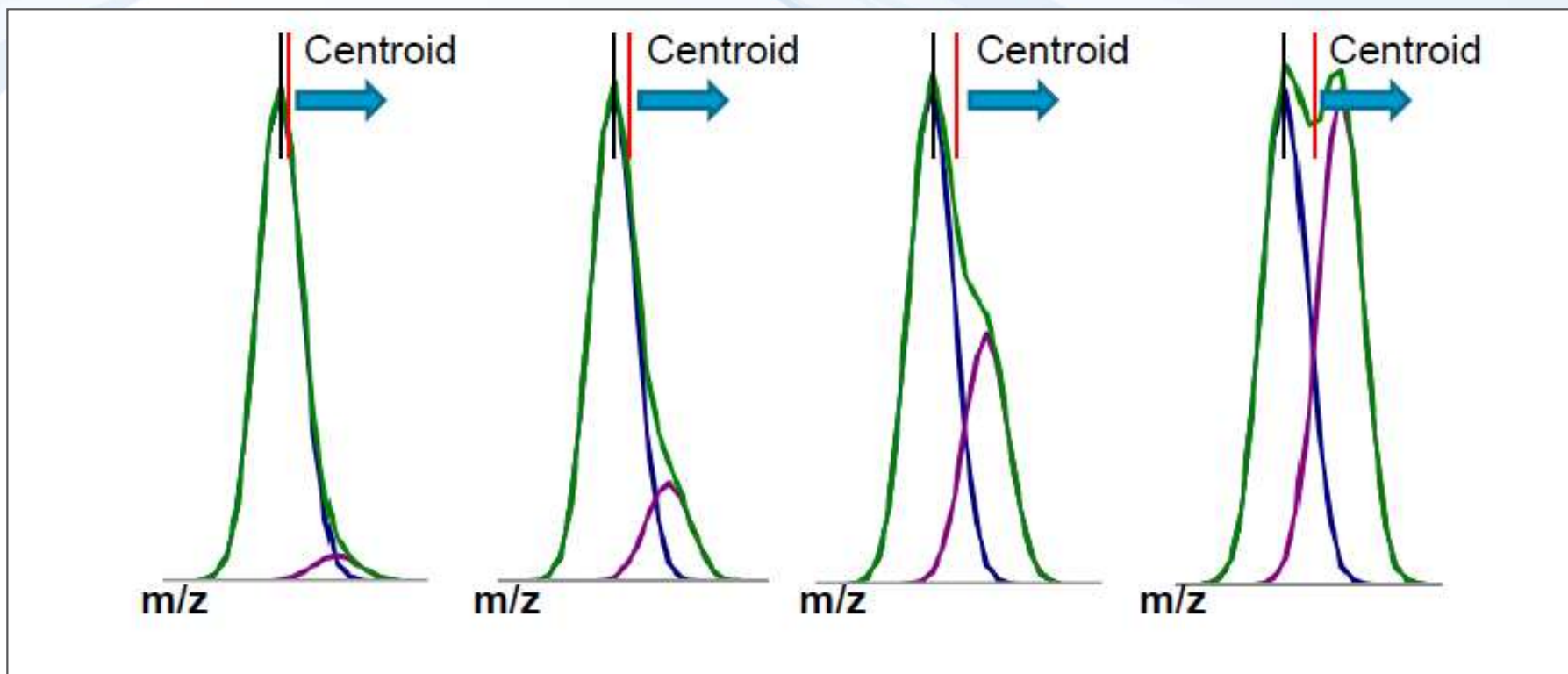
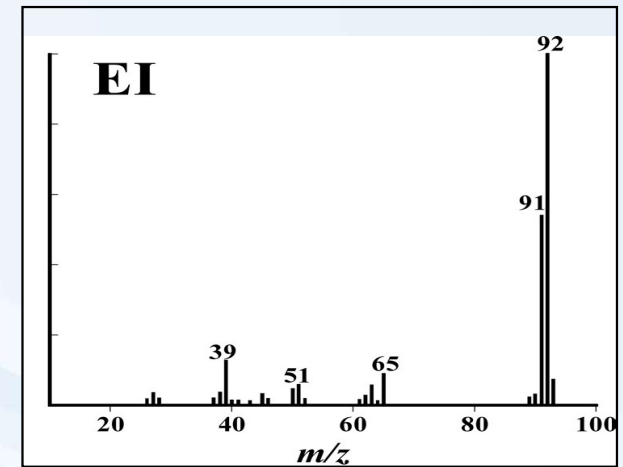


## Profilový vzhled hmotnostního píku



***Záznam v režimu centroid zakrývá tento efekt***  
Relativní intenzita ovlivňuje výsledek

# Hmotnostní spektrum terminologie

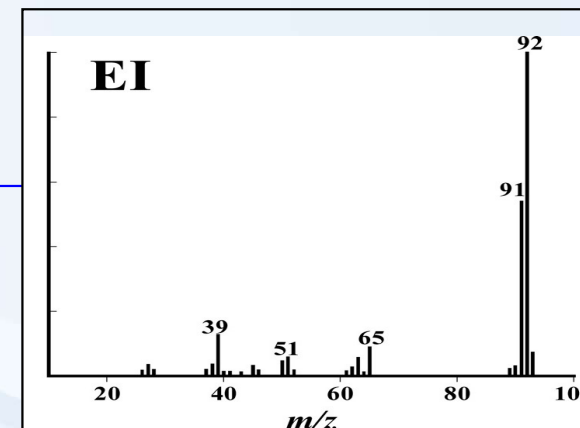


- **$m/z$  (mass-to-charge ratio)** - bezrozměrná veličina získaná vydělením hmotnosti iontu nábojovým číslem (počtem elementárních nábojů, bez ohledu na polaritu)
- **základní pík spektra (base peak)** - pík s největší intenzitou ve spektru
- **ion prekurzoru** - ion, který podléhá fragmentaci za vzniku konkrétních produktových iontů, - nepoužívat termín "rodičovský ion,"
- **produktový ion** - vzniká jako produkt po reakci z jednotlivých iontů prekurzoru disociací (fragmentový ion), reakcí iontu prekurzoru s molekulou nebo změnou počtu nábojů - nepoužívat termín "dceřiný ion,"
- **fragmentový ion** - produktový ion vzniklý disociací iontu prekurzoru
- **aduktový ion** - ion tvořený interakcí iontu s jedním a více atomy nebo molekulami  
→  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ ,  $[M+Cl]^-$ , atd.

