

Petites molécules et spectrométrie de masse : le reflux et le flux.

Pr François Couderc

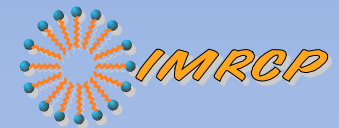
Université Paul Sabatier
Toulouse France



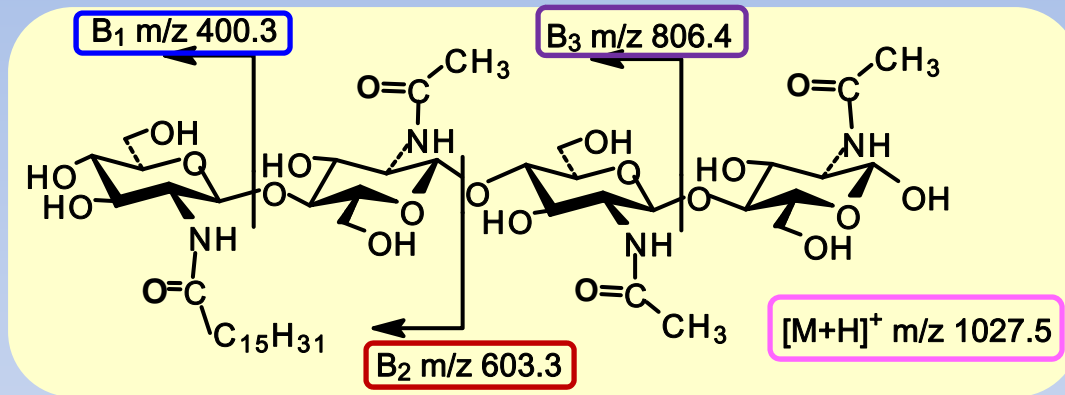
On avait toujours plus sensible et toujours plus sélectif: la MS/MS

- MRM: sélectivité de la MS/MS pour le dosage de molécules à faible concentrations.
- Exemple MRM « détournée » des facteurs Myc

Stratégie MRM des facteurs Myc

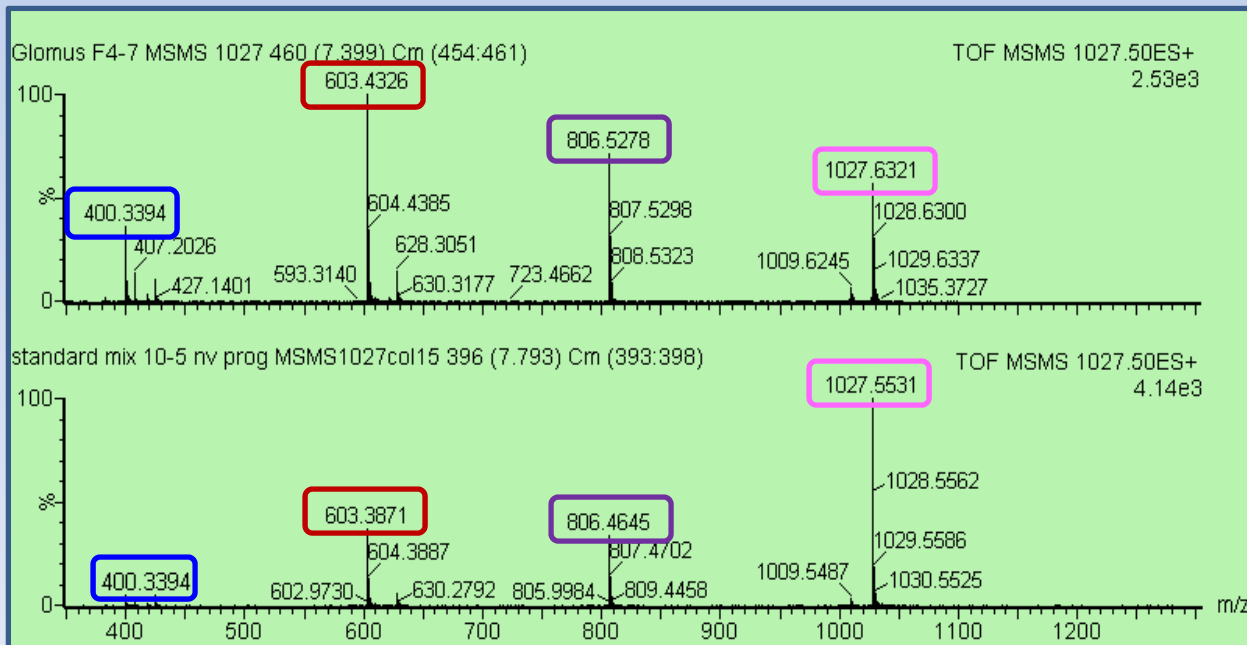


(300L d'exudats de racines mycorhizées)



DP4 C16:0 3 transitions

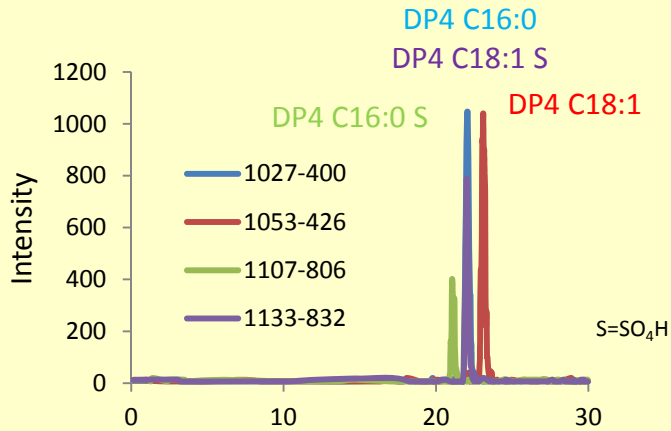
1027.6 → 400.3
603.4
806.5



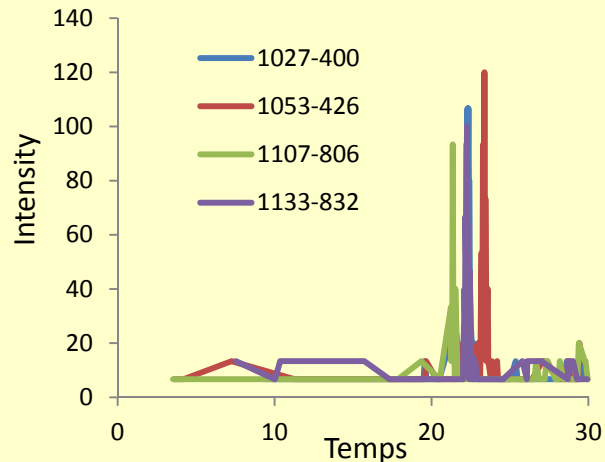
Validation:

transitions dans les bonnes proportions au bon t_R .

