

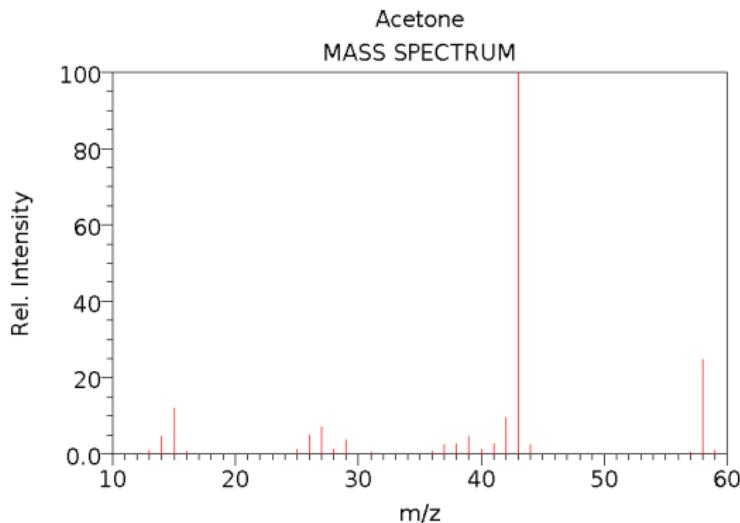
Hmotnostní spektrometrie

Zdeněk Moravec, hugo@chemi.muni.cz



Princip

- ▶ Separační metoda.
 - ▶ Principem hmotnostní spektrometrie je ionizace vzorku a analýza vzniklých iontů na základě jejich chování v magnetickém poli.
 - ▶ Hmotnostní spektrum nejčastěji zobrazuje závislost intenzity signálu na poměru hmoty iontu a jeho náboje (m/z).



Stručná historie

- ▶ **1912** První hmotnostní spektrometr, J.J. Thompson. První naměřená spektra O₂, N₂, CO₂ a COCl₂.
- ▶ **1934** MS využita v organické chemii. R. Conrad
- ▶ **1940** Elektronová ionizace. C. Berry
- ▶ **1948** Publikován návrh nového analyzátoru typu TOF (Time Of Flight). A.E. Cameron, D.F. Eggers
- ▶ **1953** První kvadrupolární analyzátor, W. Paul a H. Steinwedel
- ▶ **1956** První spojení GC/MS. F.W. McLafferty, R.S. Gohlke
- ▶ **1966** Objev chemické ionizace. F. H. Field a M. S. B. Munson
- ▶ **1974** První spojení HPLC/MS. P.J. Arpino, M.A. Baldwin, F.W. McLafferty
- ▶ **1988** První použití ionizace elektrosprejem. J. Fenn
- ▶ **1999** Nový typ analyzátoru - Orbitrap. A.A. Makarov

