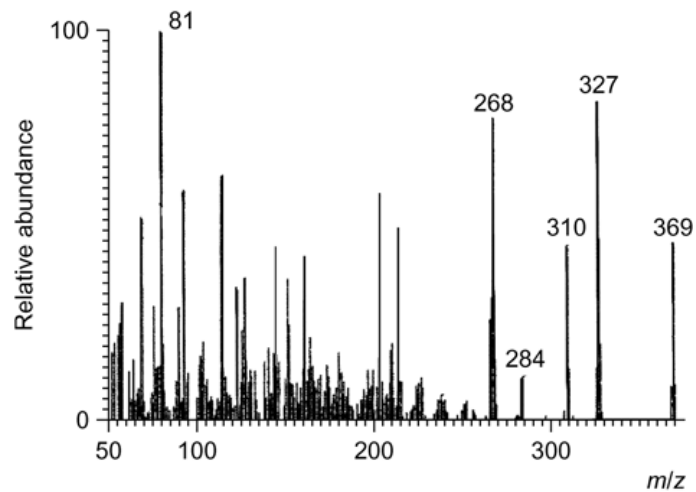
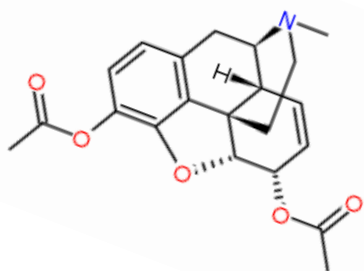


Aplikovaná hmotnostní spektrometrie (MS)



1. Title: **The forensic analysis of office paper using carbon isotope ratio mass spectrometry - Part 1: Understanding the background population and homogeneity of paper for the comparison and discrimination of samples**
Author(s): Jones, Kylie; Benson, Sarah; Roux, Claude
Source: FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL Volume: **231** Issue: **1-3** Pages: **354-363** DOI: **10.1016/j.forsciint.2013.03.048**
Published: **SEP 10 2013**
Times Cited: **0** (from Web of Science)
[→Links](#) [→ Full Text](#) [[View abstract](#)]
2. Title: **The forensic analysis of office paper using carbon isotope ratio mass spectrometry-Part 2: Method development, validation and sample handling**
Author(s): Jones, Kylie; Benson, Sarah; Roux, Claude
Source: FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL Volume: **231** Issue: **1-3** Pages: **364-374** DOI: **10.1016/j.forsciint.2013.05.009**
Published: **SEP 10 2013**
Times Cited: **0** (from Web of Science)
[→Links](#) [→ Full Text](#) [[View abstract](#)]
3. Title: **Application of mass spectrometry to hair analysis for forensic toxicological investigations**
Author(s): Vincenti, Marco; Salomone, Alberto; Gerace, Enrico; et al.
Source: MASS SPECTROMETRY REVIEWS Volume: **32** Issue: **4** Pages: **312-332** DOI: **10.1002/mas.21364** Published: **JUL-AUG 2013**
Times Cited: **2** (from Web of Science)
[→Links](#) [→ Full Text](#) [[View abstract](#)]
4. Title: **DIFFERENTIATING MICROBIAL FORENSIC QPCR TARGET AND CONTROL PRODUCTS BY ELECTROSPRAY IONIZATION MASS SPECTROMETRY**
Author(s): Motley, S. Timothy; Redden, Cassie L.; Sannes-Lowery, Kristin A.; et al.
Source: BIOSECURITY AND BIOTERRORISM-BIODEFENSE STRATEGY PRACTICE AND SCIENCE Volume: **11** Issue: **2** Pages: **107-117** DOI: **10.1089/bsp.2012.0062** Published: **JUN 2013**
Times Cited: **0** (from Web of Science)
[→Links](#) [→ Full Text](#) [[View abstract](#)]
5. Title: **Forensic discrimination of blue ballpoint pens on documents by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry and multivariate analysis**
Author(s): Alamilla, Francisco; Calcerrada, Matias; Garcia-Ruiz, Carmen; et al.
Source: FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL Volume: **228** Issue: **1-3** Pages: **1-7** DOI: **10.1016/j.forsciint.2013.01.034** Published: **MAY 10 2013**

ÚVOD DO HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

- **1912 – záznam první hmotnostního spektra (Thomson)**
- **Během posledních desetiletí byla hmotností spektrometrie předmětem řady pokroků**
 - Spojení MS s GC a LC
 - Rozvoj nových ionizačních technik
 - Dostupnost relativně levných hmotnostních analyzátorů (kvadrupól, iontová past)
 - „Znovuobjevení“ TOF hmotnostních analyzátoru

ÚVOD DO HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

▪ Technika

Hmotnostní spektrometrie (*mass spectrometry*)

nikoliv

hmotnostní spektroskopie

▪ Instrumentace

Hmotnostní spektrometr (*mass spectrometer*)

nikoliv

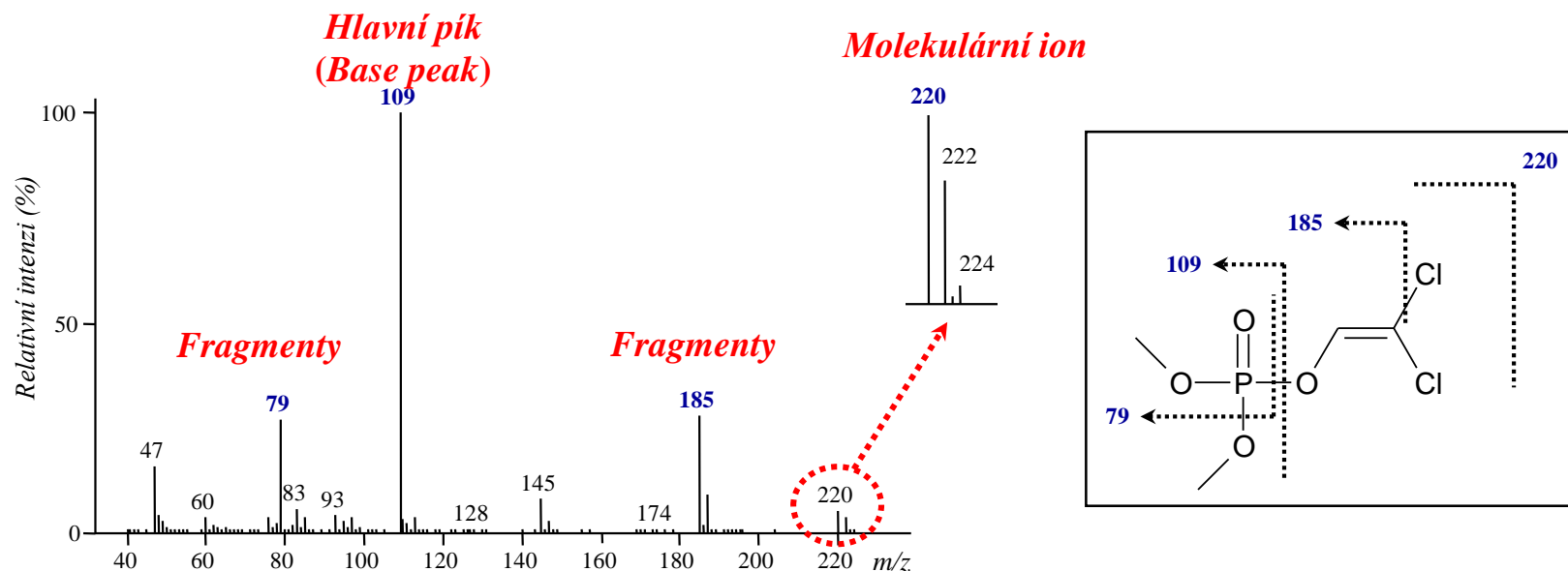
hmotnostní spektroskop

PRINCIP HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

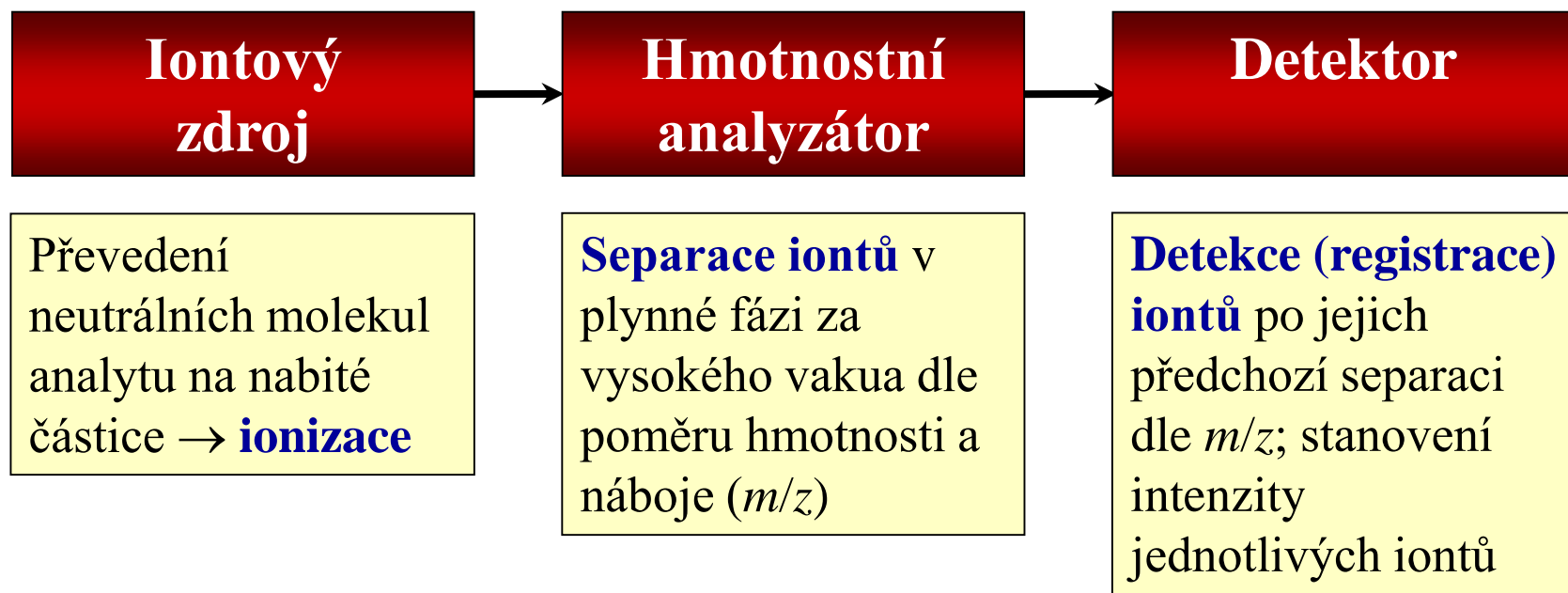
- Instrumentální technika založená na separaci iontů ve vakuu, v plynné fázi, dle poměru hmotnosti a náboje (m/z)
- Analyzované molekuly jsou nejprve ionizovány za tvorby molekulárních iontů nebo (de)protonovaných molekul (dle typu ionizační techniky)
- Pokud tyto molekuly obsahuje dostatek vnitřní energie, podléhají další fragmentaci
- Veškeré vytvořené ionty jsou pak separovány pomocí hmotnostního spektrometru dle hodnot m/z

PRINCIP HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

- Následně je získáno **hmotností spektrum** dané molekuly, tj. **osa y** – relativní intenzita (%); **osa x** – poměr hmotnosti a náboje (m/z)



ČÁSTI HMOTNOSTNÍHO SPEKTROMETRU



GC-MS

http://www.unsolvedmysteries.oregonstate.edu/MS_05

LC-MS

<http://www.dnatube.com/video/7235/Animation-of--Mass-Spectrometry-explaining-its-principle>

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Ionizační techniky

ELEKTRONOVÁ IONIZACE (EI)

▪ Princip

- Urychlení elektronů prostřednictvím elektrického pole
- Interakce daných energetických elektronů s neutrální molekulou (M)
- Po následné kolizi molekula ztrácí elektron a stává se částicí s lichým počtem elektronů a pozitivním nábojem (radikálkation, $M^{\bullet+}$)



Molekulární ion

ELEKTRONOVÁ IONIZACE (EI)

■ Princip

- Pokud molekulární ion obsahuje dostatek vnitřní energie, dochází k jeho fragmentaci, což vede k tvorbě fragmentů



- Může vznikat:

1. ion se sudým počtem elektronů (EE^+) a radikál (R^{\bullet})
2. nový radikálkation ($OE^{\bullet+}$) s lichým počtem elektronů a neutrální molekula (N)

ELEKTRONOVÁ IONIZACE (EI)

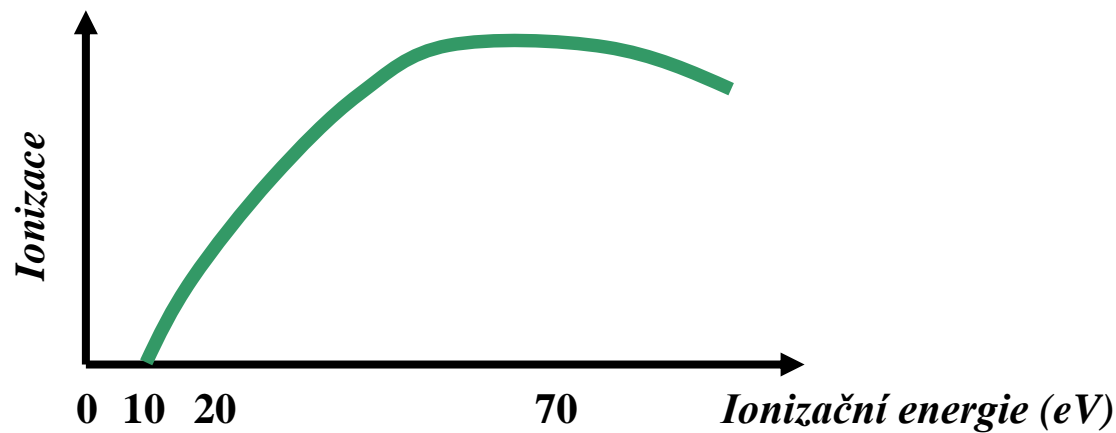
▪ Ionizační energie

- Energie vyžadovaná pro ionizaci
- Rozsah hodnot: 0 eV až přes 100 eV
- Positivně nabitě částice (tj. molekulární ionty) se začínají objevovat s nízkou intenzitou při ≈ 10 eV
- Vzrůst ionizačního potenciálu vede k tvorbě fragmentů

ELEKTRONOVÁ IONIZACE (EI)

▪ Ionizační energie

- Standardní hmotnostní spektra jsou získávána obvykle při **70 eV**
 - Je pozorována maximální intenzita iontů
 - Hmotnostní spektra jsou opakovatelná a charakteristická nezávisle na použitém typu přístroje

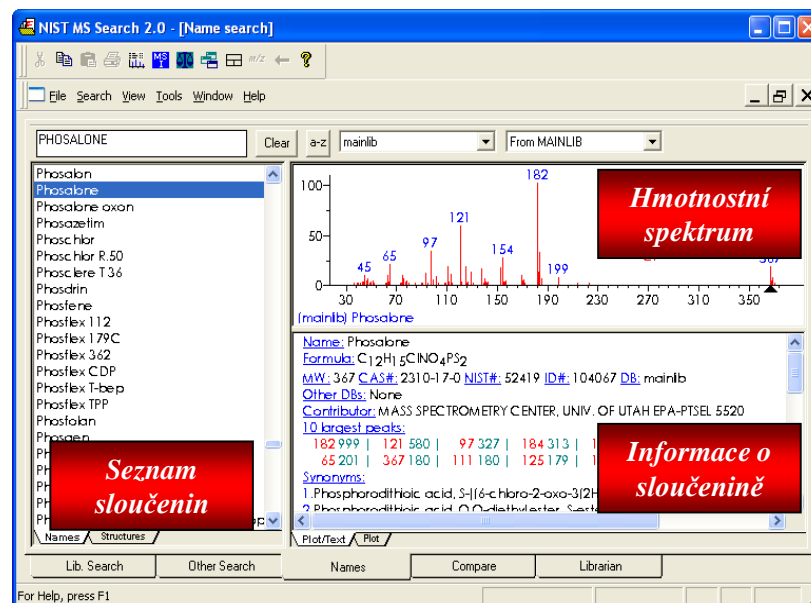


ELEKTRONOVÁ IONIZACE (EI)

■ Výhody EI

- Identická spektra jsou získána bez ohledu na použitý typ hmotnostního spektrometru s EI zdrojem za předpokladu, že je použito stejné ionizační energie

- Vznik rozsáhlých knihoven spekter (např. **NIST**—National Institute of Standard and Technology, **Wiley**)



ELEKTRONOVÁ IONIZACE (EI)

▪ Použití EI

- Identifikace „neznámé“ sloučeniny
- Stanovení molekulární struktury sloučeniny
- Konfirmace (potvrzení) identity cílového analytů na základě shodných poměrů iontů a shody s knihovnou spekter

CHEMICKÁ IONIZACE (CI)

▪ Úvod

- „Měkká“ ionizační technika (ve srovnání s EI)
- Vhodná pro méně těkavé nebo termálně labilní molekuly, které neposkytují molekulární iont při elektronové ionizaci

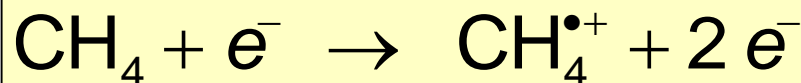
▪ Proces

- Vhodný reakční plyn je zaváděn do iontového zdroje, přičemž koncentrace reakčního plynu značně převyšuje množství analytů (např. $10^4:1$)
- Reakční plyn podléhá v iontovém zdroji obvyklé ionizaci jako v EI

POZITIVNÍ CHEMICKÁ IONIZACE (PCI)

▪ Princip

- Do iontového zdroje je dodáván reakční plyn (např. methan) o relativně vysokém tlaku (0,1–100 Pa)
- Reakční plyn podléhá elektronové ionizaci (EI) a dochází k tvorbě nadbytku **reakčních iontů**

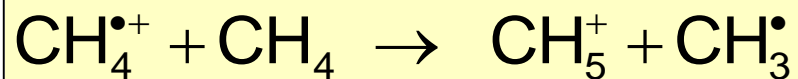


Reakční ion

POZITIVNÍ CHEMICKÁ IONIZACE (PCI)

■ Princip

- Molekuly vzorku jsou následně ionizovány reakčními ionty prostřednictvím přenosu protonu a vznikají **protonované molekuly $[M+H]^+$**



Reakční ion



Protonovaná molekula

- Může rovněž docházet k tvorbě **aduktů $[M+C_2H_5]^+$ a $[M+C_3H_5]^+$**

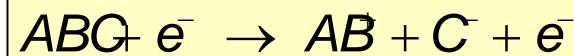
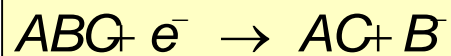
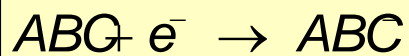
POZITIVNÍ CHEMICKÁ IONIZACE (PCI)

