

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

MASS SPECTROMETRY (MS)

Alternativní názvy (spojení s GC, LC, CZE, ITP):
Hmotnostně spektrometrický (selektivní) detektor
Mass spectrometric (selective) detector (MSD)

Spektrometrie - metoda založená na interakci záření a hmoty

Hmotnostní spektrometrie - metoda založená na tvorbě iontů při interakci elektrického pole a analytů, které jsou následně analyzovány (separovány, filtrovány) podle hodnoty m/z pomocí elektrických/magnetických polí



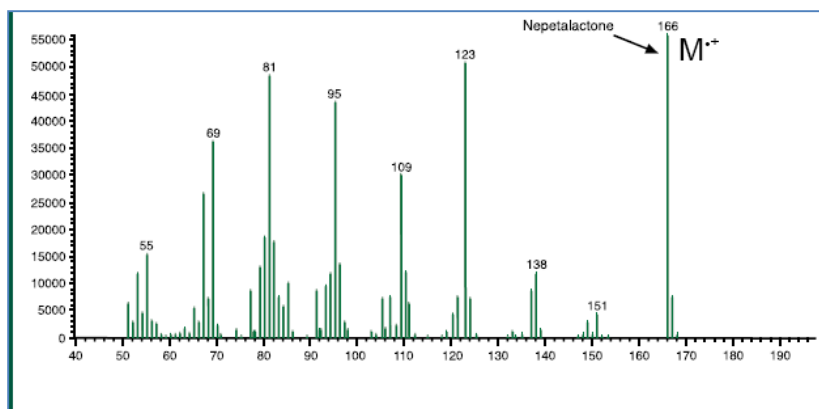
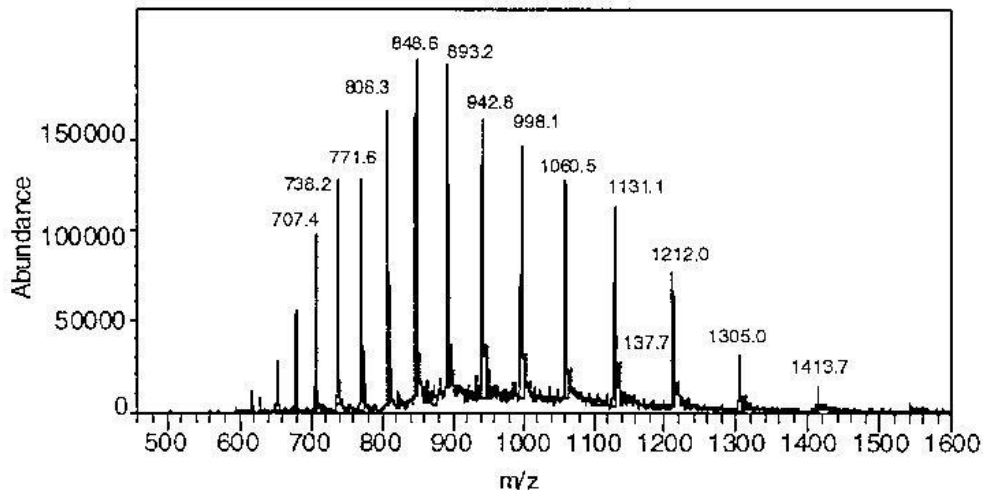
Princip MS: měření a výstup měření

1.	Tvorba iontů - ionizace	Iontový zdroj	Typ iontů: [+] nebo [-] vícenásobné [±] [M] ; fragmenty Adukty
2.	Filtrace iontů - hmotnostní analýza podle hodnoty m/z	Hmotnostní analyzátor	Rozsah, přesnost, rozlišení, rychlost
3.	Měření četnosti iontů	Detektor iontů	Citlivost, životnost
4.	Hmotnostní spektrum - analýza informací	Záznamové zařízení - procesní software	Automatické algoritmy, knihovny spekter



Hmotnostní spektrum: formáty

Grafický - profilové nebo centroidní (čárové) spektrum



Tabelární

<i>m / z</i>	Intenzita <i>Abundance</i> Četnost	Relativní intenzita (%)
57	560	3,72
58	800	5,31
59	550	3,65
125	2532	16,81
126	2935	19,48
127	2580	17,13
128	2100	13,94
134	5785	38,40
135	15065	100,00
136	6256	41,53
137	10258	68,09
138	4618	30,65

