

Hmotnostní spektrometrie v organické analýze

Miroslav Lísa, Michal Holčapek

- každé úterý 16 - 18 hod, učebna HB-S23
- plný text přednášek: <http://holcapek.upce.cz/>
- zkouška:
 - a/ písemný test (60 min) – 40% známky (91-100% - *výborně*, 81-90% - *výborně mínus*, 71-80% - *velmi dobře*, 61-70% - *velmi dobře mínus*, 51-60% - *dobře*, <50% - *nevyhověl*)
 - b/ interpretace spekter – 40% známky
 - c/ ústní zkouška – 20% známky
 - pokud jsou části a/ + b/ hodnoceny „výborně“, pak ústní zkouška odpadá
 - nesložení jedné z částí = nesložení zkoušky, pokud ostatní dvě části hodnoceny nejhůře „velmi dobře“, pak stačí opakovat jen nesloženou část

Úvod do hmotnostní spektrometrie

- **Hmotnostní spektrometrie (MS)** je analytická metoda sloužící k převedení molekul na ionty, rozlišení těchto iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) a následnému záznamu relativních intenzit jednotlivých iontů
- **Hmotnostní spektrometr** je iontově-optické zařízení, které rozlišuje ionty podle poměru jejich m/z
 - + vysoká citlivost
 - + kvalitativní analýza - určení M_R a dalších strukturních informací
 - + kvantitativní analýza - odezva je závislá na koncentraci
 - + minimální spotřeba vzorku
 - destruktivní metoda
 - vysoké pořizovací a provozní náklady

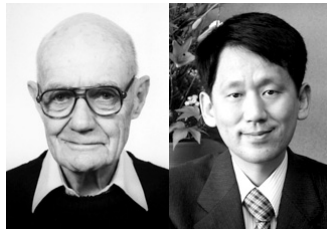
Hmotnostní spektrometrie Držitelé Nobelových cen za chemii nebo fyziku



Francis William Aston (1922, chemie)
hmotnostní spektrometrie izotopů



Wolfgang Paul (1989, fyzika)
popis iontové pasti



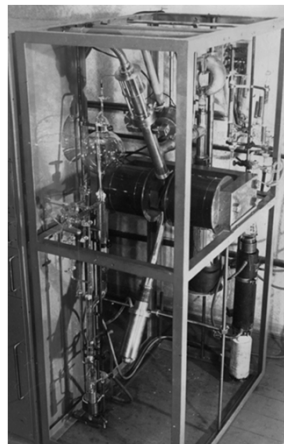
John B. Fenn (elektrosprej) a Koichi Tanaka (MALDI) (2002, chemie)
vývoj měkkých ionizačních technik pro hmotnostní spektrometrii biomakromolekul

Historický vývoj hmotnostní spektrometrie

- 1898 (Wien) - objev zakřivení dráhy letu urychlených iontů v elektrickém a magnetickém poli
- 1913 (Thomson) - rozdělení izotopů neonu ^{20}Ne a ^{22}Ne , považován za zakladatele MS
- 1924 (Thomson, Aston) - charakterizováno izotopické zastoupení 50ti prvků
- 1934 (Mattauch, Herzog) - sektorový analyzátor s dvojí fokusací
- 1946 (Stephens) - TOF analyzátor
- 1953 (Paul) - kadrupól a iontová past
- 1957 (Holmes, Morrell) - první spojení GC/MS
- 1966 (Munson, Field) - popis chemické ionizace (1. měkká ionizační technika)
- 1968 (Dole) - elektrosprej jako zdroj iontů
- 1973 (Baldwin, McLafferty) - první spojení HPLC/MS
- 1974 (Comisarow, Marshall) - FTICR
- 1976 (McFadden & kol.) - Moving Belt převodník pro spojení HPLC/MS
- 1984 (Willoughby, Browner) - Particle Beam HPLC/MS spojení
- 1984 (Fenn) - ionizace biomolekul pomocí ESI
- 1985 (Hillenkamp, Karas) - vynález MALDI
- 1999 (Makarov) - Orbitrap jako hmotnostní analyzátor

