

# Úvod do strukturní analýzy farmaceutických látek

Garant předmětu: doc. Ing. Bohumil Dolenský, Ph.D.  
A28, linka 4110, dolenskb@vscht.cz

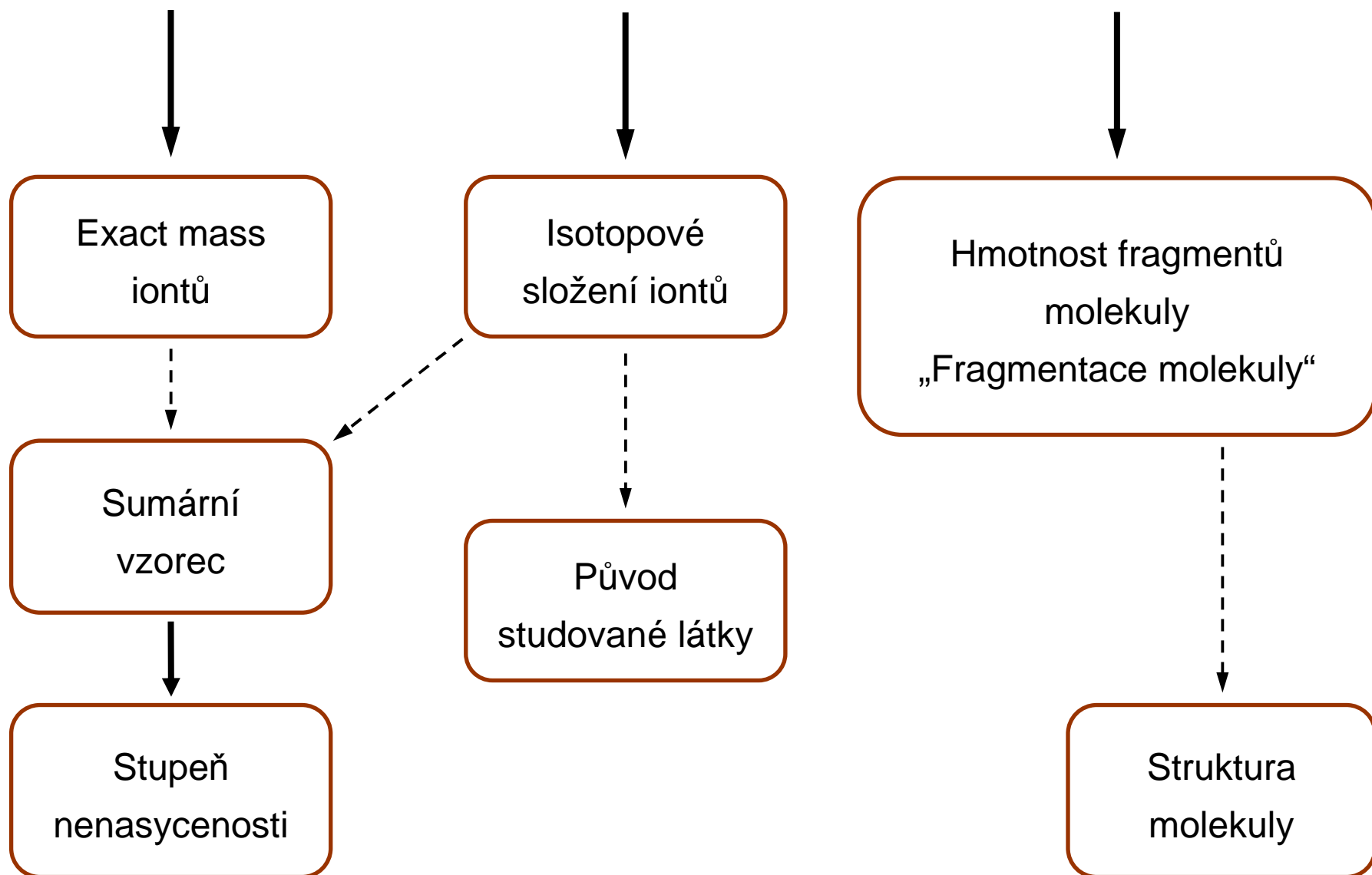
## Hmotnostní spektrometrie II.

*Příprava předmětu byla podpořena  
projektem OPFA č. CZ.2.17/3.1.00/33253*



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

# Hmotnostní spektrum



## Nejběžnější ionizační techniky

### **Electron Impact (EI)**

Vhodná pro malé těkavé stabilní látky do 1 kDa; tvrdá ionizace poskytující značnou fragmentaci – informace o struktuře – vhodná pro strukturní analýzu.

### **Chemical Ionization (CI)**

Vhodná pro malé těkavé látky do 1 kDa; měkká ionizace obvykle poskytující pseudo-molekulový ion  $[M+H]^+$

### **Electrospray (ESI)**

Vhodná pro netěkavé látky do 200 kDa (peptidy, proteiny), měkká ionizace, často poskytující ionty mající více nábojů  $[M+nH]^{n+}$

### **Fast Atom Bombardment (FAB)**

Vhodná pro netěkavé látky do 6 kDa (sacharidy, organokovy, peptidy), vyžaduje viskózní matrici, měkká ionizace, ale tvrdší než ESI nebo MALDI.

### **Matrix Assisted Laser Desorption (MALDI)**

Vhodná pro netěkavé látky do 500 kDa (peptidy, proteiny, nukleotidy), vyžaduje pevnou matrici, měkká ionizace.

**APCI, APPI, ...** a desítky dalších

## Molekulový ion $[M]^+$

1. Ion s nejvyšším  $m/z$  ve spektru může, ale nemusí být molekulový
2. Molekulový ion je vždy ion-radikál (při EI ionizaci) 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 (OCH<sub>3</sub>), aj.  
nebo molekuly 18 (H<sub>2</sub>O), 20 (HF), 28 (CO nebo C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> nebo N<sub>2</sub>), 32 (CH<sub>3</sub>OH), 36 (HCl) aj.
4. Zakázané ztráty:  $m/z = 3 - 14, 21 - 25$  neodpovídají žádné reálné fragmentaci  
**molekulového iontu**
5. Je vhodné využít ionizačních technik různé tvrdosti.

## Dusíkové pravidlo

Na rozdíl od běžných prvků (C, H, N, O, F, Si, P, S, Cl, Br, I) je dusík je trojvazný, ale jeho majoritní izotop ( $^{14}\text{N}$ ) má sudou nominální hmotnost.

Dle počtu dusíků v molekule pak tedy pozorujeme nominální hmotnosti  $M^+$  iontu

a) lichý počet dusíků = lichý  $M^+$  a sudé fragmenty

b) sudý počet nebo žádný dusík = sudý  $M^+$  a liché fragmenty

Pro případy pseudo-molekulových iontů

$[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $[\text{M}-\text{H}]^-$ ,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $[\text{M}+\text{CH}_3\text{CO}_2]^-$ ,  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ , ...

je potřeba modifikace dusíkového pravidla zřejmá.

## Využití isotopových iontů M+1

### Odhad počtu uhlíků

1. Pokud intenzita  $m/z$  položena rovna 100, pak intenzita píku ( $m/z + 1$ ) dělená 1,1 (tj. přirozeným zastoupením izotopu  $^{13}\text{C}$ ) dává odhad počtu uhlíků v iontu  $m/z$ .
2. Hodnota je přibližná (+/- 1 uhlík), je potřeba zvážit více možností.

### Hledání molekulového iontu

Vypočtením přibližné hodnoty počtu uhlíků z dvojice  $M^+$  a  $[M+1]^+$  lze odhadnout molární hmotnost molekuly, která musí korespondovat s  $m/z$  posuzovaných iontů. Počet vodíků a halogenů nesmí být větší než  $2C+2$ .

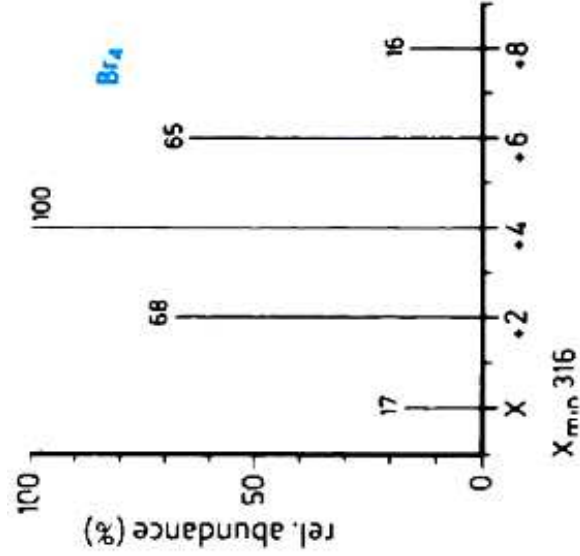
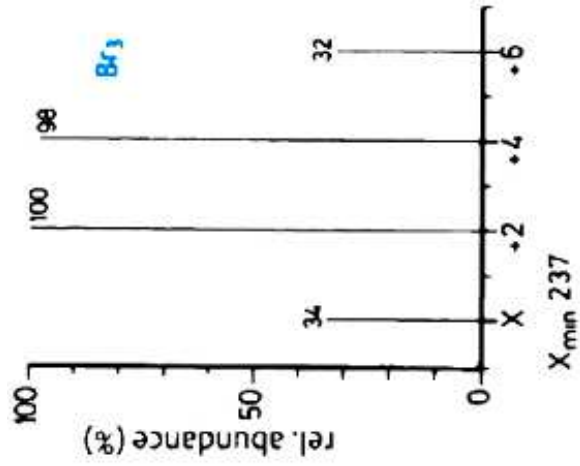
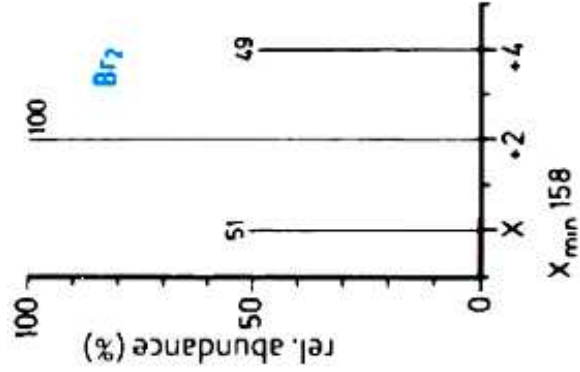
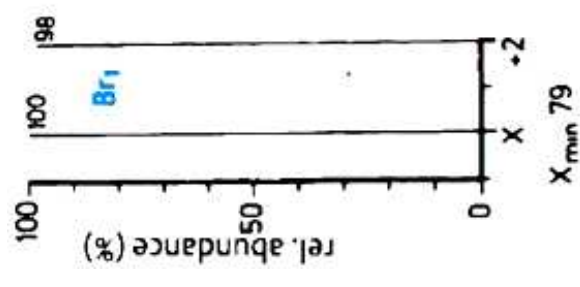
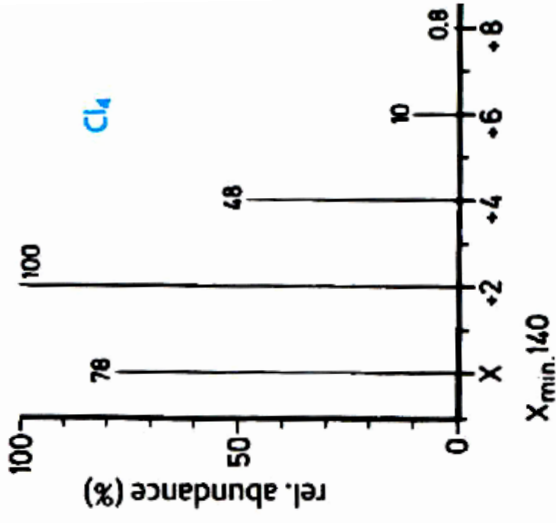
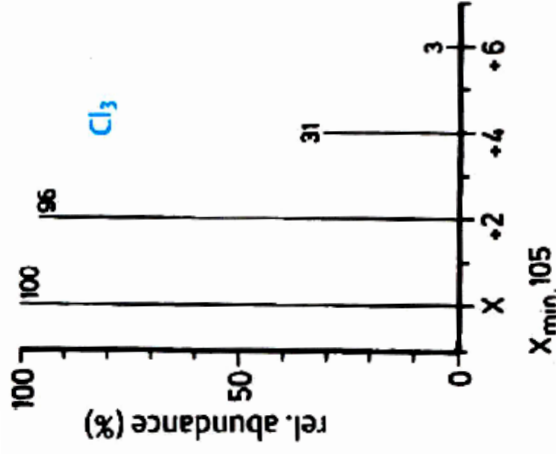
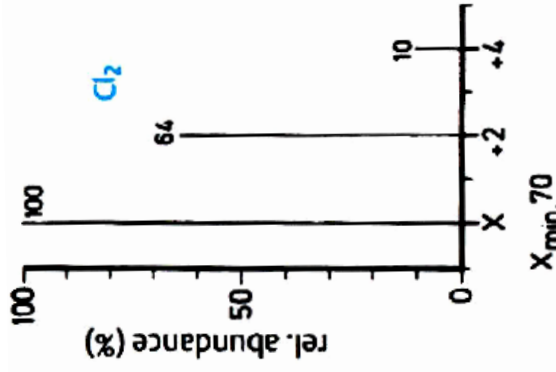
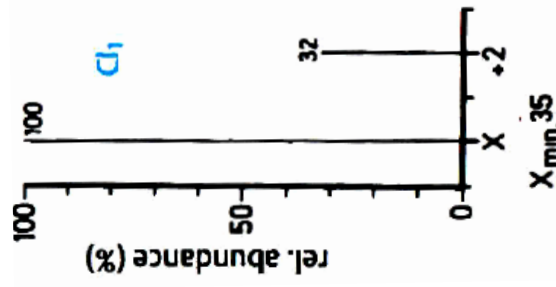
## Využití isotopových iontů M+2

### Odhad počtu M+2 prvků

- Nejprve Cl (32,0 %) a Br (97,3 %)
- Následně S (4,4 %) a Si (3,4 %)
- Kyslík obtížně (0,2 %)
- Zvážit možnost méně běžných prvků
- Neopomenout isotopy  $^{13}\text{C}$

### Příspěvek izotopů $^{13}\text{C}$ k intenzitě iontů M+1, M+2, M+3

Počet C	M+1	M+2	Počet C	M+1	M+2	M+3
<b>C1</b>	1.1	0.00	<b>C10</b>	11.0	0.54	-
<b>C2</b>	2.2	0.01	<b>C15</b>	16.5	1.3	-
<b>C3</b>	3.3	0.04	<b>C20</b>	22.0	2.3	0.2
<b>C4</b>	4.4	0.07	<b>C50</b>	55.0	15.0	2.6
<b>C5</b>	5.5	0.12	<b>C100</b>	110.0	60.0	22.0

