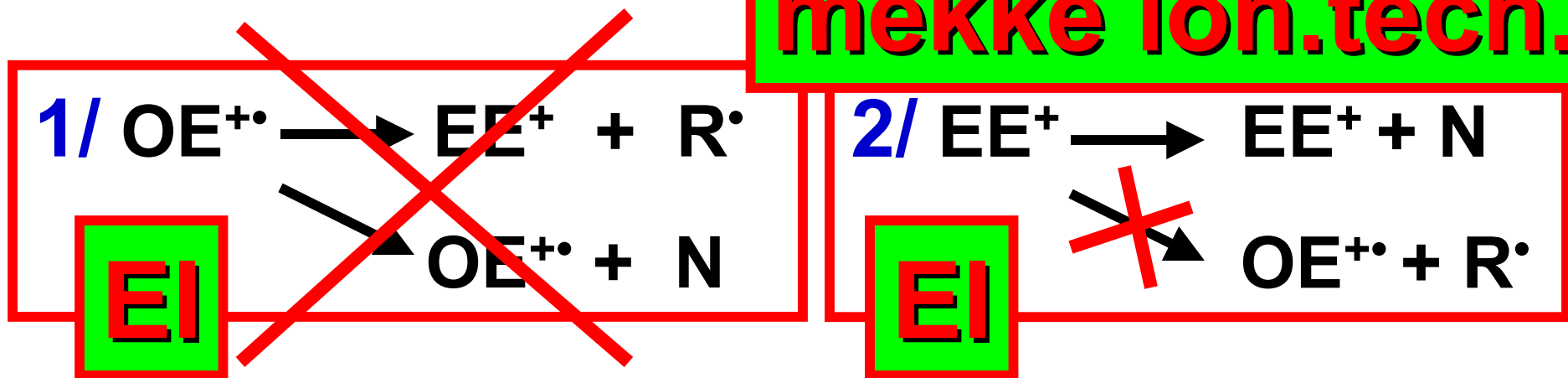


**Základy interpretace
hmotnostních spekter měřených
s použitím měkkých ionizačních
technik**

Pravidlo sudého počtu elektronů (Even-Electron Rule)

měkké ion.tech.



~~1/ Fragmentace iontů s lichým počtem e^- ($OE^{+\bullet}$) – mohou vznikat opět ionty s lichým počtem e^- anebo se sudým počtem e^-~~

2/ Fragmentace iontů se sudým počtem elektronů (EE^+) - přednostně vnikají opět ionty se sudým počtem elektronů

- vznik kation-radikálů při fragmentaci iontů se sudým počtem elektronů vyžaduje energeticky velmi nevýhodné rozdělení elektronového páru (popsané výjimky)

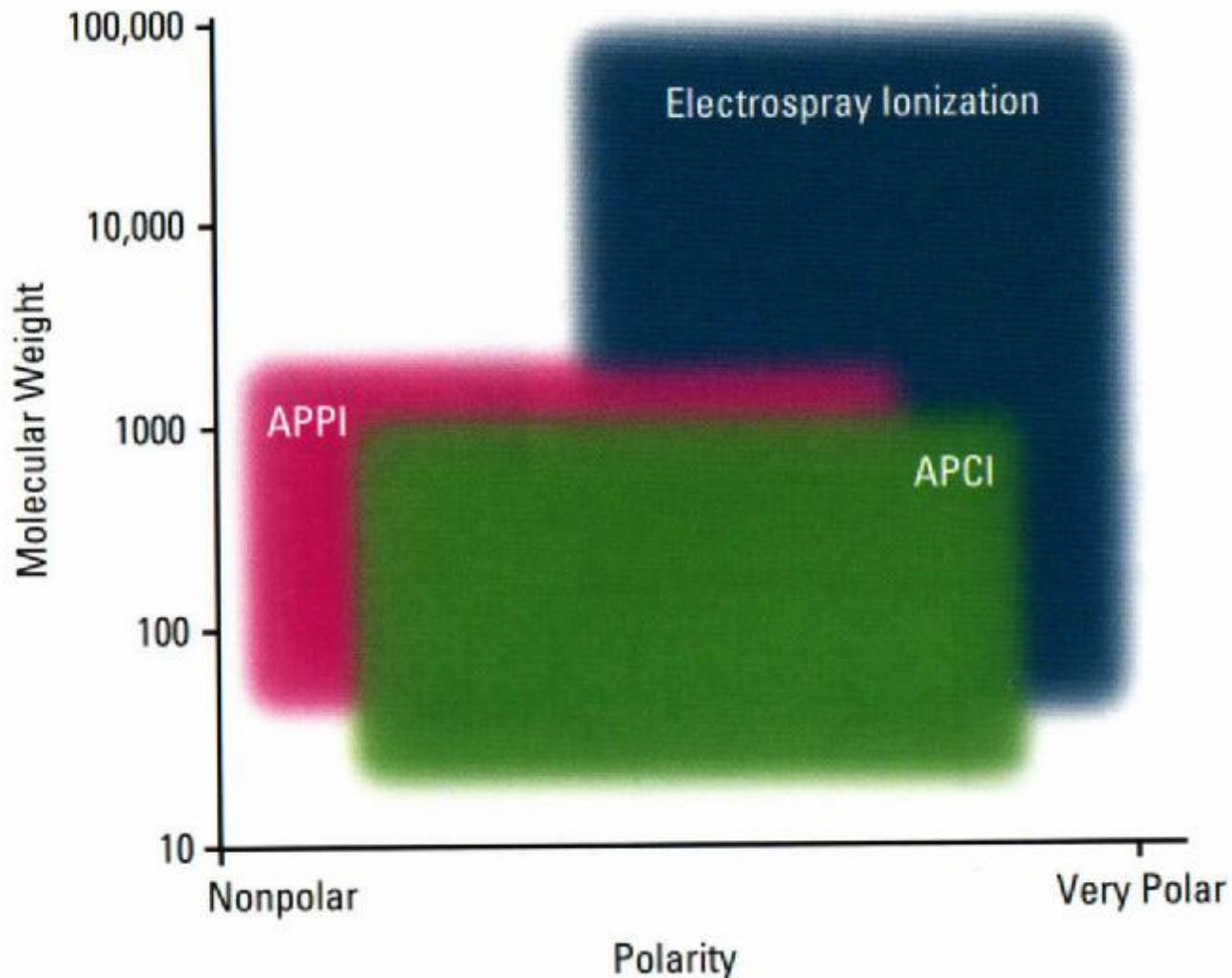
Zastoupení izotopů běžných organických prvků

Prvek	“M”		“M+1”		“M+2”		Typ prvku
	m/z	%	m/z	%	m/z	%	
H	1	100	2	0.015	-	-	“M”
C	12	100	13	1.1	-	-	“M+1”
N	14	100	15	0.37	-	-	“M+1”
O	16	100	17	0.04	18	0.2	“M+2”
F	19	100	-	-	-	-	“M”
Si	28	100	29	5.1	30	3.4	“M+2”
P	31	100	-	-	-	-	“M”
S	32	100	33	0.79	34	4.4	“M+2”
Cl	35	100	-	-	37	32	“M+2”
Br	79	100	-	-	81	97.3	“M+2”
I	127	100	-	-	-	-	“M”

Volba ionizační techniky a polariry záznamu

Záznam kladných iontů – většina sloučenin

Záznam záporných iontů – sulfonové a karboxylové kyseliny, (poly)hydroxysloučeniny, nitrosloučeniny, (poly)halogensloučeniny, apod.



Dusíkové pravidlo

Základní formulace (platí pro M_R a $OE^{+\cdot}$):

➔ lichá M_R = lichý počet dusíků v molekule

➔ sudá M_R = sudý počet dusíků v molekule

Pro ionty EE^+ přesně naopak:

lichá hodnota m/z znamená sudý počet dusíků, sudá hodnota m/z lichý počet dusíků

■ platí pro běžné organické prvky (C, H, N, O, F, Si, P, S, Cl, Br, I)

Počet dusíků	m/z lichá	m/z sudá
0, 2, 4, ... (sudý)	EE^+	$OE^{+\cdot}$
1, 3, 5, ... (lichý)	$OE^{+\cdot}$	EE^+

Dusíkové pravidlo

Základní formulace (platí pro M_R a OE^{+}):

➔ lichá M_R = lichý počet dusíků v molekule

➔ sudá M_R = sudý počet dusíků v molekule

Pro ionty EE^{+} přesně naopak:

lichá hodnota m/z znamená sudý počet dusíků, sudá hodnota m/z lichý počet dusíků

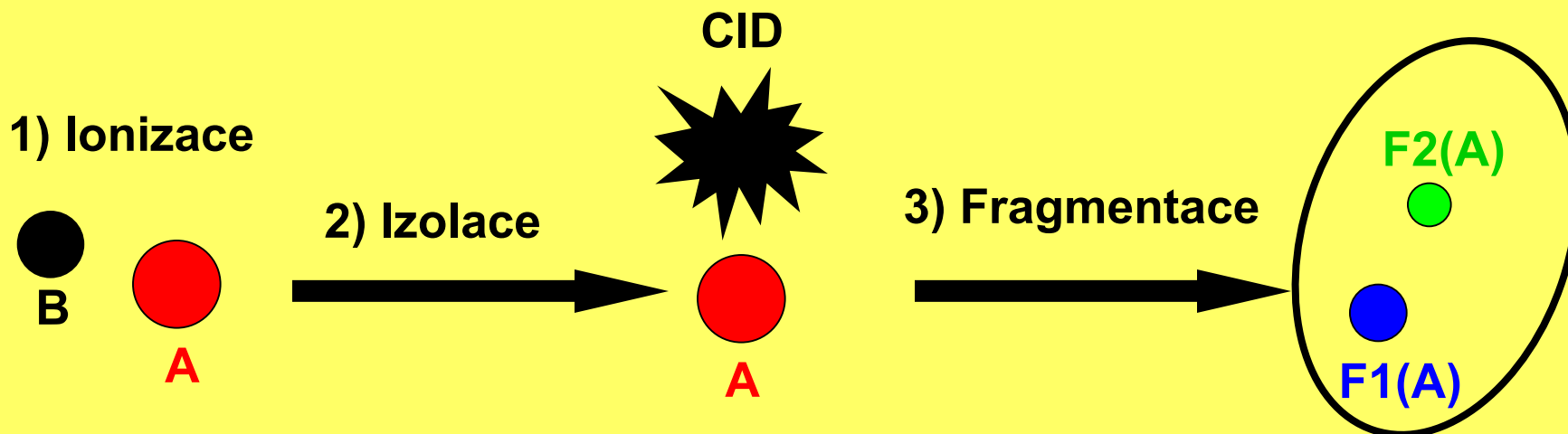
■ platí pro běžné organické prvky (C, H, N, O, F, Si, P, S, Cl, Br, I)

Počet dusíků	m/z lichá	m/z sudá
0, 2, 4, ... (sudý)	EE^{+}	OE^{+}
1, 3, 5, ... (lichý)	OE^{+}	EE^{+}

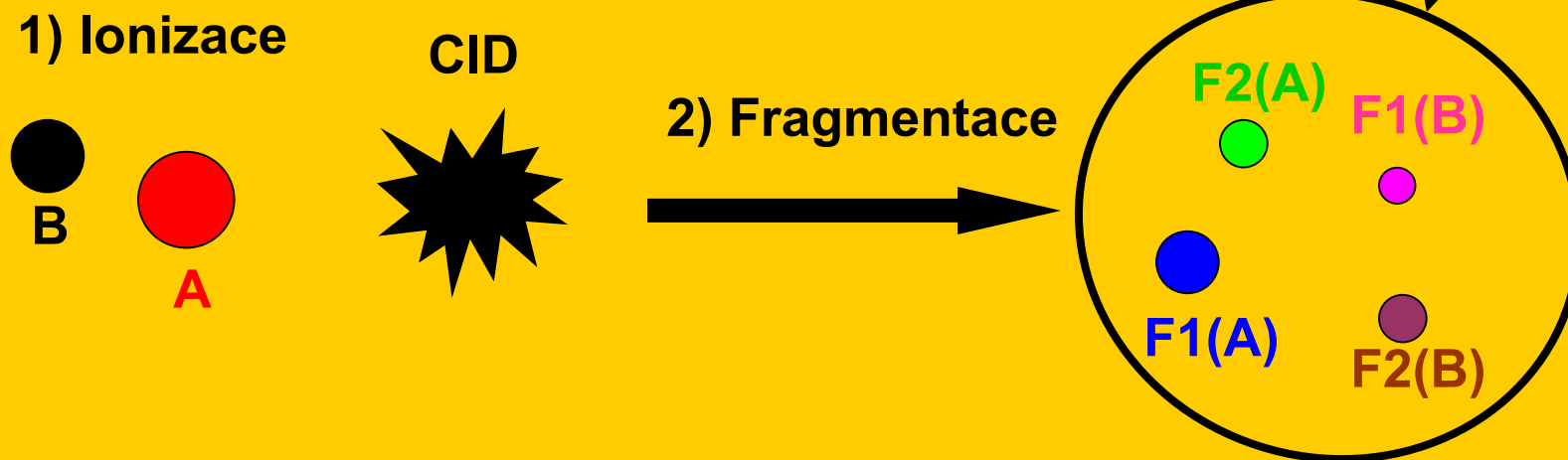
Porovnání CID v uspořádání „in-source“, QqQ a iontové pasti

- **„in-source“** – kolizně indukovaná disociace v iontovém zdroji **bez možnosti izolace iontu prekurzoru**
- **MS/MS** – izolace iontu prekurzoru a teprve potom jeho kolizní disociace, proto získané spektrum musí obsahovat pouze produktové ionty vzniklé rozpadem iontu prekurzoru a žádné kontaminanty
- a) **QqQ** – může dojít k opakovaným kolizím iontů s neutrálními částicemi, a proto pozorujeme více fragmentových iontů v celém rozsahu m/z ve srovnání s iontovou pastí, i opakované kolizní rozpady iontů
 - izolace iontu prekurzoru **v prostoru**
- b) **iontová past** – často pouze jednostupňové rozpady, méně fragmentů, snazší na interpretaci, ale zase mohou chybět fragmentové ionty v nízkomolekulární oblasti (tzv. „cut-off“ v 1/3 m/z iontu prekurzoru), možnost měření MSⁿ
 - izolace iontu prekurzoru **v čase**

MS/MS spektrum (izolace iontu A)



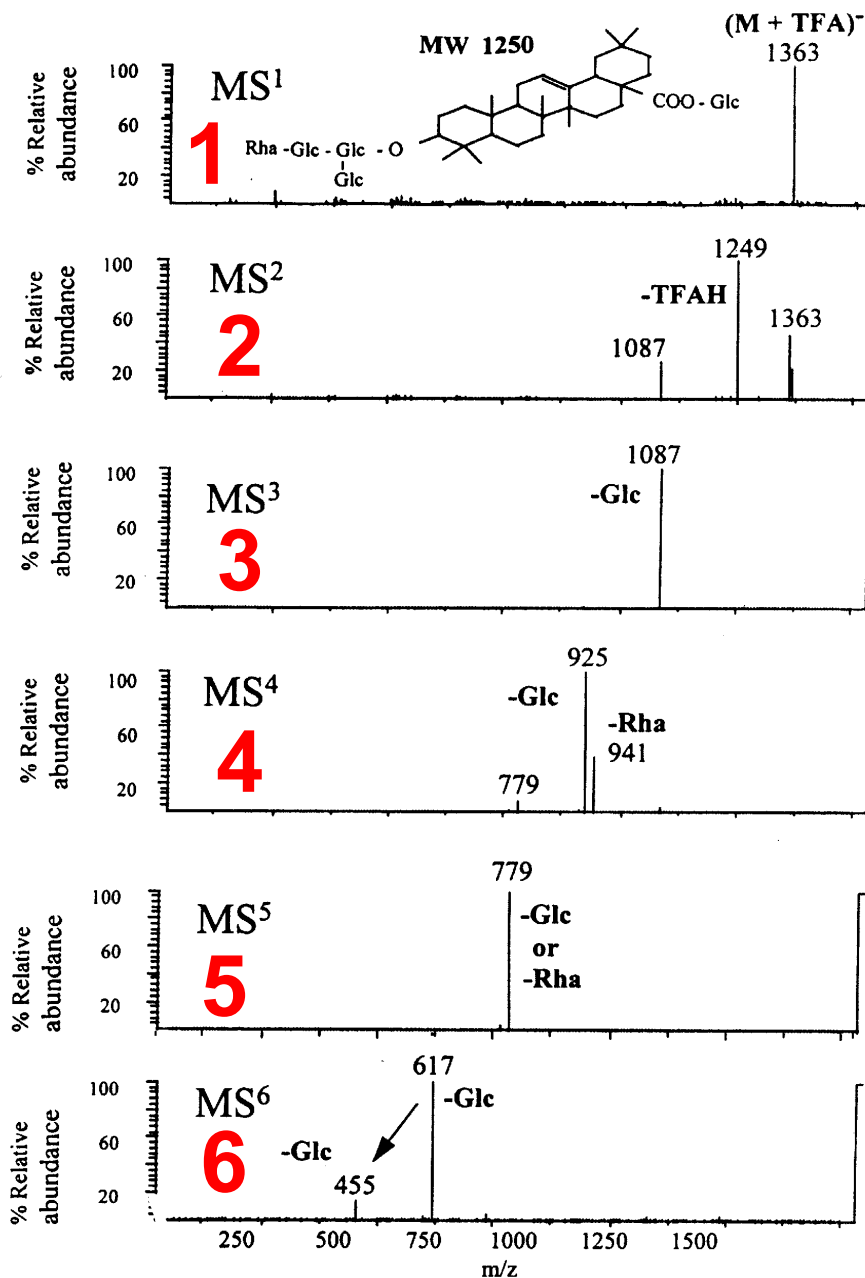
„In-source“ MS (bez izolace)



Ukázka MS⁶ analýzy s využitím iontové pasti

- MSⁿ - velice cenné ve strukturní analýze a studiu fragmentačních cest

- obvykle maximálně MS³ až MS⁵, do vyšších stupňů výjimečně



Meření s vysokým rozlišením

- lze určit náboj iontu podle difference mezi izotopickými píky, která je $1/X$, tedy $1/2$ pro dvakrát nabitý ion, $1/3$ pro třikrát nabitý, atd.
- nelze určit přesnou hmotu, na to je třeba měřit s vysokou přesností určení m/z , tedy vždy s použitím kalibrace, nejlépe interní
- iontová past, analyzátor z doby letu (TOF), magnetický analyzátor s dvojí fokusací iontů, iontová cyklotronová rezonance

Meření s vysokou přesností určení m/z

- přesné určení m/z na několik (nejméně 3) desetinných míst, možnost určení elementárního složení iontů anebo alespoň výrazné zúžení potenciálních možností
- velmi důležitá přesná kalibrace hmotnostní
- analyzátor z doby letu (TOF), kvadrupól s hyperbolickým průřezem tyčí, magnetický analyzátor s dvojí fokusací iontů, iontová cyklotronová rezonance
- iontová past z principu NELZE

Základní pravidla interpretace ESI/APCI spekter

- 1/ a) Téměř výhradně **ionty se sudým počtem e^-** , např. $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$ při záznamu kladných iontů, resp. $[M-H]^-$ při záznamu záporných iontů
b) Ionty s lichým počtem e^- výjimečně, např. organokovy, polyaromáty, záchyt e^- za tvorby radikál-aniontu $M^{\cdot-}$ pro nitrosloučeniny, fragmentové ionty se stabilizací nepárového e^- na cyklické konjugované struktuře, apod.
- 2/ Dochází k **štěpení menšího počtu labilních vazeb** ve srovnání s EI, tzn. „molekula fragmentuje po větších logických částech“
- 3/ Hmotnostní spektrum prvního stupně (**MS¹**) většinou obsahuje pouze (de)protonované molekuly a molekulární adukty, **minimum nebo absence fragmentových iontů** (neplatí vždy!)
- 4/ Pro získání většího množství fragmentových iontů lze použít **CID** v iontovém zdroji nebo MS/MS uspořádání
- 5/ **Knihovny ESI/APCI spekter neexistují** s výjimkou biomolekul, pro strukturní návrhy nad rámec určení M_R nezbytné zkušenosti s daným typem sloučenin, porovnání s literaturou nebo změření většího souboru sloučenin daného typu pro zobecnění pozorovaného fragmentačního chování

Postup interpretace ESI/APCI spekter

1/ Určení M_R včetně ověření správnosti návrhu M_R podle přítomnosti charakteristických aduktů, např. $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$; někdy také adukty s mobilní fází typu $[M+H+metanol]^+$ nebo $[M+H+acetonitril]^+$, popř. zdvojené molekuly typu $[2M+H]^+$, $[2M+Na]^+$, apod.

- většina těchto aduktů má malou až mizivou relativní intenzitu (obvykle nejintenzivnější $[M+Na]^+$), ale přesto mají velký význam pro potvrzení správnosti určení M_R , protože uvedené aduktové ionty jsou většinou pozorovány pouze pro molekuly a nikoliv pro fragmenty

- u záporných iontů kromě $[M-H]^-$ lze v závislosti na složení mobilní fáze čekat např. $[M+Cl]^-$, $[M+CH_3COO]^-$, $[M+HCOO]^-$, apod.

- typ a relativní intenzita aduktových iontů velmi výrazně závisí na složení mobilní fáze a obsahu solí v eluentu či vzorku

2/ Dusíkové pravidlo (předpokládáme pouze EE^+ ionty)

3/ “M+2” prvky: nejdříve určení počtu Cl+Br, pak odhad S+Si, kyslík nelze

Postup interpretace ESI/APCI spekter (pokr.)

4/ U techniky HPLC/MS vždy ověřit, zda pozorované ionty patří do spektra daného píků a nepochází z šumu, paměťového efektu předchozích píků či vzorků, kontaminace zdroje nebo neidentifikovaných iontů eluujících se často v průběhu gradientu (zejména u gradientu s velkou strmostí)

- rekonstrukcí iontových proudů pro jednotlivé m/z ověřit shodnost časových maxim a profilu píků, potvrzení náležitosti k píku či případné koeluce píků

5/ CID hmotnostní spektra

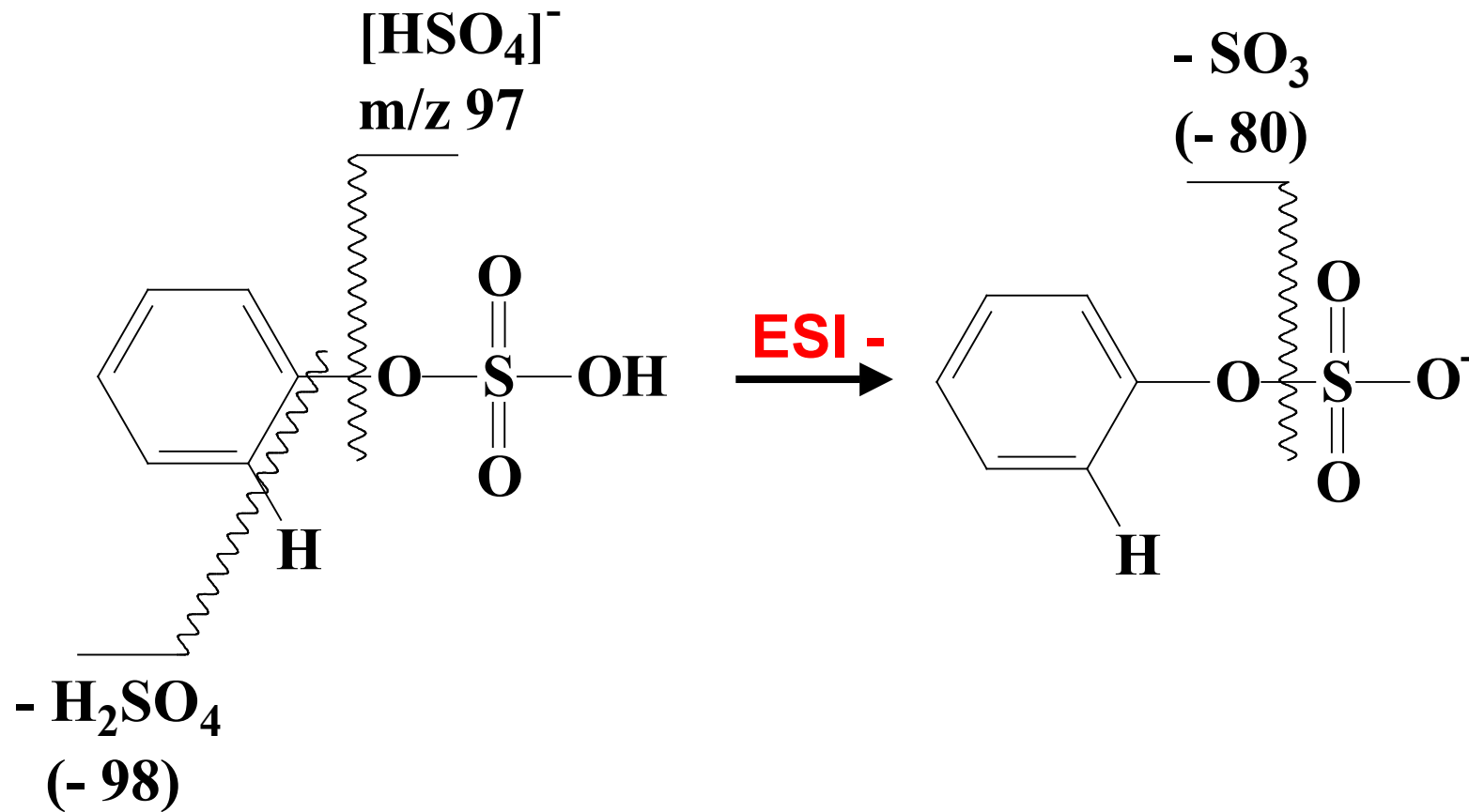
6/ Sumarizace všech získaných informací včetně informací o původu vzorku a dalších informací zadavatele, UV spekter změřených PDA detektorem, atd. – pokus o návrh struktury (ne vždy se podaří)

7/ Je retenční chování sloučeniny v souladu s navrženou strukturou?

8/ V optimálním případě by na závěr mělo dojít k porovnání MS spekter a retenčního chování identického standardu navržené struktury a neznámé sloučeniny měřené za identických podmínek = jednoznačné potvrzení identity

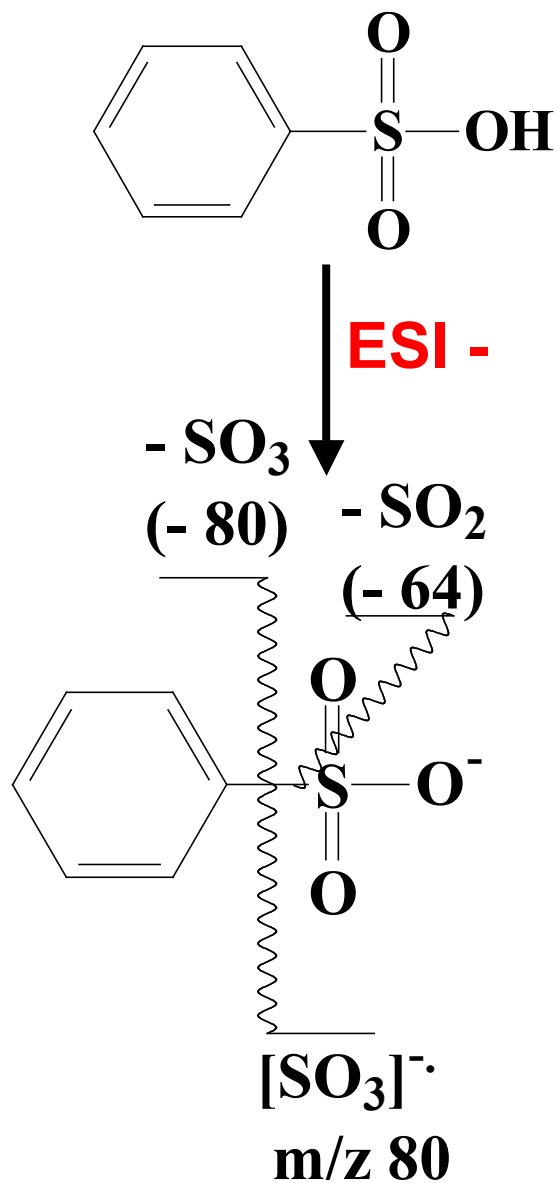
Charakteristické fragmentační chování pro vybrané funkční skupiny v ESI/APCI spektrech

Sulfátová skupina - ROSO_3H

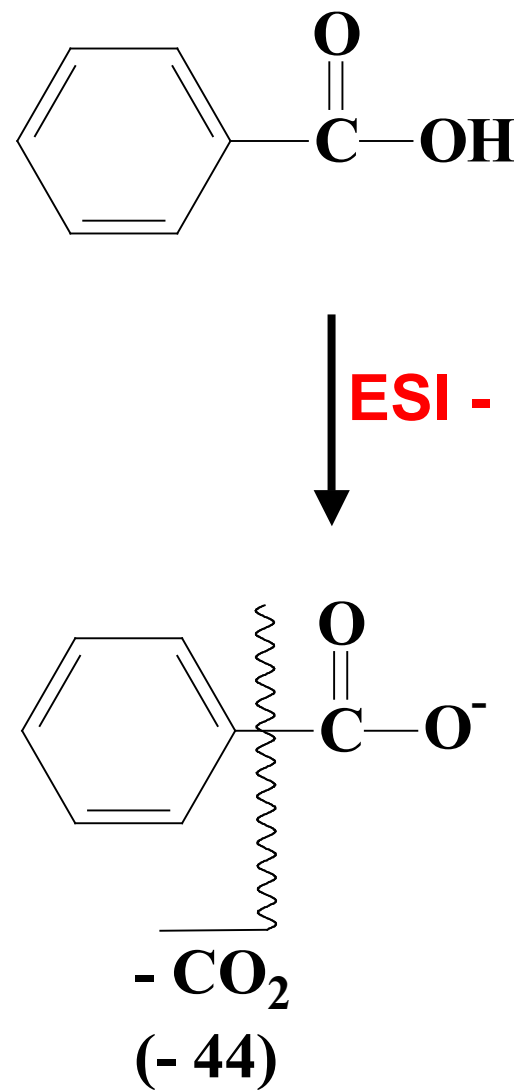


- rozsáhlá fragmentace, typicky velmi nízká intenzita nebo absence $[\text{M}-\text{H}]^-$ iontu
- intenzivní adukty se sodným iontem

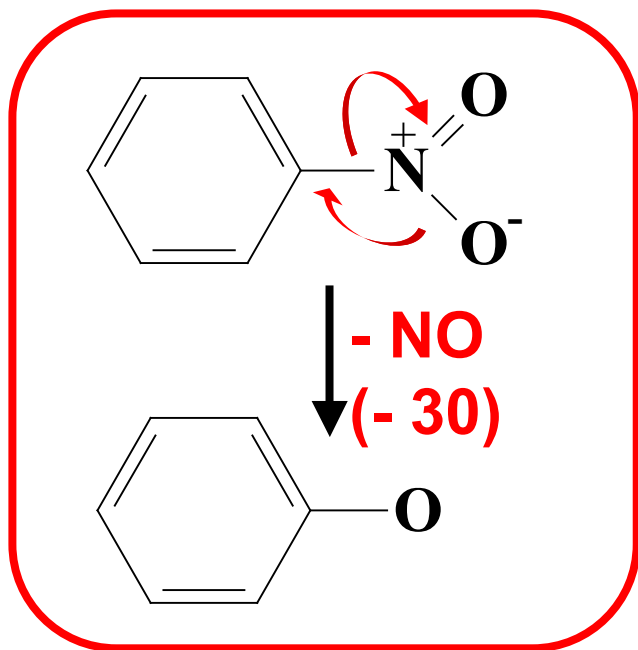
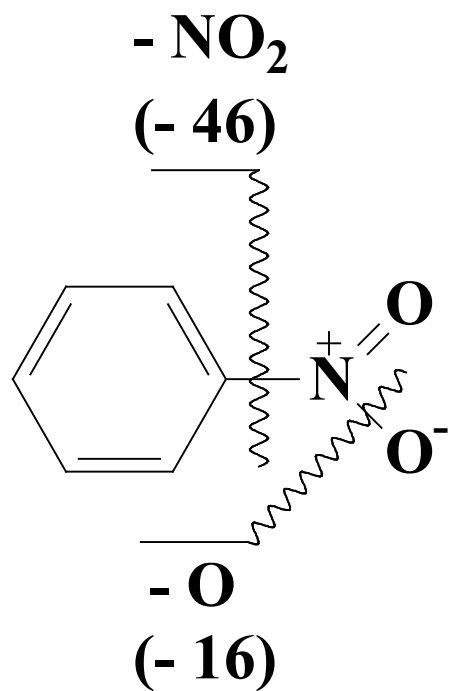
Sulfonové kyseliny - RSO₃H



