

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA
BRNO

FARMACEUTICKÁ FAKULTA
Ústav chemických léčiv

Strukturní analýza organických sloučenin, přírodních látek, léčiv a jejich intermediátů pomocí hmotnostní spektrometrie.

Michal Greguš, Kateřina Šenkeříková, Pavel Bobál

Tato výuková opora vznikla v rámci řešení projektu: 2018FaF/3150/78

BRNO 2018

Obsah

1. Úvod do hmotnostní spektrometrie	2
2. Základní součásti hmotnostního spektrometru.....	4
3. Ionizace a metody ionizace	6
3.1. Elektronová ionizace (EI – Electron Ionisation)	8
3.2. Chemická ionizace (CI – Chemical Ionisation)	10
3.3. Ostřelování vzorků rychlými atomy (FAB – Fast Atom Bombardement)	12
3.4. Ionizace elektrosprejem (ESI - ElectroSpray Ionization).....	12
3.5. Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI – Atmospheric Pressure Chemical Ionization).....	15
3.6. Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI – Atmospheric Pressure Photoionization).....	18
3.7. Ionizace laserem za účasti matrice (MALDI - Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)	19
4. Hmotnostní analyzátoři a detektory	23
4.1. Magnetický sektorový analyzátoř s jednoduchou a dvojitou fokusací iontů	25
4.2. Kvadrupólový analyzátoř	29
4.3. Iontová past	31
4.4. Průletový analyzátoř (TOF – Time-Of-Flight).....	32
4.5. Tandemové uspořádání MS/MS	34
4.6. Detektory.....	35
5. Hmotnostní spektrum	36
5.1. Izotopové ionty v hmotnostní spektrometrii	37
5.2. Základní pravidla fragmentací při ionizaci EI	41
6. Spojení hmotnostní spektrometrie a separačních technik.....	46
7. Obrazová příloha – příklady hmotnostních spekter	47
8. Seznam použité a doporučené literatury	84

1. Úvod do hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je fyzikálně-chemická metoda, pomocí které můžeme určit hmotnost atomů, molekul a jejich částí po jejich převedení na kladné nebo záporné ionty. Díky této metodě můžeme určit strukturu analyzovaných látek anorganického a zejména organického původu.

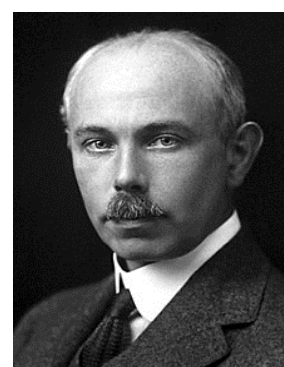
Hmotnostní spektrometrie se od ostatních běžně používaných metod organické spektrální analýzy liší tím, že vzorek neabsorbuje infračervené ani ultrafialové záření a ani rádiové vlny z elektromagnetického spektra. Na rozdíl od infračervené spektroskopie (IR) nebo nukleární magnetické rezonance (NMR), kde obě metody identifikují sloučeniny se specificitou srovnatelnou s hmotnostní spektrometrií, MS je destruktivní metoda analýzy což znamená, že po MS analýze nelze již vzorek získat zpět. Na druhou stranu je MS mimořádně citlivá metoda a na získání relevantních informací o struktuře analytu vyžaduje méně vzorku než IR nebo NMR.

Historie hmotnostní spektrometrie sahá ke konci 19. století, kdy Eugen Goldstein pozoroval záření, při elektrickém výboji v plynu za sníženého tlaku, putující z anody ke katodě, opačně jako tomu je při negativně nabitým katodovým záření. Pozorované pozitivně nabitě záření pojmenoval jako anodové nebo-li kanálové záření. Německý vědec Wilhelm Wien objevil, že silné magnetické resp. elektrické pole dokáže toto záření vychýlit a v roce 1899 sestrojil zařízení s kolmým elektrickým a magnetickým polem. Takové pole bylo schopné rozdělit pozitivně nabitě částice na základě jejich poměru náboje k hmotnosti (Q/m). Wien také zjistil, že poměr závisí na povaze plynu vystavenému elektrickému výboji. Následné zdokonalení Wienovi práce snížením tlaku vedlo ke vzniku prvních hmotnostních spektrografů.

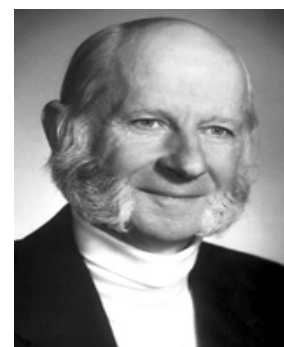
Zprvu se hmotnostní spektrometrie využívala jako metoda umožňující měření izotopového zastoupení různých prvků. V roce 1922 získal Nobelovu cenu za chemii Francis William Aston, poté co objevil a popsal stabilní izotopy velkého množství neradioaktivních prvků. Pomocí hmotnostního spektrometru také zjistil a publikoval hmotnost izotopu ^{12}C . Tato hodnota se později stala referenční pro měření atomové hmotnosti a nahradila předešlý standart izotopu ^{16}O . Díky dalšímu zlepšení rozlišovací schopnosti u hmotnostní spektrometrie,



Obr. 1. Wilhelm Wien



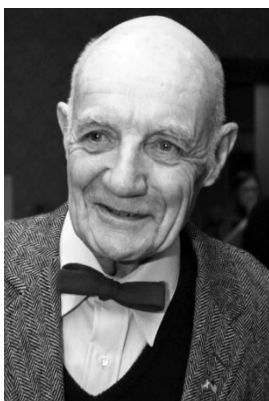
Obr. 2. Francis W. Aston



Obr. 3. Hans G. Dehmelt



Obr. 4. W. Paul



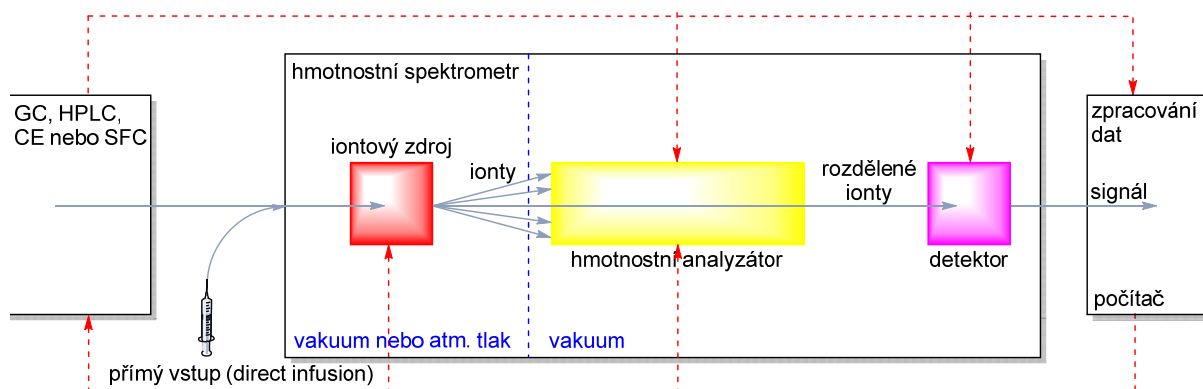
bylo možné již ve 40. letech plně využít tuto metodu v analytické chemii při kvalitativní analýze benzinů a později i k typové analýze různě složitých směsí a ropných frakcí. V 50. a 60. letech byla vyvinuta nová technika pro hmotnostní spektrometrii tzv. technika iontové pasti, za kterou získali Nobelovu cenu v roce 1989 Hans Georg Dehmelt a Wolfgang Paul. Další Nobelova cena byla udělena v roce 2002



Obr. 5. John B. Fenn Johnovi Bennettovi Fennovi za vývoj ionizace elektrosprejem (ESI) a Koichi Tanakovi za vývoj jemné laserové desorpce a MALDI techniky (tyto techniky budou popsány později v kapitole metody ionizace).

2. Základní součásti hmotnostního spektrometru

Dnes používané hmotnostní spektrometry obsahují 5 základních částí: Místo pro vstup vzorku, iontový zdroj, analyzátor hmotnosti, detektor a počítač. (Obr. 7)



Obr. 7. Blokový náčrt hmotnostního spektrometru

Nedílnou součástí každého takového přístroje je vakuový systém (soustava vakuových pump) a iontová optika sloužící k fokusaci a urychlení vzniklých iontů. Aby mohl být vzorek analyzován, je nutné ho v místě vstupu **převést do plynného skupenství**. Tato podmínka dříve značně omezovala analýzu, neboť sloučenina musela být termicky dostatečně stabilní, avšak vývoj modernějších přístrojů umožnil měřit i látky termicky labilní nebo částečně těkavé. Dále také lze propojit vstupní zařízení s výstupem kolony plynového nebo kapalinového chromatografu, nebo také s výstupem z kapilární elektroforézy, což umožňuje analyzovat separované složky soustavy. Následuje **ionizace** vzniklého plynu, během které získávají molekuly, respektive jejich příslušné ionty dostatečné množství energie, díky níž může dojít k jejich fragmentaci za vzniku jednodušších iontů, neutrálních molekul a radikálů. Během ionizace dochází i k urychlení iontů vstupujících do hmotnostního analyzátoru. **Hmotnostní analyzátor** je v podstatě zařízení využívající silné magnetické nebo elektrické pole, které je schopné změnami trajektorií rozdělit směs iontů na základě poměru hmotnosti (relativní atomová hmotnost) k počtu elementárních nábojů iontů m/z . Jednotlivé ionty dále dopadají na detektor, za vzniku analogového signálu. Ten se následně digitalizuje a převádí do **počítače**, kde se pomocí programového vybavení zpracuje do podoby hmotnostního spektra.

Hmotnostním spektrem označujeme zápis relativního zastoupení rozdělených iontů charakteristickým poměrem hmotnosti k náboji. Vzhledem k tomu, že během ionizace vznikají majoritně jednonásobně nabitě ionty s nábojem rovnajícím se $z = 1$, poměr hmotnosti a náboje vyjadřuje hmotnost příslušného iontu. Každý hmotnostní spektrometr musí být také vybaven vakuovou aparaturou, díky níž je možné v analyzátoru, popřípadě v iontovém zdroji dosáhnout velmi nízkého tlaku v rozmezí 10^{-3} až 10^{-6} Pa (10^{-5} až 10^{-8} Torr).

Tento nízký tlak je esenciální, neboť brání nežádoucím srážkám iontů a neutrálních molekul v době mezi ionizací a detekcí iontů.

Nutno podotknout, že se hmotnostní spektrometrie značně liší od ostatních spektrálních metod, které měří absorpci nebo emisi elektromagnetického záření v závislosti na jeho energii. Tvar hmotnostních spekter není možné předpovědět kvantově-chemickými výpočty a jejich interpretace se řídí hlavně empirickými zkušenostmi. Vzhled – kvalita hmotnostního spektra zde závisí mnohem více na parametrech přístroje, než při jiných spektrálních metodách. Spektra té samé látky mohou být značně odlišná v závislosti na ionizační technice, uspořádání jednotlivých částí přístroje či využití různých technik podporující fragmentaci iontů. V hmotnostní spektrometrii probíhají všechny děje v silně zředěném plynu (danou látku lze analyzovat a identifikovat již při hmotnostech menších než 10^{-12} g) a vzniklé spektrum je výsledkem mnoha konkurenčních po sobě jdoucích monomolekulárních reakcí. Můžeme tedy říct, že hmotnostní spektrometrie závisí na chemické reaktivitě. Vzhledem k tomuto faktu a k informacím výše uvedeným se hmotnostní spektrometrie **nezařazuje mezi spektrální metody**. Na druhou stranu díky získaným informacím při studiu různých struktur látek, možnosti jejich identifikace a separace se hmotnostní spektrometrie běžně interpretuje společně se spektrálními metodami.

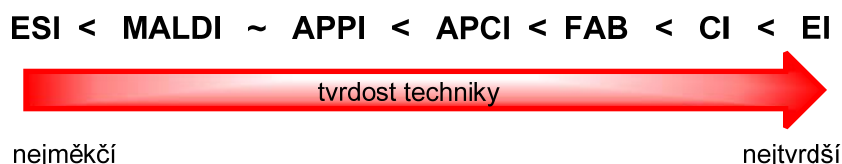
3. Ionizace a metody ionizace

Jak již bylo řečeno, molekuly analyzované látky musí být převedeny na příslušné ionty, k tomuto účelu slouží iontový zdroj. Pro ionizaci dané látky je potřeba překonat její tzv. **ionizační energii**, ta se pro organické látky pohybuje v rozmezí 7 – 16 eV. Dále je nutné zaručit, aby při daném způsobu ionizace bylo možné reprodukovat zastoupení jednotlivých iontů vstupujících do analyzátoru hmotnosti. Účinnost ionizace je extrémně nízká - pouze 0,01 % molekul vstupujících do iontového zdroje je převedeno do iontového stavu. V současné době existuje velké množství způsobů, jak lze analyzovanou látku ionizovat. I přesto neexistuje univerzální ionizační technika pro všechny látky. Samotný výběr konkrétního typu ionizace závisí na typu látky a na požadavcích kladených na analýzu. Jednotlivé způsoby ionizace lze rozlišit na základě skupenství, v němž ionizace probíhá, a množství energie dodávané iontovým zdrojem do procesu. Nejběžnější je ionizace látek v **plynném skupenství**. Termolabilní nebo netěkavé látky lze ionizovat buď v pevném skupenství (vznikne plazma iontů) nebo jako kapalné látky v médiu, ale také v podobě eluátu z kapalinové chromatografie. Podle množství dodané energie rozdělujeme ionizační techniky na měkké a tvrdé.

U **měkké techniky** je přebytek dodané vstupní energie malý a vzniklý ion se fragmentuje jen s malou pravděpodobností. U **tvrdé techniky** je použito velké množství energie, která výrazně převyšuje ionizační energii molekuly a tento energetický přebytek (rotačně – vibrační energie) se eliminuje **fragmentací** primárního iontu.

Vzhledem k velkému množství druhů ionizace se budeme věnovat pouze některým – těm nejčastěji využívaným: **Elektronová (EI) a chemická ionizace (CI), Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI), Ostřelování vzorků rychlými atomy (FAB), Ionizace laserem za účasti matrice (MALDI) a Ionizace elektrosprejem (ESI)**. Přehled těchto nejčastěji používaných metod ionizace je uveden v tabulce č. 1

Orientační pravidlo určující míru tvrdosti ionizační techniky:

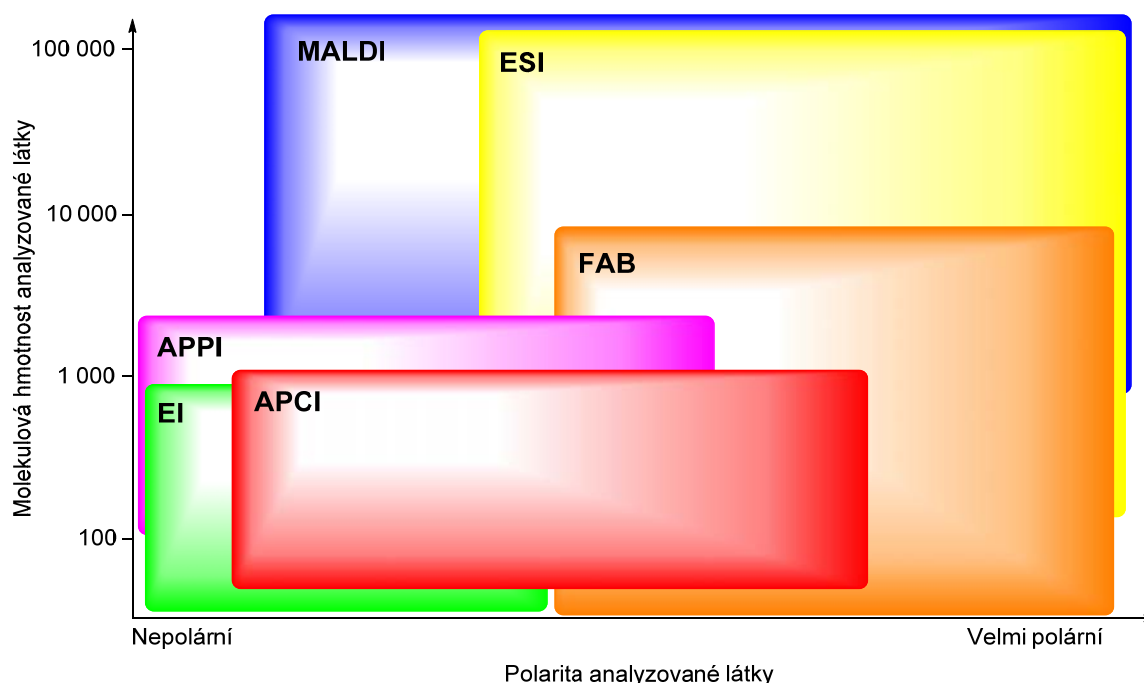


Volba ionizační techniky se řídí fyzikálně-chemickými vlastnostmi analytu jako jsou: těkavost látky což souvisí s její polaritou, tepelná stabilita látky, velikost molekuly (mol. hmotnost). Pro analýzu těkavých, termicky stabilních látek s molekulovou hmotností do 1 000 g.mol⁻¹ jsou vhodné tvrdé techniky (EI, CI). Výhodou těchto technik je jejich vysoká citlivost a existence rozsáhlých knihoven spekter. V případě termolabilních nebo netěkavých sloučenin,

nebo sloučenin s vysokou molekulovou hmotností je vhodné použít měkké techniky. Kritéria použití jednotlivých ionizačních technik vyjadřuje ve zjednodušené formě obrázek 8.

Tabulka č. 1. Nejznámější ionizační techniky v hmotnostní spektrometrii

Ionizační metoda	Ionizační činidlo	Tlak v iontovém zdroji	Citlivost	Použití
EI	elektrony 50 – 70 eV	$10^{-4} - 10^{-6}$ torr	ng – pg	analýza hlavně termostabilních těkavých, nízkomolekulových a nepolárních látek, v kombinaci GC/MS
CI	reakční plyn a elektrony	~ 1 torr	ng – pg	analýza hlavně termostabilních těkavých, nízkomolekulových a nepolárních látek, v kombinaci GC/MS
FAB	atomy Xe, Ar	$10^{-3} - 10^{-4}$ torr	μg – ng	analýza hlavně termolabilních, polárních a vysokomolekulových látek
ESI	elektrické pole	atmosférický	ng – pg	analýza hlavně termolabilních, netěkavých a polárních látek, často v kombinaci HPLC/MS a CE/MS
APCI	koronový výboj	atmosférický	ng – pg	analýza relativně termolabilních, netěkavých a středně polárních látek, často v kombinaci HPLC/MS a CE/MS
APPI	fotony (UV) 10,6 eV	atmosférický	ng – pg	analýza relativně termolabilních, nepolárních až středně polárních látek, často v kombinaci HPLC/MS a CE/MS
MALDI	fotony z laseru	$10^{-6} - 10^{-7}$ torr	μg – ng	analýza hlavně termolabilních, polárních a vysokomolekulových látek



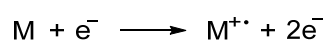
Obr. 8. Rozsah použití různých metod ionizačních technik.

Dalším důležitým faktorem je volba polarizace ionizace. To platí zejména pro měkké techniky. Nejčastěji používanou je ionizace v pozitivním modu, při které vznikají kvazimolekulové ionty $[M+H]^+$. Ionizace v negativním modu je využívána u látek podléhajících snadné deprotonaci (karboxylové a sulfonové kyseliny, polyhydroxy sloučeniny, nitrosločeniny, apod.). Pro studium nekovalentních interakcí je asi jedinou vhodnou metodou ESI. V případě, že analytem je směs látek, je téměř nutné použít metodu kompatibilní se separačními technikami, jako jsou GC, HPLC, CE nebo SFC.

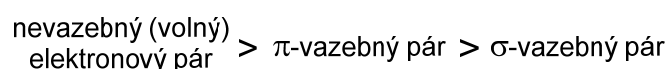
3.1. Elektronová ionizace (EI – Electron Ionisation)

Elektronová ionizace patří mezi jednu z nejstarších, nejpropracovanějších a v současnosti stále používanou metodu. Řadíme ji mezi **tvrdé ionizační techniky**, při nichž interaguje vysokoenergetický proud elektronů s analyzovanou látkou **v plynném skupenství**. Proud elektronů získáme zahřátím resp. rozžhavením wolframového nebo rheniového vlákna (katody), ten následně dopadá na anodu. Mluvíme tedy o katodovém záření a jeho kinetická energie se dá plynule regulovat napětím přiváděným na katodu v rozmezí od 5 do 100 eV. (Obr. 9) Elektrony s energií přesahující ionizační energii molekul (7-16 eV) jsou schopné vyrazit (*pozn.: tento termín není přesný, protože ke skutečnému střetu elektronů nedochází*) elektrony z molekuly, zejména elektrony z ne vazebných elektronových párů. Vzniká kation s lichým počtem elektronů – **kationradikál $M^{+\bullet}$** neboli **molekulový ion**.

Schéma vzniku molekulového ionu:

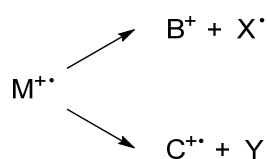


Přednostně dochází ke ztrátě nejméně vázaného elektronu v molekule tj. jednoho elektronu s nejvýše obsazeného molekulového orbitalu (HOMO). Obecně pořadí jak se elektrony vlivem EI uvolňují je:



Jestliže energie dodaná elektrony přesáhne energii nejslabší vazby v molekule, může dojít k roztržení vazby a nastává **fragmentace**. Jako její výsledek vzniká menší nabitá částice (fragmentový ion, např. kation B^+ nebo kationradikal $C^{+\bullet}$), neutrální částice Y , popřípadě radikály X^\bullet . S fragmentací také souvisí riziko, kdy může dojít k úplnému rozpadu primárního molekulového iontu, ten poté není možné pozorovat ve výsledném hmotnostním spektru. V takovém případě někdy postačí snížit energii ionizujících elektronů, čímž se docílí zvýšení intenzity molekulového iontu.

Základní schéma fragmentace:

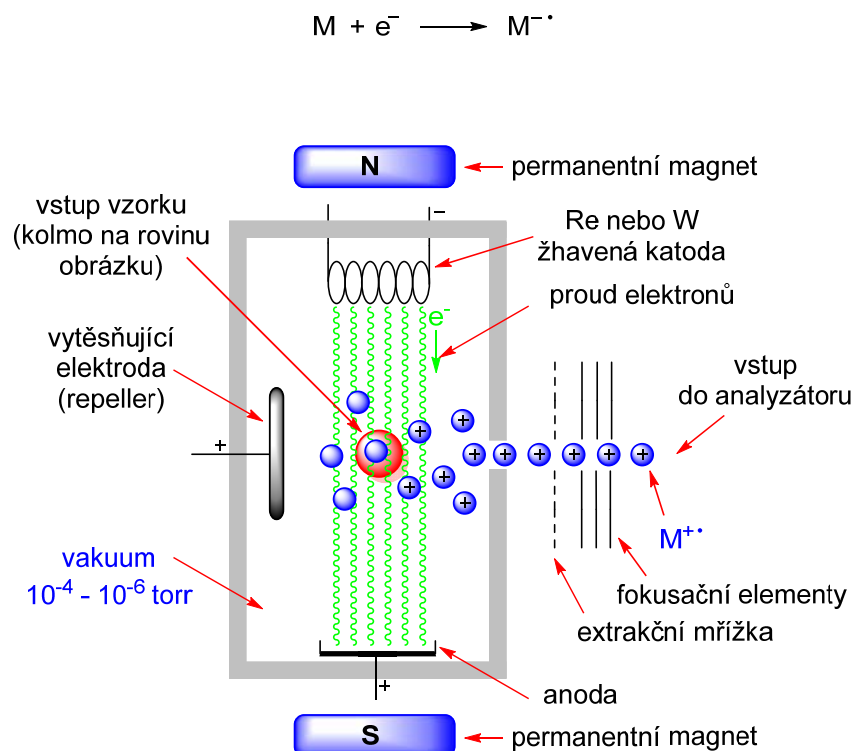


Čím vyšší bude energie elektronů než disociační energie, tím vyšší bude pravděpodobnost, že dojde v molekule k fragmentaci. Protože chceme docílit, aby proces fragmentace probíhal jako monomolekulová reakce, je nezbytné pracovat pod velkým vakuem řádově 10^{-5} až 10^{-6} torru. Tím zamezíme vzájemným srážkám iontů a molekul.

Při EI se standardně používá energie elektronů 70eV. Takové množství energie nám zajistí vznik maximálního počtu iontů a také zabezpečí rozsáhlou fragmentaci.

Alternativou vyrážení elektronů z cílové molekuly je jejich zachycení. V takovém případě vzniká molekulový ion s lichým počtem elektronů a záporným nábojem – anionradikál $M^{-\bullet}$. Pravděpodobnost zachycení elektronu je však příliš malá a tento jev nastane pouze v případě, že se v analyzované molekule nachází elektronegativní funkční skupina (např. halogeny). Energie ionizujících elektronů je řádově nižší než při standardním EI a nepřesahuje hodnotu 15 eV. Dále se do ionizačního zdroje zavádí tzv. brzdny plyn, který zpomaluje dopadající elektrony a tím zvyšuje pravděpodobnost jejich zachycení.

Schéma vzniku anionradikálu:

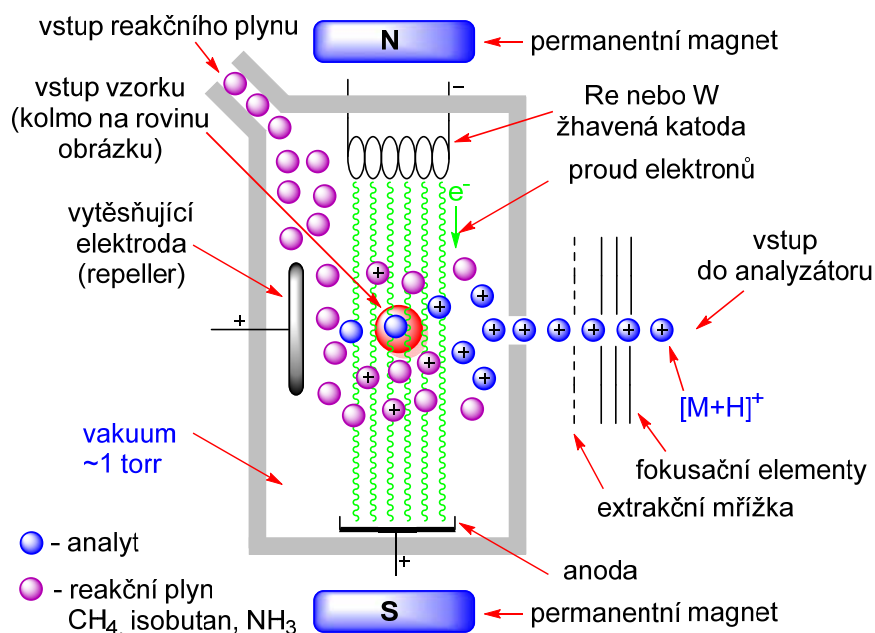


Obr. 9. Schéma přístroje s elektronovou ionizací.

Metoda elektronové ionizace (EI) se dneska využívá při analýze těkavých, nepolárních a nízkomolekulových látek hlavně ve spojení s plynovou chromatografií (GC).

3.2. Chemická ionizace (CI – Chemical Ionisation)

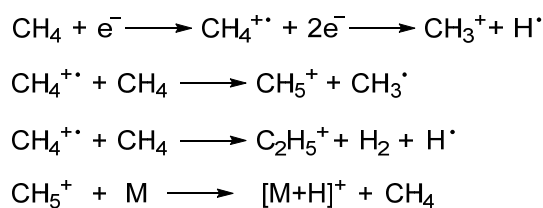
Chemickou ionizaci řadíme mezi měkké metody ionizace a částečně představuje analogii ionizace elektronovým impaktem. Konstrukce iontového zdroje chemické ionizace je prakticky totožná s EI, díky čemuž dnes velmi často dochází ke kombinaci a využití těchto dvou metod podle potřeby. (Obr. 10) Stejně jako u elektronové ionizace dochází i zde k ionizaci díky elektronům z rozžhavené katody, avšak energie těchto elektronů je mnohem větší a může dosahovat 300 či více eV. Tyto energeticky bohaté elektrony však nepůsobí na analyzovanou látku přímo. Primárně atakují **reakční plyn**, který je přiváděn do ionizační komory společně s analytem. Abychom předešli nežádoucím srážkám ionizujících elektronů a vzorku, je nutné zajistit, aby koncentrace vzorku vůči reakčnímu plynu byla výrazně nižší (zpravidla nepřesáhne více než 0,01 %). Tlak při tomto způsobu ionizace je oproti EI relativně vysoký, v rozmezí 50 – 150 Pa (0,5 – 1 torr).



Obr. 10. Schéma přístroje s chemickou ionizací.

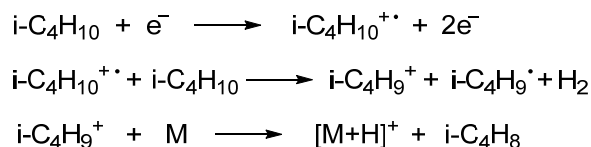
Jak už bylo řečeno, samotná ionizace probíhá díky reakčnímu plynu v přístroji, jehož výběr závisí na typu analyzované látky. Nejčastější volbou bývá **metan**, **isobutan** nebo **amoniak**, můžeme ale použít i propan, vodík, dusík, páry vody nebo metanolu nebo některý ze vzácných plynů.

Při nárazu ionizujícího elektronu na molekulu reakčního plynu (např. metanu), dochází ke vzniku kationradikálu $\text{CH}_4^{+\bullet}$, který díky vyššímu tlaku interaguje s dalšími molekulami za vzniku stálých kationtů CH_5^+ a C_2H_5^+ .

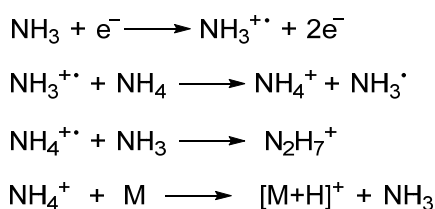


Pozorované ionty: $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($[\text{M}+\text{CH}_5]^+$, $[\text{M}+\text{C}_2\text{H}_5]^+$)

Analogicky vznikají kationty i dalších reakčních plynů.

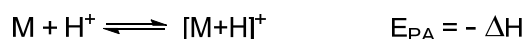


Pozorované ionty: $[\text{M}+\text{H}]^+$



Pozorované ionty: $[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$

Tyto kationty se poté chovají jako silné Brønstedovy kyseliny a při kontaktu s molekulami analyzované látky odevzdají svůj proton za vzniku kationtu $[\text{M}+\text{H}]^+$ a neutrální molekuly. Tuto schopnost reakčního plynu odevzdat proton, můžeme charakterizovat jako tzv. **protonovou afinitu** E_{PA} . Ta je definována, jako záporná hodnota změny enthalpie u všeobecné protonační reakce. Volně přeloženo, jedná se o energii uvolňující se při adici protonu na cílovou molekulu.



Protonové afinity různých reakčních plynů jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2. Vybrané termo-chemické údaje o iontech vybraných molekul v plynné fázi.

Reakční plyn	IE (eV) ^a	E_{PA} (kJ.mol ⁻¹) ^a	Reakční plyn	IE (eV) ^a	E_{PA} (kJ.mol ⁻¹) ^a
methan	12,6	543	dusík	15,6	494
propan	10,9	625	amoniak	10,0	854
isobutan	10,7	677	voda	12,6	691
vodík	15,4	422	methanol	10,8	754

^a- hodnoty převzaté z literatury¹

Jestliže má ionizující plyn vysokou hodnotu E_{PA} (amoniak, aminy), nedochází přednostně k protonaci ale k adiční reakci plynu na molekulu analytu. Vznikne adukt molekulového iontu např. $[M+NH_4]^+$, ten se štěpí na ion $[M+H]^+$ a neutrální molekulu reakčního plynu (NH_3).

Kationtový komplex $[M+H]^+$ představuje charakteristický molekulový ion ve spektru pozitivní chemické ionizace (PCI). Takové ionty mají mnohem nižší přebytek vnitřní energie a nedochází u nich k další fragmentaci. Díky tomu je možné chemickou ionizaci využít u látek, které při klasické elektronové ionizaci neposkytují molekulový pík. Relativní hmotnost kationtu $[M+H]^+$ je o jednotku vyšší než molekulová hmotnost výchozí analyzované látky před ionizací a označuje se jako **kvazimolekulový ion**.

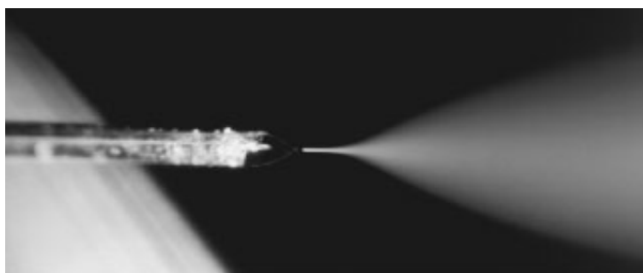
Chemická ionizace umožňuje tvorbu kladně i záporně nabitých iontů. Negativní chemická ionizace (NICI) se uplatňuje především u sloučenin obsahujících kyselou funkční skupinu nebo elektronegativní prvky např. halogeny.

3.3. Ostřelování vzorků rychlými atomy (FAB - Fast Atom Bombardement)

Ostřelování vzorků rychlými atomy (FAB) jak to už naznačuje název, zahrnuje bombardování roztoku analytu v matrici za vakua paprskem rychle se pohybujících atomů, nejčastěji xenonových nebo argonových atomů s energií v rozmezí 4 – 10 keV. Toto ostřelování má za následek přenos energie z atomů Xe (Ar) do matrici, což vede k přerušení intermolekulárních vazeb a k desorpci analytu do plynné fáze a jeho ionizaci. Technika FAB je nízko fragmentační (měkká) ionizační technika a byla široce využívána pro ionizaci velkých polárních molekul. Obecně dává píky primárně intaktních protonovaných molekul $[M+H]^+$ s malou fragmentací. FAB lze také použít ke generování negativně nabitých iontů $[M-H]^-$. Nejčastěji používanými matricemi jsou alkoholy zejména: glycerol, 4-nitrobenzylalkohol nebo triethanolamin.

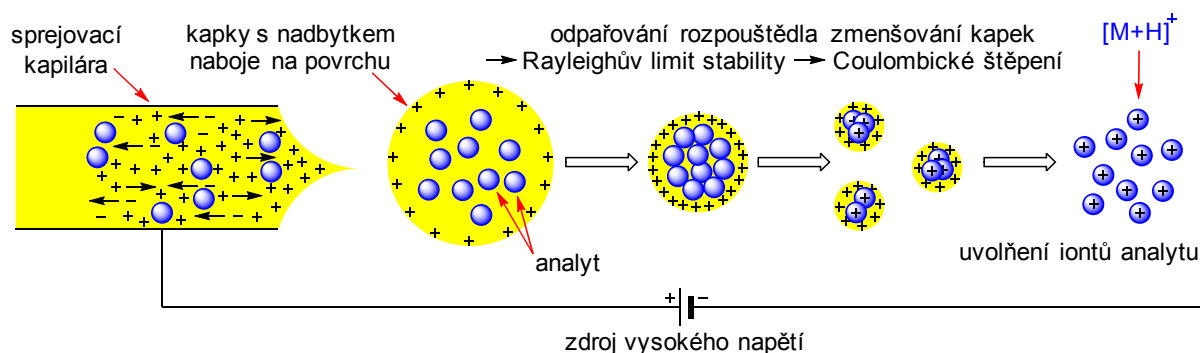
3.4. Ionizace elektrosprejem (ESI - ElectroSpray Ionization)

Tato metoda, řazená mezi **měkké techniky**, umožňuje práci **s kapalnou fází za atmosférického tlaku**, díky čemuž je možné ji spojit s kapalinovou chromatografií. Je určena pro středně polární až iontové látky, u nepolárních sloučenin ji nelze aplikovat. ESI zaručuje velmi šetrný způsob ionizace, při které můžeme analyzovat látky labilních sloučenin nebo také biomolekuly. Za vývoj metody ESI a následnou analýzu biomakromolekul získal v roce 2002 John B. Fenn Nobelovu cenu za chemii.



Obr. 11. Obrázek elektrospreje z křemenné kapiláry – převzaté z literatury.²

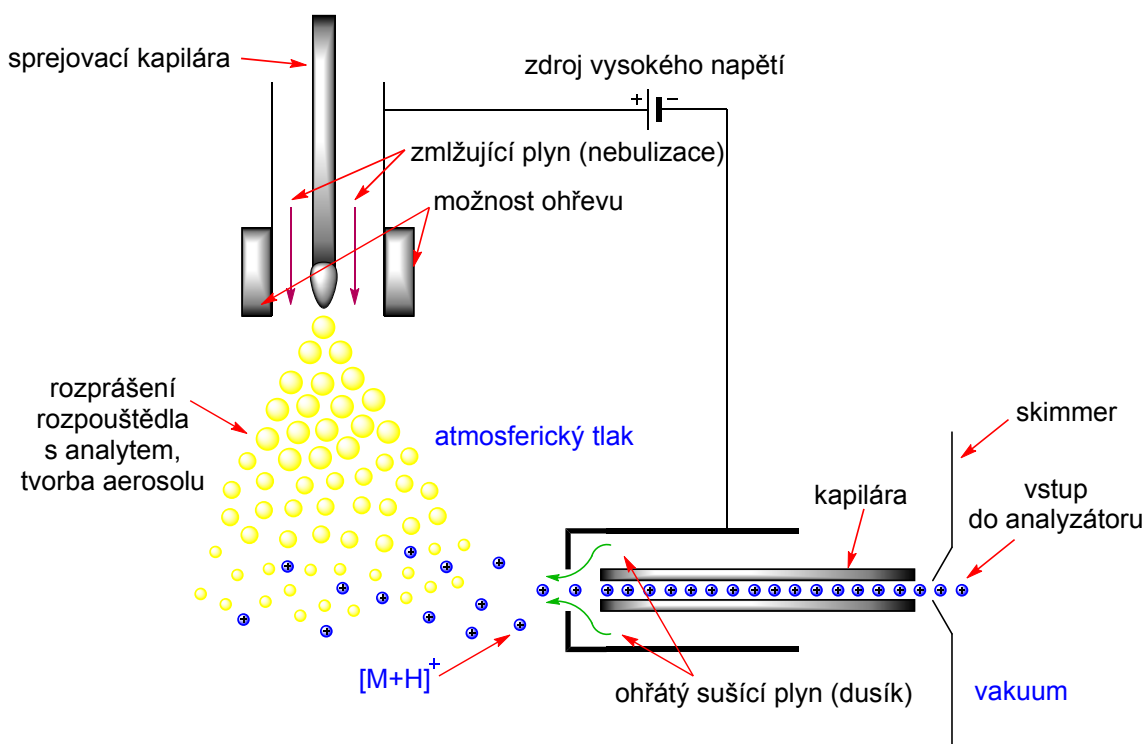
Analyzovaná látka rozpuštěná v mobilní fázi se kontinuálně přivádí do přístroje přes úzkou kapiláru s vnitřním průměrem přibližně 0,1 mm. Optimální průtok kapilárou je v mezích 1 – 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. U ústí kapiláry detekujeme napětí v rozmezí 3 – 5 kV, to vytváří **elektrostatické pole** a způsobuje, že je mobilní fáze rozprášena (nebulizována) za vzniku aerosolu nabitých kapek roztoku analytu. (Obr. 11) Nebulizaci také pomáhá tzv. **zmlžující plyn**, nejčastěji dusík. Po rozprášení jsou nabitě kapičky vystaveny **sušicímu plynu** – zahřátému dusíku, jenž pomáhá odpaření rozpouštědla. Tím dochází ke zmenšení rozměru kapek, přičemž hustota náboje se zvyšuje až do kritické velikosti. Jestliže se vyrovnají odpuzivé síly mezi stejně nabitými částicemi a silami zodpovídající za povrchové napětí, nastává dosažení **Rayleighova limitu stability**, což má za následek tzv. **coulombickou explozi**. (Obr. 12) Původní kapka „exploduje“, přičemž vzniká množství menších identických kapek. Tento děj se neustále opakuje až do doby, kdy se z vysoce nabitých kapek uvolní samotné ionty do plynné fáze. Uvolněné ionty jsou následně vtaženy do kapiláry, odkud vstupují do hmotnostního analyzátoru.



Obr. 12. Ilustrace zobrazující tvorbu mikroskopických kapiček obsahujících analyt a tvorbu iontů analytu.

Vlastní konstrukce iontových zdrojů (ESI) se značně liší, ale všechny fungují na stejných zásadách. Příklad konstrukce ESI iontového zdroje uvádí obrázek 13.

Elektrosprej není ionizační metodou sám o sobě a popisuje proces, při kterém ionty přechází z kapalného skupenství do plynného. Skutečná ionizace je děj **acido-bazický** a nabitě částice analyzované látky musí být přítomny už v rozpouštědle. Ionizace tedy nastává buď protonizací anebo deprotonizací analytu.



Obr. 13. Blokový náčrt ortogonální konstrukce iontového zdroje ESI.

V pozitivním módu, který se využívá nejčastěji, se do mobilní fáze přivádí menší množství kyseliny mravenčí, octové nebo trifluoroctové, sloužící jako zdroj protonů. Tyto protony se váží na nukleofilní místo v analyzované molekule a vzniká nabitý komplex $[M+H]^+$, ten je charakteristický pro menší molekuly do hmotnosti 1000 Da. Větší molekuly jsou často schopné přijmout více jako jeden proton a vznikají vícenásobně nabitě ionty $[M+H_2]^{2+}$, $[M+H_3]^{3+}$ (obecně $[M+H_n]^{n+}$). Tato skutečnost umožňuje detekci látek s vysokou molekulovou hmotností například polypeptidů a bílkovin, a to až do hmotnosti 100 000 Da. Kromě protonu může analyt vytvářet aduty také s alkalickými kovy (lithium, sodík, draslík), popřípadě s amonným kationtem. V negativním módu analyzovaná látka ztrácí vlastní proton z molekuly a vzniká iontový komplex $[M-H]^-$. Stručný přehled typických iontů vytvářených v iontovém zdroji ESI udává tabulka č. 3.

Ve spektru se zpravidla nenacházejí (popřípadě jen velmi zřídka) píky fragmentovaných iontů. Jestliže bychom chtěli dosáhnout spektra s větším zastoupením fragmentovaných iontů, je nutné zvýšit napětí v iontovém zdroji. Fragmentace můžeme také docílit interakcí nabitých částic s reakčním plynem (např. argonem) při tandemovém uspořádání hmotnostních analyzátorů. Rozpouštědla použitá v ESI jsou obvykle roztoky vody s těkavými organickými rozpouštědly, nejčastěji metanolem nebo acetonitrilem. Jak již bylo vzpomenuo, do této směsi se přidává také menší množství kyseliny, která slouží jako zdroj ionizujících protonů, kromě toho také zvyšuje vodivost mobilní fáze.

Tabulka č. 3. Typické ionty vytvářené v ESI iontovém zdroji.

