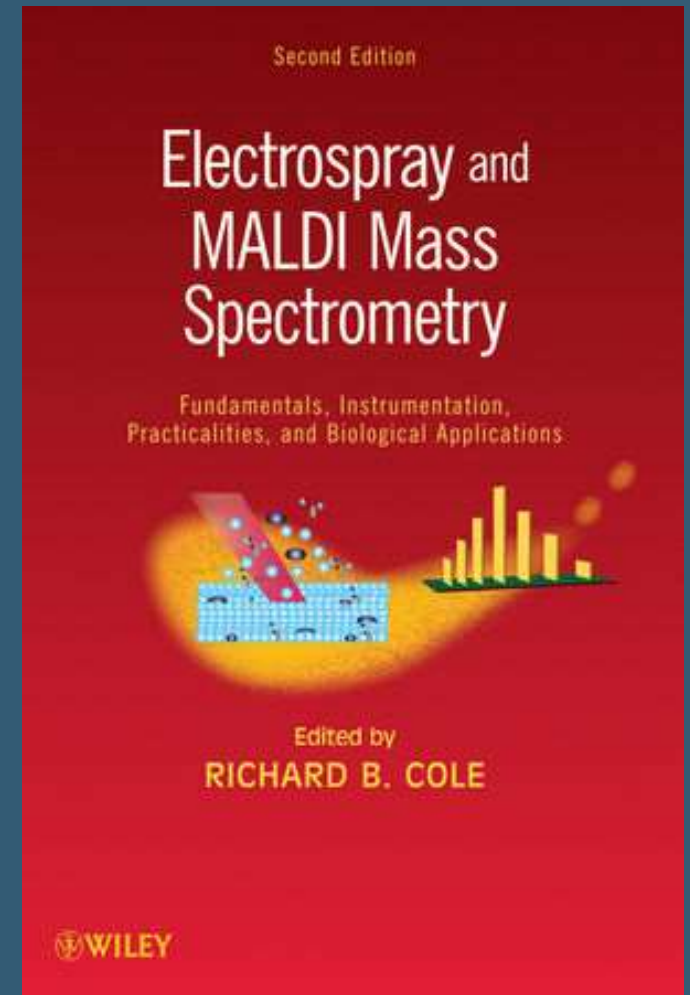
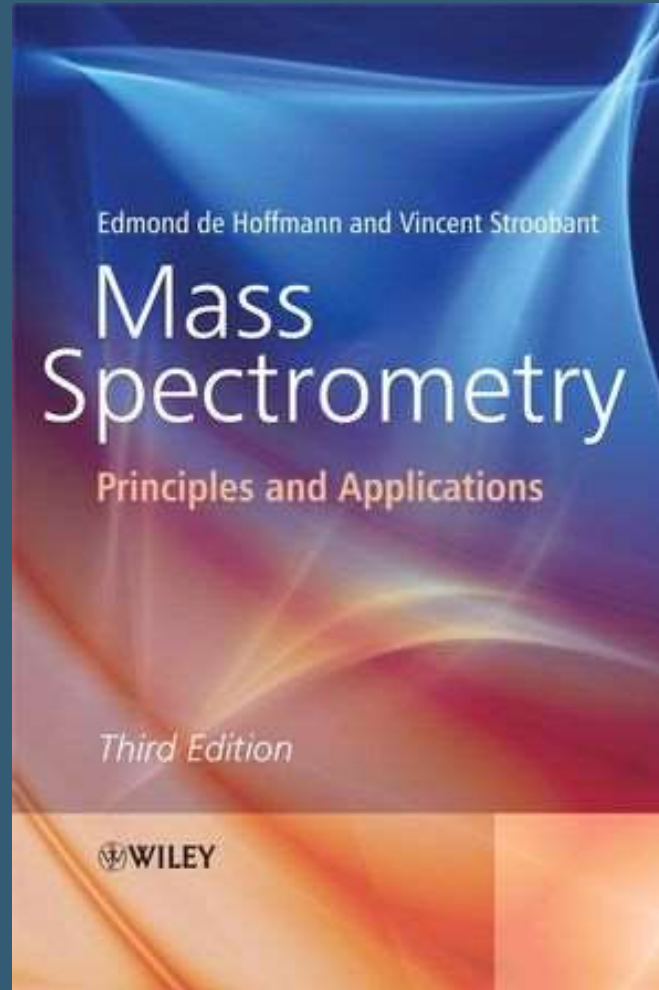
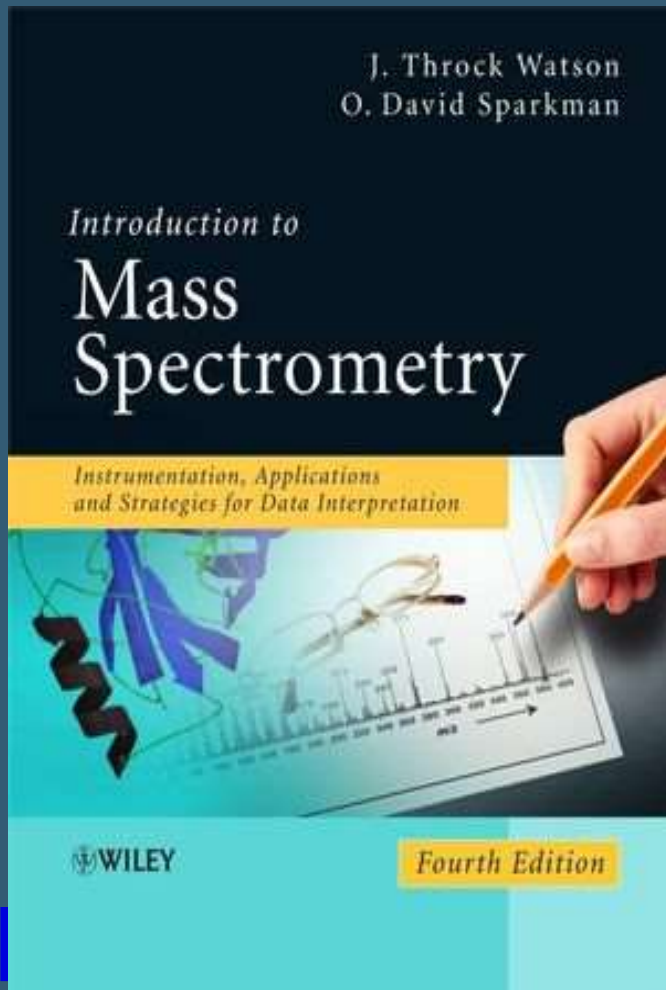


HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

LITERATURA



HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

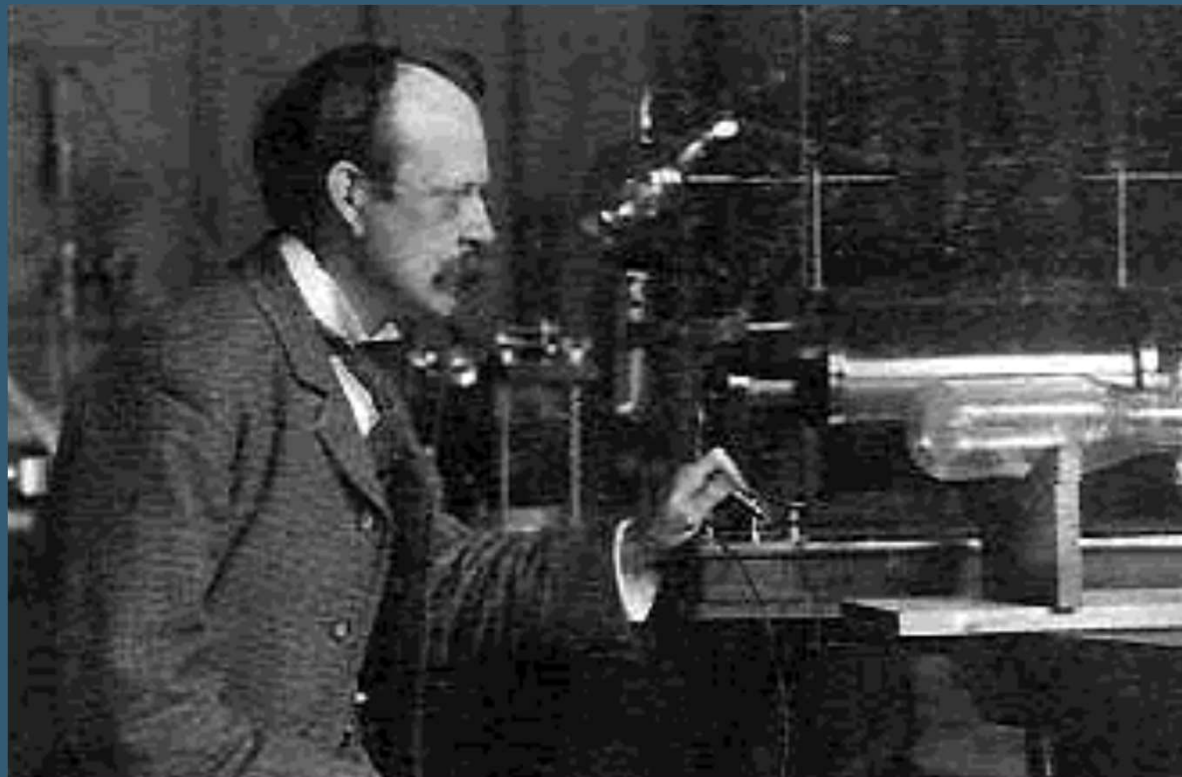
- MS - mimořádně citlivá metoda,
- destruktivní metoda,
- minimální spotřeba vzorku,
- určení MW a dalších strukturních informací.

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
lontová past



1989



HISTORIE HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

▪ 1930 J.B. Fenn

ESI



2002



HISTORIE HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

▪ 1930 K. Tanaka

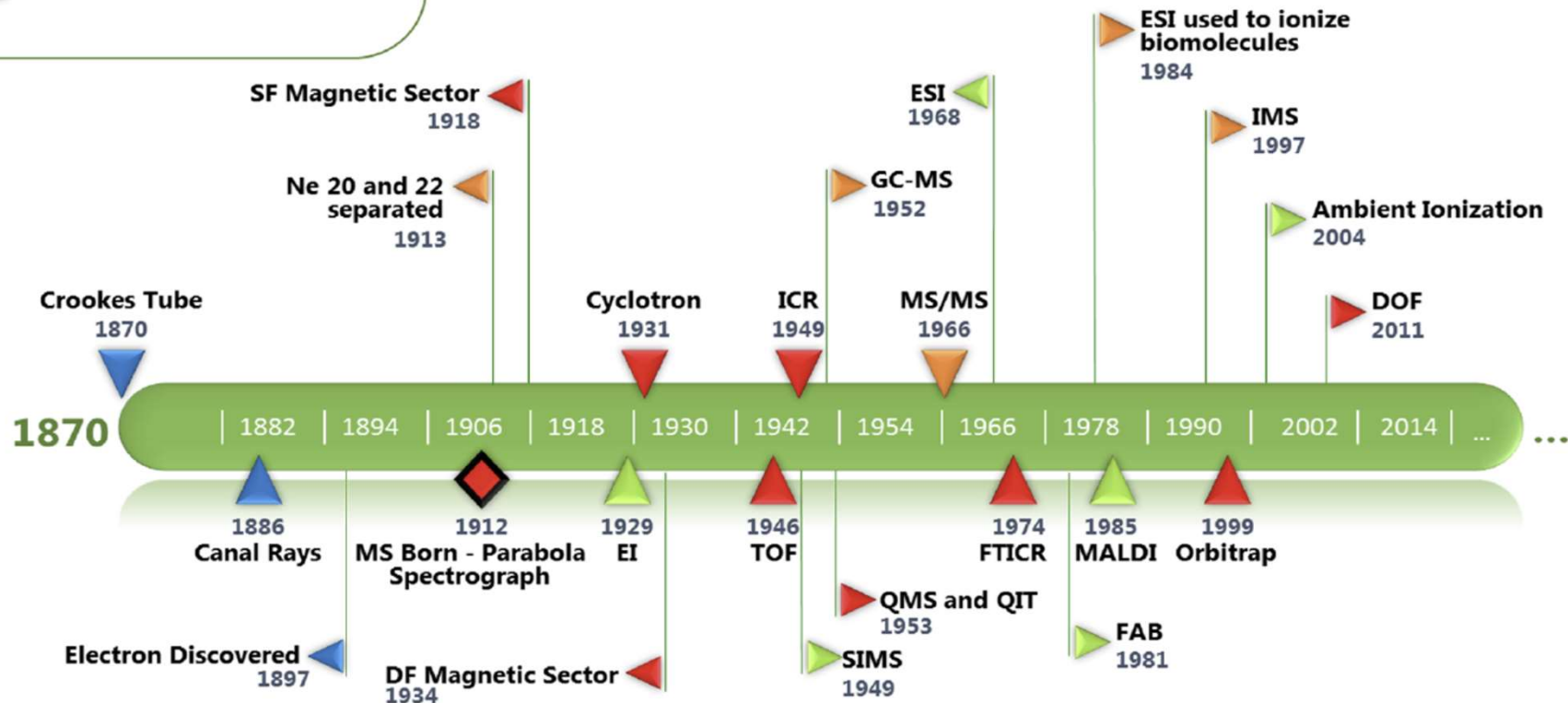
MALDI



HISTORIE HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

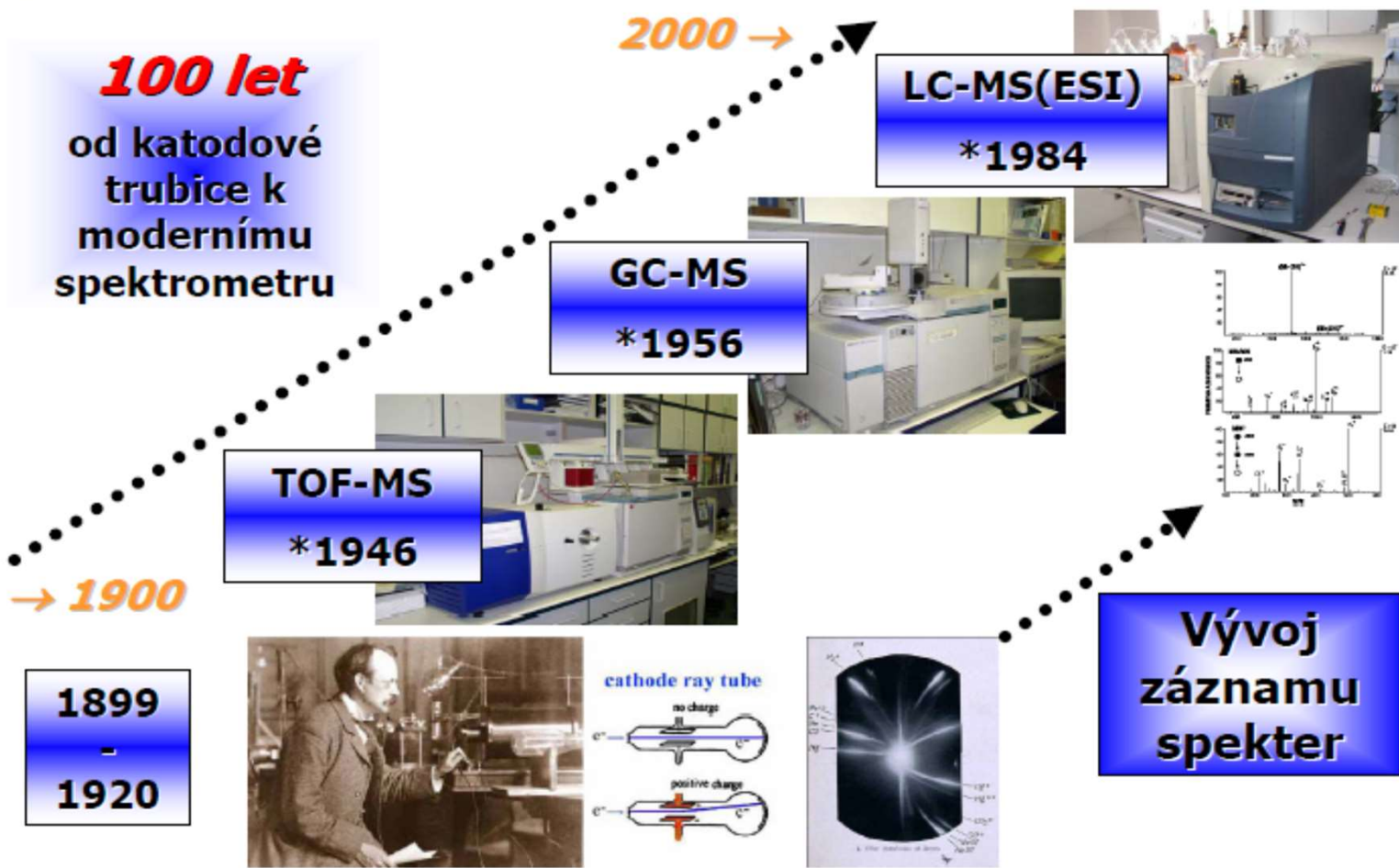
Milestones

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



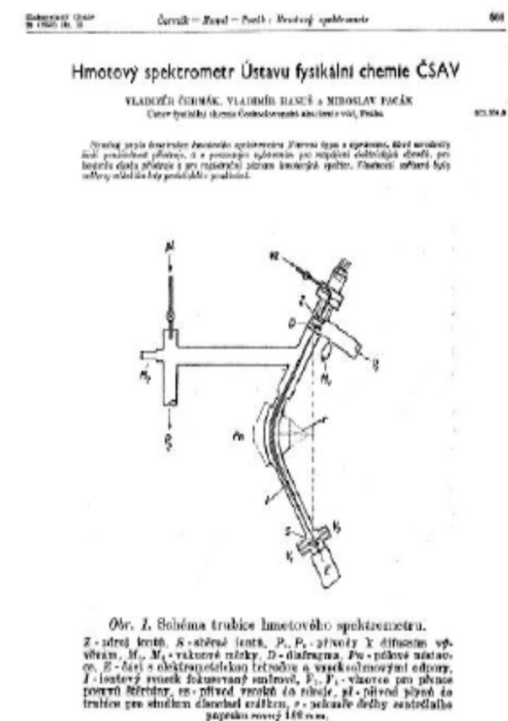
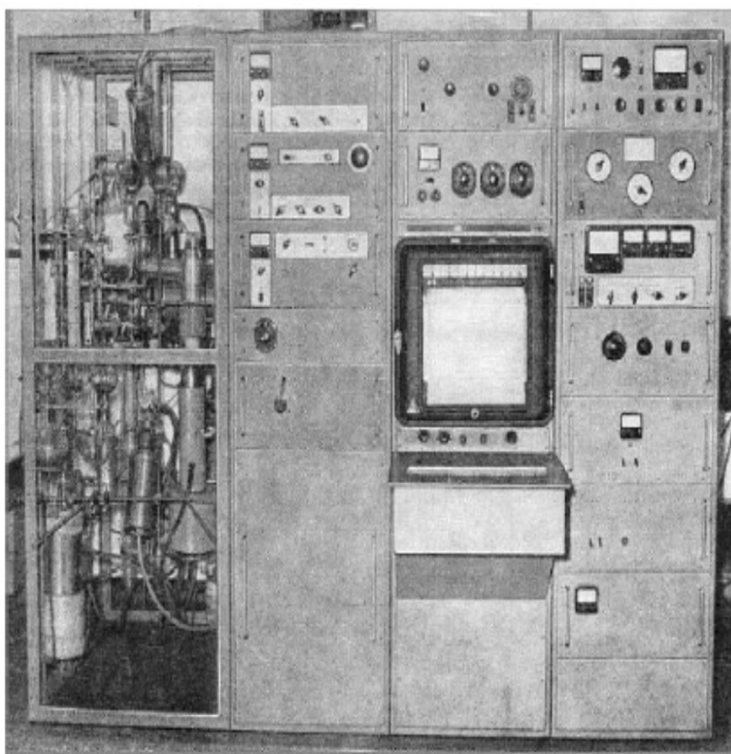
HISTORIE HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Historický vývoj MS - souhrn



PRVNÍ MS V ČR

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



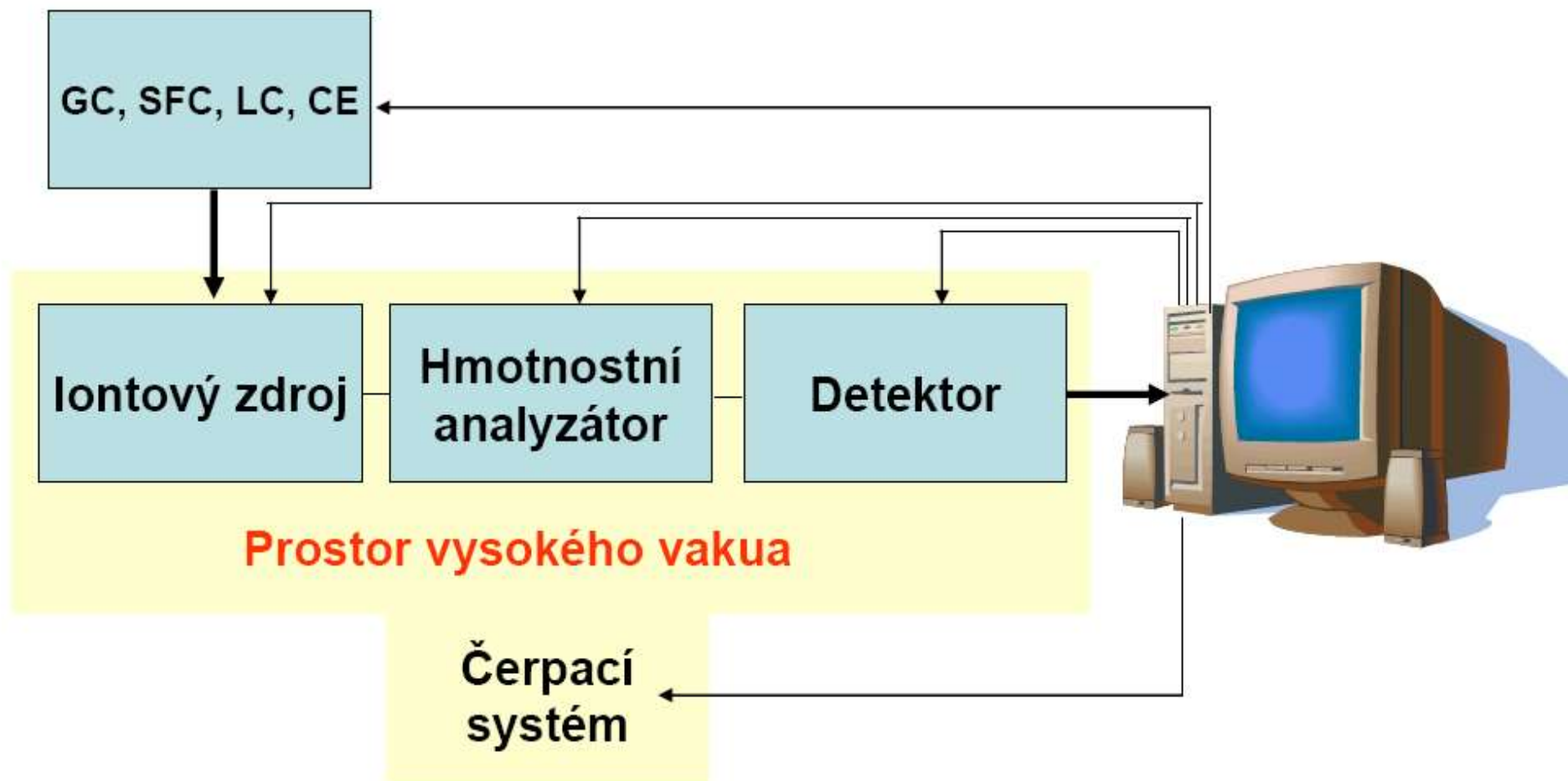
PODSTATA

- analytická metoda sloužící k převedení molekul na ionty (může dojít k jejich fragmentaci)
- **separační technika**
- **rozlišení těchto iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z)**
- **interakci nabitých částic s elektrickým nebo magnetickým polem ve vakuu**

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

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 individuum 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.)

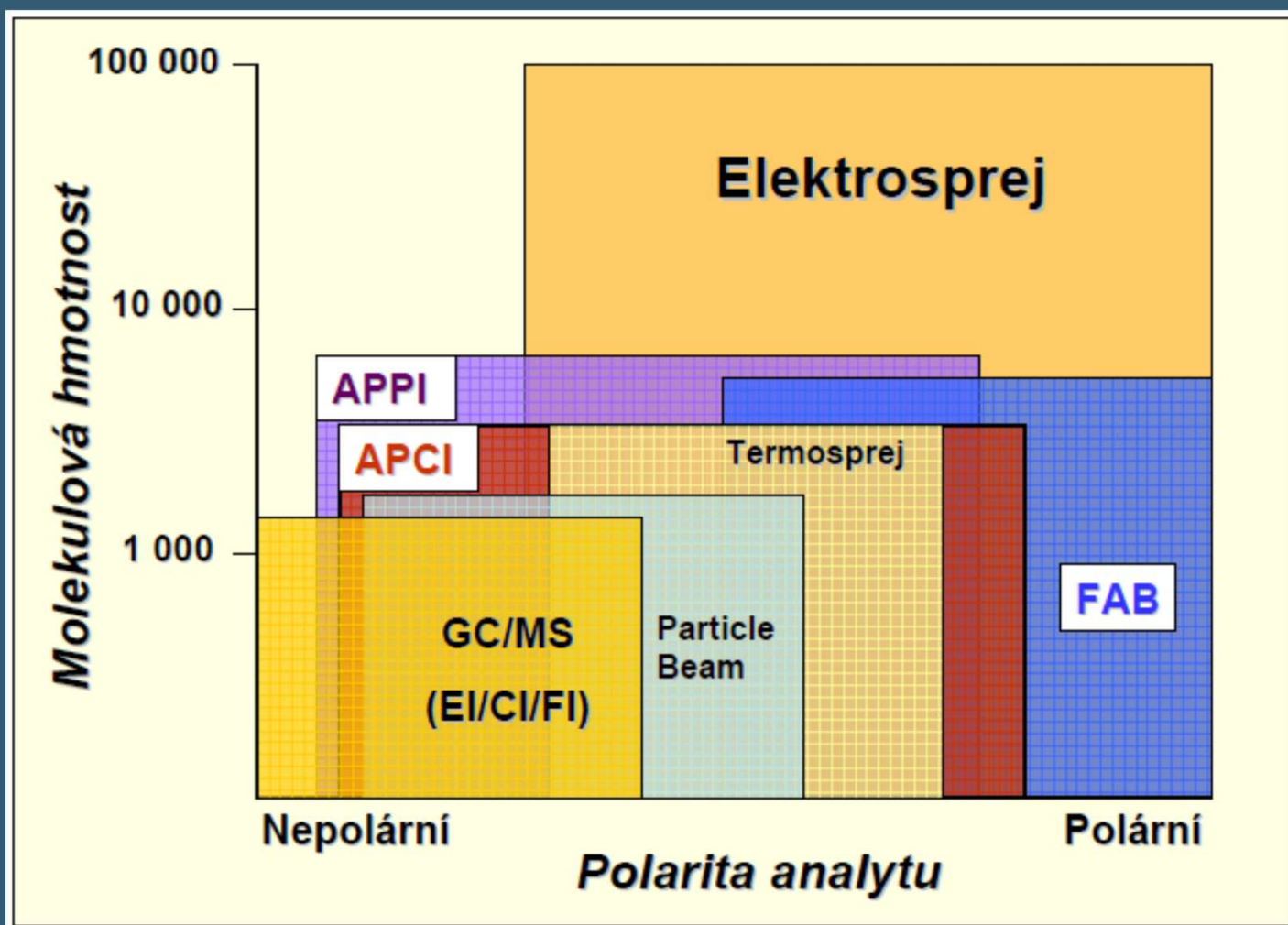
- **záporné ionty** - sulfonové a karboxylové kyseliny, polyhydroxylované látky (snadná deprotonace), tvorba aduktů s jednoduchými anionty (octan, mravenčan, chlorid, apod.)

