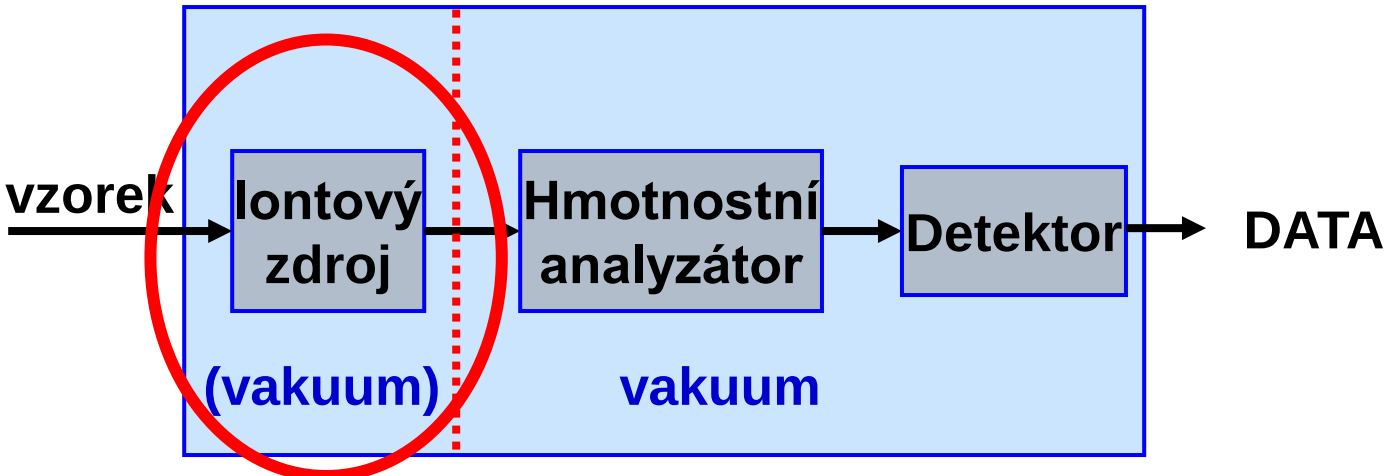
Ionizační techniky

Základní části hmotnostního spektrometru

1/ iontový zdroj - slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabité 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 (a k zesílení signálu)

• 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

- neexistuje univerzální ionizační technika pro všechny látky (mohou se 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 (ionizace termosprejem, ionizace urychlenými atomy/ionty (FAB/FIB), ionizace polem, desorpce polem)
- podle množství vnitřní energie po ionizaci lze dělit na "tvrdé" a "měkké"
- mohou pracovat za atmosférického nebo sníženého tlaku
- dnes největší praktický význam:
  - ESI, APCI, APPI - pro spojení HPLC/MS
  - ESI, MALDI - analýza biomolekul, nejšetrnější ionizační techniky
  - EI - GC/MS, možnost porovnání s knihovnami spekter, strukturní informace, dobře popsaná pravidla fragmentace, zavedené postupy
  - MALDI, DESI, SIMS - pro MS zobrazování
  - DESI, DART - desorpční ambientní techniky

Podle čeho volit způsob ionizace?

• těkavost (souvisí s polaritou a M_R) - pro těkavé látky: EI, CI

• molekulová hmotnost - asi do M_R=1000 lze EI/CI, do cca 2 tisíc APCI a APPI, do desítek až stovek tisíc ESI a MALDI

• tepelná stabilita látky - pro termolabilní látky nejsou vhodné techniky, kde je nutné látku převést do plynné fáze před vlastní ionizací (EI, CI), volit šetrnější ionizační techniky (ESI nebo MALDI)

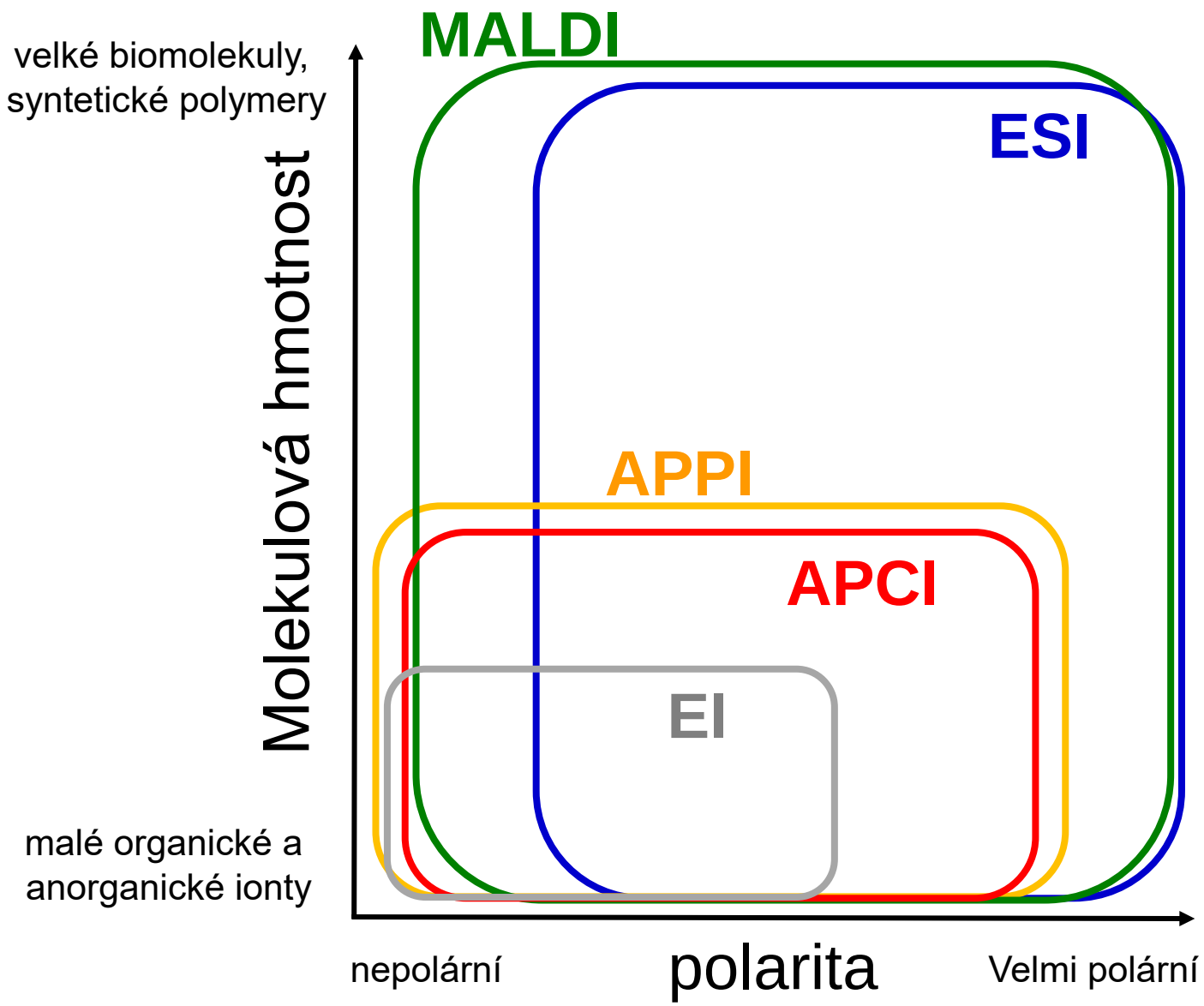
• chemické individuum nebo směs - pro směsi spojení s vhodnou separační technikou (GC/MS, HPLC/MS, CE/MS), pro čisté látky je separace zbytečná

• volba polarity ionizace (platí pro měkké ionizační techniky)

- kladné ionty - pro většinu látek, musí být možné látku protonovat (vhodná přítomnost heteroatomu) či kationizovat (Na^+, K^+, Li^+, Ag^+, apod.)