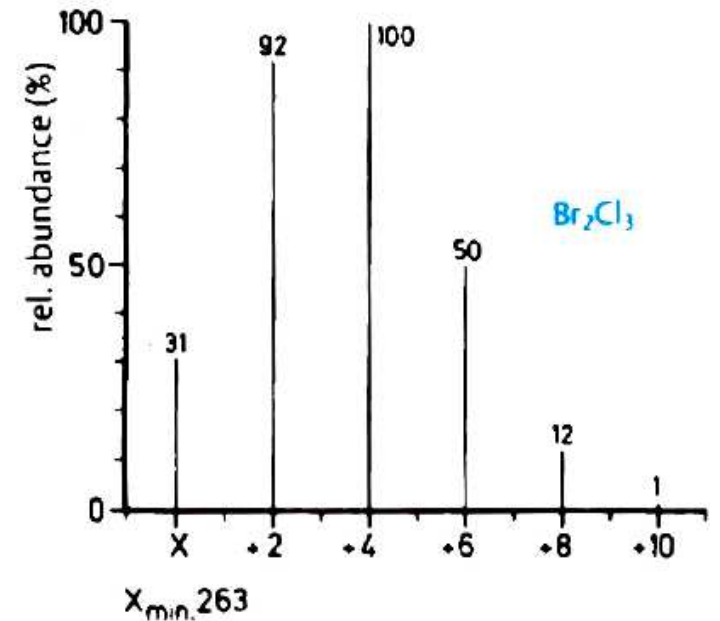
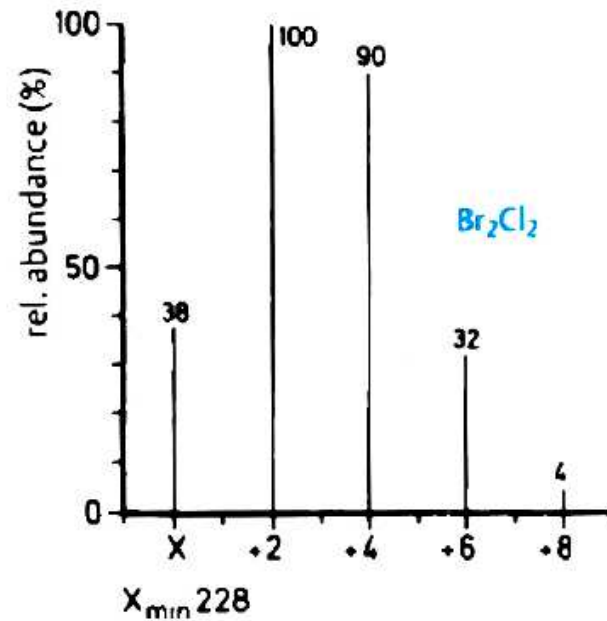
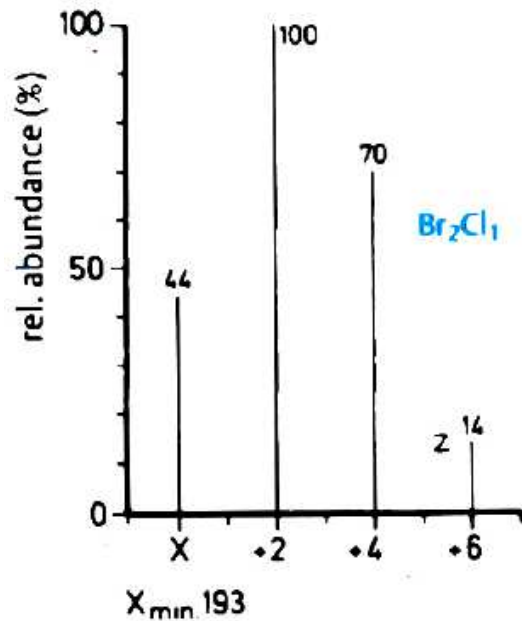




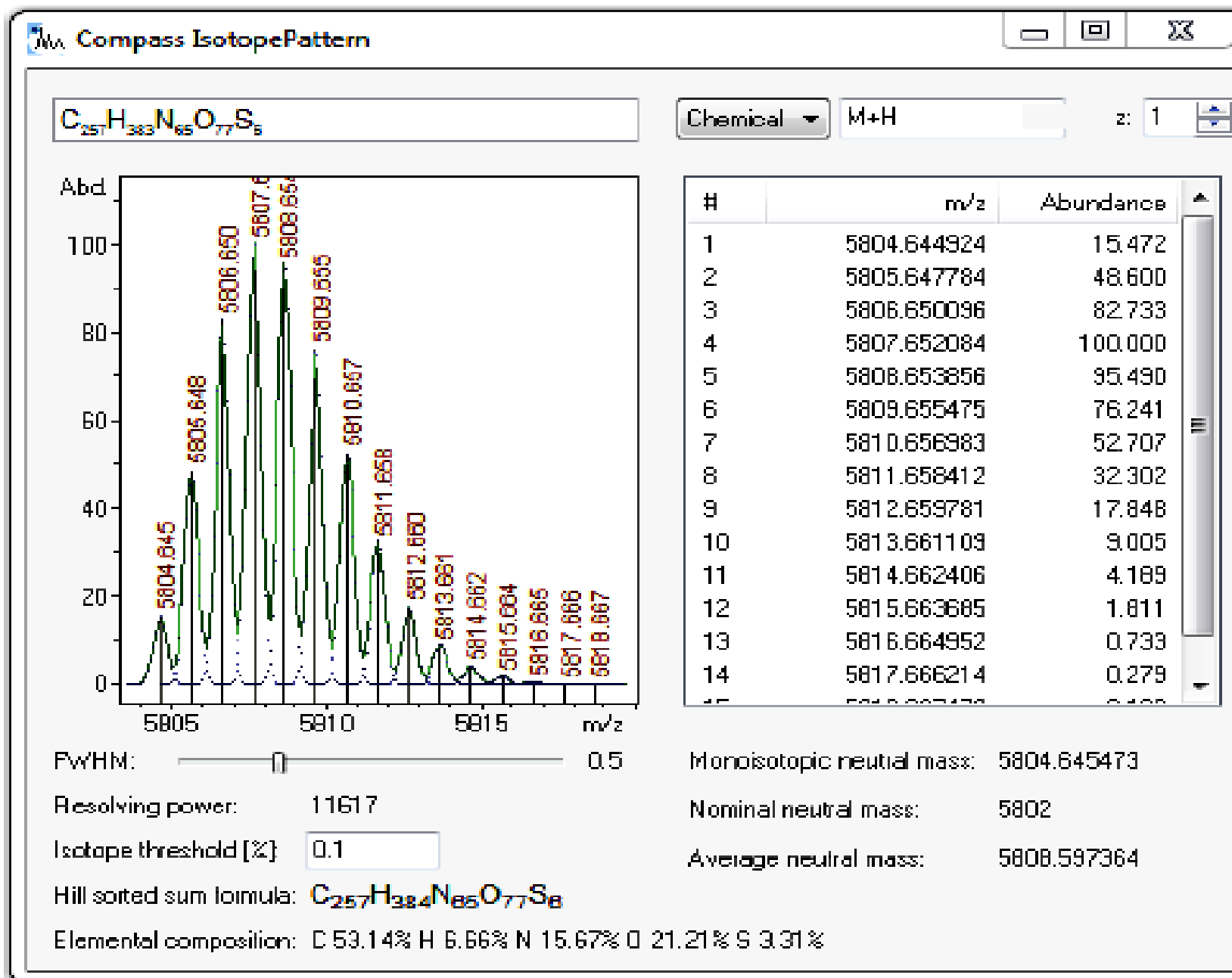
# Br<sub>2</sub>Cl

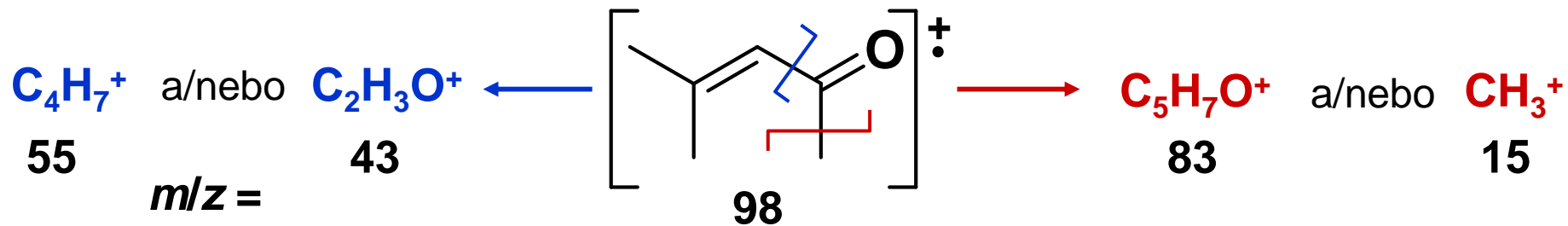
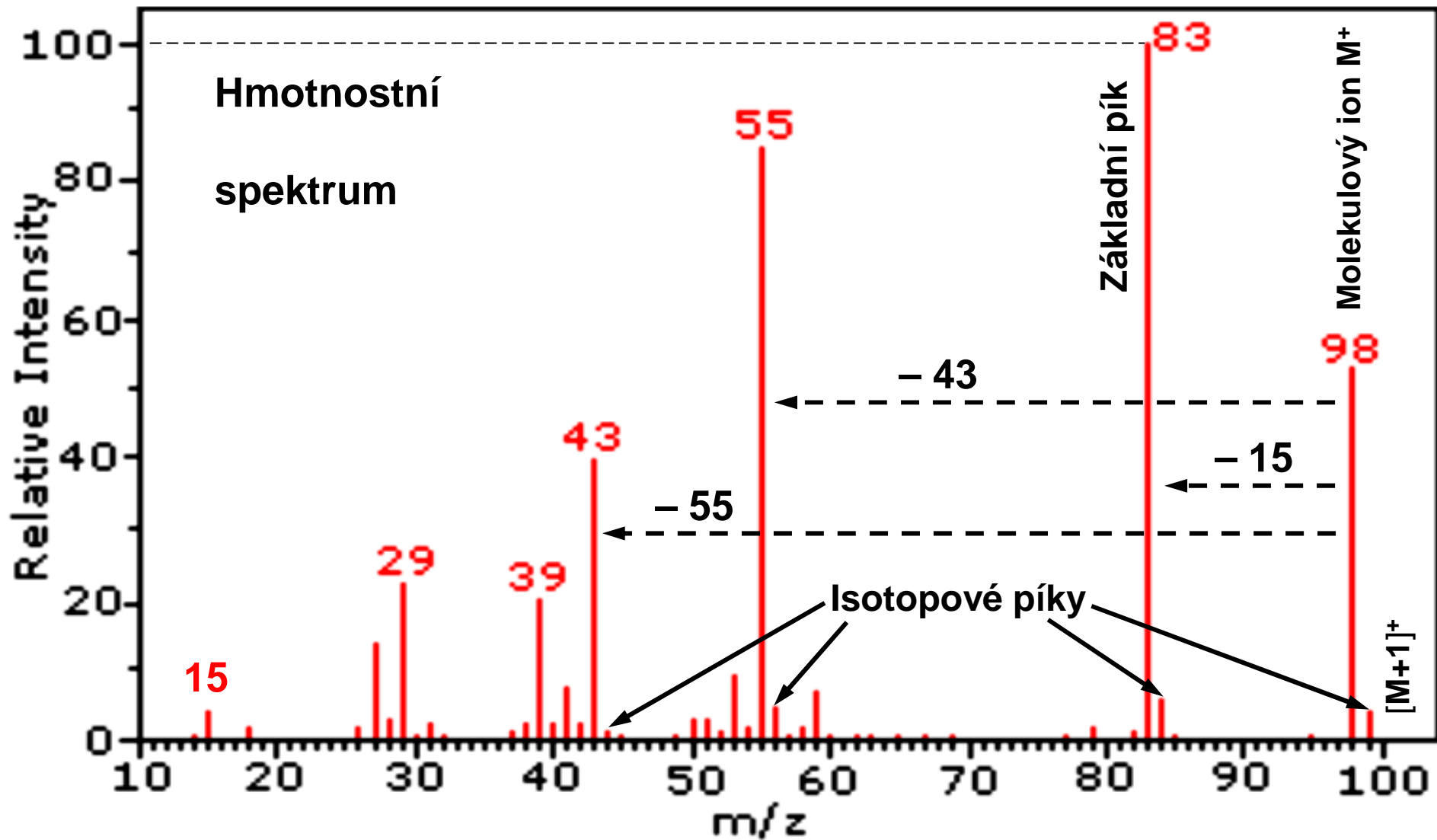
$$(1,000 \text{ } ^{35}\text{Cl} + 0,320 \text{ } ^{37}\text{Cl}) \cdot (1,000 \text{ } ^{79}\text{Br} + 0,973 \text{ } ^{81}\text{Br}) \cdot (1,000 \text{ } ^{79}\text{Br} + 0,973 \text{ } ^{81}\text{Br}) =$$

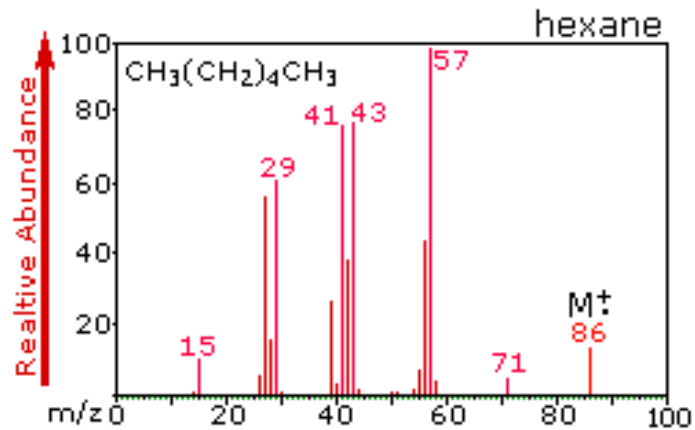
1,000 • 1,000 • 1,000 <sup>35</sup> Cl <sup>79</sup> Br <sup>79</sup> Br +	1,000	<b>44</b>
0,320 • 1,000 • 1,000 <sup>37</sup> Cl <sup>79</sup> Br <sup>79</sup> Br +	}	2,266
1,000 • 1,000 • 0,973 <sup>35</sup> Cl <sup>79</sup> Br <sup>81</sup> Br +		
1,000 • 0,973 • 1,000 <sup>35</sup> Cl <sup>81</sup> Br <sup>79</sup> Br +		
0,320 • 1,000 • 0,973 <sup>37</sup> Cl <sup>79</sup> Br <sup>81</sup> Br +		
0,320 • 0,973 • 1,000 <sup>37</sup> Cl <sup>81</sup> Br <sup>79</sup> Br +	}	1,569
1,000 • 0,973 • 0,973 <sup>35</sup> Cl <sup>81</sup> Br <sup>81</sup> Br +		
0,320 • 0,973 • 0,973 <sup>37</sup> Cl <sup>81</sup> Br <sup>81</sup> Br		
	0,303	<b>13</b>



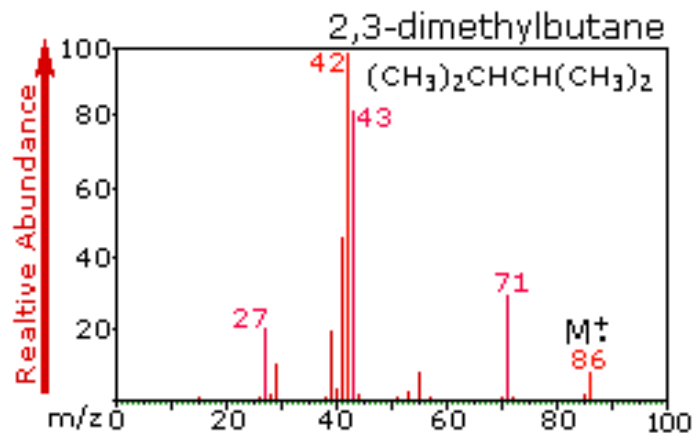
# Výpočet isotopového klastru



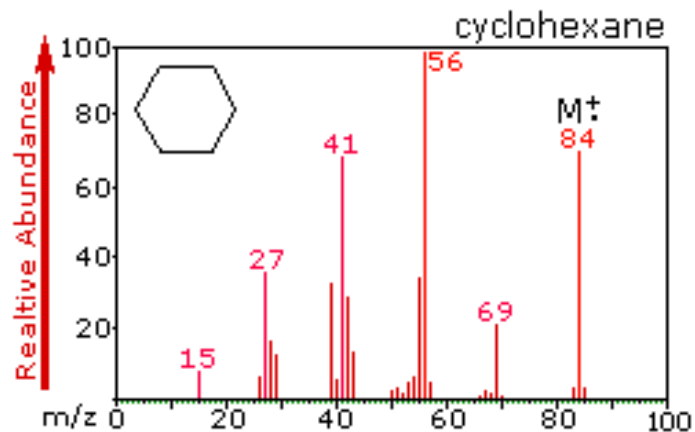




Typická fragmentace nerozvětvených alkanů.  
 $m/z = 15$  (methyl), 29 (ethyl), 43 (propyl), 57 (butyl).