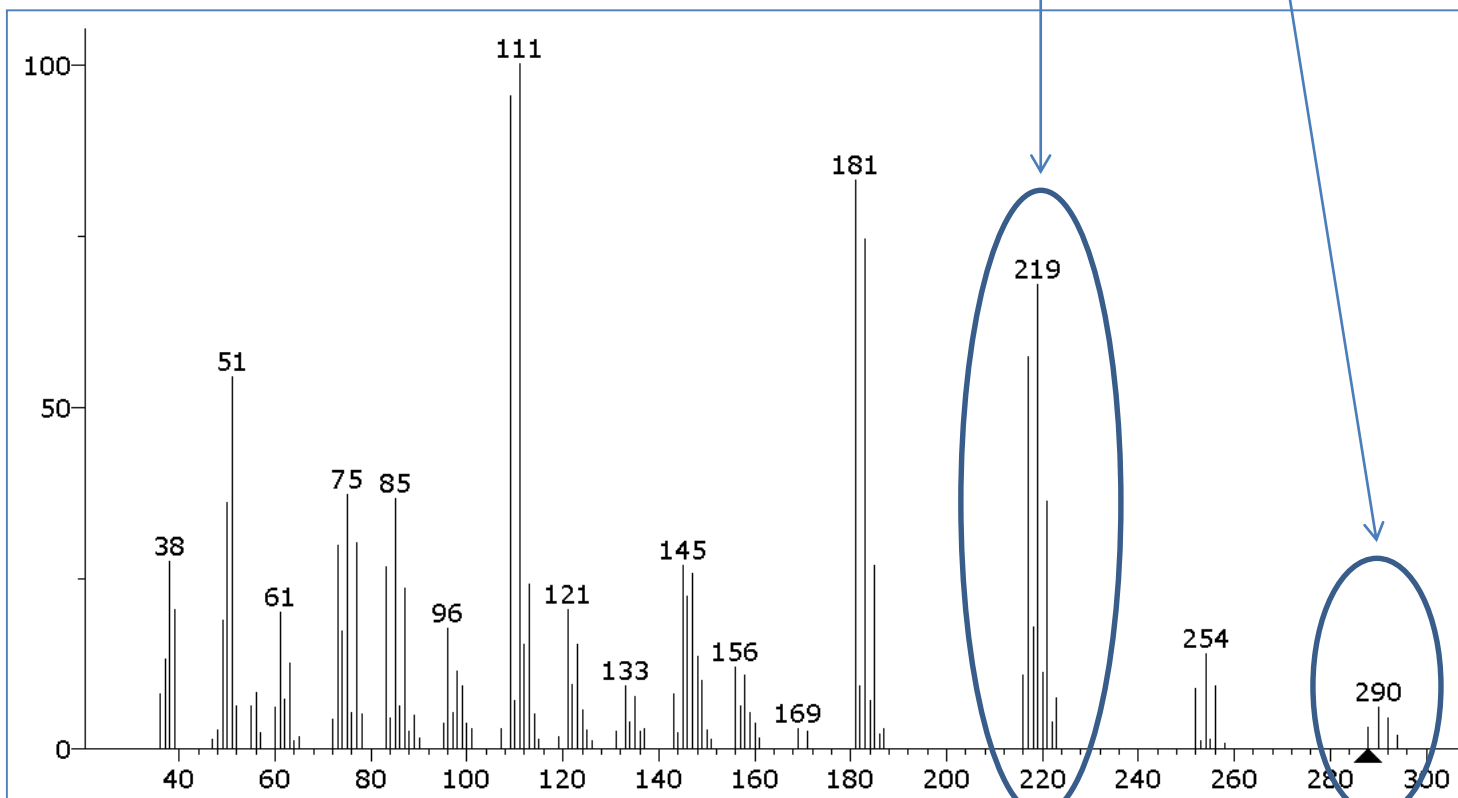
Hmotnostní spektrum: obsažené informace

Molekulová hmotnost - (pseudo)molekulární ion

Elementární složení - přesná hmota, izotopový klastr

Struktura - fragmentace

Velikost náboje - vzdálenost iontů v klastru



Aplikační možnosti MS

Identifikace sloučenin

Molekulová hmotnost / elementární složení / 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
- aplikace spektrální knihoven

Kvantifikace sloučenin

Univerzální

- LOD se liší podle schopnosti sloučenin poskytovat za daných podmínek ionty



Historický vývoj MS - souhrn

Od katodové trubice k modernímu spektrometru

Spojení iontové mobility a MS

*2006

J.B. Fenn (1984)

LC-MS(ESI)

*1984



GC-MS

*1956



TOF-MS

*1946

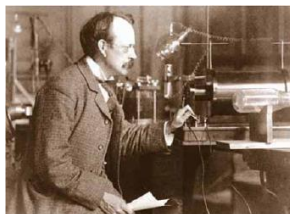


J.J. Thomson (1899)

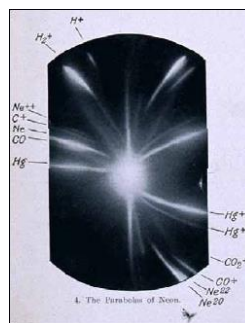
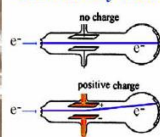
1899

-

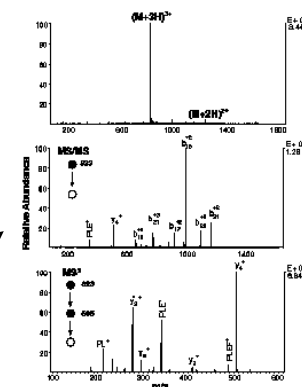
1920



cathode ray tube



F.W. Aston (1920)



Vývoj záznamu spekter



Vznik a typy iontů

- vznik různými mechanismy - typ mechanismu zásadně ovlivňuje výsledné spektrum
- z hlediska polaritly vznikají ionty nabitě kladně nebo záporně
(*vždy pouze jeden typ*)
- rozlišujeme tak POZITIVNÍ a NEGATIVNÍ ionizaci
- z hlediska původní struktury vznikají ionty:
 - a) molekulární: $[M]^+$ nebo $[M]^-$
 - b) pseudomolekulární a aduktové: $[M+H]^+$, $[M-H]^-$, $[M+CH_4]^+$
 - c) fragmentové: např. $[M-CH_3]^+$



Ionizace v plynné fázi (za sníženého tlaku $\approx 10^{-4}$ torr $\approx 10^{-2}$ Pa)

Elektronová ionizace (Electron Ionization - EI)

Princip: dochází ke ztrátě elektronu z elektroneutrální molekuly

A) 'nárazem' elektronu (Electron Impact) *nebo jiná teorie* \rightarrow

B) uvolněním valenčního elektronu zachyceného proudem elektronů

- primárně vznikají \oplus ionty:



