

Hmotnostní spektrometrie



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

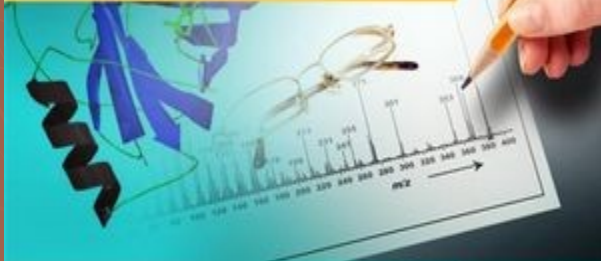
Literatura

J. Throck Watson
O. David Sparkman

Introduction to

Mass Spectrometry

*Instrumentation, Applications
and Strategies for Data Interpretation*



WILEY

Fourth Edition

Edmond de Hoffmann and Vincent Stroobant

Mass Spectrometry

Principles and Applications

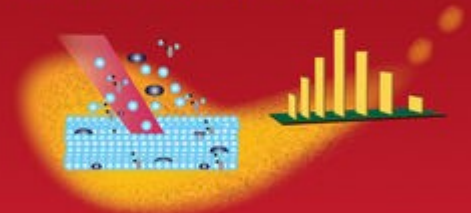
Third Edition

WILEY

Second Edition

Electrospray and MALDI Mass Spectrometry

*Fundamentals, Instrumentation,
Practicalities, and Biological Applications*



Edited by
RICHARD B. COLE

WILEY

Hmotnostní spektrometrie

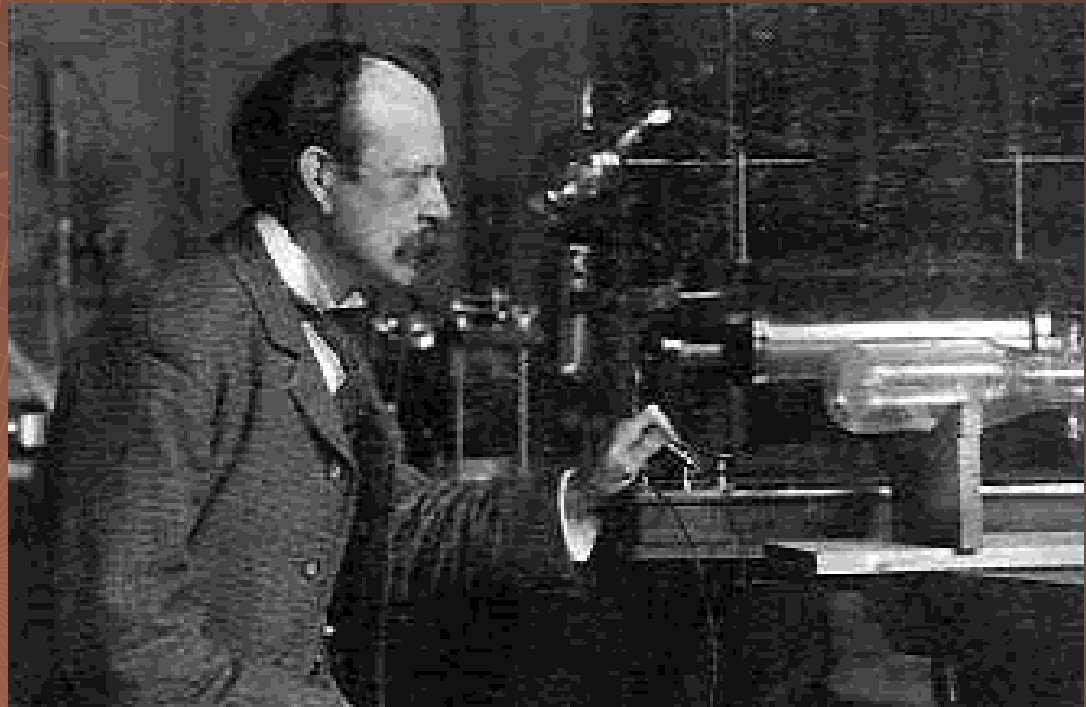
MS - mimořádně citlivá, destruktivní metoda, minimální spotřeba vzorku, určení MW a dalších strukturních informací.

Historie hmotnostní spektrometrie

- ◆ 1906 J.J. Thomson
Elektron,



1906



Historie hmotnostní spektrometrie

- ◆ 1922 F.W. Aston
Izotopy



1922



Scan ©American Institute of Physics

Historie hmotnostní spektrometrie

- ◆ 1930 W. Paul
Iontová past



1989

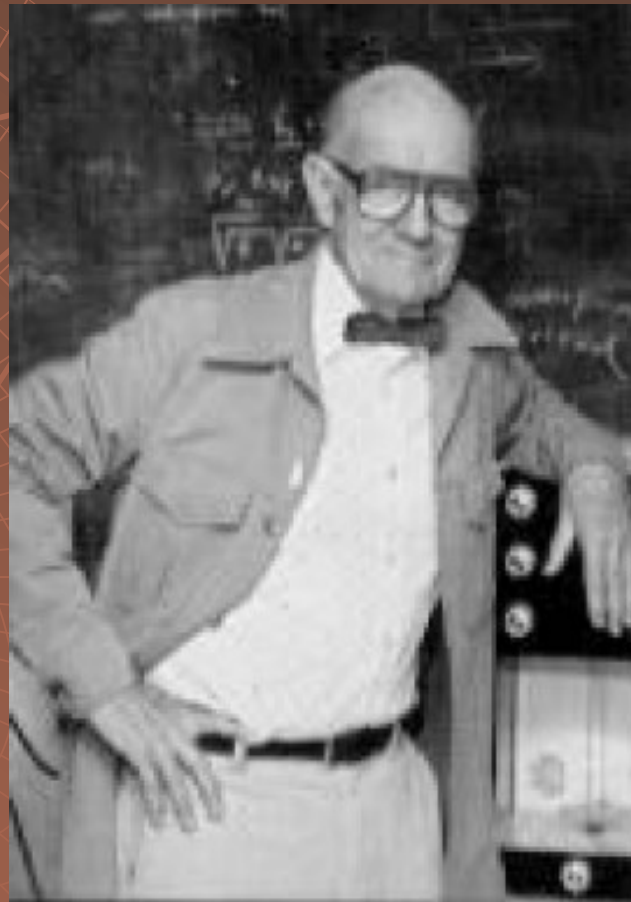


Historie hmotnostní spektrometrie

◆ 1930 J.B. Fenn
ESI



2002



Historie hmotnostní spektrometrie

◆ 1930 K. Tanaka

MALDI



2002



Historie hmotnostní spektrometrie

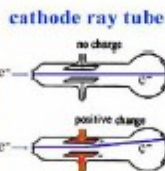
Historický vývoj MS - souhrn

100 let
od katodové
trubice k
modernímu
spektrometru

→ 1900

1899
-
1920

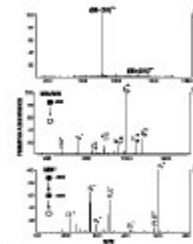
TOF-MS
*1946



GC-MS
*1956



LC-MS(ESI)
*1984



**Vývoj
záznamu
spekter**



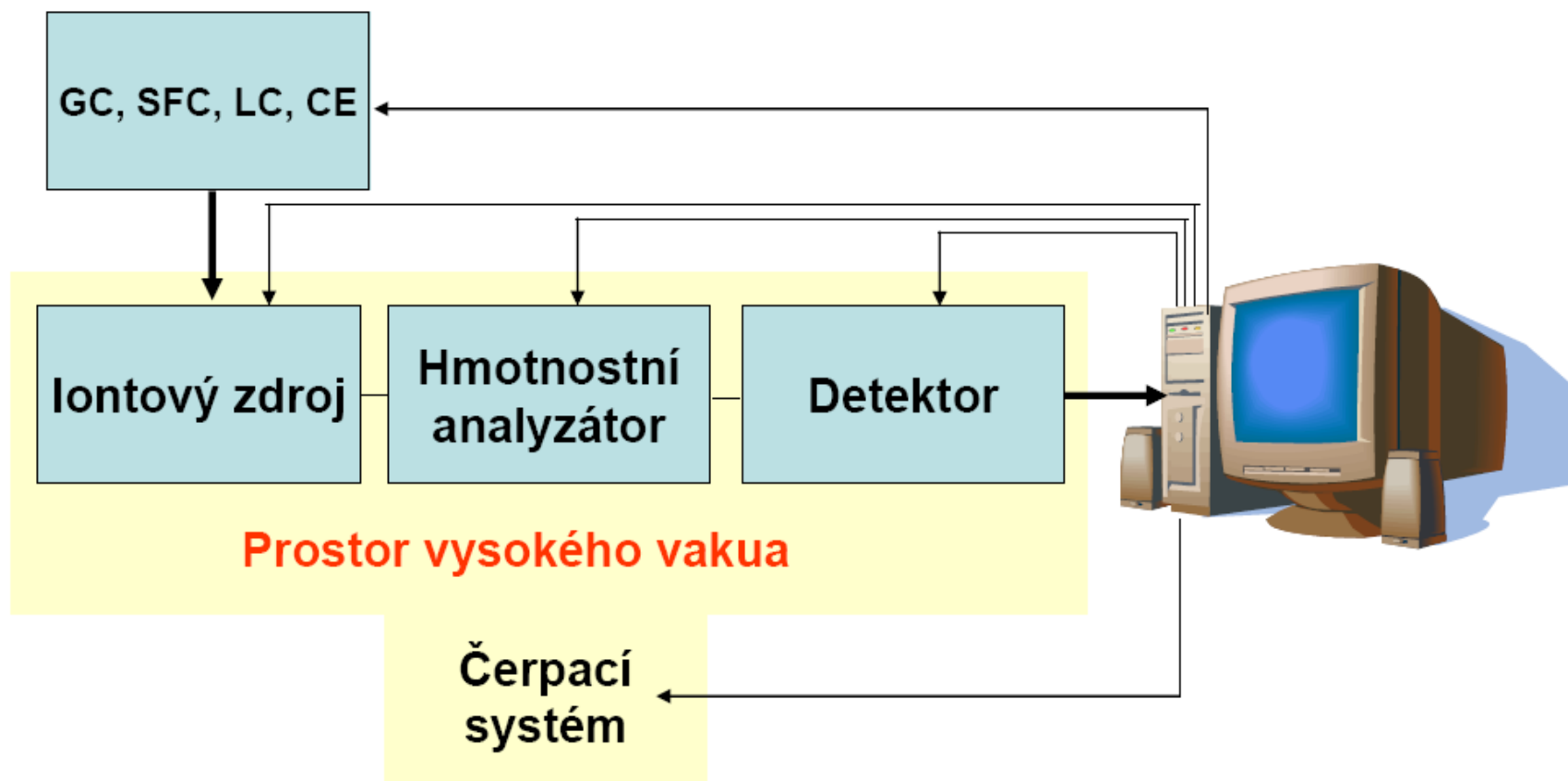
Podstata

- ◆ analytická metoda sloužící k převedení molekul na ionty
- ◆ rozlišení těchto iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z)
- ◆ záznam relativních intenzit jednotlivých iontů

Hmotnostní spektrometr

Hmotnostní spektrometr je iontově-optické zařízení, které separuje ionty podle poměru jejich m/z .

Blokové schéma



Součásti MS

- 1/ iontový zdroj - slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice (tzv. ionizace), konstrukce se liší podle použité ionizační techniky
- 2/ hmotnostní analyzátor - slouží k rozdělení iontů v plynné fázi za vysokého vakua podle poměru hmotnosti a náboje (m/z)
- 3/ detektor - slouží k detekci iontů po jejich separaci podle m/z a k určení relativní intenzity jednotlivých iontů

Součásti MS

- další části přístroje:
 - vakuový systém
 - zařízení pro zavádění vzorků (sonda)
 - iontová optika sloužící k urychlení a fokusaci iontů
 - počítač na ovládání a ladění přístroje, sběr a ukládání dat, porovnání spekter s knihovnou



Ionizační techniky

Volba ionizační techniky

a/ **těkavost látky (polarita)** - pro těkavé látky za podmínek měření: EI, CI, FI

b/ **tepelná stabilita látky** - pro termolabilní látky nejsou vhodné techniky, kdy je nutné látku převést do plynné fáze před vlastní ionizací (EI, CI, FI); volit nejšetrnější techniky, např. ESI nebo MALDI

c/ **molekulová hmotnost** (souvisí s těkavostí) - asi do MR=1000 lze EI/CI, do několika tisíc APCI, APPI a FAB, do desítek až stovek tisíc ESI a MALDI

d/ **chemické individuum nebo směs** - pro směsi spojení s vhodnou separační technikou (GC/MS, HPLC/MS, CE/MS)

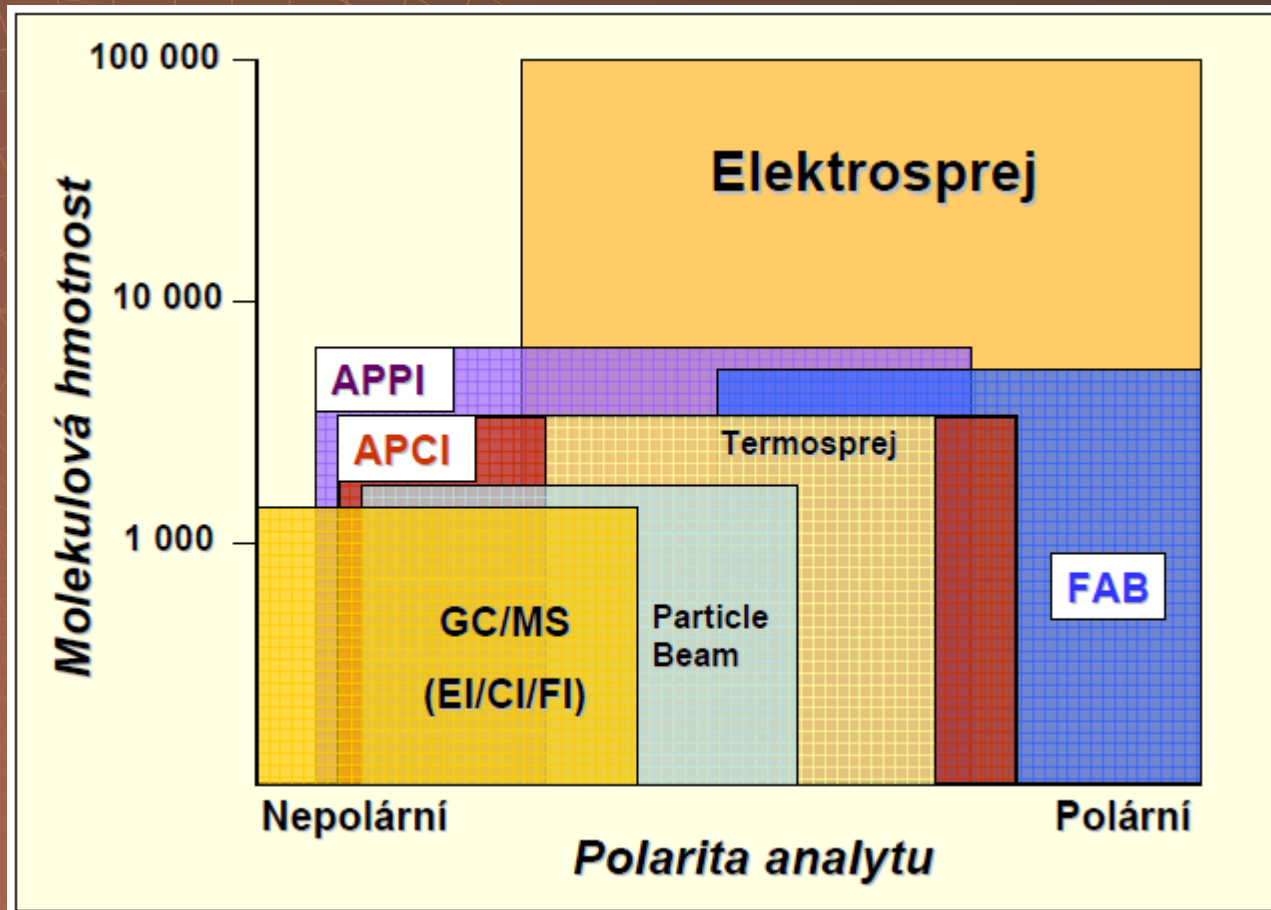
e/ **volba polarity ionizace** (platí pro měkké ionizační techniky)

- **kladné ionty** - pro většinu látek, musí být možné látku protonovat (vhodná přítomnost heteroatomu) či kationizovat (sodíkem, stříbrem, apod.)