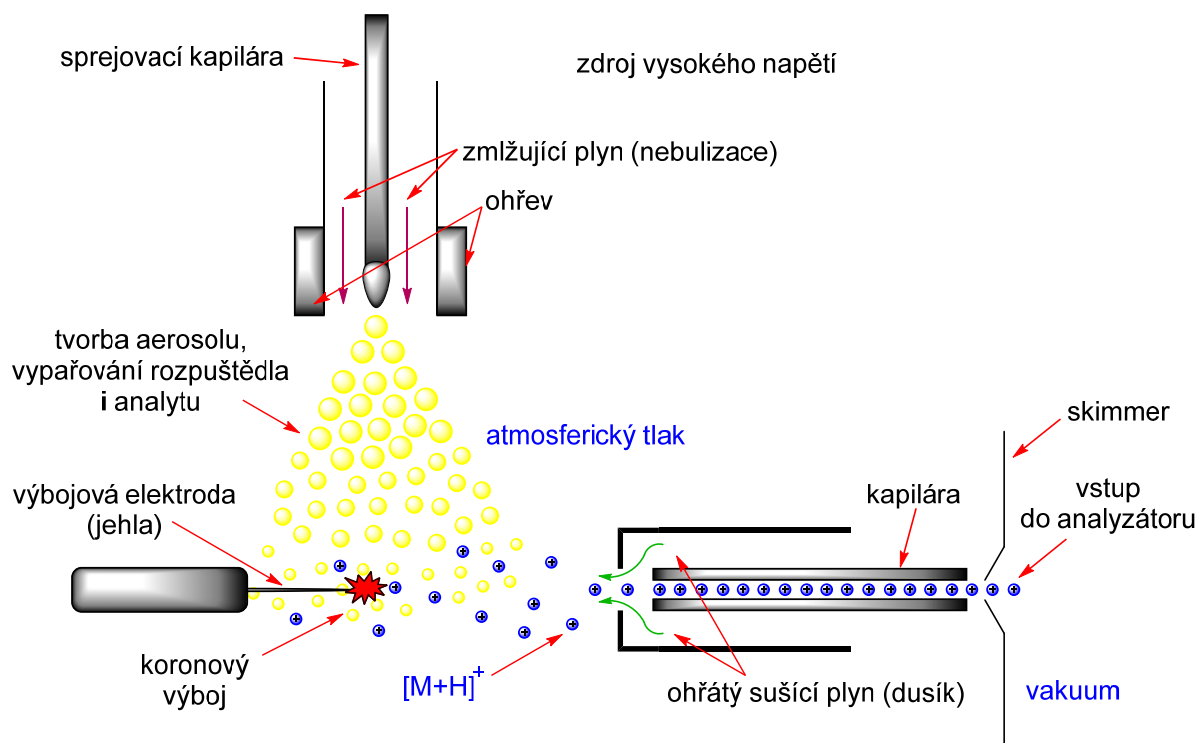
Pozitivní ionty	Negativní ionty
$[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+Alk]^+$,	$[M-H]^-$, $[M+HCO_2]^-$, $[M+CH_3CO_2]^-$,
$[M-H_n+Alk_{n+1}]^+$, $[2M+H]^+$, $[2M+Alk]^+$	$[M+Cl]^-$, $[M+A]^-$, $[M-H_n+Alk_{n-1}]^-$,
$[M+rozp+H]^+$, $[M+rozp+Alk]^+$	$[2M-H]^-$, $[M+rozp-H]^-$,
Kat^+ , $[Kat_n+A_{n-1}]^+$	A^- , $[Kat_{n-1}+A_n]^-$

Kat = kation, A = anion, rozp = rozpouštědlo, Alk = alkalický kov

Práci při atmosférickém tlaku v průběhu ionizace provází problém dosažení vakua v hmotnostním analyzátoru. Toho lze docílit použitím jedné či více vakuových vývěv v různých částech hmotnostního spektrometru. Jednotlivé části jsou od sebe oddělené tzv. **skimmery**.

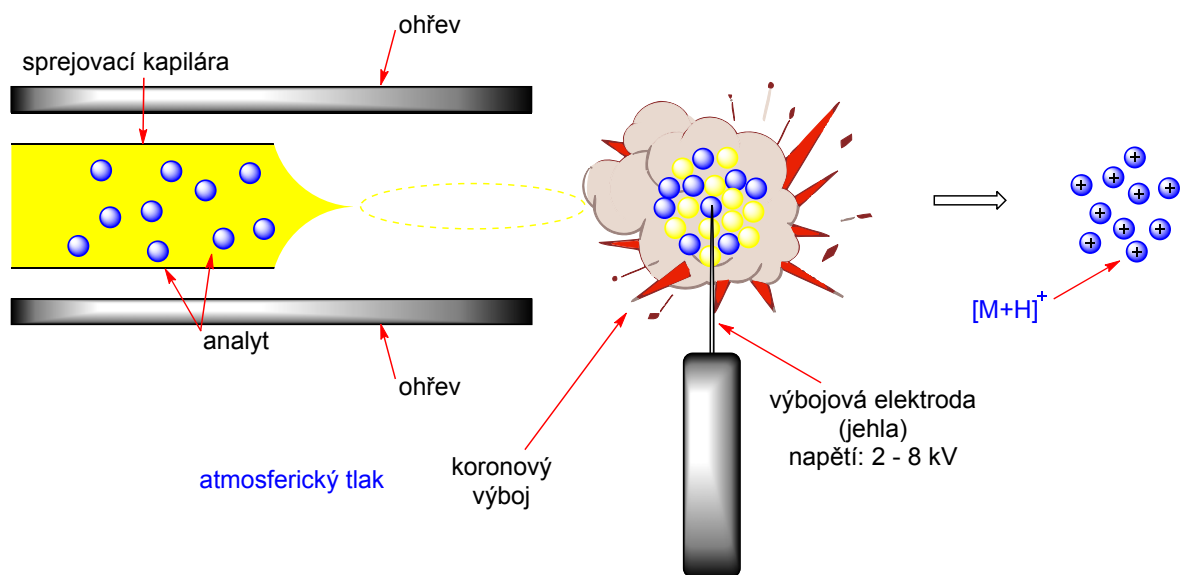
3.5. Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI - Atmospheric Pressure Chemical Ionization)

Chemická ionizace za atmosférického tlaku patří mezi měkké metody ionizace a lze ji považovat za přechod mezi chemickou ionizací a ionizací pomocí elektrospreje. Způsob ionizace je analogický, avšak šetrnější než u CI, uspořádání iontového zdroje je obdobné jako u ESI. (Obr. 14)



Obr. 14. Ortogonální konstrukce APCI iontového zdroje.

Analyzovaná látka v rozpouštědle se přivádí prostřednictvím úzké kapiláry s průtokem od 0,2 do 2 ml/min. Ústí kapiláry končí v iontovém zdroji, teplota uvnitř zdroje může dosahovat 300 – 600 °C. Vzniká **aerosol** a při tak vysoké teplotě se mobilní fáze bleskově odpaří. K tvorbě aerosolu dopomáhá také **zmlžující plyn** a k odpaření rozpouštědla přispívá **sušící plyn**, v obou případech to je dusík stejně jako u ESI. Hlavním rozdílem oproti ESI je však fakt, že k ionizaci nedochází použitím vysokého napětí (v kapiláře). Odpařený analyt spolu s rozpouštědlem je následně vystavený **koronovému výboji z jehlové (výbojové) elektrody** s napětím cca 2 – 8 kV. (Obr. 15)

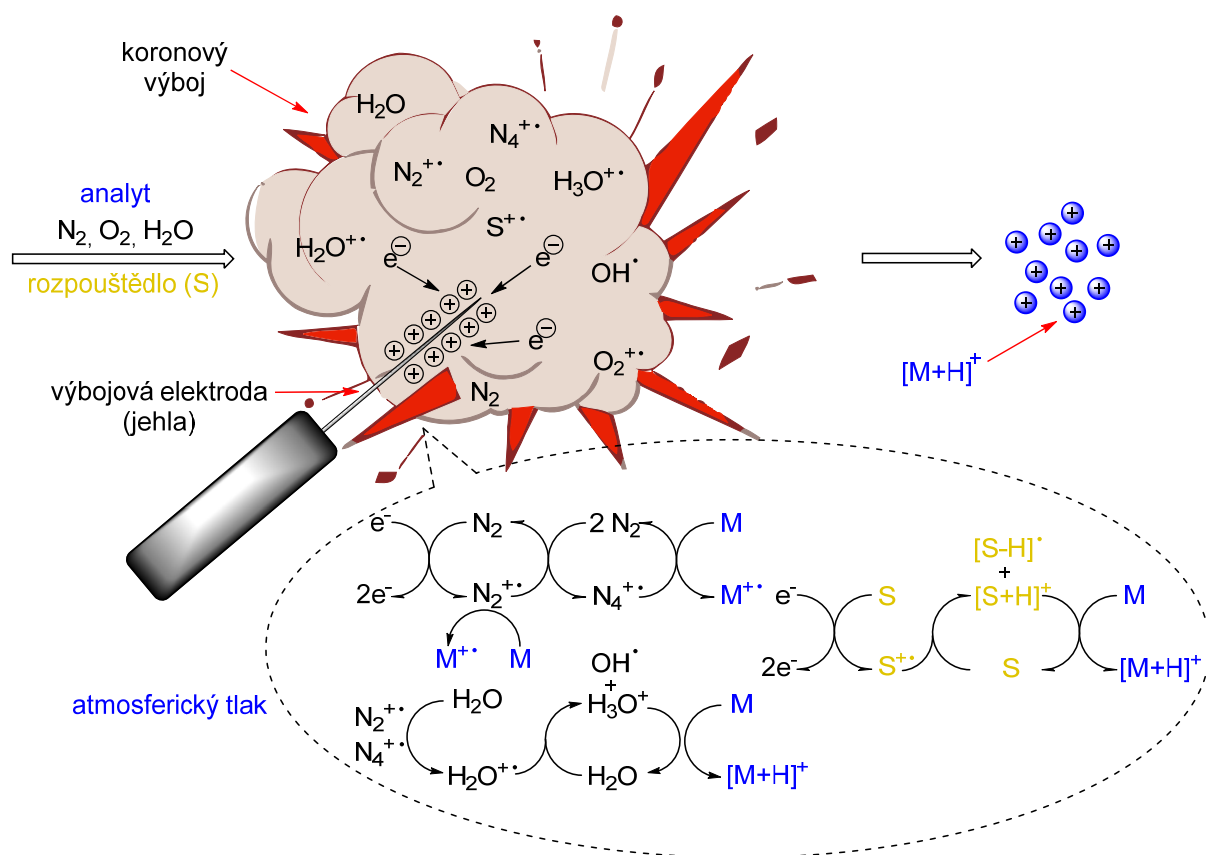


Obr. 15. Detail oblasti koronového výboje v APCI iontovém zdroji.

Koronový výboj je schopen ionizovat molekuly rozpouštědla, ale i běžných plynů přítomných ve vzduchu, protože celý proces probíhá za atmosférického tlaku. Vznikají při něm primární ionty odvozené od dusíku, vody, molekul rozpouštědla (Obr. 16), ale i různých jiných molekul vyskytujících se v mobilní fázi. Mechanismus ionizace samotného analytu se podobá chemické ionizaci a je založen na **protonové afinitě**. Molekuly vody nebo rozpouštědla (např. metanol, acetonitril) mají relativně vysoké a současně blízké hodnoty protonové afinity, proto jsou schopné zachytit jakýkoliv volný proton přítomný v plynu. Jestliže se následně takto vzniklá protonizovaná molekula dostane do kontaktu s molekulou analyzované látky, která má větší protonovou afinitu (resp. je více bazická), dojde k transferu protonu za vzniku charakteristického **kvazimolekulového iontu $[M+H]^+$** .

Ionizace za normálního tlaku (101kPa; 758 Torr), zabezpečuje vysokou míru srážek jednotlivých částic, jinak řečeno vysokou efektivitu ionizačního procesu. Atmosférický tlak má však i několik nevýhod. První je samotný iontový zdroj – výbojová elektroda je u APCI esenciální, neboť běžný způsob tvorby ionizujících elektronů pomocí žhaveného wolframového nebo reniového vlákna by vedl k jeho přepálení. Druhou překážkou je teplota, které je vystavena analyzovaná látka. Organické látky jsou častokrát termolabilní a při vysokých teplotách sloužících na odpařování mobilní fáze může docházet k rozkladu

analyzované molekuly. V neposlední řadě je to rozdíl tlaků mezi ionizačním zdrojem a hmotnostním analyzátozem. Stejně jako u ESI se i zde využívají vakuové vývěvy v oddělených segmentech a skimmery oddělující tyto sektory.



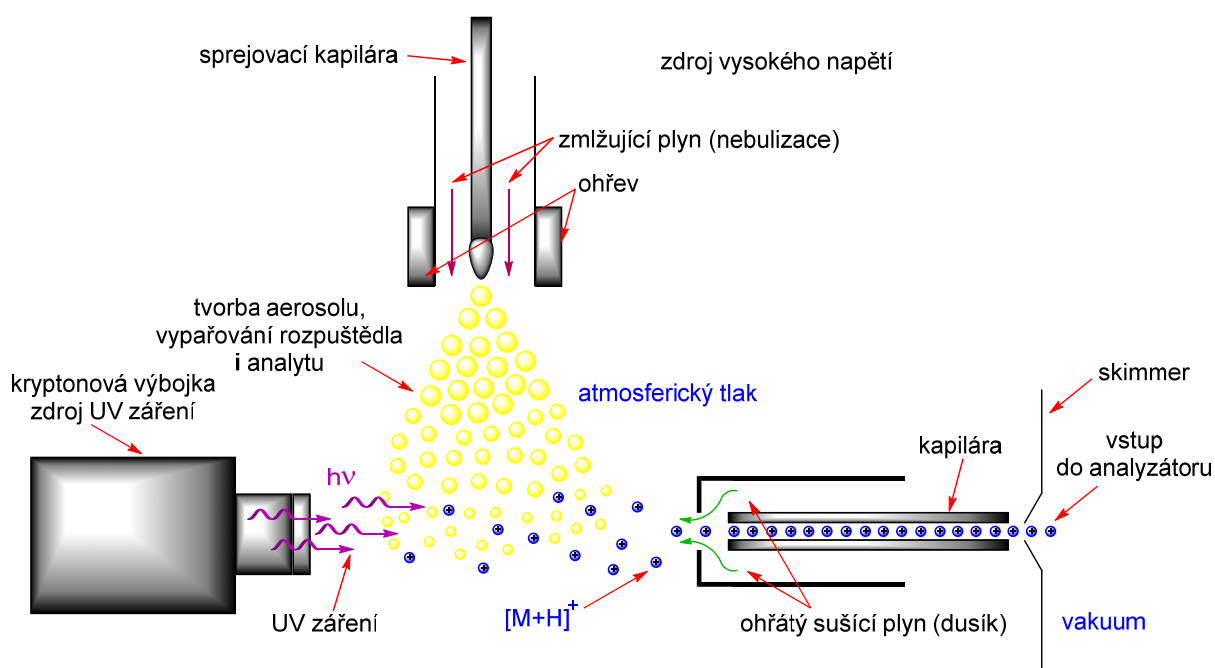
Obr. 16. Chemické proměny v koronovém výboji

Při APCI je fragmentace vzniklého tzv. **kvazimolekulového iontu** $[M+H]^+$ méně pravděpodobná ze stejných důvodů, jako je tomu při chemické ionizaci. Fragmentaci však lze uměle indukovat vyšším napětím na elektrodě. Termickým rozpadem molekuly dochází také k fragmentaci původní molekuly a i když se může tento rozpad jevit jako škodlivý prvek, je možné ho v některých případech využít pro jeho reprodukovatelnost při kvantitativní analýze látek.

Spektra lze změřit v pozitivním i negativním módu s molekulovým iontem $[M+H]^+$ anebo $[M-H]^-$. V negativním módu je také možný vznik aduktu $[M+X]^-$. V praxi je tato metoda ionizace při atmosférického tlaku vysoce kompatibilní s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). Analyzovat látky lze do hmotnosti 2 000 Da a to už v množství femtogramů (10^{-15} g).

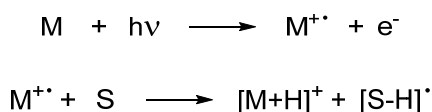
3.6. Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI – Atmospheric Pressure Photoionization)

Fotoionizace za atmosférického tlaku představuje další z měkkých ionizačních technik. Nalezneme u ní podobné uspořádání iontového zdroje jako u chemické ionizace za atmosférického tlaku. (Obr. 17) Mobilní fáze spolu s rozpuštěným analytem je přiváděna kapilárou, na jejímž ústí se nachází výhřevné články vytvářející aerosol. Na vzniku aerosolu se také podílí zmlžující plyn, zatímco na jeho odparu sušící plyn (zahřátý dusík). Páry rozpouštědla a analytu jsou následně vystaveny ionizujícím fotonům emitovaným z kryptonové výbojky, které indikují sérii reakcí vedoucích k ionizaci analyzované látky. Jedná se tedy o modifikaci klasické metody APCI, u níž je namísto výbojové elektrody použita výbojka.

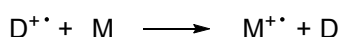
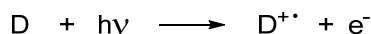


Obr. 17. Schematický náčrt APPI iontového zdroje.

Kryptonová výbojka je schopná emitovat fotony s energií 10 eV, což odpovídá vlnové délce UV záření. Tato energie může ionizovat velkou část organických sloučenin, přičemž nepřesahuje ionizační energii jednotlivých složek vzduchu (dusík, kyslík), nebo nejběžnějších rozpouštědel (voda, methanol, acetonitril). Analyzovaná látka může tedy být ionizována přímo emitovanými fotony vyražením elektronu z molekuly za vzniku **molekulového ionu** $M^{+\bullet}$. Vzniklý molekulový ion následně reaguje s molekulami rozpouštědla a abstrahuje z něho proton, přičemž vzniká kladně nabitý iontový komplex (**kvazimolekulový ion**) $[M+H]^+$.



Přímá ionizace (direct APPI) je provázená nízkou účinností, což lze z části vysvětlit absorpcí fotonů molekulami rozpouštědla a jejich fotoexcitací. Pro dosažení vyšší účinnosti se zavádí do mobilní fáze společně s analytem tzv. **dopant** (dopant APPI). Jedná se o látky, které musí být fotoionizovatelné a schopné ionizovat molekuly analytu. Mezi nejužívanější dopanty patří toluen ($E_i = 8,83 \text{ eV}$) a aceton ($E_i = 9,70 \text{ eV}$). Pokud je dopant v relativně vysokém poměru vůči samotnému analytu, narůstá účinnost ionizace 10 až 100 násobně.



Vznik kationradikálů $M^{+\bullet}$ anebo protonovaných molekul $[M+H]^{+}$ závisí na ionizačních energiích a protonových afinitách jak molekul analytu, tak i složek rozpouštědla. Kationradikál vzniká přednostně v rozpouštědle s nízkou protonovou afinitou (halogenovaná rozpouštědla, cyklohexan, ...), zatím co rozpouštědla s vyšší protonovou afinitou (metanol, acetonitril) budou poddajné k protonovému transferu.

Pokud molekula analytu nese elektronegativní funkční skupinu, můžeme měřit spektra APPI i v negativním módu s kvazimolekulovým iontem $[M-H]^{-}$.

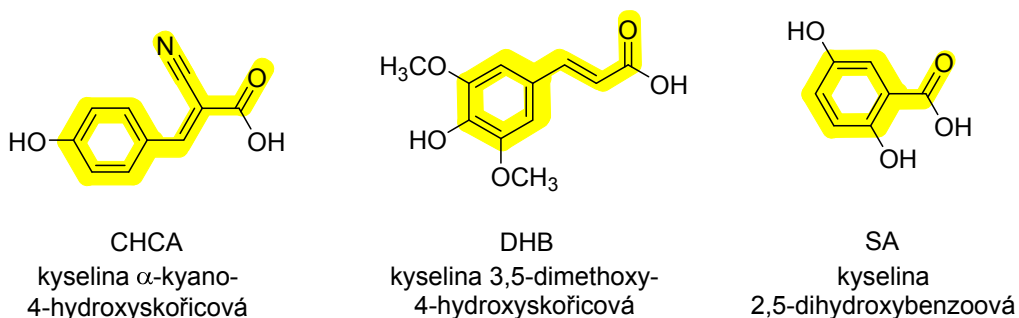
APPI je poměrně moderní metoda využívána při ionizaci především nepolárních sloučenin s molekulovou hmotností přibližně do 2 000 Da, např. flavonoidů, steroidů, pesticidů a polyaromatických uhlovodíků.

3.7. Ionizace laserem za účasti matrice (MALDI - Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)

Metoda ionizace MALDI se ukázala jako velmi účinná pro analýzu některých velkých biopolymerů - zejména v kombinaci s hmotnostním analyzátozem doby letu neboli **průletovým analyzátozem** (TOF – Time-Of-Flight), který má v podstatě teoreticky neomezený rozsah m/z .

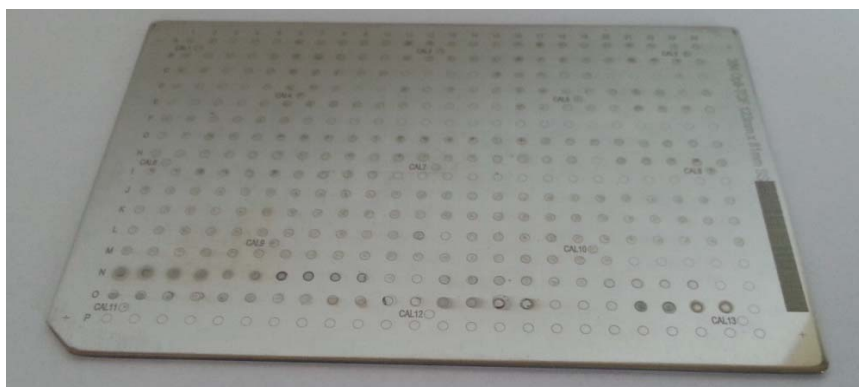
MALDI-TOF hmotností spektrometrie je univerzální analytická technika sloužící k detekci a charakterizaci směsí hlavně velkých organických molekul např. biopolymerů a syntetických polymerů. Tato ionizační metoda je založená na laserem indukované desorpci matrice malých organických molekul, která způsobí uvolnění analytu tak, aby se velké, křehké molekuly analytu dostaly do plynné fáze ve formě iontů, aniž by byly fragmentovány nebo rozkládány. MALDI je považována za velmi šetrnou měkkou techniku ionizace, která ionizuje celou molekulu analytu. Klíčovým v tomto procesu ionizace je použití matrice. Matrice je nízkomolekulová organická látka, která usnadňuje ionizační proces. Struktury několika běžných příkladů matric uvádí obrázek 18. Společné pro všechny matrice je přítomnost

konjugovaného π -systému (zvýrazněno žlutě), který je schopen absorbovat energii ve formě UV světla a rozptýlit molekuly analytu do plynné fáze.



Obr. 18. Struktury nejčastěji využívaných matic.

Odsolené roztoky matrice a analytu (nutný přebytek matrice – až 5 000 : 1) se nanesou na malou kovovou destičku známou jako **terčová** nebo **spotovací deska** (terčík). (Obr. 19) Terčová deska je obvykle vyrobena z leštěné nerezové oceli a má políčka tzv. spoty pro použití několika různých vzorků.

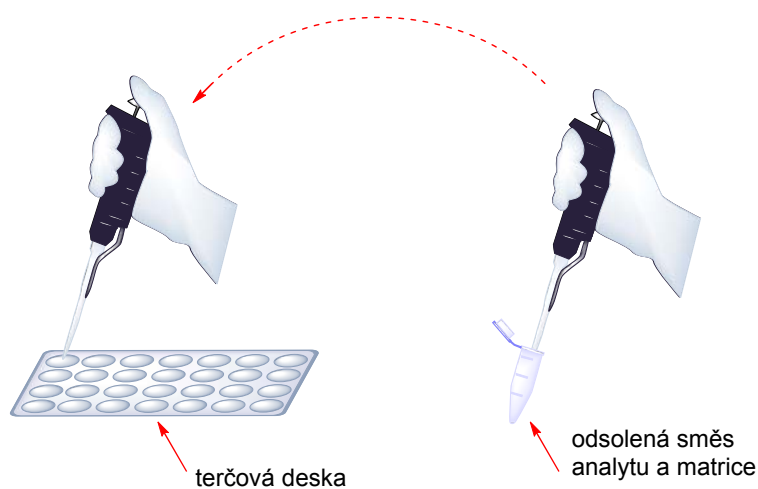


Obr. 19. **Terčová** nebo **spotovací deska** firmy Applied Biosystem.

Analyt se nejčastěji nanáší pipetou na terčovou desku rozpuštěný v rozpouštědle spolu s matricí. (Obr. 20) V případě přítomnosti anorganických solí (napr. z pufrů) ve vzorku je nutné vzorek předem zbavit těchto solí odsolením. Existuje několik technik na odsolení vzorků. Rovněž existuje několik způsobů nanášení vzorku a matrice na terčovou MALDI desku.

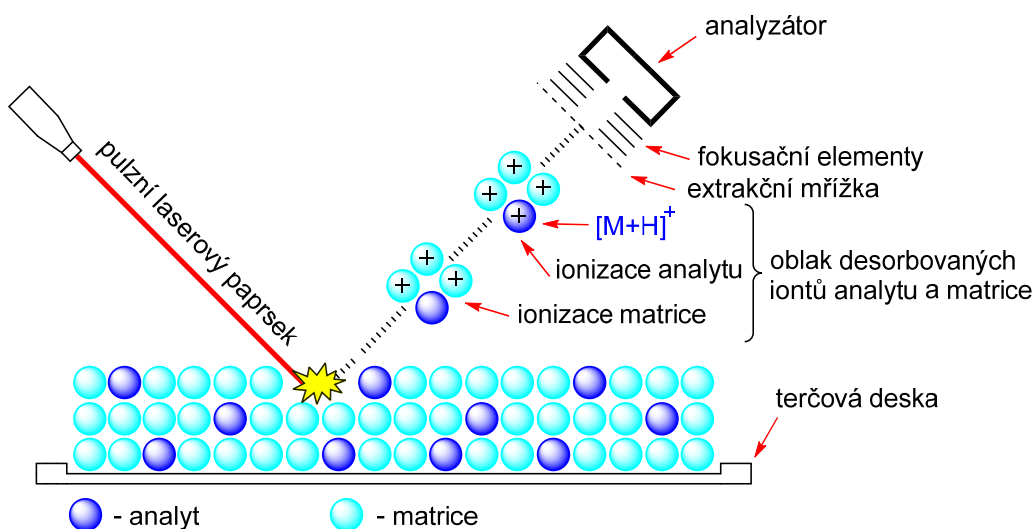
Rozpouštědlo se nechá odpařit z roztoku vzorku a matrice a zanechá za sebou pevný kokrytalizovaný vzorek na desce, která bude analyzována. Po vložení do spektrometru se prostor kolem terčové desky uvede do vakua a vzorek se zasáhne pulsním UV laserem obvykle s vlnovou délkou 337 nm (dusíkový laser). Délka pulsu se běžně pohybuje v rozsahu 0,5 – 20 ns. Kromě dusíkového laseru, který je cenově nejpříznivější, se používá také Nd:YAG laser s vlnovou délkou 355 nm, nebo nejnověji infračervený Er:YAG laser s vlnovou délkou 2,94 μm avšak diskuze o jejich výhodách a aplikacích jsou mimo rozsah tohoto textu. Energie laseru je absorbována molekulami matrice, kdy proběhne jejich razantní ablace z povrchu

vzorku, a tím se molekuly analytu spolu s matricí dostanou do plynné fáze. Během procesu ablace jsou molekuly analytu ionizovány, obvykle protonovým přenosem z blízkých molekul matrice. (Obr. 21)



Obr. 20. Nanášení vzorku analytu a matrice na terčovou desku pro MALDI MS spektrometr.

Při MALDI ionizaci vznikají převážně kvazimolekulové ionty $[M+H]^+$, nebo $[M-H]^-$, ionty $[M+2H]^{2+}$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ a jiné. Tyto generované ionty analytu v plynné fázi mohou být analyzovány nejčastěji průletovým (TOF) analyzátozem.



Obr. 21. Znázornění vlivu laserového záření na vzorek s matricí za účelem ionizace.

Na rozdíl od jiných forem ionizace MALDI nabízí řadu výhod, jako například elektronová ionizace (EI). Její zavedení spolu s ESI ionizací umožnilo studium molekul, které byly dříve neanalyzovatelné v plynné fázi, protože byli netěkavé, polární nebo příliš velké. Technika MALDI je považována za metodu měkké ionizace, což znamená, že po ionizaci molekulové ionty zůstávají neporušené. To umožňuje analyzovat pomocí hmotnostní spektrometrie i směsi sloučenin. Když jsou pozorovány pouze molekulové ionty, hmotnostní spektrum

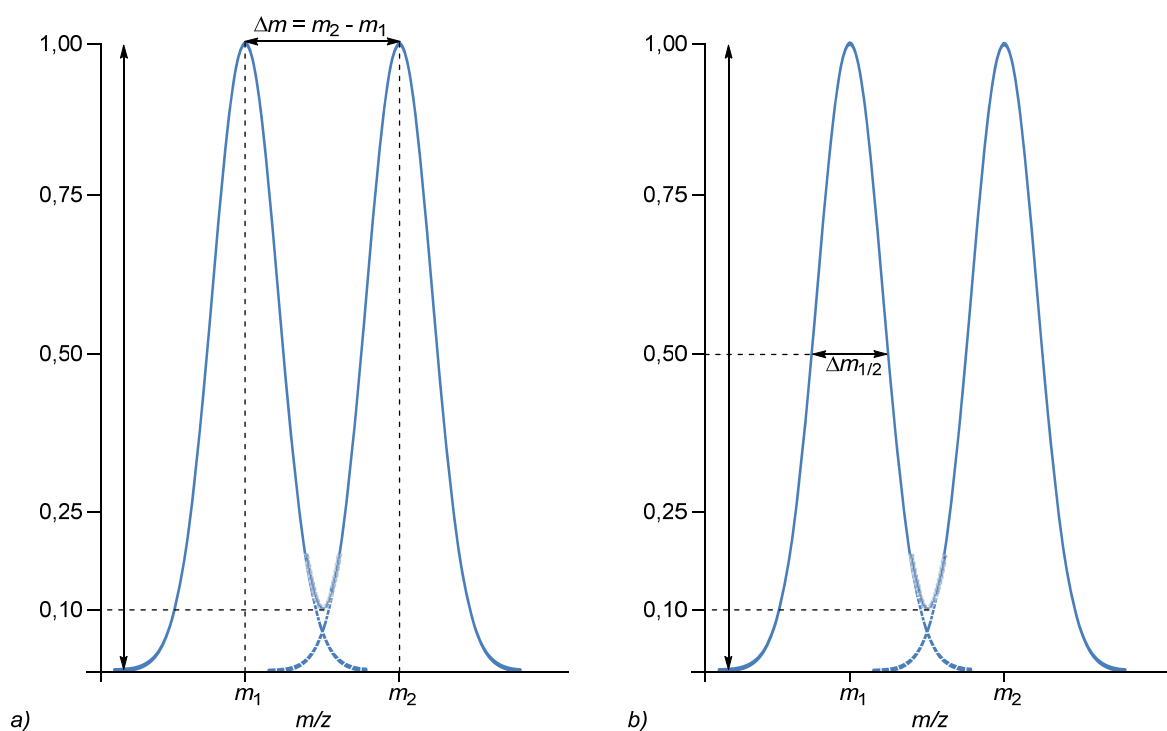
ukazuje složení této směsi, přičemž jednotlivé složky jsou uspořádaných poměrem jejich hmotnosti k náboji. To by nebylo možné nebo velmi obtížné v případě, že by hmotnostní spektrum obsahovalo fragmentové ionty. Další výhodou MALDI spočívá v možnosti skladování a archivace vzorků. Tím, že na terčové desce se po nanesení vzorku analytu s matricí a odpaření rozpouštědla vytvoří vrstvička pevného vzorku a laserové světlo svítí jenom na velmi malém procentu vzorku, většina vzorku zůstává nedotčena a je možné ji skladovat (např. pod inertní atmosférou, za chladu, ...) a opětovně použít na měření. MALDI nabízí univerzální molekulární analýzu s rozsáhlými aplikacemi nejenom v chemii a biochemii, ale také v biologii, farmacii, medicíně, průmyslu atd. Kromě klasických stanovení proteinů, peptidů, oligosacharidů, oligonukleotidů, metabolitů nebo i menších molekul se dneska využívají např. pro identifikaci mikroorganismu jako bakterií, kvasinek a plísní izolovaných z různých biologických materiálů, pro stanovení biomarkerů mnohých onemocnění apod.

4. Hmotnostní analyzátoři a detektory

K separaci jednotlivých iontů v hmotnostním analyzátoru dochází na základě jejich poměru hmotnosti k náboji. Teoreticky by signál, který vzniká po dopadu iontů se stejnou efektivní hmotností m/z na detektor, měl mít velmi úzký interval a tyto signály by ve výsledném spektru vypadaly spíše jako čáry. Ve skutečnosti však má takový signál tvar rozšiřujícího se píku (většinou Gaussovy křivky) a to z důvodu odlišné rychlosti (případně směru) stejných iontů při průletu analyzátořem. Míra rozlišení píku pro konkrétní ion souvisí s kvalitou hmotnostního analyzátořem. Rozšíření (šířka) jednotlivých píků charakterizuje nejdůležitější vlastnost spektrometru – rozlišovací schopnost. **Rozlišovací schopnost** (= Resolving Power, **RP**) vyjadřuje míru vzájemného odlišení dvou sousedních iontů s rozdílným poměrem m/z . Kvantitativně to můžeme vyjádřit jako poměr hmotnosti píku m_1 , který se z 10 % (popřípadě z 5 %) překrývá se sousedním píkem s hmotností m_2 , a rozdílem hmotností těchto sousedních iontů Δm respektive $m_2 - m_1$. (Obr. 22a) Vztah potom lze zapsat jako:

$$RP = \frac{m_1}{\Delta m} = \frac{m_1}{m_2 - m_1}$$

Jestliže je tedy $RP = 1\ 000$, dokážeme rozlišit sousední ionty s 10% překryvem píků s hmotností 100 a 100,1. Pro $RP = 100\ 000$ by bylo možné takto odlišit ionty s hmotnostmi 100 a 100,001. Toto vyjádření se dneska používá jenom zřídka a výhradě u sektorových přístrojů s magnetickým analyzátořem.



Obr. 22. Rozlišovací schopnost spektrometru vyjádřen způsobem a) nebo b).

V současnosti užívaný způsob vyjádření rozlišovací schopnosti spektrometru je založen na poměru hmotnosti určitého iontu m k šířce píku daného iontu Δm v určité výšce, nejčastěji 50 % $\Delta m_{1/2}$. (Obr. 22b) Vztah poté vypadá následovně:

$$RP = \frac{m_1}{\Delta m_{1/2}}$$

Hmotnostní spektrometry můžeme dělit na přístroje s vysokým a nízkým rozlišením. U přístrojů s nízkým rozlišením se RP pohybuje v rozmezí 600 – 3 000, zatímco u přístrojů s vysokým rozlišením od 25 000 až 150 000. To znamená, že dva sousední ionty lze rozlišit s přesností na 5 až 6 desetinných míst. Tohoto se v praxi využívá jen při molekulách s malou až střední molekulovou hmotností, neboť s narůstající hodnotou poměru m/z by musela narůstat i rozlišovací schopnost. Například, aby bylo možné rozlišit 2 píky iontů s 10%-ním překryvem, přičemž jeden z těchto píků leží při $m/z = 10\,000$ a hmotnost druhého píku se liší o 2 desetinné místa (0,01 hmotnostní jednotky), musela by rozlišovací schopnost přístroje být až 1 000 000, což je pro současné spektrometry nereálná hodnota. Proto se musí RP vztahovat k určité hodnotě nebo rozsahu m/z . Podmínkou pro výpočet RP je záznam spektra v tzv. **profilovém** (kontinuálním) módu, z kterého je možné změřit šířku píků (více v kapitole 6).

Dalším parametrem určujícím kvalitu hmotnostního analyzátoru je tzv. **přesnost** (správnost) určení hodnoty m/z (= Mass Accuracy). Ta slouží k číselnému vyjádření správnosti určení m/z iontu přístrojem. Přesnost měření vypovídá o chybě, resp. rozdílu mezi měřenou (experimentální) a vypočítanou (správnou) hodnotou efektivní hmotnosti.

$$\text{přesnost určení } m/z = \frac{(m/z)_{\text{exp}} - (m/z)_{\text{teor}}}{(m/z)_{\text{teor}}} \cdot 10^6$$

Je to bezrozměrná veličina vyjádřená v jednotkách **ppm**. Uvádí se se znaménkem, díky němuž zjistíme, jedná-li se o negativní nebo pozitivní odchylku. Jestliže je přesnost měření vysoká (< 5 ppm), můžeme spolehlivě určit přesné **elementární složení**, resp. **sumární vzorec** analyzované látky.

Vysoká rozlišovací schopnost spektrometru a vysoká přesnost měření nám umožňuje zjistit hmotnost molekulového nebo fragmentovaného iontu a odlišit tak látky s velmi blízkou hmotností, jako například propanal $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CHO}$ ($m/z = 58,04187$) a butan C_4H_{10} ($m/z = 58,07825$).

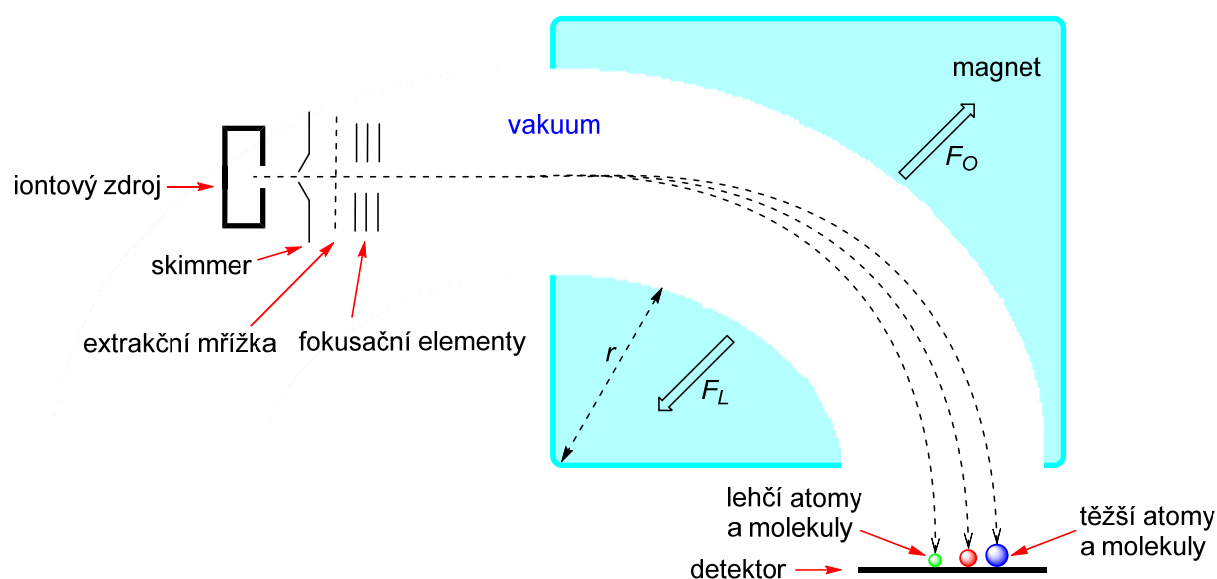
Hmotnost iontu lze vyjádřit dvěma způsoby. Buď pomocí **atomové hmotnostní konstanty** (také označována jako unifikovaná atomová hmotnostní jednotka u nebo dalton Da), ta je definována jako 1/12 hmotnosti izotopu ^{12}C , jehož hmotnost se konvenčně rovná 12,000 000 Da . Hmotnost iontu vyjádřená pomocí této jednotky je tzv. relativní hmotnost. Druhý, jednodušší způsob vyjádření hmotnosti iontu nám umožňuje **hmotnostní (nukleonové) číslo**. Toto číslo udává součet protonů a neutronů v daném iontu, respektive v jádře iontu.

Hmotnost protonů a neutronů se považuje za jednotkovou a vypočítat ji lze tak, že se relativní atomová resp. molekulová hmotnost iontu zaokrouhlí na celou jednotku hmotnosti. Takový způsob je sice jednodušší, avšak poskytuje jen malou rozlišovací schopnost a umožňuje určit hmotnost dvou rozdílných iontů s přesností na 1 Da (tedy rozdíl jedné nukleonové částice).

Hmotnostní analyzátor patří mezi základní části hmotnostního spektrometru. Jeho úlohou je rozdělení vzniklých iontů a fragmentů na základě jejich rozdílné hmotnosti. Typ hmotnostního analyzátoru určuje kvalitu a cenu hmotnostního spektrometru.

4.1. Magnetický sektorový analyzátor s jednoduchou a dvojitou fokusací iontů

Tento analyzátor je jeden z nejstarších disperzních přístrojů umožňující rozdělení iontů na základě jejich efektivních hmotností m/z . Obsahuje magnet tvořící statické magnetické pole, skrz které prolétávají kladně nabitě ionty, přičemž se separuje celkový iontový paprsek na samostatné iontové paprsky s individuálním poměrem m/z . (Obr. 23)



Obr. 23. Náčrt magnetického sektorového analyzátoru s jednoduchou fokusací iontů

Kladně nabitě ionty s hmotností m a nábojem z jsou urychlovány záporným elektrickým potenciálem (napětím) V . Ionty následně vstupují do homogenního magnetického pole s indukcí B , kde se jejich dráha zakřivuje a opisují trajektorii o poloměru r .

