

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**

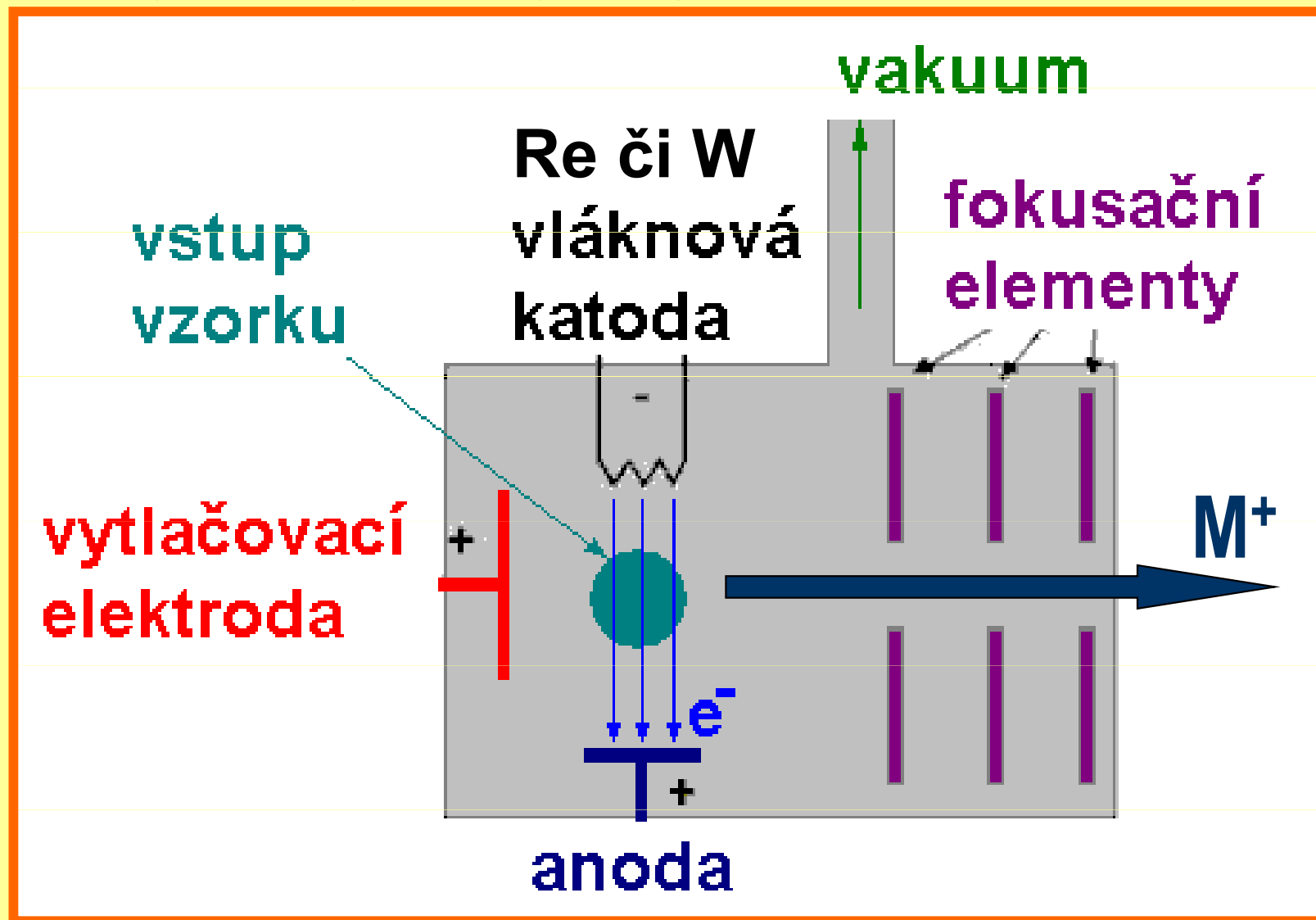
Specifické aspekty jednotlivých metod

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^-
vychytávají
vytlačovací
elektrodou

Specifické aspekty jednotlivých metod

IONIZACE VZORKU

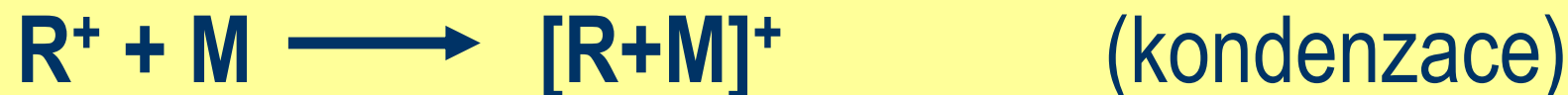
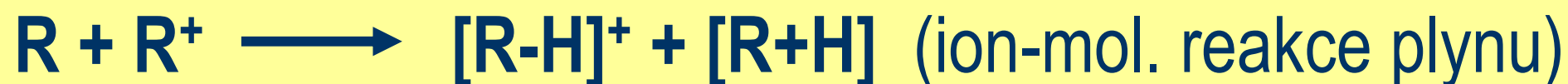
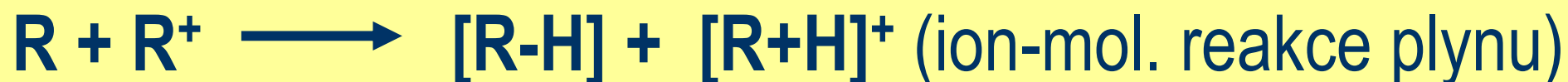
- chemická ionizace - CI
- konstrukce zdroje podobná jako pro EI
- ve zdroji přítomen **REAKČNÍ PLYN** v nadbytku vůči vzorku
- ionizace reakčního plynu - methan, amoniak, isobutan, propan, voda, dusík
 - reakce iontů s molekulami analytu
 - tvorba aduktů