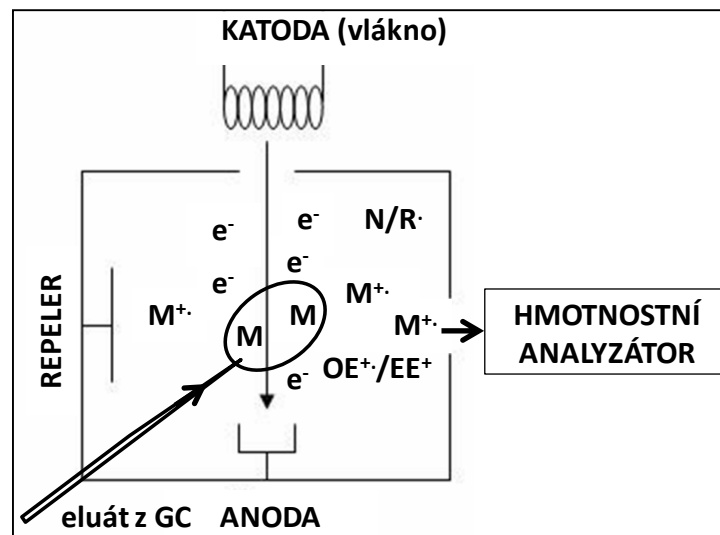
\rightarrow vzniká radikálkation

s lichým počtem elektronů

- v případě následné fragmentace existují dva možné mechanismy:



\rightarrow vznikne fragment se sudým počtem elektronů a radikál
nebo fragment radikálkation s lichým počtem elektronů
a neutrální ztráta



Ionizace v plynné fázi (za sníženého tlaku $\approx 10^{-4}$ torr $\approx 10^{-2}$ Pa)

Elektronová ionizace (Electron Ionization - EI)

Charakterizace:

'tvrdá' ionizace \Rightarrow spektrum bohaté na fragmentové ionty
 \Rightarrow mohou chybět molekulární ionty

Při použití EI můžeme ze spektra určit:

- molekulovou hmotnost / elementární složení / sumární vzorec
 - na základě přesné hmoty
 - na základě izotopového klastru molekulárního iontu
- částečně až úplně identifikovat strukturu na základě fragmentace
- provést identifikaci pomocí knihovny spekter
 - obsahuje EI spektra měřená při standardní ionizační energii 70 eV
- náboj iontů při vícenásobném nabití
 - na základě rozdílů v hodnotě m/z iontů v klastru

Aplikace: GC-MS



Ionizace v plynné fázi (za sníženého tlaku $\approx 10^{-4}$ torr $\approx 10^{-2}$ Pa)

Chemická ionizace (Chemical Ionization - CI)

Princip: ionizace prostřednictvím reakčního plynu (CH_4)

❖ reakční plyn (poměr k analytům cca $10^4:1$) podléhá EI ionizaci a jeho ionizované formy pak předávají náboj analytům

- vznik \oplus iontů (Pozitivní CI):

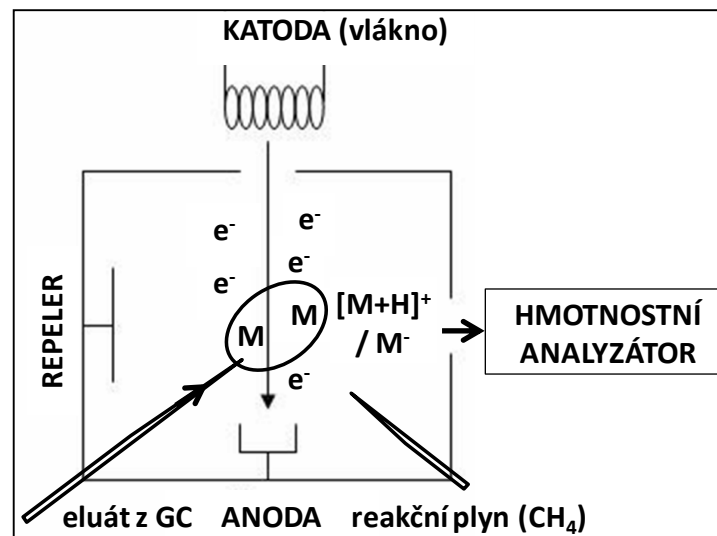


→ vzniká reakční ion



→ vzniká protonovaná molekula

- vznik \ominus iontů (Negativní CI):



Ionizace v plynné fázi (za sníženého tlaku $\approx 10^{-4}$ torr $\approx 10^{-2}$ Pa)

Chemická ionizace (Chemical Ionization - CI)

Charakterizace:

'měkká' ionizace \Rightarrow převažují molekulové ionty (PCI)
 \Rightarrow fragmentové ionty vznikají minimálně (PCI)

Při použití CI můžeme ze spektra určit:

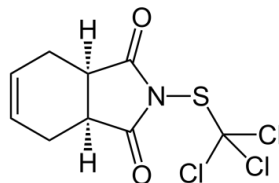
- molekulovou hmotnost / elementární složení / sumární vzorec
 - na základě přesné hmoty
 - na základě izotopového klastru molekulárního iontu
- náboj iontů při vícenásobném nabití
 - na základě rozdílů v hodnotě m/z iontů v klastru