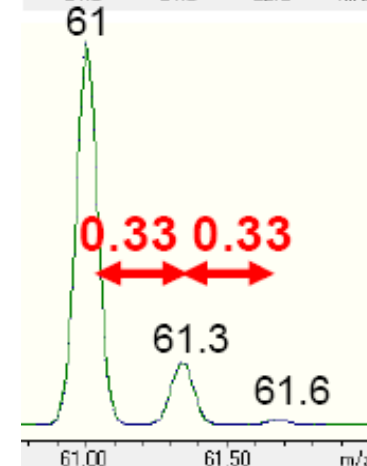
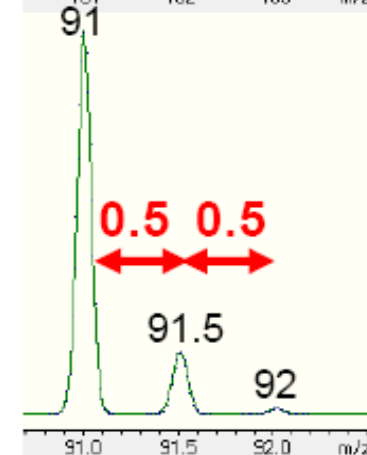
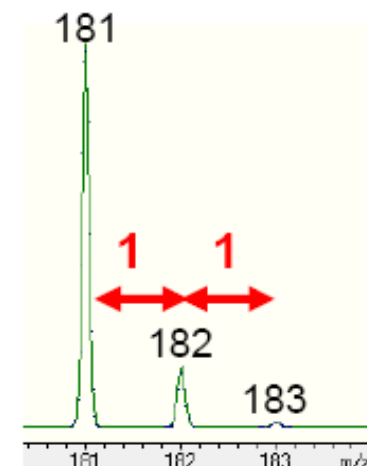
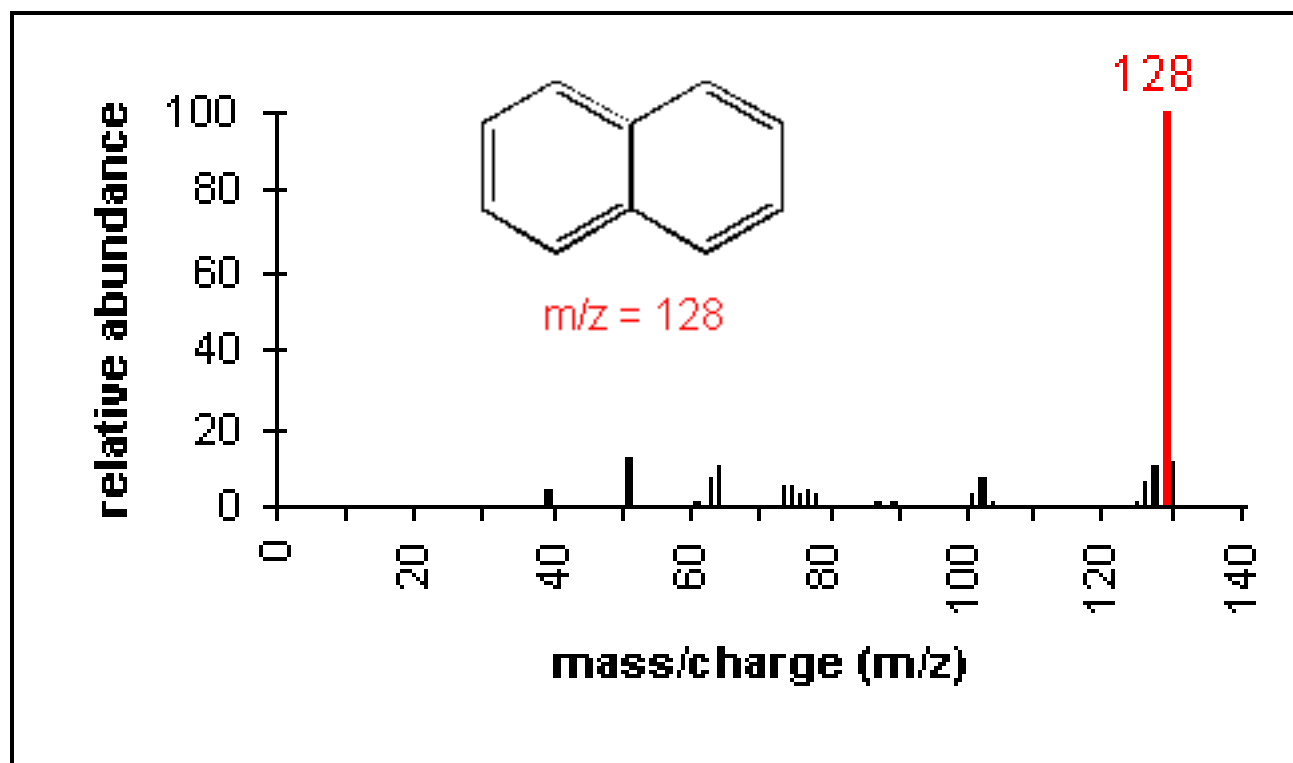


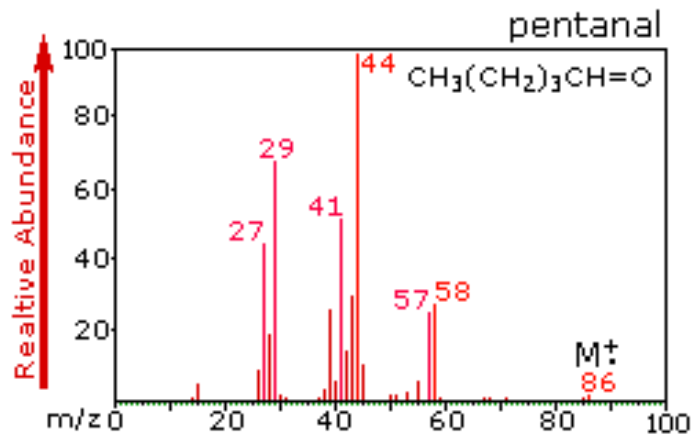
- větvení ovlivní fragmentaci.
- více methylů → M-15 ion ( $m/z = 71$ ) je intenzivnější
- ztráta butylu ( $m/z = 57$ ) téměř chybí
- dominantní je  $C_3H_6$  ( $m/z = 42$ )



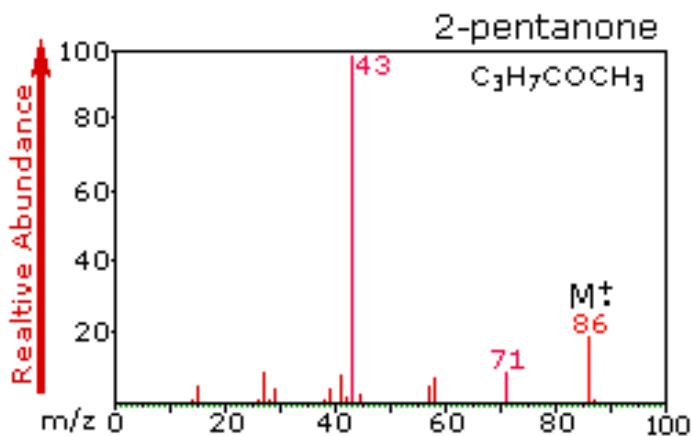
- cyklický uhlovodík má stabilnější molekulový ion
- základní pík  $m/z=56$  důsledkem ztráty ethenu
- alkenylové kationty  $m/z = 41$  a 27 jsou intenzivnější
- ztráta  $CH_3$  ( $m/z = 69$ ) důsledkem přesmyku vodíku

Aromatické látky mají velmi stabilní molekulový pík; často vícenásobně nabitý.

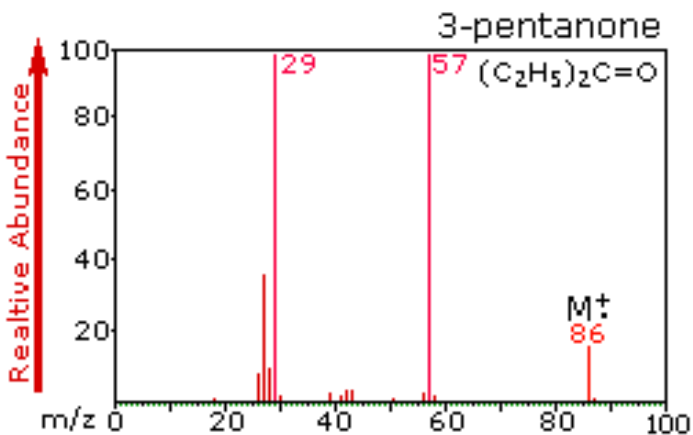




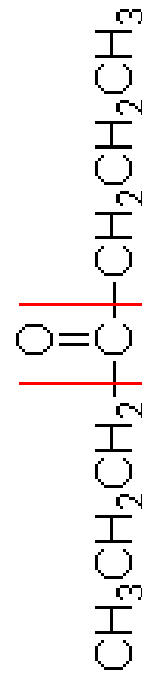
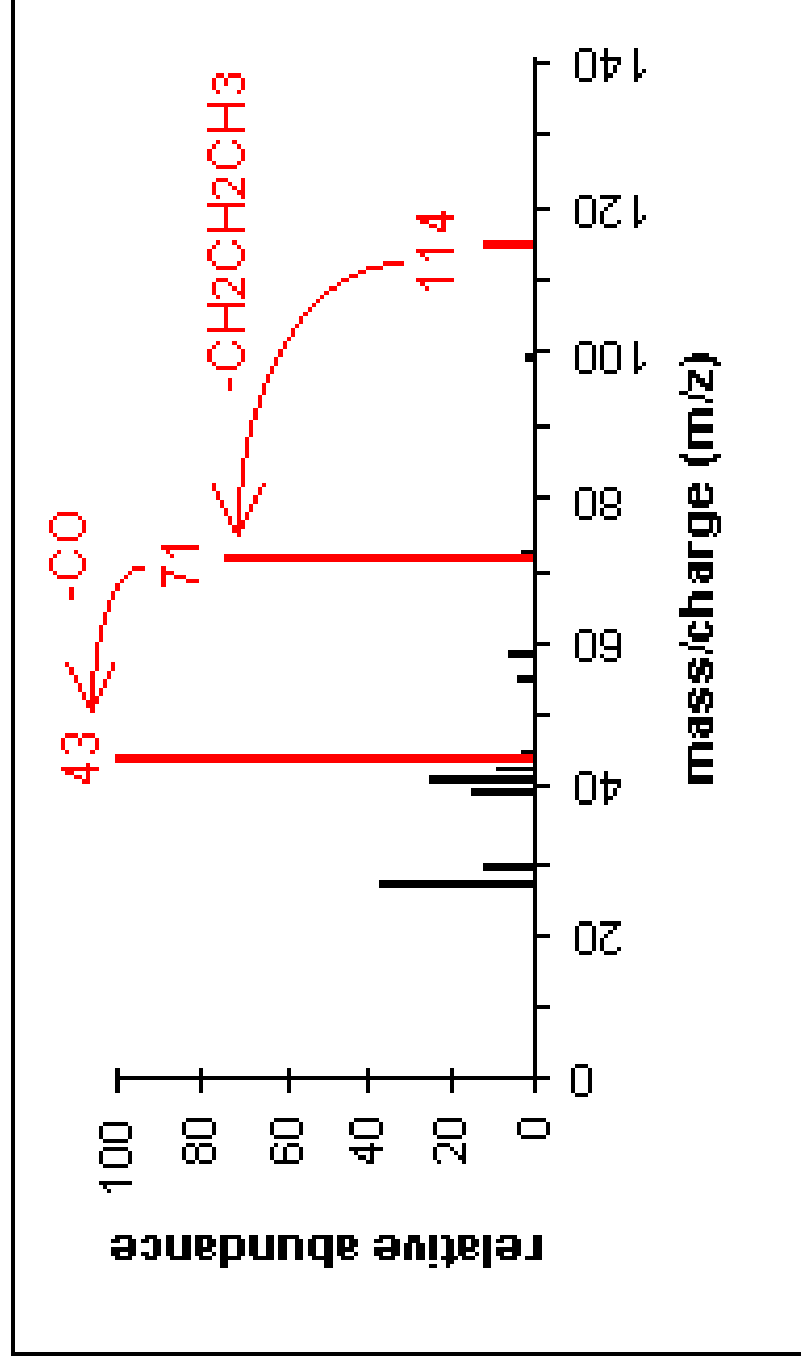
- alkylový řetězec  $m/z = 29$  (27), 43 (41), 57
- slabý molekulový ion, přítomnost M-H
- ztráta CO ...  $m/z = 86 - 58 = 28$
- ztráta  $C_3H_6$  ...  $m/z = 86 - 42 = 44$



- Intenzivnější molekulový ion
- fragmentace u ketoskupiny
- $C_3H_7-COCH_3$  ...  $m/z = 43$  a 43
- $C_3H_7CO-CH_3$  ...  $m/z = 71$  a 15



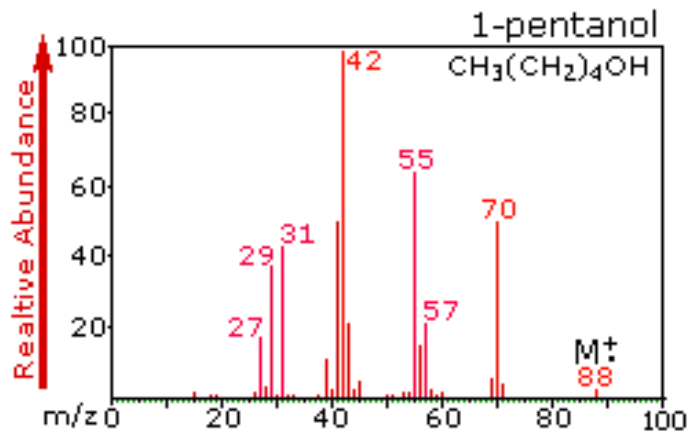
- Intenzivnější molekulový ion
- fragmentace u ketoskupiny
- $C_2H_5-COC_2H_5$  ...  $m/z = 29$  a 57



