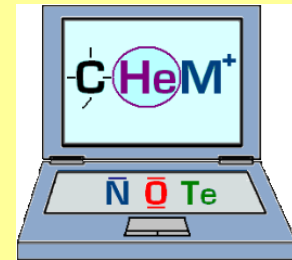


Metody „spektrální“

- **Metody hmotnostní spektrometrie**



Evropský sociální fond

Praha & EU: Investujeme do vaší budoucnosti

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

- samostatně - strukturní analýza, identifikace látek
- kvalitativní i kvantitativní detekce v GC a LC
- prvková analýza – kombinace s ICP
- pyrolýzní hmotnostní spektrometrie
- analýza polutantů v životním prostředí
- farmakokinetické studie
- kvantifikace proteinů - priony
- analýza nukleových kyselin
- analýza potravin
- detekce výbušnin, drog ...
- použití vnitřního standardu

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

- **MS** - mass spectrometry
- **MS** - mass spectrometer
- **MS** - mass spectrum

- destruktivní metoda, ale zcela minimální spotřeba vzorku - běžně mikrogramy

SPEKTROMETR - iontově-optické zařízení
- separace iontů podle m/z

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

MILNÍKY

- 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**

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

HLAVNÍ SOUČÁSTI SPEKTROMETRU

- **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

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

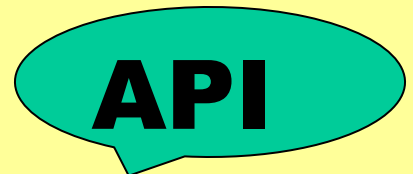
HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR

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

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE


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 urychlenými ionty - FIB**
 - **ionizace polem - FI**
 - **ionizace laserem za účasti matrice - MALDI**
 - **termosprej - TSI, plasmasprej - PSI**
 - **elektrosprej - ESI**



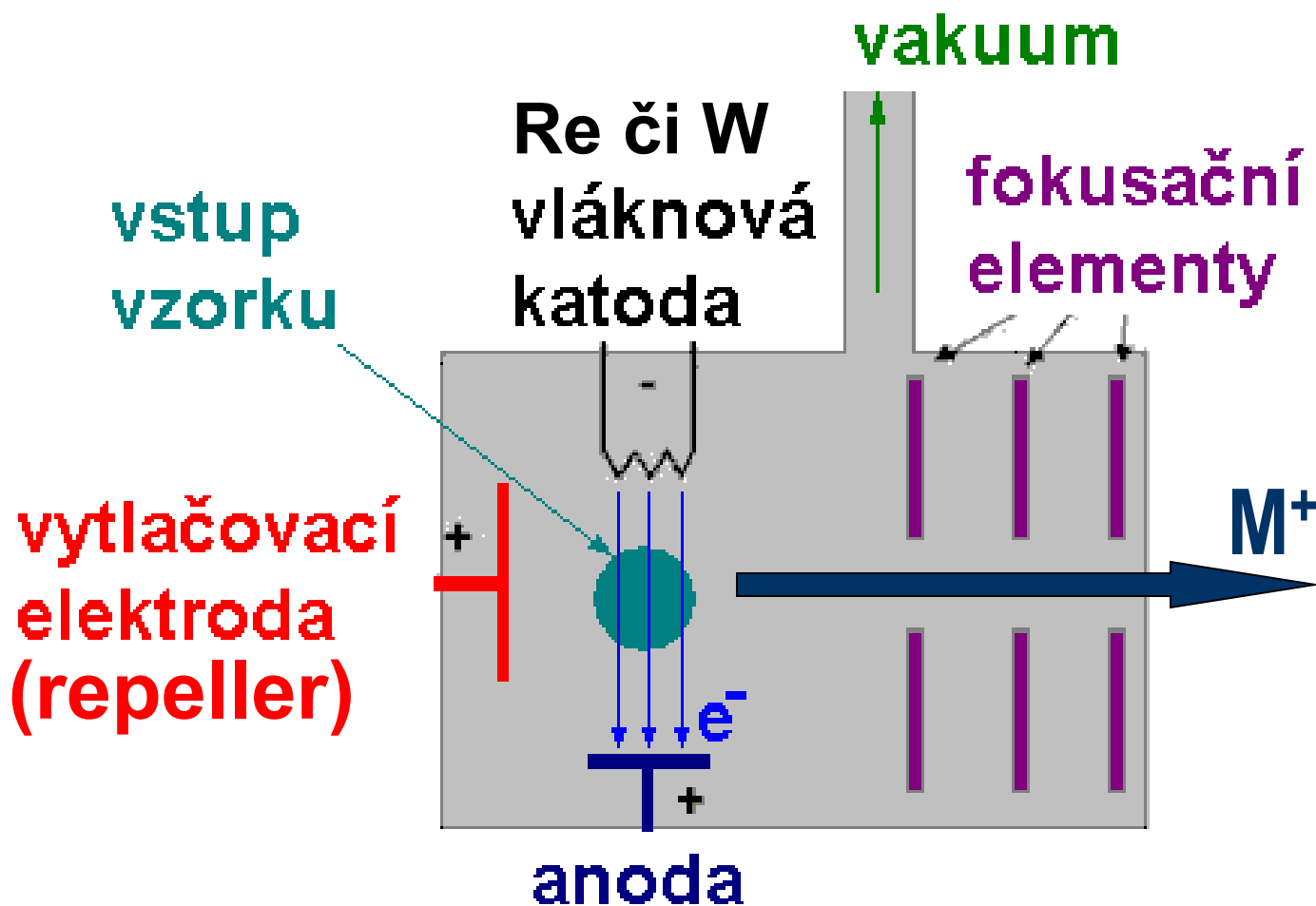
HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

IONIZACE VZORKU

- elektronová ionizace - EI
- konvenční technika (od roku 1913)
- $M + e^- \longrightarrow M^+ + 2 e^-$ (radikalkationty)
- „tvrdá“ ionizační technika  propracovaná teorie
 - fragmentace molekuly na menší části
 - slabá intenzita molekulárního píku
 - těkavé látky
 - termostabilní látky
- existují knihovny/databáze spekter, vhodné pro strukturní analýzu

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

IONIZACE VZORKU - elektronová ionizace - EI

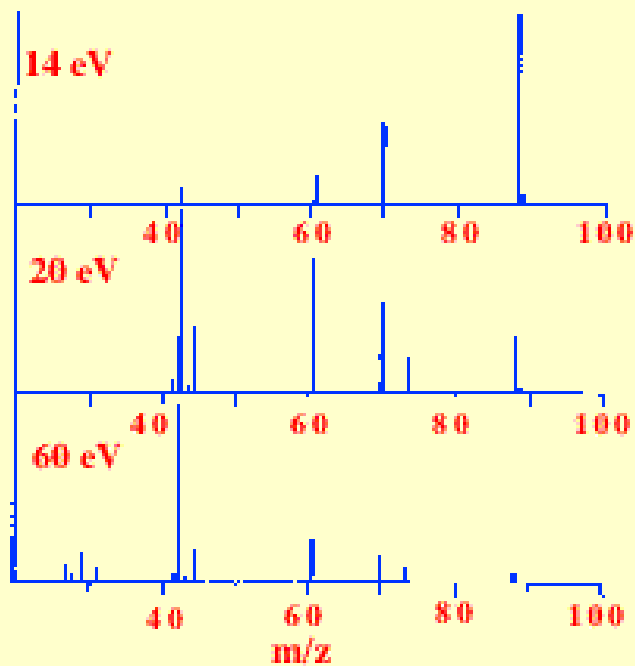


urychlující
potenciál e^-
5 – 100 V
- energie e^-
běžně 70 eV
(důležité pro
knihovny)
- záporně
nabité ionty
+ záchyt e^-
vychytávají
vytlačovací
elektrodou

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

IONIZACE VZORKU - elektronová ionizace - EI

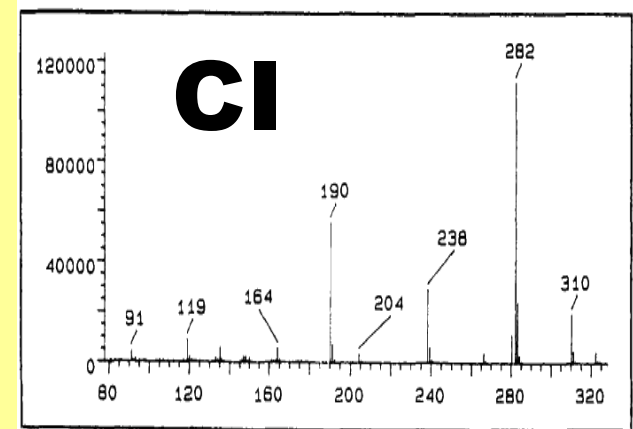
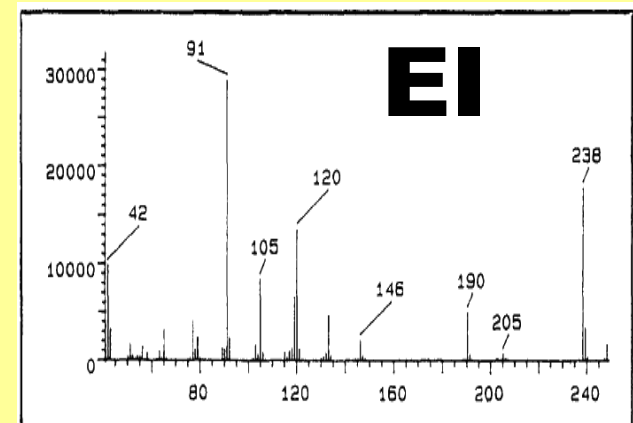
Vliv energie elektronů na fragmentaci



Vyšší urychlující
potenciál e^-

působí

HLUBŠÍ
FRAGMENTACI



HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

IONIZACE VZORKU

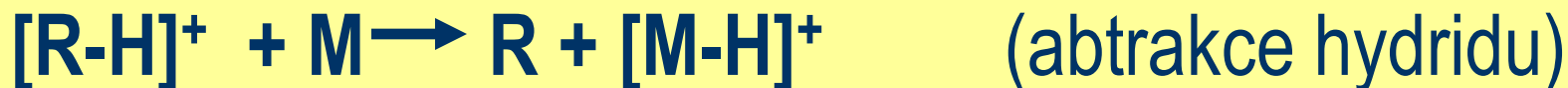
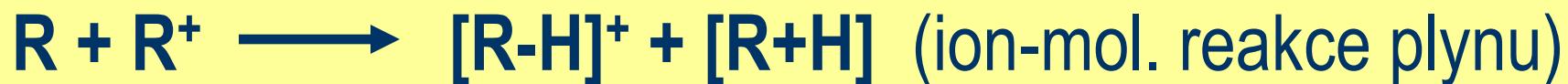
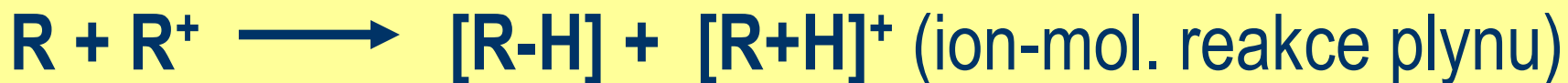
- chemická ionizace - CI
- konstrukce zdroje podobná jako pro EI
- ve zdroji přítomen REAKČNÍ PLYN v nadbytku vůči vzorku
- ionizace reakčního plynu - methan, amoniak, isobutan, propan, voda, dusík
 - reakce iontů s molekulami analytu
 - tvorba aduktů

