

# Hmotnostní spektrometrie



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

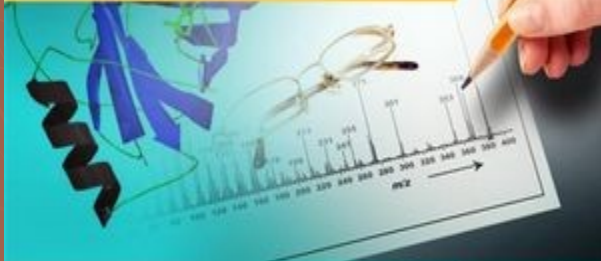
# Literatura

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*

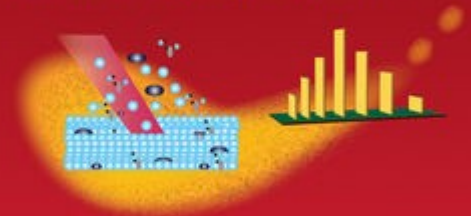
*Third Edition*

WILEY

Second Edition

## Electrospray and MALDI Mass Spectrometry

*Fundamentals, Instrumentation,  
Practicalities, and Biological Applications*

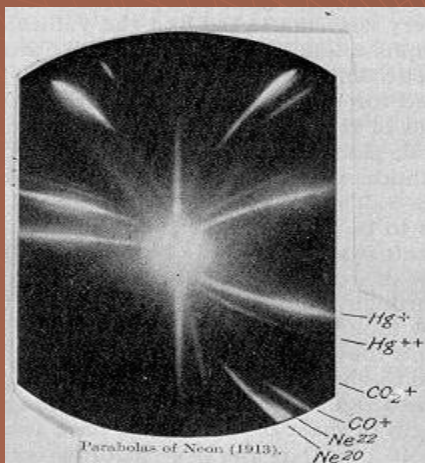


Edited by  
**RICHARD B. COLE**

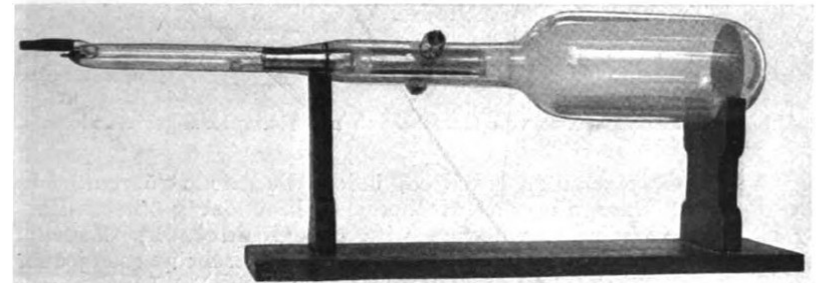
WILEY

# Historie hmotnostní spektrometrie

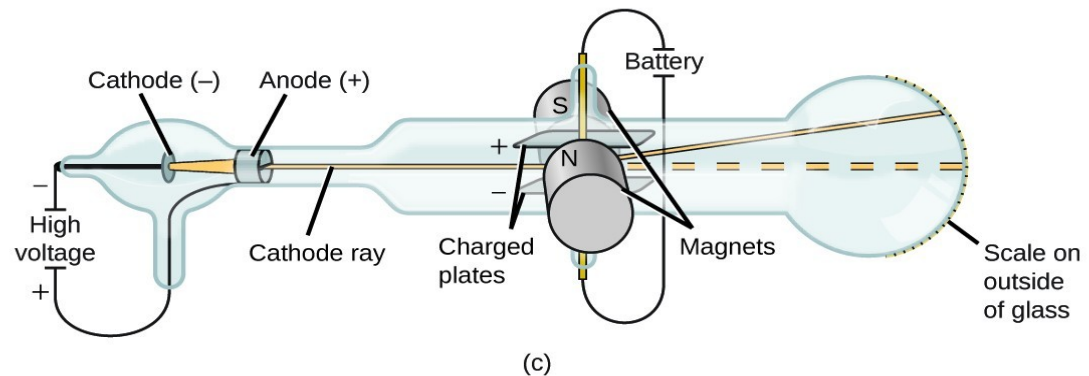
- ◆ 1906 J.J. Thomson  
Elektron,



(a)



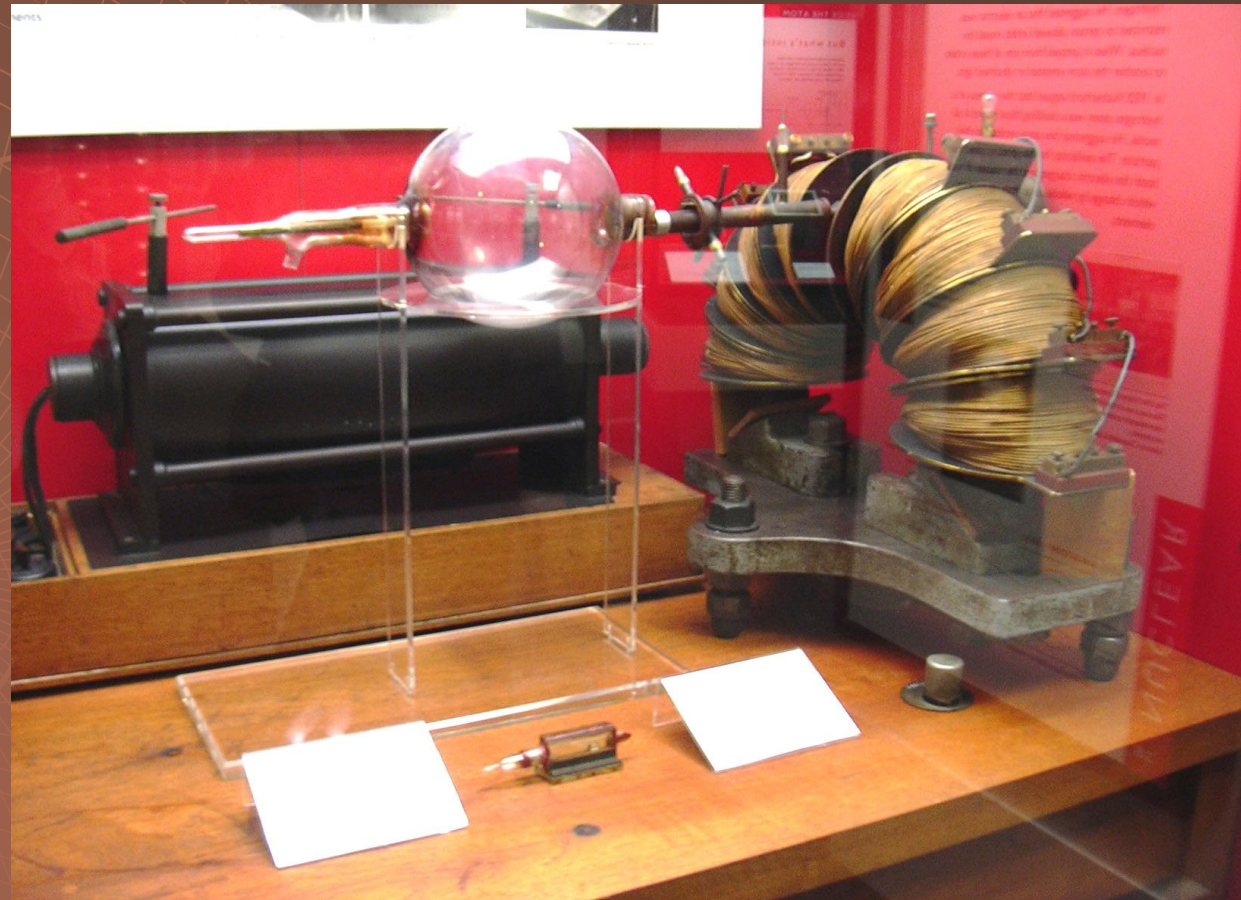
(b)



(c)

# Historie hmotnostní spektrometrie

## ◆ 1922 F.W. Aston Izotopy



### APPENDIX I

#### TABLE OF PACKING FRACTIONS AND ISOTOPIC WEIGHTS

Atoms marked + were measured by Bainbridge, × by Costa, ○ by means of optical spectra. The others by means of the second mass-spectrograph.

Symbol.	Mass Number.	Packing Fraction.	Isotopic Weight.	Proportional error × 10 <sup>4</sup> .	Symbol.	Mass Number.	Packing Fraction.	Isotopic Weight.	Proportional error × 10 <sup>4</sup> .
H	1	+ 77.8	1.00778	1	Se	78	- 8	77.937	2
H+	2	+ 67.5	2.01351	1	Se	80	- 7.3	79.941	1
He	4	+ 5.4	4.00216	0.5	Br	79	- 9.0	78.929	0.5
Li×	6	+ 20.0	6.012	3	Br	81	- 8.6	80.926	0.5
Li×	7	+ 17.0	7.012	3	Kr	78	- 9.4	77.926	1
Be+	9	+ 17.2	9.0155	1	Kr	80	- 9.1	79.926	1
B	10	+ 13.5	10.0135	0.5	Kr	82	- 8.8	81.927	0.5
B	11	+ 10.0	11.0110	0.5	Kr	83	- 9.7	82.927	0.5
C	12	+ 3.0	12.0036	0.3	Kr	84	- 8.5	83.928	0.5
CO	13	+ 3.0	13.0039	5	Kr	86	- 8.2	85.929	0.5
N	14	+ 5.7	14.008	1	Nb	93	- 8	92.926	5
NO	15	(2)	(15.007)	?	Mo	98	- 5.5	97.945	5
O	16	-	16.0000	1	Mo	100	- 5.5	99.945	5
OO	17	+ 1.7	17.0029	0.2	Sn	120	- 7.3	119.912	1
OO	18	+ 3.6	18.0065	0.2	Te	126	- 5	125.937	2
F	19	0.0	19.0000	0.3	Te	128	- 5	127.936	2
Ne+	20	- 0.16	19.99671	0.5	I	127	- 5.3	126.932	1
Ne+	22	- 0.24	21.99473	0.5	Xe	134	- 5.3	133.929	1
Si	28	- 6.5	27.9818	1	Cs	133	- 5	132.933	2
P	31	- 5.6	30.9825	0.5	Ba	135	- 6.1	137.916	2
Cl	35	- 4.8	34.983	0.5	Ta	181	- 4	180.927	3
Cl	37	- 5.0	36.980	0.5	W	184	0	184.00	5
A	36	- 6.6	35.976	0.5	Re	187	- 1	186.981	2
A	40	- 7.2	39.971	0.3	Os	190	- 1	189.981	3
Cr	52	- 10.0	51.943	3	Os	192	- 1	191.981	3
Ni	58	- 10.0	57.942	2	Hg	200	+ 0.8	200.016	1
Zn	64	- 9.9	63.937	3	Tl	203	+ 1.8	203.036	2
As	75	- 8.8	74.934	0.5	Tl	205	+ 1.8	205.037	2

# Historie hmotnostní spektrometrie

- ◆ 1930 W. Paul  
Iontová past



**1989**



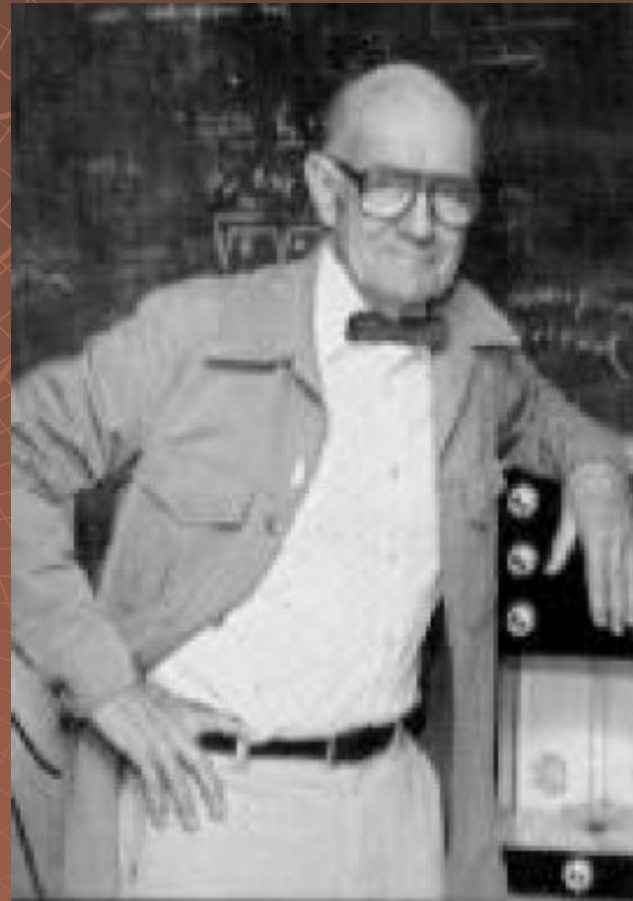
# Historie hmotnostní spektrometrie

◆ 1930 J.B. Fenn

ESI



**2002**



# Historie hmotnostní spektrometrie

◆ 1930 K. Tanaka

MALDI



**2002**



# Historie hmotnostní spektrometrie

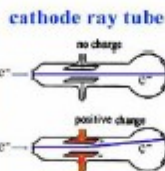
## Historický vývoj MS - souhrn

**100 let**  
od katodové  
trubice k  
modernímu  
spektrometru

→ 1900

1899  
-  
1920

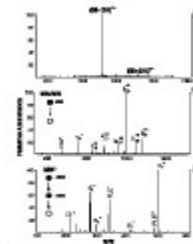
**TOF-MS**  
\*1946



**GC-MS**  
\*1956



**LC-MS(ESI)**  
\*1984



**Vývoj  
záznamu  
spekter**

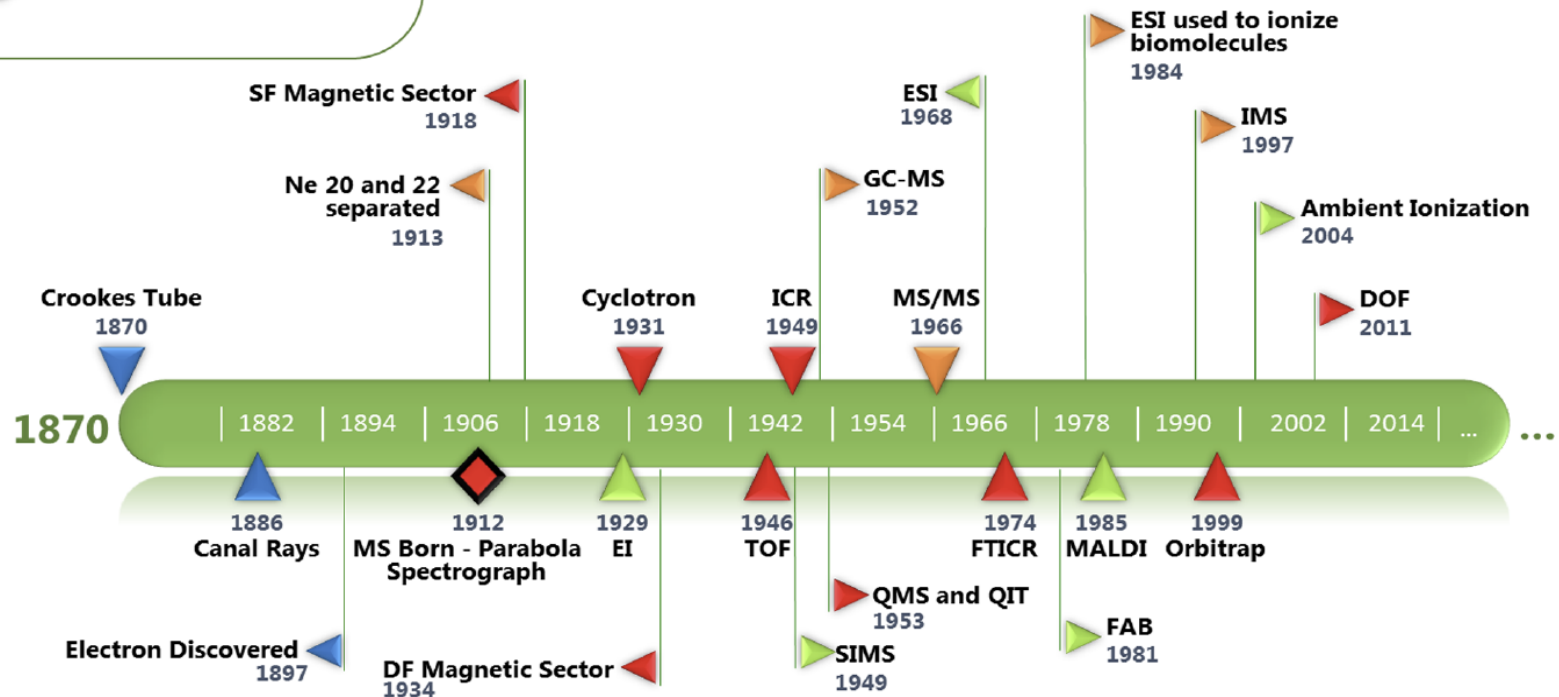




# Historie hmotnostní spektrometrie

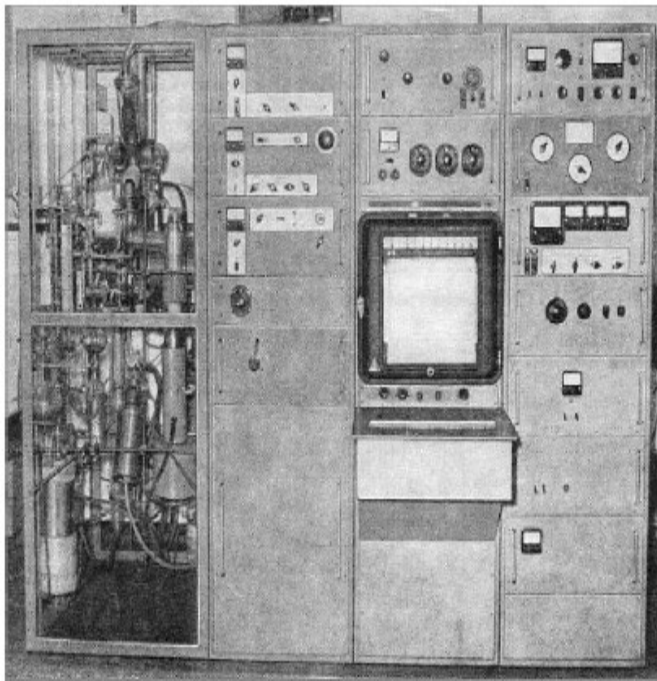
## Milestones

- Foundational Steps
- Ionization Methods
- Applications and Separation Techniques
- Mass Analyzers



# První MS v ČR

- Konstrukce prvního hmotnostního spektrometru (1953)
  - V. Čermák, V. Hanuš, Č. Jech, J. Cabicar
  - Ústav fyzikální chemie a elektrochemie ČSAV

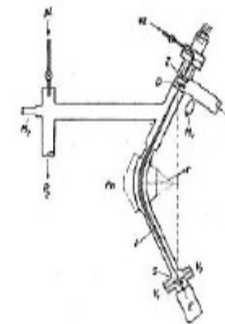


## Hmotový spektrometr Ústavu fyzikální chemie ČSAV

VLADIMÍR ČERMÁK, VLADIMÍR HANUŠ a MIROSLAV JECHEK  
Ústav fyzikální chemie Československé akademie věd, Praha

673.93.8

*Stroj byl postaven dle návrhu autorů a je určen k měření hmotnostních poměrů a k určení poměru hmotnosti k náboji jednotlivých složek, při kterých dochází k přeměně a při měření náboje ionizovaných částic. Časopis: Zvesti - Prati i. Metodni spektromet. 1953, 10, 11.*



Obr. 1. Schéma trubice hmotového spektrometru.

Z - střed tržby, S - střed iontů, P, P<sub>1</sub> - prvky Y difúzní vstupu, H, M<sub>1</sub> - vakuové nádrky, D - diafragma, Po - pákové nastavení, E - část s obkružujícími křivkami a vysokosmírovými odbojkami, J - iontový svazek zakřivený směrem, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> - výhledy pro přímou pozorovací část, se - příloha vzhledu na náčrt, pl - příloha vzhledu na tržbu pro studium charakteristik, s - náčrt dráhy iontů (části 1953, 10, 11).

# Hmotnostní spektrometrie

- ◆ Spektrální metoda ???

- Ne

- ◆ Hmotnostní spektrum

- ◆ Separáční metoda ???

- Ano

- ◆ Separace na základě  $m/z$

A background image of a mass spectrometer's detector grid, showing a series of concentric and radial lines forming a grid pattern. A small, light-colored object is positioned at the top right of the grid.

$m/z$

**HMOTNOST/NÁBOJ**

# Hmotnostní spektrometr

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

# Hmotnostní spektrometrie

MS - mimořádně citlivá metoda  
(ionizace 0,01 %)

- destruktivní metoda
- minimální spotřeba vzorku
- určení MW a dalších  
strukturních informací

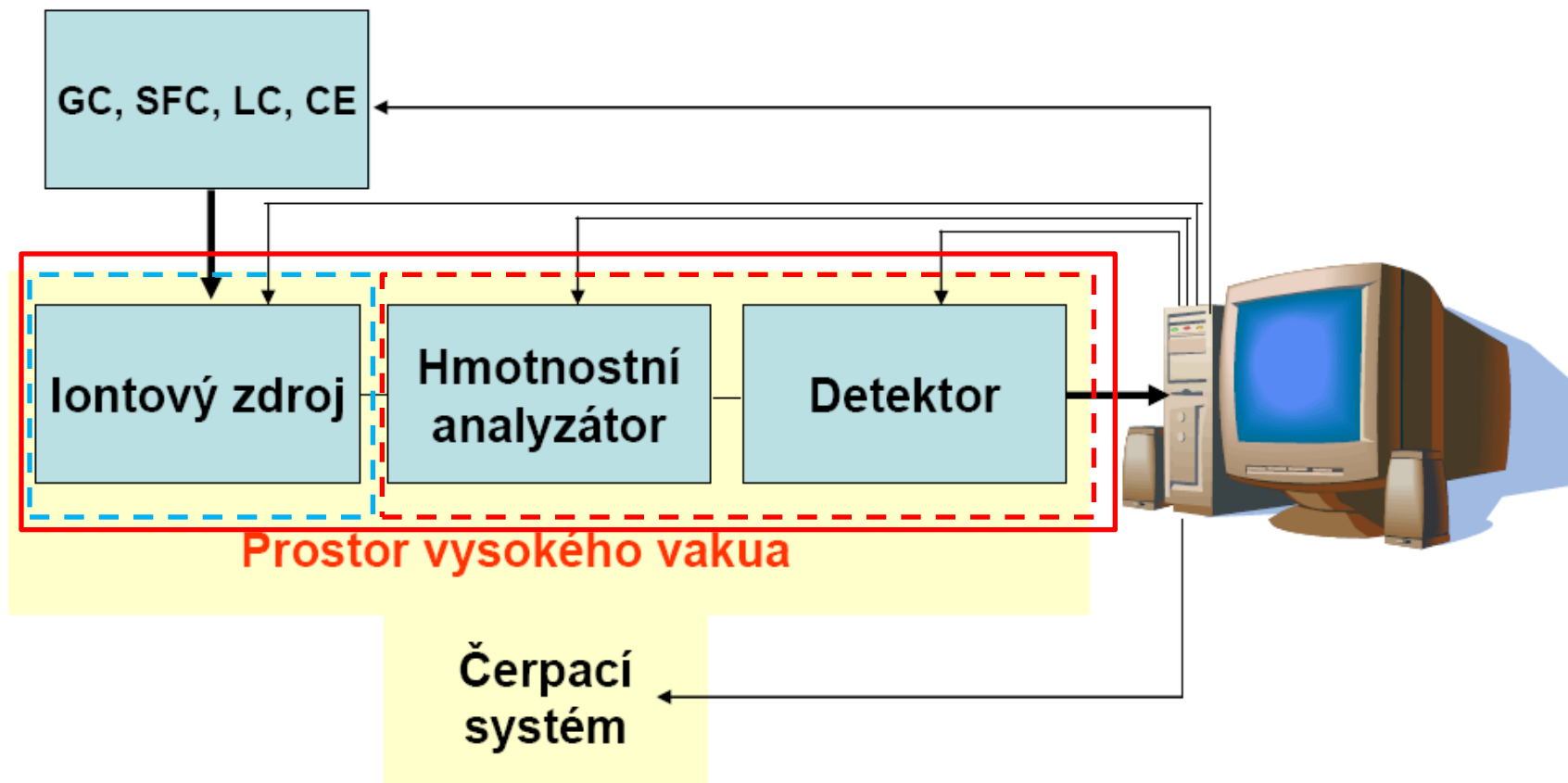
# Podstata

IONTOVÝ ZDROJ

ANALYZÁTOR

DETEKTOR

# 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) DI + LC, GC, CE
  - iontová optika sloužící k urychlení a fokusaci iontů
  - počítač na ovládání a ladění přístroje, sběr a ukládání dat, porovnání spekter s knihovnou

# Jak velké molekuly lze analyzovat ?

MALDI 100 - 1000 kDa

ESI až 100 kDa

APCI až 2 kDa

EI+ 70 eV / CI až 1 - 2 kDa

TOF

ORBITRAP

ION TRAP  
QUADRUPOLE

m/z



# 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)

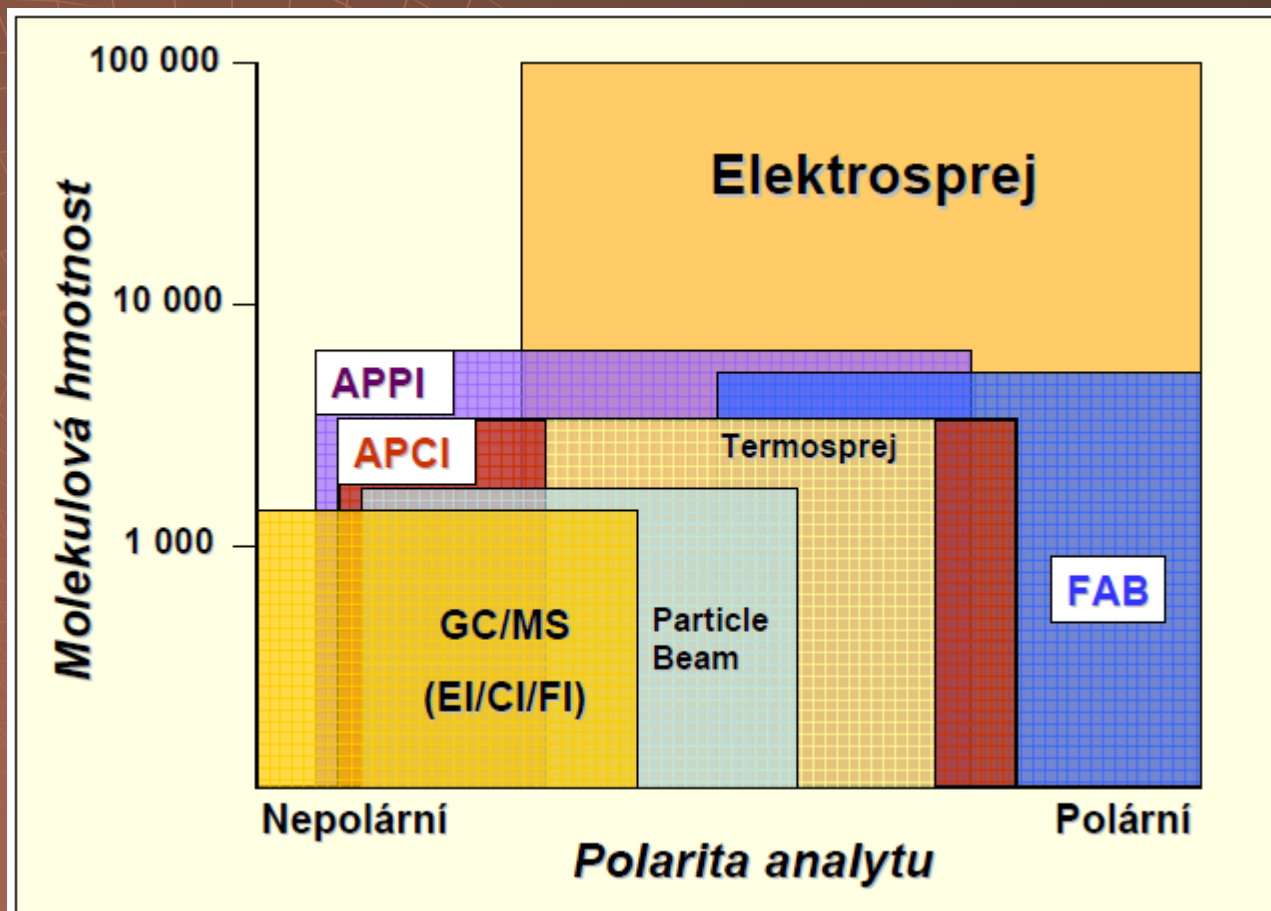
e/ **volba polarity ionizace** (platí pro měkké ionizační techniky)

