

ZÁKLADY HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie

- fyzikálně-chemická metoda, která využívá elektrická a magnetická pole k separaci nabitých částic s cílem určit jejich hmotnost (poměr m/z).

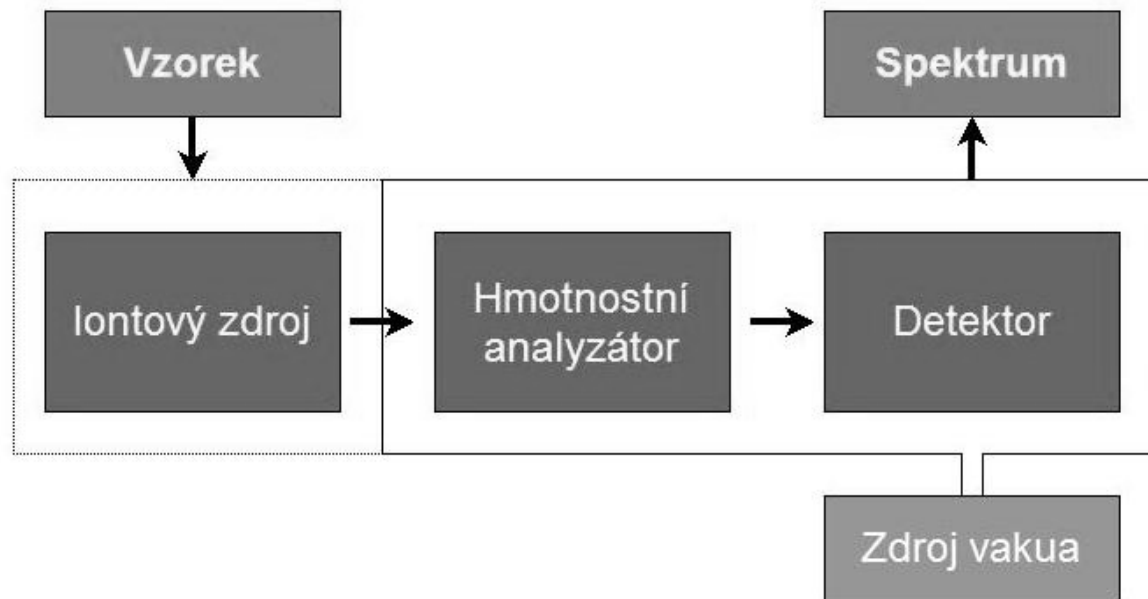
Organická hmotnostní spektrometrie

- slouží k charakterizaci (identifikaci) organických sloučenin na základě hmotnosti molekulárních iontů, aduktů a fragmentů, a ke studiu reakcí iontů v plynné fázi

Přístroj: hmotnostní spektrometr

Data: hmotnostní spektrum

Hmotnostní spektrometr



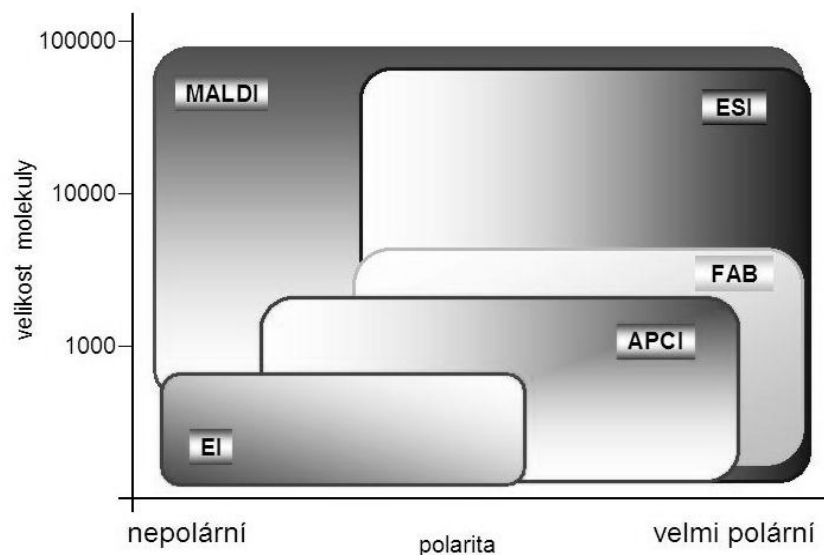
Iontový zdroj – převod neutrálních (i nabitých) látek na ionty v plynné fázi

Hmotnostní analyzátor – separace iontů podle poměru m/z

Detektor – detekce iontů

Iontové zdroje

Ionizace - převedení neutrálních molekul na ionty v plynné fázi



Neexistuje univerzální ionizační technika pro všechny molekuly, pro různé typy sloučenin jsou vhodné různé ionizace.



