

Hmotnostní spektrometrie

Mass Spectrometry (MS)

(c) David MILDE, 2003-2010

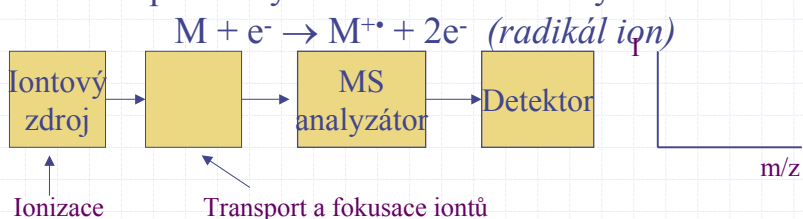
ÚVOD

- ◆ MS je nejrychleji se rozvíjející technika analytické chemie.
- ◆ Dokáže poskytnout informace o:
 - elementárním složení vzorku,
 - struktuře organických a biomolekul,
 - kvalitativním a kvantitativním složení vzorku,
 - struktuře a složení povrchů,
 - izotopických poměrech atomů ve vzorku.
- ◆ První chemické aplikace ze 40. let 20. stol. – kvantitativní analýza směsí uhlovodíků v petrochemickém průmyslu.
- ◆ Od 90. let 20. stol. explozivní nárůst biologických a biochemických aplikací.

David MILDE 2010

ÚVOD

- ◆ Spektrální technika, využívající separace iontů.
- ◆ Jeden ze způsobů dělení (podle způsobu ionizace):
 - Molekulová hmotnostní spektrometrie (studium molekul).
 - Atomová hmotnostní spektrometrie (multielementární prvková analýza).
- ◆ Základem je vytvoření iontů v plynné fázi, které jsou dále separovány v hmotnostním analyzátoru.



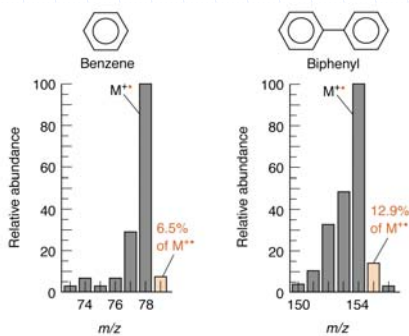
David MILDE 2008

- ◆ Hmotnostní spektrum získáme převedením atomů či molekul vzorku na rychle se pohybující ionty v plynném stavu a jejich separací podle m/z .

$$1 \text{ amu} = 1 \text{ Da} = \frac{1}{12} \text{ hmotnosti } {}^{12}_6\text{C} \quad \text{amu} - \text{atomic mass unit}$$

- ◆ Atomové a molekulové hmotnosti se odlišují podle izotopů.

${}^{12}\text{C}$	98,90 %
${}^{13}\text{C}$	1,10 %
${}^1\text{H}$	99,985 %
${}^2\text{H}$	0,015 %
${}^{79}\text{Br}$	50,69 %
${}^{81}\text{Br}$	49,31 %
${}^{35}\text{Cl}$	75,47 %
${}^{37}\text{Cl}$	24,53 %



David MILDE 2008

Atomová (anorganická) hmotnostní spektrometrie

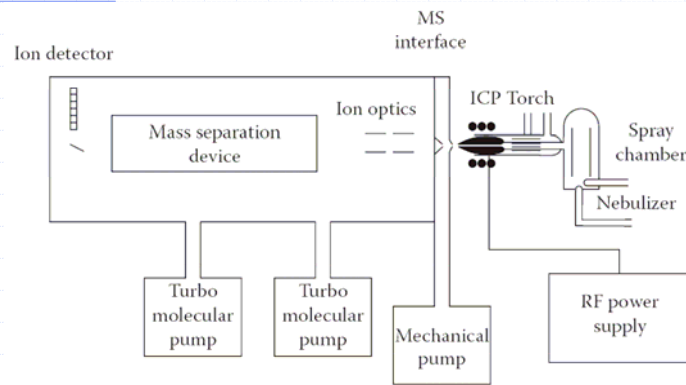
David MILDE 2010

ICP-MS

- Pouze nejrozšířenější technika ICP-MS.
- **PRINCIP:** ionizace prvků vzorku přítomných v ICP; vzniklé ionty jsou přes interface vedeny do MS.
- Zařízení rozpoznává odlišné relativní atomové hmotnosti (izotopy), ale nerozpoznává chemické prvky podle elektronových obalů !!!
- ◆ V ICP je více než 50 prvků ionizováno do 1. stupně z více jak 90 %.
- ◆ Menší % ionizace u Se, As, P, S a halogenů.
- ◆ Prvky s nízkým 2. ionizačním potenciálem – 2x nabitě ionty (např. Ba^{2+}).
- ◆ Z hlavice vystupuje a do MS vstupuje směs iontů, atomů, fragmentů molekul a Ar.

David MILDE 2010

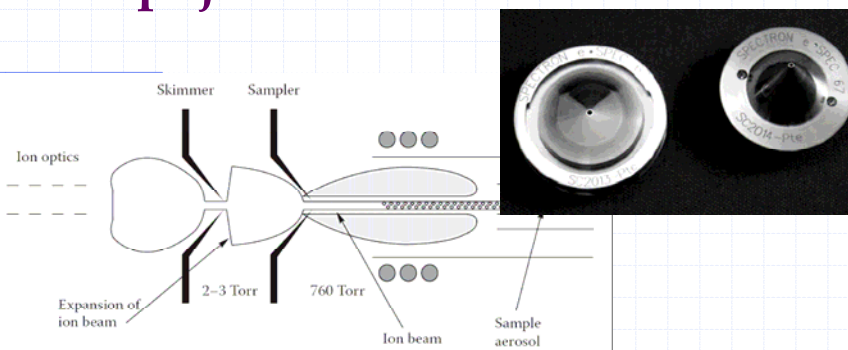
ICP-MS - instrumentace



Axiální pozorování z plazmové hlavice !
 Používané MS separátoru: kvadrupólový, průletový a s dvojitou
 fokusací (HR-MS).

