

Československá spektroskopická společnost
CZECHOSLOVAK SPECTROSCOPIC SOCIETY

Bulletin

Československá spektroskopická společnost
CZECHOSLOVAK SPECTROSCOPIC SOCIETY
261

51

1987

Bulletin
Čs. spektroskopické společnosti

Číslo 51

únor 1987

Z obsahu 51. čísla Bulletinu :

	str.
Úvod	3
Z historie hmotnostní spektrometrie	4
Postavení hmotnostní spektrometrie mezi spektroskopickými metodami	9
Ionizace nárazem iontů	14
Hlavní typy reakcí monomolekulárního rozpadu iontů organických sloučenin	20
Metódy chemickej ionizácie a ionizácie elektrickým poľom	25
Ionizace laserem, plazmou ^{252}Cf a rychlými atomy a ionty	32
Hmotnostní spektrometrie negativních iontů	43
Sektorové hmotnostné spektrometre, prístroje s dvojitou fokusáciou, vysoké rozlíšenie, detekcia metastabilných iontov	48
Dynamické analyzátory v hmotnostní spektrometrii	55
Kombinace plynové chromatografie a některých dalších chromatografických metod s hmotnostní spektrometrií	63
Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC/MS)	70
Tandemová hmotnostní spektrometrie	79
Interpretace hmotnostních spekter	84
Kvantitativní hmotnostní spektrometrie organických sloučenin	93
Izolace a příprava k analýze vzorků z biologických materiálů	97
Využití počítače v hmotnostně-spektrometrické praxi	100
Současné komerční hmotnostní spektrometry	105
Doporučená literatura	111

Autoři:

- RNDr. Vladimír Hanuš, CSc
 ČSAV ÚFCHE J.H.
 121 38 Praha 2, Máchova 7 kap. 2,3,9
- Ing. Ivan Koruna, CSc
 VÚ pro farmacii a biochemii
 130 60 Praha 3, Kouřimská 17 kap. 14,15
- Ing. Vladimír Kováčik, CSc
 SAV Chemický ústav
 842 38 Bratislava, Dúbravská cesta kap. 5
- Ing. Ján Leško, CSc
 SVŠT CHTF
 812 37 Bratislava, Jánska 1 kap. 8
- Ing. Pavel Matoušek
 VÚ syntetických pryskyřic a laků
 532 07 Pardubice, S.K. Neumanna 1316 kap. 10
- Ing. Jaromír Novák, CSc
 VŠCHT
 166 28 Praha 6, Suchbátarova 5 kap. 16
- RNDr. Miroslav Ryska, CSc
 VÚ pro farmacii a biochemii
 130 60 Praha 3, Kouřimská 17 kap. 1,7,17
- RNDr. František Tureček, CSc
 ČSAV ÚFCHE J.H.
 121 38 Praha 2, Máchova 7 kap. 4,12,18
- Ing. Karel Ubik, CSc
 ČSAV Ústav organické chemie a biochemie
 166 10 Praha 6, Flemingovo nám. 2 kap. 6,11,13

Úvod

OS hmotnostní spektrometrie uspořádala ve dnech 24.-28. listopadu 1986 školu hmotnostní spektrometrie pro začátečníky a mírně pokročilé. Uspořádání školy si prakticky vynutil nedostatek odborníků při současném stále čtenějším zavádění analytické organické hmotnostní spektrometrie na nejrůznějších pracovištích, ať již v souvislosti s řešením problémů životního prostředí, stanovení reziduí v biologických materiálech, v potravinách nebo při řešení biotechnologických problémů a pod. Tyto požadavky též rozhodujícím způsobem ovlivnily program školy. Škola si nekladla za cíl seznámit posluchače se základními principy a metodami všech oblastí hmotnostní spektrometrie, ale soustředila se pouze na analytickou organickou hmotnostní spektrometrii. Předmětem nebyla ani analýza izotopická. I tak byl program školy natolik obsáhlý, že se jen s obtížemi dal zkoncentrovat do plánovaných 32 hodin přednášek a panelových diskuzí.

Předložený monotematický soubor představuje zkrácené texty přednášek v logickém sledu, tak jak tvořily náplň školy. Je určen pro začátečníky v oboru hmotnostní spektrometrie a pro ty zájemce z jiných oblastí, kteří se potřebují v rychle se vyvíjejícím oboru analytické organické hmotnostní spektrometrie orientovat. Věříme, že vzhledem k absolutnímu nedostatku podobných domácích publikací může být i cennou pomůckou v příručních knihovnách.

M. Ryska

Redakční úprava: V. Hanuš
 I. Koruna
 M. Ryska
 M. Fara

1. Z historie hmotnostní spektrometrie

Za zakladatele hmotnostní spektrometrie považujeme vynikajícího anglického fyzika J.J. Thomsona, který v r. 1910 zkonstruoval první t.zv. parabolový spektrograf. Jeho práce byla celkem logickým vyvrcholením práce jeho předchůdců, zejména E. Goldsteina, který při studování elektrického výboje v plynech objevil v r. 1886 t.zv. kanálové neboli anodové paprsky, a W. Wiena, který v letech 1897 - 1902 studoval jejich chování v elektrickém a magnetickém poli. J.J. Thomson výsledky svých prací shrnul v r. 1913 v knize "Rays of Positive Electricity and Their Application to Chemical Analysis". Kniha snad ještě lépe než vlastní konstrukce spektrografu svědčí o genialitě tohoto fyzika a o oprávněnosti považovat jej za otce analytické hmotnostní spektrometrie. Snad nic lépe nepotvrzuje tento názor než slova, kterými knihu uvádí: "..... Popsal jsem do určité míry použití pozitivních paprsků při chemické analýze. Jedním z hlavních důvodů napsání této knihy je víra, že by mohla podnitit ostatní, zejména chemiky, aby zkusili tuto analytickou metodu. Cítím se být naprosto jist tím, že mnoho problémů v chemii by mohlo být vyřešeno daleko snadněji pomocí této metody než kterékoliv jiné. Metoda je překvapivě citlivá - dokonce citlivější než metody spektrální analýzy, vyžaduje nepatrné množství materiálu, který nemusí být zvláště čistěn; technika není obtížná, je-li k dispozici zařízení pro vysoké vakuum". Uvědomíme-li si, že své práce uskutečnil v době, kdy neexistovaly představy o stavbě atomů a molekul podobné dnešním, kdy od objevu elektronu jako jedné ze základních stavebních částí atomu uplynulo jen několik

málo let, kdy získání vakua 10^{-2} až 10^{-3} Torr ($\sim 0,1$ Pa) pomocí mechanických Sprengelových či Töplerových vývěv byla nepředstavitelně namáhavá a vyčerpávající práce, pak náš obdiv k tomuto zakladateli našeho oboru se ještě znásobí.

Pokračovateli Thomsona počátkem století se stali v Anglii W.F. Aston a v USA A.J. Dempster. Astonův první hmotnostní spektrograf z r. 1919 byl prvním přístrojem s t.zv. rychlostní i směrovou fokusací iontového paprsku. Podobně jako Thomson, používal i Aston k produkci iontů výbojovou trubici. Dokázal charakterizovat celou řadu plyných prvků z hlediska jejich izotopického složení. Potvrdil např. izotop ^{22}Ne vedle ^{20}Ne , ^{35}Cl vedle ^{37}Cl a další. Provedl řadu konstrukčních zlepšení svých spektrografů, do r. 1937 sestavil celkem 3 přístroje. Zavedl kolimační šterbiny, zdokonalil fotografický záznam. Paralelně s Astonem prováděl podobné práce Dempster v Reyerzonově laboratoři Chicagské university. Na rozdíl od Astona používal jako první ionizaci elektronovým nárazem, 180° magnetický analyzátor a elektrometrickou detekci iontů. Vzorek byl nanášen na tenký platinový pásek a elektrickým náhřevem převáděn do plyného skupenství. Aston a Dempster provedli stanovení stabilních izotopů všech existujících prvků, když v r. 1935 byly s použitím jiskrové ionizace takto charakterizovány jako poslední prvky platina a iridium. Záhy poté pro-

hlásil Aston, že hmotnostní spektrometrie splnila svůj úkol a jako oblast výzkumu odumřela. Hmotnostní spektrometrie třicátých let se tedy výhradně zabývala izotopickou analýzou. I když vedle Astona a Dempstera vzbuzují obdiv výsledky i dalších. Na př. v r. 1936 K. Bainbridge a E. Jordan pomocí svého spektrografu měřili hmotnosti izotopů s přesností na 5 až 6 platných míst. Dalším mezníkem je výpočet konstrukce dokonalého optického systému, který v r. 1934 navrhli J. Mattaucho a R. Herzog. Umožňoval perfektní fokusaci prvního řádu po celé délce fotografické desky, což na rozdíl od dosavadních iontových optik s fokusací pouze bodovou dovoľovalo zaznamenat jednotlivé druhy iontů v široké hmotnostní oblasti.

Aplikace hmotnostní spektrometrie v organické analýze byla vyvolána požadavky naftařských koncernů zejména během druhé světové války. Jejich finanční a materiální možnosti bezprostředně vedly k výrobě prvních komerčních přístrojů. První komerční hmotnostní spektrometr byl vyroben firmou Consolidated Engineering Corporation v USA podle prototypu zapůjčeného z Kalifornského technologického institutu. Tento prototyp byl zkonstruován na základě přístrojů Dempstera koncem třicátých let a měl sloužit k analýzám zemního plynu. První komerční přístroj s typovým označením CEC 21-101 byl instalován v Atlantic Refining Company v r. 1942, jeho cena byla 19500 \$. Přístroje CEC 21-101 měly nespočetné množství nedostatků a práce s nimi byla velice obtížná. Byly používány hlavně pro kvantitativní analýzy plyných směsí, především lehkých uhlovodíků $\text{C}_1\text{-C}_4$ a vybraných frakcí nízkoteplotní destilace ropy. Přes

velké problémy výrobce bylo v letech 1944 až 1954 vyrobeno 108 přístrojů, z toho 83 pro naftařské a petrochemické společnosti. Téměř současně za 2. světové války započaly s výrobou přístrojů Westinghouse Electric Corporation v Pasadeně (typ IV) a Metropolitan Vickers v Manchesteru (typ MS1). Hmotnostní spektrometrie u petrochemických společností byla až do konce čtyřicátých let využívána téměř výhradně pro posuzování kvality nízkovroucích frakcí fingerpintovým způsobem, tedy bez interpretace hmotnostního spektra.

Nápadná podobnost reakcí v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru s reakcemi chemickými připoutávala od počátku padesátých let stále více organické a fyzikální chemiky. Padesátá léta v hmotnostní spektrometrii tak znamenala další kvalitativní zlom a přínos zejména v teorii a mechanismu reakcí iontů organických sloučenin v plyné fázi. Ještě předtím než na scénu hmotnostní spektrometrie vstoupily dnešní významné osobnosti J. Beynon (ICI 1947), F. McLafferty (Dow Chemical 1950), K. Biemann (Massachusetts Institute of Technology 1955), C. Djerassi (Stanford University 1960), byly provedeny základní práce objasnění vzniku metastabilních iontů (J. Hipple 1947), interpretace potenciálů vzniku iontů ve vztahu k struktuře (D.P. Stevenson 1950) a navržena teorie kvazirovnovážného stavu pro mechanismus fragmentace iontů organických sloučenin (H.M. Rosenstock 1952). Základem moderních přístrojů a elektrometrickou registrací se stala iontová optika dvojité fokusace A.O.C. Niera a E. Johnsona (1953).

V padesátých letech byla konstruována řada přístrojů, které se staly předchůdci dnešních dynamických analyzátorů. V r. 1955 W.C. Wiley a J.H. McLaren vyvinuli první prototyp průletového analyzátoru (TOF), v r. 1958 P.H. Reinhard a U. von Zahn popsali kvadrupólový filtr. Předchůdce dnešních přístrojů iontové cyklotronové rezonance, t.zv. omegatron, popsali J. Hipple, H. Somer a H. Thomas již v r. 1948. Byly provedeny první pokusy přímého napojení hmotnostního spektrometru na výstup plynového chromatografu (J.C. Holmes, F.A. Morrell 1957).

Sedesátá léta se vyznačují vyvrcholením klasické organické hmotnostní spektrometrie. Komerční přístroje s dvojitou fokusací AEI MS9 (první komerční hmotnostní spektrometr s dvojitou fokusací, prototyp MS8, byl vyroben pro prof. Beynona v r. 1956) a CEC 21-110 vyráběné v poměrně značných sercích usnadňovaly interpretace spekter organických sloučenin. Zavedení přímého vstupu umožnilo analyzovat všechny typy organických sloučenin, které po nahláti bez rozkladu poskytovaly

tenzi par alespoň 10^{-5} Torr (10^{-3} Pa). Jestliže v r. 1947 American Petroleum Institute (API) spolu s National Bureau of Standards (NBS) založily knihovnu spekter a standardů s několika desítkami základních uhlovodíků, pak knihovna NBS koncem šedesátých let obsahovala již několik desítek tisíc spekter. Byl učiněn rovněž rozhodující pokrok ve vývoji kombinací GC/MS. V r. 1967 byl uveden na trh první komerční GC/MS systém LKB 9000, který bezprostředně podnítil vývoj kvadrupólových přístrojů, jejichž rychlý záznam byl pro GC/MS spojení žádánější a vhodnější, nemluvě o nižších pořizovacích nákladech. GC/MS technika svými požadavky na zpracování dat přímo ovlivnila zavádění systémů s automatickým zpracováním dat. Původně však byly počítače používány při vyhodnocování spekter vysokého rozlišení, poprvé vůbec pak z fotografických desek (K. Bieman 1964). Malá kapacita počítačů, jejich rozměry, pomalé analogové číslicové převodníky však vedly zpočátku pouze k jejich použití "off line" způsobem, tedy ke zpracování dat v oddělených laboratorích nebo dokonce pracovištích. Hmotnostní spektrometrie našla uplatnění při analýzách všech organických sloučenin, pokud byly dostatečně tekavé. V tomto směru nepomohlo ani zavedení chemické ionizace (M.S.B. Munson, H.F. Field 1966). Podobně jako Aston koncem třicátých let považoval vývoj hmotnostní spektrometrie za ukončený a neposkytující další perspektivy, byly koncem šedesátých let některými předními odborníky (např. prof. C. Djerassim) aplikační možnosti a perspektivy hmotnostní spektrometrie v organické chemii považovány za vyčerpané. Přispěl k tomu též i rozvoj metody NMR.

Částečnou krizi a skepsi konce šedesátých let rozptýlil vývoj nových ionizačních technik, který zejména v druhé polovině sedmdesátých let a počátkem tohoto desetiletí vyústil v explozi t.zv. desorpčních technik umožňujících ionizaci molekul v pevném stavu. Již v r. 1969 H.D. Beckey vyvinul metodu desorpce polem (FD). První použití desorpce laserem spadá sice rovněž do let šedesátých, avšak přímo revoluční práci vykonal F. Hillenkamp se spolupracovníky s použitím pulsního laseru a

průletového analyzátoru (1976). D.S. Simons a C.A. Evans popsali v r. 1974 metodu elektrohydrodynamické desorpce (EHDS), R.D. MacFarlane a D.F. Toger son v téže roce vyvinuli metodu desorpce štěpnými vysokoenergetickými fragmenty ^{252}Cf (^{252}Cf PDMS). A. Benninghoven (1976) rozšířil hmotnostní spektrometrii sekundárních iontů (SIMS) na oblast organické analýzy. V r. 1981 M. Barber zavedl metodu ionizace rychlými atomy (FAB). Řada dalších příbuzných metod ionizace rozšiřuje počet používaných akronymů v hmotnostní spektrometrii do nepřehledného výčtu. Vývoj těchto ionizačních technik rozšířil použitelnost hmotnostní spektrometrie v organické chemii na vysokomolekulární oblast a zároveň vyvolal potřebu zdokonalit analyzátor v tomto směru. Iontová optika sektorových přístrojů s dvojitou fokusací byla dovedena k téměř absolutní dokonalosti (H. Matsuda 1981), nová technologie magnetů rozšířila hmotnostní rozsah až na 16000 daltonů při plném akcelerujícím napětí. Nové perspektivy odhalují pulsní metody ve spojení s dynamickými analyzátoru a vysokovýkonnými počítači: iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací ICR FTMS (M.B. Comisarow, A.G. Marshall 1975, R.T. McIver 1980), průletové hmotnostní spektrometrie s desorpcí, případně ionizační lasery nebo ve spojení s ^{252}Cf PDMS.

Velký rozmach nastává ve vývoji kombinovaných metod. Zatímco metoda GC/MS dospěla ve šedesátých letech ke své dokonalosti a rutinně je využívána nejen klasická ionizace elektronovým nárazem (EI), ale i ionizace chemická (CI), spojení s kapalinovou chromatografií (LC/MS) se neustále rychle vyvíjí, v poslední době zejména díky zavedení termosprejové ionizace (M.L. Vestal 1980). Tandemové spojení dvou a více hmotnostních analyzátorů (MS/MS), z nichž některé slouží k separaci iontů a ostatní k analýze produktů jejich rozpadu, je nejnovější špičkovou technikou dnešní doby, která ve spojení s novými ionizačními technikami dává perspektivy přesahující obzor našich představ.

Československá hmotnostní spektrometrie zaujala pevné postavení ve světovém vývoji hlavně v době, kdy komerční přístroje neovlivňovaly tak bezprostředně její vývoj. Již v roce 1953 V. Čermák, V. Hanuš, Č. Jech a J. Gabicár zkonstruovali první československý hmotnostní spektrometr, který byl po několika letech jediným přístrojem v Československu vůbec. V retrospektivě uvedeného vývoje byl tento úspěch přinejmenším srovnatelný s úspěchy předních průkopníků té doby. Skoly V. Čermáka v oblasti iontové molekulových reakcí v návaznosti na spektroskopii elektronů (zejména pionýrské práce v oboru Penningovy ionizace) a V. Hanuše v oblasti hmotnostní spektrometrie alkaloidů a mechanistických aspektů rozpadů iontů v plynné fázi (retro Dielsovy-Alderovy reakce apod.) pevně zakotvily v popředí světového vývoje. Rovněž v přístrojovém vybavení, které ovlivňuje hmotnostní spektrometrii více než kteroukoliv jinou disciplínu byla u nás koncem šedesátých a začátkem sedmdesátých let uspokojivá situace. Vždyť již v r. 1967 byl na VŠCHT v Praze instalován první GC/MS systém LKB 9000, tedy bezprostřed-

ně po jeho uvedení na světových trzích. V r. 1969 byl v ÚMCH CSAV instalován první přístroj s vysokou rozličovací schopností AEI MS 902, brzy následovan dalšími třemi přístroji tohoto typu. Léta sedmdesátá a první polovina let osmdesátých však nepřinesla žádnou významnější inovaci přístrojového vybavení u nás a lze je z tohoto hlediska označit za léta totální stagnace. Nové perspektivy se otevírají v návaznosti na řešení úkolů 8. pětiletky, při řešení úkolů v oborech farmacie, medicíny, biotechnologie a zejména při řešení ekologických problémů, kde je hmotnostní spektrometrie dnes prakticky nenahraditelnou analytickou metodou.

2. Postavení hmotnostní spektrometrie mezi spektroskopickými metodami

Podstatou všech spektroskopických metod je měření rozdílů energií mezi dvěma stavy molekuly a sledování pravděpodobnosti přechodu. Spektra jsou proto fyzikální vlastnosti molekul v daném stavu. Naproti tomu se v hmotnostní spektrometrii měří relativní zastoupení kladných iontů (v poslední době též záporných iontů), rozlišených podle poměru m/z (M = hmotnost, z = počet jednotkových nábojů) vzniklých při některém způsobu ionizace. Se spektroskopickými metodami má hmotnostní spektrometrie řadu společných vnějších znaků, např. povšechný vzhled hmotnostních spekter a mnohé termíny (disperse, rozlišovací schopnost, fokusace ap.), ale zvláště důležitý je společný hlavní cíl - poznávat vlastnosti hmoty.

2.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti molekul

Z měření závislosti výtěžků iontů na energii ionizujících elektronů lze stanovit kritické potenciály. Minimální energie elektronů, postačující k ionizaci molekul, je ionizační energie $IE(M)$; minimální energie elektronů potřebná pro vznik fragmentových iontů F^+ z určité molekuly M je označována jako $AE(F^+)_M$. Při ionizaci monochromatizovanými elektrony nebo vhodnými početními metodami a kalibracemi lze měřit IE s přesností dosahující několik desítek mV. Přesnost měření AE je podstatně nižší ze zásadních důvodů, přesto však AE mají značný význam: umožňují s jistými předpoklady jednoduchými termodynamickými cykly určit disociační energii příslušné vazby v molekule nebo v molekulárním iontu i slučovací tepla radikálů či iontů.

Díky širokému dynamickému rozsahu umožňuje hmotnostní spektrometrie sledovat v mnoha podrobnostech reaktivitu iontů v plynné fázi. Monomolekulární rozpady ionizovaných molekul s definovaným obsahem vnitřní energie (získané např. přenosem náboje z ionizovaných atomů nebo koincidenční technikou při fotoionizaci) přispěly experimentálními daty k upřesnění základních představ teorie reakčních rychlostí i k rozvoji obecných početních metod reakční kinetiky. U bimolekulárních reakcí iontů s molekulami v plynné fázi má hmotnostní spektrometrie význam ve více směrech. Technika zkřížených paprsků iontů a molekul s měřením závislosti kinetické energie sekundárního iontu na úhlu odklonu umožňuje poznat mnohé detaily o průběhu reakce, např. roli kinetické energie v aktivaci i mechanismu reakce, a charakterizovat dobu života komplexu. Příkladem termodynamických měření rovnovah reakcí, jichž se účastní ionty v plynné fázi, jsou měření protonových afinit, $PA(M)$, nebo bazicit v plynném stavu, $GB(M)$, ($PA = \Delta H^\circ$; $GB = \Delta G^\circ$); tyto veličiny nejsou komplikovány solvatačními efekty a odrážejí základní vlastnosti molekul. Hmotnostně spektrometrickými

metodami lze ovšem i termodynamicky studovat rovnováhy při postupných solvatacích iontů v plynné fázi.

2.2 Kvantitativní chemická analýza

V hmotnostním spektru bývají látky zpravidla charakterizovány celou řadou iontových druhů rozdílně zastoupených a přitom lze poměrně snadno zastoupení měřit v širokém dynamickém rozsahu (např. proudy 10^{-9} až 10^{-15} A). Analytická využití jsou však omezoována vysokou pořizovací cenou i provozními náklady, obvykle na takové úkoly, v nichž je třeba využít zvláštních předností, a to zejména:

- izotopická měření: zastoupení a přesné hmotnosti izotopů prvků; distribuce izotopomerů molekul, někdy i lokalizace izotopického značení; zřetelovací izotopická analýza (např. v kombinaci GC/MS pro kvantitativní analýzu subnanogramových množství ve velmi složitých směsích);
- analýza složek za nízkých a velmi nízkých parciálních tlaků; analýza znečištěnin ve vysokém a velmi vysokém vakuu; složení par velmi málo těkavých látek (např. aktivity složek slitin za vysoké teploty); detekce netěsností velkých aparatur;
- "spojité analýzy" - analýzy s velmi krátkou časovou konstantou pro sledování velmi rychlých dějů (např. exploze, zapalování a hoření, výboje, změny složení vzduchu při výdechu a výdechu v lékařské diagnostice);
- "typové analýzy" velmi složitých směsí, které mohou mít nescíslně velký počet složek, pokud je lze zařadit do několika strukturálně typických serií (např. u frakcí pohonných hmot obsahů alkanů, cykloalkanů, aromátů, příp. bicykloalkanů ap.).

Pro jednotlivé obory analytických aplikací jsou ovšem komerčně vyráběny více méně specializované spektrometry, dosahující vysoké citlivosti nebo přesnosti měření, např. citlivé detektory helia pro měřiče netěsností a detekci netěsností, dvoupaprskové spektrometry pro měření zastoupení izotopů s kompenzačním zapojením a napouštěcím systémem pro rychlé střídání měřeného vzorku a standardu ap.

2.3 Identifikace a objasnění struktury

Forma hmotnostních spekter -serie číselných dvojic m/z iontu a jeho relativní zastoupení- je výhodná pro jejich katalogizaci číselnicovou, grafickou nebo v paměti počítače i pro porovnání spektra sloučeniny, která má být identifikována s pomocí spekter sbírky. Je ovšem třeba mít na zřeteli, že hmotnostní spektra nejsou fyzikální vlastností molekuly, ale závisí na podmínkách ionizace i hmotnostní analýzy. Nadto mnohé sloučeniny strukturálně od sebe značně rozdílné poskytují spektra navzájem velmi podobná (např. izomery, pokud se při ionizaci přeměňují na společný ion, z něhož vznikají ostatní fragmento-

vé ionty). V hmotnostní spektrometrii proto platí více než u jiných spekter, že identifikaci nebo přiřazení struktury je nutno považovat za předběžné, nezbytně vyžadující ověření jinými metodami. Hmotnostní spektrometry s vysokou rozlišovací schopností (10^4 a více) poskytují velkou výhodu v tom, že umožňují měřit poměr hmotnosti z náboje iontů m/z s přesností 5-10 ppm a lepší, což postačuje k tomu, aby bylo možno více méně jednoznačně přiřadit všem iontům elementární složení. Tím se velmi zjednodušuje hledání ve sbírkách spekter. Nejobsáhlejší z nich má asi 80 tisíc spekter (ve formě počítačové knihovny), což je jenom o málo více než 1% z celkové počtu popsanych sloučenin.

Při identifikaci sloučenin, jejichž spektra nejsou katalogizována, je nutno postupovat stejnými způsoby jako při objasnění struktury nových látek. Pokud je vzorek k dispozici v dostatečném množství, je namístě kombinovat data spektroskopická s daty chemickými, včetně úprav vzorku pro hmotnostně spektrometrické stanovení počtu aktivních vodíků a pro charakterizaci funkčních skupin.

Mechanismy rozpadů monomolekulárních iontů nejsou obvykle cizí organickým chemikům, obeznámeným s reaktivitou karboniových iontů, radikálů a fotochemických reakcí, nicméně mají některé zvláštnosti. Vyplynávají především z toho, že ionizací nárazem elektronů vzniká ion-radikál obecně ve vzbuzeném stavu a nestabilizovaný solvátovým obalem.

Diskuse vztahů mezi hmotnostně spektrometrickou fragmentací molekul a jejich strukturou je obsahem rozsáhlé časopisecké i monografické literatury. Řešení konkrétních úkolů se však leckdy neobejde bez konfrontace s chováním modelových sloučenin blízké struktury. Při srovnávání příbuzných sloučenin nastává obecně jedna ze dvou možností:

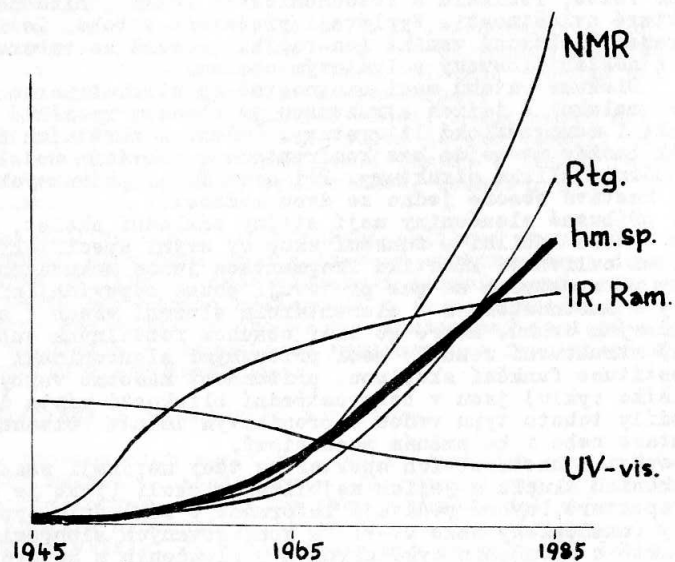
- příbuzné sloučeniny mají stejný základní skelet, který je sám o sobě labilní a funkční skupiny svými specifickými vlastnostmi ovlivňují kinetiku fragmentace jenom sekundárně; rozdíly ve spektrech se pak projevují pouze odpovídajícími rozdíly v hmotnostech a v elementárním složení všech (a jen těch) iontových druhů, které se liší obsahem rozdílných substituentů;
- strukturální rozdíly mezi příbuznými sloučeninami (např. substituce funkční skupinou, přítomnost násobné vazby nebo dalšího cyklu) jsou v bezprostřední blízkosti místa disociace; rozdíly tohoto typu vedou k pronikavým změnám rozsahu fragmentace nebo i ke změnám mechanismů.

Výpovědi z hmotnostních spekter se tedy netýkají samotných funkčních skupin a jejich nejbližšího okolí (jako je např. u IR spekter), nýbrž podávají informace o základním typu struktury (analogicky jako UV-VIS u konjugovaných sloučenin), zvláště u sloučenin cyklických a u sloučenin s heteroatomy. Až na výjimky neposkytuje hmotnostní spektrum data, jež by umožňovala jednoznačně logickým postupem určit posloupnost vazeb v molekule, jako je tomu u spektroskopie NMR. Hmotnostně spektrometrická data však diskusí spekter NMR obvykle značně usnadňují.

Při objasňování struktury mají význam i doplňkové hmotnostně spektrometrické techniky. Jsou to zvláště tzv. "chemické ionizace" a mezi nimi především ionizace přenosem protonu; takto lze např. získat ionty MH^+ (se sudým počtem val. elektronů) u sloučenin, jejichž ionizované molekuly M^+ jsou zcela nestáble. - V posledním desetiletí získala půdu technika MS/MS umožňující charakterizovat separované ionty stejného elementárního složení (isomerní ionty), a to pomocí jejich další fragmentace a hmotnostní analýzy; dodatečná aktivace a fragmentace vybraných iontů se vyvolá buď srážkou s lehkou neutrální částicí, při níž část kinetické energie iontu se přemění na vnitřní energii, nebo např. absorpcí fotonů.

Nelze ani pochybovat o tom, že s rostoucím objemem sbírek spekter a se zdokonalováním vyhledávacích programů poroste význam počítačového zpracování dat pro objasňování struktury. V současnosti je už běžně užíván program, který vyhledává strukturní typy nejen podle iontových druhů obsažených ve spektrech, ale také podle hmotností neutrálních částic odštěpovaných při vzniku fragmentových iontů.

Ani s obrovským rozvojem spektrálních a optických metod pro objasňování struktury nových sloučenin neztrácí hmotnostní spektrometrie na svém významu (obr. 1). Předností hmotnostní

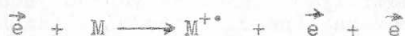


Obr. 1. Význam jednotlivých spektrálních metod při objasňování struktury nových sloučenin (na základě odhadu počtu publikací)

spektrometrie je obrovský počet informací, které lze získat se ztrátou velmi málo množství sloučeniny (např. 0,1 mg), i charakter těchto informací, jejichž diskuse je často blízká vyslovené chemickým úvahám. Nevýhodou jsou značné náklady pořizovací i provozní (např. střední třída hmotnostních spektrometrů cenově odpovídá nejvyšší třídě komerčních spektrometrů NMR), vzorek se při měření nevratně ztrácí (i když se pro ionizaci obvykle využívá velmi malý podíl); vzorky znečišťují součásti iontové a elektronové optiky i vakuového systému ("paměť", snižování rozlišovací schopnosti, nutnost čištění).

3. Ionizace nárazem elektronů

U organických sloučenin je ionizace nárazem elektronů podle schématu



nejdůležitějším způsobem ionizace. Umožňuje získávat poměrně jednoduše dobře reprodukovatelná spektra (alespoň v daném experimentálním uspořádání).

3.1 Podmínky ionizace nárazem elektronů

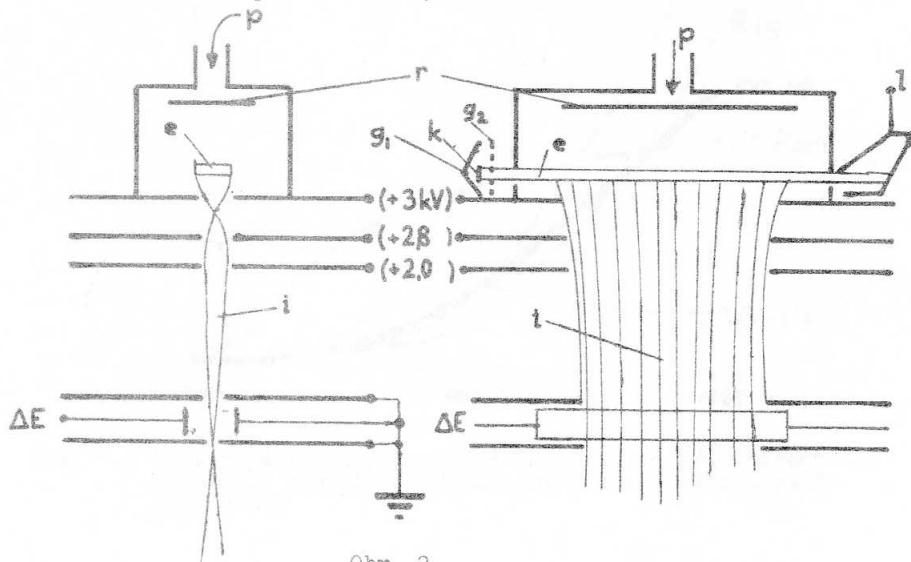
(i) proud elektronů procházející ionizační komůrkou, obvykle směřovaný pomocným magnetickým polem, nesmí dosahovat hodnot, při nichž by nastaly komplikace z prostorového náboje (max. 200 až 500 μA při 10^{-5} Torr (10^{-3} Pa));

(ii) elektrony mají definovanou energii, obvykle v oboru 70–85 eV (obor maximálních průřezů pro ionizaci);

(iii) celkový tlak v ionizační komůrce nemá překročit 10^{-5} Torr (10^{-3} Pa), aby se omezily na minimum reakce iontů s molekulami;

(iv) ionizační komůrka má být termostatována, obvykle na teplotu zabranující kondensaci napouštěných par.

Do ionizační komůrky iontového zdroje (obr. 2) jsou analyzované páry kontinuálně přiváděny a odčerpávány šterbinami iontové a elektronové optiky. Molekuly setrvávají v komůrce podle typu komůrky 0,1 až 10 ms. Ionizaci podléhá jen velmi malá část (zlomek promile), avšak ze vzniklých iontů je značný podíl z prostoru ionizace vytahován, zformován do iontového svazku a v analyzátoru analyzován podle m/z . Ionty setrvávají v komůrce po dobu ca 1 μs .

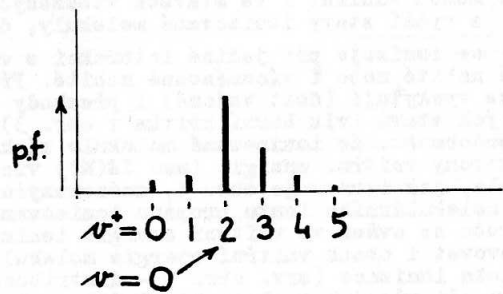
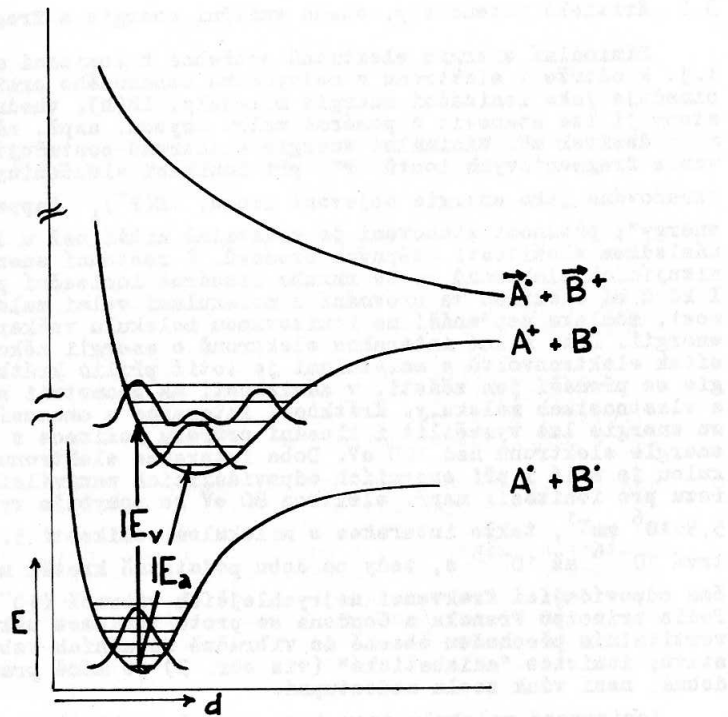


Obr. 2

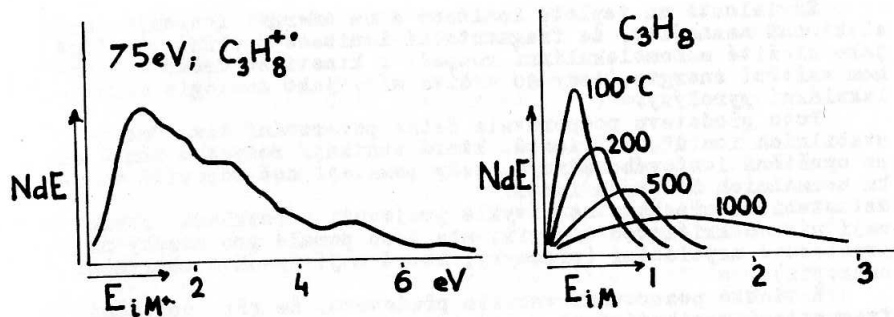
3.2 Kritické potenciály, obsah vnitřní energie a fragmentace

Minimální energie elektronů potřebná k ionizaci molekuly, t.j. k odtržení elektronu z nejvyššího obsazeného orbitalu, se označuje jako ionizační energie molekuly, $IE(M)$; vhodnými postupy ji lze stanovit s poměrně malou chybou, např. několik málo desítek mV. Minimální energie elektronů postačující pro vznik fragmentových iontů F^+ při ionizaci sloučeniny A je označována jako energie objevení iontu, $AE(F^+)_A$ "appearance energy"; přesnost stanovení je podstatně nižší než u $IE(M)$, následkem složitosti štěpných procesů. S rostoucí energií ionizujících elektronů roste zhruba lineárně ionizační průřez. I když má elektron ve srovnání s molekulami velmi malou hmotnost, zdaleka nepřenáší na ionizovanou molekulu veškerou svoji energii. Doba silné interakce elektronů o energii několika desítek elektronvoltů s molekulami je totiž příliš krátká, energie se přenáší jen zčásti, v závislosti na geometrii srážky a vlastnostech molekuly. Krátkostí interakce a omezením přenosu energie lze vysvětlit i klesání průřezu ionizace s růstem energie elektronů nad 100 eV. Doba interakce elektronu s molekulou je malá i při energiích odpovídajících maximálnímu průřezu pro ionizaci; např. elektron 80 eV se pohybuje rychlostí $5,9 \cdot 10^6 \text{ ms}^{-1}$, takže interakce s molekulou velikosti $5 \cdot 10^{-10} \text{ m}$ trvá 10^{-16} až 10^{-15} s , tedy po dobu podstatně kratší než je čas odpovídající frekvenci nejrychlejších vibrací (10^{-14} – 10^{-13} s). Podle principu Francka a Conda se proto ionizace uskutečňuje vertikálním přechodem obecně do vibračně rotačních vzbuzených stavů; ionizace "adiabatická" (viz obr. 3) je méně pravděpodobná, není však zcela nedostupná.

