

PODSTAWY INTERPRETACJI WIDM MASOWYCH

1. Ustalanie masy cząsteczkowej

Metody:

- widmo EI 70 eV i np. 12 eV;
- łagodne metody jonizacji (FAB, LSIMS, CI, ESI, APCI, MALDI, FI) w celu otrzymania jonu molekularnego.

TERMINOLOGIA

Jon molekularny: jon o masie równej masie cząsteczkowej badanego związku (z dokładnością do masy elektronu) powstający w wyniku oderwania lub (znacznie rzadziej) przyłączenia elektronu przez cząsteczkę.

Jon pseudomolekularny, quasimolekularny lub jon typu jonu molekularnego: jon powstający w wyniku przyłączenia prostego jonu (najczęściej H^+ , Na^+ , Cl^-) do cząsteczki badanego związku lub oderwania jonu H^+ od tej cząsteczki. Obecnie zaleca się stosowanie nazw typu: protonowana cząsteczka, deprotonowana cząsteczka itp.

„REGUŁA AZOTOWA”

Copyright © 2005
Witold Danikiewicz

Parzysta liczba atomów azotu =

= **parzysta** masa cząsteczkowa (nominalna)

Nieparzysta liczba atomów azotu =

= **nieparzysta** masa cząsteczkowa (nominalna)

W spektrometrii mas dotyczy jonów **nieparzystoelektronowych**.

Dla jonów **parzystoelektronowych** jest na odwrót.

Jony **parzystoelektronowe**: $M + H^+$, $M - H^+$, $M + Na^+$, $M + Cl^-$ itp.
– powstają w wyniku jonizacji ESI, APCI, MALDI

Jony **nieparzystoelektronowe**: $M^{+\bullet}$ – powstają w wyniku jonizacji EI
i FI

LICZBA MIEJSC NIENASYCENIA

Dla cząsteczki o wzorze $C_xH_yN_zO_n$ liczba miejsc nienasyceń N wynosi:

$$N = x - \frac{1}{2}y + \frac{1}{2}z + 1$$

Ogólniej:

- typ x : C, Si
- typ y : H, F, Cl, Br, I
- typ z : N, P
- typ n : O, S

Dla cząsteczek obojętnych i kationo- lub anionorodników liczba miejsc nienasyceń musi być całkowita i dodatnia lub równa 0.

Dla jonów parzystoelektronowych – ułamkowa i nie mniejsza niż -0.5 .

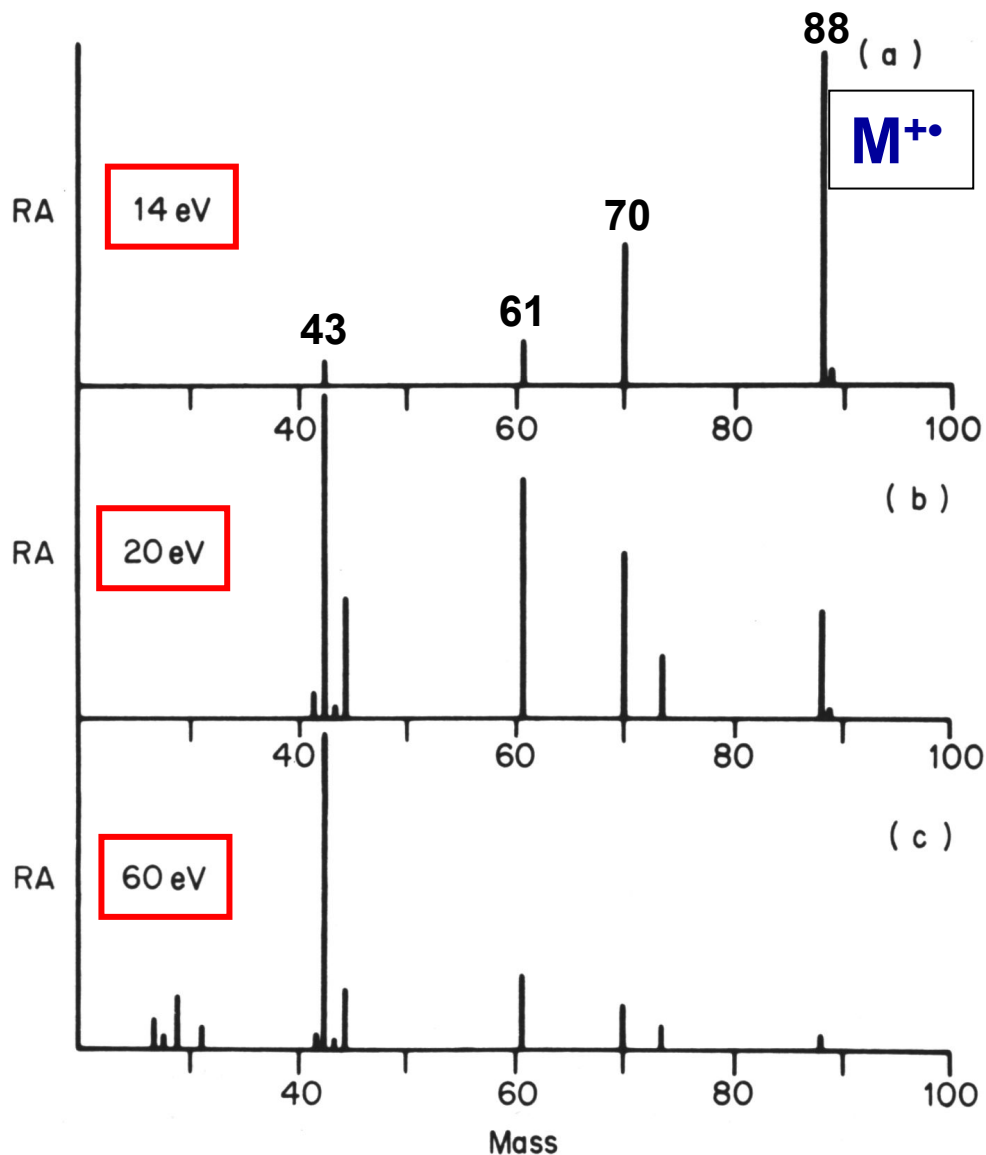
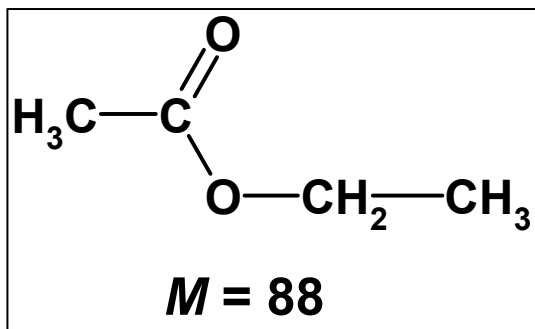
Warunki, które musi spełnić jon molekularny w widmie EI (konieczne, ale nie wystarczające)

1. Musi być jonem o najwyższej masie w danym widmie (z uwzględnieniem jonów izotopowych).
2. Musi być jonem nieparzystoelektronowym, czyli odpowiadający mu wzór sumaryczny musi spełniać „regułę azotową”.
3. Masy najbliższych mu jonów fragmentacyjnych (czyli fragmentów o najwyższych masach) muszą dać się wyjaśnić utratą fragmentów obojętnych (cząsteczek lub rodników) o logicznych masach.

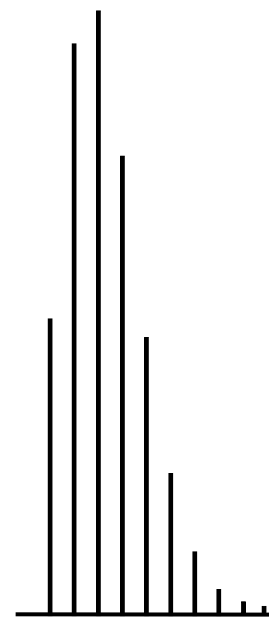
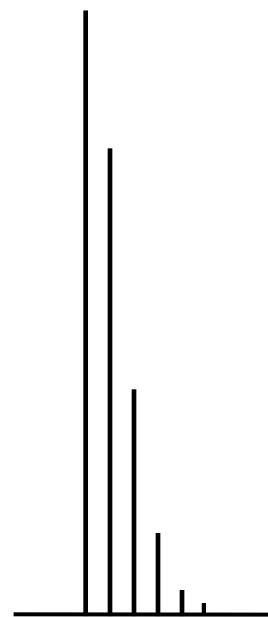
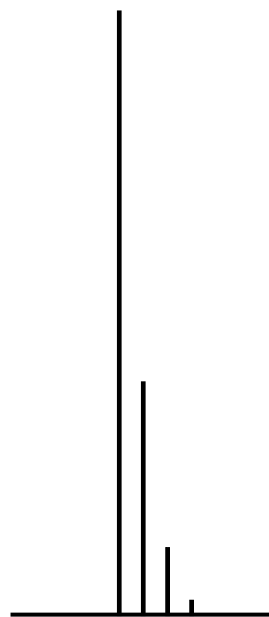
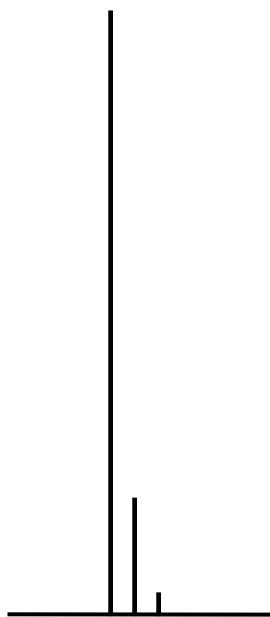
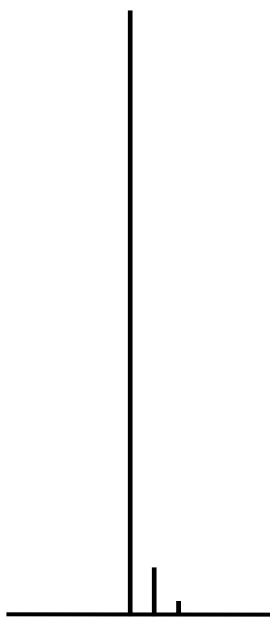
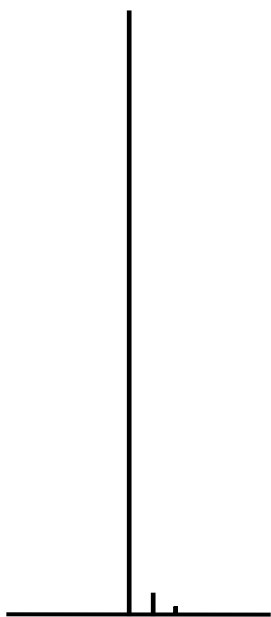
Warunki, które musi spełnić jon pseudomolekularny w widmie LSIMS, ESI lub APCI

1. Musi być jonem parzystoelektronowym, a odpowiadający mu wzór sumaryczny musi spełniać regułę azotową po odjęciu lub dodaniu jonu odpowiedzialnego za jonizację (najczęściej H^+ , Na^+ , Cl^- itp.).
2. Jego masa musi umożliwić wyjaśnienie obecności ewentualnych klasterów typu $(nM + Kat)^+$, $(nM - Kat)^-$ lub $(nM + A)^-$, a także klasterów z matrycą (w LSIMS) lub rozpuszczalnikiem (w ESI).
3. Jego masa musi być zgodna z masami obserwowanych jonów naładowanych wielokrotnie (w ESI, czasem także w LSIMS).
4. W większości przypadków zakwaszenie próbki powinno spowodować wzrost intensywności jonu $M + H^+$, a dodanie soli sodowej – jonu $M + Na^+$.
5. W przypadku próbek o charakterze amfoterycznym (np. peptydy) dodatni jon pseudomolekularny powinien mieć masę o dwie jednostki większą niż ujemny jon pseudomolekularny (dotyczy jonów $M + H^+$ i $M - H^+$).

