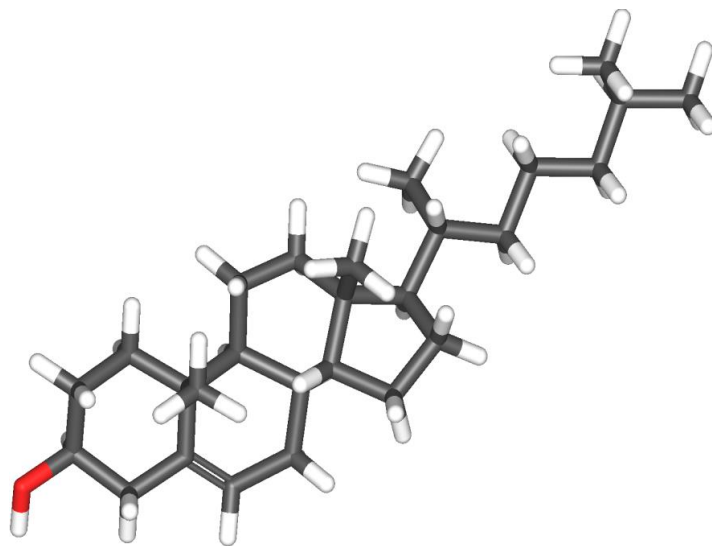


Kvalitativní analýza v hmotnostní spektrometrii – základy interpretace „měkkých“ MS a MS/MS



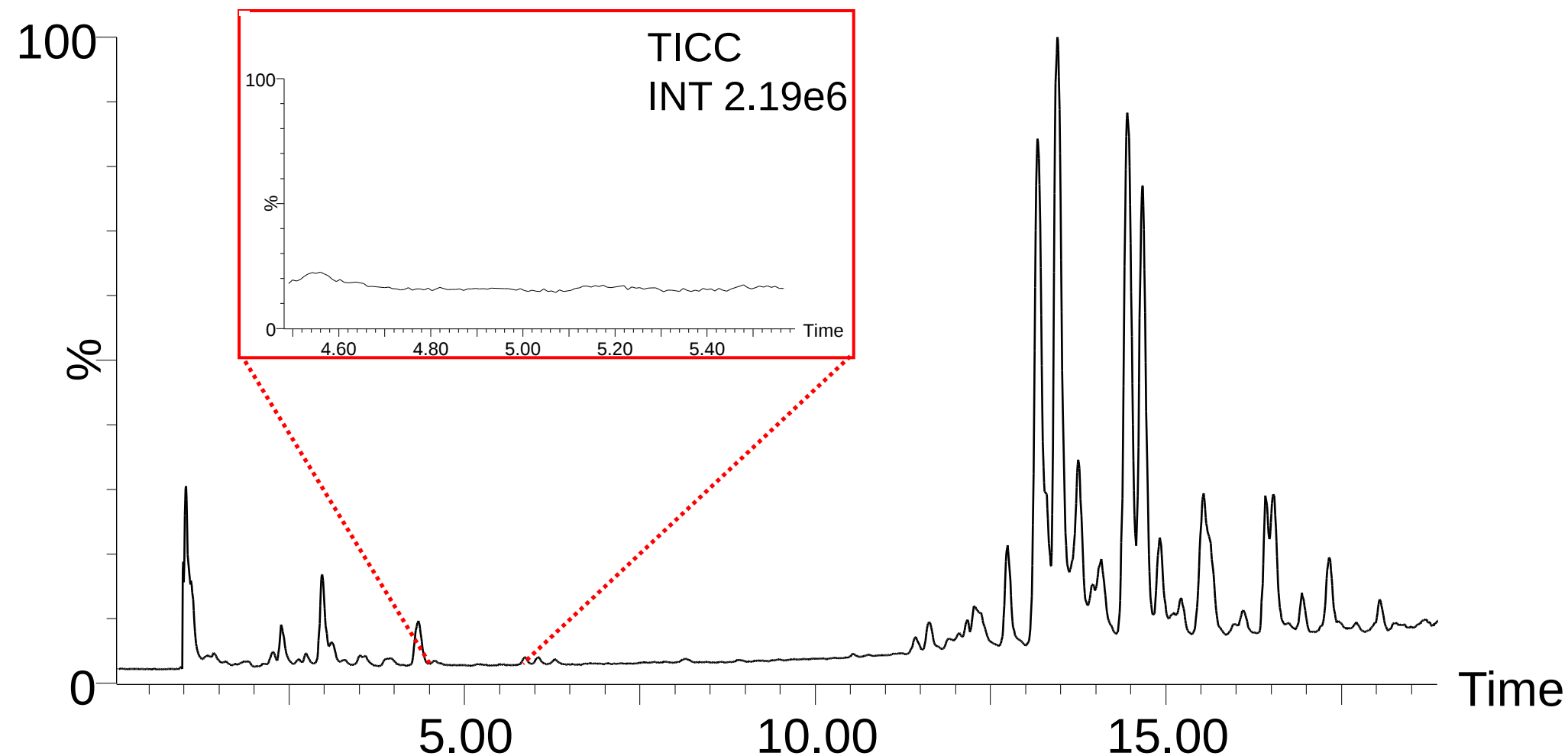
Kroky při identifikaci iontů (molekul) pomocí MS

- Důležité je mít kvalitní hmotnostní spektra – dostatečně zprůměrovaná, správně odečtené pozadí, znalost historie vzorku (jak byl odebrán, připraven, s čím přišel do styku) atd.

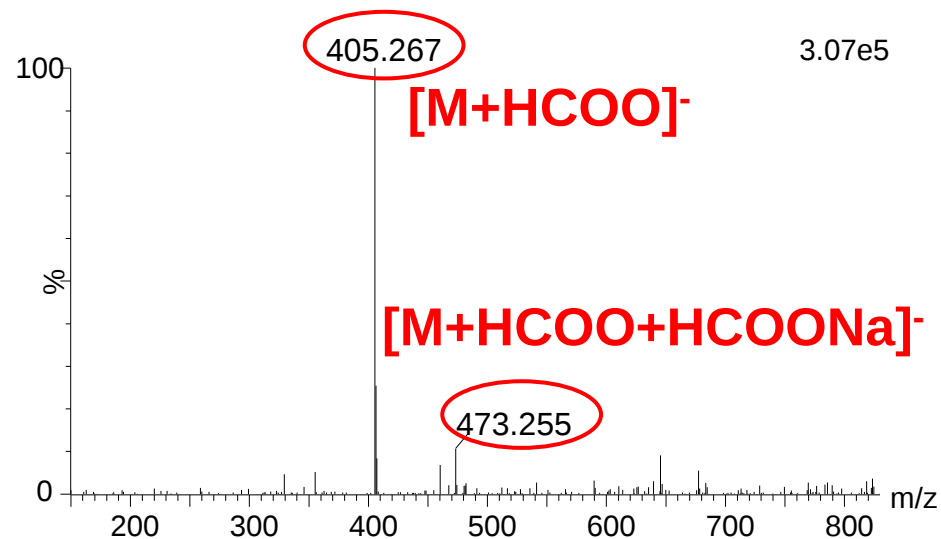
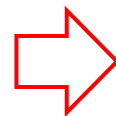
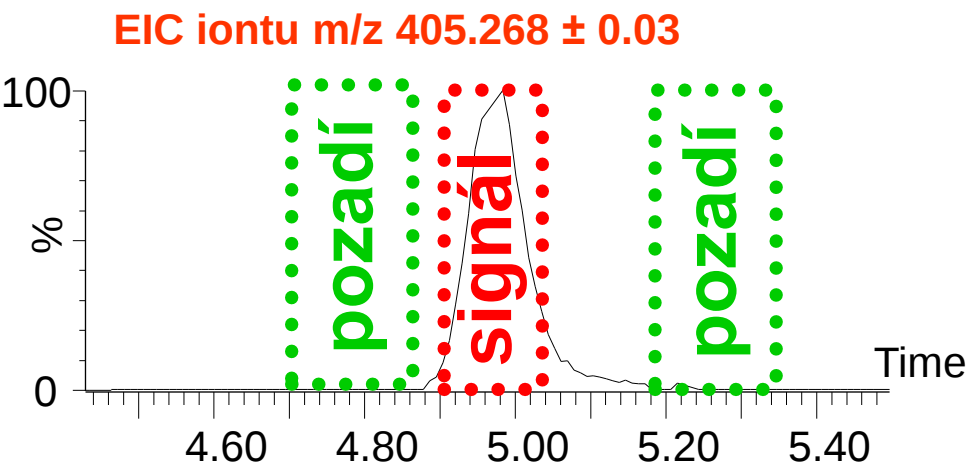
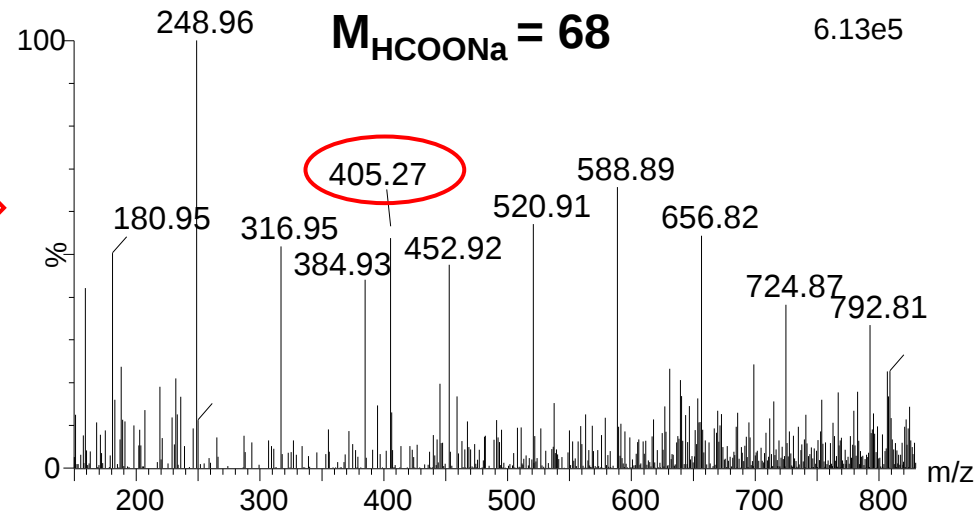
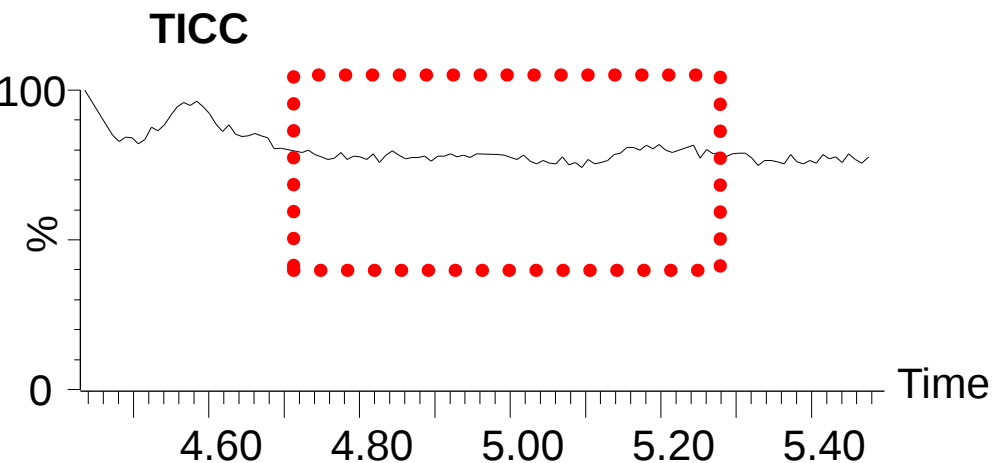
1. Určení molekulové hmotnosti, pokud možno vysvětlit všechny přítomné ionty (jejich původ)
2. Určení velikosti náboje (hlavně v případě iontových sloučenin, biopolymerů).
3. Určení elementárního složení – správná hmotnost a přítomnost charakteristických izotopických píků (izotopická obálka - charakteristické intenzity izotopů) – hlavně při vysokém hmotnostním rozlišení HRMS (čím větší R_{FWHM} tím lépe).
4. Strukturní informace – na základě různých MS/MS (či MS^n) experimentů (charakteristické ztráty pro funkční skupiny, substituenty, ligandy atd.).
5. Využití různých identifikačních softwarů a databází (knihovny spekter) – často jako první krok (po vyčištění spekter, po identifikaci a odstranění interferujících iontů)
6. V případě kombinace se separačními metodami – informace o retenčním čase (LC, GC, SFC, CZE) – může pomoci, driftový čas (v případě IMS).
 - Možnost využití různých filtrovacích přístupů pro zjednodušení TICC – rekonstruovaný iontový chromatogram v MS i MS/MS, filtrování s ohledem na hmotnostní defekt, chromatogram neutrálních ztrát u LC/MS/MS měření, atd.

Čištění spekter stopových látek v LC/MS

TICC
INT 6.05e7



Čištění spekter stopových látek v LC/MS



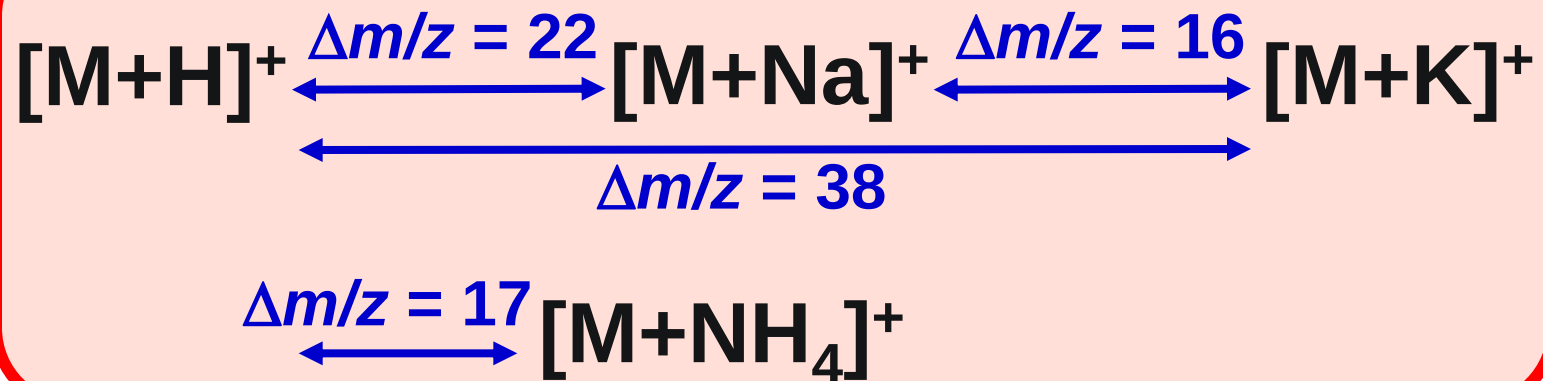
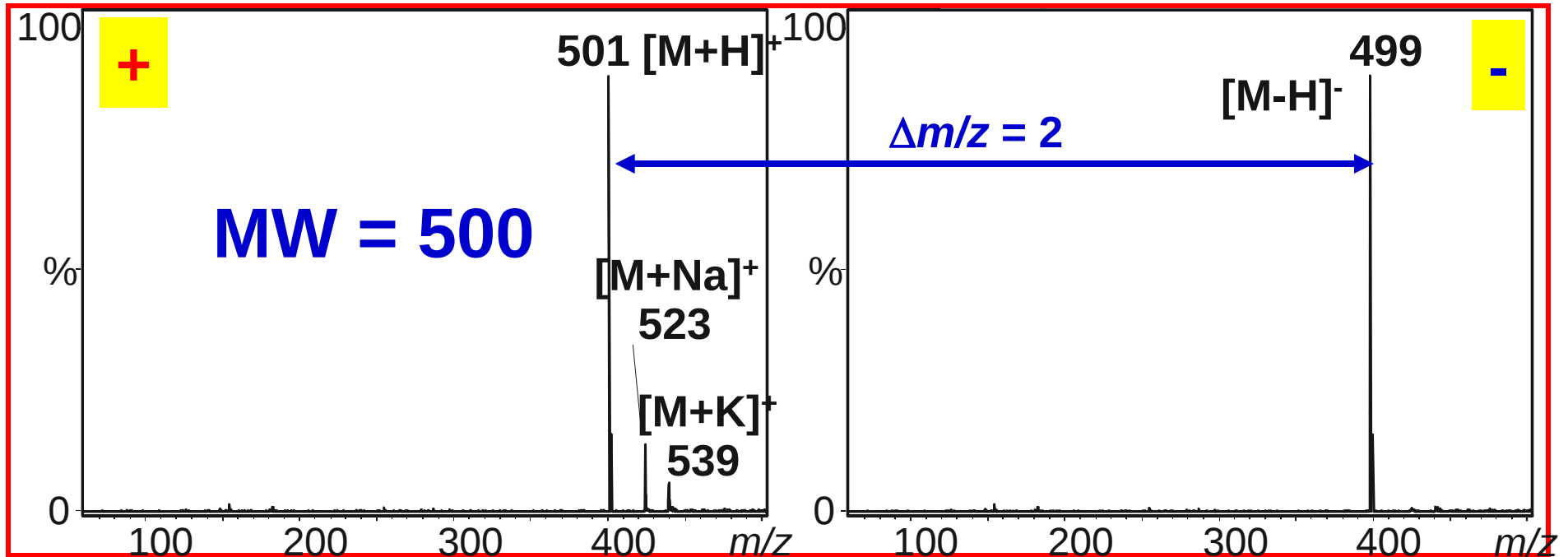
Identifikace iontu po odečtení iontů na pozadí

1. Určení molekulové hmotnosti

1. Určení molekulové hmotnosti

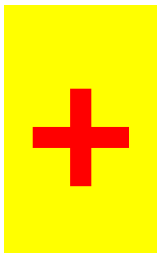
- na základě $[M+H]^+$, $[M-H]^-$, M^+ iontů nebo aduktů s molekulou $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+CH_3COO]^-$, $[M+HCOO]^-$, $[M+Cl]^-$, někdy i dimerní ionty typu $[2M+H]^+$, $[2M+Na]^+$.
 - typ a relativní intenzita aduktových iontů velmi výrazně závisí na složení mobilní fáze (rozpouštědla vzorku) a obsahu solí v eluentu či vzorku
 - závislé na použité ionizační technice - někdy je vhodné kombinovat více technik (ESI, APCI, APPI), **kombinace oboru módů polarity**
 - pokud zcela chybí molekulární ion použít šetrnější ionizaci (ESI, MALDI) a snaha o tvorbu molekulárních aduktů na základě přidavku vhodného iontu (NH_4^+ , Na^+ , K^+ , Ag^+ , Li^+ , CH_3COO^- , Cl^- , atd.), změna napětí na sprejovací jehle, vstupní elektrodě, iontové optice, změna průtoků sušících a zmlžujících plynů, změna teploty iontového zdroje, změna rozpouštědla vzorku

1. Určení molekulové hmotnosti (API-MS)



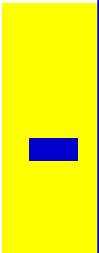
1. Určení M - Nejběžnější typy molekulárních aduktů

Singly charged molecular adducts in positive-ion API mass spectra. Rozdíl mezi $[M+H]^+$ a konkrétním aduktem



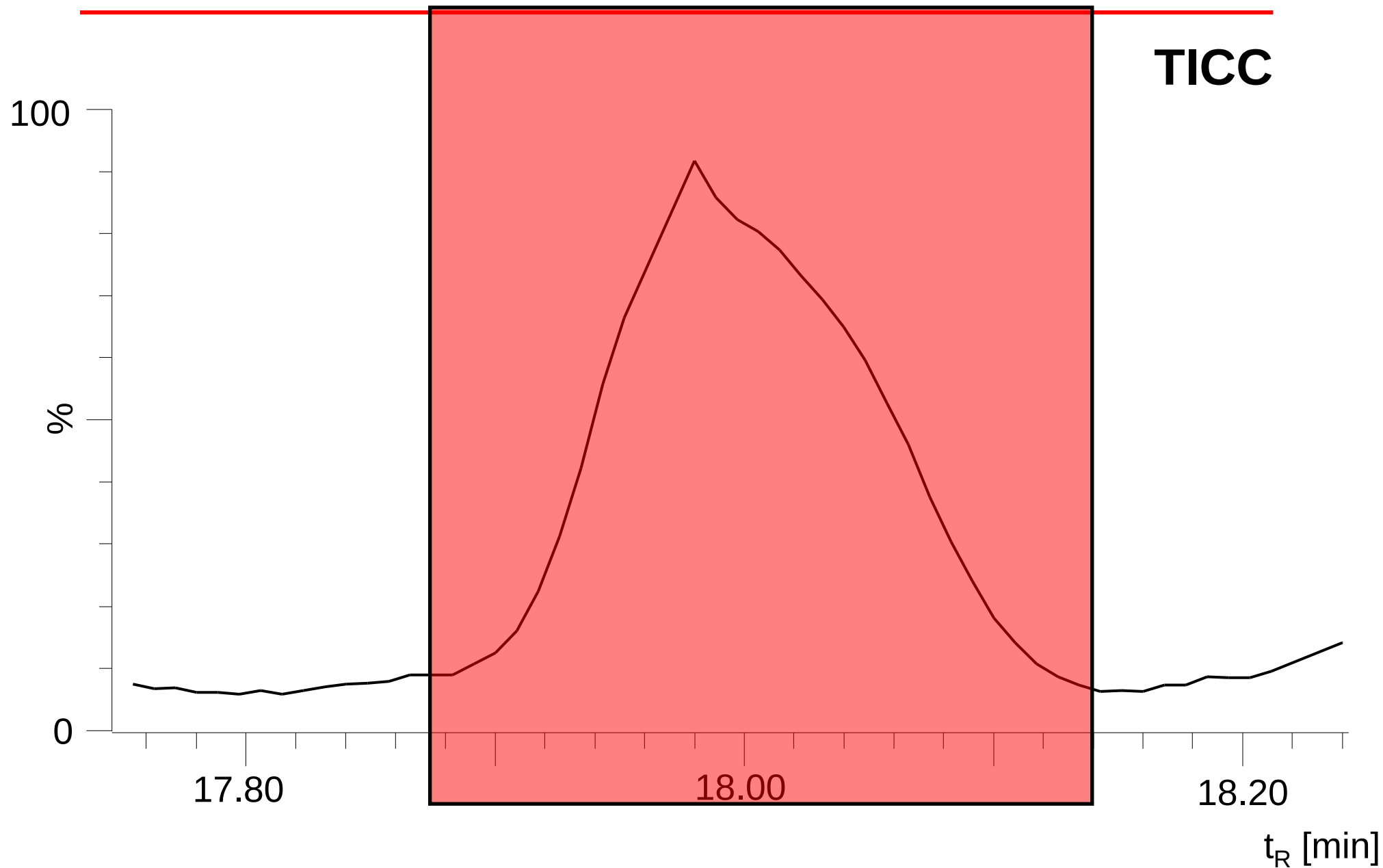
Molecular adduct	Nominal mass shift ^a [Δ Da]	Exact mass shift ^a [mDa]
$[M+Li]^+$	6	+8.2
$[M+NH_4]^+$	17	+26.5
$[M+H+H_2O]^+$	18	+10.6
$[M+Na]^+$	22	-18.1
$[M+H+CH_3OH]^+$	32	+26.2
$[M+K]^+$	38	-44.1
$[M+H+CH_3CN]^+$	41	+26.5
$[M+H+H_2O+CH_3OH]^+$	50	+36.8
$[M+Na+CH_3CN]^+$	63	+8.5
$[M+Ag]^+$	106	-102.7

Singly charged molecular adducts in negative-ion API mass spectra. Rozdíl mezi $[M-H]^-$ a konkrétním aduktem

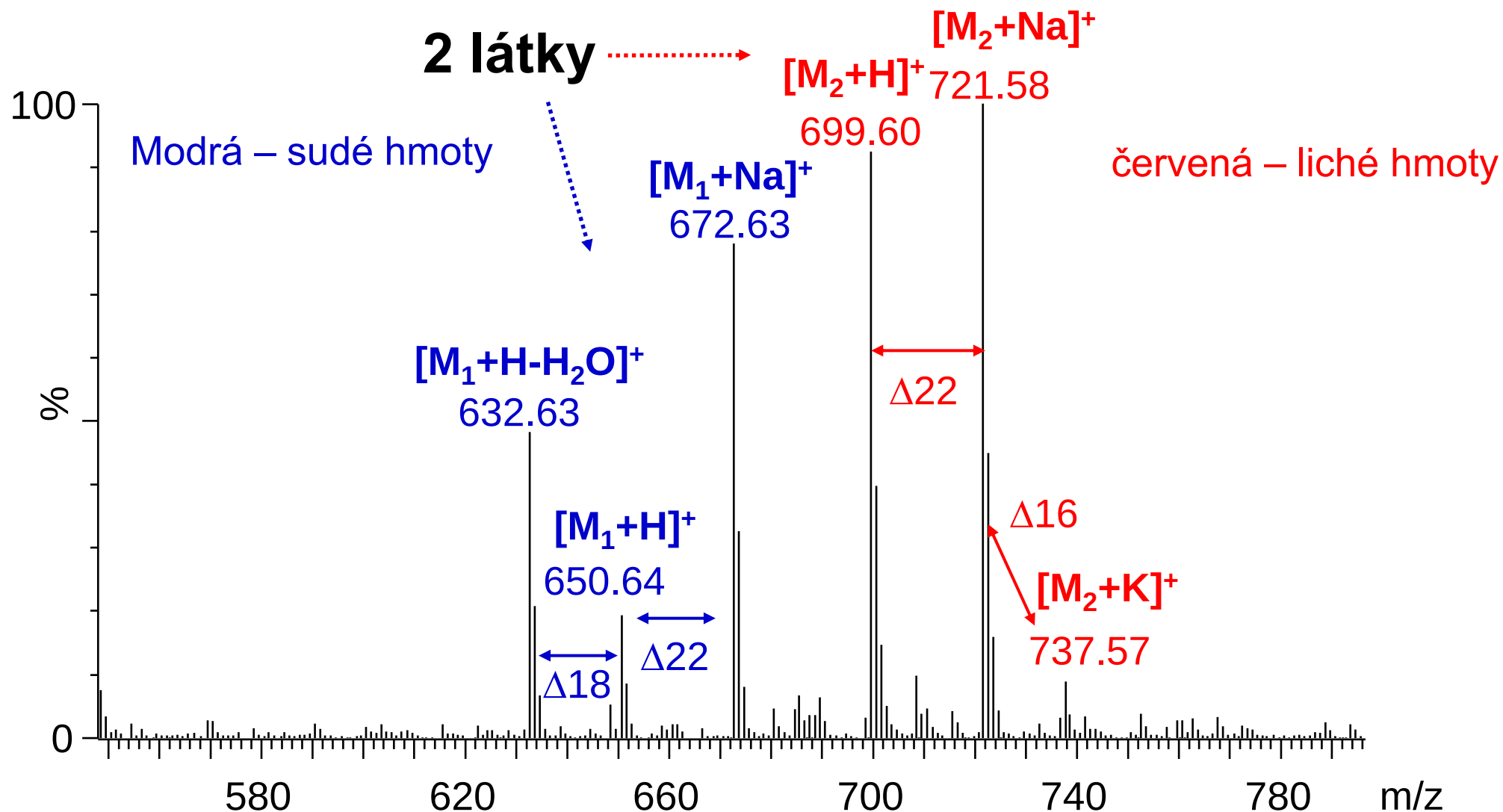


Molecular adduct	Nominal mass shift ^a [Δ Da]	Exact mass shift ^a [mDa]
$[M-H+H_2O]^-$	18	+10.6
$[M+F]^-$	20	+6.2
$[M-H+CH_3OH]^-$	32	+26.2
$[M+Cl]^-$	36	-23.3
$[M+HCOO]^-$	46	+5.5
$[M+NO_2]^-$	47	+0.7
$[M+CH_3COO]^-$	60	+21.1
$[M+NO_3]^-$	63	-4.4
$[M+Br]^-$	80	-73.8
$[M+HSO_4]^-$	98	-32.6
$[M+H_2PO_4]^-$	98	-23.1
$[M+CF_3COO]^-$	114	-7.1
$[M+I]^-$	128	-87.7
$[2M-H]^-$	-	-

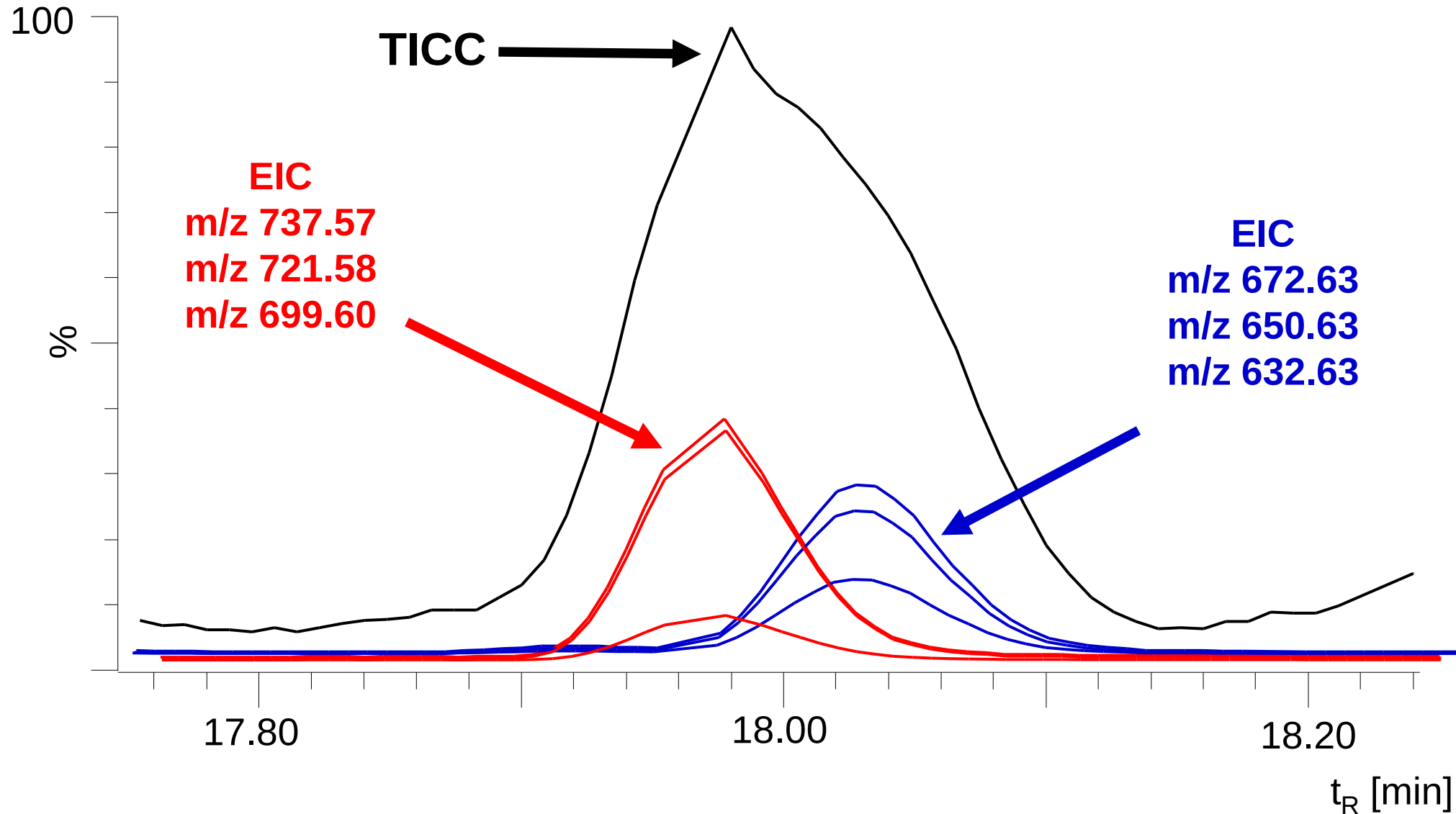
Filtrování dat a čištění spekter z LC/MS (koeluce)



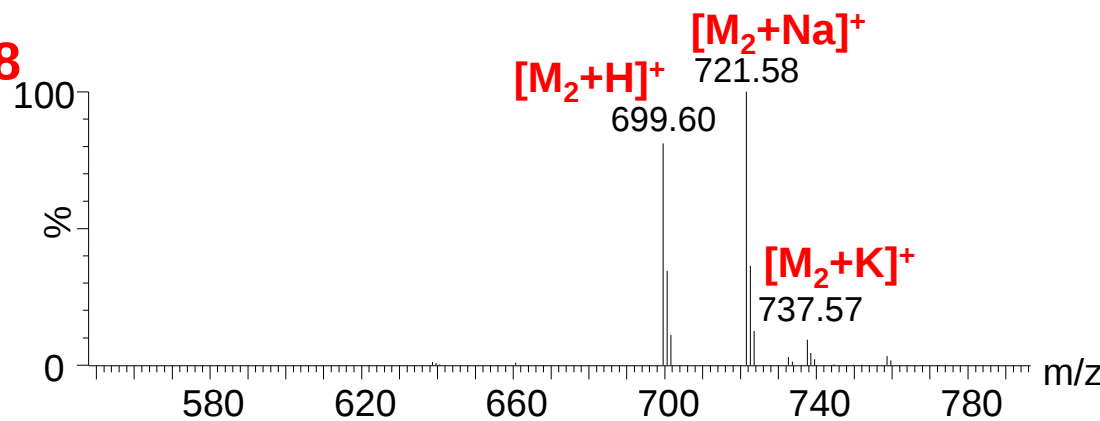
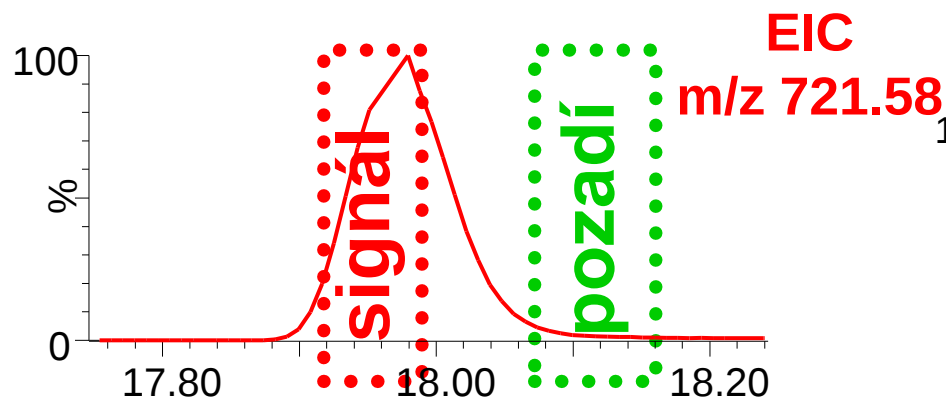
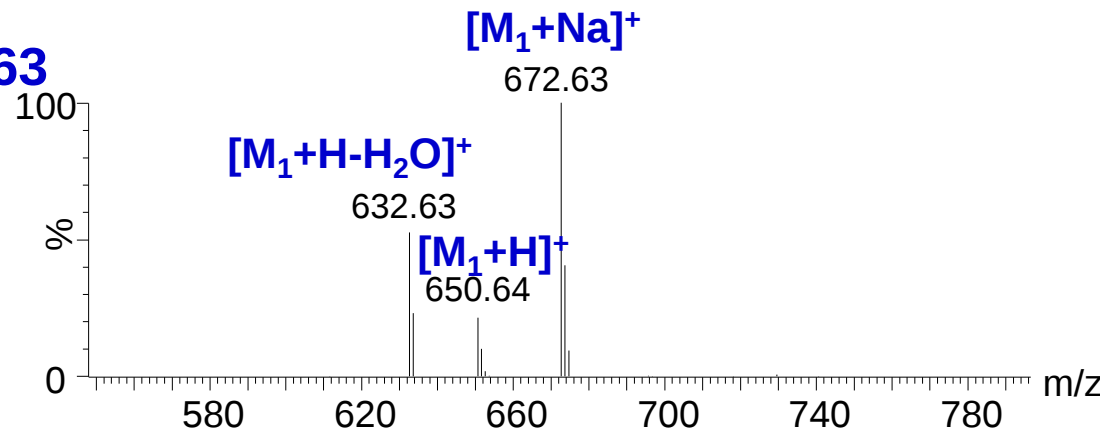
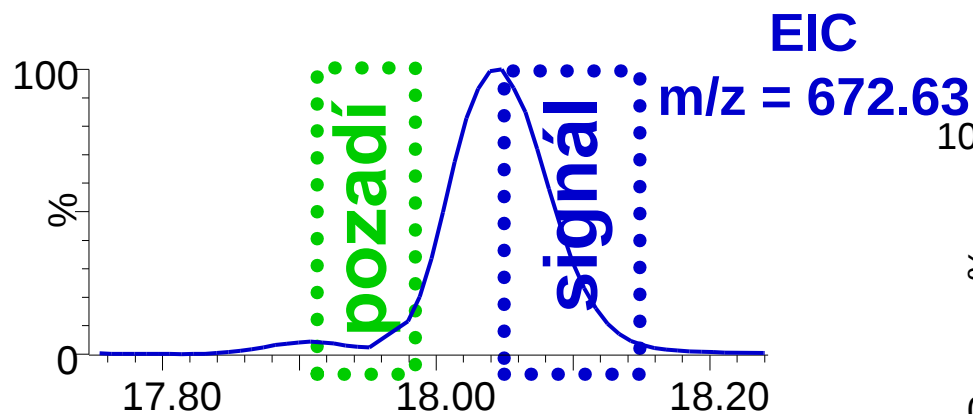
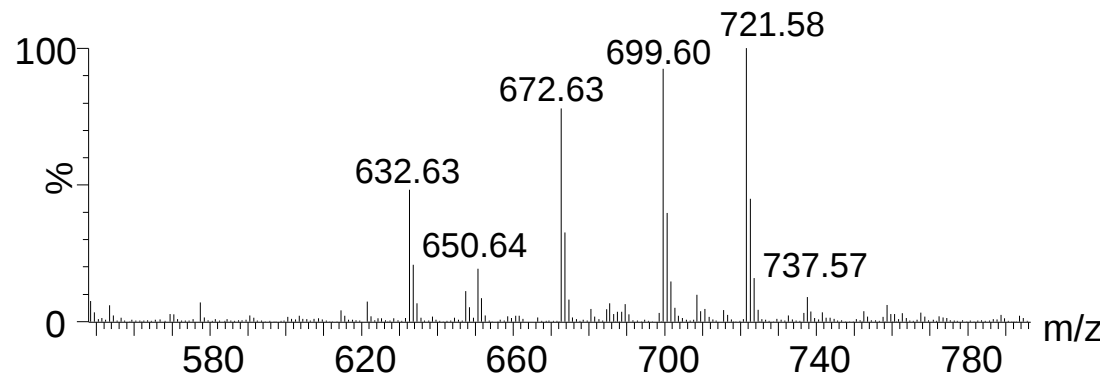
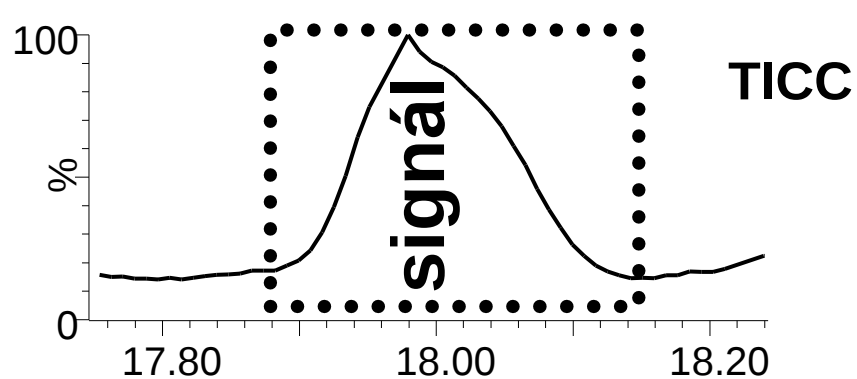
Filtrování dat a čištění spekter z LC/MS (koeluze)