- **Protonované molekuly** mají obvykle nízkou vnitřní energii a jsou **méně náchylné k fragmentaci** ve srovnání s molekulovými ionty produkovány za podmínek elektronové ionizace (EI)
- Za daných podmínek je možné získat jednoznačnou informaci o molekulové hmotnosti sloučeniny

NEGATIVNÍ CHEMICKÁ IONIZACE (NCI)

■ Princip

- Základní mechanismus shodný s detektorem elektronového záchytu (ECD): Nízkoenergetické elektrony jsou zachyceny elektronegativní molekulou (ABC) vzorku
- Vzniká **molekulární aniont**, který může dále podléhat fragmentaci v závislosti na své struktuře

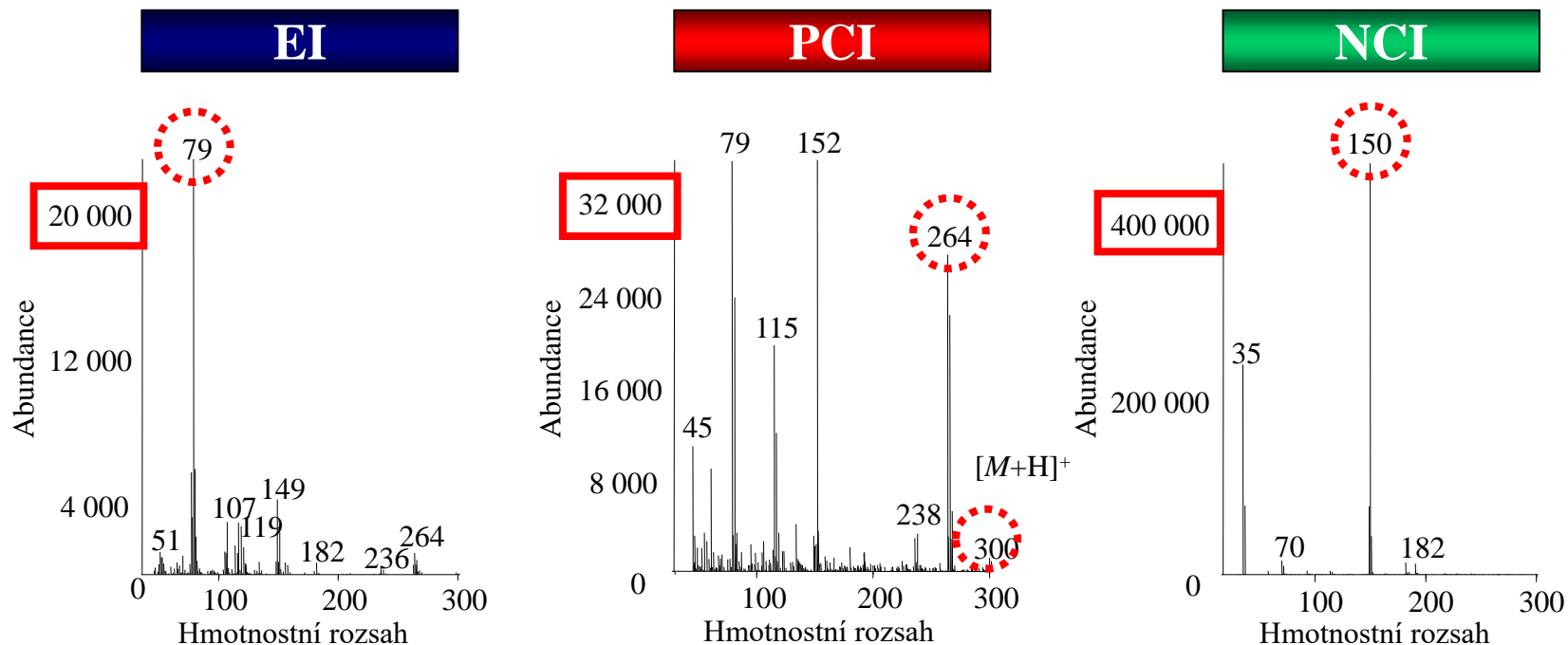


- Reakční plyny: methan (ion $[H]^-$), amoniak (ionty $[NH_2]^-$, $[H]^-$)

NEGATIVNÍ CHEMICKÁ IONIZACE (NCI)

- **Výhody NCI vs. EI a PCI**
 - Možnost až **100-násobného zlepšení citlivosti**
 - **Vyšší stupeň selektivity** — pouze limitovaný počet analytů, např. obsahující atom halogenu, nitro skupinu, nebo aromatický kruh, je schopen efektivního zachytu elektronu

VLIV IONIZAČNÍCH TECHNIK NA HMOTNOSTNÍ SPEKTRUM V GC-MS



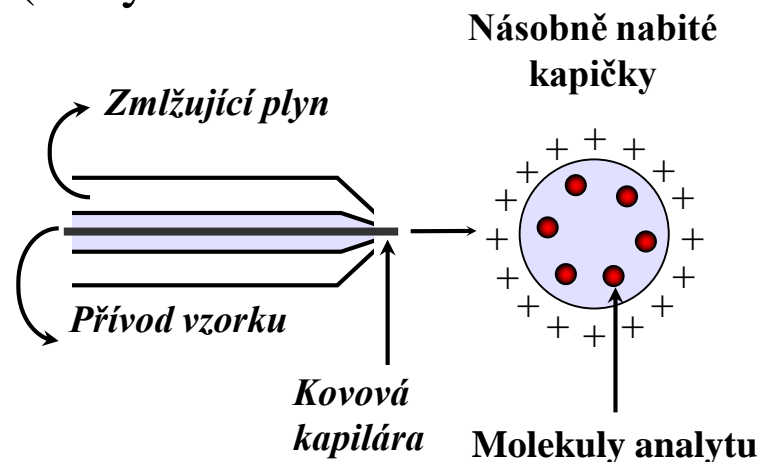
Hmotnostní spektra pesticidu captan (MW = 299)

V případě PCI a NCI použit methan jako reakční plyn

IONIZACE ELEKTROSPREJEM (ESI)

■ Princip

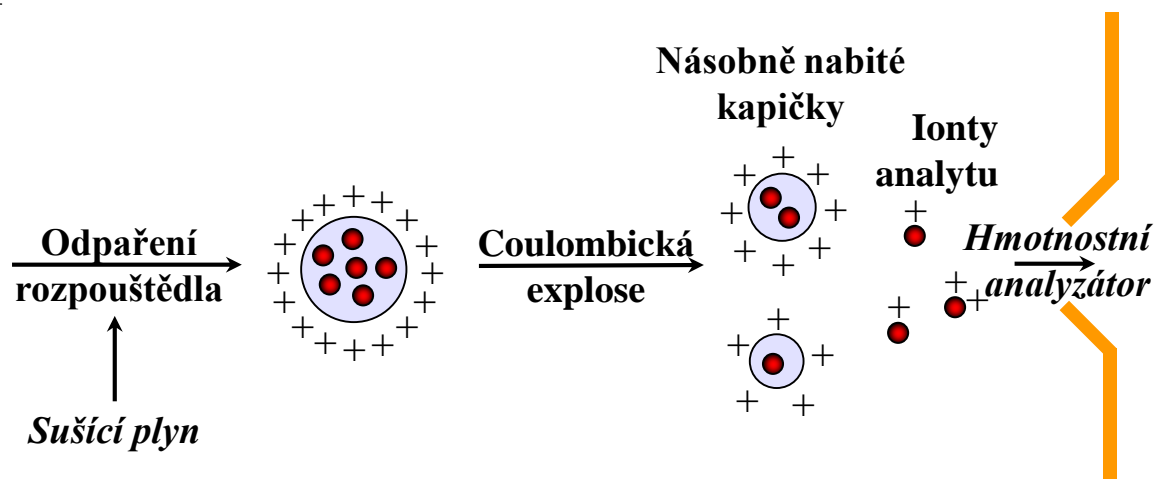
- Analyt rozpuštěný ve vhodném rozpouštědle je přiváděn kovovou kapilárou (průtok mobilní fáze 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ – 1 mL/min), na kterou je vloženo vysoké napětí (2,5–4 kV)
- Dochází ke tvorbě násobně nabitých kapiček na výstupu z kapiláry za pomoci zmlžovacího plynu (obvykle dusík)



IONIZACE ELEKTROSPREJEM (ESI)

■ Princip

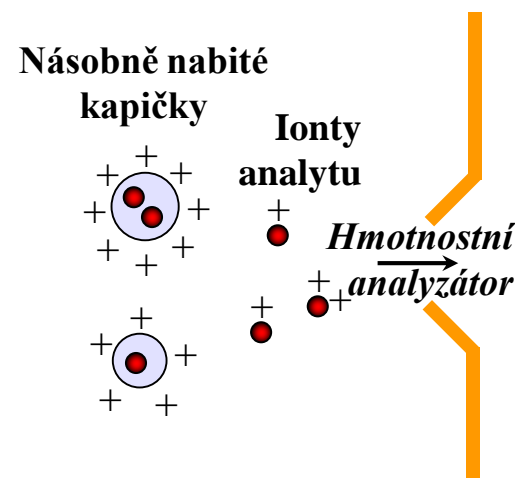
- Za pomoci sušícího plynu (horký proud dusíku) dochází k odpařování rozpouštědla a ke zmenšení velikosti nabitých kapiček → zvýšení hustoty povrchového náboje
- Při dosažení kritické hodnoty dochází ke Coulombické explozi



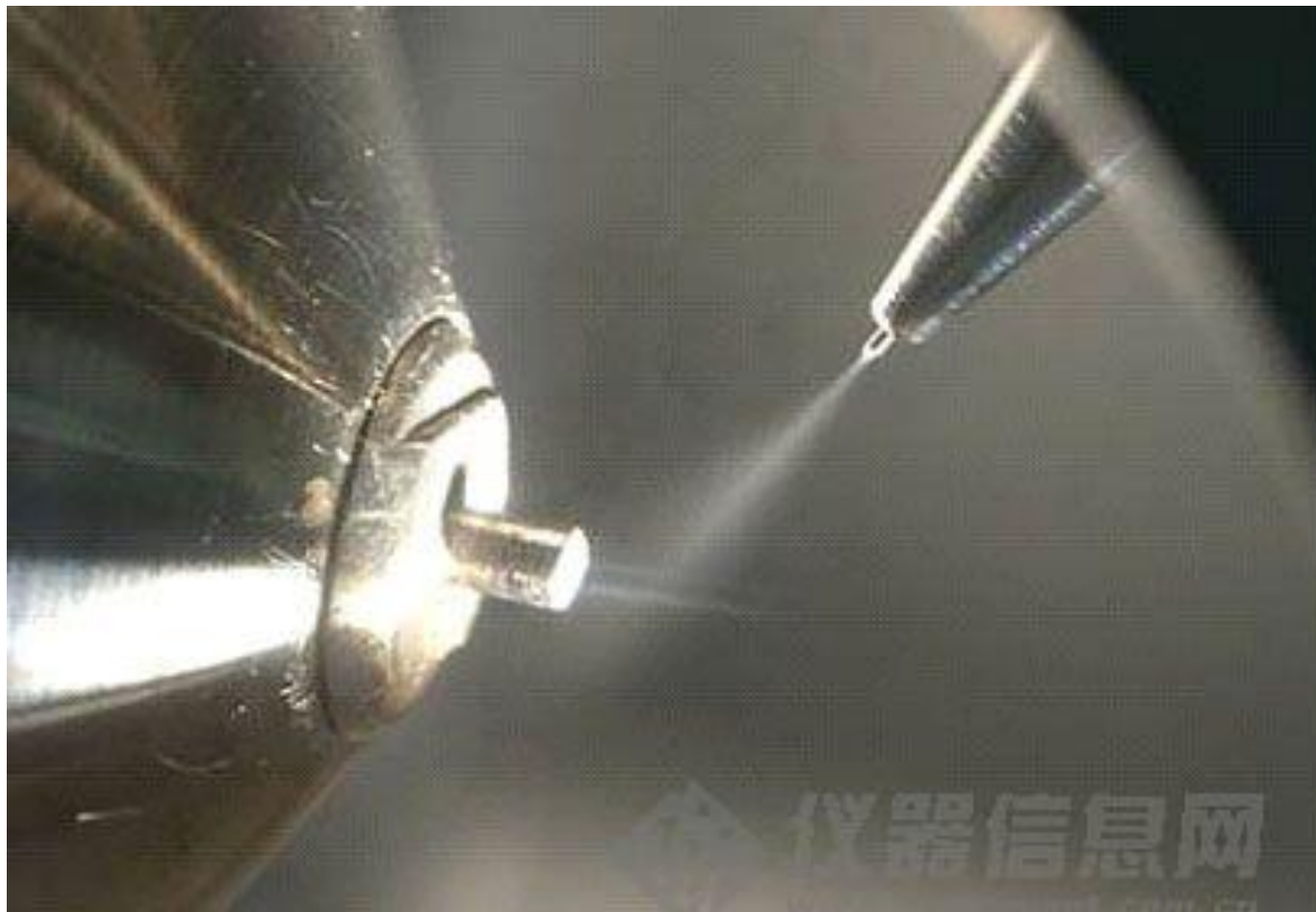
IONIZACE ELEKTROSPREJEM (ESI)

■ Princip

- Coulombická exploze → rozpad na menší kapičky s rozdělením původních nábojů a opakováním daného procesu až k uvolnění (de)protonovaných molekul
- Vstup (de)protonovaných molekul do hmotnostního analyzátoru



IONIZACE ELEKTROSPREJEM (ESI)



Zdroj: bbs.instrument.com.cn/shtml/20080910/1473107/

IONIZACE ELEKTROSPREJEM (ESI)

■ Charakterizace

- Velmi „měkká“ ionizační technika (minimum fragmentů)
- Obvykle vzniká (de)protonovaná molekula:
 - Pozitivní mód: $[M+H]^+$
 - Negativní mód: $[M-H]^-$
- A dále (minoritní) adukty a klastry s molekulárním iontem (např.):
 - Pozitivní mód: $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$,
 $[2M+Na]^+$, $[2M+K]^+$, $[2M+NH_4]^+$,
 $[2M+H]^+$
 - Negativní mód: $[M+Cl]^-$, $[M+EtO]^-$,
 $[2M+Cl]^-$, $[2M+EtO]^-$, $[2M-H]^-$

CHEMICKÁ IONIZACE ZA ATMOSFÉRICKÉHO TLAKU (APCI)

▪ Úvod

- Ionizační technika podobná CI v GC–MS
- GC–CI-MS vyžaduje vakuum; LC–APCI-MS probíhá za atmosférického tlaku

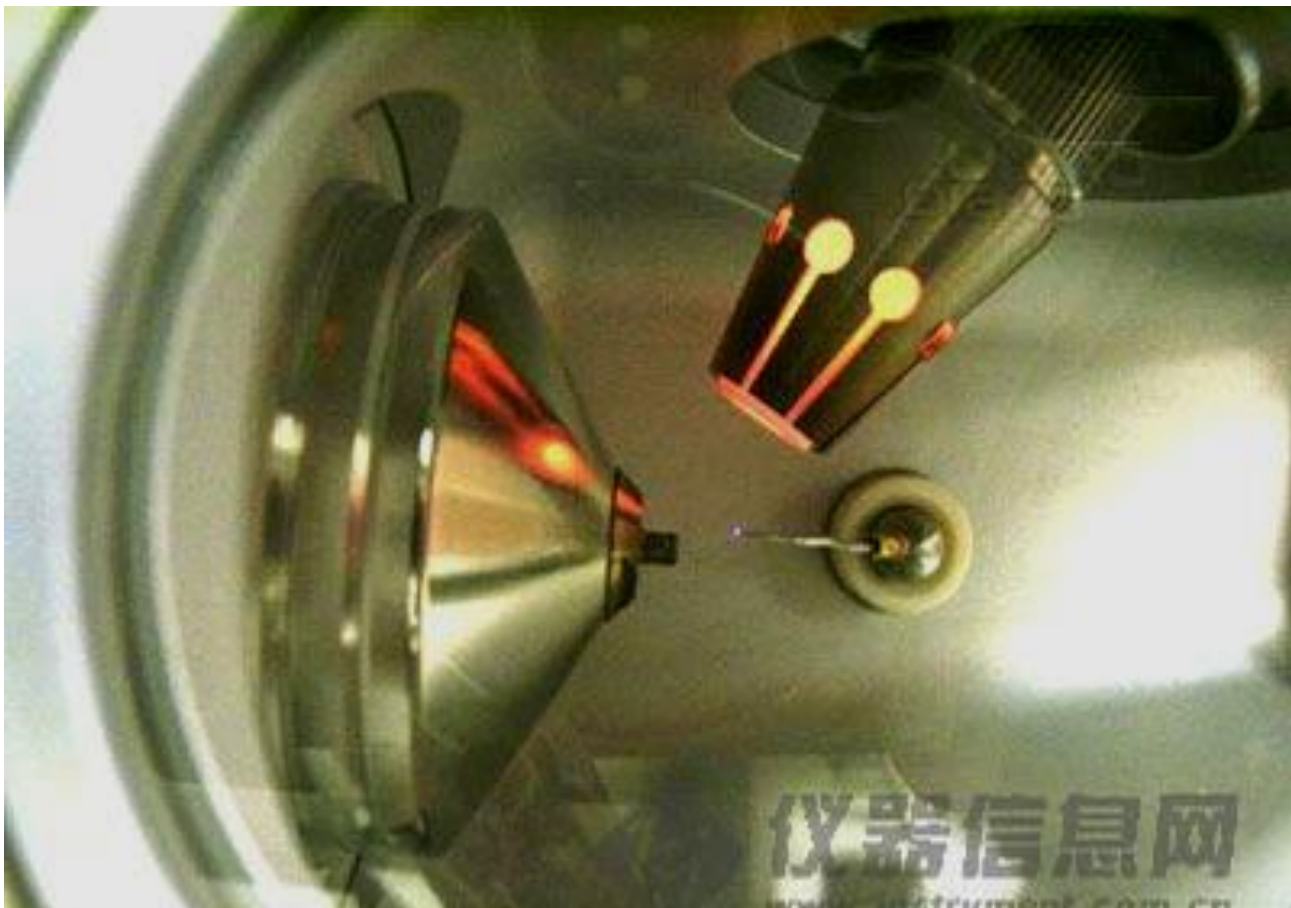
(průtok mobilní fáze 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ – 2 mL/min)

APCI

▪ Princip

- Eluát je za pomoci zmlžovacího plynu (dusík) převeden ve formu par
- Na **výbojovou elektrodu** (*corona discharge needle*) je vloženo vysoké napětí (3–4 kV) → dochází ke **koronovému výboji** (analogie s vláknem v GC–CI-MS) → ionizace molekul zmlžovacího plynu (tvorba $\text{N}_2^{\bullet+}$ = **primární reakční ionty**)
- Následuje **ionizace molekul mobilní fáze** primárními ionty → tvorba **sekundárních reakčních iontů**
- Dochází k opakovaným srážkám sekundární reakční iontů s analytem → **přenos protonu a tvorba iontu analytu**