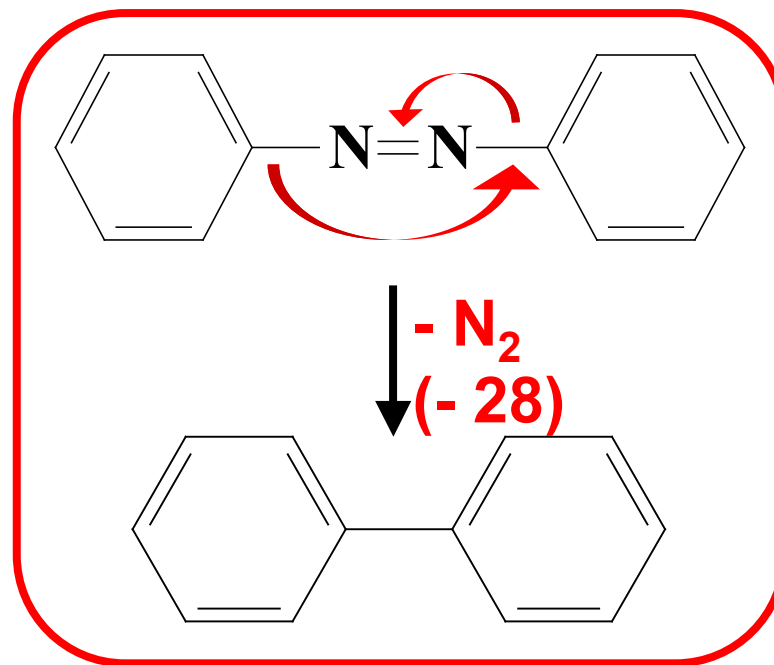
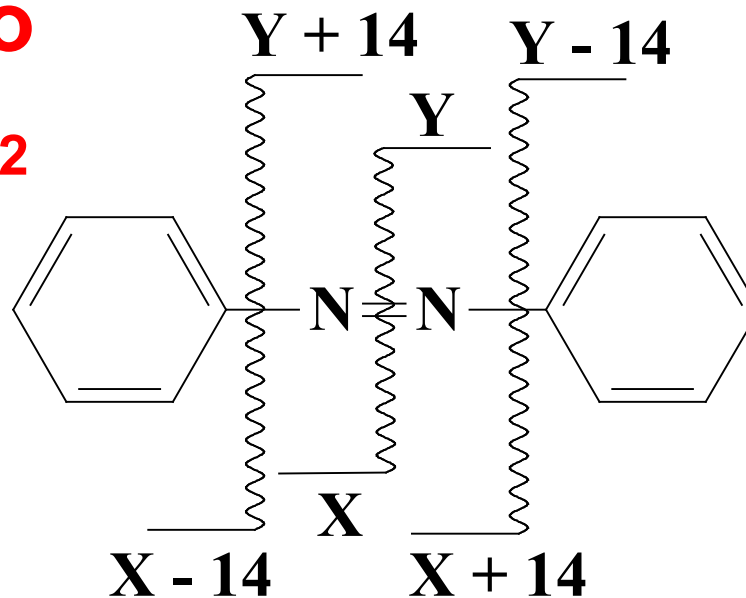
Karboxylové kyseliny - RCOOH



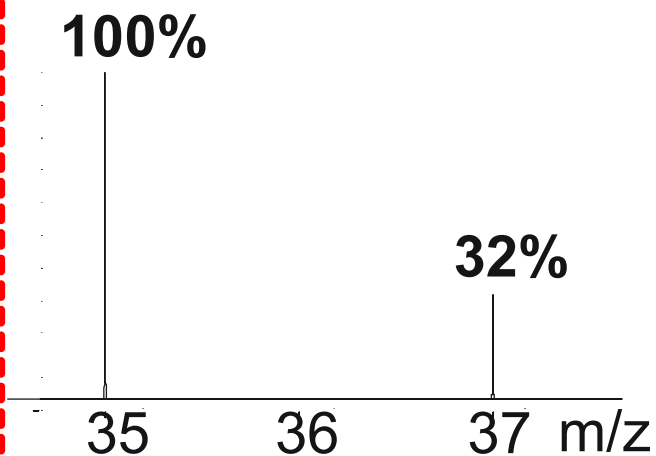
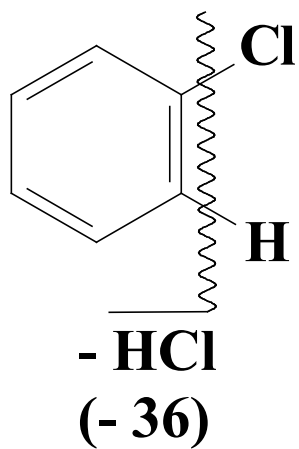
Nitro
- NO₂



Azo
- N₂



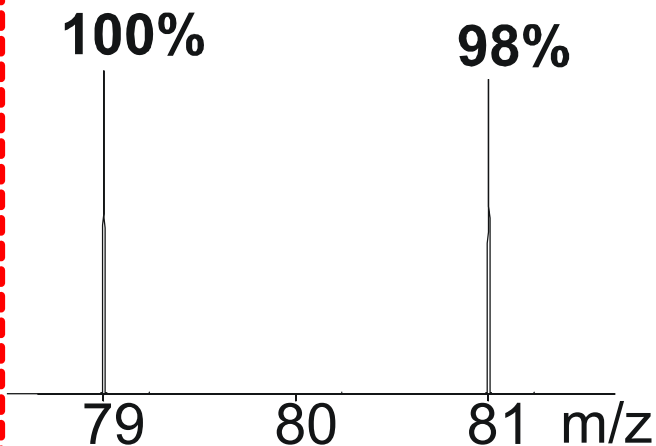
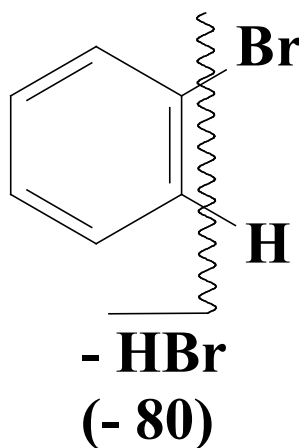
Halogeny – Cl, Br



Poměr izotopů

$$^{35}\text{Cl} : ^{37}\text{Cl} = 3 : 1$$

$$n * \text{Cl} = (3a + b)^n$$



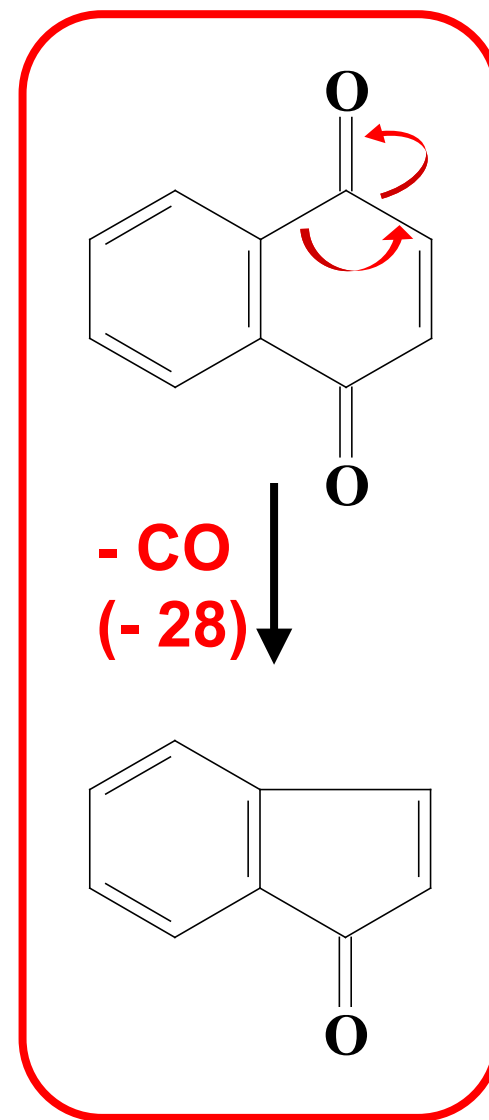
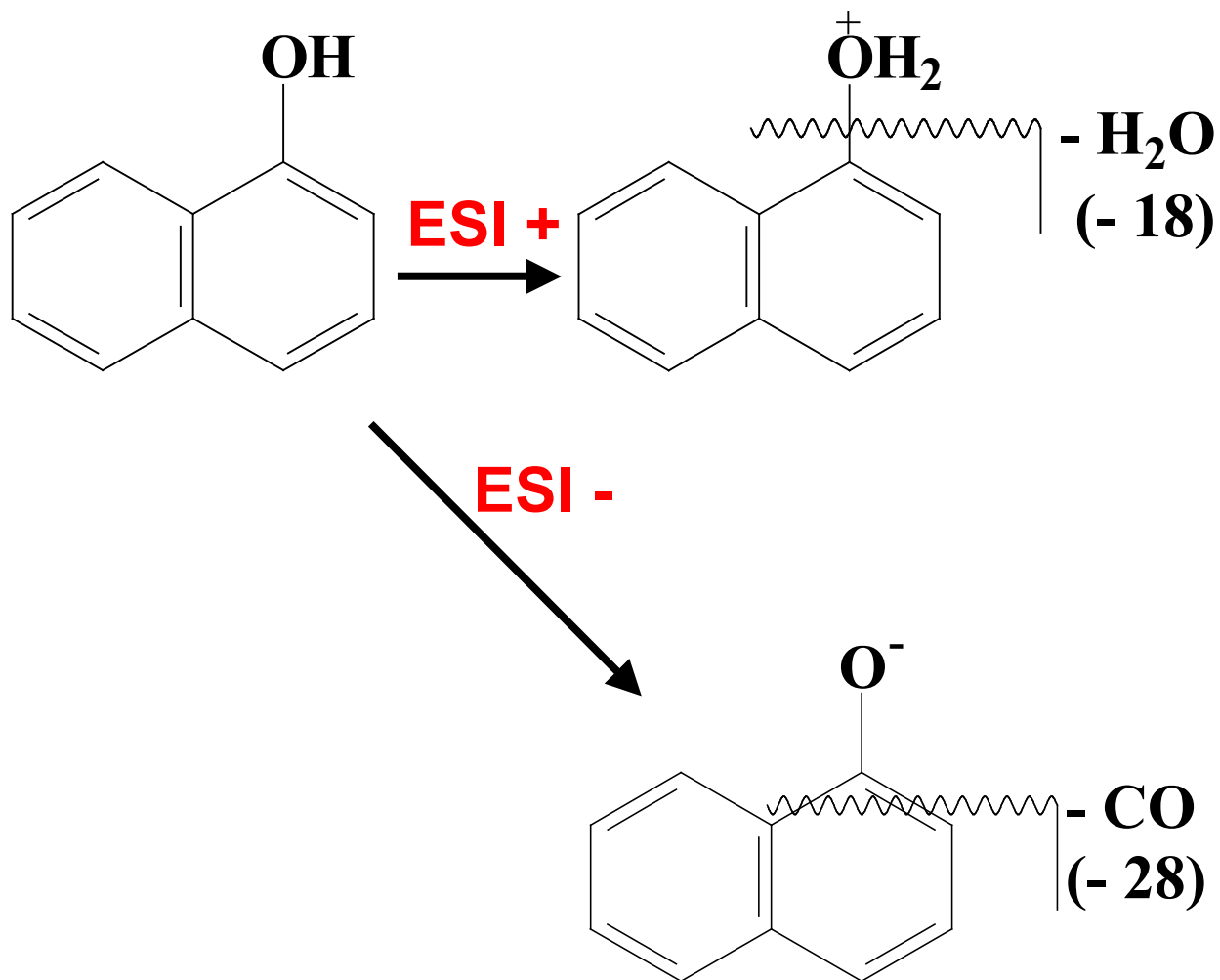
Poměr izotopů

$$^{79}\text{Br} : ^{81}\text{Br} = 1 : 1$$

$$n * \text{Br} = (a + b)^n$$

- pro polyhalogenované sloučeniny i opakovaná ztráta $[\text{M}+\text{H}-n\text{HX}]^+$, což vede k výraznému poklesu $[\text{M}+\text{H}]^+$

Chinony a fenoly



Alkoholy

- typická ztráta vody $[M+H-H_2O]^+$, často velmi intenzivní a pozorovaná již v MS¹ spektrech; pro polyhydroxysloučeniny opakované ztráty vody, může výrazně poklesnout intenzita $[M+H]^+$ až k nule, upřednostnění $[M+Na]^+$ oproti $[M+H]^+$

Ketony (R_1COR_2)

- analogicky α -štěpení u EI vznikají $[R_1CO]^+$ a $[R_2CO]^+$, někdy též ztráta vody $[M+H-H_2O]^+$ (obvykle velmi malá intenzita)

Fenyl nebo alkyl substituce na aromatické nebo obecně cyklické struktuře

- ztráta benzenu $[M+H-C_6H_6]^+$ nebo $[M+H-C_6H_4]^+$ pro fenyl
- ztráta alkenu $[M+H-alken]^+$, méně často alkanu $[M+H-alkan]^+$ pro alkyl
- může být pozorováno už v MS¹, závisí na struktuře a podmínkách ionizace

Dusíkaté sloučeniny

- dusíkové pravidlo; dusík je obvykle místem protonace

Primární aminy

- ztráta amoniaku $[M+H-NH_3]^+$ (není příliš charakteristické)

Sekundární a terciální aminy R_1NHR_2 nebo $R_1NR_2R_3$

- ionty typu $[R_1NH_3]^+$ a $[R_2NH_3]^+$ (na aminoskupině dochází obvykle k protonaci a přenosu vodíku), analogicky $[R_1NH_2R_2]^+$ či $[R_1NHR_2R_3]^+$ ionty
- vedle toho mohou být přítomny též ionty $[R_1NH]^+$ a $[R_2NH]^+$, většinou méně intenzivní

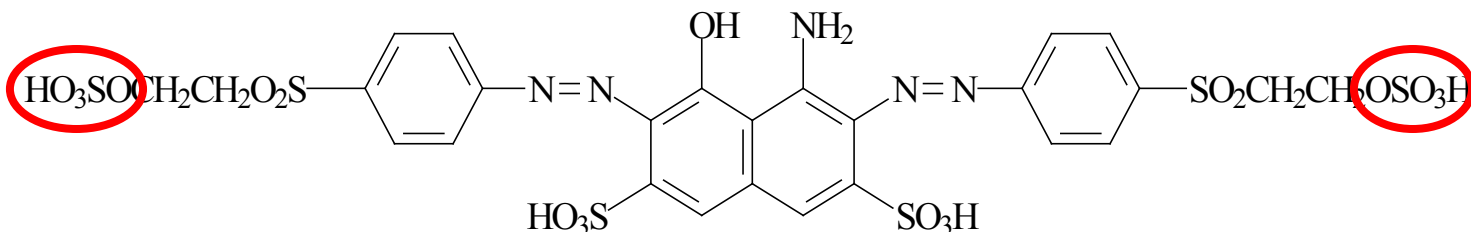
Kvartérní aminy $(R)_4N^+X^-$

- vysoce stabilní ionty $[(R)_4N]^+$ s vysokou ionizační účinností (např. tetrabutylamoniová ion-párová činidla), velmi silné paměťové efekty

Vliv funkčních skupin na fragmentaci

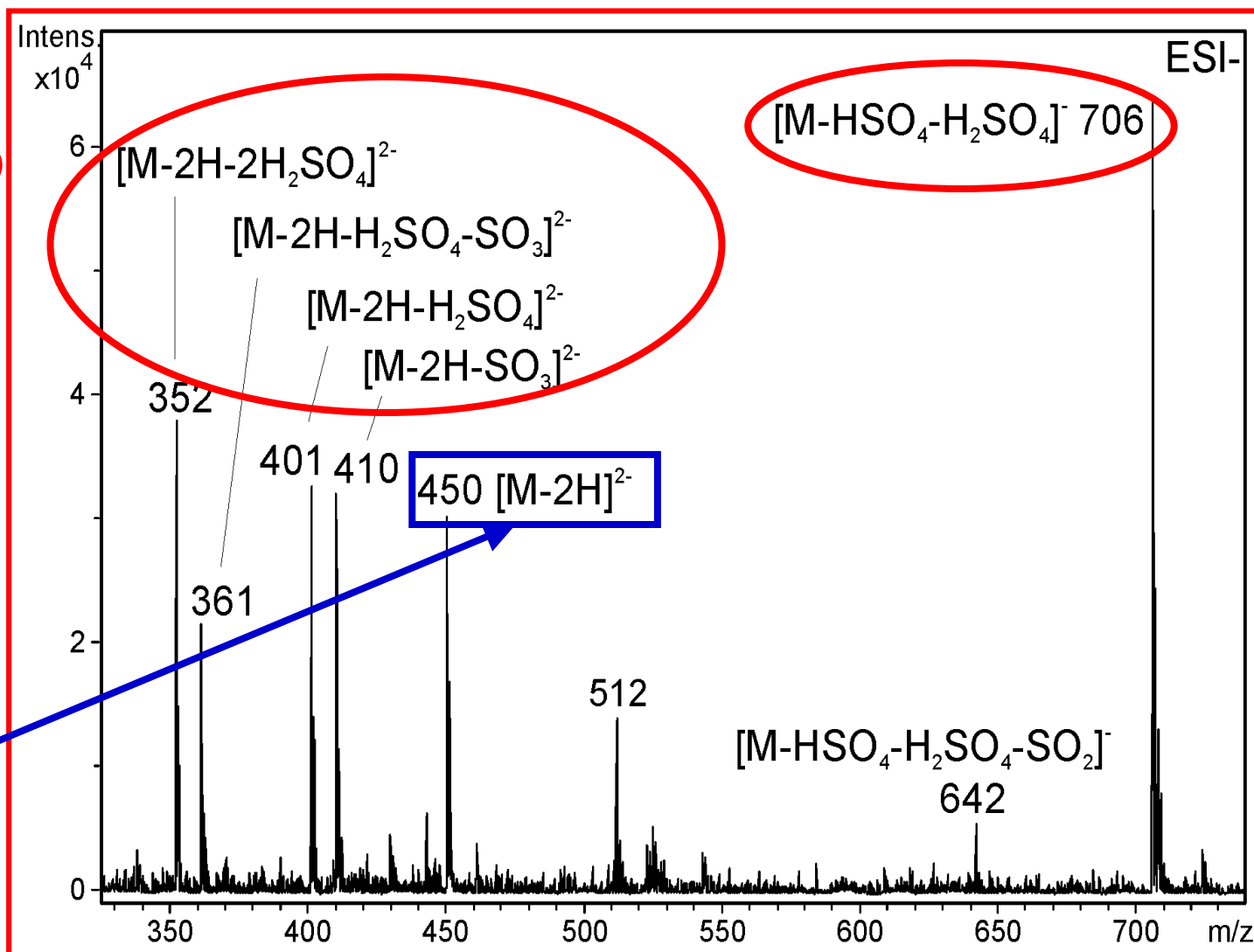
Skupina	Typické ionty	Komentář
- OSO ₃ H	[M-H-H ₂ SO ₄] ⁻ , [M-H-SO ₃] ⁻ , [HSO ₄] ⁻	Rozsáhlá fragmentace, typicky velmi nízká intenzita [M-H] ⁻ , adukty se sodným iontem
- SO ₃ H	[M-H-SO ₂] ⁻ , [M-H-SO ₃] ⁻ , [SO ₃] ⁻	Opakované ztráty pro polysulfonované kyseliny, adukty se sodným iontem
- COOH	[M-H-CO ₂] ⁻	CO ₂ je charakteristická první ztráta, pokud nejsou přítomny SO ₃ H nebo OSO ₃ H skupiny
- NO ₂	[M-H-NO] ⁻ , [M-H-NO ₂] ⁻ , [M-H-O] ⁻	Radikál-kation M [·] může být pozorován místo [M-H] ⁻ , dusíkové pravidlo
- Cl - Br	[M-H-HCl] ⁻ [M-H-HBr] ⁻	Izotopické poměry (³⁷ Cl: ³⁵ Cl=3:1 nebo ⁷⁹ Br: ⁸¹ Br=1:1), pro polyhalogenované sloučeniny - následné ztráty HCl/HBr a snížená intenzita [M-H] ⁻ iontu
- N=N -	[M-H-N ₂] ⁻	Štěpení vedle azo vazby, přesmyková ztráta N ₂ z azo skupiny
- CO - - OH	[M-H-CO] ⁻ [M-H-H ₂ O] ⁻	Přesmyková ztráta CO pro chinony a fenoly, ztráta vody pro fenoly a alkoholy

ESI-MS of Reactive Black 5



- 2 sulfate
- 2 sulfonic groups
- 2 azo groups
- 1 hydroxyl group
- 1 amino group

MW=901
 $[M-2H]^{2-} = 449.5$



Negative-ion ESI MS/MS of Mordant Black 15

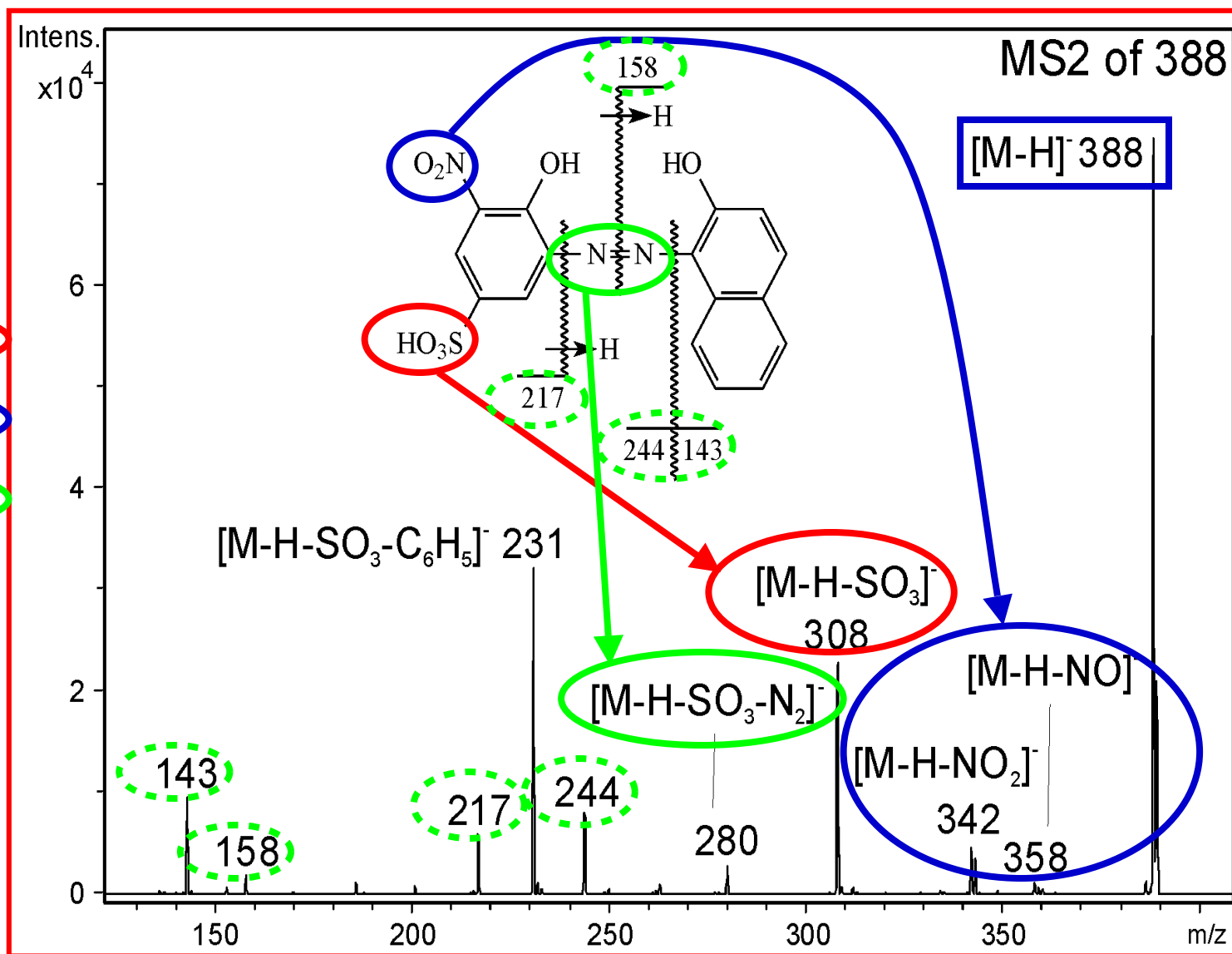
MW = 389

- 1 sulfonic acid

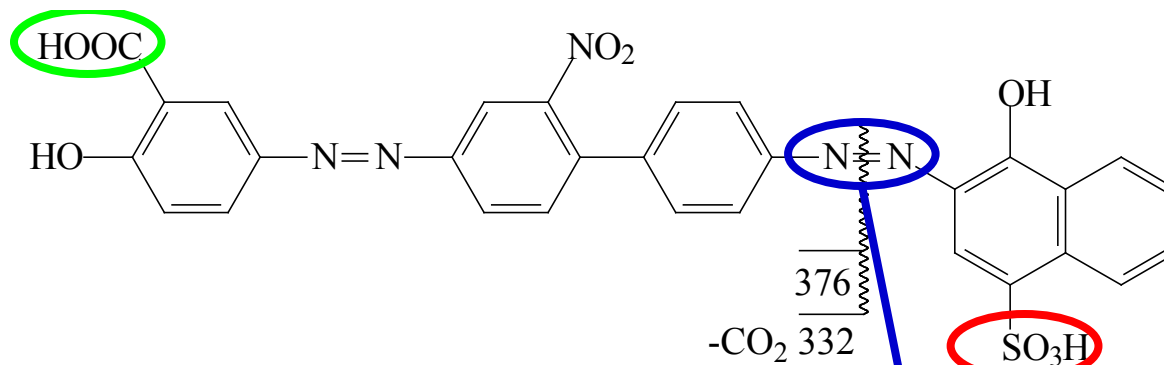
- 1 nitro group

- 1 azo group

- 2 hydroxyls

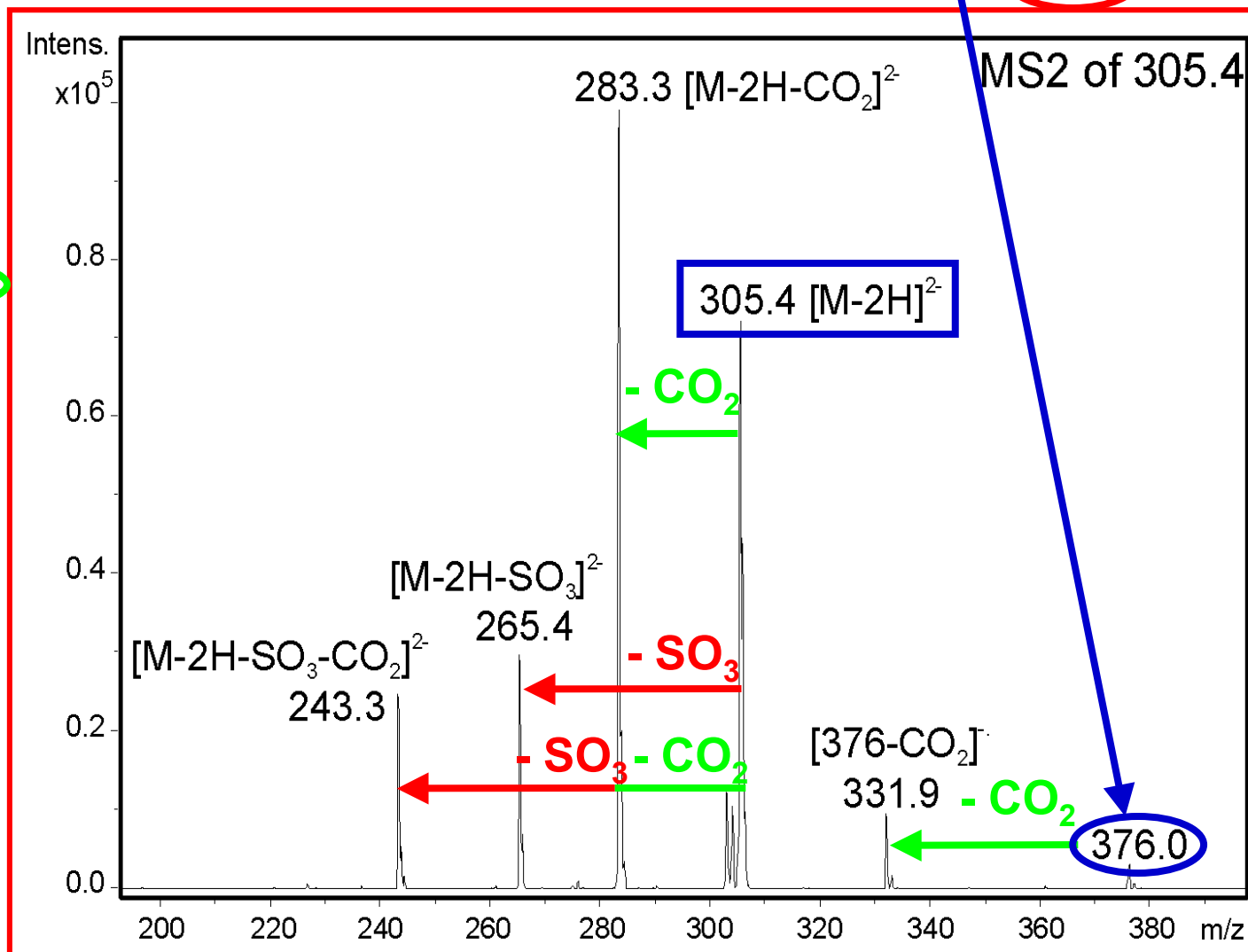


ESI MS/MS of Mordant Red 8



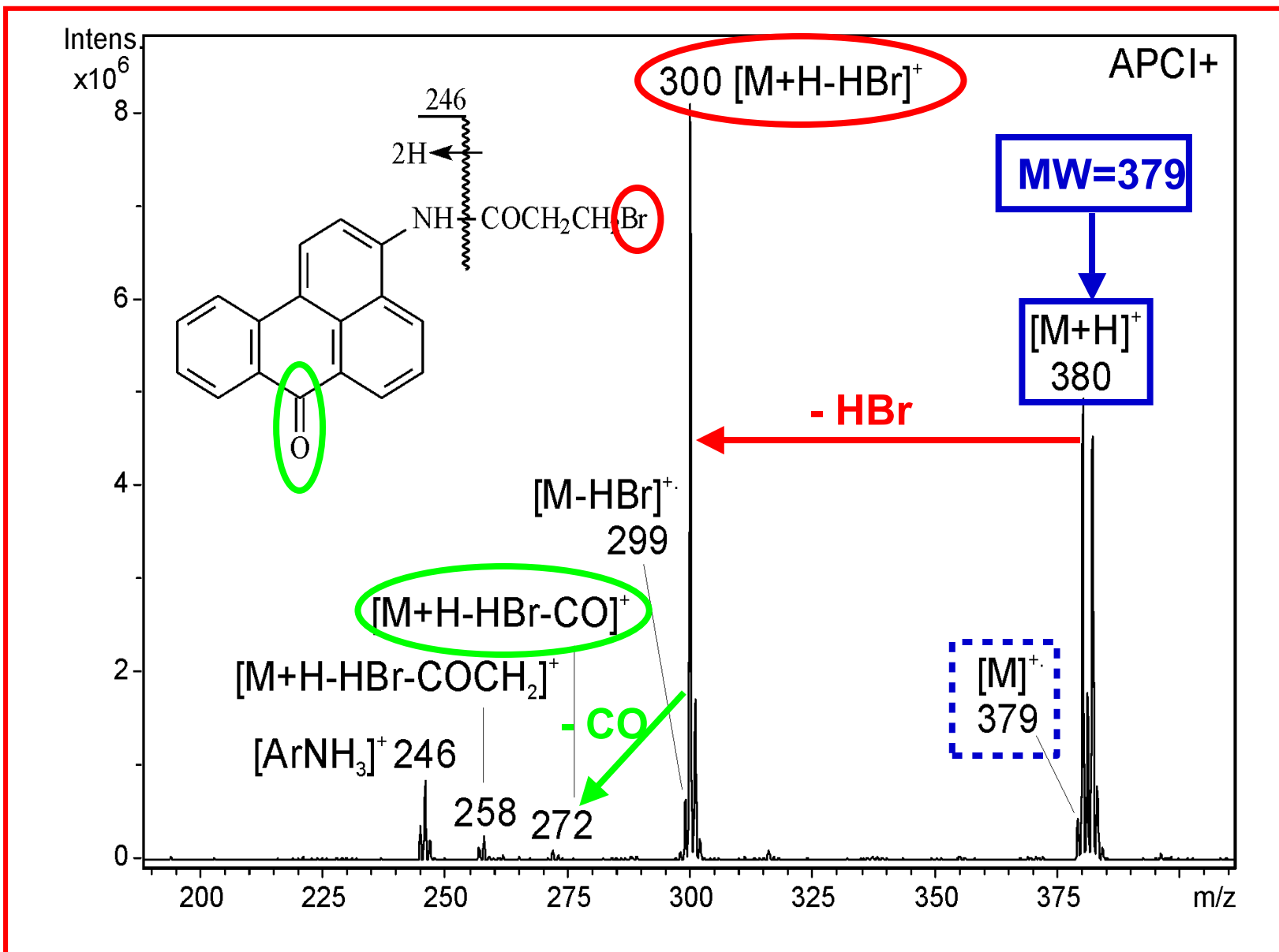
MW = 613

- 1 sulfonic acid
- 1 carboxylic acid
- 1 nitro group
- 2 azo groups
- 2 hydroxyl groups