Ionizované molekuly jsou tedy obecně excitovány nejen vibračně-rotačně, ale mohou vznikat i ve stavech vzbuzených elektronicky, $IE_{II}(M)$ a vyšší stavy ionizované molekuly, dokonce malá frakce molekul se ionizuje při jediné interakci s elektronem na ionty dvojně nabitě nebo i vícenásobně nabitě. Při některých ionizacích se vyskytují (dost vzácně) i přechody do nevazných elektronických stavů (viz horní křivka v obr. 3). Přitom však pravděpodobnost, že ionizovaná molekula získá při ionizaci 80 eV elektrony vnitřní energii (nad $IE(M)$) více než 5 eV, je poměrně malá, jak ilustruje obr. 4, znázorňující distribuci energie u molekulárního iontu propanu ionizovaného elektrony 80 eV. Proto se ovšem ve vnitřní energii ionizované molekuly může projevit i obsah vnitřní energie molekuly před ionizací, tedy teplota ionizace (srv. obr. 5 - distribuce obsahu energie u propanu při různých teplotách). Právě u složitých molekul se výrazně projevuje závislost hmotnostních spekter na teplotě ionizace: s rostoucí teplotou klesá zastoupení ionizovaných molekul a zvyšuje se zastoupení iontů fragmentových, zvláště produktů hlubokého rozkladu.



Obr. 3



Obr. 4

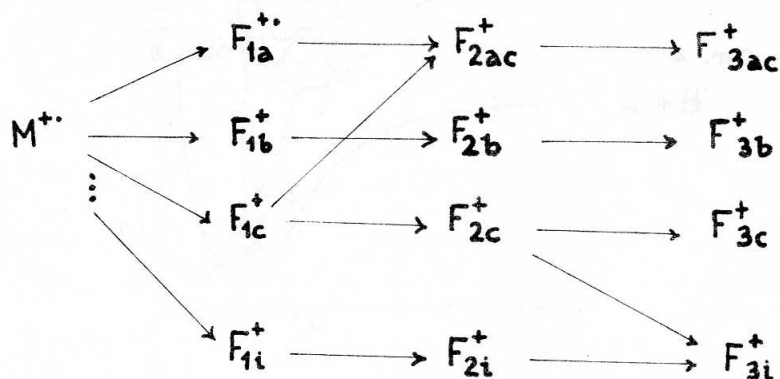
Obr. 5

Závislosti na teplotě ionizace a na energii ionizujících elektronů naznačily, že fragmentační ionizace probíhá převážně jako složité monomolekulární rozpady s kinetikou určenou obsahem vnitřní energie, tedy do určité míry jako analogie monomolekulární pyrolýzy.

Tuto představu podporovala četná pozorování tzv. "metastabilních iontů", tj. iontů, které vznikají rozpadem iontů až po opuštění iontového zdroje, tedy pomaleji než odpovídá vzniku normálních štěpných iontů.

Metastabilní přechody se obvykle projevují u rozkladů, které mají nízkou kritickou energii, ale jsou pomalé pro nároky na prostorové uspořádání (přesmyky, které mají vysokou aktivační entropii).

Z těchto pozorování vznikla představa, že při ionizační fragmentaci vznikají ionty z ionizovaných molekul soustavou paralelních a následných reakcí, znázorněných schématem



3.3 "Teorie kvasirovnováhy" - statistická teorie fragmentace

H.M. Rosenstock zavedl začátkem padesátých let soubor představ a zjednodušujících předpokladů, které umožňují vypočítávat zastoupení iontů v hmotnostních spektrech (s užitím dat o mechanismech a aktivačních energiích rozpadů); nejde tedy o teorii v pravém slova smyslu.

Předpokládá se především, že všechny rozpadové reakce, jimž podléhají molekulární ionty (viz schéma), jsou dostatečně pomalé ve srovnání s rychlostmi degradace elektronické energie na vnitřní vibračně-rotační energii, a jejím nahodilým rozdělením do všech vibračně-rotačních stupňů volnosti. Ionty vytvářejí izolovaný systém ve stavu vnitřní rovnováhy - tj. nejsou v te-

pelné rovnováze ani mezi sebou ani s okolím, avšak u každého iontového druhu jsou vzbuzené stavy E až $E + \Delta E$ rovnovážně zastoupeny.

Rychlostní konstanty jsou pro každou disociaci počítány - (s uvažováním uvedených předpokladů) - pomocí teorie absolutních reakčních rychlostí.

Podle výchozích zjednodušení se zanedbávají rozklady z izolovaných vzbuzených stavů molekulárních iontů i ze stavů repulsních, neuvažuje se možnost vyzařování excitační energie a předpokládá se, že v celém průběhu fragmentace je rychlost přenosů vibračně rotační energie dostatečně vysoká vůči rychlostem chemických rozpadů.

Výpočet zastoupení iontů vyžaduje další informace o fragmentaci, a to zejména: znalost mechanismů rozpadových reakcí (většně přesmyků), znalost vibračních frekvencí (obvykle se užívají frekvence pozorované u molekul blízké struktury), znalost aktivačních energií jednotlivých rozpadů (hodnoty odvozené z kritických potenciálů jsou zatíženy chybou z tzv. kinetického posunu $\Delta E(F^+)$), znalost vlastností přechodového stavu ("volný" nebo "vázaný"), znalost energií, které získávají ionizované molekuly v okamžiku ionizace, distribuci časů setrvání iontů ve zdroji atj.

V padesátých letech bylo matematické zpracování problémů příliš zjednodušováno, koncem šedesátých let se však řada pracovišť dopracovala výsledků, které dobře souhlasí s pozorovanými spektry a dobře vystihují zastoupení fragmentových iontů na skutečném obsahu vnitřní energie molekulárních iontů. Tyto závislosti, tzv. "rozpadové grafy" byly experimentálně sledovány dvěma technikami:

(i) přenosem náboje z atomárních iontů podle reakce



při němž lze volbou X^+ měnit vnitřní energii molekulárního iontu, neboť platí

$$EE(M^{+*}) = IE(X) - IE(M) ;$$

(ii) technikou fotoelektronové fotoionizační koincidence ("PEPICO"), která umožňuje určovat obsah vnitřní energie u jednotlivých ionizovaných molekul

$$EE(M^{+*}) = h\nu - IE(M) - \bar{E} \quad (e)$$

a sledovat zastoupení fragmentových iontů pro různé energie.

"Teorie kvasirovnováhy" má spíše gnozeologický než praktický význam. Nemůže být sporu o tom, že některé rozpady probíhají z izolovaných elektronických stavů nebo přímo ze stavů repulsních (rozklady, při nichž je kladný náboj na fragmentu s vyšším IE , tedy proti Stevensonovu pravidlu a ve shodě se Stevensonovým zjištěním, že takovýto iontům přásluší počáteční kinetická energie). Rovněž je nutno předpokládat, že u některých typů sloučenin může být rychlost disociace vyšší než rychlost přenosu (disipace) vibračně rotační energie.

4. Hlavní typy reakcí monomolekulárního rozpadu iontů organických sloučenin

Při ionizaci organické molekuly nárazem elektronu dochází k předání části energie vznikajícímu kation-radikálu. Je-li tato excitační energie vyšší než bariéra pro rozpad iontu nějakým fragmentačním kanálem, dochází k monomolekulární reakci, rozpadu mateřského iontu na ion dceřiný a neutrální fragment. Fragmentace energeticky vzbuzených iontů neprobíhá statisticky nahodile, ale závisí na výšce bariéry pro daný rozpad (tzv. kritické energie) (4.1) a počtu kvantových stavů uskutečnitelných v přechodovém stavu reakce. Kvalitativní, popř. semikvantitativní popis kinetiky monomolekulárních rozpadů iontů podává teorie "kvazirovnovážného" stavu (Quasiequilibrium theory, QET) (4.2). Rychlostní konstantu rozpadu souboru iontů o vnitřní energii E reakčním kanálem o kritické energii E_0 lze v rámci teorie vyjádřit vztahem (4.1),

$$k_E = \frac{W^\ddagger(E - E_0)}{h \rho(E)} \quad (4.1)$$

kde $W^\ddagger(E - E_0)$ je počet kvantových stavů v konfiguraci přechodového stavu pro interval energií mezi E_0 a E a $\rho(E)$ je hustota energetických stavů v konfiguraci výchozího iontu. Podle vztahu (1) lze fragmentační reakce rozdělit do dvou skupin (4.3). Přímá štěpení vazeb (typ A) se vyznačují vysokým počtem uskutečnitelných energetických stavů v přechodovém stavu a obvykle též vysokou kritickou energií. Přesmyky (typ B) mají obecně nižší kritické energie a méně husté spektrum energií v přechodovém stavu. Hmotnostní spektrum organické sloučeniny je výsledkem měření proudů jednotlivých iontových druhů po uplynutí několika mikrosekund až desítek mikrosekund od okamžiku ionizace. Kinetika rozpadových procesů, tj. uplatnění souběžných a následných reakcí typu A a B, má na tvar spektra zásadní význam.

4.1 Přímá štěpení vazeb (reakce typu A)

Rozpady kation-radikálů typu A dávají vzniknout iontům se sudým počtem elektronů a radikálům (2):



U polyatomických molekul vyvstávají dvě otázky:

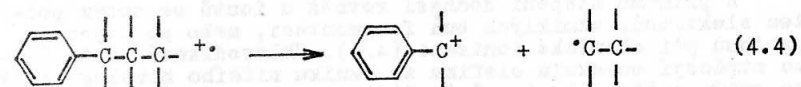
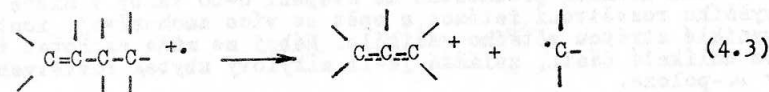
1) které vazby se budou přednostně štěpit, 2) který z fragmentů ponese kladný náboj. U reakcí typu A je rozhodujícím parametrem kritická energie rozpadu, kterou lze vypočítat ze slučovacích enthalpií produktů. Ty jsou však známy pouze pro omezený počet iontů a radikálů (4.4), a proto v praxi používáme spíše odhadnutých poměrných disociačních energií vazeb. Z vazeb existujících ve výchozím kation-radikálu se budou přednostně štěpit slabé vazby, jak lze odhadnout z několika empirických pravidel.

Fragmentace nasyceného uhlovodíkového řetězce nastává přednostně v místech rozvětvení. Např. v kation-radikálu 2-methylpentanu dochází přednostně ke štěpení vazeb C(2)-C(3), C(1)-C(2) a C(2)-CH₃, zatímco štěpení vazeb C(3)-C(4) a

C(4)-C(5) se uplatňuje velmi málo. Vzniklé dceřiné ionty se však mohou dále štěpit v závislosti na počtu vazeb a obsahu vnitřní energie. To vystihuje druhé empirické pravidlo: Přednostně se zachovávají (tj. jsou nalezeny ve spektru) ionty vzniklé ztrátou většího neutrálního fragmentu (4.5).

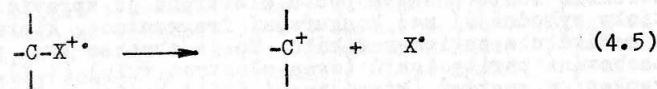
Rozdělení náboje mezi částice R a X se řídí pravidlem dle Stevensona a Audiera (4.5): Kladný náboj se přednostně zachovává na fragmentu o nižší ionizační energii.

U nenasycených sloučenin dochází často ke štěpení allylových a benzylových vazeb za vzniku stálých allylových či benzylových kationů (4.3) a (4.4):

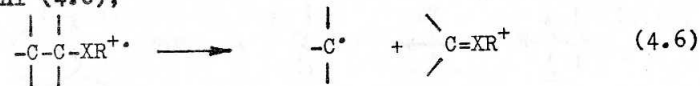


Benzylové ionty se mohou dále přesmyknout rozšířením kruhu na ionty tropyliové.

Přítomnost heteroatomu v molekule má často za následek oslabení některé z vazeb v kation-radikálu. U těžších heteroatomů (Br, I, S, Se apod.) se snadno štěpí vazba C-heteroatom (4.5):

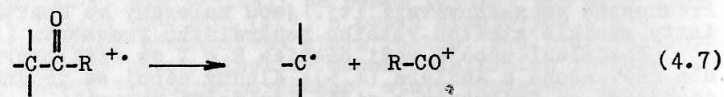


Pro alkoholy, ethery a aminy je charakteristické tzv. α -štěpení (4.6),



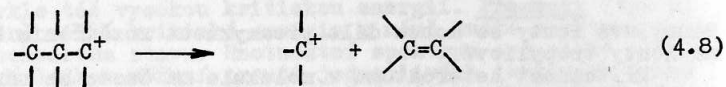
kteřé vede ke stálým "oniiovým" iontům. V případě nesymetrické substituce na uhlíkovém atomu nescoucím heteroatom se přednostně štěpí C-C vazba v místě většího rozvětvení a zachovává se přednostně ion vzniklý ztrátou většího neutrálního fragmentu. K α -štěpení dochází též u alkyhalidů a sulfidů, kde však konkurují rozpady typu (4.5).

Sloučeniny obsahující karbonylovou skupinu, zvláště aldehydy, ketony, kyseliny a estery, poskytují po ionizaci acylové fragmenty vznikající přímým štěpením (4.7):



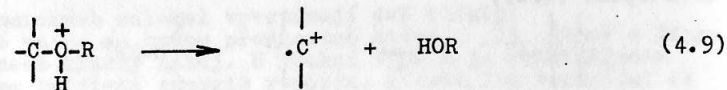
U aldehydů, zvláště aromatických, jsou typické ionty (M-H)⁺. U ketonů dochází přednostně ke štěpení C-CO vazby v místě vyššího rozvětvení řetězce a opět se více zachovávají ionty vzniklé ztrátou většího radikálu. Náboj se může zachovat též na uhlíkaté části, zvláště je-li alkylový zbytek rozvětven v α -poloze.

K přímému štěpení dochází rovněž u iontů se sudým počtem elektronů, vzniklých buď fragmentací, nebo připojením protonu při chemické ionizaci (4.6). Uhlovodíkové ionty často ztrácejí molekulu olefinu za vzniku nižšího homologu opět se sudým počtem elektronů (4.8):



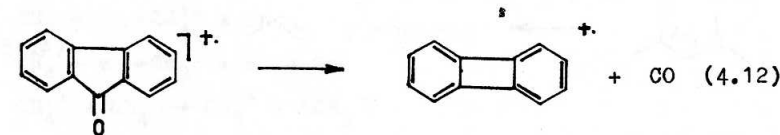
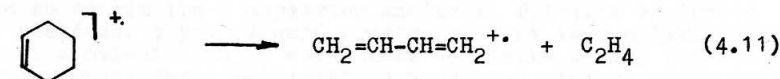
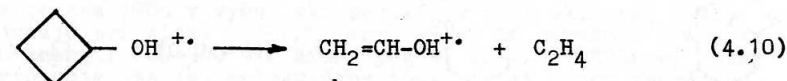
Vznik molekuly a iontu se sudým počtem elektronů z mateřského iontu o sudém počtu elektronů je zpravidla energeticky výhodnější než konkurenční fragmentace, která by vedla k radikálu a kation-radikálu. To je obsahem tzv. pravidla o zachování parity iontů (even-electron rule) (4.7). Pravidlo neplatí u systémů, které tvoří stálé kation-radikály, např. u některých aromátů.

Protonované molekuly alkoholů, etherů a esterů se rozpadají heterolýzou vazby C-O (4.9):



Rozsah reakce závisí na vlastnostech odstupující skupiny a na exothermicitě protonace.

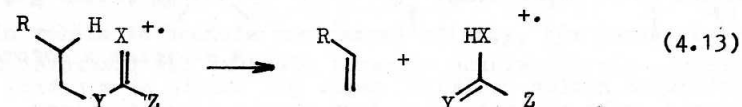
U kation-radikálů vzniklých z cyklických molekul dochází k přímému štěpení dvou vazeb za vzniku dceřiného kation-radikálu a molekuly. Reakce tohoto typu (4.10)-(4.12) lze formálně považovat za retrogrese cykloadicí (2 + 2) (4.10) a (4 + 2) (4.11) nebo cheletropních reakcí (4.12)



Podobně dochází k vyštěpování molekuly kyanovodíku z kation-radikálů aromatických azinů, i když tato reakce má často složitý mechanismus.

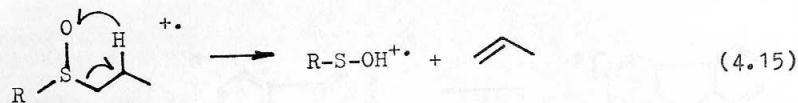
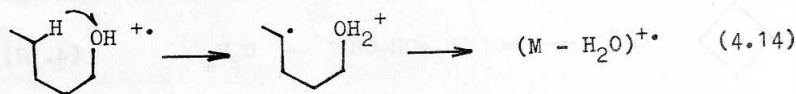
4.2 Přesmyky (reakce typu B)

Pro fragmentace probíhající s přesmykem jsou charakteristické cyklické přechodové stavy a vznik nových vazeb v dceřiných iontech. Přesmyky jsou v chemii iontů v plynné fázi velmi časté a někdy ve skryté formě předcházejí přímému štěpení vazeb. Jedním z nejvýznamnějších přesmyků je reakce typu McLafferty (4.13), která probíhá v kation-radikálech aldehydů, ketonů, esterů, oximů a terminálních alkenů a poskytuje molekuly alkenů a dceřiné kation-radikály:

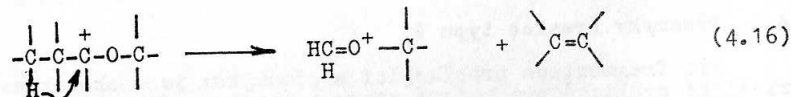


Podmínkou průběhu reakce je přítomnost alespoň jednoho vodíkového atomu v β -poloze vzhledem ke karbonylu nebo dvojně vazbě. Rozdělení náboje mezi fragmenty se řídí pravidlem dle Stevenzona-Audiera.

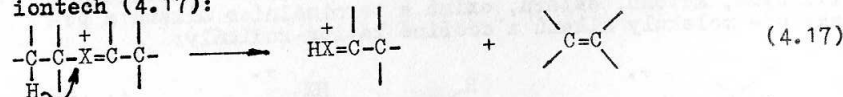
Mezi důležité přesmyky patří též eliminace malých molekul (voda, alkoholy, halogenovodíky, kyseliny, olefiny), jež probíhají přes pěti nebo šestičlenné přechodové stavy (4.14), (4.15):



Přesmyky jsou časté i u iontů se sudým počtem elektronů, které vznikají ztrátou radikálu z mateřských kation-radikálů. Oxoniové ionty ztrácejí molekuly alkenů s přenosem vodíku na vzniku nižších homologů (4.16):



Podobně může dojít k přenosu vodíku na heteroatom v oxiolových iontech (4.17):

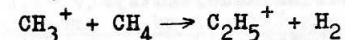
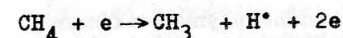
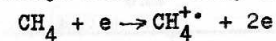


Speciální, ale strukturálně významné přesmyky lze pozorovat u aromatických kation-radikálů, např. při ztrátě NO z nitrosloučenin, nebo při interakci dvou skupin v ortho-poloze.

5. Metódy chemickej ionizácie a ionizácie elektrickým počom

5.1 Chemická ionizácia

Chemická ionizácia (CI) sa líši od elektrónovej ionizácie (EI) tým, že skúmaná látka je ionizovaná interakciou alebo kolíziou s ionmi reakčného plynu. Ako reakčné plyny môžu byť použité rôzne plyny, s výnimkou aprotických inertných plynov (v tom prípade hovoríme o ionizácii výmenou náboja - "charge exchange ionization"). Ióny reakčného plynu, ktorých parciálny tlak je cca 1000 x vyšší ako parciálny tlak skúmanej látky, sa produkujú pri tlaku 0,5-1,0 Torr (100 Pa) po nárazoch s elektrónmi o energii 200-500 eV. Nízky podiel molekúl skúmanej látky zapríčiniuje, že jej molekulárne ióny oproti iónom reakčného plynu sa tvoria iba v nepatrnom množstve. Primárne vzniknuté ióny reakčného plynu reagujú prostredníctvom ióno-molekulových reakcií s neionizovanými molekulami za vzniku plazmy stabilnejších iónov. Napr. najčastejšie používaný reakčný plyn, metán, produkuje reakčné ióny nasledujúcim spôsobom:



Ióny CH_5^+ a C_2H_5^+ , predstavujúce 90% z celkového prúdu iónov, slúžia ako atakujúce činidlo pri reakcii s molekulami skúmanej látky:

V CI zdroji iónov hmotnostného spektrometra teda prebiehajú principiálne postupne tri procesy:

1. EI reakčného plynu,
2. primárne reakcie iónov reakčného plynu s molekulami plynu
3. reakcie iónov reakčného plynu s molekulami skúmanej látky

Druh posledne menovaných reakcií závisí od druhu použitého plynu. V tab. 1 sú uvedené najbežnejšie plyny, používané pri CI. Reakčné plyny sú charakterizované hodnotou protónovej afinity PA . Protónová afinita látky M je definovaná ako záporná hodnota zmeny entalpie pri všeobecnej protonačnej reakcii:



Čím vyššia je hodnota protónovej afinity, tým pevnejšie viaže proton k molekule M.

Tab. 1

Reakčný plyn	Prevládajúce reakčné ióny	PA/[kcal.mol ⁻¹]
He/H ₂	HeH ⁺	42
H ₂	H ₃ ⁺	101
CH ₄	CH ₅ ⁺ , C ₂ H ₅ ⁺	127,159
H ₂ O	H ₃ O ⁺	164
CH ₃ CH ₂ CH ₃	C ₃ H ₇ ⁺	182
(CH ₃) ₃ CH	C ₄ H ₉ ⁺	195
NH ₃	NH ₄ ⁺ , (NH ₃) ₂ H ⁺ , (NH ₃) ₃ H ⁺	207
(CH ₃) ₂ NH ⁺	(CH ₃) ₂ NH ⁺ , (CH ₃) ₂ NH ₂ ⁺	222
(CH ₃) ₃ N	(CH ₃) ₂ NH ⁺	226

Hodnoty protónových afínit reakčného plynu a skúmanej látky majú značný vplyv na deje, prebiehajúce medzi skúmanou látkou a iónmi reakčného plynu. Vo všeobecnosti prebiehajú v CI zdroji tri druhy reakcií molekúl skúmanej látky.

5.1.1 Acido-bázické reakcie v plynnej fáze



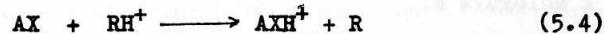
Protóny odovzdávajú ióny, pôsobiace ako Brønstedova kyselina, príjemcom je M vo funkcii Brønstedovej bázy.

Ak je reakčný ión dobrou Brønstedovou kyselinou alebo ak M je dobrou bázou, potom prenos protónu je hlavným dejom v CI.

Vytvorené MH⁺ "quasimolekulárne ióny" slúžia často k spoľahlivému určovaniu molekulárnej hmotnosti neznámej látky.

5.1.2 Fragmentácia "quasimolekulárnych" iónov

Charakteristickým rysom CI hmotnostných spektier je, že obsahujú menší počet fragmentov ako EI spektrá. Najbežnejším dejom je eliminácia funkčných skupín X spolu s vodíkovým atómom z protonizovaného molekulárneho iónu podľa všeobecnej schémy:



V praxi sa v prípade HX molekuly stretávajú s H₂O, alkoholmi, kyselinami, H₂S, alkylsulfidmi a pod.

Fragmentácia pri CI prebieha tým intenzívnejšie, čím je väčší rozdiel v hodnotách PA plynu a skúmanej látky.

Reakcie (5.1)-(5.3) a (5.4),(5.5) sú demonštrované v obr. 6 na CI spektrách 5- α -dihydrotestosteronu, ukazujúcich stúpajúci podiel fragmentácie so stúpajúcou AP hodnotou plynu ($PA_{H_2} < PA_{IB} < PA_M$).

5.1.3 Kondenzačné reakcie

U iónov plynov s vysokou hodnotou PA (NH₃, amíny) nedochádza k prenosu protónu. Dominujúcim procesom je adícia iónov plynu na voľné elektrónové páry heteroatому neutrálnej molekuly. Tvorí sa tak napr. u amoniaku rada polymérnych (NH₃)_xH iónov, spolu s "quasimolekulárnymi" [M + NH₄]⁺ iónmi. Ióny [M + NH₄]⁺, slúžiace k presnému stanoveniu molekulárnej hmotnosti M, môžu fragmentovať elimináciou neutrálnych molekúl: [MXH + NH₄]⁺ \longrightarrow [MNH₄]⁺ + HX.

Iný, málo početný dej pri NH₃ CI spektrometrii je adícia fragmentov z EI na molekulu amoniaku (amínu).

Pri CI vznikajú okrem pozitívnych i negatívne ióny. Hmotnostné spektrometre, ktoré analyzujú negatívne ióny, poskytujú negatívne CI hmotnostné spektrá. Sú veľmi informatívne najmä u zlúčenín s elektronegatívnymi skupinami. Na obr. 7 sú uvedené pre porovnanie konvenčné EI, CI (metán) pozitívne a CI (metán) negatívne hmotnostné spektrá 2,4-dichlor-nitrobenzénu.

Podmienkou získania dobrého CI spektra je podobne ako u EI prchavosť a termická stabilita vzoriek. Čiastočné rozšírenie použiteľnosti metódy poskytuje metóda desorpčnej (priamej) chemickej ionizácie (DCI). Pri nej je vzorka skúmanej látky nanosená na odporový drôtik, umiestnený priamo do plazmy iónov.

5.2 Ionizácia (FI) a desorpcia (FD) elektrickým polom

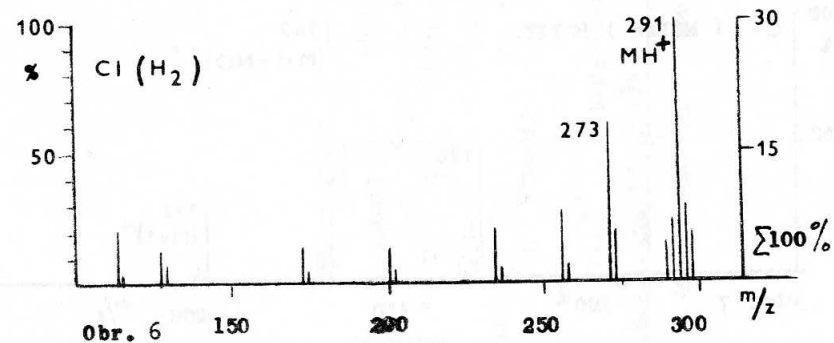
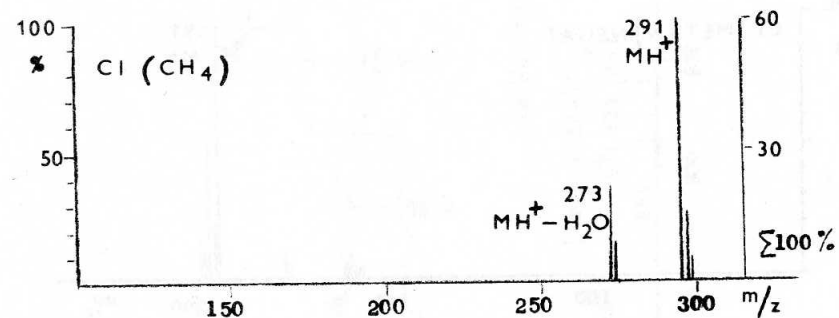
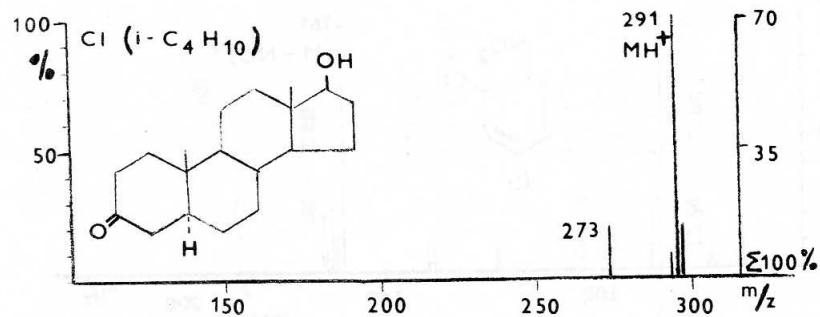
Ionizačné médium v tomto prípade je silne elektrické pole, rádovo 10⁻⁷-10⁻⁸ v cm⁻¹, umiestnené medzi ostrými hrotmi (drôtičky, hrany) elektrod. Odstránenie elektrónu z molekuly prebieha tunelovým efektom s menším prenosom vnútornej energie na molekulárny, alebo jemu podobný ión, ako v prípade EI. Hovoríme o makkých ("soft") ionizačných procesoch.

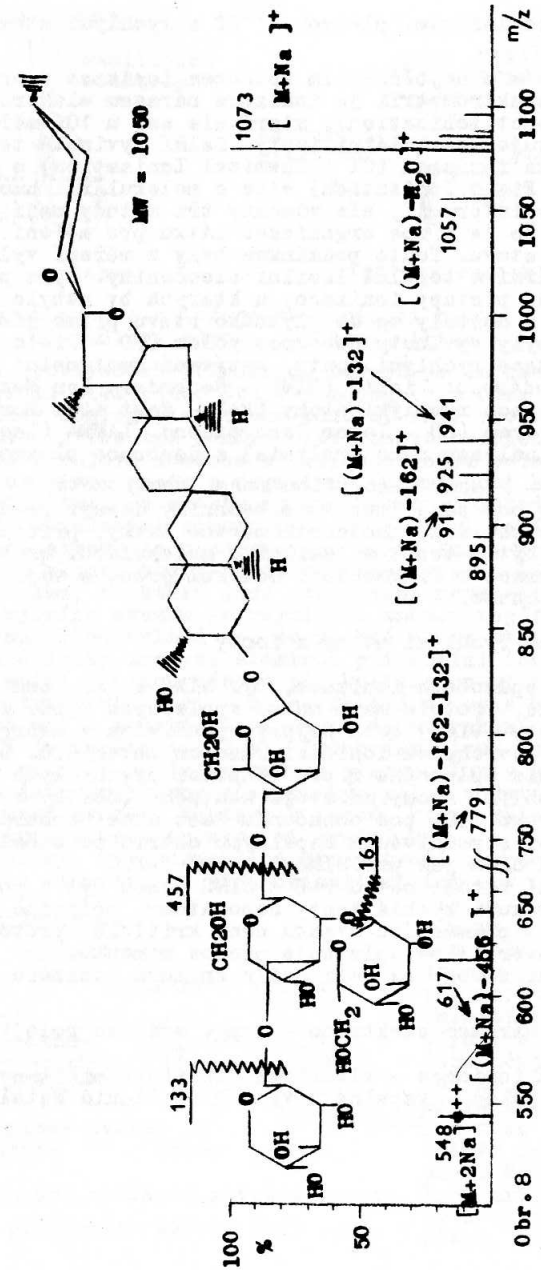
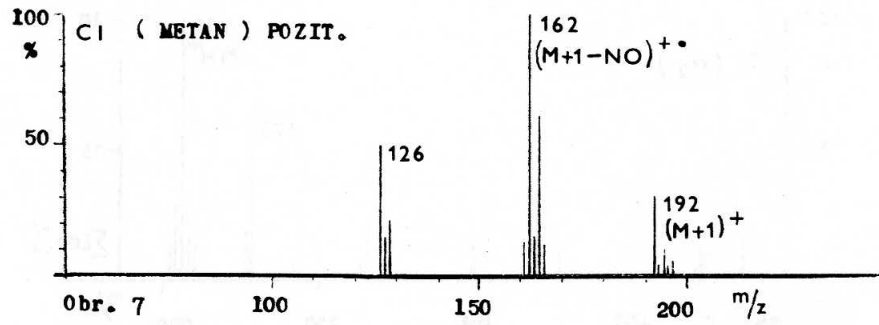
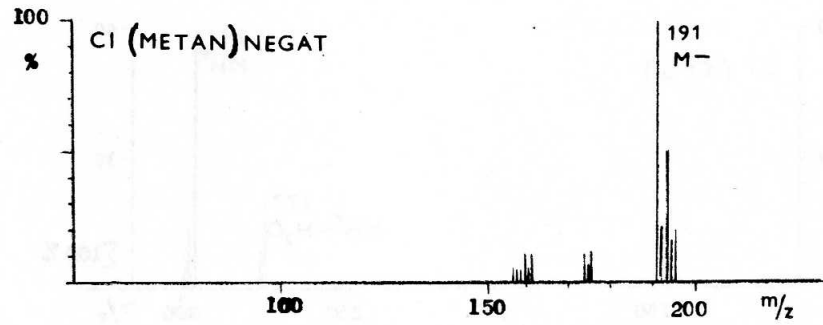
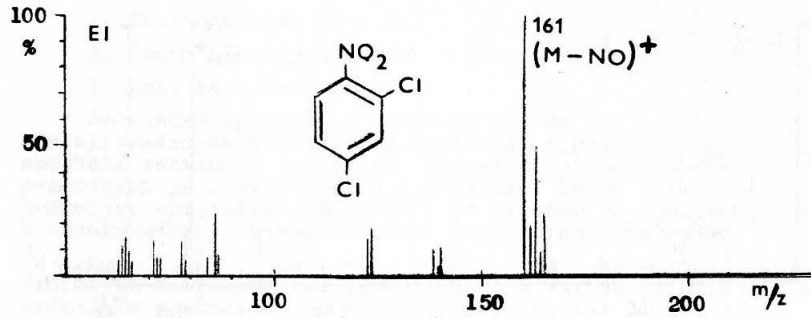
V prípade FI ionizácia prebieha v plynnej fáze, u FD vo fáze pevnej. Skúmaná látka je desorbovaná z povrchu jednej z elektrod v ionizovanej forme. FD MS sa zaraďuje k metódam analýzy neprchavých a termicky labilných materiálov, ako sú oligosacharidy, O-, C- a N-glykozidy, glykolipidy, saponiny, peptidy, glykopeptidy a i.

Často používanou modifikáciou FD metódy je použitie prímesi alkalických solí k vzorke skúmanej látky. Získané hmotnostné spektrá charakterizujú deje v zdroji iónov:

1. Kationizácia: $[M + Na]^+$, $[M + K]^+$
2. Vznik násobných iónov: $[M + 2Na]^{+2}$, $[M + 3Na]^{+3}$
3. Zriedková fragmentácia

Jedinečné uplatnenie našla FD metóda pri určovaní štruktúr oligomérnych a nižších polymérnych zlúčenín, včetně príspevku k sekvencii jednotiek. Charakteristické štiepenie medzi jednotkami je korelovateľné s kinetikou kyslo katalyzovanej hydrolyzy oligomérov. Na obr. 8 je uvedené FD spektrum využité k štruktúrálnej charakterizácii P-gitoninu. Hmotnosti iónov $[M + Na - 132]^+$, $[M + Na - 162]^+$, $[M + Na - 456]^+$ a pod., vzniklých fragmentáciou glykozidických väzieb prispievajú k určovaniu hmotností štruktúrálnych jednotiek zlúčeniny.





6. Ionizace laserem, plazmou ^{252}Cf a rychlými atomy a ionty

Základním a nejběžnějším způsobem ionizace v organické hmotnostní spektrometrii je ionizace nárazem elektronu (EI - Electron Impact Ionization), která ale asi u 10% měřených látek neposkytuje molekulární ionty. Další vyvinuté techniky jako chemická ionizace (CI - Chemical Ionization) a ionizace polem (FI - Field Ionization) sice o molekulární hmotnosti měřené látky informují, ale všechny tři metody mají společný nedostatek, že je třeba organickou látku pro měření převést do plynného stavu. Touto podmínkou byly z měření vyloučeny vysokomolekulární a tepelně labilní sloučeniny. Byla proto snaha vypracovat postupy ionizace, u kterých by nebylo nutno látky zahřívat a dostaly se do plynného stavu přímo již ve formě iontů. Tak byly vyvinuty desorpce polem (FD - Field Desorption), ionizace rychlými ionty, nazývaná hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů (SIMS - Secondary Ion Mass Spectrometry), ionizace rychlými atomy (FAB - Fast Atom Bombardment), desorpce laserem (LD - Laser Desorption), LAMMA (Laser Microprobe Mass Analyser nebo Analysis) a desorpce plazmou ^{252}Cf (^{252}Cf -PDMS - Plasma Desorption Mass Spectrometry).

