

Úvod do strukturní analýzy farmaceutických látek

Garant předmětu: doc. Ing. Bohumil Dolenský, Ph.D.

A28, linka 4110, dolenskb@vscht.cz

Hmotnostní spektrometrie I.

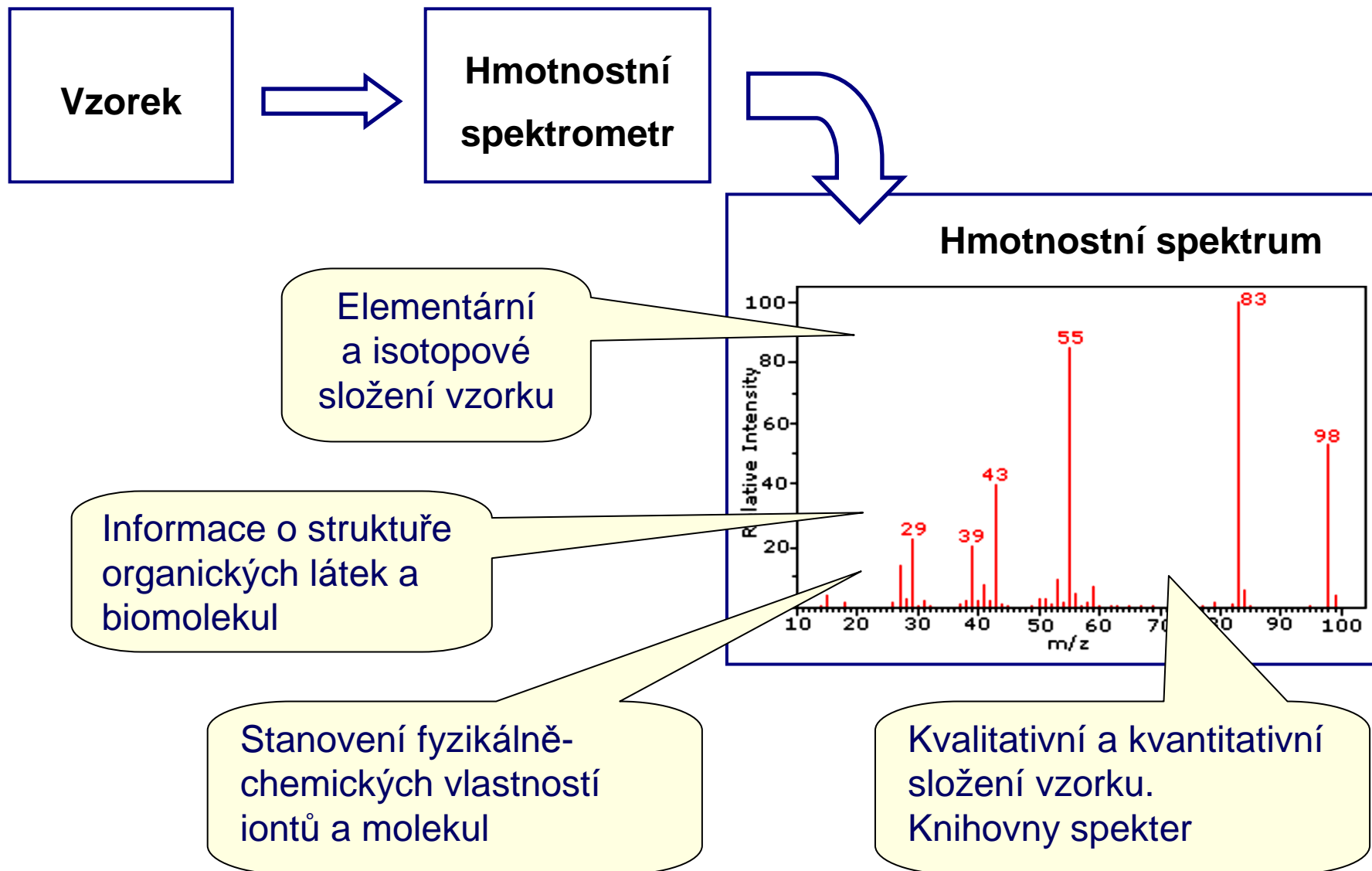
Příprava předmětu byla podpořena

projektem OPFA č. CZ.2.17/3.1.00/33253



**Evropský sociální fond
Praha & EU: Investujeme do vaší budoucnosti**

Hmotnostní spektrometrie (MS, Mass Spectrometry)



Hmotnostní spektrometrie (MS, Mass Spectrometry)

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda analýzy látek spočívající v převedení látek na plynné ionty, jejich rozdělení dle náboje a hmotnosti interakcí s magnetickým a elektrickým polem, a následné detekci odrážející jejich množství.

Hmotnostní spektrometrie není spektrální metodou (nedochází k interakci s elektromagnetickým zářením), avšak pro podobnost výstupu se mezi spektrální metody formálně řadí.

Termín „hmotnostní spektroskopie“ je zcela nesprávný.

Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013)
Pure Appl. Chem., 2013, 85 (7), 1515-1609. <http://dx.doi.org/10.1351/PAC-REC-06-04-06>

Mass Spec Terms Project http://mass-spec.lsu.edu/msterms/index.php/Main_Page

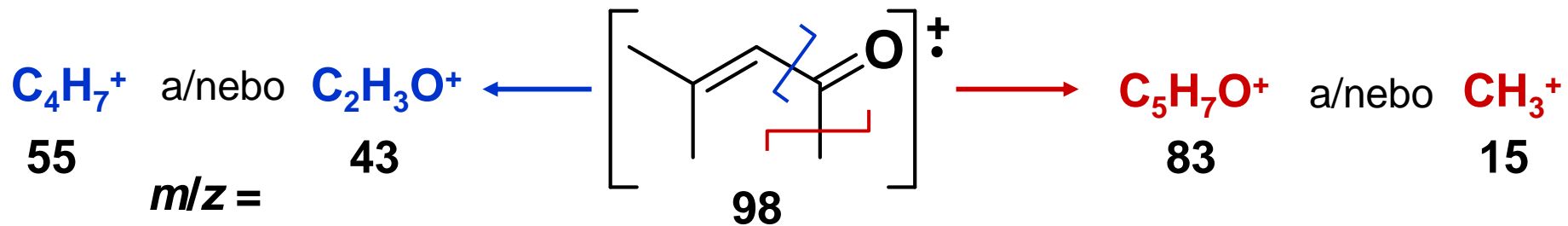
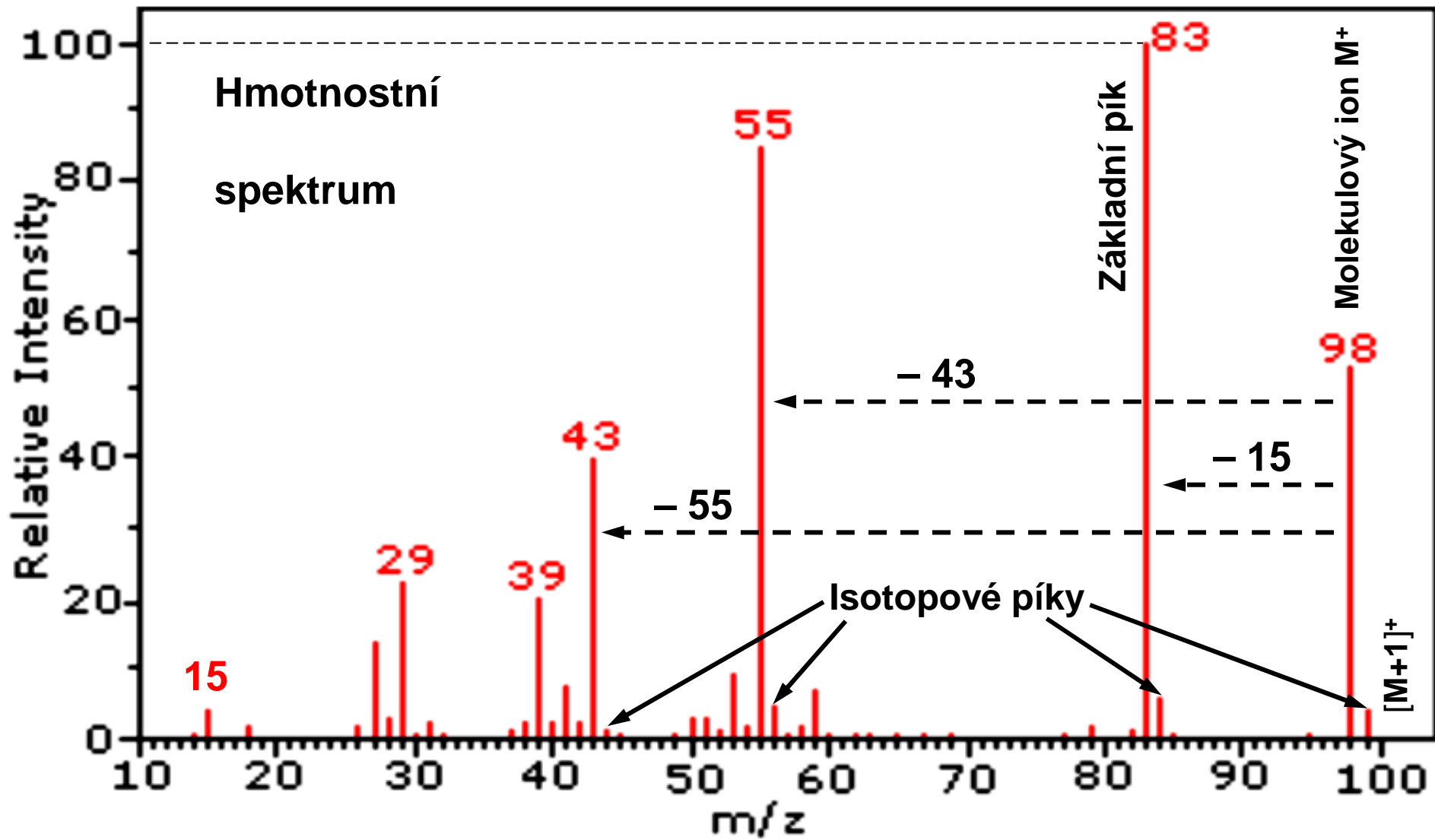
Hmotnostní spektrometrie (MS, Mass Spectrometry)