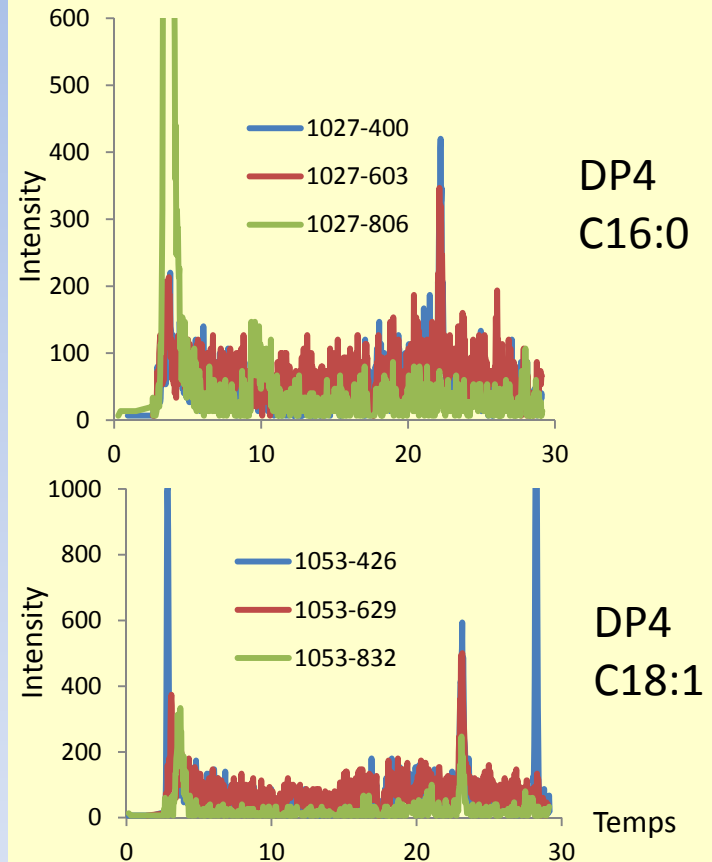
Standard mix à $0.7 \cdot 10^{-8}M$



Standard mix à $0.7 \cdot 10^{-9}M$



3 Millions spores



LCOs détectés dans les exudats de spores
(10^{-12} moles pour 3 Millions spores!)

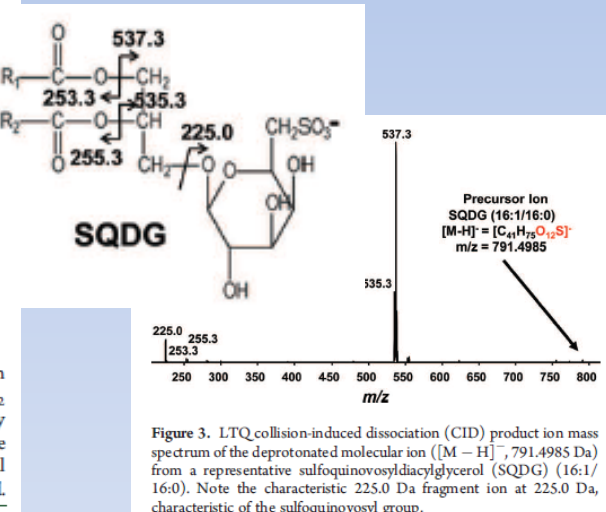
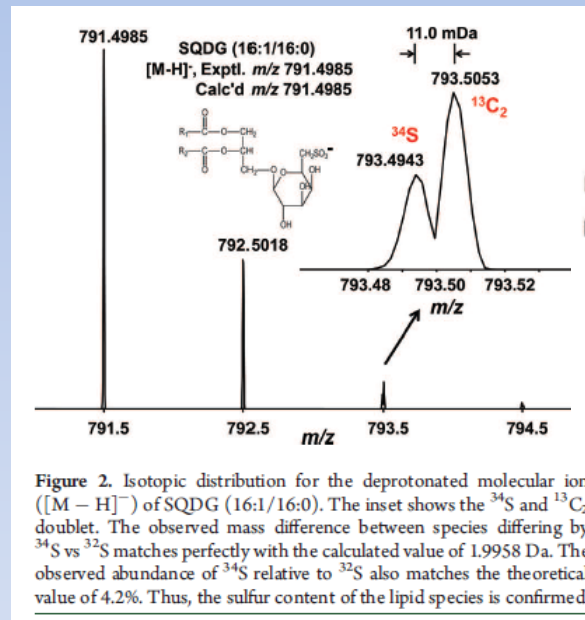
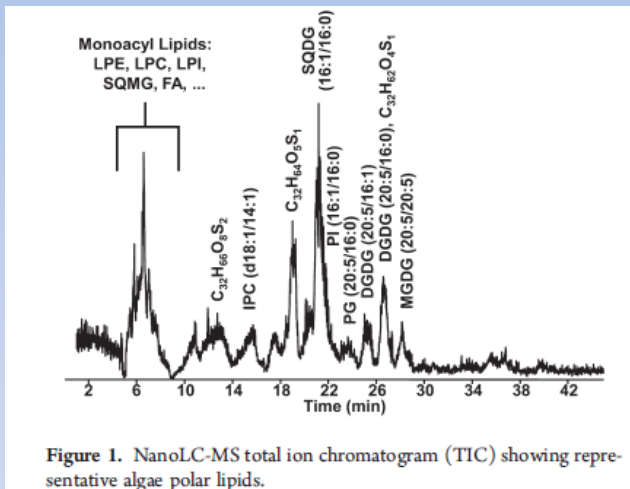
Absence de pics dans les blancs

