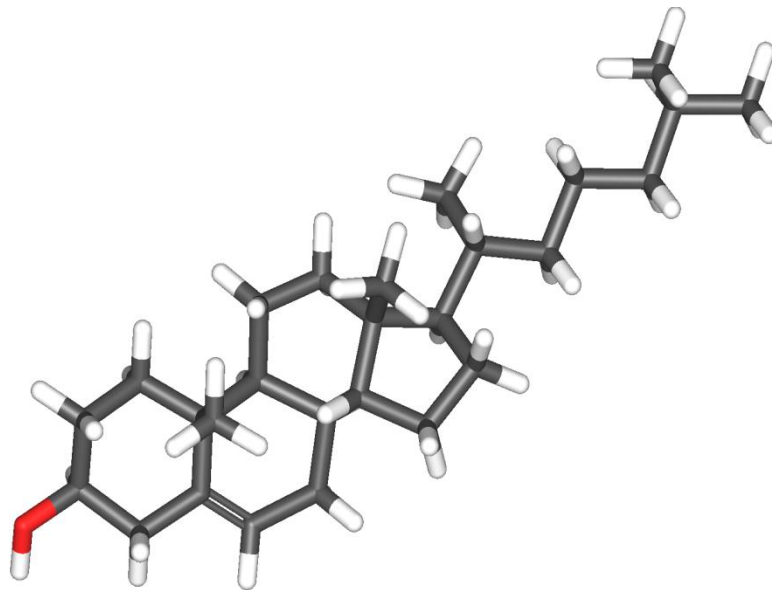


Vybrané příklady interpretace „měkkých“ MS a MS/MS spekter

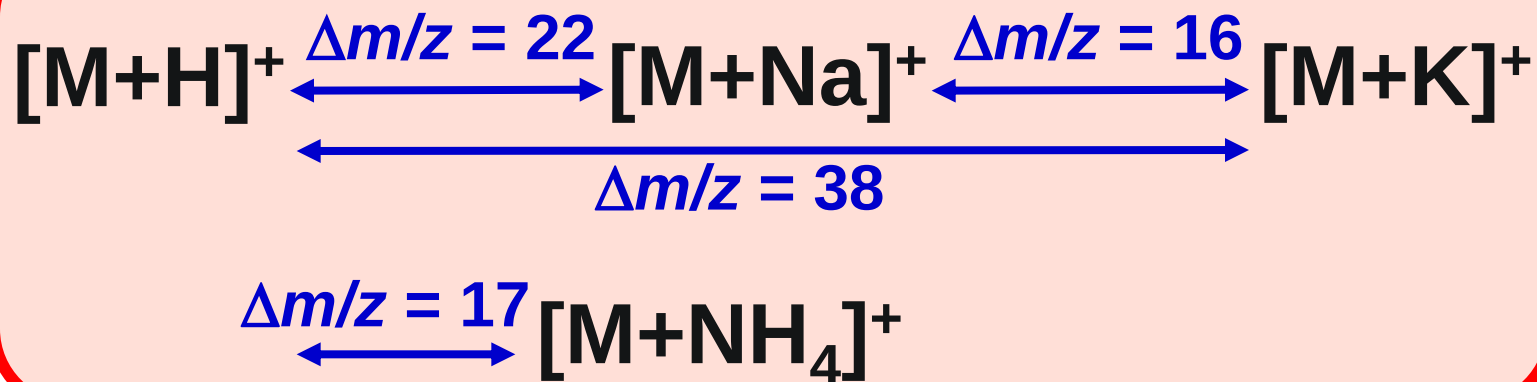
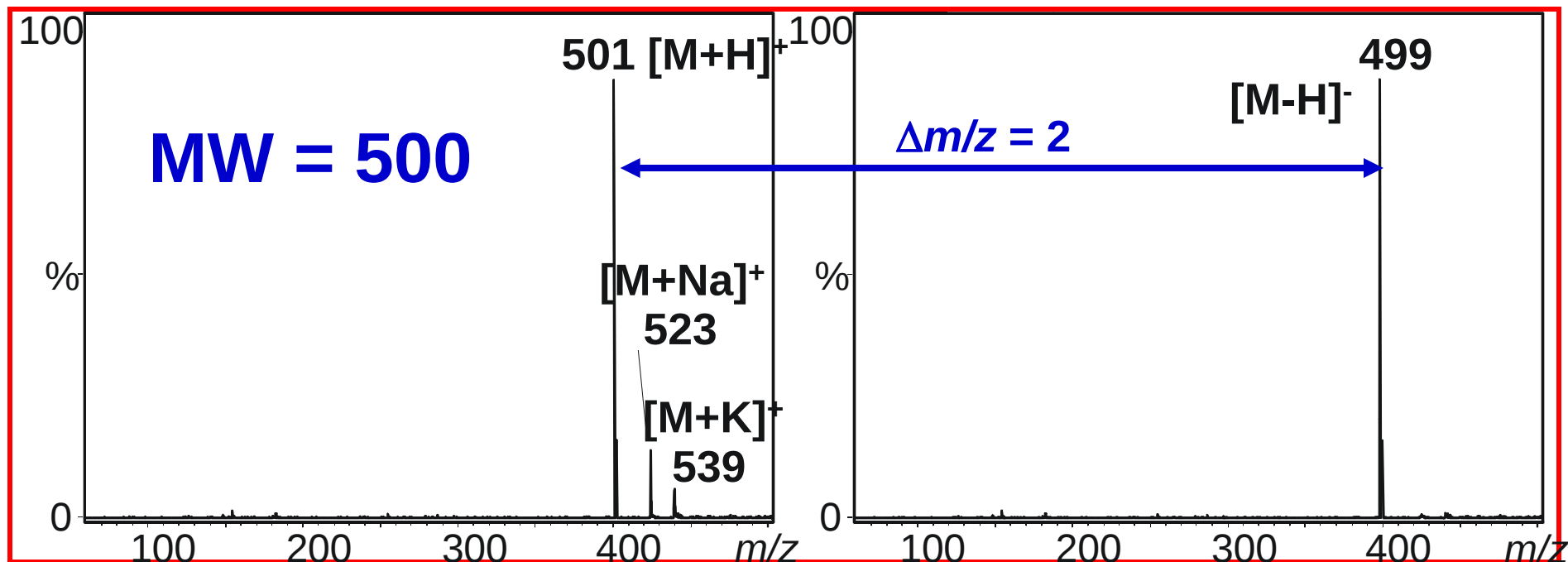


Kroky při identifikaci iontů (molekul) pomocí MS

- 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, filtrování s ohledem na hmotnostní defekt, chromatogram neutrálních ztrát u LC/MS/MS měření, atd.

Určení molekulové hmotnosti (API-MS)



Nejběžnější typy molekulárních aduktů

Singly charged molecular adducts in positive-ion API mass spectra.

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 ₂ O] ⁺	18	+10.6
[M+Na] ⁺	22	-18.1
[M+H+CH ₃ OH] ⁺	32	+26.2
[M+K] ⁺	38	-44.1
[M+H+CH ₃ CN] ⁺	41	+26.5
[M+H+H ₂ O+CH ₃ OH] ⁺	50	+36.8
[M+Na+CH ₃ CN] ⁺	63	+8.5
[M+Ag] ⁺	106	-102.7

posun od iontu
[M+H]⁺

Singly charged molecular adducts in negative-ion API mass spectra.

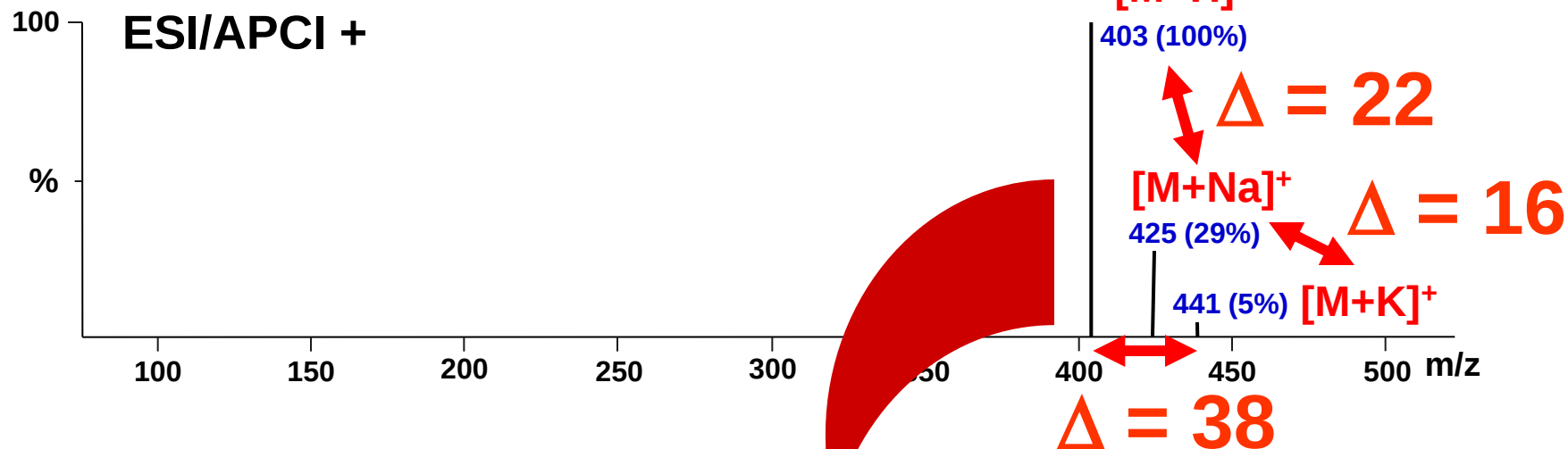
Molecular adduct	Nominal mass shift ^a [Δ Da]	Exact mass shift ^a [mDa]
[M-H+H ₂ O] ⁻	18	+10.6
[M+F] ⁻	20	+6.2
[M-H+CH ₃ OH] ⁻	32	+26.2
[M+Cl] ⁻	36	-23.3
[M+HCOO] ⁻	46	+5.5
[M+NO ₂] ⁻	47	+0.7
[M+CH ₃ COO] ⁻	60	+21.1
[M+NO ₃] ⁻	63	-4.4
[M+Br] ⁻	80	-73.8
[M+HSO ₄] ⁻	98	-32.6
[M+H ₂ PO ₄] ⁻	98	-23.1
[M+CF ₃ COO] ⁻	114	-7.1
[M+I] ⁻	128	-87.7
[2M-H] ⁻	-	-

posun od iontu
[M-H]⁻

#1/ Určete MW, popište ionty

MW=402

ESI/APCI +

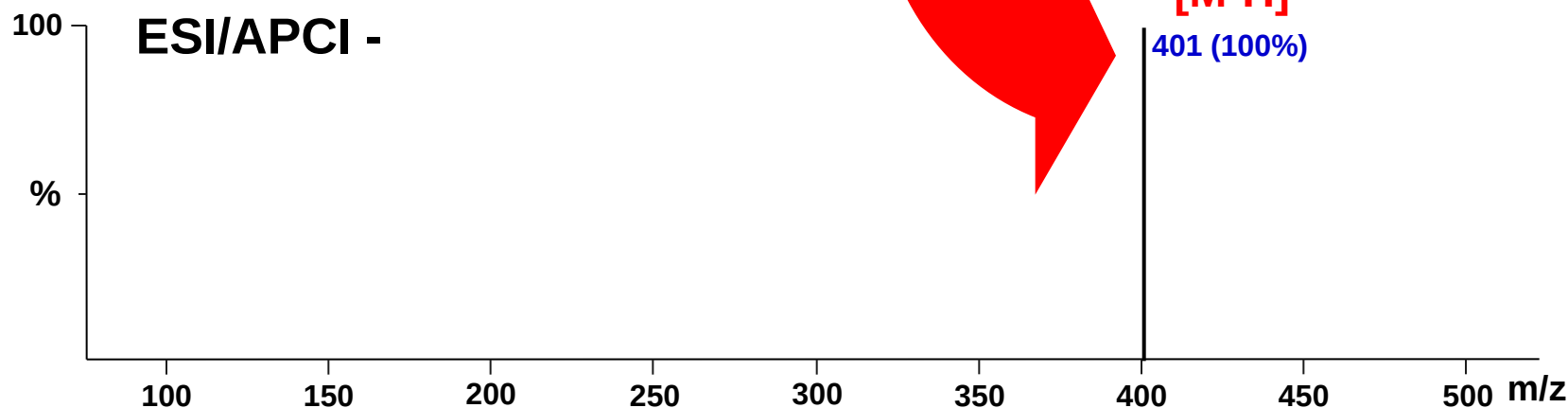


m/z 420 $[M+NH_4]^+$

m/z 461 $[M+CH_3COO]^-$ $\Delta = 2$

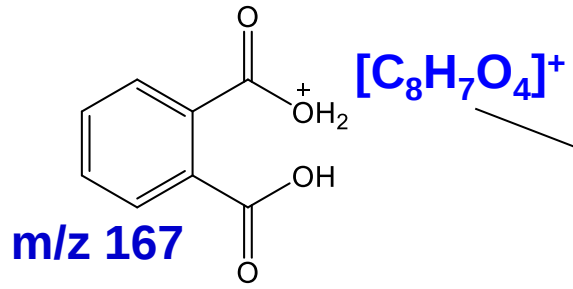
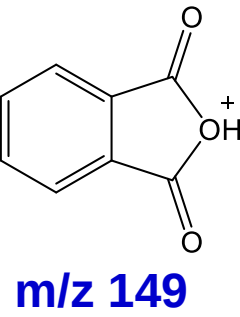
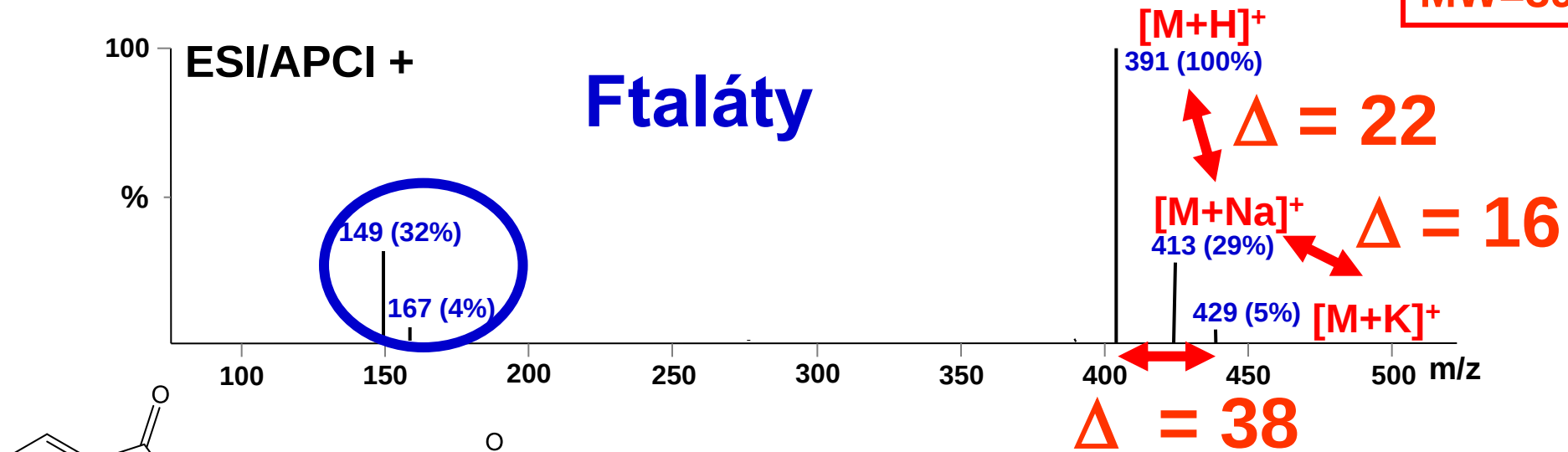
Úkol: jaké změny očekáváte po přidavku 5 mM octanu amonného do mobilní fáze

ESI/APCI -

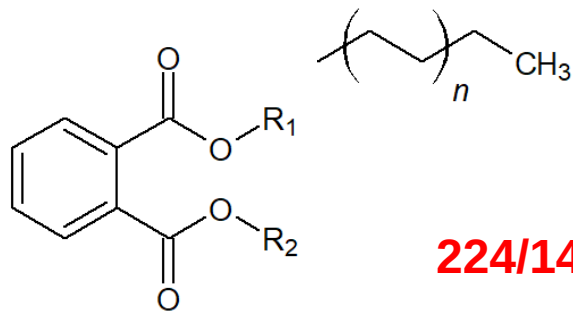


#2/ Určete MW, popište ionty

MW=390



Výpočet elementárního složení ftalátů:

