

1 Úvod	1
2 Cíle úlohy	2
3 Předpokládané znalosti	2
4 Autotest základních znalostí	2
5 Základy práce se systémem GC-MS (EI)	3
5.1 Parametry plynového chromatografu	3
5.2 Základní charakteristiky MS detektoru	3
5.3 Konkurenční výhody MS detektoru oproti konvenčním detektorům.....	3
5.4 Základní prvky MS.....	3
5.4.1 Systém zavádění vzorků.....	4
5.4.2 Iontový zdroj	4
5.4.3 Analyzátoři iontů.....	5
5.4.4 Zdroj vakua	5
5.4.5 Registrační zařízení	5
5.5 Druhy, příčiny a odstranění problémů při práci se systémem GC-MS	5
6 Interpretace hmotnostních spekter (EI)	6
6.1 Srovnání s referenčními spektry uloženými v knihovně hmotnostních spekter.....	6
6.2 Interpretace na základě rozboru získaného spektra.....	6
6.2.1 Základní kroky a pravidla	6
6.2.2 Základní pravidla fragmentace.....	6
7 Použitá instrumentace	7
8 Práce se systémem GC-MS (EI)	7
8.1 Optimalizace parametrů detektoru (GC-MS).....	7
8.2 Režimy snímání hmotnostních spekter	7
8.3 Přístrojové podmínky GC-MS	8
9 Dílčí úlohy a demonstrace	8
9.1 Prohlížení a zpracování získaných chromatografických a spektrálních dat.....	8
9.2 Identifikace složek analyzované směsi	8
9.3 Stanovení známých látek.....	9
9.4 Diagnóza a odstranění problémů GC-MS systému	9
10 Kontrolní otázky	9
11 Řešení autotestu	10

1 Úvod

Hmotová spektrometrie (MS) je fyzikální metoda pro určování hmot volných molekul a jejich částí převedených pro tento účel na kladné, příp. záporné ionty. Hmotový spektrometr je iontově optické zařízení, které ze směsi plyných molekul (iontů) separuje nabitě částice podle jejich efektivních hmot (m/z). Na základě určení hmotnosti iontů a relace mezi molekulárním a fragmentačními ionty lze pak provést predikci identity analyzovaných látek. Charakter hmotového spektra závisí na způsobu zavedení vzorku do detektoru, podmínkách a způsobu ionizace, uspořádání analyzátoru(ů) iontů a způsobu registrace iontů.

Hmotový spektrometr je dnes zřejmě nejplatnějším detektorem vhodným pro plynovou chromatografii. Pro naprostou většinu aplikací je dostatečně citlivý, selektivní a nabízí ve srovnání s dalšími konvenčními detektory zdaleka nejvíc kvalitativních informací. Spojení plynové chromatografie (GC) s hmotnostním spektrometrickým (MS) detektorem se využívá čím dál častěji jako nástroj první volby při rutinní analýze mnohých složek potravin. Obvyklému uspořádání GC-MS systémů při analýze potravin odpovídá ionizace nárazem elektronu (electron impact, EI) s jednoduchým kvadrupolovým (Q) hmotovým filtrem (analyzátořem iontů).

2 Cíle úlohy

- seznámit se s možnostmi metod GC-MS pro použití v analýze potravin a s obvyklými technickými parametry instrumentace
- osvojit si základní pravidla pro přípravu GC-MS systému k analýze a práci s jednotlivými prvky instrumentace
- naučit se pracovat a optimalizovat nastavitelné parametry detekce tak, aby byl dosažen cíl analýzy (zejména způsoby kalibrace MS)
- naučit se základním pravidlům interpretace MS spekter (EI) na praktických příkladech.

3 Předpokládané znalosti

- principy hmotnostní spektrometrie
- možnosti a podmínky ionizace analytů
- typy analyzátořů iontů.

4 Autotest základních znalostí

1. Jaké jsou hlavní součásti hmotnostního spektrometru?
2. Jaké jsou obvyklé pracovní podmínky iontového zdroje při ionizaci nárazem elektronu (EI)?
3. Lze při EI ionizaci měřit také látky, které mají při pracovních podmínkách iontového zdroje nízkou tenzi par?