Urychlením získají ionty potenciální energii E_p , rovnající se kinetické energii E_k , takže platí:

$$E_p = z \cdot V \quad E_k = \frac{m \cdot v^2}{2}$$

resp.

$$E_K = E_P = z \cdot V = \frac{m \cdot v^2}{2}$$

Kde v představuje rychlost daného iontu v magnetickém poli po urychlení. Úpravou tohoto vztahu pro rychlost v potom získáme:

$$v^2 = \frac{2z \cdot V}{m} \text{ a tedy } v = \sqrt{\frac{2z \cdot V}{m}}$$

Na každou nabitou částici v magnetickém poli působí **dostředivá síla** F_D způsobená **magnetickou** tzv. **Lorentzovou silou** F_L . Tato síla je kolmá na vektor rychlosti a způsobuje, že daný ion při letu opisuje dráhu kružnice s poloměrem r . Z pohybu iontu po kruhové dráze vyplývá, že dostředivá síla F_D je v rovnováze s odstředivou silou F_O . Tento vztah zapíšeme jako:

$$F_L = B \cdot z \cdot v \quad F_O = \frac{m \cdot v^2}{r}$$

$$F_L = F_D = F_O$$

$$B \cdot z \cdot v = \frac{m \cdot v^2}{r}$$

Po odvození pro m/z :

$$m/z = \frac{B \cdot r}{v}$$

Jestliže tedy dosadíme za rychlost v výše upravený vztah, získáme rovnici:

$$m/z = \frac{B \cdot r}{v} = \frac{B \cdot r}{\sqrt{\frac{2z \cdot V}{m}}}$$

Z tohoto vztahu lze vyjádřit **základní rovnici pro magnetický analyzátor**:

$$m/z = \frac{B^2 \cdot r^2}{2V}$$

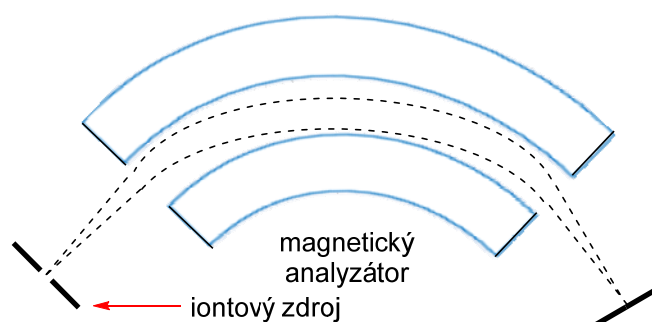
Na jejímž základě můžeme popsat **závislost efektivní hmotnosti** m/z **na experimentálních parametrech**. Hmotnost m se udává v relativních jednotkách, náboj z představuje násobek náboje jednoho elektronu, respektive počet elementárních nábojů. Poloměr r je neměnný, z rovnice tedy vyplývá, že jestliže chceme, aby jednotlivé ionty s různými hodnotami m/z postupně dopadaly na detektor, musíme měnit buď velikost magnetické indukce B nebo

velikost urychlovacího napětí V . Mluvíme potom o **magnetickém** anebo **elektrickém** (napěťovém) **skenování**, v praxi se můžeme setkat s oběma metodami.

Elektrické skenování však provází několik nevýhod. Velikost urychlujícího napětí ovlivňuje celkový počet a fokusaci iontů dopadajících do štěrbinu detektoru, proto je změna velikosti tohoto napětí při skenovacím procesu značně omezená.

Magnetické skenování je výhodnější z hlediska skenování celého hmotnostního rozmezí při konstantní hodnotě V . Drobnou nevýhodou je pouze kvadratická závislost poměru m/z na hodnotě B , která způsobuje, že píky iontů s vyšší efektivní hmotností se ve spektru jeví blíže u sebe než píky nižších hodnot. Tento problém lze vyřešit striktně stabilizovaným napájením elektromagnetu elektrickým proudem.

Ionty v iontovém zdroji vznikají na různých místech a pohybují se určitou rychlostí ještě před samotným urychlením. Po urychlení vstupují skrz štěrbinu do magnetického sektoru s malými rychlostními rozdíly a s určitou směrovou divergencí. Konkrétní svazek iontů se stejnou efektivní hmotností m/z se po proletění magnetickým polem soustředí do jednoho bodu tzv. ohniska, kde se nachází detektor. Jedná se o **směrovou fokusaci** magnetického pole. Tyto hmotnostní spektrometry řadíme mezi přístroje s **jednoduchou fokusací**. (Obr. 24)



Obr. 24. Příklad jednoduché fokusace

Takové přístroje mají jen malou rozlišovací schopnost, zpravidla se $RP = 300 - 3000$. Nízká rozlišovací schopnost je způsobená tím, že ionty po směrové fokusaci mají stále různé hodnoty kinetické energie.

Kinetickou energii tedy rychlost iontů lze sjednotit pomocí **elektrostatického analyzátoru**. Tento pomocný disperzní prvek je tvořen dvěma zakřivenými (cylindrickými) elektrodami, ty jsou připojeny na zdroj vysokého napětí. Ionty vstupující do elektrického sektoru mají kinetickou energii $E_K = E_P = z \cdot V$ a tedy opět platí:

$$E_K = E_P = z \cdot V = \frac{m \cdot v^2}{2}$$

Odvozením pro rychlost v :

$$v = \sqrt{\frac{2z \cdot V}{m}}$$

Elektrické pole působí na každou nabitou částici dostředivou silou F_D , ta je způsobena **elektrickou silou** $F_E = z \cdot E$, kde E je intenzita elektrického pole. I tato síla je kolmá na vektor rychlosti a zapříčiňuje, že ionty budou opisovat dráhu kružnice s poloměrem r . Velikost této síly se rovná velikosti odstředivé síly F_O . Jestliže se $F_O = F_D$, můžeme odvodit následující:

$$F_E = z \cdot E \quad F_O = \frac{m \cdot v^2}{r}$$

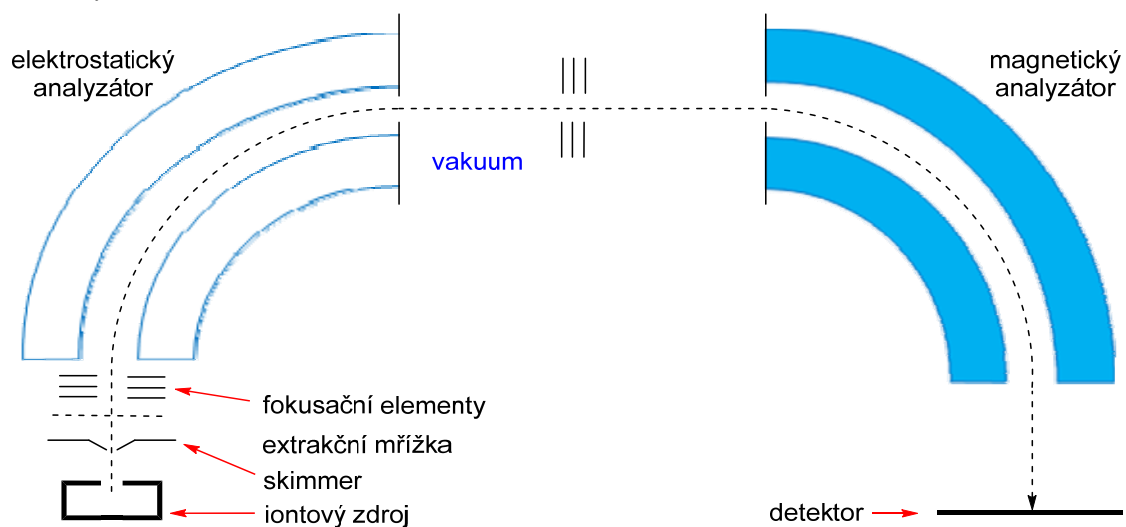
$$F_E = F_D = F_O$$

$$z \cdot E = \frac{m \cdot v^2}{r}$$

Dosažením rychlosti v a vypočtením rovnice pro poloměr r získáme vztah:

$$r = \frac{2V}{E}$$

Z této rovnice vyplývá, že poloměr kruhu, který bude částice opisovat při konstantní intenzitě elektrického pole E , závisí jen na akcelerujícím napětí V a to nezávisle na různých efektivních hmotnostech m/z . Při stálém poloměru r lze měnit velikost urychlujícího potenciálu V tak, aby štěrbinou proletěly jen částice s požadovanou rychlostí (kinetickou energií), zatímco ostatní částice narazí do stěn elektrod. Do magnetického sektoru následně vstupuje energeticky sjednocený iontový svazek a až tady dochází k rozdělování iontů na základě poměru m/z .



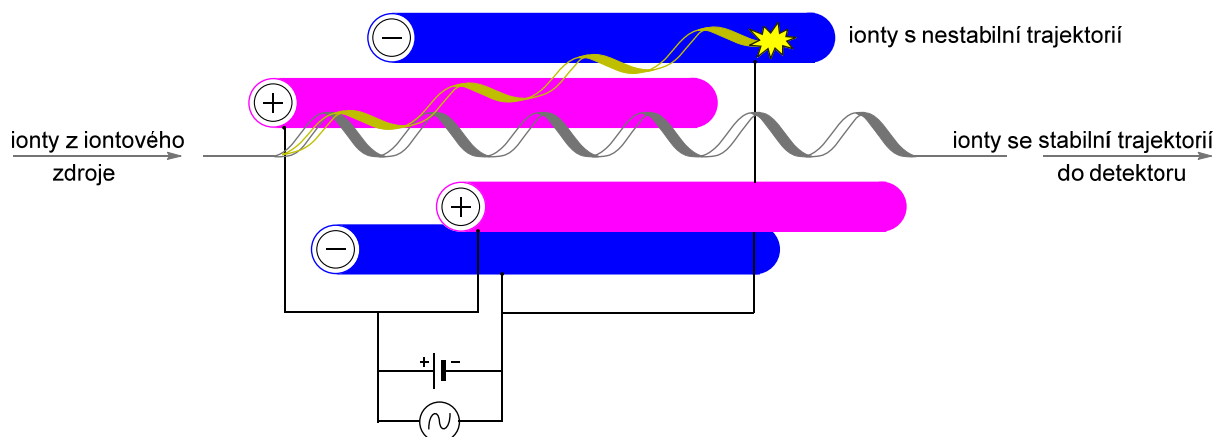
Obr. 25. Schéma magnetického sektorového analyzátoru s dvojitou fokusací iontů s uspořádáním (E-B).

Hmotnostní spektrometry s elektrostatickým analyzátozem umožňující **rychlostní fokusaci** označujeme jako **přístroje s dvojitou fokusací**. Uspořádání elektrického sektoru je variabilní. Můžeme se tedy setkat s „normálním“ uspořádáním (**E-B**) nebo „opačným“ (**B-E**), kde se elektrostatický analyzátor nachází až za magnetickým. Pomocný elektrický sektor dokáže výrazně zvýšit rozlišovací schopnost přístroje k hodnotám $RP > 10\,000$.

4.2. Kvadrupólový analyzátor

Kvadrupólový analyzátor umožňuje separaci iontů v závislosti na hodnotách m/z pomocí **elektrického pole** bez použití magnetů. Elektrické pole vytváří **čtyři** pravidelně uspořádané **paralelní válcovité elektrody** s délkou přibližně 15 cm. Na jednu dvojici protilehlých elektrod je aplikované **kladné jednosměrné napětí $+U$ a střídavé vysokofrekvenční napětí $+V_{VF}$** , na **druhou dvojici stejně velké, záporné, jednosměrné napětí $-U$ a střídavé vysokofrekvenční napětí $-V_{VF}$** . Střídavé napětí je definováno průběhem $V_{VF} = V_0 \cdot \cos \omega \cdot t$, kde ω je uhlová frekvence. Toto střídavé napětí je od záporného fázově posunuto o 180° a má řádově 6-krát větší amplitudu jako kladné nebo záporné jednosměrné napětí: $V_0 > |U|$ (např. $U = 400\text{ V}$ a $V_0 = 2\,500\text{ V}$). Obě napětí se na každé dvojici elektrod skládají (v tomto případě by napětí oscilovalo mezi hodnotami $+2\,900\text{ V}$ až $-2\,100\text{ V}$). Středová osa, do které vstupují ionty z iontového zdroje a směřují k detektoru, je udržována na nulovém potenciálu. Vysokofrekvenční střídavé napětí V_{VF} bývá také označováno jako radiofrekvenční (V_{RF}), neboť jeho frekvence se pohybuje řádově v jednotkách megahertz.

Mechanismus tohoto analyzátoru nejlépe vysvětlíme, když rozdělíme elektrody na kladné a záporné. Pokud by byly dvě protilehlé elektrody (v ose X) připojené pouze na zdroj **kladného** jednosměrného napětí, pak by kladné ionty jakékoliv hmotnosti byly odpuzovány od těchto elektrod a prošly by přímo mezi nimi. Abychom dokázali separovat těžší ionty od lehčích, potřebujeme na elektrody aplikovat střídavé napětí. To mění svoje znaménko (polaritu) v závislosti na čase a frekvenci oscilování. Pokud je toto napětí kladné, ionty budou stále odpuzovány. Jakmile ale napětí začne přecházet do záporné půlperiody oscilace a záporná hodnota tohoto napětí převýší hodnotu jednosměrného napětí, elektrody se stanou dočasně negativní (tj. přepólují se). Kladné ionty budou k záporným elektrodám přitahovány a eventuálně mohou do jedné z nich narazit. Fakt, zda ionty do elektrody narazí, závisí od jejich **hmotností, velikostí nábojů**, síly elektrického pole a **frekvenci oscilování střídavého napětí**.



Obr. 26. Schématický diagram kvadrupólového analyzátoru.

Ionty s větší efektivní hmotností m/z mají **větší setrvačnost**, takže reagují na změnu polarity jen velmi málo a dokáží **stabilním oscilačním pohybem** projít až k detektoru (než se jejich dráha výrazně vychýlí, polarita se znovu změní na kladnou a jsou opět odpuzovány). Lehčí ionty jsou naopak více ovlivňovány změnami polarity střídavého napětí a opisují **nestabilní oscilační dráhy**. Mají menší setrvačnost, takže snáze změni směr k záporné elektrodě. Opakovanými změnami polarity napětí narůstá amplituda kmitavého pohybu iontů, dokud nenarazí do jedné z elektrod. Skrz kladné elektrody se k detektoru dostanou jen ionty s relativní hmotností **větší**, než je určitá hodnota m/z , proto nazýváme kladné elektrody **high mass filter** (filtr těžší hmotnosti). Ionty tímto „filtrem“ buď projdou, nebo narazí do jedné z elektrod.

Kdyby byl druhý pár protilehlých elektrod (v ose Y) připojený pouze na zdroj **záporného** jednosměrného napětí, pak by byly kladné ionty k těmto elektrodám přitahovány nezávisle na jejich efektivní hmotnosti. Aplikováním střídavého napětí, začínajícího v záporné půlperiodě oscilace se nic nezmění. Jakmile ale toto napětí přejde do pozitivní půlperiody a hodnota tohoto napětí převyší hodnotu jednosměrného napětí, stanou se elektrody dočasně pozitivní. Těžké ionty vzhledem ke své vysoké setrvačnosti, jež byly přitahovány k záporným elektrodám, nedokáží rychle reagovat na změnu polarity elektrod a opisují **nestabilní oscilační dráhy**, až nakonec do jedné z elektrod narazí. Lehčí ionty však dokáží rychle reagovat na změny polarity střídavého napětí a opisují **stabilní oscilační dráhy**, díky nimž se dostanou až k detektoru. Z tohoto důvodu se záporné elektrody nazývají **low mass filter** (filtr malých hmotností). Kladné ionty tímto „filtrem“ projdou jen do určité efektivní hmotnosti m/z .

Spojením těchto čtyř elektrod získáme **dvojitý hmotnostní filtr** (double mass filter). Kladné ionty se pohybují po stabilních nebo nestabilních **prostorových** (spirálovitých) **drahách**. Při určitém poměru obou aplikovaných napětí projde filtrem pouze úzký pás iontů s určitou hodnotou m/z . Postupnou změnou jednosměrného napětí U a střídavého napětí V_{RF} od nuly po maximální hodnotu (při zachování konstantního poměru U/V_{RF}) dokážeme proskenovat celé spektrum efektivních hmotností.

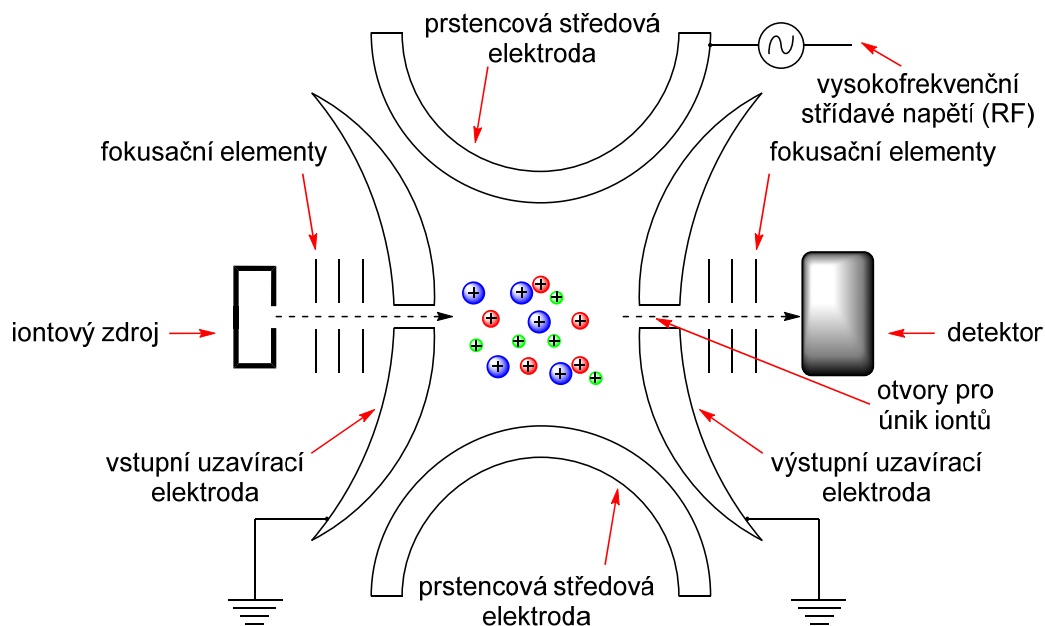
Kvadrupólový analyzátor pracuje při vysoké rychlosti a hmotnostní spektrum se zaznamenává v průběhu zlomků sekundy. Tato rychlost má velký význam při kombinaci hmotnostní spektrometrie s chromatografickými metodami, kde je možné zaznamenat několik hmotnostních spekter jednoho chromatografického píku. Analyzátor je schopný měřit spektra iontů do efektivní hmotnosti $m/z = 4\ 000$, avšak má celkem malou rozlišovací schopnost. Výhodami jsou nízká cena, potřeba nižšího vakua (oproti sektorovým analyzátorům) v rozmezí 10^{-3} až 10^{-5} Pa a možnost tandemového uspořádání MS/MS (nejčastěji triple quadrupole).

4.3. Iontová past

Hmotnostní analyzátoři založené na principu iontové pasti fungují na podobném principu jako kvadrupólové hmotnostní filtry – využívají proměnlivé elektrické pole na zachycení kladných iontů. Obdobně také využívají střídavé radiofrekvenční napětí, díky němu bývají označovány jako radiofrekvenční pasti nebo **Paulovy pasti** podle svého vynálezce Wolfganga Paula, který za vývoj této metody získal v roce 1989 Nobelovu cenu za fyziku.

Radiofrekvenční pasti se skládají ze 3 elektrod s hyperbolickým profilem: střední = prstencové (kruhové, ring) elektrody a dvou protilehlých vypuklých (koncových, endcaps) elektrod, které tvoří dno a záklop iontové pasti. (Obr. 27) Tyto dvě elektrody obsahují otvory pro vstup iontů z iontového zdroje a výstup k detektoru. Ionty se po vstupu do pasti pohybují v prostoru mezi těmito třemi elektrodami. V tomto prostoru působí proměnlivé elektrické pole, jež zadržuje všechny ionty různých hmotností, přičemž se tyto ionty pohybují po **stabilních oscilujících drahách** (Lissajousovy křivky). Změnou amplitudy vloženého napětí se oscilující dráhy stávají nestabilními a ionty se postupně vypuzují z pasti směrem k detektoru v pořadí narůstajících efektivních hmotností m/z .

Hlavním rozdílem oproti kvadrupólovému filtru je, že ionty dopadající na detektor nemají stabilní trajektorii letu, nýbrž **nestabilní dráhu**. Kromě toho iontové pasti nevyžadují přítomnost jednosměrného napětí (i když i to se může použít). Vnitřní tlak bývá řádově větší než u kvadrupólu tj. 1 – 0,1 Pa. Vyšší tlak je způsoben přítomností helia, které stabilizuje pohyb iontů v iontové pasti a tím i zvyšuje rozlišovací schopnost samotného přístroje. Analyzátoři na principu iontové pasti mohou skenovat efektivní hmotnosti iontů do hodnot $m/z\ 2\ 000$ s rozlišovací schopností $RP < 10\ 000$. Tuto rozlišovací schopnost lze zvýšit zmenšením rychlosti skenování – tedy rychlostí, při níž budou jednotlivé ionty z pasti vypuzované.

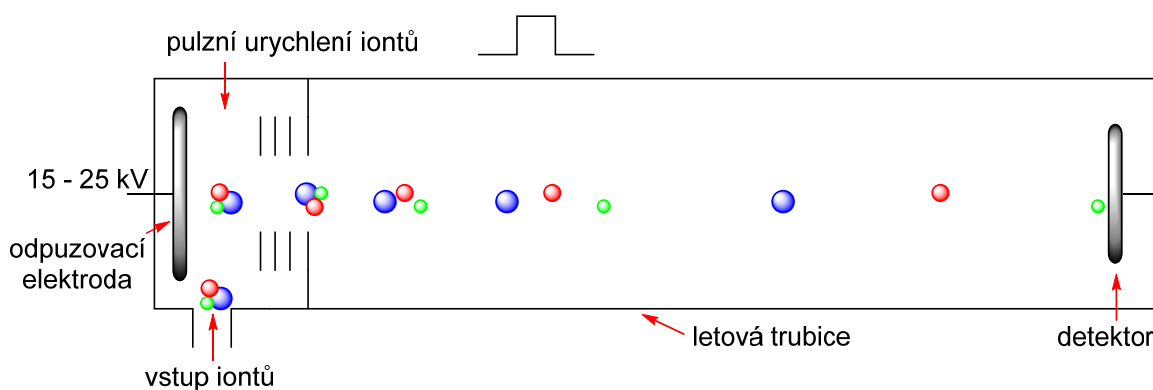


Obr. 27. Schéma iontové pasti.

Iontová past umožňuje spojení s plynovou a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií jako i tandemové uspořádání analyzátorů MS – MS, až v několika sériích. Tohoto se využívá při sledování fragmentačních cest a objasňování složitých struktur organických látek.

4.4. Průletový analyzátor (TOF – Time-Of-Flight)

Průletový hmotnostní analyzátor neboli analyzátor doby letu využívá k určení hmotnosti čas, za který ionty přeletí vzdálenost od vstupu do analyzátoru k detektoru. První koncepty metody TOF vznikly už ve 30. letech 20. století a v průběhu dalších let vývoj rychle postupoval. Koncem šedesátých let však začaly být vytlačovány cenově dostupnějšími a v té době také přesnějšími kvadrupólovými filtry. Opětovný zájem o tento typ analyzátoru podmínil až vývoj ionizační metody MALDI a jejich vzájemné propojení. Průletový analyzátor může být lineární (Obr. 28) nebo s reflektorem (rTOF). (Obr. 29)



Obr. 28. Schéma lineárního TOF analyzátoru.

Lineární průletový analyzátor se skládá z akceleračních elektrod, evakuované letové trubice a detektoru. Letová trubice měří obvykle 100 – 200 cm. Ionty jsou urychlovány pulzně v periodických svazcích elektrickým potenciálem V o velikosti v rozsahu 15 – 25 kV na stejnou hodnotu kinetické energie E_K :

$$E_K = E_P = z \cdot V = \frac{m \cdot v^2}{2}$$

Urychlené ionty vstupují úzkou štěrbinou do letové trubice, kde se pohybují různou rychlostí v závislosti na efektivních hmotnostech m/z a dopadají v různém čase na detektor. Čas t , za který ion dopadne na detektor je definovaný vztahem:

$$t = \frac{l}{v}$$

kde l je délka letové trubice a v je rychlost iontu. Rychlost v odvodíme jako:

$$v = \frac{l}{t}$$

Dosazením rychlosti v do rovnice pro výpočet kinetické energie E_K a následnou úpravou získáme vztah:

$$\frac{m \cdot l^2}{2t^2} = z \cdot V$$

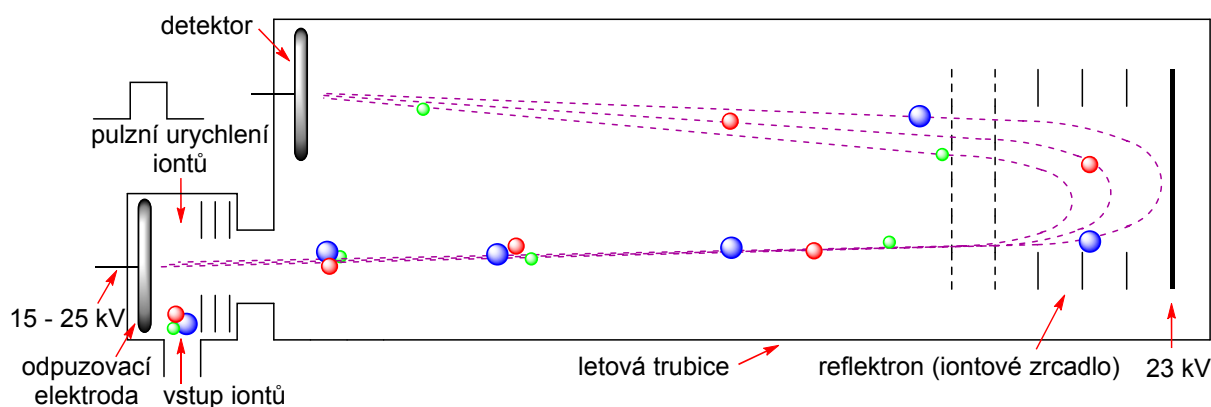
Úpravou rovnice pro poměr hmotnosti k náboji m/z dostaneme rovnici:

$$m/z = \frac{2V \cdot t^2}{l^2}$$

Z tohoto vztahu vyplývá, že při konstantní délce letové trubice a neměnném urychlovacím napětí bude čas, za jaký ion dopadne na detektor, závislý od jeho efektivní hmotnosti m/z . Volně řečeno, čím je ion lehčí, tím kratší bude čas jeho letu trubicí analyzátoru k detektoru.

Lineární uspořádání analyzátorů TOF je spojeno s nižší rozlišovací schopností především z důvodů prostorového rozprostření a odlišných velikostí kinetických energií iontů před akcelerací. Rozlišovací schopnost lze zvýšit pomocí tzv. **iontového zrcadla**, neboli reflektromu (uspořádání průletového analyzátoru s reflektromem – rTOF). (Obr. 29) Iontové zrcadlo je v podstatě elektrické pole, jehož intenzita je větší než intenzita akceleračního pole. Ionty jsou tímto polem postupně zpomalovány různě dlouhou dobu v závislosti na jejich počáteční kinetické energii. Těžší ionty zpomalují déle než lehčí a jsou tedy déle „zadržovány“. Po tom, co ionty dosáhnou nulové kinetické energie, jsou z tohoto elektrického pole vypuzovány směrem k detektoru se stejnou kinetickou energií, s jakou do tohoto pole vešly. Dochází však **k prodloužení času letu** iontů. Touto **časovou fokusací** se zmenšuje rozdíl počátečních kinetických energií iontů a zvyšuje se rozlišovací schopnost až několikanásobně oproti

původnímu lineárnímu uspořádání. Použití reflektoru dokáže výrazně zvýšit rozlišovací schopnost přístroje až k hodnotám $RP > 15\,000$. Dalším prodloužením letové trubice je možné ještě více zvýšit rozlišovací schopnost přístroje.



Obr. 29. Schéma průletového analyzátoru s reflektorem (rTOF).

Na rozdíl od ostatních typů hmotnostních analyzátorů není metoda TOF omezená maximální hodnotou efektivní hmotnosti a je prakticky využívána až do $1\,000\,000\text{ Da}$. Této skutečnosti se využívá při studiu biopolymerů s vysokými molekulovými hmotnostmi zejména v kombinaci s ionizační technikou MALDI nebo ESI.

Principiálně jiným druhem analyzátorů jsou **iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR)**, **elektrostatická orbitální past – Orbitrap** a **analyzátor iontové pohyblivosti**. Nicméně diskuze o jejich technických podrobnostech je mimo rozsah tohoto textu.

4.5. Tandemové uspořádání MS/MS

Tandemové uspořádání analyzátorů v hmotnostní spektrometrii se používá k detailní charakterizaci analytu. Toto uspořádání obsahuje minimálně dva analyzátorů nejčastěji spojené tzv. **kolizní celou**. Technika MS/MS (resp. MS^n) zabezpečuje vícestupňovou tvorbu iontů, jejich analýzu a fragmentaci. Největší význam má právě při studiu fragmentů a fragmentačních cest. K fragmentaci mezi jednotlivými analyzátorů dochází buď samovolným rozpadem (vlivem vnitřní energie) nebo za pomoci kolizního plynu (např. vzduchu nebo některého ze vzácných plynů).

Tandemové uspořádání MS umožňuje **selektivně analyzovat** vybraný ion tzv. **prekurzorový** (zkoumaný) **ion**, z něhož vznikají fragmentové ionty. Obvykle dochází k výběru prekurzorového iontu v prvním analyzátoru, ten je podroben fragmentaci v kolizní cele. Následuje analýze fragmentových tzv. **produktových** iontů v druhém analyzátoru. Ty jsou

zaznamenávány a mohou být opět podrobeny další fragmentaci. Tato metoda výrazně ulehčuje určení struktury látky, díky čemuž se dnes uplatňuje ve **strukturní analýze** sloučenin.

Tandemová MS^n technika nejčastěji využívá kvadrupólové filtry nebo iontové pasti s uspořádáním za sebou (Triple Q), analyzátor s dvojí fokusací a kvadrupólovými filtry, kvadrupól – TOF, TOF – TOF atd. Umožňuje také spojení s plynovou nebo kapalinovou chromatografií, takže lze separovaně analyzovat všechny složky směsi. Tandemové hmotnostní spektrometry našly uplatnění nejenom ve strukturní analýze, ale také v **kvantitativní analýze**.

4.6. Detektory.

Detektory jsou součástí všech hmotnostních spektrometrů vyjma iontové cyklotronové rezonance s Fourierovou transformací (FTICR) a Orbitrapu, kde je detekce prováděna přímo v analyzátoru. Iontový tok procházející úzkou výstupní štěrbinou hmotnostního analyzátoru je velmi malý a proto je potřebné jej zesílit. V detektoru dochází k jeho převedení na elektrický signál a zesílení. Detektorem v hmotnostních spektrometrech bývá nejčastěji elektronový násobič, fotonásobič, nebo tzv. Faradayova klec, nicméně diskuze o technických podrobnostech různých metod detekce iontů jsou mimo rozsah tohoto textu.

5. Hmotnostní spektrum

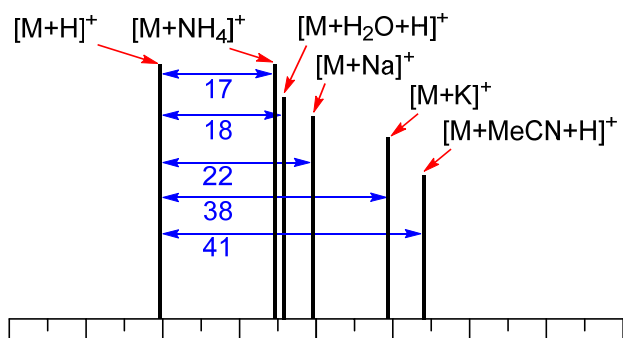
Hmotnostní spektrum vyjadřuje poměrové zastoupení jednotlivých iontů vzniklých po ionizaci a případné fragmentaci analyzované látky. Toto spektrum podává důležité informace o struktuře analyzované látky, především vyjadřuje **molekulovou hmotnost**, z které je možné následně určit i **sumární vzorec analytu**. V případě použití EI ionizace je možné vzájemně porovnávat hmotnostní spektra se spektry v standardních databázích, díky čemuž lze dané látky identifikovat.

Hmotnostní spektrum tvoří souřadnicové osy X a Y. Na vodorovné ose **X** se nacházejí **hodnoty** efektivních hmotností m/z a svislá osa **Y** reprezentuje **intenzitu** (odezvu) jednotlivých píků v procentech. Tvar píků připomíná Gaussovu křivku a pokud hmotnostní spektrum zůstane v takovéto podobě zachované, hovoříme o **profilovém** (kontinuálním) spektru. Z profilového spektra je možné vyčíst jednotlivé šířky píků. Toto spektrum může být zjednodušeno do sloupcového grafu, při němž se poloha signálu odečítá z těžiště píku a jeho intenzita zodpovídá výšce nebo ploše. Touto úpravou spektra získáme tzv. **histogram**. Hmotnostní spektrum se následně **normalizuje** – absolutní hodnoty intenzit se převedou na relativní v rozmezí 0 až 100 %. Nejintenzivnější pík se nazývá **základní pík** (base peak) a intenzity ostatních píků jsou vztaženy vůči němu.

Molekulový ion vzniká vyražením jednoho elektronu z molekuly analyzované látky – jedná se tedy o molekulu s kladným nábojem a nepárovým počtem elektronů, tzv. **kationradikál $M^{+\bullet}$** . Přítomnost molekulového iontu v hmotnostním spektru umožňuje určit relativní molekulovou hmotnost analyzované látky. Přesnost s jakou lze určit relativní hmotnost molekuly, určuje rozlišovací schopnost hmotnostního spektrometru. Dnešní přístroje dokáží změřit hodnotu hmotnosti s přesností na pět nebo šest desetinných míst. U přístrojů s nižší rozlišovací schopností se stanovuje pouze hmotnostní (nukleonové) číslo molekulového iontu. Přítomnost a intenzita molekulového píku závisí od struktury analyzované látky a typu ionizační metody.

Abychom mohli konkrétní ion definovat jako molekulový, **musí splnit následující podmínky**:

Molekulový ion musí mít největší hmotnost z daného hmotnostního spektra. Přitom se přihlíží na přítomnost: izotopových iontů $[M+1]^{+\bullet}$, $[M+2]^{+\bullet}$, aduktů s protonem $[M+H]^+$, s kationy např. alkalických kovů, stříbra, amonného kationtu $[M+Kat]^+$, s molekulami rozpouštědla (voda, acetonitril, atd.), ale také na produkty ionto-molekulových reakcí např. $[M+CH_3CO]^+$. Kromě aduktů se musí přihlížet také na negativní ionty, např. ion $[M-H]^-$. Adukt $[M+H]^+$ je charakteristický pro větší počet (měkkých) ionizačních technik, často je označován jako **kvázimolekulový ion**. Na obrázku 30 (ESI-MS) vidíme různé typy aduktů a rozdíly v efektivních hmotnostech.



Obr. 30. Příklady užitečných aduktů pro interpretaci ESI-MS

Pokud analyzovaná organická látka obsahuje pouze běžné prvky (H, C, O, S, N, halogeny) a v její struktuře se **nenachází dusík**, hmotnostní číslo molekulového iontu bude **sudé**. Stejně tak bude hmotnost iontu **sudá**, jestliže se v molekule nachází **sudý počet dusíkatých atomů**. Pokud se ve struktuře nachází **lichý počet atomů dusíku**, bude i hmotnostní číslo molekulového iontu **liché**. Tento fakt označujeme jako tzv. **dusíkové pravidlo** a platí jen pro molekuly s běžně se vyskytujícími prvky. Pravidlo se nevztahuje na organokovové sloučeniny, neboť některé kovy mají liché hmotnostní číslo.

Mezi molekulovým iontem a fragmentovými ionty musí existovat logická spojitost. Fragmentové ionty vznikají po odštěpení radikálů nebo neutrálních molekul např. alkylové skupiny $[M-15]^+$, vody $[M-18]^+$, karbonylu $[M-28]^+$ a podobných. Přičemž vylučujeme nepravděpodobné fragmenty s rozdílem hmotnosti od potenciálního molekulového iontu v intervalu 4 – 14, 21 – 25 anebo hodnoty 37, 38 apod. Jestliže tato podmínka není splněna, uvažovaný pík nereprezentuje molekulový ion. V takovém případě se s největší pravděpodobností jedná o hmotnostní spektrum dvou nebo více látek.

Mezi intenzitou molekulového píku a strukturou analyzované látky existuje přímý vztah. Platí tedy, že s rostoucím počtem cyklů a nenasycených dvojných vazeb intenzita molekulového píku roste. Při elektronové ionizaci klesá intenzita molekulového píku v pořadí: aromát a nenasycený heterocyklus > konjugované olefiny > cykloalkany > thioly > sulfidy > nerozvětvené uhlovodíky > ketony > aminy > estery > ethery > karboxylové sloučeniny > rozvětvené uhlovodíky > alkoholy. Intenzita molekulového píku s větvením řetězce v dané homologické řadě klesá.

5.1. Izotopové ionty v hmotnostní spektrometrii

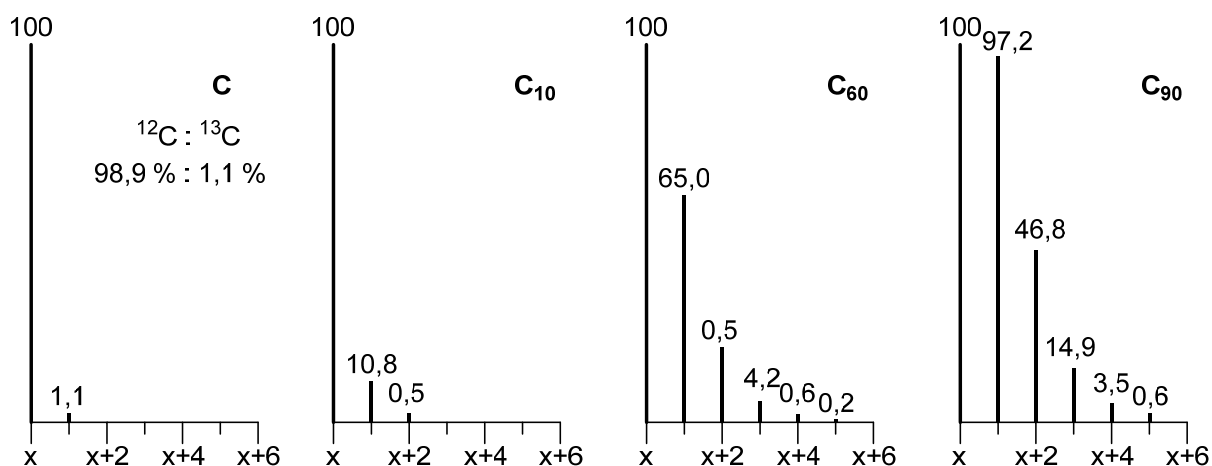
Konstantní zastoupení stabilních izotopů v přírodě se odráží i na hmotnostním spektru analyzované látky. Jednotlivé prvky obsahující jeden nebo více těžších izotopů provázejí ve spektru molekulový ion i ionty jeho fragmentů. Doprovodné píky izotopových iontů odvozené od molekulového iontu se označují $[M+1]^+$, $[M+2]^+$ (popřípadě vyššími čísly). Přehled relativního zastoupení stabilních izotopů běžných elementů uvádí tabulka č. 4.

Relativní intenzita těchto píků a jejich zastoupení závisí od sumárního (molekulového) vzorce analyzované látky. S větší molekulovou hmotností (resp. s větším počtem atomů v molekule) narůstá intenzita, ale i počet píků izotopových iontů.

Tabulka č. 4. Relativní zastoupení stabilních izotopů běžných elementů.

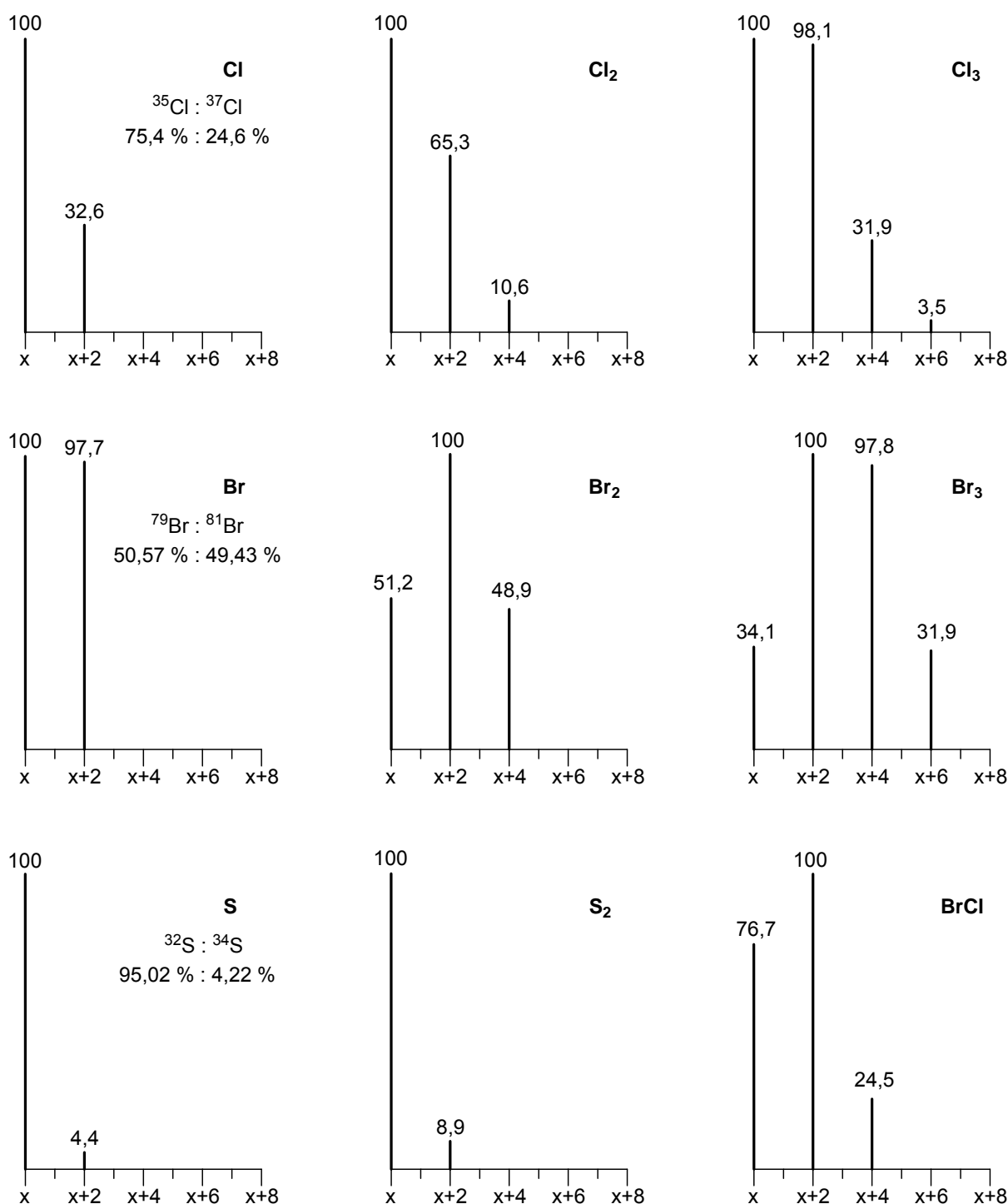
Element	M		M+1		M+2		M+4	
	izotop	%	izotop	%	izotop	%	izotop	%
vodík	¹ H	99,985	² H	0,015	-	-	-	-
uhlík	¹² C	98,892	¹³ C	1,108	-	-	-	-
dusík	¹⁴ N	99,635	¹⁵ N	0,365	-	-	-	-
kyslík	¹⁶ O	99,759	¹⁷ O	0,037	¹⁸ O	0,204	-	-
fluor	¹⁹ F	100,00	-	-	-	-	-	-
křemík	²⁸ Si	92,18	²⁹ Si	4,71	³⁰ Si	3,12	-	-
fosfor	³¹ P	100,00	-	-	-	-	-	-
síra	³² S	95,018	³³ S	0,750	³⁴ S	4,215	³⁶ S	0,107
chlor	³⁵ Cl	75,40	-	-	³⁷ Cl	24,60	-	-
brom	⁷⁹ Br	50,57	⁸¹ Br	49,43	-	-	-	-
jod	¹²⁷ I	100,00	-	-	-	-	-	-

Jako vzorový příklad můžeme uvést izotopy uhlíku ¹²C a ¹³C s poměrovým zastoupením v přírodě 98,9 % : 1,1 %. (Obr. 31) V případě molekuly obsahující 10 atomů uhlíku je relativní intenzita píku pro molekulový ion M normalizovaná na 100 %. Intenzita píku pro M+1 je přibližně 10-ti násobná, můžeme vidět i pík iontu M+2 odpovídající přítomnosti 2 atomů ¹³C v této molekule. Ve sloučenině, která by obsahovala 60 uhlíkových atomů, je opět normalizovaná intenzita píku M na 100 %. Intenzita píku M+1 je však téměř 60-ti násobná s intenzitou 65 %. Mimo to můžeme vidět rostoucí intenzitu píku iontu M+2. Ve spektru však můžeme pozorovat i další izotopové ionty s nárůstem molekulové hmotnosti o 3, 4 a 5 Daltonů. Tento jev lze vysvětlit rostoucí pravděpodobností, s jakou se může nacházet izotop ¹³C v molekule. Analogicky je možné sledovat nárůst intenzity (resp. také počtu) izotopových píků i u látek obsahujících 100 či více uhlíků.