M

S

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

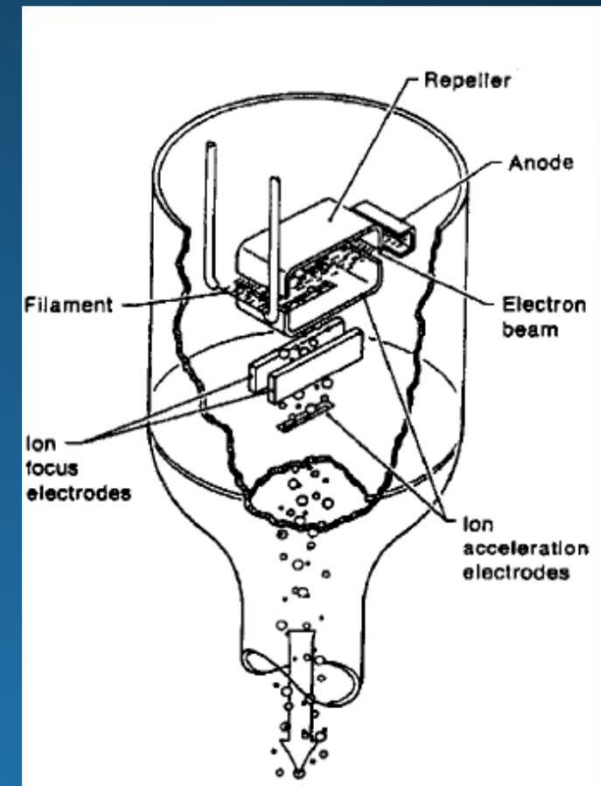
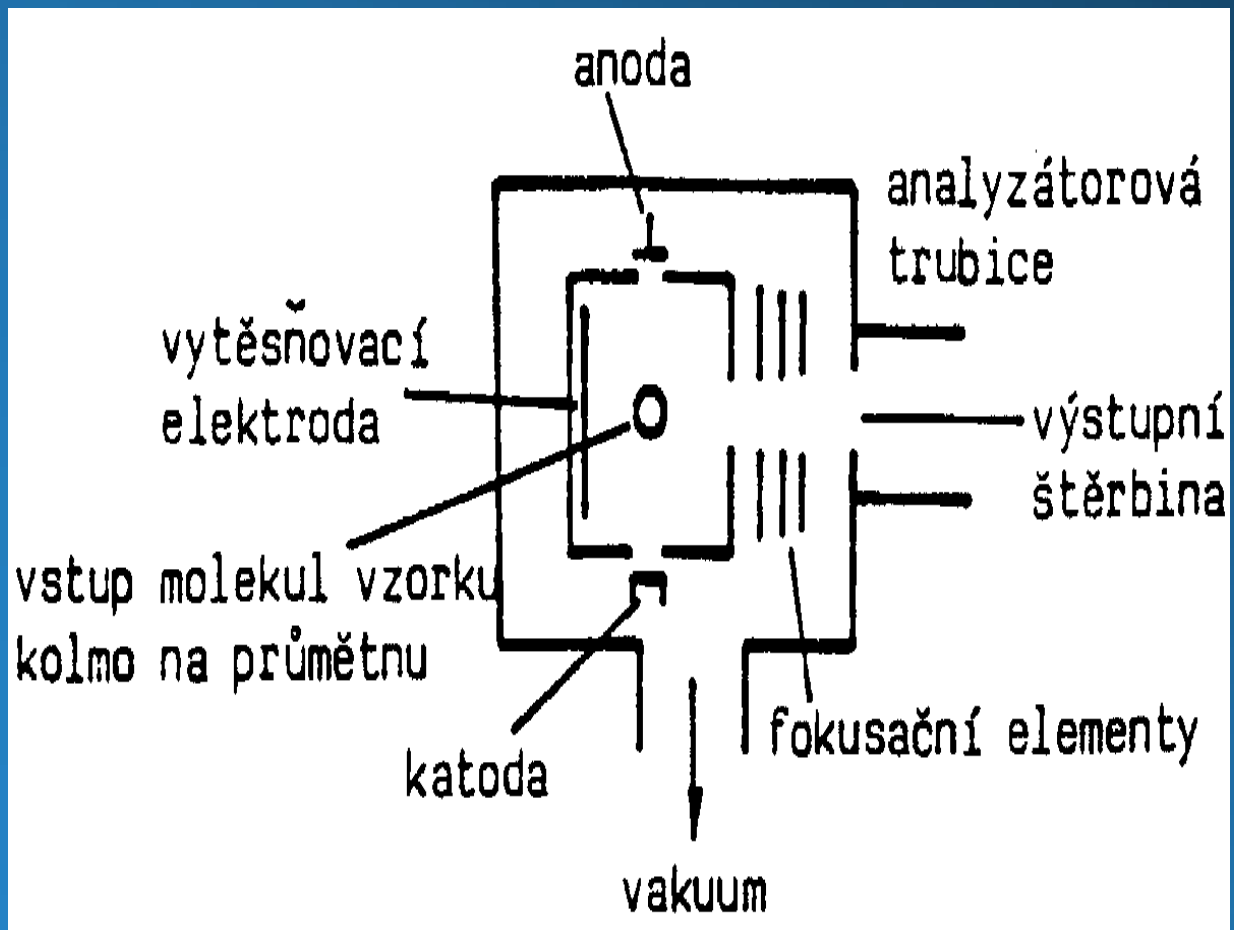
VOLBA IONIZAČNÍ TECHNIKY



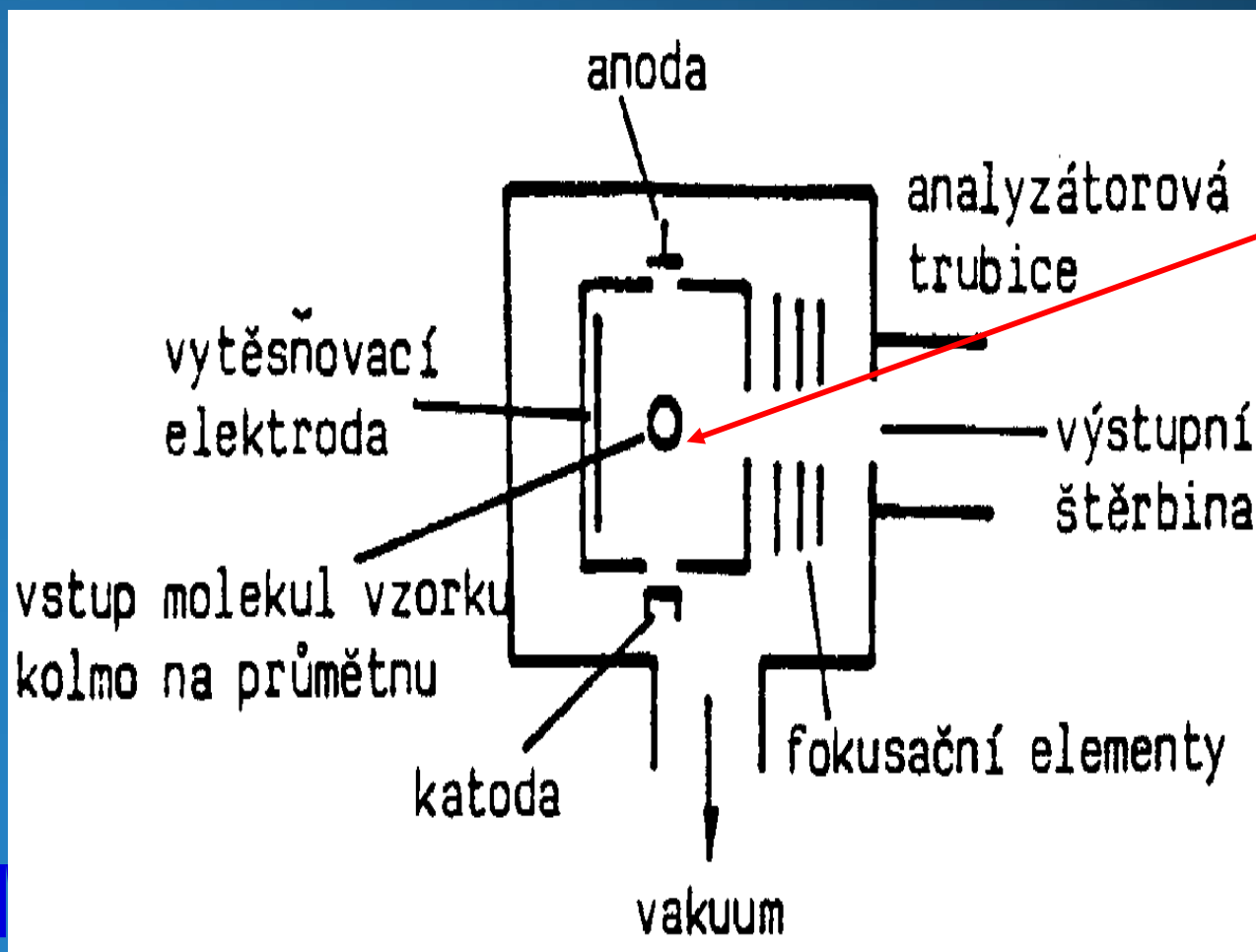
IONIZAČNÍ TECHNIKY

- Tvrdé ionizační techniky
 - EI $M + e^- \rightarrow M^{\cdot+} + 2e^-$
- Jemné ionizační techniky
 - CI $[M-H]^+$
 - ESI $[M+H]^+$
 - MALDI $[M-H]^-$

ELECTRON IMPACT (EI)

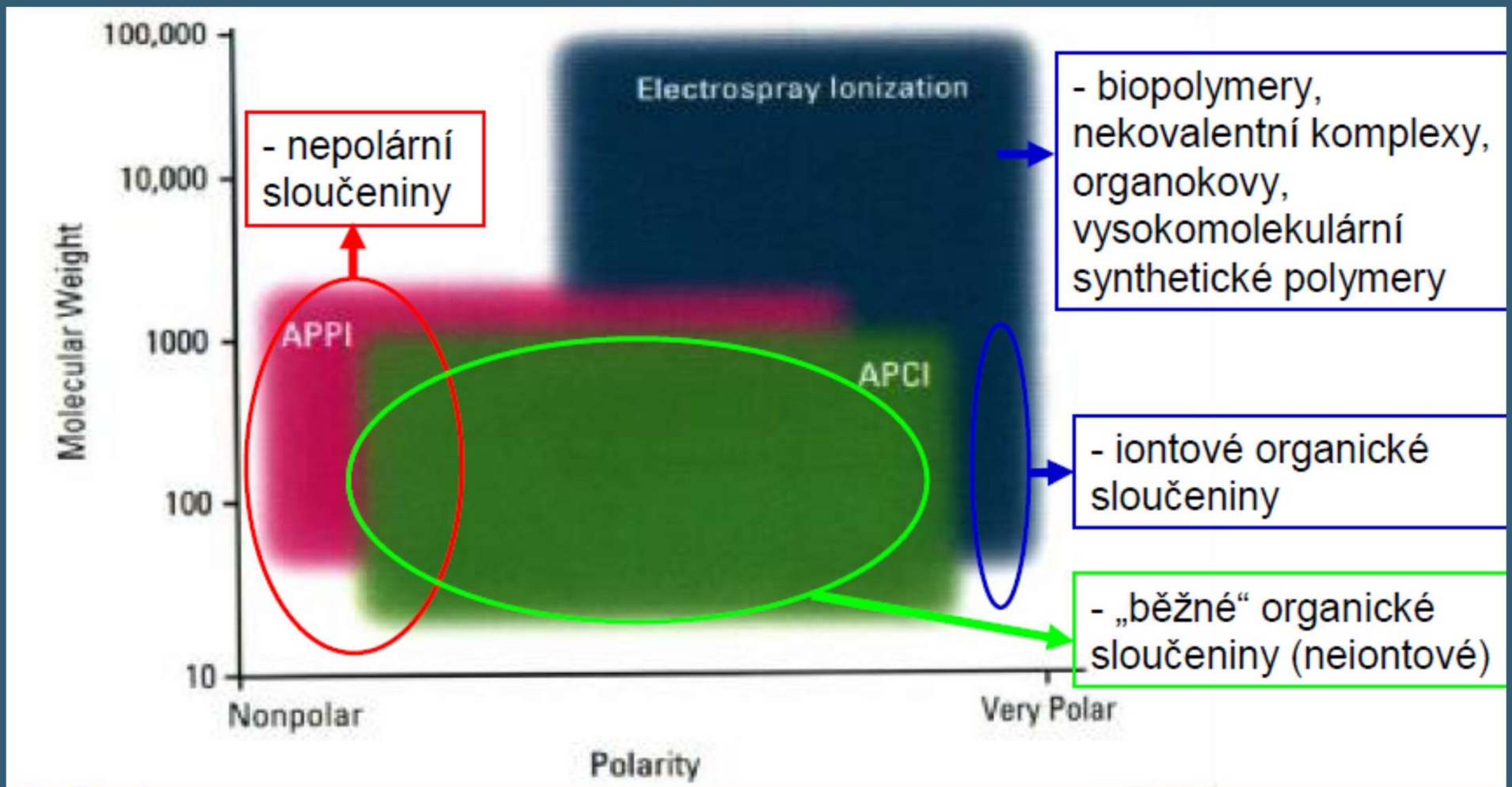


CHEMICKÁ IONIZACE (CI)

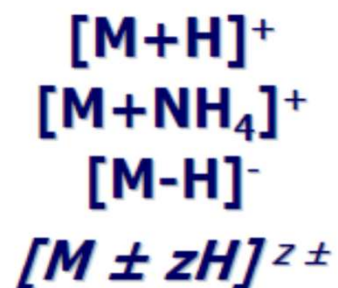
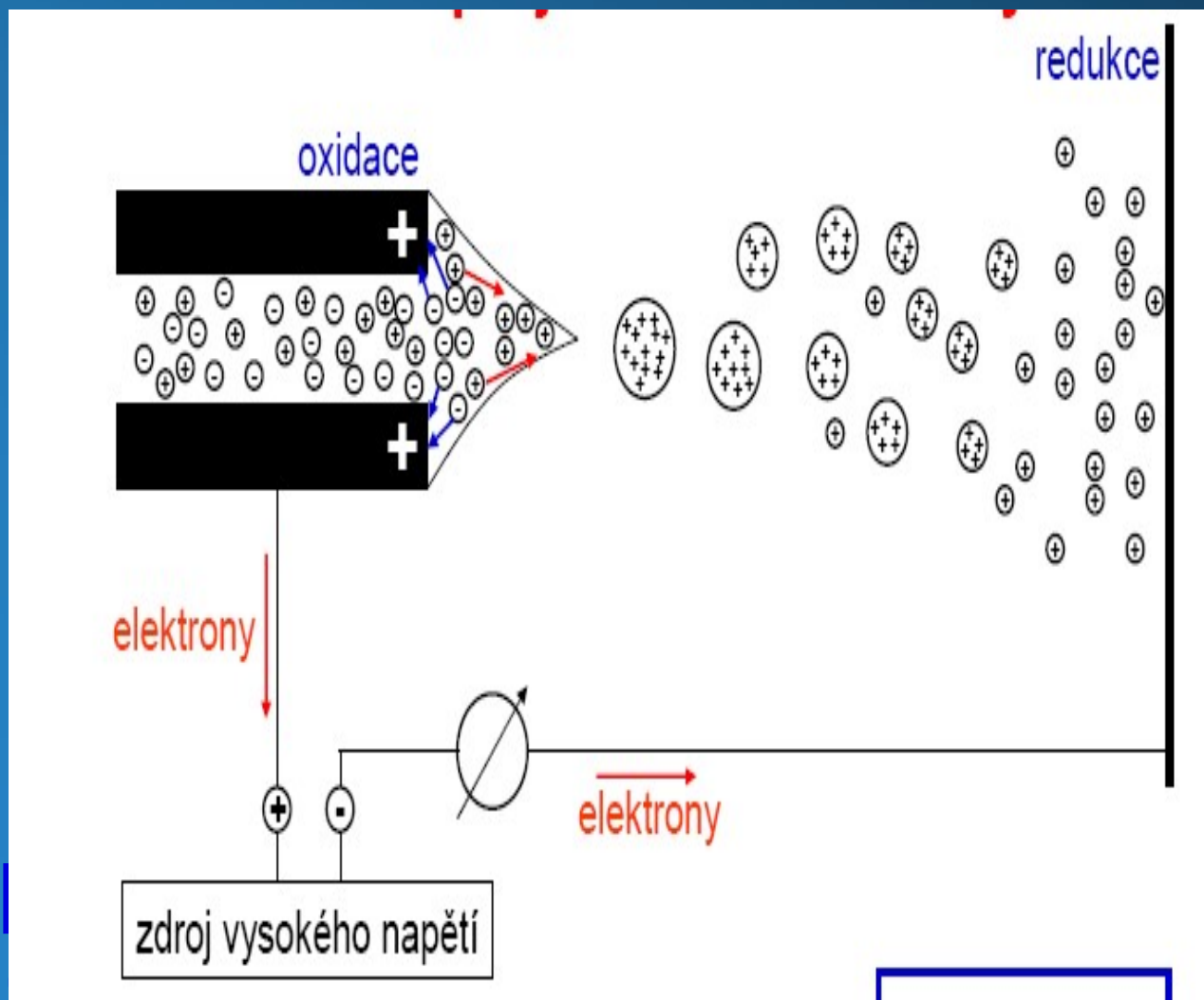


Reakční plyn 100 Pa
Plyn : vzorek 10⁴ : 1
methan, isobuthan,
ammoniak

IONIZACE ZA ATMOSFÉRICKÉHO TLAKU



ELECTROSPRAY (ESI)



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

Napětí: 2 - 8 kV

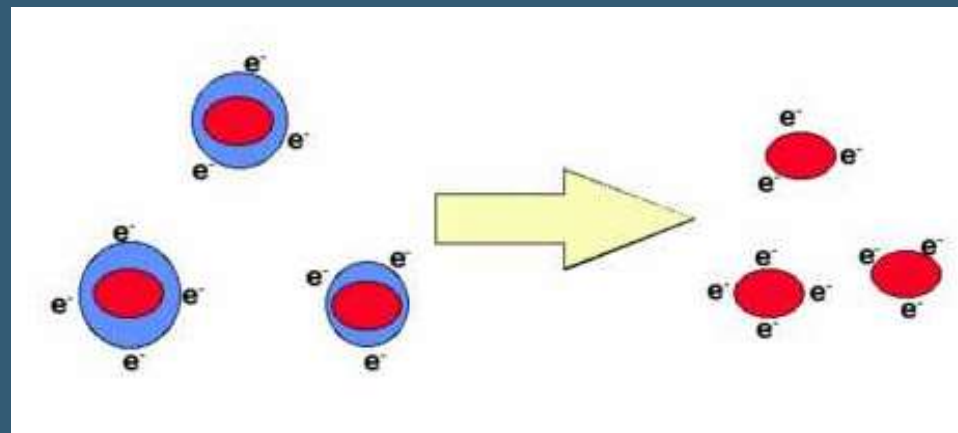
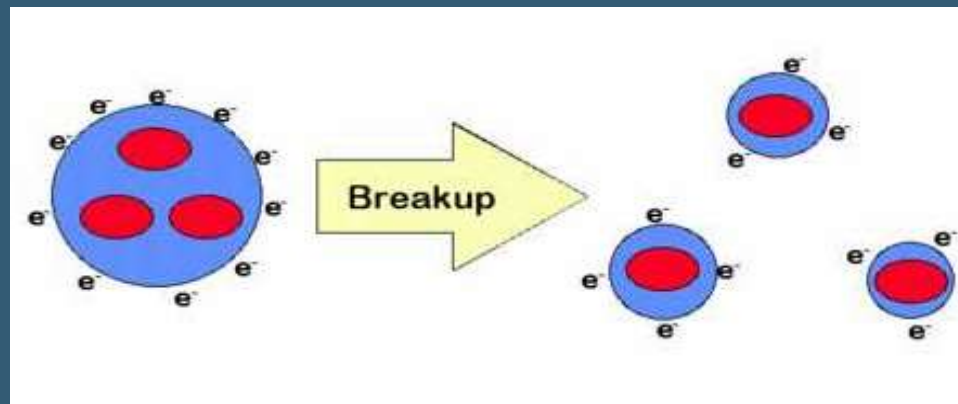
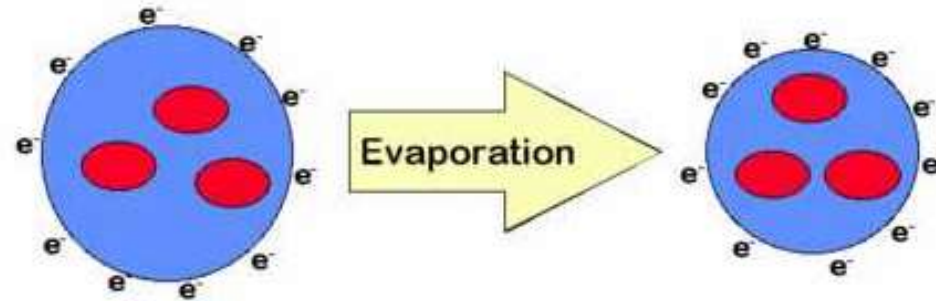
Průtok m. f. 0,001 - 1 ml/min

Ionizace za
atmosférického tlaku

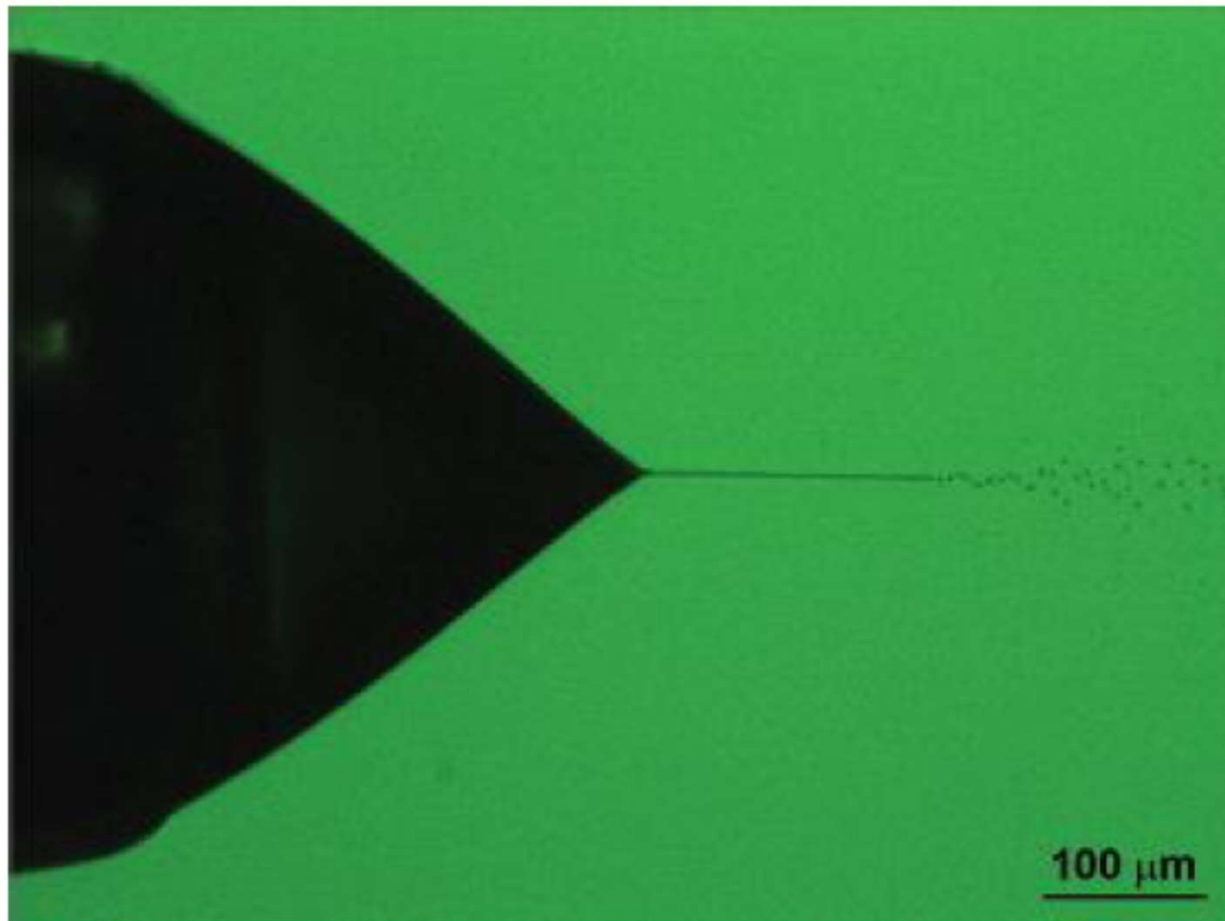
*Těkavé přísady: octan amonný,
mravenčí k.*