Zależność wyglądu widma EI octanu etylu od energii elektronów



PROFILE IZOTOPOWE JONÓW W FUNKCJI ICH MASY



89

160

427

872

1762

4432

89.05

160.09

427.23

872.47

1762.94

4434.37

89.09

160.17

427.43

89.93

1763.87

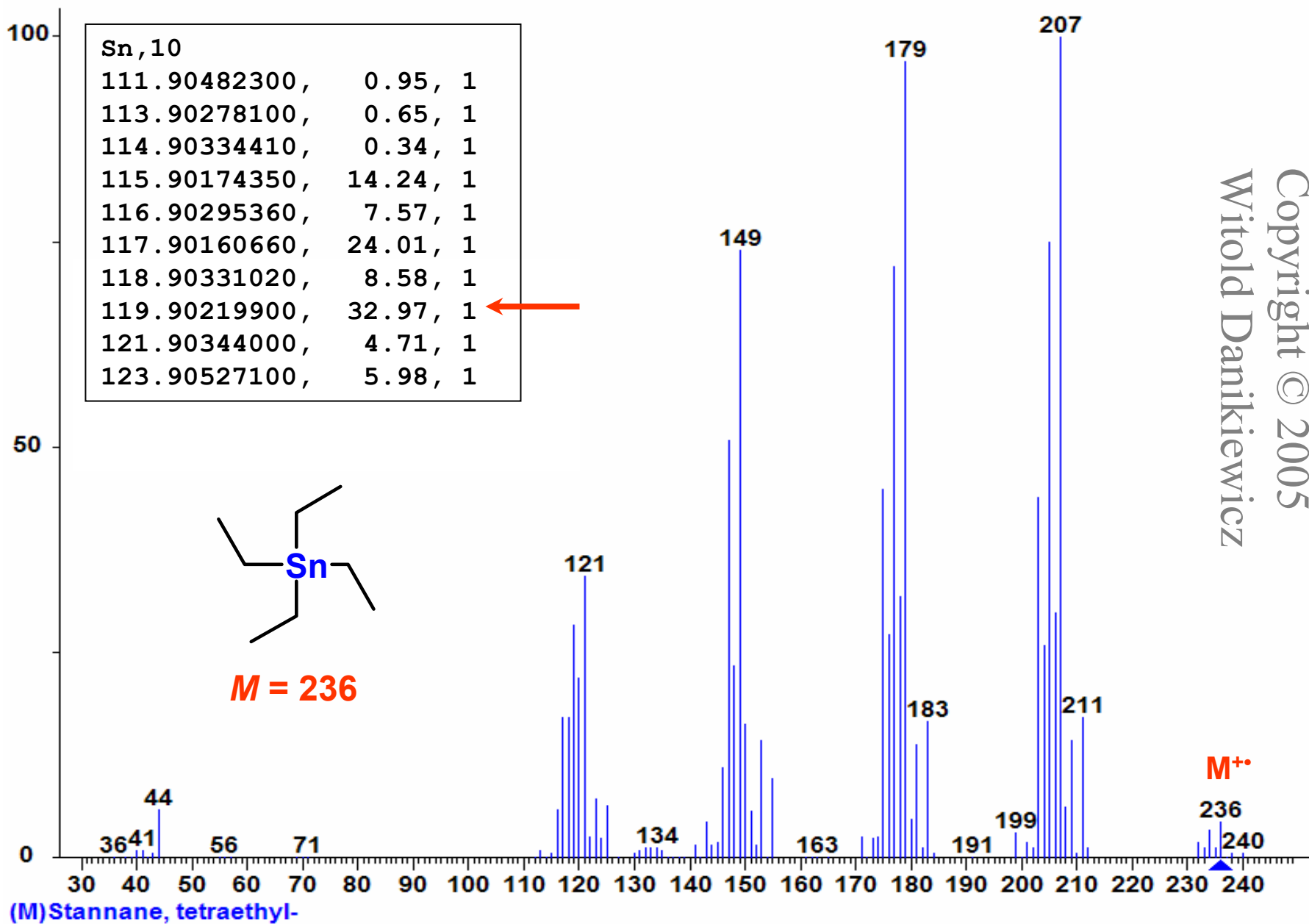
4436.69

Masa nominalna

Masa monoizotopowa

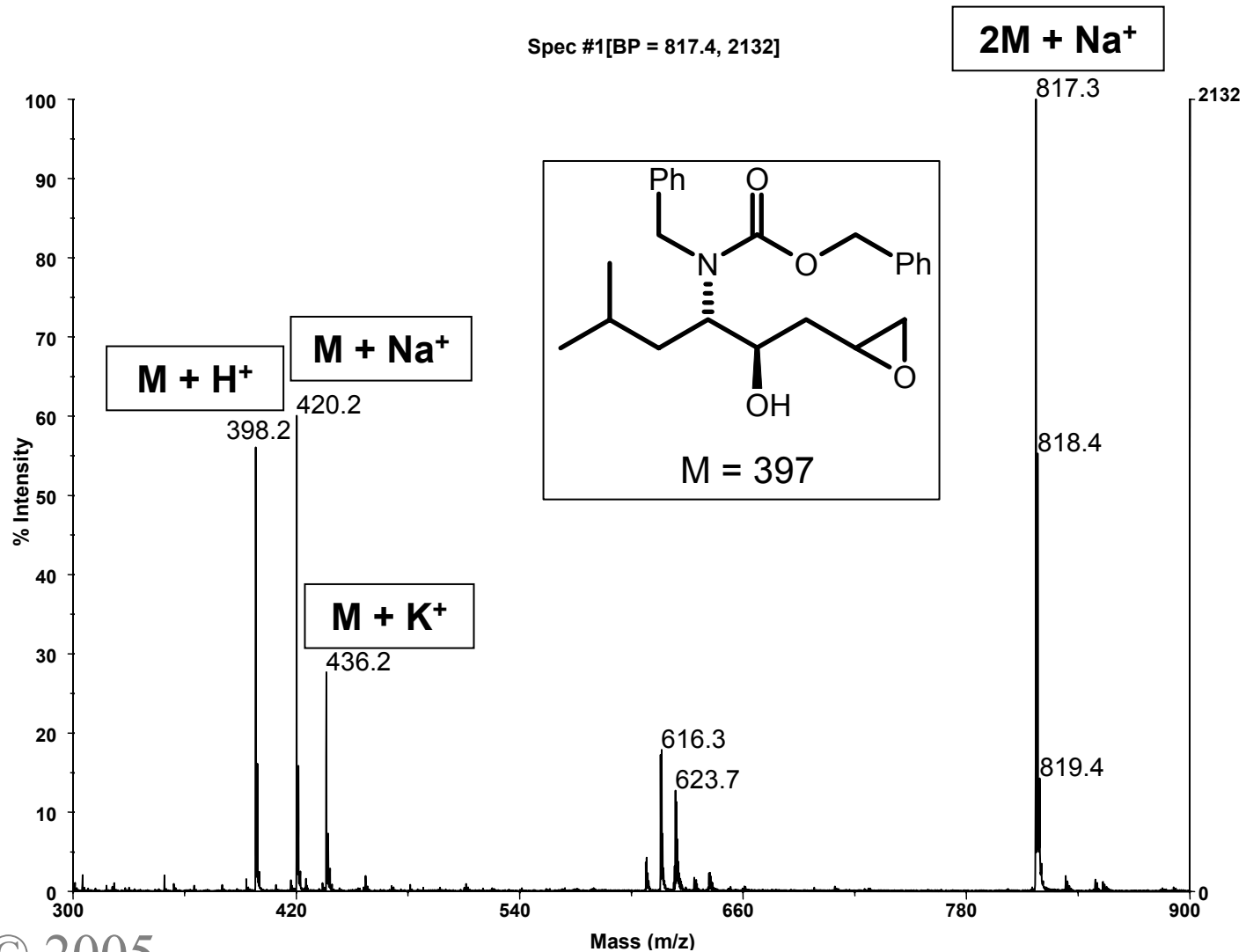
Masa średnia

Przykład widma związku cynoorganicznego



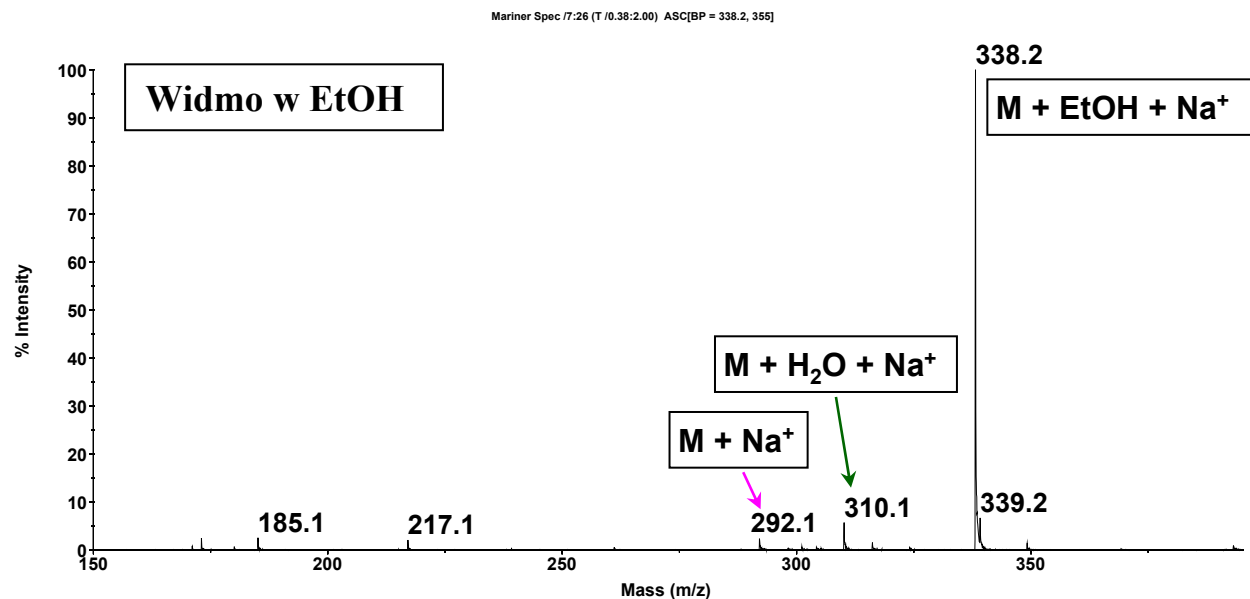
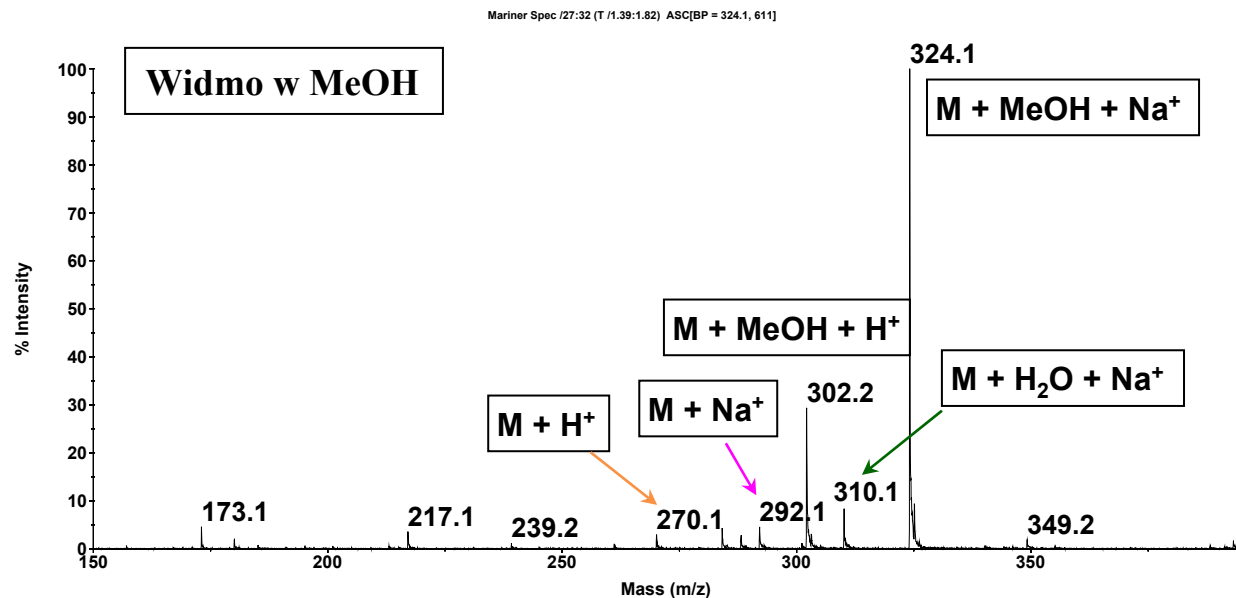
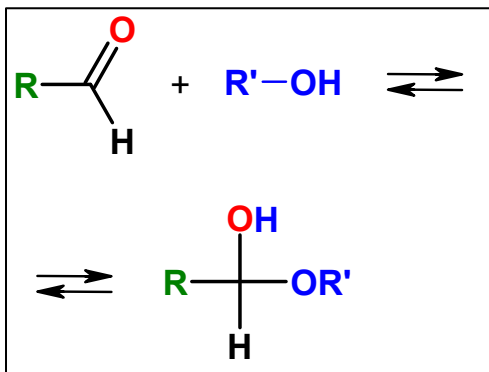
Copyright © 2005
Witold Danikiewicz

Widmo ESI związku o małej cząsteczce ($M = 397$, MeOH, jony dodatnie)

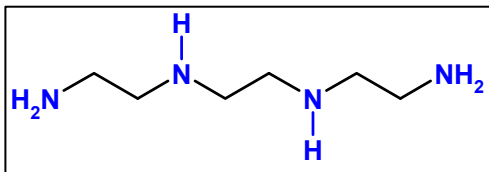


Widma ESI aldehydu o $M = 269$ Da w MeOH i EtOH

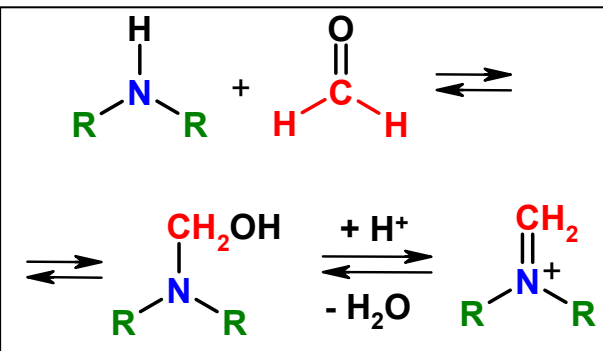
Aldehydy często tworzą hydraty i hemiacetale:



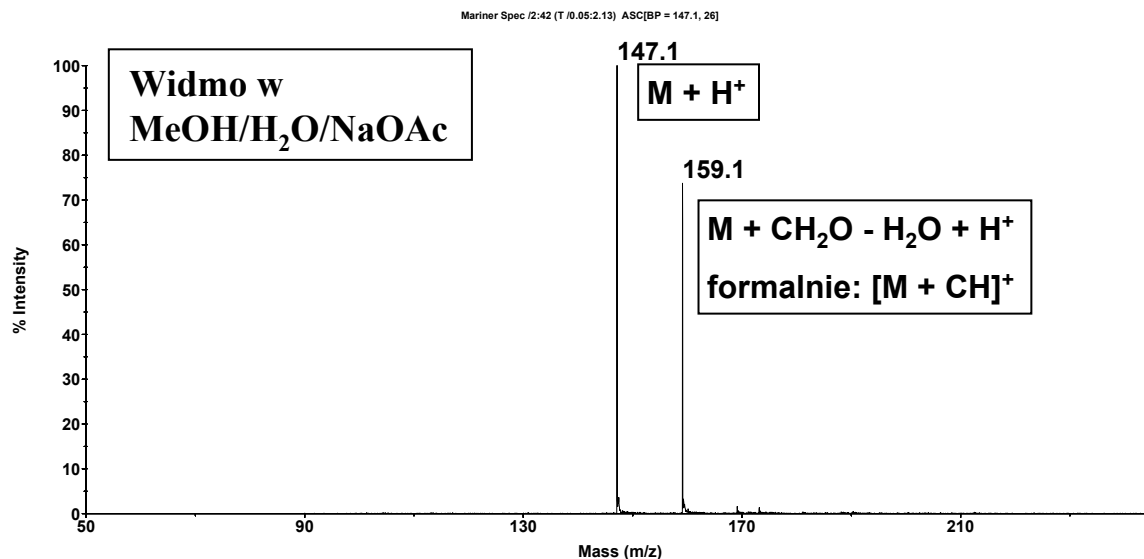
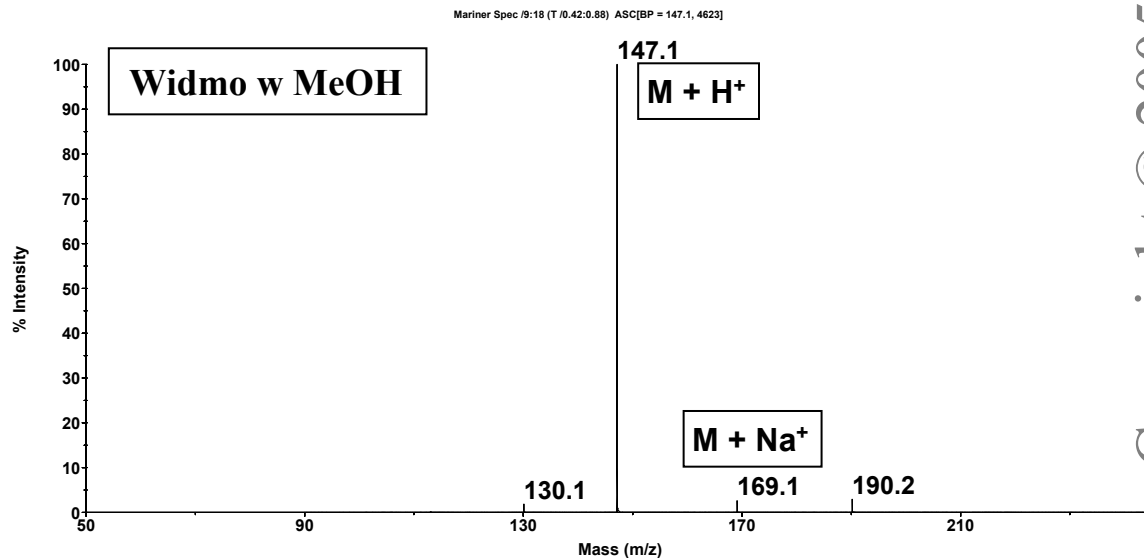
Widma ESI trietylenotetraminy w różnych rozpuszczalnikach



Aminy mogą reagować z formaldehydem (powstającym w wyniku anodowego utleniania metanolu), dając kationy imoniowe:



Taka reakcja jest dość rzadko spotykana w ESI, ale trzeba się z nią liczyć.