Všechny poslední jmenované techniky dávají především informaci o molekulární hmotnosti měřené látky, přičemž tyto látky mohou být i tepelně labilní s molekulární hmotností až 25000. Informace o fragmentaci molekul jsou, s výjimkou FAB a SIMS, velmi chudé.

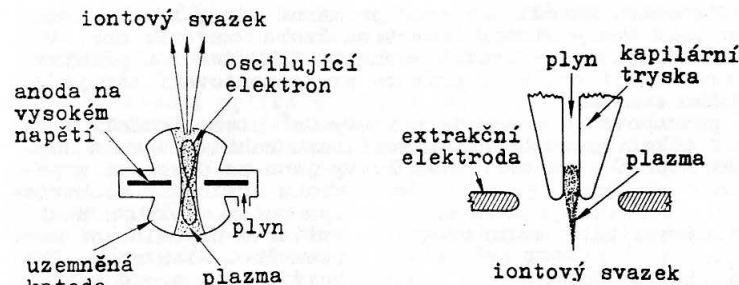
6.1 Ionizace rychlými atomy a ionty

U obou způsobech ionizace, tj. SIMS a FAB, bude pojednááno současně, protože mají mnoho společných rysů. Ionizace rychlými ionty (SIMS) byla nejprve používána v anorganické analýze pro povrchovou ionizaci různých materiálů. Od poloviny 70 let byla uplatněna i pro ionizaci organických molekul. Ionizace rychlými atomy má svoje skutečné počátky v polovině 60 let, od roku 1981 pod označením Fast Atom Bombardment (FAB). V souvislosti s používáním kapalných matic se začal používat název Liquid SIMS jak pro SIMS tak pro FAB.

Primární zdroje metod FAB a SIMS mohou být v podstatě stejné. Produkují rychlé ionty nebo atomy, případně jejich směs; složení primárního svazku není kritické, protože při ionizační desorpci se uplatňuje přenos momentu.

Primární zdroje se dělí podle způsobu ionizace primárních částic:

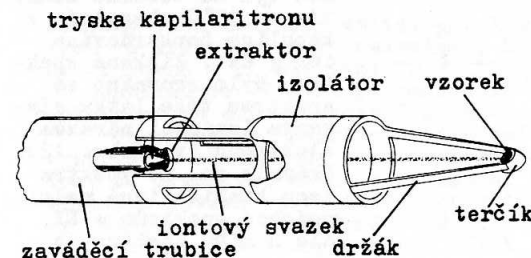
1. ionizace nárazem elektronu - typy: sedlové pole, kapilaritron
2. povrchová ionizace - alkalické hlinitokřemičitany
3. ionizace polem - kapalně kovy (LMI - Liquid Metal Ionization)



Obr.9. Primární zdroje založené na ionizaci nárazem elektronu: a) sedlový zdroj, b) kapilaritron

Asi 90% používaných primárních zdrojů je založeno na ionizaci nárazem elektronu. Sedlový zdroj (viz obr. 9 a) je elektrostatický analog plazmového zdroje. Může produkovat jak neutrální částice tak ionty. Elektronové oscilace jsou indukovány ve zdrojové komůrce elektrostatickým polem vloženým mezi pozitivní anodu a negativní (uzemněnou) katodu. Oscilace vzniká tak, že elektrony urychlené od katody k anodě procházejí středovými otvory pole a po přiblížení se ke katodě z druhé strany jsou odpuzovány zpět. Ionty jsou generovány z atomů plynu, který je do komůrky zaváděn (Xe, Ar). Tím vzniká plazma, ve které jsou generovány nové elektrony. Proud vystupujícího svazku je regulován změnou napětí nebo průtokem plynu. Předpokládá se, že rychlé atomy vznikají tím, že rychlé ionty zachytí elektron při kolizi ion-elektron a nebo spíše výměnou náboje při kolizi ion-atom.

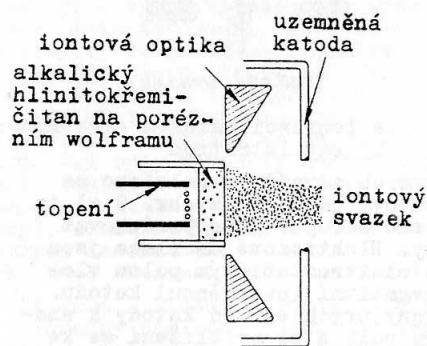
Kapilaritron (viz obr. 9 b) se skládá z jemné kapilární trysky (25 μm) a soustředné (uzemněné) extrakční elektrody mezi nimiž je napětí asi 2 kV. Průchodem plynu nebo páry kapilárou se vytvoří na jejím vstupu plazma. Ionty generované plazmou jsou urychleny elektrickým polem v ústí trysky, takže tvoří úzký svazek. Některé z iontů, které koludují s plynem u výstupu z ústí trysky, si vymění náboj a stávají se rychlými atomy. Tyto urychlené atomy tvoří asi polovinu toku. Průměr a tvar trysky jsou důležitými faktory ovlivňujícími stabilitu plazmy a svazku ion/atom. Proud svazku je regulován napětím a rychlostí průtoku plynu. Z plynů se doporučuje používat Xe, protože má velkou molekulu, lze však použít též Ar nebo jiný plyn. Malé rozměry kapilaritronu vedly k vytvoření systému, kterým se



Obr.10. Systém pro současné zavádění vzorku i primárního zdroje (DIP Gun).

do spektrometru zavádí současně primární zdroj i vzorek na terčíku (DIP Gun - Direct Insertion Probe Gun) (viz obr. 10). Tento systém umožňuje použít techniku SIMS/FAB i u přístrojů, které nemají zvláštní přírubu pro zamontování zdroje primárního svazku.

U povrchové ionizace jsou ionty Cs^+ termoionicky emitovány z alkalického hlinitokřemičitanu zahříváného na teplotu asi 1000°C (viz obr. 11). Ionty jsou po desorpci z povrchu urychleny elektrickým polem vloženým mezi

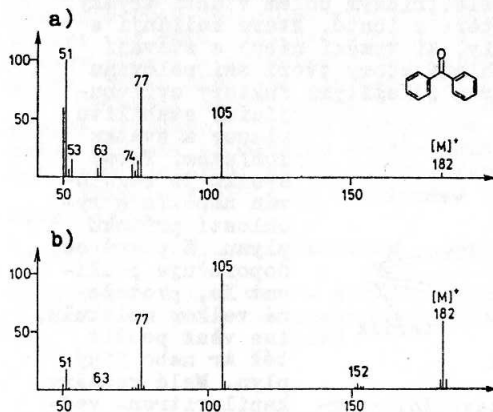


Obr.11. Primární zdroj Cs^+ iontů povrchovou ionizací.

emitor a urychlovací nebo uzemněnou elektrodu. Celkový emisní proud závisí na teplotě. V primárním svazku nejsou přítomny žádné pomalé ani rychlé atomy. Rozložení energie svazku je velmi úzké (v podstatě monoenergetický svazek) a toto nízké rozptýlení energie dovoluje velmi přesnou fokusaci, která není možná u žádného jiného zdroje primárních iontů. Při použití Cs^+ zdroje není třeba odčerpávat přebytek plynnů jako u primárních zdrojů s ionizací nárazem

elektronu a vzniklá spektra jsou jasnější, s nižším šumem, než produkují zdroje jiného typu.

Obě techniky, tj. SIMS i FAB jsou často označovány jako metody s měkkou ionizací (soft ionization methods). V nedávné době se díky sekundární ionizaci kapalin (LSI) prokázalo, že toto označení není oprávněné. K experimentu byly vybrány sloučeniny, které nemají žádné kyselé protony (např. benzofenon) jež by umožňovaly samoionizaci protonací. Benzofenon byl na terčíku zahřát na 45°C zkapalněn a kapalina bombardována ionty Cs^+ . Získané spektrum bylo srovnáno se spektrem téže látky získaným ionizací nárazem elektronu (viz obr. 12). Ukázalo se, že spektra jsou kvalitativně velmi podobná spektrům s EI, ale u SIMS spekter je



Obr.12. Hmotnostní spektra benzofenonu:

- a) ionizace kapalného benzofenonu ionty Cs^+ (LSI)
b) ionizace nárazem elektronu

podstatně nižší intenzita píku molekulárních iontů (viz obr. 12). K rozpadu těchto molekulárních iontů došlo vlivem přebytku energie získané při ionizaci primárními ionty Cs^+ .

Počáteční aplikace SIMS a FAB v oblasti organické chemie se týkaly pevných látek; pracovalo se tím způsobem, že sloučeniny byly v roztoku nanášeny na kovový terčík (Ag), který byl po odpaření rozpouštědla bombardován rychlými atomy nebo ionty. Tento způsob má nevýhody v tom, že v místě dopadu primárního svazku se látka brzo spotřebuje a kromě toho se citlivější látky po dopadu primárního svazku ohřívají a částečně rozkládají ještě před ionizací. Řešení problému bylo nalezeno v rozptýlení nebo rozpuštění měřené látky v tzv. matici, kde se nejenom obnovuje měřený povrch, ale jak se také později ukázalo, dochází tam k řadě reakcí, které příznivě ovlivňují citlivost a reprodukovatelnost měření.

Matrice se používají pevné nebo kapalné. Mezi nejběžnější pevné patří NH_4Cl a uhlík a jako kapalné se používají kapalné kovy (Ga, In) nebo kapalné organické látky (nejpoužívanějšími jsou glycerin a monothioglycerin). Uhlík se velmi osvědčil pro těkavé sloučeniny, jako např. toluen, xylen, které jsou jím adsorbovány. Předpokládá se, že uhlík vytvoří vlastně trojrozměrnou matici a látky mohou být z něho emitovány delší dobu.

Jiný způsob měření těkavých látek byl umožněn jejich zmrazením na teplotu 77°K . Touto technikou byla např. získána SIMS spektra kys. mravenčí, benzenu, cyklohexanu aj.

Chlorid amonný není chemicky inertní a může protonovat molekuly a tak zvýšit výtěžek iontů. Zpočátku se předpokládalo, že matrice jenom obnovuje povrch. Nyní je ale znám již vliv solvatace a další jevy se intenzivně studují. Např. současná teorie vysvětluje vliv NH_4Cl předpokládá, že NH_4Cl nejprve solvatuje stálý kation a potom v desolvatačním procesu se NH_4Cl rozkládá na NH_3 a HCl , k čemuž odebere část vnitřní energie kationtu. Výsledkem této ztráty vnitřní energie je snížení fragmentace a tím i zvýšení intenzity píku příslušných iontů. Alternativní vysvětlení vlivu pevného NH_4Cl spočívá v tom, že rozprášené (sputtered)

kationy jsou uvolněny kolizí při interakci s maticí v povrchové vrstvě plazmy (selvedge), která se utvoří na rozhraní pevné a plynné fáze, a celý proces se jen málo liší od desolvatace. V obou případech se disociace v plynné fázi uskuteční po emisi intaktní molekuly.

Jako kapalná matrice, vytvořená roztaveným kovem, byla vyzkoušena slitina Ga a In. Výhoda této matrice spočívá v tom, že organické látky v ní nemusí být rozpuštěny a vlivem hladkého povrchu jsou ideálně rozptýleny po povrchu taveniny. Nevýhoda je v poměrně nižší citlivosti ve srovnání s kapalnými maticemi organických látek.

Zcela převládají matrice z organických kapalin. Běžně se používají glycerin, monoethioglycerin, diethanolamin, triethanolamin, dithioerythriol, polyethylenglykoly aj. Byla také stanovena obecná kritéria, která má matrice splňovat: 1. vzorek musí být v matrici rozpustný (podle autorových zkušeností to není nutné), 2. používají se kapaliny s nízkou tenzí, které se ve vakuu rychle neodpaří (těkavost lze ale snížit použitím chlazeného terčíku). 3. viskozita matrice musí být dostatečně malá, aby zajistila difuzi vzorku k povrchu, 4. ionty z matrice nesmějí být na stejné hodnotě m/z jako ionty vzorku, 5. matrice musí být chemicky inertní (nicméně se používají specifická činidla ke zvýšení intenzity sekundárního spektra).

Primárním tokem se ionizuje jenom malá část vzorku a jeho hlavní funkce spočívá v tom, že uvolní ionty, které v matrici již existují. Ke zvýšení tvorby iontů před bombardováním jsou do matric přidávány minerální i organické kyseliny jako např. HCl, HClO₄ a kyselina šťavelová, z nichž nejúčinnější je pravděpodobně HClO₄.

Na reakční mechanismy, probíhající při ionizaci rychlými částicemi jsou protichůdné názory. Uvádí se, že k reakcím dochází na povrchu matrice, několik nm pod povrchem, uvnitř kapalně fáze, v povrchové plazmě mezi kapalnou fází a plynnou fází nebo dokonce jenom v plynné fázi. Někteří autoři předpokládají, že ionty $[M+H]^+$ vznikají v matrici, zatímco ionty M^+ v plynné fázi.

Podle typu vznikajících iontů se předpokládá, že existují nejméně tři typy ionizačních procesů, které ke tvorbě iontů přispívají:

1. První proces je kationizace/anionizace, při kterém se k neutrální molekule připojí ionty kovů, protony nebo jiné nabitě částice pocházející z matrice nebo z nečistot v matrici. Předpokládá se, že neutrální molekuly i nabitě částice jsou desorbovány z matrice a k reakci dochází v plazmě na rozhraní mezi kapalnou a plynnou fází, přičemž vznikají ionty $[M+H]^+$, $[M+C]^+$ a $[M+A]^-$.

2. Elektronový přítomné v plazmě, jako výsledek sekundární elektronové emise, mohou ionizovat neutrální molekuly. Proces se nazývá elektronová ionizace a vznikají při něm kation- a anionradikály molekulárních iontů M^+ a M^- . Předpokládaný mechanismus je přenos náboje mezi desorbovanými ionty a neutrálními molekulami nebo spojení nízkenergetického sekundárního elektronu s neutrální molekulou. Fragmentace iontů M^+ a M^- probíhají obvykle stejně jako u plynných iontů s nepárovým elektronem. Tento způsob ionizace je málo účinný a vznikají jím větší množství iontů zejména u polycyklických aromatických uhlovodíků.

3. Třetí proces ionizace zahrnuje přímou emisi celých nabitých částic z pevného stavu ve formě iontů $[M-anion]^+$

nebo $[M-kation]^-$. SIMS studie solí organických kyselin dokumentují velmi intenzivní kationové nebo anionové ionty s málo intenzivní fragmentací. Intenzita sekundárních iontů organických kyselin je zpravidla o dva řády větší než v případě kationizace.

Relativní ionizační účinnost, tj. počet vzniklých sekundárních iontů, klesá v pořadí přímá ionizace, kationizace/anionizace, elektronová disociace.

Velká účinnost přímé emise pro soli organických látek (zejména pro kvarterní soli) vedla k vypracování tzv. derivatizační SIMS, při které se kvarterní soli vytvářejí přímo na terčíku. Zvyšuje se tím citlivost (nanogramy a subnanogramy) a snižuje vliv nečistot, protože se desorbují jen kvarterní soli. Technika byla použita pro stanovení léčiv v moči (kodein, amfetamin po reakci s CH₃J) a detegování aldehydů a ketonů (progesteron, testosteron, kortizon a pod. po reakci s Girardovým činidlem P).

Srovnání metod FAB a SIMS je velmi obtížné, protože poskytují téměř stejné výsledky. Jako důvod zavedení metody FAB uvedli její autoři tyto nevýhody SIMS: 1. ionty mají velký rozdíl energií, čímž je omezeno dosažení vyššího rozlišení s jednoduchými přístroji, 2. použití iontů jako primárních částic může vytvářet povrchový náboj a je problém s fokusací a řízením iontového svazku. Oba tyto důvody jsou v současné době již překonány, protože Cs⁺ zdroj dává monoenergetický svazek primárních iontů a tyto ionty lze urychlit napětím 30 až 40 kV, což je hodnota podstatně vyšší než je urychlovací napětí sekundárních iontů (do 10 kV).

Starší práce uvádějí, že FAB je citlivější, zatímco informace z poslední doby považují SIMS za 3x citlivější. K dosažení optimální citlivosti se dokonce komerčně vyrábí iontový zdroj, kde lze současně používat FAB a SIMS. Obecně je jeho výtěžnost 10⁻² až 10⁻¹ C/mol.

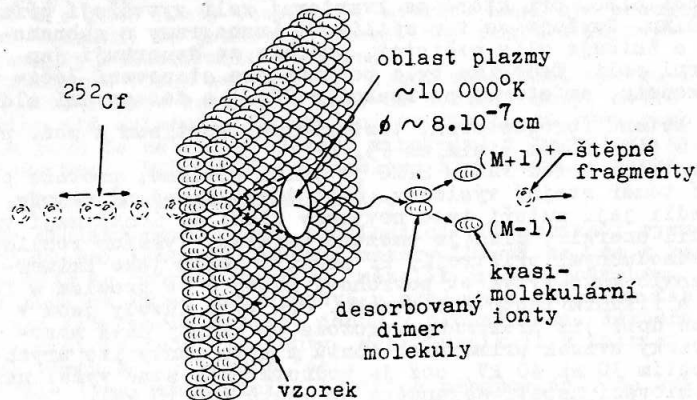
Obě techniky se používají pro měření tepelně labilních, málo těkavých a vysokomolekulárních látek, jako jsou např. cukry, oligonukleotidy, glykopeptidy, glykolipidy, nukleosidy, vitaminy aj. Sloučeniny není třeba před měřením derivatizovat jako je tomu např. pro měření s ionizací nárazem elektronu, kde se běžně provádí methylace, silylace apod.

SIMS byla aplikována zejména pro kvalitativní i kvantitativní analýzu, detekci materiálů z papírové a tenkovrstvé chromatografie, iontovou chemii, studium katalytických systémů a komplexů s kovy, povrchovou analýzu (polymery) a sekvenční analýzu biomolekul. FAB se nejvíce používá pro analýzu biomolekul, zejména peptidů, kde lze určit i celou sekvenční aminokyselin.

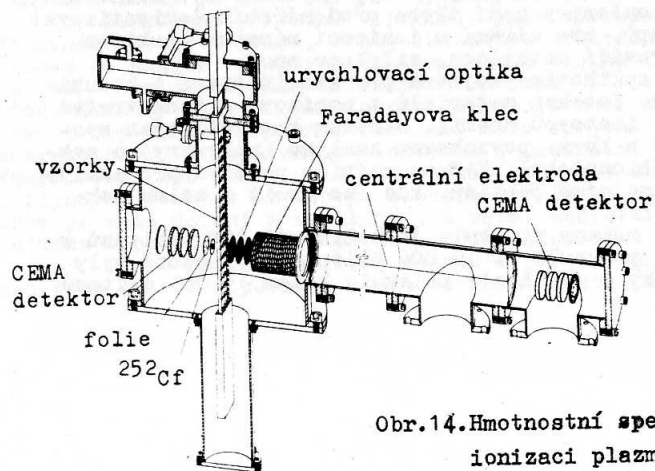
Běžně byly měřeny molekuly do velikosti 3000 daltonů a tato hranice se posunula do 10 000 daltonů. Výjimečně byly analyzovány látky s velikostí molekuly kolem 15 000 daltonů.

6.2 Desorpce plazmou ^{252}Cf

Název této techniky (^{252}Cf -PD - Plasma Desorption) souvisí se skutečností, že štěpné fragmenty spontánního štěpení radioaktivního prvku vytvoří nejprve mikroplazmu, přičemž se energie přenáší do pevné fáze. Získaná energie je potom přenesena do okolního média a výsledkem tohoto přenosu je desorpce molekulárních iontů (viz obr. 13).

Obr.13. Princip desorpce plazmou ^{252}Cf .

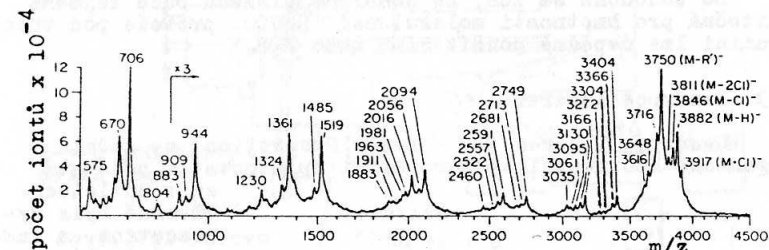
Z možných elementů bylo vybráno ^{252}Cf , protože má vhodný poločas rozpadu (2,65 roku), přiměřené samovolné štěpení (3%), přijatelnou cenu a jednu dávku lze používat asi 5 let. Při samovolném štěpení vzniká 97% alfa částic a 3% tvoří pár

Obr.14. Hmotnostní spektrometr pro ionizaci plazmou ^{252}Cf .

nabitých částic, které mají různou hmotnost i energii. Těchto párů vzniká více než čtyřicet, ale typickými jsou $^{106}\text{Tc}+^{22}\text{a}$ a $^{142}\text{Ba}+^{18}$, jejichž energie je 104 a 79 MeV.

Při přípravě měření se vzorek převede na terčík z tenké Al folie (obvykle je jich celá série) a vystaví se účinkům štěpných částic (viz obr. 14). Je důležité, aby folie byla tenká, aby propouštěla částice. Nanášení vzorku se provádí nejlépe elektrosprejem. Je třeba mít na zřeteli, že kvalita vzorku podstatně ovlivňuje kvalitu spektra. Nečistoty nebo nepřítomnost mikrokryсталů ve vrstvě potlačují desorpci molekul z povrchu. Ve spektru se objevují ionty typů $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{Cs}]^+$, M^{+} , $[\text{M}+\text{H}]^+$, M^- , $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ a sada fragmentových iontů.

K rozlišení iontů se používá průletový analyzátor. Získaná spektra mají na první pohled menší rozlišení (viz obr. 15), protože nejsou tvořena monoizotopickými a izotopickými píky, ale centroidy, tj. obalovými píky skupiny monoizotopického a jeho izotopických píků. Za základ výpočtu se používá hmotnost uhlíku 12,011.

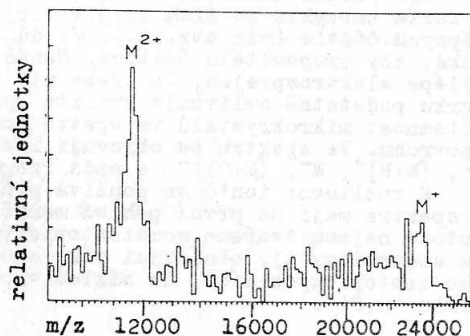
Obr.15. ^{252}Cf -PD negativní spektrum hexameru plně chráněného oligonukleotidu.

Použití desorpce plazmou je především v oblasti labilních a vysokomolekulárních sloučenin, a to zejména těch, které nelze změřit desorpcí polem (FD - Field Desorption). V posledních dvou letech byly identifikovány dvě třídy sloučenin, které právě desorpcí polem nelze měřit:

1. Vysoce reaktivní a nestabilní molekuly, které se rozkládají dokonce při nízké teplotě anody, např. estery kyseliny arachidonové.
2. Sloučeniny s extrémně silnou chemisorpcí k anodě a mající několik ionizačních center, jako např. trinukleotidy a přírodní nukleotidy vyššího řádu, u kterých je silná iontová vazba mezi molekulami.

Zatím největší změřená molekula (zřejmě ve hmotnostní spektrometrii vůbec) je prasečí trypsin s hmotností 23 463 (viz obr. 16).

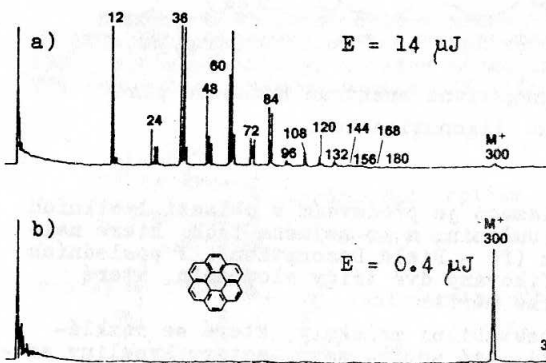
Obr. 16. ^{252}Cf -PD pozitivní spektrum veprvého trypsinu M^+ 23 406 ± 140 (vypočteno 23 463).



Do budoucna se zdá, že desorpce plazmou bude zejména užitečná pro hmotnosti molekul nad 10 000, protože pod tuto hranici lze úspěšně použít SIMS nebo FAB.

6.3 Desorpce laserem

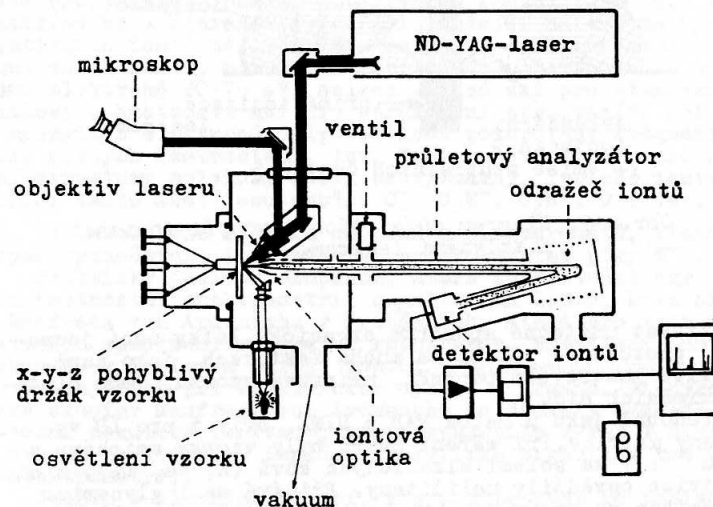
Desorpce laserem (LD - Laser Desorption) se začala v organické hmotnostní spektrometrii uplatňovat až v 80 letech. Původně byla vypracována, a také se především používá, pro stanovení kovových prvků v různém materiálu, včetně biologického. Vypracování techniky pro potřeby organické hmotnostní spektrometrie nebylo snadné, protože je nutno citlivě regulovat energii laserového paprsku, aby byly výsledky reprodukovatelné (obr. 17) a nedocházelo k nežádoucí pyrolýze materiálu, i když



Obr. 17. Hmotnostní spektrum koronenu vzbuze-
né laserem při a) vysoké a b) nízké energii.

se ke sledování pyrolýzy tato metoda používá.

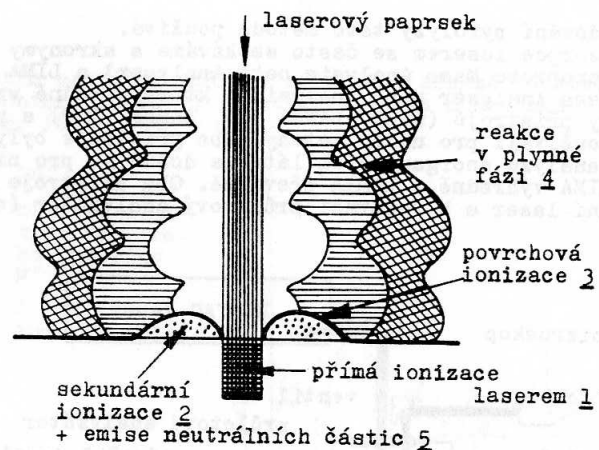
U desorpce laserem se často setkáváme s akronymy LAMMA (Laser Microprobe Mass Analysis nebo Analyser) a LIMA (Laser Induced Mass Analyser nebo Analysis), které původně vznikly jako názvy přístrojů (např. LAMMA 500, LAMMA 1000) a přeneseně se používají pro název metody. Oba přístroje byly vyvinuty pro analýzu anorganických látek a dosud se pro ni používají. LIMA výhradně a LAMMA převážně. Oba přístroje používají pulsní laser a k separaci průletový analyzátor (obr. 18).



Obr. 18. Schema přístroje LAMMA 1000.

Mechanismus zplynění lze demonstrovat na působení pulsního laseru (obr. 19), přičemž je možno rozlišit nejméně pět procesů:

1. přímá ionizace pevné fáze laserem,
2. desorpce a ionizace pevné fáze v oblasti přilehlé k laserovému pulsu,
3. povrchová ionizace,
4. reakce v plynné fázi (iontově-molekulární reakce),
5. emise neutrálních částic versus tvorba iontů.



Obr. 19. Diagram důležitých jevů při ionizaci a zplynění laserem.

Získat užitečné spektrum organické látky není jednoduché, protože to záleží na mnoha faktorech, jako např. intenzitě laserového paprsku, přípravě vzorku, jeho čistotě, příměsích atd.

Podobně jako u metod FAB a SIMS, byly i pro LD vyzkoušeny matrice. Při měření cukrů byly vzorky smíchány v poměru 1 : 1 se solemi alkalických kovů (K, Na, Li), z nichž se nejvíce osvědčily uhličitany. Přidává se i glycerin.

Metoda se zatím používá pro kvalitativní analýzu a nelze dělat ani semikvantitativní stanovení, protože výsledky lze obtížně reprodukovat. Nicméně je to užitečná technika pro jinak těžko analyzovatelné molekuly v biologických materiálech. Obecně se používá pro labilní polární sloučeniny.

7. Hmotnostní spektrometrie negativních iontů

Na rozdíl od hmotnostní spektrometrie pozitivních iontů a studií mechanismů reakcí pozitivních iontů v plynné fázi je hmotnostní spektrometrie negativních iontů mnohem méně prostudována. I když se při počátečním rozvoji organické hmotnostní spektrometrie v padesátých letech předpokládala stejný rozvoj v oblasti negativních iontů a první komerční přístroje byly pro snímání spekter negativních iontů elektronicky přizpůsobeny, převládaly v šedesátých letech skeptické názory na význam negativních iontů a přístroje byly dále konstruovány pouze pro snímání spekter pozitivních iontů. V r. 1965 Aplin, Budzikiewicz a Djerassi vyjádřili tehdejší názory na význam negativních iontů následovně: "Jeví se, že hmotnostní spektra negativních iontů, měřená na komerčních přístrojích s energiemi elektronů 20-70 eV, nejsou vhodná ani pro stanovení molekulových hmotností ani pro strukturální stanovení". Při těchto energiích elektronů byly většinou pozorovány fragmenty o velmi nízkých hmotnostech, tzv. "molekulový šrot", pro stanovení struktury molekuly zcela bezvýznamný. Typické ionty, tvořící tento šrot jsou např.: C_2^- , C_2H^- , C_4H^- , O^- , CN^- , NO_2^-

atd. Výjimkou byla spektra chinonů a nitroaromátů, která se naopak vyznačovala intenzivními molekulárními píky M^- .

Prakticky jedinou skupinou, která se systematicky věnovala hmotnostní spektrometrii negativních iontů, byla skupina Manfreda von Ardenneho v Drážďanech, která pro tyto účely postavila spektrometr vlastní konstrukce. Negativní ionty byly získávány v iontovém zdroji pomocí nízkenergetických elektronů vznikajících při elektrickém výboji v argonu. Pionýrské práce skupiny Manfreda von Ardenneho se dočkaly ocenění až po zavedení chemické ionizace, která způsobila zvrat v názorech na význam negativních iontů v analytické organické hmotnostní spektrometrii.

Jednou z hlavních reakcí, která může vést ke vzniku negativních iontů, je reakce rezonančního záchytu elektronu (7.1)



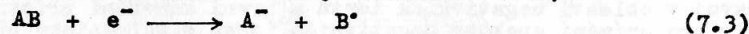
Nezbytným předpokladem pro průběh reakce (7.1) je, aby elektronová afinita (EA) molekuly AB byla kladná. EA definujeme jako energii potřebnou pro průběh děje opačného reakci (7.1). Tento děj vyjádřený rovnicí (7.2) nazýváme ionizací (nebo též autoionizací).



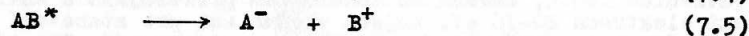
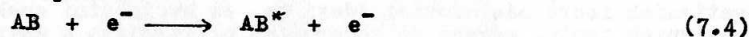
Při rezonančním elektronovém záchytu obsazuje elektron nejnižší neobsazený orbital molekuly AB a vzniká anion $AB^{\cdot-}$ jako excitovaná částice, přičemž její nadbytečná energie odpovídá alespoň hodnotě EA. Pokud tato energie vyzářením nebo srážkami s jinými částicemi nezaniká, může ion $AB^{\cdot-}$ s velkou pravděpodobností autoionizací (7.2) zanikat. U malých molekul je autoionizace (7.2) velmi rychlou reakcí, avšak u velkých organických molekul se přebytečná energie může rozdělit na mno-

ho stupně volnosti molekuly. Nastává značné zpomalení autoionizace (7.2) a molekulové ionty AB^- mohou být ve spektrech pozorovatelné. Rezonanční záchyt elektronu nastává při jeho velmi nízkých energiích (0-2 eV). Zúčastňují se ho tedy převážně tepelné elektrony.

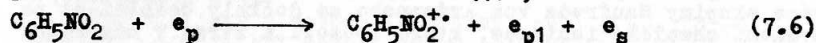
Při energiích elektronů 2-15 eV může být pozorován tzv. disociativní rezonanční záchyt elektronu (7.3)



Při energiích elektronů nad 15 eV mohou negativní fragmenty vznikat mechanismem tvorby iontových párů (7.5) jako důsledek vzniku excitované molekuly AB^* (7.4) a jejího následného rozpadu



Z nastíněné teorie vzniku negativních iontů tedy vyplývá, že molekulární ionty M^- mohou vznikat převážně při nízkých energiích elektronů. Přesto se setkáváme s případy výskytu četných molekulárních iontů při energiích elektronů 70 eV. Můžeme se setkat i s případy zvyšování relativní intenzity molekulárních píků s rostoucí energií primárních elektronů. Tak např. relativní intenzita molekulárního píku nitrobenzenu se při zvýšení energie elektronů z 3 eV na 20 eV zvyšuje 150krát. Tento zdánlivý rozpor je vysvětlitelný tím, že reakce elektronového záchytu (7.1) se zúčastňují nikoliv primární elektrony emitované katodou a urychlené napětím V na požadovanou energii, ale elektrony sekundární e_s , vzniklé při ionizaci molekul nitrobenzenu (7.6)



Nastává tedy výrazné zvýšení relativní intenzity molekulárních píků při energiích primárních elektronů, které jsou blízké ionizačnímu potenciálu nitrobenzenu.

Protože je výtěžek nízkenergetických sekundárních elektronů při elektronovém nárazu závislý na počtu srážek elektronů s neutrálními molekulami a excitační energie molekulárního iontu M^- závisí nejen na energii zachyceného elektronu, ale i na vnitřní energii ionizované molekuly, lze očekávat značnou závislost intenzity a fragmentace molekulového iontu na mnoha parametrech přístroje, zejména na tlaku a teplotě v iontovém zdroji, na teplotě vstupního systému, potenciálu extrakční elektrody iontového zdroje a pod. Obecně je intenzita molekulárních píků značná tehdy, když je dostatečná stabilita iontů vznikem konjugovaných aromatických systémů. Teoretické úvahy o vzniku, stabilitě a mechanismu fragmentace negativních iontů shrnul v r. 1975 Chvoštenko a Rafikov do následujících pravidel:

1. Zatímco kladný náboj může nést každý fragment, je pro vznik negativního iontu nezbytným předpokladem kladná hodnota EA. Z tohoto důvodu např. azoslučeniny netvoří ani N^- , ani N_2^- ionty $C_2H_5^-$ nevznikají, i když $[M-C_2H_5]^-$ ve spektrech mohou být přítomny.

2. Za jinak stejných podmínek odpovídá pravděpodobnost vzniku aniontů elektronové afinitě částic. Tím lze vysvětlit častý výskyt halogenových iontů, CN^- , O^- , $HC\equiv C^-$ atd.

3. Orbitální symetrie dceřiných a mateřských iontů musí být korelovatelné.

4. Vzhledem ke konkurenční autoionizaci převládají fragmenty vzniklé jednoduchou rychlou štěpnou reakcí nad složitými pomalými přesmykovými reakcemi. Struktura iontů a molekul je tedy snáze korelovatelná.

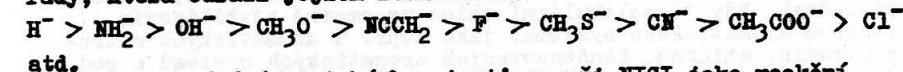
5. Vzhledem k rychlé autoionizaci jsou registrovány jen energeticky chudé iontové druhy s dostatečně dlouhou životností ($> 10^{-6}$ s). Tvoří se tedy takové ionty, na jejichž vznik je zapotřebí velké množství energie, tedy zcela opačná zákonitost než pro vznik fragmentů pozitivních iontů.

Na základě těchto pravidel je snadno vysvětlitelná řada důležitých experimentálních poznatků:

- Sloučeniny, které netvoří stabilní anionty molekuly, tvoří při energii elektronů 70 eV pouze tzv. molekulový šrot.
- Při nízké energii elektronů vznikají často místo molekulárních iontů M^- ionty $[M-1]^-$ jako následek kladné EA a štěpení vazeb C-H, resp. O-H, které je energeticky náročné.
- Je-li molekulární ion M^- stabilní, molekulový šrot se netvoří a fragmentace, pokud nastává, je strukturálně specifická.

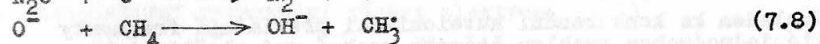
Relativní četnost molekulárních iontů lze zvyšovat změnou těch přístrojových parametrů, které vedou ke zvýšení koncentrace termálních elektronů: snížením energie primárních elektronů, snížením potenciálu extrakční elektrody iontového zdroje, zvýšením tlaku v iontovém zdroji.