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

IONIZACE VZORKU

- chemická ionizace - CI

- základní mechanismy ion-molekulárních reakcí



HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

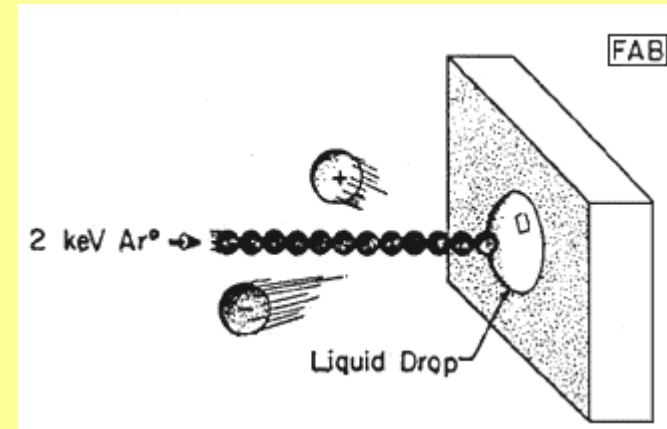
IONIZACE VZORKU

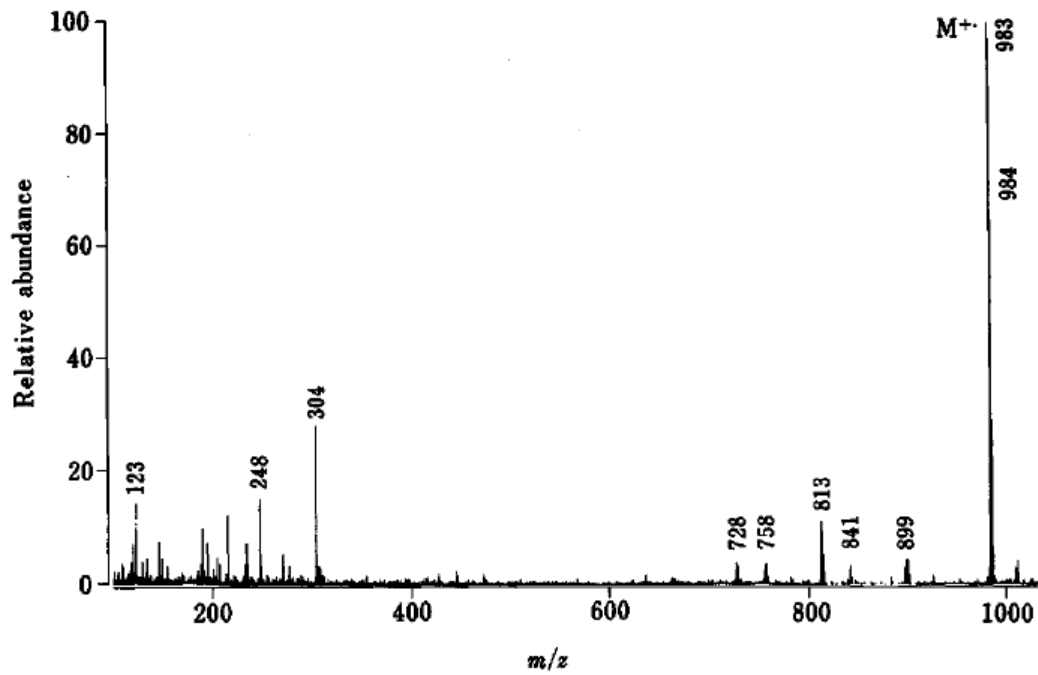
- chemická ionizace - CI
- méně výrazná fragmentace než u EI
- též vznik záporných iontů – (pozitivní/negativní mód)
 - záchyt elektronu
 - deprotonace
 - adice halogenidu

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

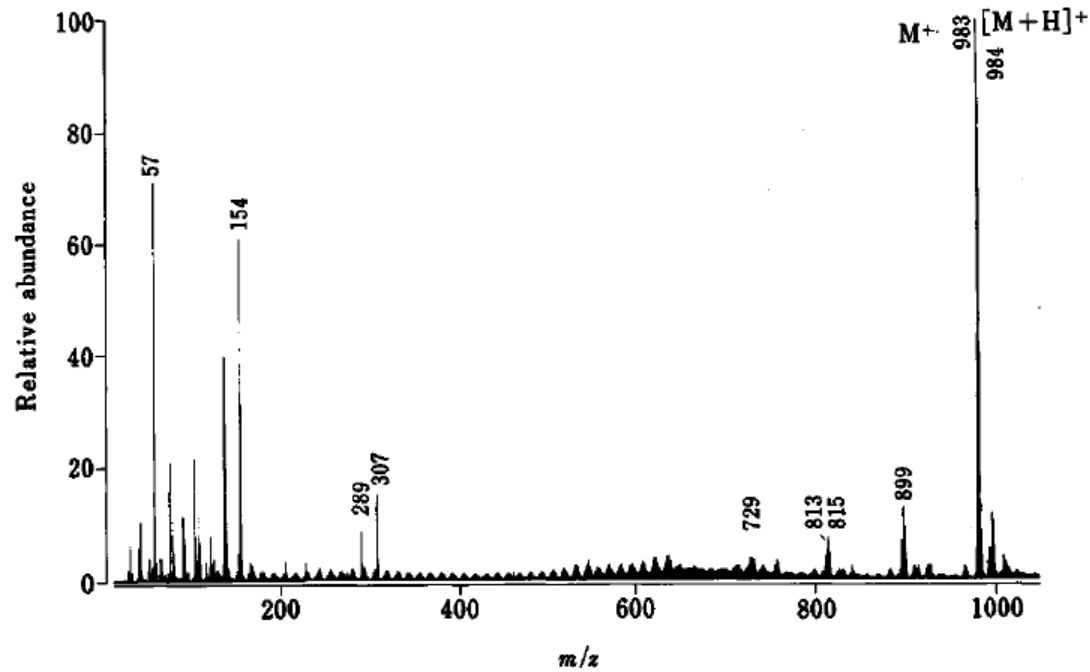
IONIZACE VZORKU - **FAB**

- ionizace urychlenými atomy
 - 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