2. Jaki jest skład elementarny związku (wzór sumaryczny)?

Metody:

- dokładny pomiar masy jonu molekularnego lub pseudomolekularnego i komputerowe dopasowanie możliwych składów elementarnych;
- badanie profilu izotopowego.

Dokładne masy atomowe i składy izotopowe najłżejszych pierwiastków

H, 2

1.00782504, 99.985
2.01410179, 0.015

He, 2

3.01602930, 0.00013
4.00260325, 99.99987

Li, 2

6.01512320, 7.52
7.01600450, 92.48

Be, 1

9.01218250, 100.0

B, 2

10.01293800, 18.98
11.00930530, 81.02

C, 2

12.00000000, 98.892
13.00335484, 1.108

N, 2

14.00307401, 99.635
15.00010898, 0.365

O, 3

15.99491464, 99.759
16.99913060, 0.037
17.99915939, 0.204

F, 1

18.99840325, 100.0

Ne, 3

19.99243910, 90.92
20.99384530, 0.257
21.99138370, 8.82

Na, 1

22.98976970, 100.0

Mg, 3

23.98504500, 78.60
24.98583920, 10.11
25.98259540, 11.29

Al, 1

26.98154130, 100.0

Si, 3

27.97692840, 92.18
28.97649640, 4.71
29.97377170, 3.12

P, 1

30.97376340, 100.0

S, 4

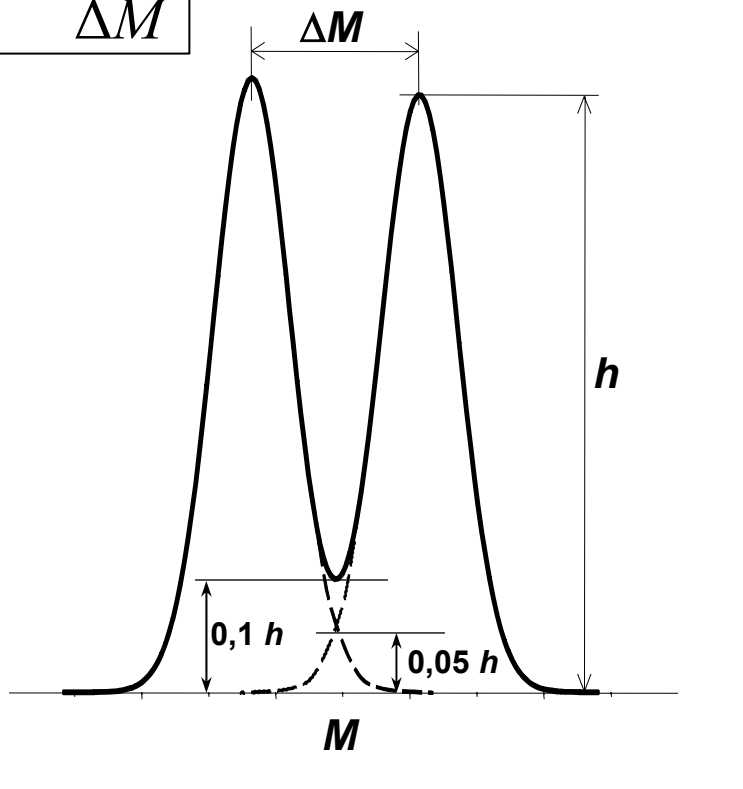
31.97207180, 95.018
32.97145910, 0.750
33.96786774, 4.215
35.96707900, 0.107

Cl, 2

34.96885273, 75.4
36.96590262, 24.6

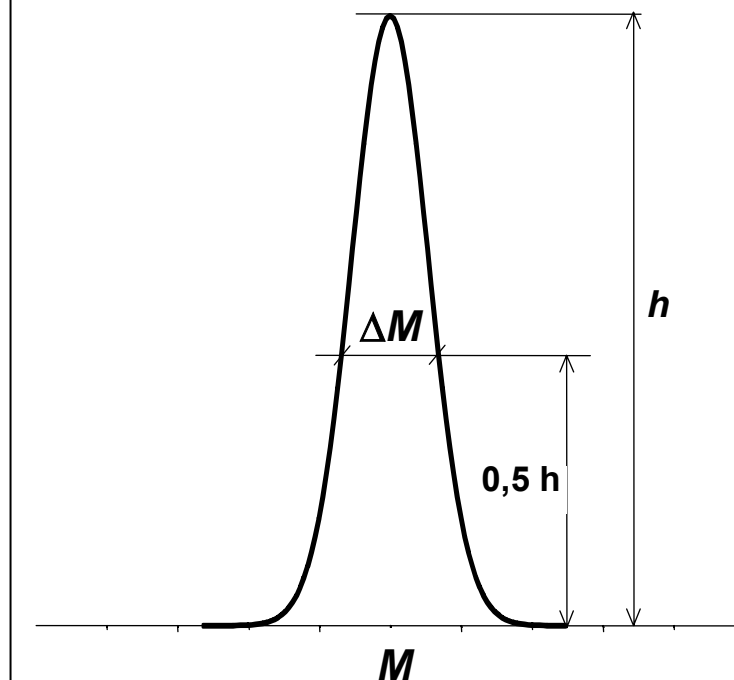
Definicje zdolności rozdzielczej spektrometru mas

$$R_{10\%} = \frac{M}{\Delta M}$$



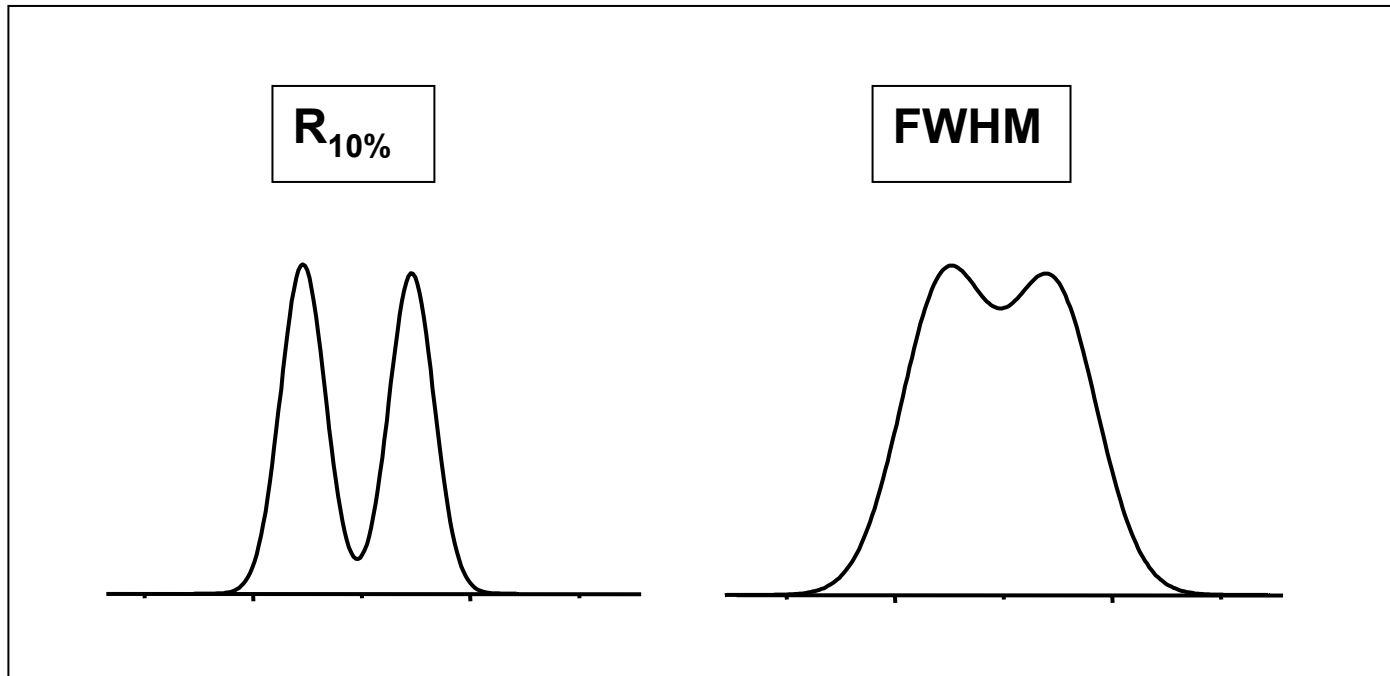
10%-owa dolina ($R_{10\%}$)
- odpowiada szerokości
na poziomie 5%

$$\text{FWHM} = \frac{M}{\Delta M}$$



Szerokość połówkowa
(FWHM – Full Width
at Half Maximum)

