

INTERPRETACE SPEKTER
-
MALÉ MOLEKULY

Interpretace hmotnostního spektra

1. Určíme, které ionty souvisí s analytem a které ne
 2. Určíme molární hmotnost - hledáme molekulární ion M^+ , adukty $(M+H)^+$, $(M+Na)^+$, $(M+HCOO)^-$ nebo deprotonované molekuly $(M-H)^-$, příp. vícenásobně nabitě ionty
 3. Odhadneme prvky, které jsou přítomny: inspekce izotopového klastru, aplikace dusíkového pravidla
 4. Určíme elementární složení na základě měření přesné hmotnosti
 5. Porovnáme spektrum s knihovnou, pokusíme se najít alespoň podobná spektra
 6. Řešíme fragmentaci (vyžaduje znalost fragmentačních mechanismů a empirických pravidel)
-

1.

Vyloučení iontů, které nesouvisí s analytem

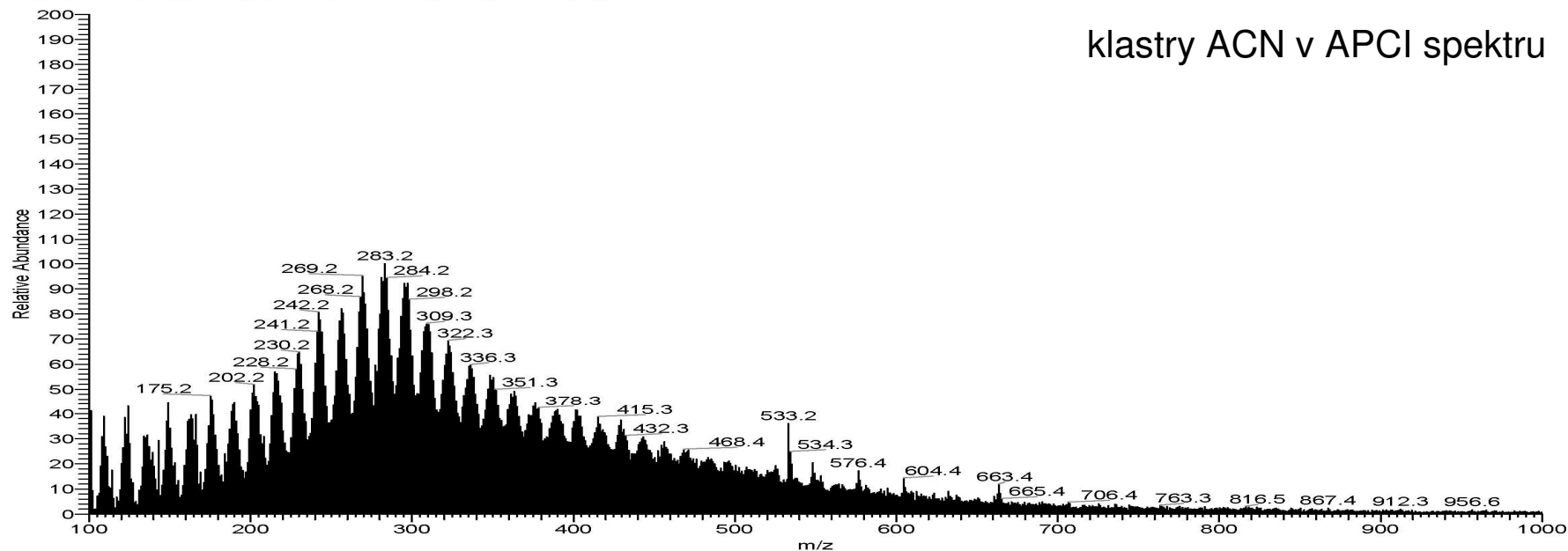
Ionty pozadí, kontaminanty

- klastrové ionty rozpouštědel
- nečistoty v rozpouštědlech
- nečistoty v systému z předchozích nástřiků
- “bleeding” kolony
- nečistoty z nádobí
- nečistoty ve vzorku

c:\Documents and Settings\...\0962VV01

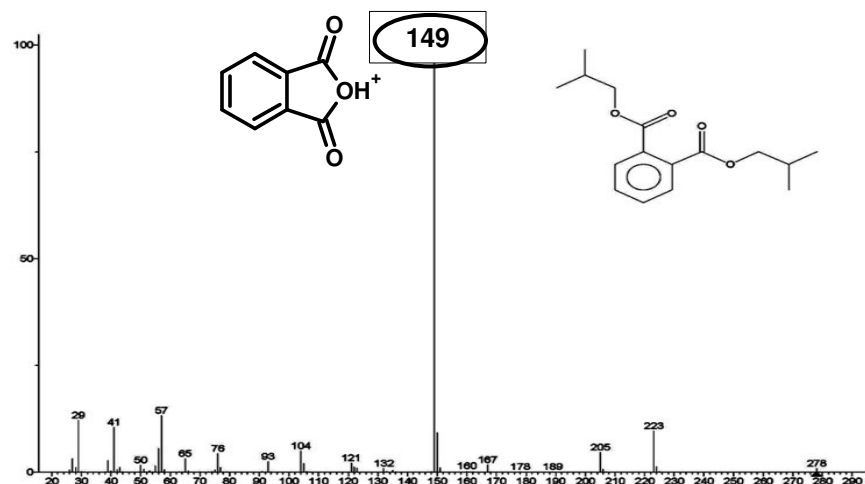
3/10/2009 12:32:40 PM

Bee Wax esters

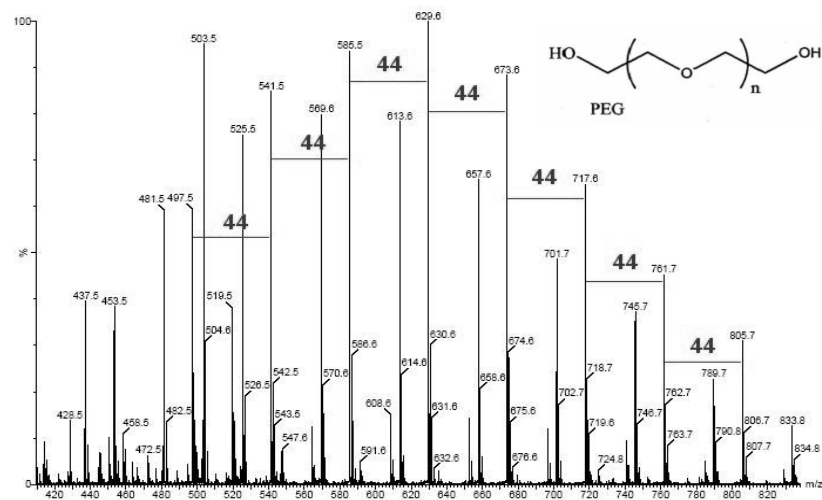
0962VV01 #7-262 RT: 0.08-3.33 AV: 256 NL: 3.63E1
F: ITMS + c APCI corona sid=8.00 Full ms [100.00-1000.00]

Ionty pozadí, kontaminanty

Ftaláty: - změkčovadla z plastů
m/z 149, 279, 301, 317 ...

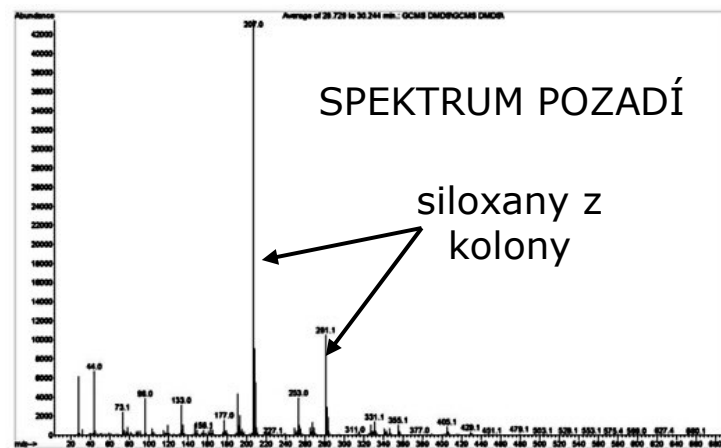
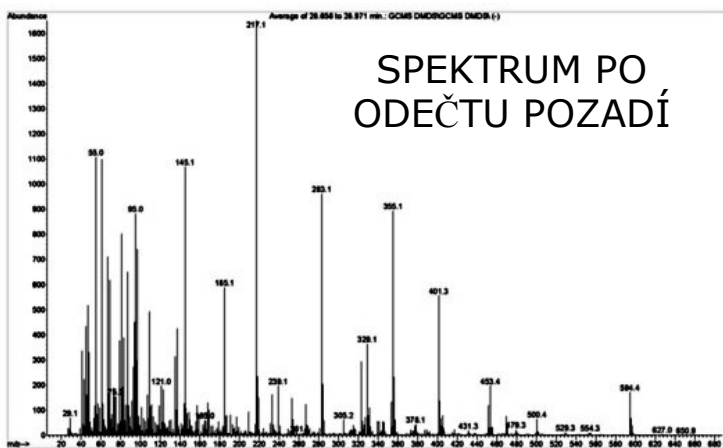
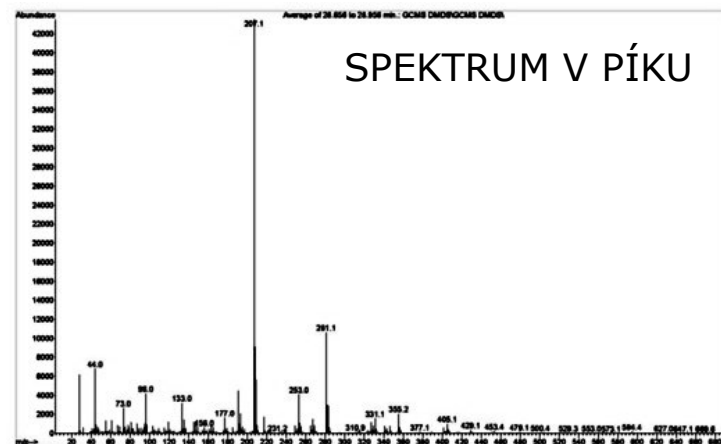
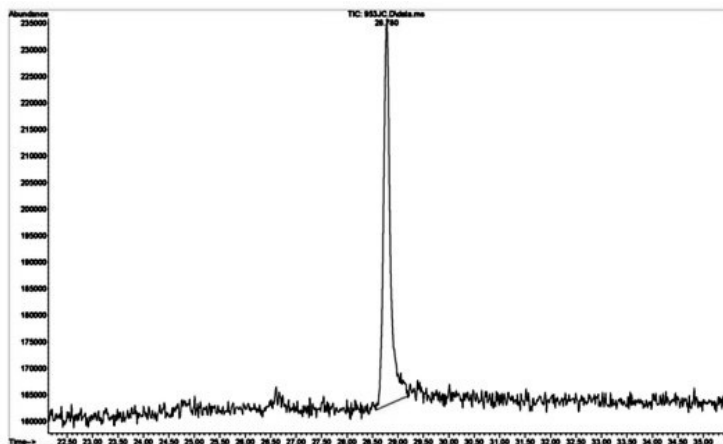


Polyethylenglykoly: - z plastů
pravidelné píkyve spektru
vzdálené 44 u



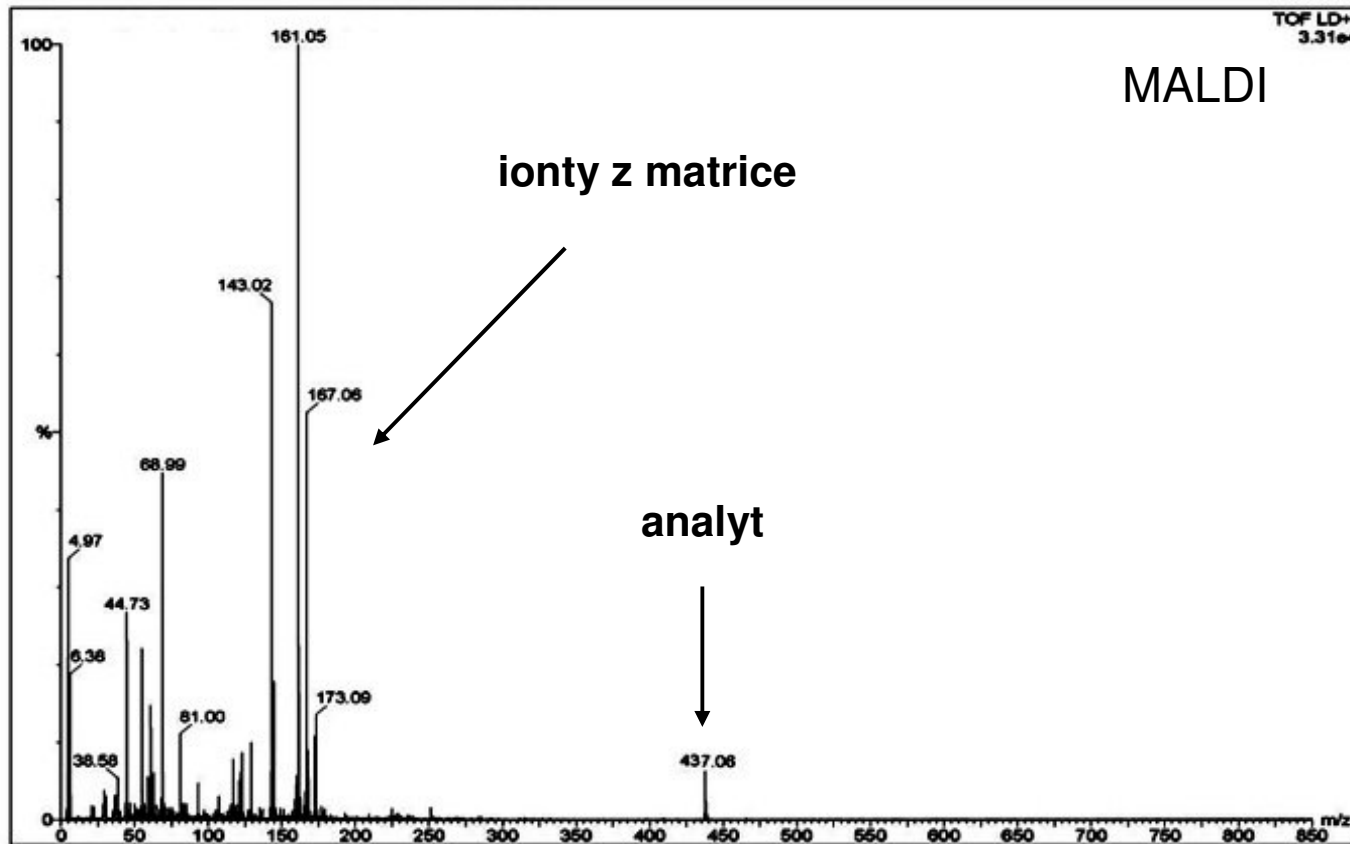
oplach laboratorních
latexových rukavic

Odečet pozadí



Ion ty matrice u MALDI

klastry, fragmenty, adukty iontů matrice v nízké oblasti spektra, velmi intenzivní. Spektra se proto měří až od ~ m/z 500.



2.

Určení molekulové hmotnosti

Určení molekulové hmotnosti

identifikace molekulového iontu, případně molekulového aduktu

I. Elektronová ionizace



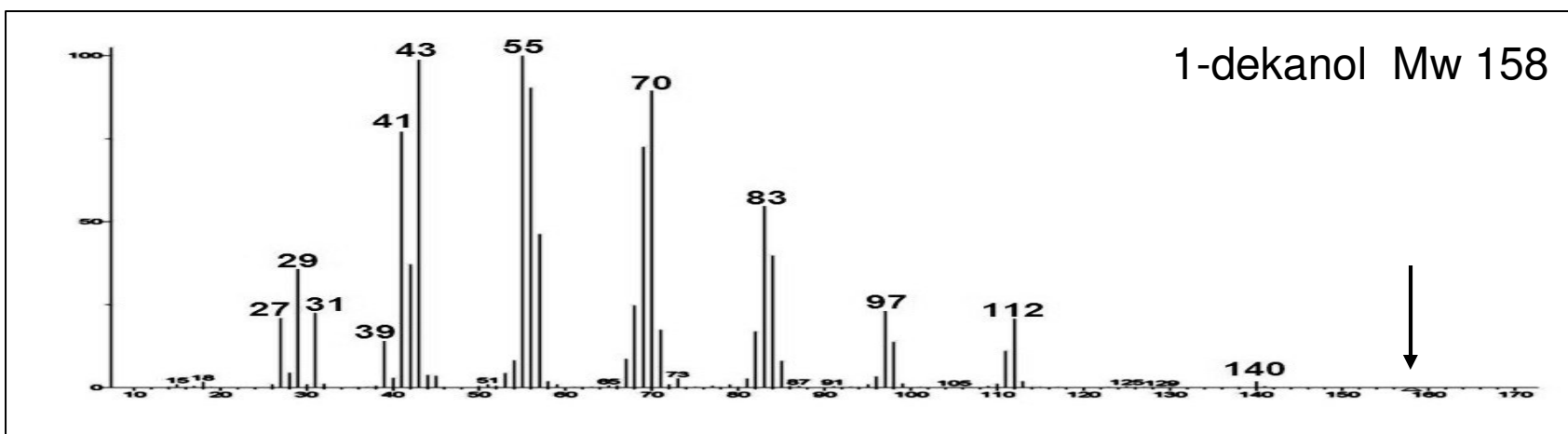
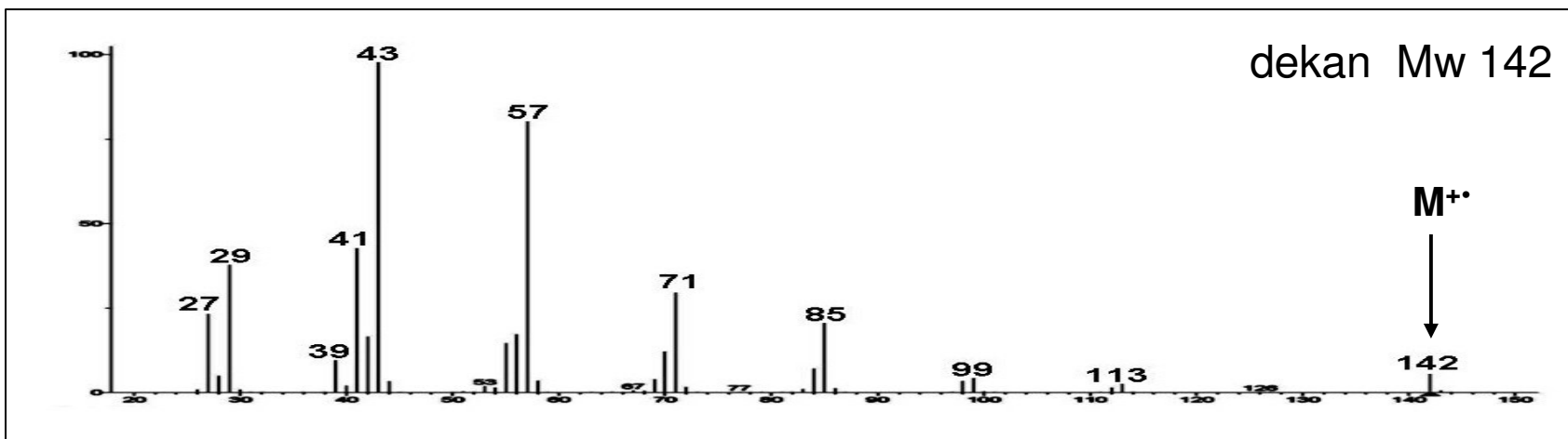
Molekulový ion ($M^{+\cdot}$) je radikál kation. Jeho m/z odpovídá monoizotopické hmotnosti analytu

