

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, $[M+H]^+$
- **deprotonovaná molekula** - ion vzniklý odštěpením protonu, $[M-H]^-$
- **hybridní analyzátor** - hmotnostní spektrometr, který kombinuje hmotnostní analyzátory 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

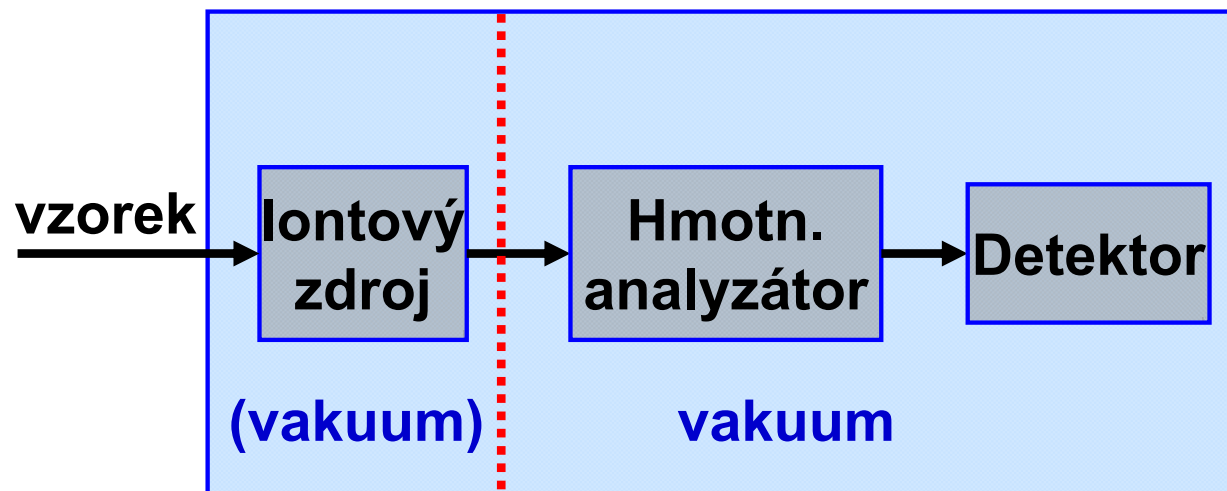
• další důležité části přístroje:

- 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)

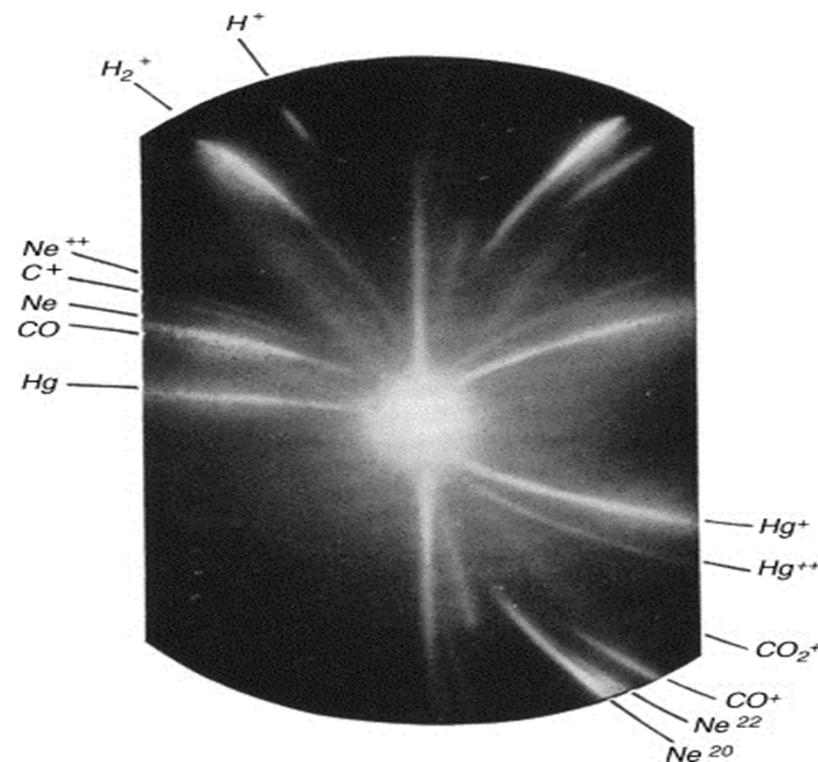
- iontový zdroj hmotnostního spektrometru slouží k **převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice** (ionty)
- tvrdé ionizační techniky (EI) - ionizovaná molekula při ionizaci získá nadbytek vnitřní energie, což se projeví fragmentací molekulového iontu na menší části (tzv. fragmentové ionty)
- 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)

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

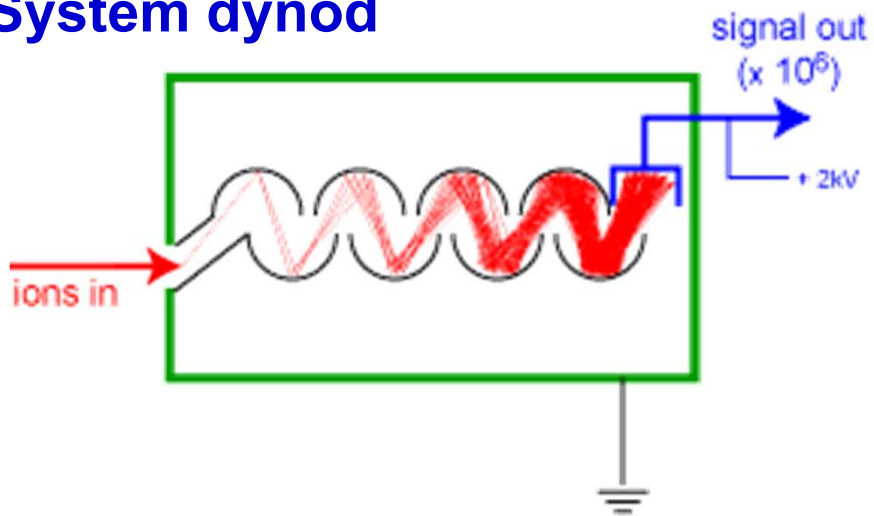


Fotografická deska Thompsonova spektroskopu (1907)

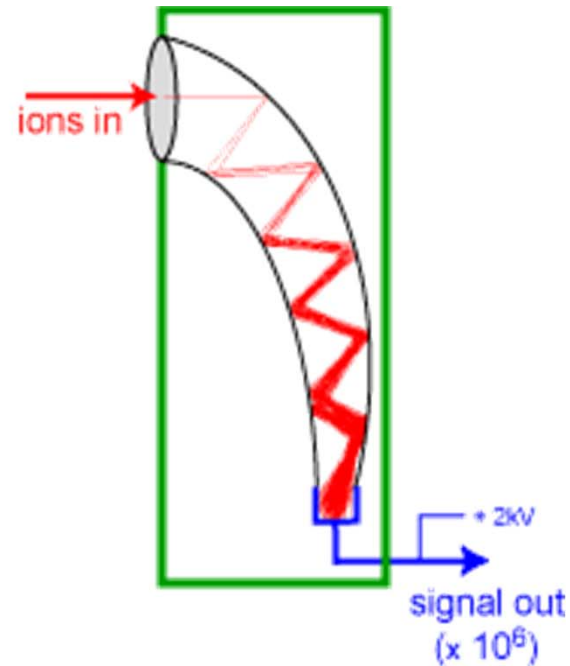
Detekce iontů

- 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

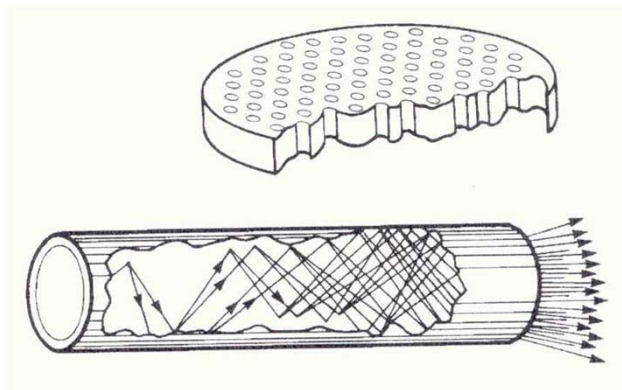
Systém dynod



Zakřivená dynoda

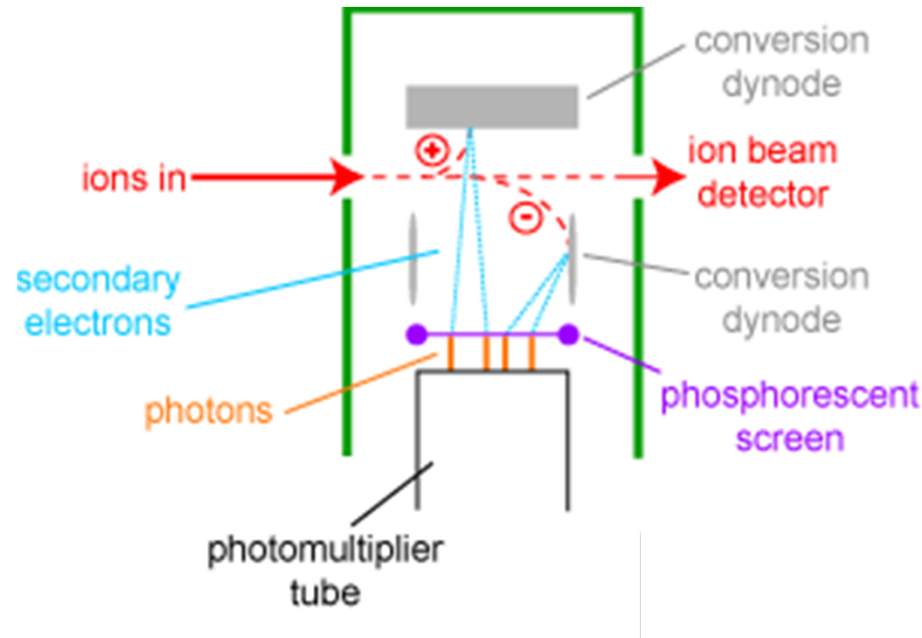


**Elektronový
násobič s polem**

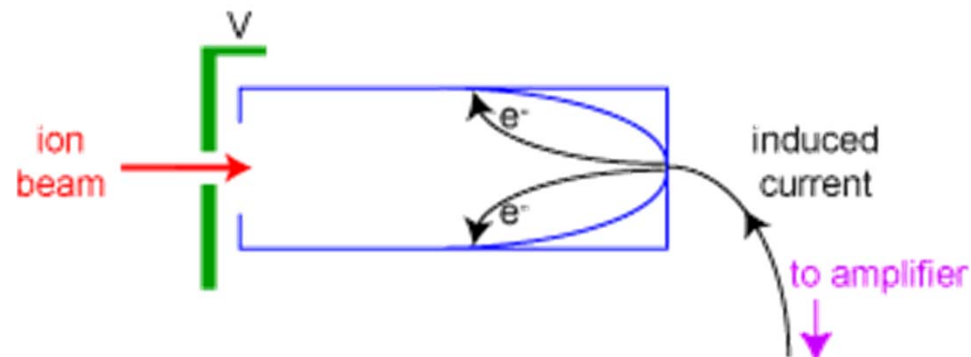


Detekce iontů

- **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

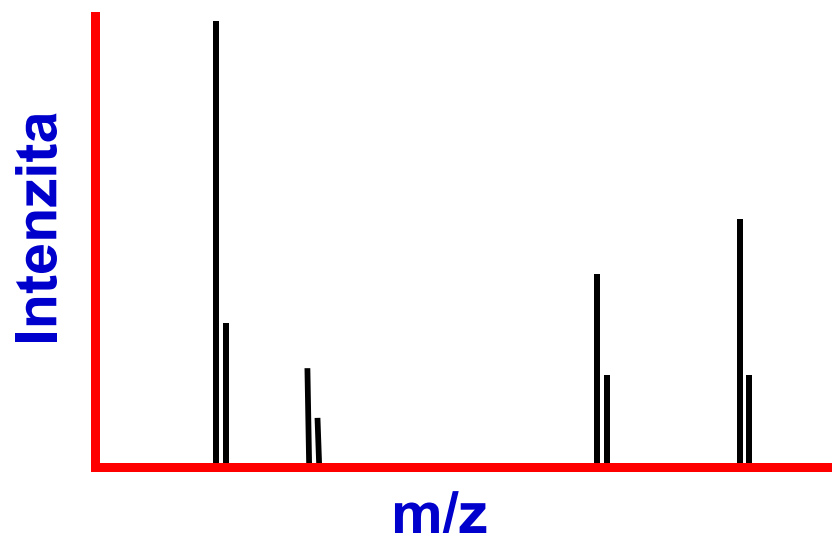


Vakuová technika

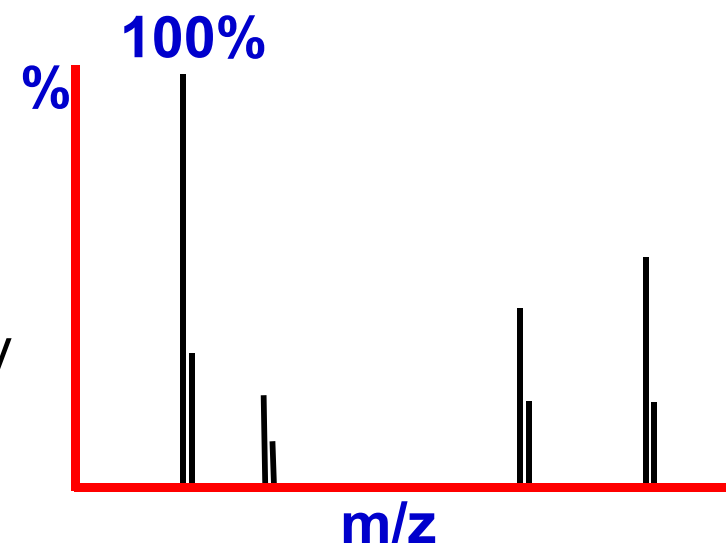
- různé požadavky na hodnotu vakua v různých částech hmotnostního spektrometru
 - iontový zdroj - za atmosférického tlaku (API - ESI, APCI, APPI) nebo vakua (EI, CI, MALDI)
 - hmotnostní analyzátor - vždy pracuje **za vysokého vakua**, hodnota vakua se liší podle typu analyzátoru ca. 10^{-3} až 10^{-11} Pa
 - detektor - vakuum
- k získání vysokých hodnot vakua je obvykle potřeba dvou- nebo třístupňové 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

Hmotnostní spektrum

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

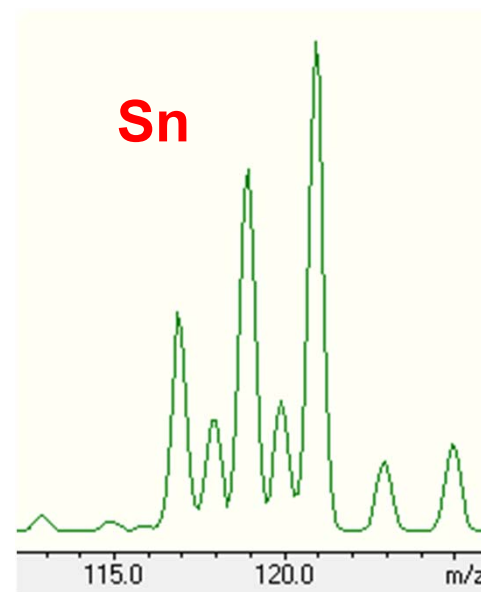
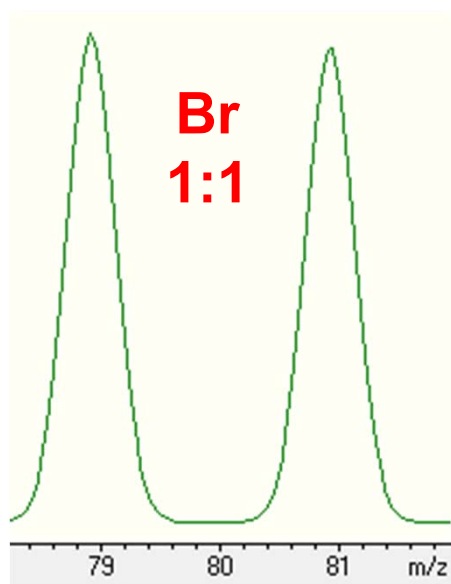
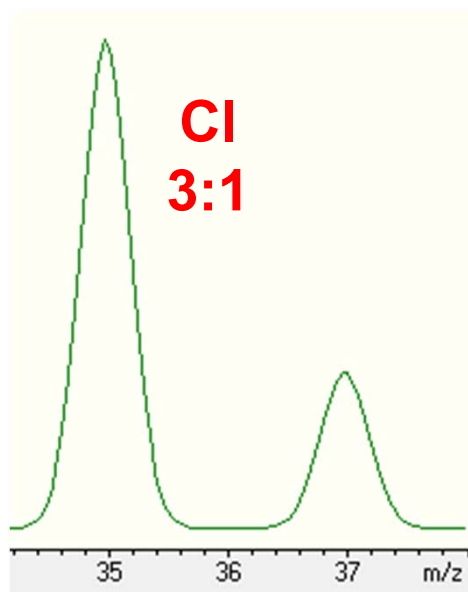


- měří se intenzita iontů v závislosti na m/z :
 - skenování = změna skenované veličiny (U , V , B) – Q , sektorové analyzátory, IT
 - záznam signálu v čase – TOF, FTICR, Orbitrap
- normalizace spekter:
 - převedení absolutních intenzit na relativní
 - intenzita osy y je v rozsahu 0-100%
 - intenzita základního píku spektra je 100% a intenzity ostatních píků jsou k ní vztaženy



Ionty v hmotnostních spektrech

- závislé na typu použité ionizace
- ionty s **lichým počtem elektronů** - M^{+} , především elektronová ionizace
- ionty se **sudým počtem elektronů** - spektra měkkých ionizačních technik
- ionty **(de)protonovaných** molekul - $[M+H]^+$, $[M-H]^-$, určení molekulové hmotnosti (M_R)
- **adukty** molekul - $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$, s mobilní fází, atd., ověření M_R
- **fragmentové** (produktové) ionty – strukturní informace, fragmentace funkčních skupin, částí molekuly, atd.
- ionty **izotopů** - atomy chemického prvku, které mají stejný počet protonů, ale rozdílný počet neutronů, tedy stejné atomové číslo a rozdílnou atomovou hmotnost



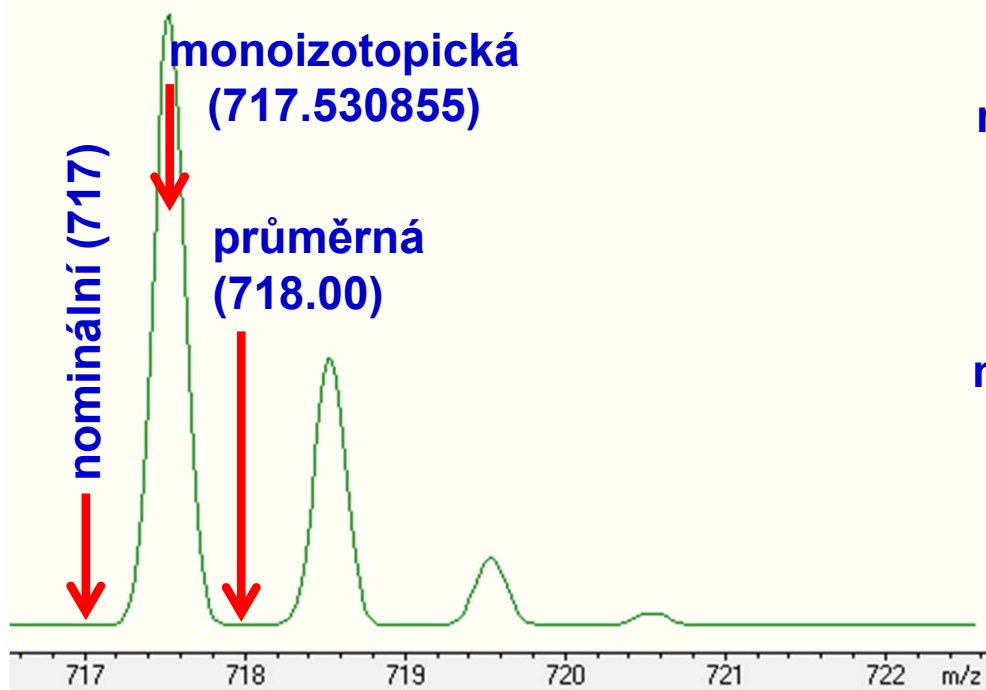
Přírodní zastoupení izotopů běžných organických prvků

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)

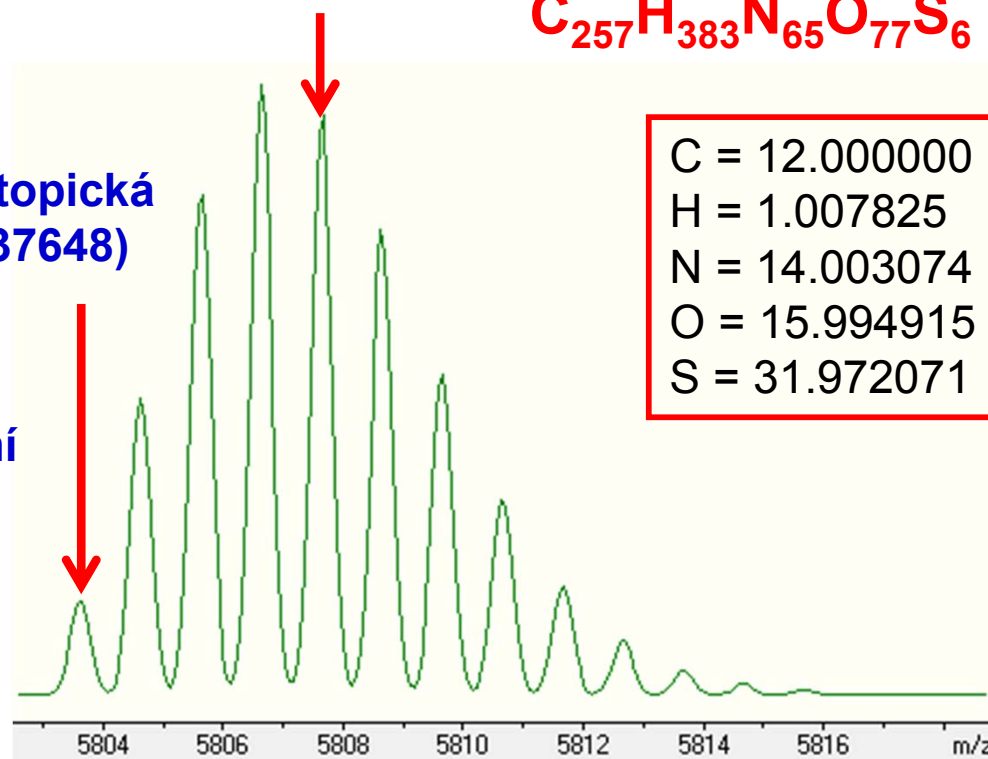


monoizotopická
(5803.637648)

nominální
(5801)



průměrná
(5807.59)



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 nevyužívají
- 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 knihovnamí spekter, strukturní informace, dobře popsaná pravidla fragmentace
 - MALDI, DESI, SIMS - pro MS zobrazování
 - DESI, DART - desorpční ambientní techniky

Elektronová ionizace

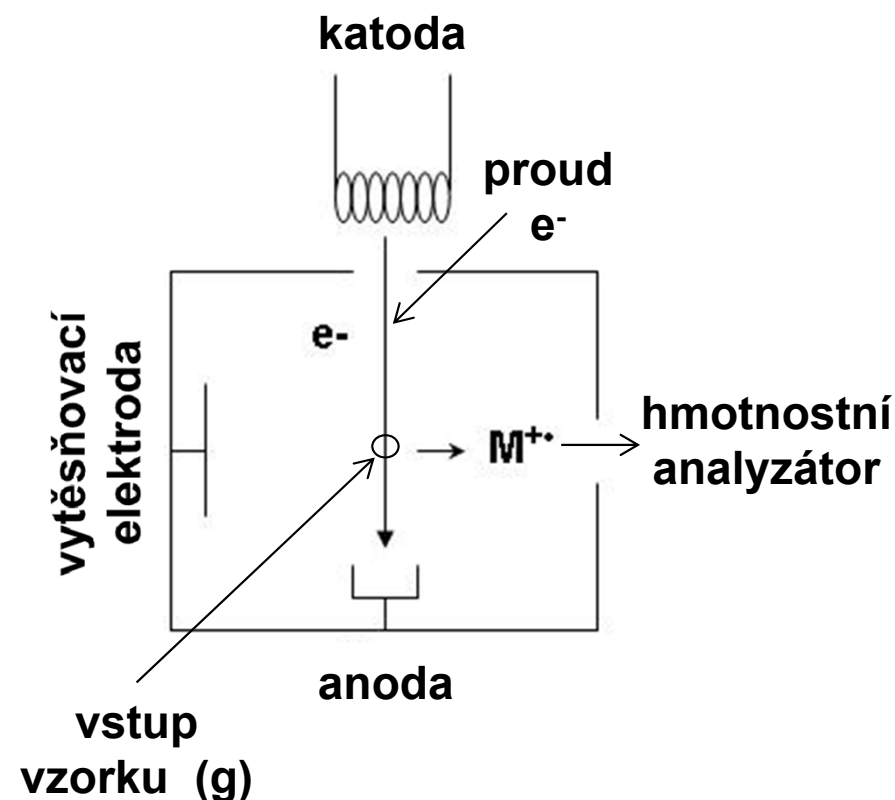
- “nejtvrdší” ionizační technika - molekula získá velký přebytek vnitřní energie, který se projeví fragmentací molekulárního iontu (někdy v takovém rozsahu, že molekulární ion zcela chybí ve spektru)
- vznikají **ionty s lichým počtem elektronů** ($M^{+\cdot}$)
- pracuje za vakua - ca. 10^{-3} - 10^{-5} 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 strukturní 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 radikalkationtu M^+ .