APCI



Zdroj: bbs.instrument.com.cn/shtml/20080910/1473107/

APCI

▪ Charakterizace

- Velmi „měkká“ ionizační technika (minimum fragmentů)

- Tvorba iontů:

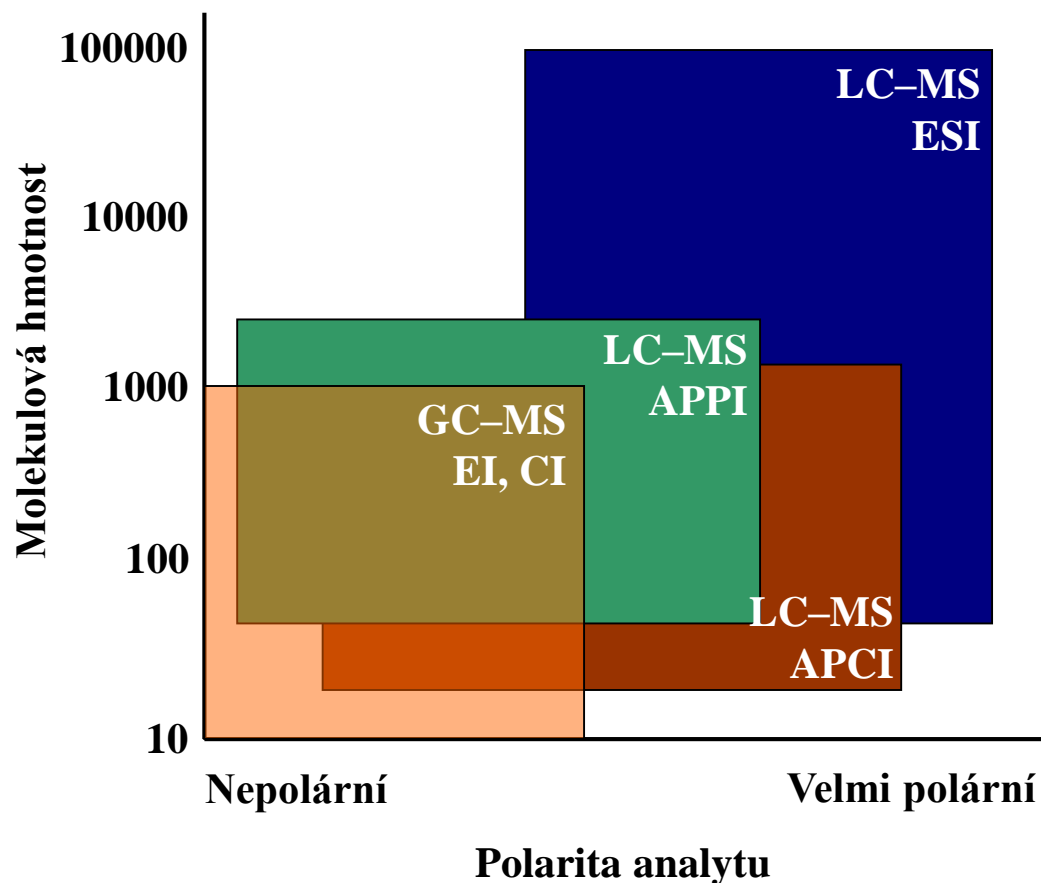
- Pozitivní mód:



- Negativní mód:



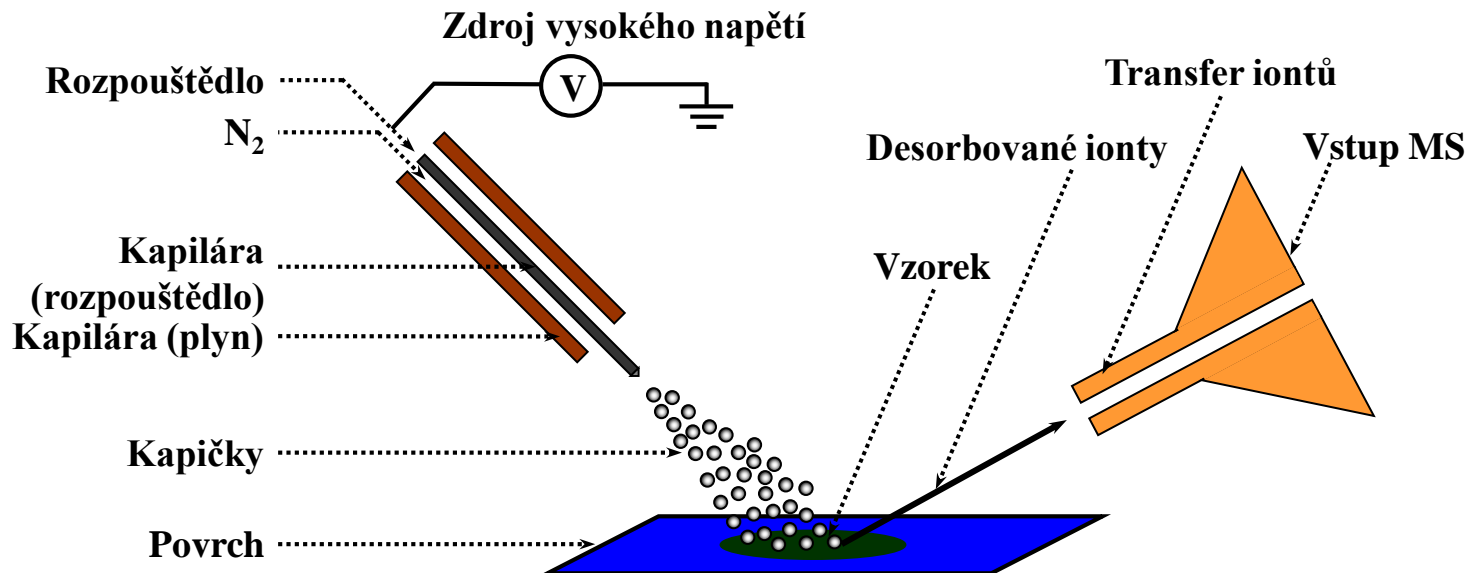
APLIKAČNÍ ROZSAH IONIZAČNÍCH TECHNIK VE SPOJENÍ S GC A LC



DESORPČNÍ IONIZACE ELEKTROSPREJEM

▪ Princip DESI

- Nabité kapičky (ESI) a ionty rozpouštědla dopadají na povrch analyzovaného vzorku na izolované ploše
- Desorbované ionty jsou vzorkovány pomocí hmotnostního spektrometru



DESORPČNÍ IONIZACE ELEKTROSPREJEM (DESI)



Zdroj: www.aocs.org

PŘÍMÁ ANALÝZA V REÁLNÉM ČASE (DART)

▪ Princip

- Z reakčního plynu (helium, neon, dusík) vznikají prostřednictvím elektrického výboje ionty, elektrony a excitované (metastabilní) atomy a molekuly
- Ionty jsou zachyceny na elektrodě a s analyty interagují výhradně excitované částice reakčního plynu
- Možnost přímé analýzy pevných, kapalných a plynných vzorků

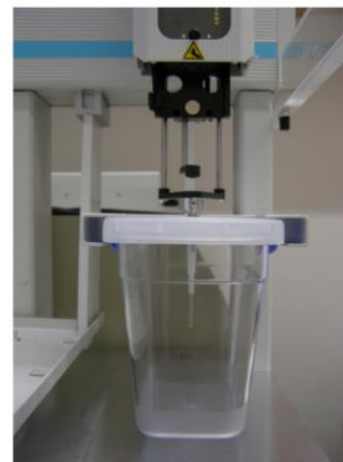
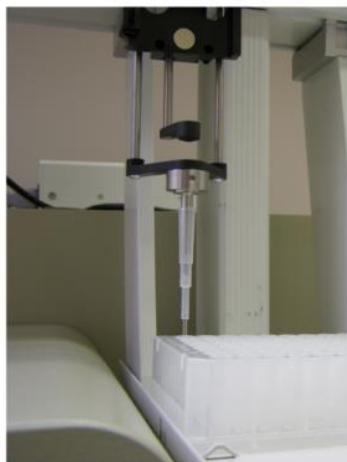
DART

- **Přehled generovaných iontů – přímá analýza**
 - Positivní mód: $[M+H]^+$, $[M]^+$, $[M-H_2O+H]^+$
 - Negativní mód: $[M-H]^+$, $[M]^-$
- **Přehled generovaných iontů – použití dopantu**
 - Positivní mód (vodný roztok amoniaku): $[M+NH_4]^+$
 - Negativní mód (dichlormethan): $[M+Cl]^-$

DART

▪ Realizace

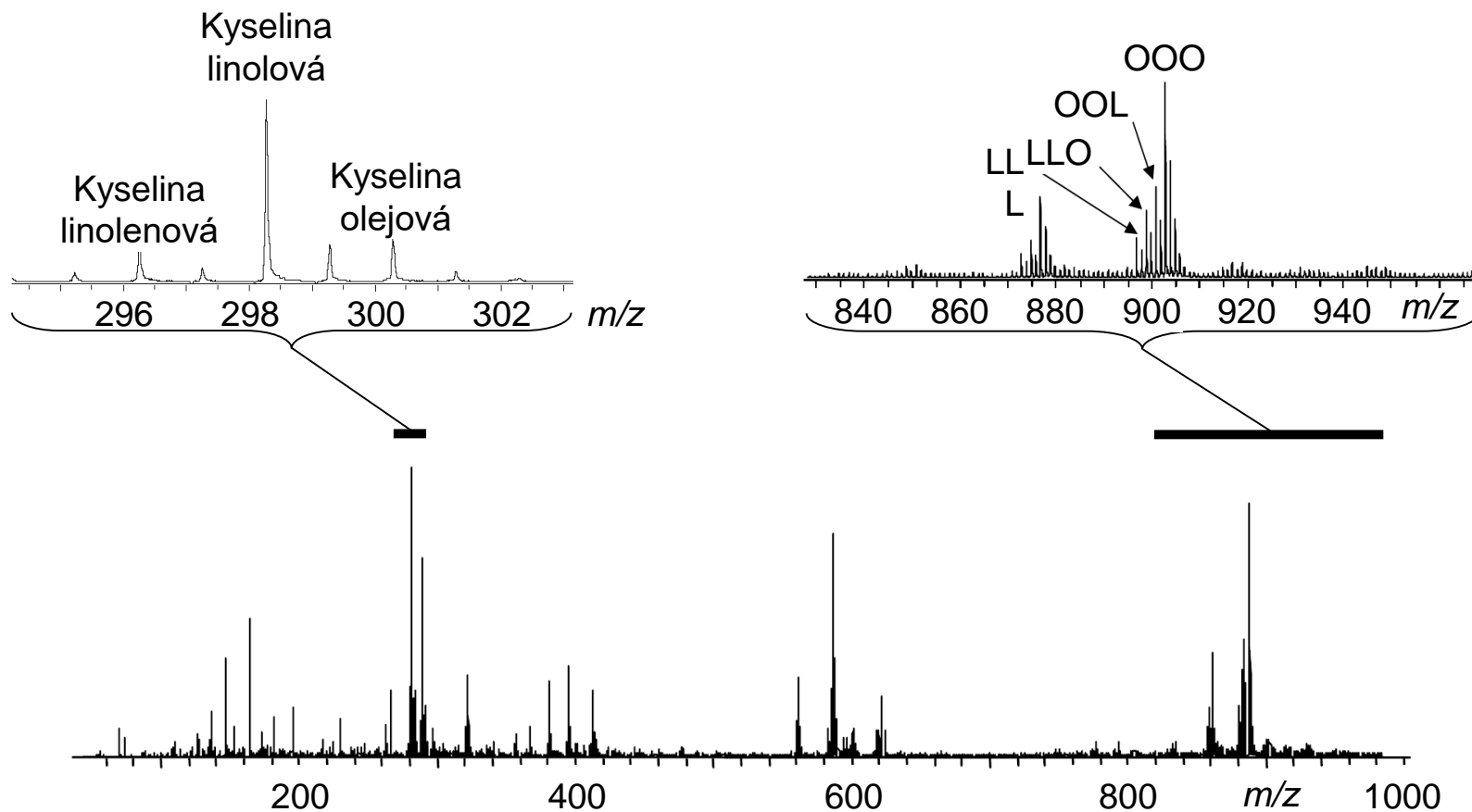
- Ponoření tyčinky do jamky se vzorkem
- Přenesení tyčinky mezi iontový zdroj a vstup MS
- Záznam spektra



Zdroj: T. Cajka, L. Vaclavik, K. Riddellova, J. Hajslova, LC GC Europe 21(5) (2008) 250–256

DART

Analýza olivového oleje

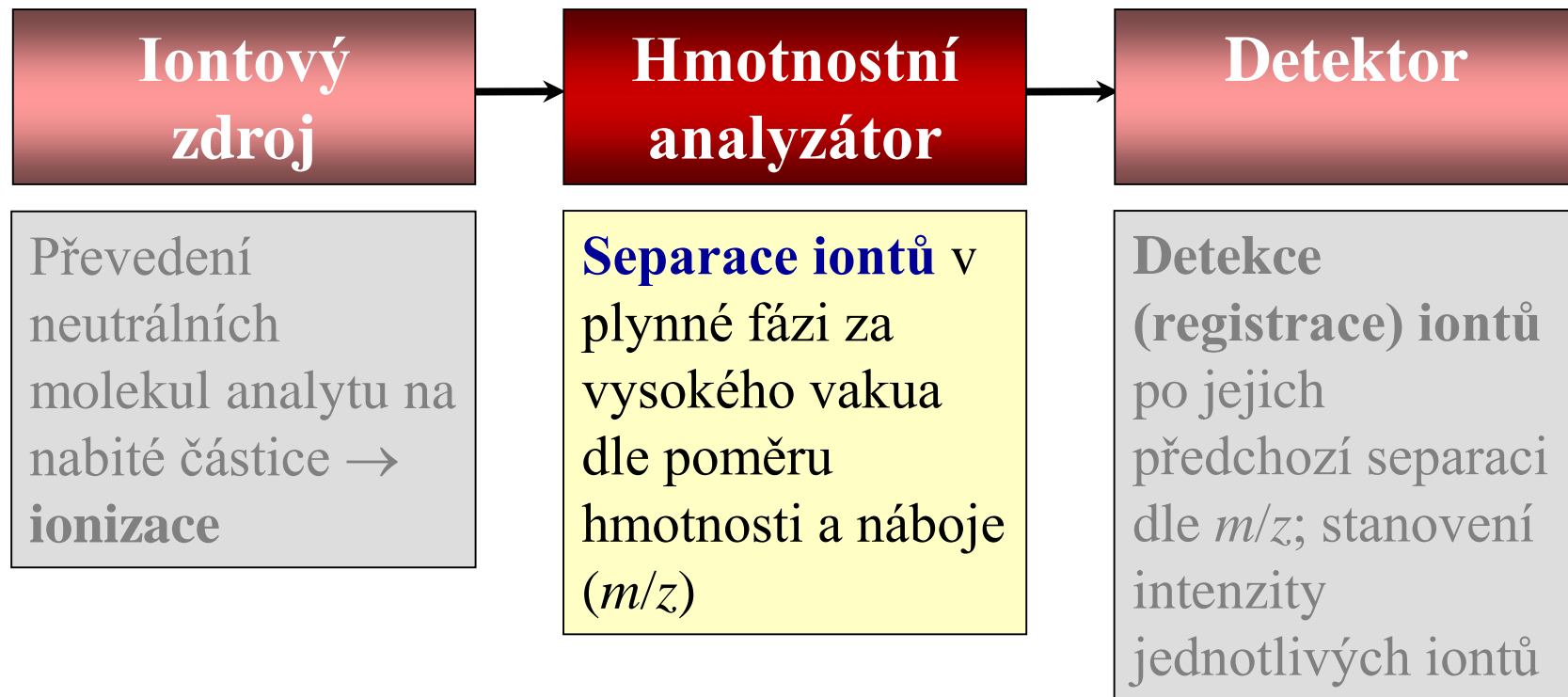


Zdroj: JEOL (Europe), Zaventem, Belgie

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Hmotnostní analyzátořy

ČÁSTI HMOTNOSTNÍHO SPEKTROMETRU



PARAMETRY HMOTNOSTNÍCH ANALYZÁTORŮ

- **Hmotnostní rozsah** (*mass range*)
- **Hmotnostní rozlišení / rozlišovací schopnost** (*mass resolution / mass resolving power*)
- **Přesnost hmoty** (*mass accuracy*)
- **Spektrální akviziční rychlost** (*spectral acquisition rate*)
- **Akviziční mód** (*acquisition mode*)
- **Citlivost** (*sensitivity*)
- **Lineární dynamický rozsah** (*linear dynamic range*)
- **Dostupnost tandemové MS** (*tandem MS*)
- **Všestrannost** (*versatility*)
- **Cena** (*cost*)

HMOTNOSTNÍ ROZSAH (*Mass range*)

- Rozsah m/z , v rámci kterého dokáže hmotnostní analyzátor separovat a následně detekovat/zaznamenat ionty
- **Spojení GC–MS**
 - Těkavost/termolabilita analytů do značné míry diktuje horní hmotnostní limit → většina hmotnostních spektrometru ve spojení s GC pracuje do m/z 1 000
- **Spojení LC–MS**
 - Hmotnostní rozsah je možno zvýšit až o několik řádů (např. až do m/z 30 000)

ROZLIŠOVACÍ SCHOPNOST

▪ Definice dle šířky jednoho píku

- Poměr hmotnosti iontu (m) a šířky daného iontu (Δm) v polovině jeho výšky
- *Full Width at Half Maximum* (FWHM)

▪ Definice dle překryvu dvou píků

- Poměr hmotnosti iontu m_1 a rozdílu iontů m_1 a m_2 ; oba píky musí být stejně vysoké a úvodí mezi těmito píky je 10 %.
- *10% Valley definition*

PŘESNOST HMOTY (*Mass accuracy*)

- **Odchylka** mezi **změřenou**, experimentálně zjištěnou hmotou (*accurate mass*) a **teoretickou**, vypočítanou hmotou (*exact mass*) iontu vyjádřená jako chybová hodnota (*error value*) v **mDa** nebo **ppm**

$$\Delta \text{ (mDa)} = (m_{\text{exp.}} - m_{\text{teor.}}) \cdot 10^3$$

$$\Delta \text{ (ppm)} = \frac{m_{\text{exp.}} - m_{\text{teor.}}}{m_{\text{teor.}}} \cdot 10^6$$

SPEKTRÁLNÍ AKVIZIČNÍ RYCHLOST

(Spectral acquisition rate)

- Doba potřebná pro záznam hmotnostního spektra nebo vybraného iontu (iontů)
 - Scannovací přístroje používají především: **scans/s, s/scan, s/dekada, cyklus/s**
 - Nescannovací přístroje: **spektra/s**
- **Maximální akviziční rychlost** představuje kritický parametr při detekci velmi úzkých píků generovaných během rychlé chromatografické separace