4. Co slouží jako zdroj elektronů pro ionizaci analyzovaných látek (reakčního plynu) v iontovém zdroji?
5. Jaké látky se používají jako tzv. reakční plyny při chemické ionizaci?
6. Co je to hmotové (hmotnostní) spektrum?
7. Co je to efektivní hmota (m/z)?
8. Co jsou monoisotopické ionty?
9. Jaký je obecný rozdíl v hmotnostních spektrech látky získaných po EI ionizaci a chemické ionizaci (CI)?
10. Proč lze s výhodou použít pro kvantifikaci látek analyzovaných metodou GC-MS isotopově značené standardy?

5 Základy práce se systémem GC-MS (EI)

5.1 Parametry plynového chromatografu

- viz úloha č. 2 v cyklu Laboratoř ze speciální analýzy potravin II (GC-FID)

5.2 Základní charakteristiky MS detektoru

- destruktivní, hmotnostní („mass flow-sensitive“) - odezva se nemění se změnou průtoku
- univerzální (skenovací mód) × selektivní (režim SIM), nastavitelný pro jakoukoliv složku
- mez detekce u obvyklých analytů při analýze potravin 1 pg (SIM) – 10 ng (scan), lineární dynamický rozsah až 10^5 .

5.3 Konkurenční výhody MS detektoru oproti konvenčním detektorům

- selektivita (hmotová), nižší nároky na chromatografické rozlišení
- více informací pro identifikaci (unikátní spektra)
- informace o molekulové hmotnosti
- informace o elementární struktuře (vysokorozlišovací MS)
- informace o struktuře při řízené fragmentaci, určení funkčních skupin, konektivity
- možnost použití isotopově značených standardů pro kvantifikaci.

5.4 Základní prvky MS

- systém zavádění vzorků (propojení s GC)
- iontový zdroj

- analyzátor(y) iontů (separace iontů)
- registrační zařízení
- zdroj vakua

5.4.1 Systém zavádění vzorků

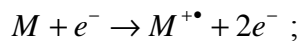
- propojení s GC (interface)
- požadavky na rozměry a stabilitu stacionární fáze kolony
 - omezený průměr (i.d. obvykle $\leq 0,25\text{-}0,32$ mm) v závislosti na délce kapilárních kolon a max. výkonu pump; max. průtok $1\text{-}2\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, příp. dělení toku efluentu (splitter, separátor); omezený průtok efluentu dán nutností evakuace detektoru.
 - menší tloušťka vrstvy stacionární fáze, stabilnější stacionární fáze a preference nepolárních stacionárních fází; souvisí s citlivostí iontového zdroje vůči znečištění (deposit), snížení výkonnosti systému; typické ionty pocházející ze stacionární fáze.
- požadavky na spojovací prvky (fítinky)
- kondicionace kolony před zavedením do GC-MS propojení.

5.4.2 Iontový zdroj

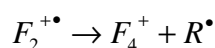
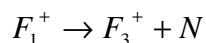
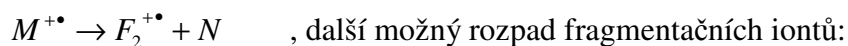
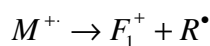
- princip ionizačního procesu EI (ionizace nárazem elektronu); pozitivní a negativní ionty; energie; fragmentace organických látek nárazem elektronu, ionizační potenciál, mechanismy fragmentace; vlákno emitující elektrony; parametry iontového zdroje, fokusace; ionizace elektrony: zachycení elektronu neutrální molekulou (záporné ionty se většinou nesledují):



odstranění elektronu z neutrální molekuly, vznik kladně nabitého molekulového iontu:



ionty se při přebytku získané vnitřní energie mohou štěpit na fragmenty nesoucí náboj se sudým (F^+) nebo lichým ($F^{+\bullet}$) počtem elektronů, neutrální radikály a neutrální částice:



- princip a parametry chemické ionizace, energie, vznikající ionty, pozitivní a negativní ionty
- kombinované iontové zdroje.

5.4.3 Analyzátoř iontů

- rozlišovací schopnost (resolution power, RP)

$$RP = \frac{m}{\Delta m_{0,5}}$$

$$\text{měření ppm} \quad \text{chyba (ppm)} = \frac{m_M - m_S}{m_S} \times 10^6, \quad \text{kde}$$

m_M = naměřená hmota, m_S = skutečná hmota

- magnetické analyzátoř (jednoduchá, dvojitá fokusace)
- kvadrupolový analyzátoř (Q; single, multiple) – popis, parametry, princip filtrace iontů. Separace iontů probíhá v proměnném elektrickém poli umístěném mezi čtyřmi hyperbolickými tyčemi, na které je vloženo stejnosměrné napětí. K tomu, aby ionty pronikly elektrostatickým polem, se musí podrobit oscilaci; stabilita závisí na hodnotě m/z . Radiofrekvenční pole je rychle skenováno, aby byly detegovány všechny ionty v měřeném rozsahu v dostatečném počtu skenů během eluce píku.
- iontová past (IT) – princip, parametry, odlišnosti od kvadrupolu
- průletový analyzátoř (TOF) – parametry, specifika
- MS/MS techniky - analyzátoř v tandemu, kolizní cely, výběř prekursorových iontů.