Obr. 31. Poměrné zastoupení izotopů uhlíka.

Podobně tomu je i u chlorovaných uhlovodíků. Poměr přirozených stabilních izotopů ^{35}Cl a ^{37}Cl je 75,4 % : 24,6 %. V hmotnostním spektru bychom měli vidět normalizovaný pík pro molekulový ion s 100 % a pík izotopového iontu M+2. Pokud by se v uhlovodíku nacházely 2 nebo více atomů chlóru pravděpodobnost, že jeden z těchto atomů bude izotop, narůstá a ve spektru bychom pak našli izotopové ionty s hodnotami M+2, M+4 atd. Intenzita by rostla úměrně k počtu chlorovaných atomů. Tuto skutečnost lze pozorovat i u ostatních uvedených příkladů bromu a síry (respektive u každého prvku, který není monoizotopický). Obr. 32.



Obr. 32. Intenzity píku u některých izotopových klastrů obsahujících Cl, Br a S.

Poměr intenzit píků jednotlivých iontových izotopů lze zjistit pomocí koeficientu binomického rozvoje $(a+b)^n$, kde **a** a **b** představují relativní zastoupení těžšího a lehčího izotopu a exponent **n** je počet pojednávaných atomů v molekule. Např. u molekuly obsahující 2 atomy síry s relativním poměrem stabilních izotopů ^{32}S a ^{34}S 95,02 % : 4,22 % zapíšeme vztah:

$$(a + b)^2 = a^2 + 2ab + b^2$$

$$(95,02 + 4,22)^2 = 9028,8 + 801,97 + 17,81$$

Poměr vyjádříme jako:

$$9028,8 : 801,97 : 17,81$$

$$\mathbf{M : M+2 : M+4}$$

A intenzitu píků dopočítáme:

hodnotě 9028,8 odpovídá 100 %

potom 801,97 odpovídá 8,9 %

a 17,81 potom 0,2 %.

Intenzita píku s m/z M+4 je vůči základnímu píku příliš malá (0,2 %) a v hmotnostním spektru se neobjeví. (Obr. 32)

Výpočet sumárního (molekulového) vzorce patří k důležitým atributům, které z hmotnostního spektra můžeme získat. U přístrojů s nízkou rozlišovací schopností lze sumární vzorec vypočítat vyhodnocením poměru intenzit píků izotopových iontů vůči intenzitě píku molekulového iontu. Takové vyhodnocení je poměrně komplikované, a jelikož dnes již všichni výpočetní činnost vykonávají počítače, nebudeme se této problematice blíže věnovat. U přístroje s nižším rozlišením je možné určit počet atomů uhlíku s přesností ± 1 .

Přibližný počet atomů uhlíku ve sloučenině lze získat ze vztahu:

$$C_n = \frac{I_{A+1}}{I_A \cdot 1,1} \cdot 100$$

Přesné elementární složení a eventuálně i molekulový vzorec lze určit pomocí přístrojů s vysokou rozlišovací schopností (RP = 10 000 – 25 000) a přesností měření $m/z < 3$ ppm na základě molekulové hmotnosti a zastoupení izotopů. Díky přesné číselné hodnotě hmotnosti molekulového iontu je možné určit kombinaci a počet atomů a tím i sumární vzorec. Čím přesnější je měření, tím lehčí a jednodušší bude určení sumárního vzorce. Podobně můžeme určit sumární vzorec a elementární složení i u všech fragmentů, čehož se prakticky využívá při studiu fragmentových cest a celkové struktury analyzované látky.

5.2. Základní pravidla fragmentací při ionizaci EI

Fragmentace je proces, při kterém vznikají jednodušší štěpené částice tzv. fragmenty, díky přetržení chemických vazeb v molekulovém iontu, důsledkem čehož vzniká sekundární ion (výjimečně další kationradikál) a k němu komplementární radikál nebo neutrální molekula. Fragmentace je závislá od energie, kterou měla molekula před ionizací, způsobu ionizace, množství dodané energie ionizačním procesem a tlaku, při němž dochází k ionizaci. Všechny tyto podmínky ovlivňují **množství přebytečné energie** získané molekulou, tato energie pak určuje, do jaké míry bude k fragmentaci docházet. V následující části se budeme věnovat fragmentaci při **elektronové ionizaci (EI)**.

Aby byl ion detekovatelný a viditelný v hmotnostním spektru, musí mít dostatečně dlouhou životnost. Ion s délkou životnosti delší než 10^{-4} s označujeme jako **stabilní**. Opakem jsou ionty **nestabilní** – s délkou životnosti kratší než 10^{-6} s. Takové ionty vznikají a zanikají ještě v ionizačním zdroji a v hmotnostním spektru se neprojeví. Ionty s délkou života v rozmezí 10^{-4} až 10^{-6} se rozpadají buď v ionizační komoře, nebo přímo v hmotnostním analyzátoru a označují se jako **metastabilní ionty**. V případě, že se takový ion rozpadne v prostoru mezi ionizační komorou a magnetickým (resp. elektrickým) polem v tzv. oblasti bez pole (field free region), proletí část svojí dráhy jako ion s původní hmotností m_1^+ a druhou část jako fragmentovaný ion s menší hmotností m_2^+ . Nově vzniklý fragment m_2^+ si rozdělí původní kinetickou energii s odštěpenou částicí m_3 . V hmotnostním spektru se tento metastabilní ion projeví **zdánlivou (neskutečnou) hmotností s difuzním (roztáhnutým) píkem**. Metastabilní ionty označujeme symbolem m^* . Hmotnost takového iontu charakterizuje vztah:

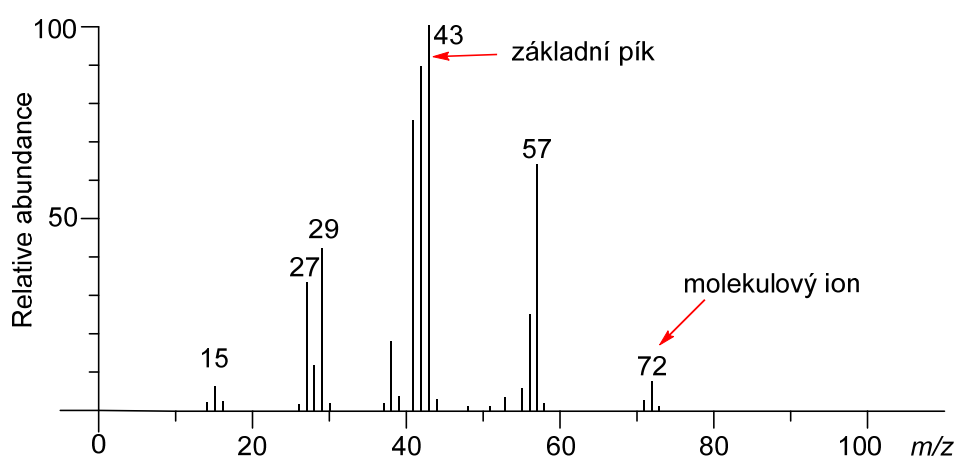
$$m^* = \frac{m_2^2}{m_1}$$

Metastabilní ionty se často vyskytují při aromatických sloučeninách a poskytují důležité informace ke studiu fragmentačních cest analyzované látky. Jsou relativně častými jevy při elektronové ionizaci a často se tvoří v procesech MALDI. Bez ohledu na to, jak jsou tyto ionty tvořeny, jejich fragmentační rozklad po opuštění iontového zdroje je procesem unimolekulárního rozkladu. Fragmentace metastabilních iontů je v současné době pozorována jenom ve spojení s magnetickými sektorovými analyzátory nebo v driftové trubici nástrojů MALDI-TOF, které jsou široce používány k určení sekvencí peptidů.

Intenzita každého píku v hmotnostním spektru narůstá **jednoduchostí vzniku** daného iontu a klesá s jeho **snižující se stabilitou**. Pro molekulový ion platí, že čím je nižší ionizační potenciál některého z elektronů v molekule (čím je hodnota dodané energie nižší), tím snáze dojde k jeho vzniku. Ionizační potenciál elektronů roste v pořadí: Nevazebné elektrony heteroatomů < konjugované π elektrony < nekonjugované π elektrony < σ elektrony jednoduchých vazeb C–C < σ elektrony vazeb C–H. Nejpravděpodobněji tedy vzniká kladný náboj na heterocyklu nebo v místě násobné vazby s heteroatomem. Intenzita píku molekulového iontu narůstá s jeho stabilitou. Stabilita cyklických sloučenin je větší než u

acyklických a výrazně narůstá delokalizací kladného náboje (konjugace π elektronů) v molekule. Důkazem zvýšené stability způsobené rezonancí mohou být píky aromatických iontů s nábojem $z = 2$, které v hmotnostním spektru poskytují necelé hodnoty m/z v případě liché hodnoty m .

Jednoduché alkany jsou naopak silně náchylné k fragmentaci, neboť nejčastějším způsobem ionizace je uvolnění σ elektronu z kovalentní vazby C–C. Sigma vazba s jedním elektronem je vysoce nestabilní a podléhá štěpení. Na obrázku 33 můžeme ilustrovat vzorový příklad.



Obr. 33. Hmotnostní spektrum 2-methylbutanu s EI.

Při EI ionizaci může dojít v molekule 2-methylbutanu k uvolnění elektronu na kterémkoliv atomu uhlíku za vzniku molekulového iontu $M^{+\bullet}$. Vzhledem k množství dodané energie ionizujících elektronů (70 eV) a přítomnosti pouze jednoduchých σ vazeb dochází k efektivní fragmentaci za vzniku několika fragmentovaných částic. Důkazem nestability molekulového iontu je také jeho píka s nízkou intenzitou, který v hmotnostním spektru vidíme u hodnoty m/z 72. (Obr. 33) Odštěpením metylového radikálu může vzniknout sekundární *n*-butylový kation nebo primární isobutylový kation se stejnou efektivní hmotností m/z 57. (Schéma 1)

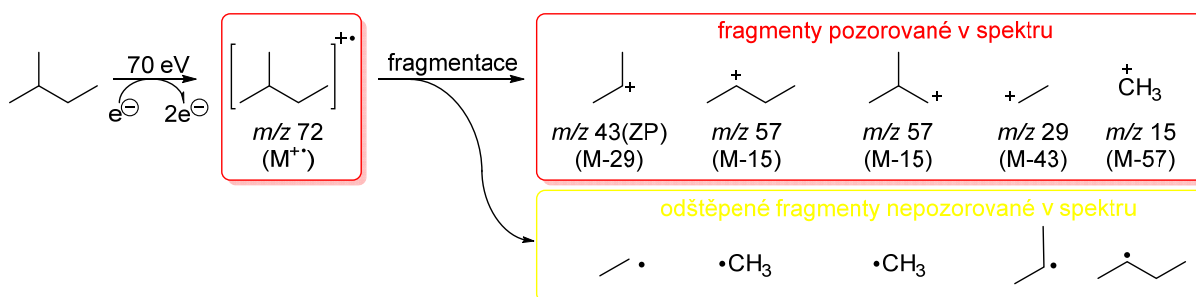


Schéma 1. Schéma EI ionizace a fragmentace 2-methylbutanu.

Protože víme, že sekundární kation je stabilnější než primární, bude pravděpodobnější vznik píky sekundárního butylového kationtu. Základní píka s relativní intenzitou 100 % patří iontu

s hodnotou m/z 43. Jedná se o nejvíce zastoupený a tedy nejstabilnější štěpný ion, který vzniká eliminací etylového radikálu. Fragmentový pík s hodnotou m/z 42 může vzniknout ztrátou vodíkového radikálu z iontu s m/z 43. Ztrátou dalšího vodíkového radikálu vzniká relativně stabilní allylový kation s m/z 41. (Schéma 2) Důkazem etylového kationtu je pík s hodnotou m/z 29 a málo výrazný pík s m/z 15 je zase důkazem methylového kationtu.

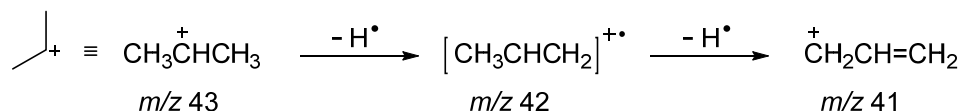


Schéma 2. Ztráta vodíkového radikálu iontu m/z 43.

Fragmentační procesy neprobíhají podobným způsobem jako běžné reakce v organické chemii. Nejčastěji dochází k odtržení neutrálního fragmentu – radikálu nebo jednoduché molekuly. Častým jevem jsou tzv. přesmyky. Mechanismy fragmentace můžeme rozdělit podle způsobu jejich iniciace buď **radikálovým centrem** (nespárovaným elektronem) nebo **nábojovým centrem**. Přenos elektronů ve schématech se značí podobně jako v organické chemii: jednoelektronový proces jednoduchou šipkou a přenos celého elektronového páru dvojitou šipkou.

Štěpení σ vazby

Štěpení jednoduchých vazeb je typické především u alkanů, méně časté pak u nasycených sloučenin s heteroatomy ve své struktuře. K samotnému štěpení dochází v důsledku vysoké nestability chemické vazby tvořené jedním elektronem. Mechanismus je iniciovaný radikálovým centrem, při němž vzniká kation a neutrální radikál.

α -Štěpení

K α -štěpení dochází nejčastěji při odštěpení nevazebného elektronu z heteroatomu. Jedná se o mechanismus iniciovaný radikálovým centrem. Heteroatom s lichým počtem elektronů se snaží o tvorbu nové (násobné) vazby pomocí nespárovaného elektronu. Vazba mezi α - β uhlíkem se homologicky štěpí za vzniku neutrálních radikálů R^\bullet a kationtu $\text{H}_2\text{C}=\text{X}^+$, resp. $^+\text{CH}_2\text{-X}$. (Schéma 3) α -Štěpení je typické pro aminy, thioly, alkoholy, ketony případně halogenidy.

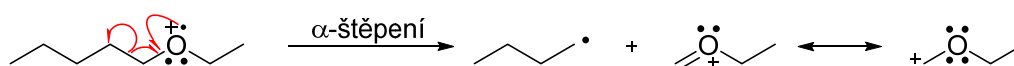


Schéma 3. Příklad α -štěpení.

Benzylové štěpení za tvorby tropyliového iontu

Substituované alkylbenzeny poskytují intenzivní pík s m/z 91 odpovídající sedmičlennému rezonančně stabilizovanému **tropyliovému kationtu**. (Schéma 4) Pík tropyliového kationtu je typický pro všechny sloučeniny obsahující benzyl a jeho intenzita klesá s rostoucí délkou

alkylového řetězce. Ke štěpení dochází mezi **α - β uhlíkem** od benzenového jádra a následným přesmykem vzniká stabilizovaný kruh. Tropyliový kation bývá častokrát doprovázen **pentadienyliovým kationem s m/z 65** vzniklým po odštěpení acetyleny z původního kationtu.

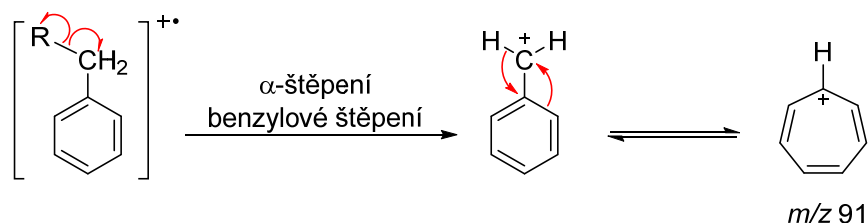


Schéma 4. Benzylové štěpení a vznik tropyliového iontu.

Mc Laffertyho přesmyk

McLaffertyho přesmyk patří mezi nejznámější příklad přesmyku v hmotnostní spektrometrii iniciovaný radikálovým centrem. (Schémata 5 a 6) Při tomto přesmyku dochází k přenosu vodíku z **γ uhlíku** (C4) na heteroatom (resp. i uhlík) přes nenasyčený šestičlankový tranzitní stav, přičemž vzniká neutrální molekula a kationradikál. Reakce se hodně vyskytuje u alkenů, iminů a především u karbonylových sloučenin. Po vzniku kationradikálu dochází k tautomernímu přesmyku vodíku z γ uhlíku na heteroatom a k přeskupení vazeb, přitom kladný náboj z heteroatomu může migrovat nebo zůstat na něm. Pohyb náboje závisí od typu heteroatomu a navázaných substituentů v molekule. Výsledkem přesmyku je v případě nepohyblivého náboje kationradikál a odštěpená nenasyčená neutrální molekula, v případě migrujícího náboje α,β nenasyčená sloučenina obsahující heteroatom jako kationradikál.

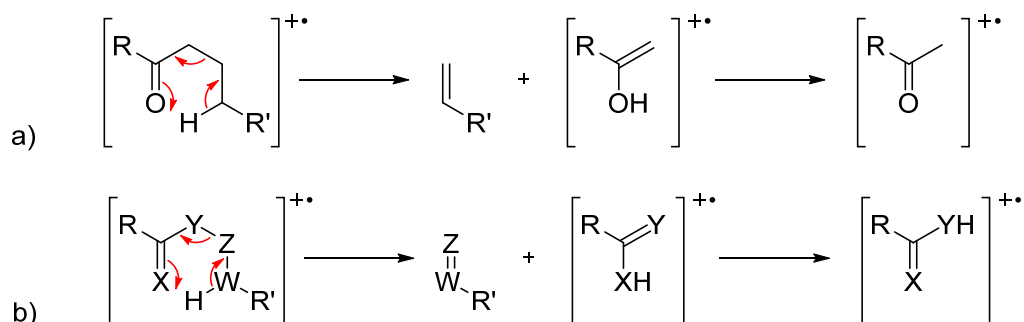
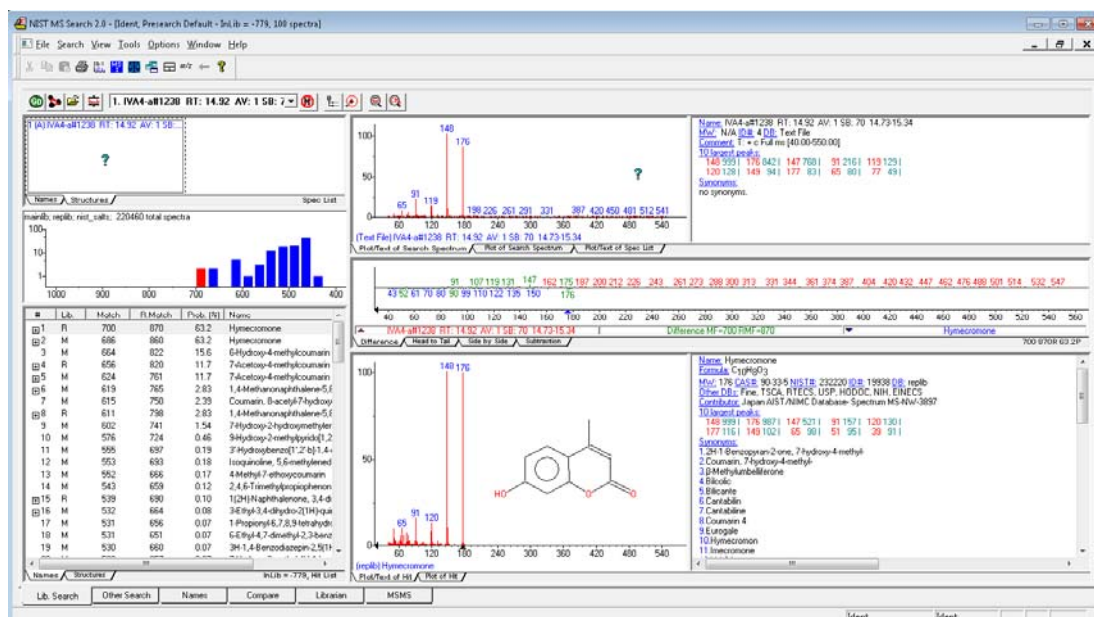


Schéma 5. a) Příklad McLaffertyho přesmyku ketonů; b) všeobecné schéma McLaffertyho přesmyku.

Kromě získaných znalostí o molekulové hmotnosti a hmotnosti fragmentů v případě použití hmotnostní spektrometrie s ionizací EI můžeme naměřená spektra látek softwarově porovnat s knihovnými naměřených spekter (NIST – National Institute of Standards and Technology, Mass Spectral Library; Wiley Registry of Mass Spectral Data). To může výrazně pomoci při interpretaci spekter a určení struktury analytu. V dnešní době databáze obsahují stovky tisíc spekter i s fragmentacemi. Spektra naměřená s ionizací EI (70 eV) jsou víceméně

nezávislá na experimentálních podmínkách měření. Na obrázku 34 je uveden příklad náhledu do této databáze.



Obr. 34. Náhled do databáze MS spekter NIST

Na rozdíl od EI MS spekter knihovny spekter měkkých ionizačních technik jsou méně rozsáhlé a nejsou univerzálně použitelné. Vzhled MS spektra velmi silně závisí na experimentálních podmínkách měření (typ a energie ionizace, uspořádání iontového zdroje, typ a konstrukce analyzátoru, složení analyzované směsi – tvorba aduktů, apod.). U měkkých technik většinou nejsou přítomny fragmentové ionty. Na rozdíl od EI MS spekter, kde fragmentové ionty výrazně přispívají k určení struktury analytu, u měkkých ionizačních technik MSⁿ spektra také silně závisí na experimentálních podmínkách a typu přístroje. Proto interpretace těchto spekter si vyžaduje individuální přístup operátora přístroje. Výjimkou jsou databáze molekul z určitých specifických oblastí (analýza proteinů a peptidů, oligosacharidů, apod.), kde je přístrojové porovnávání s existujícími knihovnami často používané.

6. Spojení hmotnostní spektrometrie a separačních technik

Hlavní výhodou spojení hmotnostní spektrometrie a separačních technik je, že v rámci jedné analýzy můžeme směs látek zároveň separovat separační technikou vhodnou pro danou směs (GC, LC, CE atd.) a posléze identifikovat jednotlivé složky neznámé směsi.

GC/MS byla první chromatografickou metodou spojenou s MS. Malý průtok nosného plynu v GC zabezpečoval spolehlivé fungování iontového zdroje v MS. Nejčastěji se využívalo elektronové a chemické ionizace, analyzátozem byl Q nebo IT, dnes i TOF. Pro analýzu GC/MS se hodí zejména látky **termicky stabilní, těkavé, méně polární a s nízkou molekulovou hmotností**. V některých případech lze převést netěkavou látku na těkavou **derivatizací** (např. menší karboxylové kyseliny převést na estery). Jedná se o široce využívanou techniku vhodnou pro analýzu složitých směsí (těkavé přírodní látky, těkavé polutanty, forenzní analýza, ...).

LC/MS je schopna podat informace o struktuře látek, jež jsou **polárnější, termicky méně stabilní a mají vyšší molekulovou hmotnost** než je tomu u GC/MS. K ionizaci se využívají šetrnější metody jako ESI nebo APCI, případně APPI při nepolárních a labilních sloučeninách. Jako hmotnostní analyzátozem jsou u LC/MS běžně využívány kvadrupólové filtry, iontové pasti a TOF. Je možné i tandemové uspořádání (např. Q-TOF). Nevýhodou spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií oproti GC/MS je vysoký rozdíl tlaků na rozhraní s hmotnostním analyzátozem. Spojení LC a MS umožňuje identifikaci i stopových množství látek ve složitých směsích s využitím v téměř všech oblastech vědy, výzkumu, průmyslu, zdravotnictví, státní správy apod.

CE/MS neboli spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií může být alternativou k HPLC, umožňuje totiž separaci **iontových látek**. Není však tak běžná jako LC nebo GC/MS.

SFC/MS využívá superkritickou fluidní chromatografii ve spojení s MS. Tato metoda je vhodná pro polární i nepolární látky rozpustné v rozpouštědlech pro SFC (např. CO₂). SFC/MS je v dnešní době stále poměrně málo využívanou metodou.

7. Obrazová příloha – příklady hmotnostních spekter

Obrazová příloha obsahuje příklady hmotnostních spekter naměřených na přístrojích využívajících ionizační techniky EI, ESI a MALDI.

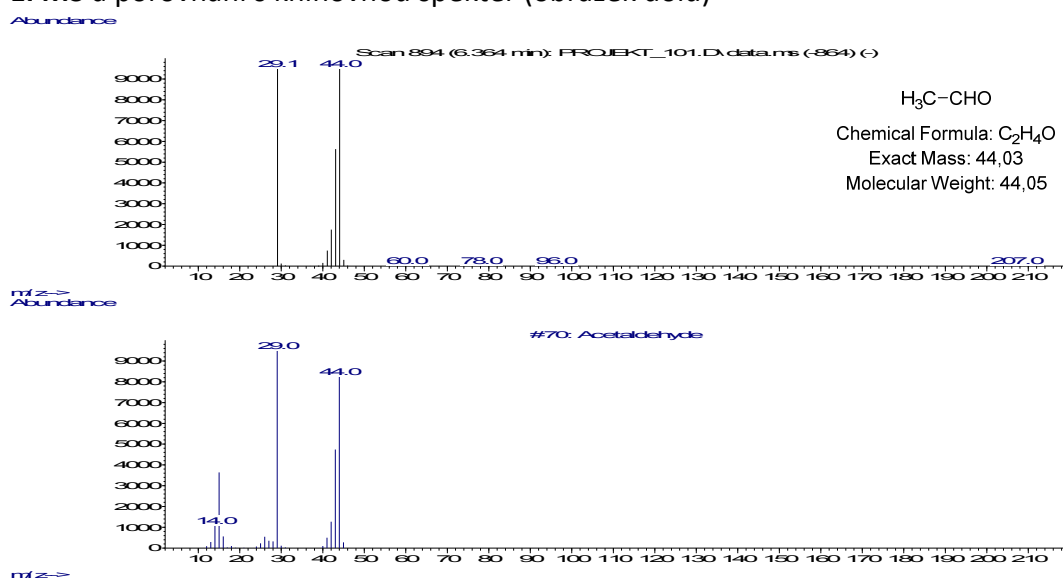
Příklad 1.

Hmotnostní spektrum **acetaldehydu** s monoizotopickou hmotností **44,03**.

Přístroj: GC-MS HP 7890 A s 5975C Series GC/MSD (Q, Agilent)

Ionizační technika: **EI**

EI MS a porovnání s knihovnou spekter (obrázek dolu)



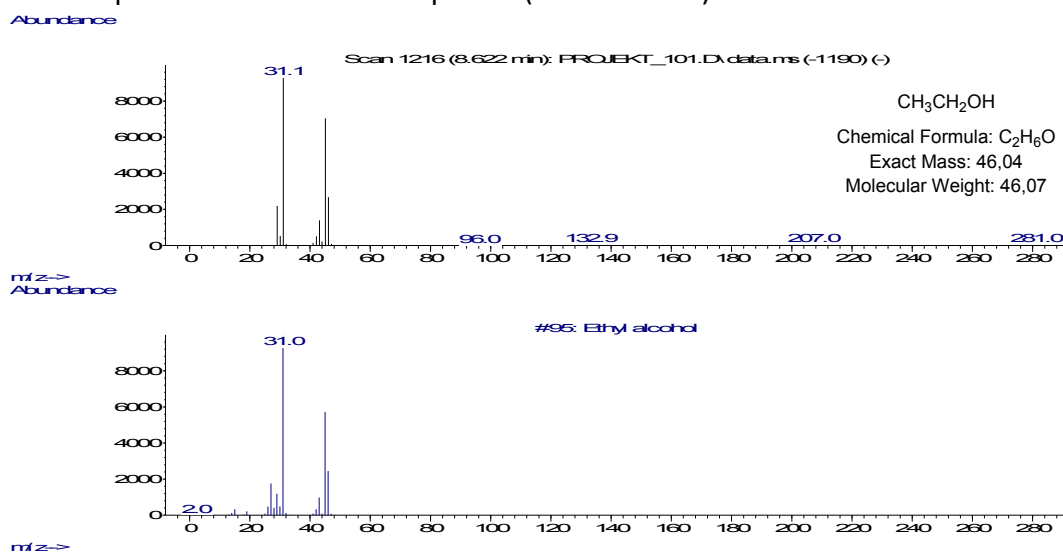
Příklad 2.

Hmotnostní spektrum **ethanolu** s monoizotopickou hmotností **46,04**.

Přístroj: GC-MS HP 7890 A s 5975C Series GC/MSD (Q, Agilent)

Ionizační technika: **EI**

EI MS a porovnání s knihovnou spekter (obrázek dolu)



Příklad 3.

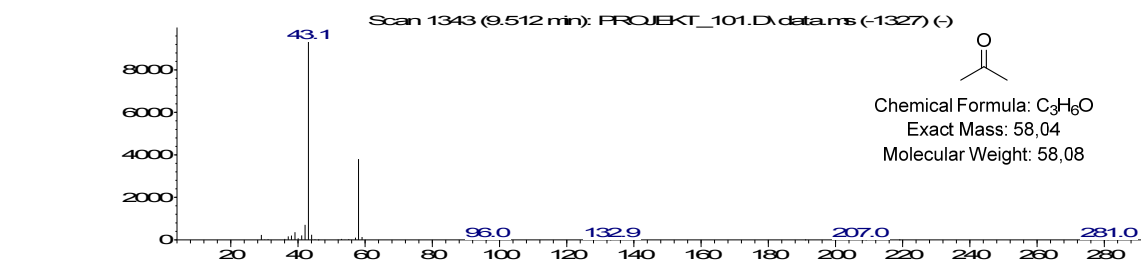
Hmotnostní spektrum **acetonu** s monoizotopickou hmotností **58,04**.

Přístroj: GC-MS HP 7890 A s 5975C Series GC/MSD (Q, Agilent)

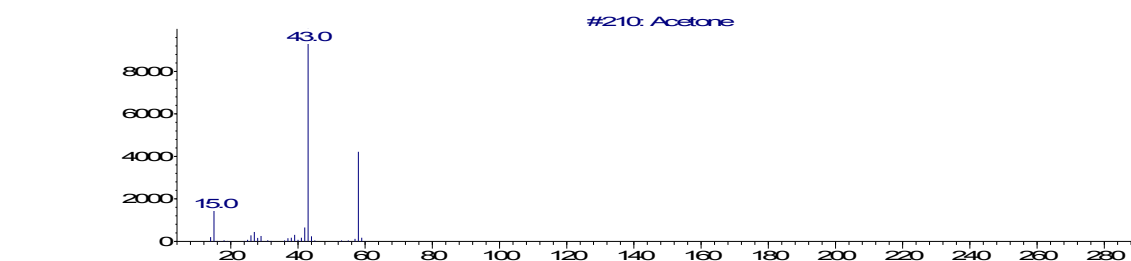
Ionizační technika: **EI**

EI MS a porovnání s knihovnou spekter (obrázek dolu)

Abundance



m/z->



m/z->

Příklad 4.

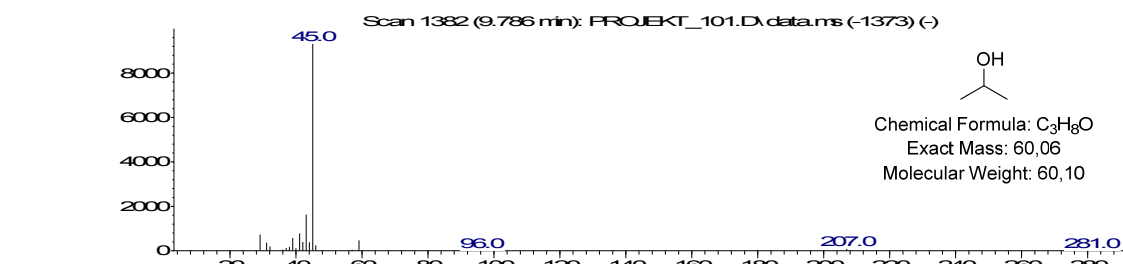
Hmotnostní spektrum **propan-2-olu** s monoizotopickou hmotností **60,06**.

Přístroj: GC-MS HP 7890 A s 5975C Series GC/MSD (Q, Agilent)

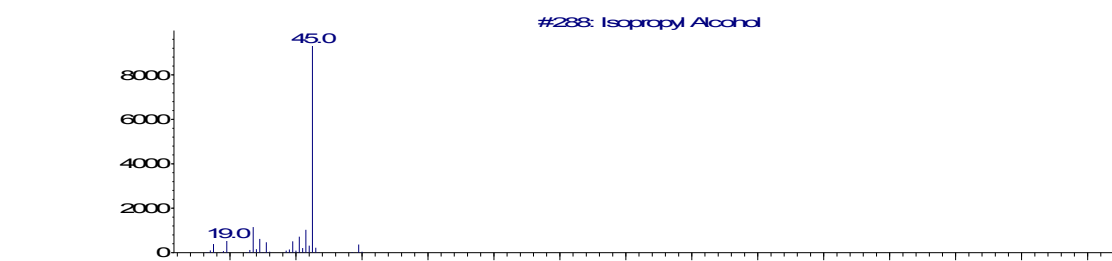
Ionizační technika: **EI**

EI MS a porovnání s knihovnou spekter (obrázek dolu)

Abundance



m/z->



m/z->

Příklad 5.

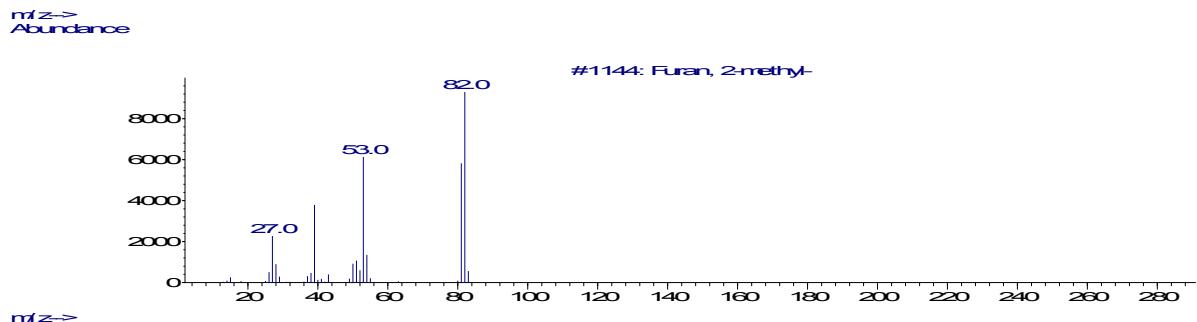
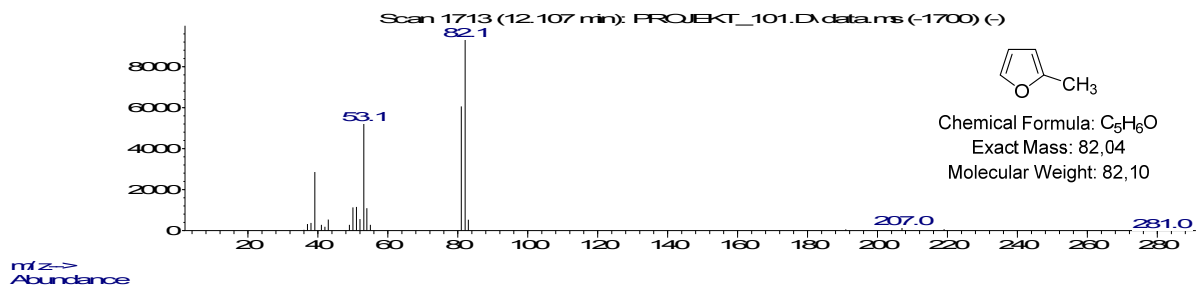
Hmotnostní spektrum **2-methylfuranu** s monoizotopickou hmotností **82,04**.

Přístroj: GC-MS HP 7890 A s 5975C Series GC/MSD (Q, Agilent)

Ionizační technika: **EI**

EI MS a porovnání s knihovnou spekter (obrázek dolu)

Abundance



Příklad 6.

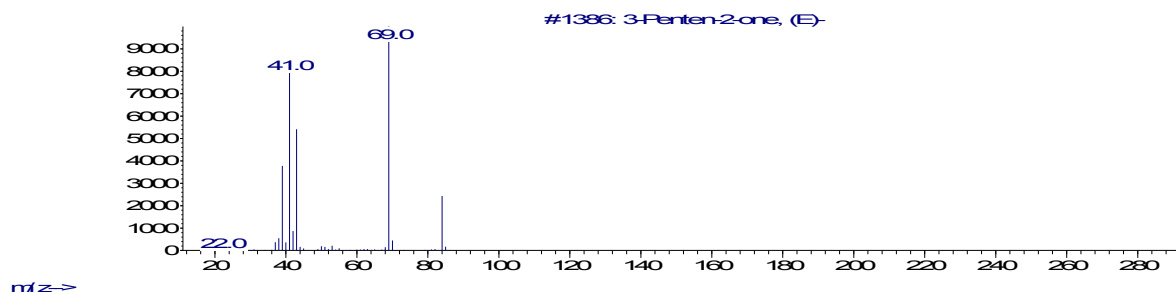
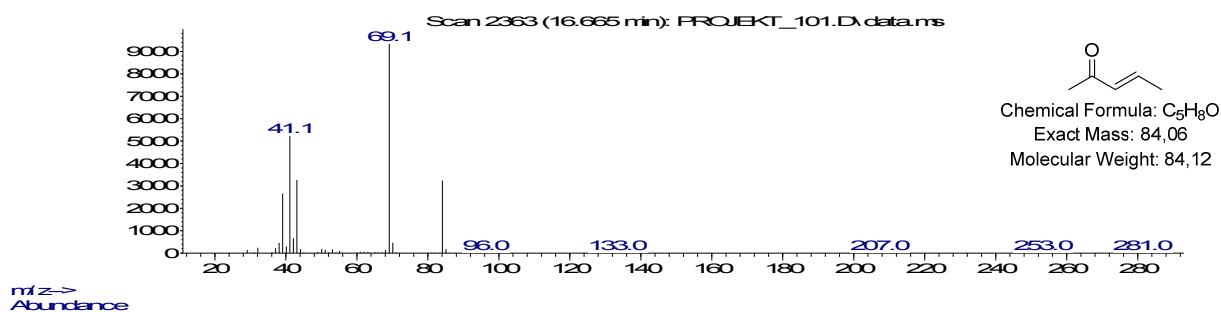
Hmotnostní spektrum **pent-3-en-2-onu** s monoizotopickou hmotností **84,06**.

Přístroj: GC-MS HP 7890 A s 5975C Series GC/MSD (Q, Agilent)

Ionizační technika: **EI**

EI MS a porovnání s knihovnou spekter (obrázek dolu)

Abundance



Příklad 7.

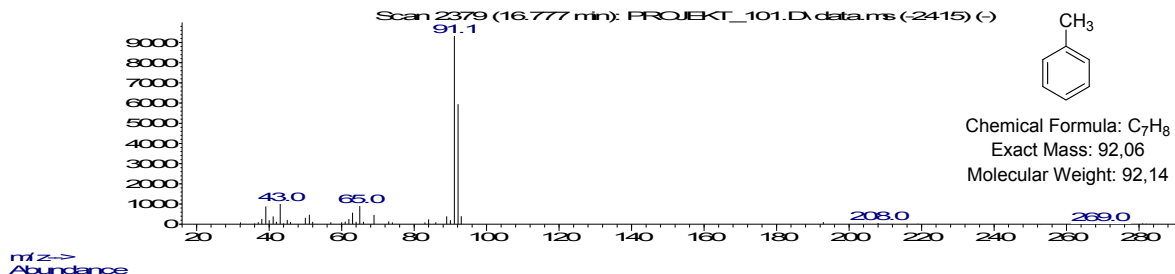
Hmotnostní spektrum **toluenu** s monoizotopickou hmotností **92,06**.

Přístroj: GC-MS HP 7890 A s 5975C Series GC/MSD (Q, Agilent)

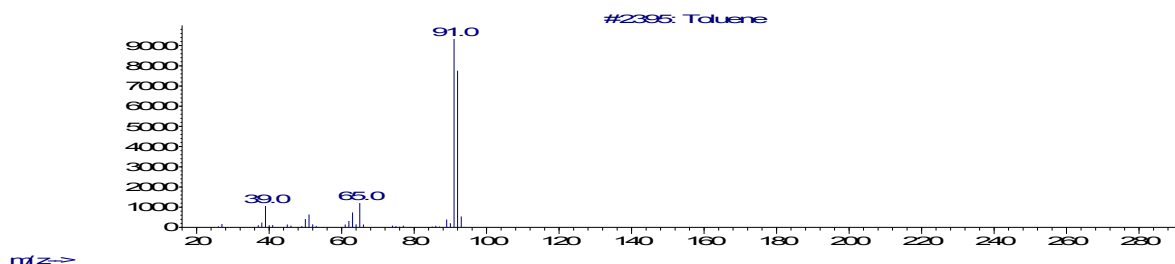
Ionizační technika: **EI**

EI MS a porovnání s knihovnou spekter (obrázek dolu)

Abundance



m/z->
Abundance



m/z->

Příklad 8.

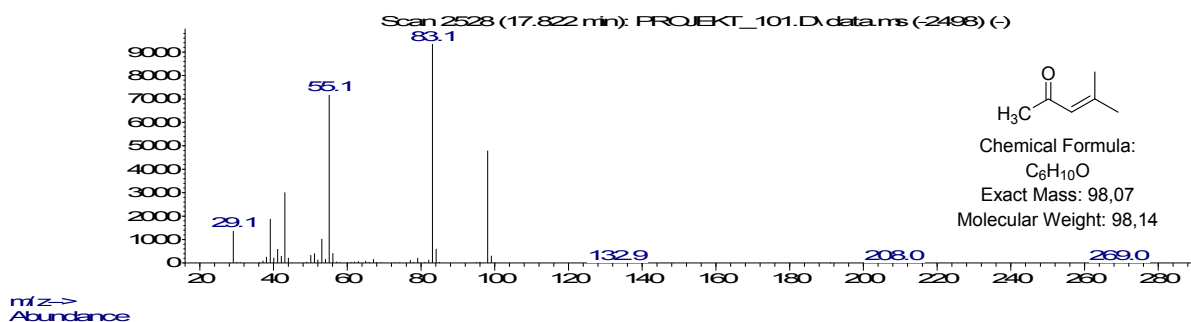
Hmotnostní spektrum **4-methylpent-3-en-2-onu** s monoizotopickou hmotností **98,07**.