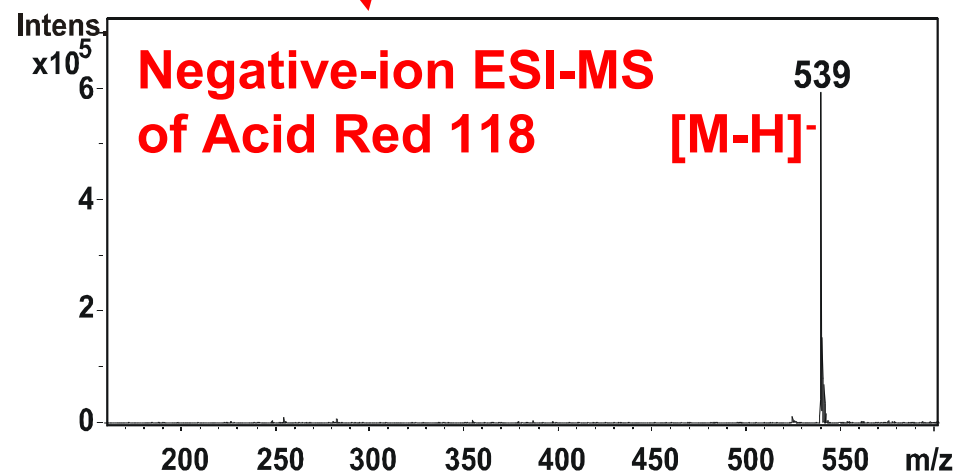
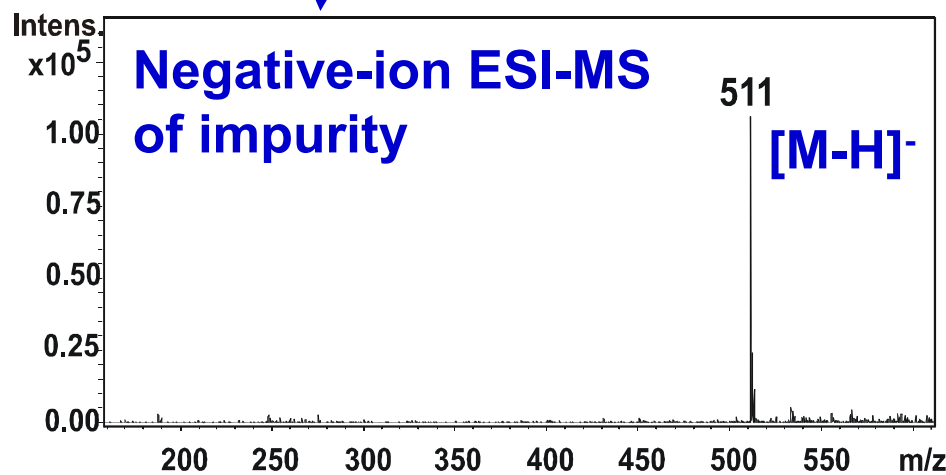
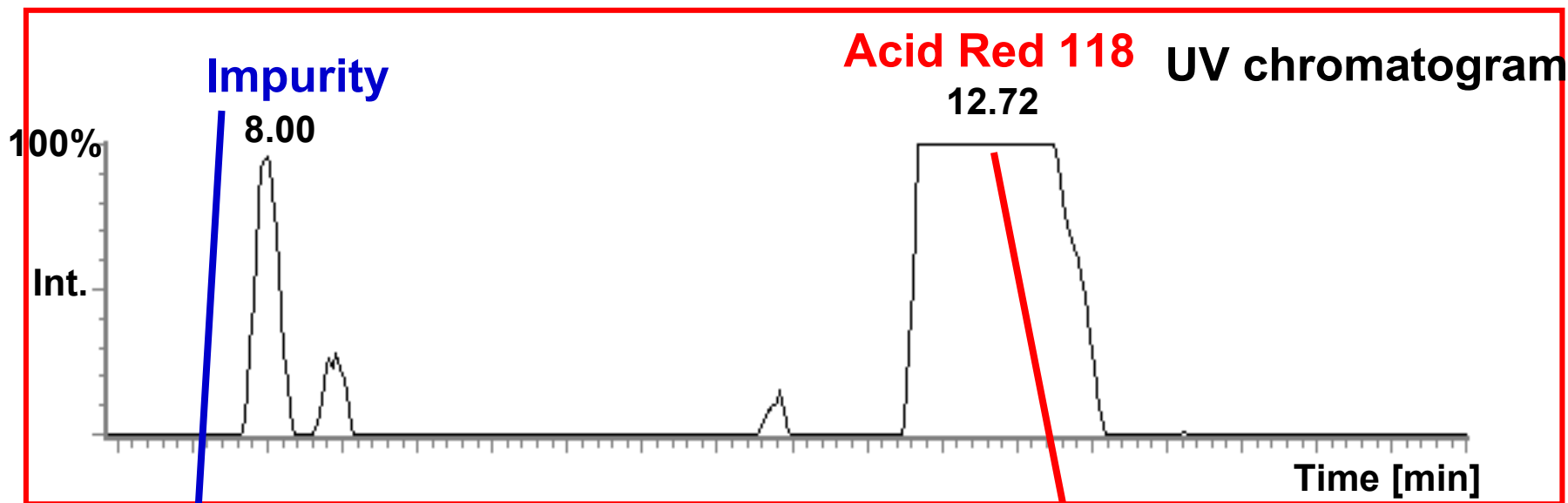


APCI-MS of Polyaromatic Compounds

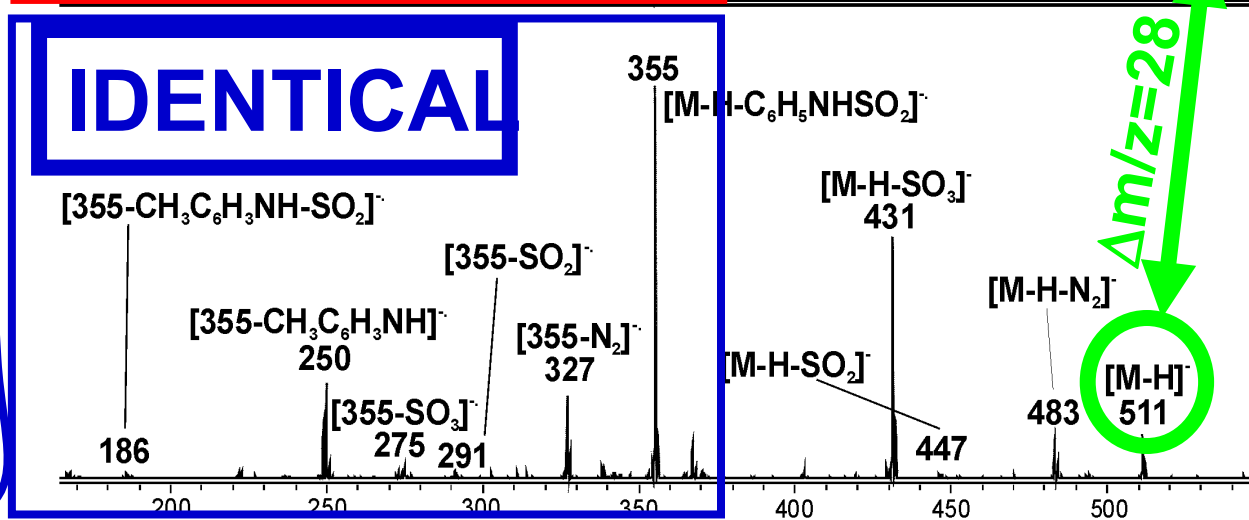
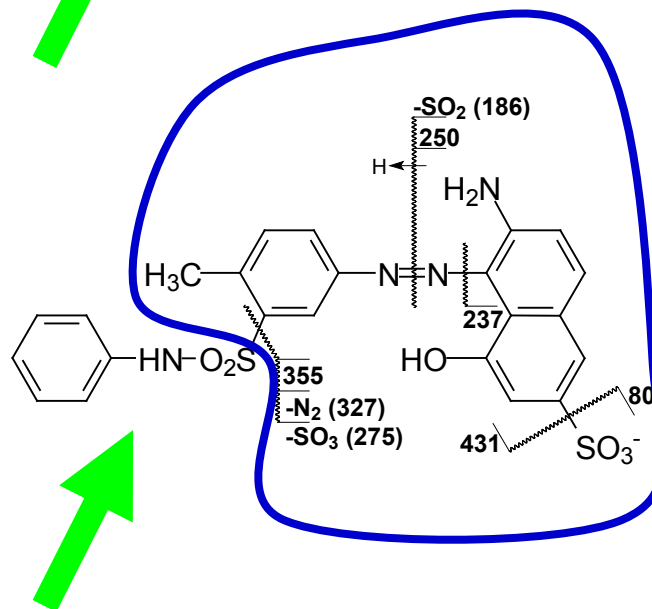
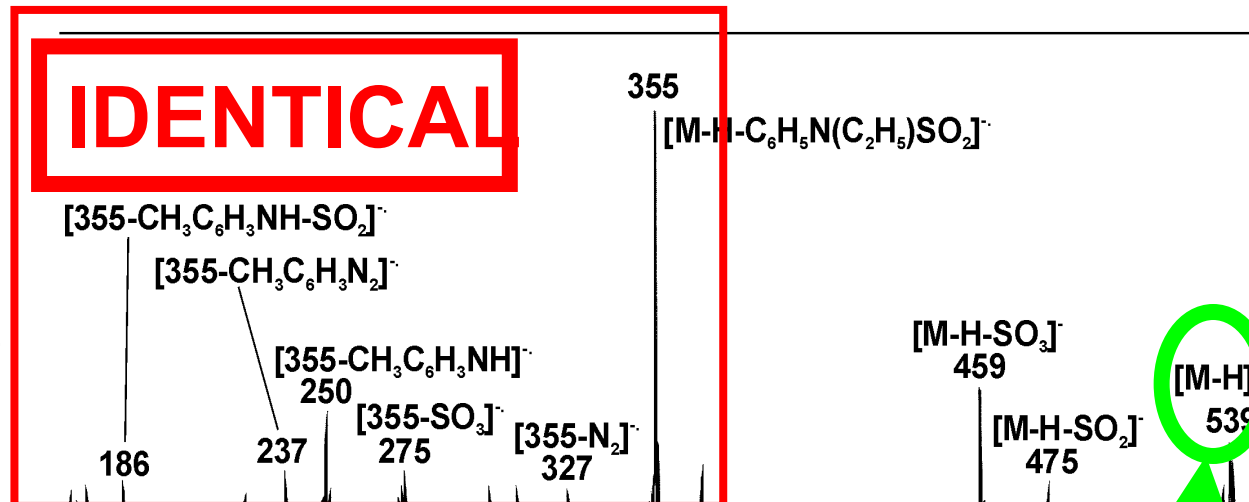
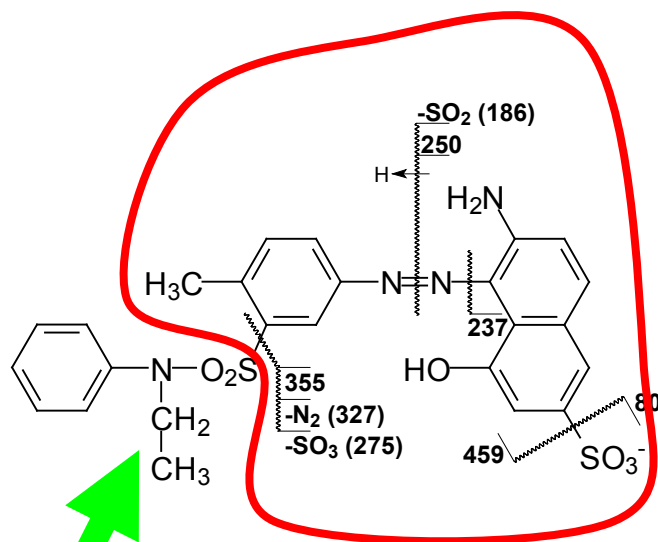
(N-(7H-benz[de]anthracen-7-on-3-yl)-3-bromopropanamide)



HPLC/MS of C.I. Acid Red 118



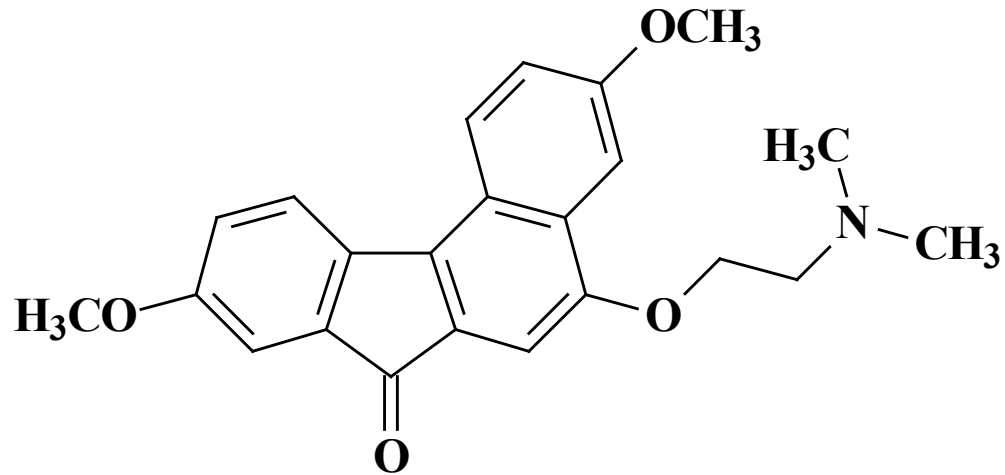
HPLC/MS/MS of C.I. Acid Red 118 and Impurity



Identification of dimefluron metabolites

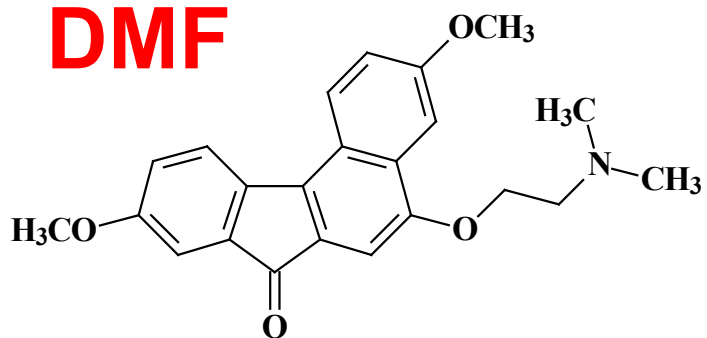
Dimefluron (DMF)

3,9-dimethoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-
-7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-one hydrochloride

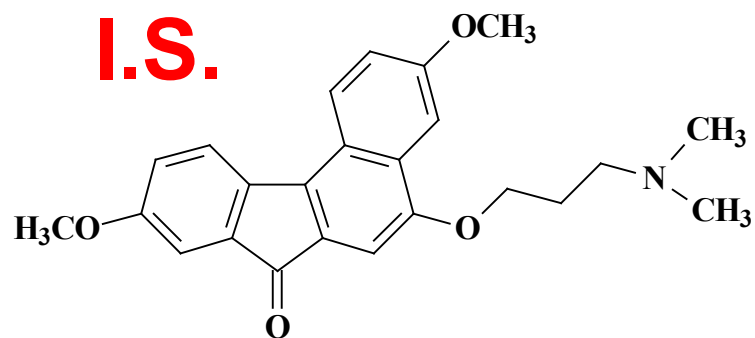


potential antineoplastic agent
samples: rat faeces

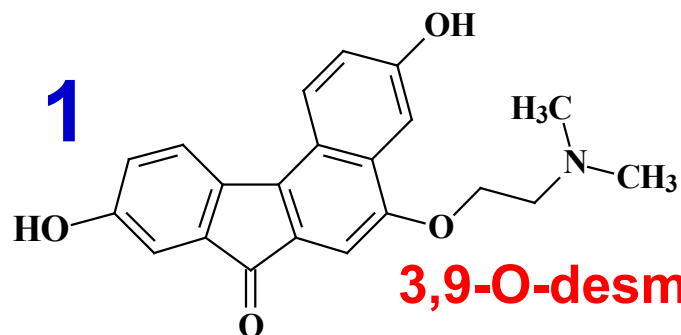
DMF



I.S.

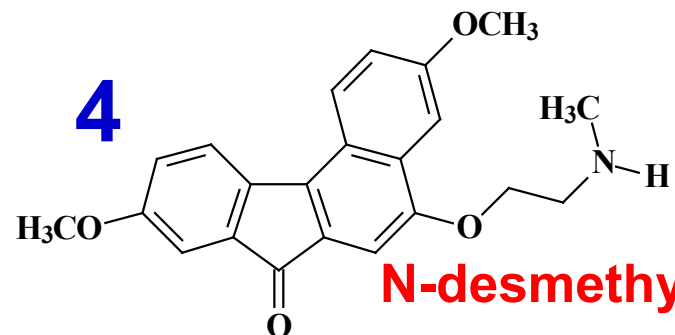


1



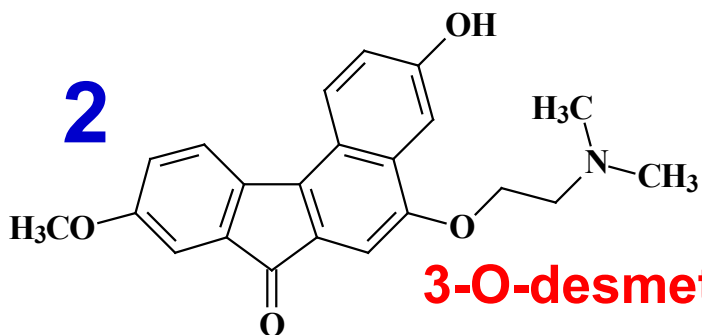
3,9-O-desmethyl DMF

4



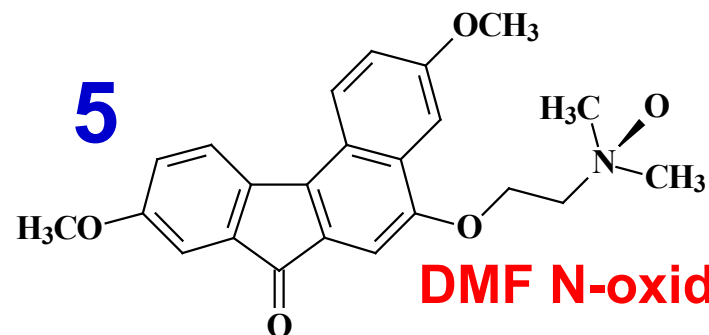
N-desmethyl DMF

2



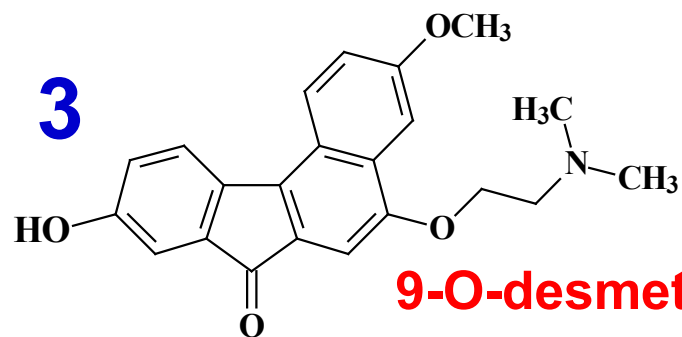
3-O-desmethyl DMF

5



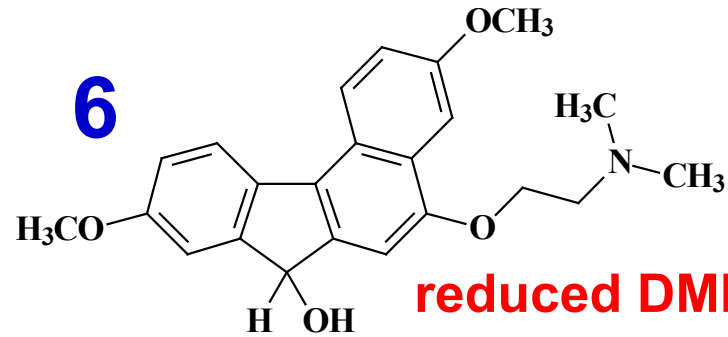
DMF N-oxide

3



9-O-desmethyl DMF

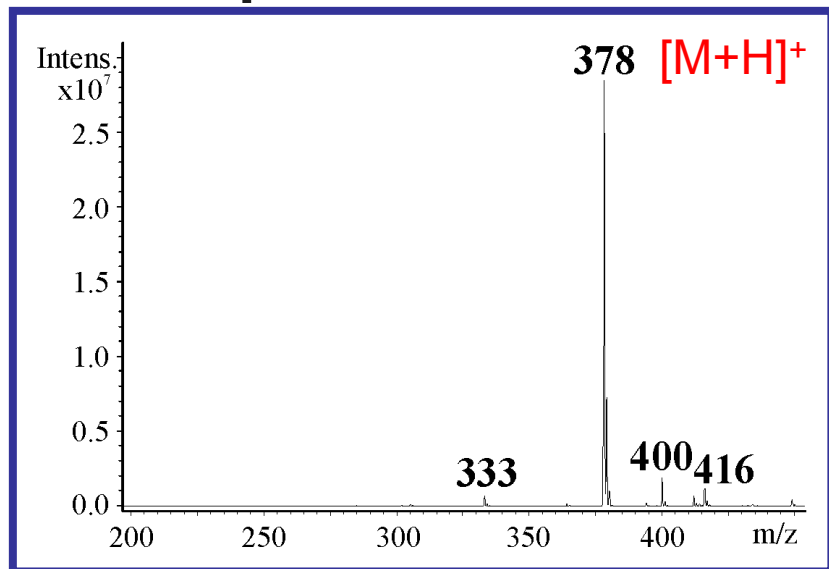
6



reduced DMF

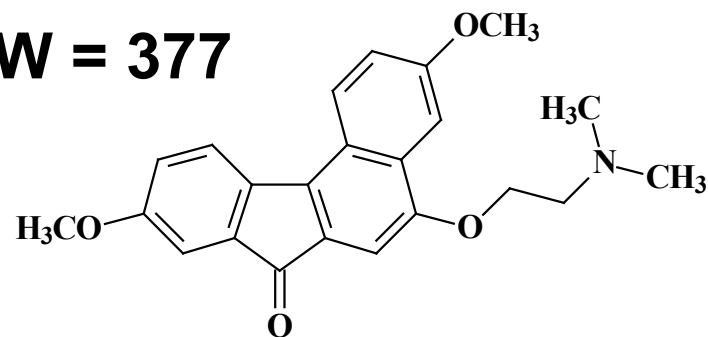
ESI-MS and MSⁿ

DMF – positive ion ESI-MS

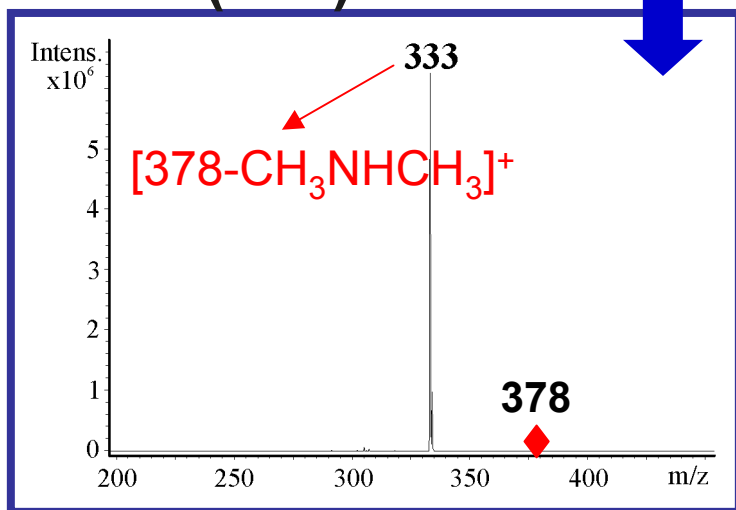


Negative ion ESI-MS - no signal

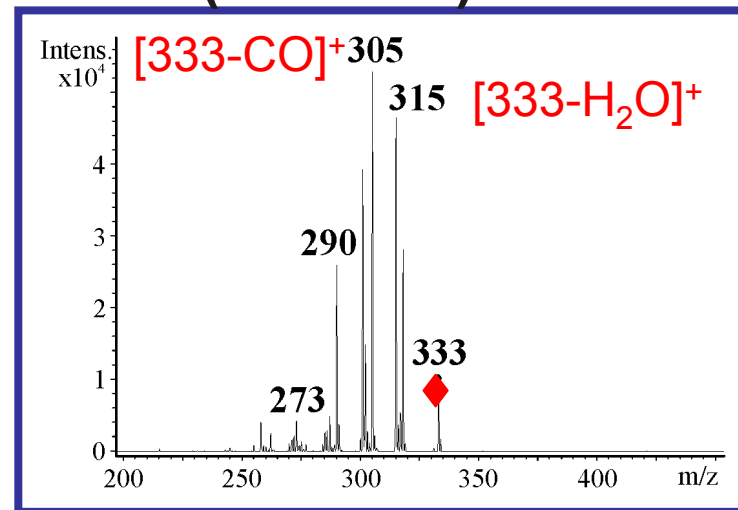
MW = 377



MS² (378)



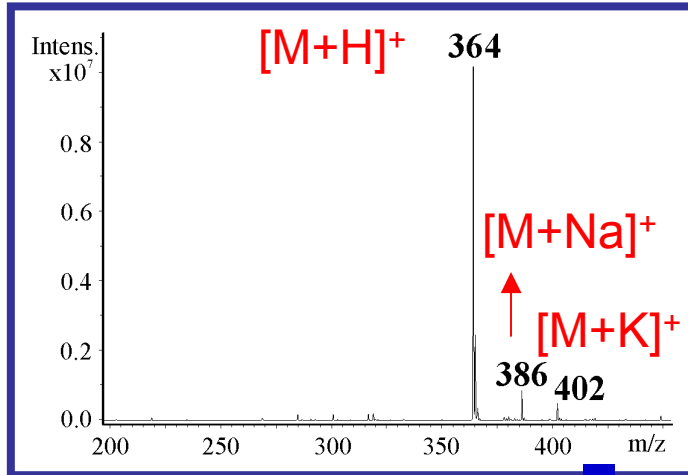
MS³ (378-333)



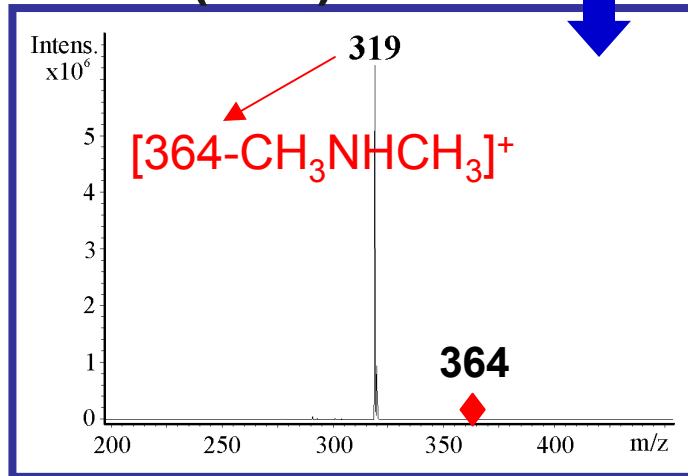
ESI-MS and MSⁿ

9-O- or 3-O-desmethyl DMF (MW = 363)

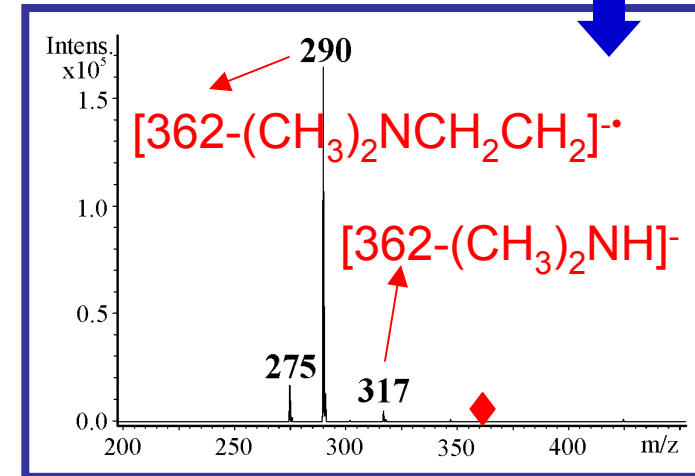
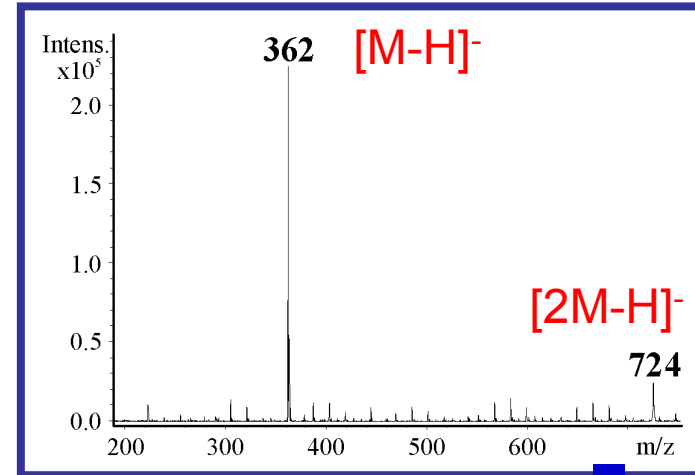
positive-ion ESI-MS



MS² (364)



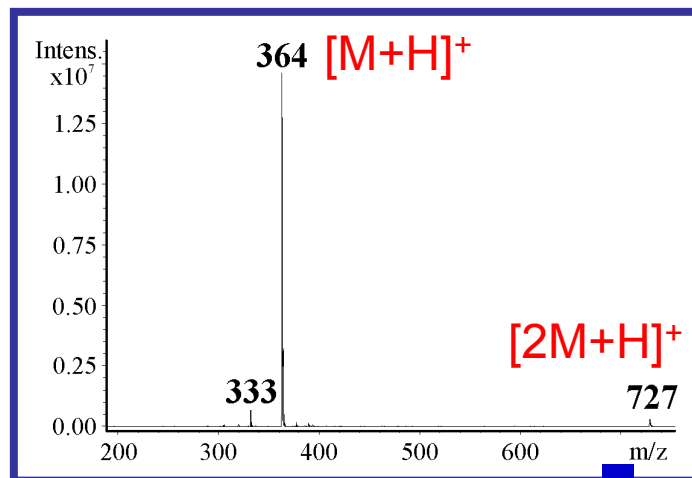
negative-ion ESI-MS



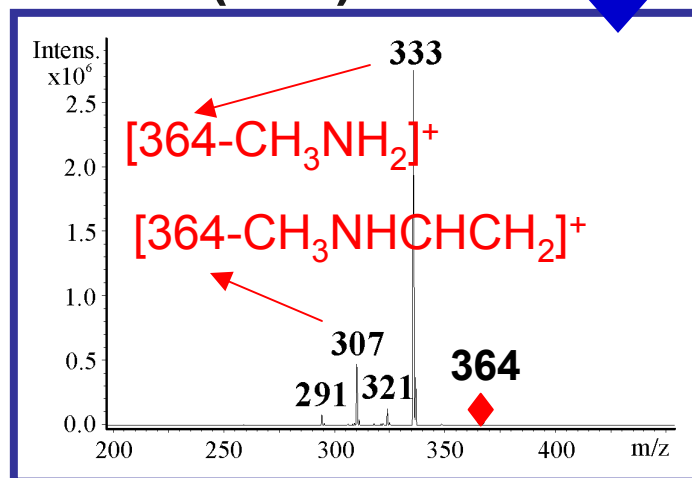
similar spectra for 3,9-O-desmethyl DMF (MW = 349)

ESI-MS and MSⁿ

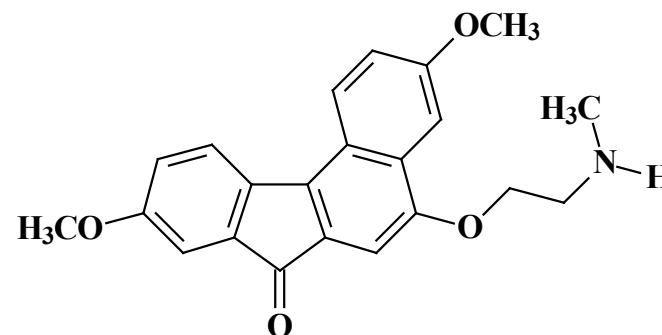
positive-ion ESI-MS



MS² (364)



N-desmethyl DMF (MW = 363)