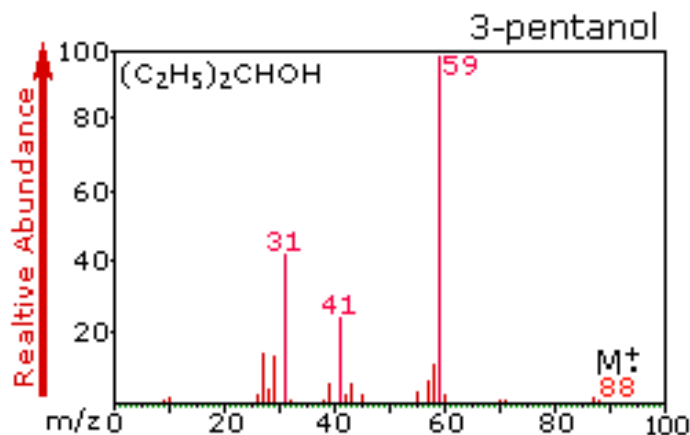
43

71

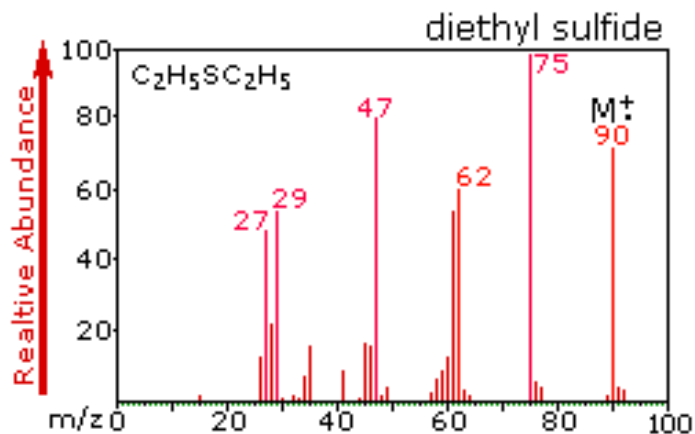
$m/z = 114$



- pro alkoholy typické  $m/z = 31$
- ztráta vody  $m/z = 88 - 18 = 70$
- ztráta ethenu  $m/z = 70 - 28 = 42$



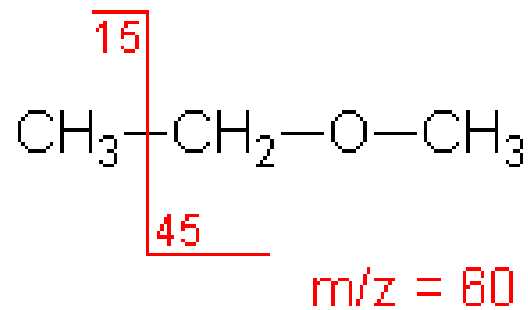
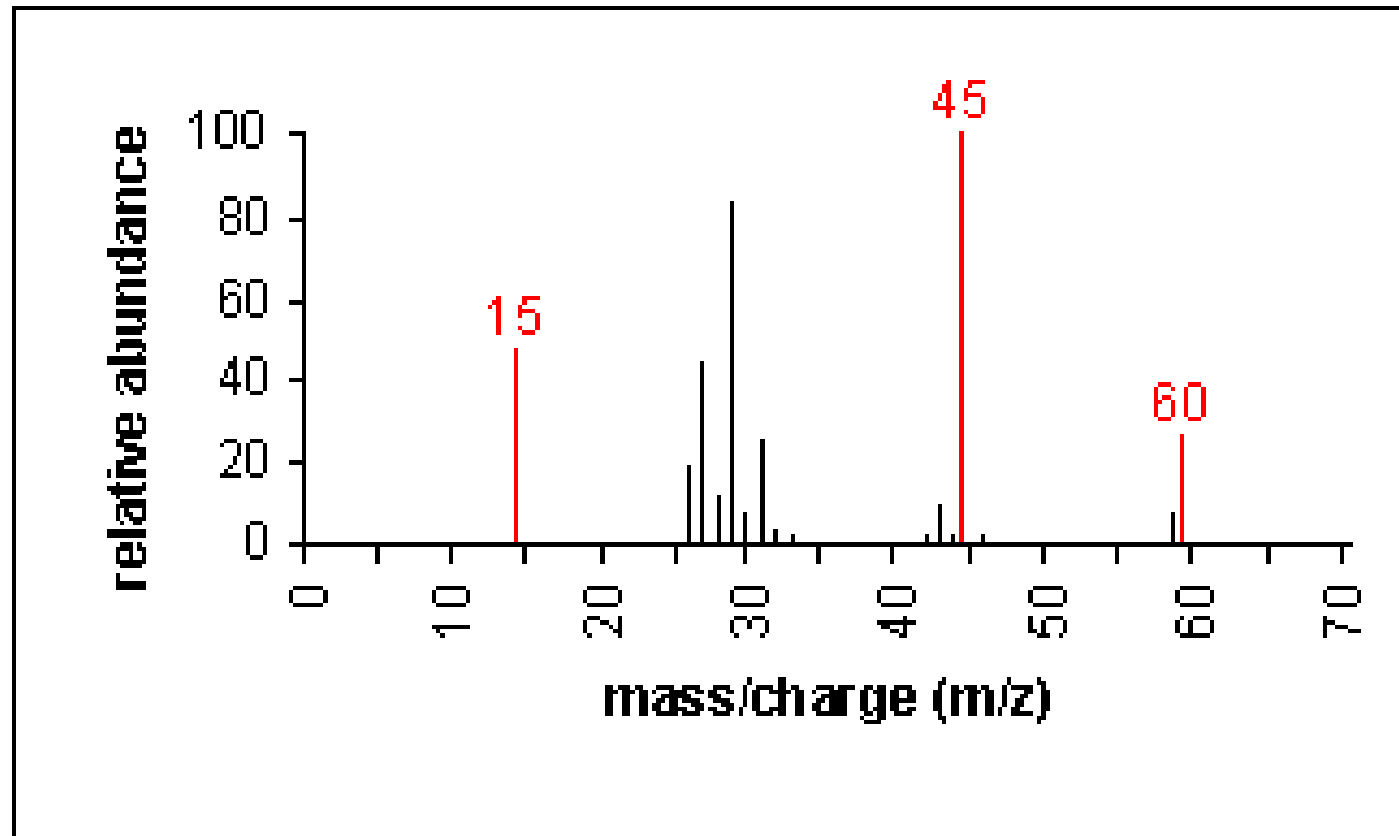
- alpha-fragmentace  $-C_2H_5 \dots m/z = 88 - 29 = 59$
- ztráta vody  $m/z = 59 - 18 = 41$

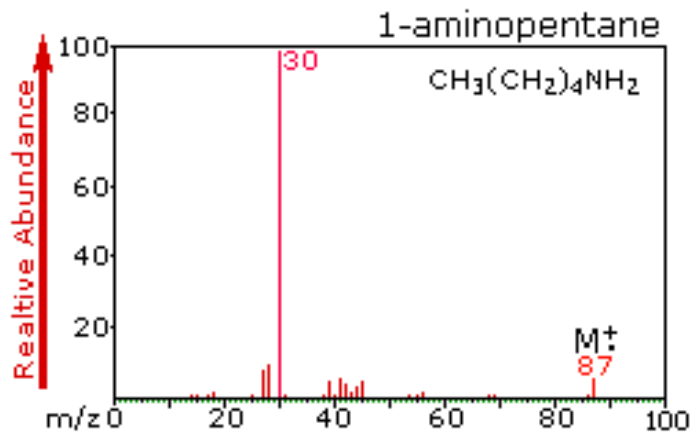


- silný molekulový pík
- silný  $M+2$  u  $m/z = 92, 75$  a  $47$
- $C_2H_5-SC_2H_5 \dots m/z = 29$  a  $61$
- $M - CH_3 \rightarrow m/z = 75$
- $M - C_2H_4 \rightarrow m/z = 62$
- $62 - CH_3 \rightarrow m/z = 47$

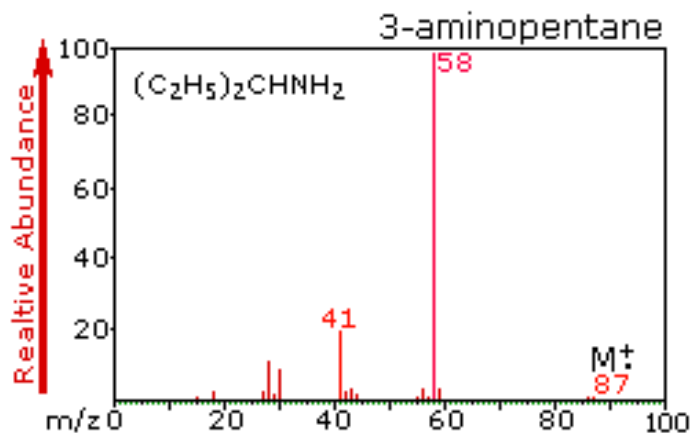


## Ethery

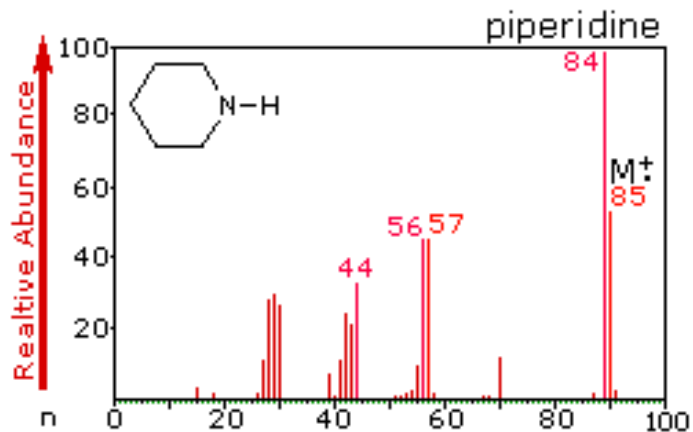




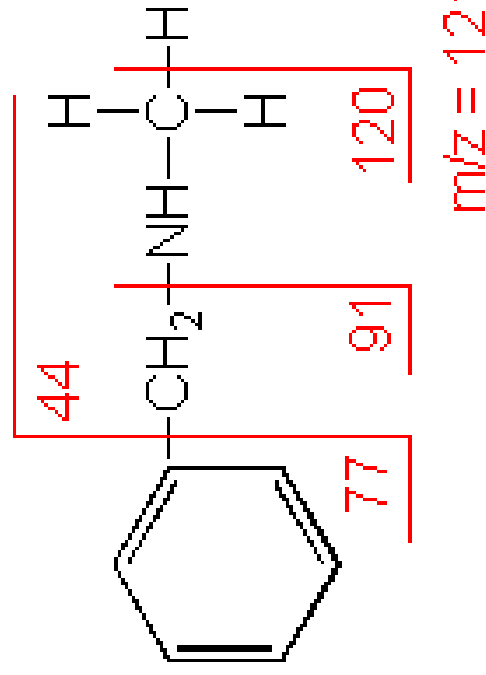
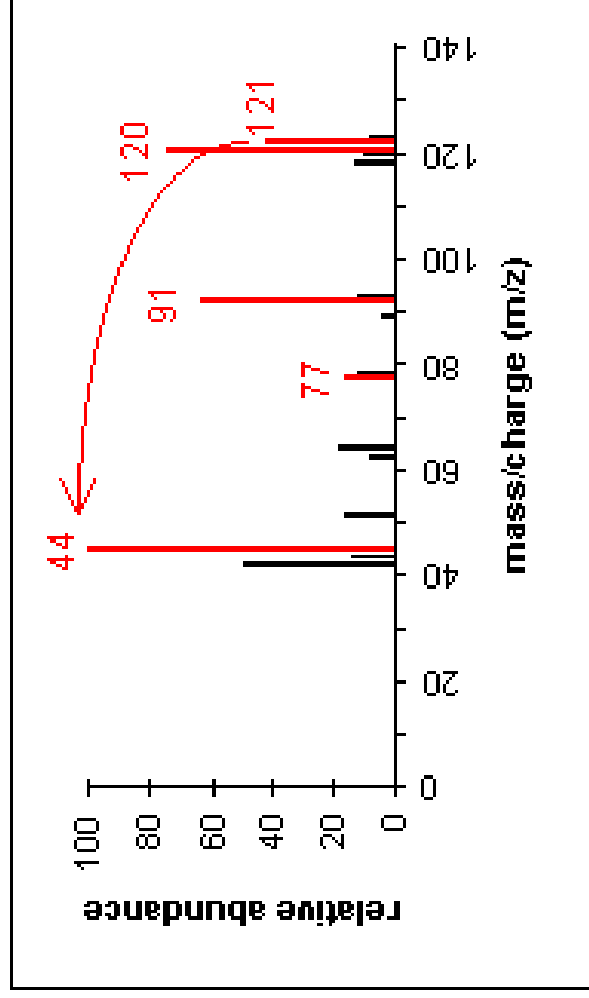
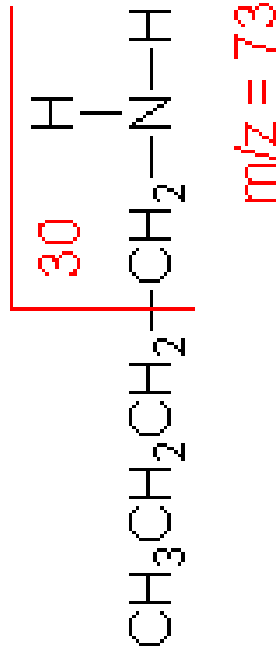
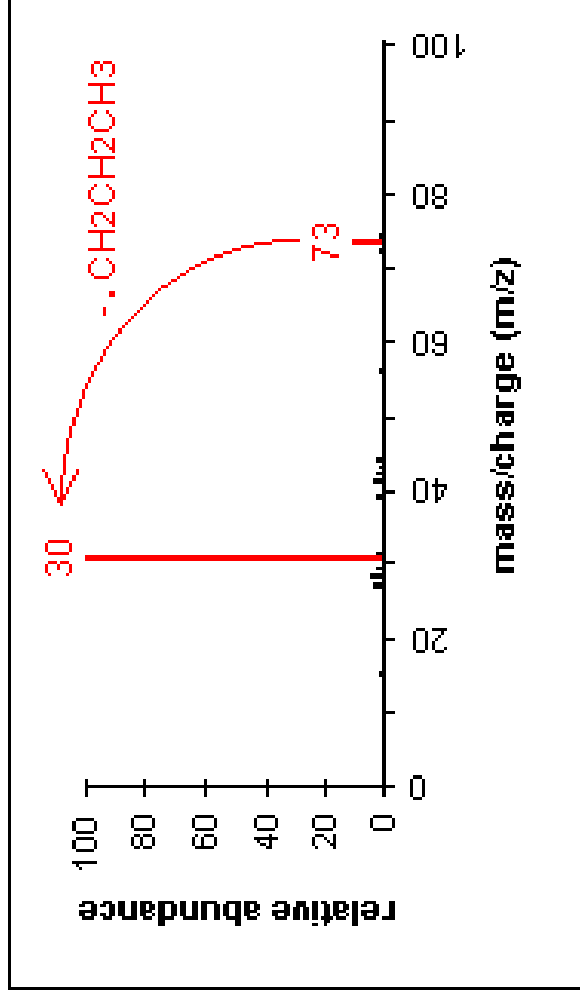
- slabý molekulární ion
- alpha-fragmentace  $m/z = 30$   $M - CH_2NH_2$