- záporné ionty - sulfonové a karboxylové kyseliny, polyhydroxylované látky (snadná deprotonace), někdy pomůže tvorba aduktových iontů s jednoduchými anionty, např. $[M+octan]^-$, $[M+mravenčan]^-$, $[M+Cl]^-$, apod.

Podle čeho volit způsob ionizace?



EI

(Electron Ionization)

Elektronová ionizace

- nejstarší ionizační technika
- "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 (např. derivatizace kyselin na estery apod.)
- podrobně popsána pravidla fragmentace jednotlivých tříd látek
- rozsáhlé knihovny EI spekter - v databázi Wiley Registry of Mass Spectral Data a NIST je přes 600 000 spekter, kompatibilní formát se všemi běžnými přístroji na trhu, dále obsahuje informace jako 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”)

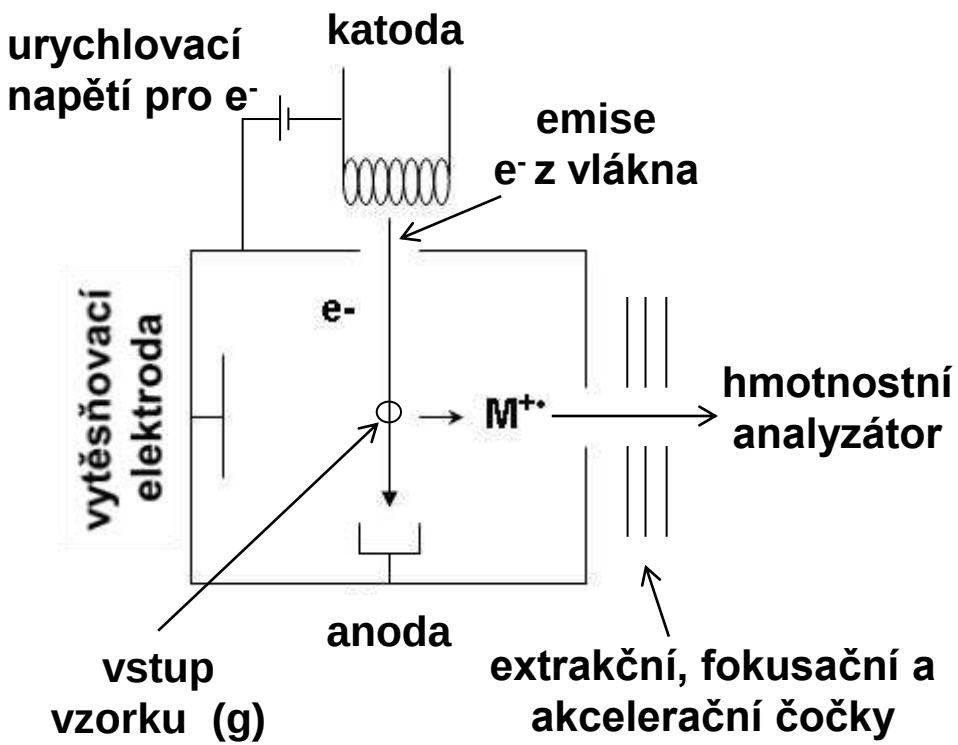
• urychlující potenciál v elektronvoltech (eV) mezi katodou a anodou určuje energii elektronů (1 eV = $1.602*10^{-19}$ J), standardně 70 eV

• přiblížením emitovaného elektronu k valenčním elektronům molekuly dojde k ovlivnění jejich magnetických polí, což vede k uvolnění valenčního elektronu a tím vzniku radikálkationtu $M^{+\cdot}$

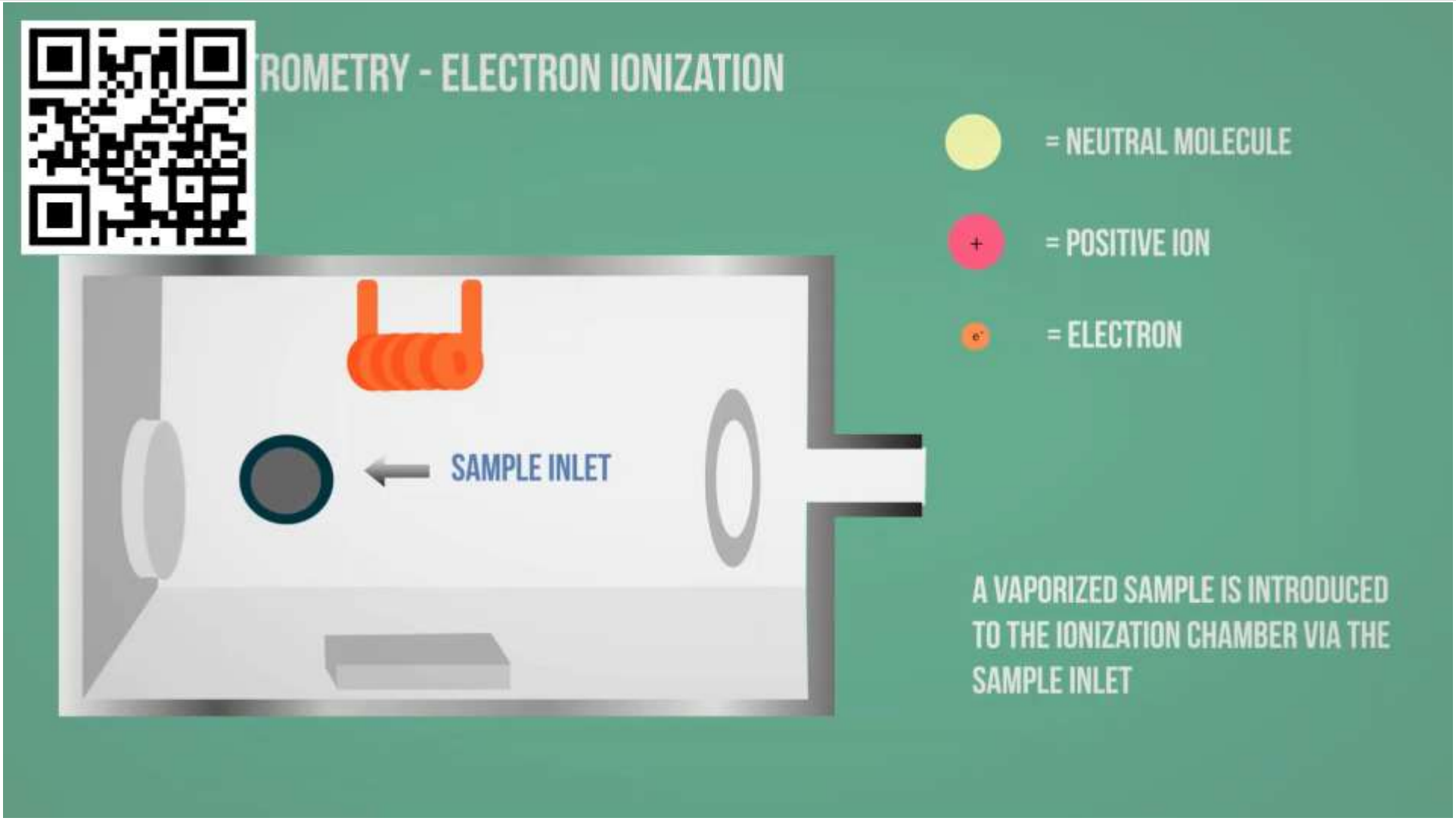
$$M + e^- \rightarrow M^{+\cdot} + 2\,e^-$$

