

Hmotnostní detekce v separačních metodách

MC230P75 2/0 Zk 2 kredity

doc. RNDr. Josef Cvačka, Ph.D.

Mgr. Martin Hubálek, Ph.D.

Ústav organické chemie a biochemie AVČR, v.v.i.

Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6

tel. 220 183 303

e-mail: cvacka@uochb.cas.cz



<http://www.mu-j-web.cz/MC230P75/>



Skupina Hmotnostní spektrometrie



Možnost práce na **diplomových a doktorských projektech**

- *strukturní analýza přírodních látek*
- *vývoj metod založených na MS, LC/MS a GC/MS*
- *vývoj instrumentace*
- *metabolomika, lipidomika, proteomika ...*

Plán přednášek

1/ **Základní pojmy.** Principy spojení GC, LC, CE a mikrofuidních technik s hmotnostním spektrometrem. Vlastnosti MS detektorů, jejich výhody, nevýhody a použití. Historie MS. [17.2. – JC]

2/ **Ionizační techniky I.** Ionizace elektrosprejem a nanoelektrosprejem. Chemická ionizace a fotoionizace za atmosférického tlaku. [24.2. – JC]

3/ **Ionizační techniky II.** Elektronová a chemická ionizace. MALDI. Ambientní ionizační techniky. [2.3. – JC]

4/ **Exkurze na ÚOCHB.** [9.3. – MH]

5/ **Analyzátory iontů I.** Kvadrupól. Iontová past. Průletový analyzátor. Sektorové analyzátory. Orbitrap. Iontová cyklotronová resonance. [16.3. – JC]

6/ **Analyzátory iontů II. a detektory iontů. Vakuové technika.** Separace na bázi iontové mobility. Tandemové a hybridní přístroje. Detektory. Vakuová technika. [23.3. – JC]

Plán přednášek

7/ **Volba podmínek** pro experimenty a praxe GC/MS, LC/MS a CE/MS. **Přehled instrumentace. Aplikace MS detekce** v environmentální, potravinářské a farmaceutické analýze. Metabolomika. [30.3. - JC]

8/ **Kvantitativní analýza.** Kvantifikace malých molekul pomocí GC/MS, LC/MS a CE/MS. [6.4. – MH]

9/ **Základní principy interpretace** spekter malých molekul. [20.4. - JC]

10/ **Aplikace MS detekce** v biologických vědách I. **Proteomika kvalitativní.** [27.4. – MH]

11/ **Aplikace MS detekce** v biologických vědách II. **Proteomika kvantitativní.** [11.5. – MH]

Hmotnostní detekce

MS je (téměř) ideální detektor pro GC, HPLC, UHPLC, CE ...

- vysoká citlivost
- vysoká selektivita a zároveň univerzálnost
- umožňuje kvantitativní analýzu (odezva závislá na koncentraci)
- umožňuje kvalitativní analýzu (informace o chemickém složení)
- výrazně nepřispívá k rozšiřování chromatografické zóny

Nevýhody:

- cena, vyšší provozní náklady, vyšší nároky na čištění
- někdy se uplatňují matriční efekty, odezvové faktory se mohou velmi výrazně lišit

Hmotnostní detekce - citlivost

Typická citlivost detektorů (hmotnost/ml)

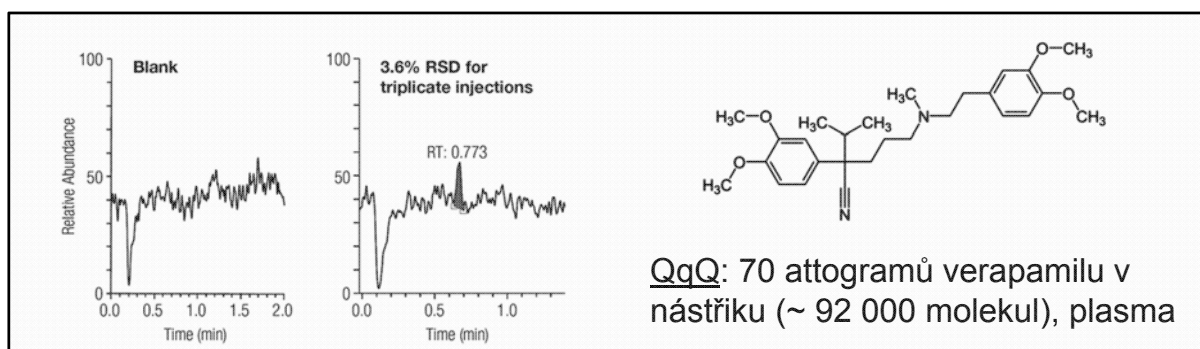
refraktometrický (LC) . . . μg

UV/VIS (LC) . . . ng

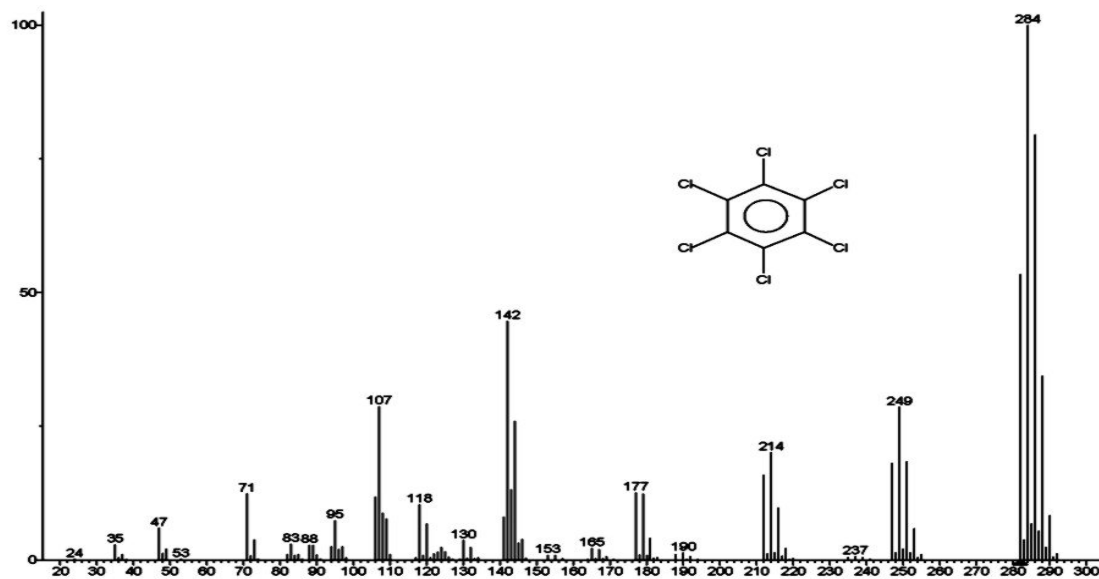
fluorescenční (LC) . . . pg

plamenově ionizační (GC) . . . pg

hmotnostně-spektrometrický (LC, GC) . . . pg

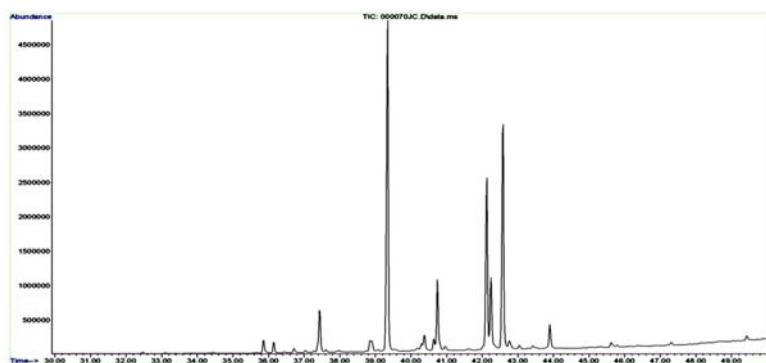


Hmotnostní detekce – kvalitativní analýza

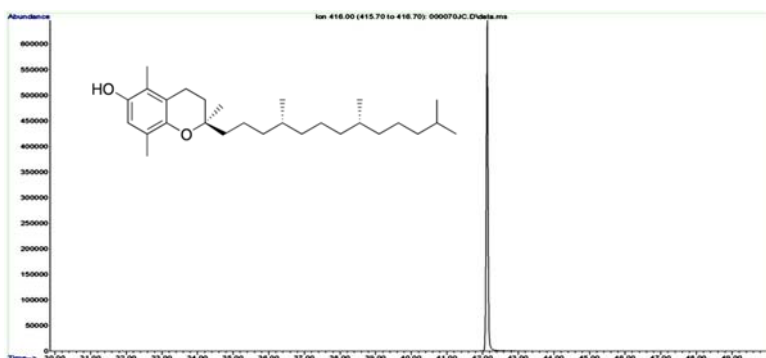


Na základě spekter lze charakterizovat (identifikovat) analyt.

Hmotnostní detekce – selektivita, univerzálnost

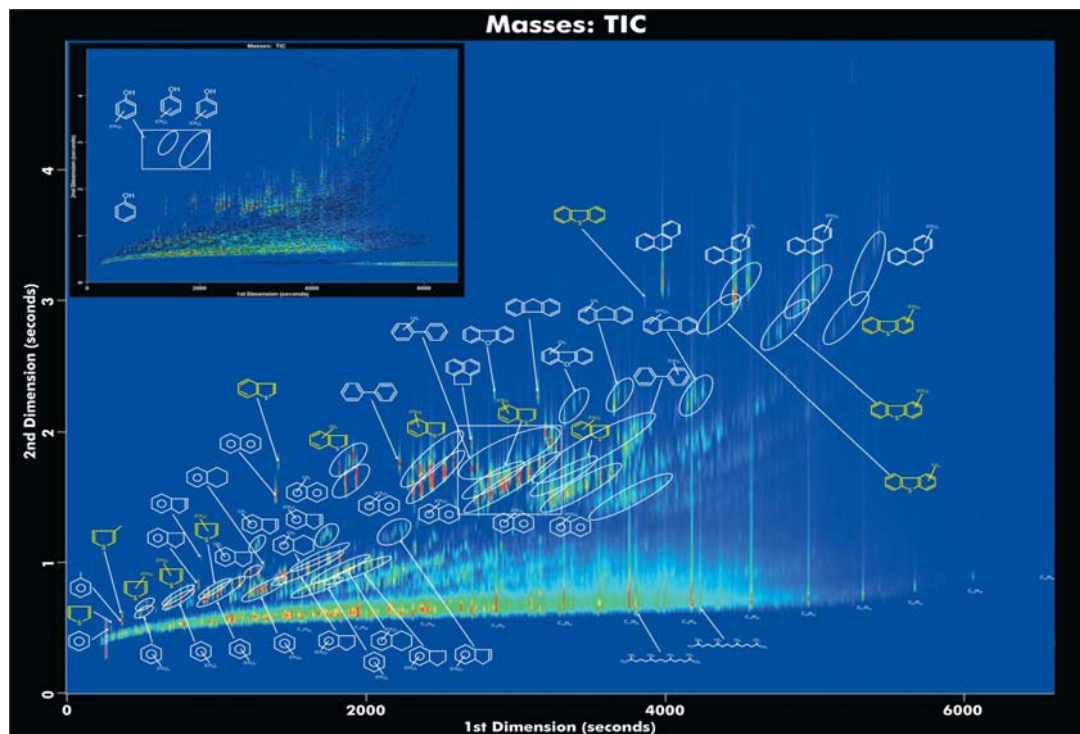


Celkový iontový proud
všechny látky obsažené ve směsi



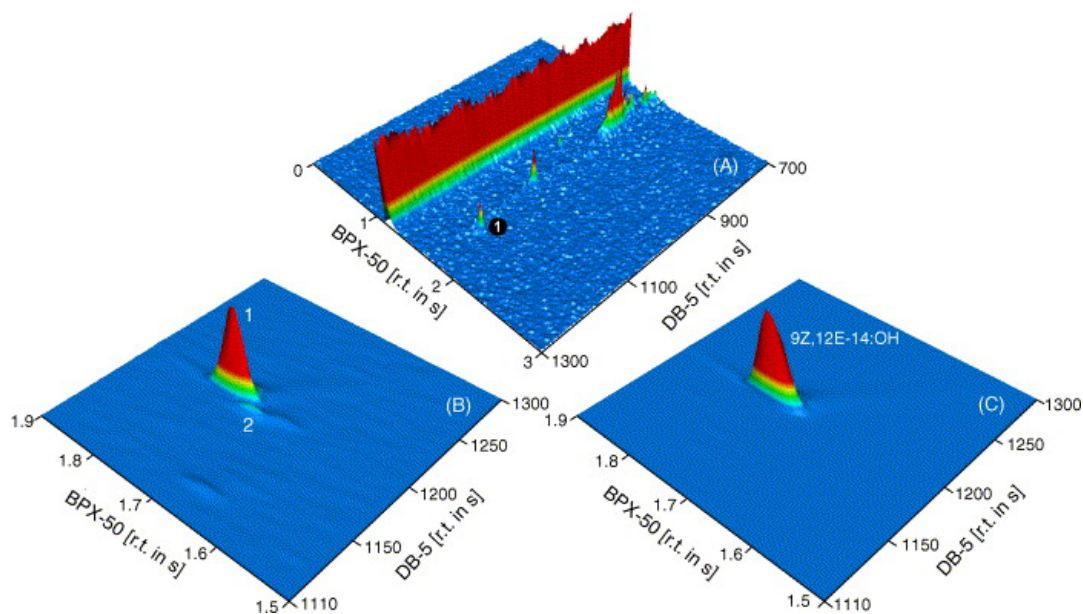
Vybraný ion
m/z 416 – jen vybraná
sloučenina (β -tokoferol)