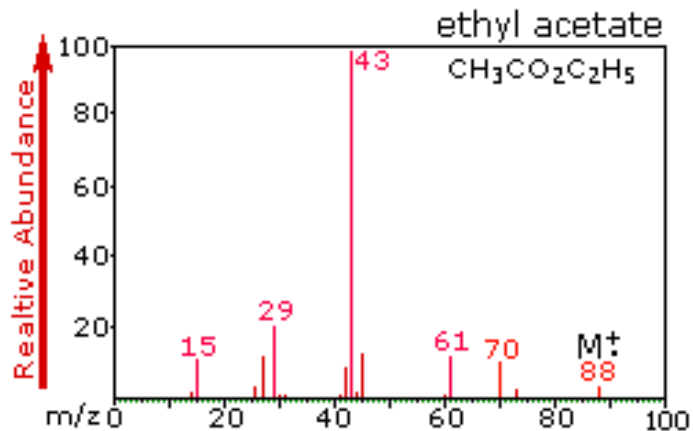


- slabý molekulový ion
- alpha-fragmentace  $M - C_2H_5 \rightarrow m/z = 58$
- ztráta amoniaku  $58 - NH_3 \rightarrow m/z = 41$

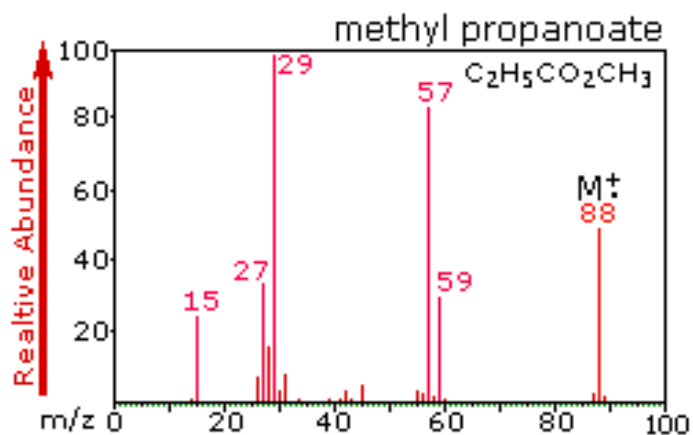


- cyklická látka dává dobrý molekulový pík  $m/z = 85$
- alpha-fragmentace vodíku  $\rightarrow M - H \rightarrow m/z = 84$
- ztráta ethylu či ethenu  $\rightarrow m/z = 56$  a  $57$
- ztráta allylu  $M - C_3H_5 \rightarrow m/z = 44$



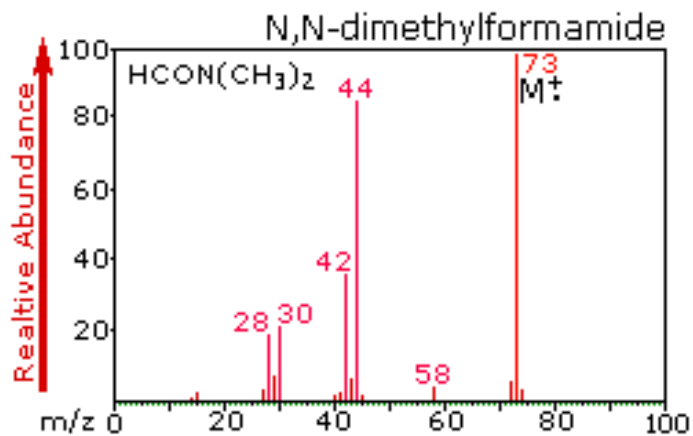


- slabý molekulový pík
- alpha-fragmentace  $M - C_2H_5O \rightarrow m/z = 43$
- kuriosní ztráta vody  $m/z = 88 - 18 = 70$
- alpha-fragmentace  $CH_3-CO_2C_2H_5 \rightarrow m/z$  15 a 73
- slabé  $CH_3$  a  $C_2H_5 \rightarrow m/z = 15$  a 29



### Isomerní ester

- silnější molekulový pík
- alpha-fragmentace  $M - CH_3O \rightarrow m/z = 57$
- 

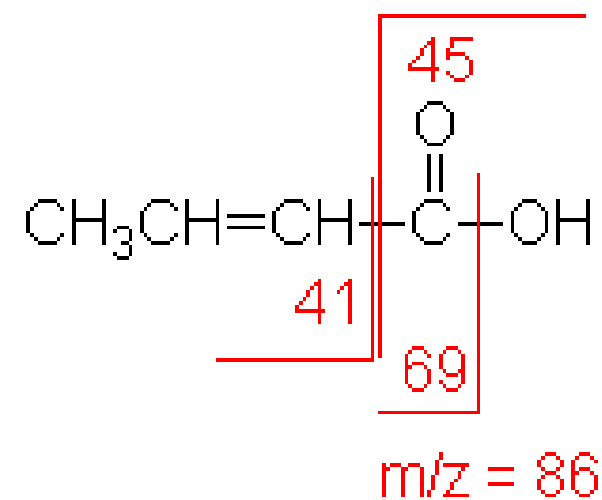
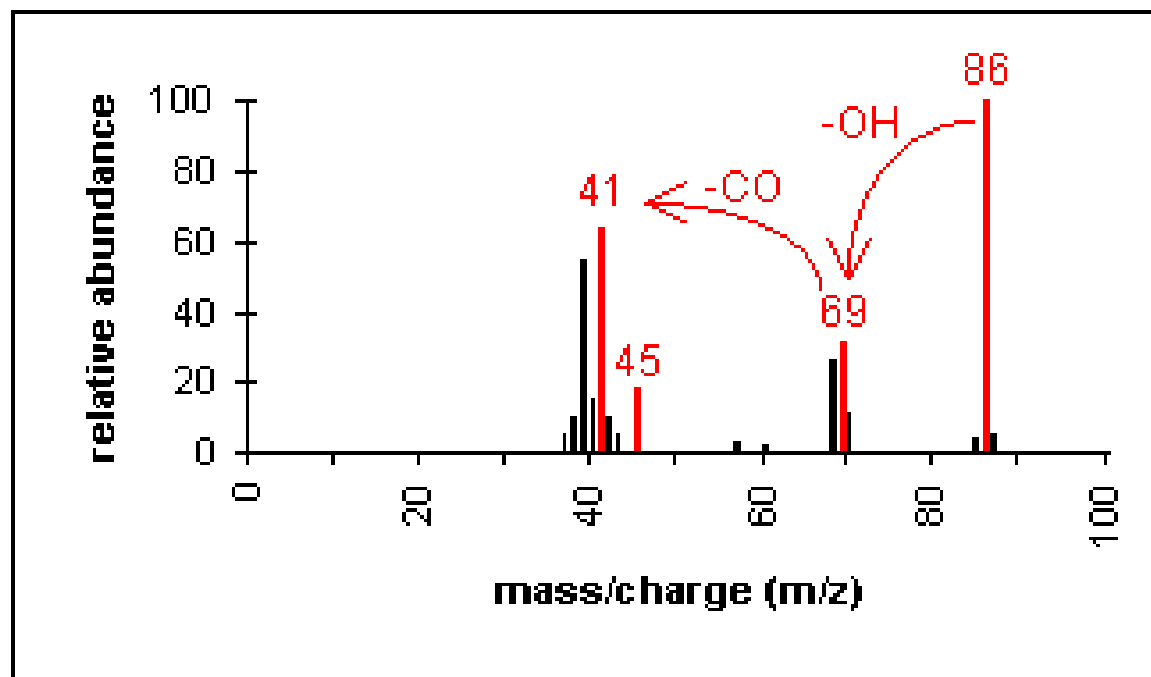


- stabilní molekulový pík  $m/z = 73$
- alpha-fragmentace  $M - HCO \rightarrow m/z = 44$

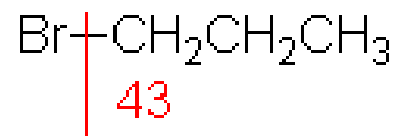
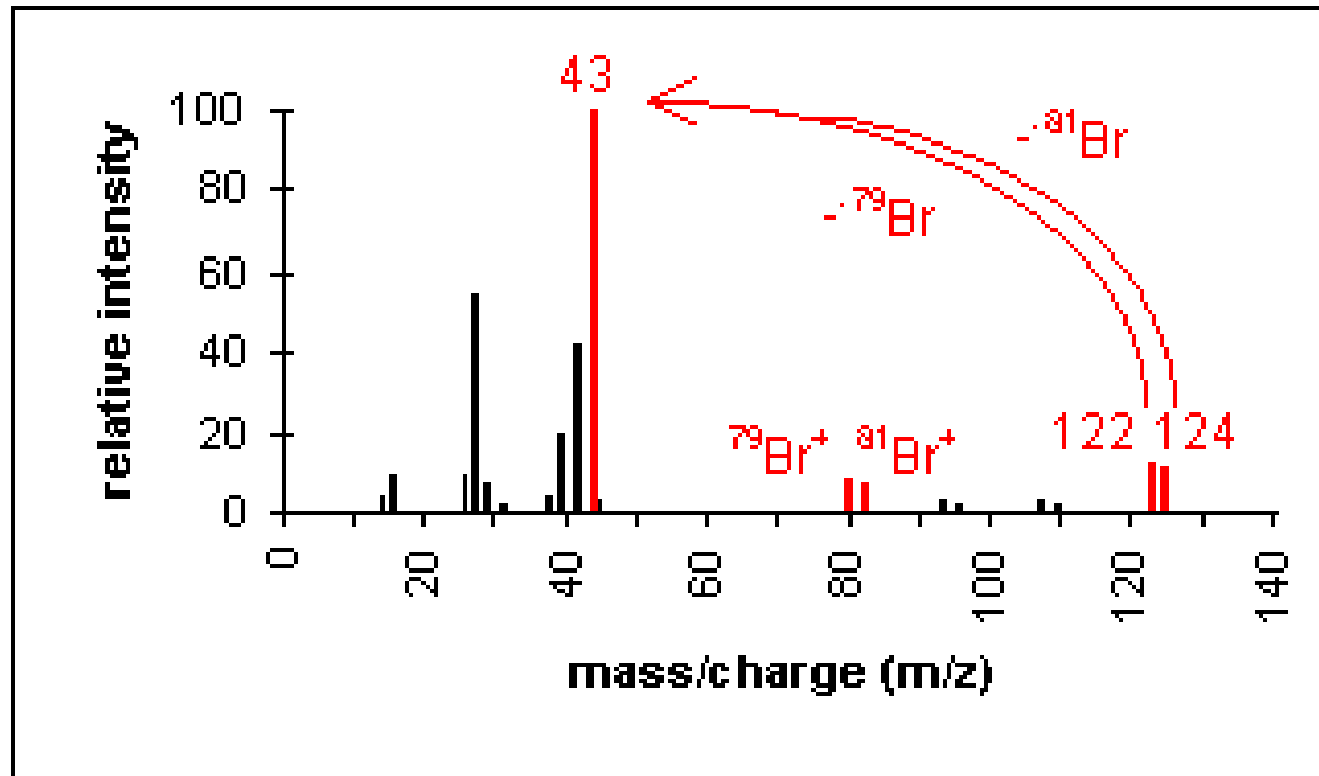
U nižších karboxylových kyselin jsou dominantní píky:

M - OH, tj. M - 17

a M - CO<sub>2</sub>H, tj. M - 45



## Halogenderiváty



$$m/z (^{79}\text{Br}) = 122$$

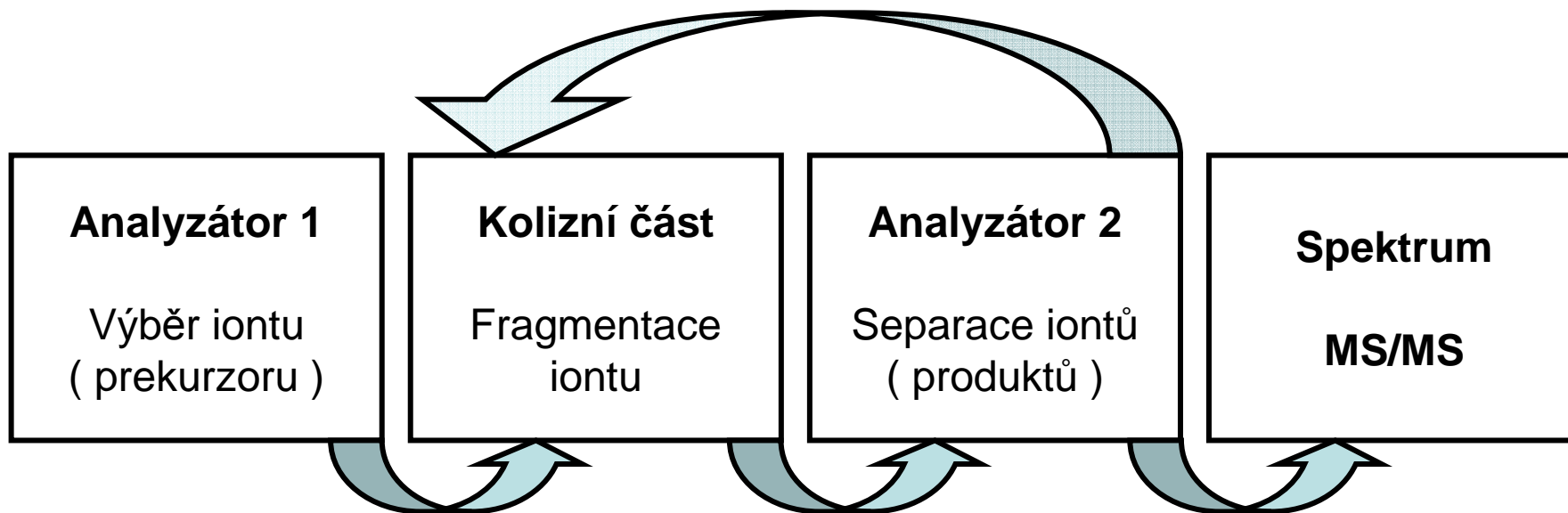
$$m/z (^{81}\text{Br}) = 124$$

Common Small Ions		Common Neutral Fragments	
m/z	composition	mass loss	composition
15 Da	CH <sub>3</sub>	1 Da	H
17	OH	15	CH <sub>3</sub>
18	H <sub>2</sub> O	17	OH
19	H <sub>3</sub> O, F	18	H <sub>2</sub> O
26	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> , CN	19	F
27	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub>	20	HF
28	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> , CO, H <sub>2</sub> CN	27	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> , HCN
29	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> , CHO	28	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> , CO
30	CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	30	CH <sub>2</sub> O
31	CH <sub>3</sub> O	31	CH <sub>3</sub> O
33	SH, CH <sub>2</sub> F	32	CH <sub>4</sub> O, S
34	H <sub>2</sub> S	33	CH <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O, HS
35(37)	Cl	33	H <sub>2</sub> S
36(38)	HCl	35(37)	Cl
39	C <sub>3</sub> H <sub>3</sub>	36(38)	HCl
41	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> , C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N	42	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> , C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O, C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> N
42	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> , C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O, C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> N	43	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> , CH <sub>3</sub> CO
43	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> , CH <sub>3</sub> CO	44	CO <sub>2</sub> O, CONH <sub>2</sub>
44	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O	45	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O
46	NO <sub>2</sub>	55	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub>
56	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub>	57	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>
57	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	59	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub>
60	CH <sub>4</sub> CO <sub>2</sub>	60	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>
79(81)	Br	64	SO <sub>2</sub>
80(82)	HBr	79(81)	Br
91	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub>	80(82)	HBr
127	I	127	I
128	HI	128	HI