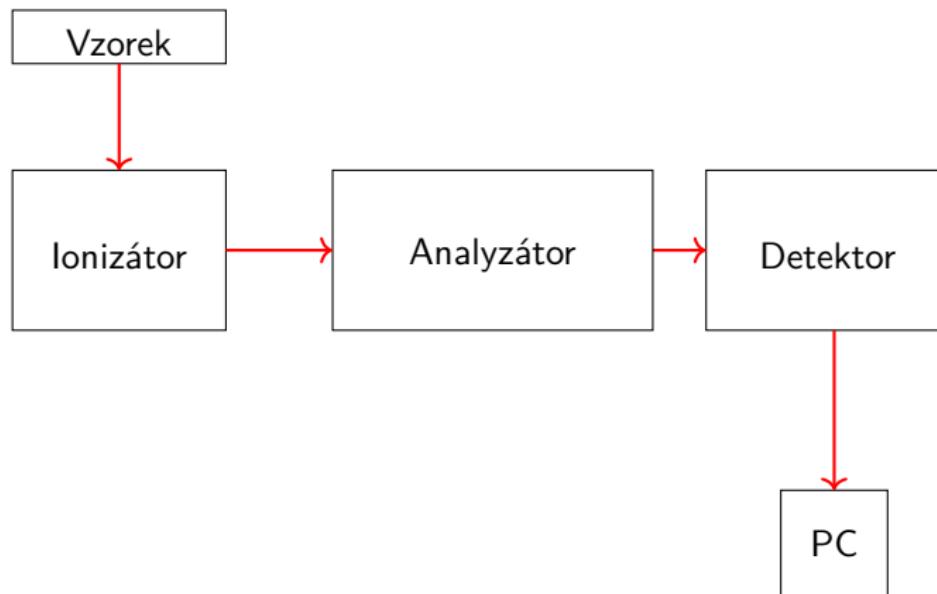
Úvod do hmotnostní spektrometrie

Základní pojmy

- ▶ Fragmentace - disociace nestabilních iontů vzniklých během ionizace analytu.
- ▶ Hmotnostní spektrum - závislost množství iontů na m/z .
- ▶ m/z - podíl hmotnosti iontu a jeho náboje.
- ▶ Molekulový pík - pík s hmotnostní odpovídající hmotnosti molekuly (M).
 - ▶ $M+1$
 - ▶ $M+2$
- ▶ Základní pík - pík s nejvyšší intenzitou ve spektru.

Úvod do hmotnostní spektrometrie

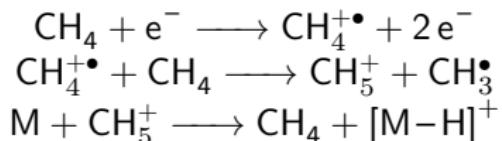
Schéma hmotnostního spektrometru



Hmotnostní spektrometr

Iontový zdroj

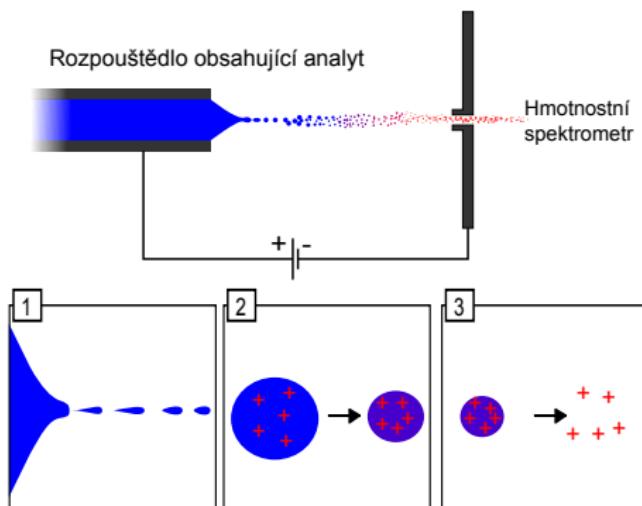
- ▶ Iontový zdroj je odpovědný za ionizaci vzorku, která je nezbytná, aby mohla proběhnout jeho analýza. Podle množství dodané energie rozlišujeme měkké a tvrdé iontové zdroje.
- ▶ Elektronová ionizace (EI) - iontový zdroj s tvrdou ionizací. Ionizace probíhá v plynné fázi, běžně se vyskytuje u sestav GC/MS. Principem je předávání energie letících elektronů analytu. Produktem je nejčastěji kladně nabitý radikál molekuly. Často dochází k rozsáhlé fragmentaci molekuly a ve spektru chybí molekulový pík.
- ▶ Chemická ionizace (CI) - měkký ionizace než EI. Nejprve ionizujeme reakční plyn (např. CH_4) a ten následně ionizuje molekuly analytu.



