

Základy hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie

- Spektrometrické metody – metody založené na interakci hmoty a záření
- **Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně chemická metoda, která využívá elektrické a magnetické pole k separaci nabitých částic s cílem určit jejich hmotnost (poměr m/z)**

Organická hmotnostní spektrometrie

➤ Kvalitativní

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

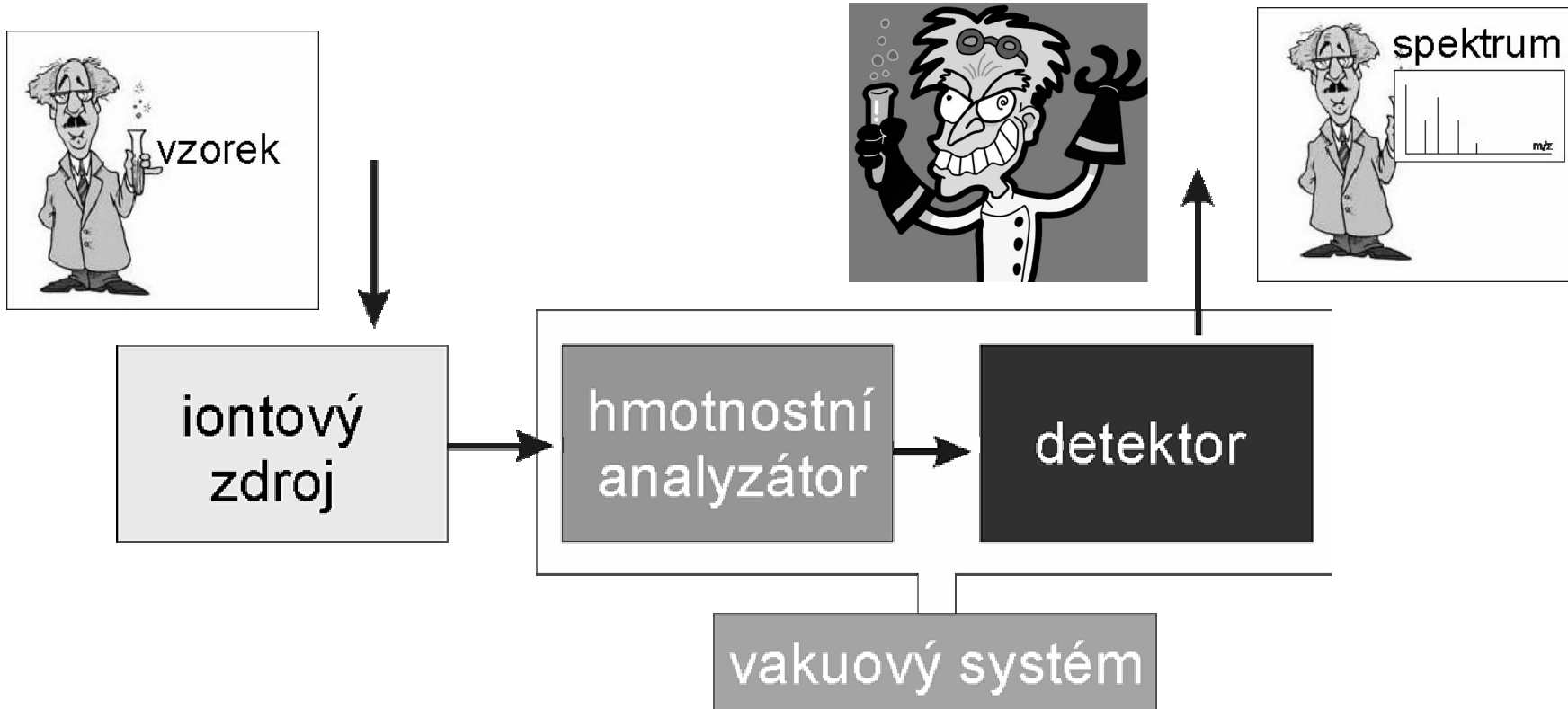
➤ Kvantitativní

- pro kvantifikaci organických sloučenin ve vzorku na základě intenzity odezvy detektoru pro vybraný ion nebo skupinu iontů

Základní pojmy

- Hmotnost (m)
 - Da (Dalton), u – počet atomových hmotnostních jednotek, číselně rovný molární hmotnosti
 - m/z – účinná hmotnost
- Počet nábojů (z)
 - z - počet elementárních nábojů (většinou 1)
- Ionty pozitivní a negativní – NE kationty a anionty
- Hmotnostní spektrometrie – NE spektroskopie

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

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

- Neexistuje univerzální ionizační technika pro všechny molekuly, pro různé typy sloučenin jsou vhodné různé ionizační techniky
- Rozdělení ionizačních technik
 - Tvrdé
 - Měkké
- Ionty
 - $M + e^- \rightarrow M^{+\bullet} + 2 e^-$
 - $M + HA \rightarrow [M+H]^+ + A^-$
 - $M + B^- \rightarrow [M-H]^- + HB$

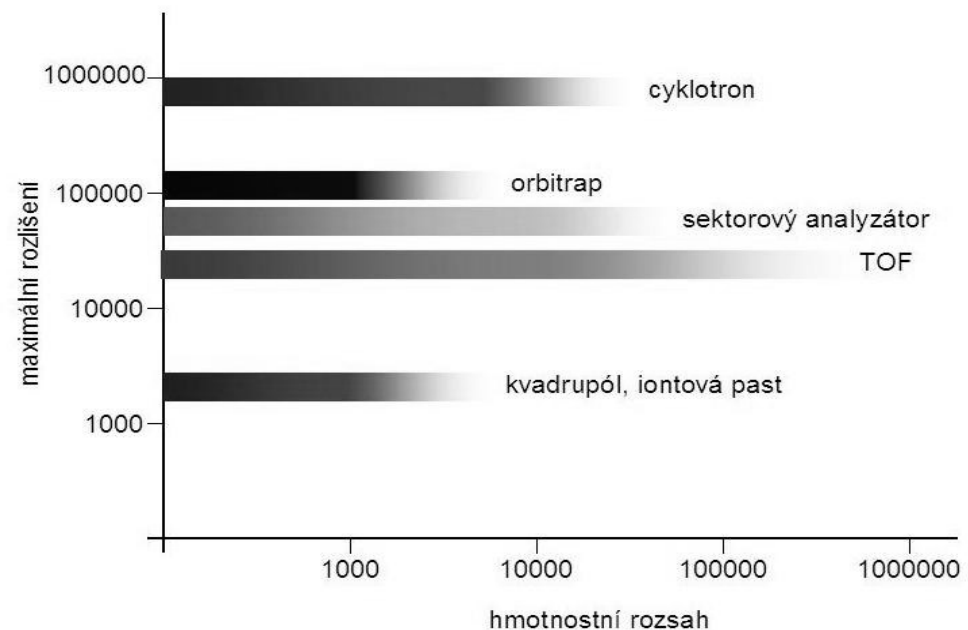
(Viz. následující přednáška M. Šandy)

