Hmotnostní analyzátory



Hmotnostní analyzátory

- hmotnostní analyzátor slouží k dělení iontů v plynné fázi za vakua podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z)
- analyzátor je umístněn 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 frekvence rotace při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli (iontová cyklotronová resonance – ICR)

Základní typy hmotnostních analyzátorů

- Magnetický sektorový analyzátor
- Kvadrupólový analyzátor
- 3D a lineární iontová past
- Průletový analyzátor
- Orbitrap
- Iontová cyklotronová rezonance
- Hybridní hmotnostní spektrometry



 celkový počet instalací přístrojů LC-MS (2016 - 2022)

zdroj - prof. J. Preislera (předseda sekce hmotnostní spektrometrie SSJMM) z přednášky 24. Školy hmotnostní spektrometrie (2023)

Hmotnostní analyzátory

- Podle způsoby 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 (Paulova iontová past, orbitrap, FT-ICR)
- průletový měří čas iontů potřebný pro překonání určité vzdálenosti (TOF)
- analyzátory pohyblivosti iontů dělení (separace) 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 hmotnostního rozlišení



- **Definice pomocí šířky píku** $\mathbf{R} = \mathbf{m} / \Delta \mathbf{m}$ (*m/z*)/ Δ (*m/z*), kde Δ (*m/z*) je šířka píku ve výšce, která je určitou částí maximální výšky píku. Doporučuje se vždy využívat jednu ze tří hodnot 50, 5 či 0.5 %. Běžným standardem je definice rozlišení založená na Δ m, které je plnou šířkou píku v polovině jeho výšky (FWHM).
- Definice pomocí 10% sedla $R = m_1 / (m_2 m_1)$

Hodnota $(m/z)/\Delta(m/z)$ měřená pro dva píky o stejné výšce v hmotnostním spektru při m/z a $m/z \pm \Delta(m/z)$, které jsou odděleny sedlem, které je ve svém nejnižším bodě rovno 10 % výšky těchto píků.

Hmotnostní rozlišovací schopnost (RP)

Míra schopnosti hmotnostního analyzátoru poskytnout určitou hodnotu hmotnostního rozlišení. *Poznámka: Způsob, jakým bylo* $\Delta(m/z)$ *definováno a*

získáno, a hodnota m/z, při které bylo měření provedeno, musí být vždy uvedeno.

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), hmotnostní rozlišení 10 000 – 20 000 000
- spektra s nízkou RP = pouze rozlišení iontů lišících se o jednotku m/z nebo o něco lepší (obvykle Q nebo IT), hmotnostní rozlišení cca 3 000
- pro výpočet RP nebo R musíme spektrum zaznamenat v profilovém módu (tj. kontinuální záznam ve formě píků, který nám umožňuje změřit šířku jednotlivých píků) a nikoliv v čárovém módu (intenzita pro každý pík je počítačem zintegrována a uvedena ve formě čáry, takže šířku píku nelze měřit)
- R nebo RP musí být vztaženo k určité hodnotě m/z nebo rozsahu m/z, výrobci často definují rozlišovací schopnost platnou pro celý hmotnostní rozsah analyzátoru, tedy v případě kvadrupólů a iontových pastí obvykle 2 000 - 4 000

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

Vysoká versus nízká rozlišovací schopnost

- např. pro nominální hmotnost m/z = 28:

CO (27.9949) × N₂ (28.0061) × C₂H₄ (28.0313)

nízká RP (ionty nejsou rozlišeny) vysoká RP (separace CO⁺, N_2^{+} a $C_2H_4^{+}$)



Vysoká a nízká rozlišovací schopnost - příklad



Správnost určení hodnoty m/z (mass accuracy)

Správná hmotnost	 Vypočtená hmotnost iontu nebo molekuly s daným izotopovým složením odpovídá konkrétnímu elementárnímu vzorci
Přesná hmotnost	 Experimentálně určená hmotnost iontu se známým nábojem (není synonymum správné hmotnosti) Je z ní možno odvodit sumární vzorec (molekulový vzorec) chemického složení iontu v mezích daných správností a přesností měření
Chyba určení	- Rozdíl mezi experimentálně přesně určenou a teoreticky vypočtenou správnou hmotností <i>Chyba měření (mass error)</i> = $10^6 \times \frac{m/z_{exp} - m/z_{teor}}{m/z_{teor}}$ [ppm]

Pro stejný rozdíl *m/z_{exp} – m/z_{teor} c*hyba měření [ppm] vzrůstá s klesající hodnotou *m/z*

Česká terminologie hmotnostní terminologie (http://terminologie-ms.sci.muni.cz)

Správnost určení hodnoty m/z (Mass Accuracy)

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

(m/z)_{teor}

Naměřená hodnota m/z = 300.0463, teoreticky vypočtená hodnota m/z = 300.0473

Chyba určení m/z =

$$\frac{300.0463 - 300.0473}{300.0473} *10^{6} = -3.3 \text{ ppm} (včetně znaménka!)$$

 dle tabulek (nebo lépe s využitím softwaru) nejlépe odpovídá elementární složení C₁₂H₁₇N₂O₂Br, podle izotopů M:M+2 potvrzena přítomnost bromu



Přesnost vs. Správnost

- přesnost (precision) měření vyjadřuje rozptyl jednotlivých měření
- správnost (accuracy) měření vyjadřuje, jak blízko je měření pravdivé hodnotě



Přehled MS analyzátorů

HRMS analyzátor	<i>m/z</i> rozsah (horní limit) *10 ³	Rozlišovací schopnost *10 ³	MA [ppm]	Rychlost	Lineární dynamický rozsah
Q	2 - 3	3 - 5	nizká	Střední	10 ⁵ - 10 ⁶
IT	4 -6	4 - (20)	nízká	Střední	10 ⁴ – 10 ⁵ (10 ⁶)
Magnetický sektorový s dvojitou fokusací	2 - 4	10 - 70	1 - 10	low	10 ⁴ - 10 ⁵
TOF	10 - 1000	10 – 100 (az 300)	1 - 5	vysoká	10 ⁴ - 10 ⁵
Spiral TOF	30	> 60 (pro MS/MS > 2)	1 - 5	vysoká	10 ⁴ - 10 ⁵
QTOF	10 - 20	20 - 75	1 - 5	vysoká	10 ⁴ - 10 ⁵
Orbitální past	4 - 6 (20)	100 - 1000	< 1	nízká (zaleží na R)	104
FT-ICR	4 - 10	750 - 20000	< 1	nízká	104

Vzrůstá cena

Kalibrace hmotnostní stupnice

Kalibrace hmotnostní stupnice

- u všech typů analyzátorů je vždy nutné kalibrovat hmotnostní stupnici
- 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
- analyzátory 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 (měsíc) (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 strukturní typ analytu (není podmínkou) nebo přítomnost monoizotopických prvků (např. perfluorované látky, CsI)

- typické kalibranty: syntetické polymery (např. PEG, PPG), klastry solí (např. monoizotopický CsI, HCOONa), směsi peptidů, apod.