*Netěkavé přísady: fosfátové
pufrы*

IONIZACE



TAYLORŮV KUŽEL



- Podmínky: 50% methanol – voda, 2 ml/min, 4 kV

- P. Nemes a kol., Anal. Chem. 79 (2007) 3105

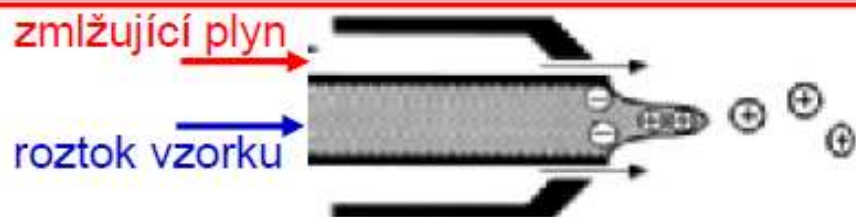
ESI - ZMLŽOVÁNÍ



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

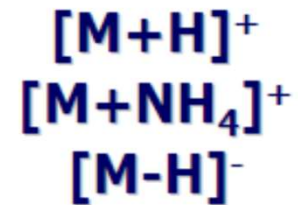
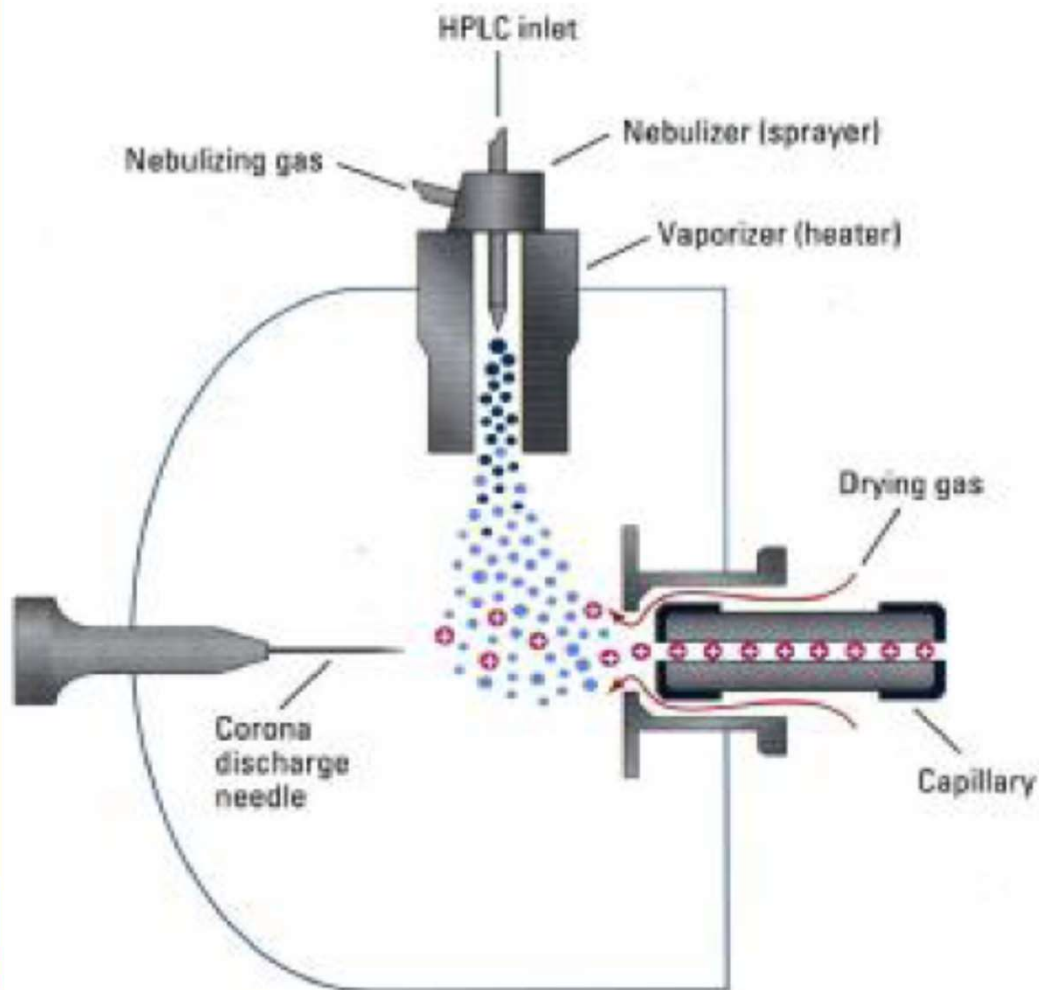


B/ elektrosprej roztoku analytu s
přídavným tokem kapaliny
(vodivé spojení pro CZE/MS, podpora
ionizace, např. přídavek NH_4^+ pro
preferenční tvorbu aduktů $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$)



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

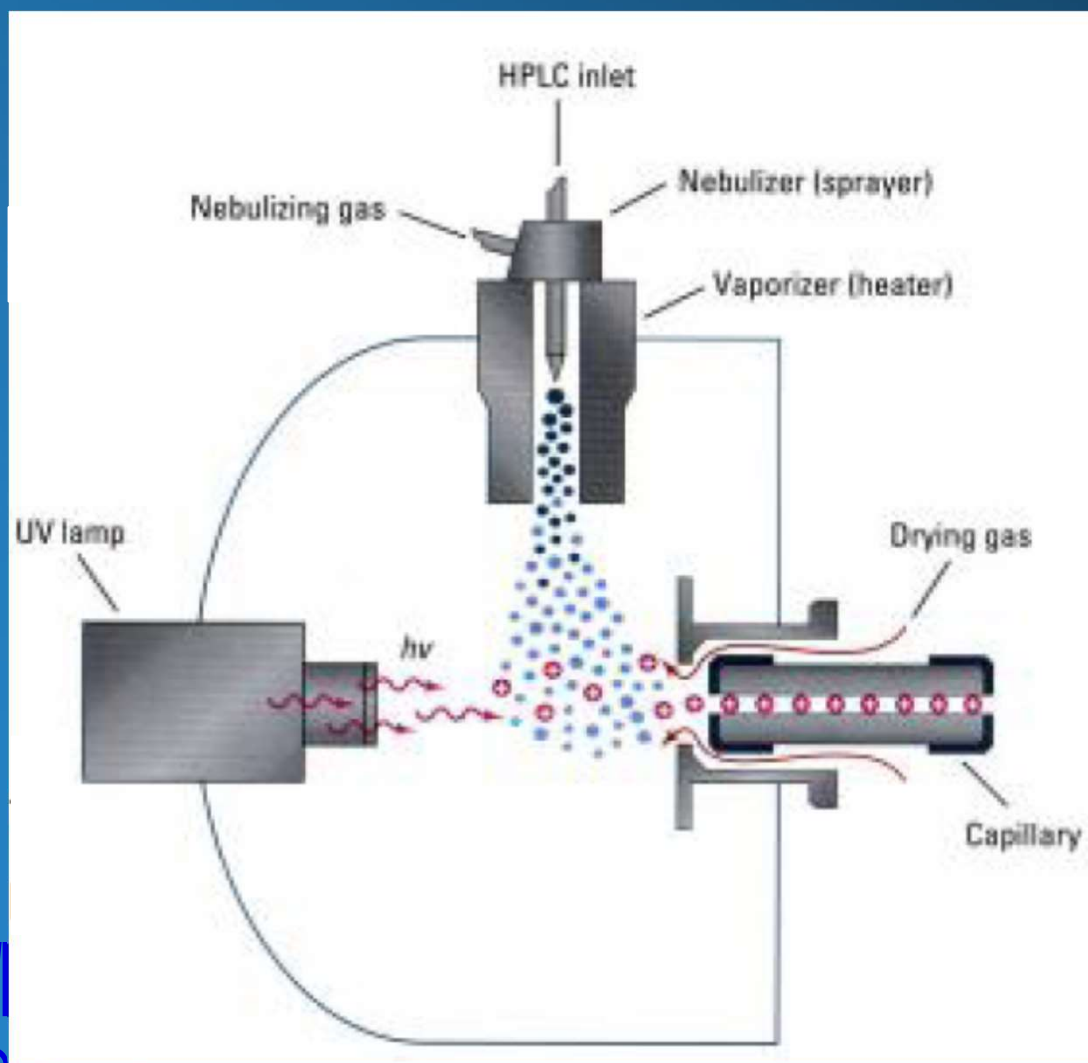
Průtok m. f. 0,2 - 2 ml/min

Ionizace za
atmosférického tlaku

*Těkavé přísady: octan amonný,
mravenčí k.*

*Netěkavé přísady: fosfátové
pufry*

FOTOIONIZACE ZA ATMOSFERICKÉHO TLAKU (APPI)



$[M+H]^+$

$[M+NH_4]^+$

$[M-H]^-$

$([M \pm zH]^{z \pm})$

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

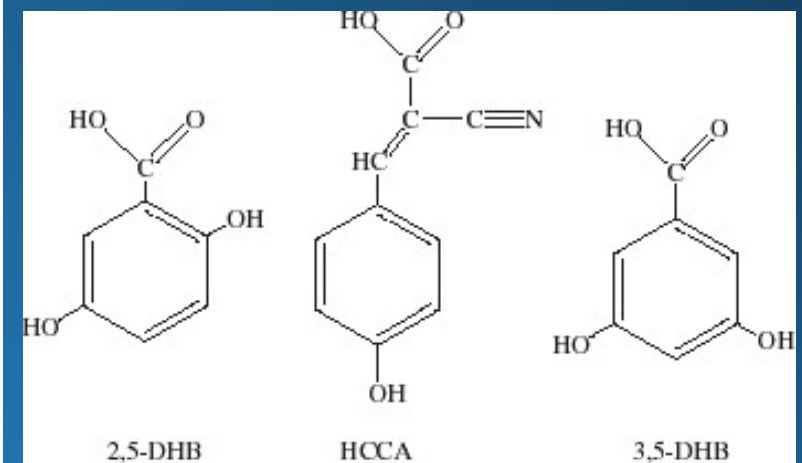
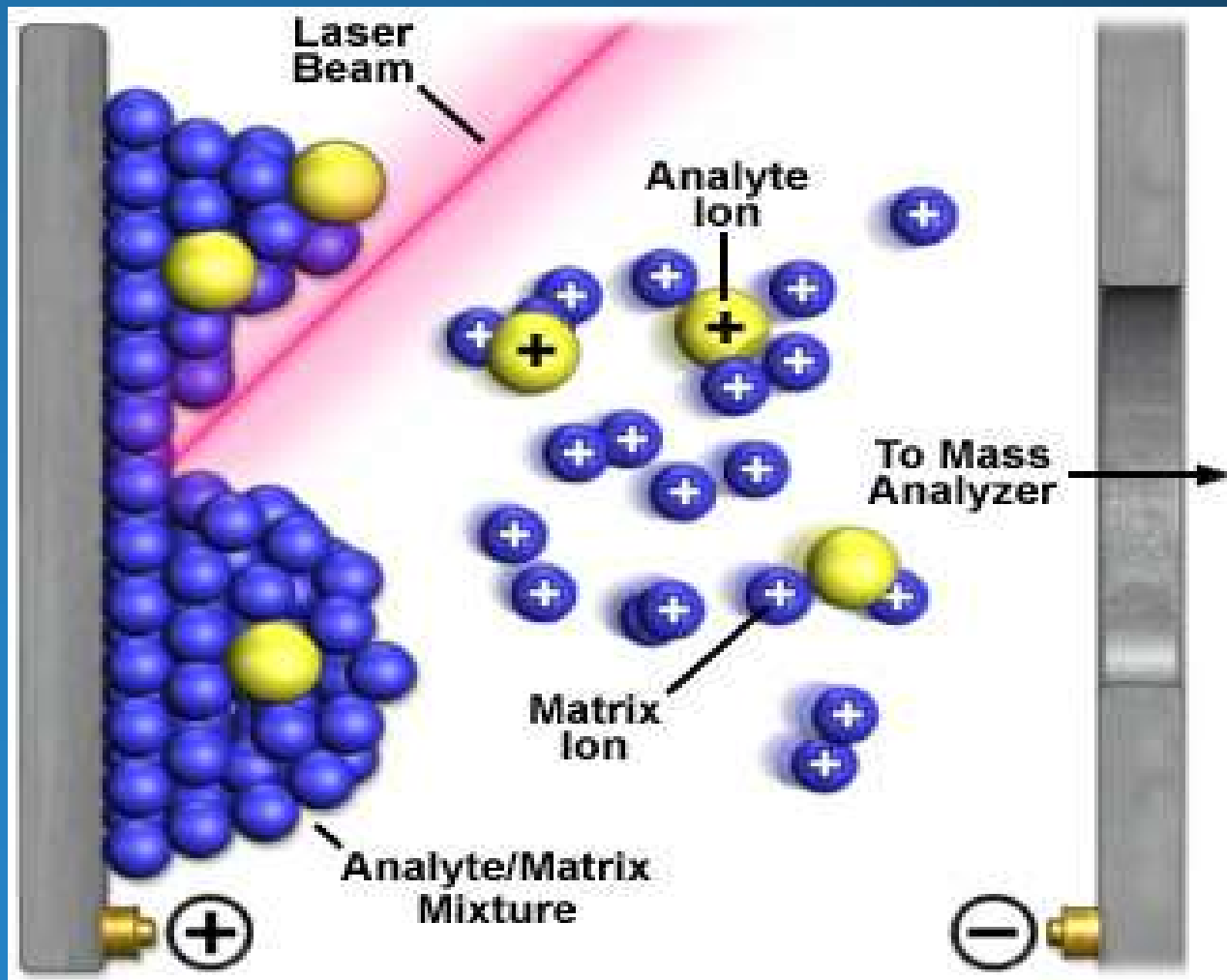
UV záření $\approx 10 \text{ eV}$

průtok m. f. 0,2 - 2 ml/min

Ionizace za
atmosférického tlaku

Dopant: toluen, benzen (citlivost \uparrow)

MATRIX ASSISTED LASER DESORPTION IONISATION (MALDI)



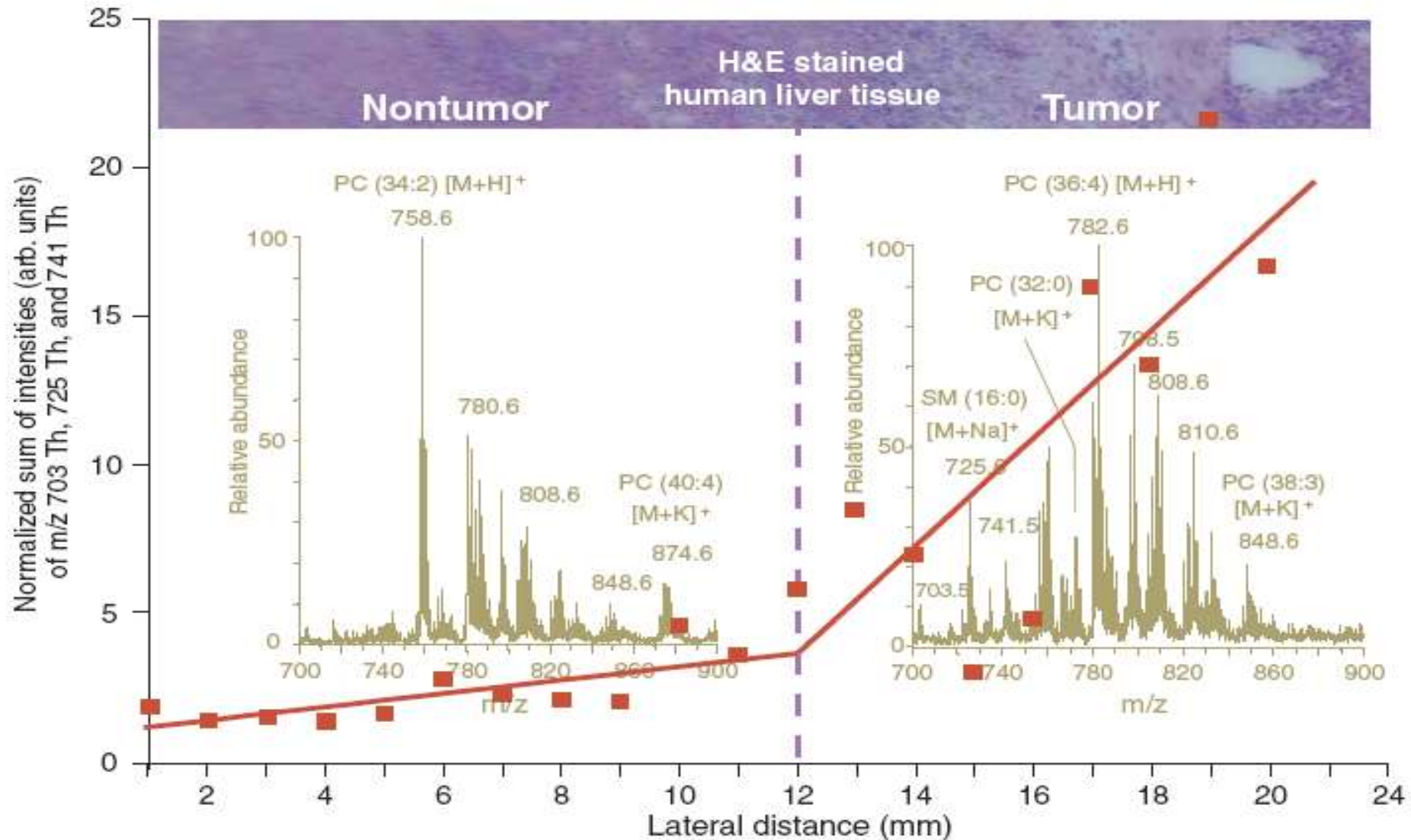
MATRIX ASSISTED LASER DESORPTION IONISATION (MALDI)



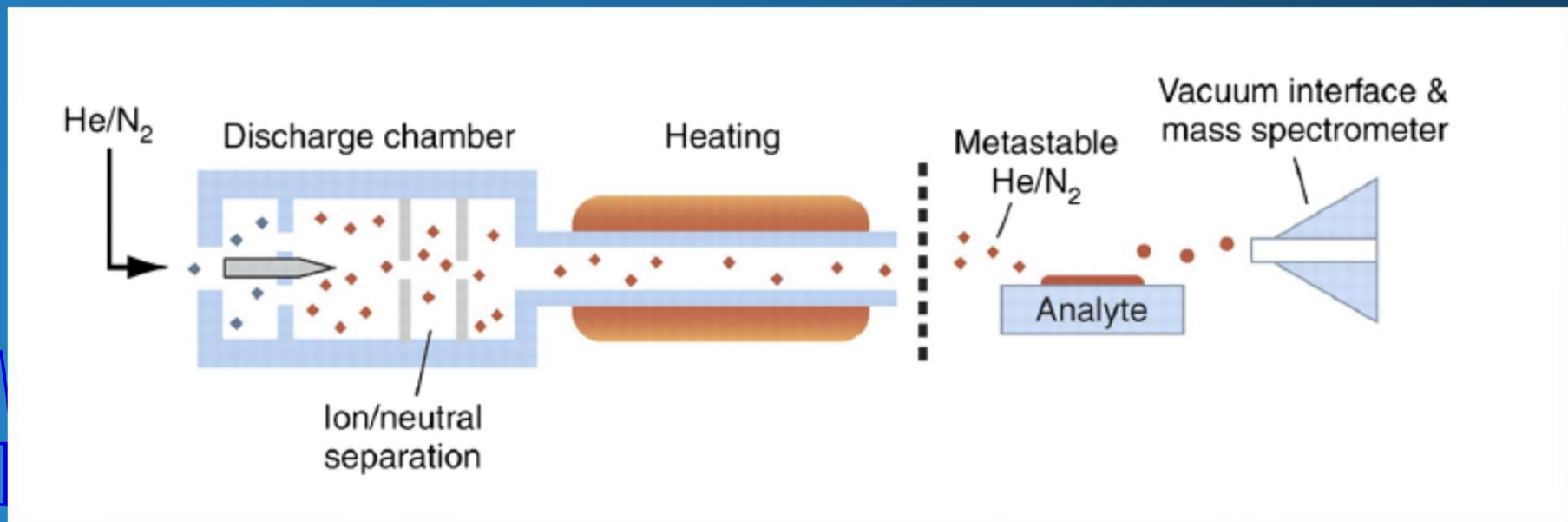
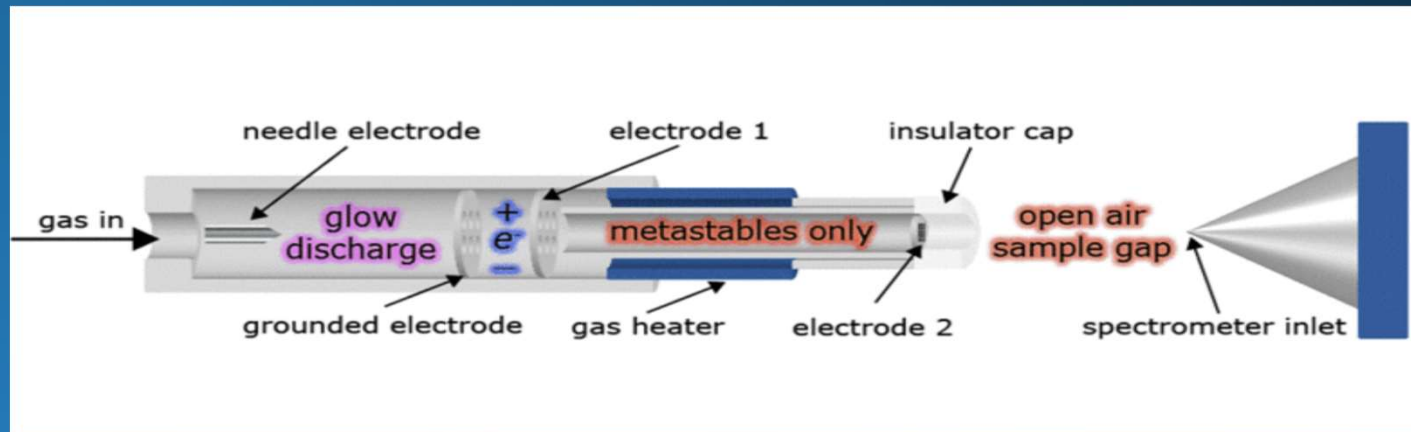
DESORPČNÍ IONIZACE ELEKTROSPRAYEM (DESI)



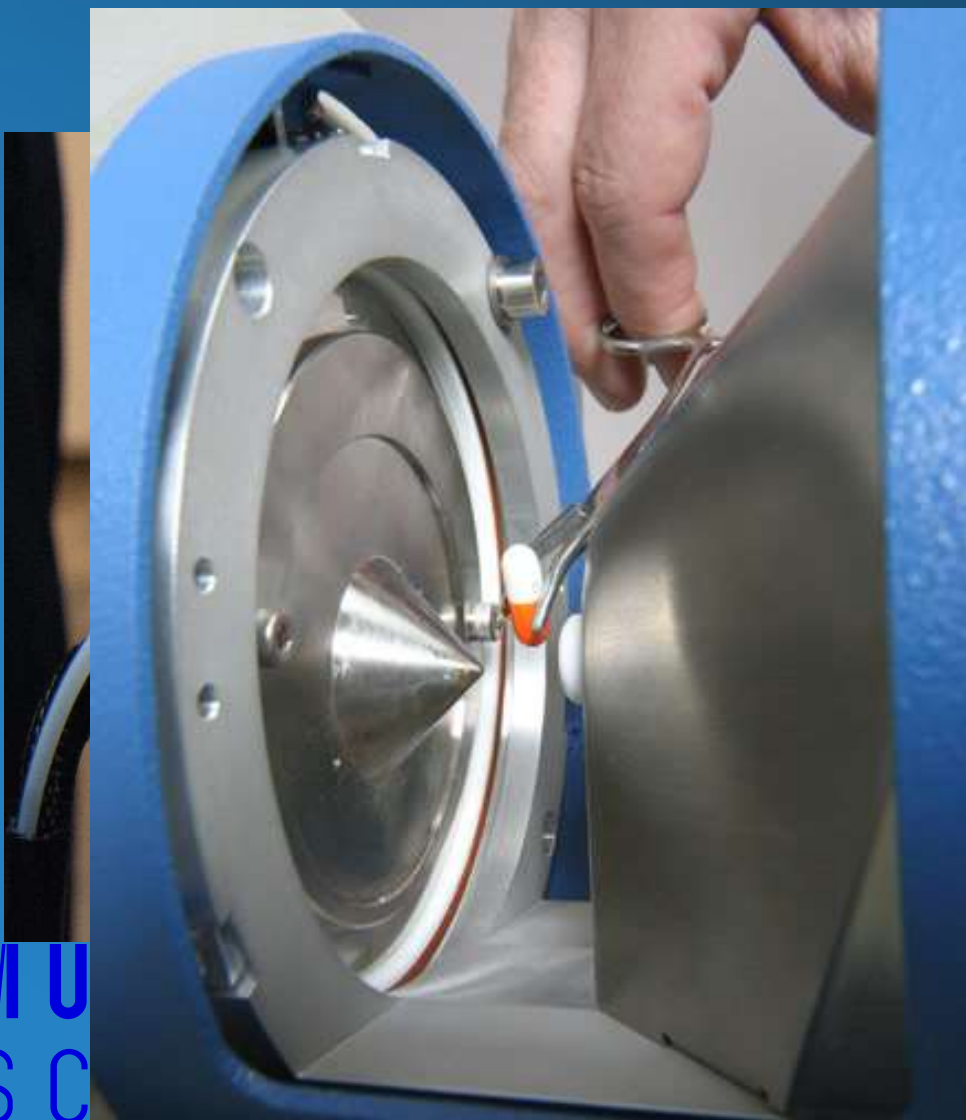
DESORPČNÍ IONIZACE ELEKTROSPRAYEM (DESI)



PŘÍMÁ IONIZACE V REÁLNÉM ČASE (DART)



PŘÍMÁ IONIZACE V REÁLNÉM ČASE (DART)



ZOBRAZOVACÍ MS (IMS)