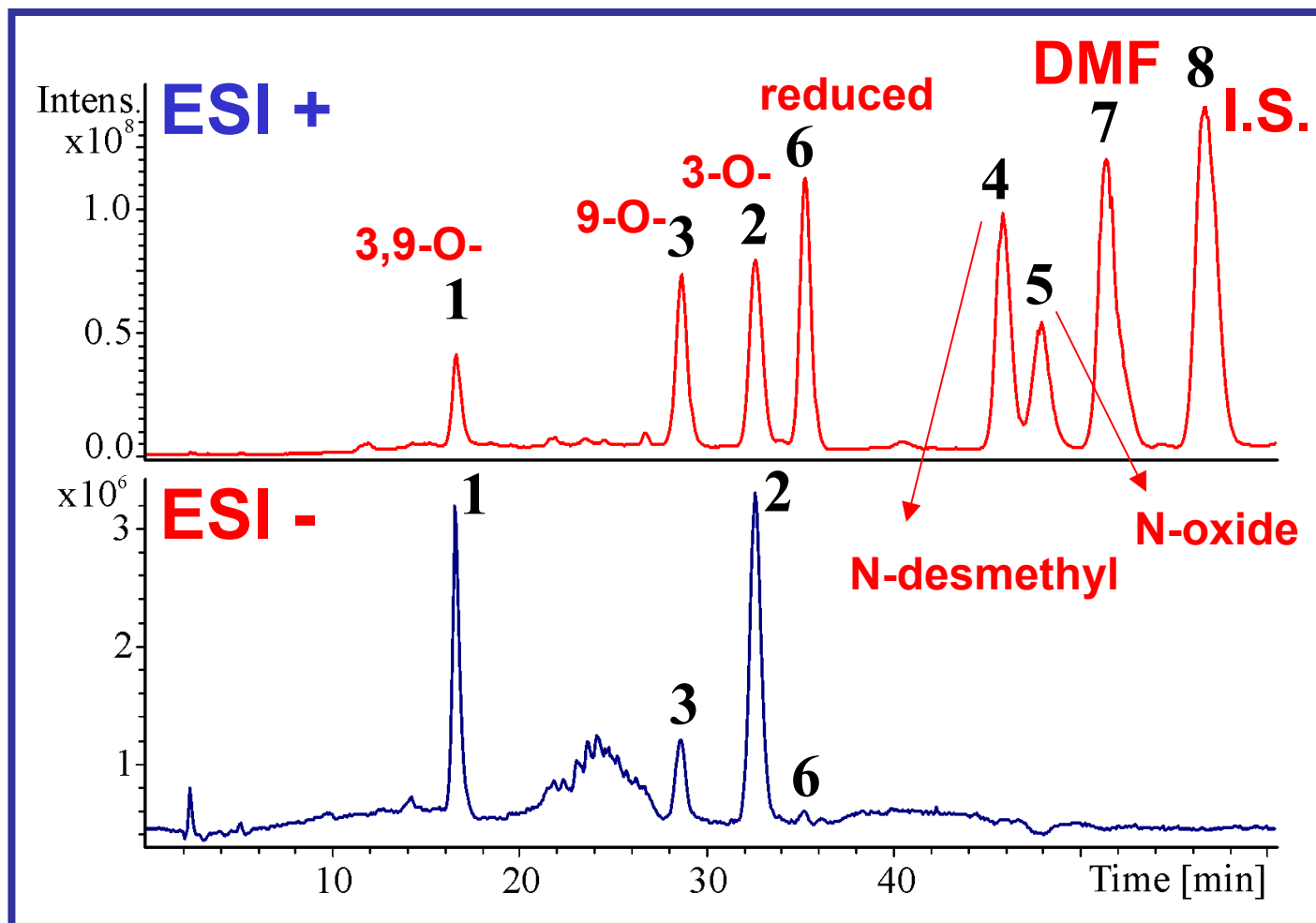


negative-ion ESI-MS

no signal

HPLC/ESI-MS

Standards

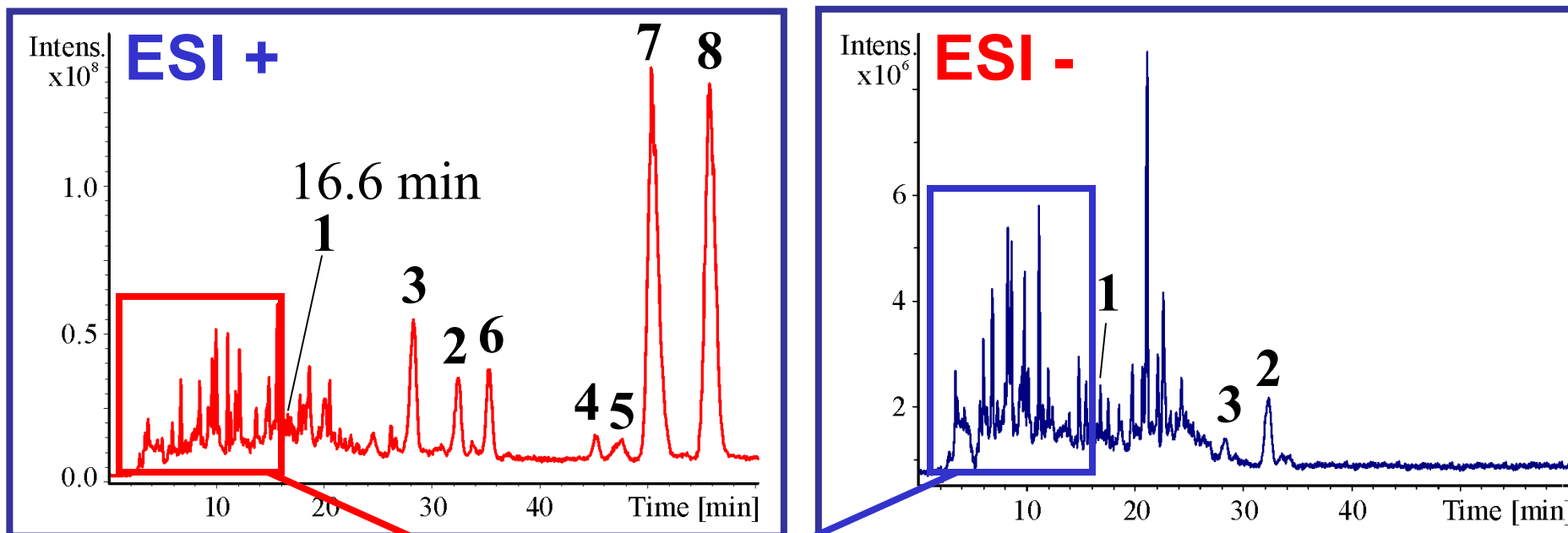


- 1 - MW = 349
- 2 - MW = 363
- 3 - MW = 363
- 4 - MW = 379
- 5 - MW = 363
- 6 - MW = 393
- 7 - MW = 377
- 8 - MW = 391

Mobile phase: 40-80% A in 20 min (A-acetonitrile, B-buffer $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ pH=3). Column: Supelco Discovery, 250x4mm; F=1ml/min, T=30°C.

HPLC/ESI-MS

Samples

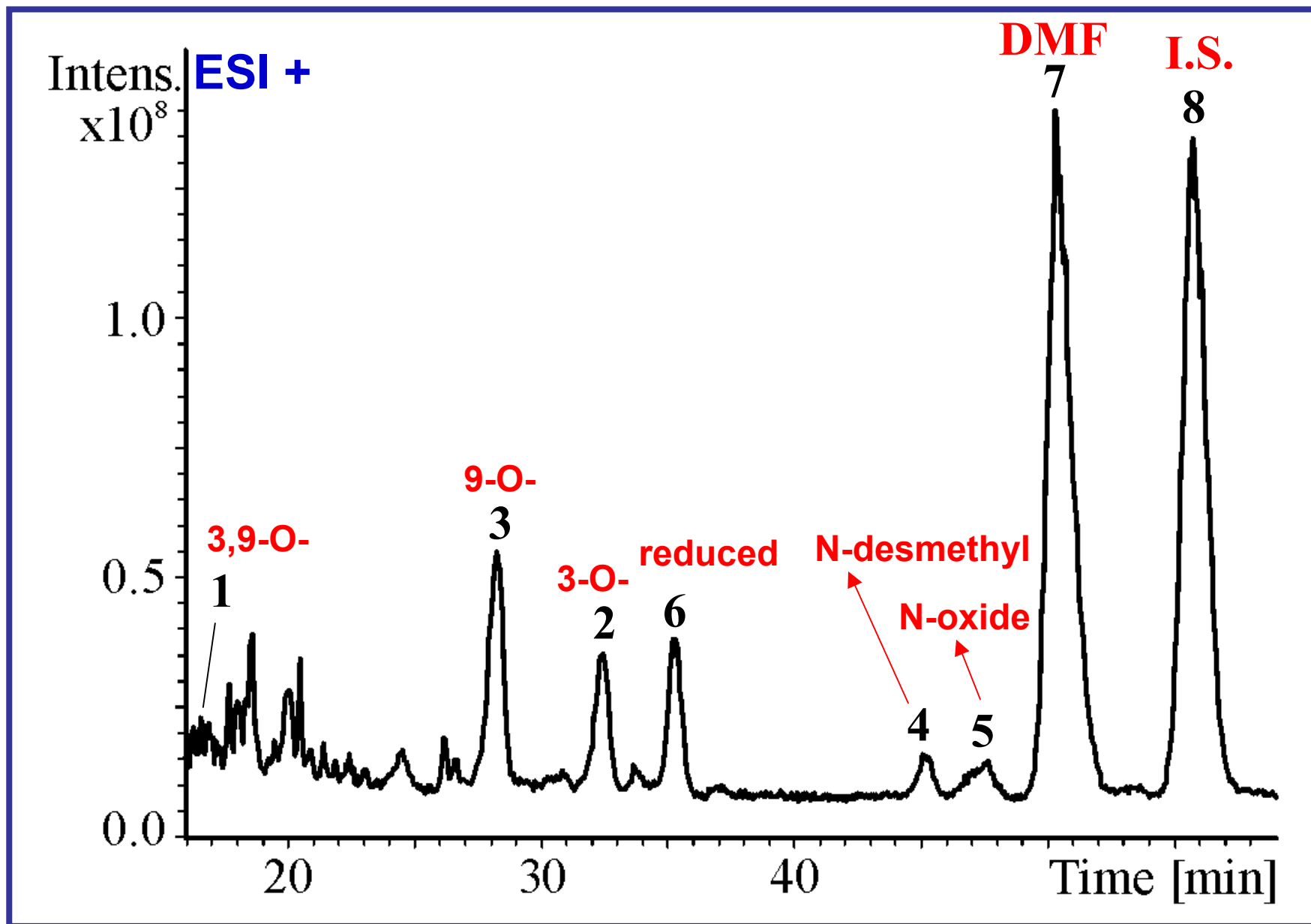


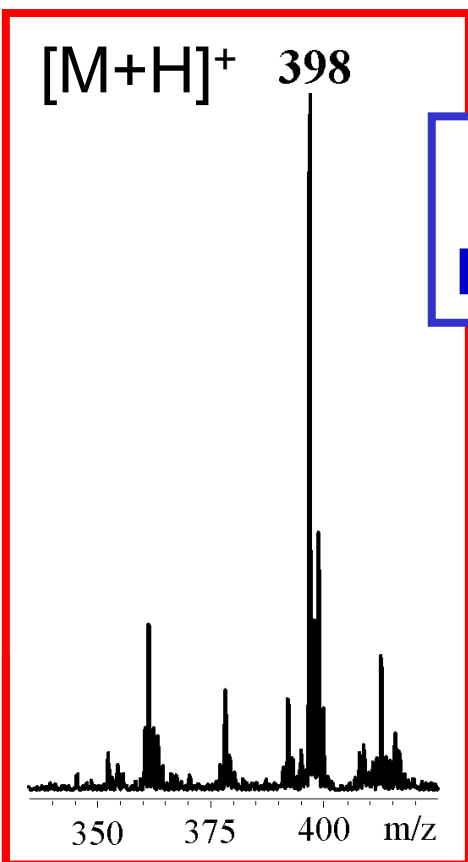
II. phase metabolites

ions: $[M+Na]^+$, $[M-H_2O+H]^+$ etc.; even MW
 \Rightarrow adducts with glycine or glucuronic acid

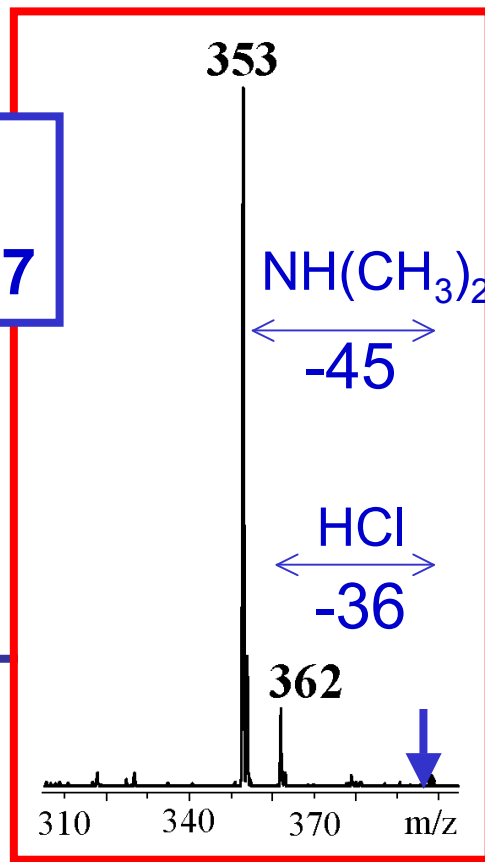
I. phase metabolites \Rightarrow from $t_r = 16$ min

HPLC/ESI-MS and MSⁿ

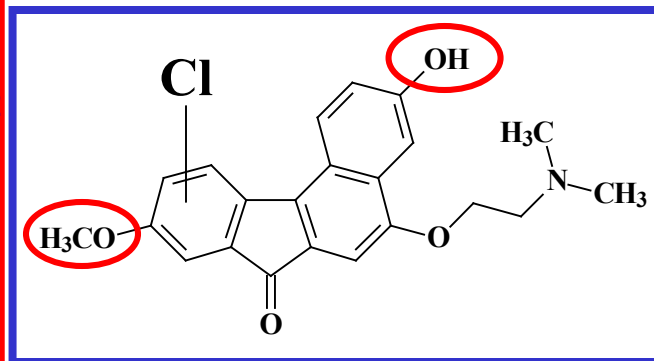




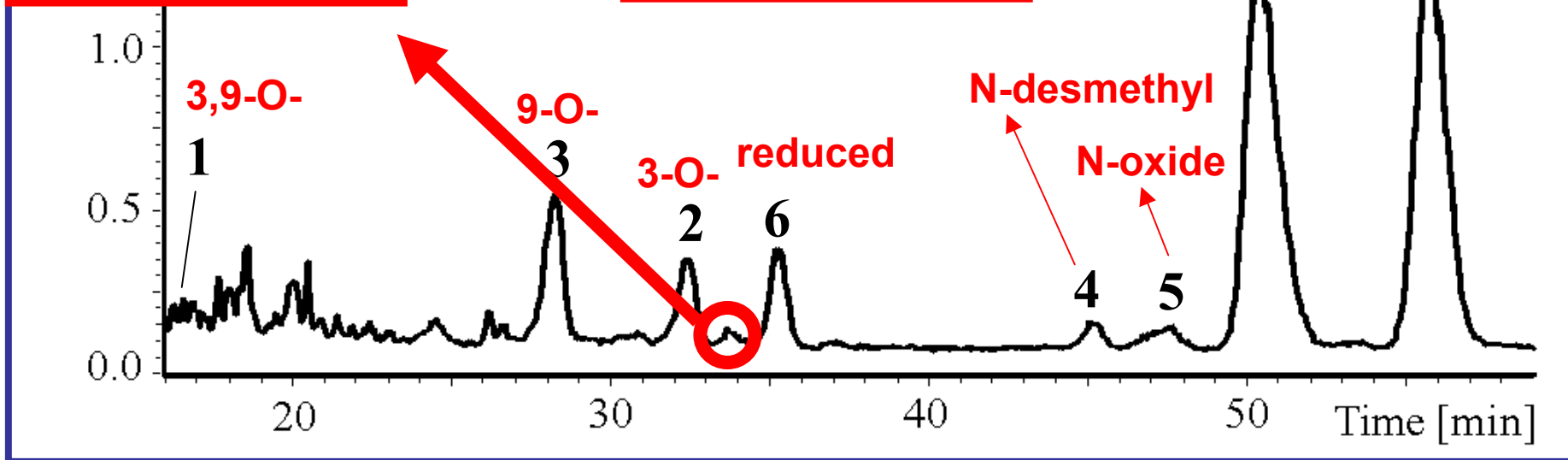
9
MW = 397

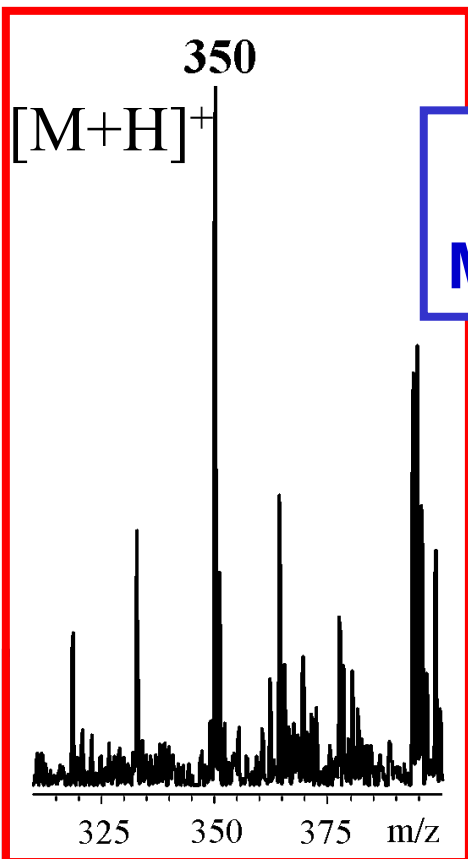


derived from standard 2
 or 3 + chlorine

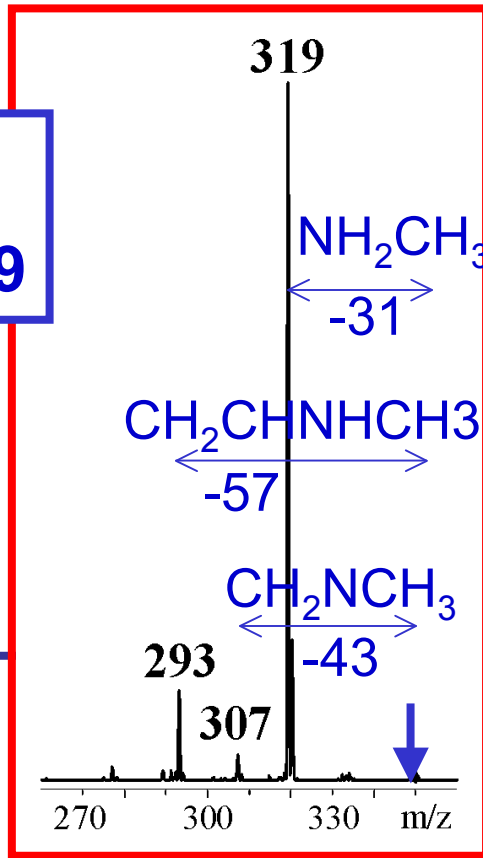
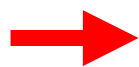


3-O or 9-O- desmethyl DMF

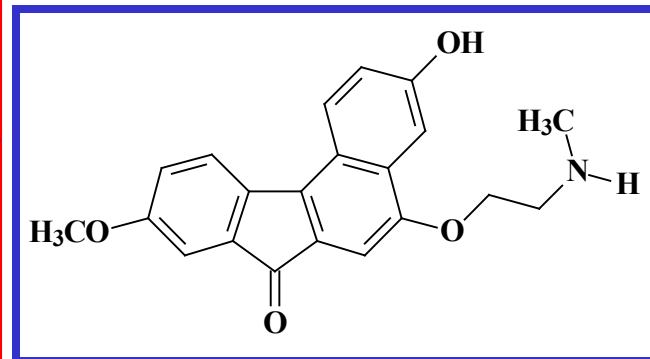




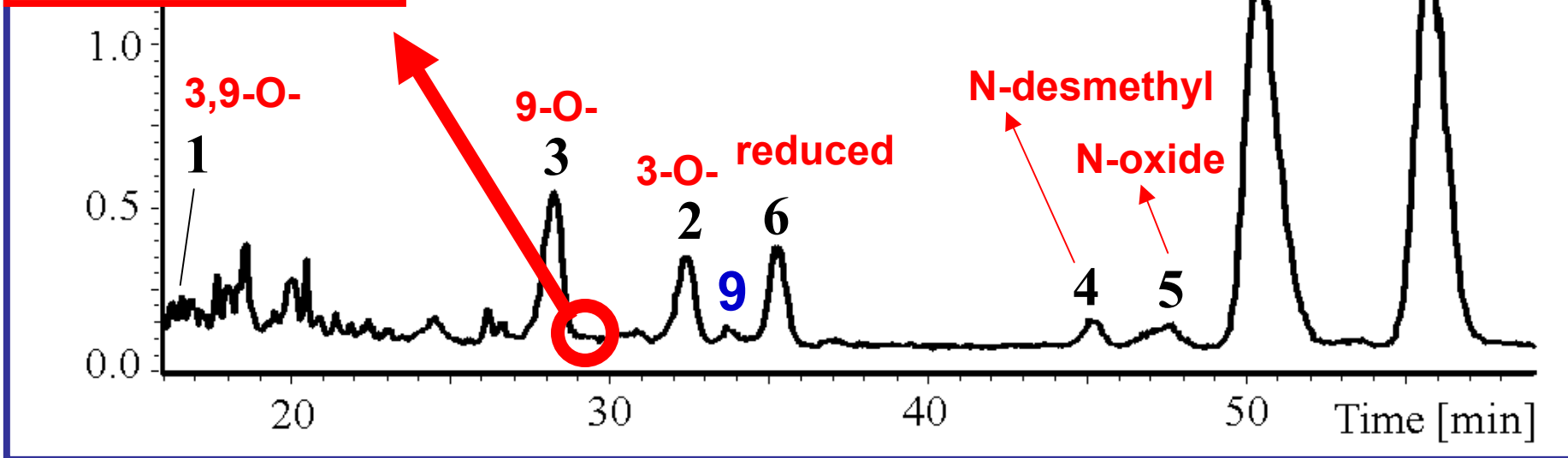
10
MW = 349



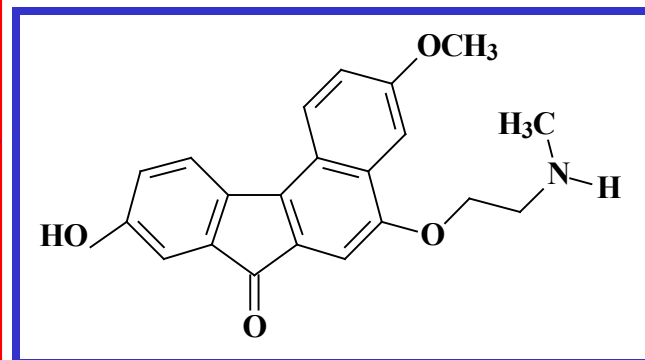
derived from standard 4



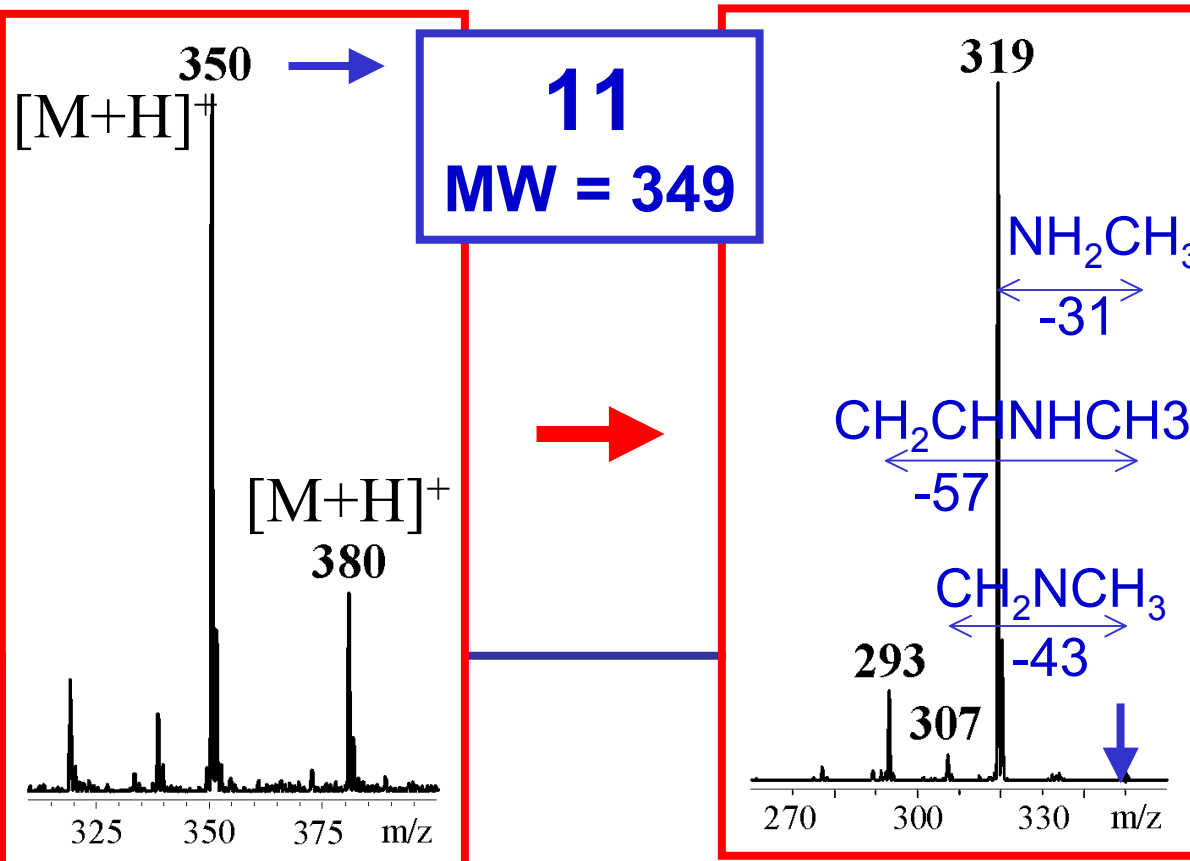
3-O-desmethyl
N-desmethyl DMF



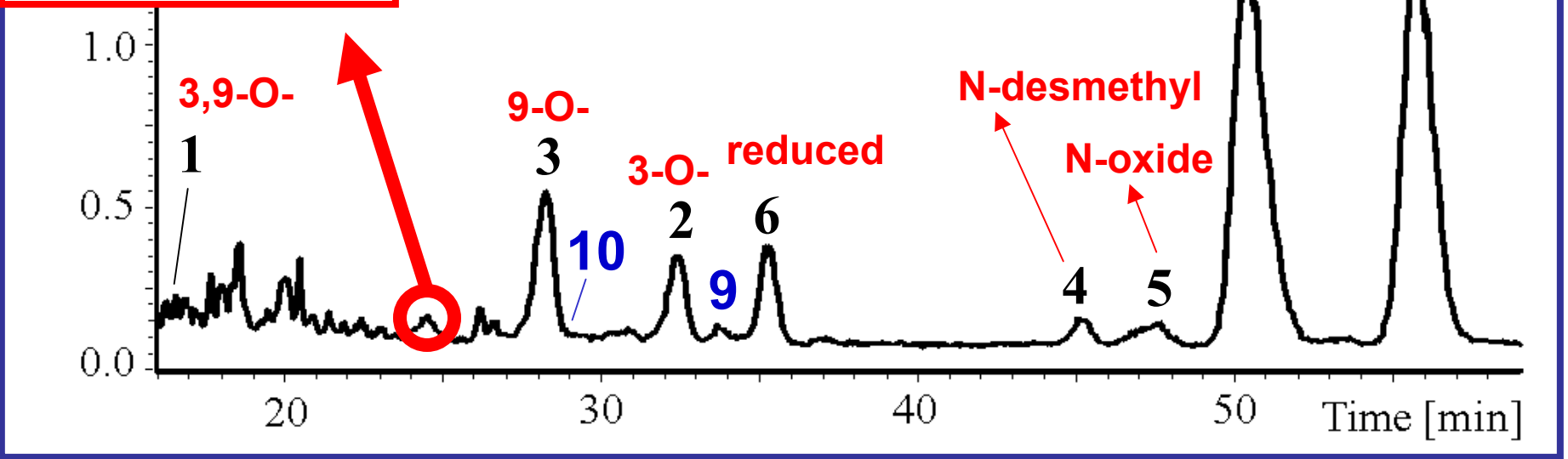
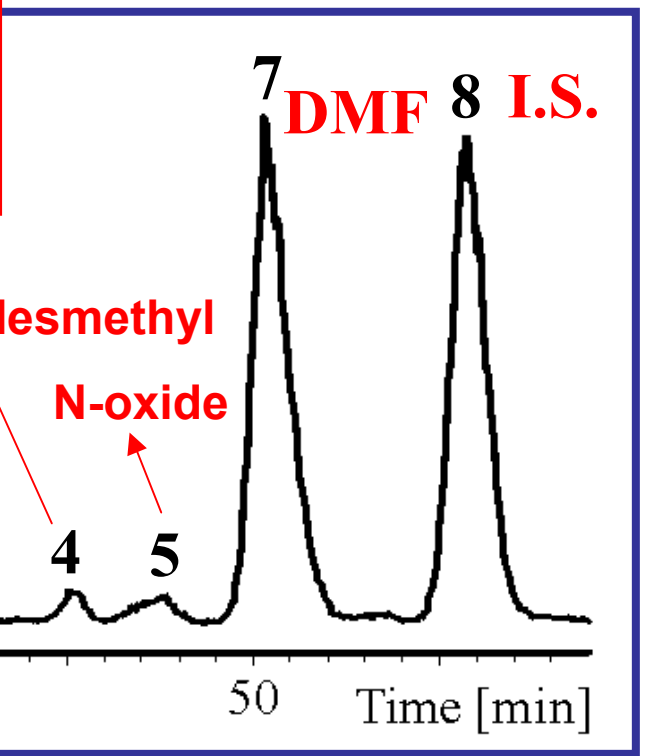
derived from standard 4



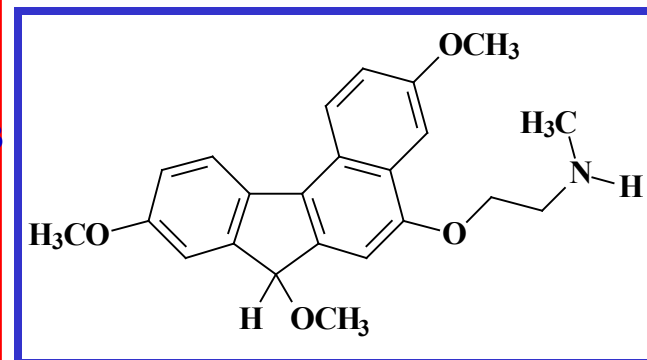
**9-O-desmethyl
N-desmethyl DMF**



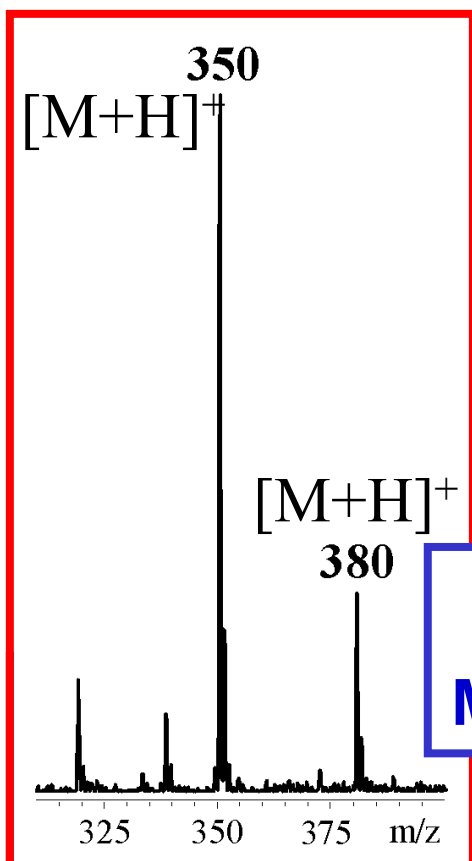
11
MW = 349



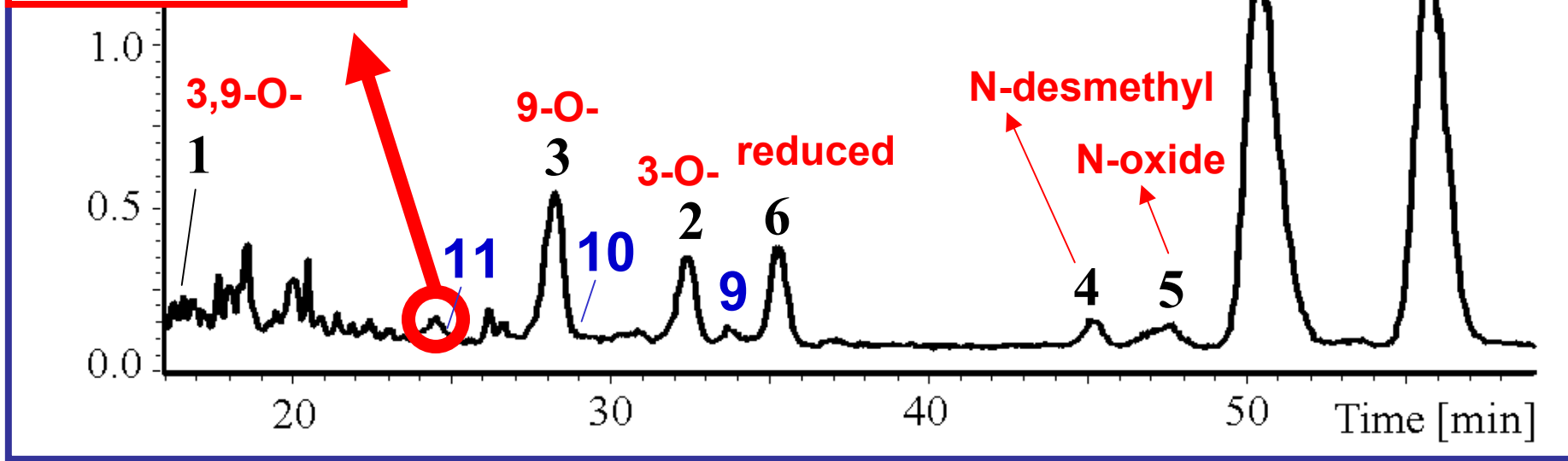
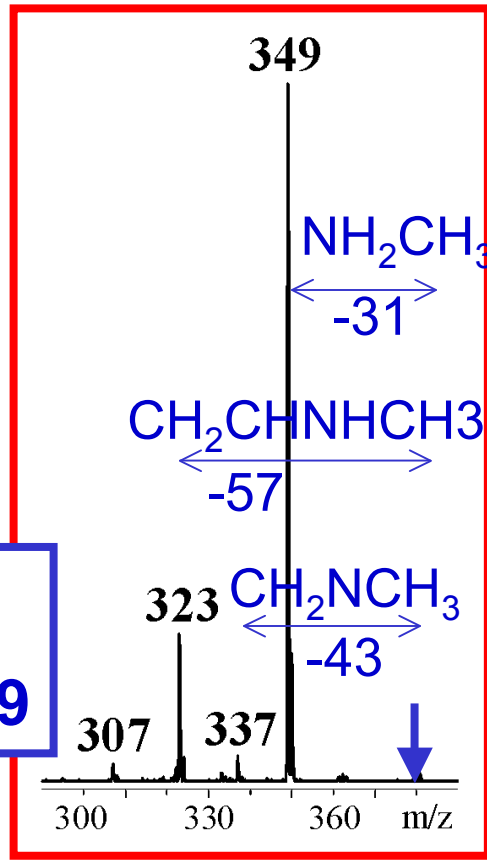
derived from standard 4