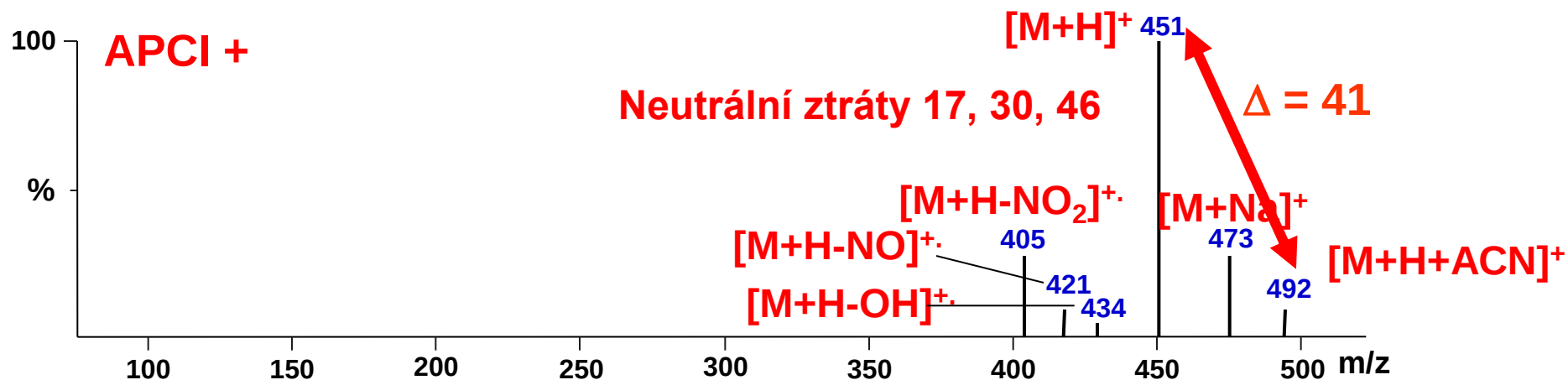


$[M+H]^+ \rightarrow [C_{16+8}H_{32+7}O_4]^+ = [C_{24}H_{39}O_4]^+$

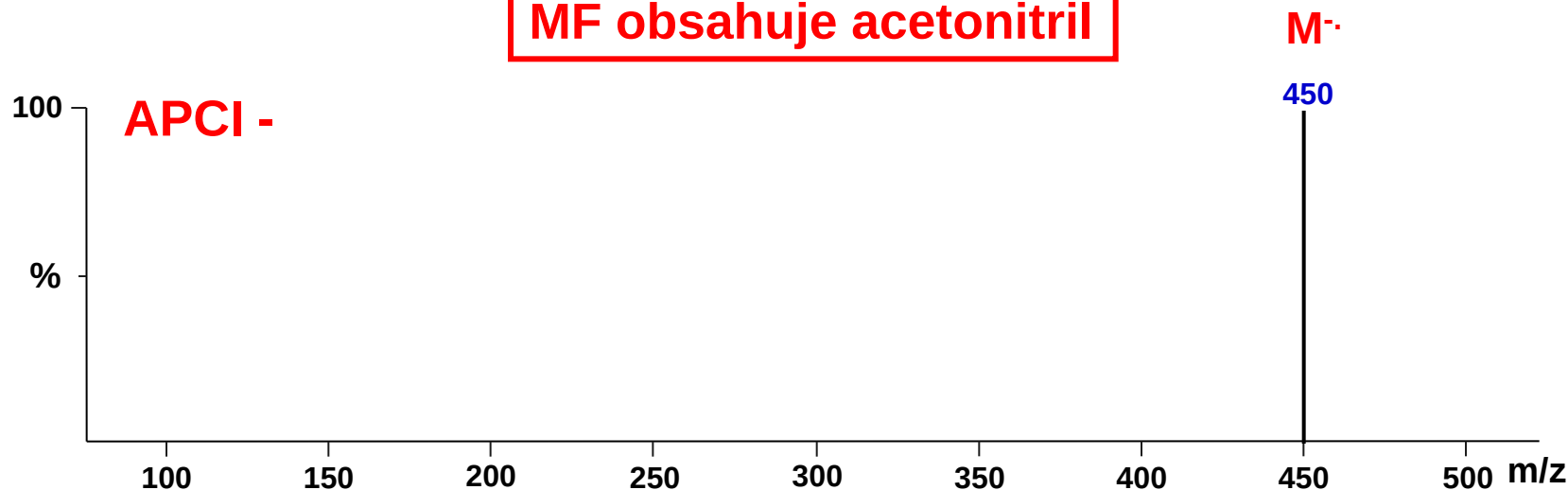
$391 - 167 = 224$
 $224/14 = 16 = 16 \times CH_2 = C_{16}H_{32}$

$M \rightarrow C_{24}H_{38}O_4$
Di(n-octyl) ftalát

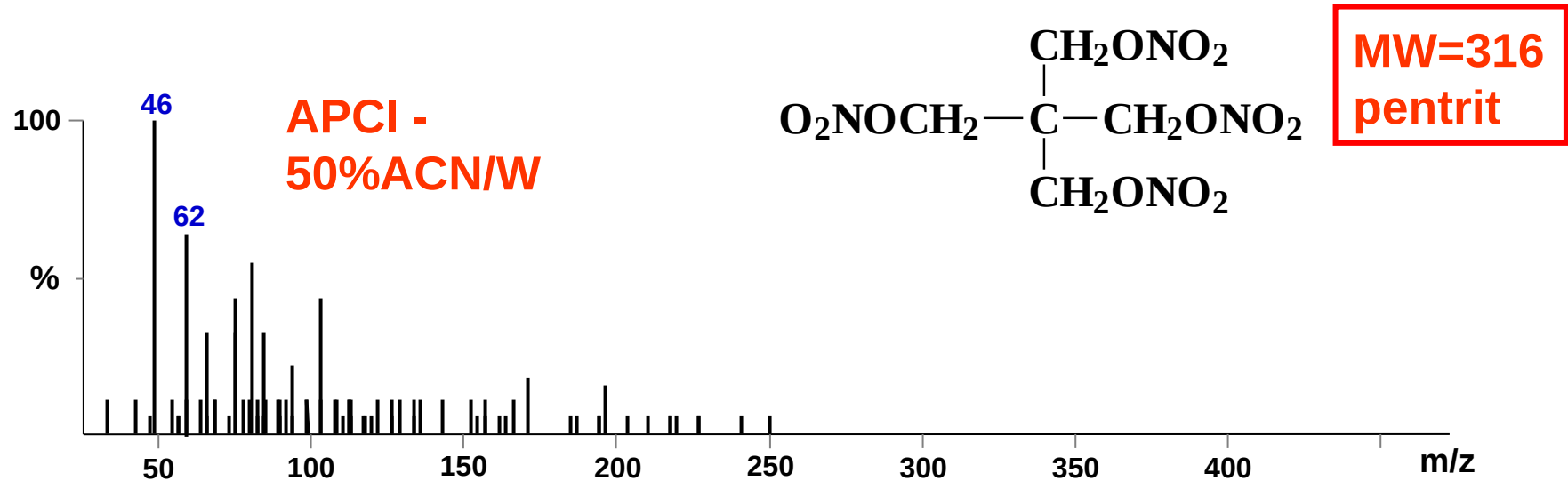
#3/ Určete MW a další strukturní informace



MW=450
nitroskupina
sudý počet dusíků
MF obsahuje acetonitril



#4/ O jaký typ sloučeniny se jedná? Tvorba aduktů může vést ke stabilizaci iontu.



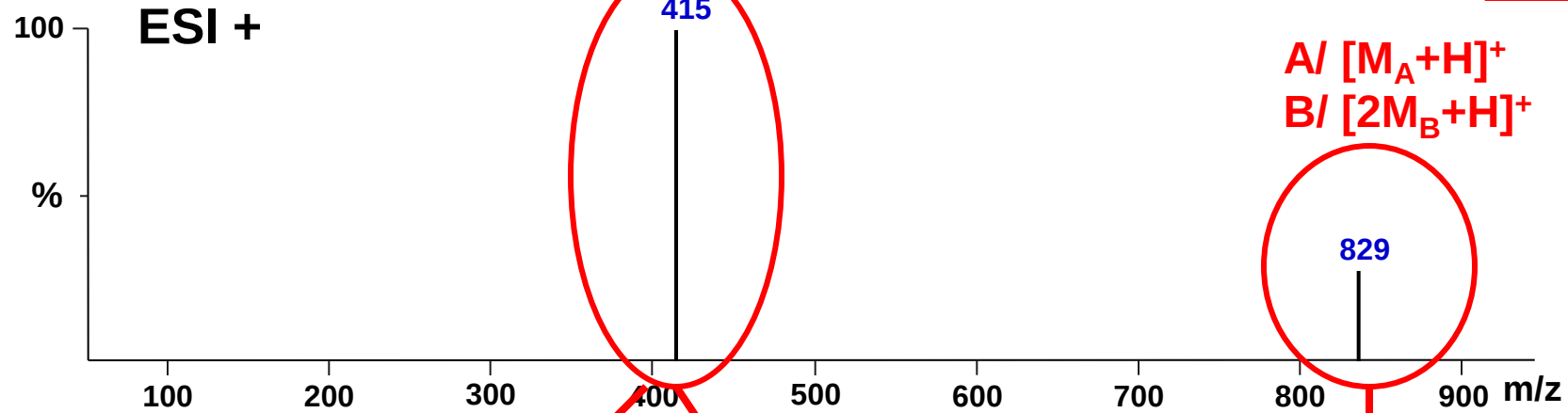
#5/ Určete MW

$$A/ [M_A + 2H]^{2+} \rightarrow (M_A + 2) / 2 = 415 \rightarrow$$

$$B/ [M_B + H]^+ \rightarrow M_B + H = 415 \rightarrow$$

$$A: M_A = 828$$

$$B: M_B = 414$$



$$A/ [M_A + H]^+$$

$$B/ [2M_B + H]^+$$

829

415.0

A/

415.5

416.0

415.0

B/

416.0

417.0

829.0

830.0

831.0

Určení elementárního složení

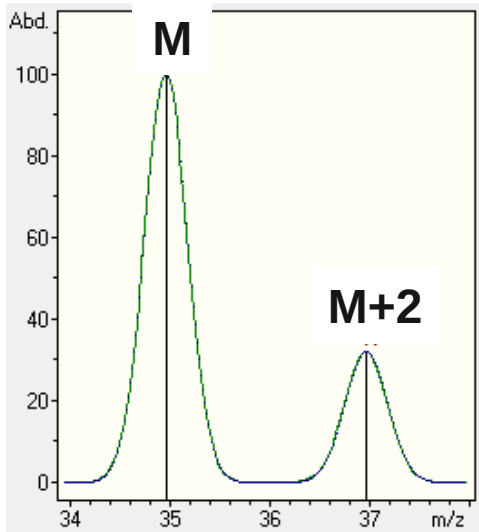
Defekty atomových hmotností

Izotopické zastoupení

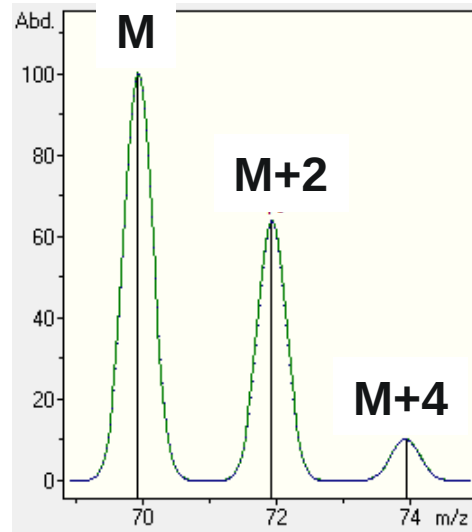
Prvek	Nominální atomová hmotnost [Da]	Hmotnostní schodek [mDa]	Přírodní zastoupení izotopů			Typ prvku
			M [%]	M+1 [%]	M+2 [%]	
H	1	7.8	100	0.015		"M"
C	12	0	100	1.1		"M+1"
N	14	3.1	100	0.37		"M+1"
O	16	-5.1	100	0.04	0.2	"M+2"
F	19	-1.6	100			"M"
Si	28	-23.1	100	5.1	3.4	"M+2"
P	31	-26.2	100			"M"
S	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"
Na	23	-10.2	100			"M"

