

# Analizne metode v karakterizaciji materialov in bioloških sistemov

Masna spektrometrija, 3. del

H. Prosen, FKKT UL

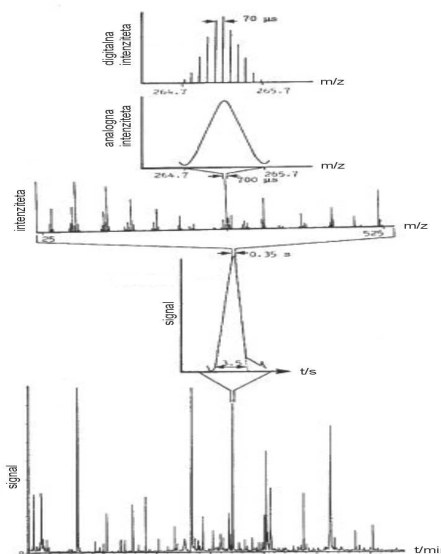
## Kvantifikacija v masni spektrometriji

- občutljivost (angl. *sensitivity*) in meje zaznave (angl. *limit of detection, LOD*): polni ionski tok (angl. *total ion current, TIC*) vs. opazovanje izbranih ionov (angl. *selected ion monitoring, SIM*)
- umerjanje z eksternimi standardi (metoda umeritvene krivulje, metoda standardnih dodatkov)
- umerjanje z internimi standardi
- metoda izotopskega razredčenja (angl. *isotopic dilution*)

## Polni ionski tok/kromatogram (TIC)

Čas merjenja intenzitete nekega iona pri pregledujočih (*scanning*) analizatorjih (sektorski, kvadrupolni):

- širina kromatografskega vrha (GC-MS) 3,5 s
- za izris kromatografskega vrha 10 točk: 0,35 s / točko
- pri TIC pregleduje območje  $m/z$  25-525, torej se na eni  $m/z$  zadrži 700  $\mu$ s
- 10 meritev za eno  $m/z$ , torej 70  $\mu$ s za vsako meritev



## SIM in SRM

Kaj pridobimo z opazovanjem izbranih ionov (SIM):

- analizator ne pregleduje po celam  $m/z$  območju, temveč preklaplja med nastavitvami za izbrane ione: daljši čas merjenja za izbrane  $m/z$ , boljše razmerje signal/šum, do 1000x večja intenziteta signala.

Slabost SIM: detekcija je manj specifična kot pri TIC.

Opazovanje izbranih reakcij (SRM):

- razmerje signal/šum še boljše kot pri SIM
- boljša specifičnost kot pri SIM
- izvedba možna le s tandemsko MS.

## Umerjanje z eksternimi standardi

- faktor odziva inštrumenta definiran kot množina/koncentracija analita glede na intenziteto signala
- enak faktor odziva v širokem območju (do 6 redov velikosti) samo pri EI
- pri drugih ionizacijskih tehnikah količina vzorca vpliva na potek ionizacije in fragmentacije
- nujna uporaba umeritvene premice ali metode standardnih dodatkov
- druge napake: spremembe pogojev v ionskem izvoru

## Umerjanje z internimi standardi (IS)

- primerjava intenzitete signala analita na njegovo količino z intenziteto signala internega standarda na njegovo količino:

$$I_{an}/I_{IS} = fn(c_{an}/c_{IS})$$

- eliminira večino napak, povezanih s spremenljivostjo signala (sprememba pogojev v ionskem izvoru, količina vzorca, vpliv matrice na ionizacijo...)
- še vedno potrebna konstrukcija umeritvenih krivulj
- izbira primerne internega standarda: fizikalno in kemijsko čim bolj podoben analitu (strukturni analogi, spojine iz iste kemijske "družine"), inerten, ne sme vsebovati primesi analita
- daleč najbolj primeren, a tudi najdražji izotopsko označen IS - ista spojina kot analit, vendar označena s stabilnimi izotopi

## Izotopsko razredčenje

- interni standard (IS) je izotopsko označeni analit
- najpogosteje devterirani IS: pri kapilarni GC-MS lahko zamik retencijskih časov
- drugi IS:  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$  (manjša čistota)
- problemi: drage spojine; umeritvena premica pogosto ni linearna

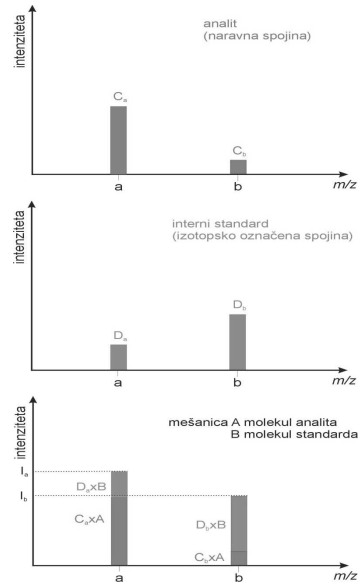
$$\frac{I_a}{I_b} = \frac{C_a \cdot A + D_a \cdot B}{C_b \cdot A + D_b \cdot B} = \frac{\frac{n_a}{n_b} C_a + D_a}{\frac{n_a}{n_b} C_b + D_b}$$

$n_a, n_b$ ... množine analita, IS

$I_a, I_b$ ... intenzitete ionov pri  $m/z$  a in b

$A, B$ ... število delcev analita, IS

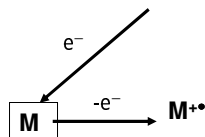
$C_a, C_b, D_a, D_b$ ... deleži analita, IS pri  $m/z$  a in b



