

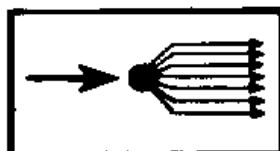
MS 2

PRODUCT ION SCAN

1



SELECTED
 m/z



CID



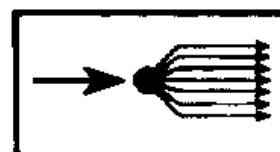
SCANNED

PRECURSOR ION SCAN

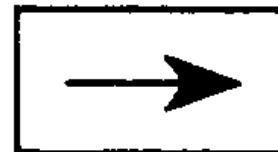
2



SCANNED



CID



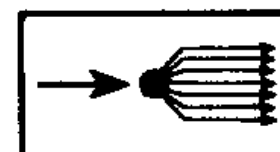
SELECTED
 m/z

NEUTRAL LOSS SCAN

3



SCANNED
 $m/z = x$



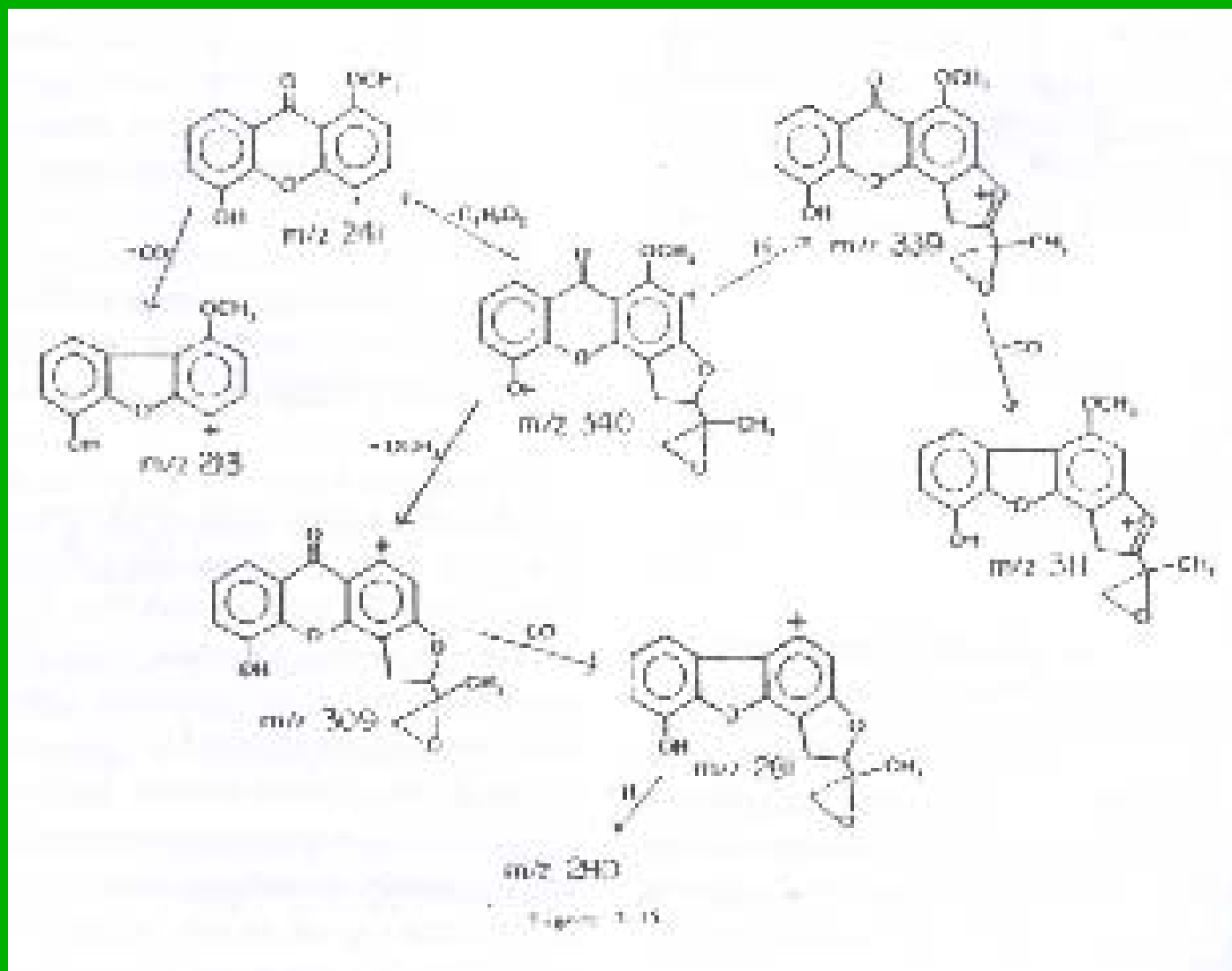
CID



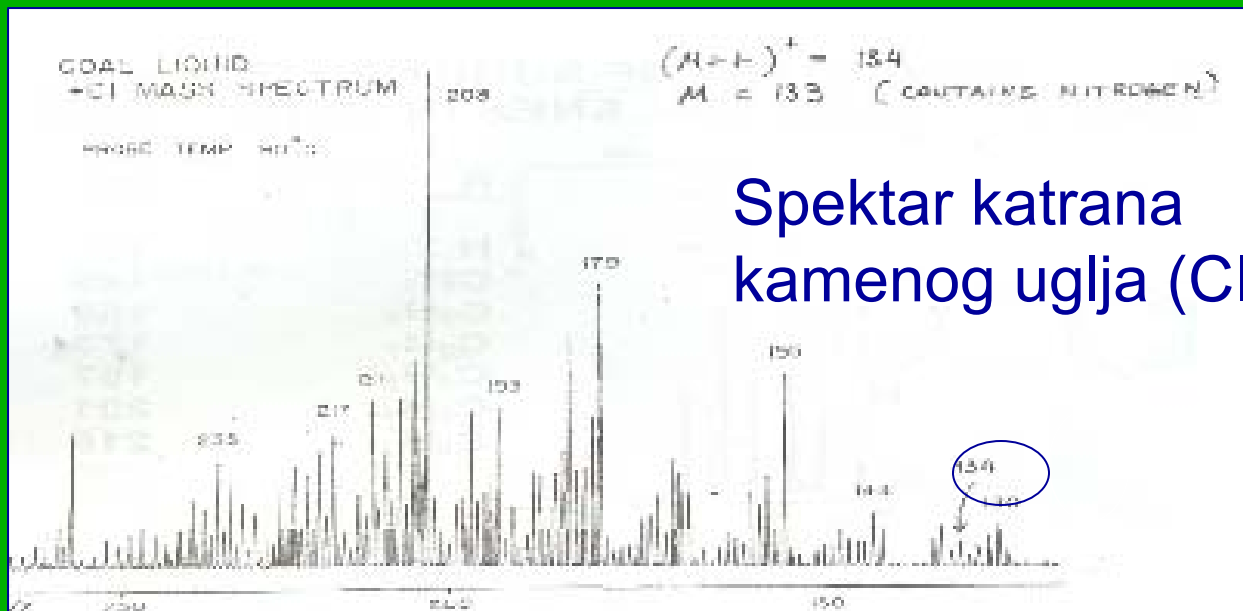
SCANNED
 $m/z = x - a$

Načini rada
u tandem MS
uključuje
fiksiranje ili
skeniranje
jednog ili
oba analizatora

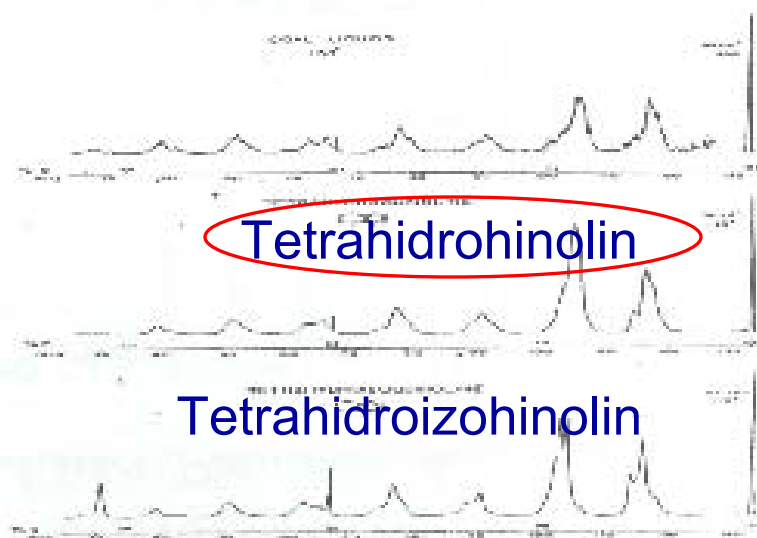
1. Product ion scan-analiza fragmenata odabranog jona