- **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

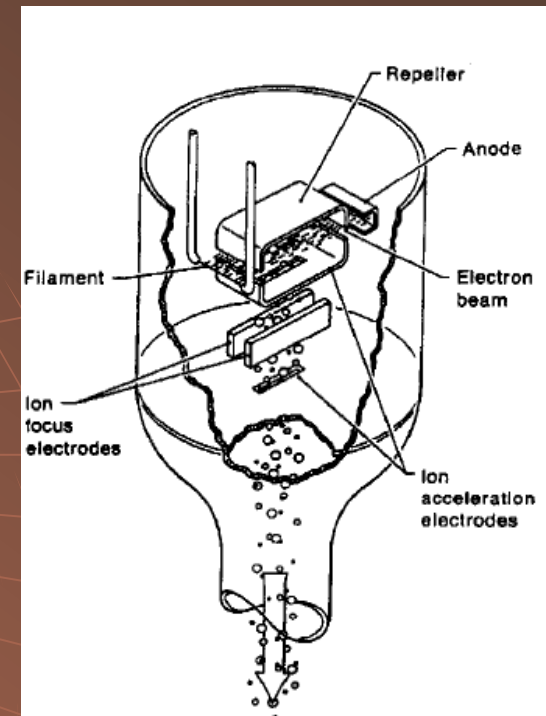
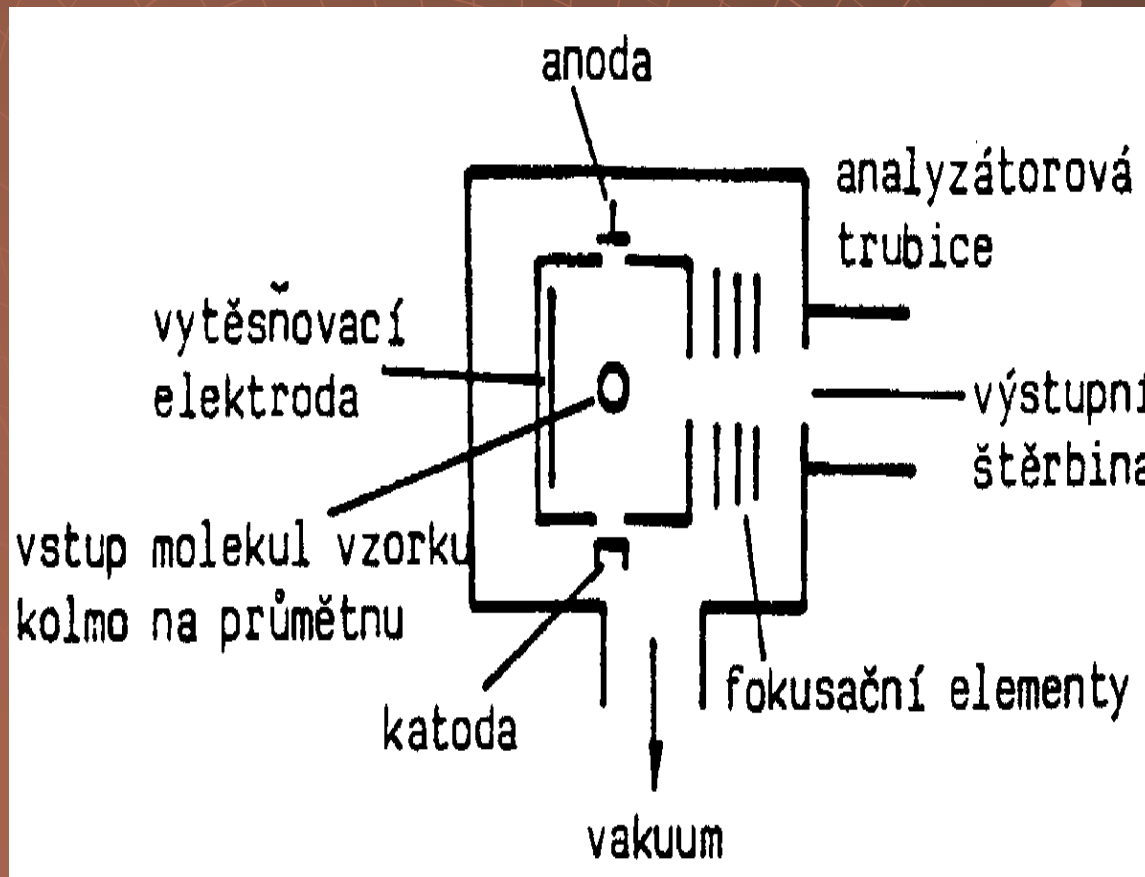
# Volba ionizační techniky



# Ionizační techniky

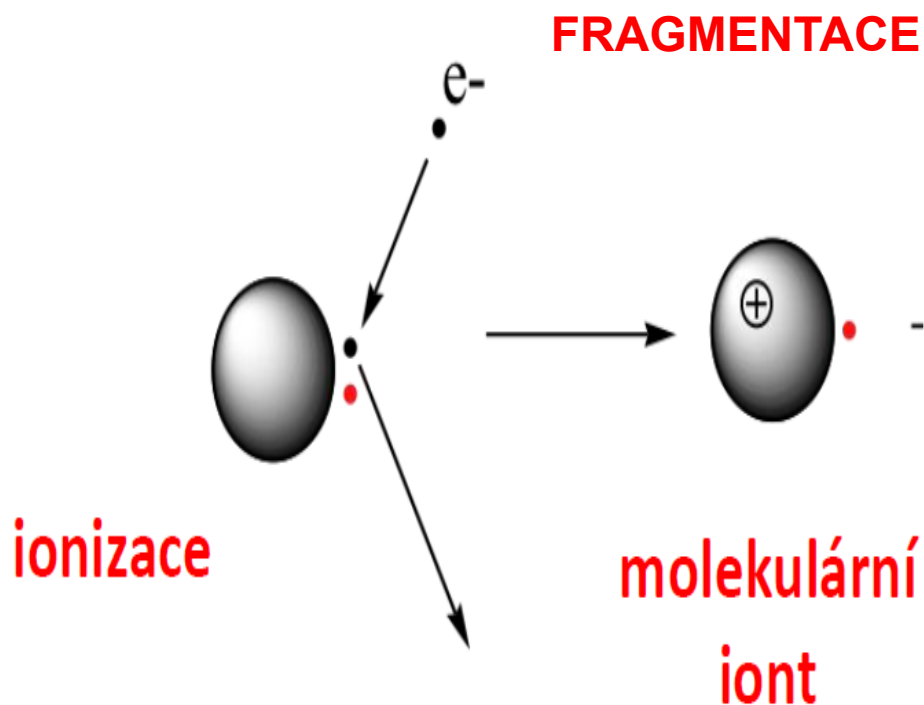
- ◆ Tvrdé ionizační techniky +70 eV
  - EI  $M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^-$
- ◆ Jemné ionizační techniky 10 eV
  - CI  $[M-H]^+$
  - ESI  $[M+H]^+$
  - MALDI  $[M-H]^-$

# Electron impact (EI)

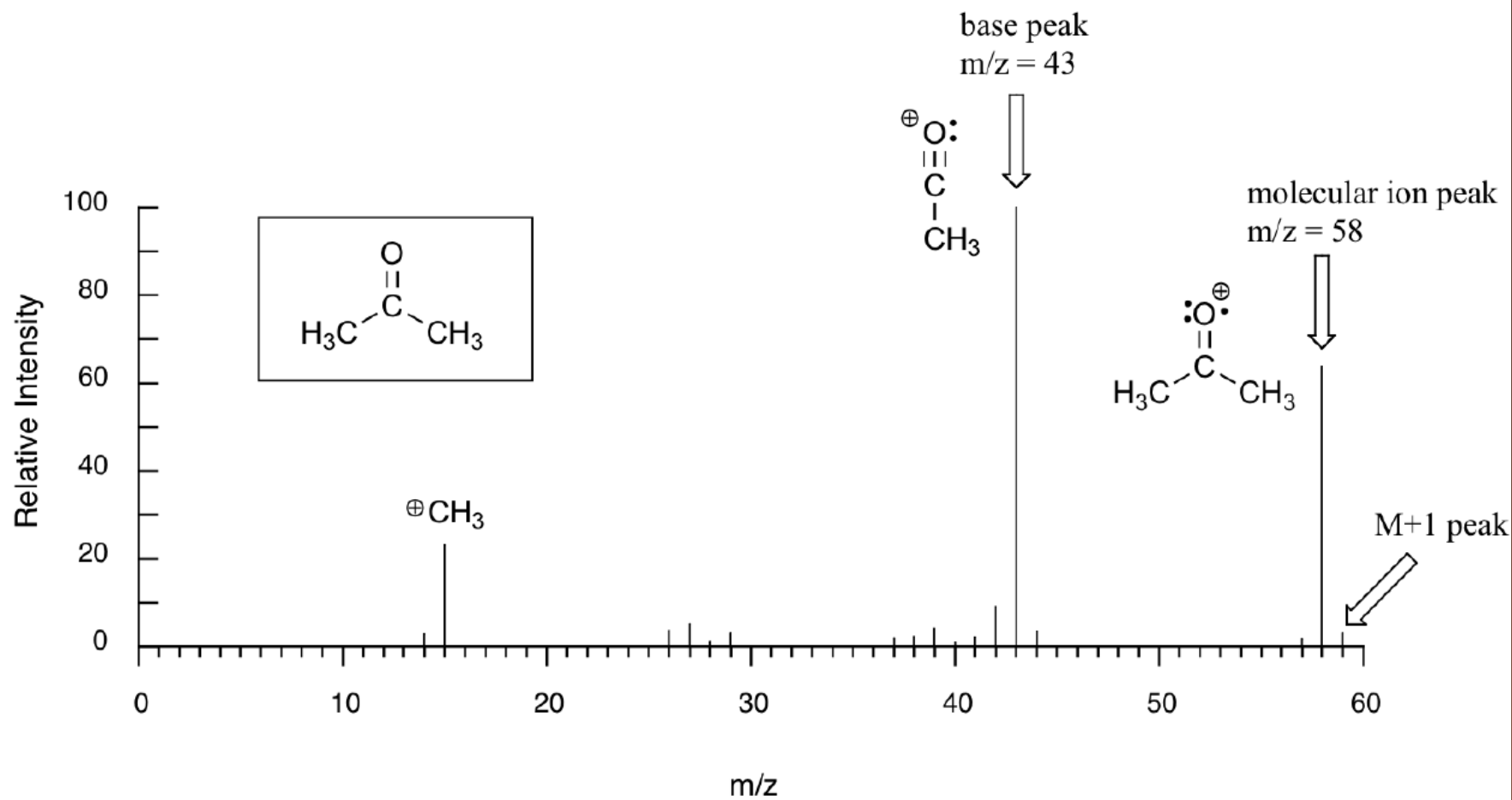




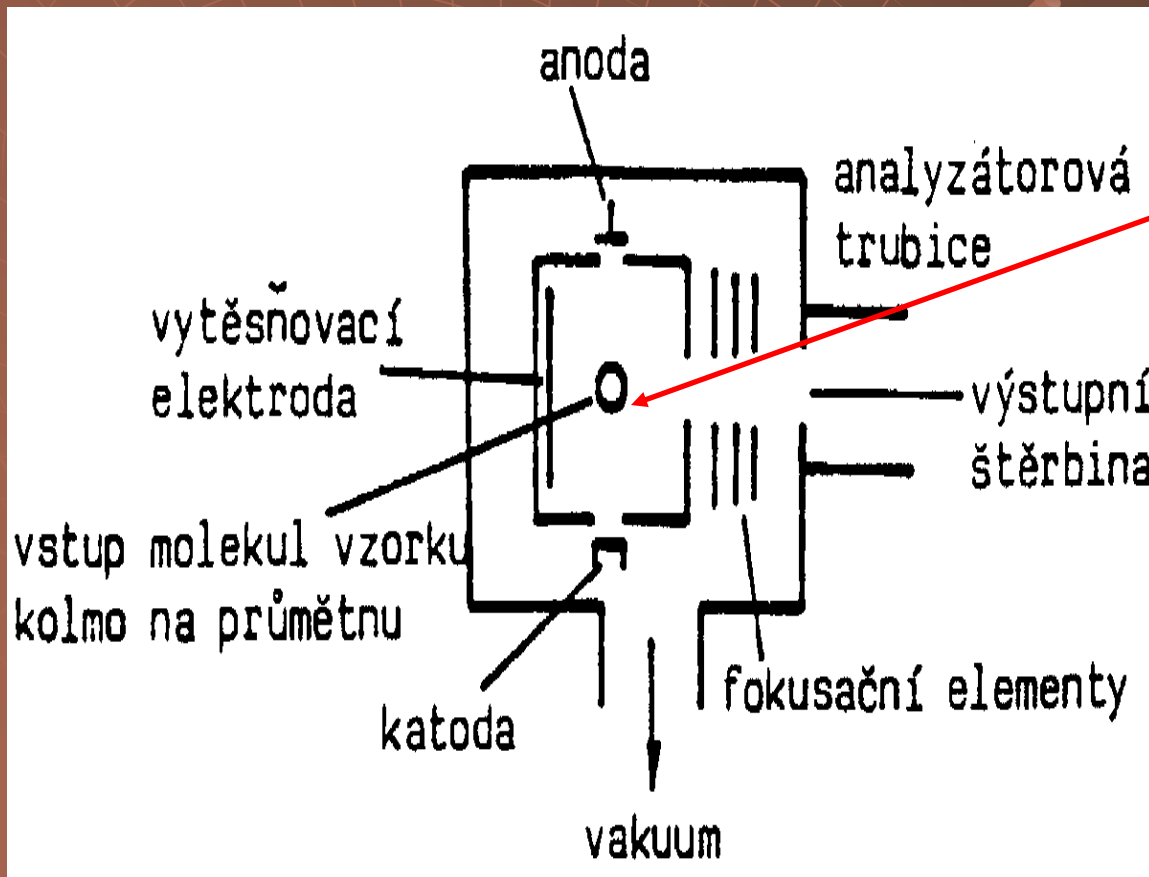
# Electron impact (EI)



# Electron impact (EI)



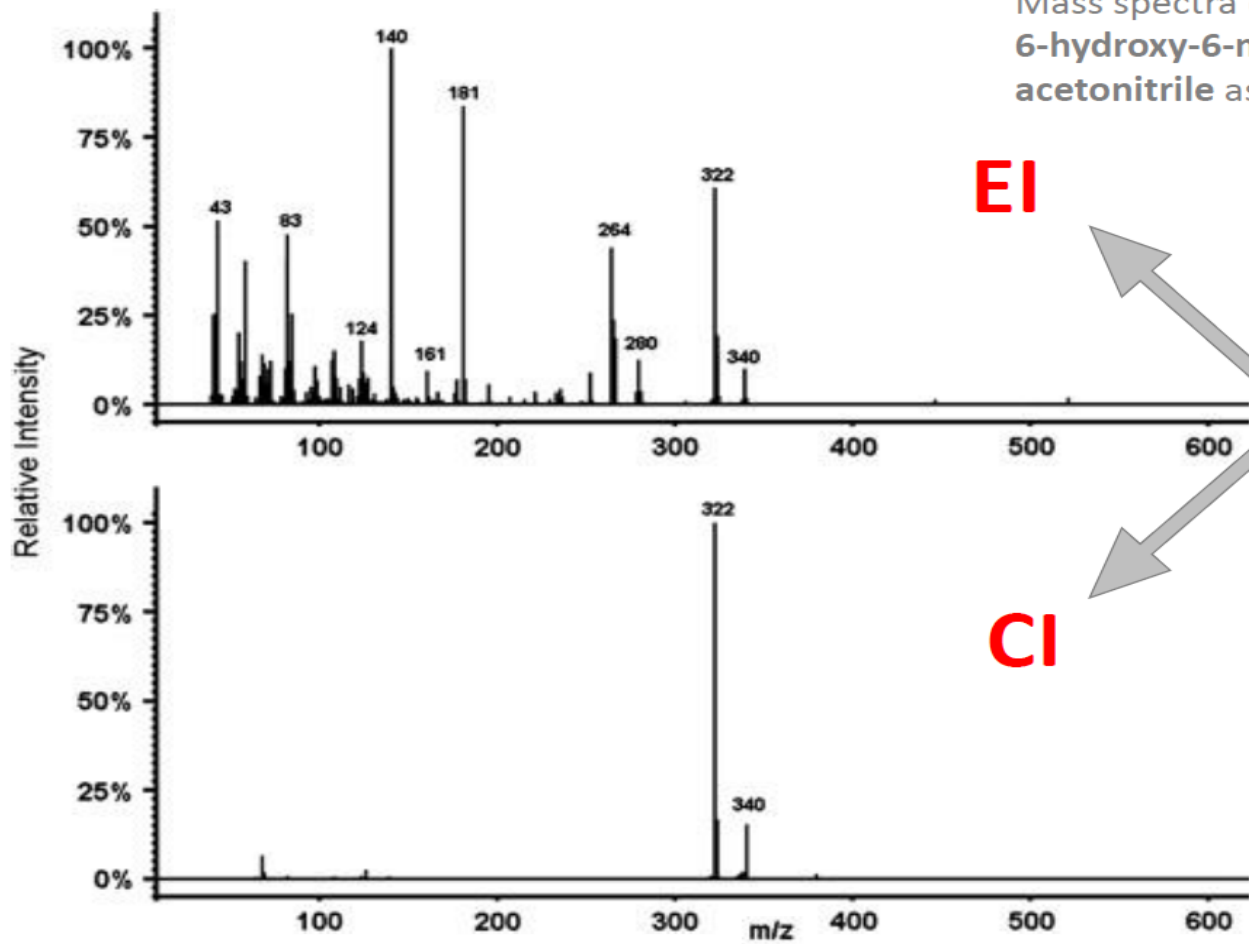
# Chemická ionizace (CI)



**Reakční plyn 100 Pa**  
**Plyn : vzorek 10<sup>4</sup> : 1**  
**methan, isobuthan,**  
**ammoniak**

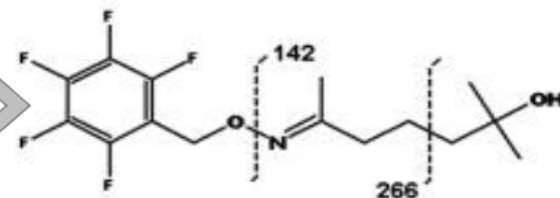
# Porovnání „tvrdosti“ technik EI a CI

Mass spectra of PFBHA-derivatized  
6-hydroxy-6-methyl-2-heptanone using  
acetonitrile as chemical ionization reagent.



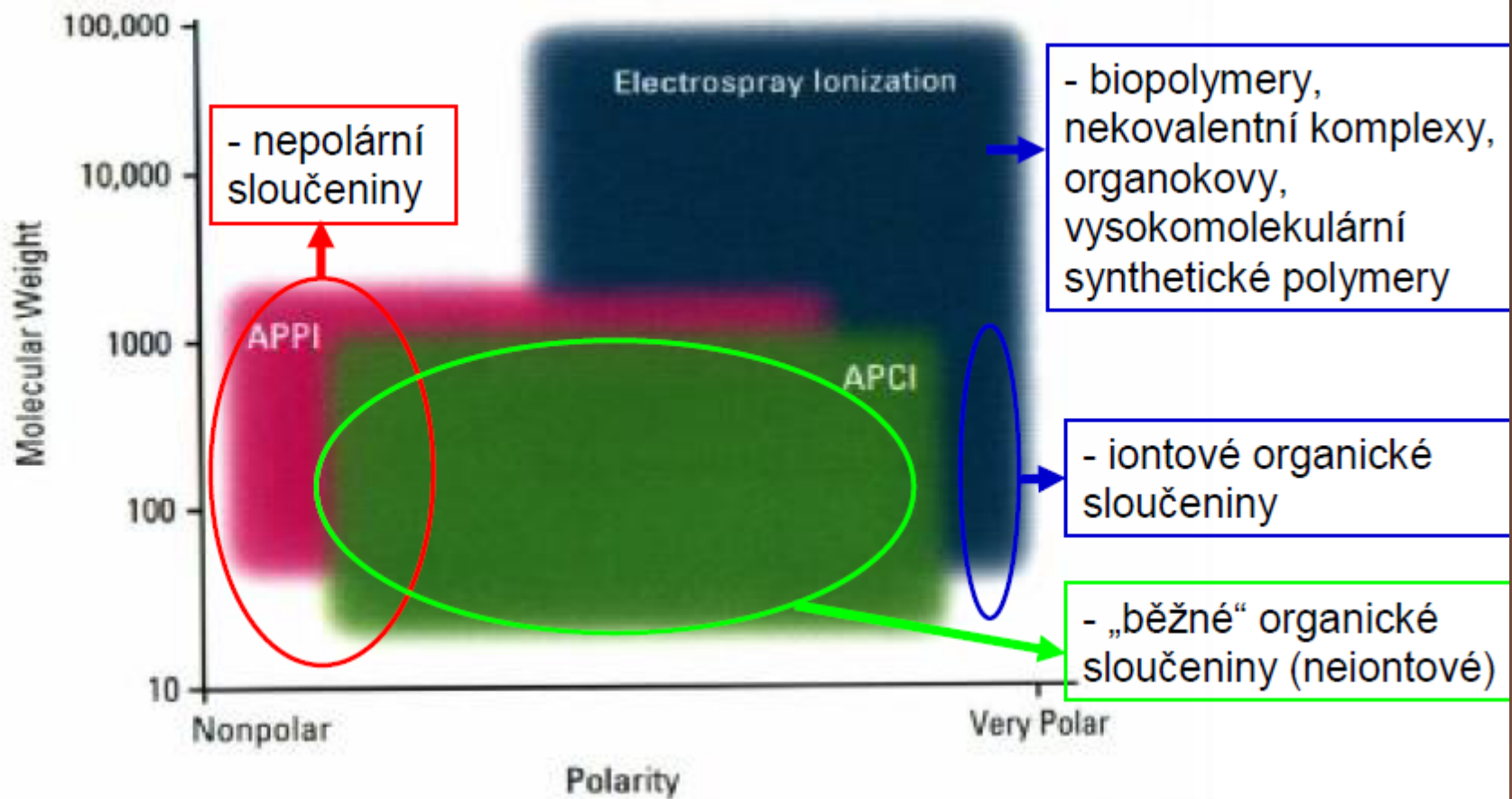
EI

CI

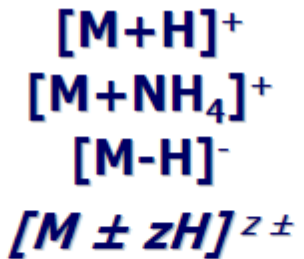
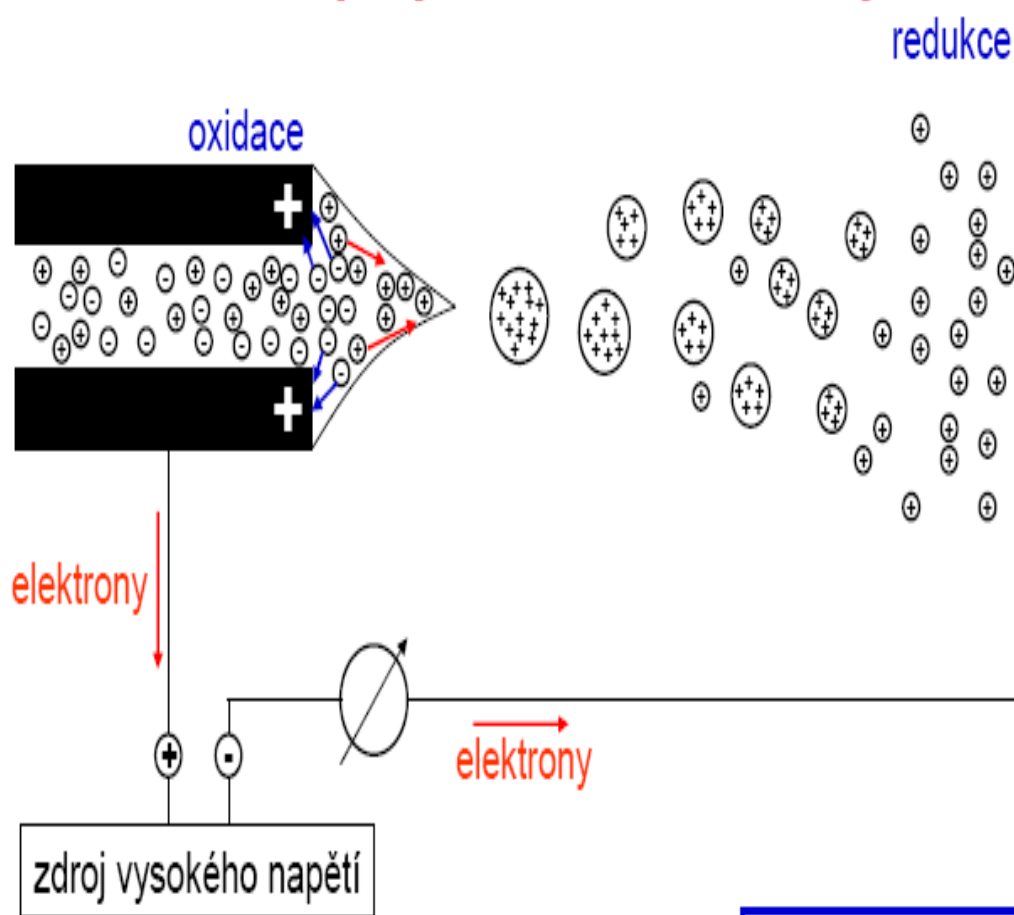