David MILDE 2010

Spojení ICP s MS



- Snížení tlaku na 10^{-5} Pa.
- Materiál konusů: kov s dobrou vodivostí a odolností vůči kyselinám – Ni. Pt. Konusy chlazeny vodou.
- Problémy se solnými roztoky.
- **Iontová optika:** fokusace iontového paprsku a odstranění nenabitých částic a fotonů. (Zarážka fotonů.)

David MILDE 2010

Interference u ICP-MS

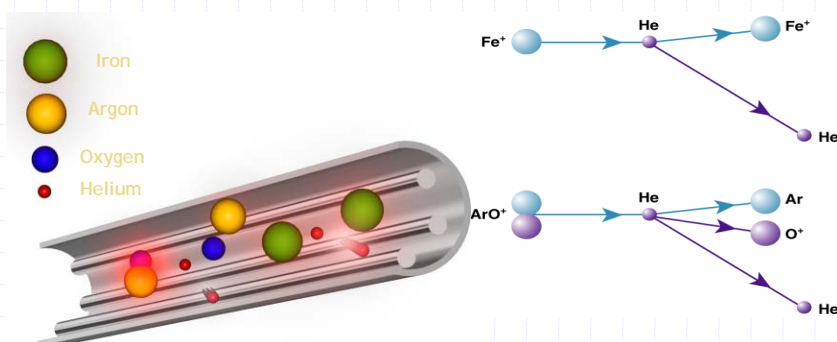
- ◆ **Nespektrální interference:** ovlivnění transportu a zmlžování; ovlivnění ionizace v plazmatu; blokování interface usazenými solemi.
 - **ELIMINACE:** vnitřní standard (např. Re, In) – přidávána známá koncentrace.
- ◆ **Spektrální interference** – (jsou u MS s nízkým rozlišením): hmotnostní překryv prvku s molekulárními či polyatomickými ionty z H_2O , Ar či vzorku.

m/z	prvek	Interferent
23	Na	$^{46}Sc^{2+}$
56	Fe	$^{40}Ar^{16}O$, $^{40}Ca^{16}O$
77	Se	$^{40}Ar^{37}Cl^+$

David MILDE 2003

Spektrální interference u ICP-MS

- ◆ **Eliminace spektrálních interferencí:**
 - Kolizní cela.



David MILDE 2008

Molekulová (organická) hmotnostní spektrometrie

David MILDE 2010

Instrumentace

◆ Základní části spektrometru:

- zavádění vzorku: přímé či spojení se separační technikou,
- iontový zdroj: ionizace molekul a urychlení,
- analyzátor(-y): separace iontů v plynném skupenství,
- zařízení pro detekci a registraci iontů,
- vakuová aparatura – snížení tlaku na $10^{-3} - 10^{-6}$ Pa.

◆ VAKUOVÁ APARATURA: turbomolekulární pumpy, vývěvy – obvykle vícestupňové snižování tlaku. Nízký tlak brání nežádoucím srážkám mezi ionty a neutrálními molekulami mezi ionizací a detekcí.

David MILDE 2010

ZPŮSOBY IONIZACE MOLEKUL

2 základní skupiny

◆ Způsoby ionizace se liší „*tvrdostí*“ = množstvím E, která na molekulu při ionizaci působí (tvrdé a měkké ionizační zdroje).

1. „Gas-phase sources“ – vzorek nejprve převeden do plynné fáze a pak ionizován různými způsoby:

- **Elektronová ionizace** (Electron Ionization – EI)
- **Chemická ionizace** (Chemical Ionization – CI)
- **Ionizace polem** (Field Ionization – FI): k ionizaci plynných molekul se používá velmi silné elektrické pole $\approx 10^7$ V/cm, které se udržuje mezi kladně nabitým vláknem a protielektrodou potenciálem 8-12 KV. Elektron z plynné molekuly je kvantově mechanickým tunelováním přenesen na elektrodu.

David MILDE 2010

ZPŮSOBY IONIZACE MOLEKUL

2 základní skupiny

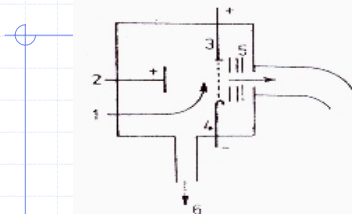
2. „Desorption sources“ (desorpční zdroje) – vzorek umístěn na sondě, E k ionizaci dodávána ke kapalnému nebo pevnému vzorku, kde dochází ke vzniku plynných iontů:

- **Desorpce polem** (Field Desorption – FD)
- **Náraz rychlými atomy či ionty** (FAB/FIB)
- **Laserová desorpce** (Laser Desorption – LD)
- **Elektrosprej** (Electrospray Ionization – ESI)
- **Termosprej** (Thermospray Ionization – TSI)
- Některé ionizace probíhají za atmosférického tlaku a využívají se ve spojení HPLC-MS).

David MILDE 2010

Elektronová ionizace (EI)

starší název: Electron Impact



1 - přívod vzorku, 2 - vytlačovací elektroda, 3 - anoda, 4 - žhavená katoda, 5 - urychlovací a fokusační elektrody, 6 - vakuum

- ◆ Elektronů vytlačovaných ze žhavené katody (W, Re) a urychlených potenciálem 70 eV směřují k anodě. Molekuly vzorku se dostávají do proudu e^- , kde dochází k jejich ionizaci. Vzniklé kladné ionty jsou vytlačovány elektrodou (2) a po urychlení vysokým kladným potenciálem na (5) přecházejí do MS analyzátoru.
- ◆ Dochází k ovlivnění elektromagnetických polí (nikoli nárazu e^-) a tím k uvolnění valenčního e^- .
- ◆ Tlak 10^{-5} Pa – nedochází ke srážkám \Rightarrow pouze monomolekulární „rozpady“ – mají-li ionty přebytek E tak fragmentují.