• účinnost ionizace je velice nízká, vzniká 1 ion z 10^5 interakcí

• vzniklé ionty jsou vytěsňovací elektrodou vypuzeny z iontového zdroje (+5 až 10V vůči ionizační komoře), svazek iontů je dále fokusován (zaostřen) a urychlen dalšími elektrodami směrem do hmotnostního analyzátoru



Princip elektronové ionizace



zdroj - https://www.youtube.com/watch?v=22dr-3XDNmQ

Princip elektronové ionizace

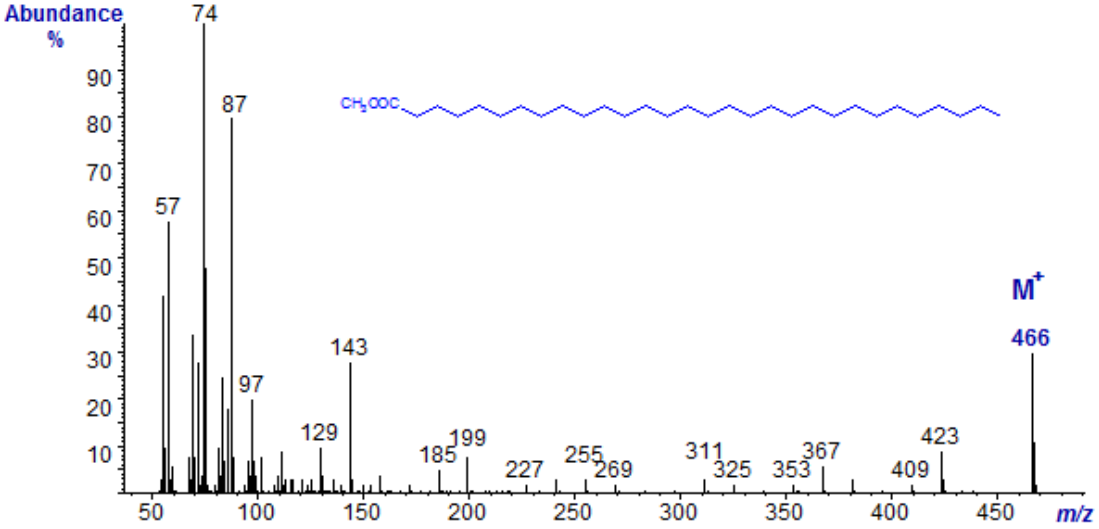
- ionizační energie = minimální množství energie, které musí být absorbováno neutrální molekulou, aby došlo k ionizaci odstraněním elektronu = vyjadřuje, jak silně je e^- v el. obalu vázán (u většiny organických látek je v rozmezí 7 až 16 eV)

- jestliže molekula získá při ionizaci příliš velký přebytek vnitřní energie, projeví se to její fragmentací (tj. rozpadem na menší nabité a nenabité části); při rozsáhlé fragmentaci může chybět molekulární ion

- v rozmezí 50 - 100 eV je spektrum relativně nezávislé na zvolené energii

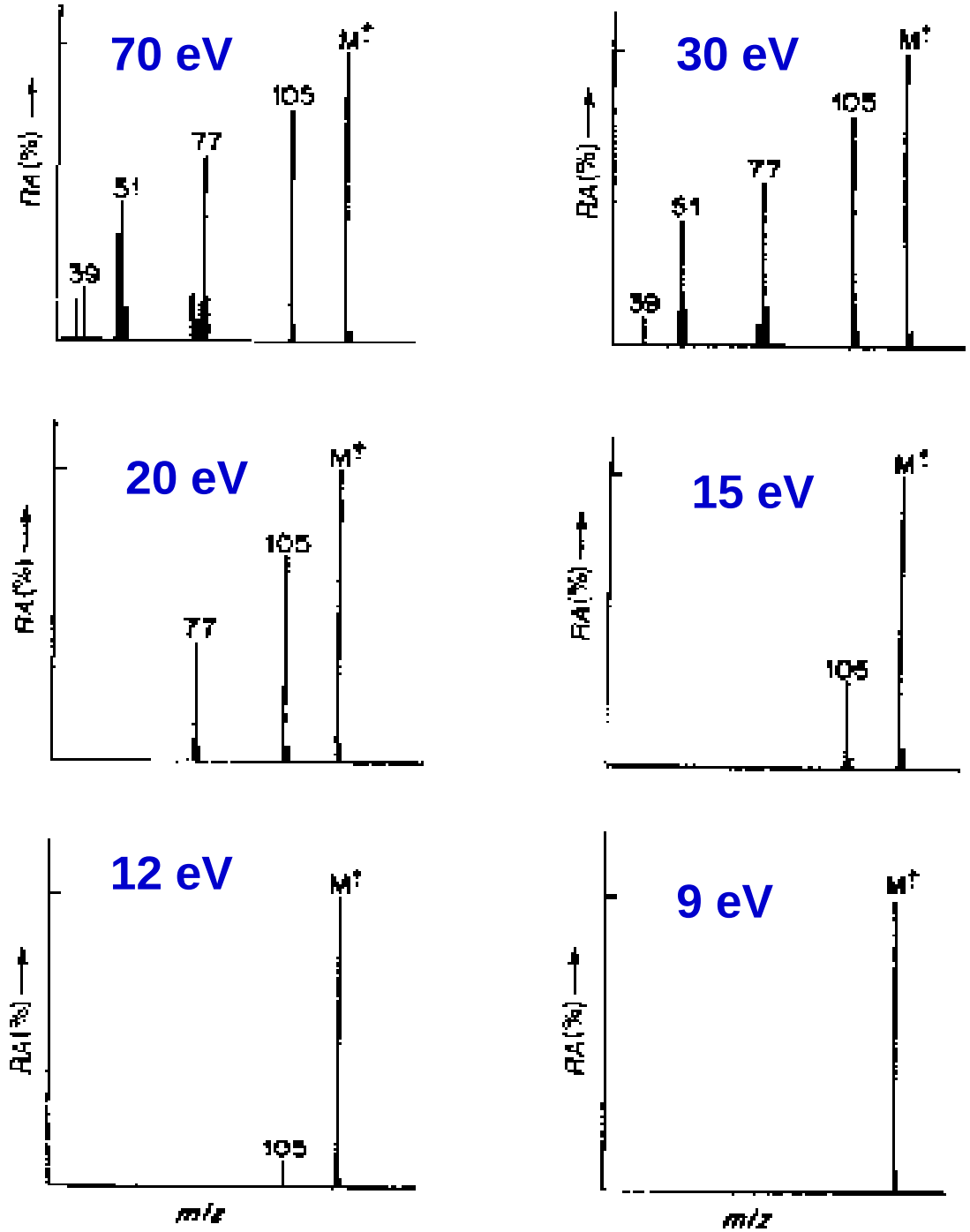
- standardní urychlující energie e^- pro měření knihovních EI spekter je 70 eV (musela být zvolena určitá hodnota kvůli možnosti porovnání spekter)