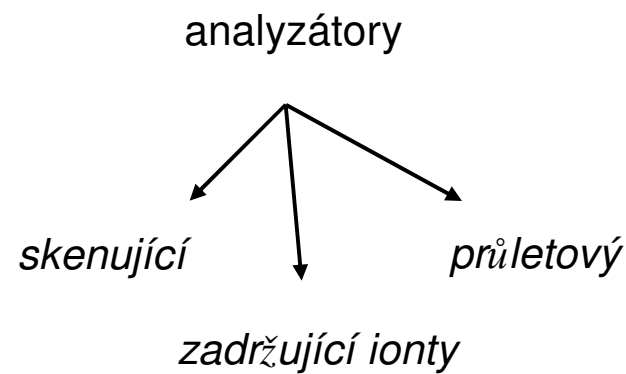
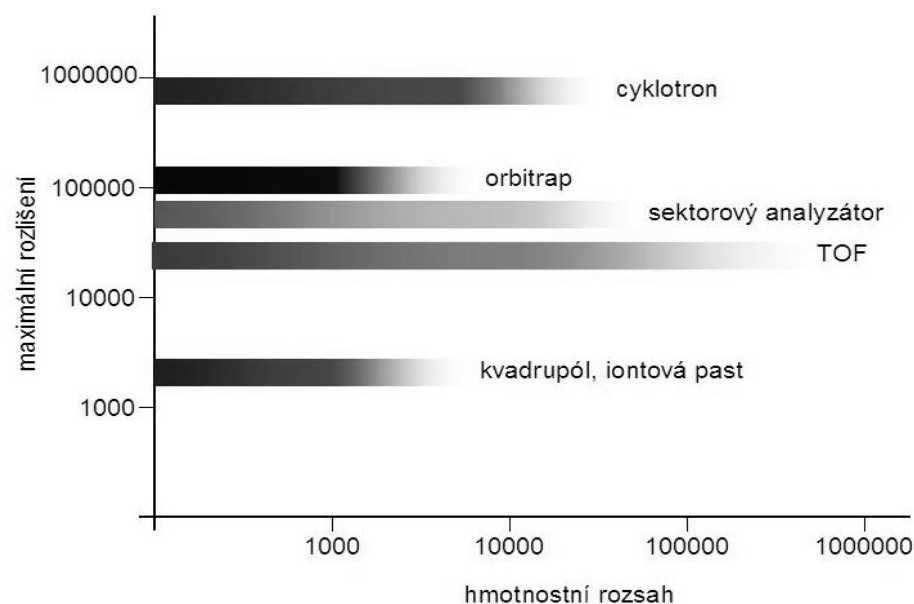
Rozdělení ionizačních technik podle energie:

tvrdé – vysoce energetická ionizace, molekuly se rozpadají na fragmenty (EI)

měkké – málo energetické, vznikají hlavně molekulární adukty, minimální fragmentace (ESI, MALDI, APCI, FAB)

Hmotnostní analyzátoři

Hmotnostní analyzátoř je zařídění, které využívá elektromagnetických polí k separaci iontů v plynné fázi podle jejich poměru hmotnost/náboj (m/z).



skenující - postupně propouští ionty různých hmotností (sektor, kvadrupól)

zadržující ionty - zachytí ionty, pak je analyzuje (iontová past, orbitrap, ICR)

průletový - zaznamenává čas, který potřebují ionty k překonání dané vzdálenosti (TOF)

Detektory, vakuová čerpadla

Detektor je zařízení, které převádí proud nabitých částic (iontů) na měřitelnou veličinu (el. proud). Přístroje s ICR celou a orbitrap neobsahují zvláštní detektor - signálem je proud indukovaný na stěnách analyzátoru.

Hmotnostní spektrometry pracují za vakua, aby nedocházelo ke srážkám iontů s neutrálními částicemi.

jemné vakuum (předvakuum)

100 - 0,1 Pa ($l = d$)

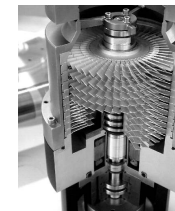
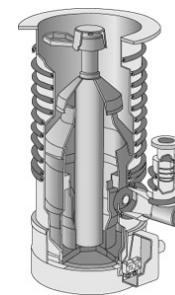
rotační olejová pumpa

vysoké vakuum / ultravakuum

0,1 - 10^{-6} Pa ($l > d$)

difúzní pumpa nebo turbopumpa

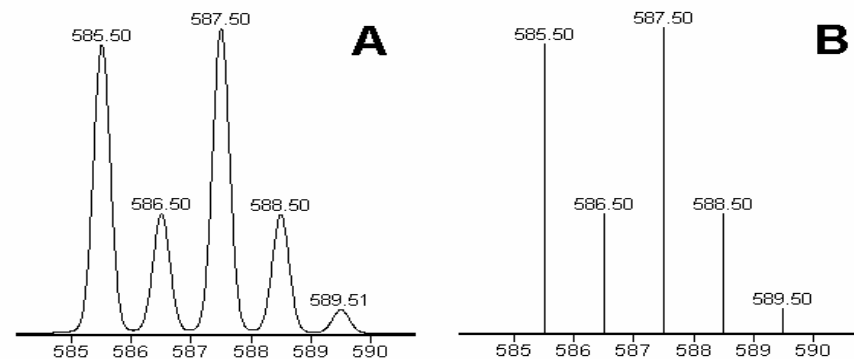
l = střední volná dráha iontu, d = rozměr vakuové komory