## Interpretacija masnih spektrov

- masni spektri visoke ločljivosti
- masni spektri nizke ločljivosti pri EI
- fragmentacije psevdomolekulskih ionov
- knjižnice masnih spektrov

## Ionizacija z elektroni (EI)



Molekulski ion:

- M<sup>+•</sup>: kationski radikal ali radikal-kation (molekula je izgubila en elektron; OE ion)
- M<sup>2+</sup>: kation (molekula je izgubila dva elektrona; EE ion)
- od elektrona, ki jo je ioniziral, je prejela višek energije, kar vodi v nadaljnje razpade vezi (fragmentacija)
- elektron se najlažje odcepi:  $n > \pi > \sigma$

OE: ion z lihim številom e<sup>-</sup> (angl. *odd-electron ion*)

EE: ion s sodim številom e<sup>-</sup> (angl. *even-electron ion*)

## Molekulski ion

- kako ga prepoznamo:
  - najvišja  $m/z$  v spektru?
  - $m/z$  je sodo število?
  - razlike  $\Delta m/z$  do fragmentnih ionov smiselne?
- intenziteta odvisna od tipa spojine
- informacije:
  - molekulska masa spojine
  - značilni "sateliti": (M+1)<sup>+</sup>, (M+2)<sup>+</sup>
    - ⇒ prepoznavamo prisotnost nekaterih elementov z značilno izotopsko sestavo
  - postavitev empirične formule
  - izračun števila dvojnih vezi in obročev

## Nekaj orientacijskih pravil

Število dvojnih vezi in obročev ( $N$ ) v molekuli  $A_xB_yC_zD_w$ :

$$N = x - y/2 + z/2 + 1$$

A - štirivalentni atom (C, Si)    B - enovalentni atom (H, F, Cl, Br, I)

C - trivalentni atom (N, P)    D - dvovalentni atom (O, S)

Intenzitete "satelitskih" ionov:

Prisotni element	Intenziteta $M^+$	Intenziteta $(M+1)^+$	Intenziteta $(M+2)^+$
ogljik	100 %	$1,1 \% \cdot N(C)$	/
dušik	100 %	$0,4 \% \cdot N(N)$	/
kisik	100 %	/	$0,2 \% \cdot N(O)$
silicij	100 %	$5,1 \% \cdot N(Si)$	$3,3 \% \cdot N(Si)$
žveplo	100 %	$0,8 \% \cdot N(S)$	$4,4 \% \cdot N(S)$
klor	100 %	/	$32 \% \cdot N(Cl)$
brom	100 %	/	$97,5 \% \cdot N(Br)$

## Primer izračuna izotopskega vzorca

spojina  $CS_2$

en atom C:  $^{12}C$  98,90 %,  $^{13}C$  1,10 %

dva atoma S:  $^{32}S$  95,02 %,  $^{33}S$  0,75 %,  $^{34}S$  4,21 %,  $^{36}S$  0,02 %

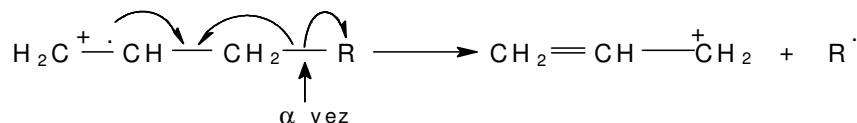
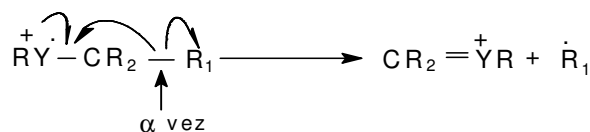
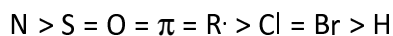
Masa	Masa C	Masa $S_2$	Verj. C	Verjetnost $S_2$	Skupna verj. v %
76	12: $^{12}C$	64: $2x^{32}S$	0,9890	$(0,9503)^2$	89,317
77	12: $^{12}C$	65: $^{32}S^{33}S$ in obratno	0,9890	$0,9503 \times 0,0075 \times 2$	1,404
77	13: $^{13}C$	64: $2x^{32}S$	0,0110	$(0,9503)^2$	0,993
78	12: $^{12}C$	66: $^{32}S^{34}S$ in obr. + $2x^{33}S$	0,9890	$0,9503 \times 0,0422 \times 2 + (0,0075)^2$	7,938
78	13: $^{13}C$	65: $^{32}S^{33}S$ in obratno	0,0110	$0,9503 \times 0,0075 \times 2$	0,016
79	12: $^{12}C$	67: $^{33}S^{34}S$ in obratno	0,9890	$0,0075 \times 0,0421 \times 2$	0,062
79	13: $^{13}C$	66: $^{32}S^{34}S$ in obr. + $2x^{33}S$	0,0110	$0,9503 \times 0,0422 \times 2 + (0,0075)^2$	0,088
80	12: $^{12}C$	68: $2x^{34}S$	0,9890	$(0,0422)^2$	0,176
80	13: $^{13}C$	67: $^{33}S^{34}S$ in obratno	0,0110	$0,0075 \times 0,0421 \times 2$	0,001
81	13: $^{13}C$	68: $2x^{34}S$	0,0110	$(0,0422)^2$	0,002

Izotop  $^{36}S$  zanemarimo.