Hmotnostní spektrometr

Iontový zdroj

- ▶ *Elektrosprej (ESI)* - využívá se hlavně pro analýzu biologických vzorků. Ionizace probíhá působením silného elektrického pole (napětí 2-5 kV) na elektrodu. Ionizace probíhá za atmosférického tlaku.¹



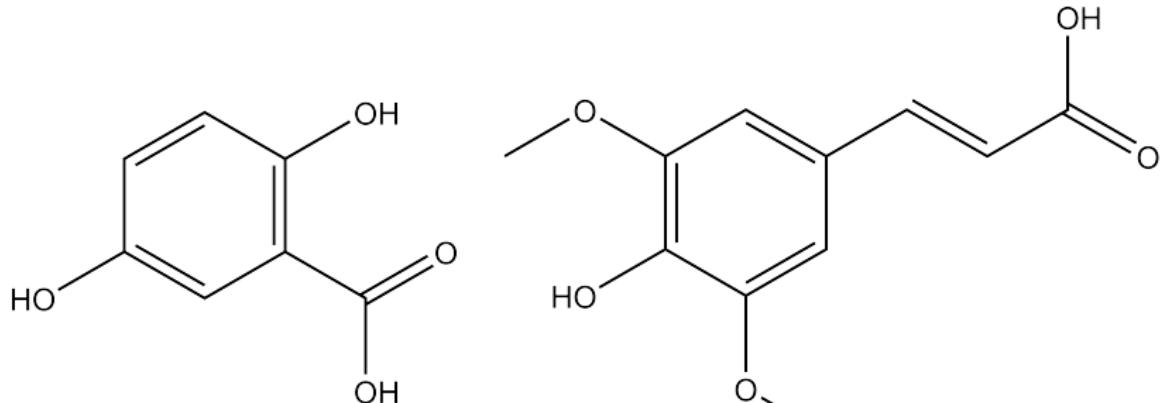
¹Evan MASON, Electrospray Ionization Spectroscopy.svg

Hmotnostní spektrometr

Iontový zdroj

► MALDI - Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization

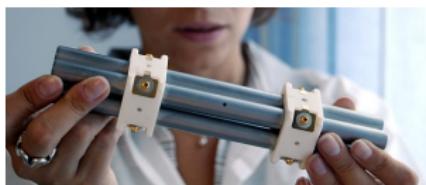
- Měkká ionizační technika. Využívá se při analýze biomolekul a velkých organických molekul, které snadno fragmentují.
- Vzorek se nejprve smíchá s vhodnou matricí, např. kyselinou 2,5-dihydroxybenzoovou nebo 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicovou a nanesese se na kovové platíčko.
- Směs vzorku v matrici je ozářena pulsem laseru, čímž dojde k ablaci a desorpci materiálu.
- Ionizace vzorku probíhá protonací matrice.



Hmotnostní spektrometr

Analyzátor

- ▶ Analyzátor je součást MS spektrometru, kde dochází k separaci iontů podle poměru m/z .
- ▶ Kvadrupól - nejběžnější a nejlevnější typ analyzátoru.
 - ▶ Kombinace čtyř tyčí, na které je přivedeno stejnosměrné i střídavé napětí. Úpravou velikosti stejnosměrného napětí a amplitudy střídavého lze zvolit ionty s určitým poměrem m/z a umožnit jim doputovat k detektoru, zatímco ostatní ionty jsou vychýleny mimo detektor.²
 - ▶ Analyzátor může pracovat buď jako skenovací, kdy postupně zvyšujeme hodnotu m/z nebo v režimu SIM (Single Ion Monitoring).