AKVIZIČNÍ MÓD (*Acquisition mode*)

- Výběr akvizičního módu dovoluje použití různých módů sběru hmotnostních spekter
 - **Full scan** → monitoring vybraného hmotnostního rozsahu (např. m/z 50–550)
 - **Monitoring vybraných iontů** (*selected ion monitoring*, SIM) → monitoring pouze vybraných iontů nebo pouze jednoho iontu (např. m/z 109, 149, 220)

CITLIVOST (*Sensitivity*)

- Citlivost přístroje je obvykle charakterizována výrobcem daného přístroje jako minimální poměr S/N při dané koncentraci referenční sloučeniny
 - GC–MS: např. oktafluoronaftalen, hexachlorbenzen (HCB)
 - LC–MS: reserpin

LINEÁRNÍ DYNAMICKÝ ROZSAH

(Linear dynamic range)

- Rozmezí koncentrací, ve kterém se mění definovatelným způsobem odezva detektoru se změnou koncentrace analytu
 - Běžné scanovací přístroje: 5–6 řádů
Např. 5 řádů: 0,1–1–10–100–1000–10000)
 - Nescanovací přístroje (TOF): 4 řády
- Úzký dynamický rozsah může vést ke komplikacím, především v případě, kdy jsou analyzovány vzorky se značně proměnnými koncentracemi cílových analytů

DOSTUPNOST TANDEMOVÉ MS

(Tandem MS)

- Metoda zahrnující alespoň **dva stupně hmotnostní analýzy**: buď ve spojení s disociačním procesem nebo chemickou reakcí, která způsobí změnu v hmotě nebo náboji daného iontu
- MS/MS metody zahrnují **aktivaci vybraného iontu** (prekurzor) obvykle kolizí s inertním plynem vhodným k navození fragmentace za vzniku produktových, dceřinných, iontů

TANDEMOVÁ MS

▪ Přístupy v MS/MS

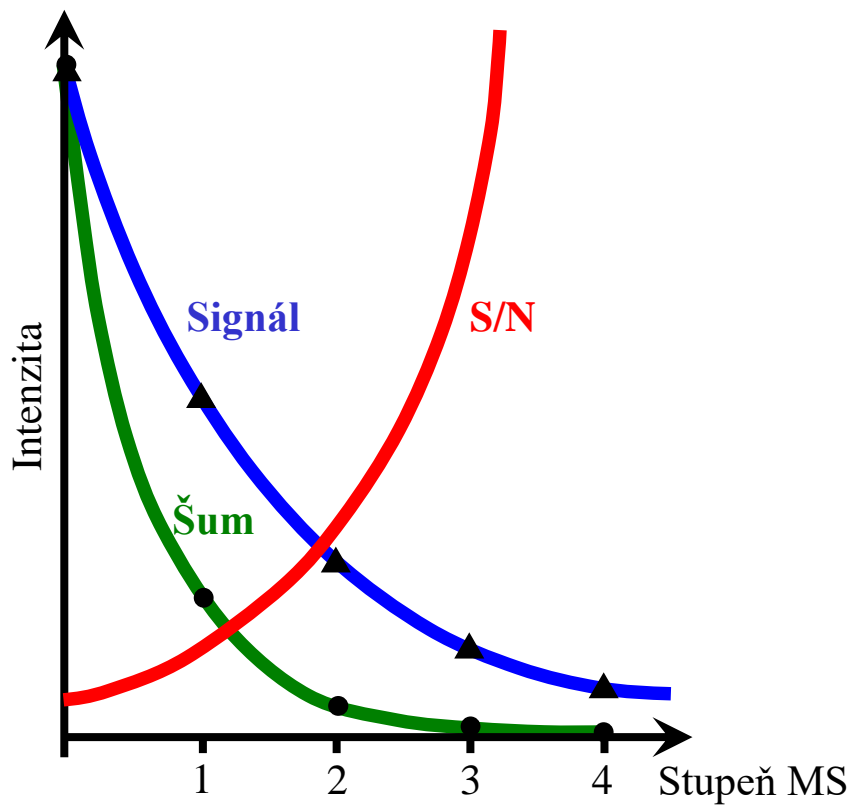
- **V prostoru (*in space*)** → každý krok MS/MS postupu vyžaduje specifické instrumentální součásti
 - Trojitý kvadrupól (QqQ)
 - Kvadrupól/průletový analyzátor (Q-TOF)
- **V čase (*in time*)** → provedení sekvence událostí v analyzátoru umožňující zachytávat ionty
 - Iontová past

MÓDY TANDEMOVÉ MS

- Scan produktových iontů
- Scan iontů prekurzoru
- Scan neutrálních ztrát
- Monitoring jedné iontové reakce
- Monitoring více iontových reakcí
- Scan MS^n

MÓDY TANDEMOVÉ MS

- Scan MS^n : selektivita vs. citlivost

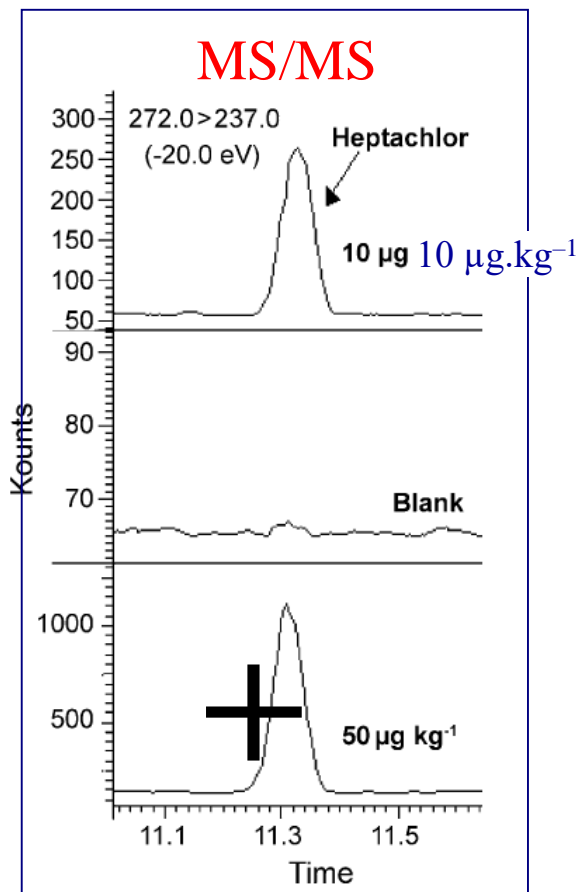
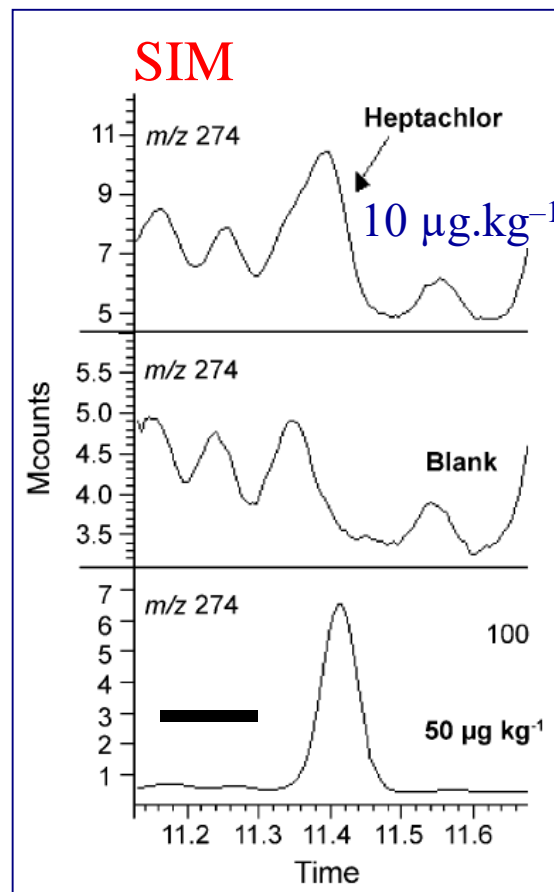
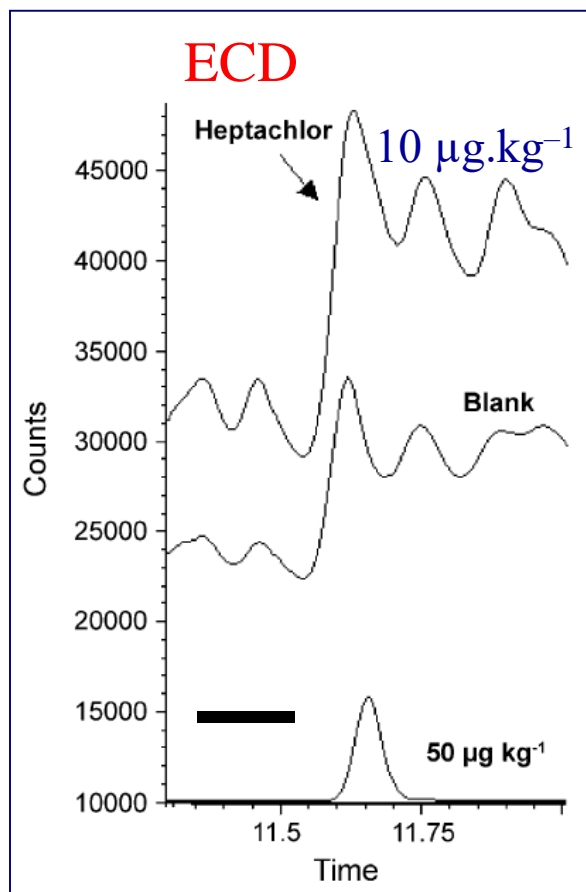


Zdroj: R.G. Cooks, K.L. Busch, J. Chem. Educ. 59(11) (1982) 926–933

MÓDY TANDEMOVÉ MS

heptachlor v rybím oleji

Zdroj: K. Patel et al., J. Chromatogr. A 1068 (2005) 289.



VŠESTRANNOST (*Versatility*)

- **Možnost použití alternativních ionizačních technik**
 - GC–MS: EI, PCI, NCI
 - LC–MS: ESI, APCI, APPI
- **Rozšíření rozsahu aplikací**

HMOTNOSTNÍ ANALYZÁTORY

- **Separaci iontů dle m/z lze provést na základě různých fyzikálních principů**
 - *Kvadrupól, iontová past* → různá stabilita oscilací iontů v dvoj- nebo trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí
 - *Průletové (TOF)* → různá doba letu iontů v oblasti bez pole
 - *Sektor* → zakřivení dráhy letu iontů v magnetickém nebo elektrickém poli
 - *FT-ICR* → různé absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli

KVADRUPÓL



Zdroj: www.qmg700.com/quadinfo/

KVADRUPÓL

■ Princip

- Ionty jsou přivedeny do středy osy kvadrupólu, kde začnou oscilovat (kmitat)
- Pro určitý poměr stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí jsou oscilace stabilní pouze pro ion s určitou hodnotou m/z → tento ion dosáhne detektoru; ostatní jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu (*využití: SIM*)
- Plynulou změnou hodnot stejnosměrného napětí a amplitudy střídavého napětí (poměr je konstantní!) se k detektoru dostávají postupně všechny ionty (*využití: Full scan*)

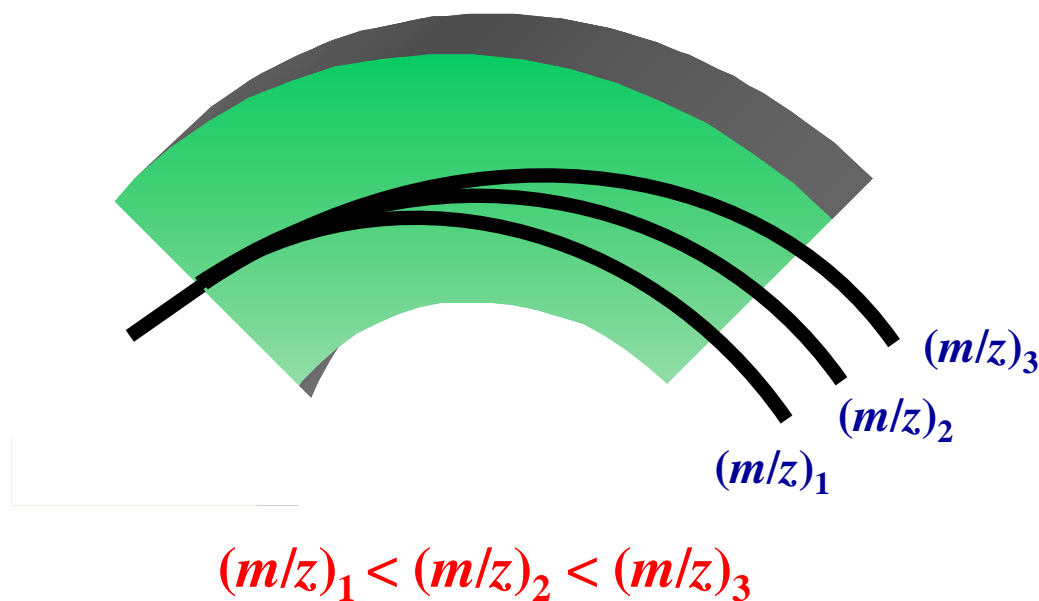
KVADRUPÓL

▪ Režimy

- **Full scan** → monitoring vybraného hmotnostního rozsahu (např. m/z 50–550 → na detekci iontu o určité hodnotě m/z je využito pouze 1/500 z celkového času)
- **Monitoring vybraných iontů** (*selected ion monitoring*, SIM) → monitoring pouze vybraných iontů nebo pouze jednoho iontu (obvykle 1–20 iontů)
- *Poznámka*: Čím menší počet monitorovaných iontů, tím lepší citlivost (za cenu ztráty spektrálních informací) → použití módu SIM převážně v (ultra)stopové analýze

SEKTOR

- Princip (*magnetický analyzátor s jednoduchou fokusací iontů*)
 - Při průchodu magnetickým polem dochází k většímu zakřivení dráhy iontů s nižší hodnotou m/z

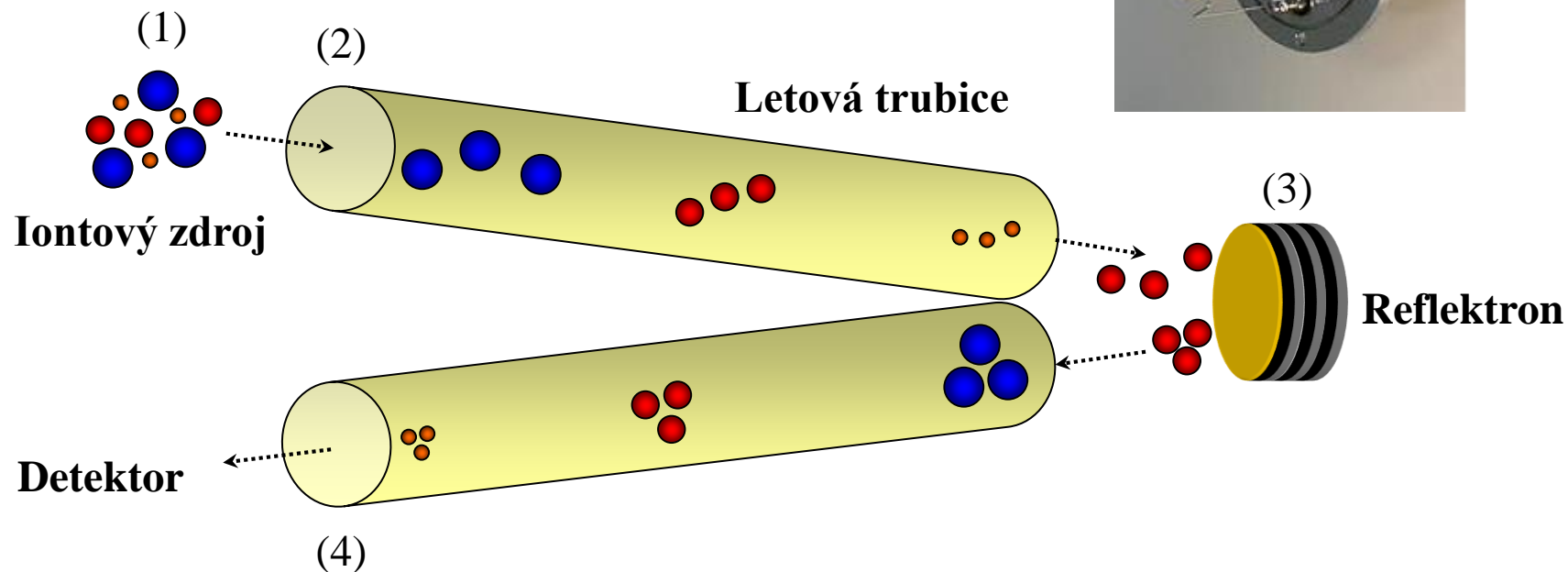


SEKTOR

- **Princip** (*magnetický analyzátor s dvojitou fokusací iontů*)
 - K magnetické fokusaci (zaostření) iontů ještě přistupuje elektrostatická fokusace
 - Dochází k výraznému zvýšení rozlišovací schopnosti → >10 000 (*10% valley*)

PRŮLETOVÝ ANALYZÁTOR S MĚŘENÍM DOBY LETU (TOF)

▪ Schéma

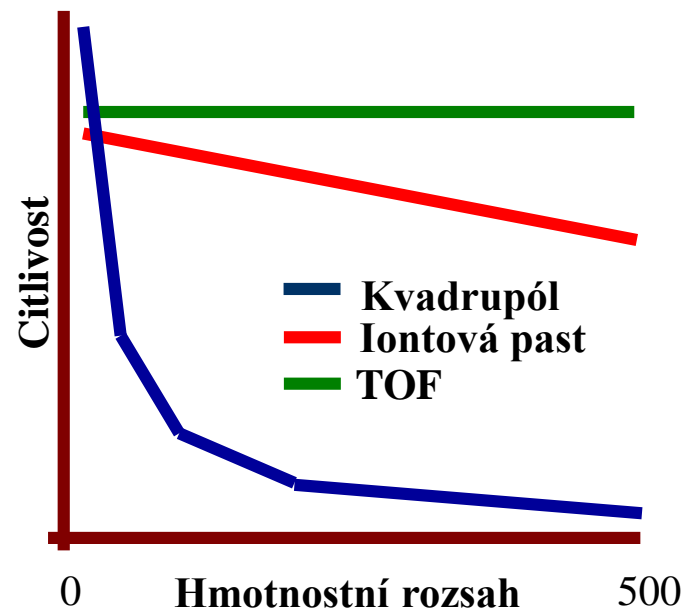


PRŮLETOVÝ ANALYZÁTOR (TOF)

- **Hlavní faktory pozitivně ovlivňující rozlišovací schopnost**
 - Použití gradientu elektrického pole ortogonálně (kolmo) na paprsek iontů → prostorové zaostření
 - Použití reflektoru → zaostření kinetické energie iontů
 - Ionty prochází dvakrát letovou trubicí než dosáhnou detektor → zvýšení efektivní letové délky

