

Hmotnostní spektrometrie



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

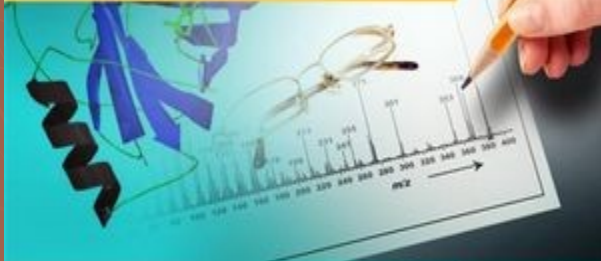
Literatura

J. Throck Watson
O. David Sparkman

Introduction to

Mass Spectrometry

*Instrumentation, Applications
and Strategies for Data Interpretation*



WILEY

Fourth Edition

Edmond de Hoffmann and Vincent Stroobant

Mass Spectrometry

Principles and Applications

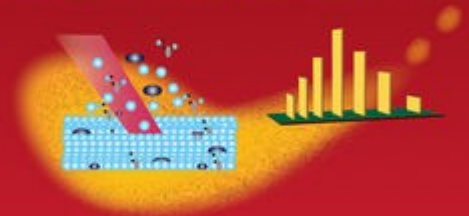
Third Edition

WILEY

Second Edition

Electrospray and MALDI Mass Spectrometry

*Fundamentals, Instrumentation,
Practicalities, and Biological Applications*



Edited by
RICHARD B. COLE

WILEY

Hmotnostní spektrometrie

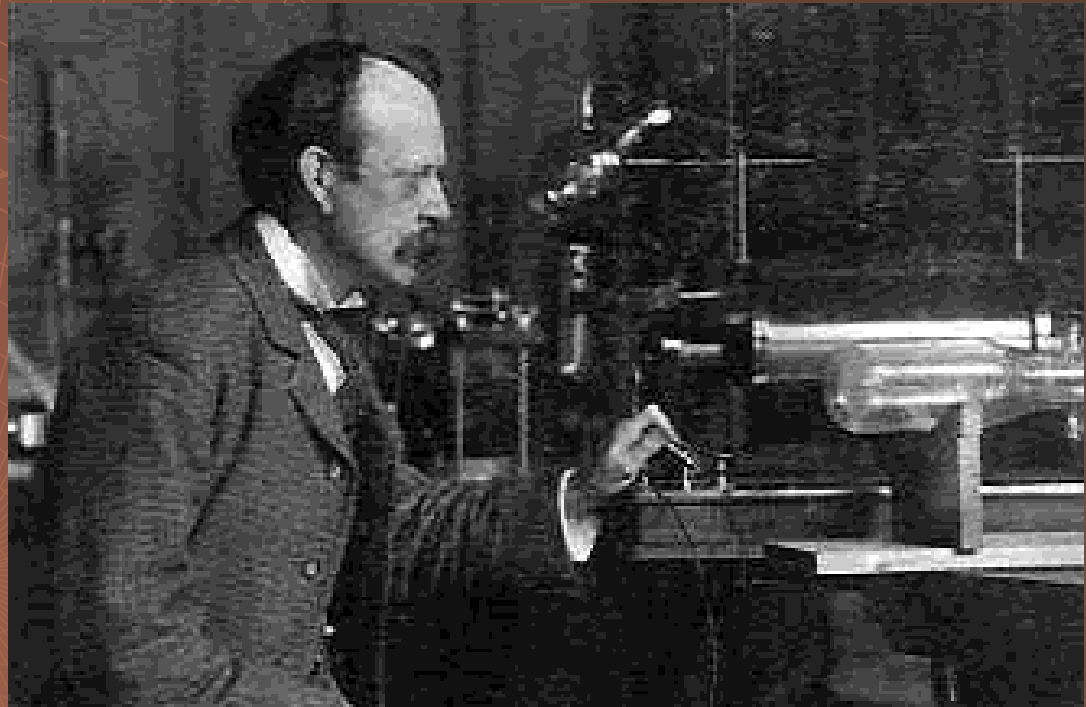
- MS - mimořádně citlivá metoda,
- destruktivní metoda,
 - minimální spotřeba vzorku,
 - určení MW a dalších
strukturních informací.

Historie hmotnostní spektrometrie

- ◆ 1906 J.J. Thomson
Elektron,



1906



Historie hmotnostní spektrometrie

◆ 1922 F.W. Aston

Izotopy



1922



Scan ©American Institute of Physics

Historie hmotnostní spektrometrie

- ◆ 1930 W. Paul
Iontová past



1989



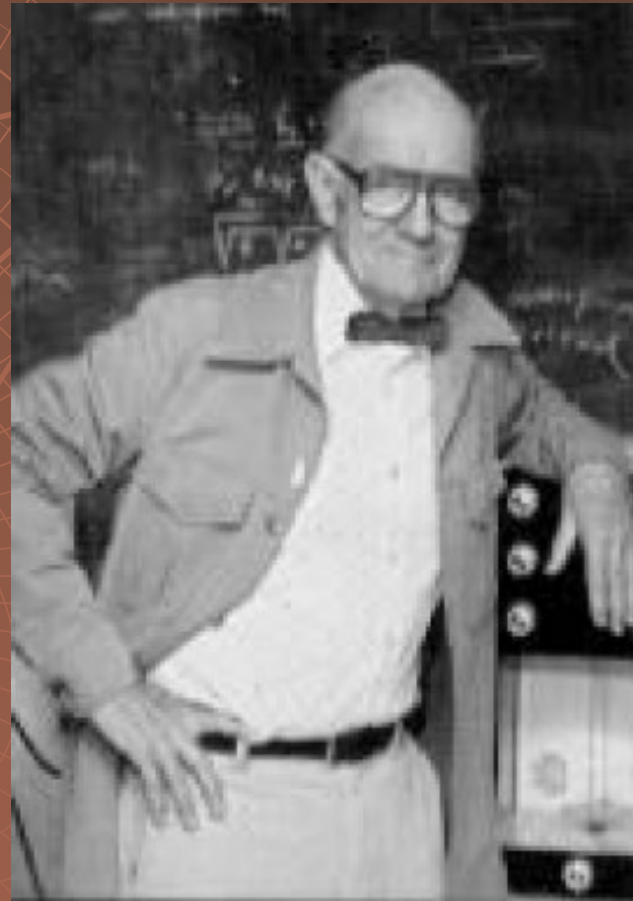
Historie hmotnostní spektrometrie

◆ 1930 J.B. Fenn

ESI



2002



Historie hmotnostní spektrometrie

◆ 1930 K. Tanaka

MALDI



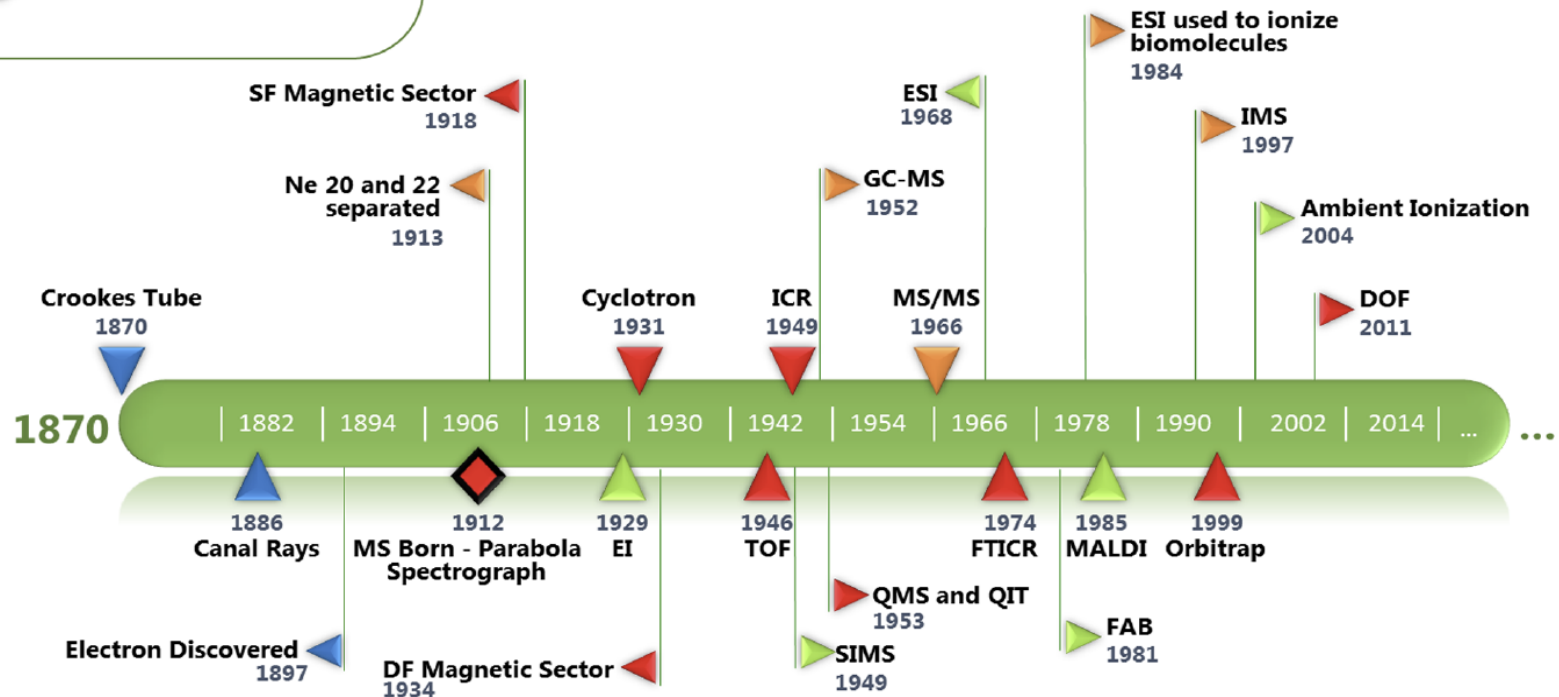
2002



Historie hmotnostní spektrometrie

Milestones

- Foundational Steps
- Ionization Methods
- Applications and Separation Techniques
- Mass Analyzers



Historie hmotnostní spektrometrie

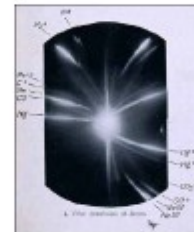
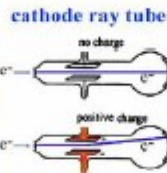
Historický vývoj MS - souhrn

100 let
od katodové
trubice k
modernímu
spektrometru

→ 1900

1899
-
1920

TOF-MS
*1946



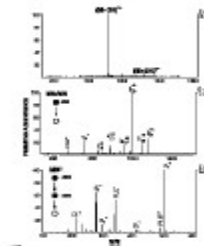
**Vývoj
záznamu
spekter**

2000 →

GC-MS
*1956

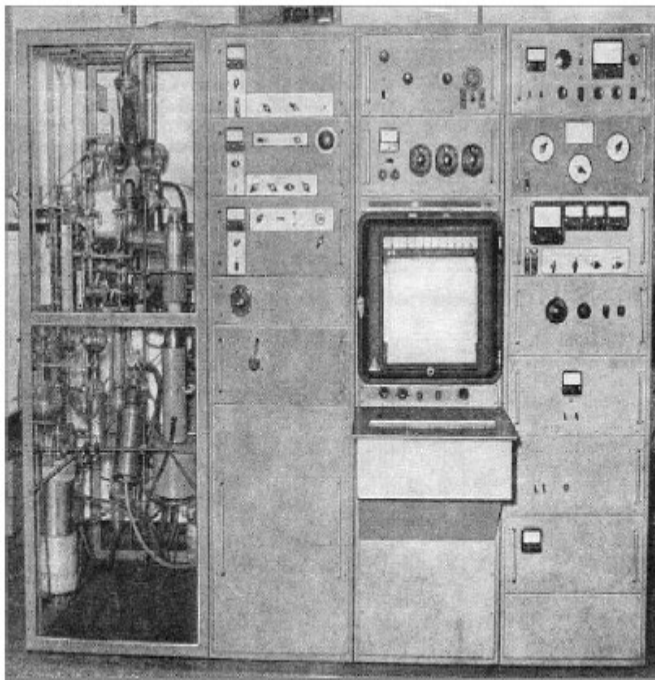


LC-MS(ESI)
*1984



První MS v ČR

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

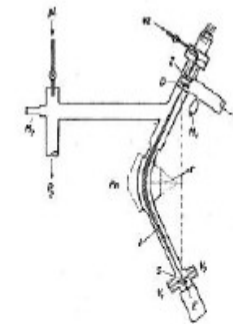


Hmotový spektrometr Ústavu fyzikální chemie ČSAV

VLADIMÍR ČERMÁK, VLADIMÍR HANUŠ a MIROSLAV JECHEJ
Ústav fyzikální chemie Československé akademie věd, Praha

183.933

Prvního typu hmotového spektrometru (prvního typu s vakuovými trubkami) byl postaven v Ústavu fyzikální chemie Československé akademie věd, Praha. Ústav fyzikální chemie Československé akademie věd, Praha.



Obr. 1. Schéma trubkové hmotového spektrometru.
Z - střed lože, S - střed lože, P, P₁ - plochy Y difúzní vstupu, H, M₁ - vakuové nádrky, D - diafragma, Po - plová nádrž, E - část s obkružovacími trubkami a vakuovými vstupy, J - ložiskový svazek s vakuovými vstupy, F, F₁ - vakuové vstupy pro plová nádrž, K - plocha vstupu do trubky, G - plocha vstupu do trubky pro studium chemického rozkladu, H - plocha vstupu do trubky pro studium chemického rozkladu, I - plocha vstupu do trubky pro studium chemického rozkladu, J - plocha vstupu do trubky pro studium chemického rozkladu, K - plocha vstupu do trubky pro studium chemického rozkladu, L - plocha vstupu do trubky pro studium chemického rozkladu, M - plocha vstupu do trubky pro studium chemického rozkladu, N - plocha vstupu do trubky pro studium chemického rozkladu, O - plocha vstupu do trubky pro studium chemického rozkladu, P - plocha vstupu do trubky pro studium chemického rozkladu, Q - plocha vstupu do trubky pro studium chemického rozkladu, R - plocha vstupu do trubky pro studium chemického rozkladu, S - plocha vstupu do trubky pro studium chemického rozkladu, T - plocha vstupu do trubky pro studium chemického rozkladu, U - plocha vstupu do trubky pro studium chemického rozkladu, V - plocha vstupu do trubky pro studium chemického rozkladu, W - plocha vstupu do trubky pro studium chemického rozkladu, X - plocha vstupu do trubky pro studium chemického rozkladu, Y - plocha vstupu do trubky pro studium chemického rozkladu, Z - plocha vstupu do trubky pro studium chemického rozkladu.

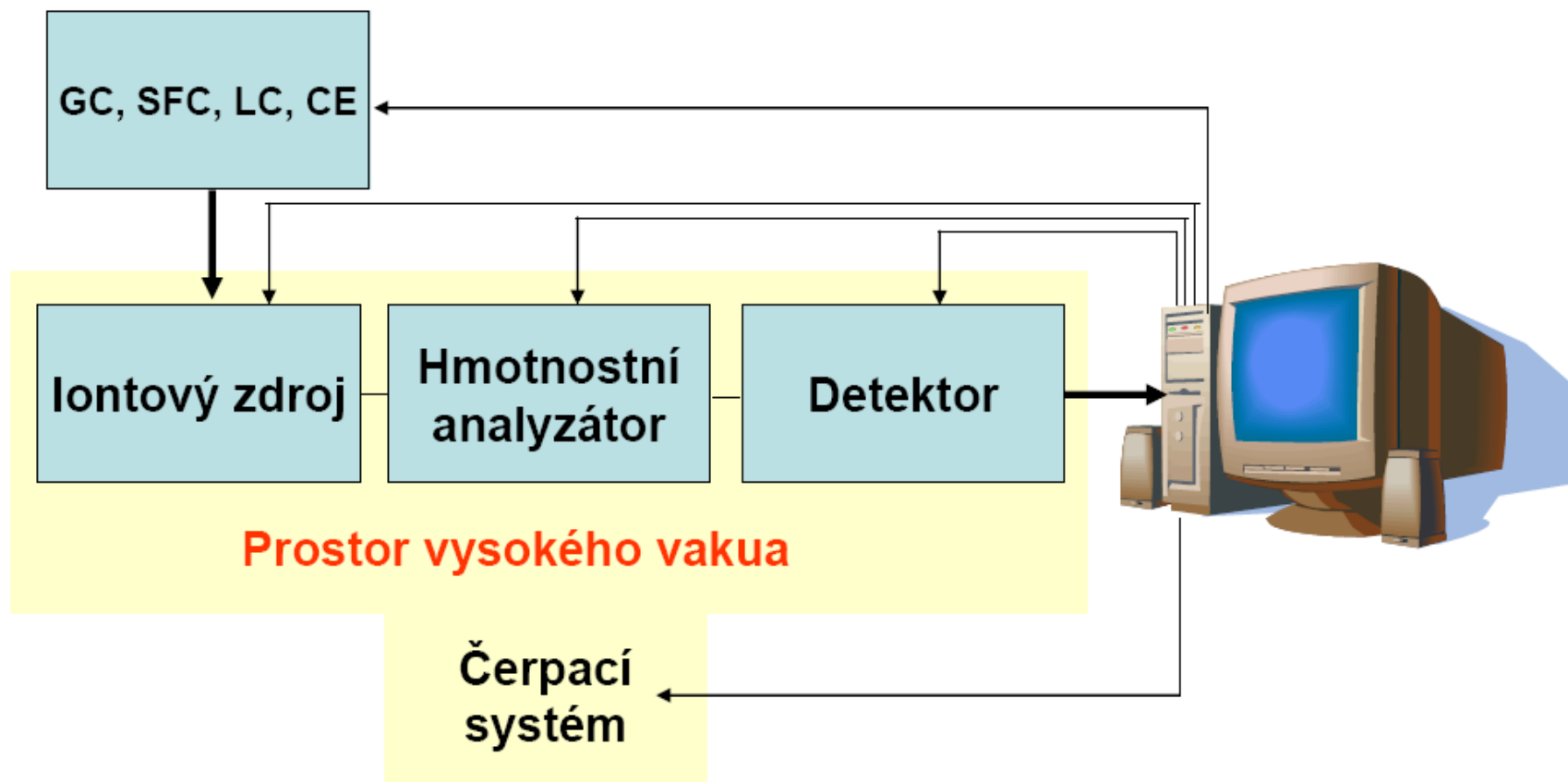
Podstata

- ◆ analytická metoda sloužící k převedení molekul na ionty (může dojít k jejich fragmentaci)
- ◆ rozlišení těchto iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z)
- ◆ záznam relativních intenzit jednotlivých iontů

Hmotnostní spektrometr

Hmotnostní spektrometr je iontově-optické zařízení, které separuje ionty podle poměru jejich m/z .

Blokové schéma



Součásti MS

1/ iontový zdroj - slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice (tzv. ionizace), konstrukce se liší podle použité ionizační techniky

2/ hmotnostní analyzátor - slouží k rozdělení iontů v plynné fázi za vysokého vakua podle poměru hmotnosti a náboje (m/z)

3/ detektor - slouží k detekci iontů po jejich separaci podle m/z a k určení relativní intenzity jednotlivých iontů

Součásti MS

- další části přístroje:
 - vakuový systém
 - zařízení pro zavádění vzorků (sonda)
 - iontová optika sloužící k urychlení a fokusaci iontů
 - počítač na ovládání a ladění přístroje, sběr a ukládání dat, porovnání spekter s knihovnou



Ionizační techniky

Volba ionizační techniky

a/ **těkavost látky (polarita)** - pro těkavé látky za podmínek měření: EI, CI, FI

b/ **tepelná stabilita látky** - pro termolabilní látky nejsou vhodné techniky, kdy je nutné látku převést do plynné fáze před vlastní ionizací (EI, CI, FI); volit nejšetrnější techniky, např. ESI nebo MALDI

c/ **molekulová hmotnost** (souvisí s těkavostí) - asi do MR=1000 lze EI/CI, do několika tisíc APCI, APPI a FAB, do desítek až stovek tisíc ESI a MALDI

d/ **chemické individuuum nebo směs** - pro směsi spojení s vhodnou separační technikou (GC/MS, HPLC/MS, CE/MS)

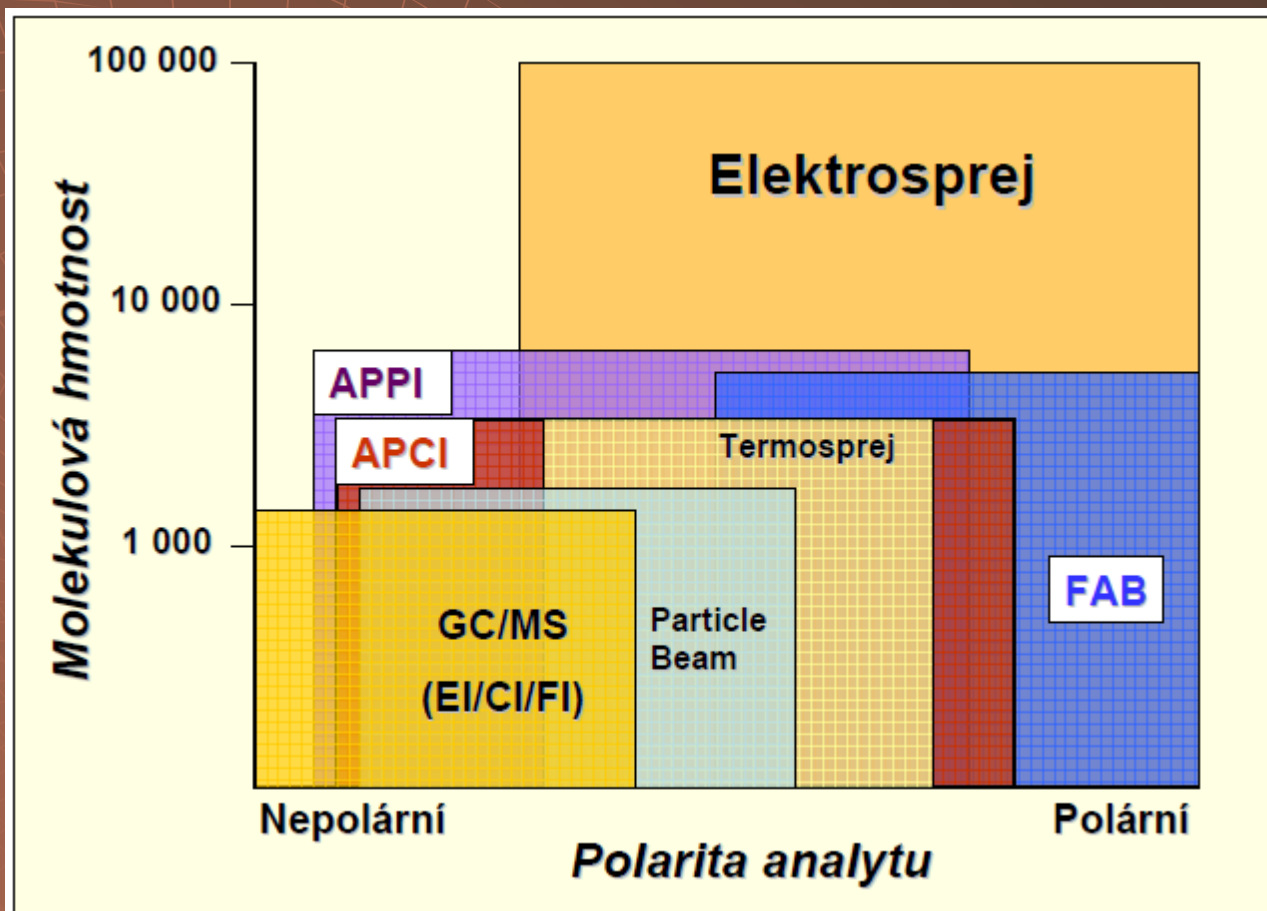
e/ **volba polarity ionizace** (platí pro měkké ionizační techniky)

- **kladné ionty** - pro většinu látek, musí být možné látku protonovat (vhodná přítomnost heteroatomu) či kationizovat (sodíkem, stříbrem, apod.)