# Ionizace za atmosferického tlaku



# Electrospray (ESI)



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

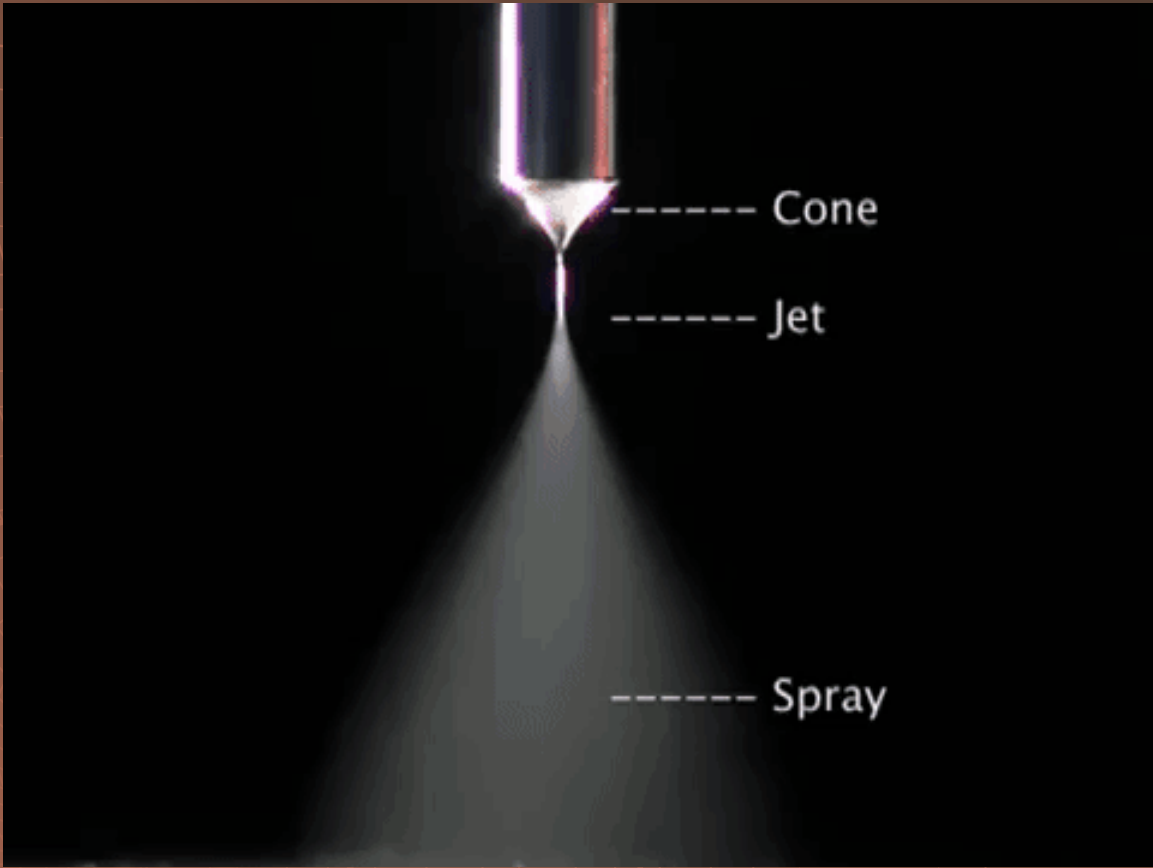
Napětí: 2 - 8 kV

Průtok m. f. 0,001 - 1 ml/min

Ionizace za  
atmosférického tlaku

*Těkavé přísady: octan amonný,  
mravenčí k.*

*Netěkavé přísady: fosfátové  
pufrы*



----- Cone

----- Jet

----- Spray

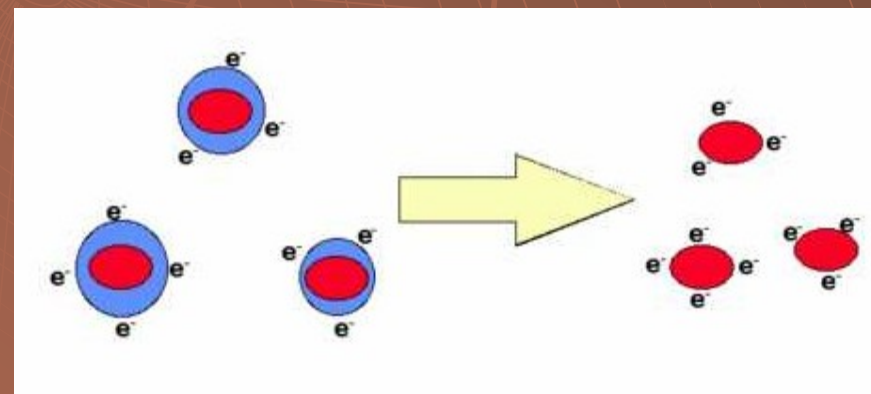
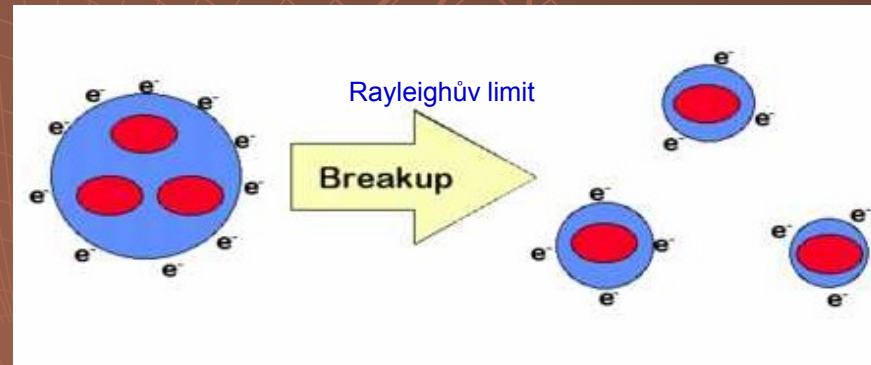
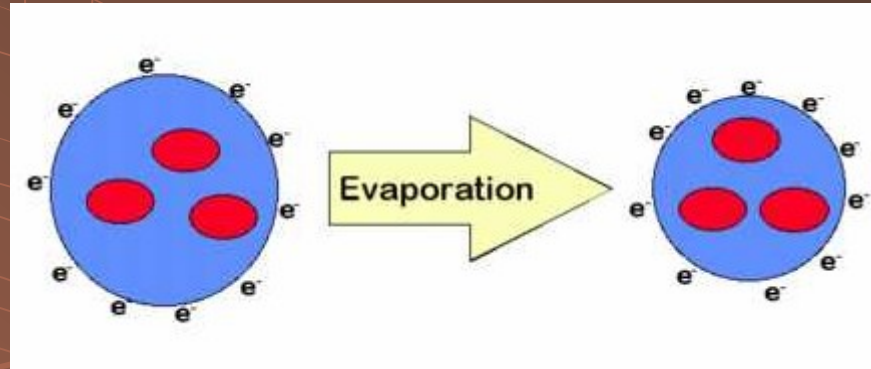


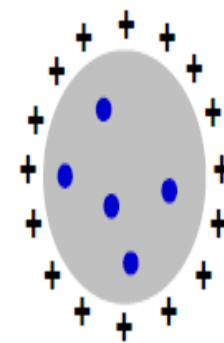
VAKUUM

# Ionizace

RAYLEIGHŮV  
LIMIT

COULOMBICKÁ  
EXPLOZE



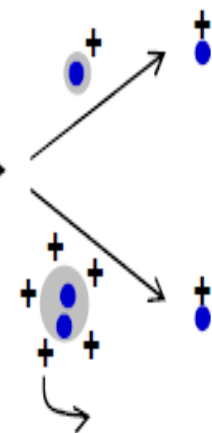
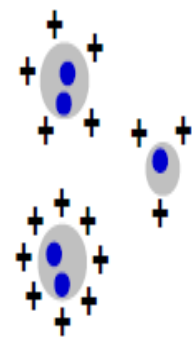


odpařování  
rozpouštědla



dosažení  
Rayleighova limitu

Coulombická  
exploze



zbytkový náboj

vypaření iontů



# ESI - zmlžování

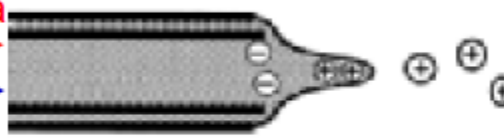
roztok vzorku



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

přídavná kapalina

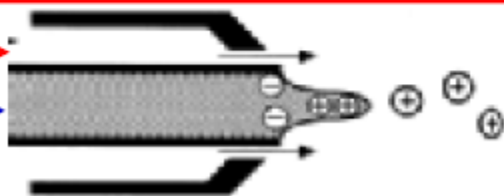
roztok vzorku



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

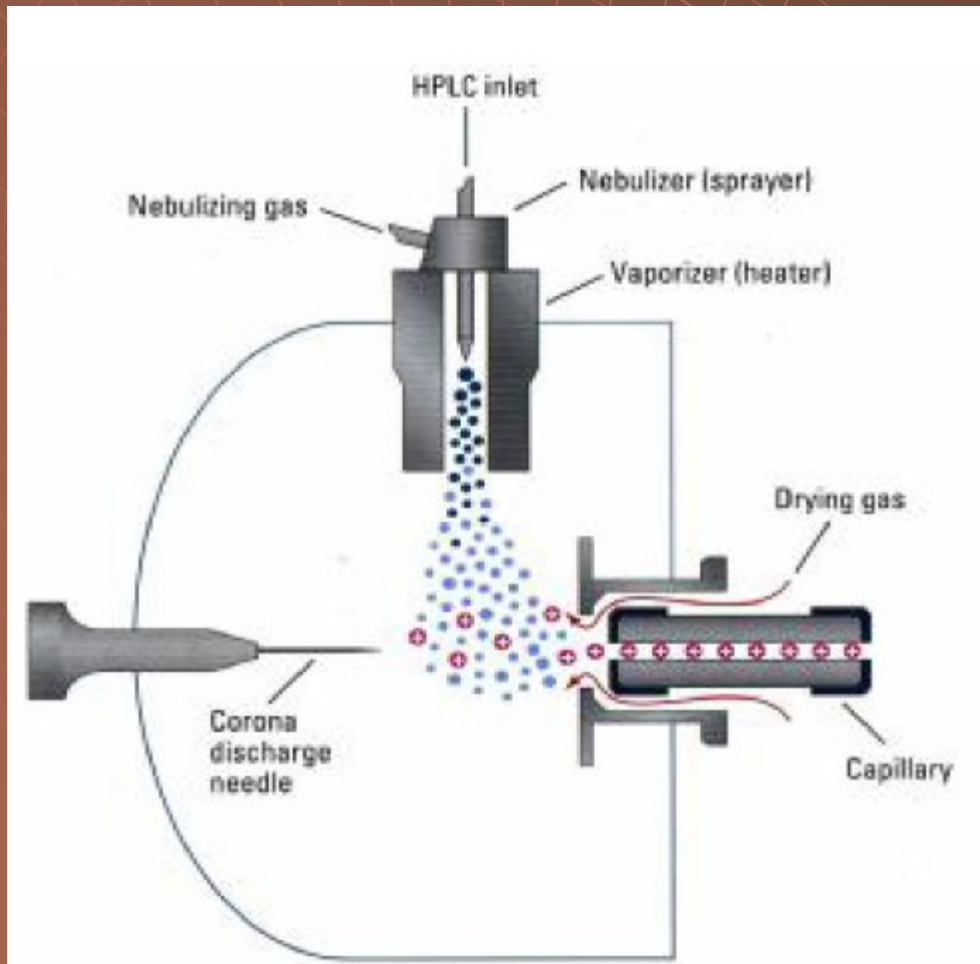
zmlžující plyn

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)



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

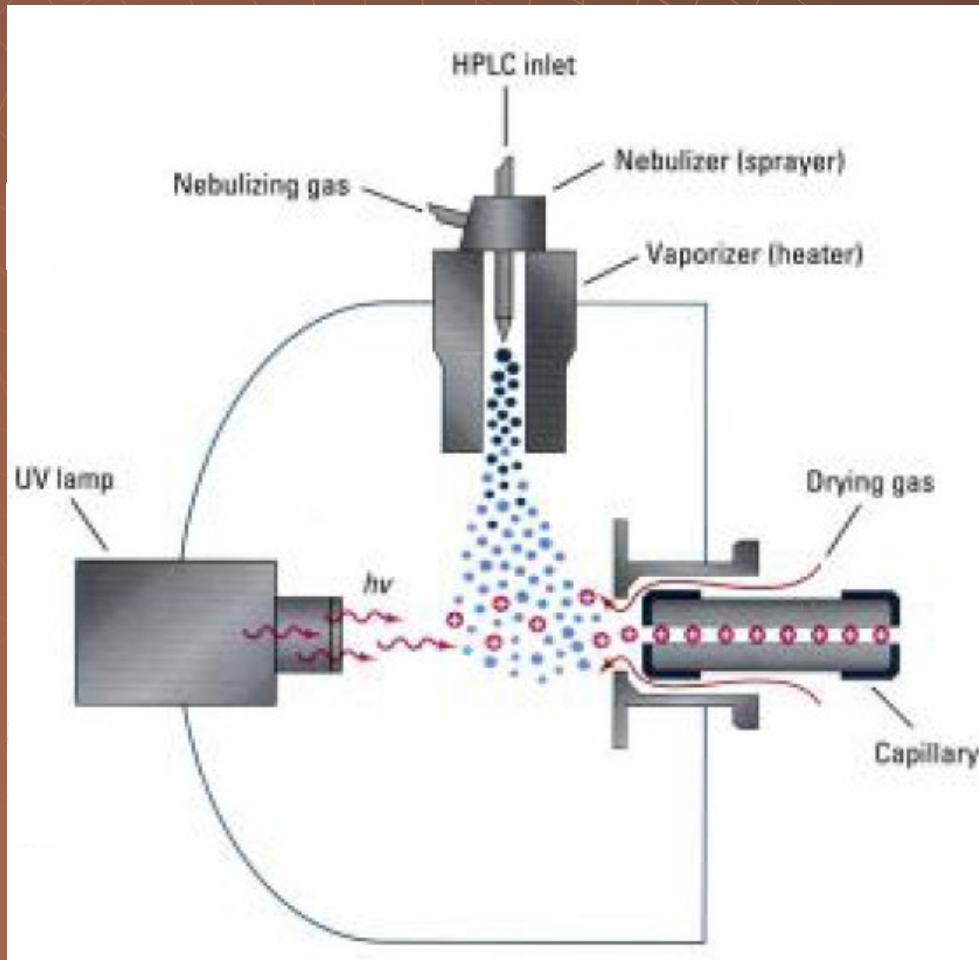
Napětí (výboj. el.): 2 - 8 kV

Průtok m. f. 0,2 - 2 ml/min

Ionizace za  
atmosférického tlaku

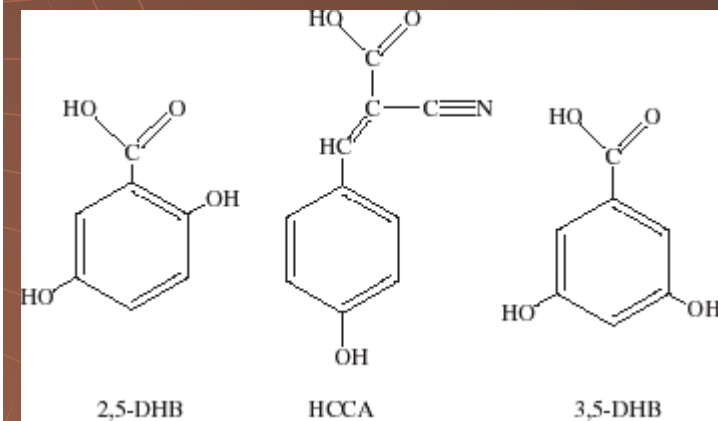
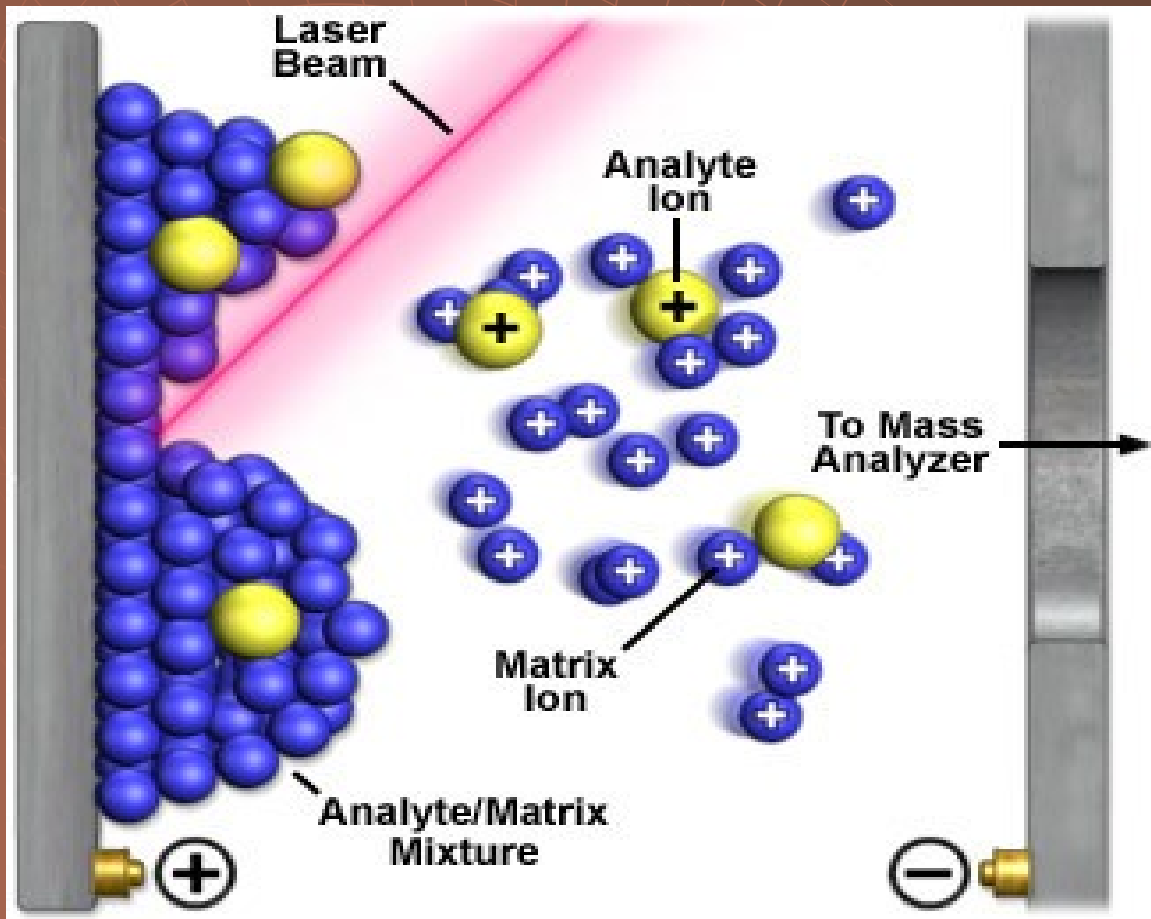
*Těkavé přísady: octan amonný,  
mravenčí k.*  
*Netěkavé přísady: fosfátové  
pufry*

# 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 ml/min**  
**Ionizace za  
atmosférického tlaku**  
*Dopant: toluen, benzen (citlivost  $\uparrow$ )*

# Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI)



# Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI)





# Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI)



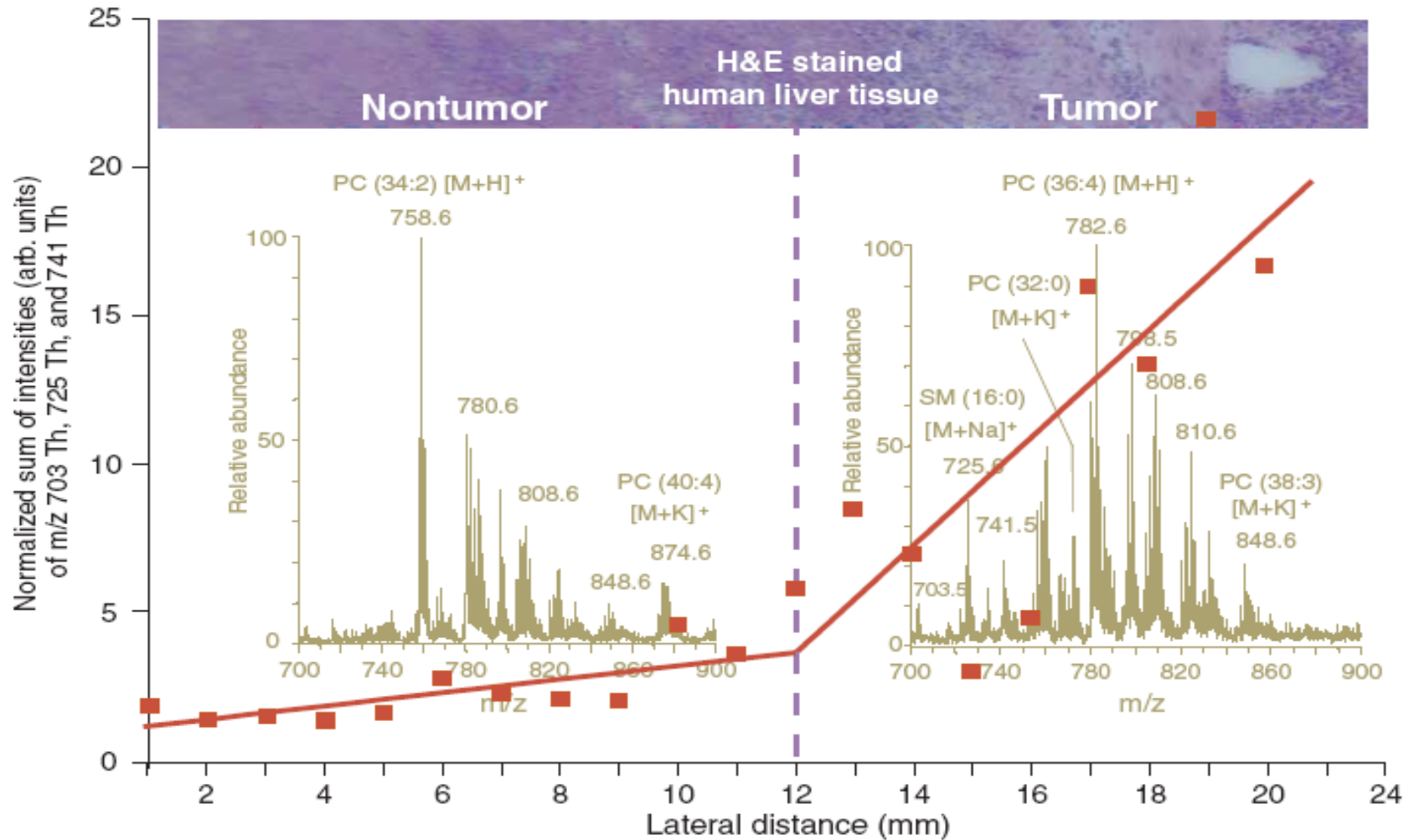
# Ambientní ionizační techniky

- ionizační techniky pracující mimo hmotnostní spektrometr
- ionizace neprobíhá v iontovém zdroji jako třeba u ESI, ale **v otevřeném prostoru**
  - lze analyzovat i objekty neobvyklého tvaru a velikosti
- umožňují přímou analýzu vzorků s **minimální** nebo **žádnou** přípravou vzorku
- jsou použitelné jako zdroj iontů pro většinu hmotnostních analyzátorů
- jsou to **měkké** a velmi **šetrné** ionizační techniky - vnitřní energie vzniklých iontů by měla být srovnatelná nebo nižší než při použití ESI, APCI, APPI
- využívají principy běžných ionizačních technik, ale v otevřeném prostoru
  - ESI, CI, fotoionizace, atd.
- lze využít i pro **hmotnostně spektrometrické zobrazování** - nižší prostorové rozlišení v porovnání se SIMS a MALDI

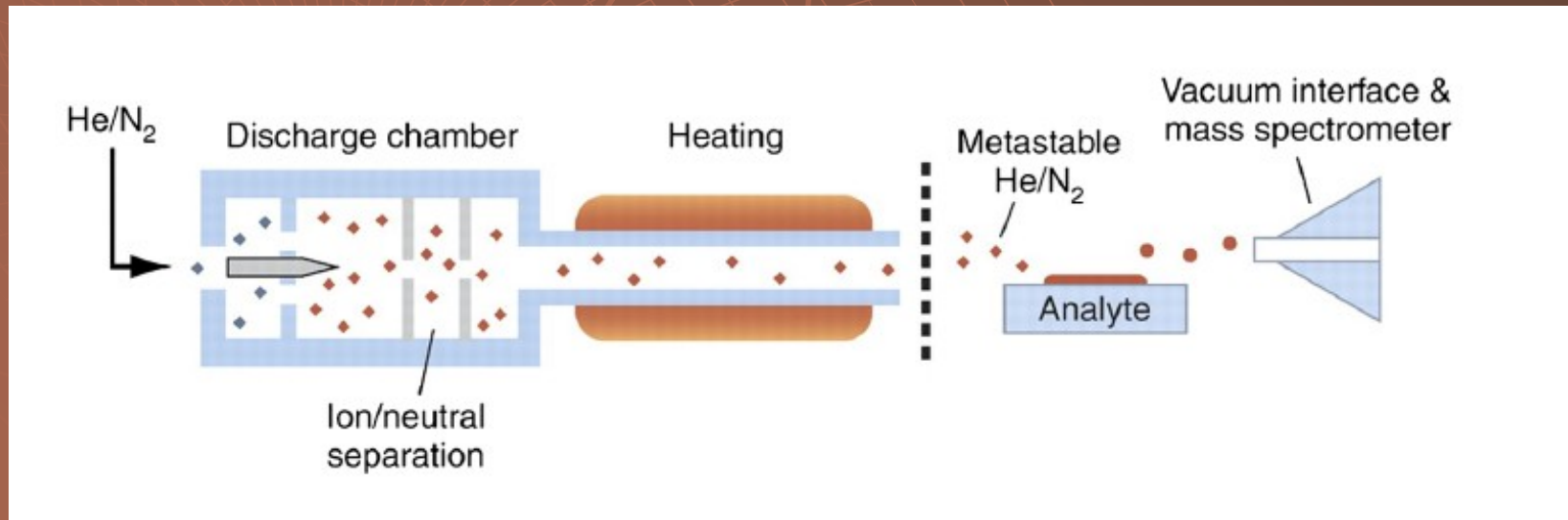
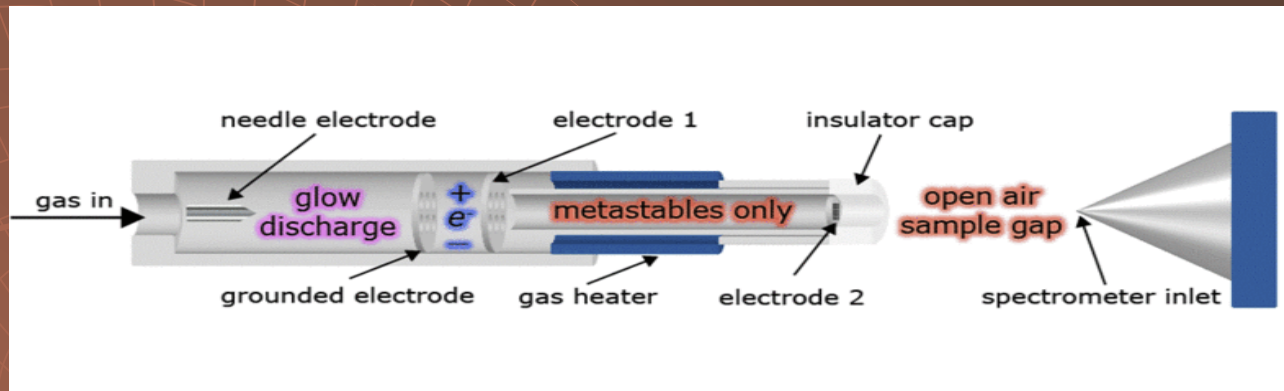
# Desorpční ionizace elektrosprayem (DESI)