Historický vývoj hmotnostní spektrometrie Česká republika

- **1953** sestaven první hmotnostní spektrometr v ČR
 - magnet Nierova typu
 - Ústavu fyzikální chemie ČSAV
 - V. Čermák, V. Hanuš, Č. Jech, J. Cabicar
 - 1954 udělena Státní cena
- **1962** první komerční hmotnostní spektrometry
 - MCH-1303
 - Ústav organické chemie a biochemie AVČR - L. Dolejš
 - Ústavu fyzikální chemie ČSAV - V. Hanuš



Současná situace v ČR (září 2012)

- >270 HPLC/MS a >55 MALDI-MS včetně přístrojů nejvyšší třídy (FTICR, Orbitrap)
- každoroční Školy hmotnostní spektrometrie pořádané Spektroskopickou Společností JMM a Univerzitou Pardubice (>200 účastníků)

Základní termíny

- Mass Spec Terms Project (http://mass-spec.lsu.edu/msterms/index.php/Main_Page)
 - projekt MS názvosloví podporovaný IUPAC
 - Pure and Applied Chemistry (K. Murray a kol., 2006) - Standard definitions of terms relating to mass spectrometry
 - J. Chromatogr. A (K. Murray, 2010) - Glossary of terms for separations coupled to mass spectrometry
 - český překlad se připravuje
- **hmotnostní spektrometrie** (MS) - obor zabývající se hmotnostními spektrometry a jejich výsledky
 - zkratku MS nelze využívat jako zkratku pro hmotnostní spektrometr
 - nepoužívat hmotnostní spektroskopie nebo hmotnostní spektroskop - využívají pro detekci iontů fotografickou desku
- **hmotnostní spektrometr** - zařízení, které měří m/z hodnoty a zaznamenává jejich intenzitu
 - ne hmotnostní spektroskop, hmotnostní spektrofotometr, atd.
- **hmotnostní spektrum** - graf závislosti intenzity iontů (absolutní/relativní) na jejich m/z
 - ne chromatogram

Základní termíny

- **m/z** - bezrozměrná veličina získaná vydělením hmotnosti iontu nábojovým číslem (počtem elementárních nábojů, bez ohledu na polaritu)
 - jednotku Th (Thomson) IUPAC nedoporučuje
- Dalton (Da) - není SI jednotka, většinou se používá v biologii, pro molekulové hmotnosti větších proteinů (kDa)
 - atomová hmotnostní jednotka (unified atomic mass unit) u - 1/12 hmotnosti ^{12}C
 $1 \text{ u} = 1 \text{ Da} = 1.6605402(10) \times 10^{-27} \text{ kg}$
- **základní pík** spektra - pík s největší intenzitou ve spektru
- **ion prekursoru** - ion, který reaguje za vzniku konkrétních produktových iontů
 - nepoužívá se termín "rodičovský ion"
- **produktový ion** - vzniká jako produkt po reakci z jednotlivých iontů prekursoru
 - disociace (fragmentový ion), reakce ion/molekula, změna počtu nábojů
 - nepoužívat termín "dceřiný ion"
- **fragmentový ion** - produktový ion vzniklý disociací iontu prekursoru
- **aduktový ion** - ion tvořený interakcí iontu s jedním a více atomy nebo molekulami
 - $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{K}]^+$, $[\text{M}+\text{Cl}]^-$, atd.

