

# INTERPRETACE SPEKTER

-

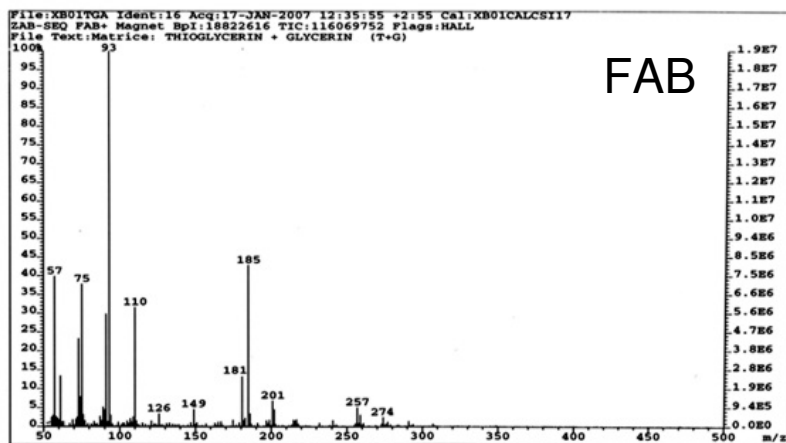
# MALÉ MOLEKULY

# Interpretace hmotnostního spektra

1. Získáme co nejvíce informací o vzorku – původ, UV spektra, NMR spektra, rozpustnost, předpokládaná struktura, čistota (koncentrace).
2. Určíme, které ionty souvisí s analytem a které ne.
3. Určíme hmotnost - hledáme molekulární ion  $M^{+\bullet}$  nebo adukty  $(M+H)^+$ ,  $(M+Na)^+$ ,  $(M+K)^+$ ,  $(M+NH_4)^+$ , pokud je ve spektru multimer  $(2M+H)^+$ ,  $(2M+Na)^+$ , potvrdíme  $M_R$ ; v záporném módu  $(M-H)^-$ , příp.  $(M+CH_3COO)^-$ ,  $(M+HCOO)^-$ .
4. Určíme prvky, které jsou přítomny: aplikace dusíkového pravidla, inspekce izotopového klastru.
5. Určíme elementární složení na základě měření přesné hmotnosti.
7. Porovnáme spektrum s knihovnou, pokusíme se najít alespoň podobná spektra.
8. Řešíme fragmentaci (vyžaduje znalost fragmentačních mechanismů a empirických pravidel) a navrhujeme strukturu.
9. Definitivní potvrzení – srovnání s autentickým standardem.

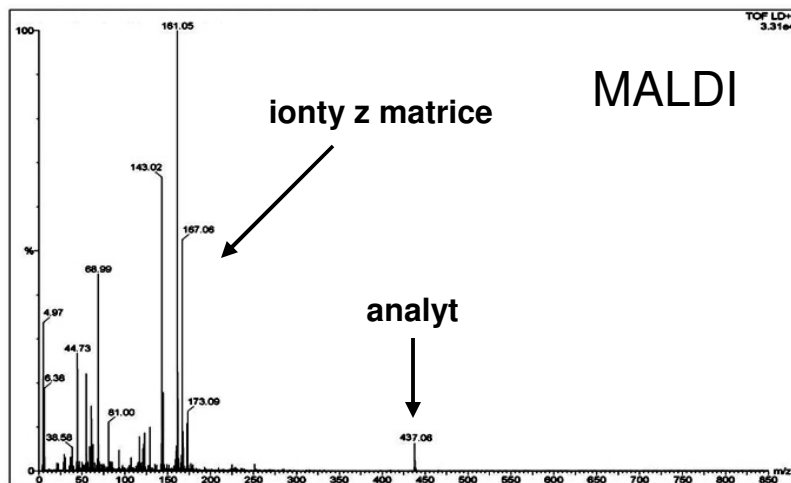
Vyloučení iontů, které nesouvisí s analytem

## Ionty které nesouvisí s analytem – matriční ionty



FAB: molekulární adukty a klastry,  
 fragmentové ionty

FAB spektra běžných matic:  
 I:\MISC\MS\FAB MATRICE\



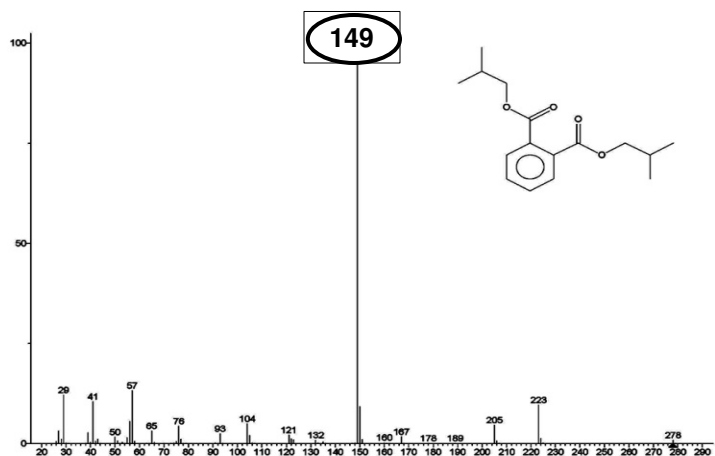
MALDI: molekulární adukty a klastry,  
 fragmentové ionty v nízké oblasti  
 spektra, velmi intenzivní. Spektra se  
 proto měří až od ~ m/z 500.

## Ionty které nesouvisí s analytem – běžné kontaminanty

Vzorky jsou často kontaminovány změkčovadly z plastů (plastové nádoby, hadičky, rukavice, eppendorfky), krémů na ruce apod:

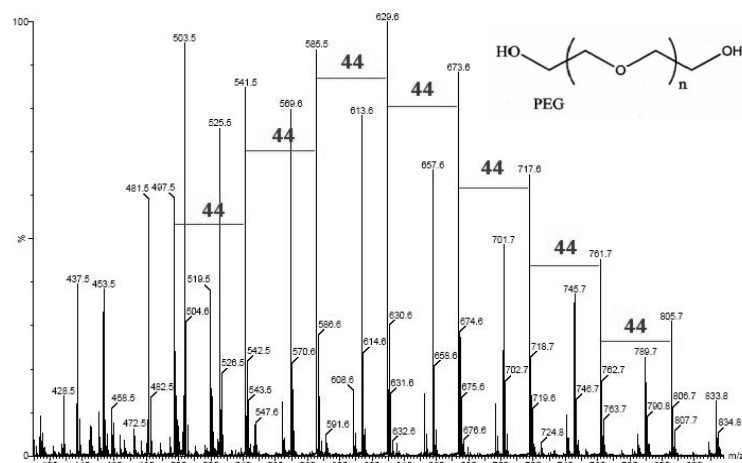
ftaláty, sebakáty, adipáty, fenylfosfáty, silikony, polyethylenglykoly

Ftaláty: výrazný ion  $m/z$  149



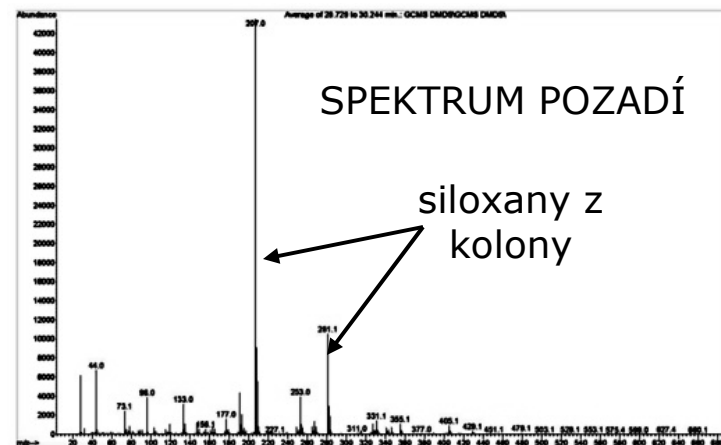
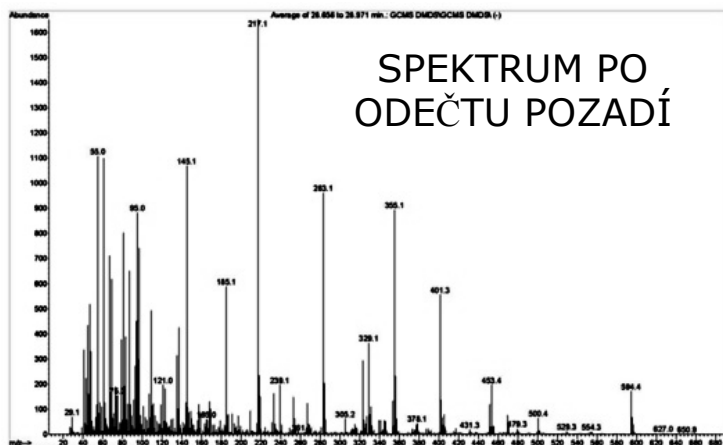
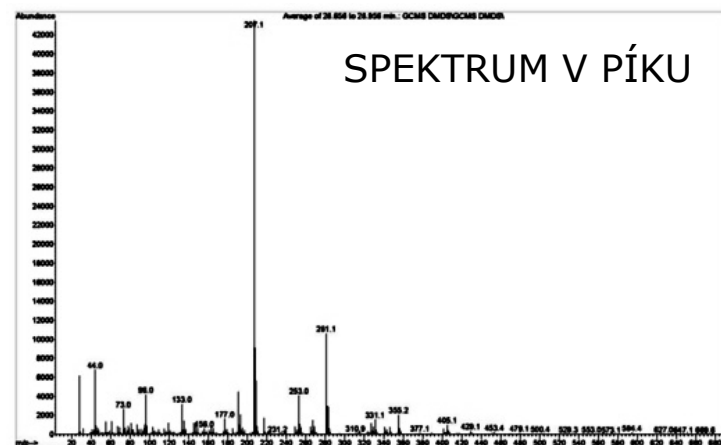
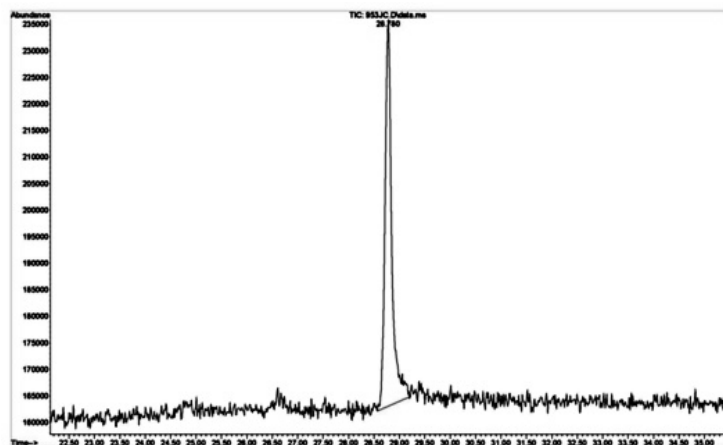
diisobutyl ftalát