Wpływ definicji zdolności rozdzielczej spektrometru na wygląd widma

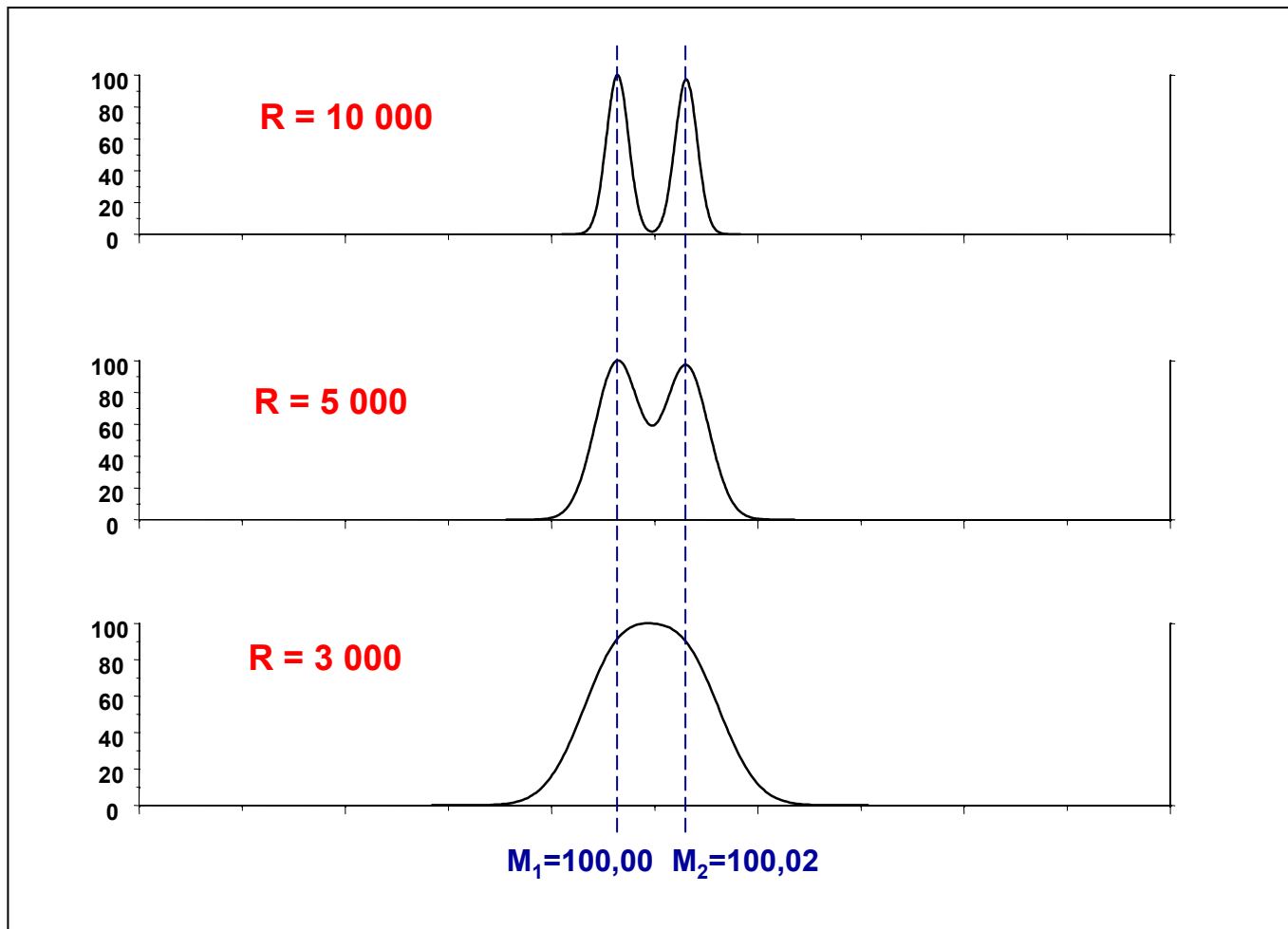


Widma dla takiej samej nominalnie rozdzielczości
 $R_{10\%}$ i FWHM

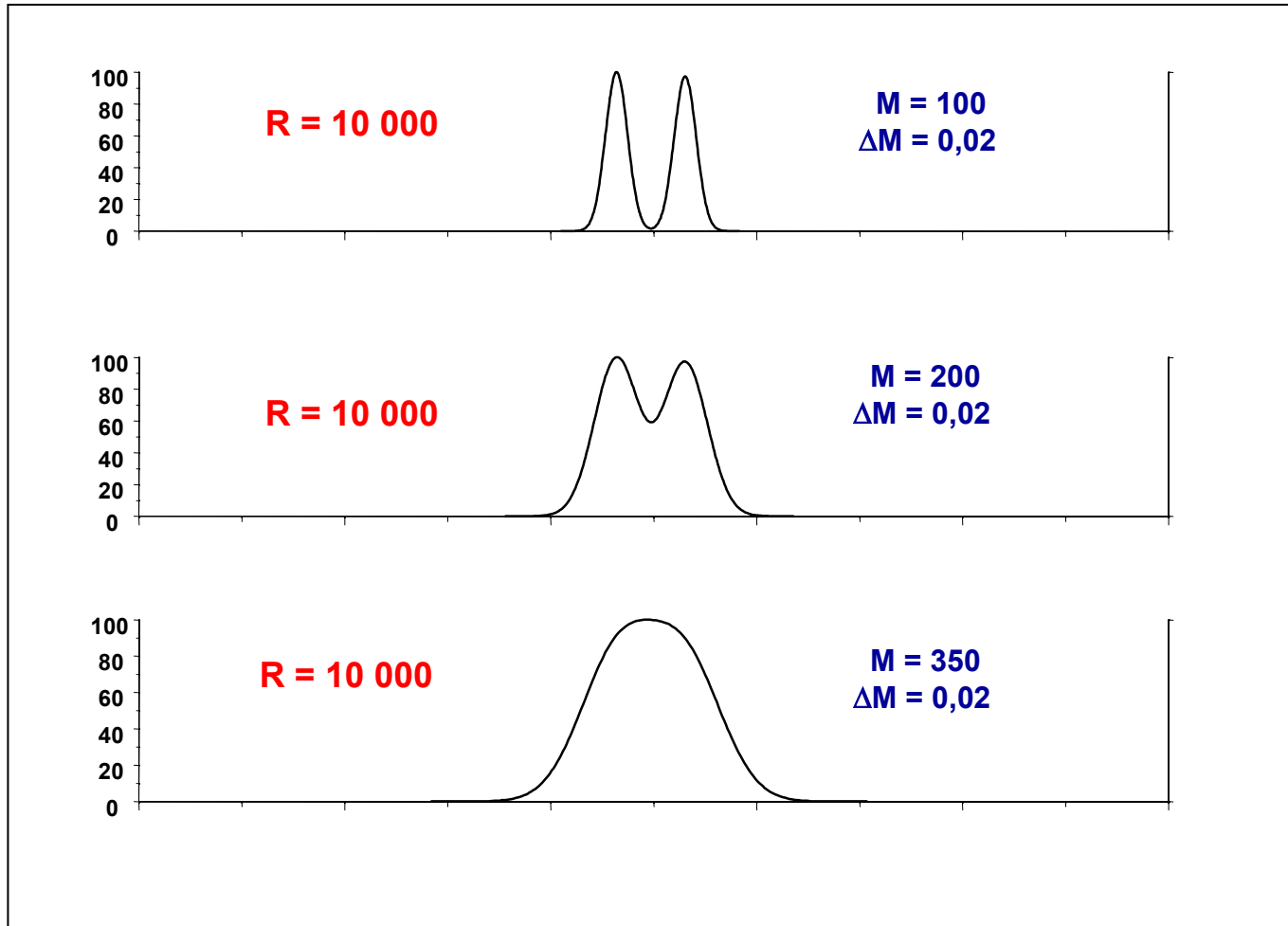
Przykład wymagań dotyczących rozdzielczości niezbędnej dla rozróżnienia pików

	M	ΔM	R
CO	27,9949		
		0,0113	2478
N₂	28,0062		
		0,0250	1120
C₂H₄	28,0312		

Wpływ zdolności rozdzielczej spektrometru na wygląd widma



Wpływ masy jonów przy stałej różnicy masy i rozdzielczości na wygląd widma



Dokładny pomiar masy - wymagania

Ważne:

Dokładny pomiar masy nie zastępuje analizy elementarnej, ponieważ nie dostarcza informacji o czystości próbki. Pozwala jedynie na stwierdzenie, że w widmie masowym badanej próbki znajduje się pik pochodzący od jonu o masie odpowiadającej założonemu wzorowi sumarycznemu. Czystość związku należy udowodnić w inny sposób.

Wymagania większości czasopism odnośnie dokładnych pomiarów masy są następujące:

1. Pomiar musi dotyczyć jonu molekularnego lub pseudomolekularnego (a nie jonów fragmentacyjnych).
2. Dokładność pomiaru powinna wynosić **5 ppm** (w niektórych czasopismach dopuszcza się 10 ppm, zwłaszcza dla wyższych mas).
3. Można mierzyć masy nie przekraczające **800 u**.

Wpływ dokładności pomiaru masy na liczbę możliwych wzorów sumarycznych

Elements: C12:20 H1:30 N14:4 O16:6 S32:1

Tolerance window: 2 mmu (ok. 8 ppm)

Mass (u)	Deviation (mmu)	Formula
260.08306	.0	C:10 H:16 N:2 O:4 S:1
	-.7	C:16 H:10 N:3 O:1 S:0
	.7	C:18 H:12 N:0 O:2 S:0

Elements: C12:20 H1:30 N14:4 O16:6 S32:1

Tolerance window: 5 mmu (ok. 19 ppm)

Mass (u)	Deviation (mmu)	Formula
260.08306	-4.0	C:5 H:16 N:4 O:6 S:1
	.0	C:10 H:16 N:2 O:4 S:1
	-3.4	C:13 H:12 N:2 O:4 S:0
	2.7	C:13 H:14 N:3 O:1 S:1
	4.0	C:15 H:16 N:0 O:2 S:1
	-.7	C:16 H:10 N:3 O:1 S:0
	.7	C:18 H:12 N:0 O:2 S:0

Wpływ wyboru pierwiastków na liczbę możliwych wzorów sumarycznych

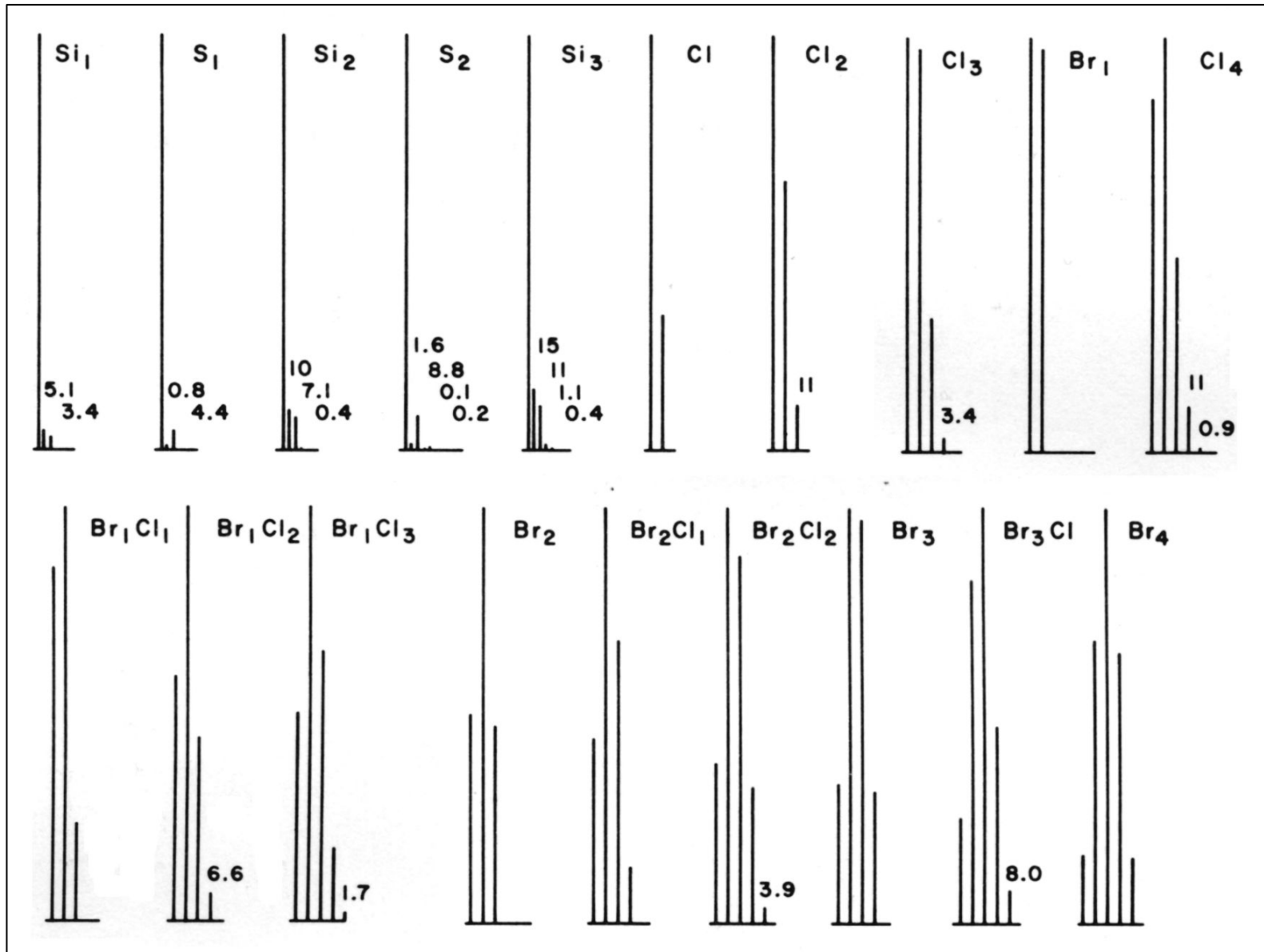
Elements: C12:12 H1:30 N14:4 O16:4 S32:1
Tolerance window: 5 mmu
Mass Deviation Formula
(u) (mmu)
260.08306 .0 C:10 H:16 N:2 O:4 S:1

Elements: C12:16 H1:30 N14:4 O16:4 S32:1
Tolerance window: 5 mmu
Mass Deviation Formula
(u) (mmu)
260.08306 .0 C:10 H:16 N:2 O:4 S:1
-3.4 C:13 H:12 N:2 O:4 S:0
2.7 C:13 H:14 N:3 O:1 S:1
4.0 C:15 H:16 N:0 O:2 S:1
-.7 C:16 H:10 N:3 O:1 S:0

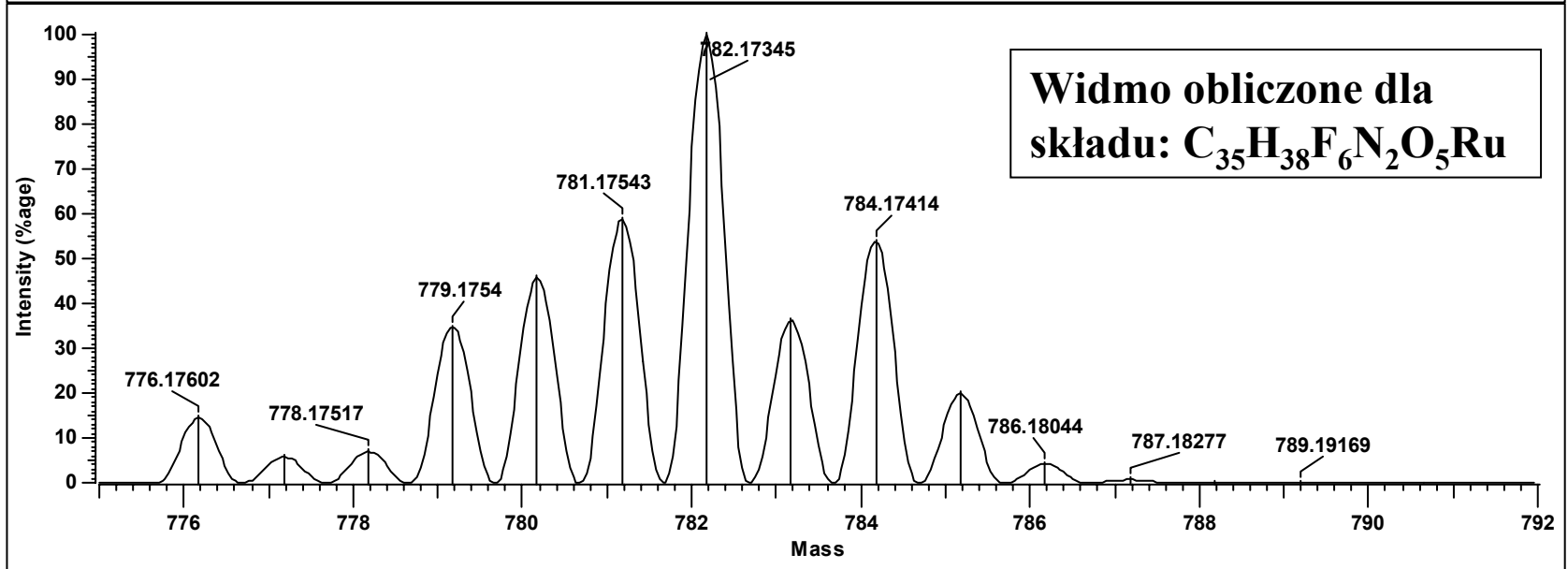
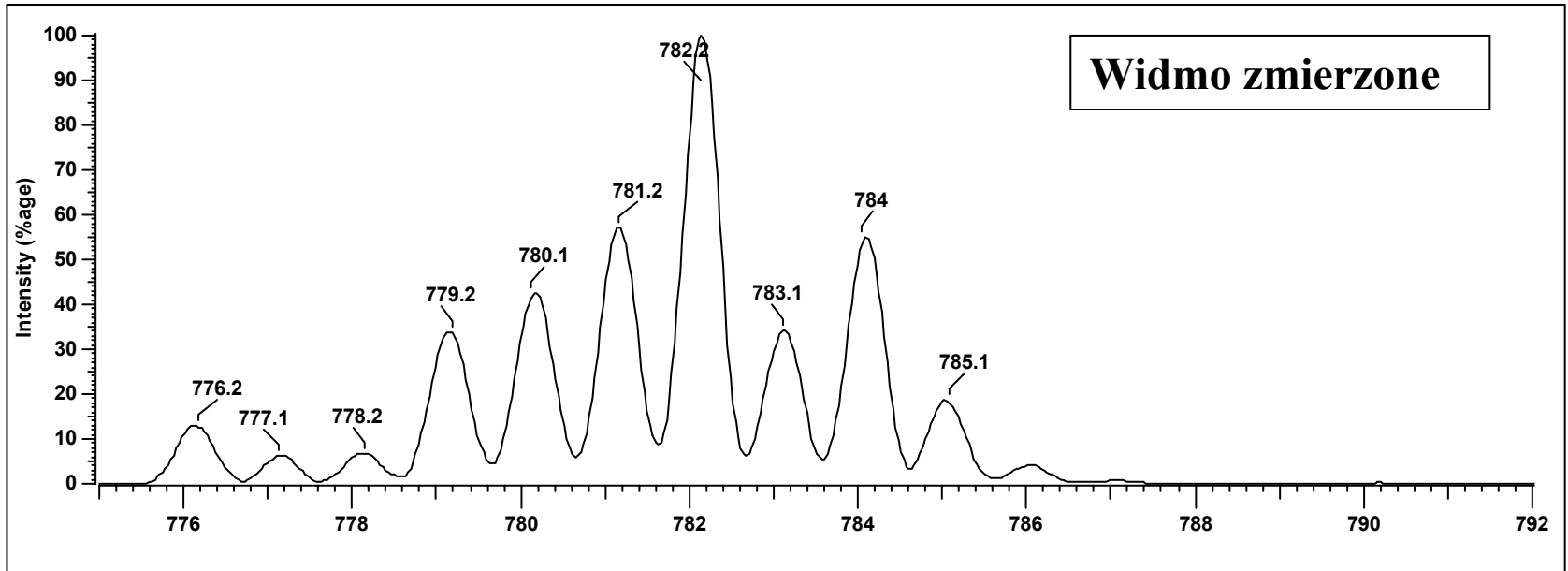
Elements: C12:16 H1:30 N14:4 O16:4
Tolerance window: 5 mmu
Mass Deviation Formula
(u) (mmu)
260.08306 -3.4 C:13 H:12 N:2 O:4
-.7 C:16 H:10 N:3 O:1