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 ($OE^{+\cdot}$)
 4. poskytuje logické neutrální ztráty
-

Určení molekulové hmotnosti

I. Elektronová ionizace

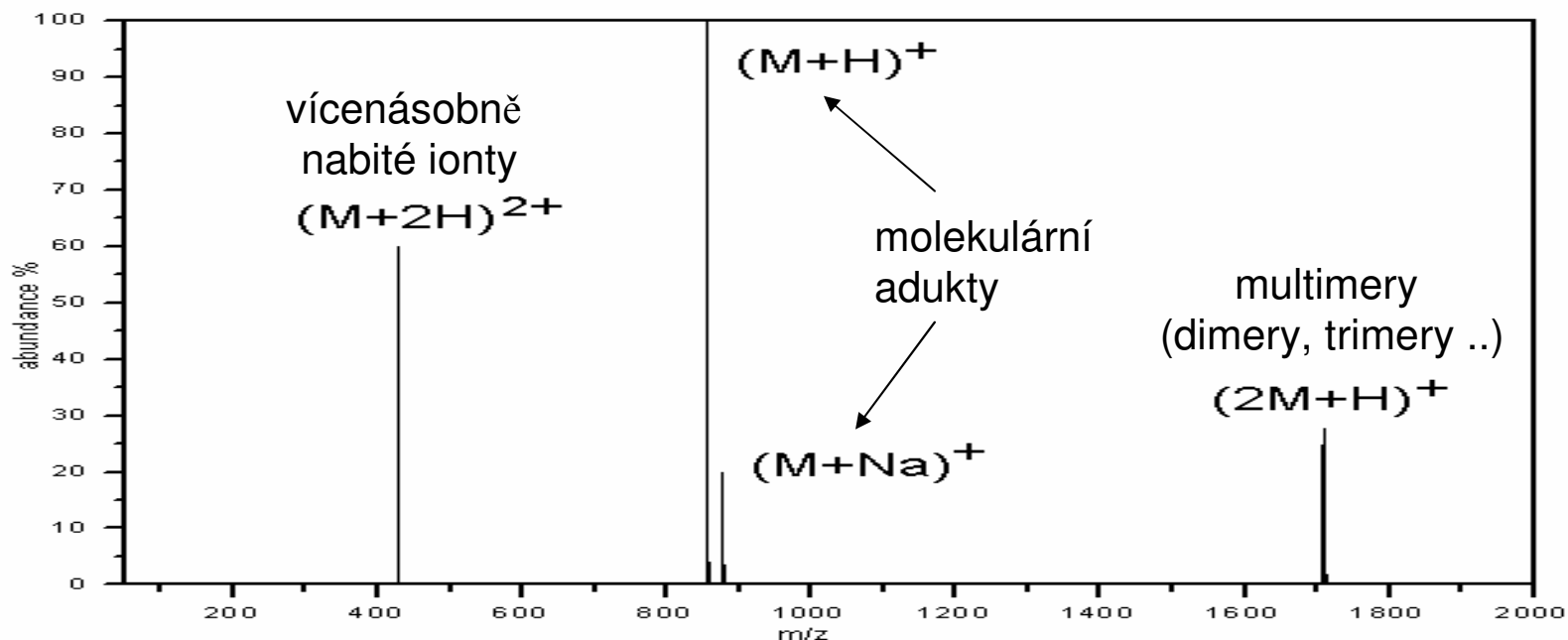


Určení molekulové hmotnosti

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

molekulární adukty ($[M+H]^+$, $[M+Na]^+$) nebo deprotonované molekuly ($[M-H]^-$)

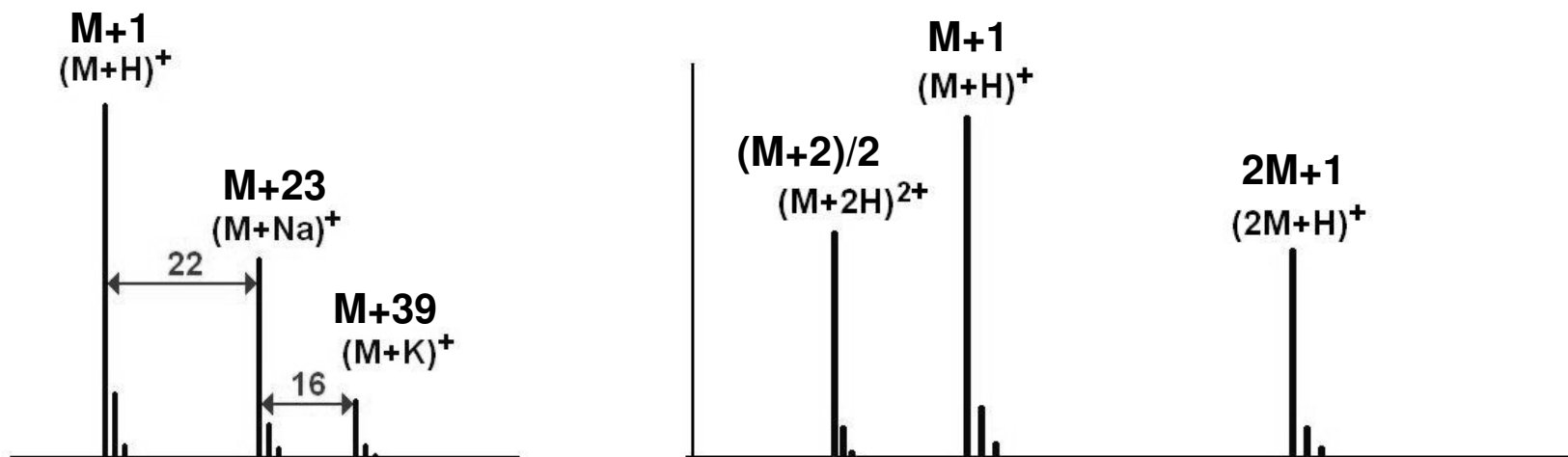
Molekulový adukt je ion se sudým počtem elektronů a nemusí být nejvyšším iontem ve spektru.



Určení molekulové hmotnosti

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

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



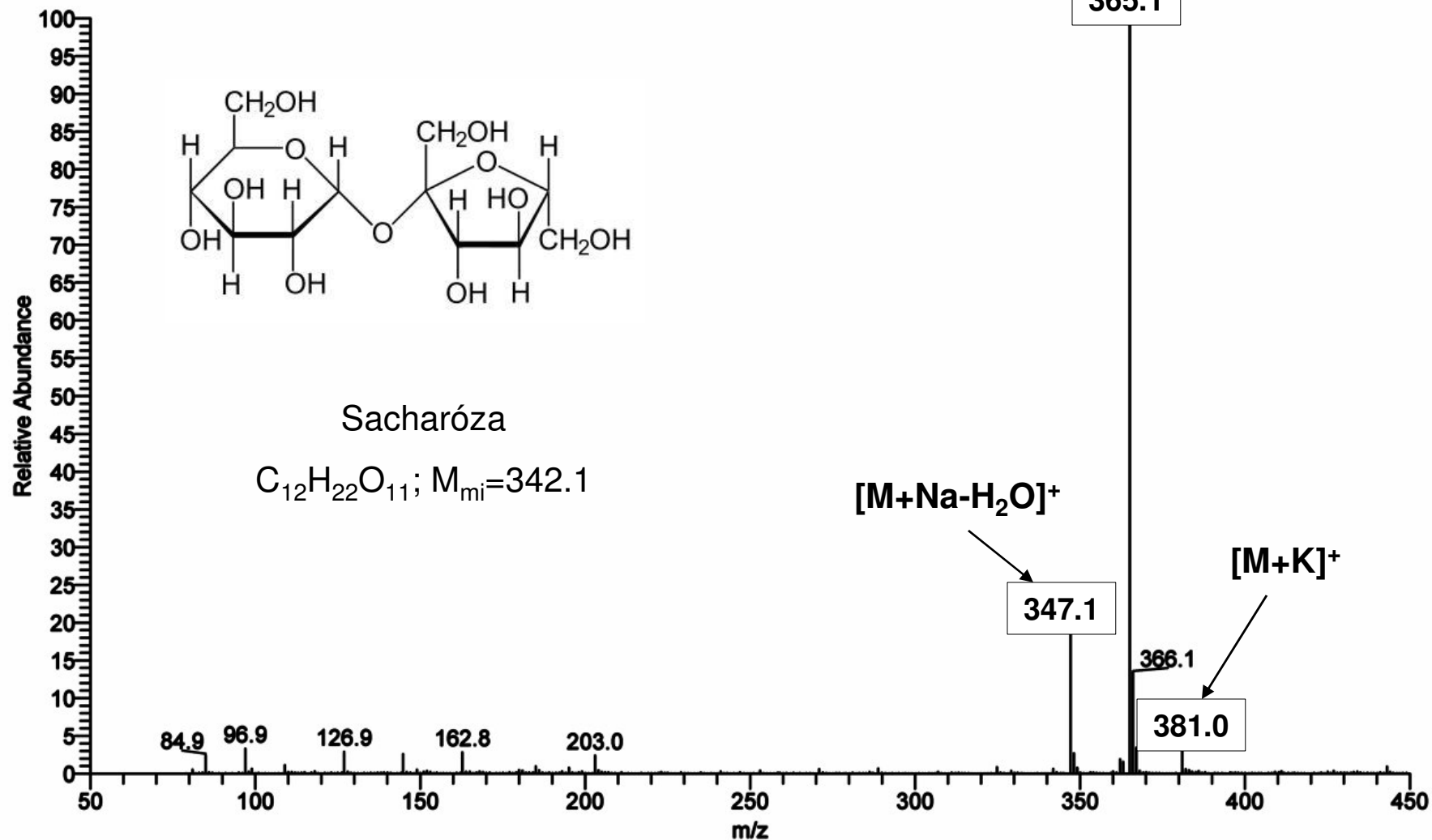
Výpočet aduktů, multimerů, vícenásobně nabitých iontů – Kalkulátor EIC

I:\MISC\MS\DOWNLOAD\

Určení molekulové hmotnosti



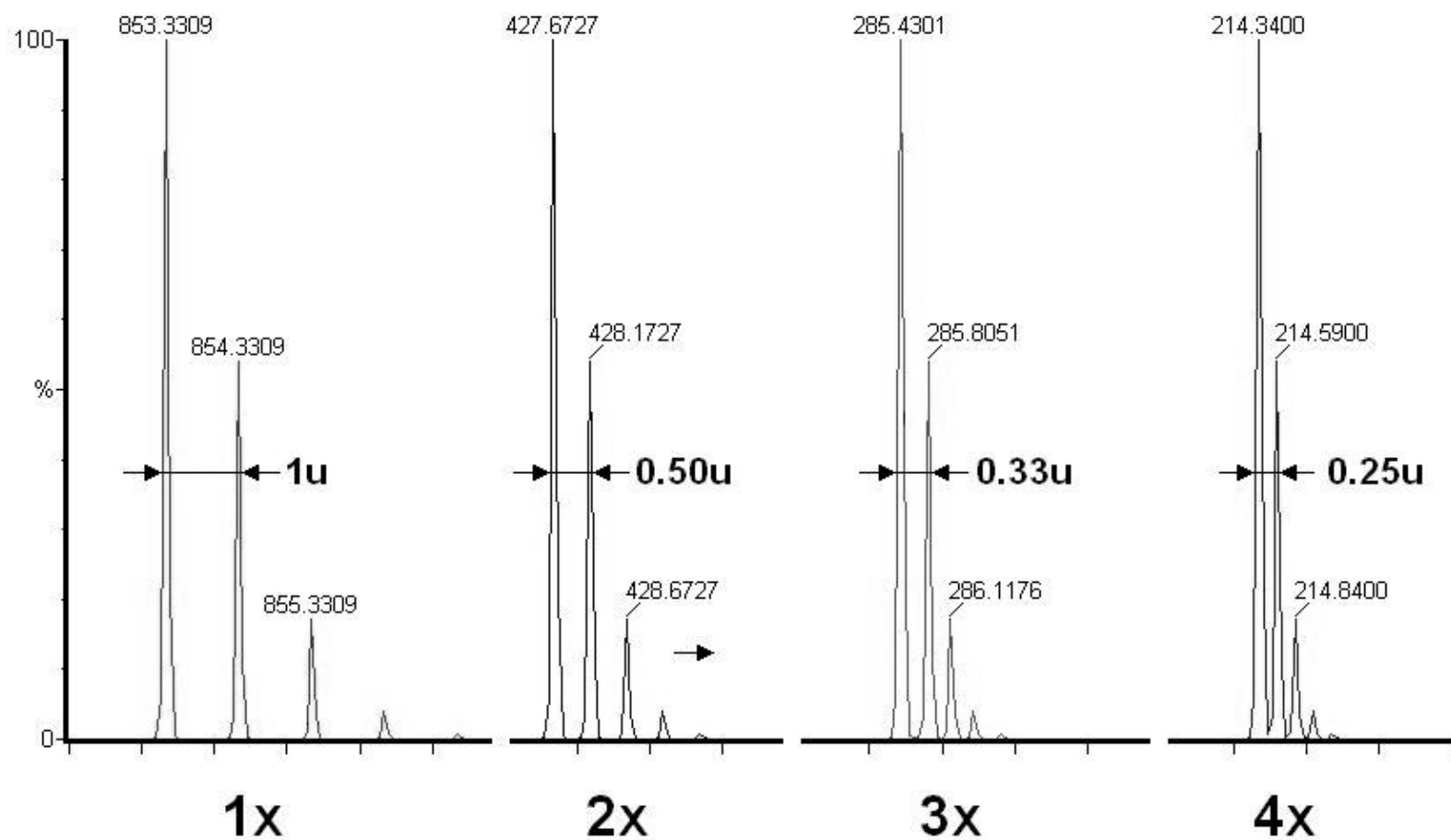
2256jc #1-51 RT: 0.00-0.75 AV: 51 NL: 1.77E4
T: ITMS + c ESI Full ms [50.00-1000.00]



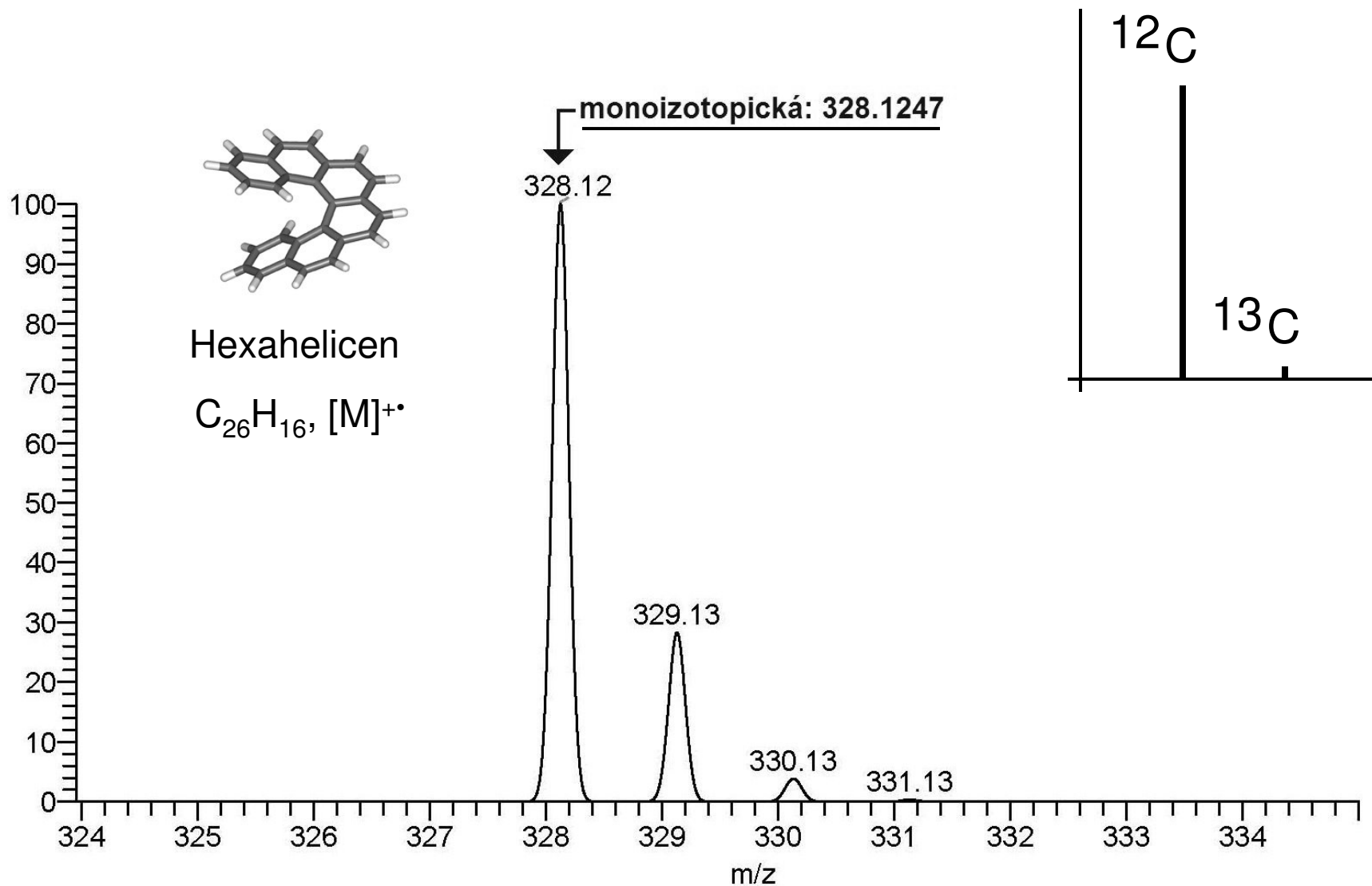
Určení molekulové hmotnosti – nábojové stavy

Určení počtu nábojů iontu

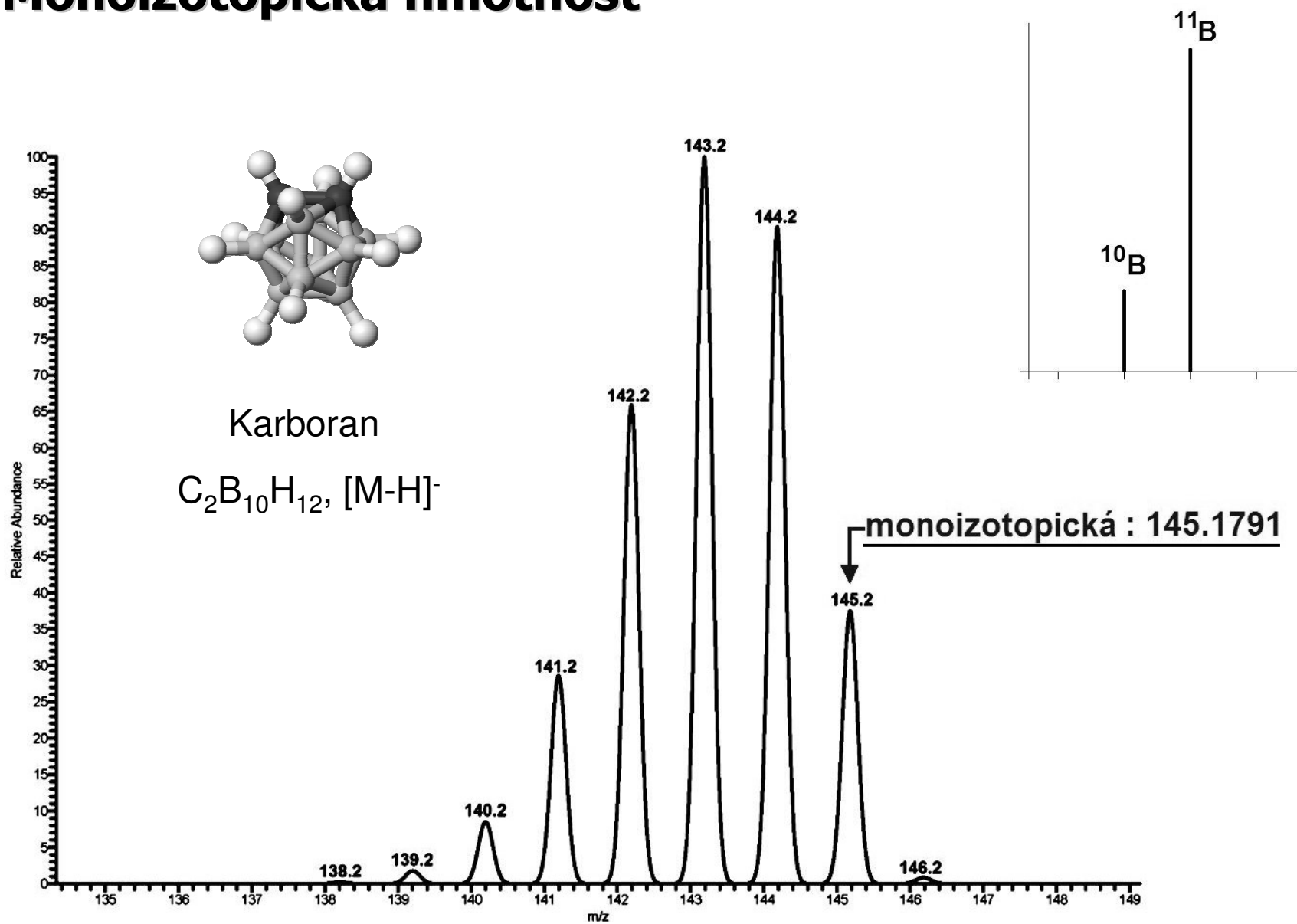
Počet nábojů lze zjistit ze vzdálenosti mezi píky v izotopovém klastru.



