

# **Kvantitativní spektrometrie**

## **- specifické aspekty jednotlivých metod**

### **HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE**

- kvalitativní i kvantitativní detekce v GC a LC**
- pyrolýzní hmotnostní spektrometrie**
- analýza polutantů v životním prostředí**
- farmakokinetické studie**
- kvantifikace proteinů - priony**
- analýza nukleových kyselin**

### **IDENTIFIKACE LÁTEK, STRUKTURNÍ ANALÝZA, PRVKOVÁ ANALÝZA, KVANTITATIVNÍ ANALÝZA**

- použití vnitřního standardu**

# **Specifické aspekty jednotlivých metod**

## **HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE**

- **MS - mass spectrometry**
- **MS - mass spectrometer**
- **MS - mass spectrum**
  
- **destruktivní metoda, minimální spotřeba vzorku**

**SPEKTROMETR - iontově-optické zařízení**

- **separace iontů podle *m/z***

# **Specifické aspekty jednotlivých metod**

## **HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE**

- 1899 - počátky hmotnostní spektrometrie
- cca 1940 - použití v petrochemickém průmyslu
- 1946 - TOF MS - „time of flight“
- 1953 - kvadrupólová MS
- 1956 - identifikace organických látek pomocí MS
- 1964 - GC-MS
- 1966 - chemická ionizace
- 1980 - ICP-MS
- 1996 - MS viru

# **Specifické aspekty jednotlivých metod**

## **HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR**

- **vstup** - zavedení vzorku
- **iontový zdroj** - ionizace
- **separátor (analyzátor)** - separace iontů podle  $m/z$
- **detektor** - četnost daného typu iontů
- **zpracování signálu** - spektrální výstup
- **vakuový systém** - vyloučení srážek iontů

# **Specifické aspekty jednotlivých metod**

## **HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR**

- vstup - zavádění vzorku do spektrometru
  - přímý vstup
  - přes zásobník - studený či vyhřívaný
  - chromatografický vstup - GC
    - LC

# **Specifické aspekty jednotlivých metod**

## **HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR**

- **iontový zdroj - ionizace a fragmentace vzorku**
  - **elektronová ionizace - ionizace nárazem elektronů - EI - electron ionization (impact)**
  - **chemická ionizace - CI**
  - **ionizace urychlenými atomy - FAB**
  - **ionizace polem - FI**
  - **ionizace laserem za účasti matrice - MALDI**
  - **termosprej - TSI, plasmasprej - PSI**
  - **elektrosprej - ESI**

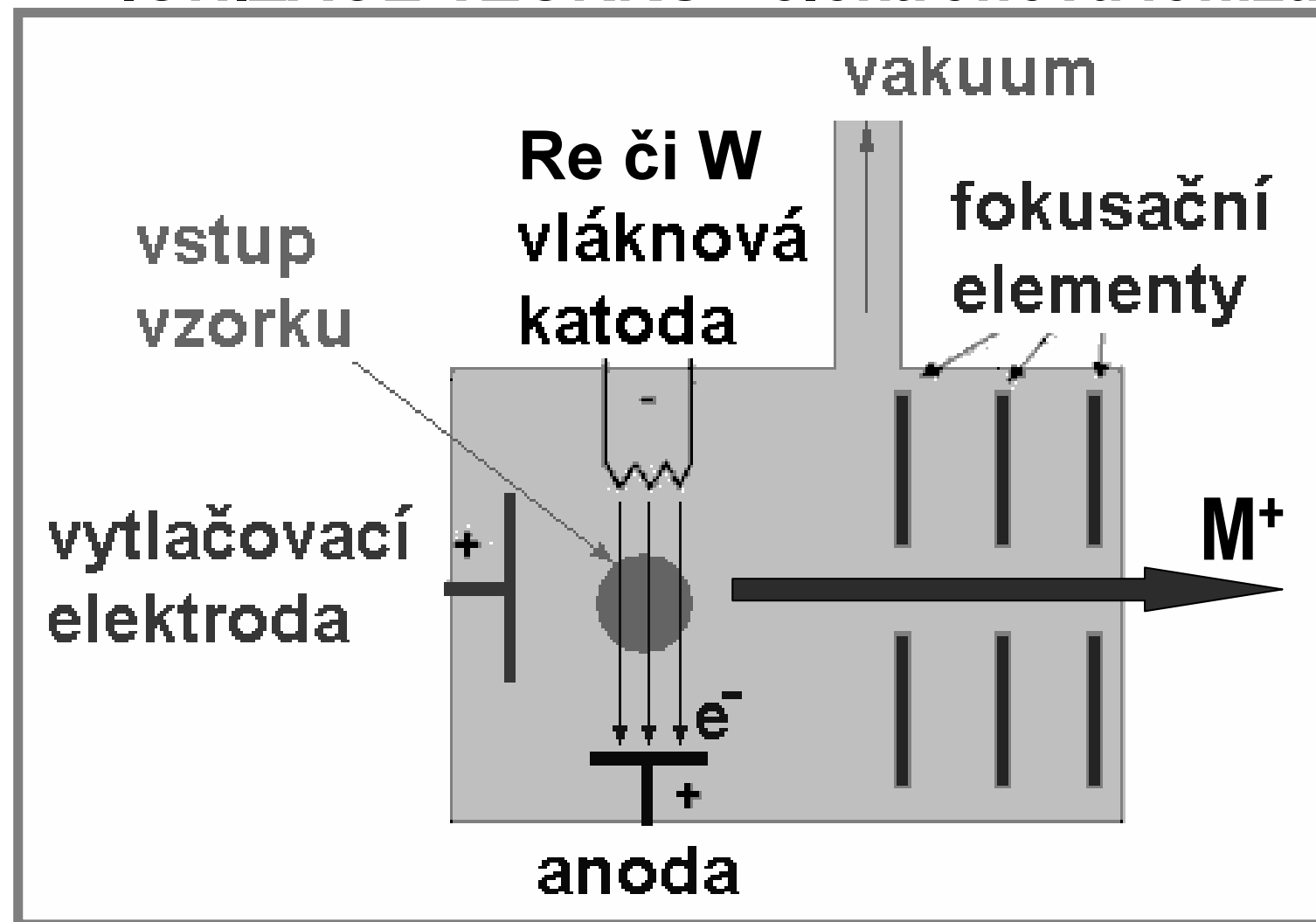
# **Specifické aspekty jednotlivých metod**

## **IONIZACE VZORKU**

- **elektronová ionizace - EI**
- **konvenční technika (od roku 1913)**
- **$M + e^- \longrightarrow M^+ + 2 e^-$**
- **„tvrdá“ ionizační technika**
  - **fragmentace molekuly na menší části**
  - **slabá intenzita molekulárního píku**
    - **těkavé látky**
    - **termostabilní látky**