5.4.4 Zdroj vakua

- dvě pumpy - hrubá (olejová) pumpa,
- difusní (turbo) pumpa - dosažení vysokého vakua.

5.4.5 Registrační zařízení

- detekce iontů, záznam spektra
- zesilovače, elektronový násobič, fotonásobič.

5.5 Druhy, příčiny a odstranění problémů při práci se systémem GC-MS

- běžné kontaminanty (ionty) v hmotovém spektru, jejich možné zdroje (z GC i MSD)
- symptomy znečištěného detektoru

- příčiny znečištění detektoru, prevence znečištění
- čištění iontového zdroje, ochrana emisního vlákna (katody)
- symptomy týkající se vakua.

6 Interpretace hmotnostních spekter (EI)

6.1 Srovnání s referenčními spektry uloženými v knihovně hmotnostních spekter

- předběžné vyhledávání (redukované spektrum)
- podrobné vyhledávání (podle m. h., podle fragmentů)
- komerční, nekomerční a vlastní knihovny.

6.2 Interpretace na základě rozboru získaného spektra

6.2.1 Základní kroky a pravidla

- hlavní pík/ion
- molekulární pík, intenzita m. píku a stabilita molekuly, stabilizace cyklizací iontů, stabilizace delokalizací náboje
- klastr (skupina) molekulárního píku (isotopické píky/ionty)
- přirozené isotopy – isotopy C, S, N, halogenů, monoisotopická hmota
- stanovení elementárního složení iontů (sumární vzorec)
- dusíkové pravidlo, počet nenasycených míst, pravidlo sudého počtu elektronů, Stevenson-Audierovo pravidlo
- možnost potvrzení nálezu analyzované látky na základě prokázání přítomnosti odpovídajících iontů s typickými hodnotami m/z a s charakteristickým poměrem intenzit v daném retenčním čase.

6.2.2 Základní pravidla fragmentace

- závislost na instrumentálních a experimentálních podmínkách
- míra fragmentace souvisí s disociační energií jednotlivých vazeb v molekule
- hledání a hodnocení typických fragmentů iontů nebo neutrálních fragmentů, indikátorů přítomnosti funkčních skupin nebo strukturních typů sloučenin
- obecně platné projevy fragmentace některých strukturních typů organických sloučenin.

7 Použitá instrumentace

- 6890N network GC System s 5973N Mass Selective Detector, příp. s 5975 inert Mass Selective Detector, vše Agilent Technologies.



8 Práce se systémem GC-MS (EI)

Po inspekci nástřikového prostoru se připraví a poté do přístroje nainstaluje vhodná kolona. Přístroj se zapne, nastaví se požadovaný průtok nosného plynu kolonou, splitový poměr, teplota pece, nástřiku a detektoru a poté se nahraje, event. upraví příslušná metoda a spustí se pumpy. Po několika desítkách minut až hodinách jsou dosaženy podmínky v detektoru vhodné pro analýzu.

8.1 Optimalizace parametrů detektoru (GC-MS)

- kalibrace MSD
- důvody, provedení, parametry, vyhodnocení
- testovací sloučeniny a směsi.

8.2 Režimy snímání hmotnostních spekter

- GC-MS experimenty
- „full scan“ - data jsou použita k vytvoření TIC
- SIM - technika určená pro stopovou analýzu
- doba skenovacího cyklu, délka elučního pásu (10-15 s).

8.3 Přístrojové podmínky GC-MS

- běžné GC parametry
- rozsah hmot, nastavení „solvent delay“.

9 Dílčí úlohy a demonstrace

Studenti (laboratorní skupina) provedou minimálně jednu úlohu z každé skupiny úloh podle pokynů vyučujícího.

