

ZAHRADA

SOUČASNÉ TRENDY HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

VERONIKA VIDOVÁ^a, KAREL LEMR^a
a VLADIMÍR HAVLÍČEK^b

^a Katedra analytické chemie, PŘF UP Olomouc, Tr. Svobody 8, 771 46 Olomouc, ^b Mikrobiologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
vlhavlic@biomed.cas.cz

Došlo 17.1.08, přijato 21.5.08.

Klíčová slova: hmotnostní spektrometrie, hmotnostní mikroskopie, analýza povrchů

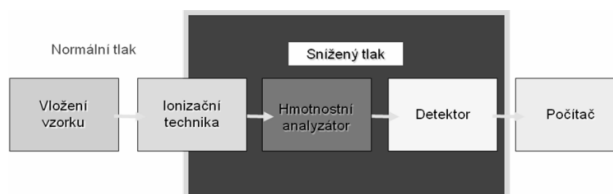
Hmotnostní spektrometrie je poměrně rozšířená moderní instrumentální technika, která je schopna analyzovat téměř jakýkoli materiál, ať už organický nebo anorganický. Metoda potřebuje minimální množství vzorku, který může mít opět téměř libovolnou formu (plazma, plyn, kapalina, tuhá látka) a umožňuje pracovat s čistými látkami i s velmi komplikovanými směsmi, jako je např. biologický materiál. Princip analýzy je založen na měření hmotnostních spekter, ze kterých je možno „přečíst“, často i velmi přesně, struktury měřených látek.

Hmotnostní spektrometrie rozhodně není doménou pouze vysoce specializovaných vědeckých laboratoří. S touto technikou se můžeme běžně setkat i přímo, např. během osobních bezpečnostních prohlídek na letištích, nebo zprostředkovaně, kdy je tato metoda použita např. v lékařství (jedná se třeba o diagnostiku nádorových onemocnění a metabolických poruch). Metoda je nezastupitelná pro kriminalisty (např. v souvislosti s identifikací drog, detekcí výbušnin, identifikací pachatelů zvláště nebezpečné trestné činnosti, apod.), hmotnostní spektrometrie je rozhodujícím nástrojem antidopingových kontrol, používá se v archeologii (při datování stárí předmětů) a geologii, v monitorování kvality životního prostředí, v toxikologii, chemii (zde třeba při sledování průběhu chemických reakcí), při kontrole kvality potravin, zemědělských produktů nebo předmětů denní potřeby obecně (dětské zboží, kosmetika, apod.). Hmotnostní spektrometry jsou součástí výbavy většiny vesmírných sond i některé speciální vojenské techniky. Farmaceutické firmy používají hmotnostní spektrometrii při hledání nových účinných látek „šitých“ na míru. Hmotnostní spektrometrie se používá i jako zobrazovací technika. Významnou úlohu hraje hmotnostní spektrometrie v otázkách národní bezpečnosti: technika dokáže odhalit a identifikovat látky, které mohou být zneužity při

terorismu a bioterorismu. Základní schéma obecného hmotnostního spektrometru ukazuje obr. 1.

Učebnicová definice říká, že hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda, která využívá separace urychlených ionizovaných částic (iontů) ve vakuu, a to podle jejich hmotnosti při jejich průchodu magnetickými a elektrickými poli. Hmotnostní spektrometr se skládá z pěti základních modulů. První z nich se váže ke vkládání vzorků (analyzovat lze téměř všechna skupenství). Druhý modul se týká ionizace vzorku, čili převedení analyzovaných elektroneutrálních molekul do nabitě formy. Vyrábíme ionty nesoucí kladný náboj (kationty) nebo záporný náboj (anionty) a způsobů, jak „výrobu“ provést, resp. jejich modifikací, existují desítky. Podobně je to se třetím modulem, tedy s hmotnostním analyzátozem. Metod analýzy hmotností iontů je celá řada, pro ilustraci jmenujme alespoň lineární iontovou past, iontový cyklotron, orbitrap a analyzátor z doby letu. To jsou moderní typy analyzátorů, které se v současnosti široce používají. Poslední dva moduly na obr. 1 pak zahrnují detekci iontů a zpracování získaných dat příslušnou výpočetní technikou. Všimněme si, že část celého procesu, zvláště analýza a detekce iontů, probíhá za vakua. A právě náklady na vakuovou techniku představují značný podíl z ceny celého přístroje. Relativně vysoká cena je snad jedinou nevýhodou hmotnostních spektrometrů.