Izotopická obálka pro atomy chloru a bromu

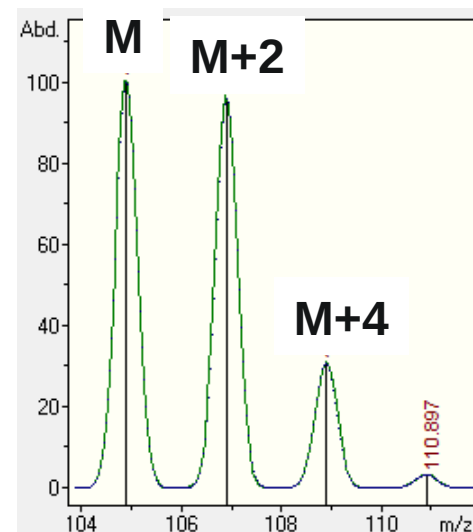
Cl



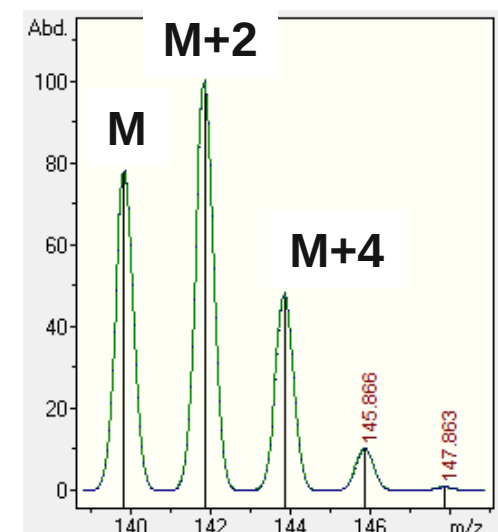
Cl₂



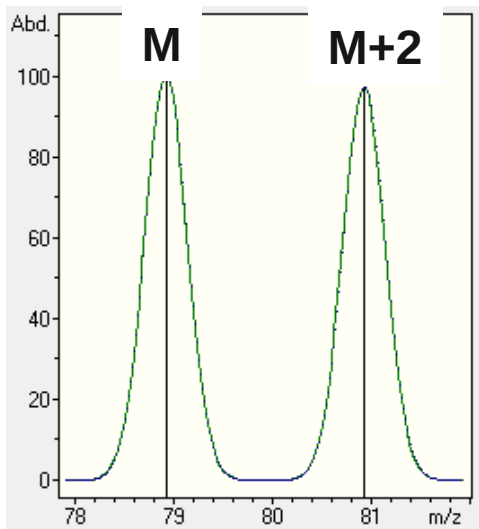
Cl₃



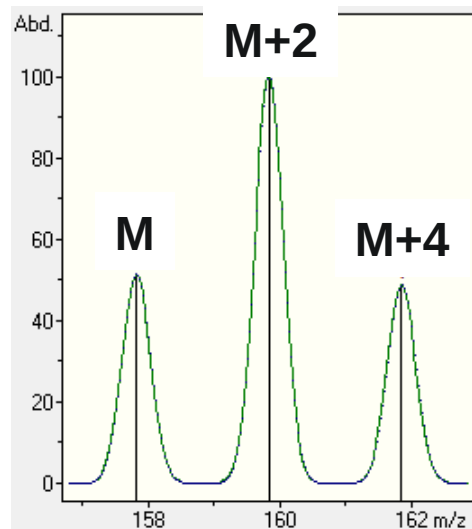
Cl₄



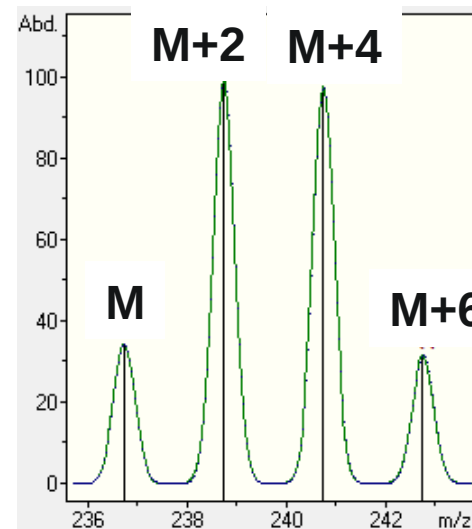
Br



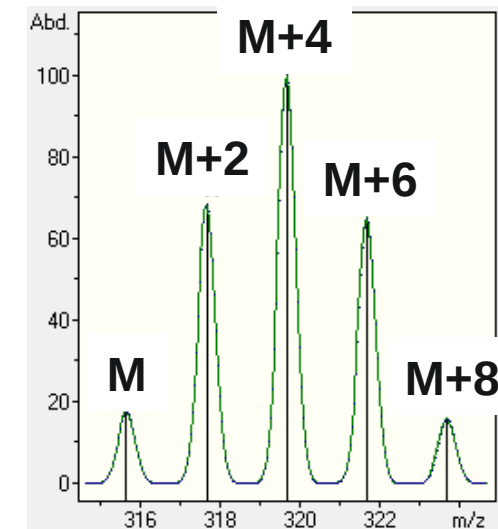
Br₂



Br₃

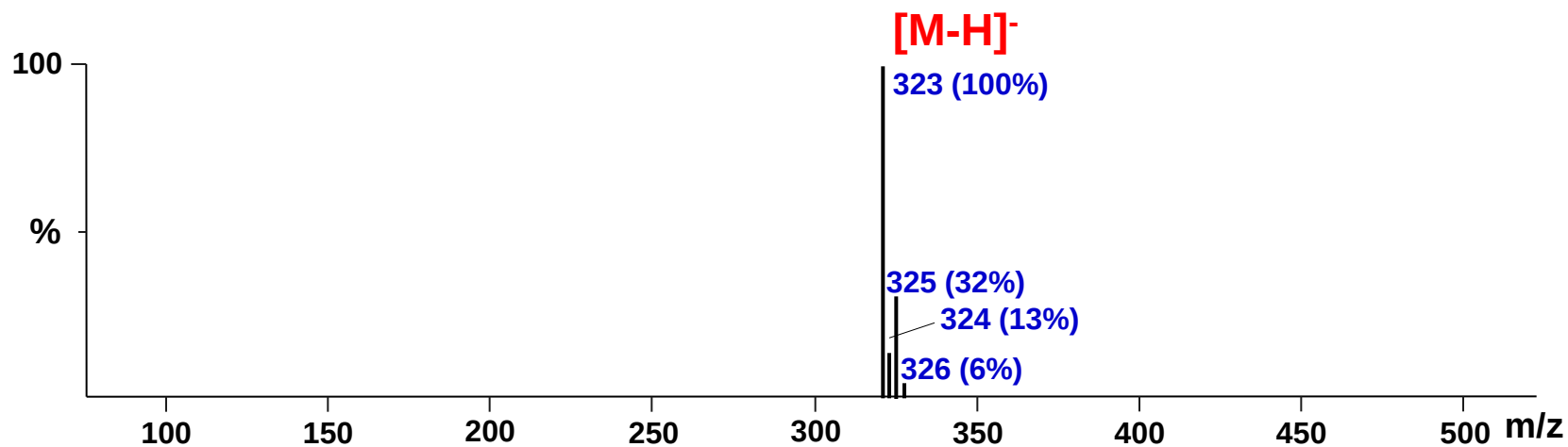
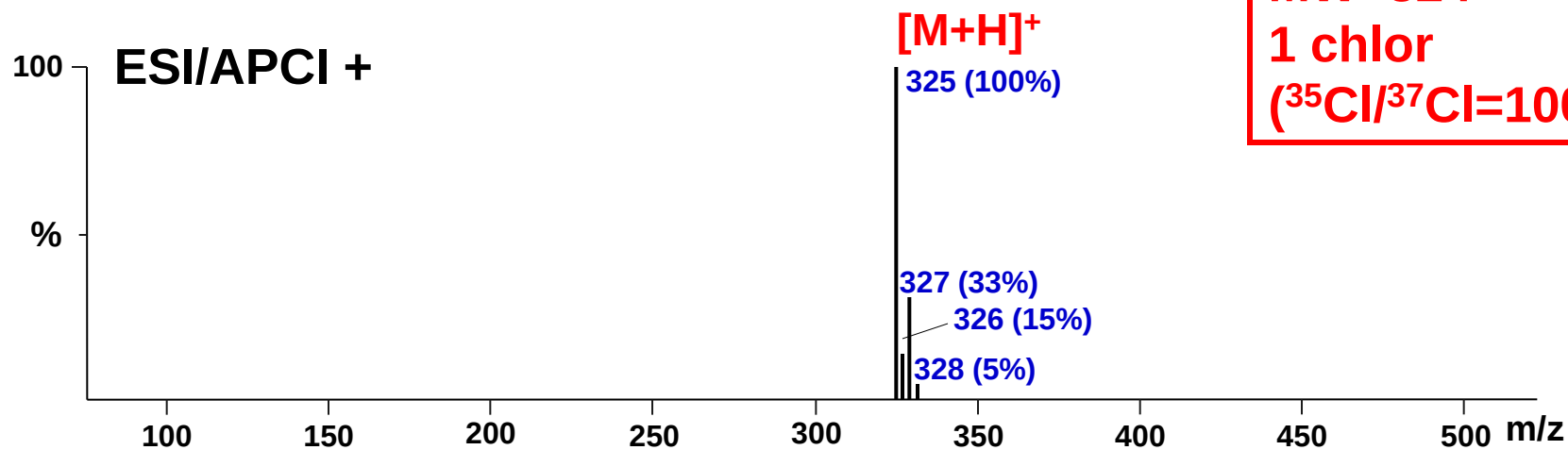


Br₄

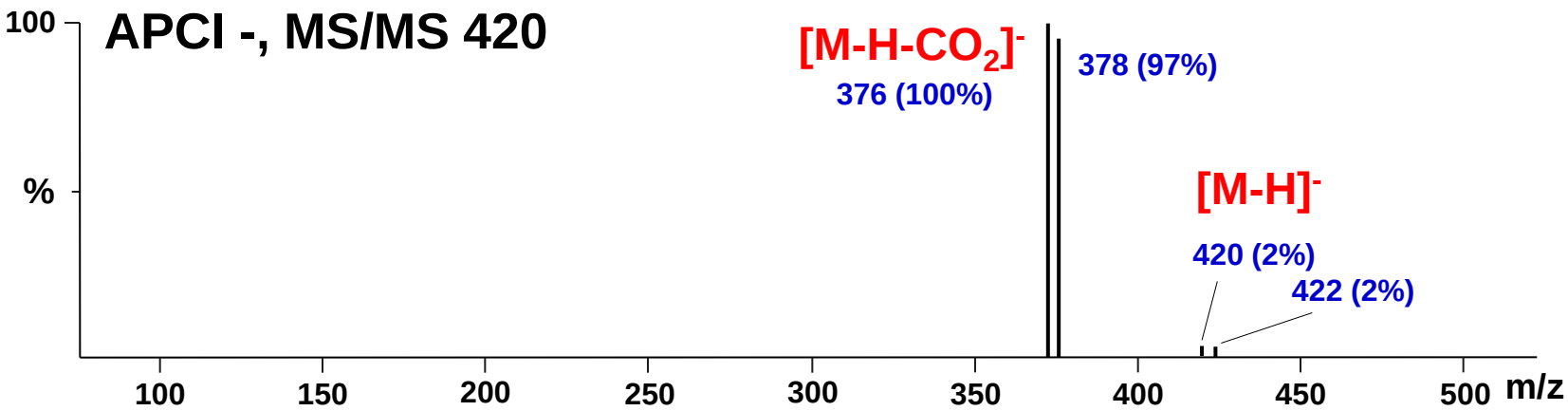
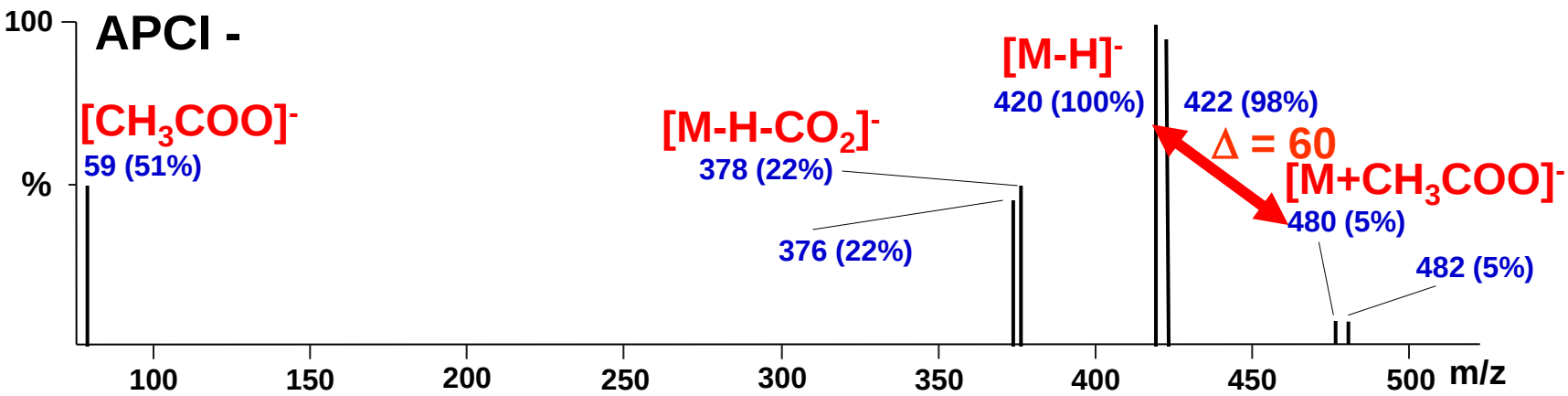
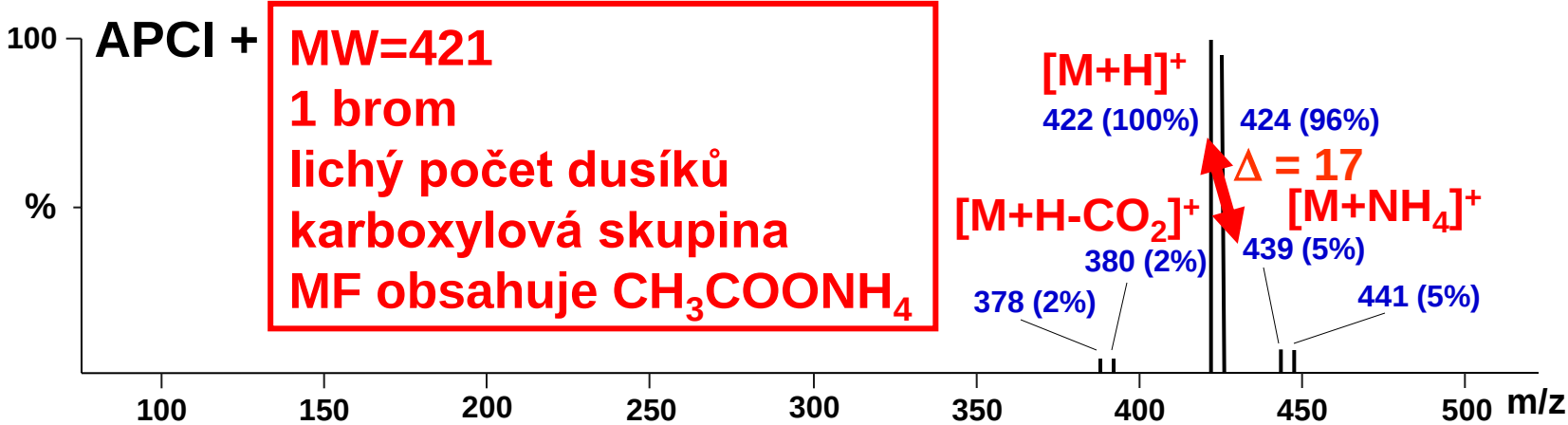


#6/ Určete MW a vysvětlete izotopy

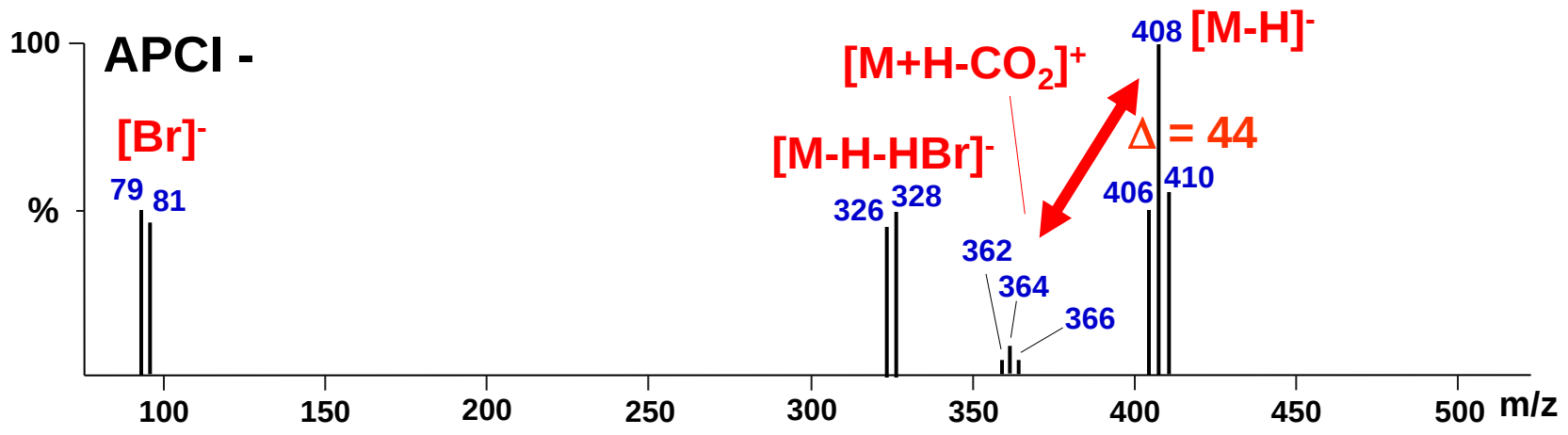
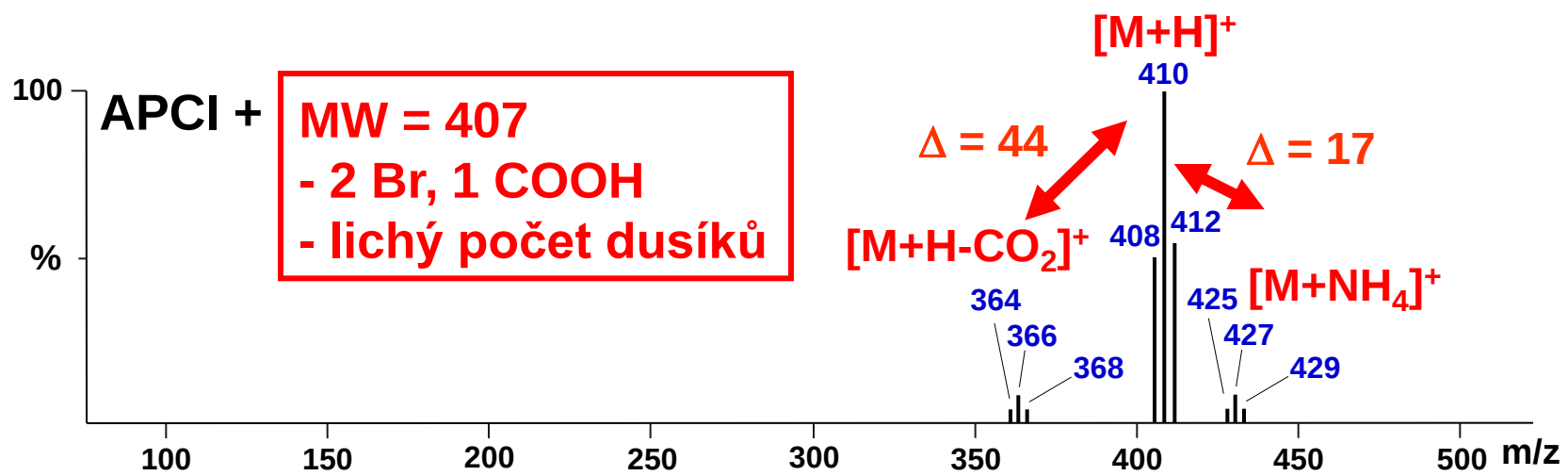
MW=324
1 chlor
($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}=100:32$)



#7/ Určete MW, popište ionty



#8/ Určete MW a maximum informací



#9/ Určete o jakou sloučeninu se jedná?