Tyto představy vedly Manfreda von Ardenneho k používání argonu jako pomocného plynu při tlaku 1 Pa k zvýšení výtěžku nízkenergetických elektronů následkem srážek primárních elektronů s jeho molekulami. Zvýšení tlaku v iontovém zdroji však vedlo k reakcím ion-molekula, které Manfred von Ardenne začal systematicky studovat a položil tak základy moderní metody tzv. chemické ionizace za vzniku negativních iontů (NICI), často též nesprávně nazývané jako negativní chemická ionizace (NCI). Ionizaci chápeme totiž jako proces vedoucí ke zvýšení pozitivního náboje částice nebo ke snížení náboje záporného. Bowie definuje NICI jako iontové molekulovou reakci, ve které vystupuje analyzovaná látka jako Brønstedova kyselina a anion reakčního plynu jako base. Anionty, které vstupují do takové reakce lze na základě jejich bazicity seřadit do následující řady, která odráží jejich reaktivitu:

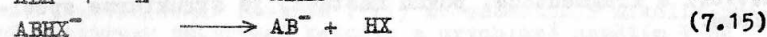
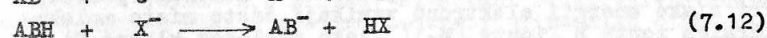
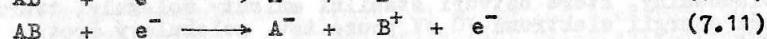
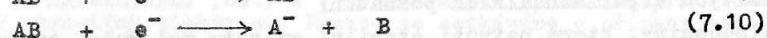


Pro získávání bazických aniontů se při NICI jako reakční plyny někdy používají speciální plyny, jako dichlordifluor-

metan, trifluormetan, tetrafluormetan, fluorodusík, kyslík a další. Pro získání reaktivních hydroxylových aniontů je používána směs kysličníku dusného a methanu. Hydroxylové ionty se tvoří podle schématu:



Přesto jsou však pro NICI používány stejné plyny jako pro ionizaci pozitivní, např. methan a isobutan, tedy plyny, které nemají předpoklady pro tvorbu negativních iontů a průběhu reakcí ion-molekula, jak definice NICI vyžaduje. Negativní ionty obecně při chemické ionizaci vznikají tedy nejen v důsledku reakcí ion-molekula (7.12) až (7.15), ale i v důsledku reakcí elektronového záchyty, (7.9) až (7.11), o kterých byla řeč výše.



Při bombardování molekul methanu nebo isobutanu primárními elektrony vzniká vždy značné množství nízkoenergetických sekundárních elektronů, které mohou vstupovat do reakcí (7.9) až (7.11). Důležitá role navíc patří vždy přítomným nečistotám v reakčním plynu, v nosném plynu při GC/MS analýze a reziduálním nečistot v iontovém zdroji. Tyto nečistoty mohou tvořit reaktivní bazické anionty schopné vstupovat do reakcí (7.12) až (7.15) s molekulami analyzované látky. Těmito ionty jsou např. anionty kyslíku, chloru a dalších halogenů. Tak např. v NICI spektrech čistého methanu či isobutanu jsou zpravidla jako jediné píky přítomny m/z 35, 37, 79, 81, 127, tvořené halogeny z "pozadí", tj. těžko odstranitelných nečistot adsorbovaných nebo chemisorbovaných v ionizační komůrce a jejím okolí. NICI s použitím methanu jako reakčního plynu zaujímá důležité místo, často bývá označována jako EA NCI (Electron Attachment Negative Chemical Ionization).

Vzhledem k tomu, že vznik negativních iontů při chemické ionizaci je důsledkem paralelního průběhu reakcí (7.9) až (7.15), mohou vznikat z analyzované látky různé iontové druhy. Molekulární ionty M^- vznikají reakcemi (7.9) a (7.13) v těch případech, kdy je molekulární anion mesomerně stabilizován tvorbou aromatického systému, jako např. u aromatických nitrosloučenin, chinonů, kondensovaných aromatických systémů a pod. Častými jsou $[\text{M}-1]^-$ ionty jako produkty reakcí (7.10), (7.12) a (7.15), $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ jako produkt reakce (7.14). V některých případech mohou vznikat též $[\text{M}+1]^-$, jestliže H^- jako silný nukleofilní reagent vstupuje do reakce (7.14). Interpretace hmotností iontů v molekulové oblasti hmot tedy vyžaduje zvýšenou

opatrnost a ne vždy poskytuje NICI jednoznačné informace o molekulových hmotnostech analyzovaných látek. Citlivost NICI je pro jednotlivé typy látek značně rozdílná v závislosti na velikosti jejich elektronové afinity. Některé chlorované dibenzodioxiny jsou při NICI až 1000krát citlivější než při pozitivní chemické ionizaci nebo při ionizaci elektronovým nárazem. Metoda NICI se tak stala významnou metodou při kvantitativním stanovení mnohých sloučenin. I v případech, kdy iontový výtěžek je menší ve srovnání s FICI nebo EI ionizačních metodách, lze docílit pomocí NICI vzhledem k její selektivitě podstatně nižších mezí stanovitelnosti.

Podobně jako při chemické ionizaci nachází metoda hmotnostní spektrometrie negativních iontů značné uplatnění při desorpčních ionizačních technikách DCI, LD (laserová desorpce),

SIMS, ^{252}Cf PD a zejména při ionizaci rychlými atomy (FAB). Např. charakteristické jednoduché štěpení negativních iontů peptidů, které postupuje do koncové karboxylové skupiny, umožňuje s použitím ionizace FAB snadnou sekvenční analýzu. Rovněž desorpce polem (PD) lze získat spektra negativních iontů. Je však třeba použít speciálních polymerních nosičů. Zpravidla na bázi polyethylenoxidu. V neposlední řadě i při termosprayové ionizaci v přímém spojení LC/MS poskytují spektra negativních iontů důležité informace. Mechanismus vzniku negativních iontů u desorpčních technik však vyžaduje mnohem systematictější studium než dosud.

Hmotnostní spektrometrii negativních iontů v organické analýze lze dnes považovat za rutinní metodu. Modifikace přístrojů pro snímání spekter negativních iontů je zcela jednoduchá a prakticky každý výrobce ji nabízí buď jako dodatečné příslušenství nebo již v základním vybavení.

8. Sektorové hmotnostné spektrometre, prístroje s dvojitou fokusaáciou, vysoké rozlíšenie, detekcia metastabilných iónov

8.1 Sektorové hmotnostné spektrometre

Ióny rôznych hmotností a nábojov, ktoré vznikli v iónovom zdroji hmotnostného spektrometra, sa v jeho ďalšej časti delia podľa $m/z.e$. Táto časť prístroja sa nazýva analyzátor. Jedným z najčastejšie používaných analyzátorov je klasický magnetický analyzátor - magnetický sektor. Do tohoto priestoru vletia ióny rýchlosťou v s hmotnosťou m a nábojom $z.e$. Rýchlosť v a tým aj potrebnú kinetickú energiu získajú ióny preletom cez urýchľujúce elektrické pole s napätím U ešte v iónovom zdroji:

$$z.e.U = \frac{1}{2} m.v^2 \quad (8.1)$$

$$v = \sqrt{\frac{2.z.e.U}{m}} \quad (8.2)$$

Účinkom dostredivej sily magnetického poľa, ktorá je v rovnováhe s odstredivou silou, sa pohyb iónov v magnetickom poli zakrivuje do kruhovej dráhy s určitým polomerom zakrivenia r :

$$B.v.z.e = \frac{m.v^2}{r} \quad (8.3)$$

kde: B - indukcia magnetického poľa
Z rovníc (8.1) a (8.3) získame vzťah:

$$\frac{m}{z.e} = r^2 \cdot \frac{B^2}{2U} \quad (8.4)$$

$$r^2 = 2 \cdot \frac{m}{z.e} \cdot \frac{U}{B^2} \quad (8.5)$$

To znamená, že ióny s rovnakým nábojom, ale s rôznymi hmotnosťami sa budú pohybovať po kruhových dráhach s rôznym polomerom zakrivenia.

Zmenu polomeru zakrivenia r v závislosti od rozdielu hmotností m dvoch druhov iónov dostaneme diferenciaciou rovnice (8.5):

$$\frac{\Delta r}{r} = \frac{1}{2} \cdot \frac{\Delta m}{m} \quad (8.6)$$

Okrem uvedeného deliaceho účinku má magnetické pole na divergujúci zväzok lúčov aj fokusačný účinok podobne ako v optike sošovka spojky na svetelný zväzok lúčov. To znamená, že ióny rovnakej hmotnosti a náboja, vychádzajúceho z jedného bodu s určitou malou divergenciou α , sa po prelete magnetickým polom sústreďujú opäť do jedného bodu (obr. 20).

Jednotlivé druhy iónov rôznych hmotností sú preletom cez magnetické pole fokuseované do určitých bodov. Množina týchto bodov vytvára tzv. obrazovú (fokusačnú) krivku. Na centrálnu dráhu s polomerom zakrivenia r možno na detekčnú štrbinu privádzať ióny s rovným pomerom $m/z.e$ menením hodnôt B alebo U (pomeru B^2/U). Na prístroji s magnetickým rozvojom spektra získame hmotnostné spektrum tak, že budeme s určitou zvolenou rýchlosťou meniť indukciu magnetického poľa, pričom jednotlivé druhy iónov budú prechádzať detekčnou štrbinou v určitom poradí podľa $m/z.e$ (obr. 20). Kolmá vzdialenosť dvoch susedných blízko dopadajúcich lúčov (stredov obrazov) s hmotnosťami m a $(m + \Delta m)$ nazývame disperziou magnetického sektoru D :

$$D = K \cdot \frac{\Delta r}{r} \quad (8.7)$$

kde K je disperzný koeficient

Podobne na ióny rovnakých hmotností, ale rôznych kinetických energií, pôsobí magnetické pole tak, že sa budú pohybovať po dráhach s rôznym polomerom zakrivenia. Diferenciáciou rovnice (8.5) dostaneme vzťah:

$$\frac{\Delta r}{r} = \frac{1}{2} \cdot \frac{\Delta U}{U} \quad (8.8)$$

Sektor magnetického poľa účinkuje teda na lúč iónov rovnakej hmotnosti, ale s rôznou kinetickou energiou podobne ako hranol na elektromagnetické žiarenie rôznych frekvencií. Množina fokusačných bodov vytvára opäť určitú fokusačnú krivku.

V praxi sa naďalej v dôsledku divergencie iónového lúča vytvára v priestore fokusačnej krivky určité "rozostrenie"

$$\Delta b : \quad \Delta b = k.r. \alpha^2 \quad (8.9)$$

Hovoríme, že fokusačia je nedokonalá.

Z toho je zrejmé, že rozlišovacia schopnosť okrem disperzie závisí aj na šírke obrazu a na jeho ostrosti. Ak označíme šírku obrazu $s = s_1 + \Delta s$, kde s_1 je šírka výstupnej štrbiny z iónového zdroja a Δs celkové rozšírenie, spôsobené nehomogenitou kinetickej energie iónov, nestabilitou magnetického poľa a nedokonalosťou fokusačie, musíme použiť detekčnú štrbinu o šírke $s_2 = (s_1 + \Delta s)$. Na úplné oddelenie iónových lúčov s hmotnosťami m a $(m + \Delta m)$ musí byť vzdialenosť okrajov ich obrazov aspoň taká veľká ako je šírka detekčnej štrbiny.

Rozlišovacia schopnosť R sa obvykle definuje ako maximálna hmotnosť iónov, ktoré ešte možno oddeliť od iónov s hmotnosťou o jednotku vyššou. Spravidla sa R udáva pro 10%-ný prekryv medzi dvoma rovnako intenzívnymi iónovými signálmi:

$$R_{10\%} = \frac{m}{\Delta m} \quad (8.10)$$

8.2 Dvojitá fokusácia

Rozlišovaciu schopnosť možno zvyšovať zväčšovaním polomeru zakrivenia centrálnej dráhy r , ktorý je konštrukčne daný pre každý sektor magnetického analyzátoru, alebo zužovaním výstupnej štrbiny z ionového zdroja. Hodnoty $R_{10\%} > 2000$

už nie je účelné dosahovať týmto spôsobom, pretože sa treba vyrovnat s nehomogenitou kinetickej energie iónov, opúšťajúcich priestor ionizácie. Problém sa vyrieši kombináciou magnetického sektoru s elektrickým sektorom (sl. radiálnym polom), ktorý sa umiesti buď pred magnetický sektor (klasické usporiadanie) alebo za neho (tzv. obrátená geometria).

Pre pohybujúce sa ióny v radiálnom elektrickom poli po centrálnej dráhe (hladina nulového potenciálu) s polomerom zakrivenia r_e platí:

$$r_e = \frac{m \cdot v^2}{z \cdot e \cdot F} = \frac{2U}{F} \quad (8.11)$$

kde F je sila poľa v elektrickom sektore,

U je urýchľujúce napätie iónov v iónovom zdroji.

Ióny, ktoré majú inú rýchlosť ako je uvedené v rovnici (8.11) alebo iný smer vstupu, budú sa pohybovať po dráhach s iným polomerom zakrivenia. Na obr. 21 sú znázornené iba dve okrajové dráhy divergujúceho iónového lúča s dvomi energiami $e(U \pm \Delta U)$. Možno povedať, že elektrické radiálne pole účinkuje na vstupujúci lúč s určitou obmedzenou divergenciou podobne ako magnetické pole, teda ako šošovka spojky. Ióny s rôznou kineticou energiou $e(U \pm \Delta U)$ sa budú pohybovať po rôznych dráhach a po prelete radiálnym el. polom budú fokusované na rôznych miestach. To znamená, že ióny vstupujú do magnetického poľa rozdelené a fokusované podľa energie tak, že magnetický sektor fokusuje ióny s rovnakou hmotnosťou aj vtedy, ak ich energia je do istej miery rozdielna. Hovoríme o dvojitej fokusácii.

Poznáme dva základné klasické konštrukčné systémy dvojitej fokusácie. Prvým je princíp Mattaucha a Herzoga, ktorý umožňuje dvojitú fokusáciu súčasne pre široký rozsah hmotností v jednej rovine, a preto možno použiť pre záznam fotografickú dosku. Druhým je princíp Njera a Johnsona (obr. 21). Tento systém má vyššiu svetelnosť, ale umožňuje dvojitú fokusáciu len pre centrálnu dráhu v priesečníku kriviek (ploch) rýchlostnej a smerovej fokusácie.

Klasický postup merania exaktných hmotností na prístrojoch dvojitej fokusácie s el. detekciou je tzv. spôsob "peak matching" - spôsob porovnávania hmotností. Ak máme dva iónové lúče s hmotnosťou m_0 a $m = m_0 + \Delta m$, ktoré sa majú pohybovať v magnetickom poli s rovnakým polomerom zakrivenia, môžeme napísať:

$$\frac{m}{m_0} = k_1 \frac{E_0}{E} = k_2 \frac{U_0}{U} \quad (8.12)$$

kde E_0 resp. E sú vkladané napätia na platne elektrostatického analyzátoru

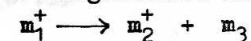
U_0 resp. U sú urýchľovacie napätia, ktoré sa periodicky menia

Ak sa píky na obrazovke osciloskopu presne kryjú, odčítame pomer hodnôt U_0/U na tzv. dekáde prístroja a pri známej presnej hmotnosti porovnávacieho štandardu m_0 môžeme vypočítať hľadajú exaktnú hmotnosť m . Z presnej hmotnosti môžeme potom odvodiť elementárne zloženie iónu. Na jednoznačné stanovenie elementárneho zloženia potrebujeme v danom prípade dostatočne vysokú rozlišovaciu schopnosť. Napr. ióny $[C_6H_5N_2]^+$ a $[C_6H_5CO]^+$ majú presné hmotnosti 105,0452 a 105,0340. Na ich dokonalé rozlíšenie potrebujeme rozlišovaciu schopnosť $R = m/\Delta m = 105/(105,0452 - 105,0340) \approx 9000$. Hovoríme, že ide o rozlíšenie dubletu N_2-CO ($\Delta m = 0,0112$) pri hmotnostom čísle 105. Presnosť stanovenia exaktnej hmotnosti vyjadrujeme obvykle v ppm. Pri automatickom spracovaní údajov počítačom sa získa tzv. "elementárna mapa".

8.3 Metastabilné ióny

V hmotnostnej spektrometrii označujeme metastabilnými iónmi také ióny, ktoré sa šťastie rozkladajú ešte v iónovom zdroji a šťastie po opustení iónového zdroja počas letu na detektor. Ich stredný čas životnosti t je približne v rozmedzí $10^{-4,5} s > t > 10^{-5,5} s$.

Popíšeme si takýto rozpad metastabilného iónu m_1^+ v tzv. "druhej oblasti bez poľa" (pozri obr. 21) ešte pred analýzou v magnetickom sektore:



(v angl. literatúre sa m_1^+ označuje ako "Precursor" a m_2^+ ión ako "Daughter" ion).

Ak takýto rozpad prebieha bez akejkoľvek konverzie excitačnej energie na kineticú energiu, pokračuje fragmentový ión m_2^+ v lete s tou istou rýchlosťou v ako povodný ión m_1^+ a tiež tým istým smerom. Rovnakú rýchlosť v má aj fragment bez náboja (neutrálny úlomok) m_3 . To znamená, že kineticá energia iónu m_1^+ sa po rozpade rozdelí medzi ión m_2^+ a neutrálny úlomok m_3 v pomere k ich hmotnostiam. Hybnosť takto vzniknutého iónu m_2^+ je nižšia v porovnaní s tým iónom m_1^+ , ktorý vznikol uvedeným rozpadom ešte v ionizačnom priestore. Jeho nižšia hybnosť sa potom prejaví v spektre zdanlivo nižšou hmotnosťou

$m^{\bar{x}}$, danou vzťahom:

$$m^{\bar{x}} = \frac{m_2^2}{m_1} \cdot \frac{x}{y^2} \quad (8.13)$$

kde x a y je počet nábojov iónu s hmotnosťou m_1 resp. m_2 . Takýto metastabilný prechod $m_1^+ \rightarrow m_2^+ + m_3$ sa v spektre prejaví malým difúznym píkom o zdánlivej hmotnosti $m^{\bar{x}}$.

Pochopiteľne, ak dojde k uvedenému metastabilnému prechodu v "prvej oblasti bez poľa", nemožno u spektrometra dvojitej fokusácie takýto prechod detekovať len púhym scanom indukcie magnetického poľa. Ióny m_2^+ , vzniknuté v prvej oblasti bez poľa, neprejdú totiž cez radiálne elektrické pole, a preto je nevyhnutné úmerne znížiť napätie medzi platnami el. sektoru E alebo zvýšiť urýchľujúce napätie v ionovom zdroji U .

Vo všeobecnosti možno produkty rozpadov metastabilných iónov v prvej oblasti bez poľa privádzať na detekčnú štrbinu pomocou rôznych kombinácií scanov U , E a $B/4$. Zmeny týchto veličín z určitých pôvodných hodnôt U_1 , E_1 , B_1 na hodnoty

U_2 , E_2 , B_2 možno vyjadriť nasledovnými vzťahmi:

$$U_2 = \left(\frac{m_1}{m_2} \right)^x \cdot U_1 \quad (8.14)$$

$$E_2 = \left(\frac{m_1}{m_2} \right)^{x-1} \cdot E_1 \quad (8.15)$$

$$B_2 = \left(\frac{m_1}{m_2} \right)^{\frac{x-1}{2}} \cdot B_1 \quad (8.16)$$

kde x je faktor rovný nule, resp. nadobúdajúci kladných alebo záporných integrálnych hodnôt (tab. 1).

Tabuľka 2 (8.4)

x	U_2/U_1	E_2/E_1	B_2'/B_1'	B_2''/B_1''
-2	$(m_2/m_1)^2$	$(m_2/m_1)^3$	$(m_2/m_1)^{3/2}$	$(m_2/m_1)^2$
-1	m_2/m_1	$(m_2/m_1)^2$	m_2/m_1	$(m_2/m_1)^{3/2}$
0	1	m_2/m_1	$(m_2/m_1)^{1/2}$	m_2/m_1
1	m_1/m_2	1	1	$(m_2/m_1)^{1/2}$
2	$(m_1/m_2)^2$	m_1/m_2	$(m_1/m_2)^{1/2}$	1

B_1' - počiatková indukcia magnetického poľa pre prelet m_2^+ iónov, vzniknutých v ionovom zdroji (pre $x = 0, 1$)

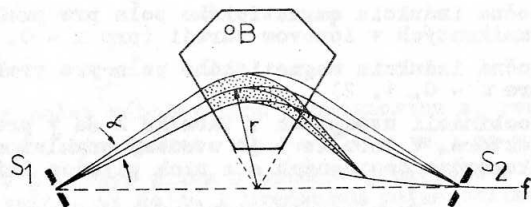
B_2'' - počiatková indukcia magnetického poľa pre prelet m_1^+ iónov (pre $x = 0, 1, 2$)

Z rôznych kombinácií uvedených v tabuľke 2 sa v praxi používajú len niektoré. V tabuľke 3 je uvedený prehľad scanov u prístrojov komerčne dostupných a z nich plynúce informácie.

Tabuľka 3 Prehľad metastabilných scanov

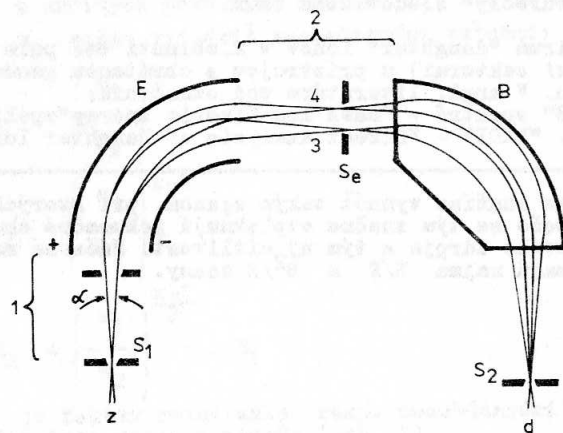
Scan	Informácia
B/E	Spektrum "daughter" iónov v 1.oblasti bez poľa
E^2/U	Spektrum "daughter" iónov v 1.oblasti bez poľa
B^2/E	"Precursory" sledovaného iónu
U	"Precursory" sledovaného iónu
E	Spektrum "daughter" iónov v 2.oblasti bez poľa (medzi sektormi) u prístrojov s obrátenou geometriou. V angl. literatúre pod označením: "MIKE" spektrá - "Mass Ion Kinetic Energy" spektrá resp. "DADI" - "Direct Analysis of Daughter Ions"

V súčasnosti sa snažíme vyhnúť takým scanom, pri ktorých sa mení U , pretože sa tým značne ovplyvňujú fokusačné charakteristiky ionového zdroja a tým aj citlivosť. Súčasné moderné prístroje majú najmä B/E a B^2/E scany.



Obr. 20 Schéma magnetického analyzátoru

S_1 - výstupná štrbina iónového zdroja, S_2 - detekčná štrbina, α - uhol divergencie iónového lúča, B - magnetické pole (magnetický analyzátor), r - polomer zakrivenia centrálnej dráhy, f - fokusačná krivka



Obr. 21 Schéma dvojitej fokusácie podľa princípu Niera a Johnsona

z - iónový zdroj, S_1 - výstupná štrbina iónového zdroja, S_2 - detekčná štrbina, S_e - energetická clona, α - uhol divergencie iónového lúča, E - elektrické radiálne pole (elektrický sektor), B - magnetické pole, d - detektor, 1 - prvá oblasť bez pola, 2 - druhá oblasť bez pola, 3 - eU , 4 - $e(U + \Delta U)$.

9. Dynamické analyzátory v hmotnostní spektrometrii

Tzv. statické analyzátory (obvykle analyzátory sektorového typu, které plní funkci prismatu i čočky) jsou charakterizovány tím, že ionty zvoleného m/z jsou přivedeny na centrální dráhu kombinací statických polí. V současné době mají význam pro spektrometrii vysokého rozlišení (s dvojitou fokusací) a pro izotopická měření (dvoupaprskové spektrometry s kompenzačním měřením proudů). U dynamických analyzátorů je pro dosažení stabilní dráhy mezi zdrojem a detektorem iontů potřebné radiofrekvenční pole, nebo se rozdělí iontů podle m/z určí z doby letu mezi zdrojem a detektorem se širokopásmovým zesilovačem (např. 0-500 MHz). V průběhu čtyř desetiletí bylo popsáno mnoho různých způsobů analýzy, avšak trvalé a perspektivní se nyní jeví tři typy analyzátorů: kvadrupólový, cyklotronový (pro iontově-molekulové reakce) a analyzátor z doby letu.

9.1 Kvadrupólové hmotnostní spektrometry

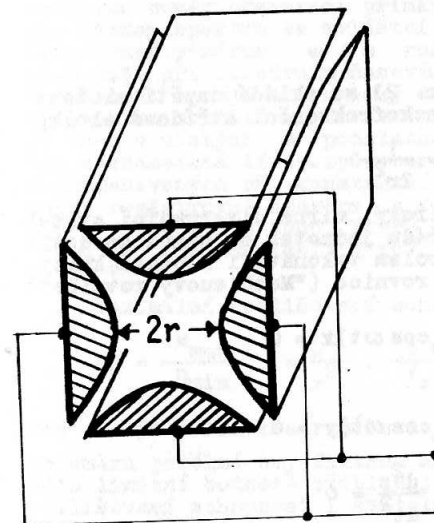
Podstatou kvadrupólových analyzátorů je hyperbolické radiofrekvenční pole (obr. 22), pro něž platí

$$\Phi = \Phi_0 (\lambda x^2 + \sigma y^2) \\ = U + V_0 \cos \omega t (\lambda x^2 + \sigma y^2),$$

(kde Φ je potenciál), takže na částici s jednotkovým nábojem působí síla přímo úměrná výchylce od neutrální polohy:

$$F_{1x} = -e \frac{d\Phi}{dx} = -2e\Phi_0 \lambda x;$$

$$F_{1y} = -e \frac{d\Phi}{dy} = -2e\Phi_0 \sigma y.$$



9.1.1 Kvadrupólový filtr

Kvadrupólový filtr je podstatou převážné většiny komerčně vyráběných spektrometrů (asi 70% celkového počtu). Hyperbolické pole je obvykle aproximováno polem tvořeným čtyřmi

$m^{\#}$, danou vzťahom:

$$m^{\#} = \frac{m_2^2}{m_1} \cdot \frac{x}{y^2} \quad (8.13)$$

kde x a y je počet nábojov iónu s hmotnosťou m_1 resp. m_2 . Takýto metastabilný prechod $m_1^+ \rightarrow m_2^+ + m_3$ sa v spektre prejaví malým difúznym pikom o zdánlivej hmotnosti $m^{\#}$.

Pochopiteľne, ak dojde k uvedenému metastabilnému prechodu v "prvej oblasti bez poľa", nemožno u spektrometra dvojitej fokusácie takýto prechod detekovať len púhym scanom indukcie magnetického poľa. Ióny m_2^+ , vzniknuté v prvej oblasti bez poľa, neprejdú totiž cez radiálne elektrické pole, a preto je nevyhnutné úmerne znížiť napätie medzi platnami el. sektoru E alebo zvýšiť urýchľujúce napätie v ionovom zdroji U .

Vo všeobecnosti možno produkty rozpadov metastabilných iónov v prvej oblasti bez poľa privádzať na detekčnú štrbinu pomocou rôznych kombinácií scanov U , E a $B/4$. Zmeny týchto veličín z určitých pôvodných hodnôt U_1 , E_1 , B_1 na hodnoty

U_2 , E_2 , B_2 možno vyjadriť nasledovnými vzťahmi:

$$U_2 = \left(\frac{m_1}{m_2} \right)^x \cdot U_1 \quad (8.14)$$

$$E_2 = \left(\frac{m_1}{m_2} \right)^{x-1} \cdot E_1 \quad (8.15)$$

$$B_2 = \left(\frac{m_1}{m_2} \right)^{\frac{x-1}{2}} \cdot B_1 \quad (8.16)$$

kde x je faktor rovný nule, resp. nadobúdajúci kladných alebo záporných integrálnych hodnôt (tab. 1).

Tabuľka 2 (8.4)

x	U_2/U_1	E_2/E_1	B_2'/B_1'	$B_2^{\#}/B_1^{\#}$
-2	$(m_2/m_1)^2$	$(m_2/m_1)^3$	$(m_2/m_1)^{3/2}$	$(m_2/m_1)^2$
-1	m_2/m_1	$(m_2/m_1)^2$	m_2/m_1	$(m_2/m_1)^{3/2}$
0	1	m_2/m_1	$(m_2/m_1)^{1/2}$	m_2/m_1
1	m_1/m_2	1	1	$(m_2/m_1)^{1/2}$
2	$(m_1/m_2)^2$	m_1/m_2	$(m_1/m_2)^{1/2}$	1

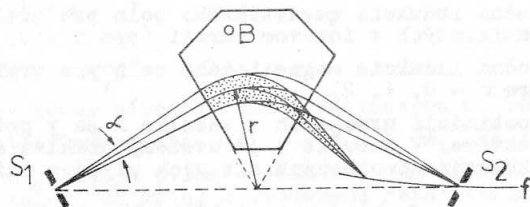
B_1' - počiatková indukcia magnetického poľa pre prelet m_2^+ iónov, vzniknutých v ionovom zdroji (pre $x = 0, 1$)
 $B_2^{\#}$ - počiatková indukcia magnetického poľa pre prelet m_1^+ iónov (pre $x = 0, 1, 2$)

Z rôznych kombinácií uvedených v tabuľke 2 sa v praxi používajú len niektoré. V tabuľke 3 je uvedený prehľad scanov u prístrojov komerčne dostupných a z nich plymúce informácie.

Tabuľka 3 Prehľad metastabilných scanov

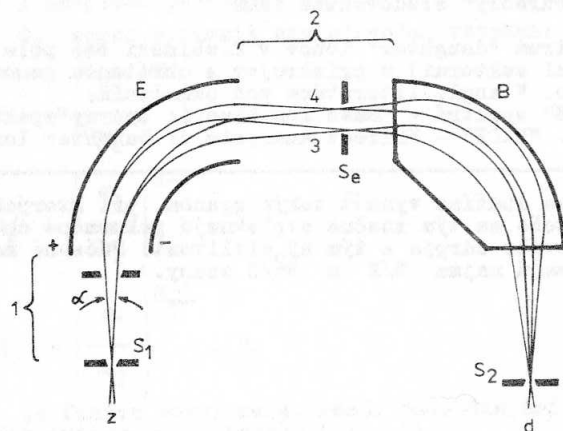
Scan	Informácia
B/E	Spektrum "daughter" iónov v 1.oblasti bez poľa
E^2/U	Spektrum "daughter" iónov v 1.oblasti bez poľa
B^2/E	"Precursory" sledovaného iónu
U	"Precursory" sledovaného iónu
E	Spektrum "daughter" iónov v 2.oblasti bez poľa (medzi sektormi) u prístrojov s obrátenou geometriou. V angl. literatúre pod označením: "MIKE" spektrá - "Mass Ion Kinetic Energy" spektrá resp. "DADI" - "Direct Analysis of Daughter Ions"

V súčasnosti sa snažíme vyhnúť takým scanom, pri ktorých sa mení U , pretože sa tým značne ovplyvňujú fokusačné charakteristiky iónového zdroja a tým aj citlivosť. Súčasné moderné prístroje majú najmä B/E a B^2/E scany.



Obr. 20 Schéma magnetického analyzátoru

S_1 - výstupná štrbina iónového zdroja, S_2 - detekčná štrbina, α - uhol divergencie iónového lúča, B - magnetické pole (magnetický analyzátor), r - polomer zakrivenia centrálnej dráhy, f - fokusačná krivka



Obr. 21 Schéma dvojitej fokusácie podľa princípu Niera a Johnsona

z - iónový zdroj, S_1 - výstupná štrbina iónového zdroja, S_2 - detekčná štrbina, S_e - energetická clona, α - uhol divergencie iónového lúča, E - elektrické radiálne pole (elektrický sektor), B - magnetické pole, d - detektor, 1 - prvá oblasť bez poľa, 2 - druhá oblasť bez poľa, 3 - eU , 4 - $e(U + \Delta U)$.

9. Dynamické analyzátohy v hmotnostní spektrometrii

Tzv. statické analyzátohy (obvykle analyzátohy sektorového typu, které plní funkci prismatu i čočky) jsou charakterizovány tím, že ionty zvoleného m/z jsou přivedeny na centrální dráhu kombinací statických polí. V současné době mají význam pro spektrometrii vysokého rozlišení (s dvojnásobnou fokusační) a pro izotopická měření (dvoupaprskové spektrometry s kompenzačním měřením proudů). U dynamických analyzátohy je pro dosažení stabilní dráhy mezi zdrojem a detektorem iontů potřebné radiofrekvenční pole, nebo se rozdělení iontů podle m/z určí z doby letu mezi zdrojem a detektorem se širokopásmovým zesilovačem (např. 0-500 MHz). V průběhu čtyř desetiletí bylo popsáno mnoho různých způsobů analýzy, avšak trvalé a perspektivní se nyní jeví tři typy analyzátohy: kvadrupólový, cyklotronový (pro iontové-molekulové reakce) a analyzátohy z doby letu.

9.1 Kvadrupólové hmotnostní spektrometry

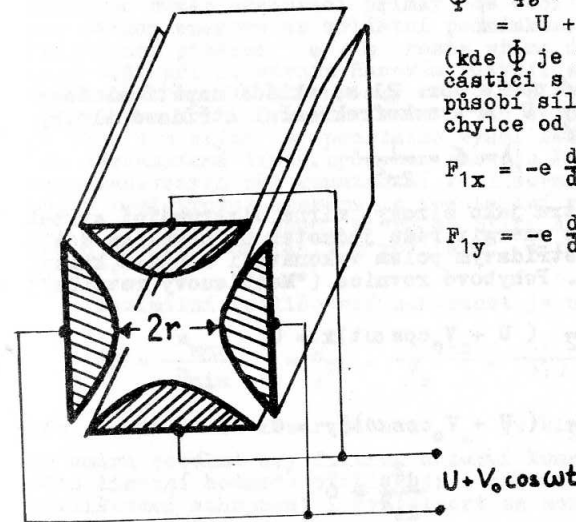
Podstatou kvadrupólových analyzátohy je hyperbolické radiofrekvenční pole (obr. 22), pro něž platí

$$\Phi = \Phi_0 (\lambda x^2 + \sigma y^2) \\ = U + V_0 \cos \omega t (\lambda x^2 + \sigma y^2),$$

(kde Φ je potenciál), takže na částici s jednotkovým nábojem působí síla přímo úměrná výchylce od neutrální polohy:

$$F_{1x} = -e \frac{d\Phi}{dx} = -2e\Phi_0 \lambda x;$$

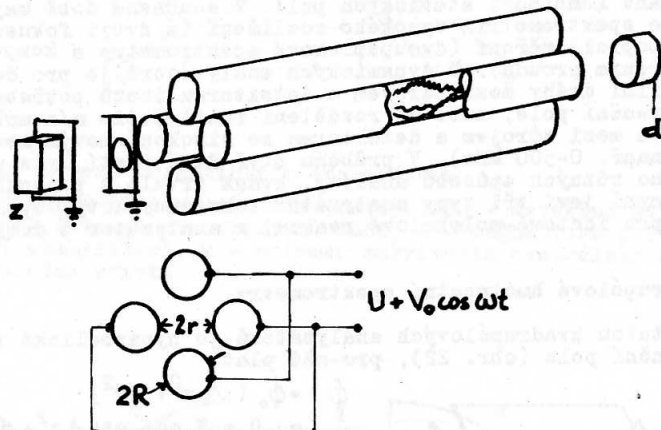
$$F_{1y} = -e \frac{d\Phi}{dy} = -2e\Phi_0 \sigma y.$$



9.1.1 Kvadrupólový filtr

Kvadrupólový filtr je podstatou převážné většiny komerčně vyráběných spektrometrů (asi 70% celkového počtu). Hyperbolické pole je obvykle aproximováno polem tvořeným čtyřmi

rovnoběžnými tyčemi kruhového průřezu o poloměru $R = 1,148 r$ (obr. 23).



Obr. 23

Na elektrody propojené podle obr. 23 se vkládá napětí složené ze stejnosměrné složky U a vysokofrekvenční střídavé složky $V_0 \cos \omega t$. Přitom platí

$$\lambda = \sigma = \frac{1}{2r^2}.$$

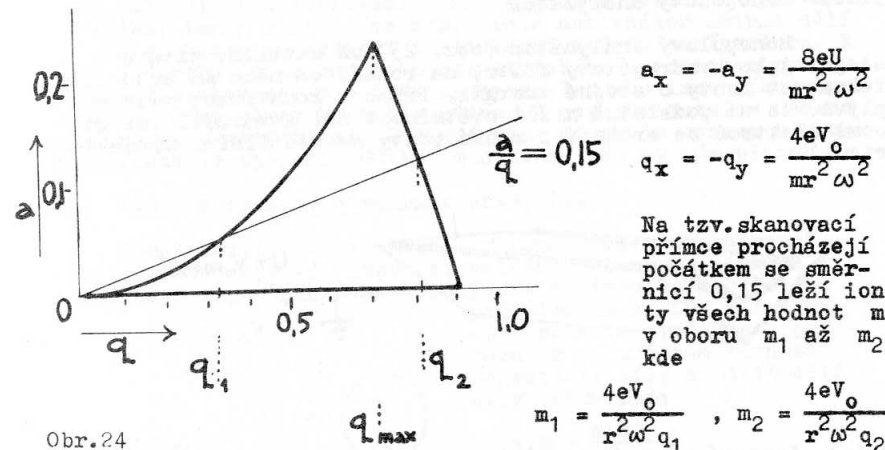
Ionty vstupují do filtru jako široký, mírně divergující svazek ve směru podélné osy s energií řádu jednotek až několika desítek eV. Při průchodu střídavým polem vykonávají složité kmity kolmo na podélnou osu. Pohybové rovnice ("Mathieuovy rovnice")

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \frac{e}{mr^2} (U + V_0 \cos \omega t)x = 0.$$

$$\frac{d^2y}{dt^2} + \frac{e}{mr^2} (U + V_0 \cos \omega t)y = 0$$

$$\frac{d^2z}{dt^2} = 0$$

poskytují řešení, podle něhož velikost i forma kmitů závisí na hmotnosti iontů m ; filtrem mohou projít jenom ionty se stabilní dráhou, ostatní ionty skončí na povrchu elektrod nebo na stěnách vakuového obalu. Hlavní obor stability je znázorněn tzv. "stabilitním diagramem" (obr. 24), v němž



Obr. 24

Měněním frekvence nebo lépe měněním V_0 a současně U , aby byl zachován poměr skanovací přímky, se docílí rozvoje škály hmot pro záznam spektra se zvláštní podmínkou: rozlišovací schopnost definovaná poměrem $m/\Delta m$ roste přímo úměrně s m , tj. signály mají při lineárním časovém rozvoji stejnou šířku, stejnou vzdálenost a mají analogický tvar, což je výhodné pro registraci spektra zvláště s užitím datových systémů. Světelnost filtru je však u nízkých m podstatně vyšší než u vysokých m a spektra zaznamenaná tímto způsobem rozvoje škály se liší od spektra zaznamenaných při konstantní rozlišovací schopnosti. Je ovšem možno registrovat spektra s konstantní rozlišovací schopností, např. v pracovním bodu, který se blíží špičce stabilitního diagramu, tj. při maximálním rozlišení, a to úměrným zvyšováním U a V_0 .