Aplikace: GC-MS

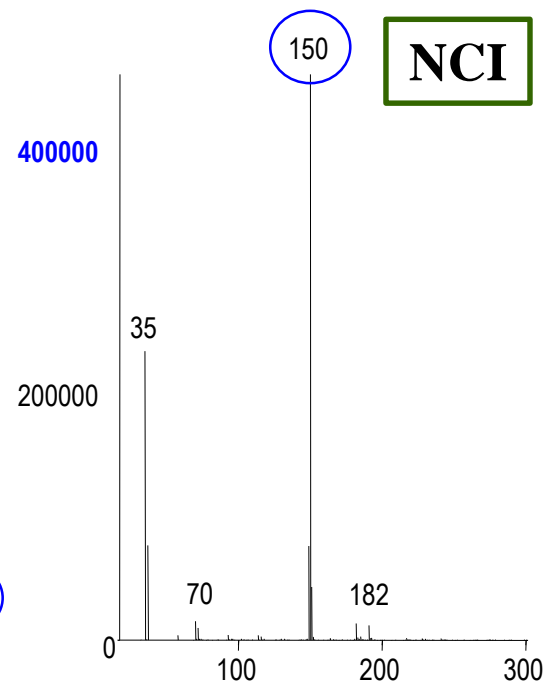
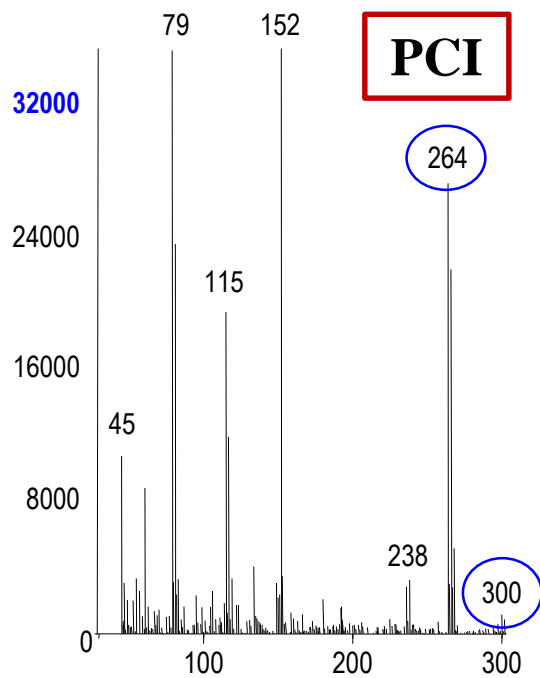
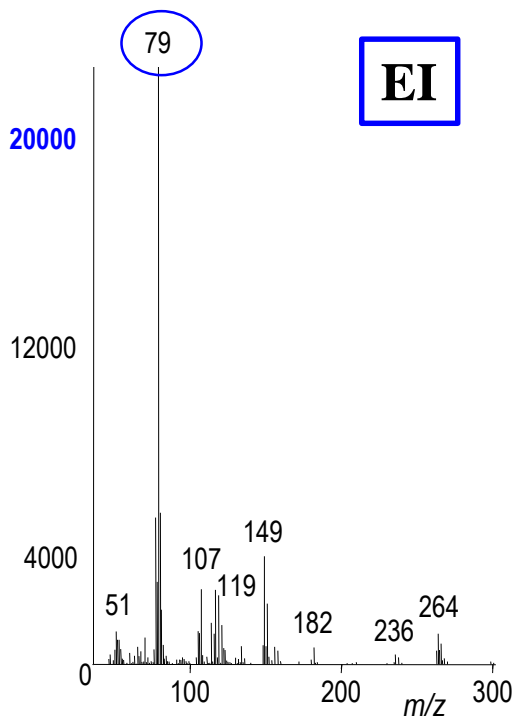


Ionizace v plynné fázi (za sníženého tlaku $\approx 10^{-4}$ torr $\approx 10^{-2}$ Pa)