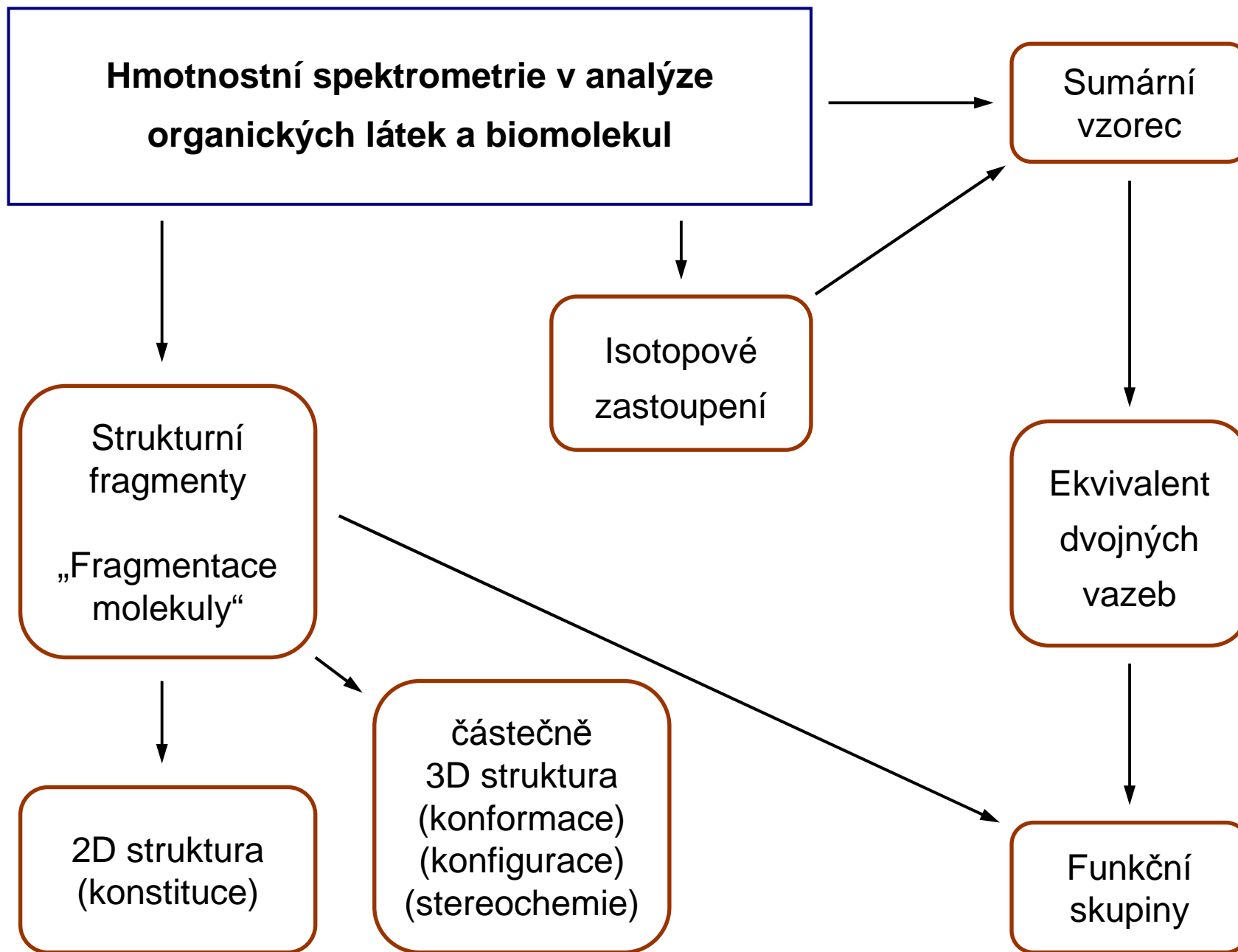
Výhody

- vysoká citlivost
- rozsáhlé databáze malých molekul
- informace o velikosti molekuly a jejich fragmentů
- variabilita MS experimentů; od identifikace malých molekul po „sekvenování“ proteinů a nukleových kyselin; od plynných a kapalných vzorků po skenování povrchů

Nevýhody

- destruktivní metoda (obvyklé množství vzorku jsou ng až μg)
- vysoké pořizovací a provozní náklady





Hmotnostní spektrometr

je iontově-optické zařízení, které rozlišuje ionty podle hodnoty poměru m/z

m ... je relativní hmotnost iontu, z ... je množství náboje iontu bez udané polarity

m/z ... (Od označení *Thomson (Th)* či *mass-to-charge* se upouští).

Zkratka vyjadřuje bezrozměrné množství vzniklé vydělením hmotnosti iontu atomovou hmotnostní jednotkou a jeho nábojem (bez ohledu na jeho znaménko).

Dalton (Da) $1 \text{ Da} = 1 \text{ u} = 1.6605402(10) \times 10^{-27} \text{ kg}$

= atomové hmotnostní jednotce **u** (unified atomic mass unit, = 1/12 hmotnosti ^{12}C)

Nejčastěji se používá v biologii pro molekulové hmotnosti proteinů (kDa)

Hmotnostní spektrometr

Hmotnostní spektrometr se skládá z několika základních částí:

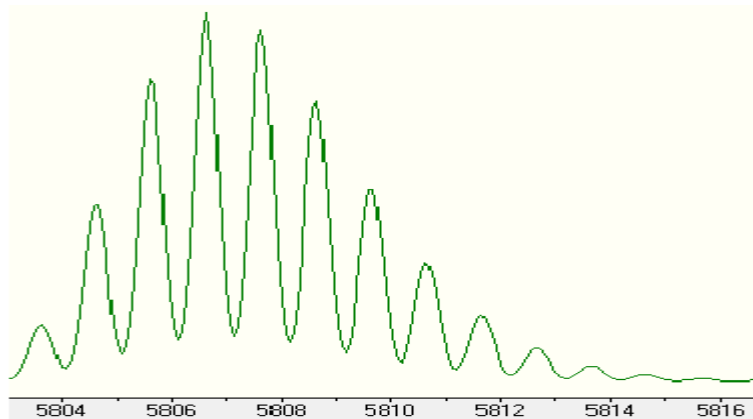
Vstup vzorku	Přímý vstup nebo spojení s plynovou (GC-MS) či kapalinovou (LC-MS) chromatografií; též TLC-MS
Ionizace a zplynění	Zásadní vliv na získaná data (informace) a využitelnost MS
Separace iontů	Hmotnostní analyzátor. Separátorů je obvykle řazeno více, buď pro zvýšení rozlišení nebo pro snadné měření MS-MS, MS ⁿ , nebo pro reakce iontů
Detekce iontů	
Hmotnostní spektrum	

Hmotnostní spektrum (MS spektrum)

Zobrazuje závislost intenzity iontů daného m/z .