# Specifické aspekty jednotlivých metod

## IONIZACE VZORKU - elektronová ionizace - EI



urychlující  
potenciál  $e^-$   
5 - 100 eV  
- běžně 70 eV

záporně  
nabité ionty  
- záchyt  $e^-$   
vychytávány  
vytlačovací  
elektrodou



# **Specifické aspekty jednotlivých metod**

## **IONIZACE VZORKU**

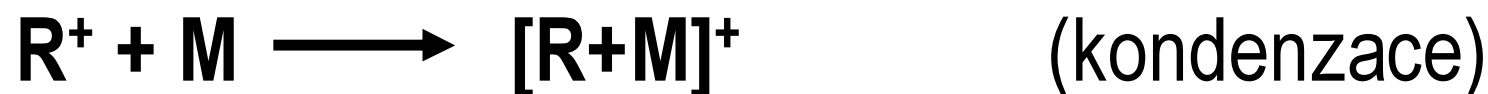
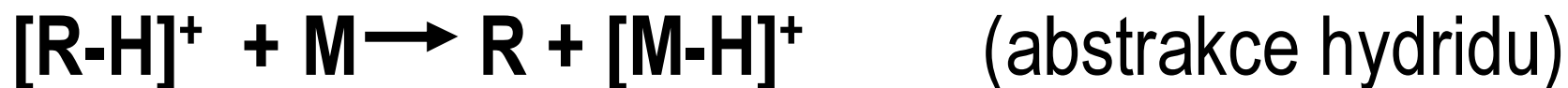
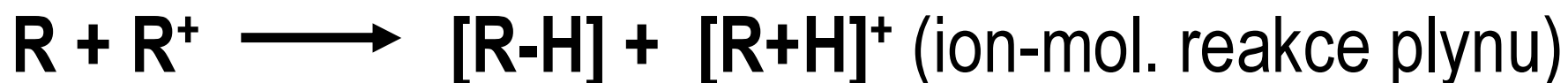
- chemická ionizace - CI
- konstrukce zdroje podobná jako pro EI
- ve zdroji přítomen **REAKČNÍ PLYN** v nadbytku  
vůči vzorku
- ionizace reakčního plynu - methan, amoniak,  
isobutan, propan, voda, dusík
  - reakce iontů s molekulami analytu
  - tvorba aduktů

# Specifické aspekty jednotlivých metod

## IONIZACE VZORKU

- chemická ionizace - CI

- základní mechanismy ion-molekulárních reakcí



# **Specifické aspekty jednotlivých metod**

## **IONIZACE VZORKU**

- chemická ionizace - CI
- méně výrazná fragmentace než u EI
- též vznik záporných iontů
  - záchyt elektronu
  - deprotonace
  - adice halogenidu

# **Specifické aspekty jednotlivých metod**

## **IONIZACE VZORKU**

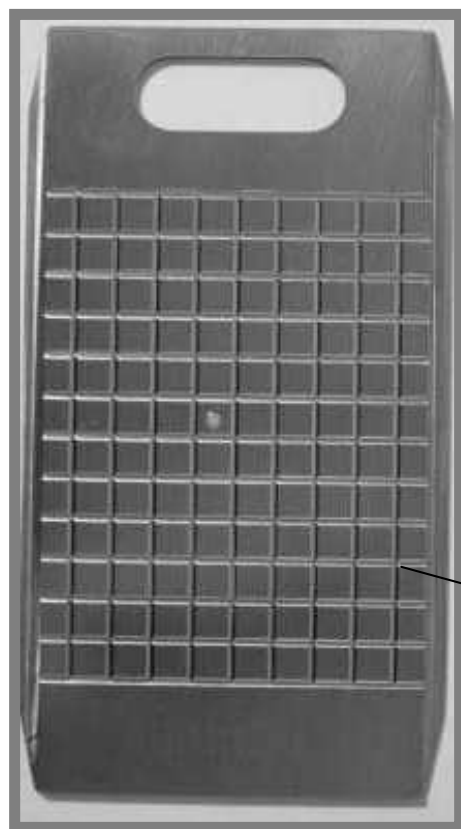
- ionizace urychlenými atomy - FAB
  - urychlené atomy Xe, Ar
  - na terčičku vzorek ve viskosní matrici
    - **matrice** - chemicky inertní, málo těkavá
      - glycerol, thioglycerol
      - kapalné kovy - Ga, In
  - vznik aduktů (s matricí)
  - jedna z šetrnějších ionizačních technik