# Hmotnostní spektrum

## terminologie

**molekulární ion** - ion vzniklý odebráním nebo přidáním jednoho a více elektronů  
- za vzniku kladného nebo záporného iontu



**protonovaná/deprotonovaná molekula** - ion vzniklý přijetím/odštěpením protonu  
[M+H]<sup>+</sup> resp. [M-H]<sup>-</sup>

**celkový iontový proud (TIC)** - suma iontových proudů všech  $m/z$  přítomných ve spektru daného rozsahu (např.  $m/z$  50–1000)

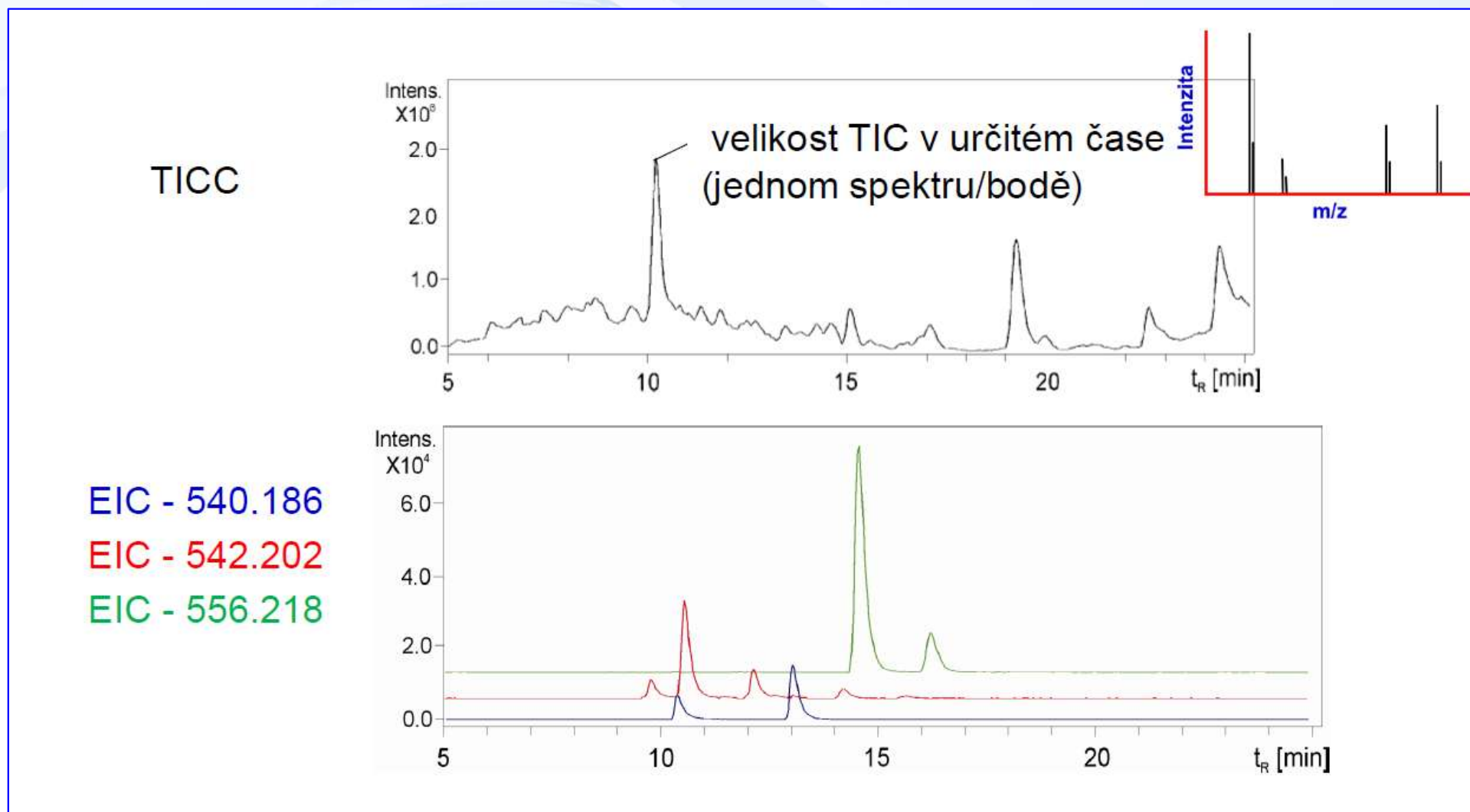
**chromatogram celkového iontového proudu (TICC)** – závislost celkového iontového proudu v sérii hmotnostních spekter na retenčním čase

**extrahovaný iontový chromatogram (EIC or XIC)** - závislost proudu vybrané  $m/z$  na čase (rekonstruujeme z TICC)

**záznam vybraného iontu (SIM)** - měření vybrané  $m/z$  v závislosti na čase *hmotnostním analyzátozem vybereme pouze jeden ion, ostatní se nezaznamenávají*

**hybridní analyzátor** - hmotnostní spektrometr, který kombinuje hmotnostní analyzátory různého typu za účelem tandemové hmotnostní spektrometrie

# Chromatogramy s MS etekcí



snímek převzat z přednášky prof. M. Holčapka (KACH, Univerzita Pardubice)

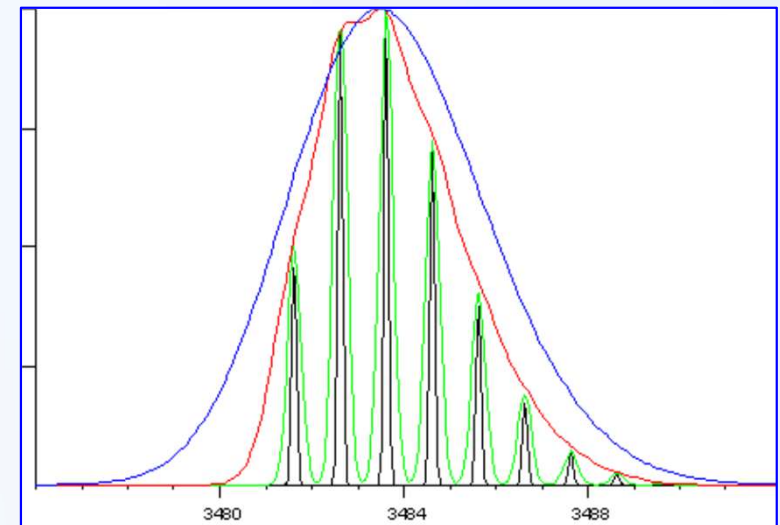
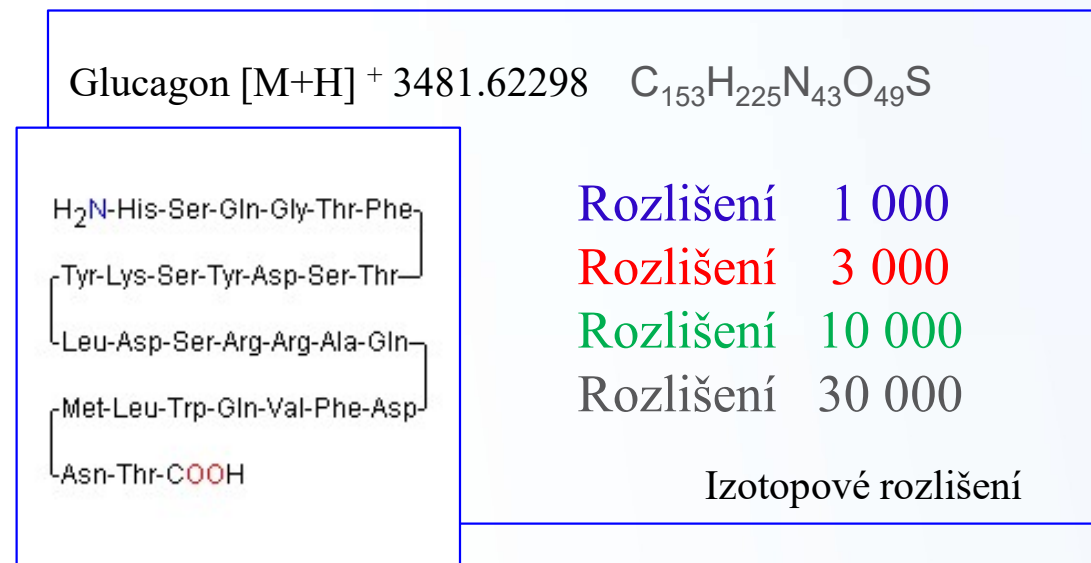
# Hmotnostní spektrum