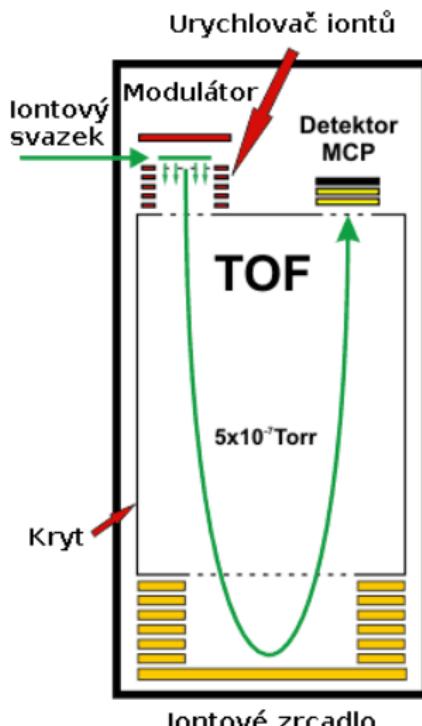


²Fulvio314, Mass spectrometer quadrupole.JPG

Hmotnostní spektrometr

Analýzátor

- ▶ Průletový analyzátor - ionty jsou pulzně vpouštěny do evakuované trubice.³
 - ▶ Separace je založena na vztahu mezi dobou letu a hodnotou poměru m/z. Ionty s menším poměrem m/z proletí trubicí za kratší dobu.
 - ▶ $\frac{m}{z} = \frac{2Vt^2}{l^2}$
 - ▶ V - potenciál, t - doba letu iontu, l - délka trubice
 - ▶ Rozlišení analyzátoru lze zvýšit použitím iontového zrcadla (*Reflektoru*) nebo tzv. opožděnou extrakcí, kdy dochází díky vzájemným srážkám iontů ke snížení rozdílů v kinetické energii iontů.



³Mkotl, Time Of Flight (TOF) Mass Analyser.gif

Hmotnostní spektrometr

Analyzátor

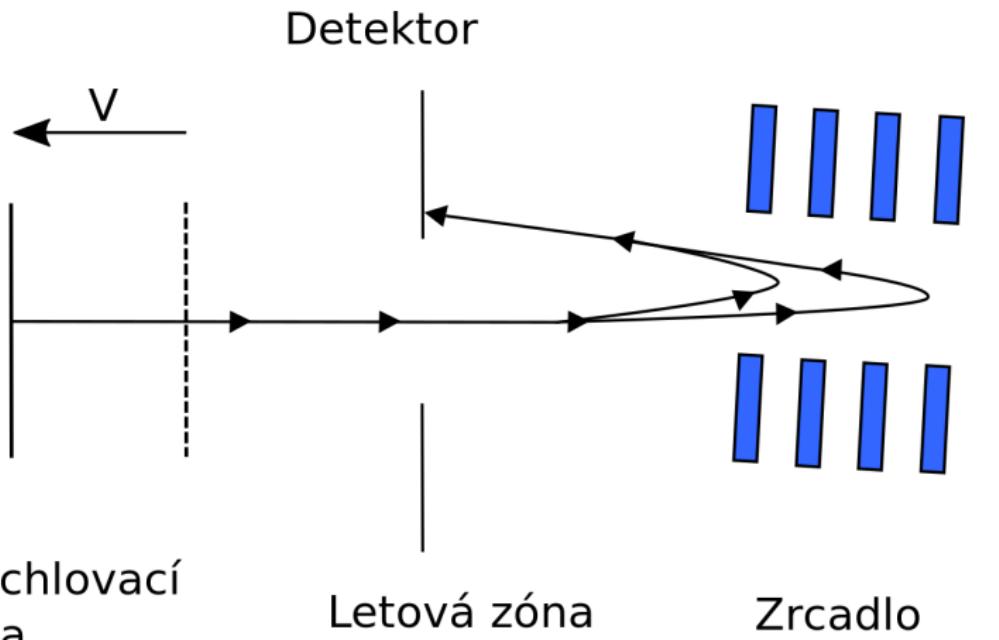


Schéma TOF analyzátoru s iontovým zrcadlem.⁴

⁴Zdroj: Elisemarion/Commons

Hmotnostní spektrometr

Analyzátor



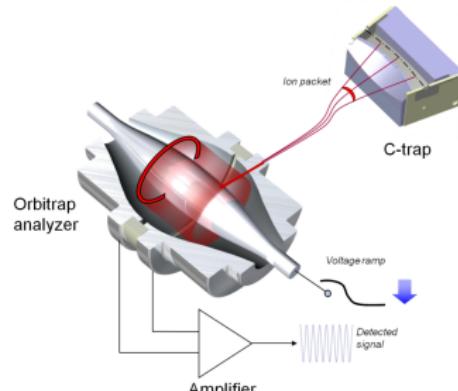
ESI-TOF MS spektrometr. TOF analyzátor je umístěn v kolmém směru.⁵