Principle of MALDI MS Imaging

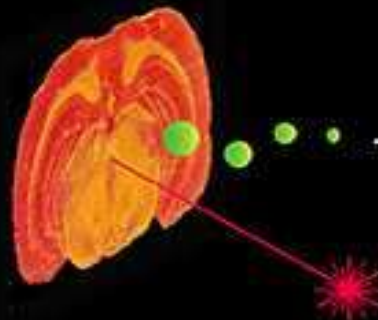
Frozen section



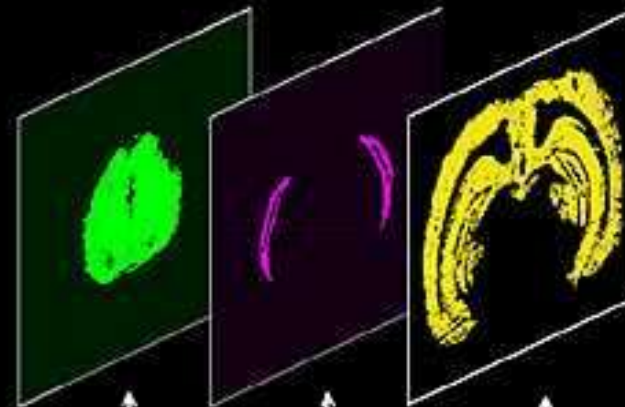
Matrix application



Raster of section



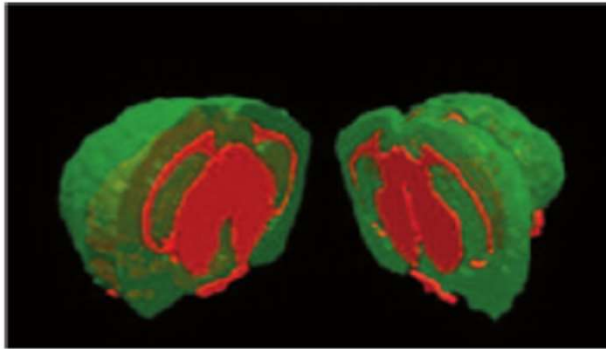
MS Images



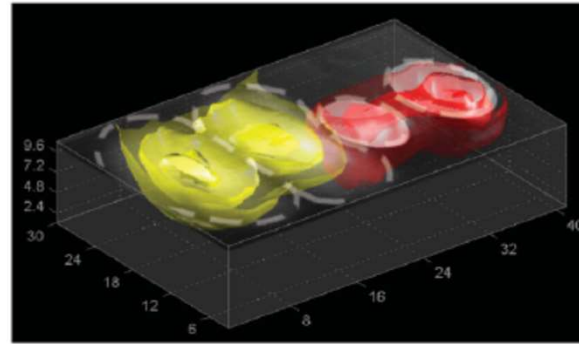
MALDI Mass Spectrum



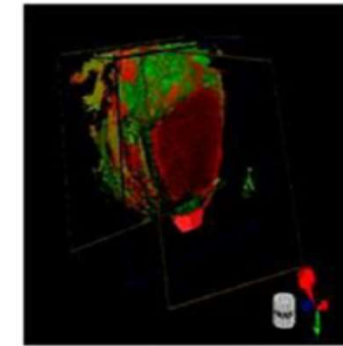
3D IMS



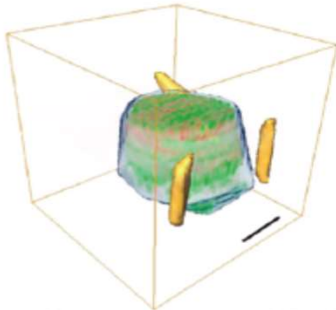
a) Eberlin et al. 2010



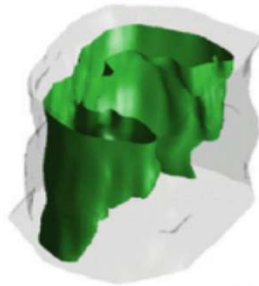
b) Watrous et al. 2013



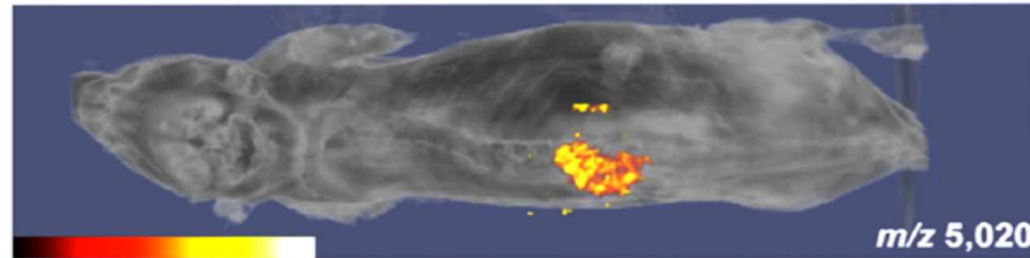
c) Fornai et al 2012



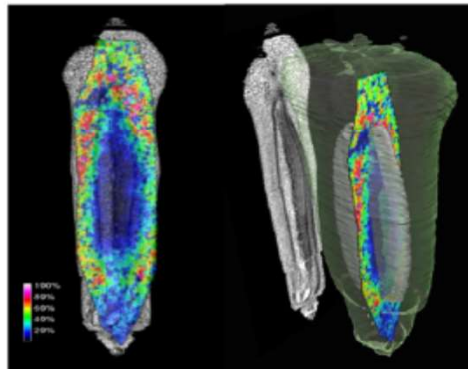
d) Chugthai et al. 2012



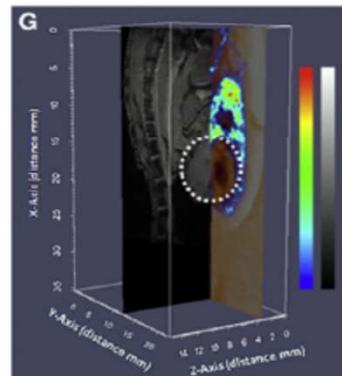
e) Jones et al. 2012



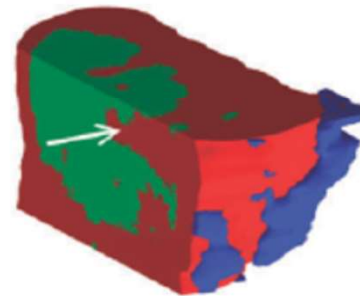
f) Attia et al. 2012



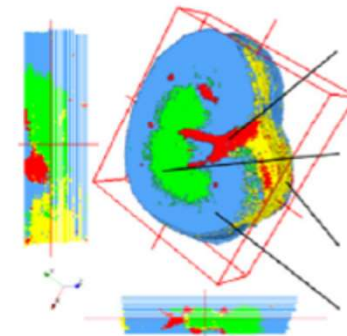
g) Bollenbeck et al. 2009



h) Seeley et al. 2014



i) Reindl et al. 2011



j) Oetjen et al. 2013

HMOTNOSTNÍ ANALYZÁTORY

HMOTNOSTNÍ ANALYZÁTORY

- hmotnostní analyzátor slouží k dělení iontů v plynné fázi za vakua podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z)
- analyzátor 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 analyzátoru probíhá za vysokého vakua (ca. 10^{-3} - 10^{-11} Pa, podle typu analyzátoru)
- 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 analyzátor)
 - 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 (analyzátor 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 ANALYZÁTORY

Podle způsobu dělení iontů:

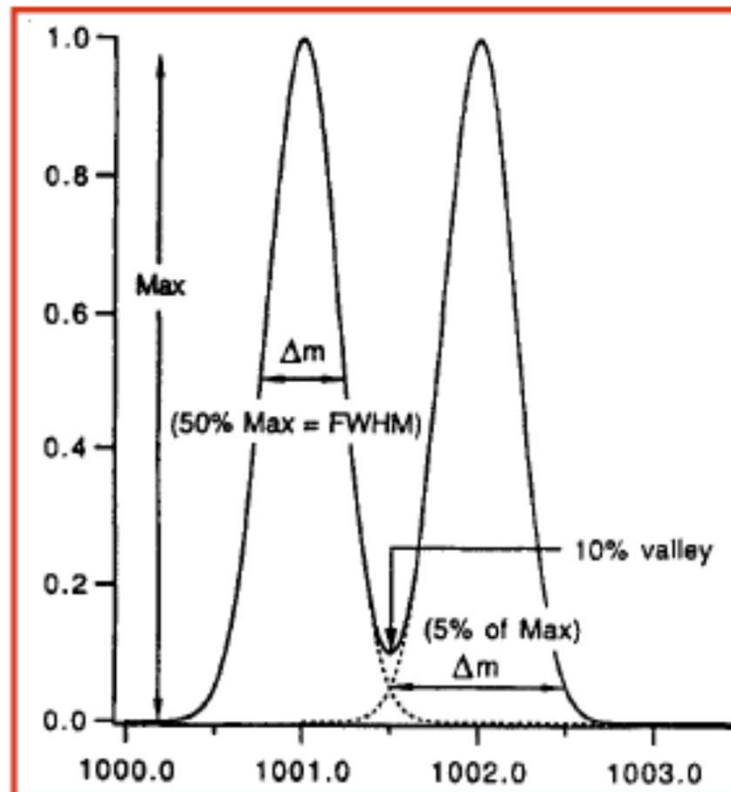
- **skenující** - postupně mění skenovanou veličinu (U , V , B) a propouští ionty o určité m/z (kvadrupólový analyzátor, sektorový magnetický analyzátor)
- **iontové pasti** - zadržuje ionty pomocí napětí na elektrodách a následně je analyzuje (iontová past, orbitrap, FT-ICR)
- **průletový** - měří čas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

Základní parametry hmotnostních analyzátorů:

- **rozlišovací schopnost (rozlišení)** – schopnost analyzátoru poskytnout rozlišené signály pro ionty s podobnou m/z
- **správnost určení m/z** - míra schopnosti analyzátoru určit správnou hodnotu m/z
- **hmotnostní rozsah** – rozsah m/z hodnot, přes který analyzátor 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)

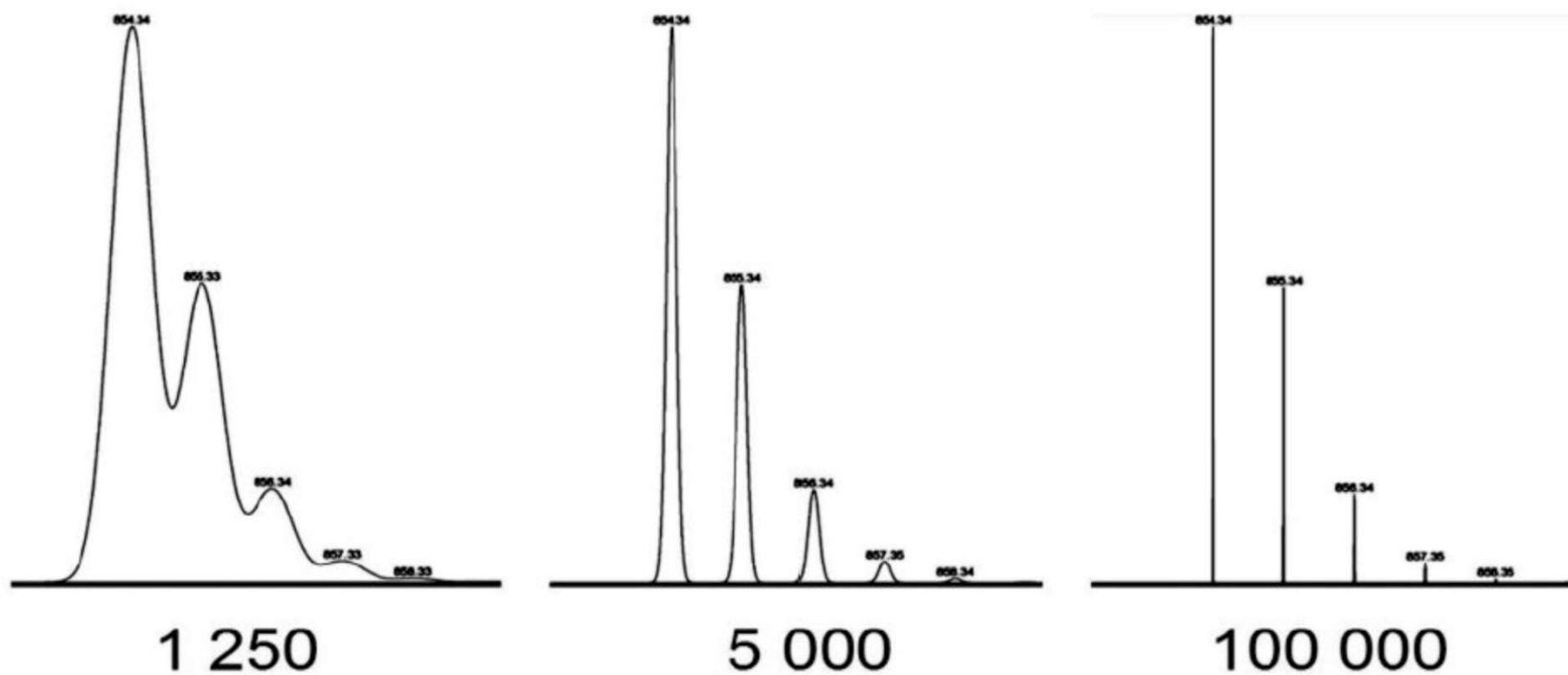


Rozlišovací schopnost
(Resolving power, RP):

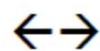
$$A/ \text{ RP} = m / \Delta m$$

ROZLIŠENÍ – RESOLVING POWER

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

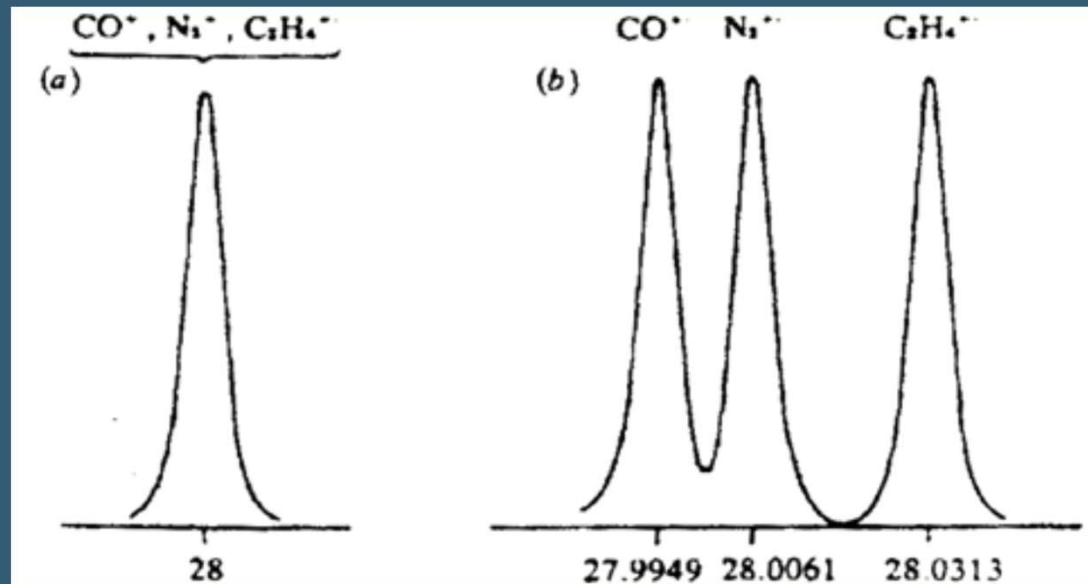


Nízké rozlišení



vysoké rozlišení

ROZLIŠENÍ – RESOLVING POWER



PŘESNOST URČENÍ m/z

MASS ACURRACY

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

experimentálně naměřená hodnota m/z = 300.0463,

teoreticky vypočtená hodnota m/z = 300.0473

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

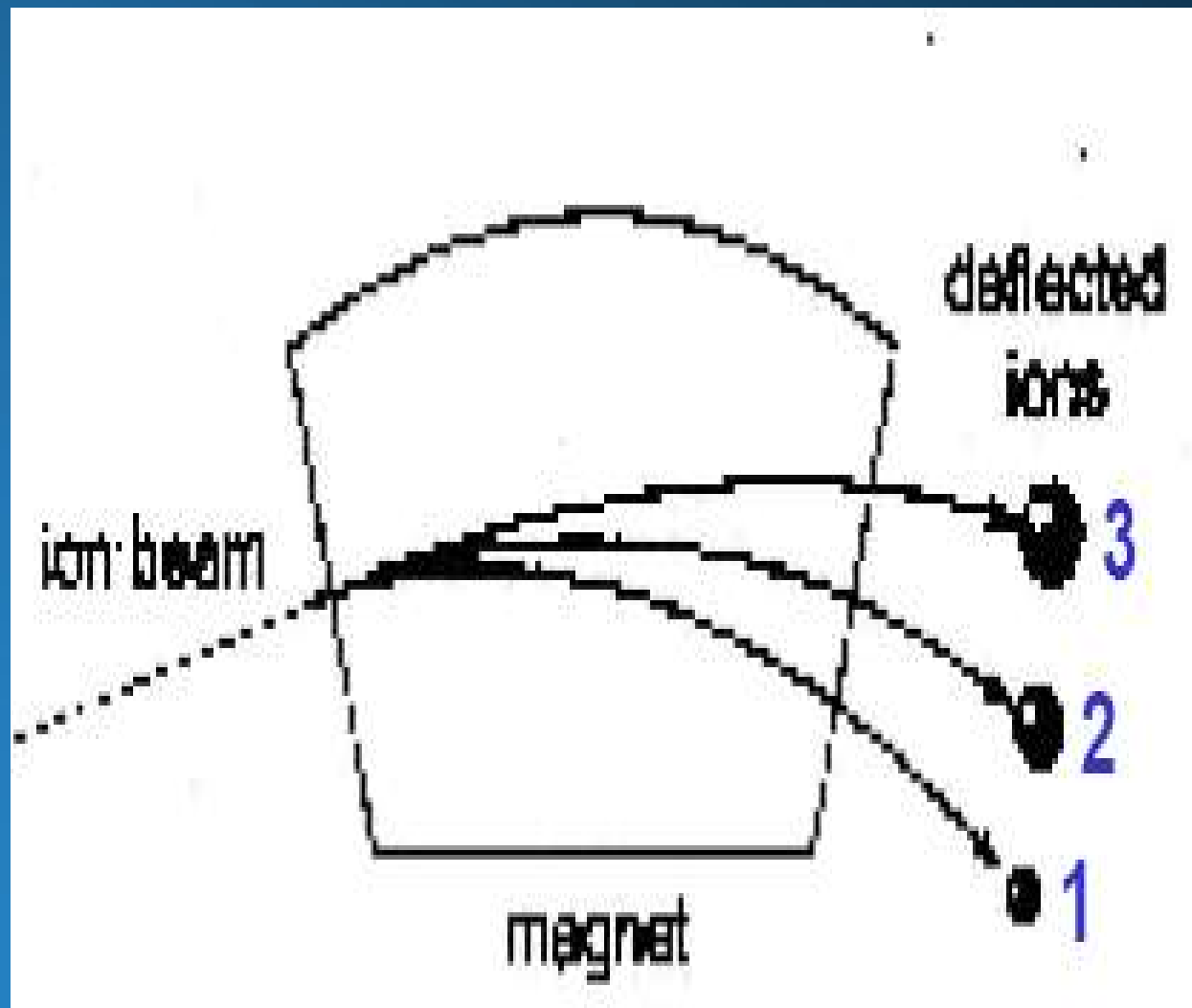
300.0473 dle tabulek (nebo lépe s využitím softwaru) nejlépe odpovídá elementární složení $C_{12}H_{17}N_2O_2Br$, podle izotopů M:M+2 potvrzena přítomnost bromu

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



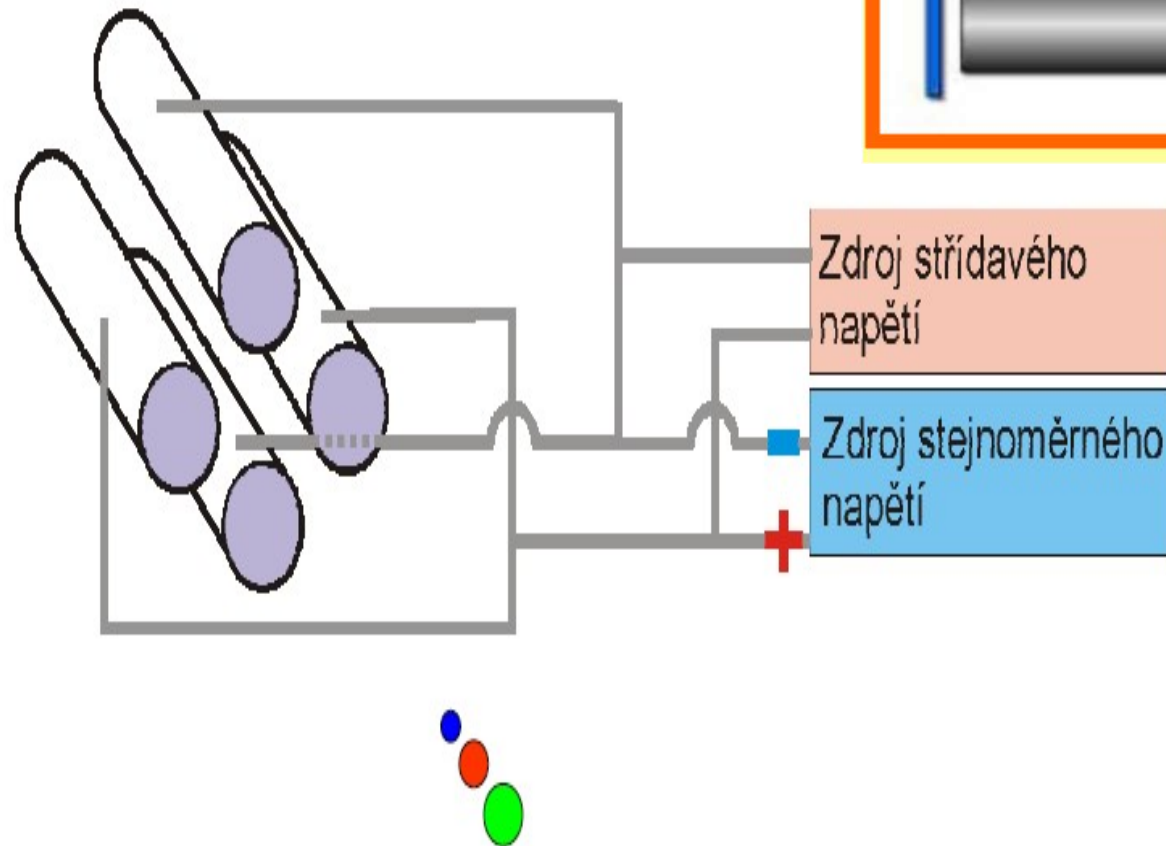
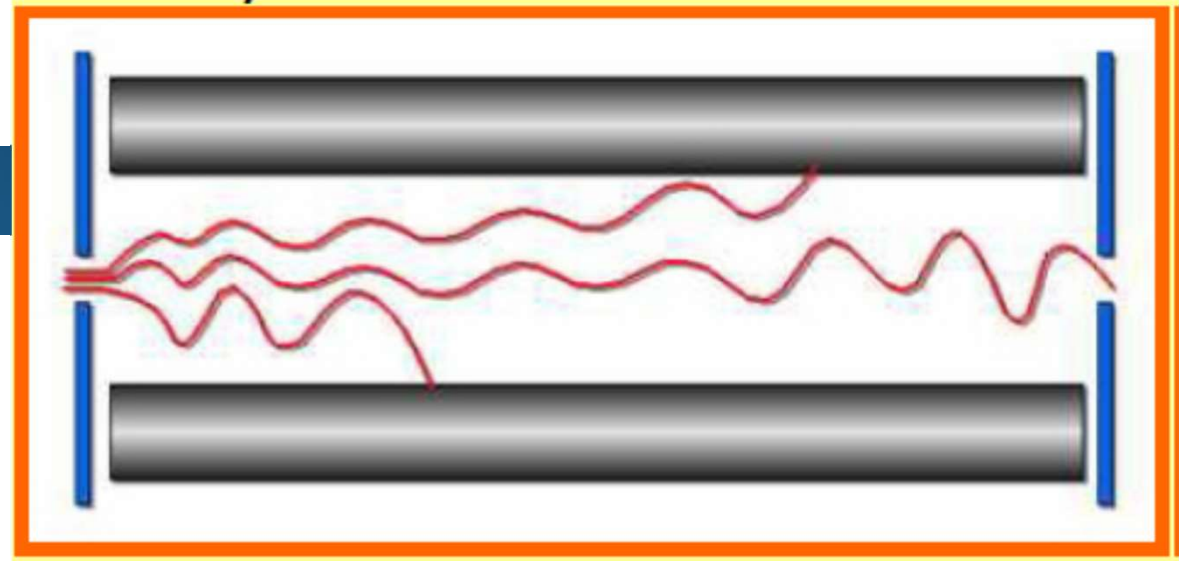
MAGNETICKÝ ANALYZÁTOR



KVADRUPOL A IONTOVÁ PAST

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

KVADRUPOL



KVADRUPOL

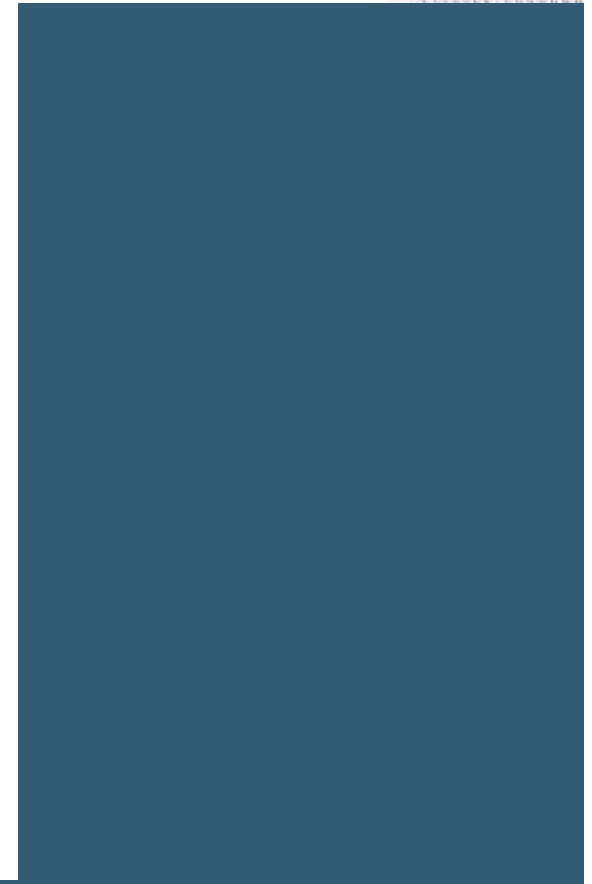
V daný okamžik jsou oscilace stabilní pouze pro určitou hodnotu m/z a tento ion projde kvadrupólovým analyzátozem, ionty s jinými hodnotami m/z mají nestabilní oscilace a jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu, změnou napětí postupně projdou na detektor ionty se všemi hodnotami m/z .