David MILDE 2003

Elektronová ionizace (EI)

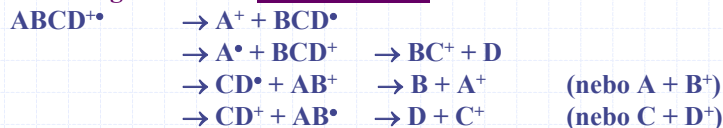
- ◆ Primárně vzniká molekulární ion: $M + e^- \rightarrow M^{+\bullet} + 2e^-$.

◆ Typické reakce u EI:

- Vznik molekulárního iontu (radikál ion!!!):



- Fragmentace \Rightarrow dceřinné ionty:



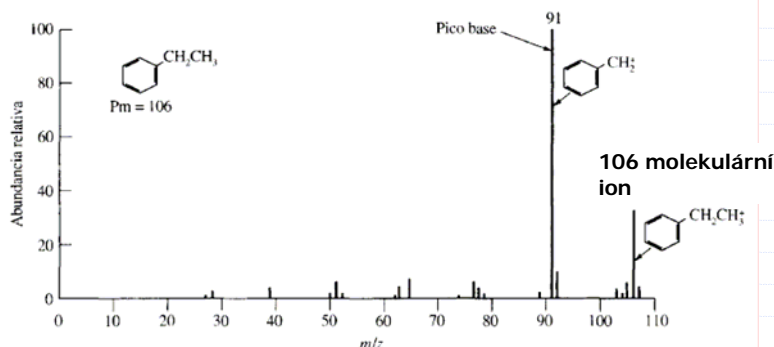
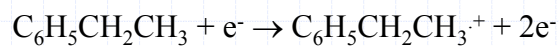
- Kolize + následná fragmentace:



- ◆ Nevýhody EI: značná fragmentace, která může zapříčinit „ztrátu“ M^+ iontu; nutný převod vzorku do plynné fáze (pro některé molekuly problematické).
- ◆ Výhody EI: dobrá citlivost; rozsáhlé knihovny spekter.

David MILDE 2003

Hmotnostní spektrum ethylbenzenu

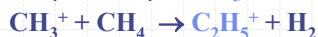


David MILDE 2003

Chemická ionizace (CI)

- ◆ Konstrukční uspořádání jako u EI. Do iontového zdroje se kromě vzorku zavádí pomocný plyn (CH_4 , NH_3 , C_3H_8 , isobutan, ...) o tlaku 10^2 Pa, tlak par vzorku 10^{-4} Pa.
- ◆ Proudem e^- jsou ionzovány téměř výhradně molekuly pomocného plynu (např.: u CH_4 ionty CH_5^+ a C_2H_5^+). Tyto ionty reagují se vzorkem iontově molekulárními reakcemi.

◆ Pro CH_4 :



Přenos protonu:



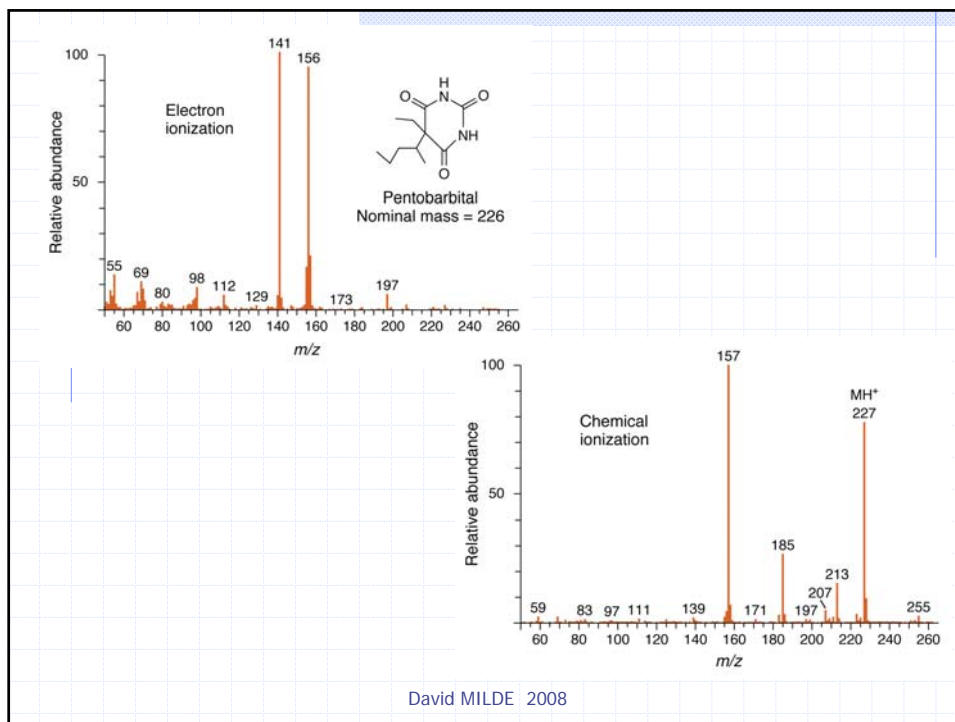
Odtržení H:



Ve spektru ionty: $(\text{M}+\text{H})^+$ nebo $(\text{M}-\text{H})^+$ - tzv. pseudomolekulární ionty.

Kondenzační reakce \Rightarrow adukty, např.: $(\text{M}+29)^+$.