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

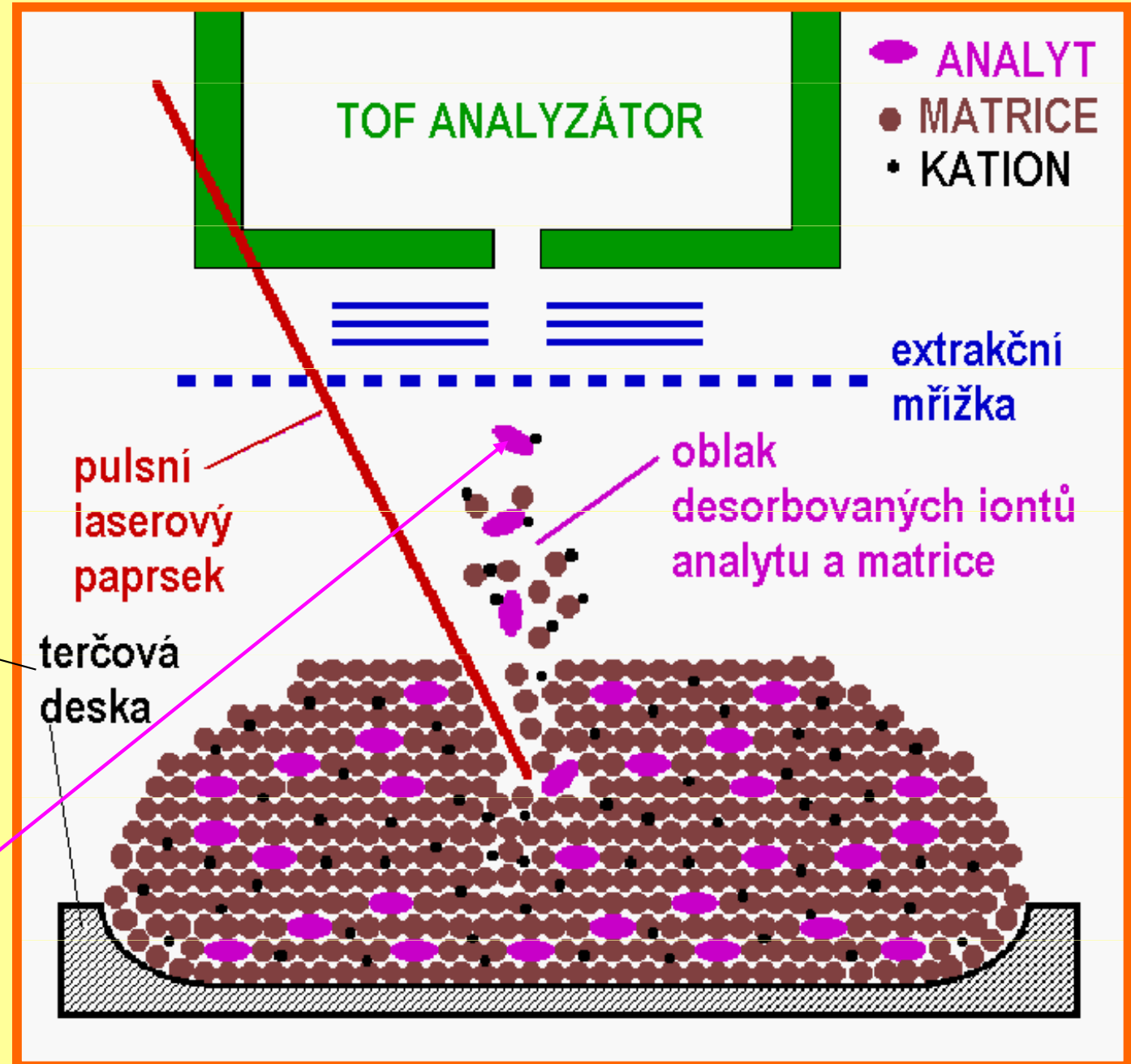
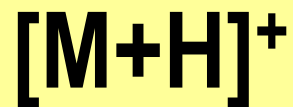
- ionizace urychlenými atomy - FAB
 - urychlené atomy Xe, Ar
 - na terčičku vzorek ve viskosní matrici
 - **matrice** - chemicky inertní, málo těkavá
 - glycerol, thioglycerol
 - kapalné kovy - Ga, In
 - vznik aduktů (s matricí)
 - jedna z šetrnějších ionizačních technik