Zařízení mohou být velmi malá a přenosná, ale jsou i typy spektrometrů, které měří několik metrů a váží řádově tuny. Složitost spektrometrů se řídí požadavky na kvalitu informace, kterou přístroj dává a samozřejmě platí, že čím je informace detailnější, tím je přístroj dražší. Takže lze pořídit přístroj za desítky milionů korun, ale třeba i za „pouhý“ milion korun. Jedno z těch dražších zařízení je instalováno v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd v Praze a stojí kolem 70 milionů korun (obr. 2). Jde o tzv. iontový cyklotron, jehož jádrem je supravodivý magnet o intenzitě pole 9,4 T. Srdcem tohoto spektrometru je cyklotronová cela, ve které jsou měřené ionty střídavě vybužovány radiofrekvenčními pulsy a následně detegovány. Každý z iontů je charakterizován svojí cyklotronovou frekvencí (té odpovídá hmotnost měřeného iontového druhu)



Obr. 1. Obecné schéma hmotnostního spektrometru



Obr. 2. Iontový cyklotron Bruker APEX-Q

a amplitudou detegovaného signálu (tomu zase odpovídá množství resp. počet analyzovaných iontů). Měření hmotností na tomto přístroji je extrémně přesné a dává přímou informaci o elementárním složení měřených iontů: víme tedy, z kterých prvků se měřené sloučeniny skládají. Iontový cyklotron, podobně jako jiné typy hmotnostních analyzátorů, poskytuje tzv. kolizní nebo produktová spektra. Jde o speciální typy analýz, ze kterých lze získat i detailní strukturní informace o měřených látkách.

Hmotnostní spektrometrie byla vyvinuta počátkem 20. století a původně byla využívána zvláště ve fyzice a chemii, mj. byly pomocí této metody objeveny stabilní isotopy prvků. Po dlouhou dobu pak hmotnostní spektrometrie byla hlavní metodou analýzy ropných produktů a analýzy těkavých organických látek obecně. Během posledních dvaceti let se použití metody rozšířilo snad do všech oblastí přírodních věd, od geologie, přes fyziku, astronomii a chemii k biologii, k analýze životního prostředí, do farmacie a medicíny. Za vývoj technik hmotnostní spektrometrie byly uděleny celkem čtyři Nobelovy ceny za fyziku nebo chemii, ale využití této techniky bylo zásadní pro udělení i řady dalších Nobelových cen. Poslední Nobelova cena vyloženě za hmotnostní spektrometrii byla udělena Koichi Tanakovi a Johnu Fennovi v roce 2002. Bylo to za vynález ionizačních technik, které umožňují analyzovat i velmi velké a složité látky, jako jsou bílkoviny a nukleové kyseliny. Jednalo se o techniku desorpce a ionizace laserem za přítomnosti matrice (matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI) a ionizaci elektrosprejem (electrospray ionization, ESI). Objev těchto ionizačních technik dal vzniknout zcela novým odvětvím biologických věd, např. proteomice. Díky moderním hmotnostně spektrometrickým metodám lze nyní nejenom jednotlivé bílkoviny identifikovat, ale rovněž i zkoumat interakce mezi nimi a jinými biomolekulami, zjišťovat funkce jednotlivých bílkovin nebo jejich komplexů. Díky hmotnostní spektrometrii můžeme na molekulární úrovni zkoumat a následně ovlivňovat základní buněčné procesy.