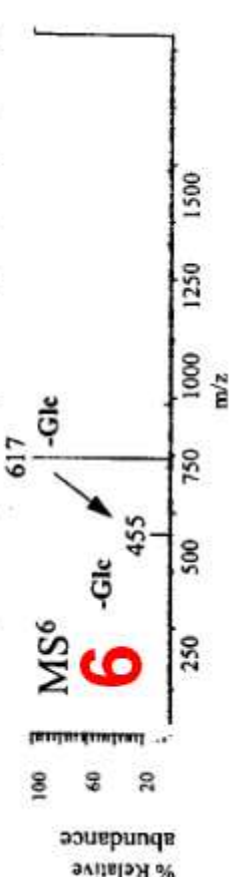
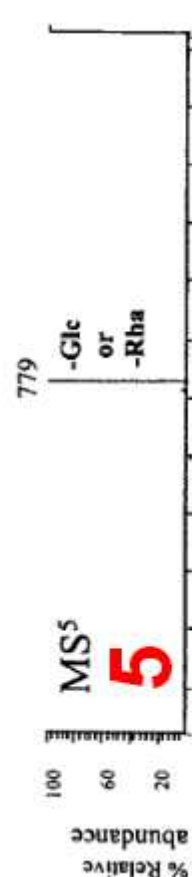
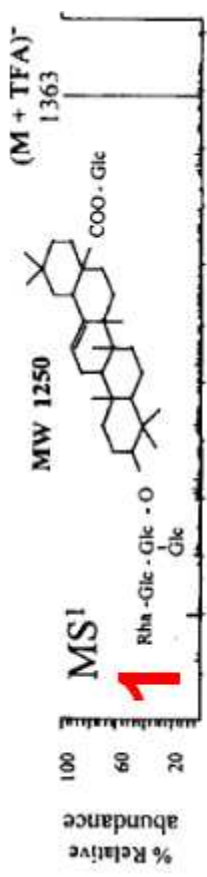
# Collision induced dissociation (CDI)

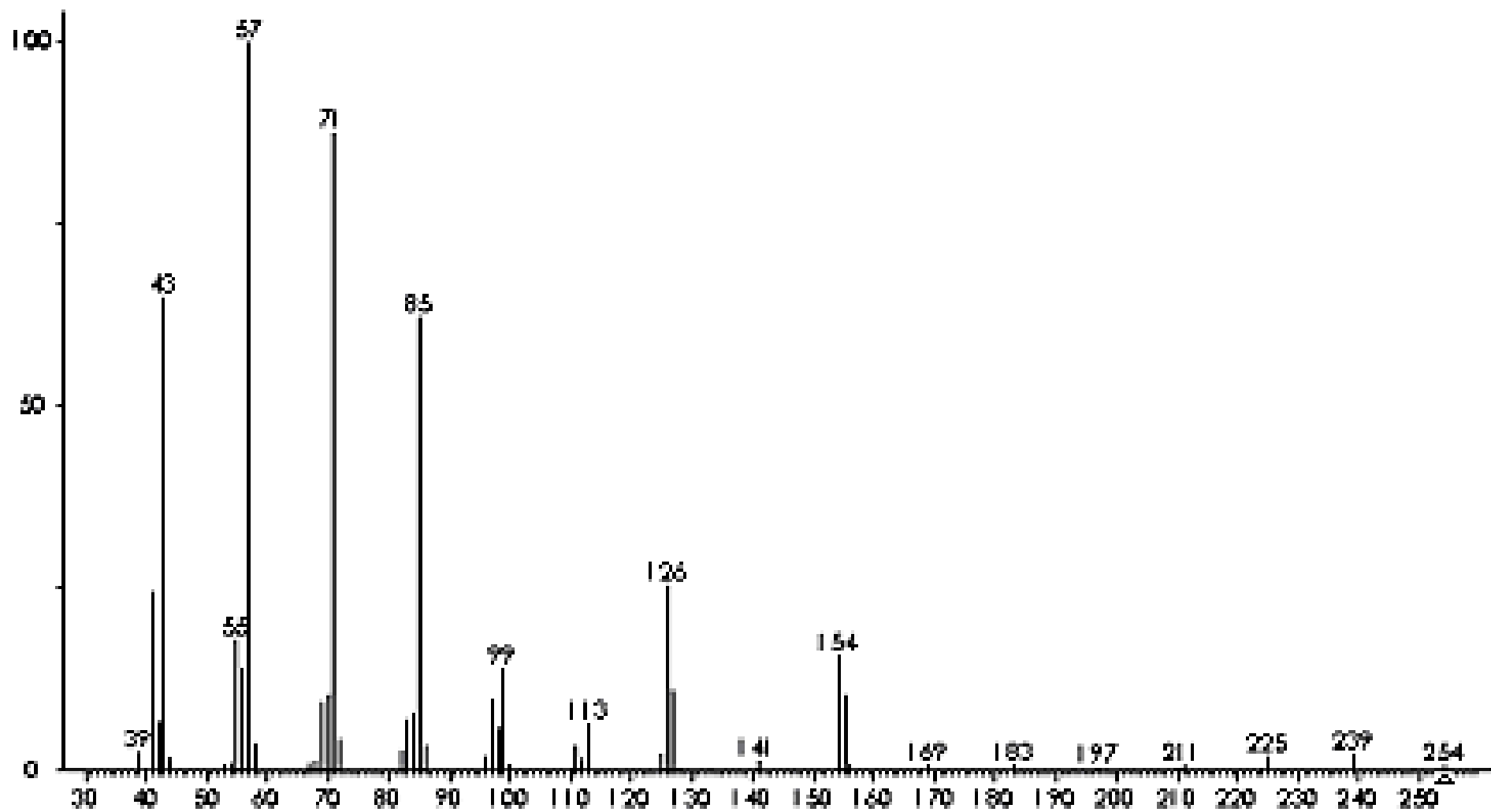
MS/MS, MS<sup>2</sup>, ... MS<sup>n</sup>