- **záporné ionty** - sulfonové a karboxylové kyseliny, polyhydroxylované látky (snadná deprotonace), tvorba aduktů s jednoduchými anionty (octan, mravenčan, chlorid, apod.)

f/ **studium nekovalentních interakcí nebo prostorového uspořádání molekul** (zejména pro biomolekuly) - ESI

Volba ionizační techniky



Ionizační techniky

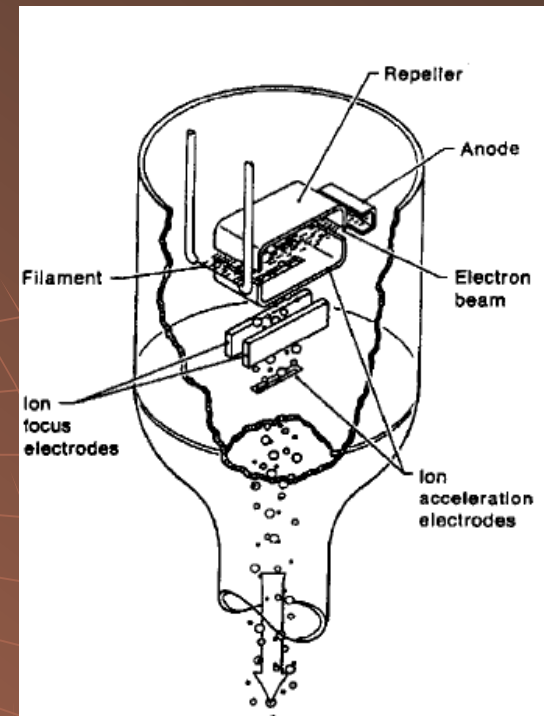
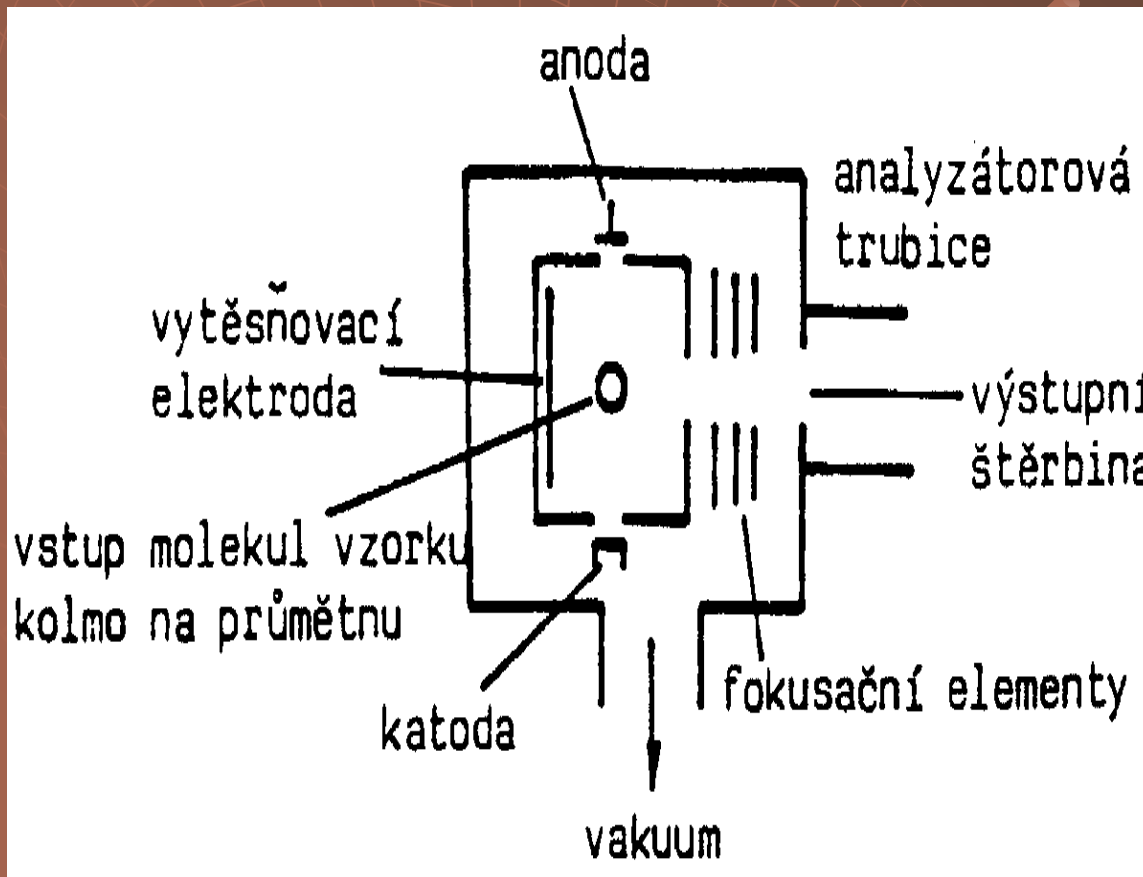
◆ Tvrdé ionizační techniky



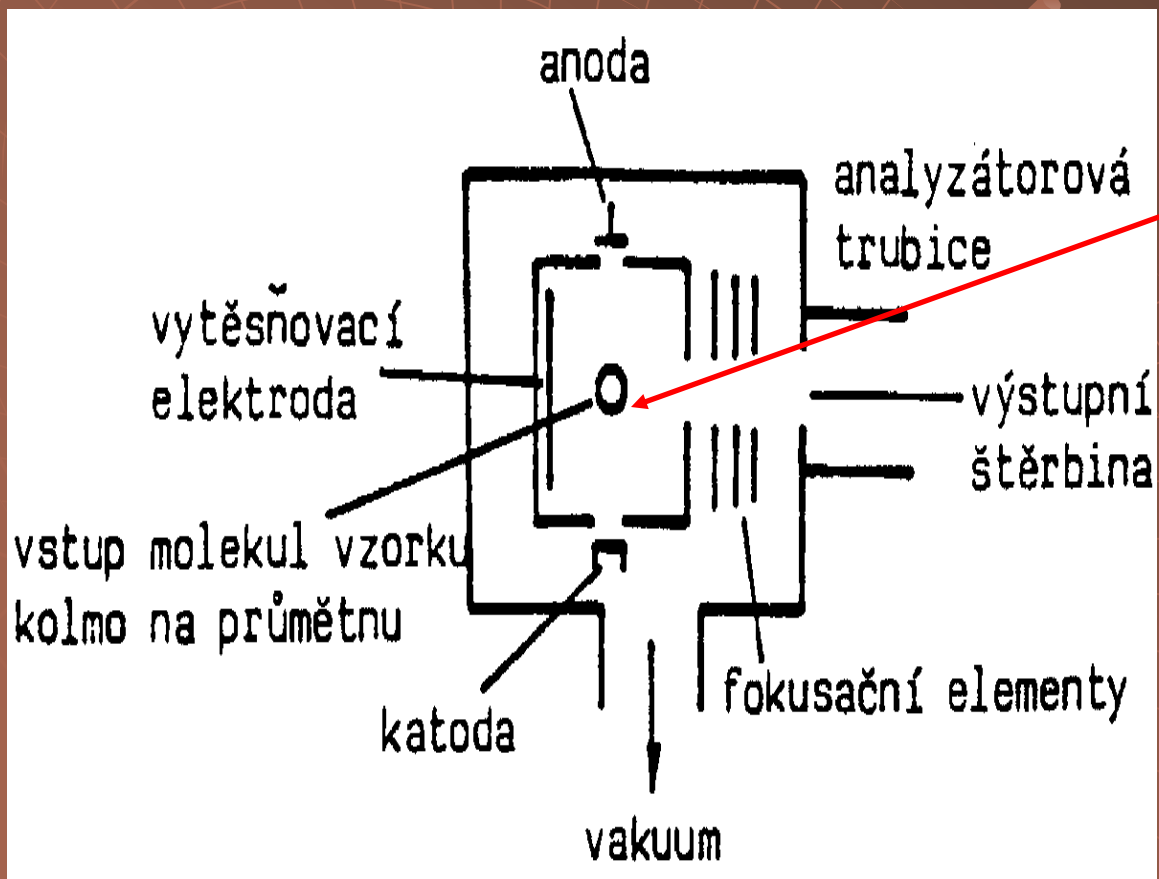
◆ Jemné ionizační techniky



Electron impact (EI)



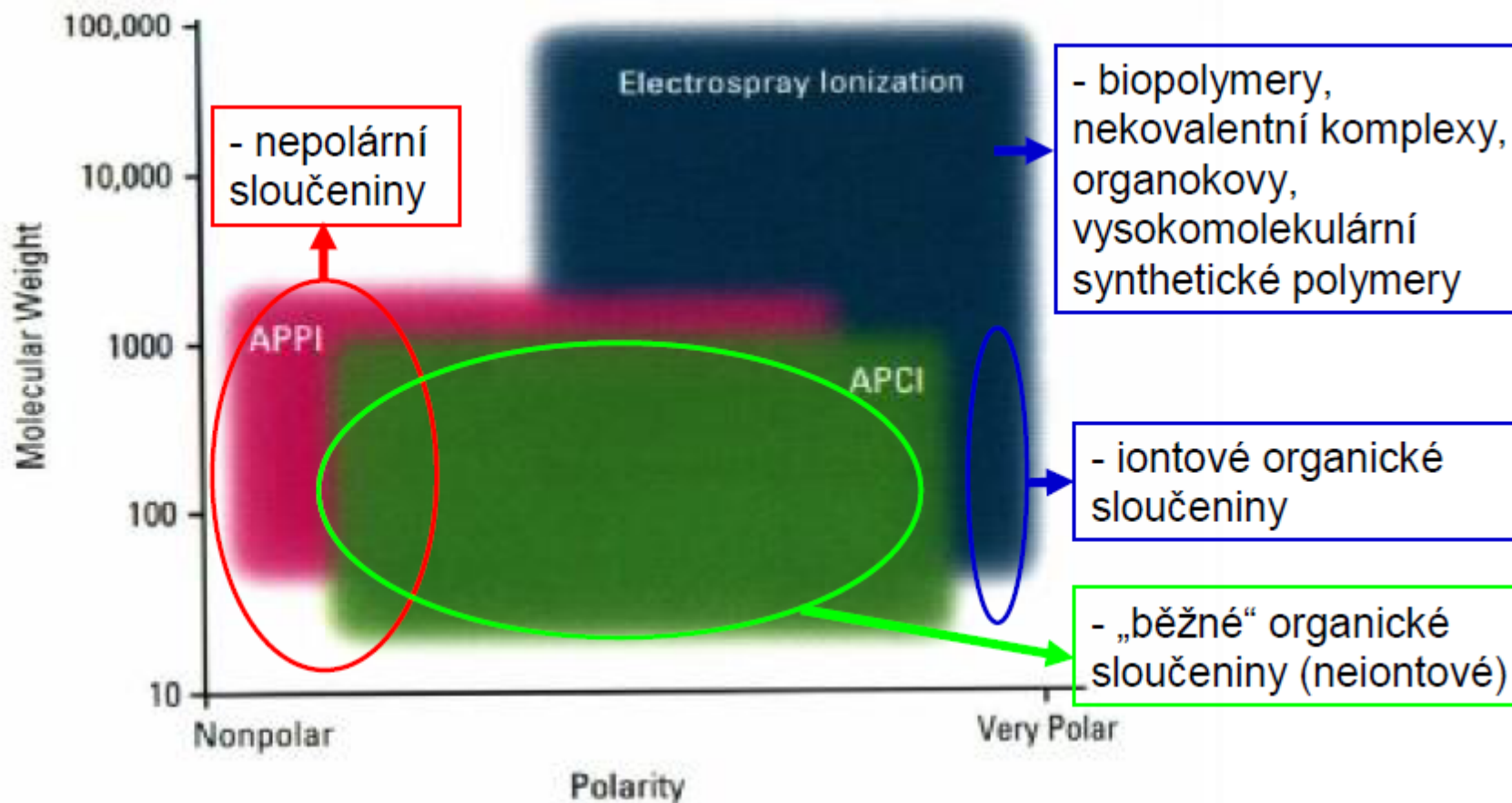
Chemická ionizace (CI)



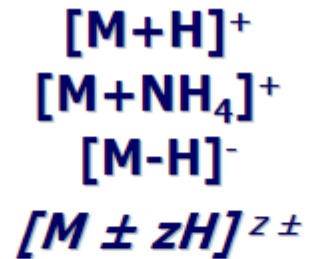
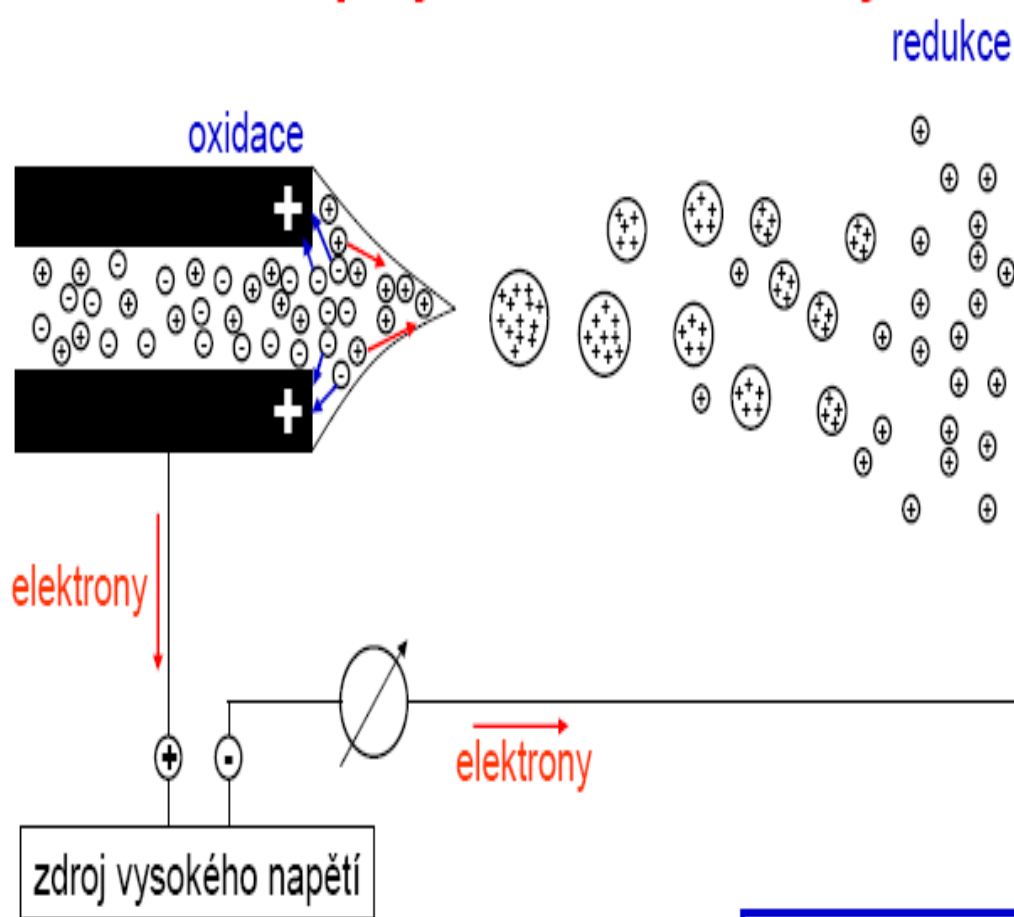
Reakční plyn 100 Pa
Plyn : vzorek 10⁴ : 1
methan, isobuthan,
ammoniak



Ionizace za atmosferického tlaku



Electrospray (ESI)



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

Napětí: 2 - 8 kV

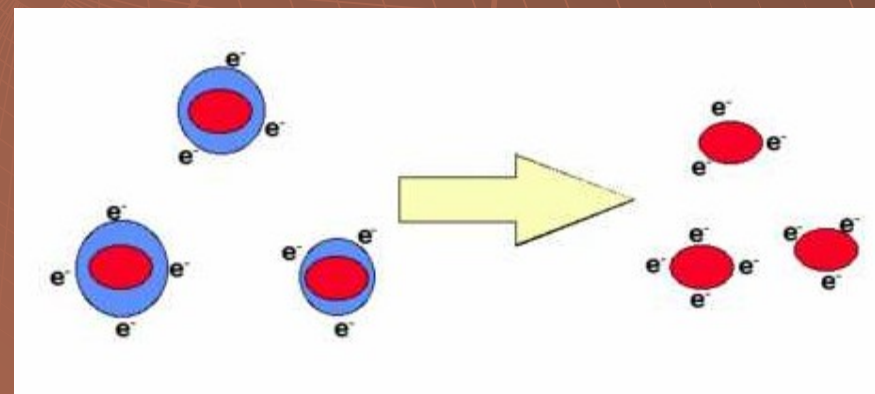
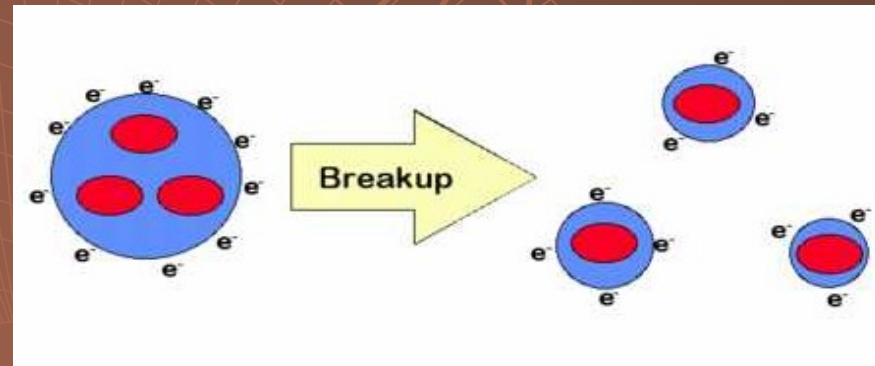
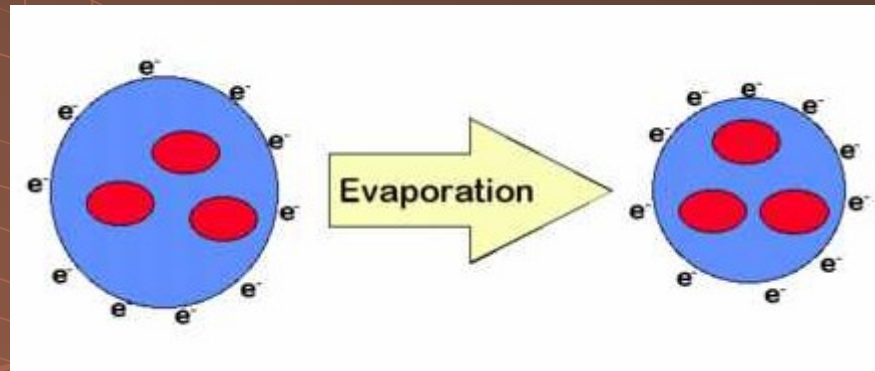
Průtok m. f. 0,001 - 1 ml/min