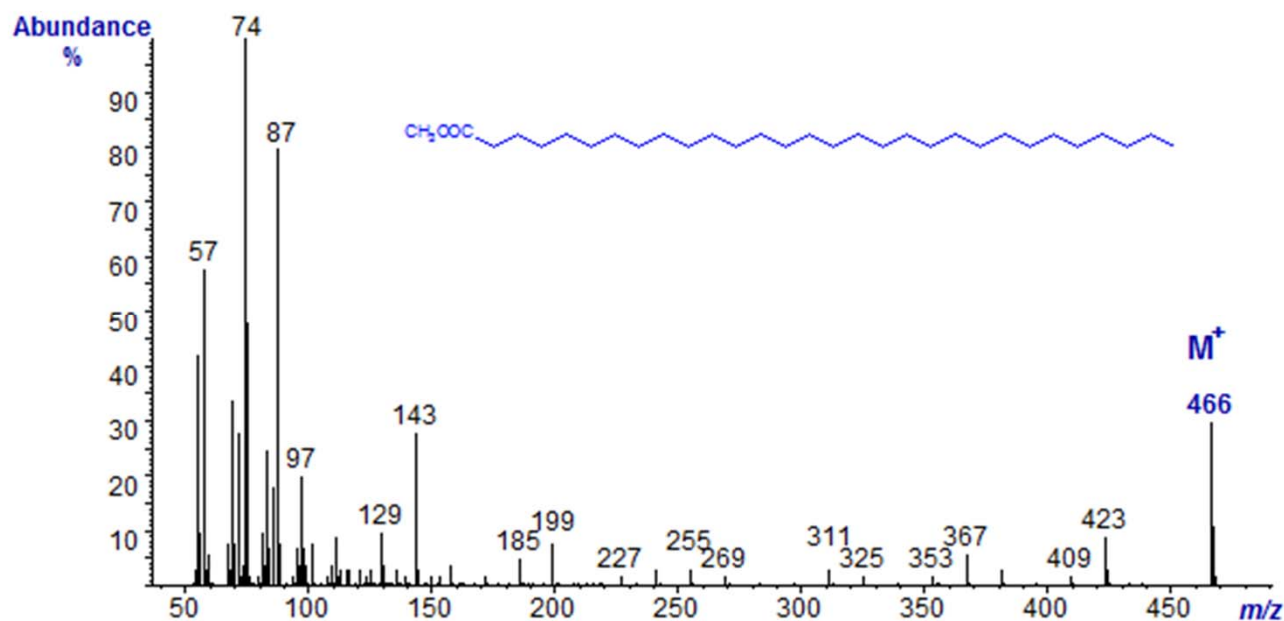


- účinnost ionizace je velice nízká, vzniká 1 ion z 10^5 interakcí
- vzniklé ionty jsou vytěšňovací elektrodou vypuzeny z iontového zdroje, svazek iontů je dále fokusován (zaostřen) a urychlen dalšími elektrodami směrem do hmotnostního analyzátoru



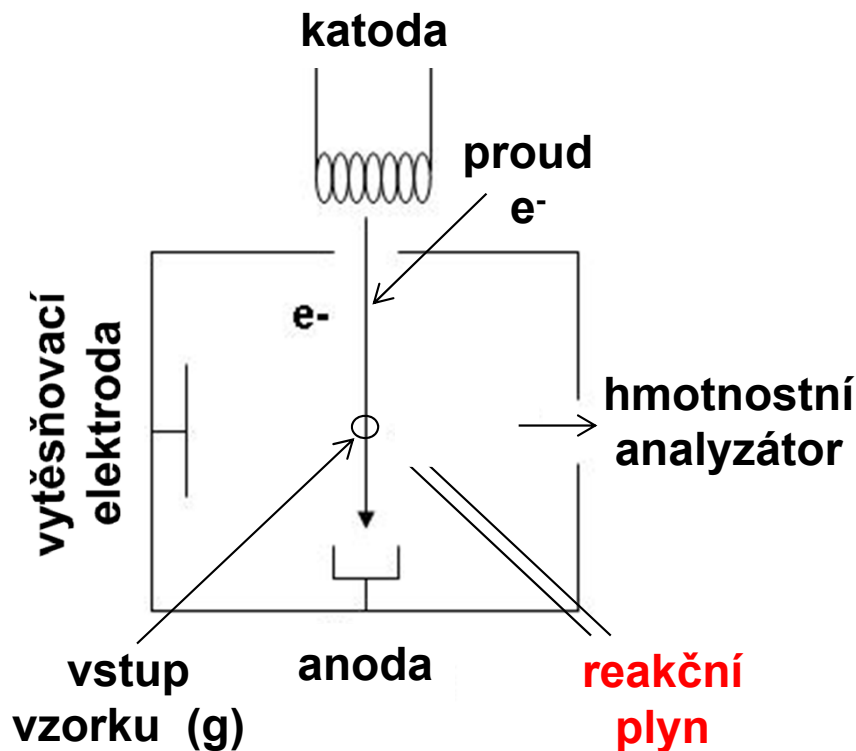
Princip elektronové ionizace

- 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



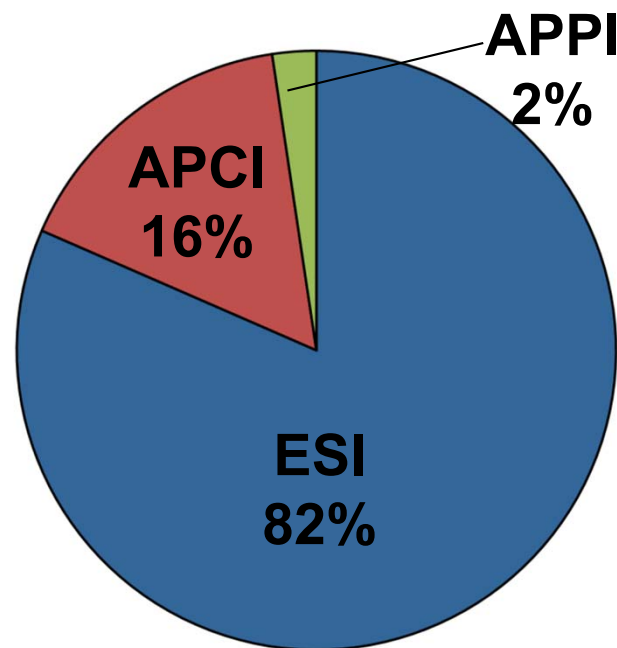
Chemická ionizace

- 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^- ionizovány 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 (nejčastěji reakční plyn metan)
- vzniklé ionty mají **sudý počet e^-** (na rozdíl od M^+ při EI)
- ca. do $m/z = 1000$



Ionizace za atmosférického tlaku

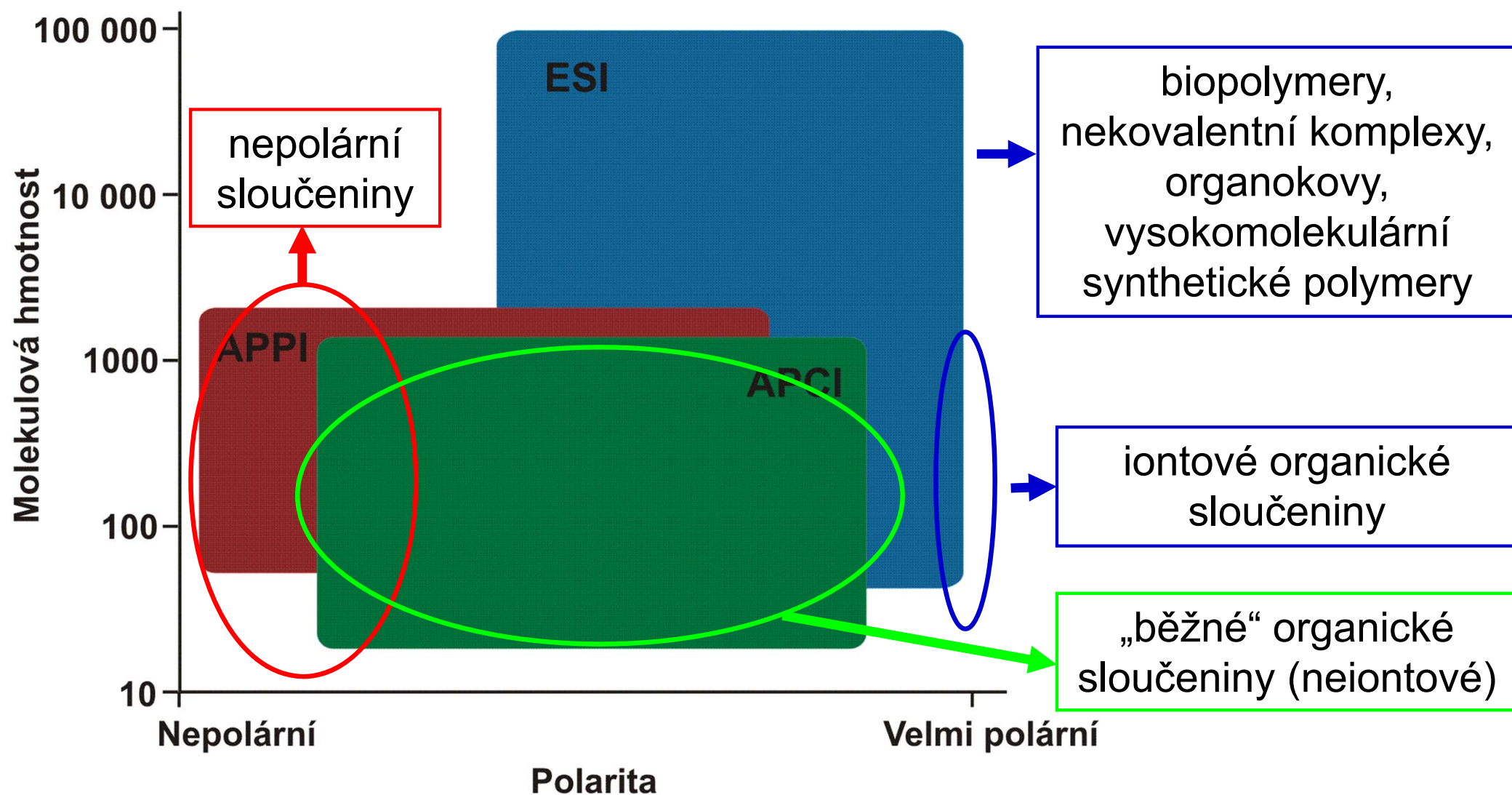
- tyto 3 ionizační techniky (ESI, APCI, APPI) pracující za atmosférického tlaku znamenaly naprostý průlom v řešení spojení HPLC/MS
- v současnosti jsou techniky ESI + APCI standardem pro komerční HPLC/MS systémy, APPI je považována za vhodnou alternativu pro nepolární nebo velmi labilní látky
- vznikají převážně ionty se sudým počtem elektronů (existují výjimky)



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

Volba ionizační techniky a polarity záznamu

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

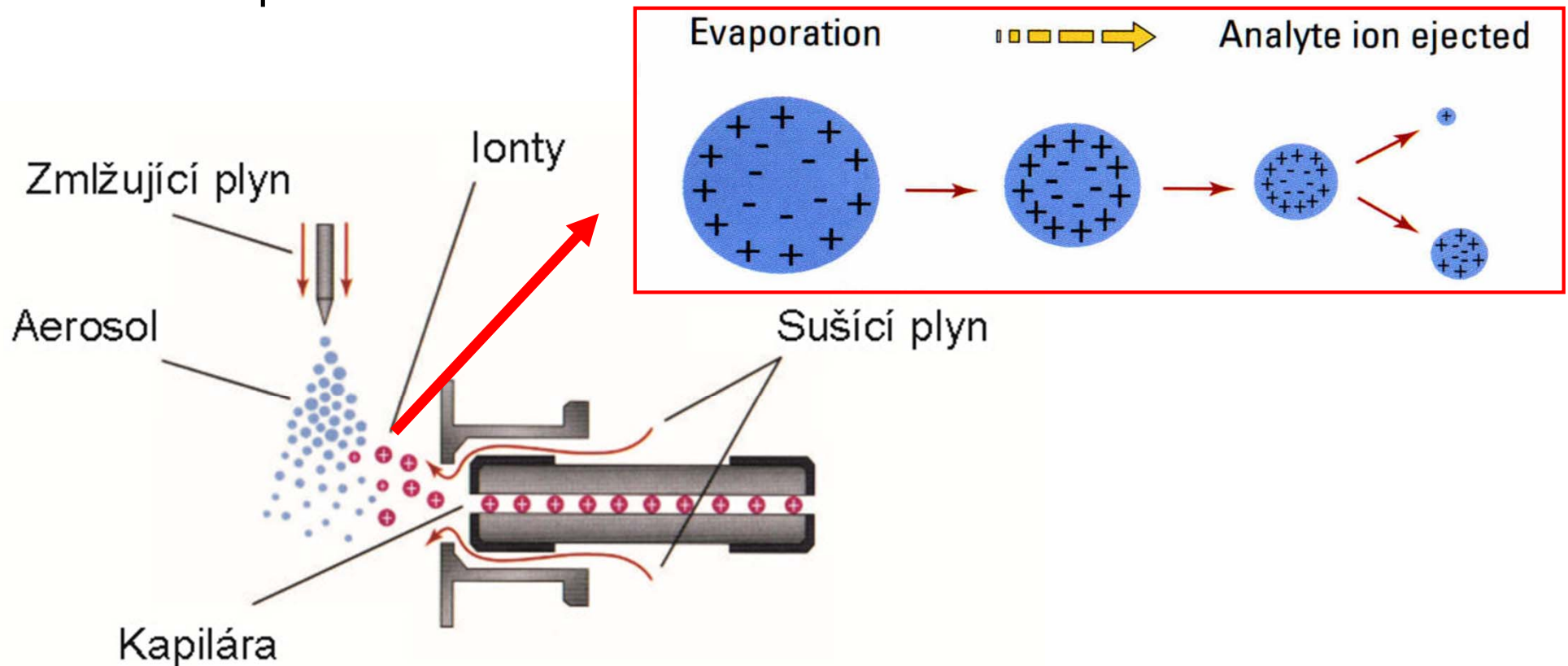


Ionizace elektrospřejem

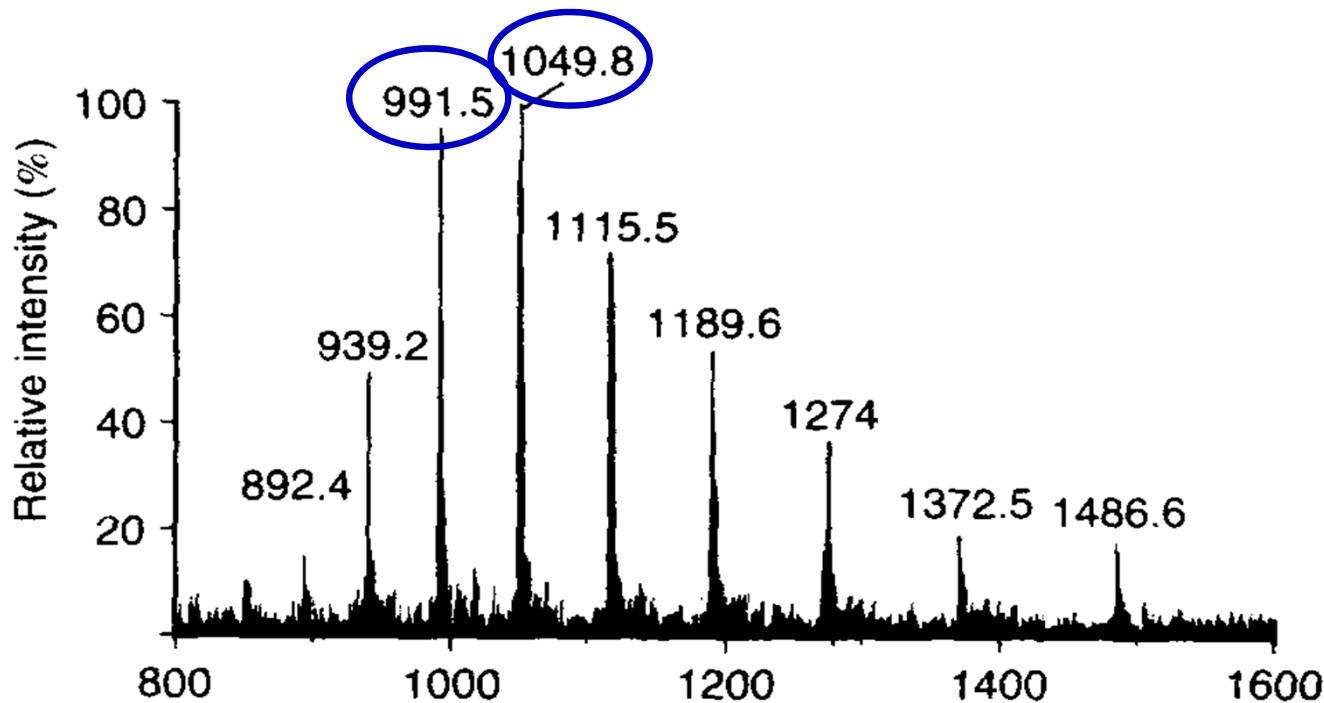
- ESI je nejčastěji používaná ionizační technika pro **spojení HPLC/MS**
- pro látky **středně polární až iontové**
- nelze použít při práci s nepolárními mobilními fázemi a pro nepolární sloučeniny
- průtok HPLC eluentu ca. 0.1 - 1.0 ml/min, přímá infúze jednotky až desítky μl
- tvorba **vícenásobně 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 elektrospřejem

- 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



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.:

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

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

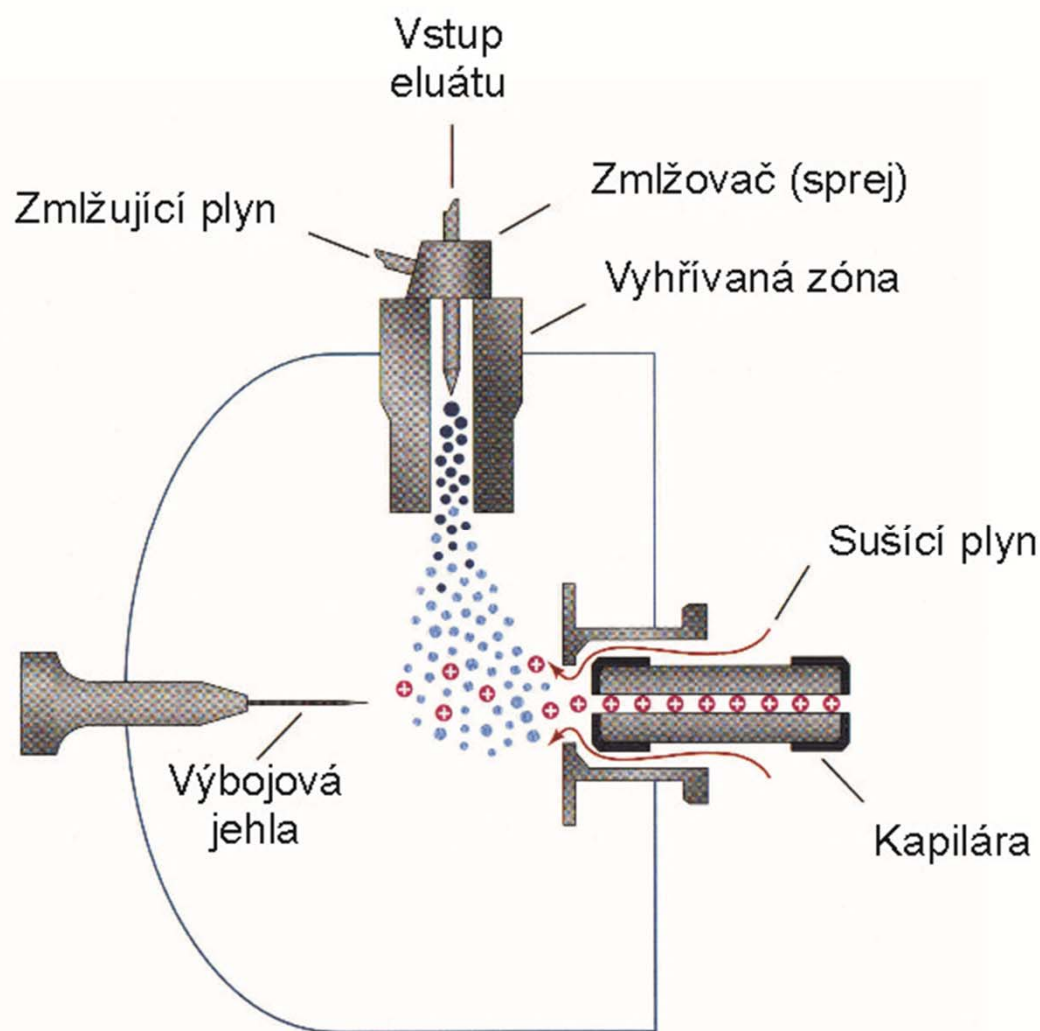
- pak zprůměrování a výpočet M_R (tzv. **dekonvoluce**), vše automaticky softwarově

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 μ l
- 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
 - $[M+H]^+$, $[M-H]^-$
 - 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