MS & multidimensionální separace



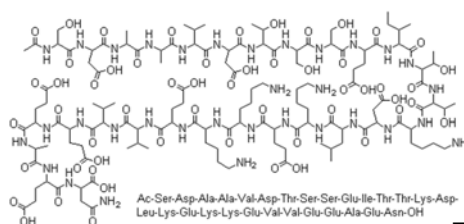
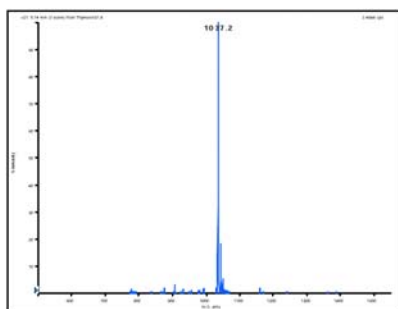
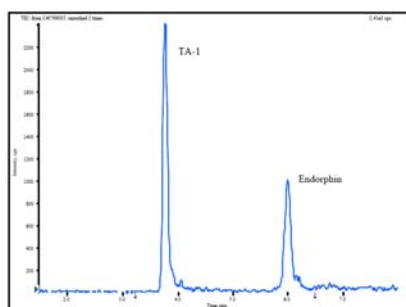
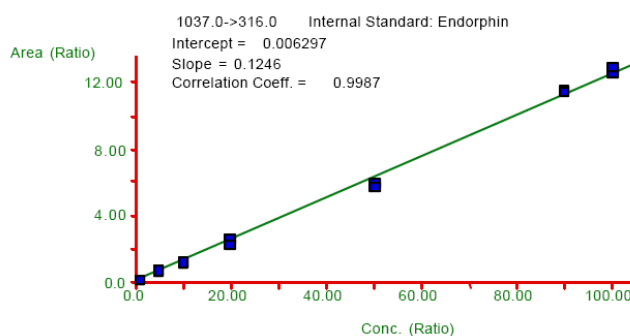
Vysoce účinných separací je dosaženo kombinací MS a multidimensionální GC (LC)

MS & multidimensionální separace



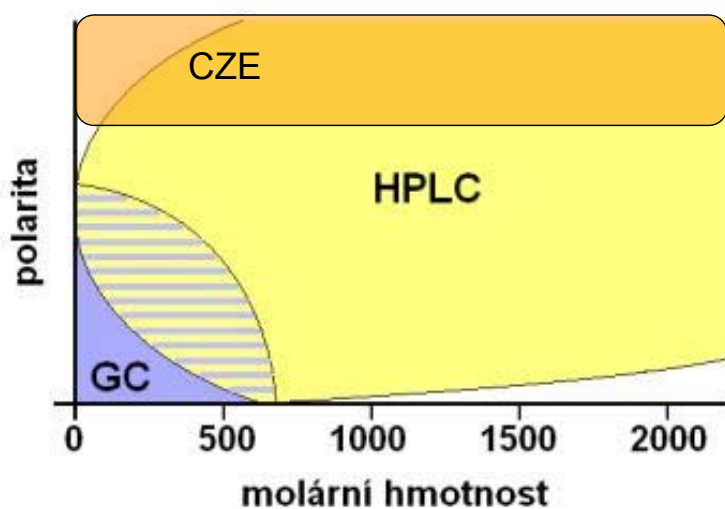
Kombinace účinných separací a vysokých citlivostí MS umožňuje detekovat ultrastopová množství látek.

Hmotnostní detekce – kvantitativní analýza

Thymosin α 1

MS (resp. MS/MS) je velmi vhodný způsob detekce pro kvantifikaci.

HPLC vs. GC vs. CE vs. SFC



LC/MS

- pro většinu polárních i nepolárních látek
- většina aplikací

GC/MS

- pro látky nízkomolekulární nepolární nebo málopolární
- množství aplikací

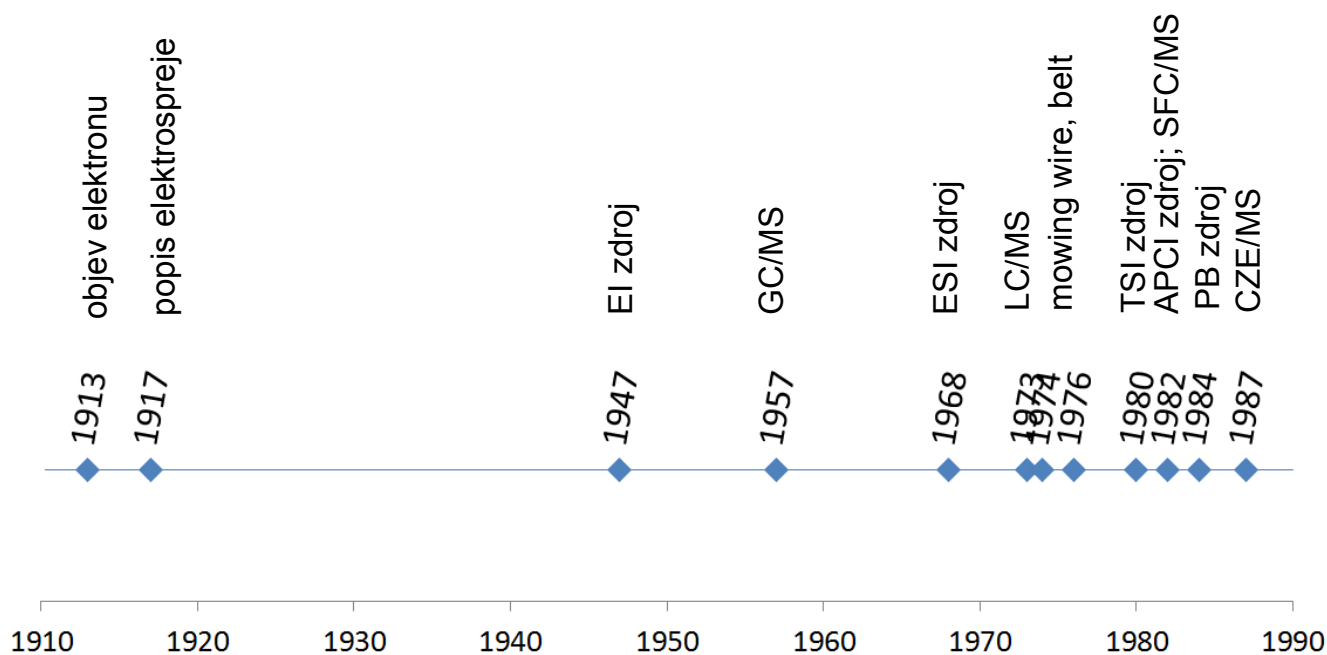
CE/MS

- pro velmi a středně polární látky
- omezené využití

SFC/MS

- pro látky nepolární i polární rozpustné v solventech pro SFC
- zatím nepříliš rozšířené

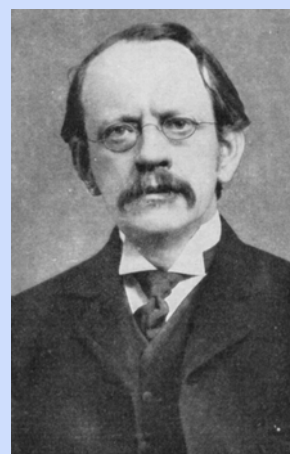
Historie MS a spojení se separačními metodami



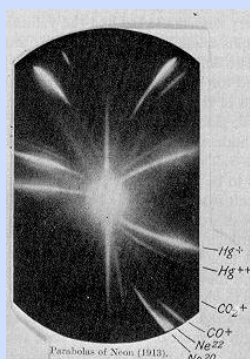
JOSEPH JOHN THOMSON

- anglický experimentální fyzik
- při studiu katodového záření objevil elektron (1897)
- prokázal existenci izotopů u stabilních prvků (1913)
- vynálezce hmotnostního spektrometru

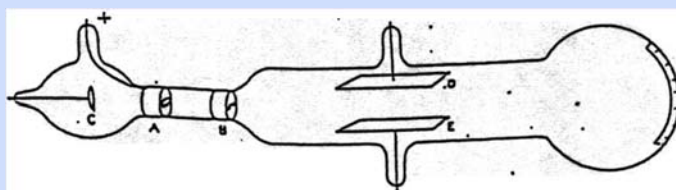
1906: Nobelova cena za fyziku



JOSEPH J. THOMSON
(1856 - 1940)



fotographická deska se stopami izotopů Ne

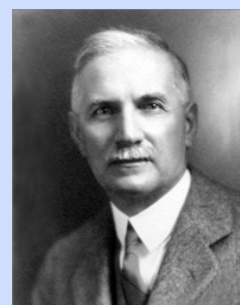


Thomsonova ilustrace zařízení, ve kterém studoval ohyb katodového záření elektrickým polem

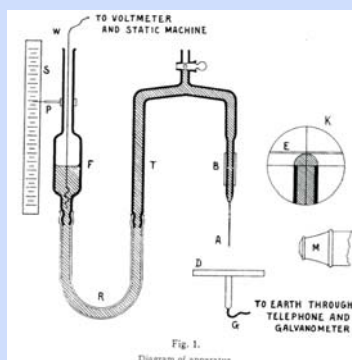
1917: POPIS ELEKTROSPREJE

- česko – americký fyzik
- studoval vliv elektrického pole na meniskus kapaliny
- podal experimentální důkaz elektrospreje

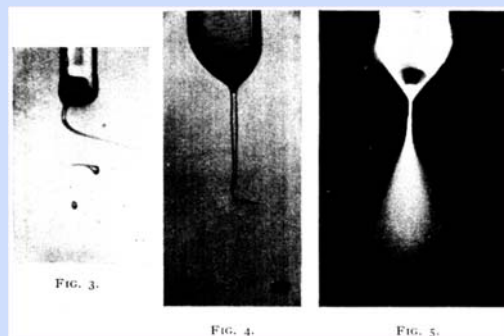
John Zeleny, Instability of electrified liquid surfaces,
Physical Review 10 (1917) 1-6



JOHN ZELENY
(1872–1951)



Zařízení pro studium výboje a el.
pole na menisku kapaliny (1914)



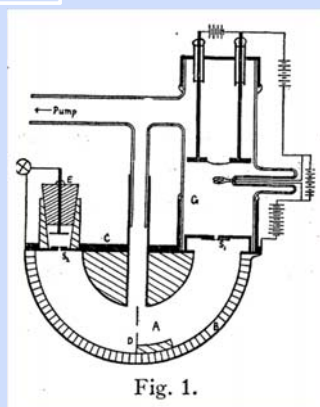
Fotografie elektrospreje (1917)

1947: IONTOVÝ ZDROJ EI

první moderní hmotnostní
spektrometr obsahující EI zdroj -
Dempster



ALFRED O.C. NIER
(1911-1994)



ARTHUR J. DEMPSTER
(1886 - 1950)

- Nier: konstrukce EI zdroje, která je dodnes
používaná

A.O. Nier , A mass spectrometer for isotope and
gas analyses, *Rev. Sci. Instr.* 18 (1947) 398-411

1957: PRVNÍ GC/MS

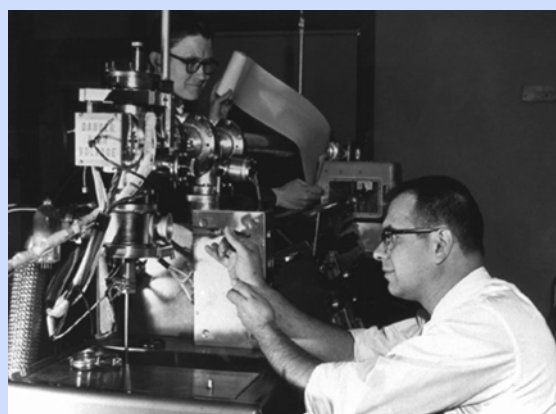
Gohlke, R.S. The use of time-of-flight mass spectrometry and vapor-phase chromatography in the identification of unknown mixtures. in *Joint Symposium on Progress in Gas Chromatography*; 1957.