Hmotnostní analyzátořy

Hmotnostní analyzátoř – separace iontů v plynné fázi podle poměru m/z (využívá principů pohybu nabitých částic v elektrickém nebo magnetickém poli)

➤ Hmotnostní analyzátořy

- Skenující - postupně propouští ionty různých hmotností (sektor, kvadrupól)
- Zadržující ionty – zachytí ionty, pak je analyzuje (iontová past, orbitrap, ICR)
- Průletový – měří čas, který potřebují ionty k překonání dané vzdálenosti (TOF)



Viz. přednáška v 11:00 h

Detektory, vakuová technika

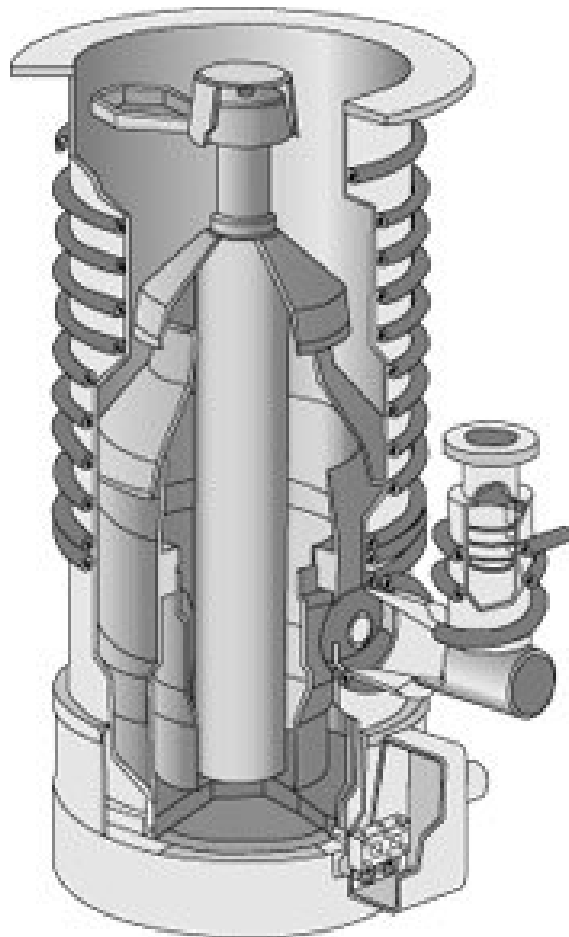
- Detektor - zařízení převádějící měřenou veličinu na elektrický proud
 - MS – převádí proud nabitých částic na elektrický proud
 - ICR a ORBITRAP výjimka – nepotřebují detektor – signálem je proud indukovaný ve stěně analyzátoru

- Vakuová čerpadla
 - Proč vakuum?

Ve vakuu nedochází ke srážkám iontů s neutrálními částicemi – zvýší se střední volná dráha letu
 - Dvojstupňová evakuace
 - 1. předvakuum (100 – 0,1 Pa), rotační olejová pumpa
 - 2. vysoké vakuum (0,1-10⁻⁶ Pa), difuzní pumpa, turbomolekulární pumpa