David MILDE 2003

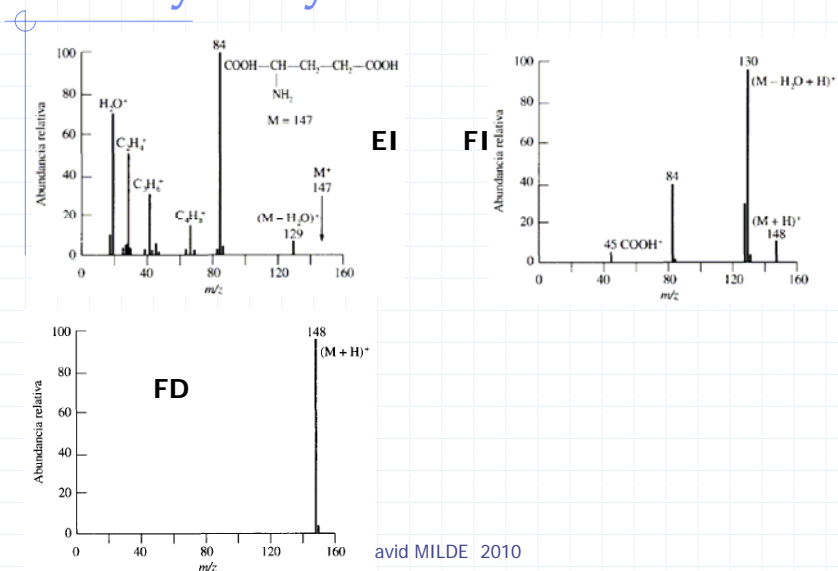


Desorpční zdroje

- ◆ **FD** (field desorption – desorpce polem) – k ionizaci kondenzované fáze se používá elektrické pole; vzorek se ionizuje z elektrody, na které je vysoký potenciál.
- ◆ **FAB a FIB** (fast atom/ion bombardment) – vzorek v kondenzované fázi (např.: glycerinový roztok na kovovém terči) je bombardován Xe či Ar atomy nebo ionty Xe^+ či Ar^+ s $E_{kin} \approx 10^3$ eV. Pozitivní i negativní ionty jsou rozprašovány z povrchu vzorku desorpčním procesem. Tento způsob ionizace provází rychlé zahřívání vzorku, což snižuje možnost fragmentace analytu \Rightarrow ve spektru převažuje M^+ ion.
- ◆ **PD** (plasma desorption – plazmová desorpce) – k ionizaci slouží urychlené produkty rozpadu vhodného radioaktivního izotopu (^{252}Cf). Vhodná je k ionizaci tepelně nestálých makromolekulárních látek.

David MILDE 2003

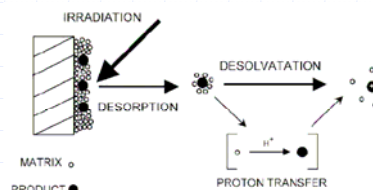
Porovnání spekter glutamové kyseliny – tvrdost ionizace



Desorpční zdroje

- ◆ **LDI** (laser desorption ionization) – laserový paprsek dopadá na vzorek umístěný na terči v pulzech a emituje ionty a neutrální částice. Citlivou regulací intenzity laseru se brání pyrolýze analytu. Možné vyvolat vznik velkých iontů k jejichž separaci se používají TOF analyzátoři.
- ◆ **MALDI** (matrix assisted LDI) – přimíchaná nízkomolekulární matrice absorbuje E laseru o vhodné λ z Vis nebo IR oblasti a tím je umožněna desorpce a ionizace velkých molekul až $m/z = 10^6$. Využívá se pro analýzu biopolymerů.

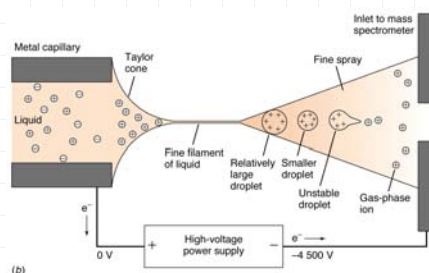
- Uspořádání MALDI-TOF.



David MILDE

Desorpční zdroje (HPLC-MS)

- ◆ **Elektrosprej:** kapalina z HPLC kolony prochází kapilárou, na kterou je aplikováno silné elektrické pole (3-6 kV) \Rightarrow kapičky po výstupu z kapiláry mají „+“ nebo „-“ náboj. Odpařováním rozpouštědla se kapičky zmenšují a roste hustota povrchového náboje až se uvolní pseudomolekulární ion $[M+H]^+$ nebo adukt nebo vícenásobně nabitý ion u velkých molekul.

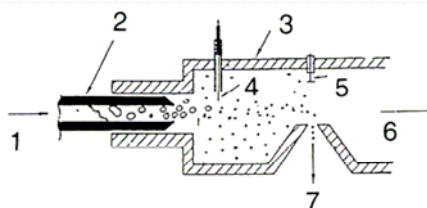


David MILDE 2010

Desorpční zdroje (HPLC-MS)

- ◆ **Termosprej (TSI)** – vzorek je zaváděn do ocelové vyhřívané kapiláry, kde dojde k rychlému zahřátí. Dále je zaváděn do vakua a vznikají kapičky obsahující ionty, rozpouštědlo a molekuly vzorku. Ionty jsou vytlačovací elektrodou směrovány do MS analyzátoru.

První ionizační
technika navržena
výhradně pro HPLC-
MS.