Intellistart – Create Calibration (Assisted) Wate The Peak Picking Window Explained

Calibration - [DEFAULT.CAL]

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE."

File View Calibration / 🗶 Q Q 🕼 📶 🍠 Data File 634,8977 100-498,8855 702.9051 430.8812 770.9128 906.9289 1042.9468 226.8822 362,8788 838.9208 1178,9670 158 8894 294.8790 **Reference File** 226.9520 100-158,9646 9/ 430,9143 566.8892 702.8640 362,9269 498.9017 974.8137 906.8262 294.9395 1110,7886 **Residual Mass** 10.00ppm 0.00 -10.00 TT M/Z 100 200 300 400 500 600 700 800 900 1000 1100 1200 **Residual mass** Summary Matched: 16 of 16 Mean Residual Mass: Polynomial Order ESI_NaFormate_MSMS_Pos Reference File: RMS Residual Mass: 0.352 ppm Sodium Formate-2013-07-09-16-22-1 95% Confidence Band: 0.656 ppm Data File: Mode: Resolution. Positive

The RMS residual error between the Data and the Reference files

Pohyb nabité částice v elektrostatickém a magnetickém poli

Newtonovy pohybové zákony:

Zákon setrvačnosti (I.)	Jestliže na těleso nepůsobí žádné vnější síly nebo výslednice sil je nulová, pak těleso setrvává v klidu nebo v rovnoměrném přímočarém pohybu. Tělesa se mohou pohybovat i bez působení sil. Ovšem tento pohyb musí být rovnoměrný a přímočarý (nemění se velikost rychlosti ani směr). Těleso si tedy zachovává svůj pohybový stav z okamžiku, kdy na něj přestala působit poslední síla.	
Zákon síly	Jestliže na těleso působí síla, pak se těleso pohybuje zrychlením, které je přímo úměrné působící síle a nepřímo úměrné hmotnosti tělesa.	
(II.)	$F = m.a \rightarrow a = F/m$	
Princip	Jestliže na těleso působí současně více sil, rovnají se silové účinky	
superpozice	působení jediné síly, tzv. výslednice sil, která je rovna vektorovému	
("IV.")	součtu těchto sil $\rightarrow \rightarrow \rightarrow$	

Zákon zachování energií - energii nelze vyrobit ani zničit, ale pouze přeměnit na jiný druh energie (nelze sestrojit perpetuum mobile prvního druhu, tj. stroj který by z ničeho konal práci). Celková energie izolované soustavy zůstává konstantní při všech dějích, které v ní probíhají

Pohyb nabité částice v homogenním elektrostatickém poli



Pohyb nabité částice v elektrostatickém poli

1. pohybuje-li se částice s nábojem Q z bodu A do B, kde dochází vlivem elektrostatického pole k urychlení (rozdílný potenciál), získá nabitá částice potenciální energii E_{el}:

 $E_{el} = Q.U = e.z.U$ e: elementární náboj (e = 1,6 × 10⁻¹⁹ C)z: nábojové číslo,U: urychlovací napětí

2. potenciální energie se změní na kinetickou energii E_k (částice koná pohyb):

 $E_{k} = \frac{1}{2} m.v^{2}$

m: hmotnost částice *v* rychlost částice



Po průchodu elektrostatického pole získají nabité částice tuto rychlost

Elektrické pole se využívá k urychlování částic, případně k zakřivení jejich dráhy

$$\overrightarrow{F}_{mag} = \mathbf{Q} \cdot (\overrightarrow{v} \times \overrightarrow{B}) = \mathbf{Q} \cdot v \cdot B \cdot \sin \alpha$$

(α = úhel, který mezi sebou svírají vektory rychlosti částice **v** a magnetického pole **B**)

Výsledkem vektorového součinu je vektor – kolmý na oba vstupující vektory **v** i **B** (tvoří s nimi pravotočivou soustavu

1) Pokud částice není nabitá \rightarrow F_{mag} = 0 . (v x B) = 0 (na částici nepůsobí žádná síla)

2) Pokud částice přiletí rovnoběžně s osou z (vektorem magnetické indukce) Úhel mezi B a v je 0 nebo π (sin 0 = sin 180 = 0

 $F_{mag} = z \cdot e \cdot v \cdot B \cdot sin\alpha = 0$ (na částici nepůsobí žádná síla)



$$\stackrel{\Rightarrow}{=} \mathbf{Q} \cdot (\stackrel{\Rightarrow}{\mathbf{v}} \stackrel{\Rightarrow}{\mathbf{x}} \stackrel{\Rightarrow}{\mathbf{B}}) = \mathbf{Q} \cdot (\stackrel{\Rightarrow}{\mathbf{v}} \stackrel{\Rightarrow}{\mathbf{x}} \stackrel{\Rightarrow}{\mathbf{B}}) = \mathbf{Q} \cdot \mathbf{v} \cdot \mathbf{B} \cdot \sin\alpha$$

(α = úhel, který mezi sebou svírají vektory rychlosti částice *v* a magnetického pole B)

Výsledkem vektorového součinu je vektor – kolmý na oba vstupující vektory (tvoří s nimi pravotočivou soustavu) – směr síly určíme Flemingovým pravidlem pravé ruky

3) Pokud částice přiletí v kolmém směru k magnetické indukci (90°)