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



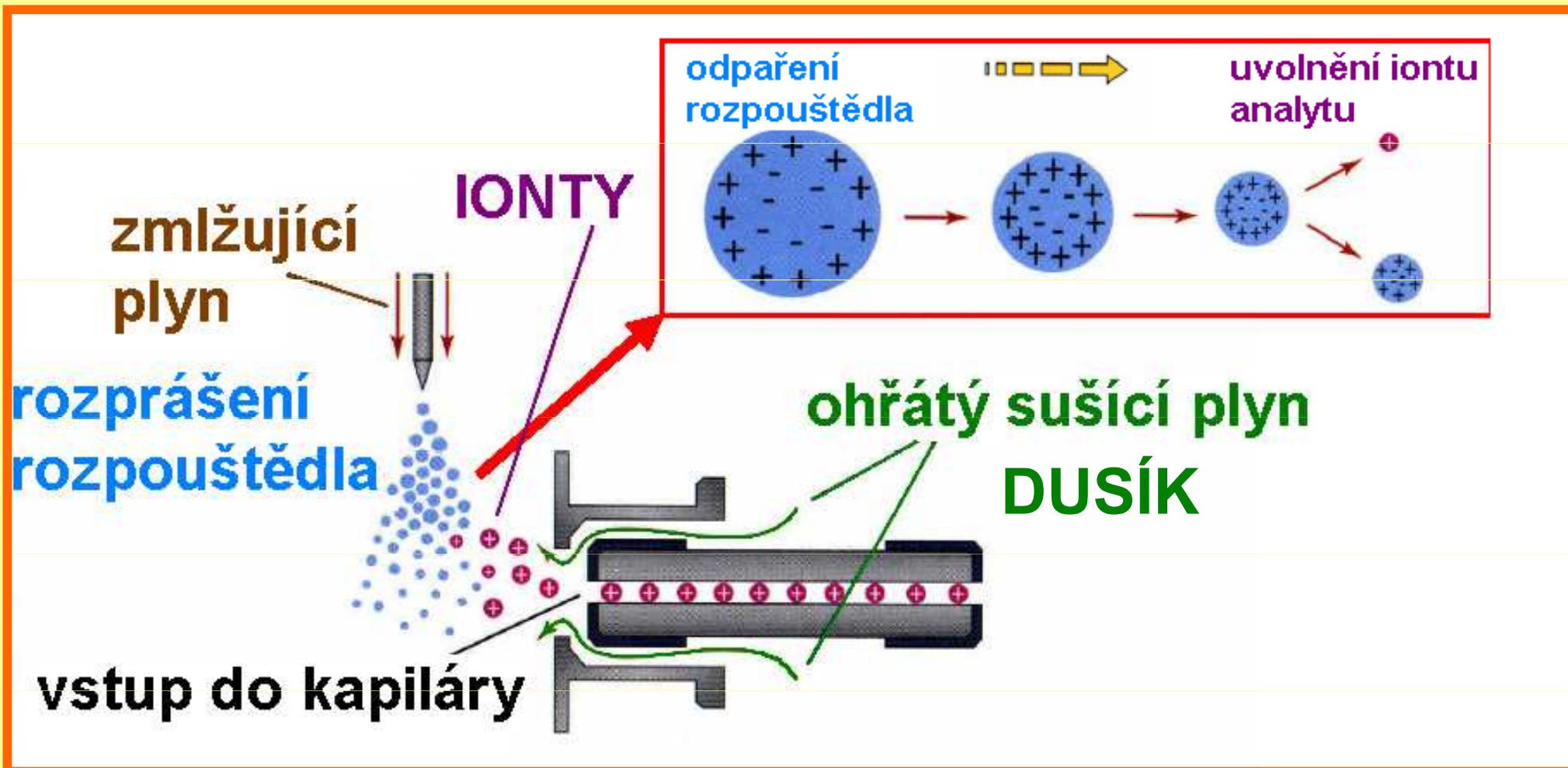
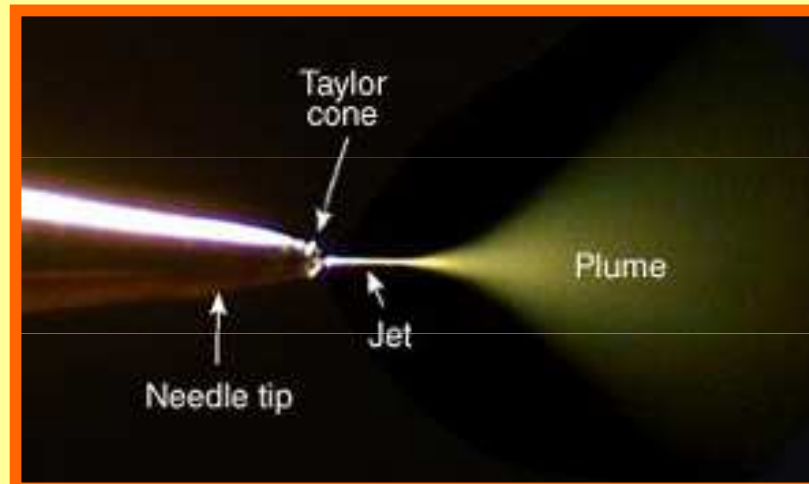
Specifické aspekty jednotlivých metod