- proč tak vysoká energie ionizace? nejvyšší citlivost, spektrum bohaté na fragmentové ionty (přebytek energie → fragmentace), pro většinu látek i molekulární ion



Vliv energie ionizujících elektronů na fragmentaci v EI spektrech

- energii e^- lze volit 5 - 100 eV
- snížením energie e^- se sníží přebytek vnitřní energie ionizovaných molekul - někdy postačuje na zvýšení relativní intenzity molekulárního iontu na úkor snížení citlivosti



Příklad: kyselina benzoová
(obecně vliv energie elektronů nemusí být tak výrazný jako v tomto příkladu)

Záporné ionty při elektronové ionizaci

- používá se zcela výjimečně, současné komerční přístroje tuto možnost vůbec nenabízí
- za standardních podmínek měření EI spekter (70 eV) mají vznikající záporné ionty příliš velkou energii a dochází k rozsáhlému rozpadu molekulárního iontu na nízkomolekulární fragmenty (tzv. „molekulární šrot“), musí se volit nižší energie
- záchyt e^- je málo pravděpodobný proces; zavedením brzdícího plynu (argon) se vzájemnými srážkami sníží rychlost ionizujících e^- (vznik tzv. pomalých e^-) a tím se zvýší pravděpodobnost záchytu e^-
- 3 základní mechanismy vzniku záporných iontů závisí na energii ionizujících e^-:

  1/ $AB + e^- \rightarrow [AB]^{-\cdot}$ - resonanční záchyt (0-2 eV)

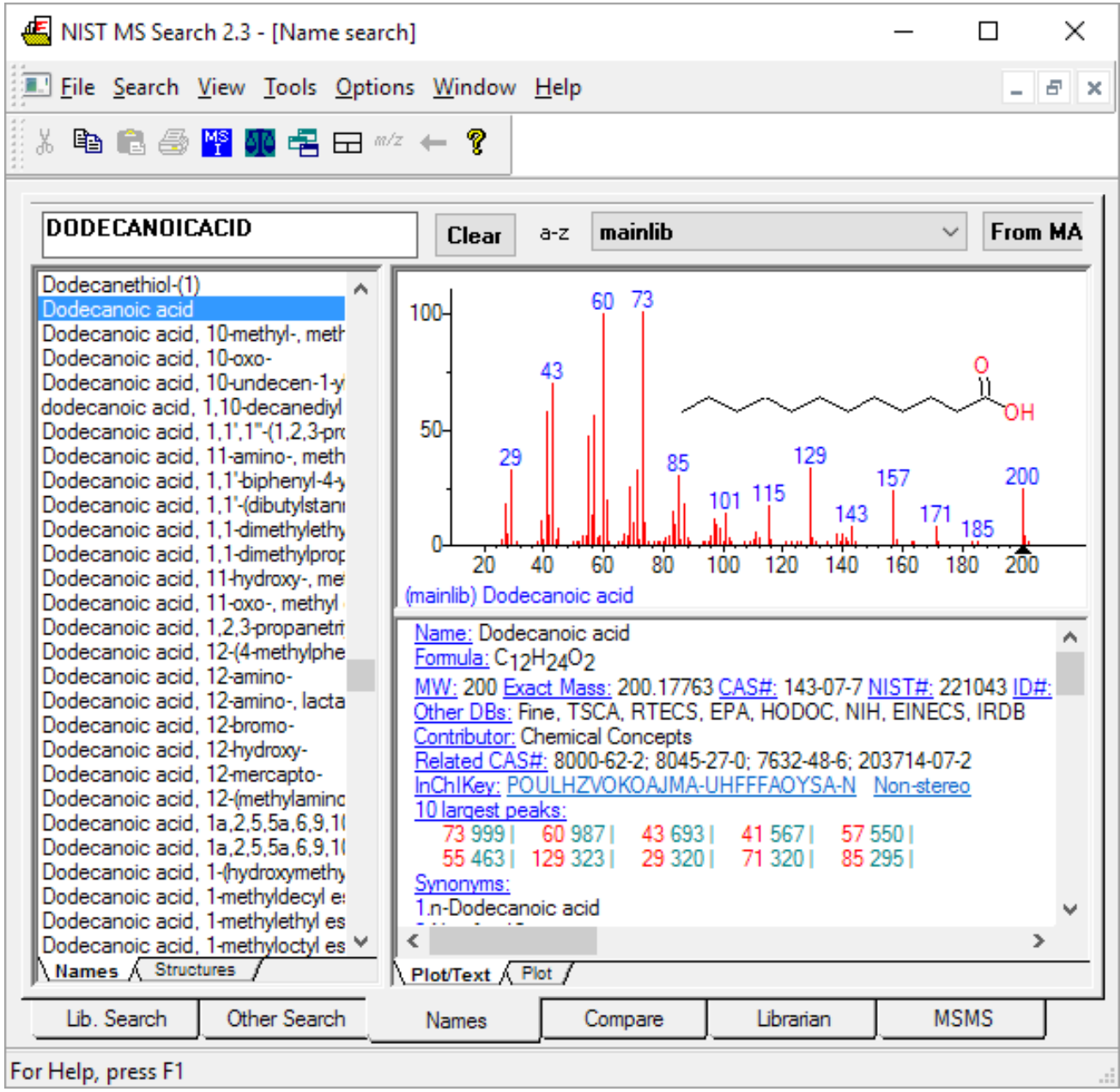
  2/ $AB + e^- \rightarrow A^\cdot + [B]^-$ - disociační záchyt (2-10 eV)