 $F_{mag} = Q \cdot v \cdot B \cdot \sin \pi/2 = F_{mag} = Q \cdot v \cdot B (na částici působí maximální síla)$

směr síly určíme Flemingovým pravidlem pravé ruky

- znázorněno pro kladně nabitou částici
- díváme-li se po směru magnetické indukce kladně nabitá částice se pohybuje proti směru hod ručiček (záporně nabitá má směr opačný)

 \vec{B}

X

X





Adaptováno z http://fyzweb.cz/materialy/hvizdy/6_casticevmagn.pdf

Dostředivá (magnetická) síla musí být v rovnováze s odstředivou sílou

II. Newtonův zákon \rightarrow F=m.a dostředivé zrychlení = v^2/r $F_d = m.v^2/r$ $F_{mag} = F_d$ $Q.v.B = m.v^2/r$ r = (m.v) / (Q.B)výpočet poloměru zakřivení poloměr zakřivení je úměrný m/z



3) Pokud částice přiletí z libovolného směru pod určitým úhlem $\alpha \neq 0^{\circ}$, 90°, 180° $\vec{F}_{mag} = Q \cdot \vec{v} \cdot \vec{B} \cdot sin \alpha$ (spojení rovnoměrného posunu a pohybu po kružnici)



vektorový součet



$$\stackrel{\Rightarrow}{=} \mathbf{Q} \cdot (\stackrel{\rightarrow}{\mathbf{v}} \stackrel{\rightarrow}{\mathbf{x}} \stackrel{\rightarrow}{\mathbf{B}}) = \mathbf{z} \cdot \mathbf{e} \cdot (\stackrel{\rightarrow}{\mathbf{v}} \stackrel{\rightarrow}{\mathbf{x}} \stackrel{\rightarrow}{\mathbf{B}}) = \mathbf{z} \cdot \mathbf{e} \cdot \mathbf{v} \cdot \mathbf{B} \cdot \sin\alpha$$

(α = úhel, který mezi sebou svírají vektory rychlosti částice *v* a magnetického pole B)

Směr síly určen Flemingovým pravidlem pravé ruky a je kolmý k okamžité rychlosti částice a vektoru magnetické indukce B

α = 0° nebo α = 180°	V případě rovnoběžného směru rychlosti č B – žádný vliv (sin 0° nebo sin 180° = 0)	ástice v s magnetickým polem
α = 90°	Pokud nabitá částice vletí v kolmém směru vliv maximální ((sin 90°=1). Magnetické pol do tvaru kružnice. II. Newtonův zákon \rightarrow F=m.a dostředivé zrychlení = v^2/r $F_d = m.v^2/r$ $F_{mag} = F_d$ $Q.v.B = m.v^2/r$ r = (m.v) / (Q.B)	do magnetického pole, tak je e zakřivuje trajektorii částice Směr B od nás k nám
ostatní	$\alpha \neq 0^{\circ}$, 90°, 180° \rightarrow Částice s nábojem se pohybuje po šroubovici	

Velikost rychlosti částice (a tedy i kinetická energie) se v magnetickém poli nemění. Směr se měnit může



zdroj - https://www.youtube.com/watch?v=ZxtPGN8Ipa0

Pohyb nabité částice v homogenním elektrickém i magnetickém poli

Pohybuje-li se částice s nábojem Q současně v elektrickém (F_{el}) i magnetickém poli (F_{mag}) (princip superpozice – síly se sčítají, vektorový součet)





- Elektrické pole se využívá k urychlování částic, případně k zakřivení jejich dráhy.
- Magnetické pole slouží pouze k zakřivení dráhy částic.
- Vhodnou kombinací elektrického a magnetického pole můžeme částici urychlovat a současně měnit směr jejího pohybu.

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 nezakřiví kvůli větší odstředivé síle těžšího iontu)



 $r = (m \cdot v) / (Q \cdot B)$

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

Fyzikální popis magnetického analyzátoru

 kladné ionty s určitou hodnotou m/z urychlené záporným potenciálem U 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 Q.U získanou v urychlujícím elektrickém poli (E_{el}=QU=ezU, takže platí: $v = \sqrt{\frac{2.Q.U}{2.Q.U}}$

 $E_k = Q.U = 1/2 \text{ m.} v^2$ (v je rychlost urychleného iontu)

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

 $B.Q.v = m.v^{2}/r$

r = (m . v) / (Q . B)

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

 $m/Q = m/(e.z) = B^2 \cdot r^2 / 2 \cdot U$

poloměr dráhy iontů tedy závisí na m/z, B, U (U urychlovací napětí)

 plynulou změnou (tzv. skenováním) B (magnetické skenování) nebo U (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 Q.E je v rovnováze s odstředivou silou m.v²/r, takže:

 $(Q.E = m.v^2/r)$ (E je intenzita elektrického pole)

• po transportu z iontového zdroje a urychlení potenciálem U mají ionty energii:

 $E_p = E_k \rightarrow Q.U = 1/2 \text{ m.v}^2 \rightarrow Q = (1/2 \text{ m.v}^2) / U$

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

$r = 2.U/E_k$

 z rovnice vyplývá, že fokusace iontů v elektrickém poli nezávisí na poměru m/z, ale pouze na jejich kinetické energii (průletem elektrostatickým analyzátorem se sjednotí kinetické energie pro příslušné m/z)

 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

Fyzikální popis elektrostatické fokusace iontů



Geometrie analyzátorů s dvojitou fokusací

a/ podle Mattaucha a Herzoga b/ podle Niera a Johnsona

- c/ podle Matsudy
- d/ inverzní uspořádání polí



Josef Mattauch (nar. 21.11.1895 v Ostravě, zemřel 10.8.1976 v Mainzu) absolvoval univerzitu ve Vídni, kde působil jako profesor fyziky. Od r. 1939 byl vedoucím oddělení na Ústavu císaře Viléma a od r. 1947 ředitelem Max Planck Institut für Chemie v Mainzu. Zabýval se mimo jiné hmotnostní spektroskopií (roku 1930 sestrojil s R. Herzogem dvoupaprskový hmotnostní spektrograf).





stitute of Physics
(Quadrupole, Q)

- 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





- čtyři stejné kovové tyče kruhového (hyperbolického) 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 určitou velikost poměru 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)



Kvadrupólový analyzátor - mechanismus



lehčí (nižší m/z) ionty reagují rychle na změny el. pole (těžší ionty reagují pomalu)