- **záporné ionty** - sulfonové a karboxylové kyseliny, polyhydroxylované látky (snadná deprotonace), tvorba aduktů s jednoduchými anionty (octan, mravenčan, chlorid, apod.)

f/ **studium nekovalentních interakcí nebo prostorového uspořádání molekul** (zejména pro biomolekuly) - ESI

Volba ionizační techniky



Ionizační techniky

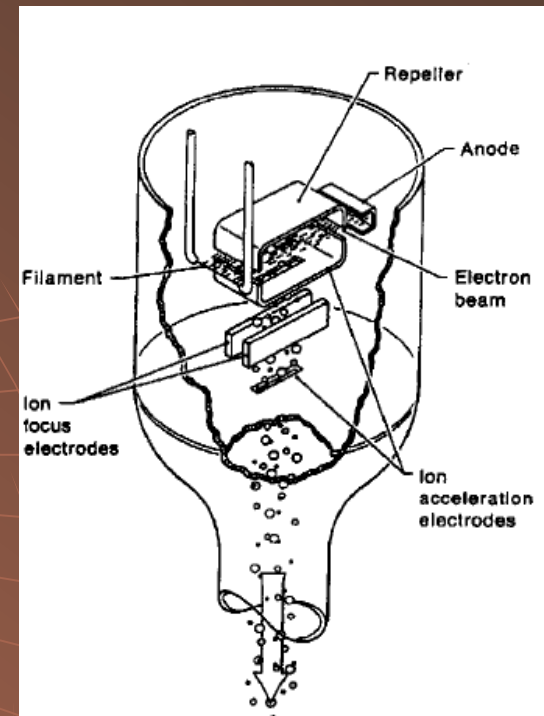
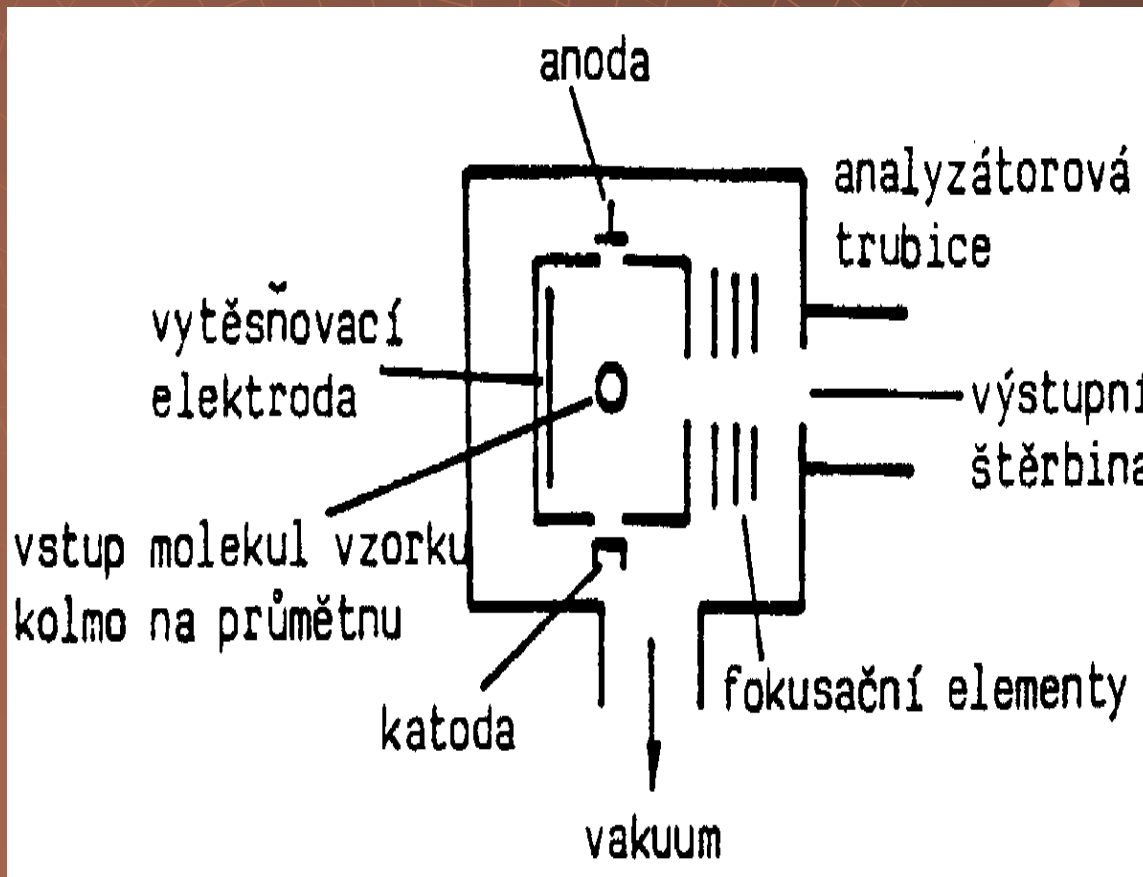
◆ Tvrdé ionizační techniky



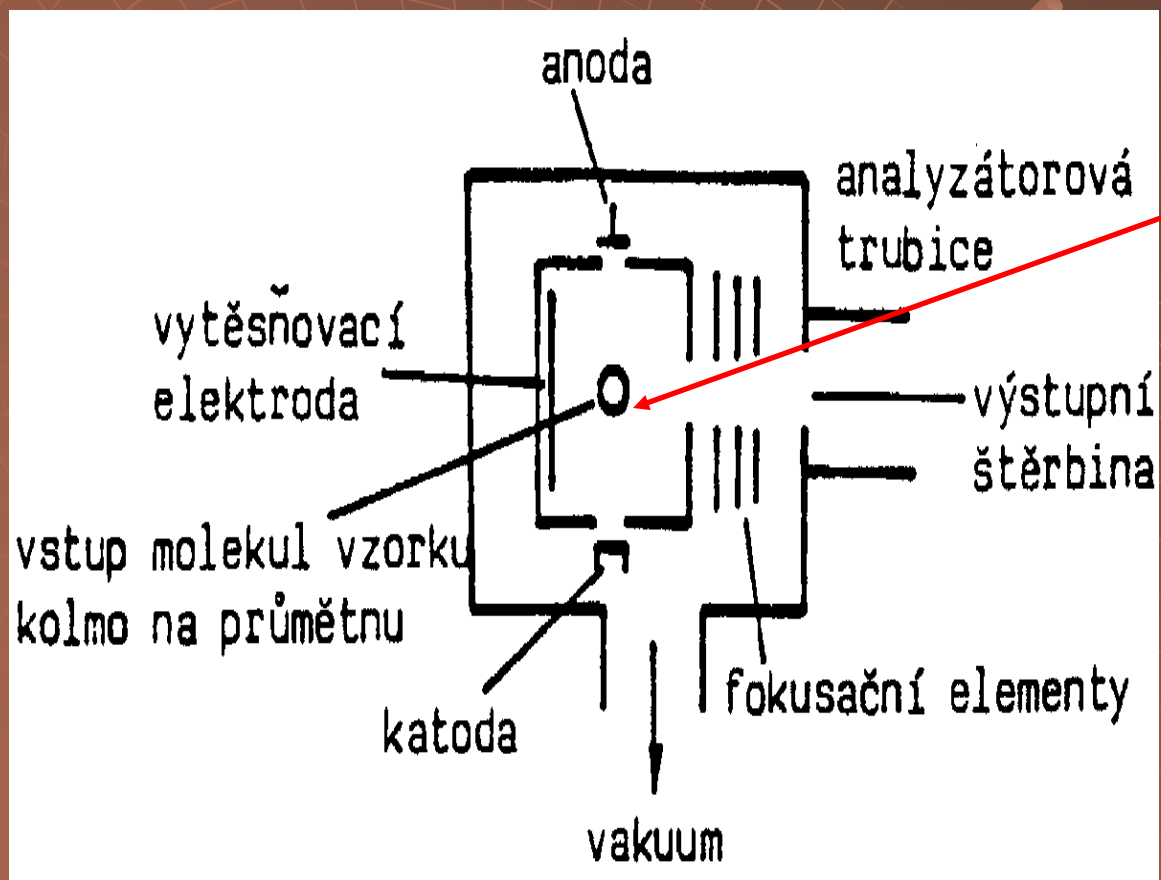
◆ Jemné ionizační techniky



Electron impact (EI)



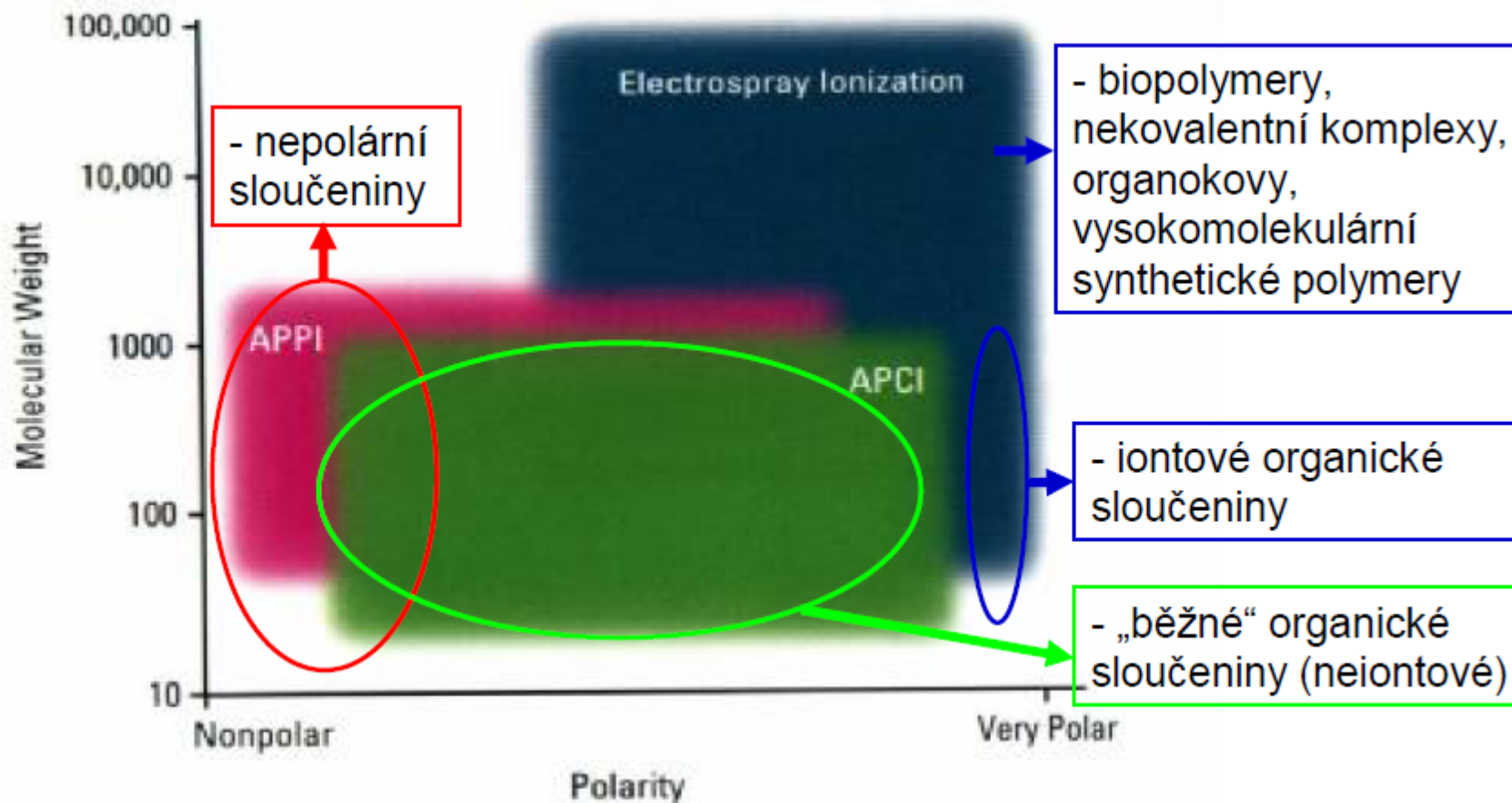
Chemická ionizace (CI)



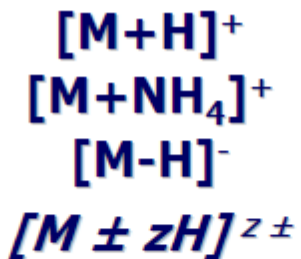
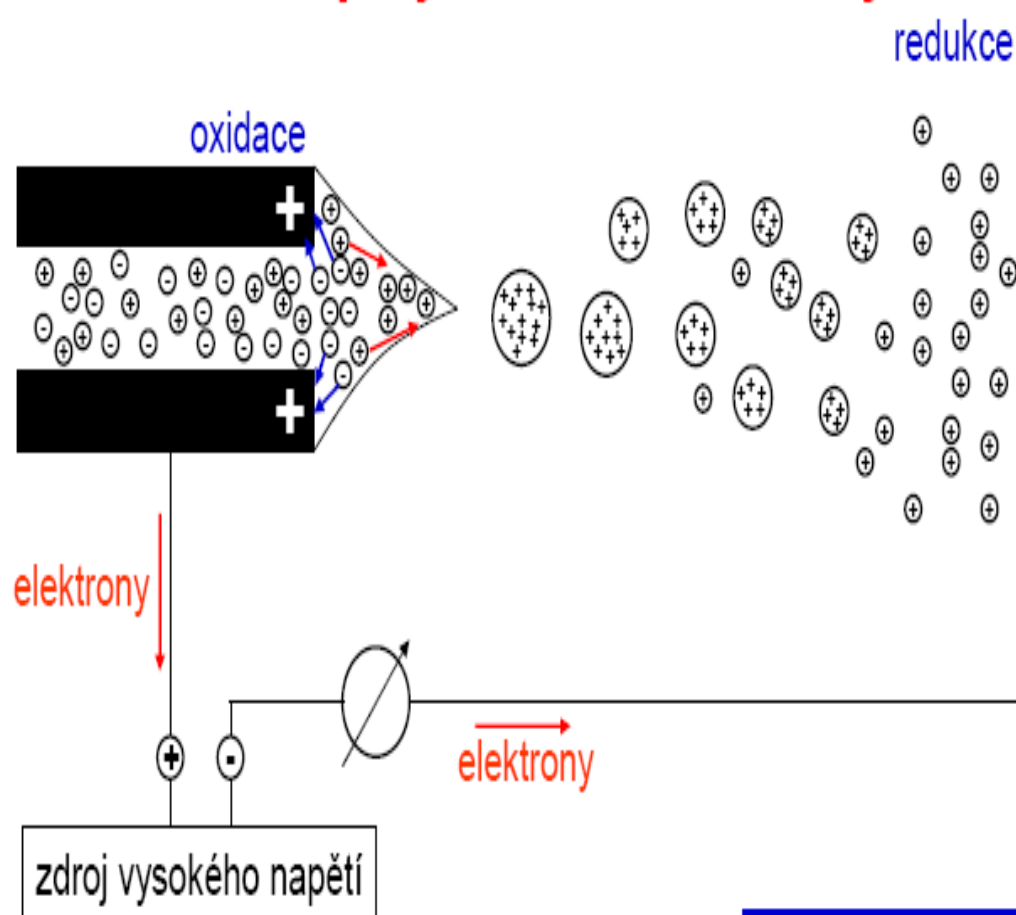
Reakční plyn 100 Pa
Plyn : vzorek 10⁴ : 1
methan, isobuthan,
ammoniak



Ionizace za atmosferického tlaku



Electrospray (ESI)



$t_{N_2} \approx 50 - 400 \text{ }^\circ\text{C}$ (přidatné)

Napětí: 2 - 8 kV

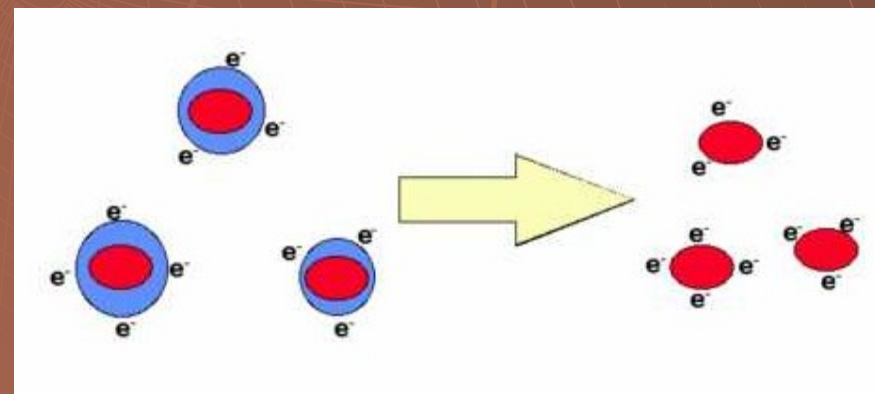
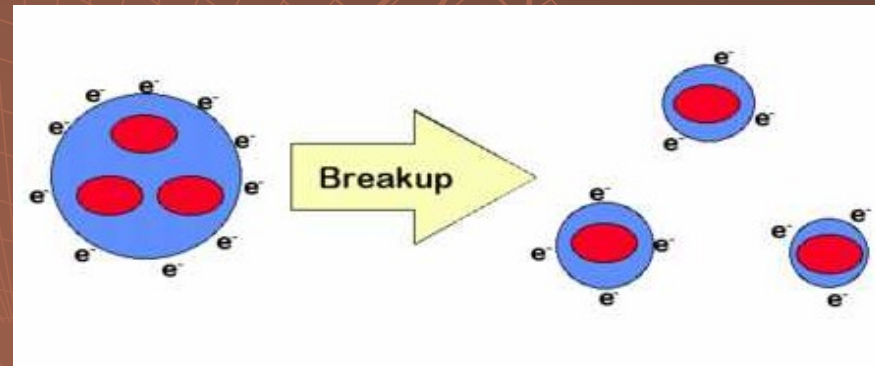
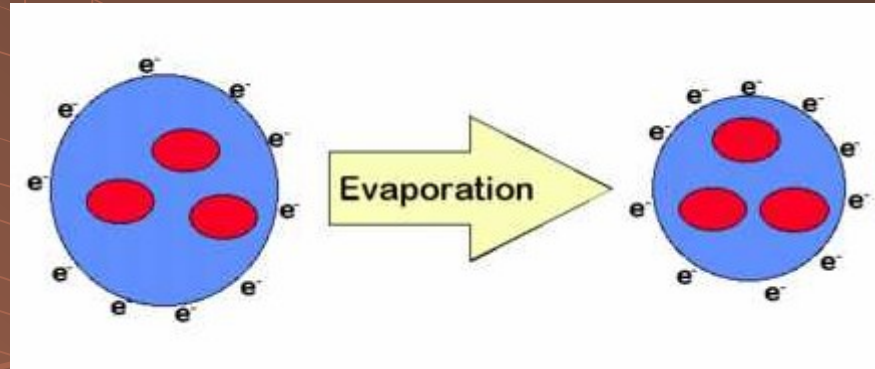
Průtok m. f. 0,001 - 1 ml/min

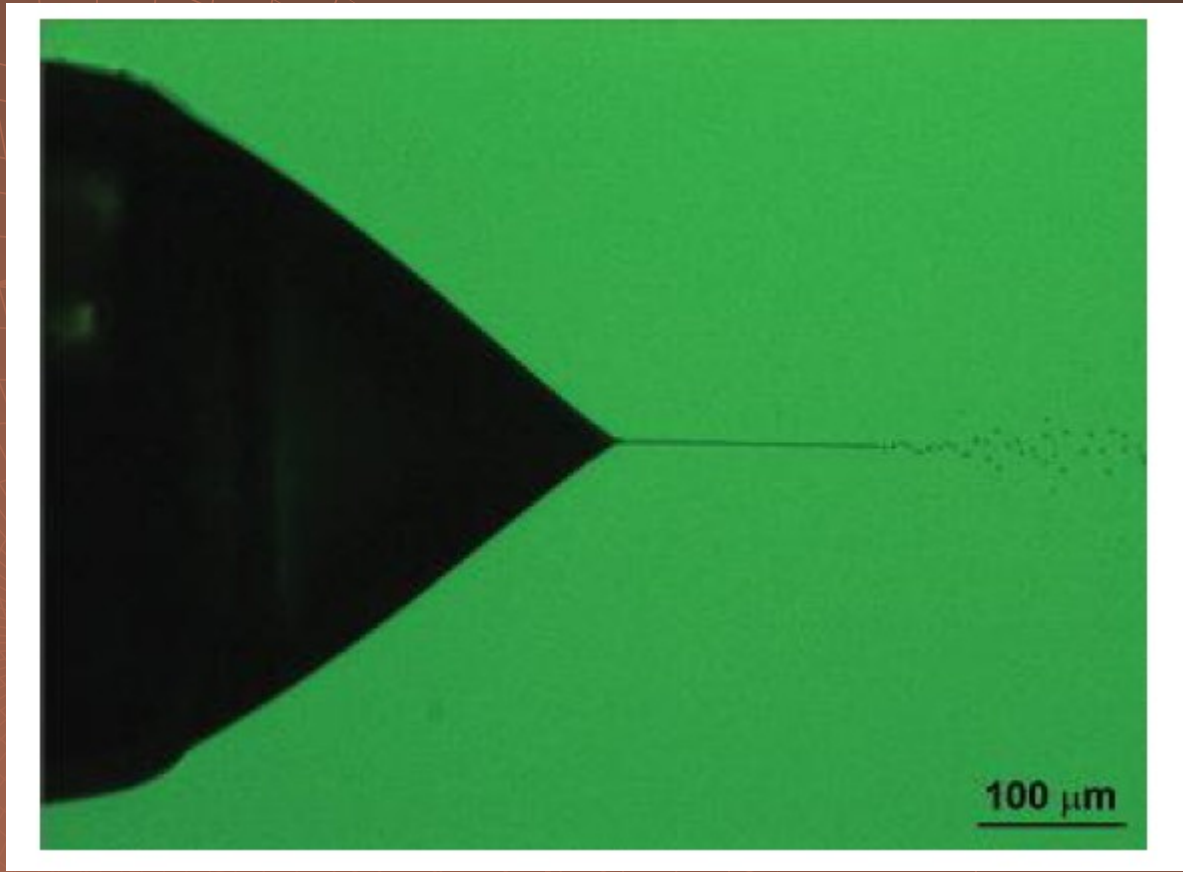
Ionizace za
atmosférického tlaku

*Těkavé přísady: octan amonný,
mravenčí k.*

*Netěkavé přísady: fosfátové
pufrы*

Ionizace





ESI - zmlžování

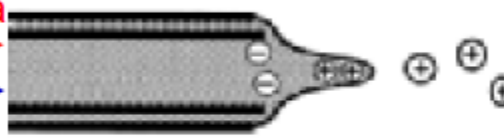
roztok vzorku



A/ „čistý“ elektrosprej roztoku analytu
(dnes méně časté, vhodné jen pro
velmi nízké průtoky, např. nanosprej)

přídavná kapalina

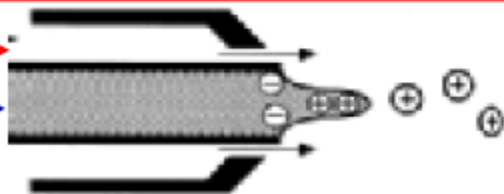
roztok vzorku



B/ elektrosprej roztoku analytu s
přídavným tokem kapaliny
(vodivé spojení pro CZE/MS, podpora
ionizace, např. přídavek NH_4^+ pro
preferenční tvorbu aduktů $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$)

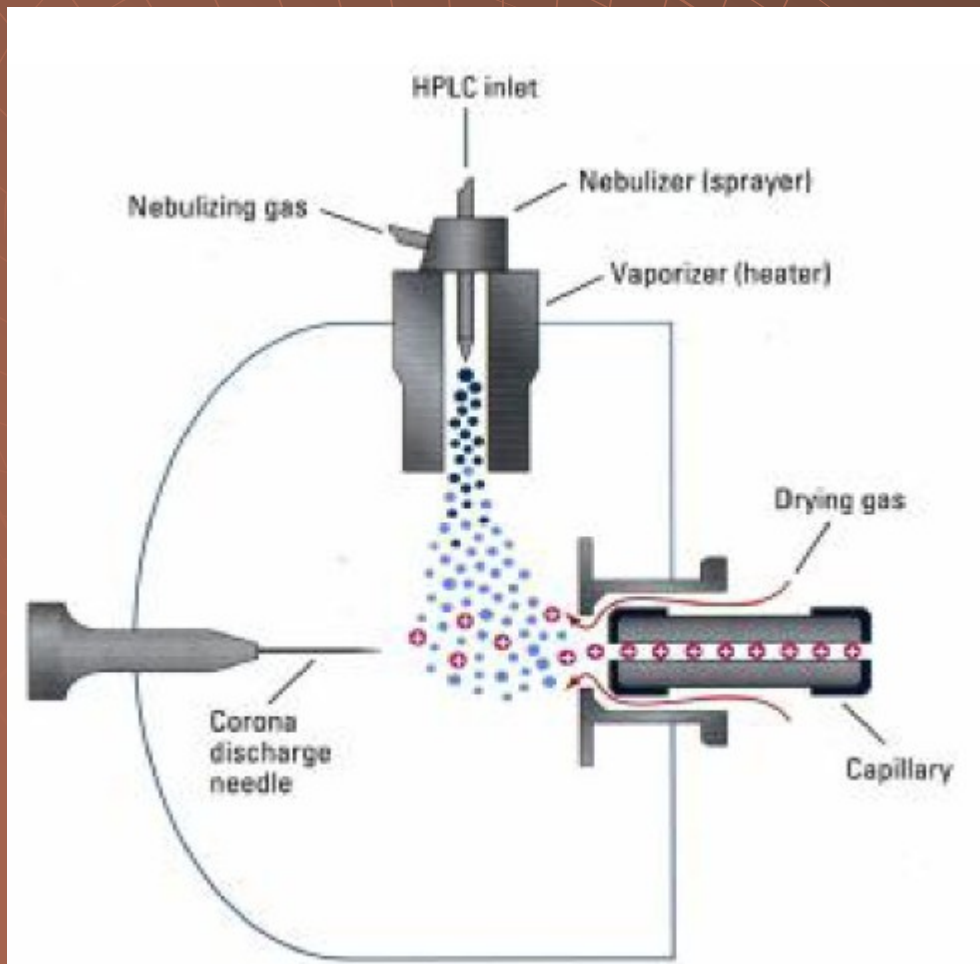
zmlžující plyn

roztok vzorku



C/ elektrosprej roztoku analytu s
pneumatickou podporou zmlžení
(standardní použití v HPLC/MS, dříve
nazýván iontový sprej)

Chemická ionizace za atmosferického tlaku (APCI)