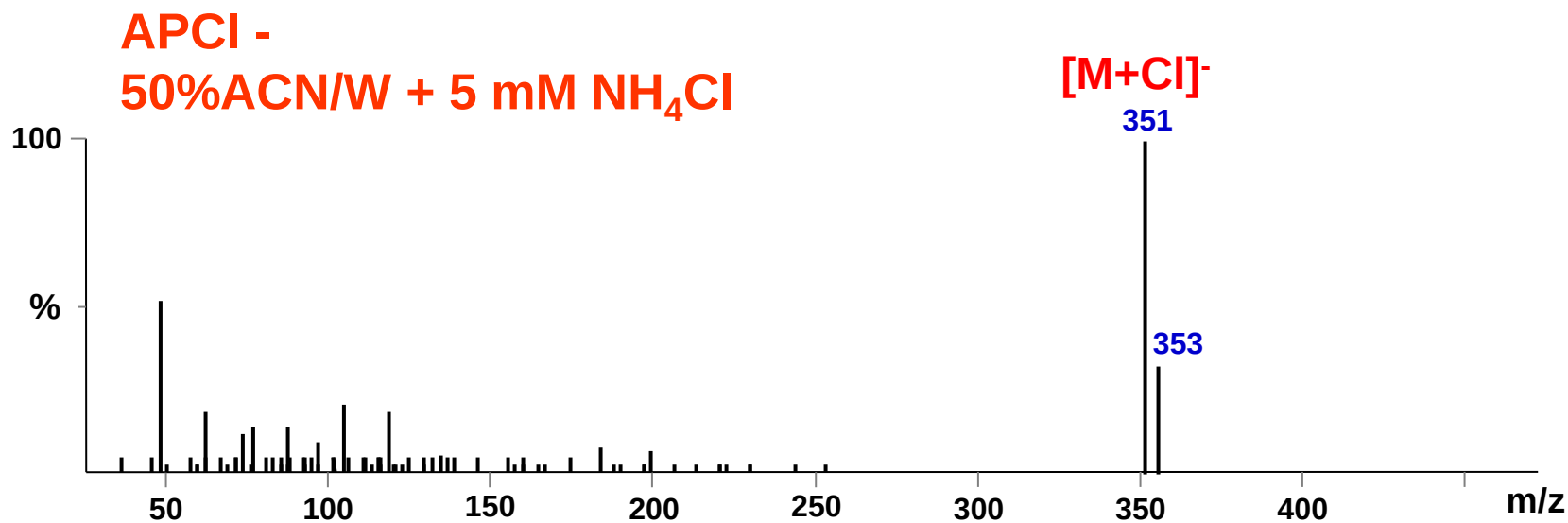
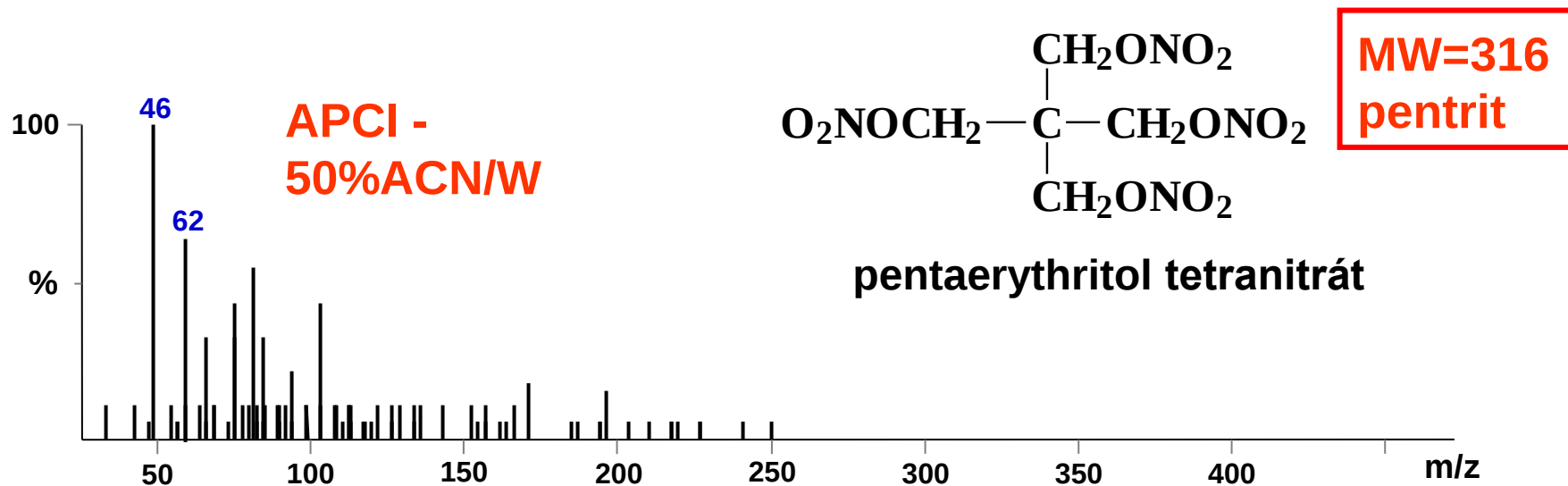
Filtrování dat a čištění spekter z LC/MS (koeluce)



Filtrování dat a čištění spekter z LC/MS (koeluze)

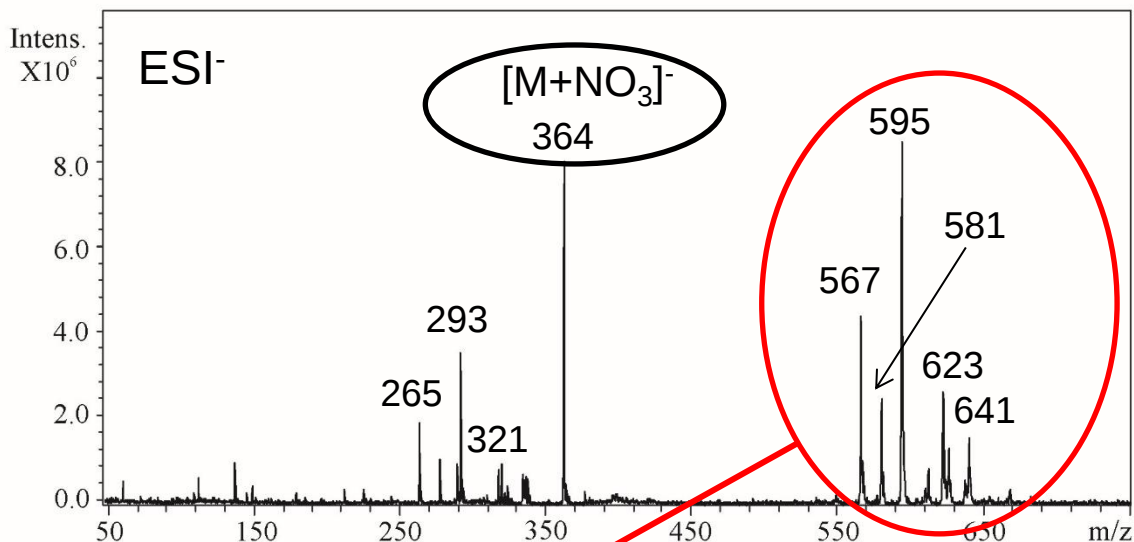
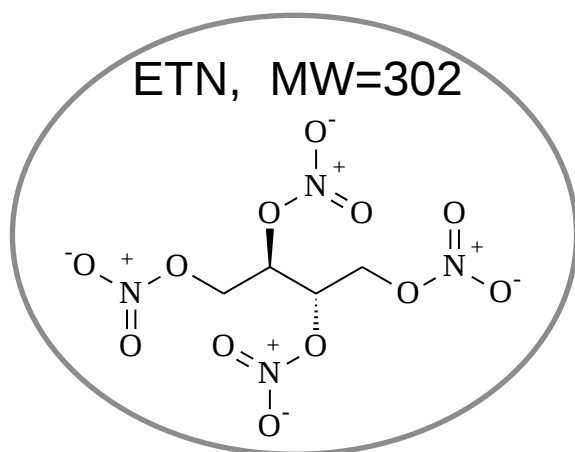


Aduky s anionty pro stabilizaci

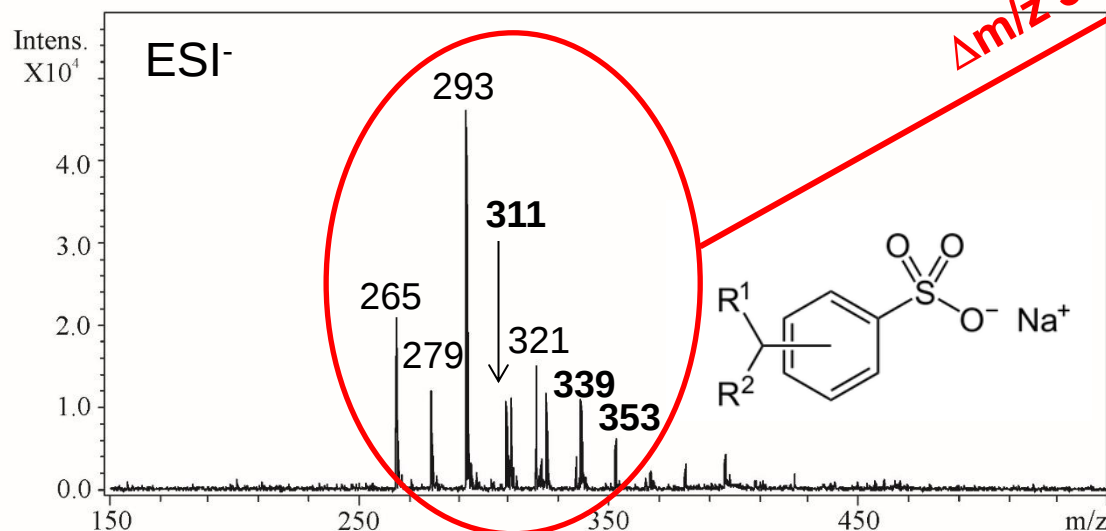


Adukty s anionty (nečistotami), přímá infúze

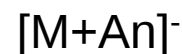
erythritol tetranitrát



ionty na pozadí, alkylbenzensulfonáty



mechanismus tvorby iontů



An = NO₃⁻, alkylbenzensulfonáty

$$302+62=\mathbf{364}; 302+265=\mathbf{567}; 302+279=\mathbf{581}; 302+293=\mathbf{595}; 302+321=\mathbf{623}; 302+339=\mathbf{641}$$

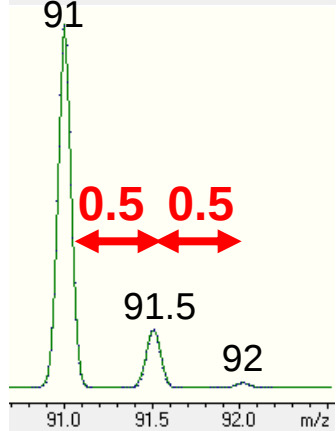
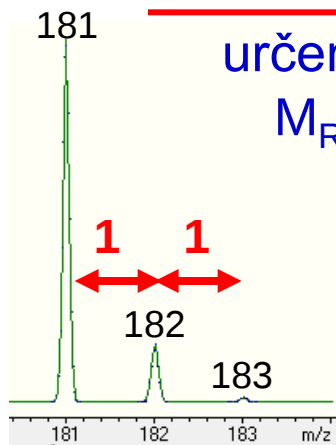
2. Určení velikosti náboje

2. Určení velikosti náboje

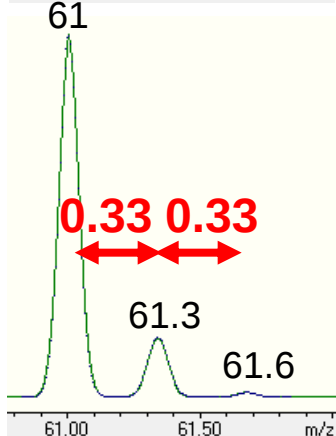
určení náboje

$$M_R = 180$$

$$[M+H]^+ \\ \Delta m/z = 1/1$$



$$[M+2H]^{2+} \\ \Delta m/z = 1/2$$

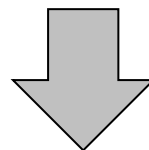


$$[M+3H]^{3+} \\ \Delta m/z = 1/3$$

Charakteristické rozdíly $\Delta m/z$ mezi jednotlivými izotopy a potřebné R_{FWHM} pro rozlišení izotopické obálky

Náboj $\pm$	1	2	3	5	10	20
$\Delta m/z$ ($M \leftrightarrow M+1$)	1	0,5	0,33	0,2	0,1	0,05
R_{FWHM} (m/z 1500)	3 000	6 000	10 000	17 000	35 000	70 000

kalkulace molekulové hmotnosti, když známe náboj

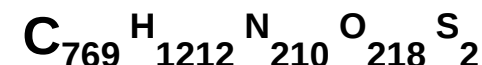
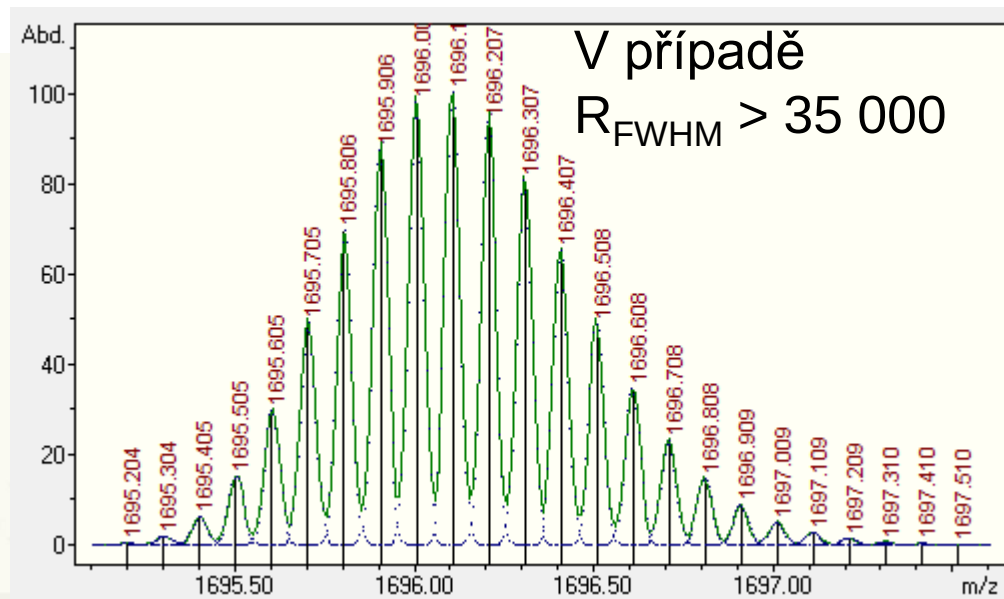
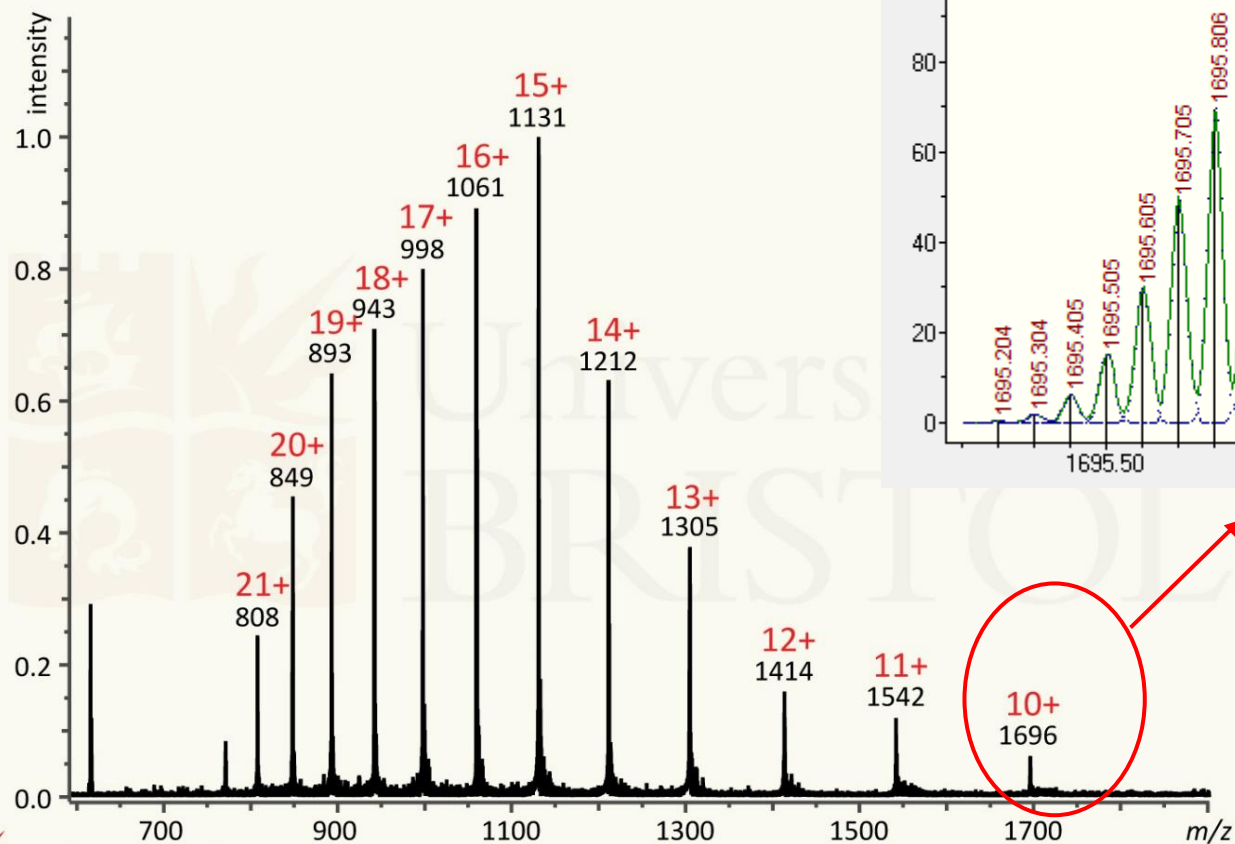


např.: m/z 1696 (rozdíl mezi izotopy je 0,1 $\rightarrow$ náboj je 10)
molekula je 10x protonovaná $[M+10H]^{10+}$

$$m/z = (M_R + 10)/10 \rightarrow M = 1696 \cdot 10 - 10 = 16\,950$$

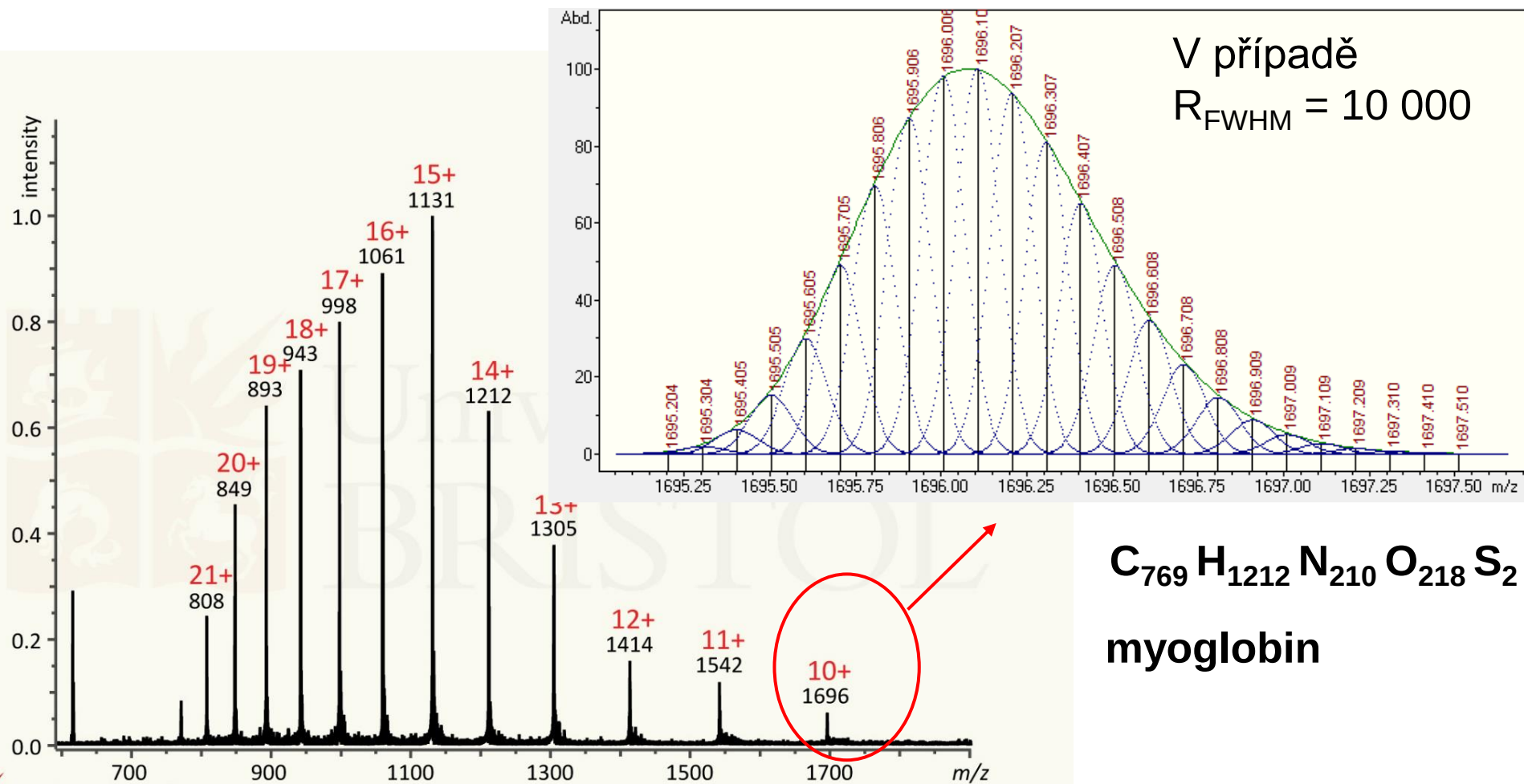
2. určení velikosti náboje a M_R proteinů

Např.: m/z 1696 (rozdíl mezi izotopy je 0,1 $\rightarrow$ náboj je 10)
molekula je 10x protonovaná $[M+10H]^{10+}$ (v m/z se $m=M+10$ a $z=10$)
 $1696 = m/z = (M+10)/10 \rightarrow M=1696*10 - 10 = 16\ 950$



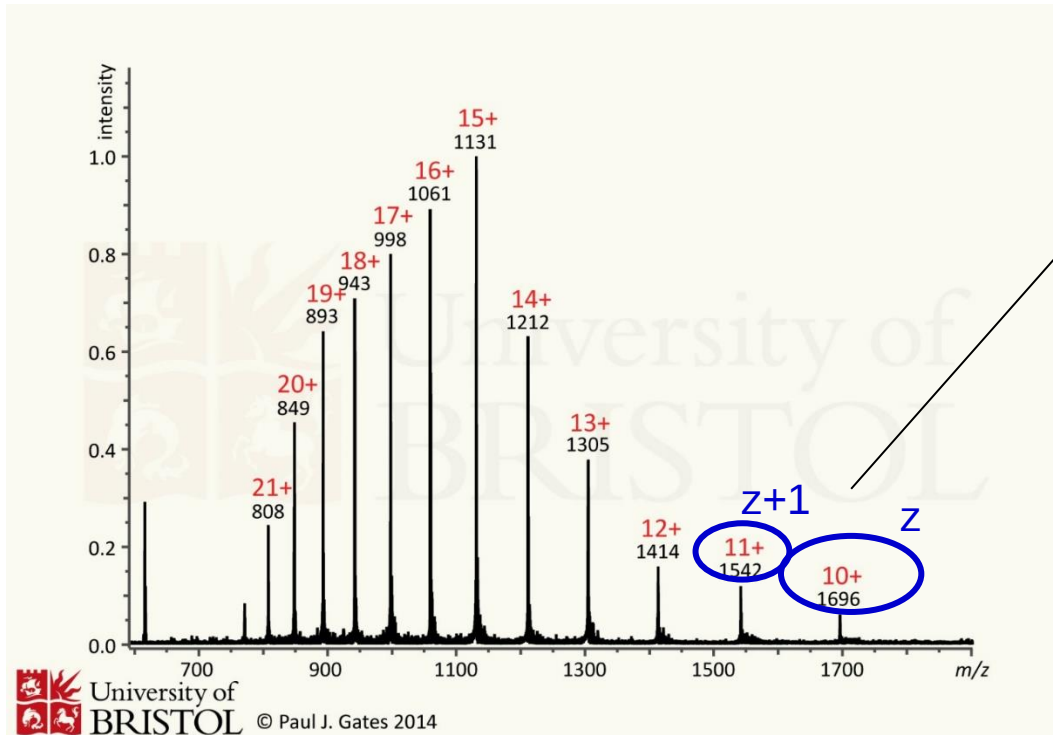
2. určení velikosti náboje a M_R proteinů

V případě nedostačujícího rozlišení nejde náboj určit na základě izotopické obálky



$C_{769}H_{1212}N_{210}O_{218}S_2$
myoglobin

2. určení velikosti náboje a M_R proteinů



Sousední ionty se liší v náboji o jednotku, můžeme tedy vyjádřit jako z a $z+1$ (náboj ale neznáme – musí se dopočítat).

V každém iontu charakteristická izotopická obálka (musíme mít ale vysoké R), pokud není lze vypočítat na základě sousedních iontů

Příklad výpočtu MW a počtu nábojů (řešení 2 rovnic o 2 neznámých)

Experimentálně určeno m/z dvou kladně nabitých iontů A (1696) a B (1542)

$$[M_R + z]^{z+} = m/z_A = 1696 = (M_R + z) / z$$

$$[M_R + z + 1]^{(z+1)+} = m/z_B = 1542 = (M_R + z + 1) / (z + 1)$$

- řešením vyjde $z = 10.006 = 10$ (náboj musí být celočíselná hodnota)

- nyní přiřadíme náboje všech iontům ve spektru (lze ověřit výpočtem)

- výpočet M_R ze všech identifikovaných iontů, např.:

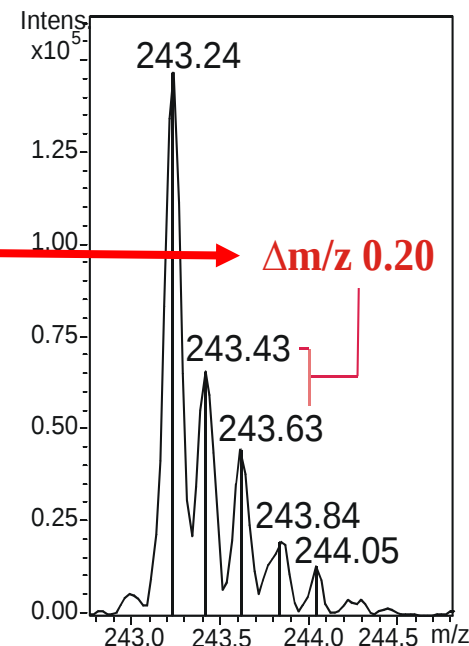
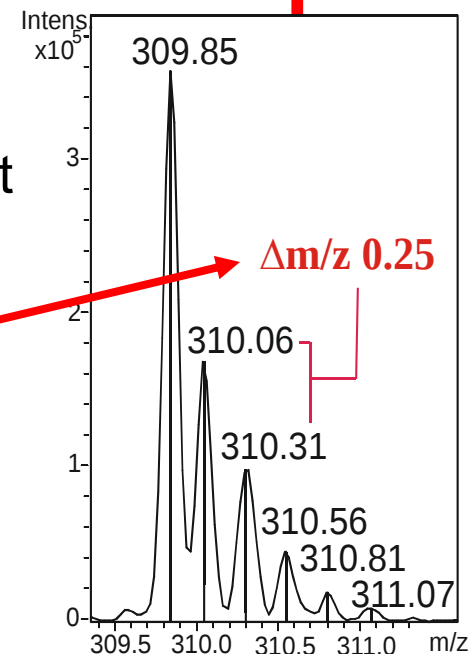
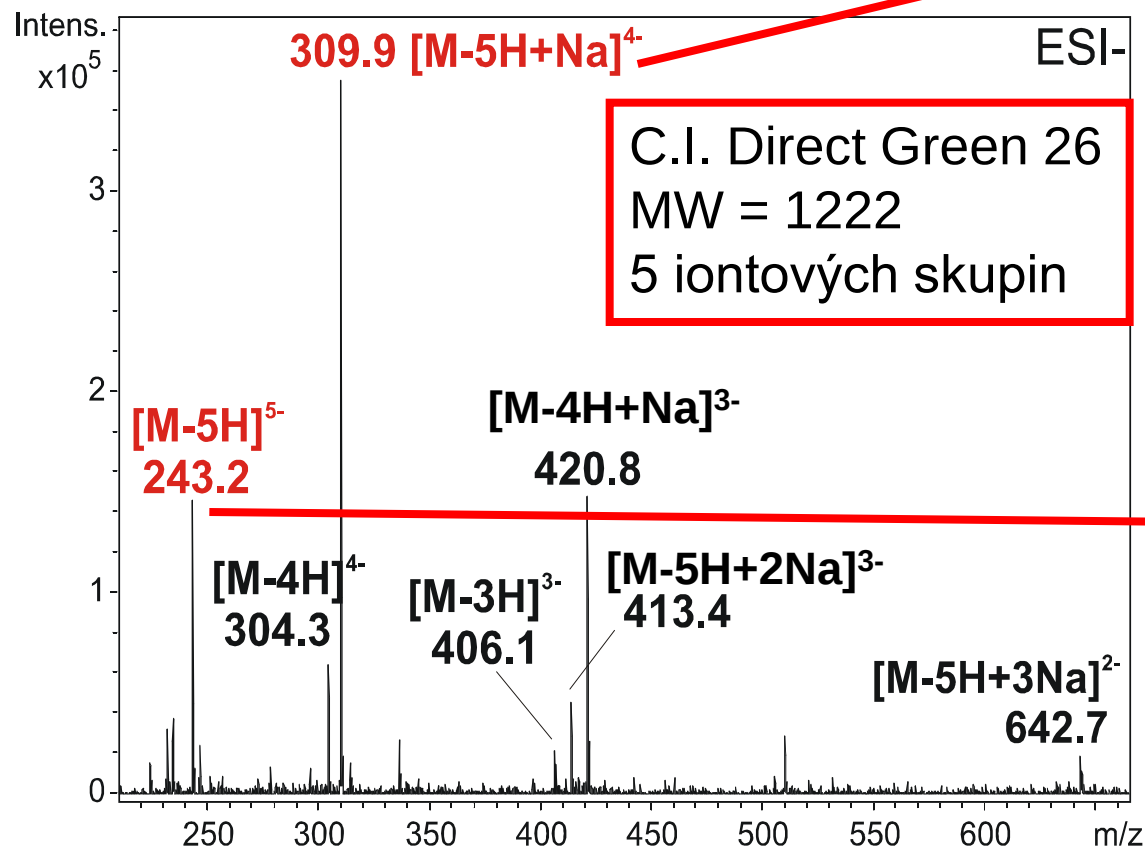
$$A: M_R = 1696 * 10 - 10 = 16950$$

$$B: M_R = 1542 * 11 - 11 = 16951, \text{ atd.}$$

- pak zprůměrování a výpočet M_R (tzv. **dekonvoluce**), vše automaticky softwarově

Určení MW a počtu iontových skupin

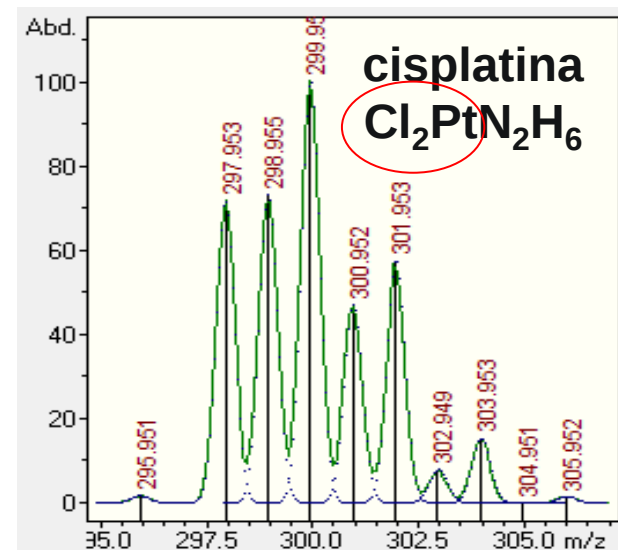
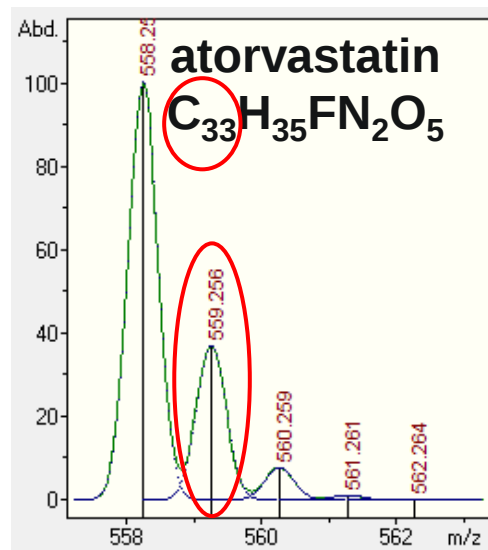
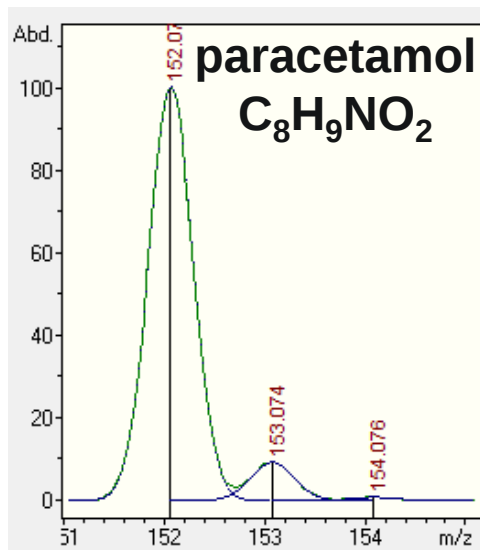
- série iontů $[M-xH]^{x-}$ a $[M-(x+y)H+yNa]^{x-}$
- maximální pozorovaný náboj x a/nebo maximální počet vyměnitelných protonů y = počet iontových skupin



3. Určení elementárního složení

3. Určení elementárního složení

- z kolika a z jakých atomů je molekula složena
 - porovnání experimentální a teoretické izotopické distribuce → charakteristické zastoupení M a M+2 izotopů - Cl (3:1), Br (1:1), polyizotopická obálka některých atomů – Ge, Sn, Hg, Pd, Pt (organokovové sloučeniny) atd.
 - pro vysokou správnost určení hmoty je nutná správná kalibrace hmotnostní stupnice - čím menší chyba, tím je menší počet možných kombinací atomů pro danou m/z, návrhy pomocí softwaru, které jsou běžně dostupné (často součástí komerčních softwarů)
 - nejlépe analyzátor s vysokou rozlišovací schopností (FT-ICR, orbitrap, QqTOF)



3. Určení elementárního složení

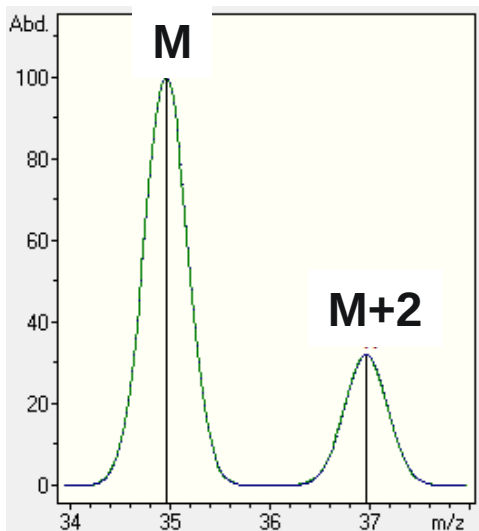
Defekty atomových hmotností

Izotopické zastoupení

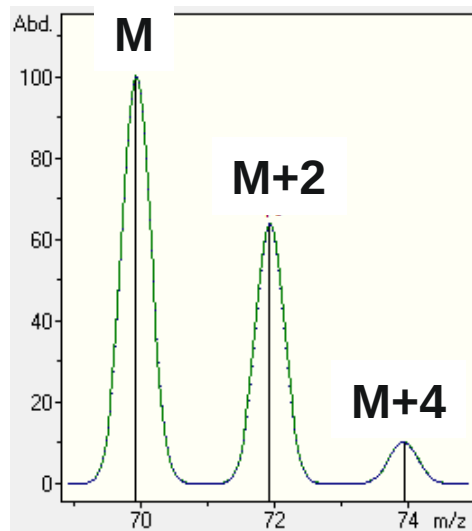
Prvek	Nominální atomová hmotnost [Da]	Hmotnostní schodek [mDa]	Přírodní zastoupení izotopů			Typ prvku
			M [%]	M+1 [%]	M+2 [%]	
H	1	7.8	100	0.015		"M"
C	12	0	100	1.1		"M+1"
N	14	3.1	100	0.37		"M+1"
O	16	-5.1	100	0.04	0.2	"M+2"
F	19	-1.6	100			"M"
Si	28	-23.1	100	5.1	3.4	"M+2"
P	31	-26.2	100			"M"
S	32	-27.9	100	0.79	4.4	"M+2"
Cl	35	-31.1	100		32	"M+2"
Br	79	-81.7	100		97.3	"M+2"
I	127	-95.5	100			"M"