⁵Zdroj: Kkmurray/Commons

Hmotnostní spektrometr

Analyzátor

- ▶ *Orbitrap* - elektrostatická orbitální past.⁶
 - ▶ Nejnovější typ hmotnostního analyzátoru.
 - ▶ Skládá se z vnější a vřetenové elektrody, na které je přivedeno elektrické napětí.
 - ▶ Ionty se pohybují okolo a podél středové elektrody.
 - ▶ Frekvence v ose z je nepřímo úměrná odmocnině z m/z .
 - ▶ $\omega_z = \sqrt{\frac{k}{m/z}} \left[\frac{rad}{s} \right]$



⁶Thermo Fisher Scientific (Bremen), OrbitrapMA&Injector.png

Hmotnostní spektrometr

Detektor

- ▶ Detektory dělíme na dvě skupiny:
 - ▶ zaznamenávají všechny ionty, bez ohledu na jejich hodnotu m/z
 - ▶ zaznamenávají ionty s ohledem na jejich hodnotu m/z



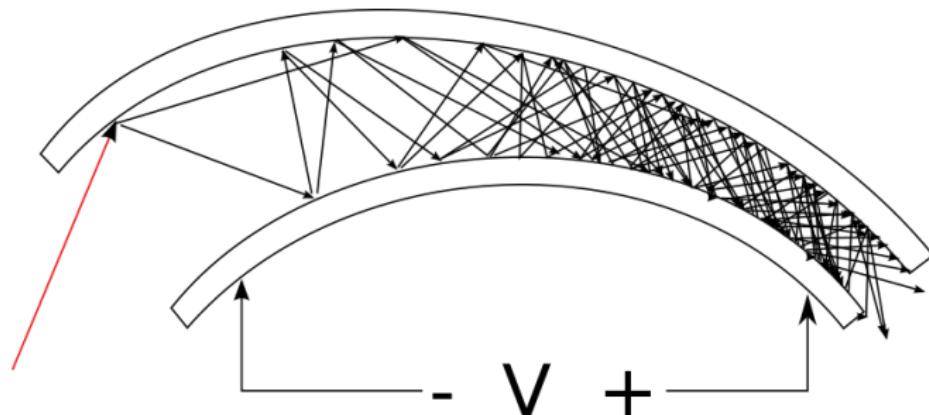
Elektronový násobič.⁷

⁷Zdroj: Kkmurray/Commons

Hmotnostní spektrometr

Detektor

- ▶ Elektronový násobič - letící iont vyrazí elektron z dynody násobiče, vyražený elektron putuje na další dynody a vyráží další elektrony. Detekce probíhá měřením vzniklého proudu.⁸