## NÍZKÉ ROZLIŠENÍ

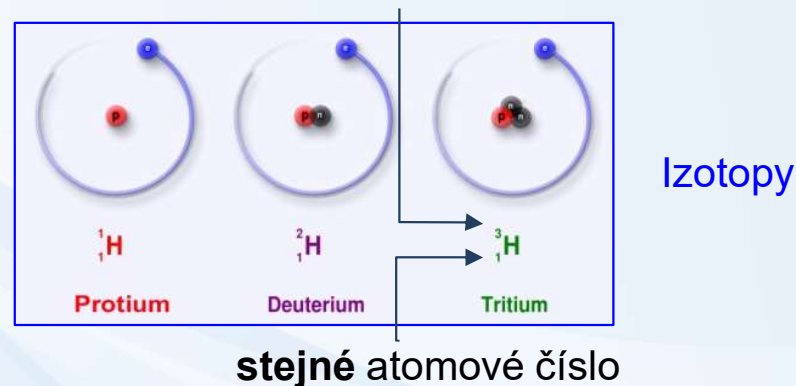
- hmotnost iontu s přesností *jednotky hmotnostní škály*  $m/z = 94$

## VYSOKÉ ROZLIŠENÍ

- hmotnost iontu s přesností *desetitisíciny až stotisíciny hmotnostní jednotky*  $m/z = 94, 25687$  v závislosti na typu použitého hmotnostního spektrometru.
- hmotnost iontu s přesností dostatečnou *pro „jednoznačné“ stanovení jeho elementárního složení.*



# Relativní atomové hmotnosti izotopů prvků



$^1\text{H}$  1,0078252

$^2\text{H}$  2,0140100

$^{12}\text{C}$  12,0000000

$^{13}\text{C}$  13,003354

$^{14}\text{N}$  14,003074

$^{15}\text{N}$  15,000110

$^{16}\text{O}$  15,99491415

$^{18}\text{O}$  17,99920

$^{19}\text{F}$  18,998405

$^{28}\text{Si}$  27,976927

$^{29}\text{Si}$  28,976496

$^{31}\text{P}$  30,973763

$^{32}\text{S}$  31,972074

$^{33}\text{S}$  32,97146

$^{34}\text{S}$  33,96786

$^{35}\text{Cl}$  34,968855

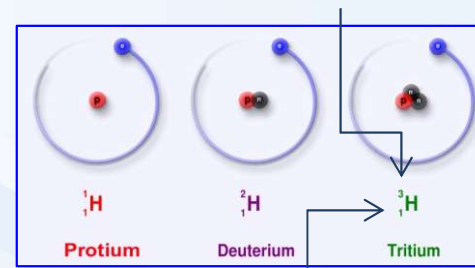
$^{37}\text{Cl}$  36,965903

$^{79}\text{Br}$  78,918348

$^{81}\text{Br}$  80,916290

# Přírodní zastoupení izotopů

Příspěvek izotopů k hmotnostnímu spektru  
rel % abundance, četnost, výskyt



Izotopy

stejně atomové číslo

Prvek	M		M+1		M+2		Typ prvku
	m/z	%	m/z	%	m/z	%	
<b>H</b>	1	100	2	0,015	-	-	M
<b>C</b>	12	100	13	<b>1,1</b>	-	-	M+1
<b>N</b>	14	100	15	<b>0,37</b>	-	-	M+1
<b>O</b>	16	100	17	0,04	18	0,2	M+2
<b>F</b>	19	100	-	-	-	-	M
<b>Si</b>	28	100	29	5,1	30	3,4	M+2
<b>P</b>	31	100	-	-	-	-	M
<b>S</b>	32	100	33	0,79	34	4,4	M+2
<b>Cl</b>	35	100	-	-	37	<b>32</b>	M+2
<b>Br</b>	79	100	-	-	81	<b>97,3</b>	M+2
<b>I</b>	127	100	-	-	-	-	M

# Chyba stanovení správné m/z

jaká chyba je vyžadována?

- Rozdíl mezi přesnou (měřenou) a správnou (vypočítanou) hmotou.
- Schopnost měřit nebo kalibrovat odezvu přístroje vůči známé hodnotě

$$\text{Chyba (mass error) [ppm]} = \frac{(\text{přesná hmotnost} - \text{správná hmotnost}) \times 10^6}{\text{správná hmotnost}}$$

*Sloučenina s hmotností 1000 Daltonů:*

<b>1000 ± 1.0 Da</b>	<b>± 1000 ppm</b>
1000 ± 0.5 Da	± 500 ppm
1000 ± 0.1 Da	± 100 ppm
1000 ± 0.01 Da	± 10 ppm
<b>1000 ± 0.001 Da</b>	<b>± 1 ppm</b>

*Sloučenina s hmotností 100 Daltonů:*

<b>100 ± 1.0 Da</b>	<b>± 10000 ppm</b>
100 ± 0.5 Da	± 5000 ppm
<b>100 ± 0.1 Da</b>	<b>± 1000 ppm</b>
100 ± 0.01 Da	± 100 ppm
100 ± 0.001 Da	± 10 ppm
200 ± 0.001 Da	± 5 ppm
<b>100 ± 0.0001 Da</b>	<b>± 1 ppm</b>
200 ± 0.0001 Da	± 0,5 ppm



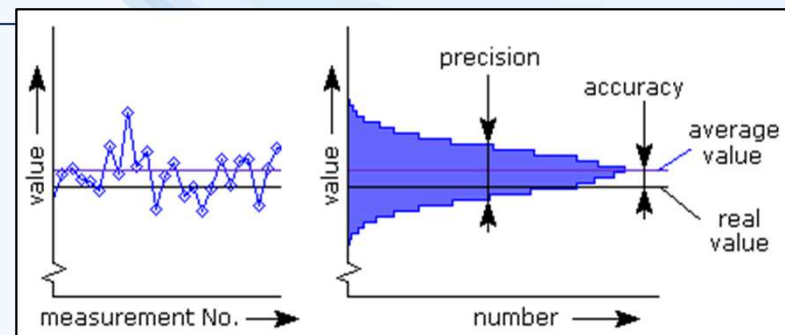
# Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013)

## 6. accurate mass

Experimentally determined mass of an *ion* of known charge.