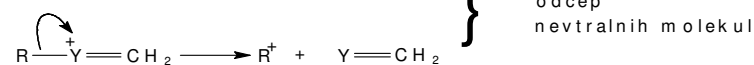
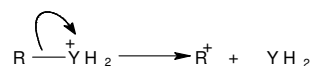
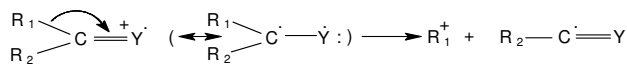
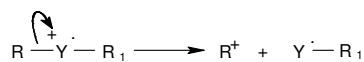
## Radikalni ali $\alpha$ razpad

- reaktivni radikalni  $e^-$  začne reakcijo na vezi poleg svojega C atoma ( $\alpha$  vez); prenos enega  $e^-$ , naboj ostane na istem mestu
- tendenca radikalnega mesta za donacijo  $e^-$ :



## Induktivni ( $i$ ) razpad

- potreben je heteroatom, ki privlači elektronski par
- prenese se  $e^-$  par, torej tudi naboj, zato manj favorizirano kot  $\alpha$  razpad - izjema kisikov atom, kjer približno enako pogosto oba tipa razpadov
- privlak elektronskega para: halogeni  $> O = S \gg N, C$



} odcep  
nevtralnih molekul

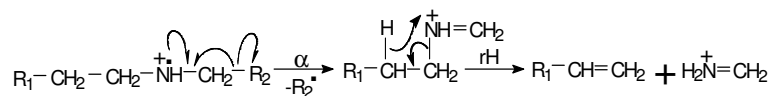


## Fragmentacije kationov (EE<sup>+</sup>)

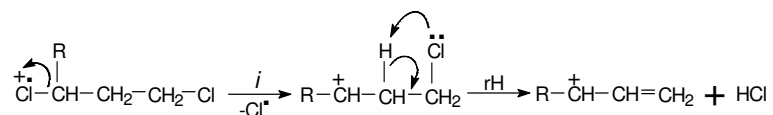
- pomembno zlasti pri mehkih ionizacijskih tehnikah, kjer nastajajo psevdomolekulski kationi
- paritetno pravilo: EE<sup>+</sup> ioni pri fragmentaciji dajejo EE<sup>+</sup> ione in nevtralne fragmente
- potekajo premestitve (npr. na mestu naboja), ciklizacija, odcep manjših molekul
- redki EE<sup>+</sup> ioni pravila ne "ubogajo" (ioni z razširjenim  $\pi$  sistemom, npr. tropilijev ion)

## Premestitve na mestu naboja

- mesto naboja se ne prenese, pogosti so odcepi manjših molekul (npr. H<sub>2</sub>O)



- podobna premestitev poteka tudi brez mesta naboja:



## Fragmentacije negativnih ionov

- največkrat EE anioni, npr.  $(M-H)^-$
- manj presežne energije, zato manj fragmentirajo
- tipične fragmentacije: homolitski razpad vezi, izguba  $H\cdot$  in alkil radikalov, premestitve
- $OE^+$  ioni zelo redki (npr. fulereni): običajno  $\alpha$  razpad vezi

## Knjižnice masnih spektrov

- komercialno dostopne knjižnice masnih spektrov, dobljenih z EI ionizacijo: Wiley, NIST, specialne knjižnice pesticidov, drog...
- pri ostalih načinih ionizacije težje izvedljivo zaradi spremenljivih pogojev ionizacije
- iskanje po knjižnici: računalniški program primerja podobnost neznanega spektra z referenčnimi spektri iz knjižnice in običajno poda obseg ujemanja v odstotkih
- napredujoči način iskanja (*forwards*): ali je neznan spekter vsebovan v referenčnem spektru?
- vzratni način iskanja (*backwards*): ali je referenčni spekter vsebovan v neznanem spektru? Ta način se bolje obnese, če imamo visoko ozadje, ali pri GC-MS, kadar so kromatografski vrhovi slabo ločeni.
- kritična presoja rezultatov iskanja: fragmenti pri višjih  $m/z$  so pomembnejši od tistih z  $m/z < 50$

## Glavna področja uporabe MS

- meritve fizikalno-kemijskih količin: elektronska afiniteta, protonska afiniteta
- študij reakcij
- aplikacija meritev stabilnih izotopov
- določanje elementov in spojin v raznih vzorcih (analitika)
- določanje sestave in strukture bioloških makromolekul: proteinov, nukleotidov...
- raziskave vesolja
- "nestandardni" MS inštrumenti: prenosni, podvodni...