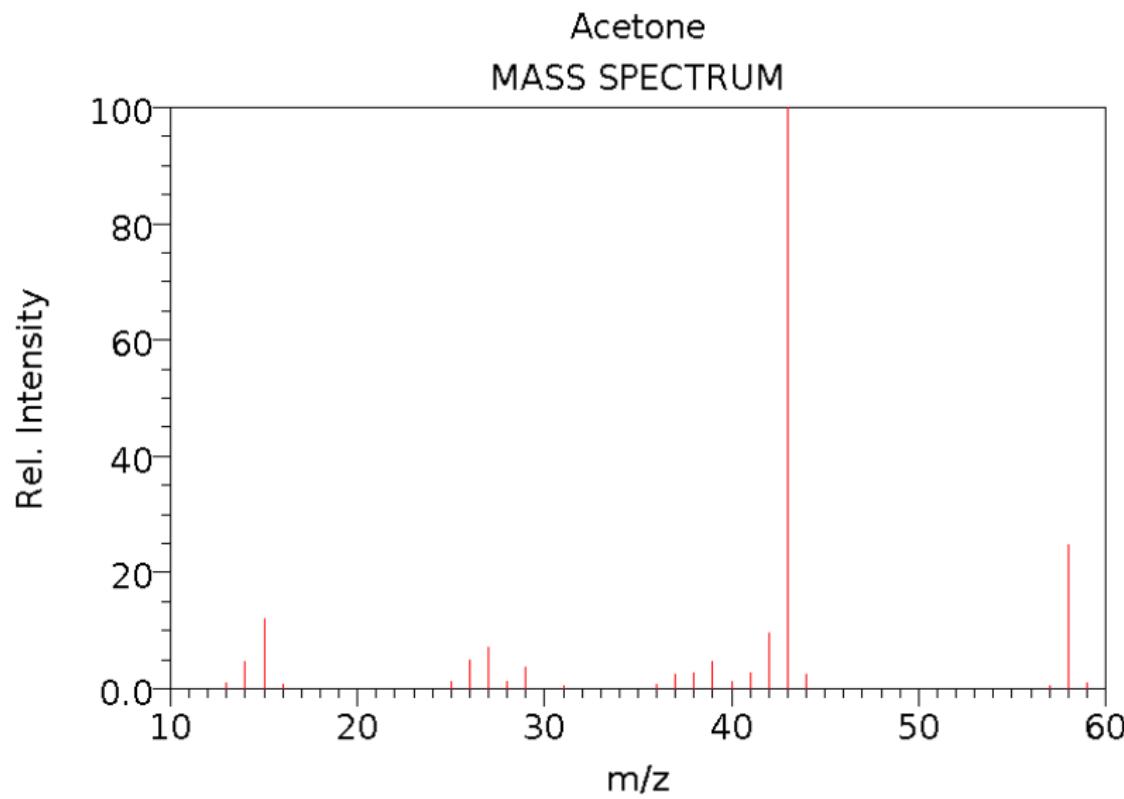


Princip funkce elektronového násobiče.⁹

⁸How Electron Multipliers work

⁹Zdroj: Egmason/Commons

Interpretace MS spekter



Interpretace MS spekter

1. Nalézt molekulový pík. Hledáme pík s nejvyšším poměrem m/z ve spektru.
2. Pokusit se o vytvoření molekulového vzorce. Užitečnou pomůckou jsou páry izotopologů.
 - ▶ Izotopology jsou izomery se stejnou strukturou, ale lišící se izotopickým složením, např. CHCl_3 a CDCl_3 .
 - ▶ Přírodní uhlík se skládá z izotopů ^{12}C a ^{13}C . Uhlíku ^{13}C je 1,1 %, tzn. že např. pro molekulu s pěti uhlíky bude intenzita píku $M+1$ rovna 6,6 %.
 - ▶ Interpretaci usnadňuje přítomnost píků $M+2$, pocházejících např. z O, Si, S, Cl, Br nebo I.
3. Pokud máme k dispozici databázi MS spekter, lze interpretaci zjednodušit a použít vyhledávání algoritmus.

Interpretace MS spekter

Izotopové zastoupení běžných prvků

Prvek	M		M+1		M+2	
	m/z	%	m/z	%	m/z	%
H	1	100,0	2	0,015		
C	12	100,0	13	1,1		
N	14	100,0	15	0,37		
O	16	100,0	17	0,04	18	0,02
F	19	100,0				
Si	28	100,0	29	5,1	30	3,4
P	31	100,0				
S	32	100,0	33	0,79	34	4,4
Cl	35	100,0			34	32,0
Br	79	100,0			81	97,3
I	127	100,0				