$t \approx 200 - 650 \text{ }^\circ\text{C}$

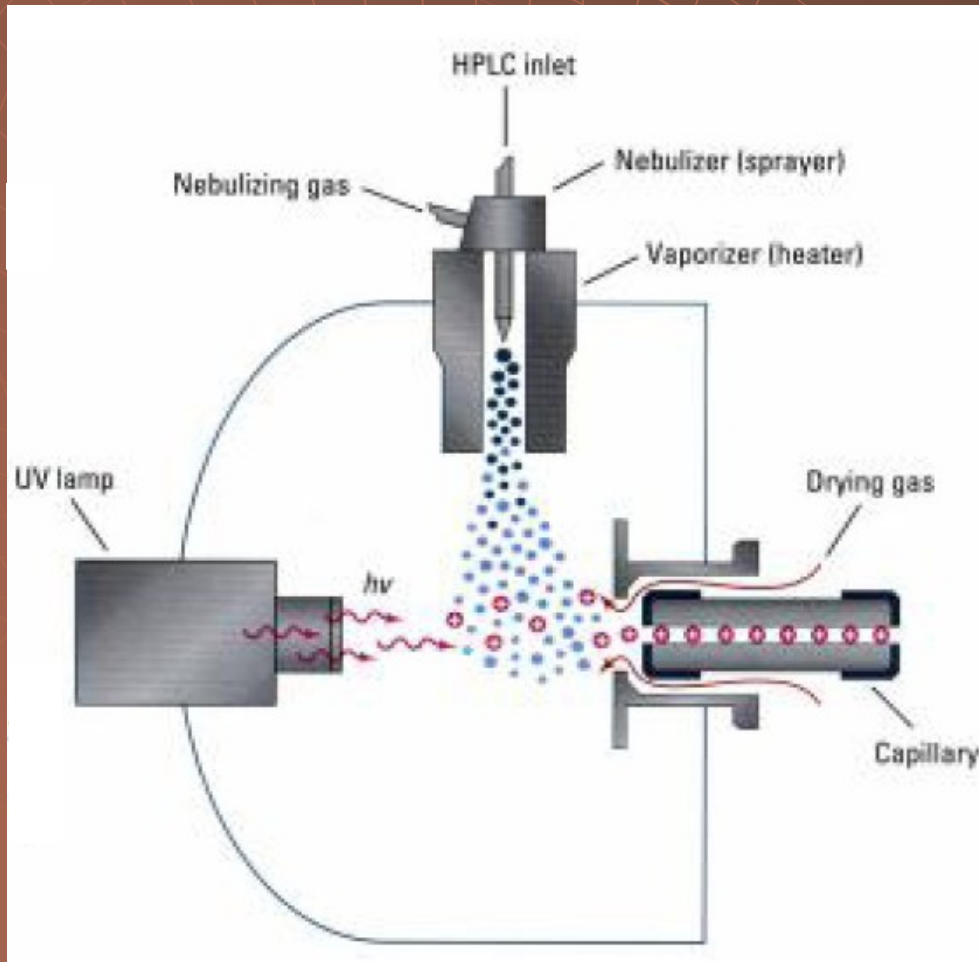
Napětí (výboj. el.): 2 - 8 kV

Průtok m. f. 0,2 - 2 ml/min

Ionizace za
atmosférického tlaku

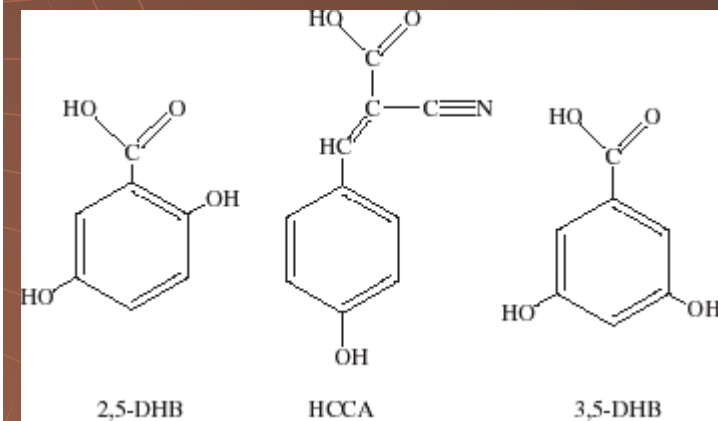
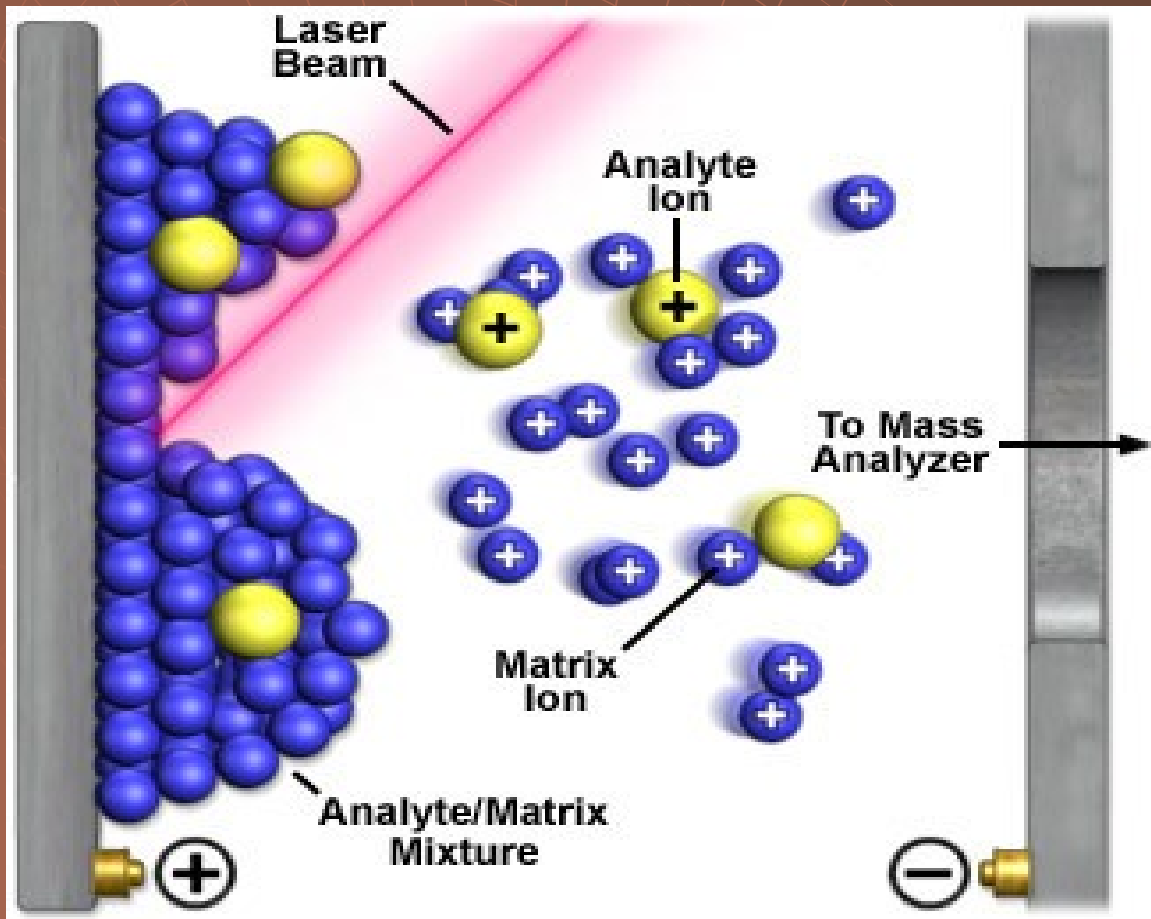
*Těkavé přísady: octan amonný,
mravenčí k.*
*Netěkavé přísady: fosfátové
pufry*

Fotoionizace za atmosferického tlaku (APPI)



$[M+H]^+$
 $[M+NH_4]^+$
 $[M-H]^-$
 $([M \pm zH]^{z \pm})$
 $t \approx 200 - 650 \text{ }^\circ\text{C}$
UV záření $\approx 10 \text{ eV}$
průtok m. f. 0,2 - 2 ml/min
**Ionizace za
atmosférického tlaku**
Dopant: toluen, benzen (citlivost \uparrow)

Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI)



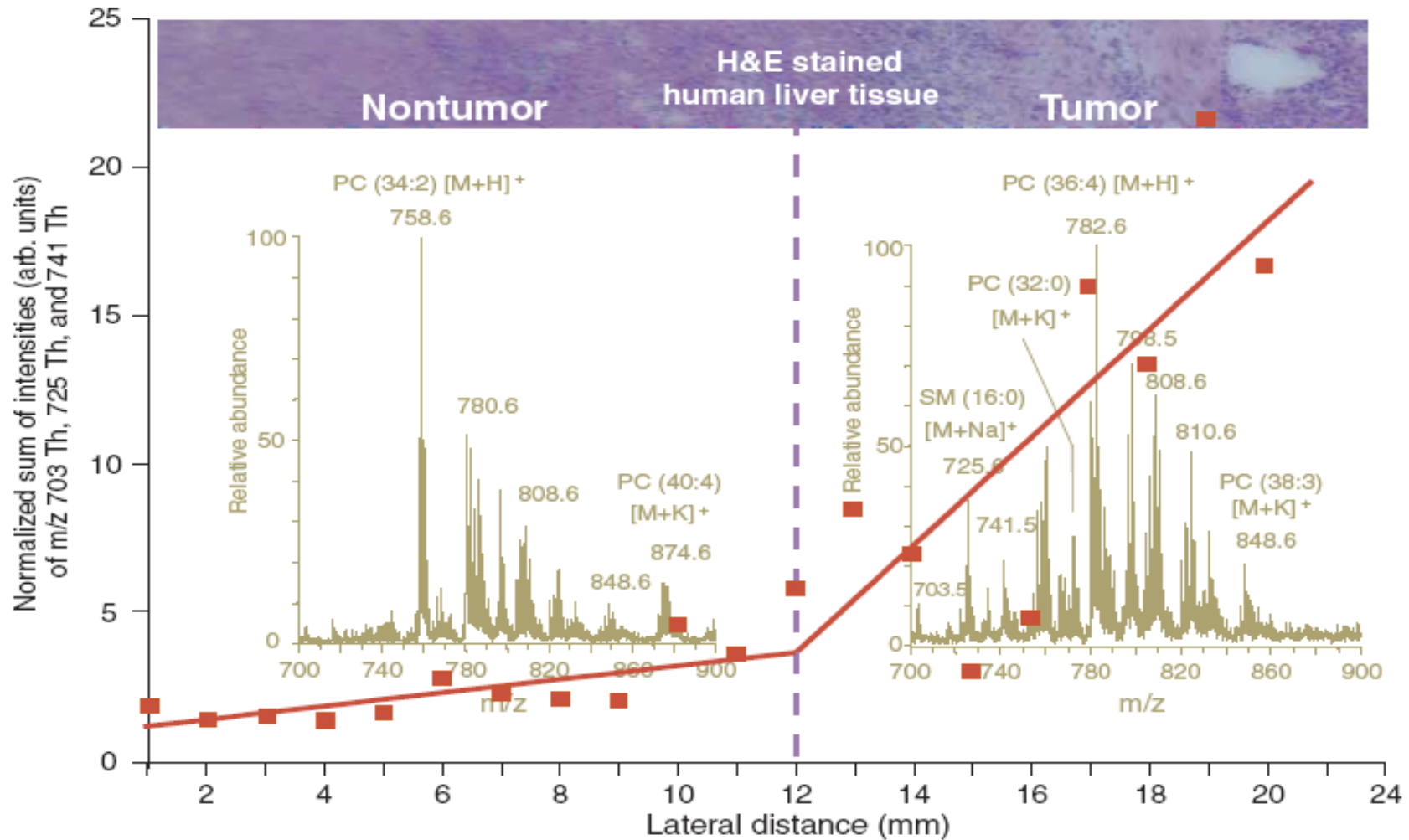
Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI)



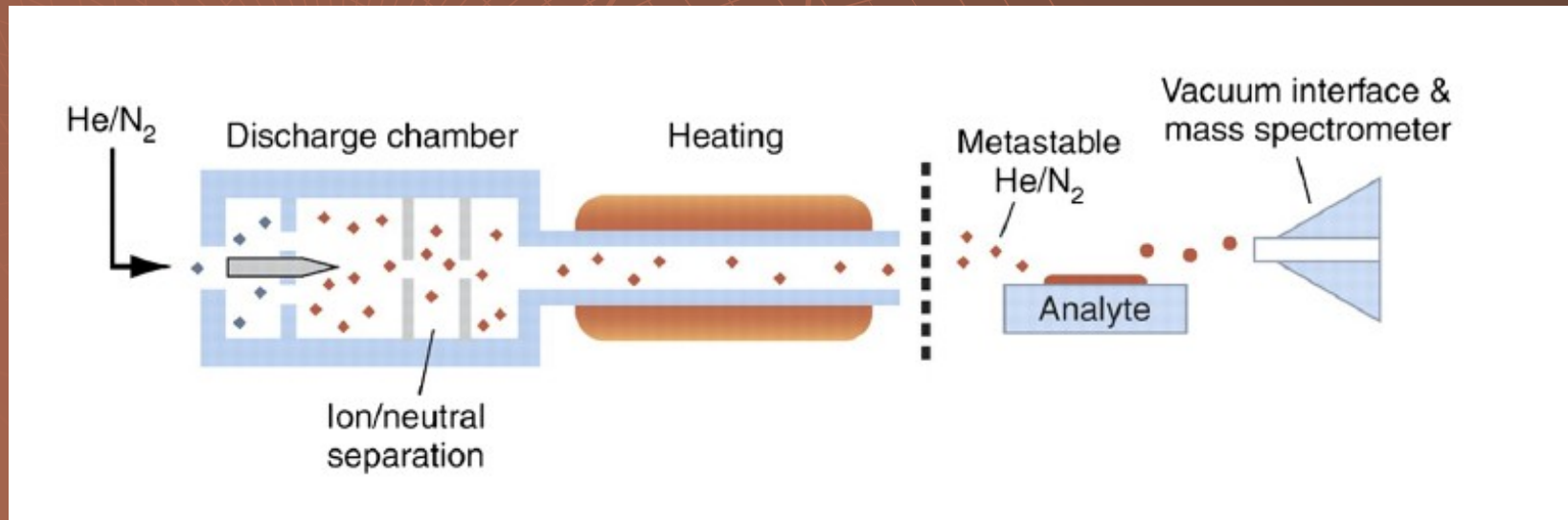
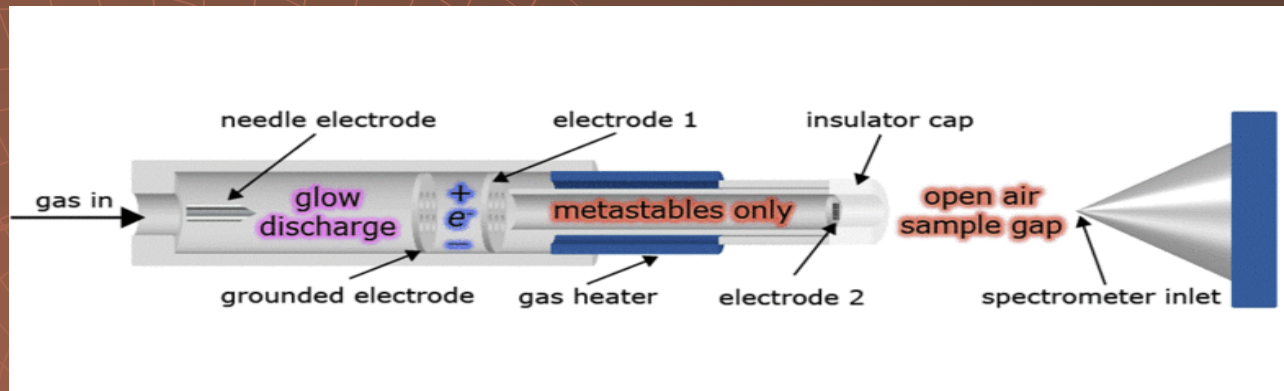
Desorpční ionizace elektrosprayem (DESI)



Desorpční ionizace elektrosprayem (DESI)



Přímá ionizace v reálném čase (DART)

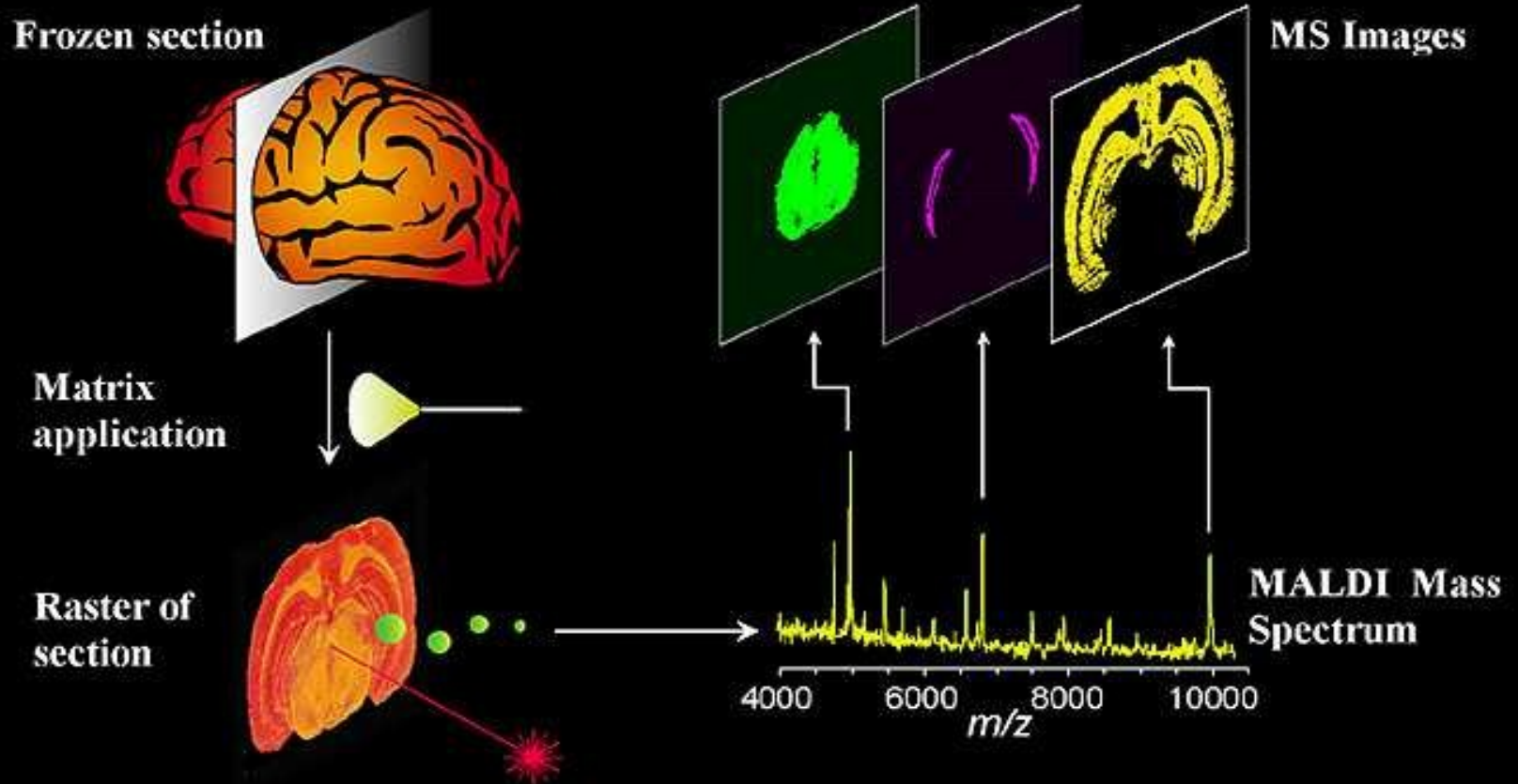


Přímá ionizace v reálném čase (DART)

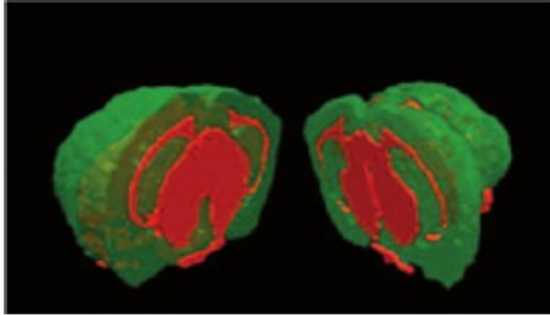


Zobrazovací MS (IMS)

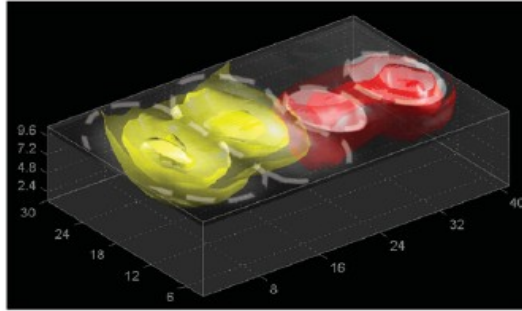
Principle of MALDI MS Imaging



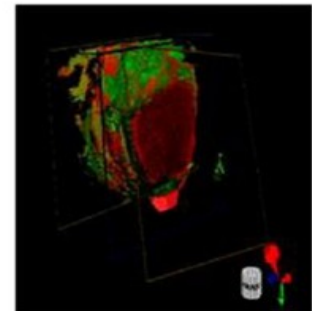
3D IMS



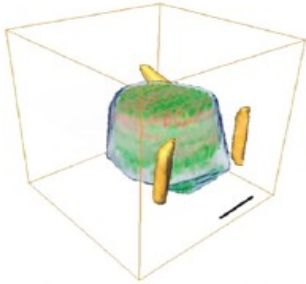
a) Eberlin et al. 2010



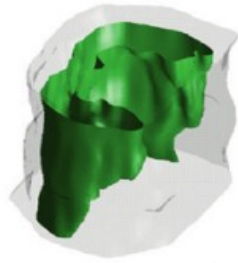
b) Watrous et al. 2013



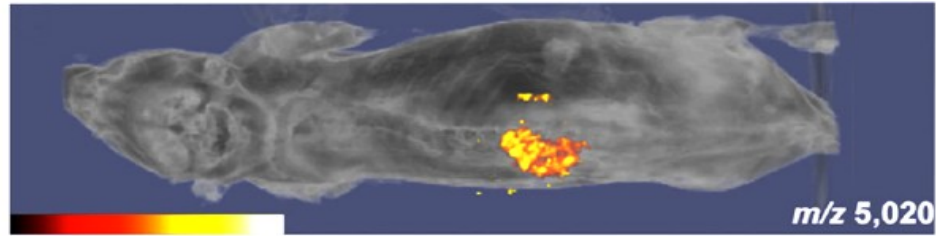
c) Fornai et al 2012



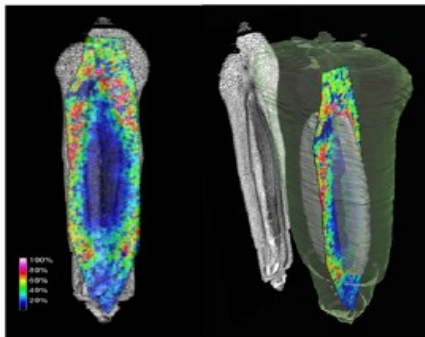
d) Chugthai et al. 2012



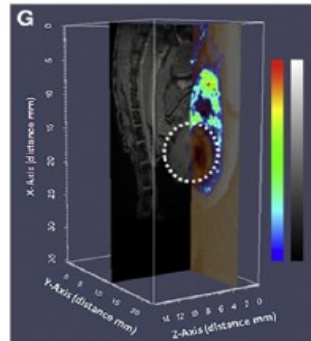
e) Jones et al. 2012



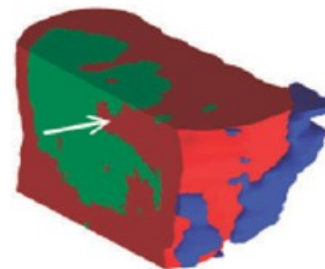
f) Attia et al. 2012



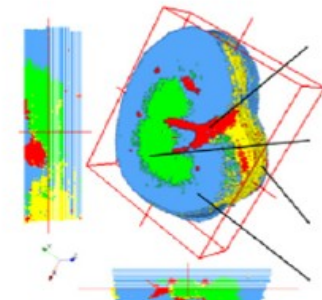
g) Bollenbeck et al. 2009



h) Seeley et al. 2014



i) Reindl et al. 2011



j) Oetjen et al. 2013



Hmotnostní analyzátořy

Hmotnostní analyzátořy

- hmotnostní analyzátoř slouží k dělení iontů v plynné fázi za vakua podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z)
- analyzátoř je umístěn za iontovým zdrojem (tzn. molekuly již byly převedeny na ionty) a před detektorem (před detekcí musíme ionty rozdělit podle m/z)
- dělení iontů v analyzátořu probíhá za vysokého vakua (ca. 10^{-3} - 10^{-11} Pa, podle typu analyzátořu)
- dělení iontů podle m/z lze dosáhnout na základě různých fyzikálních principů:
 - 1/ zakřivení dráhy letu iontů v magnetickém nebo elektrickém poli (magnetický nebo elektrostatický analyzátoř)
 - 2/ různá stabilita oscilací iontů v dvoj- nebo trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí (kvadrupól nebo iontová past)
 - 3/ různá doba rychlosti letu iontů (analyzátoř doby letu – TOF)
 - 4/ různá frekvence harmonických oscilací v Orbitrapu
 - 5/ různá absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli (iontová cyklotronová resonance – ICR)

Hmotnostní analyzátoary

Podle způsobu dělení iontů:

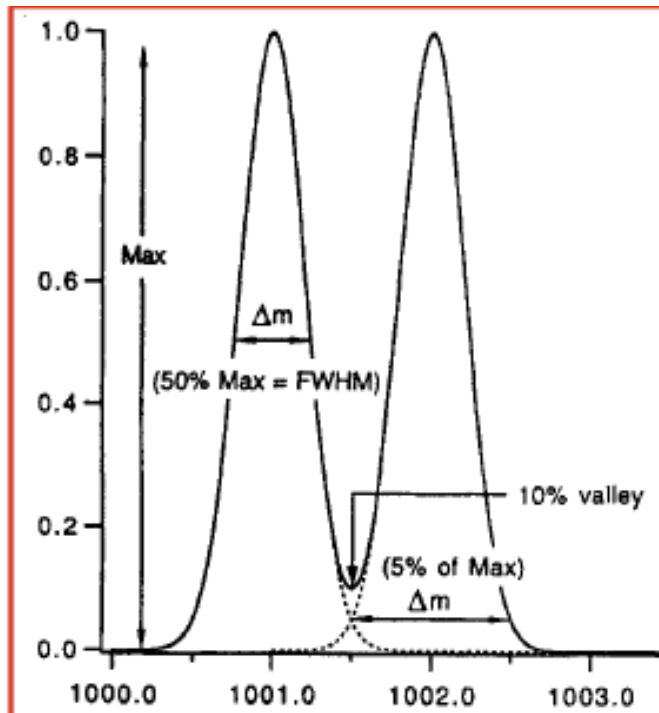
- **skenující** - postupně mění skenovanou veličinu (U , V , B) a propouští ionty o určité m/z (kvadrupólový analyzátoary, sektorový magnetický analyzátoary)
- **iontové pasti** - zadržuje ionty pomocí napětí na elektrodách a následně je analyzuje (iontová past, orbitrap, FT-ICR)
- **průletový** - měří čas iontů potřebný pro překonání určité vzdálenosti (TOF)
- analyzátoary **pohyblivosti iontů** - dělení iontů podle jejich velikosti a tvaru

Základní parametry hmotnostních analyzátoary:

- **rozlišovací schopnost (rozlišení)** – schopnost analyzátoary poskytnout rozlišené signály pro ionty s podobnou m/z
- **správnost určení m/z** - míra schopnosti analyzátoary určit správnou hodnotu m/z
- **hmotnostní rozsah** – rozsah m/z hodnot, přes který analyzátoary může zaznamenat spektra
- **dynamický rozsah** - rozmezí koncentrací, v nichž je odezva (lineárně) závislá na koncentraci
- **rychlost** – rychlost záznamu spekter

Rozlišení – Resolving Power

A/ definice založená na šířce jednoho píku (univerzální) - poměr hmotnosti iontu m a šířky tohoto iontu Δm v polovině jeho výšky (Full Width at Half Maximum, FWHM)

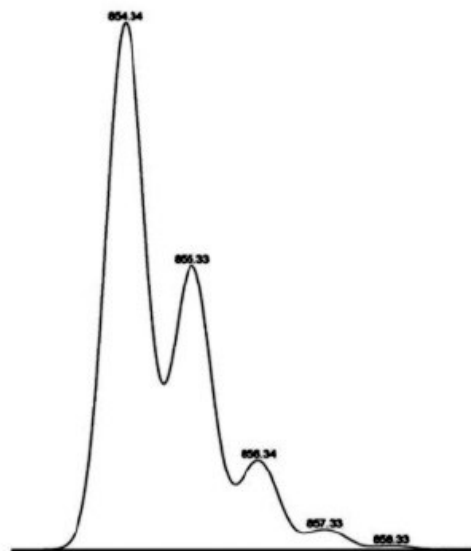


Rozlišovací schopnost
(Resolving power, RP):

$$A/ \text{ RP} = m / \Delta m$$

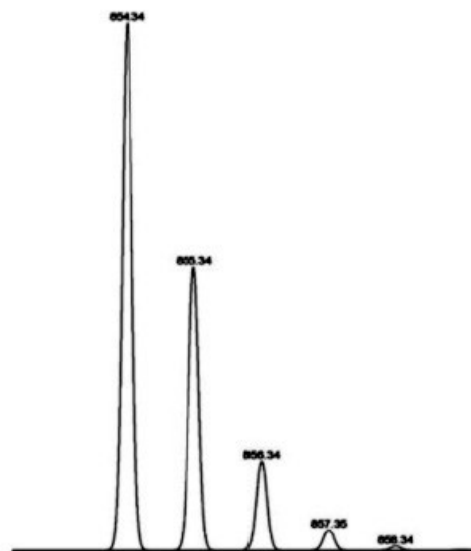
Rozlišení – Resolving Power

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



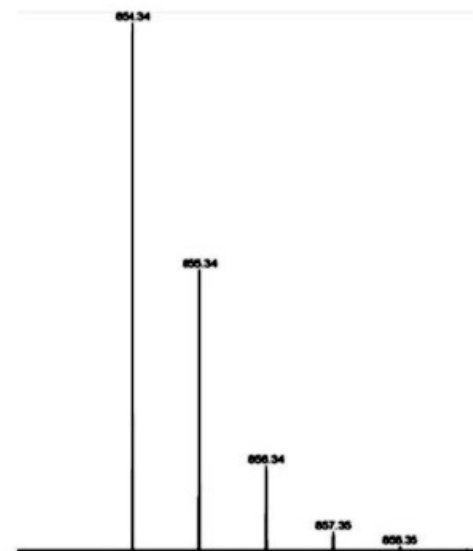
1 250

Nízke rozlišení



5 000

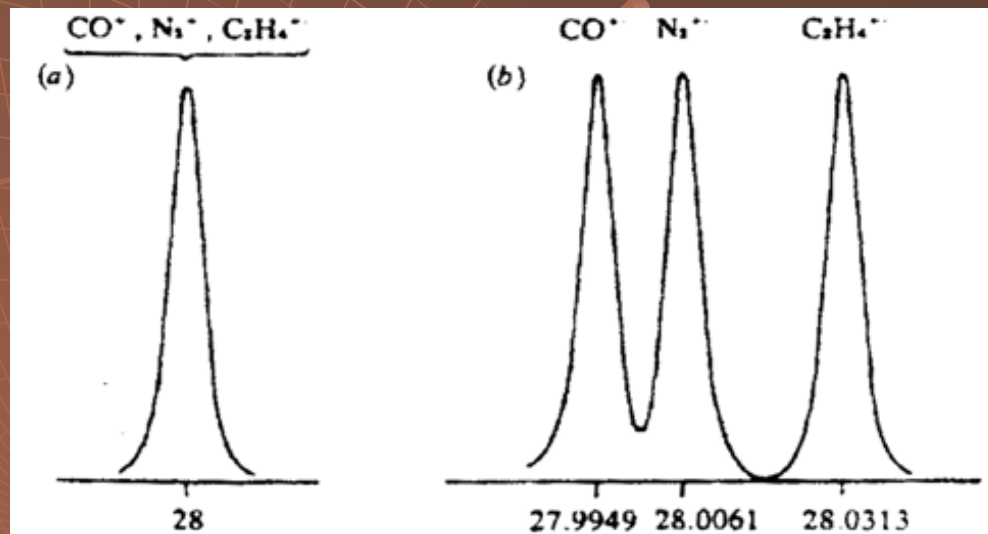
↔



100 000

vysoké rozlišení

Rozlišení – Resolving Power



Přesnost určení m/z

Mass Accuracy

$$\text{Přesnost určení m/z} = \frac{(m/z)_{\text{exp}} - (m/z)_{\text{teor}}}{(m/z)_{\text{teor}}} * 10^6$$

experimentálně naměřená hodnota m/z = 300.0463, teoreticky vypočtená hodnota m/z = 300.0473

Správnost určení m/z = -3.3 ppm (včetně znaménka!)