Maximální rozlišovací schopnost je určena vztahem

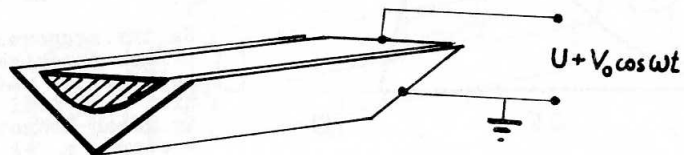
$$RS = \frac{m_{\max}}{m_{\min}} = \frac{L^2}{r^2} \cdot \frac{V_0 \max}{V_z} \cdot \frac{1}{570},$$

kde L je délka kvadrupólu a V_z je kinetická energie iontů ve směru podélné osy filtru. Moderní komerční spektrometry se této limitní hodnotě přibližují a nečiní zvláštních potíží rozlišovací schopnost i světelnost za normálních pracovních podmínek udržet.

Připomínky zasluhuje, že kvadrupólový filtr (na rozdíl od monopólového analyzátoru, viz níže) je schopen odělovat ionty bez ohledu na jejich počáteční energii (pokud ovšem není jejich rychlost tak velká, že by je r_f pole při letu filtrem nestáčilo "rozhoupat"). Proto se kvadrupólu užívá např. i v analýze sekundárních iontů vznikajících s různou počáteční energií např. při analýze povrchů (SIMS).

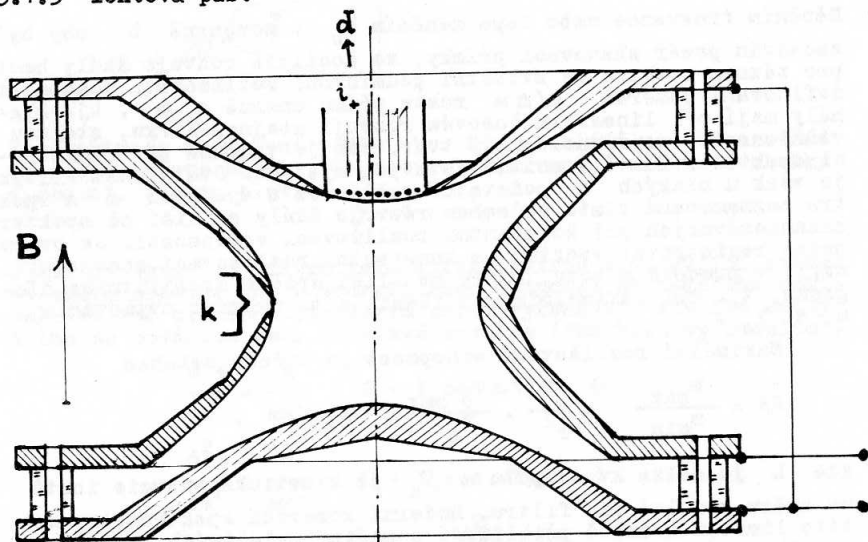
9.1.2 Monopólový analyzátor

Monopólový analyzátor (obr. 25) má stabilní diagram stejný jako kvadrupólový filtr, na rozdíl od něho má schopnost fokusovat ionty o stejné energii. Přímou z konstrukce však vyplývá, že má podstatně nižší světelnost než kvadrupól (se stěnami elektrod se srážejí i mnohé ionty se stabilními trajektoriemi).



Obr. 25

9.1.3 Iontová past

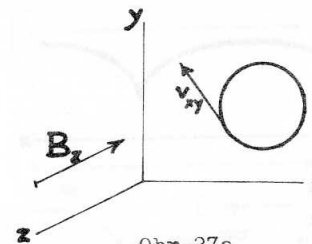


"Ion trap" (obr. 26) je kvadrupólový filtr tvořený hyperboloidním prstencem místo jedné dvojice elektrod a dvěma hyperboloidy místo druhé dvojice. Funkce spočívá v tom, že ze širokého souboru iontů vzniklých při ionizaci (spojité

nebo pulsní) jsou zvyšováním rf napětí k detektoru postupně přiváděny ionty rostoucích m/z. Tento analyzátor účinně dělí ty ionty, které se hromadí v blízkosti středu analyzátoru. K tomu je třeba nejen vhodného geometrického uspořádání pro ionizující elektrony, ale také nadbytku lehkého inertního plynu - helia. Jiné plyny by mohly přivodit nepředvídatelné reakce mezi ionty a molekulami. Iontová past má proto význam a použití pouze ve spojení GC/MS s heliem jako nosným plynem.

9.2 Iontová cyklotronová rezonance, ICR

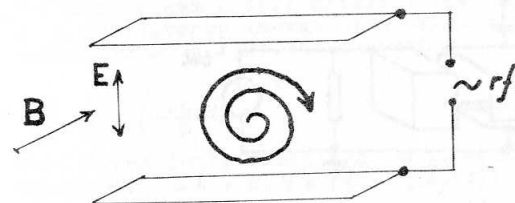
Spektrometry ICR vycházejí z konstrukce "omegatronu" (J.A.Hipple a spol.), jakéhosi malého cyklotronu. Ion se v homogenním magnetickém poli pohybuje po šroubovici, jejímž průmětem do roviny kolmé na směr pole je kružnice o poloměru r, určeném rovností Lorentzovy síly a odstředivé síly (obr. 26):



Obr. 27a

Jestliže kolmo na magnetické pole působí na ionty také vysokofrekvenční pole o frekvenci f, pak při jisté frekvenci, označené jako cyklotronová rezonanční frekvence f_c,

$$\frac{m}{z} = \frac{r \cdot B}{v} = \frac{r \cdot B}{2\pi r f_c} = \frac{B}{\omega_c}$$



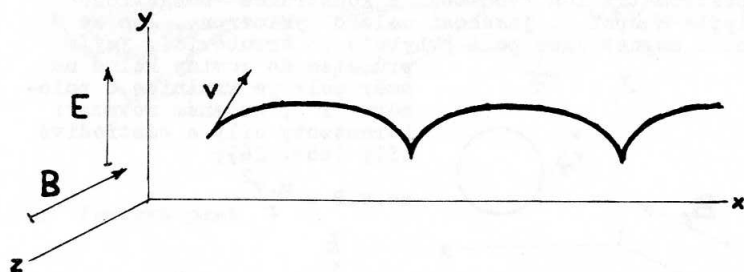
Obr. 27b

nastane rezonance; ionty jsou tímto rezonančním polem urychlovány a nabývají rostoucí energii (obr. 27). Oscilátor, který energii dodává, lze konstruovat tak, že absorpce energie a změna impedance se projeví výrazně změnou hladiny vf signálu ("marginální oscilátor"). Spojitou změnou magnetického pole lze při konstantní frekvenci vf oscilátoru rozvíjet škálu m/z a zaznamenávat přítomnost iontů rozdílných m/z (např. pro 0 až 1,6 tesla, f 0,7 MHz obor m/z 0 až 50 jednotek chem. škály). Rozlišovací schopnost je nepřímo úměrná hmotnosti:

$$RS = \frac{m}{\Delta m} = \frac{z \cdot r \cdot B^2}{2E_g m}$$

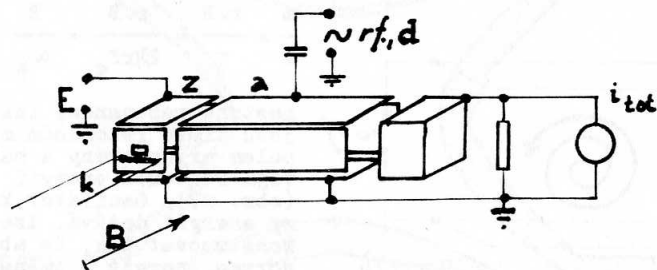
kde r je maximální poloměr zakřivení a E_0 je amplituda vř pole. Ionizace i hmotnostní analýza probíhají v jednom prostoru, srážky iontů s molekulami snižují rozlišovací schopnost; proto jsou omegatrony použitelné pro analýzu složek vysokého vakua.

U iontové cyklotronové rezonance je prostor ionizace oddělen od prostoru analyzátoru. Iontový zdroj je upraven tak, že na vzniklé ionty působí navzájem kolmé elektrické a magnetické pole, jak je naznačeno v obr. 28.



Obr.28

Ionty jsou z ionizační komůrky po cykloidálních drahách vytlačovány se střední rychlostí $\bar{v}_x = E/B$ do prostoru analyzátoru (např. pro $B = 1,6$ tesla, $E = 0,5$ V/m je \bar{v}_x asi 5 m/s).



Obr.29

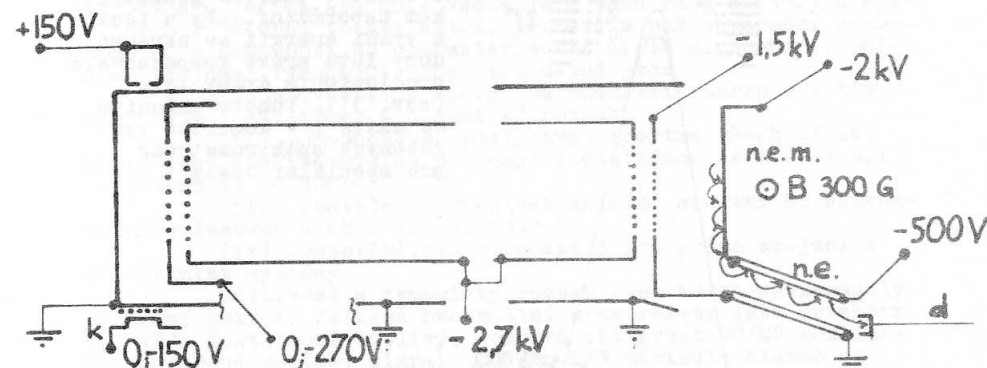
V analyzátoru jsou ionty separovány podobně jako u omegatronu (obr. 29); z iontů, které nesplňují podmínku rezonance, se značný podíl přenesení až k detektoru celkového iontového proudu. Stejně jako u omegatronu je rozlišovací schopnost nepřímě úměrná hmotnosti iontů. Dráhy iontů i doby setrvání iontů v analyzátoru jsou velké, ionty podléhají iontové molekulovým reakcím. Studium reakcí ion-molekula, zvláště mechanismů reakcí a rovnováh, zůstane asi nejdůležitější doménou spektrometrů ICR.

9.3 Spektrometry průletové ("Time-of-flight" spektrometry)

Ionty o stejné energii nebo o stejném impulsu mají rychlosti závislé na hodnotách m/z . Z několika typů zařízení stanovujících rychlost iontů nabyly rostoucí význam analyzátorů bez magnetického pole.

Lineární "TOF MS - Bendix"

Podstata spektrometru je znázorněna na obr. 30



Obr.30

Ionty vzniklé velmi krátkým pulsem ionizujících elektronů (např. 0,2 μ s, 500 μ A) jsou s malým volitelným zpožděním krátkým pulsem řídicí mřížky vypuštěny do urychlovacího pole U a se získanou energií postupují analyzátozem rychlostí v , takže dráhu d proletí za dobu t :

$$v = \left(\frac{2zeU}{m} \right)^{1/2} \quad t = d \left(\frac{m}{2zeU} \right)^{1/2}$$

mezi dvěma ionty rozdílných hmotností je tedy diference v dobách letu $\Delta t = k(\sqrt{m_1/z} - \sqrt{m_2/z})$. Jako detektoru se obvykle

používá magnetického násobiče iontů spojeného se širokopásmovým vř zesilovačem (0 až 500 MHz), takže lze s malým zkreslením registrovat dopady jednotlivých "balíčků" iontů, oddělených podle m/z , v časech od μ s do několika set μ s. Ionizační pulsy se mohou opakovat s frekvencí až kHz. Jestliže se synchronizuje časová základna oscilografu s impulsy iontového zdroje a ve svislém směru je paprsek odchylován náboji jednotlivých iontových druhů, získá se stacionární obraz hmotnostního spektra, v němž lze sledovat rychle probíhající změny.

požadavku se pak řešení spojení kapilárních vysoceúčinných kolon s iontovým zdrojem čerpaným výkonným systémem ukázalo technicky jako mnohem méně náročné než původní napojení kolon plněných s různými obohacovači.

10.1.1 GC/MS spojení prostřednictvím "separátorů nosného plynu".

Vývoji separátorů nosného plynu bylo věnováno značné úsilí během šedesátých a sedmdesátých let. Jejich cílem je zvýšit poměr množství látky k množství nosného plynu a celkové množství látek vstupujících do MS přizpůsobit pracovnímu tlaku MS. Separátory jsou určeny pro napojení plněných kolon s průtoky nosného plynu od 20 ml/min výše. Byl vyvinut značný počet nejruznějších typů separátorů, které lze na základě fyzikálních principů separace rozdělit do tří kategorií:

- 1) separace na principu přednostní efuze nebo difuze nosného plynu jemnými pory nebo malým otvorem (šěrbinou) do prostoru sníženého tlaku
- 2) separace na principu přednostní difuze vzorku polopropustnou polymerní membránou (silikonovou)
- 3) separace na principu supersonické frakcionace molekul nosného plynu od molekul vzorku po průchodu tryskou do prostoru sníženého tlaku (separátory tryskové).

Kvalita separátorů je charakterizována jednak jejich obohacovacím faktorem E a jednak jejich výtěžností Y (někdy též označovanou jako účinnost).

Obohacovací faktor E je definován jako poměr koncentrace látky v nosném plynu za separátorem při vstupu do MS a koncentrace před separátorem při výstupu z GC

$$E = c_{MS}/c_{GC}$$

Výtěžnost Y je definována jako poměr množství látky vstupujícího do MS k množství látky před separátorem

$$Y = (Q_{MS}/Q_{GC}) \cdot 100 \quad [\%]$$

Je-li V_{GC} objemový průtok nosného plynu před separátorem a V_{MS} objemový průtok plynu vstupujícího do MS, lze vyjádřit vztah mezi obohacením a výtěžností rovnicí

$$E = \frac{Y}{100} \cdot \frac{V_{GC}}{V_{MS}}$$

Z nejruznějších typů a konstrukcí separátorů nacházejí v současné době uplatnění pouze Gohlkeho separátory (obr. 32). Jsou to jednostupňové celoskleněné tryskové separátory zahřívané na teplotu 200 - 250°C. Ostatní typy separátorů mají pouze historický význam. Dokonce i použití Gohlkeho separátorů je dnes značně omezené vzhledem k stále častějšímu používání kapilárních kolon a díky praktičtějším způsobům napojení bez separátorů, jako je např. otevřené napojení.

10.1.2 Otevřené napojení

Při této technice je množství plynů odebírané hmotnostním spektrometrem určováno kapilárním omezovačem (restrikto-rem), jehož vodivost je přizpůsobena potřebnému pracovnímu tlaku v iontovém zdroji. Při použití plněných kolon a otevřeného napojení je hmotnostním spektrometrem analyzována pouze část plynů z kolony (kapilára omezovače se zavádí do výstupu plněné kolony), zpravidla 1/10 celkového průtoku kolonou. Takové spojení s plněnými kolonami má sice ve srovnání se separátory několikanásobně nižší výtěžnost, která však s ohledem na vyšší nástřiky u plněných kolon a značné citlivosti současných MS není kritickým faktorem. Otevřené napojení v tomto případě slouží jako dělič (splitter).

Otevřené napojení bývá rovněž často používáno pro kapilární kolony. V tomto případě (obr. 33) je konec kapilární kolony umístěn těsně před vstup kapilárního omezovače tak, že přes oba konce kapilár je převlečena skleněná kapilára o vnitřním průměru jen o málo větším než je vnější průměr kapilár kolony a omezovače. Napojení je oplachováno proudem helia a tím je zamezeno případné prisávání vzduchu do vstupu k iontovému zdroji. Průtok nosného plynu (helia) kapilární kolonou je možné nastavit tak, aby odpovídal optimálním pracovním podmínkám dané kolony bez ohledu na průtokové požadavky MS. V ideálním případě, je-li průtok kolonou V_{GC} roven objemovému

průtoku do MS určenému parametry omezovače (V_{MS}), je výtěžek 100 % a obohacení $E = 1$. Je-li $V_{GC} > V_{MS}$, je výtěžek $Y < 100\%$ a obohacení $E = 1$; otevřené spojení pracuje jako dělič. Je-li $V_{GC} < V_{MS}$, nastává ve spojení zředování heliem, výtěžek $Y = 100\%$, avšak obohacení $E < 1$.

10.1.3 Přímé spojení

Kromě otevřeného spojení se v případě kapilárních kolon používá spojení přímé (obr. 34), kdy konec kapilární kolony je přímo zaveden do iontového zdroje MS a ústí v bezprostřední blízkosti proudu elektronů. Je to nejjednodušší způsob GC/MS spojení, který pouze vyžaduje, aby čerpací schopnost vakuového systému MS byla dostatečná pro zajištění pracovního tlaku v iontovém zdroji.

Jako nosný plyn se při GC/MS spojení užívá zásadně helium i když leckdy z důvodů spíše historických. Původně bylo třeba, aby nosný plyn splňoval dva požadavky: aby měl velký difuzní koeficient a vysoký ionizační potenciál (> 20 eV). Velký difuzní koeficient plynů je nutný pro všechny druhy separátorů s výjimkou separátorů membránových. Požadavky na ionizační potenciál větší než 20 eV souvisely s původními konstrukcemi, kdy chromatografický záznam byl získáván měřením celkového iontového proudu při energii elektronů 20 eV tak, aby všechny organické látky byly elektronovým nárazem ionizovány a zároveň aby se změny tlaku nosného plynu na záznamu celkového iontového proudu neprojevovaly (požadavek, aby molekuly nosného plynu ionizovány nebyly).

U současných GC/MS systémů, kde výběr iontů pro celkový iontový proud (chromatografický záznam) je volitelný počítačem, vysoký ionizační potenciál nosného plynu není nutný. Výhoda helia tedy spočívá především v jeho vysokém difuzním koeficientu.

Rovněž při GC/MS s chemickou ionizací (CI) se převážně používá jako nosný plyn helium a reakční plyn (methan, isobutan, čpavek) je do ionizační komůrky přiváděn nezávislým přívodem, i když původně byl jako nosný plyn a současně reakční plyn methan používán.

GC/MS kombinace patří dnes ke standardnímu vybavení prakticky všech kvadrupolových a sektorových přístrojů určených pro organickou analýzu. V poslední době byl vyřešen i problém kombinace GC s MS na principu iontové cyklotronové resonance (ICR) s Fourierovou transformací (GC-FTMS), který spočívá v nutnosti zachování vysokého vakua v MS části systému. Problém se řeší dvěma způsoby: Buď je použito dvojité cely uvnitř pole supravodičového magnetu, kdy jedna část slouží k ionizaci a druhá - oddělená - jako analyzátor, nebo je použito externího iontového zdroje, z něhož jsou ionty bez předchozí selekce přiváděny do ICR cely.

10.2 Superkritická fluidní chromatografie kombinovaná s hmotnostní spektrometrií (SFC/MS)

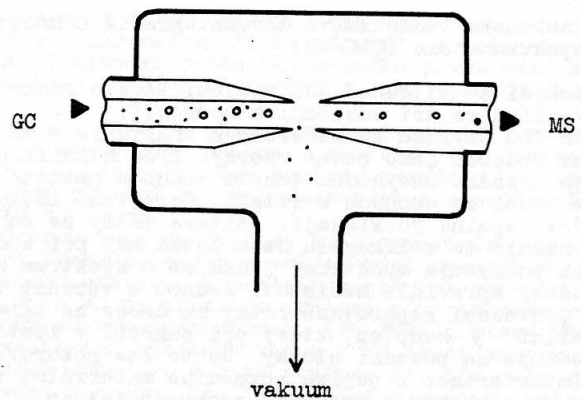
SFC má některé vlastnosti plynové a kapalinové chromatografie současně. Mobilní fáze je superkritickým fluidem, jehož hustota se blíží více kapalině než plynu, z hlediska viskozity je však více plynem. Dělicí schopnost je tedy podstatně více (podobně jako u kapalinové chromatografie) ovlivněna vlastnostmi mobilní fáze.

Spojení SFC/MS bylo vyvinuto teprve nedávno a i když je podobné GC/MS spojení, musí být při něm vyhověno řadě specifických požadavků. Tlakový spád je značně vyšší než při běžném GC/MS spojení. Superkritické podmínky musí být udržovány na koloně až do posledních okamžiků před přechodem od vysokých tlaků k vakuu iontového zdroje. Z těchto důvodů se příliš neosvědčily původní omezovače v podobě clonky s jemným otvorem (1 μm). V současné době jsou používány omezovače kapilární buď s kapilárou kovovou (Pt nebo Pt/Ir), jejíž konec je deformován, nebo s křemennou kapilárou s koncem vytaženým na vnitřní průměr 2 - 10 μm . Aby při expansi nedocházelo k podchlazování a rovněž z důvodů rozrušování vznikajících asociátů následkem solvatace, musí být omezovač zahříván na teplotu 200 - 450° C.

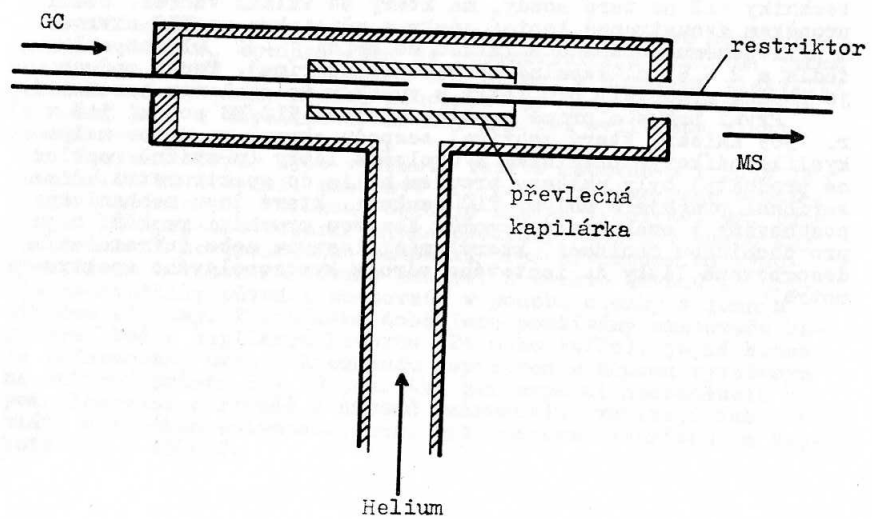
10.3 Kombinace tenkovrstvé chromatografie a hmotnostní spektrometrie (TLC/MS)

Nejběžnější a nejjednodušší spojení těchto technik je off-line. Využívá se tři základních možností:

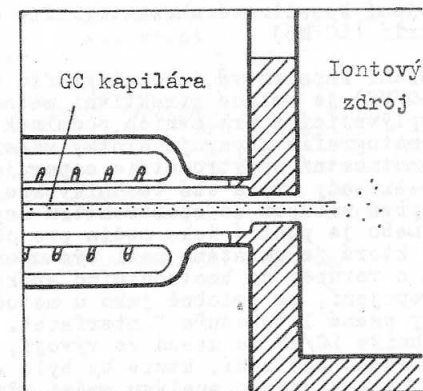
- 1) Sorbent s TLC skvrnou se seškrabe a analyzuje v MS přímým vstupem obdobně jako pevné vzorky. Přes zdánlivou jednoduchost je zásadní nevýhodou tohoto způsobu omezená tepelná desorpce látek ze suchých sorbentů. Sorbované látky se většinou dříve tepelně rozkládají. Některé látky se za normálního tlaku nedají ze silikagelu desorbovat ani při 600 °C. Pokud vzorek poskytuje spektrum, jedná se o spektrum málo polárních složek, zpravidla nečistot. Jednou z variant tohoto postupu je převedení separované látky na desce na barevný a tepelně labilní F^- komplex, který při zahřátí v iontovém zdroji disociuje na původní složky. Často lze pozorovat ve spektrech interference z pojiva sorpčního materiálu, z látek zachycených na sorbentu z ovzduší, rozpouštědel ap.
 - 2) Látka se po seškrábání sorbentu extrahuje vhodným rozpouštědlem a po odpaření se analyzuje přímým vstupem. Nevýhodou je pracnost, zdlouhavost a interference stopových nečistot nakoncentrovaných při odpaření rozpouštědla.
 - 3) Pro získání spektra se používá speciálních MS technik. Extrakt ze skvrny se např. elektrostaticky nanese na hliníkovou folii a analyzuje se pomocí ionizace ^{252}Cf PD, nebo se spektrum získává přímo z desky technikou SIMS. Při použití techniky FAB se terč sondy, na který se vkládá vzorek, obalí proužkem dvoustranně lepící pásky a přitiskne na TLC skvrnu. K přilepenému sorbentu s látkou se přidá 1 - 2 μl rozpouštědla a 2 - 5 μl kapalně matrice (glycerínu). Tento způsob je vhodný především pro látky s vysokou molekulovou hmotností.
- První pokus o přímé on-line spojení TLC/MS popsal již v r. 1969 Kaiser, který zahříval zespodu skvrny na desce malým kyslíkovodíkovým plamínkem a uvolněné látky (převážně rozkladné produkty) byly unášeny proudem helia do spektrometru. Jiné zařízení pracuje s malými TLC deskami, které jsou mechanicky posouvány v evakuované komoře. Komořou prochází reakční plyn pro chemickou ionizaci, který unáší laserem nebo infrazářením desorbované látky do iontového zdroje kvadrupolového spektrometru.



Obr. 32. Tryskový separátor



Obr. 33. Otevřené napojení



Obr. 34. Přímé napojení

11. Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC/MS)

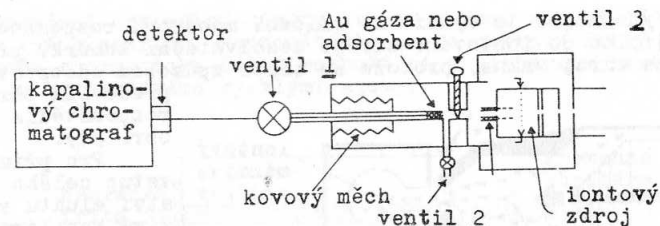
Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC/MS) je velice atraktivní metoda, která má však úskalí vyplývající z pracovních podmínek obou metod. Kapalinová chromatografie separuje složky směsi v proudu kapaliny, zatímco hmotnostní spektrometrie separuje ionty ve vysokém vakuu. Je-li tedy třeba obě techniky spojit, je nutné nosné kapaliny před vstupem do spektrometru aspon z větší části odstranit, nebo je použít jako media pro chemickou ionizaci. Zařízení, které je umístěno mezi výstupem kapalinového chromatografu a vstupem do hmotnostního spektrometru a umožňuje jejich propojení, se podobně jako u metody GC/MS označuje v anglicky psané literatuře "interface".

Technika LC/MS je dosud ve vývoji, protože stále ještě nebylo nalezeno zařízení, které by bylo zcela univerzální, tj. které by umožňovalo analýzu směsí různých typů organických látek za použití různých ionizačních technik. Tato skutečnost vede k tomu, že se stále objevují nové způsoby spojení LC/MS nebo jejich úpravy.

V následujícím stručném přehledu jsou uvedeny základní způsoby spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií, přičemž je zvýšená pozornost věnována komerčně vyráběným zařízením a perspektivním technikám.

11.1 Přerušované dávkování

Při přerušovaném dávkování, jednom ze starších způsobů spojení LC/MS (viz obr. 35), je vzorek v eluovaném rozpouštědle shromažďován v malém rezervoáru a pneumatickým ventilem 1. Těsně před dávkováním se otevře ventil 2 k vakuu rotační pumpy, čímž se evakuuje dávkovací kapilára, na jejímž konci je zlatá gáza nebo adsorbent. Po 5 sekundách se otevře ventil 1 a vzorek je vakuem vtažen do smotku zlaté gázy nebo sorbentu. Zde dojde k bleskovému odpaření rozpouštědla, které je umožněno zahřátím na teplotu 70 až 125°C (teplota se volí podle těkavosti rozpouštědla). Jakmile je vzorek shromážděn ve zlaté gáze nebo sorbentu, uzavře se ventil 1, otevře se ventil vysokého vakuu 3 a kapilára se vzorkem se zasune do iontového zdroje. Celá operace trvá 3 až 5 minut, takže je zřejmé, že techniku nelze použít pro analýzu směsí, při níž se jednotlivé složky eluují v krátkém sledu za sebou. Uvedená metoda je ovšem pozoruhodná tím, že je jednou z mála technik, které umožňují při spojení LC/MS ionizaci látek nárazem elektronu.

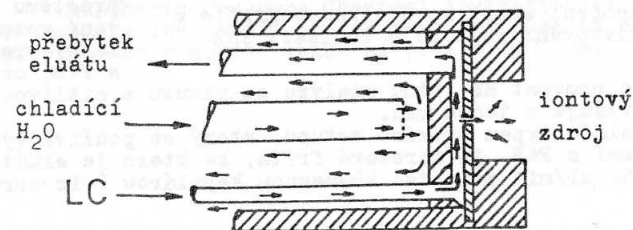


Obr. 35. Systém přerušovaného dávkování

11.2 Přímý vstup eluátu

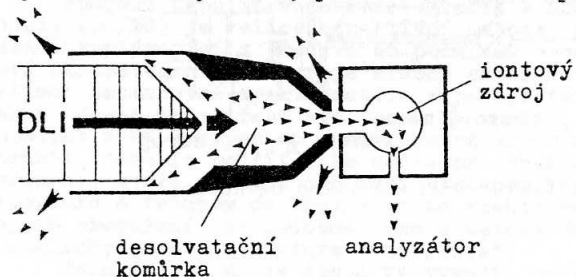
Použití přímého vstupu eluátu (DLI - Direct Liquid Introduction) do hmotnostního spektrometru je metoda dosti rozšířená, i když je známa zejména v různých místních úpravách ("home-made interface"), protože není většinou technicky náročná. K ionizaci slouží především chemická ionizace, která je schopna přijímat přímý vstup par roztoku do iontového zdroje při průtoku 5 až 50 μ l roztoku za minutu, přičemž se páry nosného média používají přímo jako reakční plyn, nebo se organické látky ionizují bombardováním rychlými atomy (FAB - Fast Atom Bombardment).

Obecně rozeznáváme spojení se splitrem (děličem) nebo bez splitru. Spojení se splitrem se používá pro konvenční chromatografii s průtokem kolem 1 - 2 ml/min a spojení bez splitru pro mikrochromatografii. Při práci se splitrem je možno rozdělit tok kapaliny již na výstupu z chromatografické kolony nebo odčerpat část par v desolvatační komůrce umístěné mezi chromatografickou kolonu a iontový zdroj. Dělení toku kapaliny je starší způsob a ztrácí se při něm citlivost, protože se využívá jenom menší část eluátu, který vstupuje velmi malým otvorem (průměr 5 - 15 μ m) do iontového zdroje (viz obr. 36). Eluát je nutno chladit vodou, aby nedocházelo k odpařování kapaliny u otvoru do iontového zdroje a tím k jeho ucpávání vzorkem.



Obr. 36. Přímé spojení za použití splitru eluátu

Výhodnější je využít ke snížení množství rozpouštědla vstupujícího do iontového zdroje desolvatační komůrku připojenou na zdroj vakua, protože se tímto způsobem odčerpávají především páry rozpouštědla (viz obr. 37).

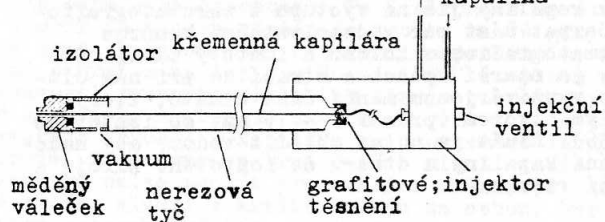


Obr. 37. Přímé spojení s odčerpáváním par rozpouštědla

trubičkou oddělenou od iontového zdroje tryskou. V desolvatační komůrce se rozpouštědlo zcela odpaří, čímž se zajistí rovnoměrný tok jeho par unášejících rozptýlené částičky vzorku do iontového zdroje. Při kapilárním spojení za následného využití chemické ionizace je třeba kapiláru zahřívát, protože jinak dochází v iontovém zdroji ke značnému kolísání tlaku, které je způsobeno vnikáním kapiček rozpouštědla do zdroje.

Přímé nevyhřívávané kapilární spojení LC/MS bylo v poslední době použito pro ionizaci bombardováním rychlými atomy a je komerčně vyráběno pod označením Continuos Flow FAB (viz obr. 38). Eluát (voda nebo směs voda-organické

obsahující 5-10% glycerinu) je při průtoku 2 - 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ přiváděn křemennou kapilárou do středu měděného válečku, kam dopadá svazek rychlých atomů. Systém lze použít bez chromatografické kolony k prostému dávkování rozpuštěné látky pro měření s FAB, což údajně



Obr. 38. Spojení kapalinové chromatografie a dávkování roztoků s ionizací FAB

umožňuje provést až jednu analýzu za minutu a citlivost měření se zvyšuje o jeden řád.

Dalším typem přímého vstupu, který se používá výhradně ve spojení s FAB, je nerezová fritka, ke které je eluát o průtoku 0,52 $\mu\text{l}/\text{min}$ přiváděn křemennou kapilárou (viz obr.39).

Pro přímý vstup celého množství eluátu se používá kapilární spojení, nebo se mezi výstup chromatografické kolony a iontový zdroj zařazuje nečerpaná desolvatační komůrka, jež je v nejjednodušším případě tvořena vyhřívanou

trubičkou oddělenou od iontového zdroje tryskou. V desolvatační komůrce se rozpouštědlo zcela odpaří, čímž se zajistí rovnoměrný tok jeho par unášejících rozptýlené částičky vzorku do iontového zdroje. Při kapilárním spojení za následného využití chemické ionizace je třeba kapiláru zahřívát, protože jinak dochází v iontovém zdroji ke značnému kolísání tlaku, které je způsobeno vnikáním kapiček rozpouštědla do zdroje.

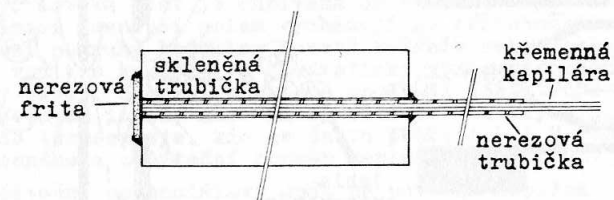
Přímé nevyhřívávané kapilární spojení LC/MS bylo v poslední době použito pro ionizaci bombardováním rychlými atomy a je komerčně vyráběno pod označením Continuos Flow FAB (viz obr. 38). Eluát (voda nebo směs voda-organické

obsahující 5-10% glycerinu) je při průtoku 2 - 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ přiváděn křemennou kapilárou do středu měděného válečku, kam dopadá svazek rychlých atomů. Systém lze použít bez chromatografické kolony k prostému dávkování rozpuštěné látky pro měření s FAB, což údajně

umožňuje provést až jednu analýzu za minutu a citlivost měření se zvyšuje o jeden řád.

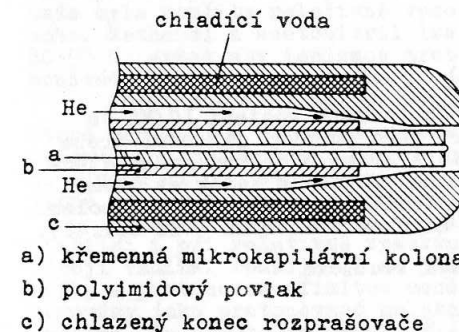
Dalším typem přímého vstupu, který se používá výhradně ve spojení s FAB, je nerezová fritka, ke které je eluát o průtoku 0,52 $\mu\text{l}/\text{min}$ přiváděn křemennou kapilárou (viz obr.39).

K dosažení optimální citlivosti je třeba, aby eluát obsahoval 15% glycerinu. Rozpouštědlo se na povrchu frity okamžitě odpaří a organická látka rozpuštěná v glycerinu (matrice) je potom bombardována rychlými atomy.