# Desorpční ionizace elektrosprayem (DESI)



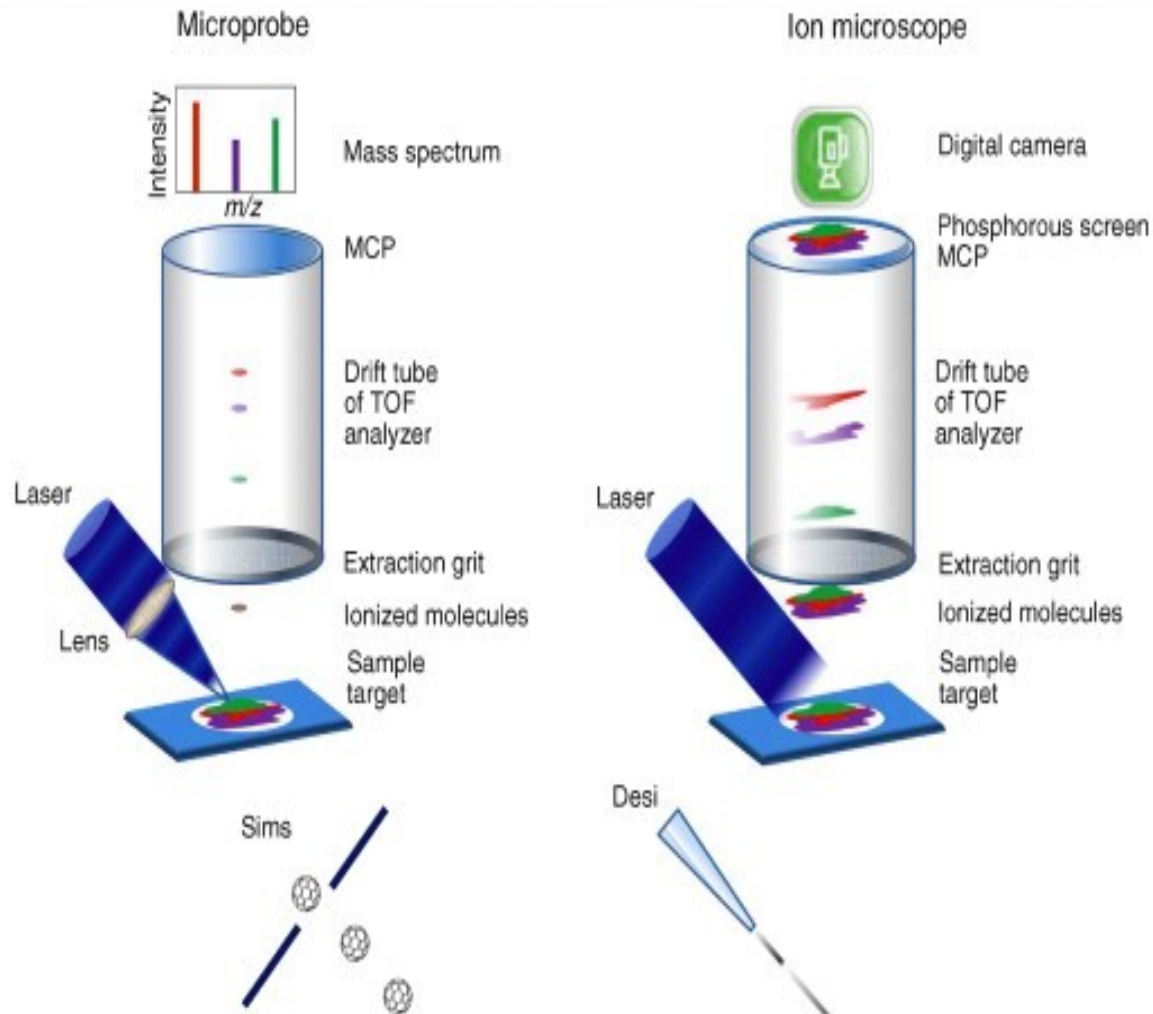
# Přímá ionizace v reálném čase (DART)



# Přímá ionizace v reálném čase (DART)



# Zobrazovací MS (IMS)

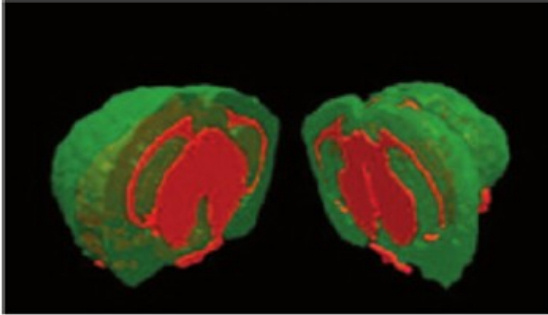


# Desorpční ionizace elektrosprayem (DESI)

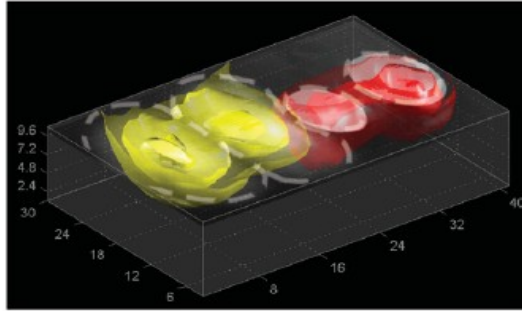




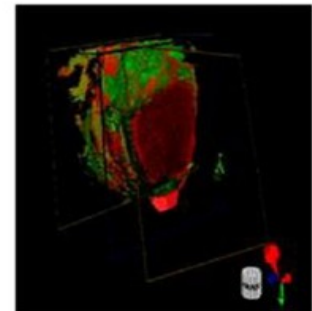
# 3D IMS



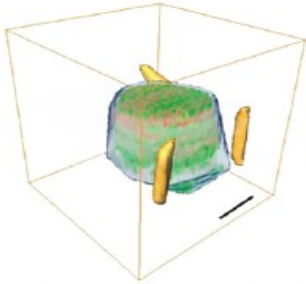
a) Eberlin et al. 2010



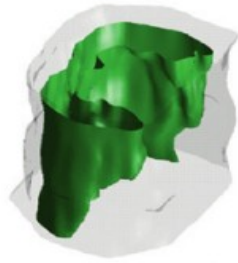
b) Watrous et al. 2013



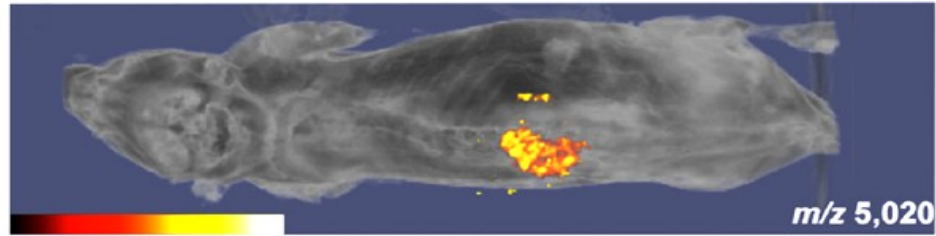
c) Fornai et al 2012



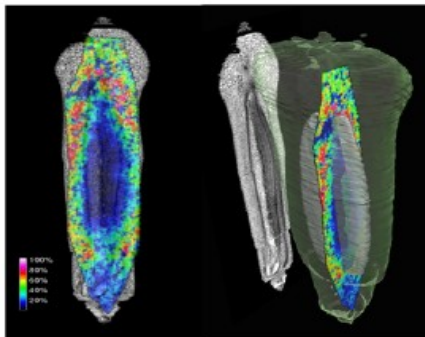
d) Chugthai et al. 2012



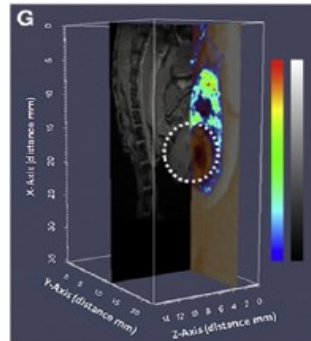
e) Jones et al. 2012



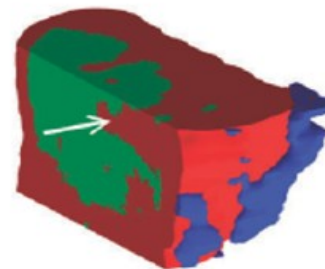
f) Attia et al. 2012



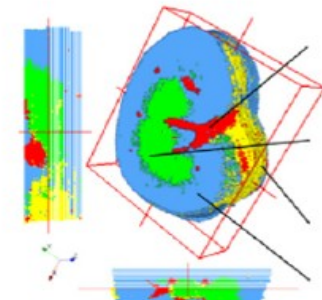
g) Bollenbeck et al. 2009



h) Seeley et al. 2014



i) Reindl et al. 2011



j) Oetjen et al. 2013



# Hmotnostní analyzátořy

# Hmotnostní analyzátořy

- hmotnostní analyzátoř slouží k dělení iontů v plynné fázi za vakua podle poměru jejich hmotnosti a náboje ( $m/z$ )
- analyzátoř je umístěn za iontovým zdrojem (tzn. molekuly již byly převedeny na ionty) a před detektorem (před detekcí musíme ionty rozdělit podle  $m/z$ )
- dělení iontů v analyzátořu probíhá za vysokého vakua (ca.  $10^{-3}$ - $10^{-11}$  Pa, podle typu analyzátořu)
- dělení iontů podle  $m/z$  lze dosáhnout na základě různých fyzikálních principů:
  - 1/ zakřivení dráhy letu iontů v magnetickém nebo elektrickém poli (magnetický nebo elektrostatický analyzátoř)
  - 2/ různá stabilita oscilací iontů v dvoj- nebo trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí (kvadrupól nebo iontová past)
  - 3/ různá doba rychlosti letu iontů (analyzátoř doby letu – TOF)
  - 4/ různá frekvence harmonických oscilací v Orbitrapu
  - 5/ různá absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli (iontová cyklotronová resonance – ICR)

# Hmotnostní analyzátořy

## Podle způsoby dělení iontů:

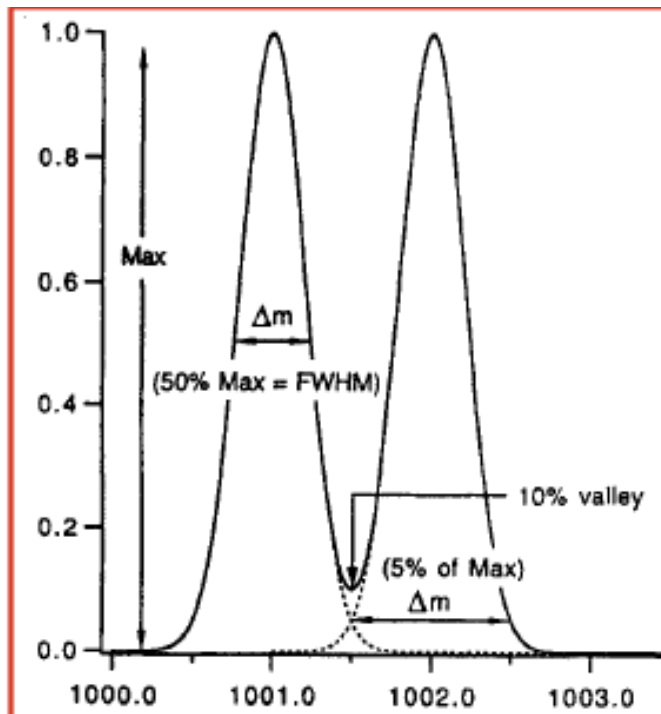
- **skenující** - postupně mění skenovanou veličinu ( $U$ ,  $V$ ,  $B$ ) a propouští ionty o určité  $m/z$  (kvadrupólový analyzátoř, sektorový magnetický analyzátoř)
- **iontové pasti** - zadržuje ionty pomocí napětí na elektrodách a následně je analyzuje (iontová past, orbitrap, FT-ICR)
- **průletový** - měří čas iontů potřebný pro překonání určité vzdálenosti (TOF)
- analyzátořy **pohyblivosti iontů** - dělení iontů podle jejich velikosti a tvaru

## Základní parametry hmotnostních analyzátořů:

- **rozlišovací schopnost (rozlišení)** – schopnost analyzátořu poskytnout rozlišené signály pro ionty s podobnou  $m/z$
- **správnost určení  $m/z$**  - míra schopnosti analyzátořu určit správnou hodnotu  $m/z$
- **hmotnostní rozsah** – rozsah  $m/z$  hodnot, přes který analyzátoř může zaznamenat spektra
- **dynamický rozsah** - rozmezí koncentrací, v nichž je odezva (lineárně) závislá na koncentraci
- **rychlost** – rychlost záznamu spekter

# Rozlišení – Resolving Power

A/ definice založená na šířce jednoho píku (univerzální) - poměr hmotnosti iontu  $m$  a šířky tohoto iontu  $\Delta m$  v polovině jeho výšky (Full Width at Half Maximum, FWHM)

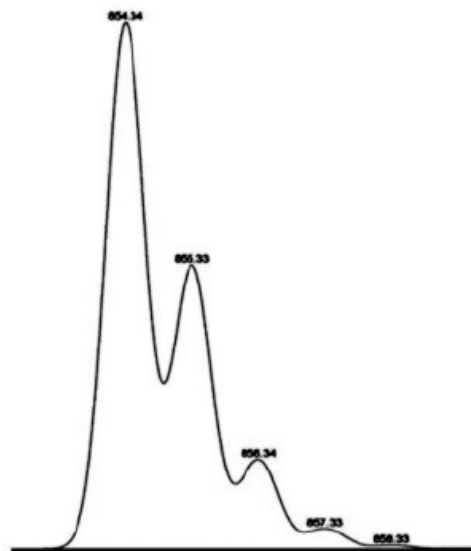


Rozlišovací schopnost  
(Resolving power, RP):

$$A/ \text{ RP} = m / \Delta m$$

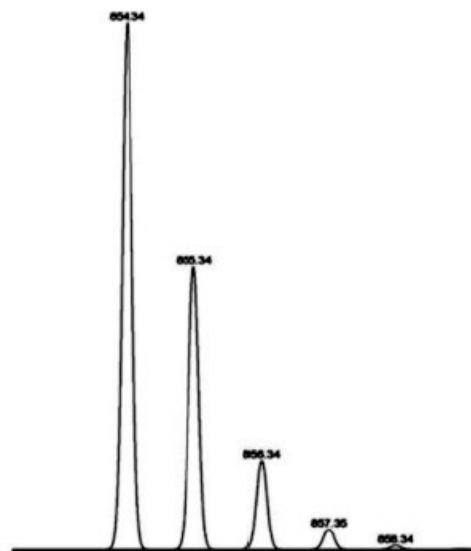
# Rozlišení – Resolving Power

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



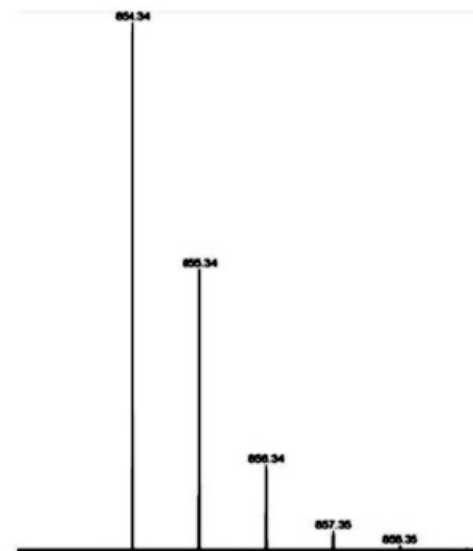
1 250

Nízké rozlišení



5 000

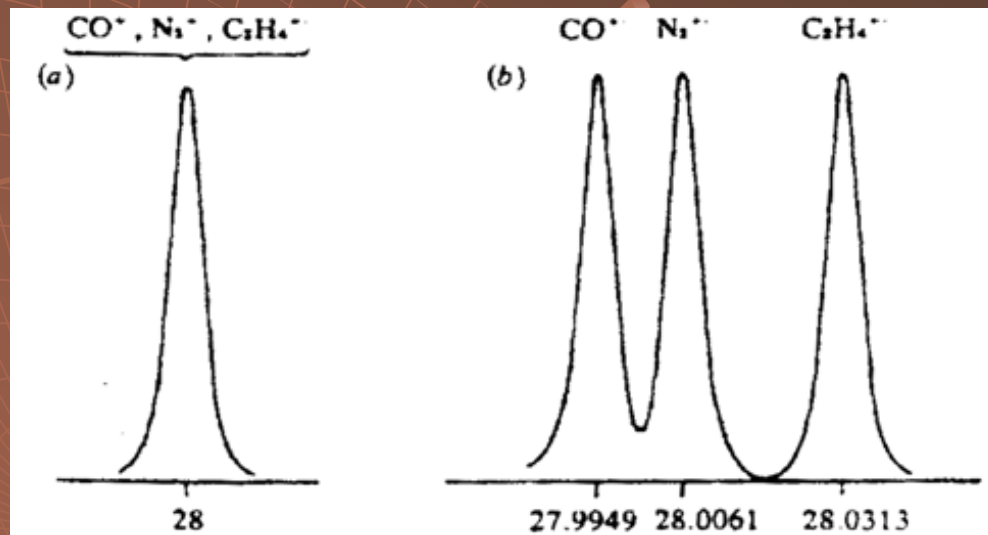
↔



100 000

vysoké rozlišení

# Rozlišení – Resolving Power



# Přesnost určení m/z

## Mass Accuracy

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

experimentálně naměřená hodnota m/z = 300.0463, teoreticky vypočtená hodnota m/z = 300.0473

Správnost určení m/z = -3.3 ppm (včetně znaménka!)

300.0473 dle tabulek (nebo lépe s využitím softwaru) nejlépe odpovídá elementární složení  $C_{12}H_{17}N_2O_2Br$ , podle izotopů M:M+2 potvrzena přítomnost bromu



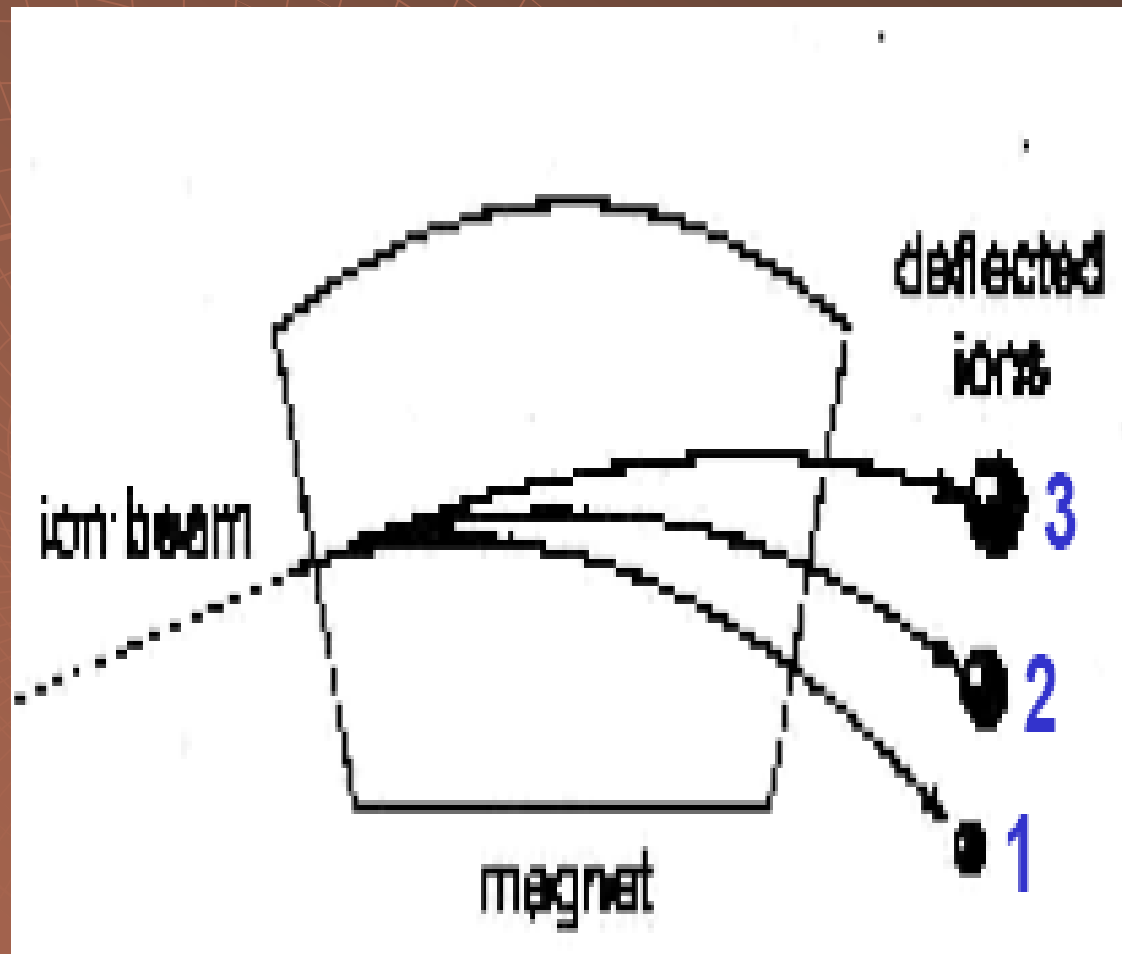
# Magnetický analyzátor

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  $r^2$ ).