# **Specifické aspekty jednotlivých metod**

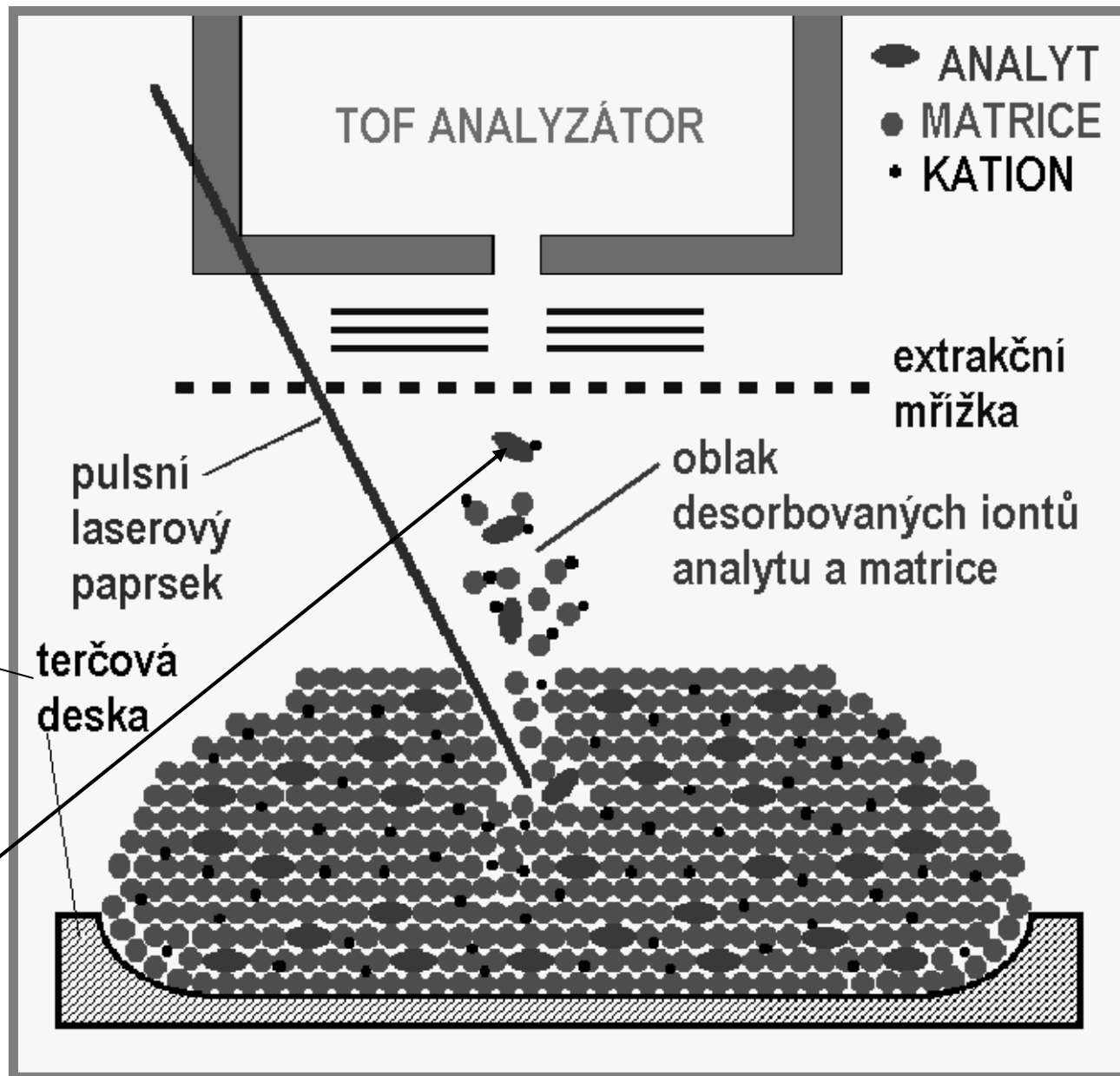
## **IONIZACE VZORKU**

- ionizace laserem za účasti matrice - MALDI
  - velmi šetrná ionizační technika
    - vhodné pro biomolekuly - proteiny, oligosacharidy
- pulzní lasery - UV - dusíkový - 337 nm (4 ns) - IR - Er-YAG - 2940 nm
- matrice musí absorbovat laserové záření -
  - kys. dihydroxybenzoová, chlorsalicylová, skořicová, nikotinová
  - nutný přebytek matrice (5000 :1)
- kovová podložka - terč

# Specifické aspekty jednotlivých metod IONIZACE VZORKU - MALDI



$[M+H]^+$



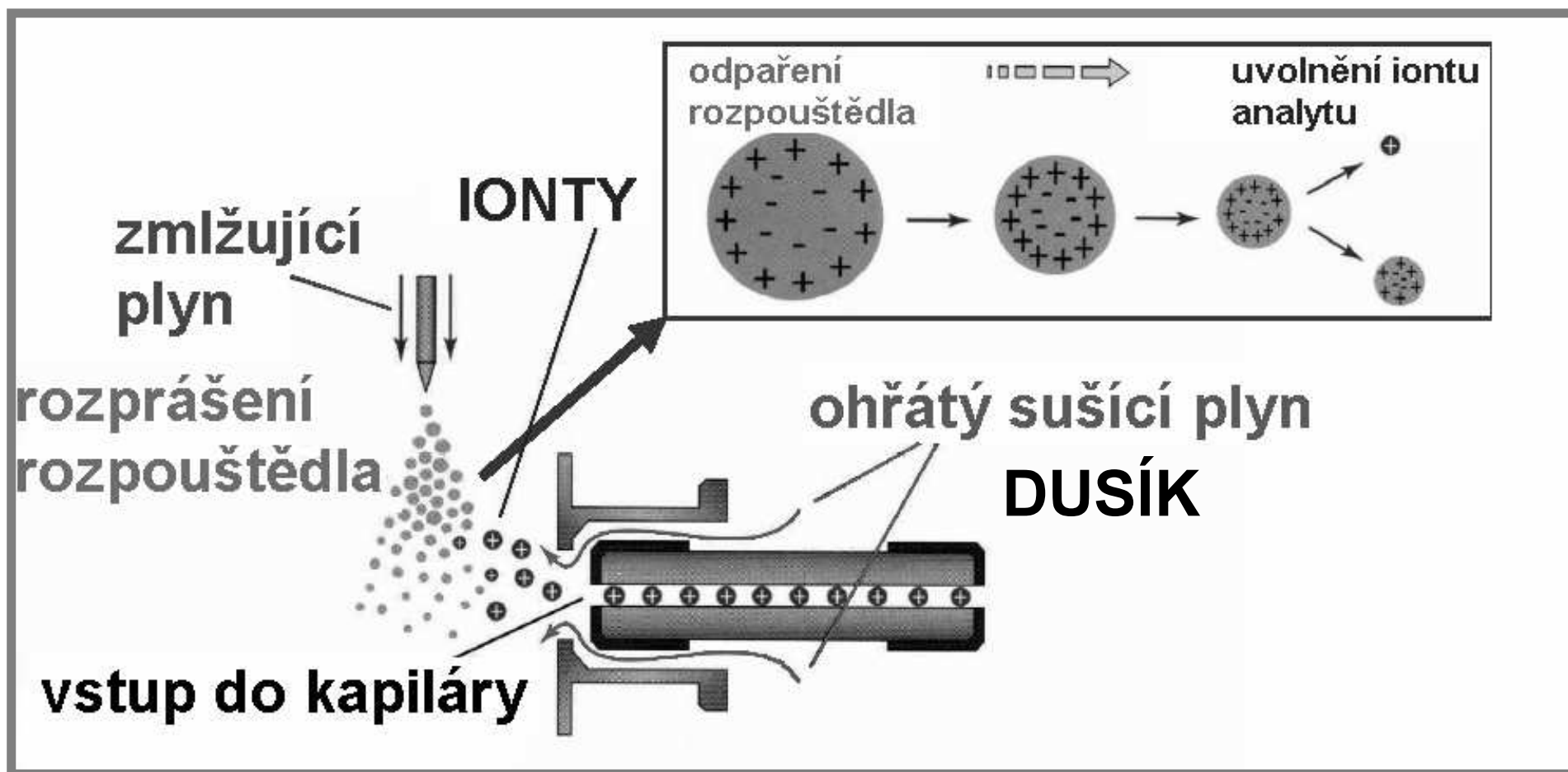
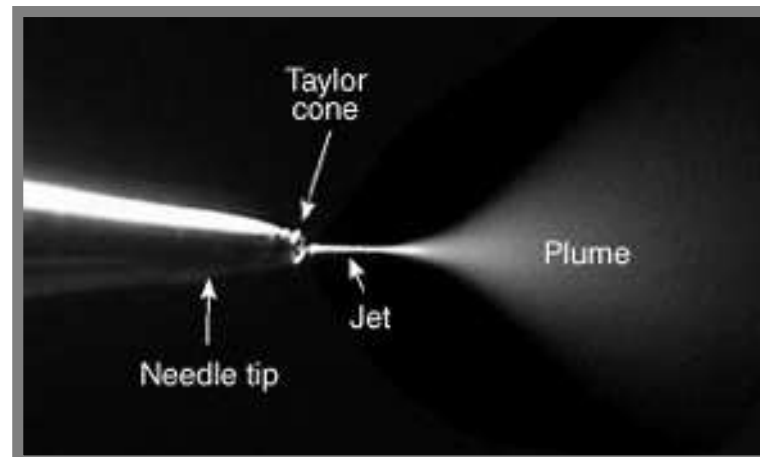
# **Specifické aspekty jednotlivých metod**