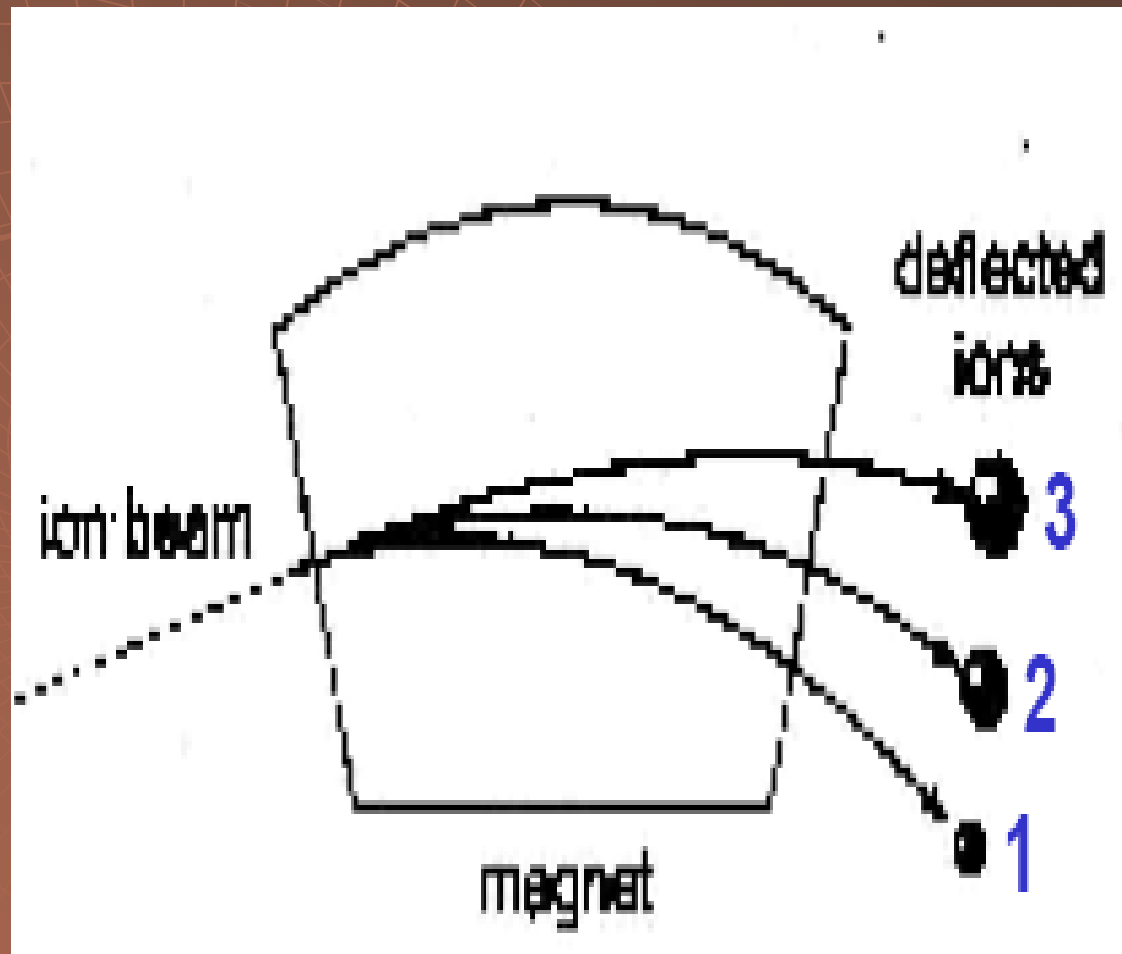
300.0473 dle tabulek (nebo lépe s využitím softwaru) nejlépe odpovídá elementární složení $C_{12}H_{17}N_2O_2Br$, podle izotopů M:M+2 potvrzena přítomnost bromu

Magnetický analyzátor

Zakřivení dráhy letu iontů
v magnetickém nebo elektrickém poli
(magnetický nebo elektrický
analyzátor).

V poli dochází k zakřivení dráhy iontu
závislé na hodnotě m/z
(m/z je úměrné kvadrátu poloměru
dráhy iontu r^2).

Magnetický analyzátor



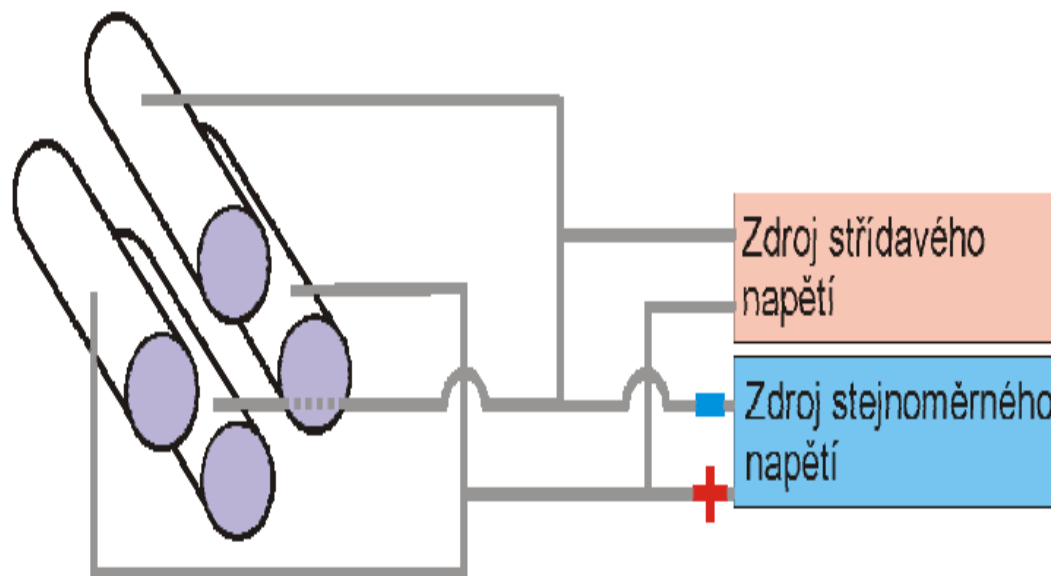
Magnetický analyzátor



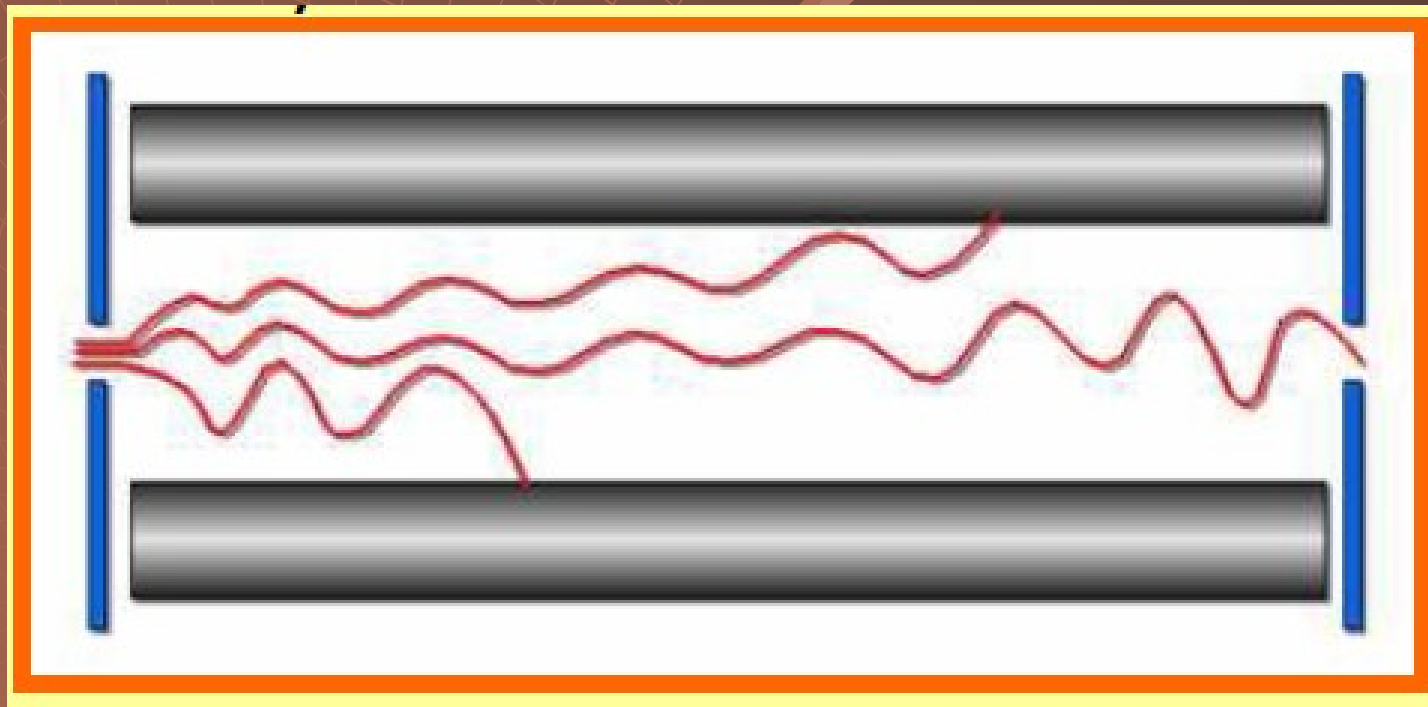
Kvadrupol a iontová past

Různá stabilita oscilací iontů
v dvoj- nebo trojrozměrné kombinaci
stejnoseměrného a vysokofrekvenčního
střídavého napětí (kvadrupól nebo
iontová past).

Kvadrupol



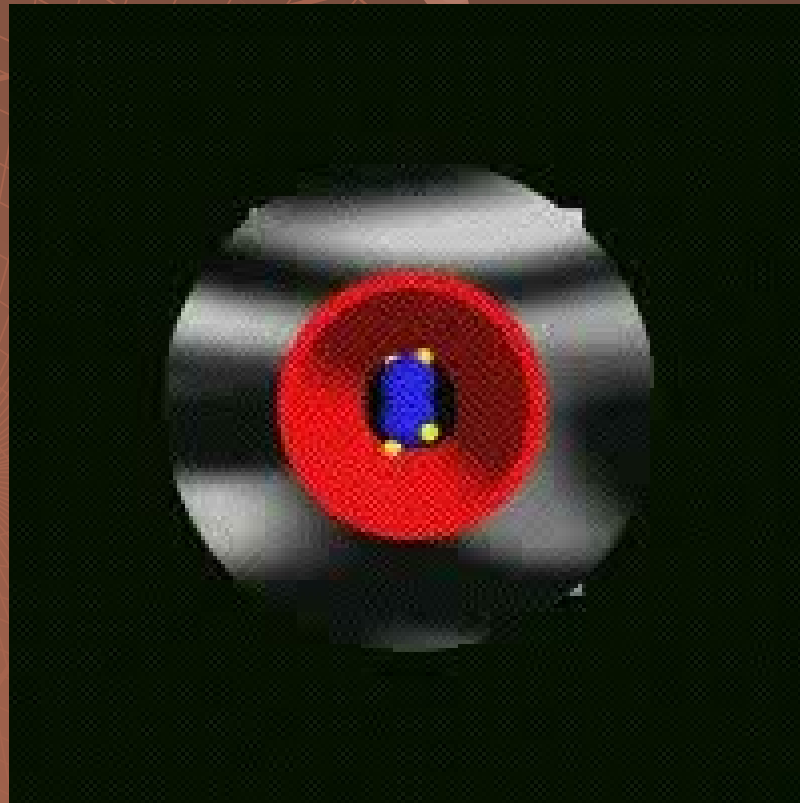
Kvadrupol



Kvadrupol

V daný okamžik jsou oscilace stabilní pouze pro určitou hodnotu m/z a tento ion projde kvadrupólovým analyzátozem, ionty s jinými hodnotami m/z mají nestabilní oscilace a jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu, změnou napětí postupně projdou na detektor ionty se všemi hodnotami m/z .

Kvadrupol



Kvadrupol



Hexapole, 9.5 mm Quadrupoles and 19 mm Quadrupoles

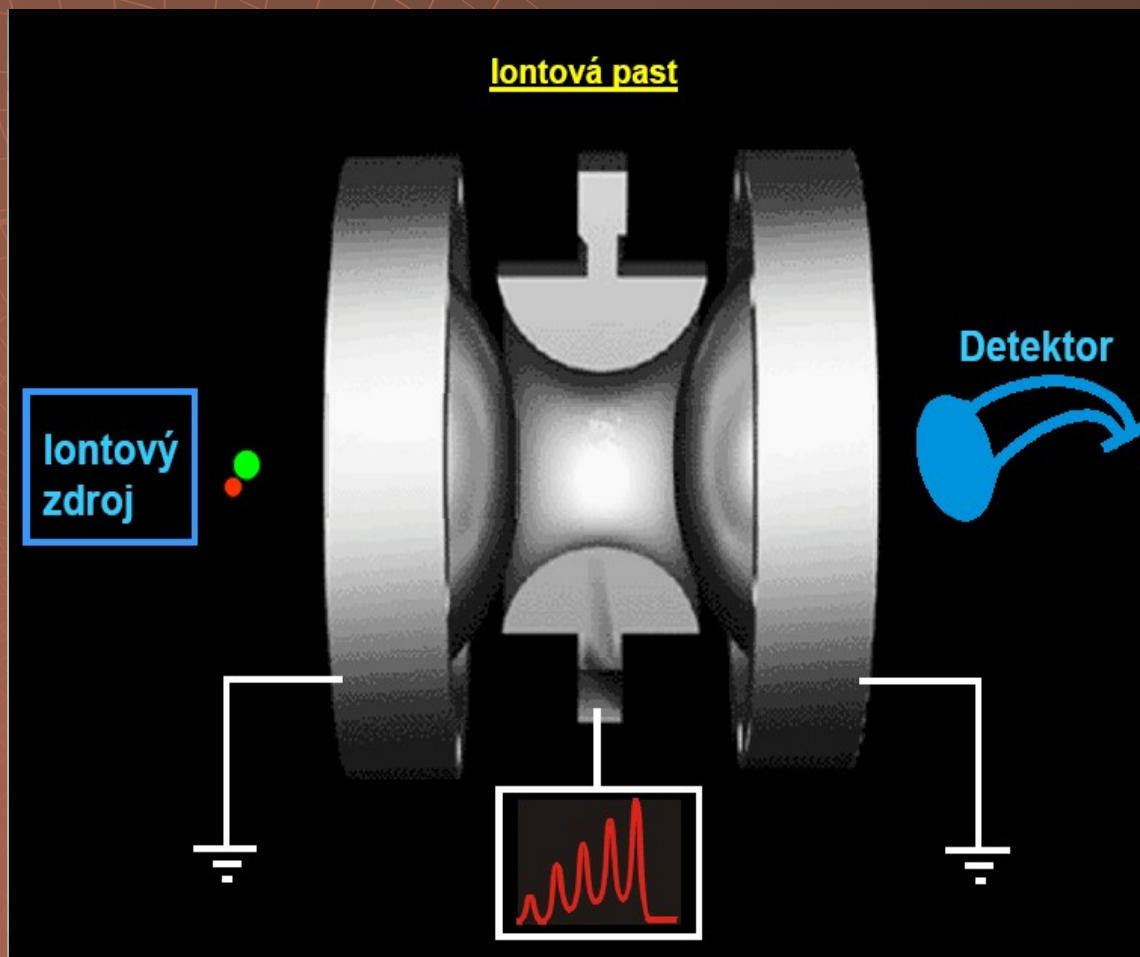
Kvadrupol



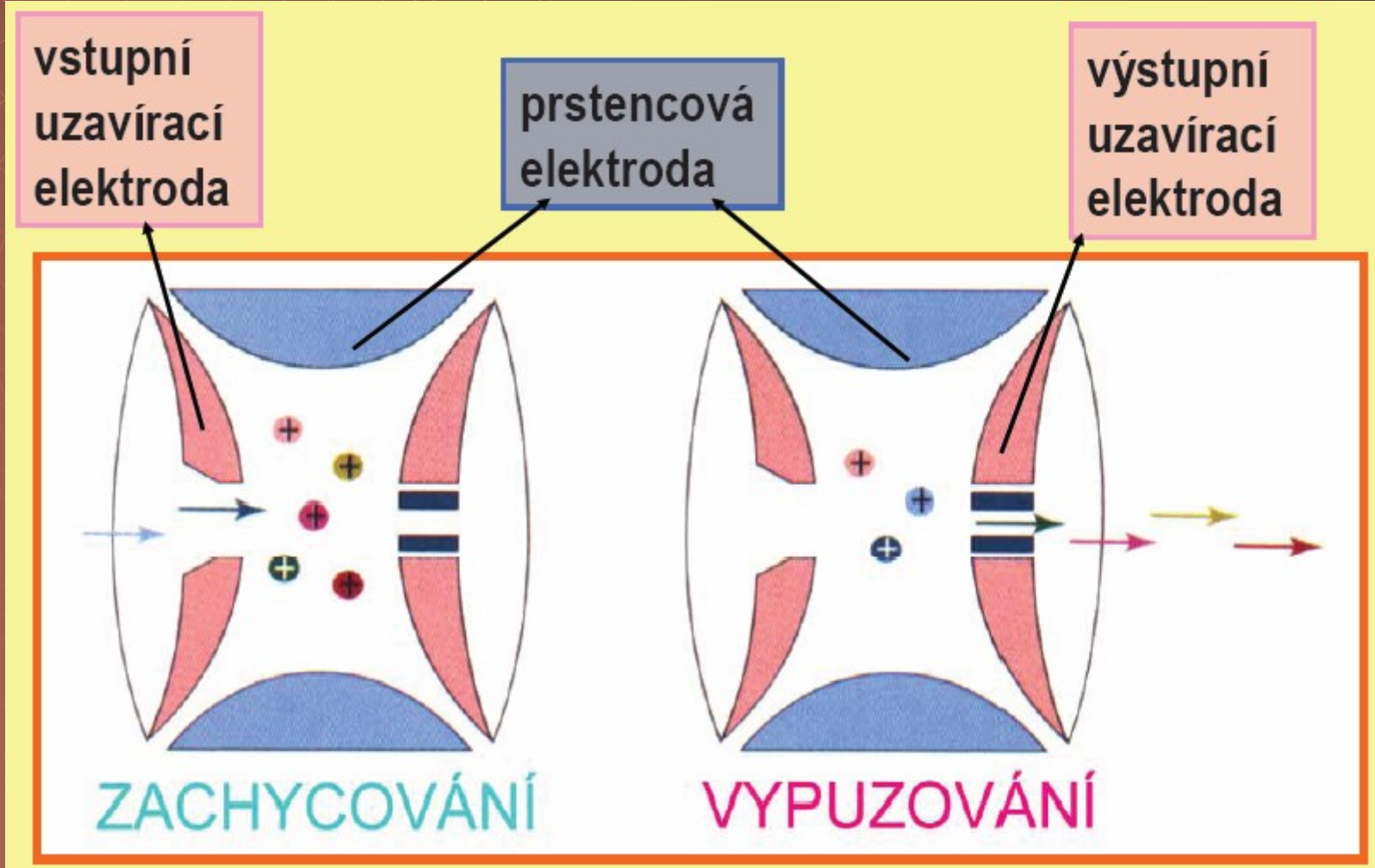
Iontová past

Trojrozměrná analogie kvadrupólu, opakované selektivní vypuzení iontů podle hodnoty m/z z iontové pasti na detektor, možnost MS^n analýzy.

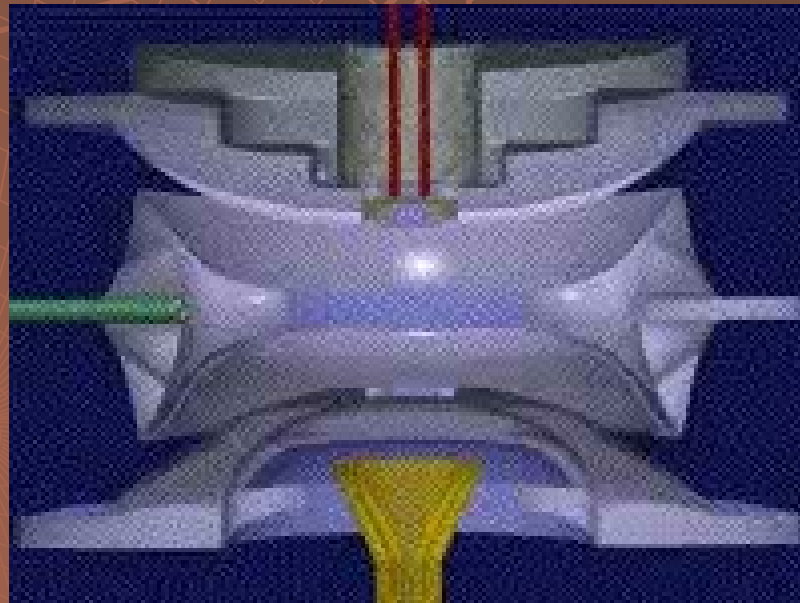
Iontová past (Ion Trap)



Ion Trap



Ion Trap



Ion Trap



Ion Trap

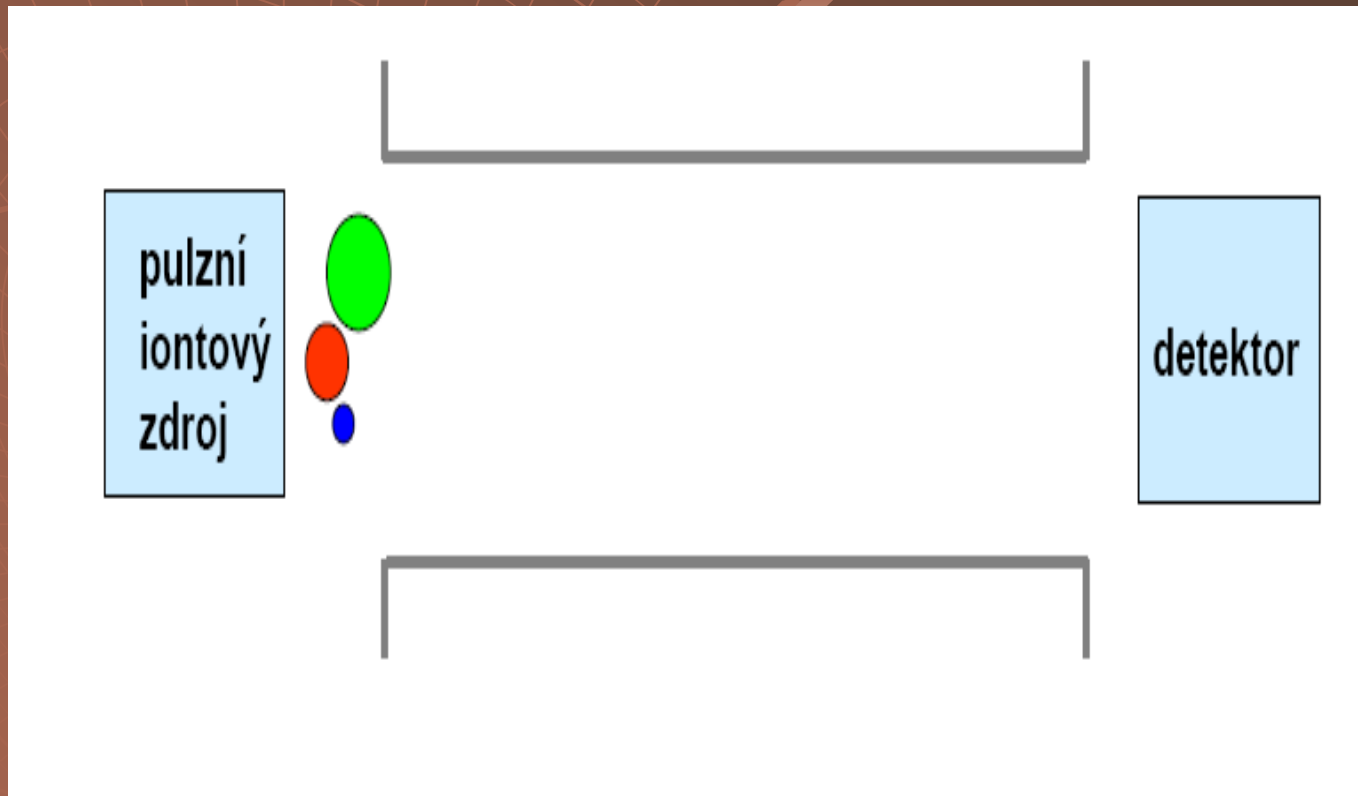


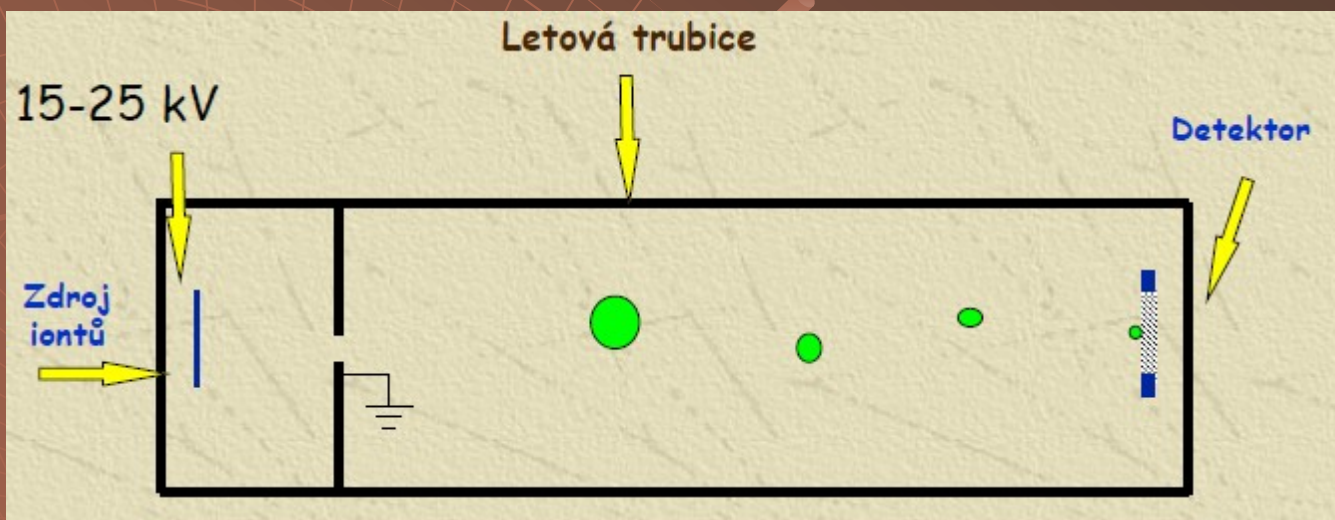
Analyzátor doby letu (TOF)

Různá doba rychlosti letu iontů (analyzátor doby letu – TOF).