Lorezova síla versus Odstředivá síla

# Magnetický analyzátor



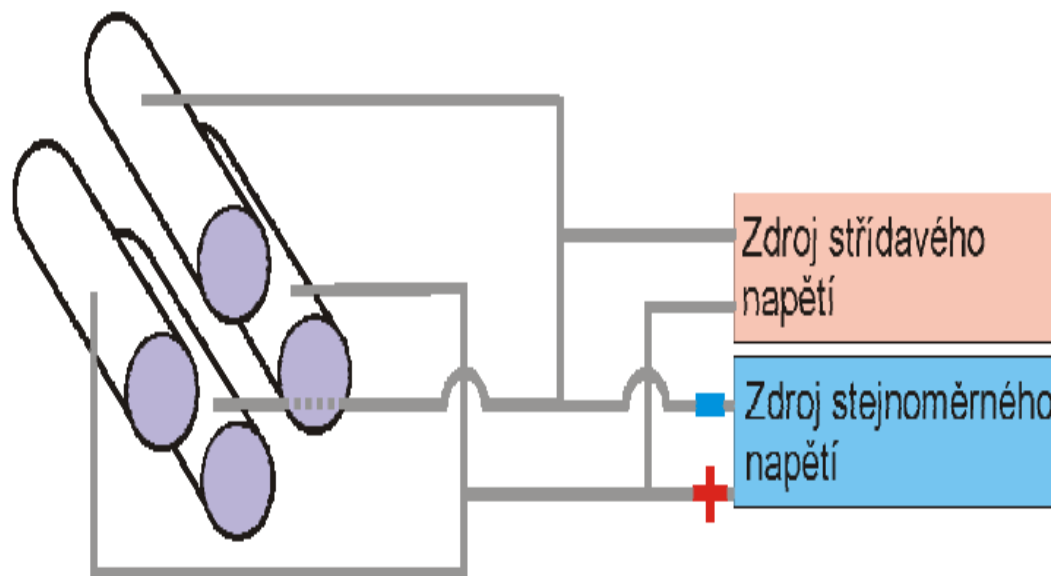
# Magnetický analyzátor



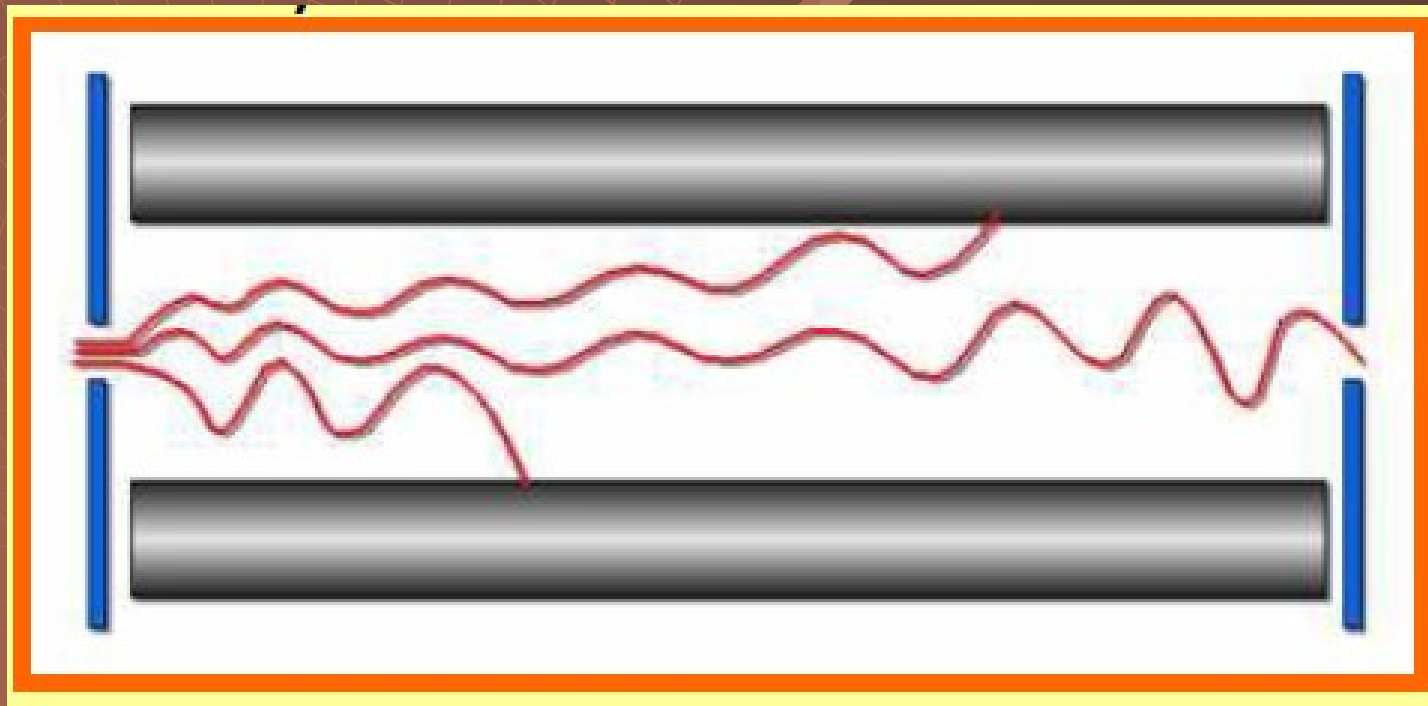
# Kvadrupol a iontová past

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

# Kvadrupol



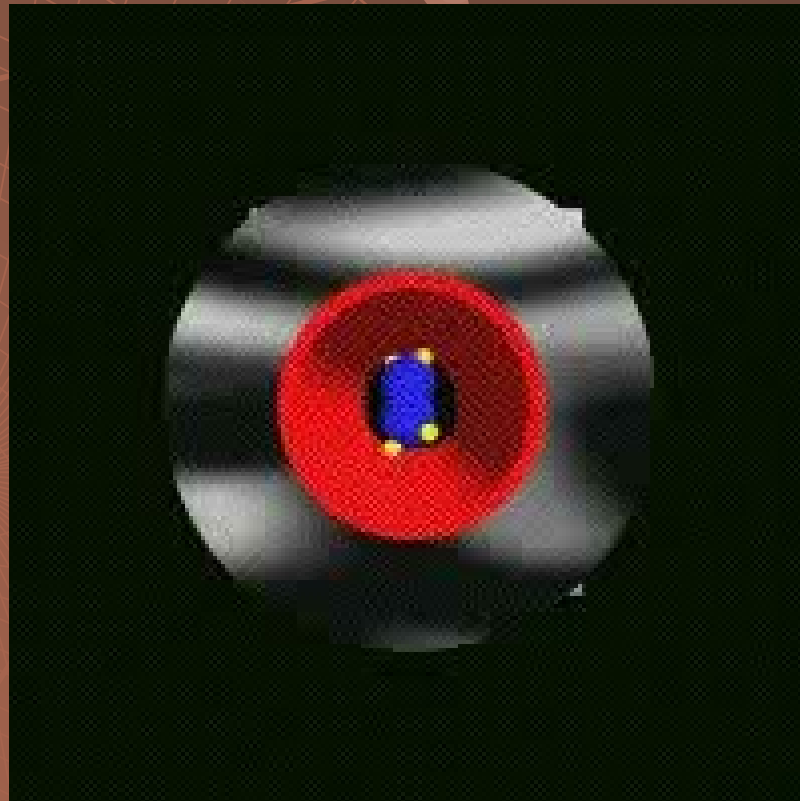
# Kvadrupol



# 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



**Hexapole, 9.5 mm Quadrupoles and 19 mm Quadrupoles**

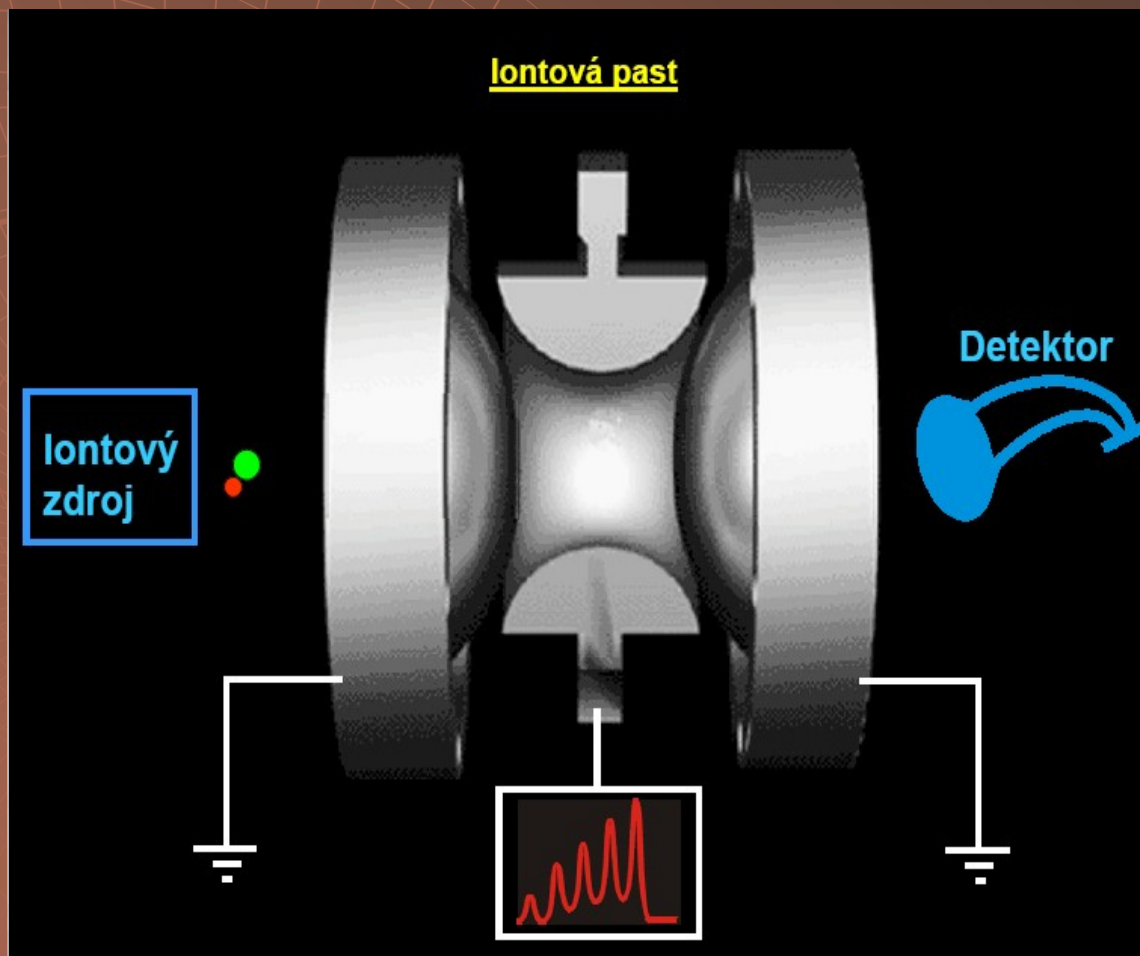
# Kvadrupol



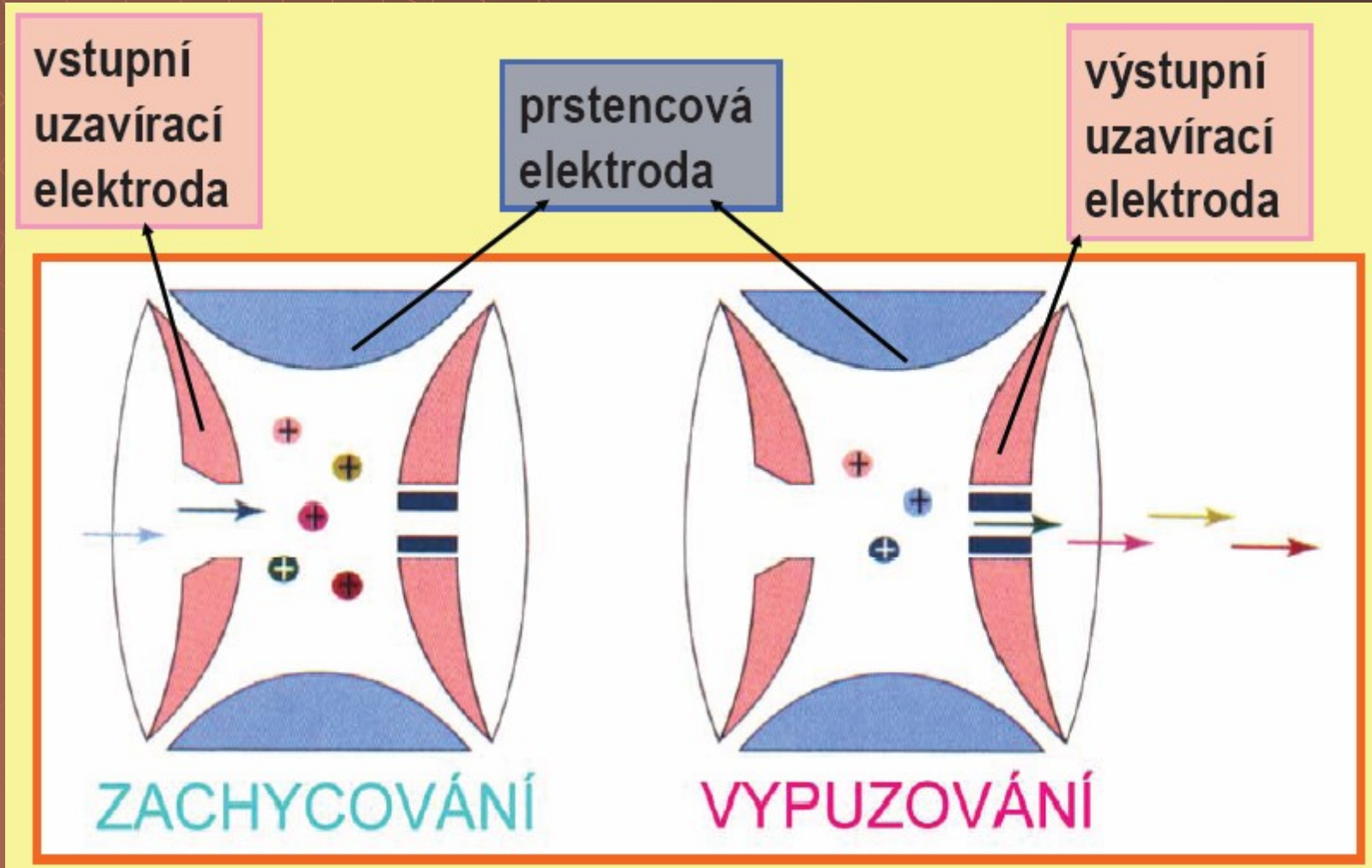
# Iontová past

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

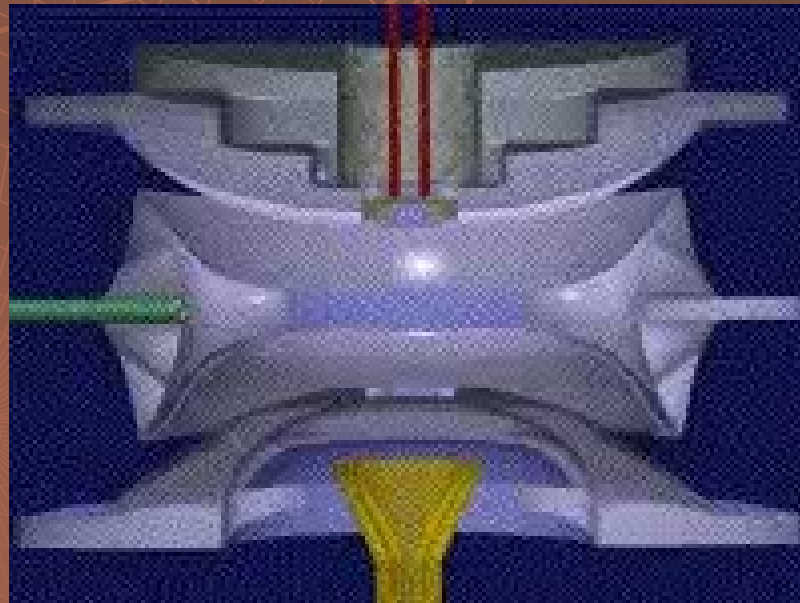
# Iontová past (Ion Trap)



# Ion Trap



# Ion Trap



# Ion Trap



# Ion Trap



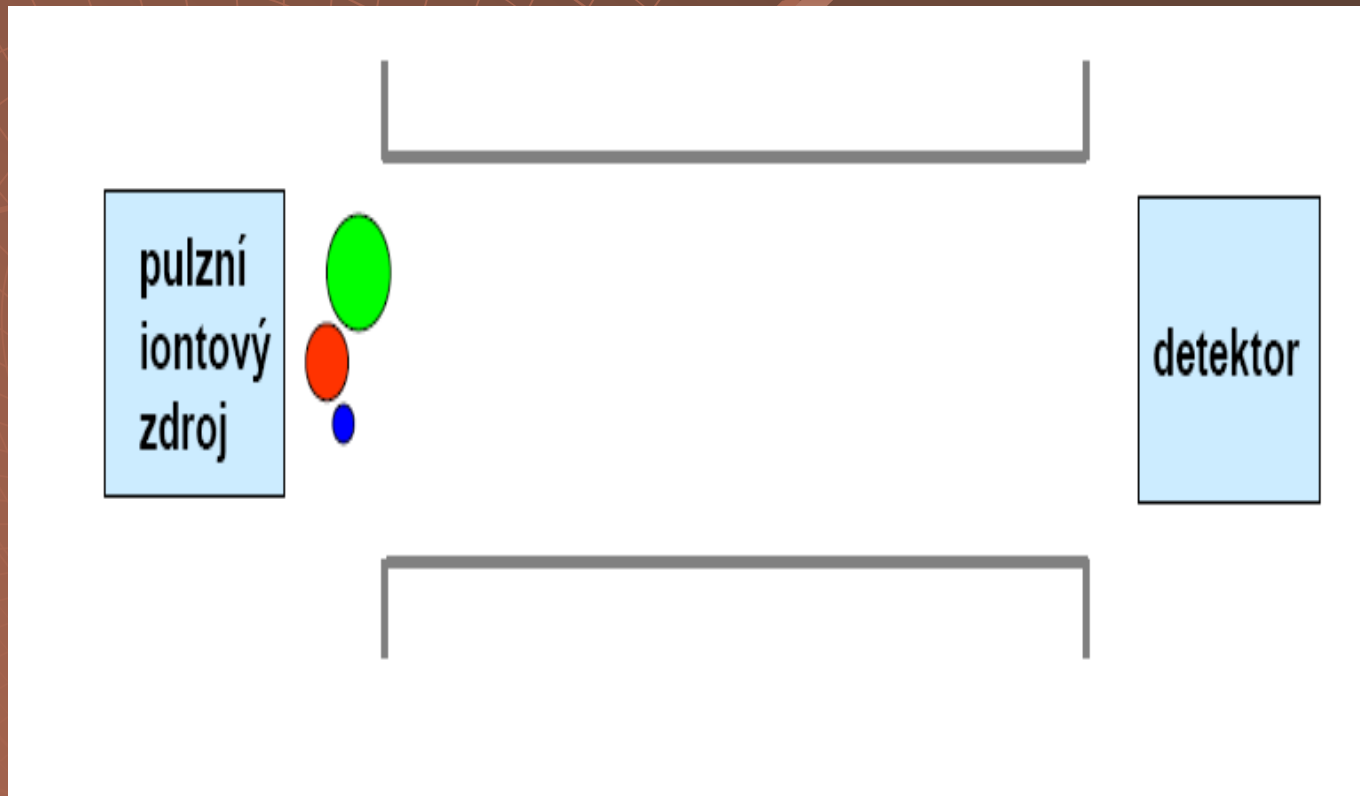


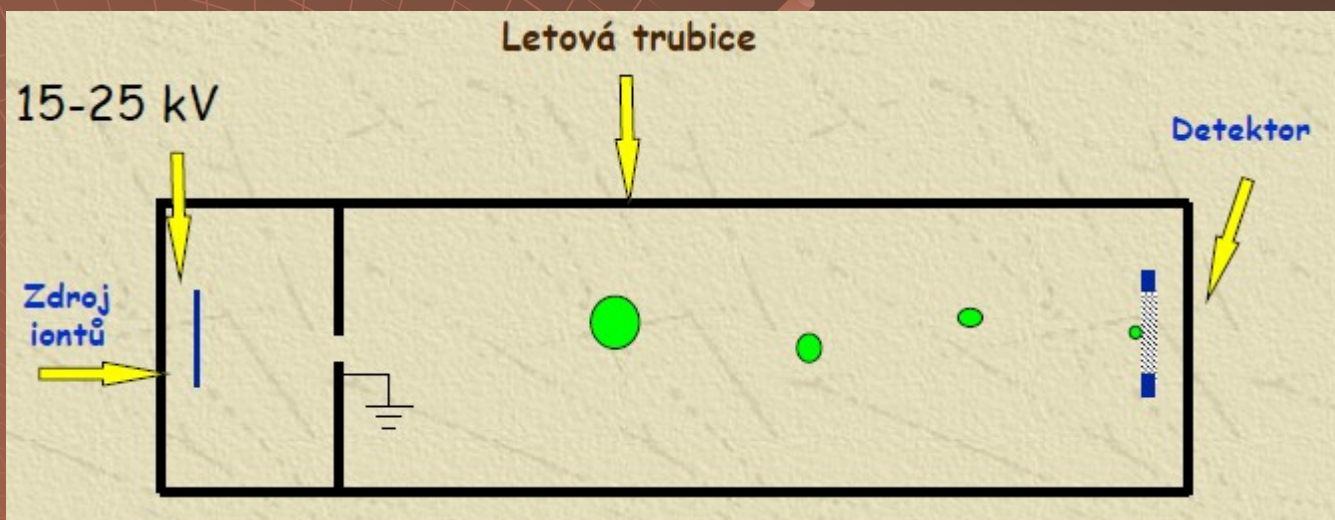
# Analyzátor doby letu (TOF)

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)

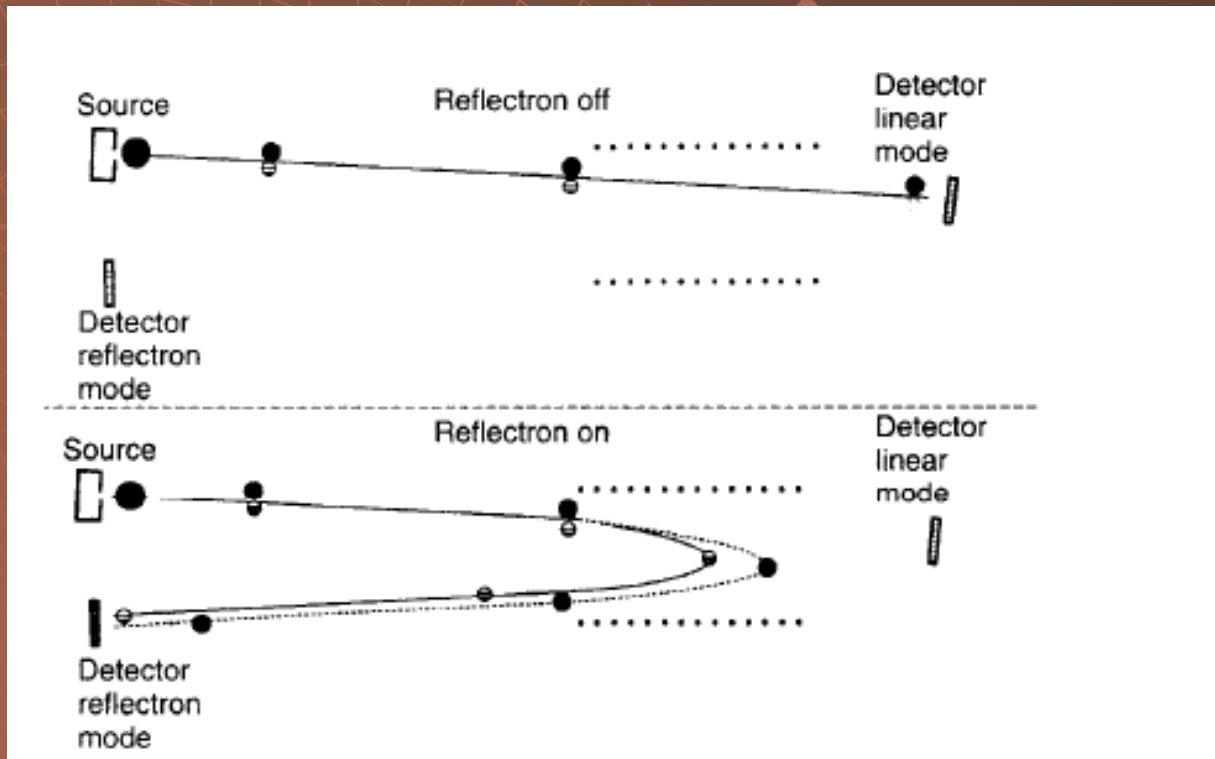




# Analyzátor doby letu (TOF)



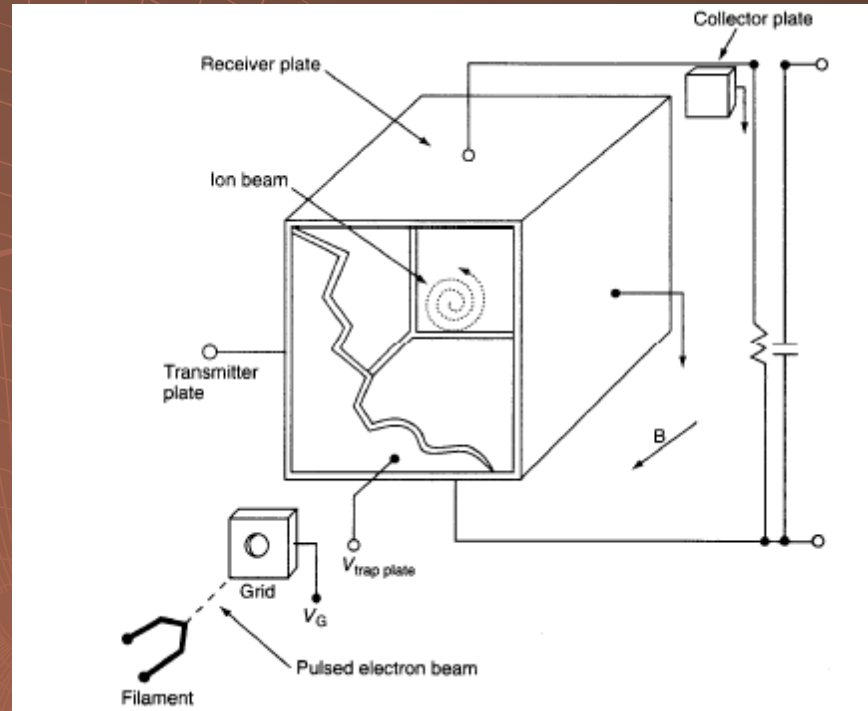
# Analyzátor doby letu (TOF)



# Iontová cyklotronová resonance (ICR)

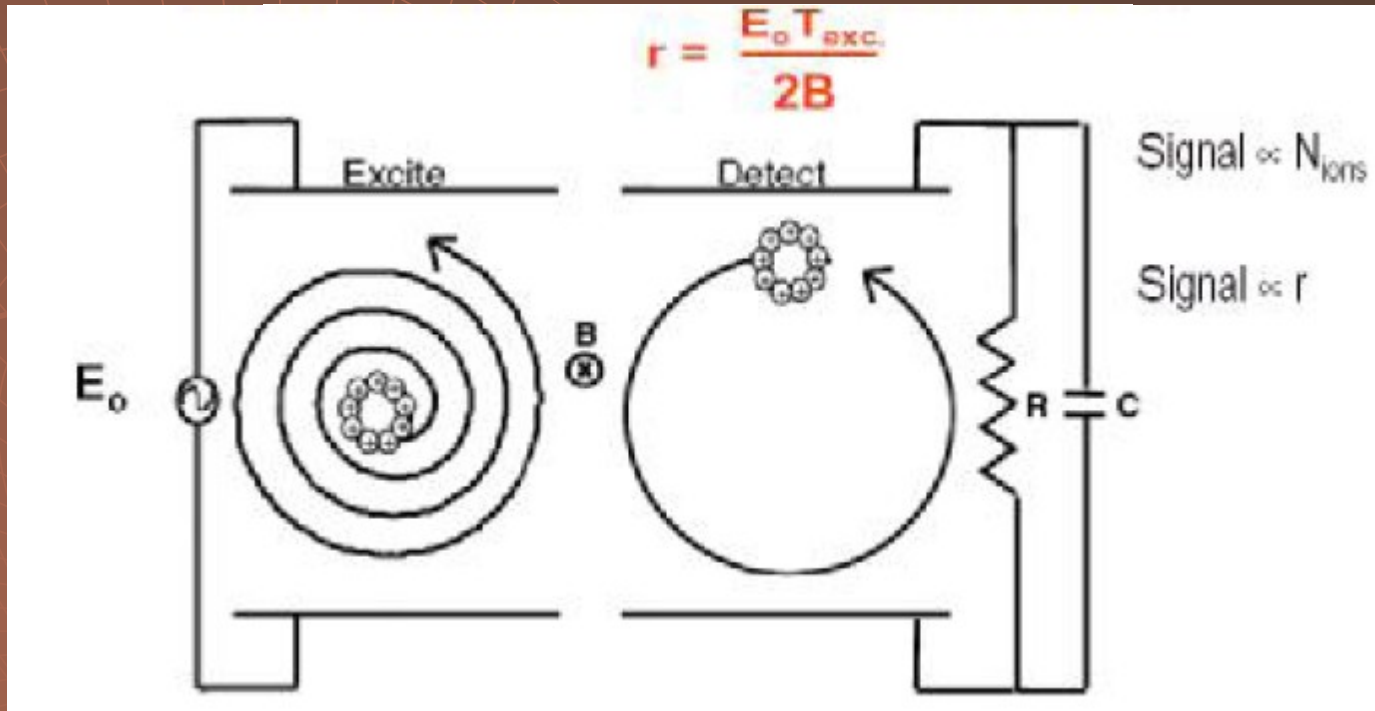
Různé absorpce energie při  
cykloidálním pohybu iontů v  
kombinovaném magnetickém a  
elektrickém poli.

# Iontová cyklotronová rezonance (ICR)



- $T \sim \text{abs. nula}$
- Vysoké vakuum
- Silné magnetické pole

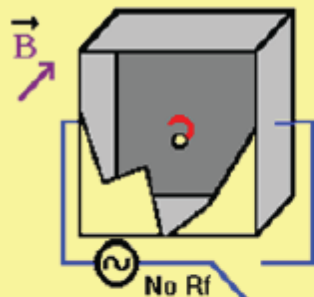
# Iontová cyklotronová resonance (ICR)





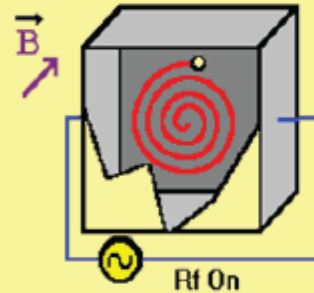
# Iontová cyklotronová rezonance (ICR)

## excitace

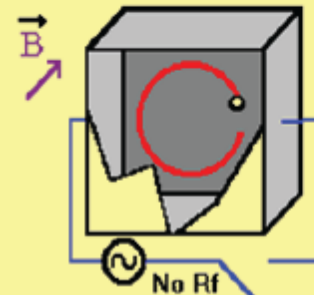


1) Ions before excitation. They are in their natural cyclotron radius within the magnetic field.