Hmotnostní spektrum

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

spektrum $\begin{cases} \rightarrow & \textit{kontinuální} \\ \rightarrow & \textit{histogram} \end{cases}$



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

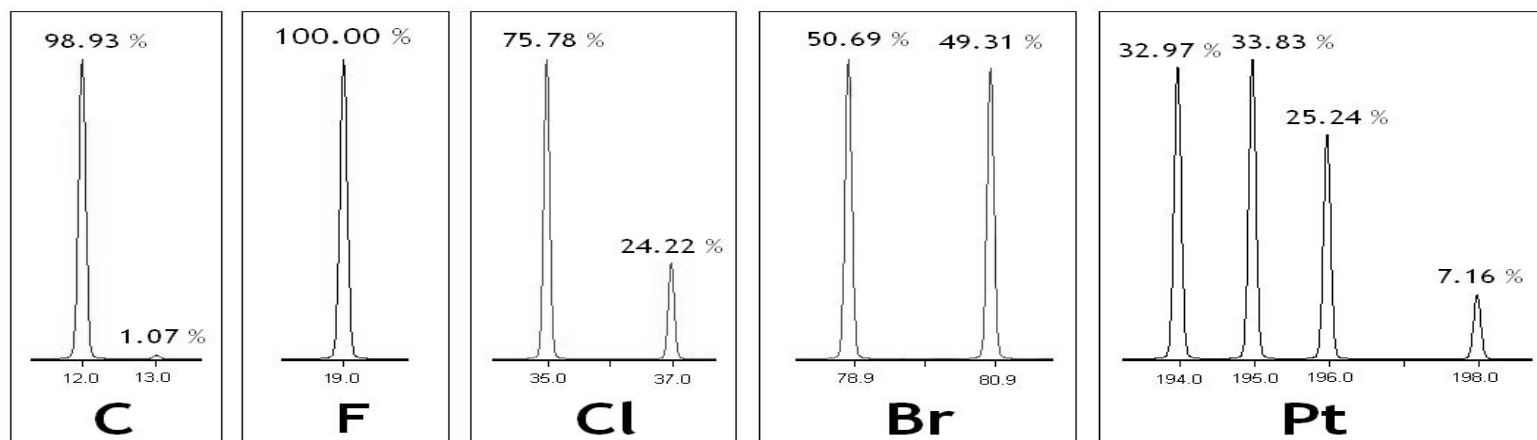
Centroidové spektrum (histogram):
spektrum je převedeno na sloupcový graf, poloha (m/z) signálu je odečtena v těžišti píku, intenzita odpovídá ploše nebo výšce píku (přehlednější); B