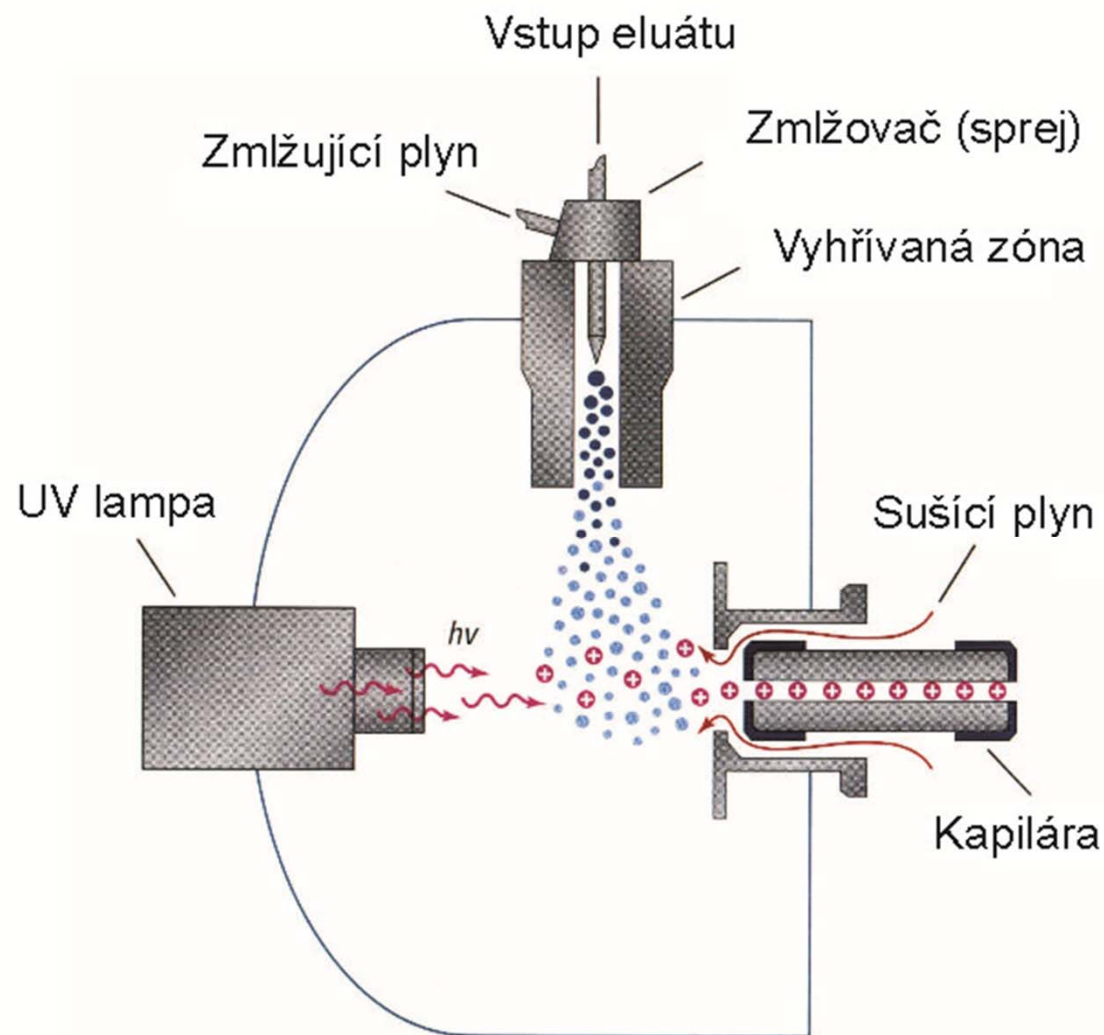


Fotoionizace za atmosférického tlaku

- 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 μl
- pro látky **nepolární** až **středně polární**
- lze ionizovat molekuly s M_R ca. do 2000
- **měkká** ionizační technika
 - $[M+H]^+$, $[M-H]^-$
 - běžně vznikají i ionty s lichým počtem elektronů - $M^{\cdot+}$, $M^{\cdot-}$, 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



Porovnání EI a měkkých ionizačních technik

- **EI** - primárně vznikají radikál-kationty $M^{\cdot+}$ (**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 (nejtvrdší)

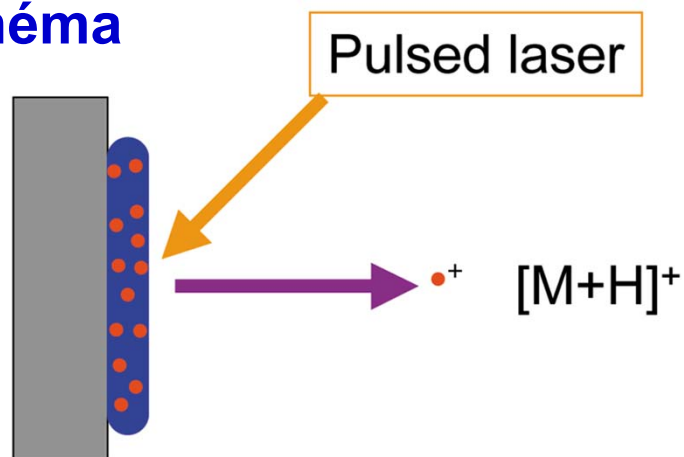
Ionizace laserem za účasti matrice

- 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 spojitě stopy na terčík nebo sběr frakcí
- možnost archivace vzorku a jeho opětovné přeměření
- ionty matrice ve spektrech

Ionizace laserem za účasti matrice

- vzorek je společně s matricí nanesen na MALDI terčík
- 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



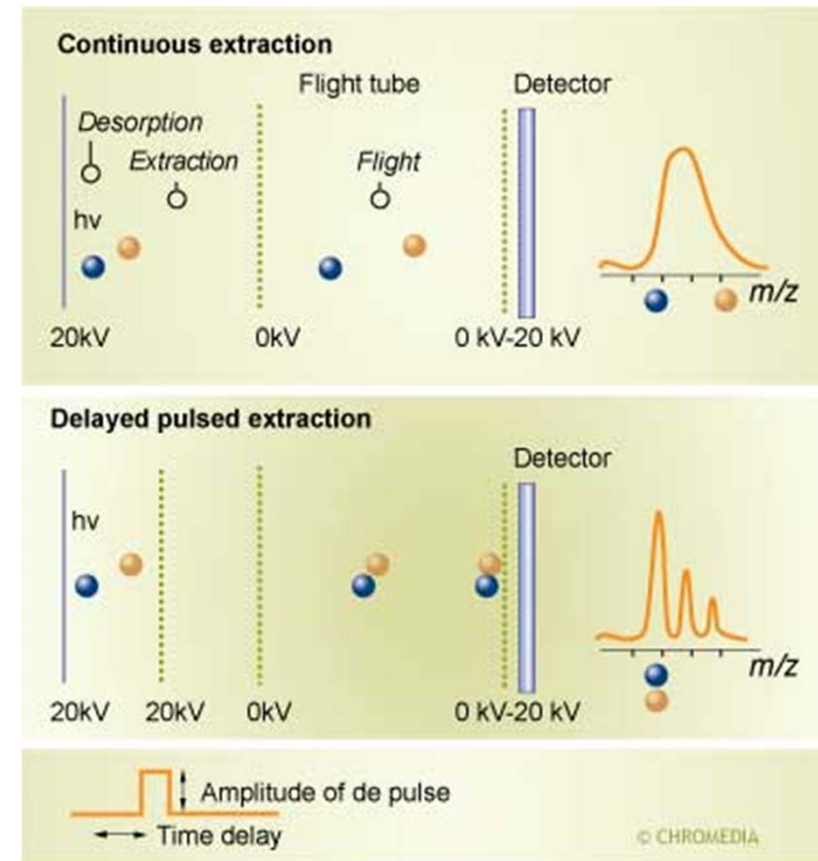
MALDI terčík



Animace

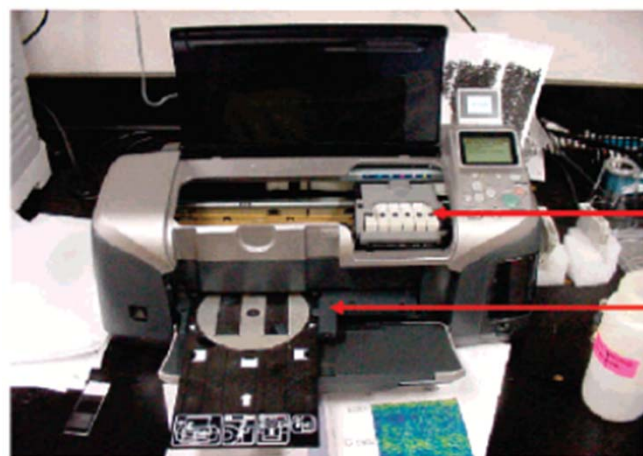
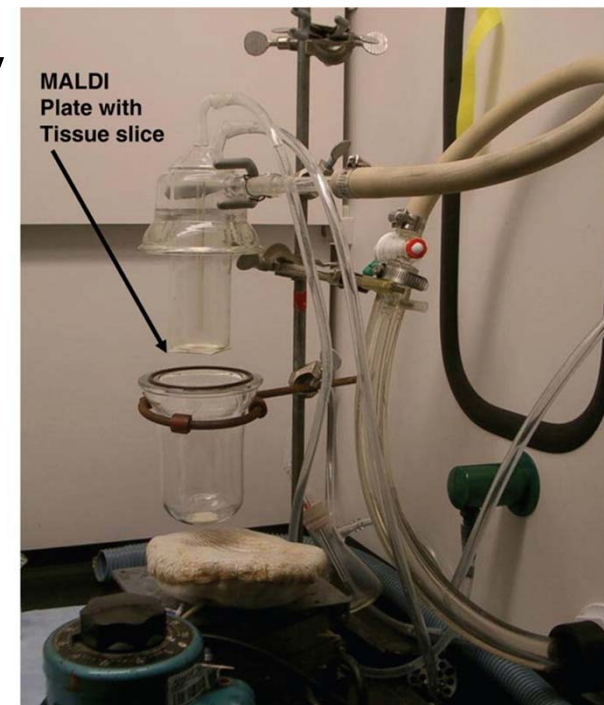
Ionizace laserem za účasti matrice

- **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 (337 nm), matrice nejčastěji aromatické karboxylové kyseliny absorbují záření laseru (např. kyseliny dihydroxybenzoová, skořicová)
 - 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



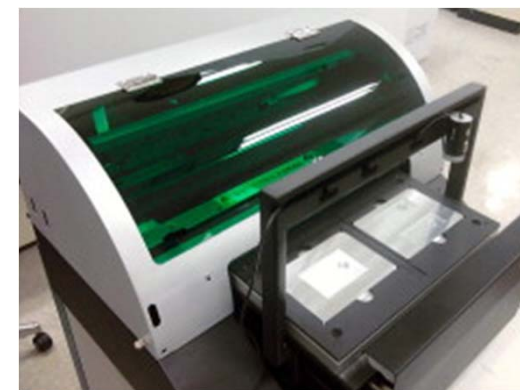
Způsoby nanášení matrice

- analyt se musí v matrici rozpouštět, rovnoměrná distribuce
- smíchání analytu s roztokem matrice a odpaření rozpouštědla
- převrstvení kapky analytu kapkou matrice
- automatizovaná depozice matrice pomocí inkoustové tiskárny
- depozice matrice sublimací
 - lepší distribuce matrice a stabilita signálu
 - nižší kontaminace alkalickými kovy (přečištění sublimací)
 - malá velikost krystalů (vyšší prostorové rozlišení)
- automatické sprejování - komerčně dostupné zařízení
- ruční sprejování pomocí fixírky



Solution reservoir

Sample plate holder

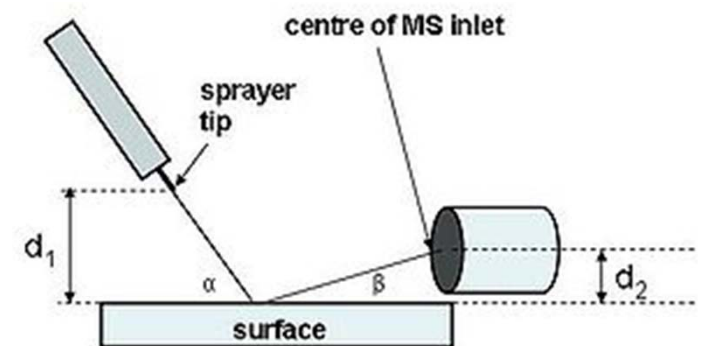
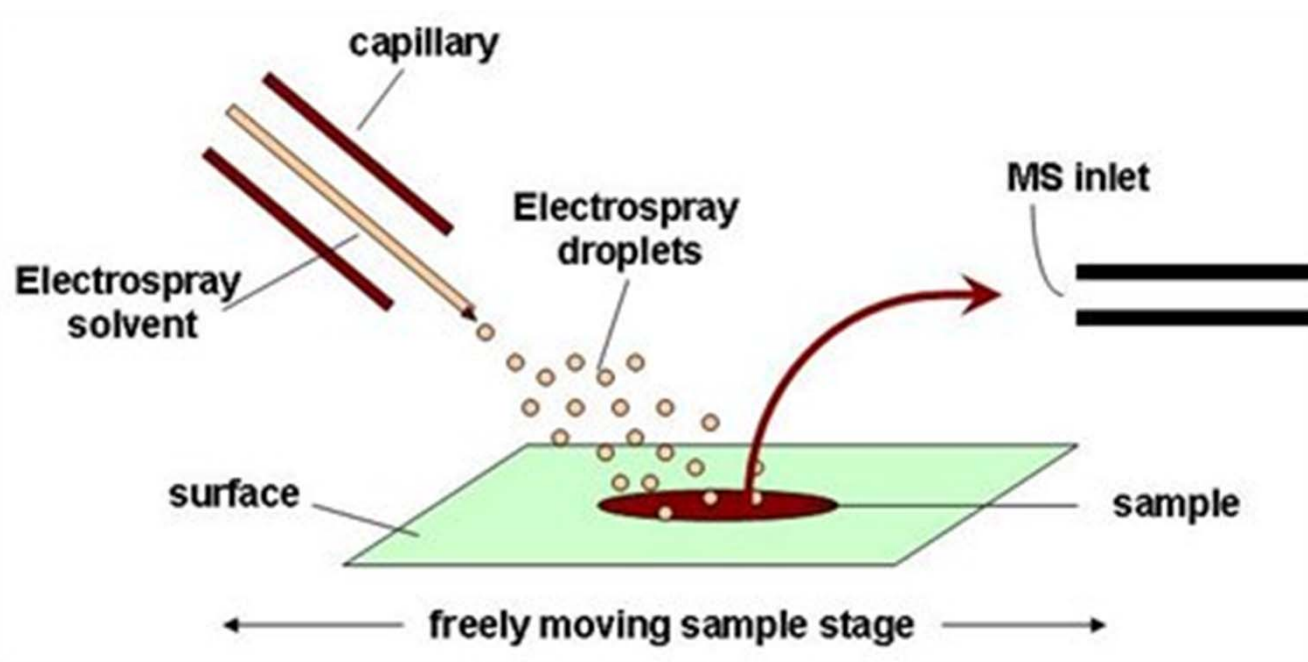


Desorpční ionizace elektrosprejem

- kombinuje ESI a desorpční ionizační techniky
- spíše pro menší molekuly
- rozdíly 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



α	Incident angle	0 – 90°
β	Collection angle	5 – 10°
d_1	Tip to surface distance	1 – 10 mm
d_2	MS inlet to surface distance	0 – 2 mm

Animace

Praktické ukázky DESI

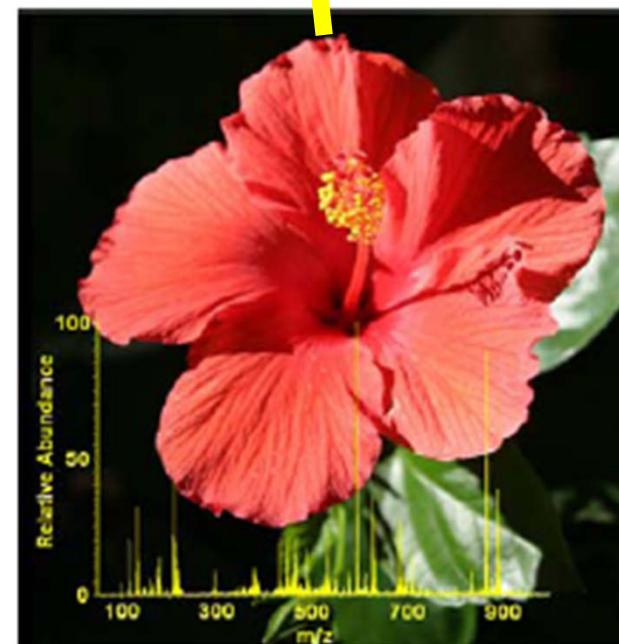
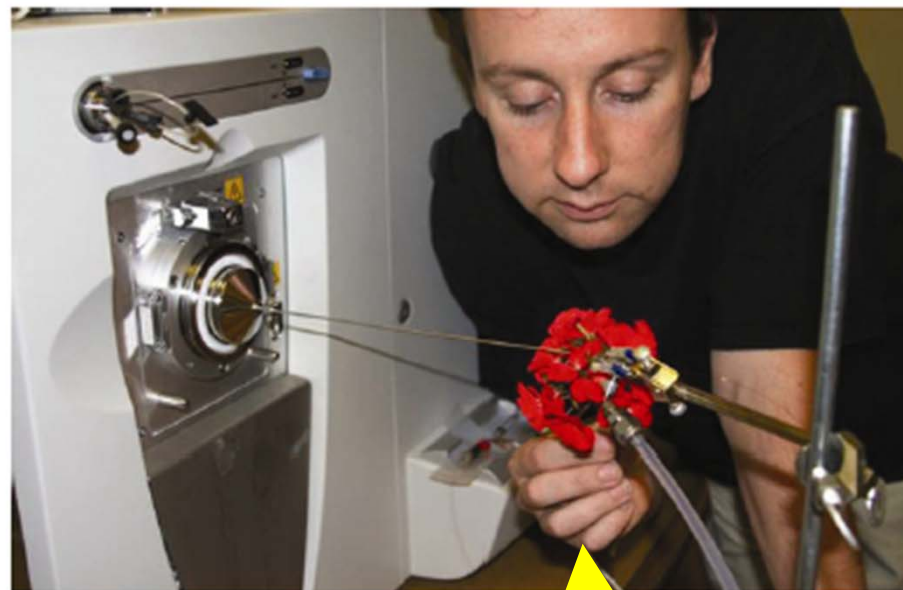
- živočišná tkáň (prst živého člověka)



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

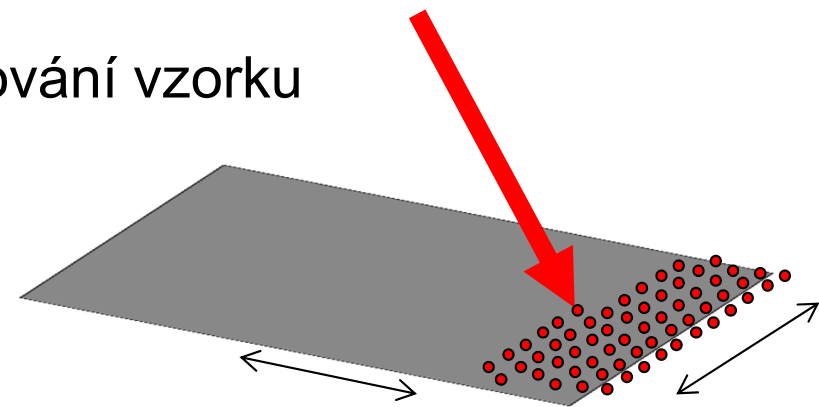
- bez jakékoliv úpravy vzorku!

- rostlinná tkáň (kytka)



Hmotnostně spektrometrické zobrazování

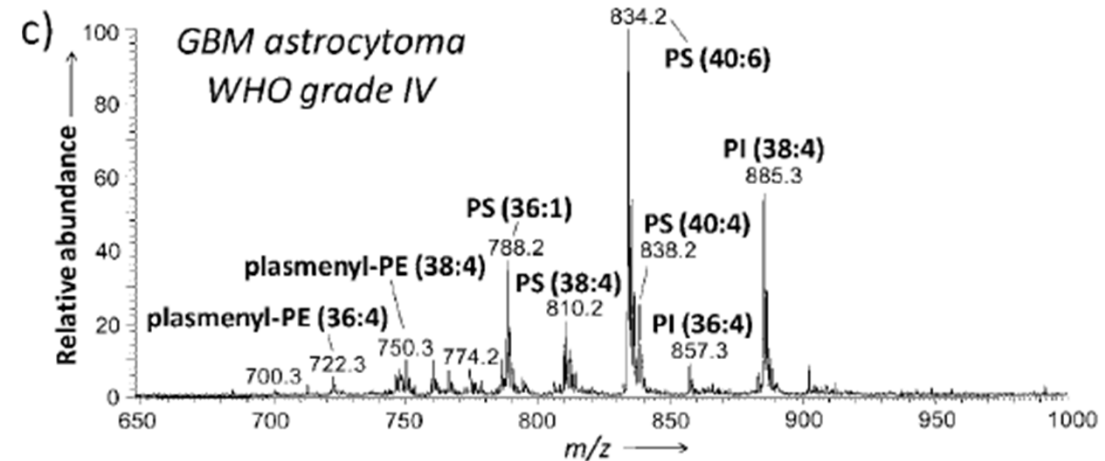
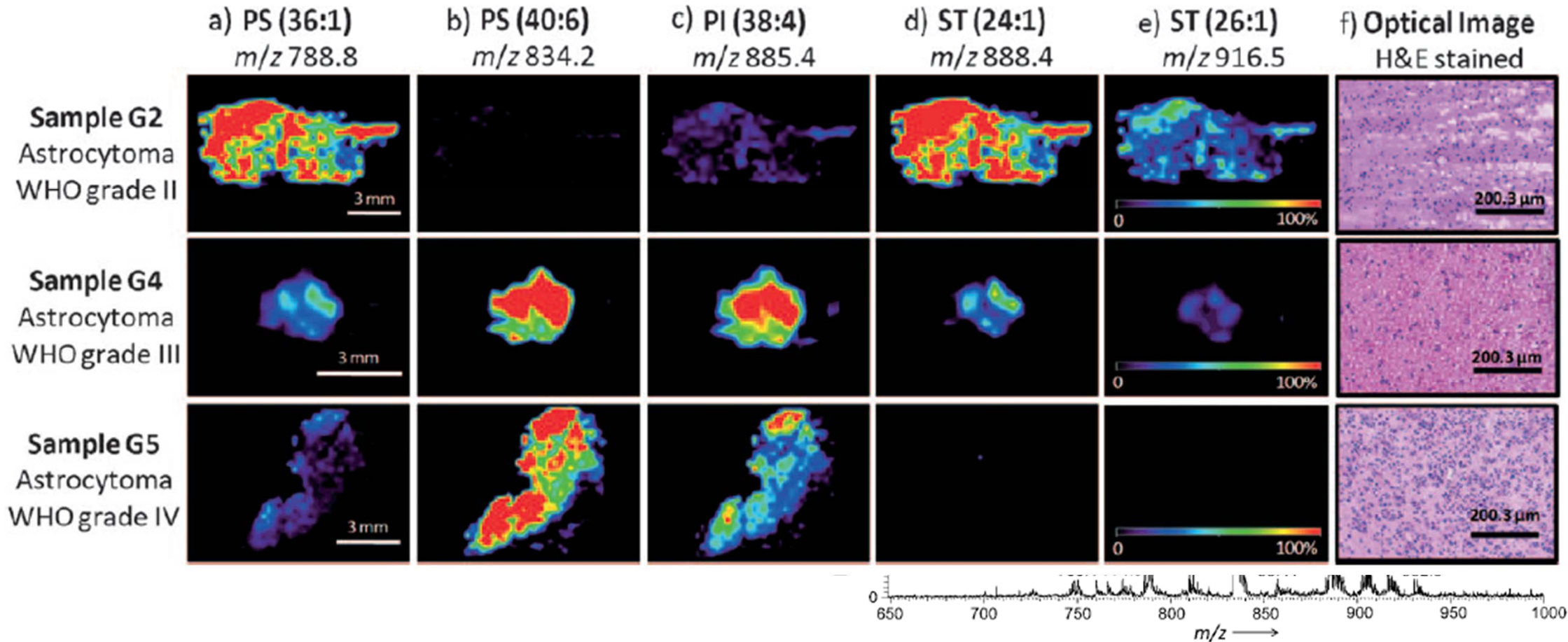
- slouží k zobrazení prostorové distribuce molekul
- desorpce/ionizace jednoho bodu a následné 2D rastrování vzorku
 - vzorek se pohybuje pod paprskem/sprejem
 - jeden bod = 1 spektrum
 - skládání spekter pomocí softwaru



- lze použít různé zdroje pro ionizaci, např. MALDI, DESI
- prostorové rozlišení je dáno šířkou bodu (laseru, spreje)
 - čím vyšší rozlišení (menší bod), tím kvalitnější obraz (více pixelů)
- úprava vzorku
 - nařezání plátků 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