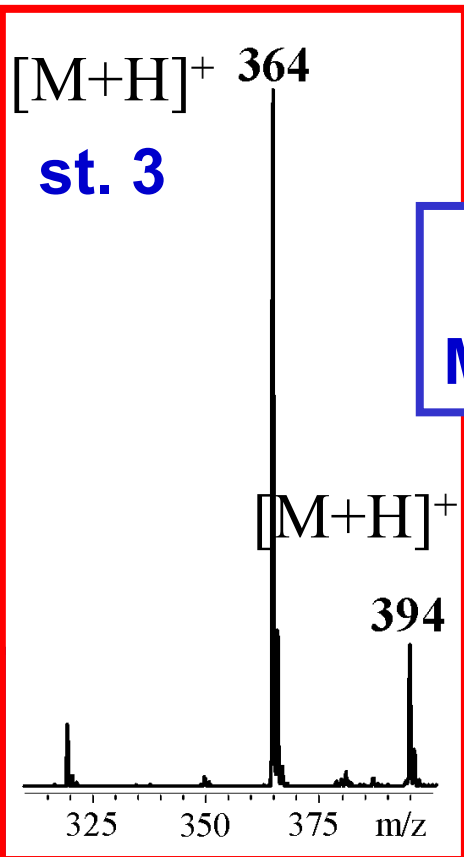


O-methyl reduced
N-desmethyl DMF

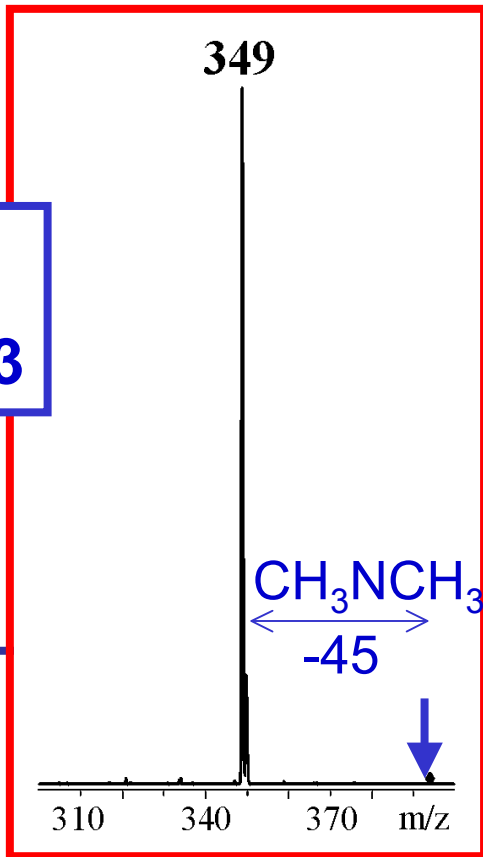


13
MW = 379

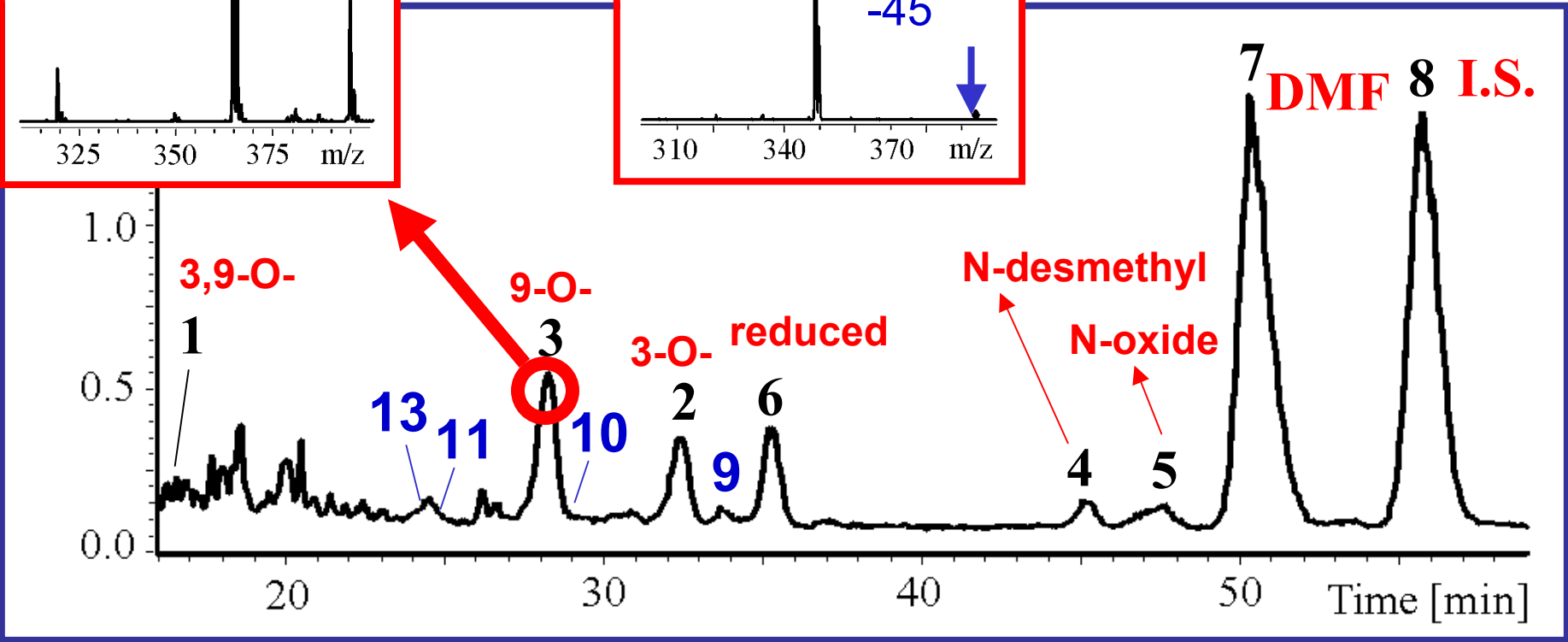
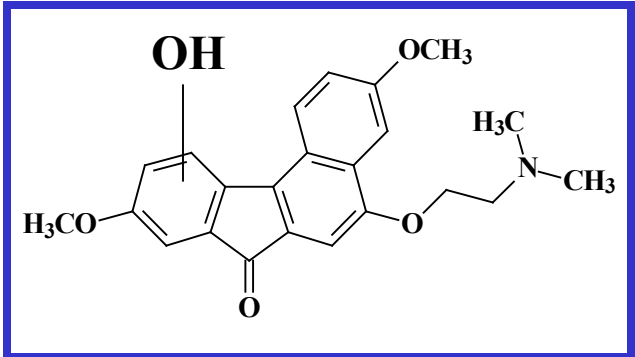




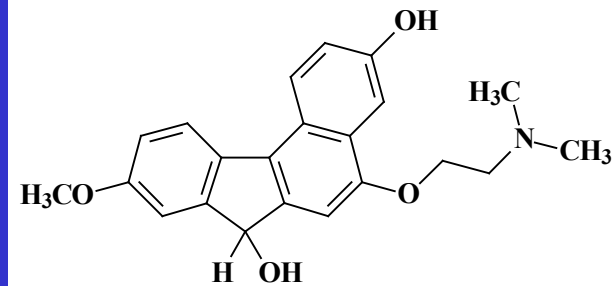
12
MW = 393



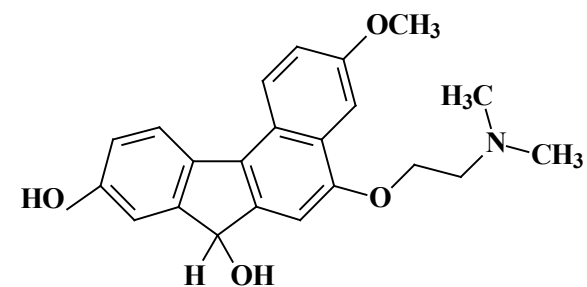
derived from DMF
+ OH (signal in negative)



positional isomers



reduced 3-O-desmethyl DMF



reduced 9-O-desmethyl DMF

$[M+H]^+$ 366

14, 15
MW = 365

348
 $CH_2CHNHCH_3$
-57

291 CH_2NCH_3
-43

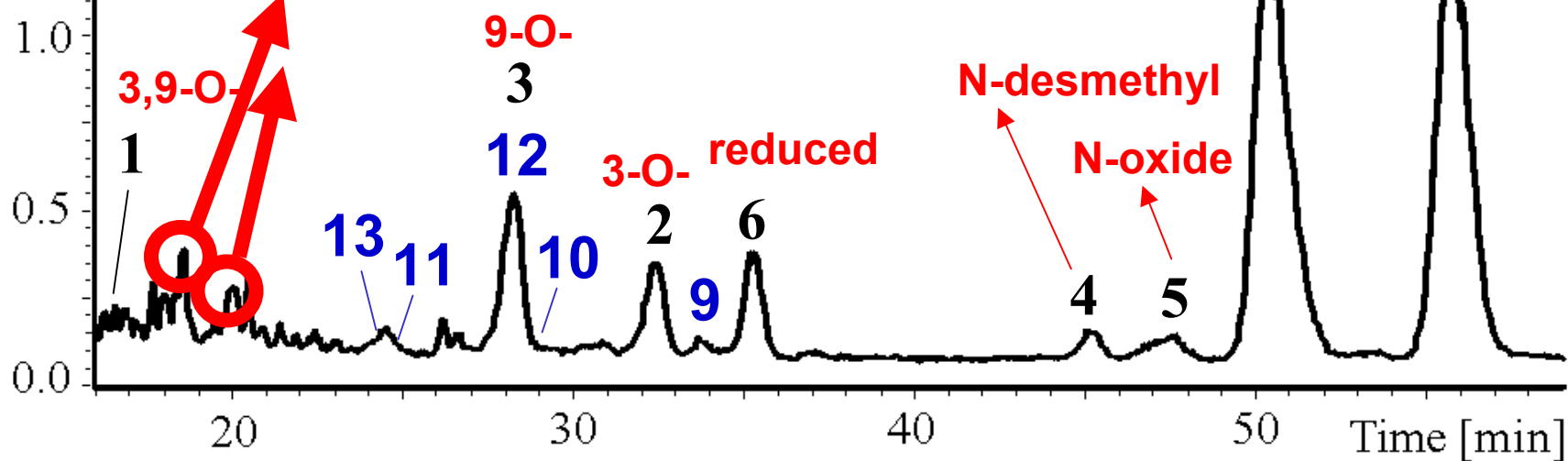
275 CH_2O
-30

330

H_2O
-18

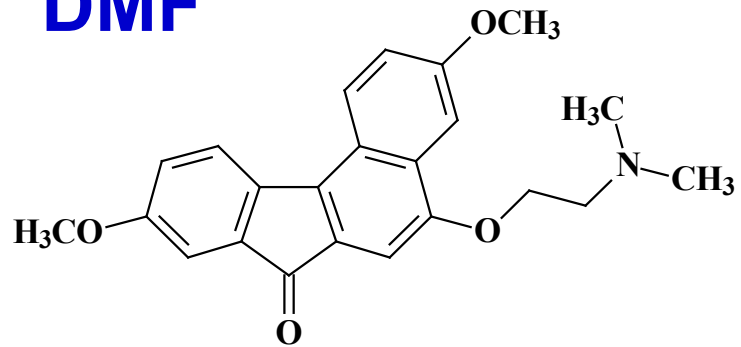
325 350 375 m/z

280 320 350 m/z

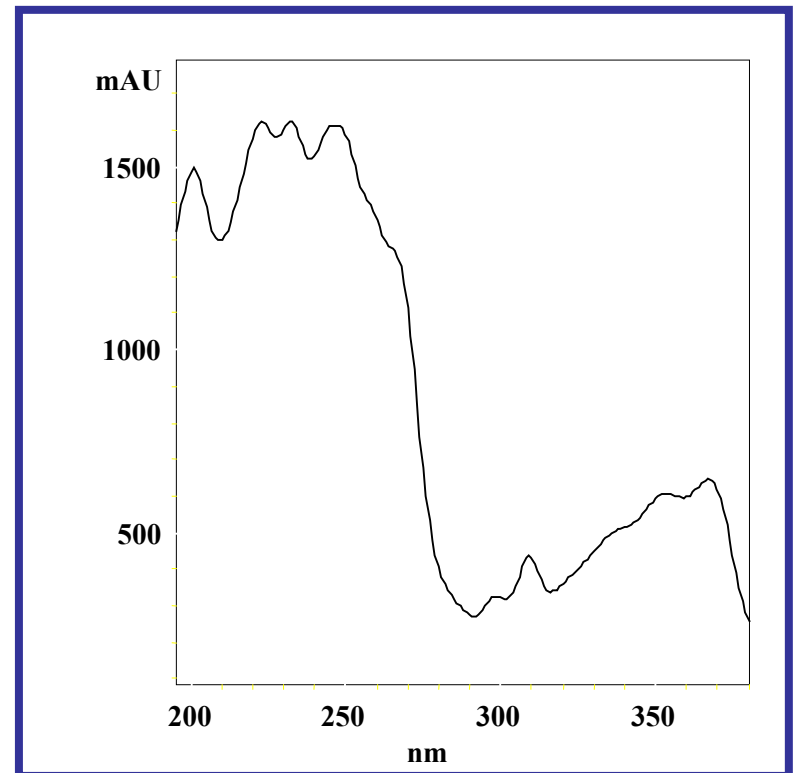
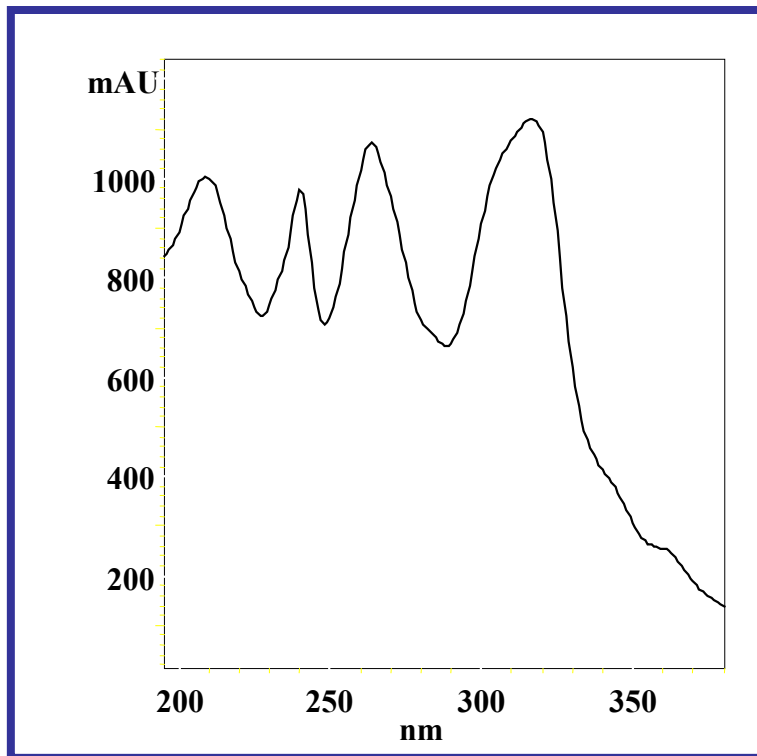
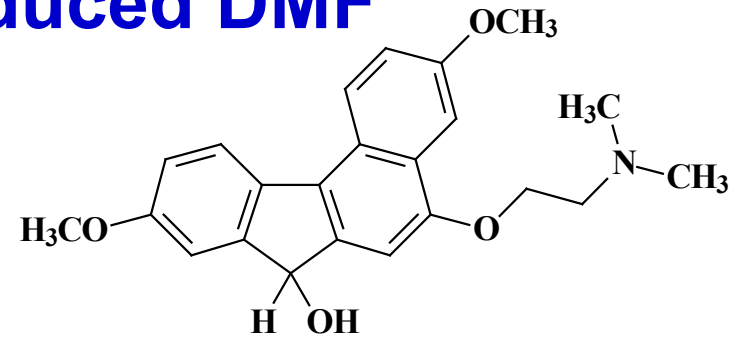


UV spectra

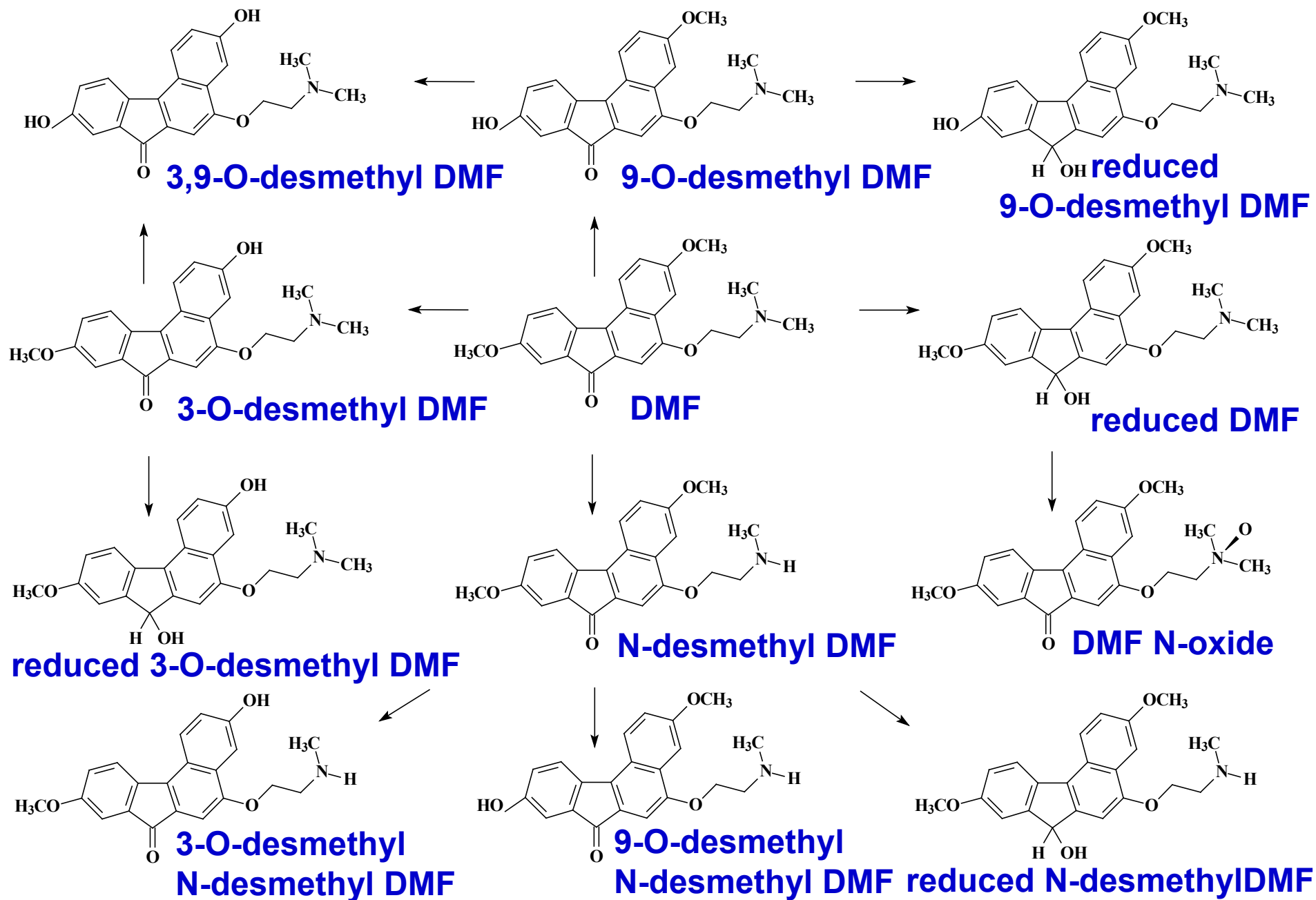
DMF



Reduced DMF



I. Phase Metabolites of Dimefluron



Biomolekuly

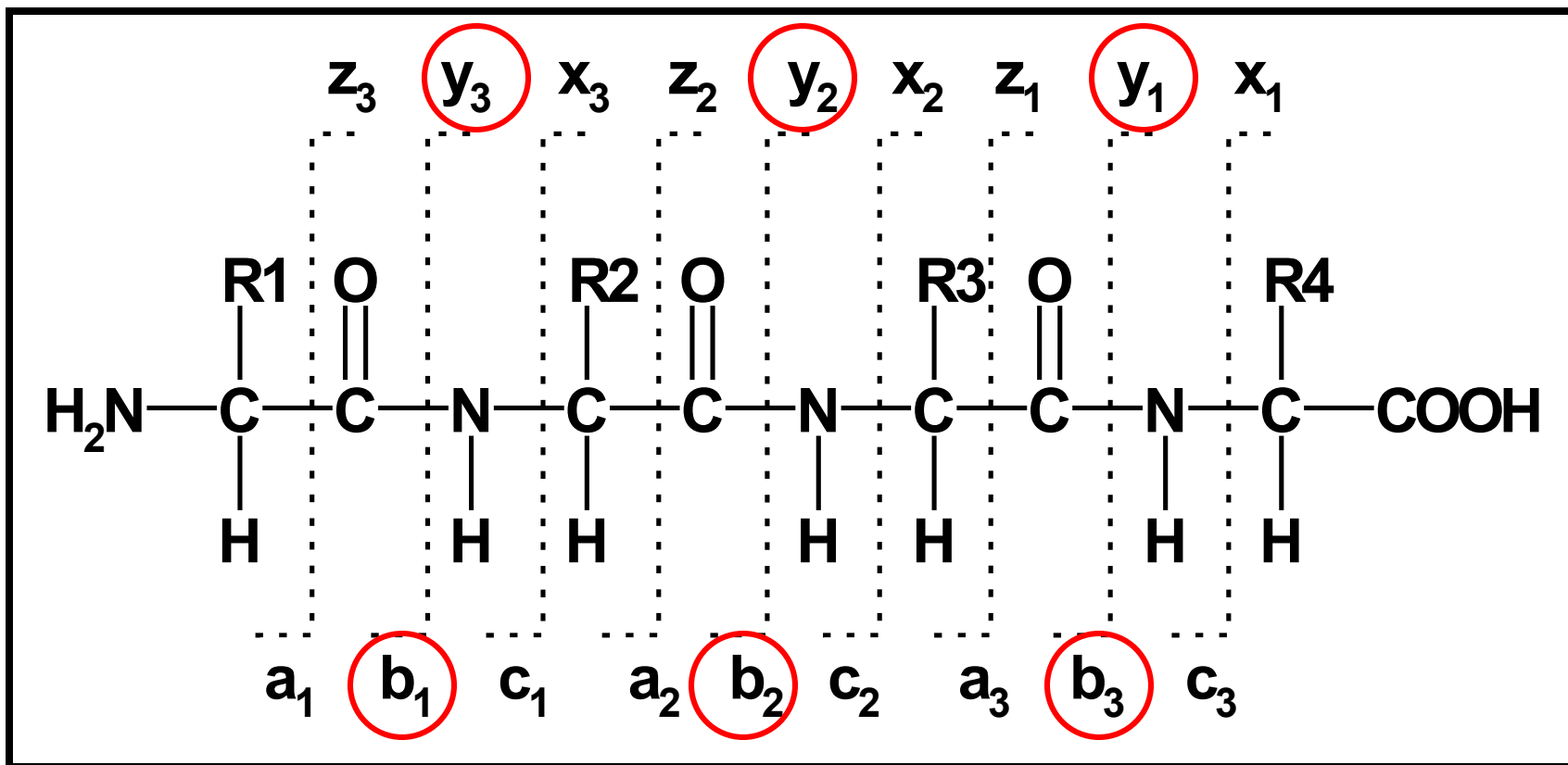
a/ peptidy

b/ proteiny

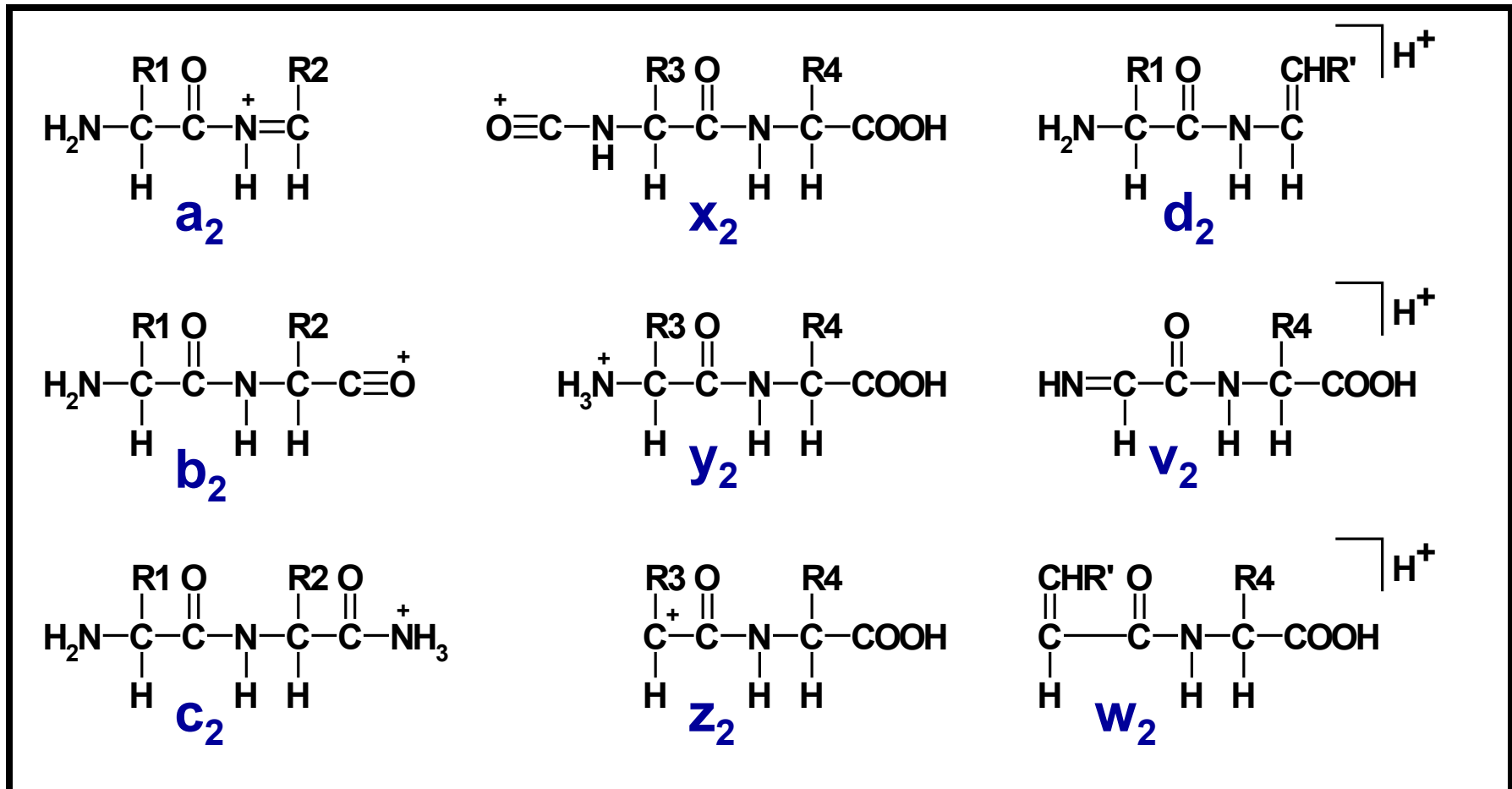
c/ nukleotidy

ESI MS/MS analýza peptidů

Schéma značení fragmentových iontů peptidů



Typy fragmentových iontů ve spektrech peptidů

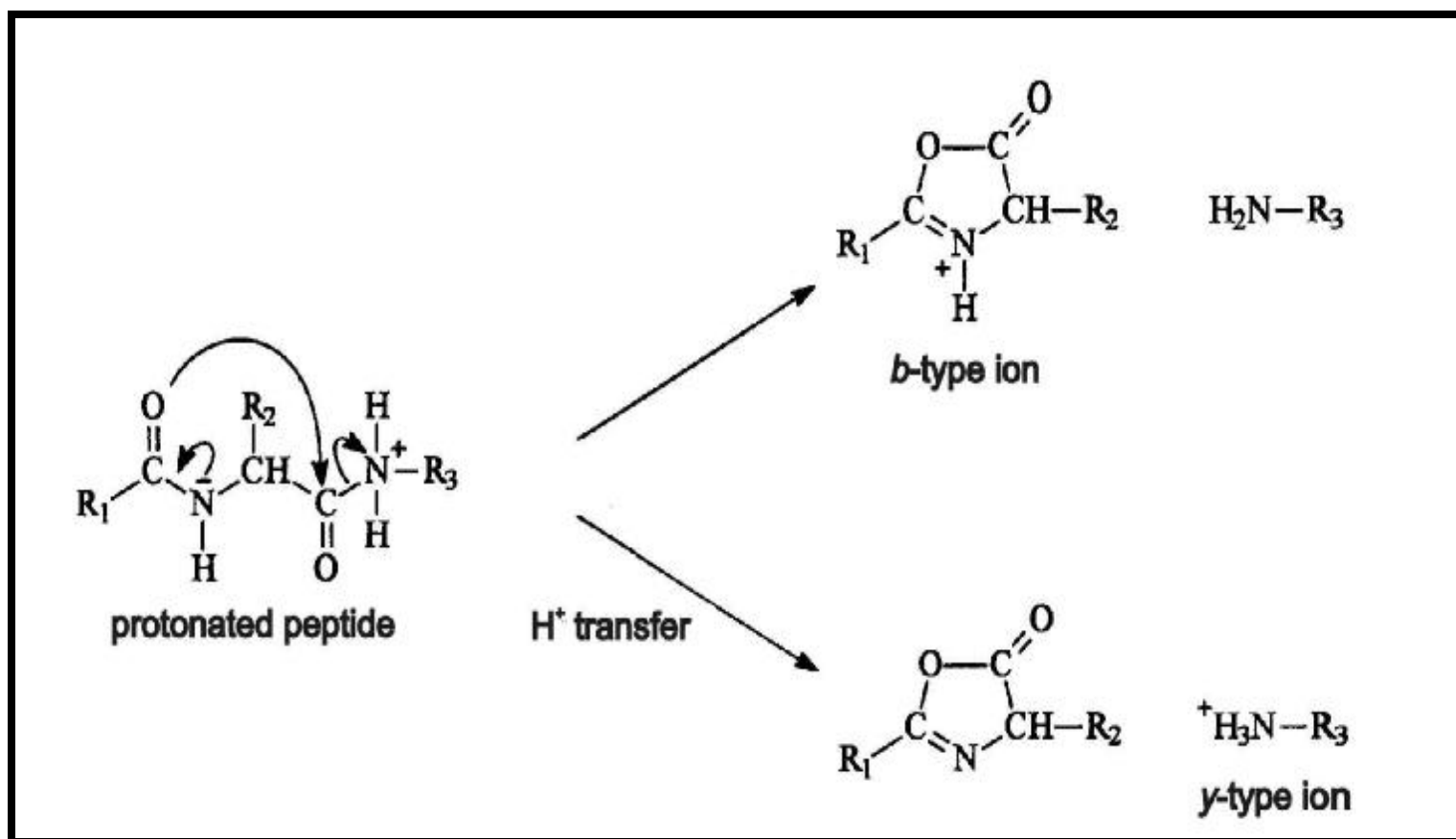


N-terminální fragmenty: a, b, c, d

C-terminální fragmenty: x, y, z, v, w

Tvorba iontů typu „b“ a „y“ ve spektrech peptidů

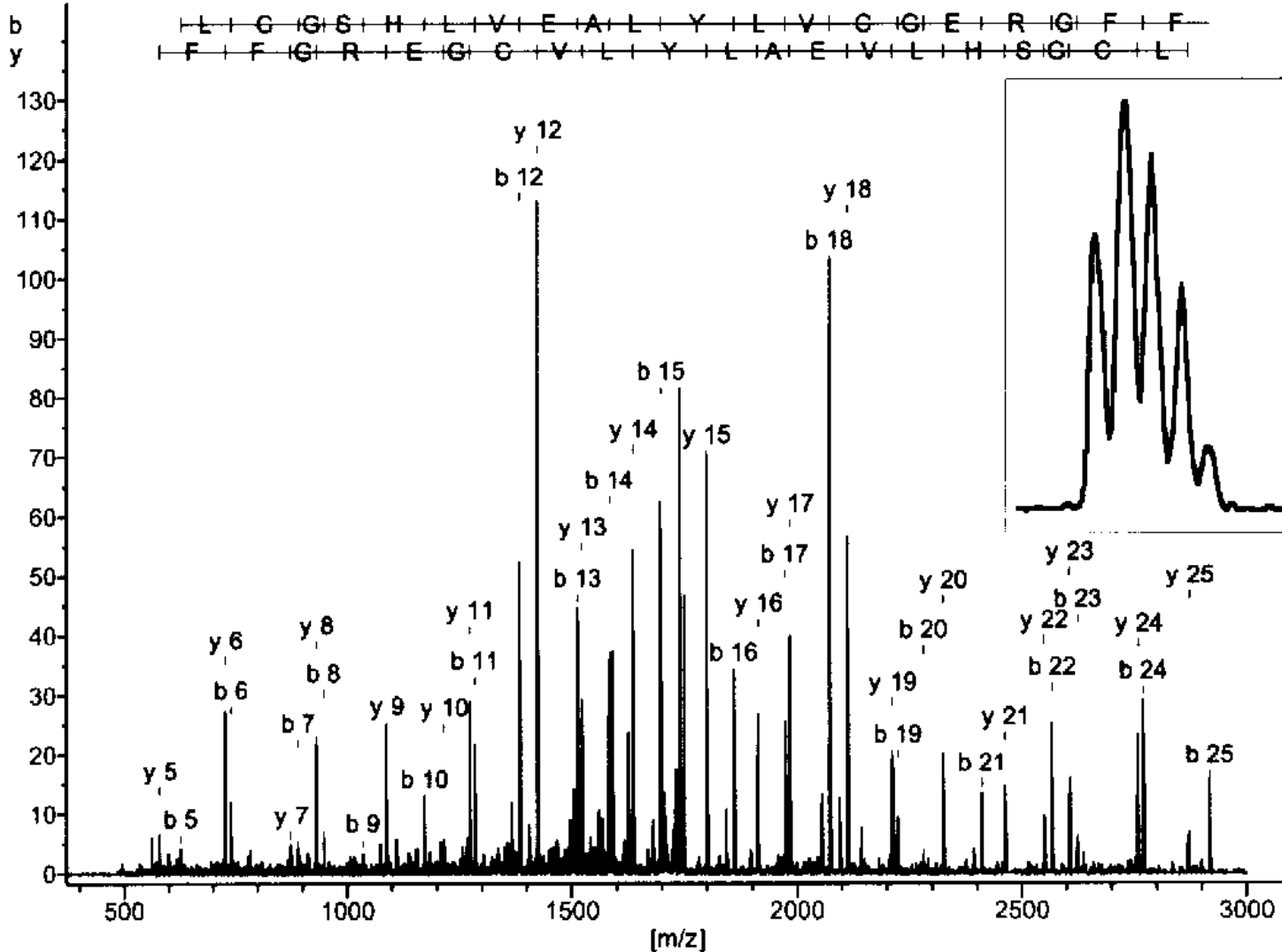
Ionty typu „b“ a „y“ jsou většinou nejintenzivnější ionty v ESI-MS/MS spektrech peptidů – podle nich můžeme určit sekvenci aminokyselin