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

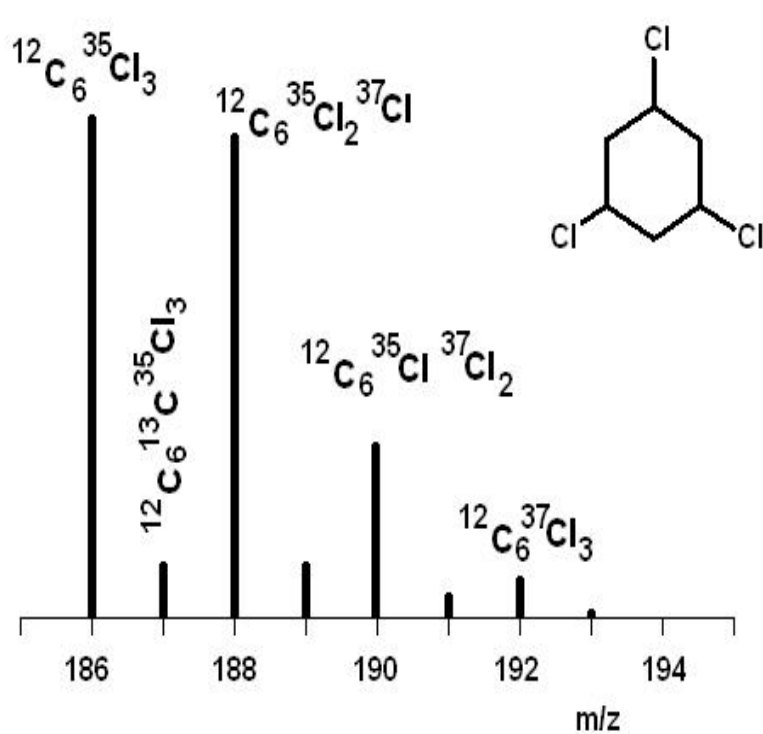


prvky

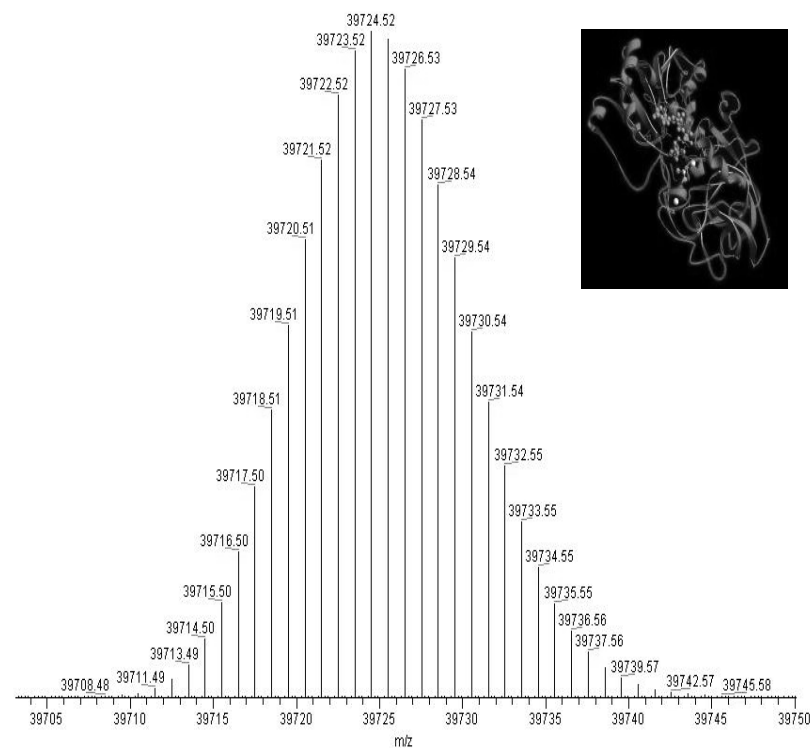
- X (monoizotopické): ^{19}F , ^{23}Na , ^{31}P , ^{127}I
- X+1: vodík (^1H , ^2H), uhlík (^{12}C , ^{13}C), dusík (^{14}N , ^{15}N)
- X+2: chlor (^{35}Cl , ^{37}Cl), brom (^{79}Br , ^{81}Br) kyslík (^{16}O , ^{18}O)

Izotopové složení iontů

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



trichlorcyklohexan
 $C_6H_9Cl_3$



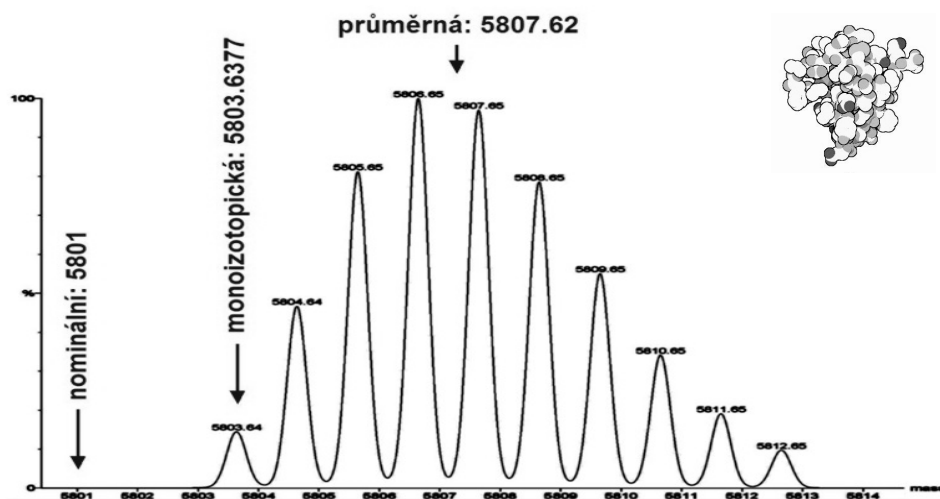
alkoholdehydrogenáza
 $C_{1764}H_{2859}N_{469}O_{516}S_{26}$