3. Určení elementárního složení - izotopy

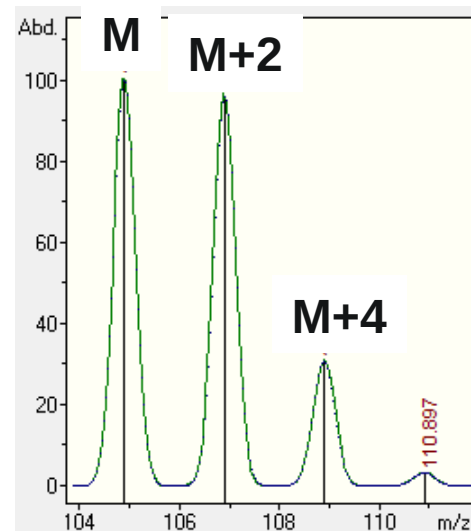
Cl



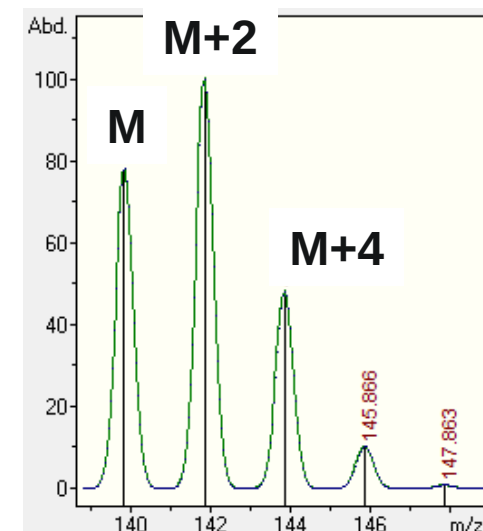
Cl₂



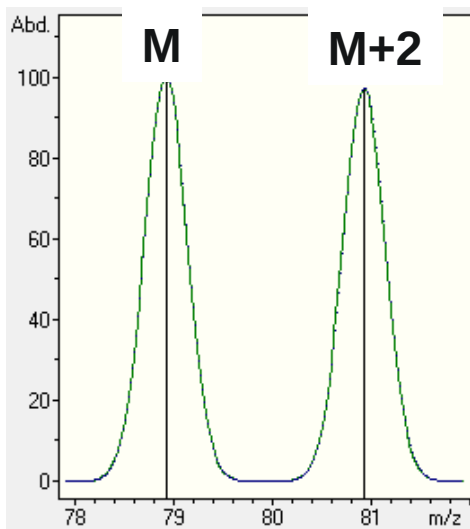
Cl₃



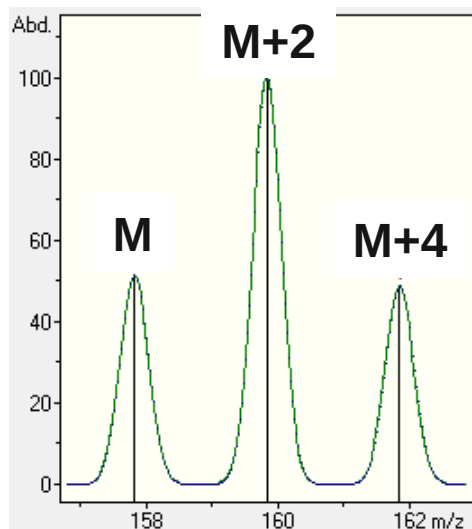
Cl₄



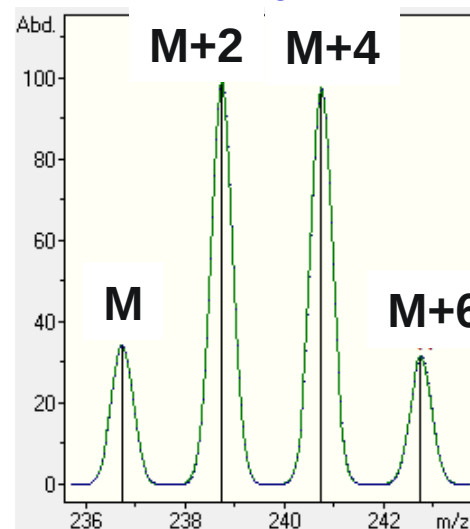
Br



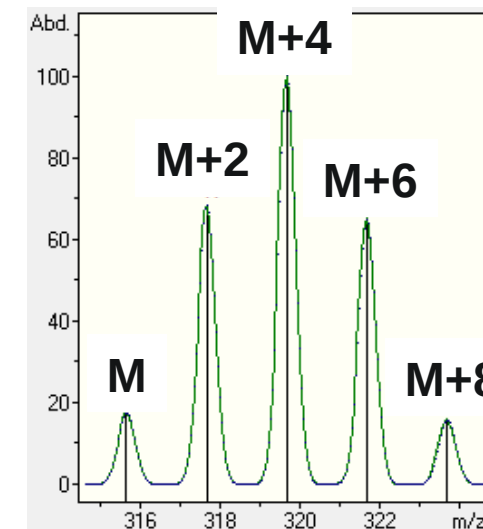
Br₂



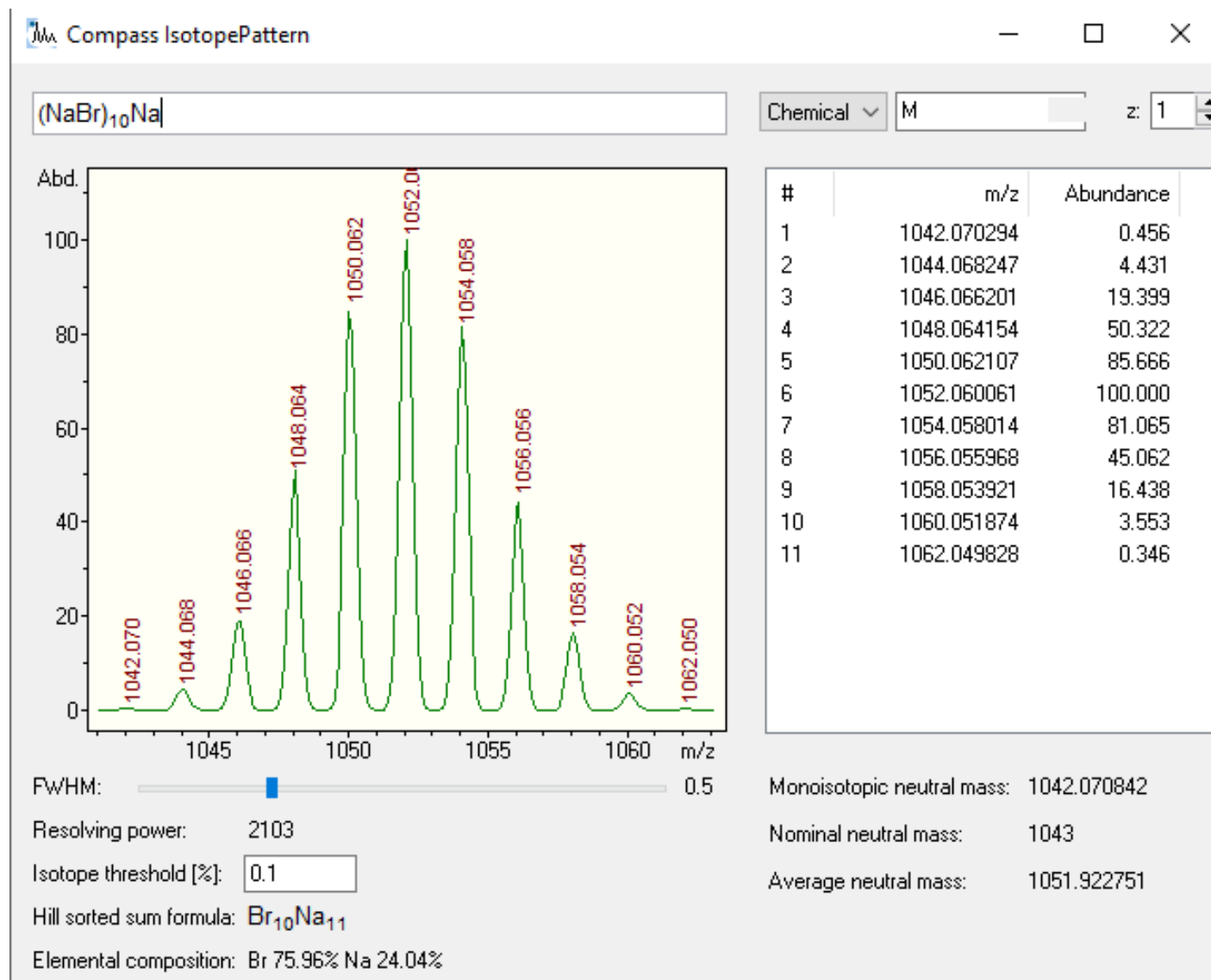
Br₃



Br₄

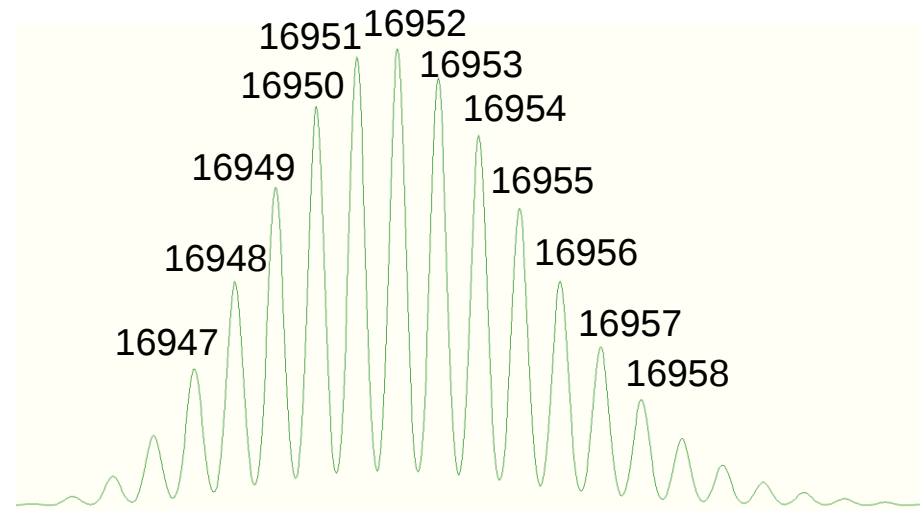
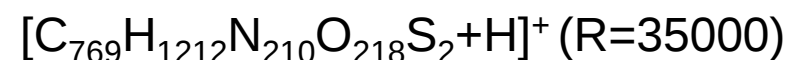
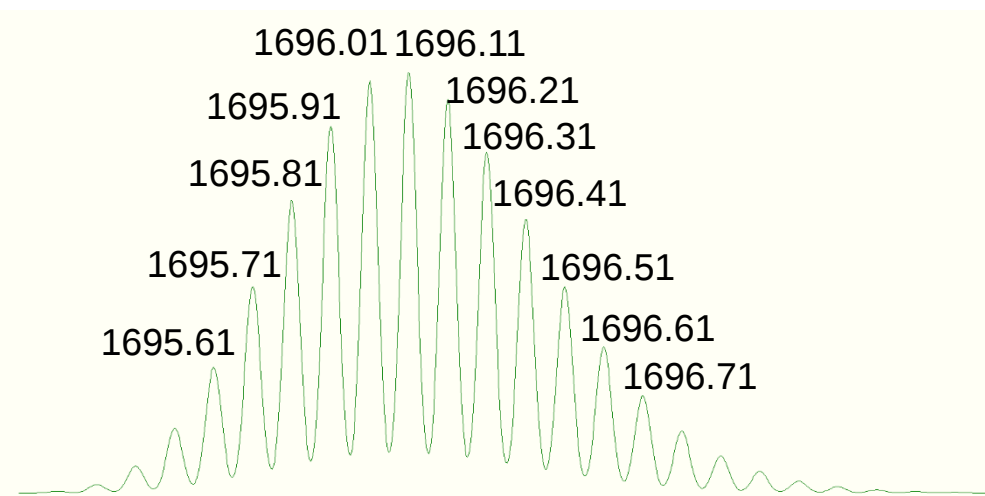
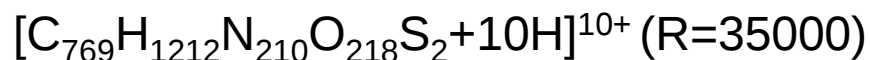
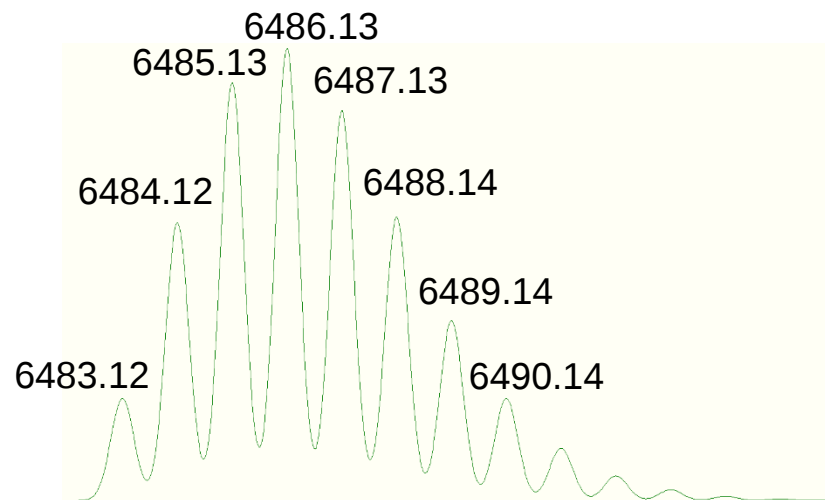
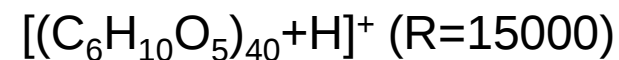
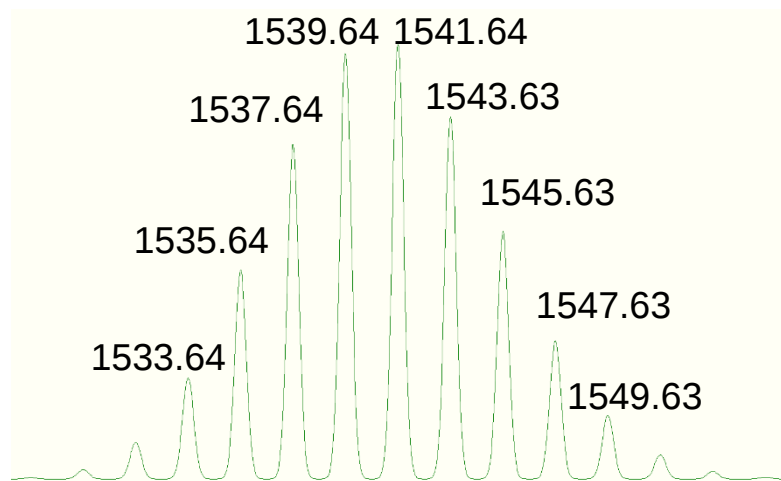


3. Určení elementárního složení - izotopy

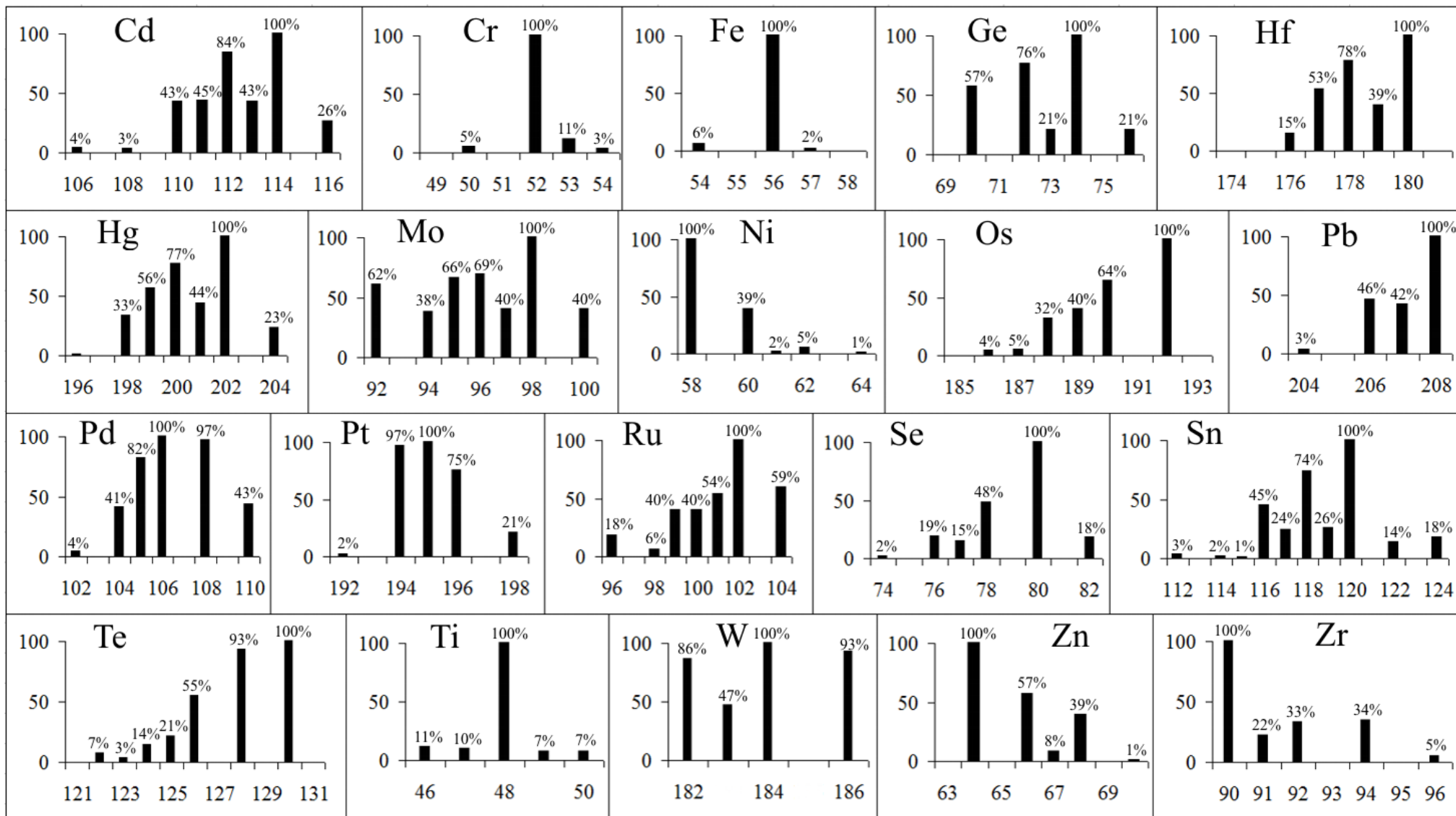


Když v elementárním složení není prvek, který obsahuje M+1 izotop (např. NaCl, NaBr), tak se v izotopické distribuci nikdy neobjeví izotopy lichého typu M+1 M+3, M+5 apod.

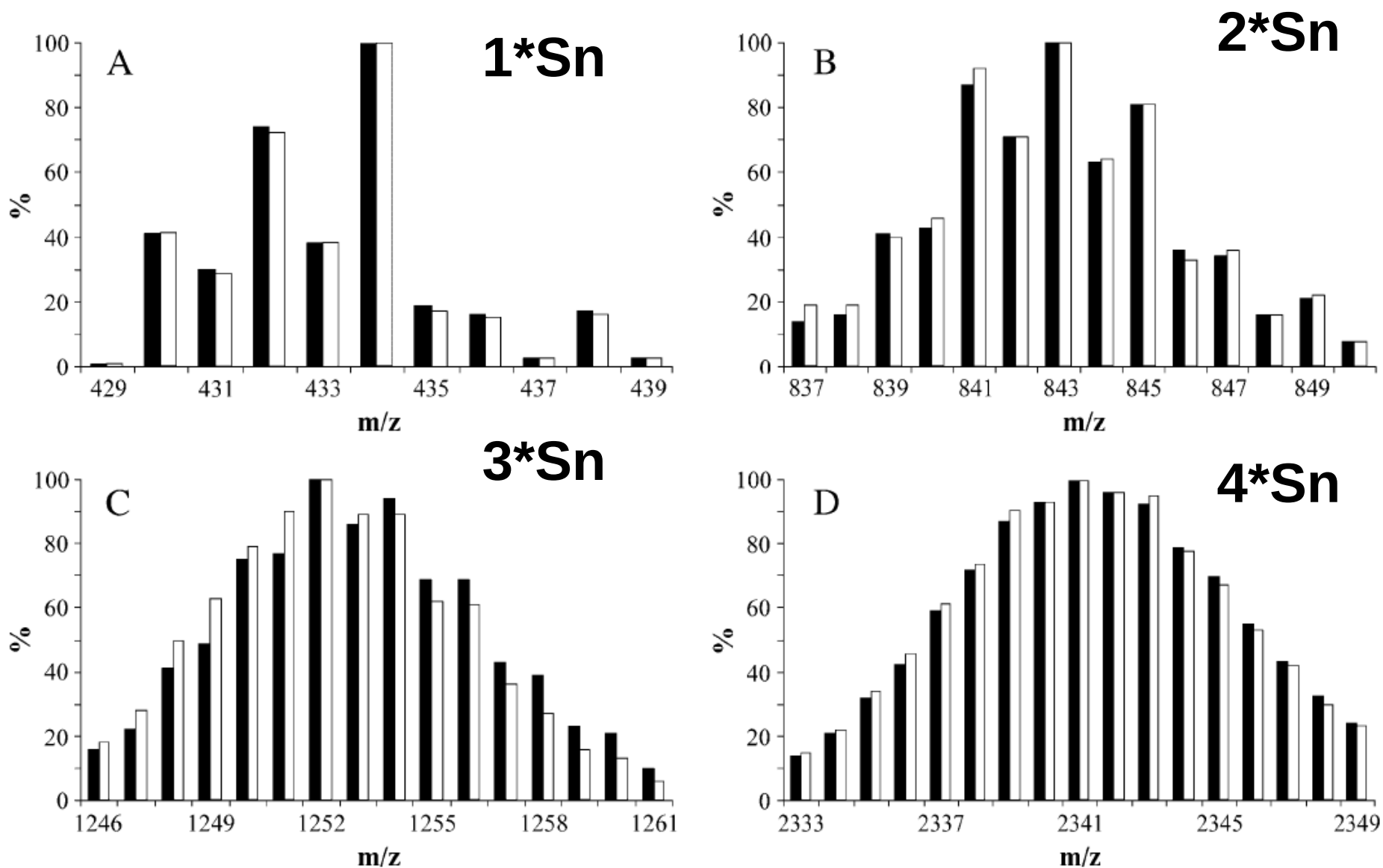
3. Určení elementárního složení - izotopy



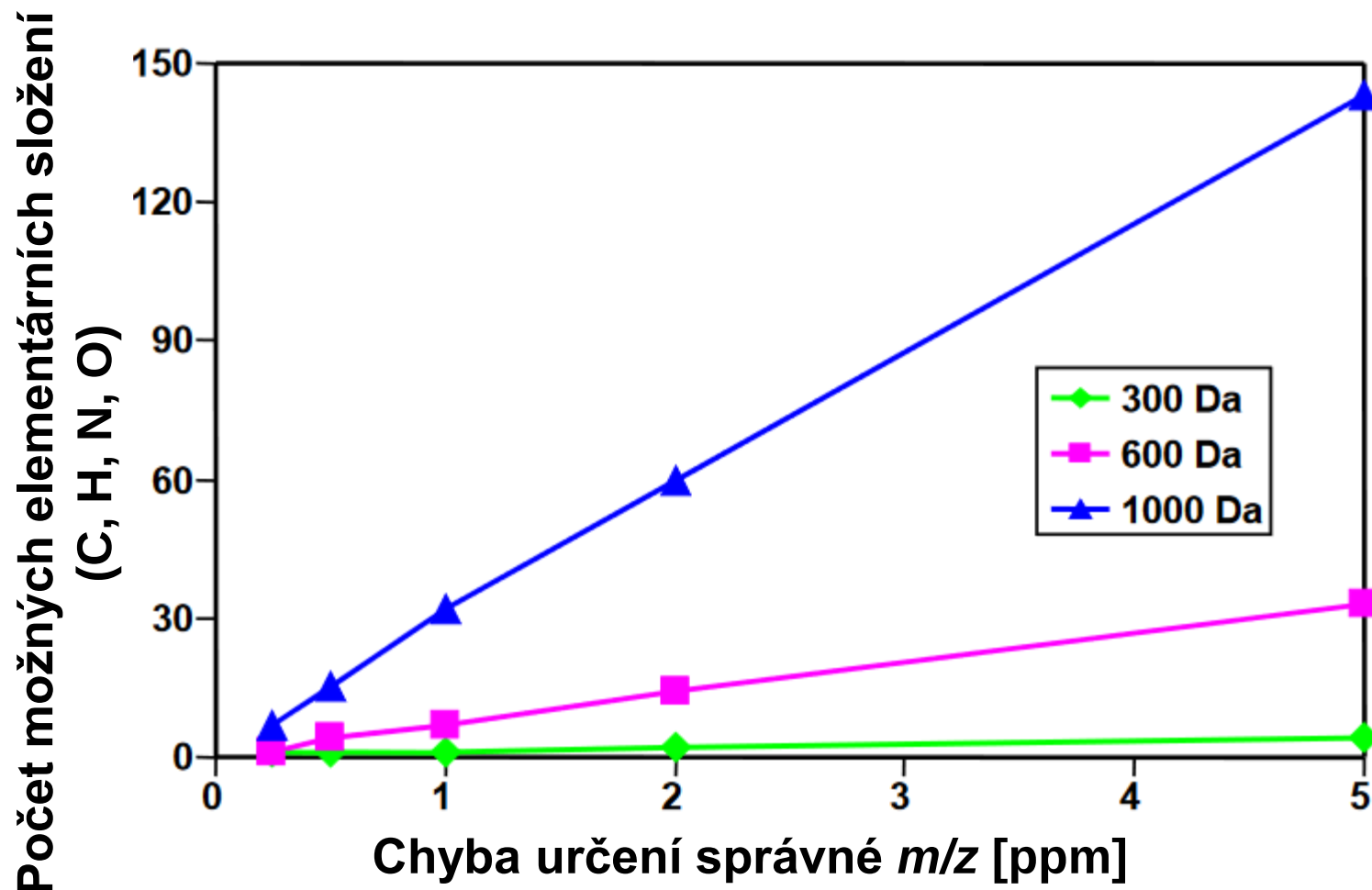
3. Určení elementárního složení - izotopy



3. Určení elementárního složení - izotopy



3. Určení elementárního složení



Počet možných elementárních složení vzrůstá s m/z a chybou určení → je potřeba definovat další pravidla (omezení) pro snížení počtu návrhů.

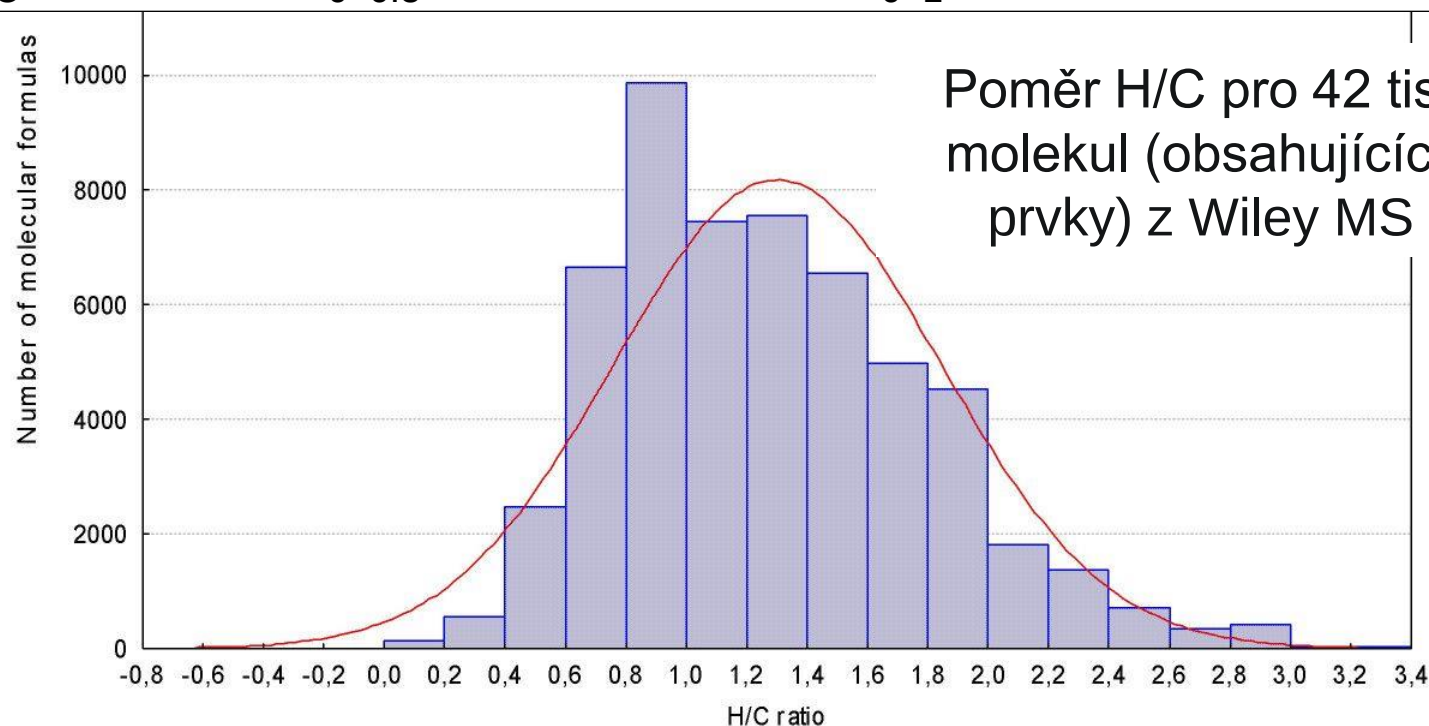
3. Pravidla při určování elementárního složení

Množství návrhů elementární složení roste s $\uparrow m/z$ a $\downarrow R$ – nutná omezení

- hledání jen očekávaných (logických) prvků – C, H, O, N, S, P (u molekulárních aduktů + Na, K), pokud očekáváme, tak případně i halogeny
- většinou pouze sudý počet elektronů (radikály vyhledávány nejsou), N pravidlo.
- charakteristická izotopická distribuce - polyizotopické prvky - C, H, K, S, Cl, atd.
- H/C poměr – výběr logických kombinací (většinou $0.5 < \mathbf{H/C} < 2$), ale jsou i extrémní poměry, např. CH_6N_2 (methylhydrazin) nebo C_8HN_5 (tetracyanopyrrol)
- poměr N, O, P, S versus C
- Ověření $R + \text{DB}$ (počet míst nenasycenosti) = $x - \frac{1}{2} y + \frac{1}{2} z + 1$ (x je počet čtyřvazných atomů např. C, Si; y je počet jednovazných atomů, např. H, halogeny; z je počet trojvazných atomů, např. N, P)

3. Pravidla při určování elementárního složení

Element ratios	Common range (covering 99.7%)	Extended range (covering 99.99%)	Extreme range (beyond 99.99%)
H/C	0.2–3.1	0.1–6	< 0.1 and 6–9
F/C	0–1.5	0–6	> 1.5
Cl/C	0–0.8	0–2	> 0.8
Br/C	0–0.8	0–2	> 0.8
N/C	0–1.3	0–4	> 1.3
O/C	0–1.2	0–3	> 1.2
P/C	0–0.3	0–2	> 0.3
S/C	0–0.8	0–3	> 0.8
Si/C	0–0.5	0–1	> 0.5



Dusíkové pravidlo

- **Pro ionty EE^+**
- lichá hodnota m/z (např. H_2O+H) znamená sudý počet dusíků, sudá hodnota m/z (např. NH_3+H) lichý počet dusíků
- platí pro běžné prvky (C, H, N, O, F, Si, P, S, Cl, Br, I)
- proč toto pravidlo? dusík je jediný z běžných organických prvků, který má sudé atomové číslo a lichou vaznost, všechny ostatní mají obojí buď liché nebo sudé
- i v měkkých ionizačních technikách můžeme někdy pozorovat lichý počet elektronů – tzn. $M^{+\cdot}$ (u technik APCI, DART – běžné), u nitro sloučenin ...

Počet dusíků	m/z lichá	m/z sudá
0, 2, 4, ... (sudý)	EE^+	$OE^{+\cdot}$
1, 3, 5, ... (lichý)	$OE^{+\cdot}$	EE^+

Ukázka aplikace softwaru pro identifikaci elementárního složení iontů

Generate Molecular Formula

Min:
Max:

Generate
Save Results...
Help

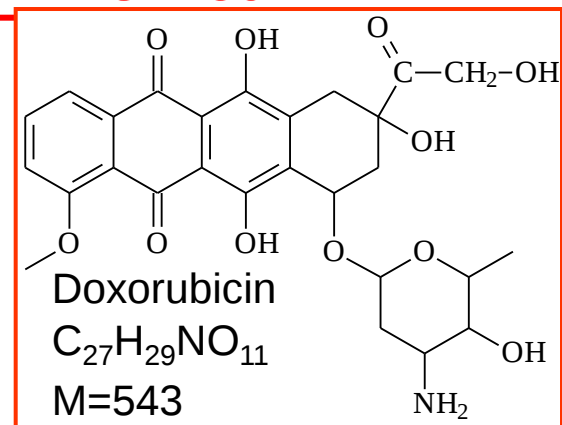
Note: for $m < 2000$ the elements C, H, N, and O are considered implicitly.

Measured m/z : 542.1677 Tolerance: 2 mDa Charge: -1

C, H, N, O

#	Mol. Formula	m/z	err [mDa]	lerr [ppm]	err [ppm]	mean err [ppm]	Sigma	Sigma Rank	rdp	N rule	ez
1	C ₂₇ H ₂₈ N ₁ O ₁₁	542.1668	-0.95	1.8	-1.8	-1.0	0.0071	1	14.5	ok	even
2	C ₂₈ H ₂₄ N ₅ O ₇	542.1681	0.38	0.7	0.7	1.4	0.0173	2	19.5	ok	even
3	C ₂₅ H ₁₆ N ₁₅ O ₁	542.1668	-0.97	1.8	-1.8	-1.6	0.0199	3	25.5	ok	even
4	C ₂₉ H ₂₀ N ₉ O ₃	542.1695	1.72	3.2	3.2	3.7	0.0289	4	24.5	ok	even
5	C ₁₃ H ₂₀ N ₁₇ O ₈	542.1686	0.89	1.6	1.6	1.4	0.0505	5	12.5	ok	even
6	C ₁₀ H ₁₂ N ₂₇ O ₂	542.1673	-0.46	0.9	-0.9	-1.5	0.0519	6	18.5	ok	even
7	C ₁₂ H ₂₄ N ₁₃ O ₁₂	542.1673	-0.45	0.8	-0.8	-0.9	0.0635	7	7.5	ok	even
8	C ₁₅ H ₃₂ N ₃ O ₁₈	542.1686	0.90	1.7	1.7	2.0	0.0635	8	1.5	ok	even
9	C ₉ H ₁₆ N ₂₃ O ₆	542.1659	-1.80	3.3	-3.3	-3.9	0.0642	9	13.5	ok	even
10	C ₁₁ H ₂₈ N ₉ O ₁₆	542.1659	-1.79	3.3	-3.3	-3.3	0.0767	10	2.5	ok	even
11	C ₄₀ H ₂₀ N ₃	542.1663	-1.47	2.7	-2.7	-1.5	0.0786	11	32.5	ok	even
12	H ₂₈ N ₁₅ O ₁₉	542.1691	1.40	2.6	2.6	1.1	0.1319	12	-5.5	ok	even
13	C ₂ H ₄₀ N ₁ O ₂₉	542.1691	1.41	2.6	2.6	3.2	0.1460	13	-16.5	ok	even

☐ Automatically locate monoisotopic peak Maximum number of formulae: 200
☐ Check rings plus double bonds Minimum: Maximum:
☒ Apply nitrogen rule Electron configuration: even
☐ Filter H/C element ratio Minimum H/C: Maximum H/C: 3
☐ Estimate carbon number ☐ Generate immediately
Save for Reporting Show Pattern



542.1677

578.1442

616.1001

690.0322

00

600

700

m/z

Dusíkové pravidlo → lichý počet N

sudý počet elektronů

parametr sigma (Bruker) - správnost hodnoty m/z a relativní intenzity pro všechny izotopy (užitečné pro výběr správného elementárního složení)

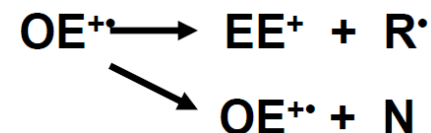
4. MS/MS pro získání strukturních informací

4. MS/MS - vliv funkčních skupin na fragmentaci

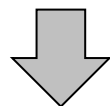
- **štěpení menšího počtu labilních vazeb** ve srovnání s EI → **minimum nebo absence fragmentových iontů** v MS¹ (záleží i na použitých napětích, teplotě v hmotnostním spektrometru a typu analytu) → pro více strukturních informací je tedy potřeba fragmentace pomocí MS/MS nebo MSⁿ (odvození struktury),
- ke štěpení dochází na termochemicky nejméně stabilních vazbách
- **orientační pravidlo** - čím polárnější je funkční skupina, tím větší vliv na ionizační a fragmentační chování lze očekávat
- **místo (de)protonace** často iniciuje mechanismus fragmentace
- **vliv funkčních skupin na fragmentaci lze orientačně seřadit:**

nitrát > fosfát ~ sulfát >> sulfonová kyselina > karboxylová kyselina > hydroxy skupina > nitro skupina > halogeny > ostatní funkční skupiny
- **polyfunkční sloučeniny** - konkurenční mechanismy fragmentace

4. MS/MS pro získání strukturních informací



- pravidlo parity = ve velké většině vznikají opět **ionty se sudým počtem e^-** odštěpením neutrální molekuly - vznik kation-radikálů při fragmentaci iontů se sudým počtem elektronů vyžaduje energeticky nevýhodné rozdělení elektronového páru



existují výjimky



- Výjimky: organokovové sloučeniny, hetrocyklycké sloučeniny, ztráta relativně stabilních radikálů je typická také pro halogenidy ($Cl^\cdot$, $Br^\cdot$); nitro ($NO_2^\cdot$) a nitroso ($NO^\cdot$) sloučeniny; methyl a methoxy substituci ($CH_3^\cdot$ a $CH_3O^\cdot$), polyaromatické látky atd.
- velmi často u aromatických a konjugovaných systémů, které mohou snadno stabilizovat vznikající radikál
- Častější výskyt pro fragmentaci $[M-H]^-$

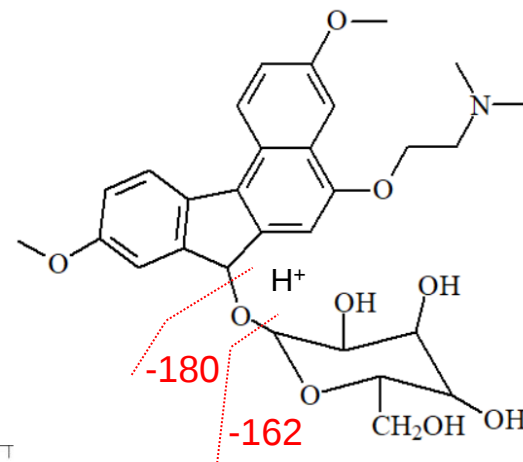
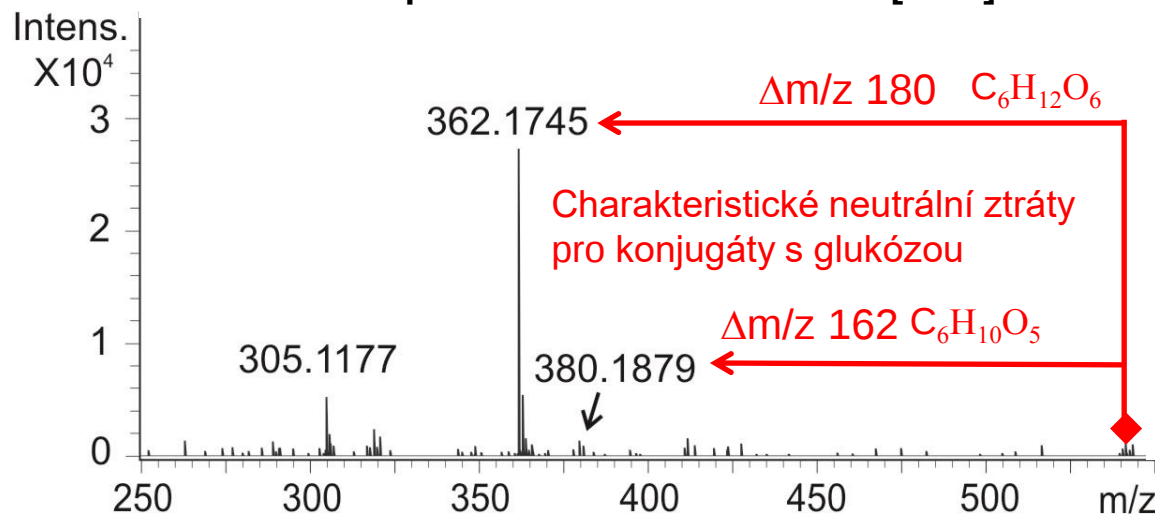
4. MS/MS pro získání strukturních informací

- Fragmentace závisí na typu aktivace prekursoru (CID, UVPD, ETD, atd.) a **získané kinetické energii**
- **Nejčastěji nízkoenergetická CID aktivace iontů ($E_k < 1 \text{ keV}$)** – IT (rezonanční excitace kolizně ochlazeného iontu - preferenčně fragmentační cesty s nejnižší bariérou a navíc „cut-off efekt“ - méně fragmentů), QqQ (průchod urychleného iontu kolizní celou, energie fragmentů může být dostatečná pro následné fragmentace – rozsáhlejší fragmentace)
- **strukturní části** molekuly určíme na základě **fragmentových iontů a neutrálních ztrát**
 - funkční skupiny - většinou poskytují charakteristické ztráty (např. OH: $\Delta m/z=18$ (H_2O), COOH: $\Delta m/z=44$ (CO_2), OSO_3 : $\Delta m/z=80$ (SO_3) atd.)
 - větší celky molekuly - např. postranní řetězce, neutrální ztráty mastných kyselin z esterů (cholesterolestery), konjugační substituenty u metabolitů II fáze (glukuronidace – ztráta 176 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ či 194 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$, sulfatace (OSO_3) – ztráta 80 SO_3 či 98 H_2SO_4)
 - výhodou je vysoká rozlišovací schopnost analyzátoru – rozlišení podobných neutrálních ztrát – např.: CO (27.9949) $\times$ N_2 (28.0061) $\times$ C_2H_4 (28.0313)
- **Informace o izomerii**
 - u polohových izomerů někdy rozdílné intenzity fragmentových iontů
 - určení polohy dvojné vazby (např. u lipidů) - využití vysokoenergetických kolizí ($E_k > 1 \text{ keV}$), fotodisociace, disociace ozonem, pro některé látky (lipidy) specifická fragmentace $[\text{M}+\text{Li}]^+$ apod.