Základní termíny

- **molekulární ion** - ion vzniklý odebráním nebo přidáním jednoho a více elektronů za vzniku kladného nebo záporného iontu
- **protonovaná molekula** - ion vzniklý interakcí molekuly s protonem, $[\text{M}+\text{H}]^+$
- **deprotonovaná molekula** - ion vzniklý odštěpením protonu, $[\text{M}-\text{H}]^-$
- **hybridní analyzátor** - hmotnostní spektrometr, který kombinuje hmotnostní analyzátoři různého typu za účelem tandemové hmotnostní spektrometrie
- **celkový iontový proud** - suma iontových proudů všech m/z ve spektru
- **celkový iontový chromatogram** - závislost sumy iontových proudů všech m/z ve spektru na čase
- **extrahovaný iontový chromatogram** - závislost vybrané m/z na čase
- **záznam vybraného iontu** - měření vybrané m/z v závislosti na čase

Základní části hmotnostního spektrometru

1/ iontový zdroj - slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice (tzv. ionizace), konstrukce se liší podle použité ionizační techniky

2/ hmotnostní analyzátor - slouží k rozdělení iontů v plynné fázi za vysokého vakua podle poměru hmotnosti a náboje (m/z)

3/ detektor - slouží k detekci iontů po jejich rozdělení podle m/z a k určení relativní intenzity (četnosti) jednotlivých iontů

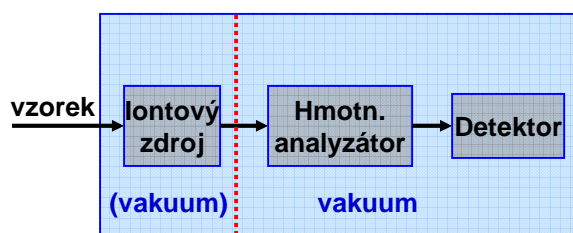
• další důležité části přístroje:

- vakuový systém

- iontová optika sloužící k urychlení a fokusaci iontů

- počítač na ovládání a ladění přístroje, sběr, ukládání a zpracování dat, porovnání spekter s knihovnou

Hmotnostní spektrometr



Ionizační techniky (= tvorba iontů)

• iontový zdroj hmotnostního spektrometru slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice (ionty)

• tvrdé ionizační techniky (EI) - ionizovaná molekula při ionizaci získá nadbytek vnitřní energie, což se projeví fragmentací molekulového iontu na menší části (tzv. fragmentové ionty)

• měkké ionizační techniky - (šetrné) ionizovaná molekula získá mnohem menší množství energie oproti EI, proto ve spektrech pozorujeme zejména (de)protonované molekuly a minimum fragmentových iontů

• ionizace může probíhat za sníženého tlaku (EI, CI, MALDI, atd.) nebo za atmosférického tlaku (ESI, APCI, APPI)

• volba ionizační techniky podle povahy analytu (M_R , polarita), příp. podle použité separační techniky (GC - EI, CI; HPLC - ESI, APCI, APPI)

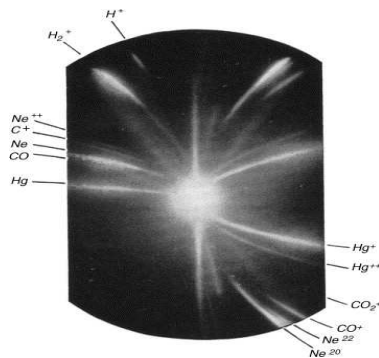
• zavádění vzorku do iontového zdroje - přímá infúze, separační technika, odpařování z kapiláry, atd.

Hmotnostní analyzátoři (= dělení iontů)

- hmotnostní analyzátoři slouží k dělení iontů v plynné fázi za vakua podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z)
- analyzátoři jsou umístěni za iontovým zdrojem (tzn. molekuly již byly převedeny na ionty) a před detektorem (před detekcí musíme ionty rozdělit podle m/z)
- dělení iontů v analyzátoři probíhá za vysokého vakua (cca. 10^{-3} - 10^{-11} Pa, podle typu analyzátoři)
- dělení iontů podle m/z lze dosáhnout na základě různých fyzikálních principů:
 - 1/ zakřivení dráhy letu iontů v magnetickém nebo elektrickém poli (magnetický nebo elektrostatický analyzátoři)
 - 2/ různá stabilita oscilací iontů v dvoj- nebo trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí (kvadrupól nebo iontová past)
 - 3/ různá doba rychlosti letu iontů (analyzátoři doby letu – TOF)
 - 4/ různá frekvence harmonických oscilací v Orbitrapu
 - 5/ různá absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli (iontová cyklotronová rezonance – ICR)