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

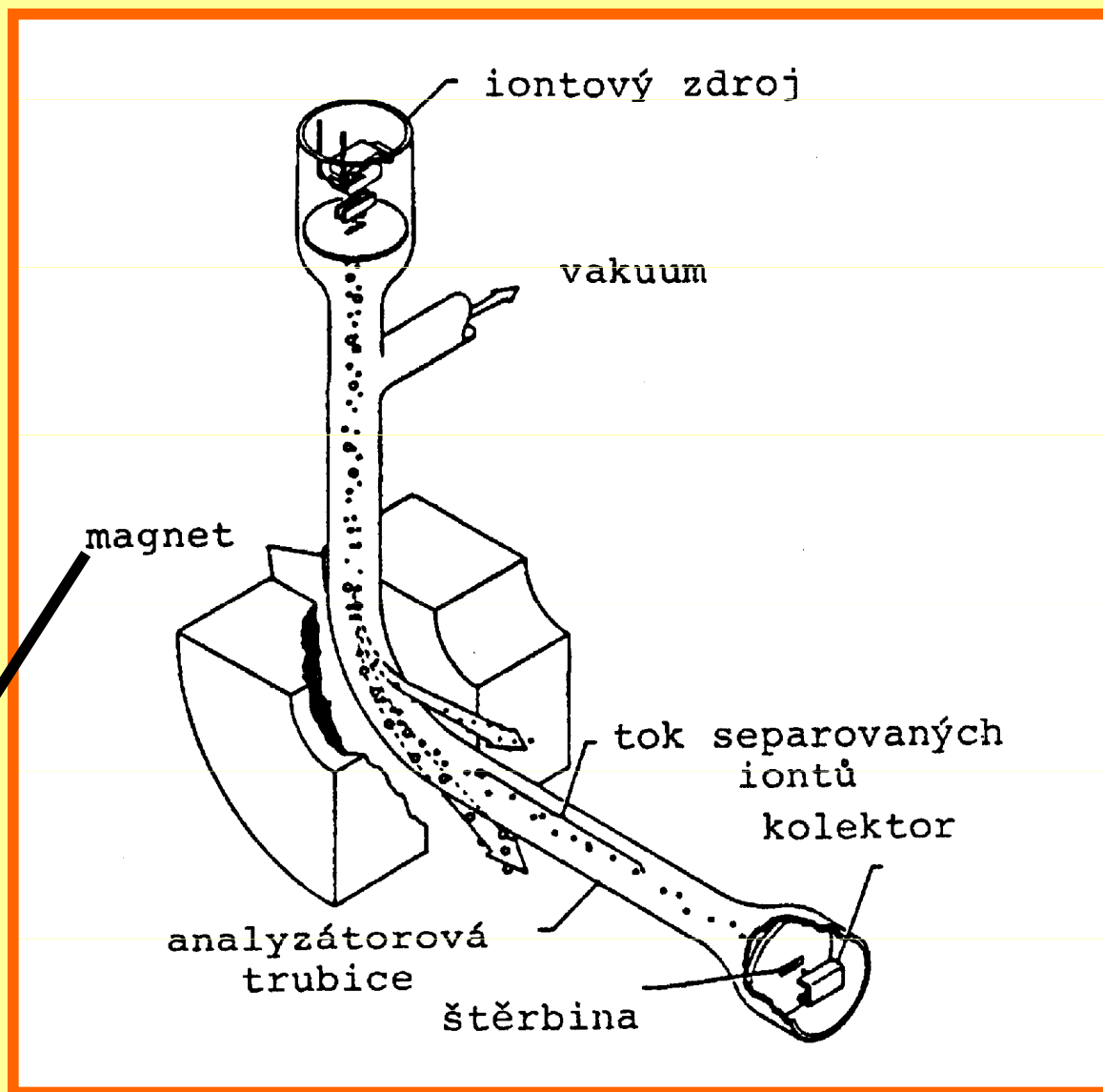
- magnetický
s jednoduchou
fokusací
- zakřivení dráhy
letu iontů