Shema fragmentacije jona psorospermina, m/z 340 je razjašnjena na osnovu spektra fragmentnih jona



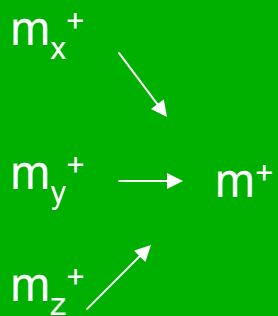
Слика 5. Парцијални масени спектар катрана каменог угља



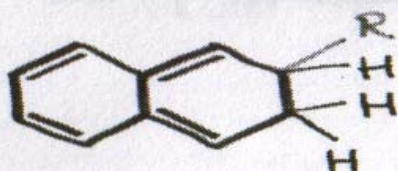
Analiza složenih smeša

Uzorak se jonizuje nekom od mekih metoda i podešavanjem napona na M1 odabira željena komponenta koja se dalje fragmentira i analizira u M2. Identifikacija poređenjem sa spektrima iz biblioteke

2. Spektar matičnih (prekursorskih) jona se dobija fiksiranjem mase jona m^+ koju propušta M2, a skenira se analizator M1 tako da spektar prikazuje matične jone koji frahmentacijom daju zajednički jon m^+ . Donijeni spektar je spektar matičnih jona.



DETECTION OF SUBSTITUTED DIHYDRONAPHTHALENES IN COAL LIQUID

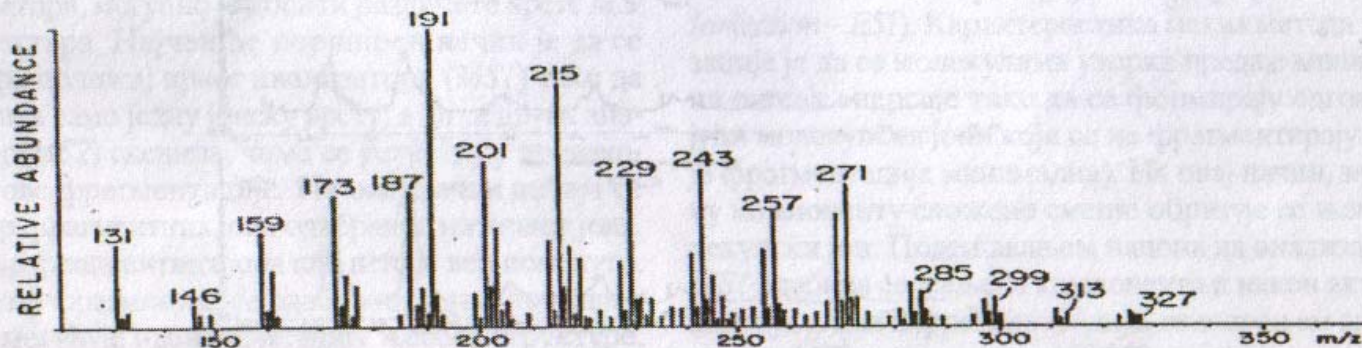


Protonisani dihidronaftalin, $C_{10}H_{10}^+$

<u>R</u>	<u>m/z</u>
H	131
CH ₃	145
C ₂ H ₅	159
C ₃ H ₇	173
C ₄ H ₉	187
C ₅ H ₁₁	201
C ₆ H ₁₃	215
C ₇ H ₁₅	229
C ₈ H ₁₇	243