Monoizotopická hmotnost



Monoizotopická hmotnost

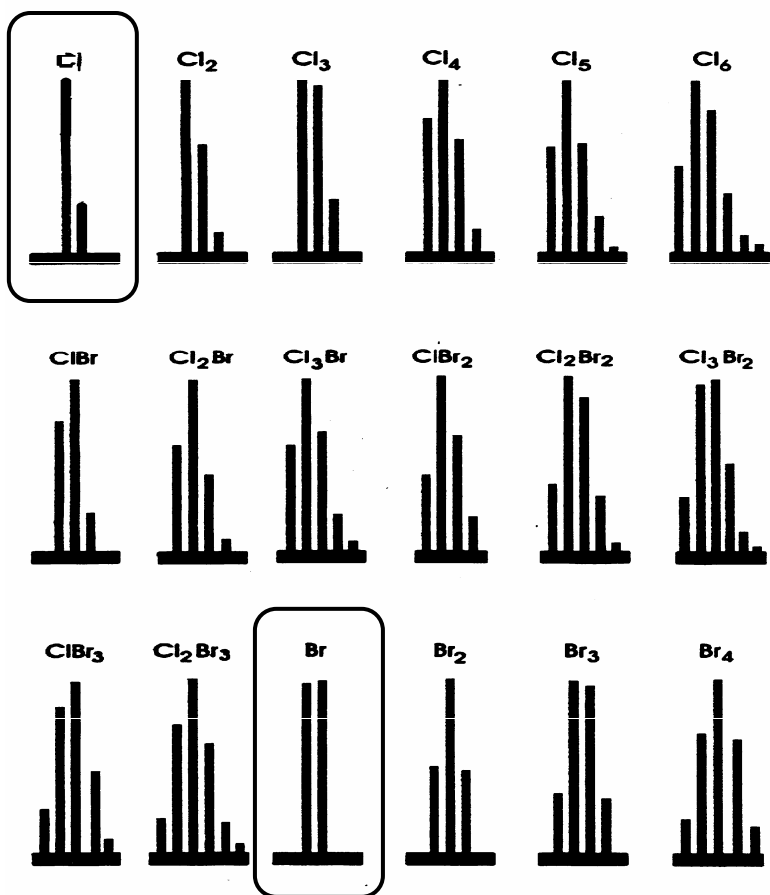


3.

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://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).

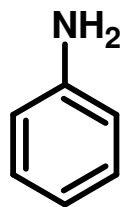
lichá hmotnost molekuly = lichý počet dusíků

sudá hmotnost molekuly = sudý (nulový) počet dusíků

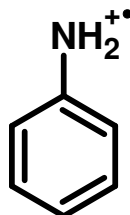
Aplikace pravidla na ionty

EI – platí pro $M^{+\bullet}$ tak, jak je uvedeno

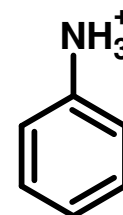
ESI, APCI, MALDI – **pro** molekulové adukty, platí pravidlo opačně !



M=93



m/z 93



m/z 94

4.

Určení elementárního složení z přesné hmotnosti

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

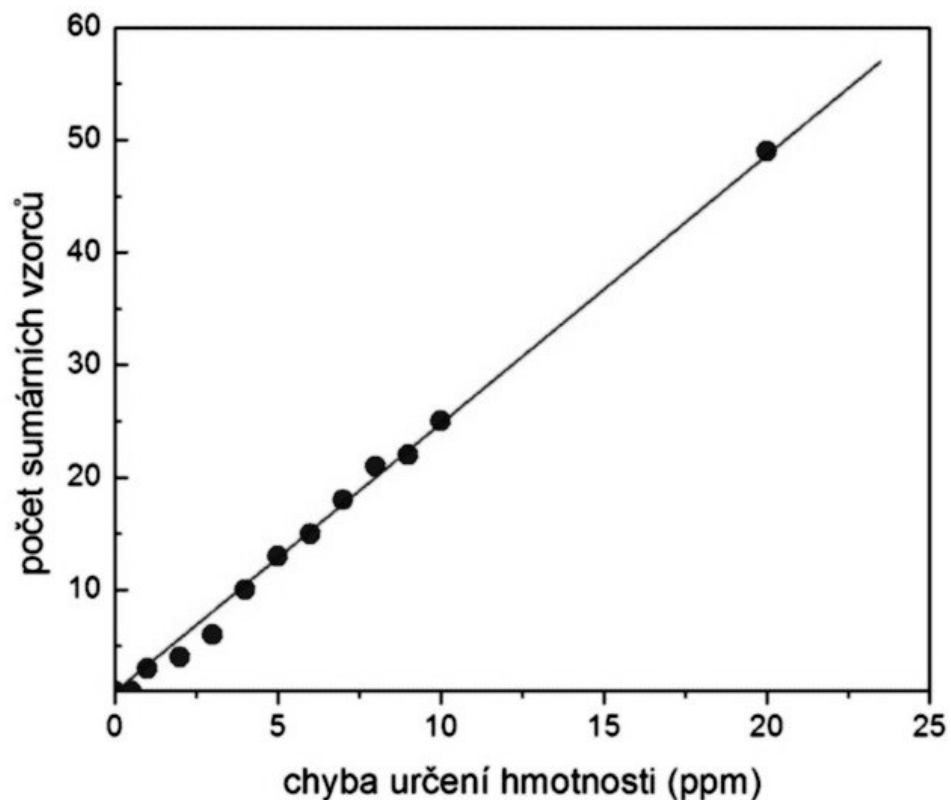
Omezení pro výpočet vzorce:

C: 0-100

H: 0-100

N: 0-10

O: 0-30

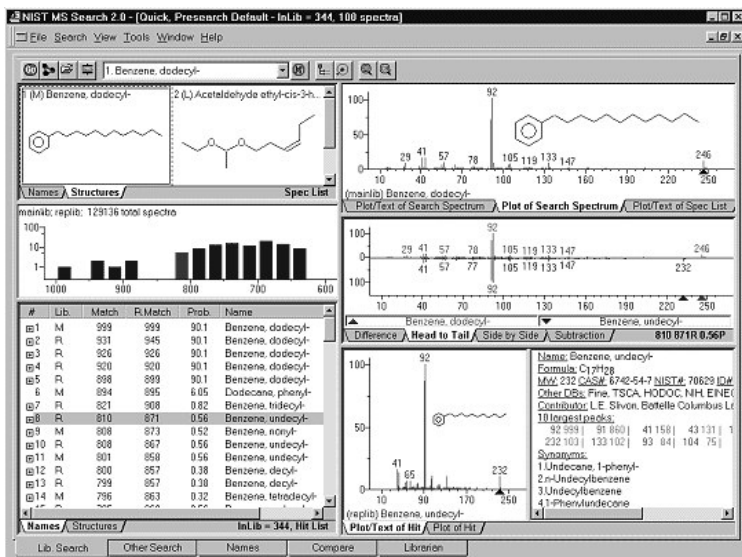


5.

Hledání v knihovných spekter

Knihovny spekter EI

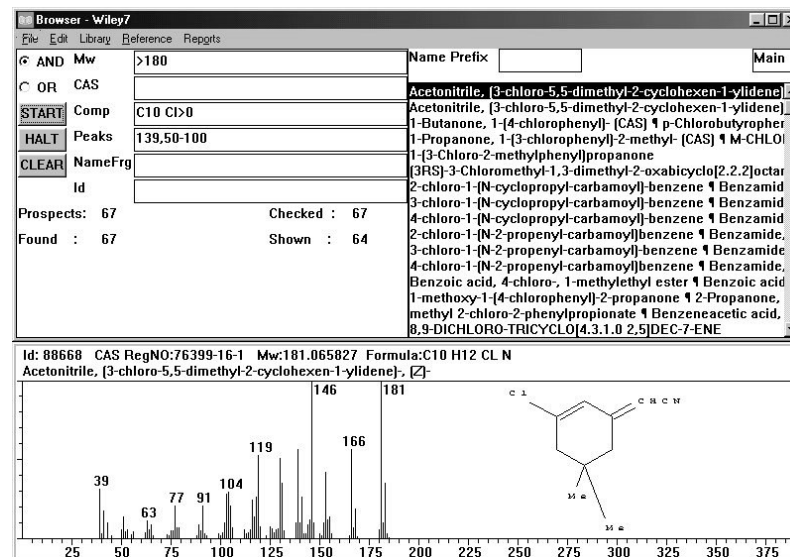
NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library



NIST 08:

191,436 EI spekter (70 eV)
 14,802 MS/MS spekter
 retenční indexy látek
 strukturní vzorce

Wiley Registry of Mass Spectral Data



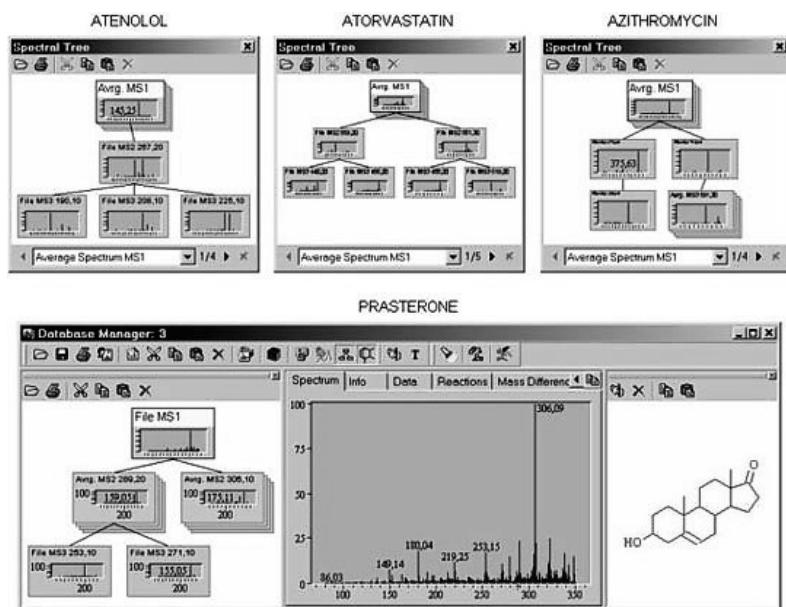
9th Edition:

663 000 EI spekter (70 eV)
 strukturní vzorce0

NIST 05 k dispozici u samoobslužného GC/MS

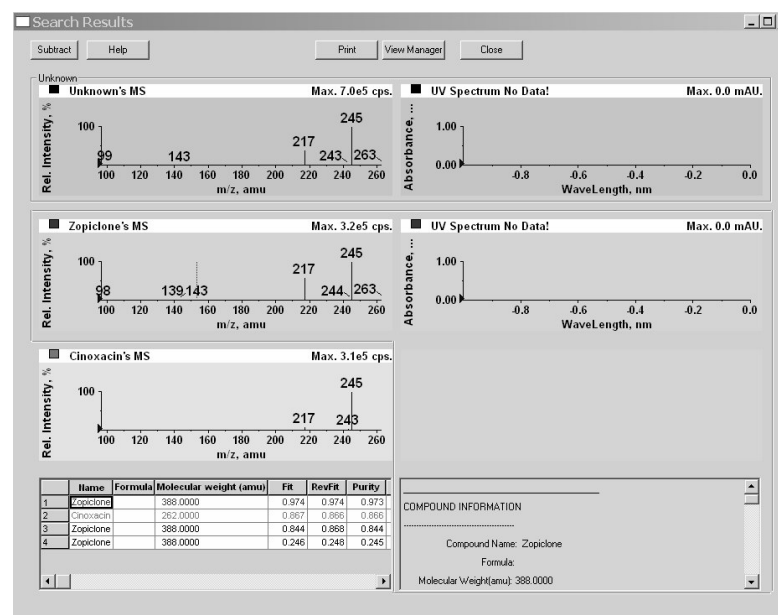
Knihovny MS/MS spekter (ESI)

HighChem's spectral library collection



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

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



MS/MS spektra ~ 800 látek,
léčiva

6.

Interpretace fragmentových iontů

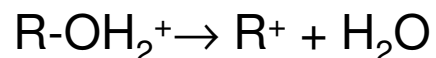
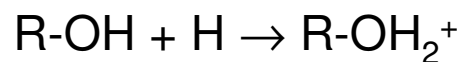
Fragmentace iontů se sudým počtem elektronů (EE^+)

ESI, APCI (APPI, MALDI, DESI ...)

Fragmentace EE^+

CID fragmentace iontů se sudým počtem elektronů ($[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M-H]^-$)

štěpení sousední vazby vzhledem k náboji, migrace náboje



FRAGMENTACE EE^+ :

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



Ionty EE jsou obecně stabilnější než OE^+

Spektra jsou jednodušší, poskytují tak méně informací než spektra EI ,
bývají citlivá na malé změny ve struktuře

Fragmentace EE^+

Odštěpení neutrální molekuly závisí na bazicitě a stabilitě vznikajícího iontu

Typické ztráty neutrálních částic:

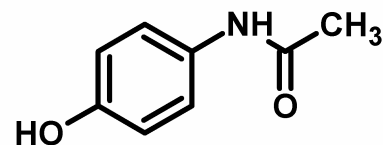
- 17: NH_3 – aminy alifatické, aromatické (+)
- 18: H_2O – kyslíkaté sloučeniny, hydroxyderiváty(+/-)
- 27: HCN - aminy alifatické, aromatické, nitrily arom. (+/-)
- 28: CO – aldehyd, ketony, nitroaromáty (+/-)
- 32: CH_3OH – methyl estery (+)
- 42: $CH_2C=O$ – N-acetyl deriváty (+/-)
- 44: CO_2 – karboxylové kyseliny, karbamáty (+/-)
- 80: SO_3 – sulfonové kyseliny (+/-)
- 162: anhydroglukosa – glukosidy (+/-)

“Zakázané” neutrální ztráty: 3-14, 21-25, 37-40

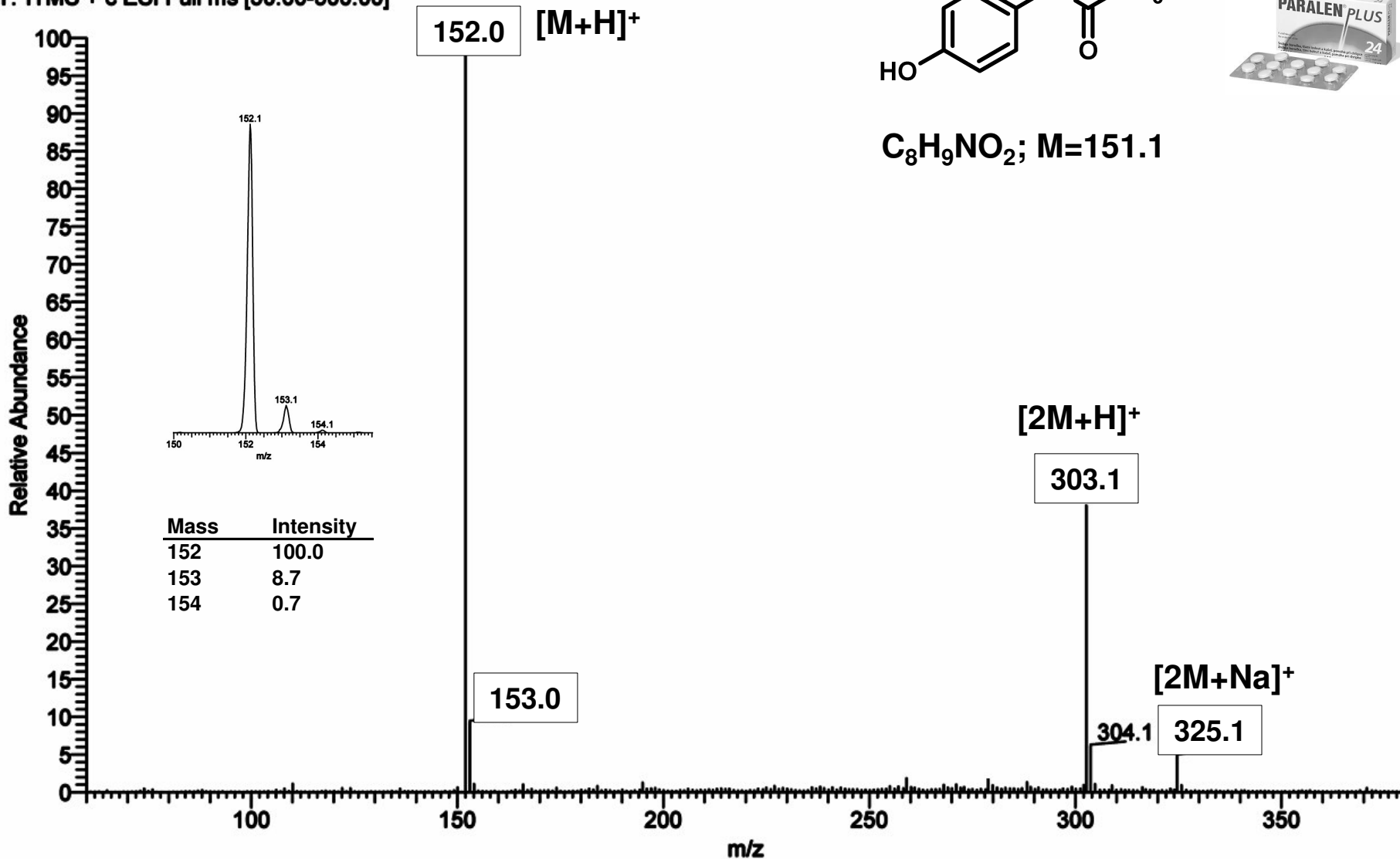
Paracetamol N-(4-hydroxyfenyl)acetamid

ESI+, MS

JC_LEKY_Pan_04_080720211508 #1-22 RT: 0.00-0.25 AV: 22 NL: 2.40E4
T: ITMS + c ESI Full ms [50.00-500.00]