PRŮLETOVÝ ANALYZÁTOR (TOF)

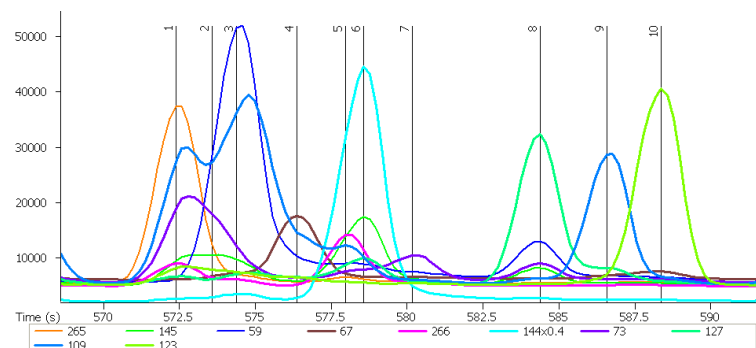
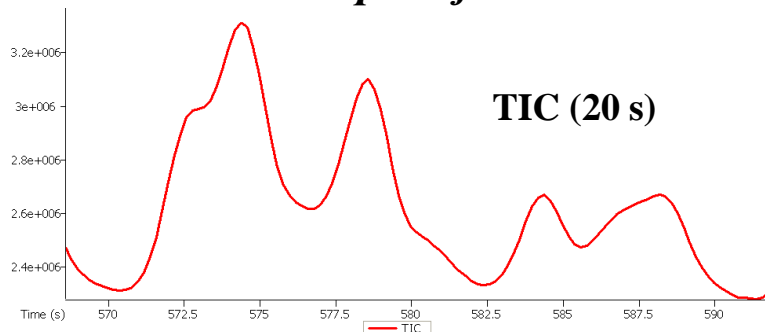
- **Hlavní výhody TOF analyzátorů**
 - **Vysoká účinnost analyzátoru během sběru spekter přes široký hmotnostní rozsah**
 - TOF 25 % vs. kvadrupól 0,1 %
 - Dostupnost spektrálních informací i na velmi nízkých koncentračních hladinách s možností identifikace na základě srovnání naměřených spekter s knihovnou spekter



PRŮLETOVÝ ANALYZÁTOR (TOF)

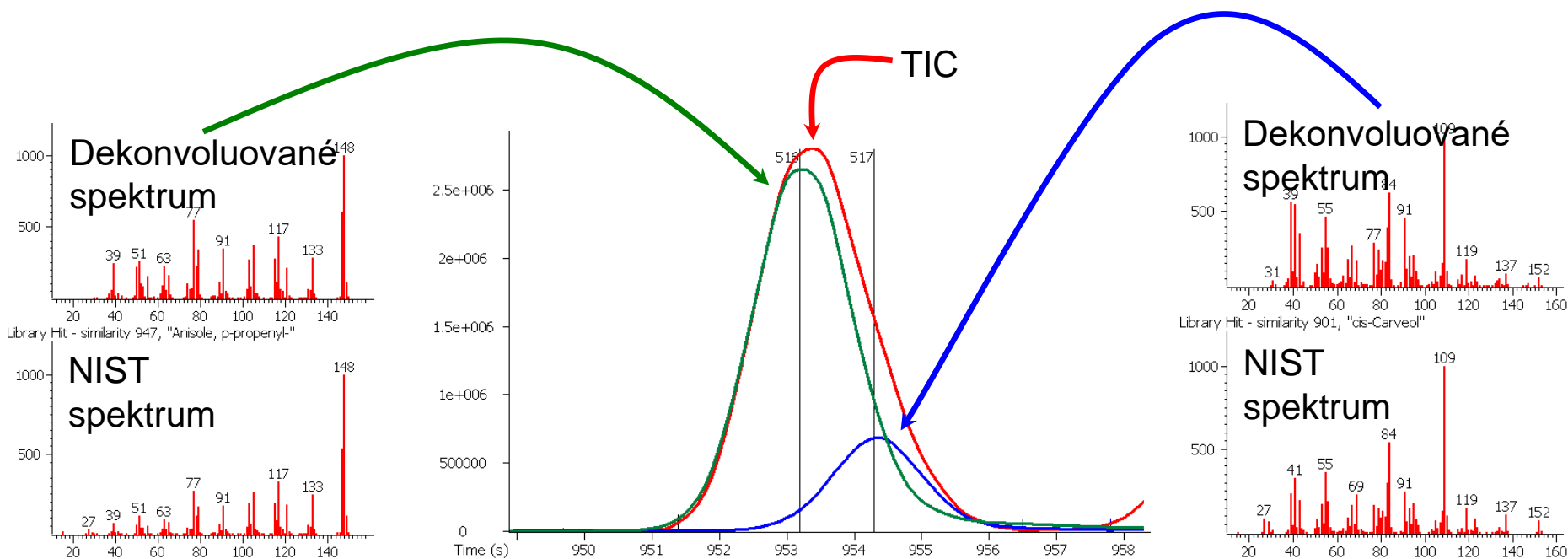
- **Hlavní výhody TOF analyzátorů**
 - **Všechny ionty jsou zaznamenávány souběžně**
 - Nedochází ke změnám poměrů iontů napříč píky během akvizice hmotnostního spektra
 - Není pozorována „spektrální asymetrie“ (*spectral skew*) obvyklá u scanovacích přístrojů → použití dekonvoluce → spektrální rozlišení částečně koeluovaných chromatografických píků

Kolik píků je vidět...?



PRŮLETOVÝ ANALYZÁTOR (TOF)

- **Příklad: Spektrální dekonvoluce 2 koeluovaných sloučenin; analýza těkavých látek lihovin**



PRŮLETOVÝ ANALYZÁTOR (TOF)

	Vysokorozlišovací TOF	Vysokorychlostní TOF
Rozlišovací sch.	7 000 FWHM	Jednotkové (1 000 FWHM)
Přesnost hmoty	5 ppm	–
Akviziční rychl.	1–10 (20) spekter/s	1–500 spekter/s
Hm. rozsah	Do m/z 1 500	Do m/z 1 000
Výrobce	Waters-Micromass	Leco
Účel	<ul style="list-style-type: none"> • měření přesné hmoty • konvenční a rychlá GC 	<ul style="list-style-type: none"> • konvenční až ultra-rychlá GC, GC×GC
Akvizice plných hmotnostních spekter Absence spektrální asymetrie (dekonvoluce)		

PRŮLETOVÝ ANALYZÁTOR (TOF)

Vysokorozlišovací vysokorychlostní TOF

Rozlišovací schop.

25 000 FWHM

Přesnost hmoty

<1 ppm

Akviziční rychlost

1–200 spekter/s

Hm. rozsah

Do m/z 1 000

Výrobce

Leco

Účel

- měření přesné hmoty
- konvenční až ultra-rychlá GC, GC×GC

Akvizice plných hmotnostních spekter
Absence spektrální asymetrie (dekonvoluce)

ORBITRAP (ORBITÁLNÍ PAST)



Zdroj: www-lpg.obs.ujf-grenoble.fr/IMG/jpg/Orbitrap.jpg

ORBITRAP (ORBITÁLNÍ PAST)

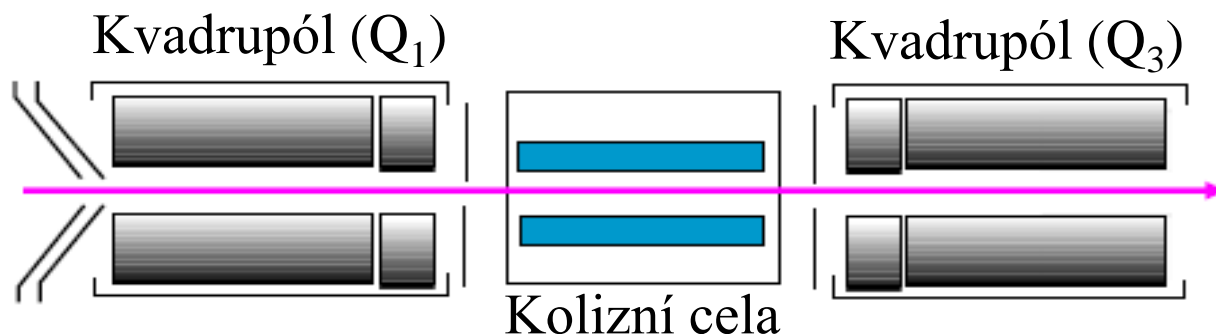
▪ Princip

- Pohybující se ionty jsou zachyceny do orbitu okolo elektrody ve tvaru hřídele pomocí elektrostatického pole
- **Vnější elektrody** ohraničují ionty, které obíhají okolo **centrální elektrody** a oscilují (kmitají) tam a zpět podél osy centrální elektrody
- Danou oscilaci je možno detekovat jako obraz proudu na elektrodě obklopující orbitrap
- Fourierova transformace je použita pro získání oscilačních frekvencí jednotlivých iontů o různých m/z

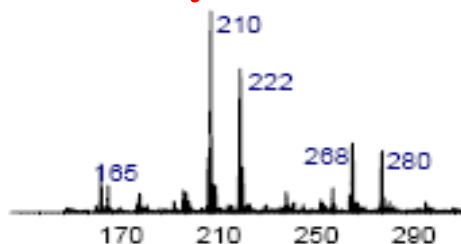
HYBRIDNÍ INSTRUMENTACE

- **Hybridní instrumenty je možné získat spojením různých hmotnostních analyzátorů**
 - **Trojité kvadrupól** (*triple quadrupole, QqQ*)
 - **Kvadrupól/lineární iontová past** (*quadrupole/linear ion trap, Q-LIT*)
 - **Kvadrupól/průletový analyzátor** (*quadrupole/time-of-flight, Q-TOF*)
 - **Sektor/průletový analyzátor** (*sector/time-of-flight*)
 - **Průletový analyzátor/průletový analyzátor** (*time-of-flight/time-of-flight, TOF-TOF*)

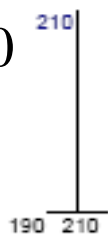
TROJITÝ KVADRUPÓL



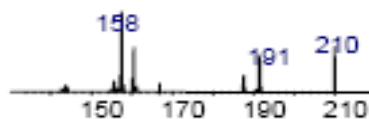
Spektrum s
pozad'ovými
ionty



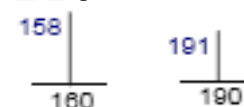
Q_1 dovoluje
přechod
pouze iontu
210



Kolizní cela
rozštěpí ion
210



Q_3 monitoruje pouze
charakteristické
fragментy 158 a 191
pocházející z iontu
210



Bez chemického pozadí

TROJITÝ KVADRUPÓL

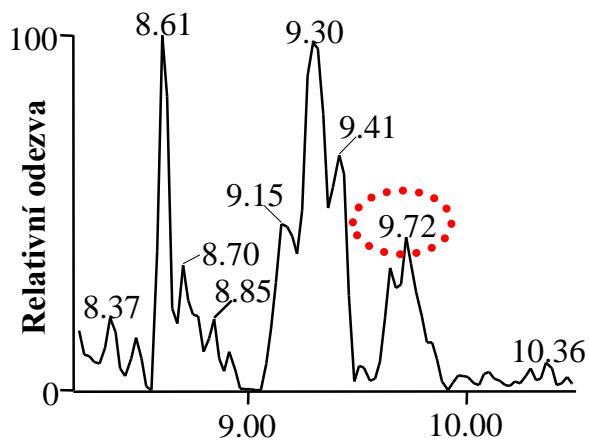
- Trojitý kvadrupól se skládá ze dvou kvadrupólů (Q_1 , Q_3) a kolizní cely, která je mezi Q_1 a Q_3
 - První kvadrupól (Q_1) slouží pro izolaci prekursorových iontů
 - Druhý kvadrupól (obvykle oktapól) představuje kolizní celu, kde dochází k fragmentaci daných iontů za pomoci reakčního plynu (argon)
 - Třetí kvadrupól (Q_3) slouží pro izolaci/scanování (záznam) produktových iontů

TROJITÝ KVADRUPÓL

▪ Zvýšení selektivity

- Příklad: pesticid thiodicarb v dětské výživě (0,1 mg/kg)

LC-MS¹ Full Scan

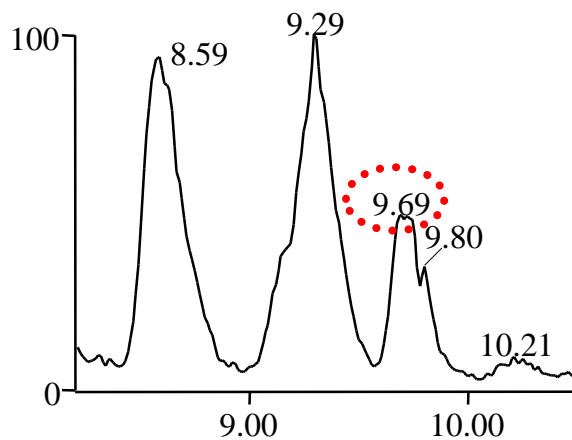


S/N = 6:1

***m/z* 355**

(full scan *m/z* 50–
1000)

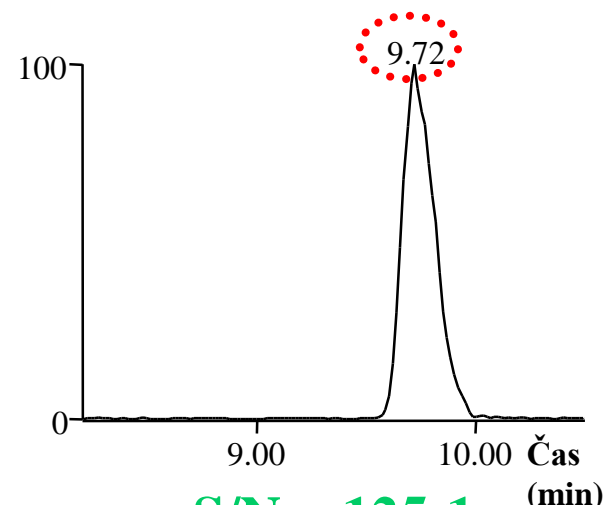
LC-MS¹ SIM



S/N = 9:1

***m/z* 355**

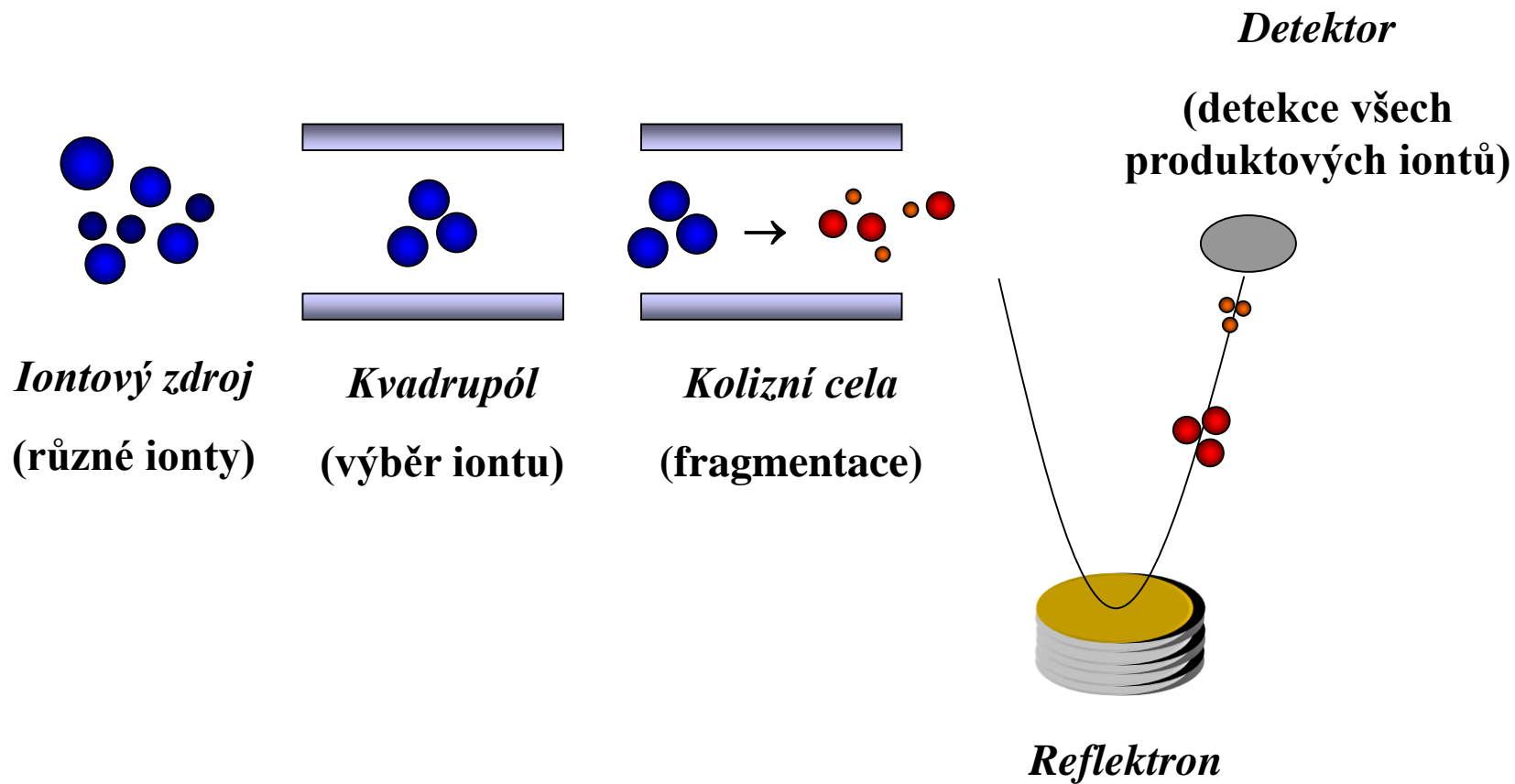
LC-MS² MRM



S/N = 125:1

Přechod *m/z* 355>87,9

KVADRUPÓL/PRŮLETOVÝ ANALYZÁTOR (Q-TOF)