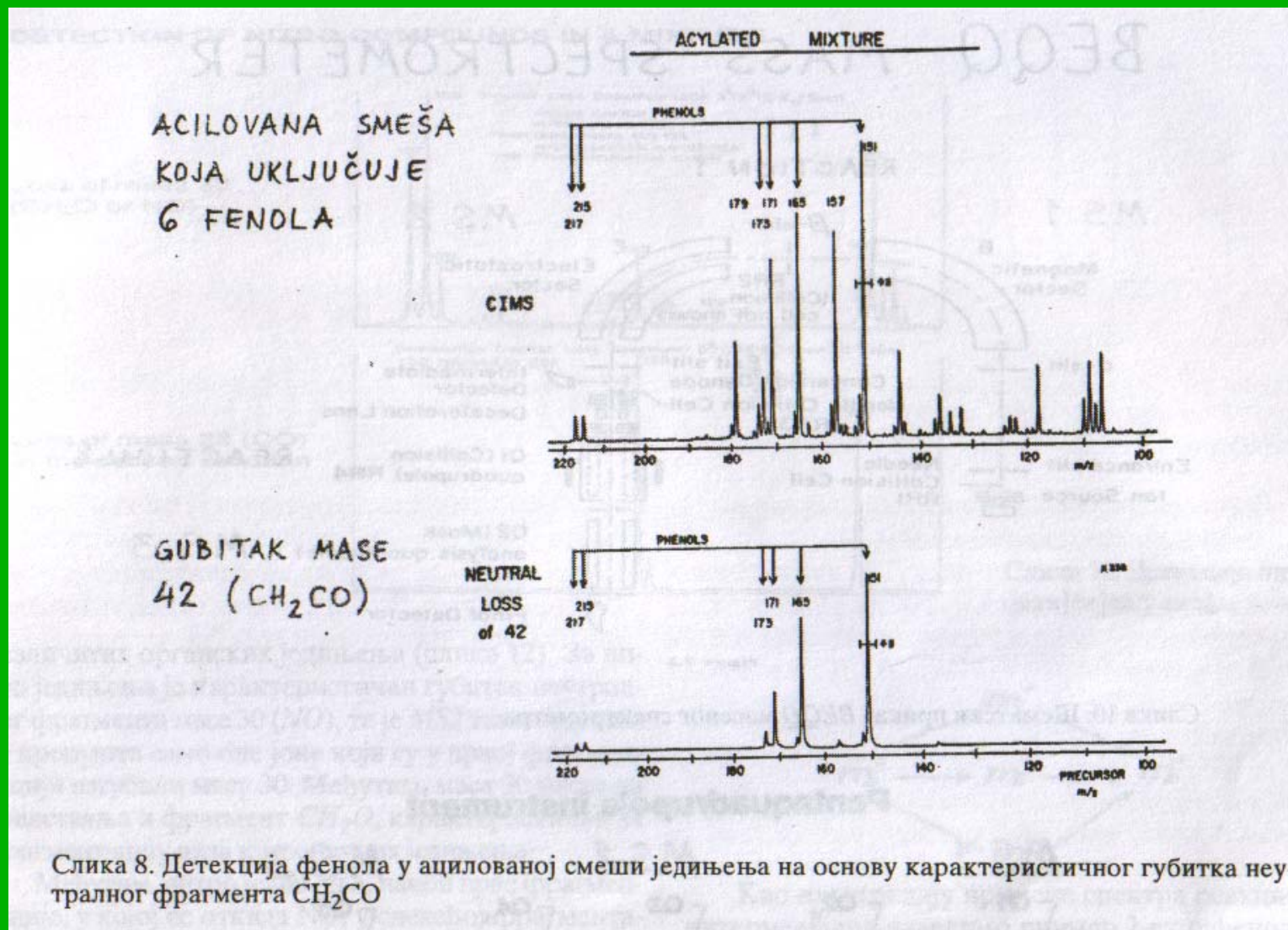
C ₁₄ H ₂₉	327

PARENT SPECTRUM OF M/Z 131 COAL SAMPLE



Слика 7. Spektar matičnih jona dihidronaftalina (m/z 131) у узорку катрана каменог угља

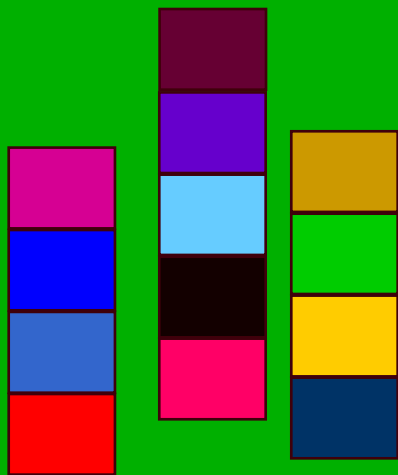
3. Skeniranjem oba analizatora ali tako da prvi propušta masu m_x^+ a drugi masu m_y^+ pri čemu je razlika između njih konstantna, može se izvršiti skrining na O, N ili sumpor u komponentama smeše.