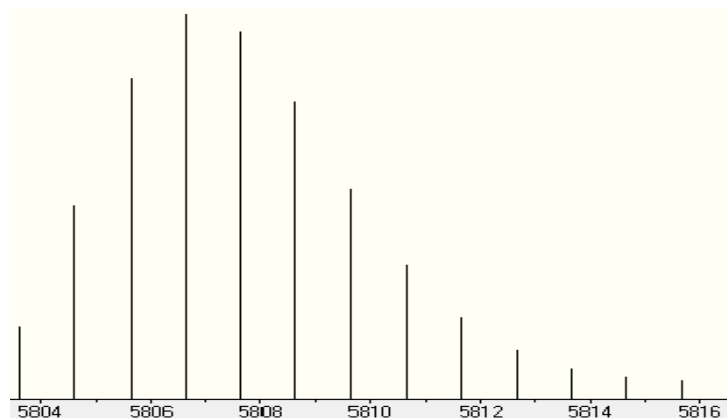
Intenzita daného iontu odráží jeho množství v ionizovaném vzorku.

Spektrum se normalizuje k základnímu píku (base peak, nejintenzivnější pík spektra).



Získané profilové (kontinuální) spektrum

- gaussovský tvar píků
- kontrola kvality záznamu
- velké množství dat



se obvykle převádí na čárové (centroidální) spektrum.

- pozice čáry odpovídá středu píku
- intenzita ploše či výšce píku
- menší množství dat
- nelze převést zpět na profilové spektrum

Hmotnostní spektrum (MS spektrum)

Ion prekurzoru - ion, který reaguje za vzniku konkrétních produktových iontů
(od termínu „rodičovský ion“ se upouští).

Produktový ion - vzniká jako produkt po reakci z jednotlivých iontů prekurzoru disociací (fragmentový ion), reakcí iontu s molekulou, nebo změnou počtu nábojů.
(od termínu "dceřiný ion,, se upouští).

Fragmentový ion - produktový ion vzniklý disociací iontu prekurzoru.

Aduktový ion - ion tvořený interakcí iontu s jedním či více atomy nebo molekulami, např.: $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+Cl]^-$, atd. (tzv. kvazi- či pseudo-molekulové ionty)

Molekulový ion - Ion vzniklý odtržením jednoho či více elektronů z molekuly (vznik pozitivního iontu) nebo přidáním jednoho či více elektronů k molekule (vznik negativního iontu).

Isotopový ion (isotopové satelity)

Ionty stejného prvkového složení, lišící se složením isotopovým.

Hmotnostní spektrum

Exact mass
iontů

Sumární
vzorec iontu

Stupeň
nenasycenosti

Prvek je definován přirozeným zastoupením izotopů stejného protonového čísla. Isotopy prvku se liší počtem neutronů v jádře (atomovým číslem), tj. **hmotností**.

Např.:

uhlík obsahuje 98,90 % izotopu ^{12}C a 1,10 % izotopu ^{13}C

$$m(^{12}\text{C}) = 12,0000000$$

$$m(^{13}\text{C}) = 13,0033548$$

Průměrná hmotnost uhlíku

$$= 0,989 * m(^{12}\text{C}) + 0,011 * m(^{13}\text{C}) = 12,011$$

**V hmotnostní spektrometrii
se isotopy prvků rozlišují**

Molekulový ion $[M]^+$

1. Ion s nejvyšším m/z ve spektru může, ale nemusí být molekulový
2. Molekulový ion je vždy ion-radikál s lichým počtem elektronů
3. Z molekuly se odštěpují smysluplné fragmenty
radikály m/z 15, 29, 43 (alkyl), 19 (F), 35 (Cl), 79 (Br), 31 (OCH₃), aj.
nebo molekuly 18 (H₂O), 20 (HF), 28 (CO nebo C₂H₄ nebo N₂), 32 (CH₃OH), 36 (HCl) aj.
4. Zakázané ztráty: $m/z = 3 - 14, 21 - 25$ neodpovídají žádné reálné fragmentaci **molekulového iontu**
5. Dusíkové pravidlo: vzhledem k tomu, že dusík je trojvazný, ale jeho majoritní izotop (¹⁴N) má sudou nominální hmotnost pak dle počtu dusíků v molekule pozorujeme nominální hmotnosti:
 - a) lichý počet = lichý M⁺ a sudé fragmenty
 - b) sudý počet nebo žádný dusík = sudý M⁺ a liché fragmenty

Molekulová hmotnost



Sumární vzorec molekuly

Average mass M_{AV}

Průměrná hmotnost ~ Molární hmotnost

Hmotnost iontu nebo molekuly zohledňující isotopové složení.

Exact mass

Správná hmotnost

Vypočítaná hmotnost iontu nebo molekuly daného isotopového složení.

Accurate mass

Přesná hmotnost

Experimentálně stanovená hmotnost iontu o známém náboji. Nezaměňovat s předchozí. Lze využít pro stanovení elementárního složení iontu.

Monoisotopic mass M_{MONO}

Monoisotopická hmotnost

Exact hmotnost iontu nebo molekuly vypočtená užitím hmotnosti nejvíce zastoupeného isotopu pro každý prvek.

Nominal mass

Nominální hmotnost

Hmotnost iontu nebo molekuly vypočtená užitím hmotnosti nejvíce zastoupeného isotopu pro každý prvek zaokrouhlenou na celé číslo.

Spektrometry s nízkým rozlišením umožňují rozlišit ionty lišící se alespoň o $m/z \geq 1$

$$m/z (\text{C}_2\text{H}_4) = 28$$

$$m/z (\text{CO}) = 28$$

$$m/z (\text{N}_2) = 28$$

Spektrometry s vysokým rozlišením umožňují rozlišit i ionty o stejné nominální hmotnosti.

$$m/z (\text{C}_2\text{H}_4) = 28,0313$$

$$m/z (\text{CO}) = 27,9949$$

$$m/z (\text{N}_2) = 28,0062$$

Rozlišovací schopnost (RP)