Gohlke, R.S., Time-of-flight mass spectrometry and gas-liquid partition chromatography. *Anal. Chem.* 31 (1959) 535-541.

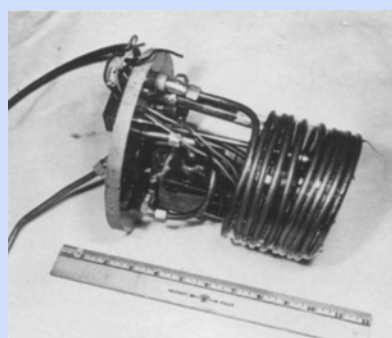
Holmes, J.C. and F.A. Morrell, Oscillographic mass-spectrometric monitoring of gas chromatography, *Appl. Spectroscopy* 11 (1957) 86-87.



Fotografie spektra acetonu z obrazovky osciloskopu



FRED MCLAFFERTY A ROLAND GOHLKE



GC z roku 1955

1968: IONTOVÝ ZDROJ ELEKTROSPREJ

- první použití elektrospreje jako iontového zdroje pro MS

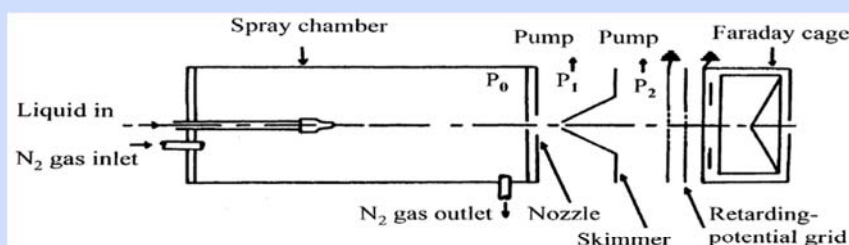
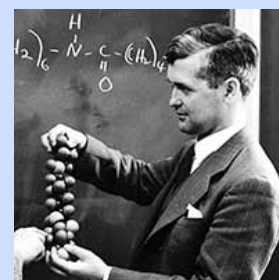


Figure 6. Schematic representation of Dole's original ESI apparatus. The electrospray forms at the tip of the tube through which liquid enters the spray chamber concurrent with the nitrogen bath gas. Most of that gas leaves the chamber near the end plate containing the nozzle through which a small portion of the mixture of bath gas and ions enters the vacuum system in the form of a supersonic free jet. A small fraction of the ion-bearing jet gas passes through a skimmer into a second vacuum stage, thence through a retarding-potential grid into a Faraday cage connected to a galvanometer.



MALCOLM DOLE
(1903-1990)

M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson and M. B. Alice, Molecular Beams of Macroions, *J. Chem. Phys.* 49 (1968) 2240.

1973: PRVNÍ LC/MS

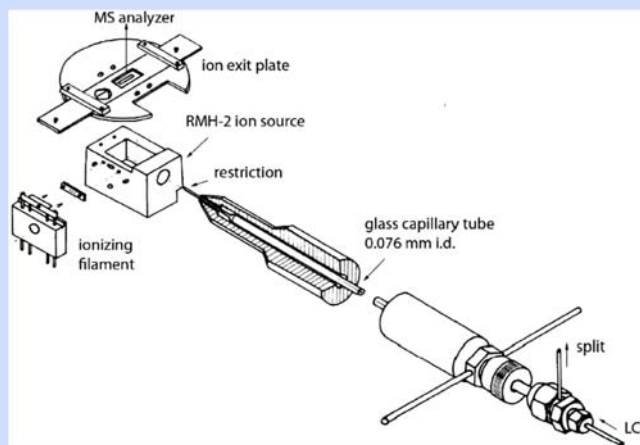
- přímé zavádění kapaliny do EI zdroje
(Direct Liquid Introduction, **DLI**)



FRED McLAFFERTY



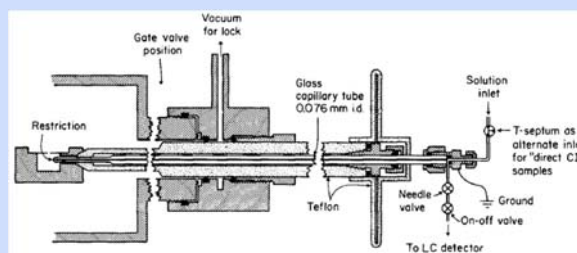
PATRICK ARPINO



Nákres sondy pro kontinuální zavádění kapaliny do iontového EI zdroje

M.A. Baldwin, F.W. McLafferty, *Org Mass Spectrom* 7 (1973) 1111-1112

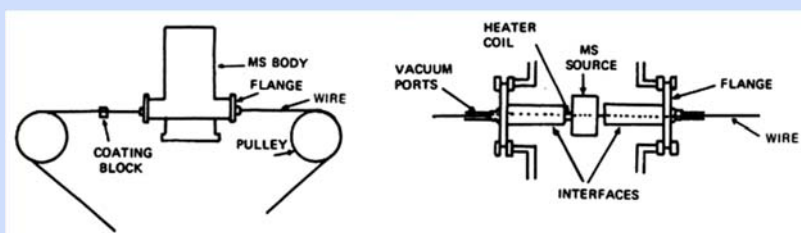
P. Arpino, M.A. Baldwin, F.W. McLafferty, *Biol Mass Spectrom* 1 (1974) 80-82



Původní schéma z publikace (1974)

1974: MOWING WIRE; 1976: MOWING BELT

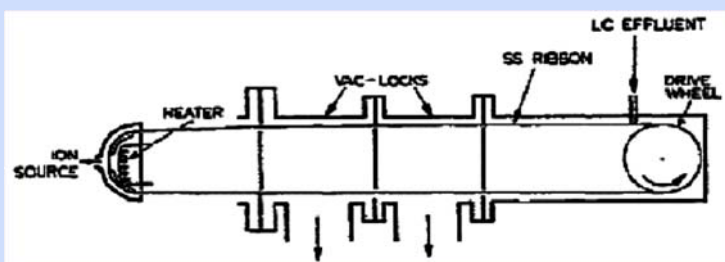
- transportní detektory



R.P.W. Scott, C.G. Scott, M. Munroe, J. Hess Jr. Interface for on-line liquid chromatography - mass spectroscopy analysis, *J. Chromatogr.* 99 (1974) 395-405



RAYMOND P. W. SCOTT



W.H. McFadden, H.L. Schwartz, S. Evans, Direct analysis of liquid chromatographic effluents, *J. Chromatogr.* 122 (1976) 389-396.

1980: IONOVÝ ZDROJ TERMOSPŘEJ

- atmosferický tlak ve zdroji



MARVIN L. VESTAL

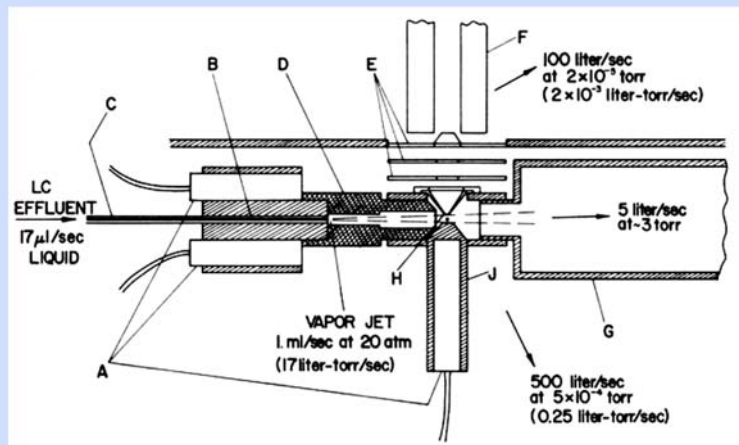


Schéma zdroje:

(A) heater; (B) copper block;
(C) stainless steel capillary;
(D) thick-walled copper tube;
(E) ion lenses; (F) quadrupole
mass filter; (G) pump wt nm to
mechanical pump; (H) ion exit
aperture; (J) source heater.

Blakley, C. R.; Carmody, J. J.; Vestal, M. L., Liquid chromatograph-mass spectrometer for analysis of nonvolatile samples, *Anal. Chem.* 52 (1980), 1636-1641

1982: IONOVÝ ZDROJ APCI

- atmosferický tlak ve zdroji



JACK D. HENION

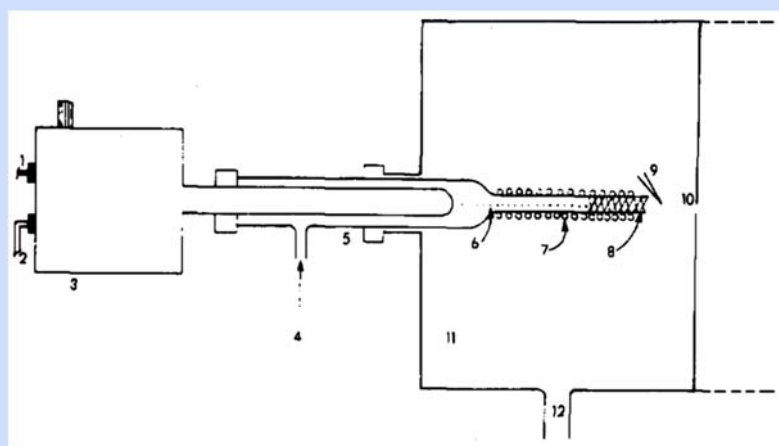


Schéma zdroje:

(1) LC inlet to probe; (2)
outlet; (4) zero air carrier gas;
(7) vaporization section; (9)
corona discharge needle; (10)
orifice into vacuum; (11)
atmospheric pressure
chamber

Jack D. Henion, Bruce A. Thomson, Peter H. Dawson, Determination of sulfa drugs in biological fluids by liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry, *Anal. Chem.* 54 (1982), 451-456

1982: PRVNÍ SFC/MS



RICHARD D. SMITH

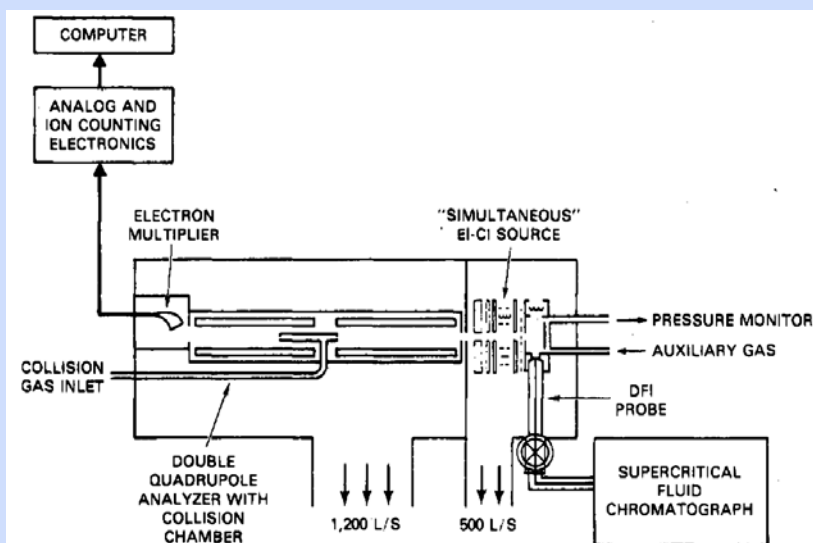
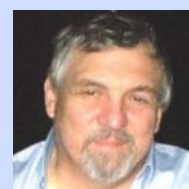


Figure 1. Schematic illustration of the SFC/MS developed in this work.