$C_8H_9NO_2$; $M=151.1$

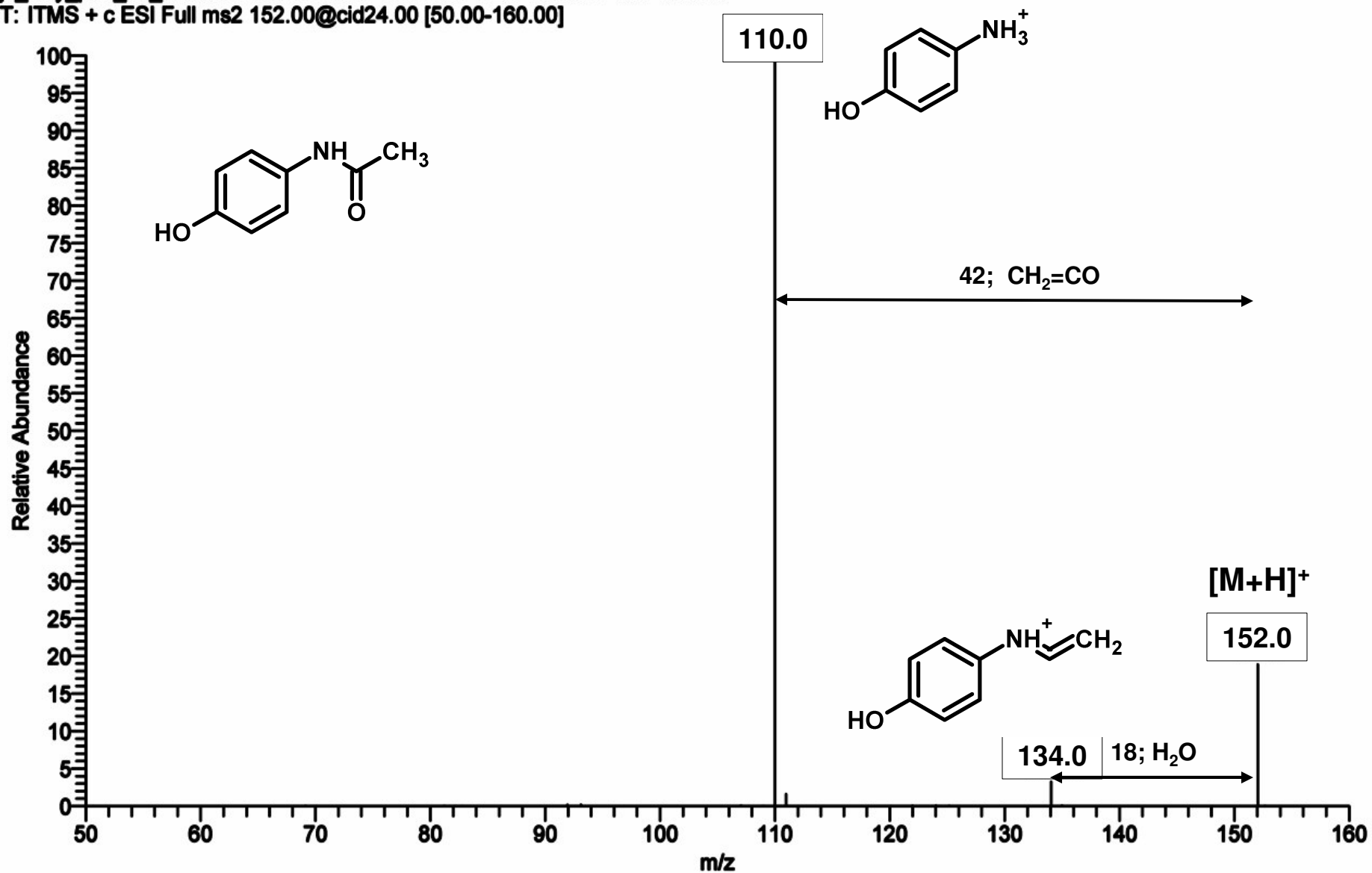


Paracetamol N-(4-hydroxyfenyl)acetamid

ESI+, MS/MS

jc_levy_pan_03_080720211358#1-36 RT: 0.00-0.24 AV: 35 NL: 1.07E3

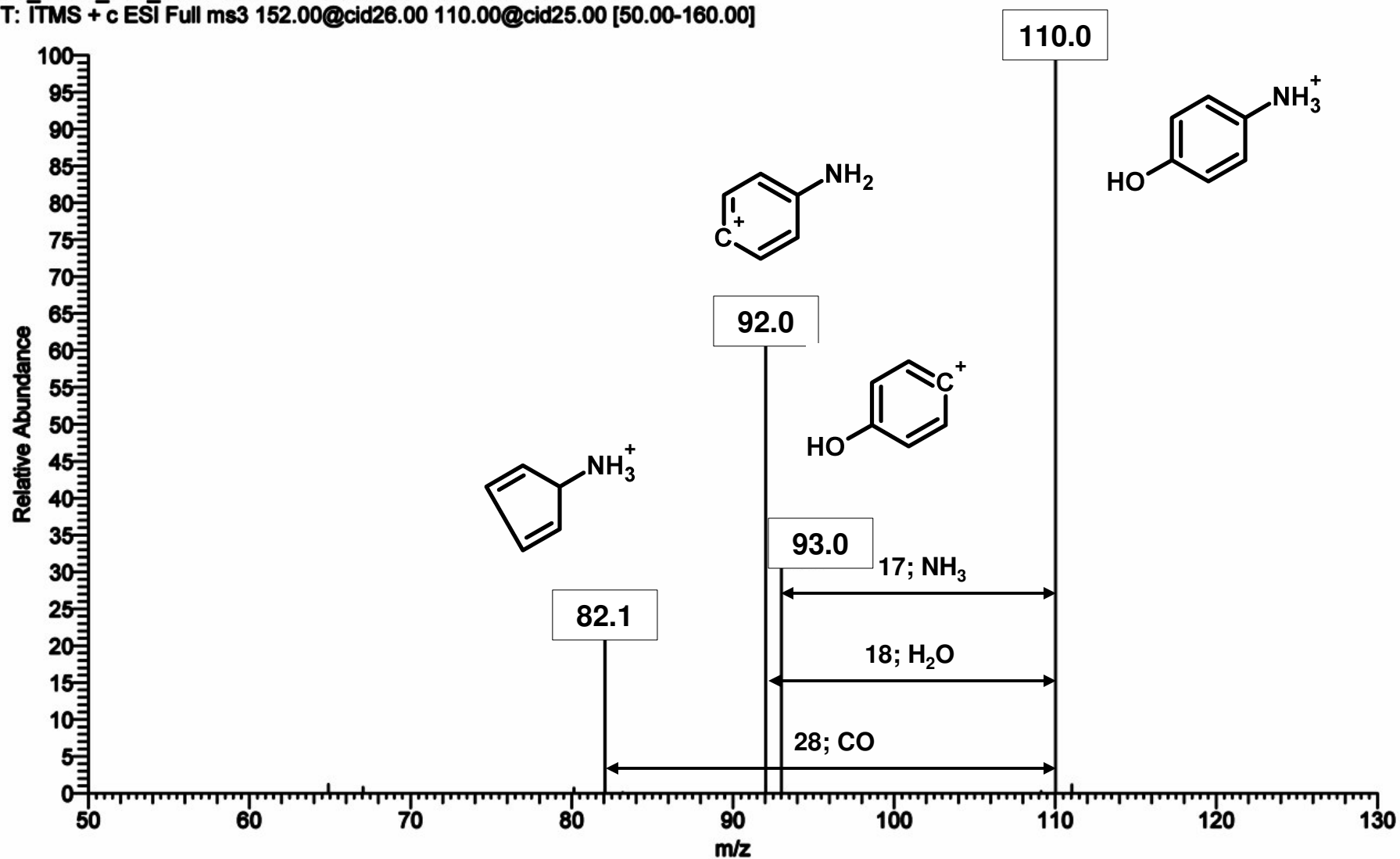
T: ITMS + c ESI Full ms2 152.00@cid24.00 [50.00-160.00]



Paracetamol N-(4-hydroxyfenyl)acetamid

ESI+, *MS*³

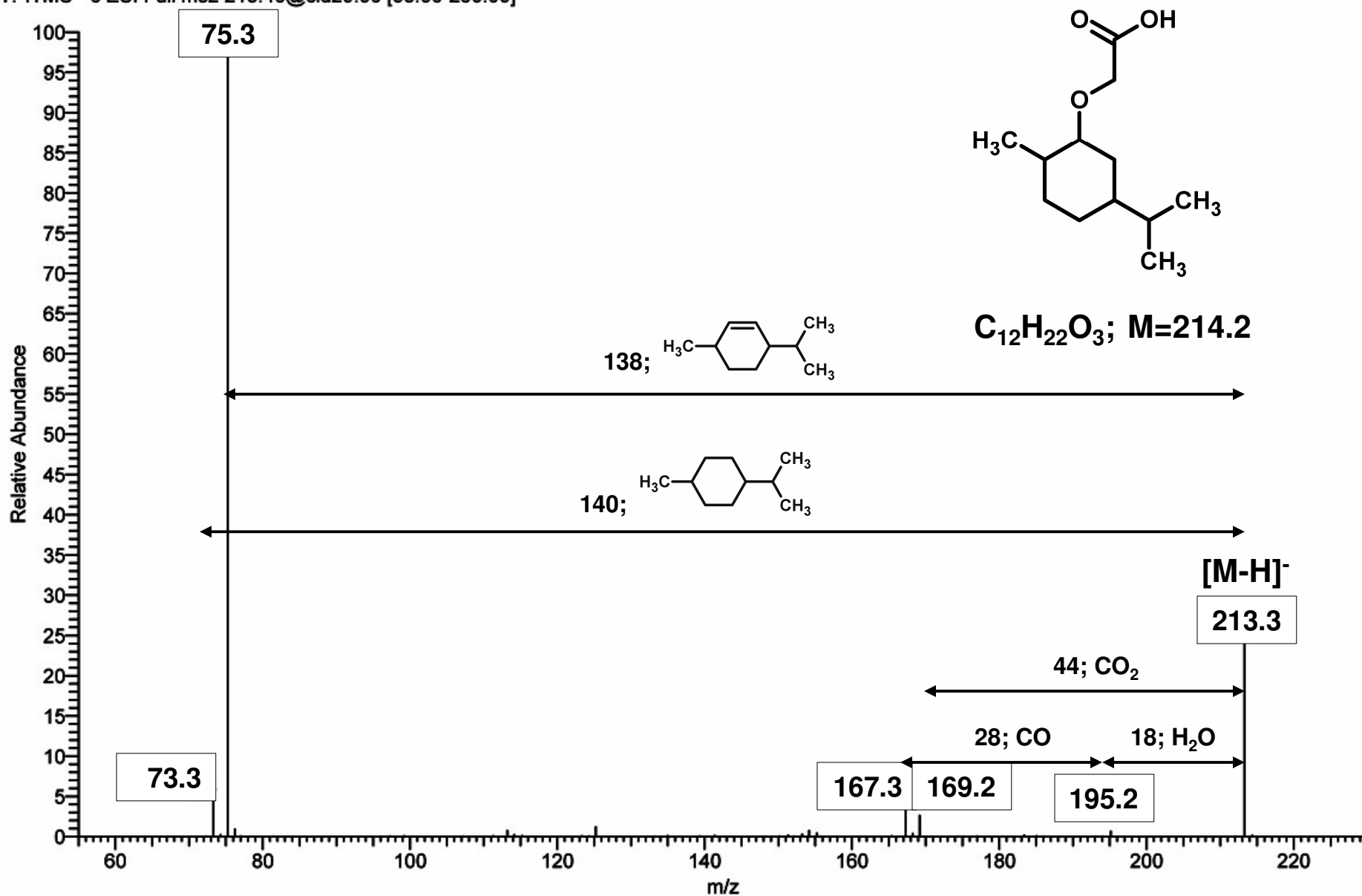
JC_LEKY_Pan_18 #1-464 RT: 0.00-2.00 AV: 464 NL: 1.12E1
T: ITMS + c ESI Full ms3 152.00@cid26.00 110.00@cid25.00 [50.00-160.00]



Kyselina menthyloxyoctová

ESI-, MS/MS

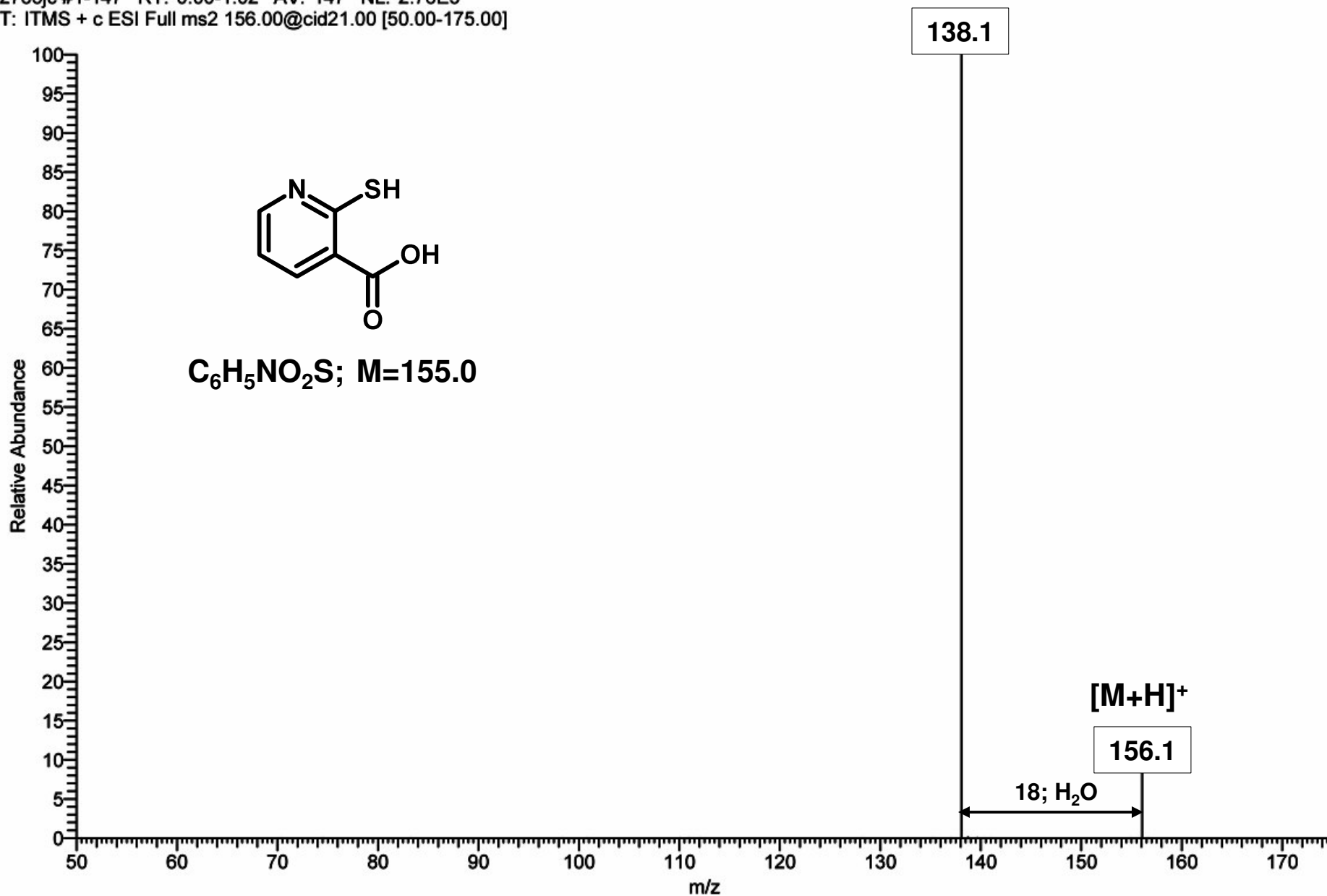
2789jc_090716170932 #1-149 RT: 0.00-2.00 AV: 149 NL: 9.82E1
 T: ITMS - c ESI Full ms2 213.40@cid29.00 [55.00-250.00]



Kyselina 2-merkaptopikotinová

ESI+, MS/MS

2786jc #1-147 RT: 0.00-1.02 AV: 147 NL: 2.76E3
T: ITMS + c ESI Full ms2 156.00@cid21.00 [50.00-175.00]