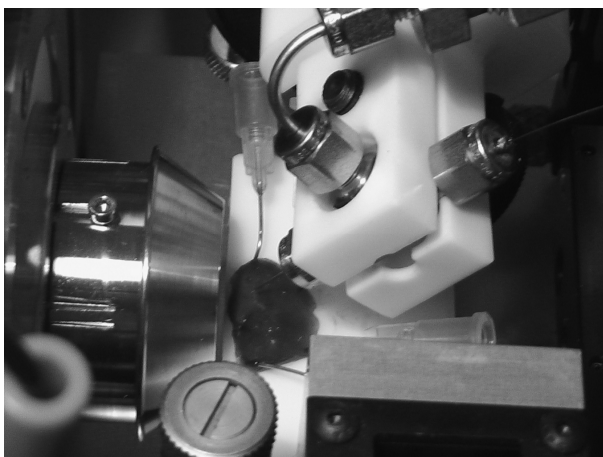
Proč právě hmotnostní spektrometrii?

Na rozdíl od jiných analytických přístupů tato metoda vyžaduje opravdu nepatrné množství měřené látky, např. 10^{-12} g. Je to nepředstavitelně malé množství, a proto se hmotnostní spektrometrie často používá ve stopové analýze čehokoli organického i anorganického. Další důležitá vlastnost této techniky tkví v její schopnosti „poradit si“ i s velmi komplikovanými směsmi látek a strukturní informací poskytnout rychle. Proto je hmotnostní spektrometrie v biologii metodou nezastupitelnou: umožňuje analyzovat i tak komplikované biologické matrice, kterými jsou lidská tkáň a tělní tekutina. Těmto biologickým aplikacím se věnují jen některá národní výzkumná pracoviště.

Hmotnostní spektrometrie ovšem zasahuje i do řady jiných oborů. Po České republice jsou „rozesety“ stovky různých hmotnostních spektrometrů, ovšem málo o nich veřejnost ví. Navíc se dá očekávat další narůstající uplatnění hmotnostní spektrometrie, které plyne ze tří moderních trendů posledních několika let. Prvním je miniaturizace přístrojů, druhým je zavedení nových ionizačních technik, které pracují za atmosférického tlaku a běžné teploty (hovoříme o tzv. „ambient“ technikách) a třetím trendem je pak zavádění nových progresivních aplikací, jako je třeba hmotnostní mikroskopie.

Co se týče miniaturizace, zde výrobci směřují k přenosným spektrometrům, které v terénu budou schopny odhalit, zdali zkoumané objekty (včetně lidí) nepřišly do styku s trhavinami, drogami nebo jinými zakázanými látkami, zdali dovážené zemědělské produkty, např. víno, opravdu pochází z deklarované země původu a nebylo zakázaným způsobem upravováno, či detegovat chemické a biologické zbraně, ať již při vojenském nasazení nebo při ochraně civilistů před teroristickým útokem. V těchto případech obsluha spektrometr používá jako „černou skříňku“, tedy se moc nezajímá o procesy, které ve spektrometru probíhají. Spektrometr dává informaci, že buď je vše v pořádku, anebo ne. Pak je třeba, aby vzorek postoupil na další, detailnější analýzu.

Se zaváděním nových ionizačních technik, které pracují za atmosférického tlaku a teploty, se otevírají možnosti k obecně povrchové analýze, a to i živých objektů. Lze sledovat podaná léčiva, která se vylučují na povrchu lidského těla, a jejich farmakokinetiku, je snadné analyzovat povrchové molekuly na jednotlivých částech živých rostlin, apod. Průlomovou technikou se jeví tzv. desorpční elektrosprej (desorption electrospray, DESI), jehož principy a první aplikace se objevily v časopise Science v roce 2004. Následovala celá řada dalších technik, např. desorpční chemická ionizace za atmosférického tlaku (desorption atmospheric pressure chemical ionization, DAPCI), desorpční fotoionizace za atmosférického tlaku (desorption atmospheric photoionization, DAPPI), extraktivní elektrosprej (extractive electrospray, EESI), přímá analýza v reálném čase (direct analysis in real time, DART), MALDI za atmosférického tlaku (atmospheric MALDI) a celá řada dalších. Všechny tyto metody mají jednu zajímavou vlastnost: vzorek je analyzován přímo, často bez nutnosti jakkoli vzorek předčišťovat nebo kon-



Obr. 3. Zařízení pro přímou analýzu tkáně technikou desorpčního elektrospreje

centrovat. Odpadá tím často časově náročná úprava vzorku, která byla nezbytná třeba před analýzou tělních tekutin a tkání (obr. 3).