0,01-0,1 mm



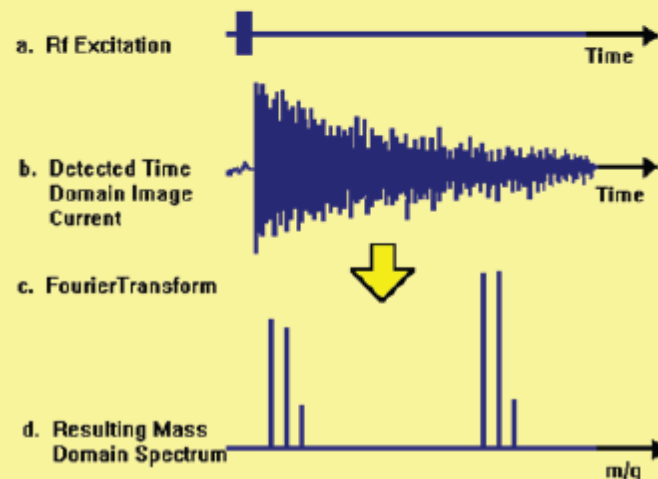
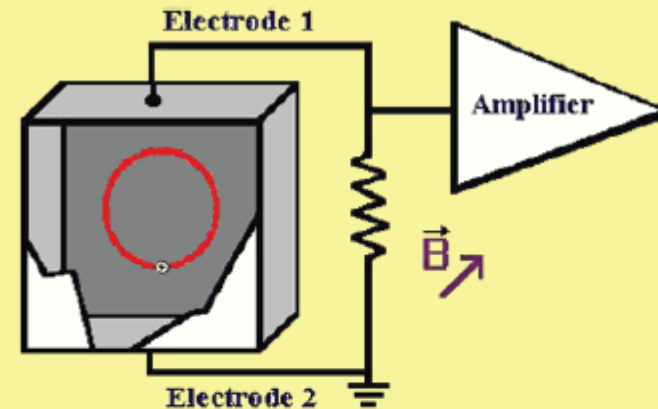
2) Ions during excitation with a radio frequency. This excites the ions to a larger cyclotron radius.



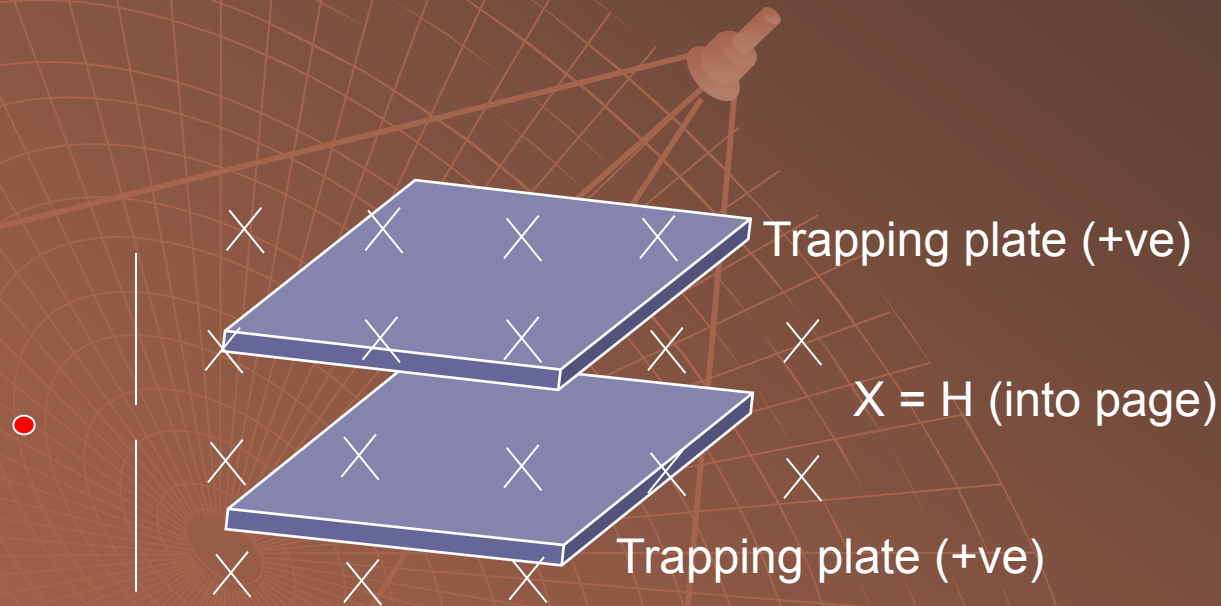
3) Ions after excitation. The cyclotron radius remains in its larger state.

1 cm

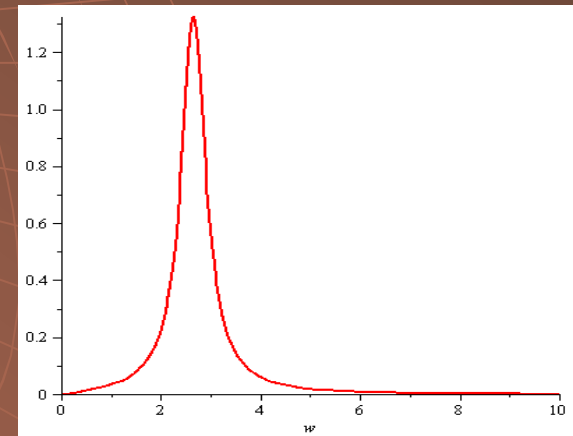
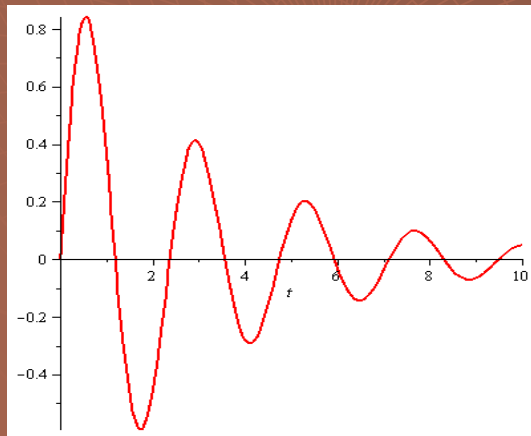
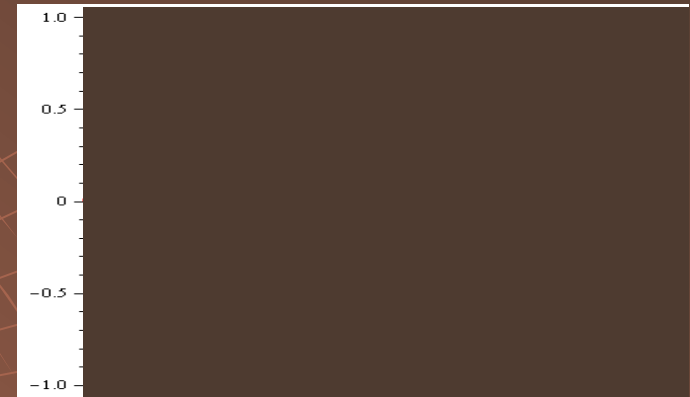
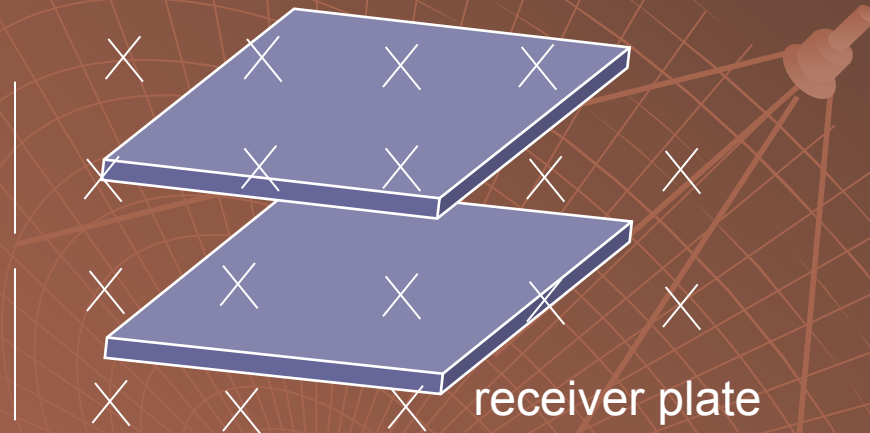
## detekce



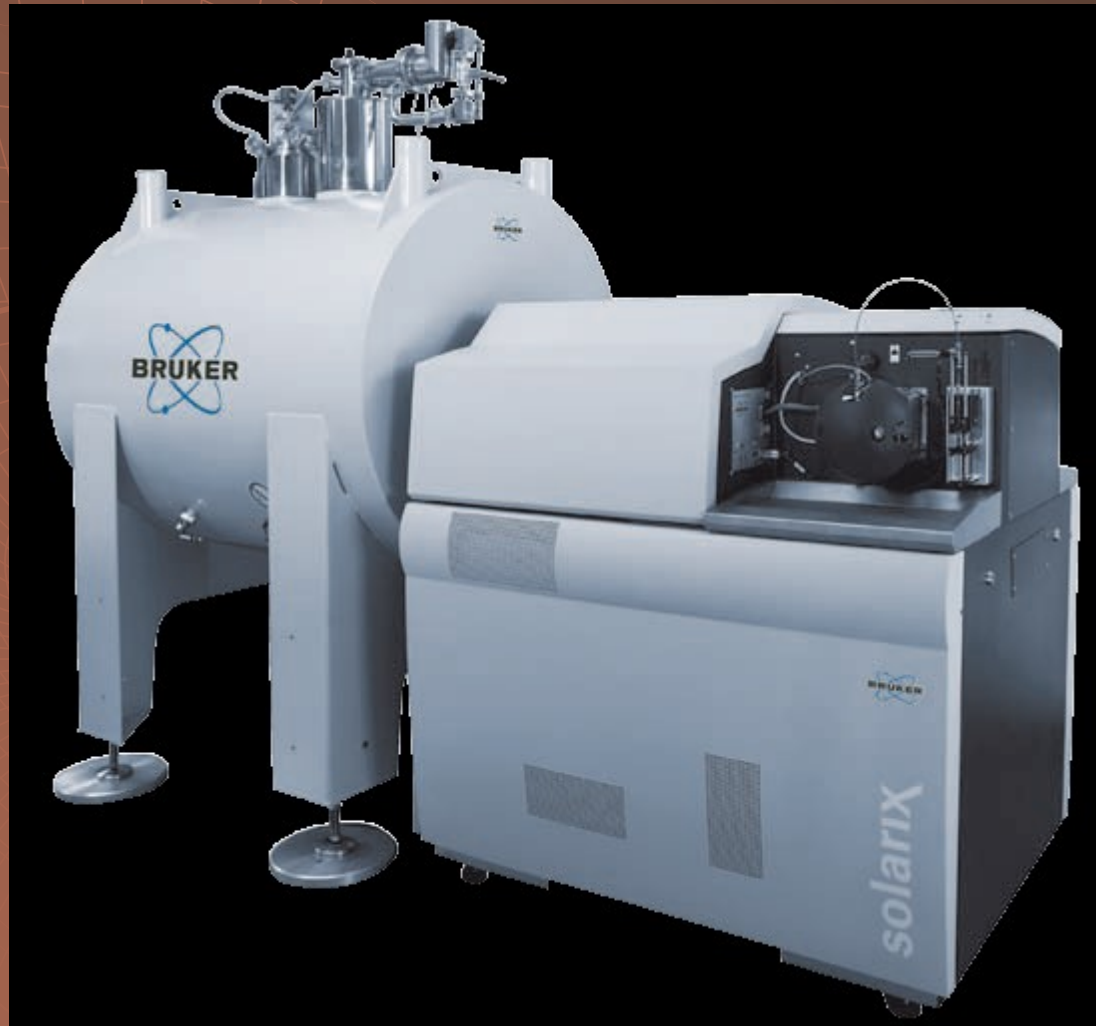
# Iontová cyklotronová resonance (ICR)



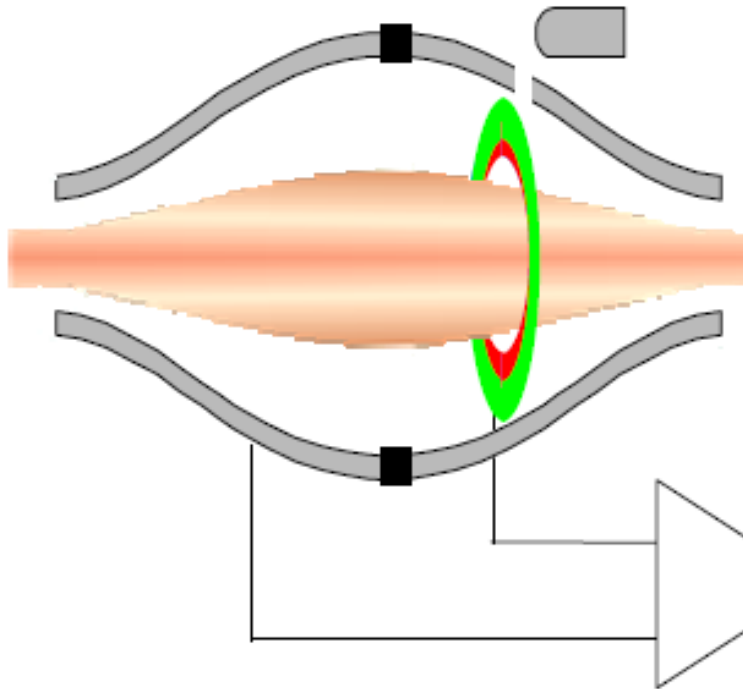
# lontová cyklotronová resonance (ICR)



# lontová cyklotronová resonance (ICR)



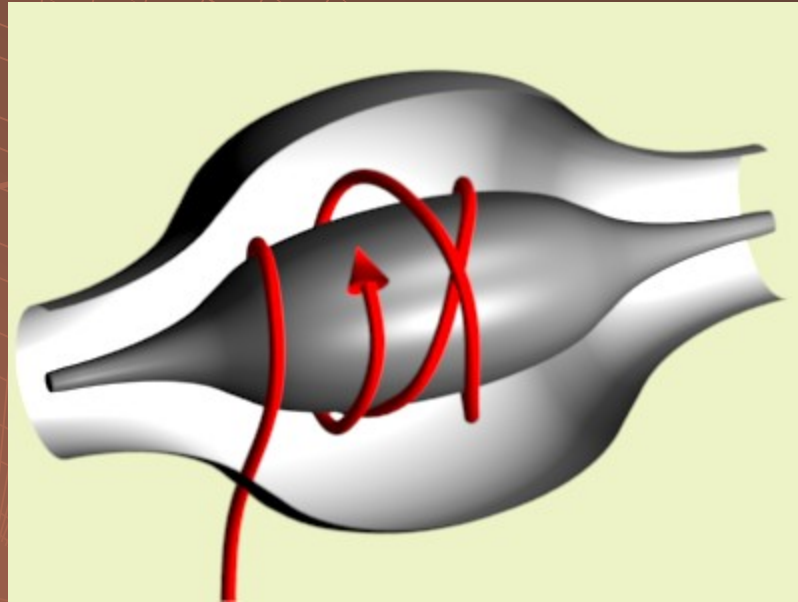
# Orbitrap



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

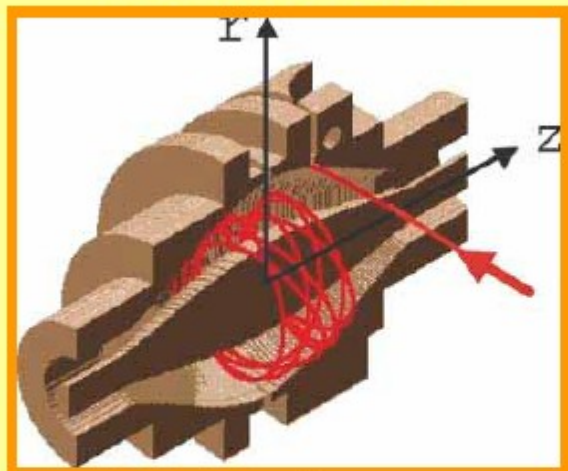


# Orbitrap



# Orbitrap

- separátory iontů – ORBITRAP s Fourierovou transformací



(a)

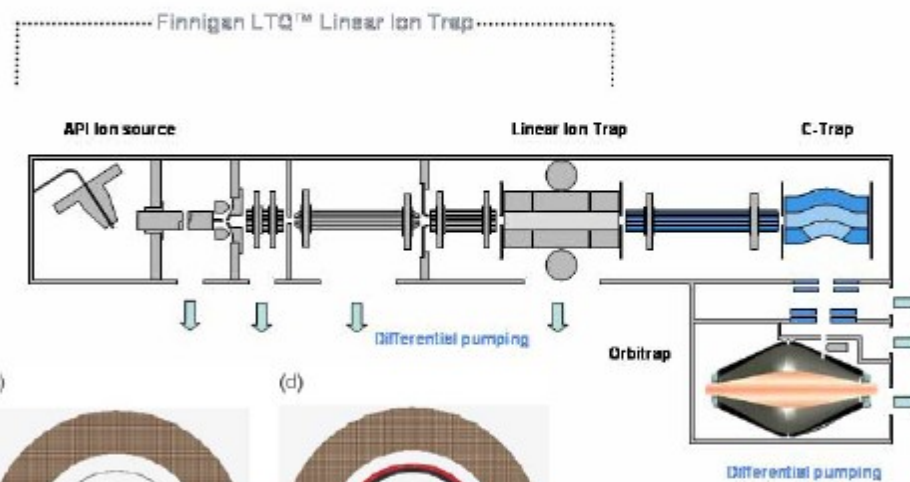
(b)



(c)



(d)



# Orbitrap



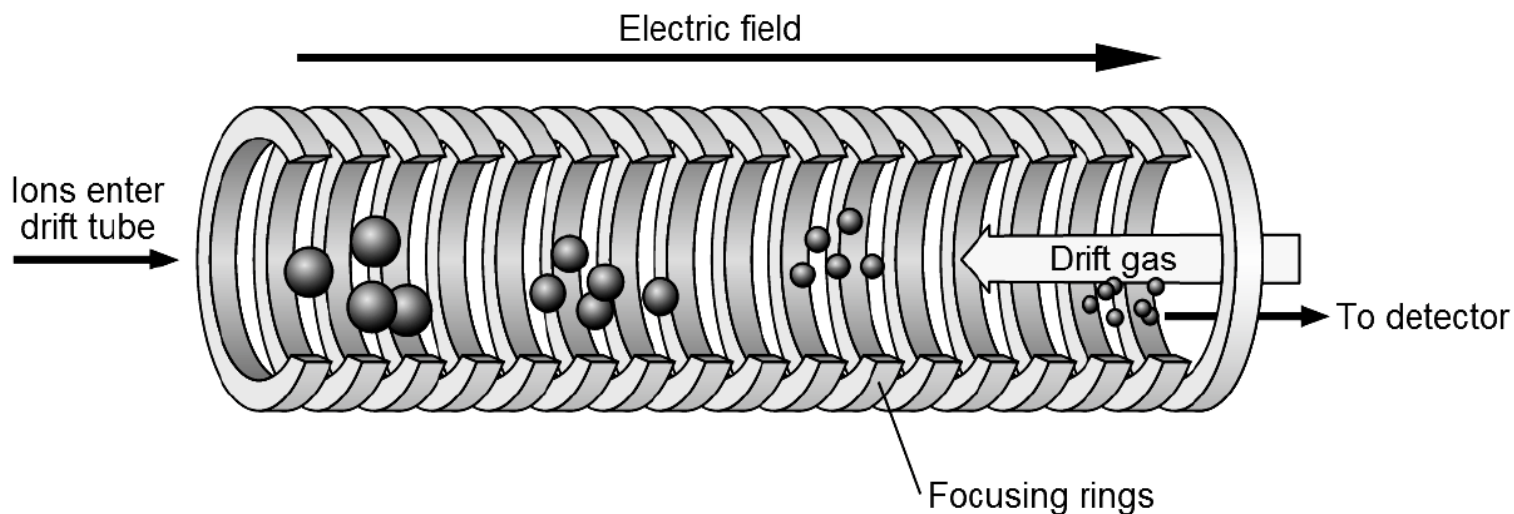


# Orbitrap



# Analyzátor iontové pohyblivosti

- ♦ **Analyzátor iontové pohyblivosti** separuje ionty na základě jejich pohyblivosti v prostředí neutrálního plynu (obdoba elektroforézy). Analyzátozem je driftová trubice obsahující plyn o daném tlaku, na kterou je vloženo napětí. Ionty se pohybují ve směru elektrického pole, odpor prostředí (plyn) působí v opačném směru. Ionty se dělí na základě svých **kolizních průřezů** (tj. tvaru a velikosti), **náboje** a **hmotnosti** (u molekul větších než 0,5 kDa na hmotnosti nezáleží).



# Typické parametry hmotnostních analyzátorů

- typické parametry LC/MS hmotnostních analyzátorů

Hmotnostní analyzátor	Rozlišovací schopnost [ $\cdot 10^3$ ]	Správnost [ppm]	m/z rozsah (horní limit) [ $\cdot 10^3$ ]	Rychlost [Hz]	Lineární dynamický rozsah	Cena
Q	3 – 5	nízká	2 – 3	2 – 10	$10^5 - 10^6$	nízká
IT	4 – 20	nízká	4 – 6	2 – 10	$10^4 - 10^5$	střední
TOF	10 – 60	1 – 5	10 – 20	10 – 50	$10^4 - 10^5$	střední
Orbitrap	100 – 240	1 – 3	4	1 – 5	$5 \cdot 10^3$	vyšší
FT-ICR	750 – 2,500	0.3 – 1	4 – 10	0.5 – 2	$10^4$	vysoká

- rozdělení hmotnostních analyzátorů

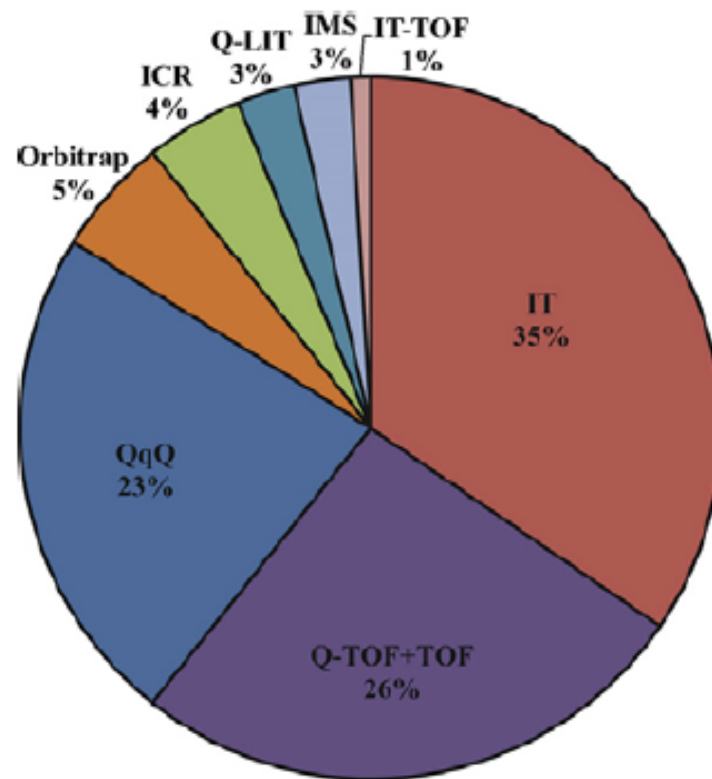
	Rozlišovací schopnost (RP, FWHM)	Správnost (MA, ppm)
nízká	<10,000	>5
vysoká	10,000 – 100,000	<5
ultravysoká	>100,000	<1

## Porovnání různých typů hmotnostních analyzátorů

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

# Hmotnostní analyzátoři

- Magnetický sektorový analyzátoř
- Kvadrupólový analyzátoř
- 3D a lineární iontová past
- Průletový analyzátoř
- Orbitrap
- Iontová cyklotronová rezonance
- Analyzátoř pohyblivosti iontů
- Hybridní hmotnostní spektrometry

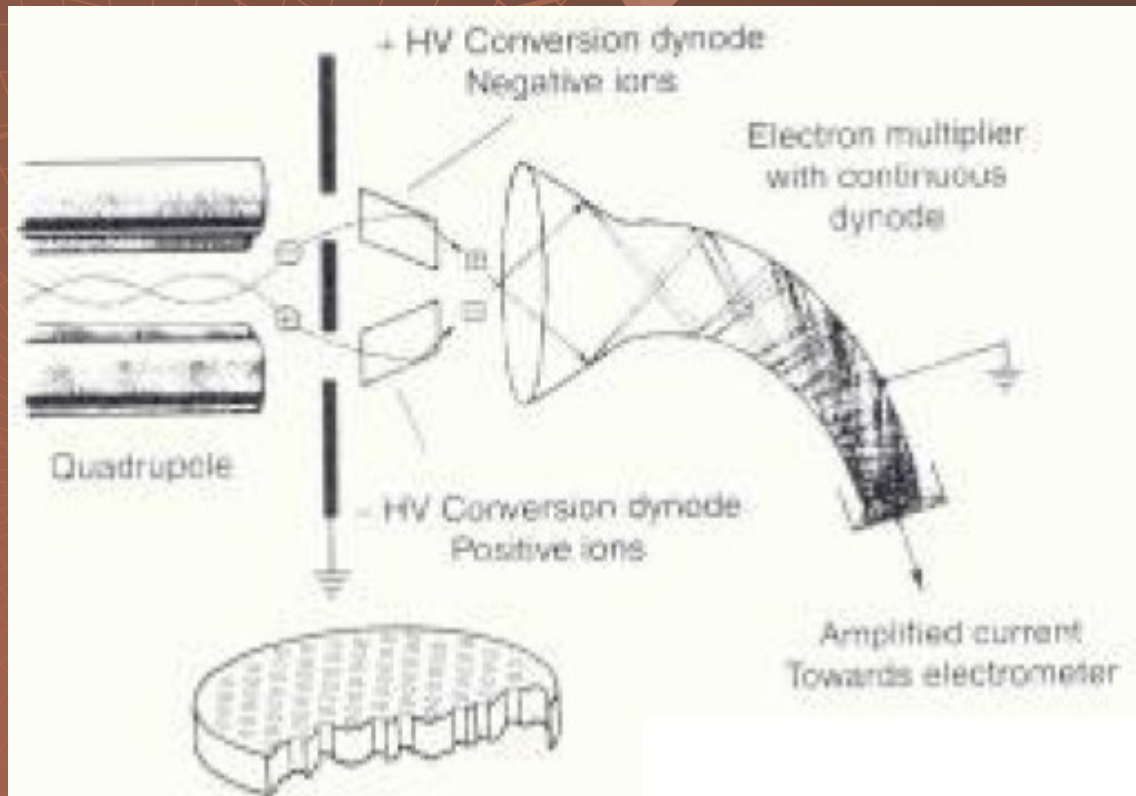




Detektory

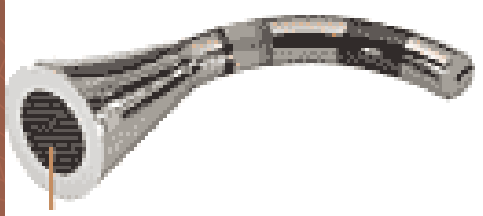
# Elektronový násobič

ionty dopadající na povrch elektrody zní vyrazí e-,  
dále zesíleny systémem dynod až  $10^8$ krát,  
životnost 1-2 roky