Hmotnost iontu v MS

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

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

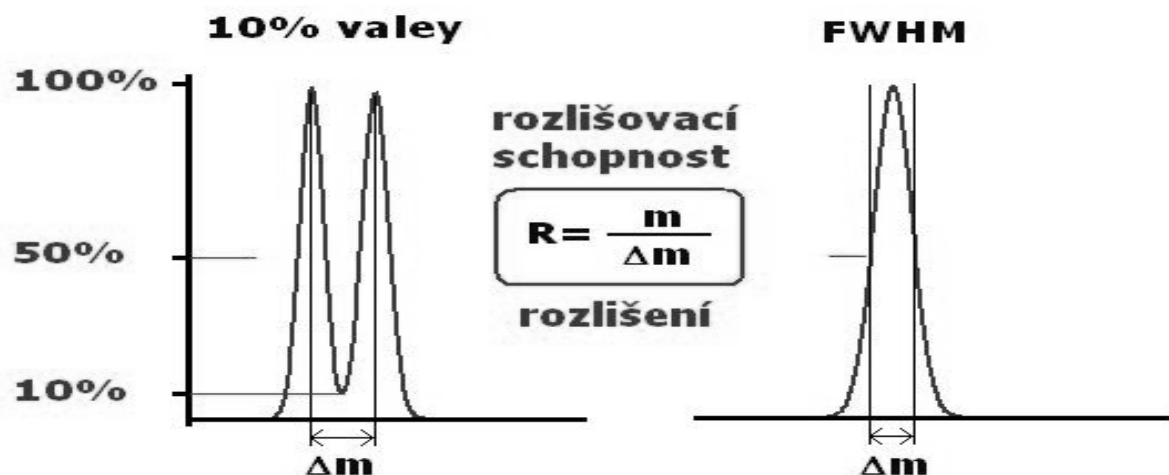
průměrná hmotnost: vážený průměr hmotností jednotlivých izotopů podle jejich zastoupení (př. CO_2 : $12.01 + 2 \times 16.00 = 44.01$)



Př.: inzulin
 $\text{C}_{257}\text{H}_{383}\text{N}_{65}\text{O}_{77}\text{S}_6$

Rozlišení v MS

Rozlišovací schopnost - schopnost přístroje oddělit sousední píky. Číselná hodnota – rozlišení.

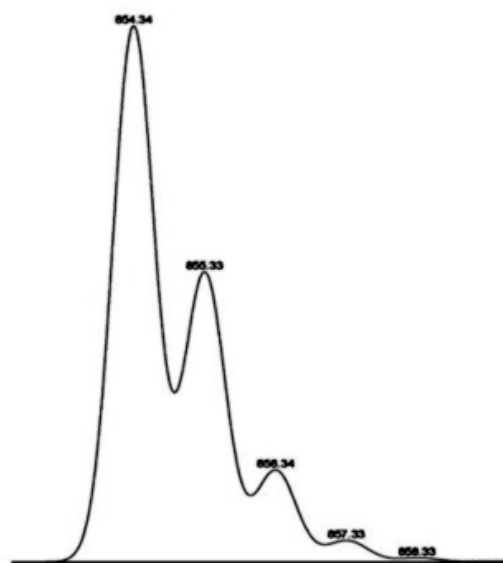
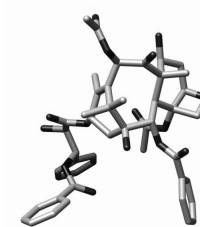


Rozlišení – 10% údolí: nejmenší rozdíl hmotností mezi stejně vysokými píky u nichž je výška údolí rovna definovanému zlomku výšky píků (např. 10% údolí). Používá se pro sektorové přístroje (konstantní rozlišení pro celý hmotnostní rozsah).