Charakteristické neutrální ztráty a m/z fragmenty

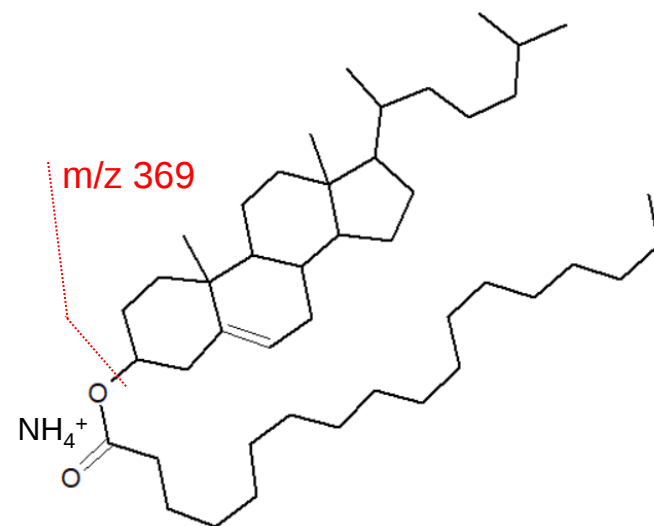
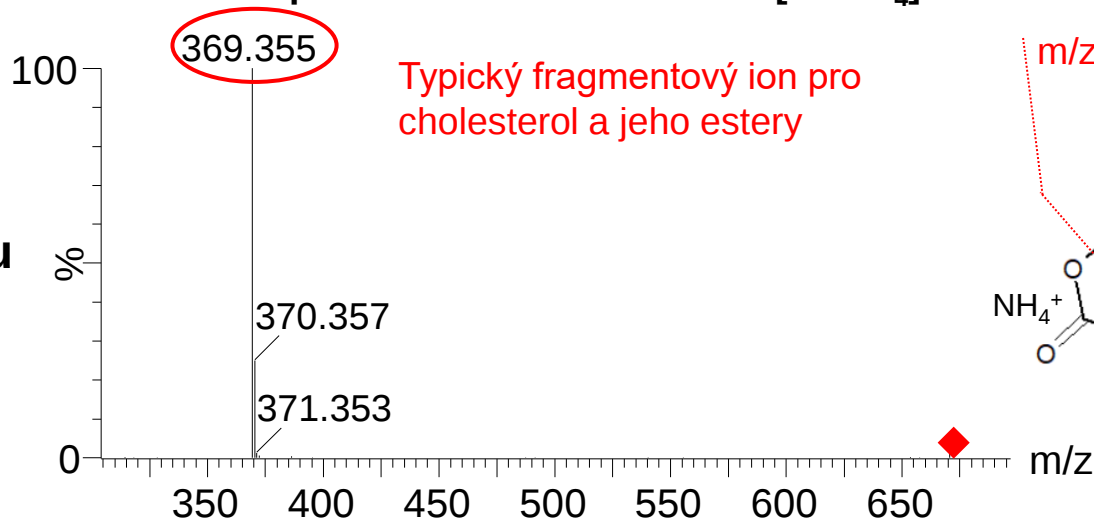
MS/MS spektrum iontu m/z 542.238 $[M+H]^+$

ESI⁺ MS/MS
DMF glukosidu

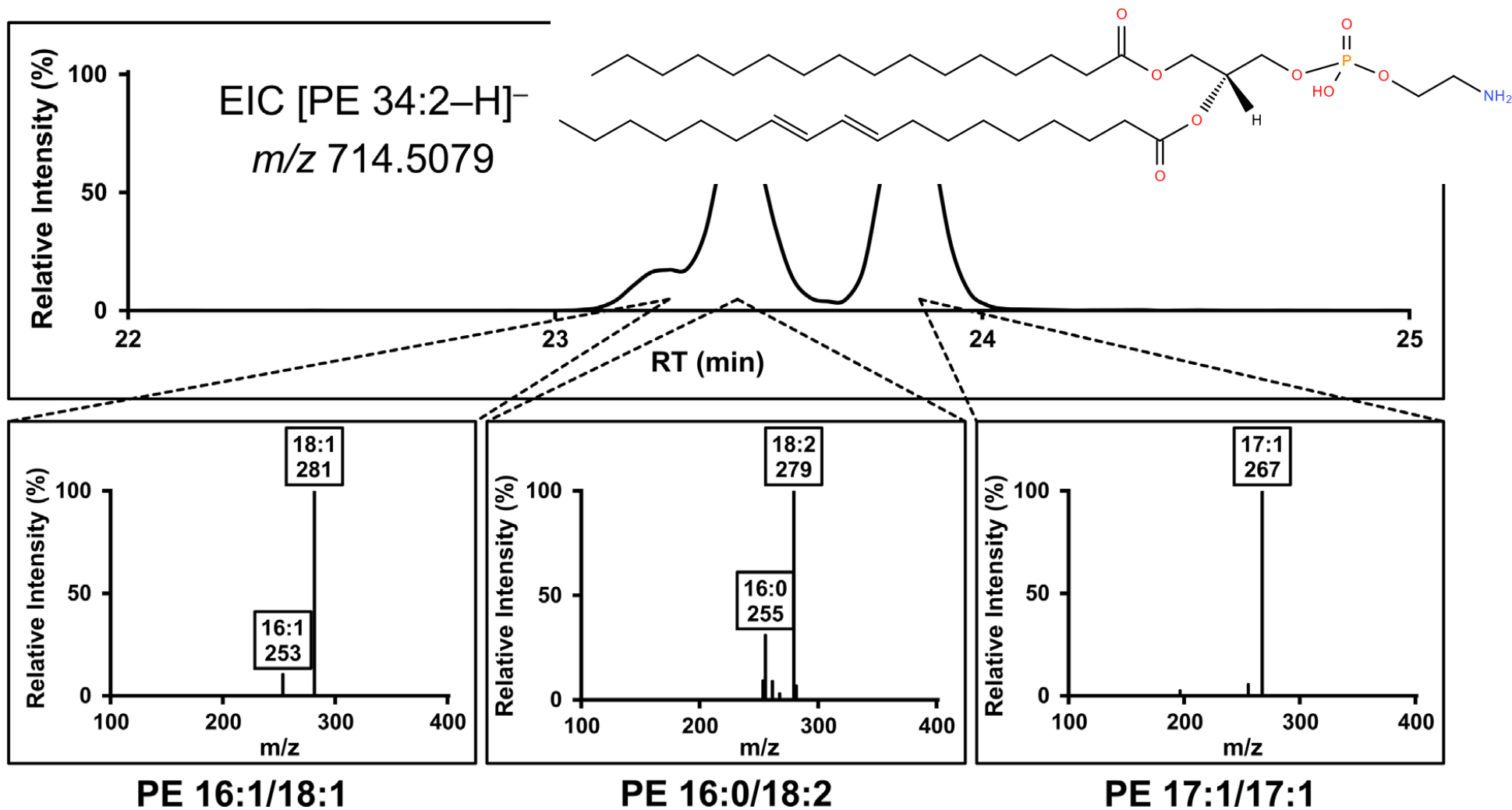


MS/MS spektrum iontu m/z 670.646 $[M+NH_4]^+$

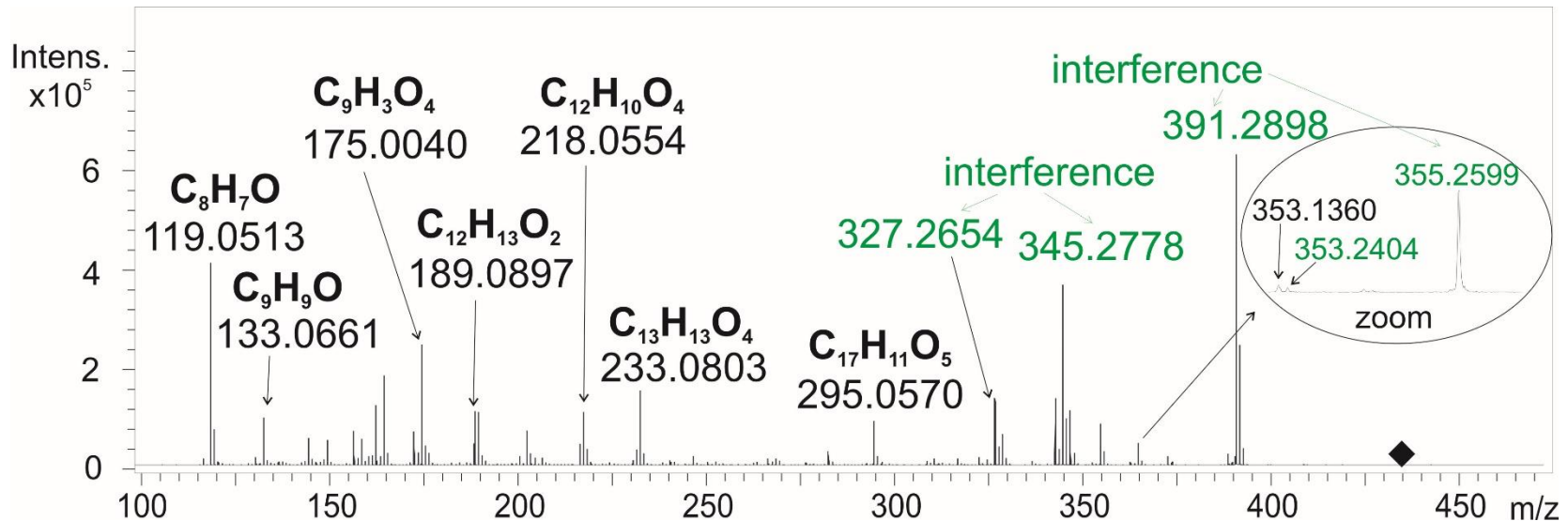
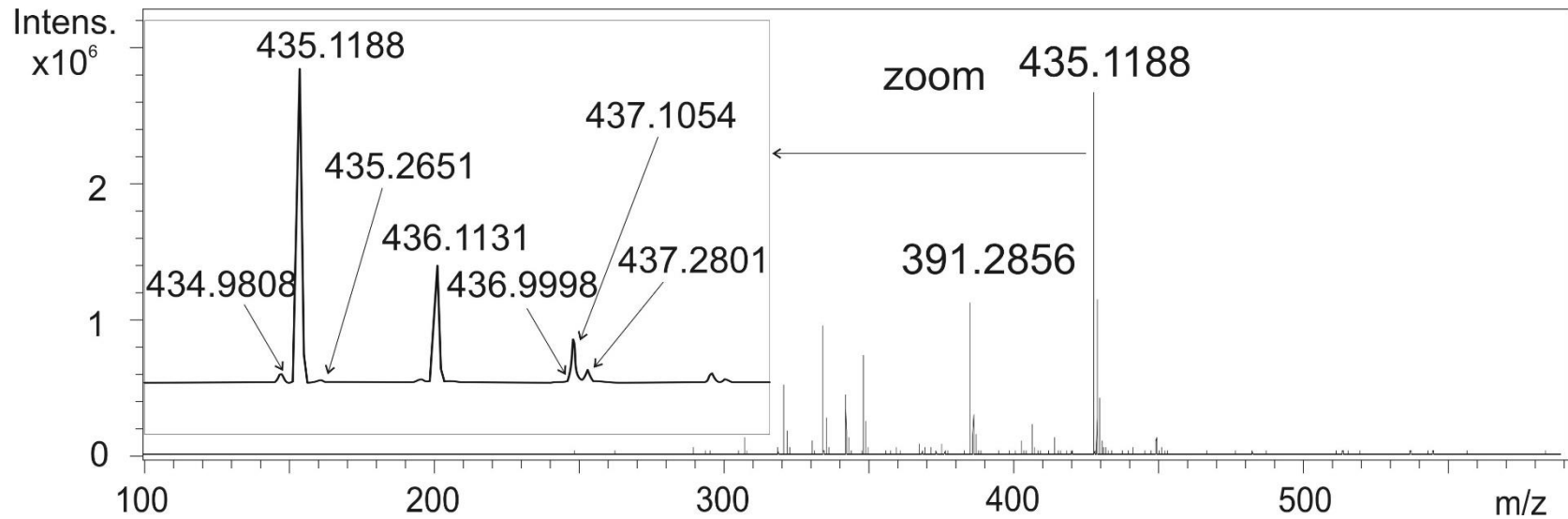
ESI⁺ MS/MS
cholesterol esteru
(CE 18:0)



RP-UHPLC/ESI-MS: separace izomerů a MS²



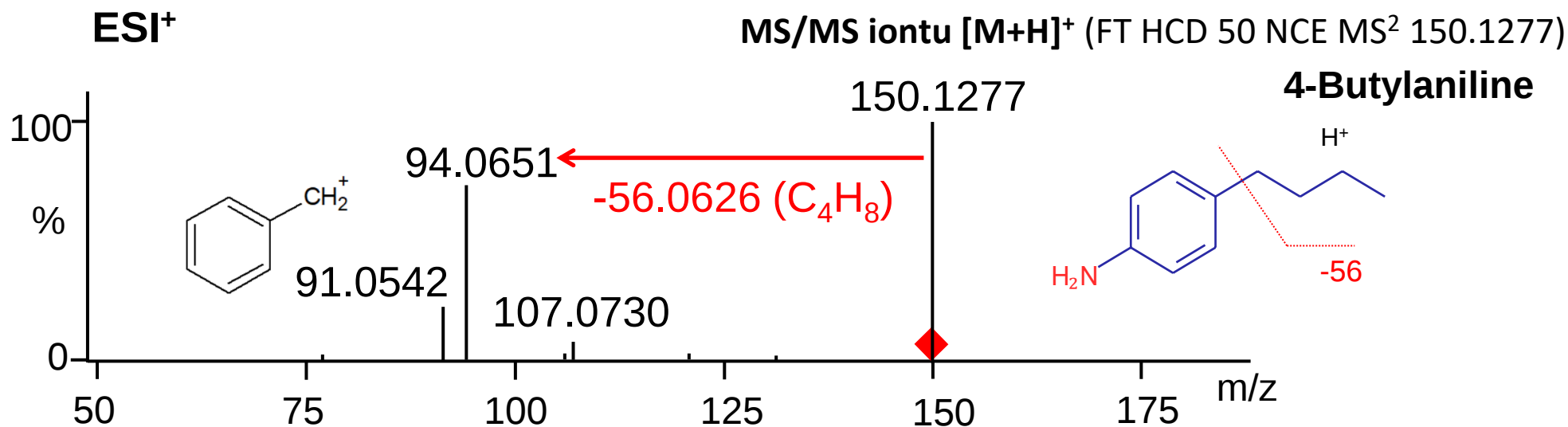
Měření tandemových hmotnostních spekter



!!! Pozor na interferenty blízke hmotnosti

Uhlovodíky (C_xH_y), alkyl/aryl substituce

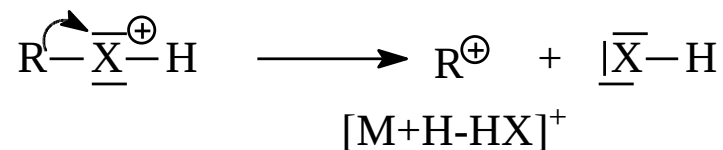
- alkany, alkeny, alkiny, aromáty
- pro uhlovodíky bez funkčních skupin nejvhodnější APCI / APPI v kladném módu, v ESI jen pomocí tvorby aduktů (Li, Ag, Na, apod.)
- pro alkyl substituci na aromatickém nebo obecně cyklickém systému očekávány **ztráty alkenu (nebo alkanu)**, zejména u druhé a další ztráty pro přítomnost více alkylů); pro alkyl substituci na aromatickém jádře (**obecně vazba aromát a CH_2**) je typický ion **m/z 91.05**
- podobně pro aryl substituci jsou obvyklé **neutrální ztráty C_6H_4 ($\Delta m/z$ 76) nebo C_6H_6 ($\Delta m/z$ 78)**
- ztráty alkyl/aryl radikálů jsou méně obvyklé, někdy se vyskytují v záporném módu (zejména pro APCI / APPI)



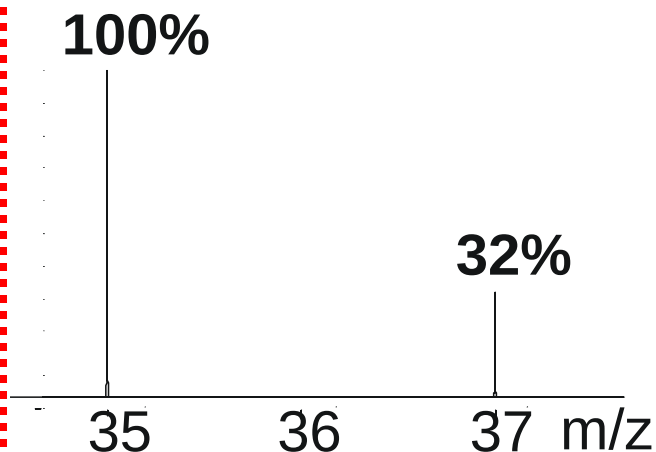
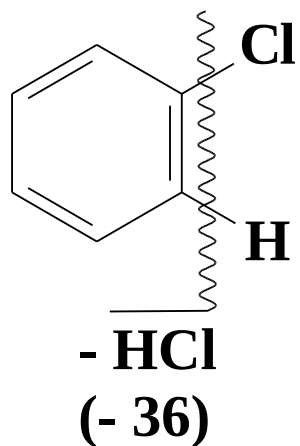
Halogeny (^{19}F , ^{35}Cl , ^{79}Br , ^{127}I)

	Nárůst nominalní hmotnosti (ΔDa)	Posun za desetinou čárkou (mDa)	MS/MS (neutrální ztráty a fragmenty)
Halides (RX)	+18 (F), +34 (Cl), +78 (Br), +126 (I)	-9.4	$[\text{M}+\text{H}-\text{X}]^{+\bullet}$
		-39.0	$[\text{M}+\text{H}-\text{HX}]^+$
		-89.5	
		-103.4	
			$[\text{M}-\text{H}-\text{X}]^{-\bullet}$
			$[\text{M}-\text{H}-\text{HX}]^-$
			$[\text{I}]^-$
			$[\text{Br}]^-$
			$[\text{Cl}]^-$

i-štěpení



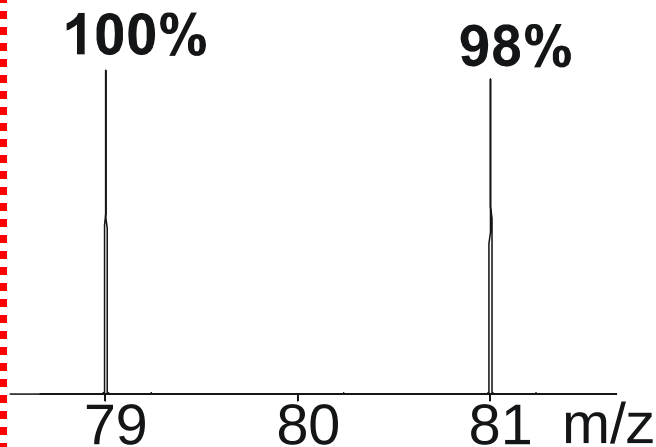
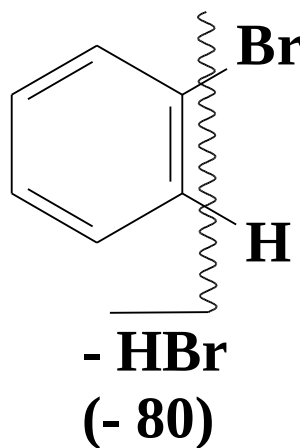
Příklady fragmentací - Halogeny – Cl, Br



Poměr izotopů

$$^{35}\text{Cl} : ^{37}\text{Cl} = 3 : 1$$

$$n * \text{Cl} = (3a + b)^n$$



Poměr izotopů

$$^{79}\text{Br} : ^{81}\text{Br} = 1 : 1$$

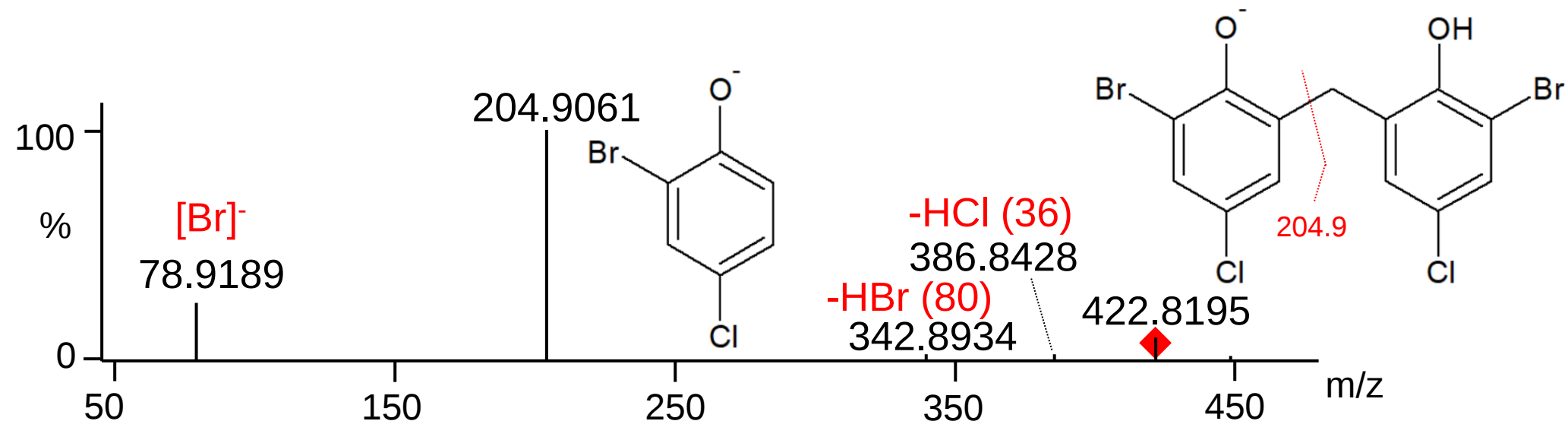
$$n * \text{Br} = (a + b)^n$$

- pro poly- a perhalogenované sloučeniny opakované ztráty HX nebo X· (zejména Br·), při fragmentaci změna izotopické distribuce

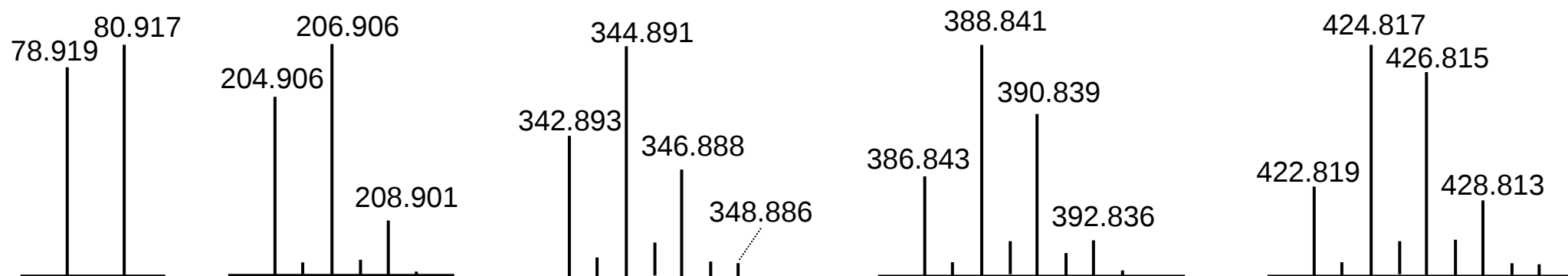
Halogeny (^{19}F , ^{35}Cl , ^{79}Br , ^{127}I)

Bromochlorophen

ESI⁺, MS/MS iontu $[\text{M}-\text{H}]^-$ (FT HCD 30 NCE MS² 422.8195)



Pokud izolujeme prekurzorový ion s dostatečnou izolační šířkou – izotopické píky:



Fosfátová skupina

Phosphate
(RPO_4H_2)

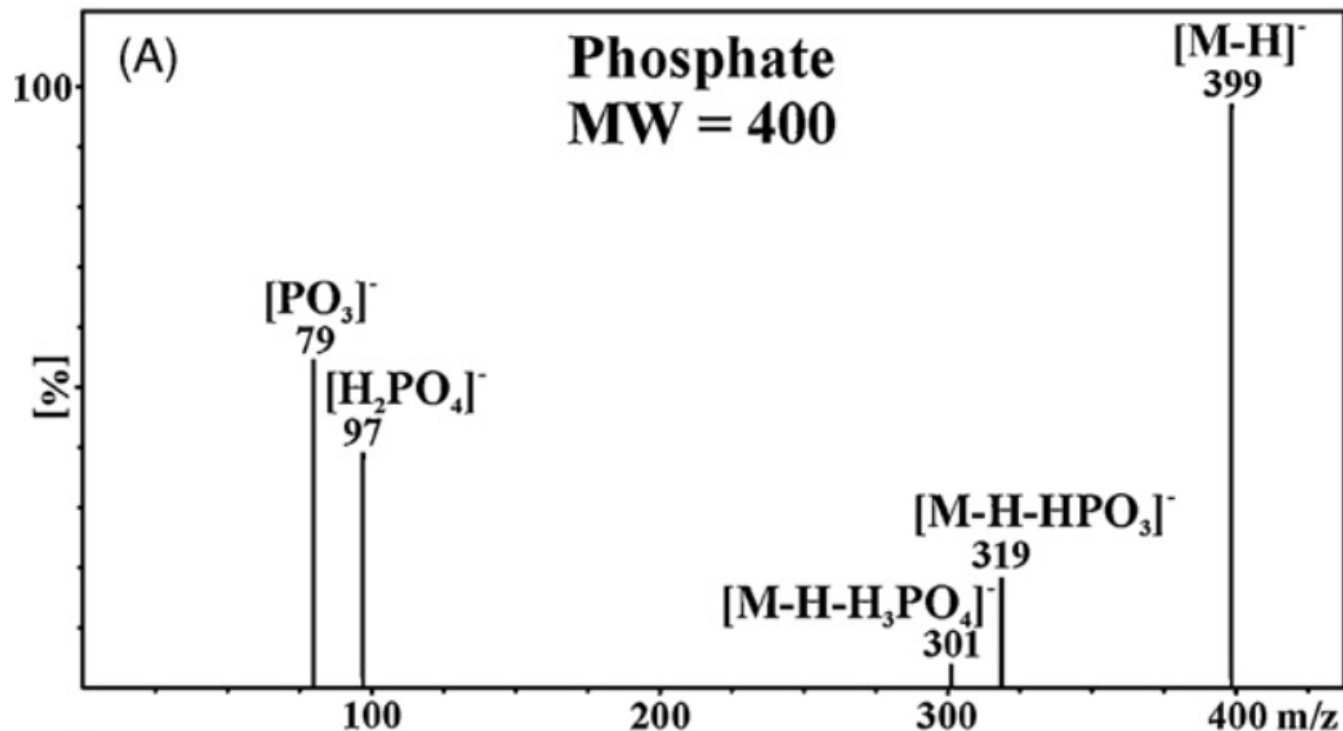
+96

−38.8

Nárůst nominální hmotnosti
(ΔDa)

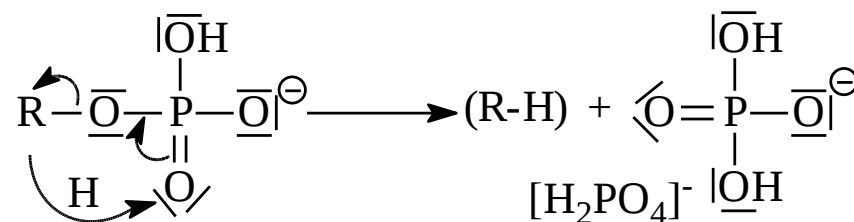
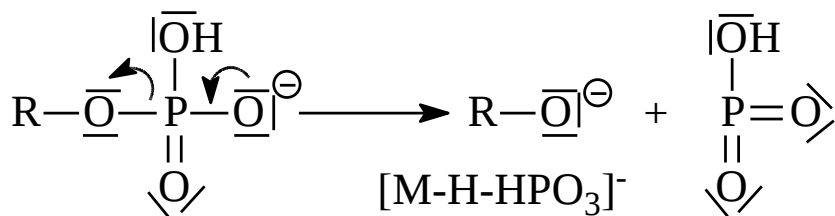
Posun za desetinou čárkou
(mDa)

$[\text{M}-\text{H}-\text{HPO}_3]^-$
 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_3\text{PO}_4]^-$
 $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$
 $[\text{PO}_3]^-$



MS/MS
(neutrální ztráty a fragmenty)

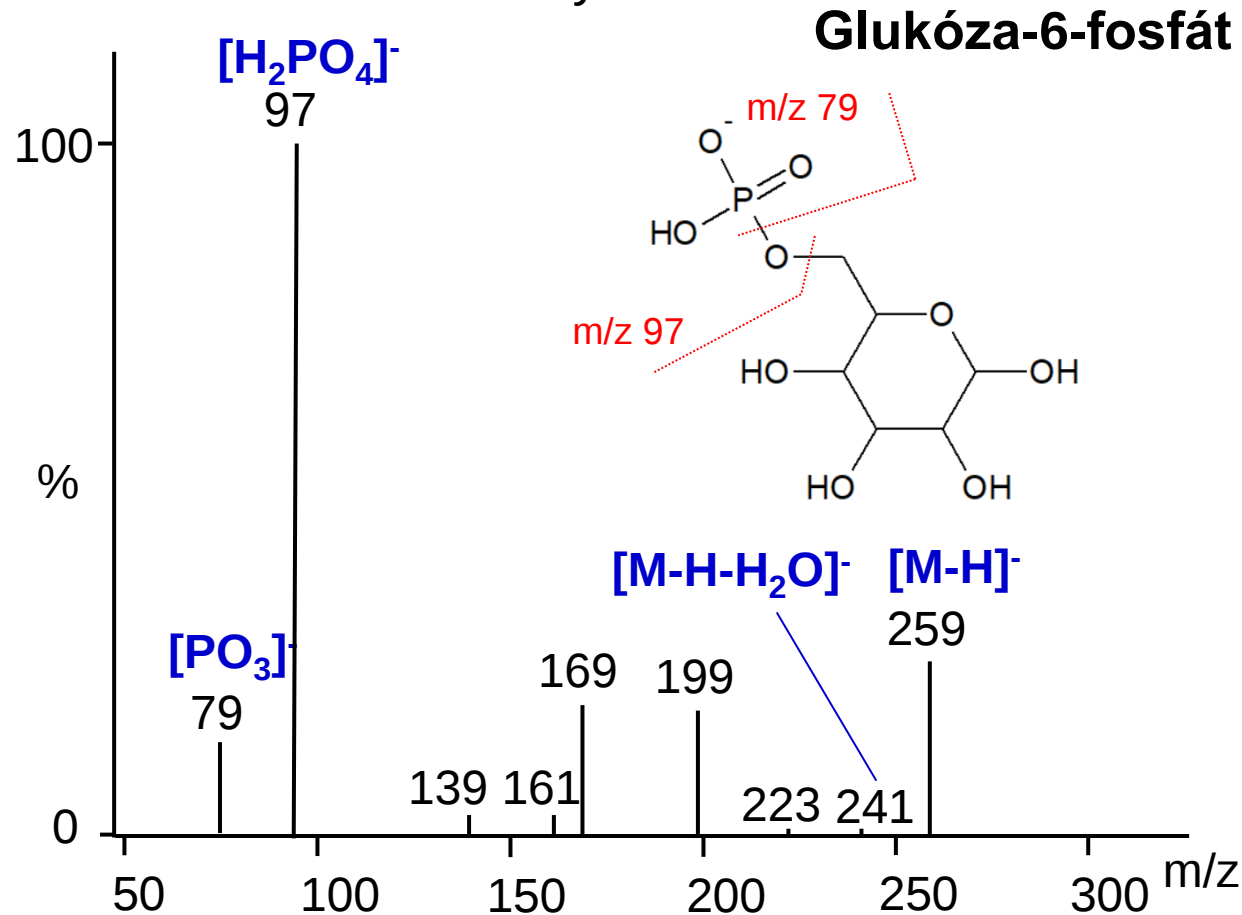
**Fosfor je
monoizotopický**



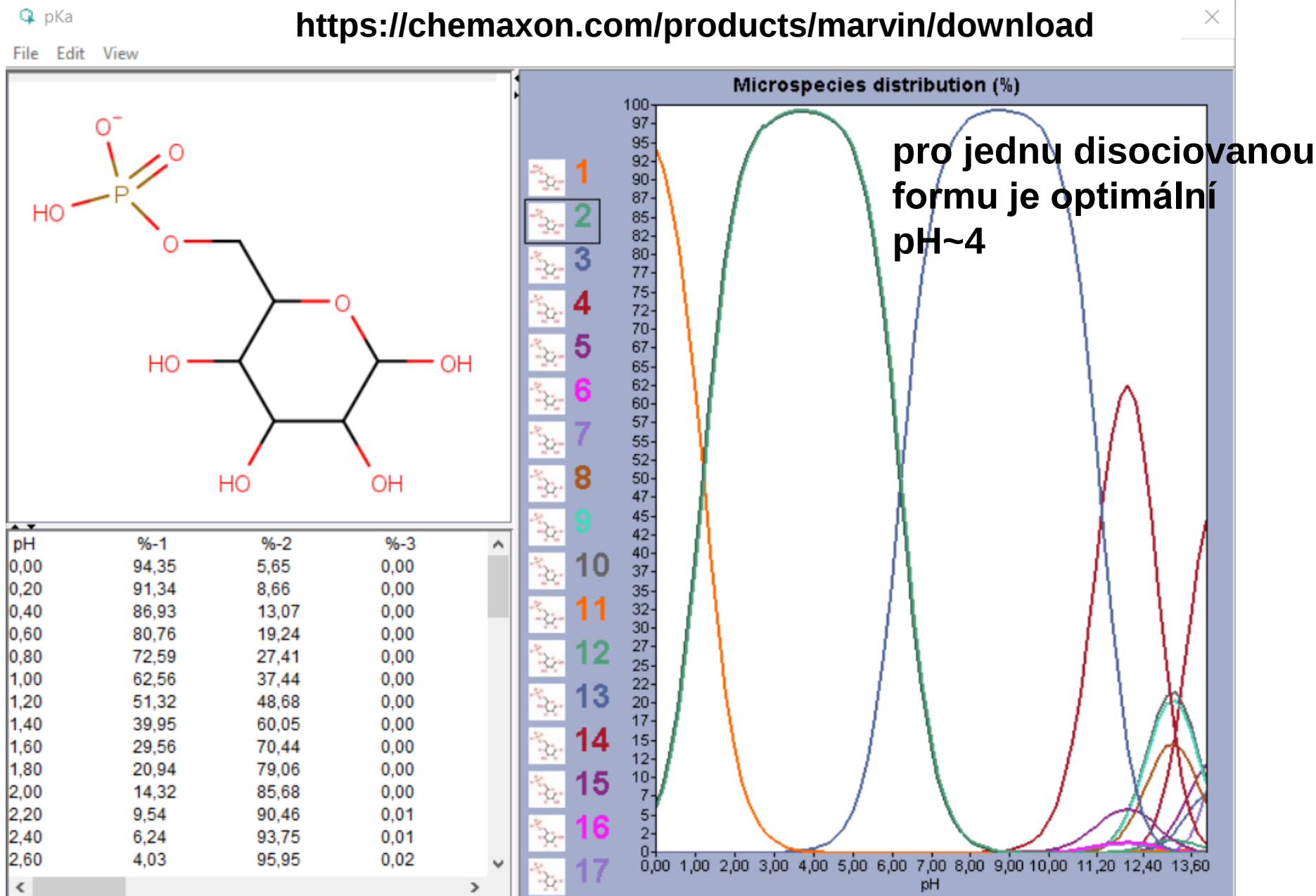
Příklady MS/MS - fosfátová skupina (ROPO₃H₂)