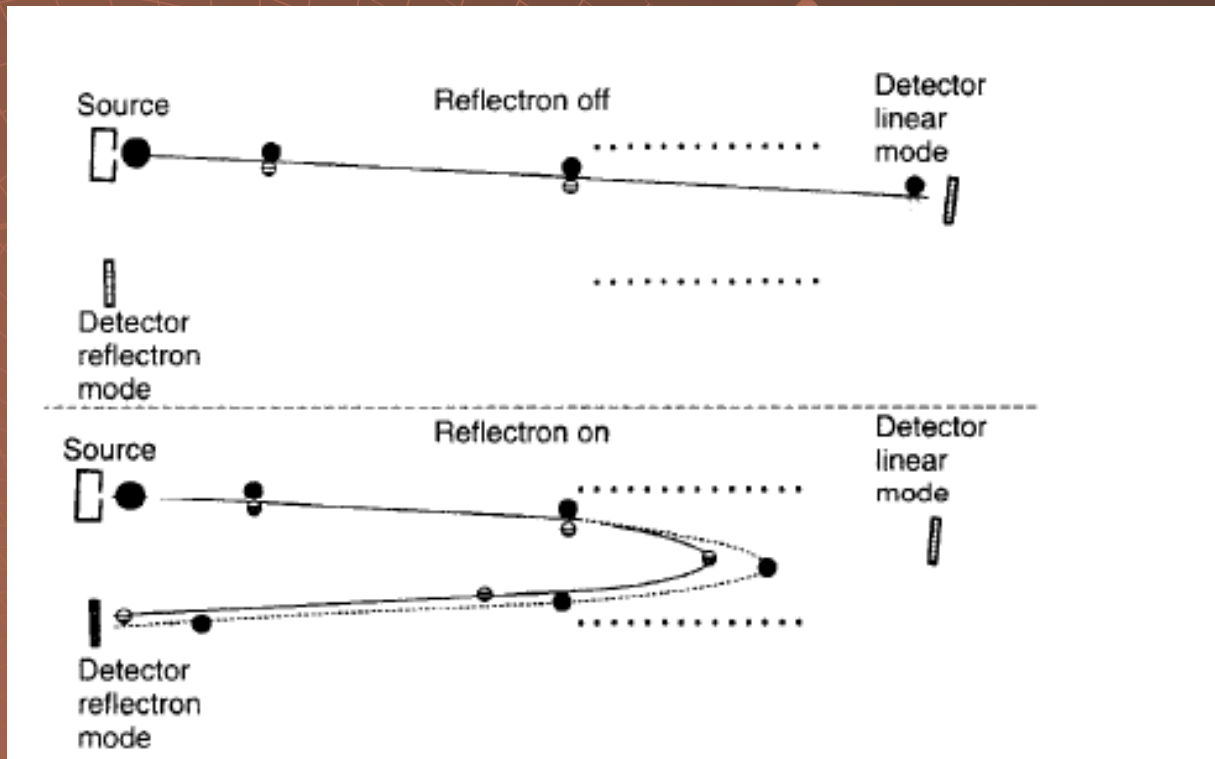
Urychlené ionty se v oblasti bez pole pohybují různou rychlostí v závislosti na hodnotě m/z ("menší ionty se letí rychleji").

Analyzátor doby letu (TOF)





Analyzátor doby letu (TOF)



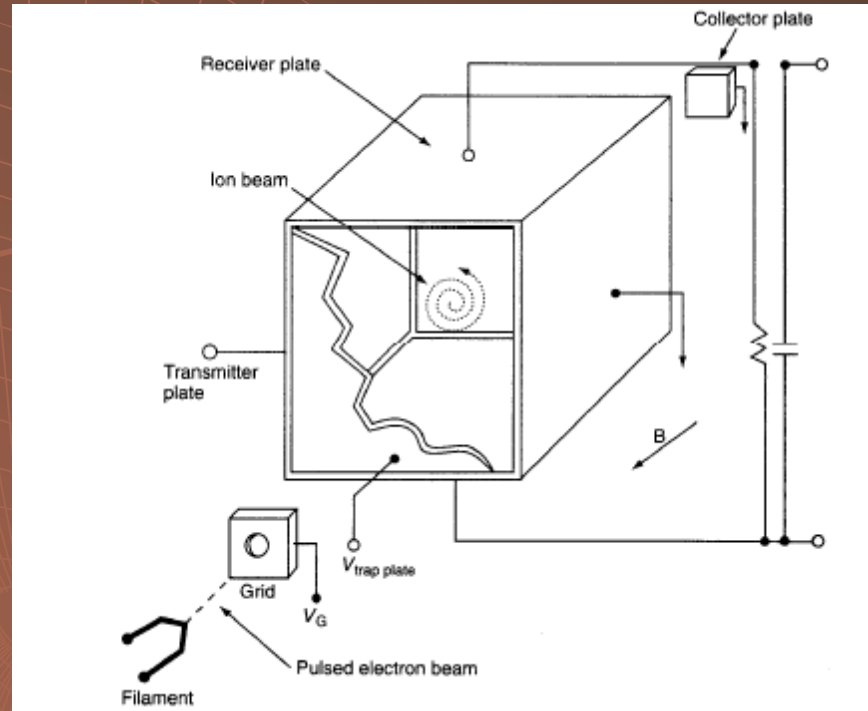
Analyzátor doby letu (TOF)



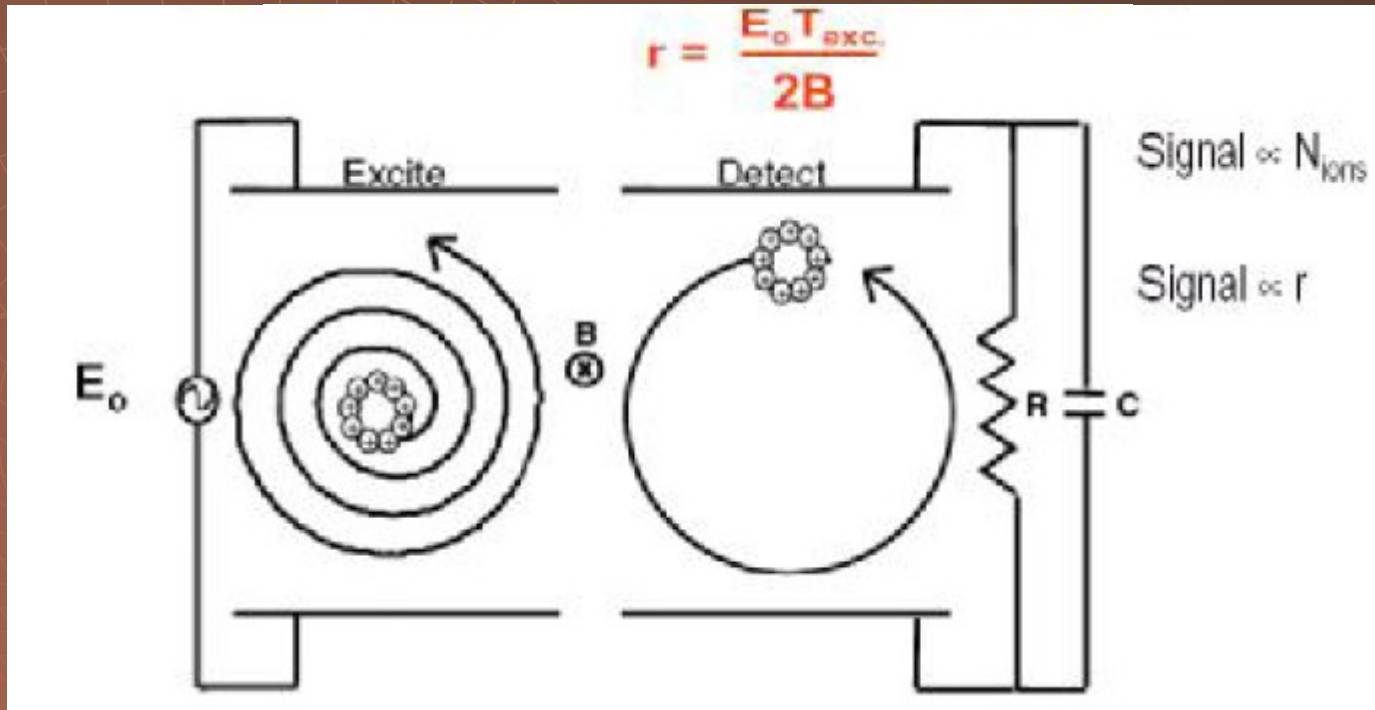
Iontová cyklotronová resonance (ICR)

Různé absorpce energie při
cykloidálním pohybu iontů
v kombinovaném magnetickém
a elektrickém poli.

Ionová cyklotronová resonance (ICR)

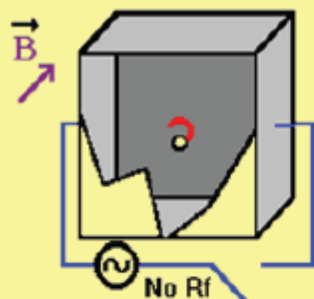


Iontová cyklotronová resonance (ICR)

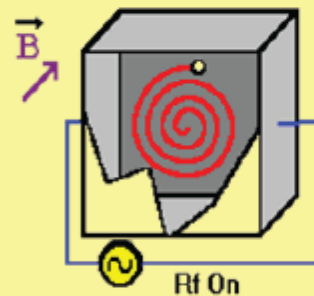


Iontová cyklotronová resonance (ICR)

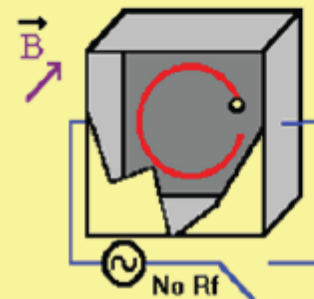
excitace



1) Ions before excitation. They are in their natural cyclotron radius within the magnetic field.

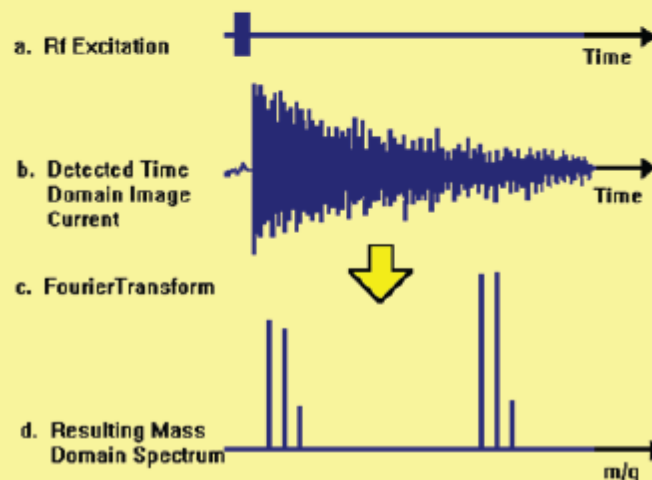
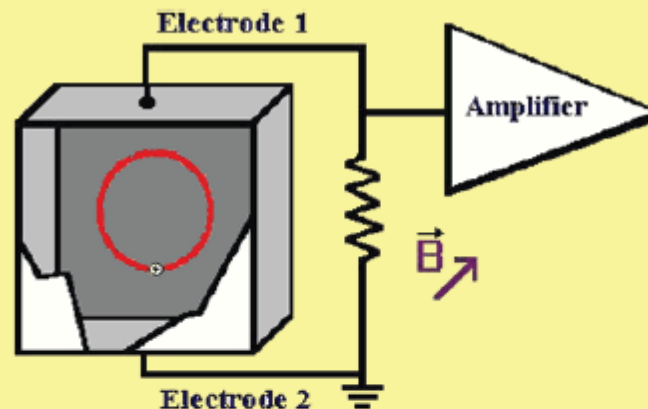


2) Ions during excitation with a radio frequency. This excites the ions to a larger cyclotron radius.

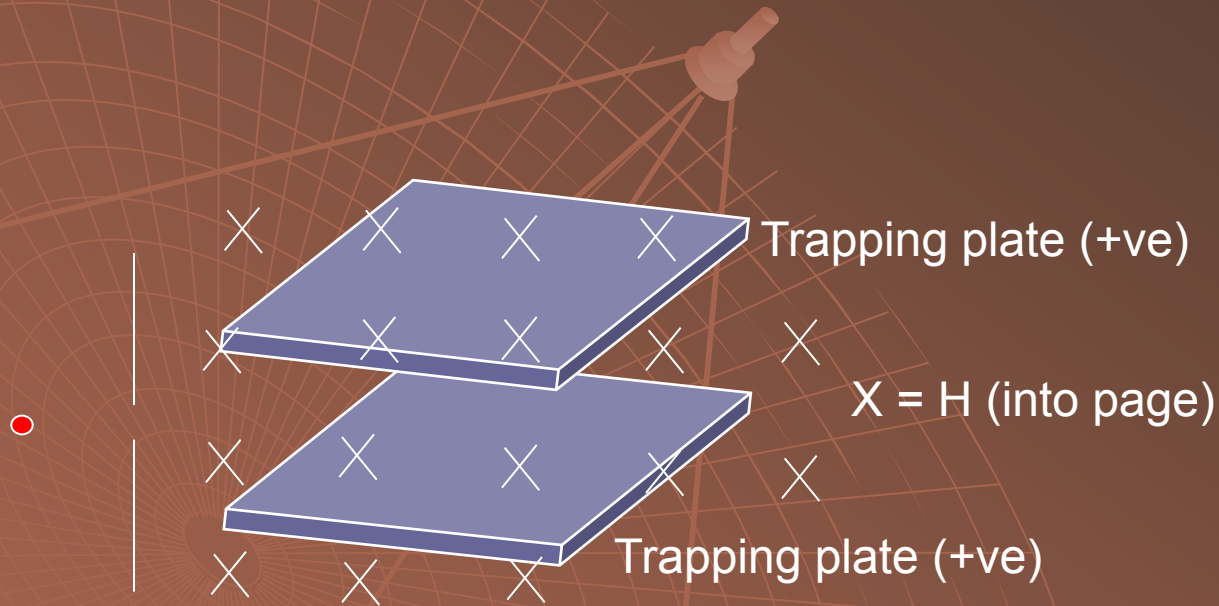


3) Ions after excitation. The cyclotron radius remains in its larger state.

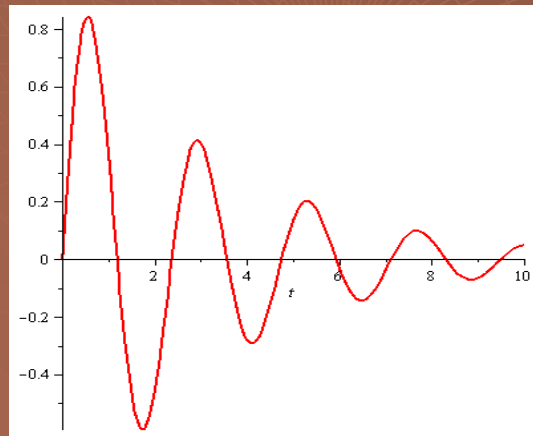
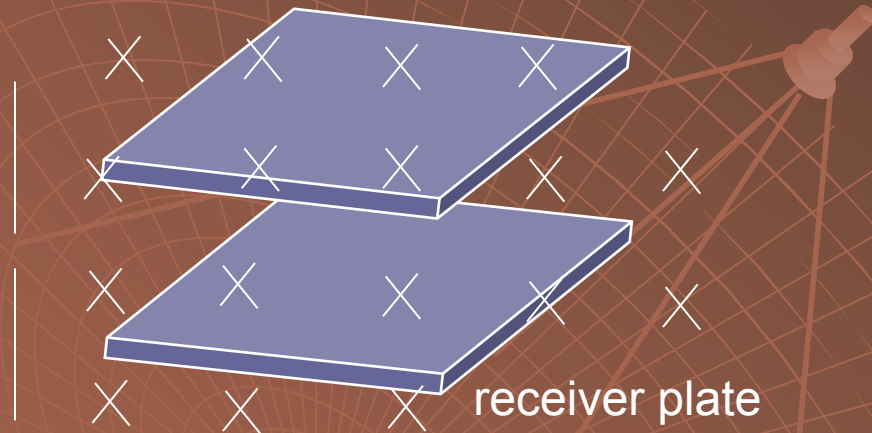
detekce



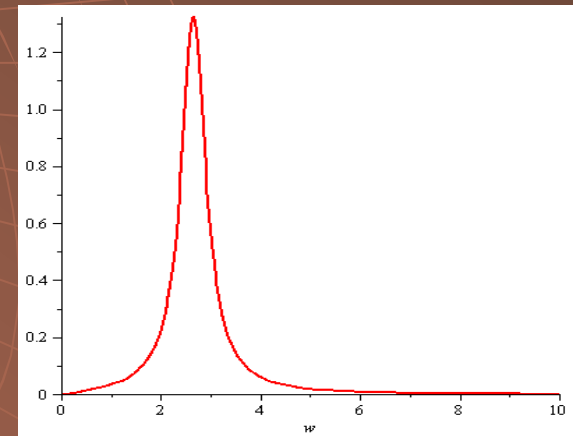
Iontová cyklotronová resonance (ICR)



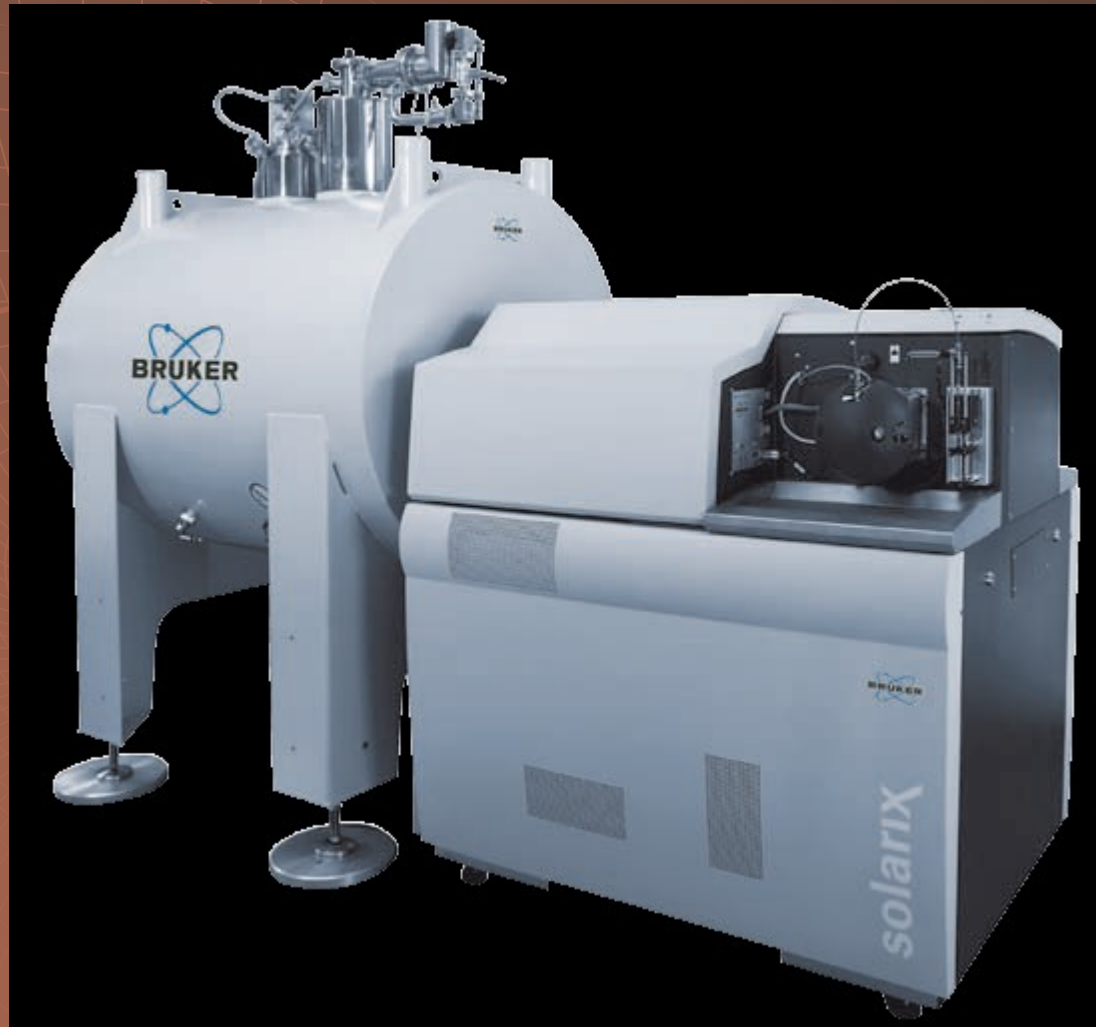
Iontová cyklotronová resonance (ICR)



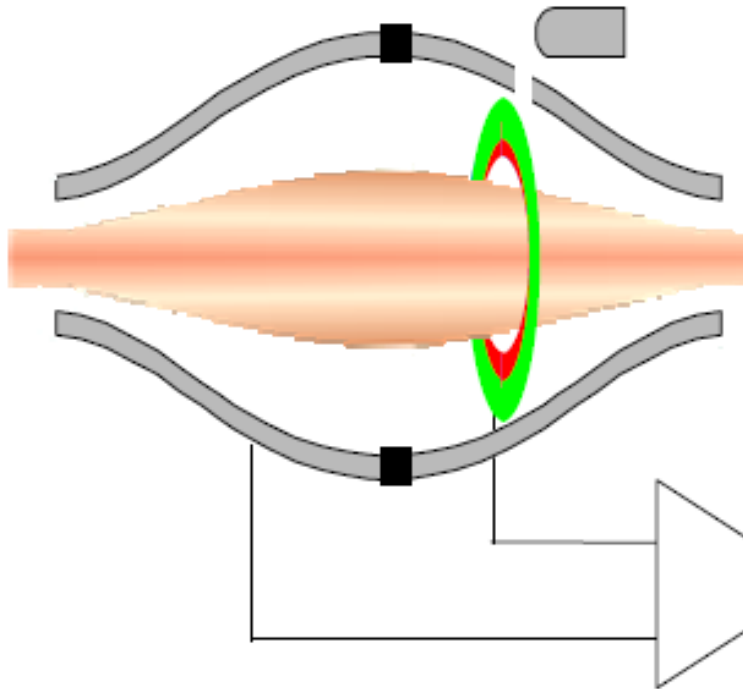
FT



lontová cyklotronová resonance (ICR)