# Elektronový násobič

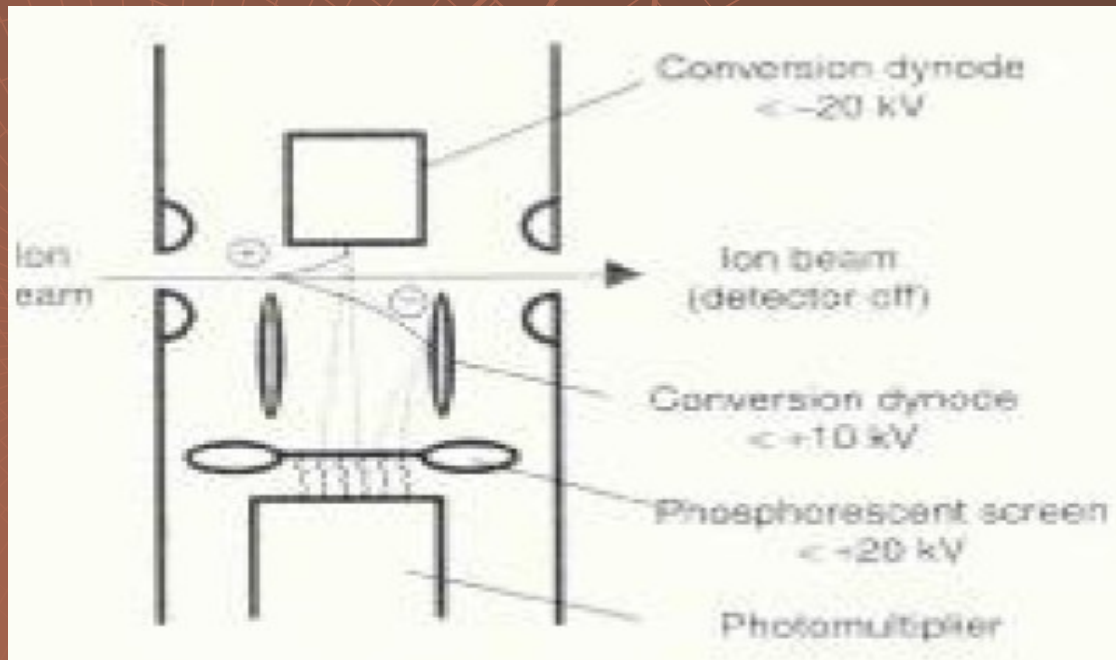
ionty dopadající na povrch elektrody zničí vyrazí e-  
dále zesíleny systémem dynod až  $10^8$ krát,  
životnost 1-2 roky





# Fotonásobič

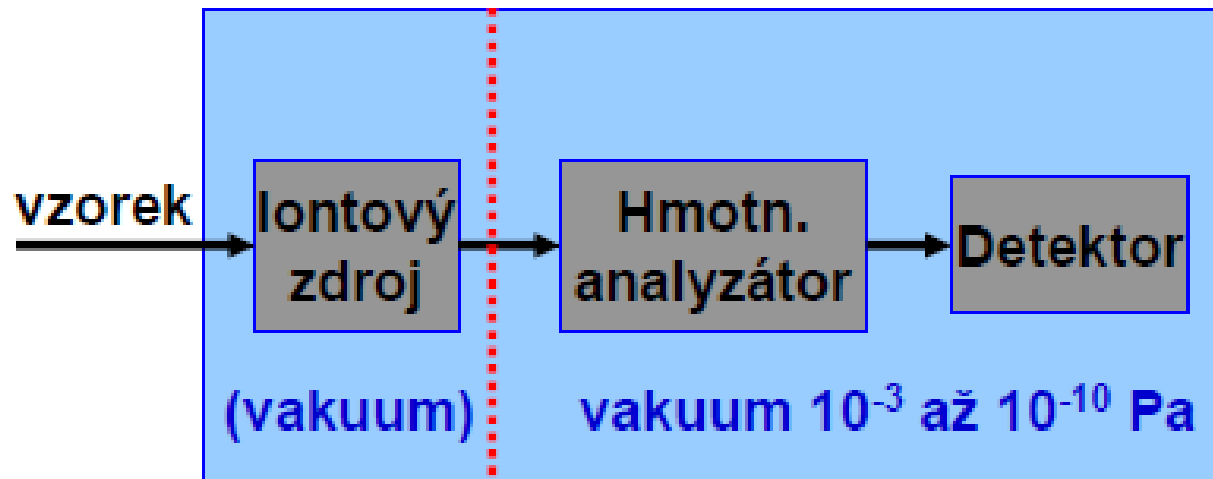
ionty dopadají na fosforovou destičku, čímž uvolní energii ve formě fotonu, zesílen systém konverzních dynod až  $10^5$ krát, delší životnost





# Vakuový systém

# Vakuový systém

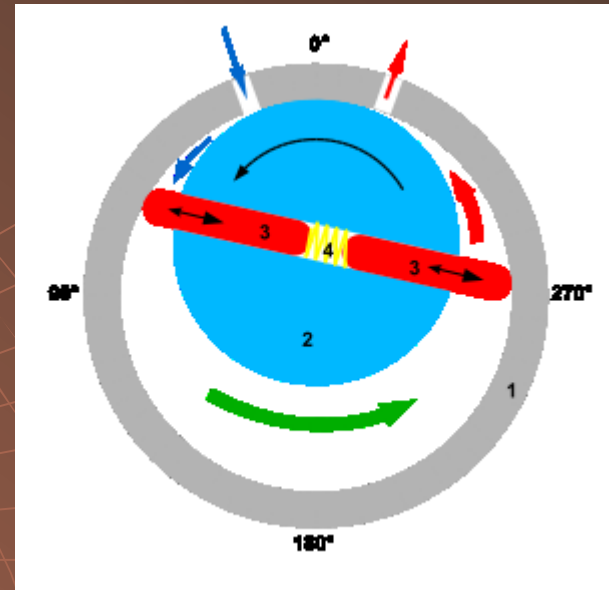


- hmotnostní analyzátor vždy pracuje **za vysokého vakua**, hodnota vakua se liší podle typu analyzátoru ca.  $10^{-3}$  až  $10^{-10}$  Pa
- kromě ionizačních technik pracujících za atmosférického tlaku (ESI, APCI, APPI) musí být za vakua i iontový zdroj
- proč tak vysoké vakuum? **ionty musí mít dostatečně 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

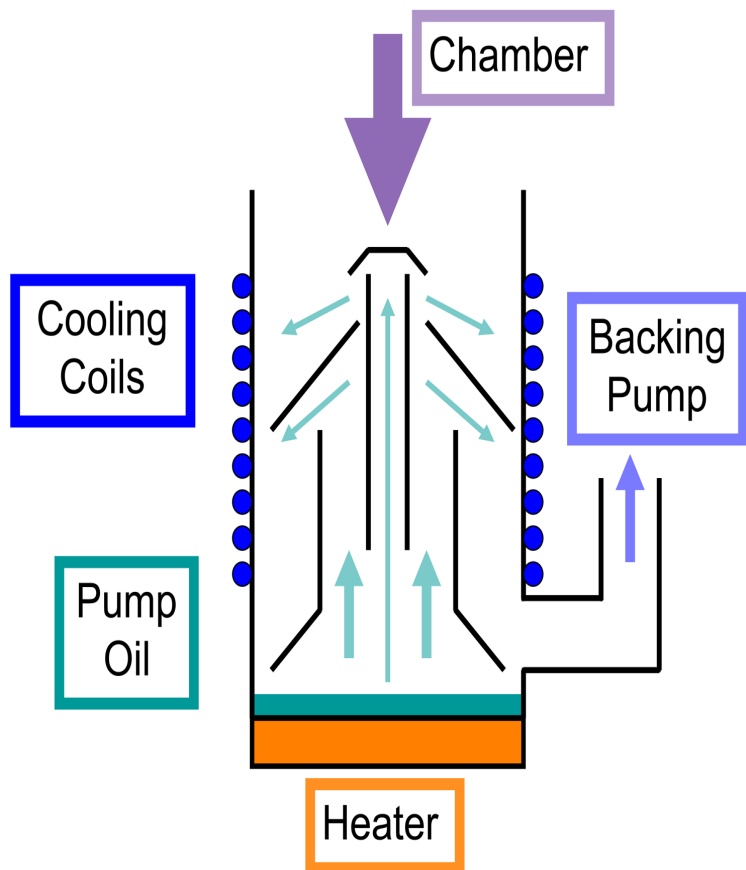
- ◆ - 1. stupeň čerpání - **rotační pumpy** (výkon 80 l/s)
- ◆ - 2. stupeň čerpání - **turbomolekulární nebo difúzní pumpy** (výkon 250 l/s)

# Rotační olejové vývěvy

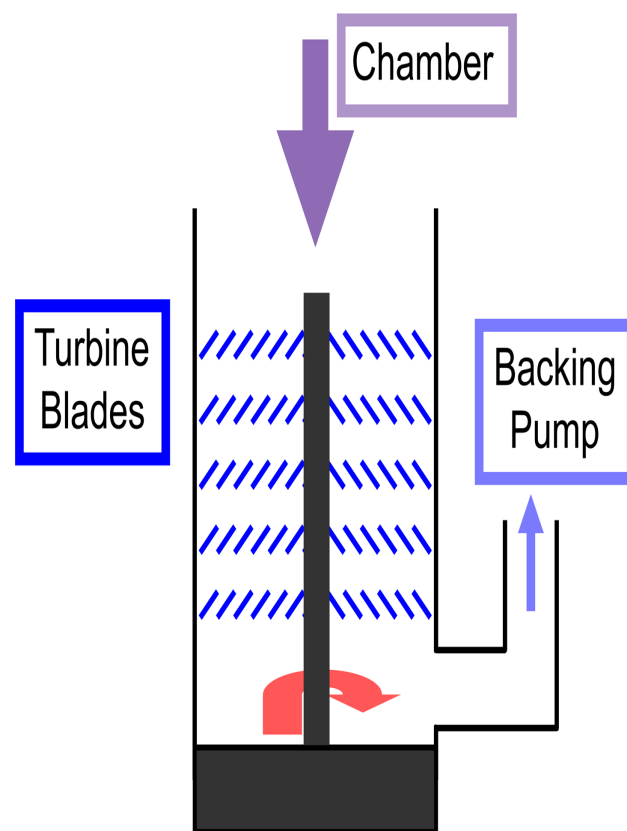


# Difuzní a turbopumpy

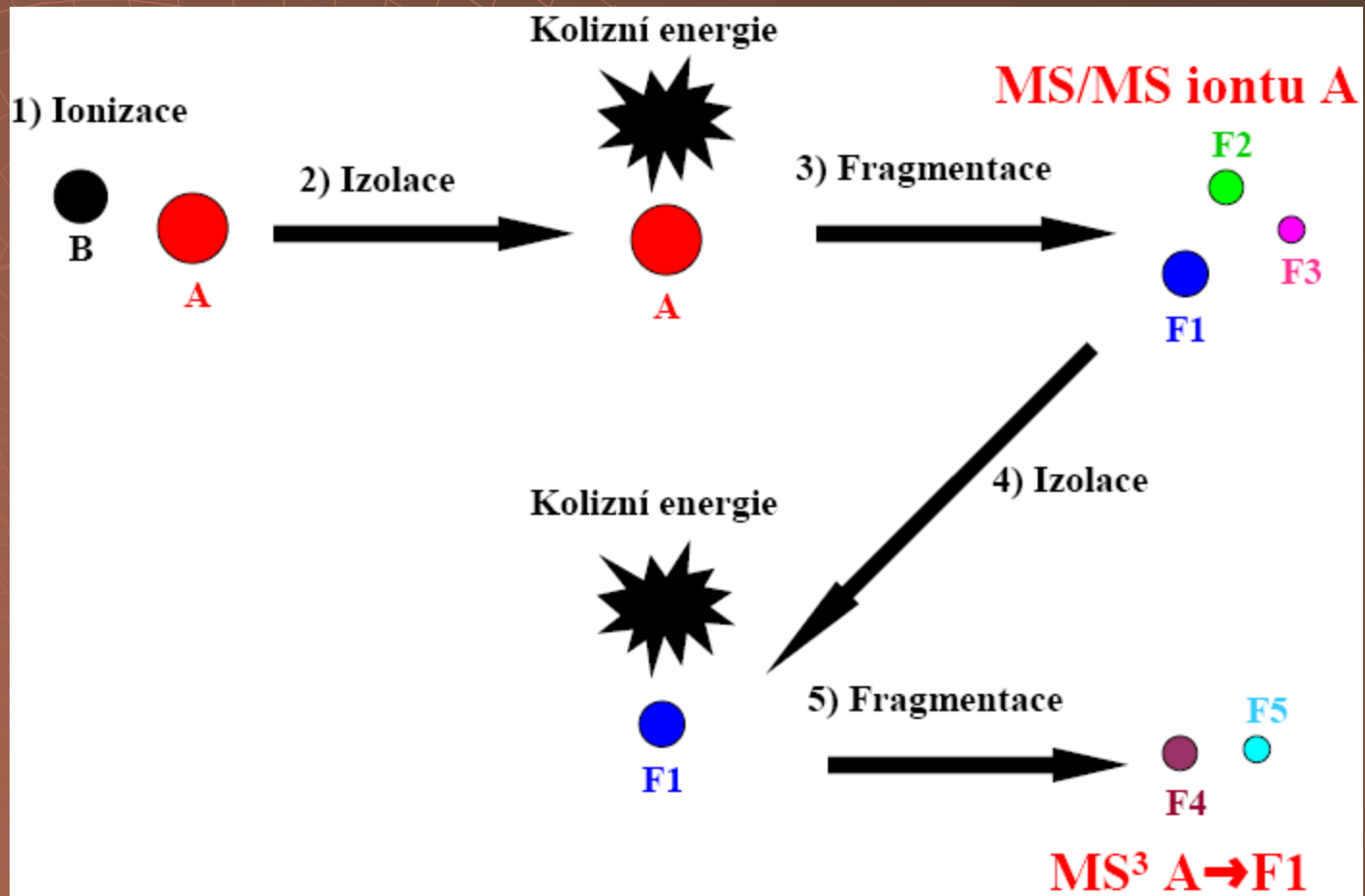
difuzní pumpa



turbomolekulární pumpa



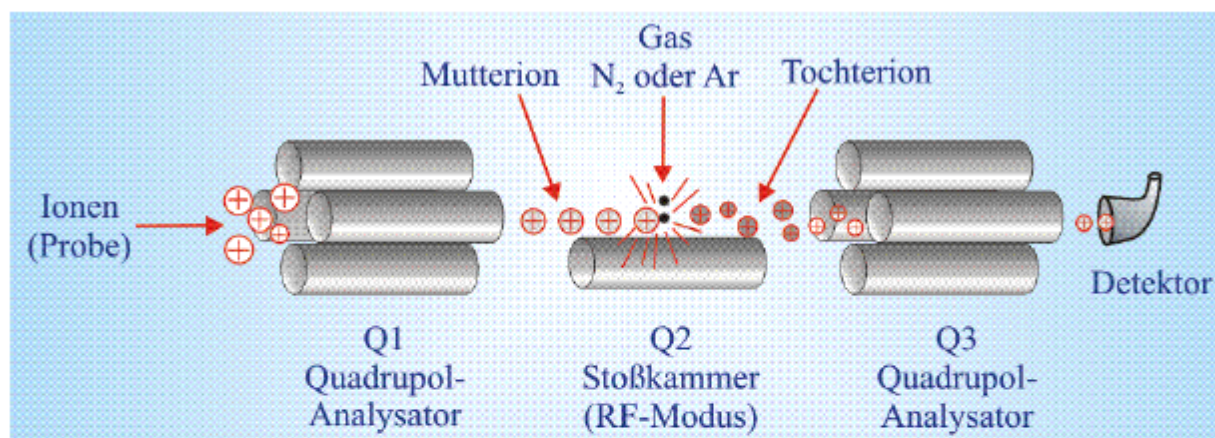
# MS<sup>n</sup>



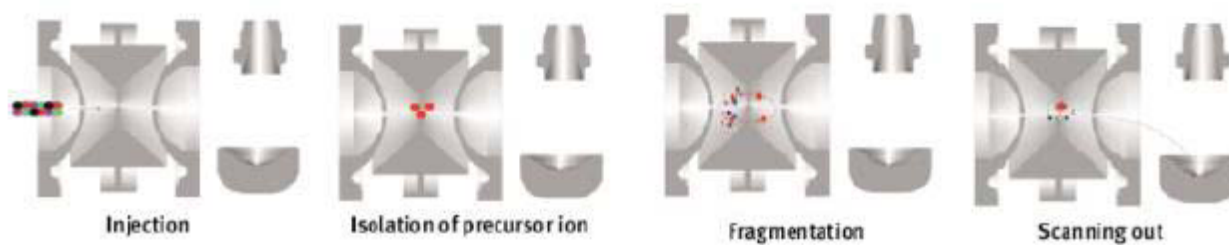


# MS<sup>n</sup>

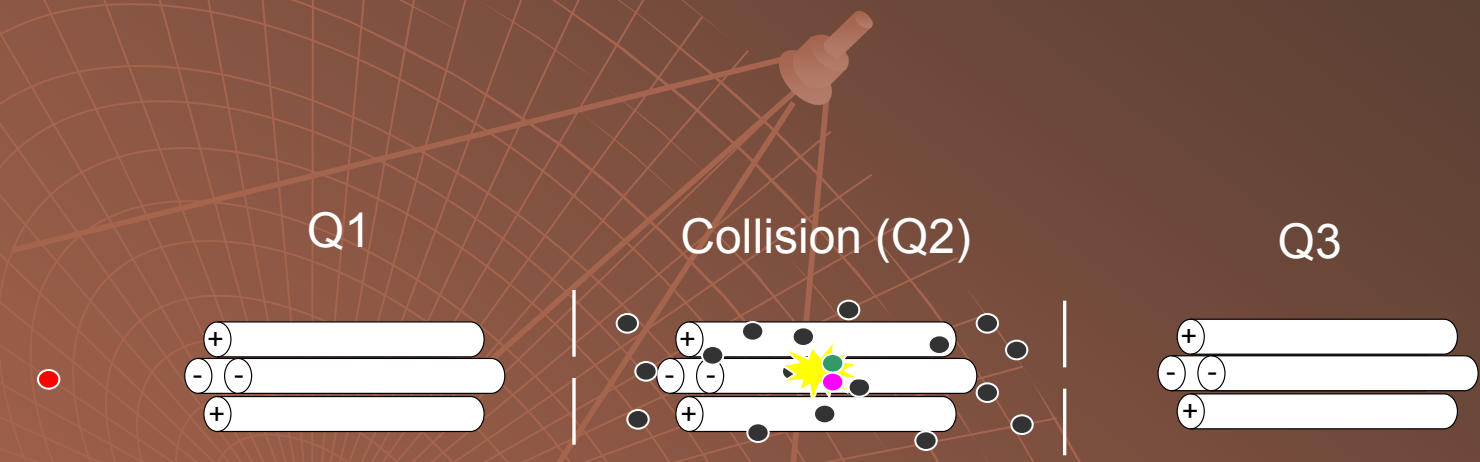
## V prostoru



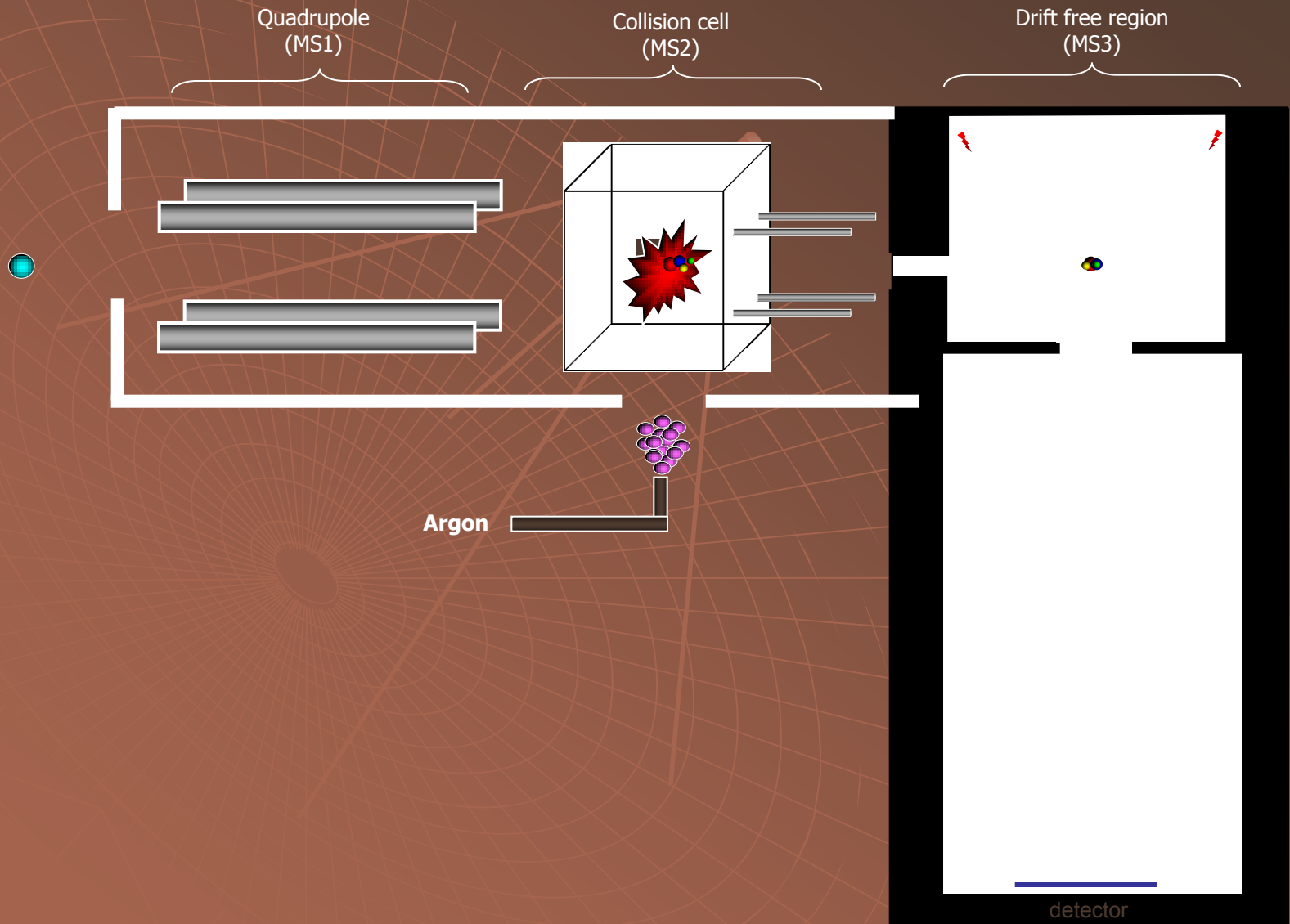
## V čase



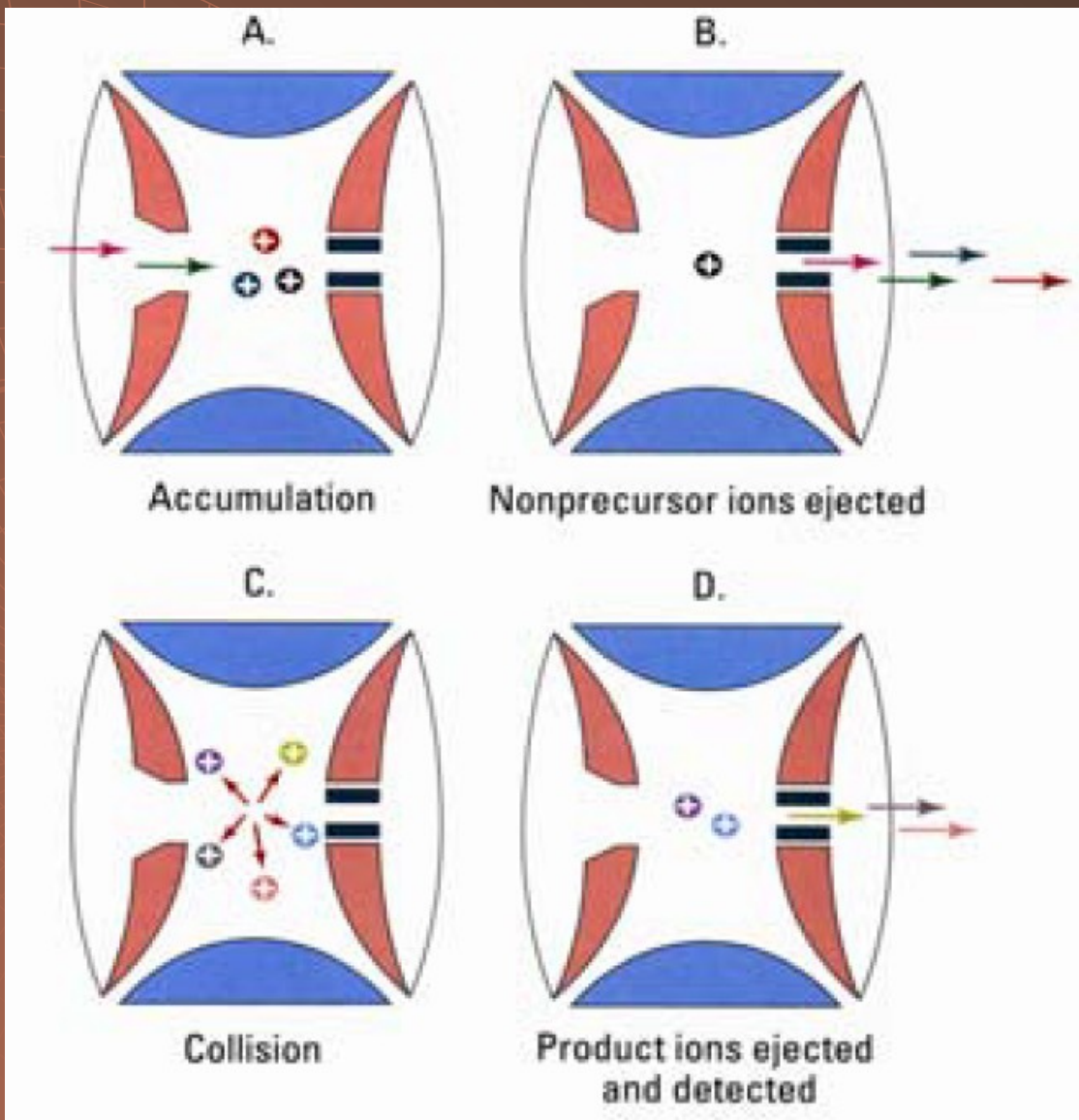
# TripleQ



# QTOF

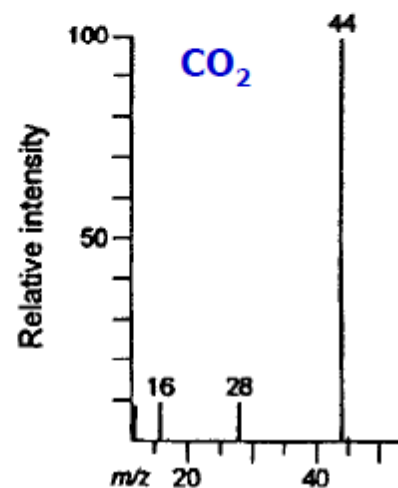
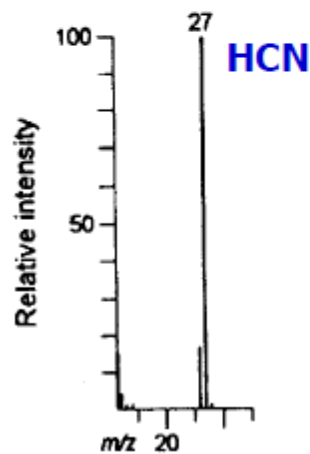
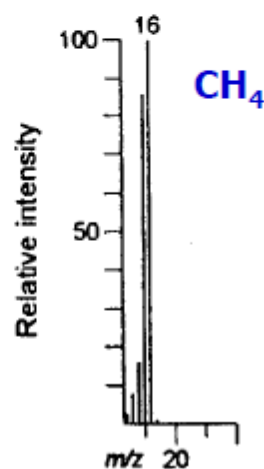
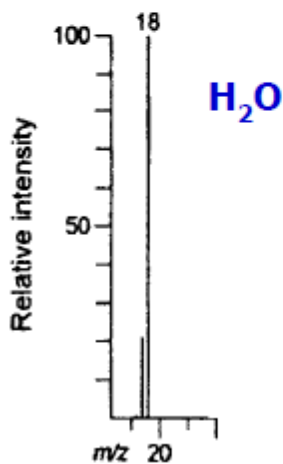