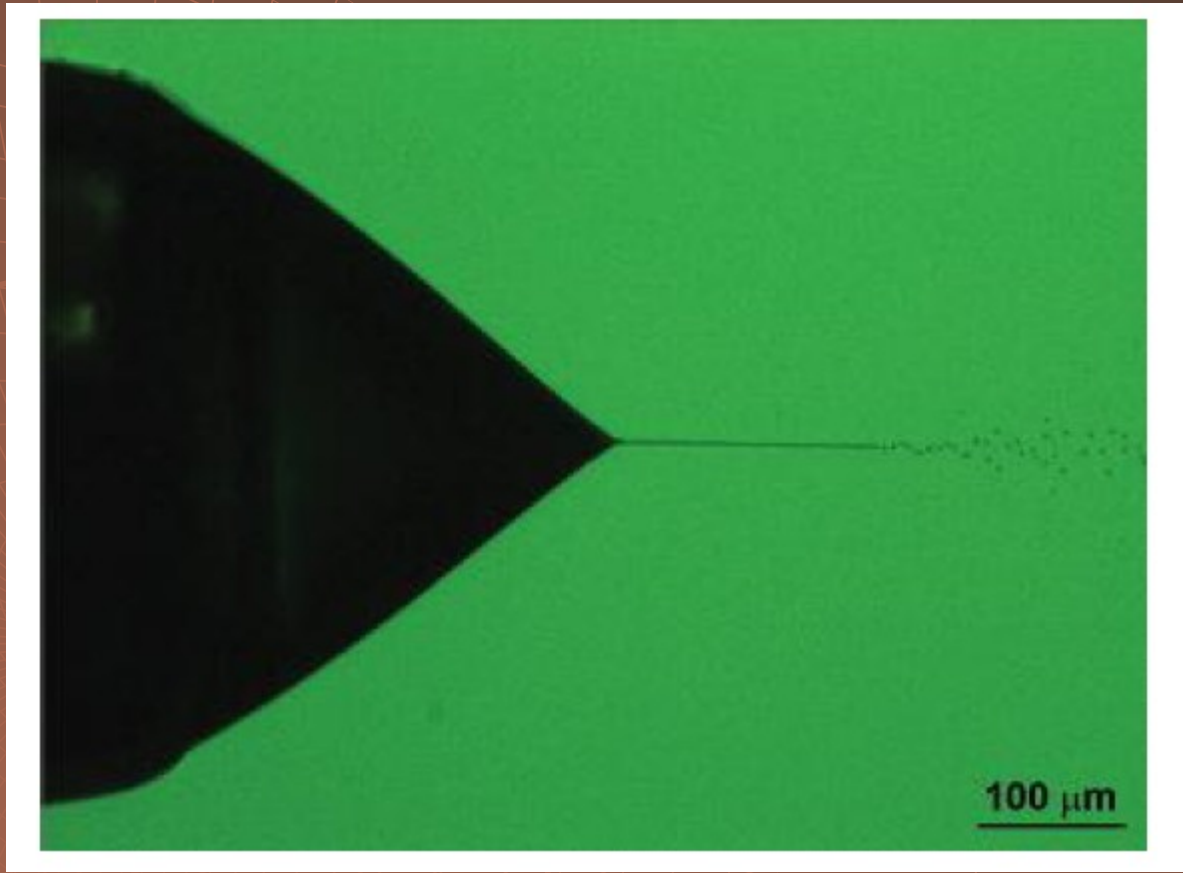
Ionizace za
atmosférického tlaku

*Těkavé přísady: octan amonný,
mravenčí k.*

*Netěkavé přísady: fosfátové
pufrы*

Ionizace





ESI - zmlžování

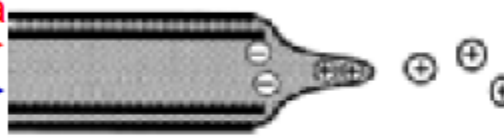
roztok vzorku



A/ „čistý“ elektrosprej roztoku analytu
(dnes méně časté, vhodné jen pro velmi nízké průtoky, např. nanosprej)

přídavná kapalina

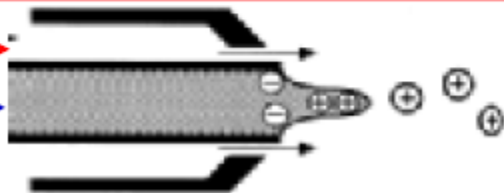
roztok vzorku



**B/ elektrosprej roztoku analytu s
přídavným tokem kapaliny**
(vodivé spojení pro CZE/MS, podpora ionizace, např. přídavek NH_4^+ pro preferenční tvorbu aduktů $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$)

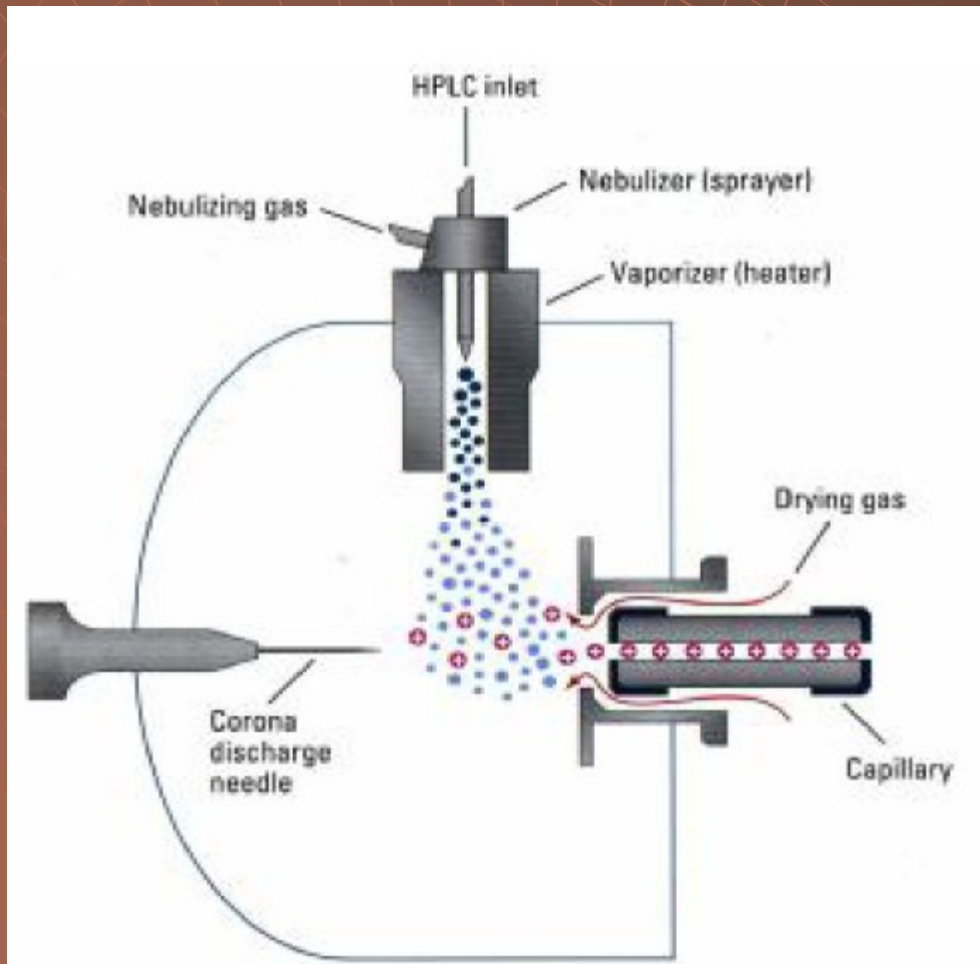
zmlžující plyn

roztok vzorku



**C/ elektrosprej roztoku analytu s
pneumatickou podporou zmlžení**
(standardní použití v HPLC/MS, dříve nazýván iontový sprej)

Chemická ionizace za atmosferického tlaku (APCI)



$[M+H]^+$

$[M+NH_4]^+$

$[M-H]^-$

$([M \pm zH]^{z \pm})$

$t \approx 200 - 650 \text{ } ^\circ\text{C}$

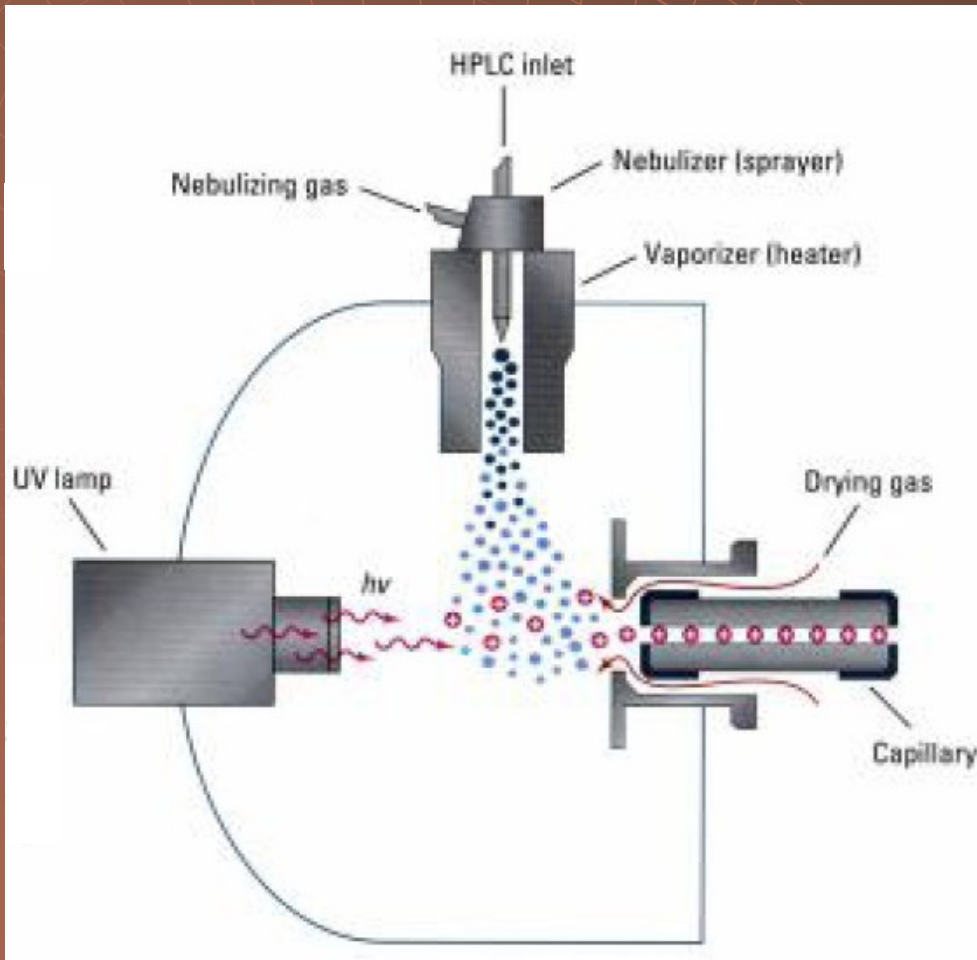
Napětí (výboj. el.): 2 - 8 kV

Průtok m. f. 0,2 - 2 ml/min

Ionizace za
atmosférického tlaku

*Těkavé přísady: octan amonný,
mravenčí k.*
*Netěkavé přísady: fosfátové
pufry*

Fotoionizace za atmosferického tlaku (APPI)



**$[M+H]^+$
 $[M+NH_4]^+$
 $[M-H]^-$**

$([M \pm zH]^{z \pm})$

$t \approx 200 - 650 \text{ }^\circ\text{C}$

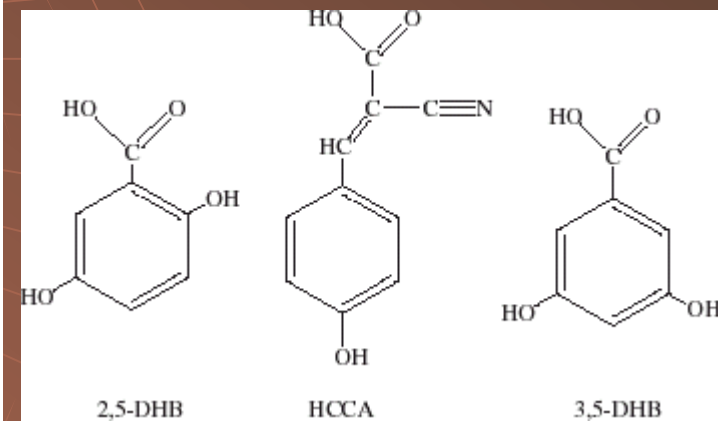
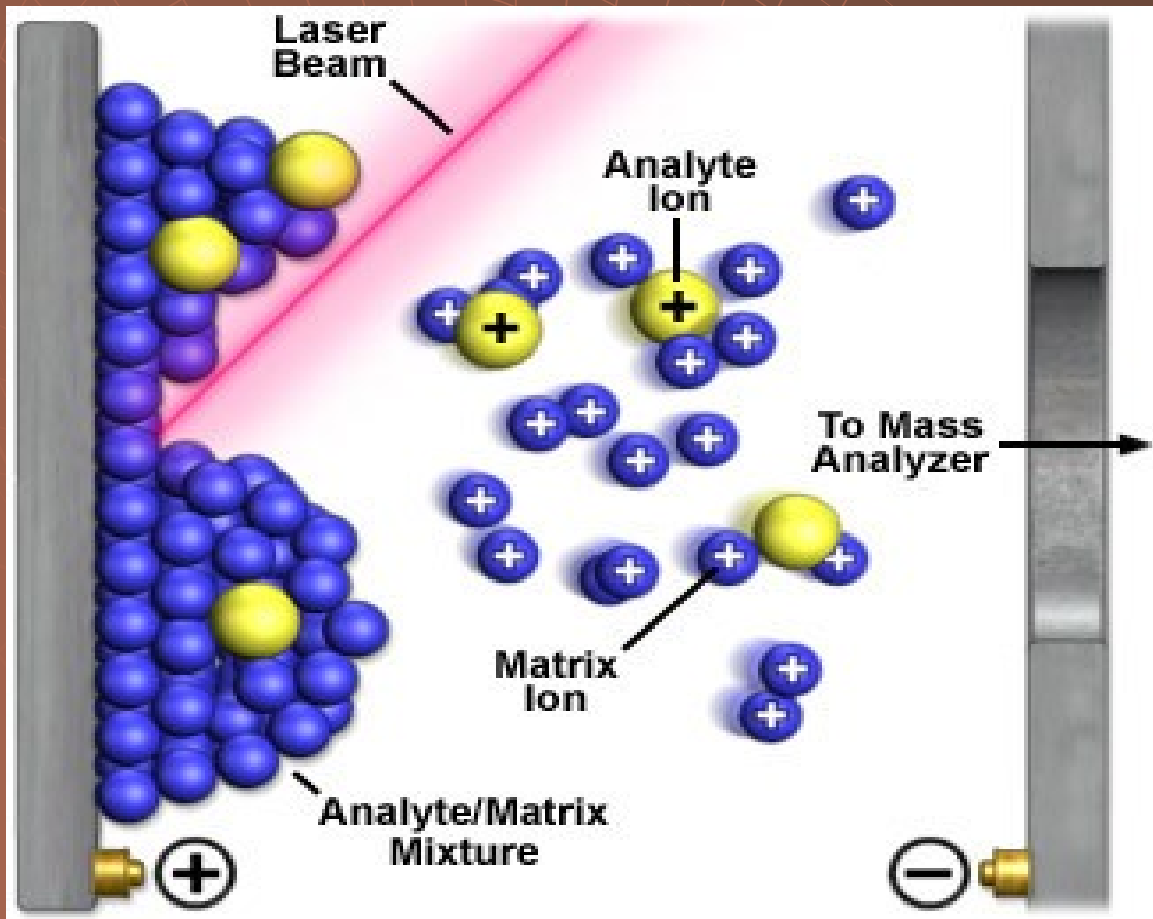
UV záření $\approx 10 \text{ eV}$

průtok m. f. $0,2 - 2 \text{ ml/min}$

**Ionizace za
atmosférického tlaku**

Dopant: toluen, benzen (citlivost \uparrow)

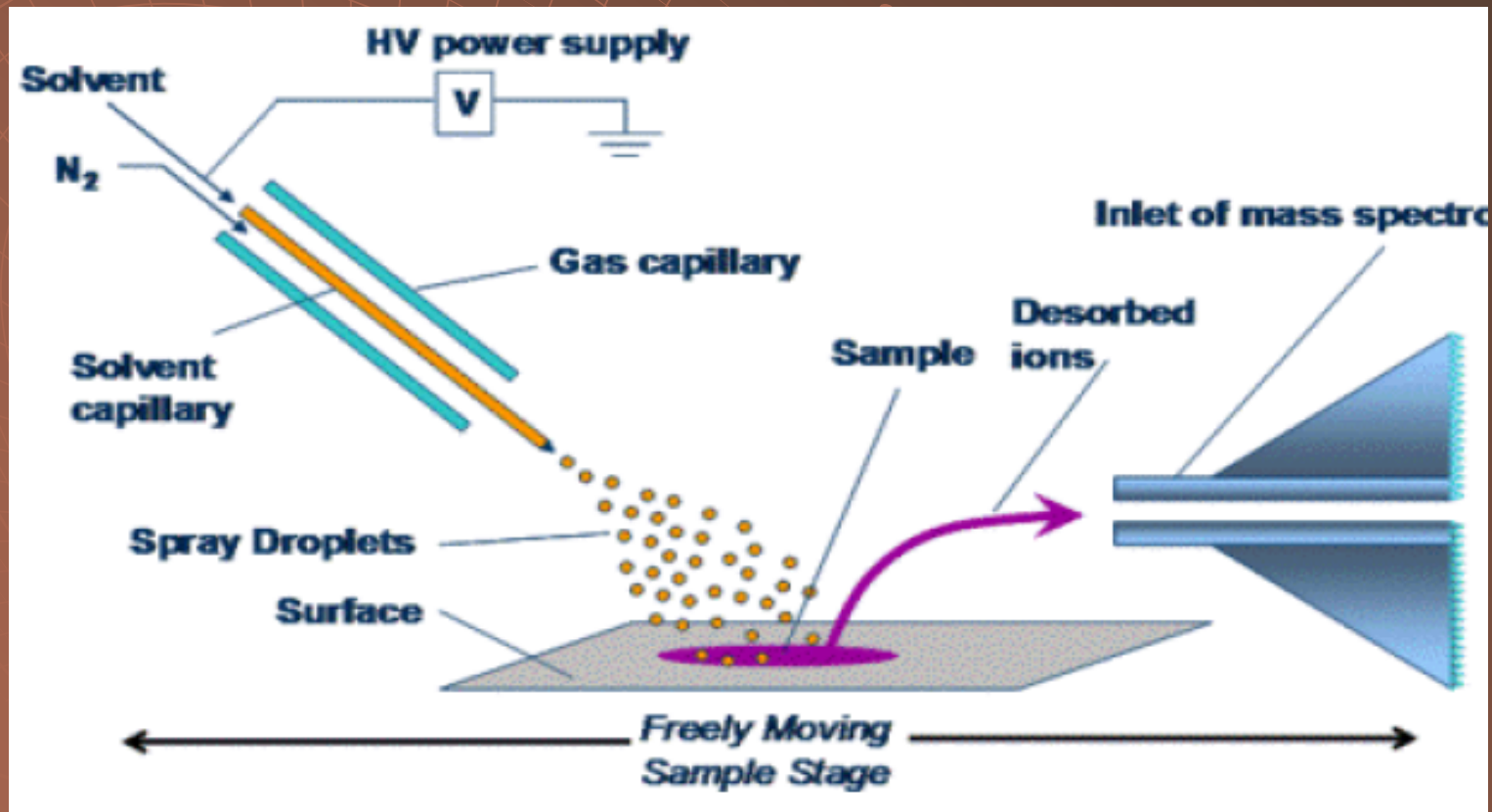
Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI)



Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI)



Desorpční ionizace elektrosprayem (DESI)





Hmotnostní analyzátor

Rozlišení – Resolving Power

a) Obecná definice rozlišovací schopnosti

- poměr hmotnosti iontu m a šířky píku iontu Δm v polovině jeho výšky (Full Width at Half Maximum, **FWHM**), výjimečně se používá i šířka iontu v jiné výšce, např. v 5%
- definice založená na šířce jednoho píku

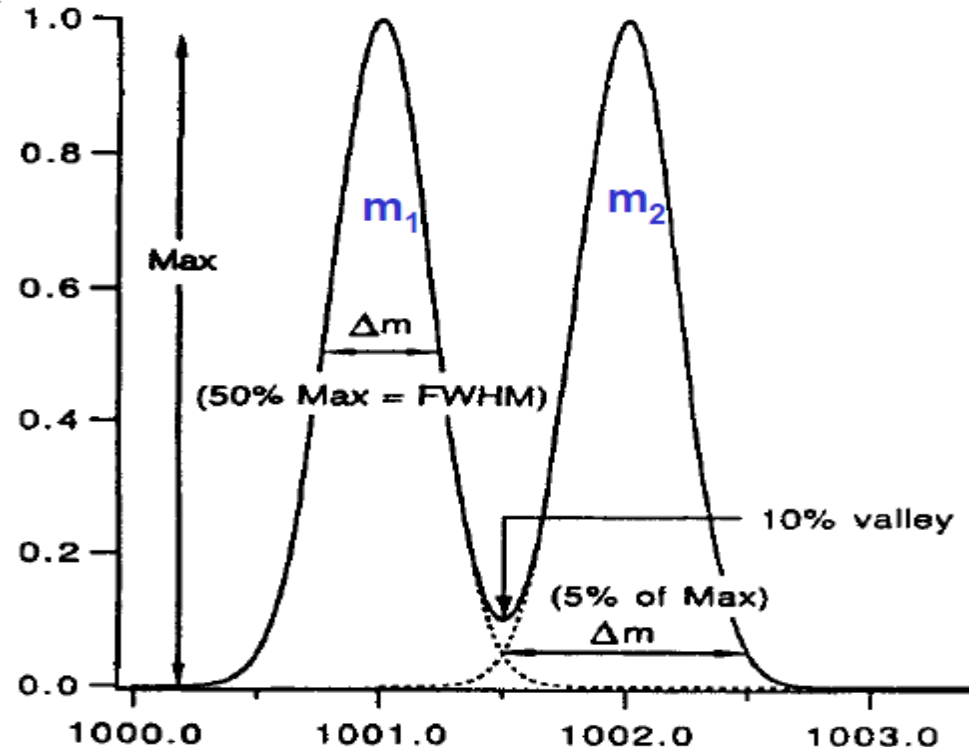
b) Starší definice rozlišovací schopnosti (používaná u sektorových přístrojů)

- poměr hmotnosti iontu m_1 a rozdílu iontů m_1 a m_2 s jednotkovým nábojem, píky obou iontů musí být stejně velké a údolí mezi píky je 10% (tj. překrývají se z 10%)
- definice založená na překryvu dvou píků

Resolving Power (RP):

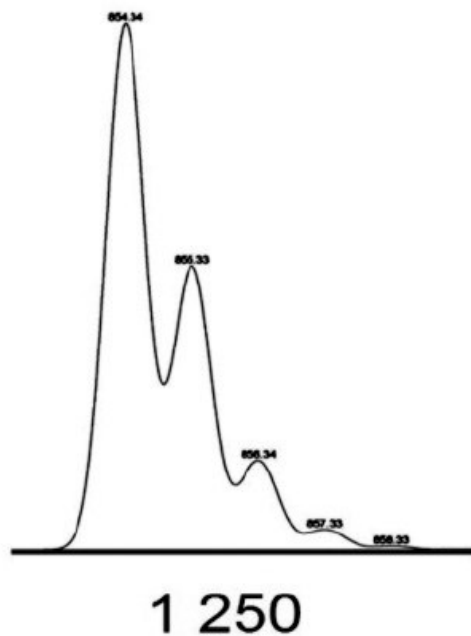
a) $RP = m / \Delta m$

b) $RP = m_1 / (m_2 - m_1)$

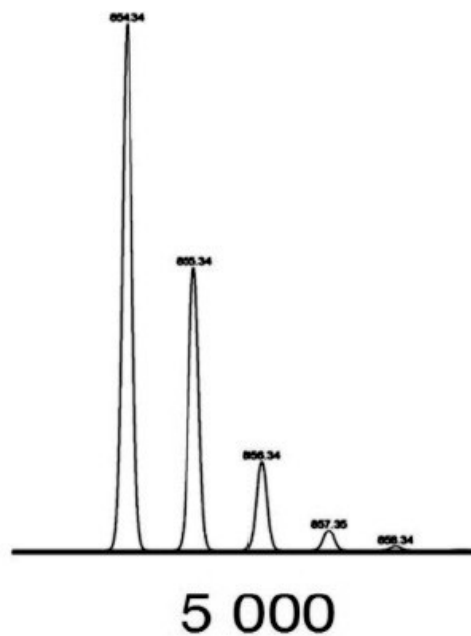


Rozlišení – Resolving Power

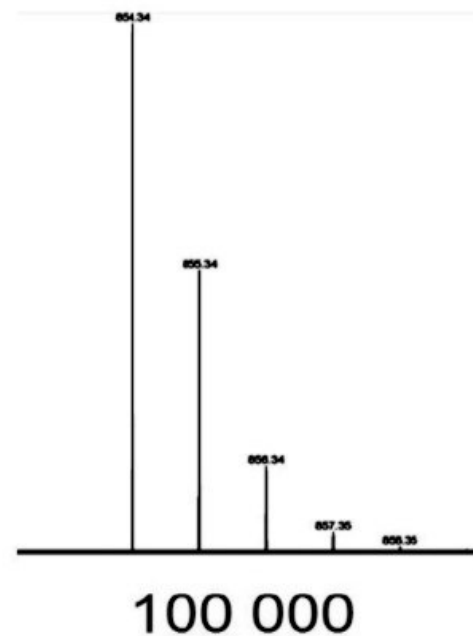
Příklad: paclitaxel
 $C_{47}H_{51}NO_{14}$ (Mw 853.3)



Nízké rozlišení



↔



vysoké rozlišení

Přesnost určení m/z

Mass Accuracy

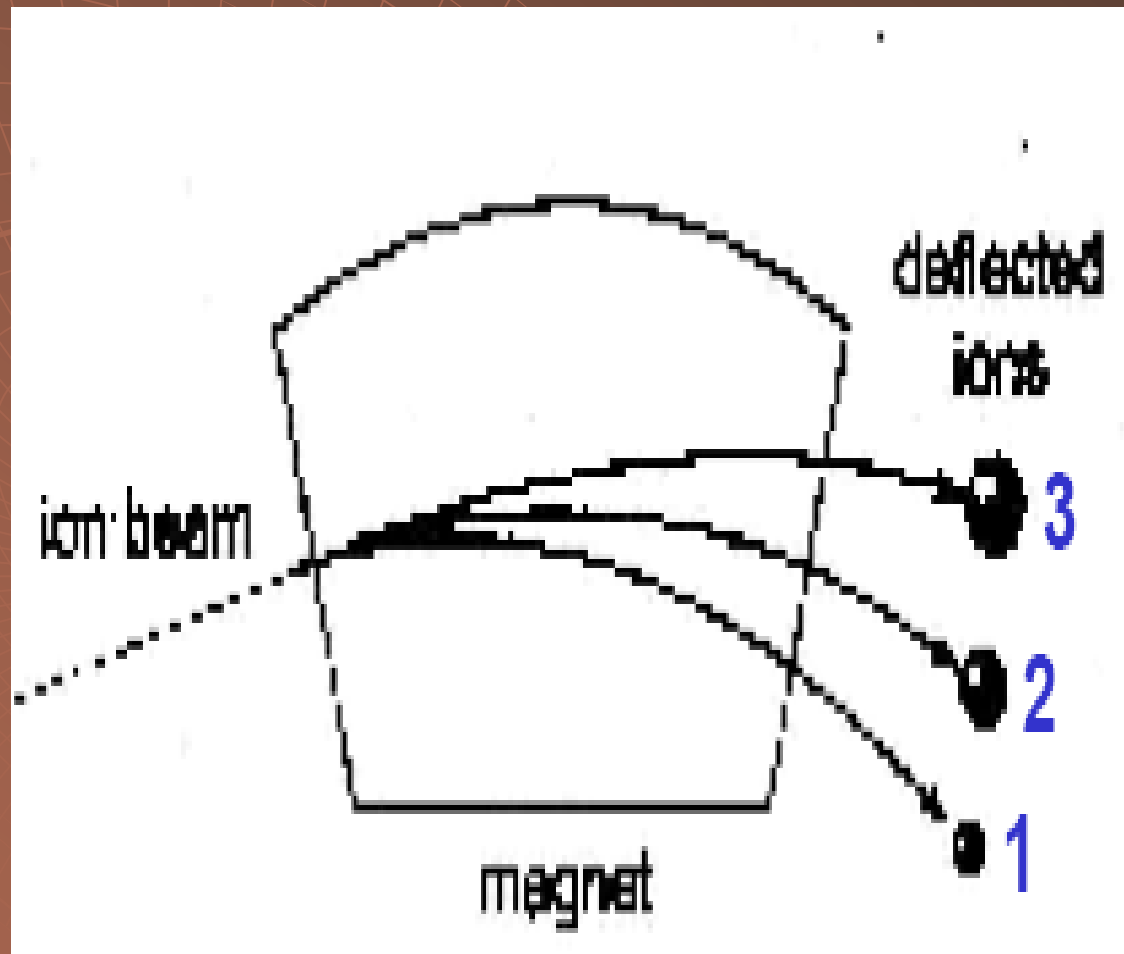
$$\text{Přesnost určení m/z} = \frac{(m/z)_{\text{exp}} - (m/z)_{\text{teor}}}{(m/z)_{\text{teor}}} * 10^6$$

Magnetický analyzátor

Zakřivení dráhy letu iontů v magnetickém nebo elektrickém poli (magnetický nebo elektrický analyzátor).

V poli dochází k zakřivení dráhy iontu závislé na hodnotě m/z (m/z je úměrné kvadrátu poloměru dráhy iontu r^2).

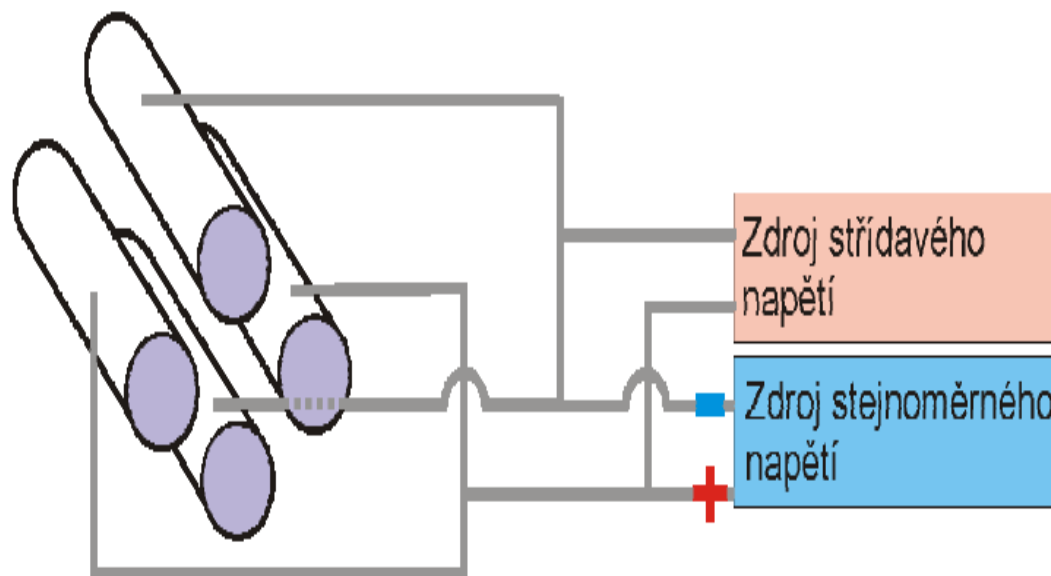
Magnetický analyzátor



Kvadrupol a iontová past

Různá stabilita oscilací iontů v dvoj- nebo trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí (kvadrupól nebo iontová past).

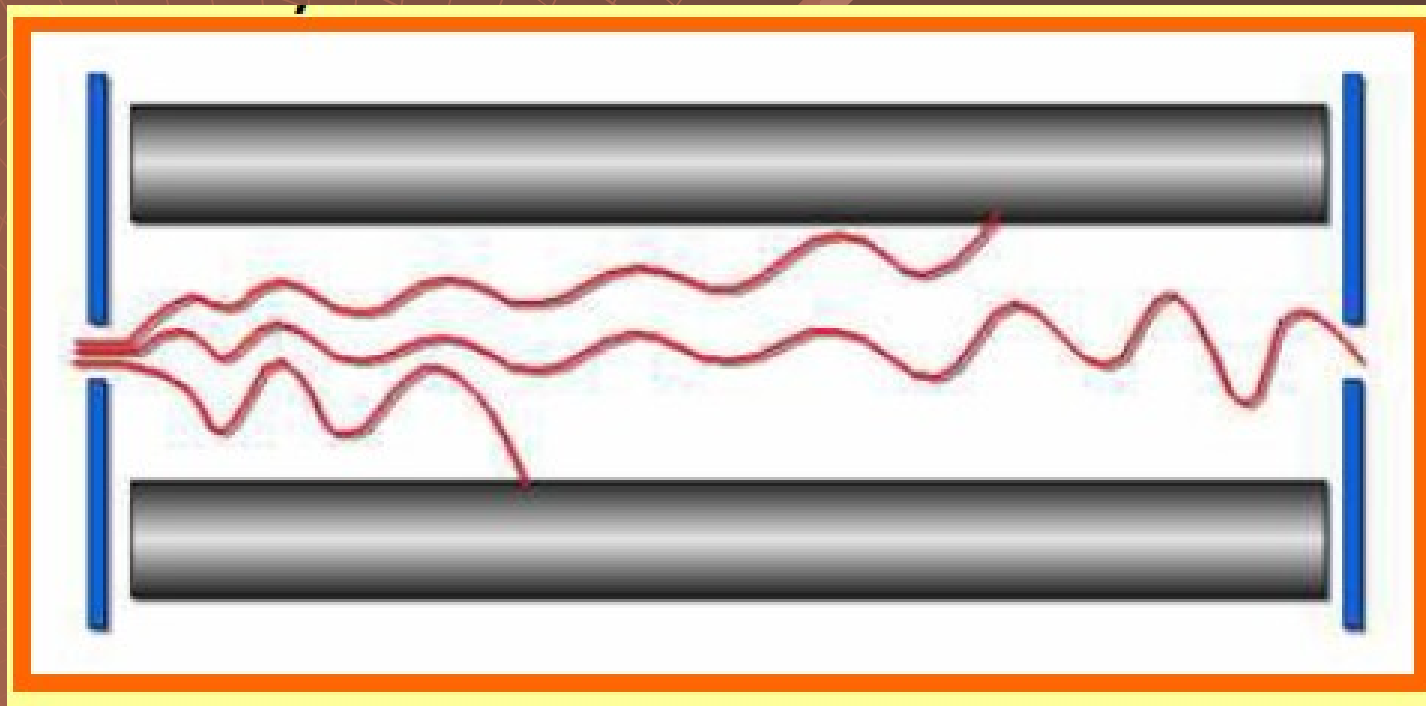
Kvadrupol



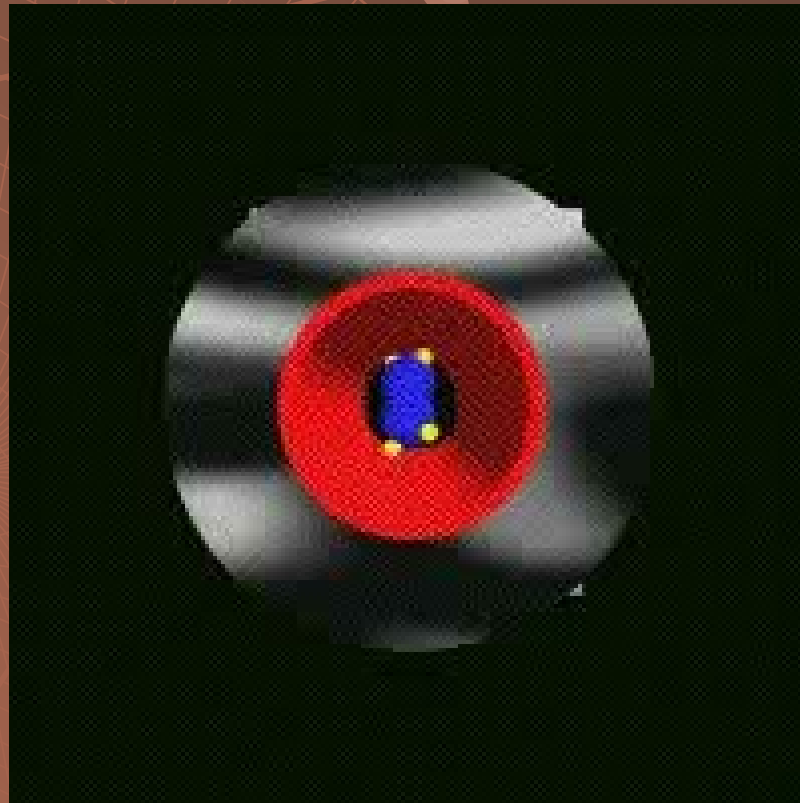
Kvadrupol

V daný okamžik jsou oscilace stabilní pouze pro určitou hodnotu m/z a tento ion projde kvadrupólovým analyzátozem, ionty s jinými hodnotami m/z mají nestabilní oscilace a jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu, změnou napětí postupně projdou na detektor ionty se všemi hodnotami m/z .