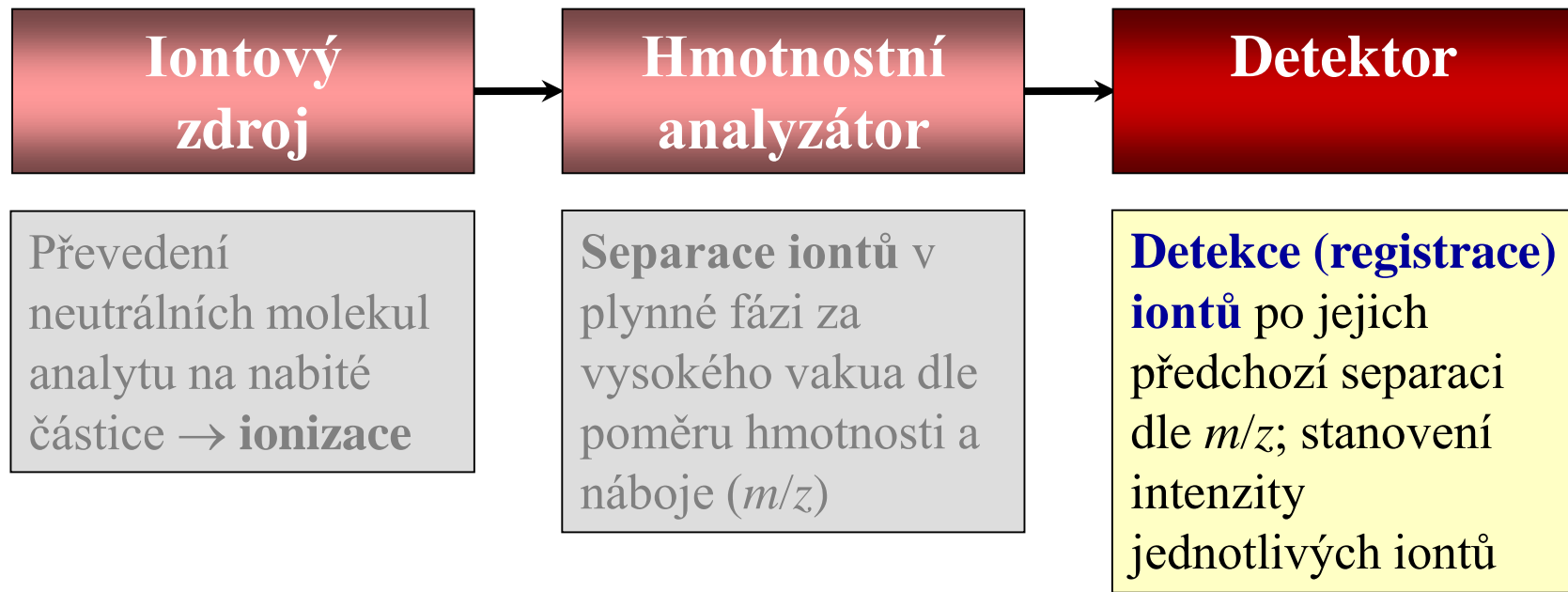
KVADRUPÓL/PRŮLETOVÝ ANALYZÁTOR (Q-TOF)

- Pokud zaměníme poslední kvadrupól (Q_3) průletovým analyzátozem (TOF), získáváme Q-TOF
 - Kombinuje jednoduchost kvadrupólového analyzátoru s vysokou účinností TOF analyzátoru
 - Detekce **produktových iontů** je realizována přes celý hmotnostní rozsah (jako u jednoduchého TOF analyzátoru) s vysokou účinností (10–100×) ve srovnání s QqQ za stejných podmínek
 - Systém Q-TOF disponuje vysokou rozlišovací schopností (10 000 FWHM), což umožňuje měření přesné hmoty produktových iontů

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Detektory

ČÁSTI HMOTNOSTNÍHO SPEKTROMETRU



DETEKTORY

- **Princip 1: postupná detekce příletu všech iontů jedním článkem**
 - Elektronový násobič (*electron multiplier*), fotonásobič (*photon multiplier*)
- **Princip II: současná detekce příletu všech iontů podél plochy**
 - Mikrokanálková destička (*microchannel plate, MCP*)
- **Princip III: ionty prochází blízko svých oscilací a pouze slabý proud je vytvořen v okruhu elektrod**
 - Detektory (kovové plochy) pro FTICR a orbitrap

ELEKTRONOVÝ NÁSOBIČ



Zdroj: www.analyticalwest.com



Zdroj: www.chem.agilent.com

MIKROKANÁLKOVÁ DESTIČKA



Zdroj: www.rmjordan.com

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

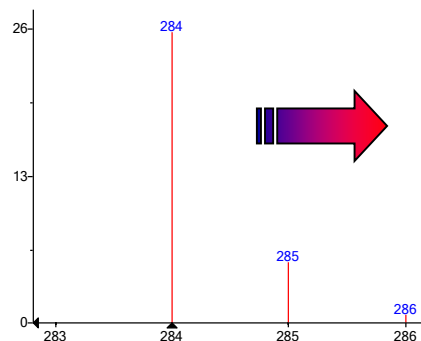
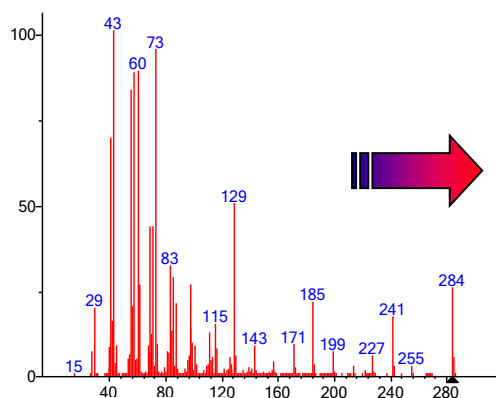
Interpretace EI-MS spekter

ÚVOD

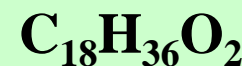
- **Praktický přístup pro ionizaci termálně stabilních a relativně těkavých organických sloučenin představuje elektronová ionizace (EI)**
- **EI spektrum v řadě případů představuje „fingerprint“ cílového analytu**
- **Ze získaného spektra je často možné stanovit strukturu organické sloučeniny na základě:**
 - **Molekulární hmotnosti**
 - **Elementárního složení**
 - **Specifických fragmentů**

STANOVENÍ MOLEKULÁRNÍ HMOTNOSTI

- Nízkorozlišovací měření
 - Poskytuje informace o **nominální hmotě** analytu
 - Elementární složení může být stanoveno na základě profilu isotopů (*isotopic pattern*)

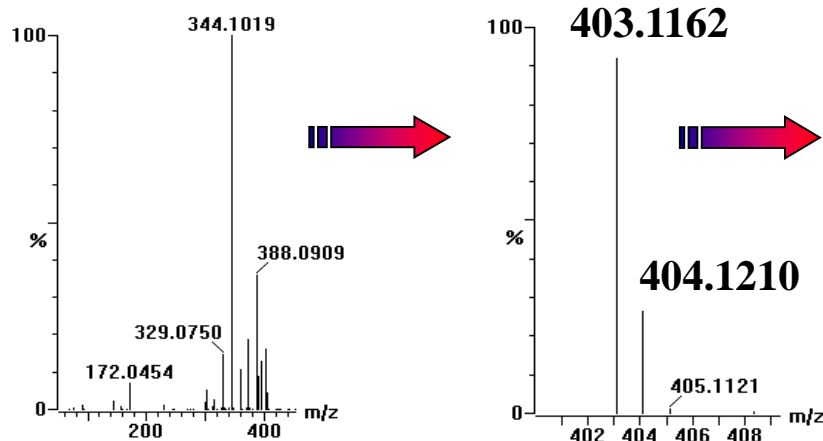


Mass	%
283	0.0
284	100.0
285	20.0
286	2.3
287	0.2
288	0.0



STANOVENÍ MOLEKULÁRNÍ HMOTNOSTI

- Vysokorozlišovací měření
 - Stanovení **přesné hmoty** molekulárního iontu na základě které je rovněž možné odvodit elementární složení



Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula
403.1162	403.1168	-0.6	-1.5	16.0	C22 H17 N3 O5
	403.1195	-3.3	-8.2	20.5	C25 H15 N4 O2
	403.1208	-4.6	-11.4	20.0	C27 H17 N O3
	403.1123	3.9	9.7	24.5	C31 H15 O

URČENÍ ELEMENTÁRNÍ SLOŽENÍ Z PŘESNÉ HMOTY

- Nominální hmota může mít řadu kombinací elementárního složení, přesná hmota může odpovídat pouze jednomu složení
- **Příklad:**

Nominální hmota	Přesná hmota	El. složení
70	70,0054	$C_3H_2O_2$
	70,0293	C_3H_4NO
	70,0419	C_4H_6O
	70,0532	$C_3H_6N_2$
	70,0657	C_4H_8N
	70,0783	C_5H_{10}

URČENÍ ELEMENTÁRNÍ SLOŽENÍ Z PŘESNÉ HMOTY

- S rostoucím počtem atomů v molekule roste počet možných kombinací elementárního složení → užitečnost přesné hmoty pro jednoznačnou identifikaci elementárního složení proto získává na důležitosti s rostoucí hmotou molekuly

Nominální hmota složení	Počet možných elementární
40	4
70	11
100	23
...	...

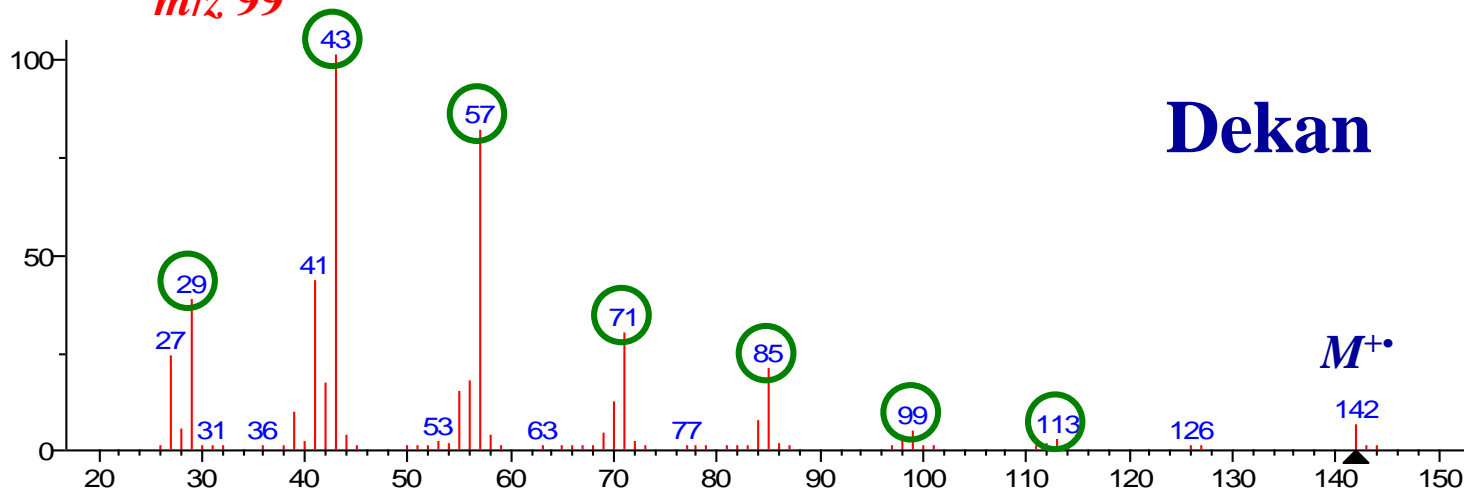
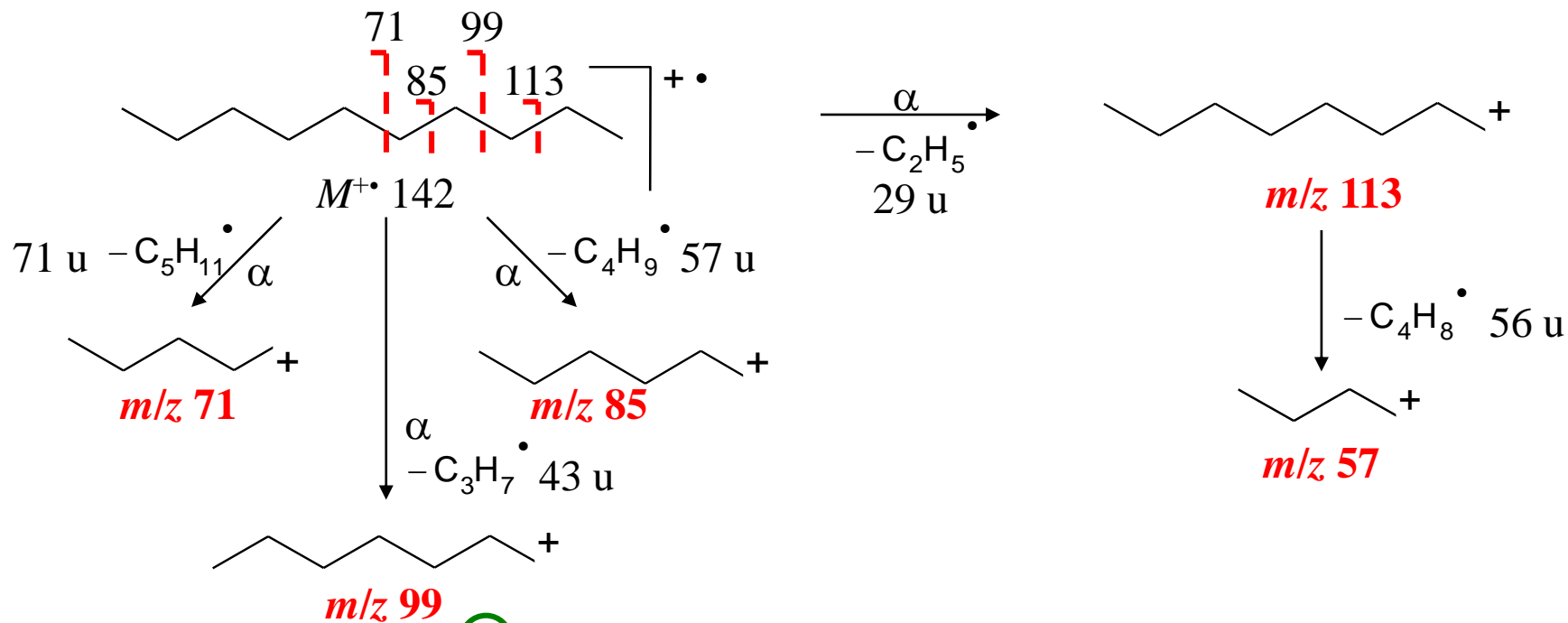
FRAGMENTAČNÍ VZORY SPECIFICKÝCH TŘÍD SLOUČENIN

- **Uhlovodíky** (lineární alkany, rozvětvené alkany, alkeny, aromatické uhlovodíky)
- **Alkoholy** (alifatické alkoholy, aromatické alkoholy)
- **Ethery** (alifatické ethery, aromatické ethery)
- **Aldehydy a ketony**
- **Karboxylové kyseliny**
- **Estery**
- **Sloučeniny s halogenem**

UHLOVODÍKY

▪ Lineární alkany

- Nízká intenzita molekulárního iontu
- Ionizace na C–C α -vazbě; fragmenty separovány o **14 jednotek**
- Série iontů C_nH_{2n+1} : **m/z 29, 43, 57, 71, 85, ...**

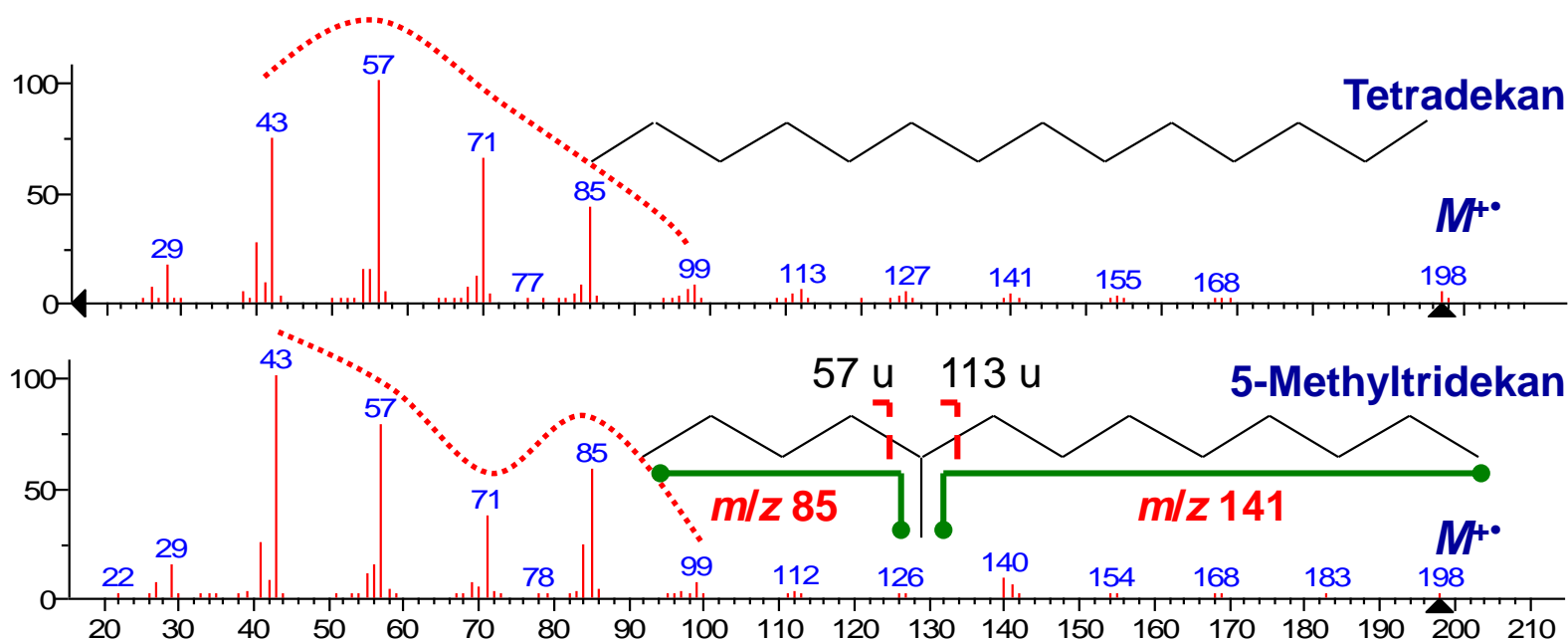


Dekan

UHLOVODÍKY

▪ Rozvětvené alkany

- Rozvětvení snižuje intenzitu molekulárního iontu
- Preferováno štěpení v místě větvení



