

„FOLDED-FLIGHT-PATH“: NOVÁ TECHNOLOGIE VYSOKOROZLIŠOVACÍ TOF MS – APLIKACE PRO ANALÝZU KOMPLEXNÍCH BIOLOGICKÝCH VZORKŮ

ZROSTLÍKOVÁ J.

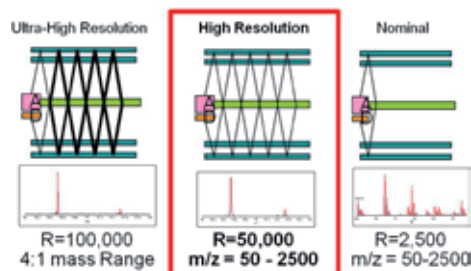
LECO Corp., Aplikační laboratoř Praha, jitka.zrostlikova@leco.cz

Vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie má svou jednoznačnou úlohu v oblasti identifikace velkých molekul, ale nalezla uplatnění také pro vysoce citlivé a specifické stanovení některých malých molekul, jako jsou např. dioxiny. Velmi vysoké rozlišení (>50 000 FWHM) bylo v minulosti doménou hmotnostních spektrometrů typu magnetického sektoru nebo hmotnostního spektrometru s Fourierovou transformací (FT MS) a v poslední době také technologie lineární iontové pasti (Orbitrap). U všech výše zmíněných hmotnostních analyzátorů je vysoké hmotnostní rozlišení dosaženo při nízké rychlosti sběru dat (jednotky spekter/sec). Jako slibná MS technologie se ukazuje v poslední době time-of-flight (TOF MS), která narozdíl od skenujících MS detektorů vždy disponuje sběrem plných spekter bez omezení rychlosti sběru dat. Doposud byly na trhu k dispozici TOF MS analyzátoři, disponující vysokým hmotnostním rozlišením nebo vysokou rychlostí sběru dat. Tento kompromis je zcela překonán novou technologií „Folded-flight-path“TM TOF MS, patentovanou firmou LECO Corp., která spojuje velmi vysoké rozlišení, vysokou rychlost sběru dat i sběr plných spekter.

V TOF MS je hmotnostní rozlišení je přímo závislé na dráze letu (geometrie letové trubice) a nepřímo závislé na počáteční disperzi (distribuci) iontů v čase, prostoru a rychlosti. Jedním z prvků používaných ke zvýšení rozlišení je reflekttron (iontové zrcadlo), který jednak prodlužuje dráhu letu odrazem iontů a jednak v něm dochází k podélné fokusaci. Při zařazení více než jednoho reflekttronu (W TOF) však dochází k výraznému snížení průchodnosti iontů, které podléhají na reflekttronu ztrátám. Více než 2 reflektrony se proto v praxi nepoužívají. Efektivní délka letové dráhy u současných komerčně dostupných TOFů nepřevyšuje několik metrů.

Z tohoto pohledu je převratná technologie LECO „Folded-flight path“TM (FFP) – viz Obr. 1. Tato technologie využívá k prodloužení doby letu série bezmřížkových iontových zrcadel (celkem 10 ks). Ionty vycházející ze zdroje jsou odráženy iontovými zrcadly a směřovány sérií fokusačních prvků, umístěných v řadě uprostřed. Podle režimu měření mohou ionty procházet různou trajektorií a s tím souvisí i dosažené rozlišení: (i) *Nominální režim* – 2 odrazy, rozlišení cca 2500, (ii) *Vysokorozlišovací režim* – 10 odrazů, rozlišení cca 50 000, (iii) *Ultra-vysokorozlišovací režim* – 20 odrazů, rozlišení cca 100 000. V Nominálním a Vysokorozlišovacím režimu je možno sbírat plný rozsah spekter, zatímco v Ultra-vysokorozlišovacím režimu je hmotnostní rozsah omezen (nejvyšší: nejnižší hmota = 4:1).

Obr. 1 – „Folded flight path“ TOF MS technologie



Ve všech módech je možno pracovat s rychlostí sběru dat do 200 spekter/sec, což předurčuje tuto MS technologii k využití v rychlé plynové i kapalinové chromatografii, jako i v ortogonální dvourozměrné plynové chromatografii.

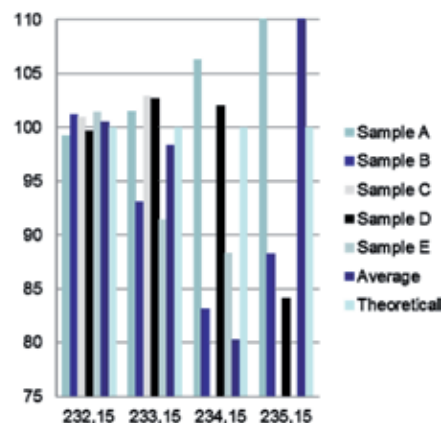
Metabolomika krevní plazmy krys

V rámci této studie byly porovnány vzorky krevní plazmy Zuckeroých myší normálních (n=10), tlustých (n=9) a obézních (n=10). Vzorky byly analyzovány metodou LC-MS s využitím FFPTM TOF MS. Analýza dat byla provedena dvěma způsoby: 1) *Cílová analýza*: ve vzorcích byly identifikovány cílové látky na základě jejich přesné

hmoty (použitá tolerance hmoty byla $\pm 0,001$ Da). 2) *Necílový screening*: přesné hmoty spekter píků nalezených softwarem ChromaTOF byly porovnány s databází ChemSpider, KEGG a dalšími databázemi metabolitů.

S pomocí cíleného postupu byly identifikovány markery Leucin/ Isoleucin, které jednoznačně prokazovaly souvislost s obezitou myši, což je ve shodě s dříve publikovanými pracemi. Co se týče necílových analytů, byla nalezena neznámá sloučenina s přesnou hmotou 232,15525 m/z, chovající se jako možný marker obezity. K upřesnění identifikace byla provedena ionizace in-source CID (collision induced dissociation), a také porovnání poměru isotopů molekulového iontu. Obrázek 2 znázorňuje přesnost měření isotopového „patternu“. Pro monoisotopický pík (¹²C) a první isotop (¹³C), byla shoda mezi teoretickým a naměřeným poměrem ve všech vzorcích lepší než ± 5 % (relativně), pro druhý isotop (²¹³C) potom lepší než ± 17 % pro 4 z 5 vzorků (pátý měl příliš nízkou intenzitu). Výsledkem tohoto postupu byla identifikace butyryl carnitinu jako markeru (hmota 232,15543, chyba hmoty 0,77 ppm).

Obr. 2 – Naměřené vs teoretické poměry isotopů molekulového iontu butyryl carnitinu



Abstract

„FOLDED-FLIGHT-PATH“: A NOVEL HIGH-RESOLUTION TOF MS TECHNOLOGY. APPLICATIONS IN THE ANALYSIS OF COMPLEX BIOLOGICAL SAMPLES.

Summary: The principles of high-resolution time-of-flight mass spectrometry utilizing „Folded Flight Path (FFP)TM“ technology patented by LECO are described. This novel technology reaches the mass resolution up to 100 000, mass accuracy under 1 ppm and (at the same time) the acquisition rates up to 200 Hz. Besides that, the identification by means of fine isotope ratios is feasible as demonstrated for the metabolomic analysis of rats blood plasma.

Key words: Folded flight path time-of-flight, high mass resolution, high acquisition rates, metabolomics, fine isotope ratios measurement.