Polyethylenglykoly: pravidelné píky ve spektru vzdálené 44 u



oplach laboratorních latexových rukavic

# Ionty které nesouvisí s analytem – pozadí v LC/MS a GC/MS



# Určení molekulové hmotnosti

# Určení molekulové hmotnosti

První krok – identifikace molekulového iontu, případně molekulového aduktu

## I. Elektronová ionizace



Molekulový ion ( $M^{+\bullet}$ ) je radikál kation. Jeho  $m/z$  odpovídá monoizotopické hmotnosti analytu

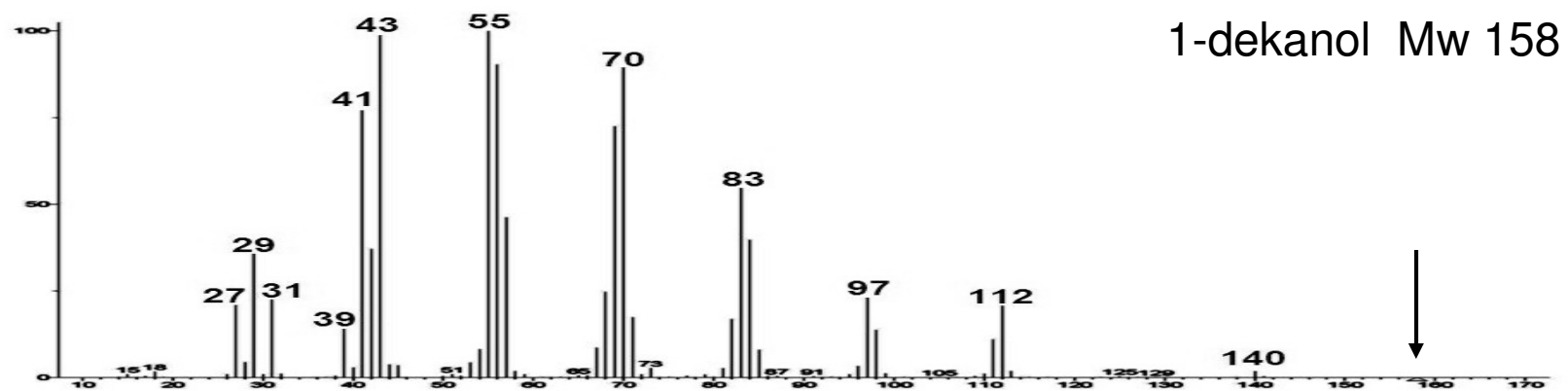
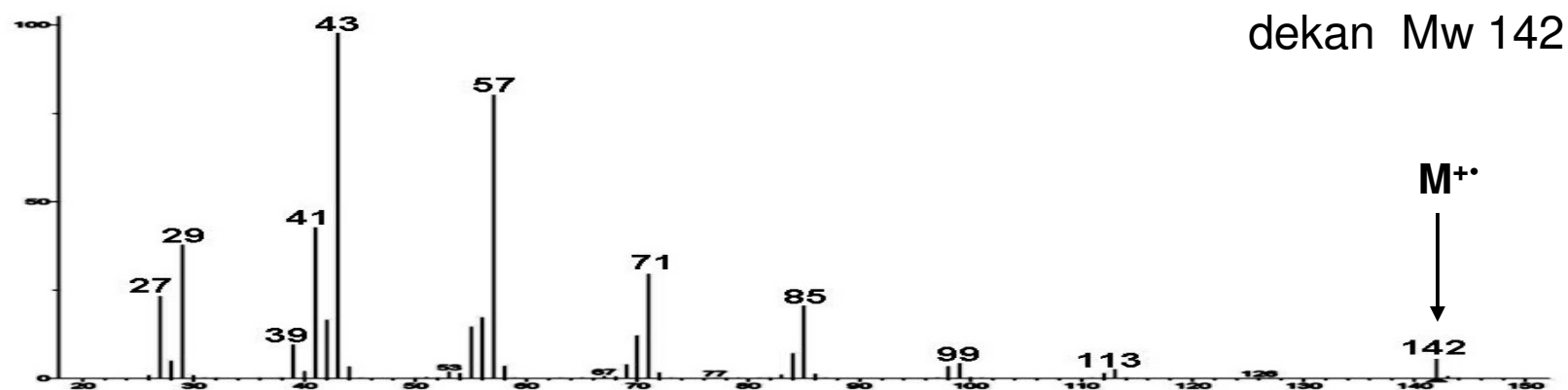
### *Identifikace molekulového iontu ve spektru*

1. ve spektru nemusí být přítomen
2. pokud je přítomen, musí mít nejvyšší  $m/z$  ve spektru
3. je to ion s lichým počtem elektronů ( $OE^{+\bullet}$ )
4. poskytuje logické neutrální ztráty



# Určení molekulové hmotnosti

## I. Elektronová ionizace



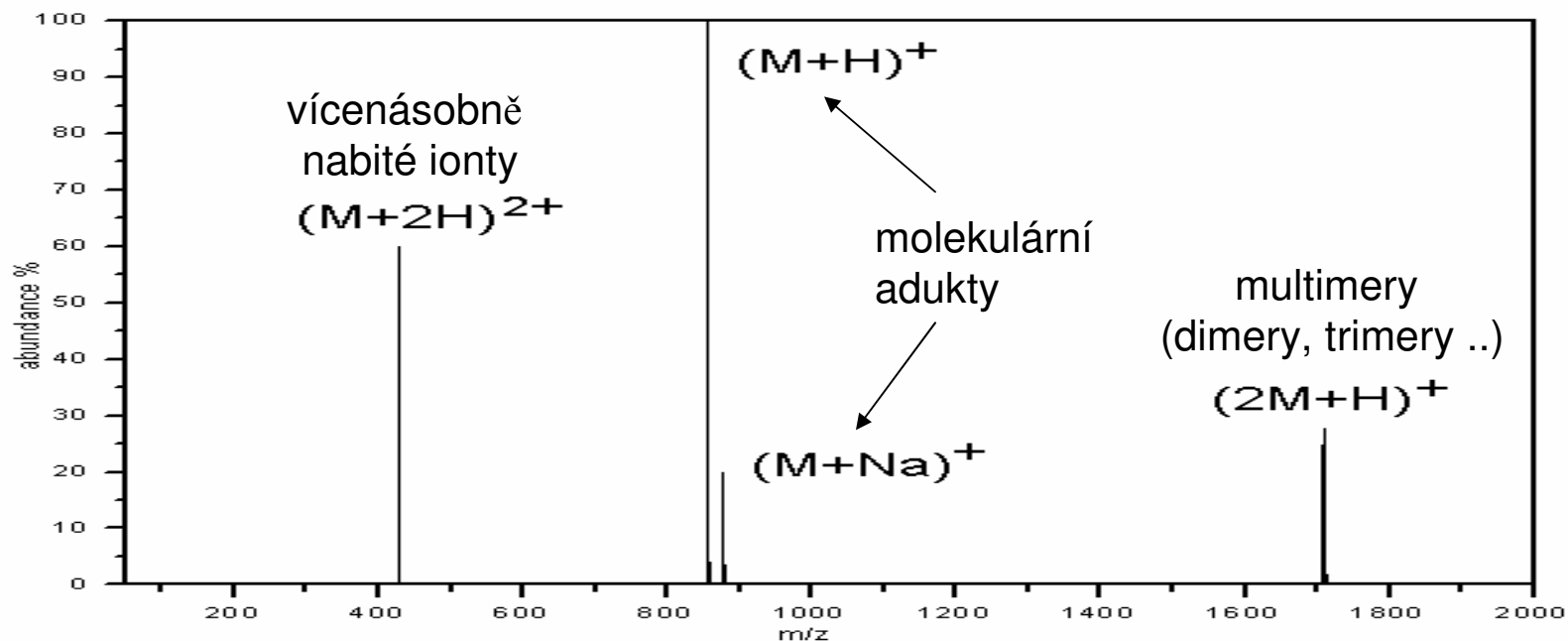
## Určení molekulové hmotnosti

### II. Měkké ionizační techniky (ESI, MALDI)

očekávané ionty (pozitivní):  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$ , vícenásobně nabitě, dimery, trimery

