

Experimentální metody strukturálního výzkumu

Hmotnostní spektrometrie

Michal Holčapek

Plná PDF verze přednášky ke stažení:
<http://holcapek.upce.cz/>

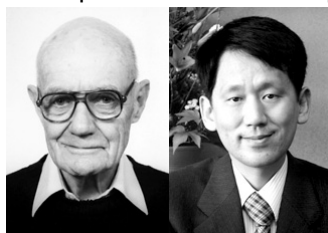
Hmotnostní spektrometrie Držitelé Nobelových cen za chemii nebo fyziku



Francis William Aston (1922, chemie)
hmotnostní spektrometrie izotopů



Wolfgang Paul (1989, fyzika)
popis iontové pasti



John B. Fenn (elektrosprej) a Koichi Tanaka (MALDI) (2002, chemie)
vývoj měkkých ionizačních technik pro hmotnostní spektrometrii biomakromolekul

Úvod do hmotnostní spektrometrie

- **Hmotnostní spektrometrie (MS)** je analytická metoda sloužící k převedení molekul na ionty, rozlišení těchto iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) a následnému záznamu relativních intenzit jednotlivých iontů
- **Hmotnostní spektrometr** je iontově-optické zařízení, které rozlišuje ionty podle poměru jejich m/z
 - + vysoká citlivost
 - + kvalitativní analýza - určení M_R a dalších strukturních informací
 - + kvantitativní analýza - odezva je závislá na koncentraci
 - + minimální spotřeba vzorku
 - destruktivní metoda
 - vysoké pořizovací a provozní náklady

Základní termíny

- **hmotnostní spektrometrie (MS)** - obor zabývající se hmotnostními spektrometry a jejich výsledky
 - zkratku MS nelze využívat jako zkratku pro hmotnostní spektrometr
 - nepoužívat hmotnostní spektroskopie nebo hmotnostní spektroskop - využívají pro detekci iontů fotografickou desku
- **hmotnostní spektrometr** - zařízení, které měří m/z hodnoty a zaznamenává jejich intenzitu
 - ne hmotnostní spektroskop, hmotnostní spektrofotometr, atd.
- **hmotnostní spektrum** - graf závislosti intenzity iontů (absolutní/relativní) na jejich m/z
 - ne chromatogram

Základní termíny

- **m/z** - bezrozměrná veličina získaná vydělením hmotnosti iontu nábojovým číslem (počtem elementárních nábojů, bez ohledu na polaritu)
- Dalton (Da) - není SI jednotka, většinou se používá v biologii, pro molekulové hmotnosti větších proteinů (kDa)
 - atomová hmotnostní jednotka (unified atomic mass unit) u - 1/12 hmotnosti ^{12}C
 - $1 \text{ u} = 1 \text{ Da} = 1.6605402(10) \times 10^{-27} \text{ kg}$
- **základní pík** spektra - pík s největší intenzitou ve spektru
- **ion prekurzoru** - ion, který reaguje za vzniku konkrétních produktových iontů
 - nepoužívá se termín "rodičovský ion"
- **produktový ion** - vzniká jako produkt po reakci z jednotlivých iontů prekurzoru
 - disociace (fragmentový ion), reakce ion/molekula, změna počtu nábojů
 - nepoužívat termín "dceřiný ion"
- **fragmentový ion** - produktový ion vzniklý disociací iontu prekurzoru
- **aduktový ion** - ion tvořený interakcí iontu s jedním a více atomy nebo molekulami
 - $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{K}]^+$, $[\text{M}+\text{Cl}]^-$, atd.

Základní termíny

- **molekulární ion** - ion vzniklý odebráním nebo přidáním jednoho a více elektronů za vzniku kladného nebo záporného iontu
- **protonovaná molekula** - ion vzniklý interakcí molekuly s protonem, $[\text{M}+\text{H}]^+$
- **deprotonovaná molekula** - ion vzniklý odštěpením protonu, $[\text{M}-\text{H}]^-$
- **hybridní analyzátor** - hmotnostní spektrometr, který kombinuje hmotnostní analyzátoři různého typu za účelem tandemové hmotnostní spektrometrie
- **celkový iontový proud** - suma iontových proudů všech m/z ve spektru
- **celkový iontový chromatogram** - závislost sumy iontových proudů všech m/z ve spektru na čase
- **extrahovaný iontový chromatogram** - závislost vybrané m/z na čase
- **záznam vybraného iontu** - měření vybrané m/z v závislosti na čase

Základní části hmotnostního spektrometru

1/ iontový zdroj - slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice (tzv. ionizace), konstrukce se liší podle použité ionizační techniky

2/ hmotnostní analyzátor - slouží k rozdělení iontů v plynné fázi za vysokého vakua podle poměru hmotnosti a náboje (m/z)

3/ detektor - slouží k detekci iontů po jejich rozdělení podle m/z a k určení relativní intenzity (četnosti) jednotlivých iontů

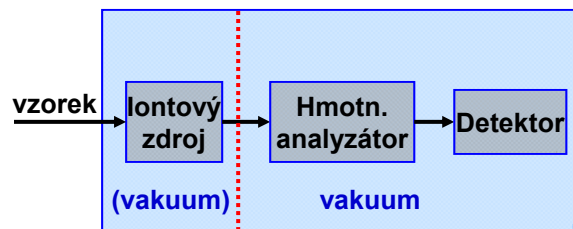
• další důležité části přístroje:

- vakuový systém

- iontová optika sloužící k urychlení a fokusaci iontů

- počítač na ovládání a ladění přístroje, sběr, ukládání a zpracování dat, porovnání spekter s knihovnou

Hmotnostní spektrometr



Ionizační techniky (= tvorba iontů)

• iontový zdroj hmotnostního spektrometru slouží k **převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice** (ionty)

• tvrdé ionizační techniky (EI) - ionizovaná molekula při ionizaci získá nadbytek vnitřní energie, což se projeví fragmentací molekulového iontu na menší části (tzv. fragmentové ionty)

• měkké ionizační techniky - (šetrné) ionizovaná molekula získá mnohem menší množství energie oproti EI, proto ve spektrech pozorujeme zejména (de)protonované molekuly a minimum fragmentových iontů

• ionizace může probíhat za sníženého tlaku (EI, CI, MALDI, atd.) nebo za atmosférického tlaku (ESI, APCI, APPI)

• volba ionizační techniky podle povahy analytu (M_R , polarita), příp. podle použité separační techniky (GC - EI, CI; HPLC - ESI, APCI, APPI)

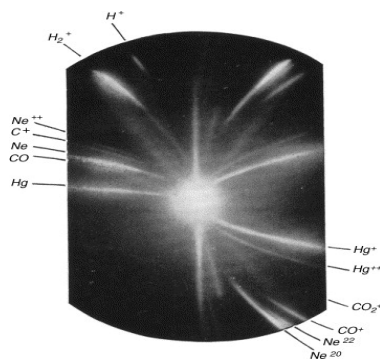
• zavádění vzorku do iontového zdroje - přímá infúze, separační technika, odpařování z kapiláry, atd.

Hmotnostní analyzátory (= dělení iontů)

- hmotnostní analyzátor slouží k **dělení iontů v plynné fázi za vakua podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z)**
- analyzátor je umístěn za iontovým zdrojem (tzn. molekuly již byly převedeny na ionty) a před detektorem (před detekcí musíme ionty rozdělit podle m/z)
- dělení iontů v analyzátoru probíhá **za vysokého vakua** (ca. 10^{-3} - 10^{-11} Pa, podle typu analyzátoru)
- dělení iontů podle m/z lze dosáhnout na základě různých fyzikálních principů:
 - 1/ zakřivení dráhy letu iontů v magnetickém nebo elektrickém poli (magnetický nebo elektrostatický analyzátor)
 - 2/ různá stabilita oscilací iontů v dvoj- nebo trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí (kvadrupól nebo iontová past)
 - 3/ různá doba rychlosti letu iontů (analyzátor doby letu – TOF)
 - 4/ různá frekvence harmonických oscilací v Orbitrapu
 - 5/ různá absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli (iontová cyklotronová resonance – ICR)

Detekce iontů

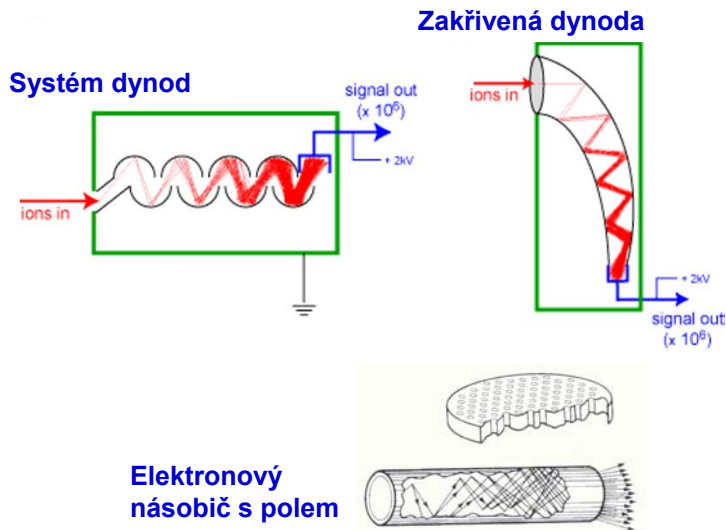
- detektory iontů používají všechny analyzátory kromě FTICR a Orbitrap, kde je v analyzátoru prováděna zároveň detekce
- ionty po rozdělení v hmotnostním analyzátoru dopadají na detektor iontů, který generuje signál z dopadajících iontů
 - tvorba sekundárních elektronů, které se následně zesilují
 - indukce proudu po dopadu iontů
- dříve využití fotografické desky, kde ionty o určité m/z dopadají na jedno místo desky a vytvářejí body, intenzita iontů je dána intenzitou zbarvení bodu



Fotografická deska Thompsonova spektroskopu (1907)

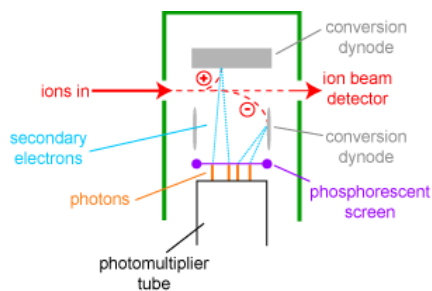
Detekce iontů

- **1/ elektronový násobič** – nejběžnější, ionty dopadají na povrch dynody, ze které vyrazí e^- , ty jsou dále zesíleny systémem dynod nebo opakovanými kolizemi na průběžné zakřivené dynodě, zesílení až 10^8 krát

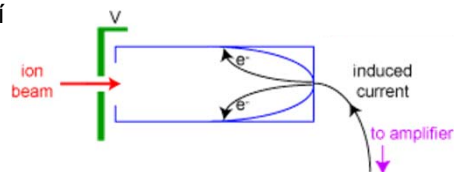


Detekce iontů

- **2/ fotonásobič** – ionty dopadají na konverzní dynodu, uvolní se e^- , dopadem na fosforovou destičku uvolní fotony, které se zesílí ve fotonásobiči, zesílení až 10^5 - 10^7 krát, delší životnost



- **3/ faradayova klec** – dopadající ionty narážejí na povrch dynody, která emituje e^- a indukuje se proud, který je následně zesílen a zaznamenán, málo citlivý, ale robustní, velmi přesné na izotopická měření

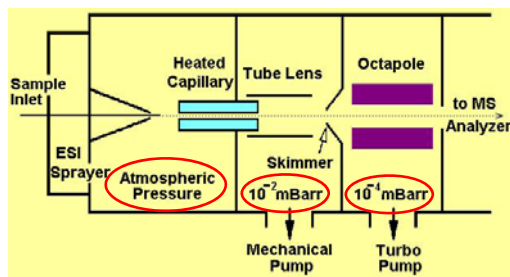
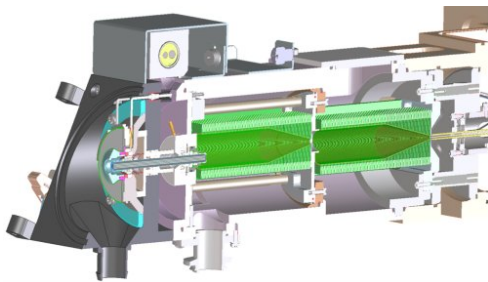
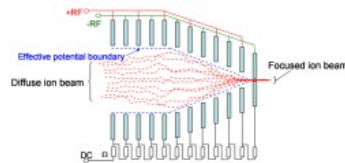


Vakuová technika

- různé požadavky na hodnotu vakua v různých částech hmotnostního spektrometru
 - iontový zdroj - za atmosférického tlaku (API - ESI, APCI, APPI) nebo vakua (EI, CI, MALDI)
 - hmotnostní analyzátor - vždy pracuje za vysokého vakua, hodnota vakua se liší podle typu analyzátoru ca. 10^{-3} až 10^{-11} Pa
 - detektor - vakuum
- k získání vysokých hodnot vakua je obvykle potřeba dvou- nebo třístupeňové čerpání velmi výkonnými vakuovými pumpami
 - 1. stupeň čerpání - rotační olejové, spirálové a membránové pumpy (výkon 80 l/s)
 - 2. stupeň čerpání - turbomolekulární nebo difúzní pumpy (výkon 250 l/s)
- proč vysoké vakuum? ionty musí mít dostatečně dlouhou střední dráhu a nesmí docházet ke kolizním srážkám s neutrálními atomy

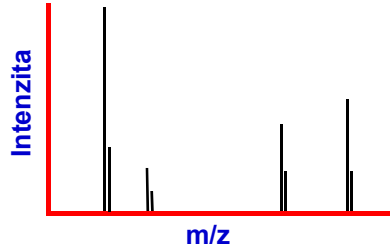
Iontová optika

- volba vhodného napětí na elektrostatických elementech pro zajištění tvorby iontů, transportu, dělení a detekci iontů
- výrazně ovlivňují výsledky měření - citlivost, rozlišovací schopnost, přesnost
- pracují za různých tlaků
 - přechod mezi atmosférickým tlakem a vakuem - skleněné kapiláry
 - přechody mezi různými stupni vakua - skimmery, ion funnels (trychtýř)
 - usměrňování iontů ve vakuu
- urychlení a transport iontů - hexapóly, oktapóly
- fokusace iontů - ion funnels



Hmotnostní spektrum

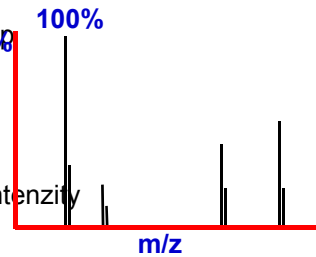
- **Základní veličiny** – intenzita (absolutní, relativní), poměr hmotnosti a náboje (m/z)



- měří se intenzita iontů v závislosti na m/z :
 - skenování = změna skenované veličiny (U, V, B) – Q, sektorové analyzátoři, IT
 - záznam signálu v čase – TOF, FTICR, Orbitrap

- normalizace spekter:

- převedení absolutních intenzit na relativní
- intenzita osy y je v rozsahu 0-100%
- intenzita základního píku spektra je 100% a intenzity ostatních píků jsou k ní vztaženy



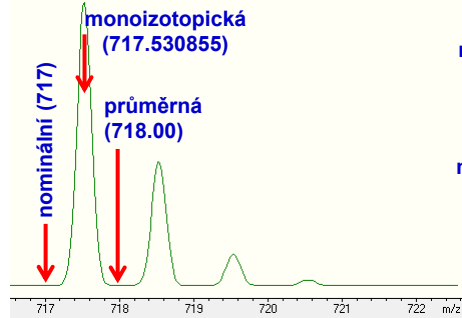
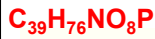
Přírodní zastoupení izotopů běžných organických prvků

Prvek	“M”		“M+1”		“M+2”		Typ prvku
	m/z	%	m/z	%	m/z	%	
H	1	100	2	0.015			“M”
C	12	100	13	1.1			“M+1”
N	14	100	15	0.37			“M+1”
O	16	100	17	0.04	18	0.2	“M+2”
F	19	100					“M”
Si	28	100	29	5.1	30	3.4	“M+2”
P	31	100					“M”
S	32	100	33	0.79	34	4.4	“M+2”
Cl	35	100			37	32	“M+2”
Br	79	100			81	97.3	“M+2”
I	127	100					“M”

Hmotnosti iontů ve spektru

- **nominální hmotnost:** hmotnost vypočítaná z celočíselných hmotností prvků
 $\text{CO}_2: 1 \times 12 + 2 \times 16 = 44$
- **monoizotopická hmotnost:** hmotnost vypočítaná z přesných hmotností prvků
 $\text{CO}_2: 1 \times 12.0000 + 2 \times 15.9949 = 43.9898$
- **průměrná hmotnost:** vážený průměr hmotností jednotlivých izotopů
 $\text{CO}_2: 1 \times 12.01 + 2 \times 16 = 44.01$

Fosfoethanolamin - PE(16:0/18:1)



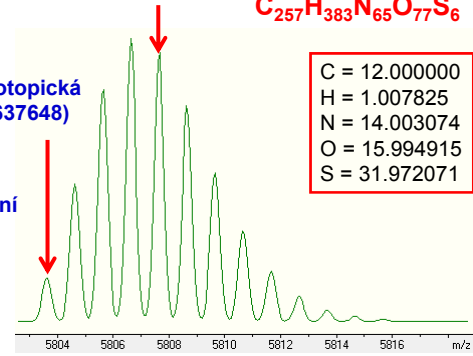
průměrná (5807.59)

Inzulín



monoizotopická (5803.637648)

nominální (5801)



C = 12.000000
H = 1.007825
N = 14.003074
O = 15.994915
S = 31.972071

Ionizační techniky

Ionizační techniky

- neexistuje univerzální ionizační technika pro všechny látky, které se mohou lišit z různých chemických hledisek, proto je vždy třeba vybrat optimální způsob ionizace pro danou látku
- celá řada ionizačních technik, některé ionizační techniky byly nahrazeny novými a dnes se nevyžívají
- podle množství vnitřní energie po ionizaci lze dělit na "tvrdé" a "měkké"
- mohou pracovat za atmosférického nebo sníženého tlaku
- dnes největší praktický význam:
 - ESI, APCI, APPI - pro spojení HPLC/MS
 - ESI, MALDI - analýza biomolekul, nejšetrnější ionizační techniky
 - EI - GC/MS, možnost porovnání s knihovnami spekter, strukturní informace, dobře popsaná pravidla fragmentace
 - MALDI, DESI, SIMS - pro MS zobrazování
 - DESI, DART - desorpční ambientní techniky

EI

(Electron Ionization)

Elektronová ionizace

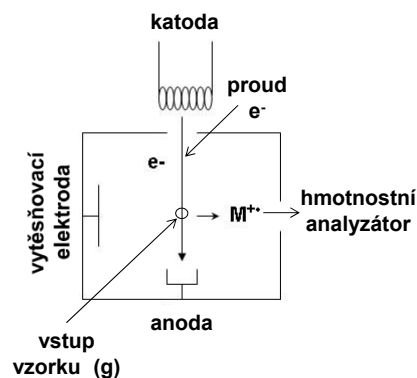
- “nejtvrdší” ionizační technika - molekula získá velký přebytek vnitřní energie, který se projeví fragmentací molekulárního iontu (někdy v takovém rozsahu, že molekulární ion zcela chybí ve spektru)
- vznikají **ionty s lichým počtem elektronů** (M^+)
- pracuje za vakua - ca. 10^{-3} - 10^{-5} Pa
- hmotnostní rozsah ca. do $m/z = 1000$
- pro **těkavé** a **termostabilní** látky - ionizace v plynné fázi při teplotě 150 – 400°C
- zvýšení těkavosti/zlepšení tepelné stability látky pomocí derivatizace
- nejstarší ionizační technika
- podrobně popsána **pravidla fragmentace** jednotlivých tříd látek
- rozsáhlé **knihovny EI spekter** - v databázi Wiley Registry of Mass Spectral Data/NIST je přes 600 000 spekter, kompatibilní formát se všemi běžnými přístroji na trhu, dále obsahuje strukturální editor, chemické názvy a jejich synonyma, MS/MS spektra, GC retenční indexy
- nepoužívat zastaralý název “ionizace nárazem elektronů” (Electron Impact)!