- časté u biomolekul (peptidů, lipidů, cukrů)
- lze měřit nejlépe v ESI-, někdy i ESI+ (fosfolipidy), labilní iontová skupina
- diagnostické fragmenty m/z 79 [PO₃]⁻, 97 [H₂PO₄]⁻
- v pozitivu adukty se sodným iontem a dalšími kationty

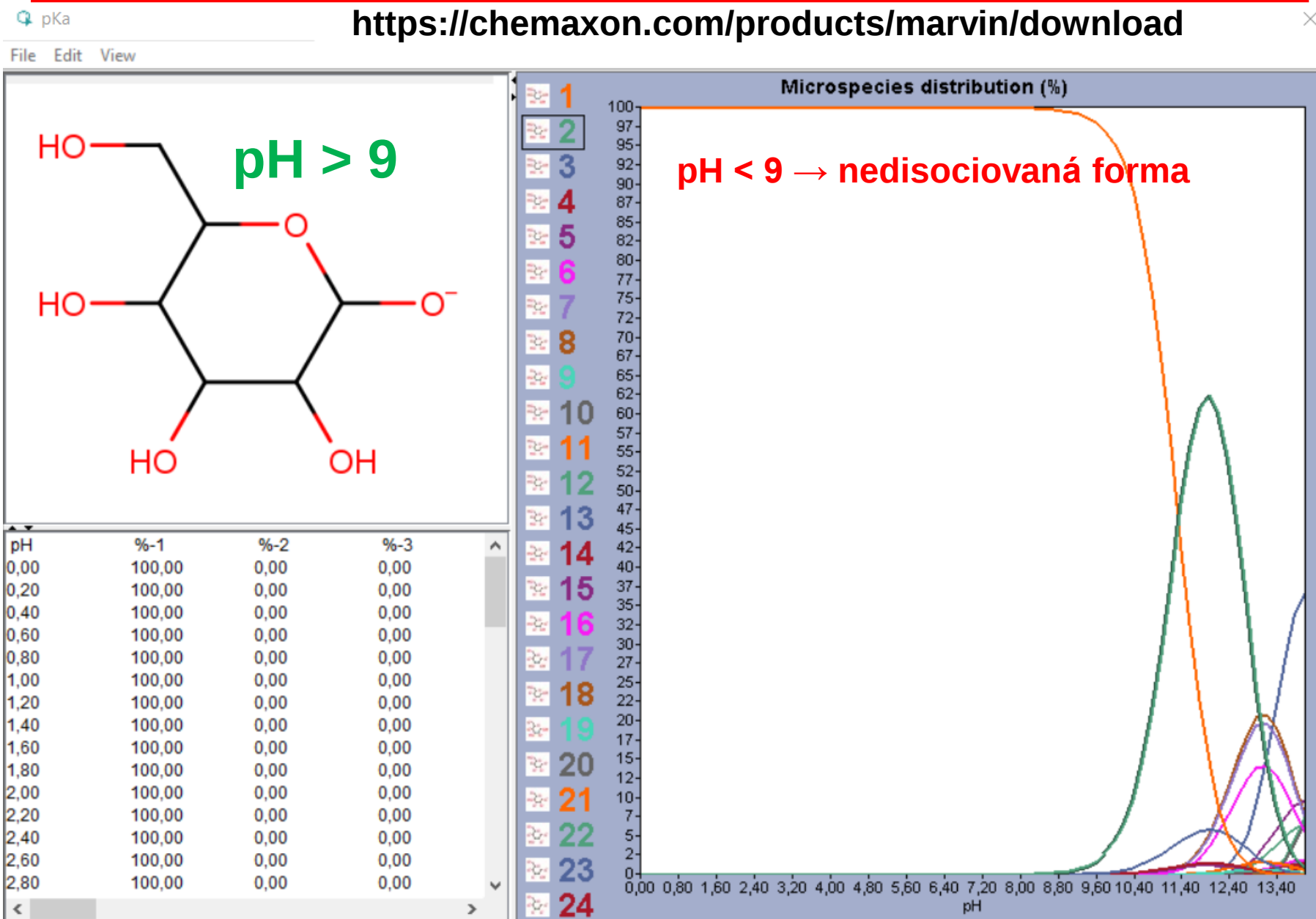
Standard compounds	Diagnostic ion (m/z)
Fru	225 [M + HCOO] ⁻
Glc	225 [M + HCOO] ⁻
Tre	387 [M + HCOO] ⁻
Suc	387 [M + HCOO] ⁻
Maltose	387 [M + HCOO] ⁻
Glc1P	259 [M - H] ⁻
Fru6P	259 [M - H] ⁻
Glc6P	259 [M - H] ⁻
Tre6P	421 [M - H] ⁻
Suc6P	421 [M - H] ⁻
PEP	167 [M - H] ⁻



pKa kalkulace – Marvin software

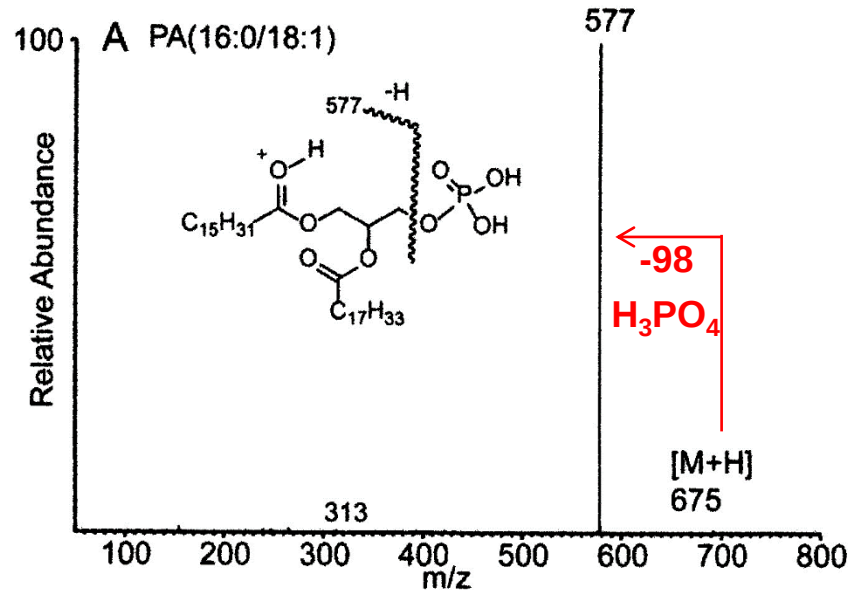


pKa kalkulace – Marvin software



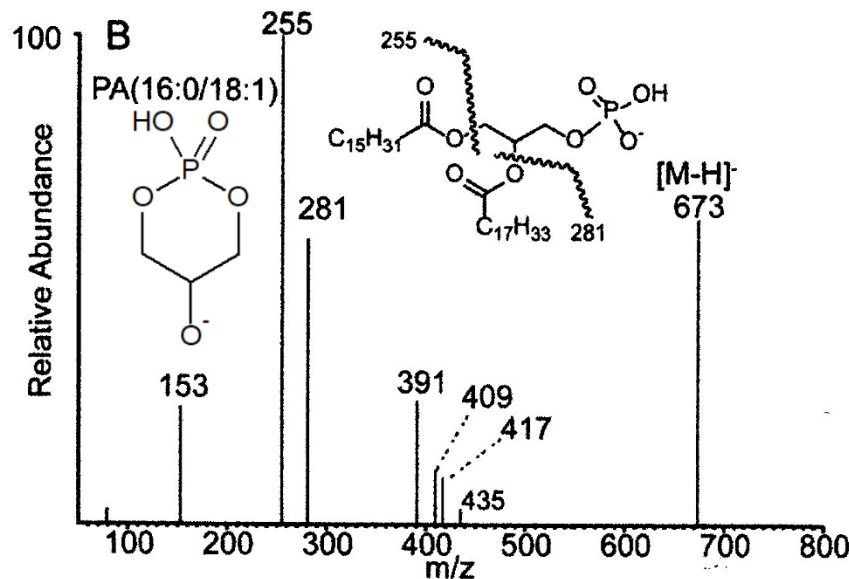
MS/MS kyseliny fosfatidové

ESI⁺
PA 16:0/18:1



ESI⁻
PA 16:0/18:1

- Intenzita karboxylátového aniontu (sn-1 > sn-2)
- Intenzita produktového iontu po NL ketenu nebo RCOOH (sn-2 > sn-1)



Sulfátová skupina

Sulfate
(RSO₄H)

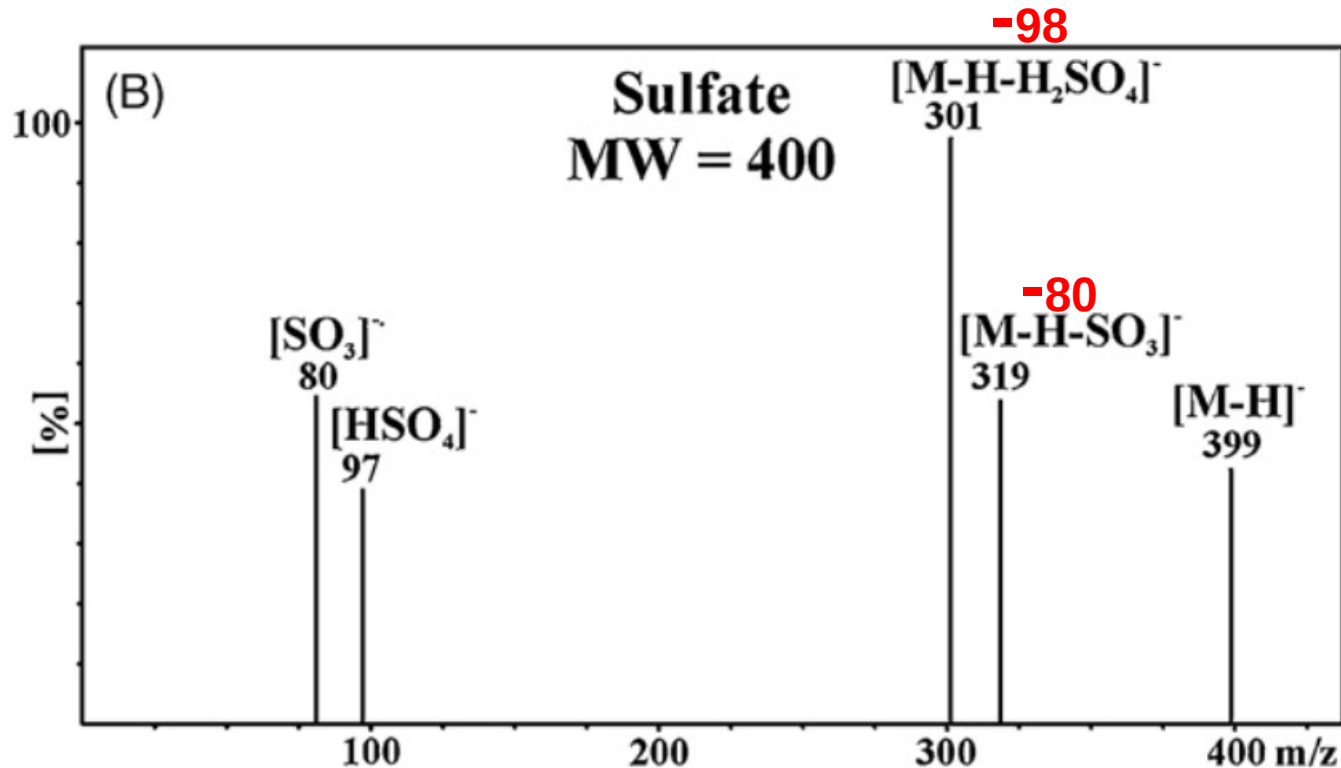
+96

-48.3

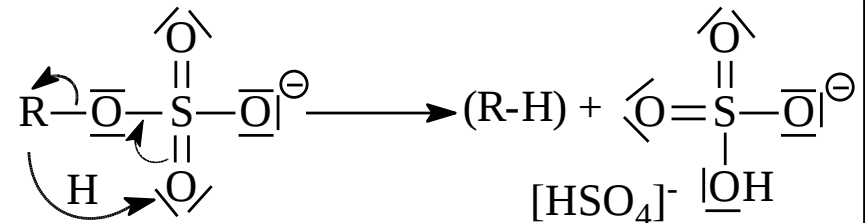
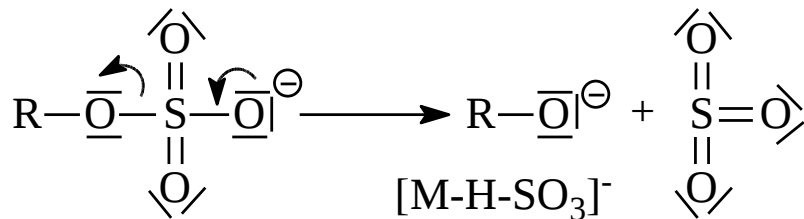
Nárůst nominalní hmotnoti (ΔDa)

Posun za desetinou čárkou (mDa)

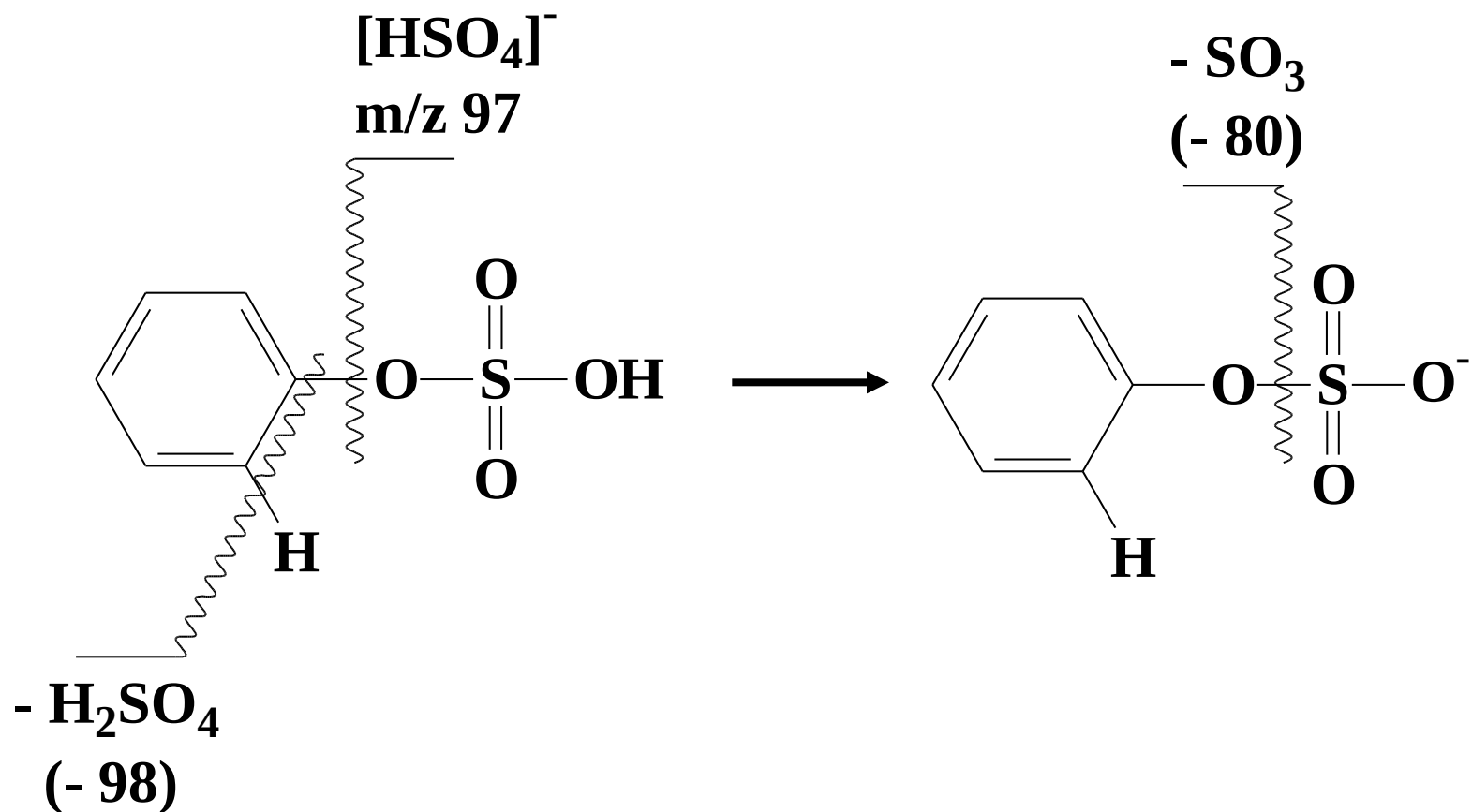
[M-H-SO₃]⁻
[M-H-H₂SO₄]⁻
[HSO₄]⁻



M (³²S) = 100%
M+1 (³³S) = 0.79%
M+2 (³⁴S) = 4.4%

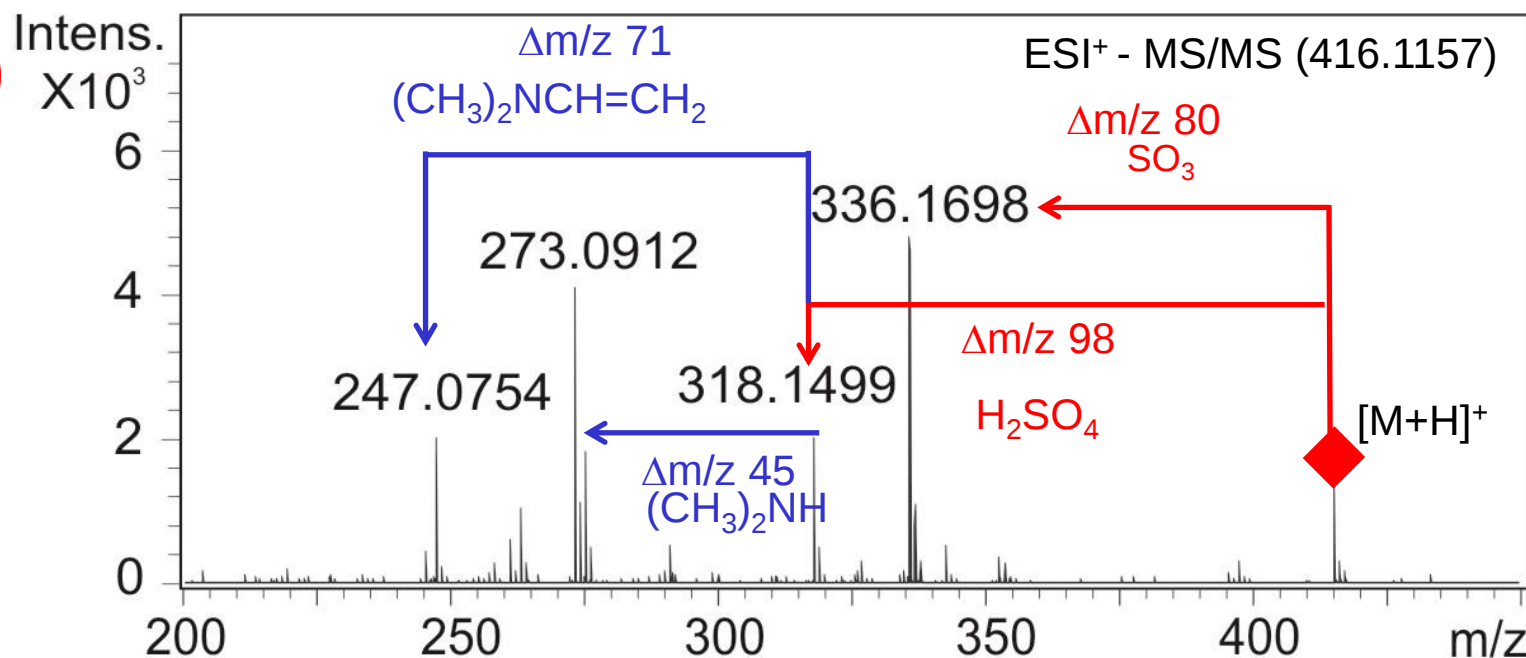
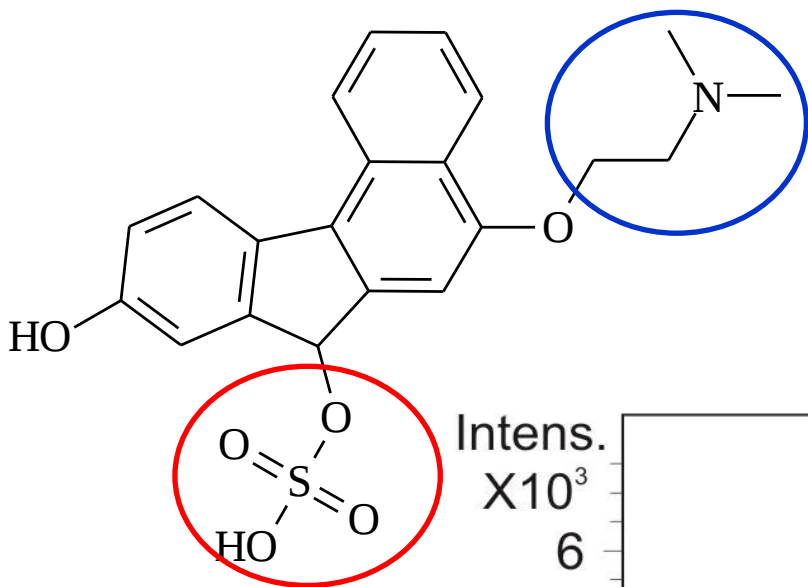


Sulfátová skupina (ROSO_3H)



- pro polysulfatované látky rozsáhlá fragmentace, nízká intenzita $[\text{M}-\text{H}]^-$ iontu (opakované ztráty H_2SO_4 a/nebo SO_3), vícenásobně nabitě ionty
- výborný signál v negativním módu: ideální pro **ESI⁻**, popř. MALDI⁻

Příklady fragmentací - sulfátová skupina



- typické ztráty $\Delta m/z$ 80 a $\Delta m/z$ 98 jsou vidět i při snímání kladných iontů

Sulfonové kyseliny (RSO_3H)

Sulfonic acid (RSO_3H)

+80

-43.2

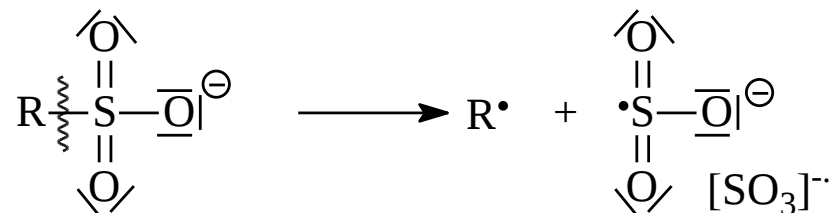
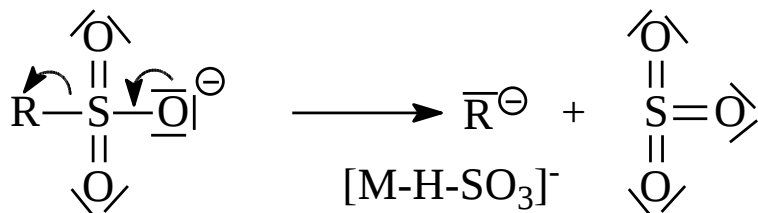
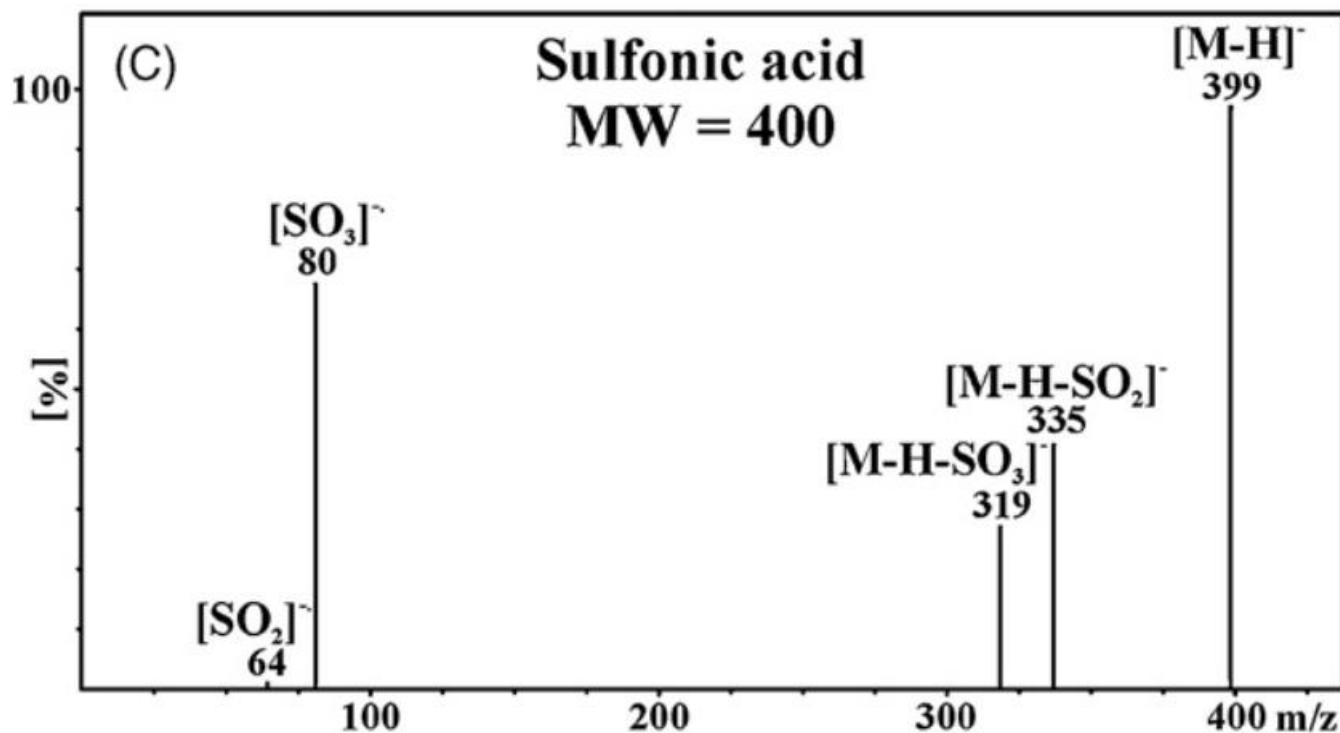
Nárůst nominalní hmotnosti (ΔDa) Posun za desetinou čárkou (mDa)

$[\text{M}-\text{H}-\text{SO}_2]^-$

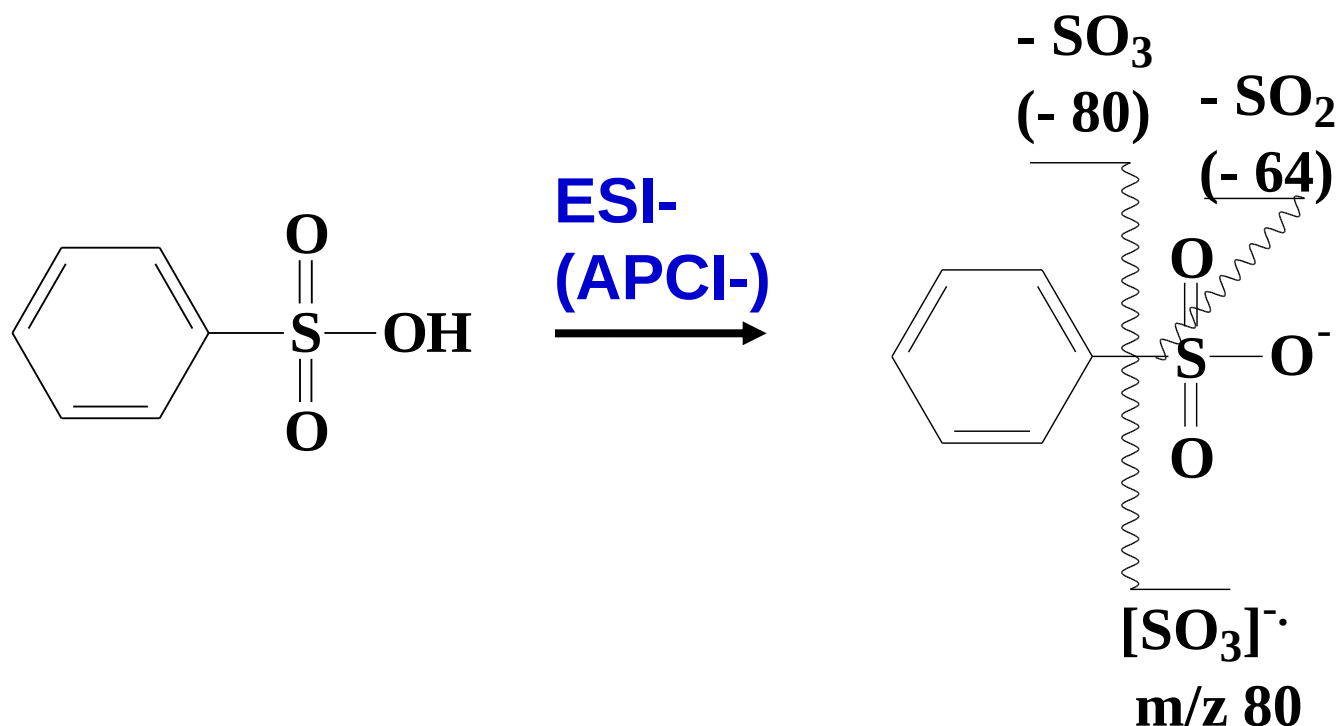
$[\text{M}-\text{H}-\text{SO}_3]^-$

$[\text{SO}_3]^- \cdot$

$[\text{SO}_2]^- \cdot$

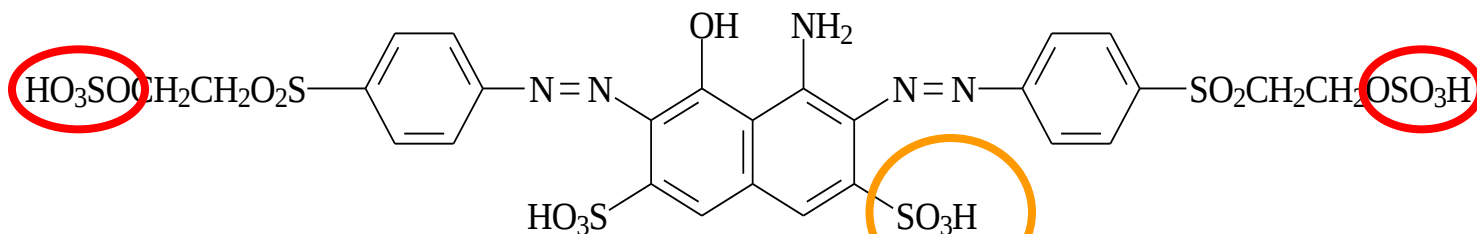


Sulfonové kyseliny (RSO_3H)



- vynikající citlivost v ESI-, lze i MALDI-, pro mono- a disulfonované sloučeniny lze s horší citlivostí i APCI- a APPI-
- intenzivní adukty se sodným iontem
- pro polysulfonované látky série násobně nabitých iontů a jejich aduktů s Na^+ , ale nikoliv fragmentace v MS^1 , proto snadné určení MW a počtu sulfo skupin
- **typické ztráty v MS/MS jsou $\Delta m/z 80 = \text{SO}_3$** (poskytuje i sulfát) a **$\Delta m/z 64 = \text{SO}_2$** (naprosto charakteristické) a radikál anion **m/z 80 = $[\text{SO}_3]^\cdot-$**

ESI-MS – barvivo Reactive Black 5



• 2 sulfát

• 2 sulfo

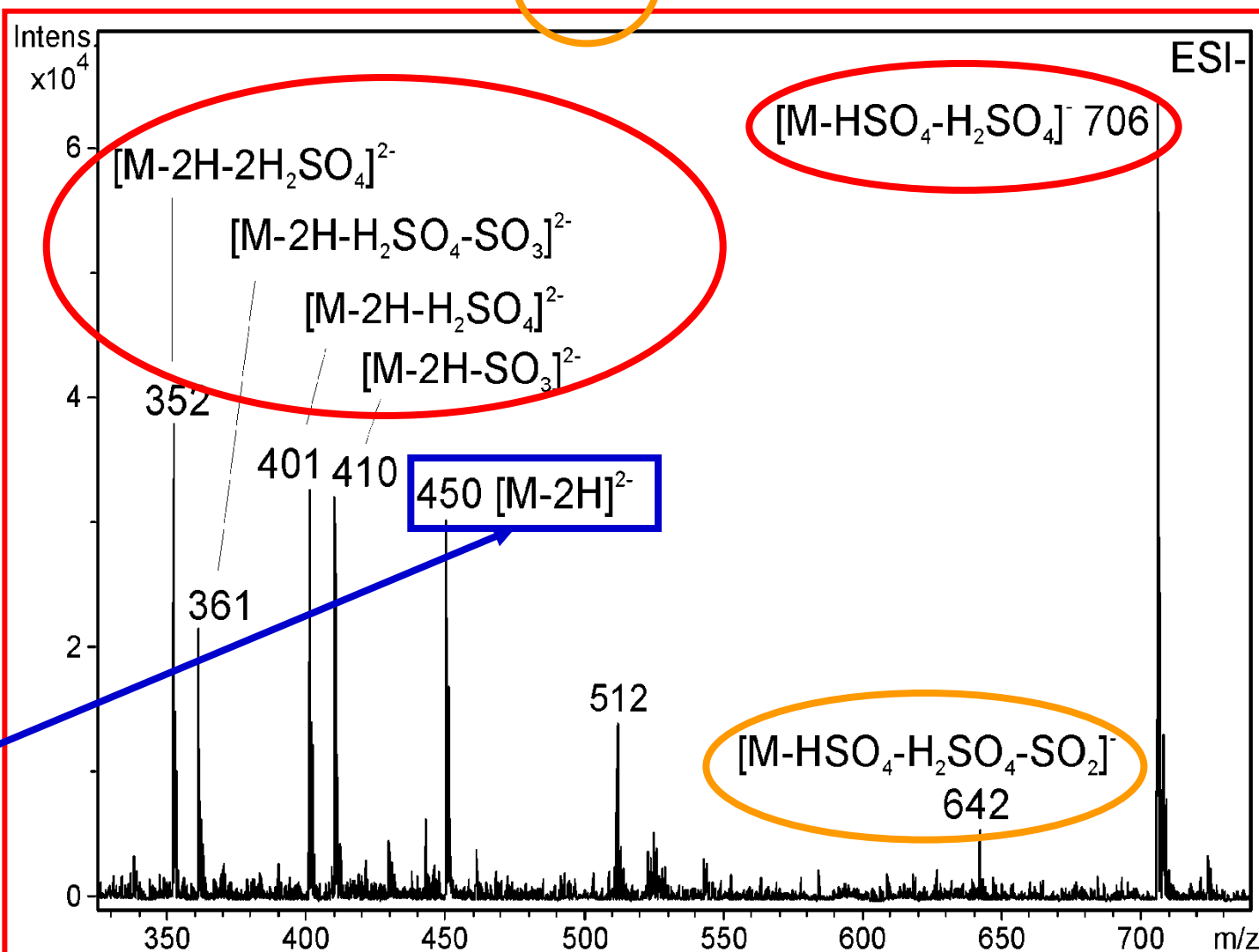
• 2 azo

• 1 hydroxyl

• 1 amino

MW=901
 $[M-2H]^{2-} = 449.5$

MW = 2x449.5 + 2 = 901



Funkční skupiny obsahující dusík (^{14}N)

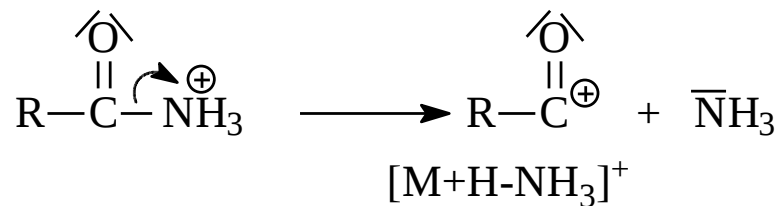
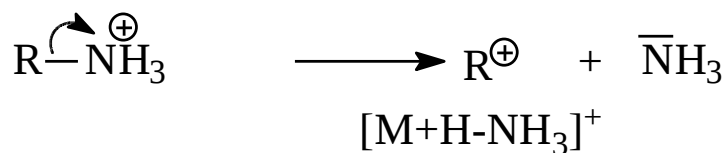
Nitrate (RNO_3)	+61	−20.0	$[\text{M}-\text{H}-\text{NO}]^{-\bullet}$ $[\text{M}-\text{NO}_2]^{-}$ $[\text{M}-\text{H}-\text{NO}_2]^{-\bullet}$ $[\text{M}-\text{H}-\text{ONO}_2]^{-}$
Nitro (RNO_2)	+45	−14.9	$[\text{M}+\text{H}-\text{OH}]^{+\bullet}$ $[\text{M}-\text{OH}]^{-}$ $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^{+}$ $[\text{M}+\text{H}-\text{NO}]^{+\bullet}$ $[\text{M}+\text{H}-\text{NO}_2]^{+\bullet}$ $[\text{M}-\text{NO}]^{-}$ $[\text{M}-\text{H}-\text{NO}]^{-\bullet}$ $[\text{M}-\text{H}-\text{OH}]^{-\bullet}$ $[\text{M}-\text{H}-\text{HNO}]^{-}$ $[\text{M}-\text{NO}_2]^{-}$ $[\text{M}-\text{H}-\text{NO}_2]^{-\bullet}$ $[\text{M}-\text{H}-\text{HNO}_2]^{-}$ $[\text{NO}_2]^{-}$
Nitroso (RNO)	+29	−9.8	$[\text{M}+\text{H}-\text{NO}]^{+}$
N-oxide (RN^+O^{-})	+29	−9.8	$[\text{M}+\text{H}-\text{O}]^{+}$ $[\text{M}+\text{H}-\text{OH}]^{+\bullet}$ $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^{+}$