Detekce iontů

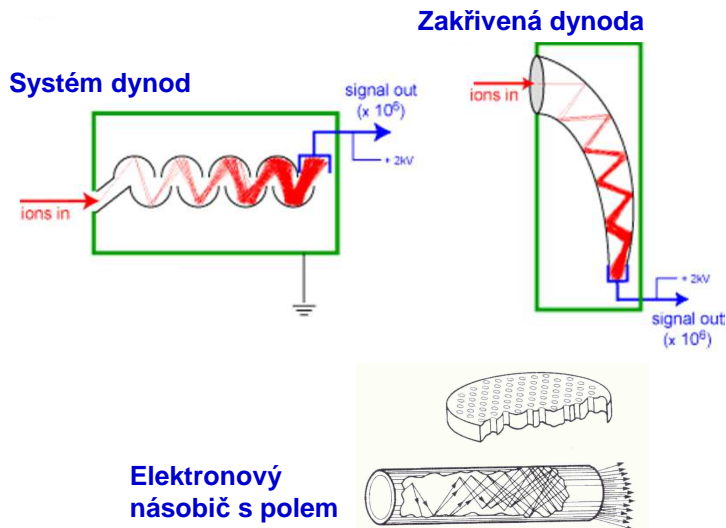
- detektory iontů používají všechny analyzátoři kromě FTICR a Orbitrap, kde je v analyzátoři prováděna zároveň detekce
- ionty po rozdělení v hmotnostním analyzátoři dopadají na detektor iontů, který generuje signál z dopadajících iontů
 - tvorba sekundárních elektronů, které se následně zesilují
 - indukce proudu po dopadu iontů
- dříve využití fotografické desky, kde ionty o určité m/z dopadají na jedno místo desky a vytvářejí body, intenzita iontů je dána intenzitou zbarvení bodu



Fotografická deska Thompsonova spektroskopu (1907)

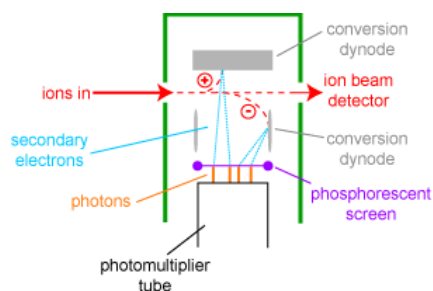
Detekce iontů

- **1/ elektronový násobič** – nejběžnější, ionty dopadají na povrch dynody, ze které vyrazí e^- , ty jsou dále zesíleny systémem dynod nebo opakovanými kolizemi na průběžné zakřivené dynodě, zesílení až 10^8 krát

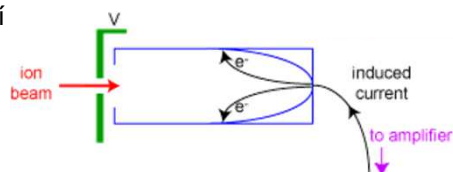


Detekce iontů

- **2/ fotonásobič** - ionty dopadají na konverzní dynodu, uvolní se e^- , dopadem na fosforovou destičku uvolní fotony, které se zesílí ve fotonásobiči, zesílení až 10^5 - 10^7 krát, delší životnost



- **3/ faradayova klec** – dopadající ionty narážejí na povrch dynody, která emituje e^- a indukuje se proud, který je následně zesílen a zaznamenán, málo citlivý, ale robustní, velmi přesné na izotopická měření