Přístroj: GC-MS HP 7890 A s 5975C Series GC/MSD (Q, Agilent)

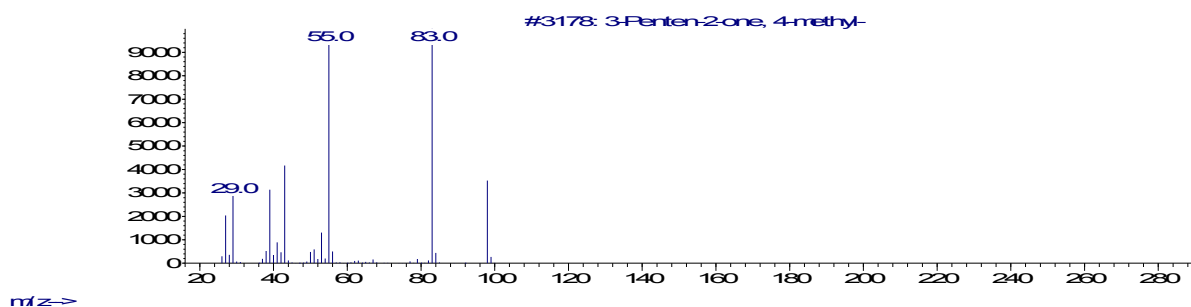
Ionizační technika: **EI**

EI MS a porovnání s knihovnou spekter (obrázek dolu)

Abundance



m/z->
Abundance



m/z->

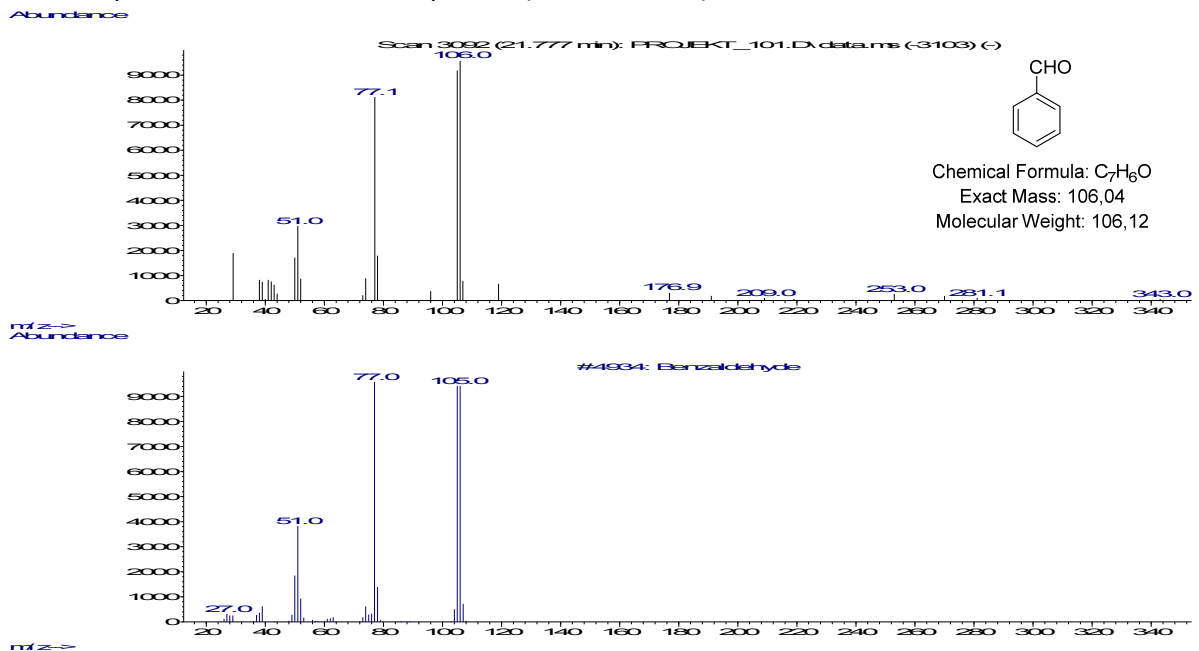
Příklad 9.

Hmotnostní spektrum **benzaldehydu** s monoizotopickou hmotností **106,04**.

Přístroj: GC-MS HP 7890 A s 5975C Series GC/MSD (Q, Agilent)

Ionizační technika: **EI**

EI MS a porovnání s knihovnou spekter (obrázek dolu)



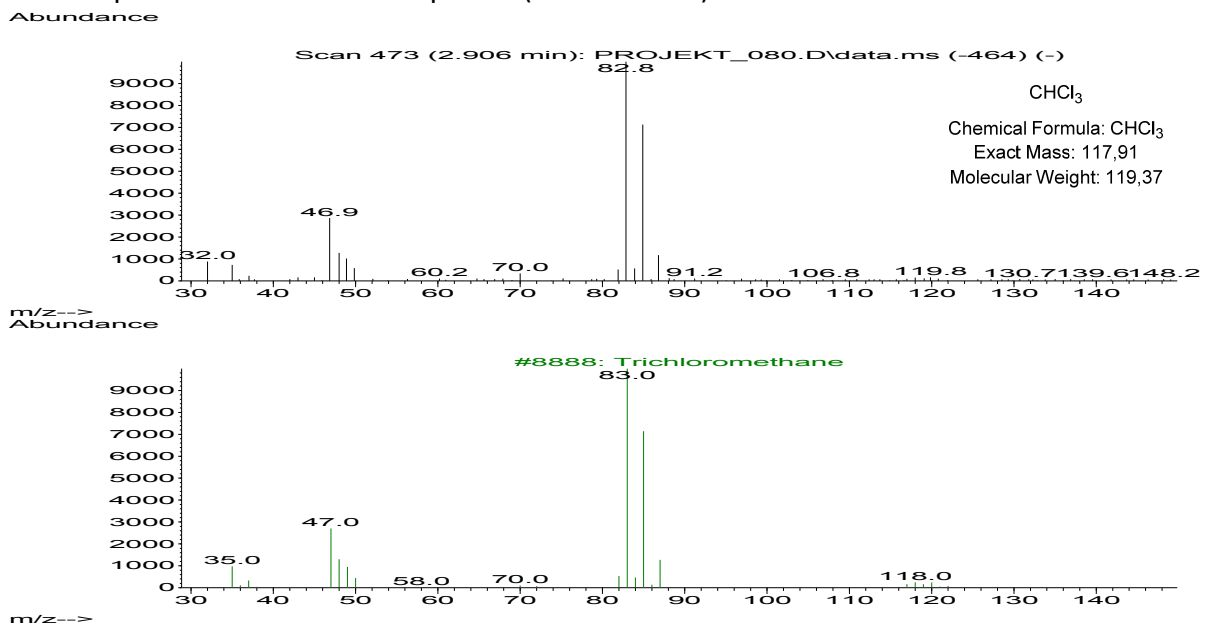
Příklad 10.

Hmotnostní spektrum **chloroformu** s monoizotopickou hmotností **117,91**.

Přístroj: GC-MS HP 7890 A s 5975C Series GC/MSD (Q, Agilent)

Ionizační technika: **EI**

EI MS a porovnání s knihovnou spekter (obrázek dolu)



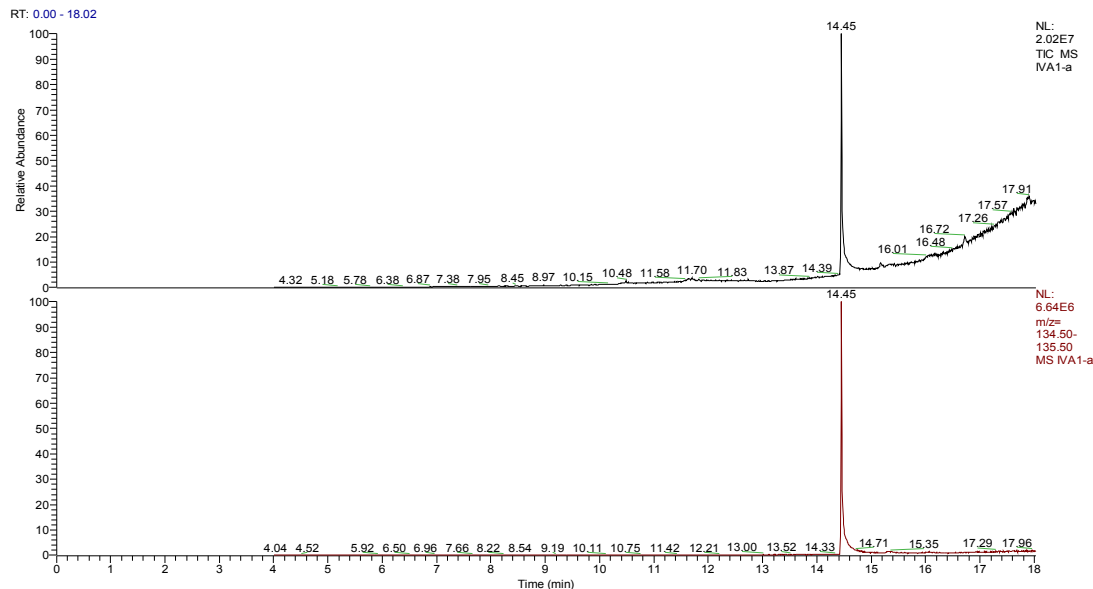
Příklad 11.

Hmotnostní spektrum **4-methoxybenzofenonu** s monoizotopickou hmotností **212,08**.

Přístroj: Trace GC ULTRA – ITQ 1100 GC/MS (ITQ, Thermo Scientific)

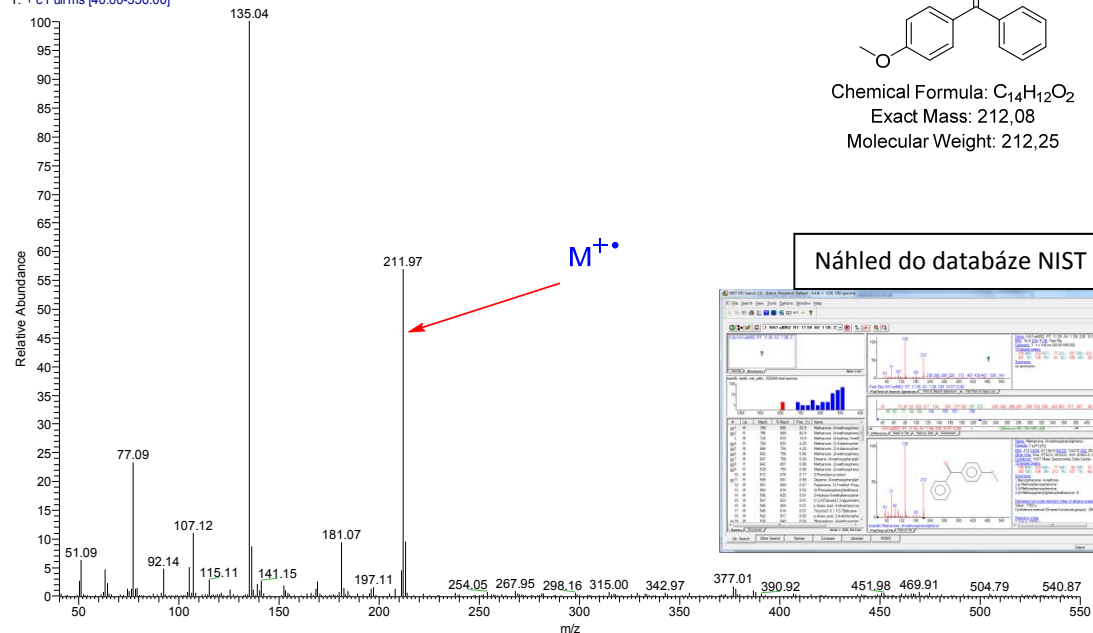
Ionizační technika: EI

GC chromatogram



EI MS

IVA1-a #852 RT: 11.59 AV: 1 SB: 238 10.57-12.66 NL: 7.19E4
T: + c Full ms [40.00-550.00]



Příklad 12.

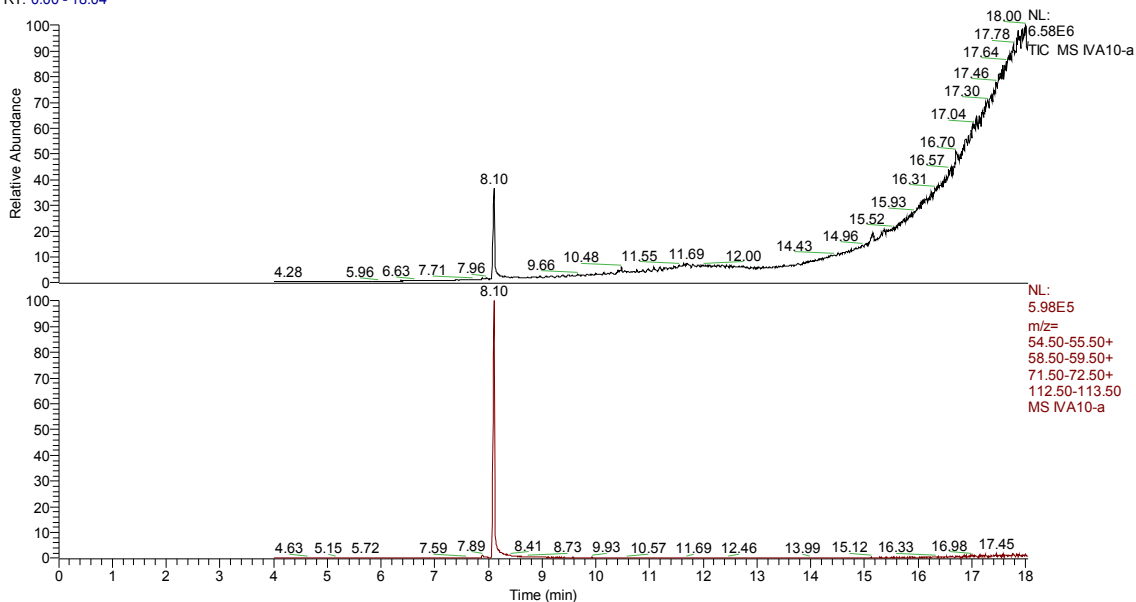
Hmotnostní spektrum **cyklohexanon-oximu** s monoizotopickou hmotností **113,08**.

Přístroj: Trace GC ULTRA – ITQ 1100 GC/MS (ITQ, Thermo Scientific)

Ionizační technika: EI

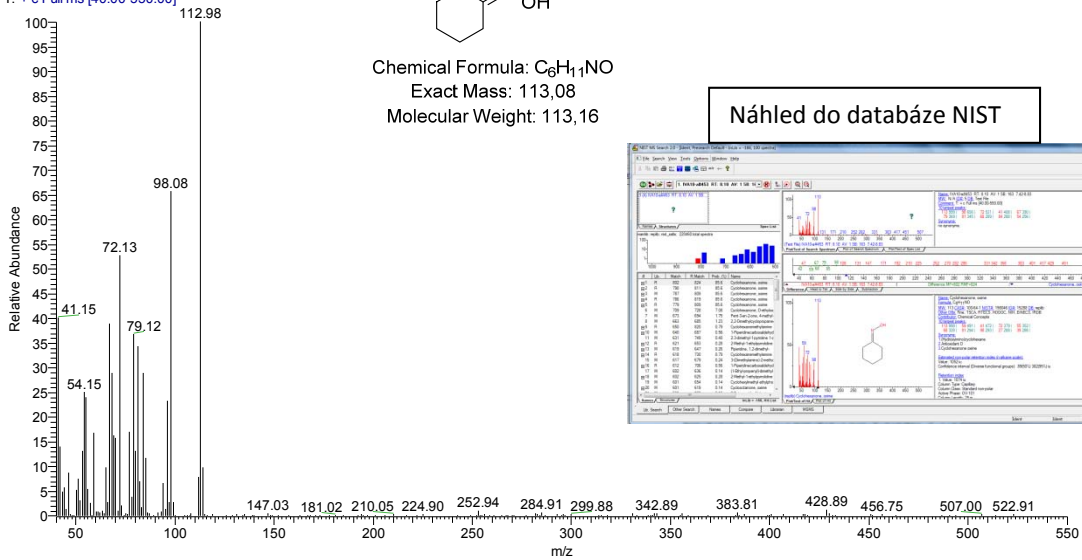
GC chromatogram

RT: 0.00 - 18.04



EI MS

IVA10-a #453 RT: 8.10 AV: 1 SB: 34 7.97-8.25 NL: 2.68E5
T: + c Full ms [40.00-550.00]



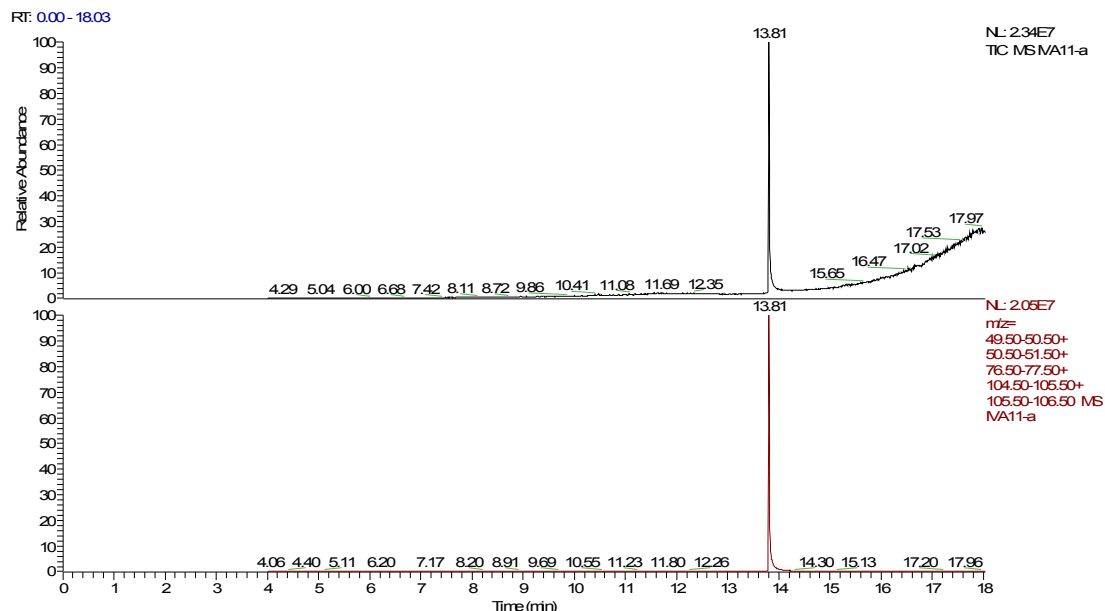
Příklad 13.

Hmotnostní spektrum **benzilu** s monoizotopickou hmotností **210,07**.

Přístroj: Trace GC ULTRA – ITQ 1100 GC/MS (ITQ, Thermo Scientific)

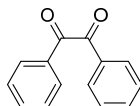
Ionizační technika: EI

GC chromatogram

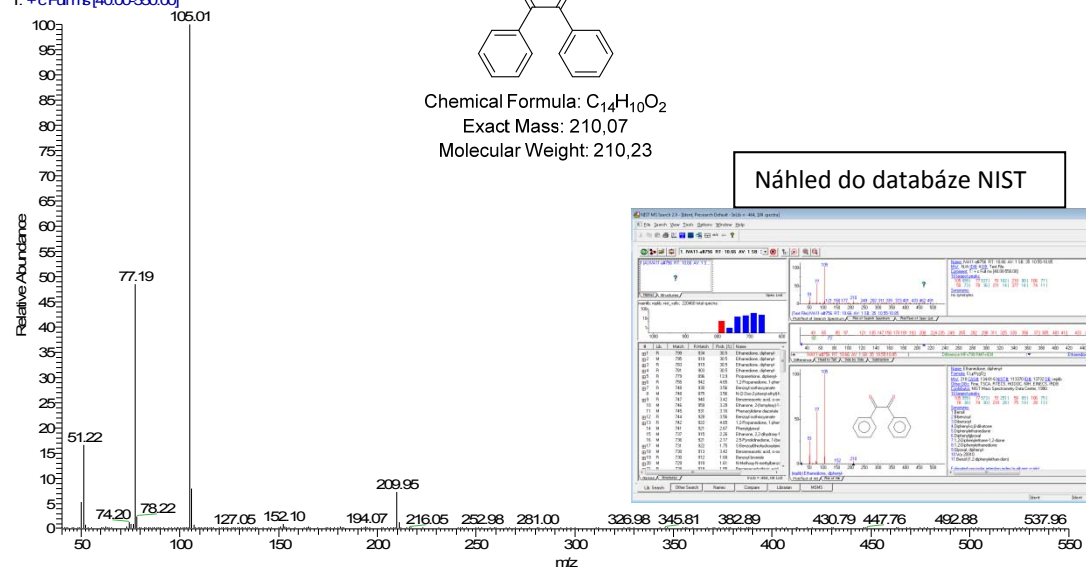


EI MS

MA11-e #1106 RT: 13.81 AV: 1 SB: 15 13.76-13.87 NL: 943E6
T: +cFII.ms[40.00-550.00]



Chemical Formula: $C_{14}H_{10}O_2$
Exact Mass: 210,07
Molecular Weight: 210,23



Příklad 14.

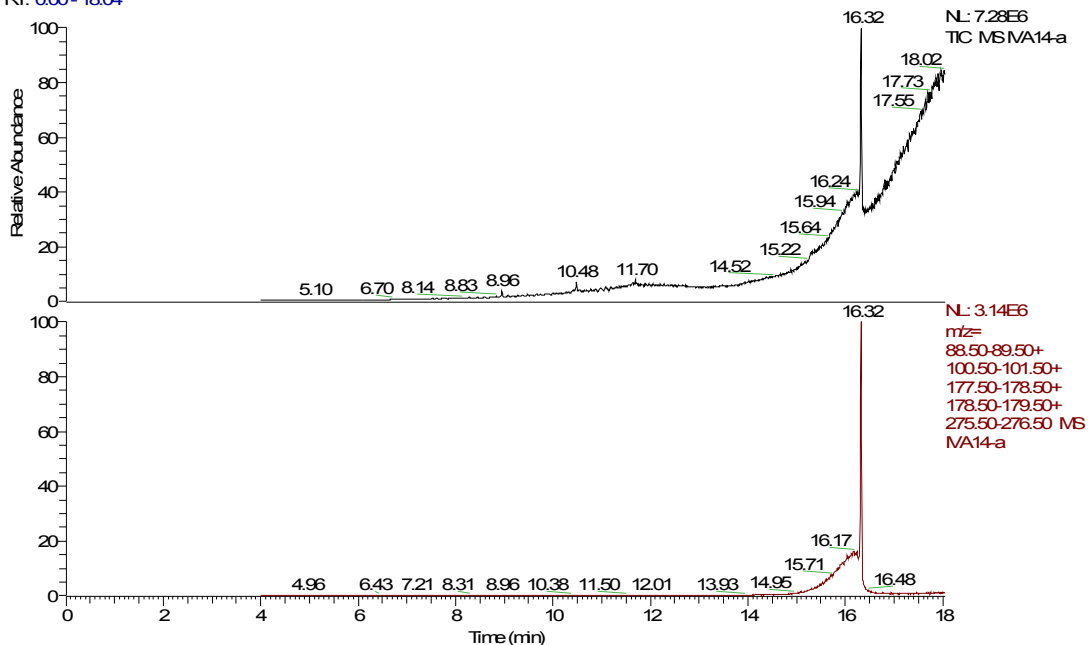
Hmotnostní spektrum **aduktu anthracenu a maleinanhydridu** s monoizotopickou hmotností **276,08**.

Přístroj: Trace GC ULTRA – ITQ 1100 GC/MS (ITQ, Thermo Scientific)

Ionizační technika: EI

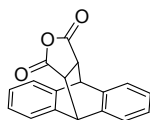
GC chromatogram

RT: 0.00 - 18.04

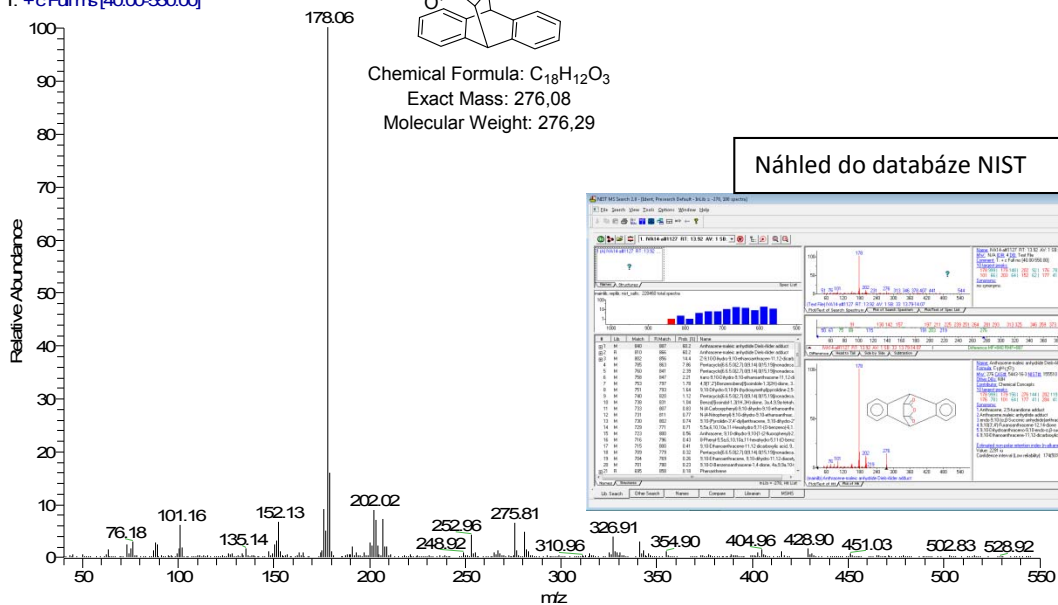


EI MS

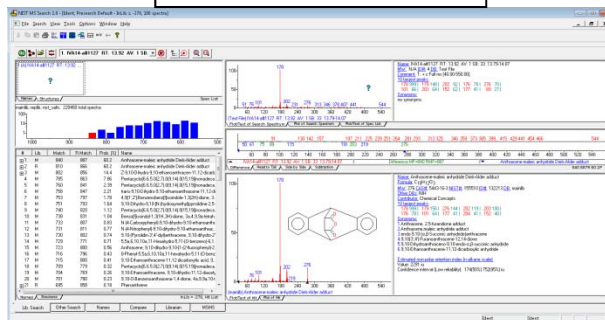
MA14-a #1396 RT: 16.32 AV: 1 NL: 241E6
T: +c Full ms [40.00-550.00]



Chemical Formula: C₁₈H₁₂O₃
Exact Mass: 276,08
Molecular Weight: 276,29



Náhled do databáze NIST



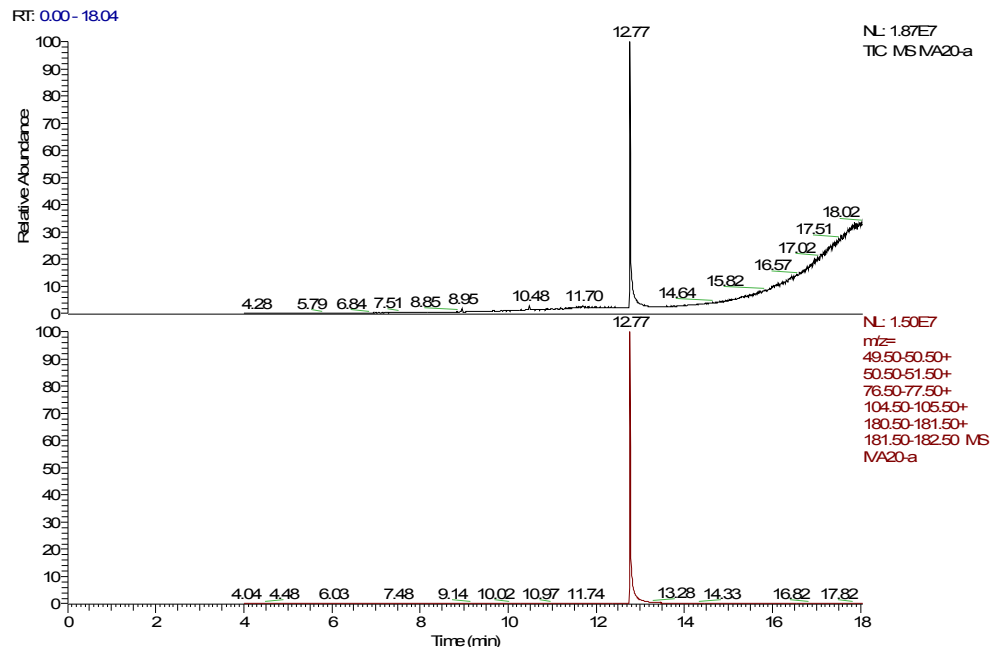
Příklad 15.

Hmotnostní spektrum **benzofenonu** s monoizotopickou hmotností **182,07**.

Přístroj: Trace GC ULTRA – ITQ 1100 GC/MS (ITQ, Thermo Scientific)

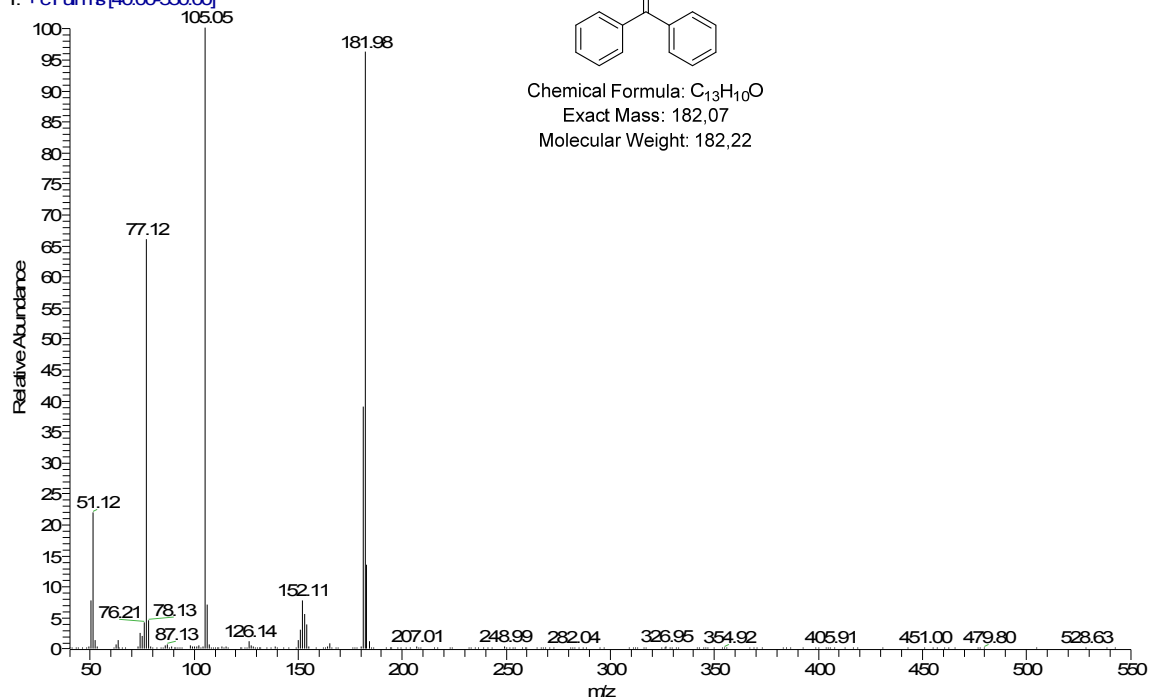
Ionizační technika: EI

GC chromatogram



EI MS

MA20-a #987 RT: 12.77 AV: 1 SB: 20 12.70-12.86 NL: 3.79E6
T: +c Full ms [40.00-550.00]



Příklad 16.

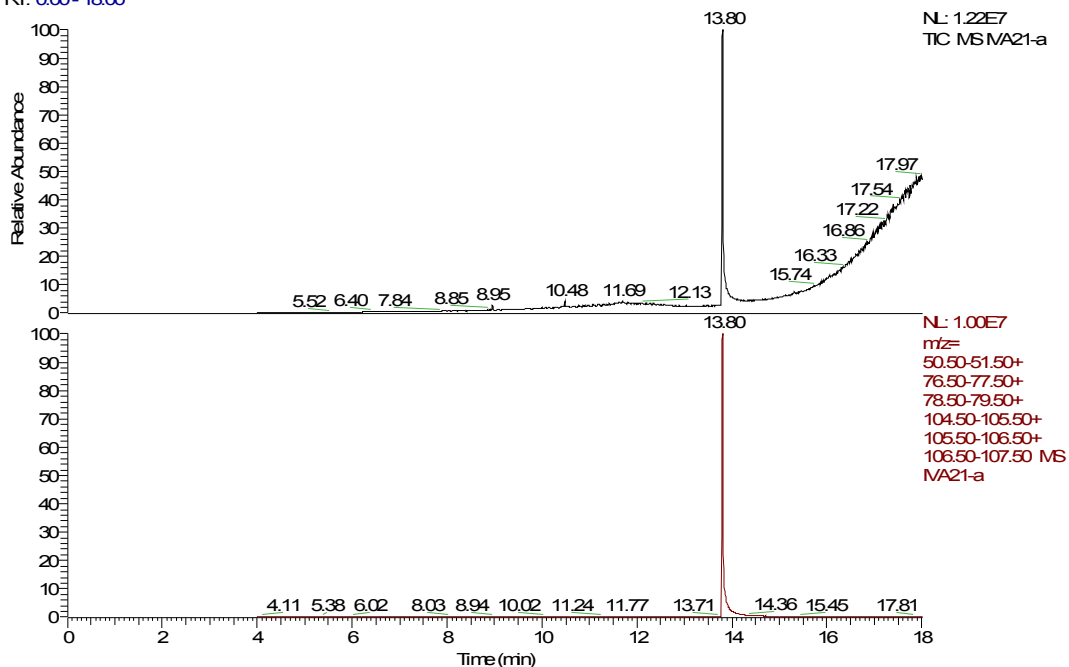
Hmotnostní spektrum **benzoinu** s monoizotopickou hmotností **212,08**.

Přístroj: Trace GC ULTRA – ITQ 1100 GC/MS (ITQ, Thermo Scientific)

Ionizační technika: EI

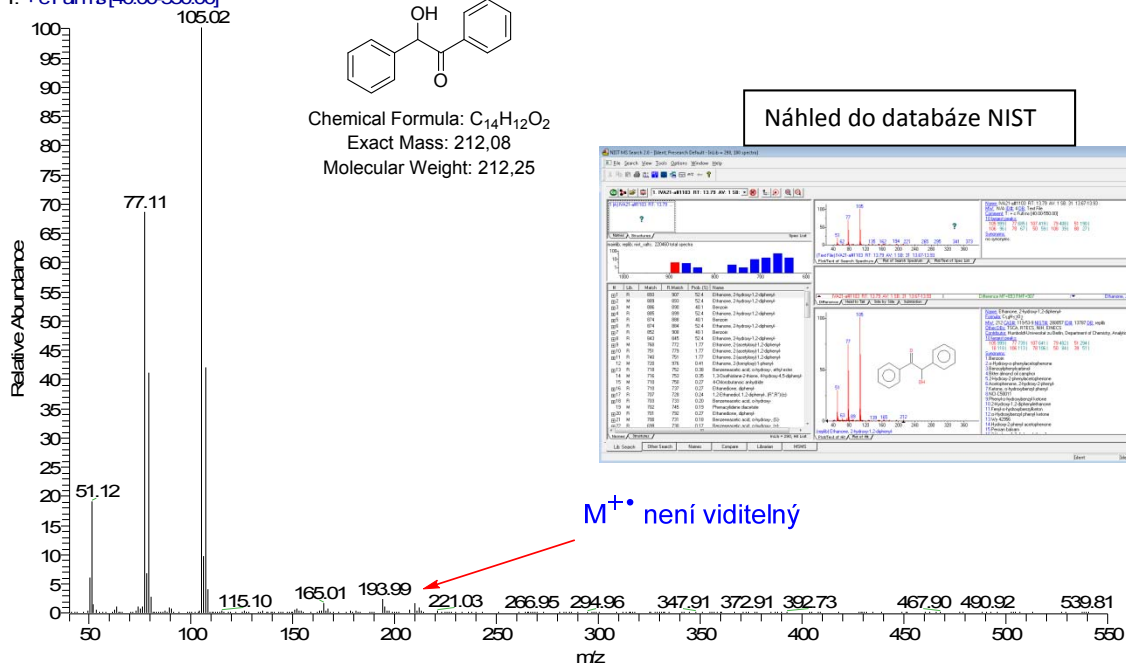
GC chromatogram

RT: 0.00–18.00



EI MS

IVA21-a #1103 RT: 13.79 AV: 1 SB: 31 13.67-13.93 NL: 3.05E6
T: +c Full ms [40.00-550.00]



Příklad 17.

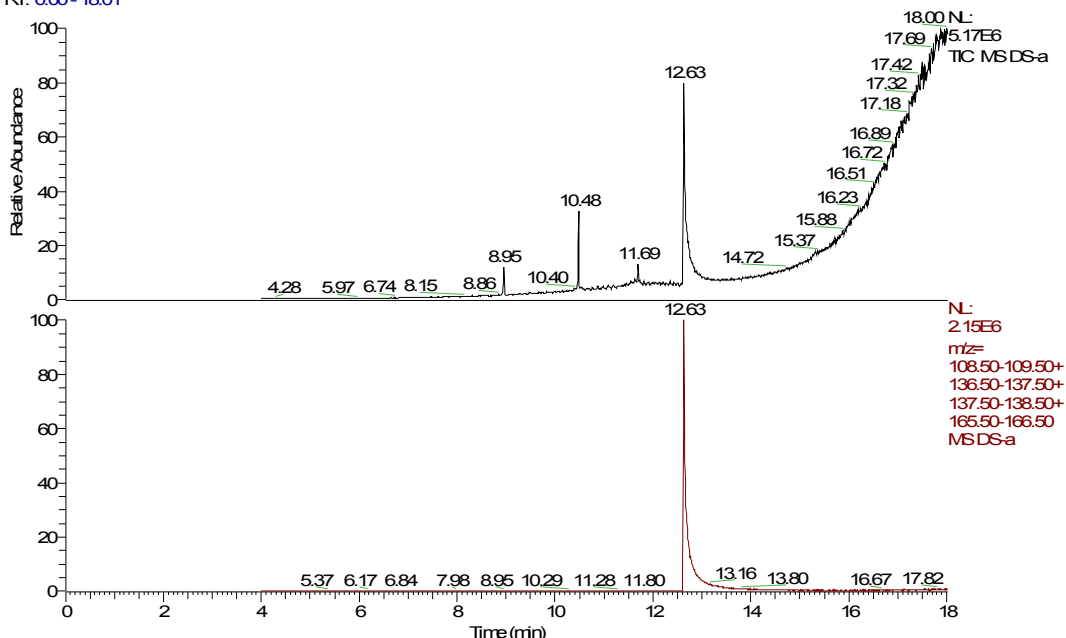
Hmotnostní spektrum **benzo[b]thiofen-1,1-dioxidu** s monoizotopickou hmotností **166,01**.

Přístroj: Trace GC ULTRA – ITQ 1100 GC/MS (ITQ, Thermo Scientific)

Ionizační technika: EI

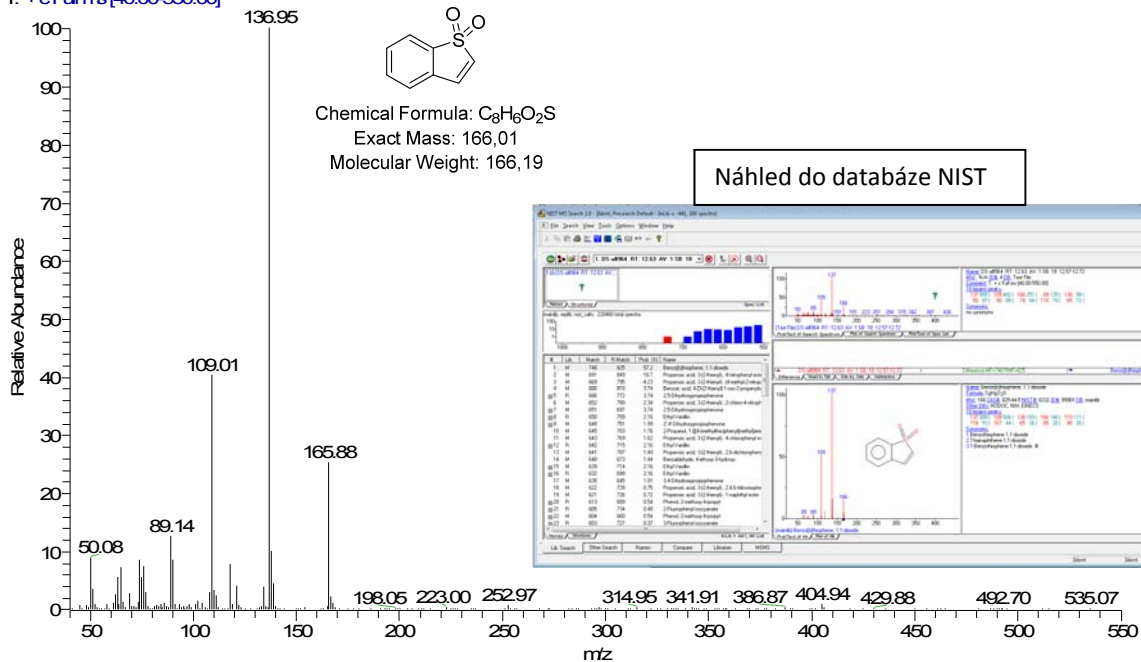
GC chromatogram

RT: 0.00 - 18.01



EI MS

DS-a #964 RT: 12.63 AV: 1 SB: 18 12.57-12.72 NL: 8.21E5
T: +cFull ms [40.00-550.00]



Příklad 18.