Toujours plus de sélectivité grâce à la haute résolution

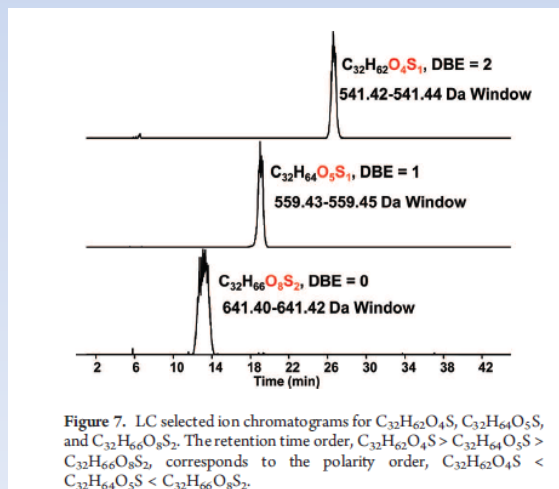
Sélectivité de la haute résolution pour l'identification
de la formule brute des ions et séparation d'ions
isobares.

« toujours plus » de sélectivité: la haute résolution

• Exemple sur la lipidomique



SQDG: sulfoquinovosyldiacylglycerol C16:0/C16:1
résolution à 200,000 à 400.
He H. et al Energy & Fuels 2011, 25, 4770. Alan Marshall
'sLab, Florida State University
Phenylhexyl stationary phase 20:80 H2O:MeOH 10mM
AcONH4. ESI- LTO FTICR MS.
Nannochloropsis oculata, algue verte



Analyse toujours plus rapide et sélective...

- Identification aisée:
 - MS^E
 - IM/MS
- Préparation d'échantillon simplifiée:
 - « ambient MS » proche du monde réel.

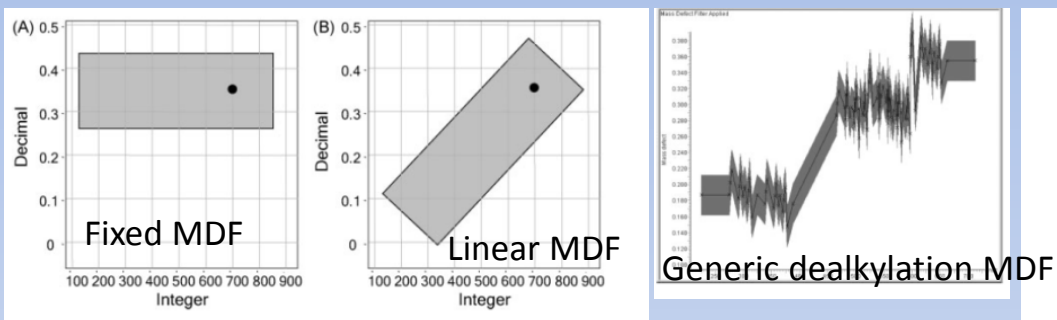
Exemples

Desorption electrospray ionization DESI

Paper spray ionisation PSI

Toujours plus sélectifs:

Utilisation de la haute résolution en LC-ESI/qTOF: mass defect filtering (MDF)



Plumb RS et al Rapid Commun Mass spectrom 2006, 20, 1989

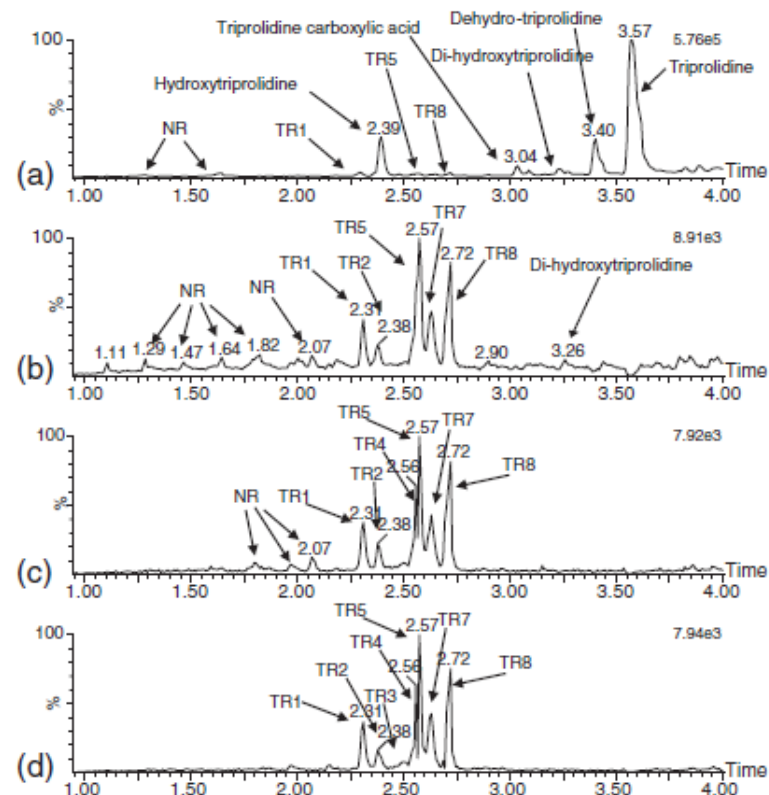
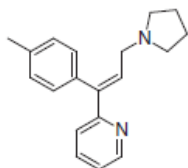


Figure 2. Representative (a) full scan, (b) linear mass defect filtered (± 50 mDa), (c) linear mass defect filtered (± 20 mDa) and (d) C-heteroatom dealkylation-based mass defect filtered (± 20 mDa) ion chromatograms for triprolidine (50 μ M) incubated with NADPH-fortified human liver microsomes in the presence of glutathione (1 mM).