## Študij reakcijskih mehanizmov

Ionsko-molekulske reakcije: prenos  $e^-$ , prenos  $H^+$ , adicija, substitucija, eliminacija:

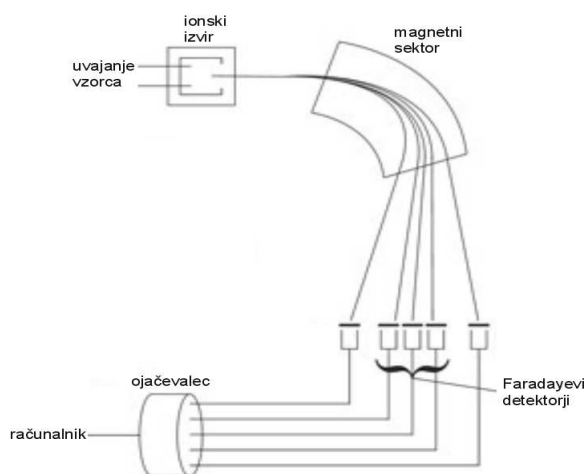
- študij mehanizmov brez prisotnosti in vpliva molekul topila
- meritve hitrosti reakcij
- meritve aktivacijskih energij
- opazovanje dolgoživih (10-100  $\mu s$ ) ionsko-molekulskih kompleksov

Kinetični izotopski učinek (angl. *kinetic isotope effect, KIE*): hitrost reakcije se spremeni z zamenjavo izotopa (npr.  $^2D$  namesto  $^1H$ )  $\implies$  vpogled v reakcijske mehanizme, strukturo prehodnega stanja...

## Meritve izotopskih razmerij

- angl. *isotope ratio mass spectrometry* (IRMS)
- merjenje razmerja ( $R$ ) stabilnih izotopov v vzorcih
- v vzorcih se razmerje med izotopi nekega elementa lahko razlikuje od naravnega razmerja zaradi *izotopske frakcionacije*, ki je posledica *kinetičnega izotopskega učinka* ali *termodinamskega izotopskega učinka* (razlike v fizikalnih lastnostih spojin glede na vsebnost izotopov, npr. parni tlak, vrelišče, tališče...)

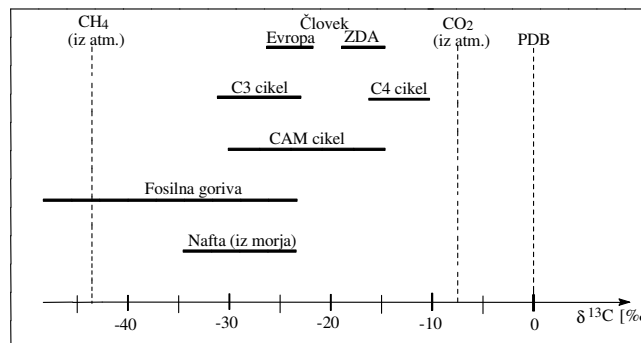
## MS za merjenje izotopskih razmerij



## Določitev $\delta^{13}\text{C}$ za odkrivanje izvora živil:

Določimo odstopanje razmerja izotopov ( $\delta$  v ‰) glede na nek standard, ki naj bi imel naravno razmerje ( $R_{st}$ ):

$$\delta = \frac{R_{vz} - R_{st}}{R_{st}} \cdot 1000$$



Dodatka sladkorja iz sladkorne pese sadnim sokovom, vinom ipd. s to določitvijo ni mogoče ugotoviti, uporabljajo se določitve  $\delta^2\text{D}$  in  $\delta^{18}\text{O}$ . S slednjima se da ugotoviti tudi dodatek vodovodne vode.

## Ugotavljanje starosti arheoloških idr. najdb z merjenjem $^{14}\text{C}$ (radiokarbonska metoda):

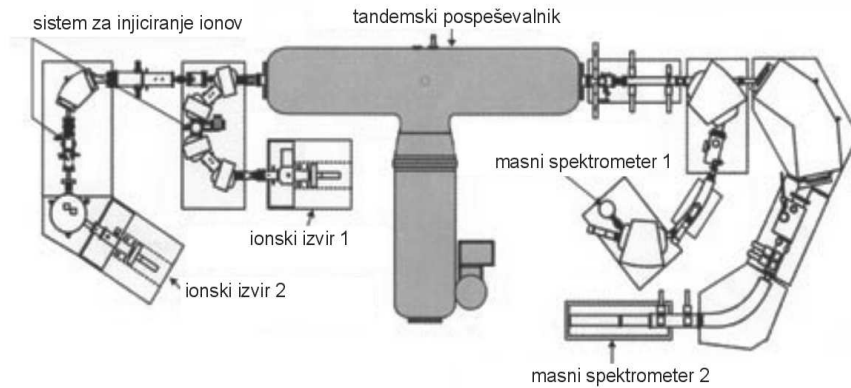
$^{14}\text{C}$  ( $t_{1/2} = 5730/5568$  let) ni naravni izotop, temveč nastaja s fotonuklearnimi reakcijami v zgornjih plasteh atmosfere. Vgradi se v  $\text{CO}_2$ , se porazdeli v atmosferi, hidrosferi, biosferi. Dokler je bitje živo, je v njem konstantna aktivnost  $^{14}\text{C}$ , po smrti eksponentialno upada.

Problemi:

- aktivnost  $^{14}\text{C}$  v biosferi ni konstantna: uporaba korekcij
- povečan vnos neradioaktivnega  $\text{CO}_2$  v atmosfero: relevantno v zadnjem stoletju; paziti, da vzorec ni onesnažen
- potrebne so večje množine vzorca ali uporaba pospeševalniške masne spektrometrije (angl. *accelerator mass spectrometry*, AMS)

## Pospeševalniški masni spektrometer, AMS

- kombinira pospeševanje ionov do visokih energij s sektorskimi analizatorji, detektor običajno Faradayev, ionski izvor FAB ali SIMS
- majhna količina vzorca (nekaj mg), 5-10 redov velikosti bolj občutljiva detekcija od drugih MS



### Geokronologija:

Določanje absolutne starosti geoloških vzorcev glede na vsebnost nekaterih dolgoživih naravnih radioaktivnih izotopov, ki so nastali ob nastanku Zemlje (izjemi  $^{14}\text{C}$  in  $^3\text{H}$ ).