Kvadrupólový analyzátor - matematický popis

pro páry tyčí platí:

 φ_{+} = + (U_{DC} + V_{AC}.cos ω t) a φ_{-} = - (U_{DC} + V_{AC}.cos ω t),

kde φ_+ a φ_- je potenciál vložený na protilehlé dvojice tyčí ("kladné" a "záporné" tyče), ω je angulární (úhlová) frekvence [rad/s] = $2\Pi v$ (v=1-3MHz), U_{DC} je stejnosměrná složka napětí, V_{AC} je střídavá složka napětí

 $\phi_x = m.d^2x/dt^2$, $\phi_y = m.d^2y/dt^2$,

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

 $a_u = a_x = -a_y = (8zeU_{DC}) / (m\omega^2 r_0^2), q_u = q_x = -q_y = (4zeV_{AC}) / (m\omega^2 r_0^2),$

z čehož odvodíme vztahy pro U, V:

$$U_{DC} = a_u$$
. m/z . ($\omega^2 r_0^2$) / 8e, $V_{AC} = q_u$. m/z . ($\omega^2 r_0^2$) / 4e

Parametr a charakterizuje vliv stejnosměrné složky napětí Parametr q charakterizuje vliv střídavé složky napětí

Stabilitní diagram pro kvadrupól

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



Během letu kvadrupólem v ose z musí mít iont stabilní trajektorii v osách x a y tak, aby nenarazil na kovové tyče; pro každou hodnotu m/z je tedy potřeba zvolit vhodné U_{DC} a V_{AC} (při konstantní frekvenci RF napětí).

Stabilitní diagram pro kvadrupól

- parametr **a** závisí na stejnosměrném napětí (U_{DC}), parametr **q** závisí na amplitudě střídavého napětí (V_{AC})
- při skenování se mění parametry **a** (U_{DC}) a **q** (U_{AC}) tak, aby jejich poměr byl stále konstantní, postupně jsou propuštěny kvadrupólem všechny ionty a zaznamenáno spektrum v daném rozsahu
- snížením poměru a/q lze zvýšit oblast (rozsah) m/z iontů, které projdou analyzátorem, ale zároveň se sníží rozlišení



 pro maximální RP je optimální hyperbolický průřez, poskytuje vyšší rozlišení, ale technicky náročnější výroba

Citlivost vs. skenovací rozsah Q:

 pokud skenujeme např. v rozsahu 1 000 m/z, na detekci jedné hodnoty m/z máme pouze 1/1 000 z celkového času, ve zbytku doby (tj. 999/1 000 času) jsou ionty s touto hodnotou zachyceny na tyčích kvadrupólu = snížíme-li hmotnostní rozsah, zvýšíme citlivost detekce

 pokud použijeme tzv. selektivní záznam iontu (Selected Ion Monitoring, SIM), zvýšíme výrazně citlivost (v uvedeném příkladu 1 000krát), ale už neměříme hmotnostní spektrum, ale pouze záznam intenzity iontu na čase (popř. i více iontů) vhodné pro kvantitativní a stopovou analýzu, kdy známe strukturu

 kvadrupól je velmi jednoduchý a relativně levný hmotnostní analyzátor, který se velice rozšířil zejména u tzv. stolních ("bench-top") hmotnostních spektrometrů pro spojení se separačními technikami (GC/MS, HPLC/MS)

Trojitý kvadrupólový analyzátor (Triple Quadrupole, QqQ)

 3 kvadrupóly řazeny za sebou a prostřední z nich (q2) slouží jako kolizní cela se zavedeným kolizním plynem, který způsobuje kolizní excitaci vybraných iontů kvadrupólovým analyzátorem 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 analyzátory na principu pastí

Normal Scan Mode



Ion transmission

Ion transmission

Q3 Mass analysis





Stabilitní diagram pro kvadrupól

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

QUADRUPOLE MASS FILTER - STABILITY



When only RF is applied (left), ions are arranged along the a=O line with heaviest ions to the left. If a DC potential is used (right), it pushes ions off the axis to varying degrees based on m/z.



 pokud se na kvadrupól (případně jiné multipóly - hexapól, oktapól) aplikuje pouze RF – můžeme ionty fokusovat, využití v iontové optice nebo kolizních celách

Paulova iontová past

(Ion trap, IT)





Wolfgang Paul (1989, Nobelova cena za fyziku) popis iontové pasti

3D lontová past

- R: 2 až 3 000 (některé přístroje s RP do 4 000)
- správnost určení hmotnosti: nízká (0.1 u)
- hmotnostní rozsah: do 3 000 (6 000)
- skenovací rychlost: až 10 Hz

3D

- možnost MSⁿ experimentů strukturní informace
- levný analyzátor



2D linear quadrupole ion trap



3D lontová past - schéma

- iontová past je tvořena prstencovou elektrodou a dvěma propojenými koncovými elektrodami, na elektrody je vloženo napětí (3D kvadrupól),
- ionty jsou krátkým napěťovým DC pulzem přivedeny do pasti vstupním otvorem koncové elektrody ("nadávkování iontů")
- vhodnými poměry napětí vloženého na kruhovou a dvě koncové elektrody jsou ionty zadrženy uvnitř pasti (účinnost záchytu přibližně 5%)



"Paulova past" využívá k zachycení iontů statická a oscilující RF elektrická pole.

3D lontová past – popis mechanismu

- na prstencovou elektrodu vloženo vhodné RF
- koncové elektrody jsou uzemněny
- elektrická pole měnící se dynamicky v čase (přepínání je tak rychlé, aby ionty "nevypadly"
- ionty stabilizovány v minimu (záchyt iontů)
- vzrůstající RF napětí lehčí ionty vypadnou
- pro excitaci iontů je mezi koncové elektrody aplikováno pomocné střídavé napětí







Endcap 2

3 hyperbolické elektrody s rotační symetrii okolo centrální osy z formují příslušná elektrická pole

3D lontová past

• do pasti se zavádí He jako tzv. tlumící plyn o tlaku asi 5*10⁻³ Pa

 tlumí oscilace v ose z (osa mezi koncovými elektrodami), čímž se dosáhne významného zvýšení RP a zlepšení záchytu iontů

- pro kolizní excitaci vybraných iontů při MS/MS experimentech

- iontová past umožňuje MSⁿ experimenty v jednom místě = izolaci iontů, fragmentaci a měření produktových iontů (možnost až MS¹⁰, v praxi max. MS⁵)
- 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 řešení:

 předsken - před vlastním skenem se provede velmi krátký předsken, 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 lontová past – matematický popis

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).