očekávané ionty (negativní):  $[M-H]^-$

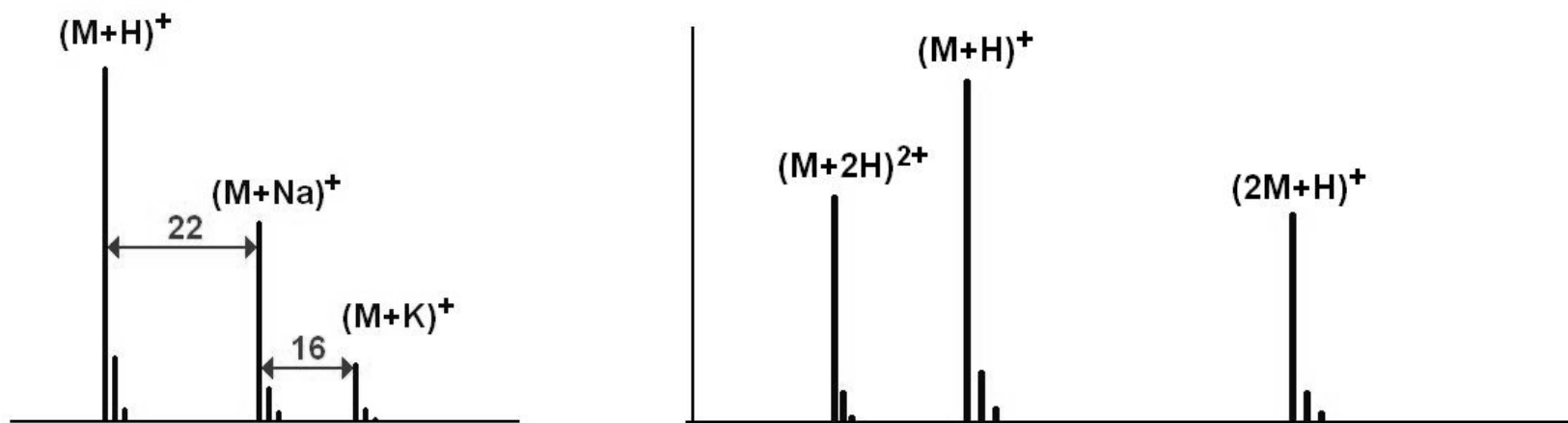
Molekulový adukt je ion se sudým počtem elektronů a nemusí být nejvyšším iontem ve spektru.



# Určení molekulové hmotnosti

## II. Měkké ionizační techniky (ESI, MALDI)

molekulovou hmotnost určujeme na základě přítomnosti aduktů, dimerů, vícenásobně nabitých iontů

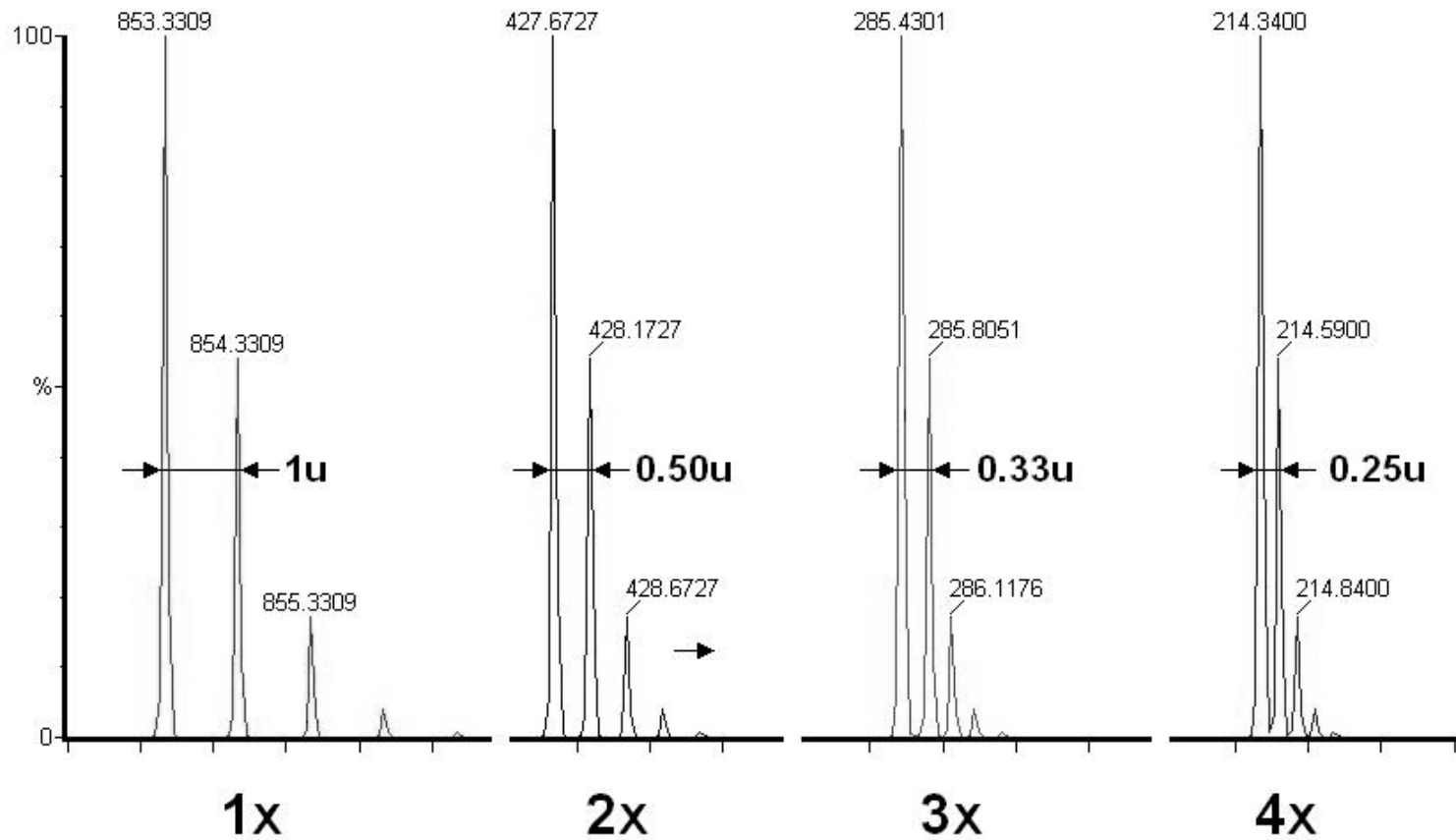


Výpočet aduktů, multimerů, vícenásobně nabitých iontů – Kalkulátor EIC  
I:\MISC\MS\DOWNLOAD\

# Určení molekulové hmotnosti

Určení počtu nábojů iontu

Počet nábojů lze zjistit ze vzdálenosti mezi píky v izotopovém klastru.



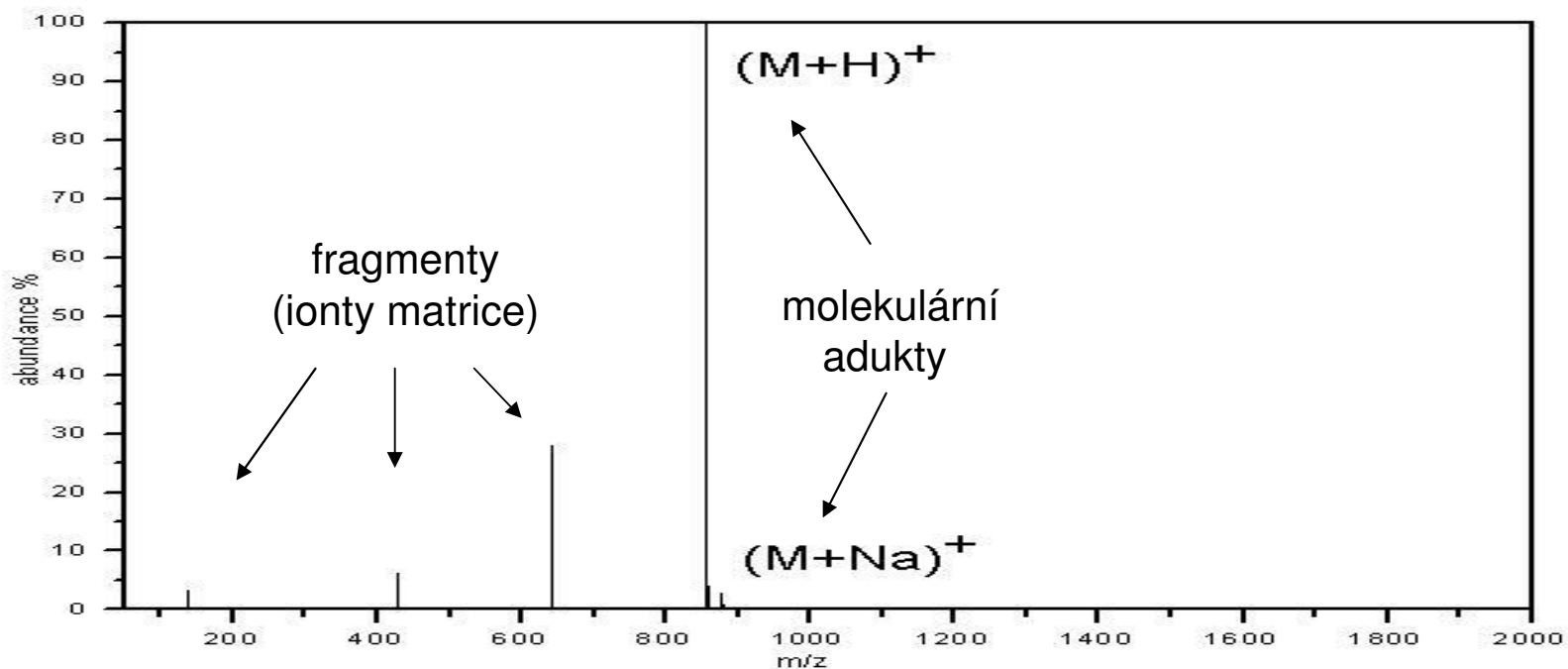
# Určení molekulové hmotnosti

## II. Ionizační techniky FAB, APCI

očekávané ionty (pozitivní):  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$ ,  $M^+$ ,