Porovnání ionizačních technik



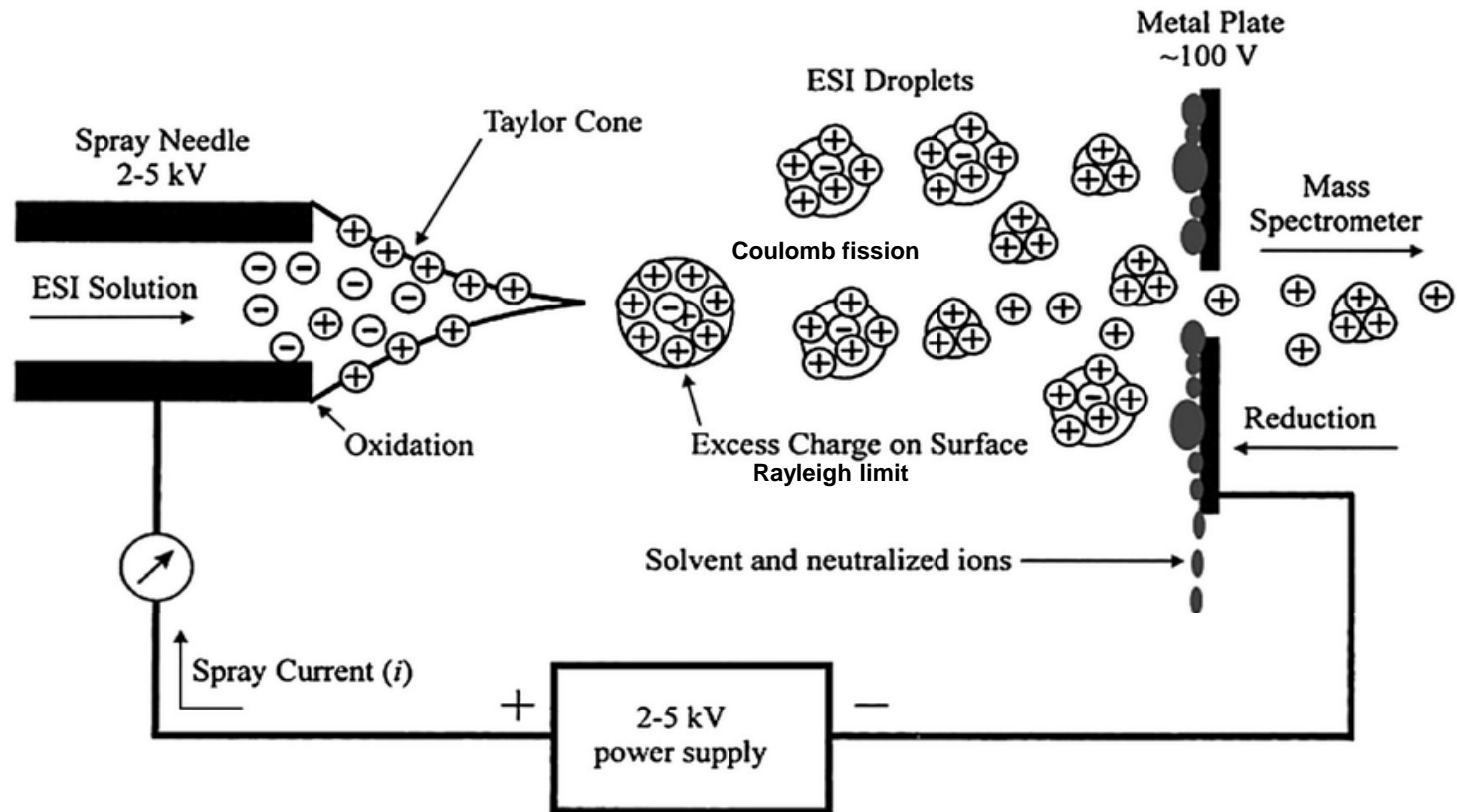
Captan - M_w 299



Ionizace v kapalně fázi (za atmosférického tlaku - API)

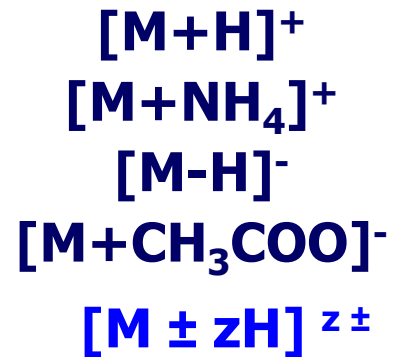
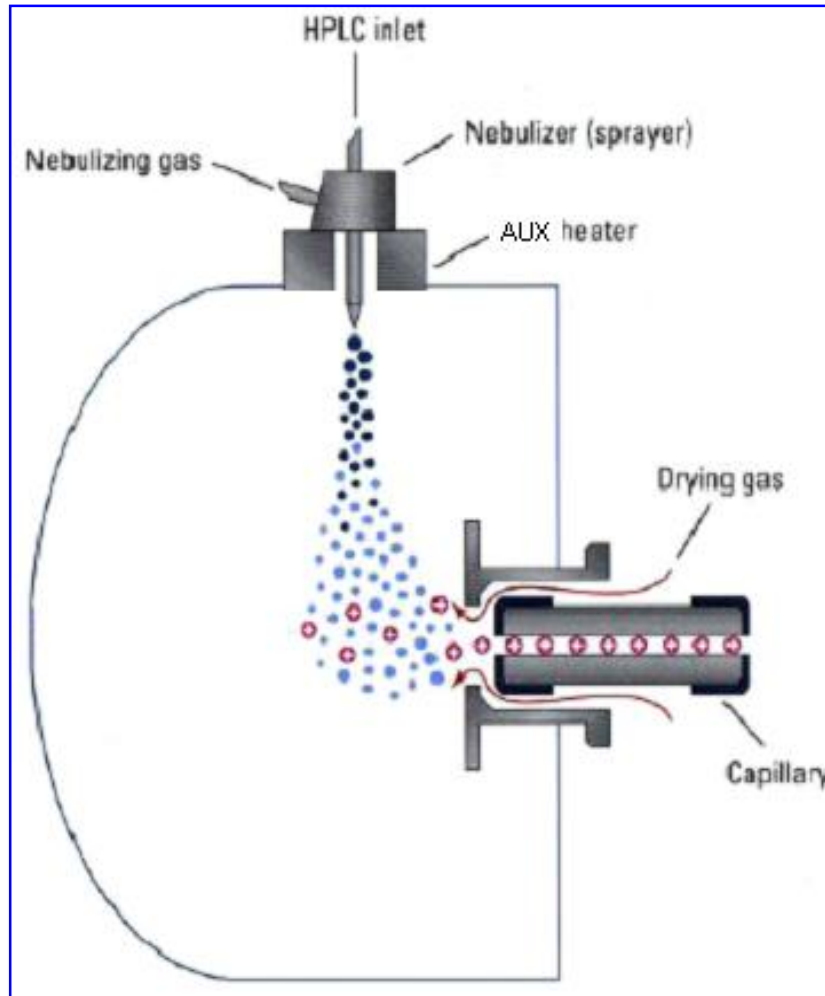
Elektrosprej (Electrospray - ESP; Electrospray ionization - ESI)

Princip: ionizace vysokým napětím ($\approx 2-5$ kV) za současného zmlžování



Ionizace v kapalně fázi (za atmosférického tlaku - API)

Elektrosprej (Electrospray - ESP; Electrospray ionization - ESI)



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

Napětí: 2 - 8 kV

Průtok m. f. 0,001 - 1 ml/min

Těkavé přísady:

*octan/mravenčan amonný,
octová k., mravenčí k.*

Netěkavé přísady: fosfátové pufrý



Elektrosprej (Electrospray - ESP; Electrospray ionization - ESI)

Charakterizace:

- ‘m kk ’ ionizace \Rightarrow spektrum obsahuje většinou molekul rn  nebo pseudomolekulární ionty
- \Rightarrow mohou vznikat v icen sobn  nabit  ionty
- \Rightarrow jsou ionizovány velké molekuly (biopolymery)

Při použití ESI můžeme ze spektra určit:

- molekulovou hmotnost / elementární složení / sum rn  vzorec
 - na základě p esn  hmoty
 - na základě izotopového klastru molekulárního iontu
- náboj iontů při v icen sobn m nabit 
 - na základě rozd l  v hodnot  m/z iontů v klastru

Aplikace: LC-MS

Ionizace v kapaln  fázi (za atmosferického tlaku - API)

Chemick  ionizace (Atmospheric Pressure Chemical Ionization - APCI)

Princip: ionizace výbojovou jehlou (≈ 5 kV) za souasn ho zmlžování
při vysok  teplotě (400 - 650 $^{\circ}$ C)

Vznik aduktov ch iontů s ionty vzniklými z p rsad v mobilní fázi

Vznikají ionty ‘malých’ molekul

Charakterizace:

‘m kk ’ ionizace \Rightarrow spektrum obsahuje většinou molekul rn 
nebo pseudomolekulární ionty

Při pou it  APCI můžeme ze spektra určit:

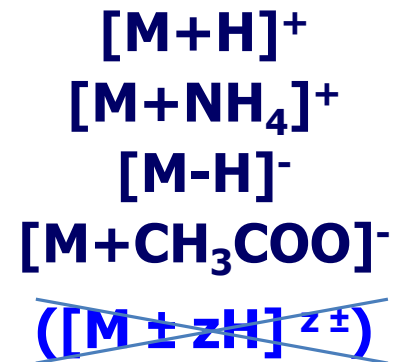
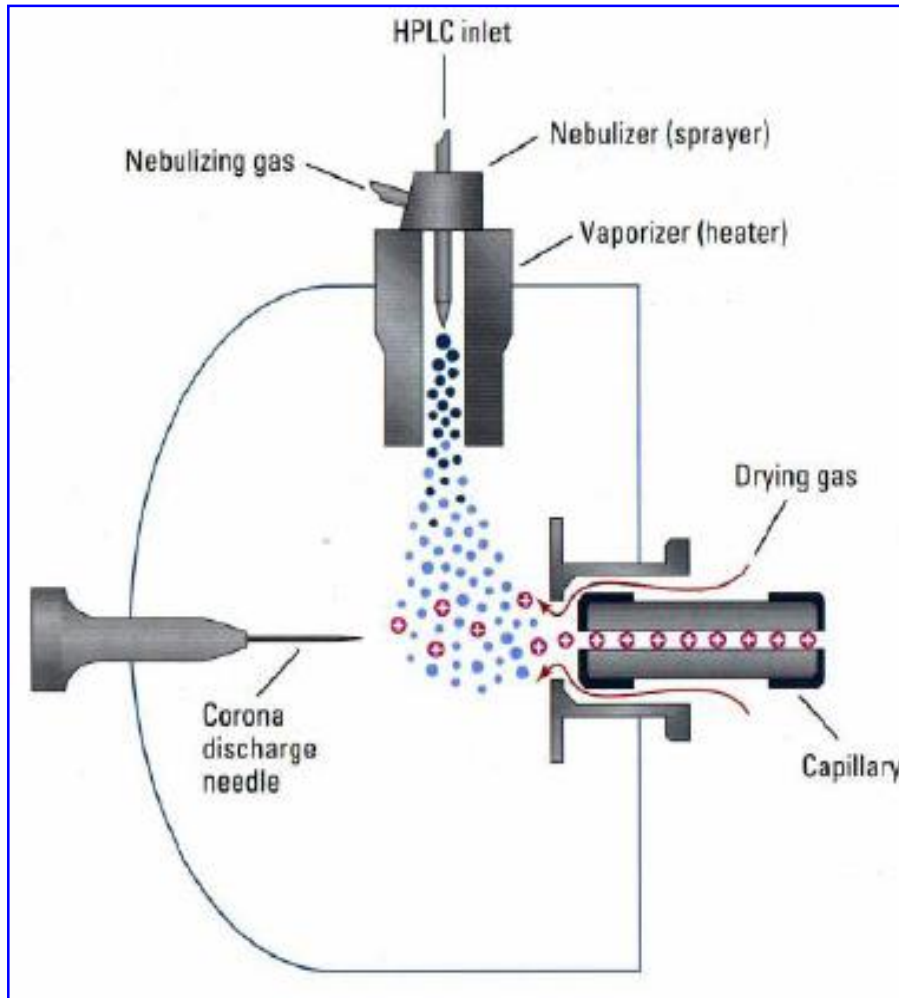
- molekulovou hmotnost / elementární složení / sum rn  vzorec
 - na základě p esn  hmoty
 - na základě izotopového klastru molekulárního iontu
- náboj iontů při v cen sobn m nabit 
 - na základě rozd l  v hodnot  m/z iontů v klastru

Aplikace: LC-MS



Ionizace v kapalně fázi (za atmosférického tlaku - API)

Chemická ionizace (Atmospheric Pressure Chemical Ionization - APCI)



$t \approx 400 - 650 \text{ }^\circ\text{C}$

Napětí (výboj. el.): 2 - 8 kV

Průtok m. f. 0,2 - 2 ml/min

Těkavé přísady:

*octan/mravenčan amonný,
octová k., mravenčí k.*

Netěkavé přísady: fosfátové pufrý



Ionizace v kapaln  fázi (za atmosferického tlaku - API)

Fotoionizace (Atmospheric Pressure Photoionization - APPI)

Princip: ionizace UV z řenim (≈ 10 eV) za současného zmlžování
při vysok  teplotě (400 - 650 $^{\circ}$ C)