  3/ $AB + e^- \rightarrow [A]^+ + [B]^- + e^-$ - tvorba iontových párů (>10 eV)
- vhodné pro látky s elektronegativními substituenty, např. halogeny
- spektra jednodušší na interpretaci (nejsou přesmykové reakce)
- nelze použít pro všechny látky, musí mít kladnou elektronovou afinitu (EA)

Knihovny EI spekter

NIST 17

- 306 000 EI spekter (pro 267 000 sloučenin)
- 652 000 MS/MS spekter
- software pro porovnávání naměřených spekter s knihovnou
- každé spektrum obsahuje informace (sumární vzorec, MW, strukturu, chemický název, synonyma, CAS#, InChikey (PubChem)
- případně GC metodu a t_R
- MS/MS (hmotnost prekurzoru, použitý hmotnostní analyzátor, kolizní energie, detaily experimentálních podmínek)



Knihovny EI spekter – porovnání s databází

NIST MS Search 2.0 - [MS/MS in EI precursor = 303, Presearch Default - 100 spectra]

File Search View Tools Options Window Help

1. Cocaine

#	Src.	Name
16	L	Cocaine
17	L	(Z,Z)-Octadeca-5,9-dienic acid, picolinyl ester
18	L	MEPERIDINE 2
19	L	MEPERIDINE 2
20	L	PROPRANOLOL
21	L	MEPERIDINE

Names Structures Spec List

mainlib; 191436 total spectra

#	L..	M...	R....	Pr...	S..	D..	Name
1	M	707	999	85.7	3...	5	Cocaine
2	M	642	989	13.8	7	0	Pseudococaine
3	M	478	817	0.33	0	0	(3-Benzoyl-2-t-butyl-4-isopr...
4	M	448	826	0.09	2	1	Nefazodone
5	M	414	608	0.02	0	0	trans-1-Benzoyloxy-cis-3-hy...
6	M	399	805	0.01	2	0	Spiro[cyclohexanol-3,6'-hex...
7	M	396	598	0.01	2	0	Allopseudococaine
8	M	391	919	0.01	0	0	m-Hydroxycocaine
9	M	387	556	0.00	0	0	Benzoic acid, 4-[(2-fluoroph...
10	M	384	802	0.00	2	0	Spiro[cyclohexanol-3,6'-hex...
11	M	371	585	0.00	1	0	Allococaine
12	M	367	891	0.00	0	0	Pyrrolo[3,2-k]anthracene-4,...
13	M	362	715	0.00	2	1	Carfentanil
14	M	348	863	0.00	1	0	Propylbenzoylecgonine
15	M	347	880	0.00	1	0	o-Chlorococaine
16	M	346	796	0.00	0	0	Acetic acid, 2-(3-hydroxy-8-...
17	M	345	938	0.00	0	0	trans-Cinnamoylcocaine
18	M	343	712	0.00	1	0	1,1'-Bicyclohexyl, 2-methyl-,...
19	M	340	748	0.00	1	0	Phenylacetoxyecgonine met...
20	M	340	708	0.00	1	0	1,1'-Bicyclohexyl, 2-methyl-,...

Names Structures Hit List

Name: Cocaine

Library Search Options

Search | MS/MS | Libraries | Automation | Limits | Constraints

Use Constraints — Clear All

MW(Nominal Mass)
Exact Mass
Name Fragment
Elements Value
Elements Present
Peaks
Other Databases

	Mass, m/z or formula	Select type
Search value		mass
Uncertainty*		ppm
Gain or loss, formula*		gain

* fields may be left blank

Find
Monoisotopic precursor mass
Among 2 most abundant isotopes

OK Cancel Help

(Spec. Plot/Text

Tail MF=707 RMF=999 — Cocaine — 707 999R 85.7P

(mainlib) Cocaine

Name: Cocaine
Formula: $C_{17}H_{21}NO_4$
MW: 303 Exact Mass: 303.147058 CAS#: 50-36-2 NIST#: 113834 ID#: 44326 DB: mainlib

Plot/Text of Hit | Plot of Hit

Lib. Search | Other Search | Names | Compare | Librarian | MSMS

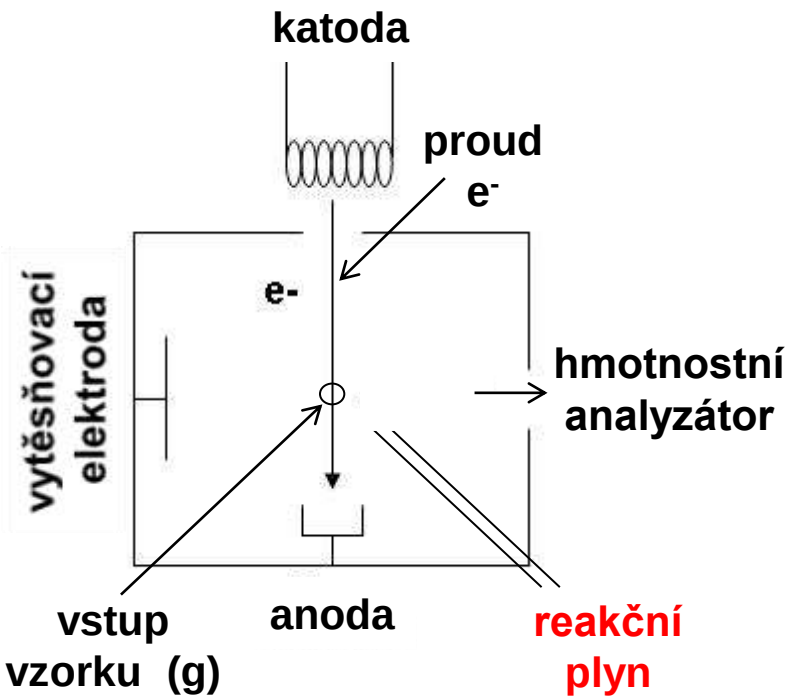
For Help, press F1 — MS/MS in EI — MS/MS in EI — 303

CI

(Chemical Ionization)

Chemická ionizace

- 1. měkká ionizační technika (1966 - Munson, Field)
- ionizace molekul v plynném stavu interakcí s reakčními ionty
- 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
  - vzniklé ionty mají sudý počet e^-
  - obvykle $[M+H]^+$ nebo $[M-H]^-$
  - aduktové ionty dle použitého reakčního plynu
- dnes především pro GC/MS, studium reakcí v plynném stavu