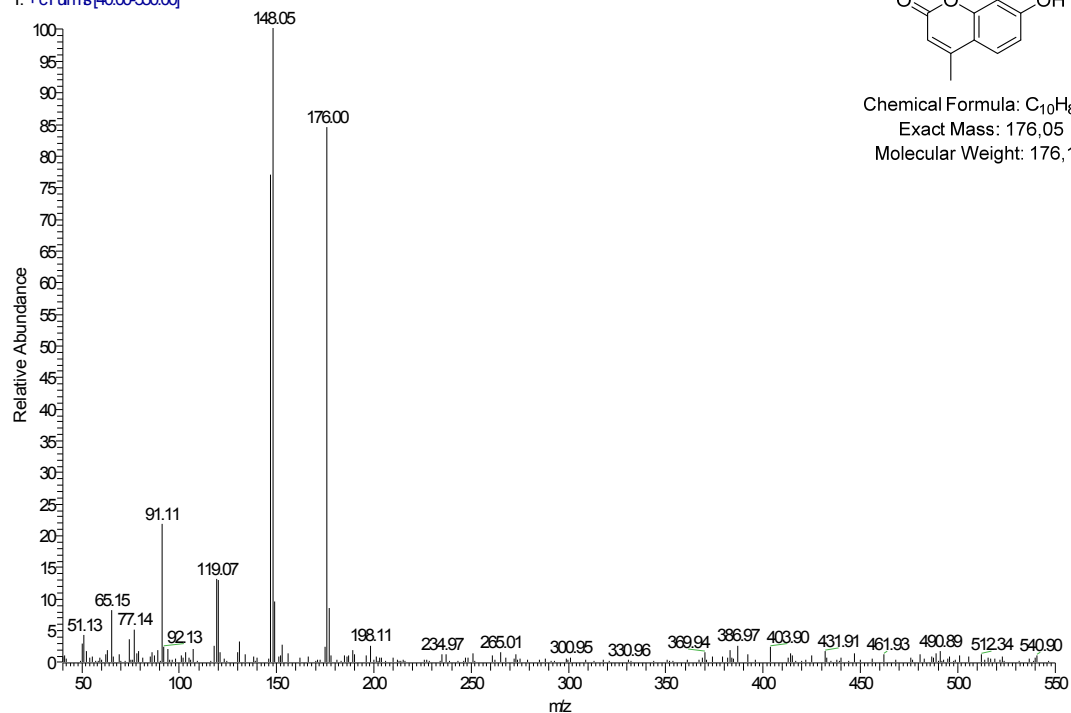
Hmotnostní spektrum **7-hydroxy-4-methyl-2H-chromen-2-onu** s monoizotopickou hmotností **176,05**.

Přístroj: Trace GC ULTRA – ITQ 1100 GC/MS (ITQ, Thermo Scientific)

Ionizační technika: **EI**

EI MS

NA4-a#1238 RI: 14.92 AV: 1 SB: 70 14.73-15.34 NL: 3.15E4
T: +cFull.ms[40.00-550.00]

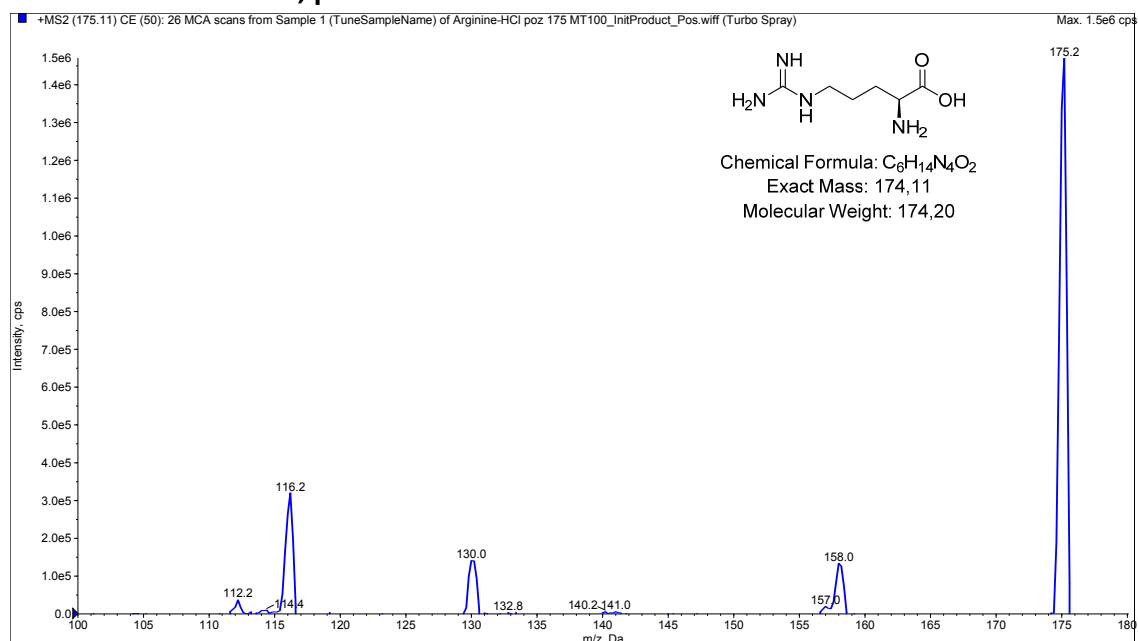


Příklad 19.

Hmotnostní spektrum aminokyseliny **Argininu** s monoizotopickou hmotností **174,11**.

Přístroj: 3200 QTRAP LC-MS/MS (QTRAP, AB Sciex)

Ionizační technika: **ESI, pozitivní mód**

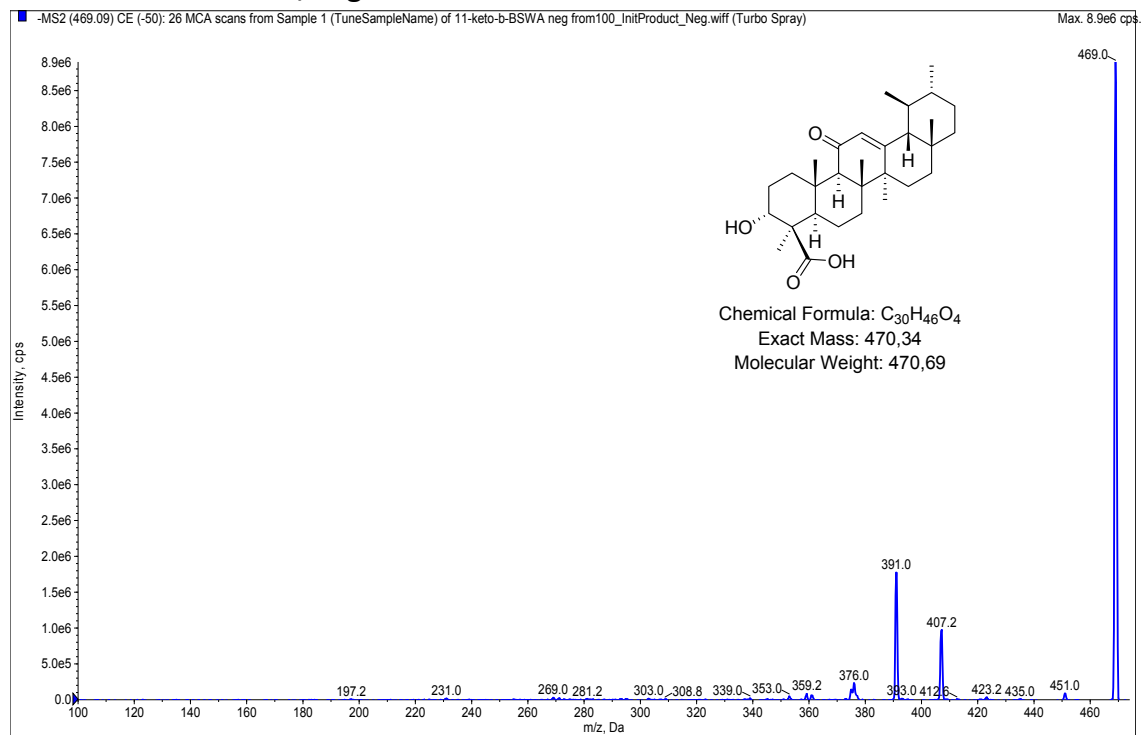


Příklad 20.

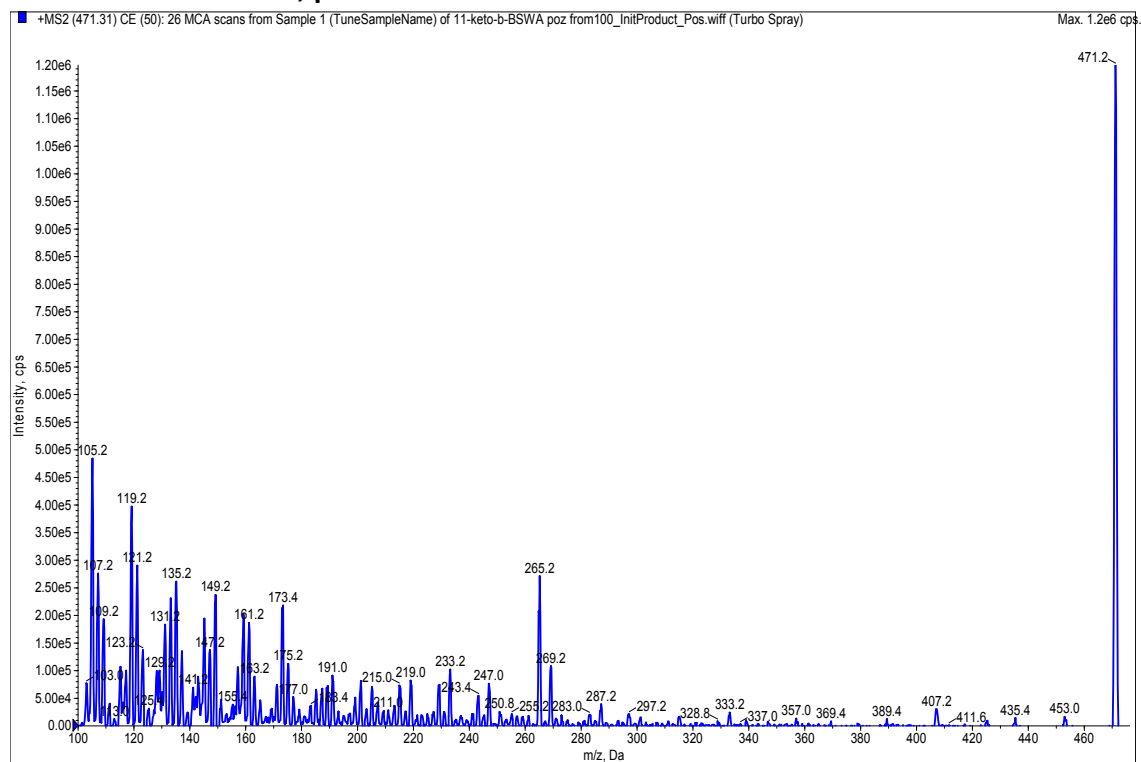
Hmotnostní spektrum **11-Keto-β-boswellic acid** s monoizotopickou hmotností **470,34**.

Přístroj: 3200 QTRAP LC-MS/MS (QTRAP, AB Sciex)

Ionizační technika: **ESI, negativní mód**



Ionizační technika: **ESI, pozitivní mód**

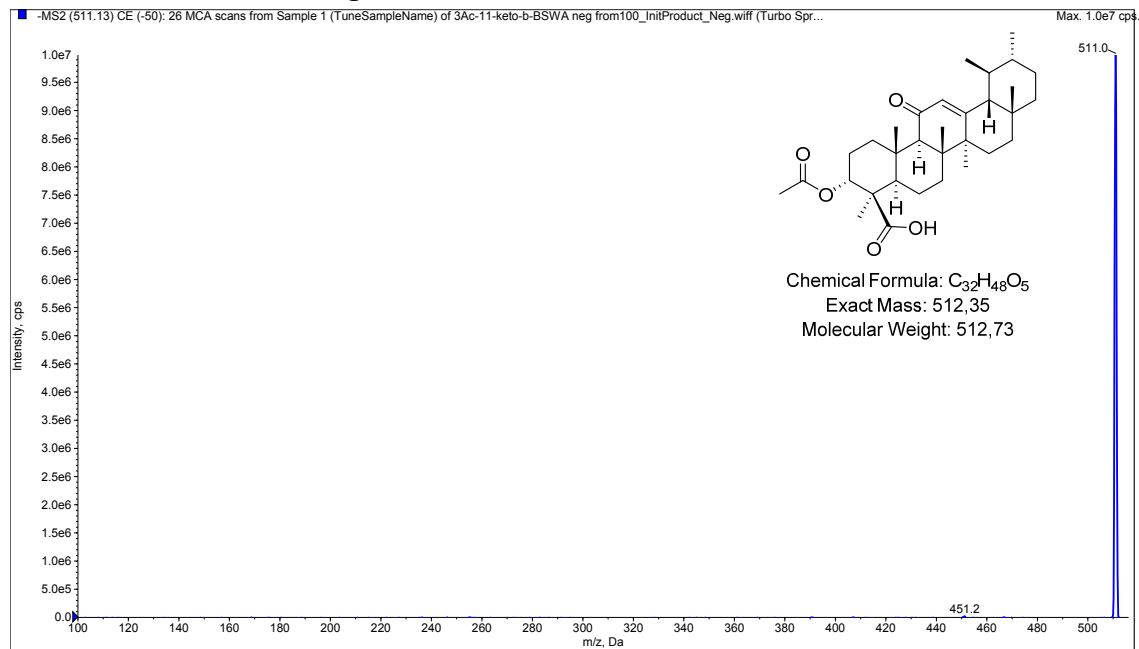


Příklad 21.

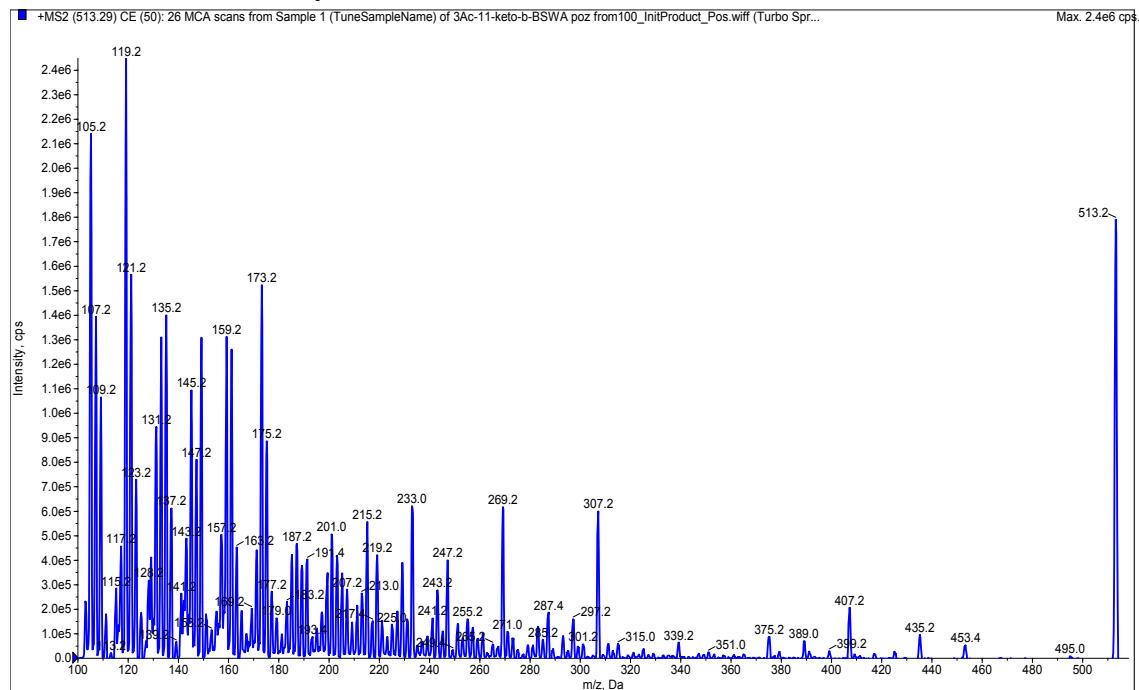
Hmotnostní spektrum **3-Acetyl-11-keto-β-boswellic acid** s monoizotopickou hmotností **512,35**.

Přístroj: 3200 QTRAP LC-MS/MS (QTRAP, AB Sciex)

Ionizační technika: **ESI, negativní mód**



Ionizační technika: **ESI, pozitivní mód**

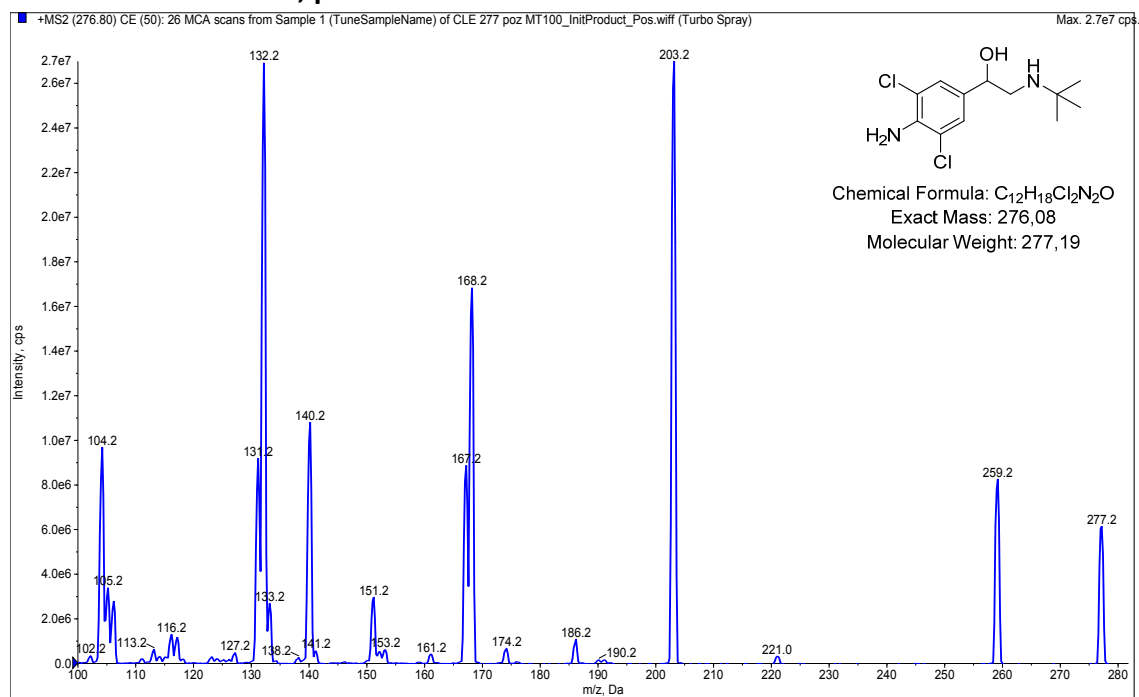


Příklad 22.

Hmotnostní spektrum **Clenbuterolu** s monoizotopickou hmotností **276,08**.

Přístroj: 3200 QTRAP LC-MS/MS (QTRAP, AB Sciex)

Ionizační technika: **ESI, pozitivní mód**

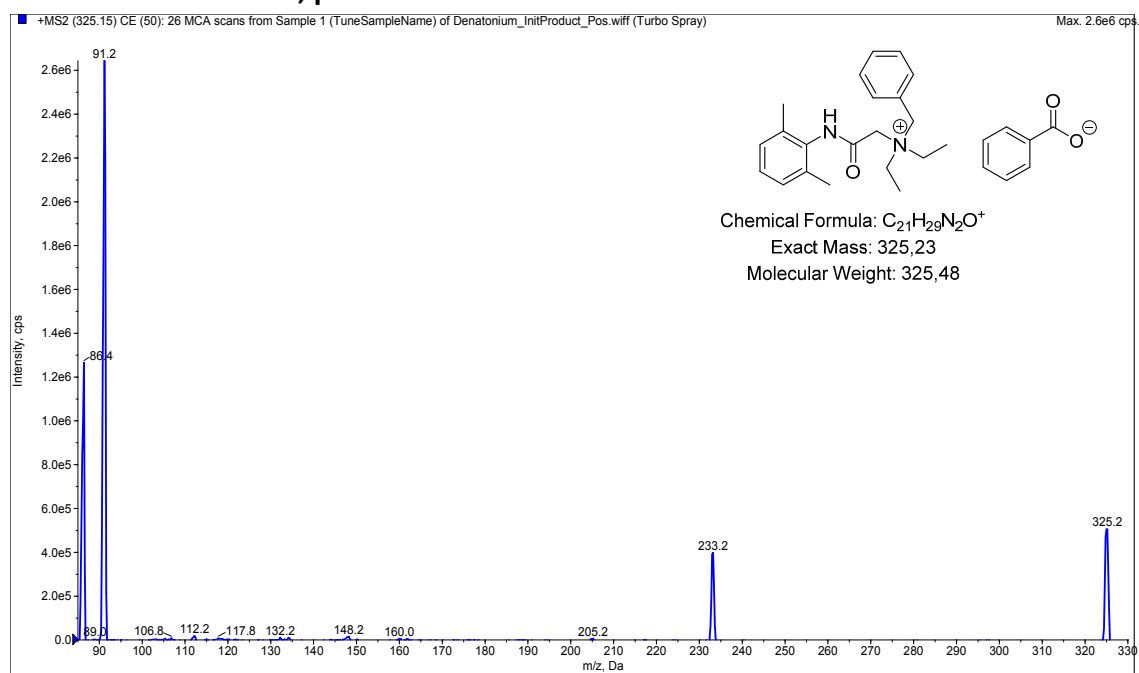


Příklad 23.

Hmotnostní spektrum **Denatonium benzoatu** s monoizotopickou hmotností **325,25**.

Přístroj: 3200 QTRAP LC-MS/MS (QTRAP, AB Sciex)

Ionizační technika: **ESI, pozitivní mód**

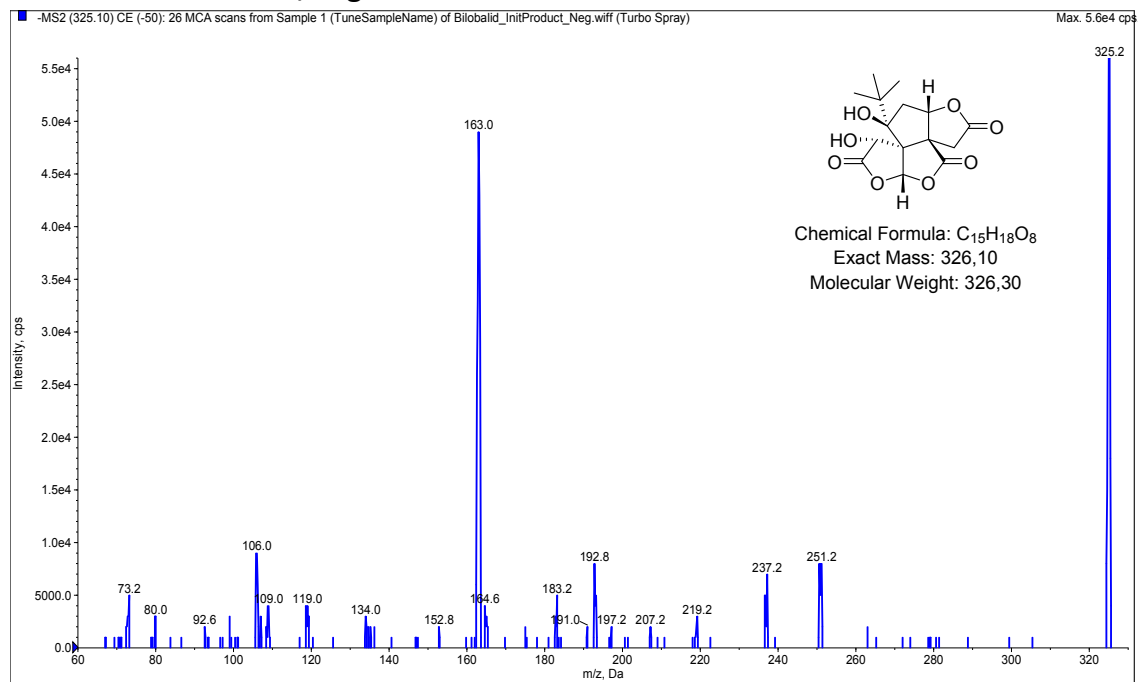


Příklad 24.

Hmotnostní spektrum **Bilobalidu** s monoizotopickou hmotností **326,10**.

Přístroj: 3200 QTRAP LC-MS/MS (QTRAP, AB Sciex)

Ionizační technika: **ESI, negativní mód**

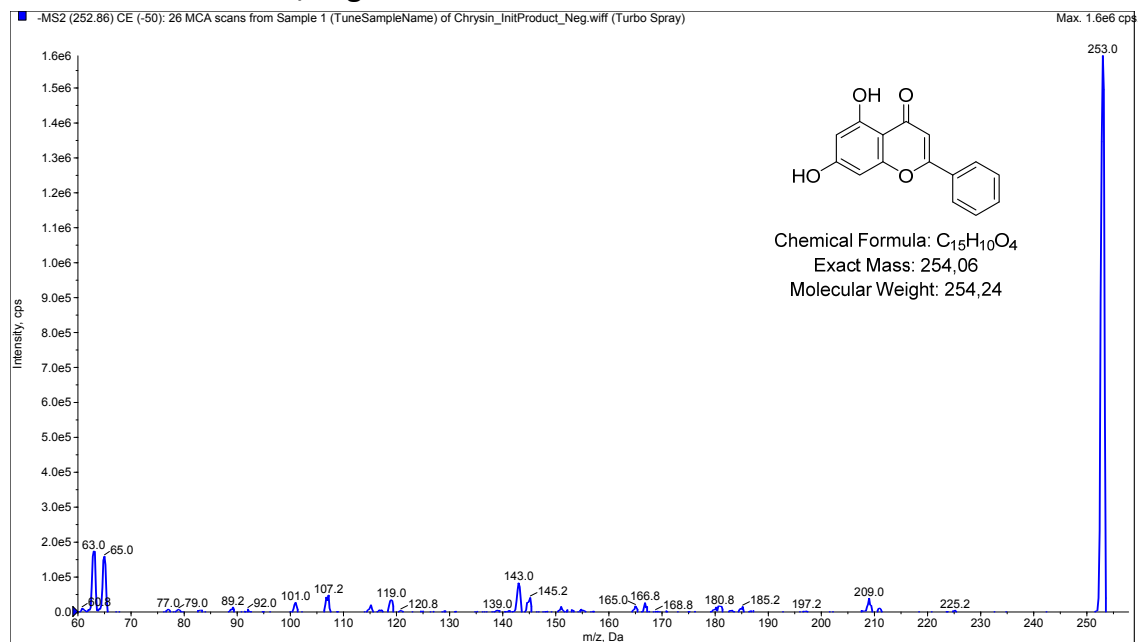


Příklad 25.

Hmotnostní spektrum **Chrysinu** s monoizotopickou hmotností **254,06**.

Přístroj: 3200 QTRAP LC-MS/MS (QTRAP, AB Sciex)

Ionizační technika: **ESI, negativní mód**

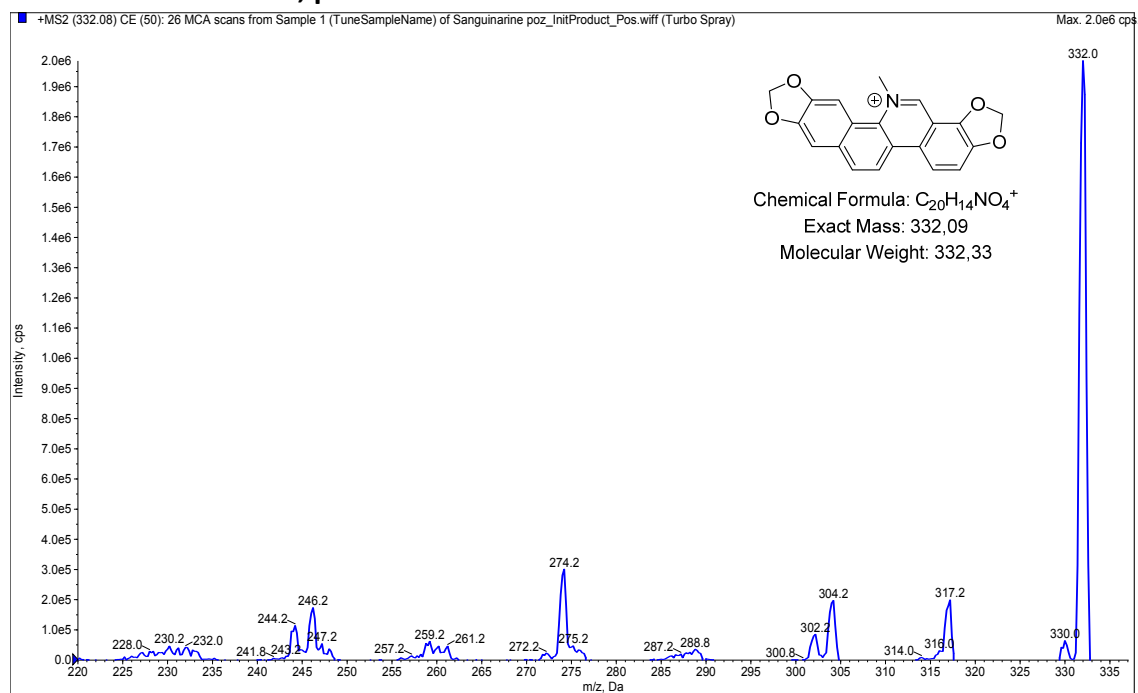


Příklad 26.

Hmotnostní spektrum **Sanguinarinu** s monoizotopickou hmotností **332,09**.

Přístroj: 3200 QTRAP LC-MS/MS (QTRAP, AB Sciex)

Ionizační technika: **ESI, pozitivní mód**

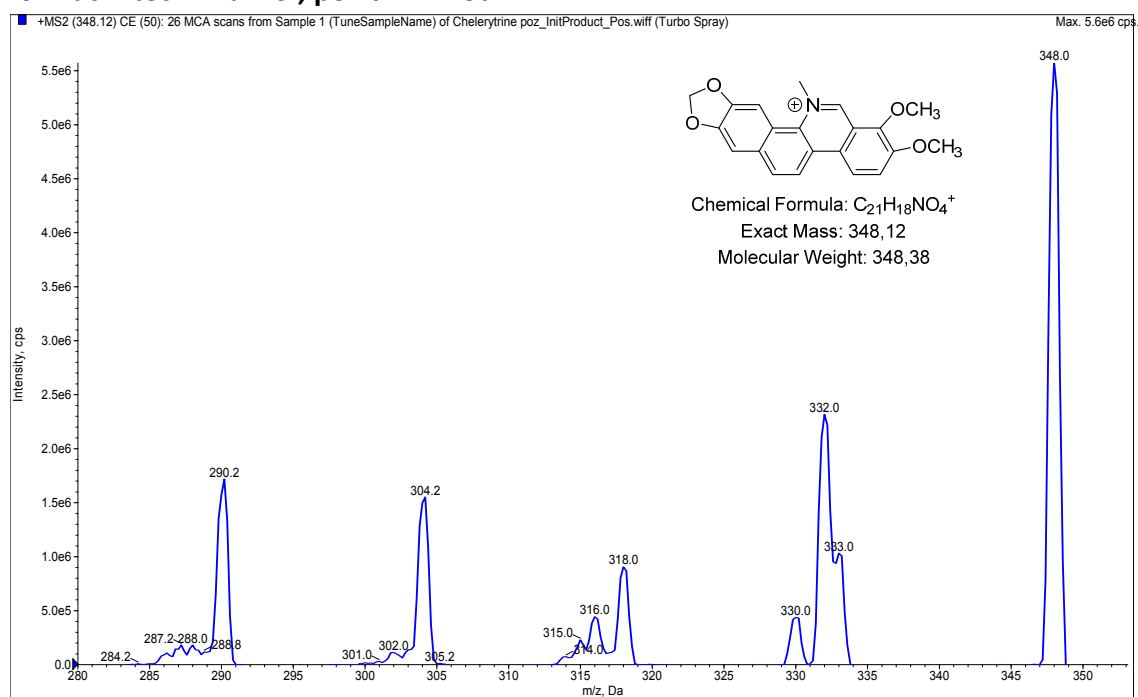


Příklad 27.

Hmotnostní spektrum **Chelerytrinu** s monoizotopickou hmotností **348,38**.

Přístroj: 3200 QTRAP LC-MS/MS (QTRAP, AB Sciex)

Ionizační technika: **ESI, pozitivní mód**

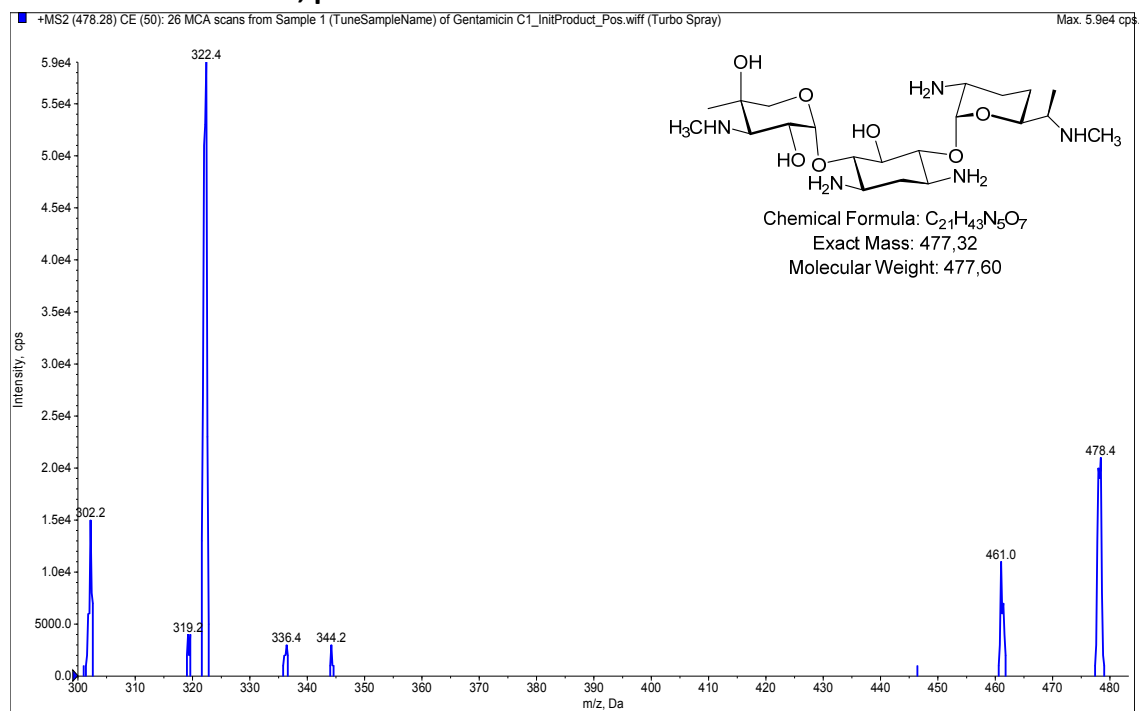


Příklad 28.

Hmotnostní spektrum **Gentamycinu C₁** s monoizotopickou hmotností **477,32**.

Přístroj: 3200 QTRAP LC-MS/MS (QTRAP, AB Sciex)

Ionizační technika: **ESI, pozitivní mód**

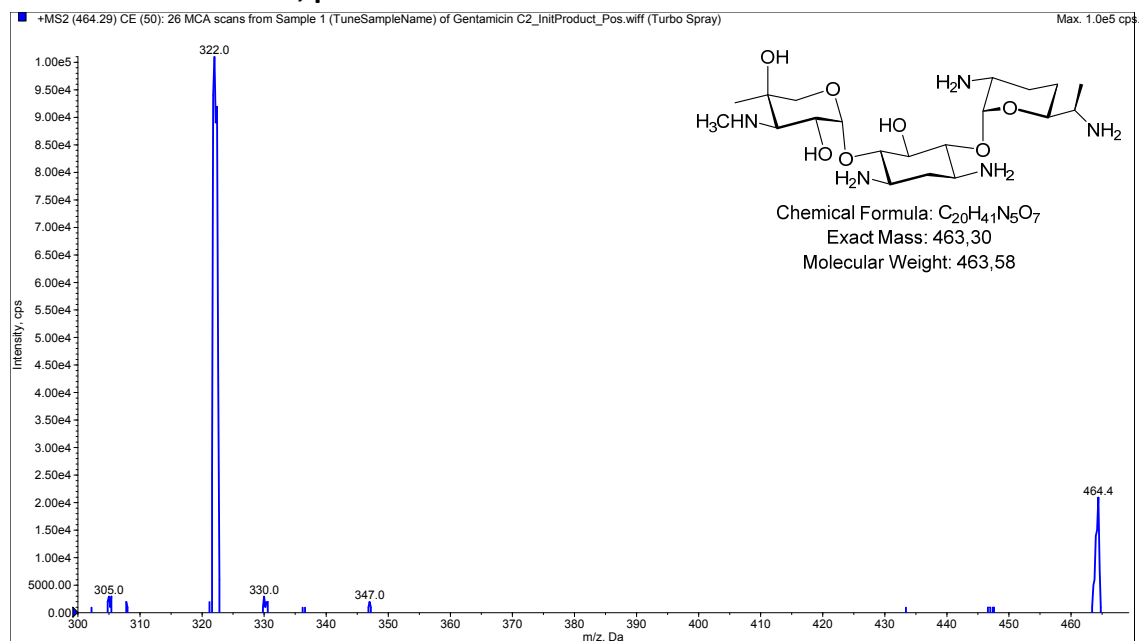


Příklad 29.

Hmotnostní spektrum **Gentamycinu C₂** s monoizotopickou hmotností **463,30**.

Přístroj: 3200 QTRAP LC-MS/MS (QTRAP, AB Sciex)

Ionizační technika: **ESI, pozitivní mód**

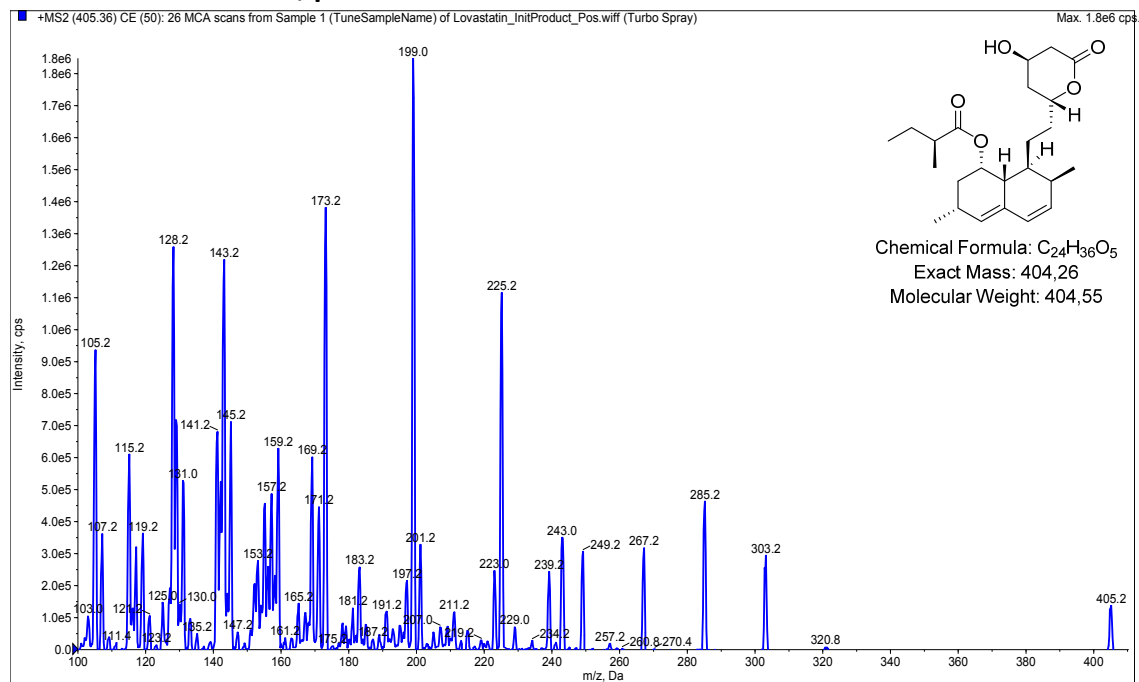


Příklad 30.

Hmotnostní spektrum **Lovastatinu** s monoizotopickou hmotností **404,26**.

Přístroj: 3200 QTRAP LC-MS/MS (QTRAP, AB Sciex)

Ionizační technika: **ESI, pozitivní mód**

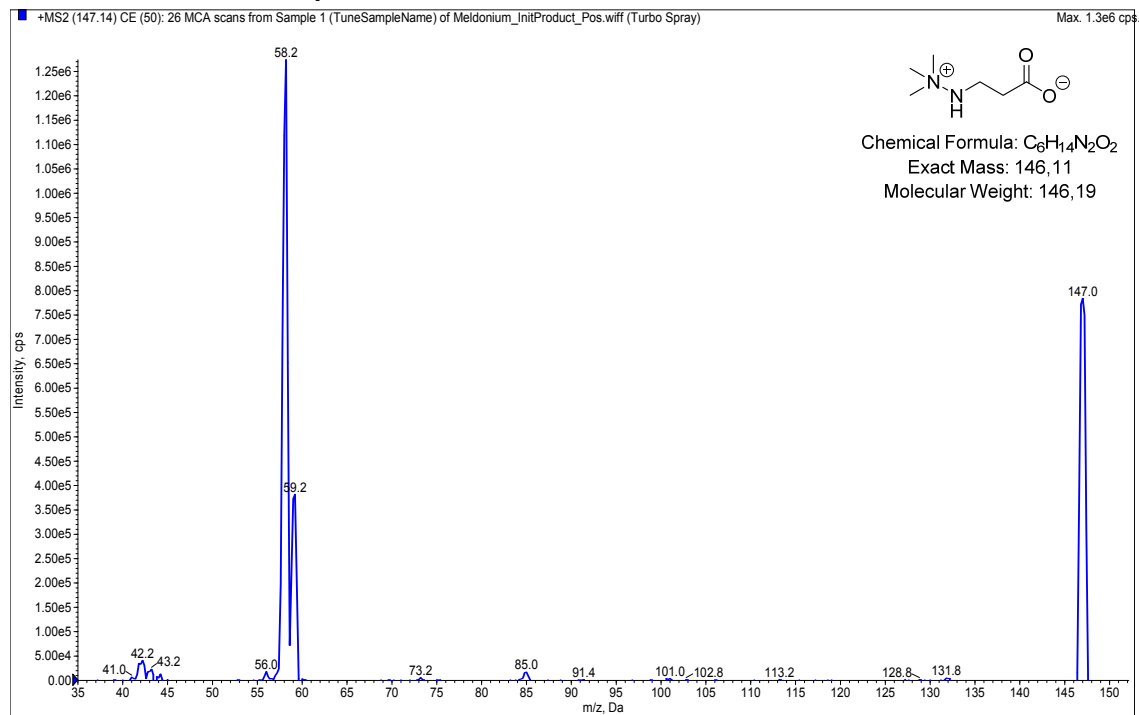


Příklad 31.

Hmotnostní spektrum **Meldonia** s monoizotopickou hmotností **146,11**.