Vakuová technika

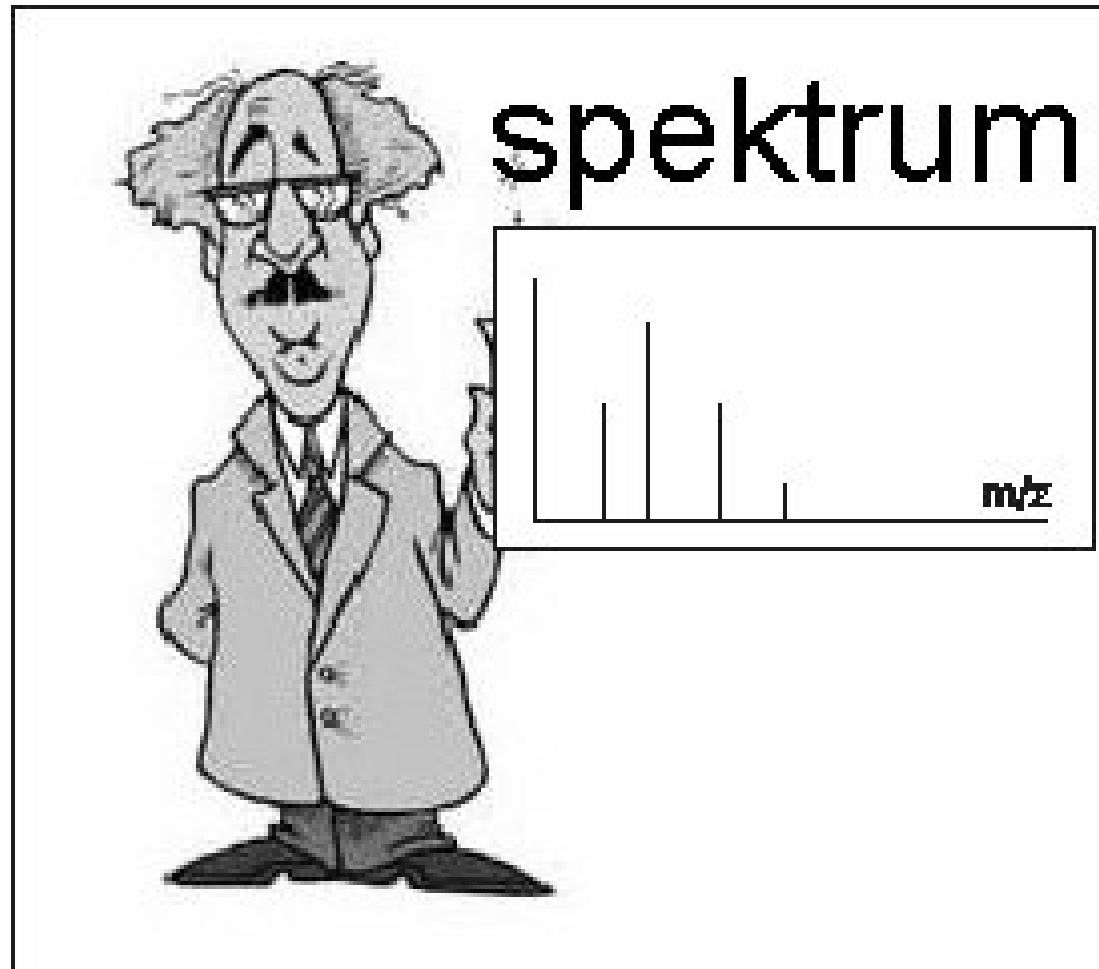
difuzní pumpa



turbomolekulární pumpa

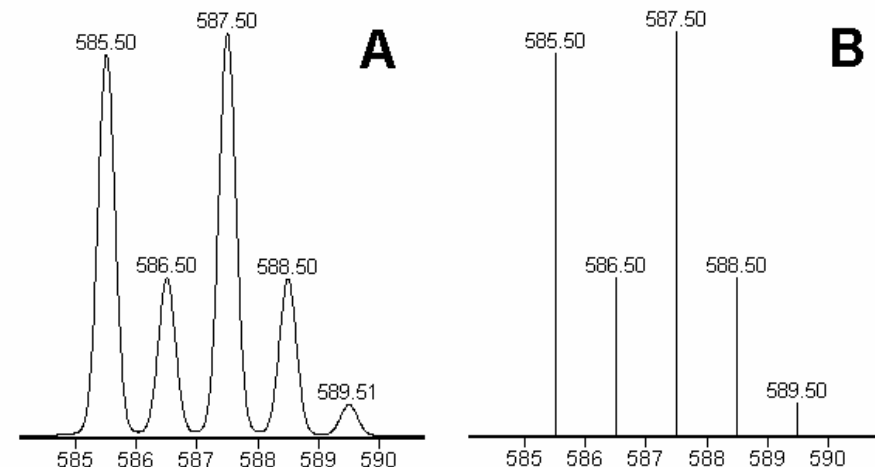


Hmotnostní spektrum



Hmotnostní spektrum

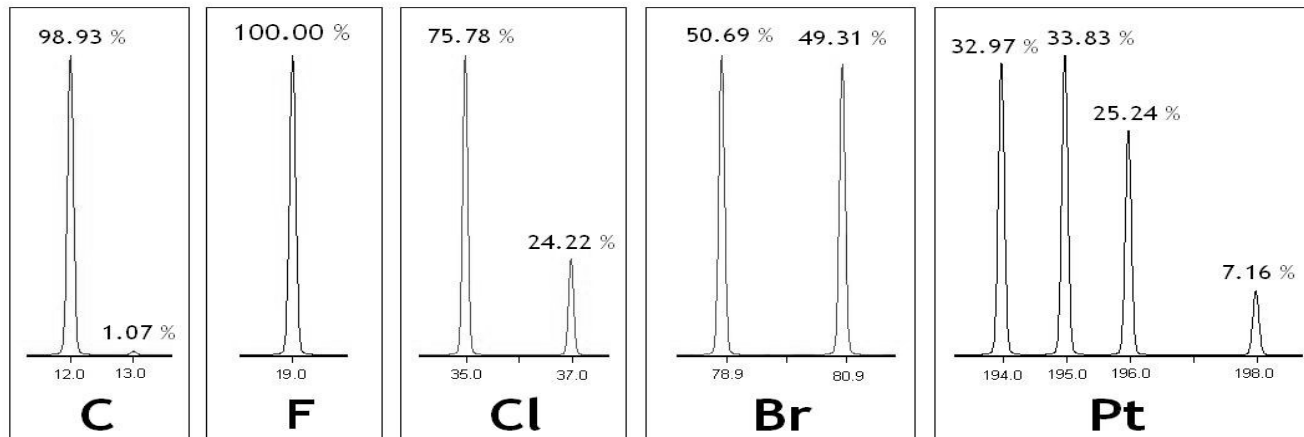
- Hmotnostní spektrum – grafické znázornění závislosti intenzity iontů na jejich poměru hmotnosti ku náboji (m/z)
- Kontinuální (profilové)
 - záznam detektoru
 - umožňuje odečíst šířku píku
- Centroidové (histogram)
 - převedeno na sloupcový graf
 - přehlednější
 - poloha = těžiště píku,
 - intenzita = výška nebo plocha píku
- Spektra normalizována
 - rozsah osy y – 0 - 100%



spektrum $\begin{cases} \nearrow & \text{profilové} \\ \searrow & \text{histogram} \end{cases}$

Izotopové klastry

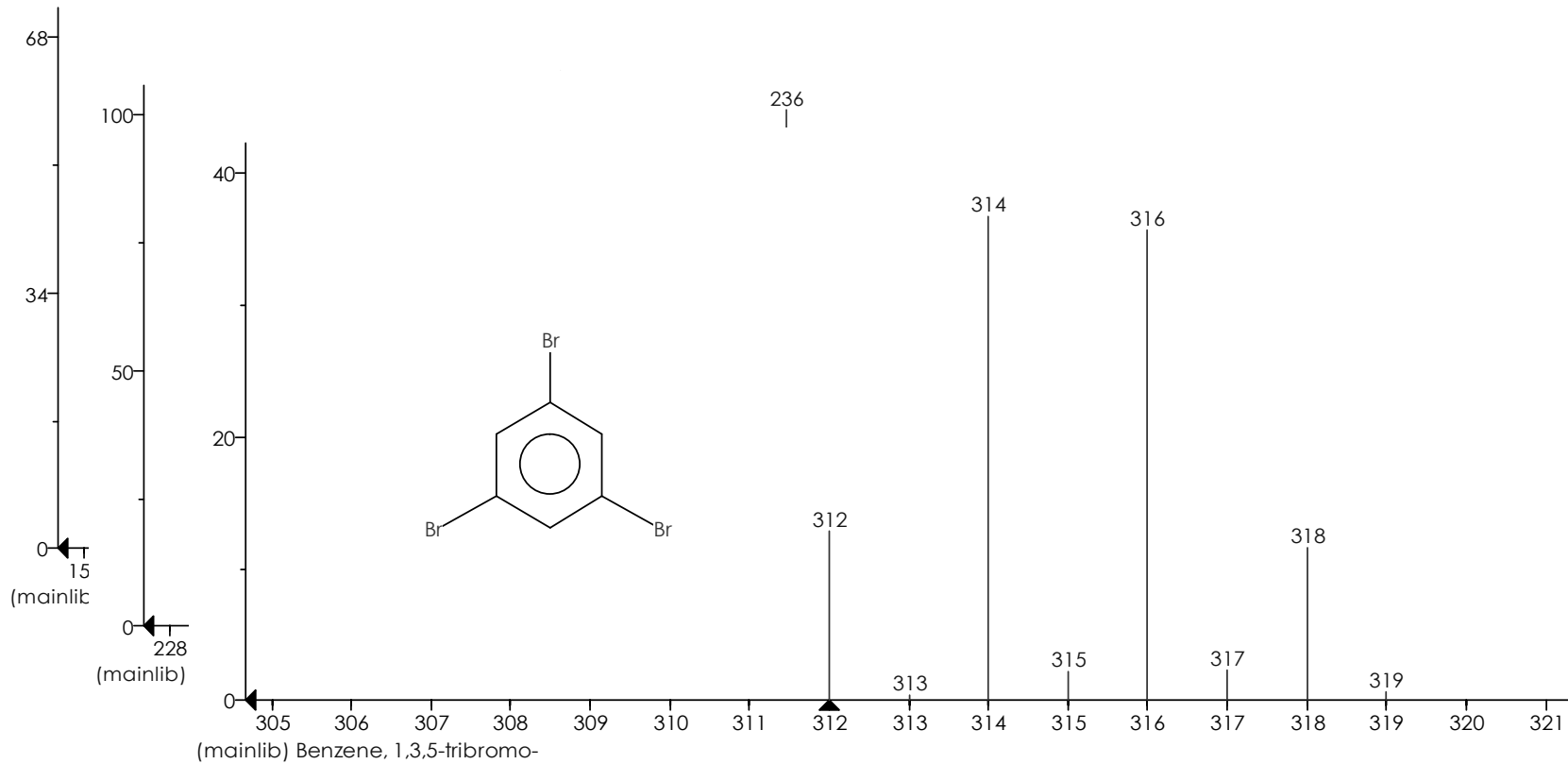
- Izotopy - atomy chemického prvku, které mají stejný počet protonů, ale rozdílný počet neutronů, tedy stejné atomové číslo a rozdílnou atomovou hmotnost
- Přírodní směsi izotopů - zastoupení izotopů jednotlivých prvků je konstantní