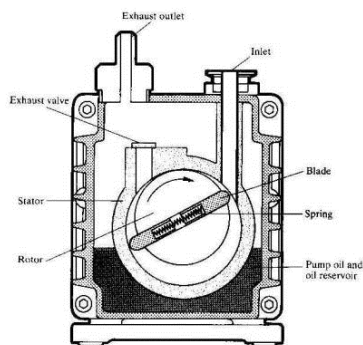
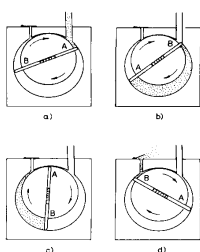


Vakuová technika

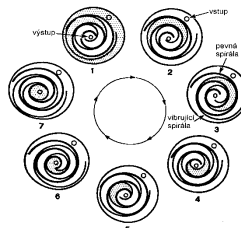
- různé požadavky na hodnotu vakua v různých částech hmotnostního spektrometru
 - iontový zdroj - za atmosférického tlaku (API - ESI, APCI, APPI) nebo vakua (EI, CI, MALDI)
 - hmotnostní analyzátor - vždy pracuje **za vysokého vakua**, hodnota vakua se liší podle typu analyzátoru ca. 10^{-3} až 10^{-11} Pa
 - detektor - vakuum
- k získání vysokých hodnot vakua je obvykle potřeba dvou- nebo třístuňové čerpání velmi výkonnými vakuovými pumpami
 - 1. stupeň čerpání - rotační olejové, spirálové a membránové pumpy (výkon 80 l/s)
 - 2. stupeň čerpání - turbomolekulární nebo difúzní pumpy (výkon 250 l/s)
- proč vysoké vakuum? ionty musí mít dostatečně dlouhou střední dráhu a nesmí docházet ke kolizním srážkám s neutrálními atomy