- Typický výskyt radikálových iontů

Funkční skupiny obsahující dusík (^{14}N)

Nárůst nominalní hmotnoti (ΔDa) Posun za desetinou čárkou (mDa)

Azo ($\text{R}^1\text{N}=\text{NR}^2$)	+28	+6.1 ^c	$[\text{M}+\text{H}-\text{N}_2]^+$ $[\text{M}+\text{H}-\text{R}^i]^+$ $[\text{M}+\text{H}-\text{R}^i\text{NH}]^+$ $[\text{M}+\text{H}-\text{R}^i\text{N}_2]^+$
Amide, alkylamide (R^1CONH_2 , R^1CONHR^2 , $\text{R}^1\text{CONR}^2\text{R}^3$)	+43	+5.8	$[\text{M}+\text{H}-\text{NH}_3]^+$ $[\text{M}+\text{H}-\text{R}^2\text{NH}_2]^+$ $[\text{M}+\text{H}-\text{R}^2\text{R}^3\text{NH}]^+$
Amine (R^1NH_2 , R^1NHR^2 , $\text{R}^1\text{NR}^2\text{R}^3$)	+15	+10.9	$[\text{M}+\text{H}-\text{NH}_3]^+$ $[\text{M}+\text{H}-\text{R}^2\text{NH}_2]^+$ $[\text{M}+\text{H}-\text{R}^2\text{R}^3\text{NH}]^+$ $[\text{M}+\text{H}-\text{HCN}]^+$
Nitrile (RCN)	+25	-4.8	$[\text{M}+\text{H}-\text{HCN}]^+$



i-štěpení

M (^{14}N) = 100%
M+1 (^{15}N) = 0.37%

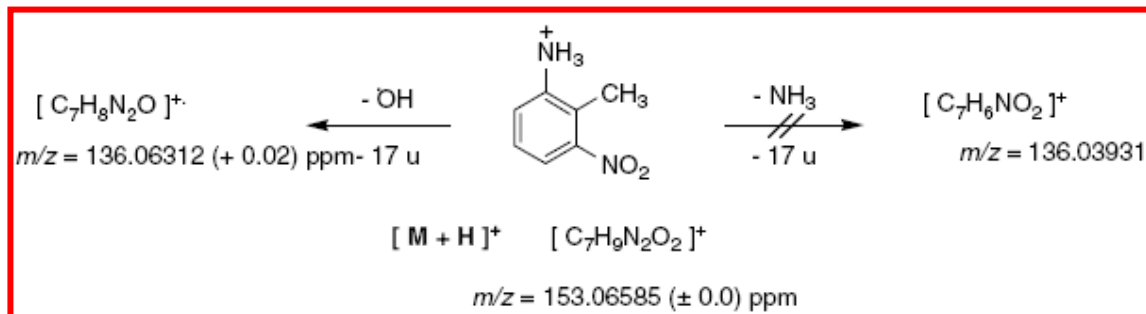
Dusíkaté sloučeniny

- **dusíkové pravidlo**; dusík je obvykle místem protonace

Primární aminy RNH_2

- ztráta amoniaku $[\text{M}+\text{H}-\text{NH}_3]^+$

často je preferována jiná ztráta



Sekundární a terciární aminy R_1NHR_2 nebo $\text{R}_1\text{NR}_2\text{R}_3$

- odštěpení R_1 nebo R_2 – vznik iontu typu $[\text{R}_1\text{NH}_3]^+$ a $[\text{R}_2\text{NH}_3]^+$ (**na aminoskupině dochází obvykle k protonaci a přenosu vodíku z odštěpeného substituentu**), pro terciární analogicky $[\text{R}_1\text{NH}_2\text{R}_2]^+$, $[\text{R}_1\text{NH}_2\text{R}_3]^+$ a $[\text{R}_2\text{NH}_2\text{R}_3]^+$
- vedle toho mohou být přítomny též ionty $[\text{R}_1\text{NH}]^+$ a $[\text{R}_2\text{NH}]^+$, méně časté
- neutrální ztráty RNH_2 (sekundární) nebo R_1NHR_2 (terciární) vedou ke vzniku iontů $[\text{M}+\text{H}-\text{RNH}_2]^+$ nebo $[\text{M}+\text{H}-\text{R}_1\text{NHR}_2]^+$, typický příklad ztráta methylaminu (dimethylaminu či podobného dialkylaminu) (**indukční štěpení**)

Kvartérní aminy $(\text{R})_4\text{N}^+\text{X}^-$

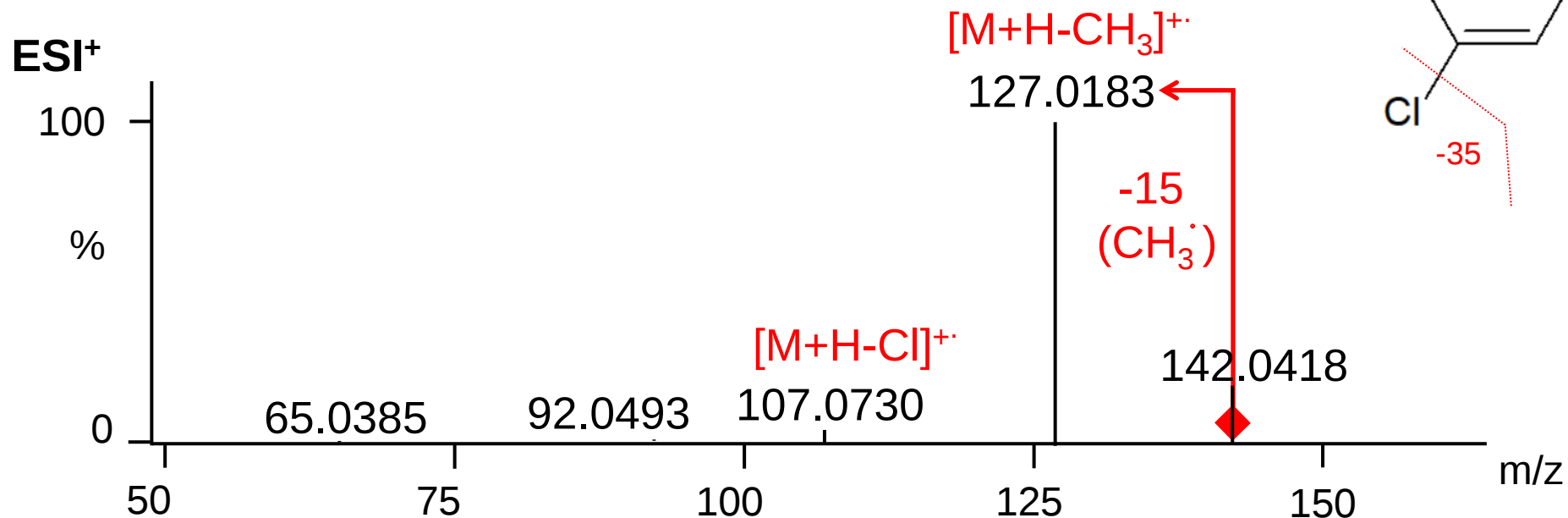
- velice stabilní ionty $[(\text{R})_4\text{N}]^+$ s vysokou ionizační účinností (např. tetrabutylamoniová ion-párová činidla), **POZOR**: velmi silné paměťové efekty!!!
- záporný mód není vhodný

Aminy - ztráta radikálů

- ztráty radikálů $R\cdot$ méně obvyklé, nicméně existují, např. $[M-H\text{-butyl}]^-$
- záleží na struktuře, **typické pro N-alkyl substituci**

Např. sekundární amin, 4-Chlor-N-methylanilin

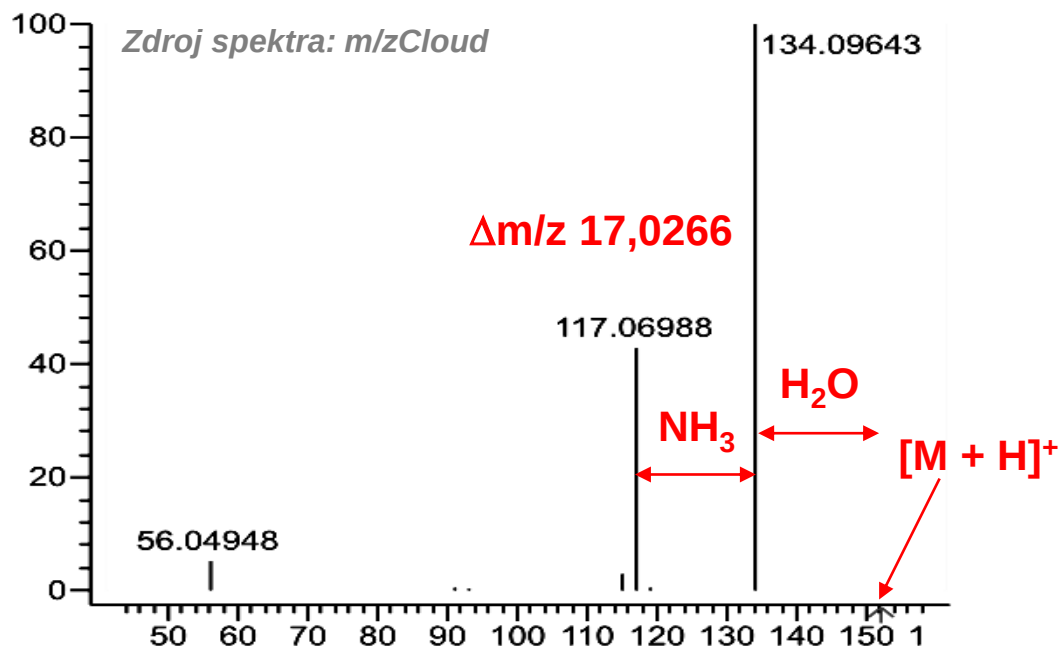
MS/MS iontu $[M+H]^+$ (FT HCD 60 NCE MS2 142.0418)



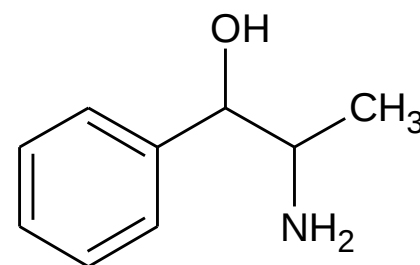
Fieldovo pravidlo

- při fragmentaci iontu EE^+ dochází přednostně k odštěpení neutrální molekuly s nižší protonovou afinitou (PA), resp. poměr intenzit vznikajících iontů odpovídá poměru PA odstupujících neutrálních molekul
- fragmentace je ovlivněna stabilitou vznikajícího iontu, roli hrají sterické faktory a intramolekulární H-vazby

ESI MS² iontu 152,1 $[M+H]^+$



Fenylpropanolamin (β -hydroxyamfetamin)



M = 151 Da

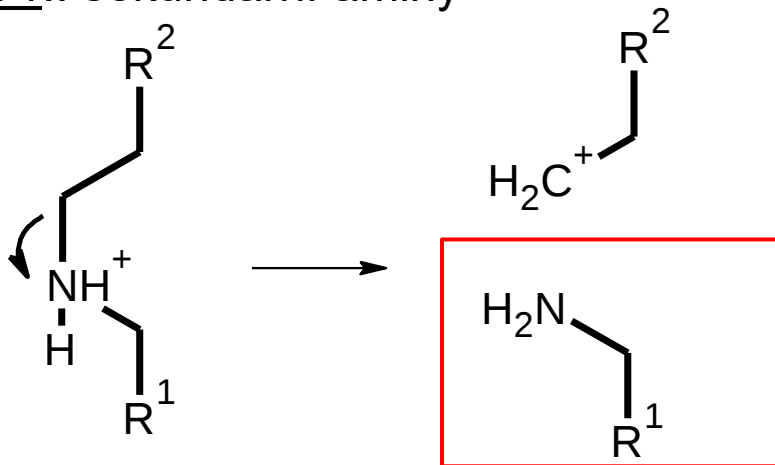
PA (H_2O) = 697 kJ.mol⁻¹

PA (NH_3) = 854 kJ.mol⁻¹

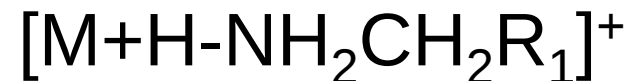
Indukční štěpení a přesmyk β -vodíku

Štěpení EE^+ : štěpení sousedních vazeb vzhledem k nábojovému centru, vysvětlení hlavních fragmentačních cest **dvěma konkurenčními procesy**

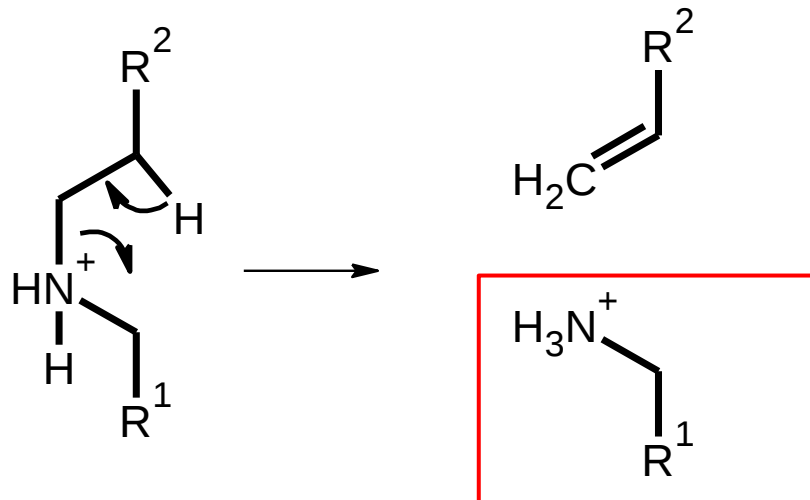
Př.: sekundární aminy



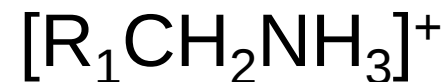
A. Indukční štěpení (kladný náboj si „přitáhne“ elektronový pár původně tvořící C-N vazbu; migrace náboje)



- Neutrální ztráta primárního aminu

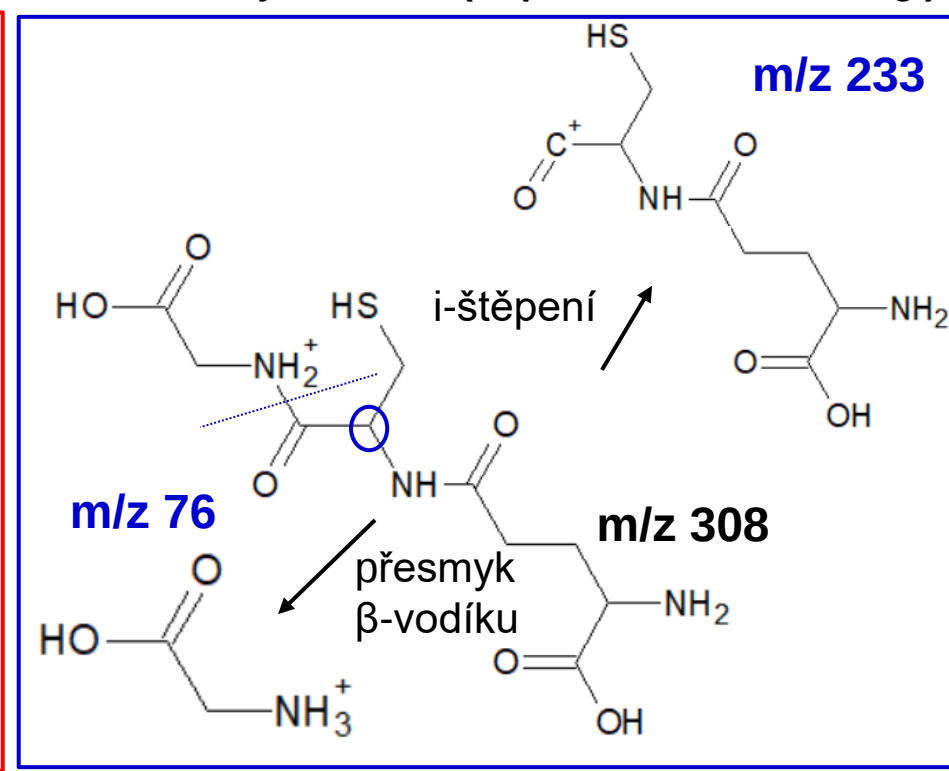
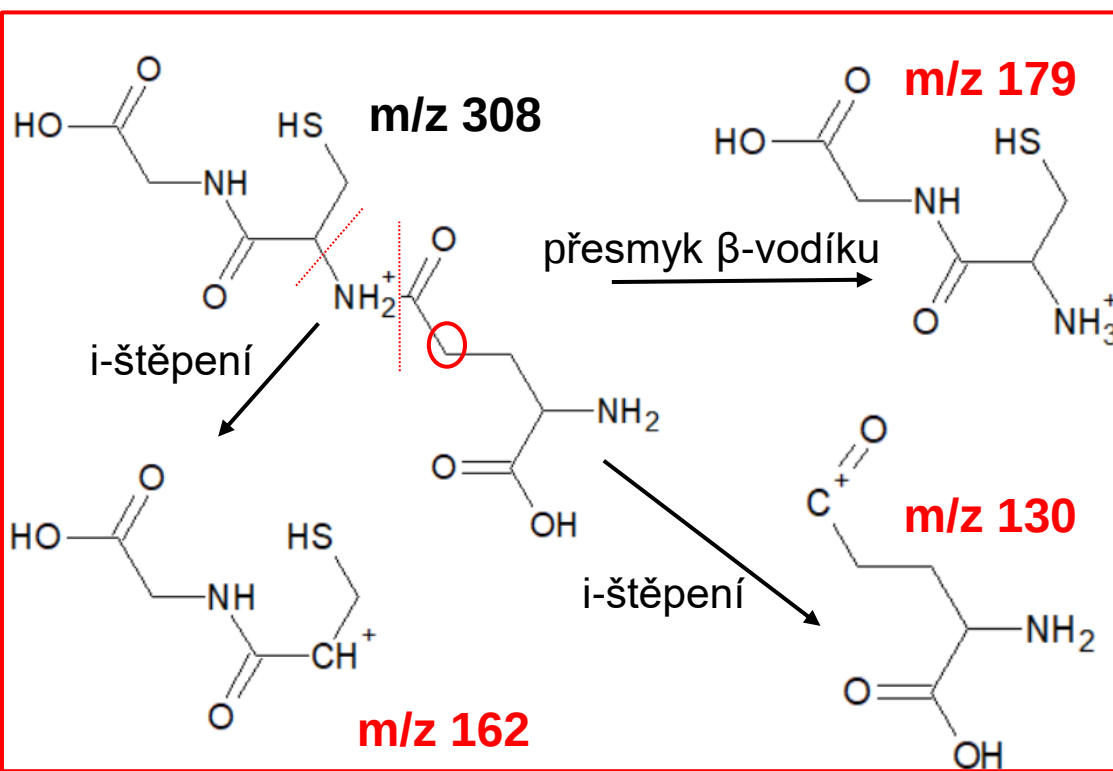
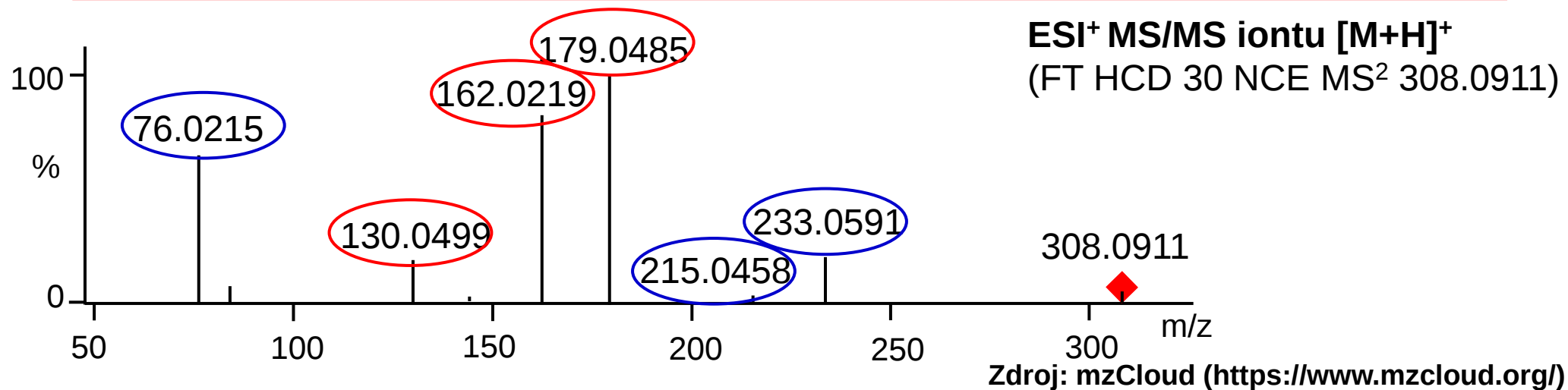


B. Acyklický přesmyk β -vodíku (přesun vodíku na dusík doprovázený štěpením N-C vazby; retence náboje na dusíku)



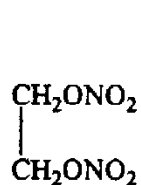
- Neutrální ztráta alkenu

Konkurenční fragmentace: L-glutathion

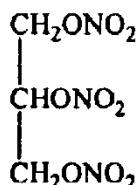


Alifatické nitráty - výbušniny (RONO₂)

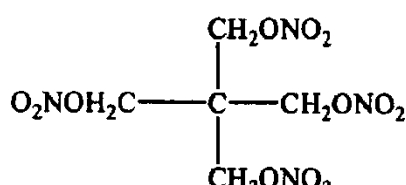
- bez aditiv úplná absence $[M+H]^+$ / $[M-H]^-$ iontů, intenzivní fragmenty m/z 62 = $[NO_3]^-$, m/z 46 = $[NO_2]^-$, obtížně interpretovatelné adukty a fragmenty



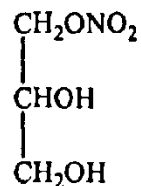
EGDN



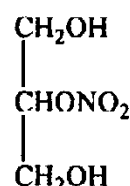
NG



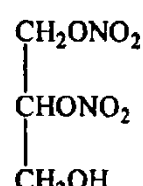
PETN



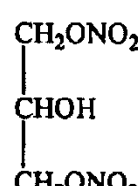
1-MNG



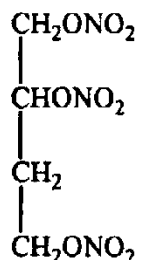
2-MNG



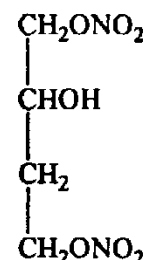
1,2-DNG



1,3-DNG



BTTN



BTDN

Fig. 1. Chemical structures of investigated nitrate esters.

- přídavek CCl₄ (nebo halogenidu, octanu, mravenčanu) – velmi charakteristická tvorba aduktů $[M+Cl]^-$, $[M+CH_3COO]^-$, atd.

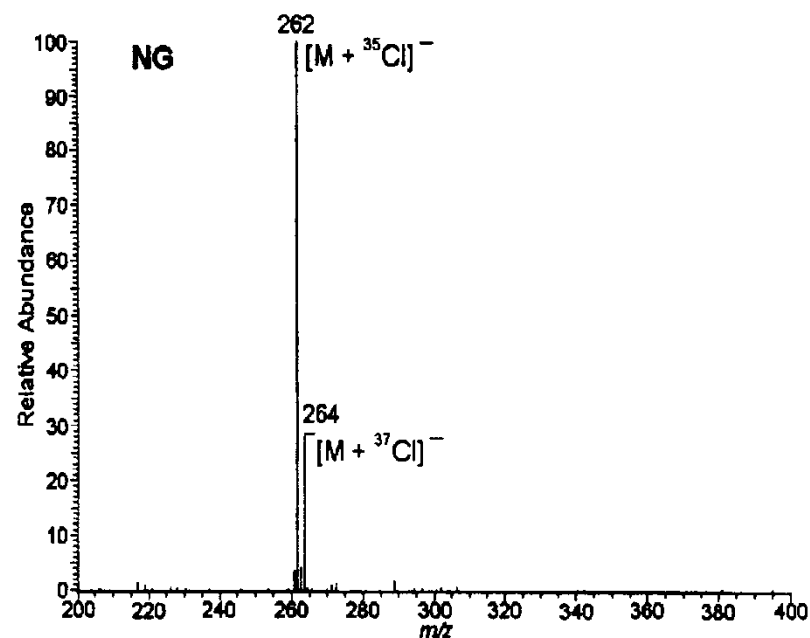
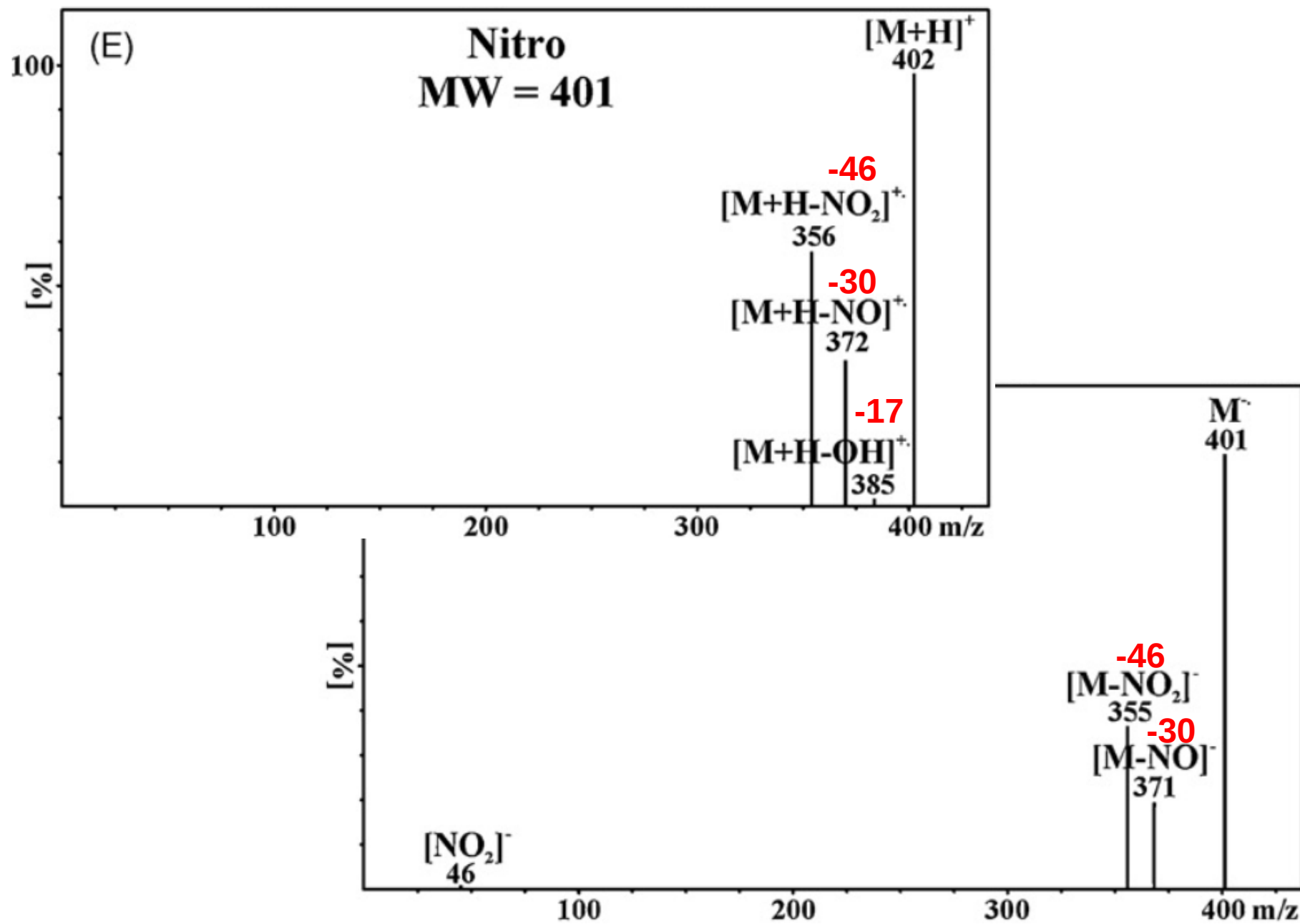


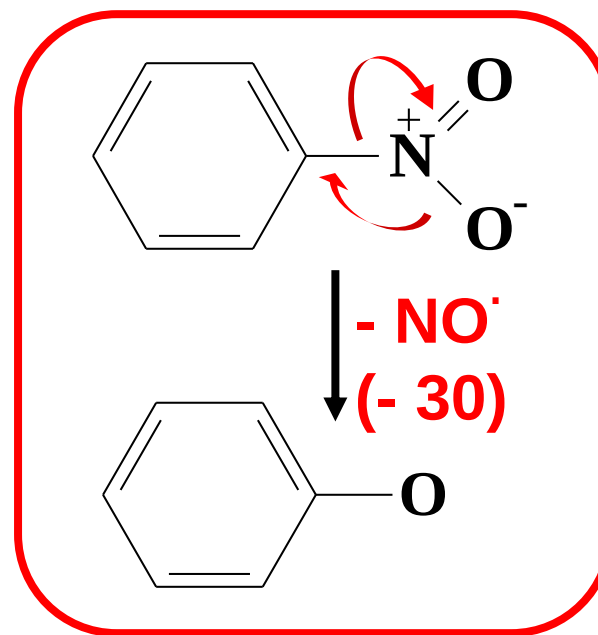
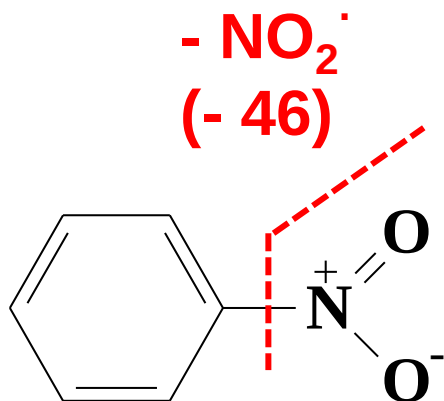
Fig. 4. Negative-ion APCI mass spectrum of NG with carbon tetrachloride additive.

Nitro sloučeniny (RNO_2)



Nitro sloučeniny (RNO_2)

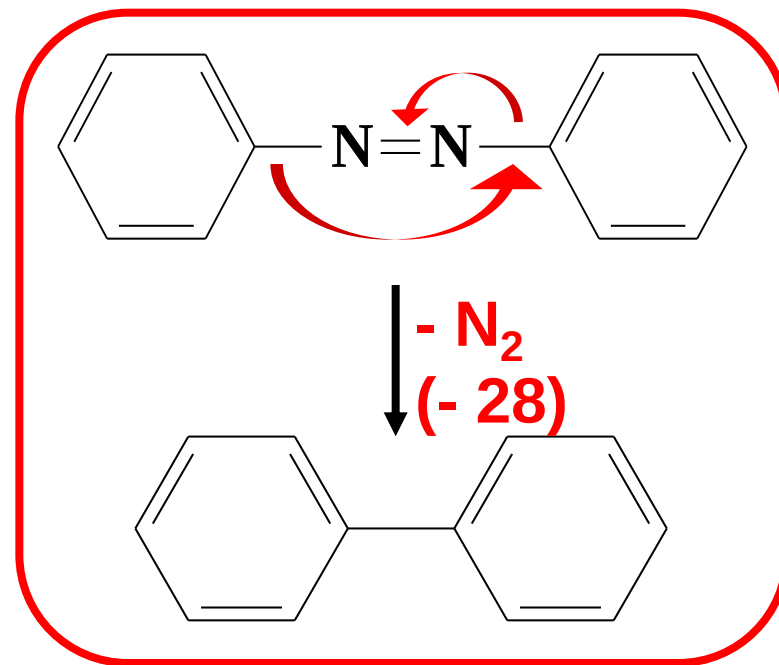
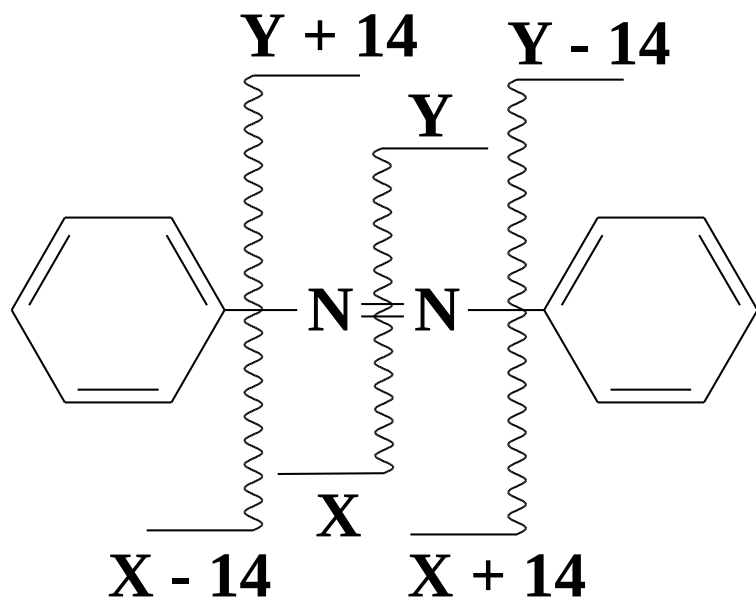
- známá výjimka tvorby molekulárního radikál aniontu M^- v APCI-
- obecně hodně radikálových ztrát pro nitro látky: $\Delta m/z$ 46 = $\text{NO}_2^\cdot$, $\Delta m/z$ 30 = $\text{NO}^\cdot$, často i ztráta $\Delta m/z$ 17 = $\text{OH}^\cdot$
- méně obvyklé ztráty $\Delta m/z$ 31 = HNO , $\Delta m/z$ 47 = HNO_2



Nitroso sloučeniny (RNO)

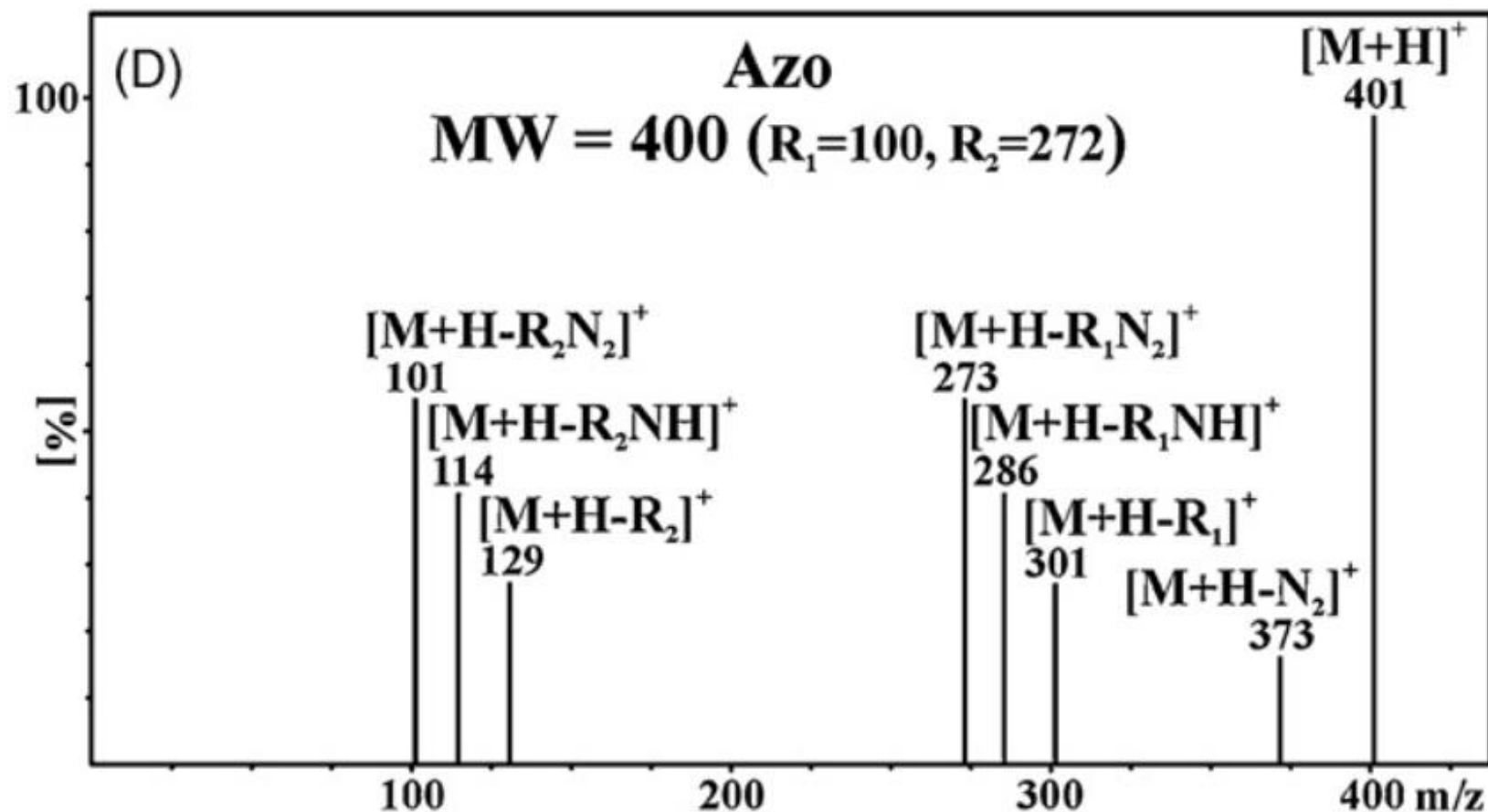
- ztráta $\Delta m/z$ 30 = $\text{NO}^\cdot$

Azo sloučeniny – organická barviva (N_2)