Princip elektronové ionizace

- žhavená katoda (W nebo Re vlákno) emituje elektrony, které jsou po průchodu iontovým zdrojem zachyceny na anodě (“lapač elektronů”)
- urychlující potenciál v elektronvoltech (eV) mezi katodou a anodou určuje energii elektronů ($1 \text{ eV} = 1.602 \cdot 10^{-19} \text{ J}$)
- přiblížením emitovaného elektronu k valenčním elektronům molekuly dojde k ovlivnění jejich magnetických polí, což vede k uvolnění valenčního elektronu a tím vzniku radikálkationtu M^+ .

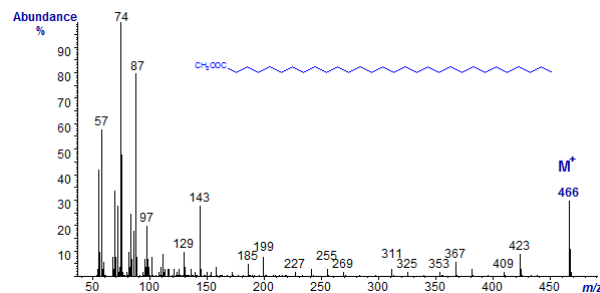


- účinnost ionizace je velice nízká, vzniká 1 ion z 10^5 interakcí
- vzniklé ionty jsou vytěšňovací elektrodou vypuzeny z iontového zdroje, svazek iontů je dále fokusován (zaostřen) a urychlen dalšími elektrodami směrem do hmotnostního analyzátoru



Princip elektronové ionizace

- jestliže molekula získá při ionizaci příliš velký přebytek vnitřní energie, projeví se to její **fragmentací** (tj. rozpadem na menší nabitě a nenabitě části); při rozsáhlé fragmentaci může chybět molekulární ion
- ionizační potenciál většiny organických látek je v rozmezí 7 až 16 eV
- v rozmezí 50 - 100 eV je spektrum relativně nezávislé na zvolené energii
- standardní urychlující energie e⁻ **pro měření knihovních EI spekter je 70 eV** (musela být zvolena určitá hodnota kvůli možnosti porovnání spekter)
- proč tak vysoká energie ionizace? nejvyšší citlivost, spektrum bohaté na fragmentové ionty, pro většinu látek i molekulární ion

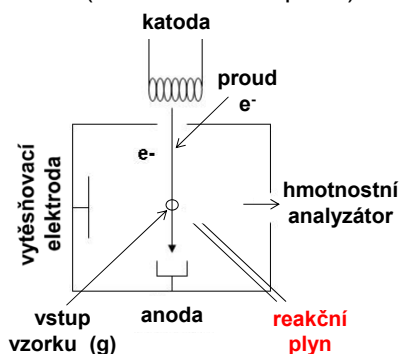


CI

(Chemical Ionization)

Chemická ionizace

- konstrukce iontového zdroje a princip analogické EI, ale ve zdroji je přítomen tzv. **reakční plyn** o tlaku 50-100 Pa - nadbytek reakčního plynu oproti vzorku ca. $10^4:1$
- nejdříve jsou ionizujícími e^- ionzovány molekuly reakčního plynu, které následně **ion-molekulárními reakcemi** ionizují molekuly analytu (použitý tlak zaručuje, že dojde k dostatečnému počtu interakcí molekul analytu s ionty reakčního plynu)
- patří mezi **měkké** ionizační techniky - obvykle vznik $[M+H]^+$ nebo $[M-H]^-$ nebo jiných aduktových iontů podle použitého reakčního plynu
- vzniklé ionty mají **sudý počet e^-** (na rozdíl od M^+ při EI)
- ca. do $m/z = 1000$



Vznik iontů při chemické ionizaci

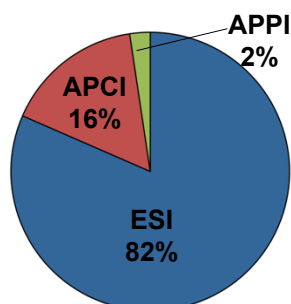
- ionty vznikají **ion-molekulárními reakcemi**
- nejčastější je **protonace** (přenos protonu z plynné Brønstedovy kyseliny $[BH]^+$ na neutrální molekulu M)
- příkladem kondenzace je reakce iontů z methanového plazmatu $[C_2H_5]^+$ a $[C_3H_5]^+$ s molekulou za vzniku $[M+C_2H_5]^+$ a $[M+C_3H_5]^+$
- k výměně náboje dochází u GC/MS: $He^+ + M \Rightarrow He + M^+$
- nejběžnější **reakční plyny**:
 - **methan** (vznikající ionty $[CH_5]^+$, $[C_2H_5]^+$, $[C_3H_5]^+$)
 - **isobutan** (ion $[t-C_4H_9]^+$)
 - **amoniak** (ionty $[NH_4]^+$, $[(NH_3)_2H]^+$, $[(NH_3)_3H]^+$)
- **protonová afinita (PA)** - kvantitativní vyjádření schopnosti bazické molekuly B přijmout proton (záporná hodnota protonační energie báze B)
$$B + H^+ \Rightarrow BH^+, -\Delta H = PA(B)$$
 - čím vyšší hodnota PA, tím pevněji se proton váže k molekule
 - čím pevněji se váže proton k molekule, tím menší chuť má molekula uvolnit ho jinam

API techniky

(Atmospheric Pressure Ionization, API)
ESI, APCI, APPI

Ionizace za atmosférického tlaku

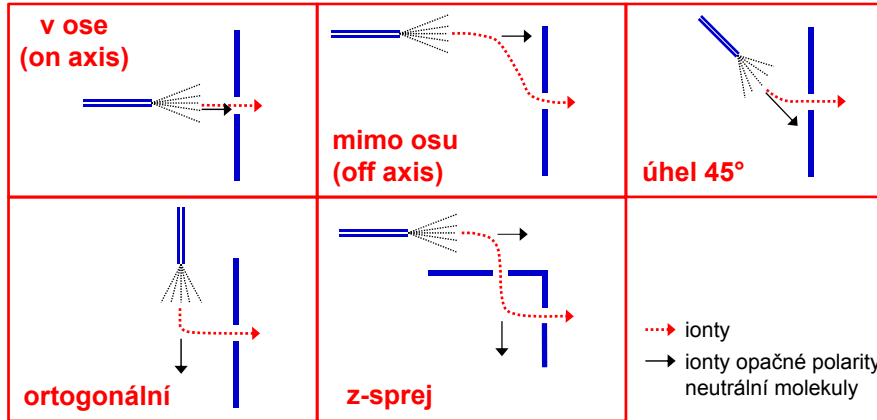
- tyto 3 ionizační techniky (ESI, APCI, APPI) pracující za atmosférického tlaku znamenaly naprostý průlom v řešení spojení HPLC/MS
- v současnosti jsou techniky ESI + APCI standardem pro komerční HPLC/MS systémy, APPI je považována za vhodnou alternativu pro nepolární nebo velmi labilní látky
- dnes je HPLC/MS díky ESI/APCI rutinní a spolehlivá analytická technika s obrovským potenciálem v řadě oborů - chemie, biochemie, medicína, farmacie, atd.
- vznikají převážně **ionty se sudým počtem elektronů** (existují výjimky)



• zastoupení API technik v LC/MS
- dle Web of Science, březen 2012

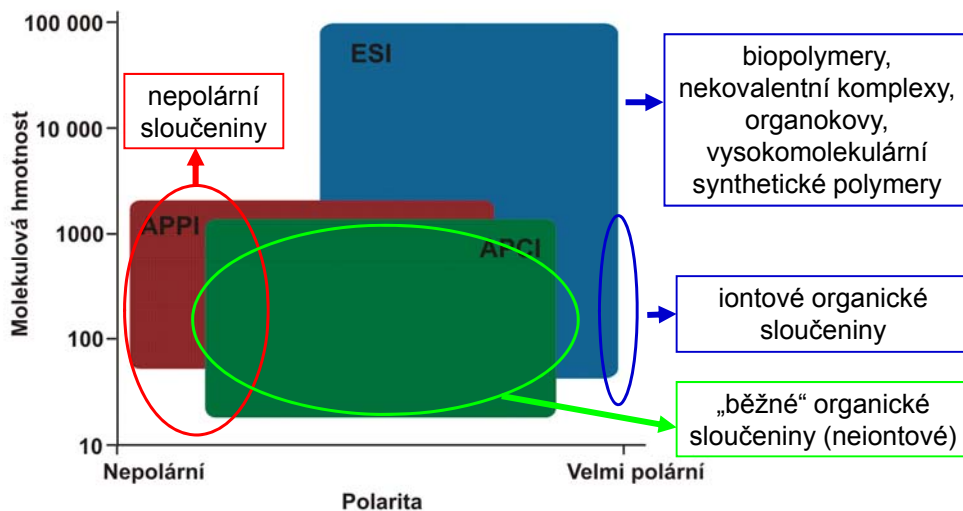
API techniky

- využívají sprejování kapaliny = **sprejovací techniky**
- tvorba spreje:
 - elektrickým polem (ESI)
 - pneumatickým zmlžováním a vyhříváním kapiláry
- **geometrie** sprejování - je důležitý úhel sprejování ke vstupu do hmotnostního spektrometru (ovlivnění citlivosti, matričních efektů, atd.)



Volba ionizační techniky a polaroty záznamu

- **záznam kladných iontů** – většina sloučenin, poměrně univerzální
- **záznam záporných iontů** – sloučeniny obsahující sulfo-, karboxy-, (poly)hydroxy- nebo nitro- skupiny, halogenované sloučeniny, organokovy, atd.



ESI

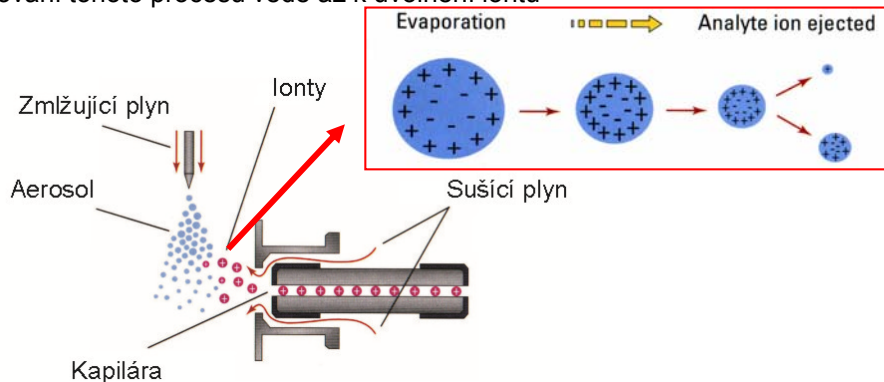
(Electrospray Ionization)

Ionizace elektrosprejem

- ESI je nejčastěji používaná ionizační technika pro [spojení HPLC/MS](#)
- pro látky [středně polární až iontové](#)
- nelze použít při práci s nepolárními mobilními fázemi a pro nepolární sloučeniny
- průtok HPLC eluentu ca. 0.1 - 1.0 ml/min, přímá infúze jednotky až desítky μ l
- tvorba [vícenásobně nabitých iontů](#) - lze ionizovat molekuly s M_R v řádech 100 tisíc
 - vhodný pro ionizaci biomakromolekul
 - proteomická analýza
- [měkká](#) ionizační technika - velmi šetrná
 - $[M+H]^+$, $[M-H]^-$, aduktové ionty
 - fragmentové ionty nejsou pozorovány nebo jen ve velmi nízké intenzitě
- peptidy, proteiny, sacharidy, nukleové kyseliny, organometalické i anorganické sloučeniny

Ionizace elektrosprejem

- rozpuštěný analyt je přiveden kovovou kapilárou, na kterou je vloženo vysoké napětí (3 - 5 kV)
- vznikající kapičky po rozprášení na výstupu z kapiláry za pomoci zmlžujícího plynu nesou na povrchu velké množství nábojů
- odpařováním rozpouštědla dojde k zvýšení hustoty povrchového náboje, až při dosažení kritické hodnoty dochází k tzv. Coulombické explozi, tj. rozpadu na ještě menší kapičky s rozdělením původních nábojů
- opakování tohoto procesu vede až k uvolnění iontů



Elektrosprej – rozbor mechanismu

Celý proces elektrospreje lze rozdělit na 3 základní kroky:

- 1/ zmlžení roztoku vzorku na malé elektricky nabitě kapičky
- 2/ uvolnění iontů z kapiček
- 3/ transport iontů z atmosférické oblasti zdroje do vakua a hmotnostního analyzátoru

ad 1/ Zmlžení roztoku vzorku

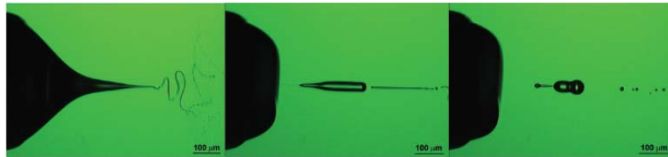
Tvorba nabitých kapiček závisí na:

- vloženém napětí na kapiláru
- složení a průtoku eluentu
- obsahu a koncentraci aditiv (zejména iontových a povrchově aktivních látek)
- průměru a geometrii kapiláry
- zmlžujícím plynu (typ, průtok, teplota)
- analytu (koncentrace, struktura)

Základní typy sprejovacích režimů

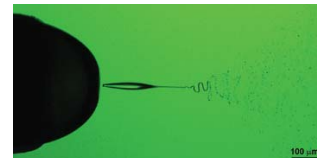
~~1/ explodující („burst“)~~

- trimodální distribuce velikosti částic
- minimální tvorba iontů analytu
- pro ESI bez významu



~~2/ pulzující Taylorův kužel („pulsating Taylor cone“)~~

- bimodální nebo monodisperzní distribuce částic podle použitého napětí
- velikost částic <math>< 10 \mu\text{m}</math>

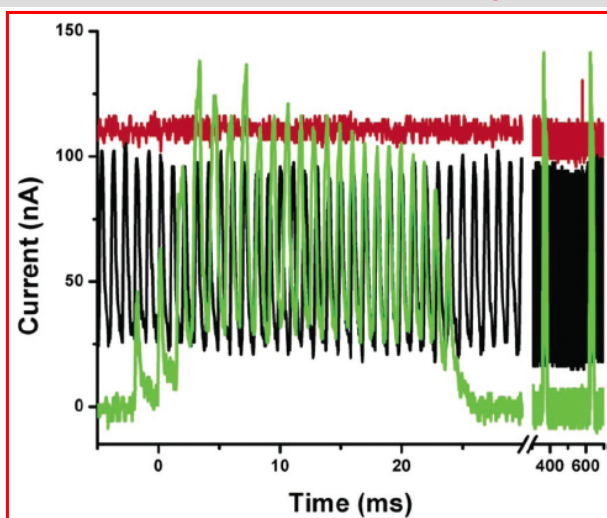


3/ tryskající kužel („cone-jet“)

- stabilní sprej bez pulzace, výrazně vyšší signál oproti prvním dvěma režimům, nižší fragmentace a potlačení oxidace, velikost částic <math>< 3 \mu\text{m}</math>
- pouze tento režim má význam pro ESI-MS !!!



Průběh závislosti proudu na sprejovacím režimu



1/ zeleně – explodující (2.75 kV)

2/ černě – pulzující Taylorův kužel (2.95 kV)

3/ červeně – tryskající kužel (4.05 kV)

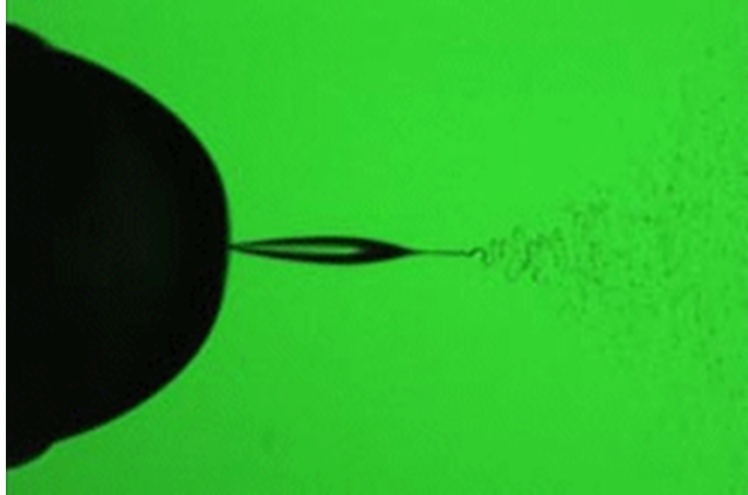
- průtok konstantní 1 $\mu\text{l}/\text{min}$, 50% methanol/voda

Sprejovací režim 1 - explodující („burst“)



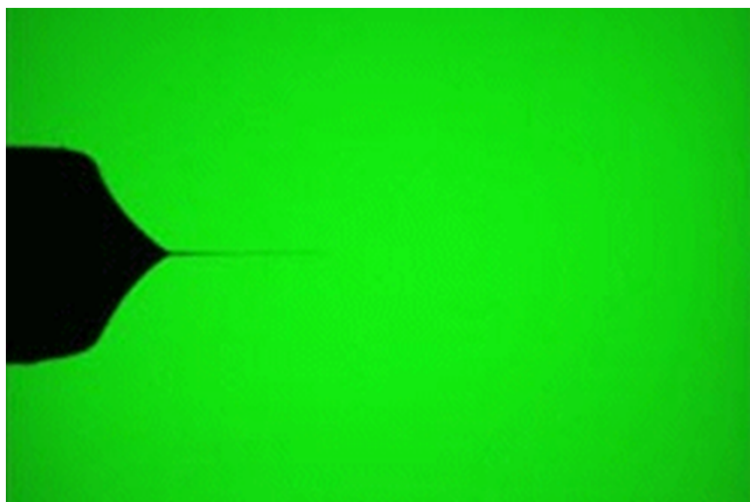
Podmínky: 50% methanol – voda, 2 $\mu\text{l}/\text{min}$, 3.4 kV

Sprejovací režim 2 – pulzující Taylorův kužel
(větší průměr kapiláry – O.D. / I.D. = 510 / 260 mm)



Podmínky: 50% methanol – voda, 5 $\mu\text{l}/\text{min}$, 2.8 kV

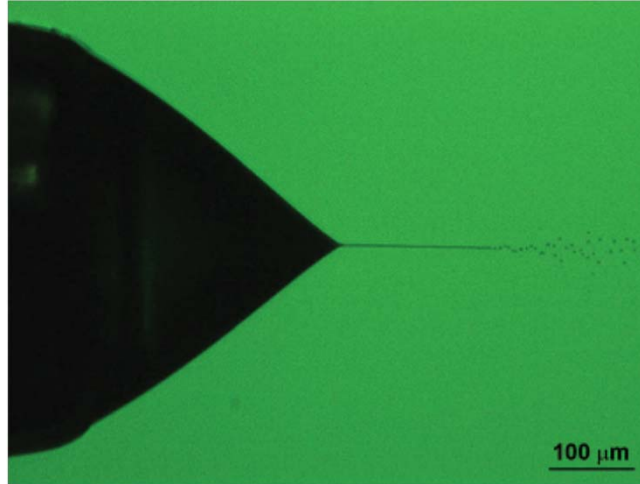
Sprejovací režim 2 – pulzující Taylorův kužel
(menší průměr kapiláry – O.D. / I.D. = 260 / 130 mm)