*Note 1:* Can be used to determine elemental composition to within limits defined by both the accuracy and precision of the measurement.

*Note 2:* **Accurate mass and exact mass are not synonymous.** *Accurate mass* refers to a measured mass, and *exact mass* refers to a calculated mass.



## 6. přesná hmotnost

Experimentálně stanovená hmotnost iontu známého náboje.

Pozn. 1: Lze použít k určení prvkového složení v mezích stanovených jak přesností tak precizností měření.

Pozn. 2: **Přesná hmotnost a správná hmotnost nejsou synonyma.**

*Přesná hmotnost* je určena měřením na rozdíl od hodnoty teoreticky vypočtené, což je *správná hmotnost*.

# Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013)

## 163. exact mass

**Calculated** mass of an *ion* or molecule with specified isotopic composition.

## 163. Správná hmotnost

**Vypočítaná** hmotnost iontu nebo molekuly se specifikovaným izotopovým složením.

---

**Přesná** hmotnost odkazuje na naměřené hmotnosti,  
**Správná** hmotnost odkazuje na vypočtenou hmotnost.

Přesnost  
*Accuracy*

• **AC**curate is **C**orrect (or **C**lose to real value)

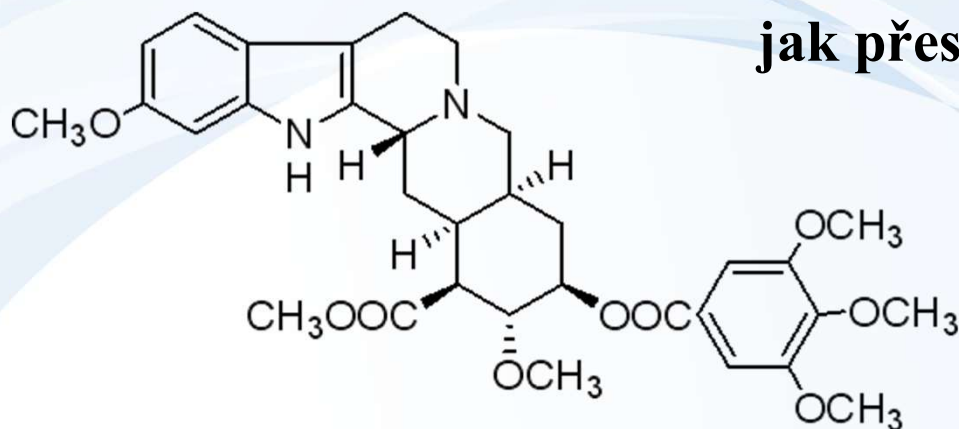
Preciznost  
*Precision*

• **PR**ecise is **R**epeating (or **R**epeatable)

Pravdivost  
Správnost  
*Trueness*

# Chyba stanovení správné m/z

jak přesné stanovení hmotnosti je vyžadováno ?



Reserpine (C<sub>33</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>)

protonovaný ion  $M_r = 609.28066$  [M+H]<sup>+</sup>

Chyba stanovení správné (vypočtené) m/z hmotnostním spektrem:

± 0.1 = 164,1 ppm      609.38066

± 0.01 = 16,4 ppm      609.29066

± 0.001 = 1,6 ppm      609.28166

Počet možných vzorců (C, H, O a N):