EI



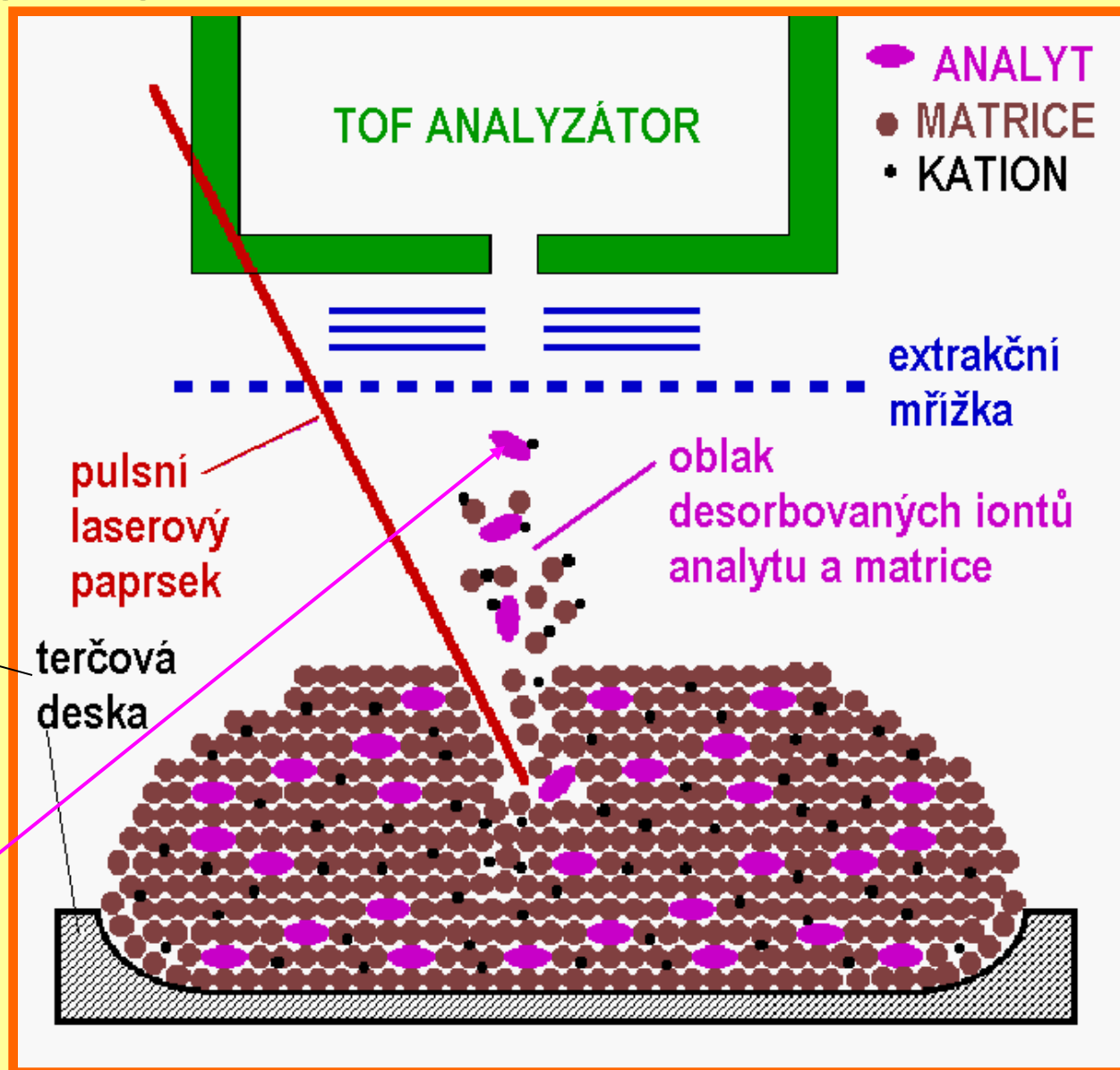
FAB

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

IONIZACE VZORKU

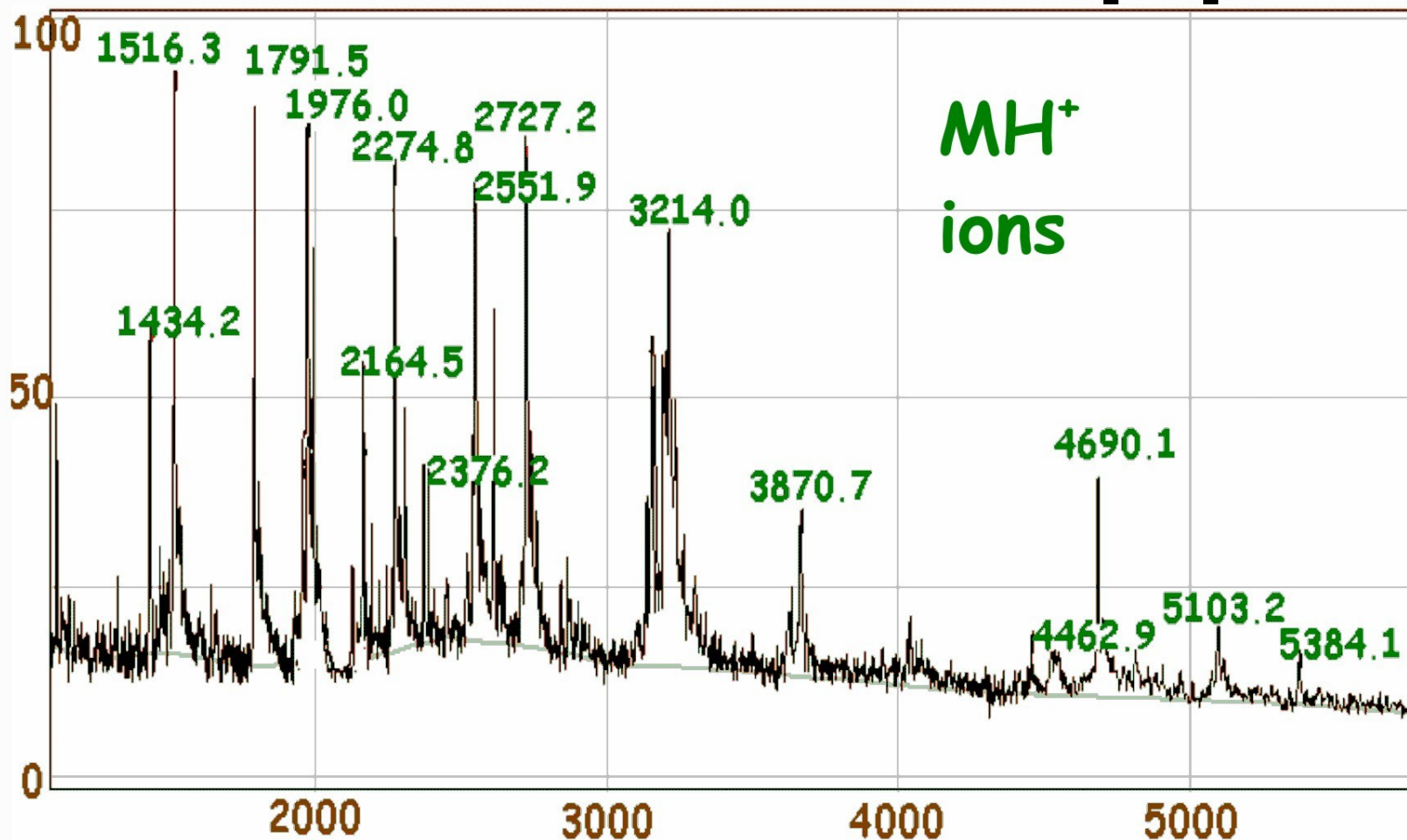
- ionizace laserem za účasti matrice - **MALDI**
 - velmi šetrná ionizační technika
 - vhodné pro biomolekuly - proteiny, oligosacharidy
- pulzní lasery - UV - dusíkový - 337 nm (4 ns) - IR - Er-YAG - 2940 nm
- matrice musí absorbovat laserové záření -
 - kys. dihydroxybenzoová, chlorsalicylová, skořicová,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

IONIZACE VZORKU - MALDI



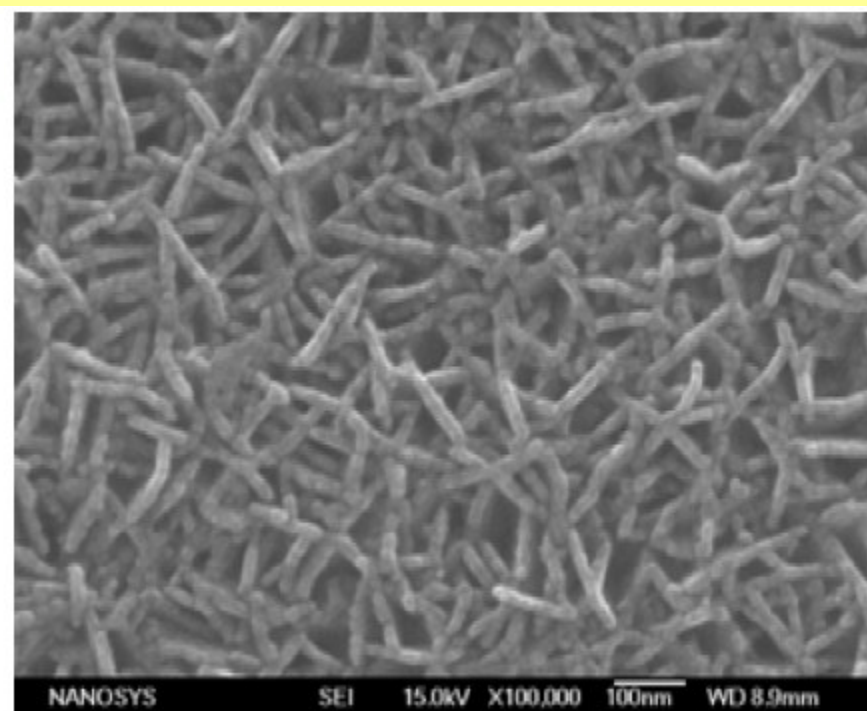
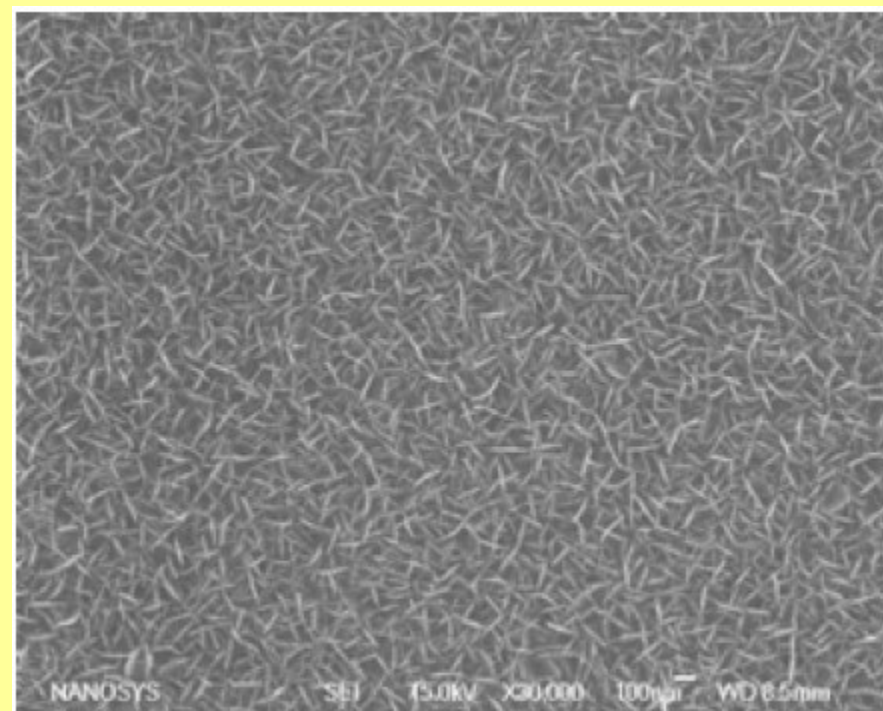
IONIZACE VZORKU - MALDI

Směs peptidů

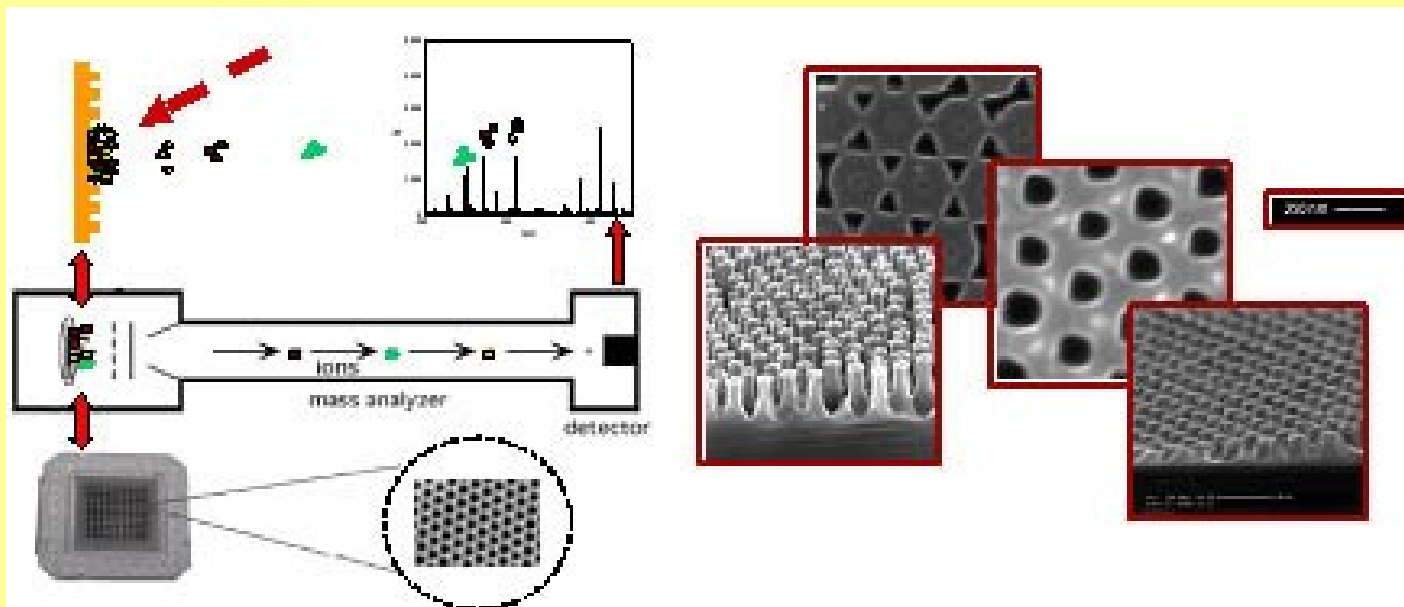


IONIZACE VZORKU – NALDI/SALDI

- simple matrix-free laser desorption/ionization mass spectrometric approach
- NALDI plate contains a hydrophobic surface made of nano-structures of 20 nm in diameter and 100 to 500 nm in length, metal oxides, nitrides