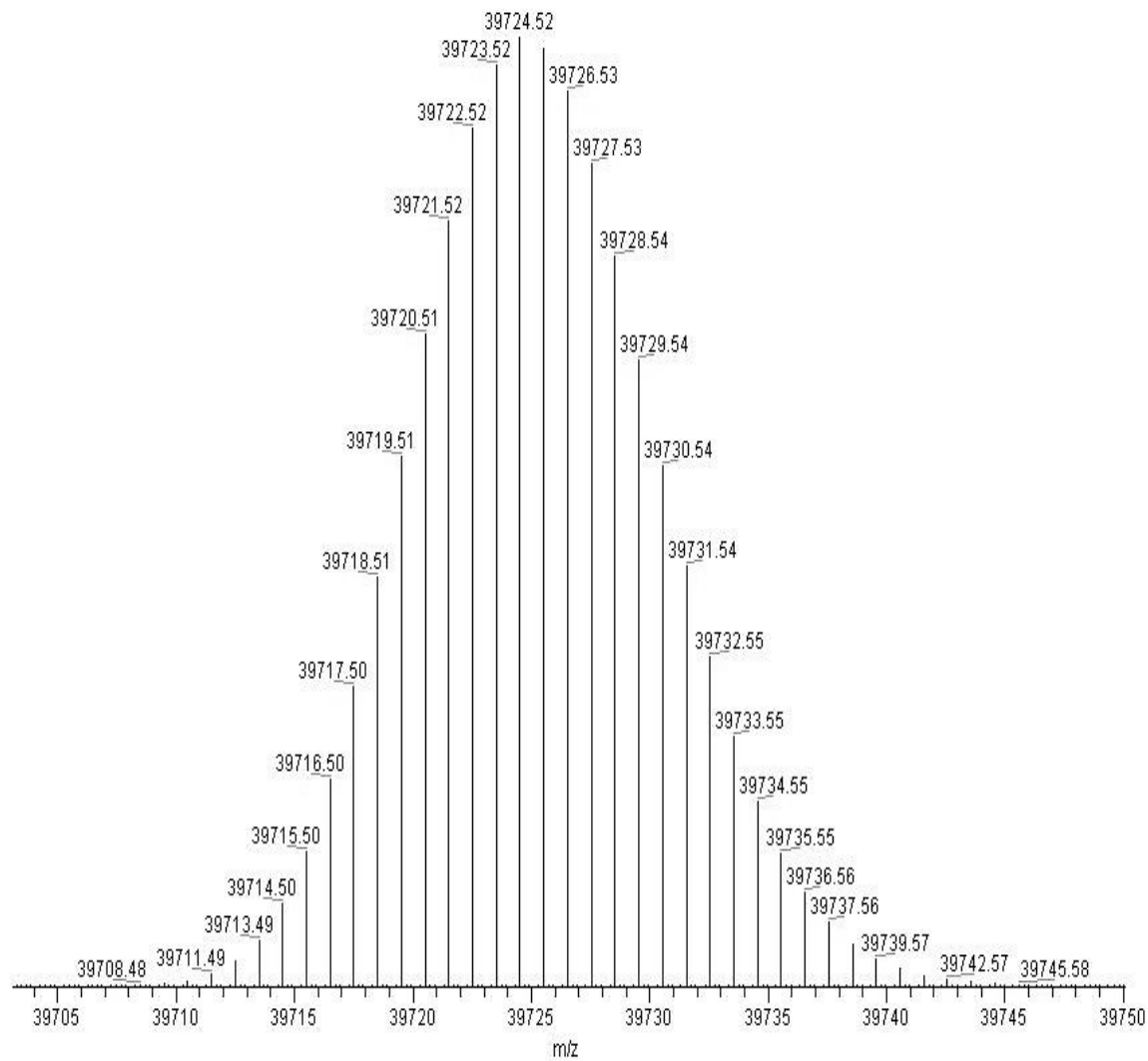
- Prvky
 - X (monoizotopické): ^{19}F , ^{23}Na , ^{31}P , ^{127}I
 - X+1: vodík (^1H , ^2H), uhlík (^{12}C , ^{13}C), dusík (^{14}N , ^{15}N)
 - X+2: chlor (^{35}Cl , ^{37}Cl), brom (^{79}Br , ^{81}Br), kyslík (^{16}O , ^{18}O)

Izotopové klastry

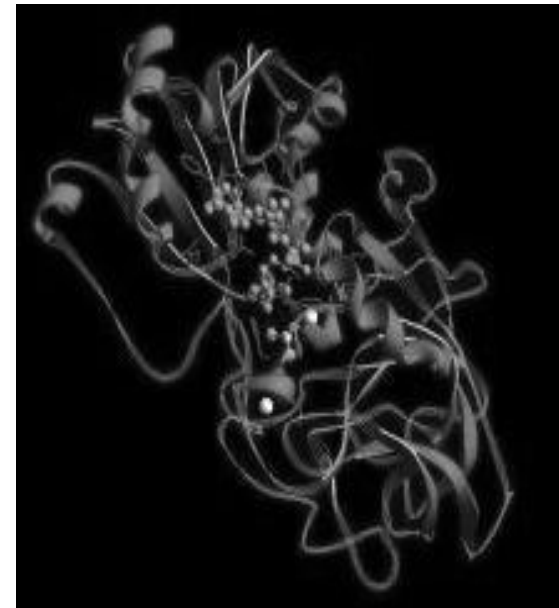
- Izotopové složení víceatomového iontu je dáno kombinací izotopového složení atomů, které jej tvoří