Vakuová technika

Rotační pumpa

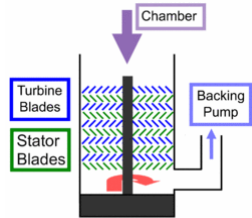


Spirálová pumpa

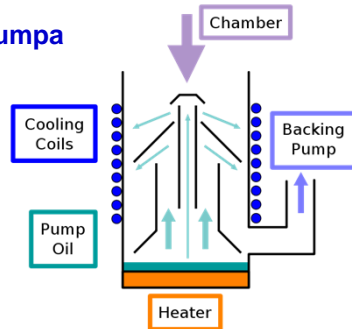


Vakuová technika

Turbomolekulární pumpa



Difúzní pumpa

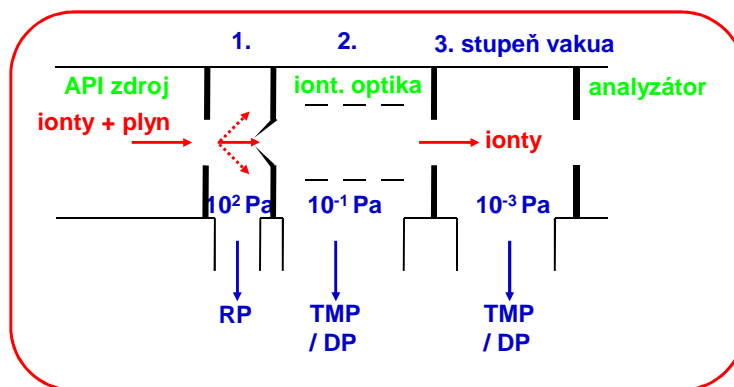


Vícestupňové čerpání



Vakuová technika

- příklad 3 stupňového vakuového čerpání



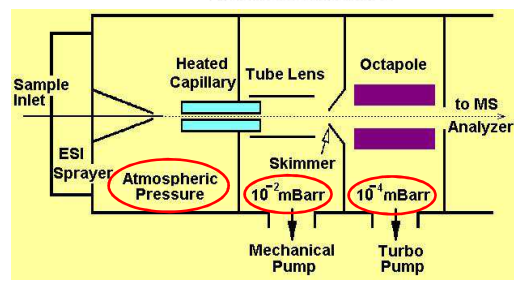
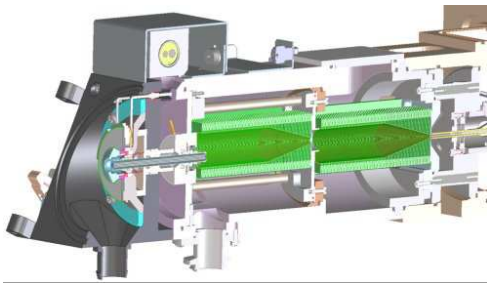
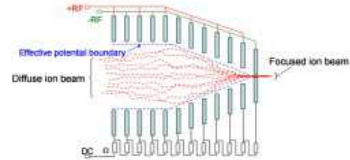
RP ... rotační pumpa

TMP ... turbomolekulární pumpa

DP ... difúzní pumpa

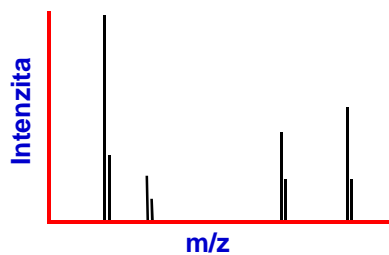
Iontová optika

- volba vhodného napětí na elektrostatických elementech pro zajištění tvorby iontů, transportu, dělení a detekci iontů
- výrazně ovlivňují výsledky měření - citlivost, rozlišovací schopnost, přesnost
- pracují za různých tlaků
 - přechod mezi atmosférickým tlakem a vakuem - skleněné kapiláry
 - přechody mezi různými stupni vakua - skimmery, ion funnels (trychtýř)
 - usměrňování iontů ve vakuu
- urychlení a transport iontů - hexapóly, oktapóly
- fokusace iontů - ion funnels



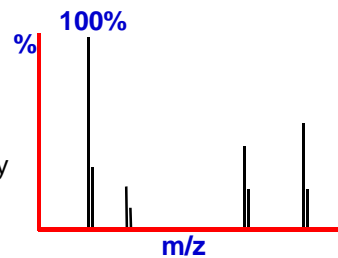
Hmotnostní spektrum

- **Základní veličiny** – intenzita (absolutní, relativní), poměr hmotnosti a náboje (m/z)



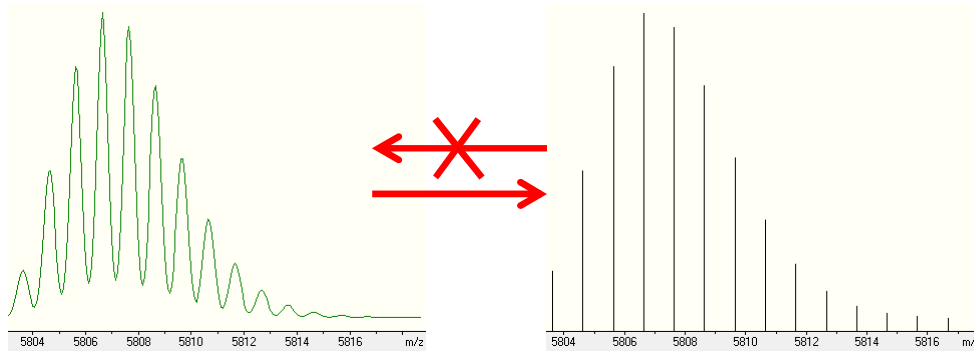
- měří se intenzita iontů v závislosti na m/z :
 - skenování = změna skenované veličiny (U, V, B) – Q, sektorové analyzátoři, IT
 - záznam signálu v čase – TOF, FTICR, Orbitrap

- normalizace spekter:
 - převedení absolutních intenzit na relativní
 - intenzita osy y je v rozsahu 0-100%
 - intenzita základního píku spektra je 100% a intenzity ostatních píků jsou k ní vztaženy