Přístroj: 3200 QTRAP LC-MS/MS (QTRAP, AB Sciex)

Ionizační technika: **ESI, pozitivní mód**

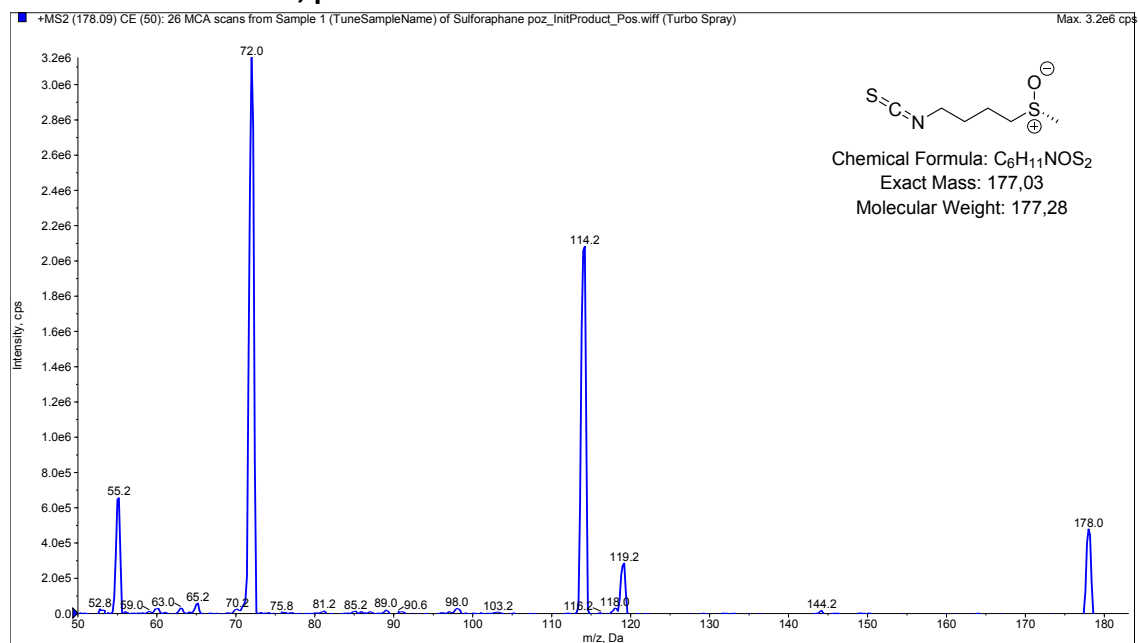


Příklad 32.

Hmotnostní spektrum **Sulforafanu** s monoizotopickou hmotností **177,03**.

Přístroj: 3200 QTRAP LC-MS/MS (QTRAP, AB Sciex)

Ionizační technika: **ESI, pozitivní mód**

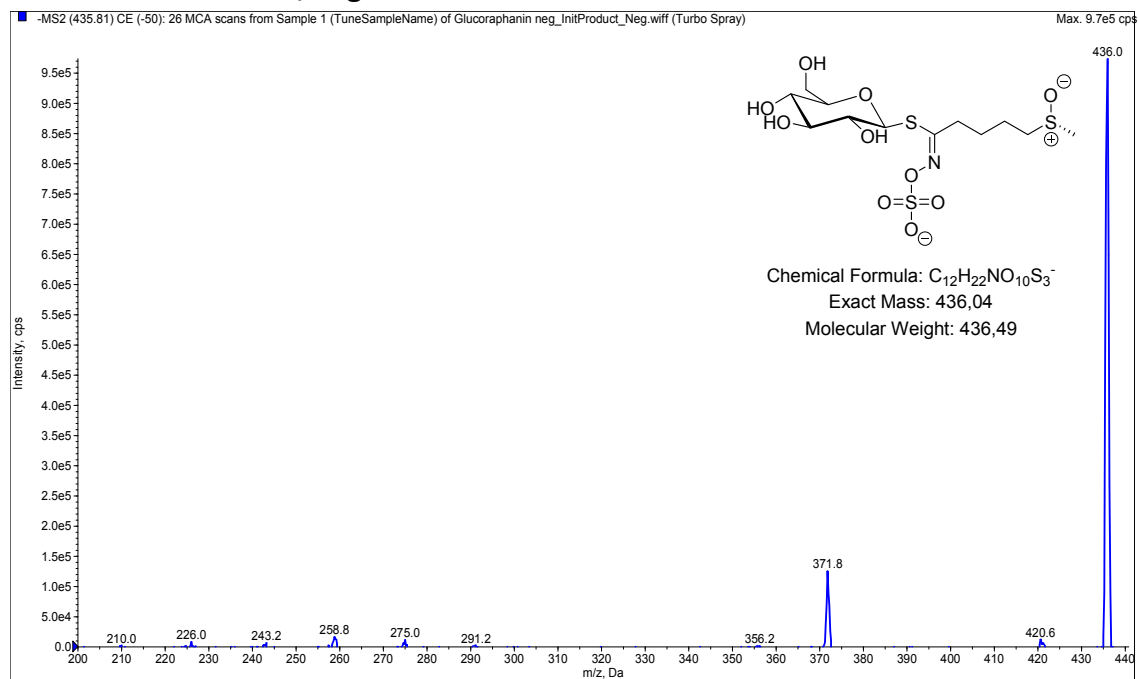


Příklad 33.

Hmotnostní spektrum **Glukorafaninu** s monoizotopickou hmotností **436,04**.

Přístroj: 3200 QTRAP LC-MS/MS (QTRAP, AB Sciex)

Ionizační technika: **ESI, negativní mód**

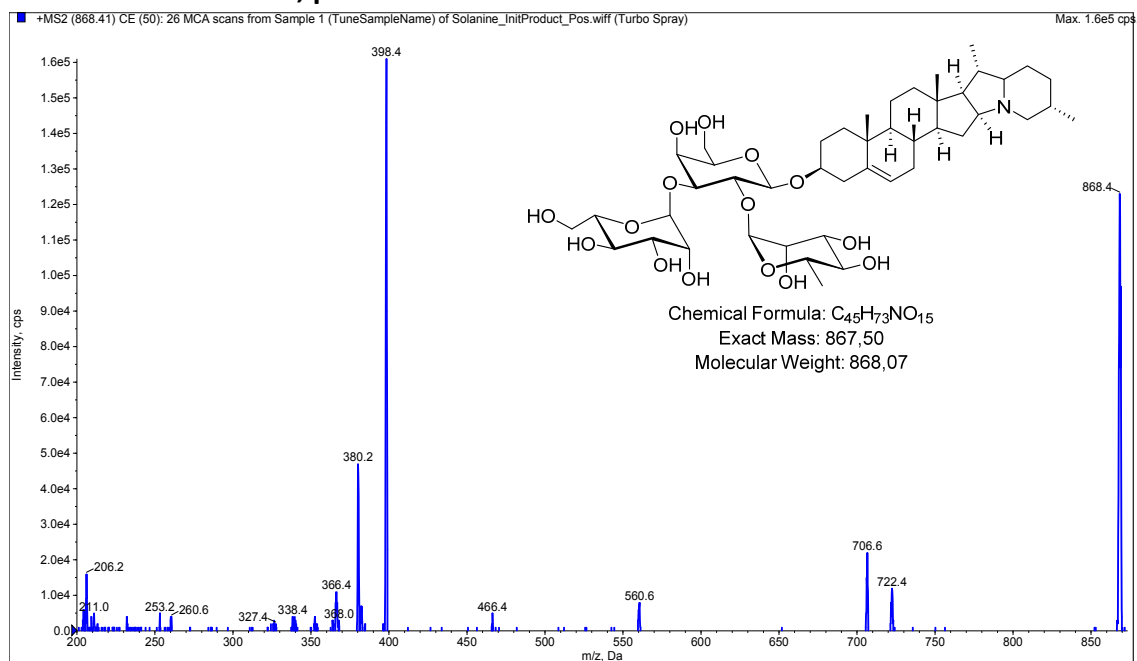


Příklad 34.

Hmotnostní spektrum **Solaninu** s monoizotopickou hmotností **868,50**.

Přístroj: 3200 QTRAP LC-MS/MS (QTRAP, AB Sciex)

Ionizační technika: **ESI, pozitivní mód**

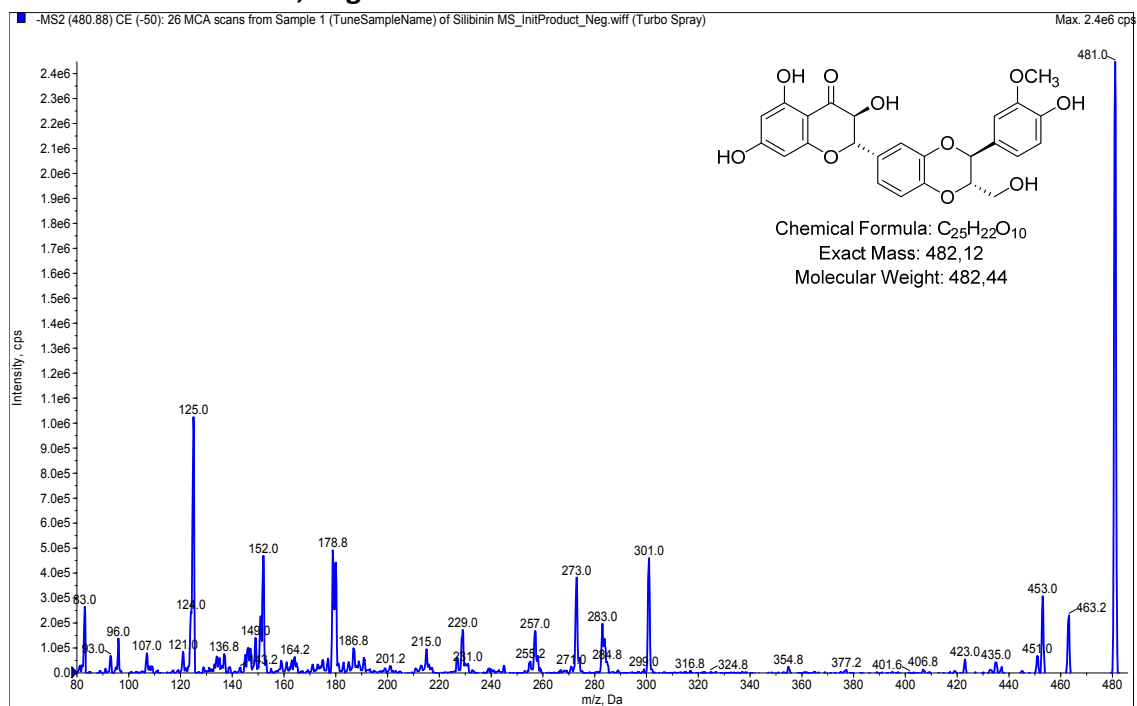


Příklad 35.

Hmotnostní spektrum **Silibininu** s monoizotopickou hmotností **482,12**.

Přístroj: 3200 QTRAP LC-MS/MS (QTRAP, AB Sciex)

Ionizační technika: **ESI, negativní mód**

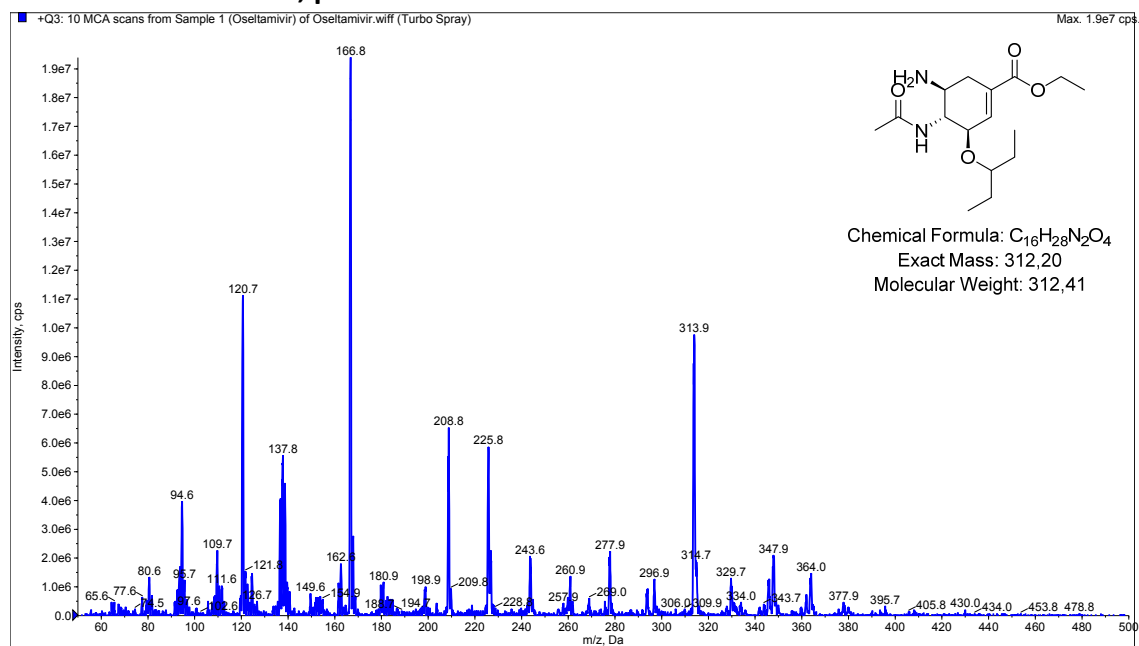


Příklad 36.

Hmotnostní spektrum **Osetamiviru** s monoizotopickou hmotností **312,20**.

Přístroj: 3200 QTRAP LC-MS/MS (QTRAP, AB Sciex)

Ionizační technika: **ESI, pozitivní mód**

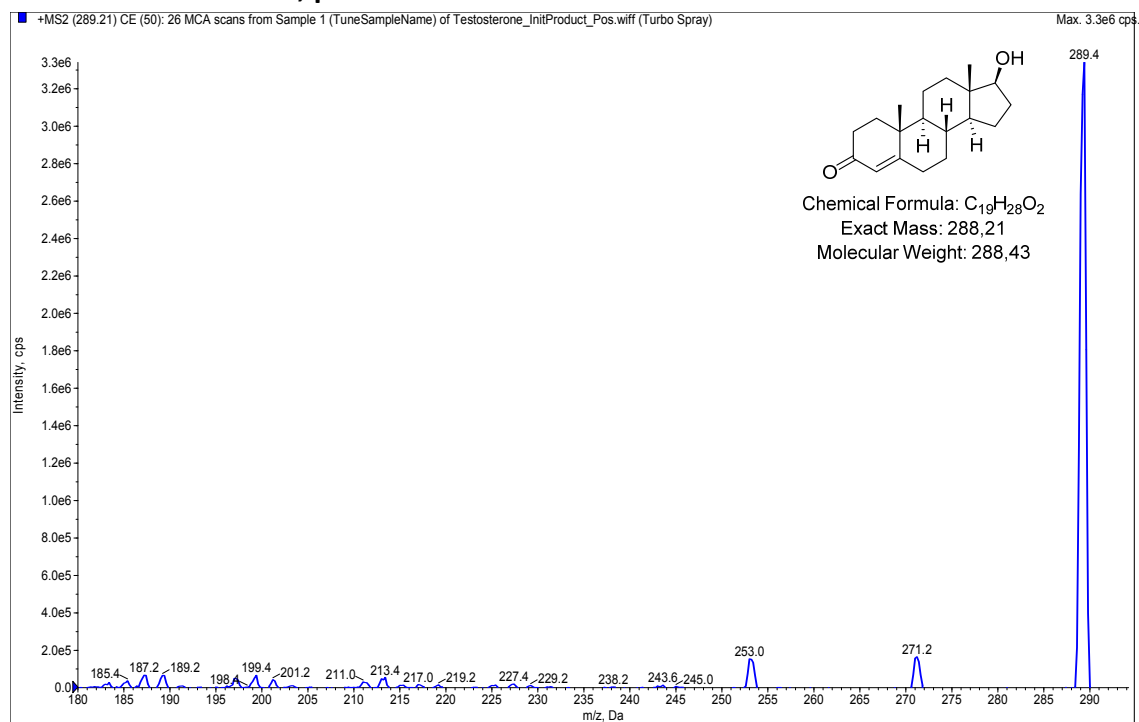


Příklad 37.

Hmotnostní spektrum **Testosteronu** s monoizotopickou hmotností **288,21**.

Přístroj: 3200 QTRAP LC-MS/MS (QTRAP, AB Sciex)

Ionizační technika: **ESI, pozitivní mód**

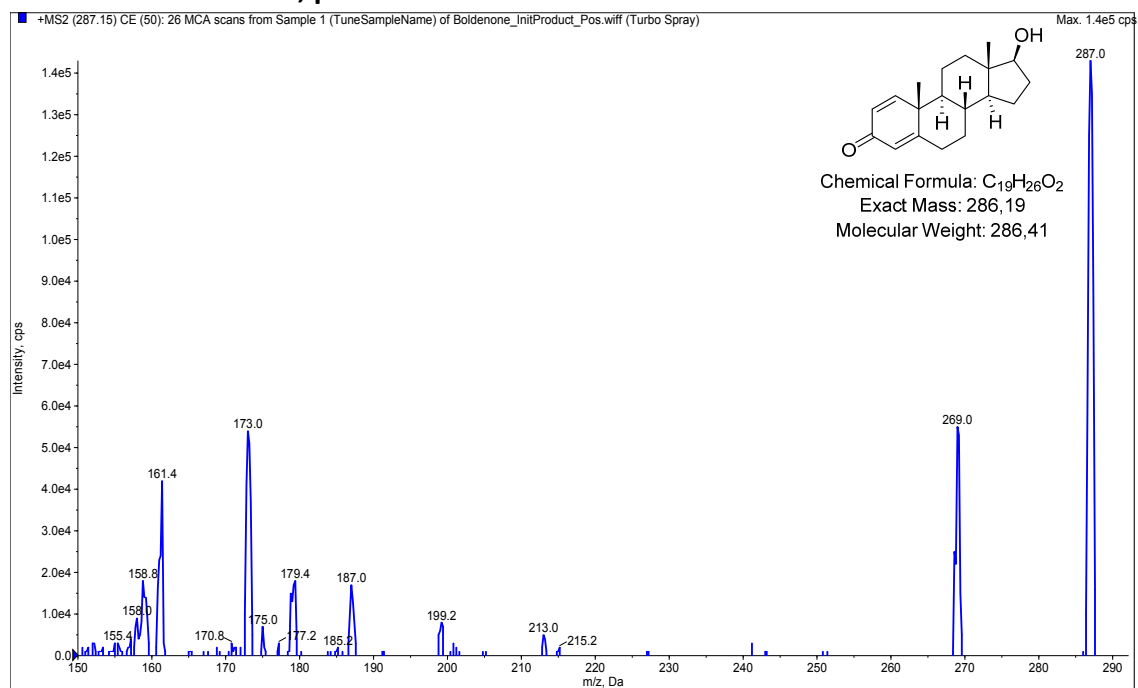


Příklad 38.

Hmotnostní spektrum **Boldenonu** s monoizotopickou hmotností **286,19**.

Přístroj: 3200 QTRAP LC-MS/MS (QTRAP, AB Sciex)

Ionizační technika: **ESI, pozitivní mód**

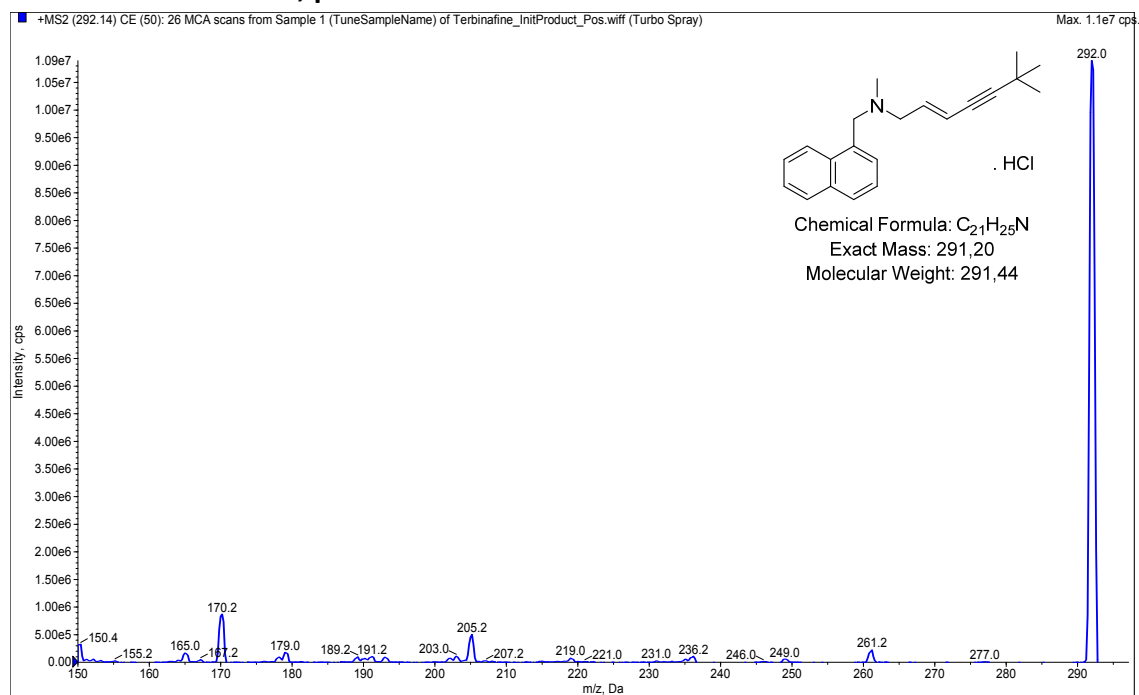


Příklad 39.

Hmotnostní spektrum **Terbinafinu** s monoizotopickou hmotností **291,20**.

Přístroj: 3200 QTRAP LC-MS/MS (QTRAP, AB Sciex)

Ionizační technika: **ESI, pozitivní mód**

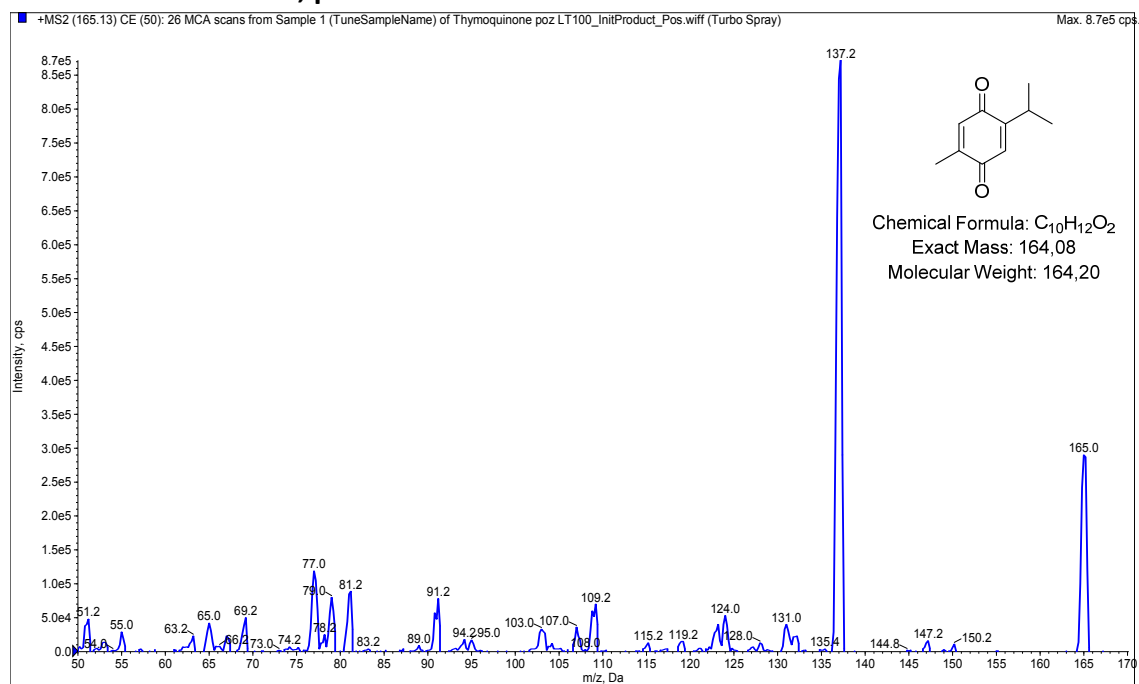


Příklad 40.

Hmotnostní spektrum **Tymochinonu** s monoizotopickou hmotností **166,08**.

Přístroj: 3200 QTRAP LC-MS/MS (QTRAP, AB Sciex)

Ionizační technika: **ESI, pozitivní mód**

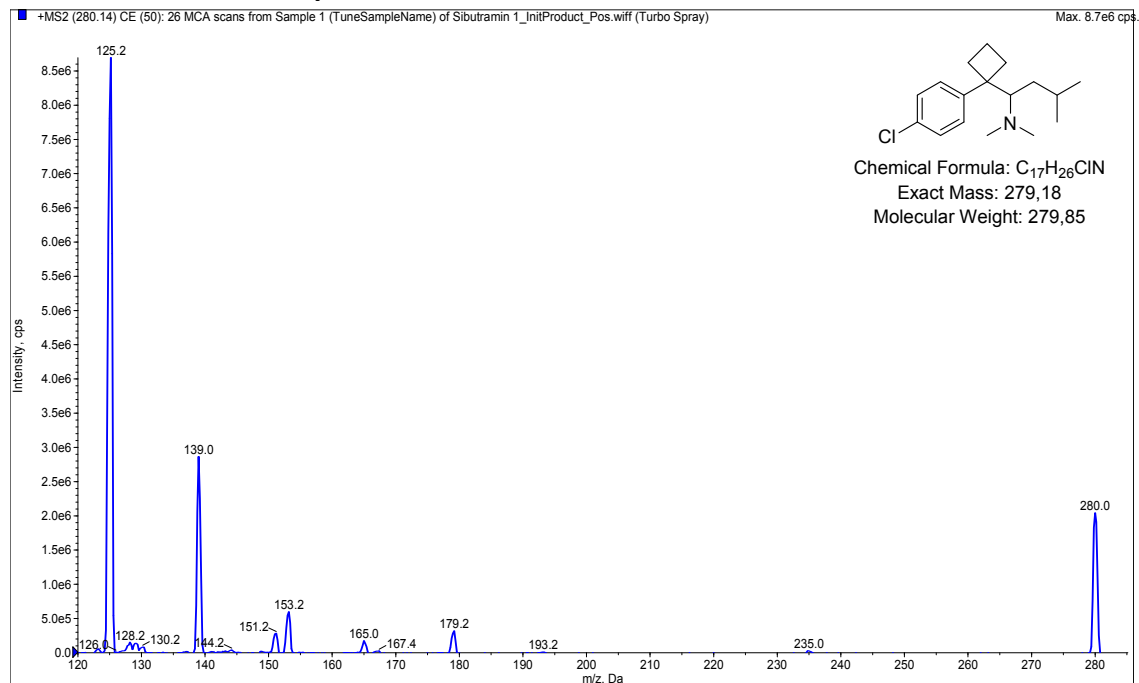


Příklad 41.

Hmotnostní spektrum **Sibutraminu** s monoizotopickou hmotností **279,18**.

Přístroj: 3200 QTRAP LC-MS/MS (QTRAP, AB Sciex)

Ionizační technika: **ESI, pozitivní mód**

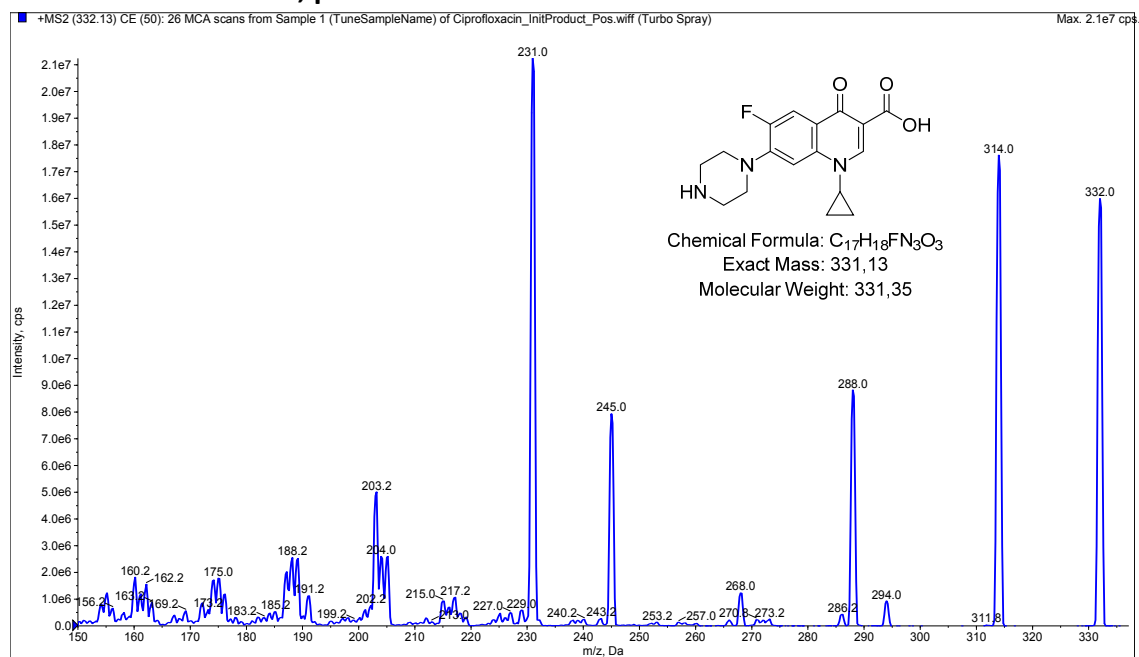


Příklad 42.

Hmotnostní spektrum **Ciprofloxacinu** s monoizotopickou hmotností **331,13**.

Přístroj: 3200 QTRAP LC-MS/MS (QTRAP, AB Sciex)

Ionizační technika: **ESI, pozitivní mód**

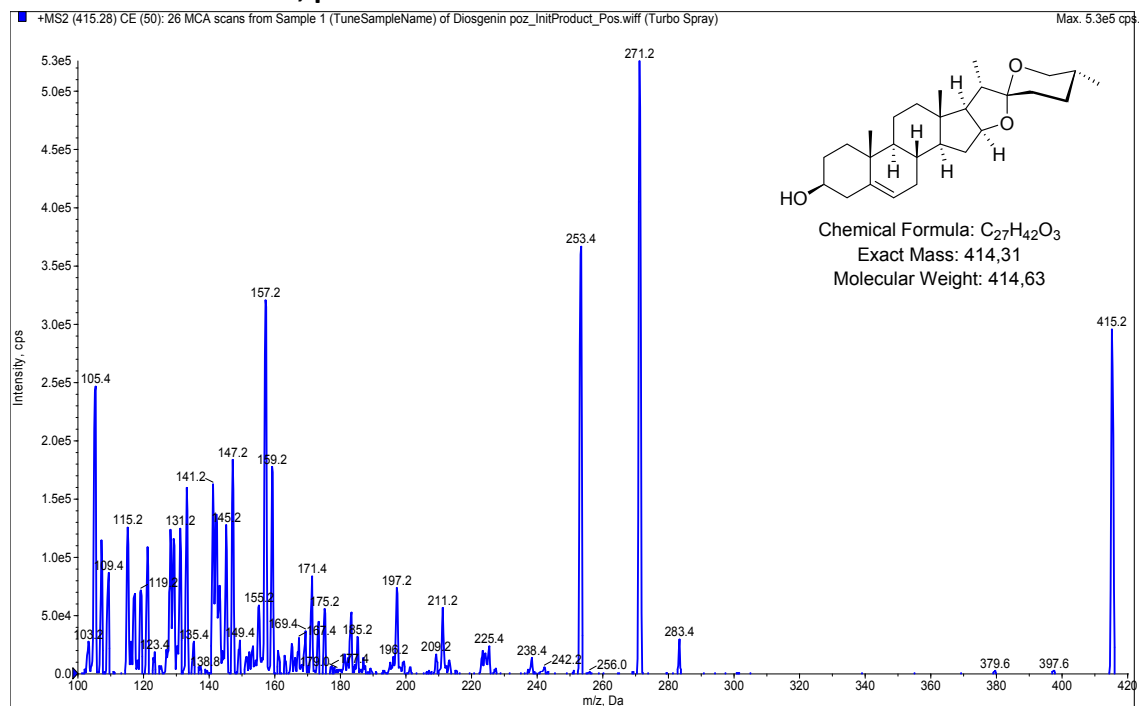


Příklad 43.

Hmotnostní spektrum **Diosgeninu** s monoizotopickou hmotností **414,31**.

Přístroj: 3200 QTRAP LC-MS/MS (QTRAP, AB Sciex)

Ionizační technika: **ESI, pozitivní mód**

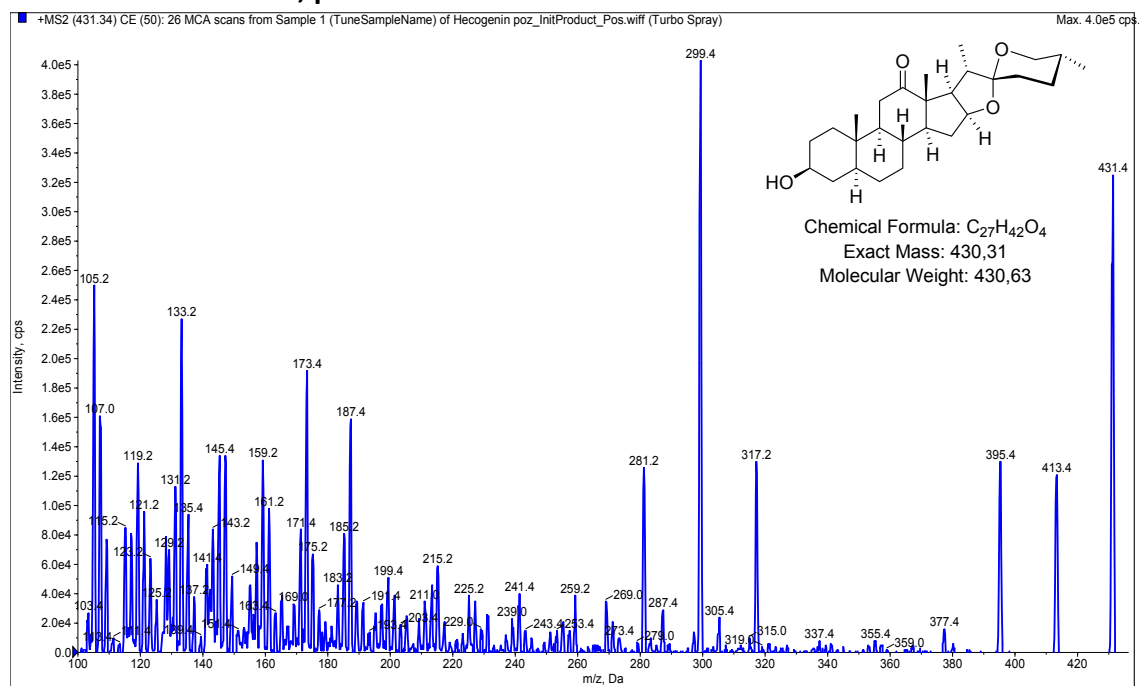


Příklad 44.

Hmotnostní spektrum **Hekogeninu** s monoizotopickou hmotností **430,31**.

Přístroj: 3200 QTRAP LC-MS/MS (QTRAP, AB Sciex)

Ionizační technika: **ESI, pozitivní mód**

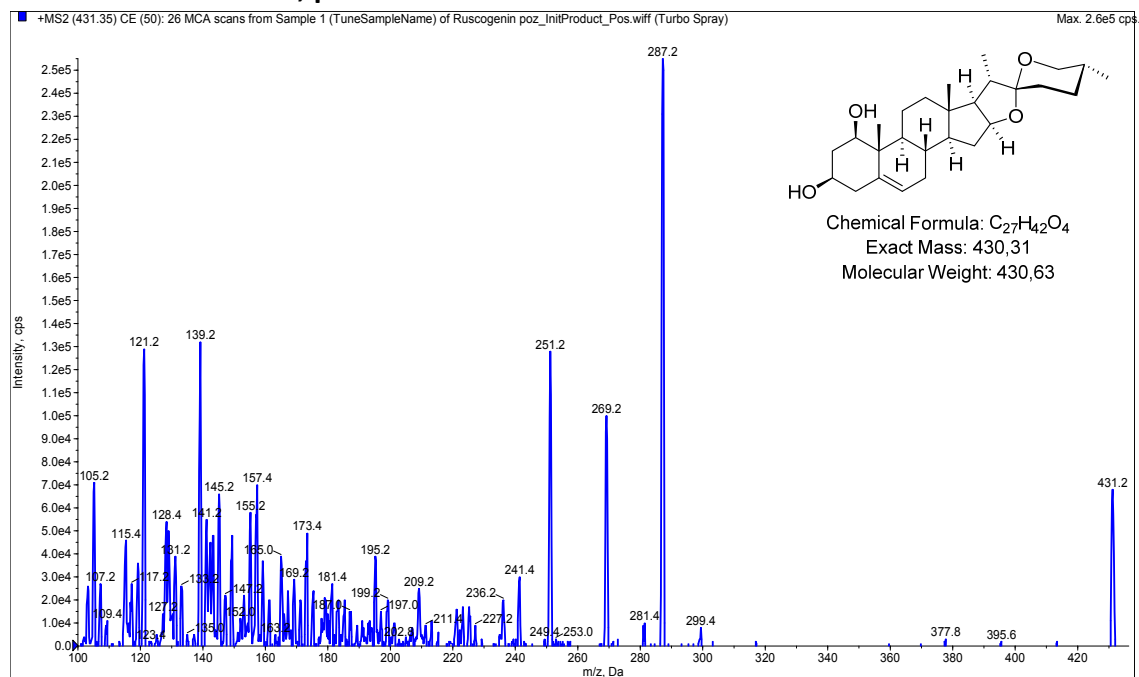


Příklad 45.

Hmotnostní spektrum **Ruskogeninu** s monoizotopickou hmotností **430,31**.

Přístroj: 3200 QTRAP LC-MS/MS (QTRAP, AB Sciex)

Ionizační technika: **ESI, pozitivní mód**

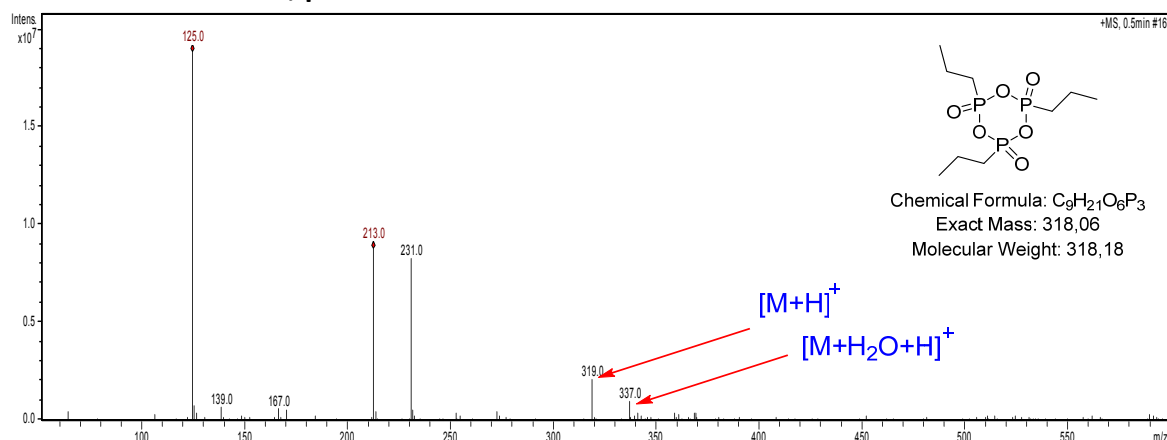


Příklad 46.¹⁰

Hmotnostní spektrum **T3P** s monoizotopickou hmotností **318,06**.

Přístroj: HPLC 1100 Series LCMS D Ion Trap (IT, Agilent)

Ionizační technika: **ESI, pozitivní mód**

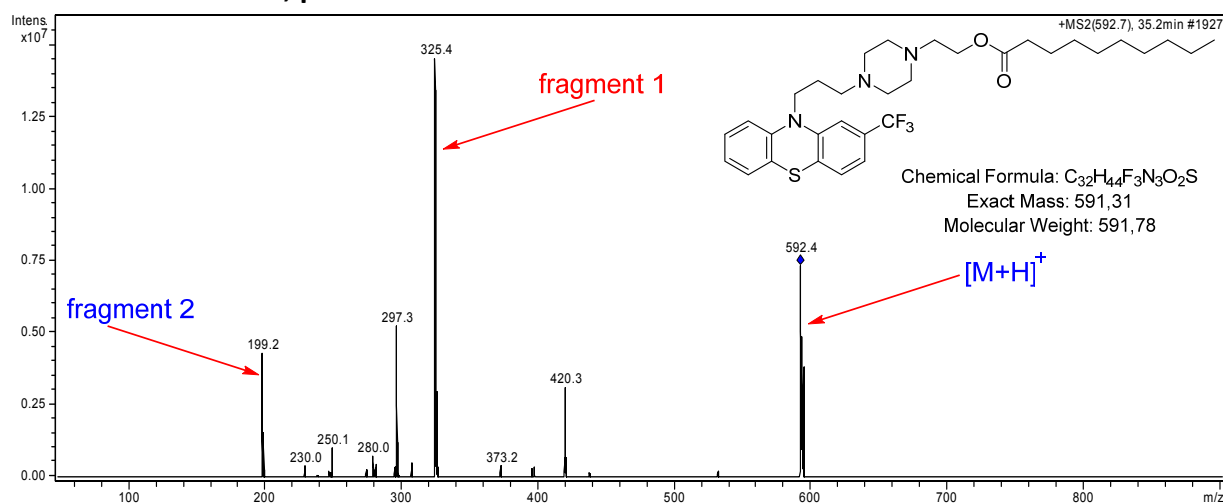


Příklad 47.

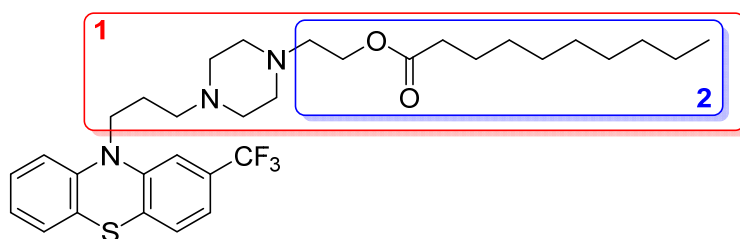
Hmotnostní spektrum **Flufenazín-dekanoátu** s monoizotopickou hmotností **591,31**.

Přístroj: HPLC 1100 Series LCMS D Ion Trap (IT, Agilent)

Ionizační technika: **ESI, pozitivní mód**



Flufenazín dekanoát je neuroleptikum s dlouhodobým účinkem (depotní forma) používané v léčbě psychóz a hlavně schizofrenie. Látka byla naměřena s použitím ESI v pozitivním modu, z čehož lze očekávat přítomnost $[M+H]^+$ kvazimolekulového iontu. Fragmentační spektrum MS^2 na obrázku vyjadřuje přítomnost fragmentů 199,2 a 325,4, které patří .