očekávané ionty (negativní):  $[M-H]^-$

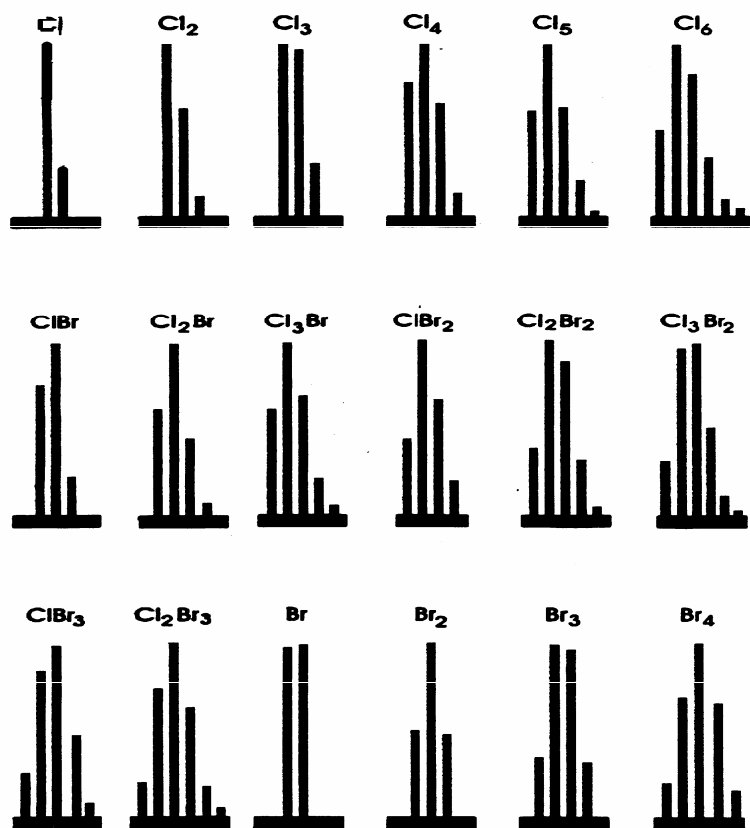
Molekulový adukt/ion je ion se sudým/lichým počtem elektronů a nemusí být nejvyšším iontem ve spektru. Ve spektru jsou i fragmenty a/nebo matriční ionty



## Určení prvků přítomných v molekule

## Izotopové klastry

Izotopické klastry naznačují přítomnost některých prvků v molekule (např. Cl, Br, kovy). Počítačové programy umožňují spočítat složení klastru ze zadaného sumárního vzorce a porovnat ho s experimentem.



<http://members.aol.com/msmssoft/>

<http://www.colby.edu/chemistry/NMR/IsoClus.html>

## Dusíkové pravidlo

Dusíkové pravidlo: platí pro organické sloučeniny obsahující C, H, N, O, S, P, F, Cl, Br, I. Založeno na faktu, že pouze dusík má lichou vaznost při sudé nominální hmotnosti (ostatní mají sudou nebo lichou vaznost i hmotnost).

**lichá hmotnost molekuly = lichý počet dusíků**

**sudá hmotnost molekuly = sudý (nulový) počet dusíků**

### **Aplikace pravidla na ionty:**

**EI** (molekulové ionty s lichým počtem elektronů) – platí tak, jak je uvedeno

**ESI, APCI, APPI, FAB** (molekulové adukty, ionty se sudým počtem elektronů) .. platí opačné pravidlo !

m/z 188

m/z 189



## Určení elementárního složení z přesné hmotnosti

Čím přesněji určíme hmotnost iontu, tím více omezíme počet možných struktur, tj. tím spíše dojdeme ke správnému elementárnímu složení

Př. paclitaxel,  $C_{47}H_{51}NO_{14}$ ,  
mon. hmotnost 854.3388

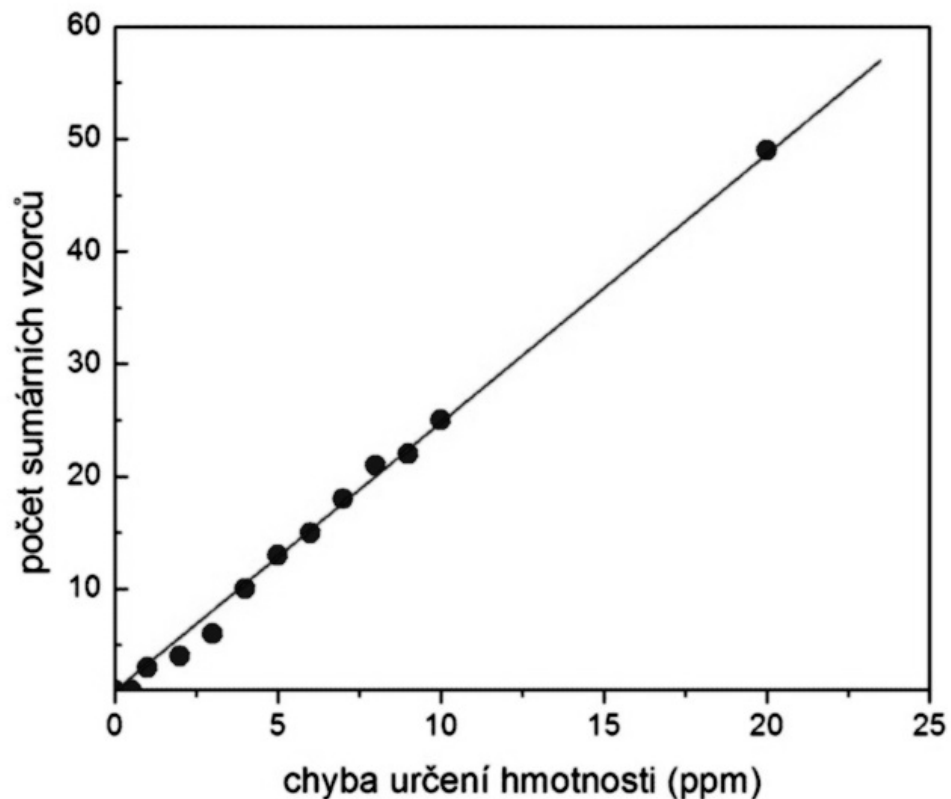
Omezení pro výpočet vzorce:

C: 0-100

H: 0-100

N: 0-10

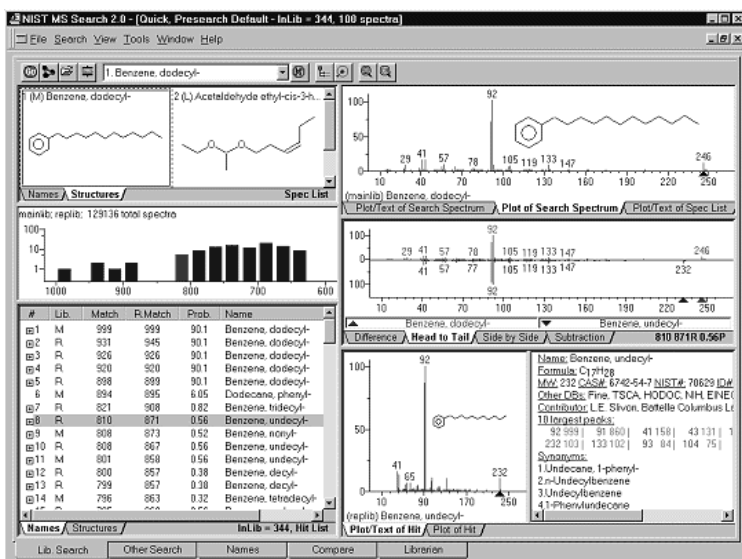
O: 0-30



## Hledání v knihovných spekter

# Knihovny spekter EI

## NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library

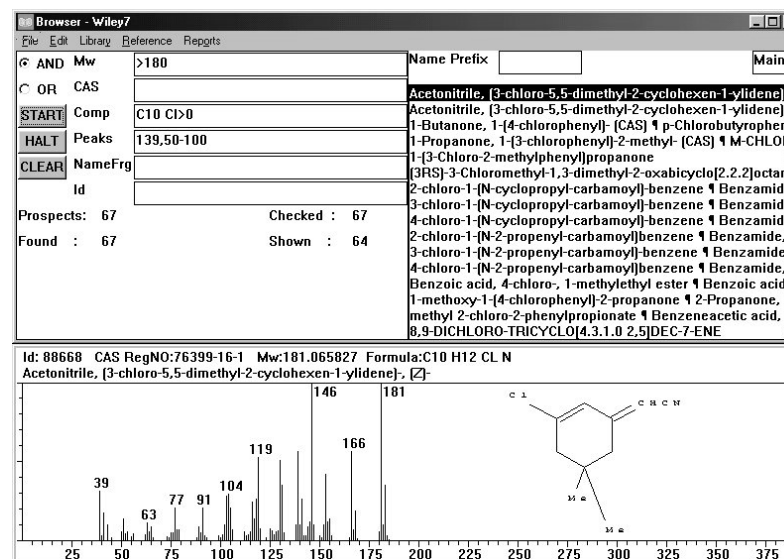


190 825 EI spekter (70 eV)  
 5 191 MS/MS spekter  
 retenční indexy látek  
 strukturní vzorce