MALDI zobrazování
- biomarkery rakoviny

Histologie pomocí MS

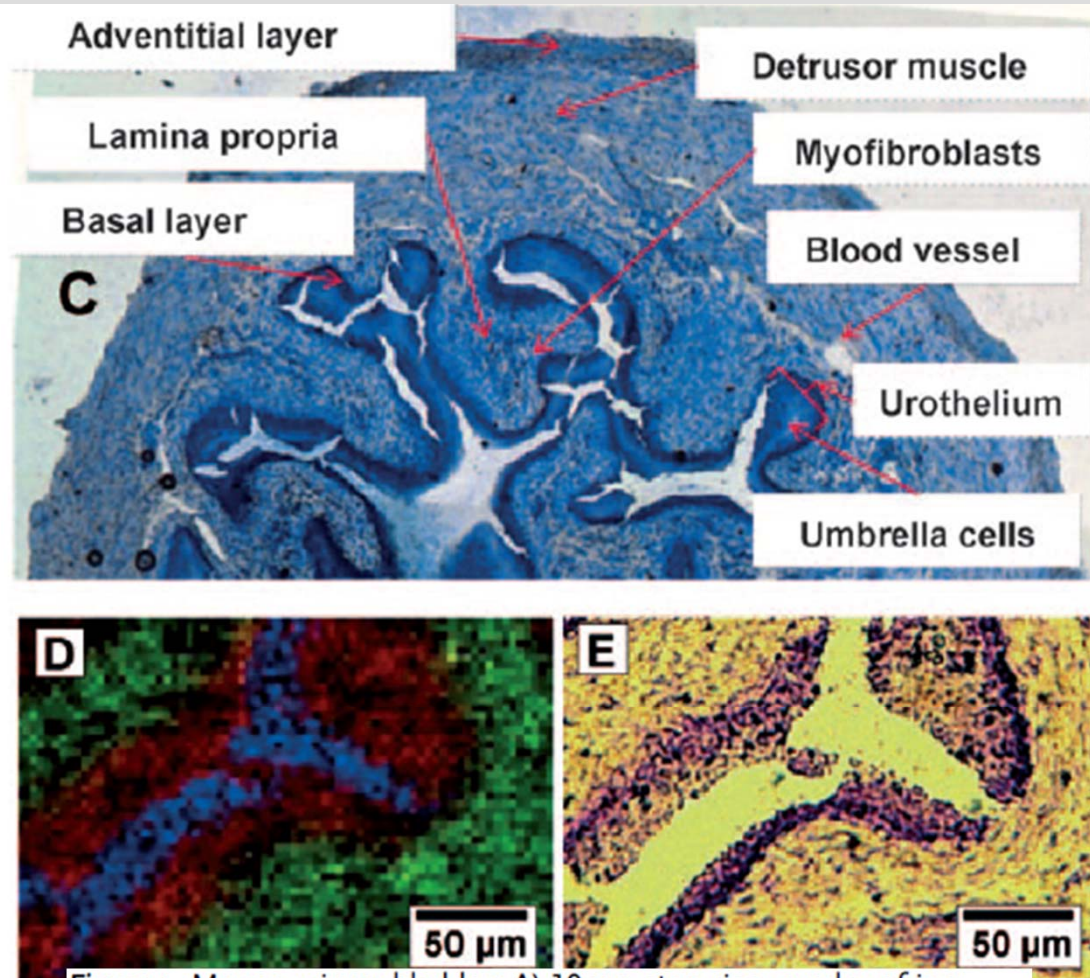
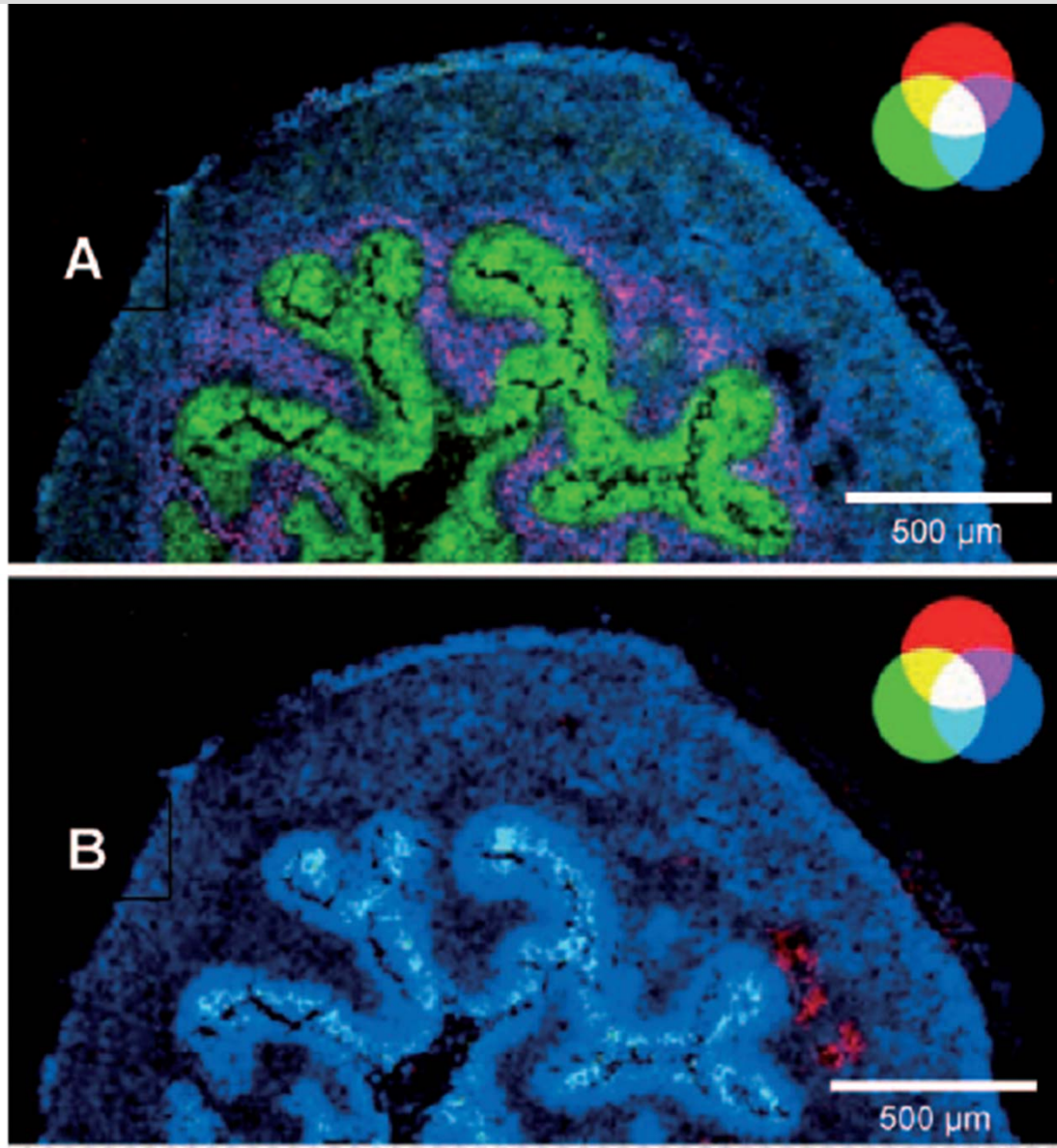


Figure 1. Mouse urinary bladder: A) 10 μm step size, overlay of ion images for m/z 741.5307 (blue, muscle tissue, SM(34:1)), m/z 798.5410 (green, urothelium, PC(34:1)), and m/z 743.5482 (red, lamina propria). B) Overlay of ion images for m/z 798.5410 (blue, urothelium, PC(34:1)), m/z 812.5566 (green, umbrella cells, PE-(38:1)), and m/z 616.1767 (red, blood vessels, heme b, M^+). C) Optical image of the same tissue section after staining with toluidine blue. D) 5 μm step size, overlay of ion images for m/z 114.9039 (In^+ substrate, blue), m/z 798.5410 (PC(34:1), red), and m/z 741.5307 (green). E) Optical image of the same tissue section after staining with toluidine blue. All of the ions are of type $[M+K]^+$ except for heme.

Starší (historické) ionizační techniky

- dnes se používají výjimečně, většinou byly vývojově překonány jinými ionizačními technikami s výhodnějšími vlastnostmi
- Ionizace termosprejem (Thermospray Ionization, TSI)
- Ionizace urychlenými atomy (Fast Atom Bombardment, FAB)
- Ionizace urychlenými ionty (Fast Ion Bombardment, FIB)
- Ionizace polem (Field Ionization, FI)
- Desorpce polem (Field Desorption, FD)
- Desorpce plazmou kalifornia 252 (^{252}Cf Plasma Desorption)

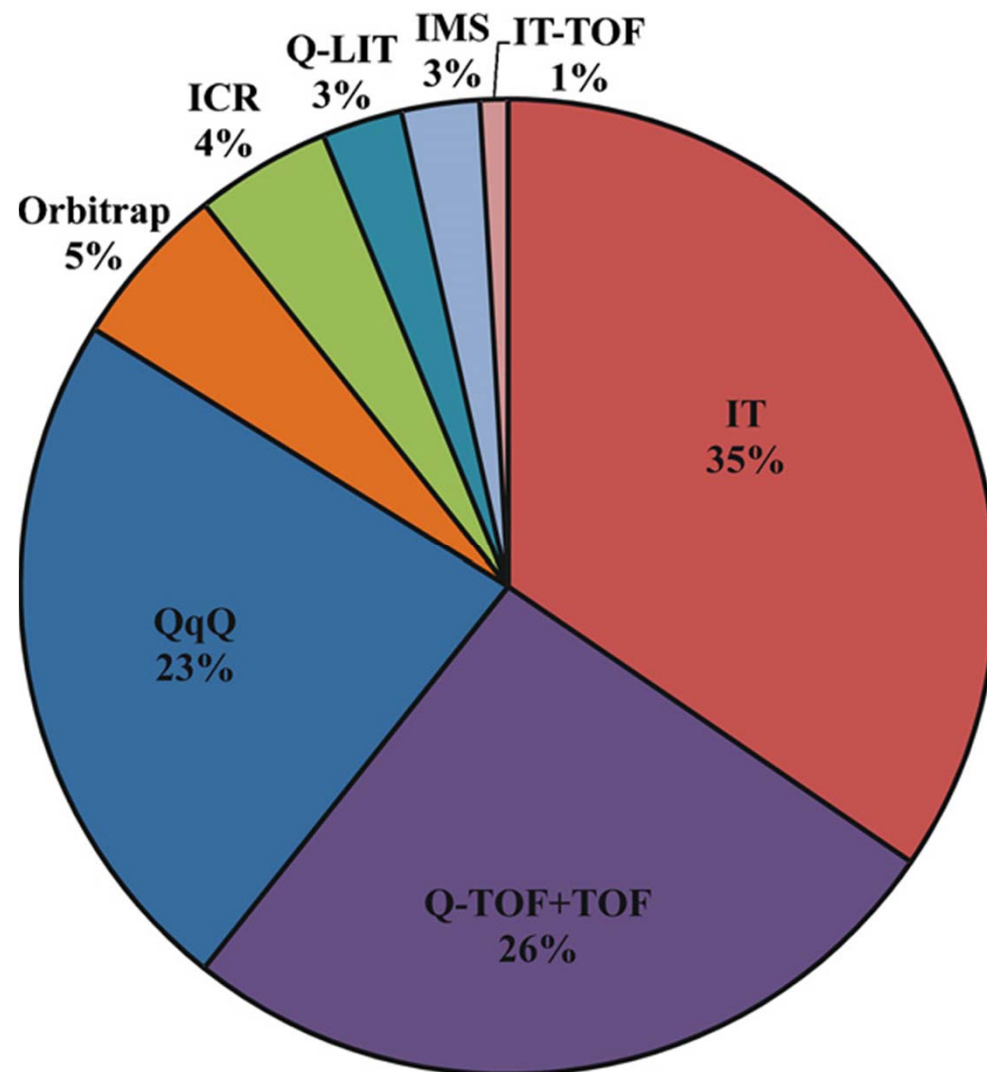
Hmotnostní analyzátory

Hmotnostní analyzátory

- hmotnostní analyzátor slouží k dělení iontů v plynné fázi za vakua podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z)
- analyzátor je 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)

Základní typy hmotnostních analyzátorů

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



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

Hmotnostní analyzátory

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)
- analyzátory **pohyblivosti iontů** - dělení iontů podle jejich velikosti a tvaru

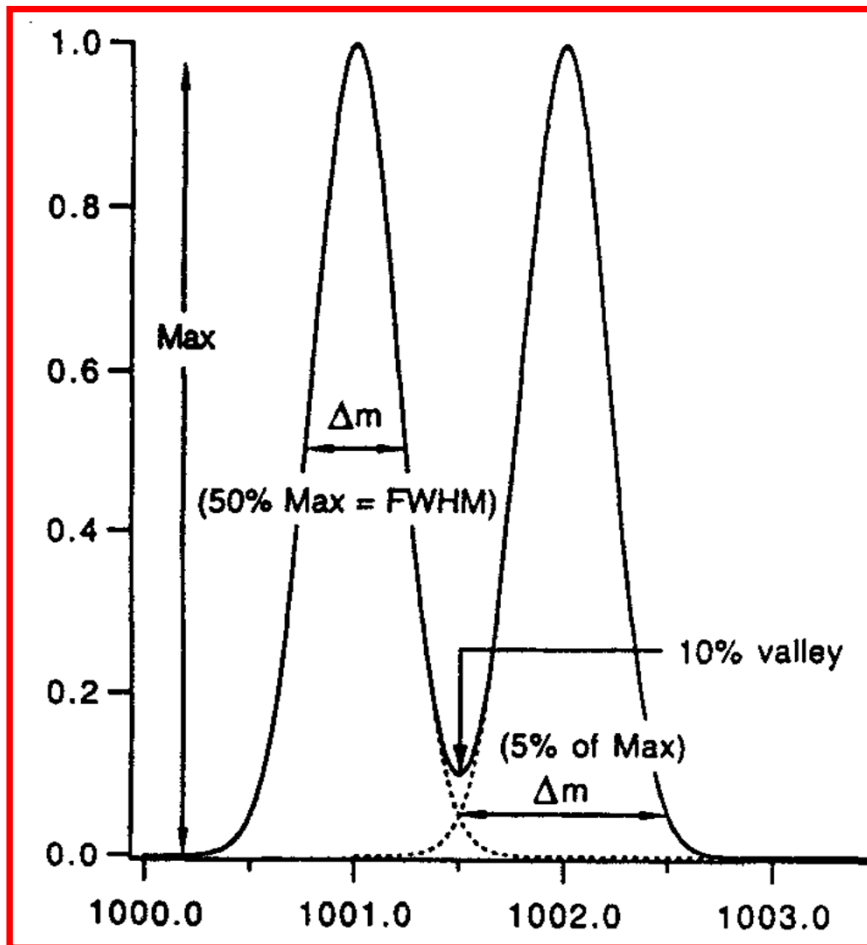
Základní parametry hmotnostních analyzátorů:

- **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/ $RP = m / \Delta m$

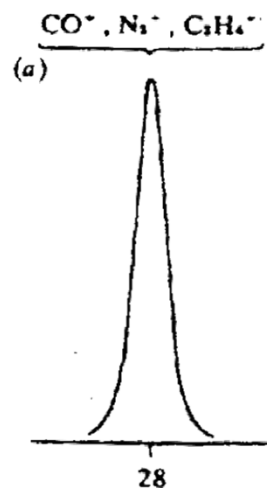
B/ $RP = m_1 / (m_2 - m_1)$

Rozlišovací schopnost (RP) vs. rozlišení (R)

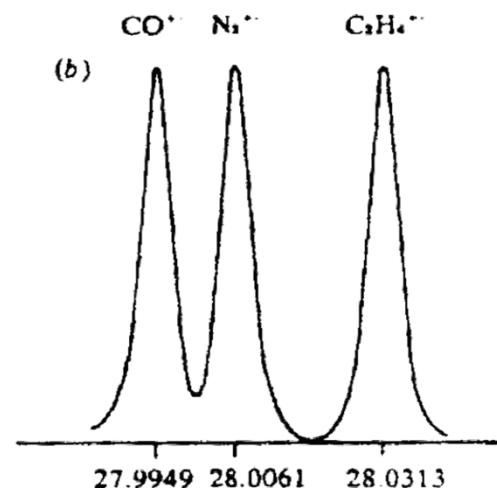
- někdy se u analyzátorů s nízkým rozlišením (kvadrupóly, iontové pasti) používá **rozlišení** (Resolution) místo rozlišovací schopnosti (Resolving Power)
- rozlišení je vyjádřeno např. jako jednotkové rozlišení (typické pro kvadrupóly) nebo rozlišení $0.1 - 0.3 \Delta m/z$ (typické pro iontové pasti)
- 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
- 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)

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)



nízká RP

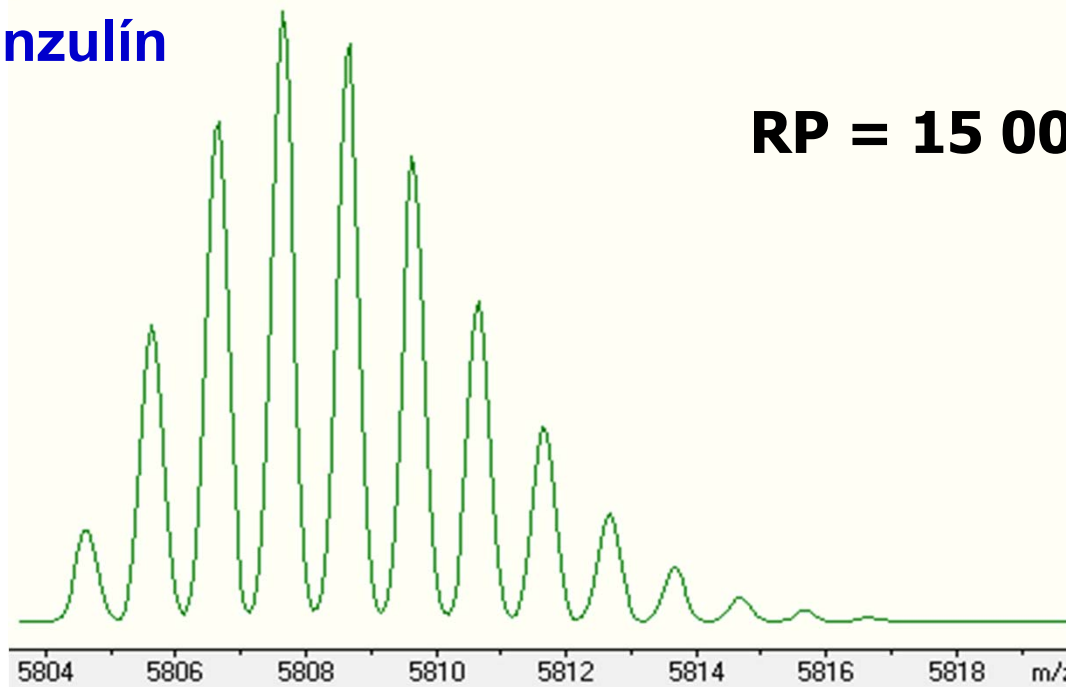


vysoká RP

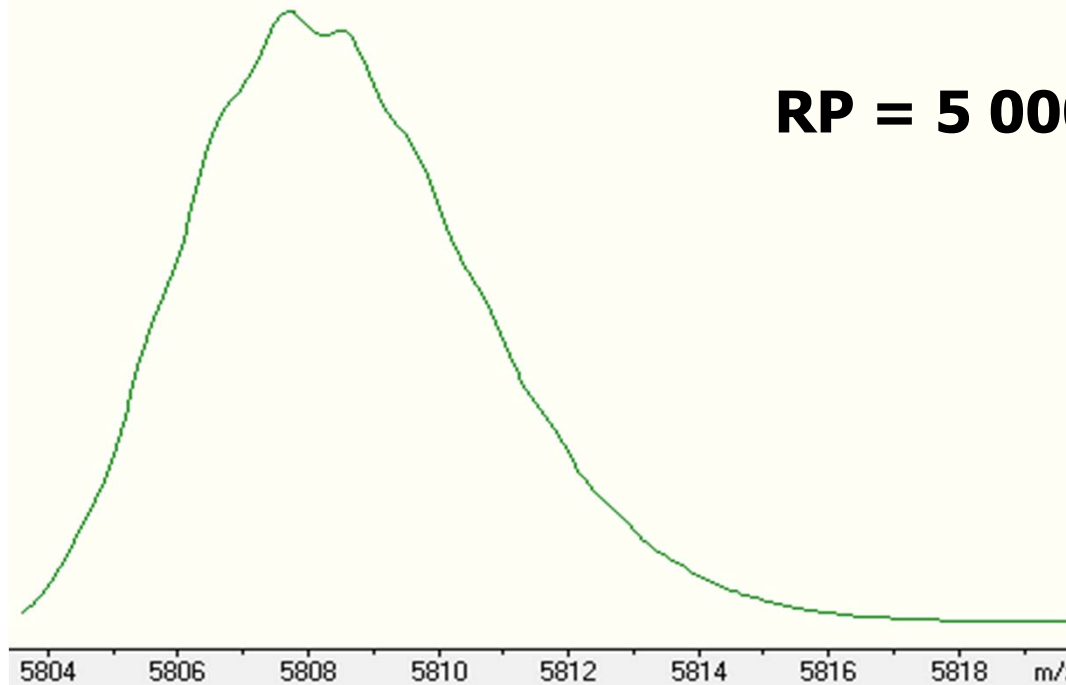
Vysoká a nízká rozlišovací schopnost

Inzulín

RP = 15 000



RP = 5 000



Správnost určení hodnoty m/z (Mass Accuracy)

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

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

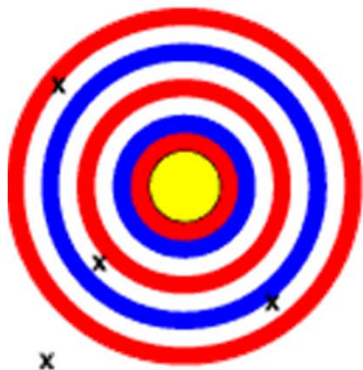
$$\text{Správnost určení m/z} = \frac{300.0463 - 300.0473}{300.0473} * 10^6 = -3.3 \text{ ppm (včetně znaménka!)}$$