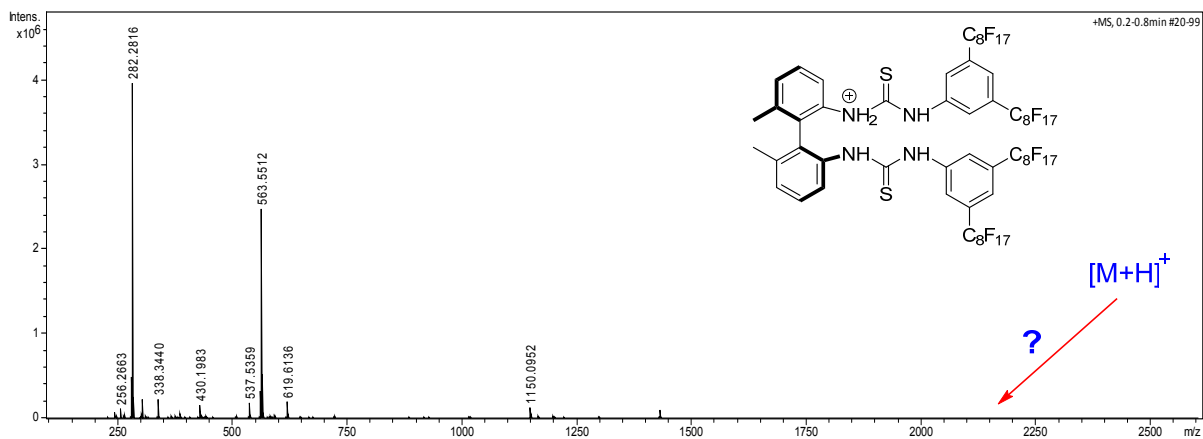
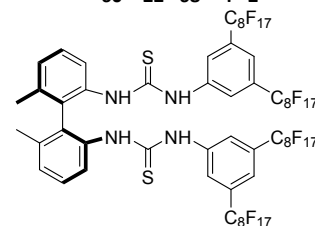


Příklad 48.¹¹

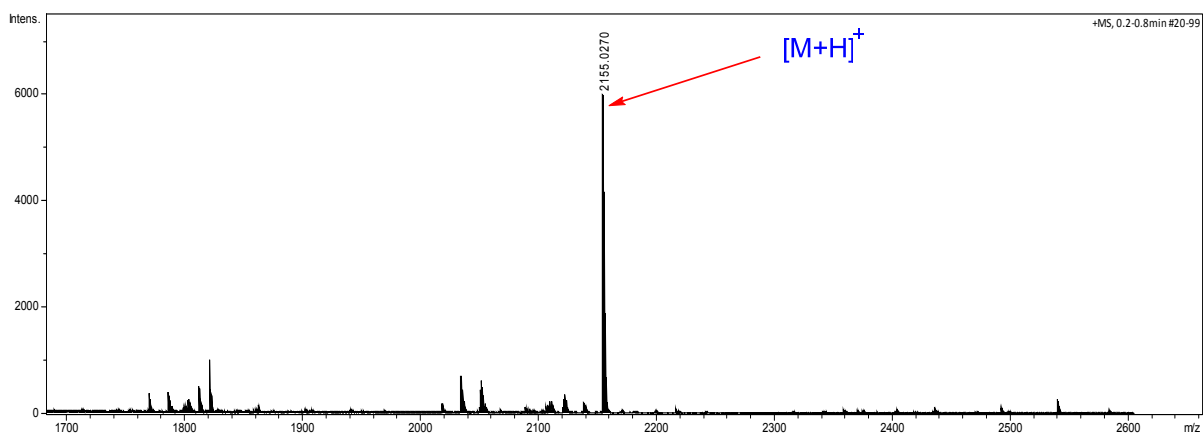
Hmotnostní spektrum s vysokým rozlišením látky se sumárním vzorcem **C₆₀H₂₂F₆₈N₄S₂** a monoizotopickou hmotností **2154,02001**.

Přístroj: Impact II (Q-TOF, Bruker Daltonics, Brémy, Německo)

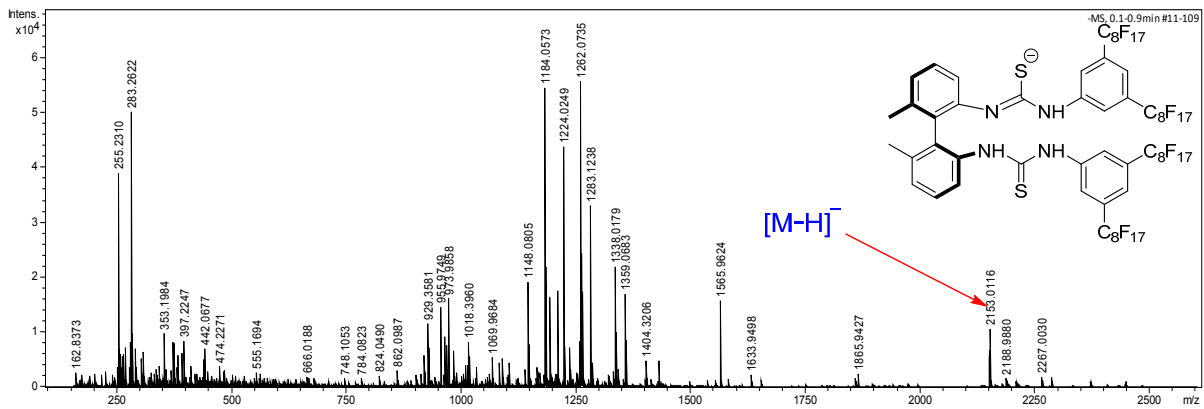
Ionizační technika: **ESI, pozitivní mód**



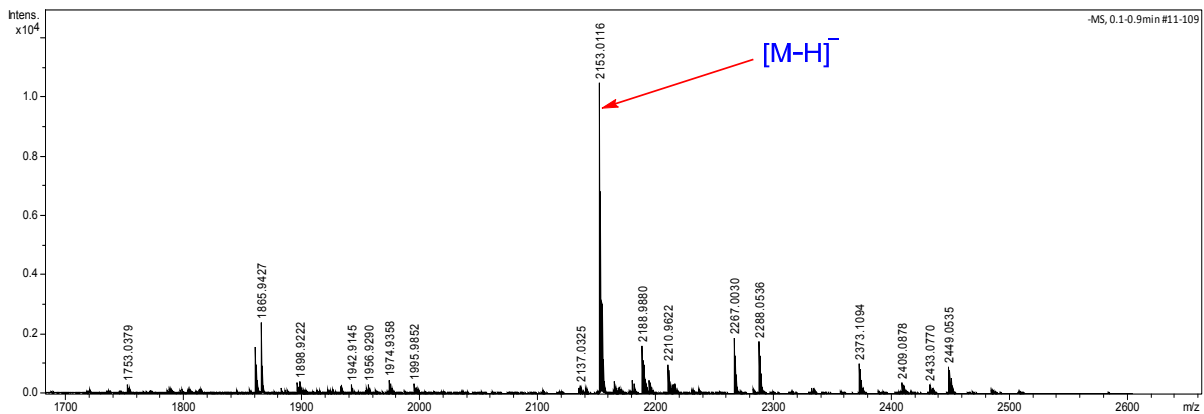
Po zvětšení v oblasti 1 700 – 2 600.



Ionizační technika: ESI, negativní mód



Po zvětšení v oblasti 1 700 – 2 600.

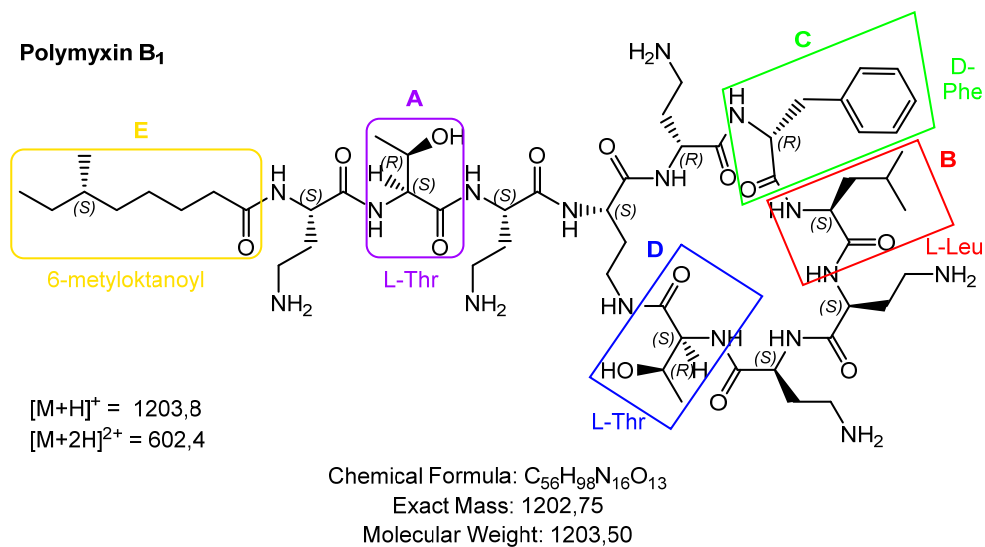


Příklad 49.

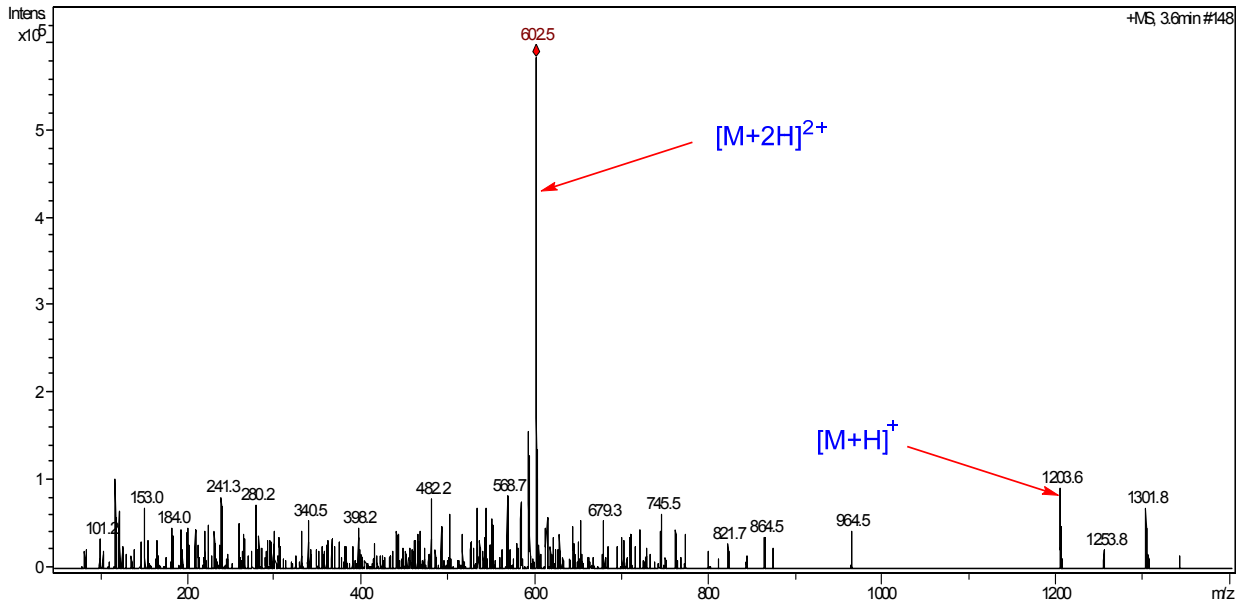
Hmotnostní spektrum **Polymyxinu B₁** s monoizotopickou hmotností **1202,75**.

Přístroj: HPLC 1100 Series LCMS D Ion Trap (IT, Agilent)

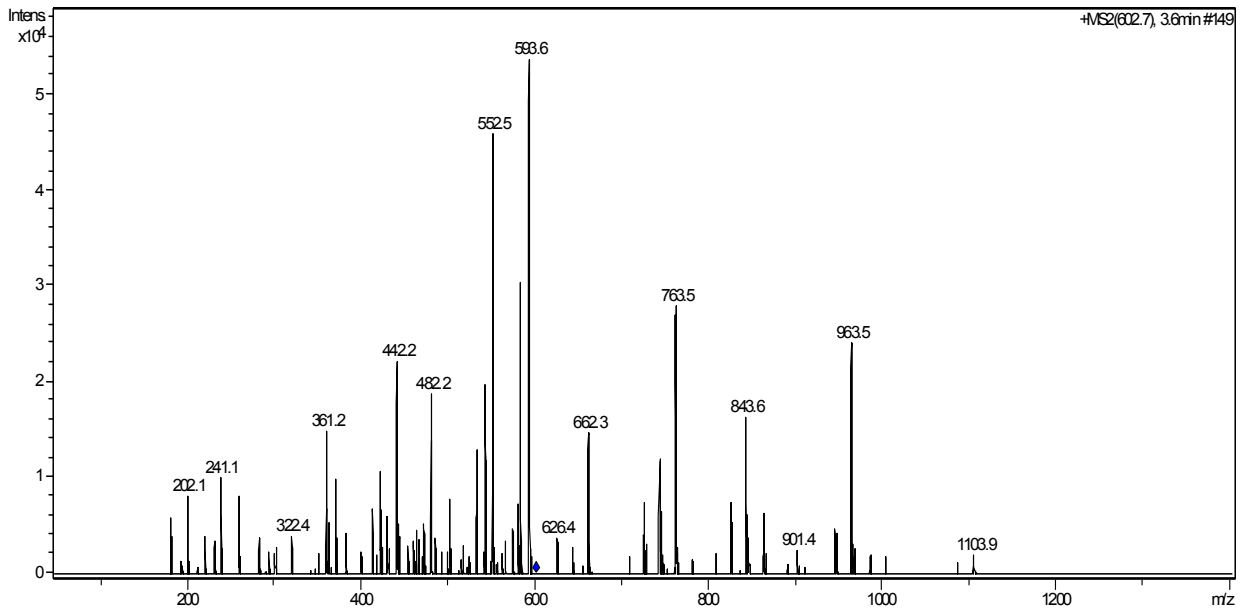
Ionizační technika: ESI, pozitivní mód



ESI MS



ESI MS² – prekurzorový ion 602,5



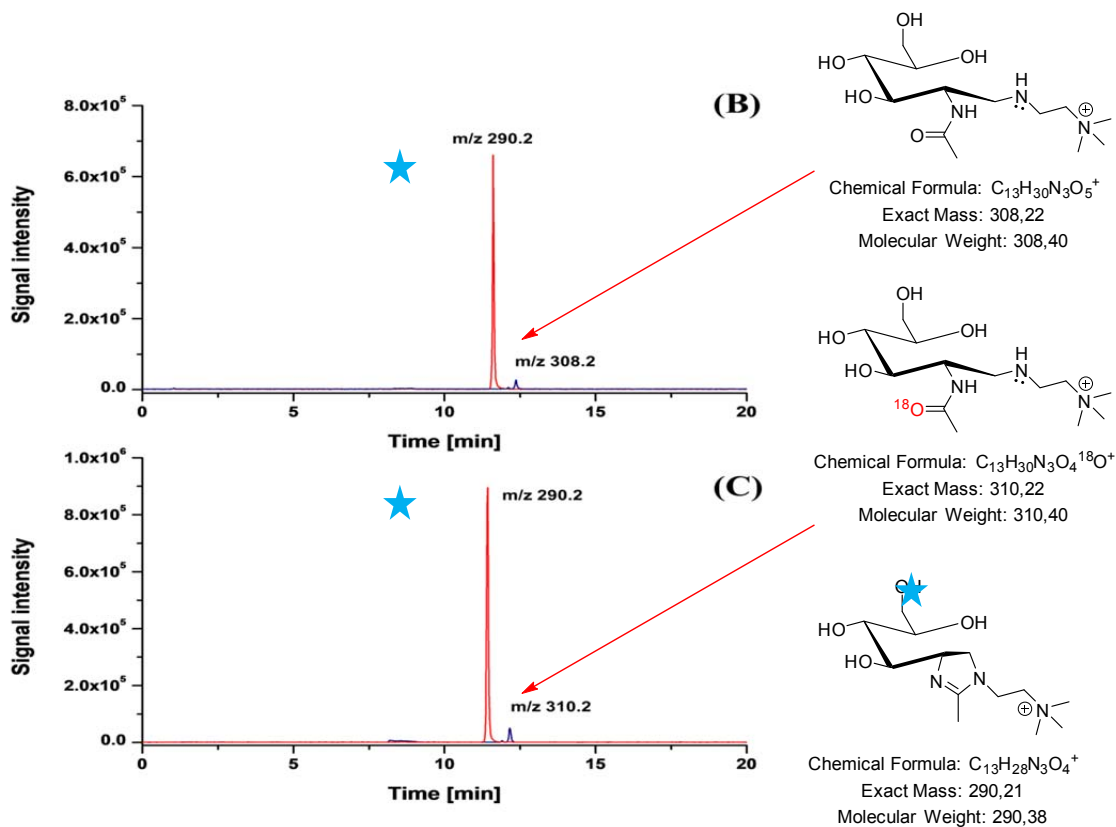
Příklad 50.¹²

Hmotnostní spektrum **produktů reaktivní aminace *N*-acetylglukosaminu s (2-aminoethyl)trimethylammonium-chloridem** s monoizotop. hmotnostmi **308,22, 310,22 a 290,21**.

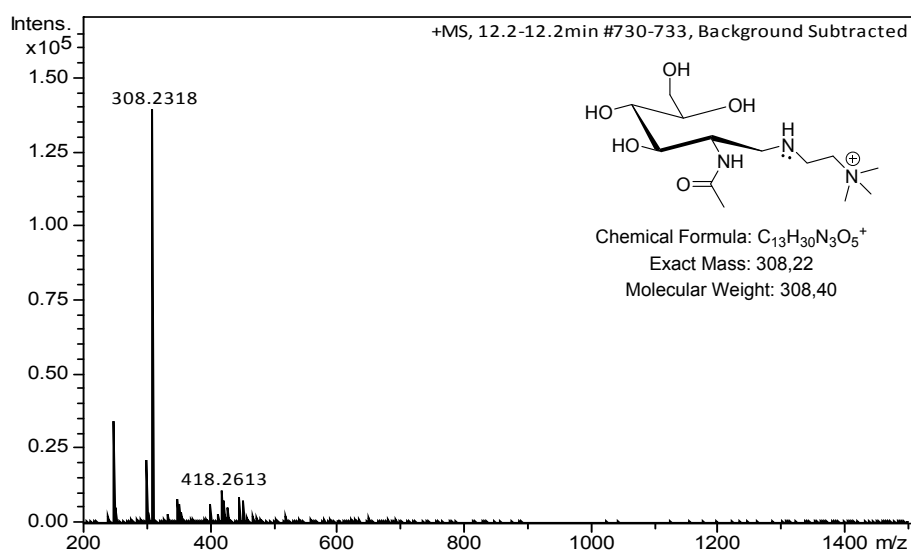
Přístroj: Agilent 7100 CE System + maXis II™ (QTOF, Bruker)

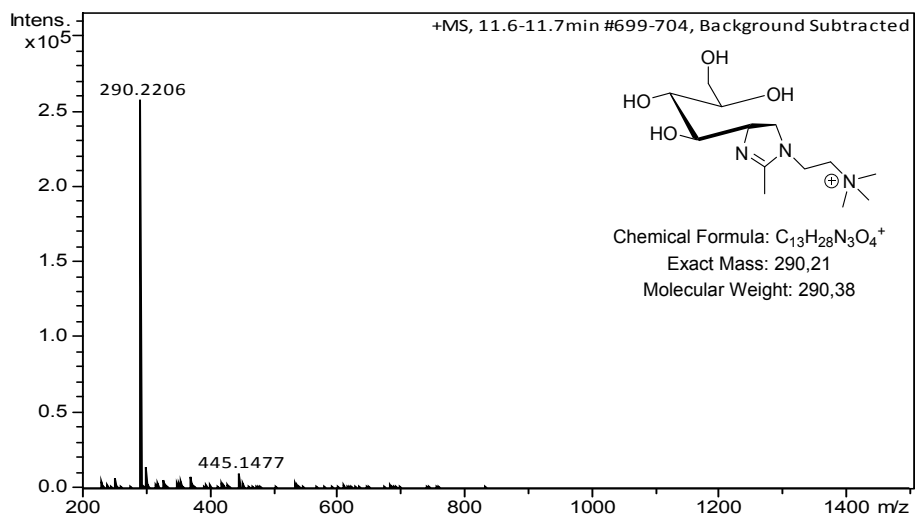
Ionizační technika: **ESI, pozitivní mód**

CE/ESI MS elektroferogram



ESI MS





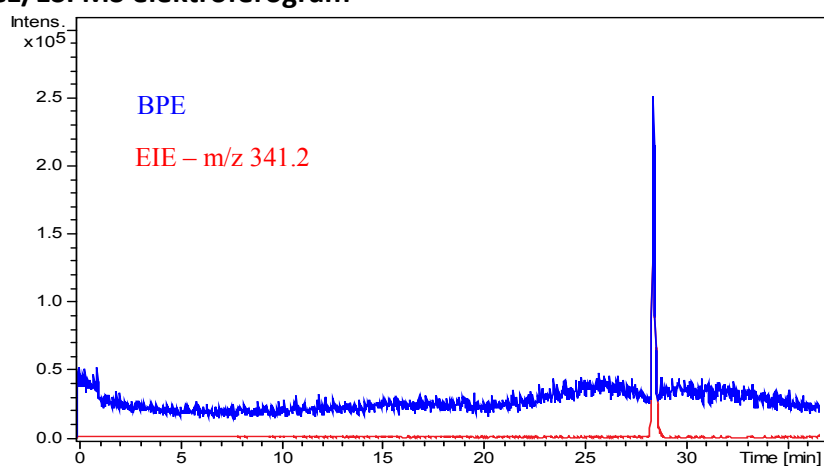
Příklad 51.¹²

Hmotnostní spektrum **produktů reaktivní aminace N-acetylglukosaminu s kyselinou 2-aminobenzovou** s monoizotopickou hmotností **342,14**.

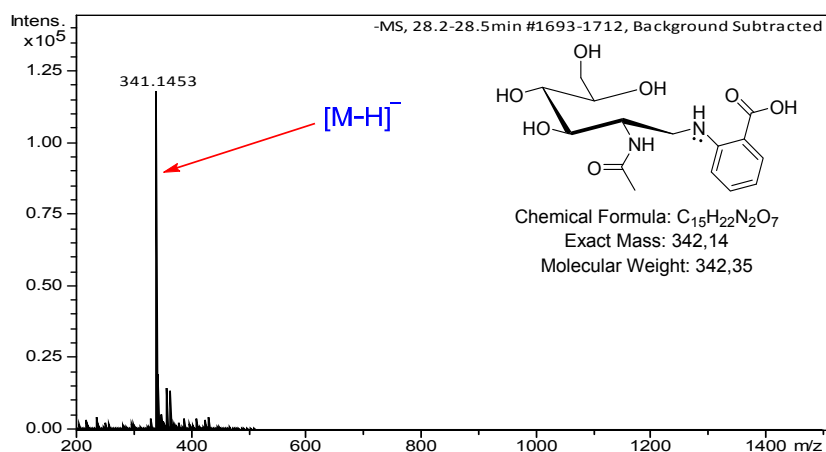
Přístroj: Agilent 7100 CE System + maXis II™ (QTOF, Bruker)

Ionizační technika: **ESI, negativní mód**

CE/ESI MS elektroferogram



ESI MS



Příklad 52.

Hmotnostní spektrum kalibrační směsi peptidů:

Angiotensin II s monoizotopickou hmotností **1046,2** → ①,

Angiotensin I s monoizotopickou hmotností **1296,5** → ②,

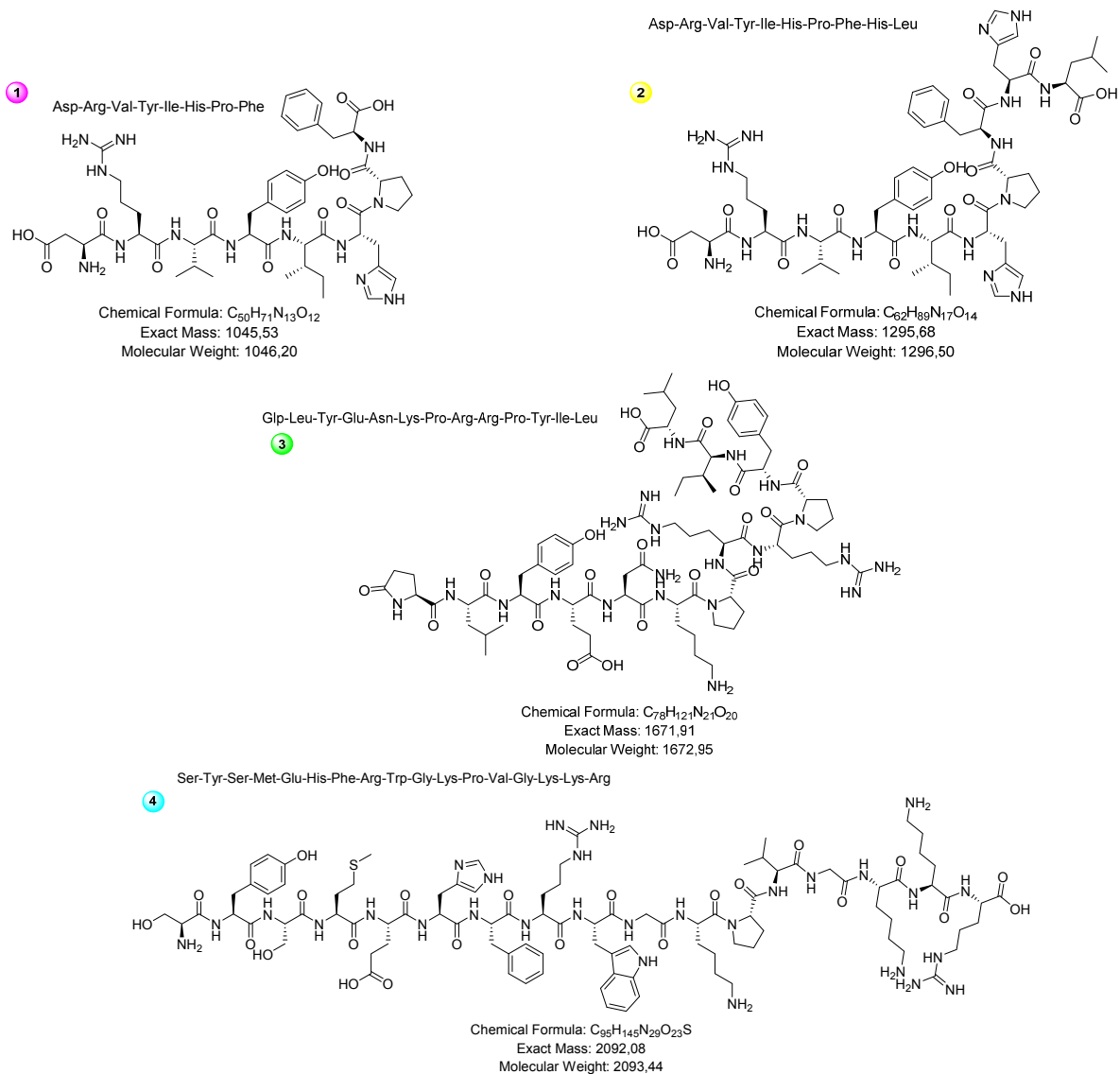
Neurotensin s monoizotopickou hmotností **1672,9** → ③,

ACTH [1-17] fragment s monoizotopickou hmotností **2093,5** → ④,

ACTH [18-39] fragment s monoizotopickou hmotností **2465,7** → ⑤.

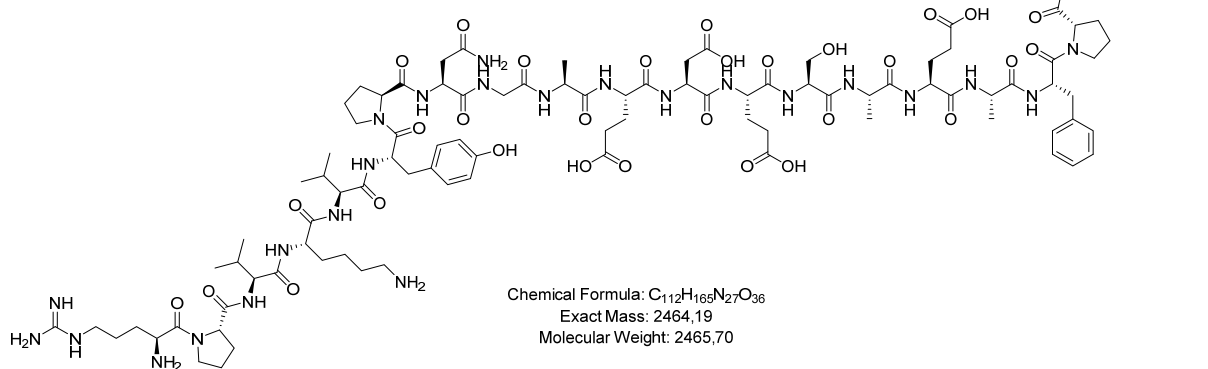
Přístroj: AB SciEX 4700 MALDI (TOF/TOF, AB Sciex)

Ionizační technika: **MALDI, pozitivní mód, rTOF**

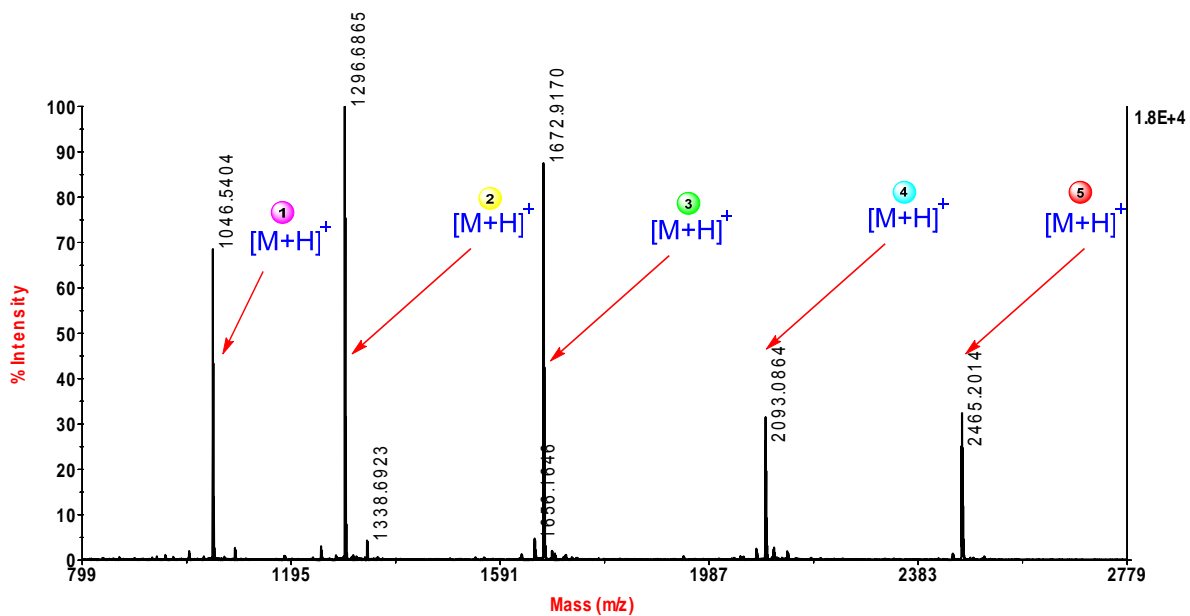


Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Ala-Glu-Asp-Glu-Ser-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe

5



4700 Reflector Spec #1 MC=>AdvBC(50,0.5,0.1)->BC[BP= 1296.7,17545]

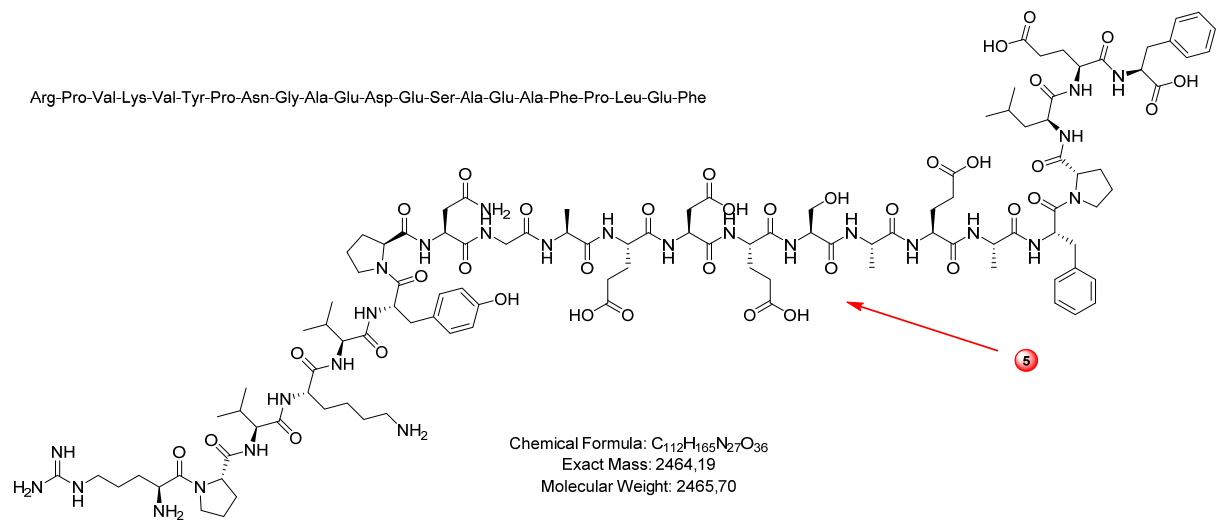


Příklad 53.

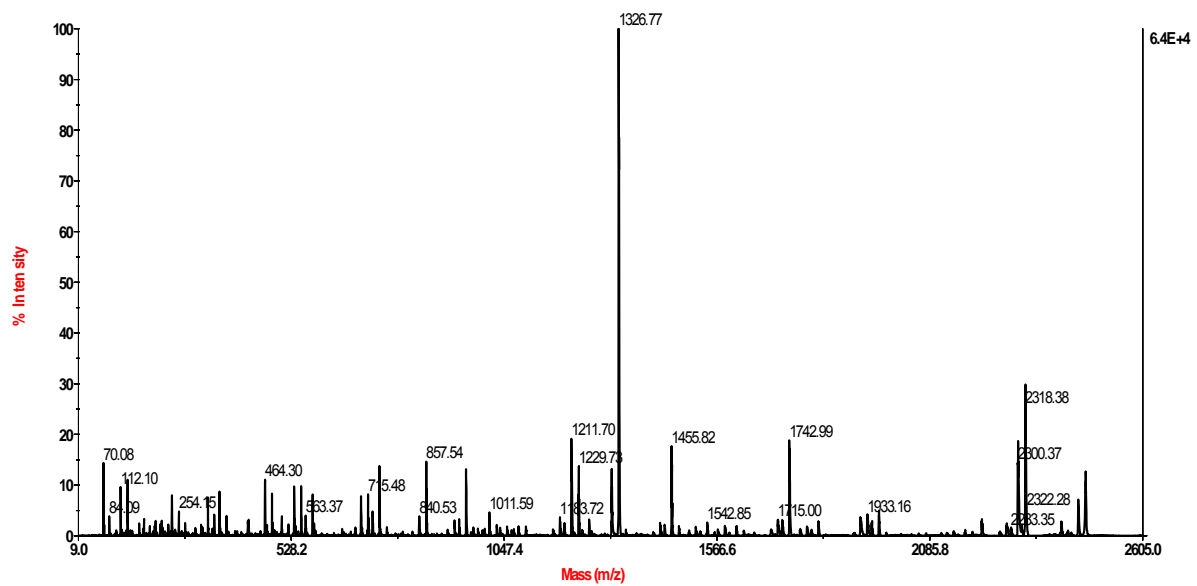
MS/MS (fragmentace) peptidu **ACTH [18-39] fragment** s monoizotopickou hmotností **2465,7**.

Přístroj: AB SciEX 4700 MALDI (TOF/TOF, AB Sciex)

Ionizační technika: **MALDI, pozitivní mód, rTOF**



4700 MS/MS Precursor 2465.2 Spec #1 MC=>AdvBC(50,0,5,0,1)[BP = 1326.8, 64296]



Příklad 54.

Hmotnostní spektrum směsi peptidů získaných enzymatickým štěpením **Trypsinem** proteinu: **BSA – Hovězí sérový albumin** s monoizotopickou hmotností **69 293**. Počet aminokyselin **607**.

Přístroj: AB SciEX 4700 MALDI (TOF/TOF, AB Sciex)

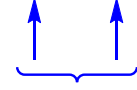
Ionizační technika: **MALDI, pozitivní mód, rTOF**

Místa štěpení řetězce trypsinem
a chymotrypsinem

Val-Phe-Leu-Met-Tyr-Pro-Gly-Trp-Cys-Glu-Asp-Ile-Lys-Ser-Arg-His

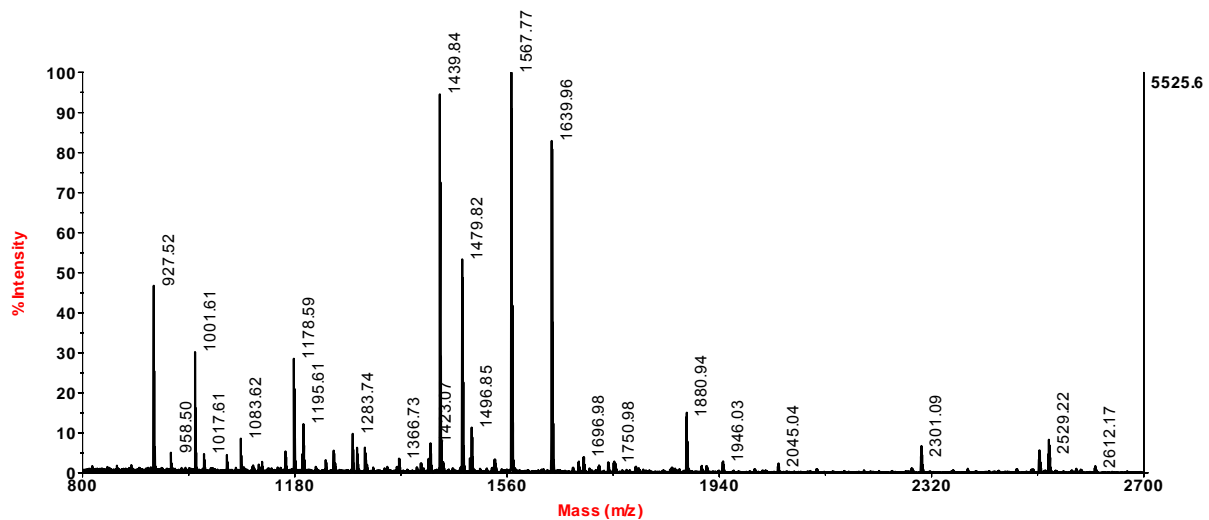


chymotrypsin štěpí tyto vazby



trypsin štěpí tyto vazby

4700 Reflector Spec #1 MC=>AdvBC(50,0,5,0.1)[BP= 1567.8,5526]



Sekvence proteinu:

```
10      20      30      40      50
MKWVTFISLL LLFSSAYSRG VFRRDTHKSE IAHRFKDLGE EHFKGLVLIA
60      70      80      90     100
FSQYLQQCPF DEHVKLVNEL TEFAKTCVAD ESHAGCEKSL HTLFGDELCK
110     120     130     140     150
VASLRETYGD MADCCEKQEP ERNECFLSHK DDSPDLPKPK PDPNTLCDEF
160     170     180     190     200
KADEKKFWGK YLYEIARRHP YFYAPELLYY ANKYNQVFQE CCQAEDKGAC
210     220     230     240     250
LLPKIETMRE KVLASSARQR LRCASIQKFG ERALKAWSVA RLSQKFPKAE
260     270     280     290     300
FVEVTKLVTD LTKVHKECCH GDLLECADDR ADLAKYICDN QDTISSKLKE
310     320     330     340     350
CCDKPLLEKS HCIAEVEKDA IPENLPPLTA DFAEDKDVCK NYQEAKDAFL
360     370     380     390     400
GSFLYEYSRR HPEYAVSVLL RLAKEYEATL EECCAADDPH ACYSTVFDKL
410     420     430     440     450
KHLVDEPQNL IKQNCDFEK LGEYGFQNAL IVRYTRKVPQ VSTPTLVEVS
460     470     480     490     500
RSLGKVGTRC CTKPESERMP CTEDYLSLIL NRLCVLHEKT PVSEKVTKCC
510     520     530     540     550
TESLVNRRPC FSALTPEDEY VPKAFDEKLF TFHADICTLP DTEKQIKKQT
560     570     580     590     600
ALVELLKHKP KATEEQLKTV MENFVAFVDK CCAADDKEAC FAVEGPKLVV
STQTALA
```

8. Seznam použité a doporučené literatury

- [1] HOFFMANN, Edmond de, STROOBANT, V. *Mass spectrometry: principles and applications*. 3rd ed. Chichester: Wiley, 2007. ISBN 978-0-470-03310-4.
- [2] HARRIS, Daniel C. *Quantitative Chemical Analysis*. 7th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2007. ISBN 0-7167-7041-5.
- [3] KOVÁČ, Štefan, J. LEŠKO a D. ILAVSKÝ. *Metódy kontroly technologických procesov: Spektrálne metódy v organickej chémii a technológii*. Bratislava: Alfa, 1987. Edícia chemickej literatúry (Alfa). ISBN 063-555-87.
- [4] MILATA, Viktor, P. SEGLA, V. BREZOVÁ, A. GATIAL, V. KOVÁČIK, M. MIGLIERINI, Š. STANKOVSKÝ, J. ŠÍMA. *Aplikovaná molekulová spektroskopia*. Bratislava: Vydavateľstvo STU, 2008. Edícia vysokoškolských učebníc. ISBN 978-80-2227-2960-4.
- [5] JANDERA, Pavel. *Atomová a molekulová spektroskopia se zaměřením na stopovou analýzu kontaminantů. Díl B - Molekulová spektroskopia v organické analýze*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2006. ISBN 80-7194-906-X.
- [6] SILVERSTEIN, Robert M. *Spectrometric identification of organic compounds*. 8th ed. Hoboken: Wiley, 2015. ISBN 978-0-470-61637-6.
- [7] WATSON, J. Throck, SPARKMAN, O. D. *Introduction to mass spectrometry : instrumentation, applications, and strategies for data interpretation*. 4th ed. Chichester: Wiley, 2007. ISBN 978-0470-51634-8.
- [8] SMITH, R. Martin. *Understanding mass spectra : a basic approach*. 2nd ed. Hoboken: Wiley, 2004. ISBN 0-471-42949-X.
- [9] PRETSCH, Ernö, P. BÜHLMANN a M. BADERTSCHER. *Structure determination of organic compounds: tables of spectral data*. 4th, rev. and enl. ed. Berlin: Springer, 2009. ISBN 978-3-540-93809-5.
- [10] PIZOVA, Hana a P. BOBAL. An optimized and scalable synthesis of propylphosphonic anhydride for general use. *Tetrahedron Letters*, **2015**, vol. 56, no. 15, pp. 2014 – 2017.
- [11] Nepublikované výsledky.
- [12] KRENKOVA, Jana, P. BOBAL, J. PARTYKA, R. CMELIK, a F. FORET. Investigation of a side reaction occurring during N-linked glycan labeling by cationic tags. *J. Chromatogr. A*, **2018**, vol. 1570, pp. 67 – 74.