Izotopové klastry

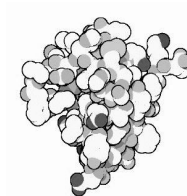
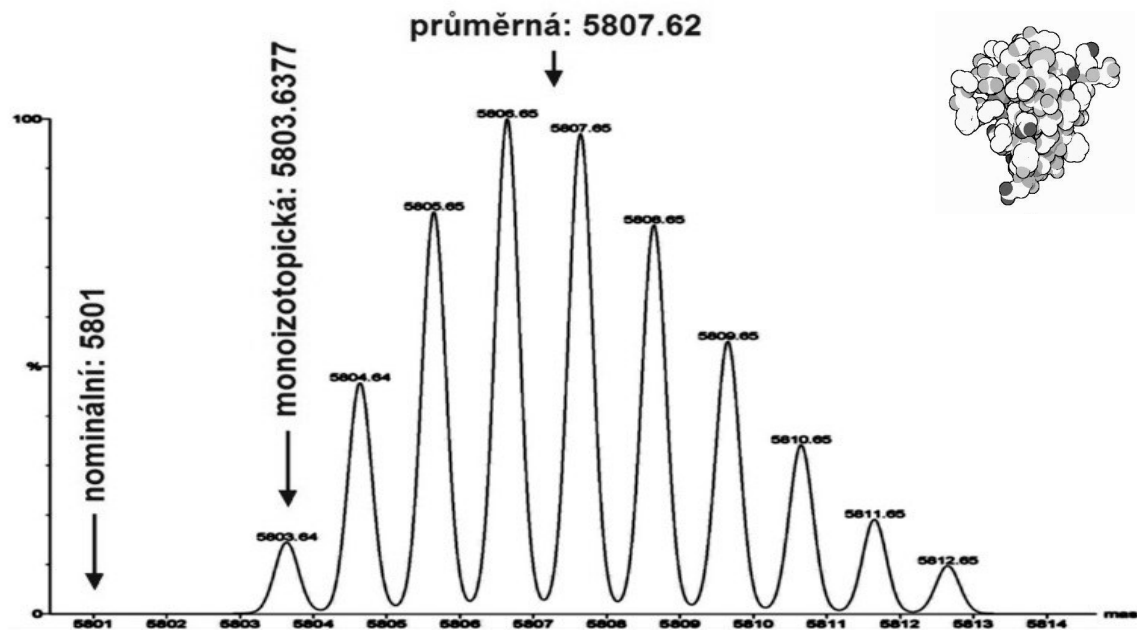


alkoholdehydrogenáza
 $C_{1764}H_{2859}N_{469}O_{516}S_{26}$



Hmotnost iontu v MS

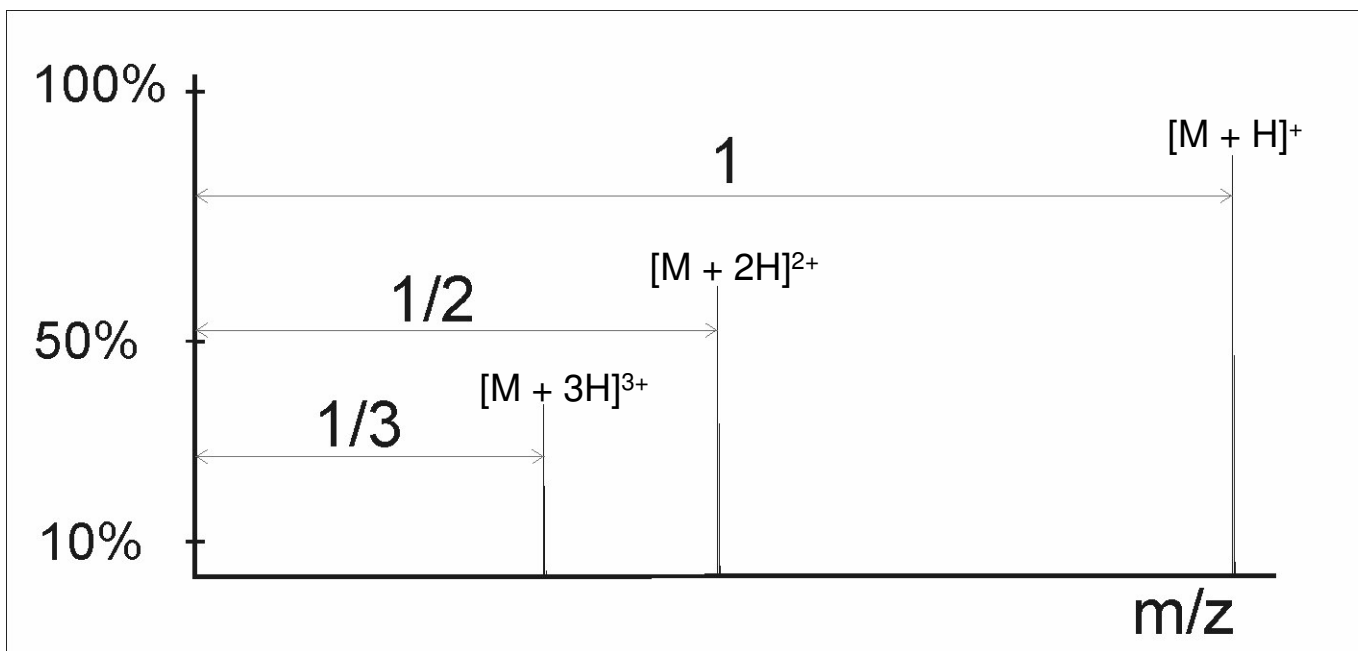
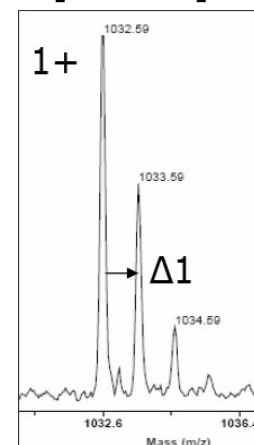
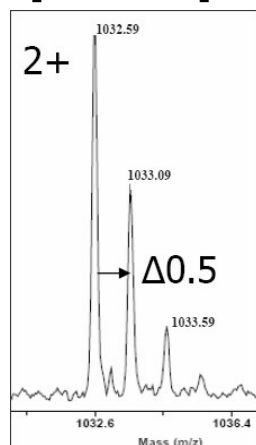
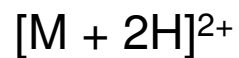
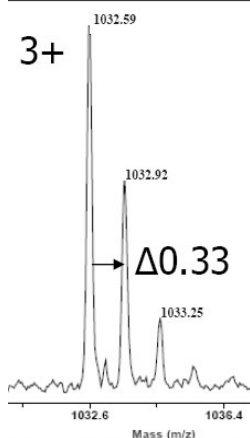
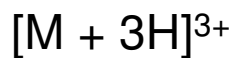
- Nominální hmotnost: z celočíselných hmotností prvků (př. CO_2 : $12\text{u} + 2 \times 16\text{u} = 44\text{u}$)
- Monoizotopická hmotnost: z přesných hmotnostní prvků nejvíce zastoupených izotopů (př. CO_2 : $12.0000 + 2 \times 15.9949 = 43.9898$)
- Průměrná hmotnost: vážený průměr hmotností jednotlivých izotopů podle jejich zastoupení (př. CO_2 : $12.01 + 2 \times 16.00 = 44.01$)