Výchozí informace: bílá krystalická látka

Hodnoty m/z ve spektru odpovídají nejintenzivnějším píkům izotopické distribuce jednotlivých iontů

ESI- 100

268.80

$$58 - 35 = 23$$
$$[(\text{NaCl})_n + \text{Cl}]^-$$
 2^*Cl

92.93

94.93

96.92

150.89

152.88

3*Cl

154.88

56.88

Detail izotopické distribuce iontů

4*Cl

210.84

208.85

212.84

214.84

268.80

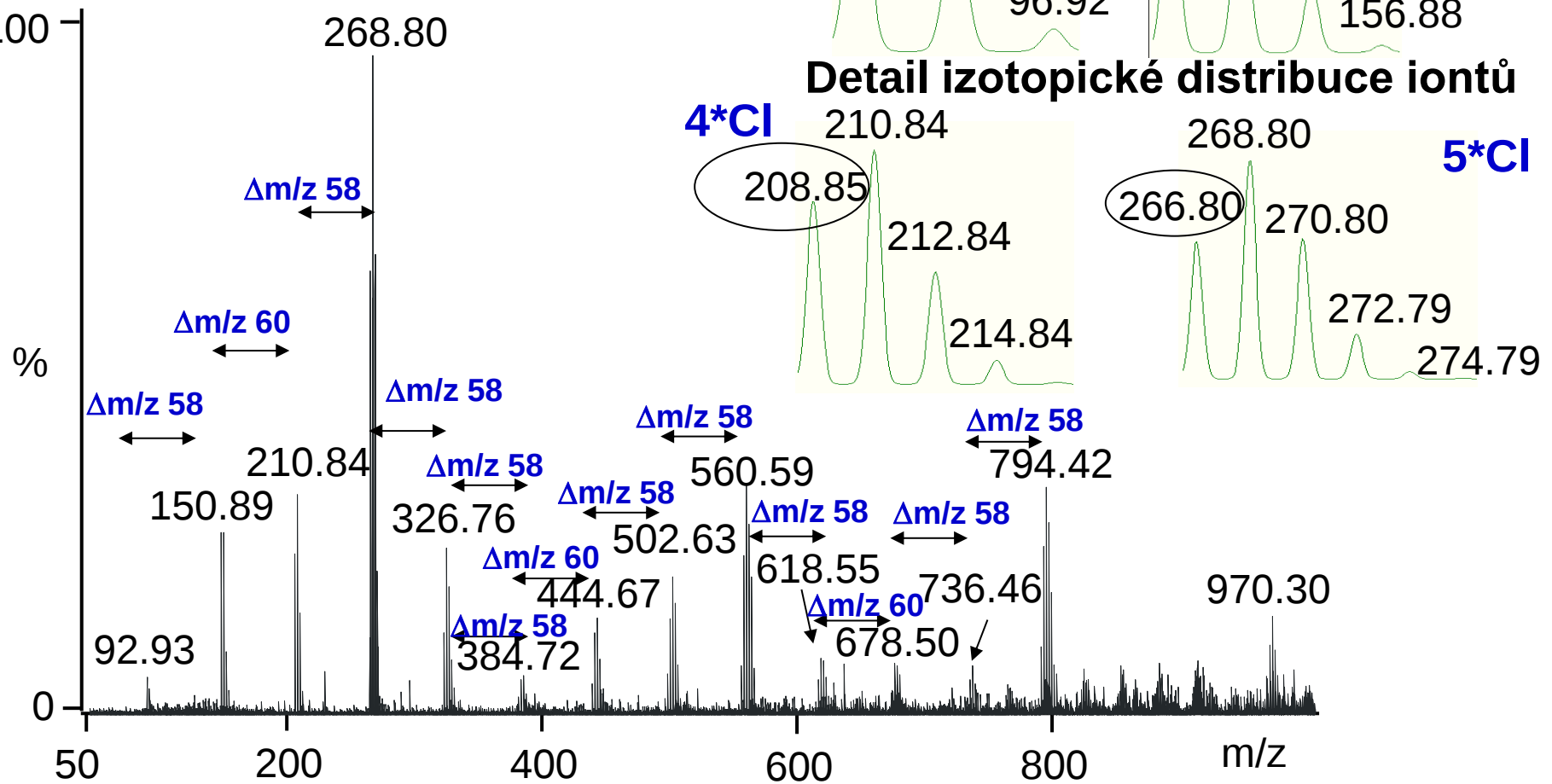
5*Cl

(266.80)

270.80

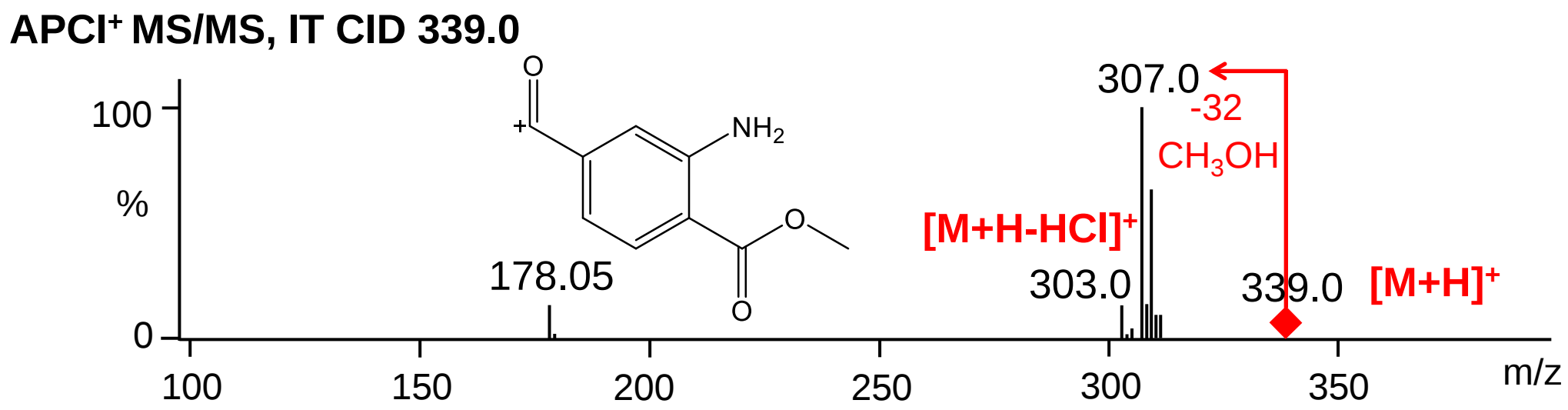
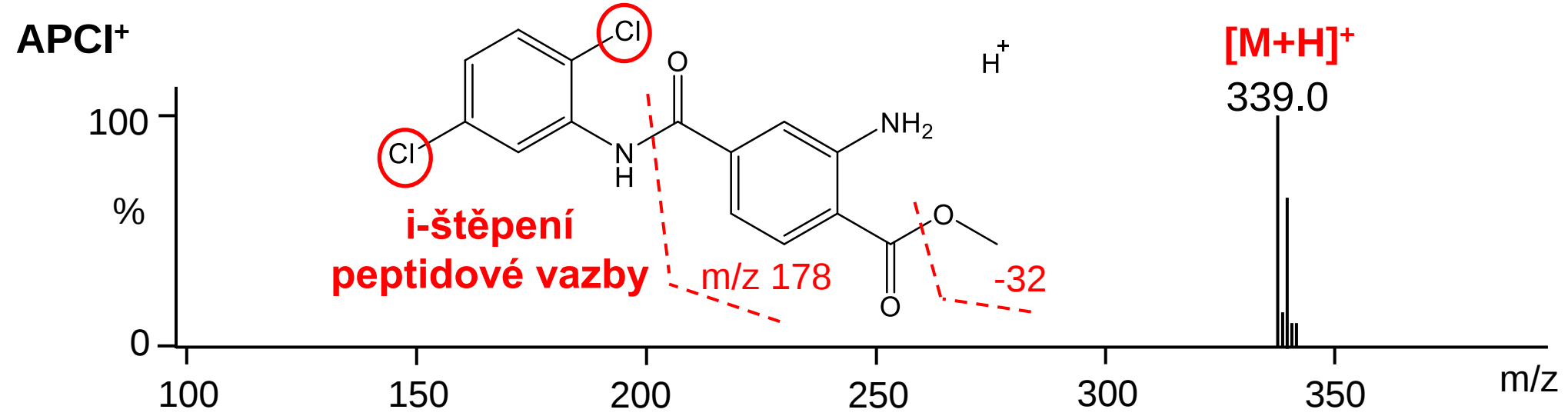
272.79

274.79



U molekul složených z atomů, které nemají M+1 izotop se nevyskytují píky M+1, M+3, atd.

#10/ Vysvětlete produktové ionty



**Pokud možné, tak kontrola izotopické distribuce
(musí být ale širší izolační šířka při izolaci prekurzoru)**

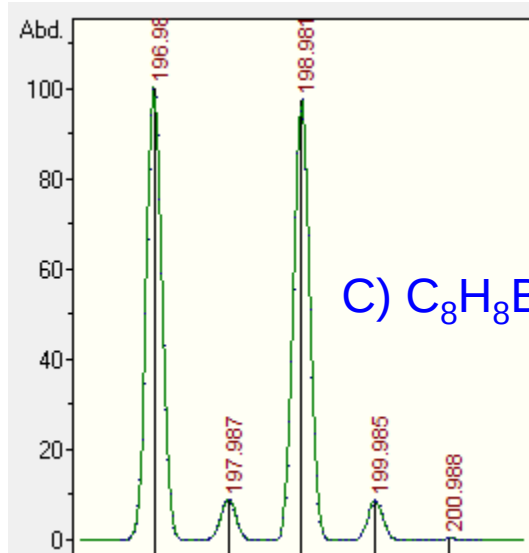
#11/ Přiřad'te jednotlivé elementární složení k izotopickým obálkám iontu m/z 197:

A) $(\text{NaCl})_3\text{Na}$ kláštrový ion

B) sodný adukt argininu $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2\text{Na}$

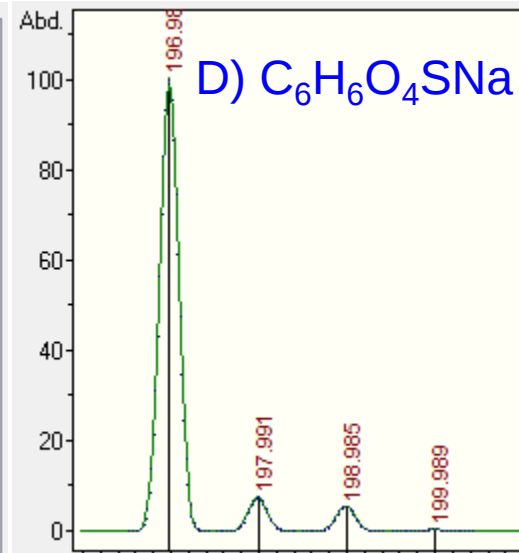
C) 5-Bromoindolin (M^+) $\text{C}_8\text{H}_8\text{BrN}$;

D) sodný adukt 4-hydroxybenzensulfonové kyseliny $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_4\text{SNa}$



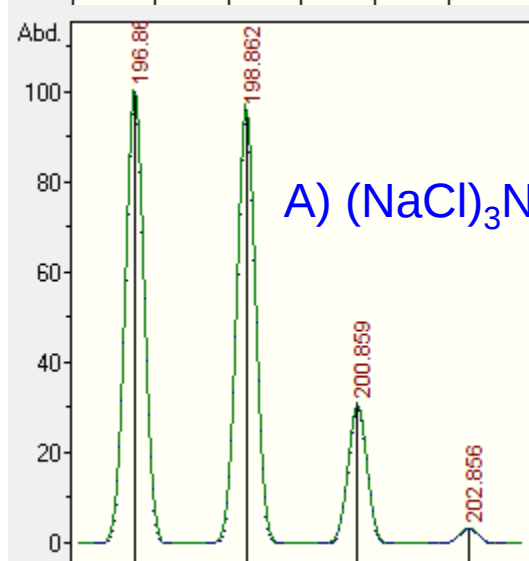
C) $\text{C}_8\text{H}_8\text{BrN}$

#	m/z	Abundance
1	196.983463	100.000
2	197.986591	9.114
3	198.981448	97.645
4	199.984553	8.874
5	200.987641	0.358



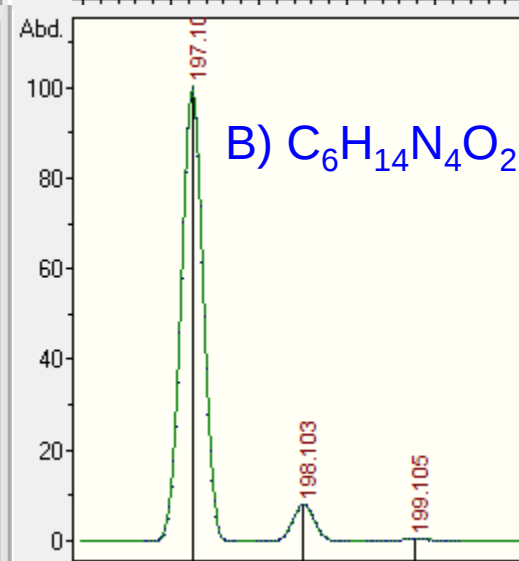
D) $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_4\text{SNa}$

#	m/z	Abundance
1	196.987900	100.000
2	197.990877	7.511
3	198.985383	5.585
4	199.988552	0.369



A) $(\text{NaCl})_3\text{Na}$

#	m/z	Abundance
1	196.865088	100.000
2	198.862138	95.883
3	200.859188	30.645
4	202.856238	3.265

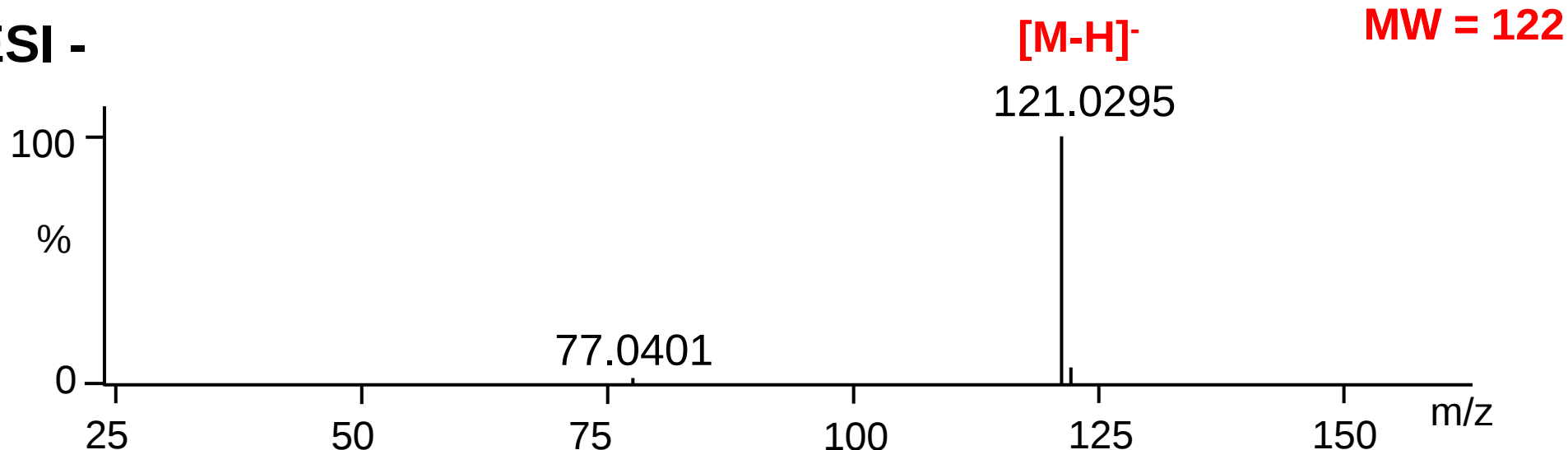


B) $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2\text{Na}$

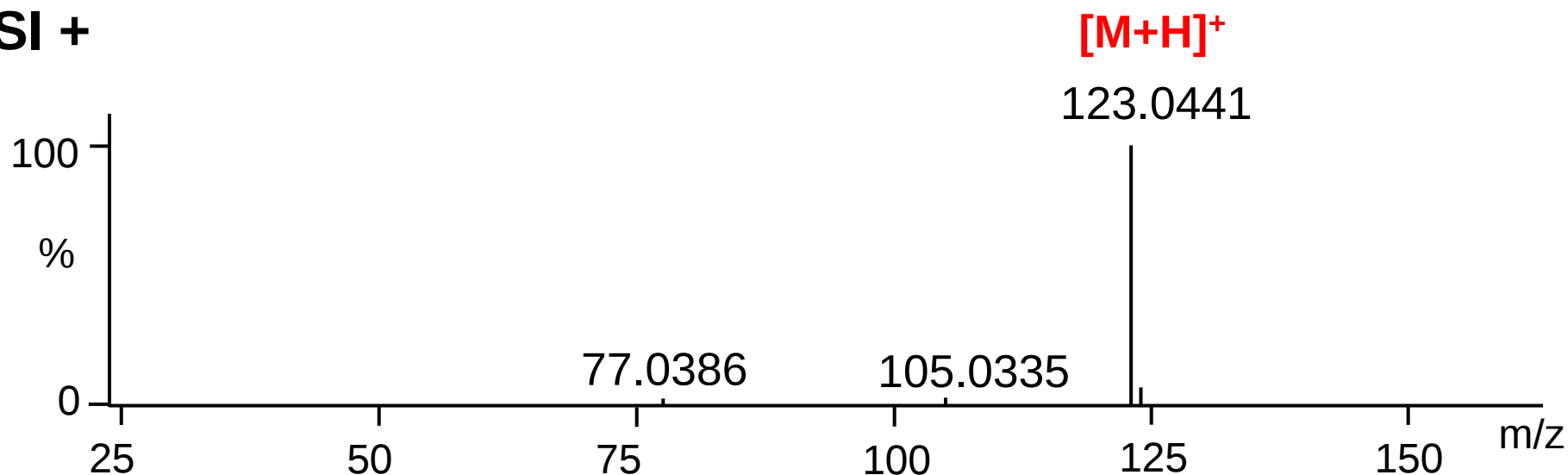
#	m/z	Abundance
1	197.100897	100.000
2	198.103179	8.204
3	199.105211	0.710