1. Výstup z HPLC, 2. odporově vyhřívaná kapilára, 3. vyhřívaný blok iontového zdroje, 4. výbojová elektroda, 5. odpuzovač iontů, 6. vakuové pumpy, 7. hmotnostní spektrometr

David MILDE 2010

ANALYZÁTORY (separátory) IONTŮ

David MILDE 2003

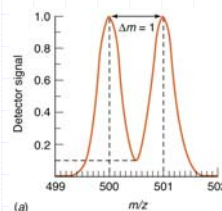
Typy analyzátorů

Typ analyzátoru	Princip separace	Rozlišení
Magnetický sektor	Magnetický moment	100000
Elektrický sektor	Kinetická energie	
Kvadrupól	m/z stabilita trajektorií	2000
Iontová past	m/z rezonanční frekvence	4000
Průletový	Rychlost (doba letu)	20000
Iontová cyklotronová rezonance	m/z rezonanční frekvence	500000
Orbitální past	m/z rezonanční frekvence	100000

◆ Rozlišení:

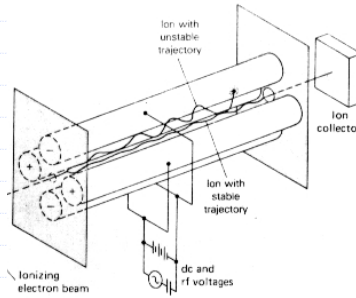
$$R = \frac{m}{\Delta m}$$

David MILDE 2010



Kvadrupólový analyzátor

- ◆ Kruhové tyče 20-30 cm
- ◆ 2 složky elektrického pole:
 - stejnosměrná
 - radiofrekvenční (10 MHz)
- ◆ Ionty mezi tyčkami začnou oscilovat.
- ◆ Při určité hodnotě poměru RF a stejnosměrného napětí dosáhnou ionty určitým m/z stabilních oscilací, zatímco ionty jiných m/z oscilují s rostoucí amplitudou a jsou zachyceny na tyčích.
- ◆ Snímání spektra: zvyšování stejnosměrného a RF napětí.

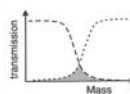
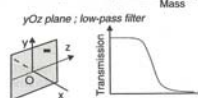
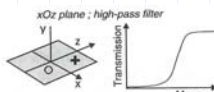
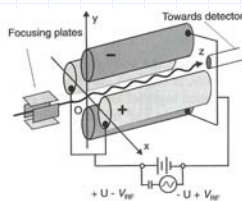


Ionty vstupují do osy kvadrupólu urychleny:

$$V_+ = U + V_F \cos 2\pi ft$$

$$V_- = -V_+$$

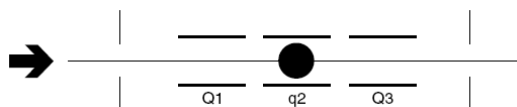
David MILDE 2008



- ◆ Zařízení se chová jako hmotnostní filtr nastavený na určitou hodnotu m/z .
- ◆ Rychlý záznam spektra, jednoduchá konstrukce, nízká cena.
- ◆ Malý rozsah m/z a nízké rozlišení.



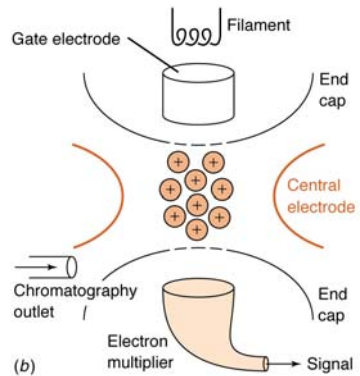
- ◆ Tandemové uspořádání kvadrupólů, např.: 3 za sebou – QqQ (tzv TripleQuad); umožňují různé způsoby scanování a MSⁿ.



Q1 a Q3 – hmotnostní filtr
q2 – kolizní cela

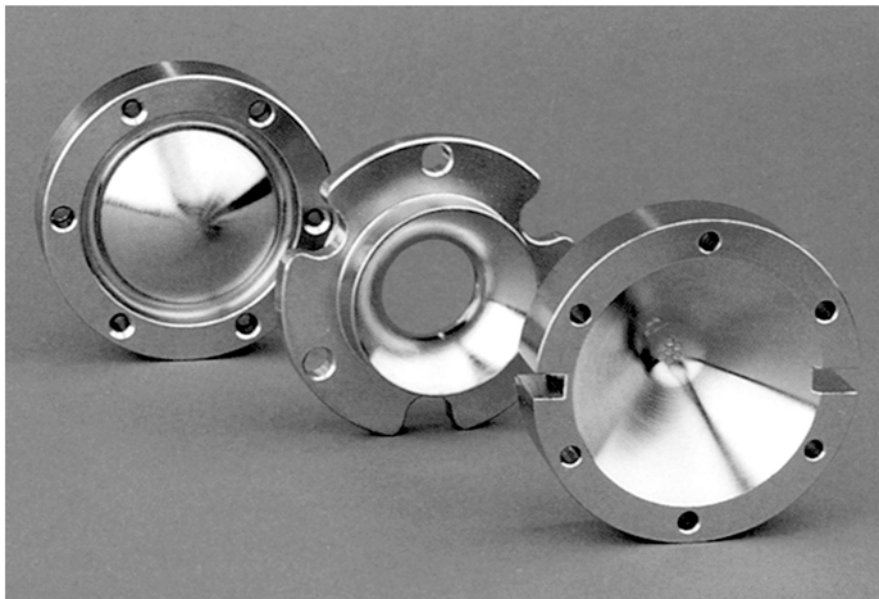
Iontová past (Ion Trap)

- ◆ Trojrozměrný kvadrupólový filtr – detektor pro GC a LC.
- ◆ Ionizaci lze provádět uvnitř IT (starší typ) nebo mimo IT (novější typ).
- ◆ Funguje obdobně jako kvadrupól: zvyšováním frekvence prstencové elektrody se dráhy iontů s určitým m/z stanou nestabilní a začnou vyletovat z IT.
- ◆ IT umožňuje zadržení iontů v prostoru pasti po dobu řádově s.
- ◆ Nízká rozlišovací schopnost; nízká cena.