Adaptováno ze zdroje - Presentation on theme: "CH 908: Mass Spectrometry Lecture 6 Mass Analyzers Prof. Peter B. O'Connor (https://slideplayer.com/)

3D lontová past - mechanismus

QITMS: Mass-Instability Ion Ejection



 $q_z = \frac{8eV}{m\omega^2(r^2 + 2z^2)}$



- Aplikujeme RF na prstencovou elektrodu
- Koncové elektrody pouze uzemněny (není aplikován DC) $\rightarrow a_z = 0$
- zvyšování RF napětí \rightarrow nárůst q_z jednotlivých iontů (trajektorie pohybu postupně nestabilní v q_z=0.908)
- lonty jsou postupně vypuzeny z pasti (nižší m/z detekovány dříve)

Adaptováno ze zdroje - Presentation on theme: "CH 908: Mass Spectrometry Lecture 6 Mass Analyzers Prof. Peter B. O'Connor (https://slideplayer.com/)

3D lontová past – rezonanční excitace iontů

- V důsledku setrvačnosti, ionty neoscilují při základní RF frekvenci, ale oscilují v pasti při tzv. sekulární frekvenci, která je nižší.
- Sekulární frekvence závisí na aplikovaném RF napětí V_{AC} a podél osy **z** je úměrná q_z.
- Pokud aplikujeme mezi koncové elektrody (osa z) pomocné napětí V_{AC} o frekvenci (f_z) odpovídající dané sekulární frekvenci iontů ω tyto ionty začnou v daném směru rezonovat a amplituda jejich oscilací v ose z bude vzrůstat (přenos energie se projeví zvýšením amplitudy) až dojde k vypuzení těchto iontů z pasti.
- Aplikace napětí několika stovek milivoltů stačí pokud je dodatečné střídavé pole vhodně aplikováno v dané oblasti frekvence pohybu určitého iontu.

Rezonanční metody používané v iontové pasti:

- → Vypuzení (ejekce) iontů (zvýšení E_{kin} vypuzení a následná detekce iontů, skenování v MS nebo MS/MS módu)
- → Izolace vybraného iontu(ů) (vypuzení ostatních nežádoucích iontů)

často se využívá širokopásmová aplikace AC frekvencí pro excitaci všech nežádoucích iontů (střídavého pole aplikováno v širokém pásmu frekvencí - vynecháme frekvence, které odpovídají požadovanému iontu prekurzoru)

→ Vybuzení iontu (zvýšení E_{kin} - "rozkmitání" a následně srážky s He) – pro fragmentaci



3D lontová past – rezonanční excitace



http://currentseparations.com/issues/16-3/cs16-3c.pdf

End Cap Electrode

3D lontová past



Animace:

- 1/ <u>MS mód záchyt v pasti</u> 2/ <u>MS mód - skenování</u> 3/ <u>Izolace pro MS/MS</u>
- 4/ <u>CID-MS/MS</u>



2D iontová past - 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
- můžou 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





kvadrupólové tyče se segmenty

٦

LINEAR ION TRAP (LIT)



The LIT is comprised of four hyperbolic rod sets, arranged around a central axis. In one common implementation, the rods are segmented into three sections and have narrow slits for ion ejection.



LIT - MASS SELECTIVE INSTABILITY MODE



The RF amplitude on the rods is ramped linearly, causing ions to simultaneously pass through the x and y-stability boundaries and eject through slits in the rods. The ejected ions strike a detector. Since RF amplitude and m/z map linearly to each other for a given q_{xy} value, the raw signal vs. time data is easily translated to signal vs. m/z.





Zdroj - http://www.massspecpro.com/technology/mass-analyzers/linear-ion-trap-lit



Zdroj - http://www.massspecpro.com/technology/mass-analyzers/linear-ion-trap-lit



Analyzátor doby letu

(Time-of-Flight, TOF)

Analyzátor doby letu

- RP: 10 000 60 000
- správnost určení hmotnosti: 1 5 ppm
- hmotnostní rozsah: až 10⁵ (až 10⁶ bez reflektronu, 20 000 pro QqTOF spektrometr)
- skenovací rychlost: 10 50 Hz
- pulzní hmotnostní analyzátor s teoreticky neomezeným hmotnostním rozsahem





Analyzátor doby letu

- Princip: měří se doba letu iontů potřebná pro překonání určité dráhy (v letové trubici).
- Jedná se o typicky pulzní hmotnostní analyzátor, protože nejdříve jsou ionty velmi krátkým pulzem urychleny na vstupu do analyzátorové trubice (oblast bez pole) a potom se přesně měří čas (řádově ns – μs), za který ionty "dolétnou" k detektoru.
- Na detektor dopadají v různém čase v závislosti na m/z ionty s menší hodnotou m/z o stejné kinetické energii se pohybují rychleji, takže se rychleji dostanou na detektor ("lehčí ionty letí rychleji").
- Extrakce iontů:
- a) konstantní DC elektrické pole (mezi vzorkem a extrakčními mřížkami) v axiálním uspořádání + pulzní ionizace (MALDI, SIMS) - (vzorek musí být na vodivém materiálu)
- b) extrakce napěťovým pulsem (pulzní elektrické pole) axiální i ortogonální uspořádání
- v kombinaci s pulzní ionizací (MALDI, SIMS) pulz okamžitě po ionizaci nebo se zpožděním (zpožděná extrakce iontů)
- kontinuální tvorba (přívod) iontů (API techniky) v kolmém směru na letovou trubici ortogonální uspořádání - extrakce před letovou trubicí.