#12/ Určete o jakou sloučeninu se jedná

ESI -



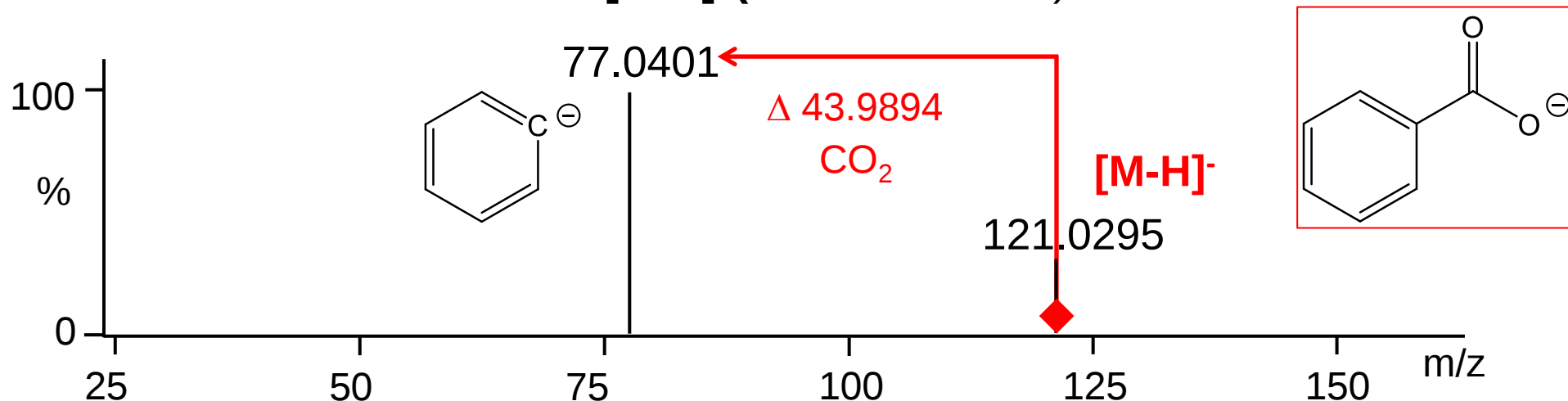
ESI +



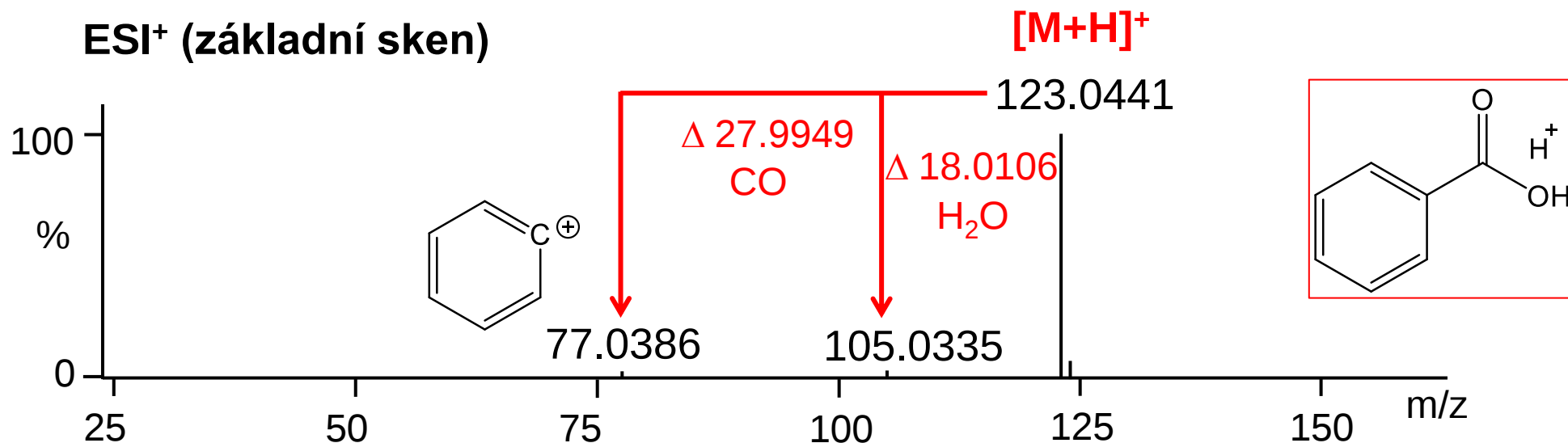
Pokračování 12.

Liché hmoty → 0 nebo sudý počet N

ESI⁻ MS/MS iontu m/z 121 [M-H]⁻ (FT CID 25 NCE)

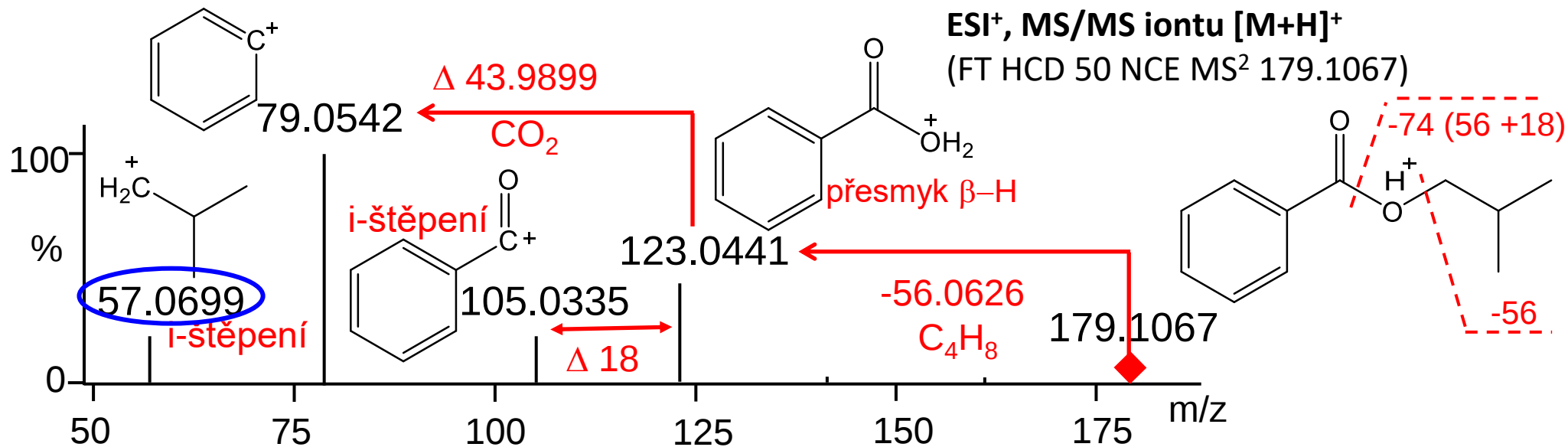
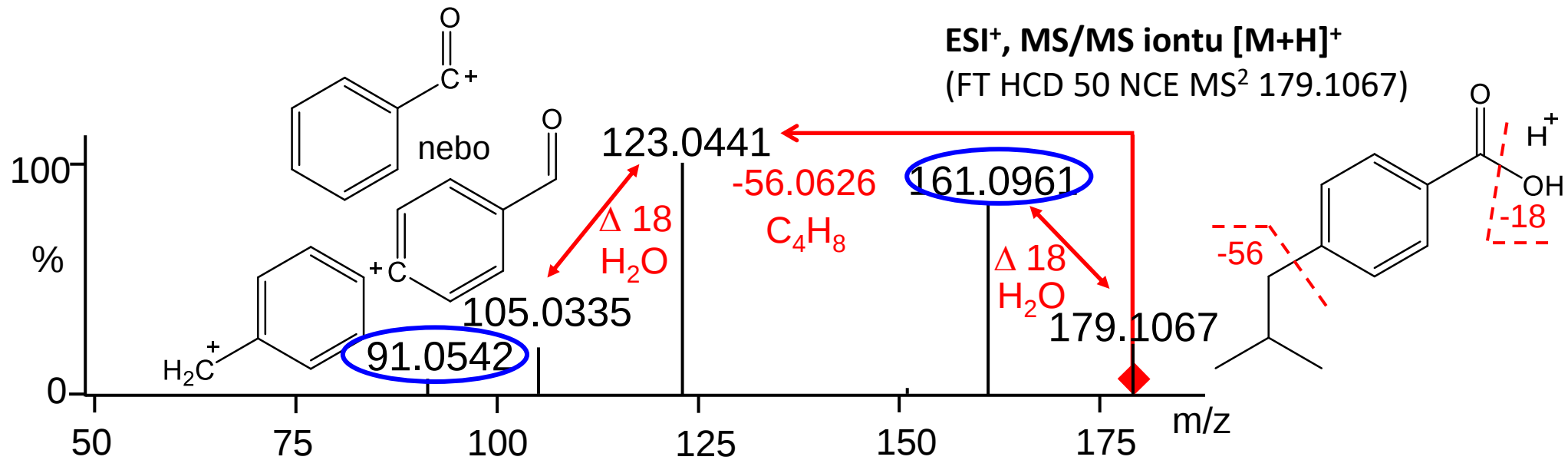


ESI⁺ (základní sken)



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

#13/ Popište ionty (neutrální ztráty). Které ionty slouží pro jednoznačné rozlišení studovaných sloučenin?

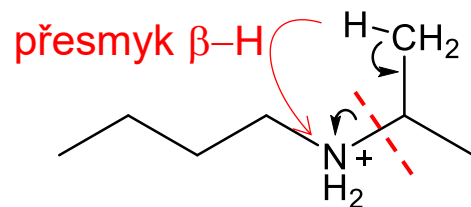
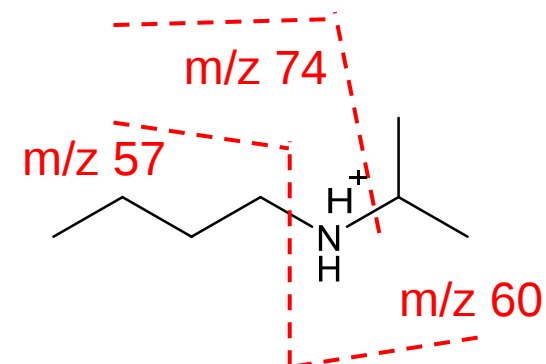
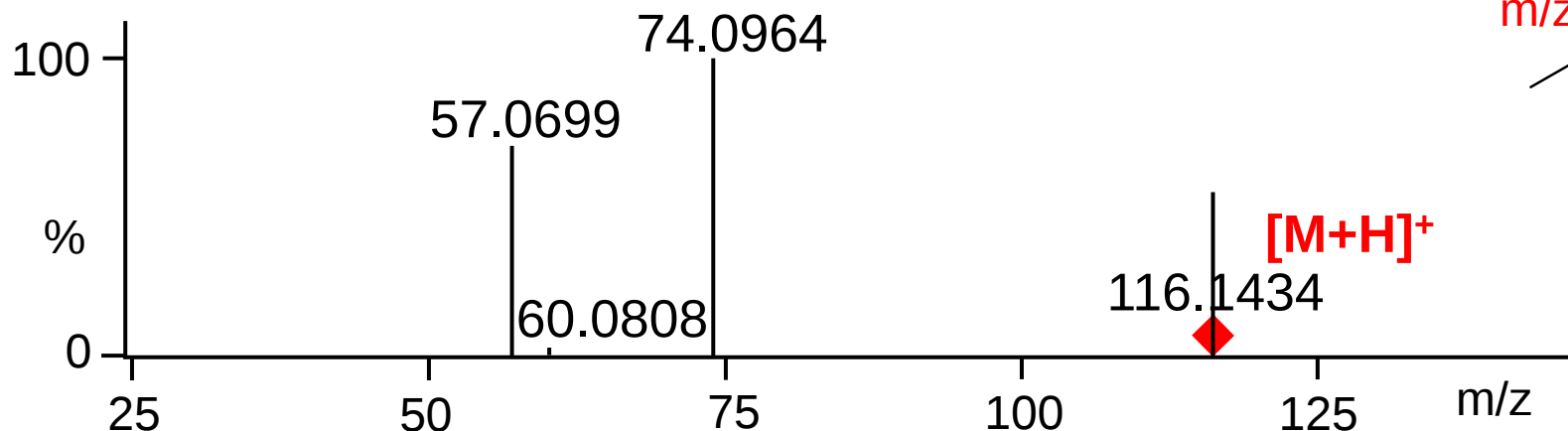


Zdroj: mzCloud (<https://www.mzcloud.org/>)

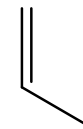
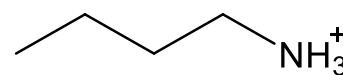
#14/ Navrhněte mechanismus tvorby iontů v MS/MS

$[M+H]^+$ butylisopropylaminu

ESI⁺ MS/MS iontu $[M+H]^+$ (FT HCD 50 NCE MS² 179.1067)

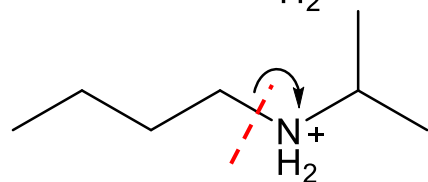


m/z 74

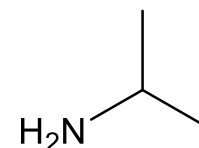
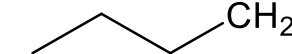


$\Delta m/z$ 42.047
 C_3H_6

i-štěpení

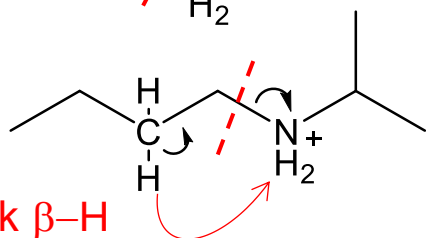


m/z 57

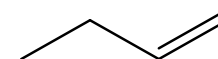
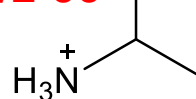


$\Delta m/z$ 59.0735
 C_3H_9N

přesmyk β -H



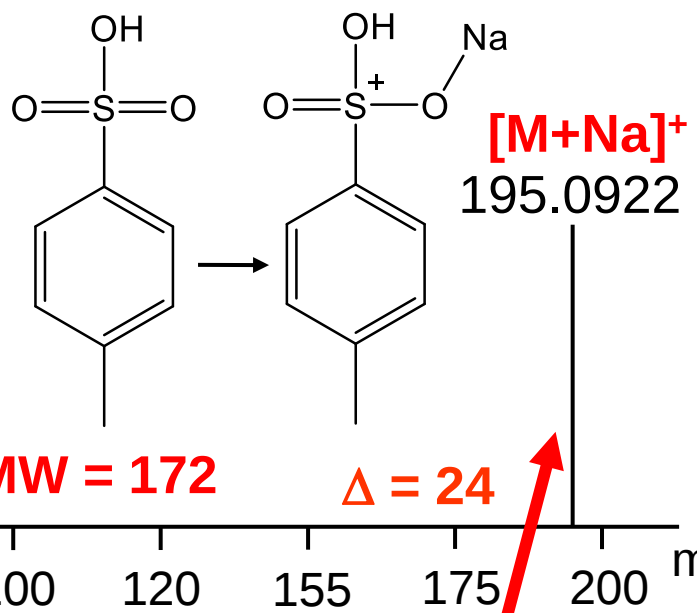
m/z 60



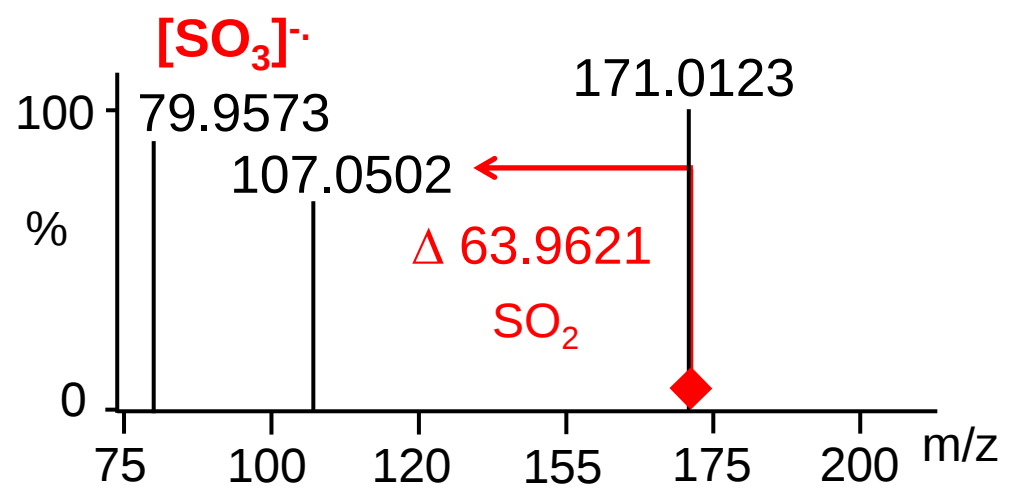
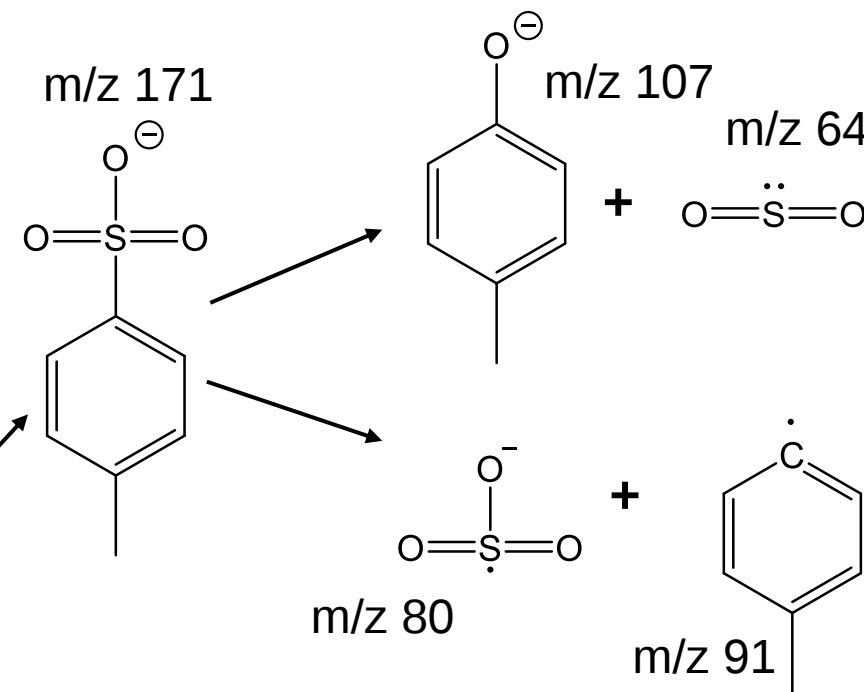
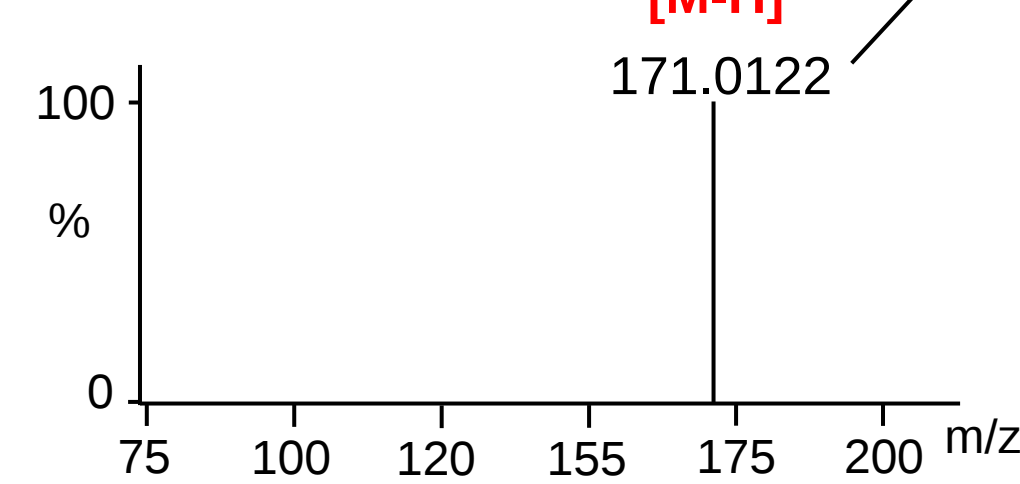
$\Delta m/z$ 56.0626
 C_4H_8