Kvadrupol



Kvadrupol



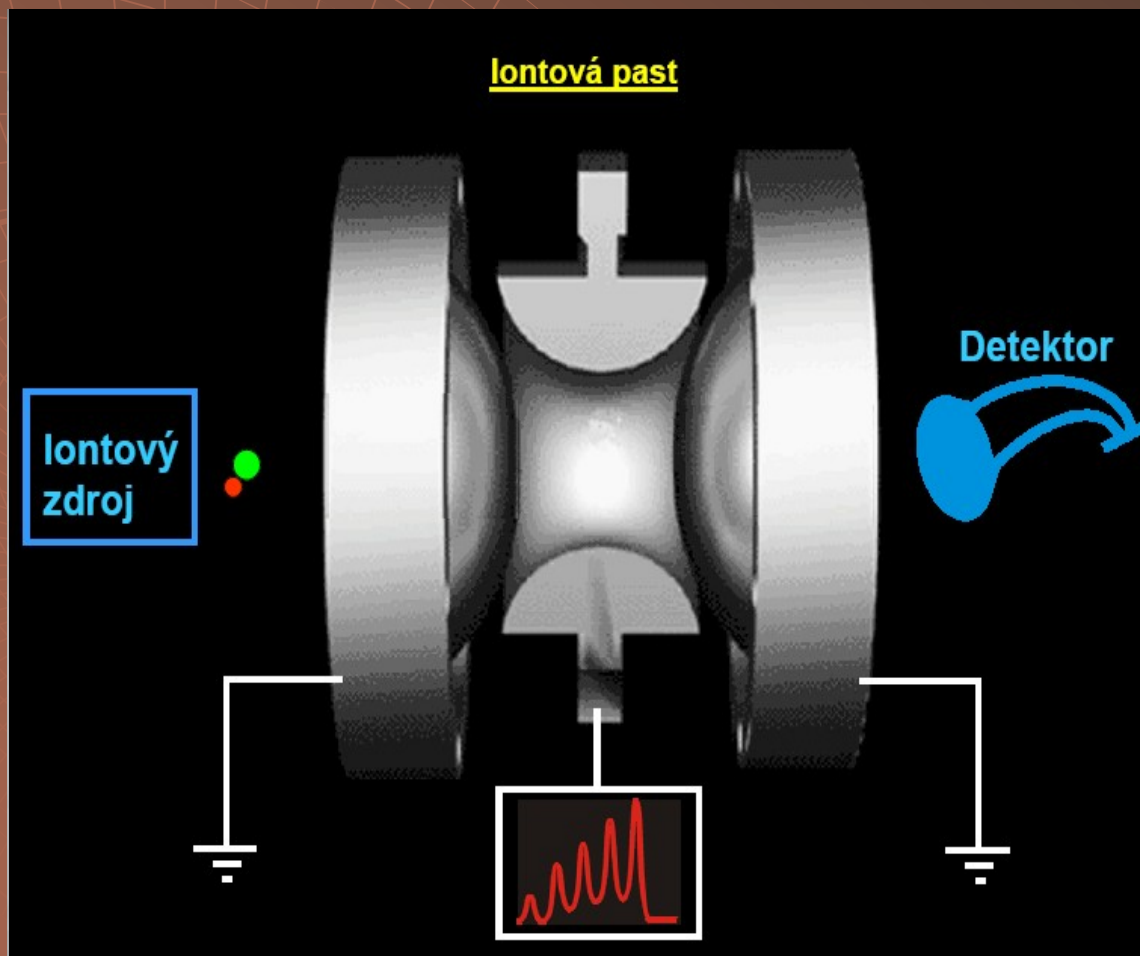
Kvadrupol



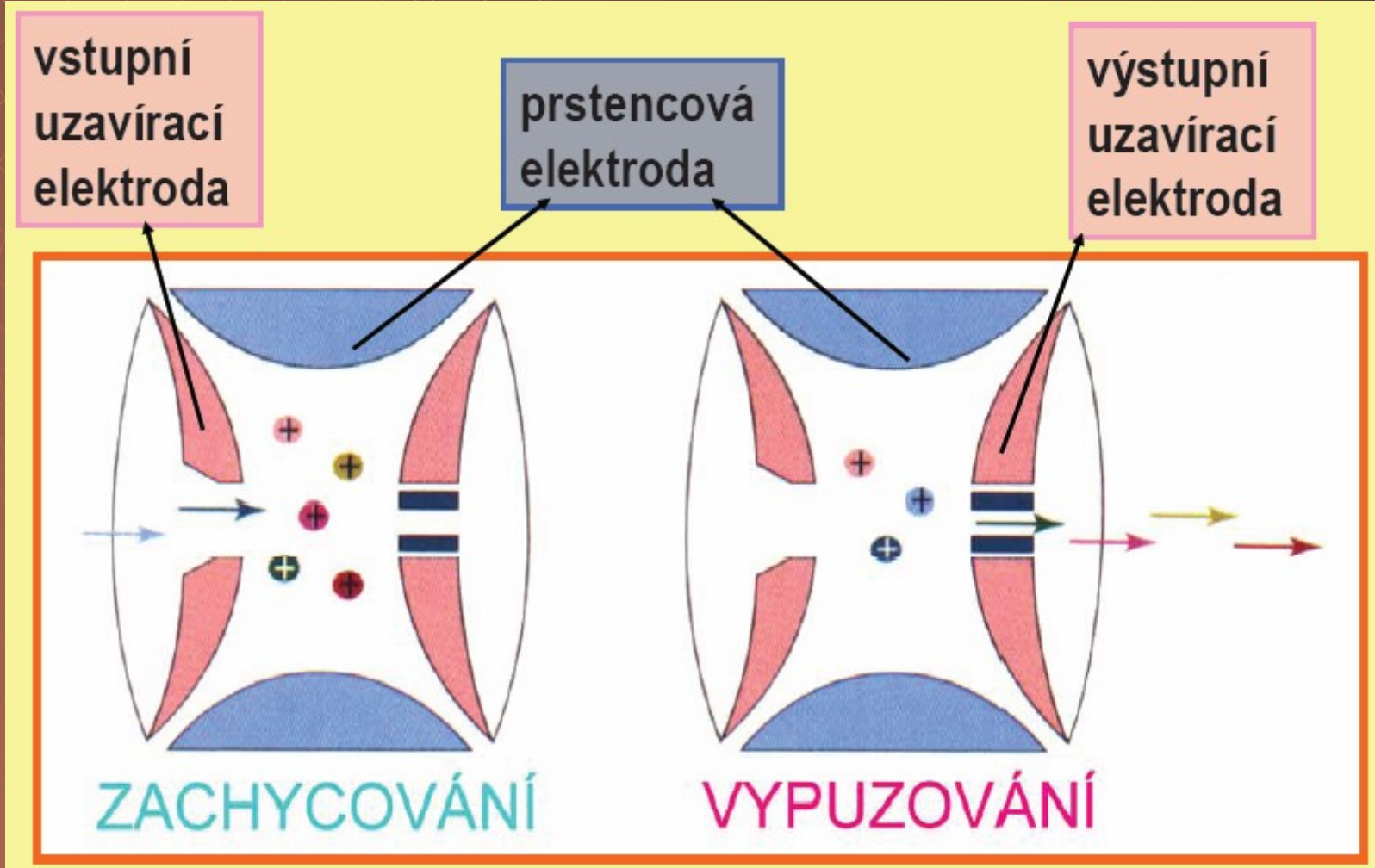
Iontová past

Trojrozměrná analogie kvadrupólu, opakované selektivní vypuzení iontů podle hodnoty m/z z iontové pasti na detektor, možnost MS^n analýzy.

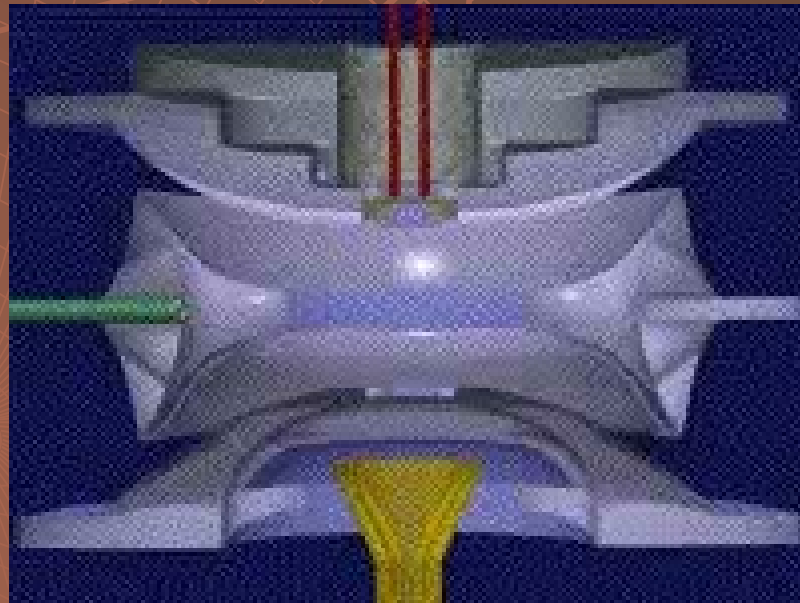
Iontová past (Ion Trap)



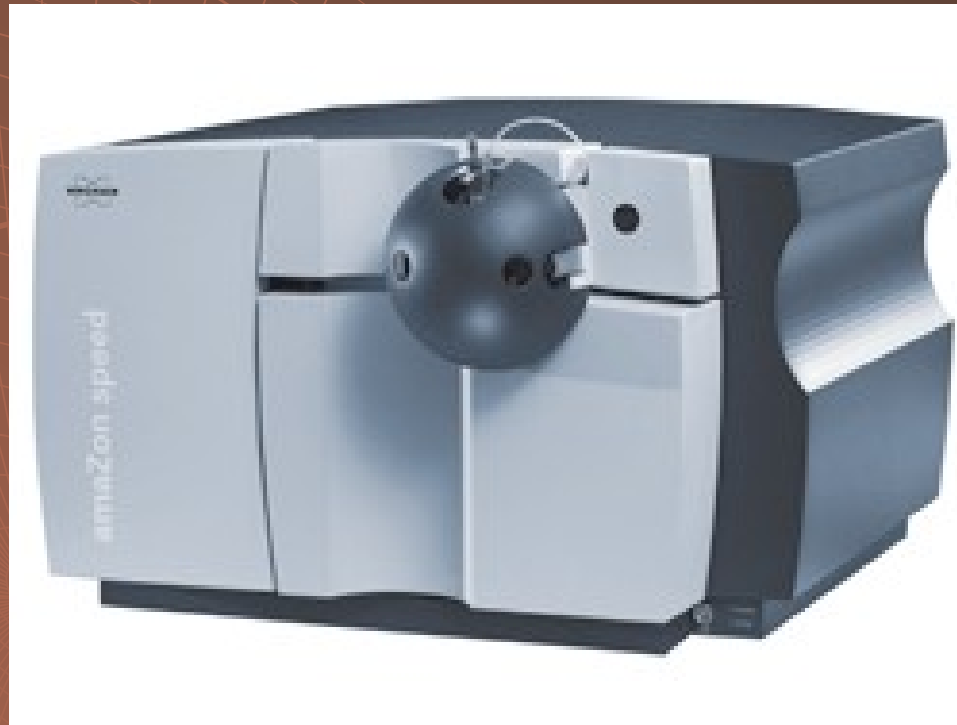
Ion Trap



Ion Trap



Ion Trap

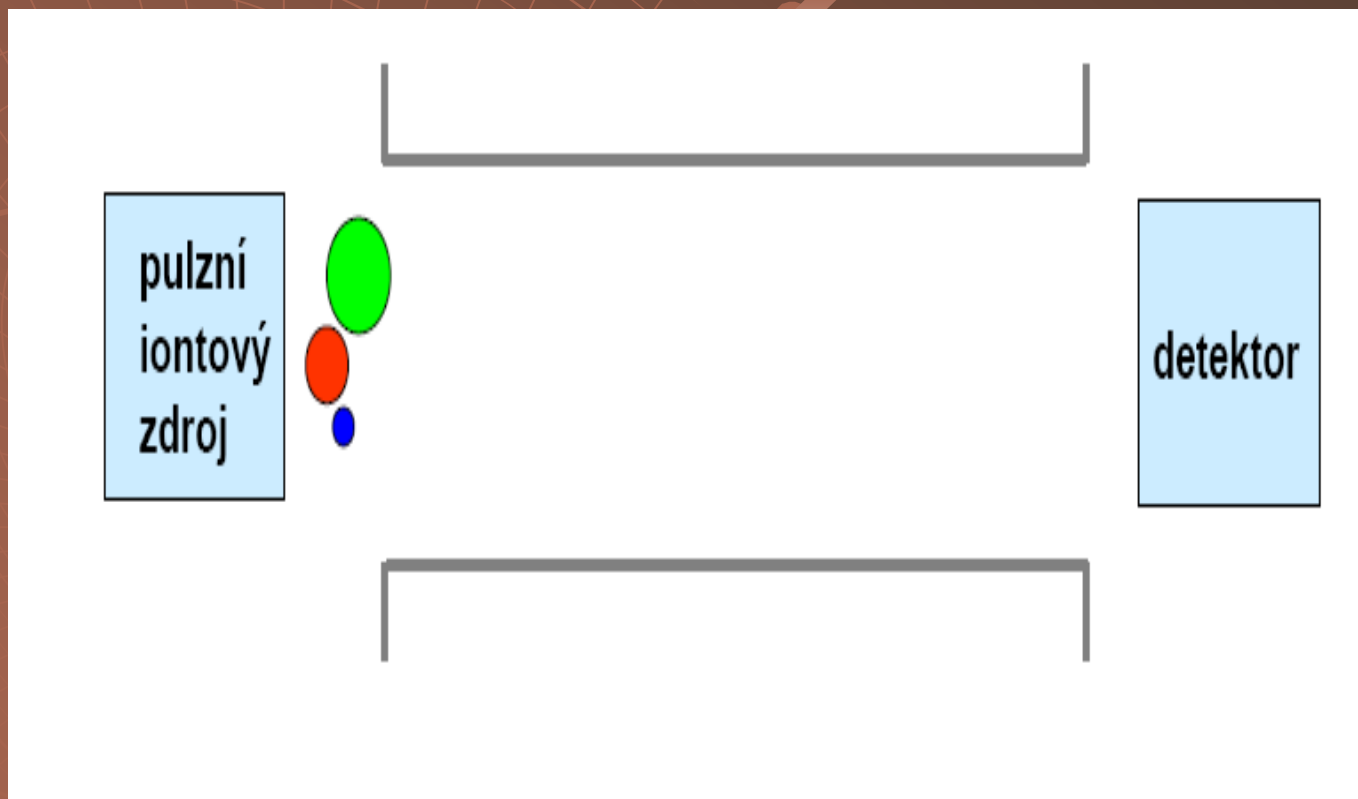


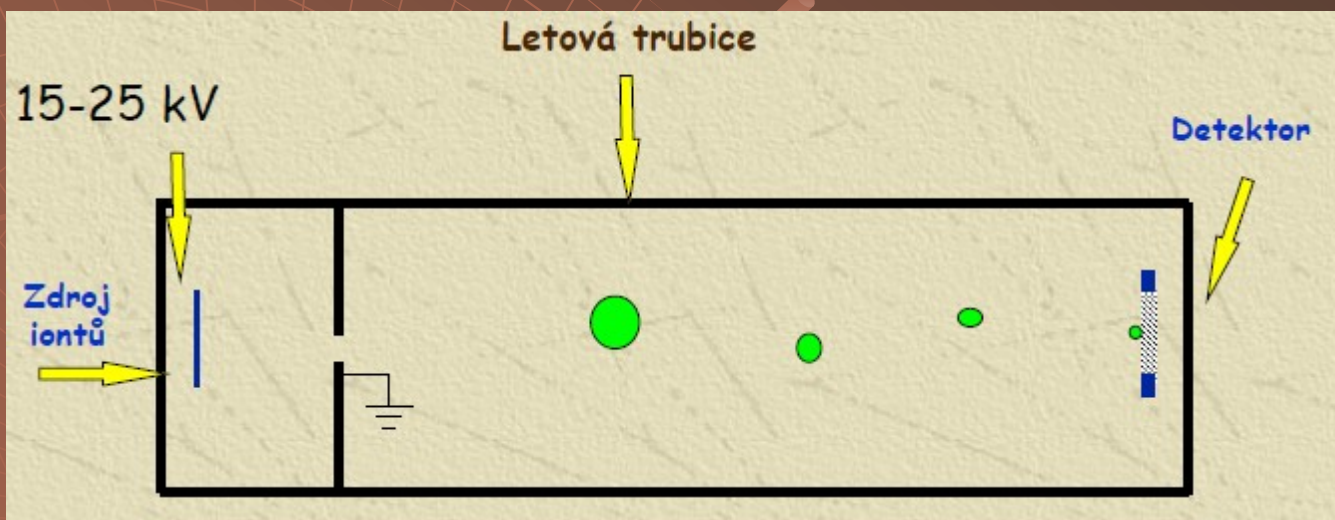
Analyzátor doby letu (TOF)

Různá doba rychlosti letu iontů
(analyzátor doby letu – TOF).