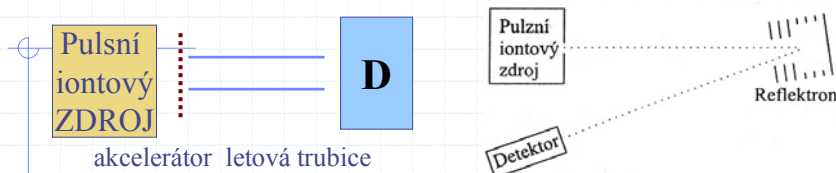
End cap – uzavírací elektrody (uzeměné)
Central electrode – prstencová

David MILDE 2008



David MILDE 2008

Průletový analyzátor (TOF)

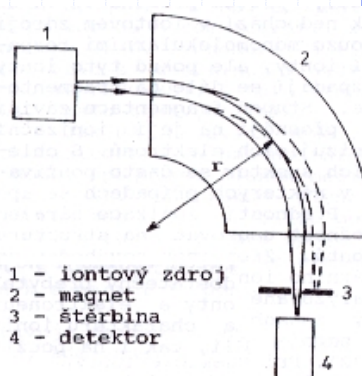


- ◆ Nejjednodušší a nejrychlejší analyzátor – celý vzorek je akcelerován (el. polem 10^3 - 10^4 V) najednou. Všechny ionty mají stejnou E_{kin} .
- ◆ Ionty vstupují do evakuované trubice bez silového pole délky asi 1 m.
- ◆ Uspořádání s reflektorem je menší a má lepší rozlišení.
- ◆ K rozdělení iontů dochází na základě jejich odlišné doby letu. Ionty s nižší m mají větší rychlost a dopadají na detektor dříve, těžší ionty dorazí na detektor později. ($E_{kin} = 1/2mv^2$)
- ◆ Velký rozsah m/z , vysoká citlivost, rychlá analýza.

David MILDE 2008

Magnetický sektorový analyzátor

- ◆ Urychlené ionty vstupují do magnetického pole tvořeného elektromagnetem ve tvaru kruhové výseče. Silové účinky mag. pole způsobí pohyb iontů po kruhové dráze.
- ◆ Na detektor dopadá při rovnosti dostředivé a odstředivé síly ion o určité m/z . Částice s jinou m opisují dráhu o jiném poloměru r .
- ◆ Záznam spektra: plynulá změna mag. indukce B (jiná možnost: měnit urychlovací potenciál – nepoužívá se kvůli diskriminaci iontů o velké m .)



1 - iontový zdroj
2 - magnet
3 - štěrbin
4 - detektor

David MILDE 2003

Magnetický sektorový analyzátor

- ◆ Ionty jsou ve zdroji urychleny a mají kinetickou energii:

$$E_{kin} = \frac{1}{2}mv^2 = zV \quad \text{kde } V \text{ je akcelerační napětí}$$

- ◆ V mag. poli na ionty působí dostředivá a odstředivá síla:

$$F = Bzv \quad \text{dostředivá síla}$$

$$F = \frac{mv^2}{r} \quad \text{odstředivá síla}$$

$$Bzv = \frac{mv^2}{r} \quad \text{a} \quad v = \sqrt{\frac{2zV}{m}}$$

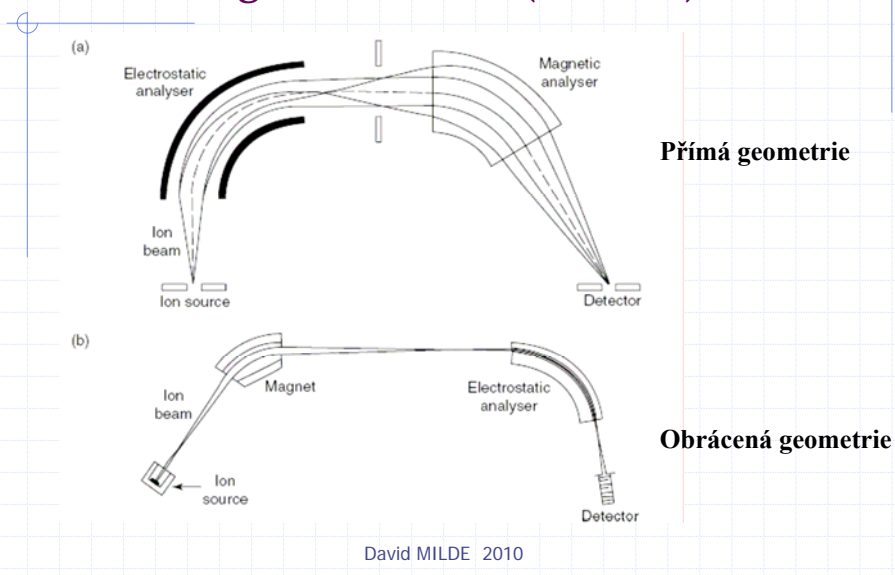
- ◆ Pro ion, který dopadne na detektor se síly rovnají:

$$\frac{m}{ze} = \frac{B^2 r^2}{2V}$$

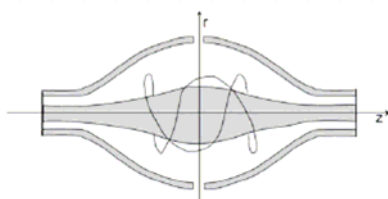
Analyzátor s dvojí fokusací High Resolution (HR-MS)

- ◆ E iontů o stejném m/z vystupujících z iontového zdroje se při vstupu do magnetického pole do „jisté míry“ liší z důvodu nehomogenity elektrického pole urychlujícího ionty. Ionty nevznikají ve stejném místě zdroje.
- ◆ To vede k rozšíření paprsku iontů dopadajících na detektor a zhoršení rozlišení.
- ◆ Kombinace magnetického sektorového analyzátoru se sektorem elektrickým polem, který „sjednotí“ E iontů o stejném m/z vstupujících do magnetického pole, tím se rozlišení spektrometru zvýší až o 2 řády.
 - Dvojí fokusace: 1 elektrický a jeden magnetický sektor.
 - Trojí fokusace: 2 elektrické a 1 magnetický sektor.