Elements: C12:20 H1:20 O16:2 S32:1
Tolerance window: 5 mmu
Mass Deviation Formula
(u) (mmu)
260.08306 4.0 C:15 H:16 O:2 S:1
.7 C:18 H:12 O:2 S:0

Profile izotopowe kombinacji pospolitych pierwiastków dwuizotopowych typu M+2



Porównanie profilu izotopowego zmierzonego i obliczonego



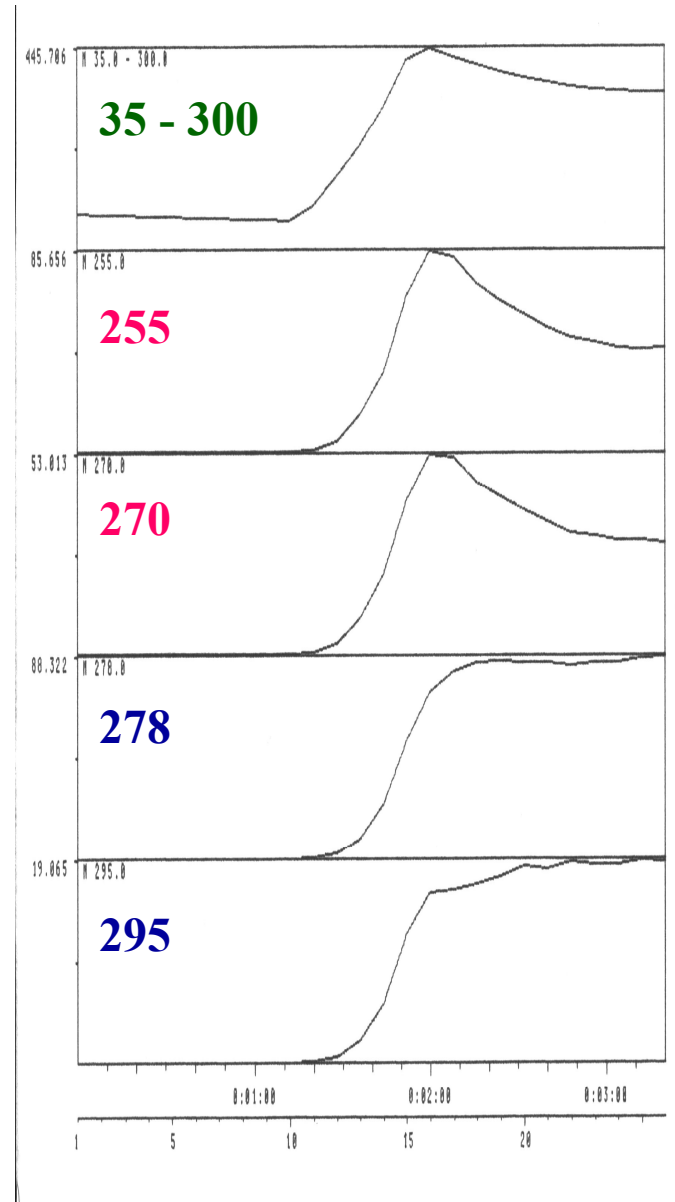
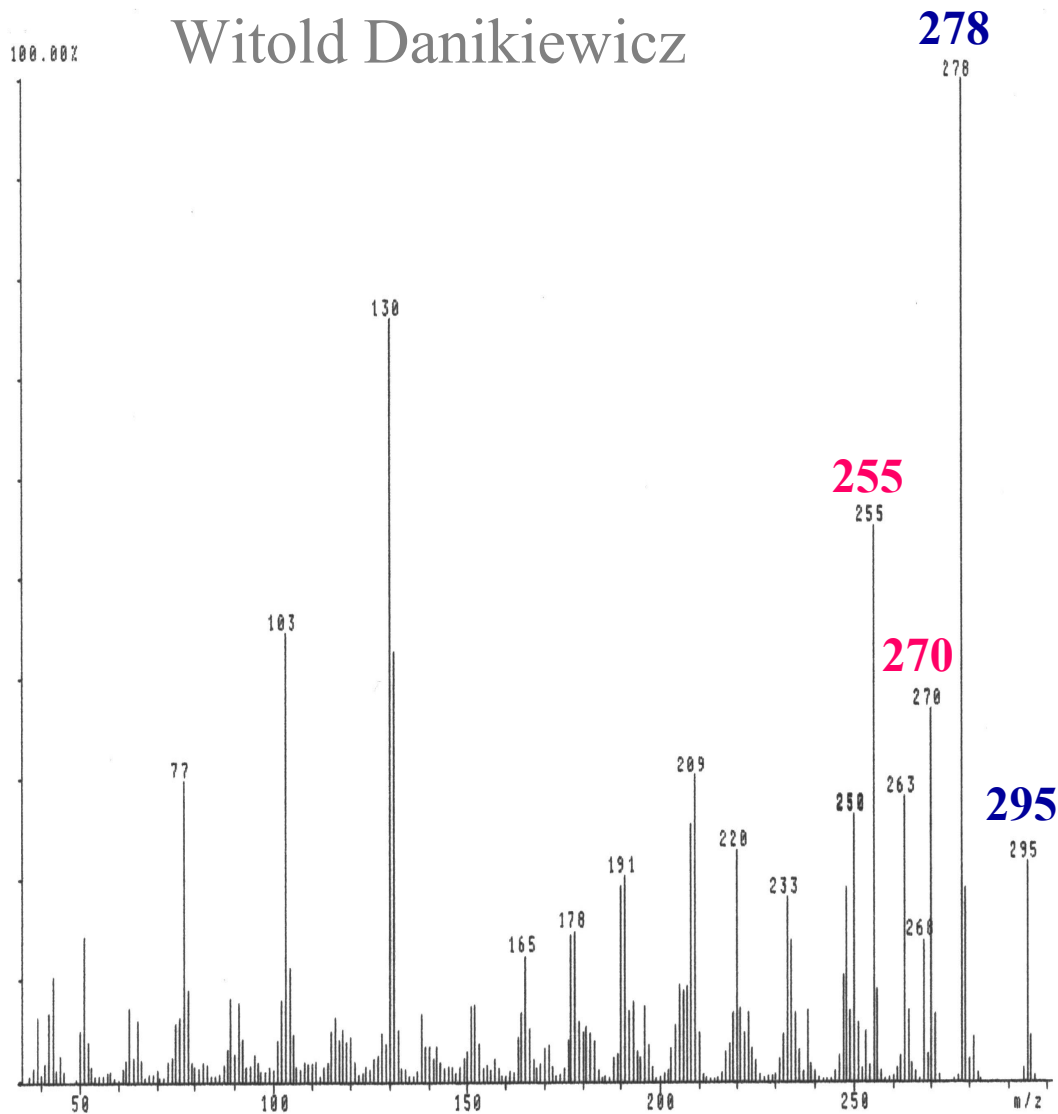
3. Czy związek jest czysty?

Metody:

- zachowanie próbki podczas parowania w źródle jonów (w EI);
- stwierdzenie obecności więcej niż jednego jonu molekularnego;
- stwierdzenie wzajemnej niezgodności widm jonów dodatnich i ujemnych.

Badanie zachowania próbki podczas parowania w źródle jonów EI

Copyright © 2005
Witold Danikiewicz



4. Jaka jest budowa cząsteczki związku (wzór strukturalny)?

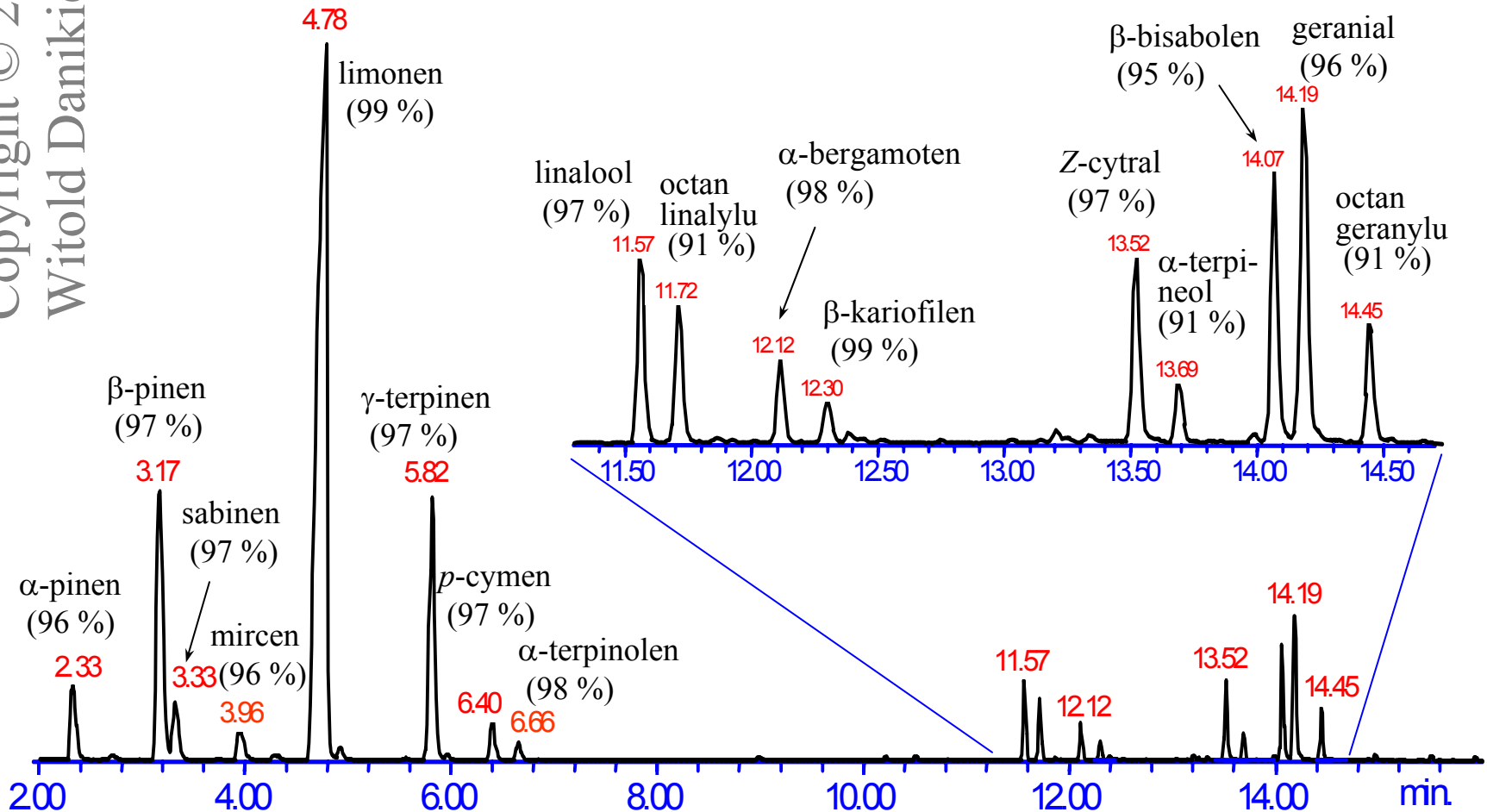
Metody:

- analiza fragmentacji w standardowym widmie EI;
- identyfikacja związków znanych przez porównanie widma eksperymentalnego z widmami z komputerowej biblioteki widm;
- badanie ścieżek fragmentacji poprzez rejestrowanie jonów metastabilnych i jonów powstających w wyniku aktywacji zderzeniowej (CID);
- dokładne pomiary masy jonów fragmentacyjnych;
- wymiana izotopowa;
- otrzymywanie i badanie pochodnych.

Chromatogram GC/MS olejku cytrynowego.

Składniki zidentyfikowano na podstawie biblioteki widm Wiley'a

Copyright © 2005
Witold Danikiewicz



Liczby w nawiasach określają w procentach współczynnik zgodności widma zmierzonego i bibliotecznego