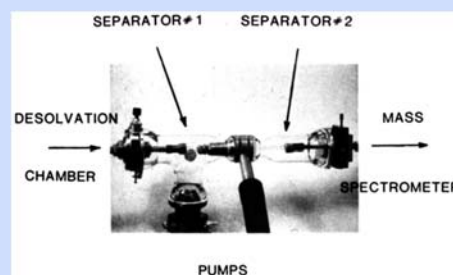
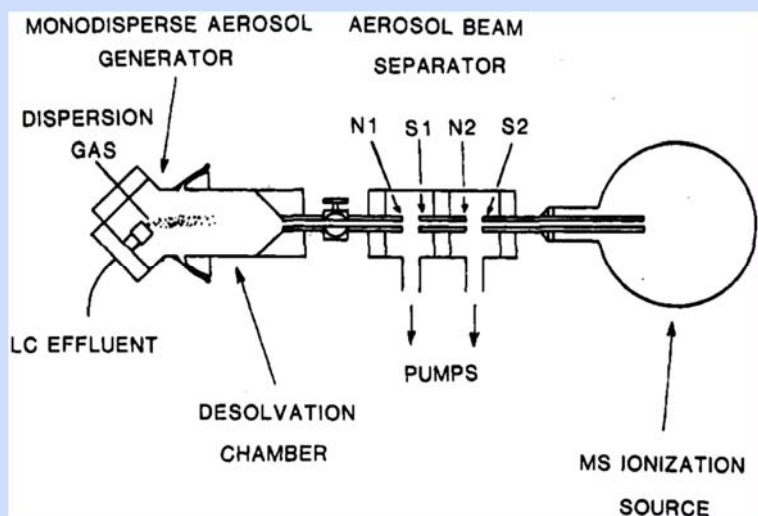
Smith, R. D.; Fjeldsted, J. C.; Lee, M. T.; Felix, W.D., Capillary Column Supercritical Fluid Chromatography-Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 54 (1982) 1883-1885.

1984: IONTOVÝ ZDROJ PARTICLE BEAM

- spojení LC/EI-MS



ROSS C. WILLOUGHBY

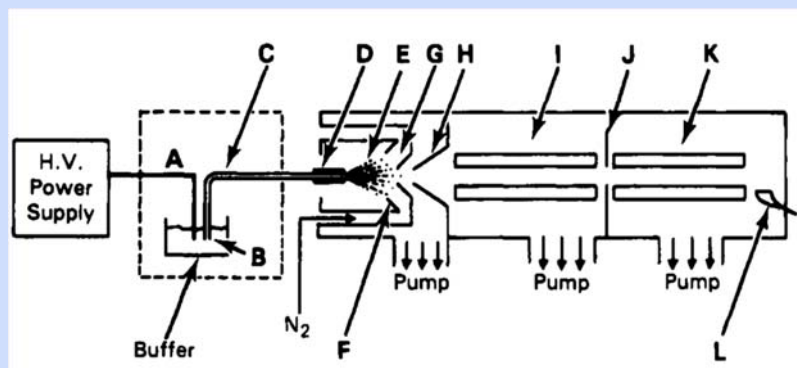


Momentový separátor

Ross C. Willoughby, Richard F. Browner, Monodisperse aerosol generation interface for combining liquid chromatography with mass spectrometry, *Anal. Chem.* 56 (1984), 2626-2631

1987: PRVNÍ CZE/MS

RICHARD D. SMITH

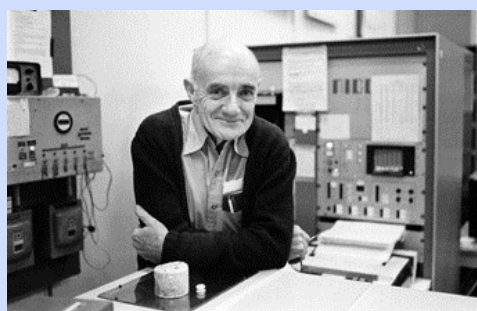
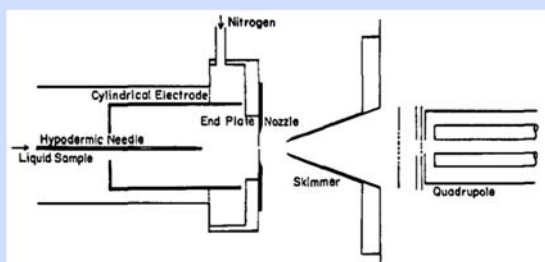
**Schéma CZE/MS:**

(A) electrically insulated box; (B) anode and reservoir; (C) fused silica capillary; (D) cathode and electrospray needle; (E) electrospray; (F) focusing ring; (G) nozzle; (H) skimmer; (I) rf only quadrupole; (J) aperture; (K) quadrupole mass spectrometer; (L) channeltron.

J. A. Olivares, N. T. Nguyen, C. R. Yonker, R. D. Smith, On-Line Mass Spectrometric Detection for CZE, *Anal. Chem.* 59 (1987) 1230-1232.

1989: ELEKTROSPREJ BIOMAKROMOLEKUL

- spojení LC/ESI-MS pro biomolekuly



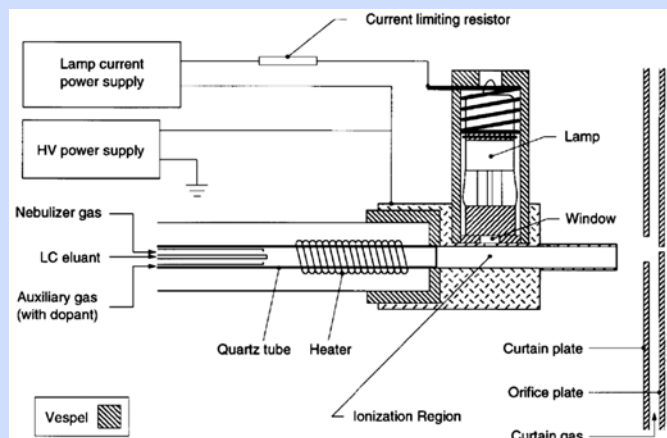
2002: Nobelova cena



JOHN B. FENN
(1917-2010)

Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM., Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246 (1989) 64-71.

2000: IONTOVÝ ZDROJ APPI



ANDRIES P. BRUINS

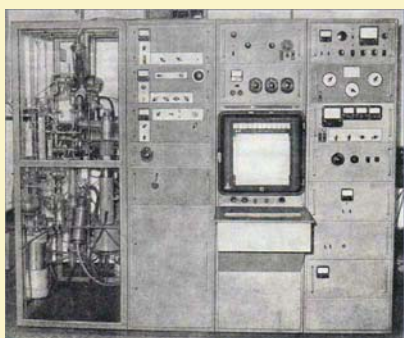


JACK A. SYAGE

Damon B. Robb, Thomas R. Covey, Andries P. Bruins, Atmospheric Pressure Photoionization: An Ionization Method for Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 72 (2000), 3653-3659

J.A. Syage, M.D. Evans, K.A. Hanold, Photoionization Mass Spectrometry, *Am. Lab.*, 32 (2000), 24-29.

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE V ČR (ČSSR)



VLADIMÍR HANUŠ
(1923-2009)



1953: první hmotnostní spektrometr

V. Čermák, V. Hanuš,
Č. Jech, J. Cabicar

V. Čermák, V. Hanuš, M. Pacák, Hmotový spektrometr Ústavu fyzikální chemie ČSAV, *Slaboproudý Obzor* 20 (1959) 603-608

počátek 60-let

první 2 komerční MS instrumenty MCH-1303

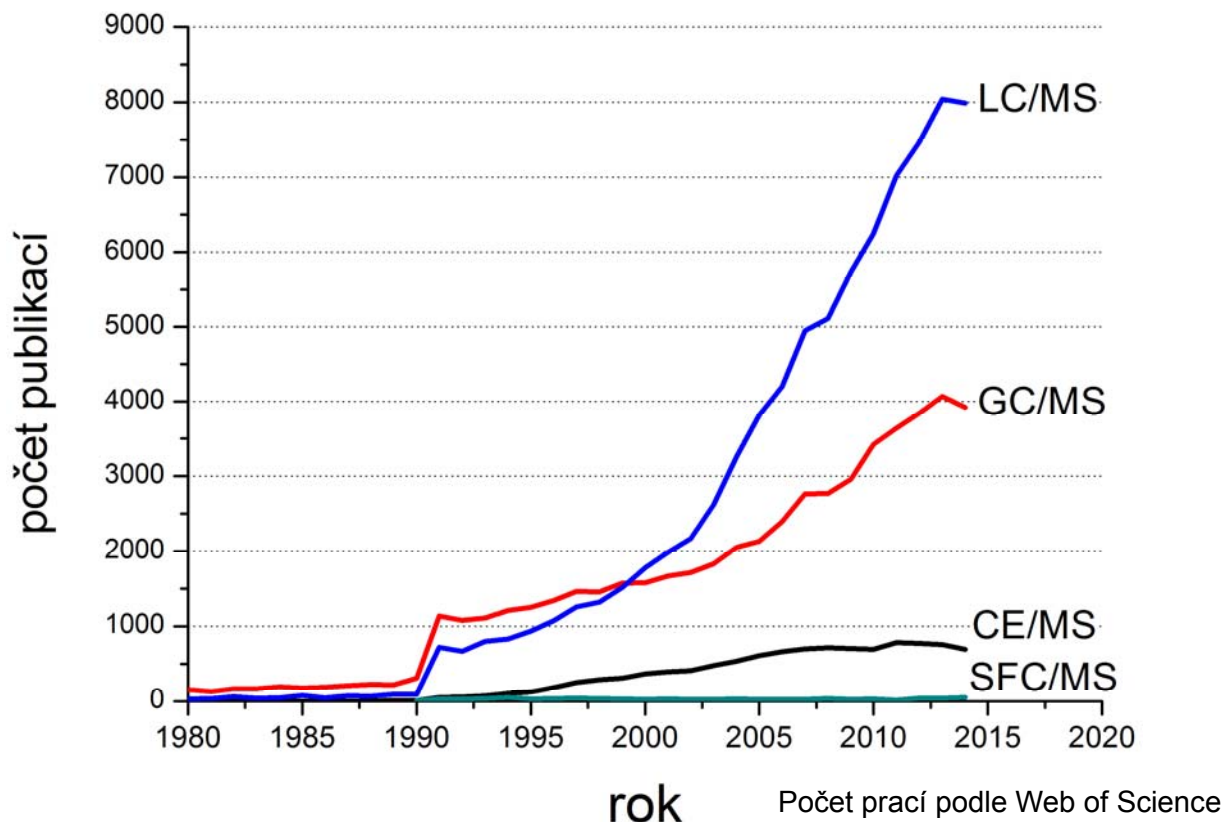
Ústav fyzikální chemie ČSAV

Ústav organické chemie a biochemie AVČR



1969 – MS902 (AEI) - ÚOCHB

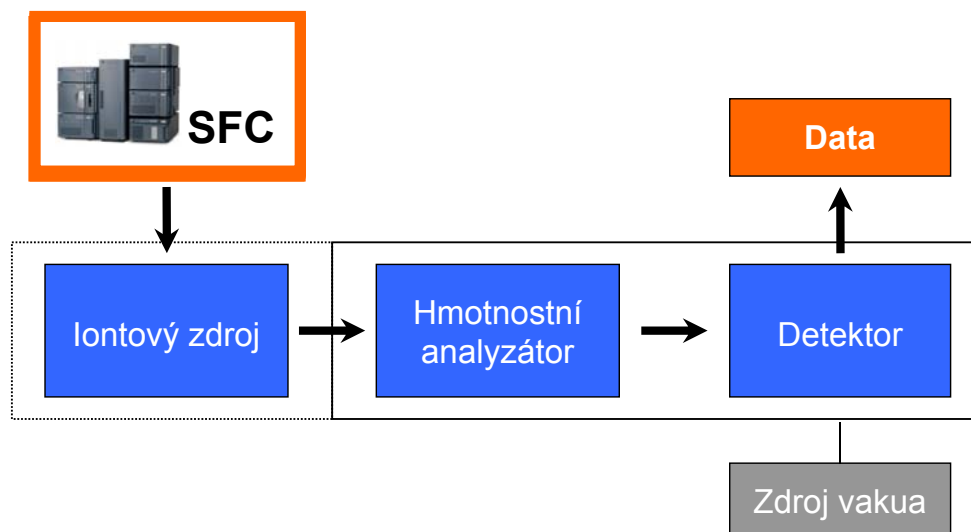
Rozvoj separačních technik ve spojení s MS



Hmotnostní detekce

Hmotnostní detektor

Zaznamenává intenzitu vybraných iontů, které vznikají v iontovém zdroji. Univerzální a vysoce selektivní, citlivý detektor. Umožňuje identifikaci analytů na základě jejich hmotnostních spekter.