Analyzátor s dvojitou fokusací High Resolution (HR-MS)



Orbitální past (Orbitrap)

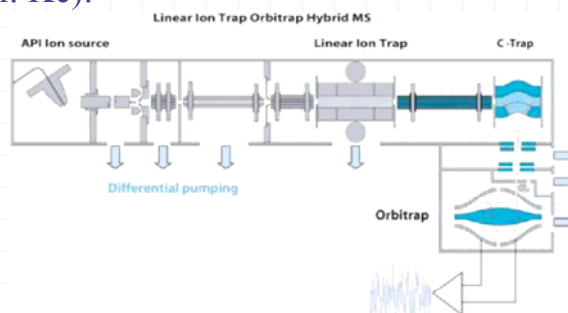


- ◆ Nejnovější komerčně vyráběný MS analyzátor (od r. 2005) využívající Fourierovu transformaci. Kombinuje v sobě separační i detekční část.
- ◆ Vnější elektroda soudkového tvaru s otvorem pro vstup iontů, uzemněná.
- ◆ Vnitřní elektroda vřetenového tvaru, potenciál asi – 3000 V.

David MILDE 2010

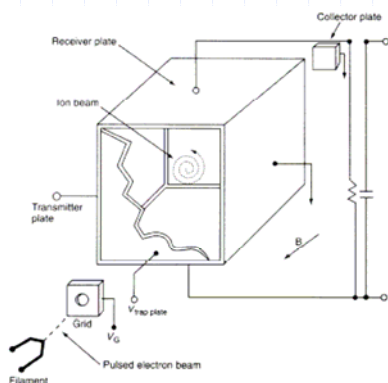
Orbitální past (Orbitrap)

- ◆ Ionty vstupují s určitým potenciálem a začnou oscilovat. Snímá se frekvence oscilace a tase pak pomocí FT převádí na hmotnostní spektrum.
- ◆ Výhody: unikátní správnost hmoty a vysoké rozlišení.
- ◆ Nevýhoda: komplikovaný a poměrně drahý systém (25 mil. Kč).



Iontová cyklotronová rezonance FT-ICR

- ◆ FT hmotnostní spektrometr: zlepšení poměru S/N, rychlejší, lepší citlivost a rozlišení.
- ◆ Výrazně vyšší požadavky na vakuum a cena kolem 70 mil. Kč – jediný přístroj v ČR.



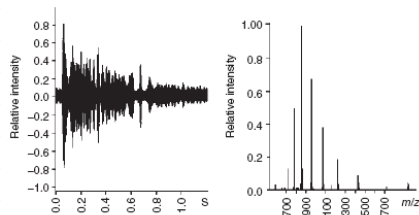
Směr magnetického pole
Síla: 3-12 T
Poloměr cely 3 cm.
Cyklotronová frekvence:

$$\omega_c = \frac{zB}{m} = \frac{v}{r}$$

E 2010

Iontová cyklotronová rezonance FT-ICR

- ◆ Ion v silném magnetickém poli se začne pohybovat s cykloidální trajektorií a frekvencí ω_c .
- ◆ Krátké vložení střídavého proudu způsobí simultánní excitaci všech iontů v cele.
- ◆ Simultánně se detekuje frekvence všech iontů (každá m/z má charakteristickou frekvenci) a pomocí FT se převádí na hmotnostní spektrum.



Časová doména
FT
„ m/z doména“

David MILDE 2010

DETEKTORY IONTŮ

- ◆ **ELEKTRONOVÝ NÁSOBIČ**: v podstatě se jedná o fotonásobič bez ochranné baňky, ion dopadající na první elektrodu (konverzní) uvolní 1-2 e^- , které jsou urychleny k další dynodě atd.
- ◆ **FARADAYOVA KLEC** (Faraday cup): ion dopadá na konverzní elektrodu (z BeO, GaP) a vyráží z ní e^- , který dopadá na anodu. Vzniklý elektrický proud je zesílen a zpracován.

David MILDE 2003

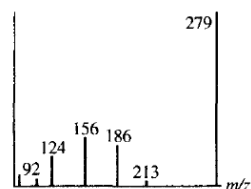
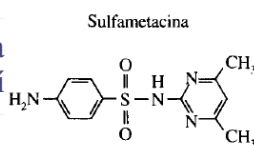
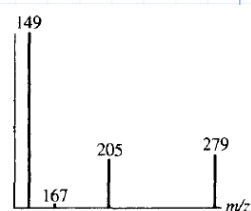
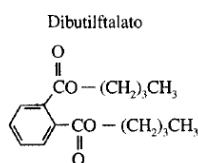
Tandemová hmotnostní spektrometrie (MSⁿ)

- ◆ Hmotnostní spektrometry mohou být spojeny jako tandemové spektrometry (např. MS/MS; MS²). První ionizace a následné fragmentační reakce generuje ionty, z nichž se vybere požadovaný ion, ten se podrobí další fragmentační reakci a z něj vzniklé ionty se analyzují.
- ◆ Požadovaný ion (tzv. prekurzor) podrobíme tzv. kolizní disociaci nejčastěji srážkami s kolizním plynem. Tím se tento ion rozpadá na fragmenty, jejichž hmotnostní spektrum změříme.
- ◆ NS/MS (či MS²) spektrum pak obsahuje fragmentové ionty pouze prekurzoru.