Najbolj znane so:

- uran-svinčeva metoda ( $^{238}\text{U} \rightarrow ^{206}\text{Pb}$ ,  $^{235}\text{U} \rightarrow ^{207}\text{Pb}$ ,  $^{232}\text{Th} \rightarrow ^{208}\text{Pb}$ ):  
starost nastanka zemljine skorje, nastanki rudišč...
- kalij-argonova metoda ( $^{40}\text{K} \rightarrow ^{40}\text{Ar}$ ):  
tudi za starost fosilnih najdb (antropologija)
- rubidij-stroncijeva metoda ( $^{87}\text{Rb} \rightarrow ^{87}\text{Sr}$ ):  
starost mineralov, raziskave meteoritov; možno uporabiti površinsko ionizacijo

## MS v analitiki anorganskih spojin/elementov

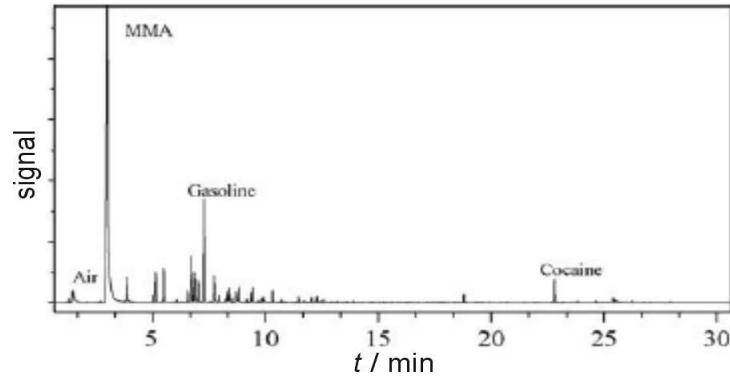
- težke kovine v okoljskih in drugih vzorcih, npr. krom v prsti in vodi kot posledica industrijskega onesnaženja, svinec v barvah, bencinu, industrijskih odpadkih (termoionizacija – TI-MS, ionizacija z induktivno sklopljeno plazmo – ICP-MS)
- kovine v bioloških sistemih npr. spremljanje absorpcije Ca
- analiza površin s SIMS: karakterizacija materialov, določitev nečistoč, študij katalizatorjev...
- *in-situ* masnospektrometrične določitve spojin in ionskih zvrsti v atmosferi in ionosferi ( $O_3$ ,  $O_2^+$ ,  $O^+$ ,  $O^{+*}$ ,  $NO^+$ ,  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $N^+$ ...)

## MS v analitiki organskih spojin

- predvsem v kombinaciji s separacijskimi metodami (GC, LC...) in metodami predpriprave vzorcev (ekstrakcija, destilacija...), da se zmanjša kompleksnost vzorca
- lahko pa skoraj brez ali z bistveno poenostavljenimi postopki predpriprave in separacije, če tandemna MS
- ciljni analiti vs. neciljni?
- glavna področja:
  - sestavine in onesnaževala v živilih
  - onesnaževala v okoljskih vzorcih
  - zdravila idr. biološko aktivne snovi v živih bitjih
  - toksikologija, kriminalistika
  - identifikacija naravnih spojin

## Forenzične analize

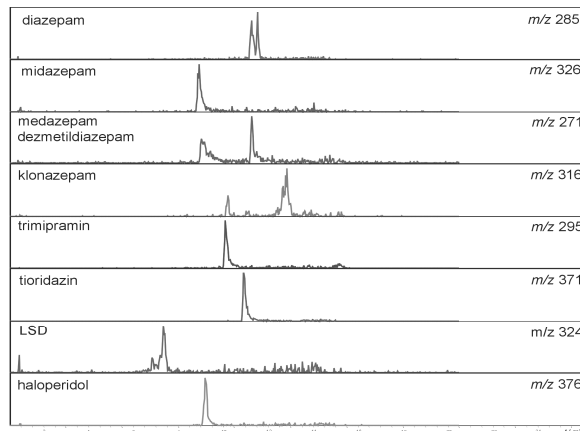
Analiza ostankov neznane bele snovi iz ilegalnega laboratorija s pirolizo in GC-MS (Py-GC-MS). Ugotovili so, da gre za ostanke pleksi stekla (MMA), v katerem so pretihotapili kokain in ga nato izolirali z raztapljanjem v bencinu.



T. Gostič et al., *Forensic Sci. Int.* 187 (2009) 19-28.

## Zdravila in droge v živih organizmih

Serum z dodanimi terapevtskimi in ilegalnimi učinkovinami v terapevtskih koncentracijah. Priprava vzorca: obarjanje proteinov. Analiza z LC-MS/MS (fragmentacija prekursorjskih ionov, ki so navedeni pri učinkovinah).