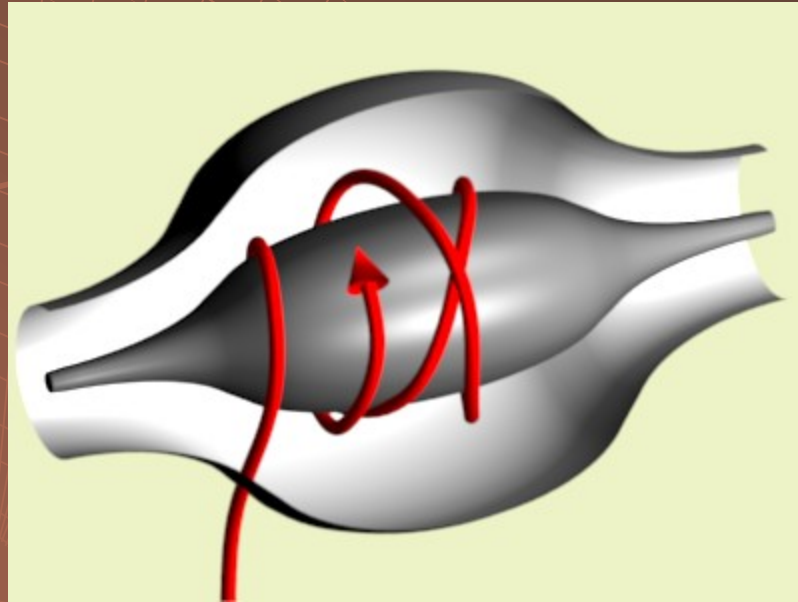
Orbitrap



$$\omega = \sqrt{\frac{k}{m/z}}$$

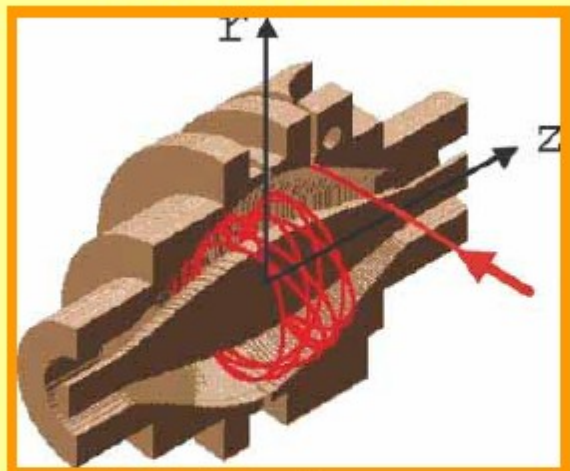


Orbitrap



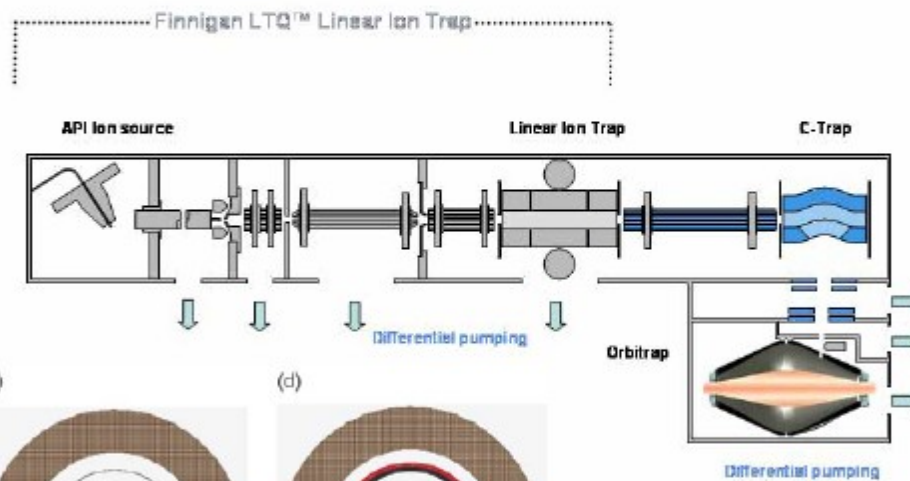
Orbitrap

- separátory iontů – ORBITRAP s Fourierovou transformací



(a)

(b)



(c)

(d)



Orbitrap



Orbitrap



Typické parametry hmotnostních analyzátorů

- typické parametry LC/MS hmotnostních analyzátorů

Hmotnostní analyzátor	Rozlišovací schopnost [$\cdot 10^3$]	Správnost [ppm]	m/z rozsah (horní limit) [$\cdot 10^3$]	Rychlost [Hz]	Lineární dynamický rozsah	Cena
Q	3 – 5	nízká	2 – 3	2 – 10	$10^5 - 10^6$	nízká
IT	4 – 20	nízká	4 – 6	2 – 10	$10^4 - 10^5$	střední
TOF	10 – 60	1 – 5	10 – 20	10 – 50	$10^4 - 10^5$	střední
Orbitrap	100 – 240	1 – 3	4	1 – 5	$5 \cdot 10^3$	vyšší
FT-ICR	750 – 2,500	0.3 – 1	4 – 10	0.5 – 2	10^4	vysoká

- rozdělení hmotnostních analyzátorů

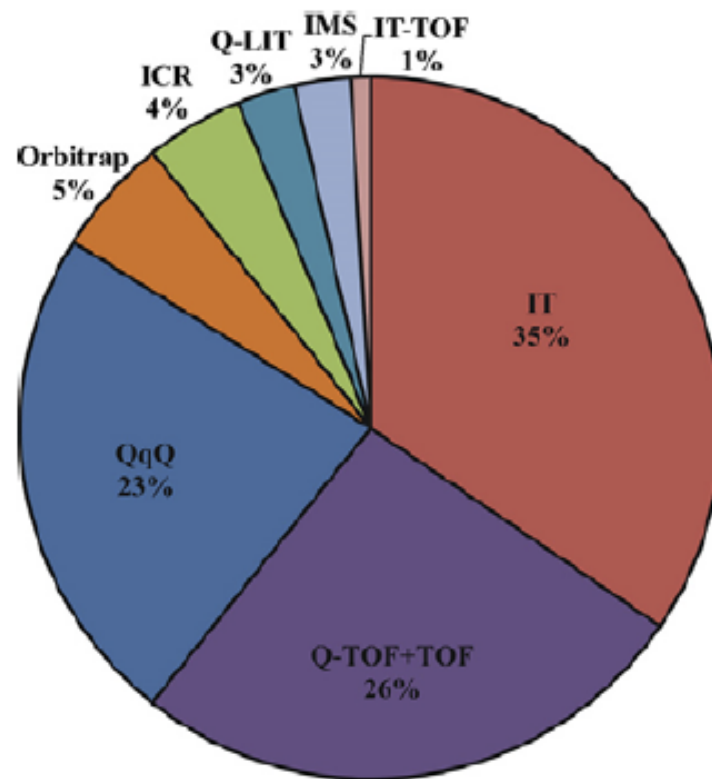
	Rozlišovací schopnost (RP, FWHM)	Správnost (MA, ppm)
nízká	<10,000	>5
vysoká	10,000 – 100,000	<5
ultravysoká	>100,000	<1

Porovnání různých typů hmotnostních analyzátorů

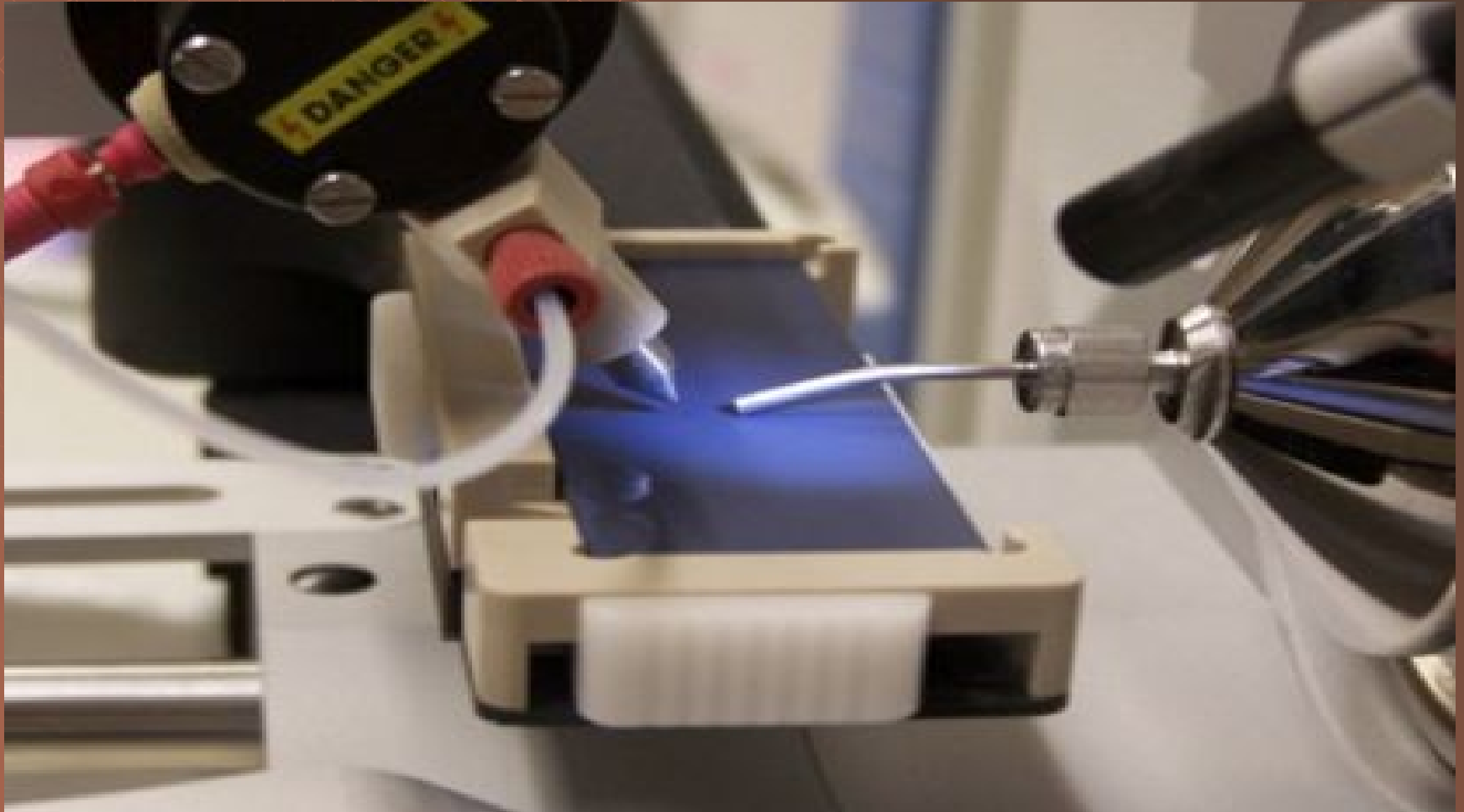
Analyzátor	RP [*10 ³ , FWHM]	m/z rozsah [*10 ³]	Sken. rychlost	LC/ MS	Vakuum [Pa]	Cena *10 ⁶ Kč
Q (QqQ)	3 – 5	3 – 4	střední	* * *	10 ⁻³	2 – 3 (4–6)
IT	5 – 20	10 – 20	vysoká	* * *	10 ⁻³ +5*10 ⁻⁴ He	3 – 4
o-TOF (QTOF)	10 – 25	~ 1000	velmi vysoká	* * *	10 ⁻⁴ -10 ⁻⁵	4 – 6 (8 – 10)
Sektor	50 – 100	~ 20 – 30	nižší	* *	10 ⁻⁵ – 10 ⁻⁶	12 – 20
ICR	~ 10 ⁶	~ 10 ⁸	vysoká	* *	10 ⁻⁷ - 10 ⁻⁹	≥ 50

Hmotnostní analyzátoři

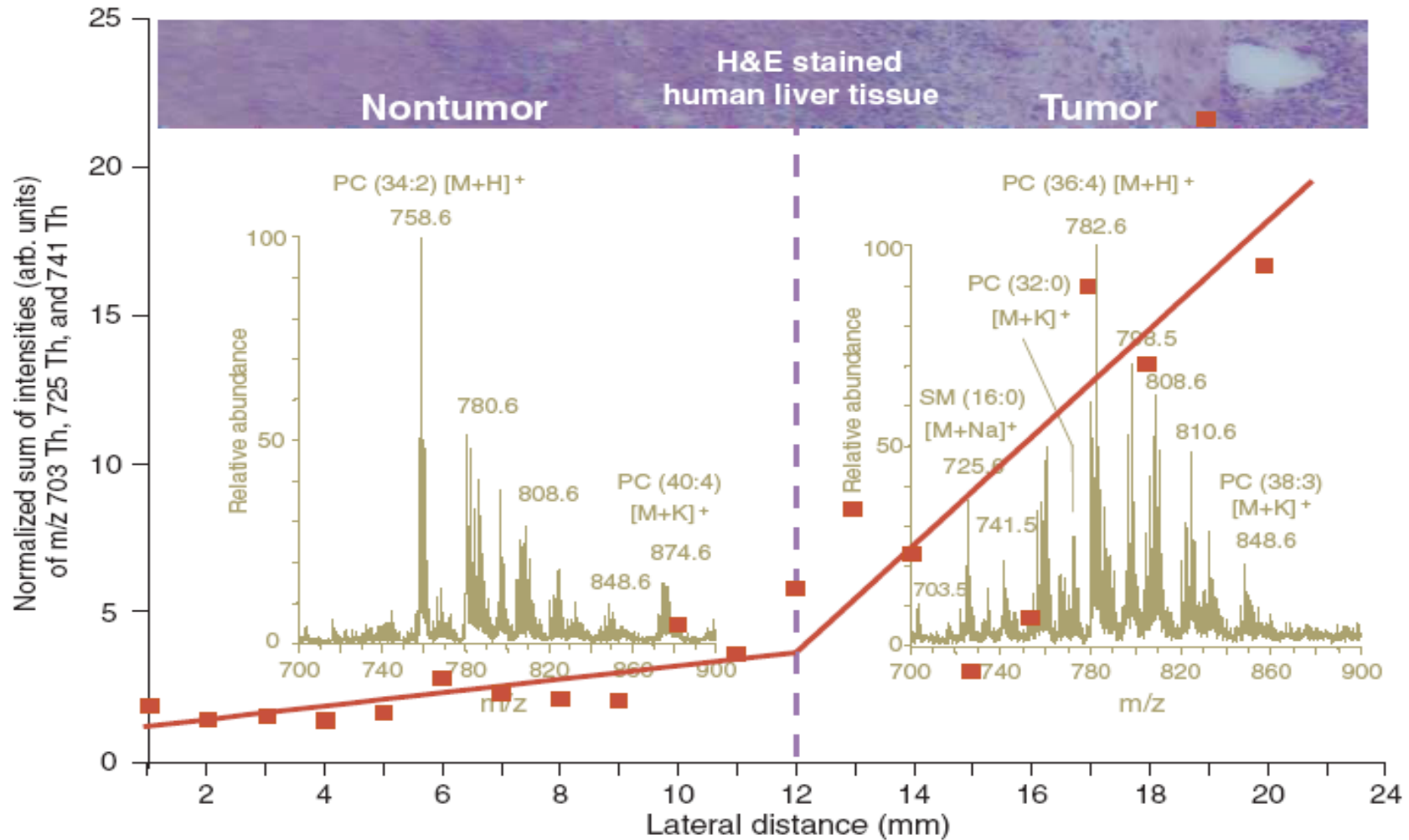
- Magnetický sektorový analyzátoř
- Kvadrupólový analyzátoř
- 3D a lineární iontová past
- Průletový analyzátoř
- Orbitrap
- Iontová cyklotronová rezonance
- Analyzátoř pohyblivosti iontů
- Hybridní hmotnostní spektrometry



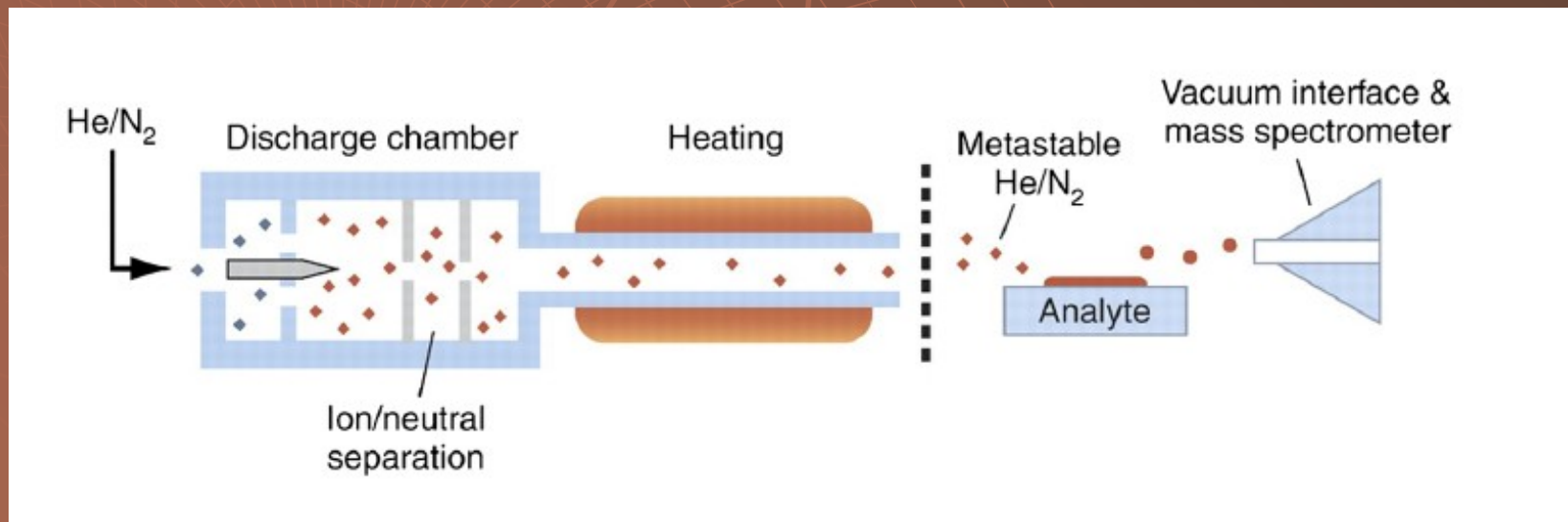
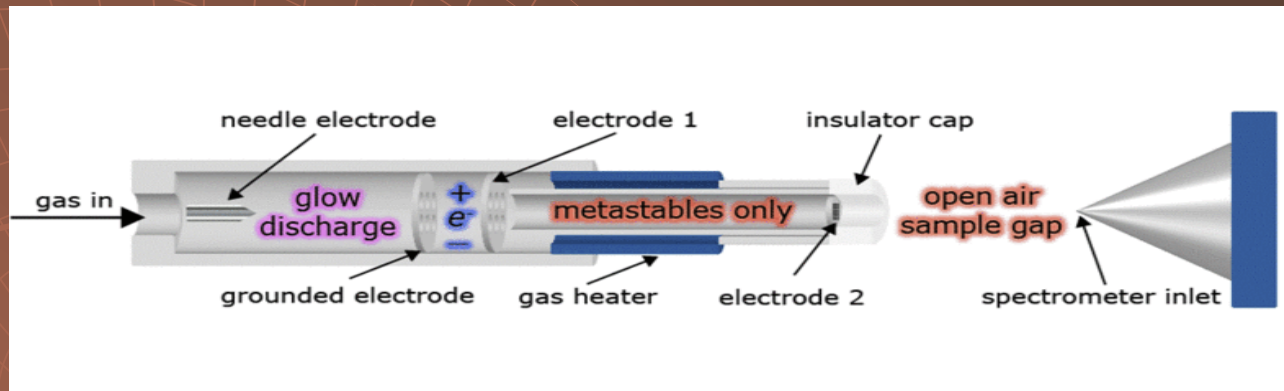
Desorpční ionizace elektrosprayem (DESI)



Desorpční ionizace elektrosprayem (DESI)



Přímá ionizace v reálném čase (DART)

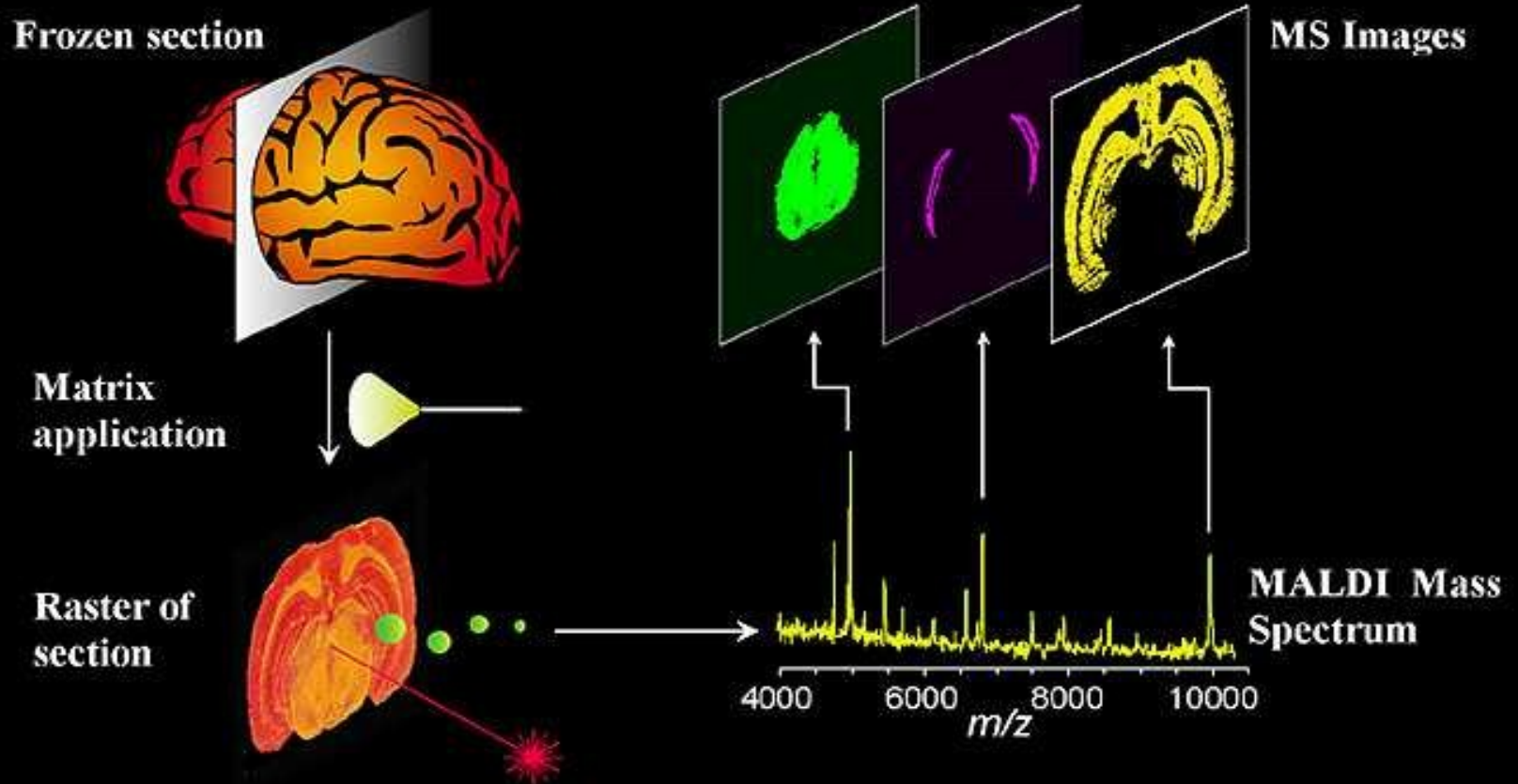


Přímá ionizace v reálném čase (DART)

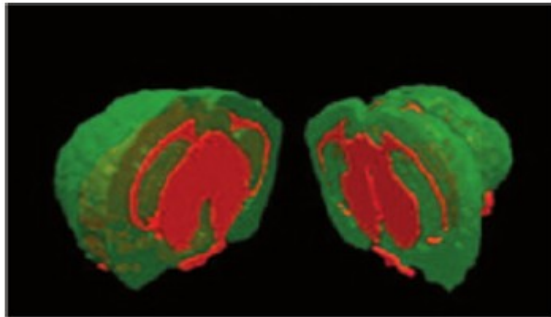


Zobrazovací MS (IMS)

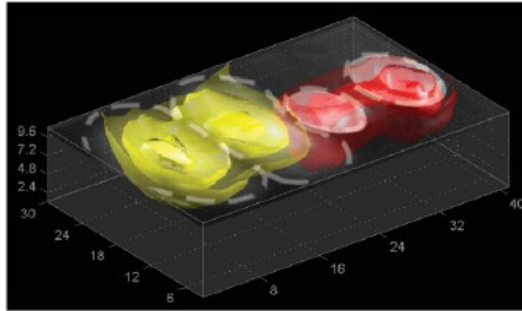
Principle of MALDI MS Imaging



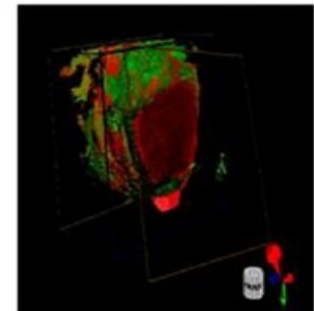
3D IMS



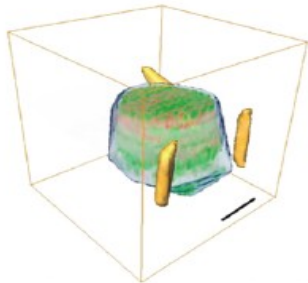
a) Eberlin et al. 2010



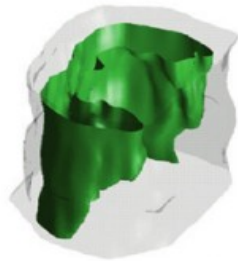
b) Watrous et al. 2013



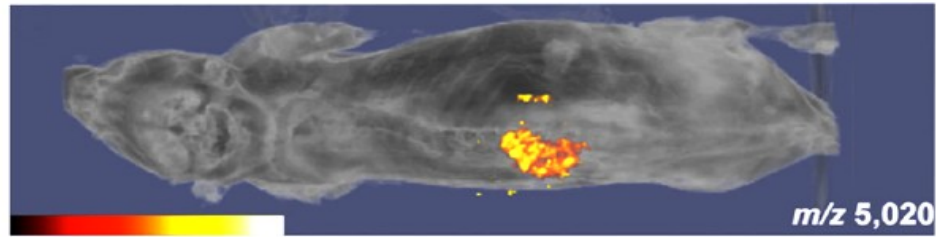
c) Fornai et al 2012



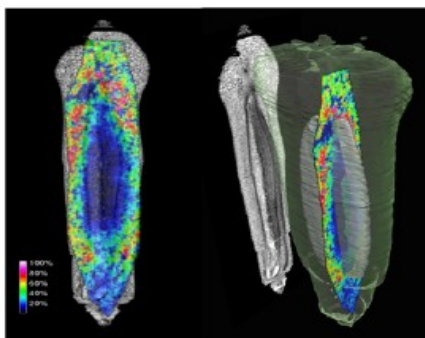
d) Chugthai et al. 2012



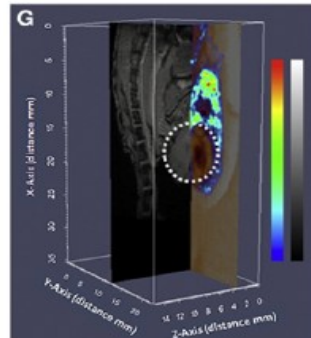
e) Jones et al. 2012



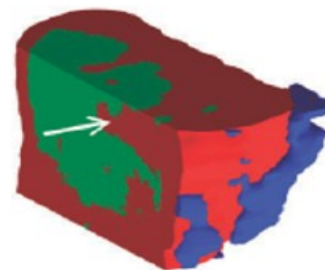
f) Attia et al. 2012



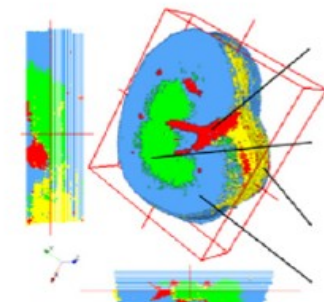
g) Bollenbeck et al. 2009



h) Seeley et al. 2014



i) Reindl et al. 2011



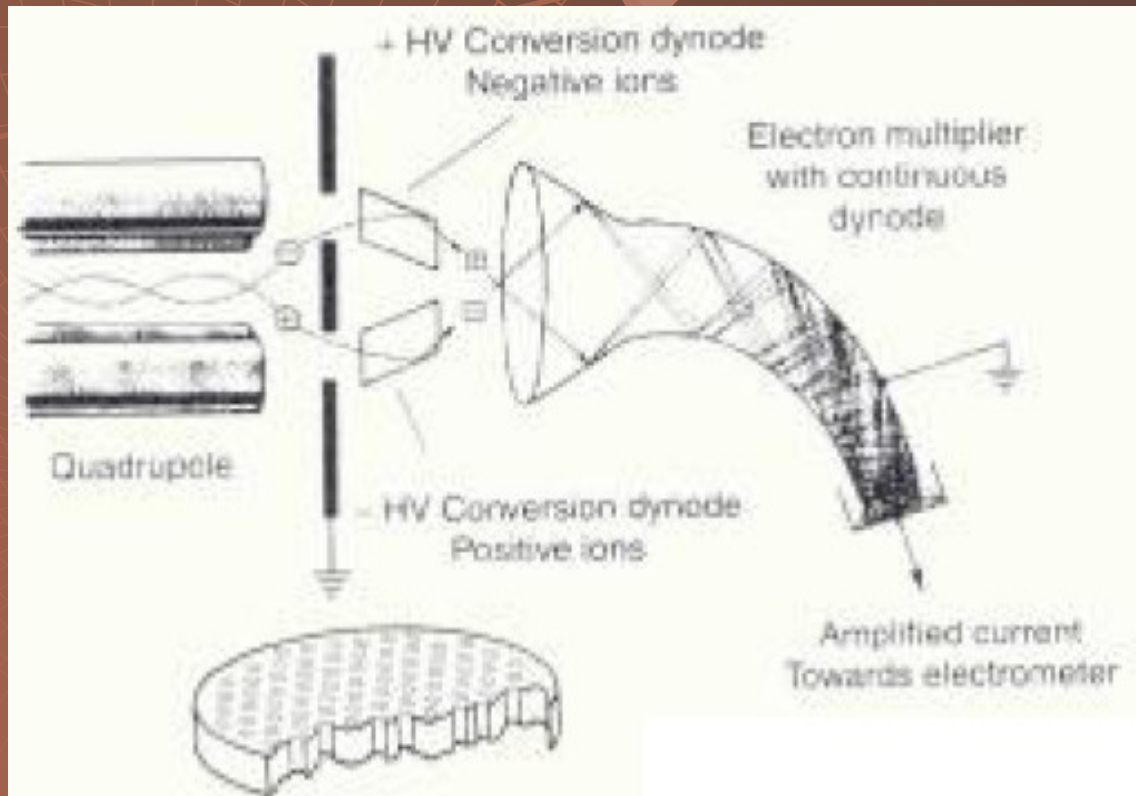
j) Oetjen et al. 2013



Detektory

Elektronový násobič

ionty dopadající na povrch elektrody zní vyrazí e-,
dále zesíleny systémem dynod až 10^8 krát,
životnost 1-2 roky