Spojení GC, HPLC a CE s hmotnostním detektorem

MS – pracovní podmínky

V prostoru analyzátoru a detektoru je vakuum (až 10^{-10} torr, tj. 10^{-8} Pa).

MS analyzátor (detektor) mohou pracovat jen s nabitými částicemi (ionty).

Interface (mezičlen) & iontový zdroj

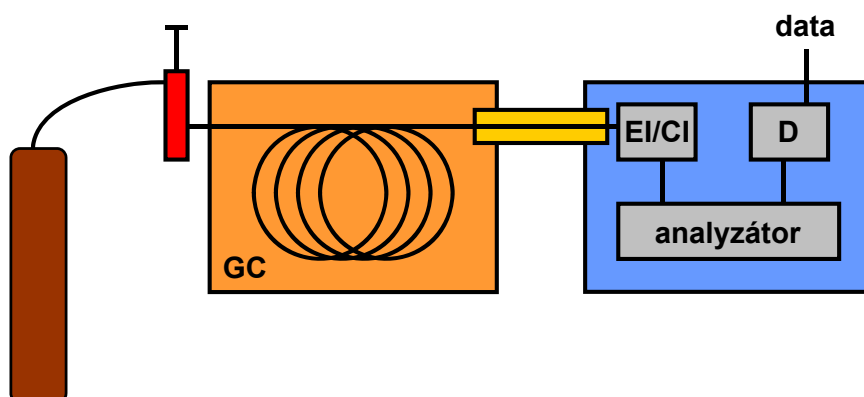
Ionizuje analyty v plynné fázi (GC/MS, elektronová ionizace)



Převéde analyty do plynné fáze a zároveň je ionizuje (LC/MS a CE/MS, ionizace elektrosprejem, chemická ionizace a fotoionizace za atmosferického tlaku)

Spojení GC s hmotnostním detektorem

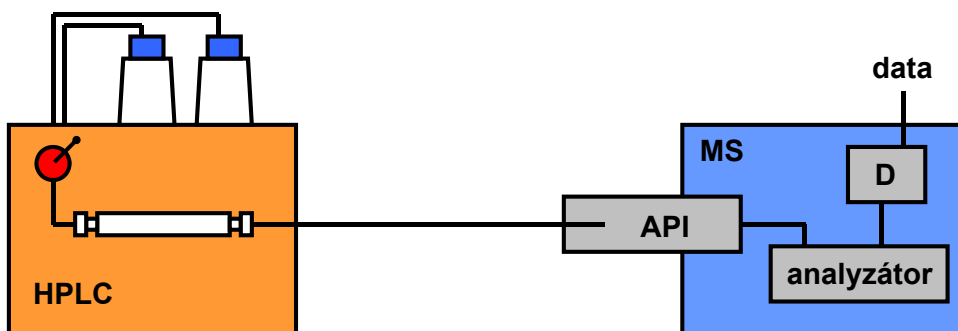
1957 první spojení **GC/MS** (Holmes, Morrell) [první komerční GC/MS 1967]



Technicky nejjednodušší interface, plynná mobilní fáze se zavádí přímo do iontového zdroje ve vakuu (EI/CI zdroj). Vakuový systém snadno odstraní přebytečnou mobilní fázi. Mezistupeň mezi GC a MS je tzv. “transferlajna” (vyhříváná trubice, kudy vede konec GC kolony). Vyšší teplota zabraňuje kondenzaci výševroucích analytů.

Spojení HPLC s hmotnostním detektorem

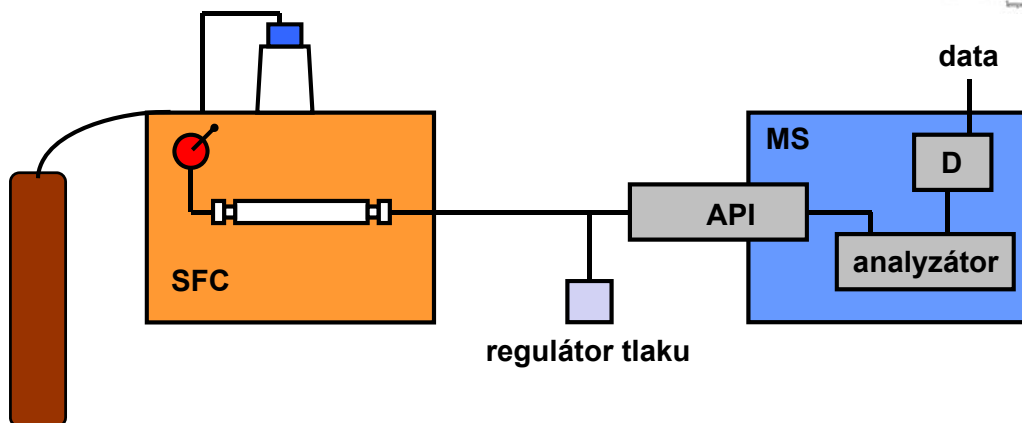
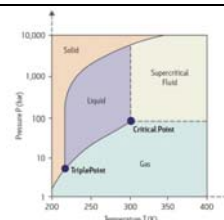
1973 první spojení **HPLC/MS** (Baldwin, McLafferty) [první komerční LC/MS 1977]



Technicky složitější interface, kapalná mobilní fáze se sprejuje do části iontového zdroje, která je při atmosférickém tlaku (tzv. API zdroj, elektrosprej, APCI, APPI). Vakuový systém v další části zdroje odstraní přebytečný plyn vytvořený sprejováním kapalné mobilní fáze.

Spojení SFC s hmotnostním detektorem

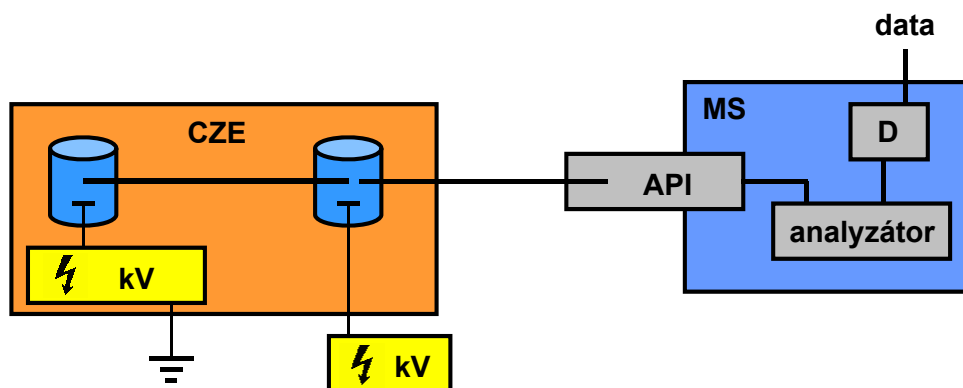
1982 první spojení **SFC/MS** (Smith)



Kapalná mobilní fáze se po splitování sprejuje do části iontového zdroje, která je při atmosférickém tlaku (APCI, elektrosprej). Tlak v systému je regulován pro udržení superkritického stavu fáze. Snížením tlaku v API zdroji dojde k tvorbě aerosolu a tím zmlžení mobilní fáze. Zdroj je většinou nutno vyhřívat na vyšší teploty než při spojení s LC.

Spojení CZE s hmotnostním detektorem

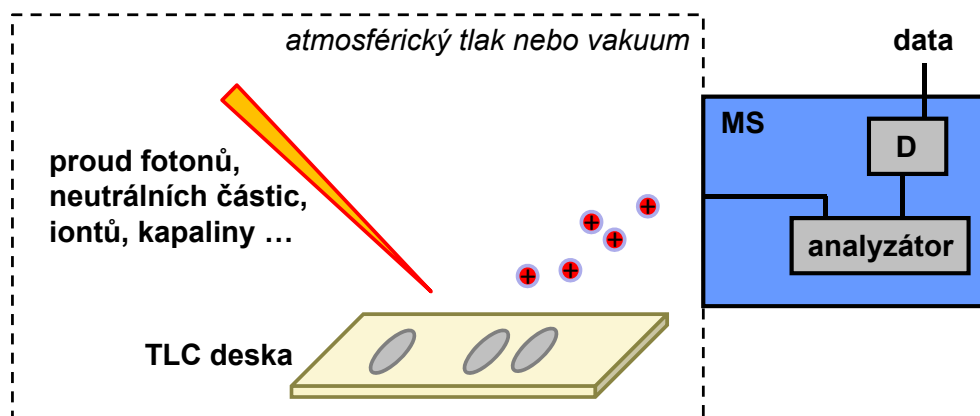
1987 první spojení CZE/MS (Smith)



Technicky složitější interface, kapalná mobilní fáze (velmi nízký průtok) se sprejuje do části iontového zdroje, která je při atmosférickém tlaku (pouze elektrosprej nebo nanoelektrosprej). Problematické je řešení vkládání sprejovacího napětí pro MS tak, aby nedocházelo k vzájemnému ovlivňování se separačním napětím pro CZE.

Spojení planárních separačních technik s MS

1995 první spojení TLC/MALDI-MS (Gusev)

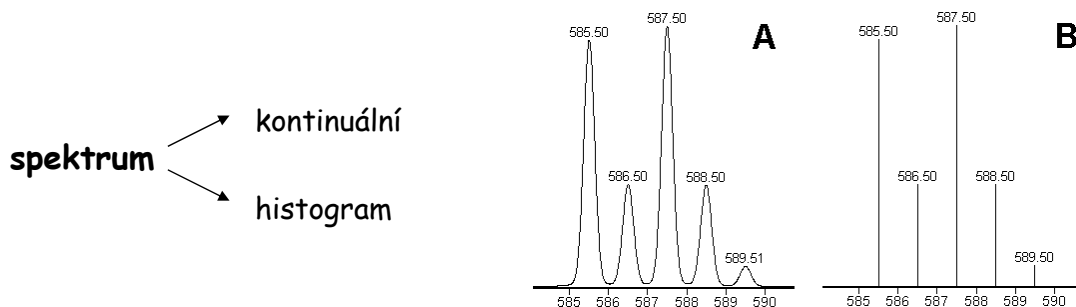


TLC deska je po separaci analytů a vysušení rozpouštědla umístěna do iontového zdroje, který může pracovat ve vakuu nebo při ambientním tlaku. Pomocí různých technik jsou analyty desorbovány z povrchu, ionizovány a analyzovány v MS. Jiné techniky jsou založené na extrakci vzorku do kapky rozpouštědla a následné MS analýze, např. pomocí ESI.

Hmotnostní spektrum

Hmotnostní spektrum:

grafické znázornění závislosti intenzity iontů na jejich poměru hmotnosti ku náboji (m/z).



Kontinuální spektrum (profilové):

spektrum, jak je zaznamenáno detektorem (umožňuje odečíst šířku píku); A

Centroidové spektrum (histogram):

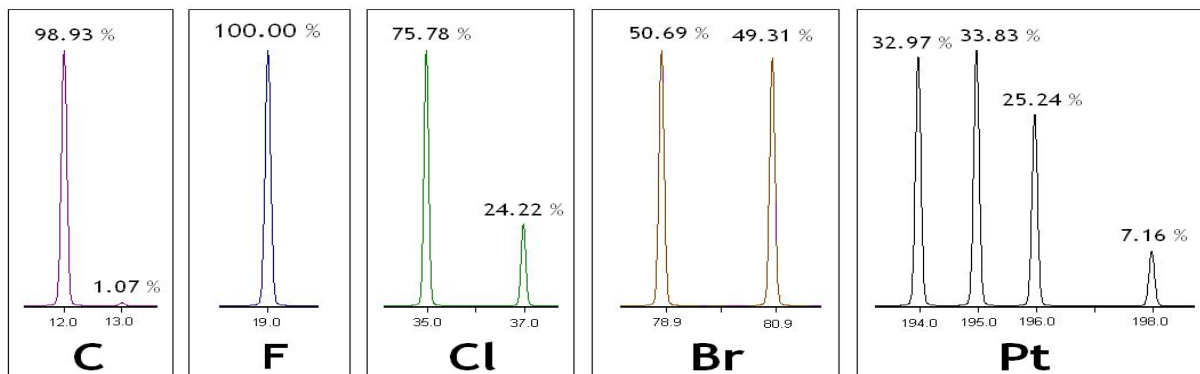
spektrum je převedeno na sloupcový graf, poloha (m/z) signálu je odečtena v těžišti píku, intenzita odpovídá ploše nebo výšce píku (přehlednější); B

Spektra jsou většinou normalizována, intenzity (osa y) jsou 0-100%.