Statystyka procedury porównywania widm

Average of 14.039 to 14.086 min.: CYTR6.D

olejek cytrynowy w heksanie 0.2 ul

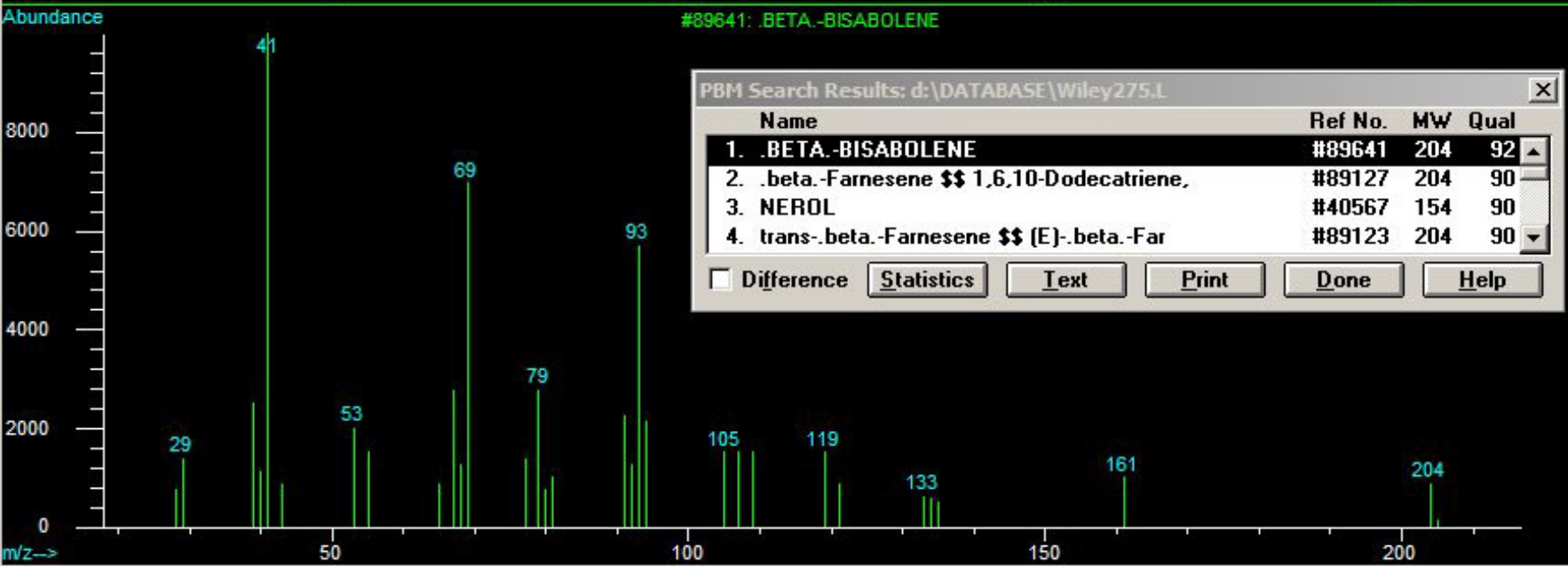
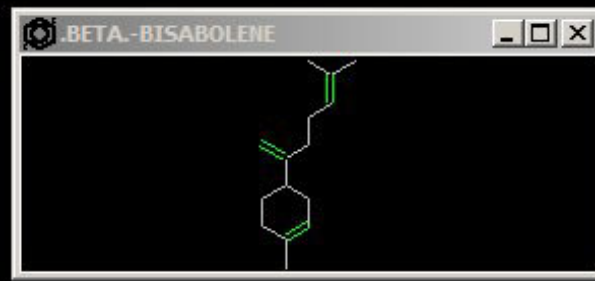
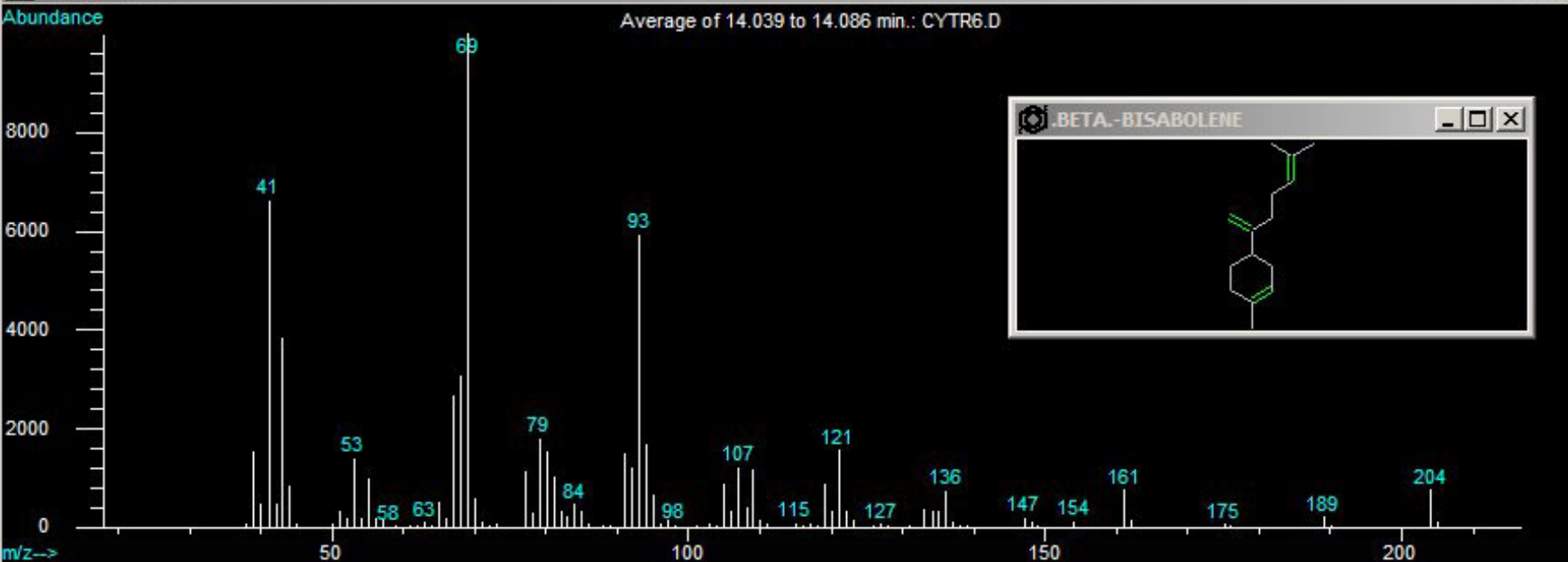
Copyright © 2005

Witold Danikiewicz

PBM Search of library d:\DATABASE\Wiley275.L

Name	MolWt	Formula	Qual
1. .BETA.-BISABOLENE	204	C15H24	92
2. .beta.-Farnesene \$\$ 1,6,10-Dodecatriene,	204	C15H24	90
3. NEROL	154	C10H18O	90
4. trans-.beta.-Farnesene \$\$ (E)-.beta.-Far	204	C15H24	90
5. .beta.-Bisabolene \$\$ Cyclohexene, 1-meth	204	C15H24	81
6. .BETA.-BISABOLENE	204	C15H24	72
7. .beta. bisabolene \$\$ BETA-BISABOLENE	204	C15H24	70
8. (Z)-.beta.-Farnesene \$\$ 1,6,10-Dodecatri	204	C15H24	70
9. 5-BROMO-3-PENTENE \$\$ 1-Pentene, 5-bromo-	148	C5H9Br	60
10. CIS-.ALPHA.-BISABOLENE	204	C15H24	53
11. .alpha.-Humulene \$\$ 1,4,8-Cycloundecatri	204	C15H24	52
12. .alpha.-Humulene \$\$ 1,4,8-Cycloundecatri	204	C15H24	50
13. .alpha.-Humulene \$\$ 1,4,8-Cycloundecatri	204	C15H24	50
14. .alpha.-Humulene \$\$ 1,4,8-Cycloundecatri	204	C15H24	50
15. .ALPHA.-HUMULENE \$\$ ALPHA-HUMULENE	204	C15H24	50
16. .alpha.-Humulene \$\$ 1,4,8-Cycloundecatri	204	C15H24	38
17. CIS-.ALPHA.-BISABOLENE	204	C15H24	38
18. .beta.-Bisabolene \$\$ Cyclohexene, 1-meth	204	C15H24	38
19. .beta.-Bisabolene \$\$ Cyclohexene, 1-meth	204	C15H24	38
20. .beta.-Bisabolene \$\$ Cyclohexene, 1-meth	204	C15H24	38

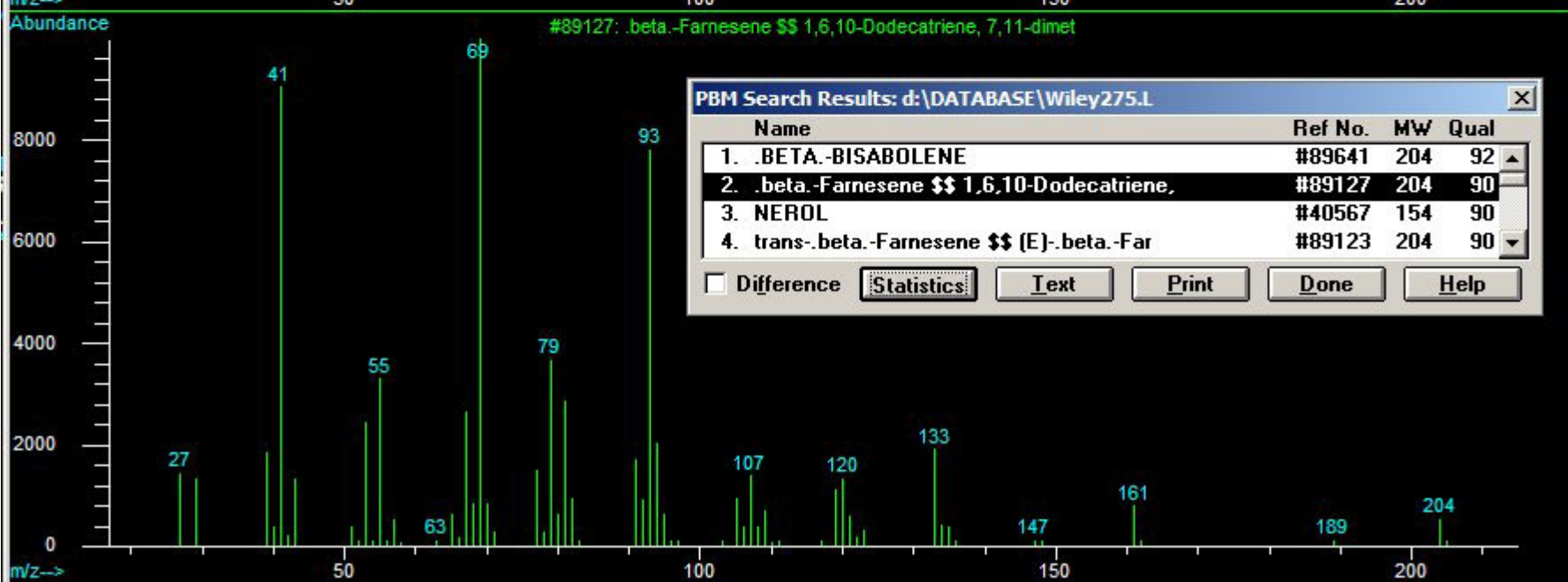
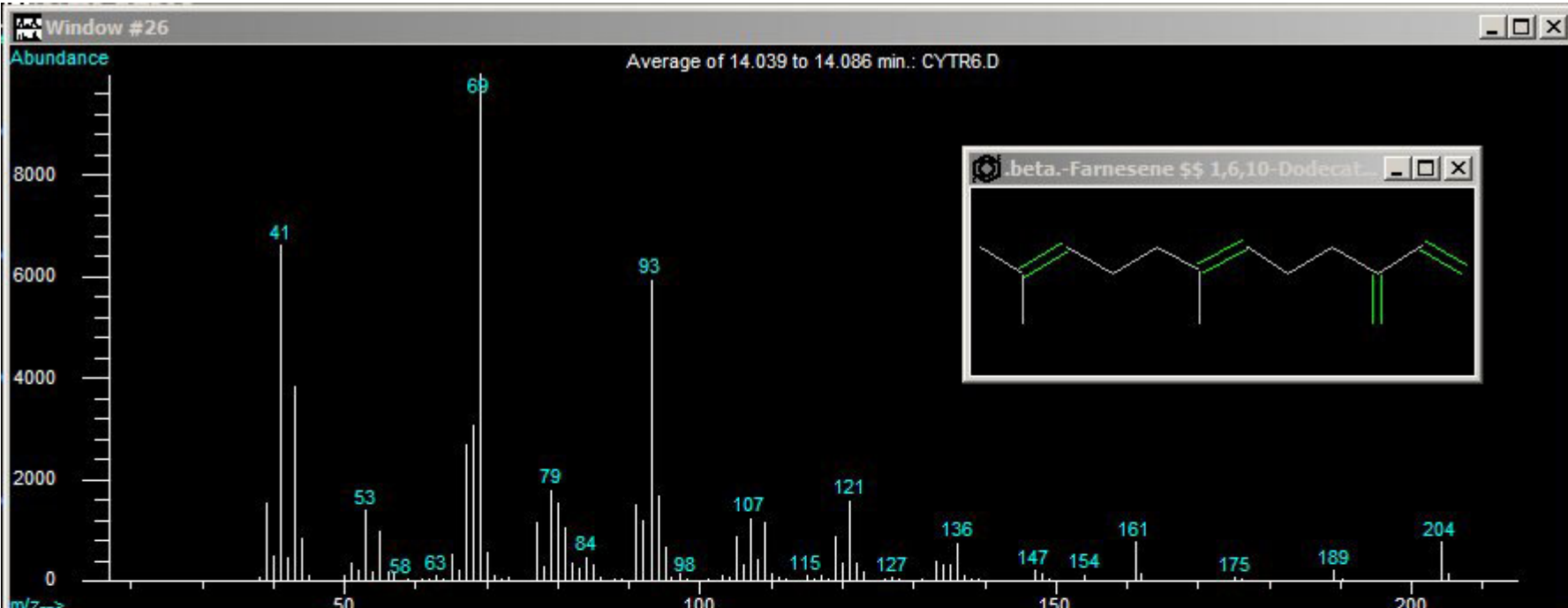
Window #26



PBM Search Results: d:\DATABASE\Wiley275.L

Name	Ref No.	MW	Qual
1. .BETA.-BISABOLENE	#89641	204	92
2. .beta.-Farnesene \$\$ 1,6,10-Dodecatriene,	#89127	204	90
3. NEROL	#40567	154	90
4. trans-.beta.-Farnesene \$\$ (E)-.beta.-Far	#89123	204	90

Difference

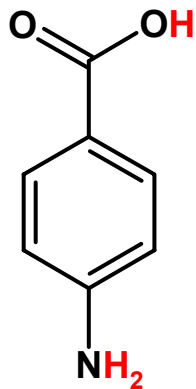


PBM Search Results: d:\DATABASE\Wiley275.1

Name	Ref No.	MW	Qual
1. .BETA.-BISABOLENE	#89641	204	92
2. .beta.-Farnesene \$\$ 1,6,10-Dodecatriene,	#89127	204	90
3. NEROL	#40567	154	90
4. trans-.beta.-Farnesene \$\$ (E)-.beta.-Far	#89123	204	90