těžší ionty -

větší odstředivá síla

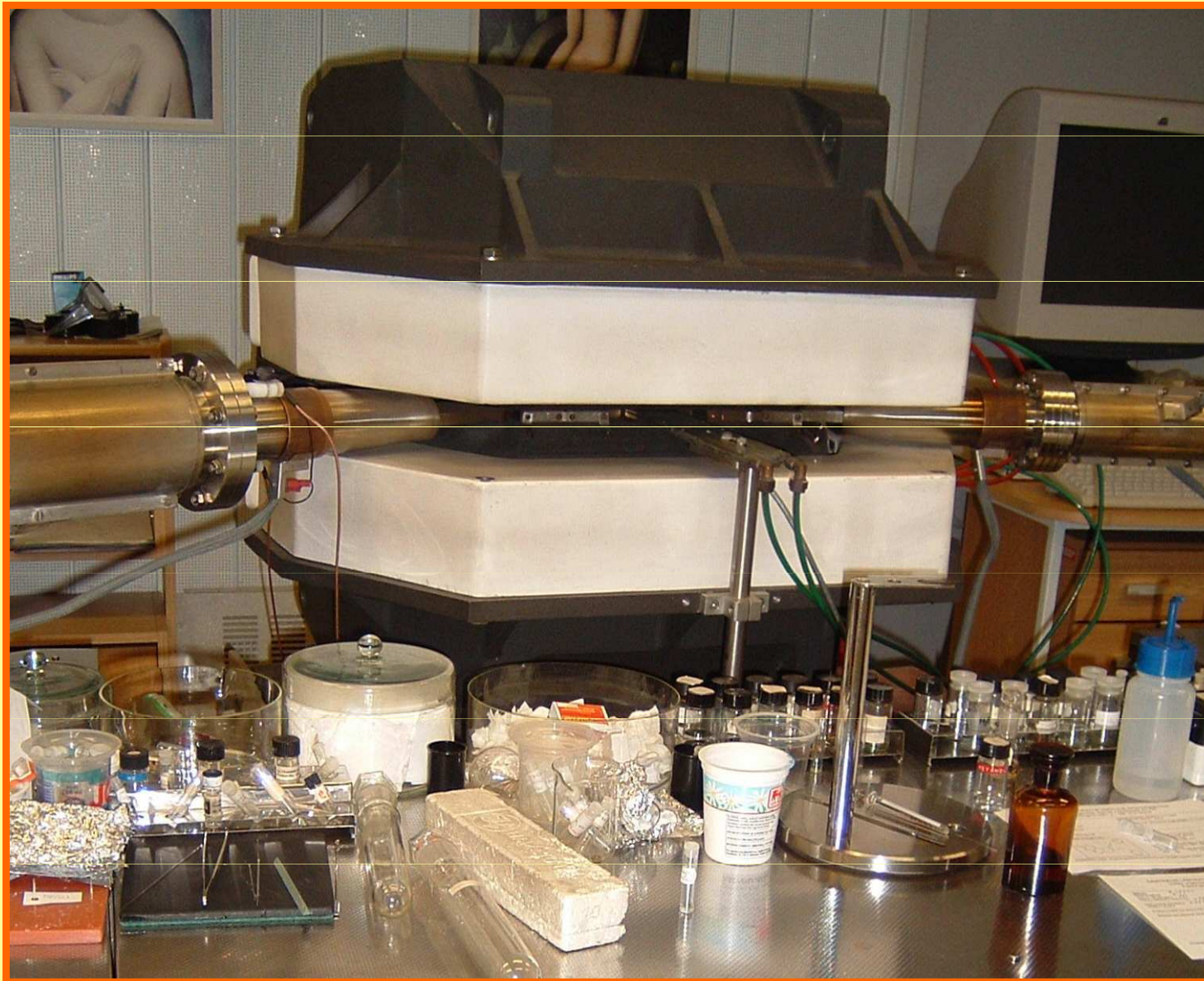
$$\frac{mv^2}{r}$$

- kruhová výseč



Specifické aspekty jednotlivých metod

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR - magnetický separátor