Podmínky: 50% methanol – voda + 0.1% k. octová, 2 $\mu\text{l}/\text{min}$, 3.4 kV

Sprejovací režim 3 – tryskající kužel

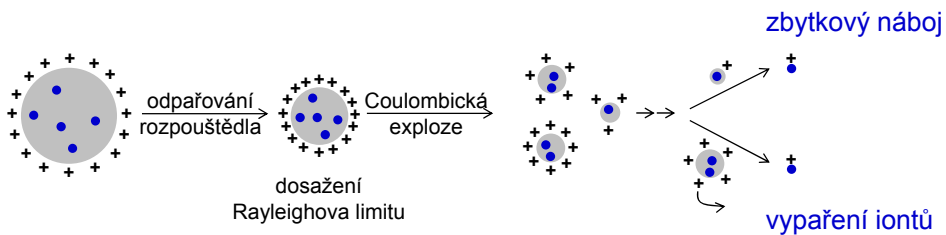
- vyšší potenciál spreje, velikost částic < 3 μm , stabilní sprej



Podmínky: 50% methanol – voda, 2 $\mu\text{l}/\text{min}$, 4 kV

ad 2/ Uvolnění iontů z kapiček

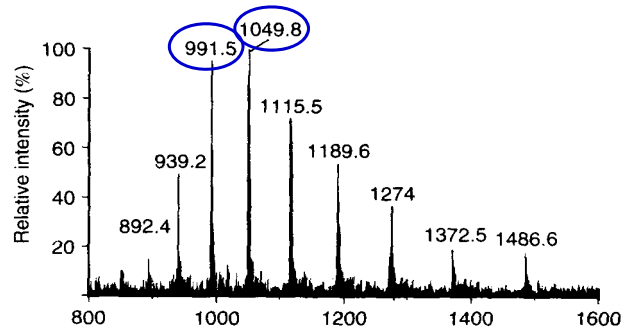
- vzniklé kapičky nesou na povrchu náboj
- odpařováním rozpouštědla se zvyšuje **hustota náboje** na povrchu
- **Rayleighův limit** - repulzní síly mezi náboji jsou stejné jako povrchové napětí kapičky, které udržuje kapku pohromadě
- po překročení Rayleighova limitu dojde ke **Coulombické explozi** = rozpad na menší kapičky, mezi kterými je distribuován původní náboj
- dva modely vzniku iontů:
 - a) **vypaření iontů** (Ion evaporation) - povrchové napětí vytrhne ion analytu z kapičky
 - b) **zbytkový náboj** (Charge residue) - odpaření rozpouštědla z nabitě kapičky za vzniku iontů



ad 3/ Transport iontů

- při vstupu do vakua dochází k velkému ochlazení iontů a nežádoucí tvorbě klastrů
- preventivní opatření proti tvorbě klastrů:
 - 1/ protiproud dusíku jako sušícího plynu (volba teploty a průtoku plynu podle průtoku a složení mobilní fáze) - odstranění vodních par a dalších neutrálních molekul z transportní části vakuového systému
 - 2/ vyhřívání iontového zdroje na $T=250^{\circ}\text{C}$ - teplota plynu i vzniklých iontů zůstane dostatečně vysoká i po expanzi do vakua, aby nemohlo dojít ke vzniku klastrů
- odstranění již vzniklých klastrů (dnes se většinou nepoužívá, ve srovnání s preventivními opatřeními má značné nevýhody):
 - 1/ nízkoenergetické kolize – postačují k rozpadu nekovalentních interakcí klastrů, nebezpečí rozpadu kovalentních vazeb (tj. fragmentace) při vyšší energii kolizí
 - 2/ vstupní otvor vakuové části se umístí až za Machův disk, silné rozptýlení iontů, nízká transmise iontů, neefektivní způsob

Aplikace ESI - určení M_R proteinů



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

Experimentálně určeno m/z dvou iontů A (1049.8) a B (991.5)

$$A = 1049.8 = (M_R + z) / z$$

$$B = 991.5 = (M_R + z + 1) / (z + 1)$$

- řešením vyjde $z = 16.99 = 17$ (náboj musí být celočíselná hodnota)

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

- výpočet M_R ze všech identifikovaných iontů, např.:

$$A: M_R = 1049.8 * 17 - 17 = 17829.6$$

$$B: M_R = 991.5 * 18 - 18 = 17829.0, \text{ atd.}$$

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

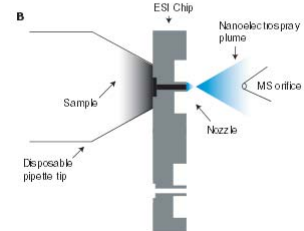
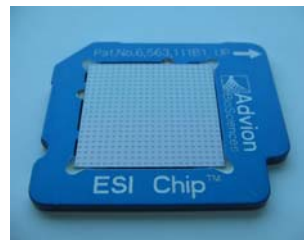
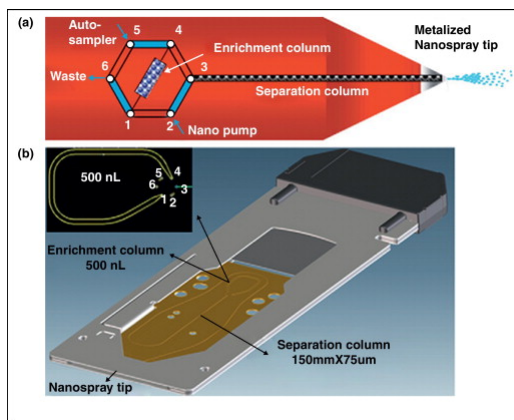
Nanoelektrosprej

- někdy se zkráceně nazývá nanosprej
- průtoky jednotky až stovky nL/min
- rozdíly oproti „klasickému“ ESI:
 - nepoužívá se zmlžující plyn
 - nižší teploty sušícího plynu
 - speciální adjustace konce sprejovací kapiláry v rovinách xyz pomocí mikrometrických šroubů a mikroskopu
 - obvykle se sprejuje přímo proti vstupní kapiláře do analyzátoru (např. pod úhlem 45°) ve vzdálenosti 1 - 2 mm



Nanoelektrosprej

- používají se speciální kovové špičky kapiláry vytažené do velmi úzkého konce o průměru 5 - 10 μm kvůli dosažení stabilního spreje
- někdy součástí čipů pro separaci látek, robotické zařízení pro přímou infúzi vzorků



Nanoelektrosprej

- extrémně nízká spotřeba vzorků (např. studium procesů in vivo)
- vysoká koncentrační citlivost (Ize analyzovat pouhé stovky molekul - attomoly až zeptomoly)
- vyšší tolerance vůči obsahu solí v roztoku
 - snižuje nároky na úpravu vzorků před analýzou
 - menší průměr primárně vzniklých nabitých kapiček ve srovnání s konvenčním ESI, proto menší počet cyklů Coulombických explozí, a proto odpařováním rozpouštědla dojde k menšímu zakonzentrování solí v jednotlivých kapičkách
- lze použít v uspořádání off-line (přímé čerpání rozpuštěného vzorku infúzní pumpou) nebo on-line (spojení CE/MS bez přídavného toku kapaliny technikou "sheathless CE/MS" nebo kapilární HPLC/MS)
- ve srovnání s konvenčním ESI je experimentálně náročnější a méně robustní

APCI

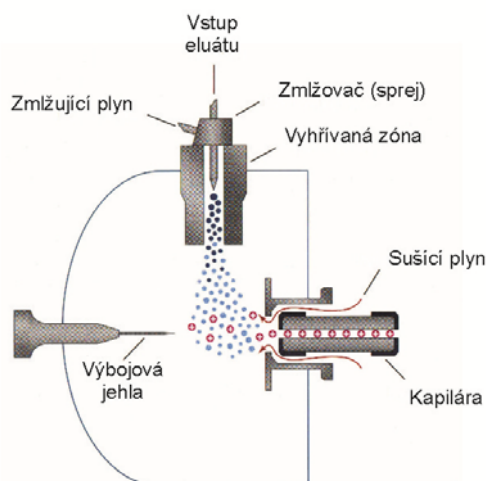
(Atmospheric Pressure Chemical Ionization)

Chemická ionizace za atmosférického tlaku

- APCI je druhá nejčastěji používaná ionizační technika pro **spojení HPLC/MS**
- průtok HPLC eluentu ca. 0.1 - 1.5 ml/min, přímá infúze desítky až stovky μl
- pro látky **nepolární až středně polární**
- vhodné pro použití s nepolárními mobilními fázemi a pro nepolární sloučeniny
- lze ionizovat molekuly s M_R ca. do 2000
- **měkká** ionizační technika - mírně "tvrdší" ve srovnání s ESI
 - $[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}-\text{H}]^-$
 - běžně jsou pozorovány fragmentové ionty

Chemická ionizace za atmosférického tlaku

- **princip APCI** je obdobný jako pro konvenční chemickou ionizaci, ale ionizace probíhá za atmosférického tlaku
- eluát je na konci kapiláry zmlžěn do vyhřívané zóny
- na výbojovou elektrodu (jehlu) je vloženo vysoké napětí (3-4 kV), čímž vzniká koronový výboj
- výbojem jsou nejdříve ionizovány molekuly mobilní fáze (protože jsou v obrovském přebytku) a následně ion-molekulárními reakcemi reakčního plynu (tj. ionizovaných molekul mobilní fáze) jsou ionizovány molekuly analytu
- vzniklé ionty jsou elektrodami usměrněny do analyzátoru
- protiproud sušícího plynu (dusík) slouží k rozbití případných nekovalentních klastrů

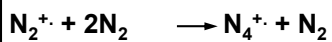
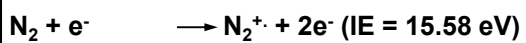


Mechanismy tvorby kladných iontů

- 1/ Primární ionty vznikající ze zmlžujícího plynu
- 2/ Reakční ionty vznikající z mobilní fáze a aditiv
- 3/ Hlavní mechanismy ionizace analytu

Mechanismy tvorby kladných iontů

- 1/ Primární ionty vznikající ze zmlžujícího plynu
- 2/ Reakční ionty vznikající z mobilní fáze a aditiv
- 3/ Hlavní mechanismy ionizace analytu

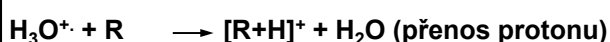
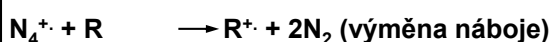
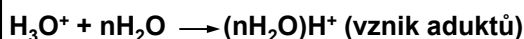
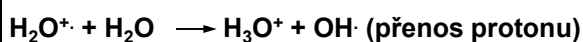


Mechanismy tvorby kladných iontů

1/ Primární ionty vznikající ze zmlžujícího plynu

2/ Reakční ionty vznikající z mobilní fáze a aditiv

3/ Hlavní mechanismy ionizace analytu



R ... rozpouštědlo (=reakční plyn), např. metanol, acetonitril

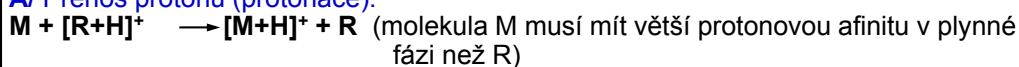
Mechanismy tvorby kladných iontů

1/ Primární ionty vznikající ze zmlžujícího plynu

2/ Reakční ionty vznikající z mobilní fáze a aditiv

3/ Hlavní mechanismy ionizace analytu

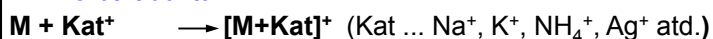
A/ Přenos protonu (protonace):



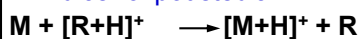
B/ Přenos (výměna) náboje:



C/ Tvorba aduktů:



D/ Adice rozpouštědla:



E/ Tvorba polymerních klastrů:



APPI

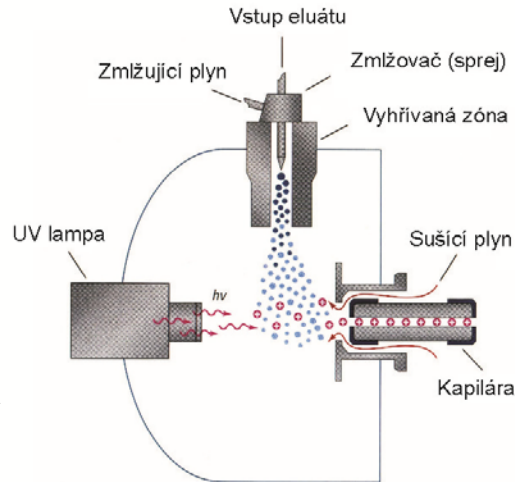
(Atmospheric Pressure Photoionization)

Fotoionizace za atmosférického tlaku

- stejné uspořádání zdroje jako pro APCI, jen se pro ionizaci molekul místo jehly s vloženým napětím používá zdroj UV záření
- APPI vhodná pro ionizaci látek s velmi nízkou polaritou
- průtoky HPLC eluentu ca. 0.1 - 1.5 ml/min, přímá infúze desítky až stovky μ l
- pro látky **nepolární** až **středně polární**
- lze ionizovat molekuly s M_R ca. do 2000
- **měkká** ionizační technika
 - $[M+H]^+$, $[M-H]^-$
 - běžně vnikají i ionty s lichým počtem elektronů - M^+ , M^- , zejména pro nepolární sloučeniny nebo pro sloučeniny s vysokým stupněm konjugace

Fotoionizace za atmosférického tlaku

- jako zdroj UV záření se používá kryptonová výbojka s energií fotonů 10 eV a minoritní 10.6 eV
- tato energie je větší než ionizační energie (IE) nepolárních organických molekul, ale menší než IE složek mobilní fáze (metanol, acetonitril, voda) nebo vzdušného kyslíku - selektivní ionizace analytu a nikoliv mobilní fáze
- na rozdíl od ESI a APCI běžně vznikají ionty s lichým počtem e^-
- výhodné použití tzv. dopantu (toluen, benzen, $IE < 10$ eV), který potom reaguje ion-molekulárními reakcemi s analytem a nikoliv s MF – vyšší citlivost
- obecně velmi podobná technika APCI, ale lze použít i pro velmi nepolární nebo labilní sloučeniny oproti APCI



Volba výbojky v APPI

energie fotonů výbojky

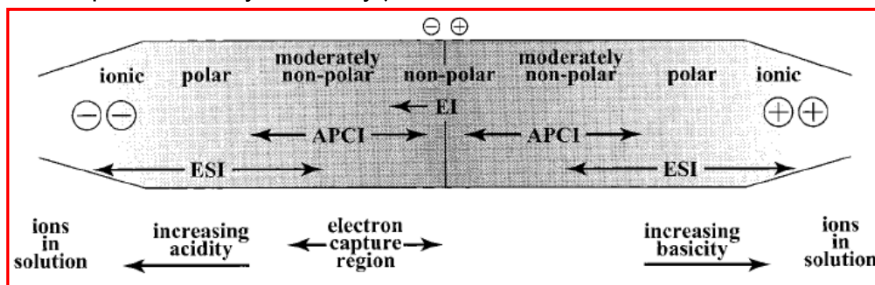
výbojka →

dopant →

Sloučenina	Ionizační energie [eV]
Helium	21.22
Neon	16.67 (+16.85)
Dusík	15.58
Voda	12.62
Acetonitril	12.20
Kyslík	12.07
Argon	11.62 (+11.83)
Methanol	10.84
2-propanol	10.17
Hexan	10.13
Krypton	10.03 (+10.64)
Heptan	9.93
Aceton	9.70
Toluene	8.83
Xenon	8.44 (+9.57)
Triethylamin	7.53

Porovnání ESI, APCI a APPI

- **ESI** – středně polární až iontové sloučeniny, mnohonásobně nabitě ionty pro biopolymery, možnost studia nekovalentních interakcí, nejšetrnější ionizační technika
 - méně vhodné pro bezvodé mobilní fáze a systémy s normálními fázemi
 - optimální průtok jednotky až desítky $\mu\text{l/ml}$, lze do 1 ml/min
- **APCI** – málo až středně polární sloučeniny ca. do M_R 1000 až 2000, větší tolerance k obsahu solí v eluentu, méně aduktových iontů
 - optimální průtok stovky $\mu\text{l/ml}$, použitelný rozsah desítky $\mu\text{l/ml}$ až 1.5 ml/min
- **APPI** – možnost analýzy zcela nepolárních látek, vhodné i pro labilní látky (např. cukry), použití vhodného typu dopantu umožní selektivní analýzu, nízký chemický šum
 - ideální pro systém s normálními fázemi
 - optimální průtok desítky až stovky $\mu\text{l/ml}$, lze až do 1.5 ml/min



Porovnání EI a měkkých ionizačních technik

- **EI** - primárně vznikají radikál-kationty M^+ (ion s lichým počtem e^-), které vlivem velkého přebytku vnitřní energie molekuly získané při ionizaci podléhají další fragmentaci (molekulární ion ve spektru chybí pro ca. 10% organických sloučenin)
- **měkké ionizační techniky** - v důsledku ion-molekulárních reakcí vznikají převážně ionty se sudým počtem e^- , např. $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M-H]^-$ a řada dalších iontů podle typu ionizační techniky a podmínek ionizace, např. adukty s kovovými ionty
 - ve většině případů ve spektrech převládají tyto molekulární adukty, relativní intenzita fragmentových iontů bývá obvykle nízká až mizivá
 - chybějící strukturní informace lze získat tandemovou hmotnostní spektromerií (MS/MS)
- jednotlivé měkké ionizační techniky lze orientačně seřadit podle přebytku jejich vnitřní energie vedoucí k fragmentaci ionizované molekuly (hovorově řečeno podle jejich „tvrdosti“)
 - pořadí je orientační, může se lišit pro různé třídy látek a také silně závisí na experimentálních podmínkách, přesto může sloužit jako užitečné vodítko:

ESI (nejšetrnější) < MALDI ~ APPI < APCI < CI < EI (nejtvrďší)

MALDI

(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)

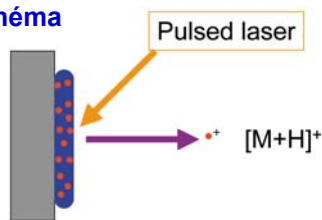
Ionizace laserem za účasti matrice

- ionizace molekul s velkou molekulovou hmotností - biopolymery a syntetické polymery (desítky až stovky tisíc Da, existují aplikace i přes milión Da)
 - proteiny, oligonukleotidy, lipidy, polymery
- pro látky **nepolární** až **polární**
- ionizace může probíhat za různých tlaků
 - nízkotlaké MALDI (klasické) - ionizace probíhá za vakua (<1 Pa)
 - středně tlaké MALDI - ionizace za sníženého tlaku
 - atmosférické MALDI (AP-MALDI) - pracuje za okolního tlaku, jiné ionty ve spektrech, nižší citlivost
- **měkká** ionizační technika, většinou jednou či dvakrát nabité ionty
 - $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[M-H]^-$
 - adukty s alkalickými kovy
- spojení s HPLC v **off-line** uspořádání - nanášení spojité stopy na terčík nebo sběr frakcí
- možnost archivace vzorku a jeho opětovné přeměření
- obtížná kvantitativní analýza
- ionty matrice ve spektrech