- 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

Přesnost vs. Správnost

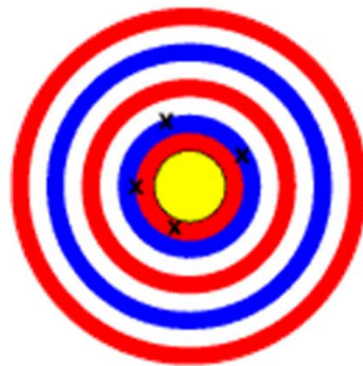
- **přesnost** (precision) - vyjadřuje rozptyl jednotlivých měření
- **správnost** (accuracy) - vyjadřuje, jak blízko je měření pravdivé hodnotě

nepřesné
nesprávné



Low Accuracy
Low Precision

nepřesné
správné



High Accuracy
Low Precision

přesné
nesprávné



Low Accuracy
High Precision

přesné
správné



High Accuracy
High Precision

Typické parametry hmotnostních analyzátorů

- typické parametry LC/MS hmotnostních analyzátorů - leden 2012

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

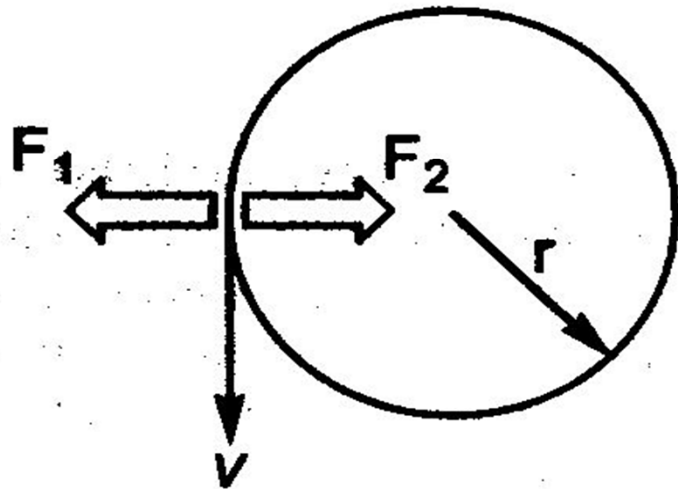
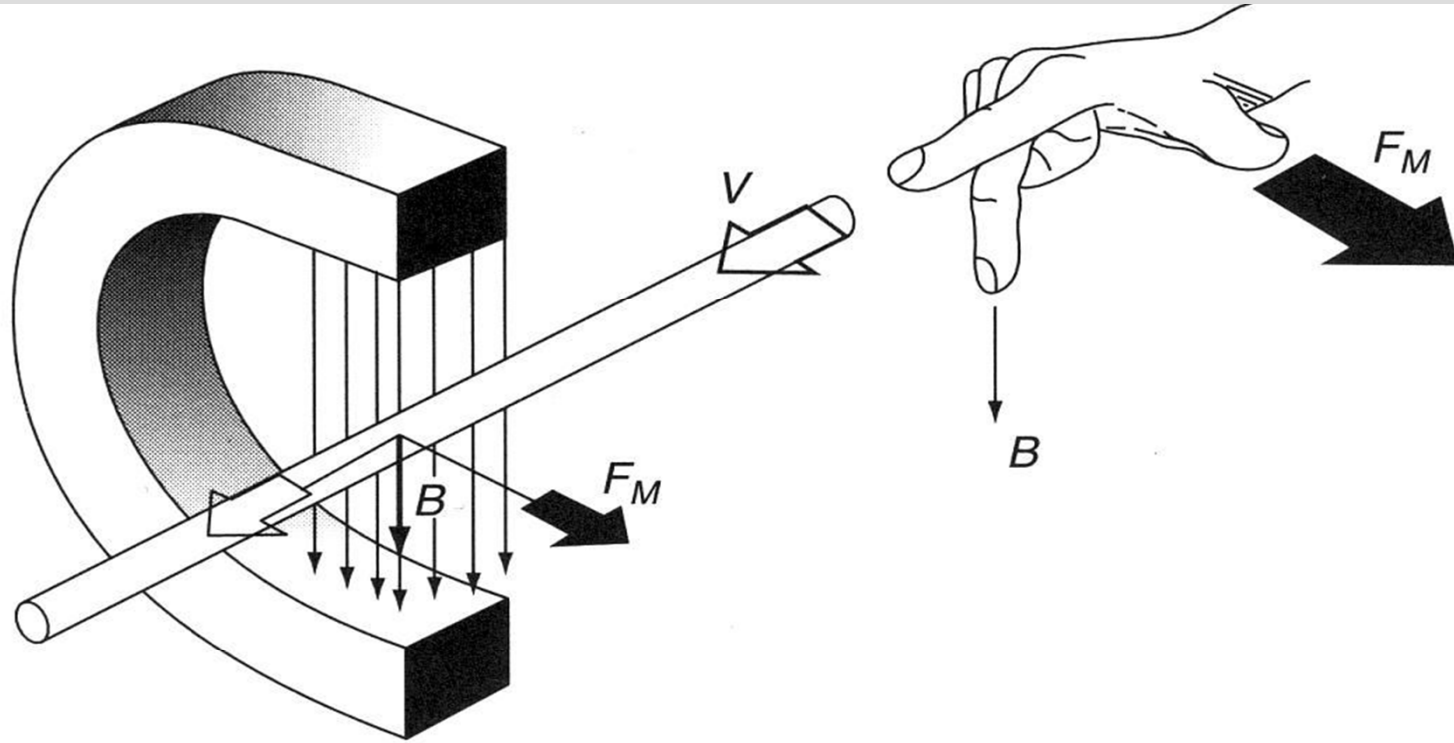
- rozdělení hmotnostních analyzátorů

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

Magnetický sektorový analyzátor

- 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

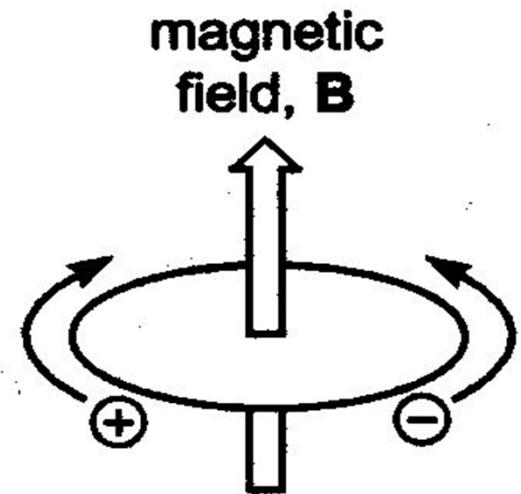


F_1 = Lorentz force, evB

F_2 = centripetal force, $\frac{mv^2}{r}$

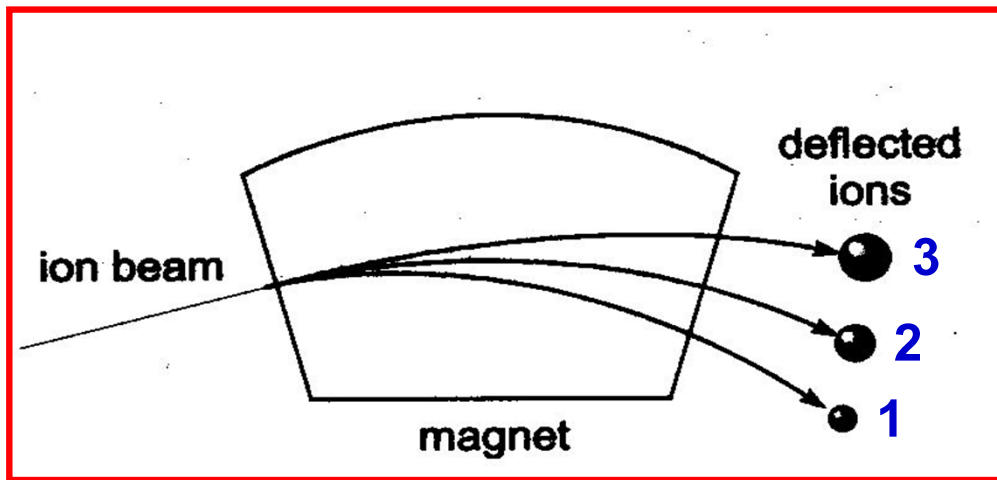
$$F_1 = F_2$$
$$evB = \frac{mv^2}{r}$$

$$\frac{eB}{m} = \frac{v}{r}$$

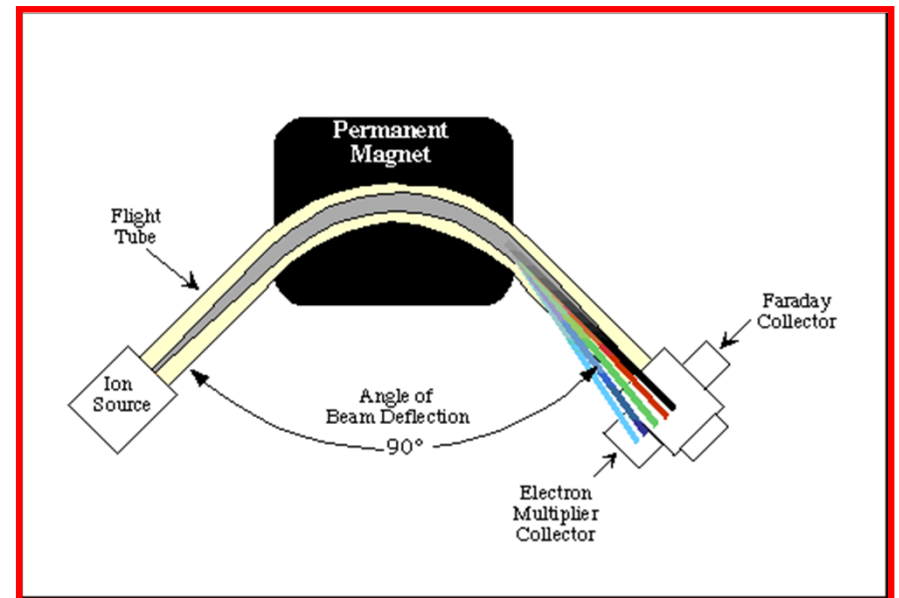


Magnetický sektorový analyzátor s jednoduchou fokusací iontů

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 $z.V$ získanou v urychlujícím elektrickém poli, takže platí:

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

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

$$B.z.v = m.v^2/r$$

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

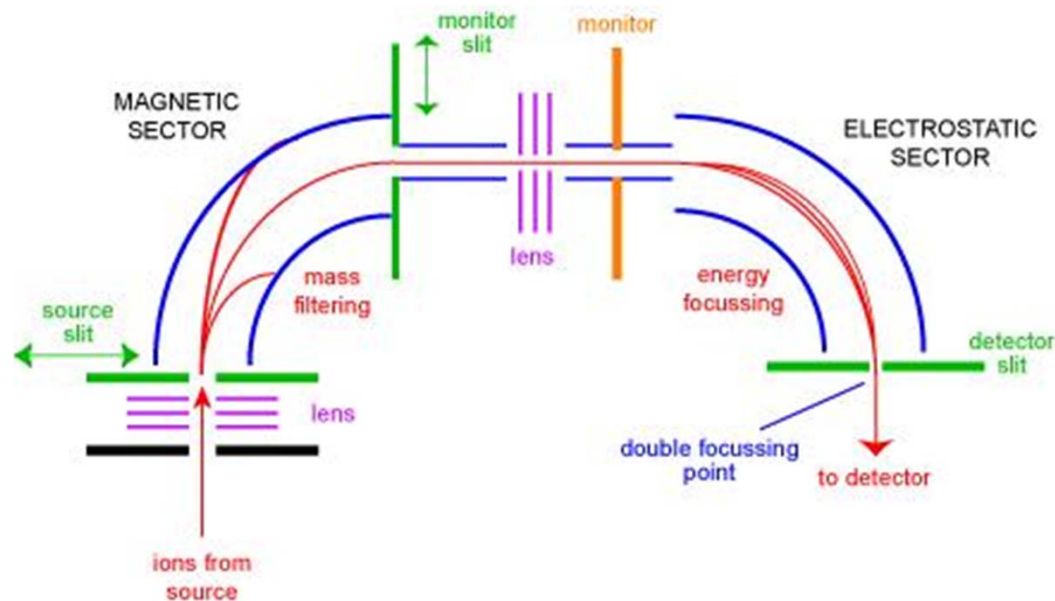
$$m/z = B^2 \cdot r^2 / 2.V$$

- 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:

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

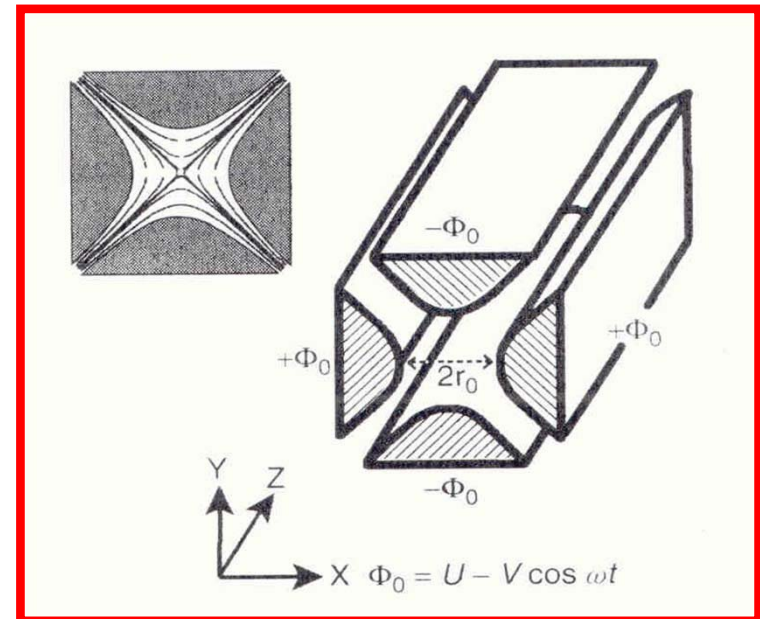
- řešením rovnice získáme vztah pro poloměr zakřivení trajektorie v elektrickém poli:

$$r = 2.V/E$$

- 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

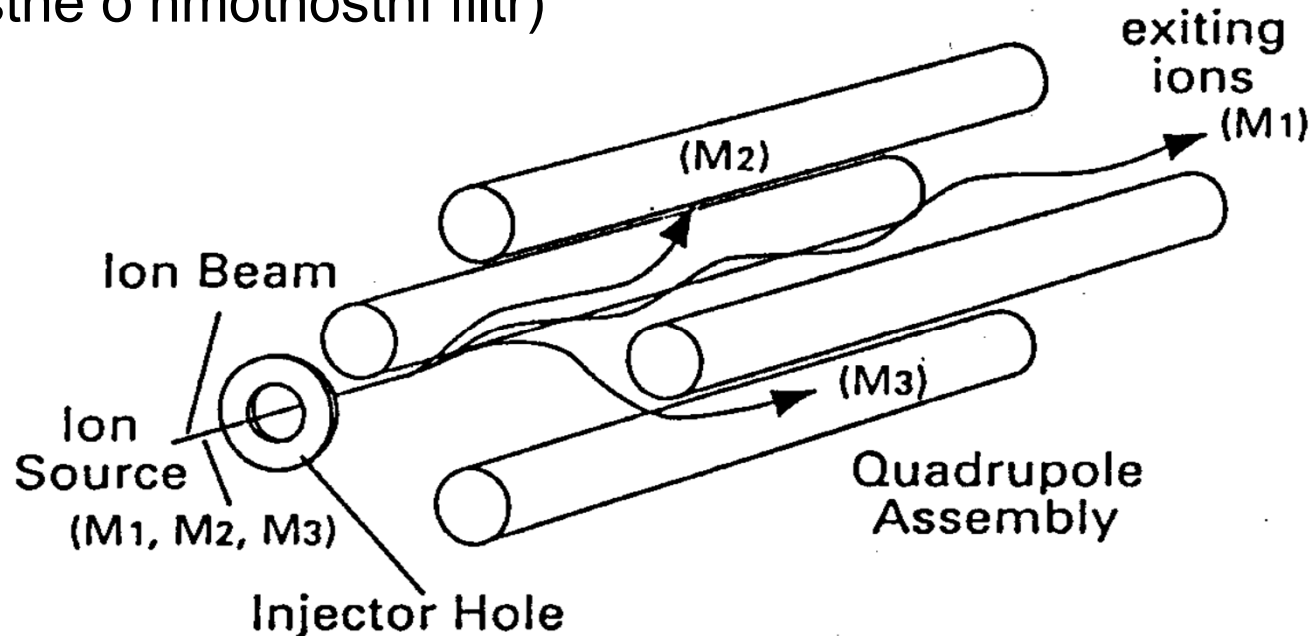
Kvadrupólový analyzátor

- 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 dvojice 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*):

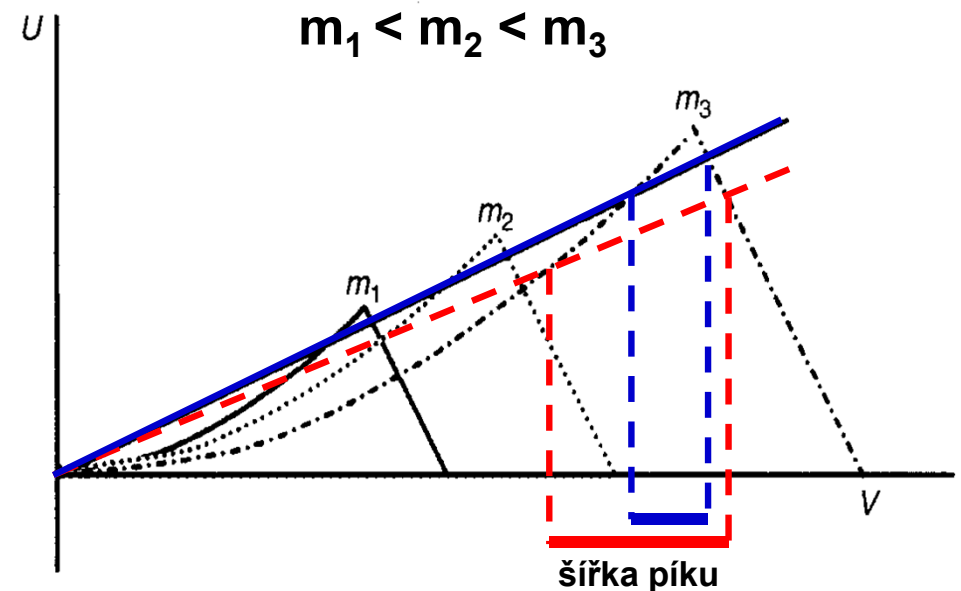
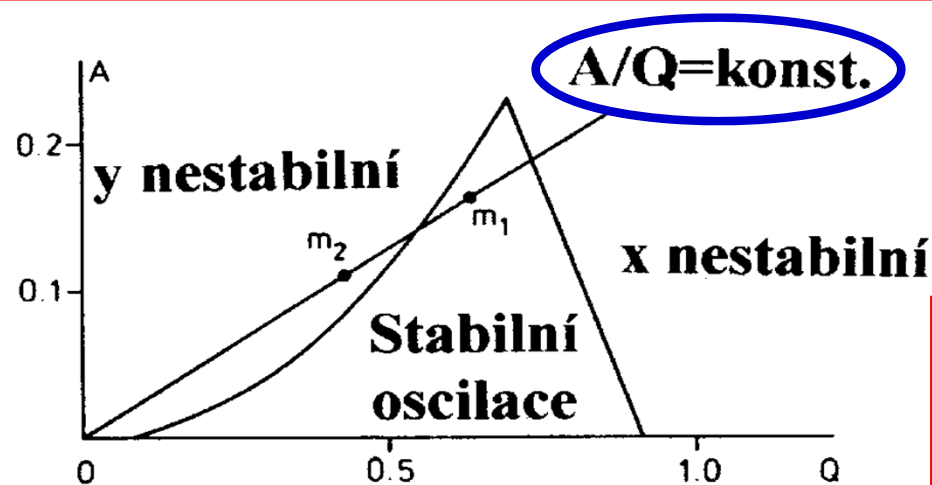
$$a_u = a_x = -a_y = (8zeU) / (mw^2r_0^2), q_u = q_x = -q_y = (4zeV) / (mw^2r_0^2),$$

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

- 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



Kvadrupólový analyzátor

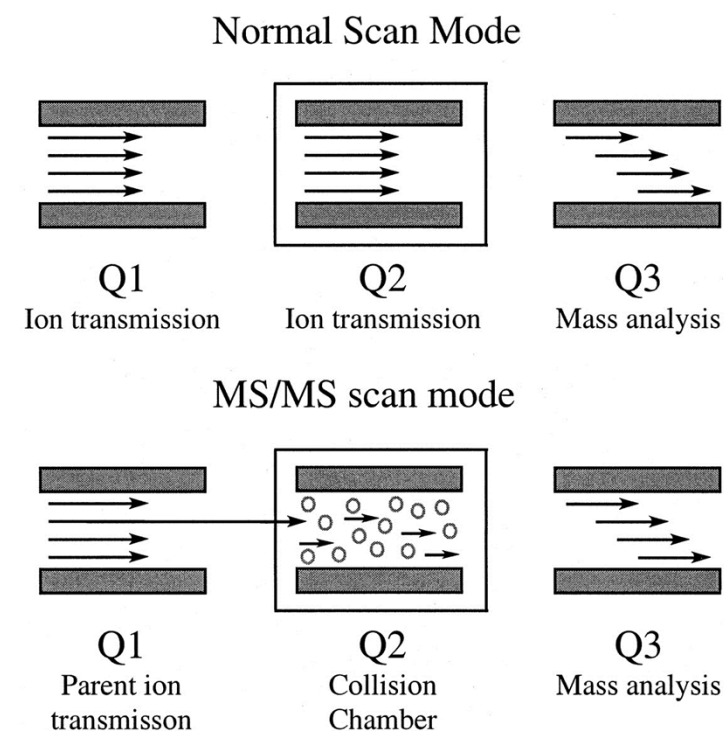
- pro maximální RP je optimální hyperbolický průřez, poskytuje vyšší rozlišení, ale kvůli technické náročnosti výroby se v praxi příliš neuplatnilo

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 čas (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)

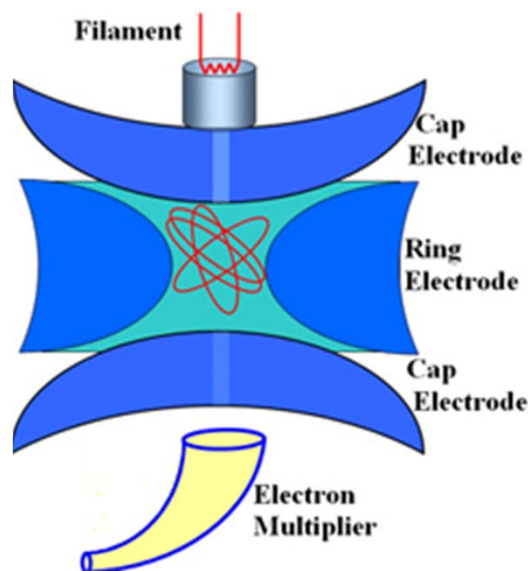
Trojité kvadrupólový analyzátor (Triple Quadrupole, QqQ)

- 3 kvadrupóly řazený 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 MS^3 by bylo nutné spojit 5 kvadrupólů za sebou QqQqQ, prakticky se nepoužívá; pro MS^n do vyššího stupně než MS^2 jsou vhodnější analyzátory na principu pastí

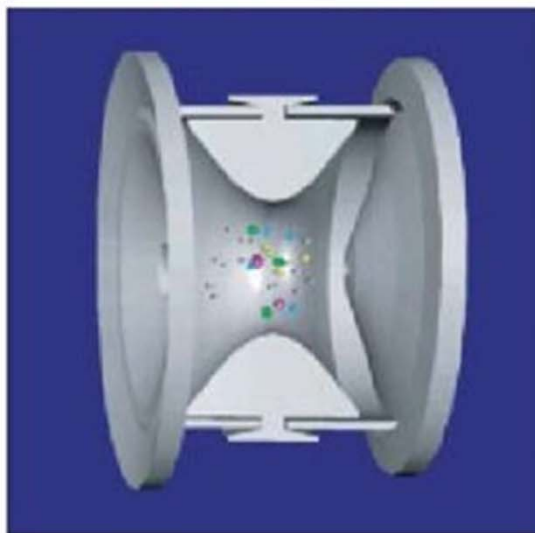


3D Iontová past

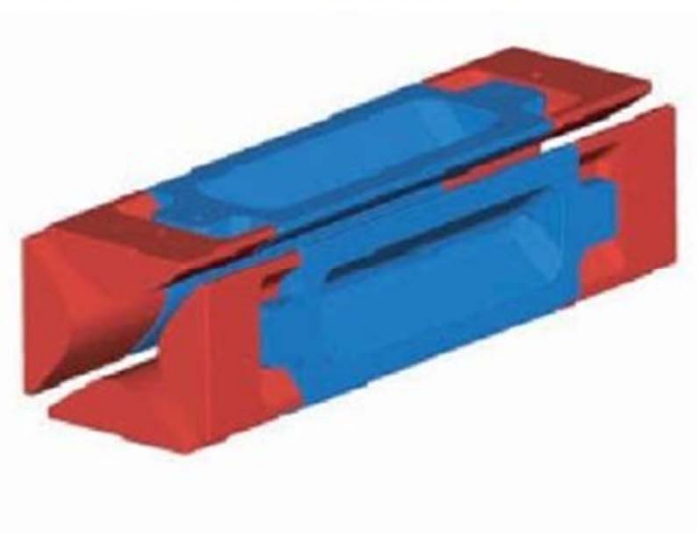
- R: obecně jednotkové rozlišení (některé přístroje s RP do 4 000 až 20 000)
- správnost určení hmotnosti: nízká (0.1 u)
- hmotnostní rozsah: do 3 000 (6 000)
- skenovací rychlost: až 10 Hz
- možnost **MSⁿ experimentů** - strukturní informace
- levný analyzátor