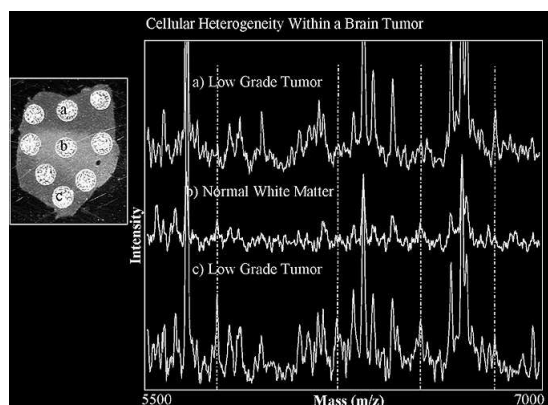
## MS v medicinskih in bioloških raziskavah

- razvoj novih zdravil, spremljanje farmakokinetike in metabolizma
- diagnostika bolezni
- metabolomika
- sekvenciranje peptidov, proteinov, sekundarna struktura, kompleksi proteinov, proteomika
- sekvenciranje oligonukleotidov, karakterizacija modificiranih oligonukleotidov, genomika
- sekvenciranje oligosaharidov, glikokonjugatov, glikomika
- določevanje lipidov, lipidomika
- določitev mikroorganizmov...

### Diagnostika bolezni

- identifikacija biomarkerjev za bolezni kot visokospecifičnega diagnostičnega orodja (male molekule npr. nižji aldehidi v izdihanem zraku pri karcinomu pljuč, hlapne spojine v urinu pri infekciji; spremenjeni proteini v krvi, cerebrospinalni tekočini pri duševnih boleznih...)
- direktna analiza tkiv z "slikovno" MS (angl. *imaging MS*): desorpcija spojin z zamrznjenega tkiva z MALDI, SIMS, DESI...
- "on-line" spremljanje encimskih reakcij

Slika: Vanderbilt Medical Center, ZDA

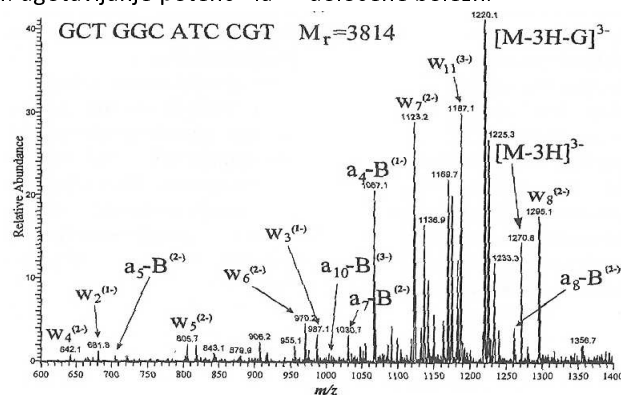


## Metabolomika in metabonomika

- definicija metabolomike: kvalitativna in kvantitativna analiza metabolitov v celici, tkivu, organizmu
- metabolom je celoten skupek endogenih metabolitov in drugih majhnih molekul, ki sodelujejo v metabolizmu in drugih procesih v celici; ne zajema proteinov, genetskega materiala ter metabolitov eksogenih substanc (zdravila...)
- definicija metabonomike: kvalitativna in kvantitativna analiza metabolnega odgovora organizma na eksogene substance, okoljske spremembe, bolezni, genetske spremembe...
- pomen: identifikacija biomarkerjev bolezni, opazovanje fizioloških reakcij na zdravila, razumevanje funkcije posameznih metabolitov...

## Genomika

- študij genov in njihove funkcije, t.j. analiza genoma, mapiranje genov, sekvenciranje DNK
- genom: celotna genetska informacija, ves dedni material nekega organizma
- MS: določitev mase, sekvenciranje oligonukleotidov (tandemska MS), identifikacija modificiranih nukleozidov
- pomen: ugotavljanje potenciala za določene bolezni



## Peptidi in proteini

- določitev molekulske mase: že s FAB l. 1980, sedaj MALDI, ESI s TOF ali FT ICR analizatorji (pri peptidih iz točne mase možno izračunati aminokislinsko sestavo!)
- določitev primarne strukture: razgradnja proteina s proteazami, analiza nastalih peptidov; drugi pristop: postopno sekvenciranje proteina z N ali C terminala in stopenjska analiza produktov
- "top-down" sekvenciranje: intaktni protein kot prekurzor, ki ga v tandemskem MS postopno fragmentiramo (ECD ali ETD in FT ICR): ni potrebna predhodna razgradnja proteina in separacija peptidov, vendar zelo kompleksni spektri

## Sekundarna struktura proteinov:

- spremljanje hitrosti izmenjave H z D - *hydrogen exchange MS* (značilne hitrosti za protone v amidni skupini, možno izračunati interakcije; tudi za študij interakcije proteinov z drugimi molekulami)
- MS na gibljivost ionov (angl. *ion mobility MS, IMMS*): čas potovanja ionov skozi inertni plin je odvisen od njihovega preseka, konformacije
- spremljanje radikalske oksidacije proteinov: oksidirajo se tiste aminokisliline, ki so v zviti obliki "dosegljive" radikalom

Terciarna struktura proteinov:

- položaj disulfidnih mostičkov

Kvarterna struktura proteinov:

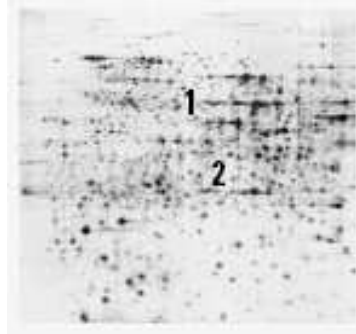
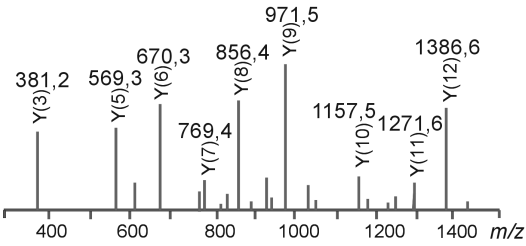
- z ESI, MALDI možno celoten di-, tri-, tetramer spraviti v plinsko fazo
- na enak način tudi komplekse proteinov z drugimi proteini (npr. protitelo-antigen)

Detekcija potranslacijskih modifikacij proteina (angl. *post-translational modification, PTM*) z opazovanjem karakterističnih nevtralnih izgub z MS/MS (npr. značilne skupine pri fosforilaciji, glikozilaciji...).