## **IONIZACE VZORKU**

- **ionizace elektrosprejem - ESI**
  - **velmi šetrná ionizační technika**
    - vhodné pro biomolekuly
  - **vhodné pro vzorky v roztoku (výstup z LC)**
  - **„vypařování iontů“** - rostoucí hustota náboje ve zmenšující se kapičce
  - na kovové kapiláře vloženo vysoké napětí na rozdíl od termosprejové ionizace TSI (TSI - vyhřívaná kapilára)

# IONIZACE VZORKU

- ionizace elektrosprejem - ESI





# **Specifické aspekty jednotlivých metod**

## **HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR**

- **separátory iontů - analyzátory - vysoké vakuum**
  - **sektorové (magnetické pole + elektrická fokusace)**
  - **kvadrupolové (vysokofrekvenční pole)**
  - **iontová past (vysokofrekvenční pole)**
  - **průletový analyzátor - TOF**
  - **iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR)**

# **Specifické aspekty jednotlivých metod**

## **HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR**

**- separátory iontů - analyzátory - vysoké vakuum**

**KLÍČOVÝ PARAMETR - rozlišovací schopnost  
(resolving power - RP)**

**$RP = m_1 / (m_1 - m_2)$  (dva stejně vysoké píky,  
údolí mezi nimi 10% jejich výšky)**

$$RP = m / \Delta m_{FWHM}$$

**spektrální ROZLIŠENÍ - reciproká hodnota RP -  
relativní ještě rozlišitelný rozdíl hmotností**

# Specifické aspekty jednotlivých metod

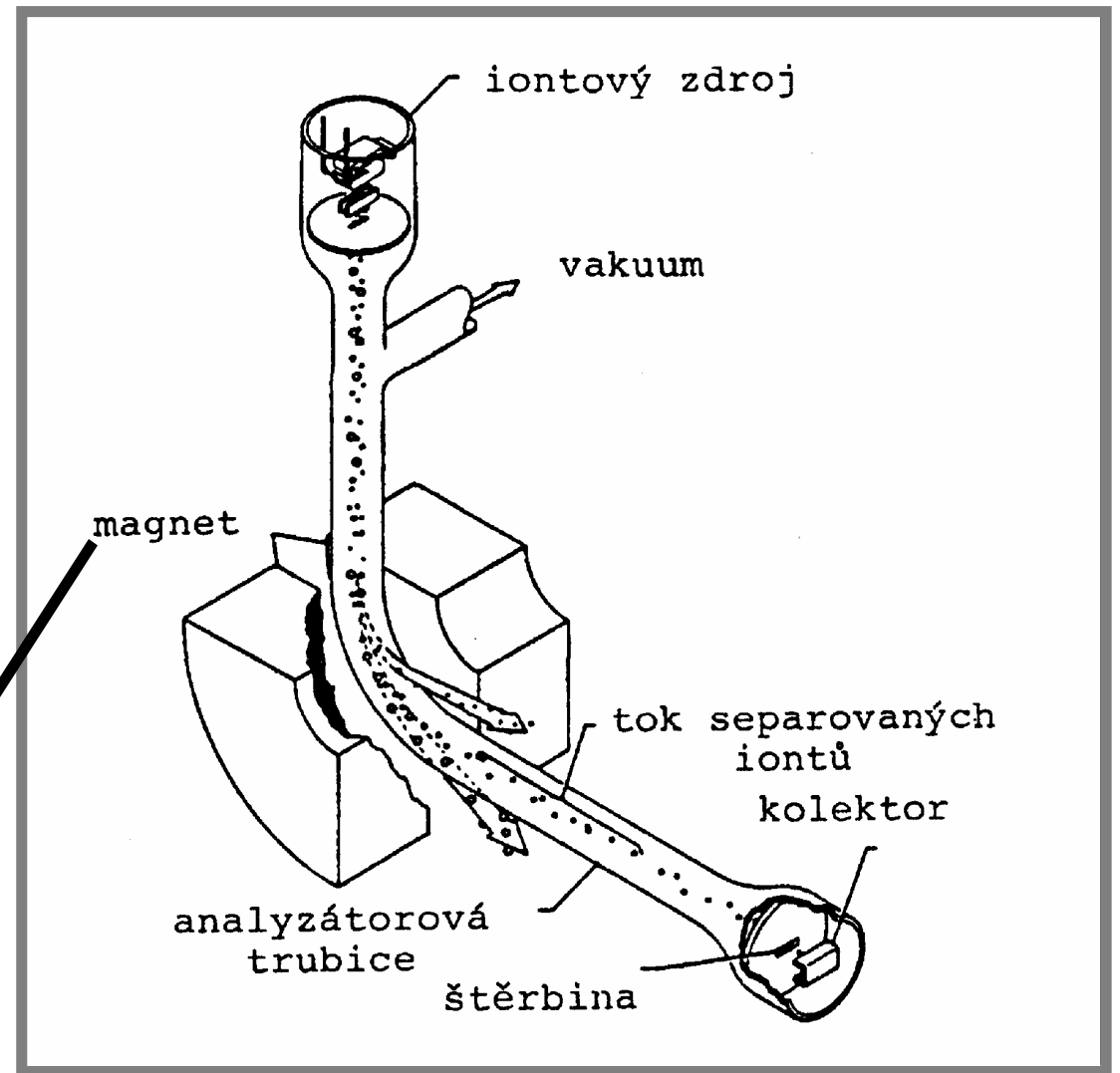
## HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR - separátory iontů