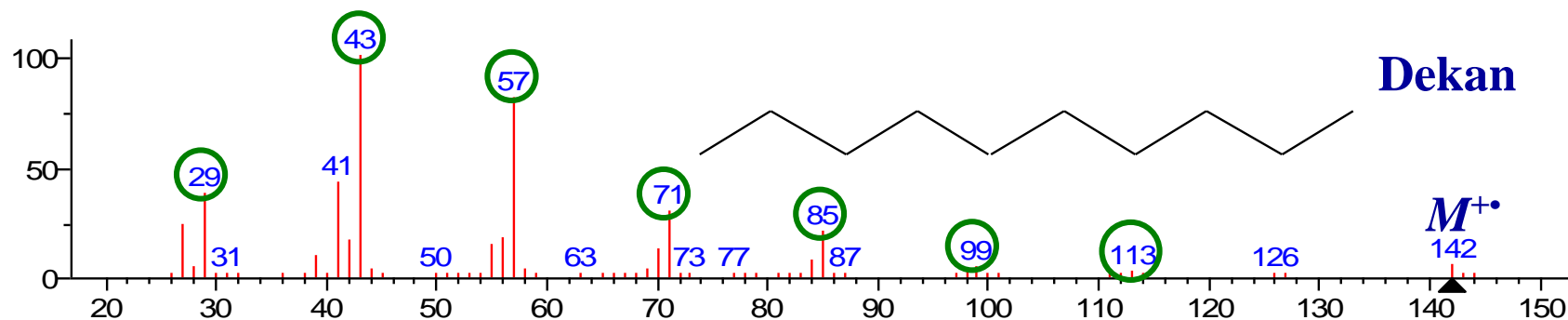
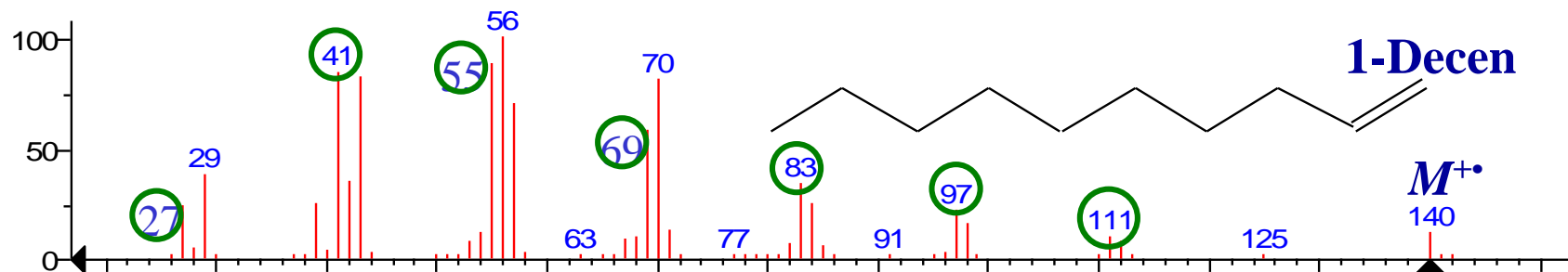
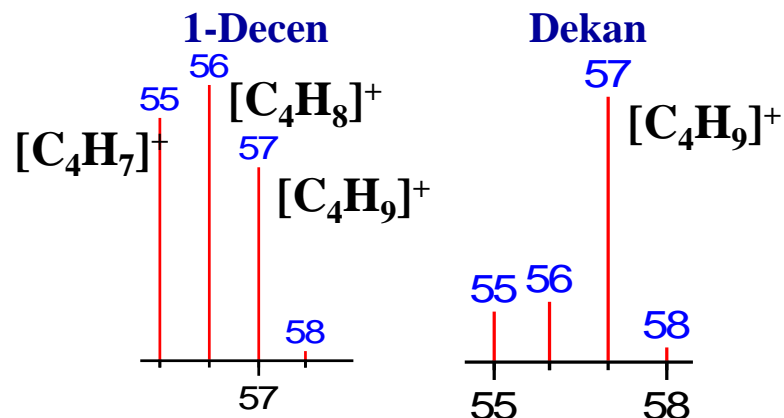
UHLOVODÍKY

▪ Alkeny

- Ionizace je iniciována v místě dvojné vazby
- Intenzita molekulárního iontu je vyšší než odpovídajícímu alkanu
- Dvojná vazba je pohyblivá, což vede k tvorbě různých izomerů alkenů
- Série iontů C_nH_{2n-1} : *m/z 27, 41, 55, 69, ...*

UHLOVODÍKY

Alkeny



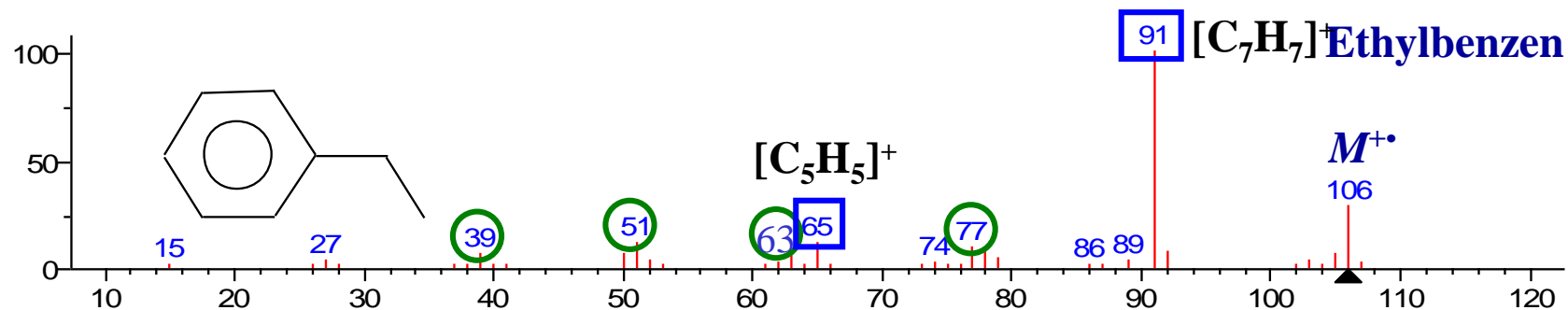
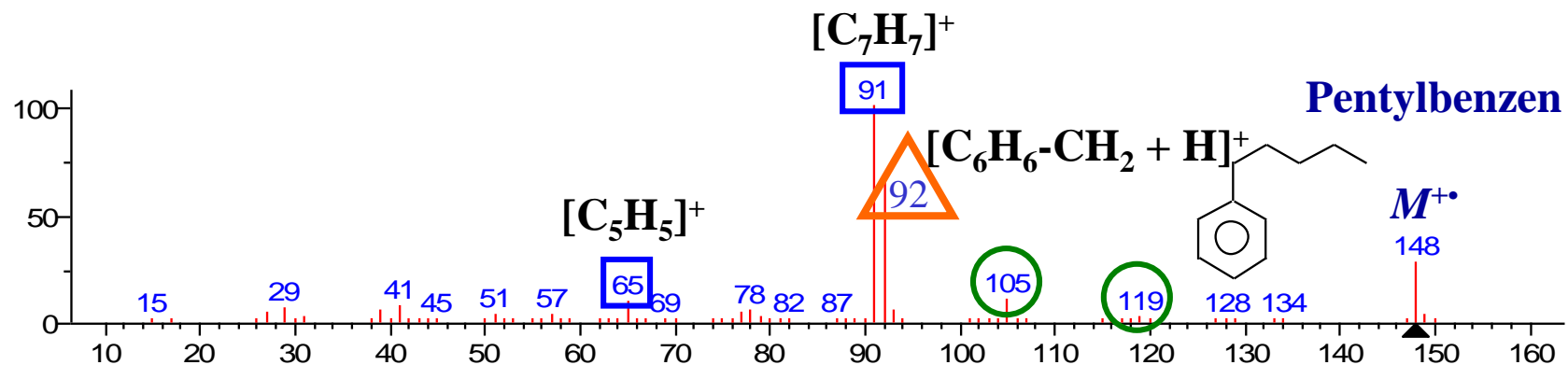
UHLOVODÍKY

▪ Aromatické uhlovodíky

- Fragmentace benzenového kruhu vyžaduje vysokou aktivační energii
- **Molekulární ion** je o **vysoké intenzitě** a ionty související s benzenovým kruhem (***m/z* 39, 51, 63 a 77**) jsou o **nízké intenzitě** α -štěpení benzylové vazby v ionizovaných alkylovaných benzenech generuje strukturně diagnostický ion ***m/z* 91** (tropyliový ion)
- Následná eliminace C_2H_2 z tropyliového iontu vede ke tvorbě dalšího charakteristického iontu ***m/z* 65**
- V přítomnosti delších alkylových skupin je pozorována série: ***m/z* 91, 105, 119, ...**
- Pokud alkylový řetězec $\geq 3C \rightarrow$ ion ***m/z* 92**

UHLOVODÍKY

▪ Aromatické uhlovodíky



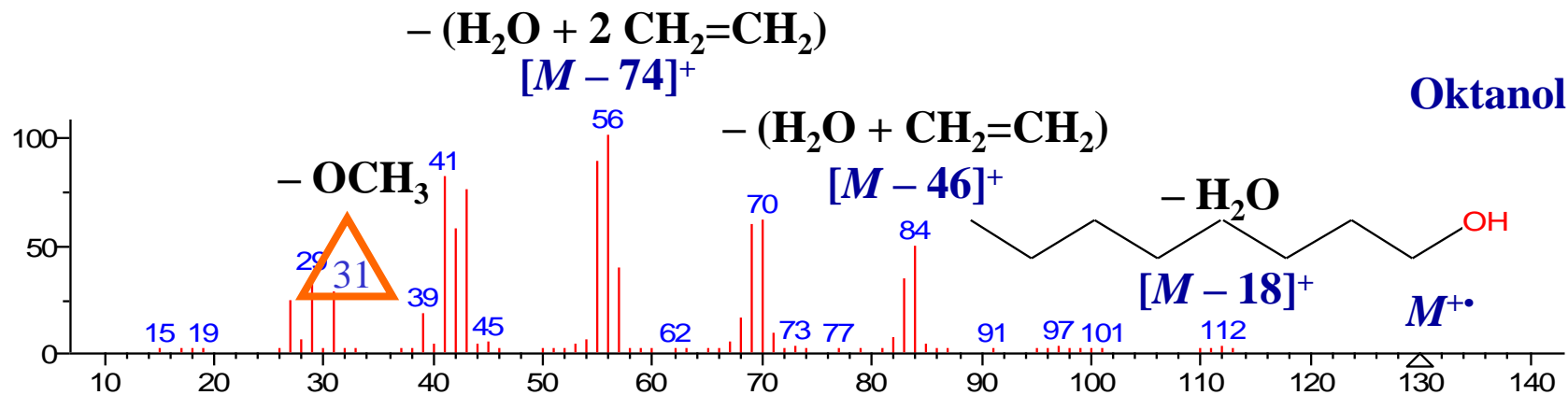
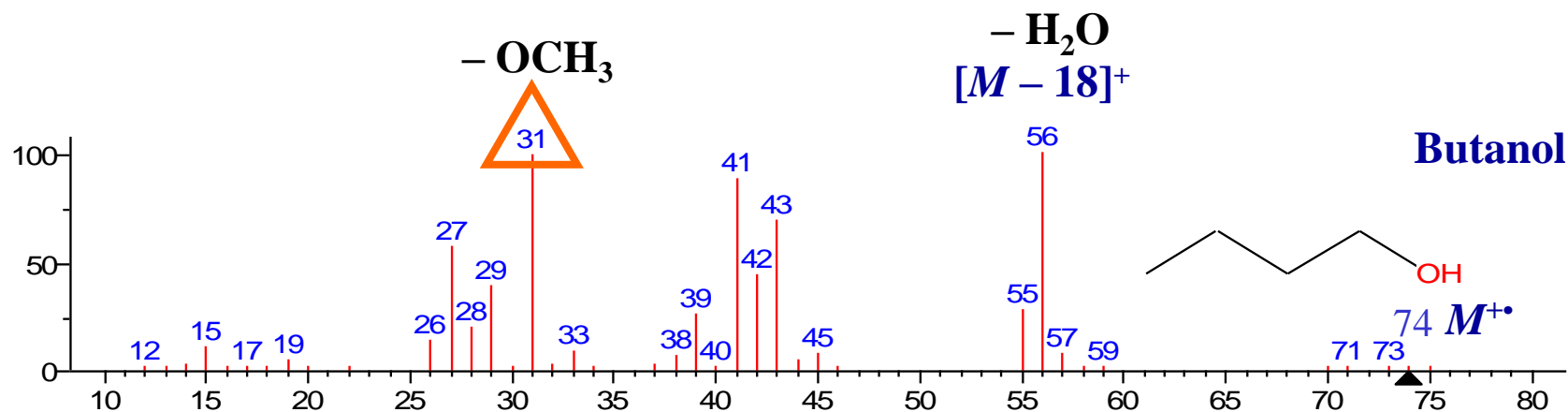
ALKOHOLY

▪ Alifatické alkoholy

- Ionizace je iniciována na atomu kyslíku –OH skupiny
- **Molekulární ion** je obvykle o **velmi nízké intenzitě** v případě primárních a sekundárních alkoholů a zcela chybí u terciárních alkoholů
- Dominují reakce α -štěpením \rightarrow rezonančně stabilizovaný **ion $[RCH=OH]^+$** je hlavním produktem \rightarrow série iontů: **m/z 31, 45, 59, ...**
- **Primární alkoholy: m/z 31** ($CH_2=^+OH$) \rightarrow diagnostický ion; **ztráta H_2O** ; **ztráta molekuly alkenu** \rightarrow nápadné ionty **$[M - 18]^+$, $[M - 46]^+$, $[M - 74]^+$, ...**

ALKOHOLY

▪ Alifatické alkoholy

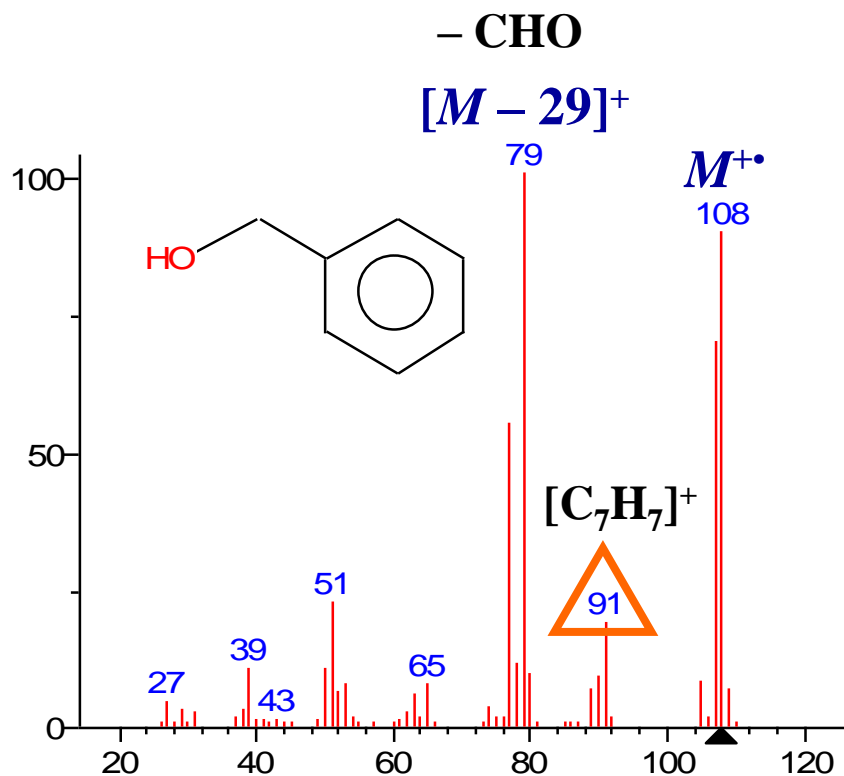


ALKOHOLY

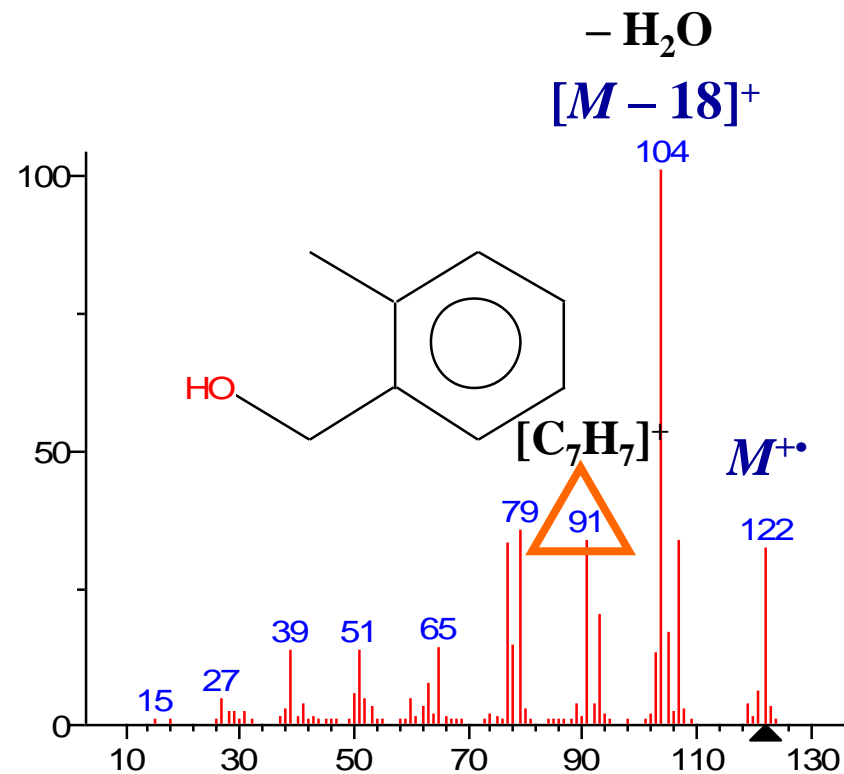
- **Aromatické alkoholy**
 - Vysoká intenzita molekulárního iontu
 - **Nesubstituované benzylalkoholy** produkují charakteristický benzylový ion ***m/z* 91** α -štěpením
 - U **benzylalkoholů** pozorován **McLaffertyho přesmyk** zahrnující fenylový kruh
 - **Ztráta H₂O** je pozorována především u ***ortho*-substituovaných benzylalkoholů**

ALKOHOLY

Benzylalkohol



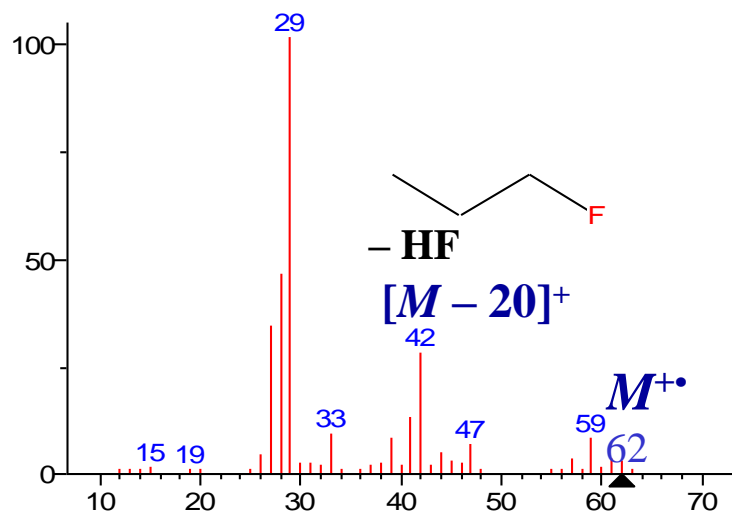
2-Methylbenzylalkohol



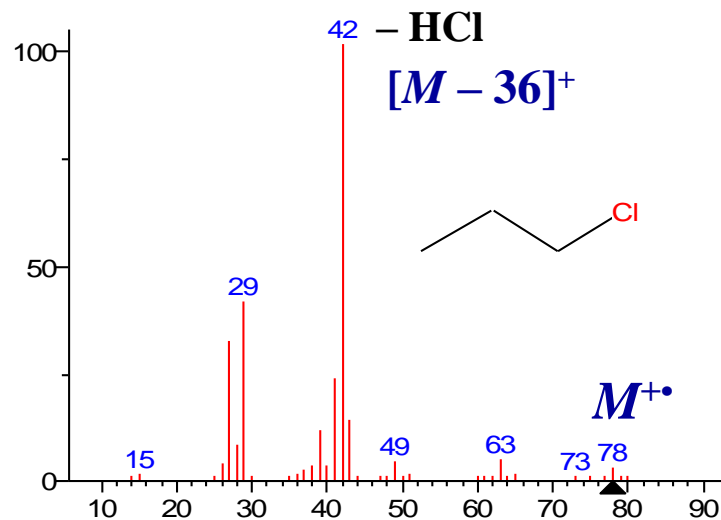
SLOUČENINY S HALOGENEM

- **F, Cl, Br, I**
 - **Cl, Br:** unikátní isotopický profil
 - **F, I:** odvození z nižšího poměru $[M+1] / [M]$, který je dán skutečností, že F a I jsou monoisotopické
 - **Alifatické chloridy:** přítomnost molekulárního iontu pouze u monochloridů; s rostoucím počtem Cl atomů se snižuje intenzita molekulárního iontu
 - **Cl, F:** ztráta HX