3D quadrupole ion trap

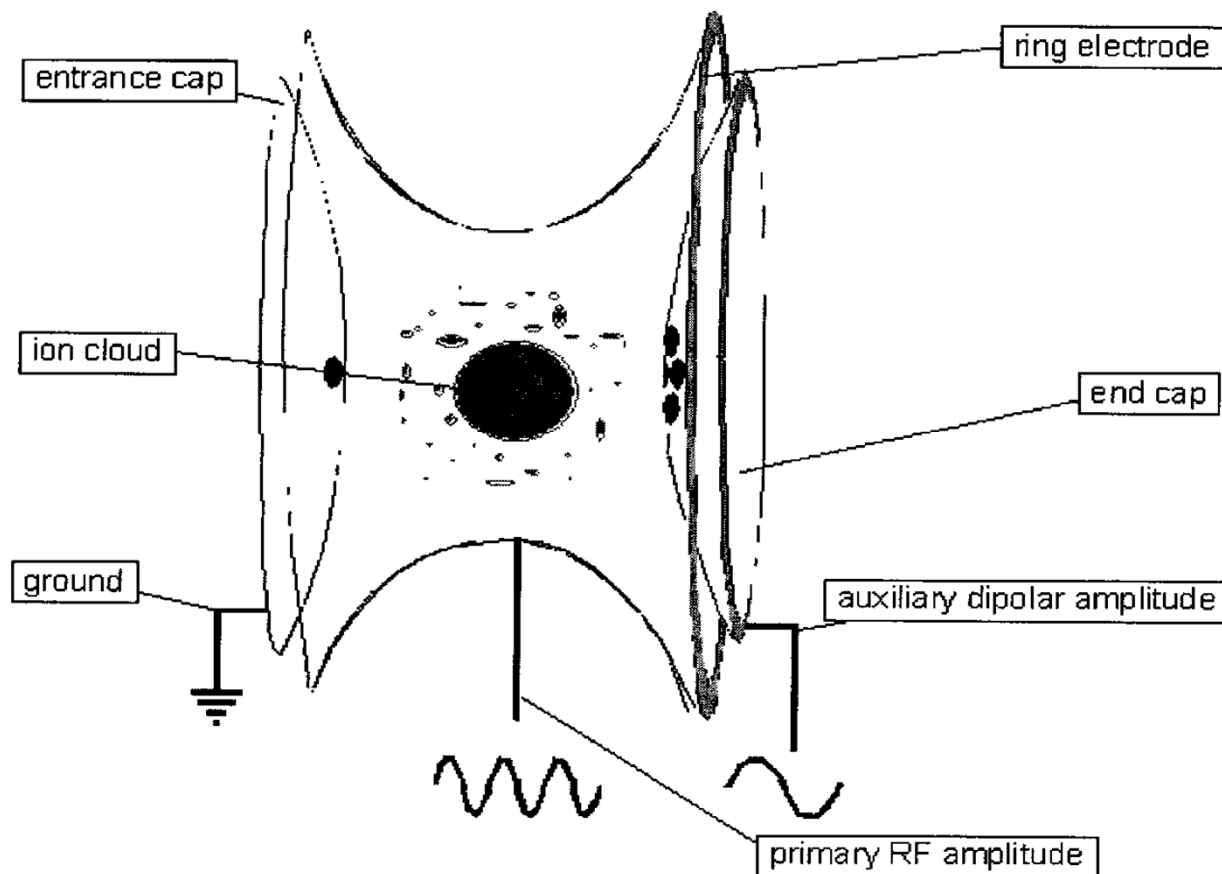


2D linear quadrupole ion trap



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 vloženého 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



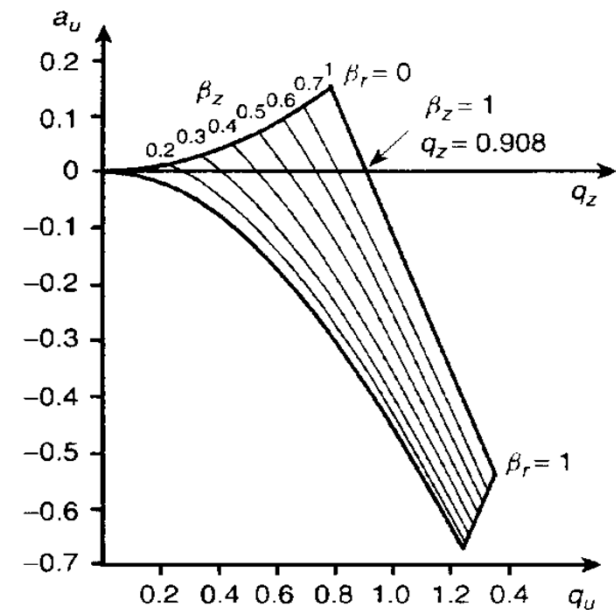
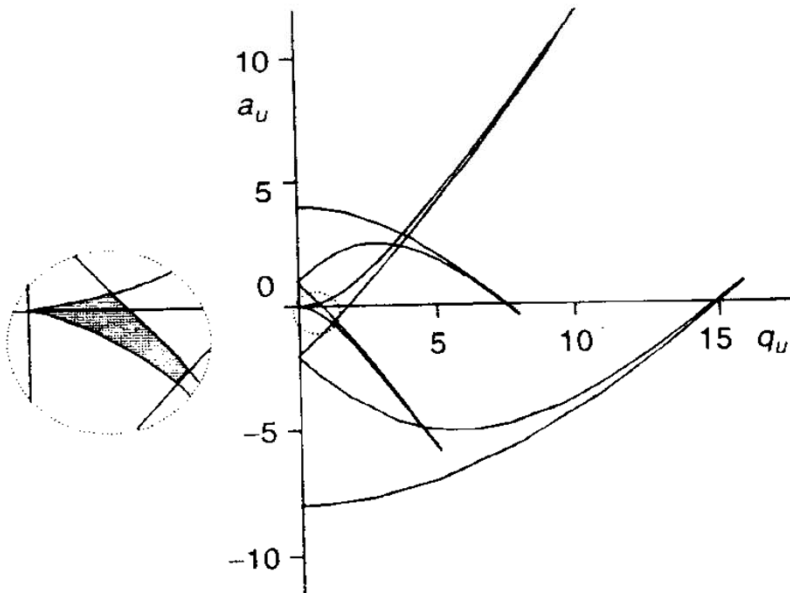
3D Iontová past

- 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



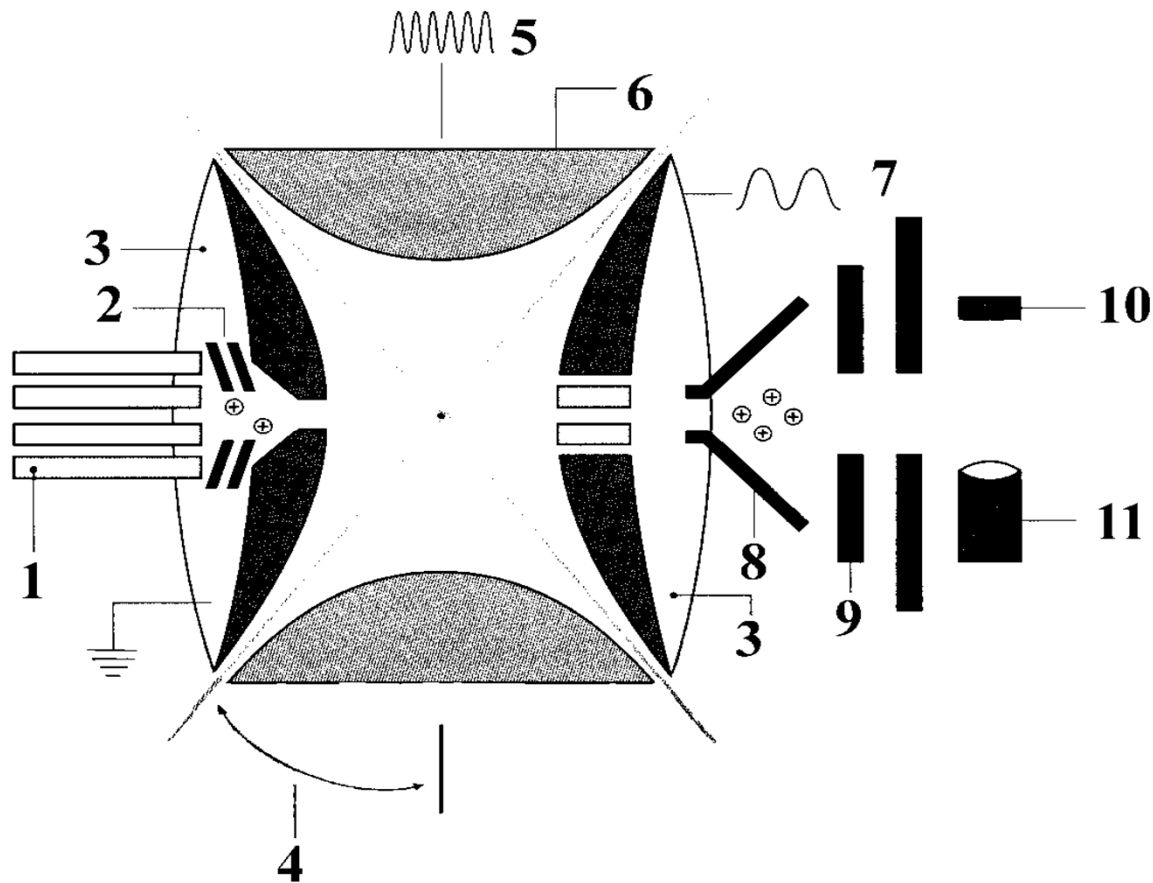
Nestabilní oscilace



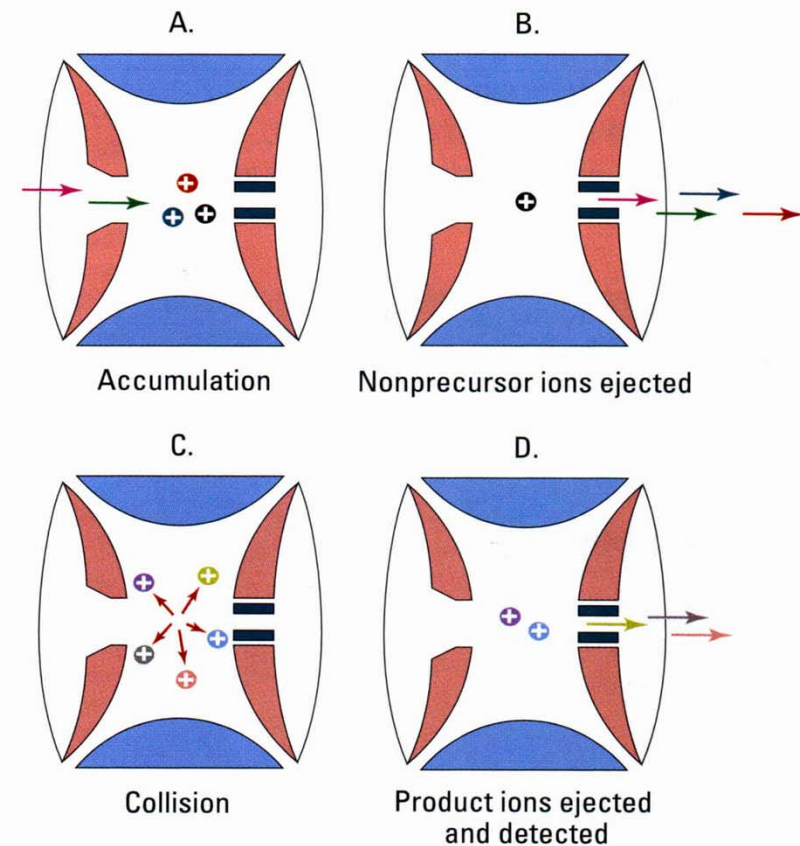
3D Iontová past

- 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 zachytu 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
 - **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 Iontová past



MS/MS



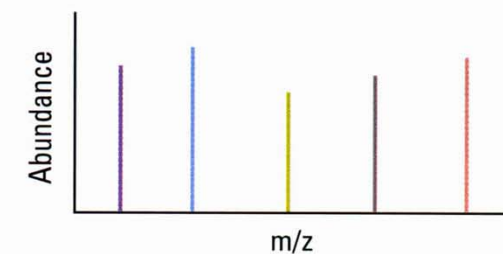
Animace:

1/ MS mód

2/ MS mód skenování

3/ Izolace pro MS/MS

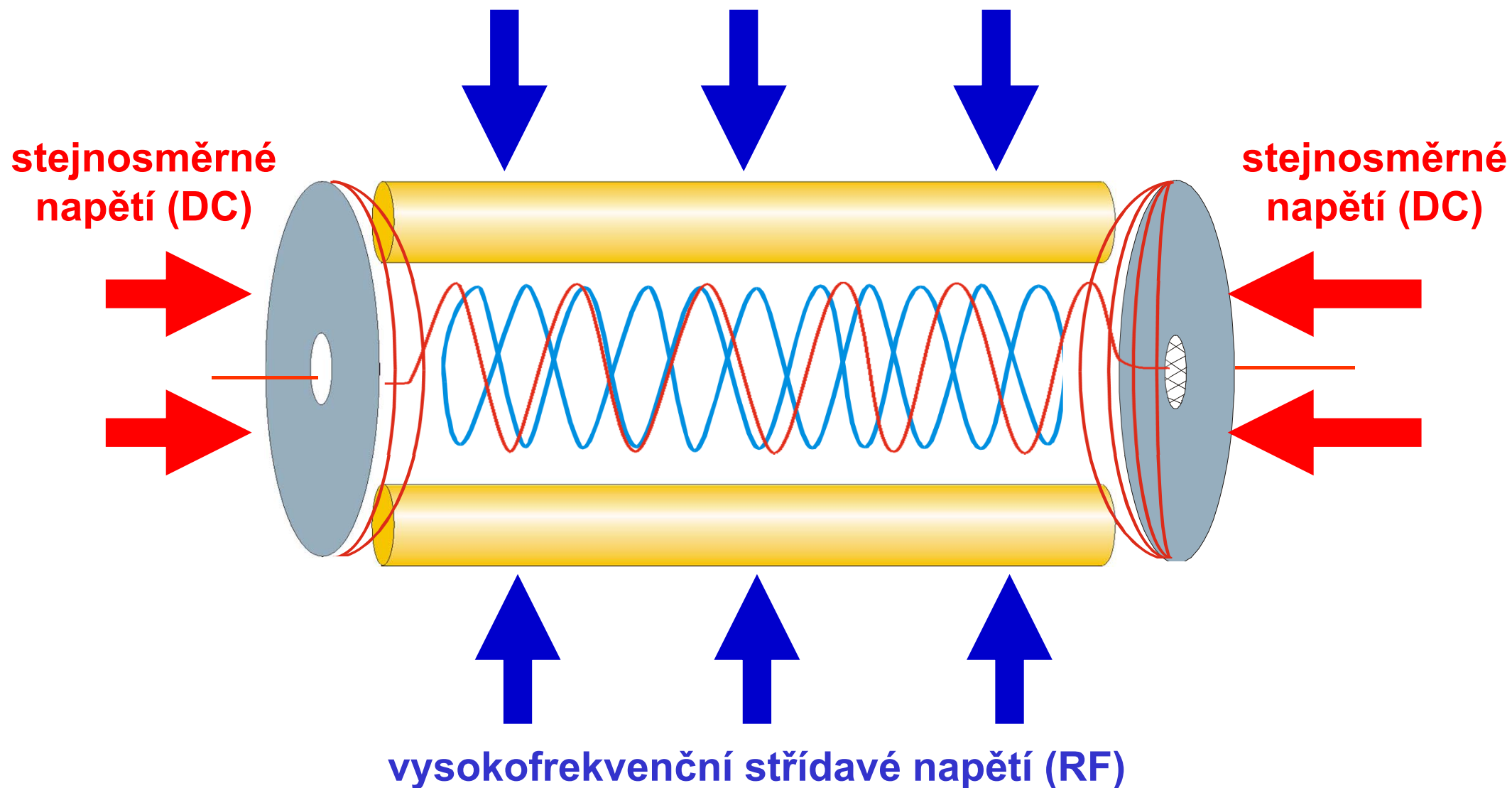
4/ CID-MS/MS



Lineární iontová past

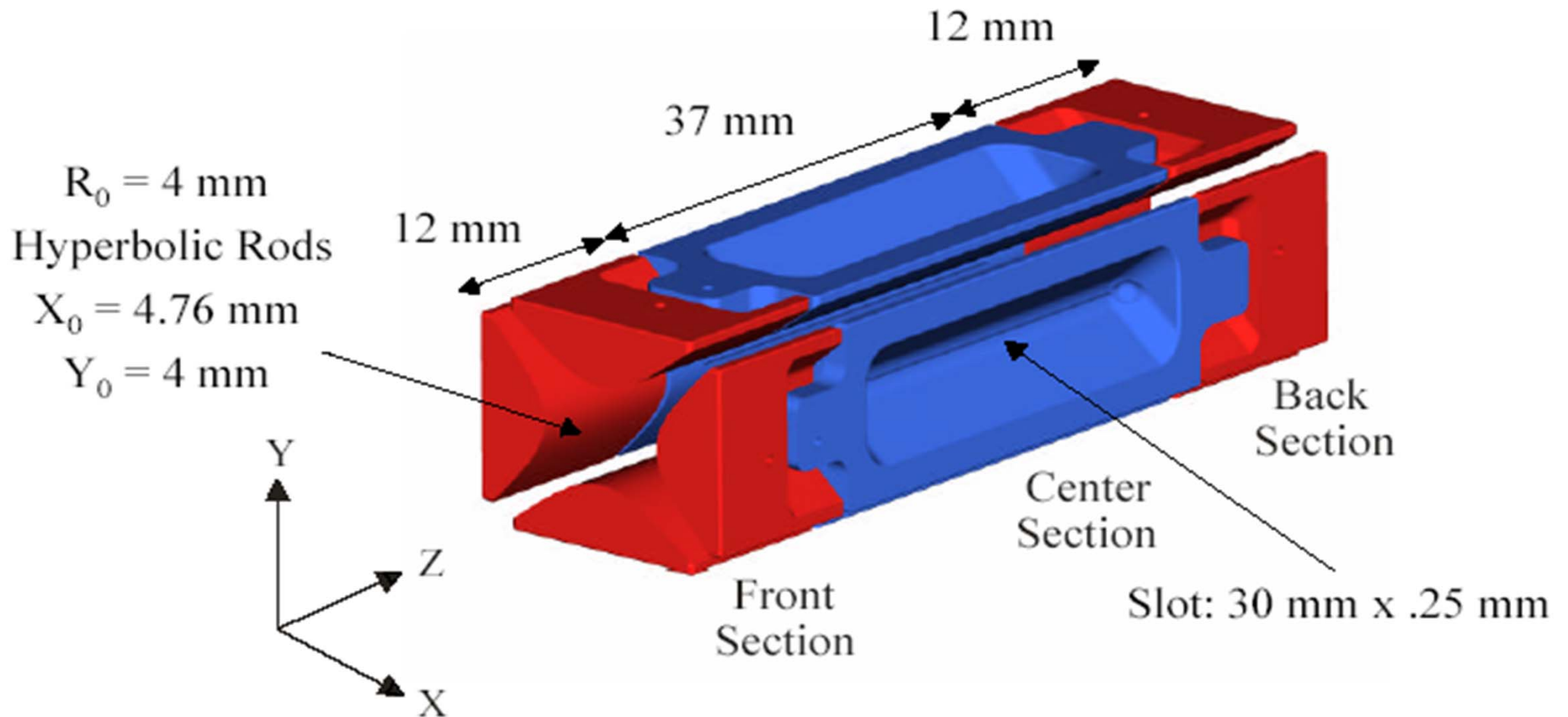
- jedná se v podstatě o kvadrupól na jehož koncích jsou umístěny elektrody s vloženým potenciálem, který umožňuje uchovávání iontů
- vyznačuje se **vyšokou kapacitou** (až 50x vyšší ve srovnání s 3D iontovou pastí)
 - méně náchylné ke vzniku prostorového náboje
 - vyšší lineární dynamický rozsah
- vyšší 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

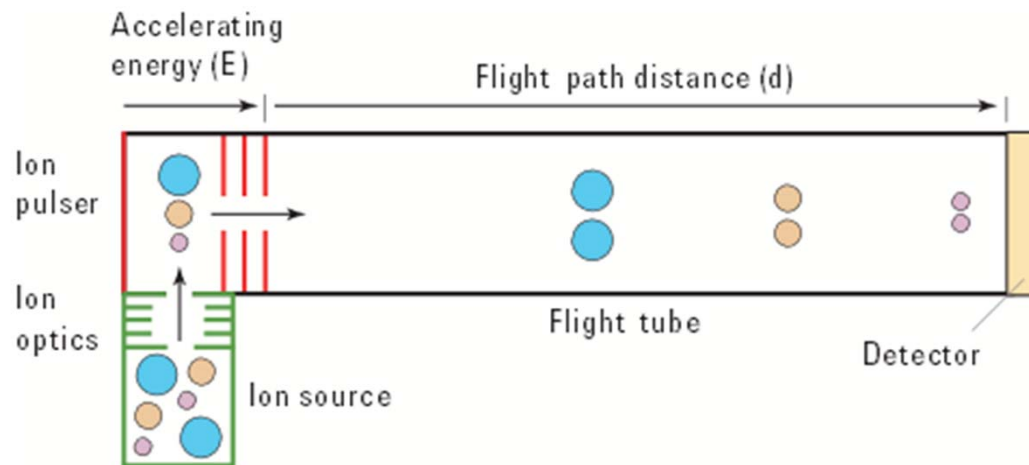
Animace



kvadrupólové tyče se segmenty

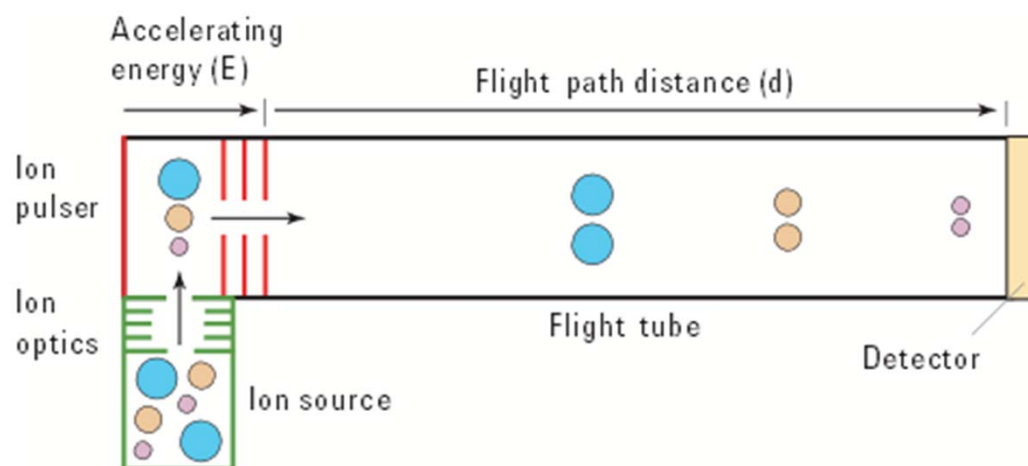
Analyzátor doby letu

- 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 typicky 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)

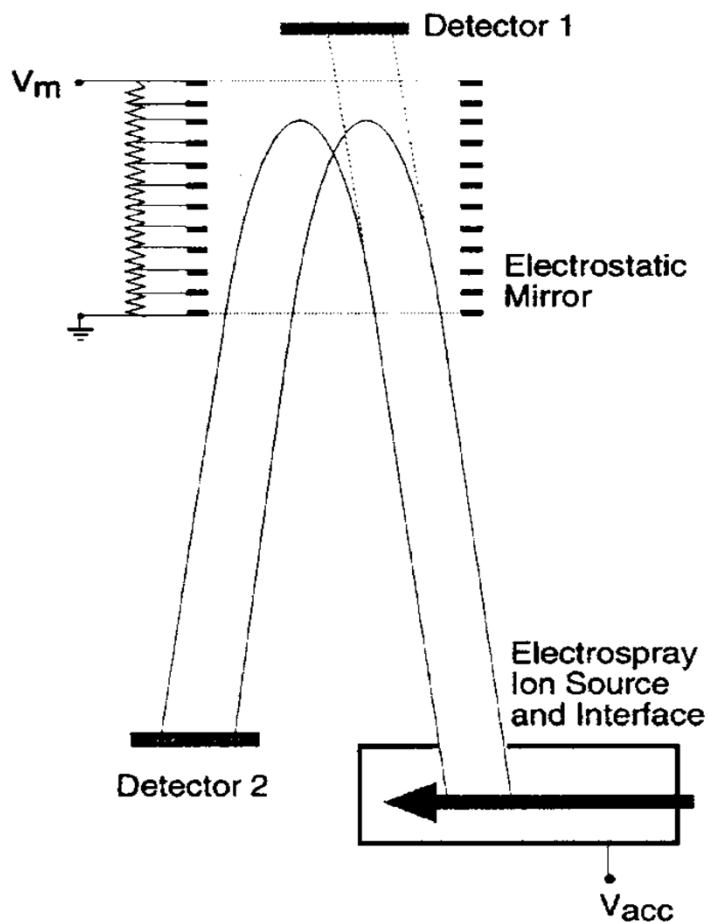
- použití tzv. iontového zrcadla neboli reflektoru, které slouží k vyrovnání různých kinetických energií pro ionty se stejnou hodnotou m/z (při ionizaci získají ionty kinetickou energii s určitou distribucí, což vede k rozšíření jejich píků a tím ke zhoršení RP)