- magnetický s jednoduchou fokusací
- zakřivení dráhy letu iontů

těžší ionty -  
větší odstředivá síla

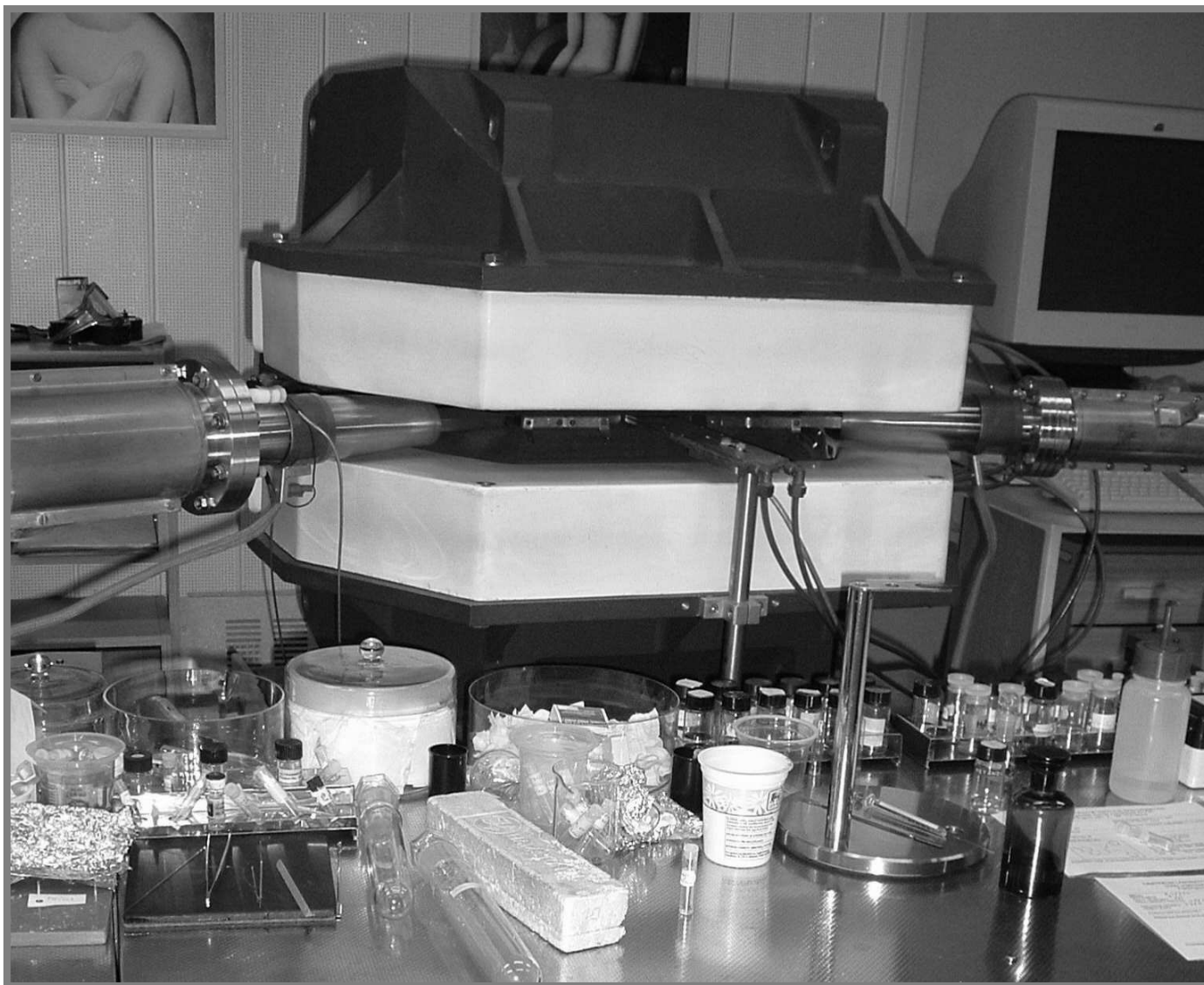
$$\frac{mv^2}{r}$$

- kruhová výseč



# Specifické aspekty jednotlivých metod

## HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR - magnetický separátor



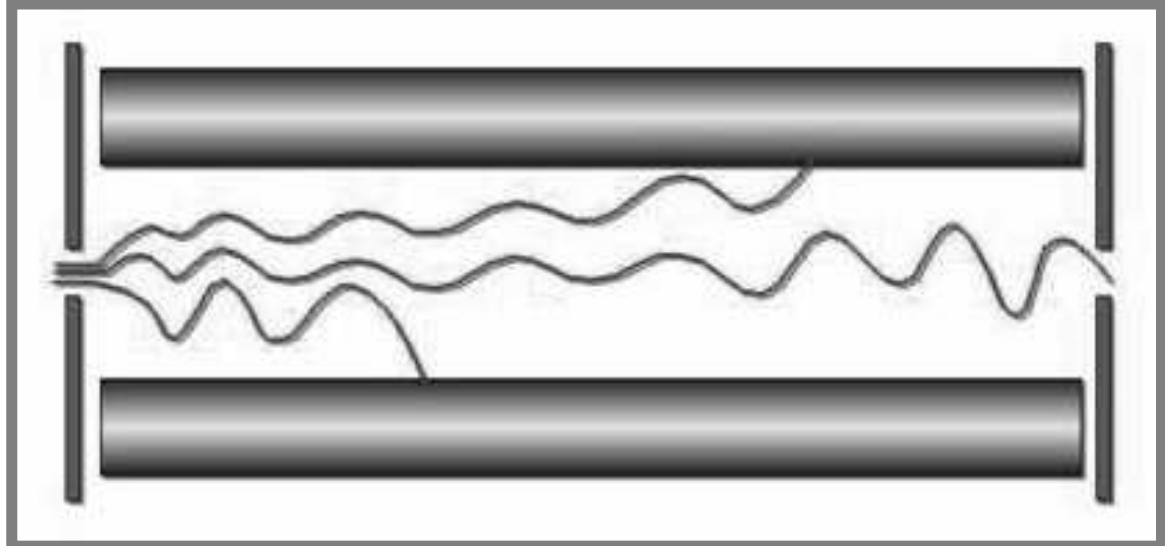
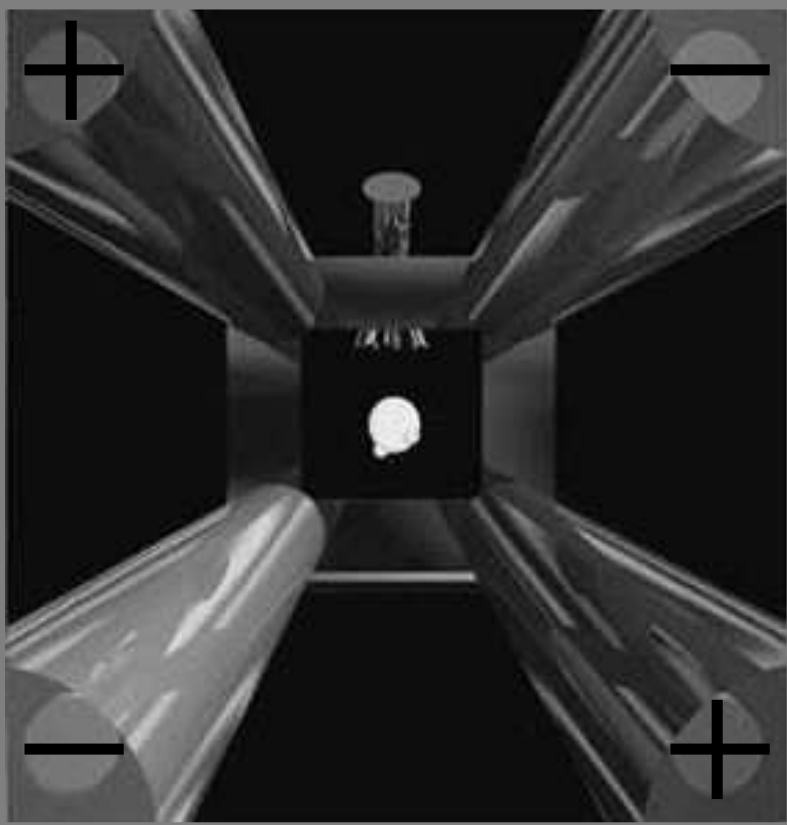
# **Specifické aspekty jednotlivých metod**