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

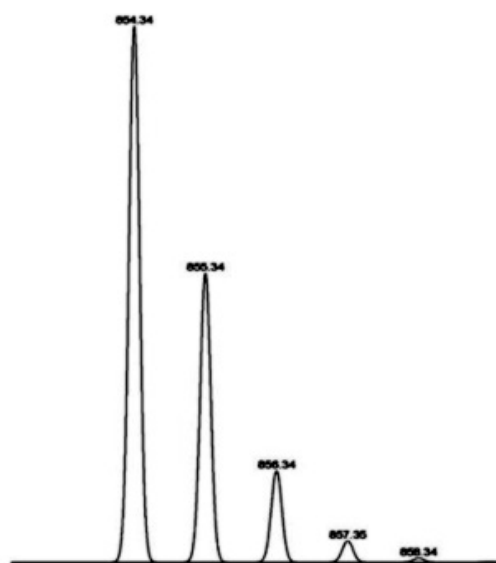
Rozlišení v MS

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



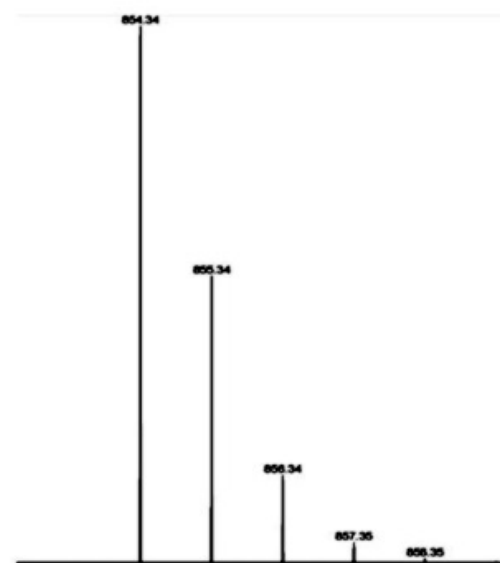
1 250

nízké rozlišení



5 000

↔



100 000

vysoké rozlišení

Přesnost určení hmotnosti

Nominální hmotnost – změřena na přístroji s jednotkovým (nizkým) rozlišením

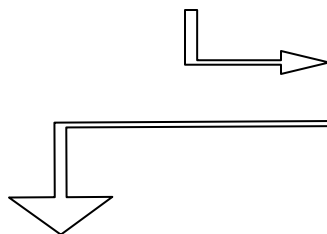
Př. odlišíme od sebe ionty m/z 500 od 501

Přesná hmotnost – změřena na přístroji s vysokým rozlišením, přesnost se vyjadřuje v ppm (“přesná hmotnost” < 5 ppm)

Př. rozlišíme m/z 500 od 500.001)

Využití přesné hmotnosti – výpočet elementárního složení iontu

Př: neznámá látka, molekulární adukt 854.3388



pravděpodobné složení: $C_{48}H_{51}NO_{14} (M+H)^+$

Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

Tolerance = 15.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
Isotope matching not enabled

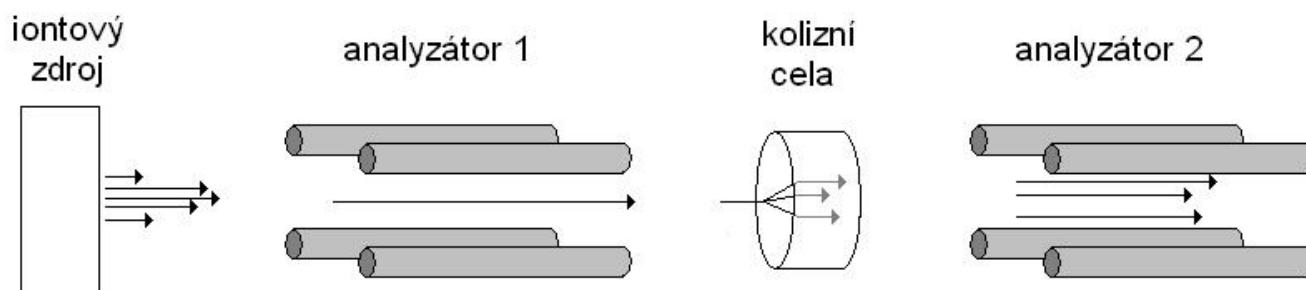
Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

390 formula(e) evaluated with 5 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

| Mass | Calc. Mass | mDa | PPM | DBE | Formula |
|----------|------------|-------|-------|------|----------------|
| 854.3375 | 854.3388 | -1.3 | -1.5 | 22.5 | C47 H52 N O14 |
| | 854.3348 | 2.7 | 3.2 | 18.5 | C42 H52 N3 O16 |
| | 854.3447 | -7.2 | -8.4 | 13.5 | C40 H56 N O19 |
| | 854.3289 | 8.6 | 10.1 | 27.5 | C49 H48 N3 O11 |
| | 854.3500 | -12.5 | -14.6 | 22.5 | C46 H52 N3 O13 |

Tandemová hmotnostní spektrometrie – MS/MS, MSⁿ

Techniky, kdy pomocí prvního hmotnostního analyzátoru jsou vybrány ionty, které jsou podrobeny fragmentaci; vzniklé produkty jsou sledovány pomocí druhého analyzátoru.



Fragmentace v kolizní cele:

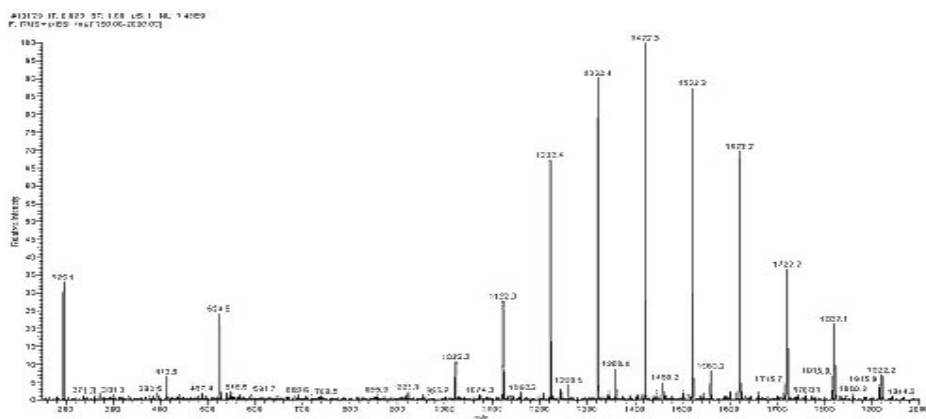
Ionty jsou urychleny elektrickým polem a srážejí se s neutrálními molekulami (N_2 , Ar, He) v kolizní cele. Vznikají fragmenty (disociace indukovaná kolizemi - CID). Využití – určování struktury, specifická detekce.