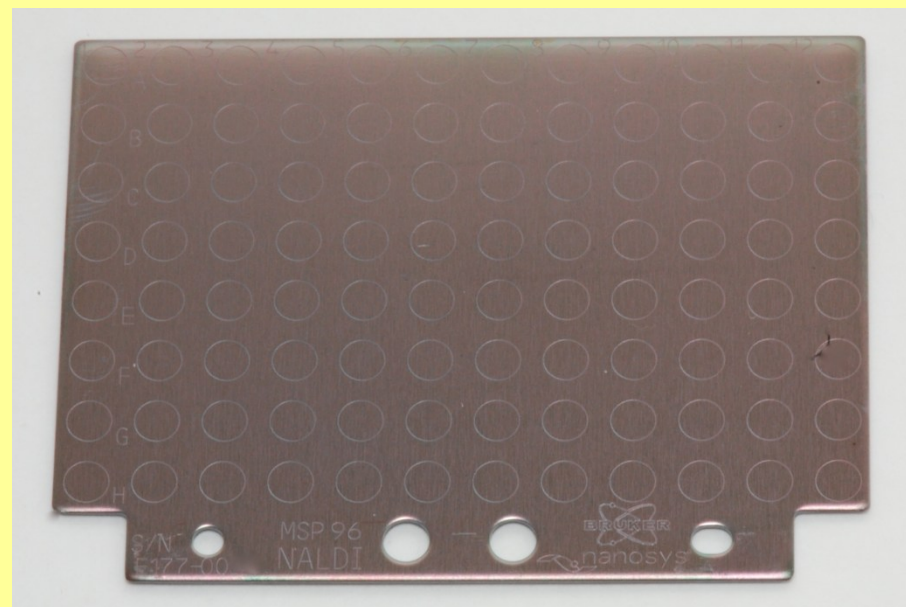


IONIZACE VZORKU – NALDI/SALDI



**GALDI – colloidal
graphite**

**SELDI – surface
enhanced**



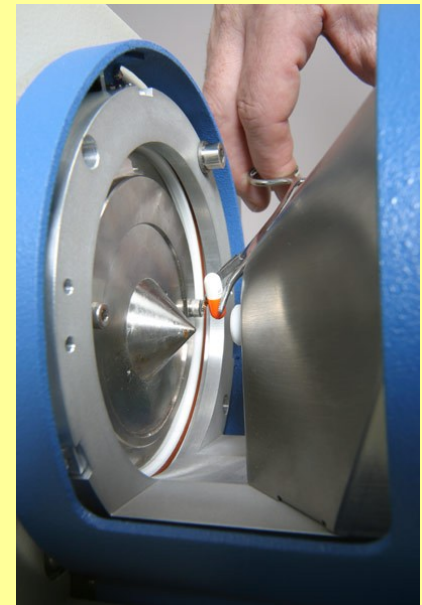
HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR

- **iontový zdroj** - ionizace a fragmentace vzorku
 - **DART** - DART (Direct Analysis in Real Time) is an atmospheric pressure ion source that instantaneously ionizes gases, liquids and solids in open air under ambient conditions

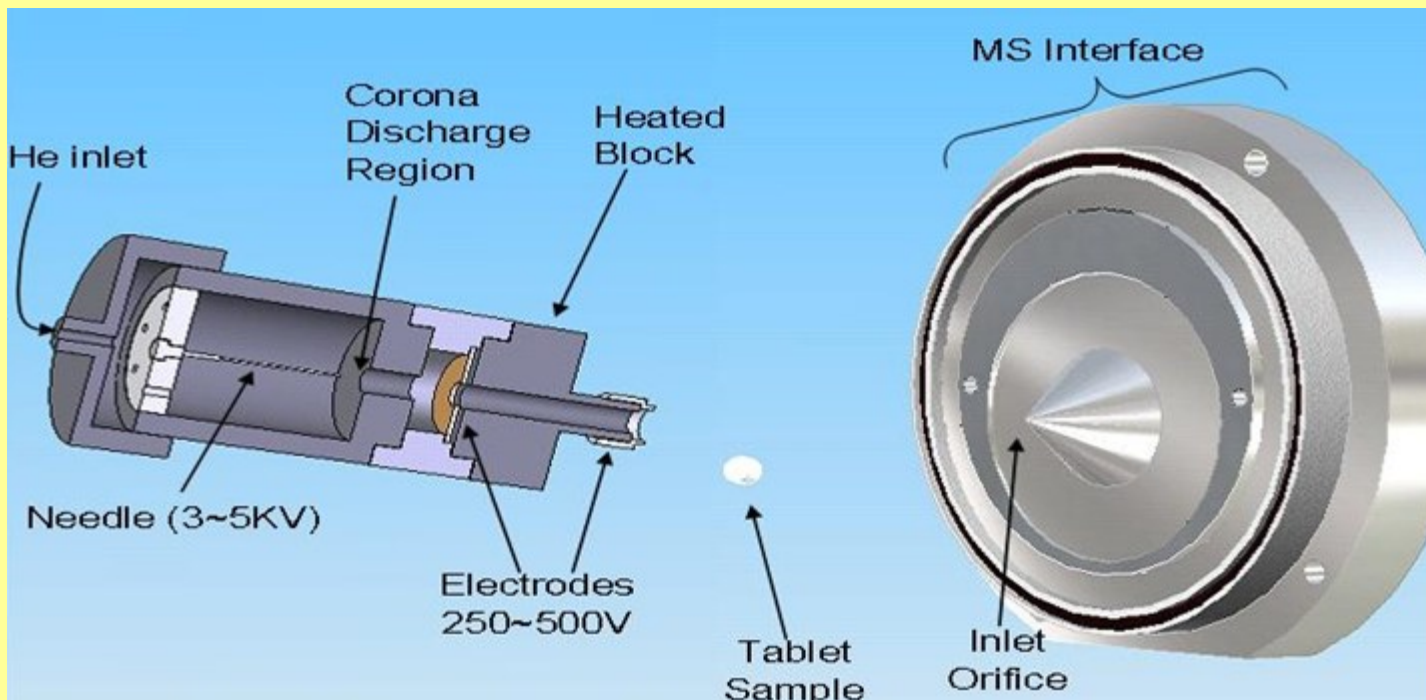
Developed 2005

pharmaceuticals, metabolites,
pesticides, peptides, oligosaccharides,
drugs of abuse, explosives and
toxic industrial chemicals



HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR

- **iontový zdroj** - ionizace a fragmentace vzorku
 - DART - DART (Direct Analysis in Real Time)
- interaction between the analyte molecule (S) and electronically excited atoms or vibronically excited molecules (metastable species – M*):



www.mMass.org

- *mMass* presents open source multi-platform package of tools for precise mass spectrometric data analysis and interpretation. It is written in *Python* language and released under *GNU General Public License*, so it's portable to different computer platforms and has a good potential to be easily modified or extended by modules of specific needs.
- Strohalm M, Kavan D, Novak P, Volny M, Havlicek V: mMass 3: A Cross-Platform Software Environment for Precise Analysis of Mass Spectrometric Data. *Anal Chem* 82 (11), 4648-51 (2010). [DOI:10.1021/ac100818g](https://doi.org/10.1021/ac100818g)
- Strohalm M, Hassman M, Kořata B, Kodíček M: mMass data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis. *Rapid Commun Mass Spec* 22 (6), 905-908 (2008). [DOI:10.1002/rcm.3444](https://doi.org/10.1002/rcm.3444)

IONIZACE VZORKU

- **ionizace elektrosprejem - ESI**

- **velmi šetrná ionizační technika**

- vhodné pro biomolekuly

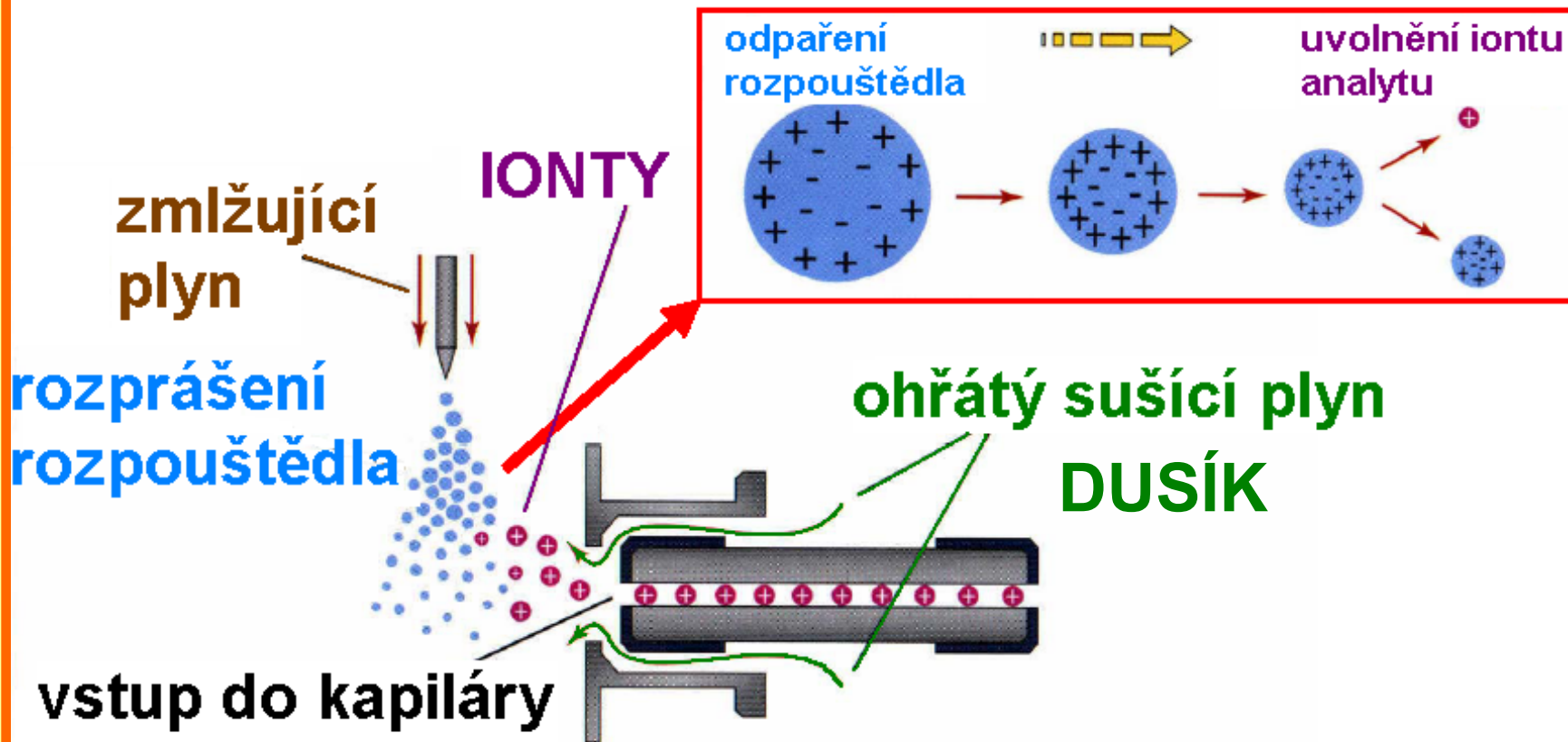
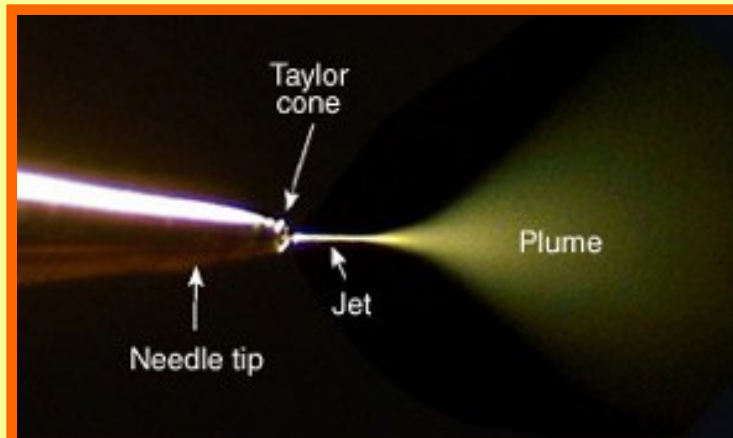
- **vhodné pro vzorky v roztoku (výstup z LC)**