Ionizace laserem za účasti matrice

- vzorek je společně s matricí nanesen na MALDI terčik
- energie krátkého laserového pulsu je absorbována matricí
- následně dojde k lokální desorpci matrice a analytu (vznikají klastry matrice a analytu)
- excitované molekuly matrice jsou stabilizovány přenosem protonu na analyt nebo dochází ke kationizaci molekul analytu za vzniku iontů analytu
- ionty jsou následně urychleny do hmotnostního analyzátoru

Schéma



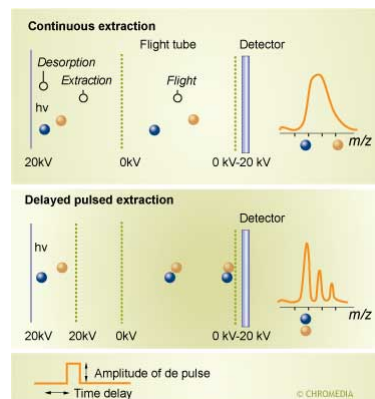
MALDI terčik



Animace

Ionizace laserem za účasti matrice

- **pulzní** ionizační technika
 - nejčastěji ve spojení s TOF analyzátozem, ale i orbitrap, IT
- matrice musí absorbovat laserový puls, aby mohlo dojít k ionizaci
 - obvykle dusíkové UV lasery (4 ns puls, UV 337 nm), IČ lasery jsou dražší ale citlivější
- důležitá je správná příprava vzorku, volba vhodné matrice a rozpouštědla vzorku
- **zpožděná extrakce iontů** (delayed extraction) - používá se pro zvýšení rozlišení u TOF analyzátoru
 - ionizované molekuly MALDI ionizací mají určitou distribuci kinetické energie a dopadají na detektor v různých časech, což způsobuje rozšíření píků a jejich horší rozlišení
 - ionty jsou extrahovány 10 -100 ns po aplikaci laserového pulzu, čímž dojde k částečnému vyrovnání jejich energií a zvýšení rozlišení



Ionizace laserem za účasti matrice

- matrice pro **UV lasery** (nejčastěji dusíkový laser při 337 nm) - nejčastěji aromatické karboxylové kyseliny, které absorbují UV záření při vlnové délce laseru, např. kyseliny dihydroxybenzoová, chlorsalicylová, skořicová, deriváty, apod.
- matrice pro **IČ lasery** – cokoliv co absorbuje IČ záření
- **LDI** (Laser desorption/ionization) – vlastní analyt zároveň plní i funkci matrice, protože intenzivně absorbuje záření při vlnové délce laseru (např. polyaromatické sloučeniny), pak tedy není nutné matrici přidávat vůbec
- **desorpce/ionizace laserem bez matrice** - především pro malé molekuly, nejsou matriční ionty, lepší reprodukovatelnost spekter (nejsou tvořeny krystaly)
- **SELDI** (Surface enhanced laser desorption/ionisation) - terčik s navázanou skupinou, na kterou se specificky vážou některé proteiny (afinitní interakce), ostatní jsou odstraněny, pak aplikace matrice a MALDI ionizace
- **SALDI** (Surface assisted laser desorption/ionisation) - použití nanočástic
- **NALDI** (Nanostructure-Assisted Laser Desorption/Ionization) - použití nanočástic
- **DIOS** (Desorption ionization on porous silicon) - použití terčíku z porézního silikonu

Ambientní ionizační techniky

(Ambient Ionization mass spectrometry)

Ambientní ionizační techniky

- ionizační techniky pracující mimo hmotnostní spektrometr
- ionizace neprobíhá v iontovém zdroji jako třeba u ESI, ale v **otevřeném prostoru**
- lze analyzovat i objekty neobvyklého tvaru a velikosti
- umožňují přímou analýzu vzorků s **minimální** nebo **žádnou** přípravou vzorku
- jsou použitelné jako zdroj iontů pro většinu hmotnostních analyzátorů
- jsou to **měkké** a velmi **šetrné** ionizační techniky - vnitřní energie vzniklých iontů by měla být srovnatelná nebo nižší než při použití ESI, APCI, APPI
- využívají principy běžných ionizačních technik, ale v otevřeném prostoru
- ESI, CI, fotoionizace, atd.
- lze využít i pro **hmotnostně spektrometrické zobrazování** - nižší prostorové rozlišení v porovnání se SIMS a MALDI

Ambientní ionizační techniky

acronym	name	
AP-TD/SI	atmospheric pressure thermal desorption-secondary ionization	
BADCI	beta electron-assisted direct chemical ionization	
DAPCI	desorption atmospheric pressure chemical ionization	
DAPPI	desorption atmospheric pressure photo-ionization	
DART	direct analysis in real-time	
DBDI	dielectric barrier discharge ionization	
DCBI	desorption corona beam ionization	
DEMI	desorption electrospray/metastable-induced ionization	
DESI	desorption electrospray ionization	
DICE	desorption ionization by charge exchange	
EASI	easy ambient sonic-spray ionization	
ELDI	electrospray-assisted laser desorption ionization	
FAPA	flowing atmospheric pressure afterglow	
IR-LAMICI	infrared laser ablation metastable-induced chemical ionization	
LADESI	laser-assisted desorption electrospray ionization	
LAESI	laser ablation electrospray ionization mass spectrometry	
LDESI	laser desorption electrospray ionization	
LESA	liquid extraction surface analysis	
LIAD-ESI	laser-induced acoustic desorption-electrospray ionization	
LMJ-SSP	liquid micro junction-surface sampling probe	
LTP	low-temperature plasma probe	
MALDESI	matrix-assisted laser desorption electrospray ionization	
ND-EESI	neutral desorption extractive electrospray ionization	
PESI	probe electrospray ionization	
RADIO	radio-frequency acoustic desorption and ionization	
REIMS	rapid evaporative ionization mass spectrometry	
SwiFerr	switched ferroelectric plasma ionizer	

- nejvíce publikovaných prací na **DESI** a **DART** - každým ca. 30%
- následuje LTP (5%), EASI (4%), LAESI (4%), atd.
- založené na různých principech

G.A. Harris, Anal. Chem. 83 (2011) 4508

DESI

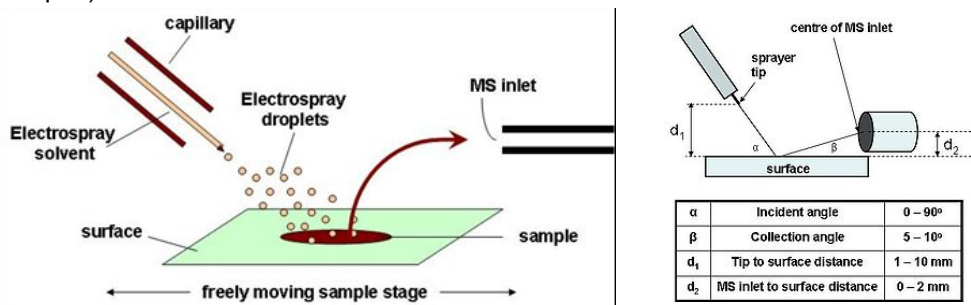
(Desorption electrospray ionization)

Desorpční ionizace elektrosprejem

- kombinuje ESI a desorpční ionizační techniky
- spíše pro menší molekuly
- **rozdílý oproti „klasickému“ elektrospreji**
 - kapilárou je přiváděno, zmlžováno a ionizováno pouze rozpouštědlo
 - vzorek je umístěn před špičkou DESI pod vhodným úhlem ke sprejovací kapiláře a vstupu do MS
- vzorek lze použít **bez jakékoliv úpravy**, např. kus rostlinné (např. list či jiná část rostliny) či živočišné tkáně (např. prst člověka, výřezy nádorových tkání)
- typické aplikace – rychlé monitorování výbušnin, drog, sledování biologických markerů, hmotnostně spektrometrické zobrazování vybraných iontů (tzv. MS imaging)

Desorpční ionizace elektrosprejem

- sprejováním rozpouštědla se na povrchu vzorku tvoří mikrovrstva rozpouštědla, do které jsou extrahovány molekuly ze vzorku (extrakce z pevné fáze do kapaliny, S/L)
- dalším sprejováním vrstvy rozpouštědla dochází k uvolnění sekundárních kapiček obsahující vyextrahované molekuly, které jsou následně usměrněny do vstupní kapiláry hmotnostního spektrometru
- ionty analytu vznikají ze sekundárních kapiček obdobným způsobem jako při ESI
- použití rozpouštědla dle polarity analytu (polární analyt/polární rozpouštědlo a naopak)



Animace

Praktické ukázky DESI

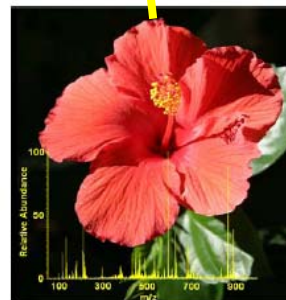
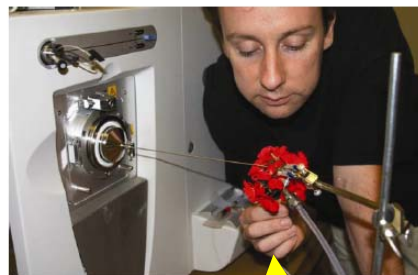
- živočišná tkáň (prst živého člověka)



Photograph S3 Aqueous alcohol being sprayed onto outer skin surface to detect compounds including drugs and metabolites by DESI

- bez jakékoliv úpravy vzorku!

- rostlinná tkáň (kytka)

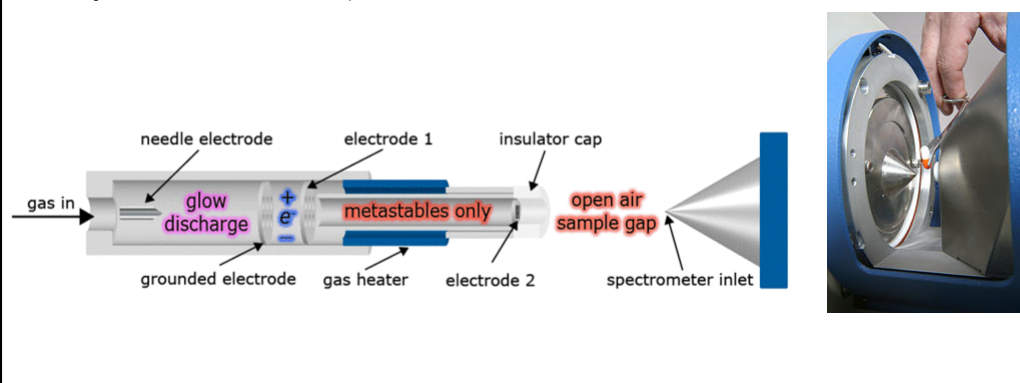


DART

(Direct analysis in real-time)

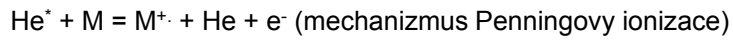
Přímá analýza v reálném čase (DART)

- podobná technika jako DESI, lze použít k analýze pevného, kapalného či plynného vzorku bez jakékoliv úpravy, aplikace podobné s DESI
- reakční plyn He jsou excitovány výbojem za vzniku metastabilních iontů a excitovaných částic
- ionty jsou zachyceny na protielektrodě
- s analytem interagují pouze excitované částice reakčního plynu He^{*} (hvězdička označuje excitovanou částici)

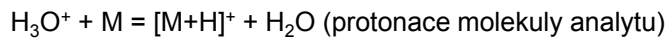
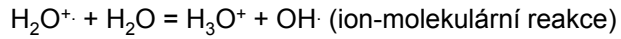
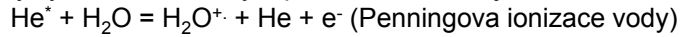


Přímá analýza v reálném čase (DART)

- reakce vzniku iontů:



- kromě Penningovy ionizace dochází k dalším ion-molekulárním reakcím za vzniku obvyklých iontů se sudým počtem elektronů jako u dalších API ionizačních technik:



MSI

(Mass spectrometry imaging)

Hmotnostně spektrometrické zobrazování

- slouží k zobrazení prostorové distribuce molekul
- desorpce/ionizace jednoho bodu a následné 2D rastrování vzorku
 - vzorek se pohybuje pod paprskem/sprejem
 - jeden bod = 1 spektrum
 - skládání spekter pomocí softwaru
- mikroskopický mód - získání celého obrazu najednou



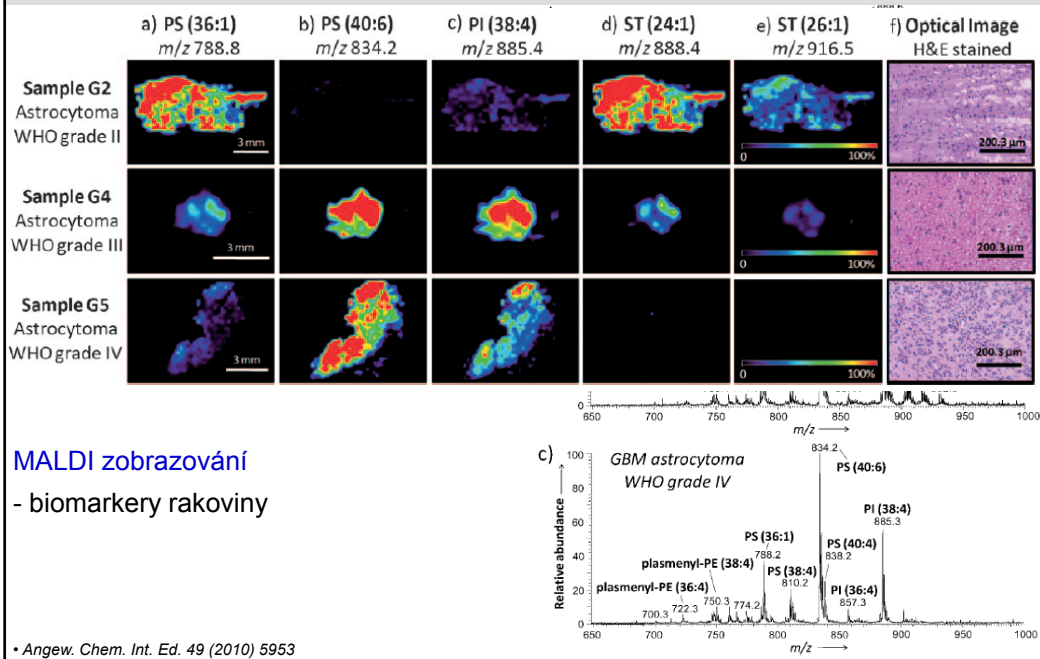
J. Pól, Hist Cell Biol 134 (2010) 423

Hmotnostně spektrometrické zobrazování

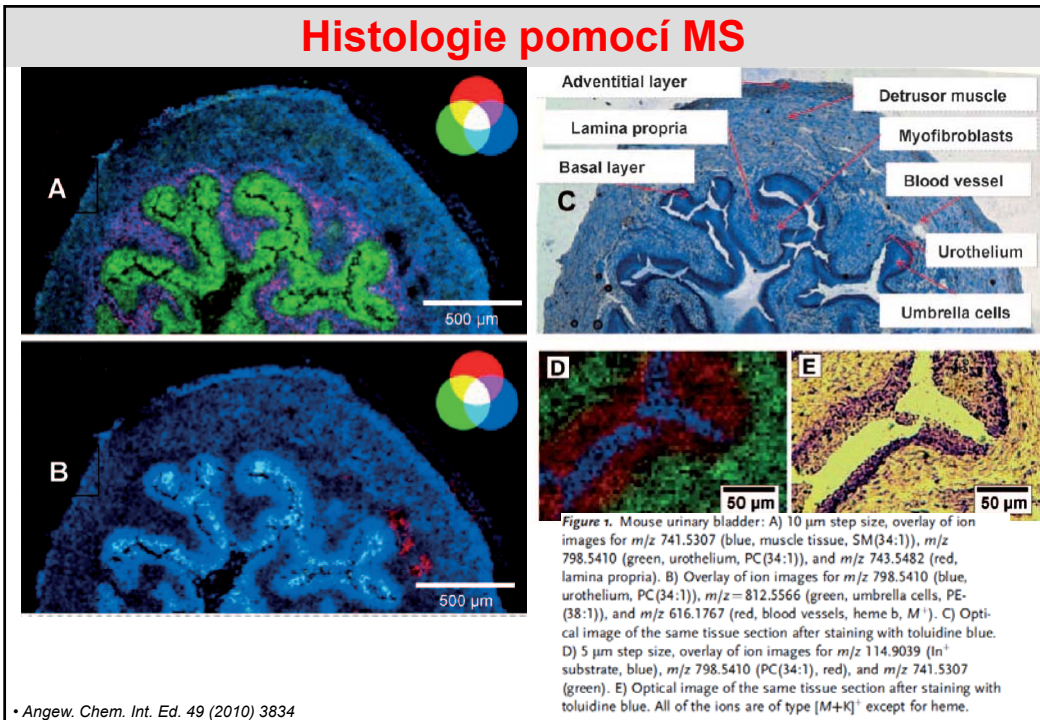
- lze použít různé zdroje pro ionizaci
 - MALDI - běžné, komerčně dostupné aplikace, prostorové rozlišení 1 - 50 μm
 - DESI - menší prostorové rozlišení ve srovnání s MALDI (>100 μm)
 - SIMS - vysoké prostorové rozlišení (>1 μm), možnost i zobrazení ve vrstvách (3D)
- prostorové rozlišení je dáno šířkou bodu (laseru, spreje)
 - čím vyšší rozlišení (menší bod), tím kvalitnější obraz (více pixelů), ale nižší citlivost a větší objem dat
- úprava vzorku
 - nařezání plátek vzorku pomocí kryorezačky (plátky 10-20 μm)
 - rovnoměrné nanesení matrice (pro MALDI-MSI) - sprejování, sublimace, ESI sprejování
- možnost rekonstrukce vybraných m/z, překrytí s optickým obrazem - vyhledání distribuce dané látky