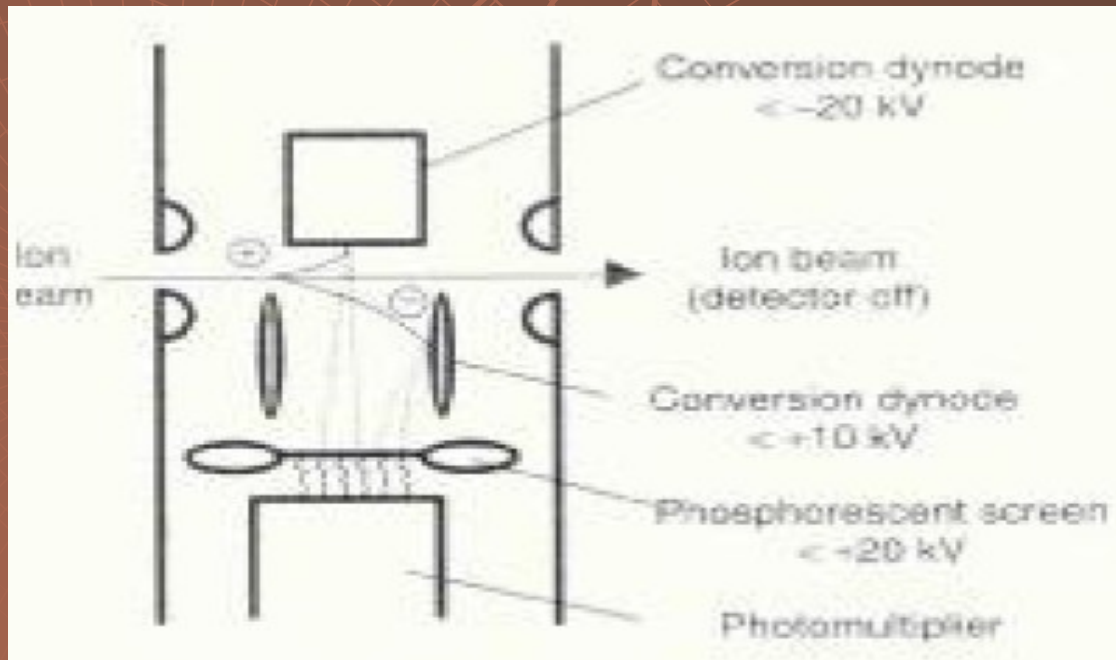
Elektronový násobič

ionty dopadající na povrch elektrody zničí vyrazí e-
dále zesíleny systémem dynod až 10^8 krát,
životnost 1-2 roky



Fotonásobič

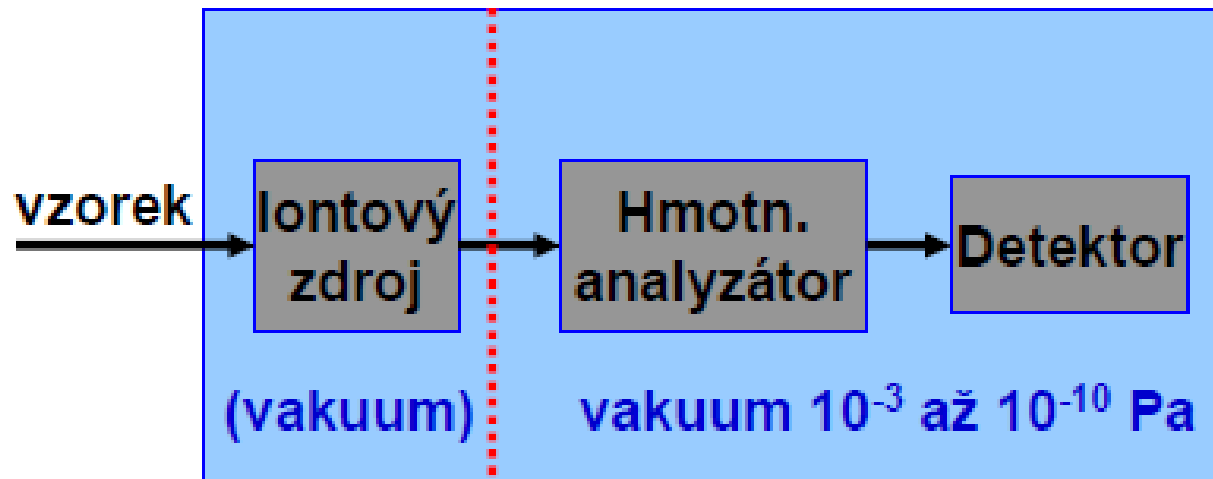
ionty dopadají na fosforovou destičku, čímž uvolní energii ve formě fotonu, zesílen systém konverzních dynod až 10^5 krát, delší životnost





Vakuový systém

Vakuový systém

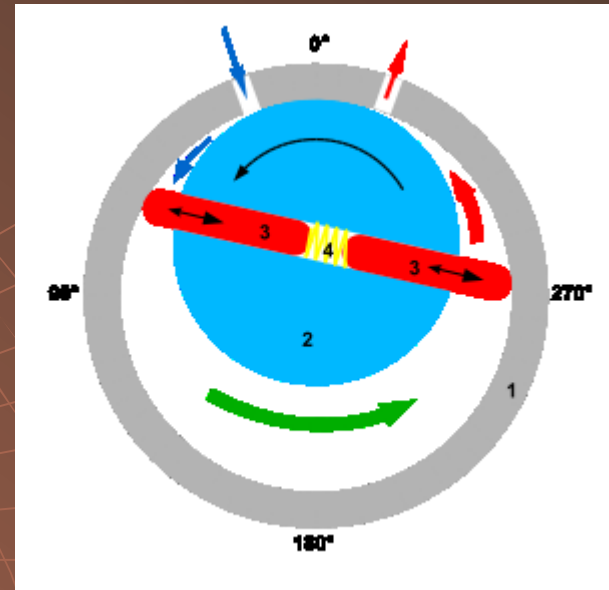


- hmotnostní analyzátor vždy pracuje **za vysokého vakua**, hodnota vakua se liší podle typu analyzátoru ca. 10^{-3} až 10^{-10} Pa
- kromě ionizačních technik pracujících za atmosférického tlaku (ESI, APCI, APPI) musí být za vakua i iontový zdroj
- proč tak vysoké vakuum? **ionty musí mít dostatečně dlouhou střední dráhu a nesmí docházet ke kolizním srážkám s neutrálními atomy**

K získání tak vysokých hodnot vakua je obvykle potřeba dvou nebo i více (FT-ICR) stupňové čerpání velmi výkonnými vakuovými pumpami

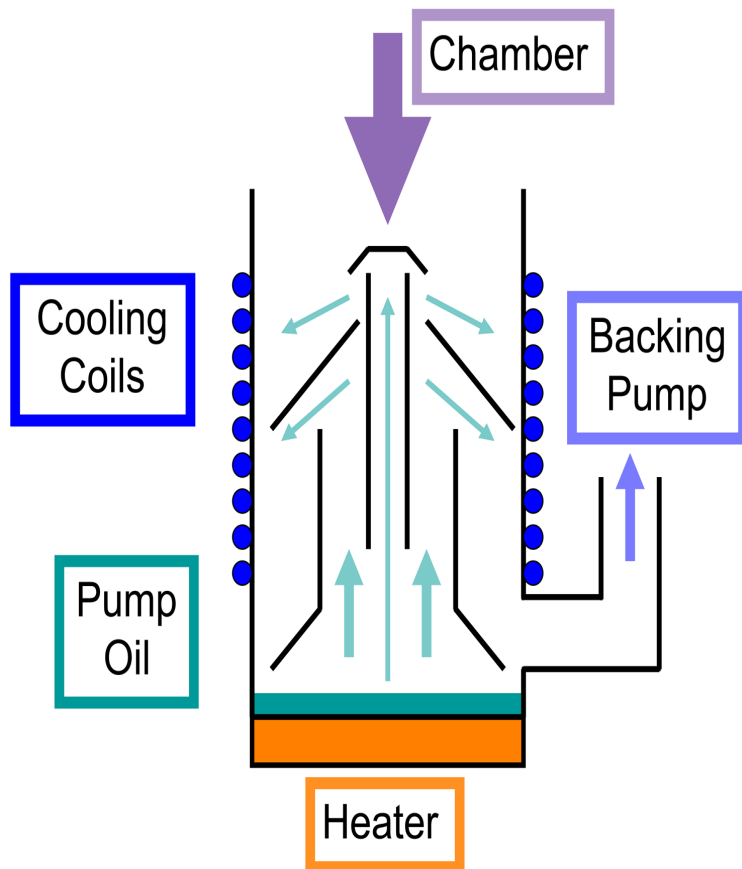
- ◆ - 1. stupeň čerpání - **rotační pumpy** (výkon 80 l/s)
- ◆ - 2. stupeň čerpání - **turbomolekulární nebo difúzní pumpy** (výkon 250 l/s)

Rotační olejové vývěvy

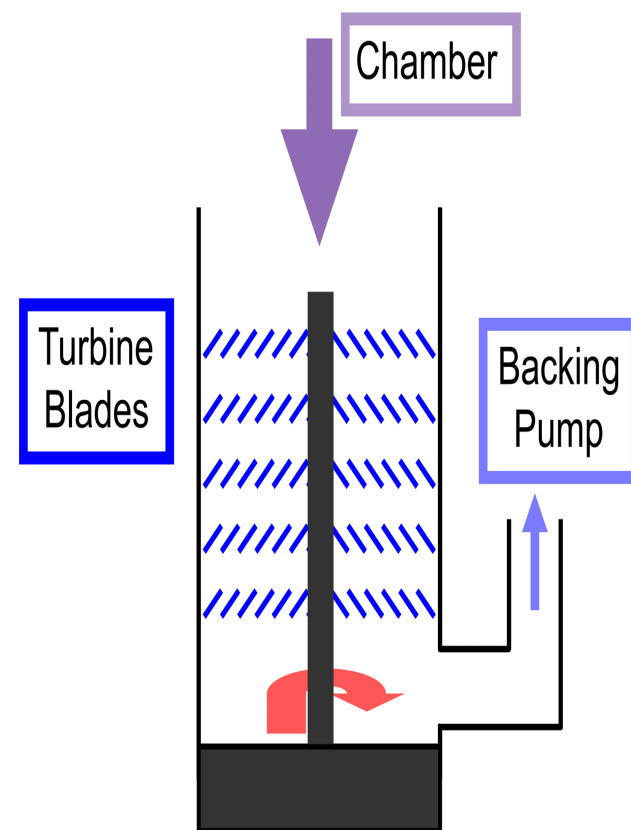


Difuzní a turbopumpy

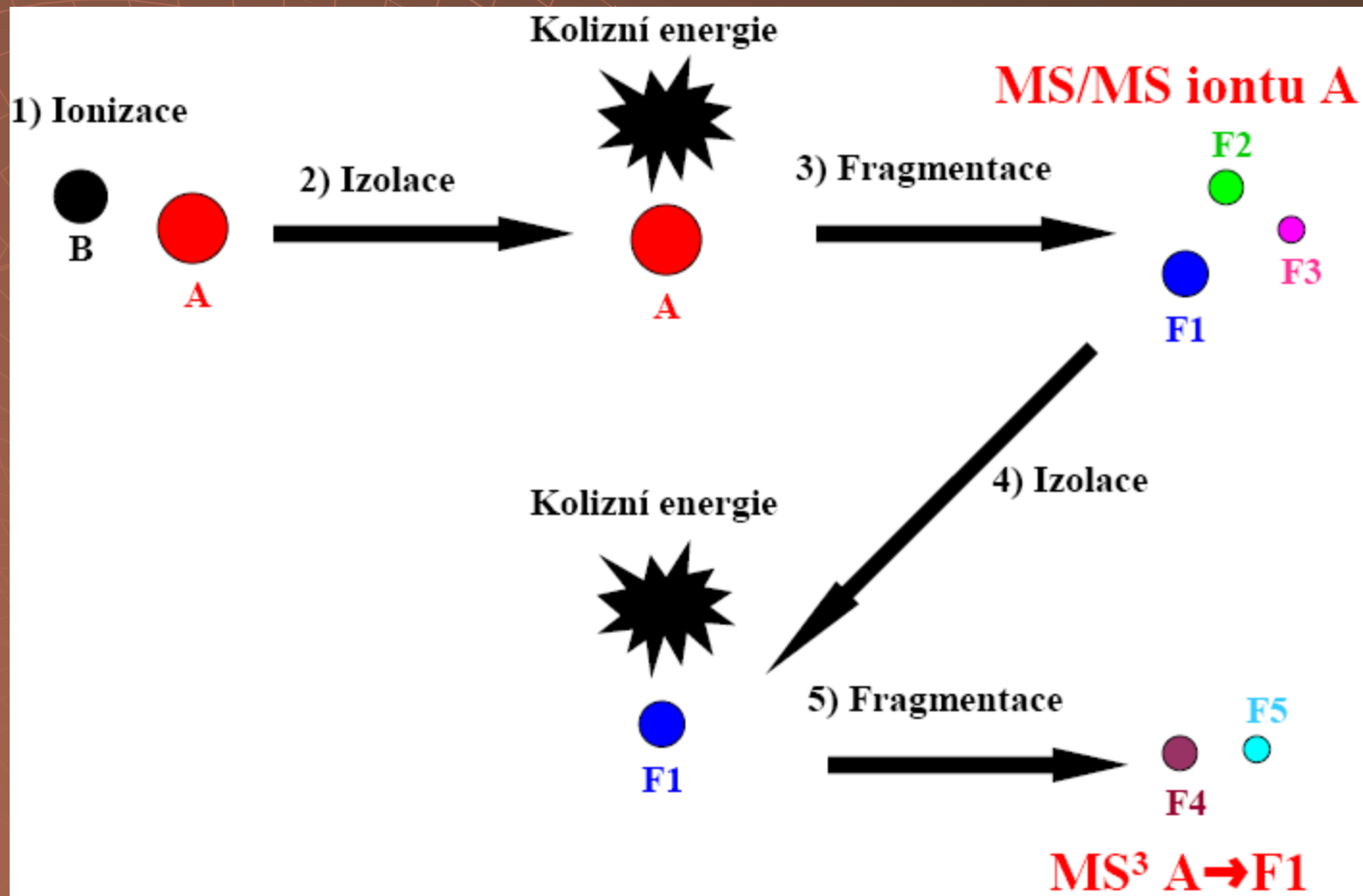
difuzní pumpa



turbomolekulární pumpa

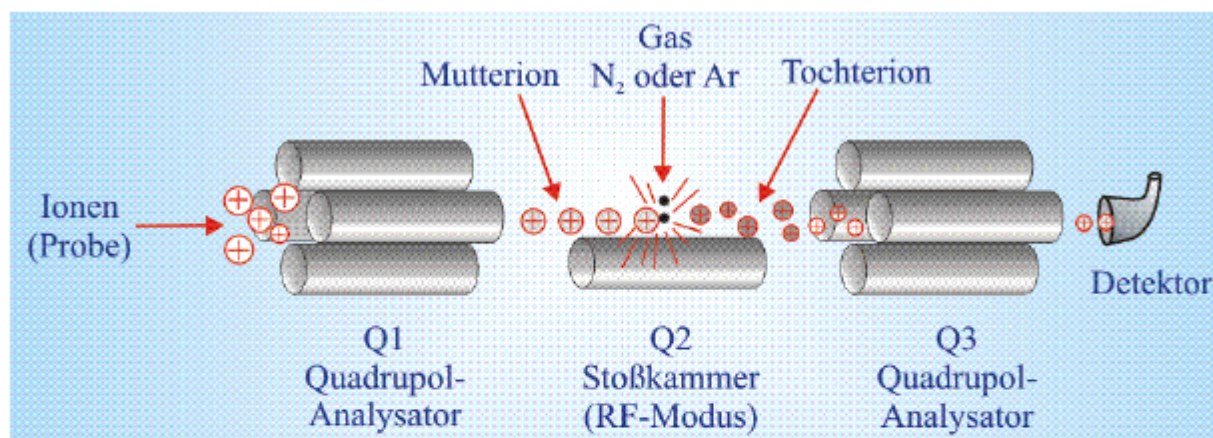


MSⁿ

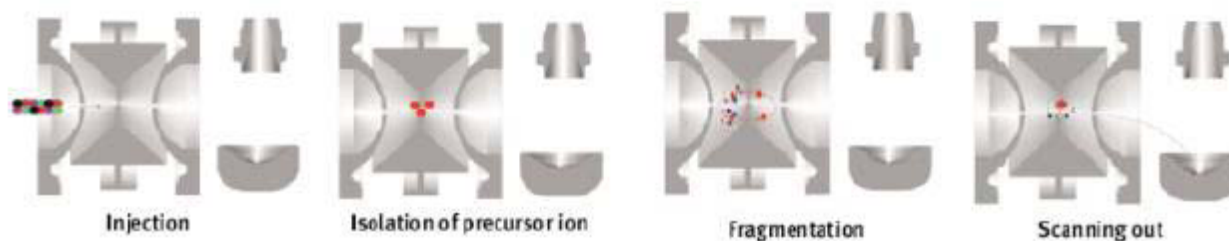


MSⁿ

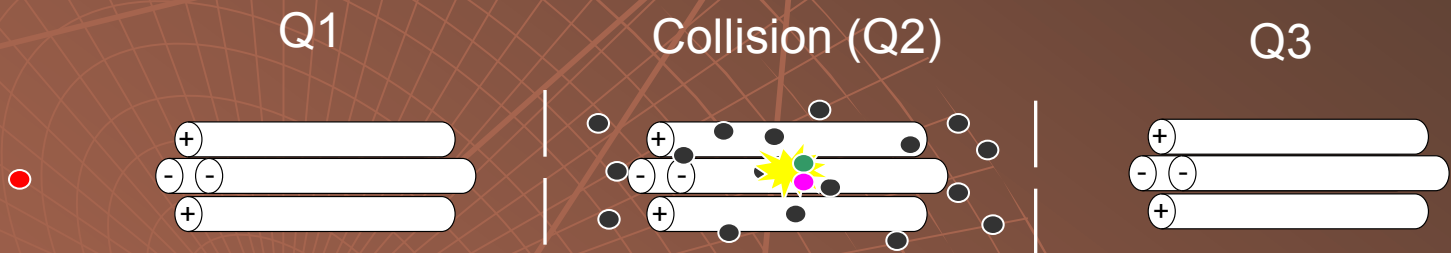
V prostoru



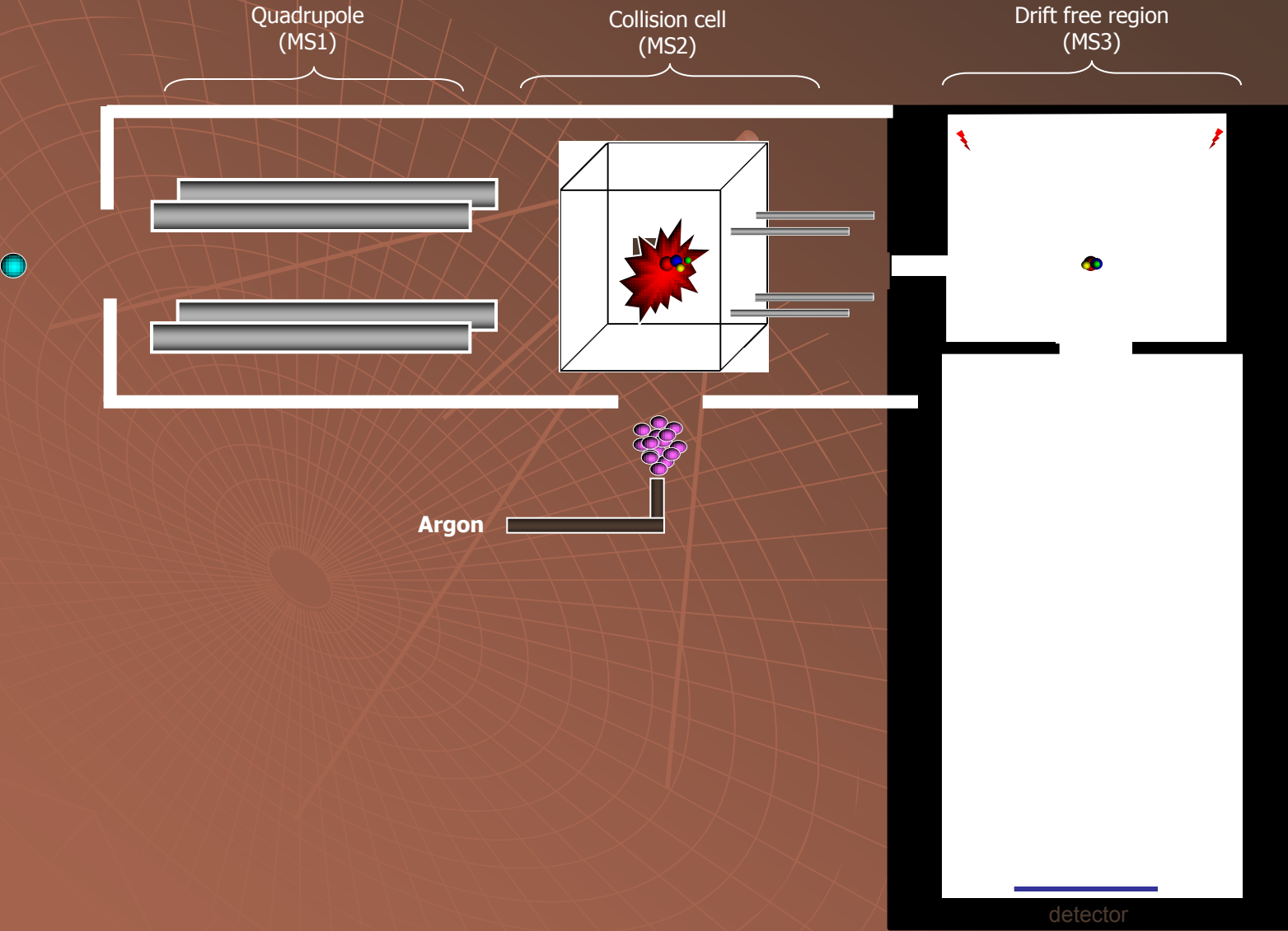
V čase



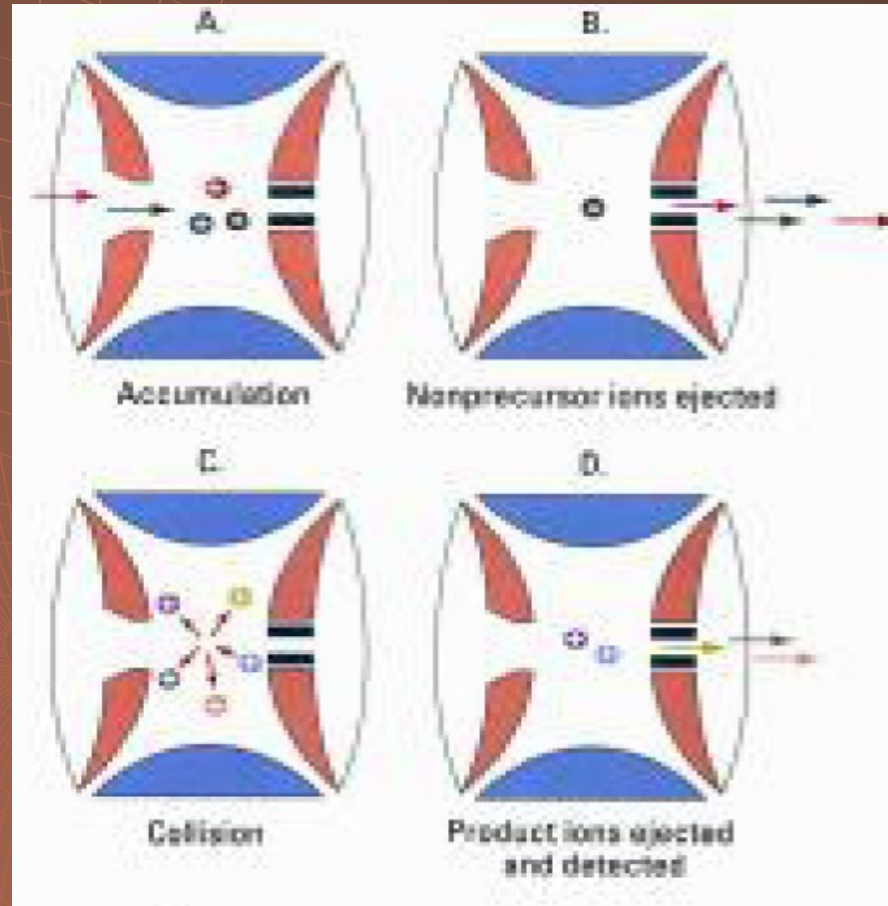
TripleQ



QTOF

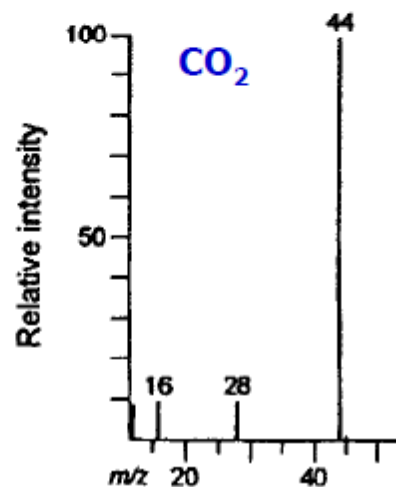
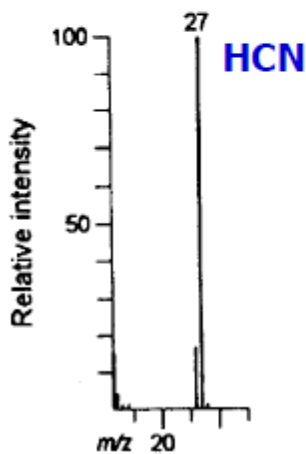
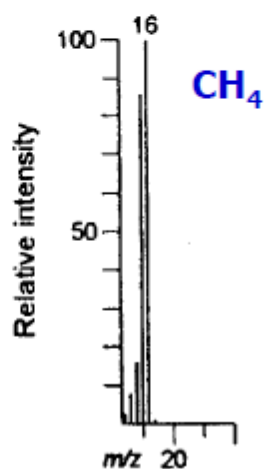
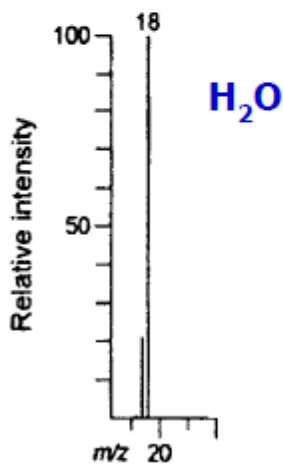