Izotopy

Izotopy: atomy chemického prvku, které mají stejný počet protonů, ale rozdílný počet neutronů, tedy stejné atomové číslo a rozdílnou atomovou hmotnost.

Přírodní směsi izotopů - zastoupení izotopů jednotlivých prvků je konstantní.



prvky

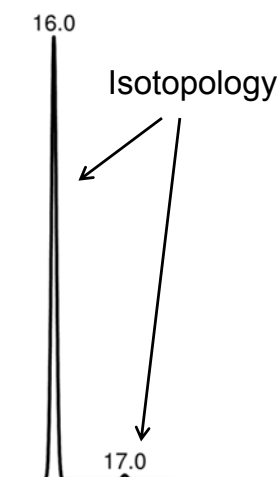
- X (monoizotopické): ^{19}F , ^{23}Na , ^{31}P , ^{127}I
- X+1: vodík (^1H , ^2H), uhlík (^{12}C , ^{13}C), dusík (^{14}N , ^{15}N)
- X+2: chlor (^{35}Cl , ^{37}Cl), brom (^{79}Br , ^{81}Br), kyslík (^{16}O , ^{18}O)

Izotopy

Izotopology: - izotopické homology – ionty, které se liší v izotopu jednoho nebo více atomů tvořících daný iont; ionty v izotopovém klastru (izotopology mají jinou hmotnost)

Příklad:

Ionty $\text{CH}_4^{+\bullet}$ (m/z 16) a $\text{CH}_3\text{D}^{+\bullet}$ (m/z 17) v EI spektru methanu



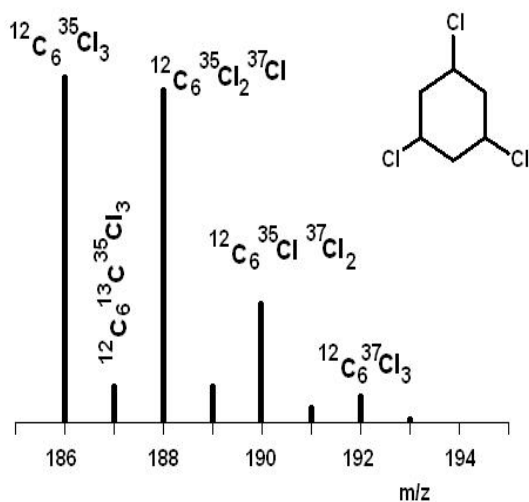
Izotopomery: - izotopické izomery – ionty se stejnými celkovými počty všech izotopů všech atomů, avšak lišící se jejich polohou (izotopomery mají stejnou hmotnost)

Příklad:

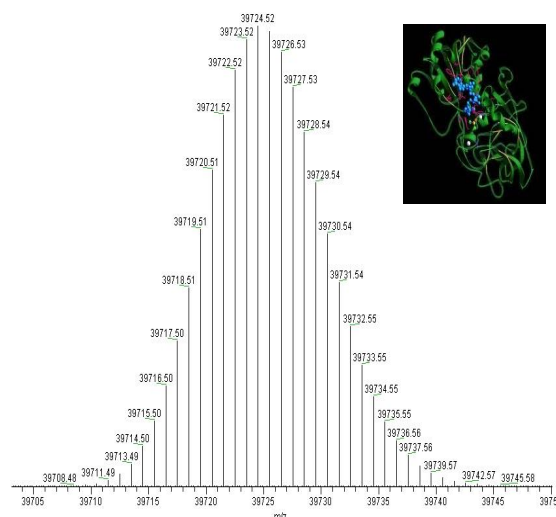
Ionty $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{D}^{+\bullet}$ (m/z 45) a $\text{CH}_3\text{CHDCH}_3^{+\bullet}$ (m/z 45)

Izotopové složení iontu

Izotopové složení víceatomového iontu je dáno kombinací izotopového složení atomů, které jej tvoří.



trichlorocyklohexan
 $\text{C}_6\text{H}_9\text{Cl}_3$



alkoholdehydrogenáza
 $\text{C}_{1764}\text{H}_{2859}\text{N}_{469}\text{O}_{516}\text{S}_{26}$



Jednotky hmotnosti v MS



hlavní jednotka SI: **kilogram kg**

Kilogram je hmotnost mezinárodního prototypu kilogramu, který je uložen u Mezinárodního úřadu pro váhy a míry v Sévres.

vedlejší jednotka SI: **atomová hmotnostní jednotka u**

Atomová hmotnostní jednotka (unitární jednotka) je 1/12 hmotnosti izotopu uhlíku o protonovém čísle $Z=6$ a nukleonovém čísle $A=12$. $u = 1,660\ 57 \cdot 10^{-27}$ kg

jednotka: **dalton Da**

Obdoba atomové hmotnostní jednotky. Není jednotkou SI.

veličina: **m/z**

m/z je bezrozměrná veličina používaná pro popis iontů ve spektru.

jednotka: **thomson Th**

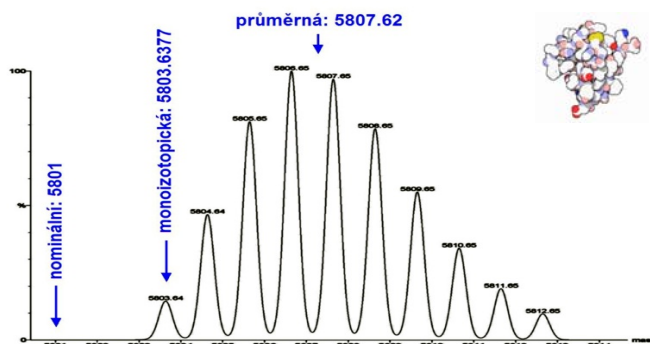
Jednotka pro veličinu m/z navržená v roce 1991. $1\text{Th}=1u/e=1\text{Da}/e$.

Hmotnost iontu v MS

nominální hmotnost: hmotnost vypočítaná z celočíselných hmotností prvků (př. CO_2 : $12u + 2 \times 16u = 44u$)

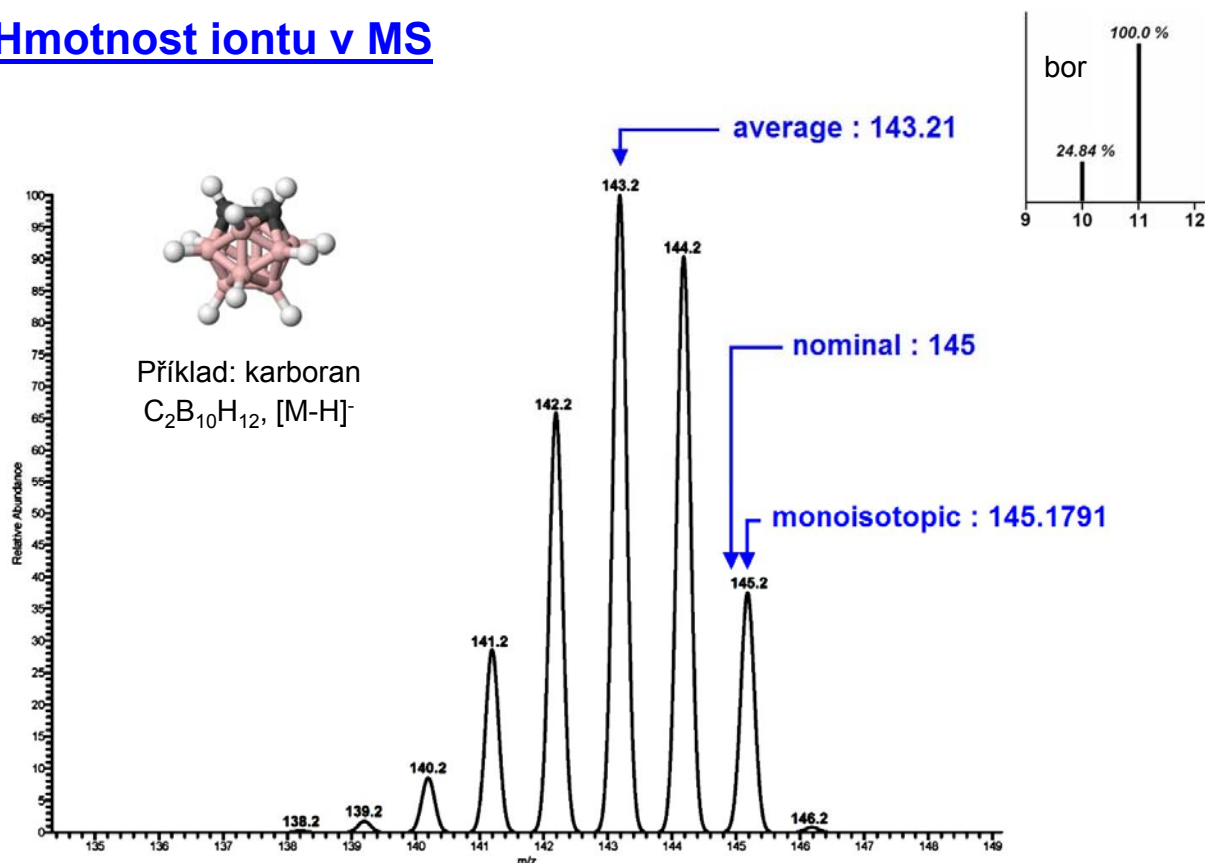
monoizotopická hmotnost: hmotnost vypočítaná z přesných hmotností prvků (nejvíce zastoupené izotopy). (př. CO_2 : $12.0000u + 2 \times 15.9949u = 43.9898u$)

průměrná hmotnost: vážený průměr hmotností jednotlivých izotopů podle jejich zastoupení (př. CO_2 : $12.01u + 2 \times 16.00u = 44.01u$)



Příklad: inzulín
 $\text{C}_{257}\text{H}_{383}\text{N}_{65}\text{O}_{77}\text{S}_6$

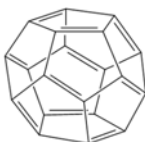
Hmotnost iontu v MS



Odchyly od nominální hmotnosti

Přesné hmotnosti se liší od nominálních hmotností. V závislosti na přítomných prvcích jsou buď vyšší nebo nižší (hmotnostní nadbytek nebo úbytek)

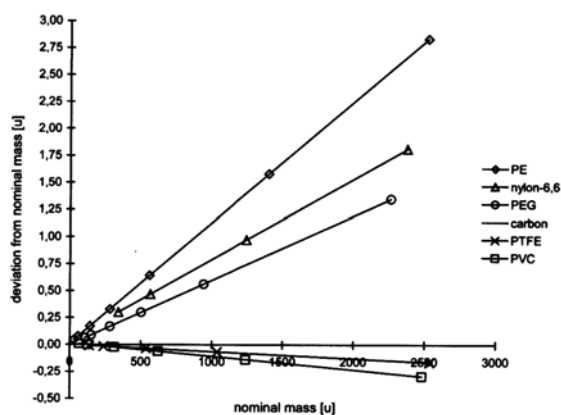
Příklad: fullerén C₂₀



[5]fullerén-C₂₀ C₂₀
 M=240.00000u (0 mmu)

dodekahedran C₂₀H₂₀
 M= 260.15650u (+156.90 mmu)

perfluorododekahedran C₂₀F₂₀
 M=619.96807u (-31.93 mmu)



Nominální hmotnost lze používat jen v nízkém hmotnostním rozsahu (hmotnostní nadbytek/úbytek je při hmotnostech nad cca 500 u vyšší než 0,5 u).