<http://www.nist.gov/>

## Wiley Registry of Mass Spectral Data



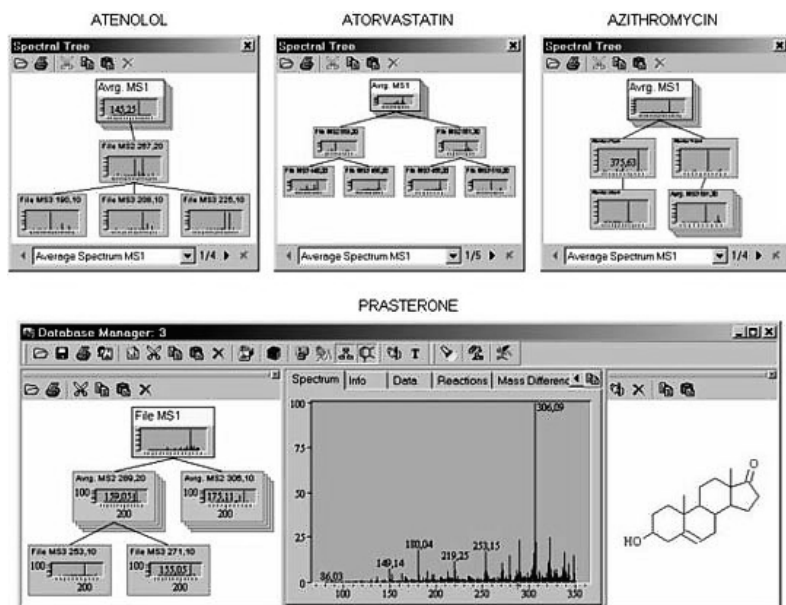
338 000 EI spekter (70 eV)  
 strukturní vzorce



<http://www.palisade-ms.com/>

# Knihovny MS/MS spekter (ESI)

## HighChem's spectral library collection

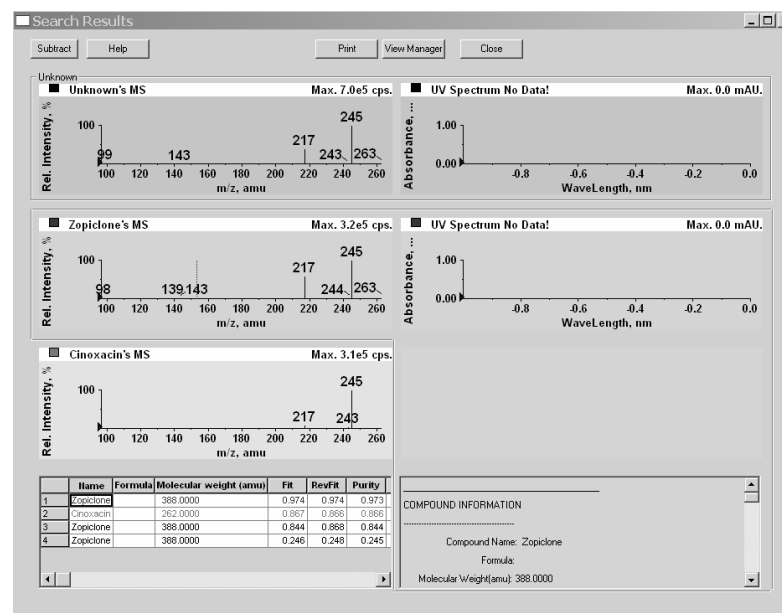


MS/MS spektra > 1000 látek  
léčiva, přírodní látky  
strukturní vzorce



<http://www.nist.gov/>

## MS Libraries for LC-MS/MS and ESI in-source CID-MS, University of Freiburg



MS/MS spektra ~ 800 látek,  
léčiva



<http://www.chemicalsoft.de/>

# Interpretace fragmentových iontů (když selžou knihovny . . . )

Fragmentace iontů se sudým počtem elektronů ( $EE^+$ )

ESI, APCI, APPI, FAB

## Fragmentace $EE^+$

lonty se sudým počtem elektronů – nejčastěji  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M-H]^-$

### FRAGMENTACE $EE^+$ :

vzniká ion se sudým počtem elektronů ( $EE^+$ ) a neutrální částice



lonty  $EE$  jsou obecně stabilnější než  $OE^+$

Spektra jsou jednodušší, poskytují tak méně informací než spektra  $EI$

# Fragmentace $EE^+$ - typické neutrální ztráty

**Table 2.** Characterization of functional groups of organic compounds using the collision-induced neutral losses from their  $[M + H]^+$  and/or  $[M - H]^-$  ions

Functional group	Compound class		Neutral loss <sup>a</sup>	
			$[M + H]^+$	$[M - H]^-$
-COOH	<b>Carboxylic acids</b>	Aromatic	H <sub>2</sub> O	<b>CO<sub>2</sub></b>
		Aliphatic	-	no CO <sub>2</sub>
-CH=O	Aldehydes	Aromatic	CO	-
-C=O	Ketones	Aromatic	CO	-
-COOCH <sub>3</sub>	<b>Methyl esters</b>	Aliphatic/aromatic	<b>CH<sub>3</sub>OH</b>	-
-CONH <sub>2</sub>	<b>Amides</b>	Aliphatic/aromatic	<b>NH<sub>3</sub></b>	-
-SO <sub>3</sub> H	<b>Sulfonic acids</b>	Aromatic	-	<b>SO<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)</b>
-CN	<b>Nitriles</b>	Aliphatic/aromatic	<b>HCN</b>	-
-F	<b>Fluorides</b>	Aliphatic	<b>HF</b>	-
-Cl	<b>Chlorides</b>	Aliphatic/aromatic	<b>HCl (°Cl)</b>	<b>HCl (°Cl)</b>
-Br	<b>Bromides</b>	Aliphatic/aromatic	<b>°Br</b>	-
-NO <sub>2</sub>	<b>Nitroaromatics</b>	Aromatic	<b>°NO/°NO<sub>2</sub>(°OH)</b>	<b>°NO/°NO<sub>2</sub></b>
-OH	Alcohols	Aliphatic	H <sub>2</sub> O	-
	Phenols	Aromatic	no H <sub>2</sub> O	-
-NH <sub>2</sub>	<b>Amines</b>	Aliphatic	<b>NH<sub>3</sub></b>	-
		Aromatic	HCN, no NH <sub>3</sub>	-
-CH <sub>3</sub>	Alkyl derivatives	Aromatic	no CH <sub>4</sub>	-
-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>		Aromatic	no C <sub>2</sub> H <sub>6</sub>	-
-NHCH <sub>3</sub>	Methylamines	Aromatic	<b>°CH<sub>3</sub></b>	-