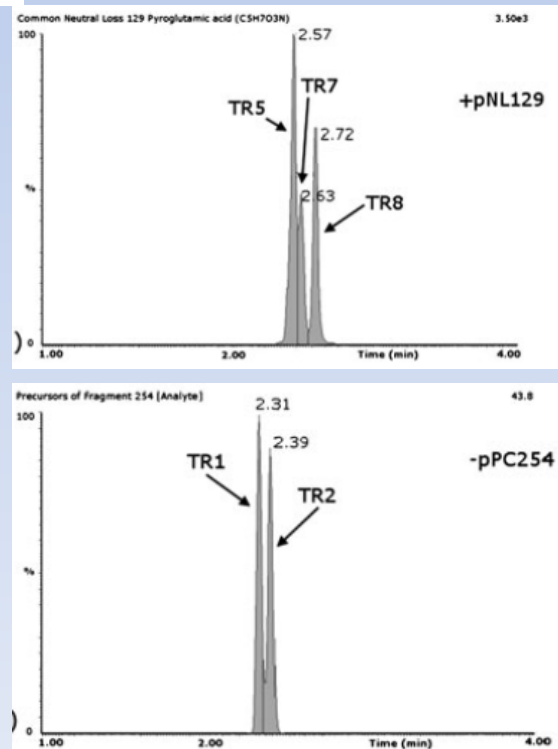
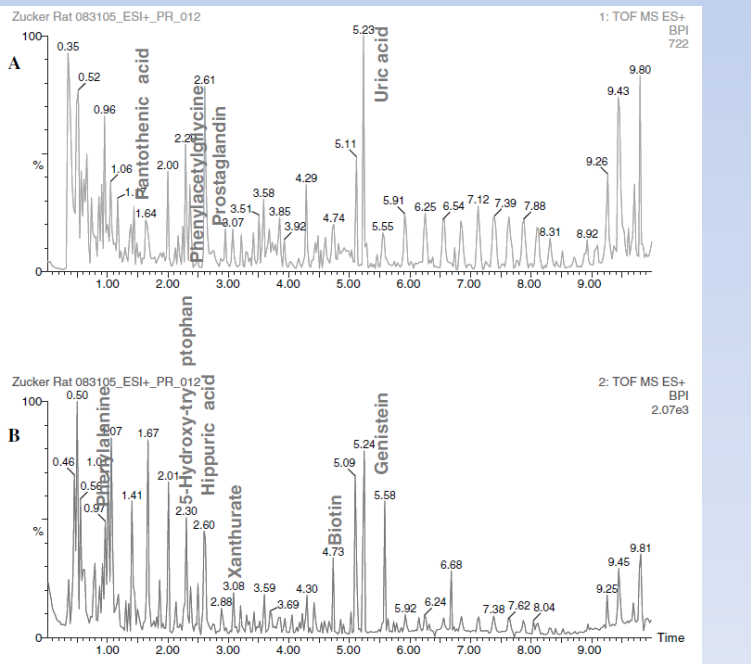
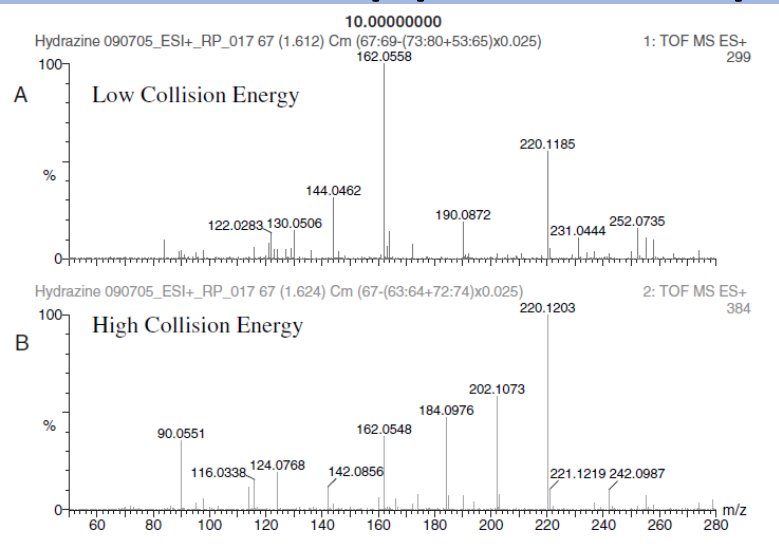
				m/z	Mass error (ppm)	m/z	Mass error (ppm)
Triprolidine MW 278.1783 3.56 min	TR1	2.31	P + GSH	584.2573	5.2	582.2406	3.3
	TR2	2.38	P + GSH	584.2635	15.8	582.2379	-1.3
	TR3	2.46	P + GSH	584.2598	9.5	ND	NA
	TR4	2.54	P + GSH + O	600.2477	-2.5	ND	NA
	TR5	2.57	P + GSH + O + 2H	602.2598	-0.5	ND	NA
	TR6	2.61	P + GSH + O	600.2446	-7.6	ND	NA
	TR7	2.63	P + GSH + 2H	586.2709	1.7	ND	NA
	TR8	2.72	P + GSH + O + 2H	602.2581	-3.3	ND	NA
	TR9	2.88	P + GSH + 2O	616.2488	7.7	ND	NA
	TR10	2.92	P + GSH + 2O	616.2434	-1.1	ND	NA