Analyzátor doby letu – fyzikální popis

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

$$E_k = 1/2 \text{ m.v}^2 = \text{e.z.U}$$

Potenciální energie získaná urychlením v elektrickém poli je přeměněna na kinetickou energii

rychlost iontu v lze vyjádřit (překonání vzdálenosti L = délka letové trubice = dráha letu za určitou dobu t):

v = L/t v oblasti bez pole je **rovnoměrný přímočarý pohyb**

• řešením rovnic získáme vztah pro výpočet m/z:

m/z = 2.e.U.t²/L²
$$\longrightarrow t = \frac{L}{\sqrt{2eU}} \sqrt{\frac{m}{z}}$$

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
- při ionizaci získají ionty kinetickou energii s určitou distribucí, což vede k rozšíření jejich píků a tím ke zhoršení RP)

Řešení je sjednocení rozdílných kinetických energií pro ionty se stejnou hodnotou m/z:

1. Analyzátor doby letu s reflektronem (rTOF)

použití tzv. iontového zrcadla neboli reflektronu, které slouží k vyrovnání různých kinetických energií (vyšší E_{kin} – větší prostup do reflektronu)

2. Opožděná extrakce iontů (Dealyed Extraction)

ionty jsou z MALDI zdroje extrahovány s malým zpožděním, v tomto mezičase se ionty rozdělí podle rychlosti (kinetických energií), následná aplikace el. pole (rychlejší ionty o trochu méně urychleny)

 Další možnost je vysoké urychlovací napětí (snížení relativního příspěvku počáteční rychlosti k celkové rychlosti) nebo výrazné prodloužení letové dráhy

Princip iontového zrcadla (reflektronu)

reflektron = soustava elektrod s postupně zvýšeným potenciálem

 ionty s větší kinetickou energií proniknou hlouběji do odrazového eletrického pole reflektronu 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 elektrostatického pole reflektronu je úměrná jejich E_k a nezávisí na m/z







Time: 51

Opožděná extrakce iontů (Delayed Extraction)

Po (MALDI) ionizaci (v t₀) mají ionty o stejné m/z různou E_k ; urychlovací napětí se aplikuje až po malé prodlevě (t₇) – ionty se zatím při E= 0 rozdělí podle rychlosti a po vložení napěťového pulsu (E>0) působí na pomalejší (modrý) ionty silnější el. pole a jsou tedy více urychleny \rightarrow vyrovnání rychlostí


Delayed Extraction -Why Reflector mode Linear mode delayed continuous continuous delayed extraction extraction extraction extraction R=1,100 R=125 R=11,000 R=650

11000 11200 11400 11600 m/z

10600

10800





Ortogonální TOF analyzátor

- typické pro spojení s API ionizačními technikami, kde je kontinuální tvorba (přívod) iontů (na rozdíl od MALDI ionizace - po laserovém pulsu se vytvoří diskrétní 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 analyzátory

• 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



Elektrostatická orbitální past - Orbitrap

- RP: 100 000 1 000 000
- správnost určení hmotnosti: <1 ppm
- hmotnostní rozsah: 6 000
- skenovací rychlost: pomalejší (1 5 Hz), pokud měříme s menším rozlišením (kratší dobu záchytu) až 20 Hz
- nejnovější typ hmotnostního analyzátoru



- popsán ruským fyzikem A. Makarovem koncem 90. let minulého století Orbitrap patent (1999), následně v roce 2005 komercializace
- nižší rozlišovací schopnost a správnost určení hmoty oproti FT-ICR, ale výrazně nižší pořizovací náklady







Elektrostatická orbitální past - Orbitrap

- Někdy se nazývá "Kingdonova past" popsal orbitální záchyt iontů (nikoliv MS analyzátor) poprvé popsal K.H. Kingdon v roce 1923 → mezi válec (s přírubami) a drát aplikace DC napětí – pokud mají ionty dostatečnou rychlost začnou v uzavřeném prostoru rotovat kolem drátu.
- Silné pole přitahuje ionty k drátu, pohyb je omezen zakřiveným polem v důsledku přítomných přírub na okraji válce
 K. H. Kingdon, Phys. Rev. 21, 408, 1923

 $\Phi = A.\ln r + B$

- frekvence rotace závisí na rychlosti iontů a počátečním úhlu
- Využívalo se převážně pro zachycení iontů a následné spektroskopické studie





MASS SPEC PRO



Elektrostatická orbitální past - Orbitrap

- Orbitrap dokáže zachytit ionty (je to tedy typ iontové pasti) není potřeba aplikovat vysokofrekvenčního napětí ani magnetické pole, aplikuje se stejnosměrné napětí
- Ionty rotují kolem elektrody, přičemž elektrostatická přitažlivá síla musí být v rovnováze s odstředivou sílou rotujícího iontu
- Geometrie elektrod je důležitá pro správné rozložení potenciálové distribuce elektrostatického pole
- Frekvence oscilace iontu (zvláště pak axiální frekvence) se dají kontrolovat tvarem elektrody

Uvnitř pasti je charakteristické Kvadraticko-logaritmické pole

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

 $R_m \ \ldots \ charakteristický poloměr Orbitrapu$

- k ... zakřivení pole
- z a r ...cylindrické koordináty



Orbitrální past jako hmotnostní analyzátor

A. Makarov, Anal. Chem. 72, 1156, 2000

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 elektrody) 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

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

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

[rad/s]

A.A. Makarov, *Anal. Chem.* 2000, 72: 1156-1162. A.A. Makarov *et al.*, *Anal. Chem.* 2006, 78: 2113-2120.

Kvadraticko-logaritmická potenciálová distribuce pro ideální Kingdonovu past:

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

- $R_m \dots charakteristický poloměr$
- k ... zakřivení pole
- r, z ... cylindrické koordináty

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

 $\omega_z = \sqrt{\frac{k}{m/z}}$

Elektrostatická orbitální past: C-trap dávkování iontů do orbitální pasti

 frekvence rotace iontů závisí na rychlosti iontů a počátečním úhlu, a proto je potřeba rychlost iontů sjednotit (jejich E_{kin}) a správně do pasti nadávkovat → zvýšení hmotnostního rozlišení

- dávkování pomocí RF iontové pasti
- v prostředí 10⁻³ mbar N₂
- ionty stlačeny do úzkého svazku (ionty se v prostředí RF v důsledku jemných kolizí z N₂ zchladí - ztráta kinetické energie – "zchlazení")
- DC pulsem zavedeny do Orbitrapu (10⁻¹⁰ mbar)



Zdroj - http://www.massspecpro.com/mass-analyzers/orbitrap

Elektrostatická orbitální past: C-TRAP dávkování



Zdroj - http://www.massspecpro.com/mass-analyzers/orbitrap

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
- rotující prstenec iontů (podobné jako prstence u planet)