Dochází k selektivn  ionizaci analytů

Charakterizace:

‘m kk ’ ionizace \Rightarrow spektrum obsahuje většinou molekul rn 
nebo pseudomolekulární ionty
 \Rightarrow vhodn  pro nepolární a labilní sloučeniny

Při pou it  APPI můžeme ze spektra určit:

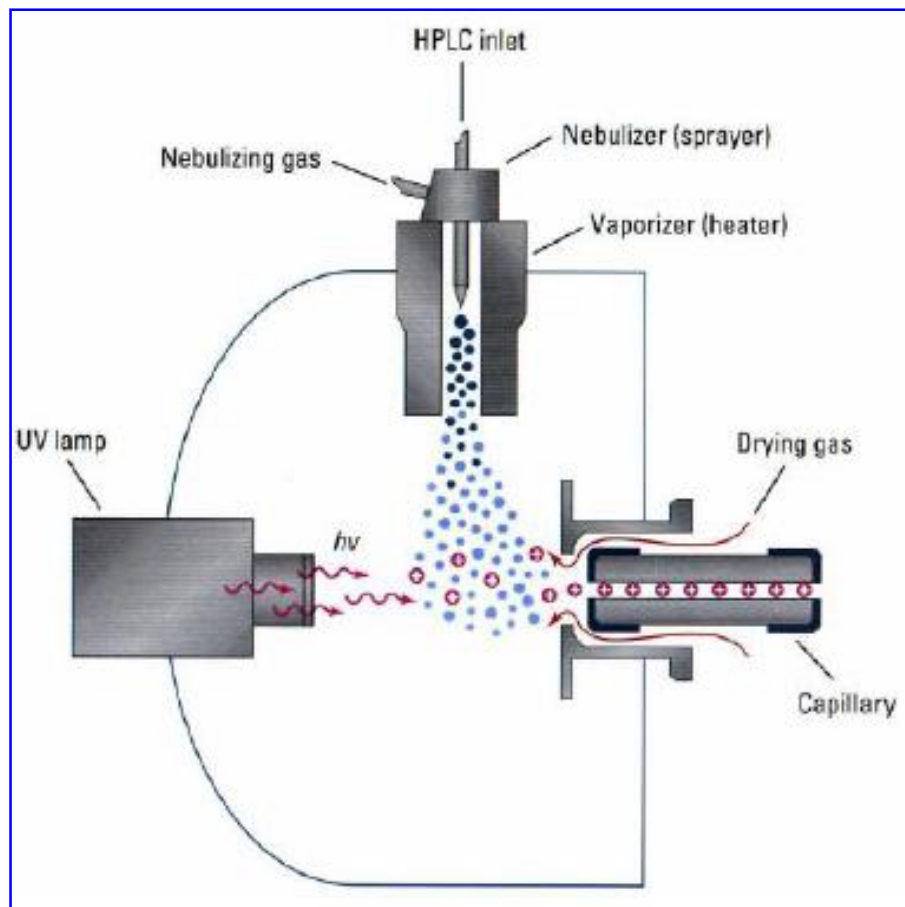
- molekulovou hmotnost / elementární složení / sum rn  vzorec
 - na základě p esn  hmoty
 - na základě izotopového klastru molekulárního iontu
- náboj iontů při v icen sobn m nabit 
 - na základě rozdílů v hodnot  m/z iontů v klastru

Aplikace: LC-MS



Ionizace v kapaln  fázi (za atmosferického tlaku - API)

Fotoionizace (Atmospheric Pressure Photoionization - APPI)



$[M+H]^+$

$[M-H]^-$

$t \approx 400 - 650 \text{ }^\circ\text{C}$

UV z ren  $\approx 10 \text{ eV}$

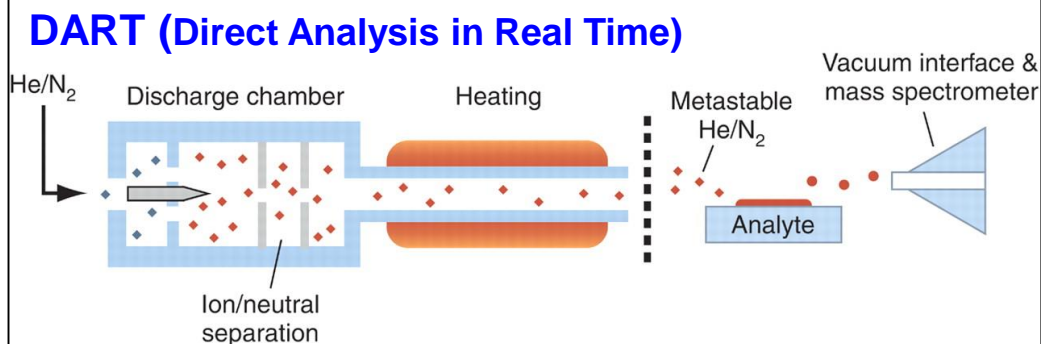
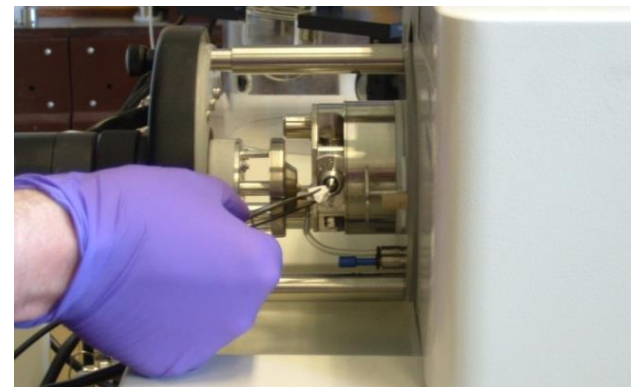
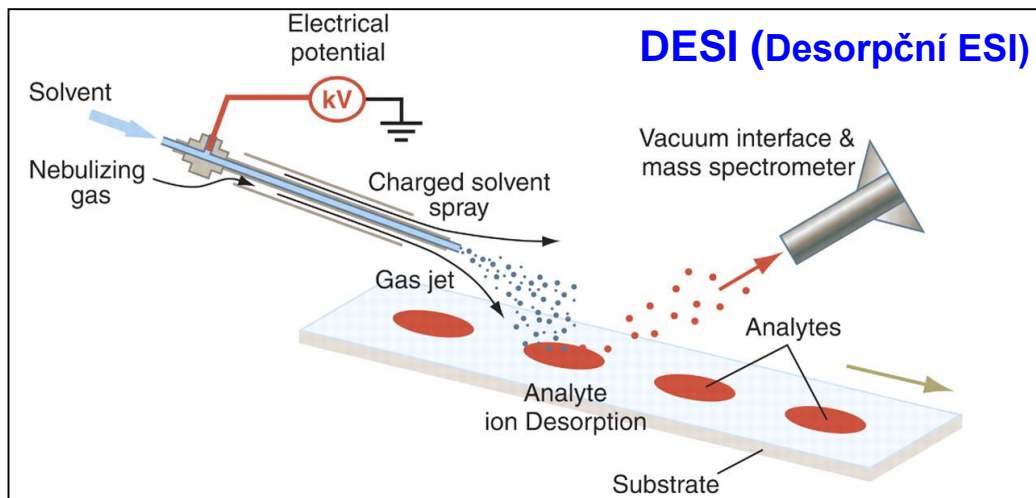
Průtok m. f. $0,2 - 2 \text{ ml/min}$