# IT



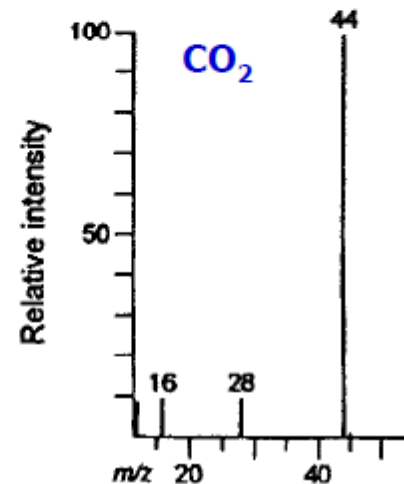
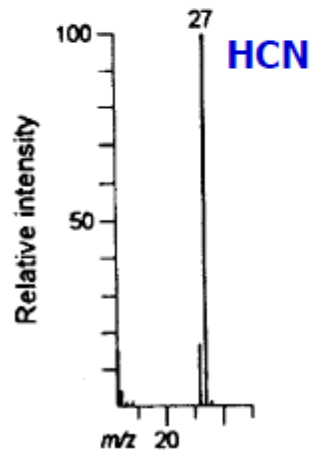
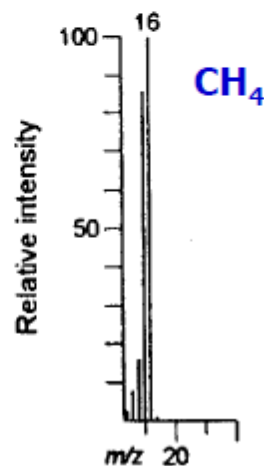
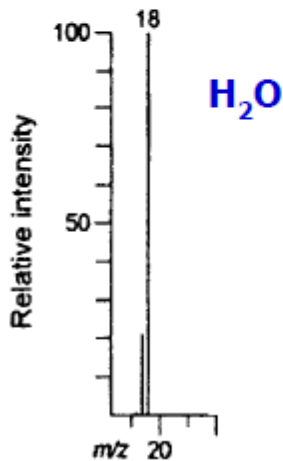
# MS spektrum

- 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

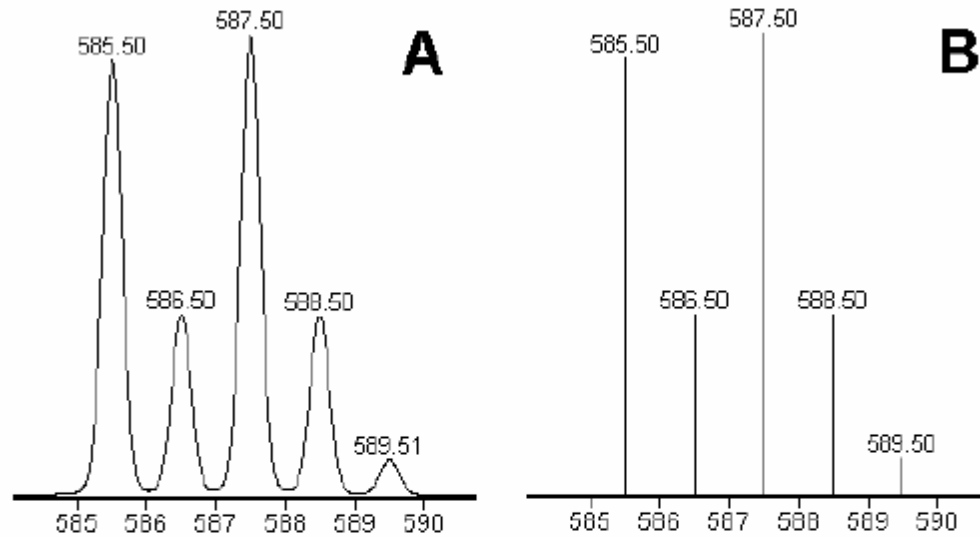


# MS spektrum

• **normalizace spekter** - hmotnostní spektra jsou obvykle uváděna v normalizovaném tvaru, tzn. nejintenzivnějšímu píku spektra je přiřazena relativní intenzita 100% a intenzity ostatních píku se dopočítají; kromě grafické formy lze spektrum uvést i v tabelární formě (přesně uvedené intenzity, ale méně přehledné pro interpretaci)



# MS spektrum



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

# MS kalibrace

- **externí kalibrace** – kalibrace a vlastní měření není ve stejný okamžik, nejdříve kalibrace a pak měření (nebo naopak), což někdy může způsobit určitý posun  $m/z$ 
  - obecně poskytuje mírně horší výsledky oproti interní kalibraci, ale je menší riziko hmotnostních interferencí analytu s kalibrantem
- **interní kalibrace** – kalibrant i analyt jsou do iontového zdroje přivedeny ve stejný okamžik a ve spektru pozorujeme jak analyt tak i kalibrant
  - poskytuje nejpřesnější výsledky, ale hrozí riziko hmotnostních interferencí (tzn. analyt a kalibrant nesmí mít příliš blízké hmotnosti, aby je daný typ analyzátor dokázal spolehlivě rozlišit, pokud by se píky analytu a kalibrantu ovlivnily, pak vzniká chyba)
  - "**lock mass**" kalibrace - založena na kontinuální kalibraci na vybraný ion pozadí o známém složení nebo sprejování standardu druhým sprejem



## Inlet

MALDI destička  
Direct Insertion  
(Infusion) Probe

GC

HPLC

CE

Iontový  
zdroj

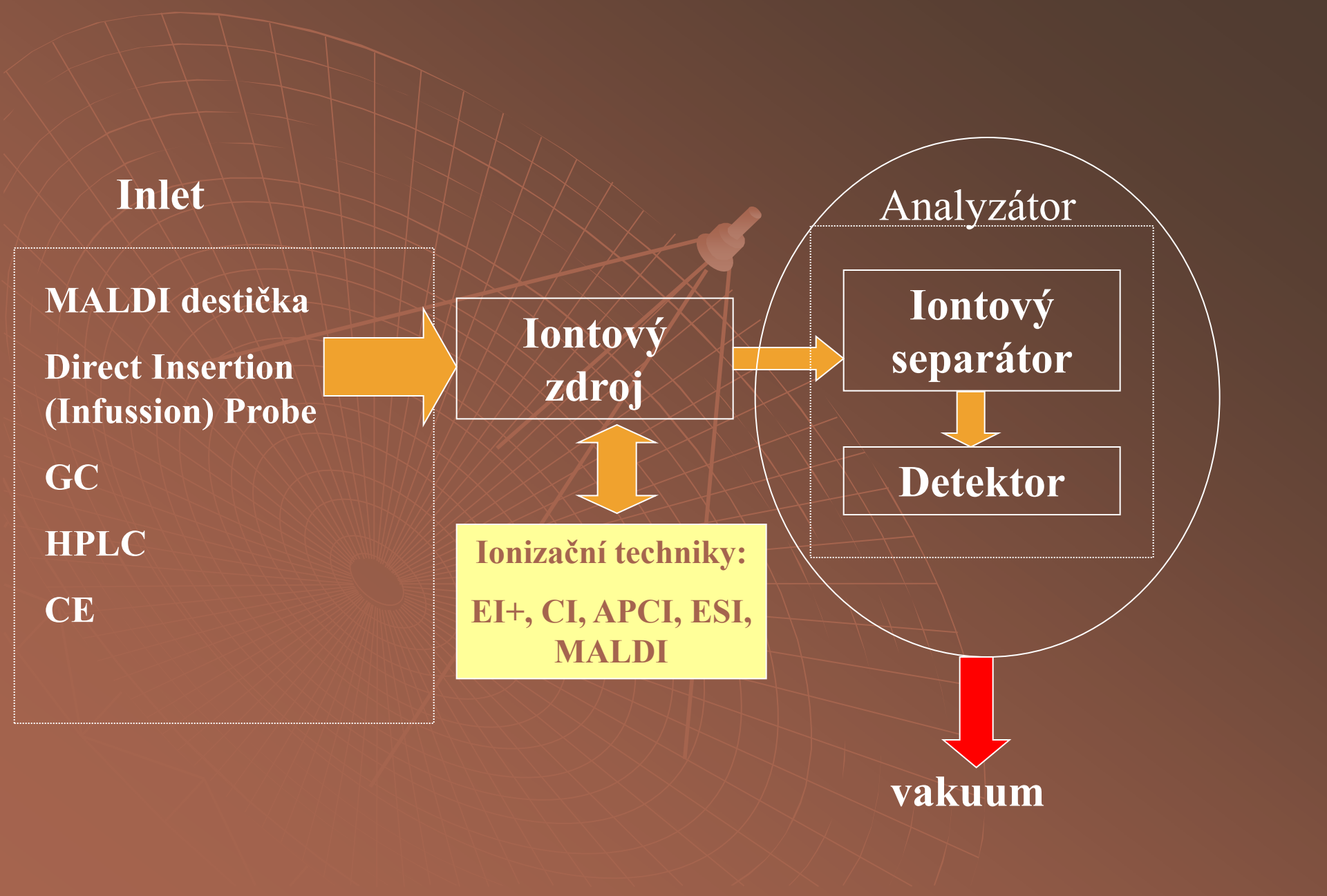
**Ionizační techniky:**  
EI+, CI, APCI, ESI,  
MALDI

## Analyzátor

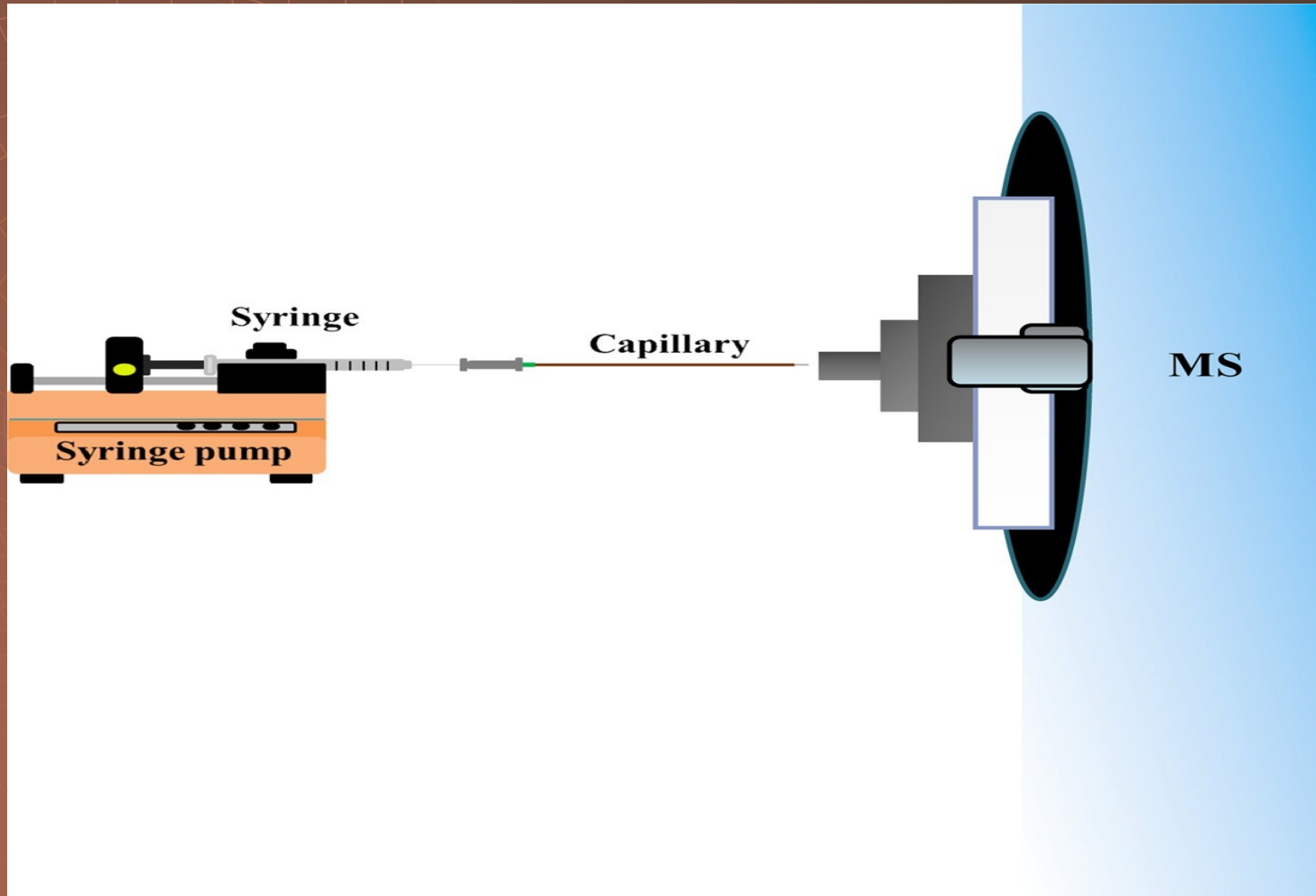
Iontový  
separátor

Detektor

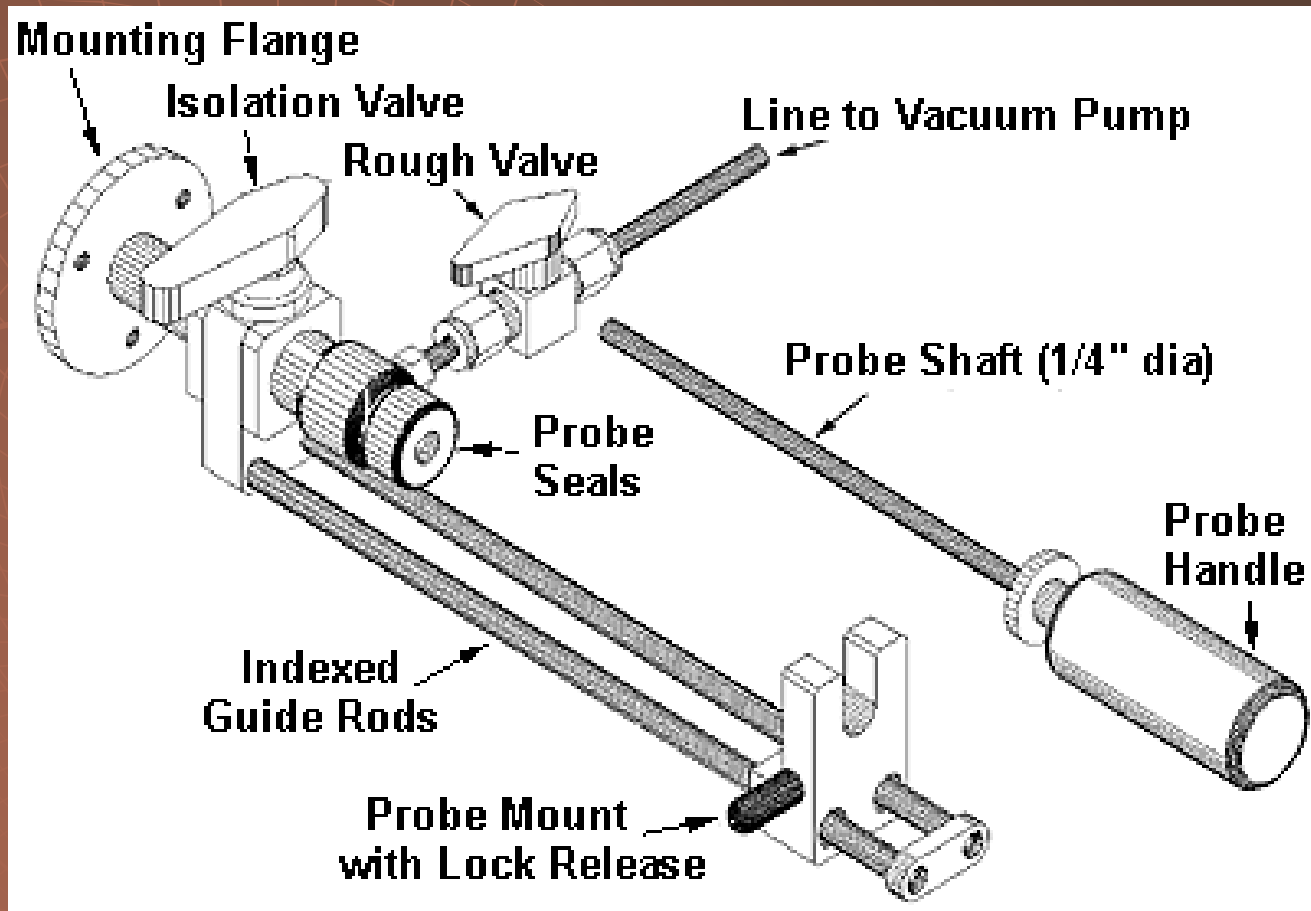
**vakuum**



# Direct infusion



# Direct probe



# GC/MS

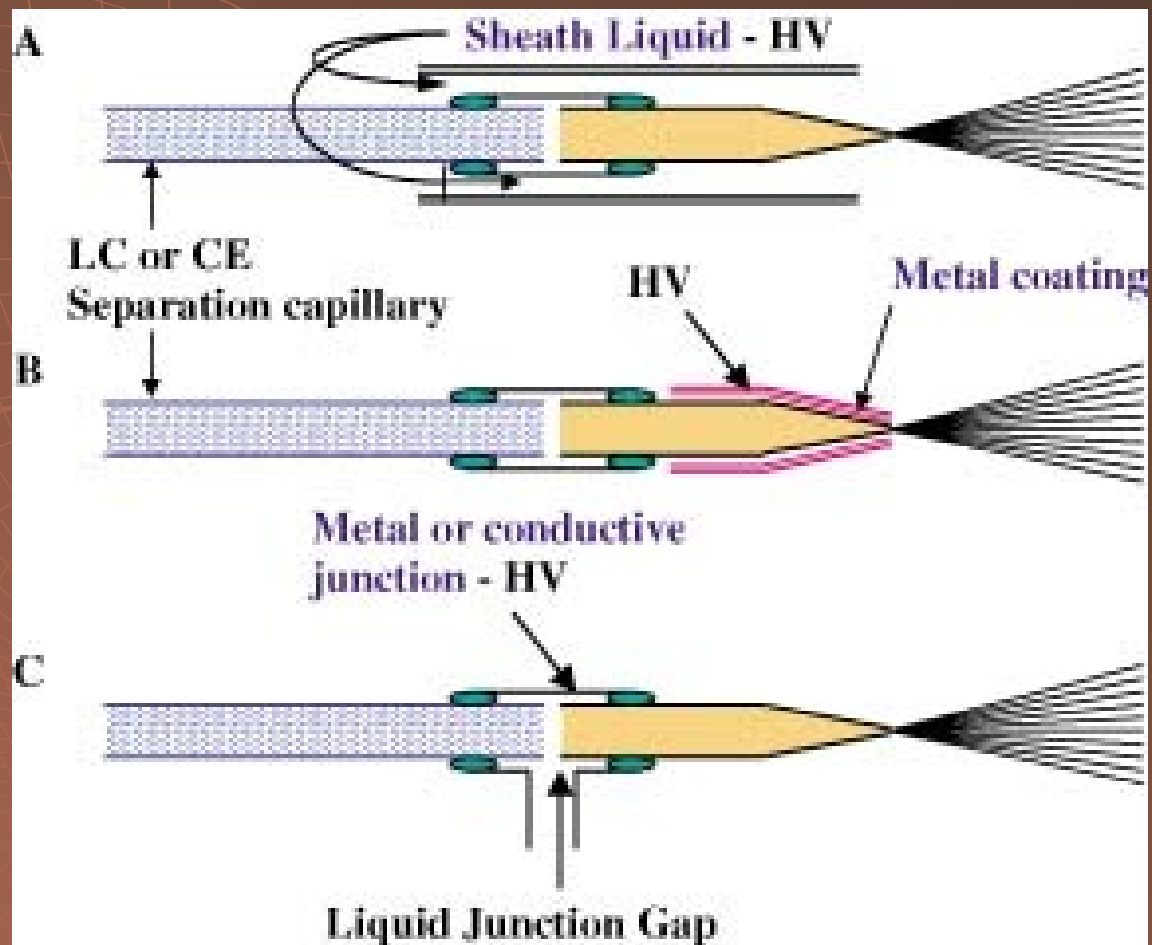
- První chromatografická metoda spojená s MS
  - malý průtok nosného plynu – kompatibilní s MS
- Instrumentace
  - iontové zdroje: EI, CI
  - analyzátory: Q, IT
- Analyty:
  - méně polární, termálně stabilní, s nízkou molekulovou hmotností
- Široce využívaná technika
  - analýza složitých směsí (např. 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 pufrů a iont-párovými činidly
  - analýza potravin, léčiv, proteomika, atd.
- Rychle se rozšiřující oblast MS

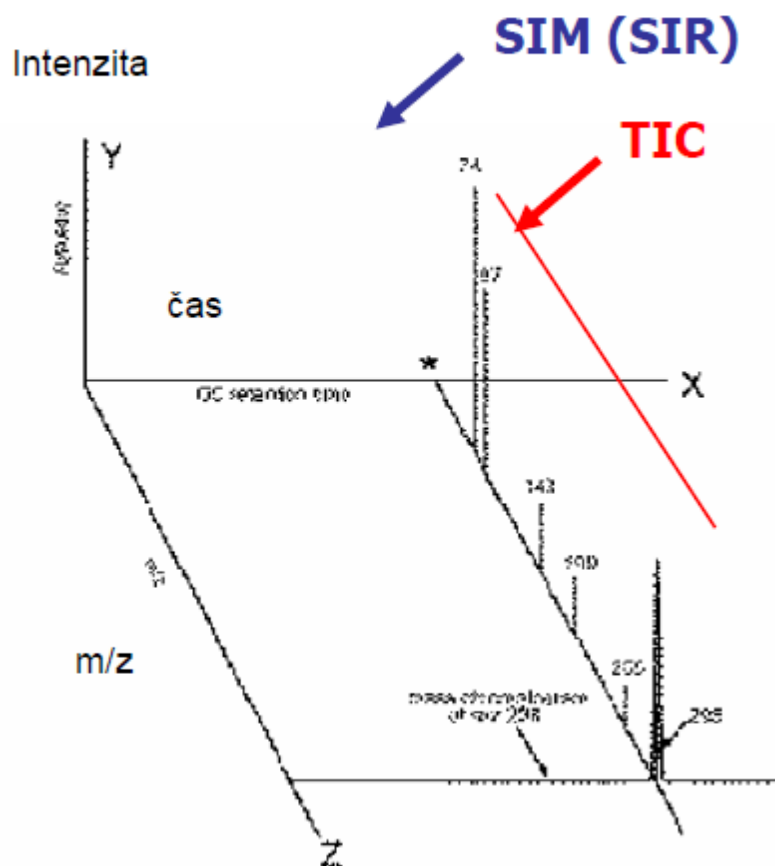
# CE/MS

- 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!*

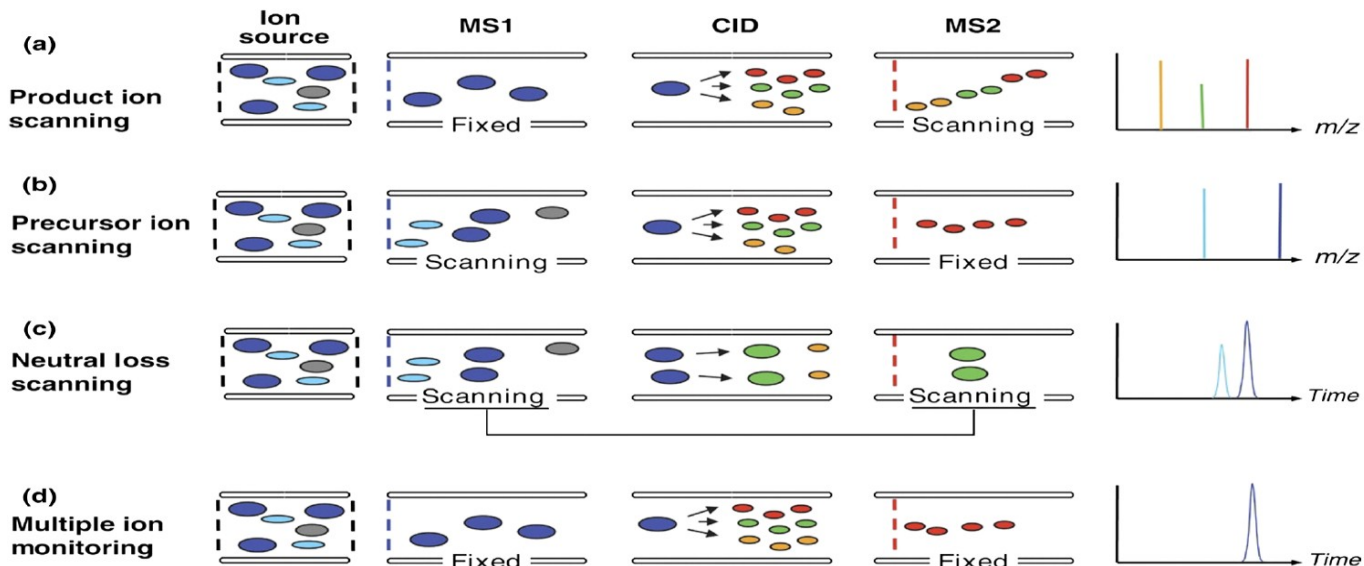
**Precursor Ion Scan:** Q1:TIC ( $m/z_1 - m/z_2$ ) Q2: fragmentace iontu Q3: SIM detekce

*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;  $\Delta N$  – 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

# Kvantitativní MS

- výhodou je vysoká selektivita (pro MS/MS experimenty) a citlivost
- je třeba vyvarovat se potlačení odezvy konkurenční ionizací (další látky, matrice)
- důležitá je volba standardu, nezbytné je použití vnitřního (interního) standardu pro potlačení vlivu matrice či kontaminace na účinnost ionizace analytu, použití vnějšího standardu není vhodné a většinou je nepřijatelné

# Kvantitativní MS

- nejpřesnější postup je pomocí **izotopicky značeného standardu** analytu
- izotopicky značený standard obsahuje atomy s těžšími izotopy, které způsobují posun  $m/z$  ve spektru a tím odlišení signálu od neznačené látky
- látky mají stejné chemicko-fyzikální vlastnosti
- nejčastěji deuterace ( $2D$ ),  $^{13}C$ ,  $^{15}N$
- doporučený posun alespoň +3 jednotky  $m/z$
- vysoká cena izotopicky značených standardů