$$RP = \frac{m/z}{m/z + \Delta m/z}$$

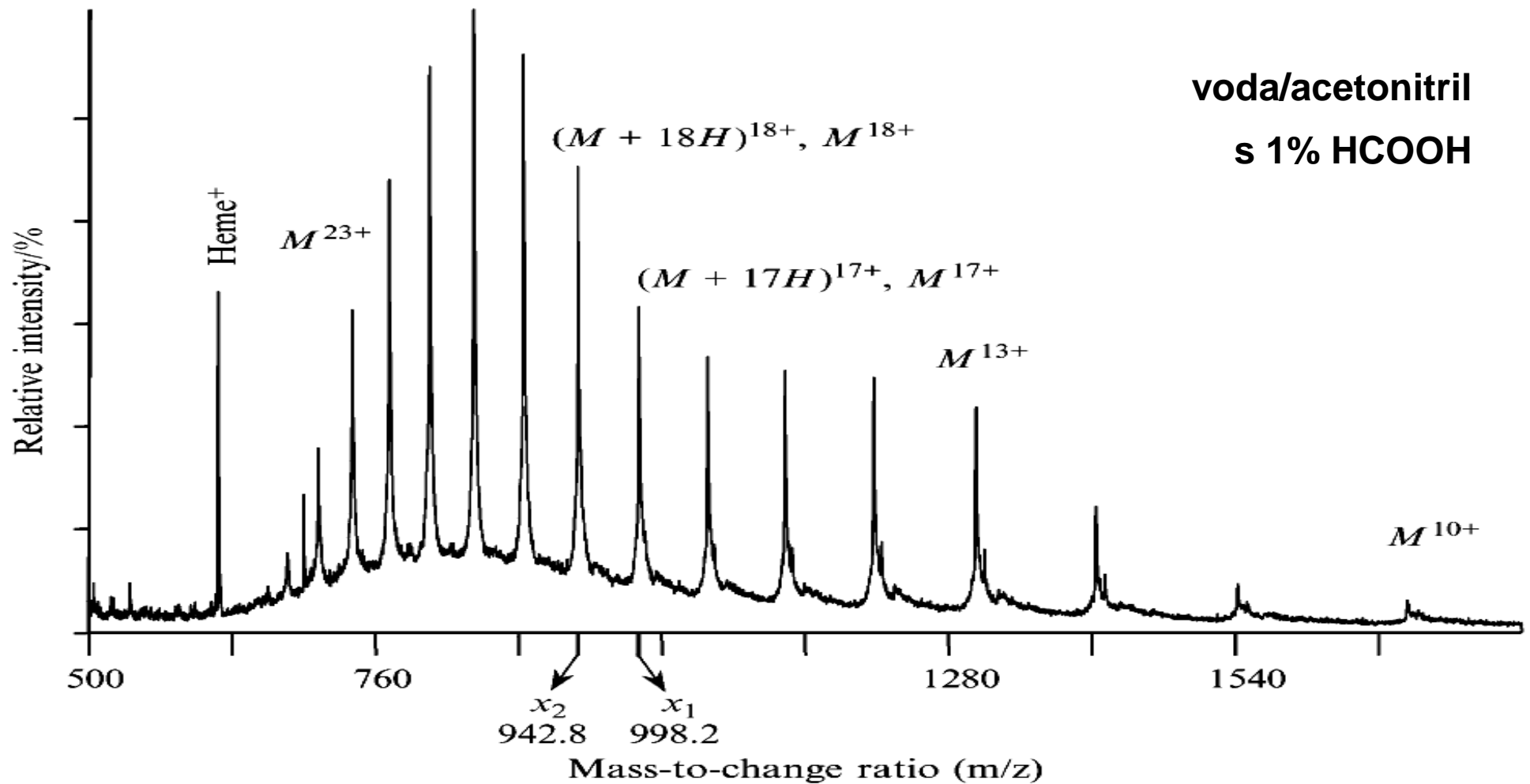
dva stejně vysoké píky jednotkového náboje mající překryv s údolím v 10% jejich výšky

též používáno

$$RP = \frac{m/z}{\Delta m/z}$$

$\Delta m/z$ je šířka píku m/z v 50% jeho výšky.
(též se používá v 5% či v 0,5% jeho výšky)

ESI (nanoelectrospray) MS spektrum apomyoglobinu (koňské srdce)

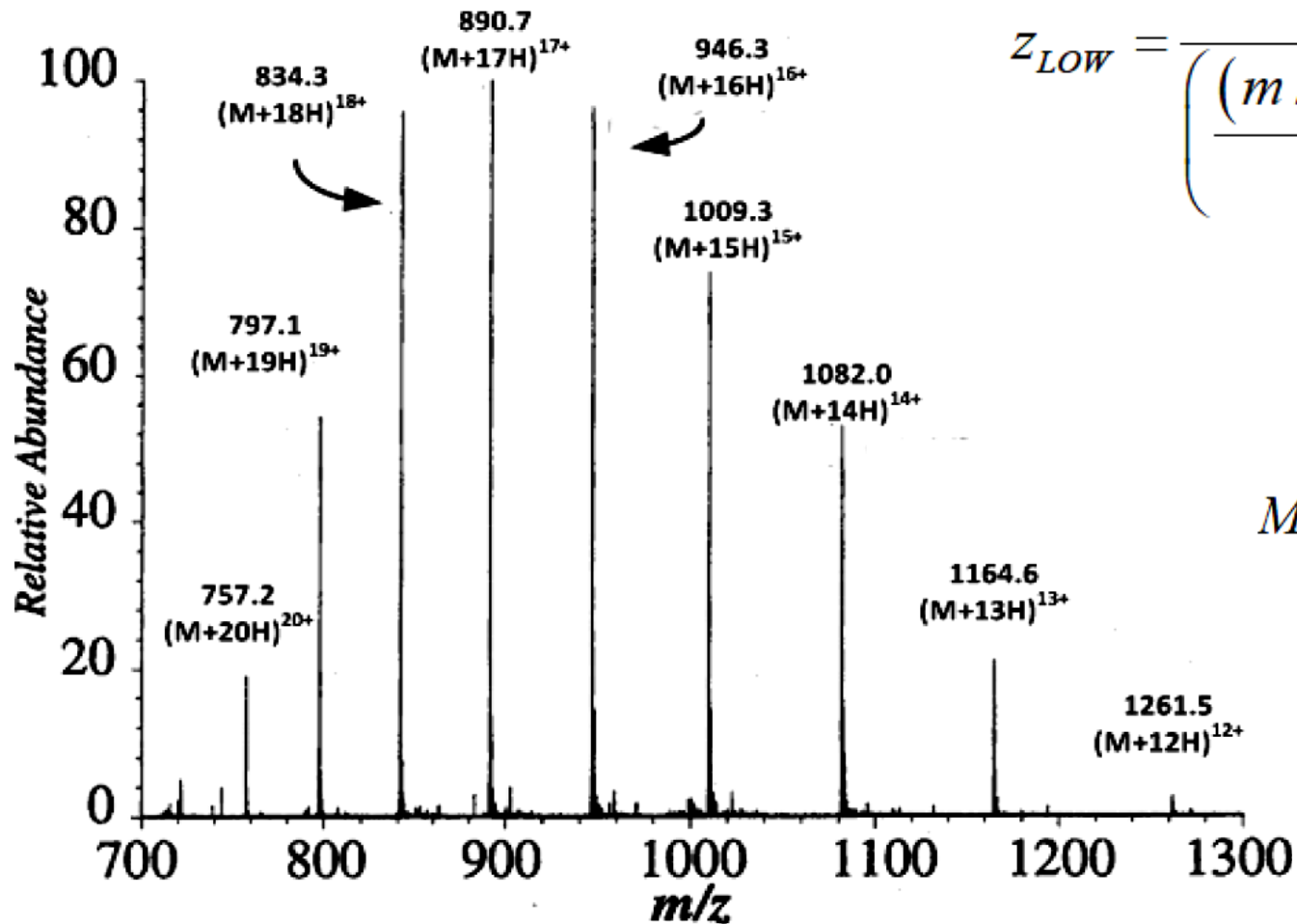


$$x_1 = (M + z \cdot m_H) / z.$$

$$x_2 = (M + (z + 1) \cdot m_H) / (z + 1) \quad z = x_2 - m_H / x_1 - x_2$$

$$M = z \cdot x_1 - z \cdot m_H = (z + 1) \cdot x_2 - (z + 1) \cdot m_H$$

Hmotnostní spektrum (ESI+) hemoglobinu



$$z_{LOW} = \frac{(m/z)_{HI}}{\left(\frac{(m/z)_{HI} - (m/z)_{LOW}}{n} \right)}$$