## **HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR - separátory iontů**

- magnetický s jednoduchou fokusací
  - zakřivení dráhy letu
    - dostředivá síla ( $B e v$ ) - úměrná magnetické indukci
    - odstředivá síla -  $mv^2/r$
  - při konstantním urychlovacím potenciálu a konstantní magnetické indukci odpovídá určité hmotnosti částic určitý poloměr zakřivení
- pro proměření spektra nutno plynule měnit buď urychlovací potenciál nebo magnetickou indukci

# HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR - separátory iontů

- kvadrupolový separátor - hmotnostní „filtr“
- různá stabilita oscilací iontů v kombinaci stejnosměrného napětí a vysokofrekvenční střídavé složky (10 MHz)



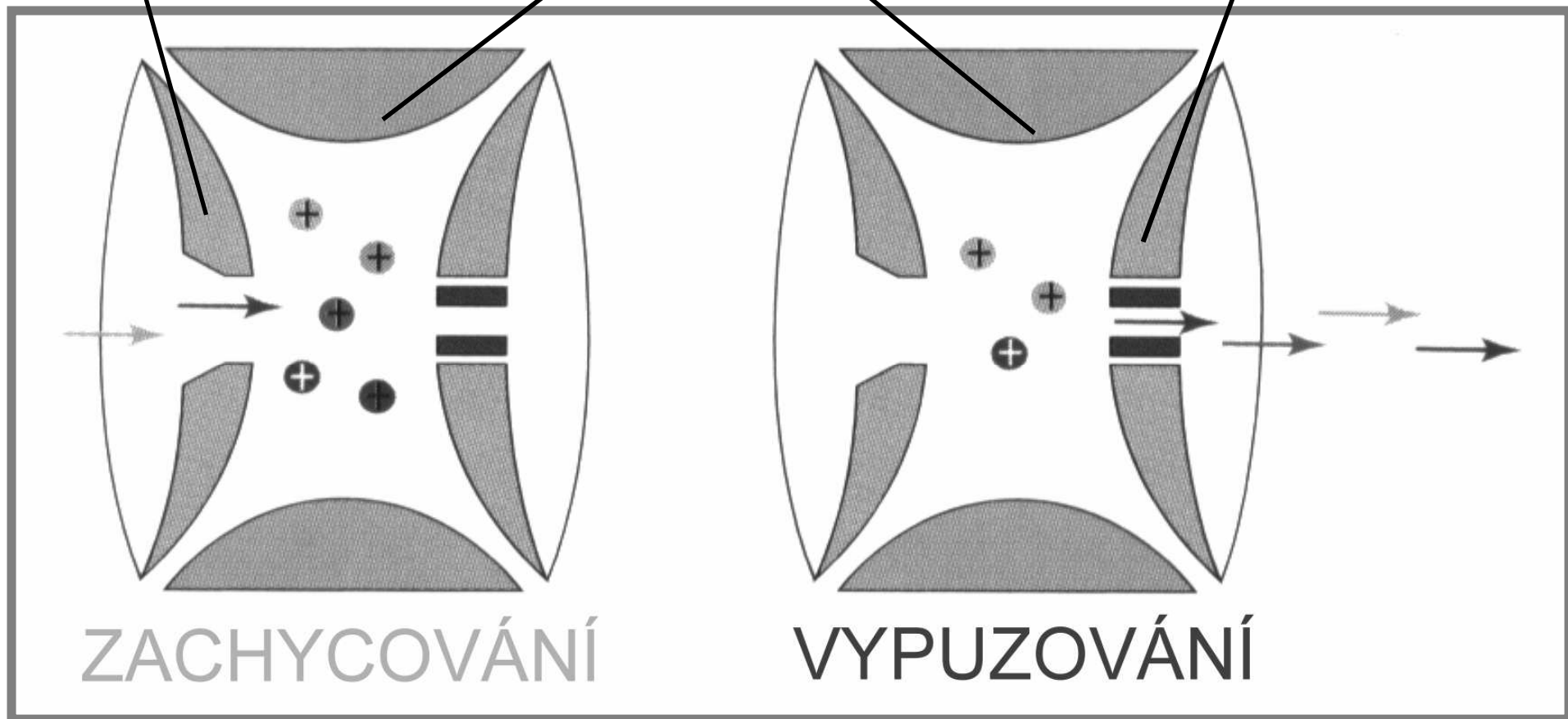
bud' plynulá změna radiofrekvence  
nebo současná změna hodnoty  
stejnosměrného napětí a amplitudy  
oscilací