Triprolidine
 $C_{19}H_{22}N_2$

Barbara JE et al Rapid Commun Mass spectrom 2011, 25, 3029

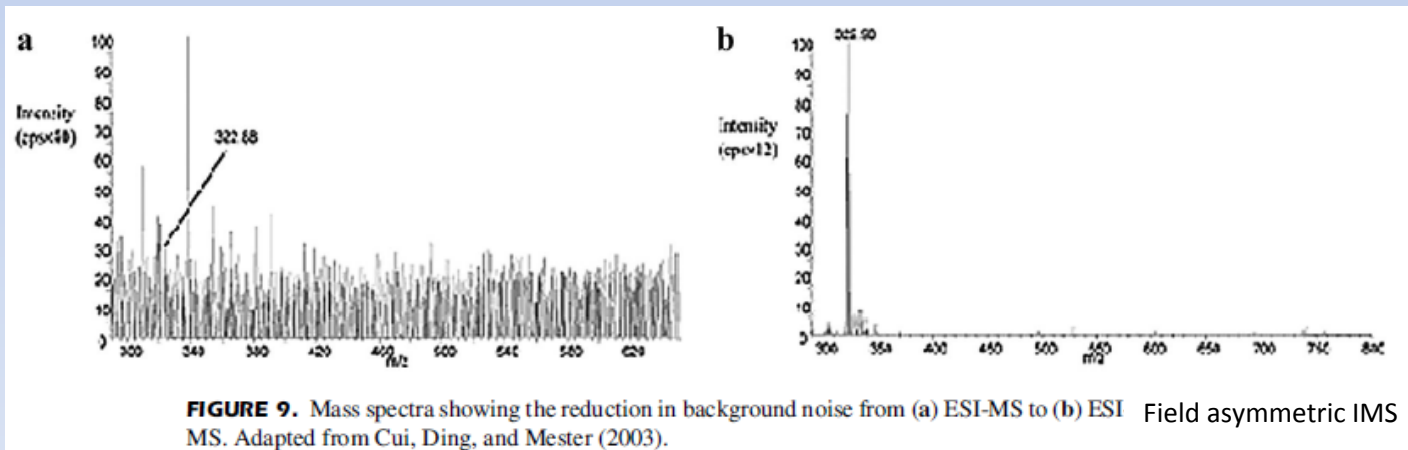
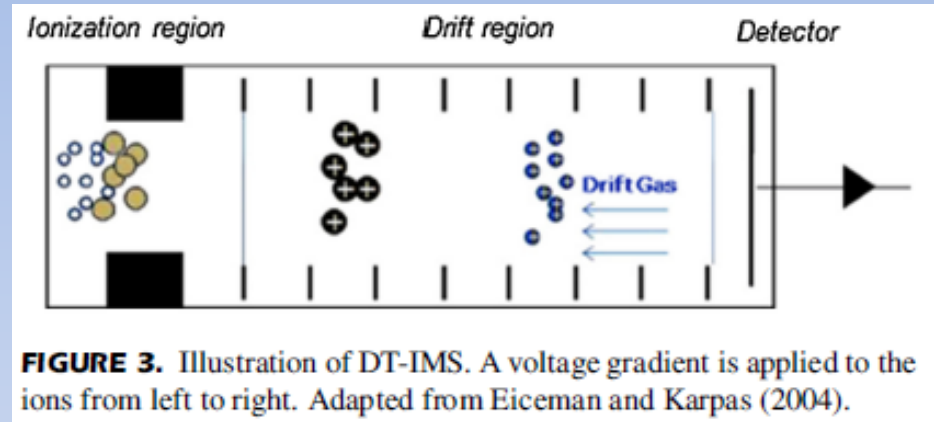
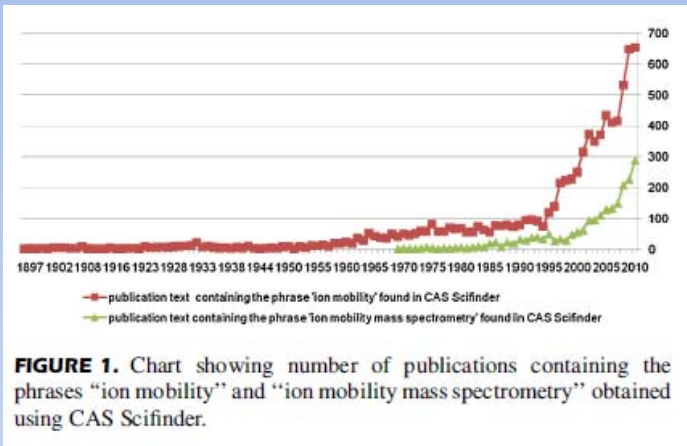
Une application particulière du MDF: la MS^E



Recherche «in silico» des ions dont la différence entre HCE/LCE et de 129.0426 (ac pyroglutamique).

À partir de l'ion m/z de 254.2199 (g Glu-dHAla-Gly-H₂O) dans HCE (absent LCE), recherche «in silico» des ions dans LCE ayant une différence compatible avec la masse de la triprolidine 278.1783.

Toujours plus de résolution! L'IM-MS?



Quelques études montrent des résolutions de 200, mais communément de 90.
200 équivaut à 200.000 en LC

Mais où en est IM-MS sur les petites molécules?

Exemple de l'analyse du sang

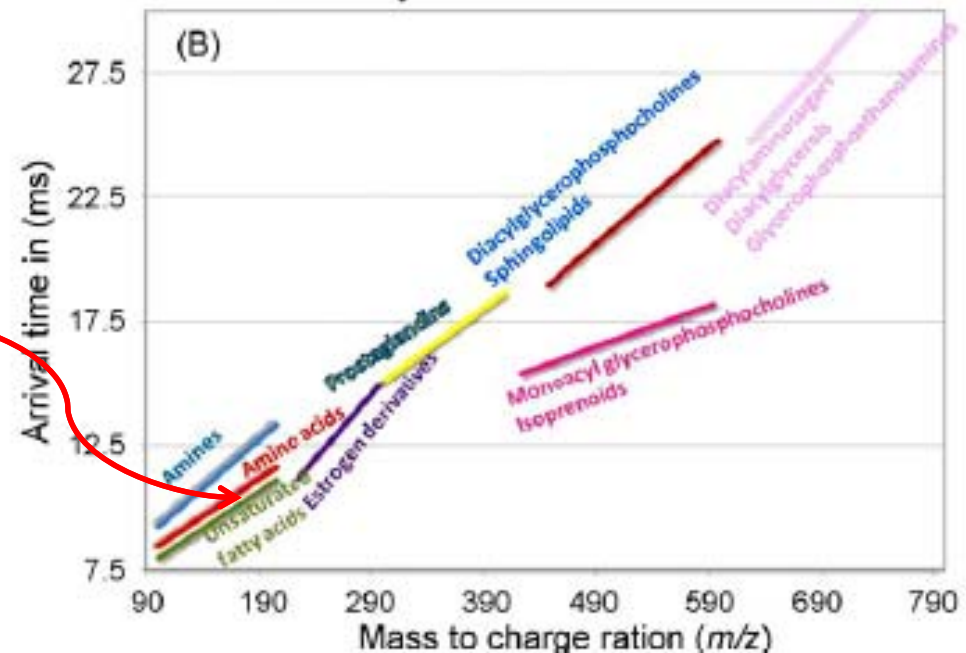
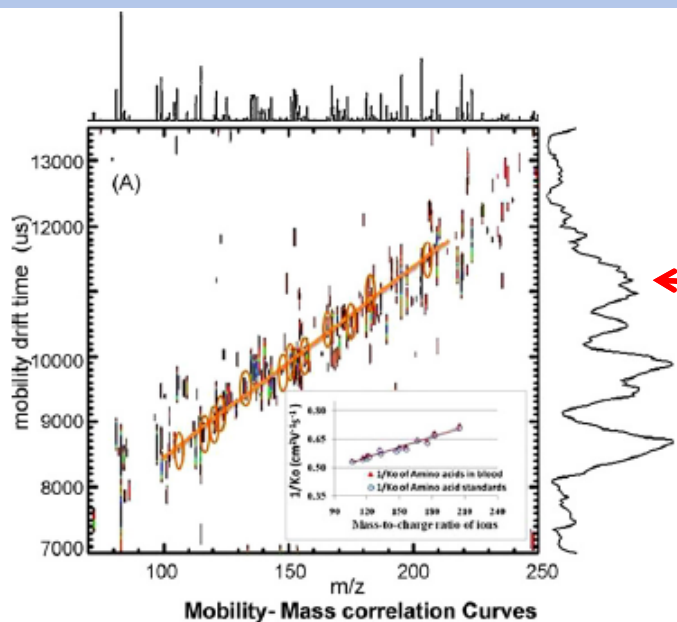
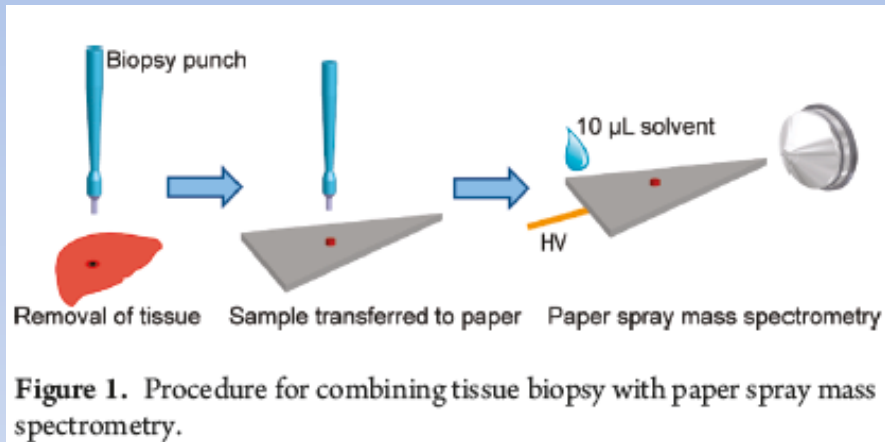