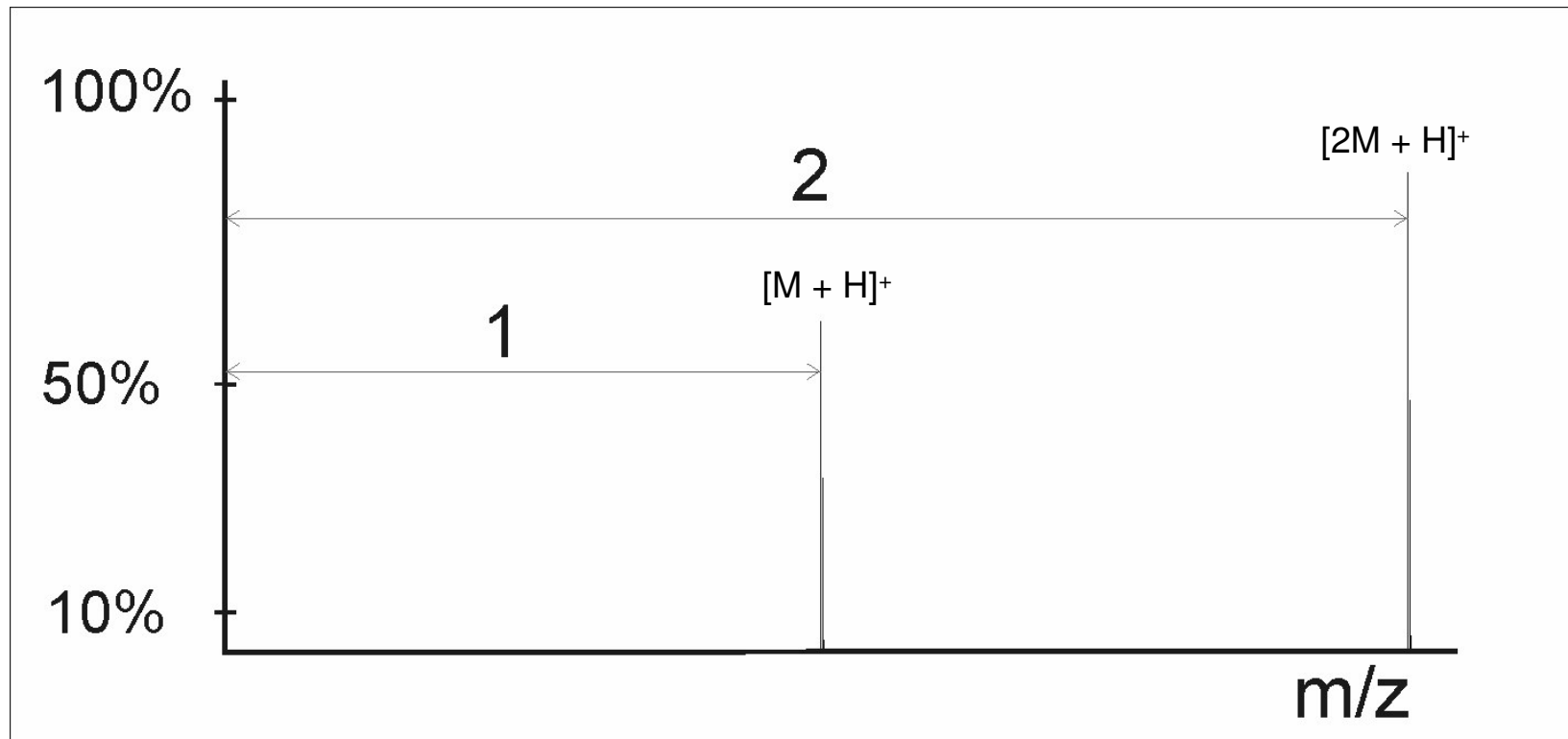
Př.: inzulín



Vícenásobně nabité ionty



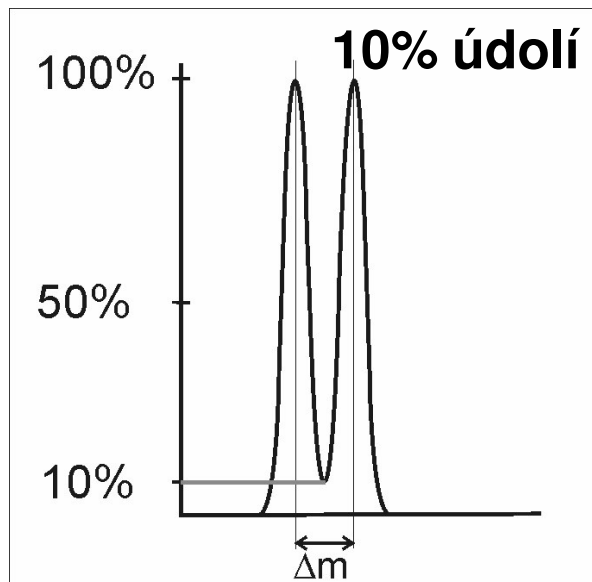
Dimery, multimery



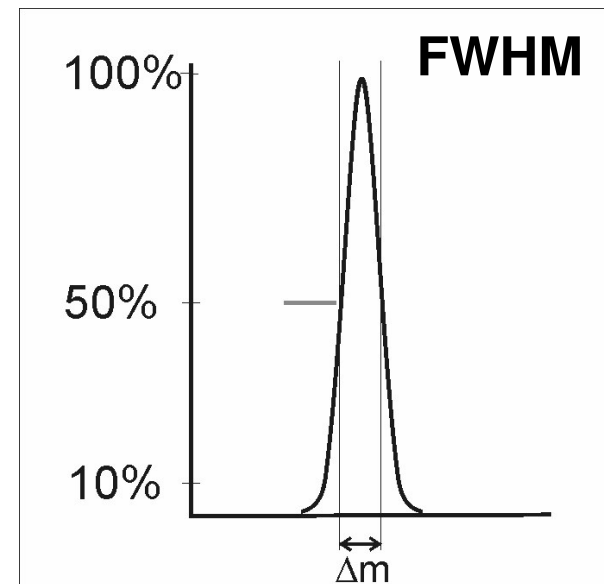
- i trimery, tetramery, ...
 - difference o „m“