$$m_i = \left(\frac{m}{z} \right) \cdot z$$

$$M_r = \left(\left(\frac{m}{z} \right) \cdot z \right) - n \cdot M_H$$

$$M_r = \frac{\sum_{i=1}^N (M_r)_i}{N}$$

z_{LOW} je náboj píky $(m/z)_{LOW}$

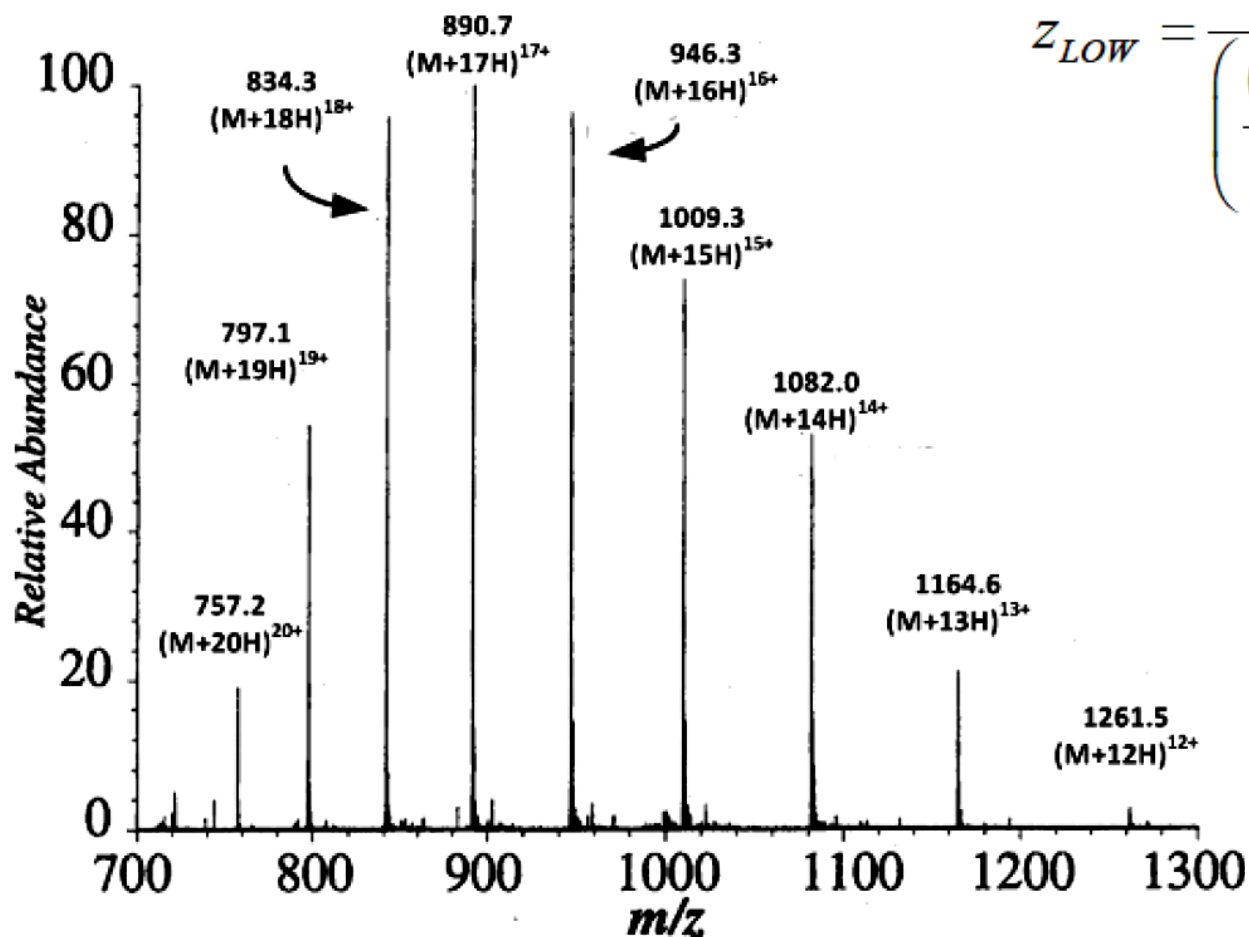
n rozdíl nábojů mezi píky $(m/z)_{HI}$ a $(m/z)_{LOW}$

m_i hmotnost iontu s nábojem z

M_r molární hmotnost proteinu

M_H molární hmotnost vodíku

Hmotnostní spektrum (ESI+) hemoglobinu



$$Z_{LOW} = \frac{(m/z)_{HI}}{\left(\frac{(m/z)_{HI} - (m/z)_{LOW}}{n} \right)}$$

$$m_i = \left(\frac{m}{z} \right) \cdot z$$

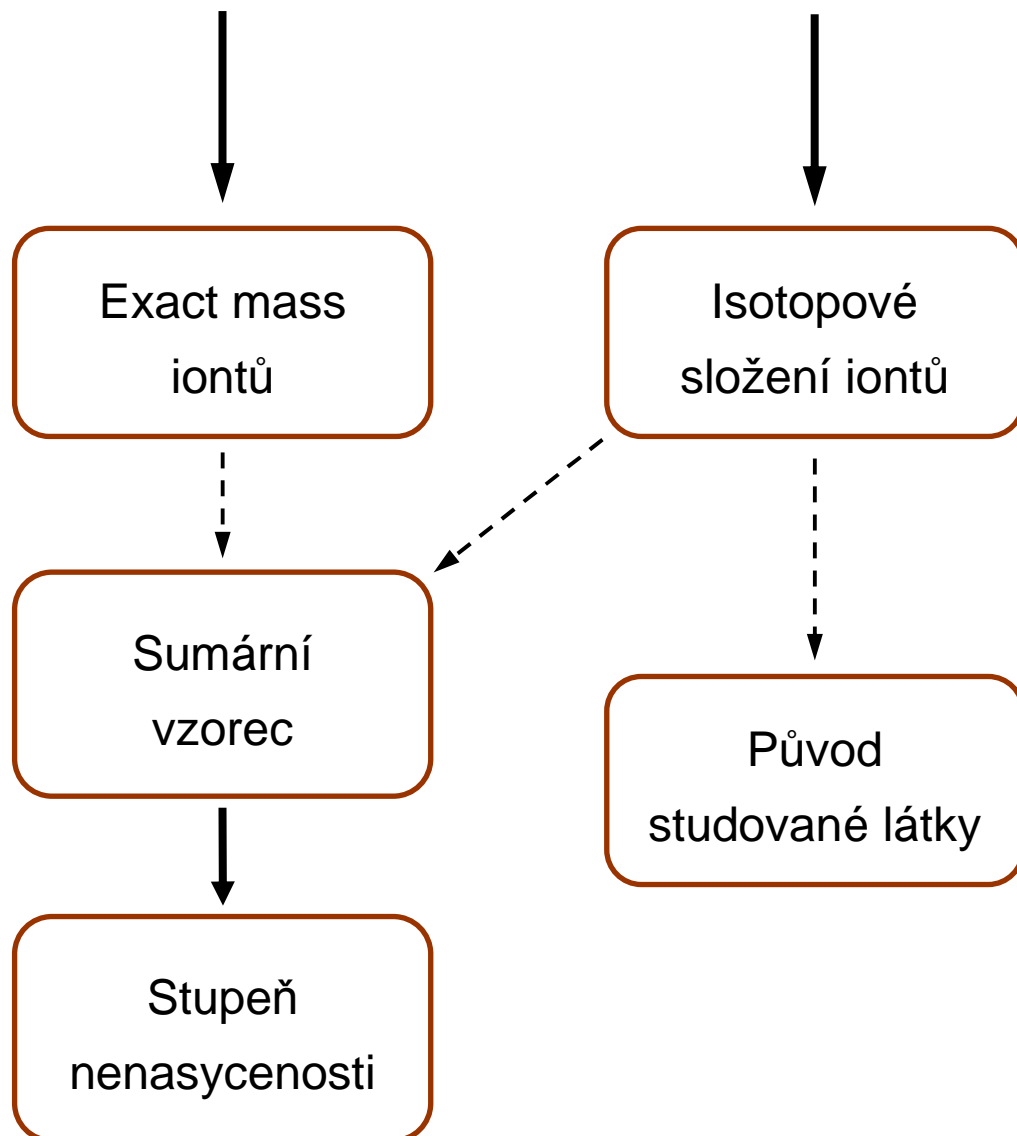
$$M_r = \left(\left(\frac{m}{z} \right) \cdot z \right) - n \cdot M_H$$

$$M_r = \frac{\sum_{i=1}^N (M_r)_i}{N}$$

$$Z_{LOW} = \frac{1164.6}{\frac{(1164.6 - 757.2)}{7}} = 20$$

$$M_r = (757.2 \cdot 20) - (20 \cdot 1.008) = 15,125 \text{ Da}$$

Hmotnostní spektrum



Přírodní zastoupení isotopů prvků běžných organických sloučenin

Prvek	„M“		„M+1“		„M+2“		Typ
	M _{NOM}	%	M _{NOM}	%	M _{NOM}	%	
H	1	100	2	0,015			„M“
C	12	100	13	1,1			„M+1“
N	14	100	15	0,37			„M+1“
O	16	100	17	0,04	18	0,2	„M+2“
F	19	100					„M“
Si	28	100	29	5,1	30	3,4	„M+2“
P	31	100					„M“
S	32	100	33	0,79	34	4,4	„M+2“
Cl	35	100			37	32	„M+2“
Br	79	100			81	97,3	„M+2“
I	127	100					„M“

Nominal mass

$$m/z (\text{C}_2\text{H}_4) = 28$$

$$m/z (\text{CO}) = 28$$

$$m/z (\text{N}_2) = 28$$

Exact mass

$$m/z (\text{C}_2\text{H}_4) = 28,0313$$

$$m/z (\text{CO}) = 27,9949$$

$$m/z (\text{N}_2) = 28,0062$$

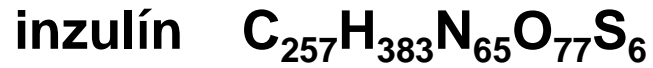
Isotopové klastry (%)

28 ...	100
29 ...	2.2272
30 ...	0.0131
31 ...	0

28 ...	100
29 ...	1.1217
30 ...	0.2009
31 ...	0.0022

28 ...	100
29 ...	0.7226
30 ...	0.0013
31 ...	0

Isotopový klastr - Skupina píků reprezentující ionty stejného prvkového složení, lišící se však odlišným isotopovým složením.