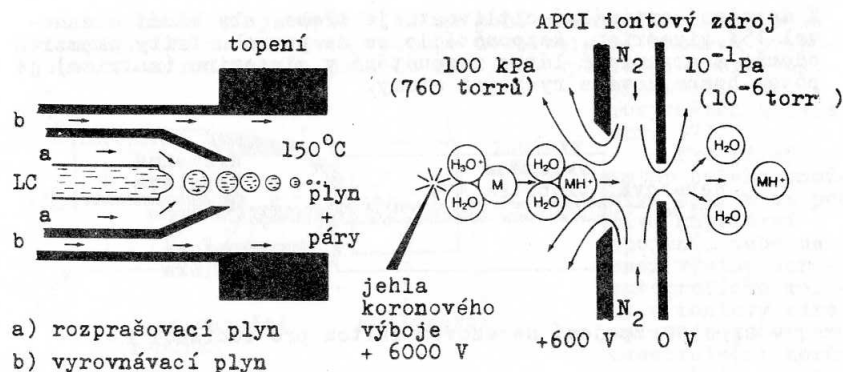
Obr. 39. Spojení nerezovou fritou pro ionizaci FAB

Pneumatický rozprašovač (nebulizer) patří svým způsobem také k přímým systémům spojení LC/MS a je založen na axiálním přívodu tlakového plynu k výstupu chromatografické kolony (viz obr. 40). Princip rozprašovače spočívá v rozprašení kapaliny na kapičky a následné úplné desolvaci. Aby se zabránilo odpařování rozpouštědla ve výstupu z chromatografické kolony a zajistilo rozprašení, je rozprašovač chlazen vodou. Výstup z rozprašovače může být připojen přímo k iontovému zdroji pro chemickou ionizaci anebo je součástí tryskového separátoru (viz GC/MS technika), kde se z



Obr. 40. Rozprašovač

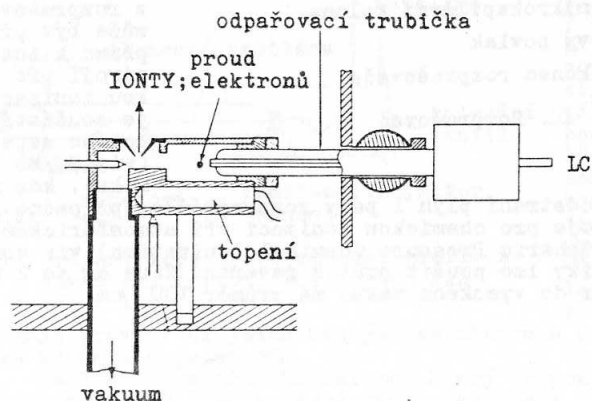
větší části odstraní plyn i páry rozpouštědla, případně je zaveden do zdroje pro chemickou ionizaci při atmosférickém tlaku (APCI - Atmospheric Pressure Chemical Ionization)(viz obr.41). U této techniky lze použít průtok reverzní fáze až do 2 ml/min. Vstupní otvor do vysokého vakua má průměr 100 μm .



Obr. 41. Spojení zahříváného pneumatického rozprašovače s chemickou ionizací při atmosférickém tlaku

11.3 Termosprej

Jednou z nejpoužívanějších technik spojení LC/MS je v poslední době termosprej. Při jeho použití již není třeba samostatný iontový zdroj, protože kromě oddělení rozpouštědla dochází v něm i k ionizaci analyzovaných látek až třemi současně probíhajícími způsoby ionizace, a to desorpcí polem, chemickou ionizací a ionizací nárazem elektronu (viz obr.42).



Obr. 42. Termosprej

Termosprej může být charakterizován jako tvorba nadzvukového proudu par, které obsahují drobné kapičky a pevné částice. Nadzvukový proud se vytváří při prudkém odpařování eluátu v kovové trubičce, připojené k výstupní části chromatografické kolony. Kovová část je ohřívána na vysokou teplotu. Úvahy o ionizaci desorpcí polem vycházejí ze skutečnosti, že při porušení povrchu kapaliny rozstříkáním nebo probubláváním nesou vzniklé kapičky ve statisticky významném množství elektrický náboj. U kapalin, které obsahují dostatečné množství rozpouštěných iontů, nese náboj většina vzniklých kapiček. V případě termosproje, kde se často používá 0,1 M roztoku octanu amonného a počáteční rozměr kapiček je řádově 1 μm a méně,

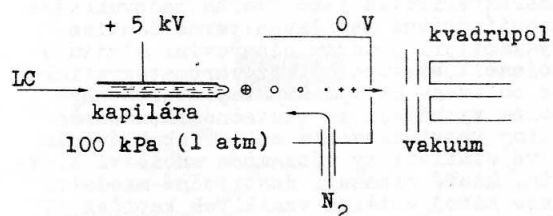
je počáteční potenciálový spád na povrchu kapiček 10^7 V/m a s odpařováním kapiček rychle vzrůstá. Při dostatečně vysokém povrchovém náboji vypařování iontů nebo jejich shluků (clusters) termodynamicky konkuruje vypařování neutrálních částic. Bylo zjištěno, že přímé vypařování iontů probíhá u libovolných molekul, bez ohledu na jejich velikost, pokud jsou ovšem přítomny ve vodném roztoku již ve formě kladných nebo záporných iontů. Popsaný ionizační mechanismus nebyl pozorován u takových rozpouštědel jako jsou methanol a acetonitril, třebaže byla použita relativně vysoká koncentrace octanu amonného. Methanol a acetonitril lze použít až do koncentrace 80-90 %, avšak aby ionizace proběhla úspěšně, musí směs rozpouštědel obsahovat nejméně 10 % vody.

Chemickou ionizaci u termosproje způsobují ionty NH_4^+ , které vznikají z octanu amonného a reagují v plynné fázi s neutrálními molekulami. Roztok octanu amonného se přidává do eluátu až po jeho výstupu z chromatografické kolony, tj. těsně před vstupem do termosproje.

Technika termosproje vyžaduje, aby vzniklé ionty byly stabilní i při relativně vysokém tlaku, který v iontovém zdroji vzniká. Použije-li se jako pufr octan amonný, potom látky s protonovou afinitou menší než má amoniak nebudou pozorovány jako protonované molekuly, ačkoliv jsou dostatečně polární. Za těchto podmínek také mnoho relativně nepolárních molekul neposkytuje detegovatelné pozitivní ionty. Tato nevýhoda vlastního termosproje může být částečně překlenuta třetím způsobem ionizace, tj. použitím katody, která emituje ionizující elektrony. Katoda bývá umístěna mezi vstupním otvorem do analyzátorové části spektrometru a výstupním otvorem odpařovací termosprejové trubičky. Současné uplatnění všech tří ionizačních způsobů umožňuje využít termosprej pro řadu mobilních fází a v širokém rozmezí průtoků.

11.4 Elektrosprej

Při použití elektrospreje jsou kapičky roztoku vystříkovány proti proudu dusíku, který je při atmosférickém tlaku, přičemž je vloženo vysoké napětí mezi výstupní kapiláru

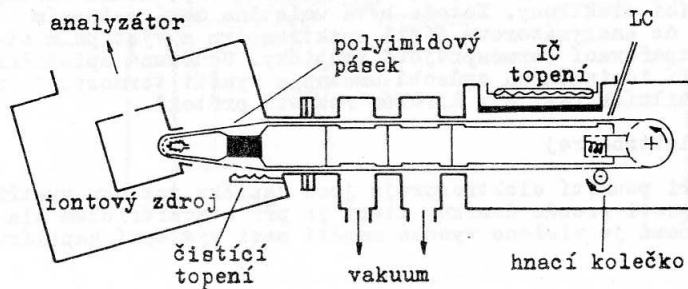


Obr. 43. Elektrosprej

ří proudem dusíku a vzniklé ionty vzorku jsou vtahovány do hmotnostního spektrometru. Tím, že není systém tepelně závislý, nedochází v něm degradaci tepelně citlivých látek. Obvykle používané průtoky jsou 5 až 15 $\mu\text{l}/\text{min}$.

11.5 Pohybující se pás

Systém pohybující se pásu (moving belt) ve formě uzavřené smyčky, kterou se dopravuje vzorek k iontovému zdroji, prošel ve svém vývoji několika stadii. Nejprve byla navržena smyčka z drátu, který byl protahován vaničkou s eluátem. Ze zachyceného roztoku se při průchodu dvěma komůrkami s diferenciálním čerpáním odstranilo rozpouštědlo a látka byla při přiblížení k otvoru do iontového zdroje odpařena zahřátím drátu. Tento způsob byl málo účinný, protože se využilo asi jenom 1 % eluátu. Z toho důvodu byl v další etapě vývoje drát nahrazen kovovým páskem o šířce 3,2 mm. Eluát se na pásek přikapával, rozpouštědlo se odtranovalo zahřátím a odčerpáváním par roztoku. K vypaření vzorku do iontového zdroje došlo opět zahřátím pásku. Použití obou systémů, tj. drátu a kovového pásku, bylo omezeno jen na tepelně stabilní látky, které bylo možno zahřátím do iontového zdroje vypařit. K výraznému zlepšení celého systému došlo náhradou kovového pásku polyimidovým a zúžením jedné části uzavřené smyčky, takže mohla být zasunuta přímo do iontového zdroje (viz obr. 44).

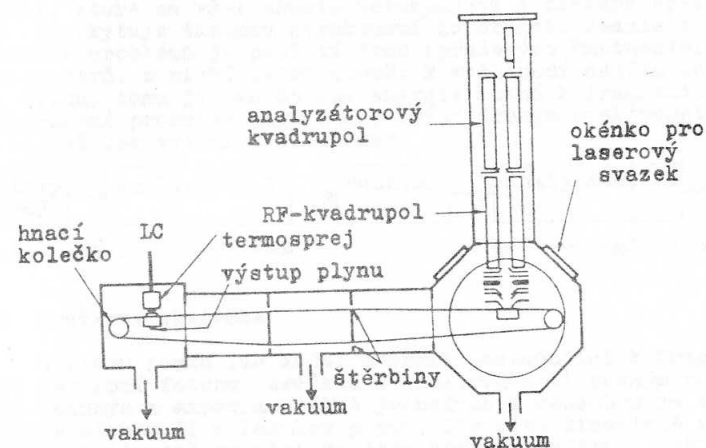


Obr. 44. Pohybující se pás

Eluát se nanáší šikmo umístěnou tryskou spreje, rozpouštědlo se odstraní zahřátím infračervenými paprsky a čerpáním a analyzované látky se ionizují nárazem elektronu, chemickou ionizací s možností libovolného výběru reakčního plynu nebo dokonce ionizací bombardováním rychlými atomy.

Možností použít tři způsoby ionizace je pohybující se pás zatím nejuniverzálnější systém spojení LC/MS. Chemická ionizace nebo ionizace rychlými atomy umožní zjistit velikost studovaných molekul a ionizace nárazem elektronu poskytne fragmentové ionty, jejichž studiem se získají informace o struktuře látky.

Renezance používání kovového pohybujícího se pásu byla zaznamenána při spojení LC/MS s desorpcí iontů pulsním laserem (viz obr. 45). Vzorek byl z chromatografické kolony nanášen na pásek termosprejem a k separaci iontů byl použit kvadrupólový analyzátor.



Obr. 45 Spojení kovového pohybujícího se pásu s desorpcí laserem

Hlavní nevýhoda systému spočívá v nutnosti ukončit chromatografickou separaci do doby jedné otočky pásu (obvykle 5 - 10 min), protože jinak dojde k překrývání vzorků. Na systému automatického čištění pásu se pracuje.

11.6 Závěr

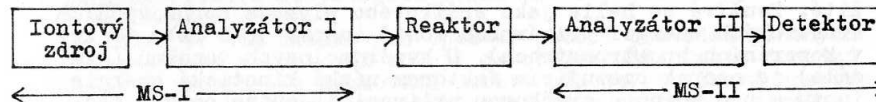
Žádný z uvedených systémů není ideální, každý má své výhody a nevýhody, jejichž podrobný rozbor přesahuje rámec tohoto výkladu. Ze současného pohledu se zdají nejuniverzálnějšími pohybující se pás a termosprej. Nedostatkem pohybujícího se pásu je zatím nedokonalé spojení s ionizací FAB, jež dosud nebylo propracováno pro všechny typy sloučenin. Jde zejména o otázku použití kapalné matrice. Bez matrice je citlivost měření nižší a po přidání matrice do eluátu vzniká problém s čištěním pásu.

Termosprej lze teoreticky použít pro libovolnou látku bez ohledu na velikost její molekuly, ale zatím nelze vždy předpovědět, zda vznikne detegovatelný počet iontů. Problémem také zůstává ucpávání odpařovací trubičky.

12. Tandemová hmotnostní spektrometrie

12.1 Úvod

Klasická hmotnostní spektrometrie, založená na záznamu iontových proudů o daném poměru m/z , může přinést přímé informace o elementárním složení iontů. Strukturální informace se však získávají pouze nepřímo na základě reakcí iontů, které vedou k typickým fragmentům nebo jejich řadám. Velmi často je žádoucí získat strukturální informaci o některém ze stálých fragmentů, jenž se však dále nerozpadá nebo jehož další rozpad lze ve spektru těžko vystopovat. Ještě horší situace nastává při analýze složitých směsí, kde se spektra jednotlivých složek překrývají a navzájem vytvářejí jakýsi chemický šum. Na druhé straně rozvoj ionizačních technik umožňuje získávat $(M + H)^+$, $(M + Na)^+$ či $(M + K)^+$ ionty ze složitých molekul, které se však zhusta nerozpadají a získané spektrum opět neposkytuje žádanou strukturální informaci. Jedním z řešení těchto problémů je použití dvou sprážených hmotnostních spektrometrů, z nichž jeden slouží k vyčlenění daného iontového druhu, tomu je pak dodána energie nutná k fragmentaci, a sekundární produkty jsou analyzovány druhým spektrometrem (12.1) což lze vyjádřit schématem:



12.2 Srážková aktivace

Stálému iontu lze dodat energii postačující k fragmentaci např. absorpcí fotonu, srážkou s elektronem či pevným povrchem. Velmi účinným a experimentálně jednoduchým způsobem je však srážka s atomem či molekulou plynu, kdy část kinetické energie projektilu (iontu) se mění na jeho energii vnitřní. Takto vzbuzený ion se pak rozpadá monomolekulárními reakcemi. Při srážkách iontů s molekulami dochází obecně k několika dějům. Elastickým rozptylem a neutralizací přenosem náboje se ztrácí podstatný podíl primárních iontů. Pro samotnou fragmentaci vyvolanou srážkou je rozhodující množství vnitřní energie přeměněné z kinetické energie iontu v důsledku srážky. Excitační energie je shora omezena vztahem (12.1)

$$E_{\text{exc}} \leq T_{\text{CM}} = T_{\text{LAB}} \frac{m_{\text{terč}}}{m_{\text{ion}} + m_{\text{terč}}} \quad (12.1)$$

kde E_{exc} je deponovaná energie, T_{CM} je kinetická energie v těžištvé soustavě souřadnic, T_{LAB} je kinetická energie iontu v

laboratorním systému souřadnic a m_{ion} , $m_{terč}$ jsou příslušné

hmotnosti srážejících se částic.

Ze vztahu (12.1) je patrné, že konverze energie je málo účinná pro lehké terčové atomy a molekuly a že účinnost klesá s rostoucí hmotností iontu. Např. mateřské ionty o kinetické energii 5 keV mohou při srážce s atomem helia ($m_{terč} = 4$) získat nejvýše 192 eV pro $m_{ion} = 100$ a 19.9 eV pro $m_{ion} = 1000$. Na druhé straně hlavní konkurenční procesy, elastický rozptyl a neutralizace, závisí rovněž na vlastnostech terče. Srážkový průřez pro elastický rozptyl je dán vztahem (12.2)

$$\sigma_e = \pi a_e^2 (Z_1 Z_2 e^2 / hv)^2 \quad (12.2)$$

kde a_e je tzv. stínící poloměr, Z_1 , Z_2 jsou náboje jader srážejících se species, e je náboj elektronu, h je Planckova konstanta a v je rychlost iontu (12.2). Elastický rozptyl je tedy účinnější pro větší terčové molekuly, ale klesá s rostoucí rychlostí iontů.

Výběr optimálního srážkového plynu závisí na uspořádání experimentu, především na typu analyzátoru v MS-III. Sektorové analyzátoři obecně přijímají ionty ve velmi malém vstupním úhlu, takže potlačení elastického rozptylu je zde velmi důležité. Používá se helia jako srážkového plynu a co nejvyšších kinetických energií primárních iontů (např. 5, 8 nebo 10 keV v komerčních spektrometrech). U kvadrupolových tandemů (viz dále) je naopak omezujícím faktorem nízká kinetická energie iontu a pro účinnou srážkovou aktivaci je nutné použít těžších plynů, např. N_2 , vzduch, Ar apod. Srážkové procesy

při nízké a vysoké kinetické energii iontů se podstatně liší jak svou povahou tak experimentálním uspořádáním, a je proto výhodné je probrat odděleně.

12.3 Srážkou vyvolané rozpady rychlých iontů

Ionty o kinetické energii řádu keV se aktivují letmou srážkou s terčovým atomem, většinou atomem helia. Doba excitace závisí na velikosti iontu a jeho kinetické energii. Např. pro ionty o m/z 16-1000 a kinetické energie v rozmezí 3-10 keV se doba excitace pohybuje mezi $2 \cdot 10^{-13}$ až $6 \cdot 10^{-16}$ s. Distribuce vnitřní energie po srážce se dá vyjádřit hladkou funkcí s jedním maximem a poměrně dlouhým chvostem do oblasti vyšších energií. Poloha maxima závisí na hmotnosti iontu a jeho kinetické energii podle přibližného vztahu (12.3)

$$E_{max} = (h/a) \cdot (2eT_{LAB}/m)^{1/2} \quad (12.3)$$

kde a je vzdálenost, na kterou dochází k interakci, a ostatní veličiny mají obvyklý význam. Pro odhadnutou interakční vzdá-

vzdálenost 40 nm, a $T_{LAB} = 8$ keV dává vztah (12.3) nejpravděpodobnější přenos energie 2,5 eV pro ion o m/z 25, zatímco pro m/z 1000 je to jen 0,4 eV. Excitované ionty, které se rozpadnou ještě před vstupem do analyzátoru MS-II poskytují detegovatelné sekundární fragmenty. Doba pro fragmentaci opět závisí na rychlosti iontů a geometrii přístroje a pohybuje se řádově v 10^{-7} - 10^{-6} s. Časové a energetické podmínky při srážkové aktivaci rychlých iontů jsou kvalitativně podobné podmínkám při ionizaci molekul nárazem elektronu, takže srážková spektra radikálových iontů se často kvalitativně podobají klasickým hmotnostním spektrům.

Velmi důležitým rysem srážkových spekter je to, že nezávisí podstatně na obsahu vnitřní energie mateřského iontu ani na jeho kinetické energii. Mateřské ionty o stejné struktuře, ale rozdílném původu, tedy poskytují velmi podobná srážková spektra. To umožňuje srovnávat spektra neznámých iontů se standardy a identifikovat tak jejich strukturu. Citlivost srážkových spekter na malé změny struktury je v průměru podobná jako u klasických spekter získaných ionizací nárazem elektronu. V některých případech napomáhá identifikaci přítomnost a relativní zastoupení dvakrát nabitých iontů vznikajících při srážce odtržením dalšího elektronu z primárního iontu. Tato tzv. charge-stripping spektra se většinou získávají s použitím kyslíku jako srážkového plynu.

Interpretace srážkových spekter pomocí pravidel platných pro fragmentace v iontovém zdroji je obtížnější. Často dochází k porušení pravidla o zachování parity náboje. Srážková spektra často obsahují posloupnosti iontů vzniklých postupnou ztrátou vodíkových atomů, takže např. fragmentace doprovázené přenosy vodíku jsou obtížně rozpoznatelné.

Zásadním nedostatkem srážkových spekter je isomerizace mateřských iontů během doby jejich vyčlenění v MS-I. To je zvláště výrazné u iontů se sudým počtem elektronů, které mají často snahu přejít na nejstálejší strukturu, čímž se smazávají rozdíly mezi isomery.

12.4 Uspořádání sektorových tandemových spektrometrů

Tandemové spektrometry lze konstruovat již pomocí dvou sektorových analyzátorů. V uspořádání BE (MS-I je magnetický analyzátor B, MS-II je elektrostatický analyzátor E) je srážková komůrka umístěna buď v prostoru mezi sektory (B-*E), nebo v tzv. prvním prostoru bez pole, tj. před vstupem do magnetického analyzátoru (*-BE). V uspořádání B-*E jsou mateřské ionty vyčleněny magnetickým analyzátořem a produkty analyzovány podle jejich kinetické energie rozvojem napětí na elektrostatickém analyzátořem. Rozlišovací schopnost zařízení je omezena v MS-I vlastnostmi magnetu, v MS-II je pak závislá na uvolnění kinetické energie při rozpadu. Hmotnostní rozlišení MS-II zde většinou nepřesahuje hodnotu 100.

V uspořádání *-BE slouží oba analyzátoři zároveň k oddělení mateřských iontů i produktů. Dosáhne se toho nastavením magnetu tak, aby propouštěl vybrané mateřské ionty, a následným vázaným rozvojem (linked-scan) obou analyzátorů, při němž je přesně zachován poměr magnetické indukce a intenzity elektrostatického pole. Toto uspořádání dává tzv. jednotkové rozlišení sekundárních iontů (tj. ionty na sousedních hodnotách m/z jsou rozlišeny), není však prosté artefaktů.

V uspořádání EB je nutné použít k získání srážkového spektra vázaného rozvoje obou analyzátorů, neboť elektrostatický analyzátor neumožňuje oddělení iontů podle hmotností.

Nevýhody dvousektorových tandemů lze částečně odstranit přidáváním dalších sektorových analyzátorů. Trojsektorový spektrometr konfigurace BEB dává možnosti B*-EB, BE*-B a *-BEB s vysokým rozlišením hmotností iontů buď v MS-I nebo v MS-II. V konfiguraci EBE lze dosáhnout vysokého rozlišení mateřských iontů (EB*-E), nebo jednotkového rozlišení (*-EBE).

Čtyřsektorové spektrometry typu BEEB nebo EBEB pak umožňují vysoké rozlišení mateřských i dceřiných iontů, přičemž rozlišovací schopnost MS-II je podstatně nižší než u MS-I a nepřevyšuje 10000 u komerčně vyráběných přístrojů (VG Analytical ZAB-4F a Jeol HX-110). Zato cena těchto tandemů přesahuje 1000000 Kč.

12.5 Srážkou vyvolané rozpady pomalých iontů

Srážková spektra pomalých iontů ($T_{LAB} = 10-100$ eV) se od spekter rychlých iontů liší ve dvou důležitých bodech. Podle vztahu (12.1) je pro deponování dostatečného množství energie při srážkou vyvolané aktivaci nutné používat těžších terčových atomů nebo molekul. To vede ale rovněž ke zvýšení průřezu pro elastický rozptyl, které je nutno kompenzovat kolimací sekundárních iontů. Druhou důležitou okolností je podstatná závislost srážkových spekter na kinetické energii mateřských iontů. Na jedné straně to poskytuje další volitelný parametr, jehož změnou lze získat informace o rozpadových dějích. Na druhé straně však je pro analytické využití srážkových spekter pomalých iontů třeba pracovat se standardním plynem a při standardní srážkové energii. I když tyto podmínky jsou splnitelné při práci na jednom typu spektrometru v jedné laboratoři, přenos dat mezi různými pracovišti je tím značně komplikován vzhledem k různým pracovním režimům komerčních spektrometrů.

Srážkové rozpady pomalých iontů mají analytický význam v souvislosti s používáním kvadrupolových spektrometrů. V typickém uspořádání tzv. trojitého kvadrupolu (QQQ) slouží první kvadrupolový analyzátor (Q_1) jako MS-I. Vyčleněné mateřské ionty podléhají srážkám v druhém kvadrupolu (Q_2), který je však provozován jen se zavedením radiofrekvenční složky na tyče a slouží jako kolimátor rozptýlených produktů. Třetí kvadrupól (Q_3) pak slouží jako MS-II.

Výhodou uspořádání QQQ je jednotkové hmotnostní rozlišení srážkových produktů a především vysoká účinnost srážkových rozpadů a detekce produktů, která činí desítky procent /3/. Nevýhodou je omezený hmotnostní dosah MS-I, který zpravidla nepřesahuje 2000.

Dobré vlastnosti sektorových a kvadrupolových spektrometrů jsou spojeny v tzv. hybridních tandemových spektrometrech. Jako MS-I se používá sektorový spektrometr v zapojení EB nebo BE, který umožňuje vydělení iontů s vysokou rozlišovací schopností. Rychlé (keV) mateřské ionty jsou pak zpomaleny na $T_{LAB} = 10-20$ eV, podrobeny srážkám a analyzovány systémem QQ s jednotkovou rozlišovací schopností.

K výše uvedeným výhodám hybridních tandemových spektrometrů se druzí též některé technické komplikace.

Je to především nutnost provozovat oba kvadrupoly na vysokém napětí blízkém potenciálu iontového zdroje a dále i nutnost manipulace s iontovým svazkem před vstupem do srážkového kvadrupolu, která přidává další stupně volnosti do ladění fokuse.

12.6 Některé zkratky používané v literatuře

V anglosaské literatuře se často vyskytují zkratky, jejichž význam nebývá jednoznačný a které dosud nejsou unifikovány, ba ani jednomyslně přijímány.

MS (mass spectrometry) je kritizována, leč velmi často používána zkratka pro hmotnostní spektrometrii nebo hmotnostní spektrometr či hmotnostní spektrum.

MS/MS (mass spectrometry mass spectrometry) je zkratka pro tandemovou hmotnostní spektrometrii zavedená jako analogie zkratk GC/MS a LC/MS.

FFR (field-free region) je zkratka pro tzv. prostor bez pole u sektorových spektrometrů. Jako 1st FFR se označuje prostor mezi iontovým zdrojem a prvním analyzátořem, 2nd FFR je prostor mezi prvním a druhým analyzátořem. 3rd FFR a 4th FFR mají pak obdobný význam u vicesektorových strojů.

CS (charge stripping) se používá pro procesy permutace náboje, většinou pro reakce $m^+ + N \rightarrow m^{++} + N + e^-$.

NRMS (neutralization-reionization mass spectrometry) a konkurenční CIDI (collision-induced dissociative ionization) označují techniku postupné neutralizace mateřského iontu přenosem náboje při srážce a následovné ionizace rychlých neutrálních produktů další srážkou.

CA (collisional activation), CID (collision-induced dissociation) a CAD (collisionally activated dissociation) se používají záměnně jako substantiva pro srážkou vyvolané rozpady, nebo jako adjektiva pro druh spekter, techniku, procesy atd. MIKES (mass-analyzed kinetic energy spectroscopy) se používá pro uspořádání, v němž jsou sekundární ionty vzniklé srážkou rozdělány podle kinetických energií elektrostatickým analyzátořem. Někdy je vidět i zkratka CAD-MIKES, popř. část MIKE.

13. Interpretace hmotnostních spekter

Hmotnostní spektrum je soubor píků iontů, z nichž pouze menší část je strukturně významná. Je tedy nutno důležité ionty rozpoznat, najít mezi nimi souvislosti a jako mozaiku skládat informace o měřené látce.

Nejdůležitějším píkem spektra je pík molekulárního iontu, který již svojí hmotností, intenzitou a poměrem doprovázejících izotopických píků poskytuje základní informace. Intenzita molekulárního píku uhlovodíků vzrůstá obvykle s počtem nenasycených vazeb a počtem kruhů. Významnou roli při určování struktur organických látek má měření přesné hmotnosti iontů při vysoké rozlišovací schopnosti, kterým je možno určit jejich elementární složení.

I když je měření při vysoké rozlišovací schopnosti velmi užitečné, je možno řadu údajů včetně informací o elementárním složení získat ze spekter nízkého rozlišení. Například již z nominální hmotnosti molekulárního iontu lze získat cenné informace o složení molekuly. Je-li tato hmotnost lichá, je možno použít dusíkové pravidlo: "Má-li molekulární iont lichou hmotnost, pak obsahuje lichý počet dusíkových atomů".

Další informace o složení molekulárních i fragmentových iontů podávají izotopické píky. Řada prvků tvořících molekuly organických látek je směsí přirozených izotopů. Zastoupení izotopicky sdružených molekul u neznačených sloučenin odpovídá statisticky nahodilému rozdělení. Z intenzity prvního přidruženého izotopického píku ($M+1$) je možno leckdy usoudit na přítomnost dusíku v molekule a lze z něho vypočítat přibližný počet uhlíkových atomů v molekule. Druhý přidružený izotopický pík ($M+2$) vypovídá zejména o přítomnosti kyslíku, síry, chloru a bromu. Přítomnost Cl a Br je z poměru izotopických píků zřejmá na první pohled vzhledem k charakteristické intenzitě ($M+2$) píků. Obsah izotopů některých nejčastěji se vyskytujících prvků v organických sloučeninách je uveden v následující tabulce:

Prvek	Izotop	Obsah %	Izotop	Obsah %	Izotop	Obsah %
Vodík	1	99,985	2	0,015		
Uhlík	12	98,9	13	1,1		
Dusík	14	99,6	15	0,4		
Kyslík	16	99,8			18	0,2
Síra	32	95,02	33	0,75	34	4,22
Chlor	35	75,5			37	24,5
Brom	79	50,5			81	49,5

Na základě známého elementárního složení iontů lze vypočítat teoretickou výšku jeho sdružených izotopických píků ve vztahu k prvnímu píku multipletu a naopak z výšek izotopických píků lze odhadnout elementární složení, nebo alespoň usuzovat na počet některých atomů (zvláště O, S, Cl, Br) ve studovaném iontu. Relativní intenzita jednotlivých izotopických píků se vypočítá pomocí binomického rozvoje

$$(a+b)^n = a^n + na^{n-1}b + n(n-1)a^{n-2}b^2/2! + n(n-1)(n-2)a^{n-3}b^3/3! + \dots$$

kde n je počet atomů prvků s dvěma izotopy v iontu, a a b relativní zastoupení obou izotopů. V případě, kdy iont obsahuje dva nebo více prvků s rozdílným izotopickým zastoupením, je třeba nejprve vypočítat relativní zastoupení pro každý prvek. Následně se příspěvky jednotlivých prvků pro daný pík multipletu skládají.

Jednoduše lze odvodit, že první dva členy binomického rozvoje pro izotopy ^{12}C a ^{13}C jsou pro libovolný počet uhlíků v poměru 89,9 : x , kde x je počet uhlíků v příslušném iontu. V praxi lze toto pravidlo uplatnit tak, že dělíme výšku píku sledovaných iontů devadesáti a získanou hodnotou pak dělíme výšku jeho izotopického píku. Výsledkem je přibližný počet uhlíků v tomto iontu. Nepřesnost je způsobena mimo jiné nepřesností v určení výšky píků. Uvedený výpočet platí za předpokladu, že studovaný iont obsahuje pouze prvky C, H, O, Cl, Br, I, F a nejvýše 2 atomy dusíku, že fragmentací nevznikají ($M-1$)⁺ ionty a že nenastává zvýšení intenzity ($M+1$)⁺ iontů v důsledku bimolekulárních reakcí.

Odhad elementárního složení na základě poměru izotopických píků lze úspěšně používat především u molekulárních iontů, protože při nízkém rozlišení může být pík nižší nominální hmotnosti složen z iontů dvou i více různých elementárních složení.

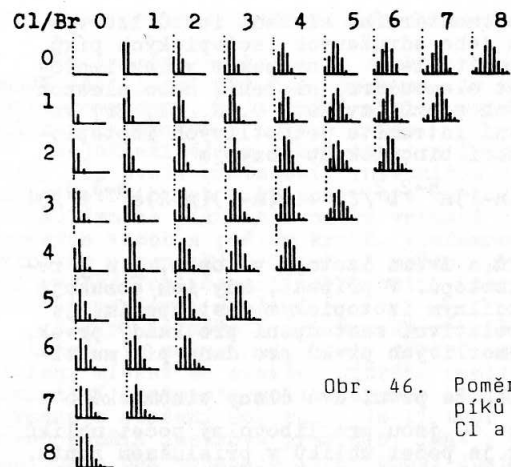
Aby nebylo nutno intenzitu izotopických píků vždy znovu počítat, byly sestaveny tabulky intenzit pro různý počet a kombinaci izotopů. Ještě pohodlnější je grafické znázornění (především pro Cl a Br), ze kterého lze určit počet příslušných prvků poměrně snadno (obr. 46).

Bližší představy o struktuře molekuly i fragmentových iontů udává počet nenasycených míst, t.j. počet kruhů s dvojných vazeb. Lze je vypočítat ze známého elementárního složení s použitím jednoduchého vztahu

$$\text{počet nenasycených míst} = x - \frac{1}{2}y + \frac{1}{2}z + 1,$$

kde x je počet uhlíkových, y počet vodíkových a halogenových a z je počet dusíkových atomů.

Kritériem důležitosti dalších píků spektra je jejich poloha ve spektru, intenzita, hmotnost, počet elektronů a souvislost s ostatními píky. Zpravidla je většina strukturně důležitých píků dostatečně intenzivní (jsou tvořeny stabilní-



Obr. 46. Poměry intenzit izotopických píků pro kombinace atomů Cl a Br.

mi ionty), ale nicméně jejich důležitost stoupá s jejich rostoucí hmotností. Často bývá málo intenzivní pík s vyšší hmotností mnohem důležitější než intenzivnější pík s malou hmotností. Menší stabilnější ionty vznikají obvykle různými cestami z větších fragmentových iontů a obvykle přispívají málo k určení struktury molekuly. Píky iontů menších hmotností spíše vypovídají o typu měřené sloučeniny, protože každý druh sloučenin má své charakteristické ionty. Např. aromáty poskytují píky iontů m/z 39, 50, 51, 63, 65, 77, 91; étery m/z 31, 45, 73; alifatické kyseliny m/z 44, 45, 60, 61, atd.

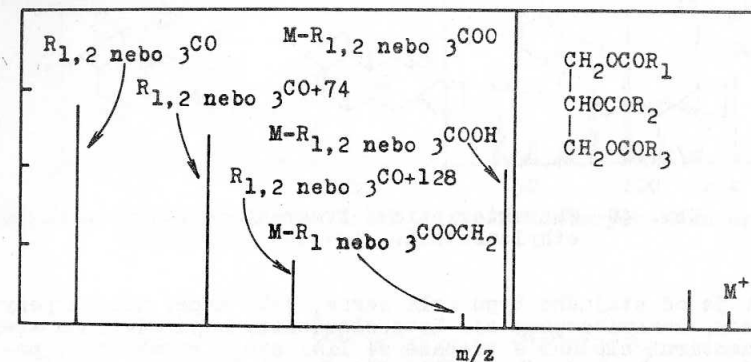
Ionty s lichým počtem elektronů jsou někdy důležitější než ionty se sudým počtem elektronů o stejné intenzitě, protože vznikají přesmyky a fragmentacemi, které jsou charakteristické pro strukturu molekuly. Ionty s lichým počtem elektronů jsou obecně méně stabilní než se sudým počtem elektronů. Vyskytuje-li se v oblasti malých m/z větší počet iontů sudých hodnot m/z , pak jsou to obvykle ionty obsahující lichý počet dusíkových atomů, jako např.: $\text{CH}_2 = \text{NH}_2$.

Při hledání souvislosti mezi píky (tzv. fragmentační cesty) se postupuje obvykle od molekulárního píku směrem dolů a využívá se metastabilních píků a znalostí o elementárním složení iontů. Vylučují se ze vzájemných vztahů nepravděpodobné difference mezi hmotnostmi, jako např. 4 až 14, 21 až 25, 37 a 38, a naopak se hledají rozdíly značící ztrátu neutrálního fragmentu, např. 15 (CH_3), 18 (H_2O), 28 (CO , C_2H_4),

33 ($\text{H}_2\text{O} + \text{CH}_3$) atd. Je-li tedy např. ve spektru velmi intenzivní pík $[\text{M}-1]^+$ a současně píky m/z 50, 51, lze usuzovat na aromatický aldehyd; je-li rozdíl mezi dvěma píky s nejvyšší hmotou tři, potom s největší pravděpodobností M^+ ve spektru

chybí a první pík je $[\text{M}-15]^+$ a druhý $[\text{M}-18]^+$; při rozdílu 14 (CH_2) mezi píky s vyšší hmotností jde pravděpodobně o směs homologů a pod. Tímto naznačeným postupem je třeba zpracovat celé spektrum a získat tak maximum informací o měřené sloučenině.

Je samozřejmé, že pro úspěšnou interpretaci je třeba mít jak obecné znalosti o fragmentaci, tak vědomosti o fragmentaci jednotlivých typů sloučenin. U některých typů látek, jako jsou např. estery mastných kyselin, alifatické alkoholy a ketony a řada jiných, stačí znát jen základní fragmentaci a pamatovat si několik charakteristických iontů (příp. píků), zatímco u jiných typů, např. triglyceridů, je třeba vědět, že byla vypracována celá fragmentační schemata (viz obr. 47).

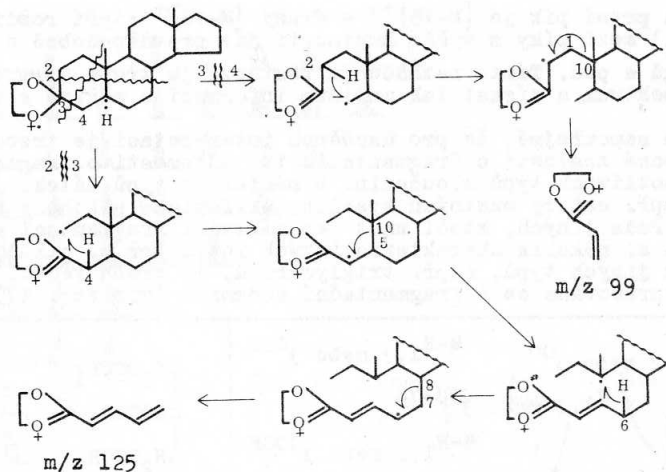


Obr. 47. Schema fragmentace triglyceridů.