KVADRUPOL



Hexapole, 9.5 mm Quadrupoles and 19 mm Quadrupoles

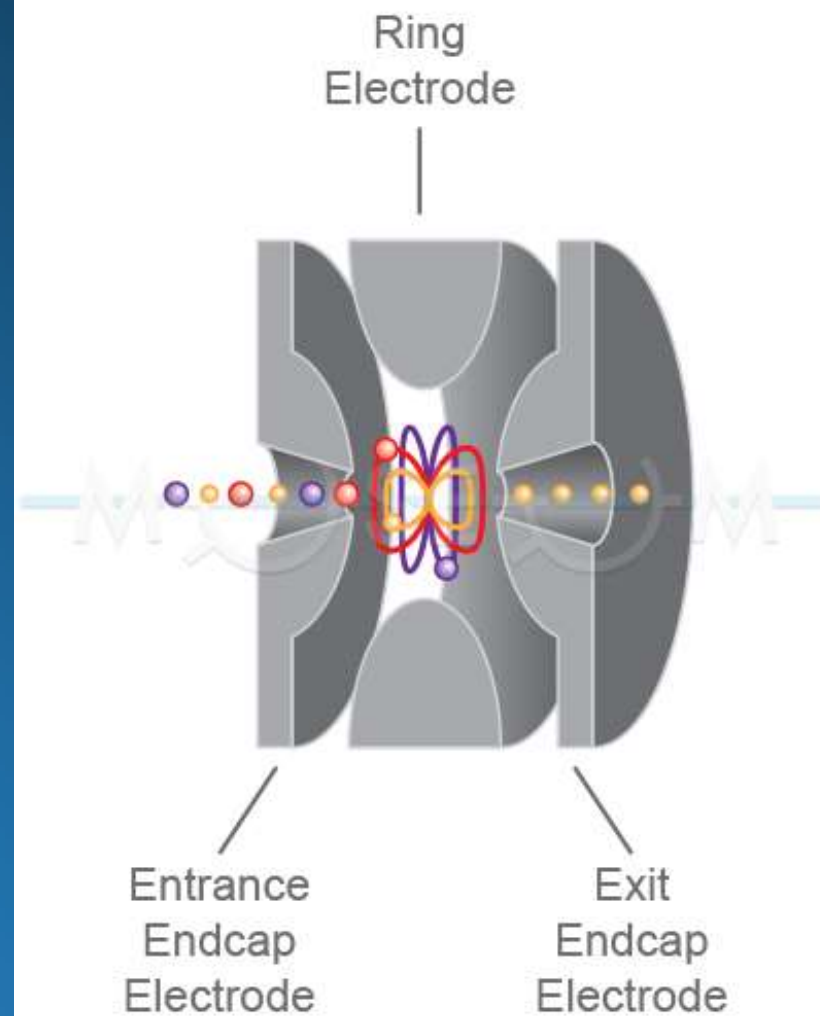
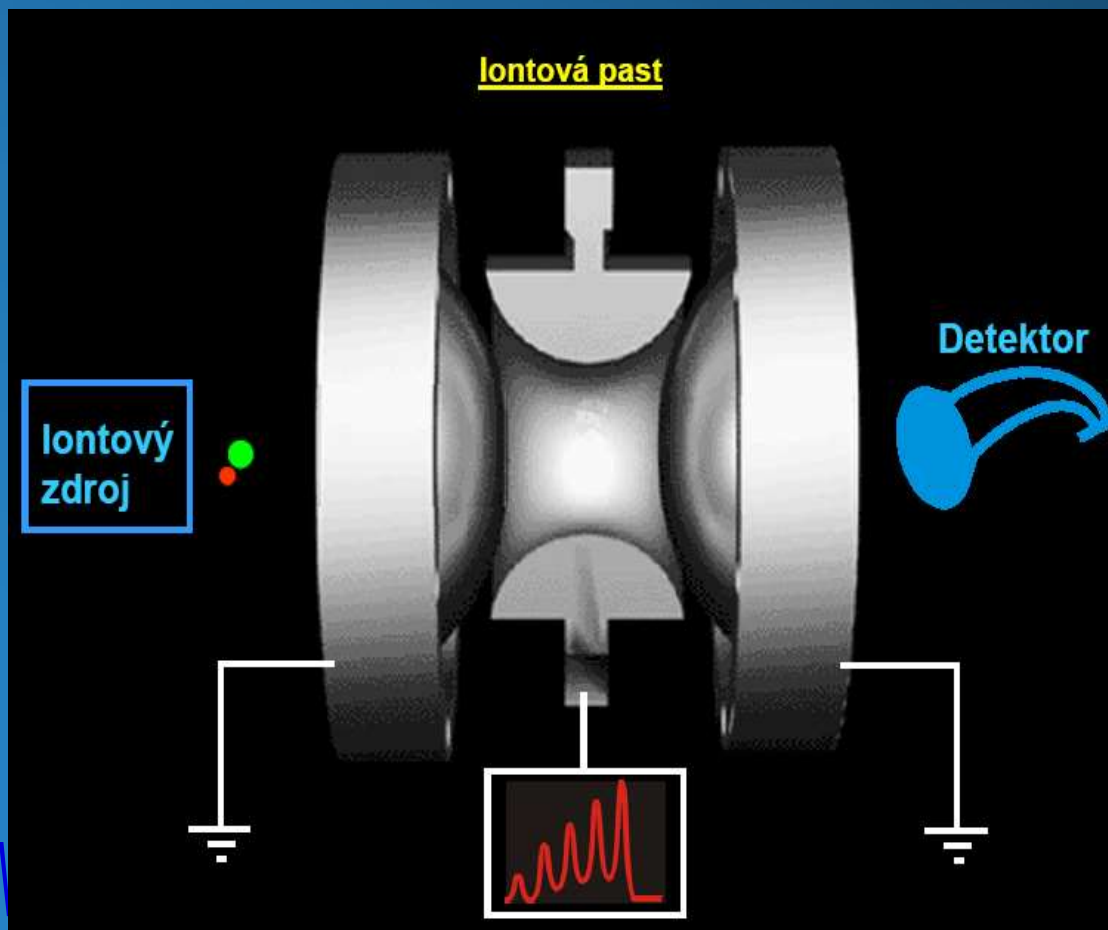
KVADRUPOL



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)

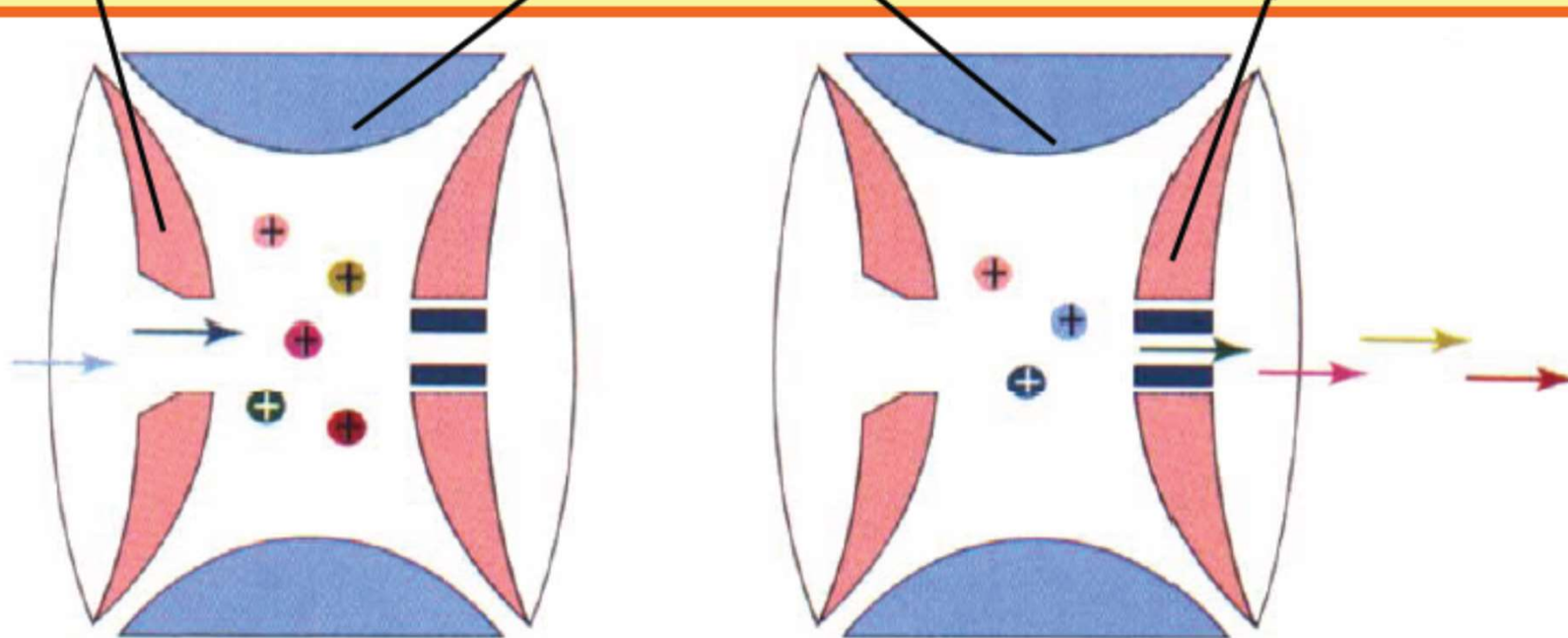


ION TRAP (IT)

vstupní
uzavírací
elektroda

prstencová
elektroda

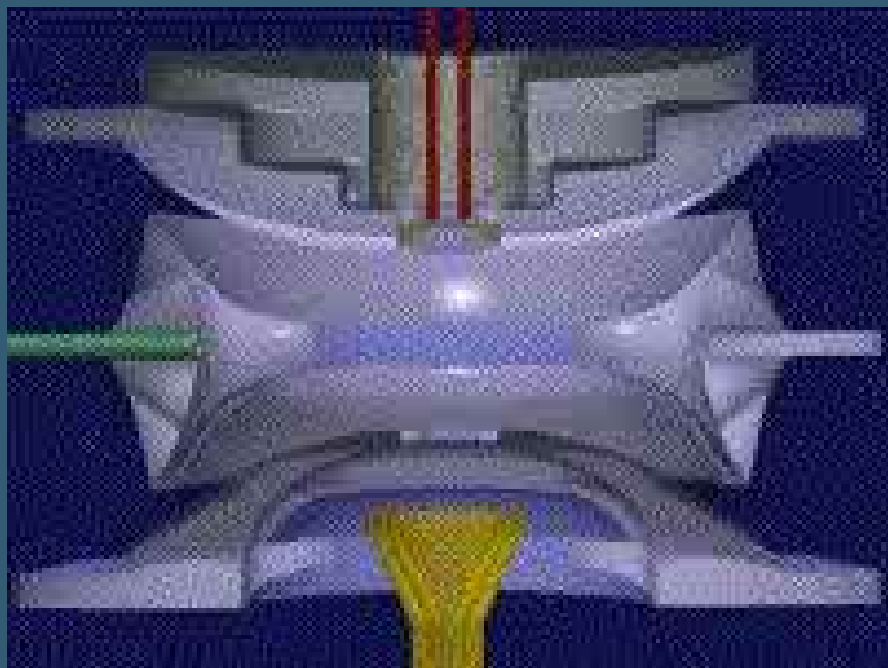
výstupní
uzavírací
elektroda



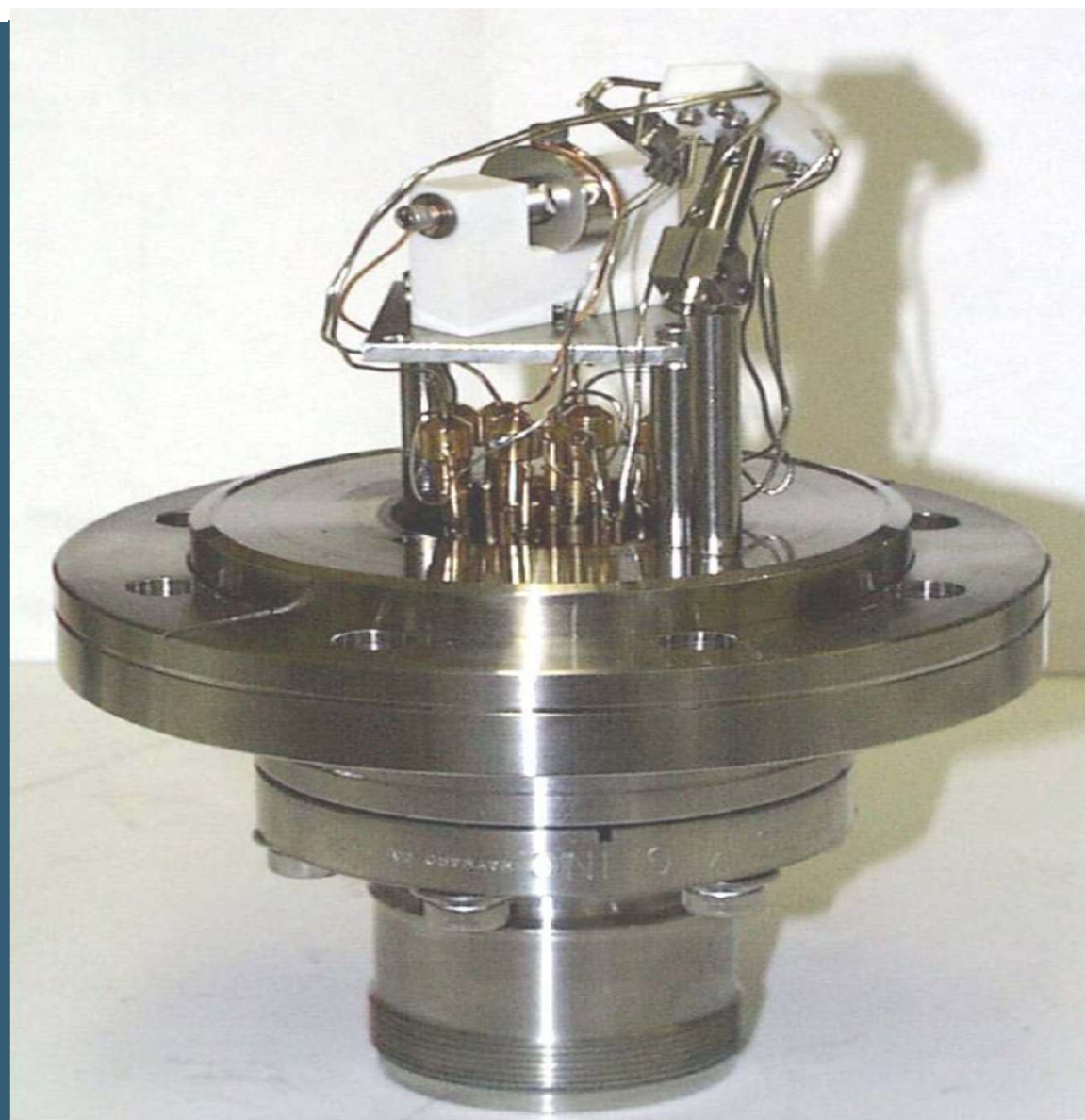
ZACHYCOVÁNÍ

VYPUZOVÁNÍ

ION TRAP



MUNI
SCI



IONTRAP

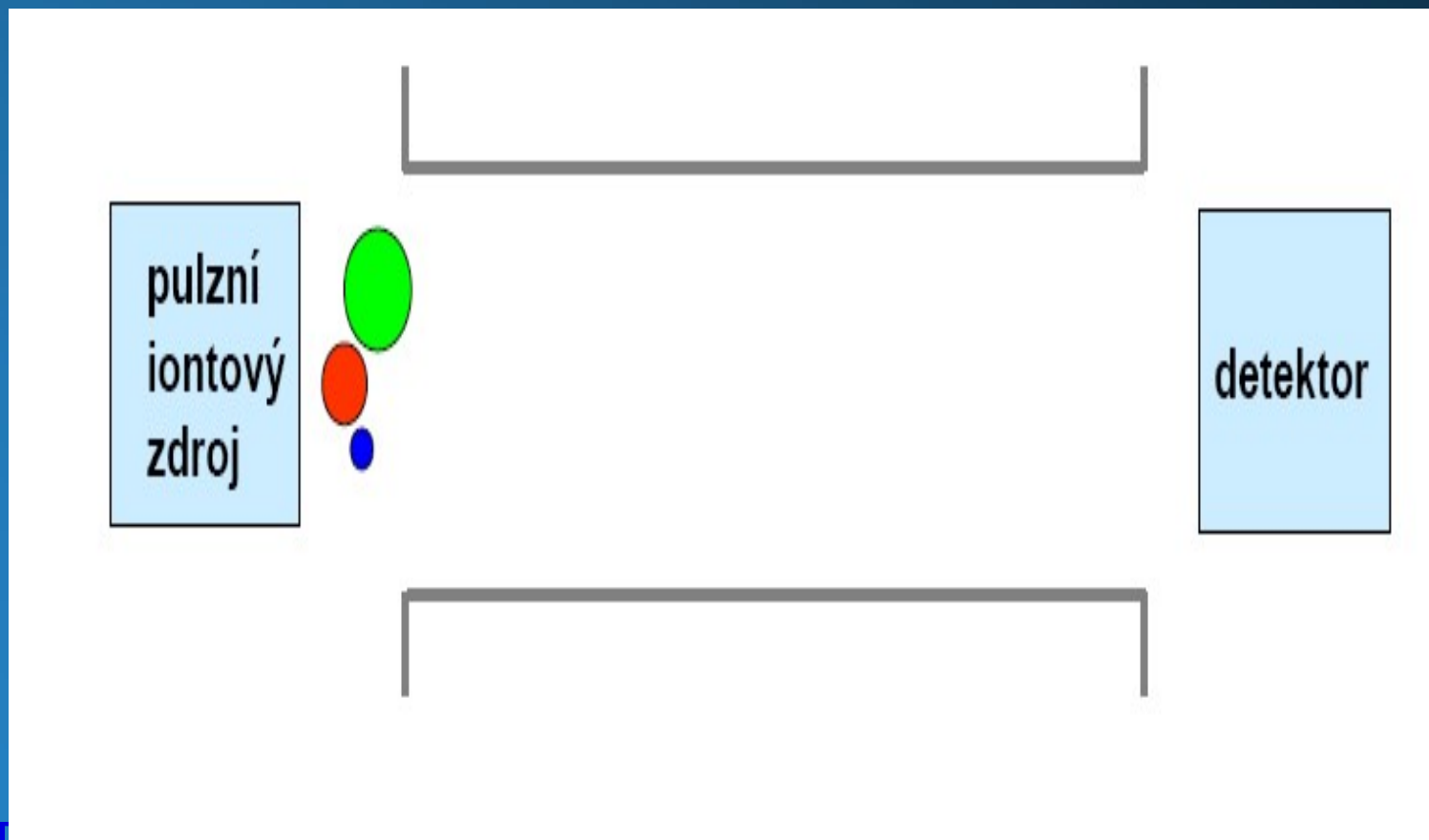


ANALYZÁTOR DOBY LETU (TOF)

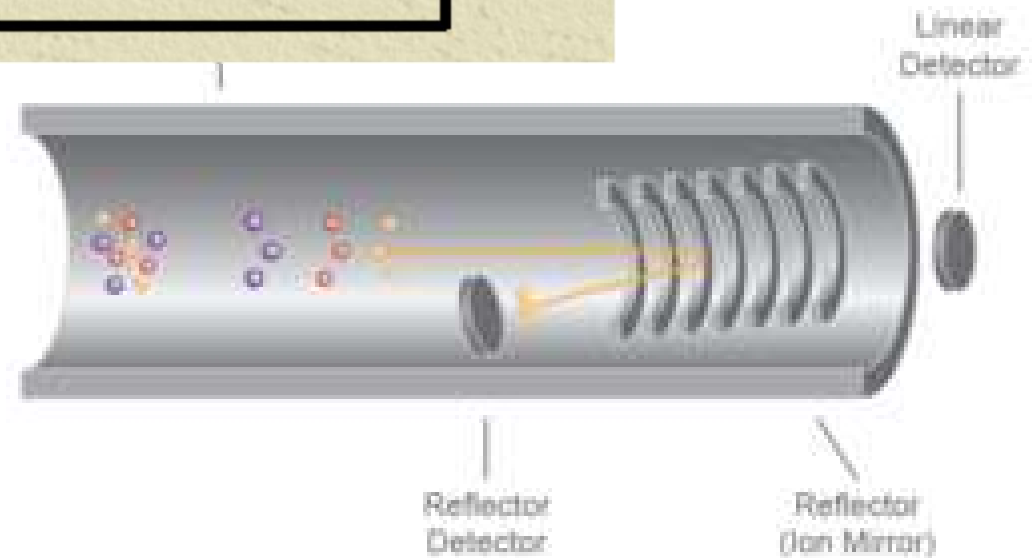
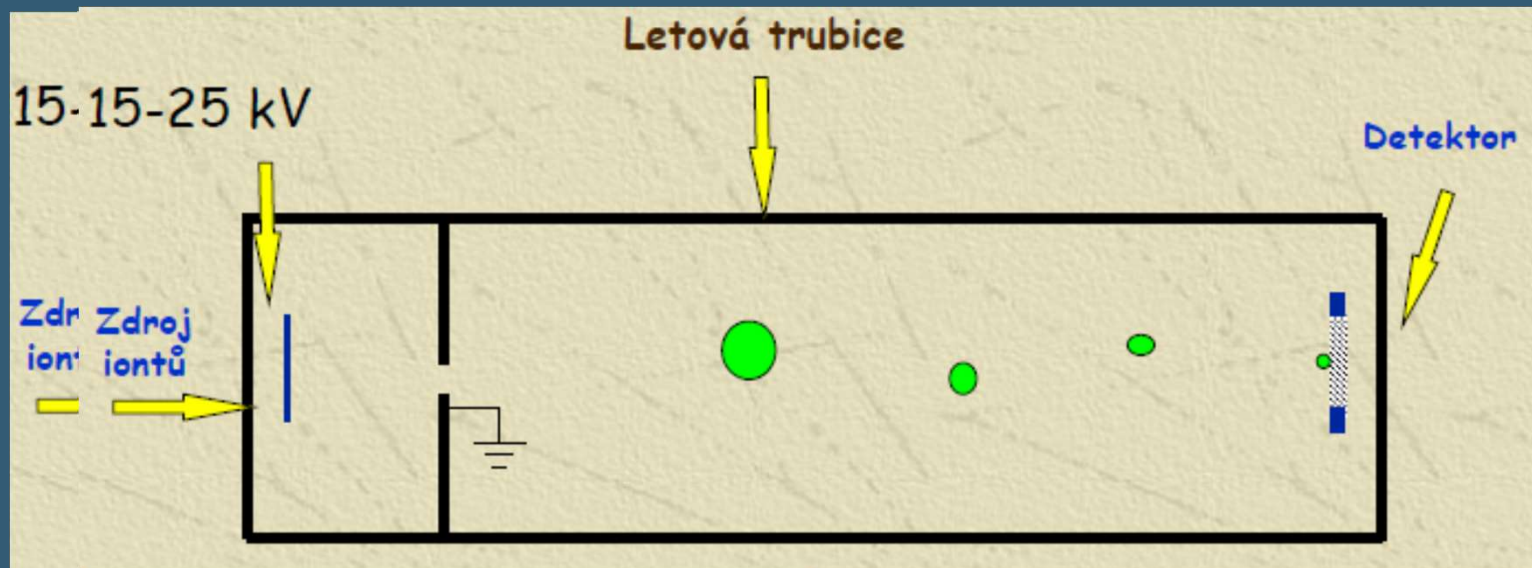
Různá doba rychlosti letu iontů
(analyzátor doby letu – TOF).

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

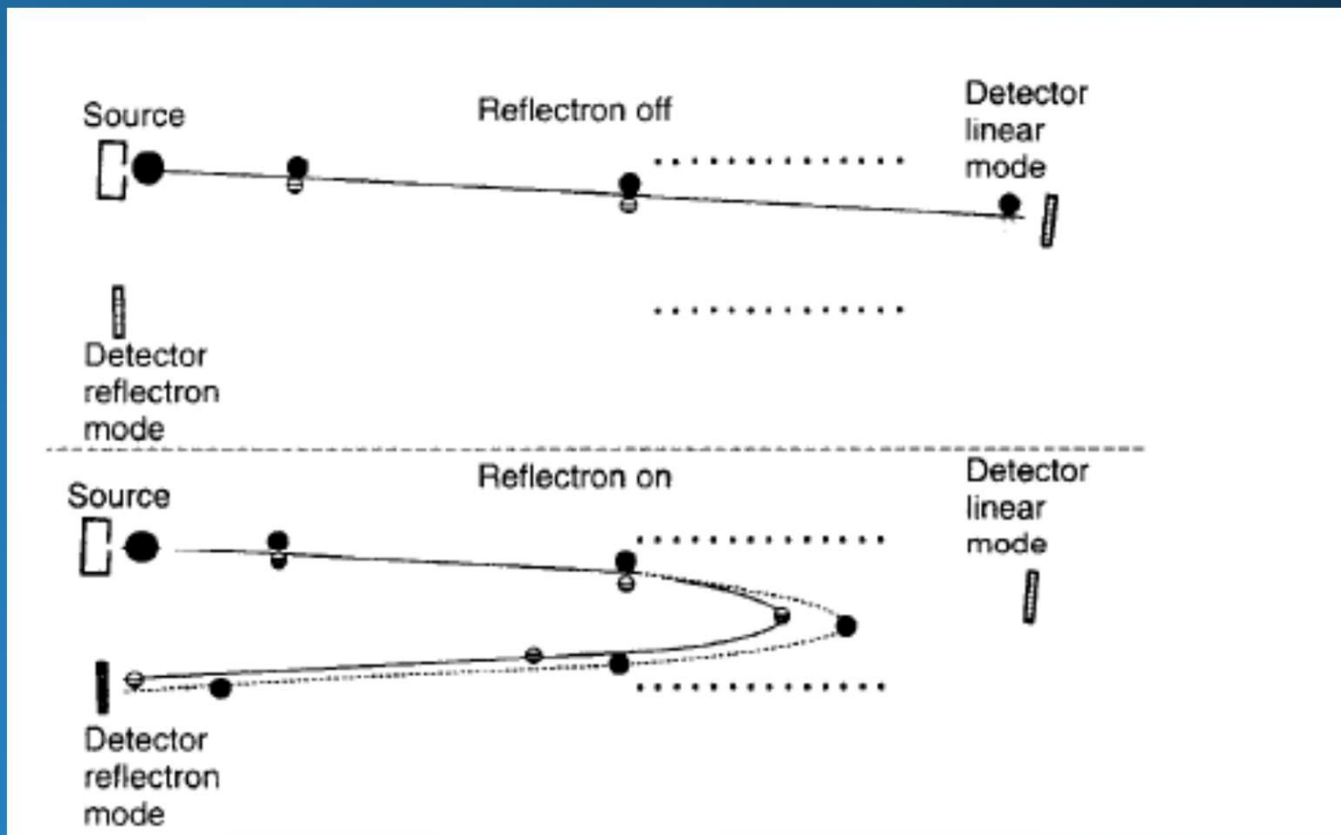
ANALYZÁTOR DOBY LETU (TOF)



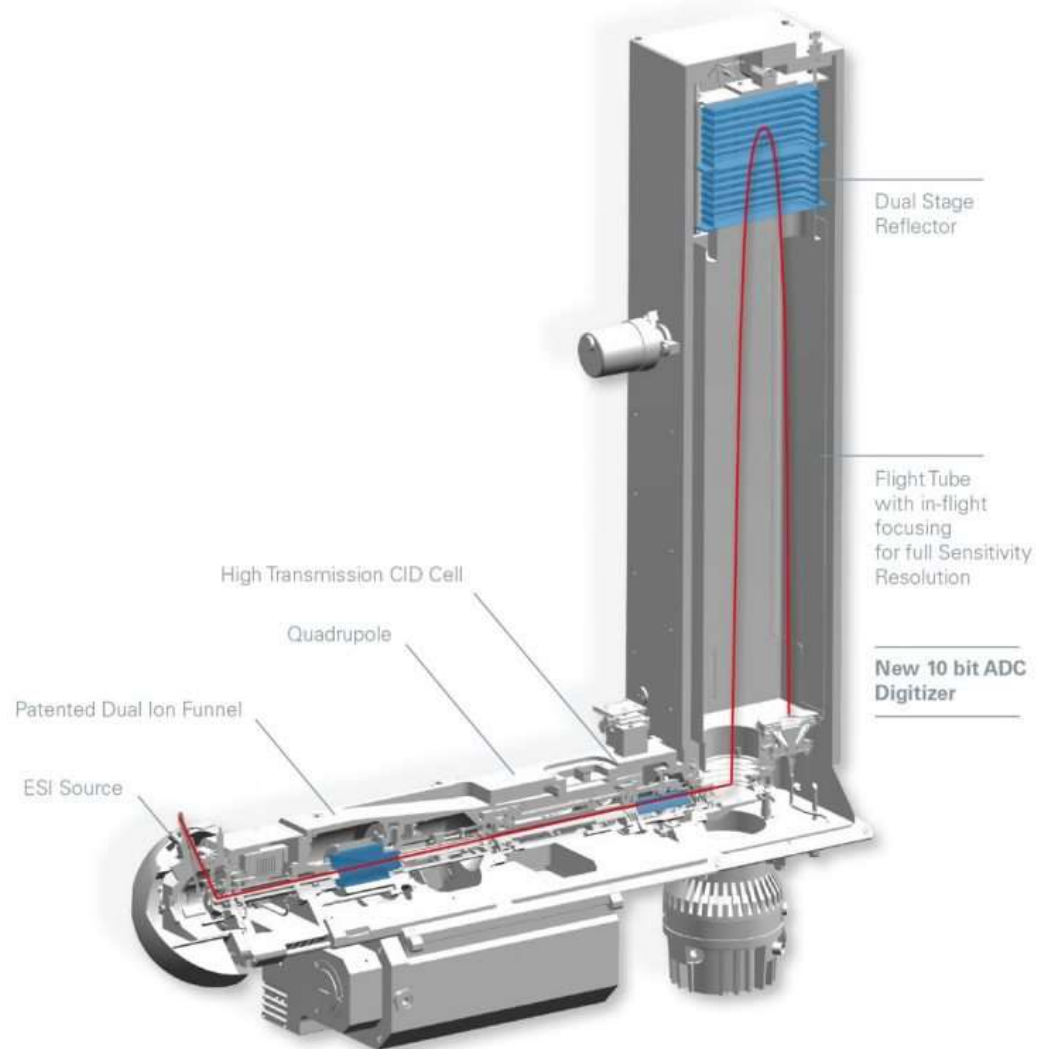
ANALYZÁTOR DOBY LETU (TOF)