- **„vypařování iontů“** - rostoucí hustota náboje ve zmenšující se kapičce

- na kovové kapiláře vloženo vysoké napětí (řádově kV) na rozdíl od termosprejové ionizace TSI (TSI - vyhřívaná kapilára)

IONIZACE VZORKU

- ionizace elektrosprejem - ESI



HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR

- **separátory iontů - analyzátoy**
 - **rozdělení iontů podle m/z - vysoké vakuum**
- **sektorové (magnetické pole + elektrická fokusace)**
 - **(odstředivá a dostředivá síla)**
- **kvadrupolové (vysokofrekvenční pole)**
- **iontová past (vysokofrekvenční pole)**
- **průletový analyzátor – TOF – (odlišná doba letu různě těžkých iontů)**
- **iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR)**
- **Orbitrap – oscilace kolem centrální elektrody - FT**

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

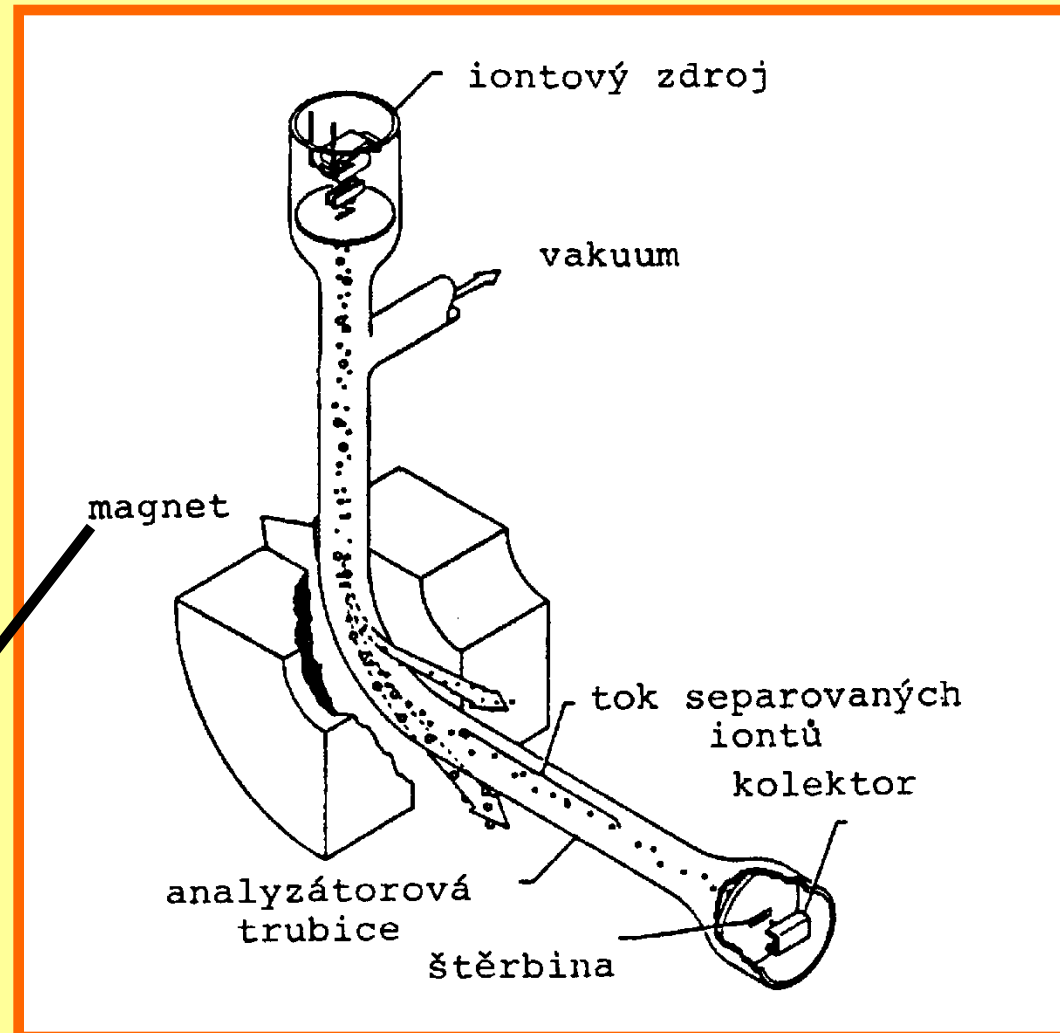
HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR - separátory iontů

- sektorový
- magnetický
- s jednoduchou fokusací
- zakřivení dráhy letu iontů

těžší ionty -
větší odstředivá síla

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

- kruhová výseč



HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR - magnetický separátor



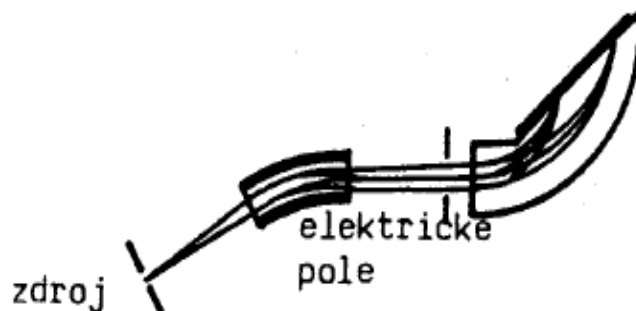
Sektorový analyzátor

- 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

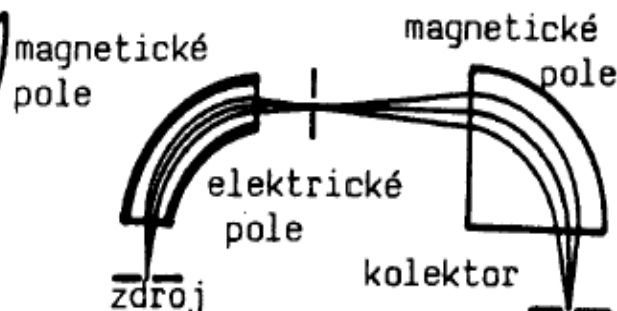
Sektorové analyzátořy

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR - separátory iontů - s dvojitou fokusací - magnetická + elektrická

EB
(30°50', 90°)

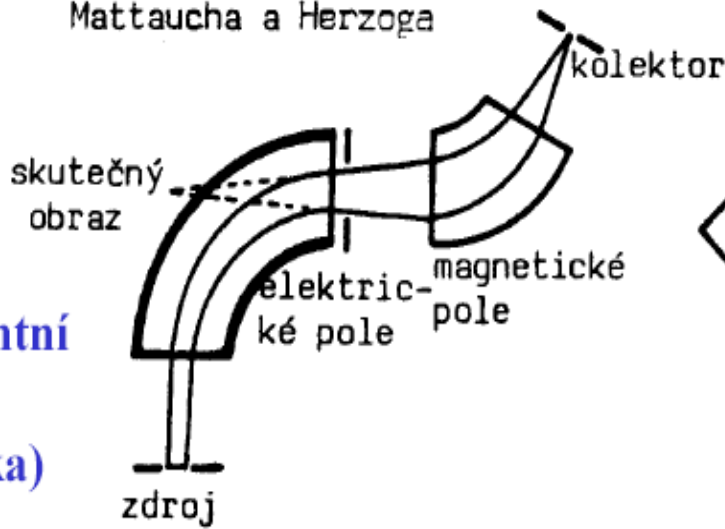


a) Uspořádaní polí podle
Mattaucha a Herzoga



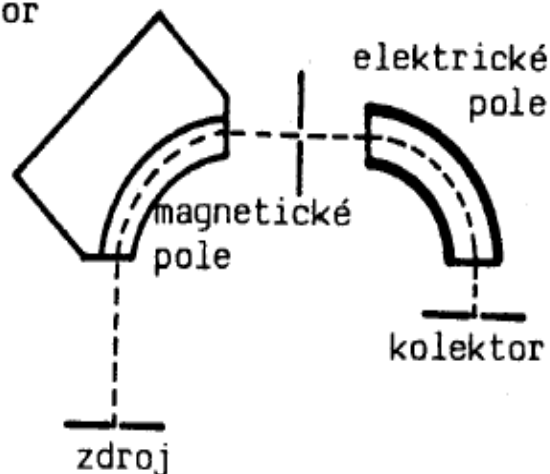
b) Uspořádaní polí podle
Niera a Johnsona

EB
(90°, 90°)



c) Uspořádaní polí podle Matsudy

EB
(stejná divergentní
funkce jako
konkávní čočka)