Dopant: toluen (\uparrow citlivost)

Techniky přímé ionizace vzorku

Princip: působení ionizujícího proudu kapaliny nebo plynu na vzorek

Vzniká směsné spektrum všech přítomných sloučenin - pro zajištění reprezentativnosti výsledku je nezbytné analyzovat homogenní vzorek nebo extrakt

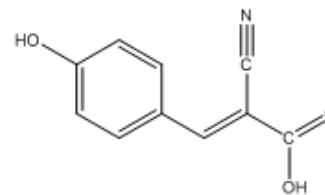
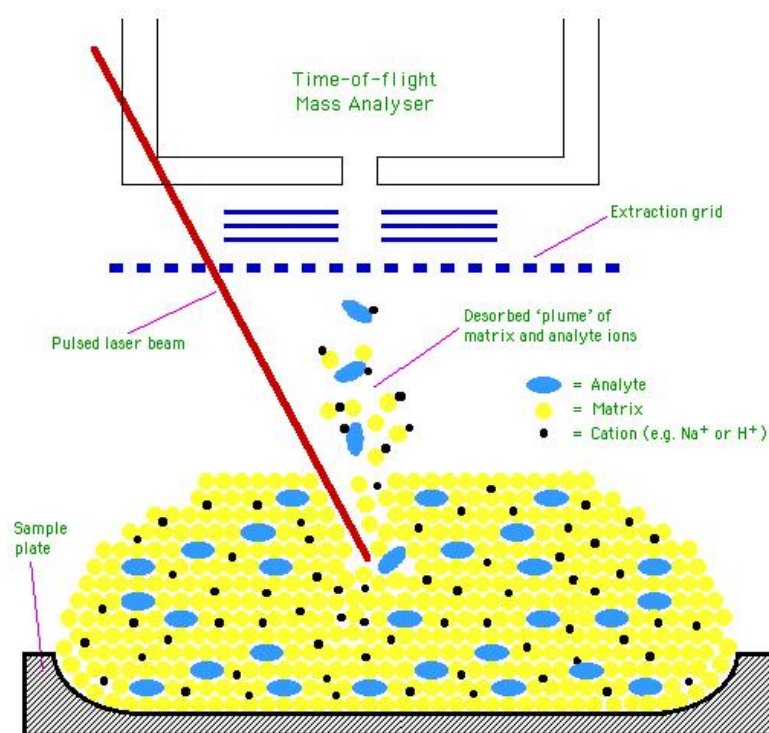


Techniky přímé ionizace vzorku

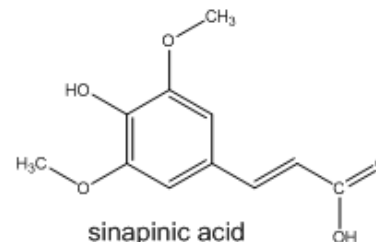
Princip: působení laserové paprsku na vzorek za přítomnosti absorbující matrice

Vzniká směsné spektrum všech přítomných sloučenin - pro zajištění reprezentativnosti výsledku je nezbytné analyzovat homogenní vzorek nebo extrakt

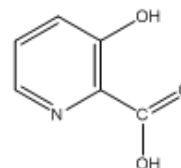
MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)



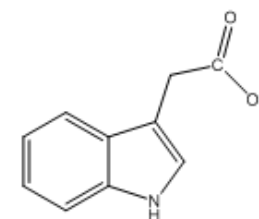
a-cyano-4-hydroxycinnamic acid
CCA C₁₀H₇NO₃
peptides and small molecules



sinapinic acid
SA C₁₁H₁₂O₅
proteins



3-hydroxypicolinic acid
HPA C₆H₅NO₃
oligonucleotides



3-indoleacrylic acid
IAA C₁₀H₉NO₂
organic polymers

Porovnání aplikovatelnosti ionizačních technik