Vznik iontů při chemické ionizaci

- ionizace reakčního plynu (EI ionizace):

$$R + e^- \longrightarrow R^{+\cdot} + 2\,e^-$$

- ionty vznikají ion-molekulárními reakcemi:

$$R^{+\cdot} + R \longrightarrow [R+H]^+ + [R-H]^\cdot \qquad \text{(ion-mol. reakce R)}$$

$$[R+H]^+ + M \longrightarrow R + [M+H]^+ \qquad \text{(přenos protonu)}$$

$$[R-H]^+ + M \longrightarrow R + [M-H]^+ \qquad \text{(abstrakce hydridu)}$$

$$R^{+\cdot} + M \longrightarrow R + M^{+\cdot} \qquad \text{(výměna náboje)}$$

$$R^+ + M \longrightarrow [R+M]^+ \qquad \text{(kondenzace)}$$

R ... reakční plyn
M ... molekula analytu

- nejčastější je přenos protonu (přenos protonu z plynné Brönstedovy kyseliny $[BH]^+$ na neutrální molekulu M)
- abstrakce hydridu bývá pozorována u alifatických uhlovodíků (vznik $[M-H]^+$)
- k výměně náboje dochází u GC/MS: $He^{+\cdot} + M \rightarrow He + M^{+\cdot}$
- příkladem kondenzace je reakce iontů z methanového plazmatu $[C_2H_5]^+$ a $[C_3H_5]^+$ s molekulou za vzniku $[M+C_2H_5]^+$ a $[M+C_3H_5]^+$

Vznik iontů při chemické ionizaci

Mezi sebou soutěžící a následné bimolekulární reakce metanu v iontovém zdroji

$$CH_4 + e^- \rightarrow \boxed{CH_4^{+\bullet}}, CH_3^+, CH_2^{+\bullet}, CH^+, C^{+\bullet}, H_2^{+\bullet}, H^+$$ **EI**

$$CH_4^{+\bullet} + CH_4 \rightarrow \boxed{CH_5^+} + CH_3^\bullet$$

$$CH_3^+ + CH_4 \rightarrow \boxed{C_2H_7^+} \rightarrow C_2H_5^+ + H_2$$

$$CH_2^{+\bullet} + CH_4 \rightarrow C_2H_4^{+\bullet} + H_2$$

$$CH_2^{+\bullet} + CH_4 \rightarrow C_2H_3^+ + H_2 + H^\bullet$$

$$C_2H_3^+ + CH_4 \rightarrow C_3H_5^+ + H_2$$

$$C_2H_5^+ + CH_4 \rightarrow C_3H_7^+ + H_2$$

ion-molekulární reakce

Reakční plyny

- nejběžnější reakční plyny:
  - methan (vznikající ionty $[CH_5]^+$, $[C_2H_5]^+$, $[C_3H_5]^+$)
  - isobutan (ion $[C_4H_9]^+$)
  - amoniak (ionty $[NH_4]^+$, $[(NH_3)_2H]^+$, $[(NH_3)_3H]^+$)

- méně časté:
  - propan (ion $[C_3H_7)]^+$)
  - methanol (ionty $[CH_3OH_2]^+$, $[(CH_3OH)_2H]^+$)
  - voda (ion $[H_3O]^+$)
  - dusík (ion $[N_2]^{+\cdot}$)
  - vzácné plyny (ionty $[He]^{+\cdot}$, $[Ar]^{+\cdot}$) a jiné

- správnou volbou reakčního plynu lze získat požadované ionty nebo selektivně ionizovat molekuly analytu

Přenos protonu

• protonová afinita (PA, kJ/mol) - kvantitativní vyjádření schopnosti bazické molekuly B přijmout proton (změna enthalpie spojená s protonací bazické molekuly B).

$$B + H^+ \rightarrow BH^+, \quad -\Delta H = PA_B$$

- čím vyšší hodnota PA, tím pevněji váže molekula proton
- čím pevněji váže molekula proton, tím obtížněji ho uvolňuje

• protonace reakčním plynem - protonovaná báze RH^+ předává proton bázi M

$$RH^+ + M \rightarrow R + MH^+, \quad \Delta H = PA_R - PA_M$$

- reakce musí být exotermní $\Delta H < 0$, aby došlo k protonaci molekuly analytu M protonovanou bází reakčního plynu $RH^+ \rightarrow$ **$PA_M > PA_R$**

Molekula	PA (kJ/mol)	Molekula	PA (kJ/mol)
vodík	424	isobutan	826
methan	533	amoniak	853
voda	691	dimethylamin	925
methanol	754		

Přenos protonu

- čím větší PA reakčního plynu, tím větší selektivita = protonovaná báze RH^+ (reakční plyn) pevně váže proton a dokáže protonovat pouze bázi M (analyt) s vyšší PA

  - např. amoniak je velmi selektivní, methan je zase poměrně univerzální

- k protonaci dochází na nejbazičtějším centru molekuly

  - např. u esterů na karbonylovém kyslíku, protože PA eterického kyslíku je o 50-90 kJ/mol nižší

- je uvažována PA v plynné fázi a nikoliv v kapalné!

Molekula	**PA (kJ/mol)**	**Molekula**	**PA (kJ/mol)**
vodík	424	isobutan	826
methan	533	amoniak	853
voda	691	dimethylamin	925
methanol	754		

Záporné ionty při chemické ionizaci

- jednodušší spektra, méně fragmentací

- vhodné pro látky s kyselým vodíkem nebo elektronegativním atomem (halogeny)

- nejběžnější reakce vedoucí ke vzniku záporných iontů:

$M + [R\text{-}H]^- \longrightarrow [M\text{-}H]^- + R$ (přenos protonu)

$M + X^- \longrightarrow [M+X]^-$ (adice halogenidu X^-)

$M + e^- \longrightarrow M^{-\cdot}$ (záchyt elektronu)

$M + R^{-\cdot} \longrightarrow M^{-\cdot} + R$ (výměna náboje)

R ... reakční plyn
M ... molekula analytu
X ... halogen

- používané reakční plyny:
  - methan nebo isobutan (ion $[H]^-$)
  - amoniak (ionty $[NH_2]^-$, $[H]^-$)
  - CCl_4 nebo jiné halogenované látky (ion $[Cl]^-$ nebo obecně $[X]^-$)
  - N_2O (ionty $[O]^{-\cdot}$, $[NO]^-$) - velmi citlivé pro molekuly obsahující halogeny nebo jiné elektronegativní prvky

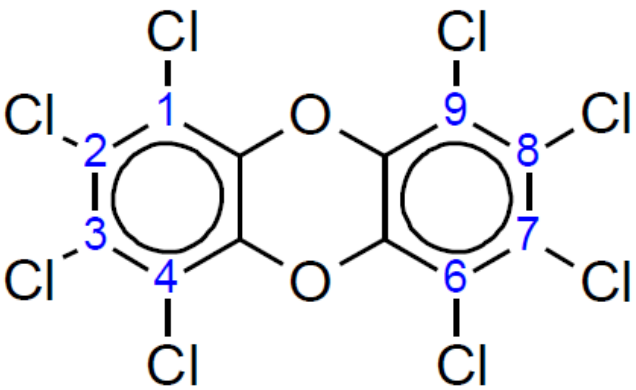
Využití EI a CI - zejména GC/MS aplikace