165 ppm      209

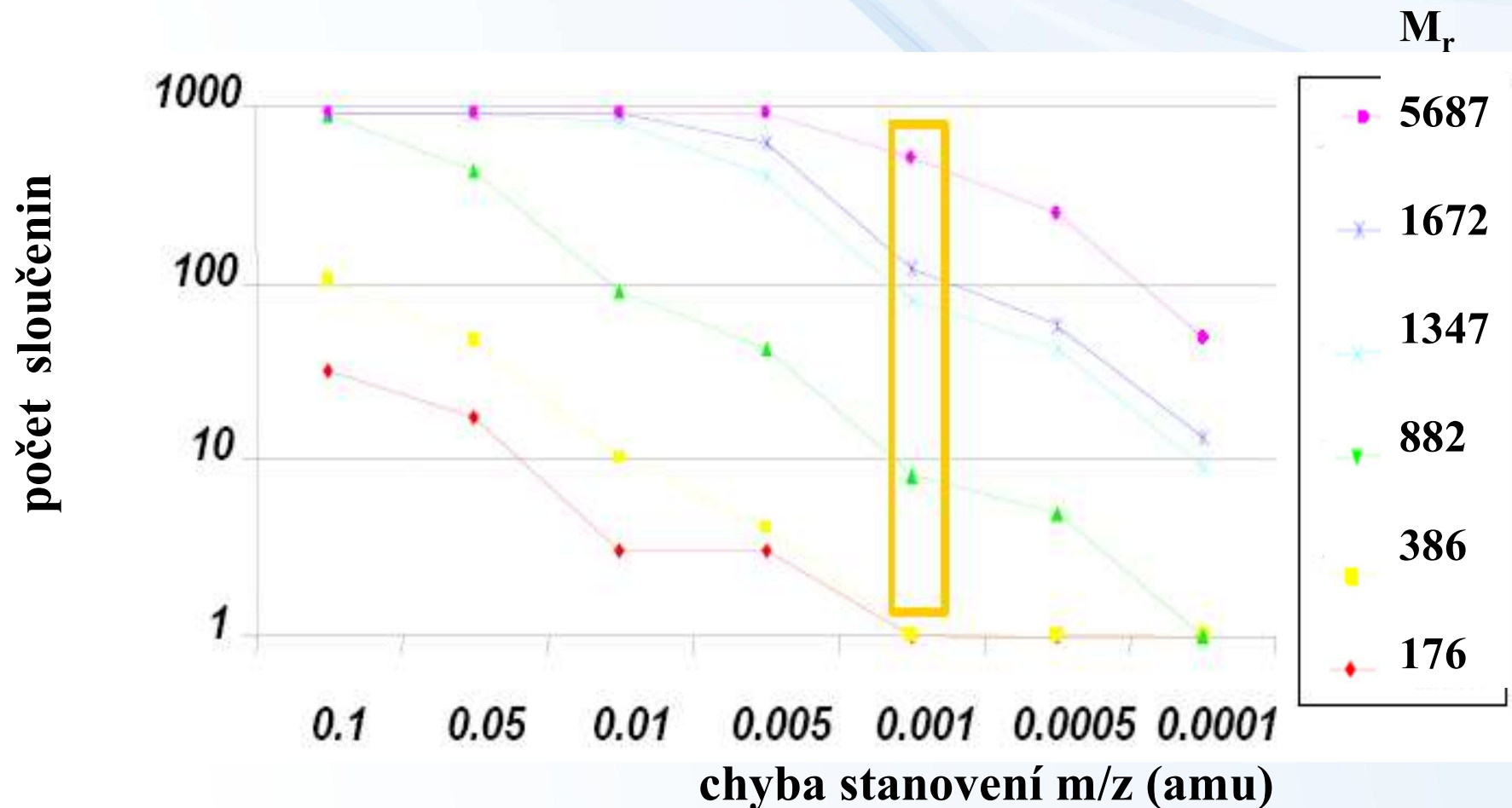
10 ppm      13

5 ppm      7

3 ppm      4

2 ppm      2

# Vztah mezi chybou stanovení m/z a počtem možných sloučenin

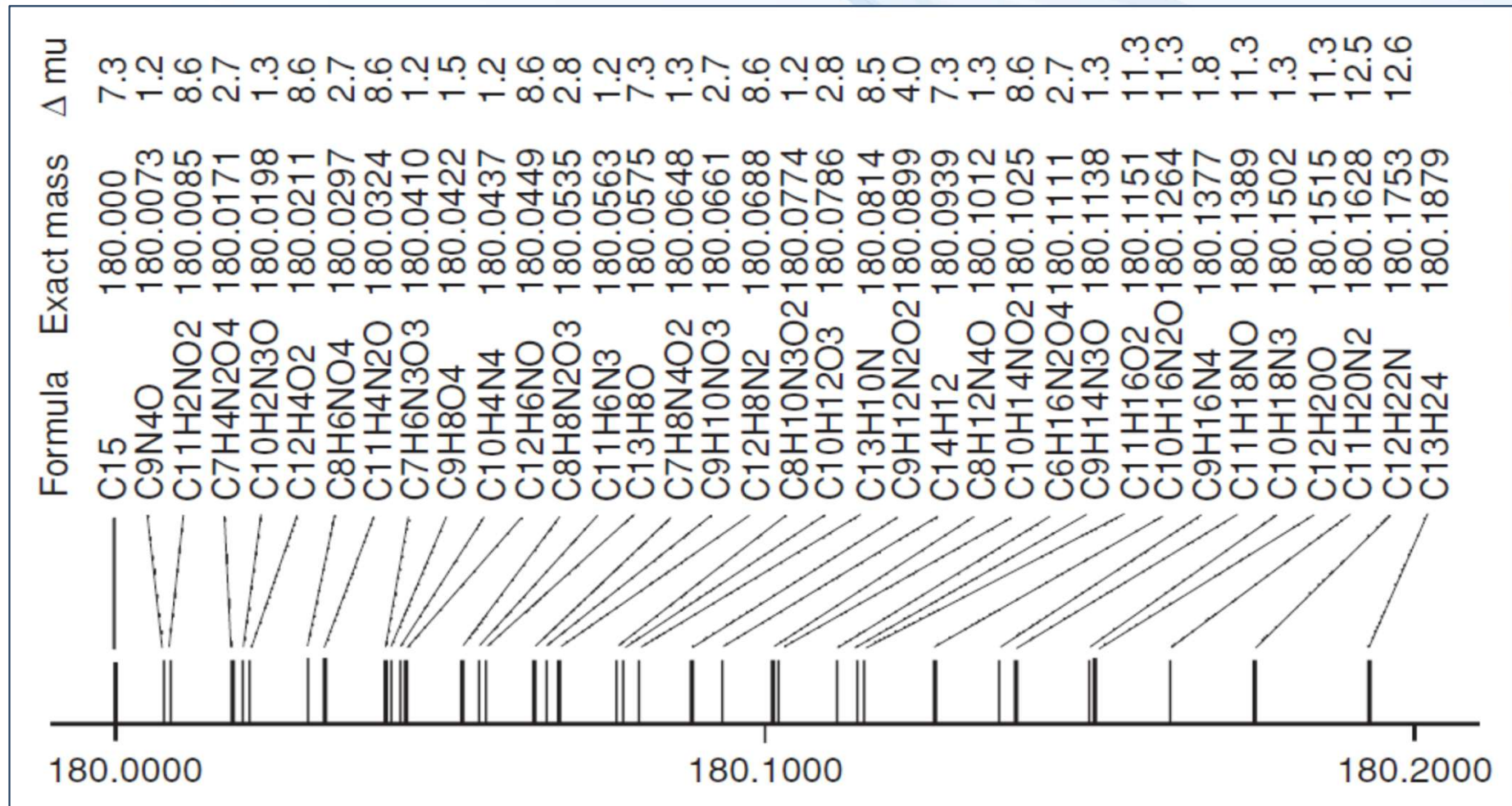


amu – atomic mass unit

# Chyba stanovení správné m/z

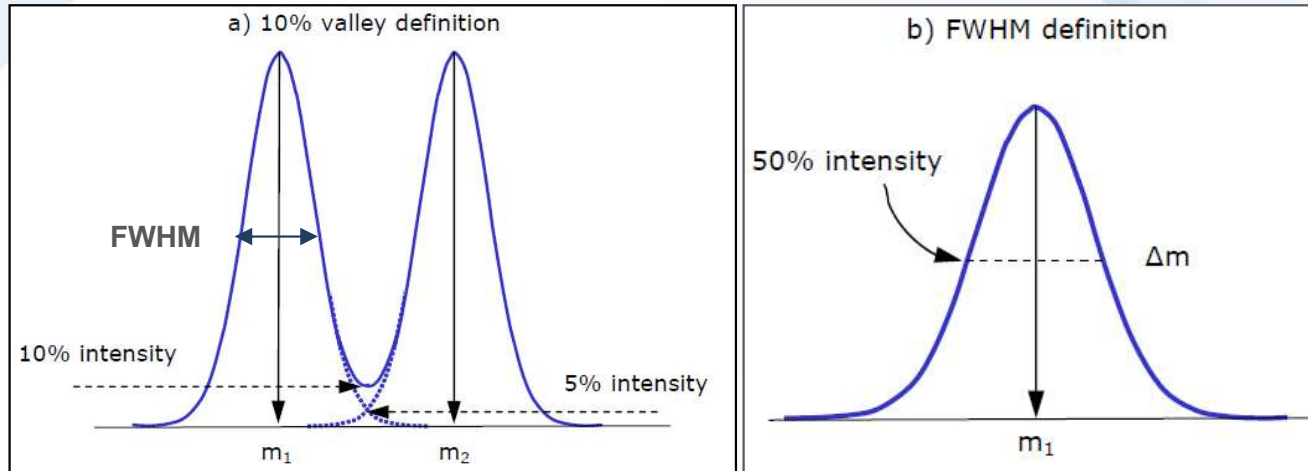
Správné hmotnosti a odpovídající vzorce různých možných iontů m/z 180 obsahující pouze C, H, N a O