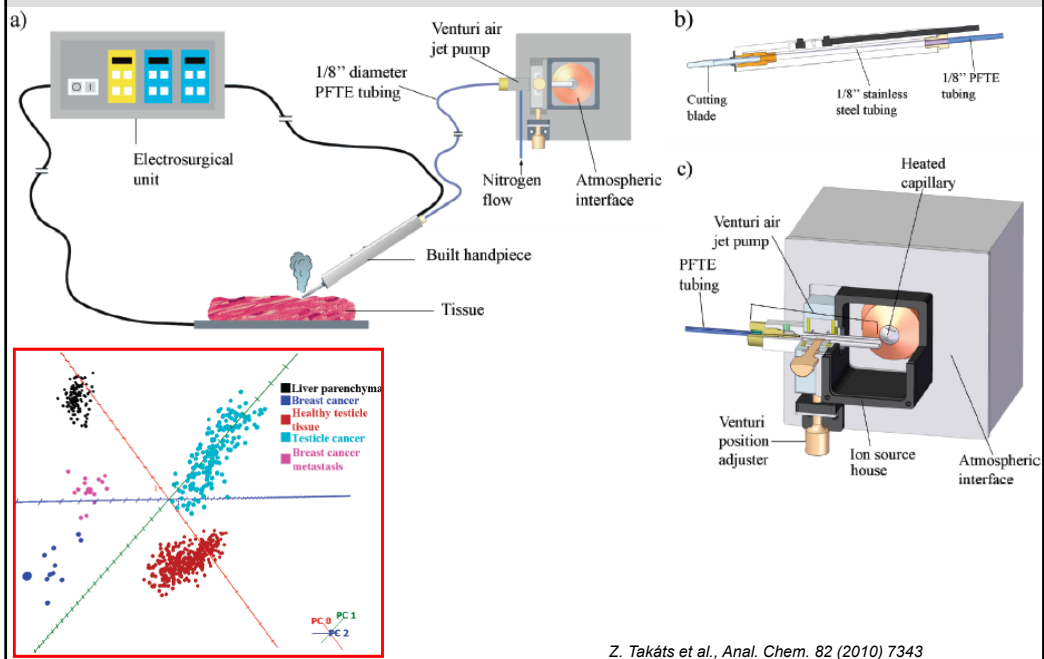
Hmotnostně spektrometrické zobrazování



Histologie pomocí MS



Sledování průběhu operací nádorů pomocí MS



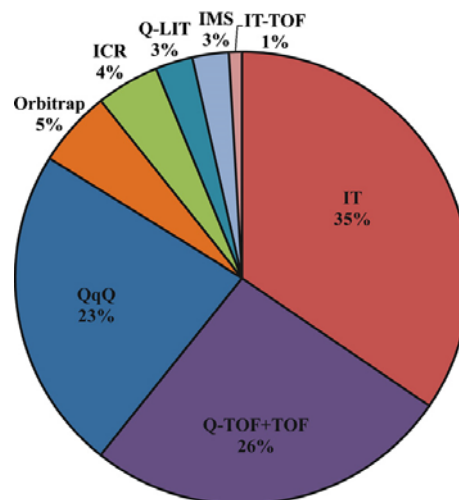
Hmotnostní analyzátořy

Hmotnostní analyzátoři

- hmotnostní analyzátoř slouží k dělení iontů v plynné fázi za vakua podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z)
- analyzátoř je umístěn za iontovým zdrojem (tzn. molekuly již byly převedeny na ionty) a před detektorem (před detekcí musíme ionty rozdělit podle m/z)
- dělení iontů v analyzátoři probíhá za vysokého vakua (ca. 10^{-3} - 10^{-11} Pa, podle typu analyzátoři)
- dělení iontů podle m/z lze dosáhnout na základě různých fyzikálních principů:
 - 1/ zakřivení dráhy letu iontů v magnetickém nebo elektrickém poli (magnetický nebo elektrostatický analyzátoř)
 - 2/ různá stabilita oscilací iontů v dvoj- nebo trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí (kvadrupól nebo iontová past)
 - 3/ různá doba rychlosti letu iontů (analyzátoř doby letu – TOF)
 - 4/ různá frekvence harmonických oscilací v Orbitrapu
 - 5/ různá absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli (iontová cyklotronová rezonance – ICR)

Základní typy hmotnostních analyzátoři

- Magnetický sektorový analyzátoř
- Kvadrupólový analyzátoř
- 3D a lineární iontová past
- Průletový analyzátoř
- Orbitrap
- Iontová cyklotronová rezonance
- Analyzátoř pohyblivosti iontů
- Hybridní hmotnostní spektrometry



- zastoupení hmotnostních analyzátoři v LC/MS - dle Web of Science, březen 2012

Hmotnostní analyzátoři

Podle způsobu dělení iontů:

- **skenující** - postupně mění skenovanou veličinu (U, V, B) a propouští ionty o určité m/z (kvadrupólový analyzátor, sektorový magnetický analyzátor)
- **iontové pasti** - zadržuje ionty pomocí napětí na elektrodách a následně je analyzuje (iontová past, orbitrap, FT-ICR)
- **průletový** - měří čas iontů potřebný pro překonání určité vzdálenosti (TOF)
- analyzátoři **pohyblivosti iontů** - dělení iontů podle jejich velikosti a tvaru

Základní parametry hmotnostních analyzátorů:

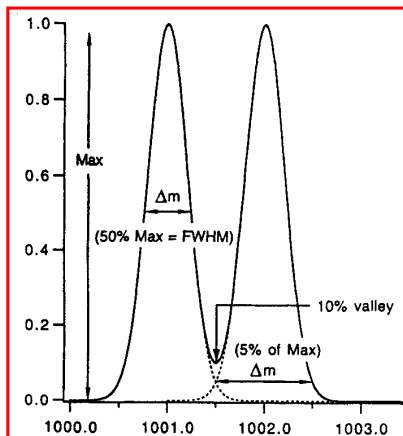
- **rozlišovací schopnost (rozlišení)** – schopnost analyzátoru poskytnout rozlišené signály pro ionty s podobnou m/z
- **správnost určení m/z** - míra schopnosti analyzátoru určit správnou hodnotu m/z
- **hmotnostní rozsah** – rozsah m/z hodnot, přes který analyzátor může zaznamenat spektra
- **dynamický rozsah** - rozmezí koncentrací, v nichž je odezva (lineárně) závislá na koncentraci
- **rychlost** – rychlost záznamu spekter

Základní definice rozlišovací schopnosti (RP)

A/ definice založená na šířce jednoho píku (univerzální) - poměr hmotnosti iontu m a šířky tohoto iontu Δm v polovině jeho výšky (Full Width at Half Maximum, **FWHM**)

B/ definice založená na překryvu dvou píků - poměr hmotnosti iontu m_1 a rozdílu iontů m_1 a m_2 s jednotkovým nábojem, přičemž oba píky musí být stejně vysoké, údolí mezi píky je 10% (tj. překrývají se z 10%) a mají jednotkový náboj

- používané pouze u magnetických analyzátorů, jinak se příliš nepoužívá



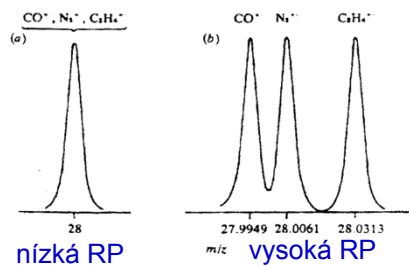
Rozlišovací schopnost (Resolving power, RP):

$$A/ \quad RP = m / \Delta m$$

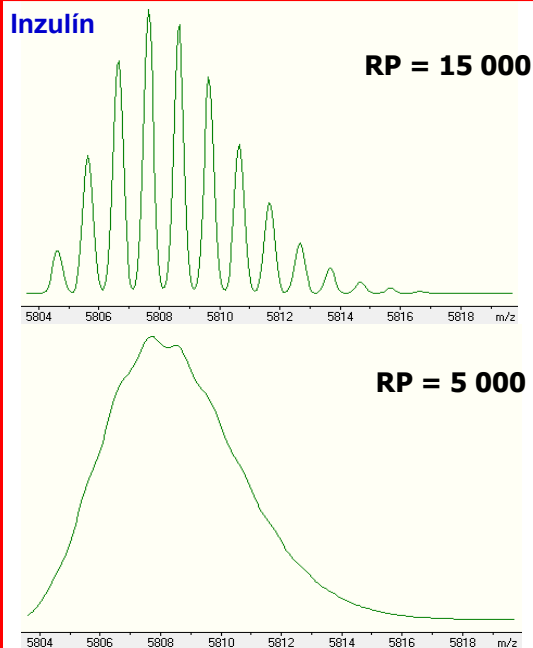
$$B/ \quad RP = m_1 / (m_2 - m_1)$$

Vysoká a nízká rozlišovací schopnost

- typ analyzátoru zásadním způsobem ovlivňuje **kvalitu** získaných hmotnostních spekter i **cenu** hmotnostního spektrometru
- **spektra s vysokou RP** (FT-ICR, orbitrap, TOF, sektorový magnetický analyzátor s dvojitou fokusací iontů)
 - např. pro nominální hmotnost $m/z = 28$: CO^+ (27.9949) \times N_2 (28.0061) \times C_2H_4 (28.0313)
 - nebo $m/z = 72$: $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2$ (72.0211), $\text{C}_4\text{H}_5\text{F}$ (72.0375), $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ (72.0575), C_5H_{12} (72.0939)
- **spektra s nízkou RP** = pouze rozlišení iontů lišících se o jednotku m/z nebo o něco lepší (obvykle Q nebo IT)



Vysoká a nízká rozlišovací schopnost



Správnost určení hodnoty m/z (Mass Accuracy)

$$\text{Správnost určení } m/z = \frac{(m/z)_{\text{exp}} - (m/z)_{\text{teor}}}{(m/z)_{\text{teor}}} \cdot 10^6$$

- **relativní rozdíl** mezi **experimentálně** získanou hodnotou a **teoreticky** vypočtenou m/z iontu vztáženou k teoretické hodnotě
- bezrozměrná veličina vyjádřená v **ppm**
- vysoká správnost určení hmoty umožňuje **určení elementárního složení** iontu
- jako neaprosté minimum pro možnost určení elementárního složení se uvádí správnost 5 ppm s externí kalibrací hmotnostní stupnice
- < 5 ppm (TOF s reflektorem, Orbitrap, sektorové analyzátoři s dvojitou fokusací iontů), < 2 ppm (FT-ICR)
- **Příklad:** experimentálně naměřená hodnota m/z = 300.0463, teoreticky vypočtená hodnota m/z = 300.0473

$$\text{Správnost určení } m/z = \frac{300.0463 - 300.0473}{300.0473} \cdot 10^6 = -3.3 \text{ ppm (včetně znaménka!)}$$

- dle tabulek (nebo lépe s využitím softwaru) nejlépe odpovídá elementární složení $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2\text{Br}$, podle izotopů M:M+2 potvrzena přítomnost bromu

Typické parametry hmotnostních analyzátorů

- typické parametry LC/MS hmotnostních analyzátorů

Hmotnostní analyzátor	Rozlišovací schopnost [$\cdot 10^3$]	Správnost [ppm]	m/z rozsah (horní limit) [$\cdot 10^3$]	Rychlost [Hz]	Lineární dynamický rozsah	Cena
Q	3 – 5	nízká	2 – 3	2 – 10	$10^5 - 10^6$	nízká
IT	4 – 20	nízká	4 – 6	2 – 10	$10^4 - 10^5$	střední
TOF	10 – 60	1 – 5	10 – 20	10 – 50	$10^4 - 10^5$	střední
Orbitrap	100 – 240	1 – 3	4	1 – 5	$5 \cdot 10^3$	vyšší
FT-ICR	750 – 2,500	0.3 – 1	4 – 10	0.5 – 2	10^4	vysoká

- rozdělení hmotnostních analyzátorů

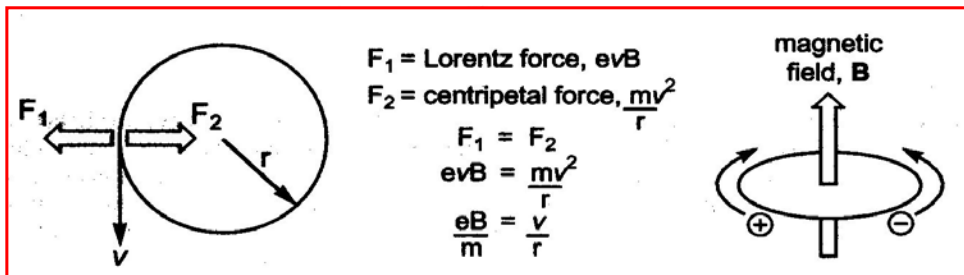
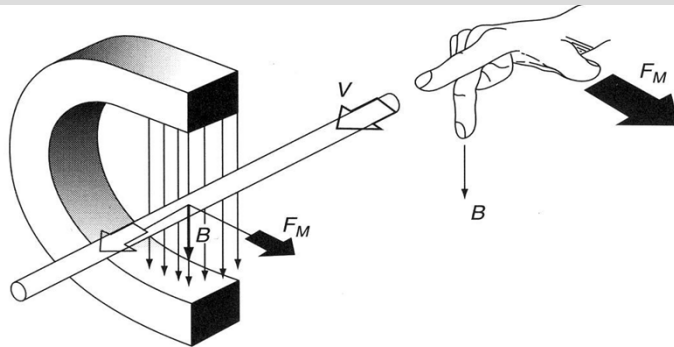
	Rozlišovací schopnost (RP, FWHM)	Správnost (MA, ppm)
nízká	<10,000	>5
vysoká	10,000 – 100,000	<5
ultravysoká	>100,000	<1

Magnetický sektorový analyzátor

Magnetický sektorový analyzátor

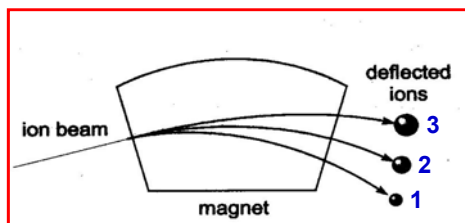
- RP: do 100 000 (magnetický sektorový analyzátor s dvojitou fokusací)
- správnost určení hmotnosti: 5 ppm
- hmotnostní rozsah: do 20 000
- skenovací rychlost: pomalé skenování
- historicky první široce používaný analyzátor, nyní pouze pro speciální aplikace
- umožňuje **vysokoenergetické MS/MS** experimenty - např. určení poloh dvojných vazeb nebo větvení v acylovém řetězci mastných kyselin na základě fragmentových iontů vzniklých při těchto experimentech
- klasický analyzátor pro **GC/MS** analýzu dioxinů, furanů, bromovaných difenyletherů, polychlorovaných naftalenů, atd.

Magnetický sektorový analyzátor

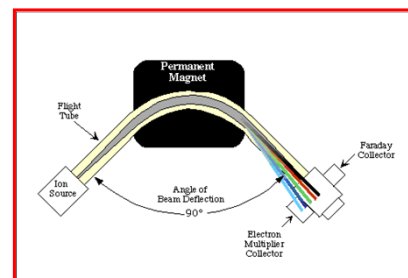


Magnetický sektorový analyzátor s jednoduchou fokusací iontů

Princip: při průchodu iontu magnetickým polem dojde k zakřivení dráhy letu iontu, větší zakřivení pro ionty s nižší hodnotou m/z (dráhy těžších iontů se tolik nezakříví kvůli větší odstředivé síle těžšího iontu)



$$(m/z)_1 < (m/z)_2 < (m/z)_3$$



Fyzikální popis magnetického analyzátoru

- kladné ionty s určitou hodnotou m/z urychlené záporným potenciálem V vstupují do magnetického pole s magnetickou indukcí B , čímž dojde k zakřivení pohybu iontů na trajektorii o poloměru r

- při vstupu do magnetického pole ionty mají kinetickou energii E_k odpovídající $z \cdot V$ získanou v urychlujícím elektrickém poli, takže platí:

$$E_k = z \cdot V = \frac{1}{2} m \cdot v^2 \quad (v \text{ je rychlost urychleného iontu})$$

- v magnetickém poli působí na ion dostředivá síla $B \cdot z \cdot v$, která musí být v rovnováze s odstředivou silou $m \cdot v^2 / r$, takže platí:

$$B \cdot z \cdot v = m \cdot v^2 / r$$

- z čehož dále odvodíme tzv. **základní rovnici pro magnetický analyzátor**:

$$m/z = B^2 \cdot r^2 / 2 \cdot V$$

- poloměr dráhy iontů tedy závisí na m/z , B , V

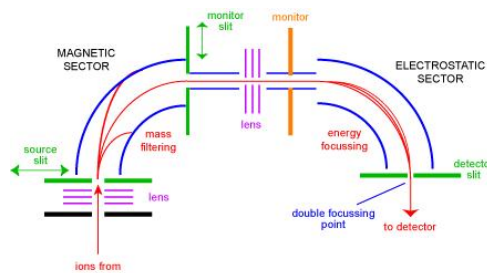
- plynulou změnou (tzv. skenováním) B (magnetické skenování) nebo V (potenciálové skenování) při konstantním poloměru r daným pro použitý přístroj projdou výstupní štěrbinou na detektor postupně všechny ionty a zaznamenají se intenzity iontů pro jednotlivé m/z , čímž získáme hmotnostní spektrum

Magnetický sektorový analyzátor s dvojitou fokusací iontů

- navíc k magnetické fokusaci iontů je ještě **elektrostatická fokusace** (zaostření) iontů, čímž dojde k výraznému zvýšení maximální RP z jednotek na desítky tisíc

- ionty vznikající v iontovém zdroji mají určitou distribuci kinetických energií, což přispívá k šířce jejich píků při detekci - pro dosažení vyššího rozlišení musíme ionty energeticky sjednotit, k čemuž slouží elektrický analyzátor

Princip: jestliže do elektrického pole vstoupí ionty s různou E_k a m/z , dojde k zakřivení jejich dráhy v závislosti na jejich E_k a bez ohledu na hodnotu m/z



Fyzikální popis elektrostatické fokusace iontů

• v elektrostatickém analyzátoru pro ionty musí platit, že dostředivá elektrická síla $z.E$ je v rovnováze s odstředivou silou $m.v^2/r$, takže:

$$z.E = m.v^2/r \quad (E \text{ je intenzita elektrického pole})$$

• po výstupu z iontového zdroje a urychlení potenciálem V mají ionty energii:

$$E_k = z.V = 1/2 m.v^2$$

• řešením rovnice získáme vztah pro poloměr zakřivení trajektorie v elektrickém poli:

$$r = 2.V/E$$

• z rovnice vyplývá, že fokusace iontů v elektrickém poli nezávisí na poměru m/z , ale pouze na jejich kinetické energii

• spojením magnetické (B) a elektrostatické (E) fokusace iontů lze dosáhnout výrazného zvýšení RP, až 30 – 100 000 pro magnetický sektorový analyzátor s dvojitou fokusací iontů

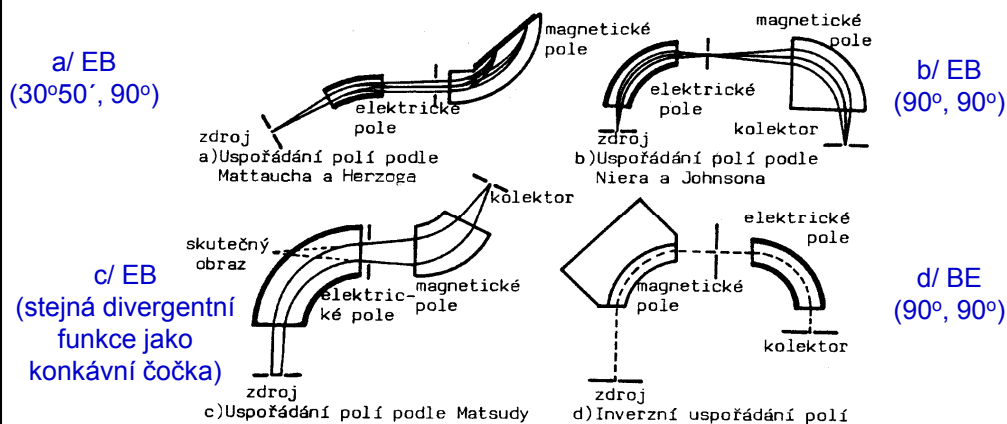
Geometrie analyzátorů s dvojitou fokusací

a/ podle Mattaucha a Herzoga

b/ podle Niera a Johnsona

c/ podle Matsudy

d/ inverzní uspořádání polí

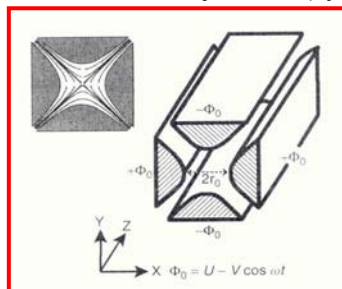


Kvadrupólový analyzátor

(Quadrupole, Q)