Specifické aspekty jednotlivých metod

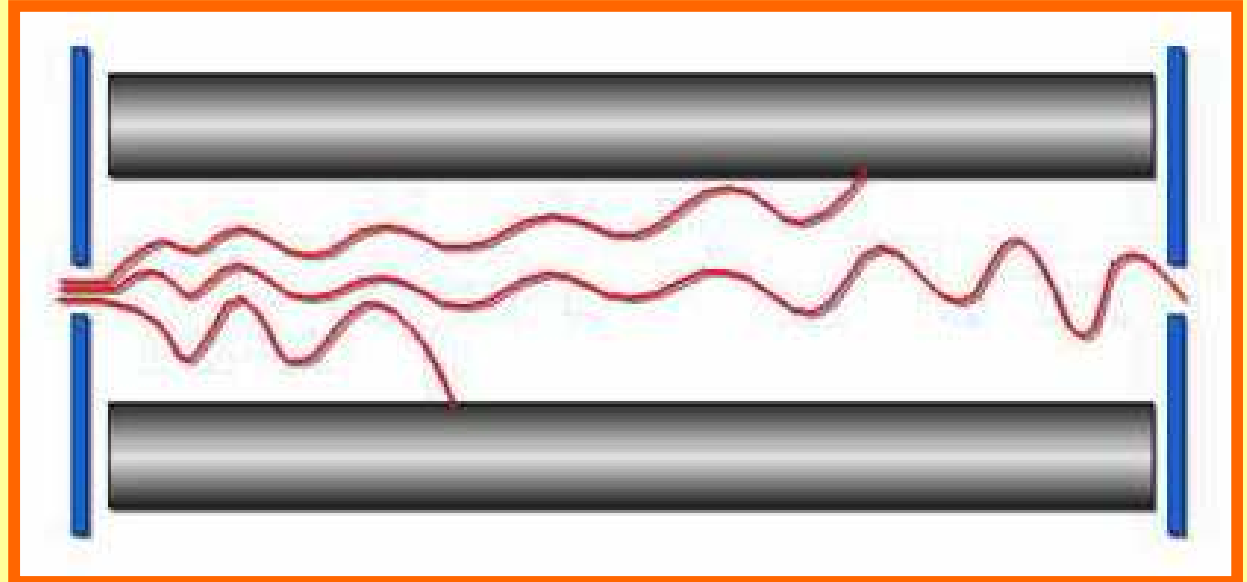
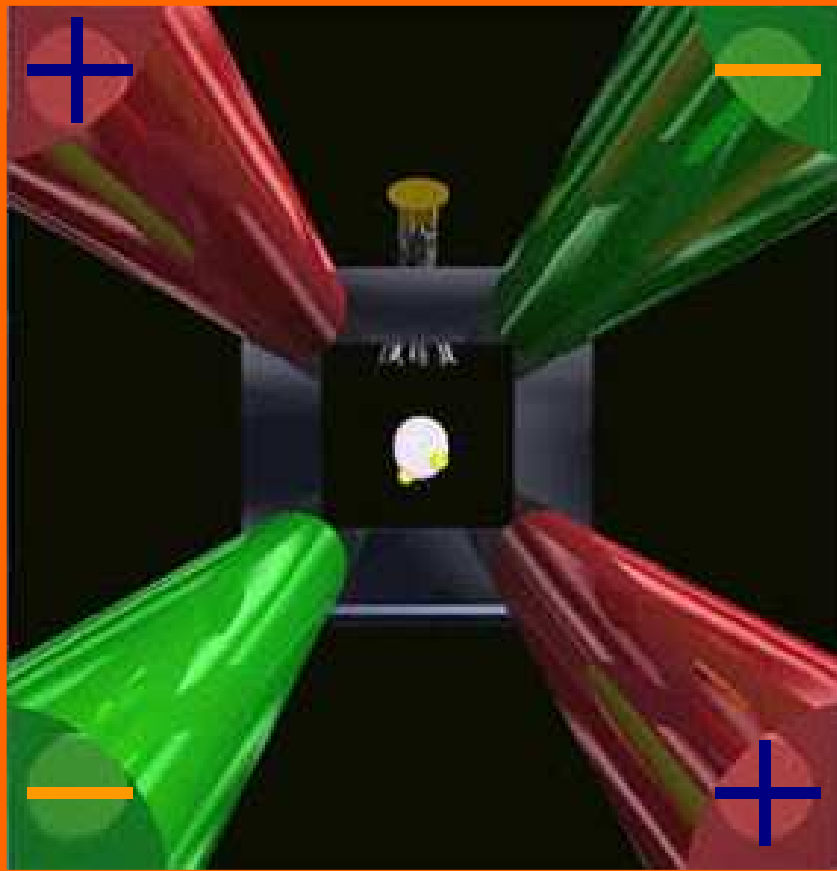
HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR - separátory iontů

- 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)