2/ Opožděná extrakce iontů (Delayed Extraction)

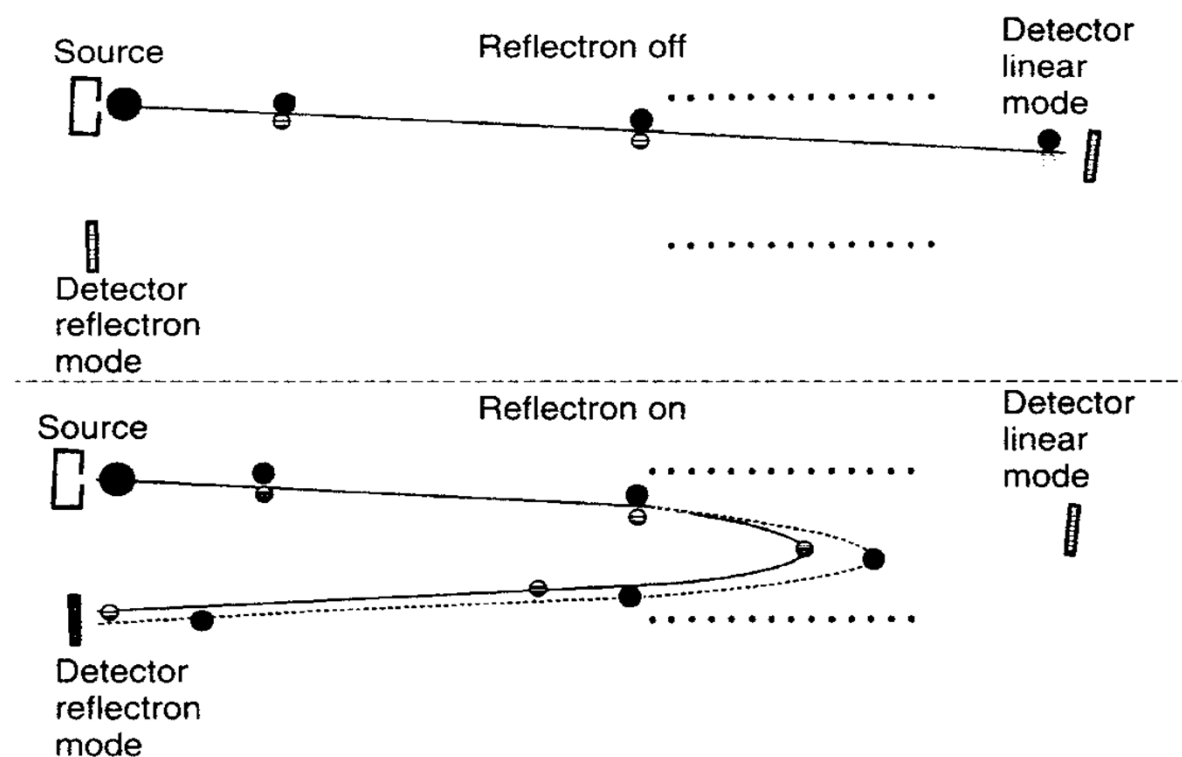
- ionty jsou z MALDI zdroje extrahovány s malým zpožděním, čímž dojde díky vzájemným srážkám ke sjednocení jejich kinetických energií

Princip iontového 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

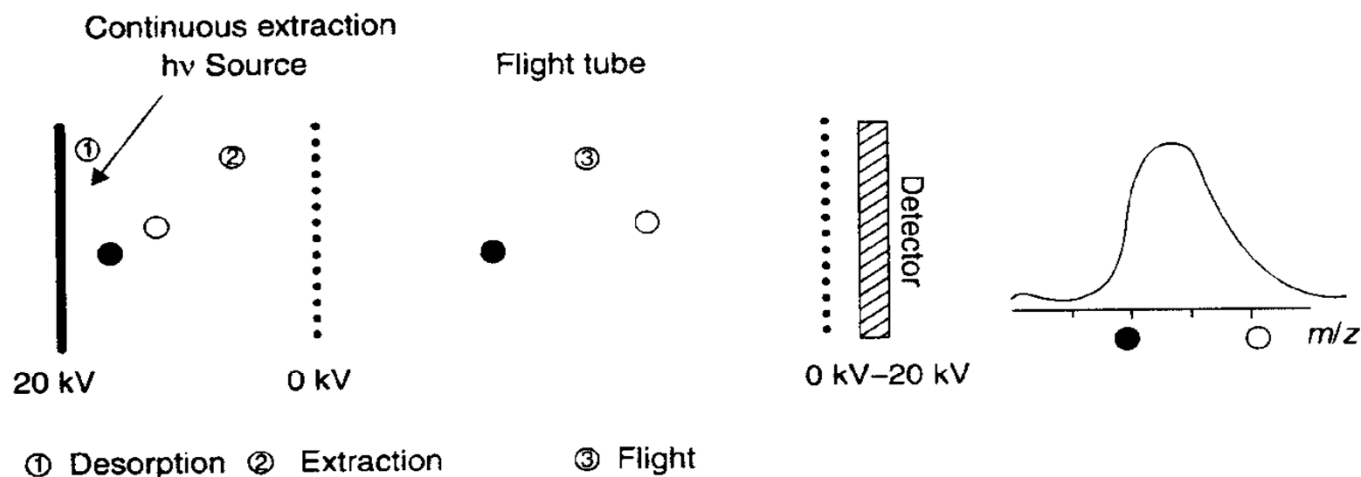


Animace

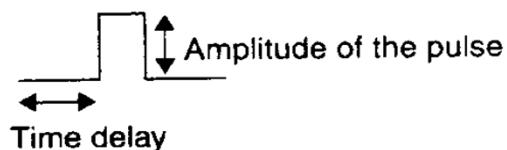
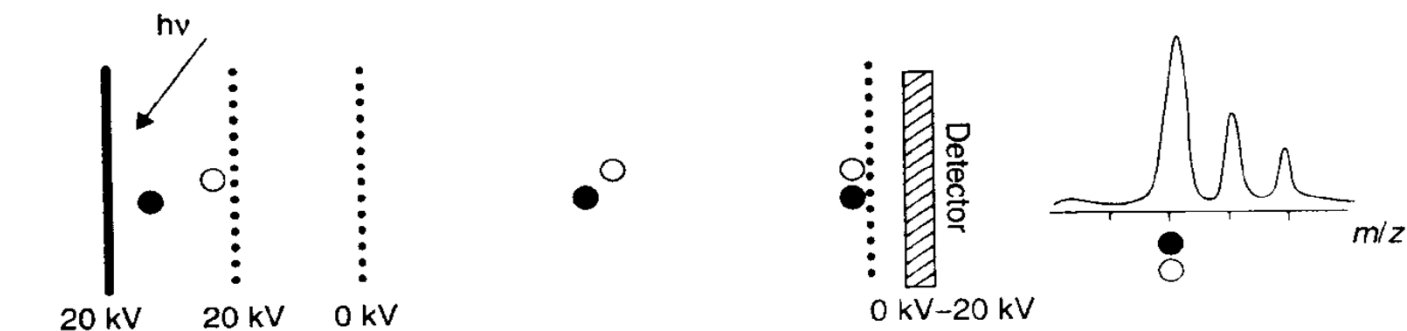


Opožděná extrakce iontů (Delayed Extraction)

- sjednocením kinetických energií dojde ke zvýšení rozlišení



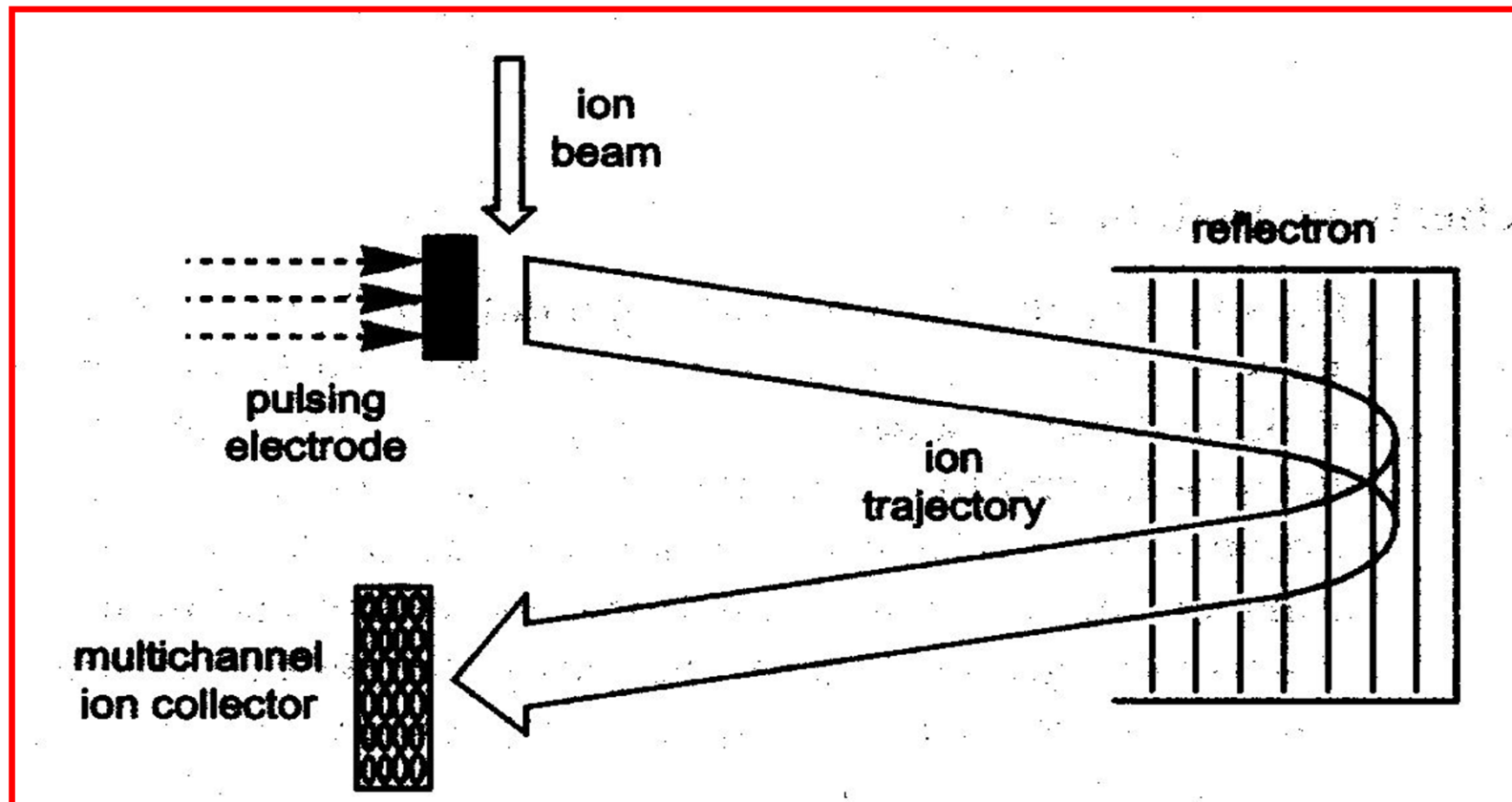
Delayed pulsed extraction



Animace

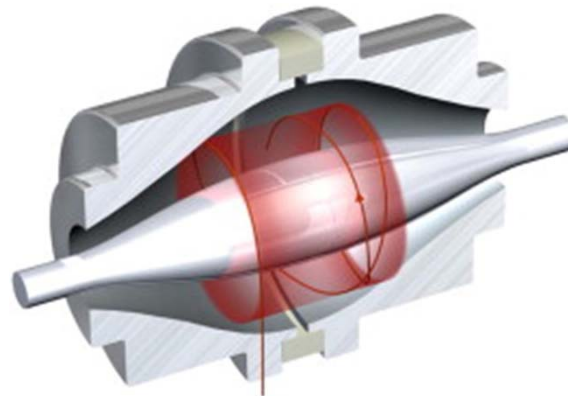
Ortogonalní TOF analyzátor

- typické pro spojení s API ionizačními technikami, kde je kontinuální zdroj iontů (při MALDI ionizaci vzniká 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

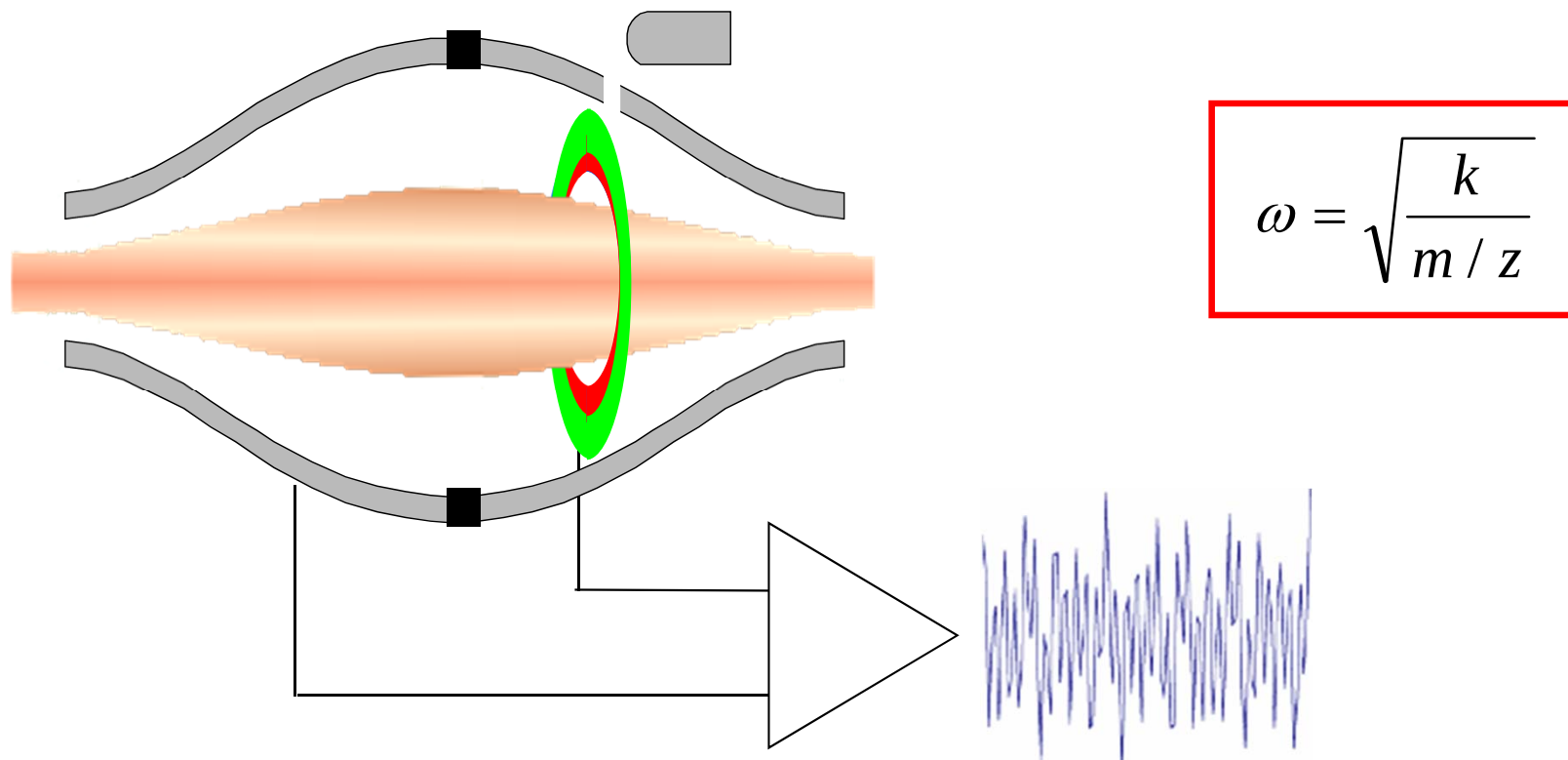


Elektrostatická orbitální past - Orbitrap

- 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

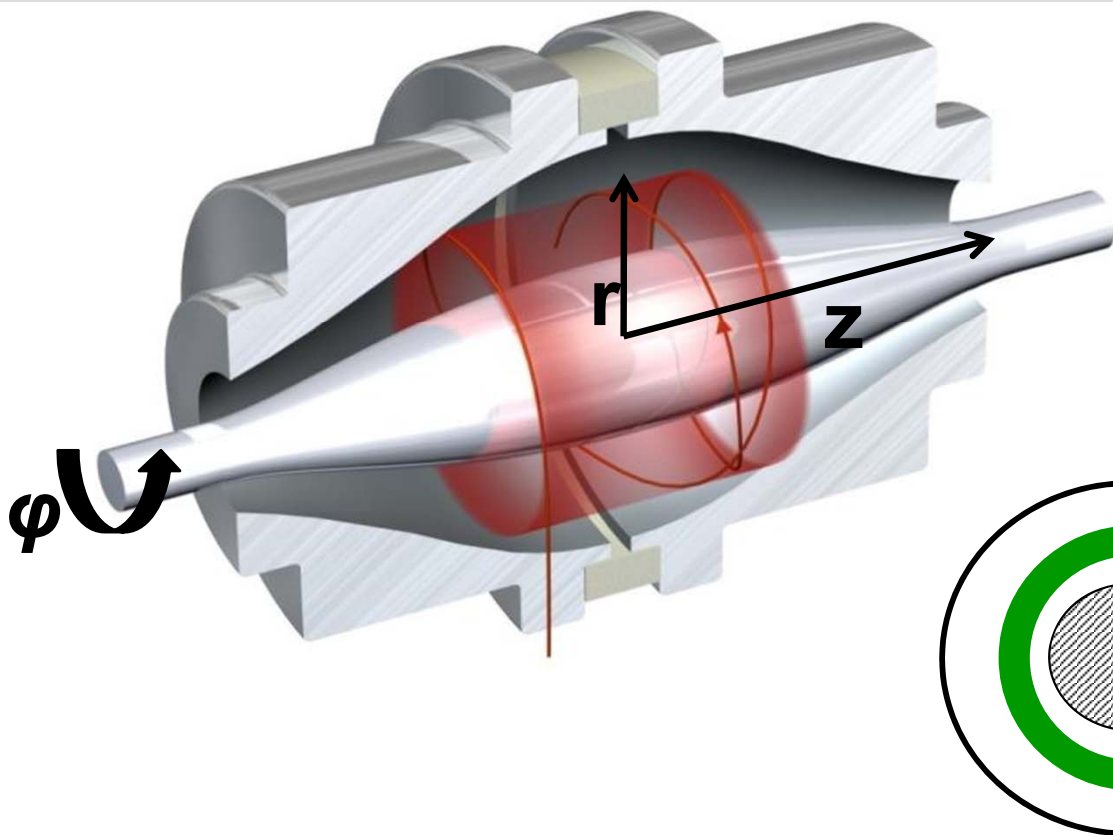


Orbitrap



- 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

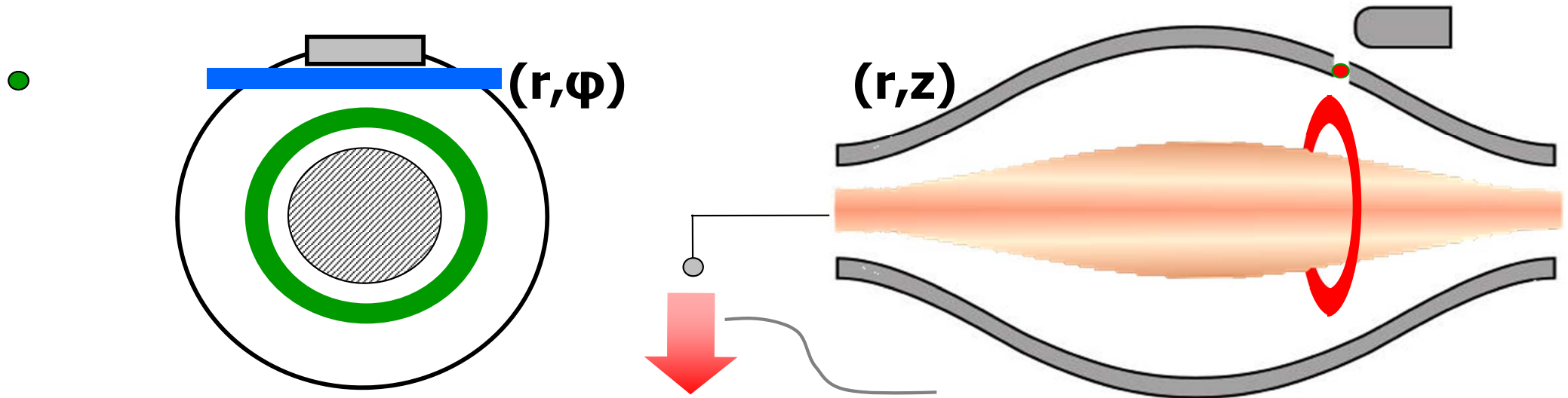
k ... zakřivení pole

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

- 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

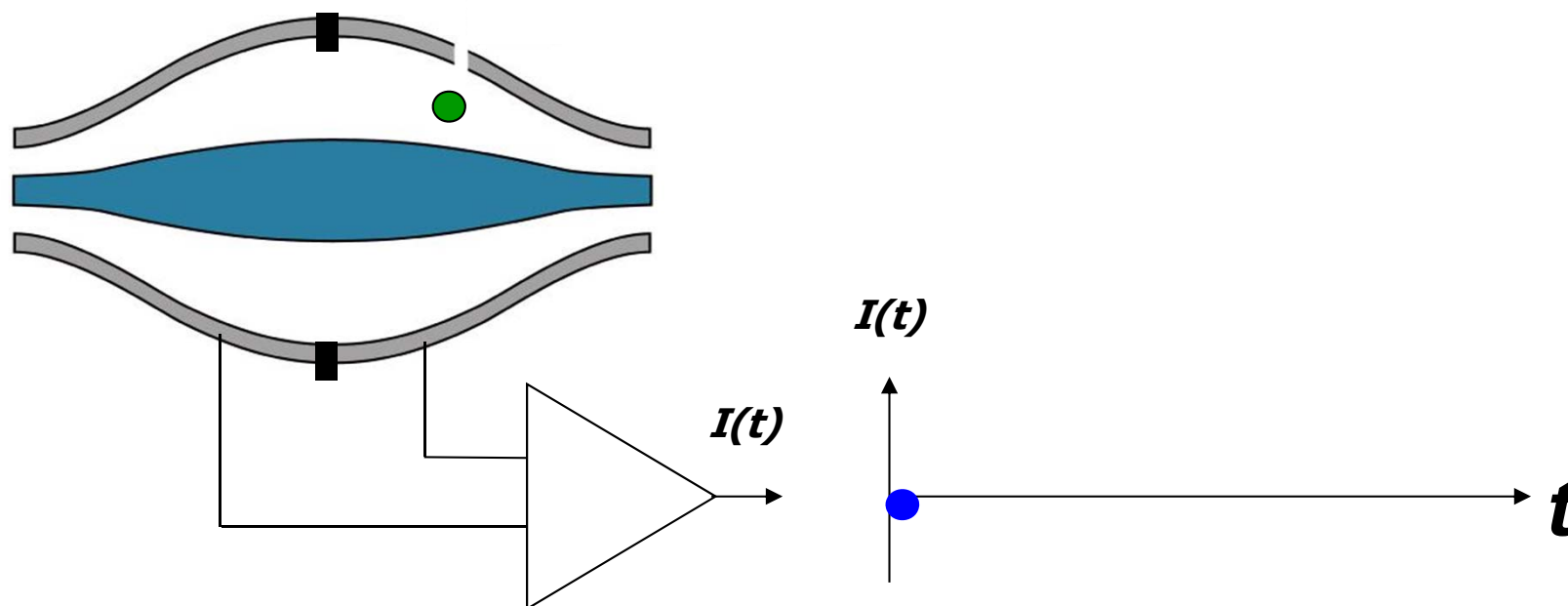
- úzký svazek iontů s určitou hodnotou m/z vstupuje do elektrického pole
- zvyšující se napětí stlačuje ionty
- stabilizuje se napětí a následně se stabilizují i trajektorie iontů
- úhlové rozšíření vytvoří rotující prstenec iontů (podobné jako prstence u planet)