#15/ určete MW a další informace

MALDI +

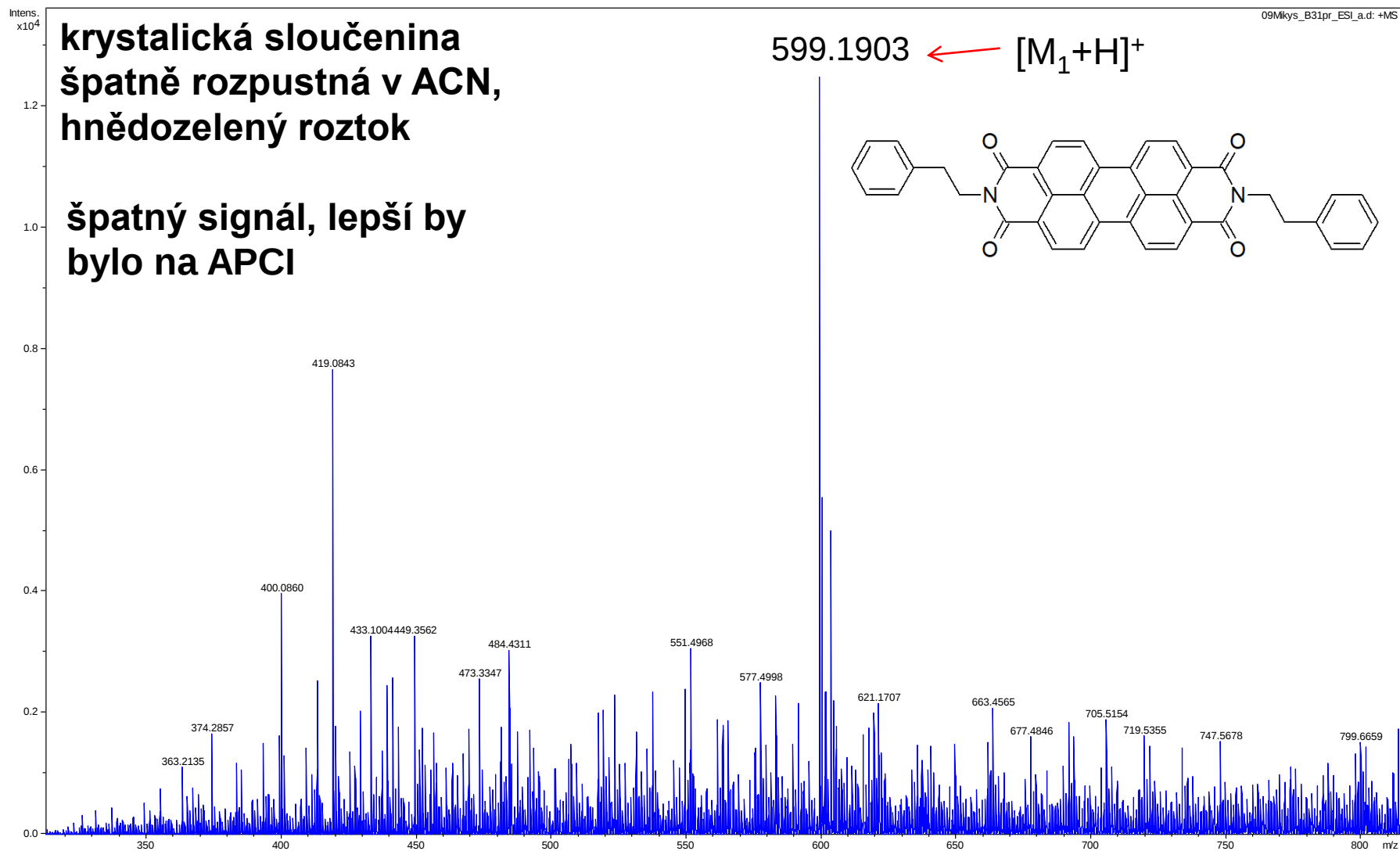


MALDI -



Kyselina p-toluensulfonová

#16/ Nepřečištěný produkt syntézy (ESI-QqTOF)

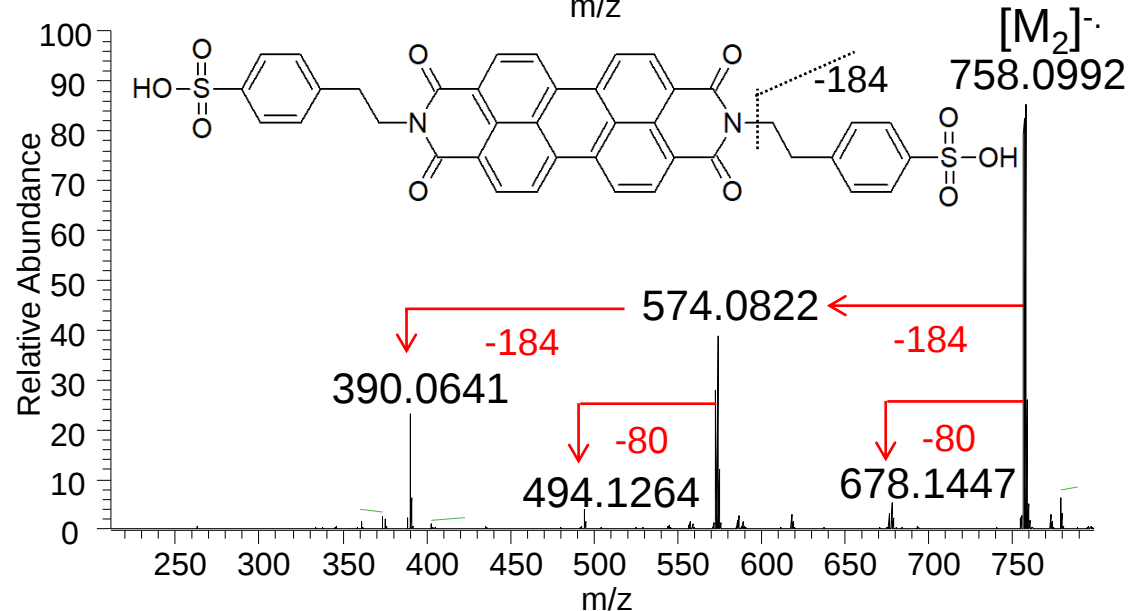
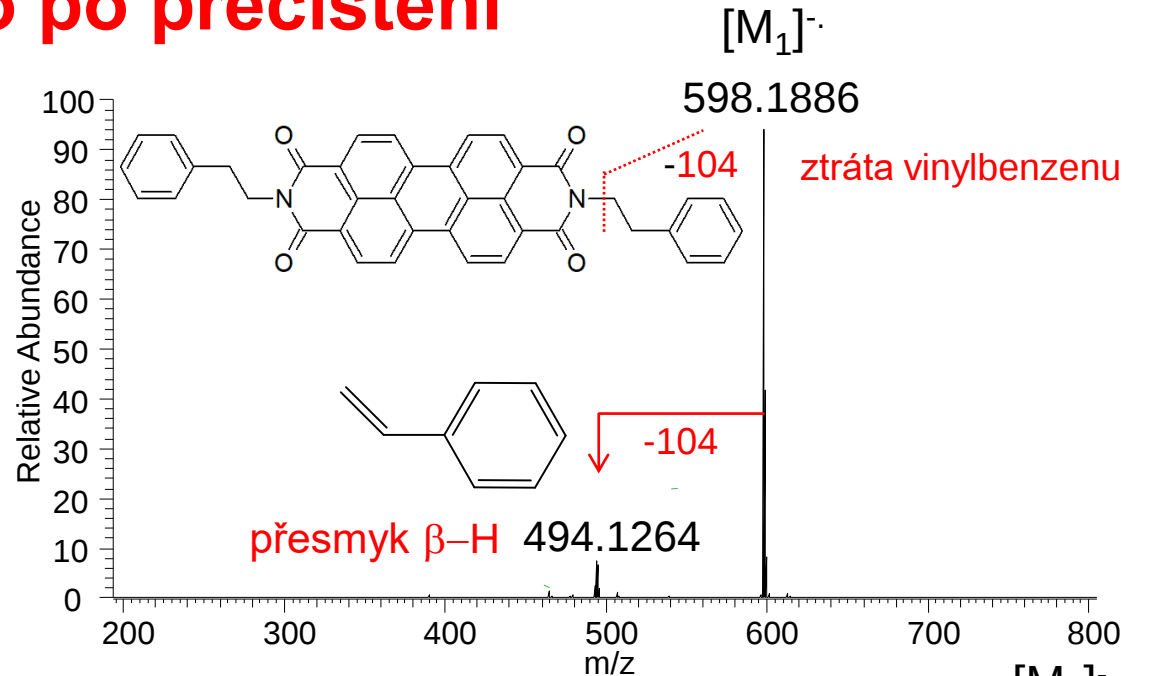


Pokračování 16 - na základě informací popište ionty a vysvětlete, co se stalo po přečištění

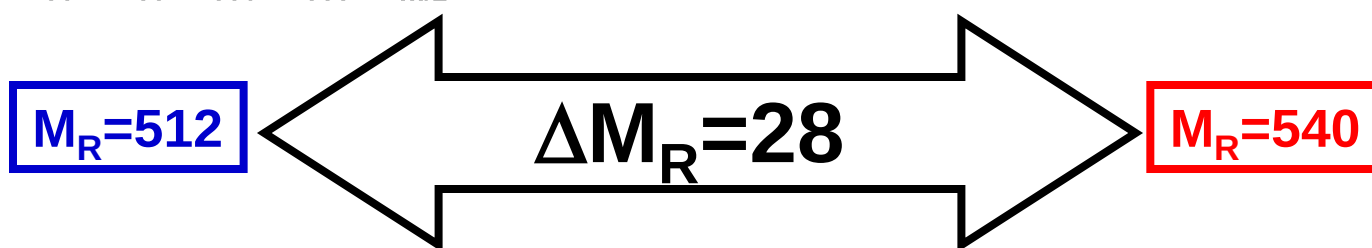
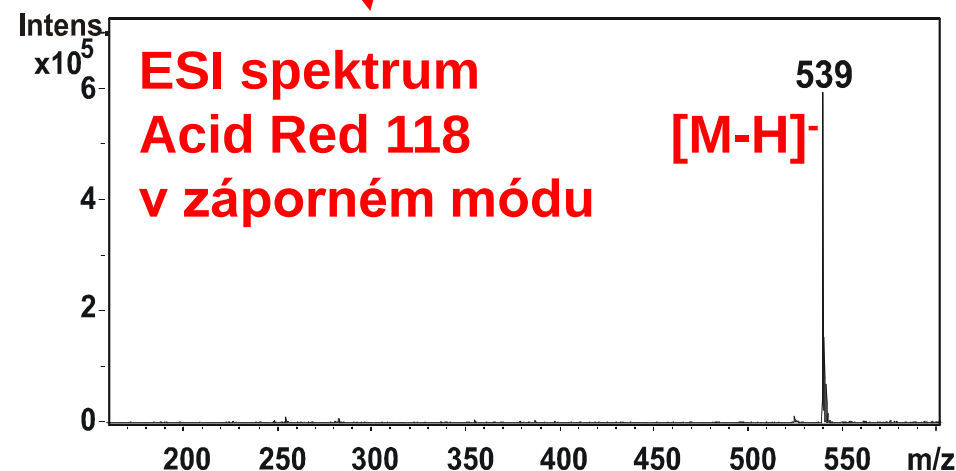
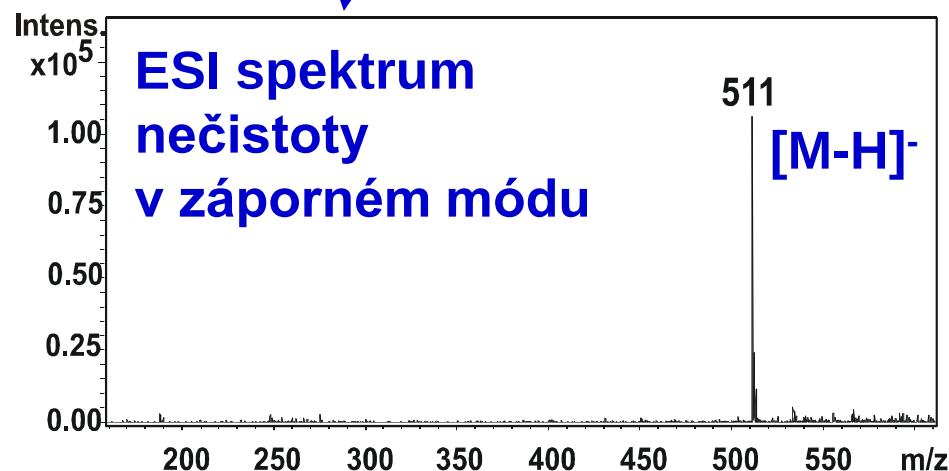
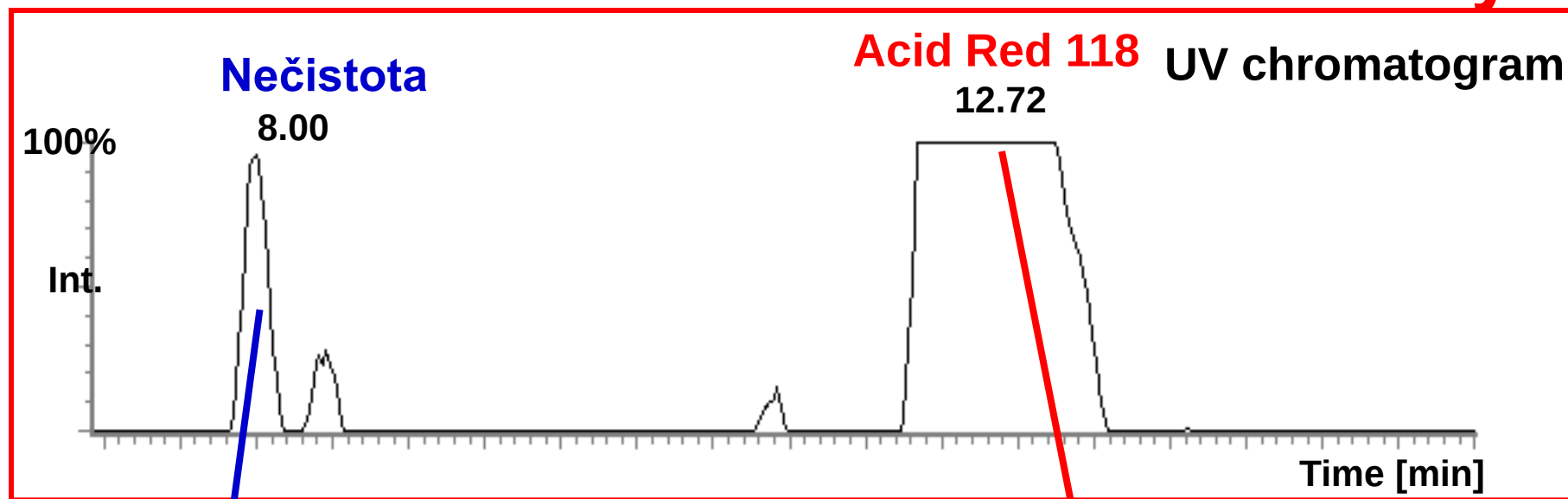
- krystalická sloučenina
špatně rozpustná ACN,
hnědozelený roztok

- po přečištění v H_2SO_4
dobře rozpustná v
 $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$, červený roztok