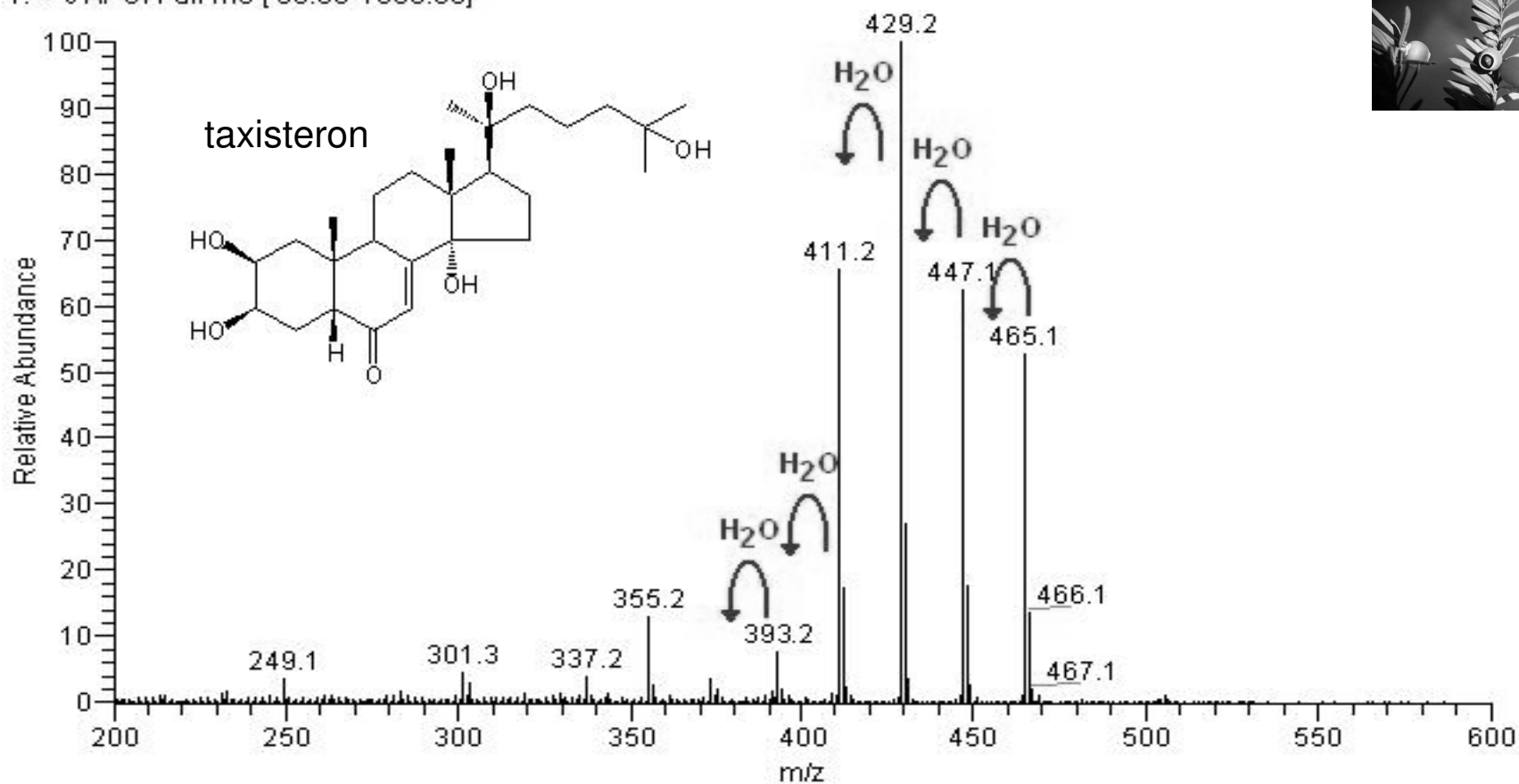
<sup>a</sup> bold: neutral loss which is characteristic as well as relatively specific for a given functional group; in parentheses: neutral losses observed only occasionally.



# Fragmentace $EE^+$ - APCI spektrum

**Př.: Steroly** – typické neutrální ztráty vody z polyhydroxylovaných sterolů

4046jh03 #485-518 RT: 13.06-13.57 AV: 34 SB: 50 12.32-12.81, 13.92-14.58 NL: 1.73E7  
T: + c APCI Full ms [ 50.00-1000.00]

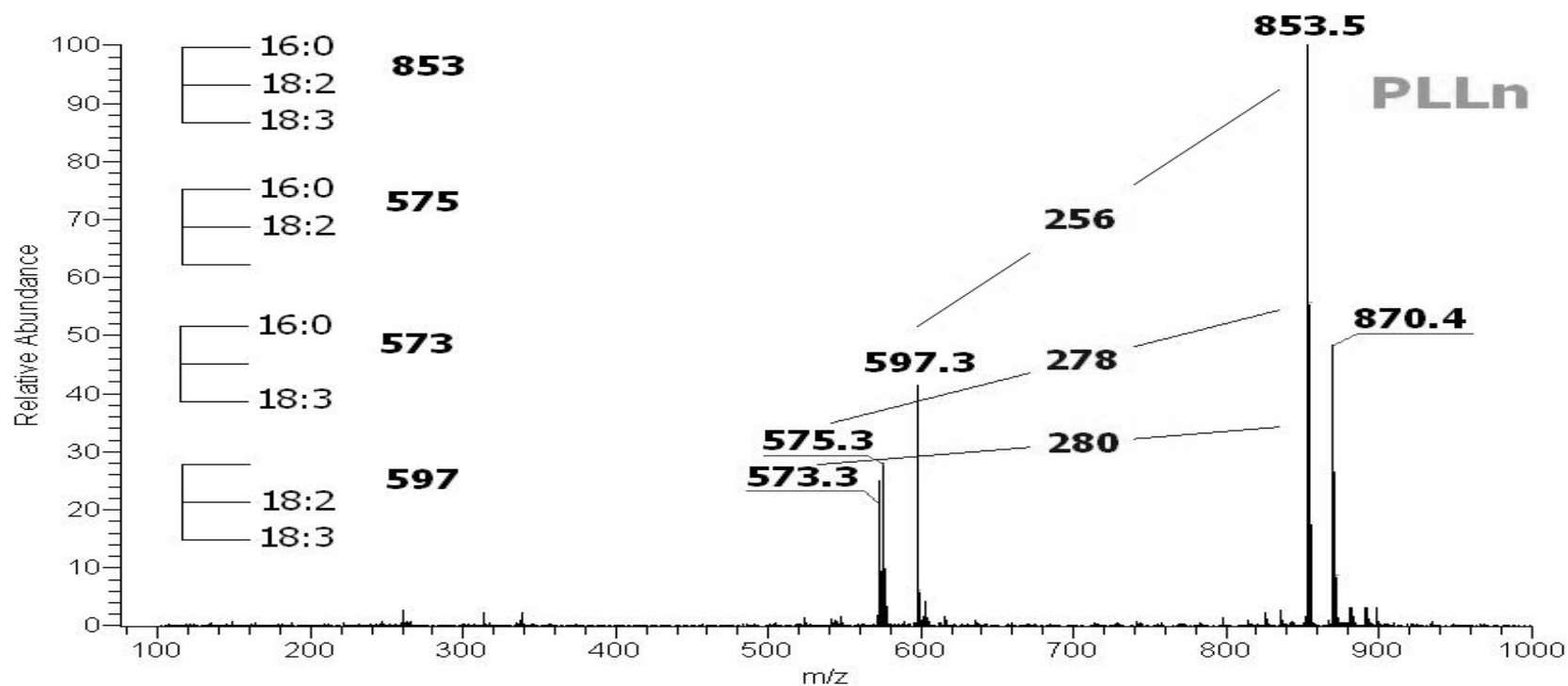


## Fragmentace $EE^+$ - APCI spektrum

**Př.: Triacylglyceroly** – identifikace mastných kyselin (acylů) v molekule

APCI ionizace – tvorba molekulárních aduktů  $[M+H]^+$  a  $[M+NH_4]^+$

Hlavní fragmentační cesta: neutrální ztráta mastné kyseliny – vznikají diacylglycerolové ionty  $[M+H-R_iCOOH]^+$

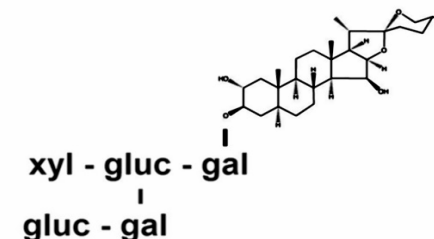
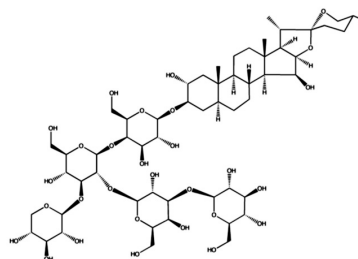


## Fragmentace $EE^+$ - ESI, $MS^n$ pro určování struktury

Př.: **GLYKOSIDY** – určování struktury cukerné složky



Př.: Digitonin,  $C_{56}H_{92}O_{29}$



ESI ionizace – tvorba molekulárního aduktu  **$[M+Na]^+$**

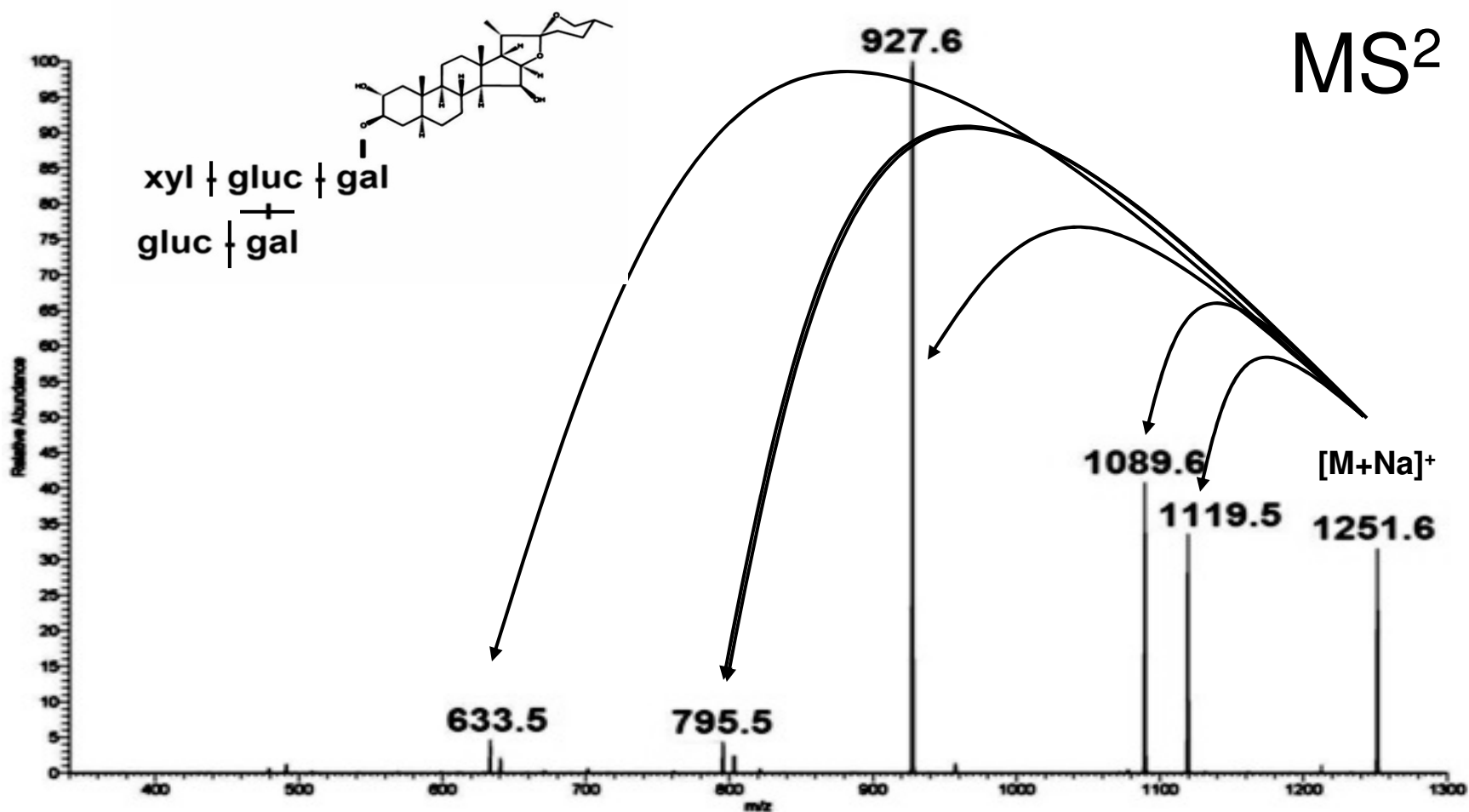
MS/MS fragmentace – odštěpování cukerných jednotek jako neutrálních částic