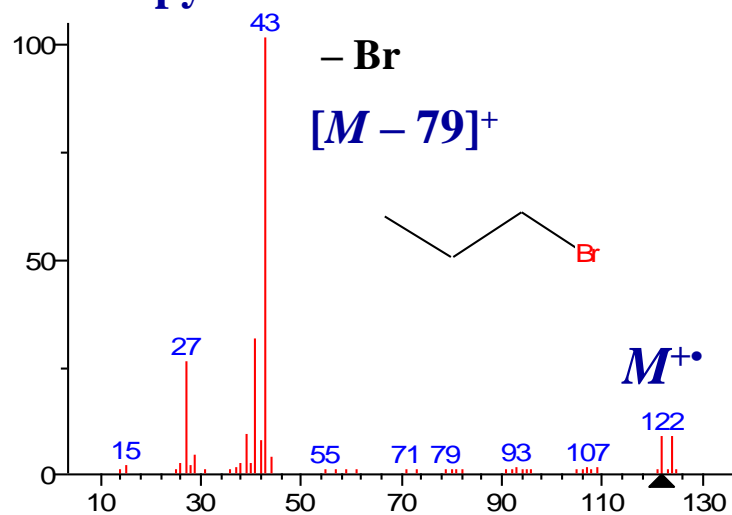
Propylfluorid



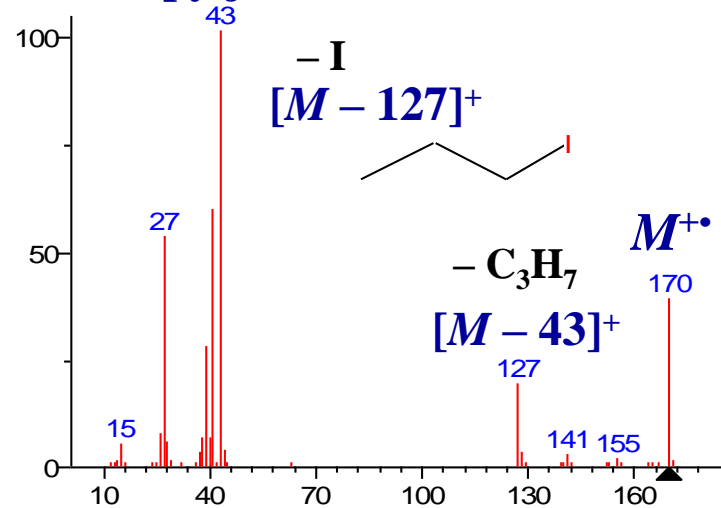
Propylchlorid



Propylbromid



Propyljodid



KNIHOVNY SPEKTER

- **Hledání v knihovně spekter pomocí počítače představuje velmi užitečný nástroj**
- **Výsledky jsou získány během několika sekund ve srovnání s hodinami při použití manuálního vyhledávání operátorem**

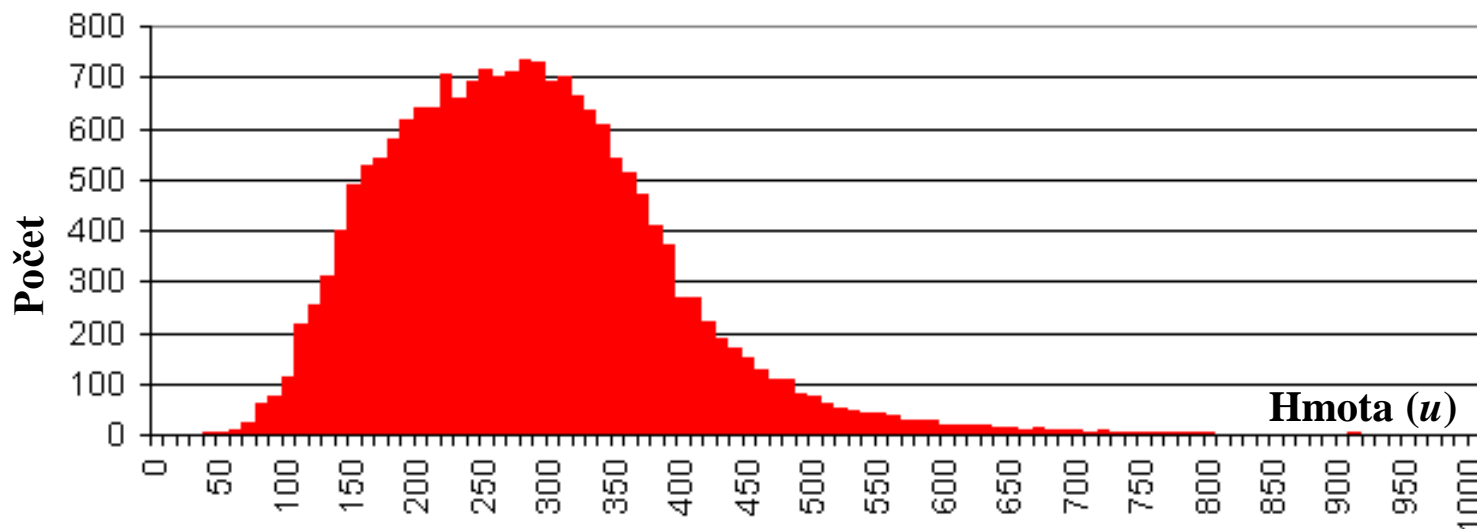
KNIHOVNY SPEKTER

- **NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library** (často jen označována jako NIST) → poslední verze NIST 08 (cena ~80 tis. Kč)
- **Wiley Registry of Mass Spectral Data** → poslední verze Wiley 8th
- **Wiley 8th/NIST 08** → kombinace obou předchozích knihoven (cena ~190 tis. Kč)
- Mass Spectra of Flavors and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds
- Mass Spectral Library of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and Their Metabolites

NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library



- Zdroj EI spekter
 - Poslední verze (NIST 08) obsahuje ~191 tis. spekter



Zdroj: <http://www.sisweb.com/software/ms/nist.htm>

<http://www.nist.gov/srd/nist1a.htm>

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

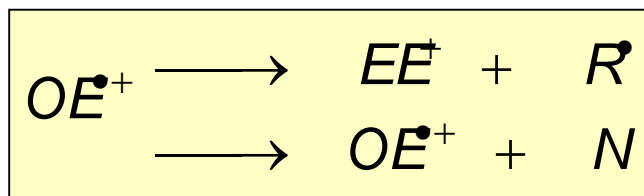
Interpretace API-MS spekter

ÚVOD

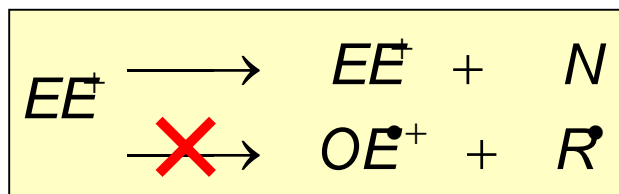
- Hmotnostní spektra získaná technikou **LC-API-MS** (ale i **GC-CI-MS**) jsou generována „měkkými“ ionizačními technikami
 - **Není pozorována tak silná fragmentace jako v případě EI**
 - **Vznikají ionty se sudým počtem elektronu, EE^+ , oproti elektronové ionizaci, kde vznikají ionty s lichým počtem elektronů ($OE^{+\bullet}$)**

ÚVOD

- **Tvrdé ionizační techniky (EI)**



- **Měkké ionizační techniky (API, CI)**

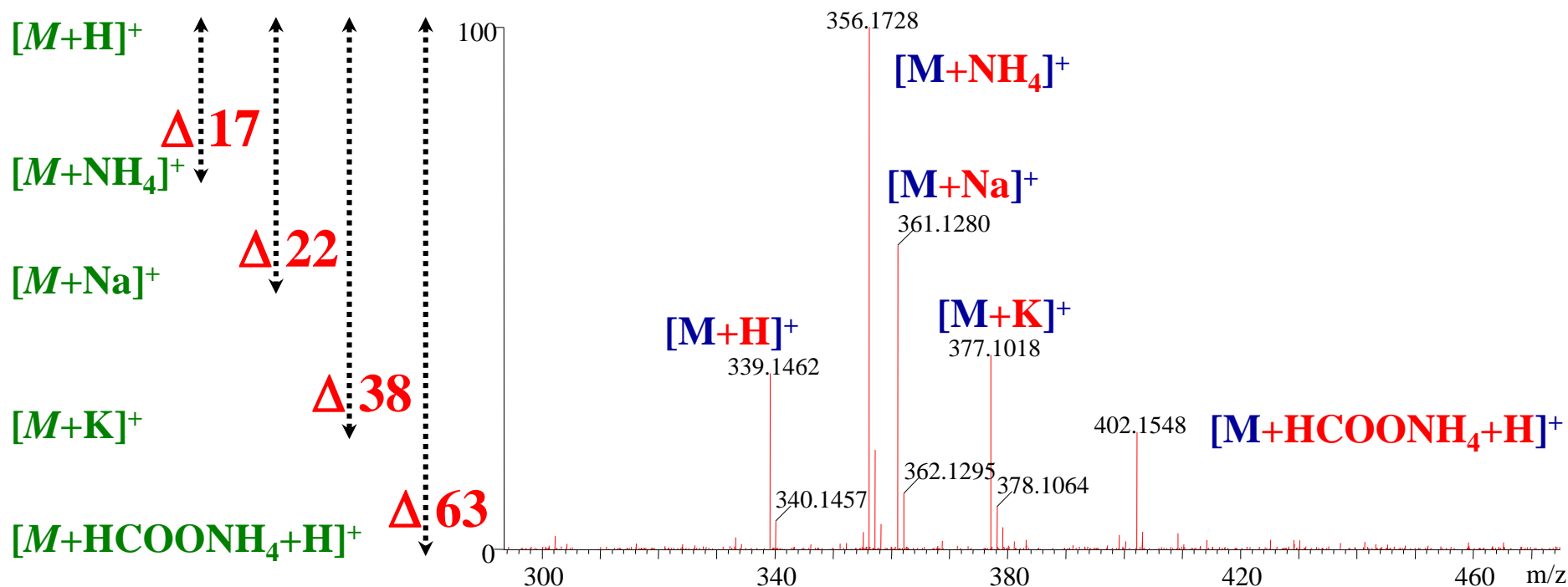


- **Přednostně vznikají ionty se sudým počtem elektronů (EE^+)**
- Ionty s lichým počtem elektronů pouze výjimečně (polyaromáty, organokovy)

ESI HMOTNOSTNÍ SPEKTRA

▪ Příklad: 3-Acetyldeoxynivalenol

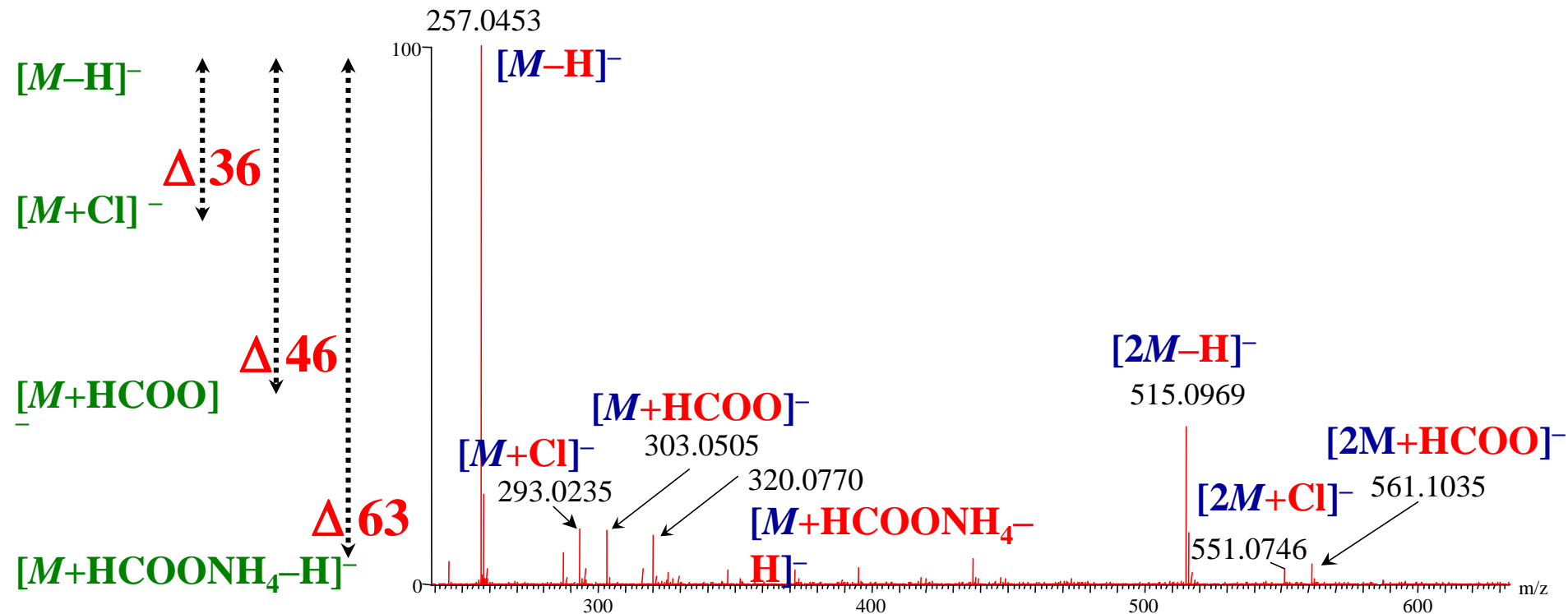
- Elementární složení: $C_{17}H_{22}O_7$ | $M_r = 338$
- Ionizace: ESI^+ | mobilní fáze: MeOH : 5 mM mravenčan amonný ($HCOONH_4$)



ESI HMOTNOSTNÍ SPEKTRA

▪ Příklad: Alternariol

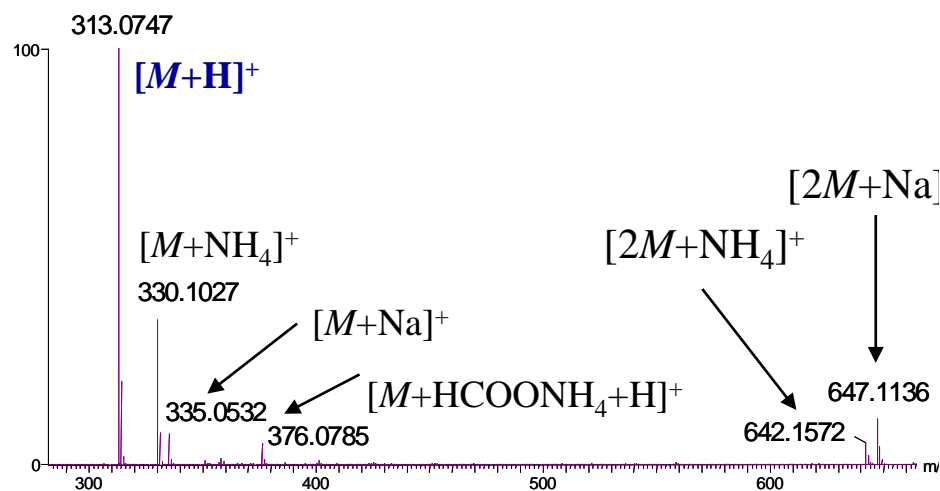
- Elementární složení: $C_{14}H_{10}O_5$ | $M_r = 258$
- Ionizace: ESI^- | mobilní fáze: MeOH : 5 mM mravenčan amonný ($HCOONH_4$)



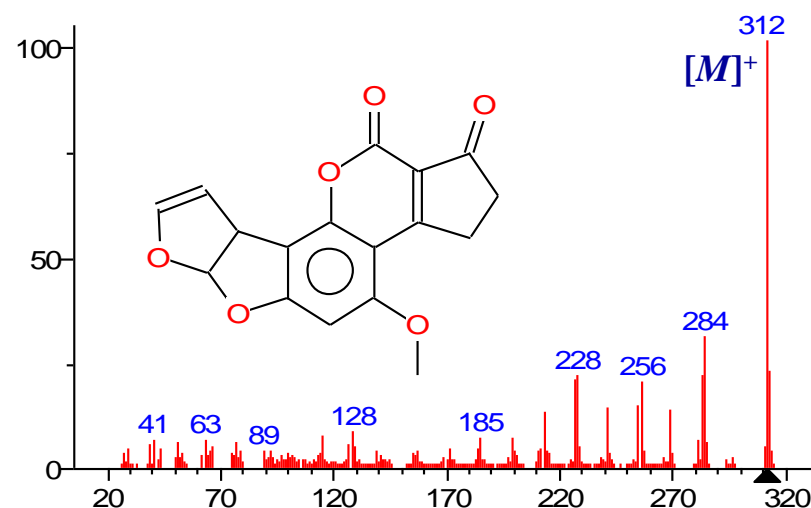
ESI-MS vs. EI-MS

- Příklad: Aflatoxin B₁
 - Elementární složení: C₁₇H₁₂O₆
 - $M_r = 312$

ESI-MS



EI-MS



HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

**Metody pro indentifikaci a/nebo
kvantifikace analytů**

METODY PRO IDENTIFIKACI A/NEBO KVANTIFIKACI ANALYTŮ

- Softwarové aplikace umožňující **rychlé vyhodnocování dat** získaných instrumentálními technikami (→ zvýšení efektivity)
 - Jinými slovy: *Co člověk vyhodnocuje hodiny, udělá počítač během sekund*
- V případě metod pro **identifikaci** je součástí rovněž **hledání v knihovně spekter**
- V případě metod pro **kvantifikaci** nemusí být **bezpodmínečně nutné hledání v knihovně spekter**