$\Delta mu$  – rozdíl hmot sousedních čar x  $10^3$



# Rozlišovací schopnost hmotnostních spektrometrů

## Rozlišení - Resolution



$$\text{R.P.} = m_1 / (m_2 - m_1)$$

$$\text{R.P.} = m_1 / (\Delta m / z)$$

## R.P. resolving power

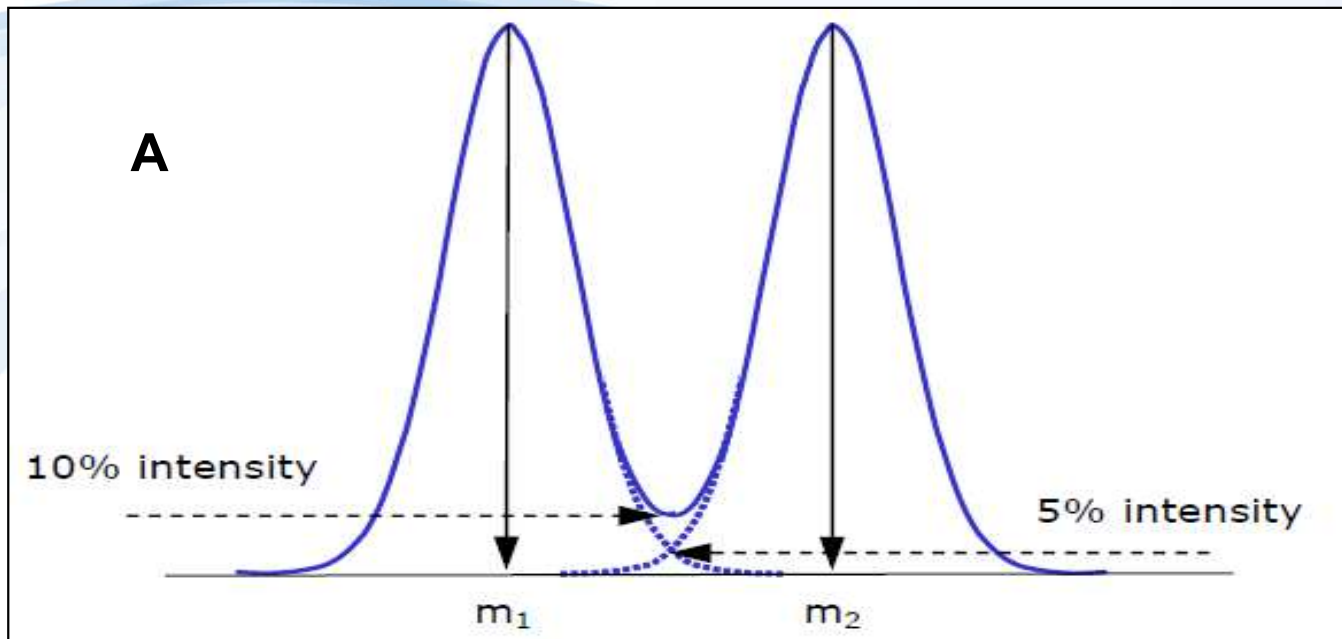
kvantifikovaná schopnost izolovat jednotlivé píky hmotnostního spektra

Analogie chromatografie  $t_R / \sigma$

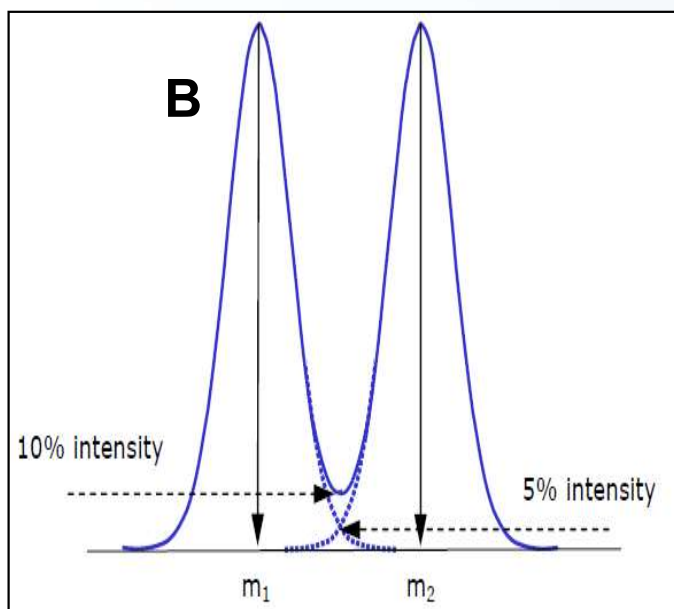
### DEFINOVANÁ

- pro 10% překryv dvou sousedních píků **nebo**
- pro izolovaný pík poměr hmotnosti iontu tvořící pík k šířce tohoto píku obvykle v 5% nebo 10%, 50% jeho výšky