MSⁿ lze provádět i v jednom analyzátoru (např. v iontové pasti).

Ladění a kalibrace hmotnostního spektrometru

LADĚNÍ: Nastavení iontové optiky a dalších parametrů přístroje tak, aby se získal maximální signál (poměr S/N) pro daný analyt. Sleduje se i tvar signálu (symetrie píku, rozlišení apod.) Ladit je možno ručně po jednotlivých parametrech nebo automaticky (dle možností ovládacího softwaru).

KALIBRACE: Hmotnostní škálu spektrometru je nutné kalibrovat. Kalibrace se provádí ze změřeného spektra směsi látek se známými poměry m/z.



Kalibrační směsi:

polyethylenglykoly
 klastry NaI, CsI
 směsi peptidů
 Ultramark™ (fluorované fosfazený)
 komerční směsi

Spektrum kalibrační směsi obsahující kofein, peptid MRFA a Ultramark 1621 (Thermo Finnigan).

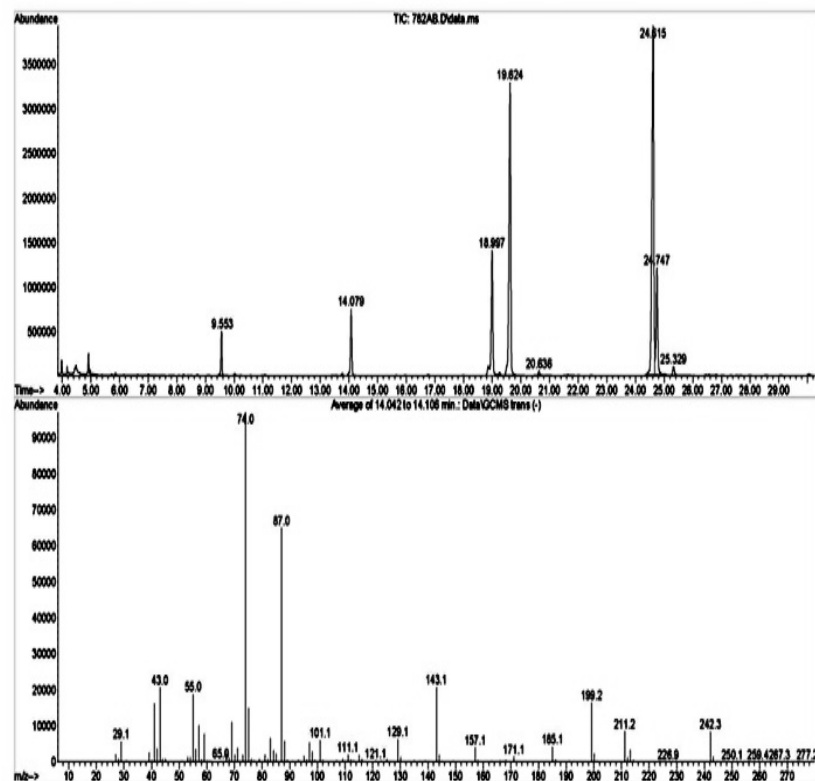
Spojení MS s plynovou chromatografií

GC byla první chromatografická technika spojená s MS (mobilní fáze kompatibilní s hmotnostním spektrometrem)

Iontový zdroj – EI (CI), možnost prohledávat databáze MS spekter – rychlá identifikace látek

Vhodná pro méně polární, termálně stabilní molekuly s nízkou molekulovou hmotností

Standardní analytická technika v mnoha odvětvích (environmentální a forenzní analýzy, analýza látek, těkavých sloučenin apod.



Spojení MS s kapalinovou chromatografií

Spojení HPLC s hmotnostní detekcí je výhodné, z technického hlediska však představovalo velký problém. Ten je dnes vyřešen API zdroji (ESI, APCI, APPI).