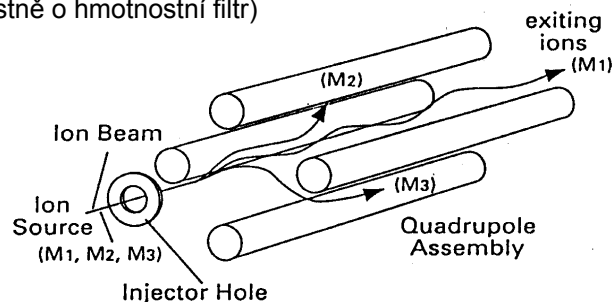
Kvadrupólový analyzátor

- R: obecně jednotkové rozlišení, při použití hyperbolických tyčí RP až 5 000
- správnost určení hmotnosti: nízká (0.1 u)
- hmotnostní rozsah: do 3 000
- skenovací rychlost: až 10 Hz
- oblíbený pro svou **jednoduchost** a **nízkou cenu** - LC/MS, GC/MS
- **trojitý kvadrupól (QqQ)** - typické pro kvantitativní analýzu, pro MS/MS experimenty, 3 kvadrupóly spojené za sebou, střední slouží jako kolizní cela
- často součástí hybridních hmotnostních spektrometrů, kde slouží jako filtr (výběr požadovaného iontu) a jako kolizní cela



Kvadrupólový analyzátor

- čtyři stejné kovové tyče kruhového průřezu délky 20 - 30 cm, na dvě protilehlé je vloženo kladné stejnosměrné napětí, na zbývající dvě záporné stejnosměrné napětí, na všechny tyče je superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí
- ion je přiveden do středu osy kvadrupólu a začne oscilovat
- v daný časový okamžik, pro určitý poměr U/V , jsou oscilace stabilní pouze pro ion s určitou hodnotou m/z , který projde kvadrupólem a dostane se na detektor, všechny ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu
- plynulou změnou (skenováním) hodnot stejnosměrného napětí U a amplitudy V (jejich poměr zůstává konstantní) jsou postupně propuštěny na detektor všechny ionty (jedná se vlastně o hmotnostní filtr)



Animace

Kvadrupólový analyzátor - fyzikální popis

- pro páry tyčí platí:

$$F_+ = + (U - V \cdot \cos \omega t) \text{ a } F_- = - (U - V \cdot \cos \omega t),$$

kde F_+ a F_- je potenciál vložený na protilehlé dvojici tyčí („kladné“ a „záporné“ tyče), ω je angulární frekvence [rad/s] = $2\pi\nu$, U je stejnosměrné napětí (~500 – 2000), V je amplituda střídavého napětí (-3000 až +3000 V)

$$F_x = m \cdot d^2x/dt^2, F_y = m \cdot d^2y/dt^2,$$

- odvozením získáme [Mathieu-ovu rovnici stability](#) (*Mathieu É., J.Math.Pures Appl. 13 (1868) 137*):

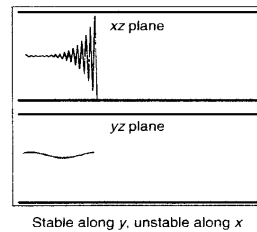
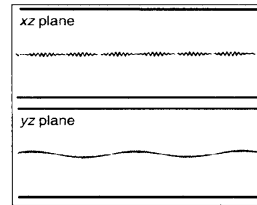
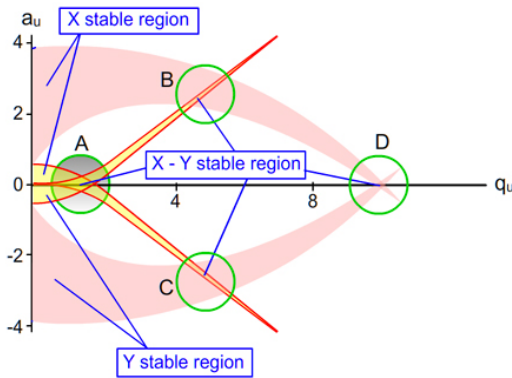
$$a_u = a_x = -a_y = (8zeU) / (mw^2r_0^2), q_u = q_x = -q_y = (4zeV) / (mw^2r_0^2),$$

z čehož odvodíme vztahy pro U , V :

$$U = a_u \cdot m/z \cdot (w^2r_0^2) / 8e, V = q_u \cdot m/z \cdot (w^2r_0^2) / 4e$$

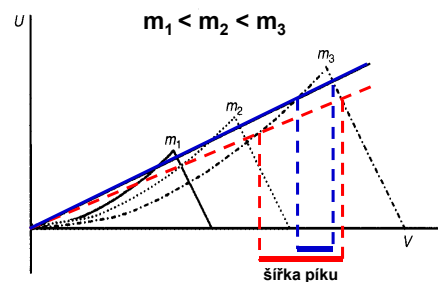
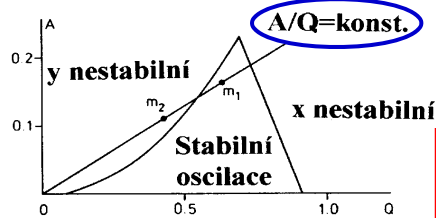
Stabilitní diagram pro kvadrupól

- závislost parametru a na q – vymezuje oblasti, kde je ion o dané hmotnosti stabilní (projde kvadrupólem) nebo nestabilní (neprojde kvadrupólem)



Stabilitní diagram pro kvadrupól

- parametr a závisí na stejnosměrném napětí (U), parametr q závisí na amplitudě střídavého napětí (V)
- při **skenování** se mění parametry a a q tak, aby jejich poměr byl stále **konstantní**, postupně jsou propuštěny kvadrupólem všechny ionty a zaznamenáno spektrum
- snížením poměru a/q lze zvýšit oblast m/z (iontů), které projdou analyzátozem, ale zároveň se sníží rozlišení



Trojité kvadrupólový analyzátor (Triple Quadrupole, QqQ)

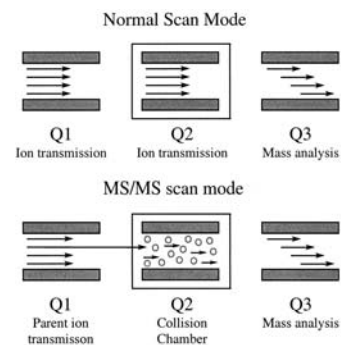
- 3 kvadrupóly řazené za sebou a prostřední z nich (q2) slouží jako kolizní cela se zavedeným kolizním plynem, který způsobuje kolizní excitaci vybraných iontů kvadrupólovým analyzátozem Q1 a jejich následnou fragmentaci, vzniklé fragmenty jsou analyzovány pomocí Q3

- na rozdíl od pasti může docházet k **opakovaným kolizním excitacím** díky opakovaným srážkám iontů (jak prekurzoru, tak i produktového iontu) a kolizního plynu, tzn. pozorujeme **více fragmentových iontů** než u MS/MS měření s iontovou pastí

- možnost měření různých **typů skenů**:

- sken produktových iontů
- sken iontů prekurzoru
- sken neutrálních ztrát
- sken iontových reakcí

- pro měření MS³ by bylo nutné spojit 5 kvadrupólů za sebou QqQqQ, prakticky se nepoužívá; pro MSⁿ do vyššího stupně než MS² jsou vhodnější analyzátoři na principu pastí

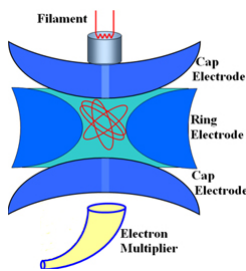


3D Iontová past

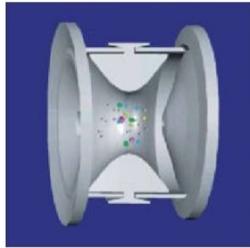
(Ion trap, IT)

3D Iontová past

- R: obecně jednotkové rozlišení (některé přístroje s RP do 4 000 až 20 000)
- správnost určení hmotnosti: nízká (0.1 u)
- hmotnostní rozsah: do 3 000 (6 000)
- skenovací rychlost: až 10 Hz
- možnost MS^n experimentů - strukturní informace
- levný analyzátor



3D quadrupole ion trap

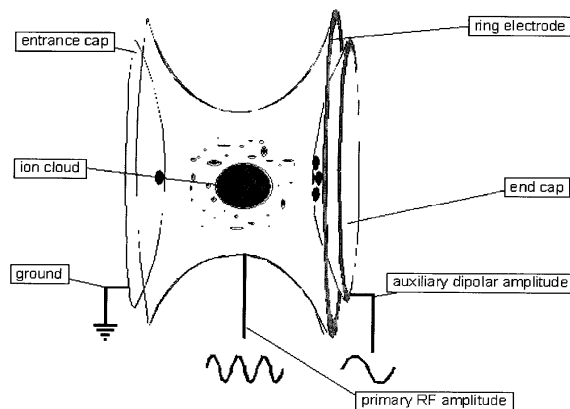


2D linear quadrupole ion trap



3D Iontová past

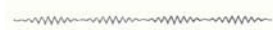
- iontová past je tvořena **prstencovou elektrodou** a dvěma **koncovými elektrodami**, na elektrody je vloženo napětí (3D kvadrupól)
- ionty jsou krátkým napěťovým pulzem přivedeny do pasti vstupním otvorem koncové elektrody ("nadávkování iontů")
- vhodnými poměry napětí vloženo na kruhovou a dvě koncové elektrody jsou ionty zadrženy uvnitř pasti (účinnost záchytu přibližně 5%)
- postupnou změnou napětí jsou podle jejich m/z vypuzovány na detektor výstupním otvorem



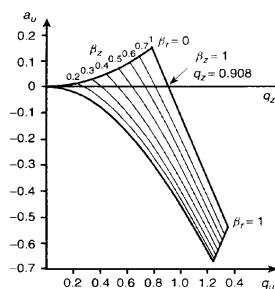
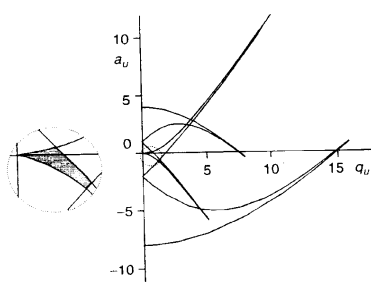
3D Iontová past

- podobně jako u kvadrupólu se stabilita oscilací iontů řídí Mathieu-ovým **stabilitním diagramem** (v tomto případě trojrozměrným), který vymezuje oblasti, kde je ion o dané m/z stabilní (zůstane v pasti) nebo nestabilní (zanikne na elektrodách nebo je vypuzen)

Stabilní oscilace



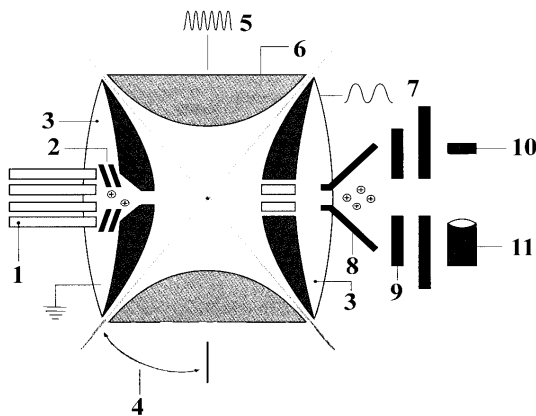
Nestabilní oscilace



3D Iontová past

- iontová past umožňuje **MSⁿ experimenty v jednom místě** = izolaci iontů, fragmentaci a měření produktových iontů (možnost až MS¹⁰, v praxi max. MS⁵)
- lze použít **externí ionizaci** (obvyklé zejména u HPLC/MS) nebo **interní ionizaci** v iontové pasti (běžné u GC/MS s EI)
- do pasti se zavádí **He** jako tzv. **tlumící plyn** o tlaku asi $5 \cdot 10^{-3}$ Pa
 - tlumí oscilace v ose z, čímž se dosáhne významného zvýšení RP a zlepšení záchytu iontů
 - pro kolizní excitaci vybraných iontů při MS/MS experimentech
- **přeplnění iontové pasti** - je potřeba optimalizovat množství iontů dávkovaných do pasti, pokud jich je přítomných příliš mnoho, dochází ke vzniku **prostorového náboje** ("space charge effect") a tím k výraznému poklesu rozlišení a posunu m/z
 - **předskan** - před vlastním skenem se provede velmi krátký předskan, ve kterém se spočítá množství iontů přicházejících do pasti a podle toho se upraví doba dávkování iontů (otevření vstupní elektrody)
 - **výpočet z předchozího skenu** - vychází z dat předcházejícího skenu
- pravidlo **30/70** ("cut-off effect") - ionty s hmotností pod 30% hmotnosti prekurzoru nemají stabilní trajektorie a nejsou v pasti zachyceny

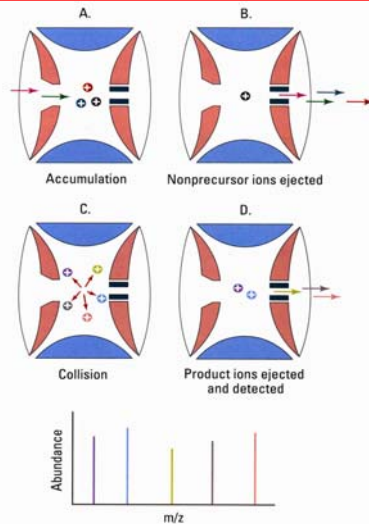
3D Iontová past



Animace:

- 1/ MS mód
- 2/ MS mód skenování
- 3/ Izolace pro MS/MS
- 4/ CID-MS/MS

MS/MS



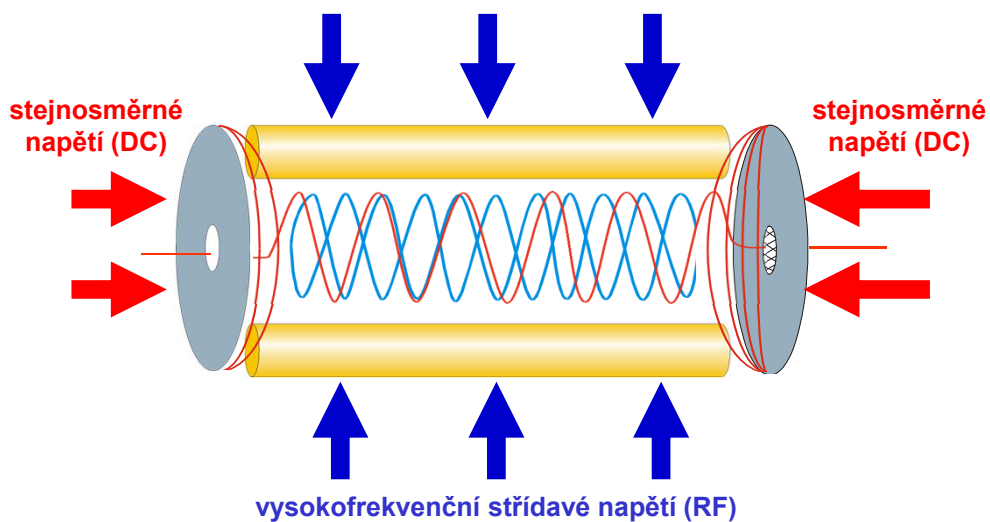
Lineární iontová past

(Linear ion trap, IT)

Lineární iontová past

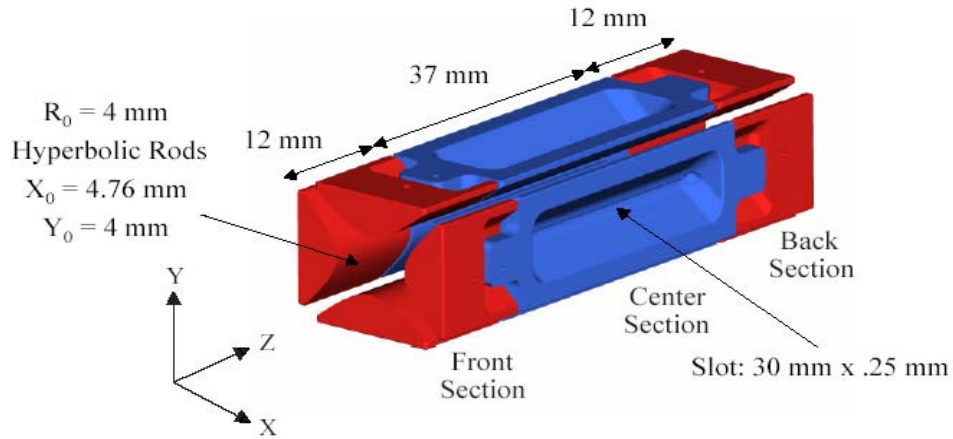
- jedná se v podstatě o kvadrupól na jehož koncích jsou umístěny elektrody s vloženým potenciálem, který umožňuje uchovávání iontů
- vyznačuje se **vysokou kapacitou** (až 50x vyšší ve srovnání s 3D iontovou pastí)
 - méně náchylné ke vzniku prostorového náboje
 - vyšší lineární dynamický rozsah
- vyšší účinnost **plnění** a **detekce** iontů
- mohou být přítomny i dva detektory
- ionty mohou být vypuzovány radiálně nebo axiálně
- může pracovat v módu LIT i jako Q

Záchyt iontů v lineární iontové pasti



Lineární iontová past

Animace



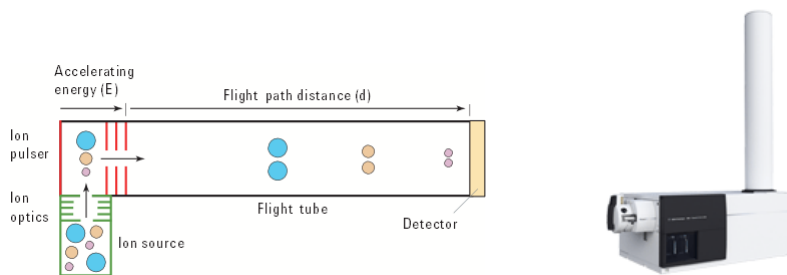
kvadrupólové tyče se segmenty

Analyzátor doby letu

(Time-of-Flight, TOF)

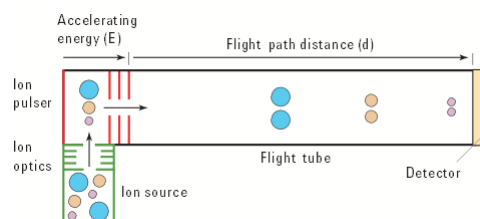
Analyzátor doby letu

- RP: 10 000 - 60 000
- správnost určení hmotnosti: 1 - 5 ppm
- hmotnostní rozsah: až 10^5 (až 10^6 bez reflektoru, 20 000 pro QqTOF spektrometr)
- skenovací rychlost: 10 - 50 Hz
- hmotnostní analyzátor s **teoreticky neomezeným hmotnostním rozsahem**
- pulzní analyzátor - často s **MALDI** ionizací



Analyzátor doby letu

- měří **dobu letu iontů** potřebnou pro překonání určité dráhy
- ionty jsou urychleny napěťovým pulsem do **letové trubice** (oblast bez pole), kde letí různou rychlostí v závislosti na jejich m/z a dopadají na detektor v různém čase
 - ionty s menší hodnotou m/z o stejné kinetické energii se pohybují rychleji, takže se rychleji dostanou na detektor ("malé ionty letí rychleji")
- měření spekter je velice rychlé a hmotnostní rozsah m/z není teoreticky omezen, záleží pouze na době, po kterou budeme čekat na dopad iontů (lze $m/z > 10^6$)
- jedná se o typický pulzní hmotnostní analyzátor, protože nejdříve jsou velmi krátkým pulzem ionty urychleny na vstupu do analyzátorové trubice a potom se přesně měří čas (řádově ns – μ s), za který ionty "dolétnou" k detektoru, podle čehož se určí jejich m/z