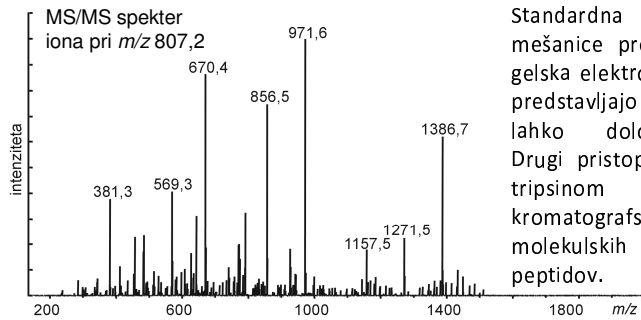
## Proteomika

- definicija: kvalitativna in kvantitativna analiza vseh proteinov, ki jih proizvede celica v določenem času (proteom), pa še njihovih modifikacij, interakcij, vpletenosti v metabolne procese
- običajno najprej separacija proteinov z velikostno-izključitveno kromatografijo (SEC) ali dvodimenzionalno gelsko elektroforezo, nato ESI/MALDI in MS/MS
- pomen: identifikacija karakterističnih proteinov pri boleznih (biomarkerji), napak v potranslacijski modifikaciji, razvoj novih ciljnih zdravil

teoretični spekter peptida LLDNWDSVTSTFSK



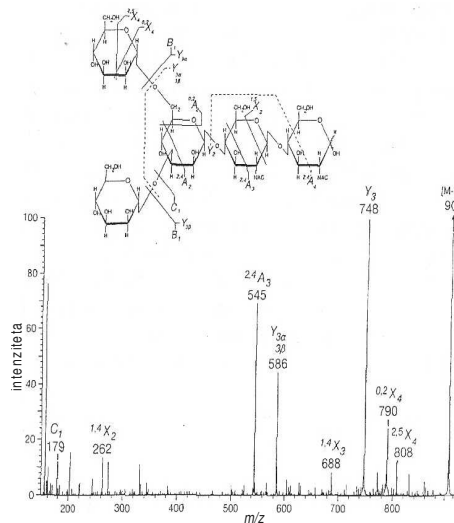
MS/MS spekter  
iona pri  $m/z$  807,2



Standardna metoda za separacijo mešanice proteinov ali peptidov: 2D gelska elektroforeza. Posamezne točke predstavljajo ločene proteine, ki jih lahko določimo z MALDI-MS. Drugi pristop: razgradnja proteinov s tripsinom (angl. *tryptic digest*), kromatografska separacija, ESI, MS/MS molekularskih ionov in identifikacija peptidov.

## Glikomika

- analiza ogljikovih hidratov (glikoproteini, glikolipidi, prosti ogljikovi hidrati), ki jih proizvede celica (glikom)
- določitev strukture težja kot pri peptidih ali oligonukleotidih, ker so osnovne enote izomeri, tudi ionizacija je manj učinkovita (najboljša negativna ESI, nato sekvenciranje s tandemsko MS; razvejanost ugotavljamo z derivatizacijo spojine pred analizo)



### Lipidomika

- analiza lipidoma: vsi tipi lipidov, ki jih proizvede celica v nekem času, tudi konjugatov
- zlasti pomembno spremljati spremembe zaradi metabolnih motenj
- običajno se izvaja tandemska MS celotnih kloroformskih ekstraktov celic

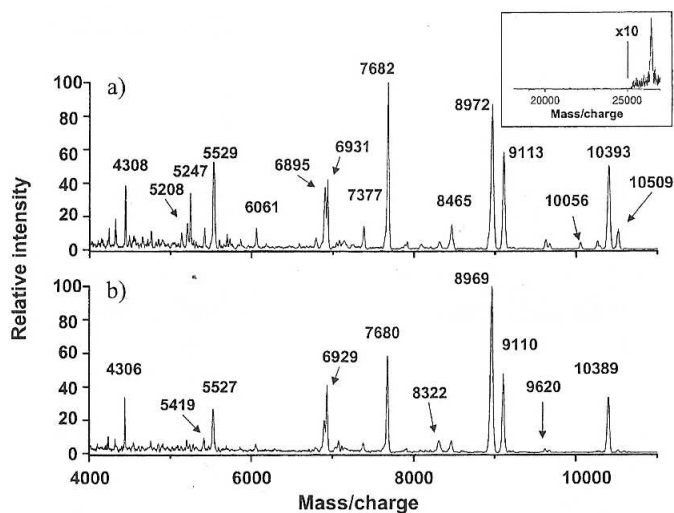
### Določanje kompleksov med biološkimi makromolekulami - kompleksomika