TSQ 8000 Evo	DFS
GC-MS/MS	GC-HRMS
Triple Quadrupole MS	Magnetic Sector HRMS
High performance, easy to use MS/MS for non-experts	High-Resolution Full Scan and SIM
Target Analysis in Complex Matrix	Dioxins, PCBs, Other POPs
Pesticides in Food, Drugs in body fluid	EPA 1613, 8270A, 8290

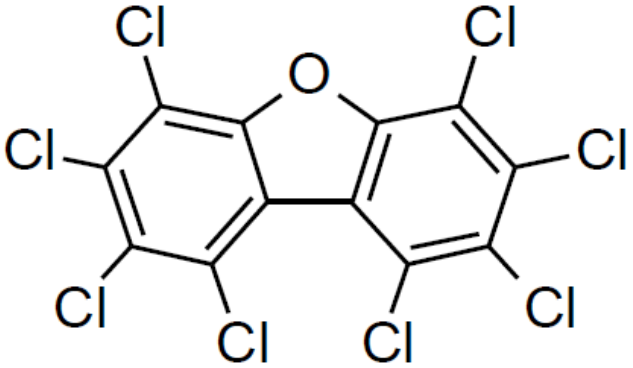
ThermoFisher SCIENTIFIC

Využití EI a CI - zejména GC/MS aplikace

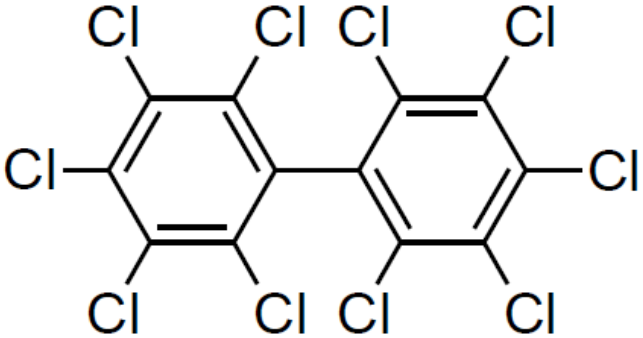
- specializované pracoviště, kde provádí ultrastopové analýzy látek zejména ze skupiny tzv. persistentních organických polutantů (POPs), jako jsou polychlorované dibenzo-p-dioxiny (PCDD) a dibenzofurany (PCDF), polychlorované bifenyly (PCB), polybromované difenylethery (PBDE) a polyaromatické uhlovodíky (PAH).



Polychlorinated dibenzo-p-dioxin (PCDD)
"Dioxin"
75 congeners



Polychlorinated dibenzofuran (PCDF)
"Furan"
135 congeners



Polychlorinated Biphenyl (PCB)
209 congeners

Havárie u Sevesa (Itálie, 10.7.1976)

Incendie de l'usine chimique de Seveso (Italie), 1976.

- v chemické továrně firmy Icmesa vybuchl chemický reaktor
- do ovzduší během havárie unikly horké jedovaté páry - asi dva kilogramy tetrachlorodibenzodioxinu TCDD (bílý oblak), které zamořily téměř dva tisíce hektarů půdy v okolí
- Dioxiny vznikají při spalovaní chlorovaných sloučenin, továrna vyráběla mimo jiné herbicid TCP
- dioxiny – akutně toxické sloučeniny (způsobují bolest hlavy, dýchací potíže, poškození jater, chlorakné, karcinogenní)
- na následky otravy zemřelo > 200 lidí
- koncentrace dioxinů je v životním prostředí sledována

Toxicity of Dioxins

- Acute toxicity
  - Chloracne
  - Carcinogenic
  - Estrogenic
- President Yushchenko (Ukraine)
  - Suffered from Dioxin intoxication during his election in 2004
  - TCDD 10-12 µg/L in blood
  - 100 **ppb** - 50,000x higher than normal concentrations

- "Dioxin so pure it was made in a laboratory"

ThermoFisher SCIENTIFIC

API techniky

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

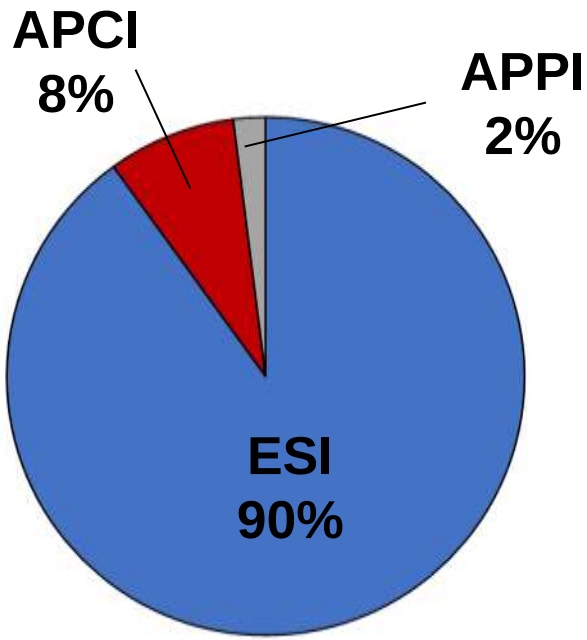
Ionizace za atmosférického tlaku

• ionizační techniky ESI, APCI, APPI pracující za atmosférického tlaku znamenaly naprostý průlom v řešení spojení HPLC/MS

• v současnosti jsou techniky ESI + APCI standardem pro komerční HPLC/MS systémy, APPI je považována za vhodnou alternativu pro nepolární nebo velmi labilní látky

• dnes je HPLC/MS díky ESI/APCI rutinní a spolehlivá analytická technika s obrovským potenciálem v řadě oborů - chemie, biochemie, medicína, farmacie, atd.