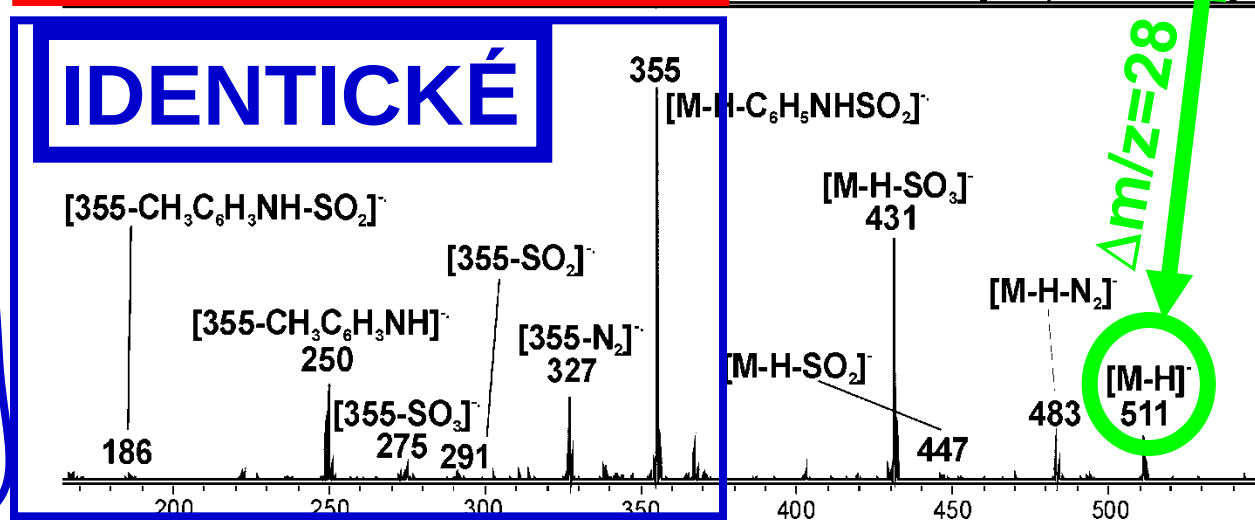
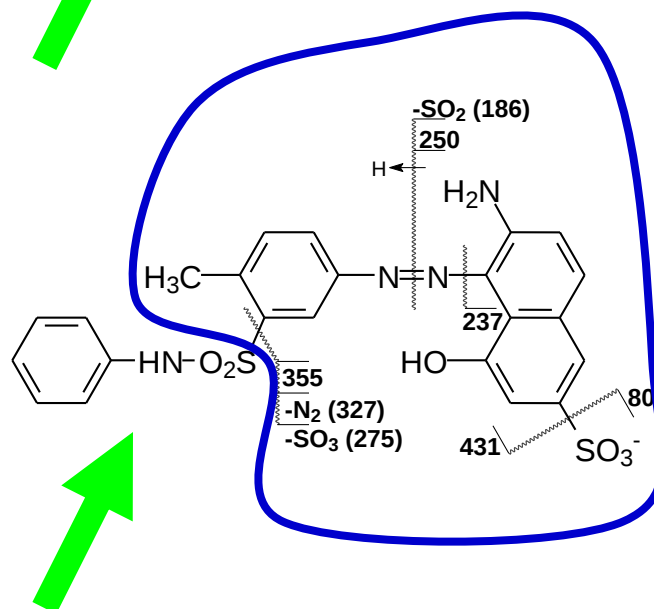
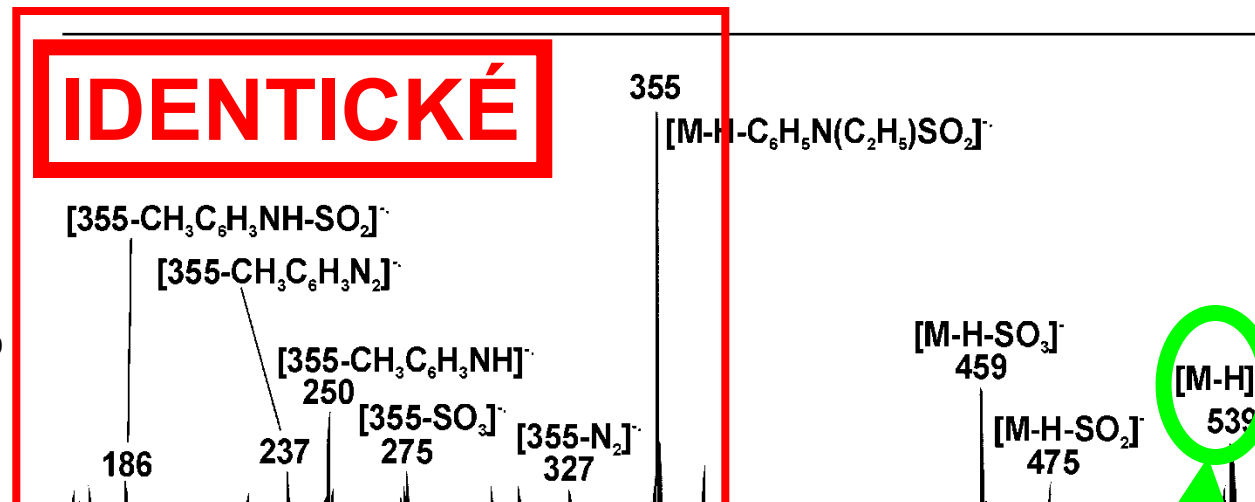
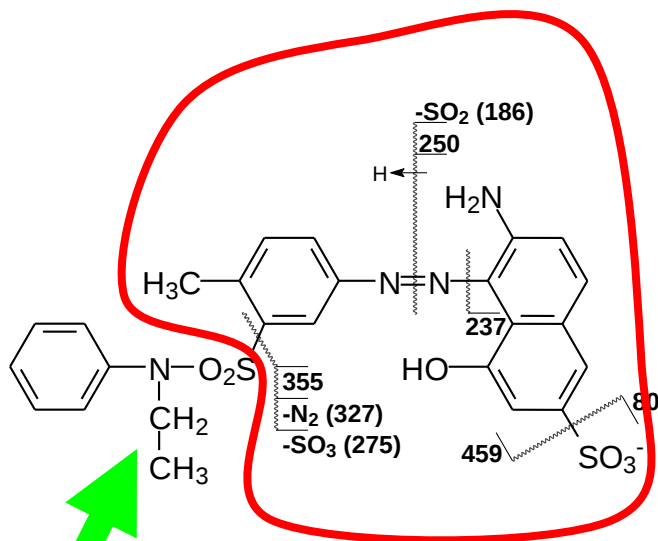
Číslo za desetinou čárkou je
u fragmentového iontu vyšší
 $\Delta m/z$ 79,9545 (hmotnostní
defekt typický pro síru) $-\text{SO}_3$



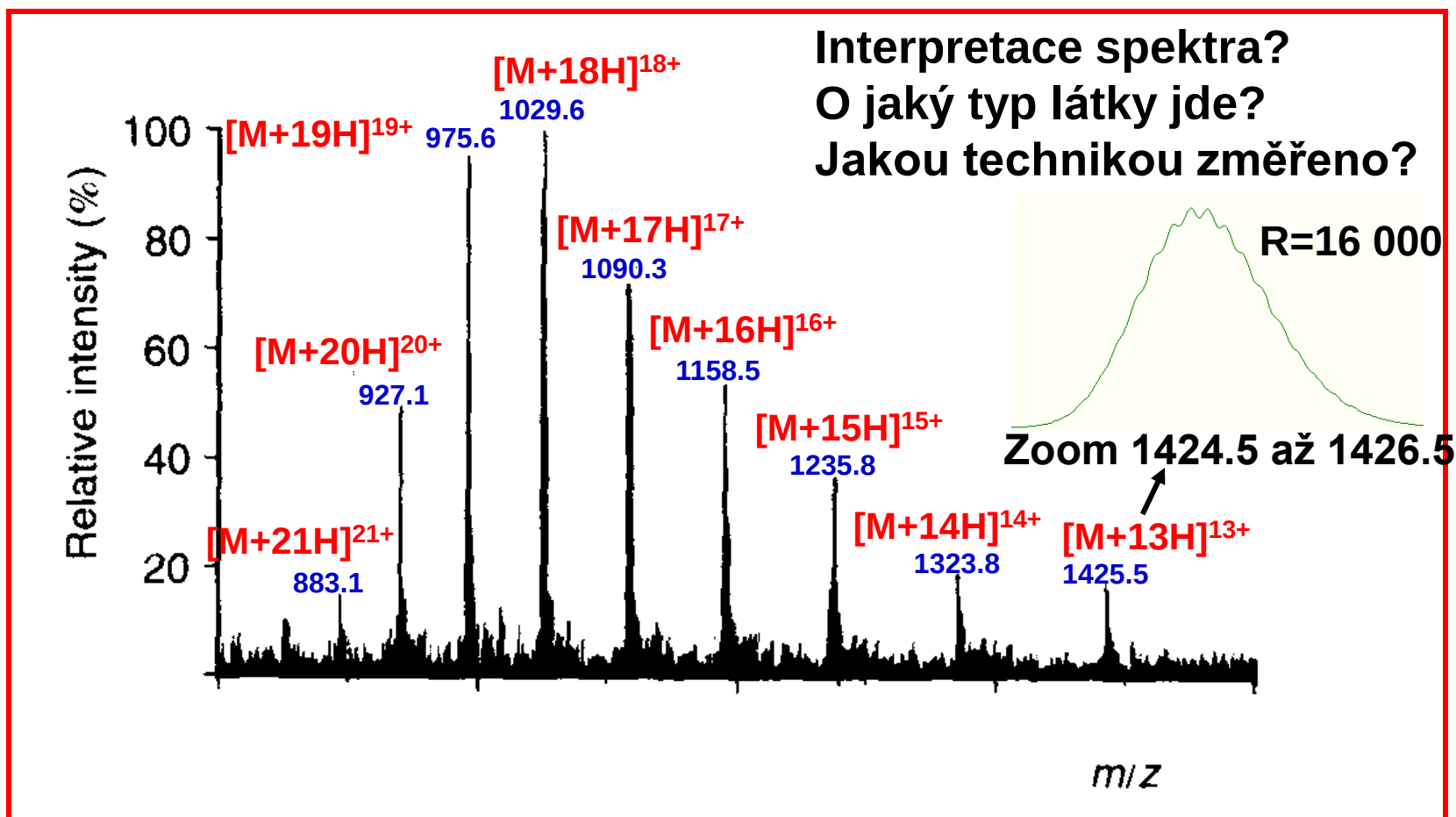
#17/ HPLC/MS/MS identifikace nečistoty



HPLC/MS/MS **barviva** a nečistoty



#18/



Příklad výpočtu MW:

$$A = 1029.6 = (MW + z) / z$$

$$B = 975.6 = (MW + z + 1) / (z + 1)$$

- řešením vyjde $z = 18.05 = 18$

$$A: MW = 1029.6 * 18 - 18 = 18514.8$$

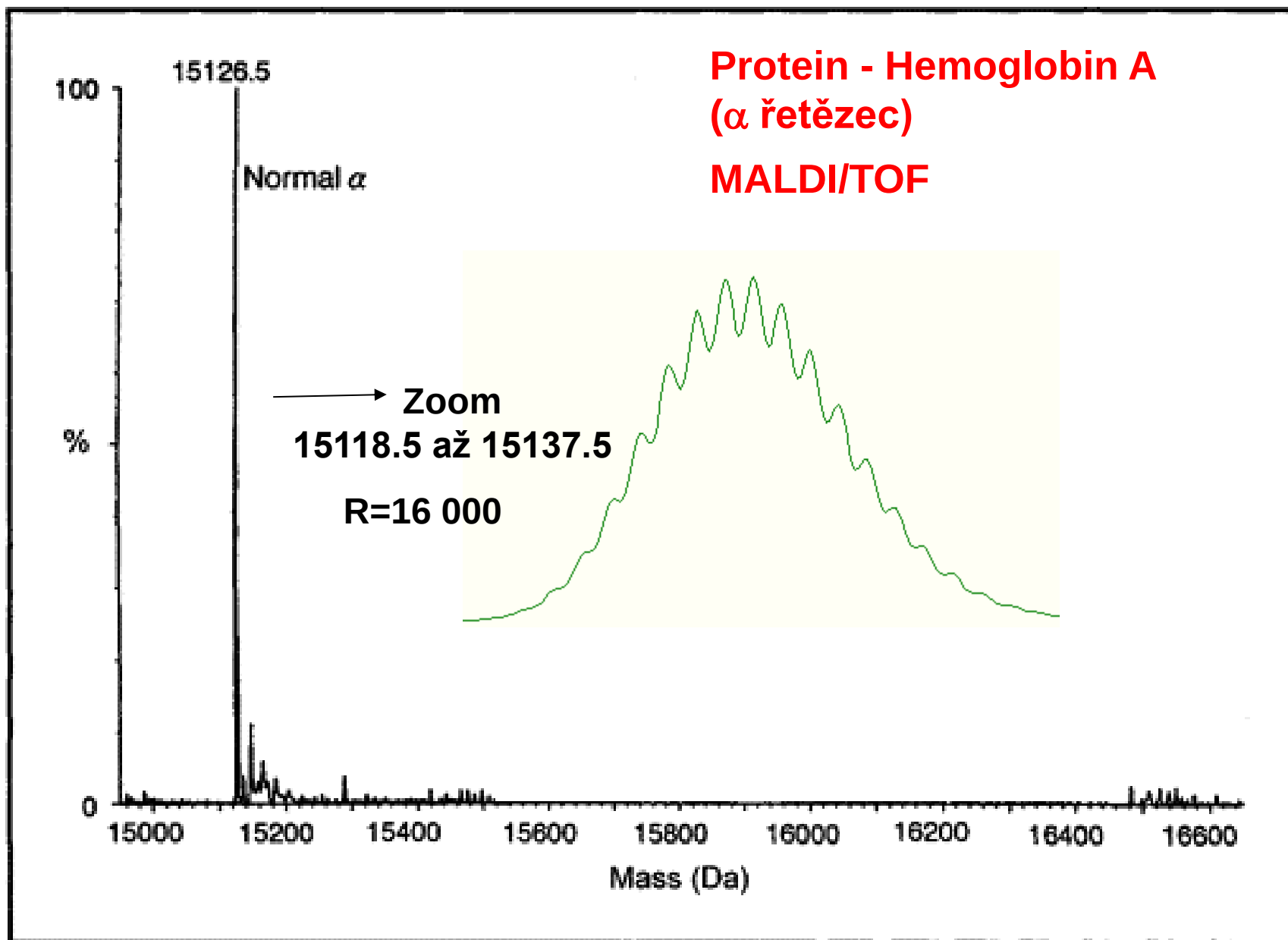
$$B: MW = 975.6 * 19 - 19 = 18517.4, \text{ atd.}$$

Změřeno pomocí ESI⁺

Protein

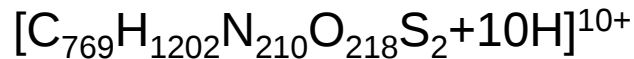
MW=18521 Da

Zadání: Určete o jaký typ sloučeniny se jedná a určete její molekulovou hmotnost. Jakou instrumentací bylo změřeno níže uvedené MS spektrum?