ESI-MS/MS spektrum peptidu

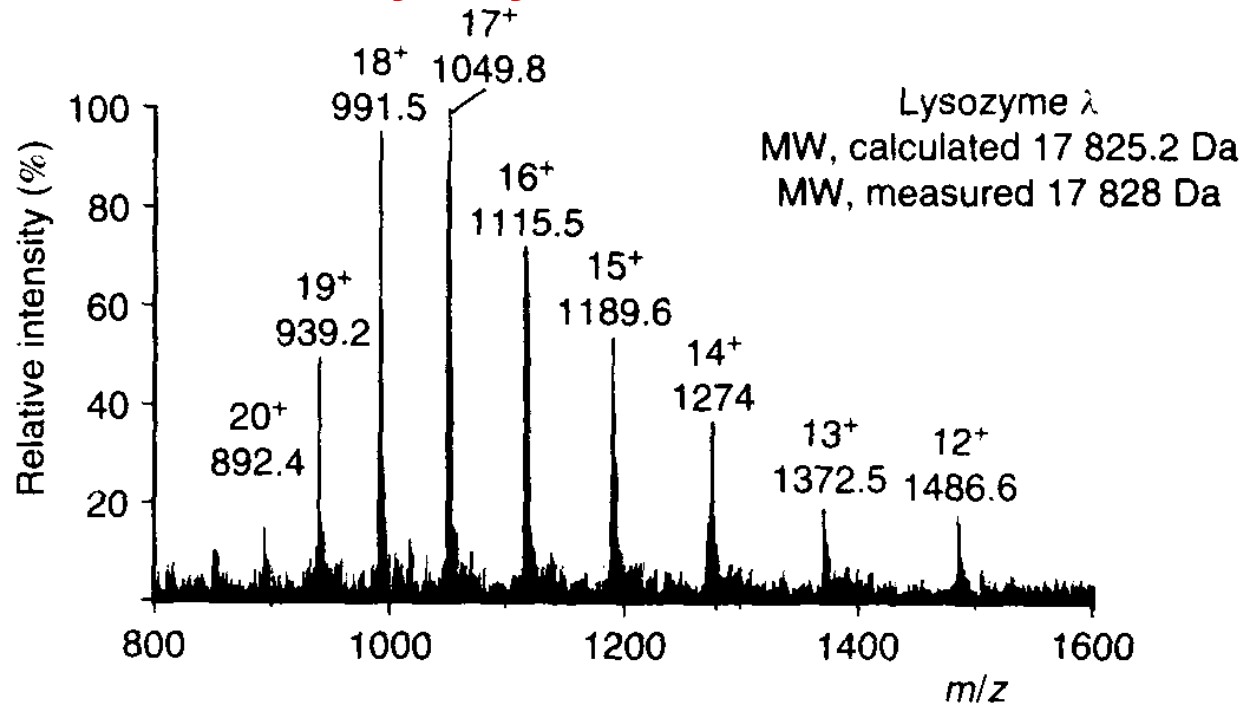
Série ionů typu „b“ a „y“

[Abs. Int. * 10³]



ESI analýza proteinů

Příklad lysozym s MW = 17825 Da



Příklad výpočtu MW a počtu nábojů (řešení 2 rovnic o 2 neznámých)

Experimentálně určeno m/z dvou iontů A (1049.8) a B (991.5)

$$A = 1049.8 = (MW + z) / z$$

$$B = 991.5 = (MW + z + 1) / (z + 1)$$

- řešením vyjde $z = 16.99 = 17$ (náboj musí být celočíselná hodnota)

- nyní přiřazení náboje všech iontů a výpočet MW z identifikovaných iontů, např.:

$$A: MW = 1049.8 * 17 - 17 = 17829.6$$

$$B: MW = 991.5 * 18 - 18 = 17829.0, \text{ atd.}$$

- pak zprůměrování a výpočet MW (tzv. **dekonvoluce**), vše automaticky softwarově

HPLC/MS analýza proteinů (zjištění koeluce píků dekonvolucí)

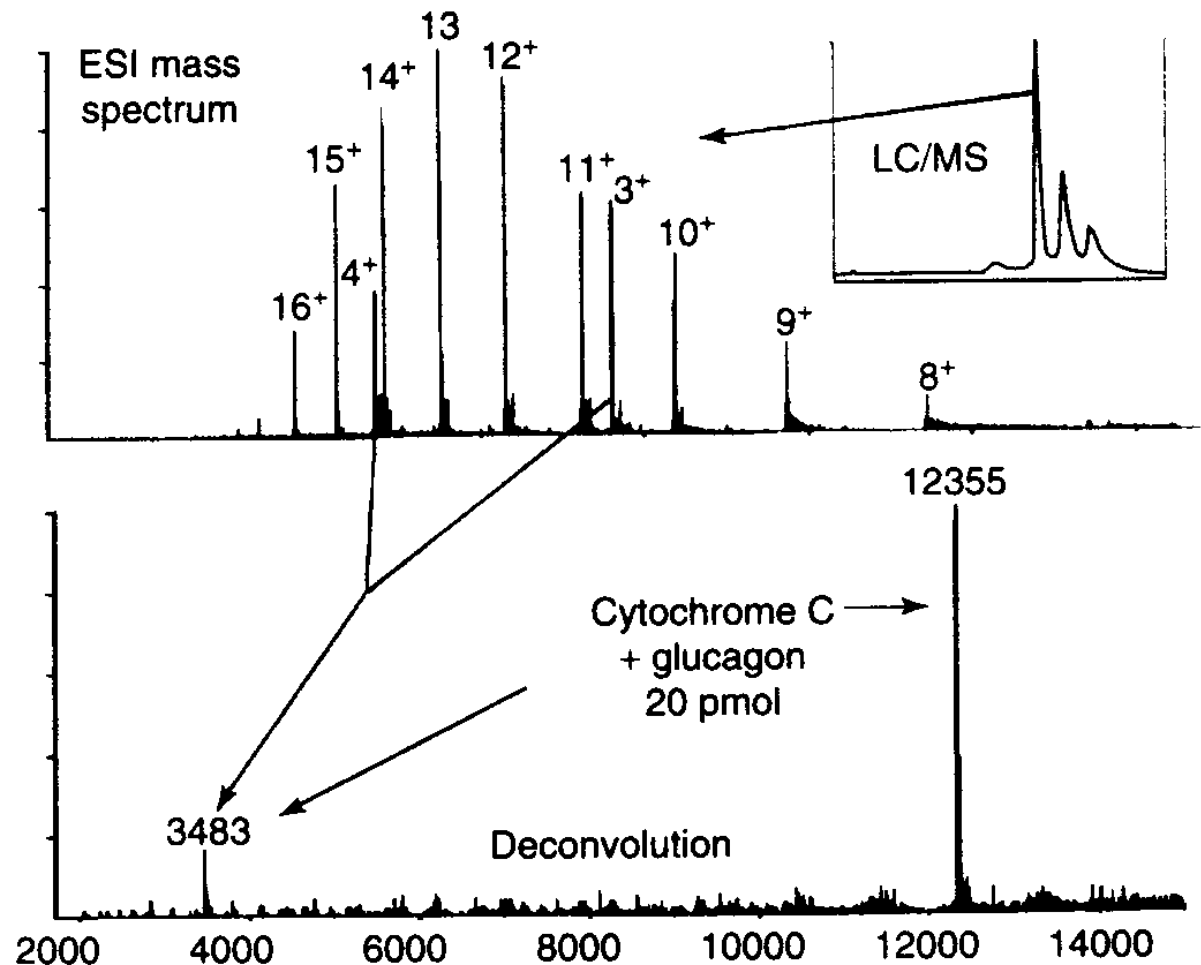
Určení M_R proteinů:

- řešení dvou rovnic o dvou neznámých:
 $(m/z)_1 = (M_R + z) / z$
 $(m/z)_2 = (M_R + z + 1) / (z + 1)$

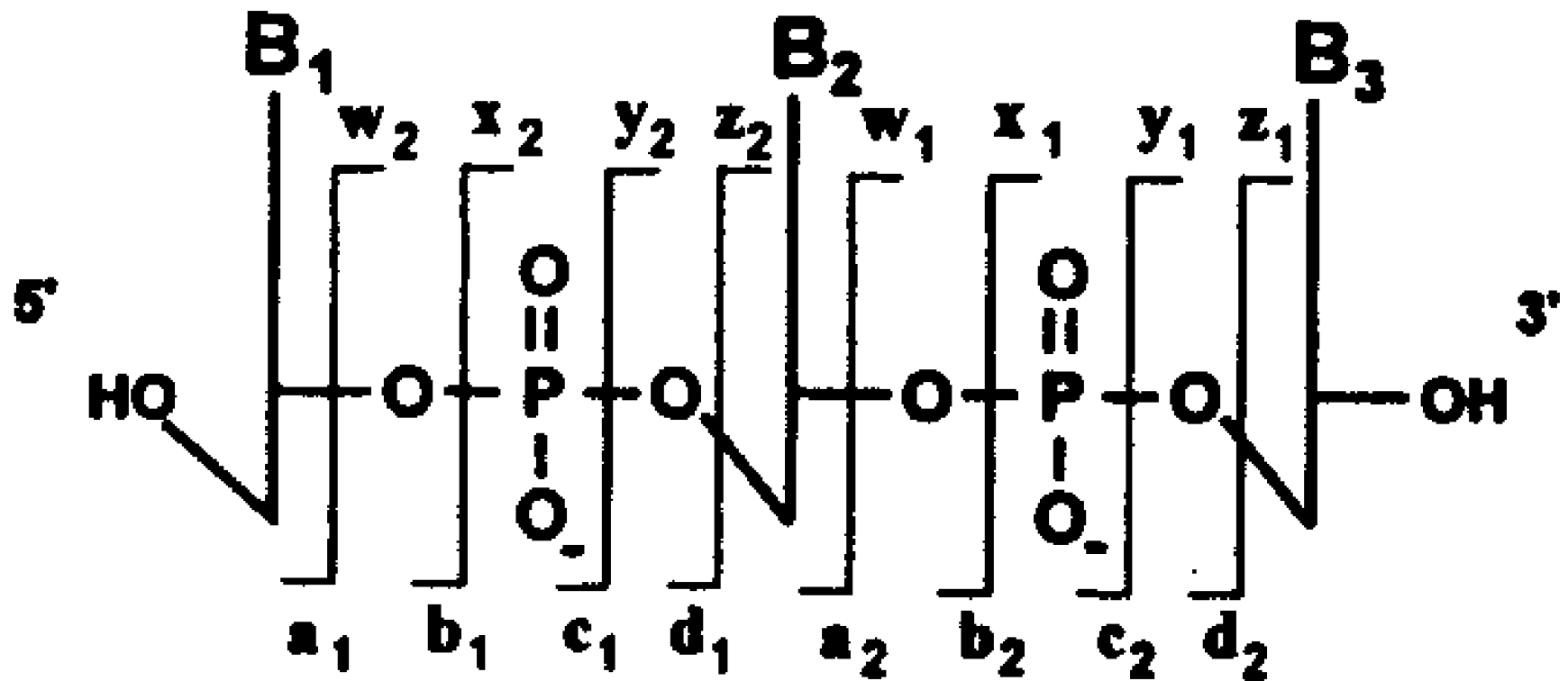
- $(m/z)_1$ a $(m/z)_2$ jsou exp. hodnoty, řešením rovnic nejdříve určíme náboj z , pak dopočteme M_R

- v praxi automaticky softwarově (dekonvoluce)

Ionty typu $[M+xH]^{x+}$



Nomenklatura fragmentace nukleotidů



HPLC/APCI-MS analýza syntetických polymerů

Ethoxylované alkoholy C12, C14, C16 a C18

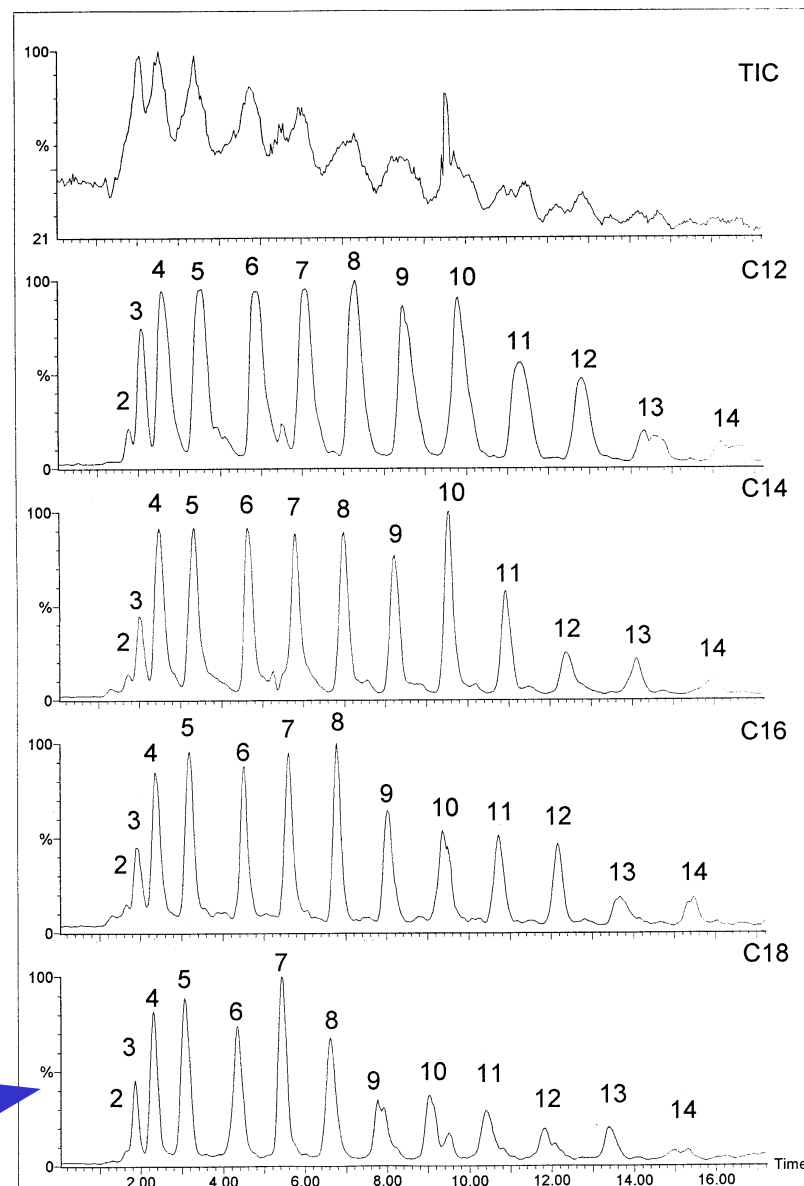
HPLC – gradientová eluce v systémech s obrácenými i normálními fázemi

APCI kladných iontů – pouze $[M+H]^+$ ionty a méně intenzivní $[M+Na]^+$ a $[M+K]^+$, fragmentové ionty chybí (platí pro řadu syntetických polymerů, např. PEG, PPG, kopolymery EO a PO, atd.)

ESI kladných iontů – spíše $[M+Na]^+$ nebo $[M+K]^+$; $[M+H]^+$ může chybět, fragmenty nejsou

MS/MS nebo in-source CID MS – fragmenty lišící se počtem ztrát ethoxyskupin (diference 44)

RIC zvolených $[M+H]^+$ při APCI



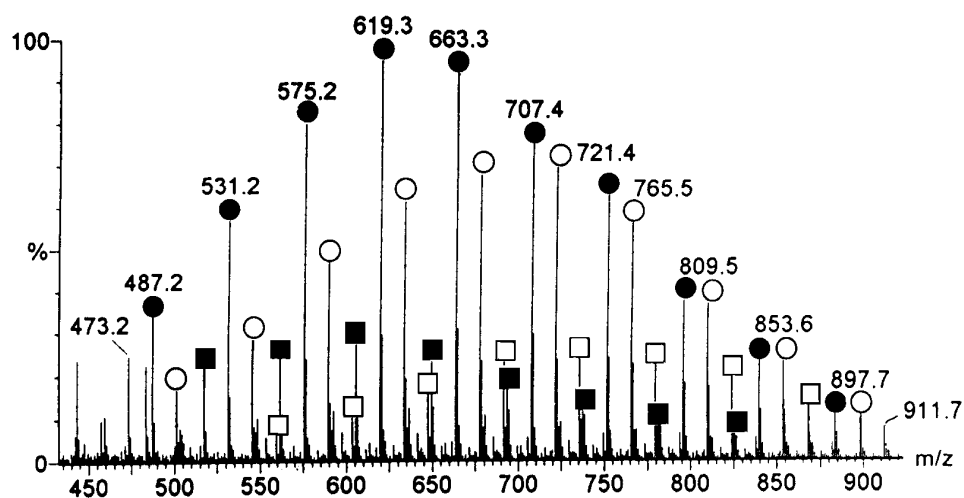
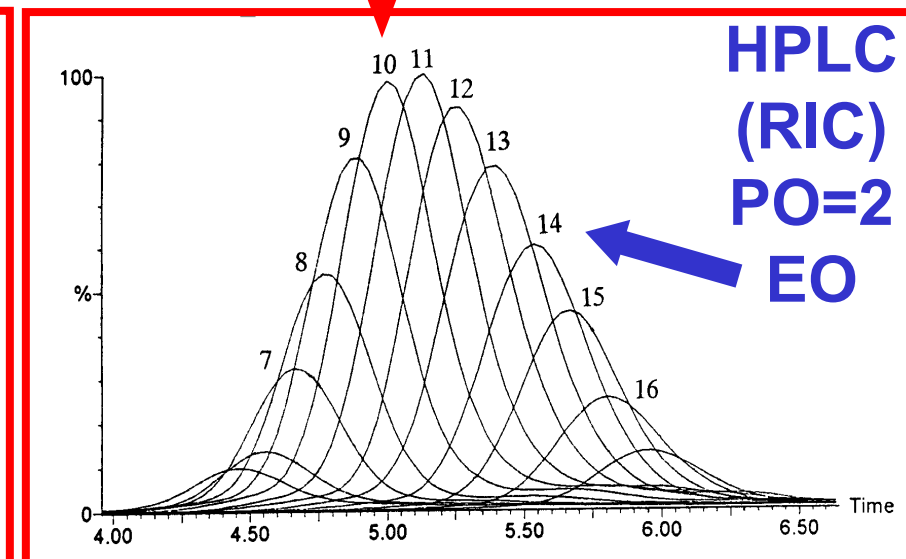
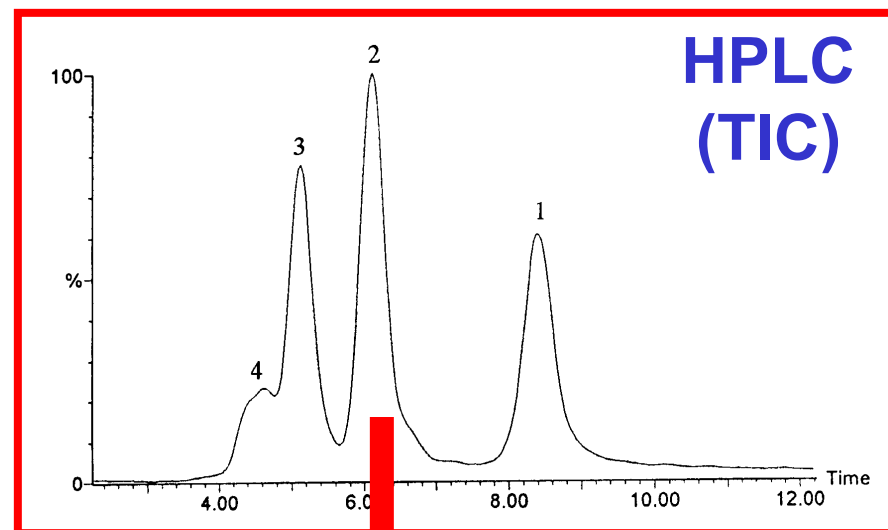
HPLC/APCI-MS analýza syntetických polymerů

Kopolymery oxyethylenu (EO) a oxypropylenu (PO)

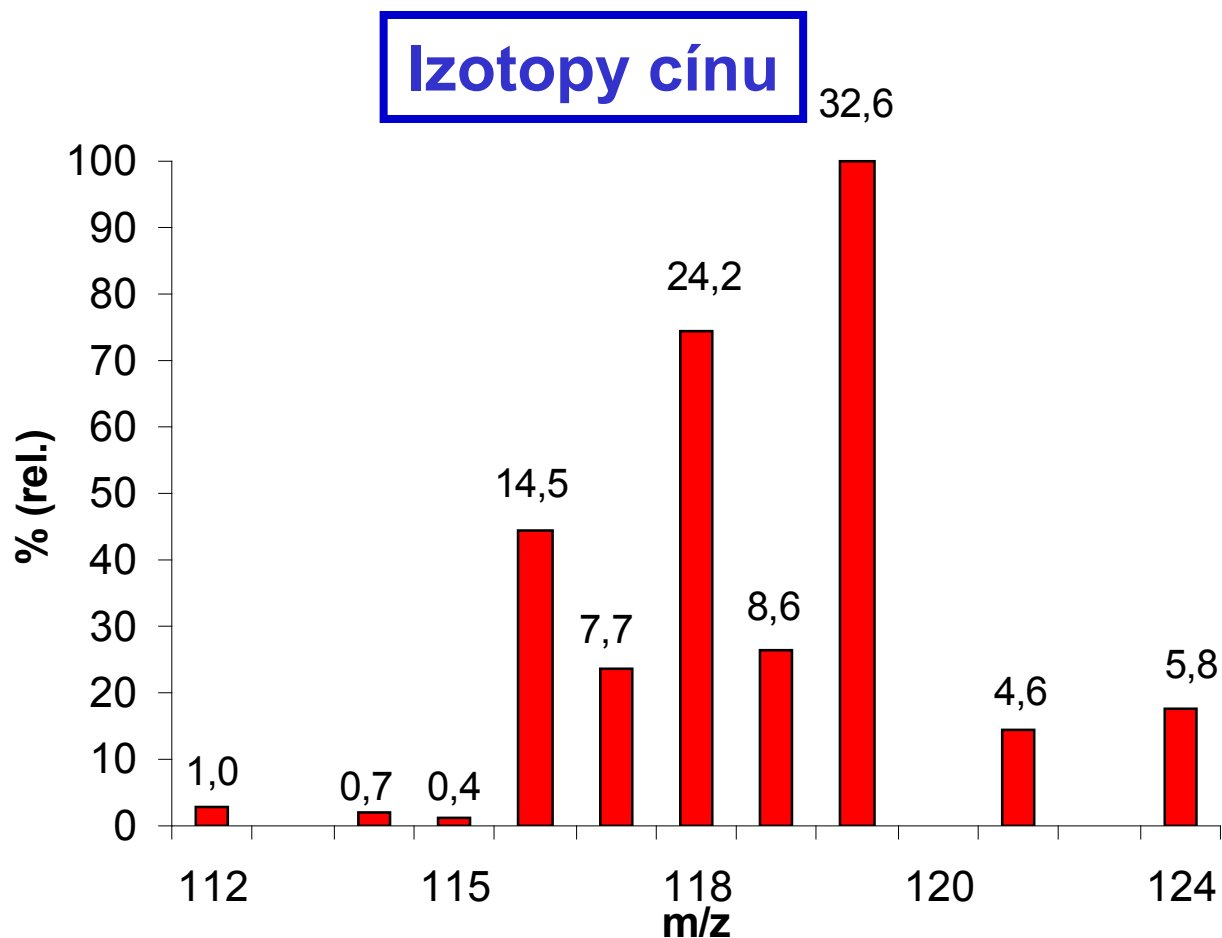
typ $(PO)_{y_1}(EO)_x(PO)_{y_2}$ (Novanik)

typ $(EO)_{x_1}(PO)_y(EO)_{x_2}$ (Slovanik)

APCI-MS kopolymeru bez HPLC



Strukturní analýza organocínitých sloučenin (organokovových)

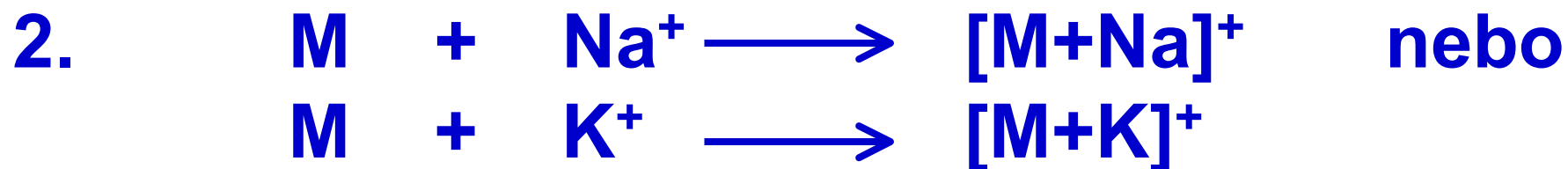


- kovy mají často charakteristické izotopické distribuce = pomůcka při interpretaci

Základní mechanismy vzniku iontů organocíničtých sloučenin



- hlavní mechanismus pozorovaný pro velkou většinu sloučenin
- nejlabilnější vazba Sn – X nebo Sn – O se štěpí nejdříve

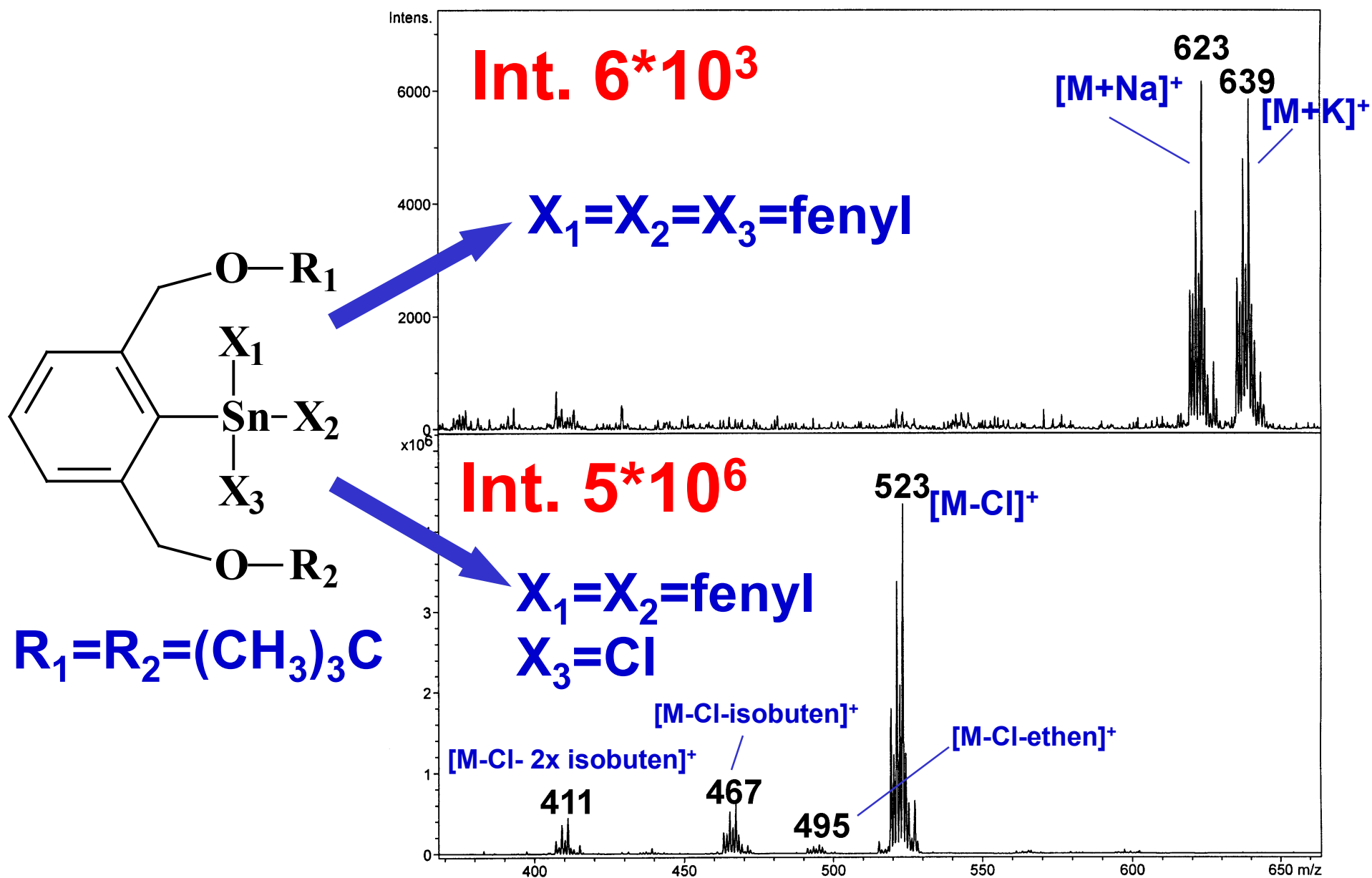


- méně důležité, objevuje se zejména v případě absence labilní Sn – X vazby
- závisí na koncentraci solí v roztoku, nižší intenzity oproti prvnímu mechanismu