- govorimo o supramolekularni MS: omogoča določitev mase nekovalentnim kompleksom, ki so že prej obstajali v neki raztopini - te interakcije se z MALDI in ESI ionizacijo ohranijo tudi v plinski fazi
- kompleksi med proteini in RNK virusov
- kompleksi med proteini, npr. protitelo-antigen
- študij replikacije DNK
- z MALDI-TOF inštrumenti do  $M$  400 000 Da

### Določitev mikroorganizmov z MS

- z MALDI ali ESI ionizacijo v povezavi s tandemsko MS možno posneti spekter intaktnega mikroorganizma, zlasti virusov, pa tudi bakterij, gliv in njihovih spor, parazitskih enoceličarjev...
- zlasti pomembni so biomarkerji (proteinski in neproteinski), t.j. spojine/deli spojin, značilne za ta mikroorganizem, ki jih sekvenciramo ("*top-down*" pristop) in primerjamo "prstni odtis" z bazo podatkov
- omogoča hitro potrditev prisotnosti nekega mikroorganizma tudi v majhni količini (pod  $10^4$  organizmov)

MALDI (poz. in neg.)-MS proteinov, desorbiranih z bakterije  
*Helicobacter pylori* (P.A. Demirev, C. Fenslau)



## Analiza drugih kompleksnih sistemov

Sintetične polimere analizirajo z MALDI in ESI ionizacijami: določiti se da povprečno  $M_r$ , kemijsko formulo, strukturo monomera, maso končnih skupin... Za porazdelitev sintetičnih makromolekul na trdnih površinah se uporablja SIMS z "imaging" MS.

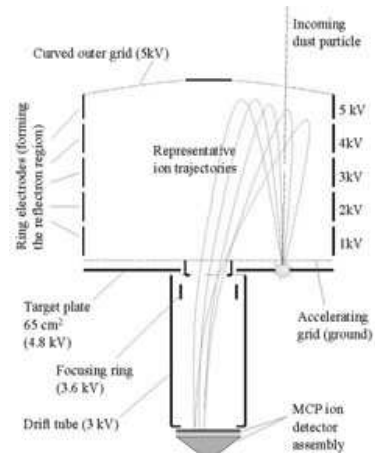
Za analizo sestave surove nafte se je uveljavil izraz **petroleomika**: vsebnost različnih ogljikovodikov, pomembna še vsebnost poliaromatskih žveplovih heterociklov (PASH) idr.

## MS v raziskavah vesolja

Študije so zasnovane v treh korakih:

- laboratorijske simulacije: modeliranje pogojev v vesolju
- razvoj in testiranje opreme, narejene posebej za ta namen; inštrumenti naj bi bili zelo robustni, da prenesejo večletno potovanje
- dejanske *in-situ* meritve: predhodno je potrebno pripraviti natančne protokole za zbiranje vzorcev in njihovo analizo, saj ti inštrumenti avtonomno delujejo daljši čas v neugodnih okoljih.

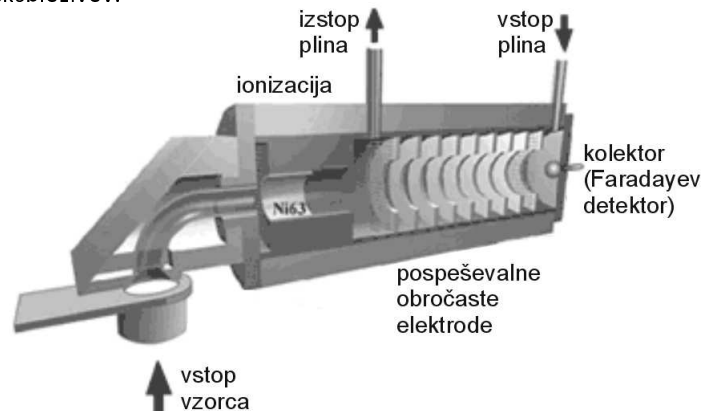
Primeri: analize kozmičnega prahu, odpadkov s kometov; sestava in nastanek kompleksnih organskih molekul na satelitu Titan; študije nanodelcev.



Skupina J. Beauchamp-a, California Institute of Technology: DUSTBUSTER (TOF MS inštrument za analizo kozmičnega prahu).

## Prenosni masni spektrometri

Običajno so to miniaturni GC-MS s čutilom oz. vzorčevalnikom za hlapne spojine v zraku; analizatorji so ionske pasti ali TOF. Verzija MS za delo na terenu je tudi masni spektrometer na gibljivost ionov - IMS (*ion mobility spectrometer*) ali IMMS. Aplikacije: spremljanje škodljivih snovi v okolju, forenzične preiskave, detekcija bojnih plinov in eksplozivov.





Drugi tip MS so podvodni/potopni inštrumenti za raziskave oceanov in za spremljanje kvalitete vode. Problem je zlasti vzdrževanje vakuumu ter vzorčevanje pod vodo - uporablja se selektivni prenos spojin v MS z membranskim vnosom (angl. *membrane introduction MS, MIMS*).

Na sliki je potopni MS z linearnim kvadrupolom (območje do  $m/z$  200) in vzorčevanjem skozi membrano za analizo plinov in hlapnih organskih snovi v površinskih vodah do globine 250 m. (Vir: P.G. Wenner, R.J. Bell, F.H.W. van Amerom, S.K. Toler, J.E. Edkins, M.L. Hall, K. Koehn, R.T. Short, R.H. Byrne, *TrAC* 23 (2004) 288-295.)