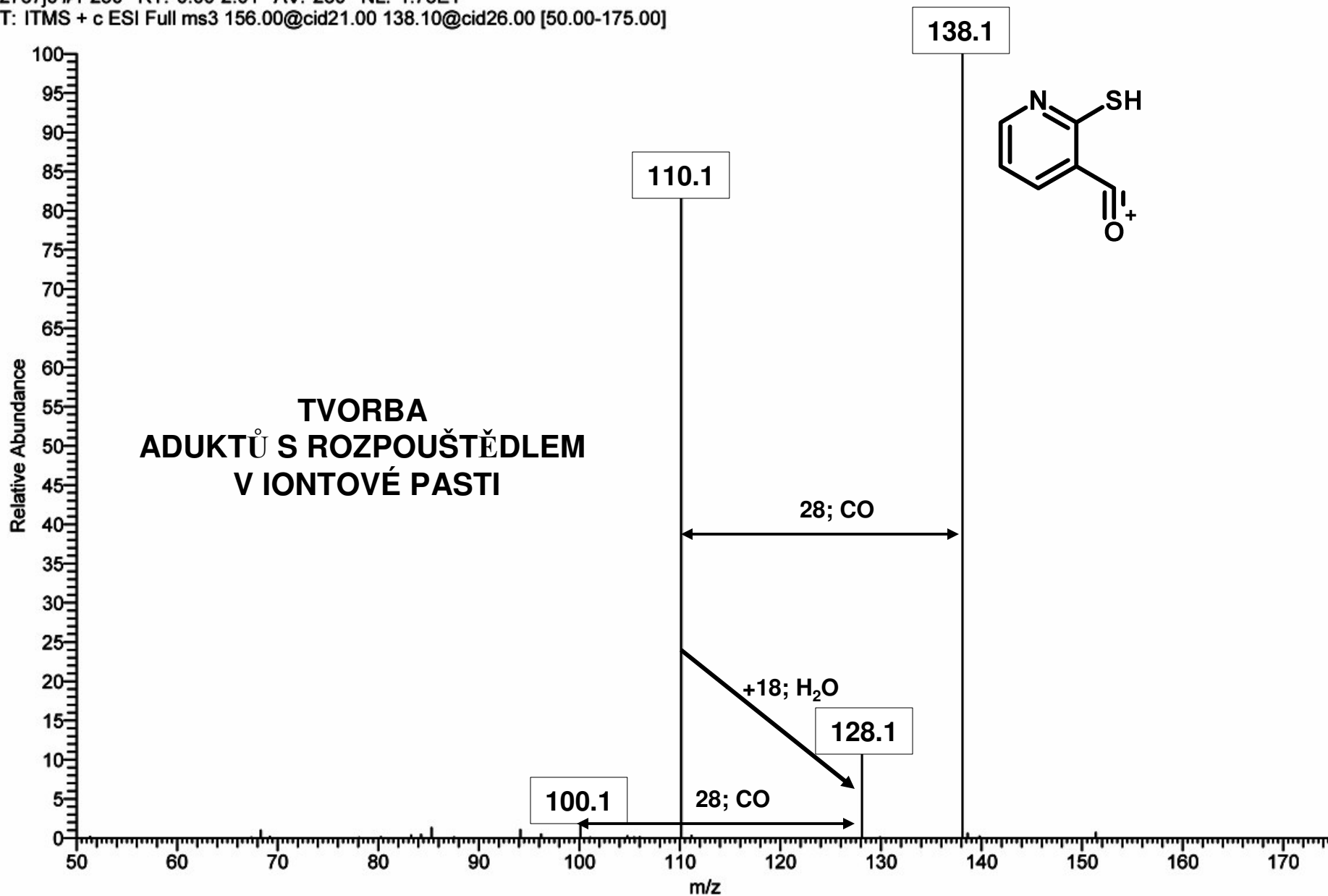


Kyselina 2-merkaptopikotinová

ESI+, MS³

2787jc #1-230 RT: 0.00-2.01 AV: 230 NL: 1.73E1

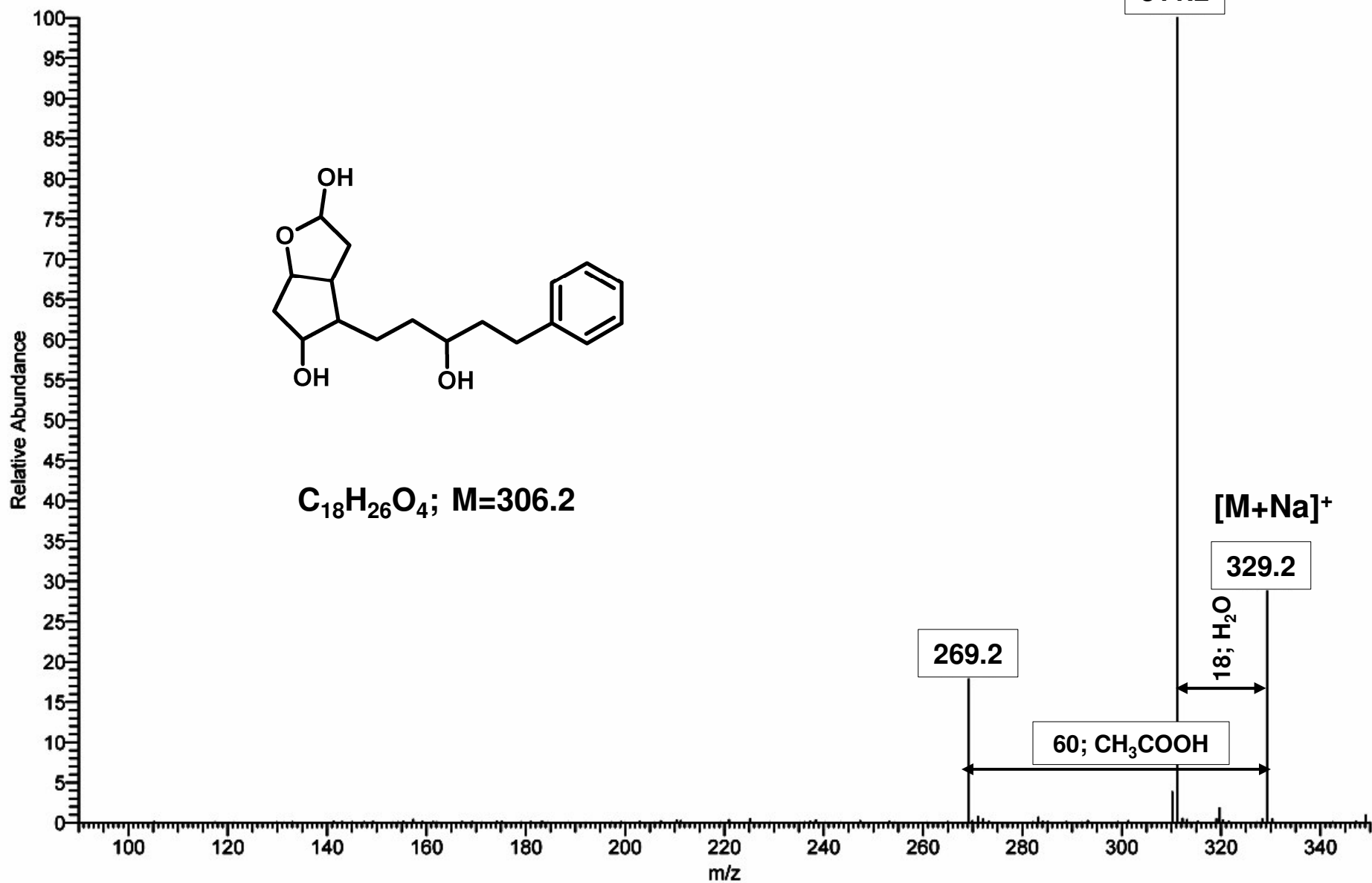
T: ITMS + c ESI Full ms3 156.00@cid21.00 138.10@cid26.00 [50.00-175.00]



Cyklopentafuranol-deriv

1748jc #1-226 RT: 0.00-1.51 AV: 226 NL: 5.26E1

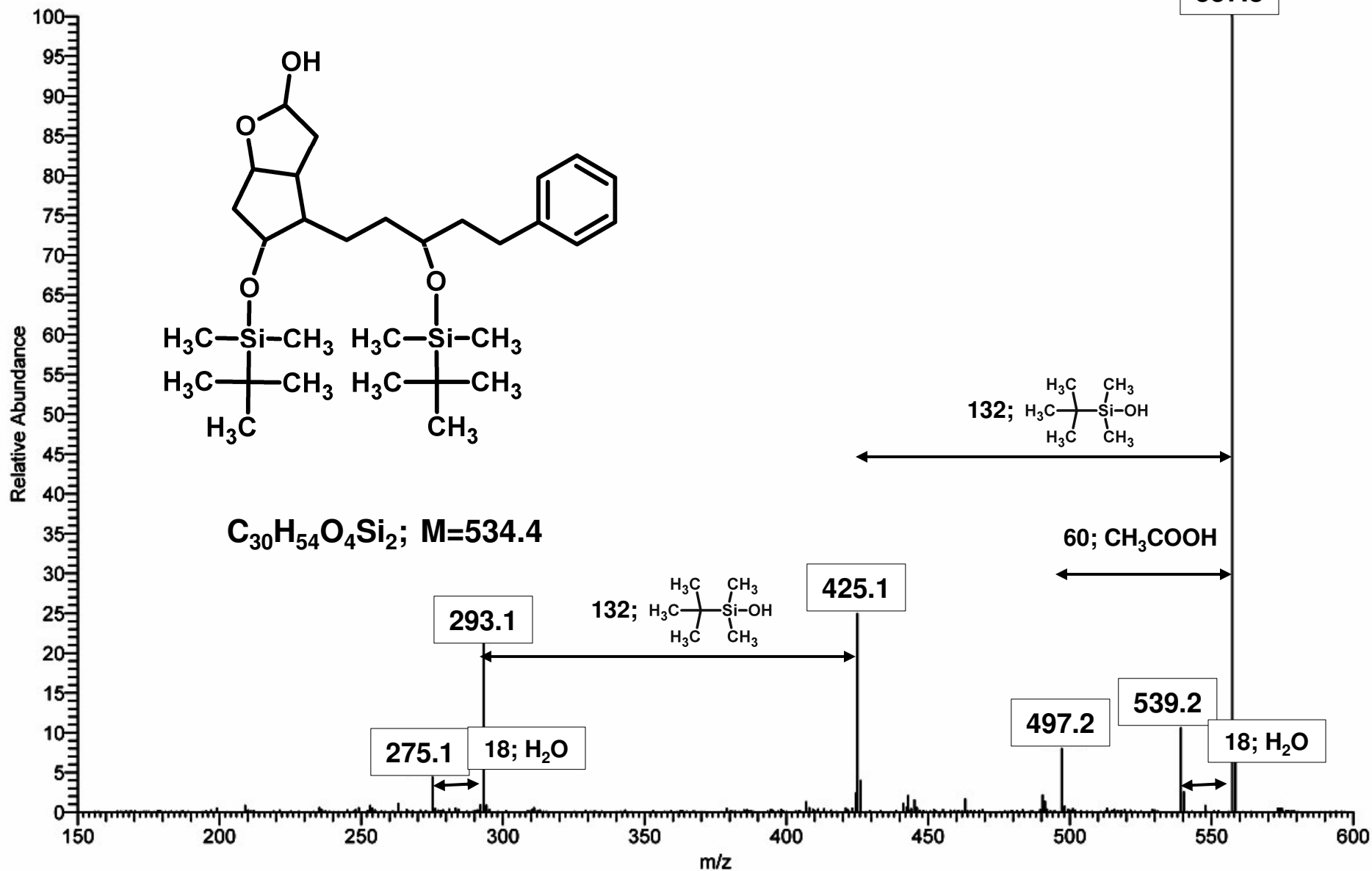
T: ITMS + c ESI Full ms2 329.20@cid27.00 [90.00-350.00]

ESI+, MS/MS

Cyklopentafuranol-deriv, disil

ESI+, MS/MS

1644jc #1-749 RT: 0.00-5.02 AV: 749 NL: 2.22E1
T: ITMS + c ESI Full ms2 557.30@cid27.00 [150.00-600.00]

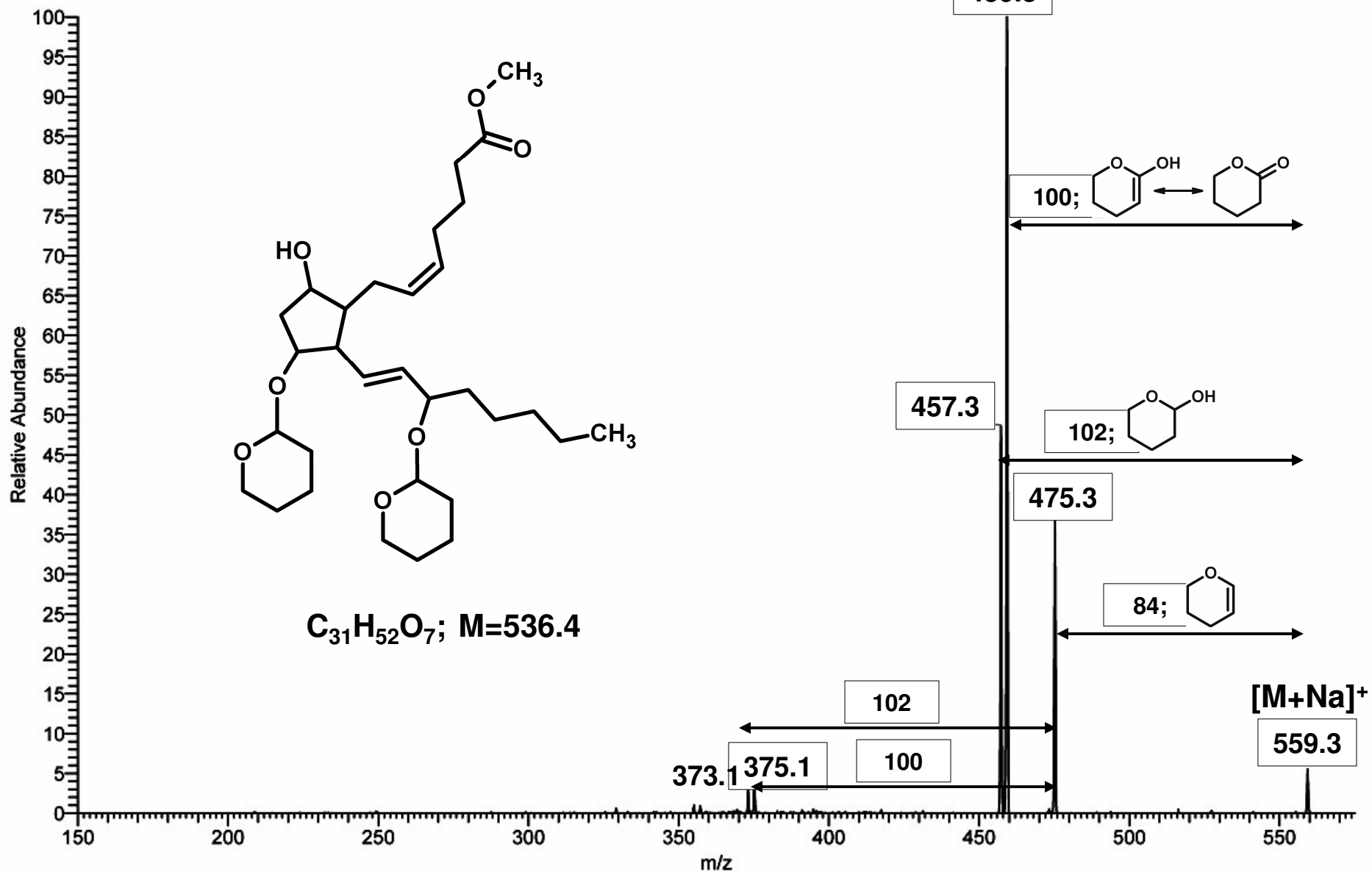


PGF_{2α}-methylester, diTHP

ESI+, MS/MS

3378jc #1-64 RT: 0.01-0.99 AV: 64 NL: 8.64E5

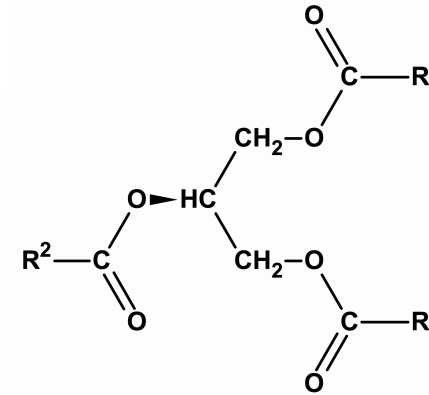
T: + p Full ms2 559.40@cid37.00 [150.00-600.00]



Triacylglyceroly

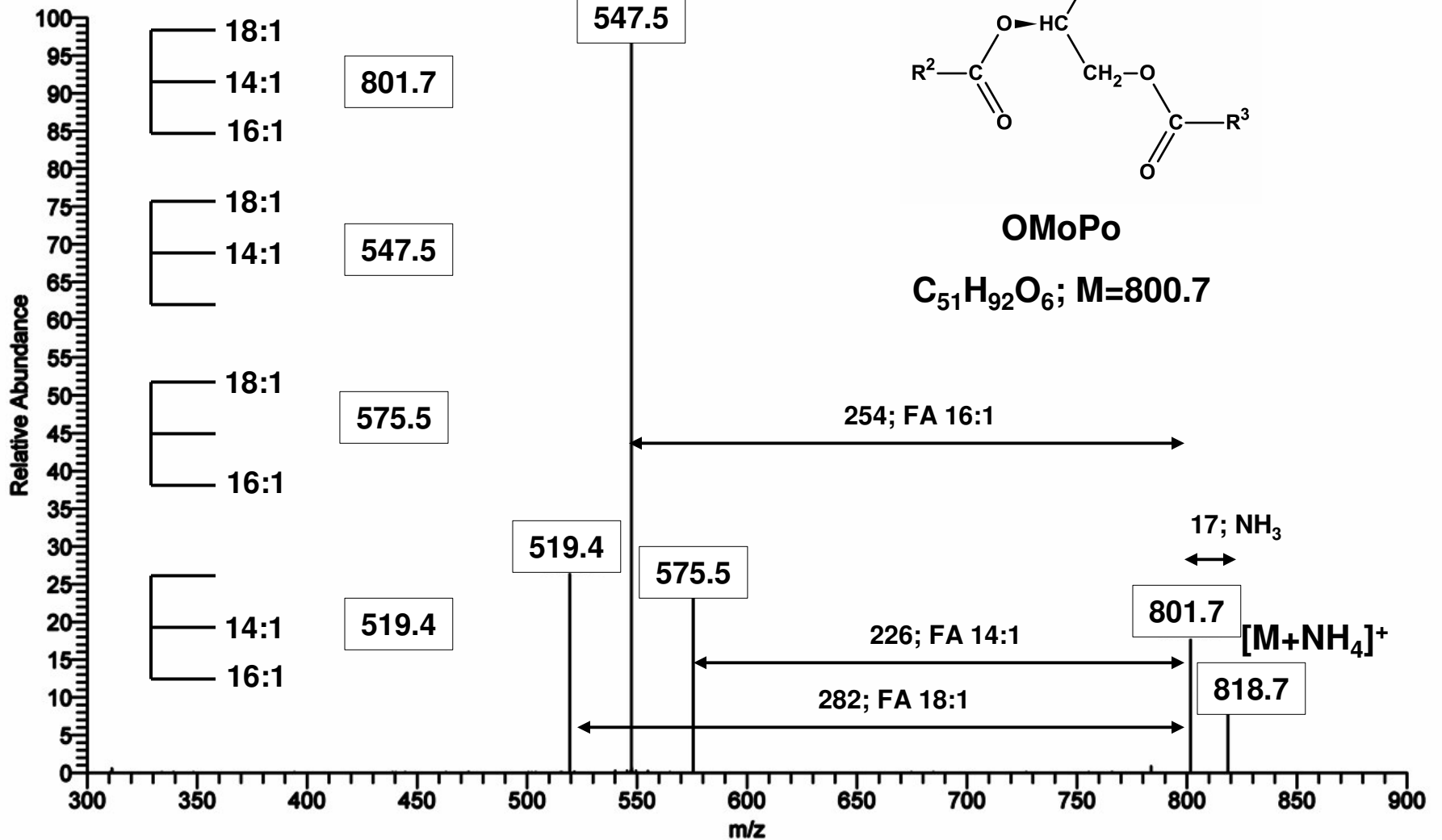
APCI+, MS/MS

JC_TAG_Bter_MSMS01 #6162 RT: 64.99 AV: 1 NL: 3.82E6
 T: FTMS + c APCI corona d Full ms2 818.72@cid30.00 [215.00-830.00]



OMoPo

C₅₁H₉₂O₆; M=800.7



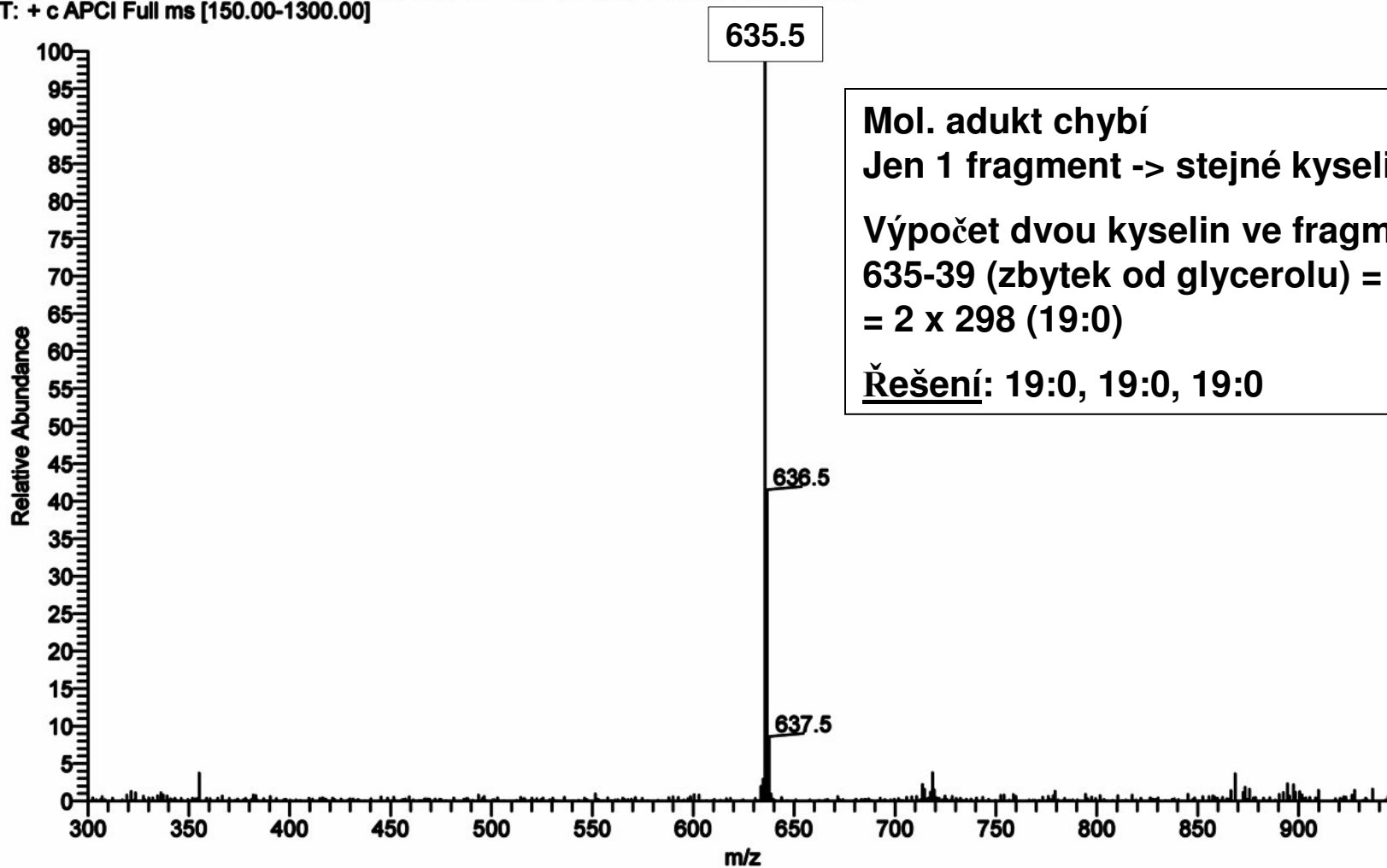
Triacylglyceroly

Určete strukturu
triacylglycerolu.