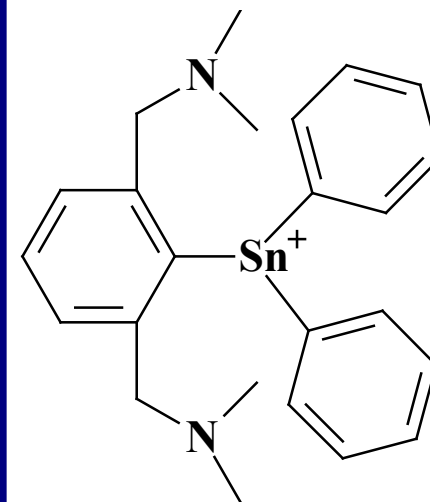
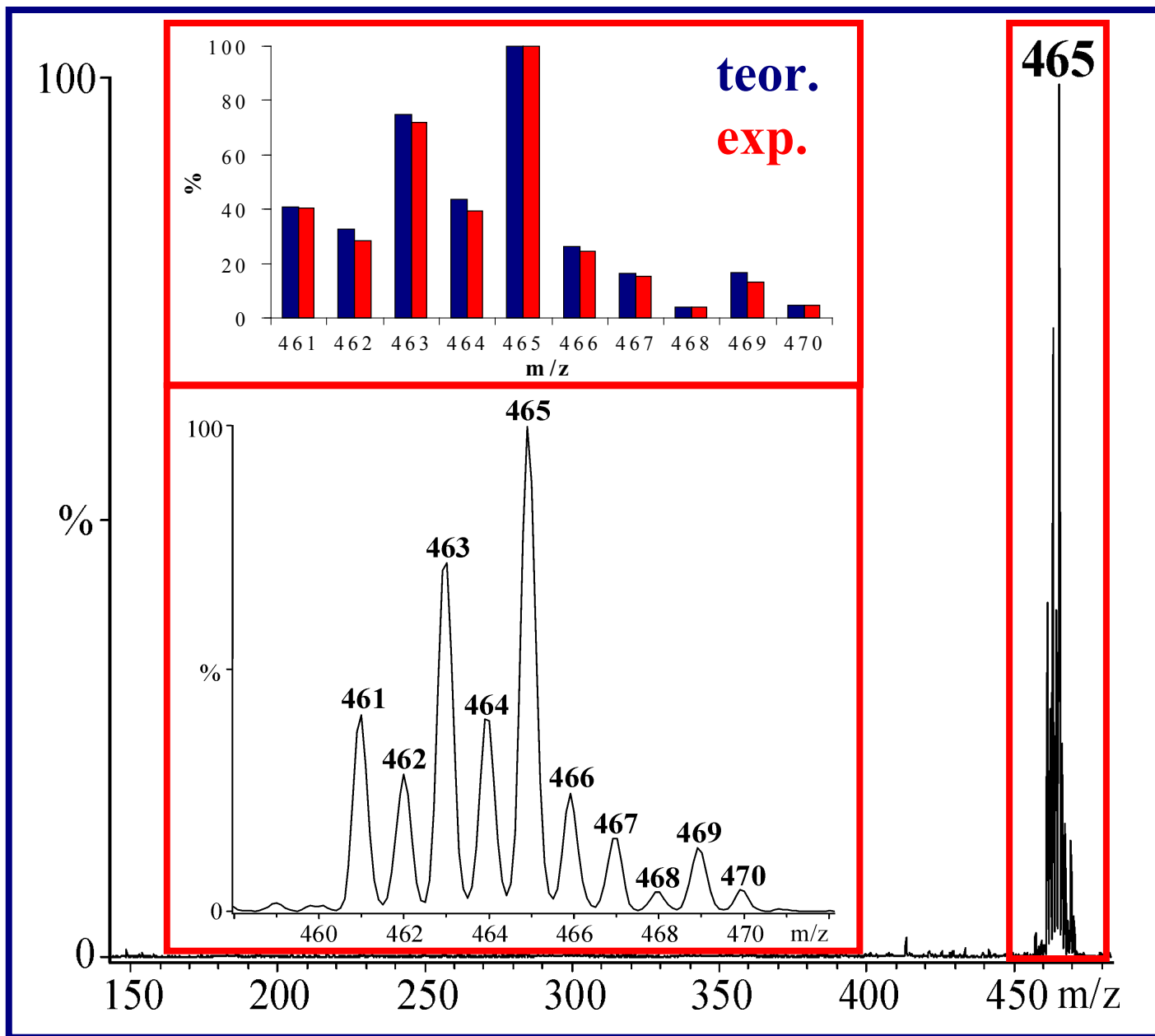


- na rozdíl od „běžných“ organických sloučenin je pozorováno vzácně a s velmi nízkou intenzitou

Příklad základních mechanismů vzniku iontů



ESI-MS kladných iontů



m/z 465

[C₂₄H₂₉N₂Sn]⁺

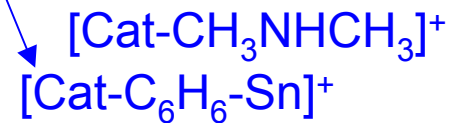
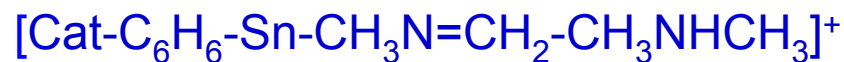
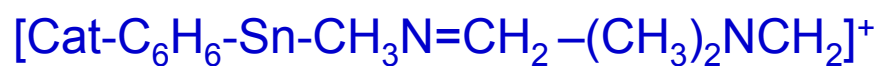
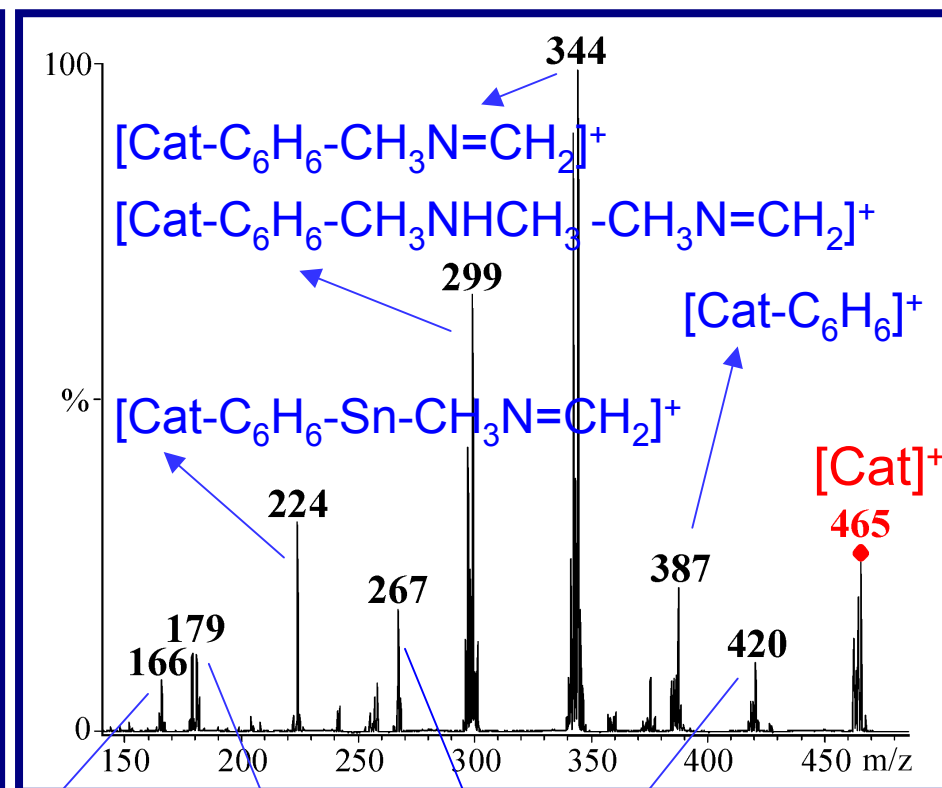
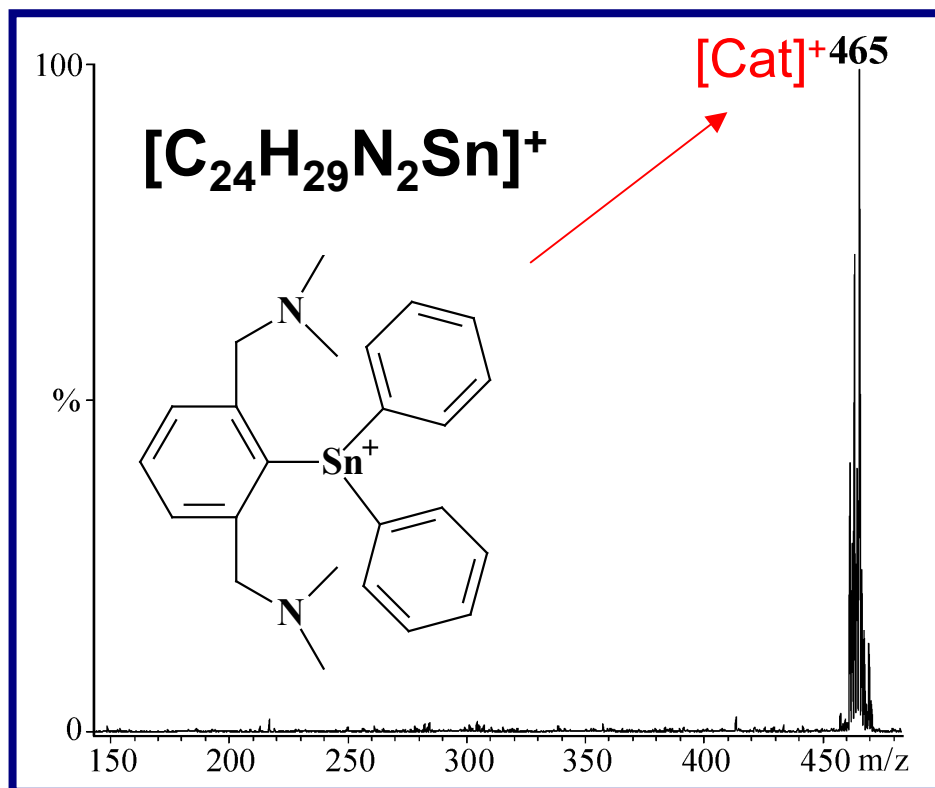
≡

[Cat]⁺

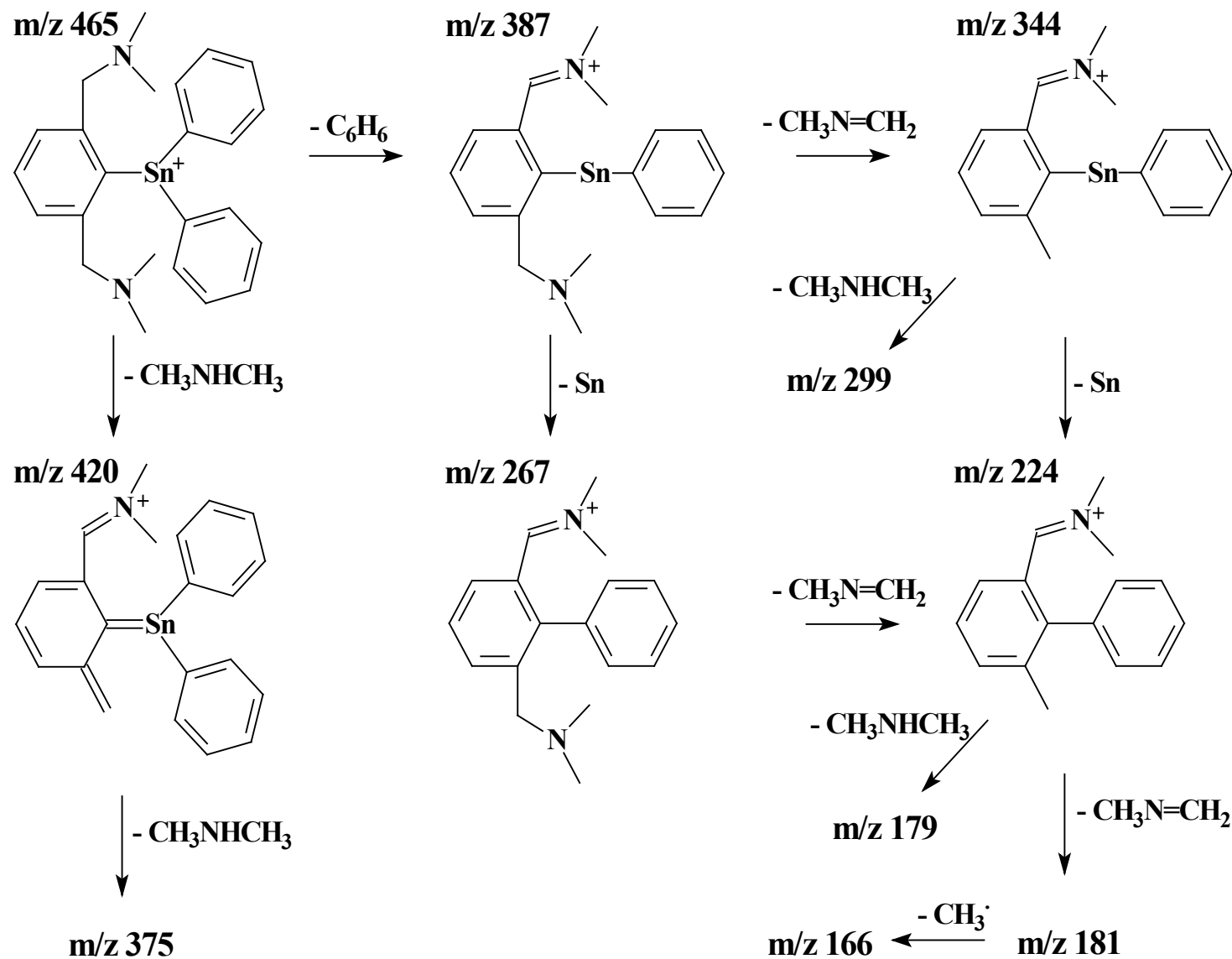
ESI-MS/MS kladných iontů

MS

MS² m/z 465

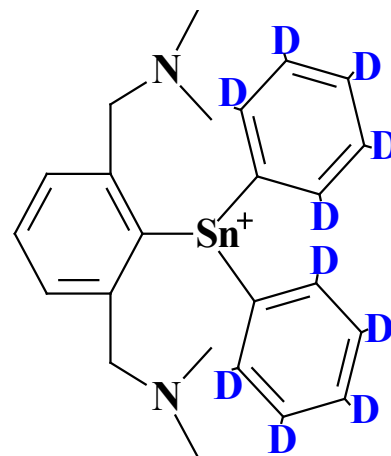
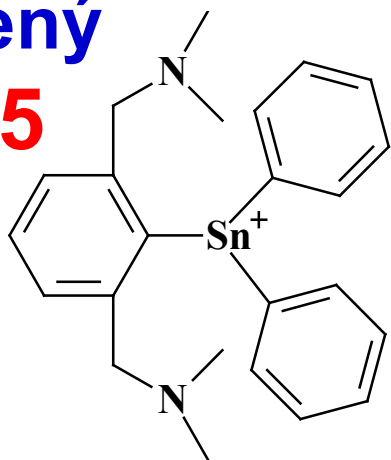


Fragmentační schéma kationické části



Potvrzení návrhů fragmentace deuterovanými standardy

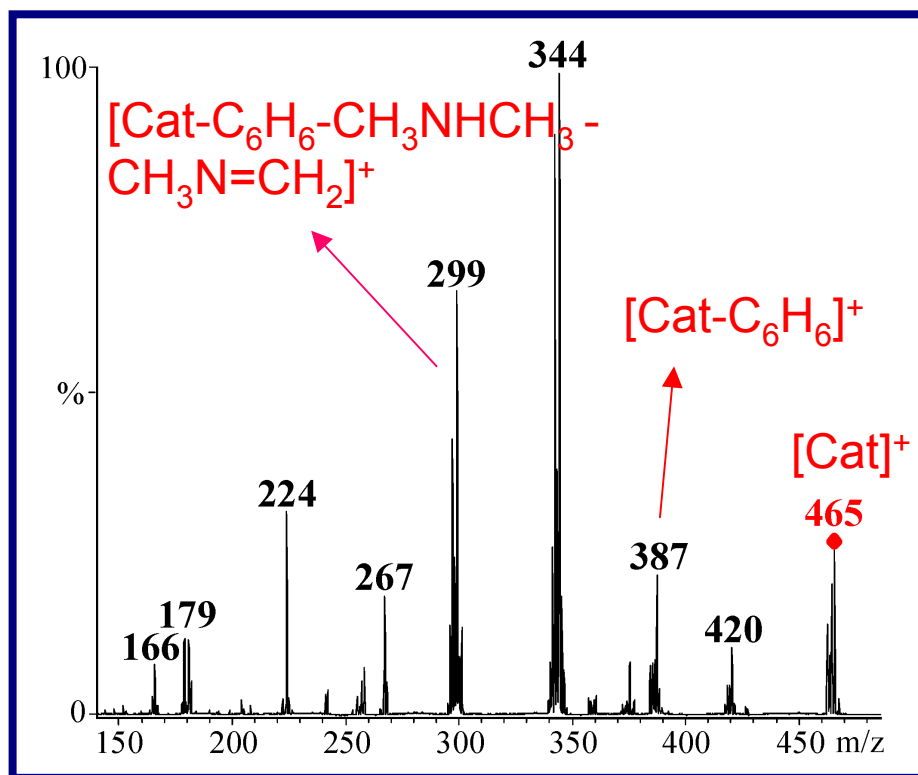
neznačený
m/z 465



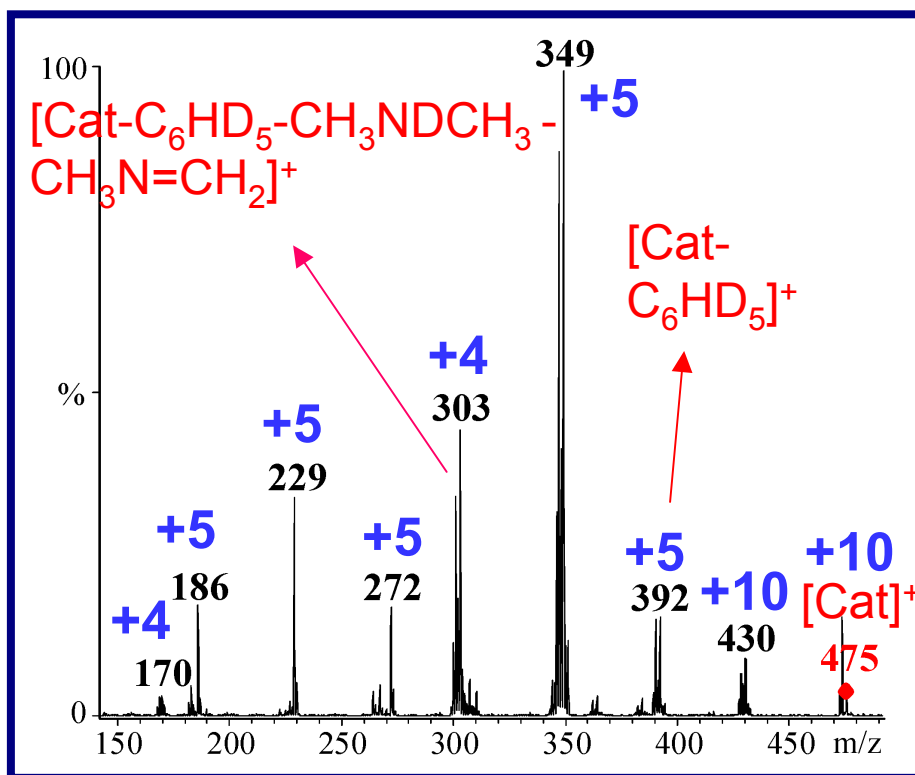
značený
m/z 475

+10

MS² m/z 465



MS² m/z 475



Absence iontů (de)protonované molekuly v ESI/APCI spektrech

a/ Alifatické polynitráty používané jako výbušniny (estery kyseliny dusičné, RONO_2)

b/ (Poly)sulfatované sloučeniny (estery kyseliny sírové, ROSO_3H)

c/ Některé organokovové sloučeniny

...

Analýza alifatických nitrátů (výbušniny)

- bez aditiv v mobilní fázi obvykle absence kvazimolekulárních iontů, pozorovány buď strukturně bezcenné fragmenty (např. NO_2 , NO_3) nebo obtížně interpretovatelné adukty

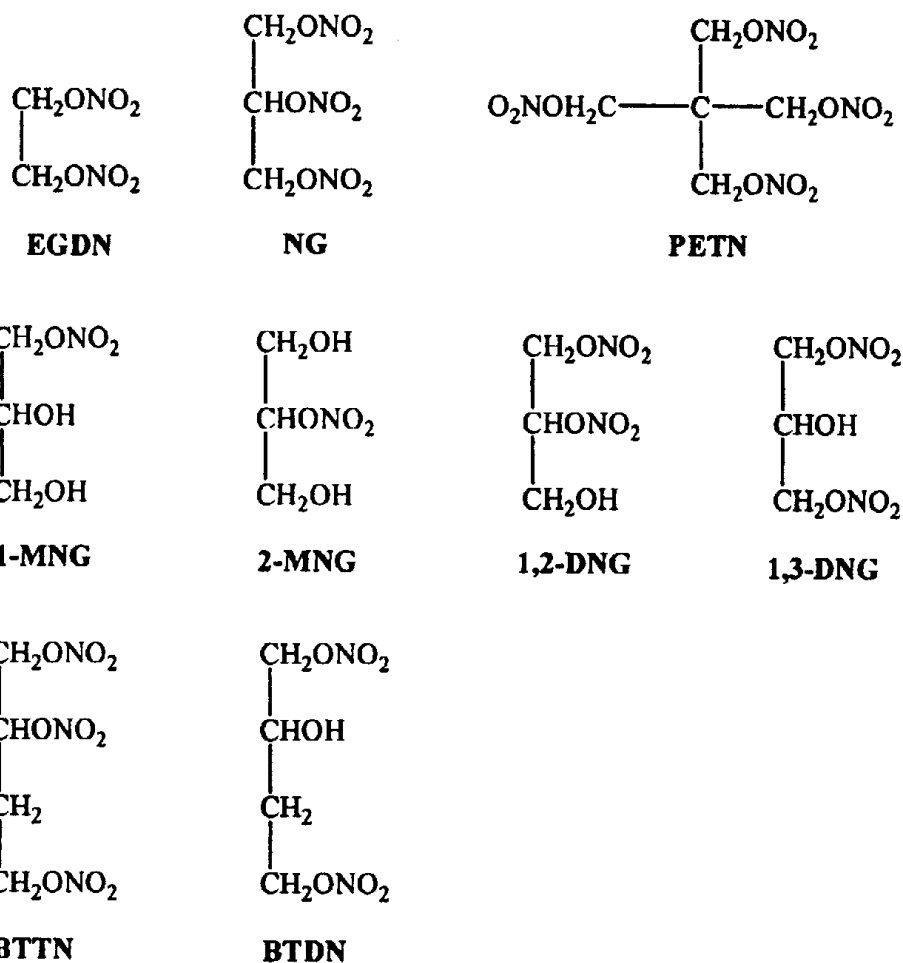


Fig. 1. Chemical structures of investigated nitrate esters.

- přídavek CCl_4 (nebo halogenidu či octanu) do MF – preferenční a velmi charakteristická tvorba aduktů, např. $[\text{M} + \text{Cl}]^+$

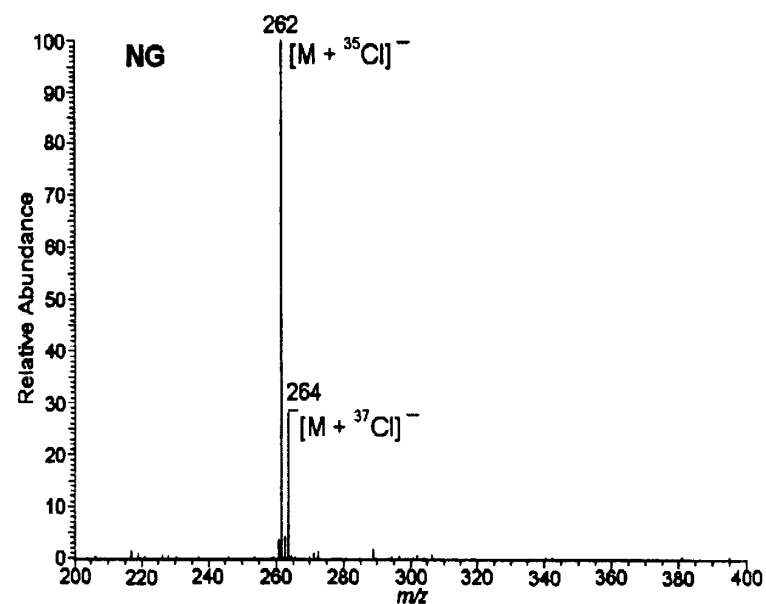


Fig. 4. Negative-ion APCI mass spectrum of NG with carbon tetrachloride additive.

Přítomnost iontů s lichým počtem elektronů v ESI/APCI spektrech

- pro tvorbu radikál-iontů je příznivý (poly)aromatický systém s možností delokalizace e^- nebo přítomnost kovového iontu s více oxidačními stavy

a/ Nitrované sloučeniny (záchyt e^- při záznamu záporných iontů)

b/ Polyaromatické sloučeniny

c/ Některé organokovové sloučeniny (např. Fe^{3+}/Fe^{2+})

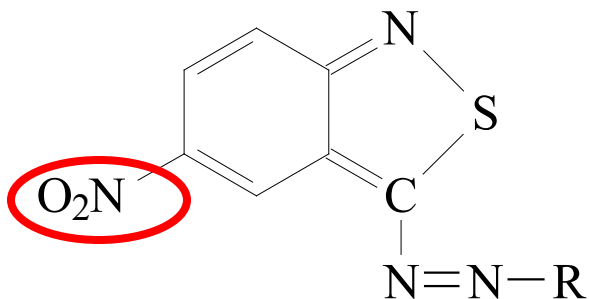
d/ Perhalogenované sloučeniny

e/ Některé fragmenty (zejména ztráta bočního řetězce z cyklického systému)

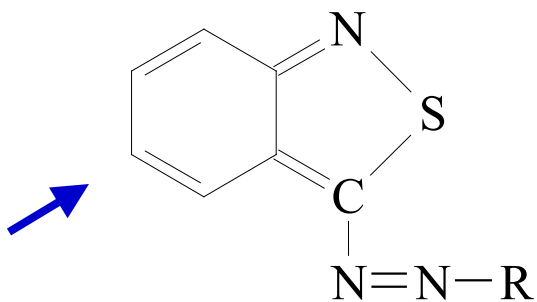
...

Vznik $M^{\cdot-}$ iontů záchytem e^- při APCI-

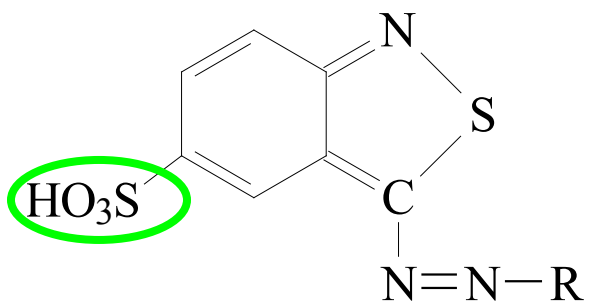
- závěry z měření série 13 součenin s různým typem R (alkyl, aryl)



- $M^{\cdot-}$ ion 100%, $[M-H]^-$ není pozorován



- ionty $M^{\cdot-}$ a $[M-H]^-$ jsou v poměru cca 1:1, pokles celkové intenzity



- ion $M^{\cdot-}$ zmizel, pozorován pouze $[M-H]^-$ ion, nárůst intenzity

Vliv složení mobilní fáze a konstrukce iontového zdroje na odezvu v API-MS

Volba rozpouštědel pro analýzu v API-MS

Vždy nejvyšší možná čistota rozpouštědel (pro HPLC nebo HPLC-gradient) i aditiv, redestilovanou vodu neskladovat (nejméně každý druhý den čistou, pokud není ve směsi s organickým rozpouštědlem), odvzdušnit, filtrace.

1/ Přímá infúze vzorku

- lze si zvolit nezávisle rozpouštědla podle rozpustnosti a maximální odezvy v ESI nebo APCI
- větší riziko matričních efektů a potlačení odezvy („ion-suppresion“)

2/ HPLC/MS

- podmínky jsou diktovány požadavky chromatografie
- v případě nutnosti lze použít postkolonový přídavek vhodného eluentu či aditiva T-kusem pro zlepšení odezvy (příspěvek k mrtvému objemu systému = může mít vliv na rozlišení)

Volba rozpouštědel: 1/ přímá infúze vzorku

„Standardní podmínky“

- pokud není problém s rozpustností, tak volíme přibližně 50 – 100% methanolu nebo acetonitrilu s vodou
- více než 90% aplikací

Problémy s rozpustností

- v závislosti na polaritě a MW volíme rozpouštědlo:
- (100% voda), aceton, 2-propanol, směs s nepolárními rozpouštědly (např. hexan, heptan, benzen, toluen, chlorovaná rozpouštědla), dioxan, dimethylsulfoxid (DMSO), dimethylformamid (DMFA)
- pokud lze nalézt jiné řešení, snažit se vyhnout aromatickým a halogenovaným rozpouštědlům a zejména DMSO a DMFA
- v principu lze měřit i v 100% DMFA či DMSO (doporučuji opatrnost, nepoužívat dlouho a raději naředit s méně agresivním rozpouštědlem)

Problémy se stabilitou

- bezvodé prostředí kvůli hydrolýze, bez alkoholu kvůli reesterifikaci
- v mezních případech lze měřit v atmosféře pod dusíkem či argonem

Volba rozpouštědel: 2/ HPLC/MS

RP-HPLC (systémy s obrácenými fázemi)

- nejběžnější, obvykle vodný methanol nebo acetonitril (ideální pro API-MS), lze i ethanol, 2-propanol, atd.
- nejlepší odezva obvykle při vysoké koncentraci organického rozpouštědla cca 70 – 90% (nemusí platit univerzálně)
- při vysokém až 100% obsahu vody zvýšit průtok a teplotu sušícího a zmlžujícího plynu (nižší citlivost)
- 100% acetonitril při APCI vyžaduje častější čištění výbojové elektrody (tvorba grafického uhlíku na elektrodě)

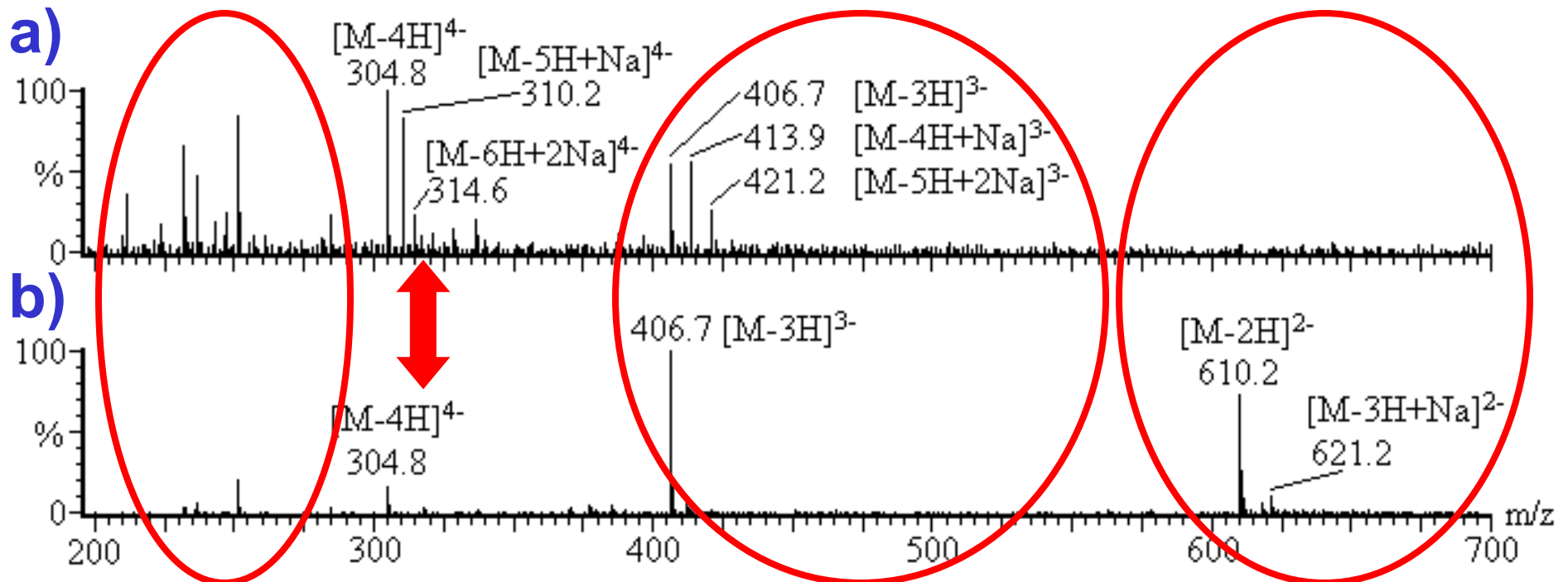
NP-HPLC (systémy s normálními fázemi)

- většinou špatně kompatibilní s ESI, lepší kompatibilita s APCI
- v mobilní fázi musí být určitý obsah (>5%) proton-donorního rozpouštědla, např. 2-propanol; ve 100% hexanu nelze signál získat
- snaha vyhnout se halogenovaným rozpouštědlům (CH_2Cl_2 , CH_3Cl , CCl_4) kvůli zvýšené kontaminaci a zhoršení stability signálu
- u NP-HPLC může být užitečný přídavek vhodného eluentu (např. 2-propanol, popř. s kyselinou octovou či mravenčí) za kolonou T-kusem