Rozlišení v MS

Rozlišovací schopnost:

schopnost přístroje oddělit sousední píky

$$R = \frac{m}{\Delta m}$$

Dvě definice rozlišení:

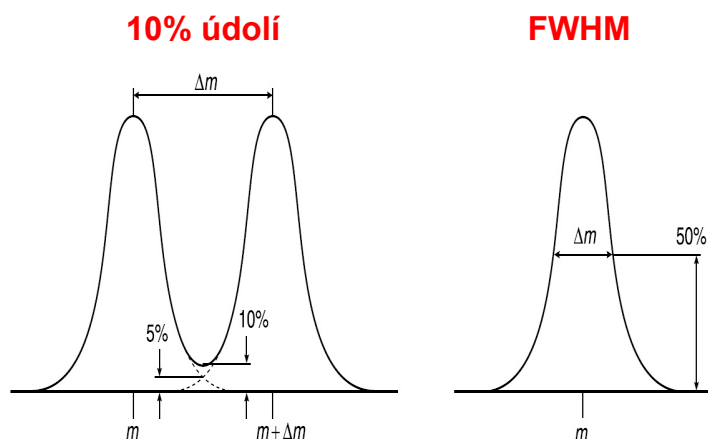
Rozlišení – 10% údolí:

nejmenší rozdíl hmotností mezi stejně vysokými píky u nichž je výška údolí rovna definovanému zlomku výšky píků (např. 10% údolí). Používá se pro sektorové přístroje (konstantní rozlišení pro celý hmotnostní rozsah).

Rozlišení – FWHM:

poměr hmotnosti iontu a šířky jeho píku v polovině výšky – FWHM. Používá se pro kvadrupóly, iontové pasti, průletové analyzáto (konstantní šířka píku).

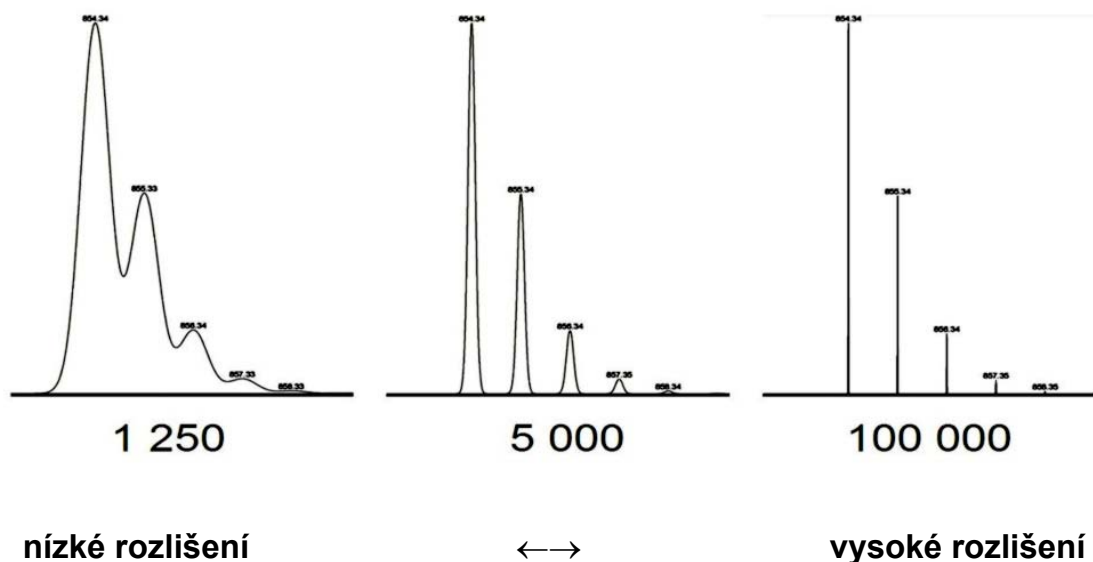
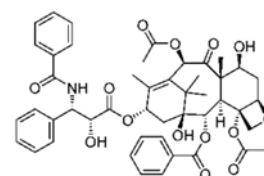
Číselně jsou hodnoty rozlišení FWHM zhruba 2x vyšší než u 10% údolí.



Rozlišení v MS



Př.: paclitaxel $C_{47}H_{51}NO_{14}$ (Mw 853.3)



Rozlišovací schopnost analyzátoru

Maximální rozlišovací schopnost různých typů analyzátorů

Průletový analyzátor (oa TOF):

R = 60 000 FWHM (Maxis 4G, Bruker)

Sektorový analyzátor s dvojitou fokusací:

R = 80 000 10% údolí (AutoSpec Premier, Waters)

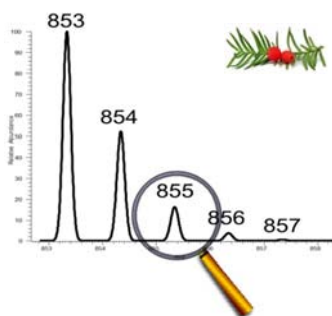
High-Field Orbitrap

R = 500 000 FWHM (m/z 200, Orbitrap Elite, Thermo)

Ionová cyklotronová rezonance (FT-ICR)

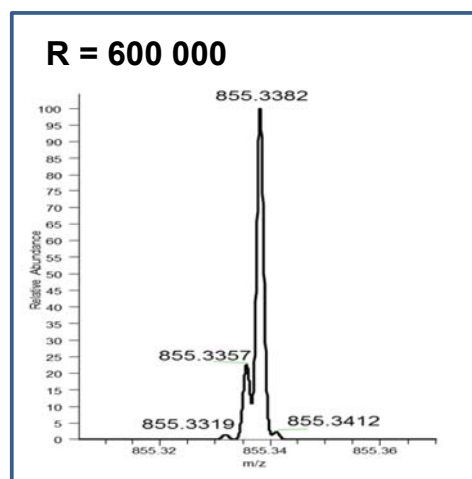
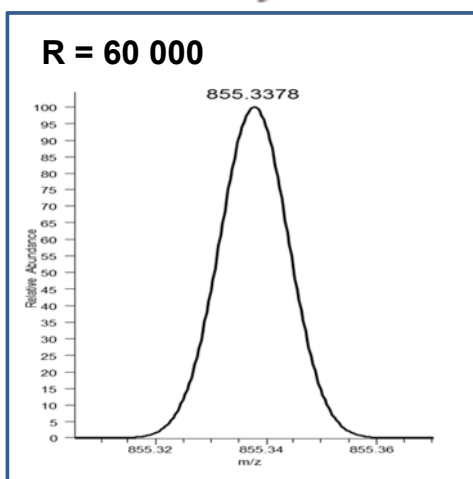
R = 20 mil. (spec. podmínky); **800 000** FWHM (m/z 400, Solarix XR 7T, full broad band Bruker)]

Spektra s velmi vysokým rozlišením



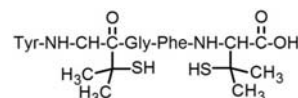
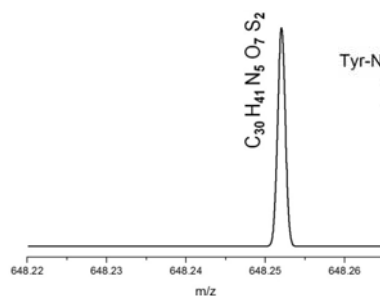
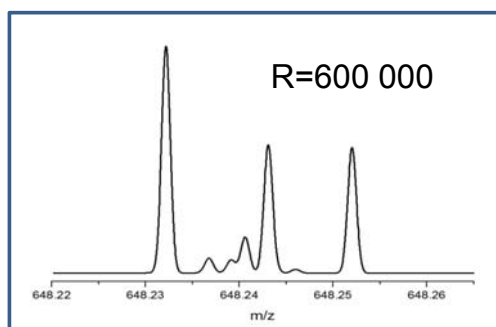
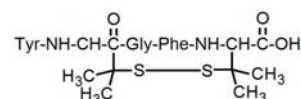
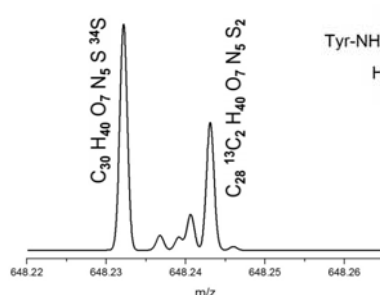
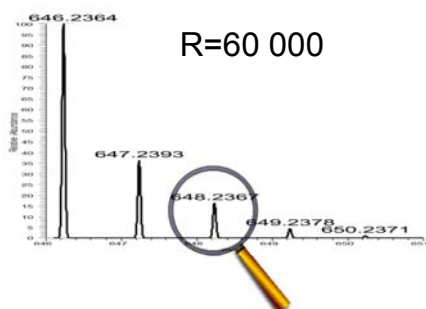
Separace izotopů v rámci nominální hmotnosti

855,3319	$C_{46}^{13}C H_{51} O_{14}^{15}N$
855,3357	$C_{47} H_{51} O_{13}^{18}O N$
855,3382	$C_{45}^{13}C_2 H_{51} O_{14} N$
855,3412	$C_{46}^{13}C H_{50}^2H O_{14} N$



Spektra s velmi vysokým rozlišením

? Jsou ve vzorku enkefalinu volné thiolové skupiny (neoxidované cysteiny)?



Přesnost určení hmotnosti

Přesnost určení hmotnosti – udává se jako chyba, tj. rozdíl mezi měřenou hmotností a vypočítanou správnou hodnotou, v hmotnostních (mmu) nebo relativních (ppm) jednotkách

$$E_{\text{mmu}} = 10^3 (M_{\text{změřená}} - M_{\text{vypočítaná}})$$

$$E_{\text{ppm}} = 10^6 \frac{M_{\text{změřená}} - M_{\text{vypočítaná}}}{M_{\text{vypočítaná}}}$$

Výpočet správné hmotnosti iontu:

Správné hodnoty hmotností jednotlivých izotopů

G. Audi, A.H. Wapstra, C. Thibault, Nucl. Phys. A 729, 337–676, 2003

Správný náboj

Hmotnost elektronu (0.5486 mmu) hraje roli !

Příklad: naftalen

$M([\text{C}_{10}\text{H}_8]^+) = 128.063149 (+4.3 \text{ ppm})$

$M(\text{C}_{10}\text{H}_8) = 128.0626$

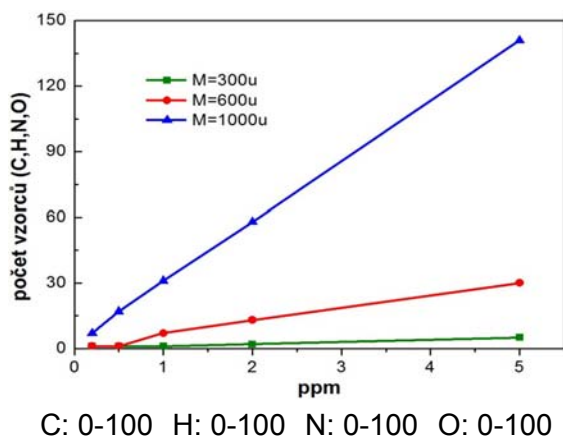
$M([\text{C}_{10}\text{H}_8]^{+•}) = 128.062052 (-4.3 \text{ ppm})$

Výpočet elementárního složení

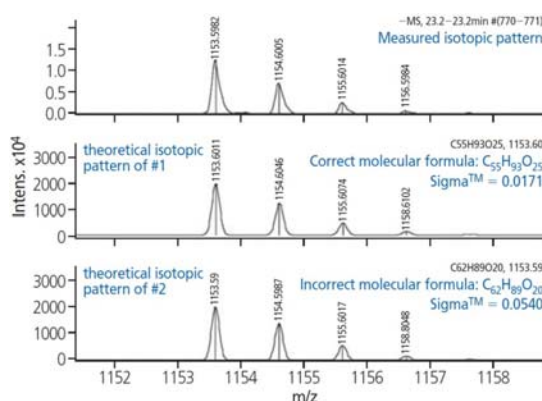
Každému elementárnímu složení odpovídá jedna unikátní hmotnost. Při nekonečně vysoké přesnosti měření bychom výpočtem získali jediné správné složení.