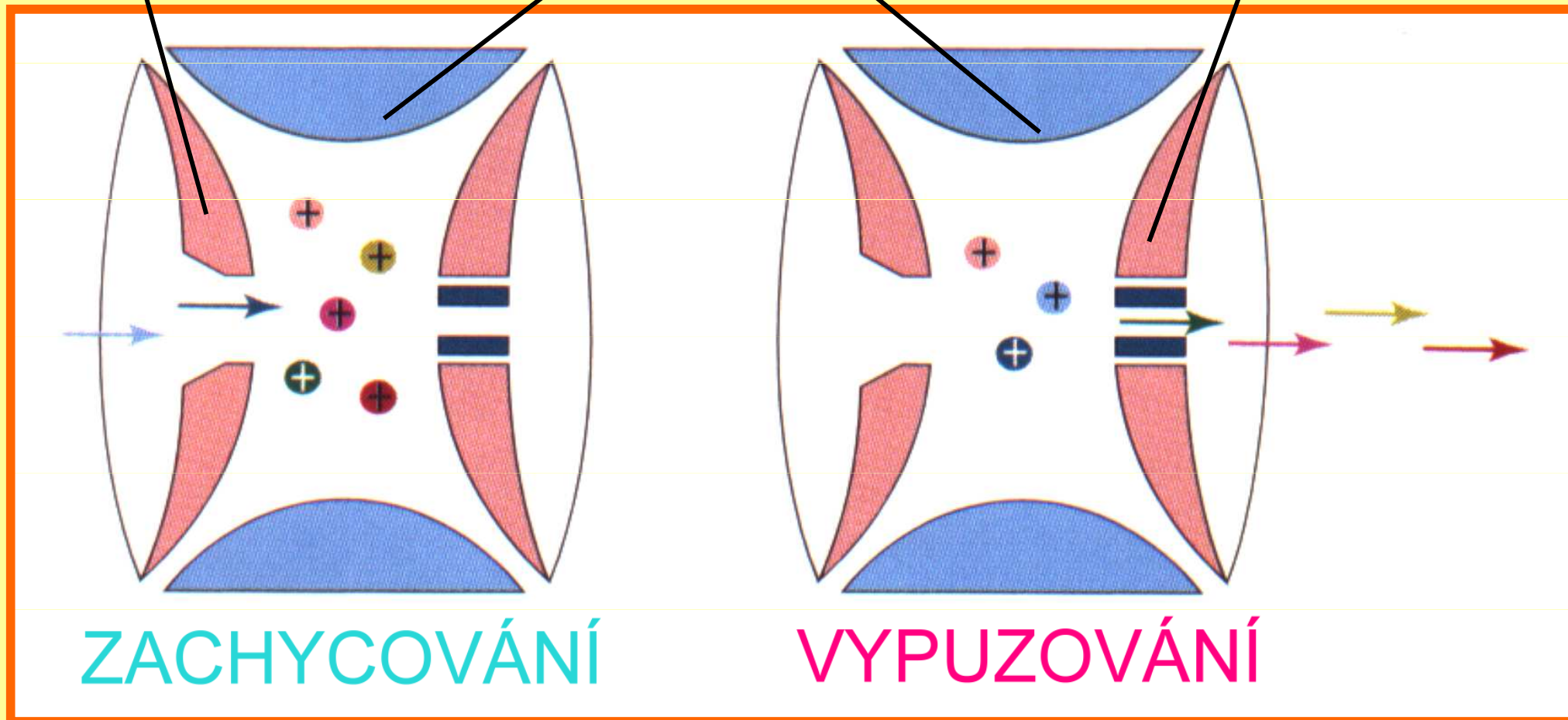
bud' plynulá změna radiofrekvence
nebo současná změna hodnoty
stejnosměrného napětí a amplitudy
oscilací

separátory iontů - iontová past - radiofrekvenčně modulované pole, možnost MSⁿ analýzy