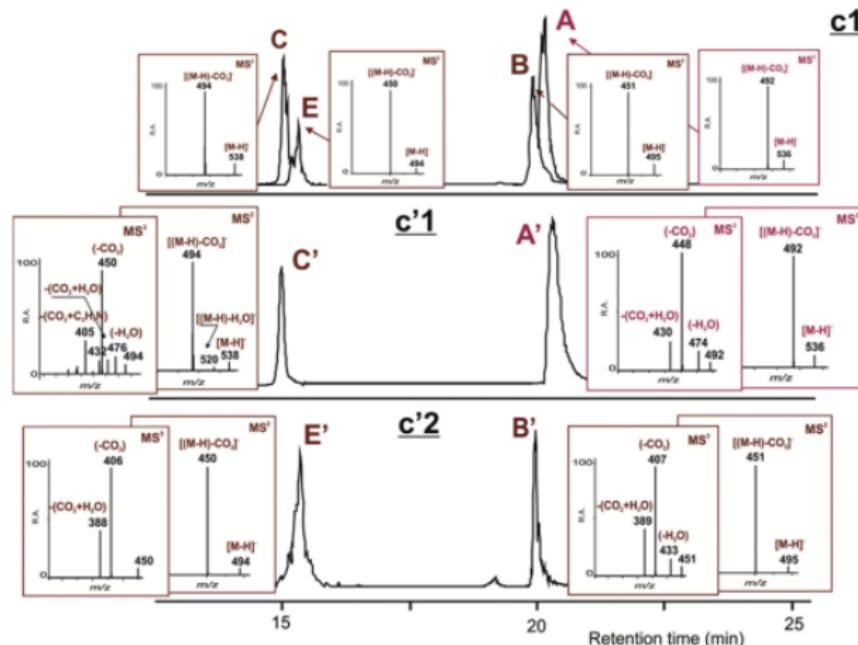
Využití MS spektroskopie

- ▶ Farmacie
- ▶ Potravinářství
- ▶ Zemědělství
- ▶ Toxikologie
 - ▶ Analýza léků
 - ▶ Analýza metabolitů
- ▶ Restaurování uměleckých předmětů
 - ▶ Identifikace polymerů
 - ▶ Identifikace přírodních látek - pryskyřic, lipidů, proteinů, apod.
 - ▶ Datování předmětů pomocí ^{14}C
- ▶ Zjišťování izotopického složení - např. pro datování předmětů
- ▶ Vesmírný výzkum
- ▶ Preparativní MS - možnost syntézy látek s využitím MS

Využití MS spektroskopie

Analýza barviv a pryskyřic

Kombinace HPLC/MS.¹⁰



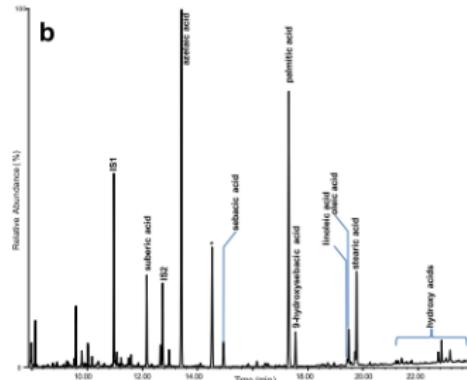
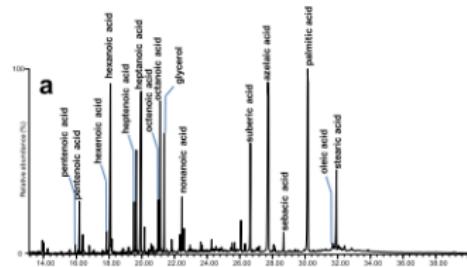
¹⁰SANTOS, Raquel, Jessica HALLETT, M. Conceição OLIVEIRA, Micaela M. SOUSA, Jorge SARRAGUÇA, M.S.J. SIMMONDS a M. NESBITT. HPLC-DAD-MS analysis of colorant and resinous components of lac-dye: A comparison between Kerria and Paratachardina genera. *Dyes and Pigments* [online]. 2015, 118, 129-136

Využití MS spektroskopie

Analýza olejových barviv v dílech Edvarda Muncha

Kombinace LC/MS.¹¹

Sampling point



¹¹LA NASA, Jacopo, Marco ZANABONI, Daniele ULDANCK, et al. Novel application of liquid chromatography/mass spectrometry for the characterization of drying oils in art. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2015, 896, 177-189 [cit. 2019-11-22]. DOI: 10.1016/j.aca.2015.09.023.

Literatura

1. DE HOFFMANN, Edmond a Vincent STROOBANT (ed.). *Mass spectrometry: principles and applications*. 3rd ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2007, xii, 489 s. ISBN 9780470033111.
2. Gross, J. H. *Mass Spectrometry, A Textbook*, Second Edition, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 2011, ISBN: 978-3-642-10709-2
3. HÜBSCHMANN, Hans-Joachim. *Handbook of GC-MS: fundamentals and applications*. Third edition. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2015, xvi, 863 stran. ISBN 978-3-527-33474-2.