Nižší přesnost určení hmotnosti = více možných sumárních vzorců

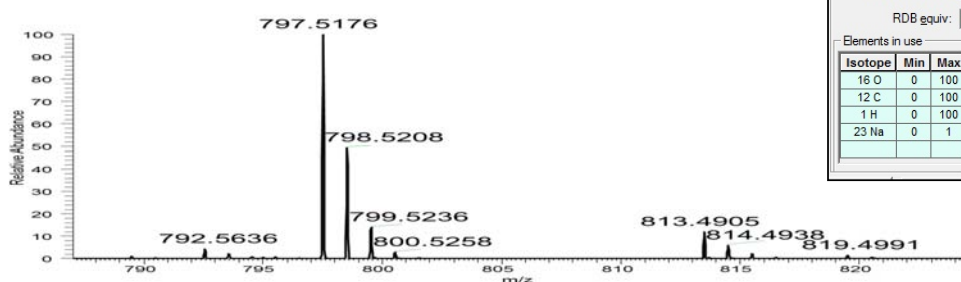
Vyšší hmotnost při stejné přesnosti = více možných sumárních vzorců



Porovnávání izotopických klastřů - zvýšení spolehlivosti určení složení



Výpočet elementárního složení



Limits				
Charge:	1			
Nitrogen-Rule:	Do not use			
Mass tolerance:	20.00	ppm		
RDB equiv.:	-1.0-100.0			
Elements in use				
Isotope	Min	Max	DB eq.	Mass
16 O	0	100	0.0	15.995
12 C	0	100	1.0	12.000
1 H	0	100	-0.5	1.008
23 Na	0	1	-0.5	22.990

tolerance 5 ppm (3 možnosti)

Elemental composition search on mass 797.52				
m/z	Theo. Mass	Delta (ppm)	RDB equiv.	Composition
797.5176	797.5174	0.20	8.5	$C_{45}H_{74}O_{10}Na$
	797.5198	-2.81	11.5	$C_{47}H_{73}O_{10}$
	797.5140	4.55	20.5	$C_{54}H_{69}O_5$

tolerance 20 ppm (13 možnosti)

Elemental composition search on mass 797.52				
m/z	Theo. Mass	Delta (mmu)	RDB equiv.	Composition
797.52	797.52	0.16	8.5	$C_{45}H_{74}O_{10}Na$
797.52		-2.24	11.5	$C_{47}H_{73}O_{10}$
797.51		3.63	20.5	$C_{54}H_{69}O_5$
797.52		-5.71	-0.5	$C_{38}H_{78}O_{15}Na$
797.51		6.03	17.5	$C_{52}H_{70}O_5Na$
797.53		-8.12	2.5	$C_{40}H_{77}O_{15}$
797.53		-9.22	21.5	$C_{56}H_{70}O_2Na$
797.51		9.50	29.5	$C_{61}H_{65}$
797.53		-11.63	24.5	$C_{58}H_{69}O_2$
797.51		11.91	26.5	$C_{59}H_{66}Na$
797.50		13.01	7.5	$C_{43}H_{73}O_{13}$
797.53		-15.10	12.5	$C_{49}H_{74}O_7Na$
797.50		15.42	4.5	$C_{41}H_{74}O_{13}Na$

Kalibrace hmotnostní škály

Hmotnostní škála každého hmotnostního spektrometru musí být kalibrována, aby chom získaly správné výsledky.

Kalibrace se provádí změřením spektra kalibrační látky (směsi) a následnou korelací změřených a vypočítaných (tj. správných) hodnot m/z .

Typy kalibrací:

Externí (vnější) kalibrace

Kalibrace se provádí před měřením analyzované látky. Měření kalibračního spektra a spektra analyzované látky probíhá odděleně.

Interní (vnitřní) kalibrace

Kalibrace se provádí ze spektra obsahujícího jak píky analyzované látky, tak píky kalibrační látky. Měření kalibračního spektra a spektra analyzované látky probíhá současně. Interní kalibrace poskytuje přesnější výsledky.

Kalibrace hmotnostní škály

Kotvící hmotnost (Lock mass)

Způsob vnitřní kalibrace, kdy se celá hmotnostní škála posunuje podle jednoho kalibračního bodu. Slouží k malým úpravám hmotnostní škály předem nakalibrovaného přístroje. Kalibrant s kotvící hmotností může být dávkován do iontového zdroje, nebo se využívá některého iontu z pozadí.

Kalibrační křivky se získají proložením (interpolací) změřených kalibračních bodů vhodnou funkcí (lineární, polynomické různých stupňů)

Kvalitu kalibrace popisujeme statistickým parametrem RMS (Root Mean Square), tj. směrodatnou odchylkou chyby (v ppm):

$$RMS = \sqrt{\frac{\sum (E_{ppm})^2}{n}}$$

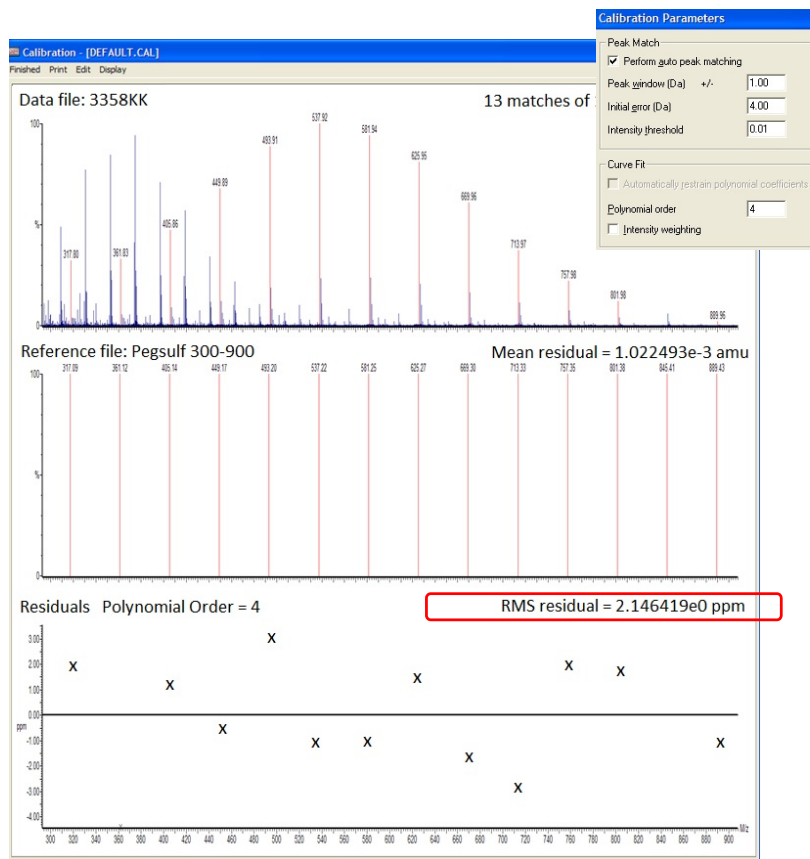
E_{ppm} - chyba v ppm

Kalibrace

Změřené spektrum

Kalibrační spektrum
(vypočítané správné m/z)

Chyby pro jednotlivé píky

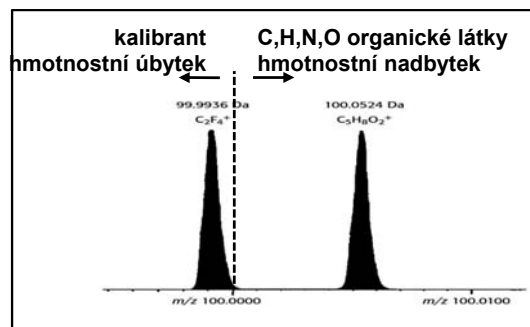


Kalibrační látky

Požadavky na kalibrační sloučeniny:

- poskytují spektra s dostatečným počtem píků v celém kalibrovaném rozsahu
- píky dostatečně intenzivní, s jednoduchými izotopovými klastry
- bez paměťového efektu (nesetrvávají v iontovém zdroji po kalibraci)
- dostatečná čistota, dostupnost, nízká toxicita

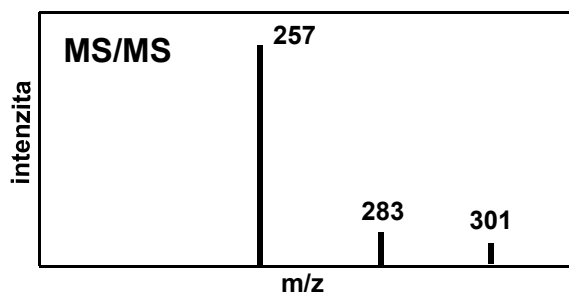
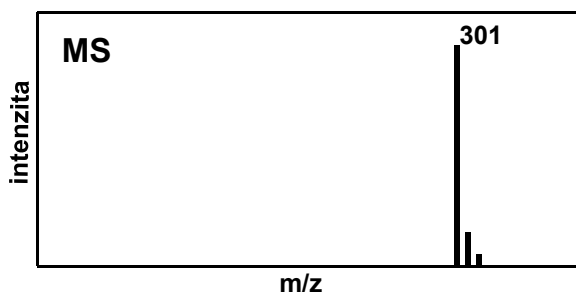
Perfluorované látky – jednoduché izotopické klastry, negativní mass defect (výhodné pro vnitřní kalibraci)



Typy kalibrantů:

- chemická individua – fragmentační (EI-MS) nebo MS/MS spektra
- chemická individua – tvorba klastrových iontů
- směsi homologů nebo oligomerů
- směsi látek, komerční směsi

Spektra MS a MSⁿ



Spektrum MS

Ionty vzniklé ionizací analytu (neutrální molekula) a případnou fragmentací molekulárního iontu (aduktu)

Př. MS spektrum (ESI) sloučeniny s molekulární hmotností 300 g/mol
->molekulární adukt - ion m/z 301

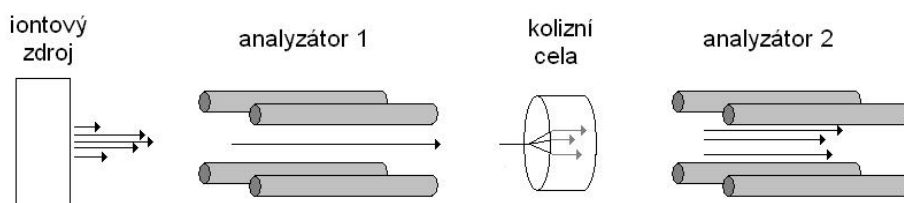
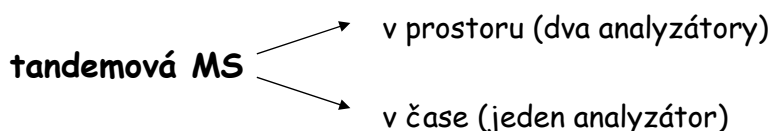
Spektrum MS/MS (MS²)

Ionty vzniklé fragmentací iontu prekurzoru.

Př. MS/MS spektrum (ESI) sloučeniny s molekulární hmotností 300 g/mol, fragmentace iontu m/z 301
-> fragmenty, ionty m/z 283 a m/z 257

Tandemová hmotnostní spektrometrie – MS/MS, MSⁿ

Souhrnný název pro techniky, které umožňují dvou nebo víceúrovňovou analýzu iontů. Ion (prekurzor) je nejprve vybrán, podroben fragmentaci a je zaznamenáno produktové spektrum (MS²). Z něj může být vybrán další ion, který je fragmentován a spektrum produktů je opět zaznamenáno (MS³), atd.
Využití – určování struktury, specifická detekce.



Tandemová MS v prostoru ve trojitém kvadrupólu (analyzátor – kolizní cela – analyzátor)

Doporučená literatura

Učebnice v češtině:

J.Vřešťál: **Hmotnostní spektrometrie** (Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2000)

K.Ubik: **Fyzikálně-chemické metody. Hmotnostní spektrometrie** (AVČR, 2000)

V.Stužka: **Instrumentální metody chemické analýzy II : hmotnostní spektrometrie organických molekul** (Palackého univerzita, 1996)

M. Holčapek (editor), skripta „**Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS)**“, Univerzita Pardubice, 2005

Sborníky škol MS a HPLC/MS (Spektroskopická společnost JMM)

J. Pól a M. Volný: **Počátky a historie československé hmotnostní spektrometrie** (Česká společnost pro hmotnostní spektrometrii, 2012)

Doporučená literatura – učebnice v angličtině



R.E. Ardrey: **Liquid Chromatography Mass Spectrometry: An Introduction** (Wiley, 2003)



W. M.A. Niessen: **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry** (2006)



R. Willoughby: **A Global View of LC/MS: How to Solve Your Most Challenging Analytical Problems** (2002)



M. McMaster: **LC/MS: A Practical User's Guide** (2005)



O.D. Sparkman: **Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide** (2011)



M. McMaster: **GC/MS: A Practical User's Guide** (2008)

a mnoho dalších ...

Doporučená literatura – internet, kurzy



spectroscopyNOW <http://www.spectroscopynow.com>



MSLINKS <http://www.sisweb.com/mslinks.htm>



IonSource <http://www.ionsource.com/>



CHROMEDIA <http://www.chromedia.org/> (placený přístup)

Kurzy a školení:

Škola MS pořádaná SSJMM

17. ročník Školy MS: 4. - 9. září 2016 v Luhačovicích ; <http://www.spektroskopie.cz/>