vstupní uzavírací elektroda

prstencová elektroda

výstupní uzavírací elektroda



HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR - separátory iontů

- průletový analyzátor - TOF - různá doba letu iontů

ANALYZÁTOROVÁ TRUBICE

VYPUZOVACÍ
ELEKTRODA
- vypnuto



DETEKTOR

AKUMULACE

Od iontového zdroje

ANALYZÁTOROVÁ TRUBICE

VYPUZOVACÍ
ELEKTRODA
- zapnuto



DETEKTOR

VYPUZOVÁNÍ

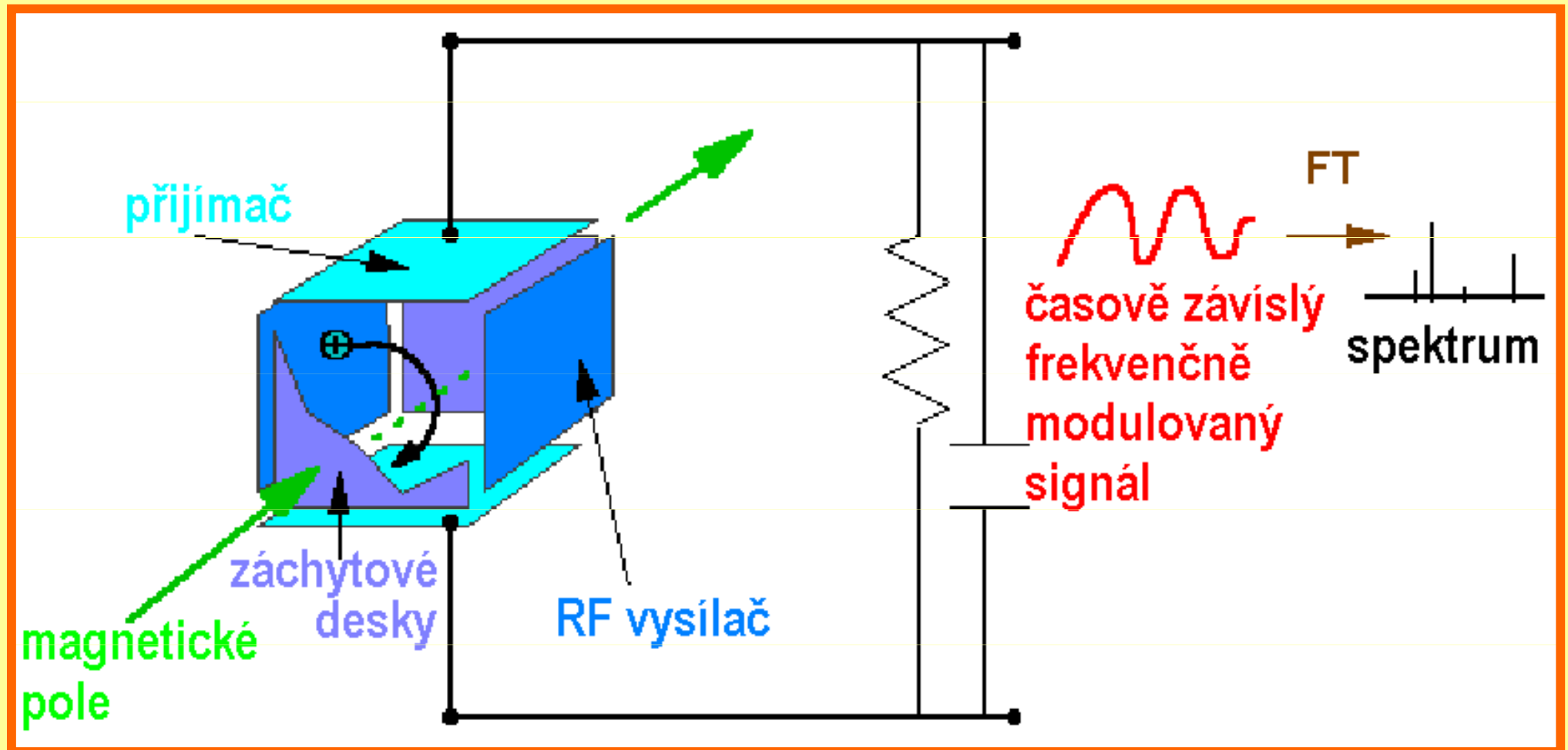
lehčí atomy
jsou rychlejší

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

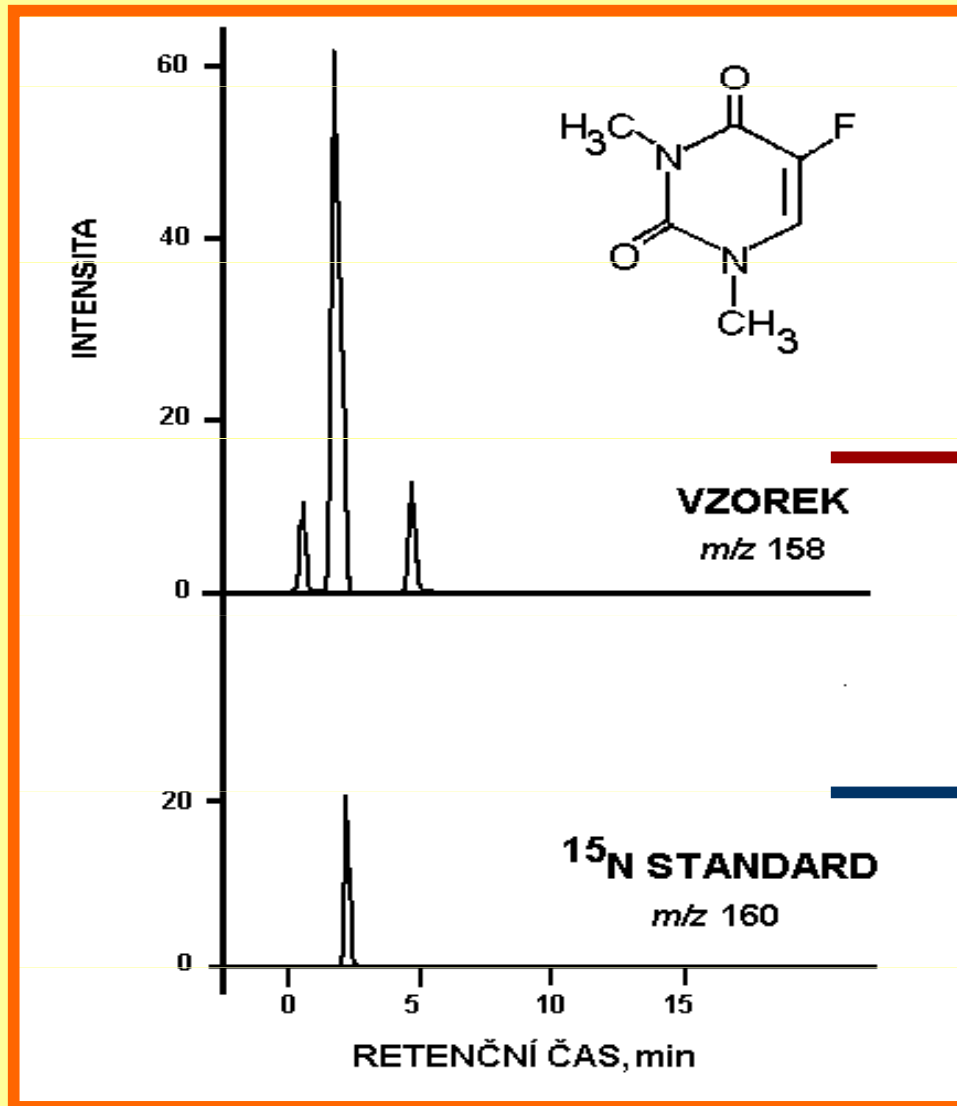
HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE - kvantita

- 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