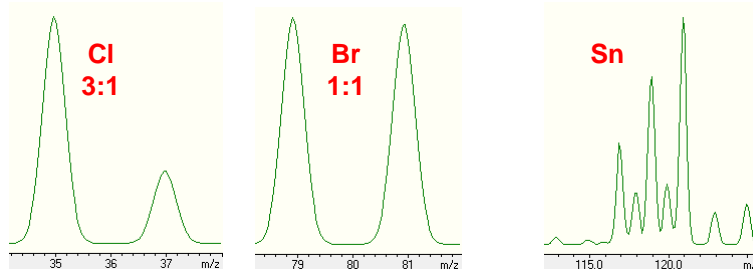
Hmotnostní spektrum

- profilové spektrum (kontinuální) - profil složený z naměřených bodů, gaussovský tvar píků, vhodné pro kontrolu kvality píků, velké množství dat
- čárové spektrum (centroidální) - píky převedené na čáry, které odpovídají jejich středu, intenzita odpovídá výšce nebo ploše píku, menší množství dat, nelze převést zpětně na profilové spektrum!



Ionty v hmotnostních spektrech

- závislé na typu použité ionizace
- ionty s **lichým počtem elektronů** - M^+ , především elektronová ionizace
- ionty se **sudým počtem elektronů** - spektra měkkých ionizačních technik
- ionty (**de**)**protonovaných** molekul - $[M+H]^+$, $[M-H]^-$, určení molekulové hmotnosti (M_R)
- **adukty** molekul - $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$, s mobilní fází, atd., ověření M_R
- **fragmentové** (produktové) ionty – strukturální informace, fragmentace funkčních skupin, částí molekuly, atd.
- ionty **izotopů** - atomy chemického prvku, které mají stejný počet protonů, ale rozdílný počet neutronů, tedy stejné atomové číslo a rozdílnou atomovou hmotnost



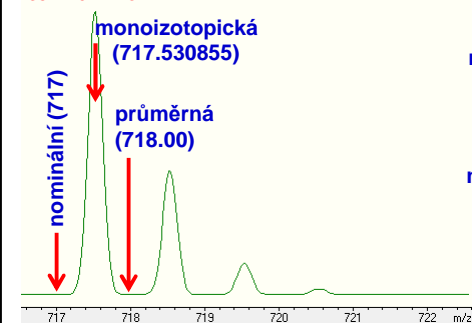
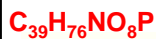
Přírodní zastoupení izotopů běžných organických prvků

Prvek	“M”		“M+1”		“M+2”		Typ prvku
	m/z	%	m/z	%	m/z	%	
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”

Hmotnosti iontů ve spektru

- **nominální hmotnost:** hmotnost vypočítaná z celočíselných hmotností prvků
 $\text{CO}_2: 1 \times 12 + 2 \times 16 = 44$
- **monoizotopická hmotnost:** hmotnost vypočítaná z přesných hmotností prvků
 $\text{CO}_2: 1 \times 12.0000 + 2 \times 15.9949 = 43.9898$
- **průměrná hmotnost:** vážený průměr hmotností jednotlivých izotopů
 $\text{CO}_2: 1 \times 12.01 + 2 \times 16 = 44.01$

Fosfoethanolamin - PE(16:0/18:1)



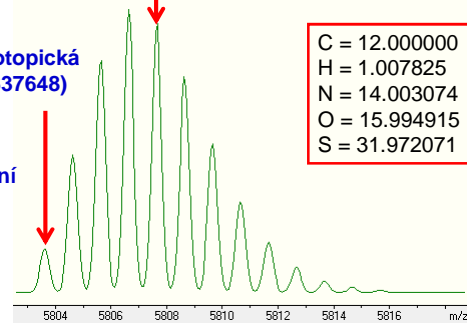
průměrná (5807.59)

Inzulín



monoizotopická (5803.637648)

nominální (5801)



C = 12.000000
H = 1.007825
N = 14.003074
O = 15.994915
S = 31.972071