Vhodné pro získání strukturních informací a studium fragmentačních cest

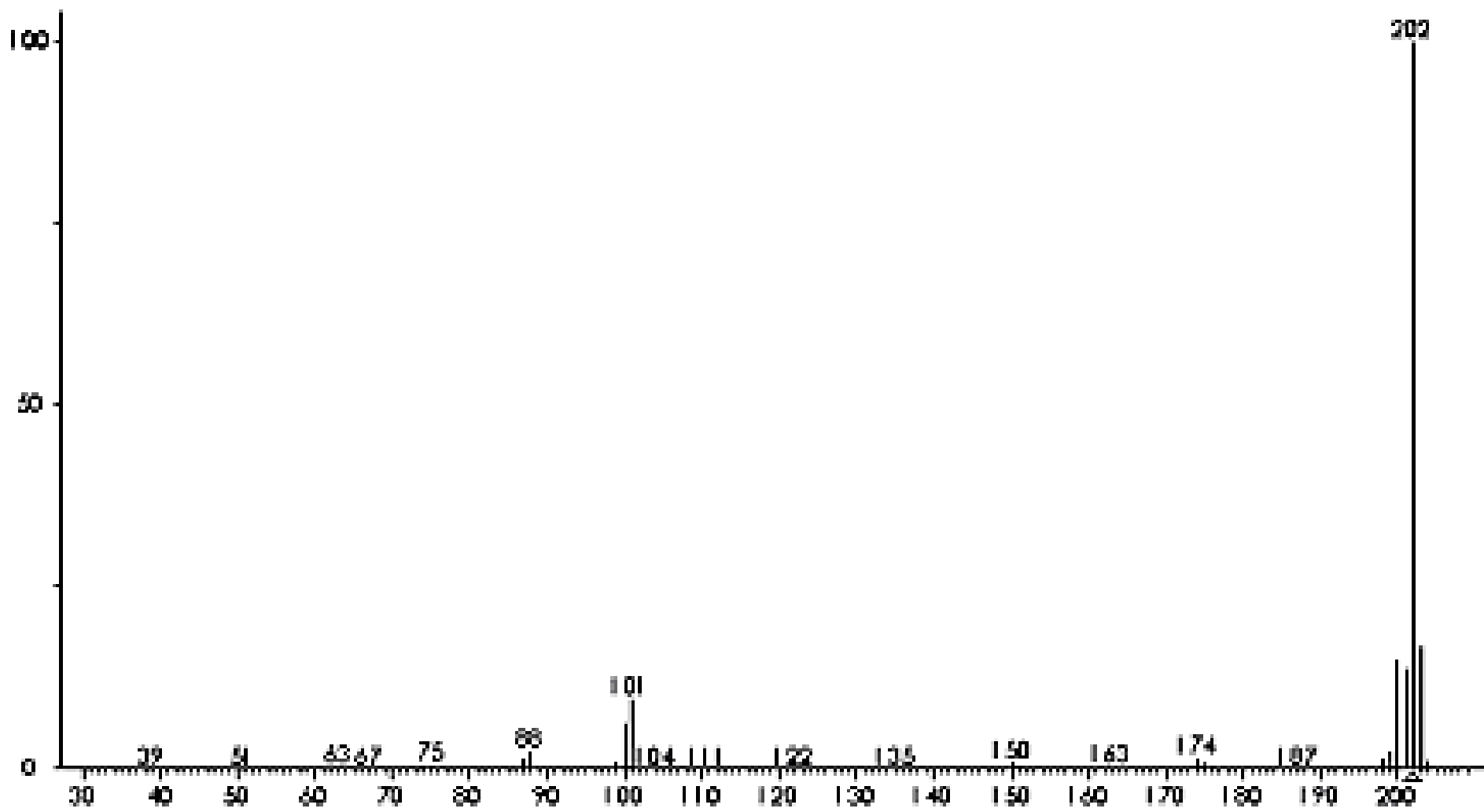




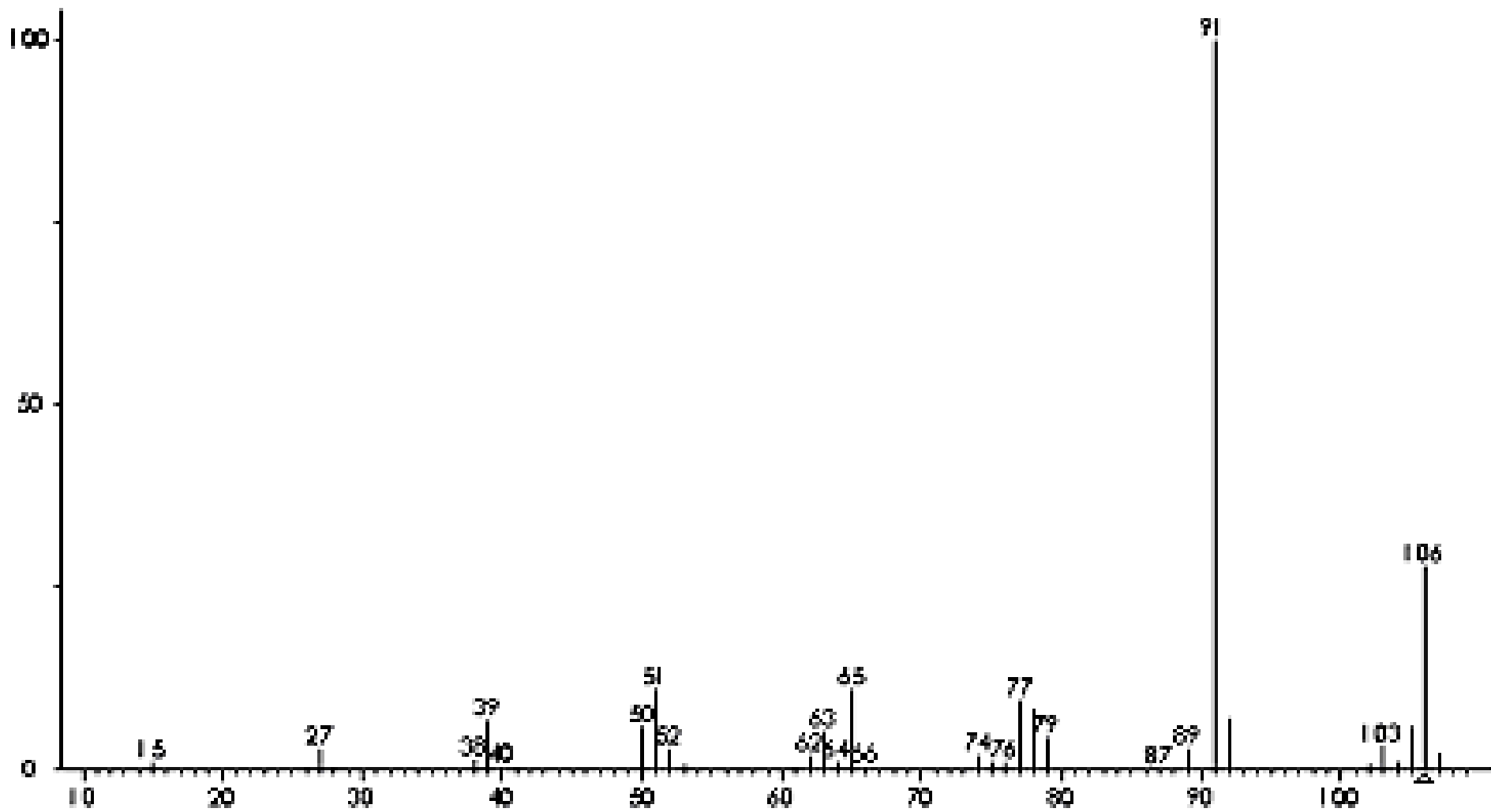




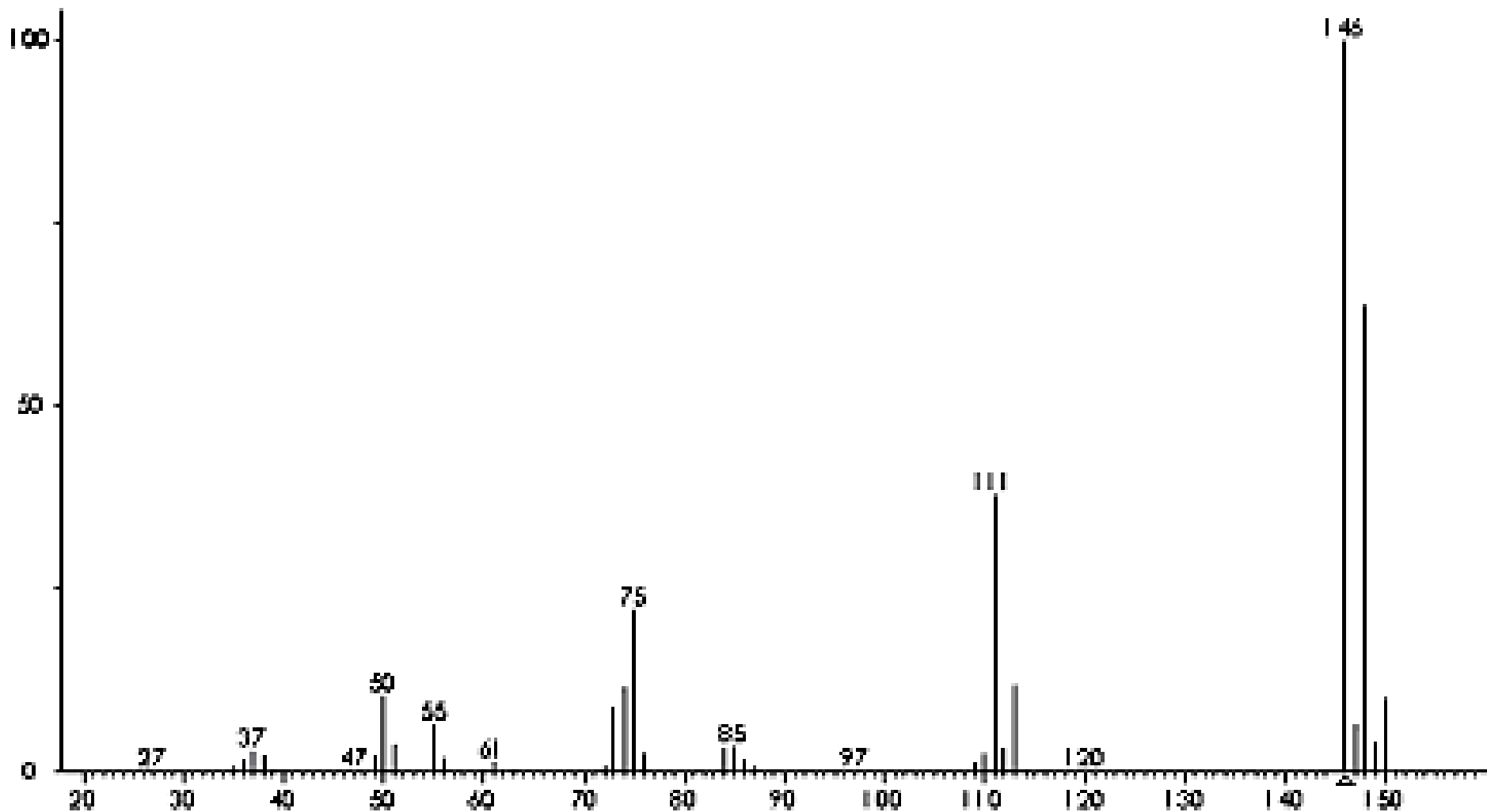
8-methylheptadekan



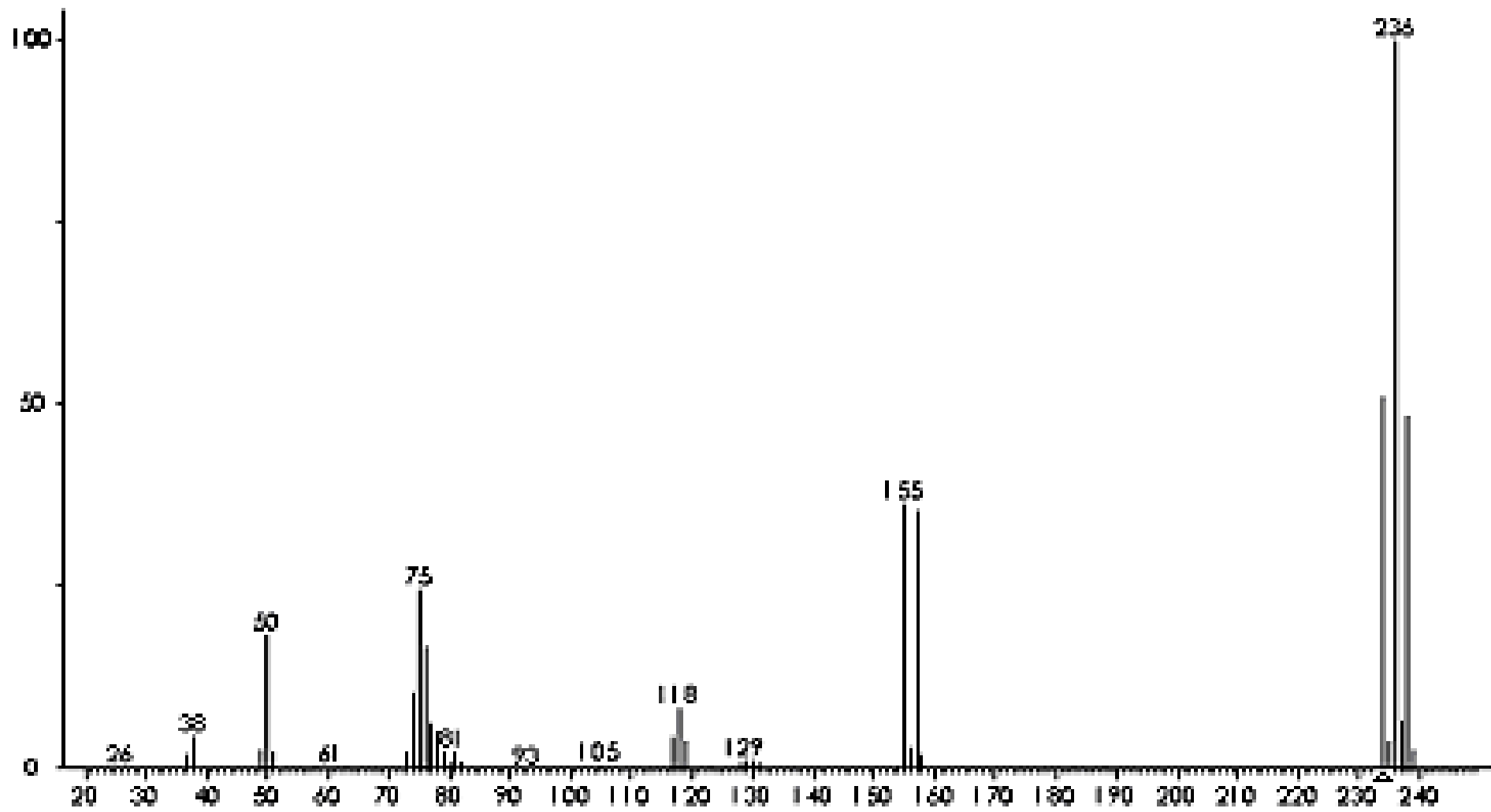
pyren



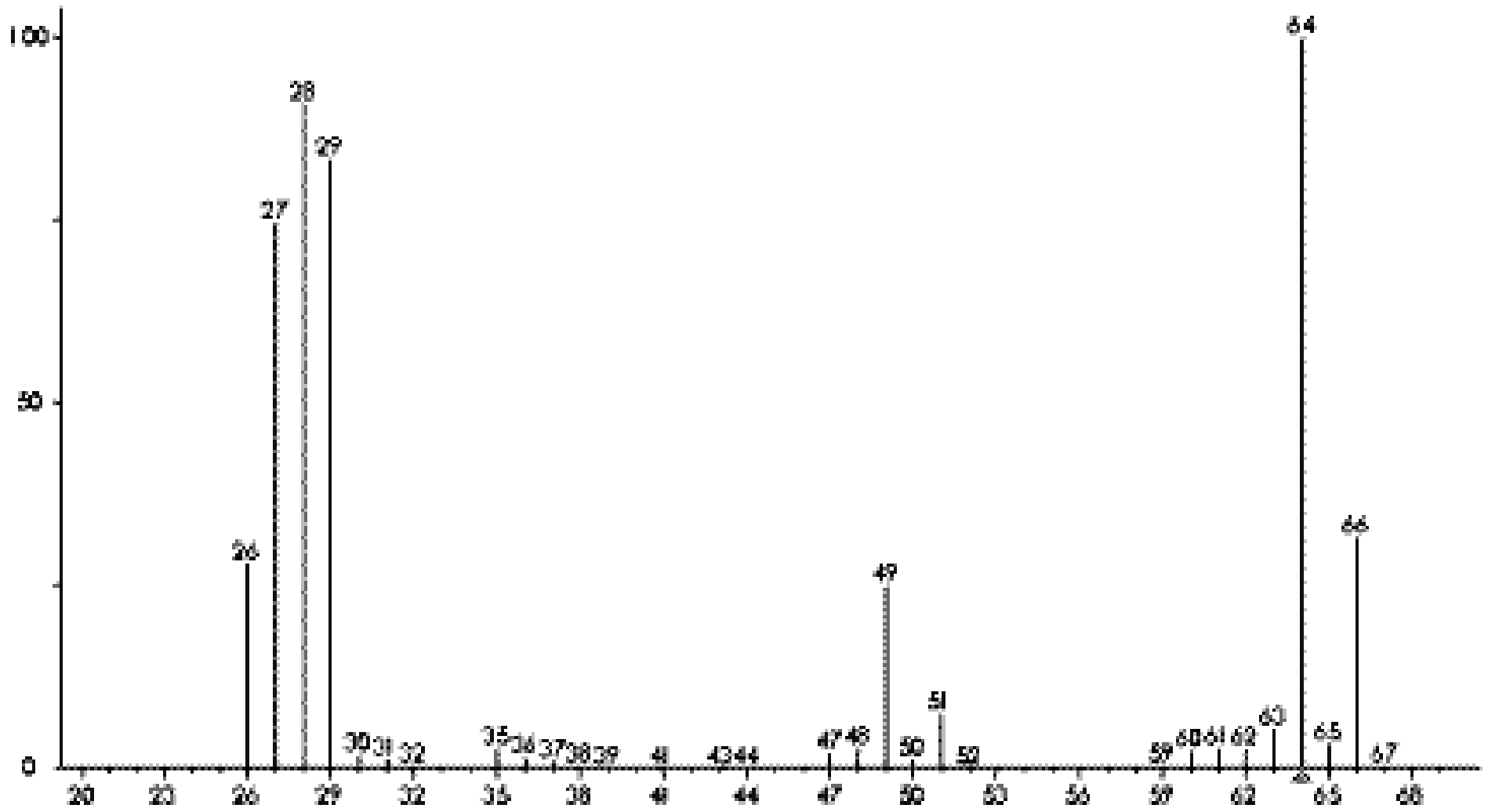
ethylbenzen



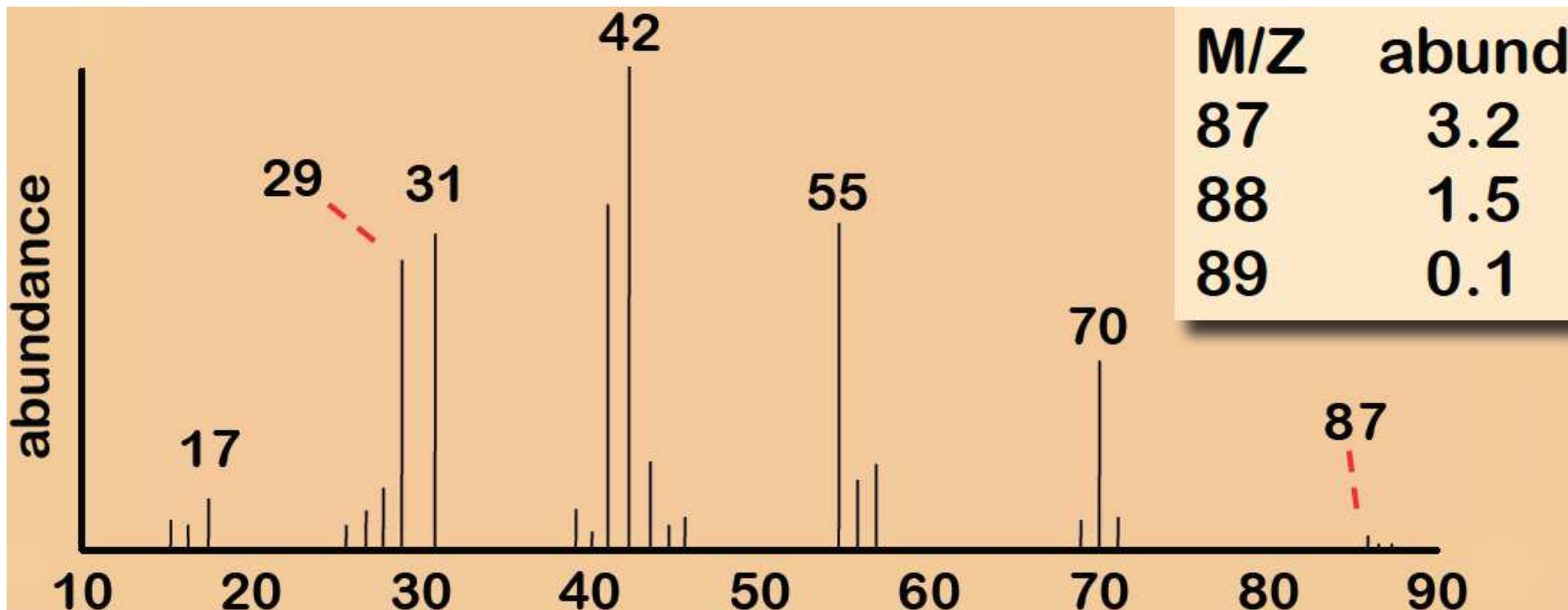
1,2-dichlorbenzen



1,2-dibrombenzen



1-chlorethan



### Molekulový ion

Normalizace  $m/z$  87 (100 %), 88 (46,9 %), 89 (3,1 %)  $\rightarrow 46,9/1,1 = 42,6$  uhlíků

$42 \cdot 12 = 504$ , ale  $m/z$  je pouze 87  $\rightarrow m/z$  87 není molekulový pík

Normalizace  $m/z$  88 (100 %), 89 (6,7 %)  $\rightarrow 6,7/1,1 = 6,1$  uhlíků

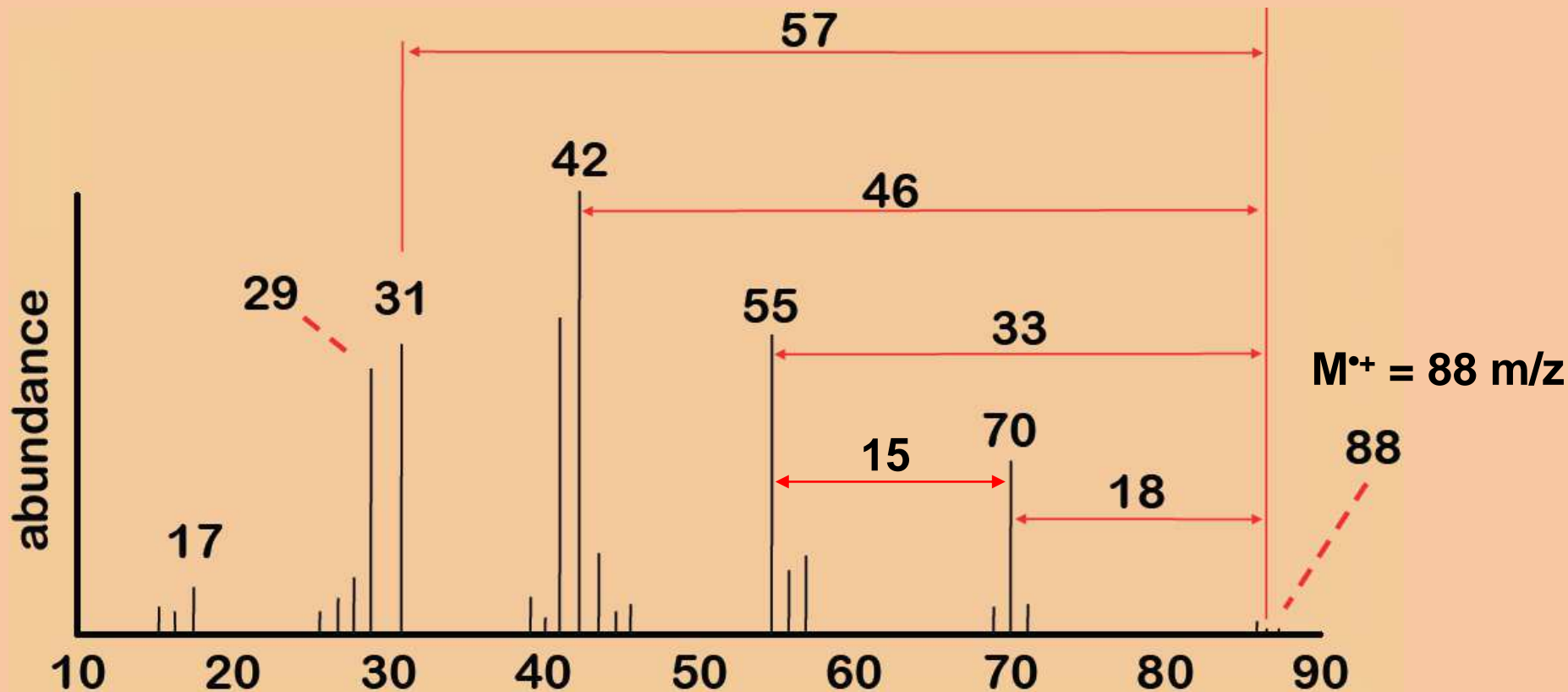
$5 \cdot 12 = 60$  (5,5 % M+1) ...  $C_5H_{28}$  (DBE = -8),  $C_5N_2^{\text{III}}$  (DBE = 7),  **$C_5H_{12}O$  (DBE = 0)**,

$6 \cdot 12 = 72$  (6,6 % M+1) ...  $C_6H_{16}$  (DBE = -1),  $C_6O$  (DBE = 7)

$7 \cdot 12 = 84$  (7,7 % M+1) ...