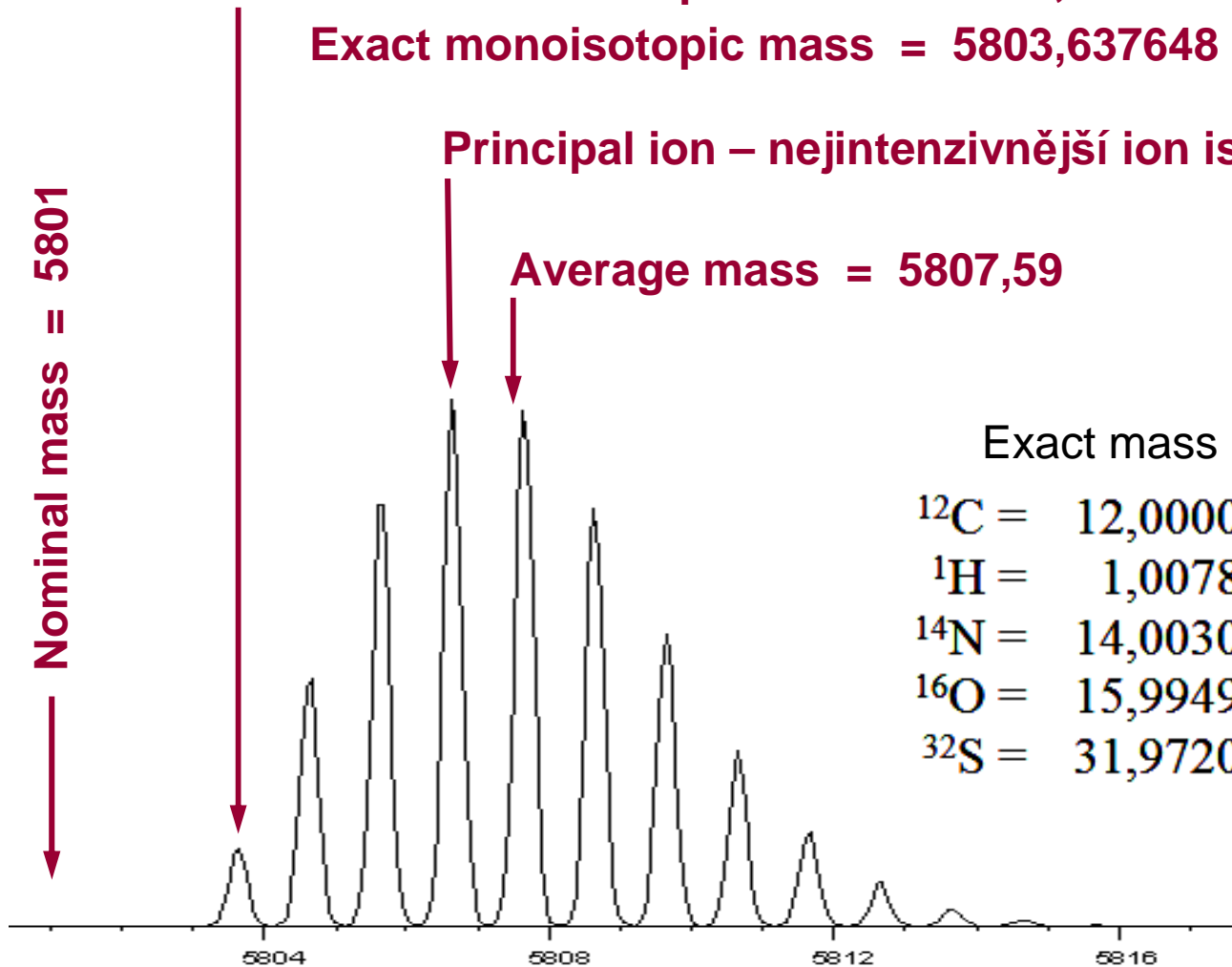
Accurate monoisotopic mass = 5803,64

Exact monoisotopic mass = 5803,637648

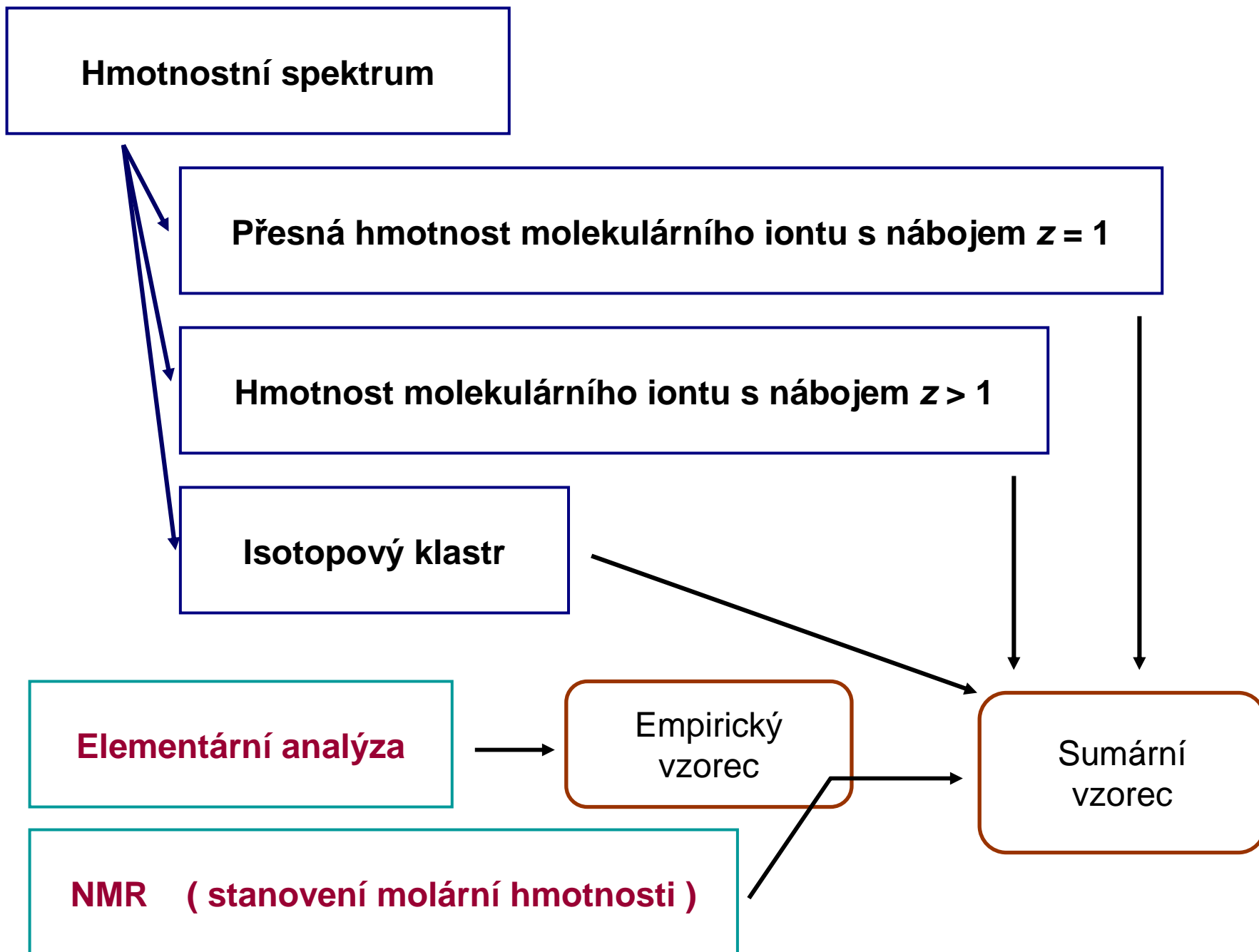
Principal ion – nejintenzivnější ion isotopového klastru

Average mass = 5807,59

Nominal mass = 5801



Exact mass		Average mass	
^{12}C	= 12,000000	C	= 12,011
1H	= 1,007825	H	= 1,008
^{14}N	= 14,003074	N	= 14,007
^{16}O	= 15,994915	O	= 15,999
^{32}S	= 31,972071	S	= 32,065



Sumární vzorec = Molekulový vzorec

udává prvky z nichž se látka skládá a skutečný počet jejich atomů v molekule sloučeniny.