ANALYZÁTOR DOBY LETU (TOF)



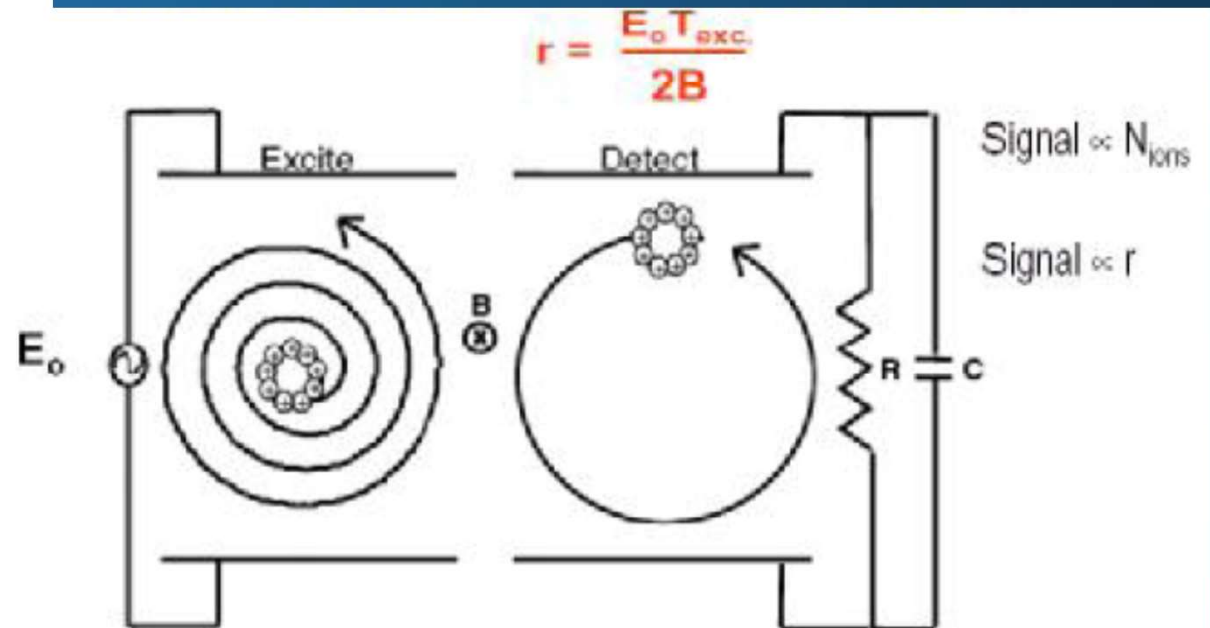
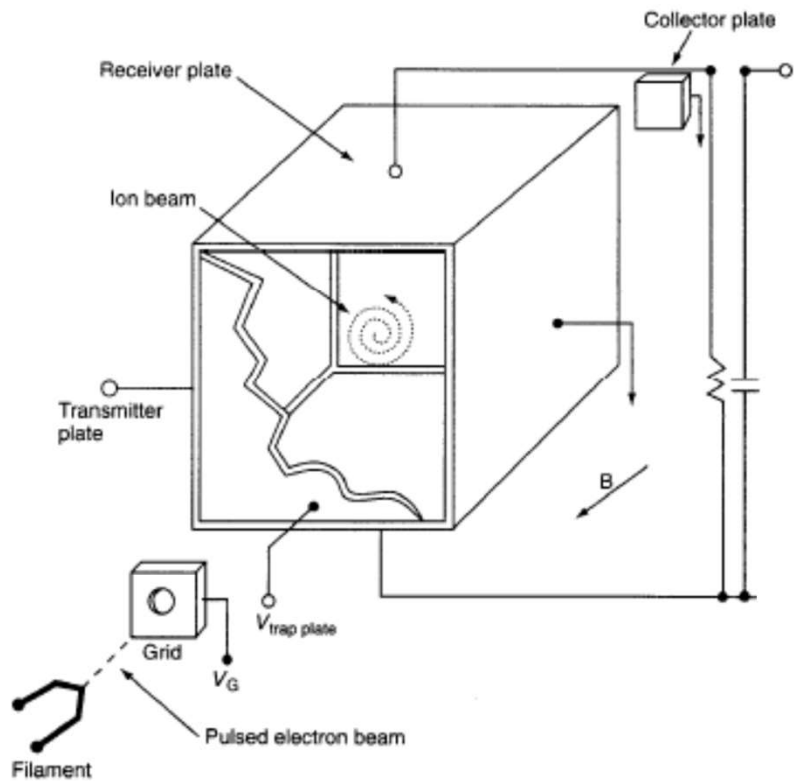
ANALYZÁTOR DOBY LETU (TOF)



IONTOVÁ CYKLOTRONOVÁ RESONANCE (ICR)

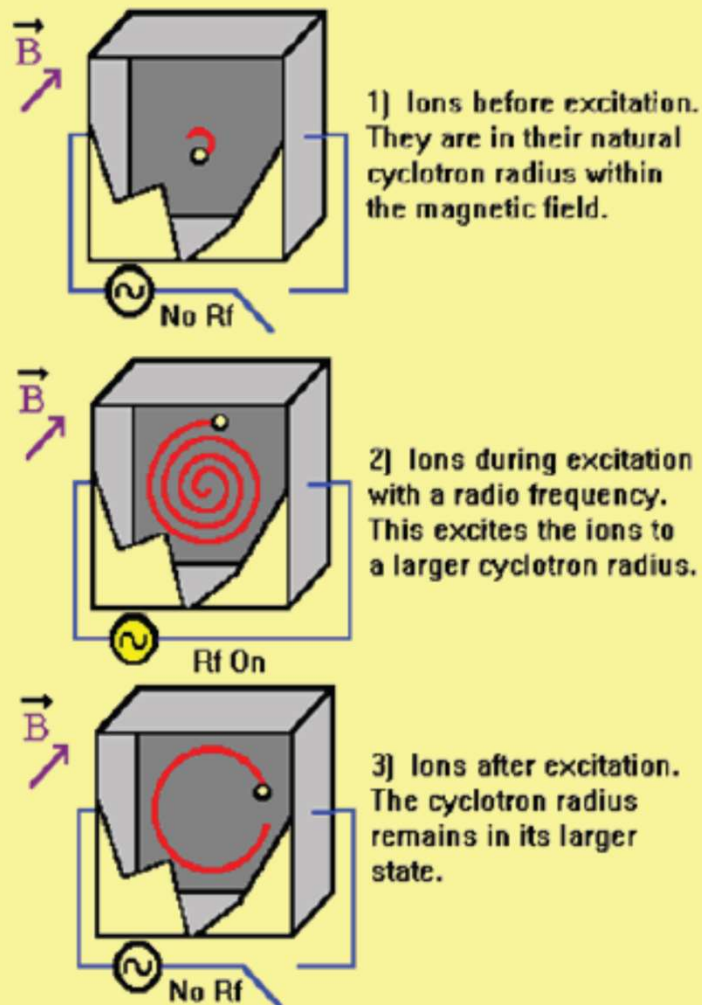
Různé absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli.

IONTOVÁ CYKLOTRONOVÁ RESONANCE (ICR)

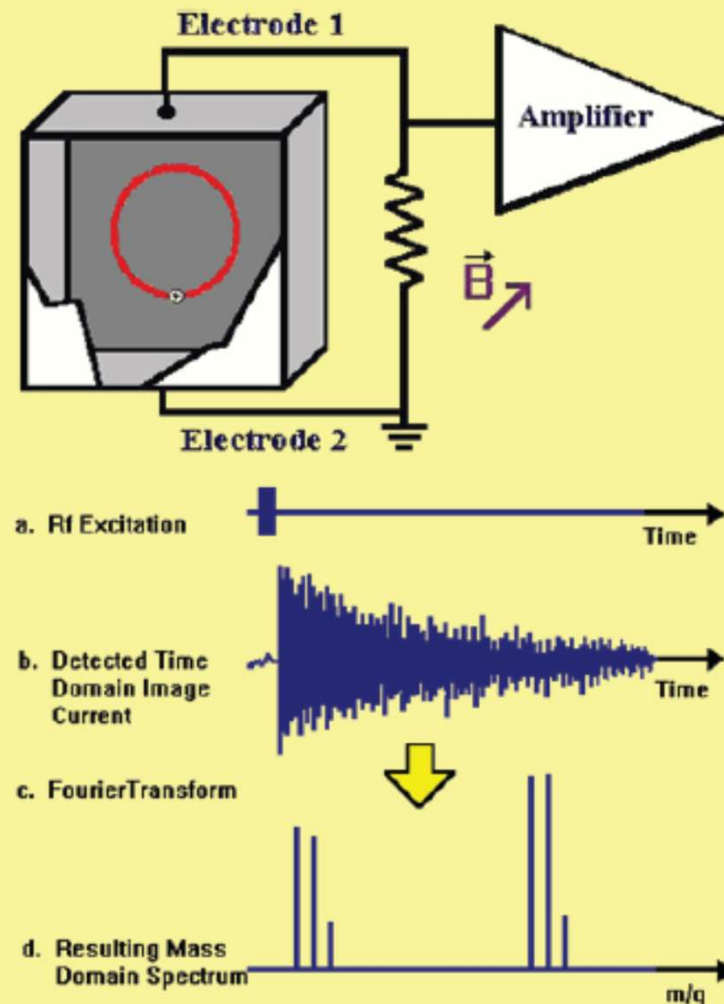


IONTOVÁ CYKLOTRONOVÁ RESONANCE (ICR)

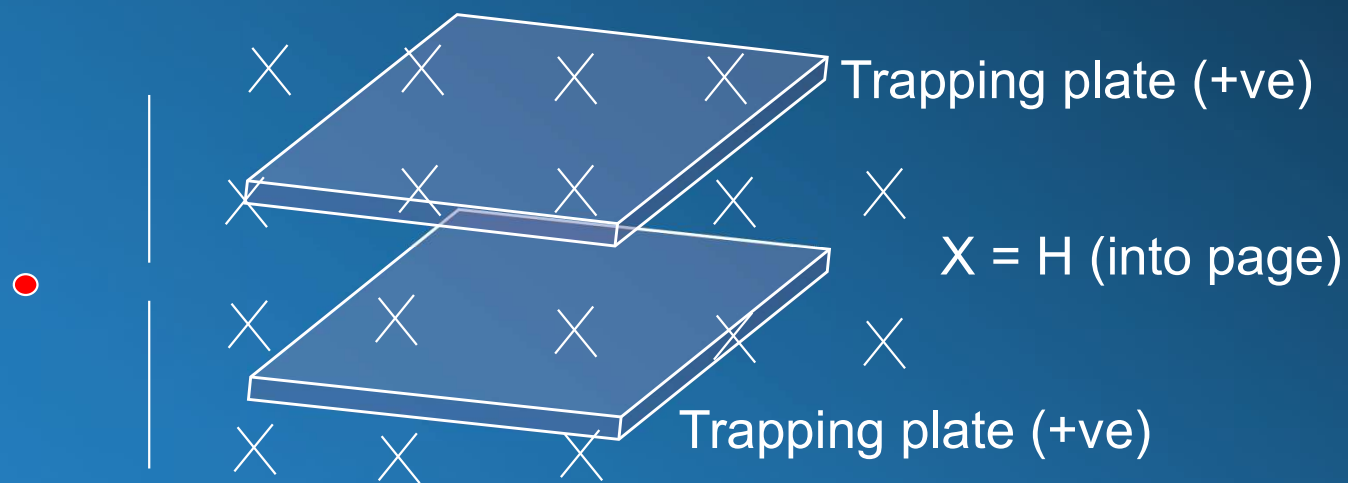
excitace



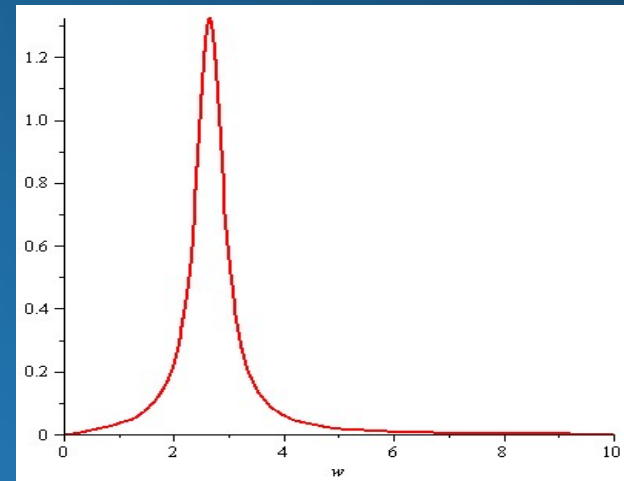
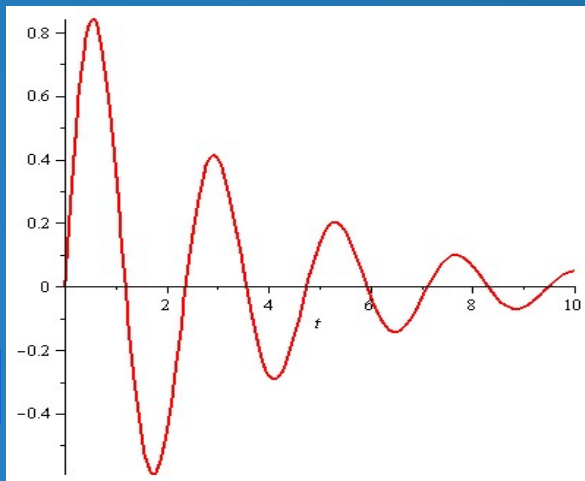
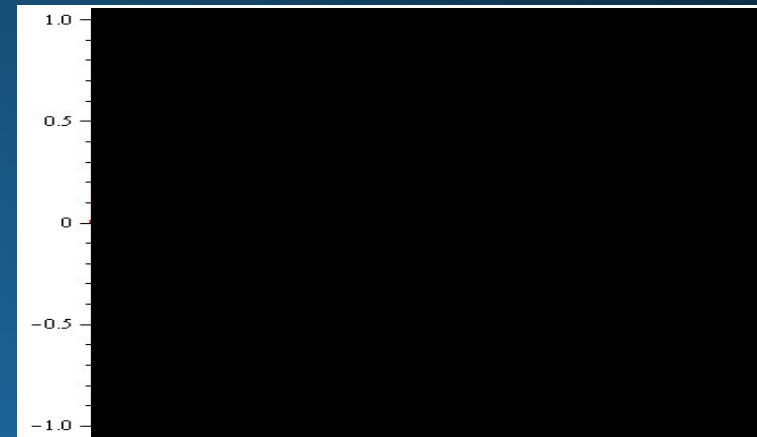
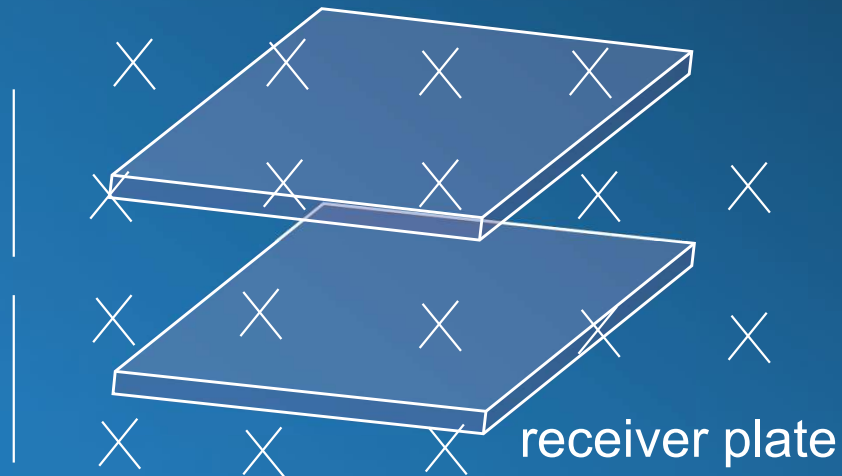
detekce



IONTOVÁ CYKLOTRONOVÁ RESONANCE (ICR)



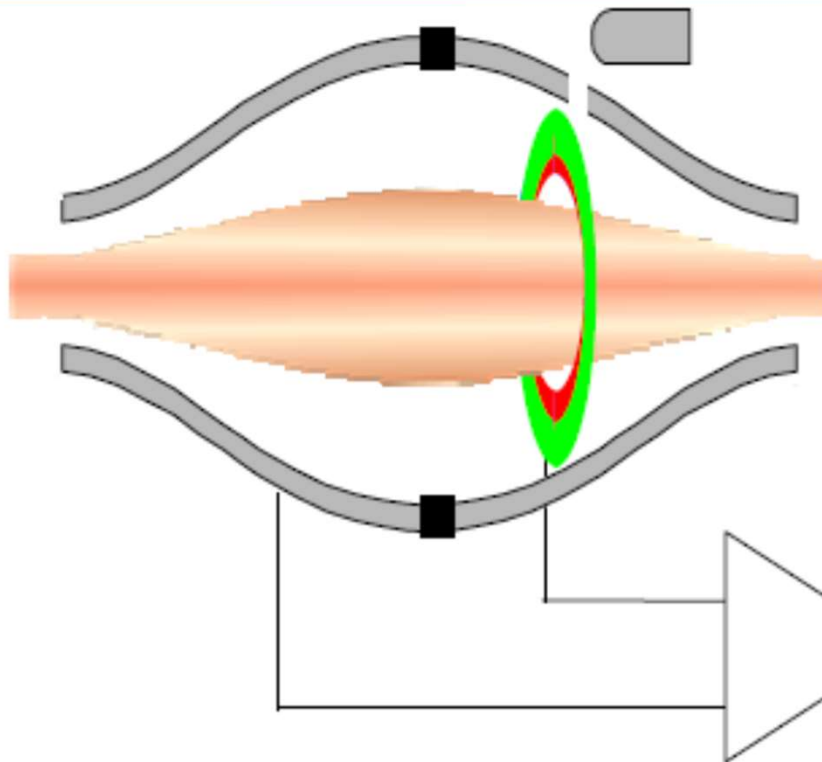
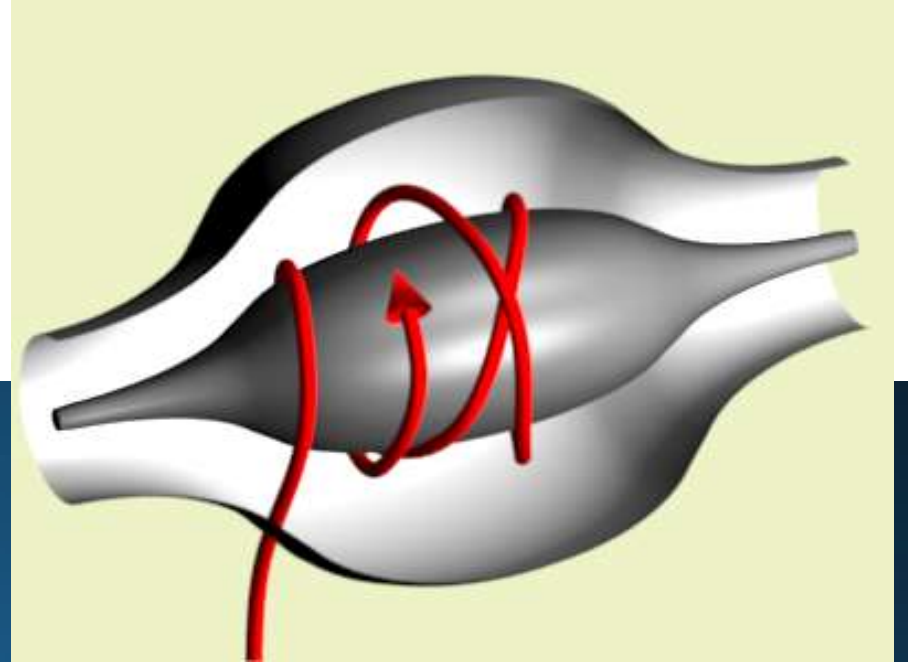
IONTOVÁ CYKLOTRONOVÁ RESONANCE (ICR)



IONTOVÁ CYKLOTRONOVÁ RESONANCE (ICR)



ORBITRAP

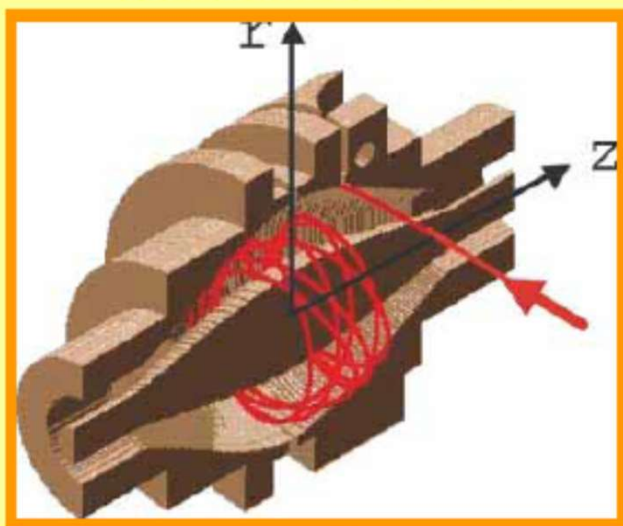


$$\omega = \sqrt{\frac{k}{m/z}}$$

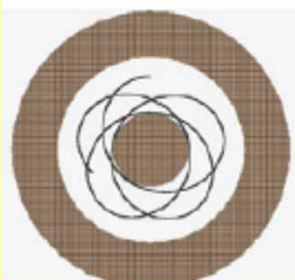


ORBITRAP

- separátory iontů – ORBITRAP s Fourierovou transformací



(a)



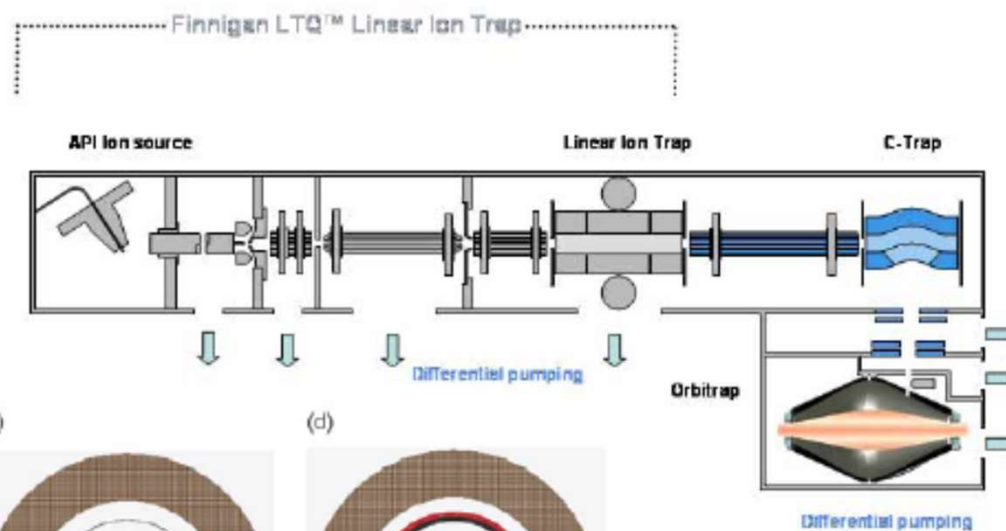
(b)



(c)



(d)



ORBITRAP



Alexander Makarov

ORBITRAP



MUNI
SCI

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

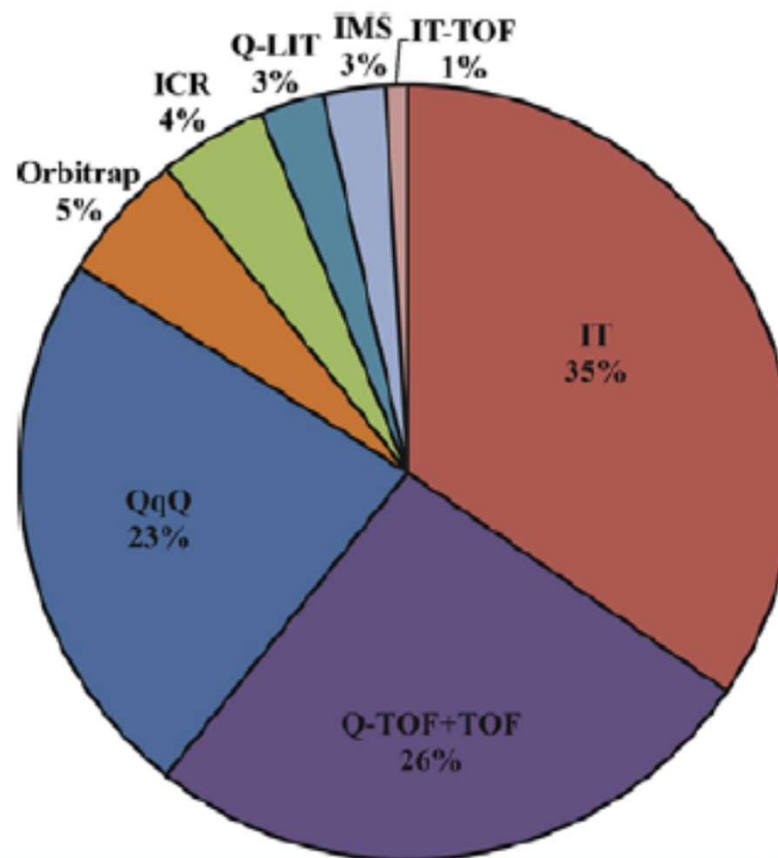
	Rozlišovací schopnost (RP, FWHM)	Správnost (MA, ppm)
nízká	<10,000	>5
vysoká	10,000 – 100,000	<5
ultravysoká	>100,000	<1