**$M^+ = 88 m/z$**



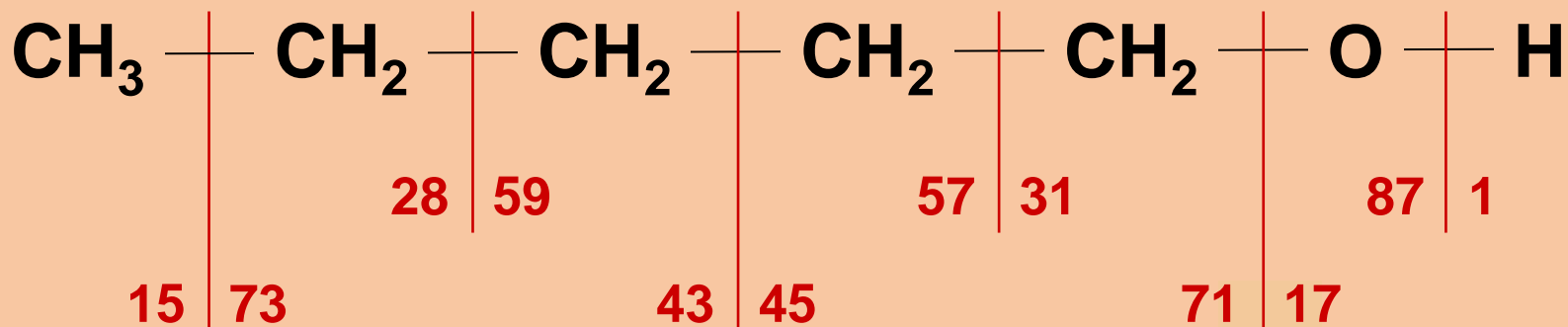
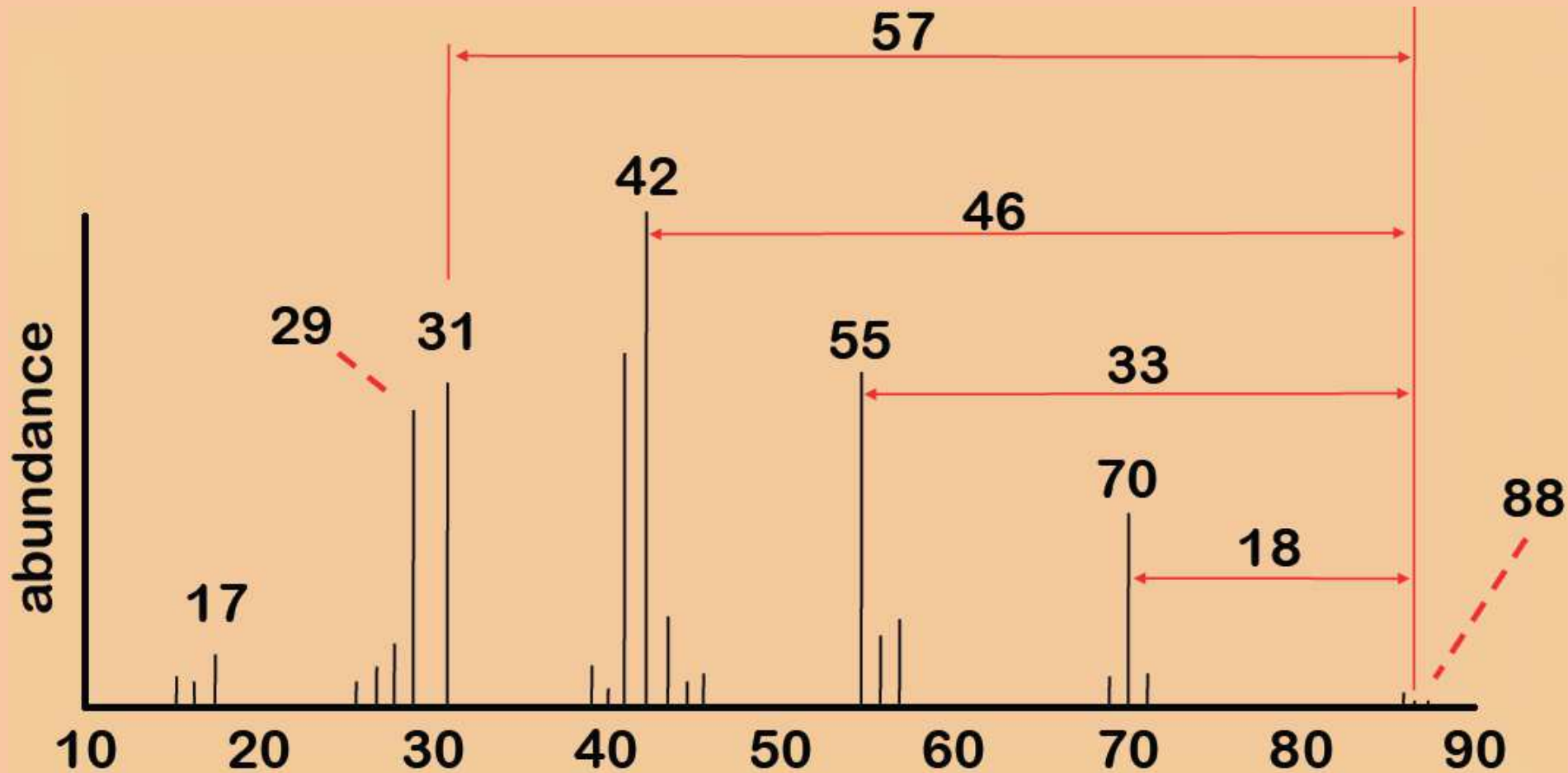


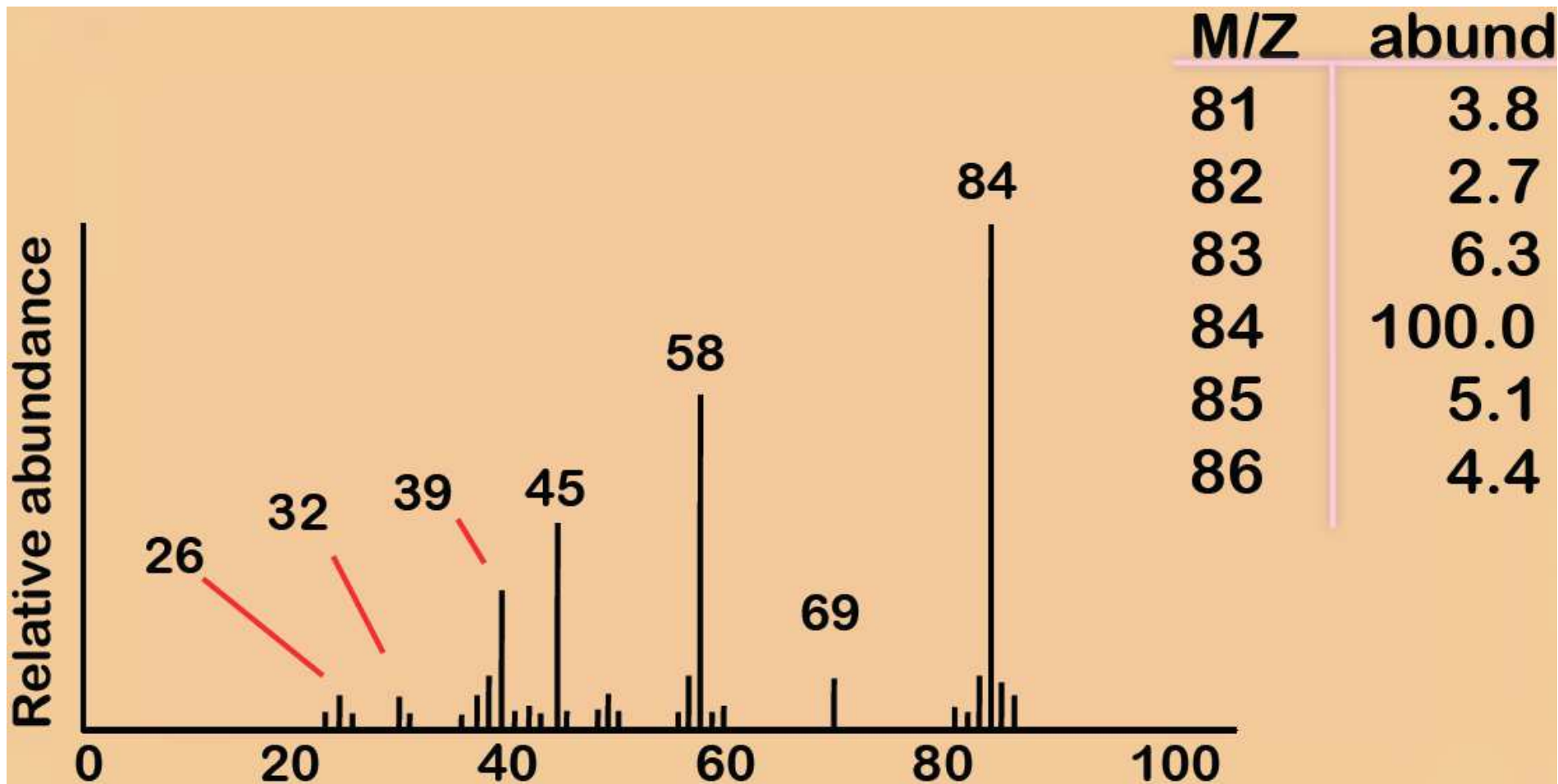
### Fragmenty

17	OH
29	$C_2H_5$ , CHO
31	$CH_2OH$
42	$C_3H_6$ , $C_2H_2O$
55	$C_4H_7$
70	$C_5H_{10}$

### Ztráty

1	H
18	$H_2O$
33	$H_2O$ a $CH_3$
46	$CH_3CH_2OH$
57	$CH_3CH_2CH_2CH_2$



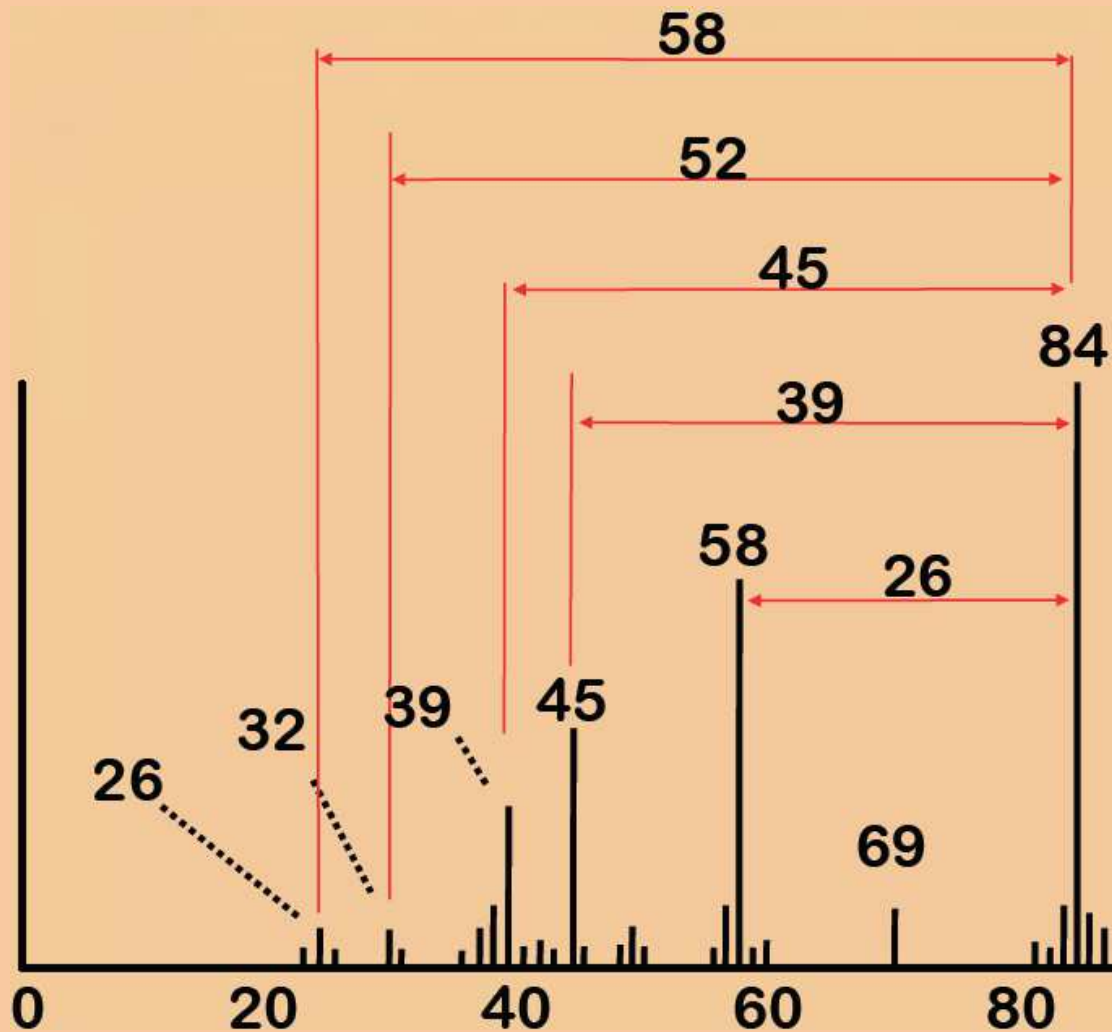


4,4 % pro M+2 → jedna síra ... též má 0,8 % M+1

$$(5,1 - 0,8) / 1,1 = 3,9 \text{ uhlíků}$$

$M^+ = 84 - \text{uhlíky} (4 * 12) - \text{síra} (1 * 32) = 4 \text{ vodíky}$

$$\text{DBE pro } C_4H_4S = 3$$



26	$C_2H_2$
39	$C_3H_3$
45	CHS
52	$C_4H_4$
58	$C_2H_2S$



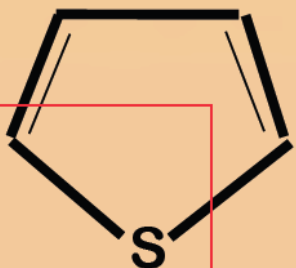
žádné  $CH_3$  ani  $C_2H_5$



cyklus

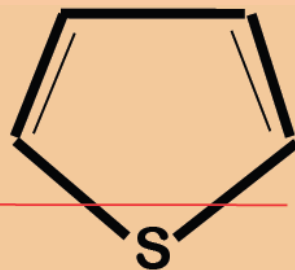
39  
 $C_3H_3$

45  
CHS



52  
 $C_4H_4$

32  
S



26  
 $C_2H_2$   
58  
 $C_2H_2S$