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

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-lon cyclotron resonance, FT-ICR)

FT-ICR

- RP: 1 20 miliónů
- správnost určení hmotnosti: <0.5 ppm
- hmotnostní rozsah: až 10 000
- skenovací rychlost: pomalý (0.5 2 Hz)



E. Nikolaev RP až 21 000 000

parametry ICR vybočují z rámce všech ostatních analyzátorů (cena, rozlišení, vakuum)





FT-ICR cela



• 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 21 Tesla, nejběžněji 7 Tesla

Iontová cyklotronová rezonance - princip

- 1. lonty jsou zachyceny pomocí koncových elektrod v ICR cele v prostředí silného magnetu a silného vakua < 10^{-7} Pa (kombinace magnetického pole a elektrického potenciálu pohyb). Jejich oscilace ω_c mají fázově nekoherentní a nízkou amplitudu (detekční elektrody nejsou schopny nic zaznamenat). $\omega_c = (Q.B) / m = (z.e.B) / m$
- Na excitační elektrody (které jsou kolmo k magnetickému poli) je vložen širokopásmový RF puls (každá frekvence excituje ionty o jiné m/z). Dojde rezonanční excitaci iontů na vyšší orbit – vyšší poloměr (blíže k detekčním elektrodám) – detekční elektrody vypnuty.
- 3. Po vypnutí RF pokračují ionty v trajektorii pohybu na vyšším orbitu a charakteristické frekvenci zapnou se detekční elektrody, které detekují indukovaný proud → interferogram, superpozice frekvencí všech iontů v cele. Fourierovou transformací se přepočtou tyto frekvence do stupnice m/z získáme hmotnostní spektrum.



Iontová cyklotronová rezonance - princip

Dostředivá (magnetická) síla musí být v rovnováze s odstředivou silou



- cyklotronová úhlová frekvence je nezávislá na počáteční rychlosti iontu a je funkcí magnetické indukce a m/z
- těžší ionty mají větší poloměr cyklotronového pohybu
- těžší ionty budou obíhat s nižší frekvencí
- silnější magnetické pole má za následek vyšší frekvenci a menší poloměr cykloidního pohybu
- kombinace radiální a axiální složky rychlosti iontu pohyb po šroubovici

FT-ICR

- Axiální (z, mezi elektrodami záchytu, rovnoběžně s B) a radiální rovina (r, kolmo k B)
- Axiální oscilace iontů v ose "z" (trapping oscilations) způsobené elektrickým polem (nutné k zachycení iontů v cele) ovlivňují cyklotronovou frekvenci a snižují rozlišení.
- Kombinace třech pohybů cyklotronová rotace, axiální oscilace a magnetronová rotace



S.F. Hoogerheide a kol., Atoms 3 (2015) 367

E.N. Nikolaev a kol., Mass Spectrom. Rev. 35 (2016) 219

Pohyb iontu v ICR cele (Peningově pasti)



Fourierova transformace



FT-ICR – různé geometrie ICR cely



E.N. Nikolaev a kol., Mass Spectrom. Rev. 35 (2016) 219

Posouvání limitů v rozlišení



https://www.bruker.com/products/mass-spectrometry-and-separations/mrms/solarix/overview.html

Posouvání limitů v rozlišení

462 rozlišených MS píků v rámci jedné nominální hmotnosti 677



Schéma ICR-MS instrumentace



Zdroj - https://www.chromacademy.com/



http://www.eu-fticr-ms.eu/upload/infra/instrument/instrument_101_UEF%20Chemistry%2012-T%20Solarix.JPG

Schéma ICR-MS instrumentace - video



Zdroj - https://www.youtube.com/watch?v=7EHngA4S3Ws

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 nějběžnější, komerčně dostupný
- IT-TOF
- kombinace Q nebo LIT s FT analyzátory (ICR, orbitrap) možnost MS/MS případně MSⁿ analýzy (vysoké rozlišení spekter produktových iontů)



- možnost vysokého rozlišení a správnosti určení m/z díky TOF analyzátoru
- kombinace s prvním kvadrupólem umožňuje MS/MS analýzu
- druhý kvadrupól (označen malým "q") slouží jako kolizní cela



Tandemová hmotnostní spektrometrie

(Tandem mass spectrometry)

Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS a MSⁿ analýza)

- v MS/MS uspořádání: vybraný ion podrobíme excitaci (nejčastěji srážkám s inertním plynem tzv. kolizní plyn) v analyzátoru nebo kolizní cele → rozpad iontu na fragmentové ionty, jejichž hmotnostní spektrum změříme (MS/MS spektrum obsahuje pouze fragmentové ionty vzniklé rozpadem vybraného prekurzoru a žádné nečistoty – pokud společně s prekurzorovým iontem nefragmentujeme blízkou interferenci)
- Disociace v iontovém zdroji (in-source fragmentace): 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)

Hmotnostní spektrometry umožňující MS/MS

- Trojitý kvadrupól QqQ (q = kolizní cela, kvadrupól, na který je vloženo pouze střídavé napětí a do něj zaveden kolizní plyn kvůli srážkám s přiváděnými ionty) – pro MS³ by muselo být QqQqQ – není praktické, roste cena
- Iontové pasti (3D, lineární, ICR)
- TOF-TOF
- Hybridní hmotnostní spektrometry (QqTOF, LIT-Orbitrap, QqICR, IT-TOF, EBqQ)

MS/MS lze rozdělit na techniky umožňující fragmentaci v prostoru (izolace a fragmentace v jiném místě) a čase (izolace i fragmentace v jednom místě \rightarrow v pasti)

Možné mechanismy fragmentace

- kolizně indukovaná disociace (CID collision induced dissociation)
 - disociace iontu po srážce s atomem nebo molekulou (He, Ar, N₂), případně kolize s povrchem (např. skimmer)
 - srážky v důsledku urychlení elektrickým polem
- fragmentace v důsledku fotodisociace (PD photodissociation)
 - energie dodána UV fotony \rightarrow UVPD (UV photodissociation)
 - energie dodána IČ fotony \rightarrow IRMPD (infrared multiple photon dissociation)
- fragmentace v důsledku záchytu e⁻: ECD electron capture dissociation ETD – electron transfer dissociation)
- nadměrná excitace při ionizaci např. vysoká energie laseru při (MA)LDI (fragmentace už ve zdroji nebo mimo zdroj (TOF analyzátory), ale před finální detekcí – PSD (post-source decay)