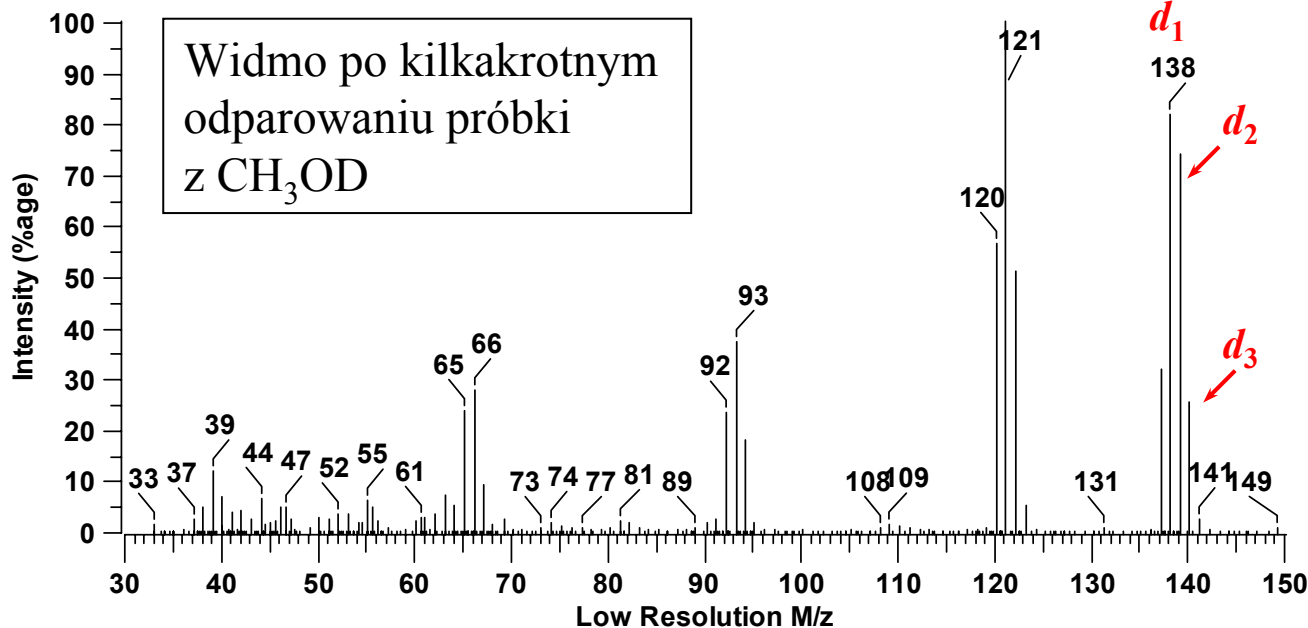
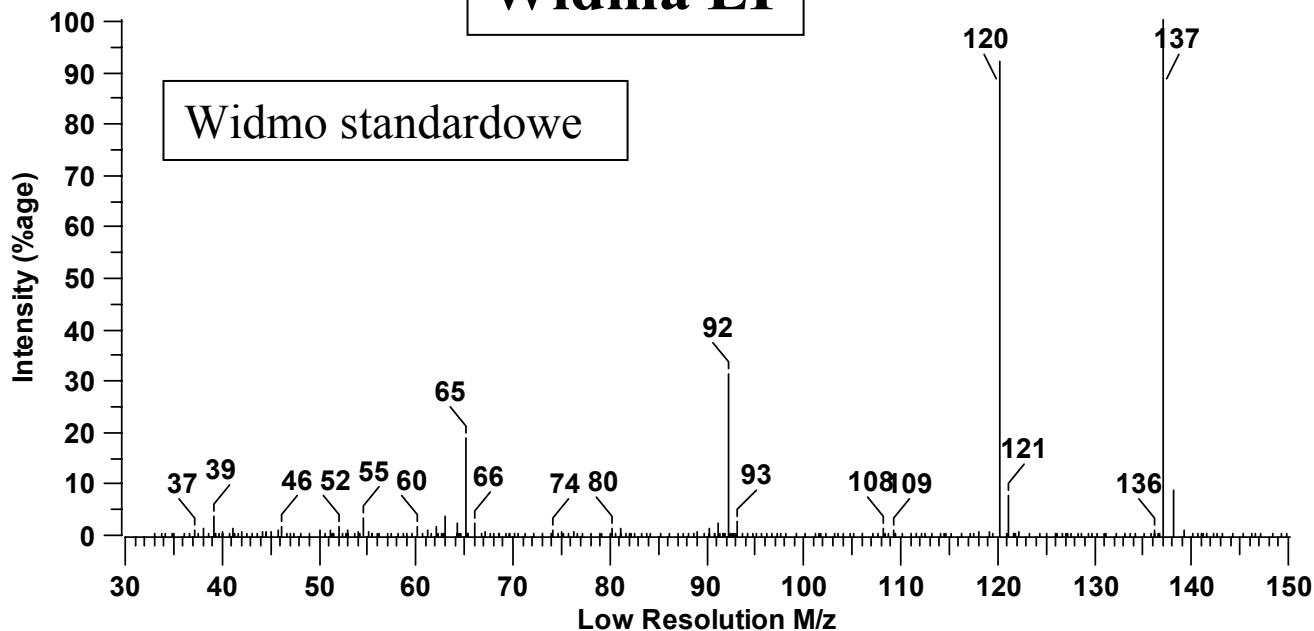
Difference
 Statistics

Wykorzystanie wymiany izotopowej do ustalania liczby wymiennalnych atomów wodoru

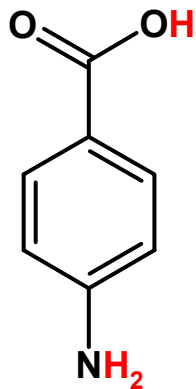


$M = 137$

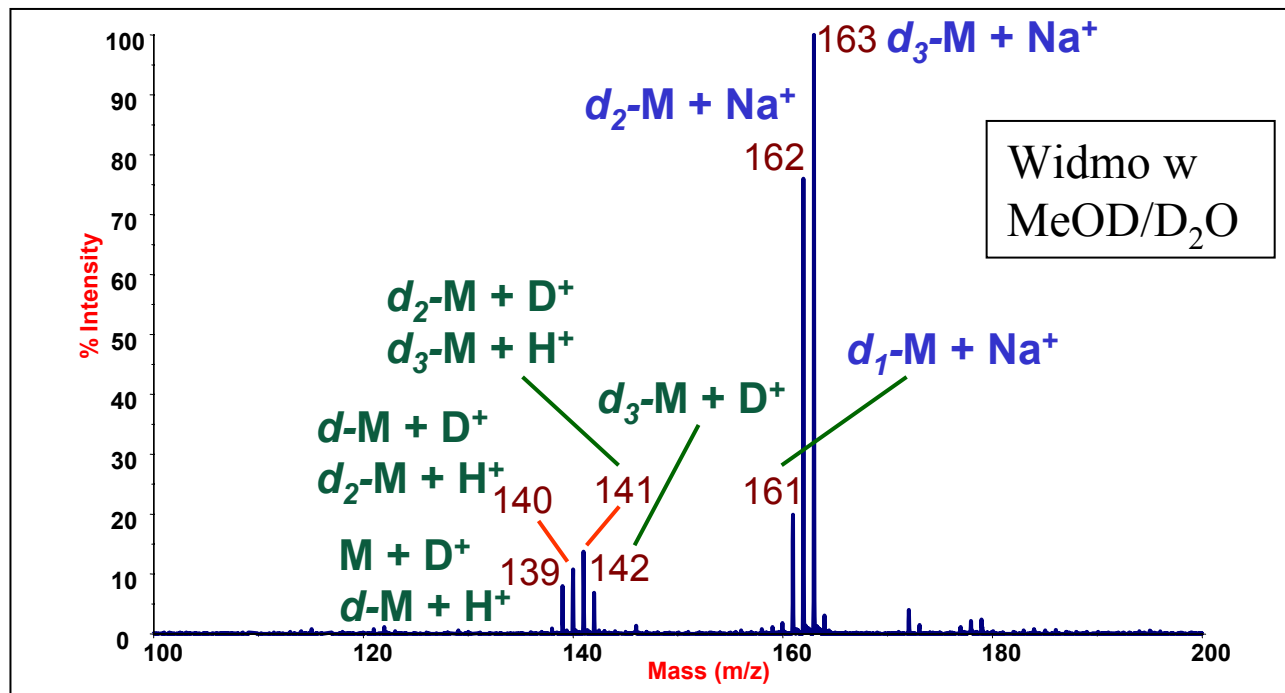
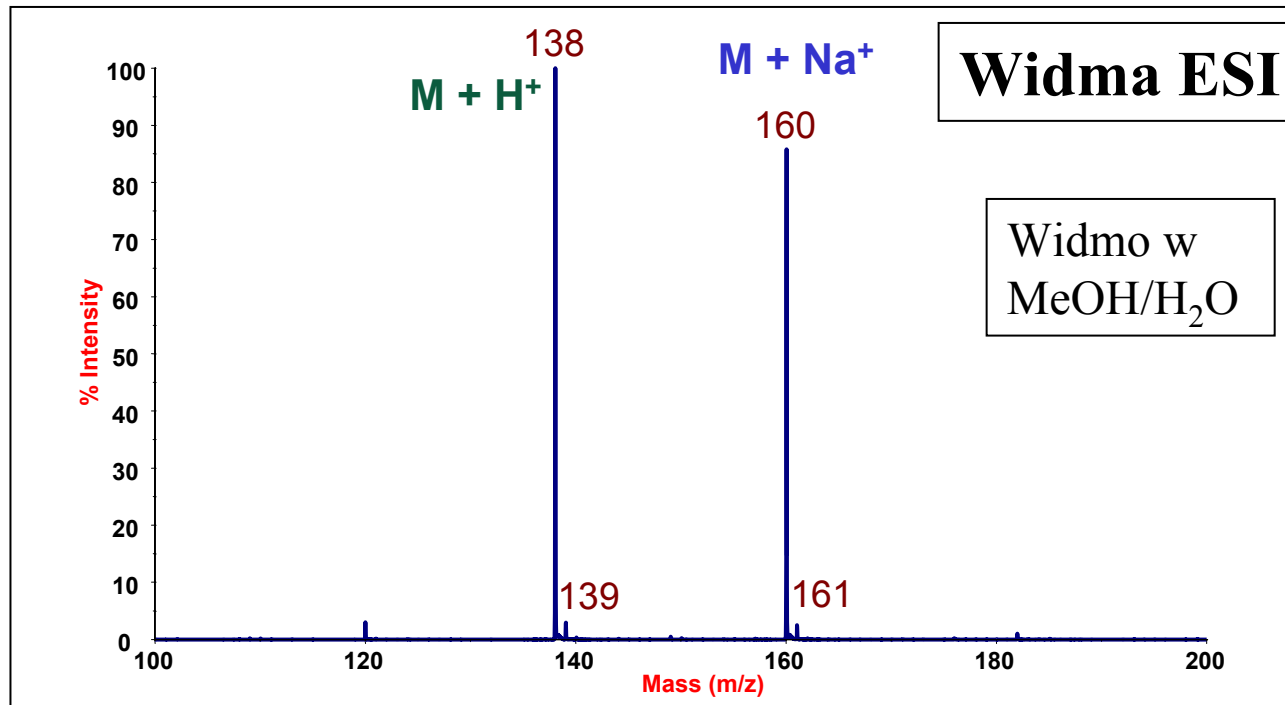
Widma EI