IT



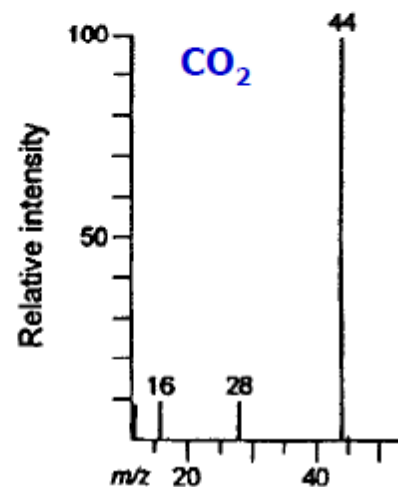
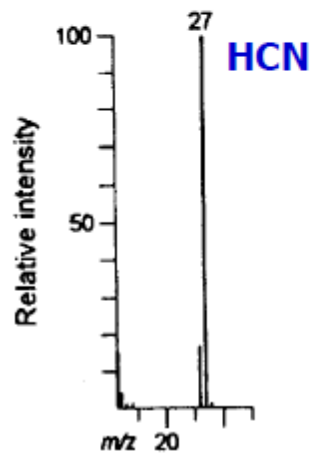
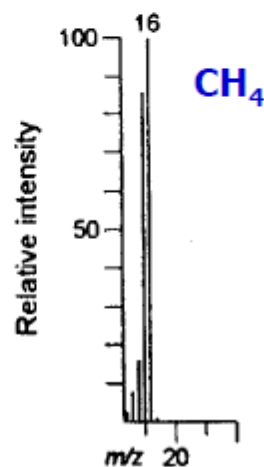
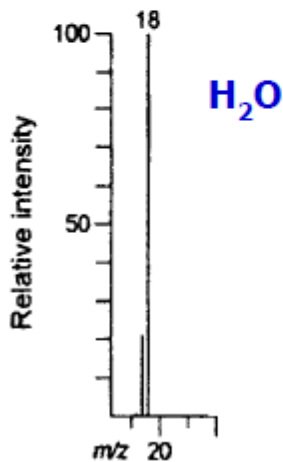
MS spektrum

- hmotnostní spektrum - **osa y = relativní intenzita v %**, **osa x = poměr hmotnosti a náboje (m/z)**, ve většině případů je náboj roven jedné (kromě ESI) a potom hodnota na ose x odpovídá přímo hmotnosti iontu

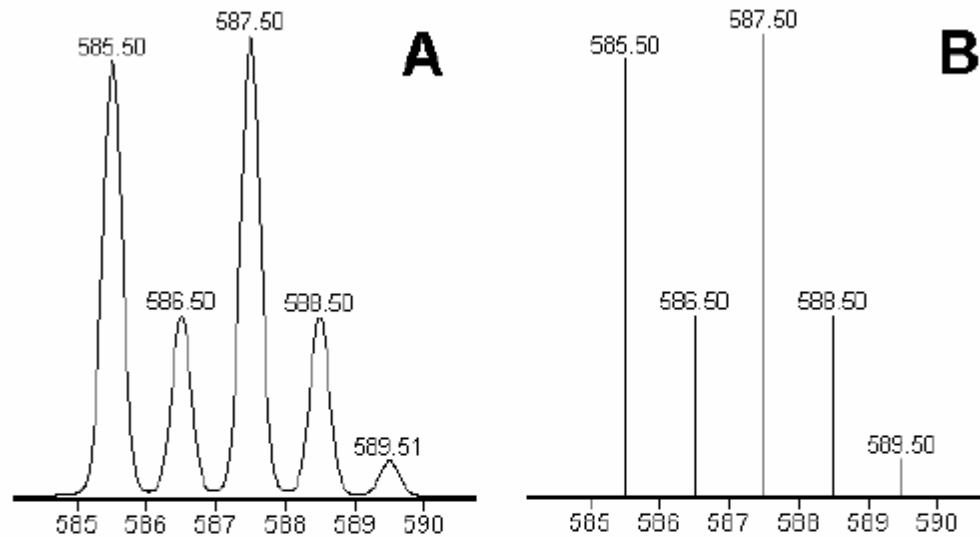


MS spektrum

• **normalizace spekter** - hmotnostní spektra jsou obvykle uváděna v normalizovaném tvaru, tzn. nejintenzivnějšímu píku spektra je přiřazena relativní intenzita 100% a intenzity ostatních píku se dopočítají; kromě grafické formy lze spektrum uvést i v tabelární formě (přesně uvedené intenzity, ale méně přehledné pro interpretaci)



MS spektrum



spektrum $\begin{cases} \rightarrow \textit{profilové} \\ \rightarrow \textit{histogram} \end{cases}$

MS kalibrace

- **externí kalibrace** – kalibrace a vlastní měření není ve stejný okamžik, nejdříve kalibrace a pak měření (nebo naopak), což někdy může způsobit určitý posun m/z
 - obecně poskytuje mírně horší výsledky oproti interní kalibraci, ale je menší riziko hmotnostních interferencí analytu s kalibrantem
- **interní kalibrace** – kalibrant i analyt jsou do iontového zdroje přivedeny ve stejný okamžik a ve spektru pozorujeme jak analyt tak i kalibrant
 - poskytuje nejpřesnější výsledky, ale hrozí riziko hmotnostních interferencí (tzn. analyt a kalibrant nesmí mít příliš blízké hmotnosti, aby je daný typ analyzátor dokázal spolehlivě rozlišit, pokud by se píky analytu a kalibrantu ovlivnily, pak vzniká chyba)
 - "**lock mass**" kalibrace - založena na kontinuální kalibraci na vybraný ion pozadí o známém složení nebo sprejování standardu druhým sprejem

Inlet

MALDI destička
Direct Insertion
(Infusion) Probe
GC
HPLC
CE

Iontový
zdroj

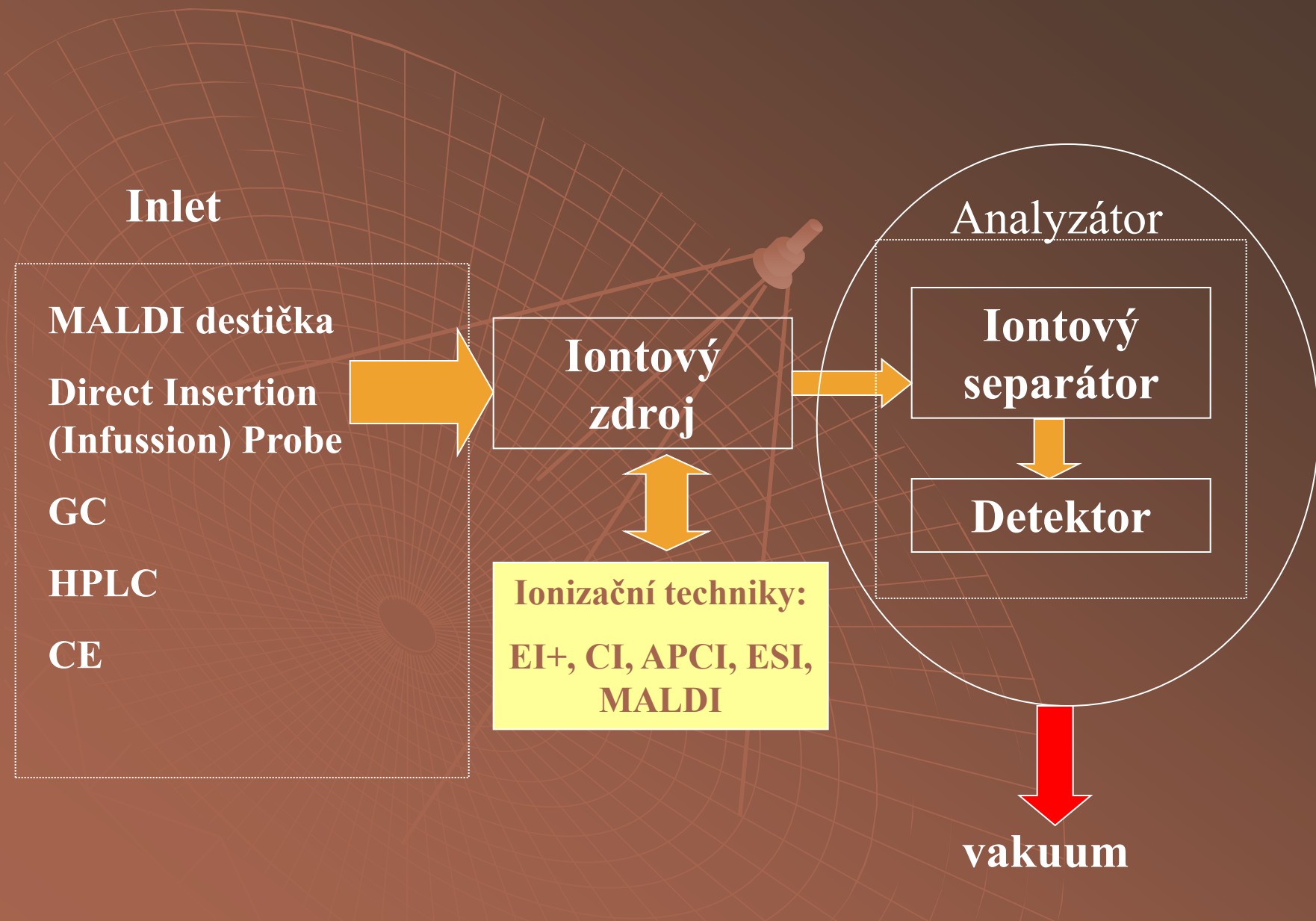
Ionizační techniky:
EI+, CI, APCI, ESI,
MALDI

Analyzátor

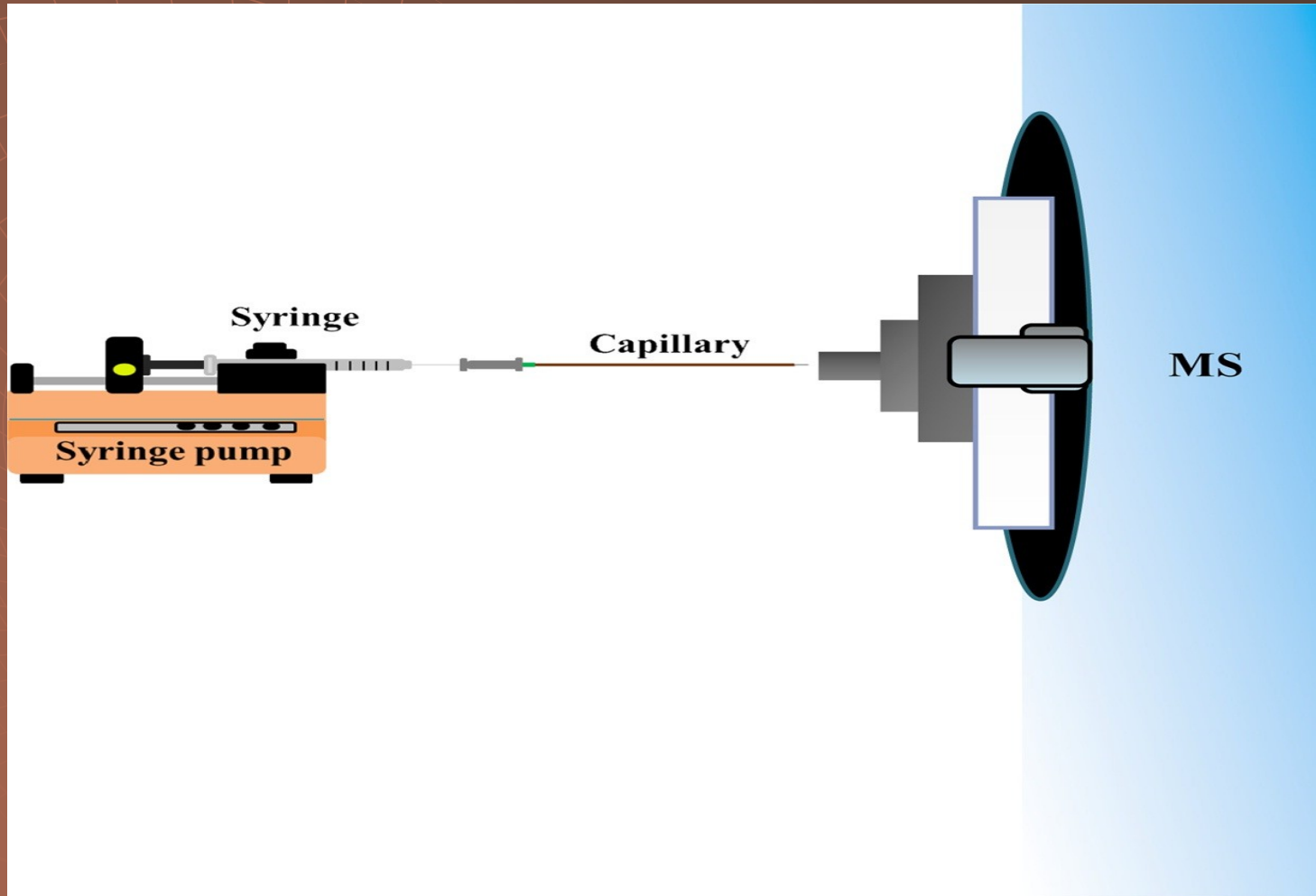
Iontový
separátor

Detektor

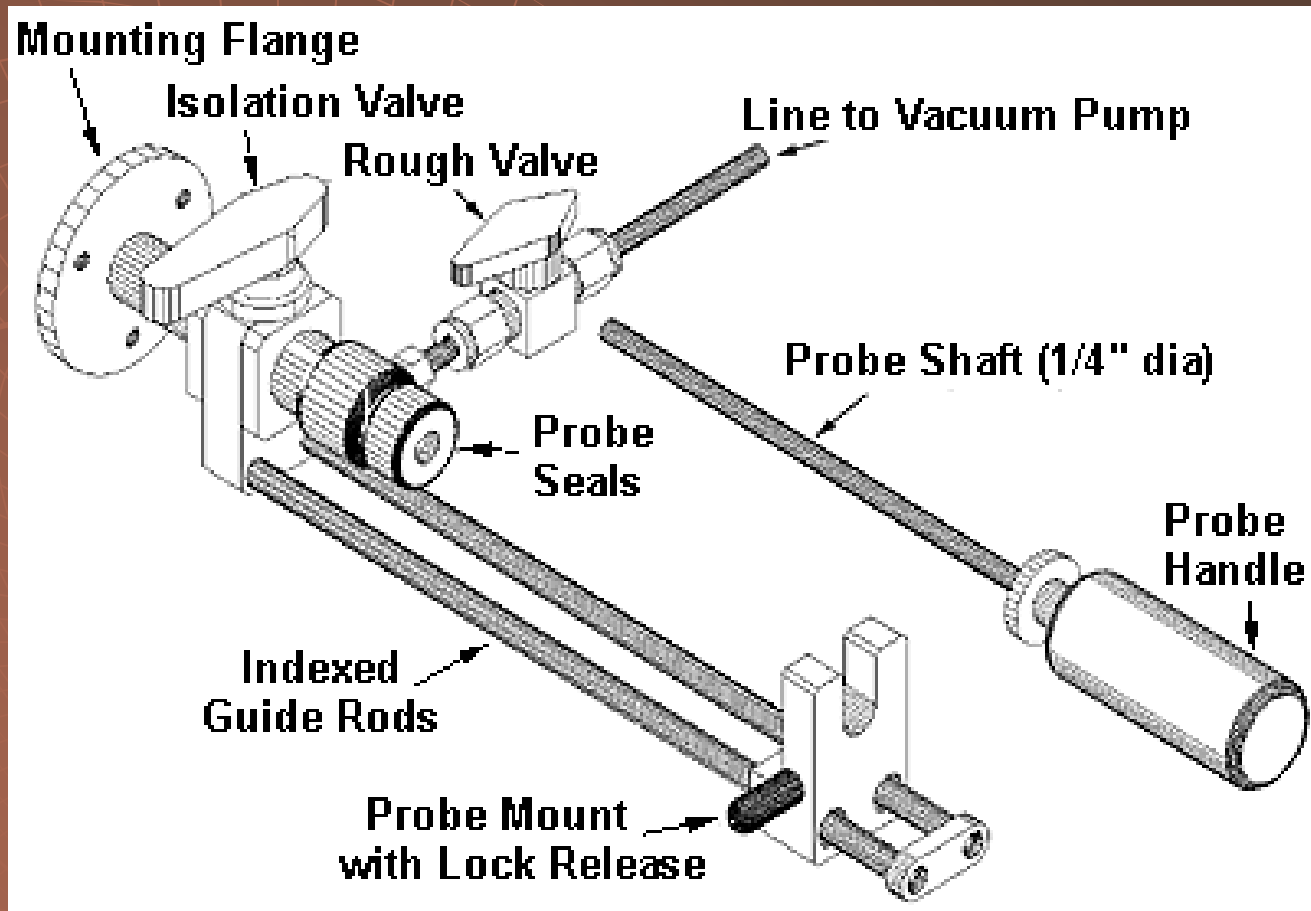
vakuum



Direct infusion



Direct probe



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

HPLC/MS

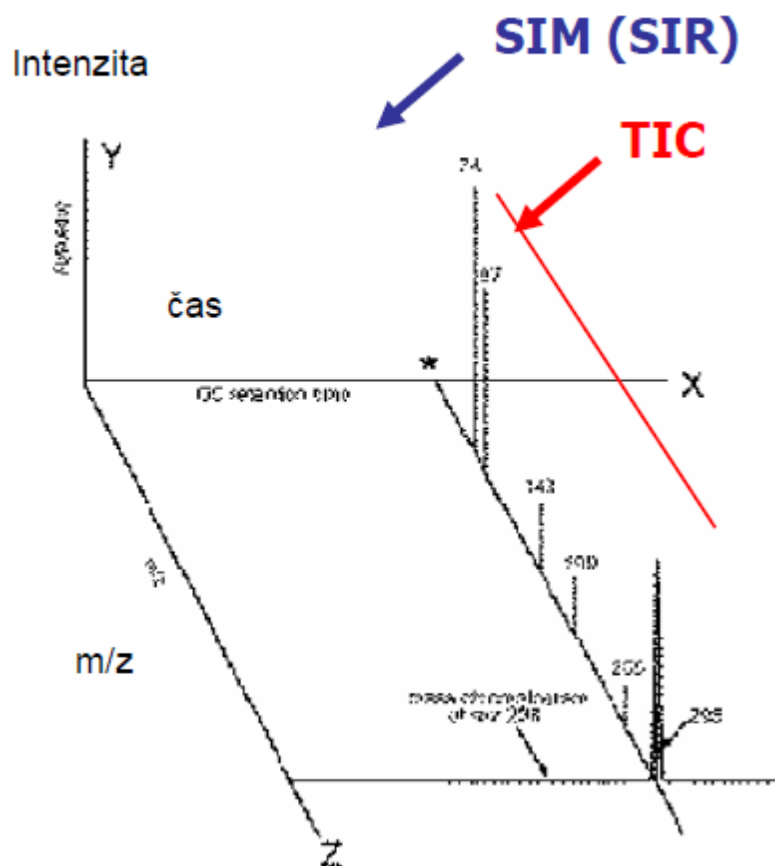
- Spojení HPLC později
 - odpaření – velký objem plynu = technický problém
 - řešení – API zdroje (APCI, APPI, ESI)
- Instrumentace
 - iontové zdroje: APCI, APPI, ESI
 - analyzátory: Q, IT, orbitrap, TOF
- Analyty:
 - od malých molekul po biopolymery
 - od málo polárních po iontové
 - omezeně kompatibilní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

CE/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

MS detekce

Režimy snímání dat:
MS experiment



Full SCAN (Total Ion Current TIC) → cyklicky se snímá celé MS spektrum požadovaného rozsahu m/z

Rekonstruovaný chromatogram (RIC) → z TICu se vybere požadovaný ion a vykreslí se chromatografický záznam

Selected Ion Monitoring (SIM) → cyklicky se snímají jen vybrané ionty → citlivější než TIC režim

např. u kvadrupolu detegované absolutní množství analytu činí:
→ TIC řádově ng (10^{-9} g)
→ SIM řádově pg (10^{-12} g) až fg (10^{-15} g)

Product Ion Scan: Q1: izolace iontu (SIM) Q2: fragmentace iontu Q3: TIC detekce

Instrumentace: Triple Quad, Q-ToF (MS^2); Ion Trap (až MS^{10}) s vyšším MS^n klesá citlivost!

Precursor Ion Scan: Q1:TIC ($m/z_1 - m/z_2$) Q2: fragmentace iontu Q3: SIM detekce

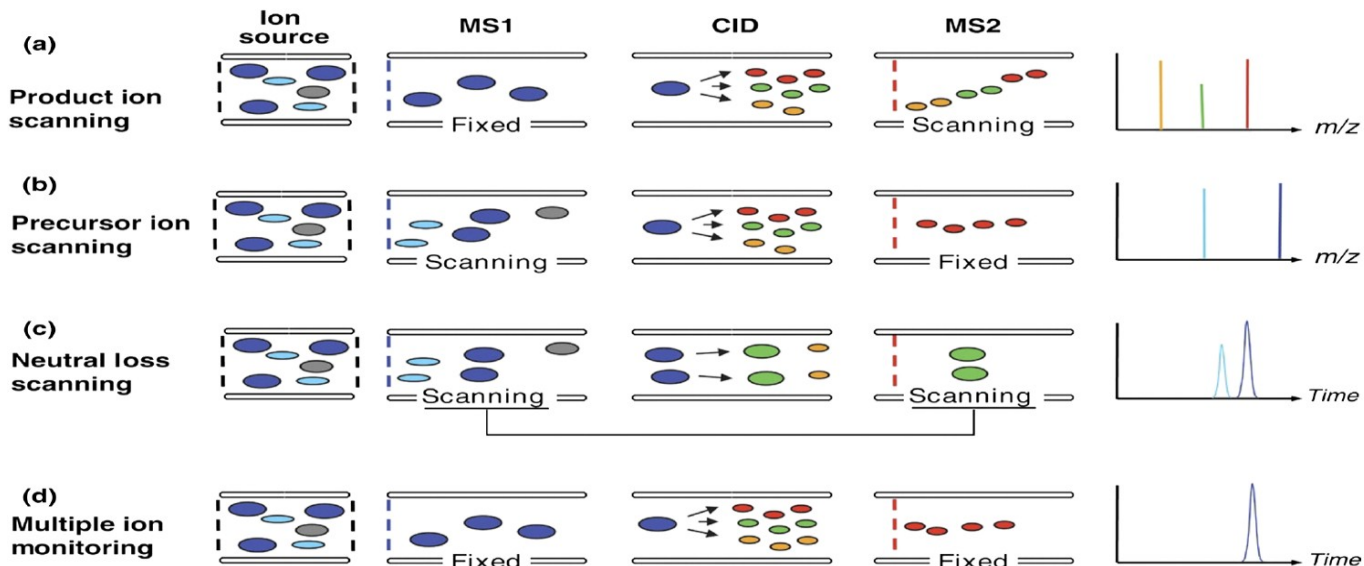
Instrumentace: nelze na Ion Trap

Constant Neutral Loss Scan: Q1:TIC ($m/z_1 - m/z_2$) Q2: fragmentace iontu

Q3: TIC ($(m/z_1 - \Delta N) - (m/z_2 - \Delta N)$) detekce; ΔN – rozdíl hmotností iontů – hmotnost odpadající neutrální částice z iontu *Instrumentace: nelze na Q-ToF a Ion Trap*

Selective Reaction Monitoring (SRM): Q1: izolace iontu (SIM) Q2: fragmentace iontu Q3: SIM detekce

Fragmentace probíhá srážkou iontů s molekulami kolizního plynu (Argon)



Aplikace MS

Identifikace sloučenin

Sumární vzorec – téměř absolutně při dostatečně vysokém rozlišení

Identifikace struktury – v závislosti na typu ionizace (možnost fragmentace)

Identifikace porováním spekter - identifikace sloučeniny na základě tvorby a poměru četností iontů o určitých hodnotách m/z (knihovny)

Kvantifikace sloučenin

Univerzální - citlivost se liší podle schopnosti sloučenin poskytovat za daných podmínek ionty

Kvantitativní MS

- výhodou je vysoká selektivita (pro MS/MS experimenty) a citlivost
- je třeba vyvarovat se potlačení odezvy konkurenční ionizací (další látky, matrice)
- důležitá je volba standardu, nezbytné je použití vnitřního (interního) standardu pro potlačení vlivu matrice či kontaminace na účinnost ionizace analytu, použití vnějšího standardu není vhodné a většinou je nepřijatelné

Kvantitativní MS

- nejpřesnější postup je pomocí **izotopicky značeného standardu** analytu
- izotopicky značený standard obsahuje atomy s těžšími izotopy, které způsobují posun m/z ve spektru a tím odlišení signálu od neznačené látky
 - látky mají stejné chemicko-fyzikální vlastnosti
 - nejčastěji deuterace ($2D$), ^{13}C , ^{15}N
 - doporučený posun alespoň $+3$ jednotky m/z
 - vysoká cena izotopicky značených standardů