Z nových aplikací hmotnostní spektrometrie poslední doby se nelze nezmínit o hmotnostní mikroskopii. V anglosaské literatuře se hovoří o technice „mass imaging“, která je v současnosti hodnocena americkou agenturou FDA (U.S. Food and Drug Administration) a očekává se, že během následujících pěti let bude uznána za standardní zobrazovací techniku. U hmotnostní mikroskopie jsou snímány minimálně dvourozměrné obrazy povrchu, přičemž tyto jsou získány počítačovou rekonstrukcí iontových druhů, které jsou ze zobrazovaného objektu desorbovány. Děje se tak rastrovacím způsobem, a to při prostorovém rozlišení zatím v řádu desítek až stovek mikrometrů podle typu primárního ionizujícího svazku, kterým může být laser (pak hovoříme o MALDI hmotnostní mikroskopii), svazek iontů (např. C_{60}) nebo svazek nabitých kapiček (DESI mikroskopie). Oproti ostatním zobrazovacím technikám hmotnostní mikroskopie nedává pouze odpověď typu „je tam nějaký objekt“, ale současně i informaci o chemické povaze příslušného zkoumaného objektu. Hmotnostní mikroskopie je tedy ideálním nástrojem pro identifikaci a charakterizaci tzv. biomarkerů, např. molekul charakterizujících třeba patologický stav. Můžeme hodnotit mj. nádorovou tkáň, případně subtypy tumorů na

základě souboru bílkovin nebo jiných specifických molekul, které jsou ve zdravých tkáních zastoupeny jinak. Pokud bychom hledali molekulární znaky nějakého infekčního onemocnění, lze přímo porovnávat tkáň zdravou a infikovanou. Můžeme se dívat, do jakých orgánů se deponuje podané léčivo a jak je metabolizováno. Můžeme sledovat, jaká je proteomická odezva na příslušný léčebný proces. Velkou budoucnost hmotnostní mikroskopie včas rozpoznal i průmysl, takže v současnosti není velká hmotnostně-spektrometrická firma, která by nenabízela jako hotový komerční produkt hmotnostní mikroskop, ať už na principu MALDI nebo zařízení užívající primární svazek desorbujících iontů. V odborné literatuře se začala objevovat i řada dalších speciálních aplikací, které komerční subjekty zatím nenabízejí. Jedná se zejména o možnosti 3D analýzy a dále o opravdovou mikroskopii v rámci jediné buňky.

Tyto speciální aplikace potvrzují obecný trend posledních 20 let ukazující, že hmotnostní spektrometrie se již dávno neprofiluje jako čistě analytická technika. Její aplikace zasahují do řady různých a nepříbuzných oborů a my se můžeme těšit, kterou novou vědní disciplínu hmotnostní spektrometrie otevře nebo jejíž vznik alespoň bude iniciovat. Není bez zajímavosti, že v průběhu své zhruba stoleté existence byla hmotnostní spektrometrie dvakrát označena vlastními předními odborníky oboru jako technika bez perspektivy, jako metoda, která již splnila svůj účel a spěje k zániku. Dynamický rozmach posledních let ukazuje, že skutečnost je zcela jiná.

Podporováno granty MŠMT (LC07017 a MSM6198959216) a institucionálním záměrem AVOZ50200510.

V. Vidová^a, K. Lemr^a, and V. Havlíček^b
(^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc, ^b Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague): **Recent Trends in Mass Spectrometry**

Mass spectrometry is an indispensable tool in modern analytical laboratories. It has also gained significant reputation in many areas of non-chemical activities. The paper summarizes the most recent analytical developments in the field. It puts emphasis on ambient ionization techniques, modern high-resolution analyzers and mass microscopy as an emerging optical/analytical tool.