APCI+, MS

1377ek #4346-4381 RT: 108.29-109.11 AV: 36 SB: 44 106.70-107.89 NL: 4.68E5
T: + c APCI Full ms [150.00-1300.00]



Mol. adukt chybí

Jen 1 fragment -> stejné kyseliny

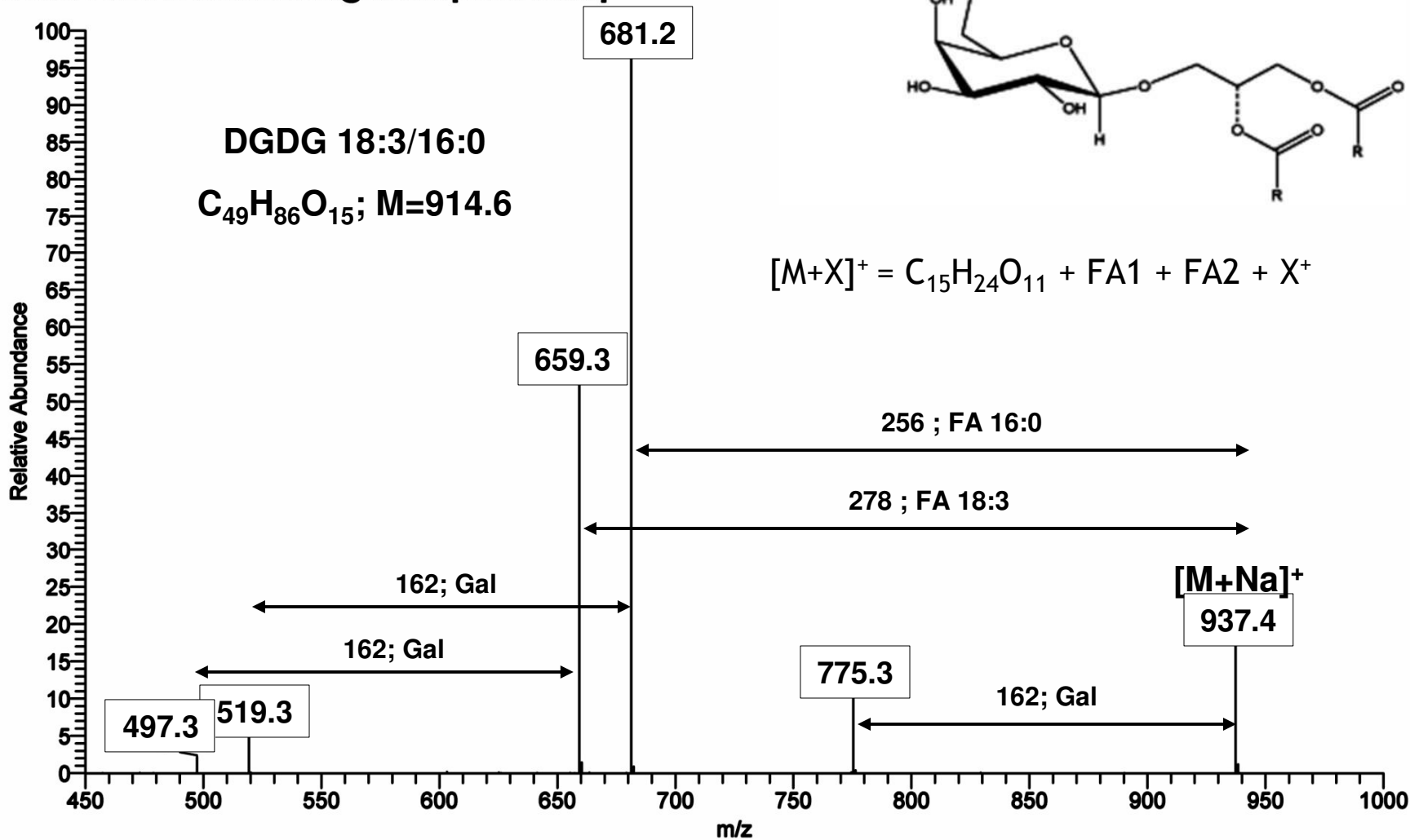
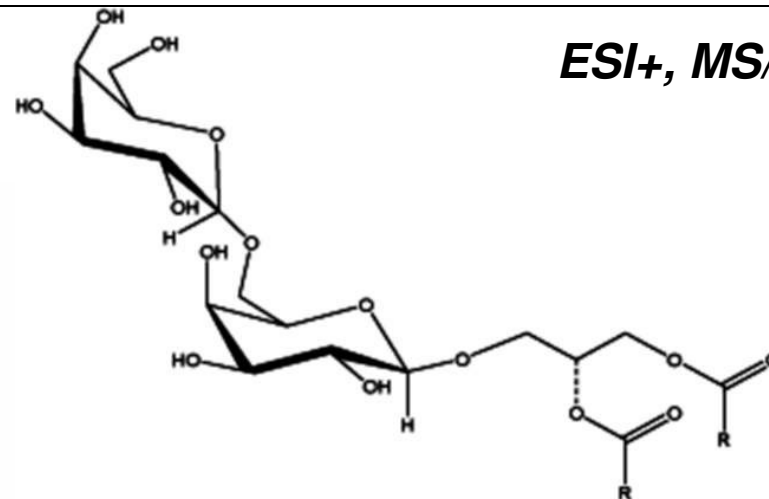
Výpočet dvou kyselin ve fragmentu:
 $635 - 39$ (zbytek od glycerolu) = 596
 = 2 x 298 (19:0)

Řešení: 19:0, 19:0, 19:0

Digalaktosyldiacylglyceroly

ESI+, MS/MS

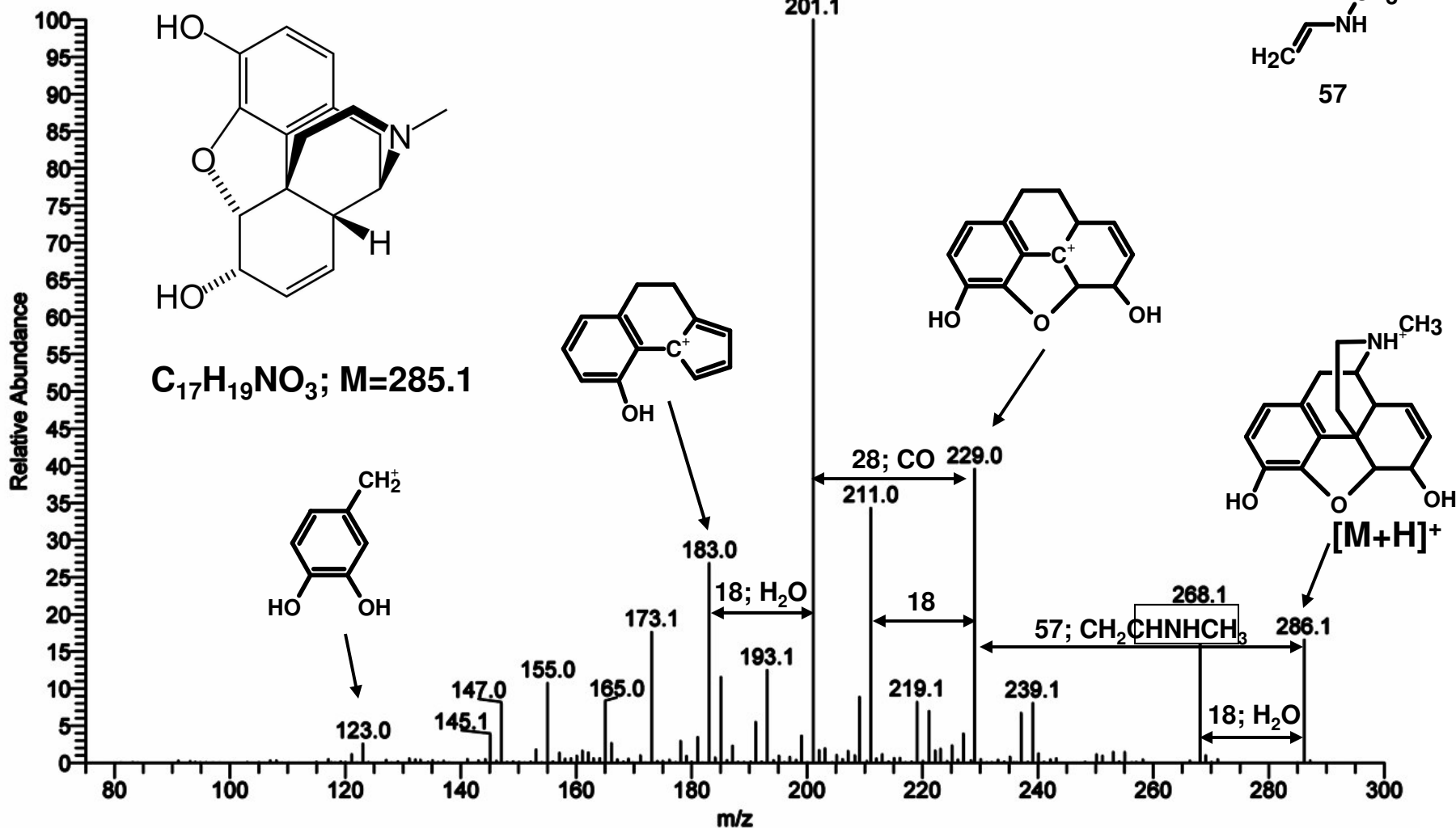
1656MK01 #1342-1375 RT: 21.08-21.58 AV: 17 NL: 1.26E3
 T: ITMS + c ESI d Full ms2 937.47@cid28.00 [245.00-950.00]



Morfin

ESI+, MS/MS

2229jc_080801195950 #1-11 RT: 0.00-0.47 AV: 11 NL: 1.81E2
T: ITMS + c ESI Full ms2 286.10@cid27.00 [75.00-300.00]

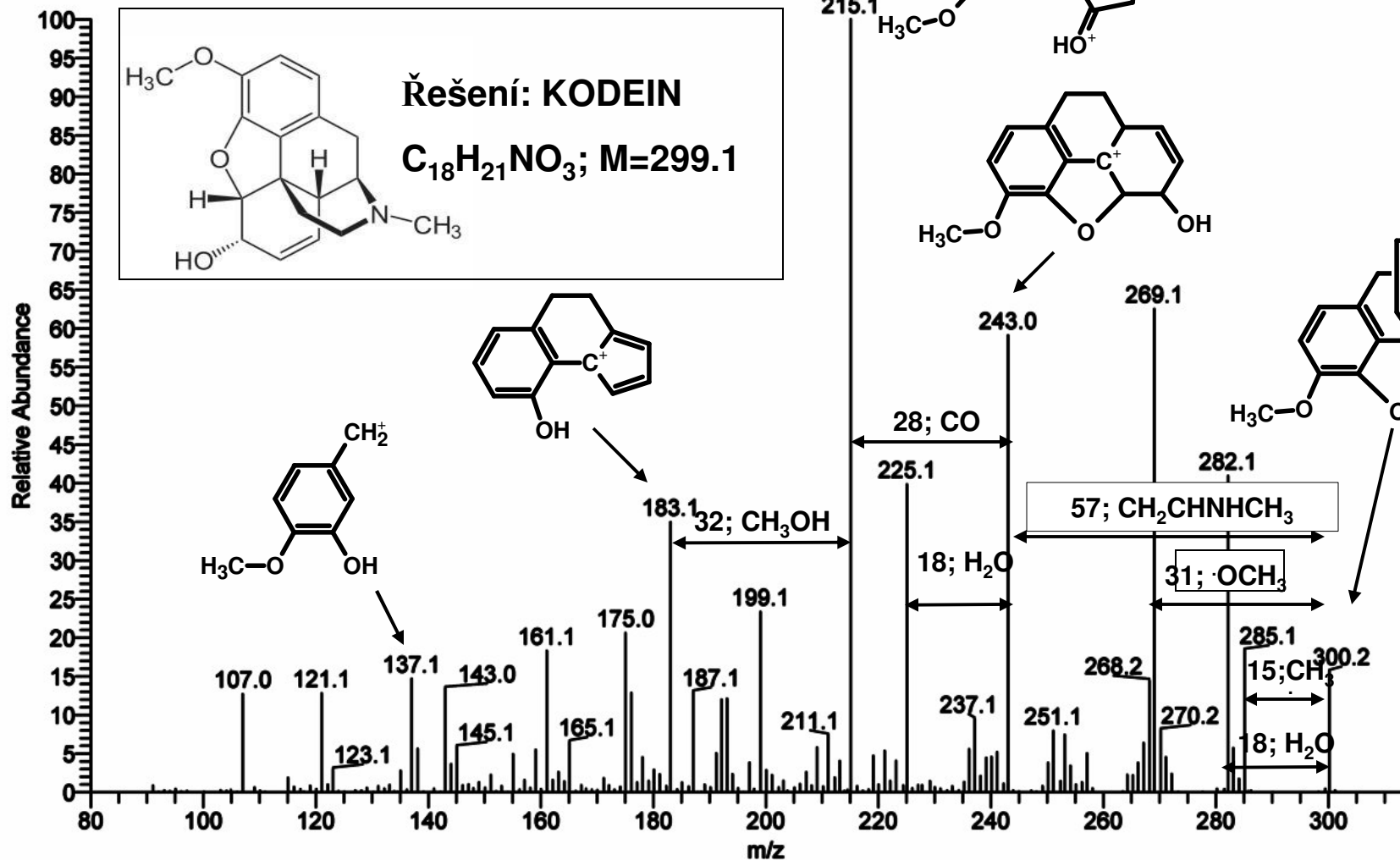


Pokuste se odhadnout strukturu alkaloidu.



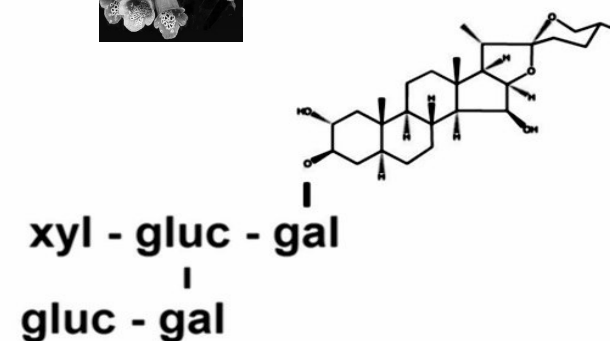
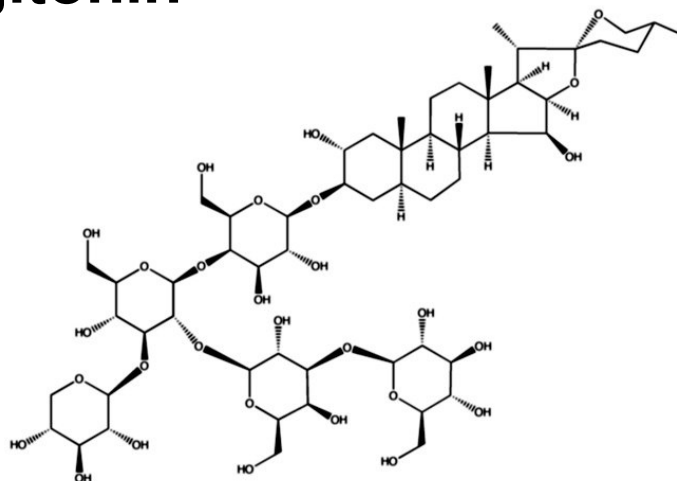
ESI+, MS/MS

2233jc #1-22 RT: 0.00-2.00 AV: 22 NL: 1.51E1
 F: ITMS + c ESI Full ms2 300.10@cid27.00 [80.00-320.00]



Glykosidy - digitonin

Digitonin
 $C_{56}H_{92}O_{29}$



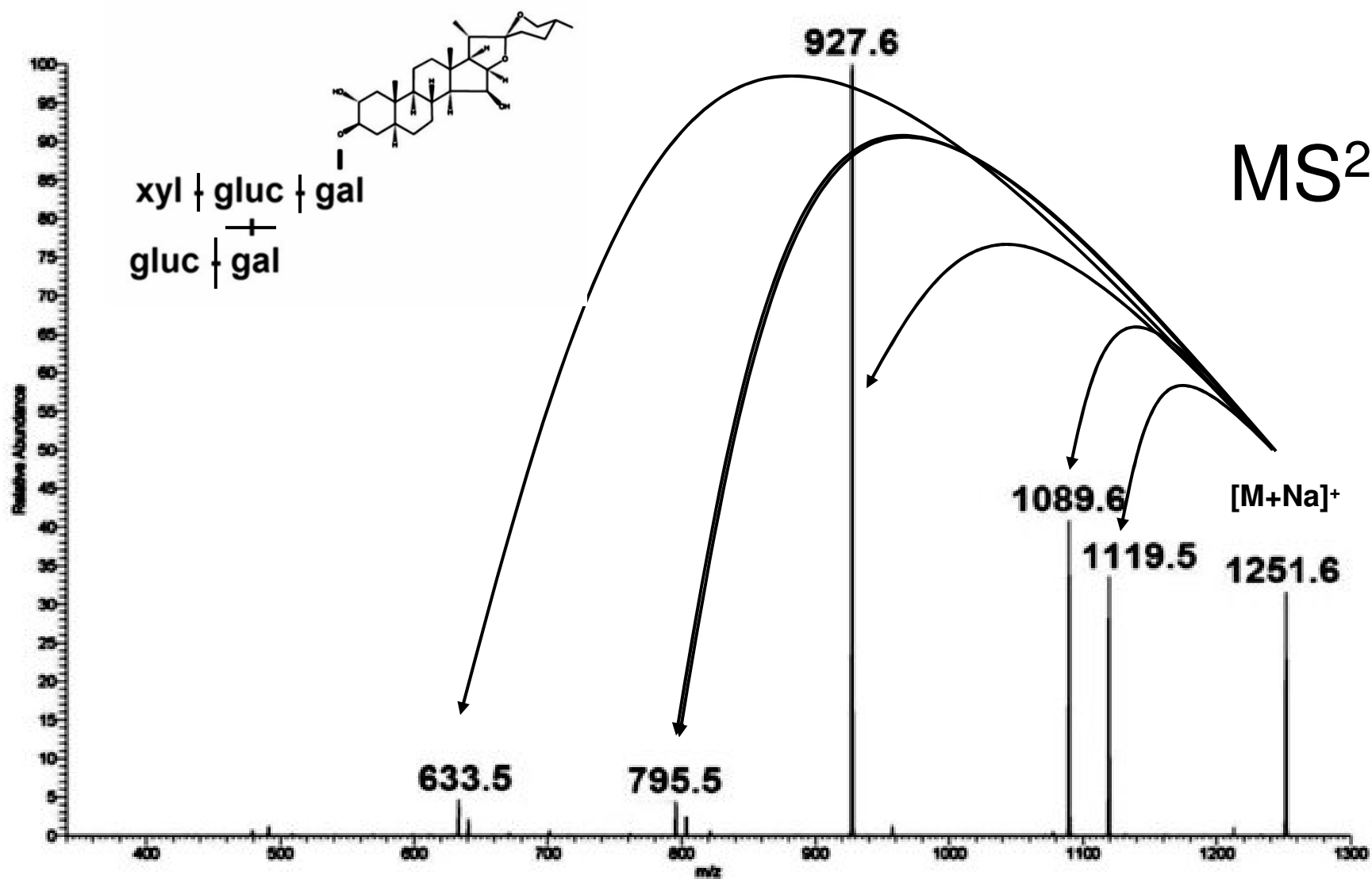
ESI ionizace – tvorba molekulárního aduktu **[M+Na]⁺**