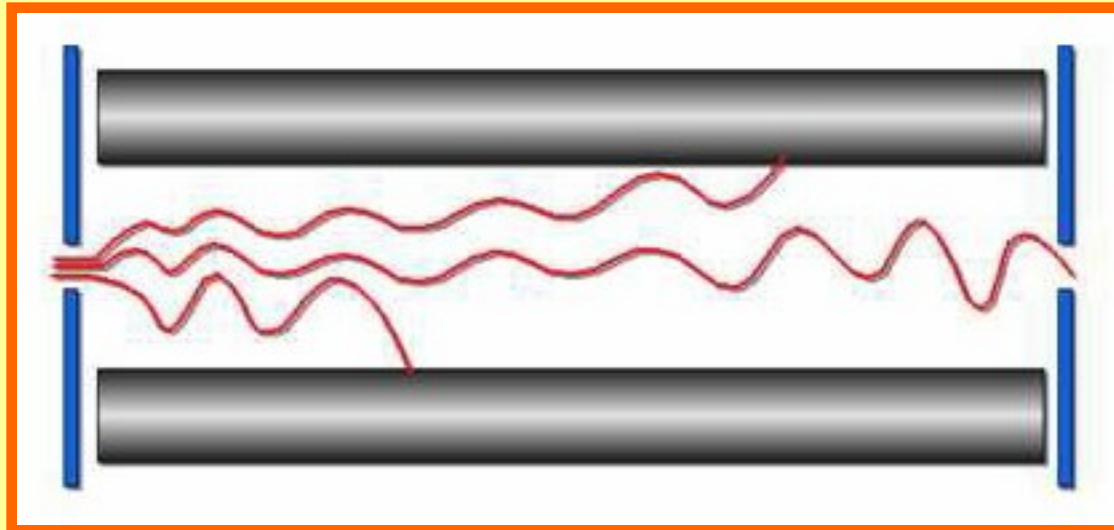
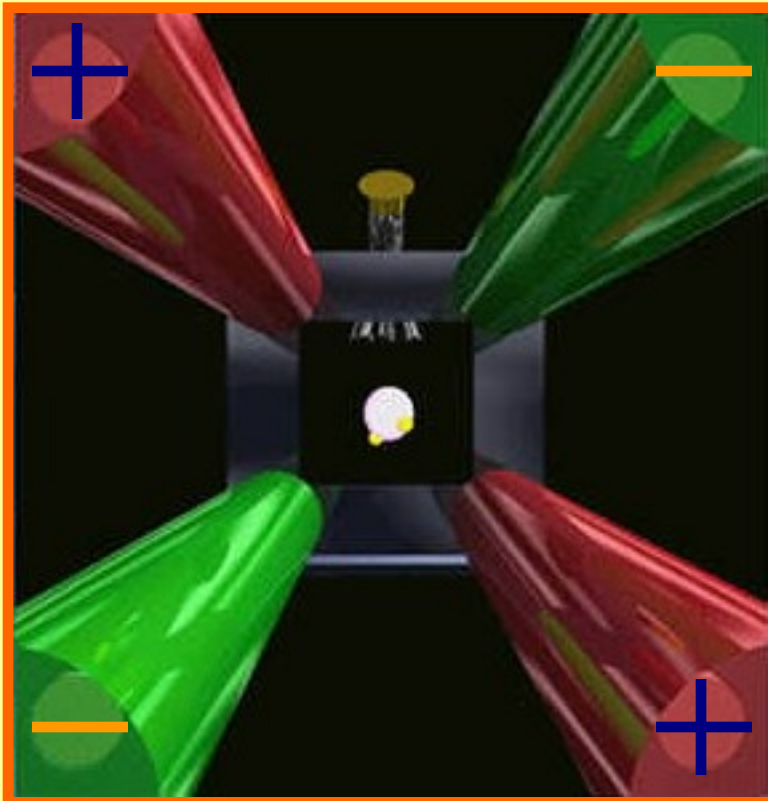


d) Inverzní uspořádaní polí

BE
(90°, 90°)

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR - separátory iontů

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



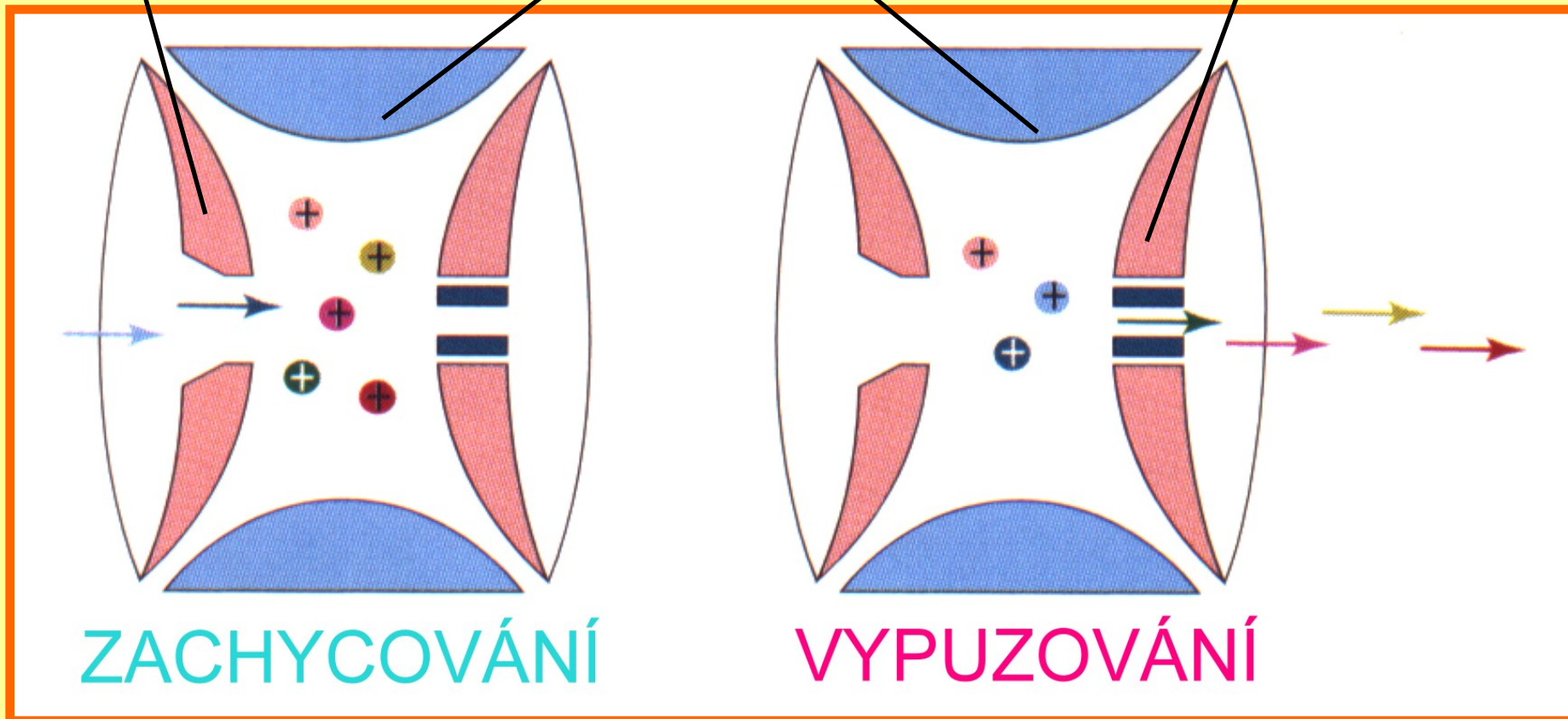
bud' plynulá změna radiofrekvence
nebo současná změna hodnoty
stejnosměrného napětí a amplitudy
oscilací