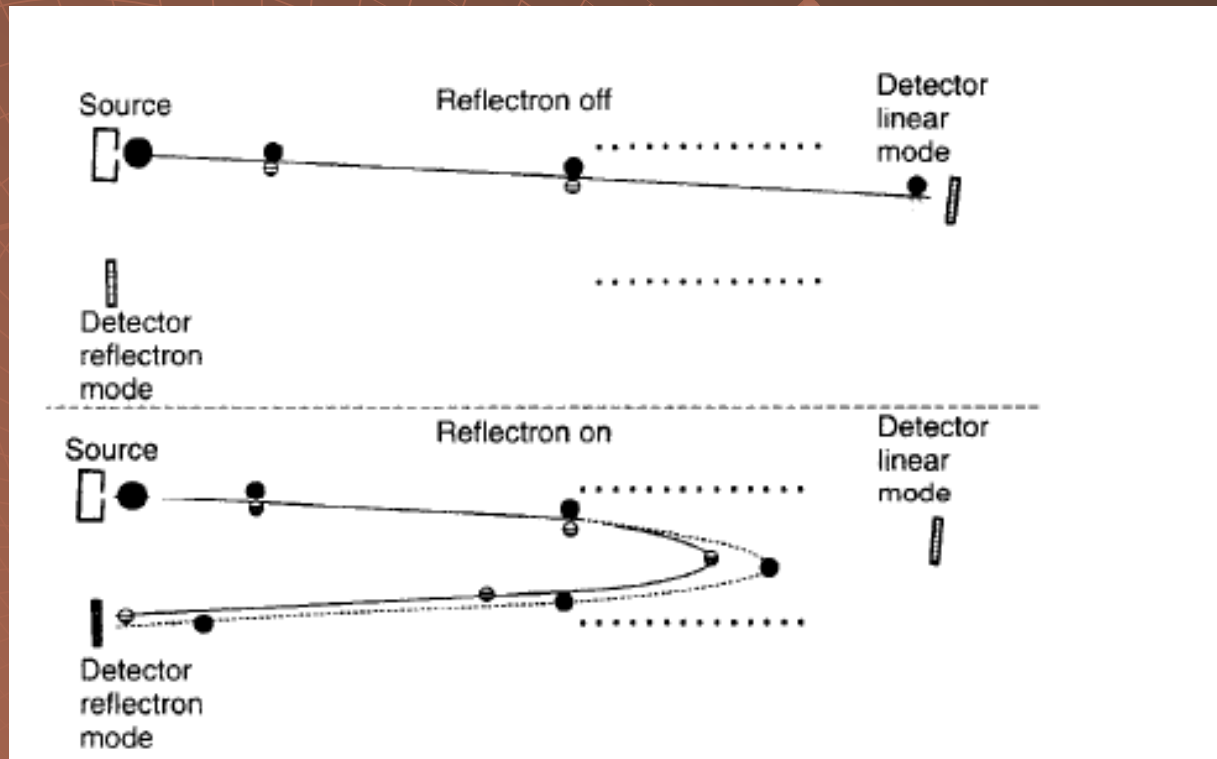
Urychlené ionty se v oblasti bez pole
pohybují různou rychlostí v závislosti na
hodnotě m/z ("menší ionty se letí rychleji").

Analyzátor doby letu (TOF)





Analyzátor doby letu (TOF)



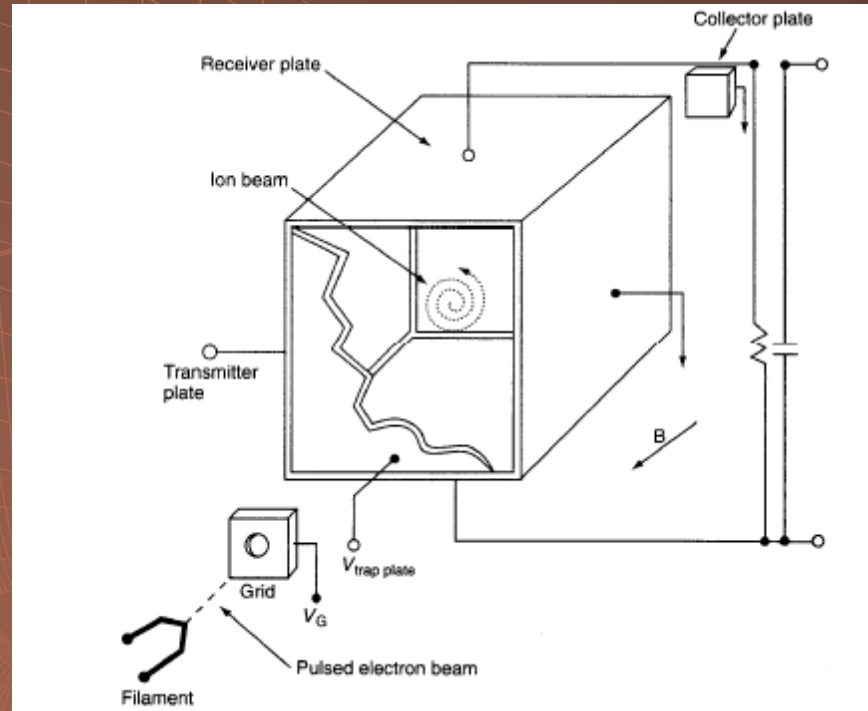
Analyzátor doby letu (TOF)



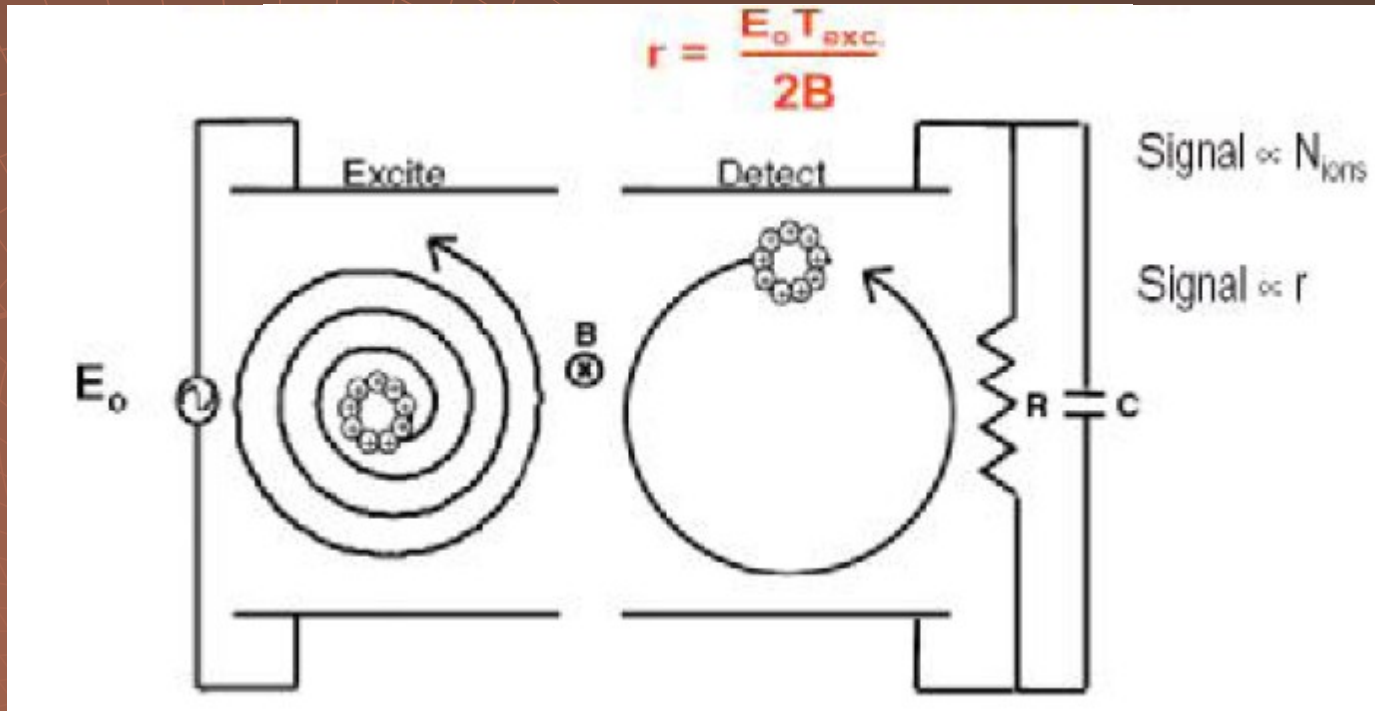
Iontová cyklotronová resonance (ICR)

Různé absorpce energie při
cykloidálním pohybu iontů v
kombinovaném magnetickém a
elektrickém poli.

Iontová cyklotronová resonance (ICR)

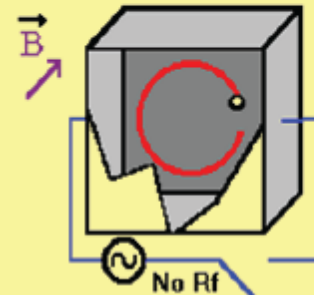
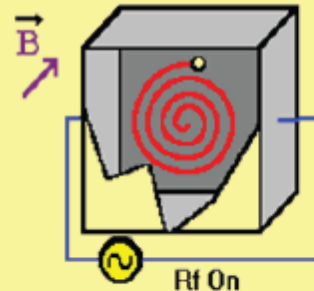
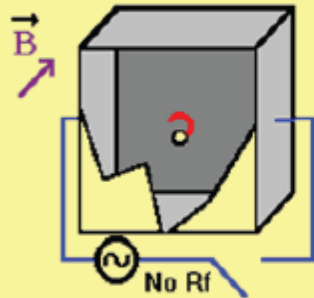


Iontová cyklotronová resonance (ICR)



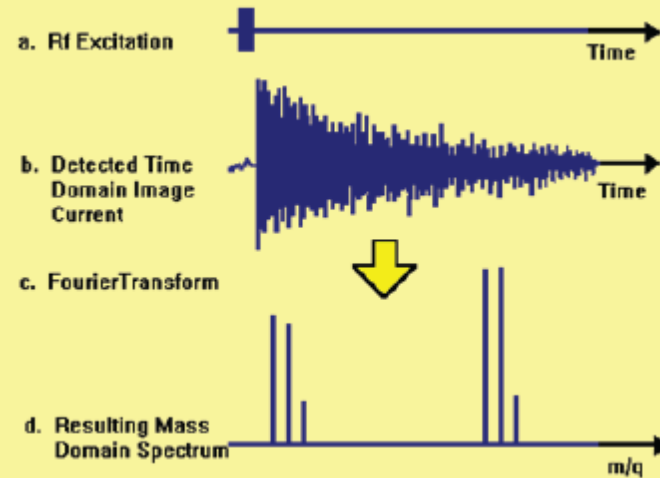
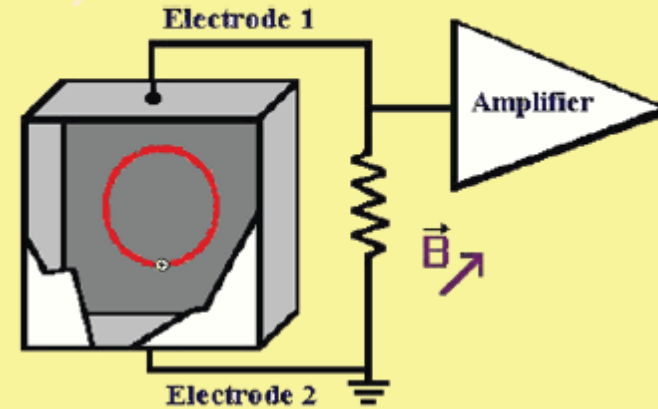
Iontová cyklotronová rezonance

excitace



(ICR)

detekce

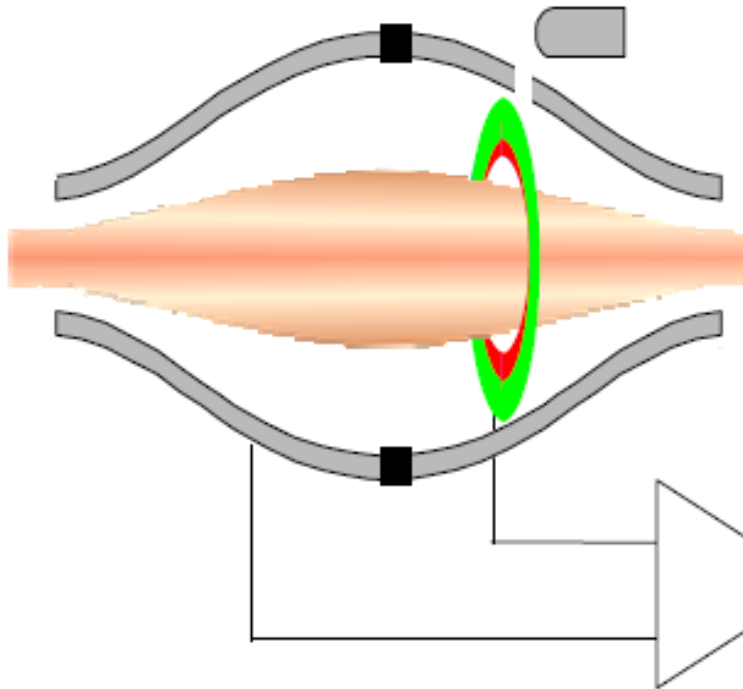


Iontová cyklotronová resonance

(ICR)



Orbitrap

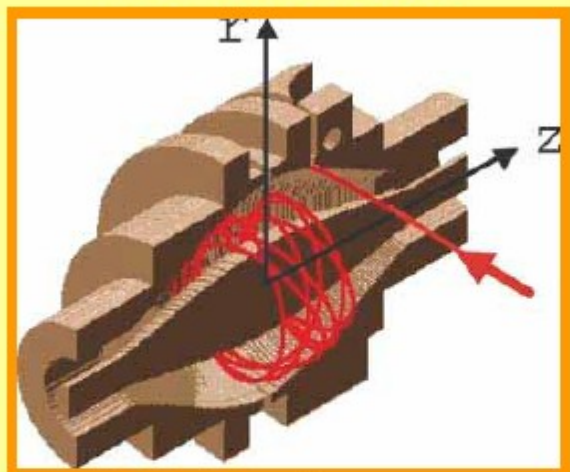


$$\omega = \sqrt{\frac{k}{m/z}}$$



Orbitrap

- separátory iontů – ORBITRAP s Fourierovou transformací



(a)

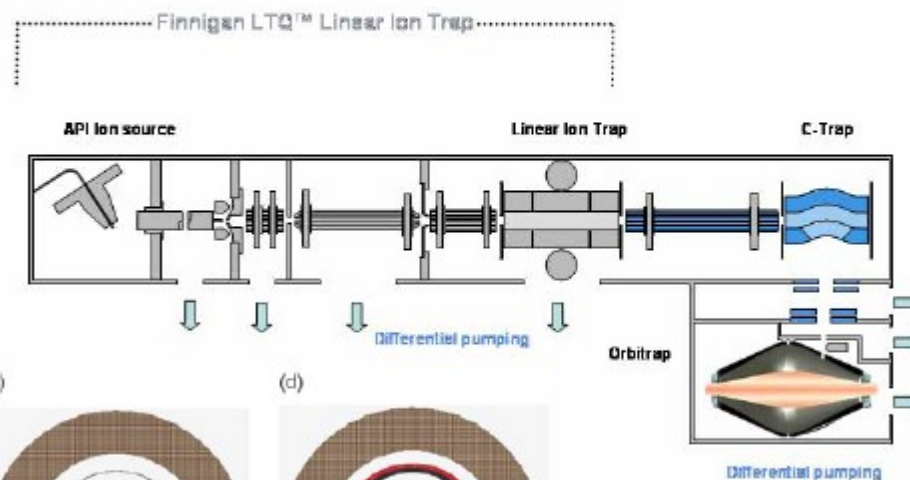
(b)



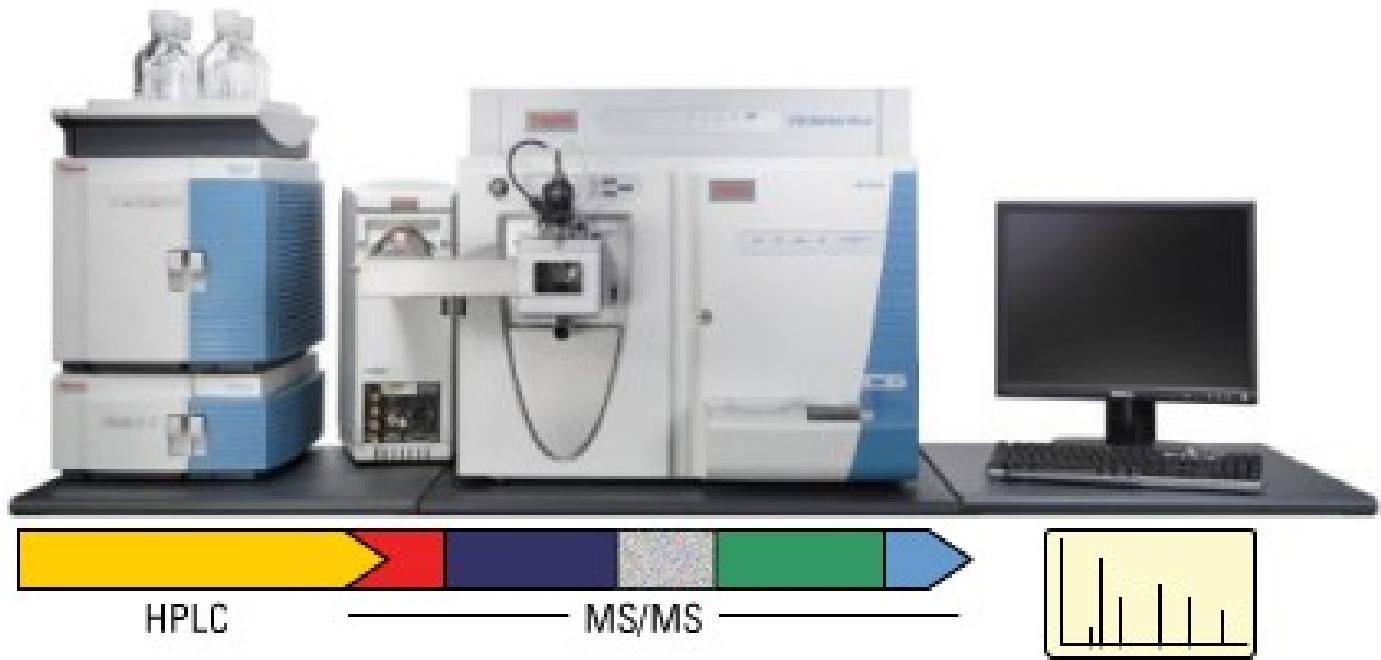
(c)