# separátory iontů - iontová past - radiofrekvenčně modulované pole, možnost MS<sup>n</sup> analýzy

vstupní uzavírací elektroda

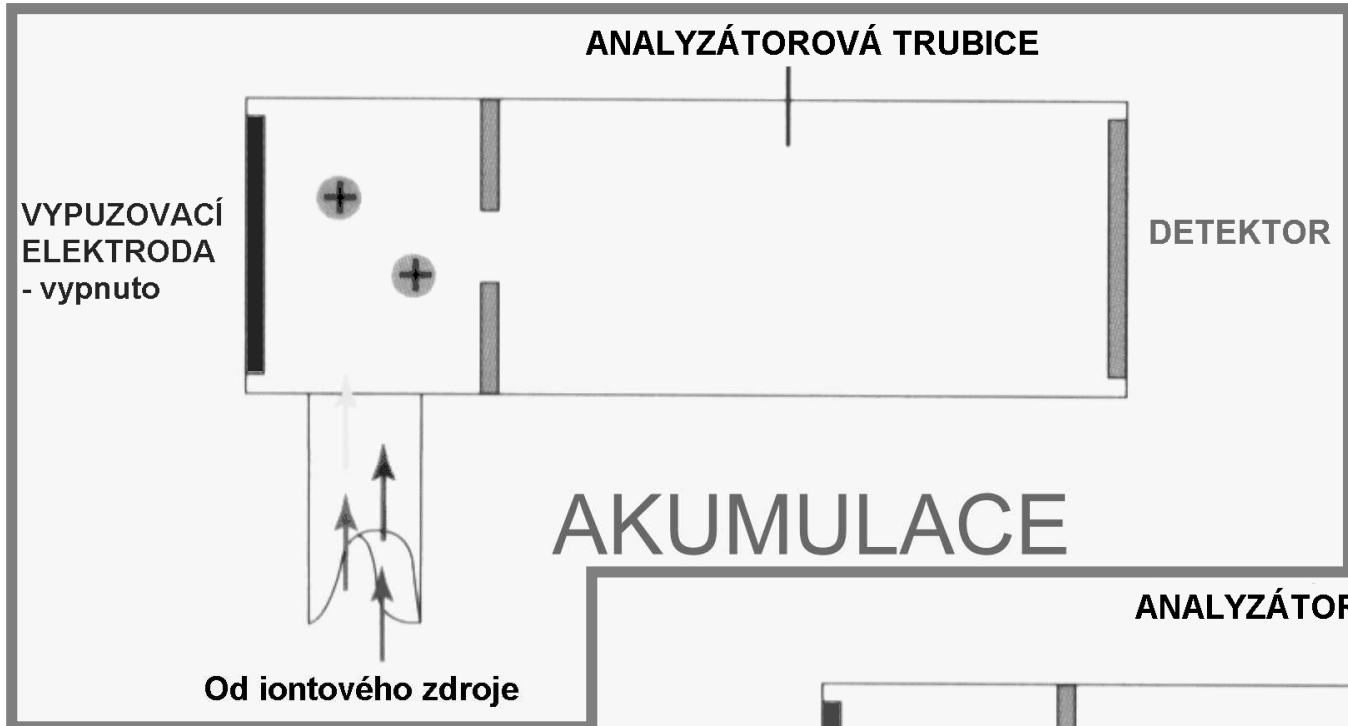
prstencová elektroda

výstupní uzavírací elektroda

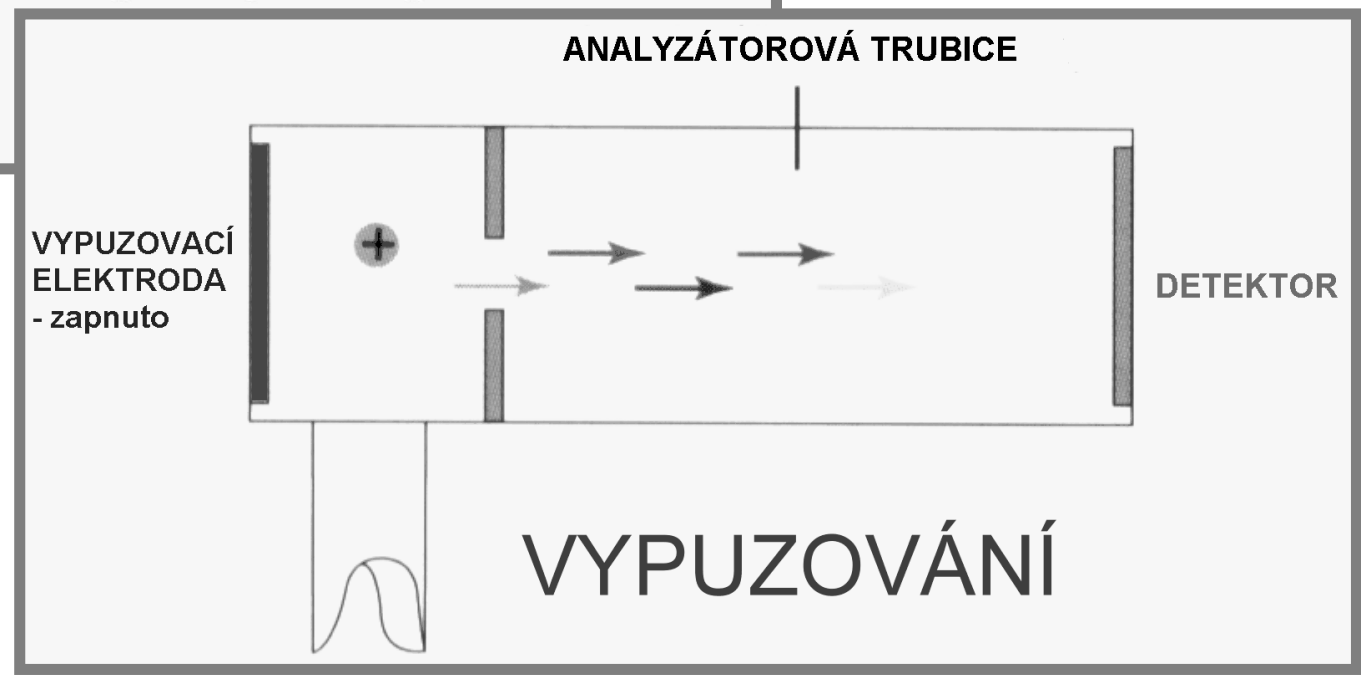


# HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR - separátory iontů

## - průletový analyzátor - TOF - různá doba letu iontů



**lehčí atomy  
jsou rychlejší**



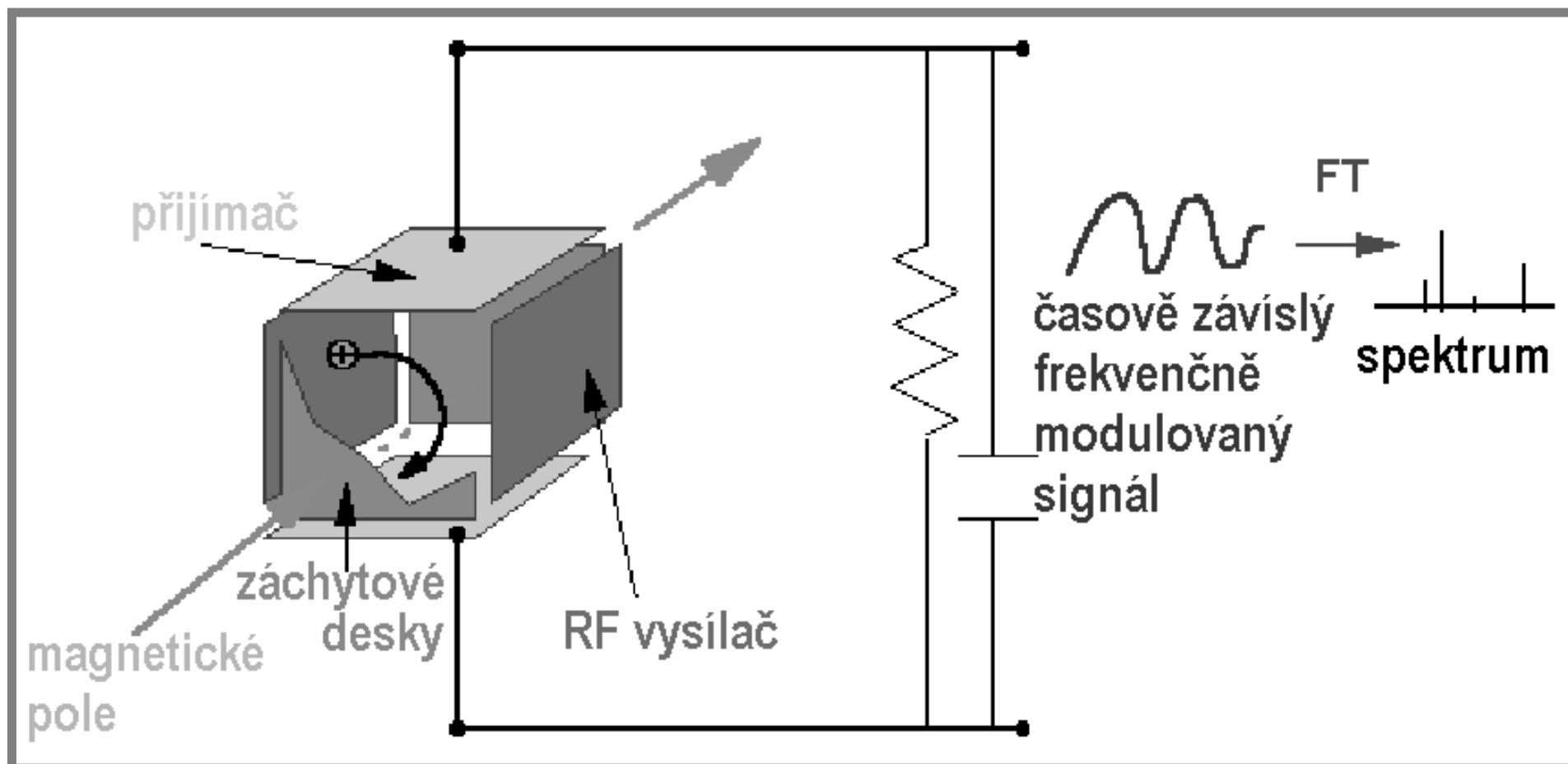


# **HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR**

- **separátory iontů - iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR)**
  - **záchyt na cykloidálních drahách**
- **různé absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném silném magnetickém (6 až 7 Tesla) a elektrickém poli**
- **každá hodnota  $m/z$  má charakteristickou cyklotronovou frekvenci**
- **vysoké rozlišení, vysoká přesnost, vysoká cena**

# Specifické aspekty jednotlivých metod HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR

- separátory iontů - iontová cyklotronová rezonance  
s Fourierovou transformací (FT-ICR)



# **Kvantitativní spektrometrie**

## **- specifické aspekty jednotlivých metod**

### **HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR**

- **detektor** - četnost daného typu iontů
  - **elektronový násobič**
  - kombinovaný **fotonásobič** - dopad iontů na fosforovou destičku - vyzáření fotonu - zesílení signálu
  - **Faradayova klec** - dopad iontů na sběrnou elektrodu, jejich vybití, záznam změny proudu