- azo skupina je typicky doprovázená řadou dalších polárních funkčních skupin (sulfo, sulfát, karboxy, amino, atd.) v molekule barviva, které podléhají fragmentaci přednostně
- zajímavá a typická je přesmyková ztráta $\Delta m/z 28 = N_2$ (analogie EI)

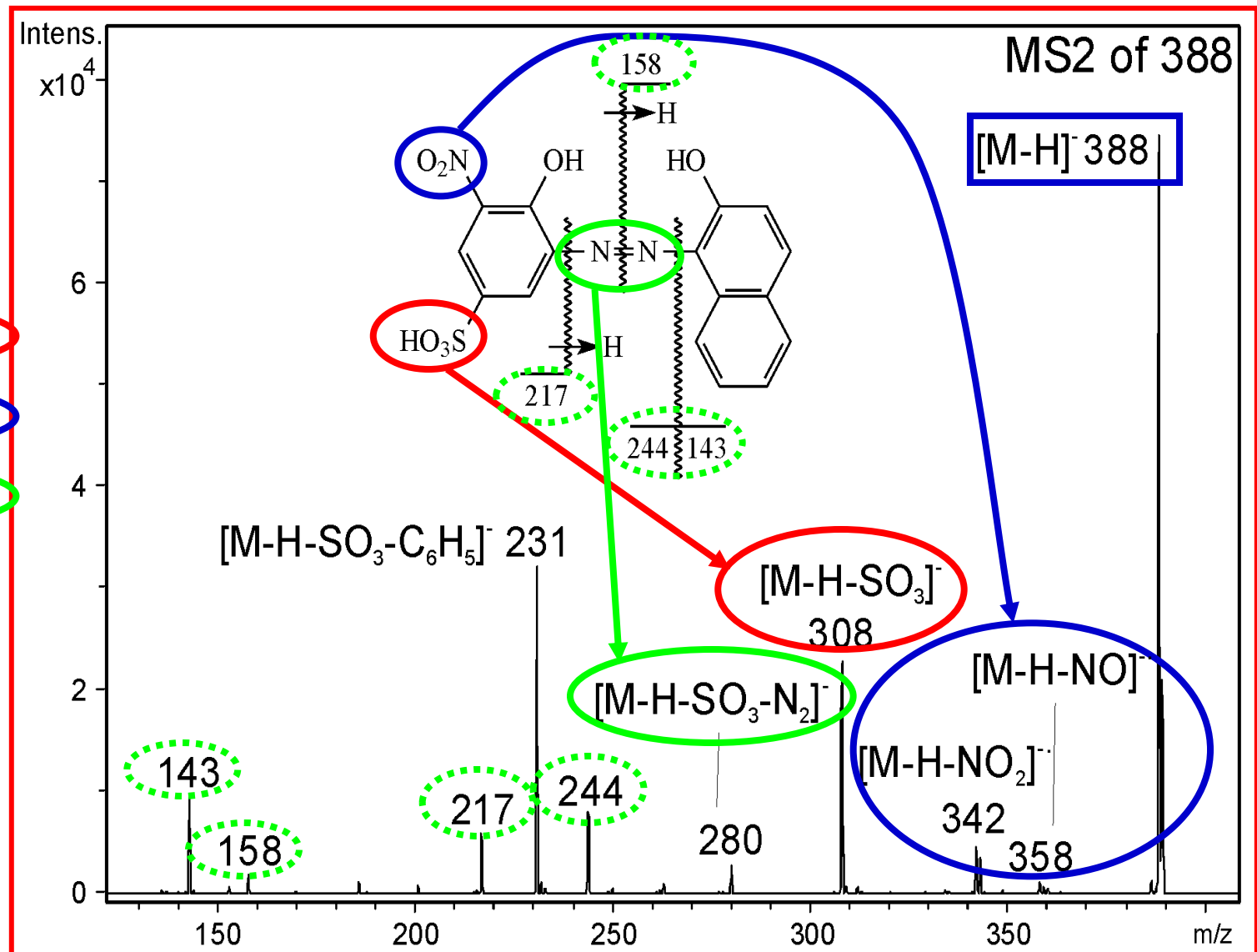
Azo sloučeniny – organická barviva (N_2)



ESI-MS/MS – barvivo Mordant Black 15

MW = 389

- 1 sulfo
- 1 nitro
- 1 azo
- 2 hydroxyl



Funkční skupiny obsahující kyslík (^{16}O)

M (^{16}O) = 100%

M+1 (^{17}O) = 0.04%

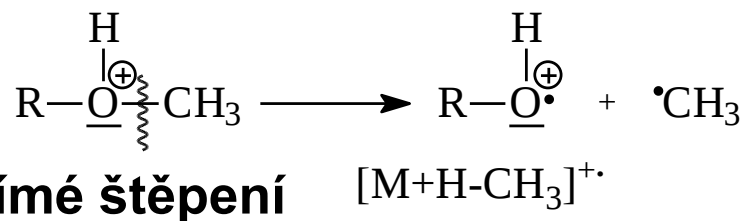
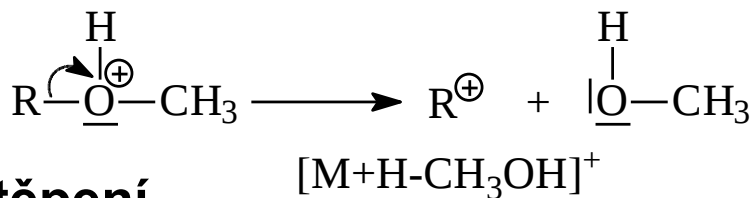
M+2 (^{18}O) = 0.2%

Nárůst nominalní hmotnosti
(Da)

Posun za desetinou čárkou
(mDa)

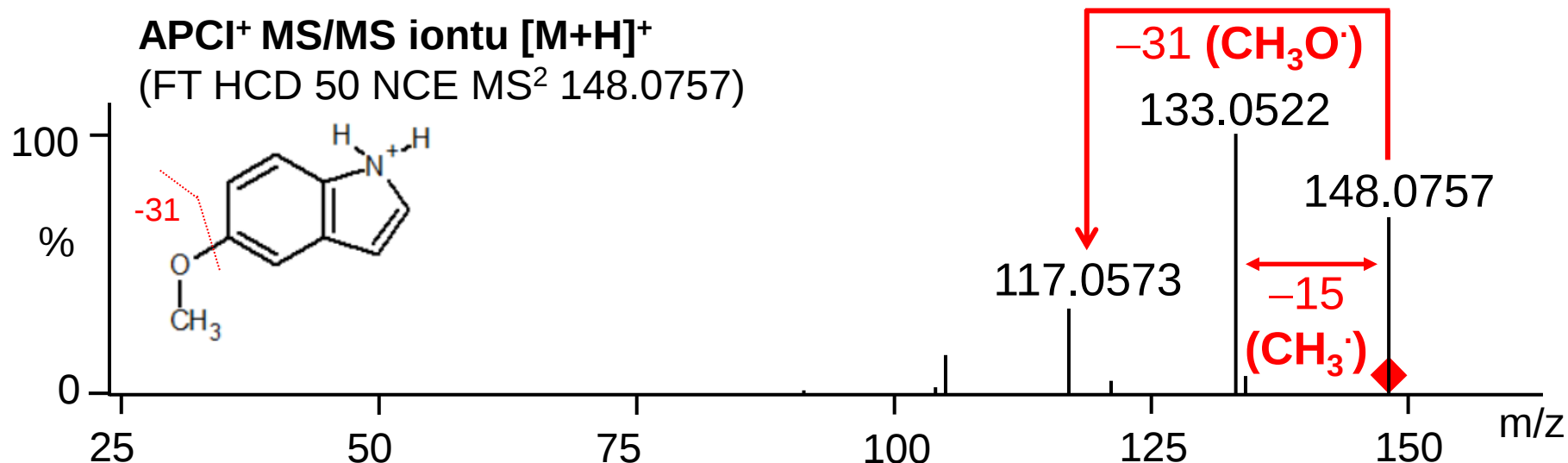
MS/MS

Hydroperoxide (ROOH)	+32	-10.2	$[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}_2]^+$
Epoxides (RO)	+16	-5.1	$[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$
Carboxylic acid (RCOOH)	+44	-10.2	$[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}_2]^+$ $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}]^+$ $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^-$
Alcohol (ROH)	+16	-5.1	$[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$
Phenol (ROH)	+16	-5.1	$[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}]^+$ $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^-$ $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}]^-$
Methoxy (ROCH ₃)	+30	+10.6	$[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3]^+\bullet$ $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3\text{O}]^+\bullet$ $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3\text{OH}]^+$ $[\text{M}+\text{H}-\text{HCOH}]^+$

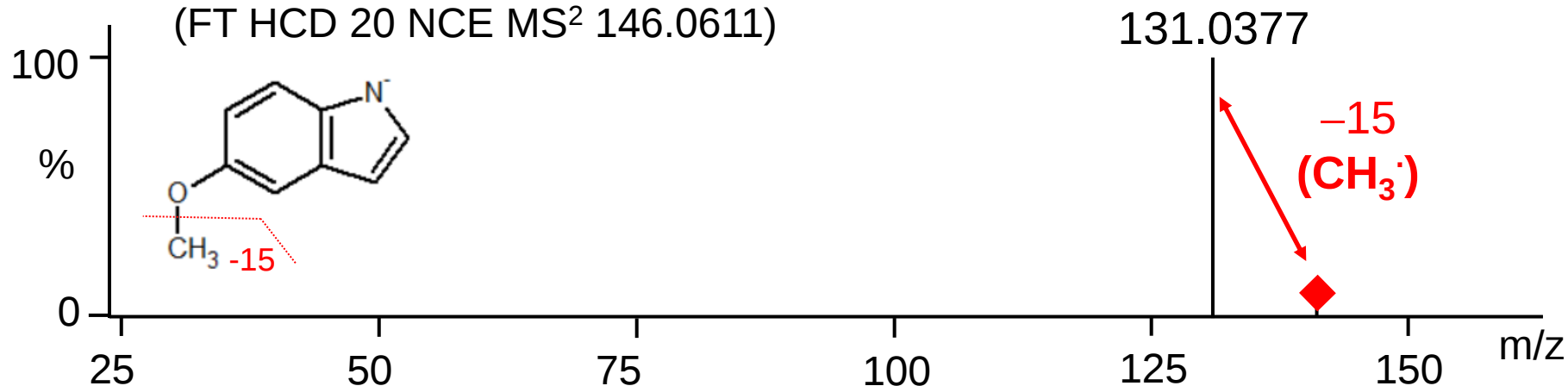


Fragmentace methoxyindolu

APCI⁺ MS/MS iontu [M+H]⁺
(FT HCD 50 NCE MS² 148.0757)



APCI⁻ MS/MS iontu [M-H]⁻
(FT HCD 20 NCE MS² 146.0611)

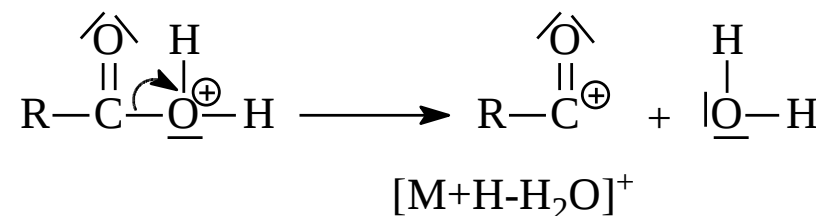
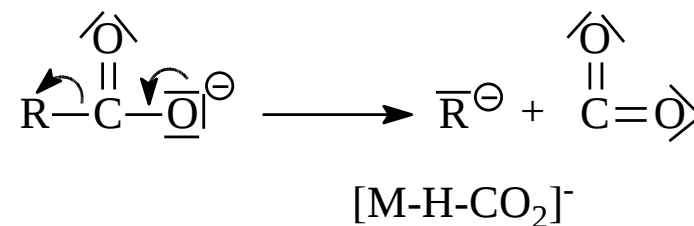
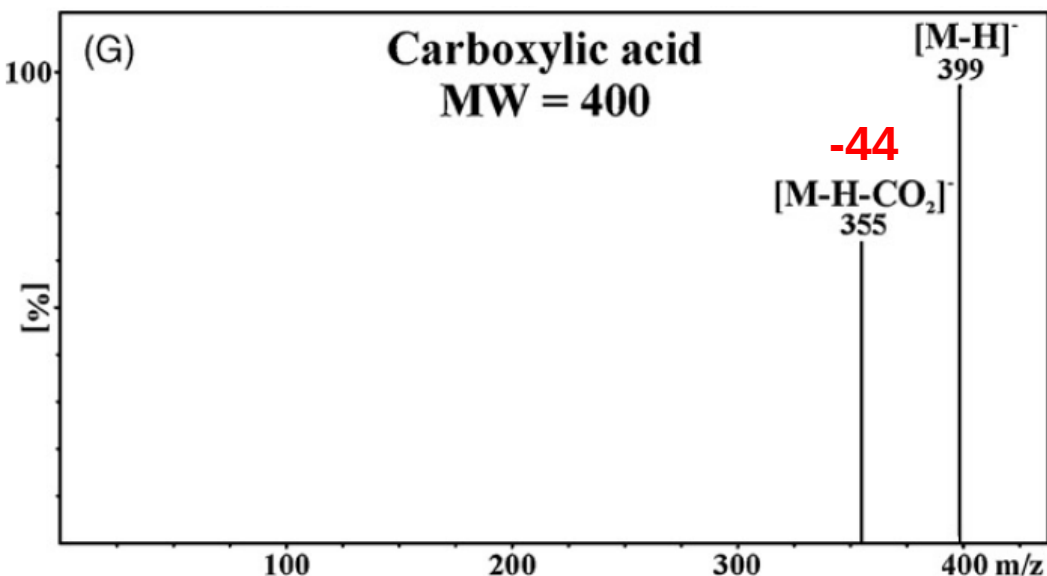


Funkční skupiny obsahující kyslík (^{16}O)

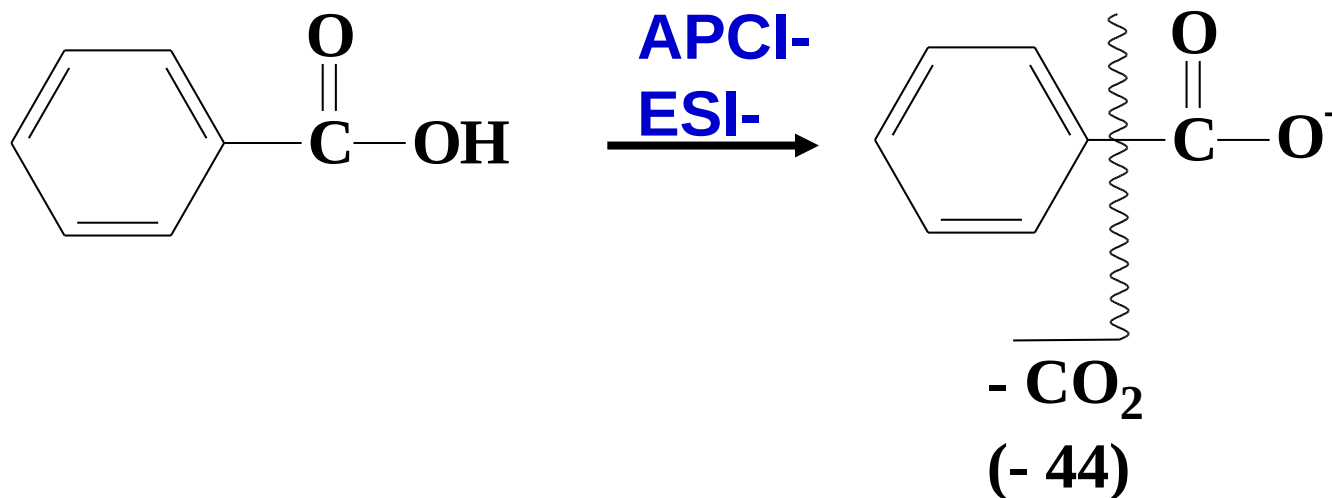
Nárůst nominalní hmotnosti (Da) Posun za desetinou čárkou (mDa)

Nárůst nominalní hmotnosti (Da) Posun za desetinou čárkou (mDa)

Carboxylic acid (RCOOH)	+44	-10.2	$[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}_2]^+$ $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}]^+$ $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^-$
Ester (R^1COOR^2)	+44	-10.2 ^c	$[\text{M}+\text{H}-\text{R}^2\text{OH}]^+$ $[\text{M}+\text{H}-\text{R}^2\text{OH}-\text{CO}]^+$
Ketone (R^1COR^2)	+28	-5.1 ^c	$[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}]^+$ $[\text{R}^i\text{CO}]^+$
Aldehyde (RCHO)	+28	-5.1	$[\text{M}+\text{H}-\text{CO}]^+$ $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}]^-$



Karboxylové kyseliny (RCOOH)



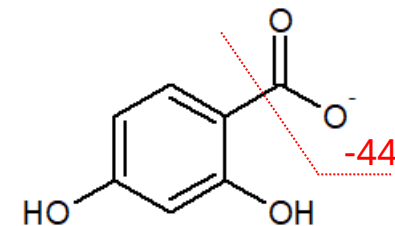
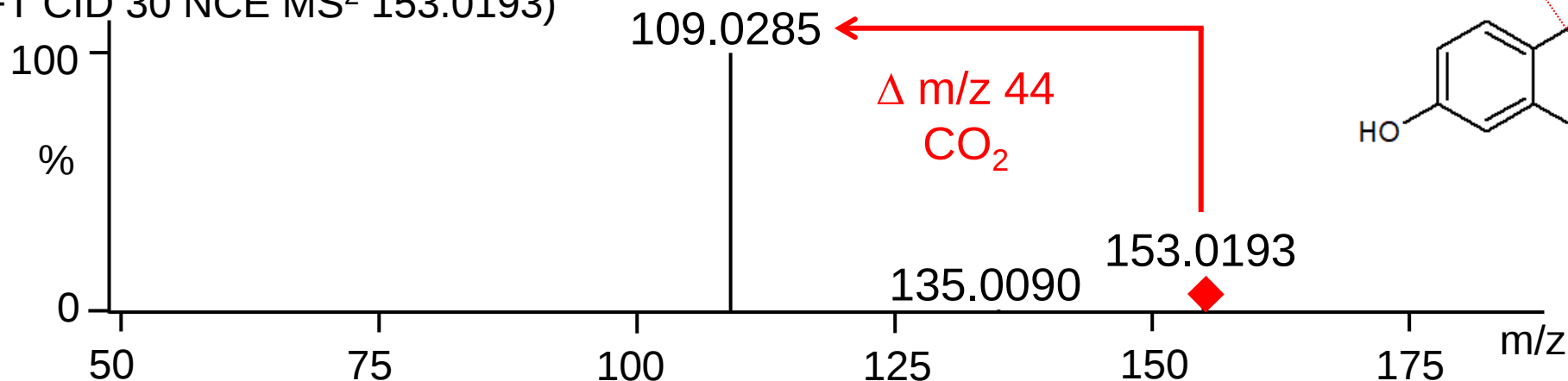
- lze použít záporný mód všech API technik i MALDI, v případě dalších funkčních skupin možný i záznam kladných iontů
- **naprosto charakteristická ztráta $\Delta m/z 44 = \text{CO}_2$** , může být intenzivní již v MS^1 , typické pro záznam záporných iontů, často i v kladném módu ($\text{H}_2\text{O} + \text{CO}$), u alifatických kyselin ztráta CO_2 méně výrazná
- polykarboxyláty (nebo kombinace karboxy + sulfo skupin) tvoří aduktové ionty záměnou kyselých protonů za sodné ionty podobně jako sulfo kyseliny

• *falešná interpretace $\Delta m/z 44$ téměř vyloučena, jediná možná záměna je ztráta radikálu $\text{NH}_2\text{CO}\cdot$ pro dusíkaté heterocykly obsahující karbonylovou skupinu, avšak tato ztráta nebývá jednotně 44 v obou módech polarit, ale doprovázena $\Delta m/z 43 = \text{NHCO}$*

MS/MS: 2,4-dihydroxybenzoová kyselina

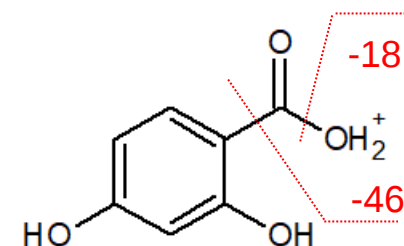
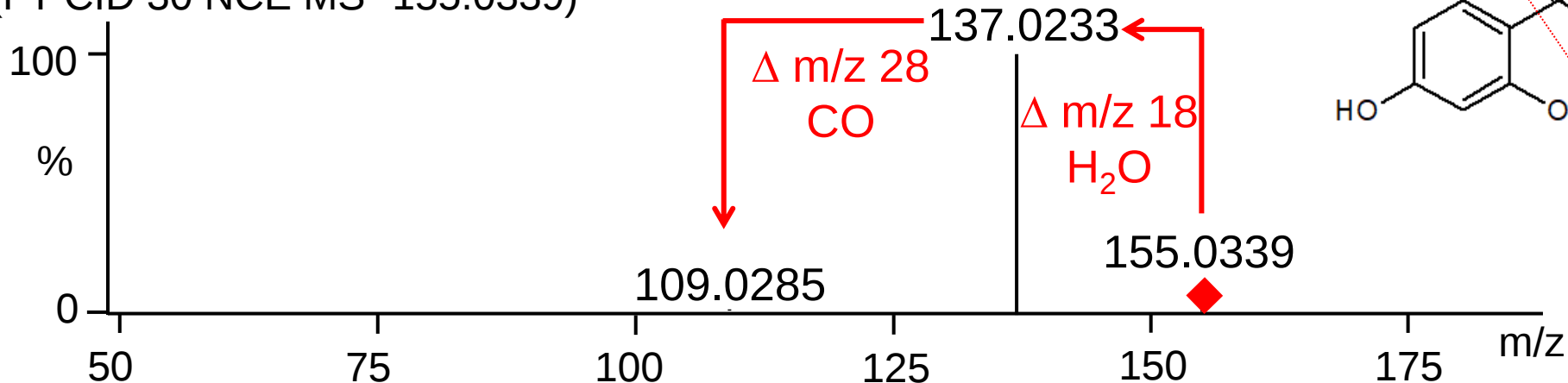
ESI⁻ MS/MS iontu [M-H]⁻

(FT CID 30 NCE MS² 153.0193)

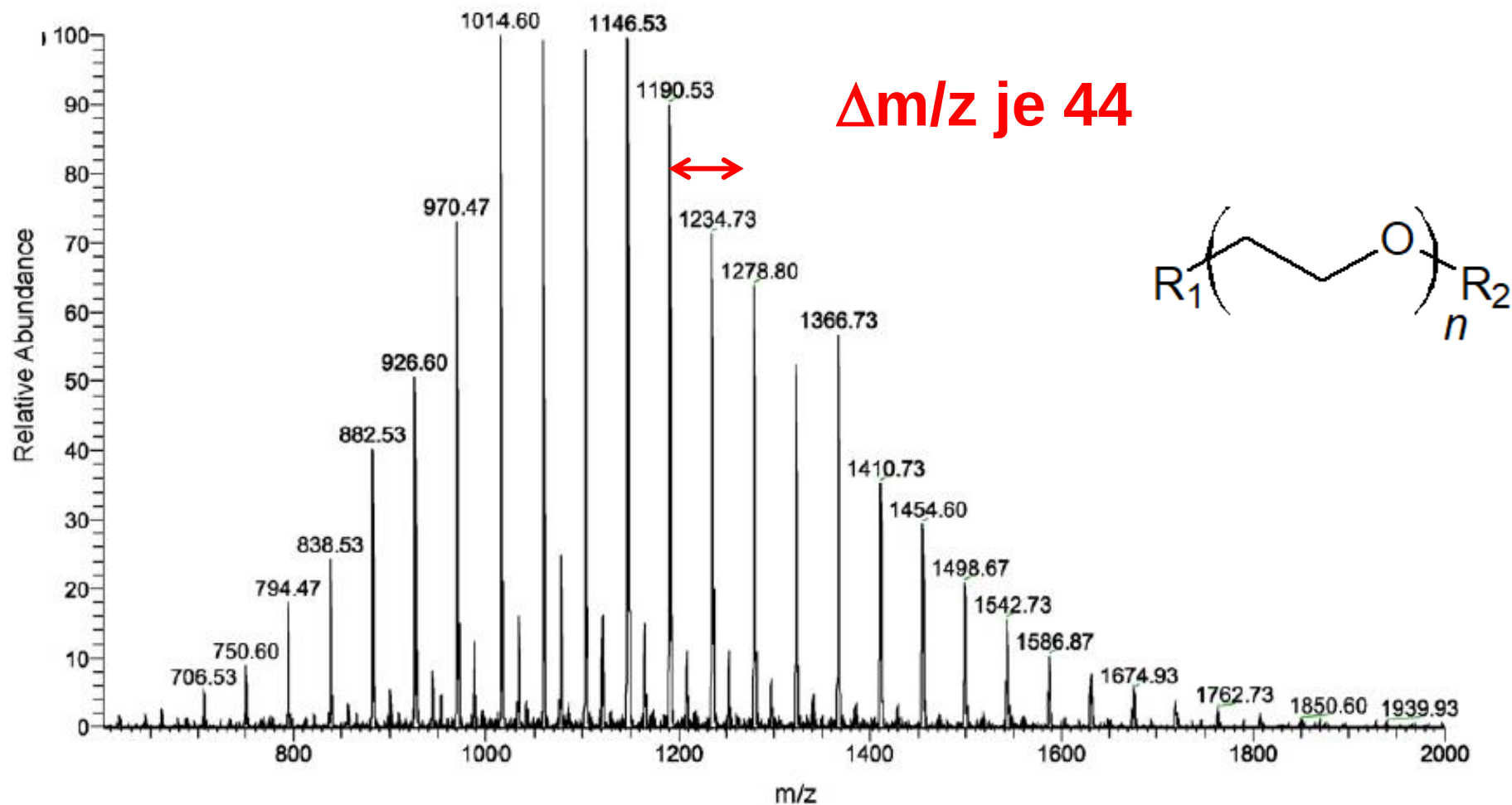


ESI⁺ MS/MS iontu [M+H]⁺

(FT CID 30 NCE MS² 155.0339)



Spektra PEG

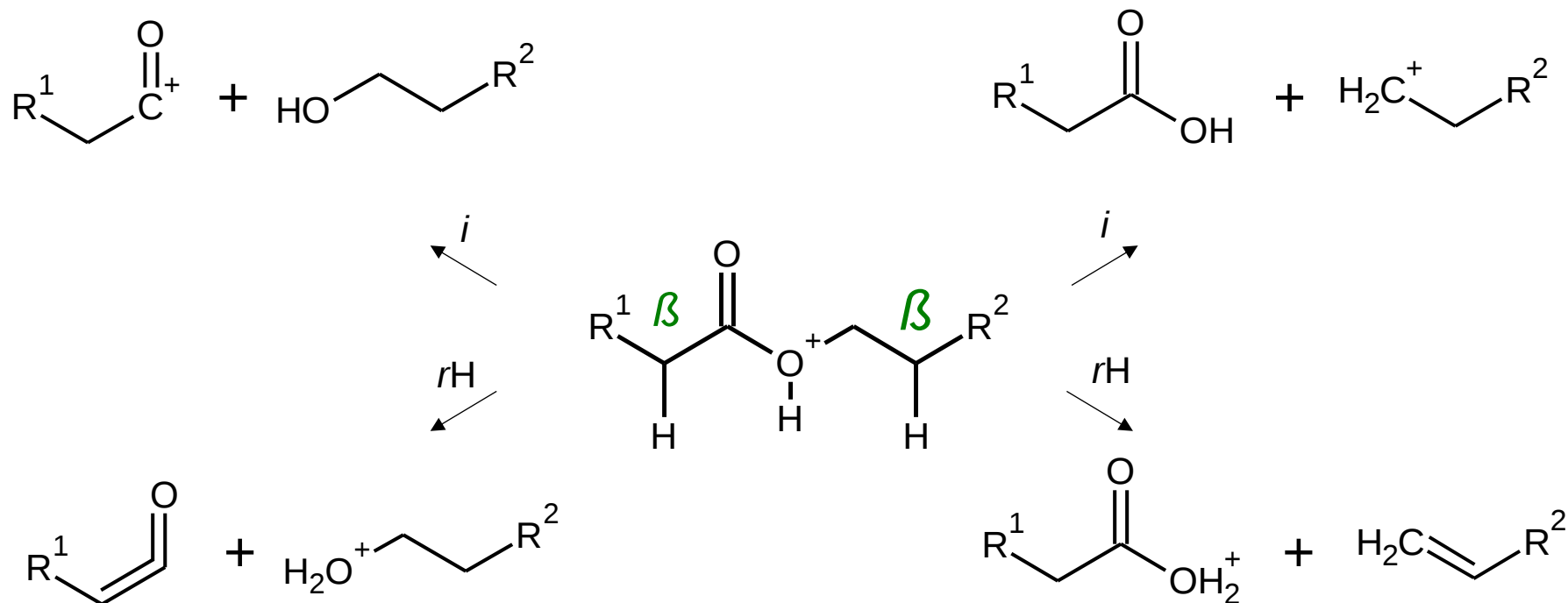


Typická distribuce iontů lišících se o monomerní jednotku

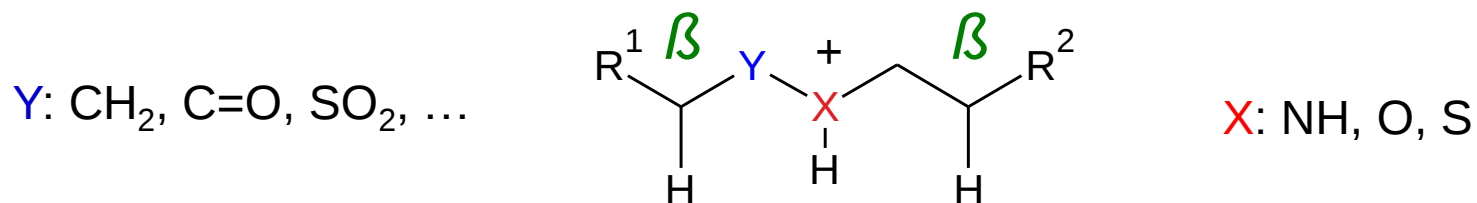
Kyslíkaté sloučeniny

- **ztráta vody $\Delta m/z$ 18** - teoreticky možná téměř pro všechny kyslíkaté sloučeniny – diagnostická hodnota je malá, nutno posuzovat i intenzitu iontu
- **alifatické alkoholy** – velice intenzivní ztráta vody již v MS^1 , v APCI většinou 100% intenzitu již v MS^1 (často i v ESI), v MS/MS ion $[M+H-H_2O]^+$ opět převládá
- **fenoly a chinony** – ztráta vody může být patrná, ale oproti alkoholům nižší relativní intenzita, někdy ztráta radikálu $OH\cdot$ (např. nitro látky), přesmyková ztráta $\Delta m/z$ 28 = CO
- **polyhydroxylované sloučeniny** (např. cukry) – nutné použít ESI, opakované ztráty vody $\rightarrow$ pokles intenzity $[M+H]^+ / [M-H]^-$
- **ketony** - analogicky α -štěpení u EI vznikají $[R_1CO]^+$ a $[R_2CO]^+$, někdy též ztráta vody $[M+H-H_2O]^+$ s velmi malou intenzitou
- **aldehydy** – ztráta CO pozorovaná v obou módech polarit (nespecifické, běžné např. pro karbonyl v cyklické struktuře), někdy ztráta $\Delta m/z$ 30 = HCOH
- **estery** – při absenci dalších funkčních skupin vhodnější záznam kladných iontů, typická ztráta alkoholu R_2OH z esterové funkční skupiny R_1COOR_2 (např. ztráta methanolu u methylesteru) za vzniku karbonylových iontů $[R_1CO]^+$, následovaná ztrátou CO, dále vznik karbonylových iontů
- **obecně výrazné analogie s EI, zejména při použití APCI**

Indukční štěpení a přesmyk β -vodíku (estery)

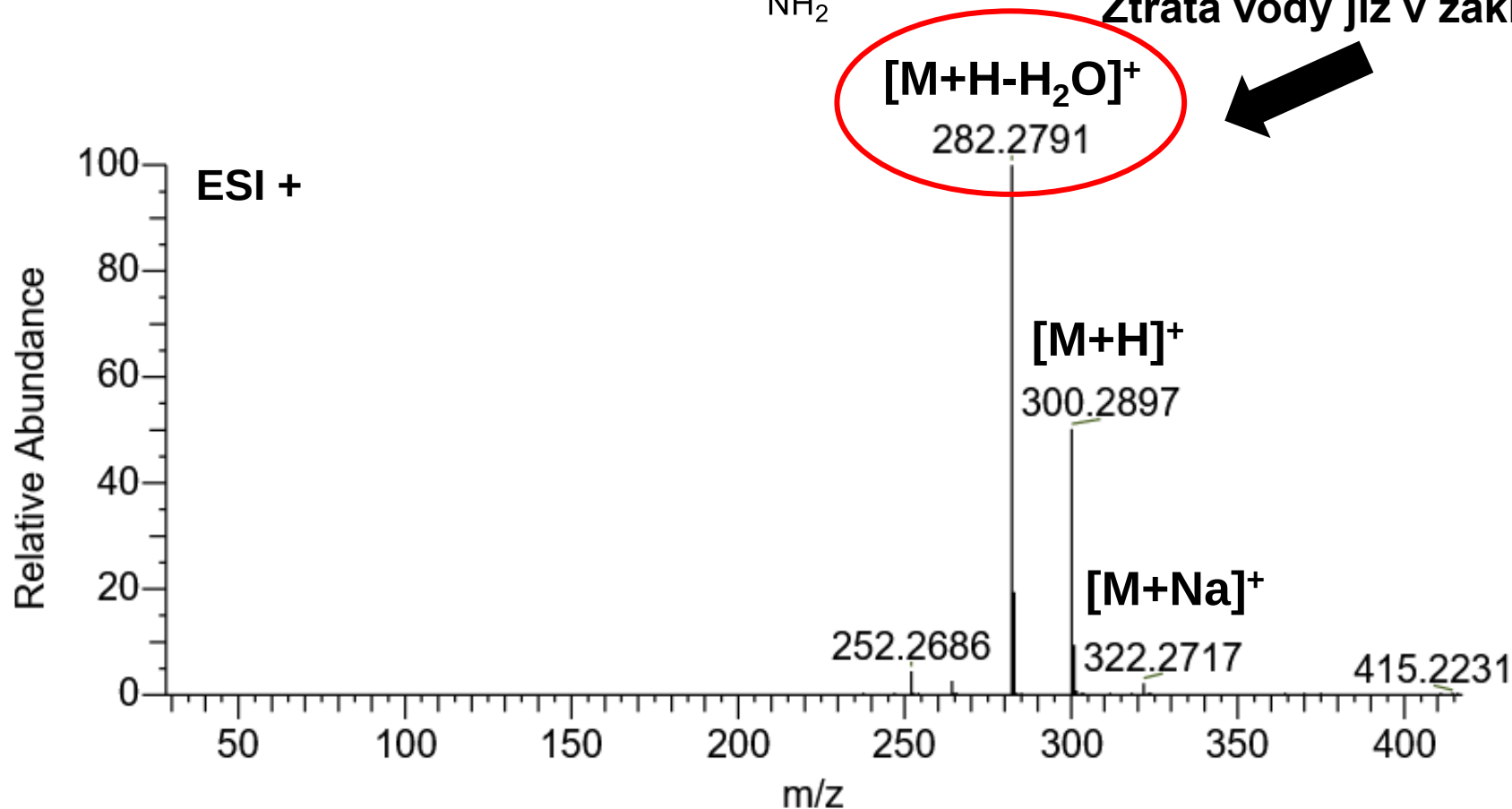
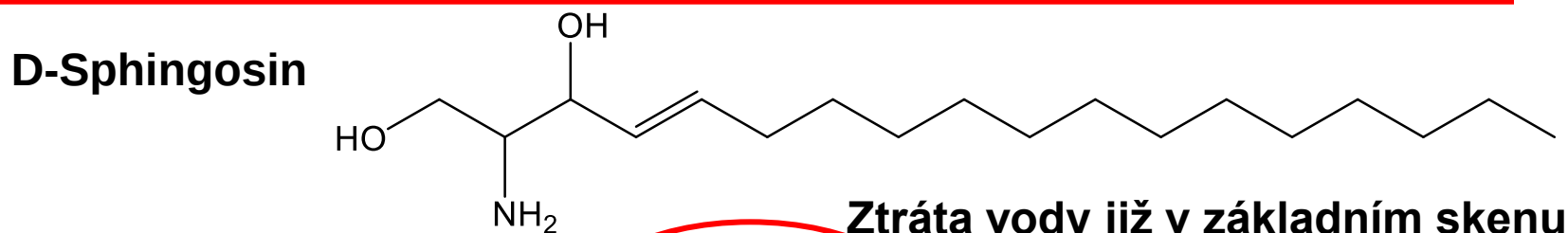


Zobecnění:



snímek převzat z přednášky doc. J. Cvačky (ÚOCHB, Praha)

Charakteristická ztráta H_2O v případě OH skupiny na alifatickém retězci



Zdroj: mzCloud (<https://www.mzcloud.org/>)

4. MS/MS - vliv funkčních skupin na fragmentaci

Funkční skupina / Substituent	Neutrální ztráta / Produktový ion (<i>m/z</i>)
Alkyl a aryl	alken, alkan (zejména u druhé ztráty), C ₆ H ₄ (76) nebo C ₆ H ₆ (78)
Fosfáty (RPO ₄ H ₂)	HPO ₃ (80) a H ₃ PO ₄ (98), <i>m/z</i> 97 [H ₂ PO ₄] ⁻ , <i>m/z</i> 79 [PO ₃] ⁻
Sulfát (RSO ₄ H)	SO ₃ (80) a H ₂ SO ₄ (98), <i>m/z</i> 97 [HSO ₄] ⁻
Amid (R ¹ CONH ₂ , R ¹ CONHR ² , R ¹ CONR ² R ³)	¹⁷ [M+H-NH ₃] ⁺ , [M+H-R ² NH ₂] ⁺ , [M+H-R ² R ³ NH] ⁺
Amin (R ¹ NH ₂ , R ¹ NHR ² , R ¹ NR ² R ³)	¹⁷ [M+H-NH ₃] ⁺ , [M+H-R ² NH ₂] ⁺ , [M+H-R ² R ³ NH] ⁺ , ²⁷ [M+H-HCN] ⁺
Azo (R ¹ N=NR ²)	²⁸ [M+H-N ₂] ⁺ , [M+H-R ⁱ] ⁺ , [M+H-R ⁱ NH] ⁺ , [M+H-R ⁱ N ₂] ⁺
Nitril (RCN)	²⁷ [M+H-HCN] ⁺
Nitrát (RNO ₃)	³⁰ [M-H-NO] ⁻ , ⁴⁶ [M-NO ₂] ⁻ , ⁴⁶ [M-H-NO ₂] ⁻ , ⁶² [M-H-ONO ₂] ⁻
Nitro (RNO ₂)	¹⁷ [M+H-OH] ⁺ , ³⁰ [M+H-NO] ⁺ , ⁴⁶ [M+H-NO ₂] ⁺ , ¹⁷ [M-OH] ⁻ , ³⁰ [M-NO] ⁻ , [M-H- ³⁰ NO] ⁻ , [M-H-HNO] ⁻ , ³¹ [M-H-OH] ⁻ , ¹⁷ [M-NO ₂] ⁻ , ⁴⁶ [M-H-NO ₂] ⁻ , ⁴⁶ [NO ₂] ⁻