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 ANALYZÁTORY

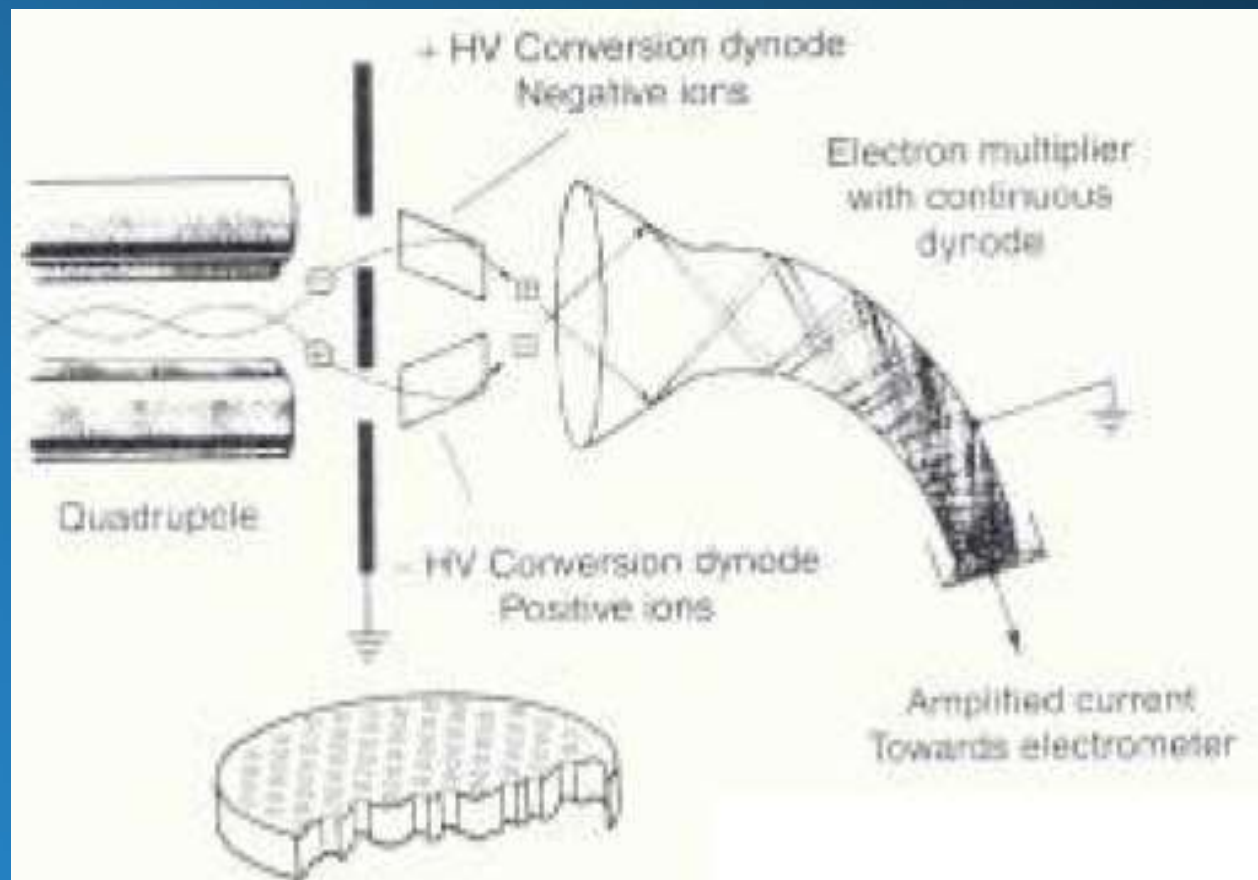
- Magnetický sektorový analyzátor
- Kvadrupólový analyzátor
- 3D a lineární iontová past
- Průletový analyzátor
- Orbitrap
- Iontová cyklotronová rezonance
- Analyzátor pohyblivosti iontů
- Hybridní hmotnostní spektrometry



DETEKTORY

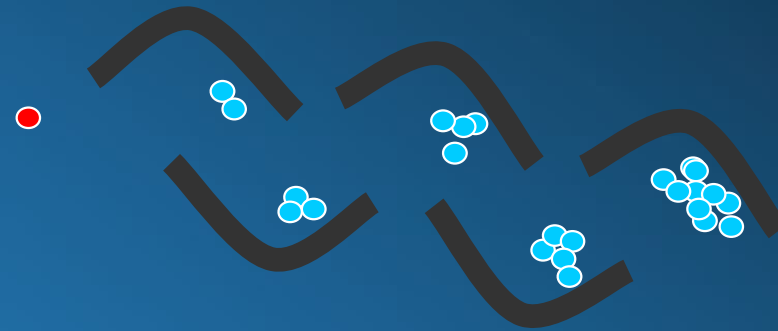
ELEKTRONOVÝ NÁSOBIČ

IONTY DOPADAJÍCÍ NA POVRCH ELEKTRODY ZNÍ
VYRAZÍ e^- , DÁLE ZESÍLENY SYSTÉMEM DYNOD AŽ
 10^8 KRÁT, ŽIVOTNOST 1-2 ROKY



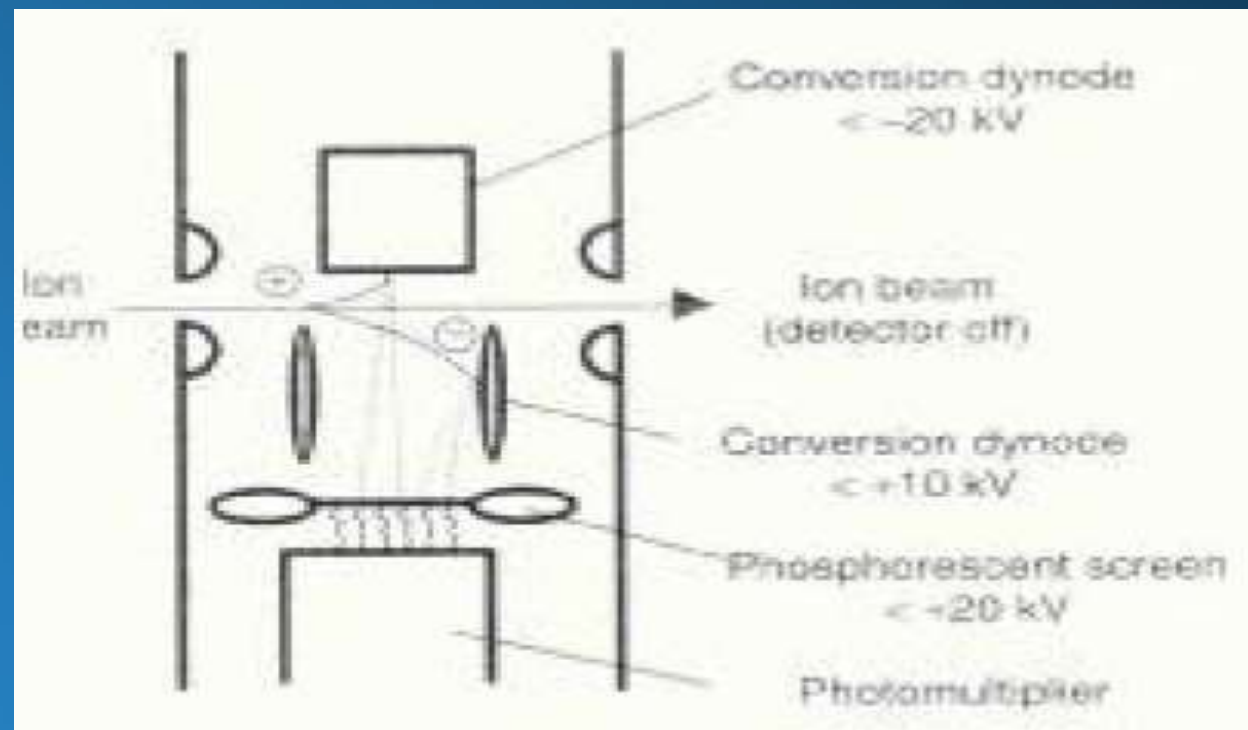
ELEKTRONOVÝ NÁSOBIČ

IONTY DOPADAJÍCÍ NA POVRCH ELEKTRODY ZNÍ
VYRAZÍ e^- , DÁLE ZESÍLENY SYSTÉMEM DYNOD AŽ
 10^8 KRÁT, ŽIVOTNOST 1-2 ROKY



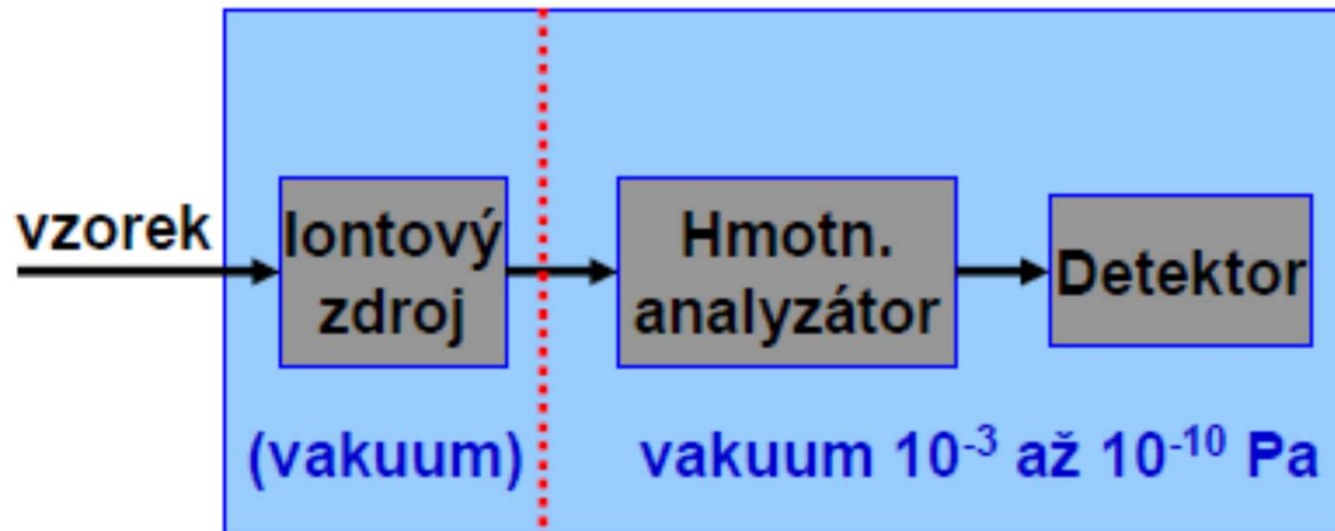
FOTONÁSOCIČ

IONTY DOPADAJÍ NA FOSFOROVOU DESTIČKU, ČÍMŽ UVOLNÍ ENERGIÍ VE FORMĚ FOTONU, ZESÍLEN SYSTÉMEM 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

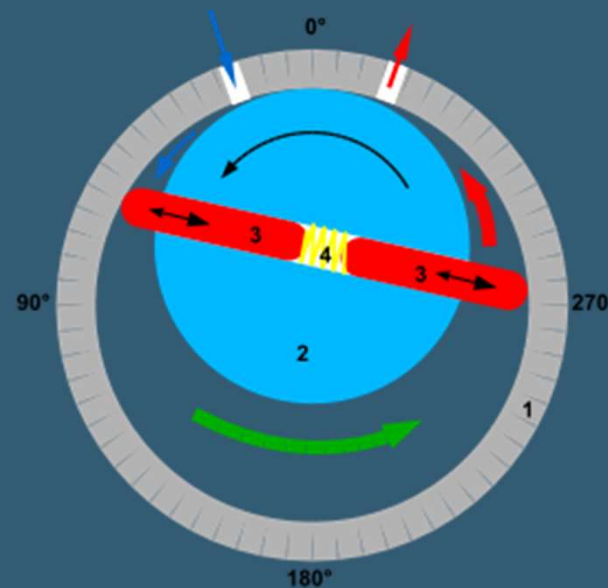
- kromě ionizačních technik pracujících za atmosférického tlaku (ESI, APCI, APPI) musí být za vakua i iontový zdroj
- PROČ tak vysoké vakuum? ionty musí mít dostatečně dlouhou střední dráhu a nesmí docházet ke kolizním srážkám s neutrálními atomy

K získání tak vysokých hodnot vakua je obvykle potřeba dvou nebo i více (FT-ICR)

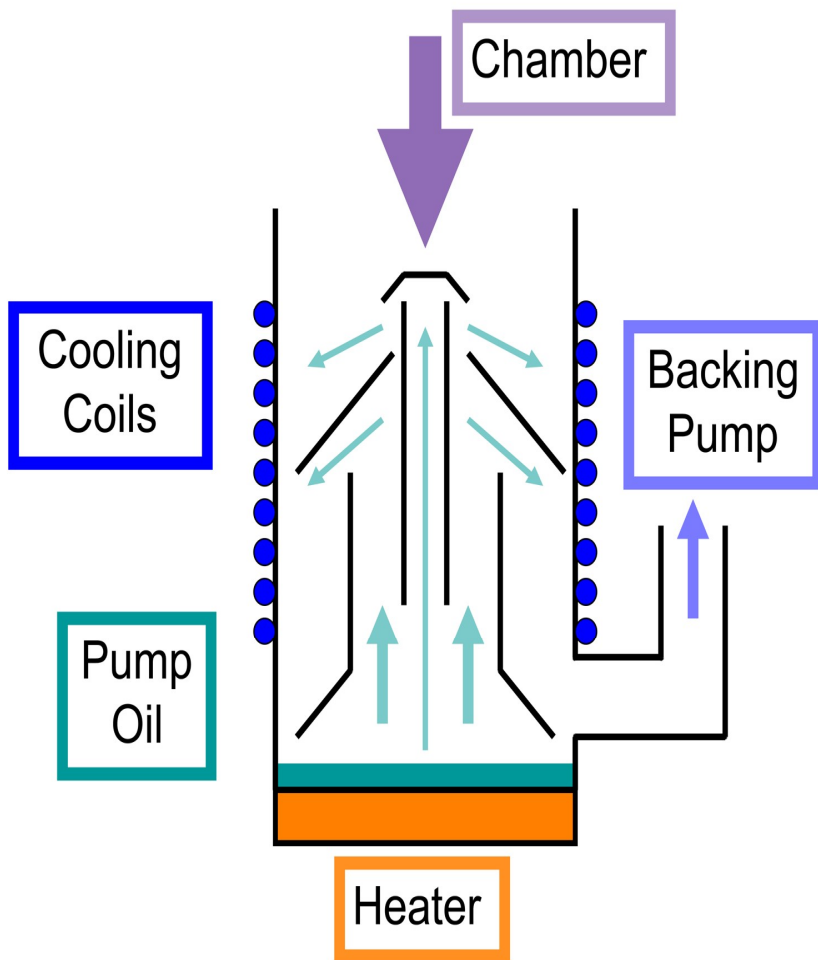
stupňové čerpání velmi výkonnými vakuovými pumpami