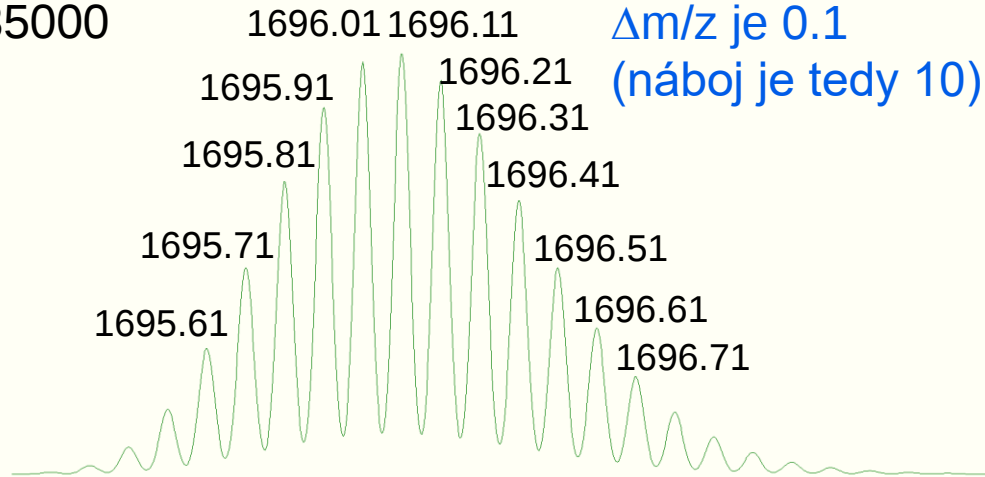


Interpretace izotopické obálky

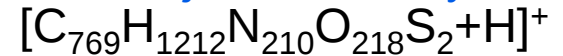
Protein v ESI+



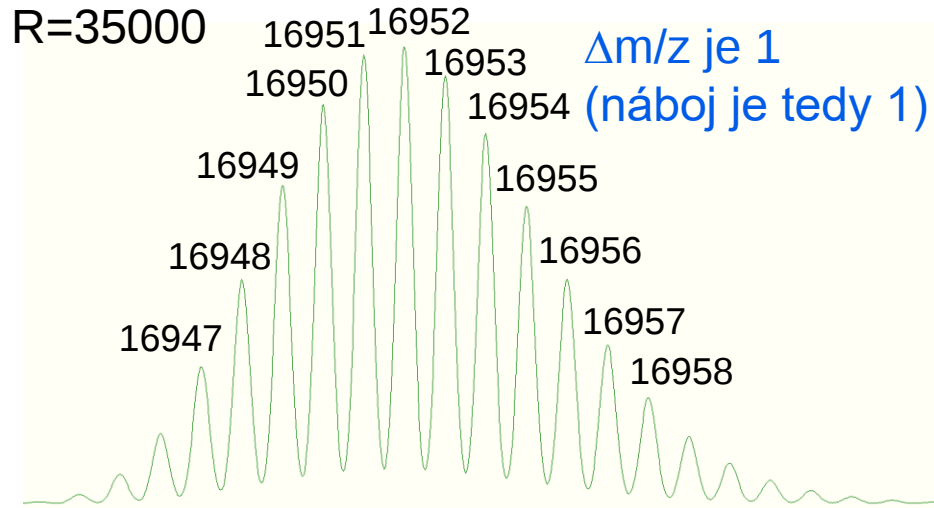
R=35000



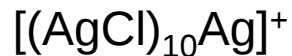
Protein jednou nabitý



R=35000



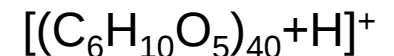
Klástr AgCl



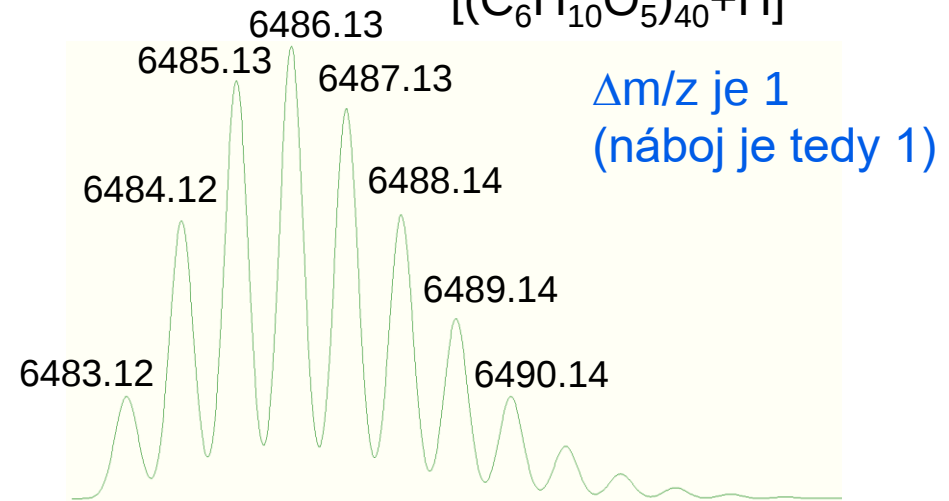
R=3000



polysacharid



R=13000



Určete o jaký typ sloučenin se jedná (všechny ionty jsou jednou nabitě)

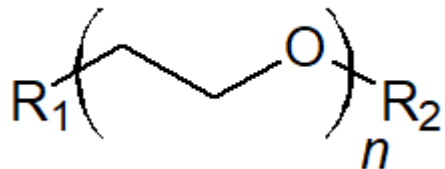
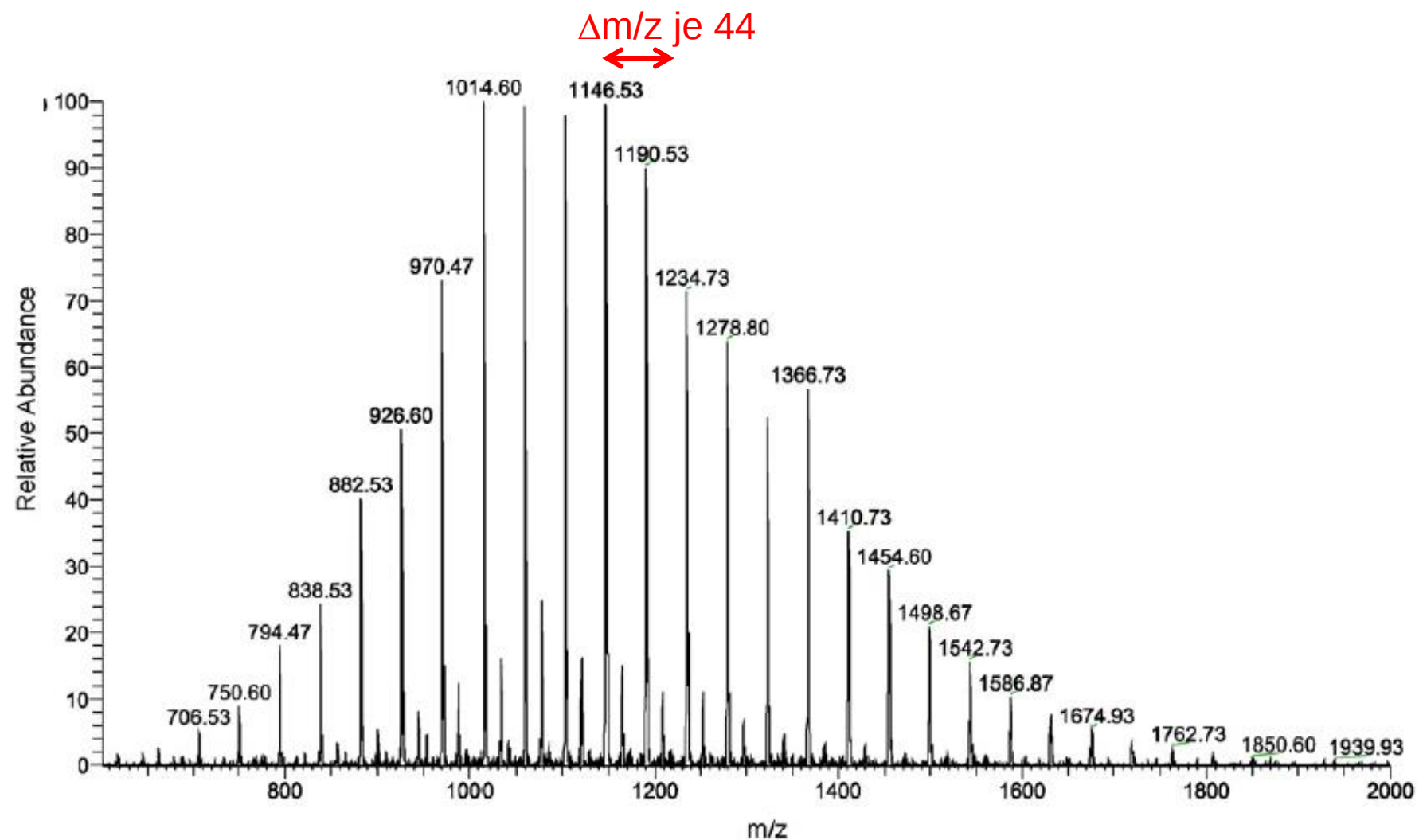
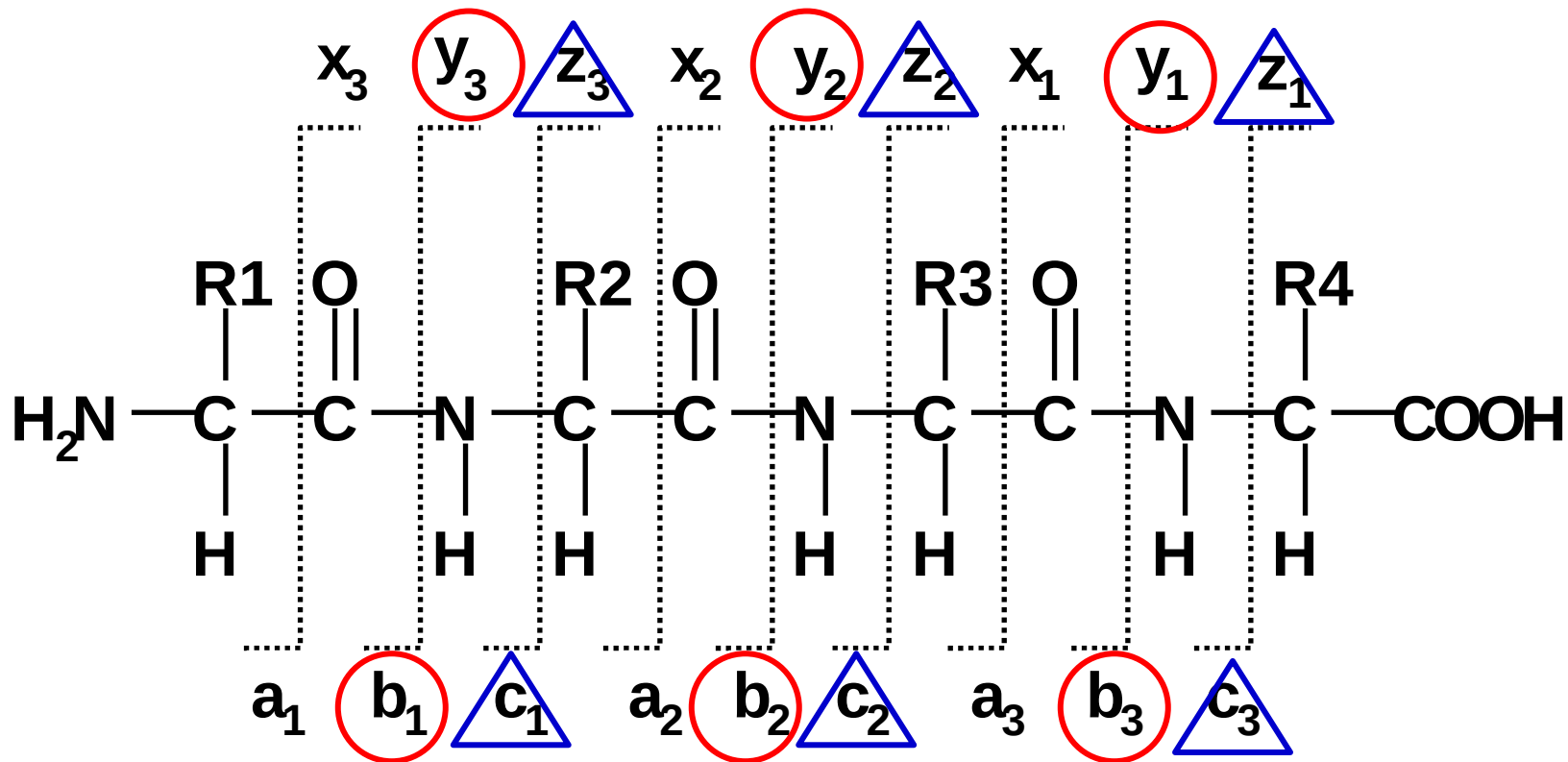


Schéma značení fragmentových iontů peptidů

Typické fragmenty pro CID MS/MS

Typické fragmenty pro ETD, UVPD

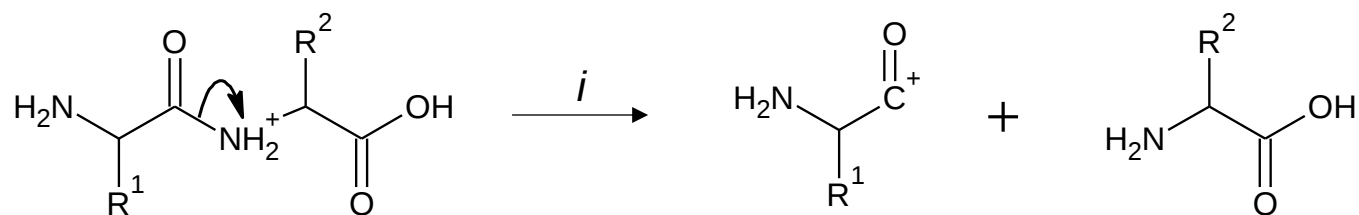


C-C (a, x); peptidová vazba (b, y); N-C α (c, z)

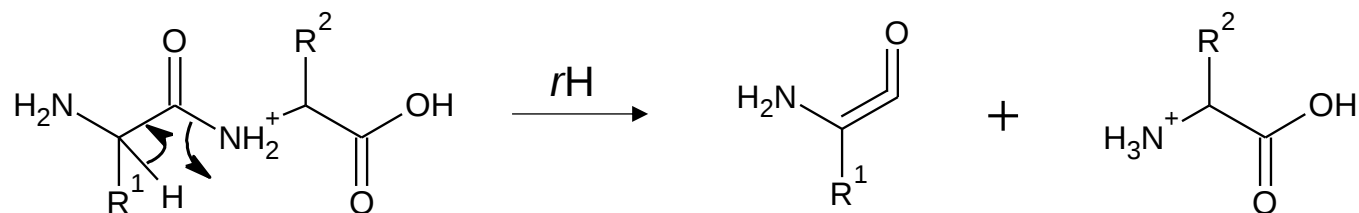
Štěpení peptidové vazby

Zjednodušený mechanismus fragmentace $[M + H]^+$ peptidu

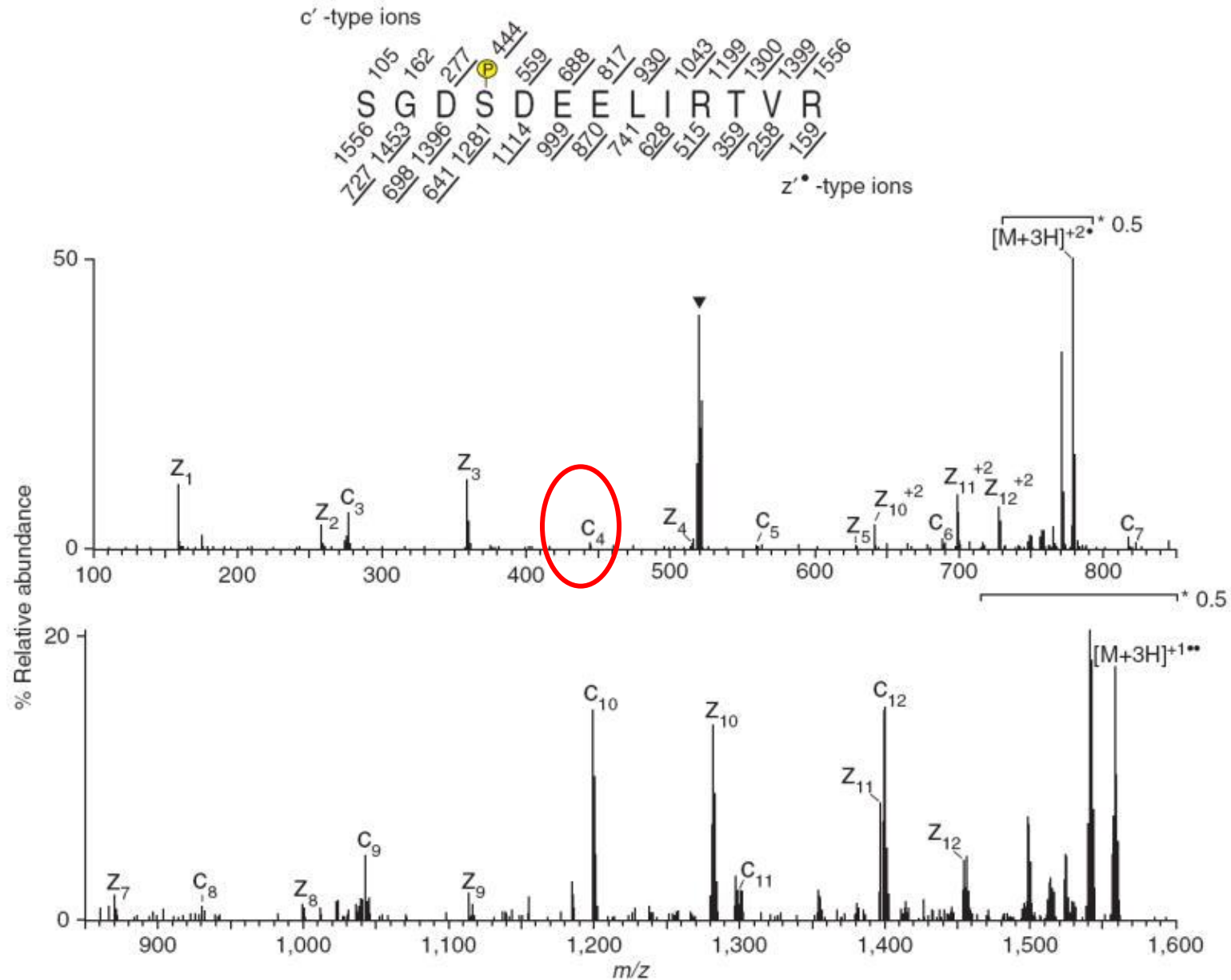
– indukční štěpení, vznik acyliového iontu (iont typu **b**)



– štěpení po přesmyku β -vodíku, vznik kratšího proton. peptidu (iont typu **y**)



Zjištění sekvence aminokyselin v peptidu - ETD



Zjištění sekvence aminokyselin v peptidu - ETD

Table of Amino Acids and Their Abbreviations

Full Name	Abbreviation (3 Letter)	Abbreviation (1 Letter)
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Aspartate	Asp	D
Aspartate or Asparagine	Asx	B
Cysteine	Cys	C
Glutamate	Glu	E
Glutamine	Gln	Q
Glutamate or Glutamine	Glx	Z
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Methionine	Met	M
Phenylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V