Funkční skupina / Substituent	Neutrální ztráta / Produktový ion (m/z)
Nitroso (RNO)	[M+H- ³⁰ NO] ⁺
N-oxid (RN ⁺ O ⁻)	[M+H- ¹⁶ O] ⁺ , [M+H- ¹⁷ OH] ⁺ , [M+H- ¹⁸ H ₂ O] ⁺
Halogenid (RX)	[M+H-X] ⁺ , [M+H-HX] ⁺ , [M-H-X] ⁻ , [M-H-HX] ⁻ , [F] ⁻ , [Cl] ⁻ , [Br] ⁻ , [I] ⁻ ^{19 35 79 127}
Ester (R ¹ COOR ²)	[M+H-R ² OH] ⁺ , [M+H-R ² OH- ²⁸ CO] ⁺ , (např. [M-C ₂ H ₅ - ⁴⁶ OH- ²⁸ CO] ⁺)
Keton (R ¹ COR ²)	[M+H-H ₂ O] ⁺ , [M+H- ²⁸ CO] ⁺ , [R ⁱ CO] ⁺ ^{18 28}
Aldehyd (RCHO)	[M+H- ²⁸ CO] ⁺ , [M-H- ²⁸ CO] ⁻
Karboxyl (RCOOH)	[M+H-H ₂ O] ⁺ , [M+H- ⁴⁴ CO ₂] ⁺ , [M+H-H ₂ O- ²⁸ CO] ⁺ , [M-H- ⁴⁴ CO ₂] ⁻ ^{18 28 44}
Hydroxyperoxid (ROOH)	[M+H-H ₂ O] ⁺ , [M+H-H ₂ O ₂] ⁺ (pozn. Δm/z 34 je i u SH skupiny) ^{18 34 HR-MS rozliší}
Epoxid/Alkohol (RO/ROH)	[M+H-H ₂ O] ⁺ ¹⁸
Fenol (ROH)	[M+H-H ₂ O] ⁺ , [M+H- ²⁸ CO] ⁺ , [M-H-H ₂ O] ⁻ , [M-H- ²⁸ CO] ⁻ ^{18 28 18 28}
Methoxy (ROCH ₃)	[M+H-CH ₃] ⁺ , [M+H-CH ₃ O] ⁺ , [M+H-CH ₃ OH] ⁺ , [M+H-HCOH] ⁺ ^{15 31 32 30}

Nesmyslné (zakázané) neutrální ztráty: 3-13 (14), 21-25, 37-40

Vliv funkčních skupin na fragmentaci

Table 2. Characterization of functional groups of organic compounds using the collision-induced neutral losses from their $[M + H]^+$ and/or $[M - H]^-$ ions

Functional group	Compound class		Neutral loss ^a	
			$[M + H]^+$	$[M - H]^-$
-COOH	Carboxylic acids	Aromatic	H ₂ O	CO ₂
		Aliphatic	-	no CO ₂
-CH=O	Aldehydes	Aromatic	CO	-
-C=O	Ketones	Aromatic	CO	-
-COOCH ₃	Methyl esters	Aliphatic/aromatic	CH ₃ OH	-
-CONH ₂	Amides	Aliphatic/aromatic	NH ₃	-
-SO ₃ H	Sulfonic acids	Aromatic	-	SO ₂ (SO ₃)
-CN	Nitriles	Aliphatic/aromatic	HCN	-
-F	Fluorides	Aliphatic	HF	-
-Cl	Chlorides	Aliphatic/aromatic	HCl (•Cl)	HCl (•Cl)
-Br	Bromides	Aliphatic/aromatic	•Br	-
-NO ₂	Nitroaromatics	Aromatic	•NO / •NO₂ (•OH)	•NO / •NO₂
-OH	Alcohols	Aliphatic	H ₂ O	-
	Phenols	Aromatic	no H ₂ O	-
-NH ₂	Amines	Aliphatic	NH ₃	-
		Aromatic	HCN, no NH ₃	-
-CH ₃	Alkyl derivatives	Aromatic	no CH ₄	-
-C ₂ H ₅		Aromatic	no C ₂ H ₆	-
-NHCH ₃	Methylamines	Aromatic	•CH₃	-

^a bold: neutral loss which is characteristic as well as relatively specific for a given functional group; in parentheses: neutral losses observed only occasionally.

radikálové
ionty

Typické neutrální ztráty < $\Delta m/z$ 100

$\Delta m/z$ (nominální)	$\Delta m/z$ (přesná)	Ztráta	$\Delta m/z$ (nominální)	$\Delta m/z$ (přesná)	Ztráta
15	15,0235	CH ₃ [·]	44	43,9898	CO ₂
17	17,0027	OH [·]	46	45,9929	NO ₂
17	17,0265	NH ₃	46	46,0055	H ₂ O + CO
26	26,0157	C ₂ H ₂	46	46,0419	C ₂ H ₅ OH
18	18,0106	H ₂ O	56	56,0626	C ₄ H ₈
20	20,0062	HF	58	58,0783	C ₄ H ₁₀
27	27,0109	HCN	60	60,0211	CH ₃ COOH
28	27,9949	CO	60	60,0575	C ₃ H ₇ OH
28	28,0061	N ₂	62	61,9878	ONO ₂ [·]
28	28,0313	C ₂ H ₄	64	63,9619	SO ₂
30	29,9980	NO	74	74,0732	C ₄ H ₉ OH
30	30,0106	HCOH	76	76,0313	C ₆ H ₄
30	30,0470	C ₂ H ₆	77	77,0391	C ₆ H ₅ [·]
31	31,0184	CH ₃ O [·]	78	78,0470	C ₆ H ₆
31	31,0422	CH ₃ NH ₂	79	78,9186	Br [·]
32	32,0262	CH ₃ OH	80	79,9262	HBr
34	33,9877	H ₂ S	80	79,9568	SO ₃
35	34,9689	Cl [·]	80	79,9663	HPO ₃
36	35,9767	HCl	98	97,9668	H ₂ SO ₄
36	36,0211	2*H ₂ O	98	97,9769	H ₃ PO ₄
42	42,0470	C ₃ H ₆			

Vliv funkčních skupin na fragmentaci – vybraná literatura

Even-electron ions: a systematic study of the neutral species lost in the dissociation of quasi-molecular ions

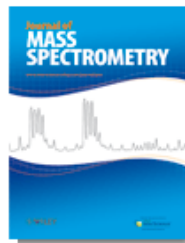
Karsten Levsen^{1,*}, Hans-Martin Schiebel², Johan K. Terlouw³, Karl J. Jobst³, Manfred Elend¹, Alfred Preiß¹, Herbert Thiele⁴ and Arnd Ingendoh⁴

Article first published online: 2 JUL 2007

DOI: 10.1002/jms.1234

Copyright © 2007 John Wiley & Sons, Ltd.

Issue



Journal of Mass Spectrometry

Volume 42, Issue 8, pages 1024–1044, August 2007



Journal of Chromatography A

Volume 1217, Issue 25, 18 June 2010, Pages 3908–3921

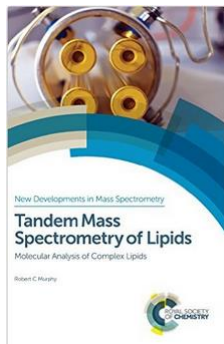
Mass Spectrometry: Innovation and Application. Part VI



Review

Basic rules for the interpretation of atmospheric pressure ionization mass spectra of small molecules

Michal Holčápek  , Robert Jirásko, Miroslav Lísa



New Developments in Mass Spectrometry

Tandem Mass Spectrometry of Lipids

Molecular Analysis of Complex Lipids

Robert C. Murphy

ISBN-10: 1849738270

ISBN-13: 978-1849738279

Anal Bioanal Chem (2008) 391:59–78

DOI 10.1007/s00216-008-1962-7

REVIEW

High-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites

M. Holčápek • L. Kolářová • M. Nobilis



Journal of Chromatography A

Volume 1217, Issue 25, 18 June 2010, Pages 4061–4070

Mass Spectrometry: Innovation and Application. Part VI



Group-specific fragmentation of pesticides and related compounds in liquid chromatography–tandem mass spectrometry

W.M.A. Niessen  

STRUCTURAL ANALYSIS OF ORGANOMETALLIC COMPOUNDS WITH SOFT IONIZATION MASS SPECTROMETRY

Robert Jirásko and Michal Holčápek*

Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry, University of Pardubice, Studentská 573, 53210 Pardubice, Czech Republic

Mass Spectrometry Reviews, **2011**, 30, 1013–1036

© 2010 by Wiley Periodicals, Inc.

5. Využití různých identifikačních softwarů a databází

5. Databáze a software využívané v MS identifikaci

- **Prohledávání a porovnávání v databázích (nutné vysoké R)** - knihovny sloučenin (zadávaní **správně naměřené přesné m/z** nebo **elementárního složení**) nebo knihovny spekter (spektrální databáze o několik řádu menší než databáze sloučenin) – *knihovny sloučenin* např. PubChem, ChemSpider, LipidSearch, KEGG, HMDB, atd.; *spektrální knihovny* např. MassBank, m/z Cloud (spektrální stromy), Metlin atd.
- **Software umožňující hledání ve strukturních databázích sloučenin + počítačem simulované (*in silico*) fragmentace**
 - predikce MS² spektra na základě definovaných pravidel fragmentace (např. MassFrontier, ACD/MS Fragmenter)
 - **kombinační fragmentace** – kombinuje, buď všechny možné fragmenty nebo zohledňuje, že některé vazby se štěpí lépe (vazebná disociační E), např. MetFrag.
- **Software kombinující porovnávání se spektrální databází a generování *in silico* fragmentací**
např. MetFusion, Metlin.

Spektrální databáze m/zCloud



Libraries

 Spectral Libraries

LC/MS Autoprocessed
LC/MS Reference

 Library Search

robert.jirasko@gmail.com (Viewer)

Log out

Training

Spectral Libraries - LC/MS Reference

Refresh

Expand all

Collapse all

	ID ↑	Legacy ID	Compound Name	Classes	No. of Trees	Monoisotopic ...	Ion Activation	Ionization	MSn Level	Polarity
										
+	51	50	Clomazone	Pesticides/Herbicides	5	239.0713	HCD and 1 more	ESI and 1 more	MS ² and 1 more	Positive
+	52	23	Epicatechin	Endogenous Metabolites	1	290.0790	CID and 1 more	NSI	MS ²	Positive
+	53	22	Diosmetin	Endogenous Metabolites	1	300.0634	HCD	ESI	MS ²	Positive
+	54	21	Catechin gallate	Endogenous Metabolites	1	442.0900	HCD	ESI	MS ²	Positive
+	55	20	Apigenin	Endogenous Metabolites	5	270.0528	CID and 1 more	NSI and 1 more	MS ² and 2 more	Positive
+	56	19	α-Estradiol		2	272.1776	CID and 1 more	ESI	MS ⁵ and 1 more	Positive
+	57	18	Naringenin	Endogenous Metabolites	3	272.0685	CID and 1 more	ESI	MS ⁴ and 2 more	Negativ
+	58	17	Naringin	Endogenous Metabolites	7	580.1792	HCD and 1 more	APCI and 2 more	MS ² and 1 more	Negativ
+	59	16	1,7-Dimethyluric acid	Endogenous Metabolites	3	196.0596	HCD and 1 more	ESI	MS ³ and 2 more	Positive
+	60	15	1,3-Dimethyluric acid	Endogenous Metabolites	2	196.0596	HCD and 1 more	ESI	MS ⁴ and 1 more	Negativ
+	61	14	L-Dopa	Endogenous Metabolites	2	197.0688	CID and 1 more	ESI	MS ⁵ and 1 more	Positive
+	62	13	Creatinine	Endogenous Metabolites	2	113.0589	HCD and 1 more	ESI	MS ²	Positive



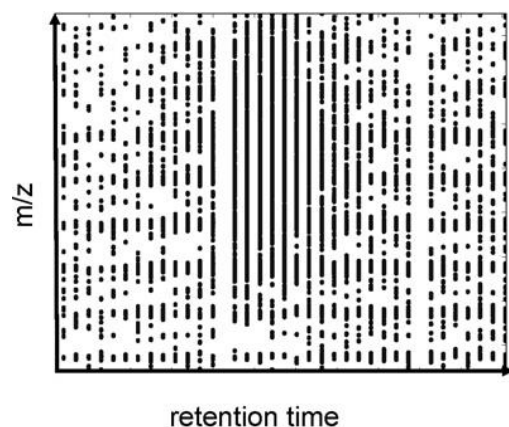
50 items per page

51 - 100 of 11275 items

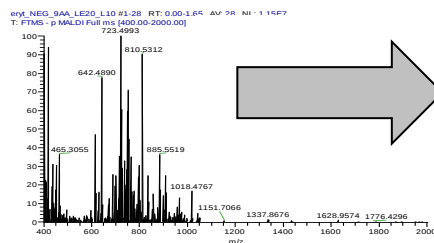
<https://www.mzcloud.org/>

Nejprve konverze a správné procesování MS dat

- Firemní nebo sdílený otevřený software - nahrávání surových raw dat nebo export do univerzálního formátu:
 - export binárních dat obsahujících jednotlivé m/z a intenzity pro každý sken (čas) nebo zprůměrované spektrum
 - konverze raw dat - např. mzML, mzXML, netCDF, ASCII, mgf, mzData, atd.



export MS spekter
(čárové nebo profilové)



m/z_1	INT_1
m/z_2	INT_2
m/z_3	INT_3
...	
m/z_n	INT_n

- **Procesování MS dat** - správný sběr MS píku, odečet pozadí, vyhlazování (je třeba jen opatrně), zarovnání píků v rámci všech záznamů (synchronizace retenčních časů i m/z), kalibrace hmoty, izotopická korekce (lipidy), normalizace (na IS), odstranění m/z s nulovými hodnotami intenzity, odstranění „shoulder píků“, atd., často jsou součástí i napojení na databáze sloučenin a knihovny spekter

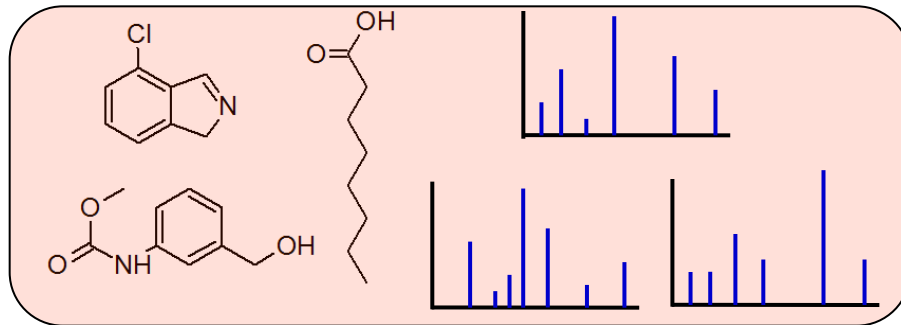
Procesování dat – přehled softwaru využívaného v metabolomice

Table 2 MS-based metabolomics data processing and analysis software/websites

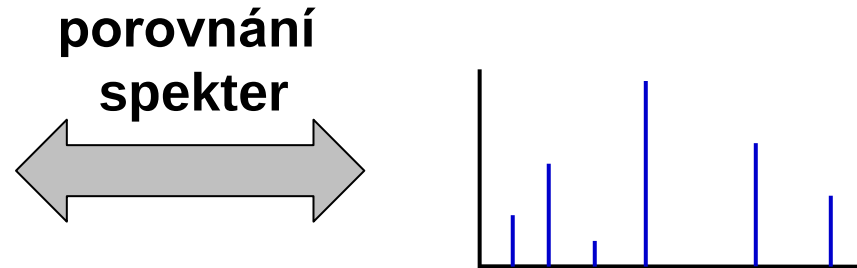
Software/website	Accepted data forms	Statistics	Pathway analysis	Data visualization	Source
MarkerLynx	.raw	✓		✓	Waters
MarkerView	.d	✓		✓	AB Sciex
MassHunter	all	✓		✓	Aglient
Mass Profiler	all	✓	✓	✓	Aglient
MetQuest	.raw	✓		✓	Thermo
SIEVE	.raw	✓		✓	Thermo
IDEOM	all	✓		✓	https://mzmatch.sourceforge.net/ideom.html
MathDAMP	all	✓		✓	https://mathdamp.iab.keio.ac.jp/
MAVEN	all	✓	✓	✓	https://maven.princeton.edu
MetAlign	all	✓		✓	https://www.metalalign.nl
MetboAnalyst	all	✓	✓	✓	https://www.metaboanalyst.ca/
MET-COFEA	all	✓		✓	https://bioinfo.noble.org/manuscript-support/metcofea/
MET-XAlign	all	✓		✓	https://bioinfo.noble.org/manuscript-support/metxalign
MS-DIAL	all	✓		✓	https://prime.psc.riken.jp/Metbolomics_Software/MS-DIAL
MsXelerator	all	✓		✓	https://www.msmatrix.com/
MZmine	all	✓		✓	https://mzmine.sourceforge.net/
msCompare	all	✓			https://trac.nbic.nl/mscompare
OpenMS	all	✓		✓	https://www.openms.de/
SMART	all	✓		✓	https://www.stat.sinica.edu.tw/hsinchou/metabolomics/SMART.htm
XCMS	all	✓	✓		https://xcmsonline.scripps.edu/

Hledání a porovnávání v knihovnách spekter

Knihovna sloučenin a naměřených
MS/MS spekter



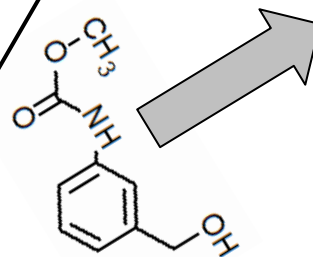
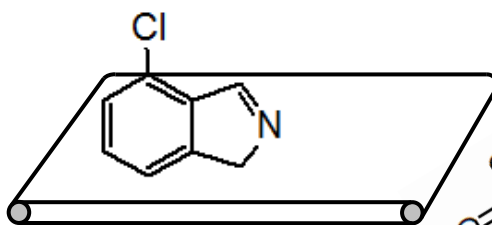
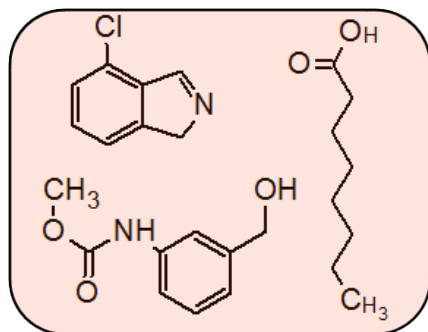
Měřené MS/MS spektrum



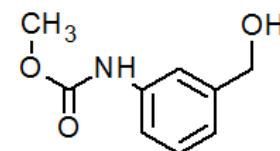
- Výhodou je HRMS – tzn. známe-li elementární složení prekurzoru a fragmentů.
- Porovnáme MS/MS spektra měřená stejným principem fragmentace (např. IT-CID, ETD).
- Spektrální knihovny jsou řádově menší než knihovny sloučenin.
- **Bodování** na základě **podobnosti** či **odlišnosti spekter** (informace, které spektrum z databáze se nejvíce shoduje se změřeným spektrem) - např. počet spárovaných píků.
- **Strukturně podobné látky** mají podobnou fragmentaci – **stejné neutrální ztráty** či **produktové ionty**, je potřeba interpretovat všechny píky ve spektru (nejlépe pokud fragmentujeme pouze jednu látku – kvalitní separace nebo jednoduchý vzorek – jinak hrozí falešně pozitivní přiřazení píků).

Porovnávání s *in silico* fragmentací

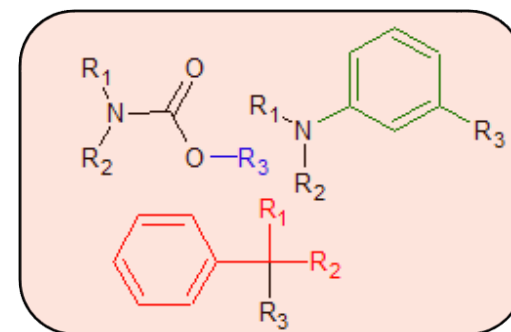
Strukturní databáze molekul



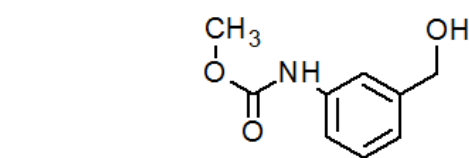
Fragmentace s pravidly



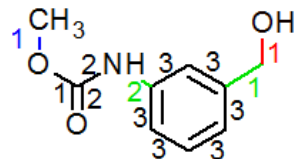
Definovaná pravidla



Kombinační fragmentace



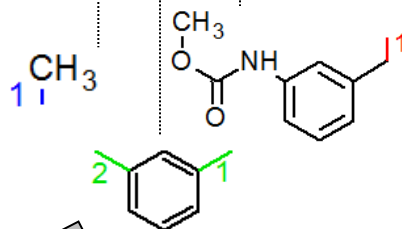
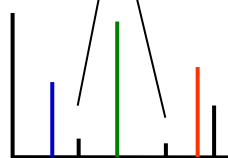
Skóre fragmentace pro každou vazbu (číslo představuje náročnost štěpení)



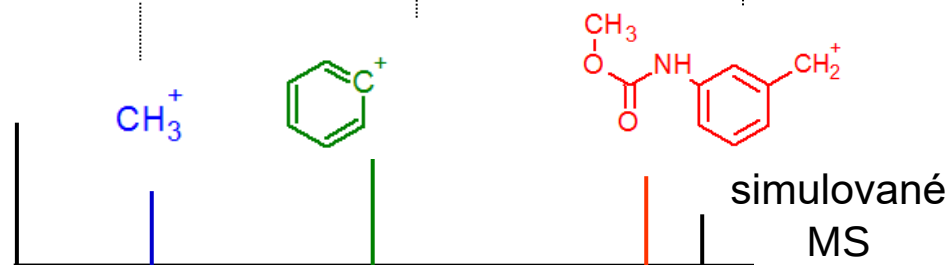
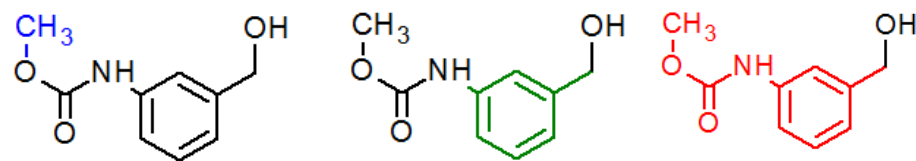
skóre: 5

nepřiřazené píky: 2

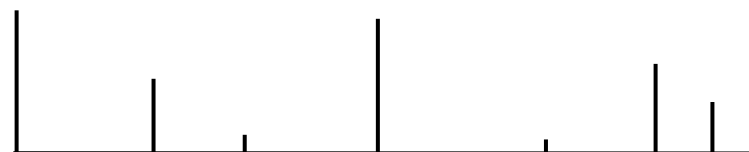
No hit



Aplikace pravidel

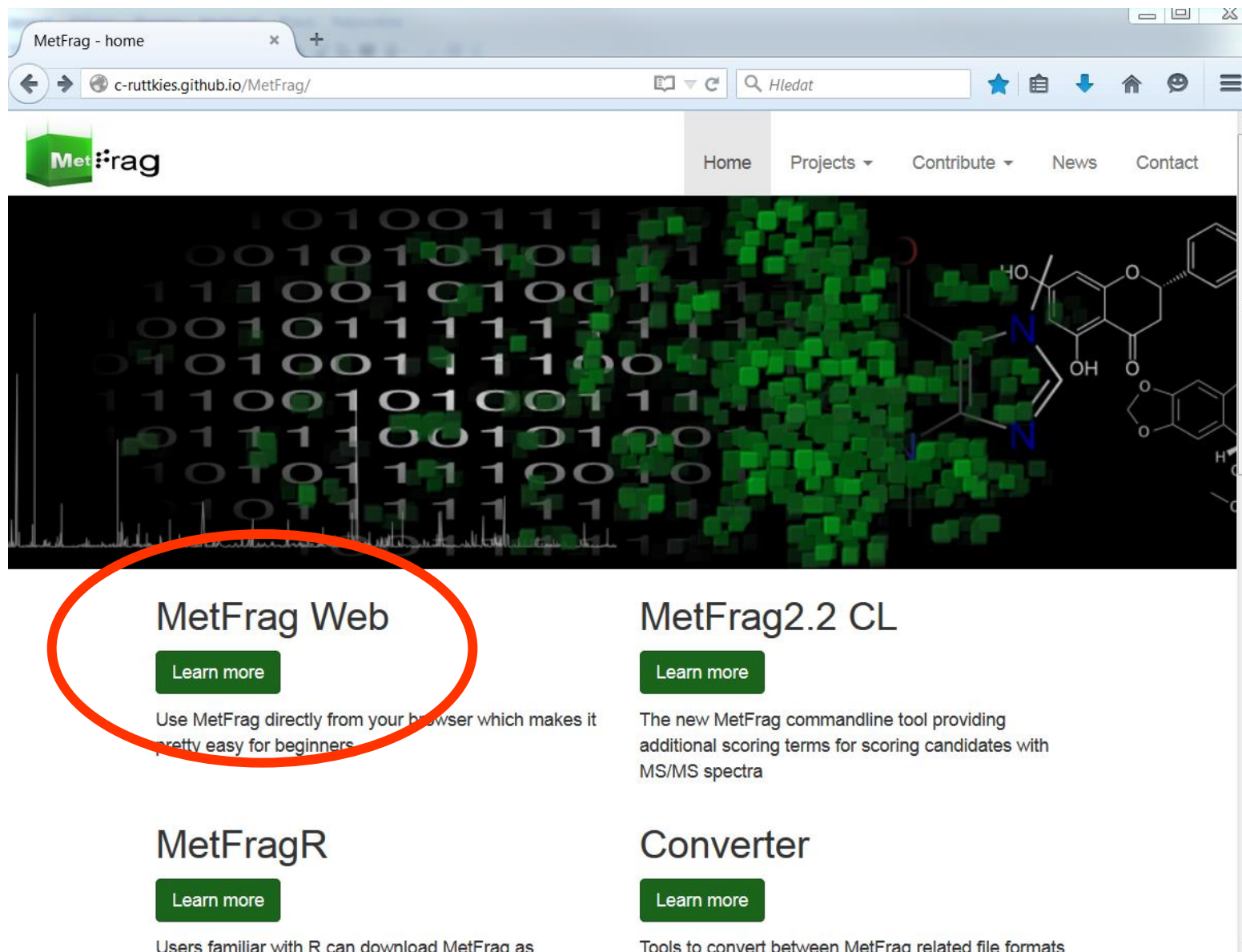


simulované MS



Měřené MS

Kombinační fragmentace - software MetFrag



MetFrag - home

c-ruttkies.github.io/MetFrag/

MetFrag

Home Projects Contribute News Contact

MetFrag Web

[Learn more](#)

Use MetFrag directly from your browser which makes it pretty easy for beginners

MetFrag2.2 CL

[Learn more](#)

The new MetFrag commandline tool providing additional scoring terms for scoring candidates with MS/MS spectra

MetFragR

[Learn more](#)

Users familiar with R can download MetFrag as

Converter

[Learn more](#)

Tools to convert between MetFrag related file formats

<http://c-ruttkies.github.io/MetFrag/>

Software MetFrag – kombinační fragmentace

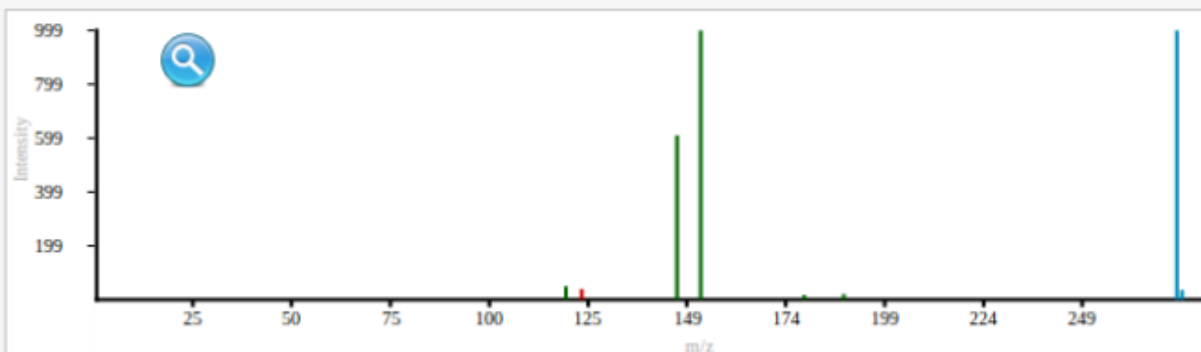
[Download complete table](#) [Generate output files](#)

[View spectrum](#)

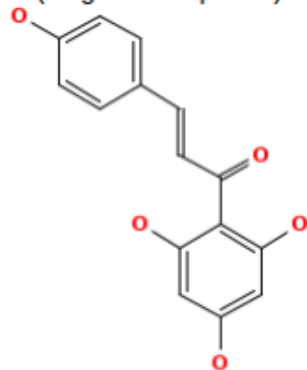
Log

[Download complete table](#) [Generate output files](#)

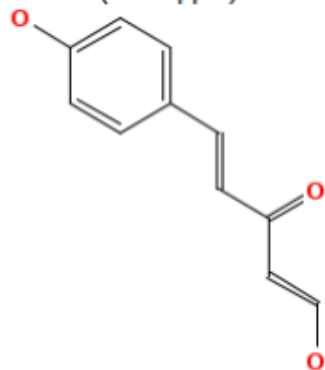
Fragments



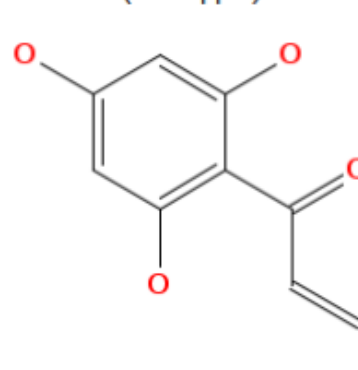
Mass: 272.0685 [C₁₅H₁₂O₅]
(Original Compound)



Mass: 189.0546 [C₁₁H₈O₃ + H]⁺
(-18.0 ppm)



Mass: 179.0339 [C₉H₇O₄]⁺
(-11.7 ppm)



Mass: 153.0182 [C₇H₅O₄]⁺
(-5.2 ppm)

Mass: 147.0441 [C₉H₇O₂]⁺
(0.7 ppm)

Mass: 119.0491 [C₈H₇O₁]⁺
(-16.0 ppm)

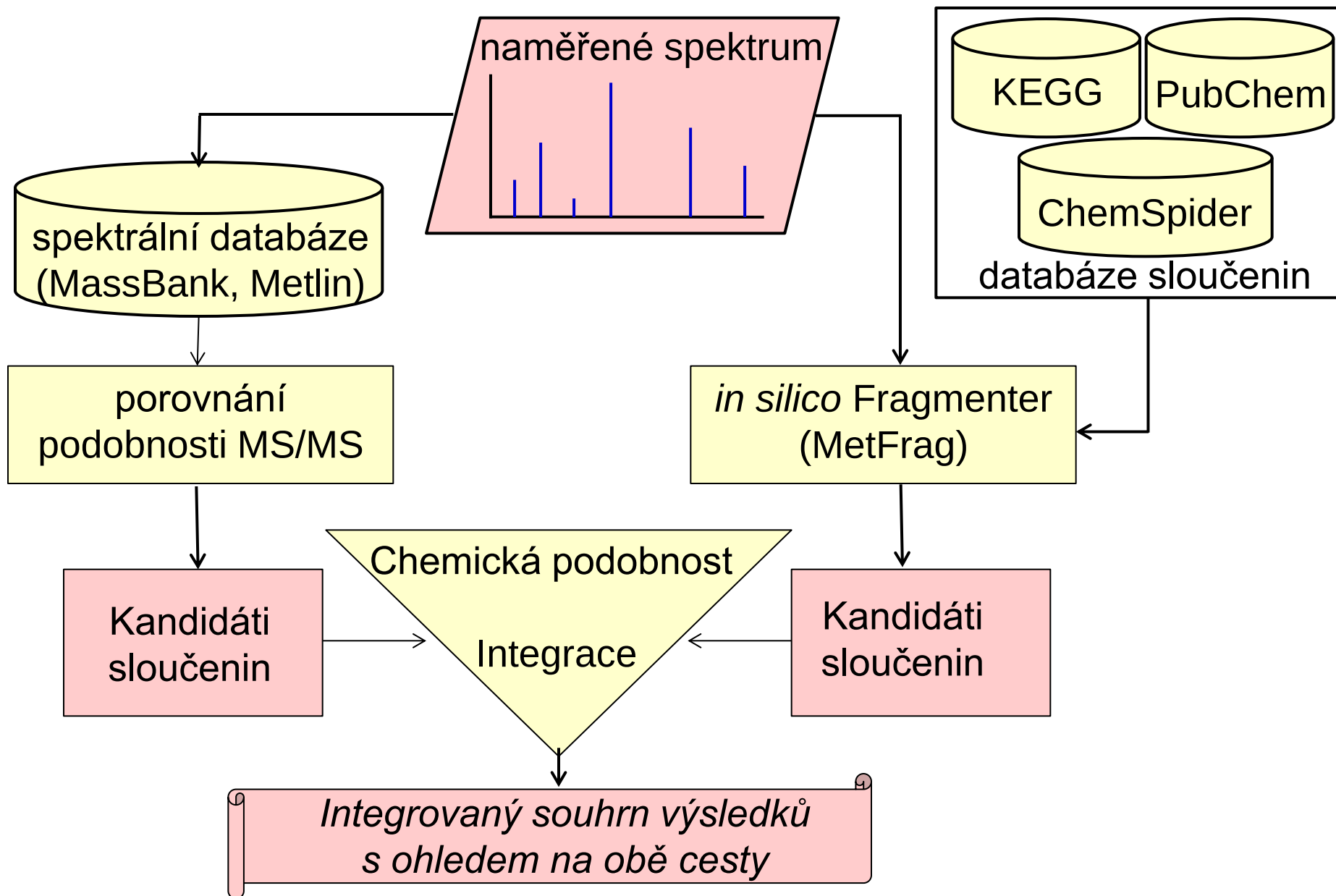
06561

[Fragments Download](#)

12087

[Fragments Download](#)

Software MetFusion



Přehled MS/MS databází - metabolomika

Database	Pros	Cons
HMDB [31]	- Public - Mass spectral data on ~9500 chemical standards - Spectral data are downloadable	- Mixed collision energies and instrument types
METLIN [53]	- Public - Curated mass spectral data on >13,000 chemical standards - Over 63,500 high-resolution MS/MS spectra	- Only Q-TOF data - Spectral data are not downloadable
LipidSearch [92]	- Over 1.5 million lipid ions and their predicted fragment ions - Includes lipid adduct ions and MSⁿ fingerprints - Data are stored in XML files	- Commercial license required - Developed for Orbitrap technology - <i>In silico</i> generated MS/MS library - Overlap with LipidBlast is unclear
LipidBlast [62]	- Over 200,000 tandem mass spectra covering 25 lipid classes - Publicly available - Spectral data are downloadable	- <i>In silico</i> generated library using heuristic modeling of tandem mass spectra - "One-third rule" limitation: developed with mostly ion-trap tandem mass spectra - Does not allow batch search of precursor ions - Overlap with LipidSearch unclear
LipidMaps [60]	- Over 40,000 unique lipid structures - Spectral data are downloadable	- MS/MS spectra only predicted in negative or positive ionization mode - MS/MS spectra only available for one adduct per lipid
mzCloud [93]	- Public - Highly curated MS/MS and MSⁿ spectral information - Spectral peaks are structurally annotated	- Low number of metabolites - Spectral data are not downloadable
Wiley 10th [94]	- Largest mass spectral library commercially available - 719,000 spectra (>950,000 spectra if combined with NIST 14) - Over 638,000 compounds (>760,000 compounds if combined with NIST 14) - Compatible with most instrument manufacturers	- Only Orbitrap spectra - Commercial license required - Only 70 eV EI mass spectra - Beyond metabolomic applications
MaConDa [95]	- Public database of ~200 contaminants in mass spectrometry - Theoretical and experimental spectral records detected across several MS platforms - Downloadable	- Has no MS/MS data
MassBank [29]	- Public - Mass spectra from different MS setups - Approximately 19,000 MS1 and 28,000 MS2 and MSⁿ spectra - Spectral data are downloadable	- Not sufficiently curated
NIST 14 [63]	- 234,284 ESI MS/MS spectra of 9344 chemical standards - Large number of MS/MS spectra from adducts - MS/MS spectra recorded using multiple high- and low-resolution instruments - Curated collection of 276,259 EI mass spectra from 242,477 unique compounds	- Commercial license - Lack of additional identifiers to external database resources

Přehled MS/MS databáze – malé molekuly

#	Name	Number of MS/MS spectra	Number of compounds	Online search	Freely available	Instrument diversity	In silico
1	NIST14 MS/MS	193 120	9344	–	\$	+++	–
2	MassBank	22 000	2800	+	+	+++	–
3	METLIN	72 268	14 034	+	+/ \$	++	+/-
4	LipidBlast	212 516	119 200	–	+	++	+
5	MoNA	194 000	68 700	+	+	+++	+/-
6	mzCloud	182 000	2800	+	+	+	–
7	MetaboBASE	26 000	13 000	–	\$	+	–
8	GNPS	212 230	12 694	+	+	++	–
9	Spektraris	2626	487	+	+	+	–
10	ReSpect	9000	4000	+	+	+	–
11	MSforID	20 000	1200	–	\$	+	–
12	HMDB	5773	3729	+	+	++	+/-
13	MetaMS	150	150	+	+	+	–
14	Sumner Library	1734	289	–	+	+	–
15	ChemicalSoft	1619	6476	–	+/ \$	+	–
16	UNPD-ISDB	170 602	170 602	–	+	+	+
17	Designer drugs	10 000	750	–	\$	+	–
18	Drugs/poisons	10 000	6816	–	\$	+	–