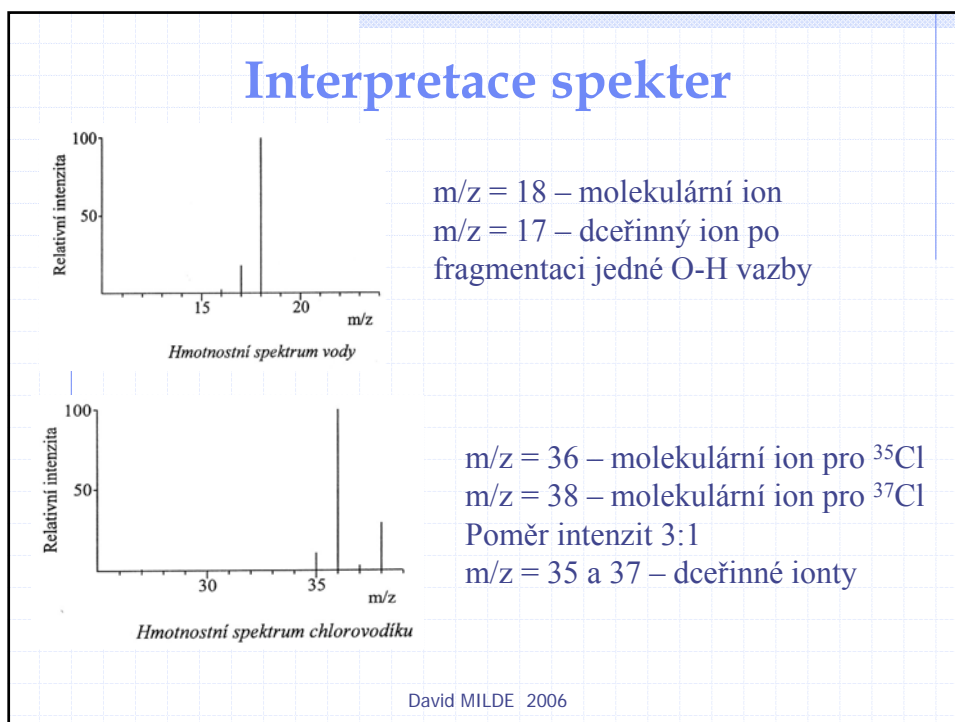
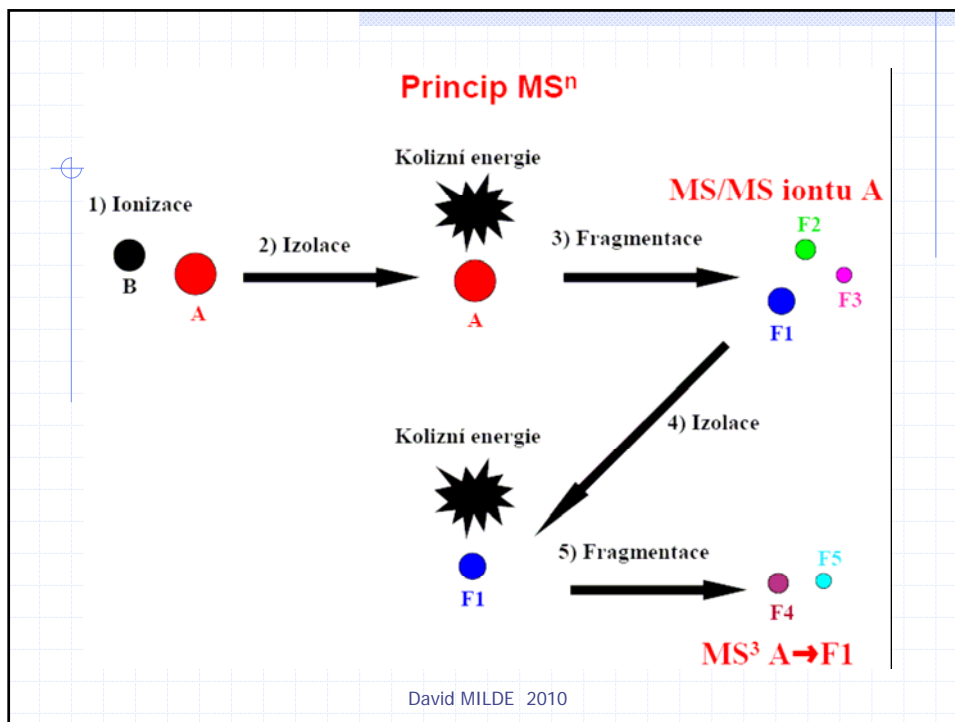
David MILDE 2010

Příklad MS/MS spekter

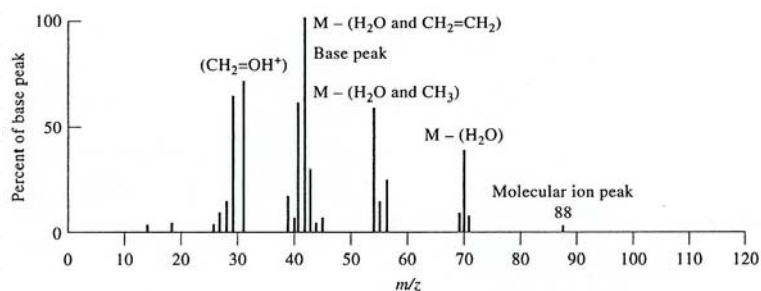
- ◆ 2 látky: dibutyl ftalát a sulfamethazin se shodnou $M_r = 279$.
- ◆ K rozlišení byl vybrán jako prekurzor ion o $m/z = 279$.
- ◆ Hmotnostní spektra prekurzoru umožní rozlišit látky.



David MILDE 2010



Interpretace spekter



1-pentanol $CH_3CH_2CH_2CH_2CH_2OH$

David MILDE 2006

Aplikace MS

- ◆ Atomová MS: kvalitativní i kvantitativní stopová prvková analýza. Ze všech metod atomové spektrometrie má nejlepší LOD.
- ◆ Molekulová MS:
 - Kvalitativní analýza (strukturní analýza) organických látek a biomolekul.
 - Spojení s plynovou či kapalinovou chromatografií (GC-MS, HPLC-MS) analýza vzorků životního prostředí, např.: pesticidy, dioxiny, dibenzofurany.
 - Toxikologická analýza – sledování léků, drog, jejich metabolitů.
 - Kvantitativní analýza: okrajová záležitost.

David MILDE 2008