9.1 Prohlížení a zpracování získaných chromatografických a spektrálních dat

Práce s modelovými směsmi, většinou rozbor již získaných záznamů -

- čistota chromatografických píků
- průměrná spektra
- určení poměru iontů
- prohlížení a srovnání tabelovaných spekter
- určení pravděpodobného molekulárního iontu
- stanovení počtu atomů C v molekule
- srovnání přesných hmot
- stanovení počtu a druhu halogenů
- identifikace důležitých substruktur.

9.2 Identifikace složek analyzované směsi

GC-MS analýza různých vzorků – extrakty z Maillardových systémů, lihoviny, extrakty s rozkladnými produkty česneku, silice aj. Cílem je určení neznámých látek srovnáním s dostupnými knihovny spekter, rozbořem spektra a srovnáním s dalšími údaji (retenčními indexy) v databázích dodaných vyučujícím, příp. srovnáním se standardy. Také práce s již získanými záznamy GC-MS analýz

- výběr knihovny spekter

- odečet a vyčištění spektra
- interpretace výsledků srovnání spektra s tabelovanými spektry
- hledání sloučenin (jejich spekter) v knihovnách
- tvorba vlastní knihovny spekter.

9.3 Stanovení známých látek

- aplikace režimu SIM (Selected Ion Monitoring, sledování zvolených iontů)
- demonstrace zvýšené citlivosti a selektivity (na vybraných extraktech).

9.4 Diagnóza a odstranění problémů GC-MS systému

- chromatografické symptomy
- symptomy hmotnostního detektoru
- symptomy tlakové
- symptomy teplotní.

10 **Kontrolní otázky**

1. Jaké omezení plynou pro výběr kapilárních kolon při GC-MS aplikacích?
2. Ve kterých případech a pro které typy struktur volíme MS metody s chemickou ionizací?
3. Proč je nutné udržovat v prostoru MS detektorů (tj. v iontovém zdroji a analyzátoru) nízký tlak („vakuum“)?
4. Vysvětlete příčinu fragmentace molekulárních iontů při ionizaci nárazem elektronů (EI).
5. Co se děje během optimalizace podmínek (ladění) GC-MS systému?
6. Vysvětlete, proč lze za použití režimu sledování vybraných iontů (SIM) dosáhnout řádově lepší citlivosti než při snímání celého spektra iontů (full scan, TIC).
7. Co je to rozlišovací schopnost spektrometru a chyba měření hmoty (v ppm)?
8. Popište základní strategii při interpretaci spekter.
9. Jaké jsou základní charakteristiky EI spektra alkanů?
10. Jaké jsou základní charakteristiky EI spektra aromatických uhlovodíků?

11 Řešení autotestu

1. Zařizování pro vstup vzorku, iontový zdroj, analyzátor iontů, registrační zařízení.
2. Energie emitovaných elektronů 5-100 eV (obvykle (50-)70 eV), pracovní tlak 10^{-6} - 10^{-4} Pa, teplota do 400°C.
3. Ne. Ionizace nárazem elektronu (podobně i CI) probíhá pouze u molekul v plynném stavu.
4. Jako zdroj elektronů slouží wolframová nebo rheniová katoda (žhavené „vlákno“), která poskytuje emisní proud do 500 μ A.
5. Nejčastěji methan, také *n*-propan, isobutan, vodík, methanol, amoniak, atd.
6. Hmotové spektrum (čárové nebo spojitě) je výsledkem (záznamem) detekce iontů (fragmentů) v určitém rozsahu hodnot m/z (osa *x*). Intenzita čar/píků (osa *y*) je úměrná počtu fragmentů s konkrétní hodnotou m/z během jednoho skenu.
7. Efektivní hmota m/z představuje poměr hmoty (relativní molekulové hmotnosti) a počtu nábojů (obvykle +1, ale také +2 nebo +3), tj. bezrozměrných veličin. Pokud je hmota vyjádřena v daltonech (Da), m/z se uvádí v thomsonech (Th).
8. Jsou to ionty skládající se pouze z jednoho isotopu každého z prvků přítomných v ionizované molekule (fragmentu).
9. Ionizace EI (70 eV) umožňuje rozsáhlejší fragmentaci molekuly než „měkčí“ CI. EI spektra proto obsahují obecně molekulový ion s nižší intenzitou a četnější fragmentární ionty než CI. Za podmínek CI je molekulový ion obvykle základním (base) iontem.
10. Isotopově značený standard má totožné chování (vlastnosti) v GC systému jako neznačená analyzovaná látka, při MS detekci jej lze ale snadno odlišit odlišnou hmotou.