Rozlišení

- Míra separace dvou přilehlých píků
- Rozlišení – 10% údolí
 - nejmenší rozdíl hmotností mezi stejně vysokými píky, u nichž je výška údolí rovna definovanému zlomku výšky píků (např. 10% údolí)
 - pro sektorové přístroje (konstantní rozlišení pro celý hmotnostní rozsah)
- Rozlišení – FWHM (full width at half maximum)
 - poměr hmotnosti iontu a šířky jeho píku v polovině výšky
 - pro kvadrupóly, iontové pasti, průletové analyzátory (konstantní šířka píku)



$$R = m/\Delta m$$



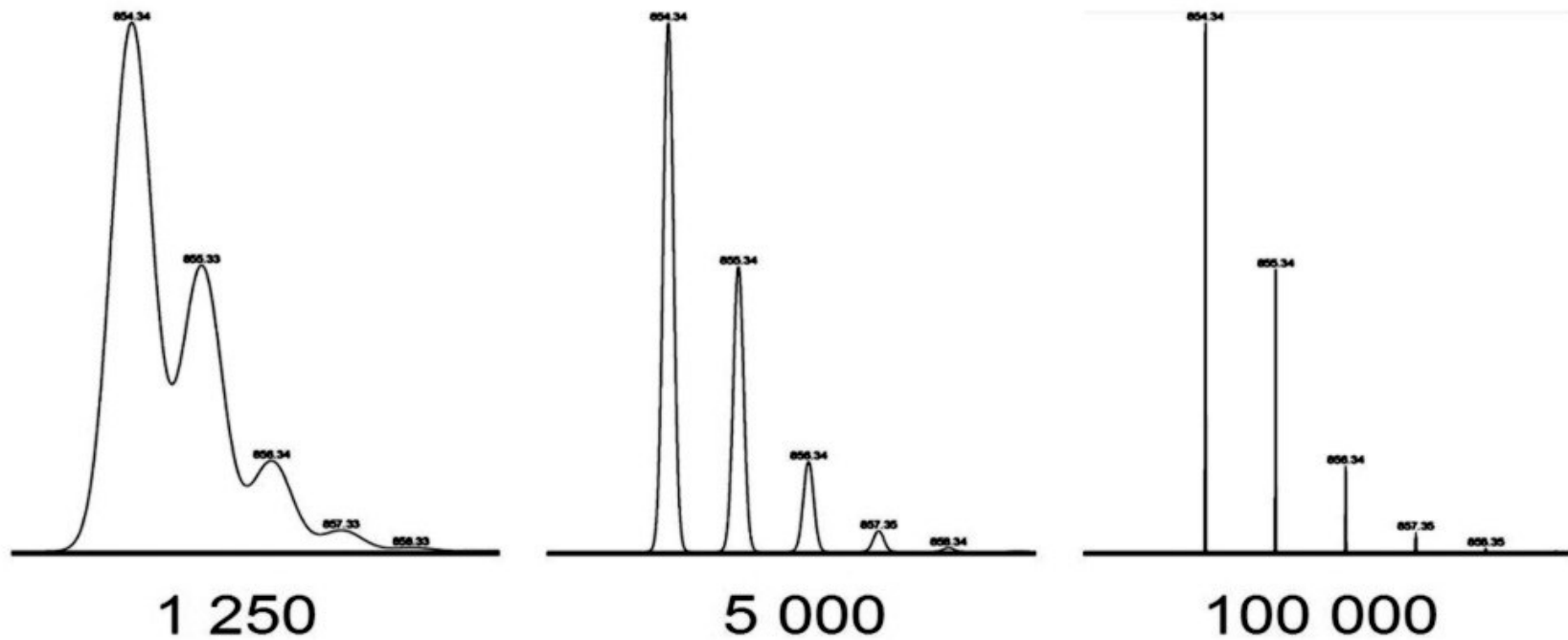
Přesnost určení hmotnosti

- vyjádření schopnosti hmotnostního analyzátoru určit správnou hodnotu m/z
- Nominální hmotnost – změřena na přístroji s jednotkovým (nizkým) rozlišením
 - např. 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)
 - např. rozlišíme m/z 500 od 500.001
 - lepší přesnost určení elementárního složení
- Kalibrace
 - seřízení iontové optiky tak, aby naměřené spektrum směsi látek se známými poměry m/z odpovídalo jejich teoretickým hodnotám

Kalibrační směsi: polyethylenglykoly, klastry NaI, CsI, směsi peptidů, UltramarkTM (fluorované fosfazeny), komerční směsi

Praktické důsledky

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



Nízké rozlišení

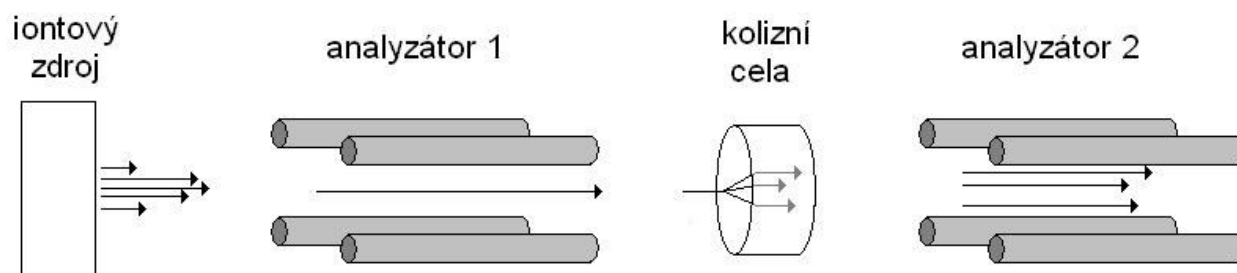
↔

vysoké rozlišení

Tandemová hmotnostní spektrometrie

➤ MS/MS, MSⁿ

- 1. separace iontu
- 2. fragmentace vybraného iontu
- 3. detekce fragmentů



➤ CID - procesy v kolizní cele

- urychlení iontů elektrickým polem
 - srážky iontů s neutrálními molekulami (N₂, Ar, He) v kolizní cele – zvyšování energie iontů
 - rozpad iontů
- určování struktury, specifická detekce