MS/MS fragmentace – odštěpování cukerných jednotek jako neutrálních částic

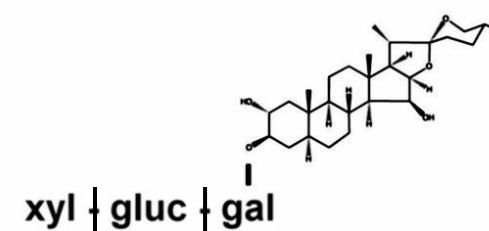
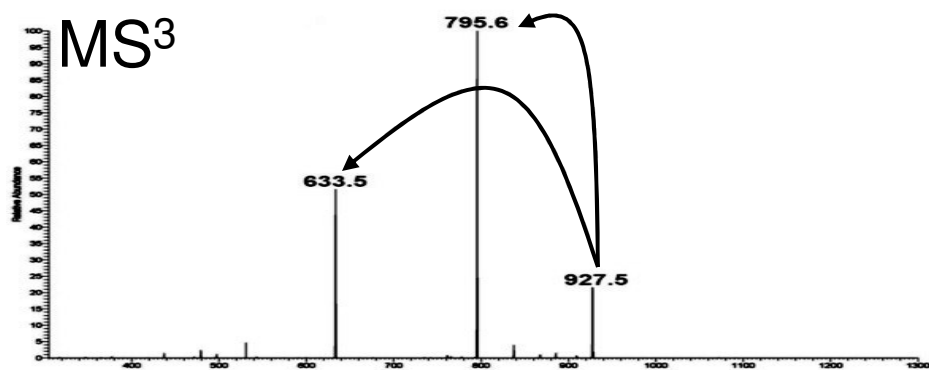
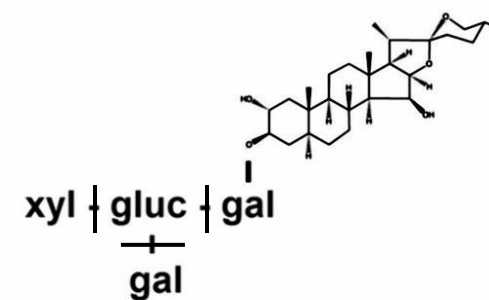
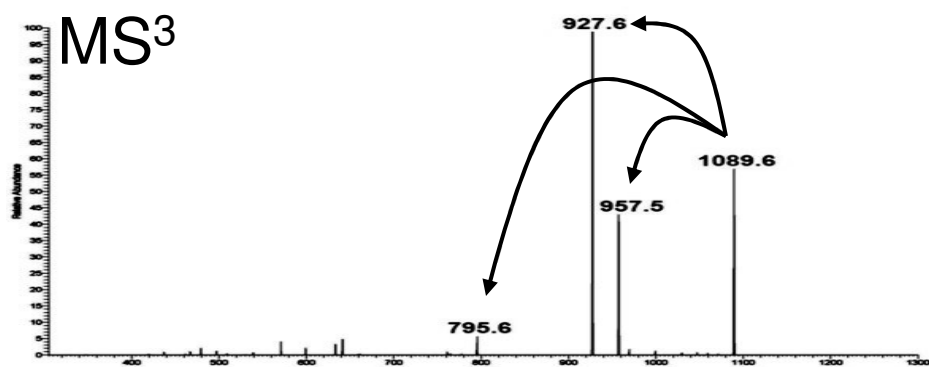
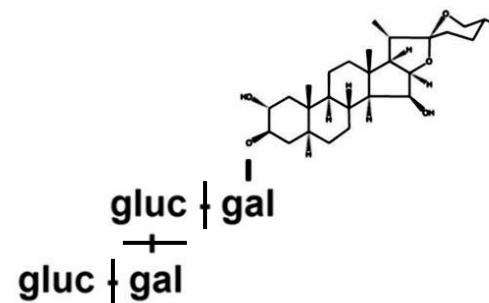
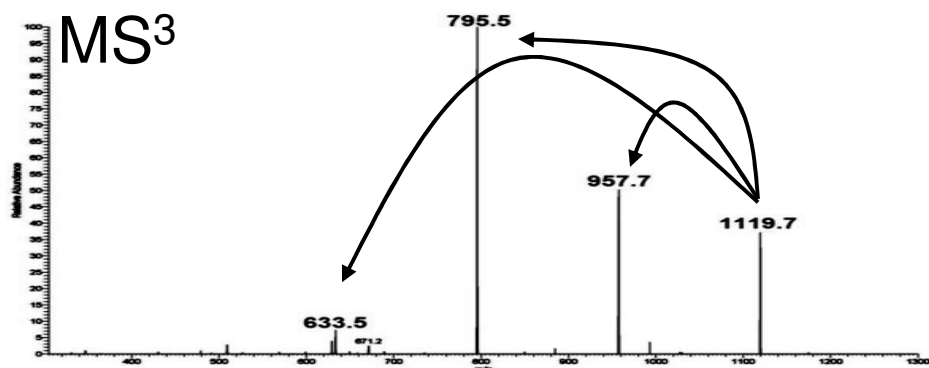
Hexóza: neutrální ztráta **162 u** (molekula – H₂O)

Pentóza: neutrální ztráta **132 u** (molekula – H₂O)

Glykosidy - digitonin



Glykosidy - digitonin



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

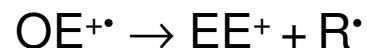
EI

Fragmentace $OE^{\bullet+}$

Při EI vznikají fragmenty již v MS kroku (nejsou nutné fragmentační techniky jako CID apod.)

FRAGMENTACE $OE^{\bullet+}$

I. vzniká ion se sudým počtem elektronů a radikál



II. vzniká ion s lichým počtem elektronů a neutrální částice

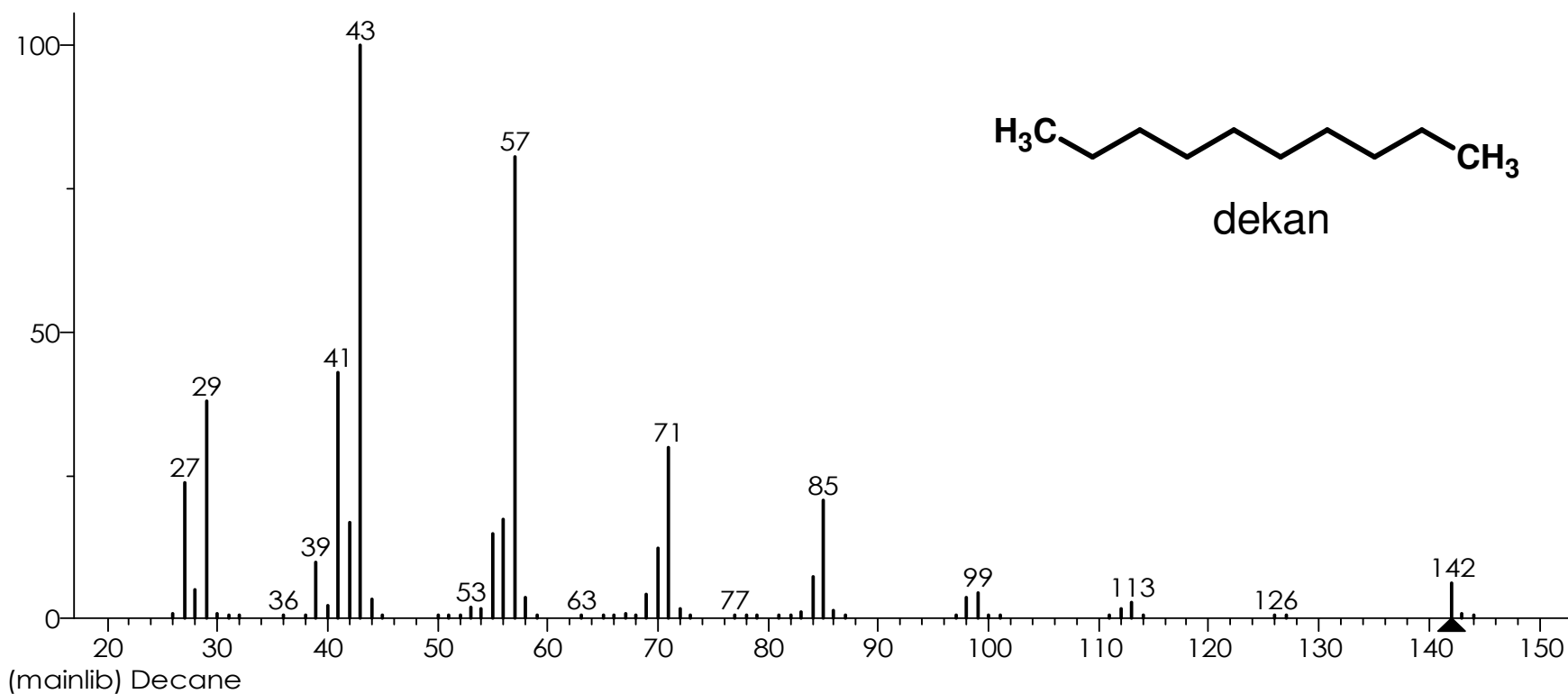


Spektra jsou bohatá, informačně obsažná, mohou být použita jako “fingerprint” pro tvorbu knihoven spekter

Probíhají pouze monomolekulární reakce

Štěpení σ -vazby

- je-li při ionizaci “vyražen” elektron ze σ -vazby, dojde k jejímu štěpení
- typická fragmentace pro **alkany**, případně pro F-, Cl-, CN- substituované alkany



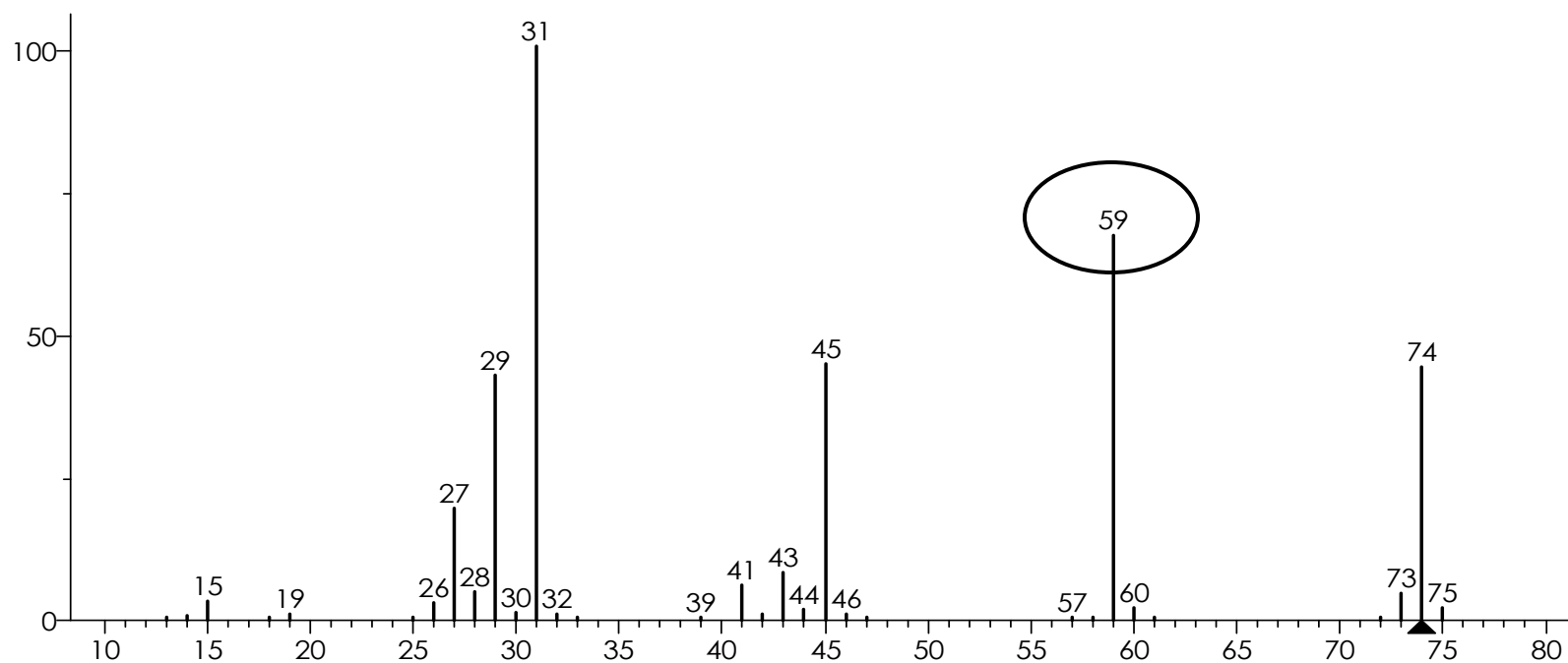
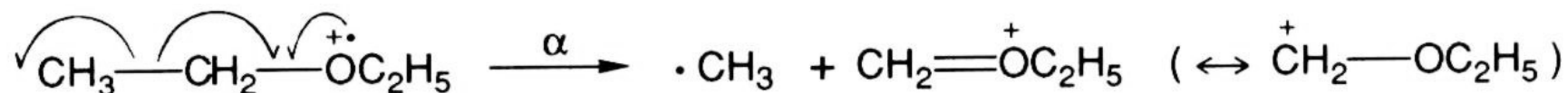
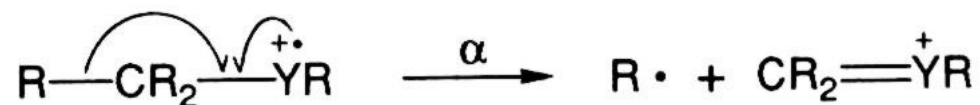
Štěpení σ -vazby

- intenzita fragmentových iontů závisí na jejich schopnosti stabilizovat náboj



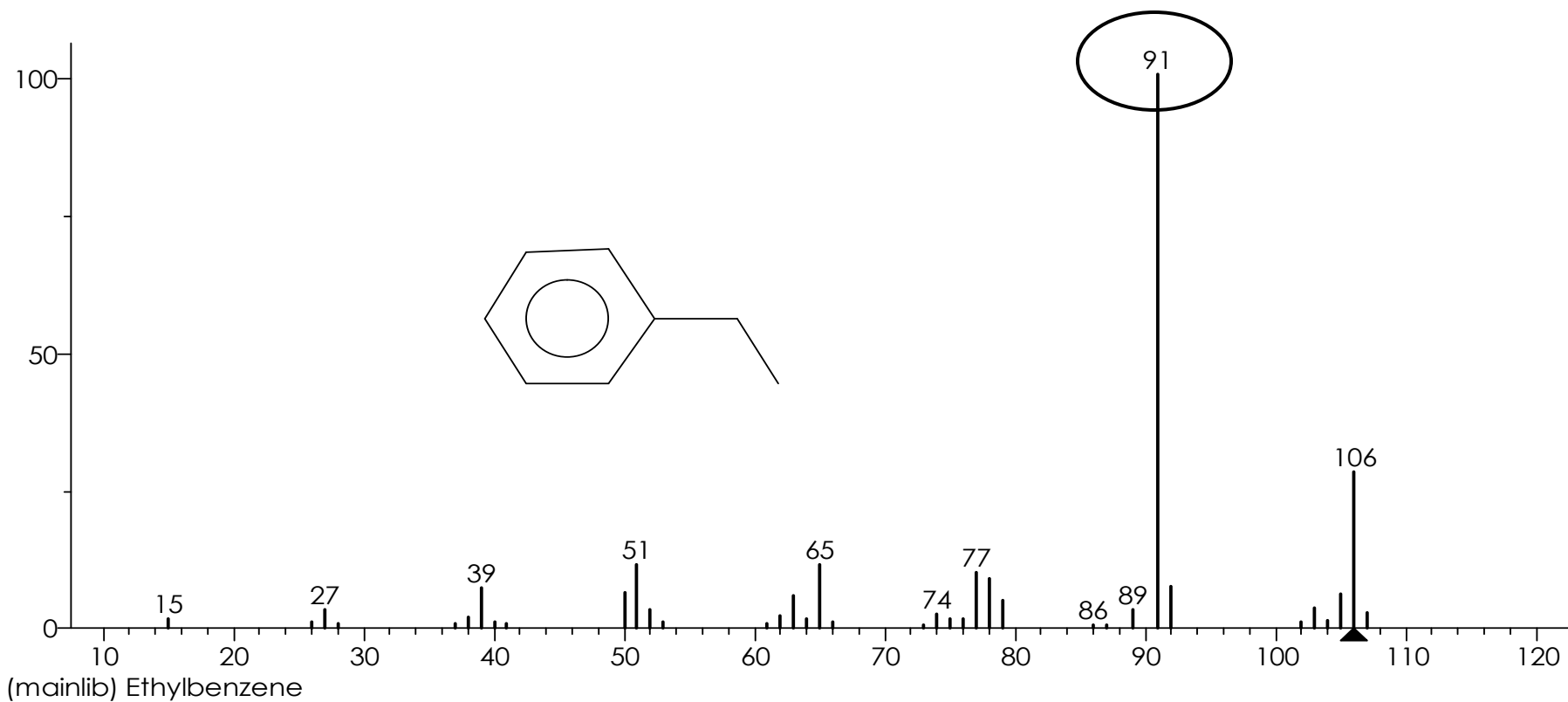
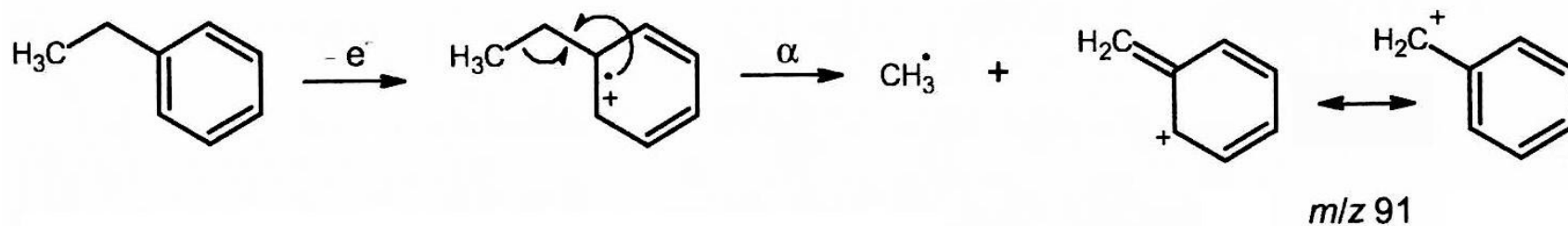
α -Štěpení: fragmentace vyvolaná radikálem