Animace

Analyzátor doby letu

- při ionizaci získají ionty přibližně stejnou energii a jsou urychleny elektrickým potenciálem V , takže platí:

$$E_k = 1/2 m \cdot v^2 = z \cdot V$$

- doba dráhy letu iontu t :

$$t = l/v$$

kde l je délka analyzátorové trubice (= dráha letu) a v je rychlost iontu

- řešením rovnic získáme vztah pro výpočet m/z :

$$m/z = 2 \cdot V \cdot t^2 / l^2$$

Zvýšení rozlišení u TOF analyzátoru

- rozlišovací schopnost lineárního TOF analyzátoru není příliš vysoká (cca. 1 000 – 3 000), použitím dále uvedených technik lze výrazně zvýšit RP až na ca. 15 - 25 000, ve speciálním případě prodloužené letové trubice až 60 000

1/ Analyzátor doby letu s reflektorem (rTOF)

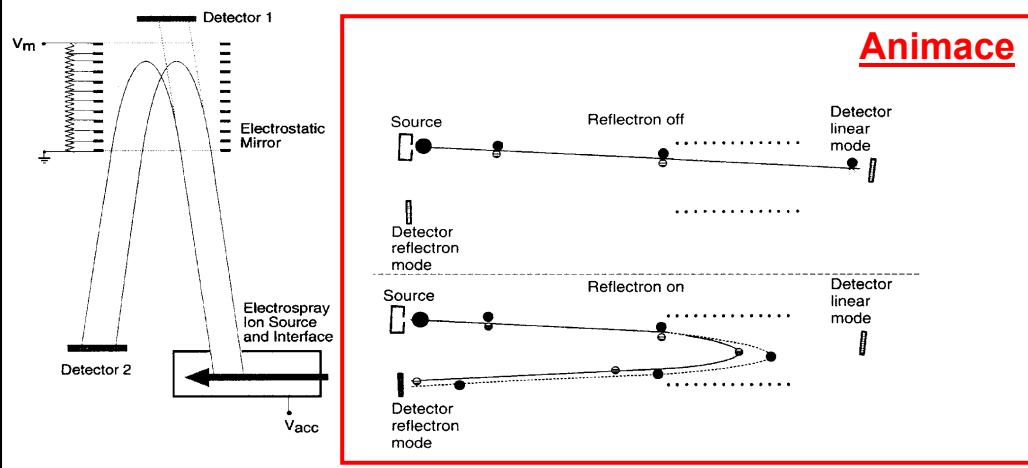
- použití tzv. iontového zrcadla neboli reflektoru, které slouží k vyrovnání různých kinetických energií pro ionty se stejnou hodnotou m/z (při ionizaci získají ionty kinetickou energii s určitou distribucí, což vede k rozšíření jejich píků a tím ke zhoršení RP)

2/ Opožděná extrakce iontů (Delayed Extraction)

- ionty jsou z MALDI zdroje extrahovány s malým zpožděním, čímž dojde díky vzájemným srážkám ke sjednocení jejich kinetických energií

Princip ionového zrcadla (reflektronu)

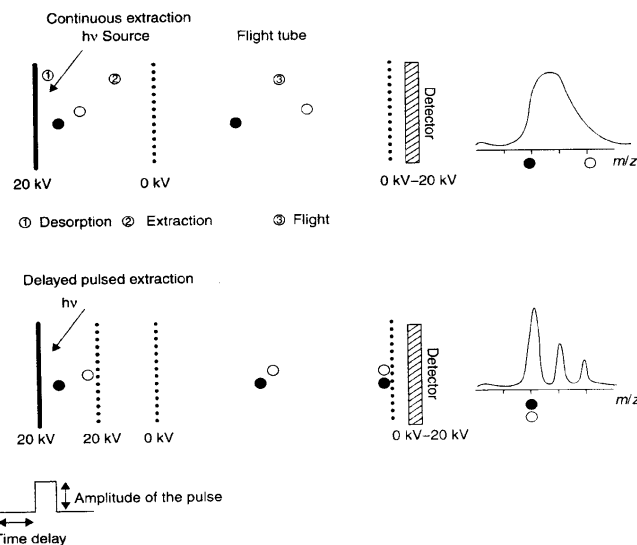
- ionty s větší kinetickou energií proniknou hlouběji do odrazového elektrického pole reflektoru před jejich odrazem (oproti iontům s nižší E_k), čímž dojde k jejich opoždění oproti iontům s nižší E_k a tím i k vyrovnání celkových drah iontů s různou E_k
- hloubka průniku iontů do elektrického pole reflektoru je úměrná jejich E_k a nezávisí na m/z



Animace

Opožděná extrakce iontů (Delayed Extraction)

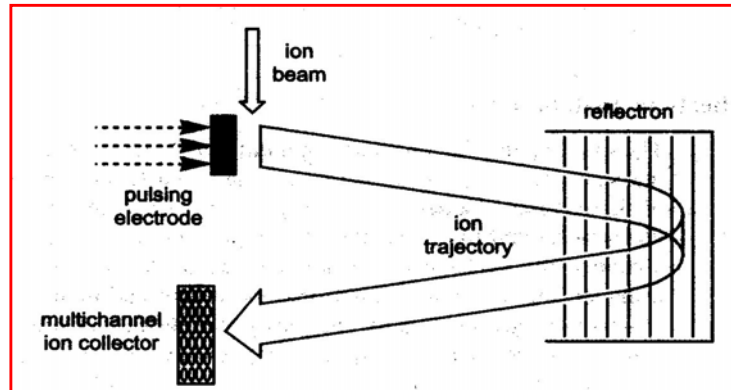
- sjednocením kinetických energií dojde ke zvýšení rozlišení



Animace

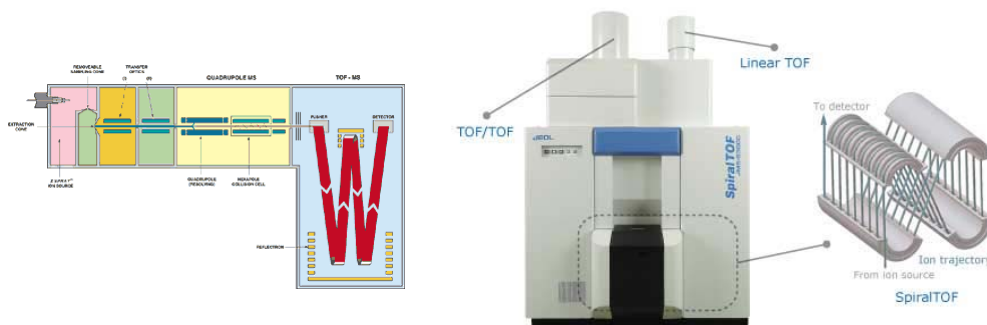
Ortogonalní TOF analyzátor

- typické pro spojení s API ionizačními technikami, kde je kontinuální zdroj iontů (při MALDI ionizaci vzniká diskretní obláček iontů, které jsou urychleny do letové trubice)
- vložení urychlujícího pulzu na pulzní elektrodu jsou ionty urychleny směrem k detektoru (reflektronu)
- po určité době dalším pulzem urychlíme další skupinu iontů, při správném nastavení parametrů lze využít všechny ionty



Multireflexní TOF analyzátořy

- využívá se odrazu iontů pro prodloužení dráhy letu - W, mnohonásobné odrazy



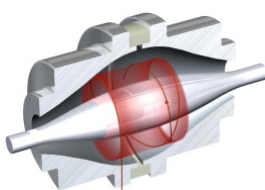
SpiralTOF™, TOF/TOF and Linear TOF

RP = 60 000, 1 ppm, 17 m dráha

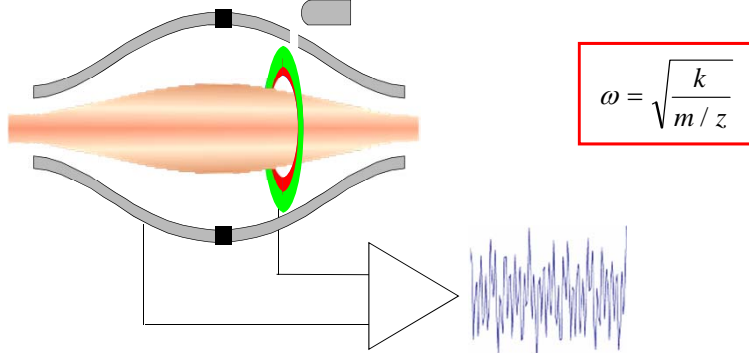
Orbitrap

Elektrostatická orbitální past - Orbitrap

- RP: 100 000 - 240 000
- správnost určení hmotnosti: 1 - 3 ppm
- hmotnostní rozsah: 6 000
- skenovací rychlost: pomalejší (1 - 5 Hz)
- nejnovější typ hmotnostního analyzátoru
- popsán ruským fyzikem Makarovem v roce 2005
- nižší rozlišovací schopnost a správnost určení hmoty oproti FT-ICR, ale výrazně nižší pořizovací náklady

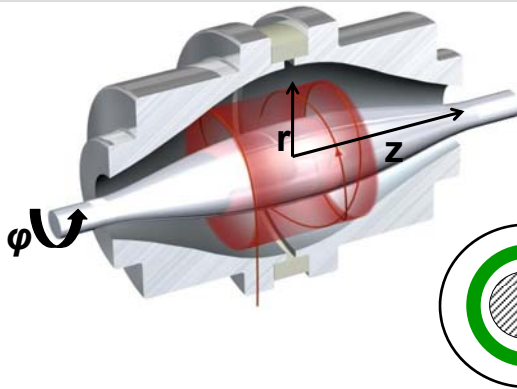


Orbitrap



- skládá se z vnější a středové vřetenové elektrody, na které je vloženo napětí
- ionty se pohybují **okolo** a **podél** středové elektrody
- frekvence v ose z (ω_z , podél středové eldy) je nepřímo úměrnou odmocnině z m/z
- jako u ICR cely je měřen ionty indukovaný proud na vnějších elektrodách
- hmotnostní spektrum se získá po Fourierově transformaci signálu

Orbitrap – základní popis

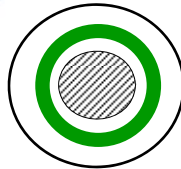


Charakteristické frekvence:

- Frekvence rotace ω_ϕ
- Frekvence radiální oscilace ω_r
- Frekvence axiální oscilace ω_z

$$\omega_\phi = \frac{\omega_z}{\sqrt{2}} \sqrt{\left(\frac{R_m}{R}\right)^2 - 1}$$

$$\omega_r = \omega_z \sqrt{\left(\frac{R_m}{R}\right)^2 - 2}$$



Kvadraticko-logaritmická potenciálová distribuce pro ideální Kingdonovu past:

$$U(r, z) = \frac{k}{2} \cdot \left\{ z^2 - r^2 / 2 + R_m^2 \cdot \ln(r / R_m) \right\}$$

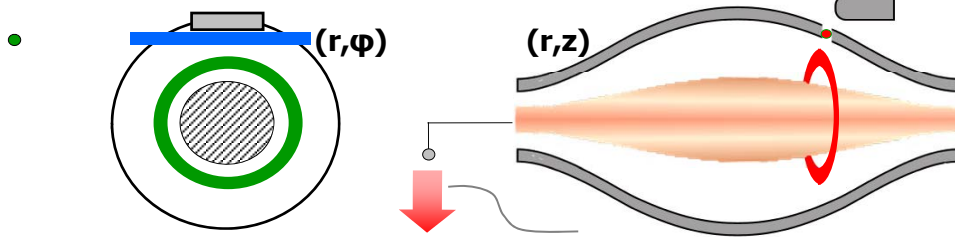
R_m ... charakteristický poloměr
 k ... zakřivení pole

$$\omega_z = \sqrt{\frac{k}{m/z}} \quad [\text{rad/s}]$$

- Pouze ω_z nezávisí na energii a úhlové distribuci iontů, ostatní ω silně závisí na rychlosti iontů a počátečním poloměru

Dávkování iontů a tvorba iontového prstence

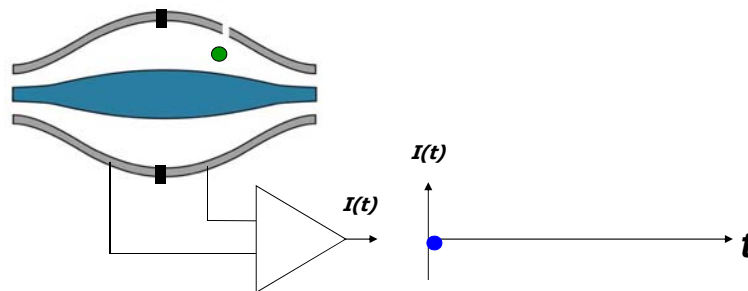
- úzký svazek iontů s určitou hodnotou m/z vstupuje do elektrického pole
- zvyšující se napětí stlačuje ionty
- stabilizuje se napětí a následně se stabilizují i trajektorie iontů
- úhlové rozšíření vytvoří rotující prsteneц iontů (podobné jako prstence u planet)



$$z_{1,2}(r) = \sqrt{\frac{r^2}{2} - \left(\frac{R_{1,2}}{2}\right)^2 + (R_m)^2 \ln\left(\frac{R_{1,2}}{r}\right)}$$

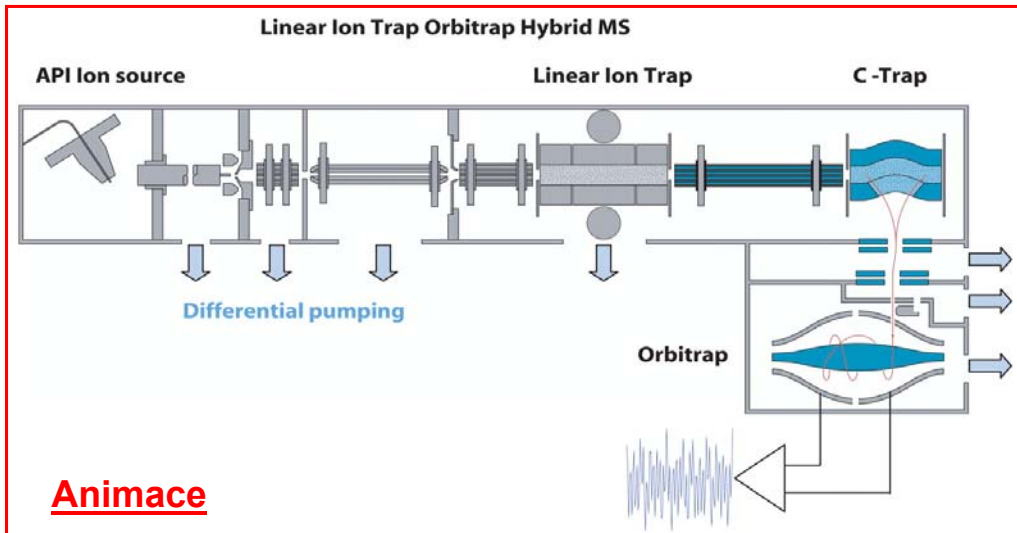
- Výpočet tvaru elektrod
(1 – středová, 2 – vnější)

Detekce proudového obrazu (image current)



- detekce všech hodnot m/z
- frekvence axiálních oscilací každého prstence iontů indukuje proudový obraz na vnějších dělených elektrodách
- paralelní záznam všech iontů generuje složitý signál (závislost intenzity na čase, superpozice všech iontů v pasti), frekvence jsou stanoveny pomocí Fourierovy transformace podobně jako u FT-ICR a převedeny na hmotnostní spektrum

Orbitrap – schéma přístroje

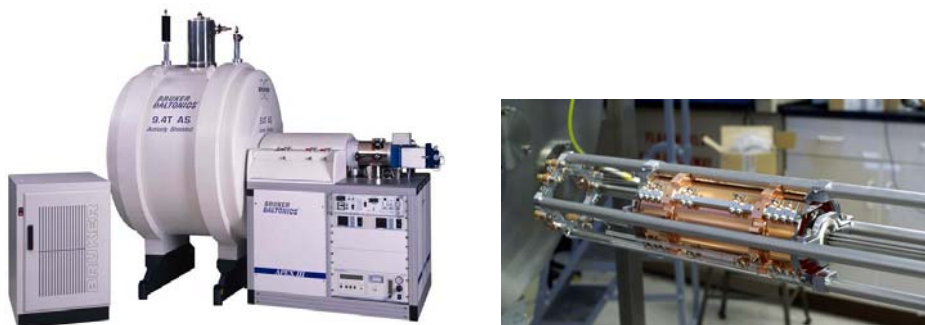


Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací

(Fourier transform-ion cyclotron resonance, FT-ICR)

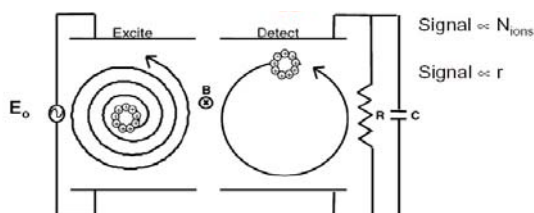
FT-ICR

- RP: 750 000 - 2 500 000
- správnost určení hmotnosti: <1 ppm
- hmotnostní rozsah: 4 000 - 10 000
- skenovací rychlost: pomalý (0.5 - 2 Hz)
- parametry ICR vybočují z rámce všech ostatních analyzátorů (cena, rozlišení, vakuum)

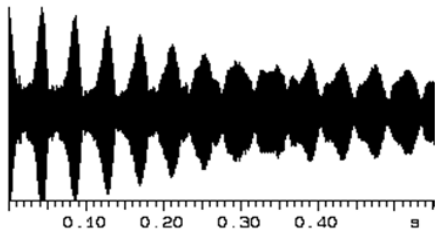


FT-ICR - princip

- FT-ICR cela je umístěna uprostřed velmi silného magnetického pole (ca. 7 Tesla)
- když se ion dostane do silného magnetického pole, začne se pohybovat po cykloidální trajektorii s cyklotronovou frekvencí $\omega_c = \frac{BZ}{m}$
- následně jsou ionty excitovány pomocí RF v širokém pásmu frekvencí na vyšší orbit
- po vypnutí RF ionty pokračují na stejných frekvencích na drahách s vyšším poloměrem
- každá hodnota m/z má charakteristickou cyklotronovou frekvenci
- detekce je založena na měření indukovaného proudu ionty na detekčních deskách (interferogram, superpozice frekvencí všech iontů v cele)
- Fourierovou transformací se přepočtou tyto frekvence do stupnice m/z - získáme hmotnostní spektrum

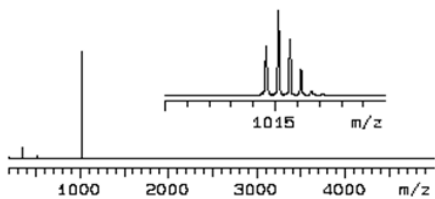


Fourierova transformace



závislost intenzity na čase
superpozice všech frekvencí iontů v cele

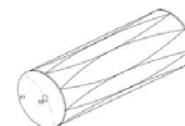
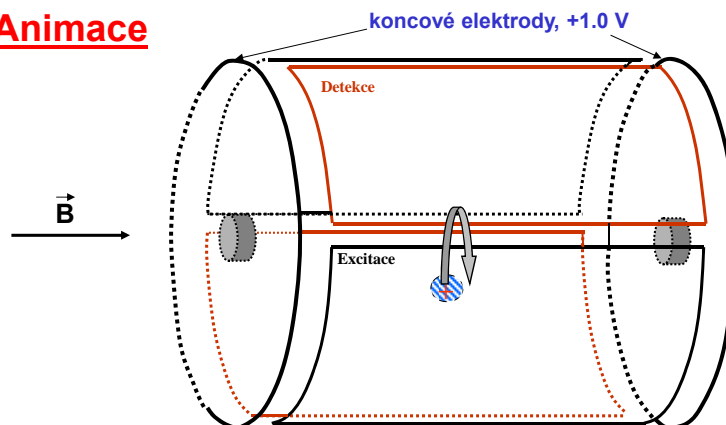
Fourierova transformace



závislost intenzity na m/z
hmotnostní spektrum

FT-ICR cela

Animace



E. Nikolaev
RP až 21 000 000

- běžný poloměr cely: 1-3 cm
- původní poloměr dráhy iontů v cyklotronu je velmi malý (0.01 - 0.1 mm) a není fázově koherentní, nepoužitelný pro měření
- excitací se poloměr zvýší na ca. 1 cm
- silné magnetické pole B v rozsahu 1-12 Tesla, nejběžněji 7 Tesla