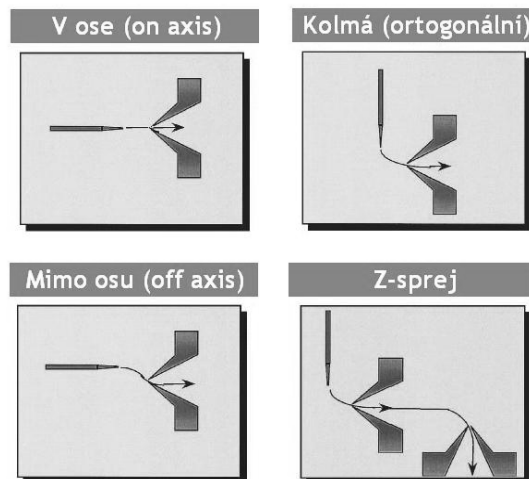
MS je (téměř) ideální detektor pro HPLC

- vysoká citlivost
- vysoká selektivita a zároveň univerzálnost
- umožňuje kvalitativní analýzu
- umožňuje kvantitativní analýzu

K dispozici jsou iontové zdroje pro spojení s normální i reverzní chromatografií. Omezeně kompatibilní jsou mobilní fáze s netěkavými pufry a iont-párovými činidly.

Společným rysem API technik je sprejování mobilní fáze do MS.

GEOMETRIE SPREJOVÁNÍ



Spojení MS s kapilární elektroforézou

CZE/MS

zatím málo rozšířená technika

Výhody:

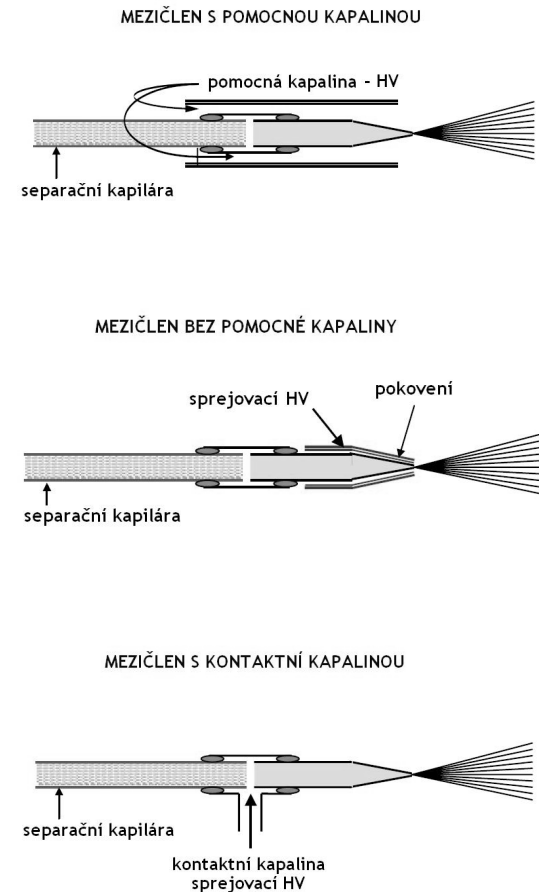
- velmi vysoká separační účinnost
- analýza nabitých a velmi polárních látek
- velmi nízká spotřeba vzorku

Nevýhody:

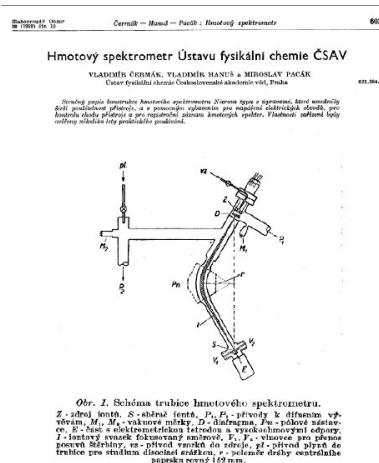
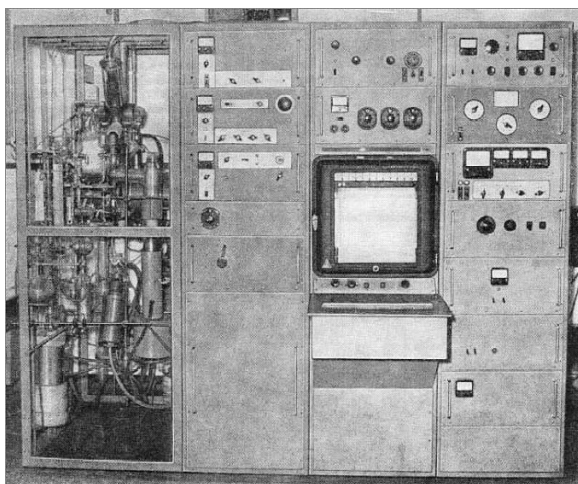
- technické problémy spojení (vzájemné ovlivňování separačního napětí a sprejovacího napětí zdroje)
- malá kompatibilita separačních pufrů s MS

Hlavní aplikace:

nanoESI – analýza peptidů, identifikace proteinů



Historie hmotnostní spektrometrie v ČR



1953

první hmotnostní spektrometr

V. Čermák, V. Hanuš,

Č. Jech, J. Cabicar

počátek 60-let

první komerční MS instrumenty MCH-1303

1 v Ústavu fyzikální chemie ČSAV

1 v Ústavu organické chemie a biochemie
(Ladislav Dolejš)



1969 - MS902 (AEI)