- štěpení vyvolané tendencí elektronů tvořit páry – lichý elektron je poskytnut na tvorbu nové vazby, štěpí se sousední vazba



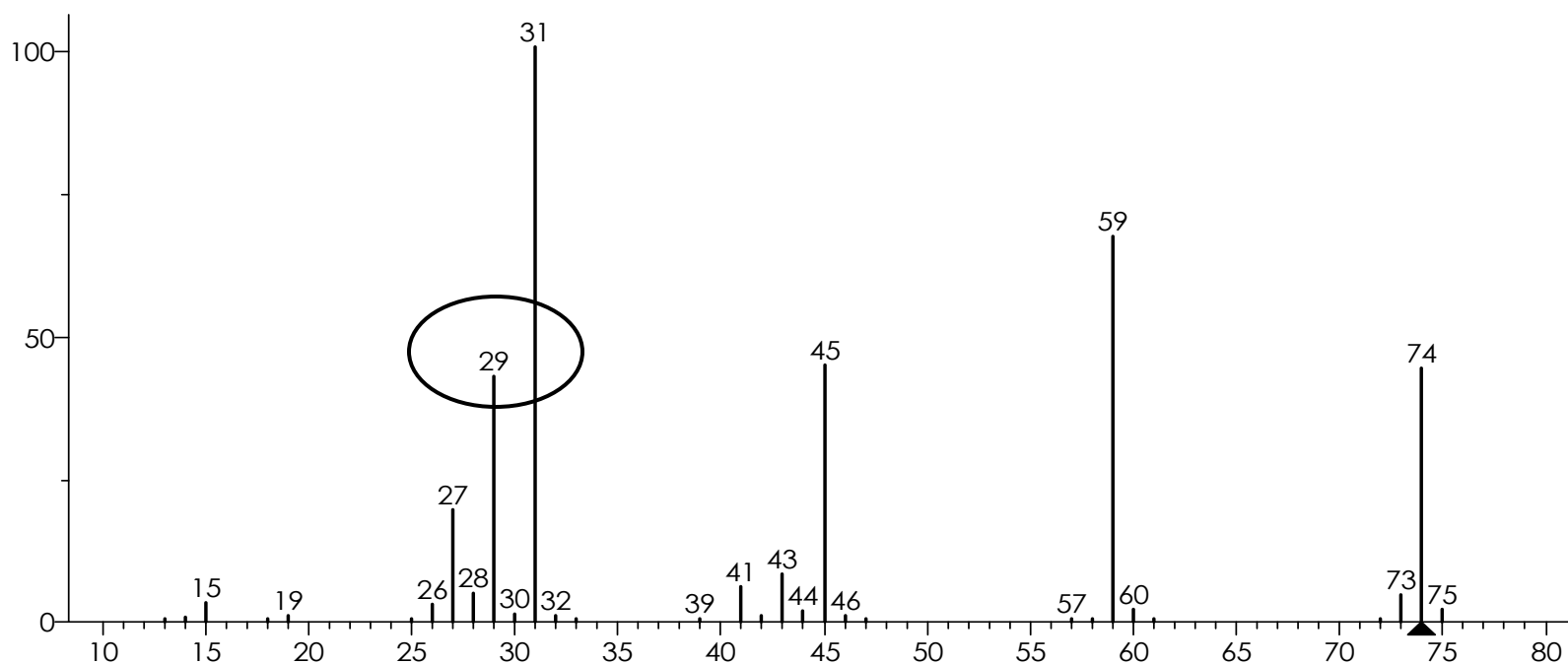
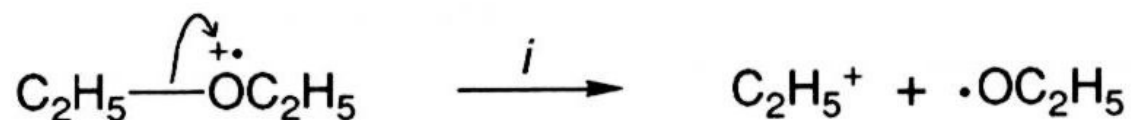
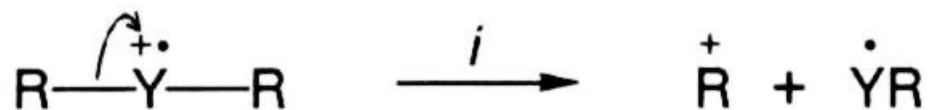
(mainlib) Ethyl ether

α -Štěpení: benzylové štěpení



Indukční štěpení: fragmentace vyvolaná nábojem

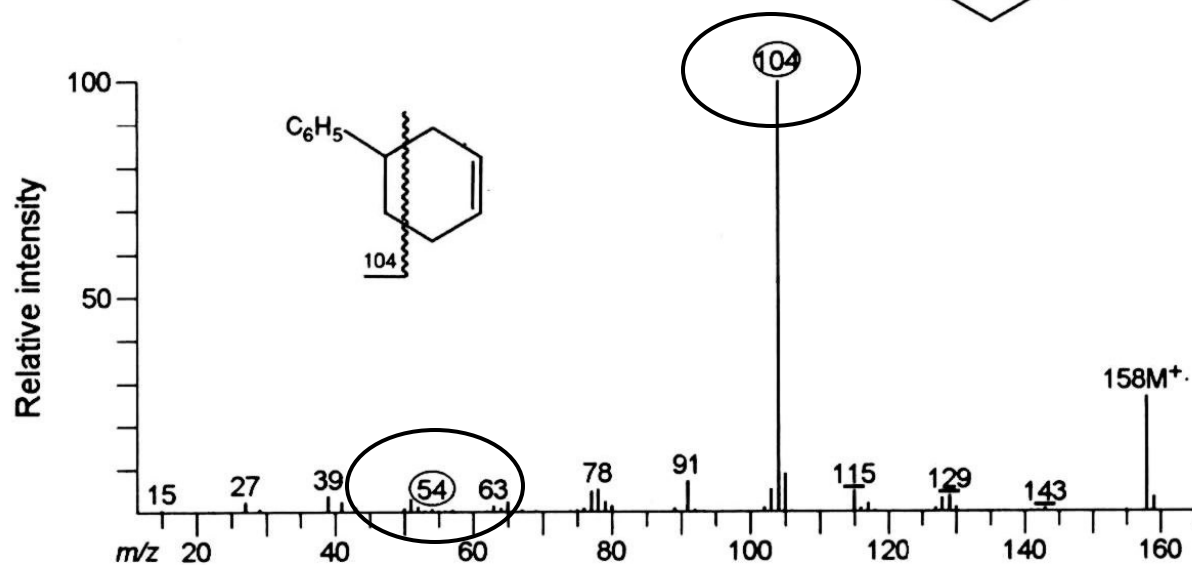
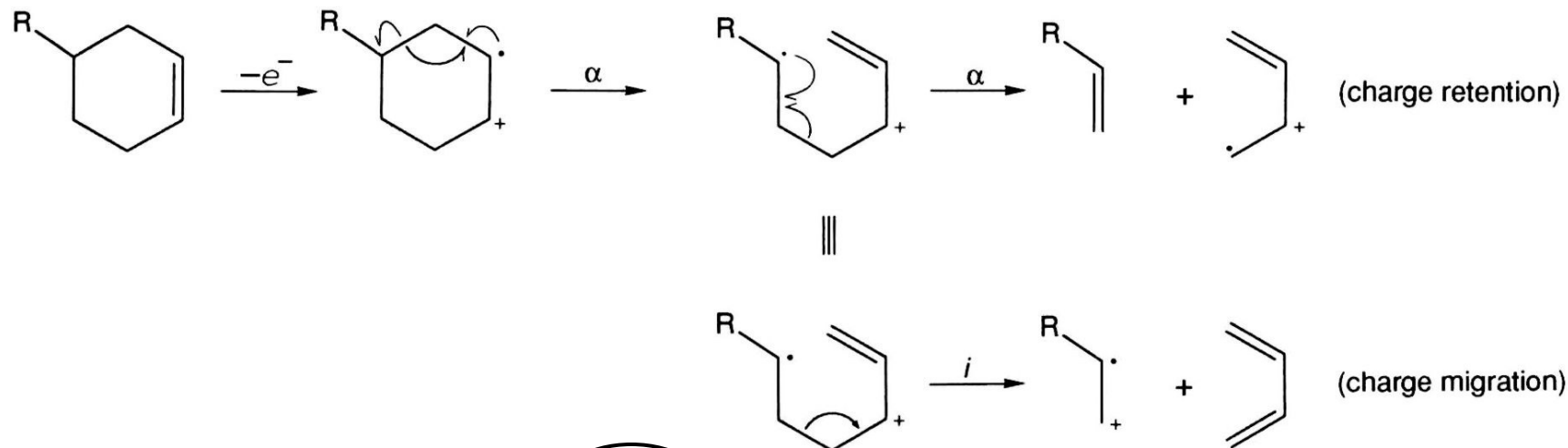
- štěpení vyvolané přitahováním elektronového páru nábojem



(mainlib) Ethyl ether

Fragmentace cyklických struktur – Retro Diels-Alder

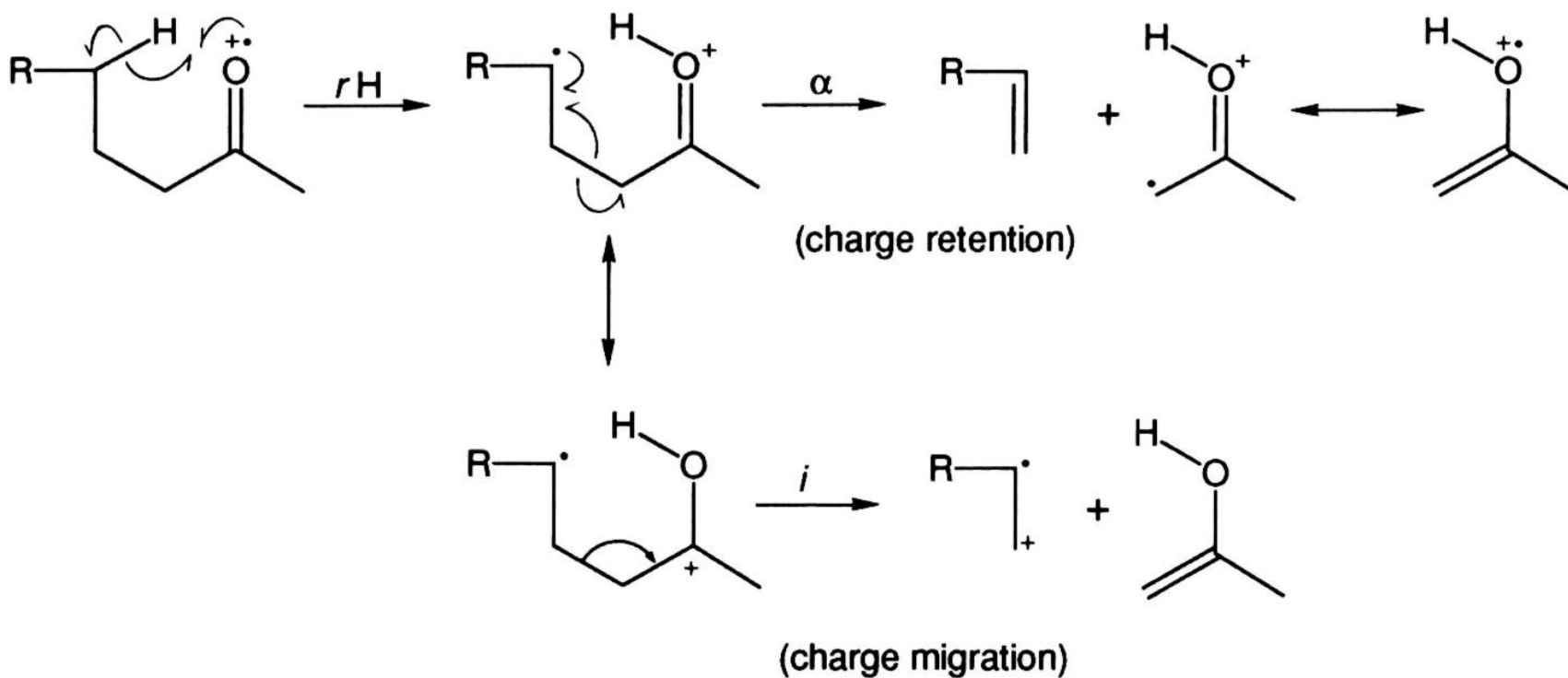
- π -elektrony dvojně vazby u cyklických struktur jsou primárním místem ionizace



4-fenylcyklohexen

Přesmyky vodíku – McLaffertyho přesmyk

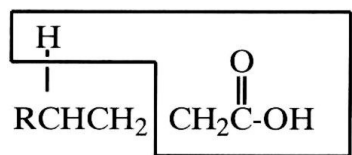
- přesmyk γ -vodíku na nenasycenou skupinu přes 6-členný kruh. Nové radikálové místo vyvolá α -štěpení



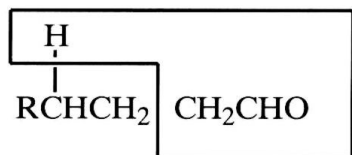
Přesmyky vodíku – McLaffertyho přesmyk

- Vzácné OE^{+} jsou typické pro řadu funkčních skupin – aldehydy, ketony, estery, kyseliny, amidy, karbonáty, fosfonáty apod.

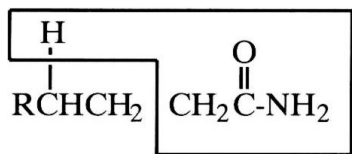
Acids

 m/z 60

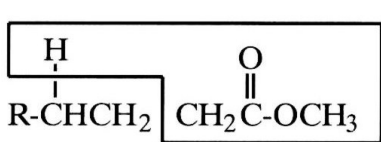
Aldehydes

 m/z 44

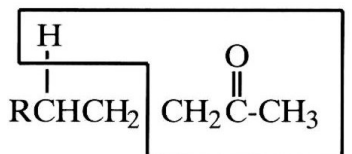
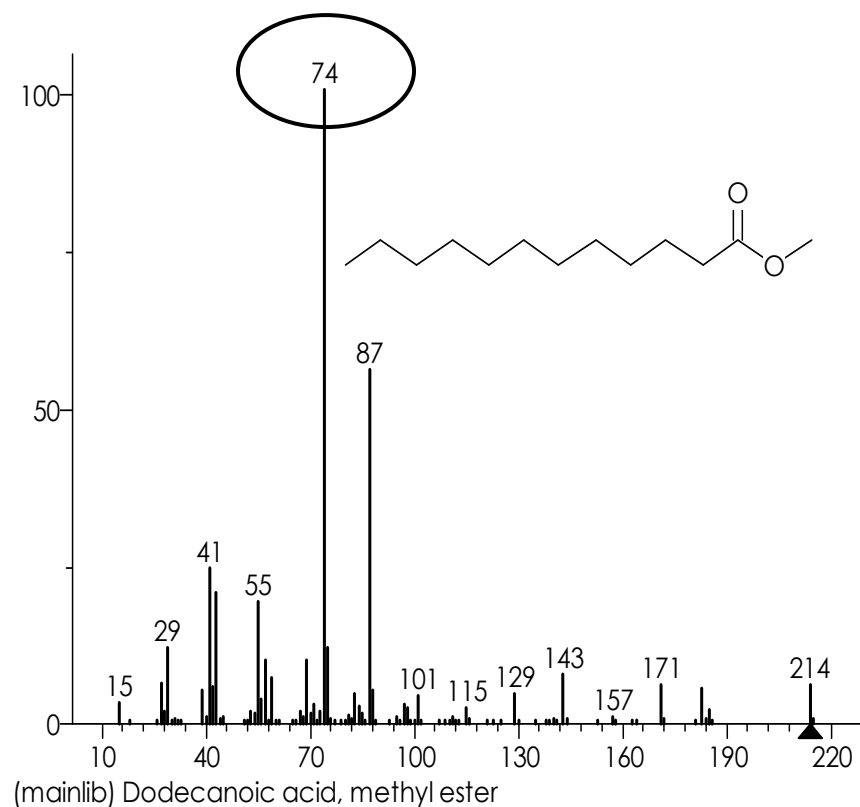
Amides

 m/z 59

Esters

 m/z 74

Ketones

 m/z 58

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

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)

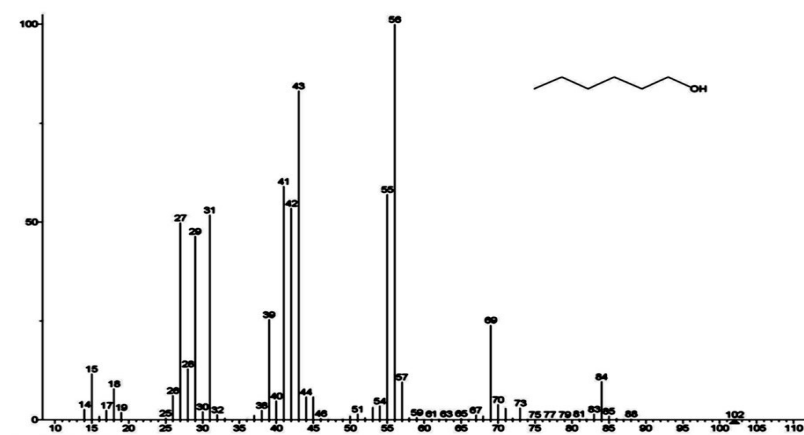
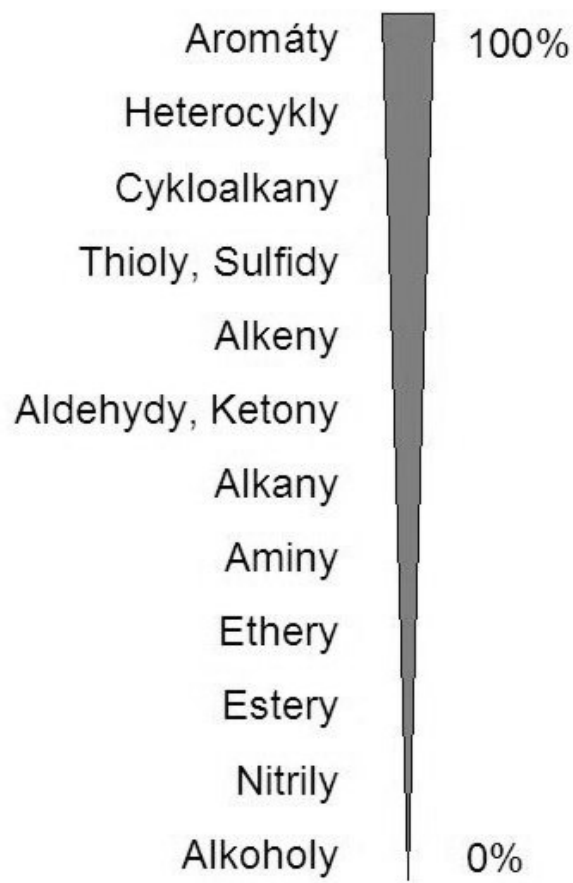
Logické neutrální ztráty

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

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

Intenzita molekulárního iontu

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

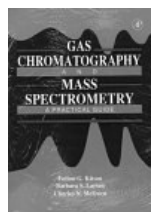


Literatura

EI



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

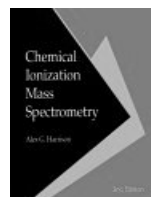


Fulton G. Kitson, Barbara S. Larsen, and Charles N. McEwen: Gas Chromatography and Mass Spectrometry. Academic Press (1996). ISBN-10: 0124833853, ISBN-13: 978-0124833852

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