# **Kvantitativní spektrometrie**

## **- specifické aspekty jednotlivých metod**

### **HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR**

- **vakuový systém** - vyloučení srážek iontů v analyzátoru
  - hodnota vakua závislá na typu analyzátoru
    - ICR -  $10^{-5}$  -  $10^{-9}$  Pa
    - sektorové -  $10^{-5}$  -  $10^{-6}$  Pa
    - kvadrupolový, TOF - cca  $10^{-3}$  Pa
    - iontová past - cca  $10^{-3}$  Pa
  - vícestupňová čerpání - rotační vývěvy,  
turbomolekulární, difusní pumpy

# **Kvantitativní spektrometrie**

## **- specifické aspekty jednotlivých metod**

### **HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE - identifikace látek**

- srovnání měřených spekter s knihovnamí dat**
  - různé porovnávací algoritmy**
- analýza molekulového píku, píků fragmentů a rozdílů mezi nimi**
- empirická pravidla**

# **Kvantitativní spektrometrie**

- **specifické aspekty jednotlivých metod**

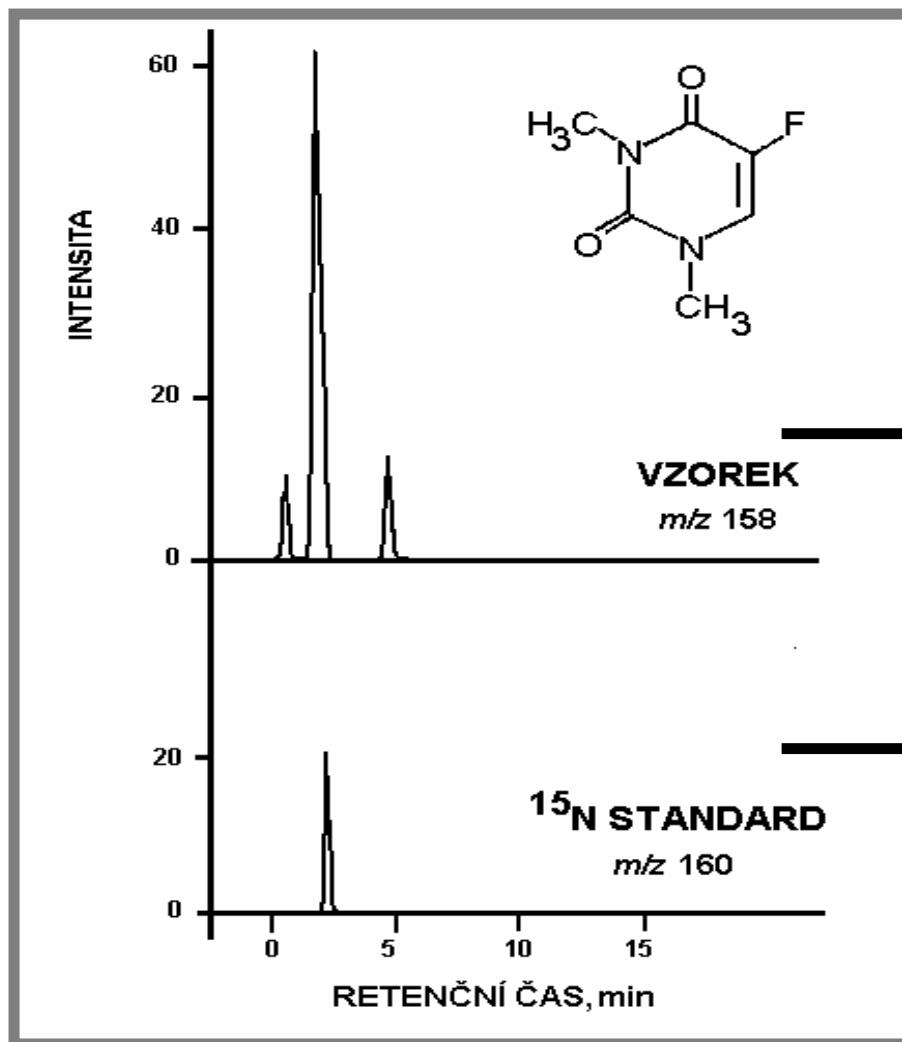
## **HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE - kvantita**

- **SLEDOVÁNÍ výšky píků pro vybraná *m/z* - SIM**  
**„SELECTIVE ION MASS“**
- **GC-MS/MS - stanovení farmak v krevní plasmě**
  - **použití vnitřního standardu**

# Kvantitativní spektrometrie

- specifické aspekty jednotlivých metod

## HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE



**SIGNÁL**  
při m/z vzorku

**SIGNÁL**  
při m/z standardu

# **Kvantitativní spektrometrie**

**- specifické aspekty jednotlivých metod**

## **HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE**