Fig. 6. (A) MMCC for amino acids detected in the blood extract. Peaks identified as amino acids in blood extract based on mass and reduced mobility data matched with that measured for standard solutions of amino acids. (B) MMCC for various classes of metabolites detected in the blood sample. Only protonated ions of metabolites constitute the MMCC (except for the sugars as sodium adducts).

Simplification dans la préparation d'échantillon: « Ambient MS »

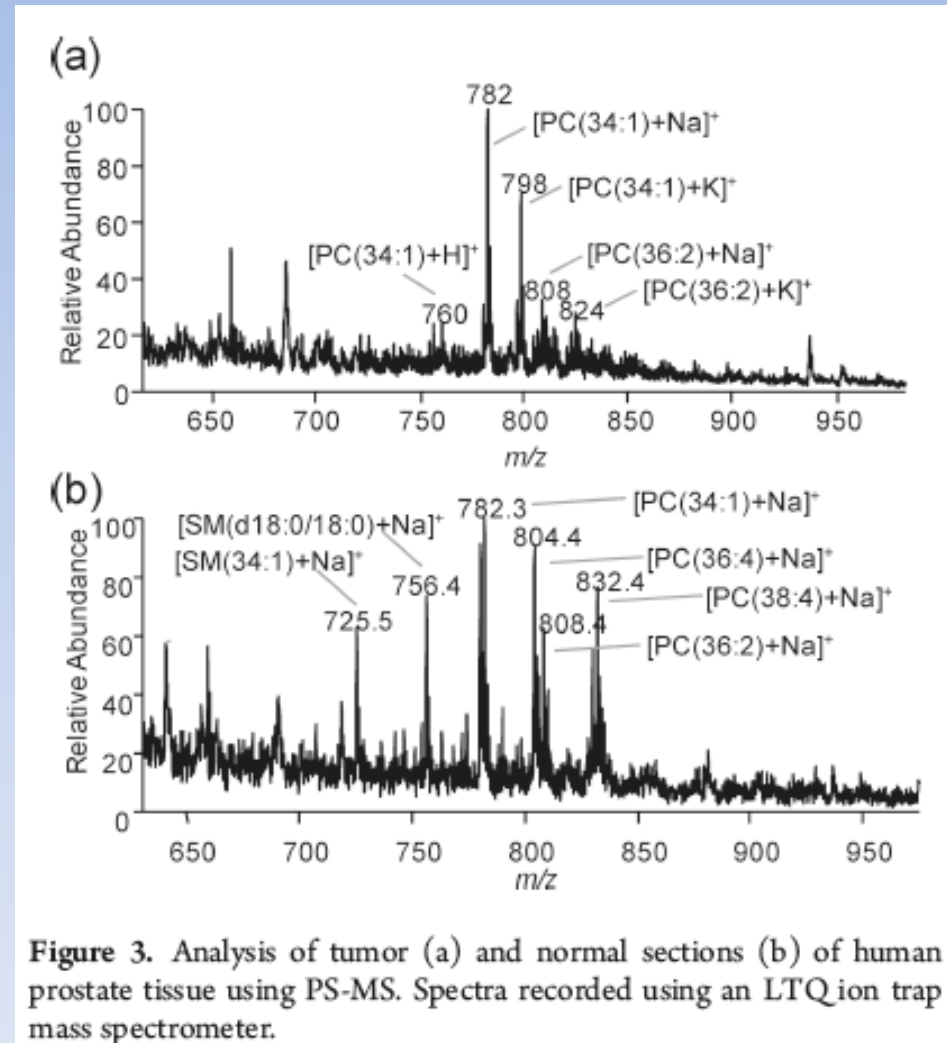
- La MS pour l'analyse d'échantillon dans leur environnement naturel « ambient »
- 20 modes ionisations « ambient » depuis 2000, à partir de l'EI, l'ESI, MALDI, GDI (gas discharge ionization), SSI (supersonic spray ionization)...
- **Exemples:**
 - Paper Spray MS
 - Desorption electrospray ionization

Paper Spray MS (2010)



Le signal varie en fonction de la concentration en méthanol dans le spray. Application aux catécholamines et imatimib, PCholine et SphingoM.