Rozdělení CID podle aktivační energie

- 1. nízkoenergetická CID (energie srážek 1 100 eV)
 - u QqQ, iontové pasti, QqTOF, QqICR lze ionty urychlit pouze asi do 100 eV
 - jako kolizní plyn se používá Ar, He, N₂ při nižších kolizních energiích je volba kolizního plynu důležitější, protože redistribuce energie při srážce trvá delší dobu
 - fragmentace funkčních skupin a větších částí molekuly
- 2. vysokoenergetická CID (energie srážek v keV)
 - u hybridních sektorových přístrojů (EBQQ a BEQQ) a TOF/TOF můžeme ionty před zavedením do kolizní cely urychlit potenciálem až několik keV, takže urychlené ionty mají vysokou kinetickou energii (jako kolizní plyn se používá He, Ar, Xe)
 - rozsáhlejší fragmentace, studium poloh dvojných vazeb a větvení řetězce
- hybridní sektorové přístroje mohou kombinovat oba způsoby excitace
- proč vůbec toto rozlišení? MS/MS spektra pro oba typy kolizí se mohou výrazně lišit, protože fragmentace iontů při srážce silně závisí na jejich původní energii
CID MS/MS spektrum iontu A



MSⁿ analýza v iontové pasti

Izolace prekurzoru, CID aktivace, analýza produktových iontů - vše se děje na jednom místě, akorát v jiném čase.

- vybraný ion prekurzoru je zadržen v pasti, všechny ostatní ionty jsou vypuzeny, pak dojde ke CID s atomy helia přítomnými v pasti a tím i fragmentaci iontu a následně zaznamenáme MS/MS spektrum
- stejným způsobem můžeme dále pokračovat na MS³, atd. Teoreticky lze až MS¹⁰, prakticky jsme omezeni citlivostí detekce a životností iontů, takže běžně se dosahuje MS³ - MS⁵, což pro strukturní analýzu plně postačuje
- 3. pro operátora experimentálně poměrně snadné, MSⁿ analýza se provádí v jediném analyzátoru

Princip MSⁿ



Egacid Red 6B



Egacid Red 6B - MS



Fragmentační schéma barviva Egacid Red 6B



Fragmentační schéma barviva Egacid Red 6B (pokr.)



Fragmentační schéma barviva Egacid Red 6B (pokr.)



TOF-TOF analyzátor

 v dráze letu iontů je zařazena kolizní cela, ve které dochází k fragmentaci vybraných iontů, možnost vysokoenergetických kolizí



Disociace záchytem elektronů (ECD)

- zejména v FT-ICR přístrojích.
- fragmentace pomocí proudu pomalých e⁻ (energie < 1eV) generovaných ze zahřívané dávkovací katody (prstencového tvaru)
- pokud několikanásobně nabitý ion zachytí uvnitř ICR cely e-, vznikne ion s lichým počtem e⁻, který díky přebytku energie rychle fragmentuje
- vhodné pro strukturní analýzu proteinů (peptidů), štěpení za peptidovou vazbou vznikají zejména ionty typu c a z; nedochází ke štěpení modifikujících funkčních skupin (posttranslační modifikace) – nevede k fragmentaci bočního řetězce!



ECD versus CID



http://www.chromatographyonline.com/posttranslational-modification-characterization-electron-capture-dissociation-using-linear-ion-trap

Disociace záchytem elektronů (ECD)

• Po záchytu e se tvoří hypervalentní radikály RNH₃⁻, které dále disociují



www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0402700101

Porovnání ECD a CID

• U CID dochází k fragmentaci peptidové vazby za vzniku b y série



www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0402700101

Porovnání ECD a CID

• Ztráta informace o poloze posttranslační modifikace u CID (příklad fosforylace)



www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0402700101

Disociace přenosem elektronů (ETD)

- mechanismus fragmentace obdobný ECD, vhodné analyzátory iontové pasti, QqTOF
- interakce vícenásobně nabitých iontů s radikál-anionty (chemická ionizace), které mají dostatečně nízkou elektronovou afinitu (ochotně předávají elektron)
- ETD reagenty:



- vhodné pro strukturní analýzu proteinů (peptidů), štěpení za peptidovou vazbou vznikají zejména ionty typu c a z; nedochází ke štěpení modifikujících funkčních skupin (posttranslační modifikace) nevede k fragmentaci bočního řetězce!
- $[M+3H]^{3+} + A^{-} \rightarrow [M+3H]^{2+} + A \rightarrow [C+2H]^{+} + [Z+H]^{+}$



Disociace přenosem elektronů (ETD)



http://planetorbitrap.com/easy-etd

Disociace přenosem elektronů (ETD)



Multifotonová disociace infračerveným zářením

- IRMPD (InfraRed MultiPhoton Dissociation)
- po absorpci IČ záření → prekurzorový ion excitován na vyšší vibrační stavy a následně dochází k fragmentaci vazeb (v plynné fázi)
- v kombinaci s FT-ICR nebo LIT
- spektra se podobají CID, avšak není omezení v nízkých hmotách (cut-off efekt) rozsáhlejší fragmentace
- selektivní disociace fosforylovaných peptidů



M. Boháč a kol., *Chem.Listy* 99 (2005) 943-951.



Multifotonová disociace infračerveným zářením



J.S. Brodbelt a kol., Chem. Soc. Rev. 43 (2014) 2757 – 2783.

Fotodisociace UV zářením

- Selektivní absorpce UV záření a následná rozsáhlá fragmentace i specifických vazeb (energie UV fotonů je v porovnání s IČ vyšší)
- Nejčastěji vlnová délka 193 nm nebo 213 nm



J.S. Brodbelt a kol., Chem. Soc. Rev. 43 (2014) 2757 – 2783.

Fotodisociace UV zářením



J.S. Brodbelt a kol., Chem. Soc. Rev. 43 (2014) 2757 – 2783.

Orbitrap Fusion - UVPD



http://planetorbitrap.com/uvpd