Hexóza: neutrální ztráta **162 u** (molekula –  $H_2O$ )

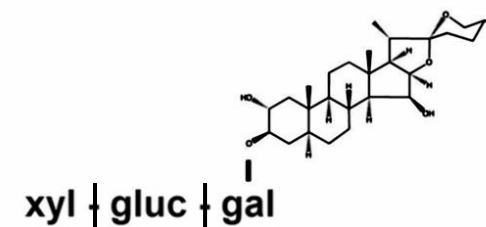
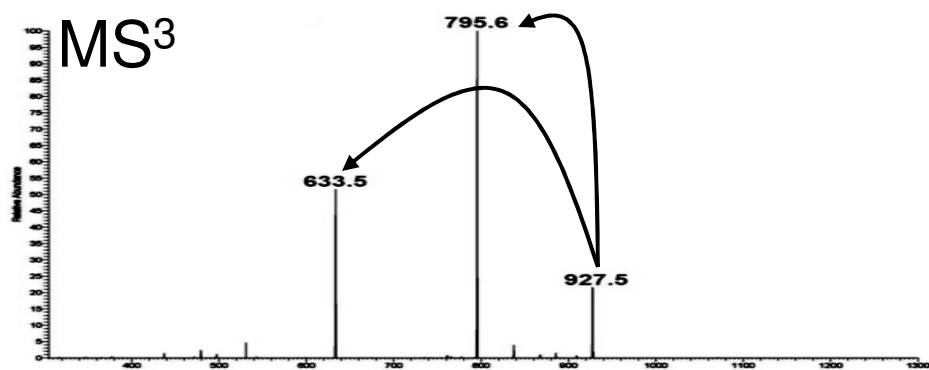
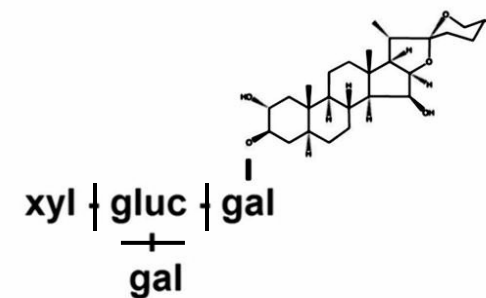
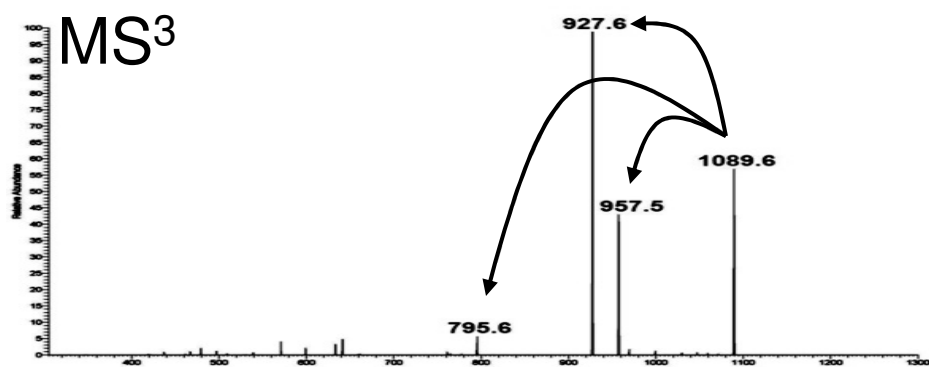
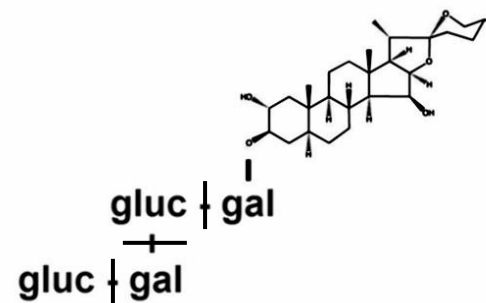
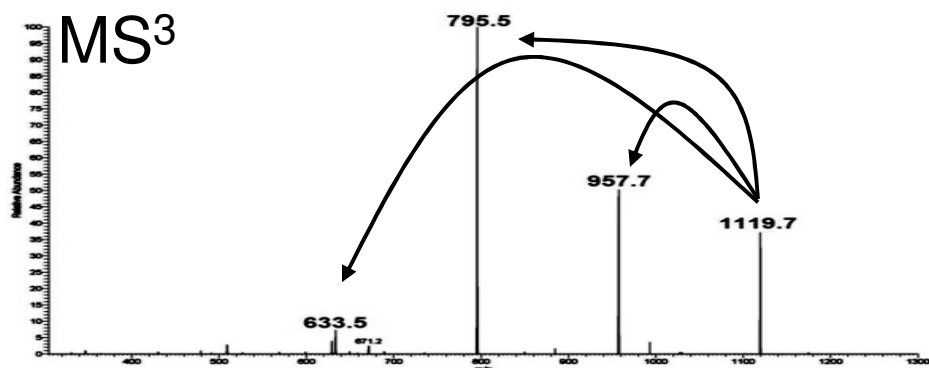
Pentóza: neutrální ztráta **132 u** (molekula –  $H_2O$ )

# Fragmentace $EE^+$ - ESI, $MS^n$ pro určování struktury

## GLYKOSIDY – určování struktury cukerné složky



# Fragmentace $EE^+$ - ESI, $MS^n$ pro určování struktury



Fragmentace iontů s lichým počtem elektronů ( $OE^{\bullet+}$ )

ionizace EI

## Fragmentace $OE^{+\bullet}$ (EI ionizace)

Ionty s lichým počtem elektronů  $M^{+\bullet}$

### FRAGMENTACE $OE^{+\bullet}$

I. vzniká ion se sudým počtem elektronů a radikál



II. vzniká ion s lichým počtem elektronů a neutrální částice



Spektra jsou bohatá, informačně obsažná, mohou být použita jako “fingerprint” - tvorba knihoven (NIST)

Probíhají pouze monomolekulární reakce

## Interpretace: Logické neutrální ztráty

Neutrální ztráty musí dávat chemický smysl. Ztráty radikálů i neutrálních molekul.

Ztráta (u)	Logická ztráta ?	Složení
1	ano	H
2	ano	H <sub>2</sub>
3 - 14	NE	-
15	ano	CH <sub>3</sub>
16	ano	NH <sub>2</sub> , O
17	ano	OH, NH <sub>3</sub>
18	ano	H <sub>2</sub> O
19	ano	F
20	ano	HF
21 - 25	NE	-
26	ano	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> , CN
27	ano	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> , HCN
28	ano	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> , CO
29	ano	HCO, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> , CH <sub>3</sub> N
30	ano	CH <sub>2</sub> O
31	ano	CH <sub>3</sub> O
32	ano	CH <sub>3</sub> OH, S
33	ano	SH
34	ano	H <sub>2</sub> S
35	ano	Cl
36	ano	HCl
37 - 40	NE	-
41 a výše	ano	homologické ztráty