FWHM full width at half maximum



$$R.P._{(A)} = m_1 / (m_2 - m_1)$$



$$R.P._{(B)} = m_1 / (m_2 - m_1)$$

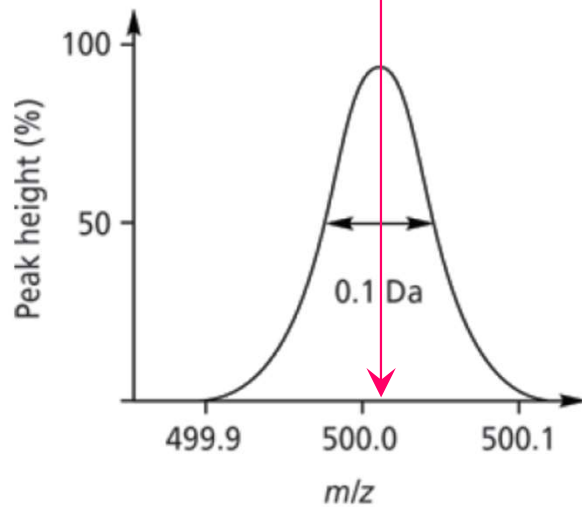
$$(m_2 - m_1)_A > (m_2 - m_1)_B$$

$$R.P._{(A)} > R.P._{(B)}$$



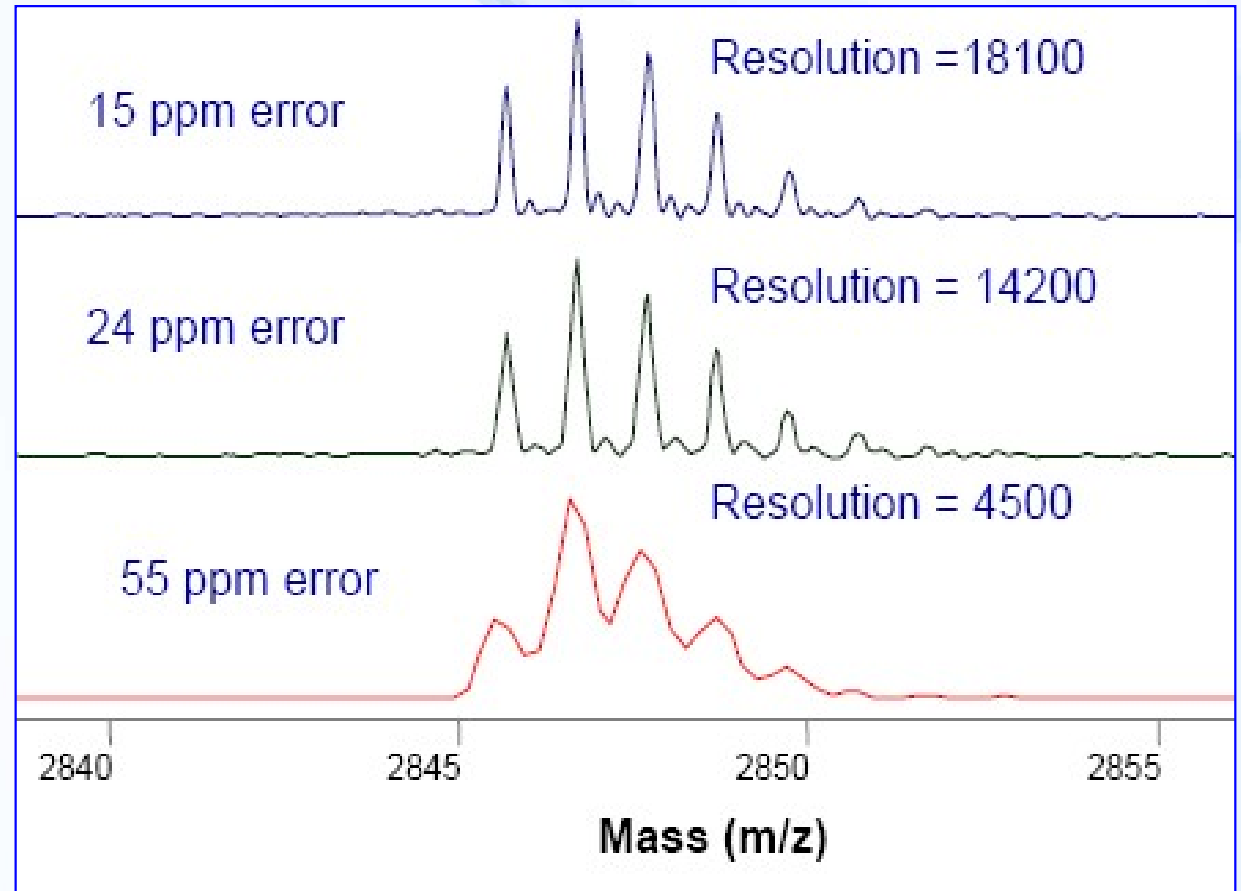
# Rozlišovací schopnost hmotnostních spektrometrů

True mass = 500.0000  
Measured mass = 500.0020  
Difference = 0.0020  
Error =  $0.002/500 \times 10^6 = 4\text{ppm}$



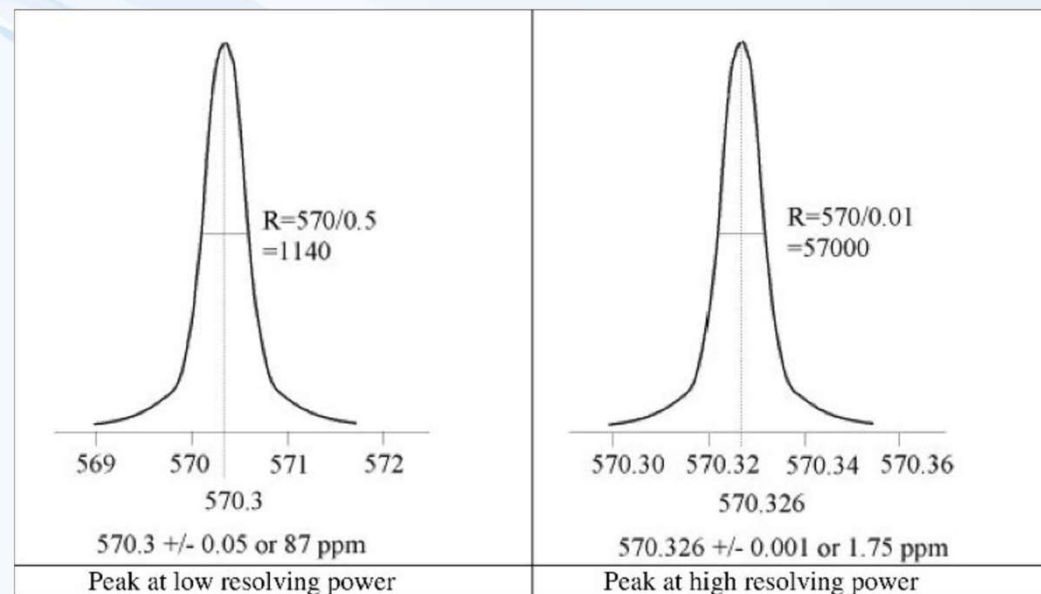
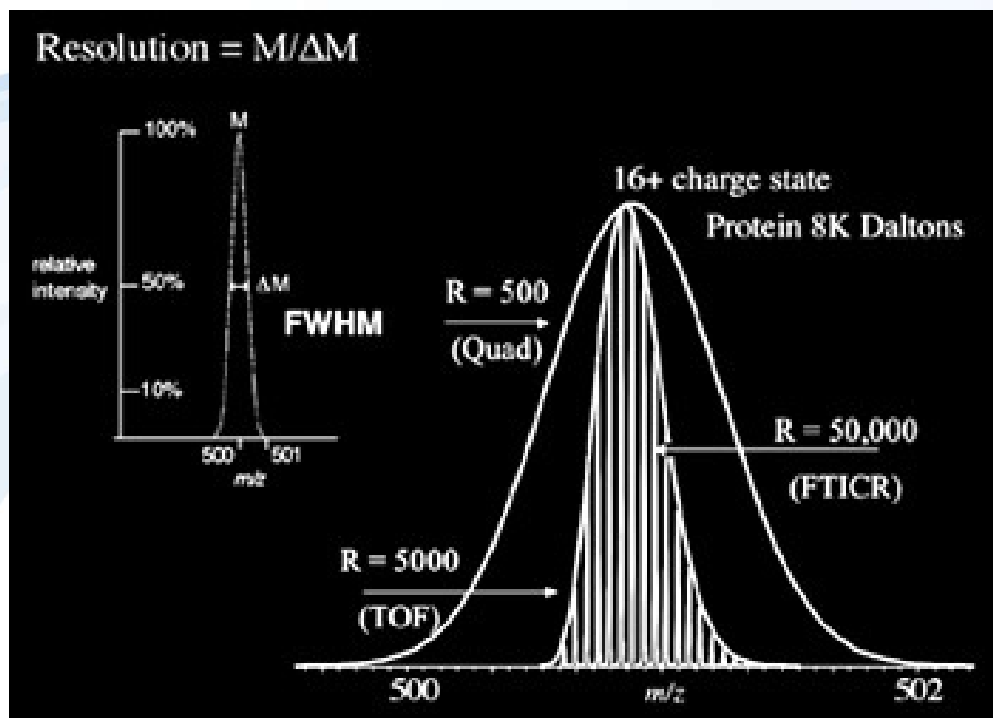
Mass = 500  
Peak width (at 50%) = 0.1  
Resolution (FWHM) =  $\frac{500}{0.1} = 5000$