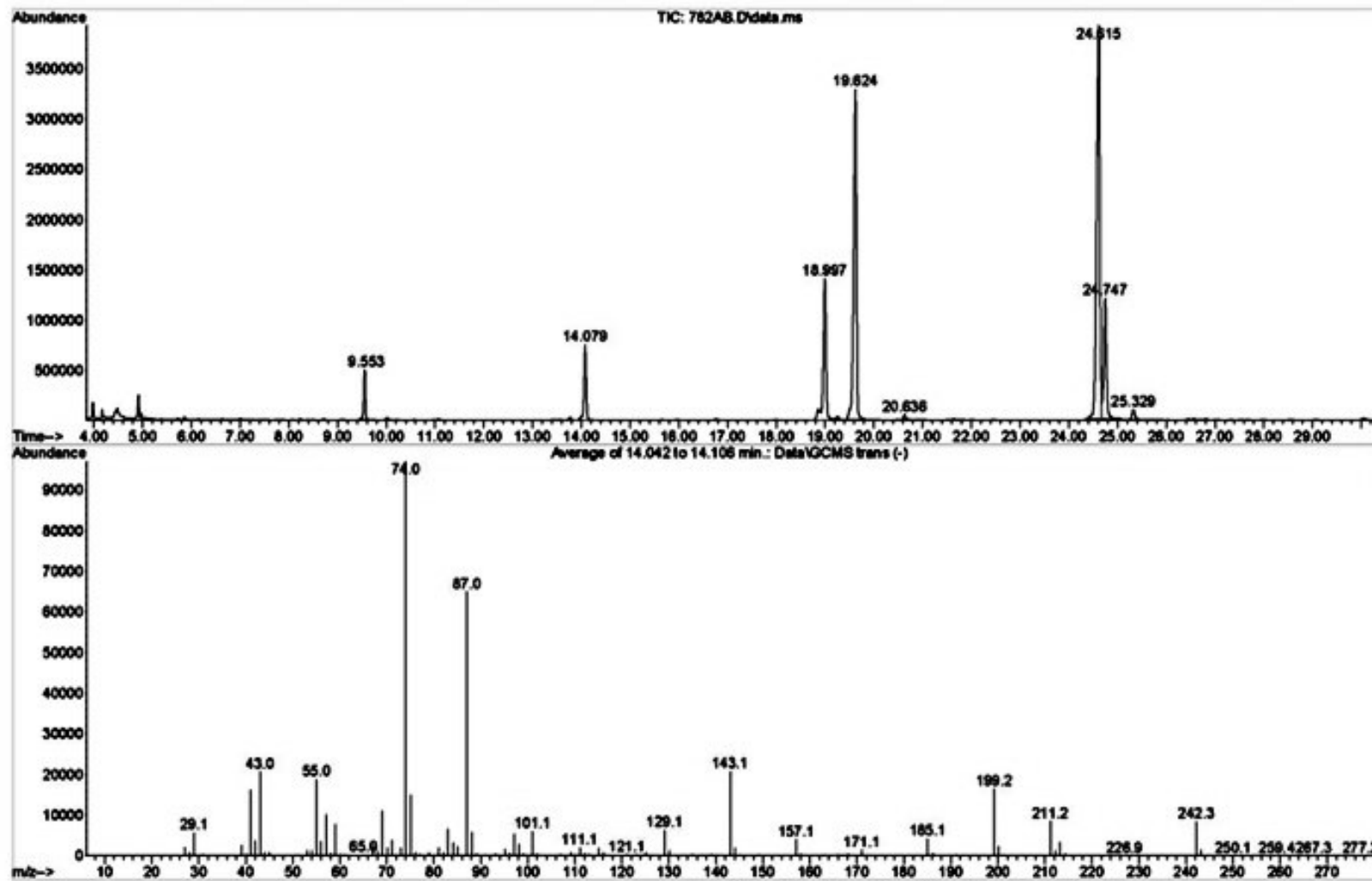
MS jako detektor v separačních metodách

- On-line spojení s
 - plynovou chromatografií (GC/MS)
 - kapalinovou chromatografií (HPLC/MS)
 - kapilární zónovou elektroforézou (CZE/MS)
- Výhody
 - vysoká citlivost
 - vysoká selektivita
 - univerzálnost
 - kvantitativní i kvalitativní analýza
- Nevýhody
 - vyšší cena přístroje
 - vyšší odborné nároky na operátora

GC/MS

- První chromatografická metoda spojená s MS
 - malý průtok nosného plynu – kompatibilní s MS
- Instrumentace
 - iontové zdroje: EI, CI
 - analyzátory: Q, IT
- Analyty:
 - méně polární, termálně stabilní, s nízkou molekulovou hmotností
- Široce využívaná technika
 - analýza složitých směsí (např. environmentální a forenzní analýzy)
 - možnost prohledávat databáze MS spekter – rychlá identifikace látek

GC/MS záznam



HPLC/MS

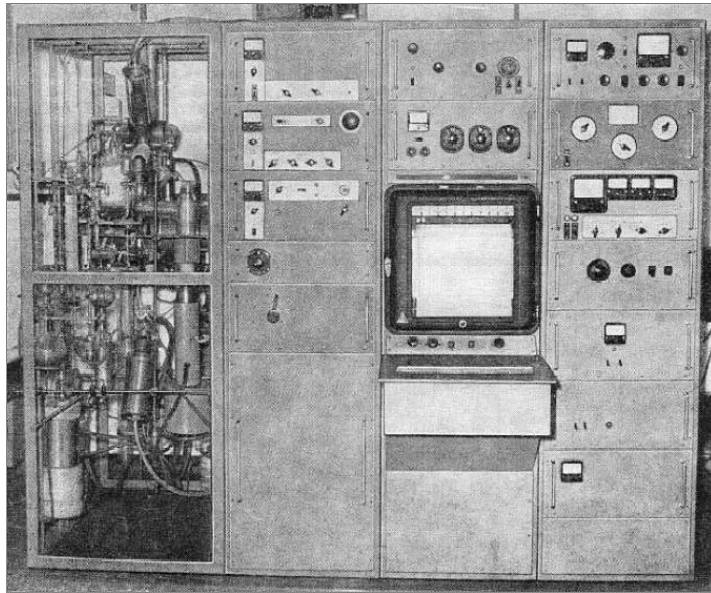
- Spojení HPLC později
 - odpaření – velký objem plynu = technický problém
 - řešení – API zdroje (APCI, APPI, ESI)
- Instrumentace
 - iontové zdroje: APCI, APPI, ESI
 - analyzátoři: Q, IT, orbitrap, TOF
- Analyty:
 - od malých molekul po biopolymery
 - od málo polárních po iontové
 - omezeně kompatibilní MF s pufrů a iont-párovými činidly
 - analýza potravin, léčiv, proteomika, atd.
- Rychle se rozšiřující oblast MS

CZE/MS

- Zatím málo rozšířená
- Výhody
 - velmi vysoká separační účinnost
 - analýza iontů
 - nízká spotřeba vzorku
- Technické problémy
 - ovlivňování separačního napětí a napětí zdroje
 - malá kompatibilita separačních pufrů s MS
- Analyty
 - analýza peptidů, identifikace proteinů

Historie MS v ČR (ČSSR)

- Konstrukce prvního hmotnostního spektrometru (1953)
 - V. Čermák, V. Hanuš, Č. Jech, J. Cabicar
 - Ústav fyzikální chemie a elektrochemie ČSAV



- První komerční MS instrumenty MCH-1303 (počátek 60.let)
 - Ústav fyzikální chemie ČSAV
 - Ústav organické chemie a biochemie

Děkuji za pozornost