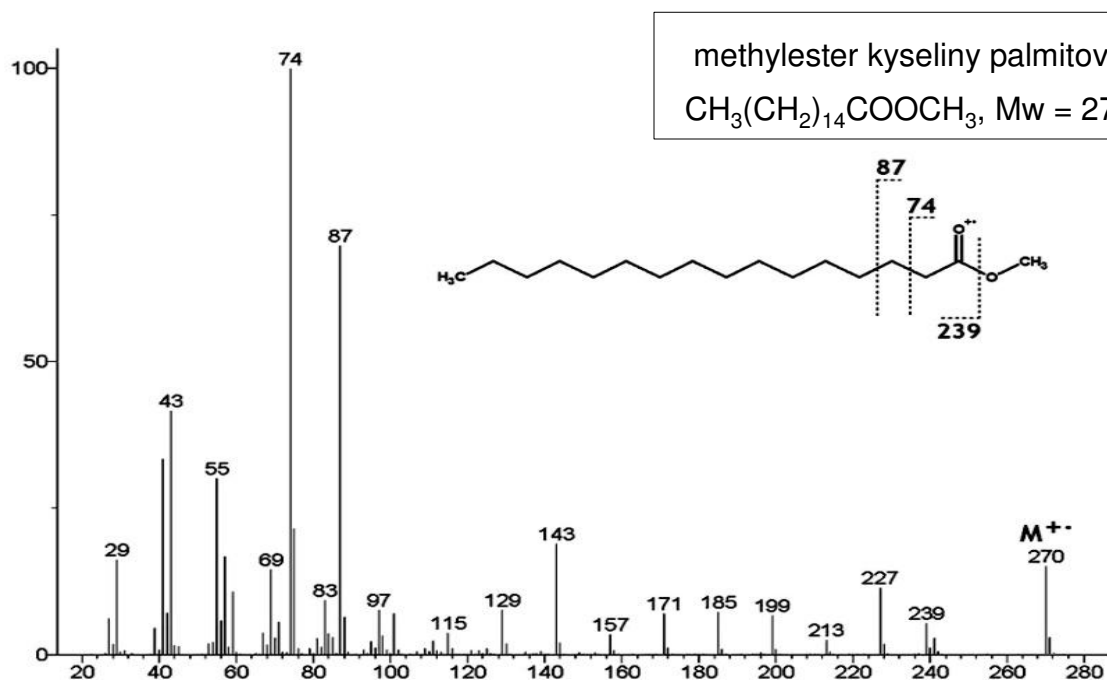


## Interpretace: Fragmenty s lichým počtem elektronů

Fragmenty s lichým počtem elektronů (např. sudé fragmenty ze sudých molekulových iontů) indikují:

- přesmyky
- retro-Diels-Alderovy reakce
- eliminace malých neutrálních molekul

m/z 74  
přesmyk  
McLafferty



## Interpretace: Charakteristické iontové série

Homologické série v oblasti nízkých  $m/z$  mohou podat informace o strukturních prvcích v molekule

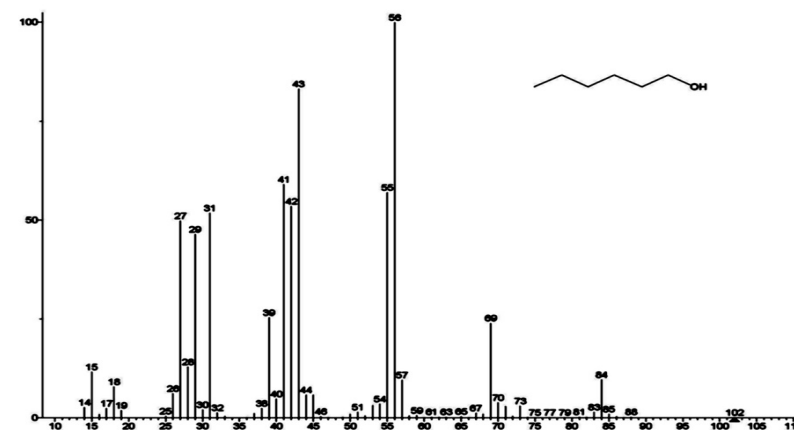
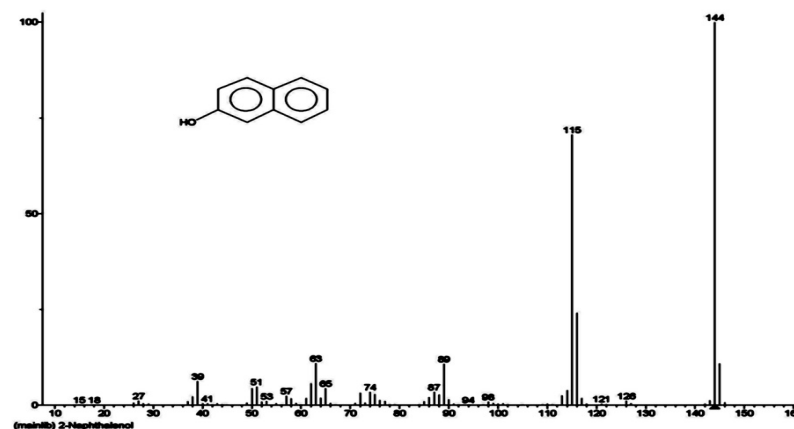
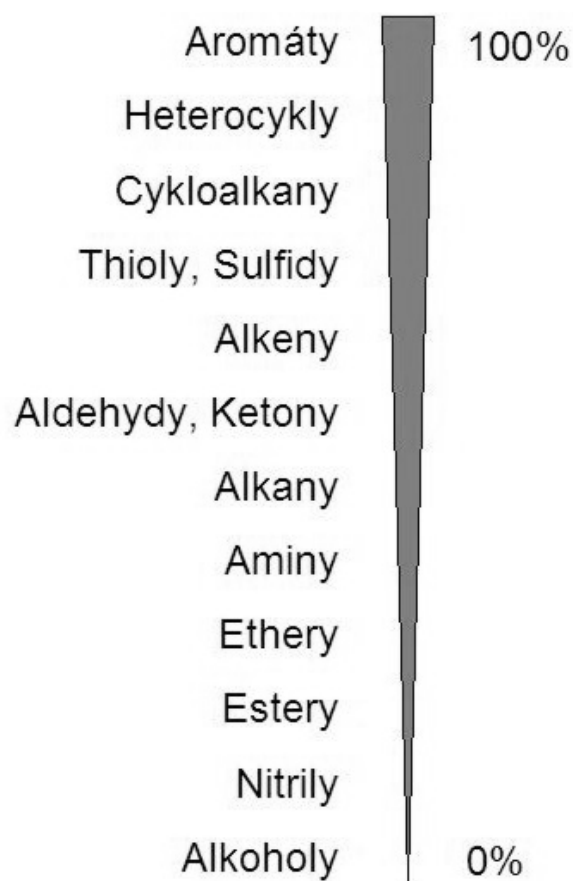
Ionty	Série	Funkční skupiny
$m/z$ 29, 43, 57, 71, 85, 99, ...	$C_nH_{2n+1}^+$	alkyl („alifatika“)
$m/z$ 31, 45, 59, 73, 87, ...	$C_nH_{2n+1}O^+$	alkoholy, ethery
$m/z$ 33, 47, 61, 75, 89, ...	$C_nH_{2n+1}S^+$	thioly, sulfidy
$m/z$ 30, 44, 58, 72, 86, ...	$C_nH_{2n+2}N^+$	aminy
$m/z$ 29, 43, 57, 71, 85, 99, ...	$C_nH_{2n-1}O^+$	aldehydy, ketony
$m/z$ 45, 59, 73, 87, ...	$C_nH_{2n-1}O_2^+$	kyseliny, estery
$m/z$ 40, 54, 68, 82, 96, ...	$C_nH_{2n-2}N^+$	nitrily
$m/z$ 38, 39, 50-52, 63-65, 75-78, 89-92	-	aromatika

## Interpretace: Charakteristické ionty

m/z	Ion
19	$F^+$ , $H_3O^+$
20	$HF^{+}$
30	$CH_2NH_2^+$ , indikuje aminy
31	indikuje $CH_3O-$ nebo $-CH_2OH$
33,34	$HS^+$ , $H_2S^{+}$
35,36,37,38	$Cl^+$ , $HCl^{+}$
46	$NO_2^+$ , indikuje nitrosloučeniny
47	$CCl^+$ , $HC(OH)_2^+$ , $CH_3S^+$
61	$CH_3C(OH)_2^+$ indikuje „dlouhé“ estery kyseliny octové
73	$(CH_3)_3Si^+$ , $CH_5Si^+$
77	fenyl (doprovázen m/z 51 a 50)
105	benzoyl (pokud doprovázen m/z 77)

## Interpretace: Intenzita molekulárního iontu

Intenzita molekulárního iontu souvisí s jeho stabilitou. Podle intenzity lze usuzovat na přítomnost určitých strukturních prvků v molekule.

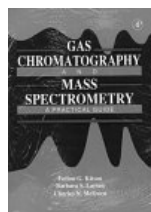


## Literatura

EI



Fred W. McLafferty and Frantisek Turecek: Interpretation of Mass Spectra. University Science Books (1993). ISBN-10: 0935702253, ISBN-13: 978-0935702255

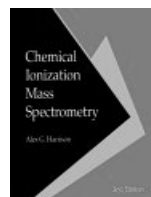


Fulton G. Kitson, Barbara S. Larsen, and Charles N. McEwen: Gas Chromatography and Mass Spectrometry. Academic Press (1996). ISBN-10: 0124833853, ISBN-13: 978-0124833852

ESI  
APCI  
CI



Levsen et al.: Even-electron ions: a systematic study of the neutral species lost in the dissociation of quasi-molecular ions. J. Mass Spectrom. 42, 1024 - 1044, 2007



Alex. G. Harrison: Chemical Ionization Mass Spectrometry, CRC(1992). ISBN-10: 0849342546, ISBN-13: 978-0849342547