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

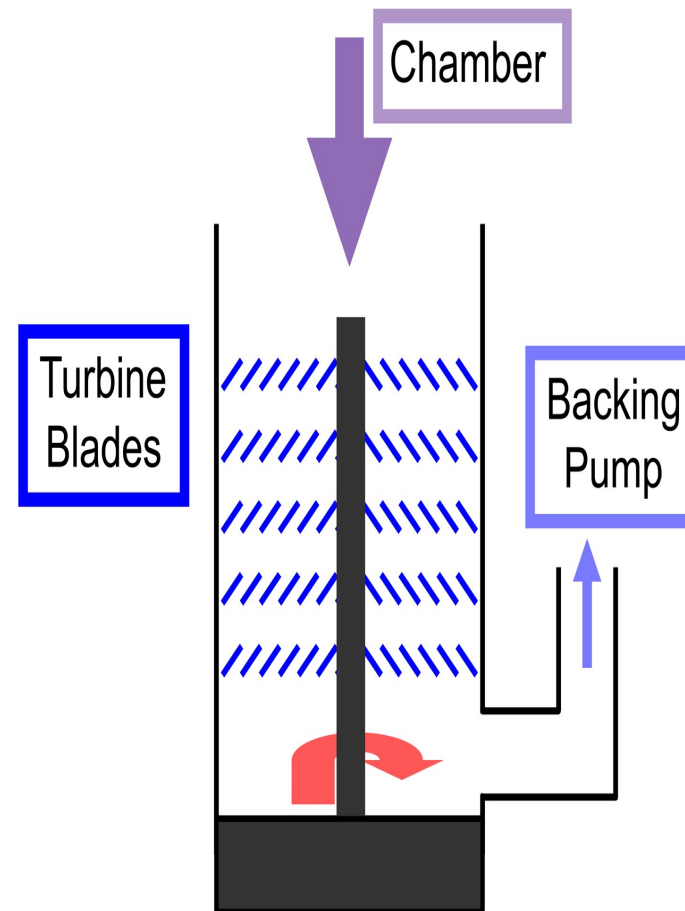
ROTAČNÍ OLEJOVÉ VÝVĚVY



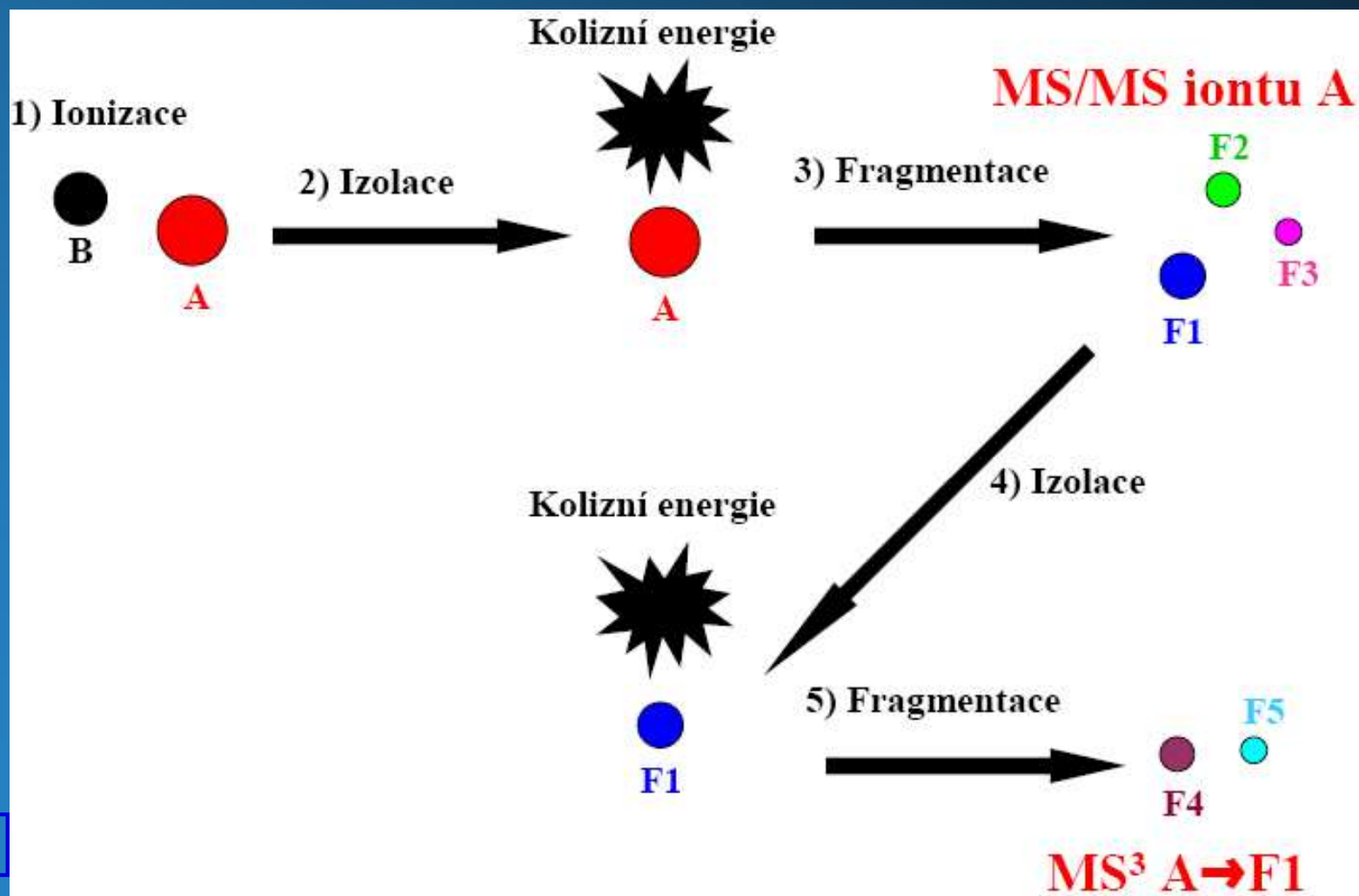
DIFUZNÍ A TURBOPUMPY



turbomolekulární pumpa

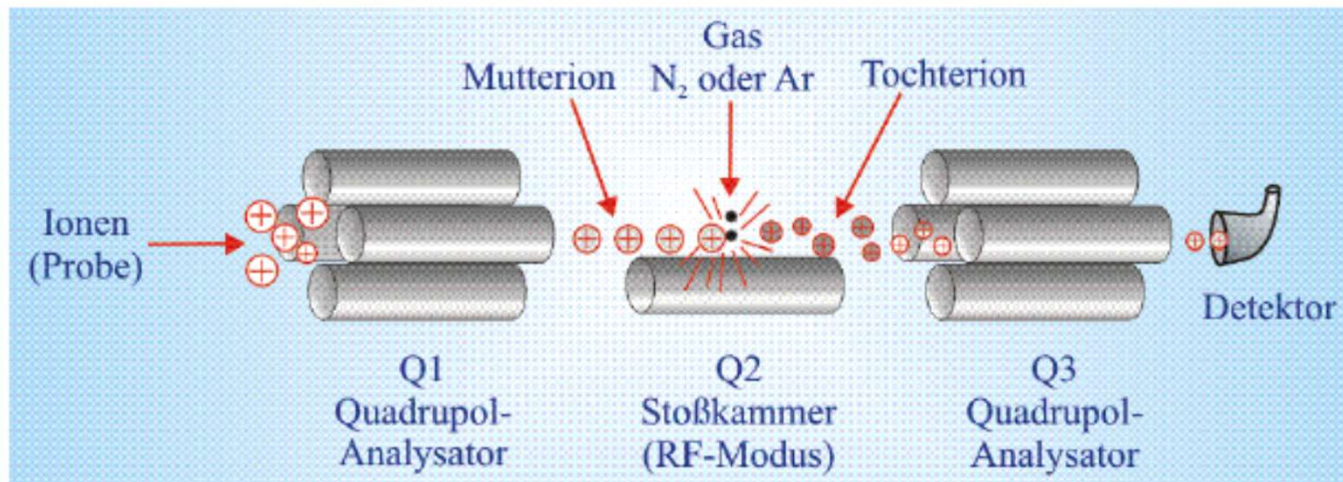


MSⁿ

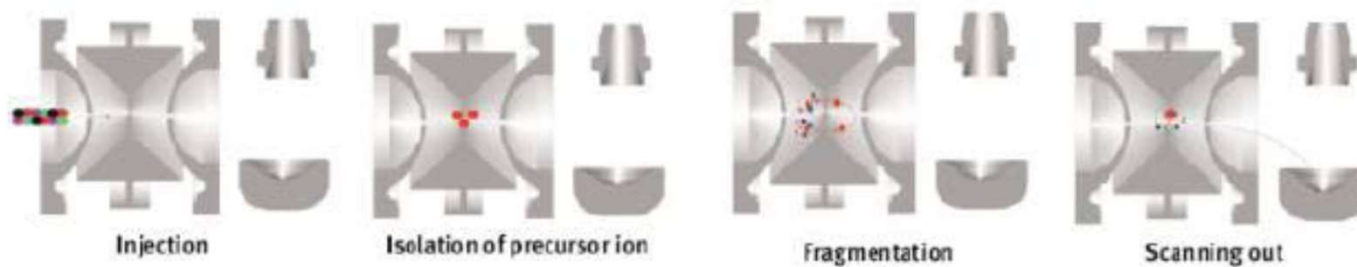


MSⁿ

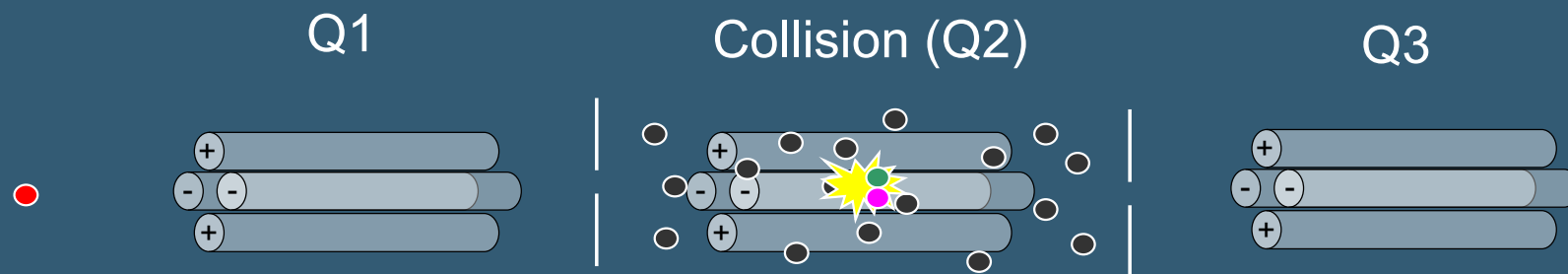
V prostoru



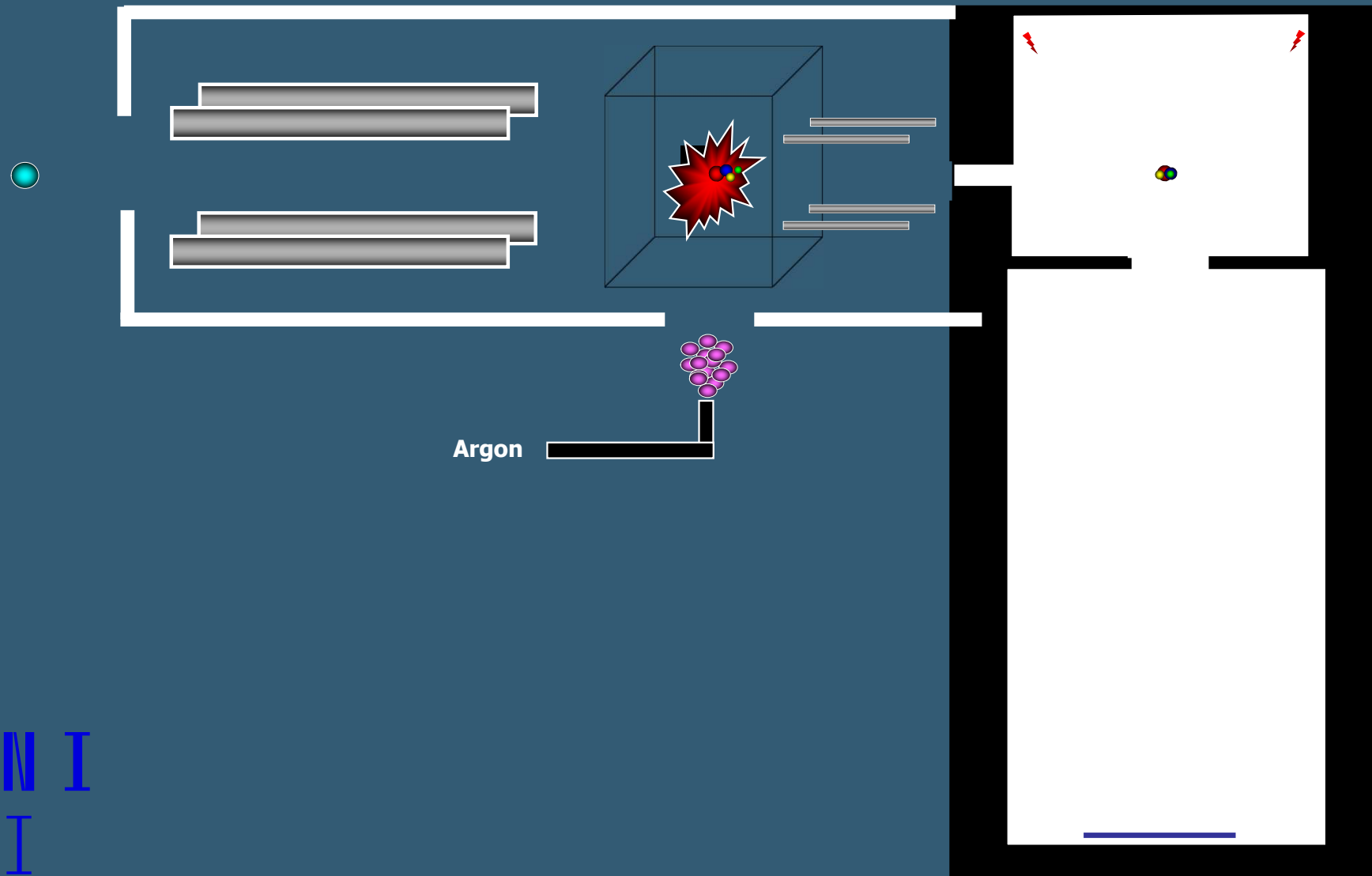
V čase



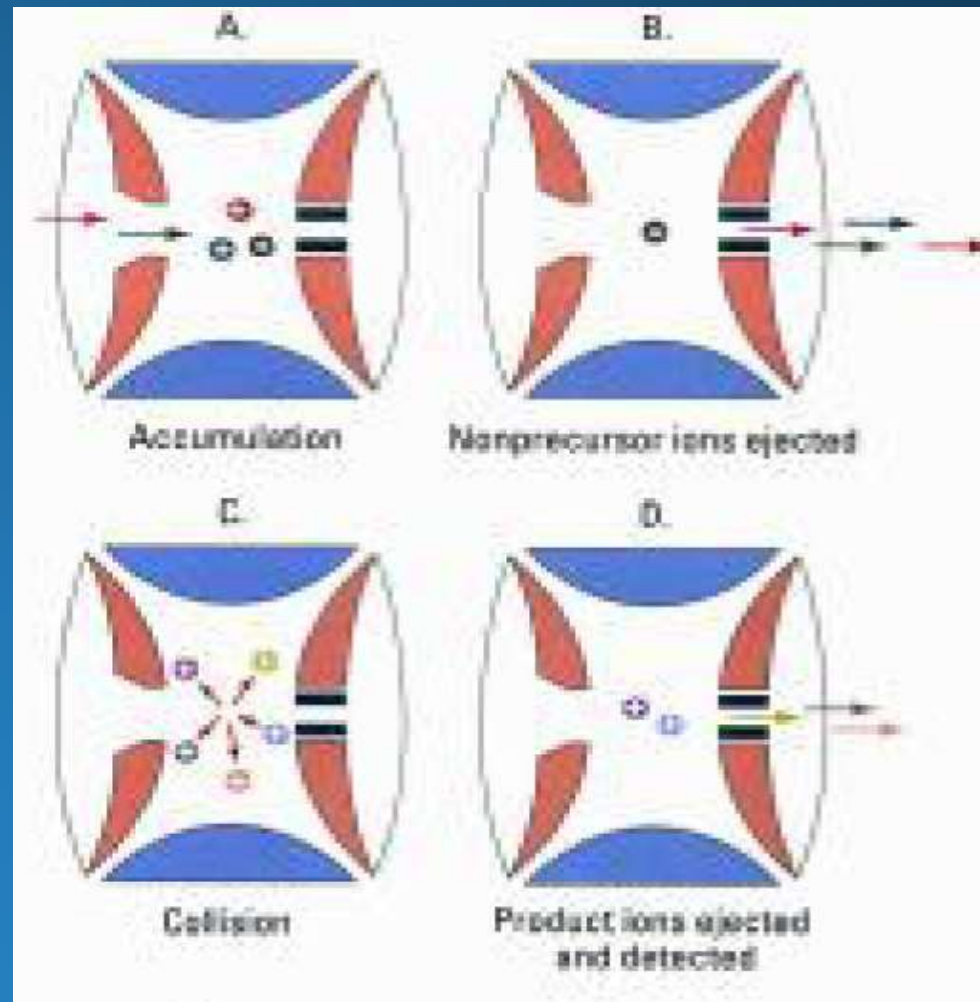
TripleQ



QTOF

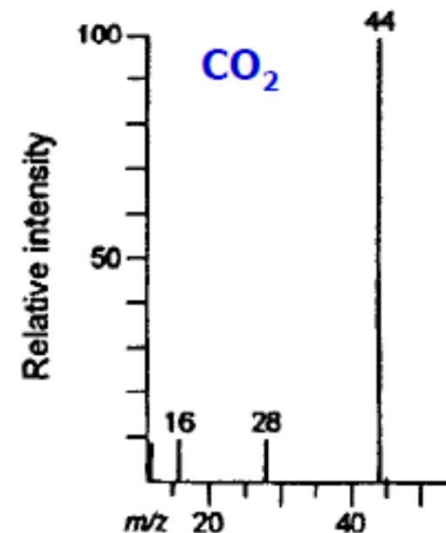
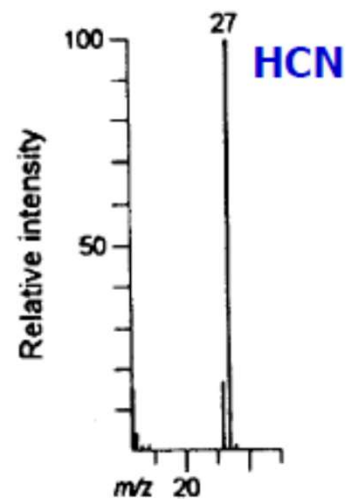
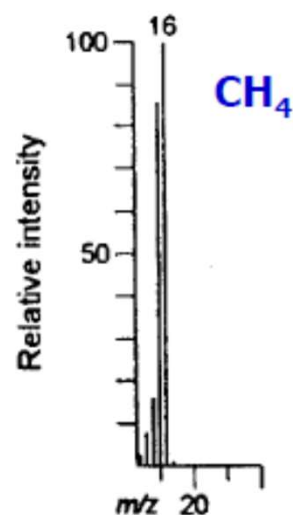
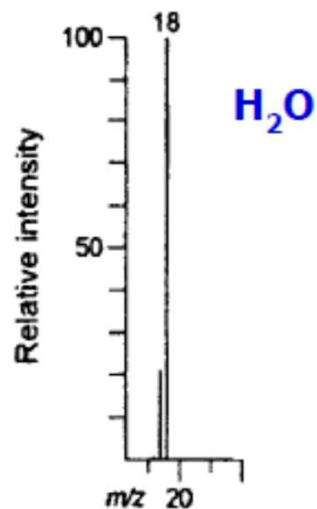


IT



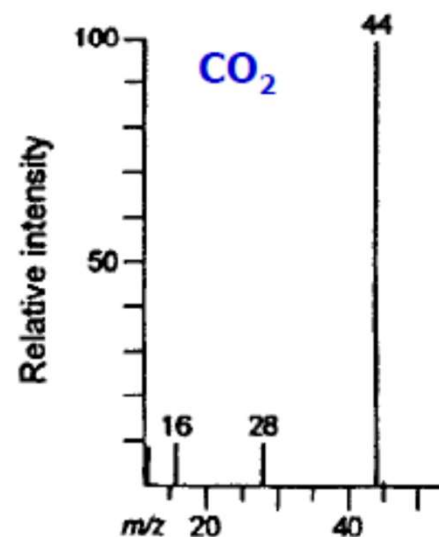
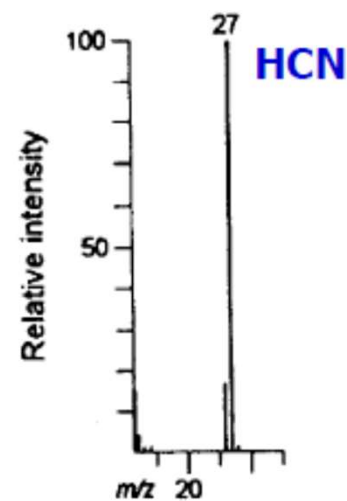
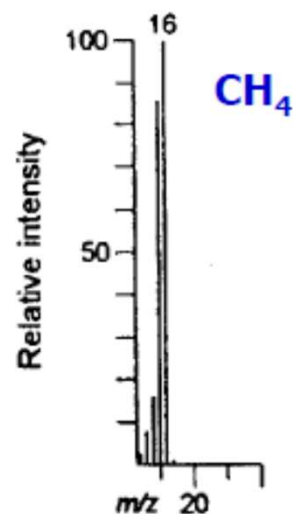
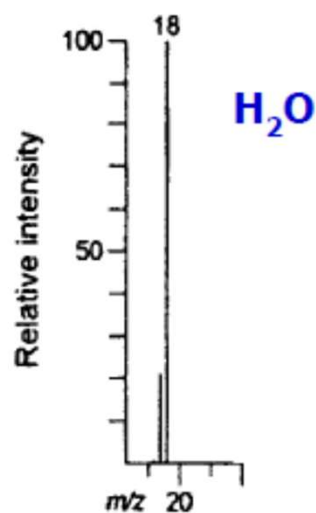
MS SPEKTRUM

- 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

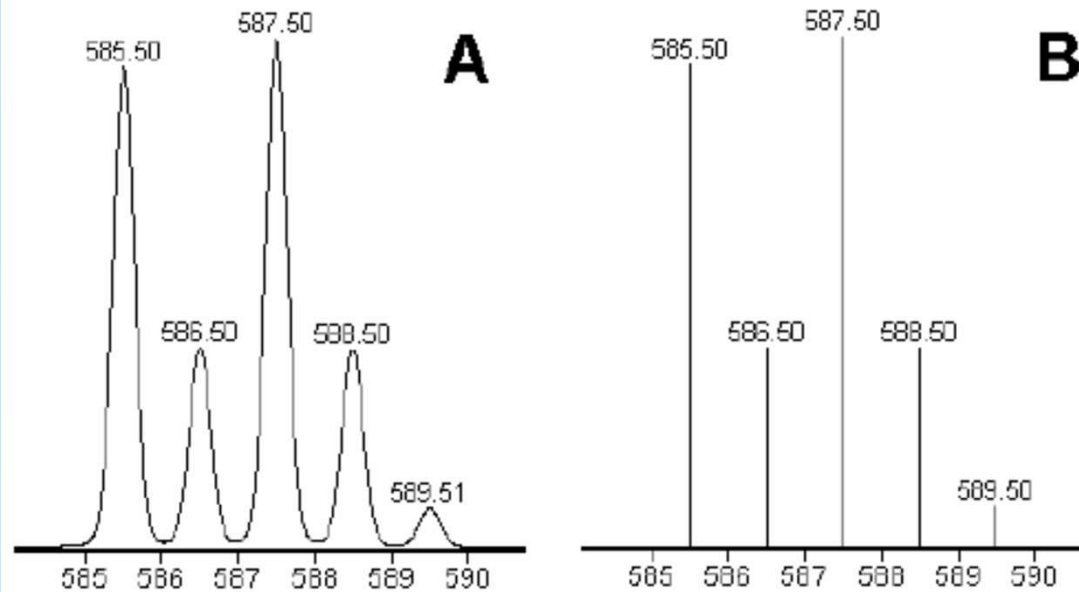


MS SPEKTRUM

- **normalizace spekter** - hmotnostní spektra jsou obvykle uváděna v normalizovaném tvaru, tzn. nejintenzivnějšímu píku spektra je přiřazena relativní intenzita 100% a intenzity ostatních píků 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
(Infussion) Probe

GC

HPLC

CE

Iontový zdroj

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

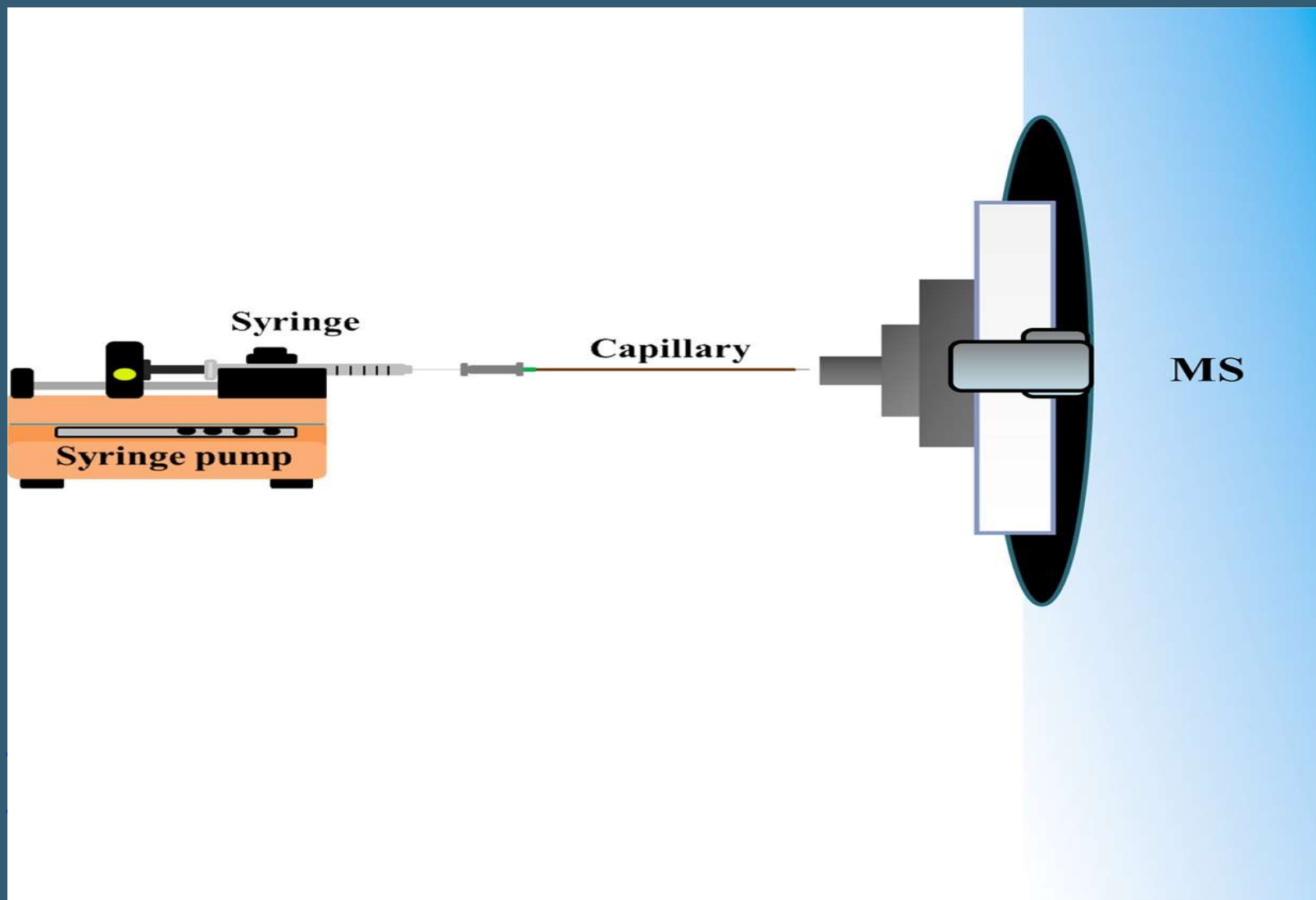
Analyzátor

Iontový separátor

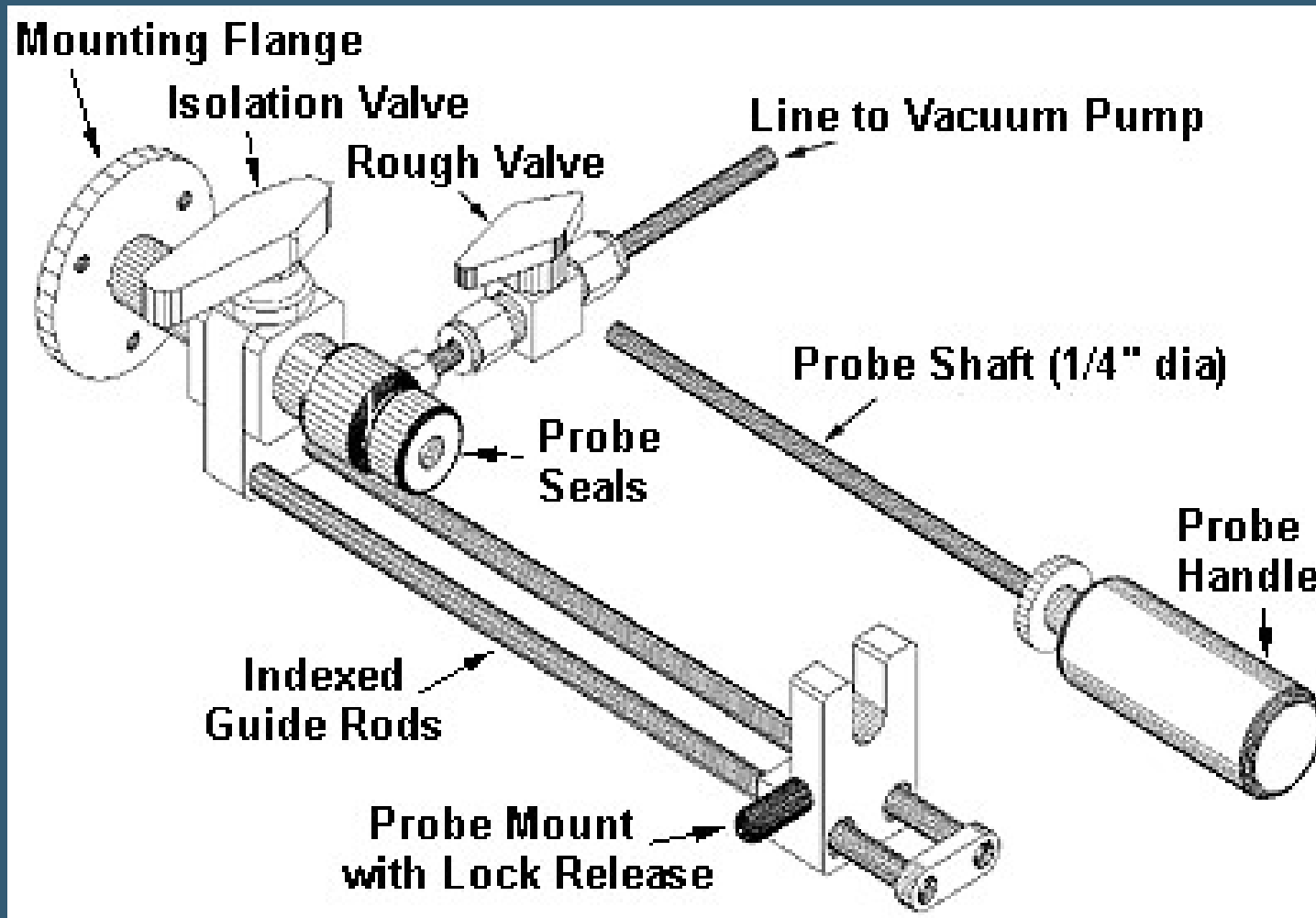
Detektor

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
 - analyzátoři: 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

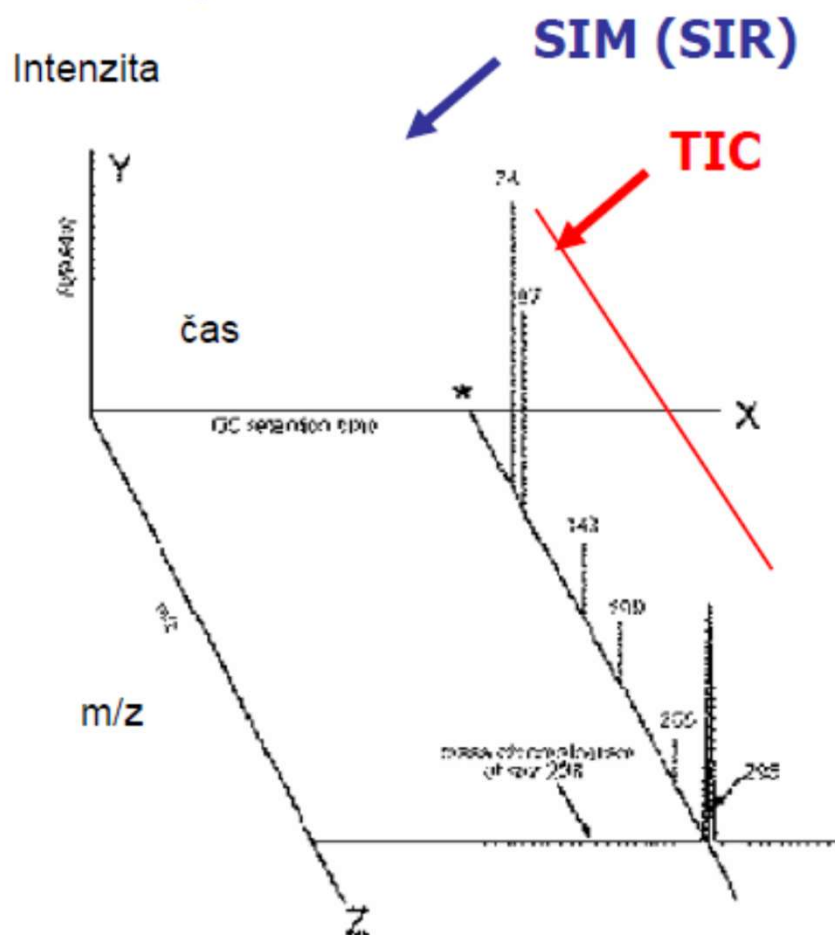
- Spojení HPLC později
 - odpaření – velký objem plynu = technický problém
 - řešení – API zdroje (APCI, APPI, ESI)
- Instrumentace
 - iontové zdroje: APCI, APPI, ESI
 - analyzátory: Q, IT, orbitrap, TOF
- Analyty:
 - od malých molekul po biopolymery
 - od málo polárních po iontové
 - omezeně kompatibilní MF s pufrý 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: Tripple Quad, Q-ToF (MS²); Ion Trap (až MS¹⁰) s vyšším MSⁿ klesá citlivost!

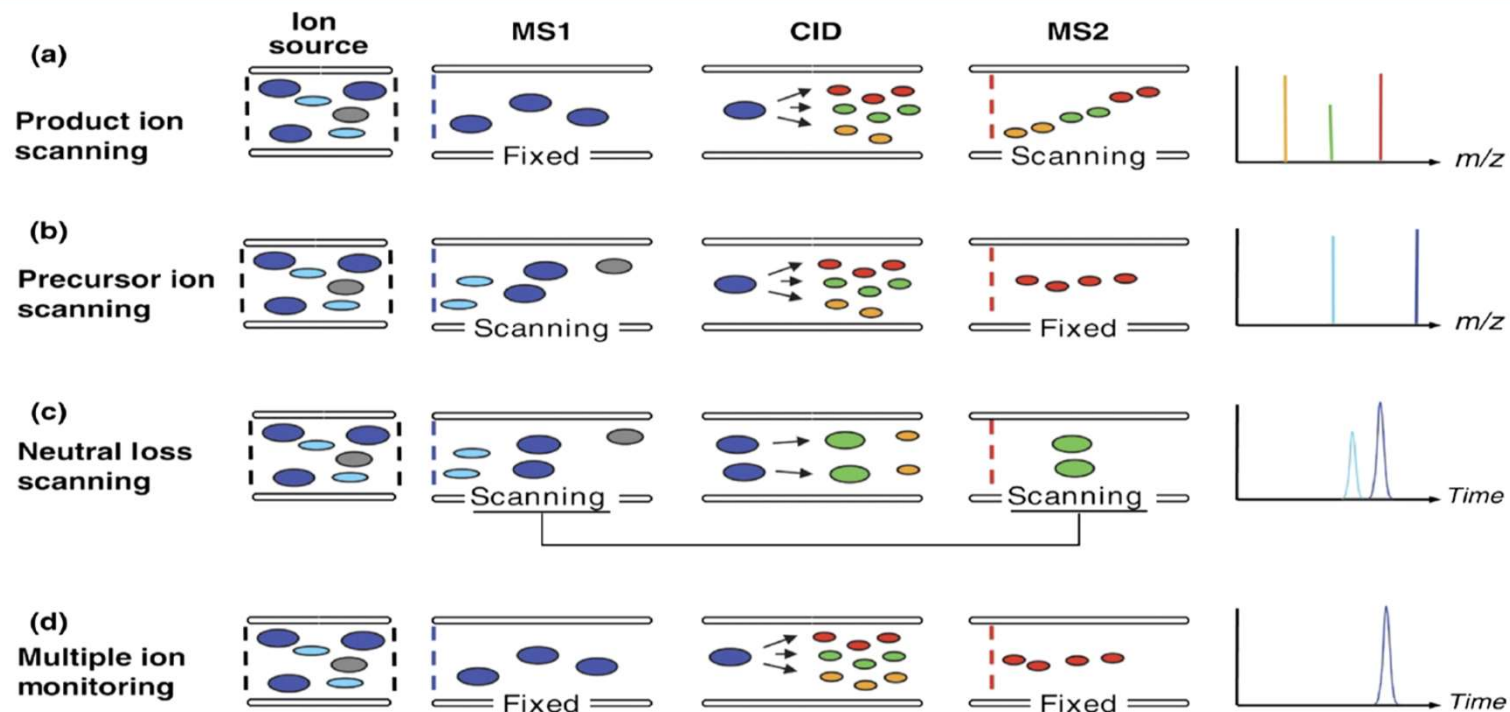
Precursor Ion Scan: Q1:TIC (m/z₁ – m/z₂) Q2: fragmentace iontu Q3: SIM detekce

Instrumentace: nelze na Ion Trap

Constant Neutral Loss Scan: Q1:TIC (m/z₁ – m/z₂) Q2: fragmentace iontu Q3: TIC ((m/z₁- ΔN) – (m/z₂-ΔN)) detekce; ΔN – rozdíl hmotností iontů – hmotnost odpadající neutrální částice z iontu *Instrumentace: nelze na Q-ToF a Ion Trap*

Selective Reacrion 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 porovnáním 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 ($2D$), $13C$, $15N$
 - doporučený posun alespoň $+3$ jednotky m/z
 - vysoká cena izotopicky značených standardů