(d)



Orbitrap



Porovnání různých typů hmotnostních analyzátorů

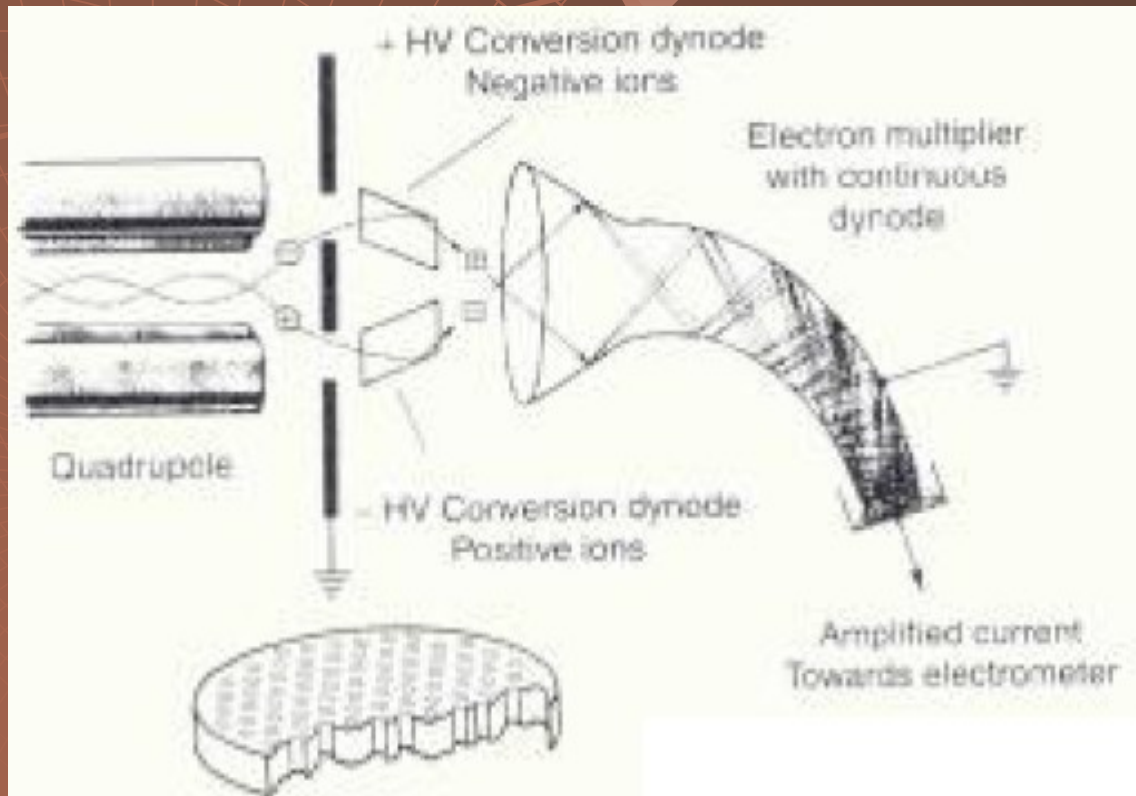
Analyzátor	RP [*10 ³ , FWHM]	m/z rozsah [*10 ³]	Sken. rychlost	LC/ MS	Vakuum [Pa]	Cena *10 ⁶ Kč
Q (QqQ)	3 – 5	3 – 4	střední	* * *	10 ⁻³	2 – 3 (4–6)
IT	5 – 20	10 – 20	vysoká	* * *	10 ⁻³ +5*10 ⁻⁴ He	3 – 4
o-TOF (QTOF)	10 – 25	~ 1000	velmi vysoká	* * *	10 ⁻⁴ -10 ⁻⁵	4 – 6 (8 – 10)
Sektor	50 – 100	~ 20 – 30	nižší	* *	10 ⁻⁵ – 10 ⁻⁶	12 – 20
ICR	~ 10 ⁶	~ 10 ⁸	vysoká	* *	10 ⁻⁷ - 10 ⁻⁹	≥ 50



Detektory

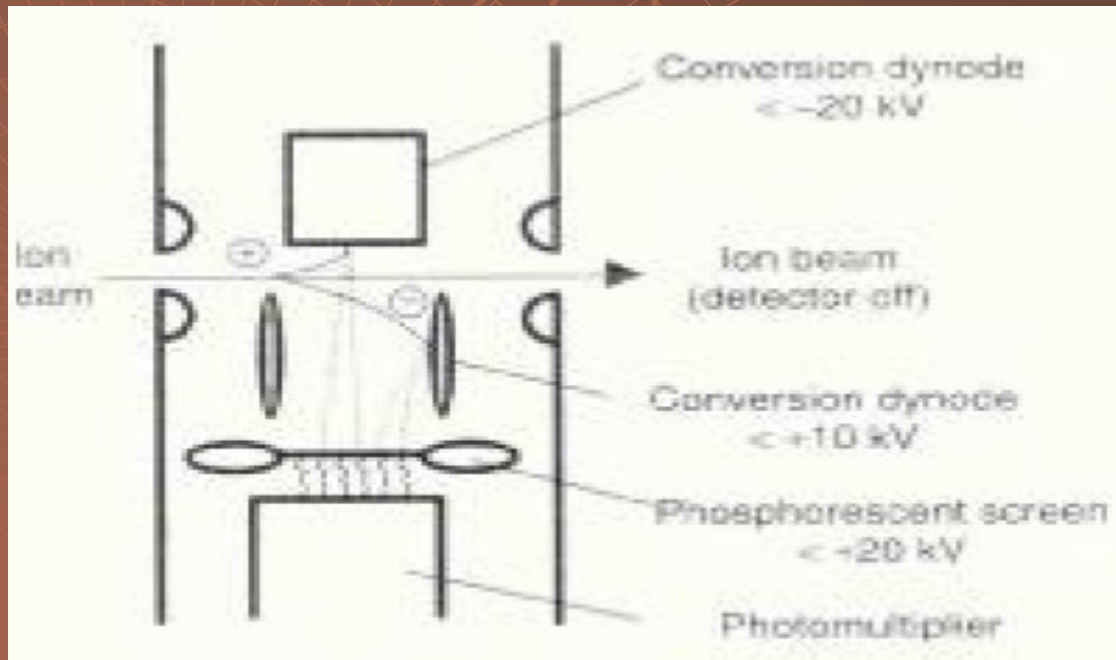
Elektronový násobič

ionty dopadající na povrch elektrody zní vyrazí e-,
dále zesíleny systémem dynod až 10⁸krát,
životnost 1-2 roky



Fotonásobič

ionty dopadají na fosforovou destičku, čímž uvolní energii ve formě fotonu, zesílen systémem konverzních dynod až 10^5 krát, delší životnost





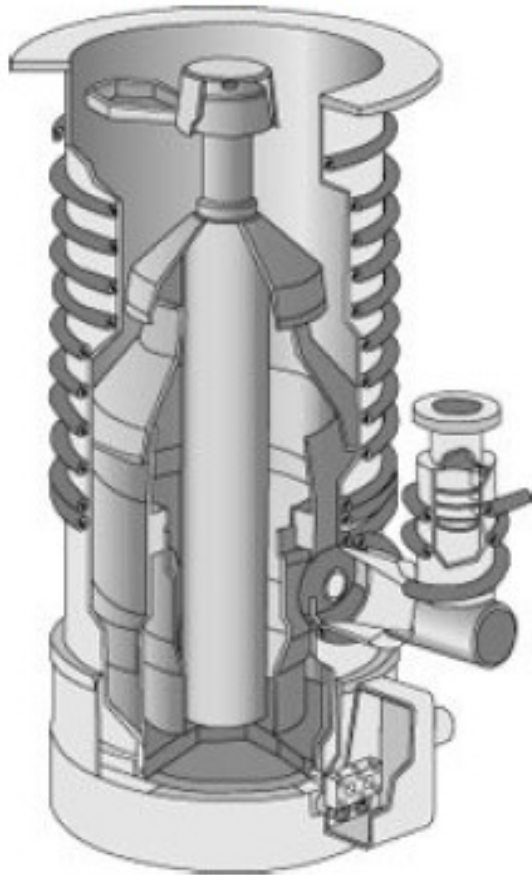
Vakuový systém

- hmotnostní analyzátor vždy pracuje **za vysokého vakua**, hodnota vakua se liší podle typu analyzátoru ca. 10^{-3} až 10^{-10} Pa
- kromě ionizačních technik pracujících za atmosférického tlaku (ESI, APCI, APPI) musí být za vakua i iontový zdroj
- proč tak vysoké vakuum? **ionty musí mít dostatečně dlouhou střední dráhu a nesmí docházet ke kolizním srážkám s neutrálními atomy**

K získání tak vysokých hodnot vakua je obvykle potřeba dvou nebo i více (FT-ICR) stupňové čerpání velmi výkonnými vakuovými pumpami

- ◆ - 1. stupeň čerpání - **rotační pumpy** (výkon 80 l/s)
- ◆ - 2. stupeň čerpání - **turbomolekulární nebo difúzní pumpy** (výkon 250 l/s)
- ◆ •