Stechiometrický vzorec

udává pouze poměr atomů v sloučenině, tj. bez ohledu na skutečný počet atomů v molekule.

Empirický stechiometrický vzorec = Empirický vzorec

stechiometrický vzorec neznáme sloučeniny stanovený kvantitativní prvkovou analýzou (např.: elementární analýzou).

Konstituční vzorec

V konstitučním vzorci zobrazuje spojení jednotlivých atomů pomocí jednoduchých, zdvojených či ztrojených úseček (v případě potřeby zakřivených čar), znázorňující vazby mezi atomy (jednoduché, dvojně či trojně vazby). Přitom délka spojovacích úseček a úhly mezi sousedními úsečkami nevyjadřují ani skutečnou délku vazeb v molekule, ani skutečné úhly mezi vazbami.

Ekvivalent dvojných vazeb (DBE)

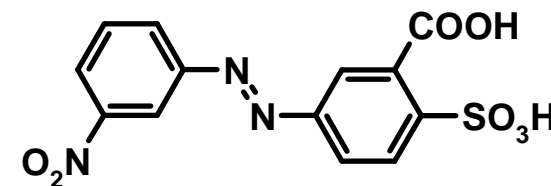
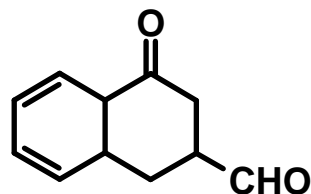
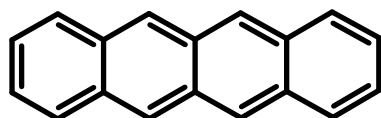
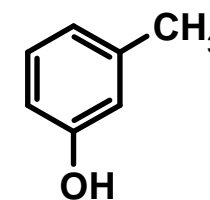
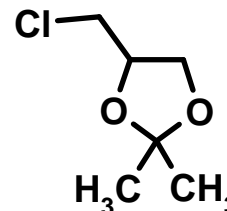
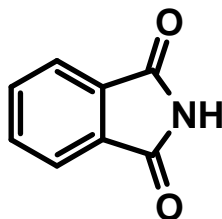
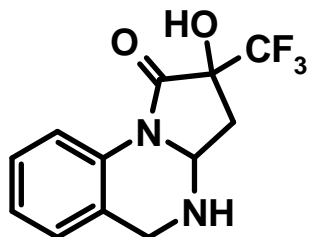
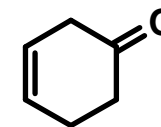
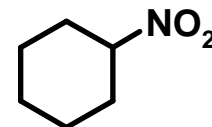
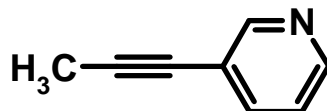
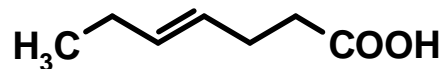
Číslo (stupeň) nenasycenosti	(UN ... Unsaturation Number)
Ekvivalent dvojných vazeb	(BDE ... Double Bond Ekvivalent)
Ekvivalent dvojných vazeb a kruhů (EDK)	(RDBE ... Ring Double Bond Ekvivalent) (PBoR ... Pi Bonds or Rings)

DBE odráží kolik je v molekule daného sumárního vzorce násobných vazeb a cyklů

- Informace o počtu cyklů a násobných vazeb
- Test na funkční skupiny a substruktury
- Ověření správnosti sumárního vzorce

Výpočet DBE ze známé struktury

DBE = počet dvojných vazeb + počet cyklů + 2 * počet trojných vazeb



Řešení: 2, 6, 3, 3, 7, 7, 1, 4, 13, 6, 14

Ekvivalent dvojných vazeb (DBE) ze sumárního vzorce

Obecné vzorce neobsahují všechny prvky ani jejich možné valence

$$\text{pro } \mathbf{C_a H_b O_c N_d X_e} \quad (X = \text{F, Cl, Br, I}) \quad \mathbf{DBE = a - (b+e)/2 + d/2 + 1}$$

Obsahuje-li sumární vzorec prvky, které mohou nabývat různých vazností,

např. síra je dvojnásobná v sulfidech, čtyřnásobná v sulfoxidech a šestnásobná v sulfonových kyselinách, dusík je trojnásobný v aminech či pyridinu, ale pětinnásobný v nitroderivátech,

pak je nutné uvažovat všechny možnosti, a zde běžné vzorce selhávají.

Ekvivalent dvojných vazeb (DBE) ze sumárního vzorce

Výpočet DBE úvahou nad vazností obsažených prvků:

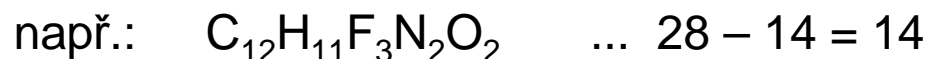
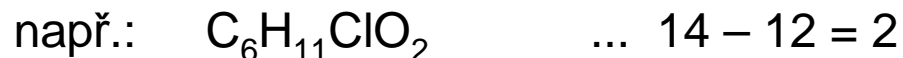
1. Spočítejme valence vícevazných atomů (dvouvazné lze vynechat).



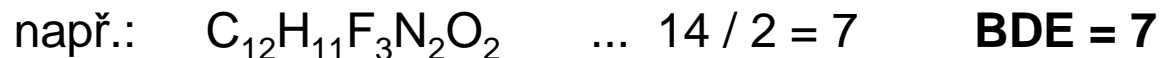
2. Odečtěme valence nezbytné k jejich propojení; pro n atomů je to $2*(n-1)$ valencí.



3. Odečteme počet valencí jednovazných atomů.



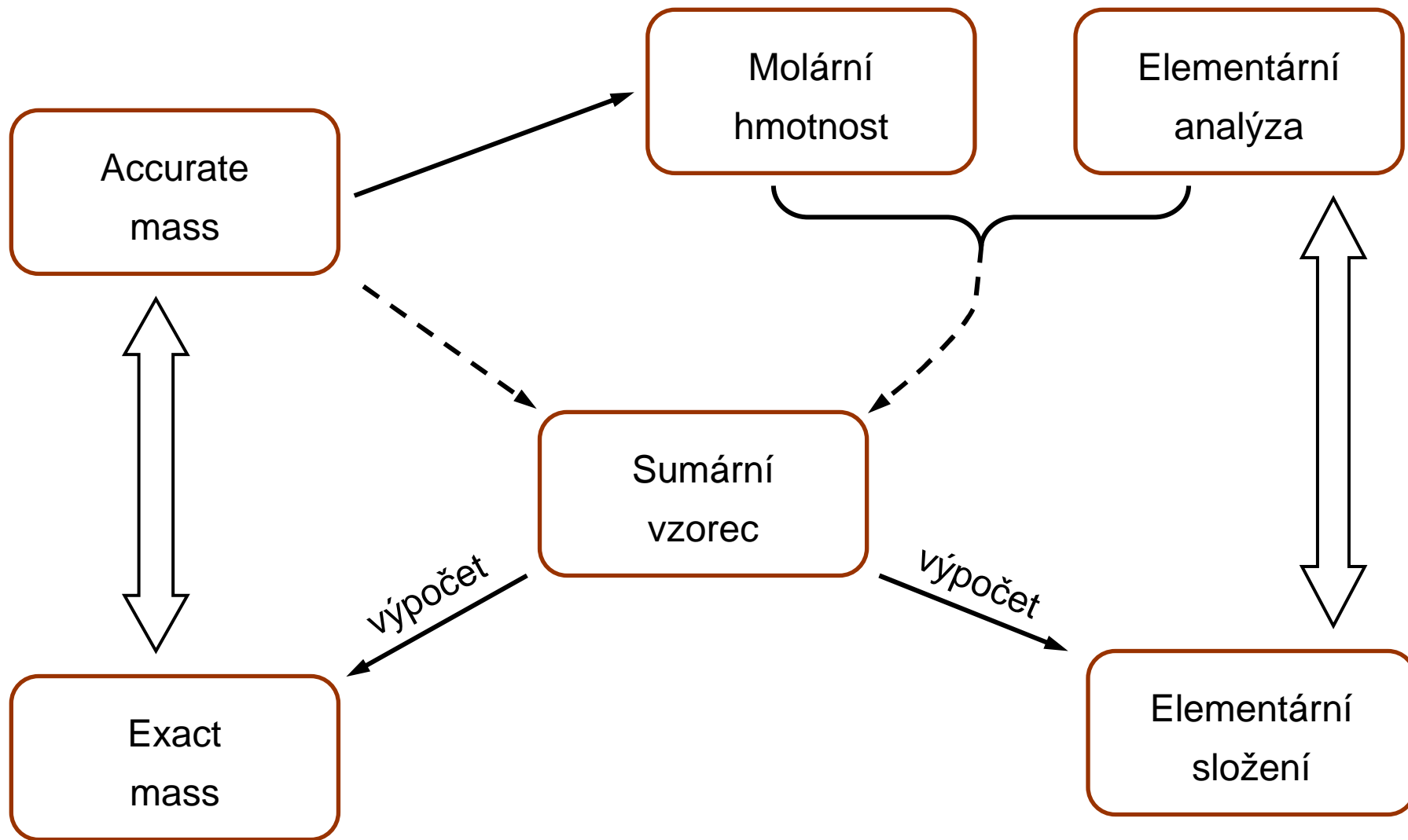
4. Zbylé valence vydělíme dvěma.