**Vysoké rozlišení znamená větší přesnost hmotnosti**





# Rozlišovací schopnost hmotnostních spektrometrů



Poloha iontů v hmotnostním spektru

- nízkorozlišovací (LRMS) do cca R.P. 5000
- vysokorozlišovací (HRMS) nad R.P. 15000

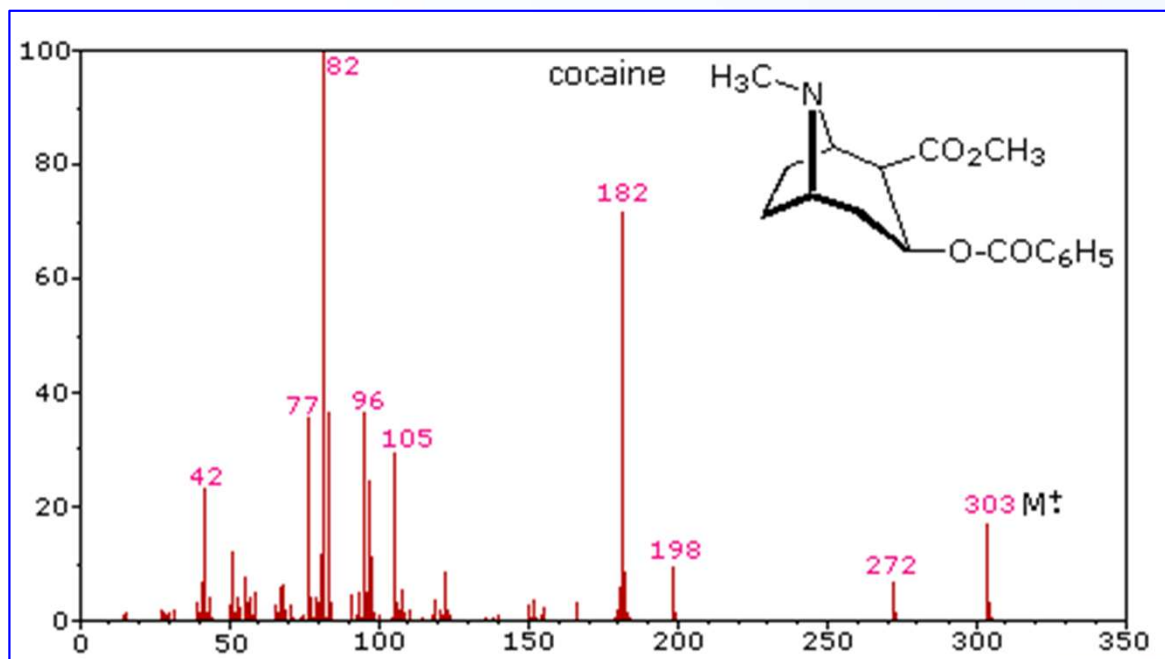
*kvadrupol, iontová past*

*orbitrap, TOF, sektor, FTICR*

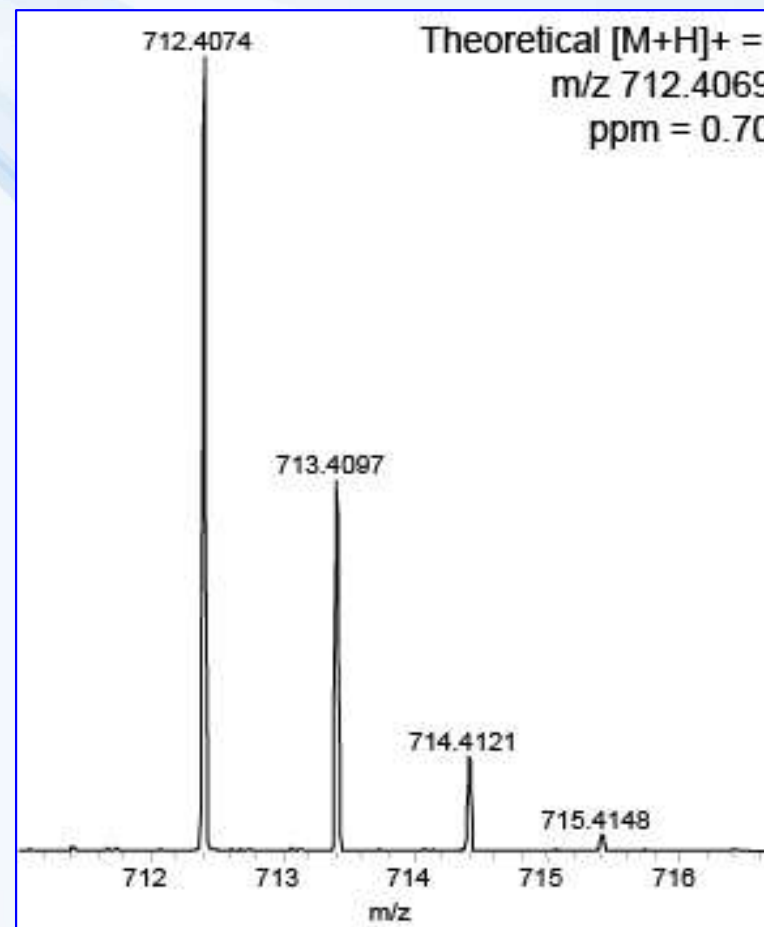
množství uvolněné jaderné energie při vzniku jádra daného druhu

*FTICR-Fourier transform ion cyclotron resonance*

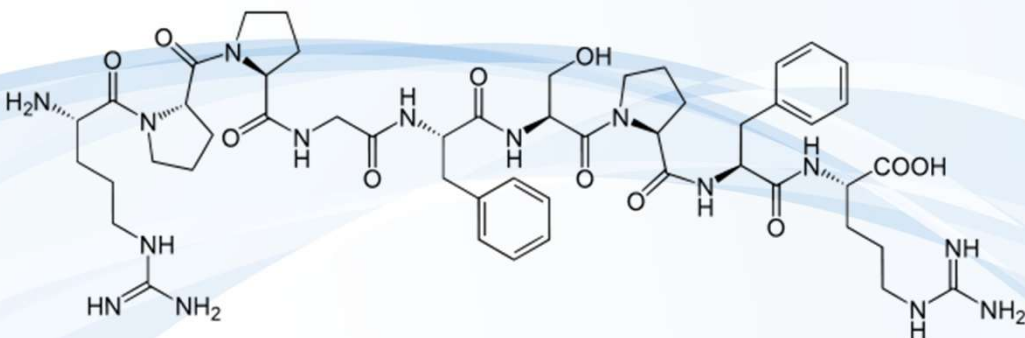
# Rozlišovací schopnost hmotnostních spektrometrů



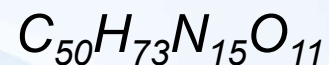
LRMS - Low Resolution MS



HRMS - High Resolution MS



Bradykinin - peptid



# Rozlišovací schopnost hmotnostních spektrometrů