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

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

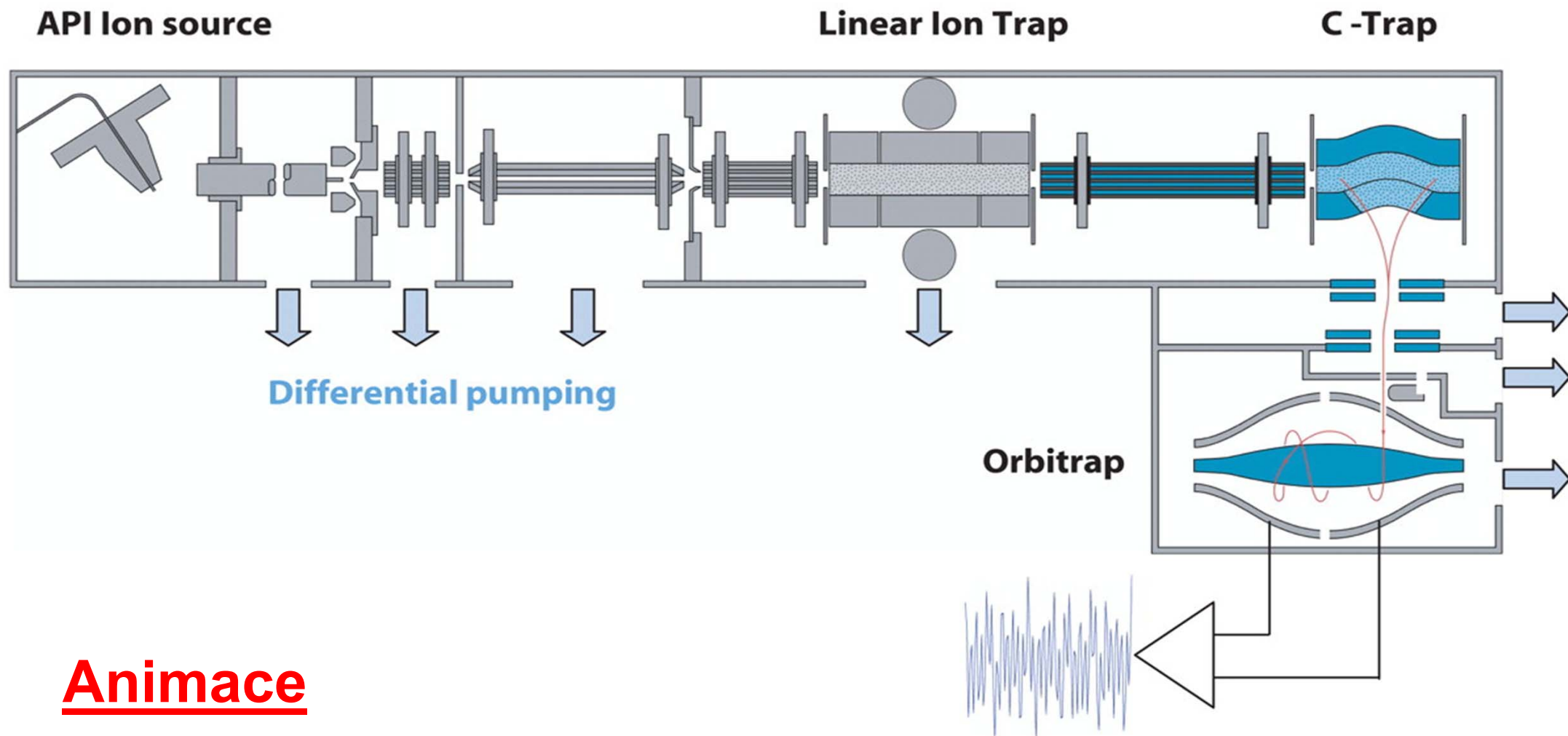
Detekce proudového obrazu (image current)



- 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

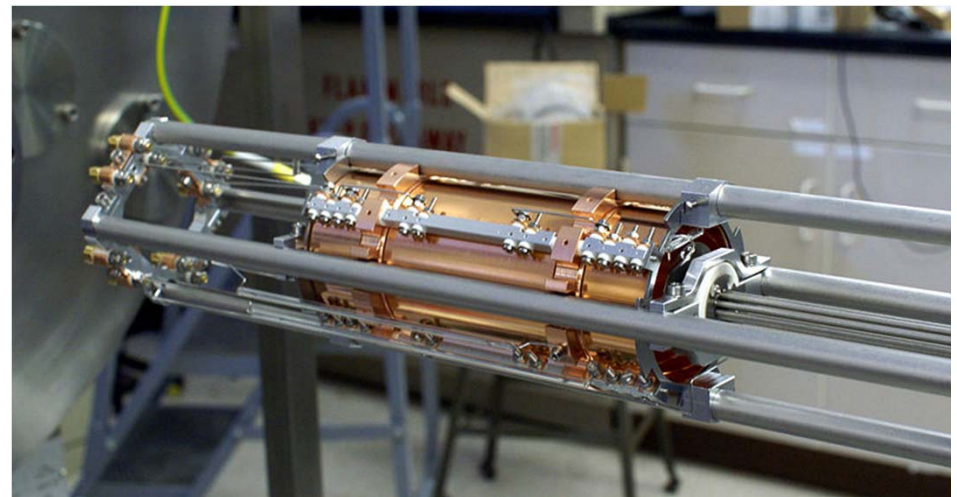
Linear Ion Trap Orbitrap Hybrid MS



Animace

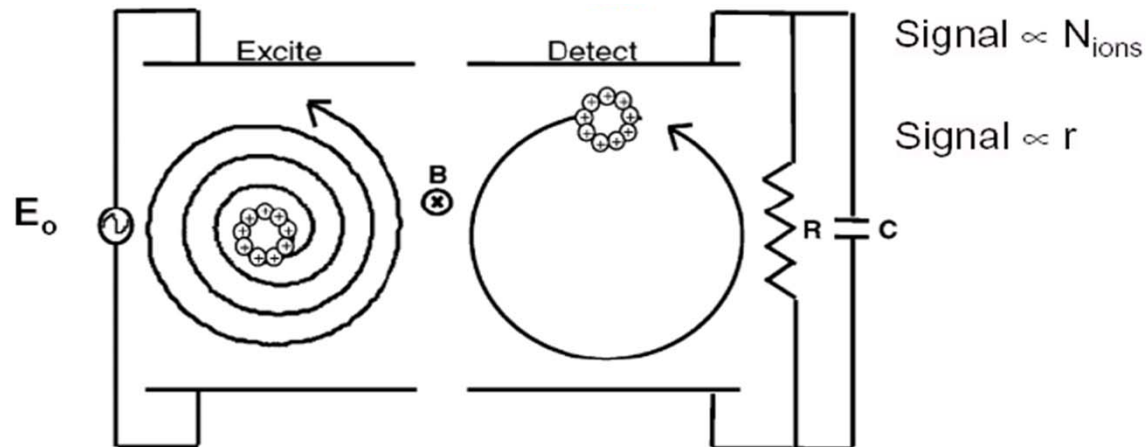
Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR)

- 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)

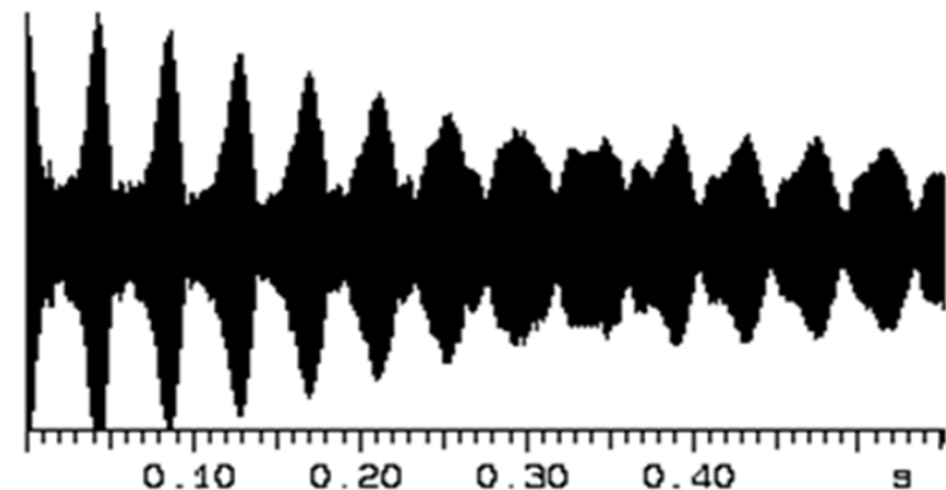


FT-ICR - princip

- 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

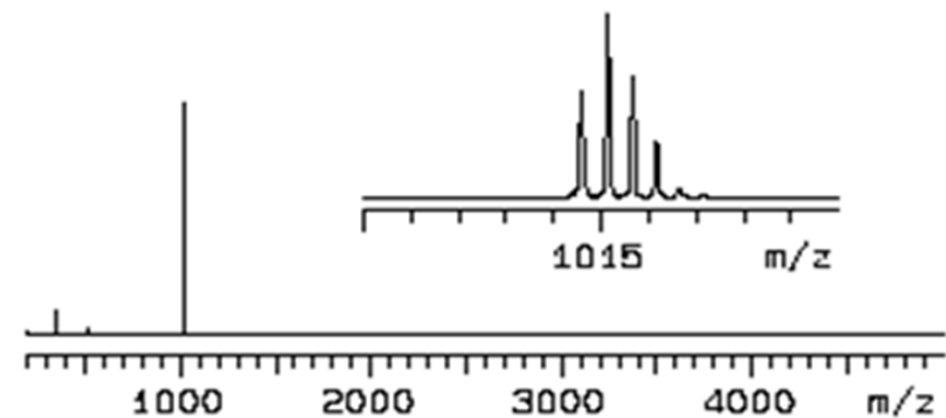
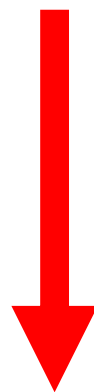


Fourierova transformace



závislost intenzity na čase
superpozice všech frekvencí iontů v cele

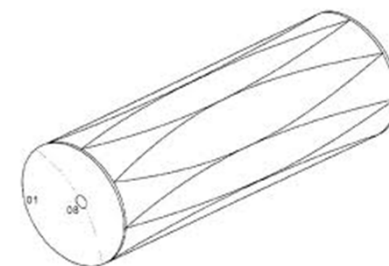
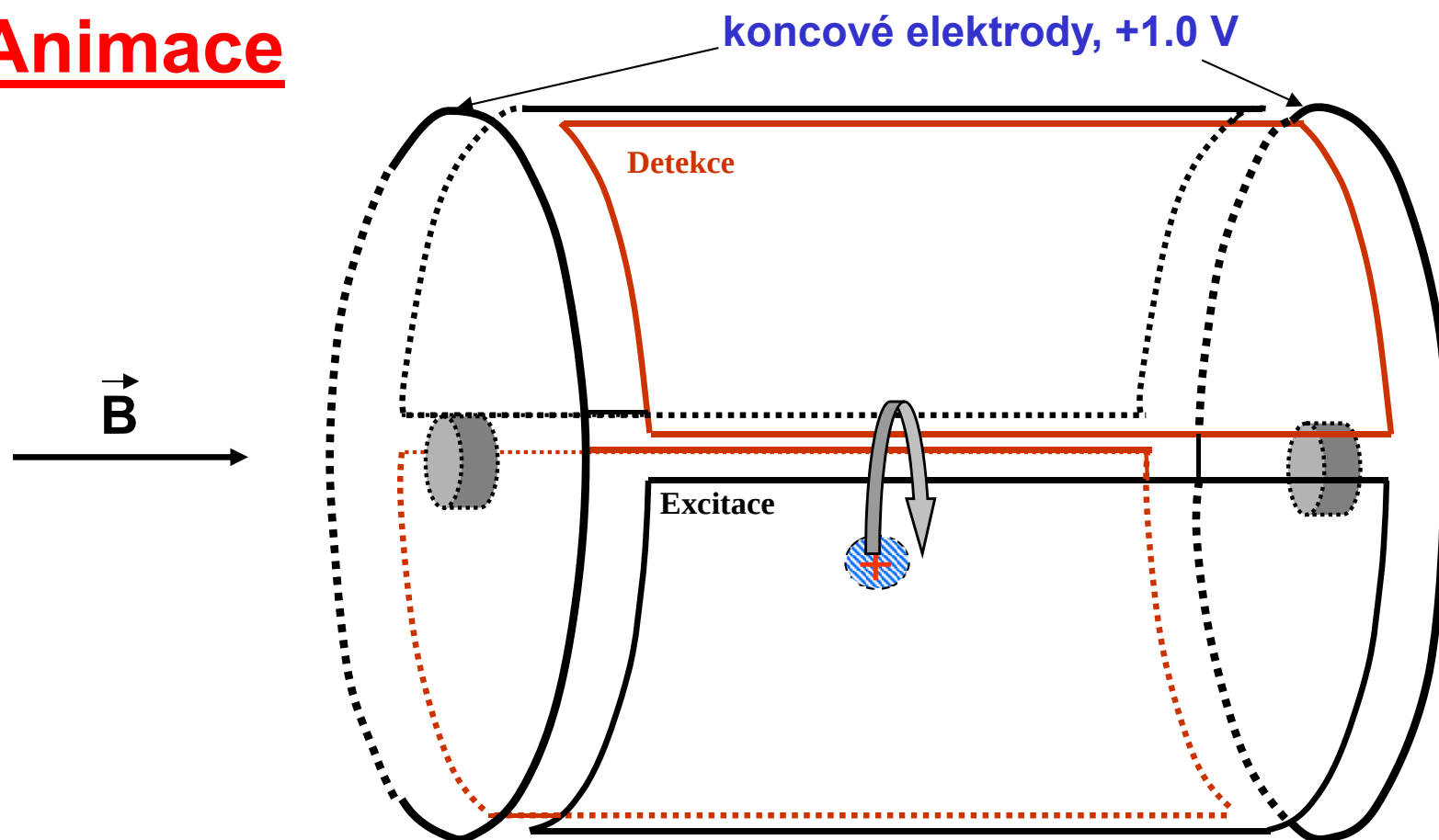
Fourierova transformace



závislost intenzity na m/z
hmotnostní spektrum

FT-ICR cela

Animace



E. Nikolaev
RP až 21 000 000

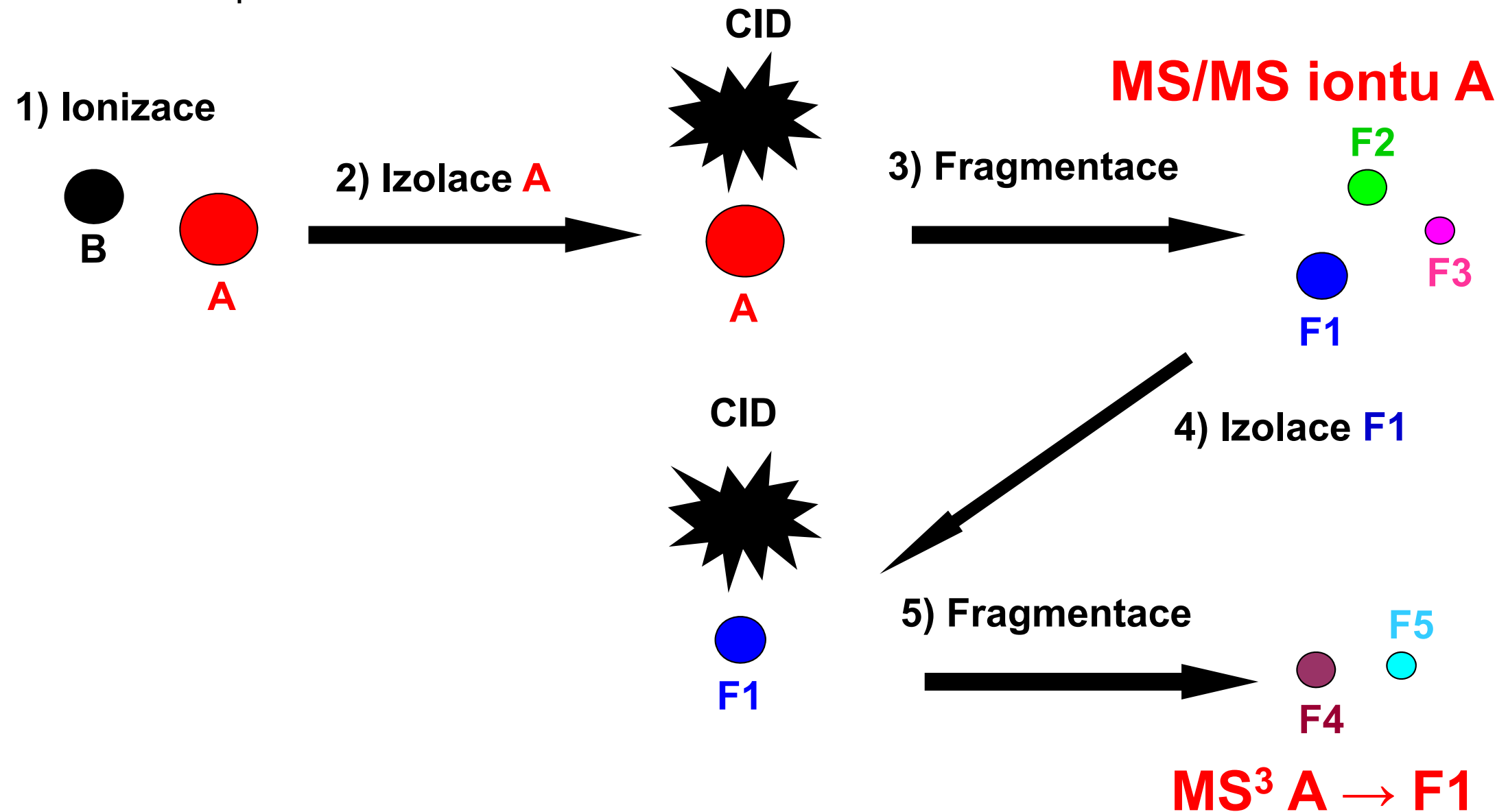
- běžný poloměr cely: 1-3 cm
- původní poloměr dráhy iontů v cyklotronu je velmi malý (0.01 - 0.1 mm) a není fázově koherentní, nepoužitelný pro měření
- excitací se poloměr zvýší na ca. 1 cm
- silné magnetické pole B v rozsahu 1-12 Tesla, nejběžněji 7 Tesla

Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS)

- **kolizně indukovaná disociace** - disociace iontu po kolizní excitaci
- **MS/MS**: 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)

Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS)

- **MS/MS**: 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



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
- **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 (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), 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 analyzátorů 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

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 knihovnami spekter v počítači (stovky tisíc spekter)
- hmotnostní analyzátory: 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

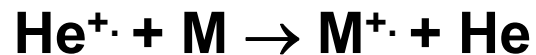
Rozdíl mechanismu ionizace oproti „klasické“ EI

- nosný plyn v GC/MS je výhradně helium, protože lze snadno odčerpávat vakuovými pumpami a také se aktivně účastní ionizačního mechanismu

1/ He je ionizováno urychlenými elektrony:



a vzniklé ionty potom ionizují analyt **přenosem náboje** („Charge transfer“)



2/ anebo může dojít k vybuzení helia do excitovaného stavu:



a následné **Penningově ionizaci** (na tomto mechanismu je založen DART)



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 (l , 1 mol) = 22.4 l plynu, tzn. 1 ml vody je po odpaření 1.2 l
- 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

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)

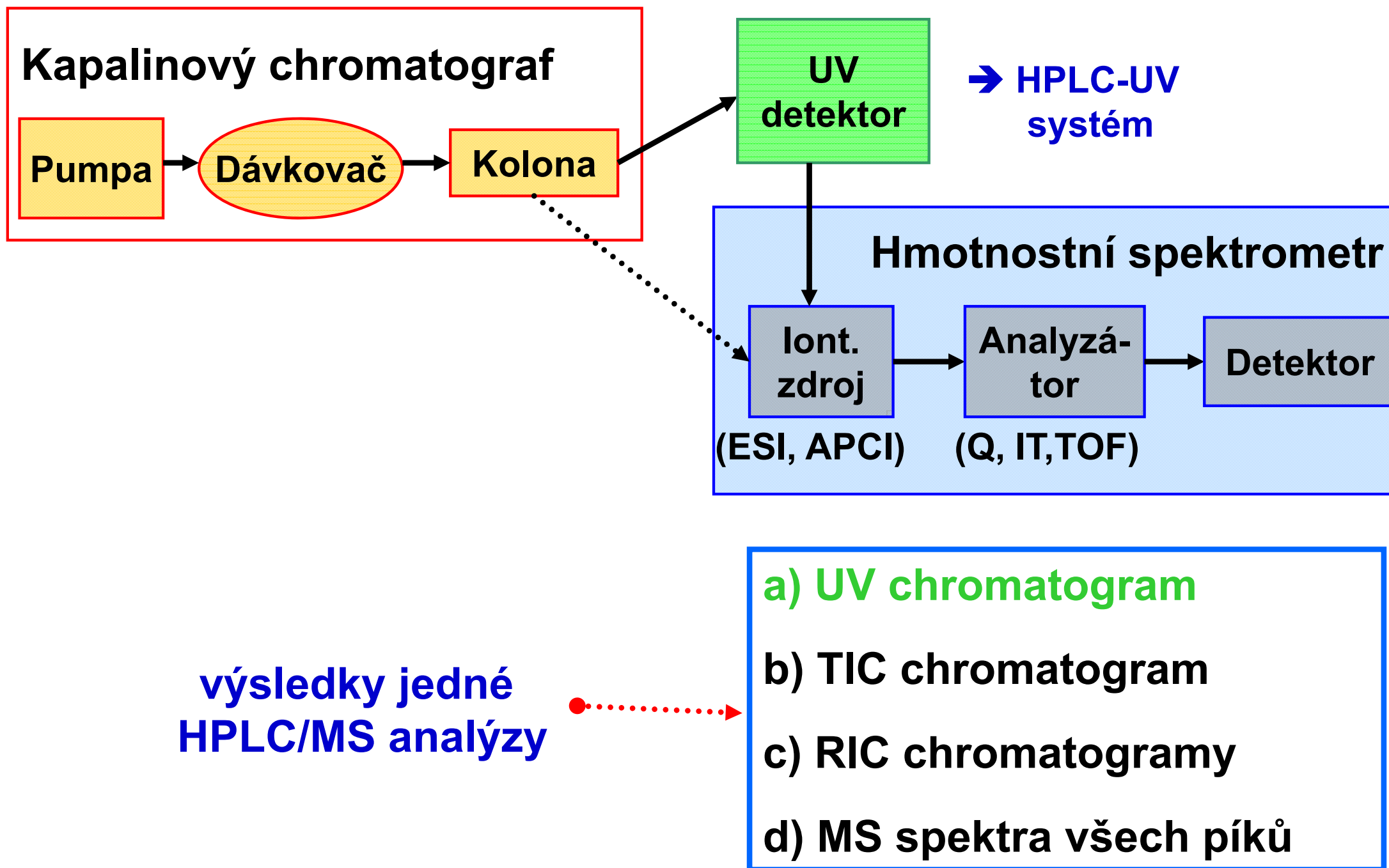
- záznam intenzity pouze základního píku spektra
- podobný TICu, ale není ovlivňován šumem nebo ionty s nízkou intenzitou

Rekonstruovaný iontový proud

(Reconstructed/Extracted Ion Chromatogram, RIC/EIC)

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

Schéma HPLC/MS systému



Kvantitativní analýza pomocí MS

- výhodou je vysoká selektivita (pro MS/MS experimenty) a citlivost
- nejpresnější 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 značený 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