- Wang H *et al Anal. Chem.* 2011, 83, 1197.



Desorption electrospray ionization

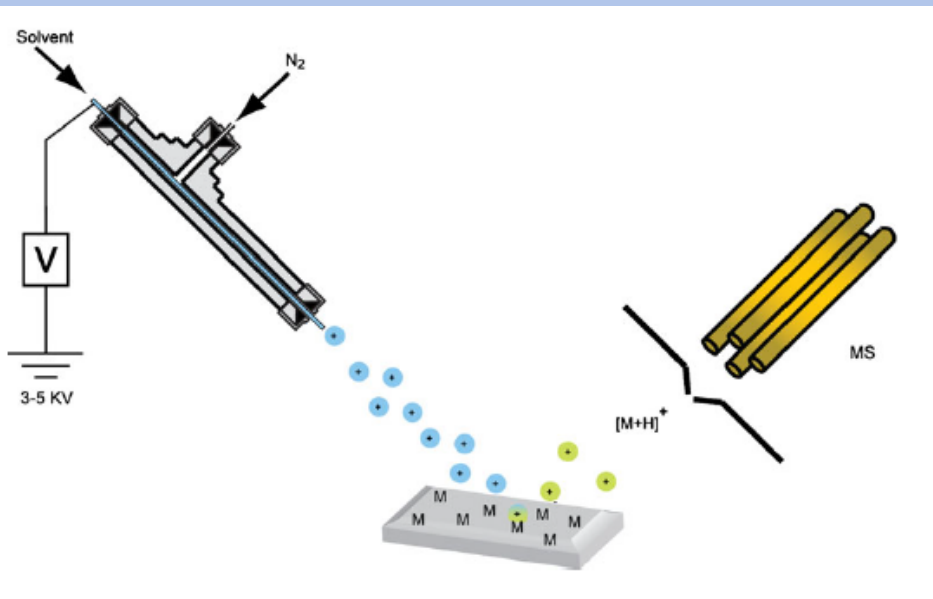
DESI/MS (2004)

Une porte ouverte pour l'imagerie par MS (MSI)

- Travaux pionniers d'imagerie:
 - Neuropeptides de neurone isolé de *Lymnaea stagnalis* (van Neelen PA et al **1993** *Org Mass Spectrom.* 28, 1542.) (MALDI)
 - Peptides et protéines de tissus d'hypophyse de rat (Caprioli RM et al **1997**, *Anal. Chem.* 69, 4751.)(MALDI)

Principe de la DESI

- Bombardement par gouttelettes +/- de milieu H₂O:MeOH acides ou basiques
- Ionisation: Processus proche de l'ESI.
- Ionisation dépend de l'angle, du solvant,
- Effets suppresseur d'ionisation dépendant de l'échantillon...
- Il ft: désorption par le spray des molécules de l'échantillon, transfert dans les gouttelettes et processus d'ionisation identique à ESI



DESI-MSI operating parameters were as follows: sprayer solvent 70/30 methanol/water, flow rate 2 $\mu\text{L}/\text{min}$. DESI parameters were as defined elsewhere:³² impact angle 55°; tip-to-surface distance 2 mm, and tip-to-inlet distance 4 mm. Electro spray capillary voltage was 4.5 kV. The surface scan rate along the tissue (*x*-dimension) was 132 $\mu\text{m}/\text{s}$, and step size in the *y*-dimension was 200 μm to generate images with pixel size 200 \times 200 μm .

Application DESI/MS à l'imagerie sur coupe de tissus de rats

Quid des effets suppresseurs d'ionisations?

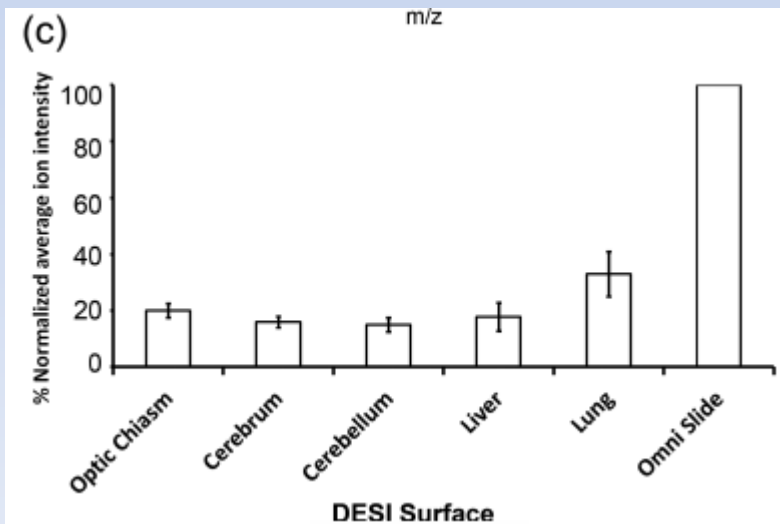
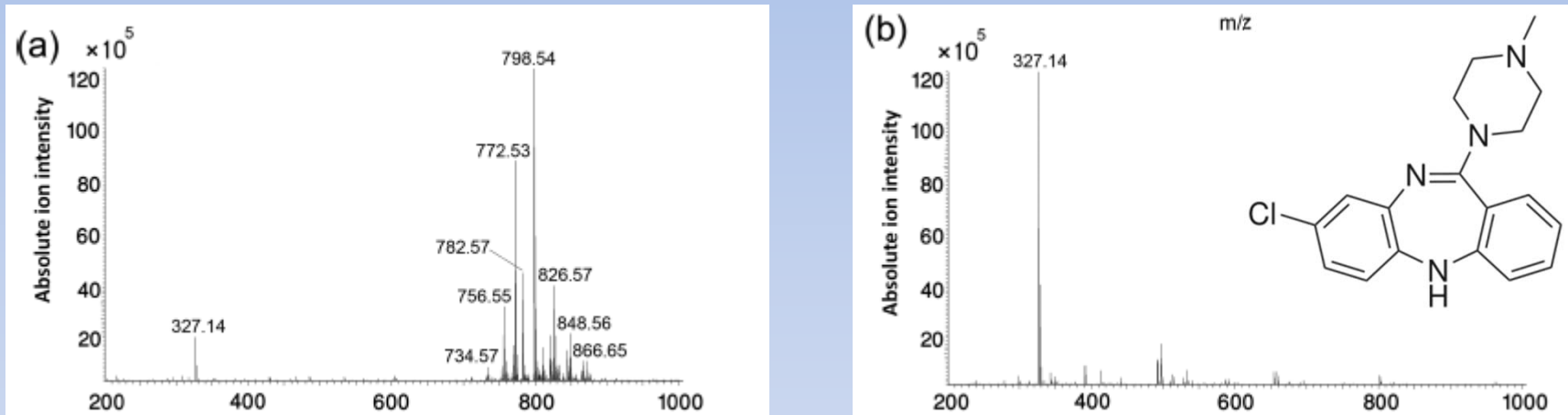