Wykorzystanie wymiany izotopowej do ustalania liczby wymiennalnych atomów wodoru

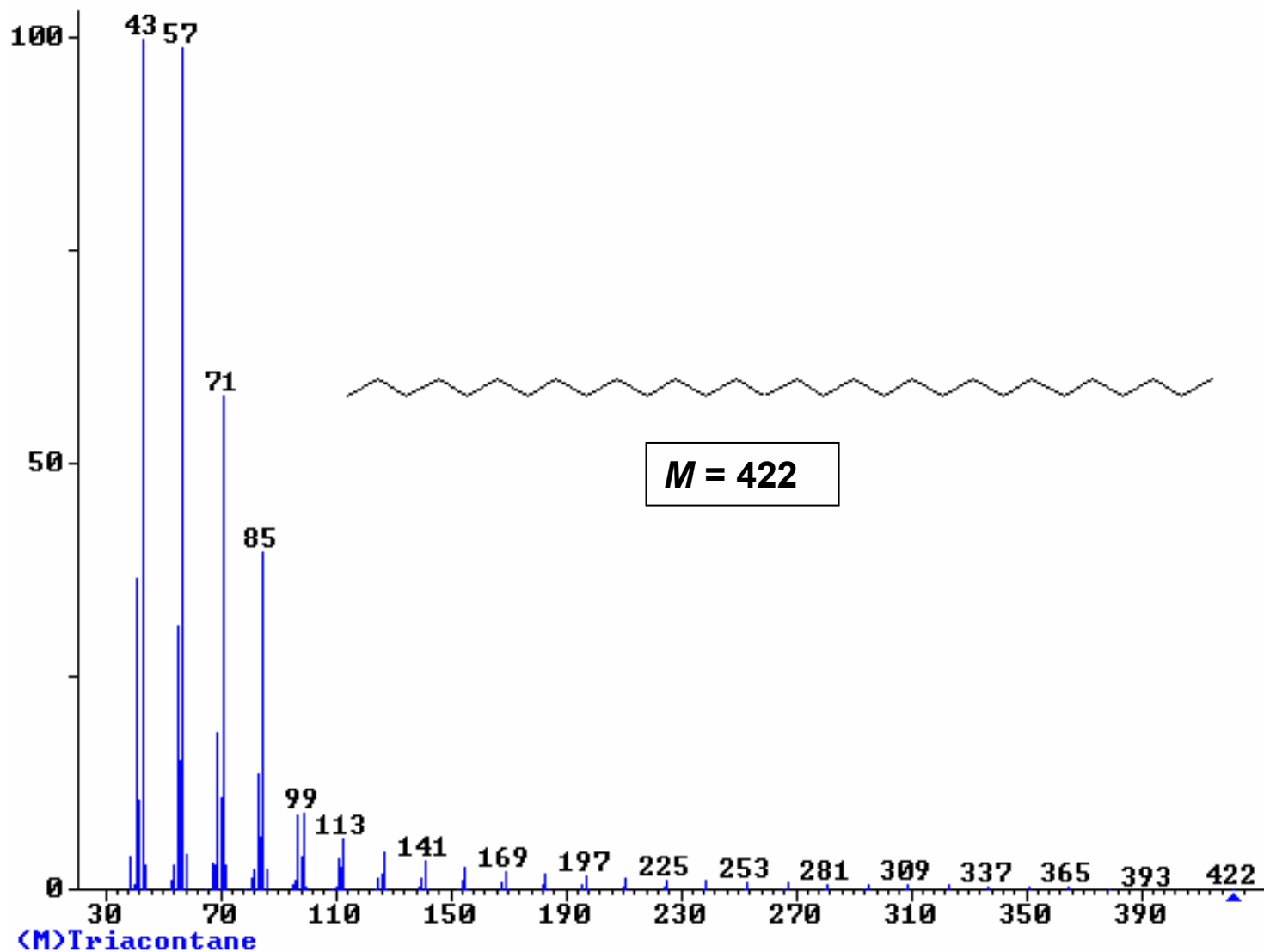


$M = 137$

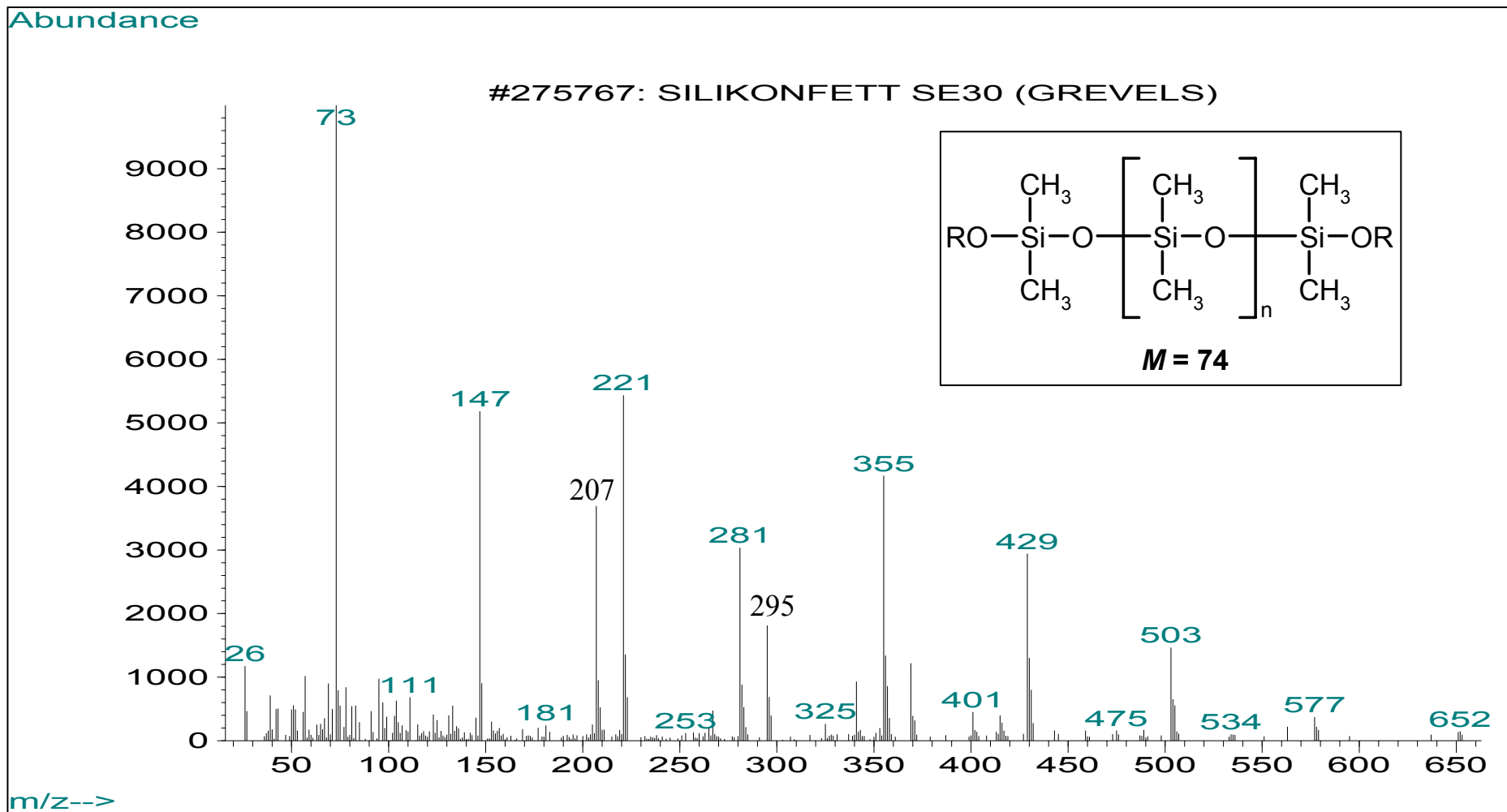


Typowe zanieczyszczenia próbek obserwowane w widmach masowych

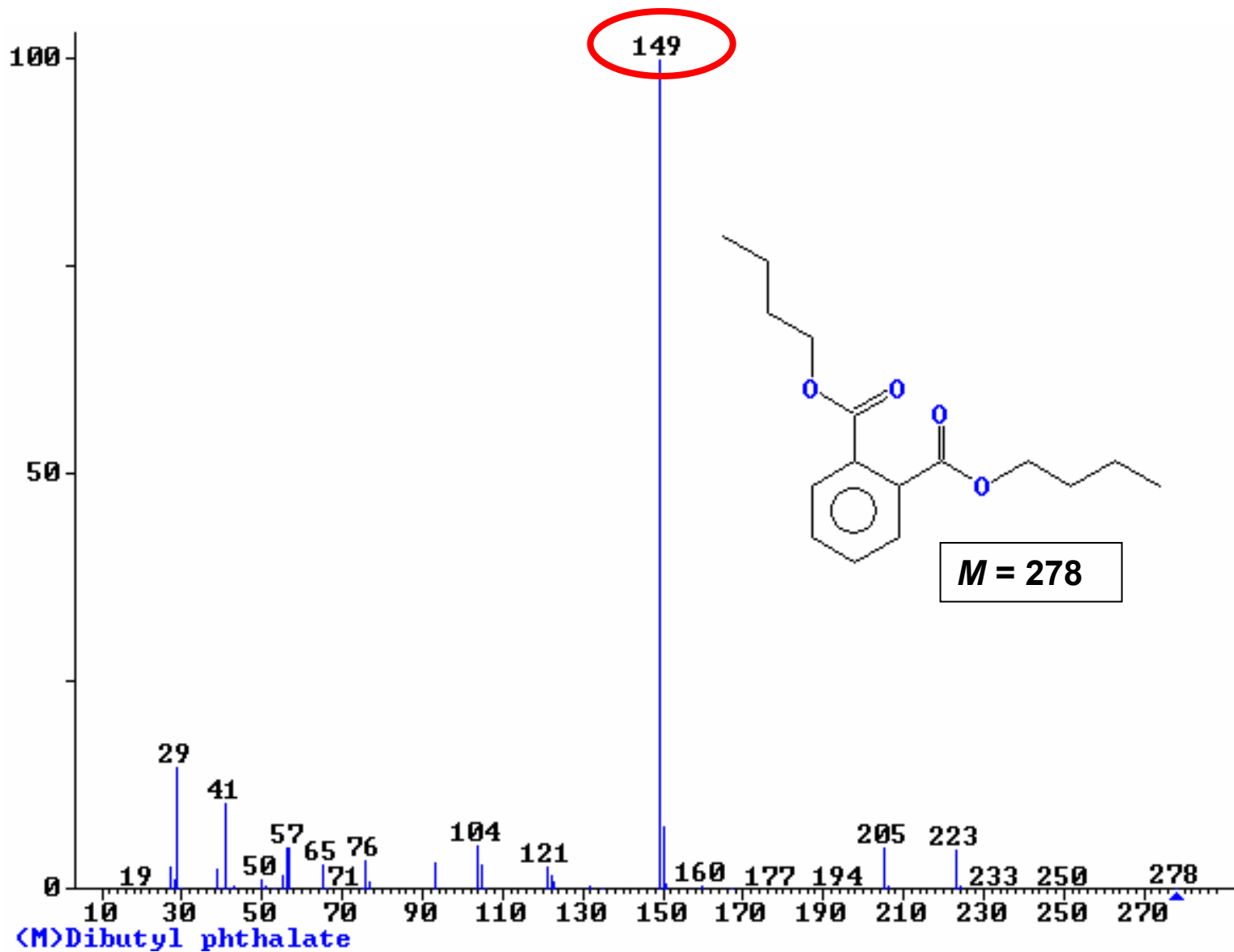
Węglowodory nasycone (na przykładzie triakontanu – $C_{30}H_{62}$)



Silikony

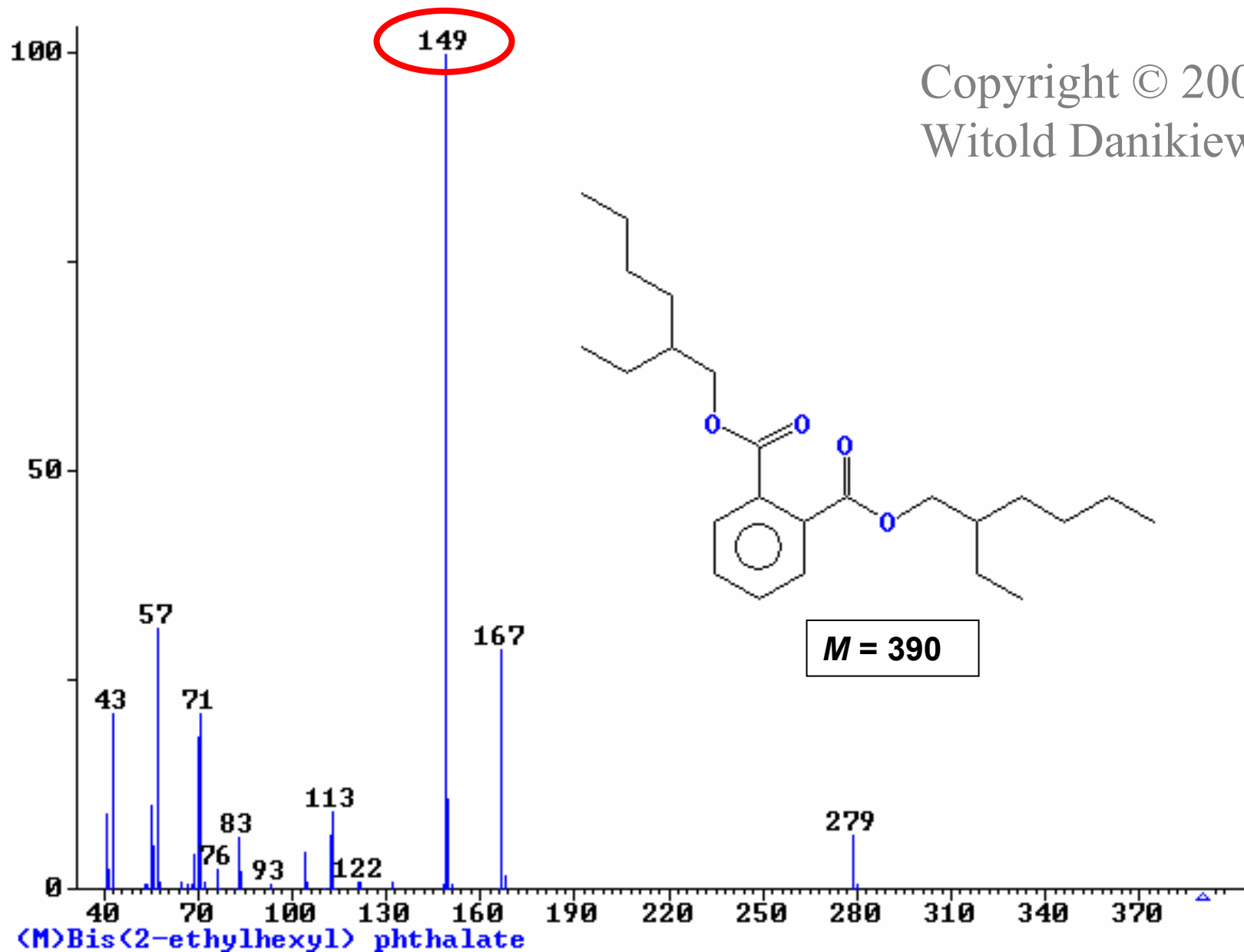


Ftalan di-*n*-butylu



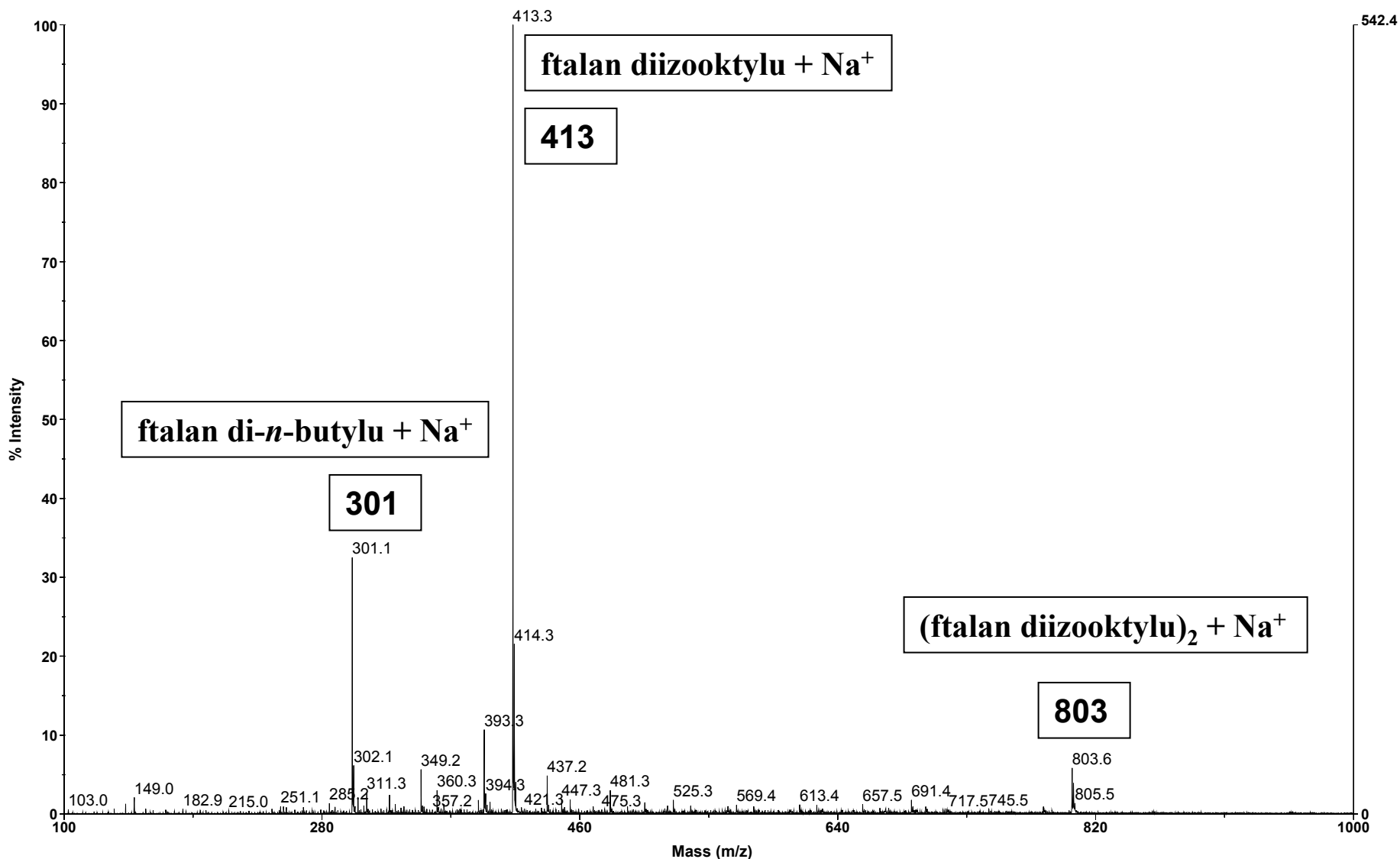
Ftalan diizooktylu

Copyright © 2005
Witold Danikiewicz



Widmo ESI ftalanów

Spec /2:19 ASC[BP = 413.3, 542]



Siarka

(widmo rzeczywistej próbki zanieczyszczonej siarką)