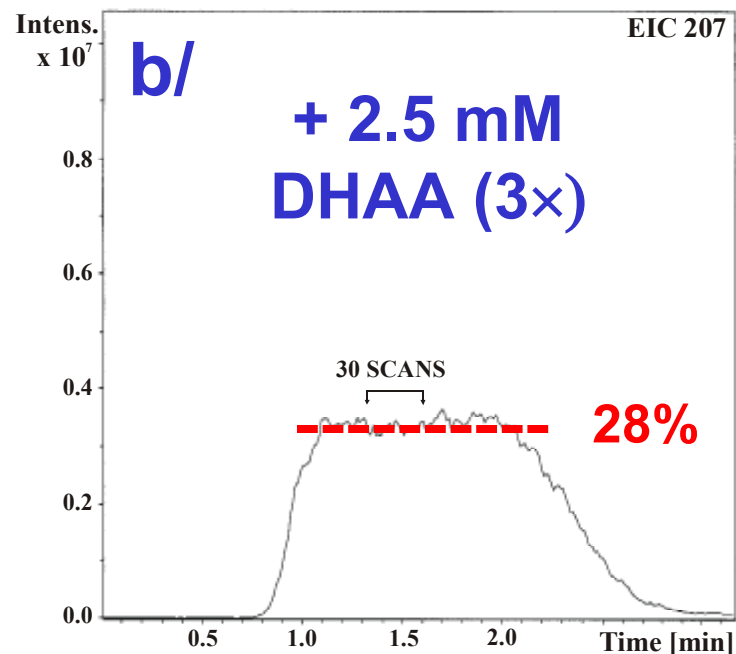
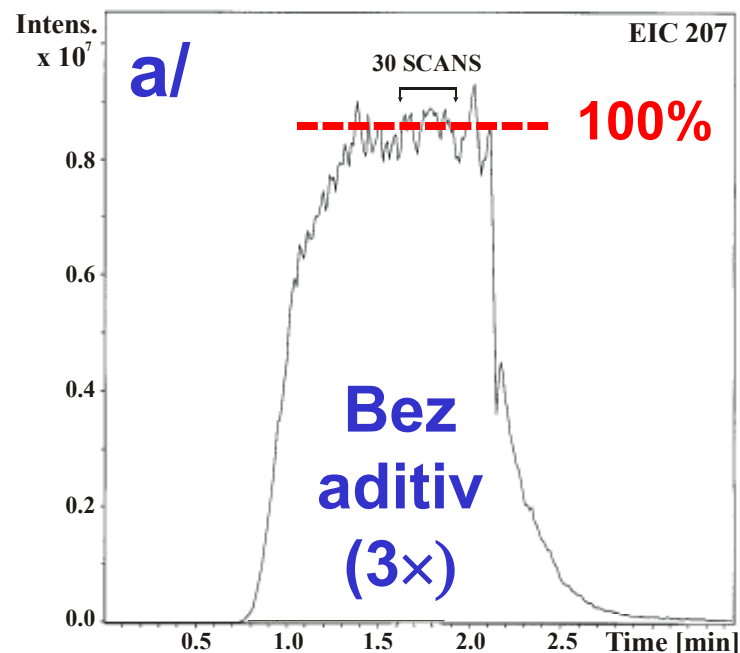
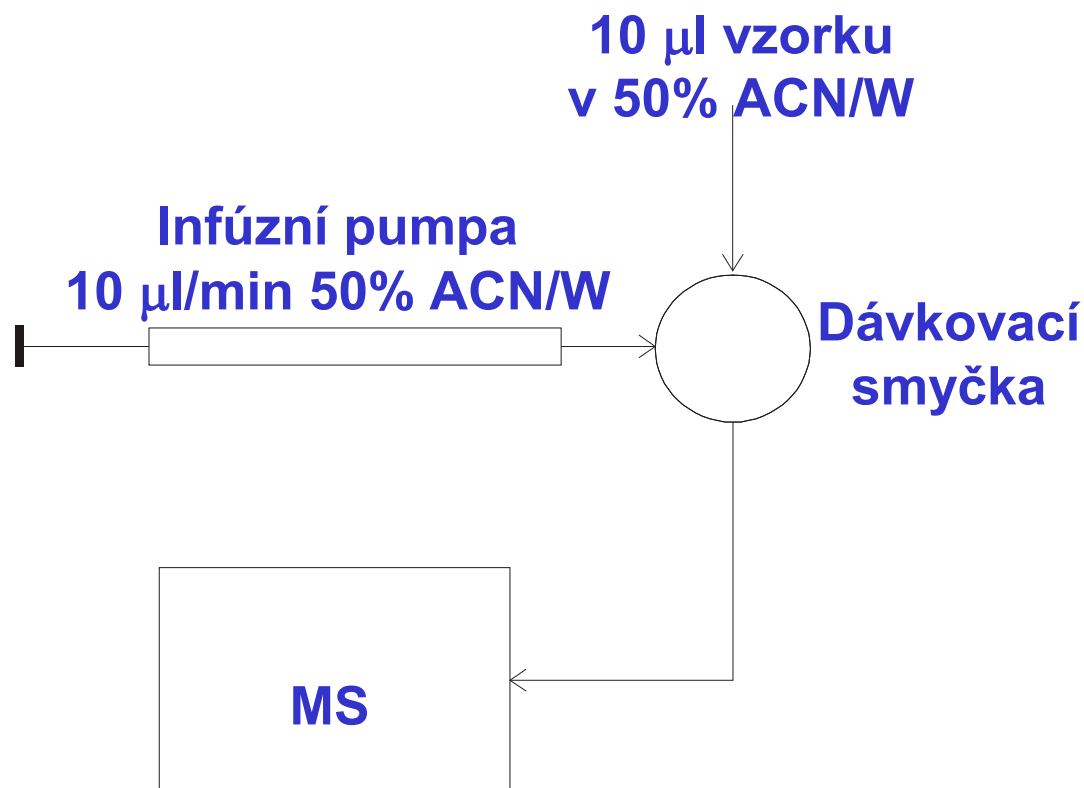
Porovnání ESI-MS spekter měřených:

- a) přímou infúzí vzorku** - ionty nečistot (zejména nízké m/z), vysoká intenzita aduktových sodných iontů kvůli zasolení vzorku
- b) HPLC/MS** - minimální intenzita aduktových sodných iontů (soli eluují v mrtvém objemu systému), posun distribuce $[M-xH]^x-$ k nižším nábojům v důsledku tvorby aduktů s ion-párovým činidlem v mobilní fázi

Vzorek: tetrasulfonované azobarvivo, $M_R = 1222$ Da



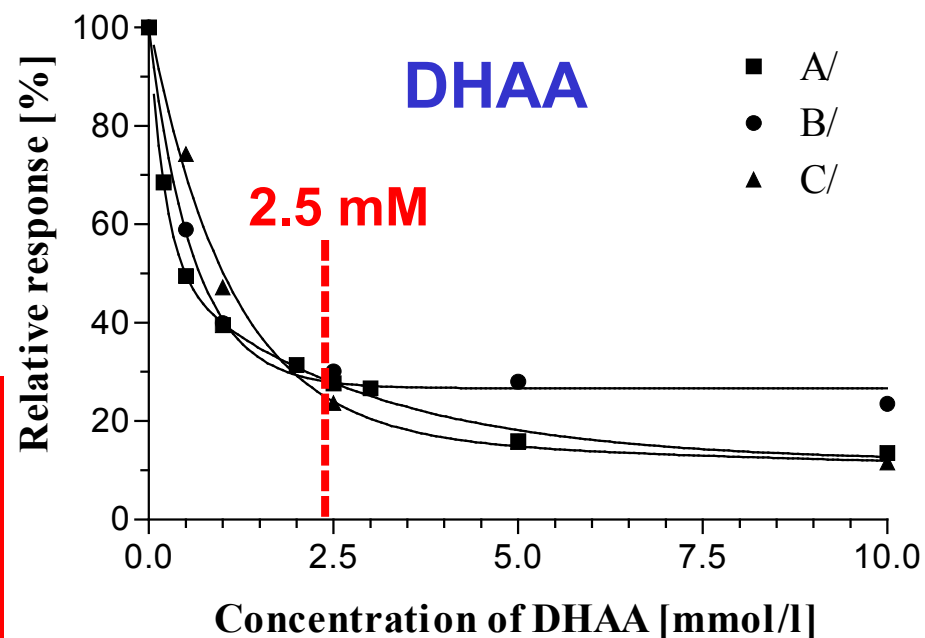
Metodika měření vlivu aditiv na ESI odezvu



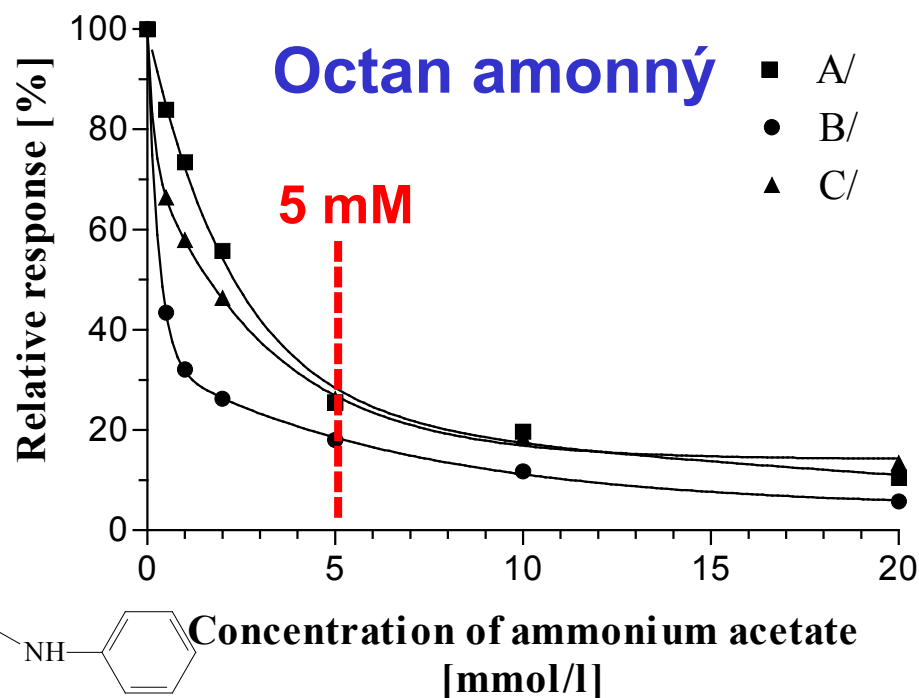
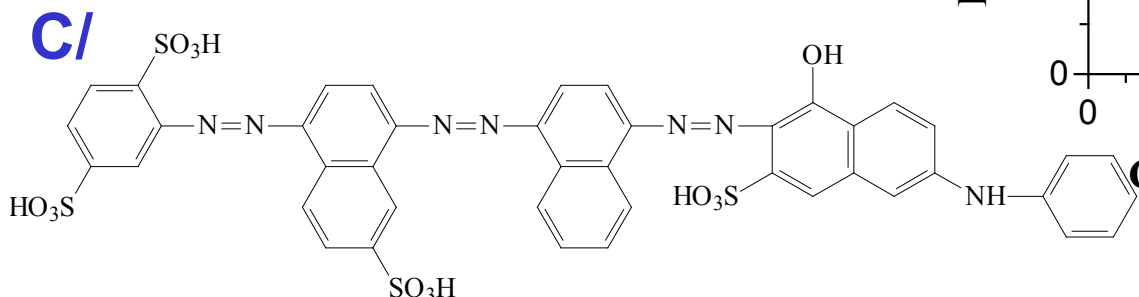
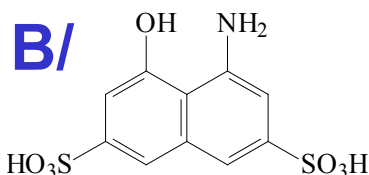
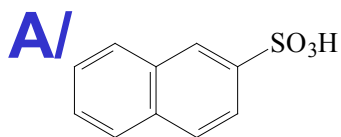
- 1) Pokles odezvy odpovídá výhradně přidanému ion-párovému činidlu.
- 2) Metoda je robustní a spolehlivá.
- 3) Minimální kontaminace systému.
- 4) Porovnání různých přístrojů a geometrií.

Vliv koncentrace aditiv na ESI odezvu

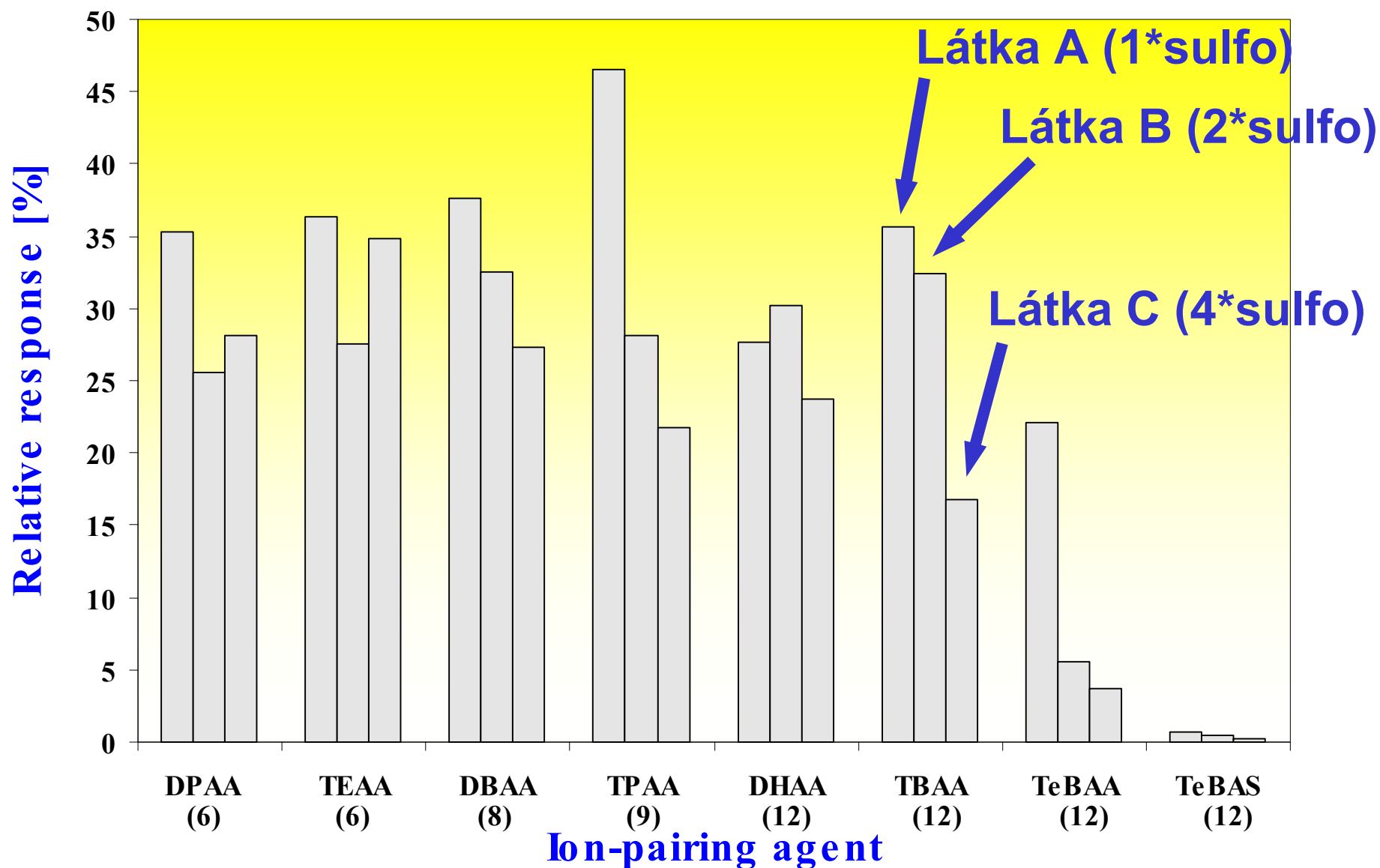
Pokles na 20-30% odezvy při nejnižší chromatograficky použitelné koncentraci!



Testovací látky:



Relativní odezvy sulfonových kyselin (+ 2.5 mM alkylamonium acetátů)



Typy geometrií iontového zdroje

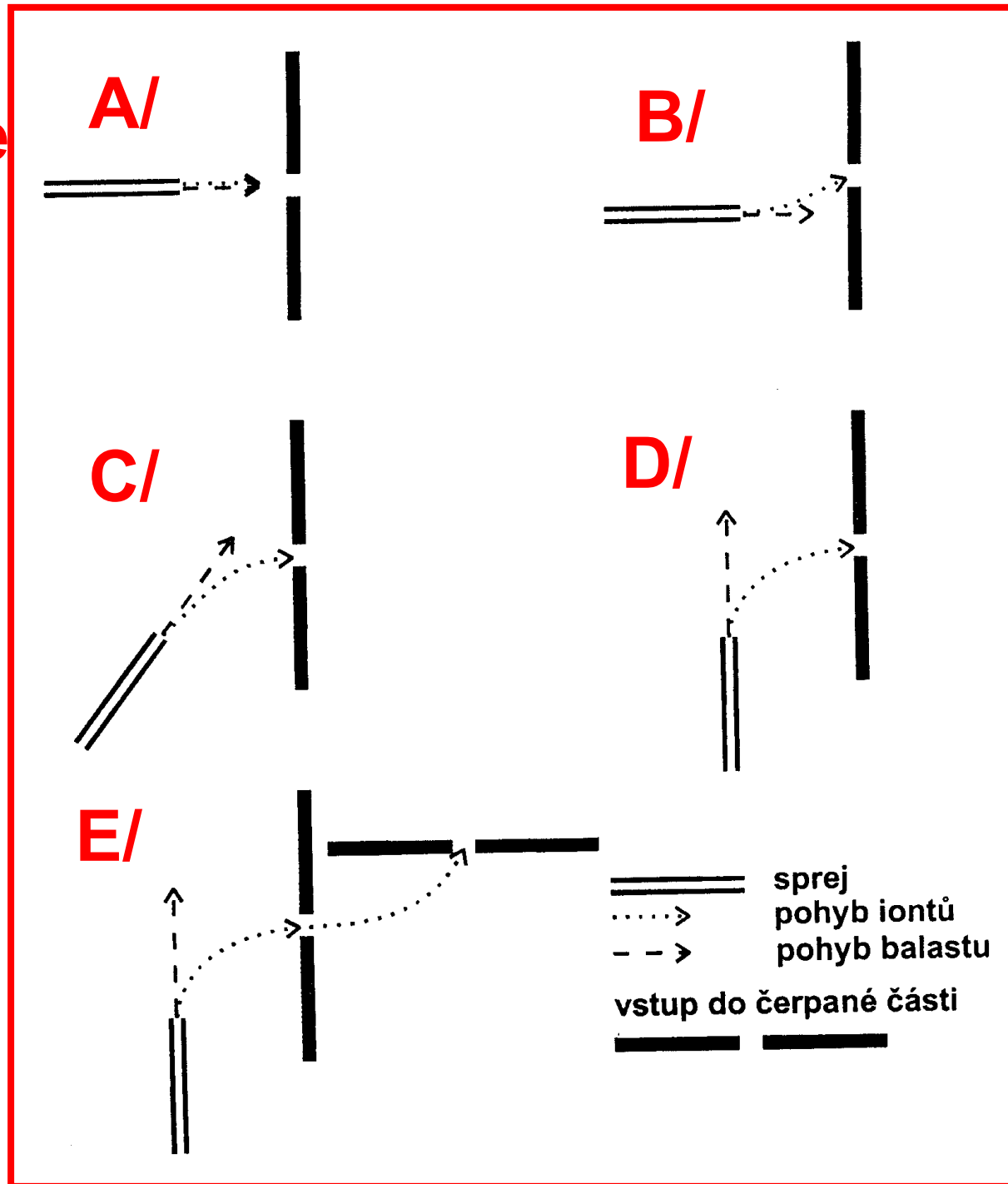
A/ lineární

B/ lineární mimo osu

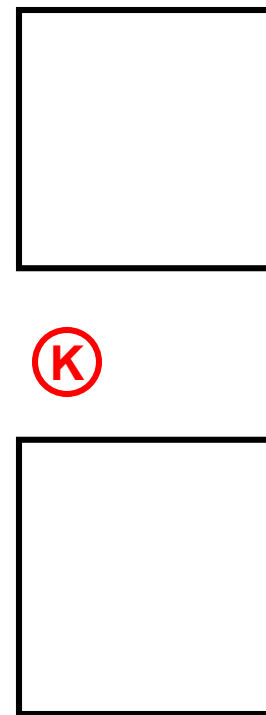
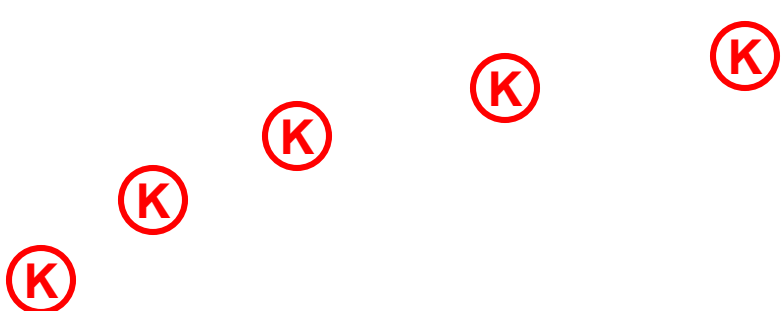
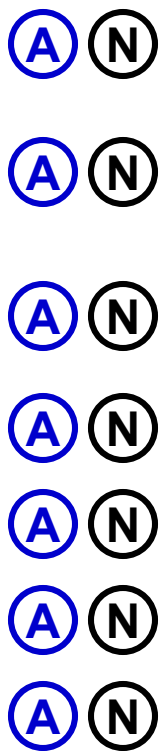
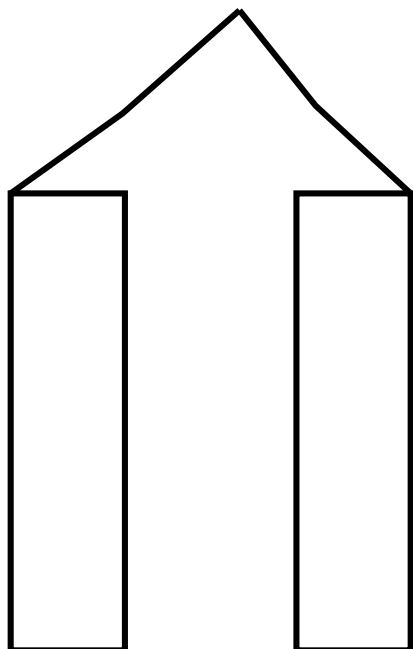
C/ úhel 45 stupňů

D/ úhel 90 stupňů
(orthogonální)

E/ dvakrát zalomení 90
stupňů (Z-sprej)



ESI



MS

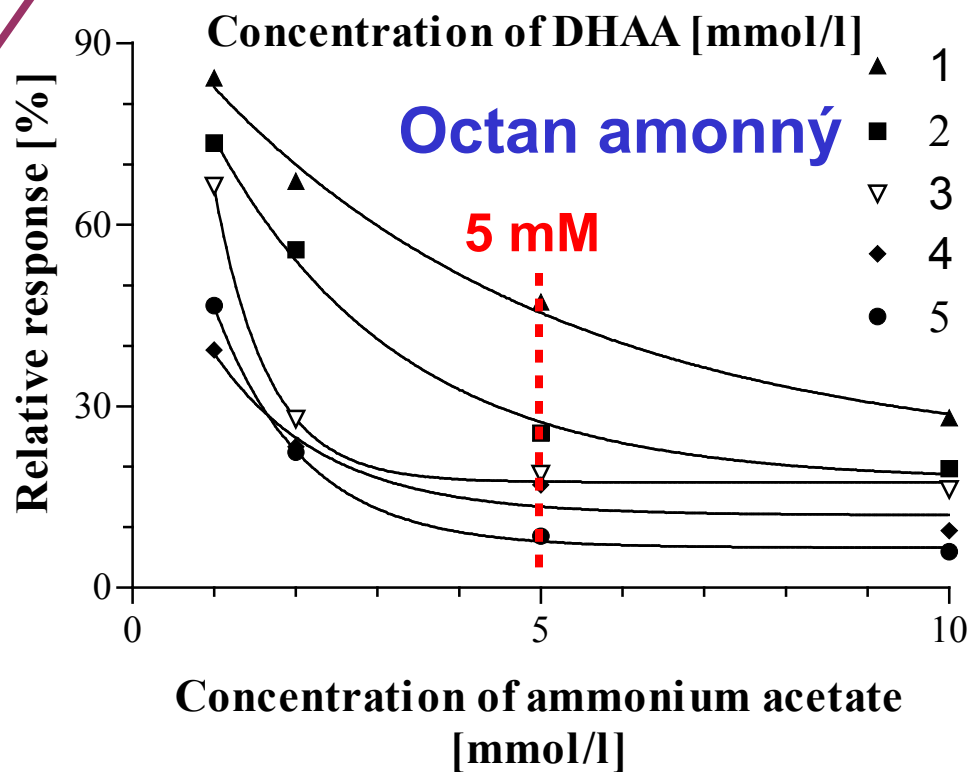
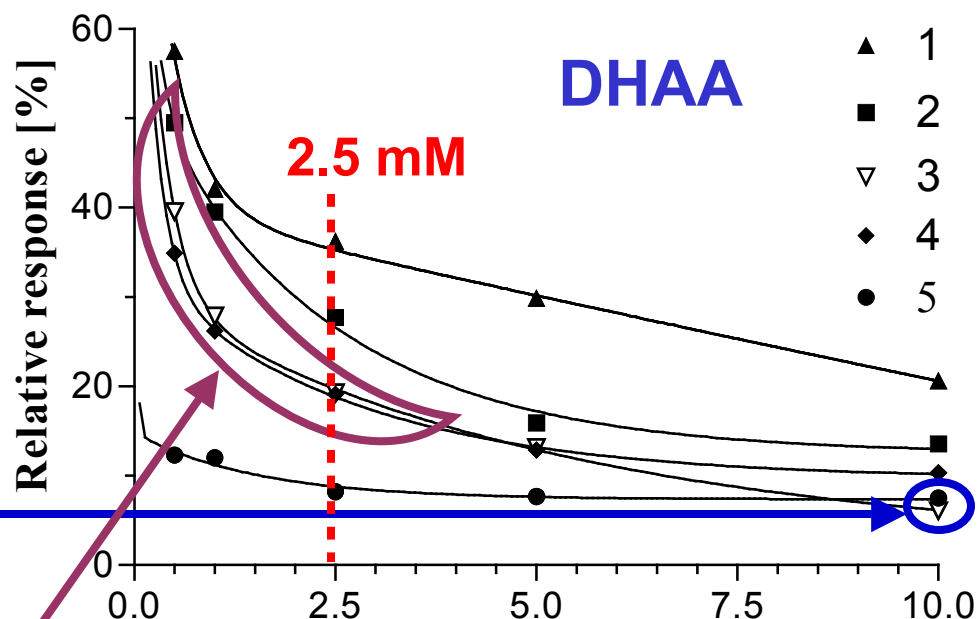
Orthogonální konstrukce iontového zdroje

Vliv geometrie iontového zdroje na ESI odezvu

- pro všech 50 bodů kromě 1 platí:
Z-sprej < orthogonální < lineární

- přístroje od 1 výrobce (č. 3 a 4)
dávají velmi podobné výsledky =
nejde pouze o vliv úhlu
elektrospreje, ale o celkové
uspořádání přístroje

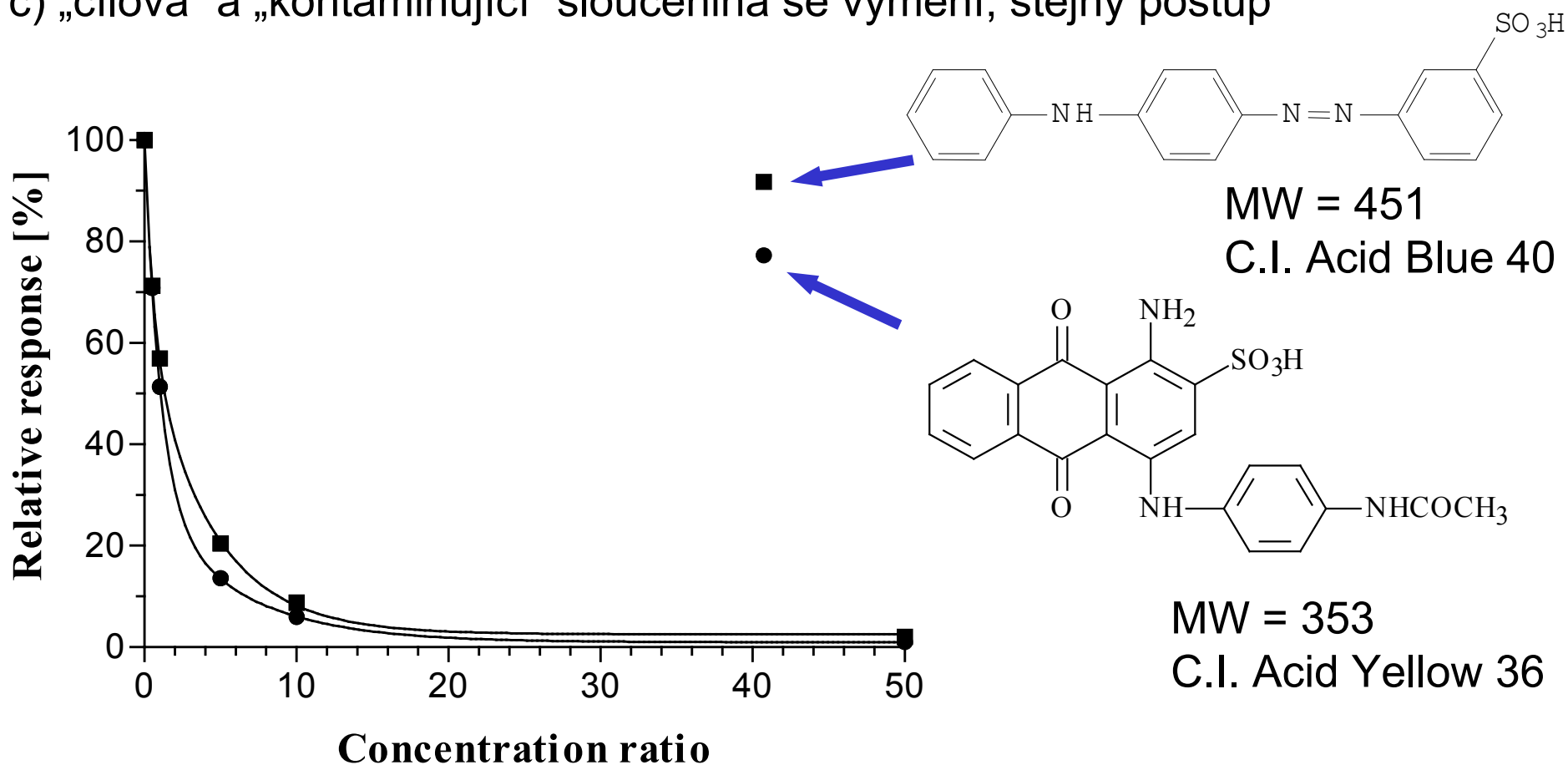
- 1/ Z-sprej Q
- 2/ orthogonální IT
- 3/ orthogonální Q
- 4/ lineární IT
- 5/ lineární Q



„Soupeření“ o náboj mezi 2 sulfokyselinami

Princip:

- odezva čisté („cílové“) sloučeniny = 100% (koncentrace 3 mg/l)
- „kontaminující“ sloučenina druhého barviva je přidána do roztoku v definovaném molárním poměru a změřena odezva „cílové“ sloučeniny, jejíž koncentrace je konstantní
- „cílová“ a „kontaminující“ sloučenina se vymění, stejný postup



Závěr

Aditiva, která lze použít v HPLC/MS

Kyseliny: mravenčí, octová, trifluorooctová není příliš vhodná (liší se podle typu analytu) – koncentrace co nejnižší, obvykle 0.01 – 0.1%

Báze: hydroxid amonný, triethylamin

Soli: octan amonný, octan mravenčí, apod. – koncentrace 5 – 10 mM

Aditiva nevhodná pro HPLC/MS

Cokoliv netěkavého nebo v příliš vysoké koncentraci, např. fosfátový nebo borátový pufr, anorganické kyseliny a báze, tetralkylamoniová ion-párová činidla, cyklodextriny, apod.

Konstrukce iontového zdroje

Při použití iontových aditiv důležité použití lomených geometrií

Literatura a další informace

Interpretace EI spekter (+ spousta dalších):

- F.W. McLafferty, F. Tureček, Interpretation of Mass Spectra, Fourth Edition, University Science Books, Mill Valley, CA, USA, 1993
- T.A. Lee, A Beginner's Guide to Mass Spectral Interpretation, J. Wiley&Sons, Chichester, 1998.

Hmotnostní spektrometrie v češtině (a zdarma):

- <http://user.upce.cz/~holcapek/> - PDF reprinty článků, přednášek a posterů, předmět „Hmotnostní spektrometrie v organické analýze“, MS webové odkazy
- <http://ms.biomed.cas.cz/> - doc. Havlíček, plná verze přednášek ze 7. Školy MS na Červenohorském sedle
- M. Holčapek (editor), Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS), Univerzita Pardubice, 2001.

Konference:

- 3. ročník školy HPLC/MS, 30.8.-4.9.2005, hotel JEF Doubice v Českém Švýcarsku - hlavním tématem bude interpretace hmotnostních spekter
- 17th International Mass Spectrometry Conference, Praha, srpen 2006, <http://www.imsc2006.org/>