Слика 8. Детекција фенола у ацилованој смеши једињења на основу карактеристичног губитка неутралног фрагмента CH_2CO

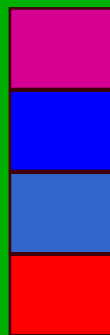
Šta je MS/MS?

Smeša peptida

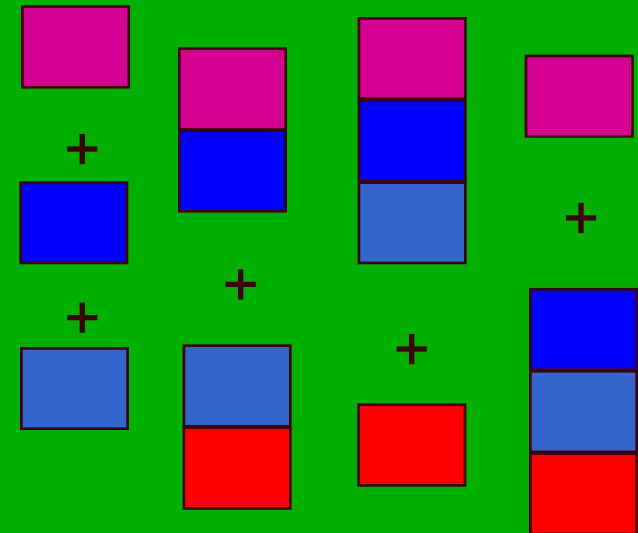


Imamo samo mase
za početak

1 peptide
izdvojen za
MS/MS



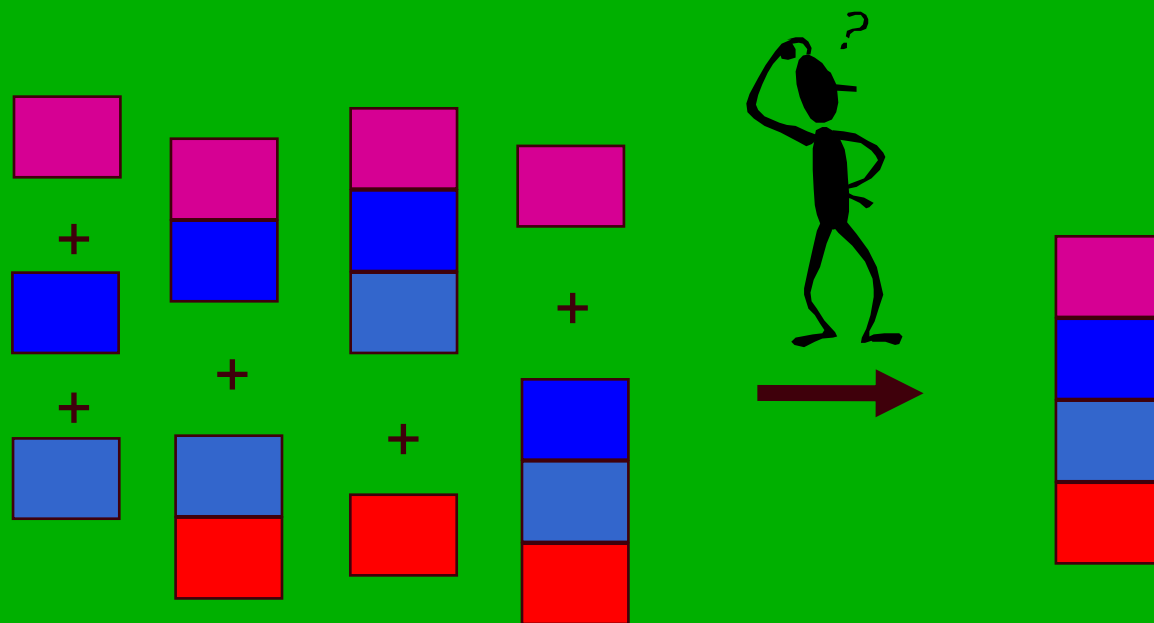
MS/MS



Mase svih
fragmenata daju
jedan MS/MS
spektar

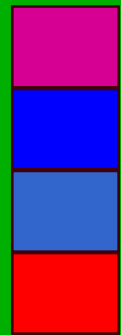
Interpretacija jednog MS/MS spektra

Dobijanje informacije o strukturi je analogno rešavanju pazla

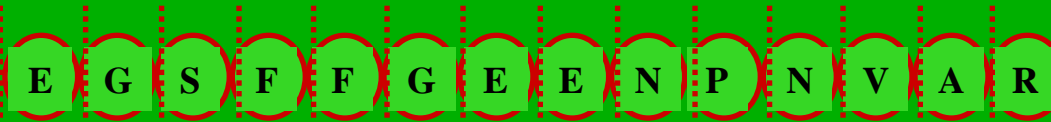


Koriste se mase fragmentnih jona kao delovi slagalice da bi se ponovo dobio roditeljski jon

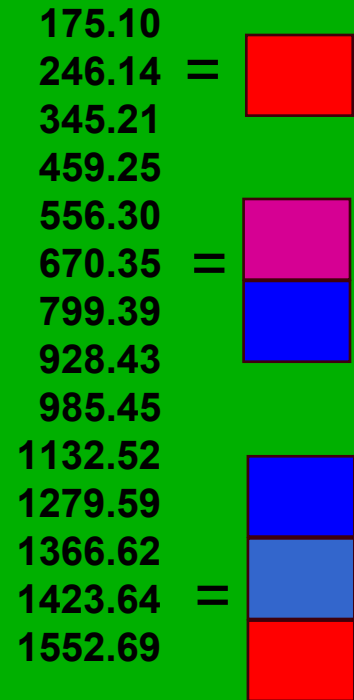
Fragmentacija peptida



=>



E=Glu
G=Gly
S=Ser
F=Phe
N=Asn
P=Pro
V=Val
A=Ala
R=Arg



Bioworks, Excalibur, SEQUEST, Mascot, In-house

Primena MS/MS

- Odredjivanje strukture molekuskog i fragmentnih jona
- Proučavanje mehanizma fragmentacije jona
- Direktna analiza smeša
- Skrining kompleksnih smeša na specifične sastojke
- Određivanje redosleda amino kiselina u peptidima

Omiks tehnologija i MS-rana dijagnostika kancera

- Veliki broj „**omiks**“ tehnika je razvijen imajući u vidu jedna cilj: otkrivanje biomarkera i rana dijagnostika kancera.
- **Proteomiks** tehnologija je identifikacija proteina ili proteinski fragmenta produkovanih od strane ćelije kancera ili njenog mikrokruženja koji mogu difundovati u cirkulaciju, a njihove koncentracije su merljive sa MS
- **Peptidomiks** se može definisati kao vizualizacija i identifikacija svih peptida ćelije ili tkiva
- **Metabolomiks** predstavlja krajnje stanje svih molekulskih događaja u određenom tkivu: varijacija gena (genomiks), ekspresija i modifikacija proteina (proteomiks) i međusobne interakcije.