Je nutno počítat s tím, že někdy charakteristická fragmentace probíhá velmi dramaticky, za přerušení několika vazeb a přesmyků, jako je tomu např. u ethylenketalů steroidů (viz obr. 48). Jindy je třeba pro charakterizaci porovnávat jen malé změny v intenzitách píků, jako např. u methylesterů n -, izo- a anteizo- kyselin.

Často není možno se obejít bez studia fragmentací modelových sloučenin jak vlastních tak i z literatury. Práce s literaturou je v hmotnostní spektrometrii velmi důležitá. Na tomto místě tím nejsou míněny jen atlasy spekter, ale i odborné monografie a časopisy.

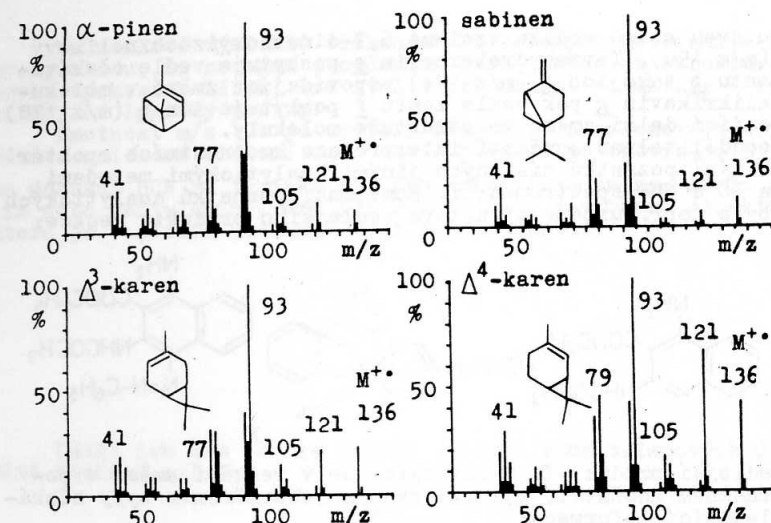
Při studiu struktur organických látek, zejména přírodního původu, se nezíská vždy tolik informací, aby bylo možno navrhnout úplnou strukturu molekuly a je třeba se spokojit jen se znalostí fragmentů. Nejsou řídké případy, kdy výsledek veškeré snahy o interpretaci je zjištění elementárního složení a typu měřené látky. Taková situace někdy nastává u látek,



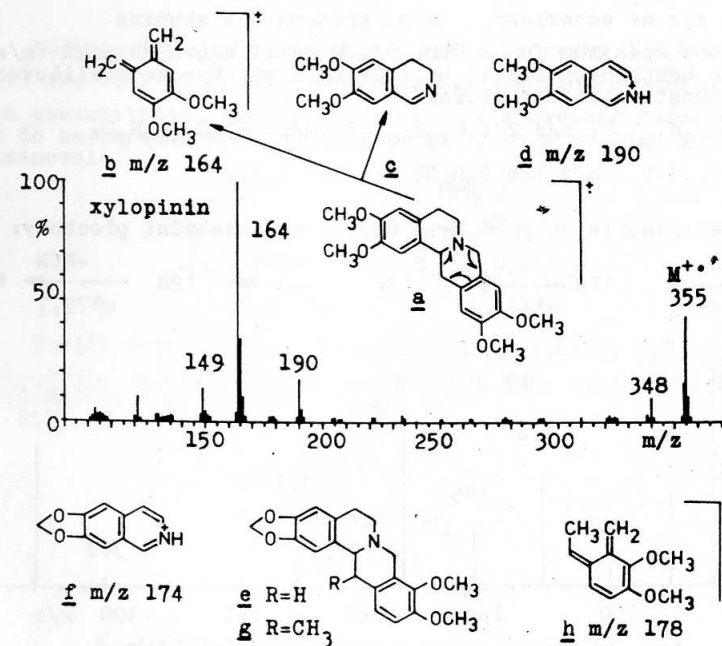
Obr. 48 Charakteristická fragmentace steroidních ethylenketálů.

kterých je od stejného typu celá serie, jako např. monoterpeny, diterpeny, seskviterpeny aj. Tyto sloučeniny mají většinou stejné elementární složení a třebaže se liší svojí strukturou, poskytují ve spektrech píky iontů stejného složení a blízké intenzity. Zde pak nepomůže ani studium modelových látek a identifikace je možná jen na základě porovnání studovaného spektra s autentickými spektry sledovaného typu látek. I toto porovnání bývá někdy obtížné, jako je např. zřejmé z několika spekter monoterpenických uhlovodíků uvedených na obr. 49.

Jsou však také oblasti, kde hmotnostní spektrometrie zaujímá i v tomto směru význačné postavení. Je to např. při studiu struktur alkaloidů, které poskytují poměrně málo intenzivních píků fragmentových iontů, ale jsou zato strukturálně důležité. Centrum fragmentace alkaloidů bývá na atomu dusíku nebo v jeho blízkosti a menší změny struktury na vzdálenějším konci molekuly tuto základní fragmentaci prakticky neovlivní. To znamená, že na základě znalosti fragmentace určitého typu alkaloidu lze z hmotnostních spekter odvodit struktury příbuzných látek. (Tako obecně to ovšem platí i o většině jiných typů látek). Na obr. 50 je např. uvedena fragmentace některých typů berberinových alkaloidů. U xylopininu a vzniká retro-Diels-Alderovým štěpením ion o hmotnosti m/z 164 (příslušející základnímu píku spektra b) spolu s neutrálním fragmentem c 3,4-dihydro-6,7-dimethoxyizochinolinem. Pokud zůstane náboj na dusíku, pak další



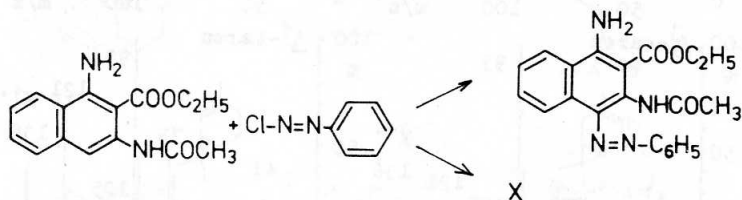
Obr. 49. Srovnání hmotnostních spekter některých monoterpenických uhlovodíků



Obr. 50. Fragmentace berberinových alkaloidů a hmotnostní spektrum xylopininu

ztrátou dvou atomů vodíku vznikne 6,7-dimethoxyizochinolinový ion d (m/z 190). Tetrahydroberberin e poskytuje vedle očekávaného iontu b také ion f (m/z 174) odpovídající změně v molekule. Thalirikavin g pak vedle iontu f poskytuje ion h (m/z 178) odpovídající další změně ve struktuře molekuly.

Neoddělitelnou součástí interpretace hmotnostních spekter je využívání poznatků získaných jinými analytickými metodami, zejména IČ a NMR spektrometrií. Kombinací poznatků analytických metod byla např. určena struktura vedlejšího produktu reakce:



Vedlejší produkt X, vyskytující se v reakční směsi v poměrně značném množství, byl izolován a jeho měření byly získány následující informace:

Elementární analýza: $C_{15}H_{12}N_4O$

NMR: $-N=N-C_6H_5$; 1 x CH_3 ; asi 10 aromatických protonů

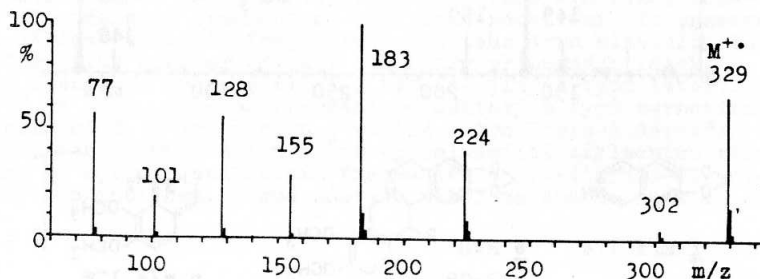
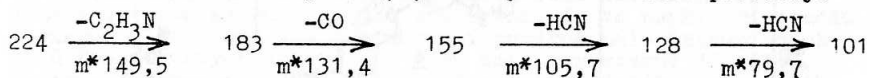
IČ: CO, ale ne esterický; není přítomna CN skupina

HS: změřené spektrum je na obr. 51. U šesti hlavních píků (m/z 77 je bezpochyby fenyl) bylo měření při vysoké rozlišovací schopnosti zjištěno složení:

M^{+} 329 $C_{19}H_{15}N_5O$; m/z 224 $C_{13}H_{10}N_3O$; m/z 183 $C_{11}H_7N_2O$;

m/z 155 $C_{10}H_7N_2$; m/z 128 C_9H_6N ; m/z 101 C_8H_5 .

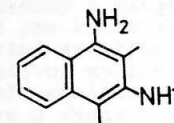
Pomocí metastabilních píků byly určeny metastabilní přechody:



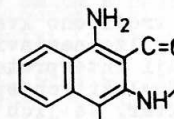
Obr. 51. Hmotnostní spektrum neznámé látky X.

Na základě výsledků získaných jmenovanými metodami a za předpokladu, že neznámá sloučenina bude obsahovat strukturální prvky výchozích látek, lze zvolit pro určení struktury X následující logický postup:

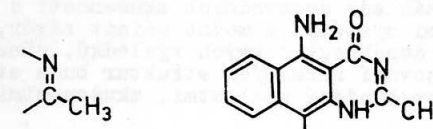
Hmotnost m/z 101 je typický fragment naftalenových derivátů a nalezené složení C_8H_5 tento předpoklad potvrzuje. Ztráta molekul HCN je typická mj. pro aromatické aminy, např. anilin nebo naftylaminy. Pro ion m/z 155 lze navrhnout strukturu, která je v přímém vztahu k výchozí sloučenině:



Další ion m/z 183 je rovněž odvozen z naftalenových derivátů reakční směsi:



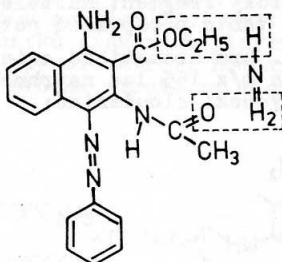
Následující úvaha zahrnuje přidání jednotky C_2H_3N k hmotnosti m/z 183. C_2H_3N může představovat stabilní neutrální molekulu acetonitrilu, kterou je možno v dále uvedené formě zabudovat do navrhované struktury, protože by se z ní jako acetonitril eliminovala.



Rozdíl mezi m/z 224 a molekulárním iontem je $C_6H_5N_2$, což představuje fenylazoskupinu detegovanou NMR. Celá navržená struktura je tedy:



Navržená struktura je v soulase s poznatky získanými fyzikálními metodami a její vznik byl vysvětlen reakcí hlavního produktu reakce s amoniakem, který byl přítomen v reakční směsi:



Významným přínosem, který dává reálný základ pro interpretaci hmotnostních spekter, bylo zavedení kolizí indukovaných disociací, spojených B/E scanů a MS/MS tandemové kombinace několika sektorů, případně trojitého kvadrupolu. S použitím poslední jmenované techniky lze sestavit celé fragmentační mapy, které značně usnadňují interpretaci spekter.

Identifikaci jednoduchých i složitých spekter někdy značně urychlí používání atlasů spekter. Je jich celá řada a spektra jsou v nich publikována buď kompletní, nebo jako několik (zpravidla osm) nejintenzivnějších pík. V atlasech se lze orientovat podle molekulární hmotnosti, elementárního složení, nebo intenzity vybraných pík.

Kromě uvedené interpretace spekter pomocí atlasů spekter je možná interpretace počítačová s použitím programů, které s větším či menším úspěchem interpretují hmotnostní spektra neznámých látek. Na základě dosavadních zkušeností s počítačovými interpretačními systémy je možno učinit závěr, že i když lze v řadě případů dosáhnout dobrých výsledků, přesto rozhodující roli při odvozování neznámých struktur bude stále mít zkušený pracovník vyzbrojený znalostmi, zkušenostmi a intuicí.

14. Kvantitativní hmotnostní spektrometrie organických sloučenin

Organická hmotnostní spektrometrie unikátně spojuje vysokou citlivost, specifickou detekci a velký dynamický rozsah a je proto vynikající metodou pro kvantitativní analýzy organických látek, zvláště ve složitých směsích. Svoji citlivostí, ne však specifičností, jí konkuruje pouze radioimunologické stanovení (RIA). Nevýhodou hmotnostní spektrometrie je časová nestabilita zdroje a jí vyvolaná nekonstantnost citlivostního faktoru analyzované látky. Obranou je relativní měření používané vnitřní standardy a kalibrační závislosti. Volba přístrojových podmínek pro kvantitativní analýzy vyžaduje znát strukturu a hmotnostní spektrum analyzované látky.

První kvantitativní aplikace hmotnostní spektrometrie byly v ropném průmyslu při analýze uhlovodíků zaváděných rezervoárovým vstupem nejdříve u dvousložkových směsí, kdy se z poměru intenzit charakteristických iontů usuzovalo na poměr parciálních tlaků a z něho plynoucí zastoupení látek ve směsi. Záhy byl zaveden pojem citlivostního faktoru (response factor) a měření se rozšířilo na složitější vícesložkové směsi. Jako vnitřní standardy sloužily zvláště *n*-butan či hexadekan přidávané ve známém množství (přesněji řečeno při známém tlaku) ke směsi.

Ke zjištění relativního zastoupení jednotlivých komponent v *n*-složkových směsích je obecně třeba vybrat *n* charakteristických iontů a zjistit jejich citlivostní faktory pro každou složku. U homologických směsí lze relativní zastoupení zjistit postupným odečítáním spekter, vycházejíc vždy z intenzity iontu, který je tvořen jedinou složkou. V případě, že ani jeden z vybraných iontů není tvořen jedinou komponentou, lze k řešení použít soustavy rovnic

$$I_1 = S_{11}P_1 + S_{12}P_2 + S_{13}P_3 + \dots + S_{1n}P_n$$

$$I_2 = S_{21}P_1 + S_{22}P_2 + S_{23}P_3 + \dots + S_{2n}P_n$$

$$\vdots$$

$$I_n = S_{n1}P_1 + S_{n2}P_2 + S_{n3}P_3 + \dots + S_{nn}P_n$$

kde I_i je intenzita *i*-tého vybraného píku, P_j je parciální tlak *j*-té složky a S_{ij} je citlivostní faktor *i*-tého píku pro *j*-tou složku.

Uvedené metody stanovení vyžadují snímat celé spektrum, v němž většina informací stejně jako prodleva mezi scany jsou neproduktivní. Připojení plynového chromatografu jako separačního zařízení (GC/MS) umožnilo kvantitativní analýzy při konstantně nastaveném analyzátoru sledováním průběhu intenzity jediného iontu (SIM, single ion monitoring, single ion detection). Jako

vnitřní standard slouží látka, která poskytuje ion shodného m/z s analyzovanou látkou a liší se chromatografickou pohyblivostí. Metodu lze rozšířit na souběžné stanovení analogu poskytujícího shodný fragmentový ion, např. metabolitu (odtud termín hmotnostní fragmentografie). Jelikož analyzátor zůstává stále nastaven na jediný pík, lze výstup z detektoru snímat s velkou časovou konstantou zesilovače. Metoda sledování jednoho iontu je proto nejcitlivější ze všech způsobů hmotnostně spektrometrické detekce. Ne vždy je však k dispozici vhodný vnitřní standard. Pak je zapotřebí sledovat časové průběhy dvou nebo více iontů.

První použil techniky sledování vybraných iontů (MIM, selected ion monitoring, multiple ion selection, multiple ion monitoring) Biemann. Princip spočíval v rekonstrukci spekter znázorněním závislosti průběhu intenzity zvolených iontů na pořadí spekter z běžně zaznamenaného sledu spekter. Metoda, nazvaná hmotnostní chromatografie (mass chromatography), posttrádá výhody velkých integračních časů techniky MIM. Ještě v nedávné době ji výrobci některých GC/MS systémů inzerovali jako techniku sledování vybraných iontů, ačkoli ve skutečnosti šlo pouze o softwarovou záležitost, o počítačové znázornění průběhu intenzit několika iontů vybraných z kompletních spekter.

Technika MIM se nejdříve uplatnila u kvadrupolových přístrojů, kde skoková změna parametrů kvadrupolu na nový poměr m/z nečiní potíže. U sektorových přístrojů je nejsnazší změna urychlujícího napětí, jak plyne ze vztahu (8.4)

$$\frac{m}{z} = r^2 \frac{B^2}{2U}$$

Urychlující napětí jako čistě elektrický parametr lze měnit skokem, ne však v libovolné míře, neboť působí defokusaci přístroje. V praxi je možné měnit urychlující napětí asi o $\pm 10\%$. Druhá veličina, kterou vztah nabízí, je intenzita magnetického pole. Jejímú pohotovému přepínání brání jev magnetické hystereze. Teprve zavedení laminovaných magnetů dovolilo rychlé přepínání mezi jednotlivými sledovanými kanály s uspokojivou přesností. Třetí, teoretickou možností, je změna poloměru zakřivení magnetu. Doposud není známo její praktické použití.

Přes značnou citlivost hmotnostních spektrometrů jsou detekční limity dosahované MIM metodou vzdáleny teoretickým možností. Důvodem je chemický šum, který zvyšuje pozadí a tím snižuje celkový poměr signál/šum. Ovlivnění tohoto poměru je podmíněno zvýšením selektivity analýzy, což lze obecně dosáhnout 1) vhodnou derivatizací, 2) volbou ionizační metody, 3) volbou sledovaných iontů, 4) volbou vnitřního standardu a v neposlední řadě 5) zdokonalením separačních metod.

Derivatizace je účelná, pokud vylepšuje tvar chromatografického píku anebo snižuje ztráty v injektoru, koloně a iontovém zdroji či posouvá intenzivní ion do vyšší hmotnostní oblasti s nižším šumem.

Ionizační metoda může vést k výraznému zvýšení píku ve vyšší oblasti hmotnosti (chemická ionizace), nebo k výrazně vyšší selektivitě (např. necitlivost negativní ionizace k uhlovodíkovým nečistotám).

Volba sledovaných iontů mimo oblast, v níž se projevují interferující látky, obvykle snižuje detekční limit, i když zvolené ionty nepatří mezi nejintenzivnější. Zvýšení selektivity lze dále dosáhnout vysokým rozlišením nebo výběrem charakteristických iontů tandemovou hmotnostní spektrometrií.

Vnitřní standardy lze rozdělit do tří skupin: (i) látky strukturálně vzdálené nebo analogické, (ii) blízké homology, (iii) izotopicky modifikované sloučeniny. Při použití standardů typu (i) a (ii) je přesnost analýzy limitována rozdíly v extraktibilitě, stabilitě a ionizačních účinnostech. Většinu těchto nepřesností eliminují standardy modifikované stabilními izotopy díky velmi blízkým fyzikálně-chemickým vlastnostem. Navíc je lze využívat současně jako nosiče, jsou-li přidány ke vzorku v ranném stadiu jeho zpracování.

Kalibrační závislosti se původně aproximovaly přímkou a koncentrace analyzované látky se zjišťovala z poměru intenzit iontových párů látky a standardu. Jelikož se však píky spekter obou látek obvykle překrývají, což vede k odchýlkám od linearity, vyvstala nutnost odvodit kalibrační závislosti teoreticky. Obecně je analýzou stanovený izotopický poměr R směsi N molů analyzované látky a M molů standardu dán vztahem

$$R = \frac{NI_{1v} + MI_{1s}}{NI_{2v} + MI_{2s}} = \frac{\frac{N}{M} I_{1v} + I_{1s}}{\frac{N}{M} I_{2v} + I_{2s}}$$

kde I_1, I_2 jsou relativní intenzity signálů vzorku (v) a standardu (s) při dvou zvolených poměrech m/z (obvykle odpovídají molekulárním iontům látky a standardu).

Z rovnice vyplývá, že analýzou stanovený poměr R není obecně lineární funkcí molárního poměru. Rozbor vztahu vede ke čtyřem možným kalibračním závislostem:

- 1) Ideální případ, kdy analyzovaná látka ani standard navzájem neinterferují, $I_{2v} = I_{1s} = 0$. Grafem je přímka procházející počátkem se směrnici I_{1v}/I_{2s} blížíící se jedné.
- 2) Analyzovaná látka nepřispívá k píku standardu ($I_{2v} = 0$). Grafem je přímka se směrnici I_{1v}/I_{2s} a úsekem na ose y I_{1s}/I_{2s} (poměr signálů čistého standardu).
- 3) Opak předchozího, standard nepřispívá k molekulárnímu píku analyzované látky ($I_{1s} = 0$). Grafem je poloviční hyperbola procházející počátkem s asymptotou I_{1v}/I_{2v} . V omezené oblasti lze část hyperboly aproximovat přímkou se směrnici I_{1v}/I_{2s} .

4) Obecný a nejčastější případ. Obě látky poskytují signál při obou sledovaných hodnotách m/z . Grafem je poloviční hyperbola procházející bodem I_{1s}/I_{2s} na ose y , blížící se v počáteční fázi přímce se směrnici I_{1v}/I_{2s} a s asymptotou I_{1v}/I_{2v} .

K obdobným závěrům vede rovnice odvozená Colbym a spol.

$$\frac{x}{y} = \frac{(R_y - R_m)(R_x + 1)}{(R_m - R_x)(R_y + 1)}$$

kde x/y je molární poměr lehkého (x) a těžkého (y) analogu, R_x , R_y jsou poměry intenzit iontů čistých látek x a y při dvou zvolených m/z , R_m poměr intenzit iontů analyzované směsi těchto látek. Z rovnice lze odvodit, že závislost chyby měření na množství přidaného vnitřního standardu (x/y) prochází širokým minimem v oblasti vyhovující nerovnosti $2R_y < R_m < 0,5R_x$. Mimo tuto oblast chyba prudce vzrůstá.

O detekčním limitu metody rozhoduje především poměr intenzity píku analyzované látky k pozadí (signal/noise, S/N). Typické detekční limity při stanovení organických sloučenin ve složitých biologických systémech se pohybují v řádu

$10^0 - 10^1$ ng/ml. Tyto hodnoty vysoko přesahují detekční schopnosti hmotnostního spektrometru, které jsou dány statistickými fluktuacemi elektrických veličin, vakua a přítomností chemických nečistot v iontovém zdroji. Hlavní příčinou poměrně vysokých detekčních limitů v praxi dosahovaných jsou ztráty při zpracování vzorku a koeluční efekty. Ke ztrátám stopových množství dochází na fázových rozhraních (kapalina - kapalina při extrakci, kapalina - pevná fáze na skleněném nádobí, injektoru, chromatografických nosičích aj.). Výrazné zvýšení obsahu vnitřního standardu jako nosiče vede sice ke snížení adsorpčních ztrát, zvyšuje však jak detekční limit větším příspěvkem sledovanému iontu analyzované látky, tak celkovou chybu měření. Nově zaváděné techniky, např. superkritická kapalinová chromatografie, HPLC s kapilárními kolonami, tandemová hmotnostní spektrometrie, dávají dobré předpoklady k dalšímu snižování detekčních limitů.

15. Izolace a příprava k analýze vzorků z biologických materiálů

Hmotnostní spektrometrie je vysoce citlivá a selektivní analytická metoda poskytující navíc strukturní informace; není však metodou universální. Cílem zpracování vzorků před analýzou je oproštění od rušivých složek, případně úprava fyzikálních či chemických vlastností. Kvalitativní analýzy by měla provázet obava, zda struktura analyzovaného individua je totožná (nebo definovatelně odvozená) se strukturou látky v prvotní matrici. U kvantitativní analýzy je nezbytné zjistit, aby množství analyzované látky bylo definovatelně odvozeno z množství látky v původním vzorku. Pokud je k dispozici syntetický standard, je možné jednotlivé izolační kroky ověřovat a optimalizovat na modelových pokusech. Následující text upozorní na některá možná nebezpečí ztráty analytické informace v průběhu přípravy vzorků k analýze.

15.1 Odběr vzorků a jejich uchovávání

Okamžitě po odběru začínají probíhat chemické a biochemické reakce, např. hydrolýza, esterolýza přítomnými enzymy, či metabolické přeměny všudypřítomnými mikroorganismy. Obranou je přidávek inhibitorů, úprava pH, antibakteriální látky, prudké zchlazení. Nejlépe je vzorek rychle zpracovat. Vzorky, pokud nemohou být ihned zpracovány, konzervujeme hlubokým zmrazením. Důležité je včasné změření objemu či hmotnosti; při uchovávání v mrazničce se snižují sublimací, při rozmrazování naopak zvyšují kondenzací vzdušné vlhkosti. U malých objemů do 0,1 ml nejsou tyto změny zanedbatelné. Bezprostředně po odběru vzorku je též vhodné přidat standard pro kvantitativní MS analýzu, s výhodou standard značený stabilními izotopy, zaručující shodné poměrné ztráty pro standard i analyzovanou látku. Mezi výhodné metody zpracování vzorku pro další uskladnění patří ne vždy docenovaná lyofilizace.

15.2 Předběžná izolace

Předběžná izolace spočívá v odstranění hlavních balastních podílů: srážení látek proteinového charakteru, filtrace či odstředování heterogenních částic, homogenizace pevných vzorků, extrakce roztoků. Při srážení dochází ke koprecipitaci a sorpci na sedimentující částice, obvykle makromolekulárního charakteru. Nelze ani podceňovat destruktivní vliv tepla vznikajícího při homogenizaci ať mechanické či ultrazvukem.

Extrakce je snad nejčastěji používanou izolační metodou, je však též zdrojem četných artefaktů. Např. tvorbu iontových párů lze cíleně využívat ke zvýšení selektivity extrakce. V mnohasložkových směsích však na rozdíl od čistých systémů také vznikají komplexy nežádoucí, které snižují extrahovatelnost látky nebo naopak zvyšují přestup nežádoucích příměsí. Značné

potíže při extrakcích působí tvorba emulzí. Pokud je látka v rozpouštědle dobře rozpustná, je účelné dobu protřepávání omezit. Další doby třepání, v literatuře často popisované, jsou naopak nutné je-li látka vázána v komplexu, jehož rychlost disociace je limitujícím faktorem extrakce. Tvorbě emulzí lze částečně zabránit již zmíněnou intenzitou a trváním extrakce, volbou rozpouštědla s velkým rozdílem specifických hmotností, iontovou silou a odstraněním jemných heterogenních částic odstředěním či ultrafiltrací. Emulze již vzniklé, pokud nejdou odstranit odstředěním, lze někdy rozrušit roztíráním špachtlí či prudkým zmrazením, případně spojeným s odstředěním ztuhlé vodné fáze.

Interakce s rozpouštědly jsou dalším častým zdrojem chyb. Patří mezi ně tvorba Schiffových basí reakcí aminů s acetonem, vznik oxazolidinů z beta-hydroxyaminů a přeměny derivátů kyseliny esterifikací, transesterifikací a pod. Známé jsou např. transesterifikace methylesterů při extrakci do butylacetátu z prostředí chlorovodíkové kyseliny. Ethylacetát, ether a jiná rozpouštědla rozpouštějí značná množství vody včetně nečistot v ní obsažených. Závažná je čistota použitých rozpouštědel. Éthery obsahují peroxidy, chlorované uhlovodíky zas obvykle fosgen, který reaguje s řadou funkčních skupin. Stabilizátorem bývá ethanol, který tvoří s fosgenem chlormravenčan. Ten jako velice reaktivní sloučenina reaguje s alkoholy a aminy na N- nebo O-ethoxykarbonylové sloučeniny. Obdobně s chloroformem vznikají přes dichlorokarbenový meziprodukt N-formylderiváty.

Účinek extrakce lze někdy zvýšit přidávkou povrchově aktivních látek. Naopak opakovaná extrakce vede k výraznému zvýšení podílu nečistot s nízkým rozdělovacím koeficientem a tím ke zhoršení poměru signál/šum. Snížení objemu rozpouštědla omezí množství nečistot přecházející do organické fáze. Pozadí zvyšují i nevhodně volené pufrů: acetát, citrát, borát a jiné ionty přecházejí snadno do organické fáze. Naopak reextrakce z organické fáze do vodné a zpět vede k výraznému vyčištění vzorku, obzvláště je-li druhé organické rozpouštědlo jiného typu než první.

Zdrojem chyb může být i prosté odstraňování rozpouštědla na rotační odparce: během destilace posledních zbytků se zvyšuje teplota a prudce stoupá koncentrace; obojí zvyšuje rychlost nežádoucích reakcí.

Zvláštní kapitolu tvoří zpracování neionogenních látek dobře rozpustných ve vodě a látek makromolekulárních. Při jejich izolaci se výhodně uplatňují krátké jednorázové komerčně dostupné kolony s náplní silikagelu, Al_2O_3 , aktivního uhlí aj., často sycené reverzní fází.

15.3 Derivatizace

Derivatizace v hmotnostní spektrometrii má dva základní cíle: zvýšit stabilitu a těkavost látek, které jinak nelze analyzovat GC či MS, a zvýšit citlivost a selektivitu a snížit detekční limit. Kromě vlivu na podmínky GC separace ovlivňuje derivatizace i charakter hmotnostních spekter. Ve šťastných případech vede ke vzniku intenzivních píků ve vyšší oblasti hmotností, kde se méně projevuje pozadí.

Chromatografické separační metody byly zmíněny v předcházejících kapitolách. I když byly popsány techniky přímé desorpce z tenké vrstvy metodou sekundární ionizace (SIMS), je dosud nejspolehlivější přenos vzorku off-line. Skvrnu je možné přenést po vyškábnutí do sondy přímého vstupu i s nosičem nebo vzorek předem eluovat a rozpouštědlo odpařit. Na tomto místě je vhodné upozornit na částečnou rozpustnost silikagelu v polárních rozpouštědlech. Při eluci přechází malý podíl silikagelu se vzorkem do rozpouštědla. V iontovém zdroji působí jako silný adsorbent polárních vzorků, zatímco (obvykle) méně polární nečistoty se teplem desorbují snáze. Důsledkem je málo intenzivní spektrum analyzované látky ukryté v šumu nečistot.

Platnost výsledku i těch nejdokonaljších analytických metod je zvláště závislá na chybách, jichž jsme se dopustili při přípravě vzorku před analýzou. Rozhodující podmínkou úspěchu je experimentální zkušenost, teoretické znalosti, ale i trpělivé a pečlivé vypracování a hlavně kritické zdůvodnění každého použitého čistícího stupně.

16. Využití počítačů v hmotnostně-spektrometrické praxi

Od svého vstupu do praxe v analytické laboratoři na přelomu 60. a 70. let získaly počítače postavení jako integrální součást přístrojové techniky.

První podmínkou pro široké použití číslicových technik byly pokroky v technice integrovaných obvodů produkující množství levných číslicových obvodů. Zavedením číslicových integrovaných obvodů do měřicí a regulační techniky bylo dosaženo výrazného snížení hmotnosti, velikosti a ceny těchto zařízení, přičemž je dosahováno vyšší přesnosti a výkonnosti při získávání i přenosu dat než u analogových technik. Významné je rovněž zvýšení stability číslicových obvodů. Prakticky jsou eliminovány vlivy prostředí na funkci součástek, problémy tolerance součástek a jejich stárnutí. Pomocí číslicové techniky je možno získat prakticky jakýkoliv dynamický rozsah. Pokročilá polovodičová technika nám nedávno poskytla mikroprocesor, plně číslicový počítač v miniaturním jednoduchém integrovaném obvodu. Mikroprocesory nahrazují minipočítače a mohou být použity i místo konvenčních číslicových obvodů.

Výhody počítačů a jejich obrovský potenciál jsou v analytické praxi plně využívány nejenom pro přesnou kontrolu vlastního měřicího procesu a získávání přesných výsledků měření s vysokou četností, ale zejména pro následné zpracování těchto dat zvoleným způsobem i jejich finální interpretaci.

Výpočetní technika obvykle sestává z centrálního počítače pracujícího v režimu sdílení času, několika jím řízených mikropočítačů a soustavy vnitřních i vnějších pamětí. Měřená hodnota je zpravidla okamžitě digitalizována a ukládána do některé z pamětí počítače, případně současně zobrazována. V hmotnostním spektru je každému iontu resp. píku přeřazena hodnota nominální hmotnosti a intenzity. Hmotnost je dána určením vrcholu píku (diferenciální záznam intenzity prochází nulou) nebo těžiště, intenzita je určena z výšky nebo plochy píku.

V hmotnostně-spektrometrické analýze umožňuje programová výbava počítače komerčně dostupných systémů provádět měření v několika režimech, např. je možno získat spektrální data po ionizaci el. nárazem i chemickou ionizací s detekcí negativních i pozitivních iontů v jediném analytickém experimentu, přičemž tato měření jsou reálná i při spojení hmotnostního spektrometru s vysokorozlišující kapilární plynovou chromatografií v některých případech s přesností postačující k určení elementárního složení iontů. Nutnou podmínkou pro taková měření je vysoká rychlost digitálního snímání (obvykle 150-200 kHz), dynamický rozsah alespoň 10^6 a vysoká rychlost "scanu" (u magnetických analyzátorů je nutná laminovaná konstrukce magnetu) ve zlomcích sekundy za dekádu. Pro spojení spektrometru s počítačem i některých dílů zařízení navzájem je hojně využíváno světlovodů a to nejenom pro elektrické oddělení obou částí zařízení, ale i pro přenos signálu v přesném tvaru a potřebnou rychlostí.

Jsme schopni monitorovat desítky vybraných iontů současně s vysokou citlivostí a měření kvantifikovat. Můžeme provádět měření spekter metastabilních iontů (u přístrojů s vysokým rozlišením) k objasnění vzniku a fragmentace podstatných iontů v hmotnostním spektru neznámé látky, případně pro nalezení těchto iontů ve spektru směsi.

Počítač nám pomůže vyřešit i problém, jak naložit s takovým množstvím výsledků. Automaticky provede normalizaci spektra na nejintenzivnější pik ve spektru a vyjádří jeho relativní intenzitu k celkové intenzitě iontového toku. Pro další zpracování hmotnostního spektra je nezbytné jeho "vyčištění". Lze zadat úroveň významnosti iontů (pod touto hodnotou jsou všechny ionty anulovány), lze získat průměrné spektrum v daném intervalu měření, konkrétní ionty (např. pozadí kolony, atmosféru, koeluující složky) lze ze spektra vymazat. Většina moderních systémů provádí takové operace automaticky tak, že např. při vyhodnocování plynové-chromatografické analýzy provede označení vrcholu píku, označí počátek, resp. konec eluce (minima) a provede odečtení průměrného spektra pozadí od spektra zaznamenaného na vrcholu chromatografické vlny.

V případě nedokonalého dělení složek při chromatografii provede počítač analýzu průběhu intenzit všech iontů ve zvoleném rozsahu hmotnosti a retenčních časů, přiřadí k sobě ionty se stejným trendem intenzit a výsledkem jsou spektra čistých složek nebo kvantitativní zhodnocení jejich obsahu.

Všechna data je možno získat jak v grafické tak i v tabulární formě s možností formátování do podoby přímo publikovatelné. Kapacita pamětí počítače dovoluje archivaci množství spektrálních dat (desítky tisíc) a je základem pro tvorbu knihoven a komparativních způsobů interpretace spektrálních dat.

Prvním krokem pro tvorbu knihovny hmotnostních spekter je redukce spektra při zachování maximálního množství strukturálních informací v něm obsažených. Tato operace je nezbytná k zefektivnění práce s databází (redukuje podstatně obsah paměti nutný pro uložení spektra a omezuje se počet operací při srovnávacím způsobu vyhledávání - šetří čas). Podstatné je, že jak spektra knihovní, tak spektrum neznámé látky musí být zpracováno stejným způsobem.

Vedle řady malých specializovaných knihoven existují i velké kolekce soukromé i obecně přístupné. "Wiley Registry of Mass Spectral Data" a NIH/EPA/NBS Mass Spectral Data Base, které dohromady zahrnují cca 80 000 hmotnostních spekter cca 67 000 sloučenin, jsou hlavními představiteli bází obecně přístupných. Základním problémem zejména velkých databází je kvalita uložených spekter. Většina spekter byla převzata bez korektury a bez znalosti podmínek měření. Přitom nemají hmotnostní spektra povahu fyzikální konstanty a jsou velice obtížně reprodokovatelná (přístrojově závislá). Bylo vyvinuto mnoho způsobů jak optimálně redukovat spektrum, počínaje výběrem určitého počtu nejintenzivnějších píků jako reprezentativní charakteristiky spektra, přes hodnocení významnosti iontů ve spektru podle jejich tzv. "momentu", tj. součinu nominální hmotnosti a intenzity iontu, až po tzv. binárně kódovaná spektra, kde je

významnost iontu určena pouhou přítomností či nepřítomností ve spektru. Posledně uvedený způsob hodnocení spekter poskytuje pozoruhodné výsledky při vyhledávání, zejména s použitím malých systémů s omezenou kapacitou paměti.

Nejrozsáhlejší metodou je technika Biemannova, která spočívá ve výběru dvou nejintenzivnějších piků v inkrementu každých čtrnácti hmotnostních jednotek a takto redukované spektrum je uloženo pro účely vyhledávání. Index podobnosti, který je vyjádřením shody mezi referenčním spektrem a spektrem neznámým, je vypočítán na základě poměru piků příslušných oběma spektrům a na základě relativní intenzity piků objevujících se pouze v jednom ze spekter. Bylo učiněno mnoho pokusů o úpravu této techniky, spočívajících v rozšíření inkrementu hmotnostní škály (20 jednotek) či zvětšení či zmenšení počtu významných iontů v tomto inkrementu. Ukázalo se však, že 14 hmotnostních jednotek reprezentujících homologický přírůstek methyleny je optimální.