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

vstupní uzavírací elektroda

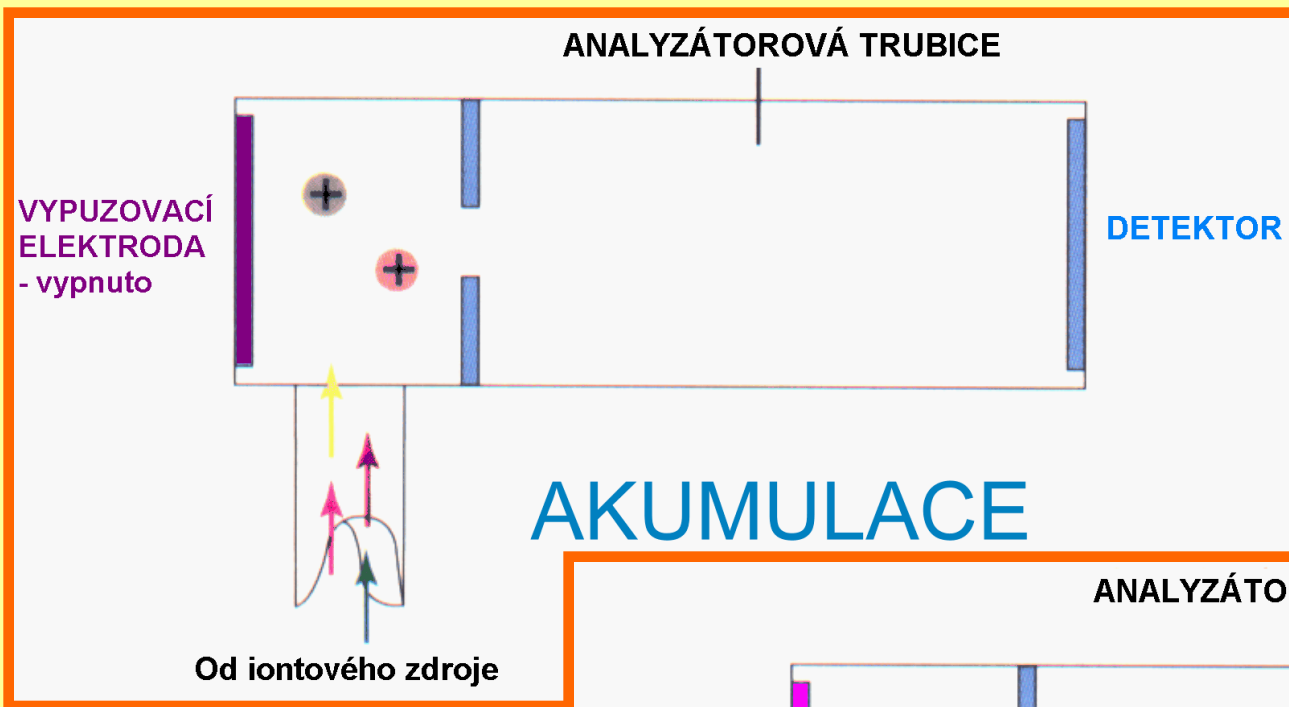
prstencová elektroda

výstupní uzavírací elektroda

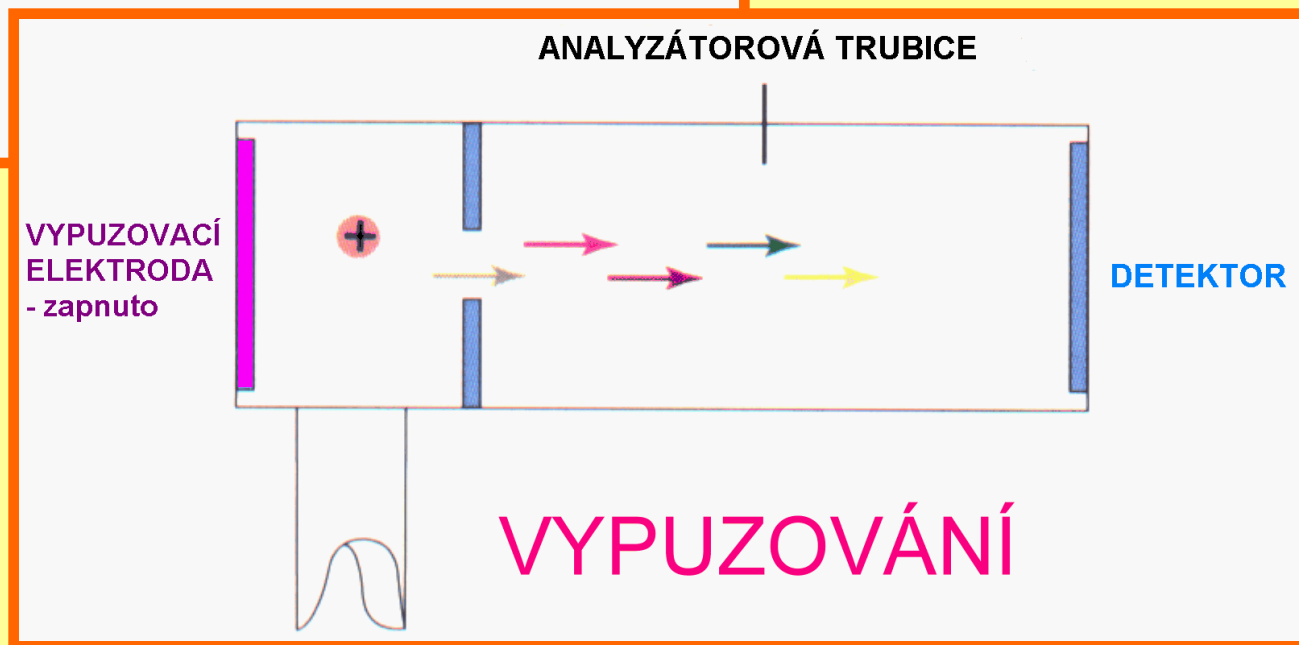


HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR - separátory iontů

- průletový analyzátor - TOF - různá doba letu iontů



lehčí atomy
jsou rychlejší

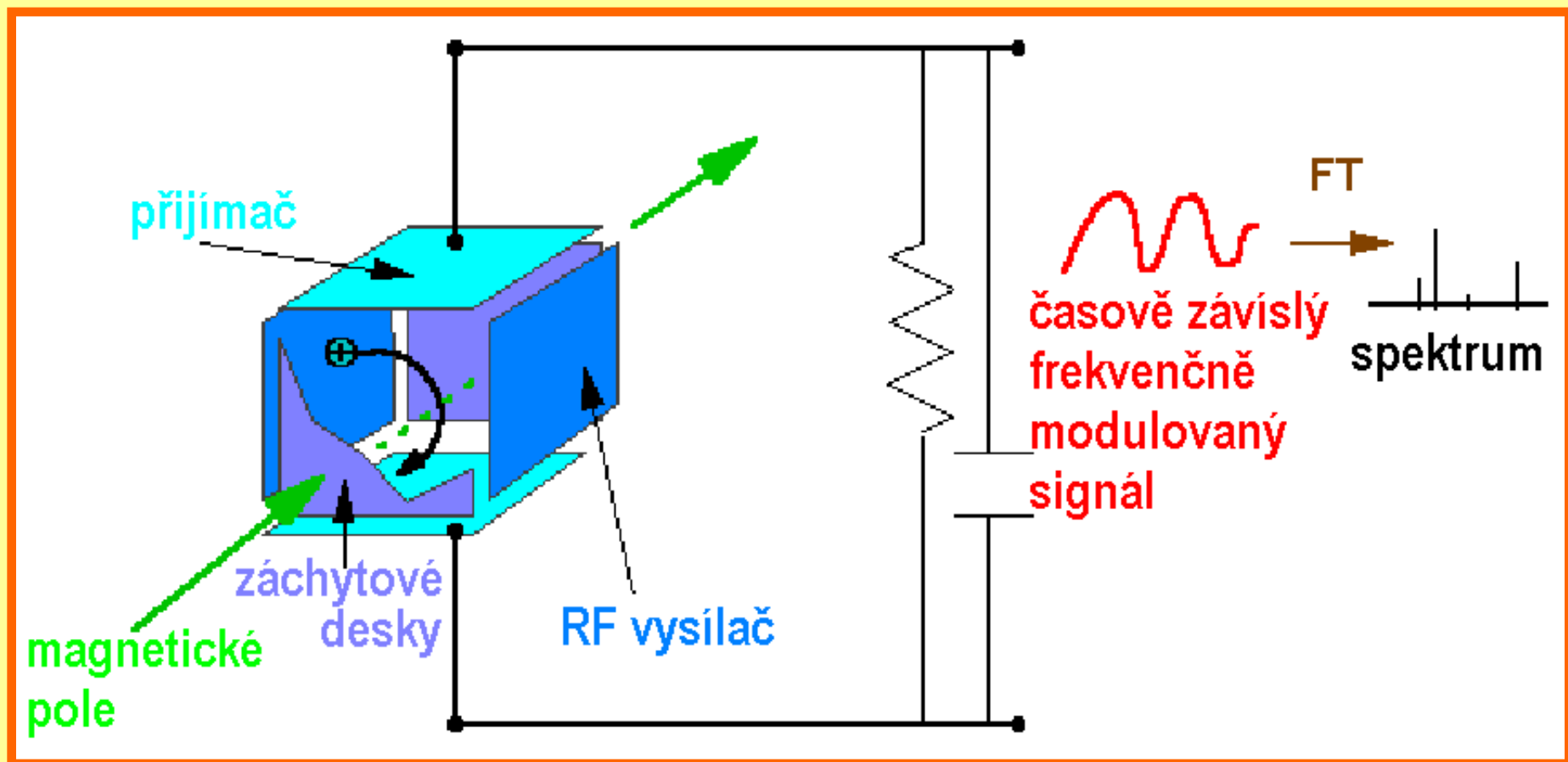


HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR

- **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**

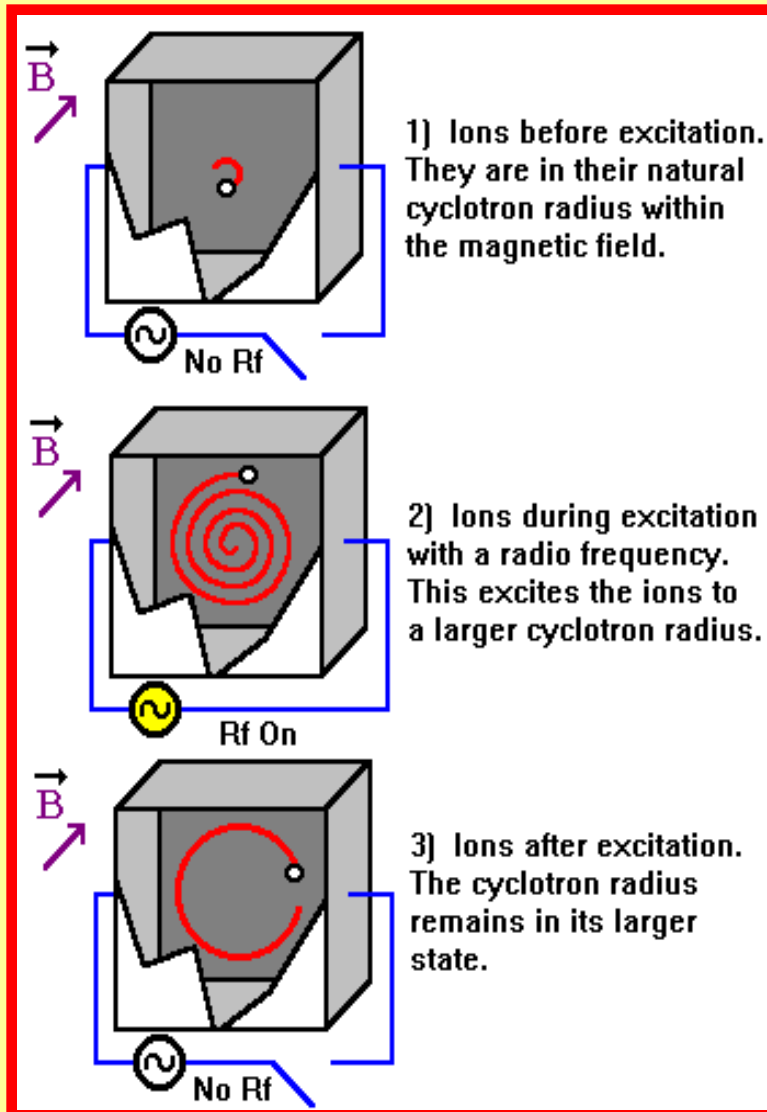
HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR

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

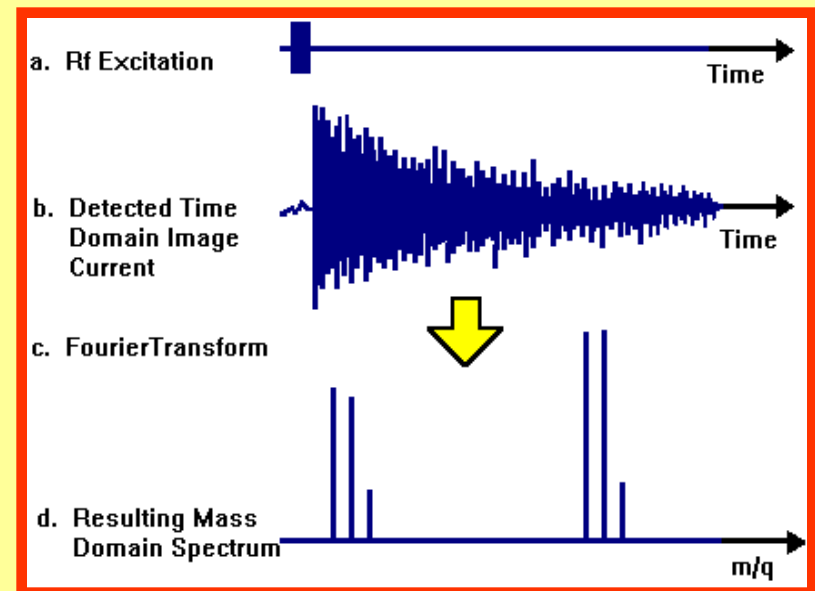
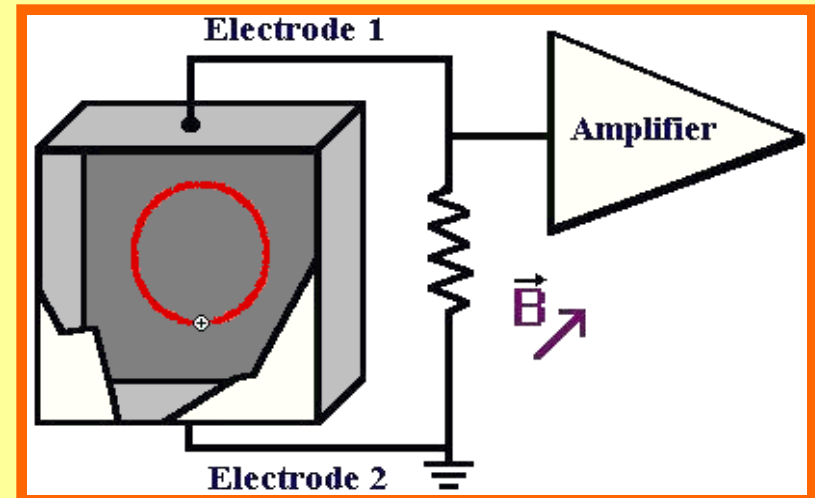


HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR - FT-ICR

excitace

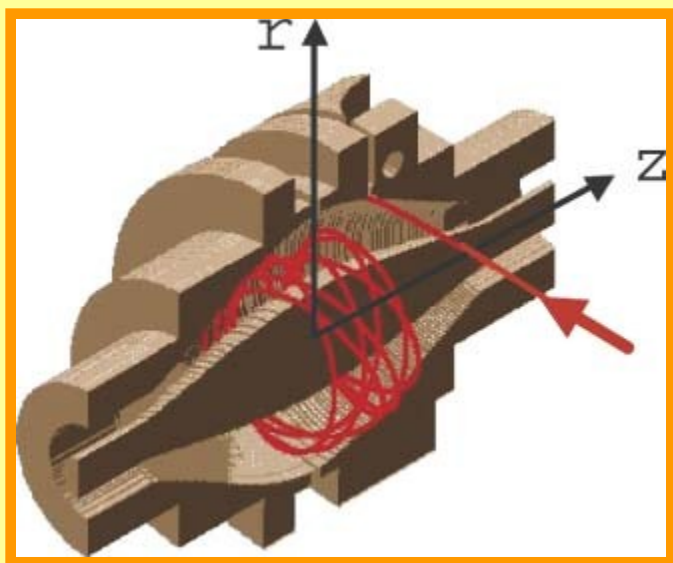


detekce



HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR

- separátory iontů – ORBITRAP s Fourierovou transformací

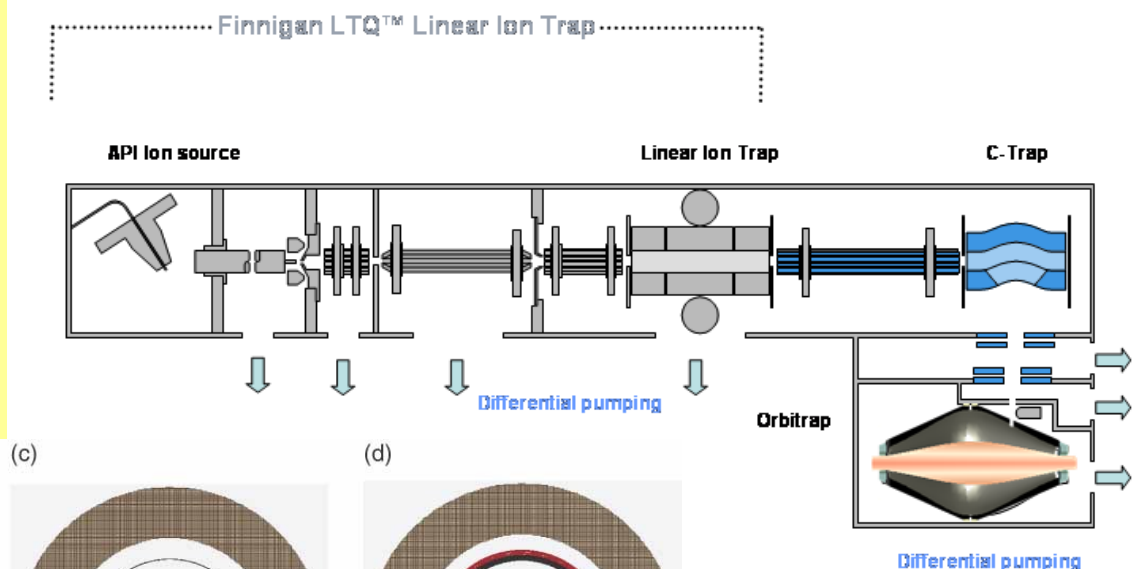
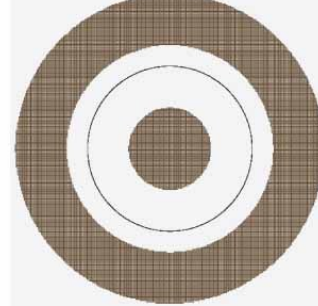
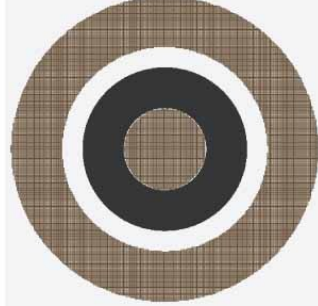
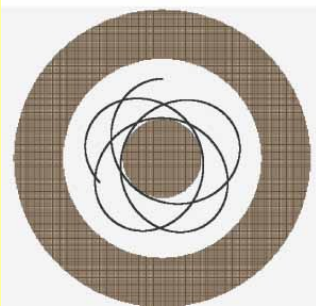


(a)

(b)

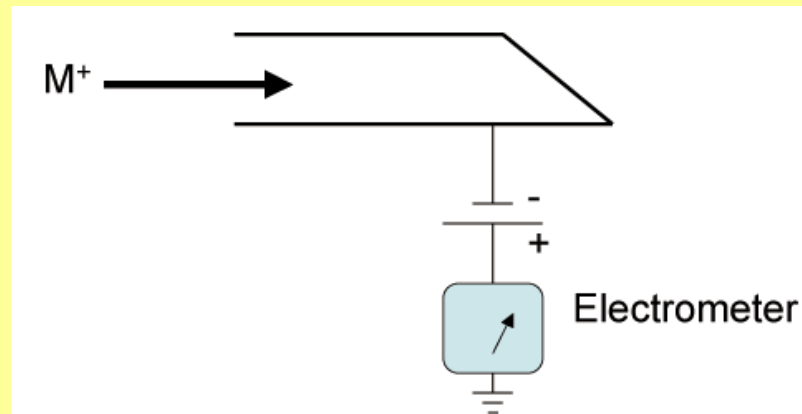
(c)

(d)



HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR

- DETEKCE ČETNOSTI IONTŮ O PŘÍSLUŠNÝCH m/z
- **detektor** – v čase postupně 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



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

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE - identifikace látek

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

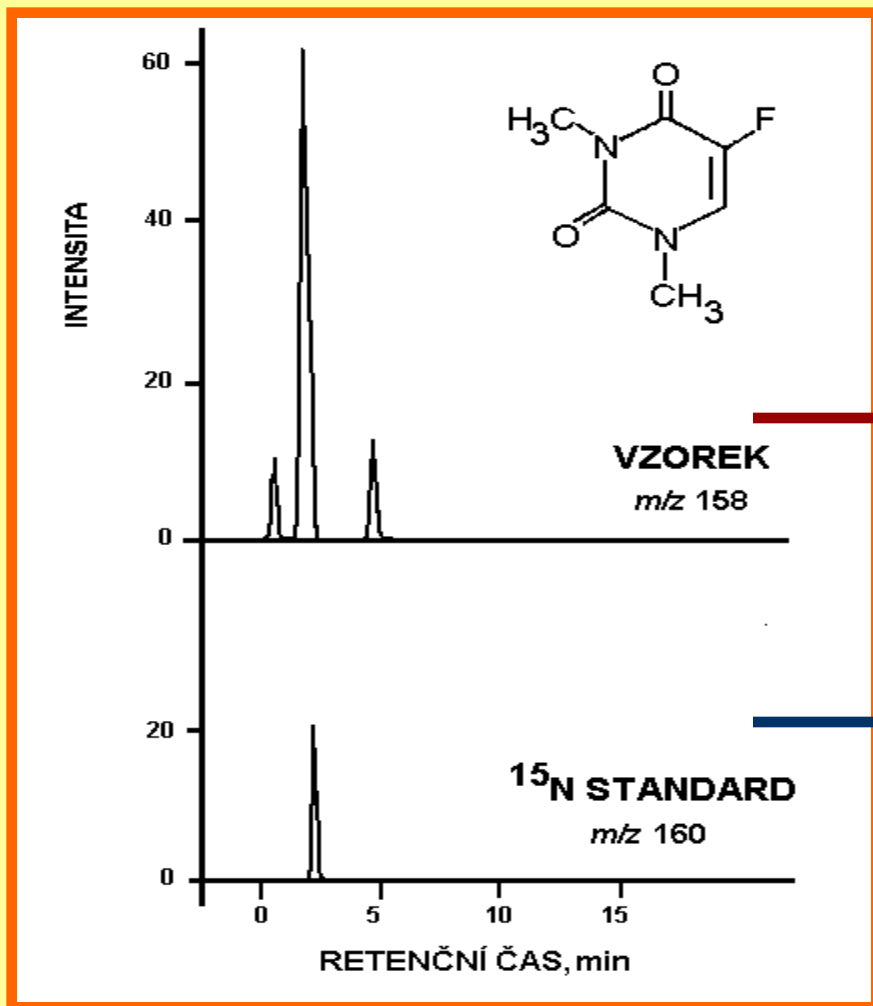
Kvantitativní spektrometrie

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE – kvantita

- Možný problém matričního efektu – vliv na ionizaci analytu
- SLEDOVÁNÍ výšky píků pro vybraná m/z - SIM
„SELECTIVE ION MASS“
(selected ion monitoring)
- GC-MS/MS - stanovení farmak v krevní plasmě
 - použití vnitřního standardu

Kvantitativní spektrometrie

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE



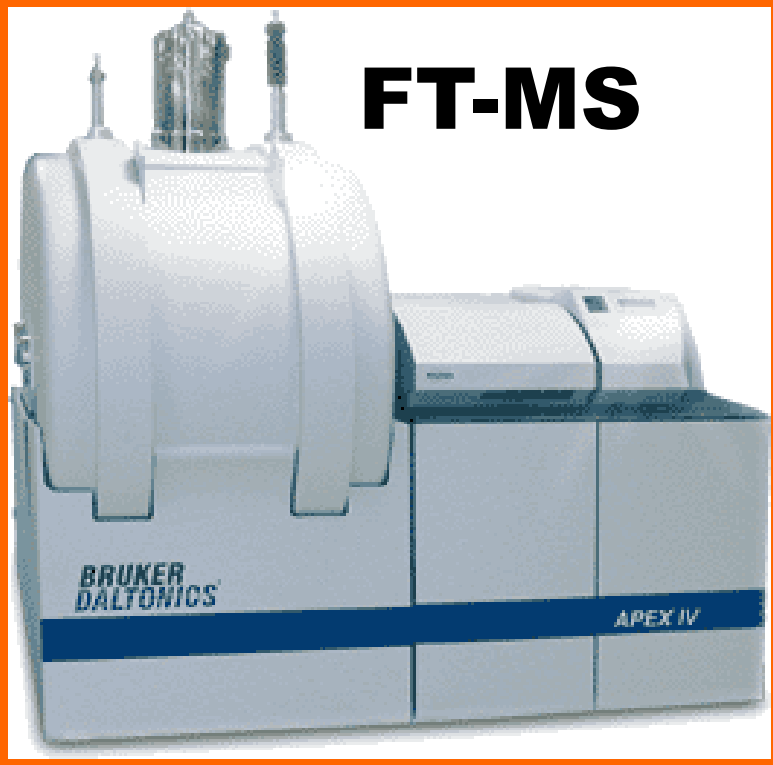
SIGNÁL
při m/z vzorku

SIGNÁL
při m/z standardu

Kvantitativní spektrometrie

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

FT-MS



TOF-MS