Primene masene spektrometrije

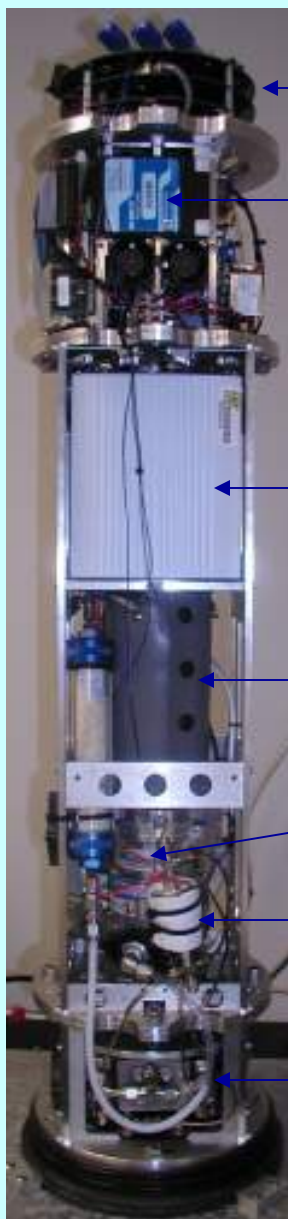
- Analiza u organskoj, neorganskoj i bioorganskoj hemiji
- Analiza geoloških uzoraka
- Kontrola u naftnoj, hemijskoj i farmaceutskoj industriji
- Analiza površina
- Zaštita okoline
 - Pesticidi u hrani
 - Zagađenje zemljišta, vazduha i voda
- Forenzička analiza/klinička
- Nauka o materijalima
- Analiza u farmaciji
- Ispitivanje biološke aktivnosti
 - Metabolizam lekova, farmakokinetika
 - Karakterizacija potencijalnih lekova
 - Analiza produkata degradacije lekova
 - Praćenje kandidata za lekove
 - Identifikacija mesta i mehanizma delovanja lekova
- Biomolekulska karakteritacija
 - Proteini i peptidi
 - Oligonukleotidi

Glavne karakteristike UMS



Type	Linear quadrupole mass filter
Mass range	200 amu
Inlet System	Membrane introduction system
Power consumption	85-90 Watts
Voltage of operation	24 VDC or 110 VAC
Deployment time	Configuration dependent
Dimensions	Ø 19 cm (7.5")
	L 105 cm (41")
Weight	33 kg (72.7 Lb)
Depth	>1000 m
DSL tether range	~1600 m (1 mile)

Novi 200 *In Situ* Maseni Spektrometar



← Microcontroller

← Embedded PC

← MS electronics box

← 200 amu linear quadrupole in
vacuum housing/heating jacket

← Turbo pump

← MIMS probe

← Roughing pump

Služi za određivanje:

Rastvorenih gasova (N_2 , O_2 , CO_2 ,
Ar, CH_4 , H_2S , $CHCl_3$,

Isp. org.jed.(toluen, benzen, dimetil
sulfid)

Jedinjenja većih MW (PCB,
pesticidi, lekovi, toksini)

The Rosetta Mission – Evropska svemirska agencija

- Approved in Nov 1993
- Hardware design was frozen in 2000
- Launched Mar 2004 on Ariane 5G+ in Kourou, French Guyana
- Designed to meet up with comet Churyumov – Gerasimenko ('67P') in May 2014
- First project ever to attempt *in-situ* analysis of comet !!
- 3000kg launched (100kg lander, 165kg scientific instruments)
- Fly-by several other comets until the landing on 30 September 2016
- Fully automatic landing after determining a suitable landing site
- Total cost: \$ 970-980 million



Ariane - launch

Rosetta 'Orbiter'

- 11 experimental probes
- ALICE – ultraviolet imaging spectrometer
- CONSERT – radio wave transmission/reflection by nucleus
- **COSIMA – ToF MS (up to 2000Th) of dust particles (organic??)**
- GIADA – number, mass, momentum and velocity distribution
- MIDAS – dust environment: population, size, volume and shape
- MIRO – microwave to determine abundances of gases
- OSIRIS – optical, spectroscopic and infrared imaging system
- ROSINA – ion and neutral spectrometer
- RPC – physical properties of nucleus, structure of inner coma etc.
- RSI – radio signal shift to measure mass, density and gravity to determine orbit
- VIRTIS – visible and infrared spectrometer to map temperature, identify gases, examine physical conditions on the nucleus and determine landing site

The Lander – ‘Philae’

- Extreme surrounding conditions:
 - “warm” environment: -40 - +50° C
 - “cold” environment: -140 - -50° C
- 9 experimental components:
- APXS – alpha proton X-ray spectrometer
- ÇIVA/ROLIS – Rosetta Lander imaging system
- CONSERT – probing nucleus using radio waves
- COSAC – complementary sampling and composition (chromatography/ TOF MS)
- **MODULUS Ptolemy – gas chromatograph ion trap MS**
- MUPUS – density and mechanical/thermal property testing
- ROMAP – local magnetic field and comet/solar wind interaction
- SD2 – sample drilling below 20cm for other components
- SESAME – electrical, seismic and acoustical testing