Figure 1. Positive-ion mode full-scan DESI mass spectra of 1.5 ng of clozapine micropipetted (a) on top of a 6 μm coronal section of rat brain and (b) on a sample spotting location on an Omni-Slide hydrophobic array. (c) Ion suppression effect in performing DESI on 1.5 ng of clozapine from the surface of different animal tissue sections. Average ion intensities are normalized to Omni-Slide. Error bars represent standard deviation from the mean for four replicates.

Prosolia **Omni Slides™ Hydrophobic Arrays**: A glass line of DESI substrates for reproducible sample spotting and improved signal stability in high-throughput and quantitative studies. No ion suppression!
Vismeh R et al 2012 Anal.Chem. 84, 5439

Application DESI/MS à l'imagerie sur coupe de tissus de rats

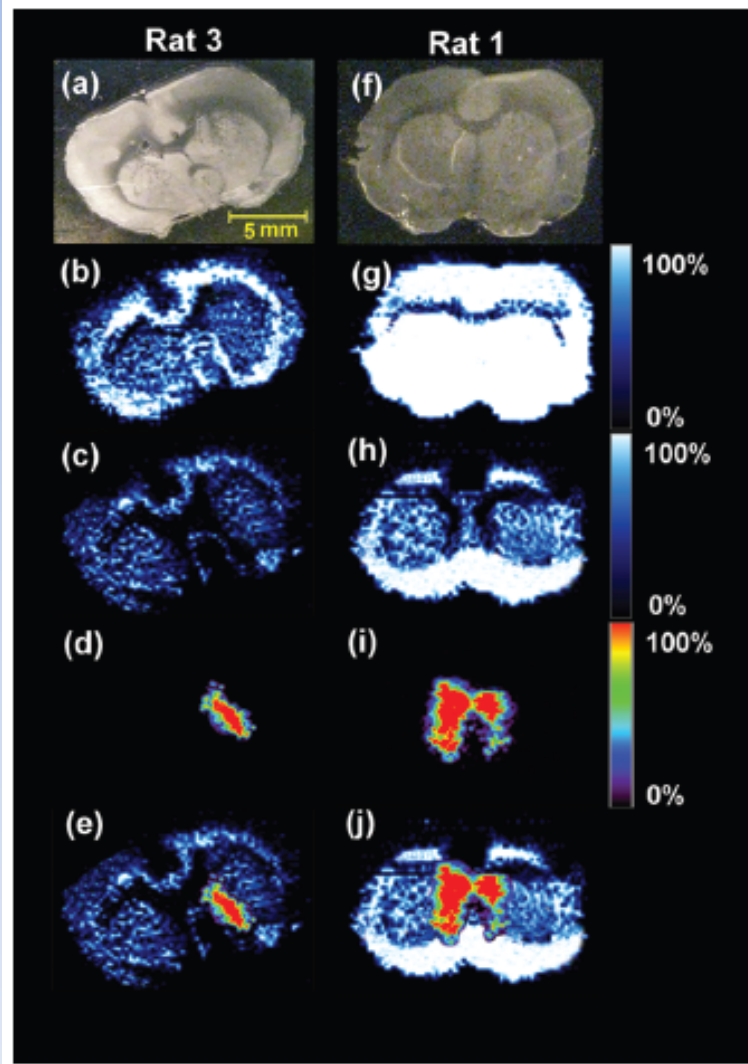


Figure 3. Optical and DESI-MS images of coronal brain sections from rats dosed with 2.5 mg/kg clozapine at 45 min postdose. Images from rat 3: (a) optical image of coronal brain section; (b–e) DESI-MS images of (b) background ion m/z 769.5, (c) background ion m/z 752.5, (d) clozapine, and (e) overlay of images c and d. Images from rat 1: (f) optical image of coronal brain section; (g–j) DESI-MS images of (g) background ion m/z 772.5, (h) background ion m/z 768.5, (i) clozapine, and (j) overlay of images h and i. Different background ions are selected only for visualization of different regions in brain sections. The same ions are present in both sections.

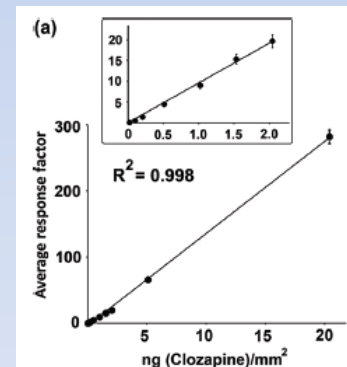


Figure 2. (a) Calibration curve for clozapine standards micropipetted on a coronal rat brain section using DESI-MSI. Average response factors were calculated for all scans in all rows of data that clozapine and IS were both detected with four replicates for each concentration. Surface concentrations are calculated on the basis of 4.9 mm² area for each spot; the inset shows linearity for lower concentrations. (b)

Loxapine= IS
6% de RSD pr dosage
1.5ng/2.5mm

Conclusion: encore plus!!!

- Rôle de la haute résolution
- Rôle de la fragmentation post source
- Amélioration de la séparation des espèces ante MS (IM)
- Problème d'obtention de fragments diagnostiques.
- **Doit-on enseigner la MS comme autrefois?:**
 - améliorer la compréhension de la répartition isotopique et de la haute résolution.
 - Parfaire l'interprétation grâce aux règles de parité afin d'identifier les ions...même si les banques de spectres en EI aident....