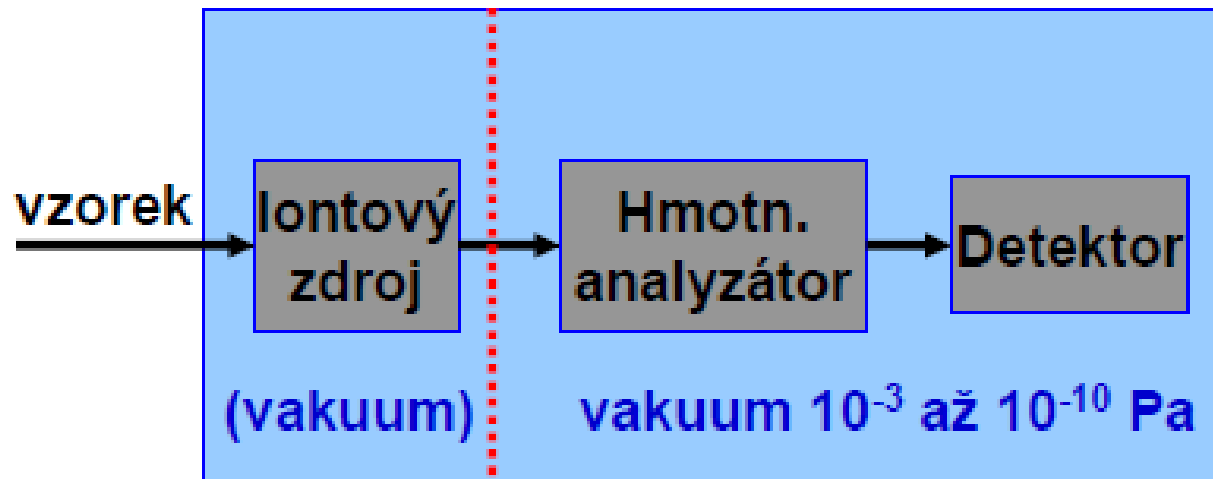
difuzní pumpa



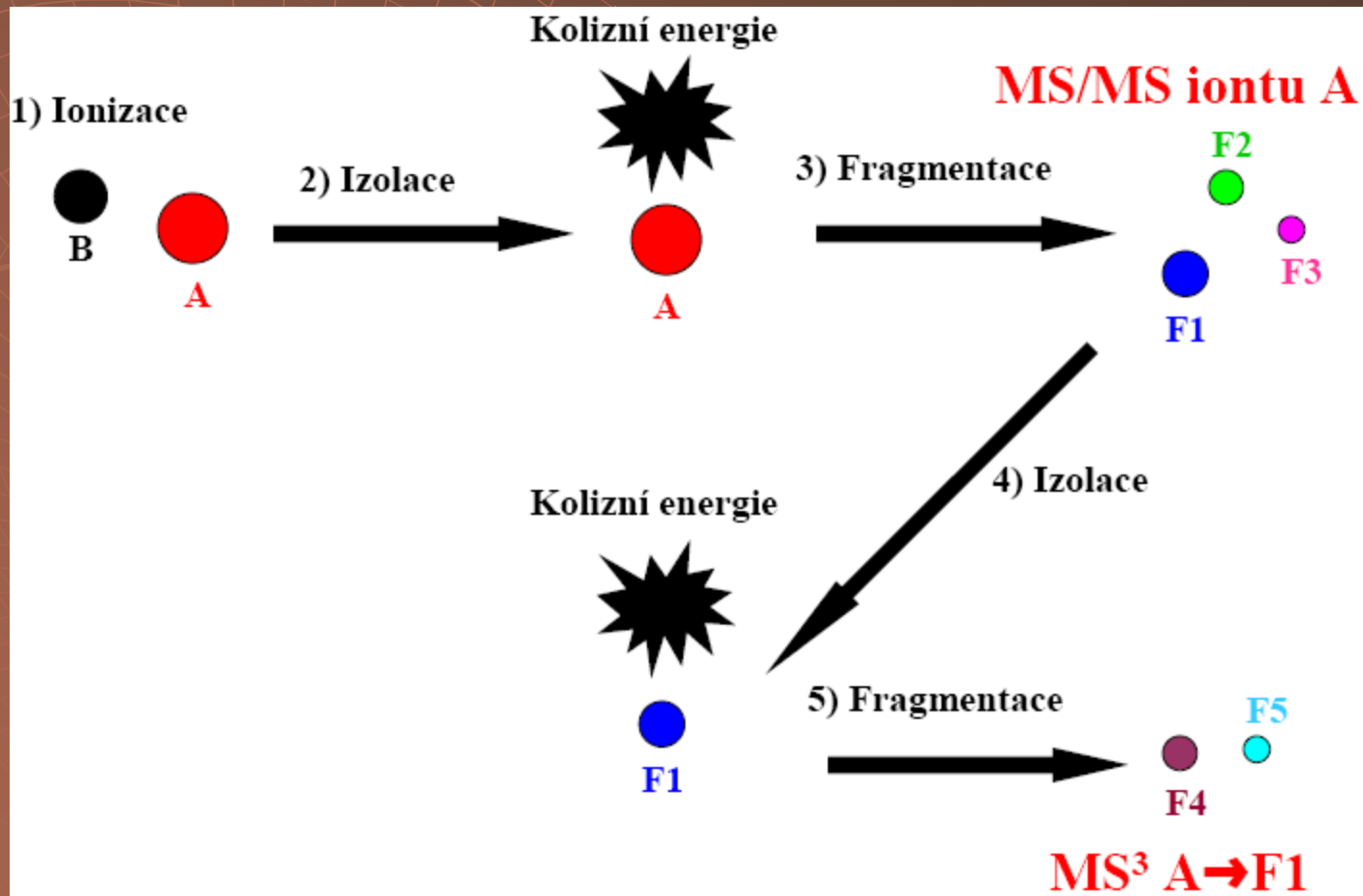
turbomolekulární pumpa



Vakuový systém

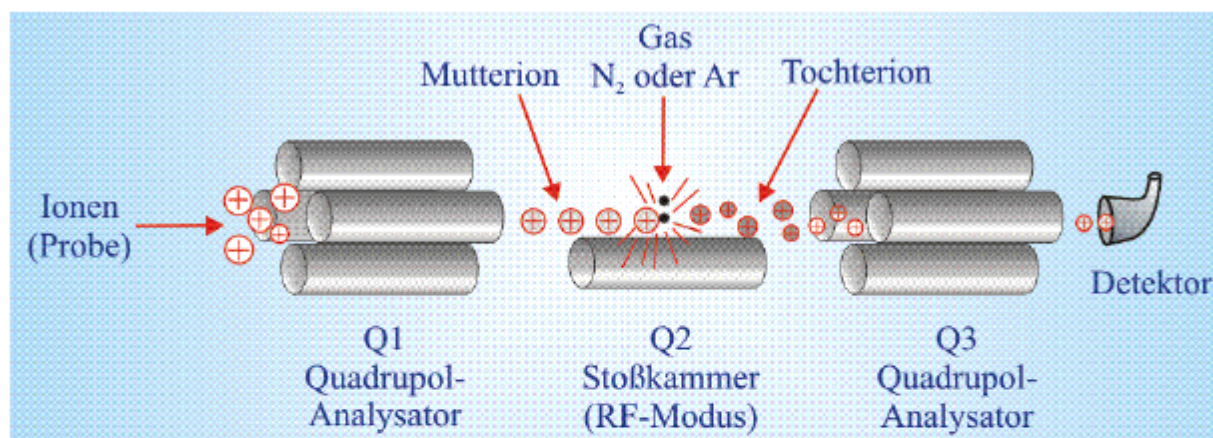


MSⁿ

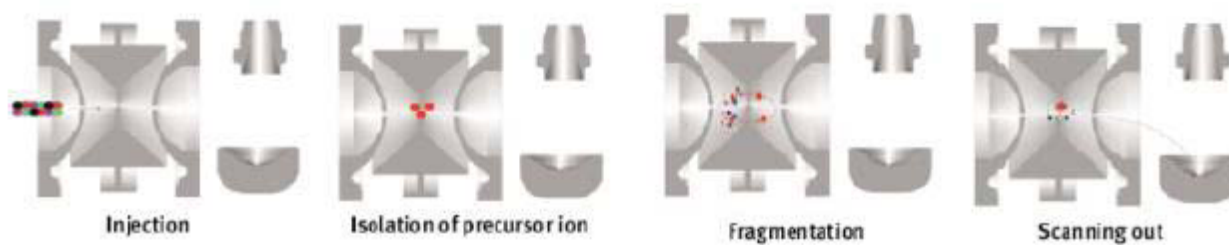


MSⁿ

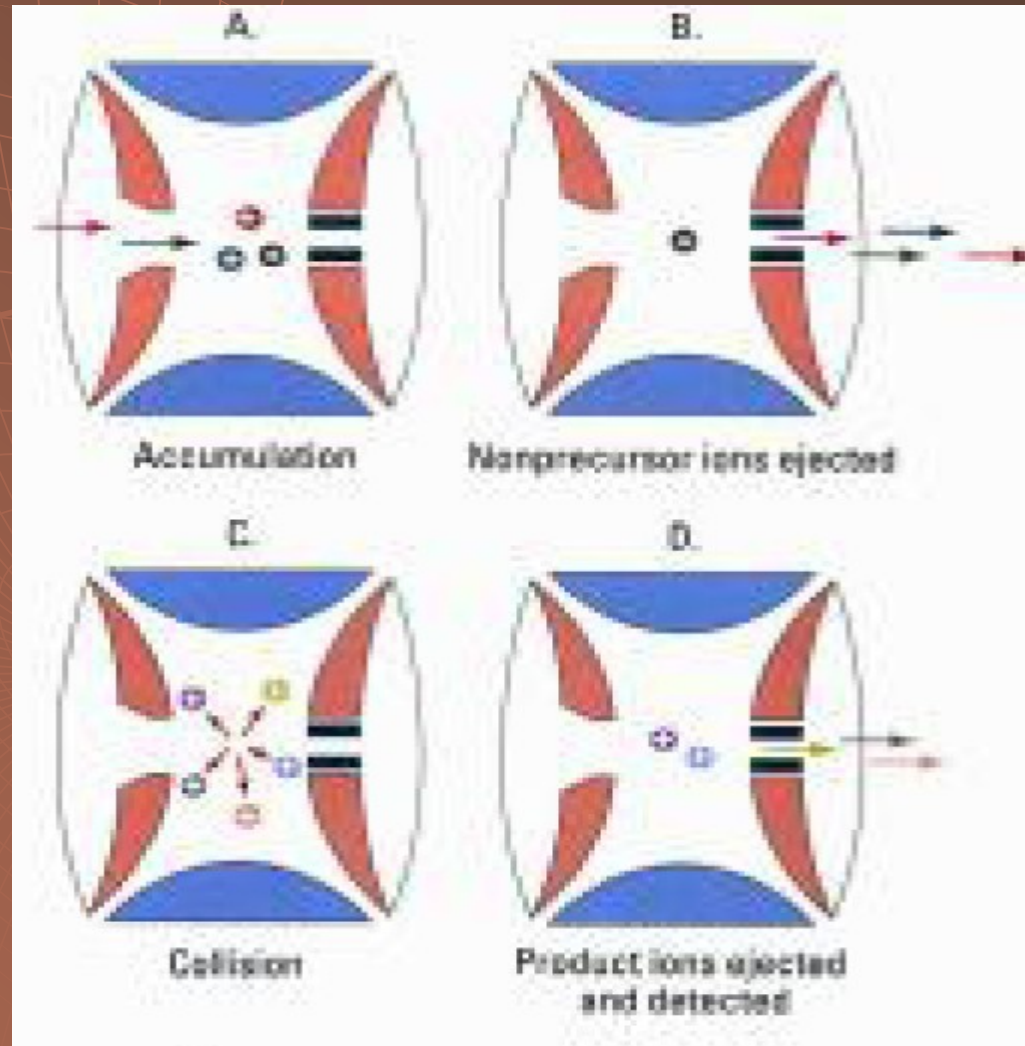
V prostoru



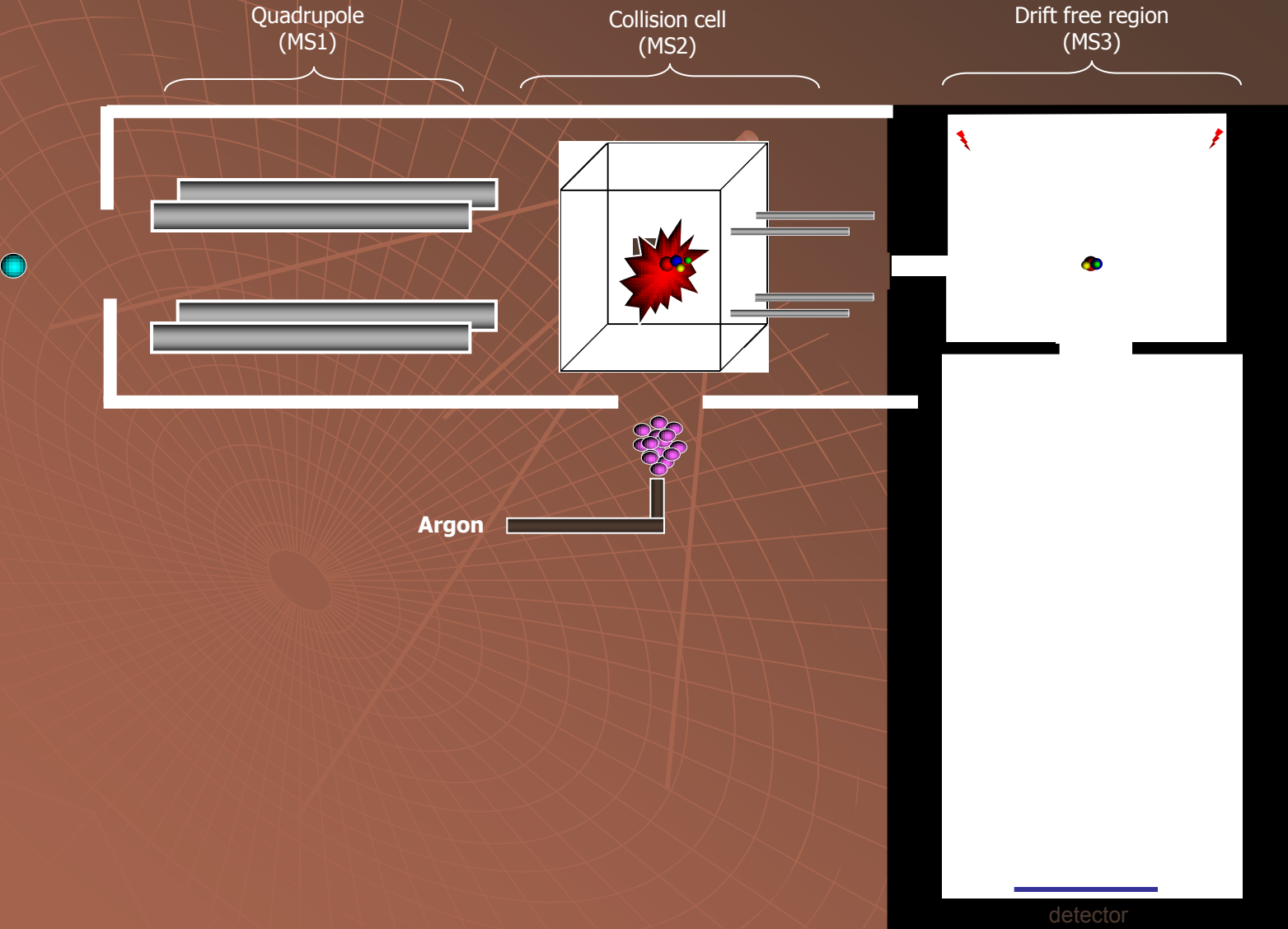
V čase



IT

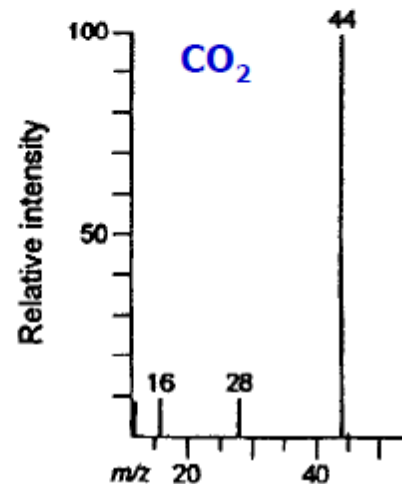
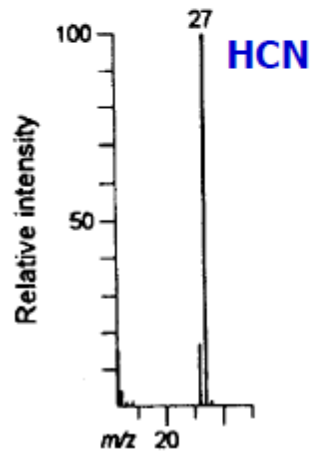
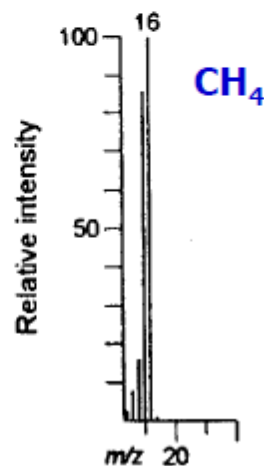
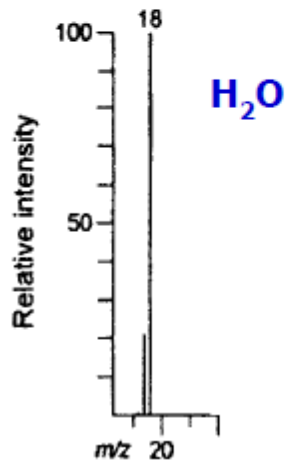


QTOF

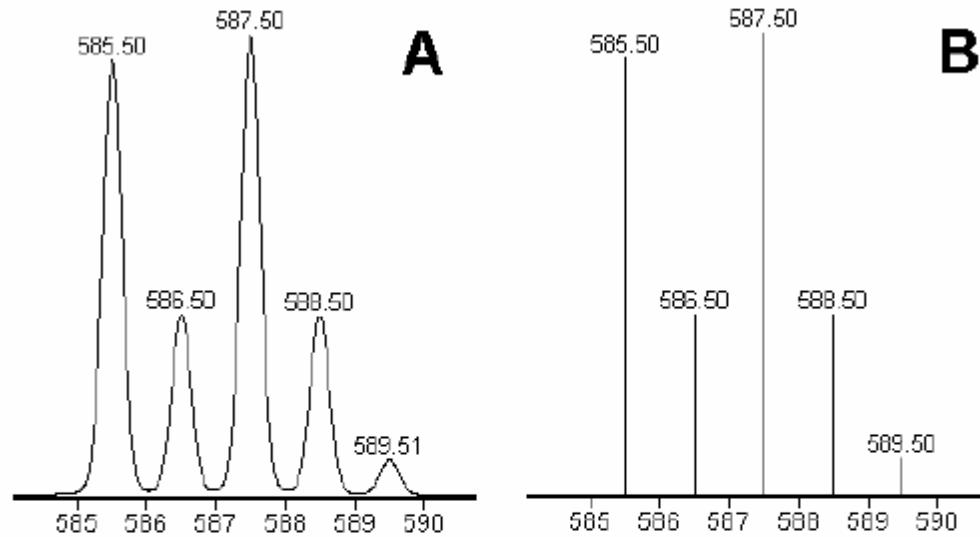


MS spektrum

- **normalizace spekter** - hmotnostní spektra jsou obvykle uváděna v normalizovaném tvaru, tzn. nejintenzivnějšímu píku spektra je přiřazena relativní intenzita 100% a intenzity ostatních píků se dopočítají; kromě grafické formy lze spektrum uvést i v tabelární formě (přesně uvedené intenzity, ale méně přehledné pro interpretaci)
- hmotnostní spektrum - **osa y = relativní intenzita v %**, **osa x = poměr hmotnosti a náboje (m/z)**, ve většině případů je náboj roven jedné (kromě ESI) a potom hodnota na ose x odpovídá přímo hmotnosti iontu



MS spektrum



spektrum $\begin{cases} \rightarrow \textit{profilové} \\ \rightarrow \textit{histogram} \end{cases}$

GC/MS

- První chromatografická metoda spojená s MS
 - malý průtok nosného plynu – kompatibilní s MS
- Instrumentace
 - iontové zdroje: EI, CI
 - analyzátory: Q, IT
- Analyty:
 - méně polární, termálně stabilní, s nízkou molekulovou hmotností
- Široce využívaná technika
 - analýza složitých směsí (např. environmentální a forenzní analýzy)
 - možnost prohledávat databáze MS spekter – rychlá identifikace látek

HPLC/MS

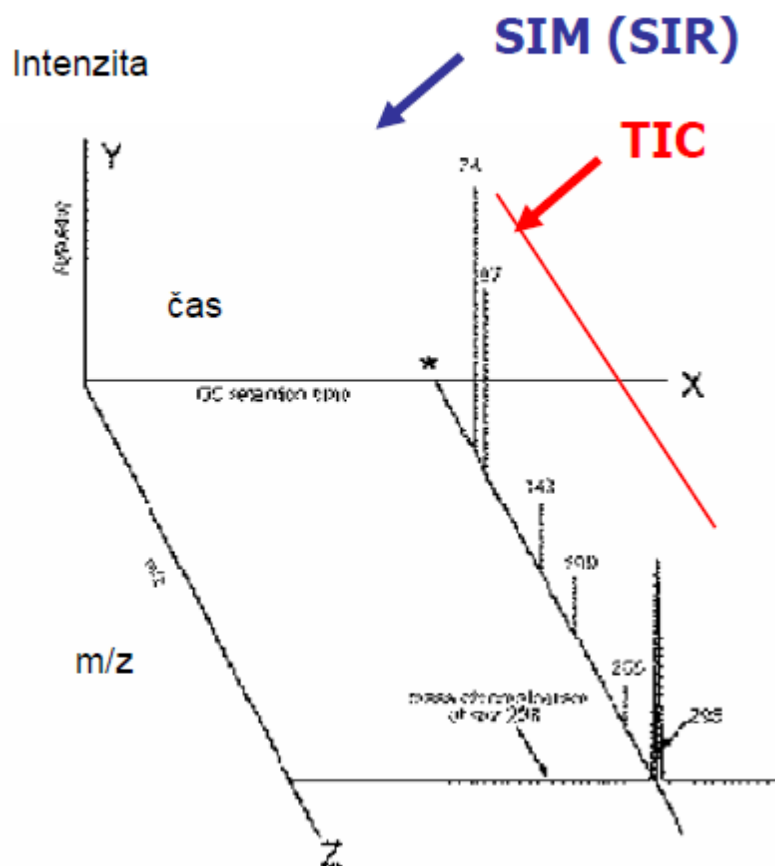
- Spojení HPLC později
 - odpaření – velký objem plynu = technický problém
 - řešení – API zdroje (APCI, APPI, ESI)
- Instrumentace
 - iontové zdroje: APCI, APPI, ESI
 - analyzátory: Q, IT, orbitrap, TOF
- Analyty:
 - od malých molekul po biopolymery
 - od málo polárních po iontové
 - omezeně kompatibilní MF s pufrý a iont-párovými činidly
 - analýza potravin, léčiv, proteomika, atd.
- Rychle se rozšiřující oblast MS

CE/MS

- Zatím málo rozšířená
- Výhody
 - velmi vysoká separační účinnost
 - analýza iontů
 - nízká spotřeba vzorku
- Technické problémy
 - ovlivňování separačního napětí a napětí zdroje
 - malá kompatibilita separačních pufrů s MS
- Analyty
 - analýza peptidů, identifikace proteinů

MS detekce

Režimy snímání dat:
MS experiment



Full SCAN (Total Ion Current TIC) → cyklicky se snímá celé MS spektrum požadovaného rozsahu m/z

Rekonstruovaný chromatogram (RIC) → z TICu se vybere požadovaný ion a vykreslí se chromatografický záznam

Selected Ion Monitoring (SIM) → cyklicky se snímají jen vybrané ionty → citlivější než TIC režim

např. u kvadrupolu detegované absolutní množství analytu činí:
→ TIC řádově ng (10^{-9} g)
→ SIM řádově pg (10^{-12} g) až fg (10^{-15} g)

Product Ion Scan: Q1: izolace iontu (SIM) Q2: fragmentace iontu Q3: TIC detekce

Instrumentace: Triple Quad, Q-ToF (MS^2); Ion Trap (až MS^{10}) s vyšším MS^n klesá citlivost!

Precursor Ion Scan: Q1:TIC ($m/z_1 - m/z_2$) Q2: fragmentace iontu Q3: SIM detekce

Instrumentace: nelze na Ion Trap

Constant Neutral Loss Scan: Q1:TIC ($m/z_1 - m/z_2$) Q2: fragmentace iontu
Q3: TIC ($(m/z_1 - \Delta N) - (m/z_2 - \Delta N)$) detekce; ΔN – rozdíl hmotností iontů – hmotnost
odpadající neutrální částice z iontu *Instrumentace: nelze na Q-ToF a Ion Trap*

Selective Reaction Monitoring (SRM): Q1: izolace iontu (SIM) Q2: fragmentace iontu Q3: SIM detekce

Fragmentace probíhá srážkou iontů s molekulami kolizního plynu (Argon)

Aplikace MS

Identifikace sloučenin

Sumární vzorec – téměř absolutně při dostatečně vysokém rozlišení

Identifikace struktury – v závislosti na typu ionizace (možnost fragmentace)

Identifikace porováním spekter - identifikace sloučeniny na základě tvorby a poměru četností iontů o určitých hodnotách m/z (knihovny)

Kvantifikace sloučenin

Univerzální - citlivost se liší podle schopnosti sloučenin poskytovat za daných podmínek ionty