Hybridní hmotnostní spektrometry

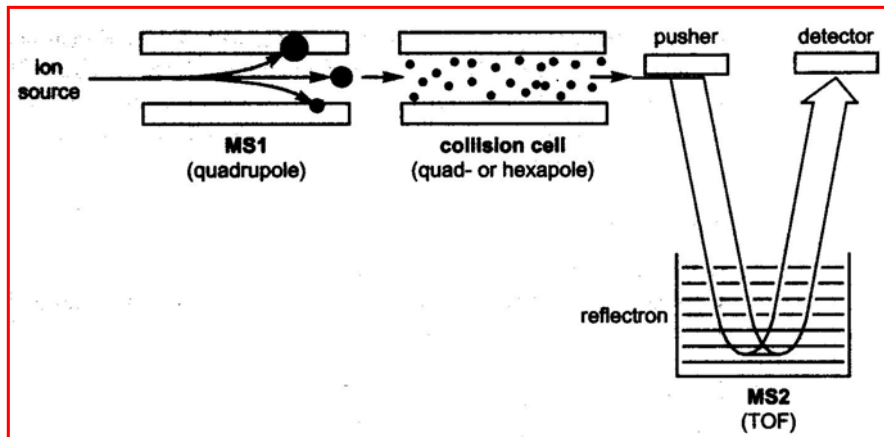
Hybridní hmotnostní spektrometry

- kombinace dvou a více různých typů analyzátorů
- za účelem MS/MS a MSⁿ experimentů
- zlepšení vlastností přístroje

- kombinace sektorového analyzátoru a kvadrupólu - BEqQ nebo BEEQ
- QqTOF - nejběžnější, komerčně dostupný
- IT-TOF
- kombinace LIT a FT analyzátorů (ICR, orbitrap) - možnost MSⁿ analýzy
- kombinace MS a iontové mobility

QqTOF

- možnost vysokého rozlišení a správnosti určení m/z díky TOF analyzátoru
- kombinace s prvním kvadrupólem umožňuje MS/MS analýzu, případně ve spojení s kolizně indukovanou disociací ve zdroji pseudo-MS³
- druhý kvadrupól (označen malým „q“) slouží jako kolizní cela

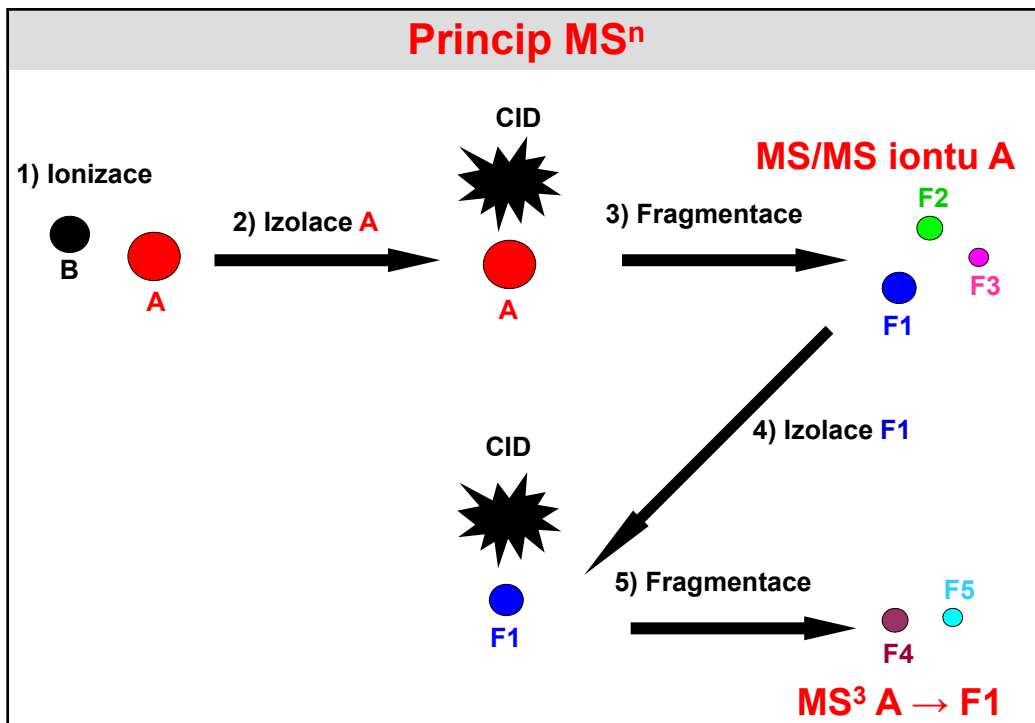


Tandemová hmotnostní spektrometrie

(Tandem mass spectrometry)

Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS a MSⁿ analýza)

- **kolizně indukovaná disociace** (Collision Induced Dissociation, CID)
 - disociace iontu po kolizní excitaci
 - nepoužívat kolizně aktivovaná disociace (CAD)
- v **MS/MS** uspořádání: vybraný ion podrobíme excitaci (nejčastěji srážkám s inertním plynem - tzv. kolizní plyn), čímž může dojít k rozpadu tohoto iontu na fragmentové ionty, jejichž hmotnostní spektrum změříme (MS/MS spektrum bude obsahovat pouze fragmentové ionty vzniklé rozpadem vybraného prekurzoru a žádné nečistoty)
- v **iontovém zdroji** (in-source CID): ionty přítomné v daný moment v iontovém zdroji podrobíme CID bez možnosti výběru iontu prekurzoru (MS/MS spektrum obsahuje fragmentové ionty vzniklé ze všech iontů přítomných ve zdroji vč. nečistot)



Kalibrace hmotnostní stupnice

Kalibrace hmotnostní stupnice

- u všech typů analyzátorů je vždy nutné kalibrovat hmotnostní škálu
- není tak kritické u **analyzátorů s nízkým rozlišením / nízkou správností určení hmoty** (např. Q, iontové pasti)
 - postačuje správnost ± 0.1 m/z
 - obvykle stabilní poměrně dlouhou dobu, ale i přesto je třeba pravidelně kontrolovat a v případě pochybností kalibrovat
- **analyzátorů s vysokou správností určení hmoty (< 5 ppm)**
 - vysoké nároky na správnost a přesnost kalibrace, potřebná stabilita a robustnost systému
 - interval kalibrace silně závisí na typu analyzátoru - před každou analýzou (QqTOF), jednou za týden (orbitrap), atd.

Kalibrace hmotnostní stupnice

- **externí kalibrace** – kalibrace a vlastní měření není ve stejný okamžik, nejdříve kalibrace a pak měření (nebo naopak), což někdy může způsobit určitý posun m/z
 - obecně poskytuje mírně horší výsledky oproti interní kalibraci, ale je menší riziko hmotnostních interferencí analytu s kalibrantem
- **interní kalibrace** – kalibrant i analyt jsou do iontového zdroje přivedeny ve stejný okamžik a ve spektru pozorujeme jak analyt tak i kalibrant
 - poskytuje nejpřesnější výsledky, ale hrozí riziko hmotnostních interferencí (tzn. analyt a kalibrant nesmí mít příliš blízké hmotnosti, aby je daný typ analyzátor dokázal spolehlivě rozlišit, pokud by se píky analytu a kalibrantu ovlivnily, pak vzniká chyba)
 - "lock mass" kalibrace - založena na kontinuální kalibraci na vybraný ion pozadí o známém složení nebo sprejování standardu druhým sprejem
- **kalibranty** – musí se jednat o látky s přesně definovaným elementárním složením a známým typem iontu, hodnoty m/z nesmí interferovat s analytem, výhodné může být též blízký strukturální typ analytu (není podmínkou) nebo přítomnost monoizotopických prvků (např. perfluorované látky, Csl)
 - typické kalibranty: syntetické polymery (např. PEG, PPG), klastry solí (např. monoizotopický Csl), směsi peptidů, apod.

Spojení MS a separačních technik

Spojení hmotnostní spektrometrie a separačních technik

Proč spojení?

- můžeme v jedné analýze zároveň separovat i identifikovat složitou směs látek, kombinace výhod obou technik
- alternativní způsob spočívající v izolaci látek po jejich chromatografické separaci a následném změření hmotnostních spekter pro jednotlivé látky off-line technikou je pracný, časově náročný a pro složité směsi látek nebo látky ve stopové koncentraci ve směsi nemusí být vůbec proveditelný

Proč bylo technické řešení spojení GC/MS a zejména HPLC/MS složité?

- rozdíl tlaků mezi hmotnostním analyzátozem (např. kvadrupól či iontová past 10^{-3} Pa) a analyzovanými látkami vstupujícími do iontového zdroje za atmosférického tlaku (tj. 10^5 Pa) je nejméně 8 řádů, pro další typy hmotnostních analyzátozů ještě více, např. TOF (vakuum 10^{-5} Pa, tj. 10 řádů rozdíl) nebo FT-ICR (vakuum 10^{-10} Pa, tj. rozdíl 15 řádů)
- navíc analyzované látky jsou nesený v toku plynu (GC, průtok u kapilárních kolon asi 1 ml/min) nebo kapaliny (HPLC, asi 1 ml/min nebo méně), které jsou v obrovském nadbytku a musí být odstraněny před vstupem do vakuové části přístroje, v současnosti již rutinní použití

GC/MS

Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC/MS)

- **1957** první spojení **GC/MS** (Holmes, Morrell), 1967 první komerční GC/MS
- v minulosti se pro spojení GC/MS s náplňovými kolonami s vyššími průtoky nosného plynu používaly různé separátory, jejichž cílem bylo odstranění nadbytku nosného plynu před vstupem do iontového zdroje a analyzátoru
- v současnosti zcela rutinní metoda, téměř výhradně se používá ve spojení s kapilárními kolonami (průtok ca. 1 ml/min)
- nosný plyn s analytem se zavádí přímo do iontového zdroje ve vakuu, kde vakuový systém odstraní přebytečný nosný plyn
- kapilára je před vstupem do iontového zdroje vyhřívána, aby nedocházelo ke kondenzaci analytů při přechodu do vakua
- iontové zdroje: EI nebo CI
- použití EI umožňuje přímé softwarové porovnání naměřených spekter s knihovny spekter v počítači (stovky tisíc spekter)
- hmotnostní analyzátoři: Q, IT, TOF, QqQ

Použití knihoven EI spekter u GC/MS

- výsledkem počítačového porovnání neznámého spektra s knihovnou jsou nejpravděpodobnější možnosti (např. pro prvních 20 možností) seřazené podle klesající podobnosti spekter s vyjádřením **koeficientu shody** v procentech
- obvykle se používají dva způsoby porovnání:
 - a/ **přímý** (forward) - software hledá všechny ionty z knihovního spektra ve spektru neznámé látky
 - vše co chybí oproti knihovnímu spektru zhoršuje koeficient shody
 - co je ve spektru navíc (např. nečistoty) na koeficient shody nemá vliv
 - b/ **zpětný** (reverse) - počítač se snaží najít všechny ionty z neznámého spektra v knihovním spektru
 - všechny píky, které jsou ve spektru navíc zhorší shodu porovnání
- vysoký koeficient shody není důkazem správnosti identifikace, ale pouze velmi rychlou a cennou pomůckou kvalifikovaného operátora, který musí posoudit rozdíly ve spektrech, zejména v případě horší shody nebo významnějších rozdílů ve spektrech
- „běžné“ a dosud popsané látky pravděpodobně v knihovně budou, nově syntetizované látky či látky omezeného významu mohou chybět, pak knihovní porovnání pouze prvním vodítkem a dokončení interpretace musí operátor provést manuálně

HPLC/MS

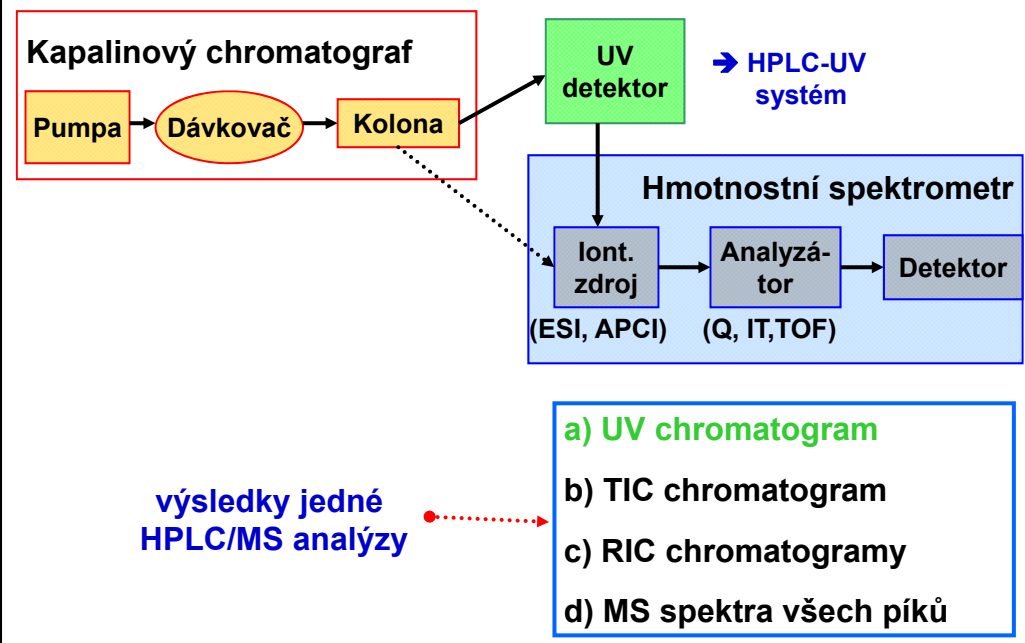
Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS)

- **1973** první spojení **HPLC/MS** (Baldwin, McLafferty), 1977 první komerční LC/MS
- technicky mnohem náročnější ve srovnání s GC/MS
 - místo 1 ml/min nosného plynu (pro GC/MS) musíme před vstupem do hmotnostního analyzátoru odstranit 1 ml/min kapaliny (pro HPLC/MS)
 - př. 18 ml vody ($1, 1 \text{ mol}$) = 22.4 l plynu, tzn. 1 ml vody je po odpaření 1.2 l plynu
- u ionizačních technik pracujících za atmosférického tlaku (ESI, APCI, APPI) se mobilní fáze přímo účastní ionizačního procesu
- spektra není možné porovnávat s knihovnou, protože knihovny pro HPLC/MS spektra většinou neexistují, spektra se výrazně liší podle použité ionizační techniky, pracovních podmínek i typu přístroje (platí kromě EI) - spektra je nutné interpretovat manuálně (zkušenosti operátora, porovnání s analogickými typy látek či literaturou)
- výjimkou v tvorbě knihoven jsou specifické případy proteomických knihoven, laboratorní knihovny pro omezený rozsah látek (např. skupiny zakázaných drog, pesticidů či podobně definovaná skupina známých cílových analytů), většinou se jedná o knihovny MS/MS spekter (na rozdíl od MS spekter u GC/EI-MS), převoditelnost knihoven mezi různými typy hmotnostních analyzátorů může přinést problémy kvůli významným rozdílům

HPLC/MS analýza

- použití HPLC umožňuje **separaci látek ve směsi** a tím **identifikaci stopových nečistot, izomerů**, atd.
- výsledek HPLC/MS analýzy je **záznam intenzity vybraných m/z v čase**
- hmotnostní spektra eluátu z HPLC měřená s určitou frekvencí – závisí na použitém analyzátoru (jeho skenovací rychlosti), šířce píku, požadavcích na analýzu, atd.
- měření spekter v celém rozsahu m/z nebo jen v určitém intervalu - ovlivňuje rychlost sběru spekter („sampling“)
- možnost **vyvolat spektrum v určitém čase**
- lze **průměrovat spektra** v určitém časovém intervalu (integrace píku)
- možnost vyvolat **záznam intenzity signálu určité m/z v čase**

Schéma HPLC/MS systému



Způsoby záznamu HPLC/MS analýzy

Celkový iontový proud

(Total Ion Current, TIC)

- součet intenzit všech měřených iontů ve spektru (včetně šumu)

Chromatogram základního píku spektra

(Base Peak Chromatogram, BPC)

- záznam intenzity pouze základního píku spektra
- podobný TICu, ale není ovlivňován šumem nebo ionty s nízkou intenzitou

Rekonstruovaný iontový proud

(Reconstructed/Extracted Ion Chromatogram, RIC/EIC)

- zpětně vyvolaný záznam intenzity jedné m/z v čase
- identifikace koeluze píků
- identifikace stopových koncentrací v šumu, atd.

Kvantitativní analýza pomocí MS

- výhodou je vysoká selektivita (pro MS/MS experimenty) a citlivost
- je třeba vyvarovat se potlačení odezvy konkurenční ionizací (další látky, matrice)
- důležitá je volba standardu, nezbytné je použití vnitřního (interního) standardu pro potlačení vlivu matrice či kontaminace na účinnost ionizace analytu, použití vnějšího standardu není vhodné a většinou je nepřijatelné
- nejpřesnější postup je pomocí **izotopicky značeného standardu** analytu
- izotopicky značený standard obsahuje atomy s těžšími izotopy, které způsobují posun m/z ve spektru a tím odlišení signálu od neznačené látky
 - látky mají stejné chemicko-fyzikální vlastnosti
 - nejčastěji deuterace (^2D), ^{13}C , ^{15}N
 - doporučený posun alespoň +3 jednotky m/z
 - vysoká cena izotopicky značených standardů
- pokud je izotopicky značených standard nedostupný, pak lze jako interní standard alternativně volit **analogickou sloučeninu** nebo **homolog**
- tento interní standard nesmí být přítomen ve vzorku, musí mít podobné vlastnosti jako sledovaný analyt (struktura, ionizační účinnost, účinnost extrakce, atd.)
- většinou se přidává již při zpracování vzorku a koriguje i účinnost extrakce

Kvantitativní analýza pomocí MS

- kvantitativní výsledky jsou závislé na typu analyzátoru a ionizace
 - QqQ - standard pro kvantitativní analýzu, citlivý, rychlý a vysoká selektivita díky možnosti MS skenů, omezený rozsah a rozlišovací schopnost
 - při správně zvoleném standardu lze použít všechny typy analyzátorů
 - MALDI - obecně horší kvantitativní analýza díky nižší reprodukovatelnosti
- metody kvantitativní analýzy
 - metoda interního standardu, externí se nedoporučuje
 - metoda přímého srovnání - koncentrace je počítána na základě srovnání se standardem o známé koncentraci (pouze jedna koncentrace)
 - metoda kalibrační přímky - kalibrační závislost interního standardu na koncentraci
 - metoda standardního přídatku
- pro zvýšení citlivosti a selektivity se využívají pro kvantitativní analýzu často speciální MS skeny
 - nejčastěji sken iontové reakce - vysoká selektivita