Další velice rozšířenou technikou redukce spekter je metoda PWM (Probability - Based Match). Principem této metody je předpoklad, že definuje významný pík spektra s ohledem na jeho statistický výskyt v databázi. Jako významné jsou hodnoceny ty píky, jejichž výskyt je méně frekventovaný a jsou tudíž více diagnostické při výběru spekter než obvyklé (běžné) ionty. Referenční spektra jsou redukována na obvyklé 15-25 "jedinečných" (neobvyklých) piků. Metoda tvořila základ řady on-line komerčně dostupných systémů. Výsledkem vyhledávání může být 100-150 nejshodnějších spekter, která mohou být dále statisticky vyhodnocena a podrobena vyhledávání stejnou technikou. Výhodou této tzv. "post search" metody je, že při druhém vyhodnocení mohou být jako významné uvažovány zcela jiné ionty než v prvním kroku, konečným výsledkem je velice jemné rozlišení mezi spektry.

Hennebergem vyvinutý systém SISCO je charakterizován schopností rozlišit stupeň podobnosti (SI) s použitím specifického typu (S), kodování (CO) a mnohonásobných (M) výběrových faktorů. Pík je zde definován jako významný, jestliže je větší než průměr jeho "homologických" piků, tj. o 14 jednotek hmotnosti nižších a vyšších než hodnocený pík. Vyhodnocení podobnosti je zde založeno na korelačním koeficientu mezi redukováním spektrem a neznámým spektrem, na významných (charakteristických) picích vyskytujících se v referenčním spektru, a nikoliv v neznámém spektru, a na významných picích přítomných v neznámém spektru, ale nikoliv v referenčním spektru. SISCO vyhledává spektra podobná spektru neznámému, tj. spektra látek strukturálně podobných.

Pro malé soubory spekter byly vypracovány techniky vyhledávání, pracující s kompletním spektrem, např. metoda LIANAL, kde knihovna 300 látek je řazena podle retenčního času. Pro každý scan je v matici GC/MS dat metodou nejmenších čtverců testována shoda referenčních spekter majících retenční čas blízký uvažovanému scanu. Touto cestou je získán profil individuální sloučeniny ve vzorku jako funkce času. Jestliže je

sloučenina přítomna ve vzorku, ale nikoliv v knihovně, metoda zaznamenaná tento fakt, program extrahuje spektrum neznámé látky a spektrum může být s příslušným retenčním časem vloženo do referenční knihovny. Obdobná metoda, používající charakteristických hmotností v příslušném intervalu retenčního času pro identifikaci a nazývaná MSSMET, umožňuje opět kvantifikaci. Obou metod bylo použito pro monitorování metabolitů steroidů v moči.

Pro vyhledávání ve velkých kolekcích spekter je nezbytné nejprve jednoduchou technikou vybrat těsný soubor k detailnímu srovnání. Je možno např. binárně kódovat osm nejintenzivnějších piků ve spektru a tuto informaci uložit jako součást indexu referenční látky. První výběr je tedy rychlý a nejbližší spektra jsou řazena podle počtu shodných piků k dalšímu zpracování. U komerčních systémů je takto získána odpověď v desítkách vteřin až v několika minutách. Úspěšné softwarové provedení je úzkostlivě střeženým vlastnictvím firem produkujících tyto systémy.

S rozvojem přístrojové techniky ve spektrální analýze jsou tendence vytvářet komplexní databáze, využívající nezávisle nebo v kombinaci výhod každé techniky. Zejména infračervená spektra jsou velmi nadějná s rozvojem GC/FTIR/MS zařízení, kde se již citlivost IR metody blíží MS. V zásadě je problém vyřešen dvěma způsoby. Buď jsou obě spektra společně kódována, nebo je infračervené spektrum využito jako doplňkový faktor určení přítomnosti funkčních skupin. První způsob naráží na nesouměřitelnost bázi obou typů dat (MS databáze s obsahem 40-70 tisíc spekter, IR spektra v plynné fázi jen několik tisíc) a obecně je obtížné v anal. praxi oba typy spekter synchronizovat. To se provádí pro danou sestavu manuálně adjustací tří až čtyř piků v chromatografu. Dále je možno využívat ^1H i ^{13}C NMR spektrálních dat pro samostatný vyhledávací postup, je-li možno (s ohledem na množství látky) taková spektra získat.

Snahy o určení struktury neznámé látky ze spektrálních dat vrcholí vývojem interpretačních metod. V zásadě je možno rozlišit dva způsoby, nazvané "pattern recognition" a "artificial intelligence". Prvá technika spočívá v určení substruktur molekuly na základě spektrálních charakteristik (v tomto smyslu lze považovat vyhledávací metody dříve popsané za podskupinu metod "pattern recognition", kde substruktura je ekvivalentem struktury kompletní). Druhý přístup zahrnuje metody vycházející ze současných znalostí vzniku a fragmentace iontů v hmotnostním spektru.

Technika DENDRAL provede nejdříve srovnání neznámého spektra se spektry substruktur uloženými v knihovně a provede výběr nejpravděpodobnějších substruktur, jež mohou být přítomny v neznámé látce. Nyní je spuštěn generátor struktur, který provede výběr možných kandidátů na molekulu. Na základě znalostí o jednoduchém štěpení a přenosu vodíku jsou odvozena teoretická spektra kandidátů a jsou porovnána se spektrem neznámým (kritéria podobnosti jsou pochopitelně odlišná od dříve uvedených vyhledávacích technik) a seřazena. Pro každou strukturu je vypočteno teoretické ^{13}C NMR a porovnáno s experimentálním spektrem a

konečným výsledkem postupu je výpis nejpravděpodobnějších struktur.

Podobně pracuje systém CHEMICS, který však pro strukturální korelace zahrnuje také infračervená spektra a není tak silně orientován hmotnostně spektrometricky (je určen pouze pro sloučeniny obsahující C, H, N, O).

Technika STIRS (Self-training interpretation and retrieval system) využívá několika odlišných technik vyhledávání, jež jsou založeny na různých způsobech redukce spekter (přepisu, hodnocení významnosti iontů ve spektru) a jsou tudíž citlivé na různé spektrální charakteristiky.

Výsledky různých způsobů vyhledávání jsou vyhodnoceny s ohledem na strukturální podobnost a je získán výpis nejpravděpodobnějších strukturálních fragmentů. Dále je získán údaj o molekulové hmotnosti sloučeniny, ekvivalent dvojných vazeb, počet atomů dusíku v molekule. K těmto metodám lze zahrnout i sekvenční analýzu derivatizovaných peptidů (od N-koncové aminokyseliny výpočtem kombinací a srovnáním s reálným spektrem. Postup pracuje automaticky až k poslednímu iontu v reálném spektru).

Počítač nám umožní přepočítání polyizotopických spekter na monoizotopická, jež jsou základem pro určení elementárního složení iontů, a naopak provede výpočet teoretického zastoupení izotopů.

Přestože algoritmus těchto výpočtů je k dispozici již delší dobu, je patrná jeho určitá renesance s ohledem na nynější dostupné hmotnosti (~ 10 000) např. technikou FAB. Další důvodem je rozvoj MS/MS techniky, kdy se neuplatňuje přirozené zastoupení izotopů v dceřiných iontech, a v neposlední řadě rostoucí využití vysokorozlišující hmotnostní spektrometrie vedlo ke kalkulacím očekávaných izotopových "clusterů" (skupinshluků) za těchto podmínek.

Co lze očekávat v blízké budoucnosti? Zejména větší praktické aplikace systémů užívajících kombinovanou spektrální data (MS/IR a snad i NMR). S rostoucí dostupností vysokých hmotností v běžné praxi je nasnadě další zpřesnění algoritmů používaných pro výpočet hmotností, elementárního složení a izotopických "clusterů". Tendence zavádění malých (a pomalejších) počítačů bude s ohledem na komerční úspěšnost pravděpodobně pokračovat a velké a převratné změny se patrně brzy nedočkáme, i když ...

Počítače představují bezesporu kvantitativní i kvalitativní změnu v měřicí technice. Je však žádoucí připomenout, že terminál a barevná obrazovka zůstávají platným nástrojem jen v rukou školeného specialisty.

17. Současné komerční hmotnostní spektrometry

17.1 Úvod

Cílem této kapitoly není podat úplné informace o všech typech současně vyráběných hmotnostních spektrometrů. Vzhledem k nepřetržitě inovaci výrobních programů všech výrobců by taková informace byla zastaralá dříve, než by text opustil tiskárnu. Cílem je spíše podat návod, jak postupovat při volbě správného přístroje. Pokud se budeme zmiňovat o jednotlivých typech a výrobcích, je třeba si uvědomit, že se jedná jen o hlavní typy, které se nejvíce uplatňují na evropském trhu. Podobně jako v předchozích kapitolách, budeme se i zde zabývat pouze oblastí organické hmotnostní spektrometrie, nebudeme se zmiňovat o přístrojích pro analýzu plynů a analýzu izotopickou, i když by se takové vymezení mohlo jevit jako neopodstatněné. Předpokládáme rovněž, že hlavní otázku před vlastní volbou vhodného přístroje, totiž otázku konkrétních analytických problémů svého pracoviště, má čtenář ujasněnu předem.

Přístroje v současné době vyráběné můžeme rozdělit do 4 skupin: I. hmotnostní spektrometry kvadrupólové, II. hmotnostní spektrometry sektorové, III. MS/MS systémy, IV. hmotnostní spektrometry speciální. Prakticky všechny přístroje I., II. a III. skupiny jsou buď v základním provedení nebo spolu s příslušenstvím konstruovány jako kombinace GC/MS. V závislosti na technických parametrech, možnostech technického vybavení a tedy i ceně lze tyto přístroje rozdělit do několika kategorií technické úrovně (nejnižší, střední a nejvyšší).

17.2 Hmotnostní spektrometry kvadrupólové

Nejjednodušší kvadrupólové přístroje (spolu s analyzátoři na principu iontové pasti) jsou výhradně používány jako selektivní detektory k plynovému chromatografům. Jsou opatřeny iontovým zdrojem s ionizací elektronovým nárazem a datasytémem, jehož základ tvoří zpravidla osobní mikro počítač s dostatečnou kapacitou na uchování největších knihoven spekter a s velkými programovými možnostmi zpracování spekter. Nejsou opatřeny systémem přímého vstupu, vakuový systém tvoří nepřilís výkonné vývěvy, v nejmodernější verzi 1 rotační pro předvakuum a jedna turbomolekulární pro vysoké vakuum. Používat lze vzhledem ke konstrukci vstupu pouze kapilární chromatografické kolony. Hmotnostní rozsah (600 resp. 800) je dostatečný pro GC/MS analýzy většiny organických sloučenin. I když jejich cena je několiknásobně vyšší než cena plynových chromatografů, je na mnohých pracovištích taková investice zcela opodstatněná, nehledě ke skutečnosti, že získávané informace kvalitativně převyšují informace získávané běžnými GC detektory. Jsou vhodné na těch pracovištích, která se zabývají problémy detekce a stanovení známých sloučenin, většinou průmyslově vyráběných, analyzovatelných plynovou chromatografií, jejichž spektra jsou

obsažena v knihovnách. Může se jednat zejména o pracoviště řešící problémy toxikologické, problémy životního prostředí a pod. Mají malé rozměry srovnatelné s rozměry plynových chromatografů, používají se jako stolní přenosné přístroje. Do této kategorie přístrojů zařazujeme hmotnostně spektrometrický detektor fy. Hewlett-Packard typ HP-5970 a detektor na principu iontové pasti fy. Finnigan MAT typ ITD-700.

Kvadrupólové hmotnostní spektrometry střední kategorie jsou zpravidla již opatřeny kombinovaným EI/CI zdrojem a přímým vstupem pro zavádění pevných látek do iontového zdroje. Zavedení chemické ionizace není složitým technickým problémem, avšak zvýšení ceny je dost významné. Chemická ionizace zvyšuje možnosti selektivní detekce řady organických sloučenin, spolu s další modifikací přístroje umožňuje též získávání spekter negativních iontů a je-li k disozici přímý vstup, též desorpční chemickou ionizací (DCI). Hmotnostní rozsah těchto přístrojů je zpravidla do m/z 1000. Nejmodernější přístroje této kategorie jsou rovněž velice kompaktní stolní zařízení. Do této kategorie lze zařadit přístroje fy. Finnigan MAT typ Incos 50 (řadu 5100 lze považovat za výběhovou), HP 5995, Shimadzu QP 1000, Nermag R 10-10T, Nermag R-10-10S.

Kvadrupólové přístroje nejvyšší kategorie jsou vybaveny kombinovanými EI/CI zdroji, přímým vstupem, mají rozšířený hmotnostní rozsah do m/z 2000 i výše (2500) a výkonný vakuový systém, zabezpečující spojení s kapalinovými chromatografy s použitím termosprejové ionizace nebo i pohyblivého pásu. Mohou být opatřeny též ionizací rychlými atomy (FAB). Jejich cena, v závislosti na vybavení, je však značná a zpravidla je srovnatelná (ne-li vyšší) s cenou sektorových přístrojů nejnižší kategorie. Do nejvyšší kategorie kvadrupólových hmotnostních spektrometrů řadíme následující přístroje: Finnigan MAT řada 4500 a 4600 jako GC/MS systémy, řada 4700 a 4800 jako LC/MS systémy, VG Masslab řada 250 (12-250, 15-250, 20-250), HP-5988, Nermag R 10-10E. Vzhledem ke konkurenci sektorových přístrojů nejnižší kategorie, které poskytují v mnohých směrech více informací a analytických možností, lze očekávat, že tato kategorie kvadrupólových hmotnostních spektrometrů bude postupně nahrazena trojitými kvadrupóly jako nejjednodušší MS/MS sestavou. Tato přestavba je již dnes uplatňována u všech uvedených firem kromě HP.

17.3 Hmotnostní spektrometry sektorové

Do nejnižší kategorie sektorových přístrojů řadíme přístroje s rozlišovací schopností (RS) do 25000/10% (definice rozlišovací schopnosti na 10% překryv, neboli dva stejně intenzivní píky o hmotnostech M a $M + \Delta M$ jsou rozlišeny tehdy, je-li výška údolí mezi nimi rovna 10% jejich intenzity, velikost rozlišovací schopnosti RP je pak určena hodnotou $M/\Delta M$). Jejich maximální rozsah hmot při plném akcelerujícím napětí je 1000 až 2000. Jejich předností před kvadrupólovými přístroji je možnost stanovit hmotnosti iontů s vysokou přesností a tím

možnost určit elementární složení iontů, možnost získávat spektra metastabilních iontů vzniklých rozpadem v první oblasti bez pole, spektra dceřiných a mateřských iontů pomocí spojených B/E scanů. Rozpady iontů je možné aktivovat zařazením komůrky pro kolísání aktivaci do 1. oblasti bez pole. Připočteme-li k jejich aktivum řádově vyšší citlivost při GC/MS kombinaci, je třeba je doporučit zejména při řešení strukturních problémů, při identifikaci látek neznámých (struktury metabolitů a pod.), zvláště pak pracovištím, která mají předpoklady pro zajištění kvalifikovanější obsluhy. Jako všechny sektorové přístroje mohou být opatřeny kombinovanými zdroji EI/CI, FAB, termosprejovou ionizací a pod. Do této kategorie řadíme přístroje: VG Analytical typ TS-250, Kratos typ MS-25 RF a JEOL typ D-303. Tyto přístroje se však podstatně liší ve svých konstrukcích i v některých parametrech. MS-25 RF má klasickou EB Nier-Johnsonovu vertikální iontovou optiku, rozlišovací schopnost je automaticky nastavitelná mechanickými šterbinami na max 7500/10%, má nejvyšší GC/MS citlivost (pětkrát větší ve srovnání s ostatními). TS-250 je trisektorová kombinace EBE, zvýhodňuje MS/MS měření. Nová koncepce bezhysterezního magnetu pak umožňuje rychlý rozvoj a přesné nastavení hmotnostní škály bez použití referenčních látek. JMS D-303 používá EB Matsudovu geometrii. Má podobné možnosti automatického nastavení rozlišovací schopnosti do 5000/10%. Navíc má možnost ručního nastavení RS pomocí kontinuálně nastavitelných šterbin až do 25000/10%.

Sektorové přístroje střední kategorie. Do této skupiny řadíme přístroje s rozlišovací schopností do 50000/10%. Vyznačují se dále vyšší citlivostí, větší přesností stanovení hmotností iontů, větším maximálním rozsahem hmotnosti (až 3000 při max. akcelerujícím napětí), adaptabilitou pro MS/MS uspořádání, zejména hybridního typu EBQQ nebo BEQQ. Pomocí těchto přístrojů je možné provádět nejnáročnější organické analýzy všeho druhu. Do této skupiny přístrojů řadíme přístroje fy VG Analytical řady 70, typ 70-S(SE) (případně též 7025), fy Kratos Analytical typ MS-890 a přístroje fy Finnigan MAT 90 a řady 8200/8400. Rovněž v této skupině se jednotlivé přístroje liší koncepcí iontové optiky, vakuové techniky i elektroniky.

Sektorové přístroje nejvyšší kategorie. Řadíme sem přístroje s velmi vysokou rozlišovací schopností a rozsahem hmot. RS přesahuje 100000/10% a maximální hmotnostní rozsah při plném akcelerujícím napětí je až 15000. Tyto přístroje v nejvyšší míře splňují požadavky nejnáročnějších laboratorí, zejména tam, kde jsou požadavky analyzovat vysokomolekulární látky o molekulových hmotnostech vyšších než 5000 daltonů. Řadíme sem následující přístroje: přístroje fy VG Analytical řady ZAB-E, přístroj JEOL HX 110 a přístroj fy Kratos MS-50 RF. Vysoké pořizovací náklady a náročnost obsluhy předurčuje u nás tuto kategorii přístrojů pouze pro ojedinělá specializovaná pracoviště.

17.4 Tandemové (MS/MS) systémy

Trojité kvadrupól QQQ patří do nejnižší kategorie pravých MS/MS systémů. Používá kvadrupóly o hmotnostním rozsahu až 4000. Jednoduché lineární scany umožňují všechny typy rozvoje známé pro spojení rozvoje B/E u sektorových přístrojů, t.j. získání spekter mateřských iontů, dceřiných i spekter iontů odštěpujících určitou zadanou neutrální částicí (neutral loss fragmentation). Má přednosti před sektorovými MS/MS systémy v jednodušším ovládní a řízení počítačem. Výhoda sektorových přístrojů je pak hlavně v přesném stanovení hmotností a v možnostech sledování kolísáních fragmentací při vysokých energiích iontů. Trojitý kvadrupól se svými přednostmi a nedostatky je zpravidla dražší než přístroje sektorové nejnižší kategorie a přibližuje se cenově sektorům střední kategorie. Do kategorie trojitých kvadrupólů patří přístroje fy Finnigan MAT TSQ 70, fy VG Masslab řady 353T (VG-20-353T a VG 30-353T) a fy Nermag typ R 30-10.

MS/MS hybridní přístroje

Jsou odvozeny od sektorových přístrojů střední kategorie připojením kolizního kvadrupólu a kvadrupólového analyzátoru nebo od přístrojů nejvyšší kategorie řady VG ZAB. Mají všechny přednosti sektorových přístrojů s dvojitou fokusací se zachováním všech jejich původních parametrů, řadu předností před trisektorovými MS/MS systémy jak typu EBE, tak i BEB. Do této kategorie řadíme přístroje fy VG Analytical typ 70-S(E)Q, (uspořádání EBQQ) ZAB HSQ/HFQ a ZAB-EQ(SEQ) (uspořádání BEQQ), přístroj fy Finnigan MAT H-SQ 30 (uspořádání BEQQ) a přístroj fy Kratos MS 890Q (uspořádání EBQQ).

MS/MS sektorové přístroje

Největší volbu poskytuje firma VG Analytical. Je to jednak čtyřsektorový systém na základě přístrojů 70-S s uspořádáním EBEB, typ 70-S4F(SE4F) a 3 přístroje odvozené od řady ZAB: trisektorový ZAB-3F(BEB uspořádání) a čtyřsektorový ZAB-4F a ZAB-SE4F (BEBB uspořádání). Firma JEOL typ JMS HX 110/HX 110 s uspořádáním EBEB a firma Kratos s uspořádáním EBE na základě analyzátorů MS 50, případně s uspořádáním EBEB těchto analyzátorů. Vertikální geometrie přístrojů firmy Kratos však způsobuje nemalé problémy v prostorovém uspořádání analyzátorů.

17.5 Speciální hmotnostní spektrometry

Do této skupiny přístrojů řadíme přístroje na principu iontové cyklotronové resonance fy Nicolet typ FTMS 2000 a fy Bruker typ CMS-47. Analyzátorů typu TOF jsou komerčně vyráběny ve spojení s ionizací ^{252}Cf PD firmou Bio-ion Nordic, ve spojení s ionizací (desorpce) lasery pak firmou Cambridge Mass Spectrometry Ltd., typ LIMA (TOF) firmou Leybold-Heraeus (typy

LAMMA 500 a LAMMA 1000). Dovolujeme si sem zařadit i kvadrupólový hmotnostní spektrometr s ionizací elektrickým výbojem fy Bruker/Franzen typ GOMS 1001 určený pro kvantitativní analýzy. Přístroje této skupiny nutno brát v úvahu při řešení některých problémů a nemusí se přitom jednat o zařízení nákladné. Tak např. mnohé problémy vysokomolekulární chemie (analýza peptidů a pod.) je výhodnější řešit na levném přístroji Bio-Ion Nordic AB než na drahých sektorových přístrojích o zvláště vysoké rozlišovací schopnosti. (Význam vysoké rozlišovací schopnosti ztrácí pro vysokomolekulární oblast hmotností nad 10000 svůj původní smysl).

17.6 Jak postupovat při porovnání kvality přístrojů?

Parametry jednotlivých přístrojů, uváděné ve specifikacích, jsou pro nás zpravidla snadno dostupnými údaji, na základě kterých můžeme více nebo méně objektivně posuzovat technickou úroveň jednotlivých typů. Jejich význam je především v tom, že každý výrobce dosažení těchto parametrů garantuje. Důležitý je pro nás nejen výčet jednotlivých parametrů, ale zejména přesné udání podmínek a jejich porovnatelnost u jednotlivých typů (týká se zejména citlivosti). Podrobné uvedení podmínek a parametrů svědčí o serióznosti výrobce, naopak chybí-li některé údaje ve specifikaci, vede nás to zpravidla k podezření, že přístroj nedosahuje kvality přístroje konkurenčního. Na zcestí nás snadno může přivést údaj měřený při nestandardních nebo nespecifikovaných podmínkách. Nemají pro nás tedy prakticky žádný význam např.: citlivost 1 pg, rozlišovací schopnost 25000, hmotnostní rozsah 5000 (u sektorových přístrojů), nejsme-li schopni zjistit na jakou látku, ionizační techniku, na jaký pík, při jakých podmínkách GC a v jakém režimu (scan nebo SIM?) je citlivost vztažena, nevíme-li, jak je rozlišovací schopnost definována či pro jaké akcelerující napětí údaj maximálního hmotnostního rozsahu platí. Mnohem jednodušší situace je u přístrojů sektorových, přestože množství údajů ve specifikacích je značně vyšší než u přístrojů kvadrupólových. Je to způsobeno větší tradicí sektorových přístrojů a malým počtem výrobců (4). Citlivost je zpravidla uváděna zvláště pro iontovou optiku v coulombech na mikrogram methylstearátu a ionty m/z 298 (pro EI) a m/z 299 (CI) většinou při několika hodnotách rozlišovací schopnosti. Pokles součinnosti citlivosti a rozlišovací schopnosti při přechodu od nízké rozlišovací schopnosti k vysoké dosti objektivně charakterizuje kvalitu optického systému. GC/MS citlivost je uváděna poměrem signálu k šumu (S/N) píků m/z 298 (EI) resp. 299 (CI) při nástrihu 100 pg methylstearátu do injektoru chromatografu. Špičkové přístroje dosahují S/N = 200:1. Rozlišovací schopnost je zpravidla vztažena na 10% překryv píků (viz výše). Větší praktický význam má údaj o dynamické rozlišovací schopnosti, uváděný však pouze u špičkových přístrojů. Velmi důležitým je údaj o přesnosti stanovení hmotnosti (v jednotkách ppm) srovnávací metodou (peak matching) a v dynamickém režimu s automatickým zpracováním dat.

U kvadrupolových přístrojů jsou specifikující údaje jednak chudší o do počtu, jednak mnohem méně jednotné. Některé z nich nemají adekvátní význam. Rozlišovací schopnost je zpravidla jednotková v celém hmotnostním rozsahu a není tak důležitým parametrem jako u přístrojů sektorových. Rovněž hmotnostní rozsah, pokud jde o kombinace GC/MS, není kritickou veličinou. Nejdůležitější charakteristikou je jejich GC/MS citlivost uváděna podobně jako u sektorových přístrojů hodnotou S/N. Bývá však vztažena na mol. pík methylstearátu jen při EI. Množství použitého methylstearátu je každou firmou a dokonce i pro každý přístroj uváděno jinak. Nejsou jednotné rychlosti záznamu spekter a hmotnostní rozsah pro danou citlivost, někdy je dokonce použit údaj při sledování jednoho iontu (SIM). Méně seriózní výrobci mohou volit takové podmínky, které při porovnání způsobí falešnou představu. Dlouhodobá stabilita uváděná v hmotnostních jednotkách na hodinu, resp. několik hodin je vesměs dostatečná a nezdá se být faktorem kritickým. Podobné platí i pro maximální rychlost záznamu spekter a pro počet sledovaných iontů v SIM režimu.

Velké data systémy jsou většinou založeny na počítačích řady PDP 11 nebo DG. Hardware a periferní jednotky jsou u všech firem na dostatečné úrovni a neměly by při výběru přístroje hrát rozhodující roli. Jinak je tomu ovšem u softwaru, který však je bez praktického provádění analýz těžko porovnatelný.

Považujeme-li parametry přístrojů uváděné ve specifikacích za objektivní měřítko posuzování technické úrovně, pak neméně důležitou úlohu při výběru má celá řada více či méně subjektivních měřítek. Seriózní výrobci poskytují na požádání seznamy uživatelů jejich přístrojů. Korespondenční spojení (není-li možné osobní) s uživateli těch přístrojů, o jejichž koupi uvažujeme, by mělo doplnit naše představy o stabilitě, zachování parametrů, poruchovosti, údržbě a servisu a o úrovni softwarového vybavení, jakožto nejkritičtější části datasytému. Lze je posoudit jen z dlouhodobé praxe podobně jako spolehlivost vakuového systému, jako jedné z nejdůležitějších částí každého hmotnostního spektrometru. Pravidlem by měla být pracovní návštěva aplikačních laboratoří výrobců s provedením analýz vlastních vzorků odpovídajících vlastním extrémním praktickým podmínkám.

Při rozhodování je třeba brát v úvahu i zkušenosti a tradici jednotlivých výrobců. Důležitým faktorem je cena náhradních dílů a správný odhad kvality a rychlosti servisních služeb v československých podmínkách. Vzhledem ke složitosti a nákladnosti přístrojů i servisu je třeba u všech výrobců uvažovat závislost na servisu, převážně zajišťovaného ze zahraničí.

18. Doporučená literatura

18.1 Učebnice

- F.W.McLafferty: Interpretation of Mass Spectra
1. vydání Benjamin, New York 1966
2. vydání University Science Books, Mill Valley 1980 (303 str.)
- H.C.Hill: Introduction to Mass Spectrometry, Heyden, London 1966 (cca 150 str.)
- M.C.Hamming, N.G.Foster: Interpretation of Mass Spectra of Organic Compounds, Academic Press, New York 1972 (694 str.)
- P.Longevialle: Principes de la Spectrométrie de Masse des Substances Organiques, Masson, Paris 1981 (208 str.)
- J.T.Watson: Introduction to Mass Spectrometry. Biomedical, Environmental and Forensic Applications, Raven Press, New York, 1976 (239 str.)
- U.P.Schlunegger: Advanced Mass Spectrometry, Pergamon Press, Oxford 1980 (143 str.)
- A.A.Poljakova: Molekuljarnyj mass-spektralnyj analiz organičeskich sojedinenij, Chimija, Moskva 1983 (248 str.)
- A.A.Poljakova, R.A.Chmelnickij: Mass-spektrometrija v organičeskoj chimiji, Chimija, Moskva 1972 (367 str.)
- K.Biemann: Mass Spectrometry, Organic Chemical Applications, McGraw-Hill, New York 1962 (363 str.)
- C.Brunnée, H.Voshage: Massenspektrometrie, Verlag K.Thiemig, Munchen 1964
- H.D.Williams, I.Howe: Principles of Organic Mass Spectrometry, McGraw-Hill, London 1972
- V.V.Tachistov: Praktičeskaja mass-spektrometrija organičeskich sojedinenij, Izdatělstvo Leningradskovo Instituta, Leningrad 1977
- R.A.W.Johnstone: Mass Spectrometry for Organic Chemists, Cambridge University Press 1972
- I.G.Zenkevič, B.V.Ioffe: Interpretacija mass-spektrov organičeskich sojedinenij, Chimija, Leningrad 1986 (175 str.)
- 18.2 Monografie složené z příspěvků více autorů (nemusí pokrýt všechny oblasti hm.sp.)
- Mass Spectrometry (R.I.Reed, Editor), Academic Press, London 1965 (463 str.)
- Mass Spectrometry, Proceedings of the International School on Mass Spectrometry, Ljubljana 1969, J.Marsel, Editor

Mass Spectrometry, Techniques and Applications, G.W.A.Milne, Editor, Wiley, New York 1971 (521 str.)

Mass Spectrometry of Organic Ions, F.W.McLafferty, Editor, Academic Press, New York 1963 (730 str.)

Topics in Organic Mass Spectrometry, A.L.Burlingame, Editor Wiley-Interscience, New York 1970 (471 str.)

Mass Spectrometry, R.Brymner, J.R.Penney, Editors, Butterworths, London 1968 (275 str.)

Mass Spectrometry, Ch.A.McDowell, ed., McGraw-Hill Company, New York, San Francisco, Toronto, London, 1963 (637 str.)

Applications of Mass Spectrometry to Trace Analysis, S. Fascetti, ed., Elsevier, Amsterdam, Oxford, N.Y. 1982

18.3 Přehledné monografie

J.H.Beynon, R.A.Saunders, A.E.Williams: The Mass Spectra of Organic Molecules, Elsevier, New York 1968 (510 str.)

J.Roboz: Introduction to Mass Spectrometry, Instrumentation and Techniques, Wiley-Interscience, New York 1968 (539 str.)

W.Benz: Massenspektrometrie Organischer Verbindungen, Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt 1969 (396 str.)

H.Kienitz: Massenspektrometrie, Verlag Chemie, Weinheim 1968 (883 str.)

J.H.Beynon: Mass Spectrometry and its Applications to Organic Chemistry, Elsevier, Amsterdam 1960 (640 str.)

H.Budzikiewicz, C.Djerassi, D.H.Williams: Mass Spectrometry of Organic Compounds, Holden-Day, San Francisco 1967 (690 str.)

J.R.Chapman: Computers in Mass Spectrometry, Academic Press, London, New York, San Francisco 1978 (265 str.)

G.Spiteller: Massenspektrometrische Strukturanalyse Organischer Verbindungen, Verlag Chemie, Weinheim 1966 (354 str.)

N.A.Šechovcov: Magnitnyje mass-spektrometry, Atomizdat, Moskva 1971 (232 str.)

N.S.Vulfson, V.G.Zajkin, A.I.Mikaja: Mass-spektrometrija organičeskich sojedinenij, Chimija, Moskva 1986 (312 str.)

B.S.Middleditch: Practical Mass Spectrometry, A Contemporary Introduction, Plenum Press, N.Y., London 1979

18.4 Monografie speciálně zaměřené

Iontová optika

E.Ewald, H.Hinterberger: Methoden und Anwendungen der Massenspektroskopie, Verlag Chemie, Weinheim 1953 (288 str.)

Iontová chemie, fragmentace, energetika

R.G.Cooks, J.H.Beynon, R.M.Caprioli, G.R.Lester: Metastable Ions, Elsevier, Amsterdam 1973 (296 str.)

K.Levsen: Fundamental Aspects of Organic Mass Spectrometry, Verlag Chemie, Weinheim 1978 (312 str.)

Metody, techniky

A.G.Harrison: Chemical Ionization Mass Spectrometry, CRC Press, Boca Raton 1980 (156 str.)

Tandem Mass Spectrometry, F.W. McLafferty, Editor, Wiley-Interscience, New York 1983 (506 str.)

T.A.Lehman, M.M.Bursey: Ion Cyclotron Resonance Spectrometry, Wiley-Interscience 1976 (229 str.)

W.H.McFadden: Techniques of Combined Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Applications in Organic Analysis, Wiley-Interscience, New York 1973 (463 str.)

C.E.Melton: Principles of Mass Spectrometry and Negative Ions, M.Dekker, New York 1970 (313 str.)

B.Ugróšák: Dynamické hmotové spektrometry, SNTL Praha 1972

P.H.Dawson, ed.: Quadrupole Mass Spectrometry and Its Application, Elsevier, New York 1976

Aplikace podle typů sloučenin

M.R.Litzow, T.R.Spalding: Mass Spectrometry of Inorganic and Organometallic Compounds, Elsevier, Amsterdam 1973 (620 str.)

Q.N.Porter, J.Baldas: Mass Spectrometry of Heterocyclic Compounds, Wiley-Interscience, New York
1. vydání 1971 (564 str.)
2. vydání 1985 (966 str.)

H.Budzikiewicz, C.Djerassi, D.H.Williams: Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry,
Volume 1: Alkaloids (233 str.)
Volume 2: Steroids, terpenoids, sugars and miscellaneous classes (306 str.)
Holden-Day, San Francisco 1964

- Z.V.Zaretskii: Mass Spectrometry of Steroids, Israel Universities Press, Jerusalem 1976 (182 str.)
- Biochemical Applications of Mass Spectrometry, G.R.Waller, O.C.Dermer, Editors, Wiley, Vol.1 (1972), Vol. 2 (1978), Supplementary Vol. 1 (1980)
- The Medical and Biological Application of Mass Spectrometry, J.P.Payne, J.A.Bushman, D.W.Hill, Editors, Academic Press, London 1979 (203 str.)
- Analysis of Drugs and Metabolites by Gas Chromatography-Mass Spectrometry, B.J.Gudzinowicz, M.J.Gudzinowicz, volumes 1-7, M.Dekker, New York 1980
- R.Hague, F.J.Biros (Eds): Mass Spectrometry and NMR Spectroscopy in Pesticide Chemistry, Plenum Press, New York, London 1976
- H.Budzikiewicz (Ed.): Progress in Mass Spectrometry
Vol.1. M.Hesse: Indolalkaloide, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1974
Teil 1: Text (261 str.)
Teil 2: Spektren (98 str.)
- Vol.2. S.E.Drewes: Chroman and Related Compounds, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 1974 (138 str.)
- Vol.3. M.Hesse, H.O.Bernhard: Alkaloide ausser Indol-Triterpen-und Steroidalalkaloide, Verlag Chemie, Weinheim 1975 (372 str.)

18.5 Periodika

- Chemical Abstracts Selects-Mass Spectrometry (od r. 1977)
- Mass Spectrometry Bulletin, Mass Spectrometry Data Center, The Royal Society of Chemistry (uvádí názvy původních prací a klíčová slova) od r. 1967
- Organic Mass Spectrometry, Heyden, Wiley, původní sdělení od r. 1968, 1 volume ročně.
- Biomedical Mass Spectrometry, Heyden, Wiley, původní sdělení od r. 1973, 1 volume ročně
- International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics (od r. 1983 Ion Phenomena), Elsevier od r. 1969, více volům ročně.
- Specialist Periodical Report, The Royal Society of Chemistry, Vol. 1-8 od r. 1968 zhruba 1 volume za 2 roky. Kompilace a kritické zhodnocení původní literatury, vychází s dvouletým zpožděním.
- Mass Spectrometry Reviews, Wiley, přehledné články, od r. 1982 1 volume ročně.
- Rapid Communications in Mass Spectrometry, od 1.5.1987.

Přehledné články vycházejí nepravidelně též v : Analytical Chemistry, Chemical Reviews, Topics in Current Chemistry, Tetrahedron, Organic Mass Spectrometry, aj.

Advance in Mass Spectrometry, Vol. 1-10, sborníky Mezinárodních konferencí o hmot. spektrometrii, jednou za 3 roky, poslední 1985.

18.6 Tabulky, atlasy spekter

- J.H.Beynon, A.E.Williams: Mass and Abundance Tables for Use in Mass Spectrometry, Elsevier 1963 (569 str.)
- F.W.McLafferty: Mass Spectral Correlations, American Chemical Society, Washington 1963 (117 str.)
- M.Spiteller, G.Spiteller: Massenspektrensammlung von Lösungsmitteln, Verunreinigungen, Säulenbelegmaterialien und einfachen aliphatischen Verbindungen, Springer-Verlag, Wien 1973 (61 str. + 170 spekter)
- R.A.Hites: Handbook of Mass Spectra of Environmental Contaminants, CRC Press, Boca Raton 1985 (394 spekter).
- E.Stenhagen, S.Abrahamsson, F.W.McLafferty: Registry of Mass Spectral Data, Wiley-Interscience, New York 1974 (18806 spekter, graf.)
- Eight Peak Index of Mass Spectra, The Royal Society of Chemistry, Mass Spectrometry Data Center, Nottingham 1983 (65000 částečných spekter, tab.)
- A.Cornu, R.Massot: Compilation of Mass Spectral Data, Heyden, London 1966-1967 (1000 částečných spekter, tab.)
- E.Stenhagen, S.Abrahamsson, F.W.McLafferty: Atlas of Mass Spectral Data, Wiley, New York 1969 (cca 6000 spekter)

Poznámky

Československá spektroskopická společnost při ČSAV
adresa sekretariátu : 160 00 Praha 6, Kozlovská 1
za ČSSS zodpovídá Dr.M.Fara, CSc
Technická redakce P.Vampolová. Redakční uzávěrka březen 1987
Pouze pro vnitřní potřebu

Vytiskly TZ 6/70 Čelákovice