Interpretace DBE

Hodnota **DBE** musí být **celé kladné číslo** nebo **nula**. Pokud ji nemá je sumární vzorec nesprávný.

- $DBE = 0$
Molekula neobsahuje žádnou násobnou vazbu ani žádný cyklus.
- $DBE = 1$
Molekula obsahuje jednu dvojnou vazbu nebo jeden cyklus.
- $DBE = 2$
Molekula obsahuje dvě dvojně vazby nebo dva cykly nebo jednu dvojnou vazbu a jeden cyklus nebo jednu trojnou vazbu.
- $DBE = 3$
Molekula obsahuje 0 – 3 dvojně vazby, 0 – 3 cykly, 0 – 1 trojně vazby
-

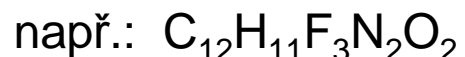


Elementární analýza (EA, Elemental analysis)

Elementární analýza poskytuje hmotnostní podíl jednotlivých prvků v analyzovaném vzorku. Obvykle vyjádřen v hmotnostních procentech.

Je-li vzorek čistou látkou, pak obsah odpovídá hmotnostnímu podílu jednotlivých prvků v molekule dané látky. Je-li znám sumární či alespoň empirický vzorec látky lze hmotnostní podíly snadno vypočítat.

Výpočet ze sumárního vzorce



$$\%C = \frac{12 * A_r(C) * 100}{M_r(C_{12}H_{11}F_3N_2O_2)} = 52,93$$

$$\%H = \frac{11 * A_r(H) * 100}{M_r(C_{12}H_{11}F_3N_2O_2)} = 4,07$$

$$\%F = \frac{3 * A_r(F) * 100}{M_r(C_{12}H_{11}F_3N_2O_2)} = 20,95$$

$$\%N = \frac{2 * A_r(N) * 100}{M_r(C_{12}H_{11}F_3N_2O_2)} = 10,29$$

$$\%O = \frac{2 * A_r(O) * 100}{M_r(C_{12}H_{11}F_3N_2O_2)} = 11,76$$

Elementární analýza



Empirický vzorec

EA	53,15 %C	4,12 %H	10,05 %N	21,74 %F	= 10,94 %O
-----------	-----------------	----------------	-----------------	-----------------	-------------------

- Pokud látka obsahuje již jen jeden prvek, který je znám (např. kyslík), lze jeho obsah dopočítat a získat tak úplný empirický vzorec.
- Pokud látka obsahuje neznámý prvek nebo nečistotu neobsahující stanovované prvky, pak získáme pouze molární poměr stanovovaných prvků v molekule.
- Pokud látka obsahuje neznámou nečistotu obsahující stanovované prvky, pak je interpretace nemožná.
- Pokud experimentální EA neodpovídá očekávané, pak je vhodné zvážit existenci solvátů – látky pro EA jsou obvykle čištěny krystalizací. EA směsi látek lze vypočítat analogicky jako u čistých látek jen je nutné zahrnout jejich obsah, např.: $C_{12}H_{11}F_3N_2O_2 \cdot \frac{1}{2}CHCl_3$ budeme uvažovat jako molekulu $C_{12,5}H_{11,5}F_3N_2O_2Cl_{1,5}$
- K ověření „správnosti“ vypočteného vzorce lze využít: a) zpětný výpočet obsahu prvků; b) hodnotu DBE, která musí být celočíselná; c) NMR spektra; d) MS data.

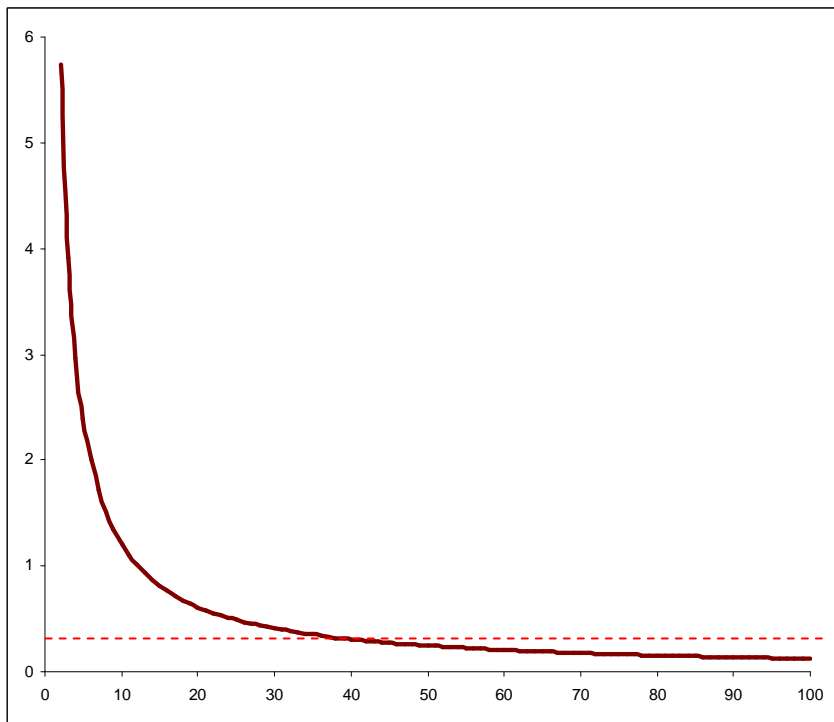
Elementární analýza



Empirický vzorec

EA	53,15 %C	4,12 %H	10,05 %N	21,74 %F	= 10,94 %O	DBE
A_r	12,011	1,008	14,007	18,998	15,999	
EA / A_r	4,425	4,087	0,717	1,144	0,684	
/ min	6,17	5,70	1,00	1,60	0,95	
zokrouhlit	6	6	1	2	1	3,5
EA calc	49,32 %	4,14 %	9,59 %	26,00 %	10,95 %	
rozdíl EA	-3,83	+0,02	-0,46	+4,26	+0,01	
* 2	12,34	11,40	2,00	3,20	1,90	
zokrouhlit	12	11	2	3	2	7,0
EA calc	52,93 %	4,07 %	10,29 %	20,95 %	11,76 %	
rozdíl EA	-0,22	-0,05	+0,24	-0,79	+0,82	
* 4	24,68	22,80	4,00	6,40	3,80	
zokrouhlit	25	23	4	6	4	13,5
EA calc	53,84 %	4,16 %	10,05 %	20,46 %	11,48 %	
rozdíl EA	+0,69	+0,04	0,00	-1,28	+0,54	

Elementární analýza (EA, Elemental analysis)



Limity elementární analýzy

%C (alkenu) – %C (alkanu)