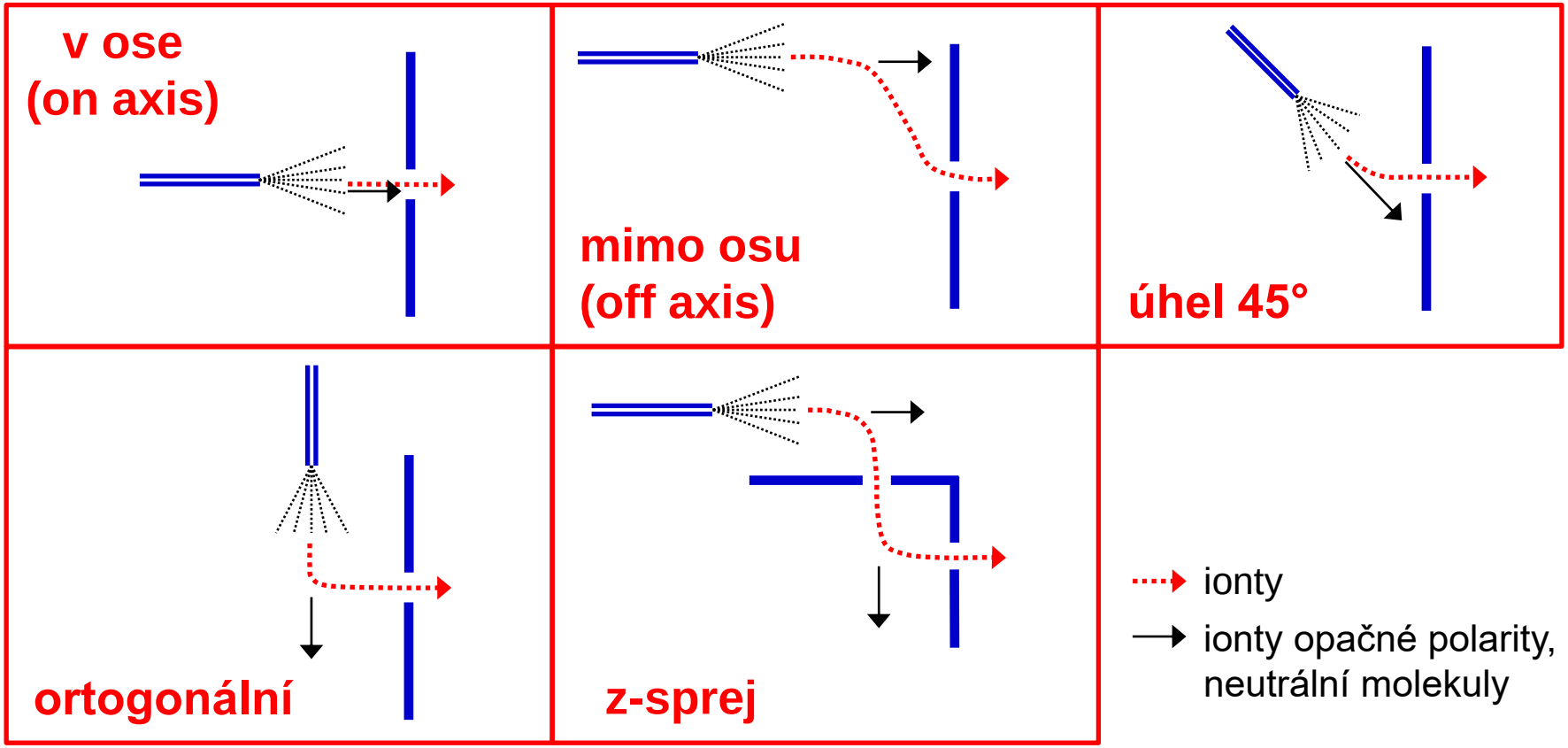
• vznikají převážně ionty se sudým počtem elektronů (existují výjimky)



• zastoupení API technik v LC/MS
- dle Web of Science, únor 2024

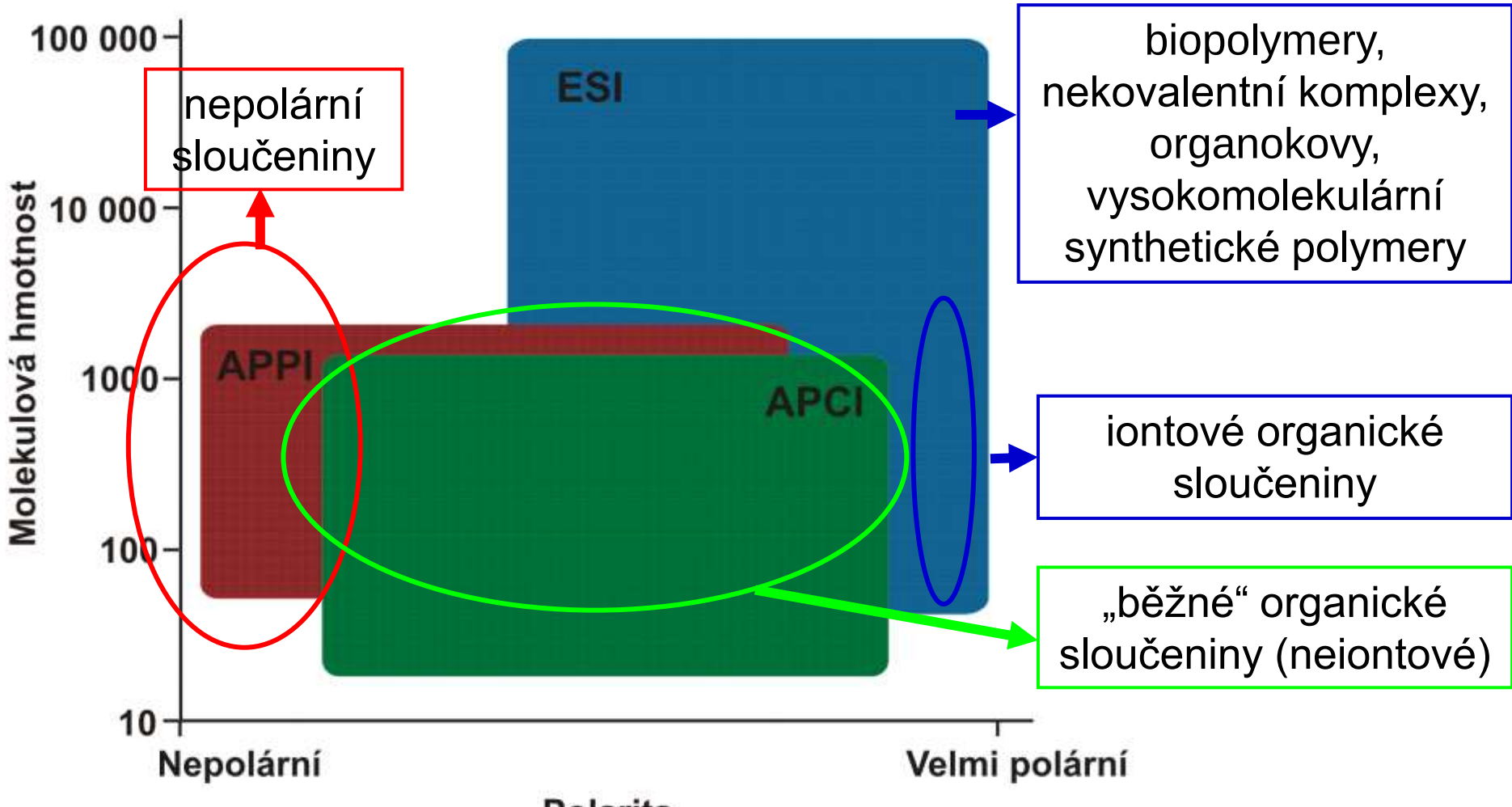
API techniky

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

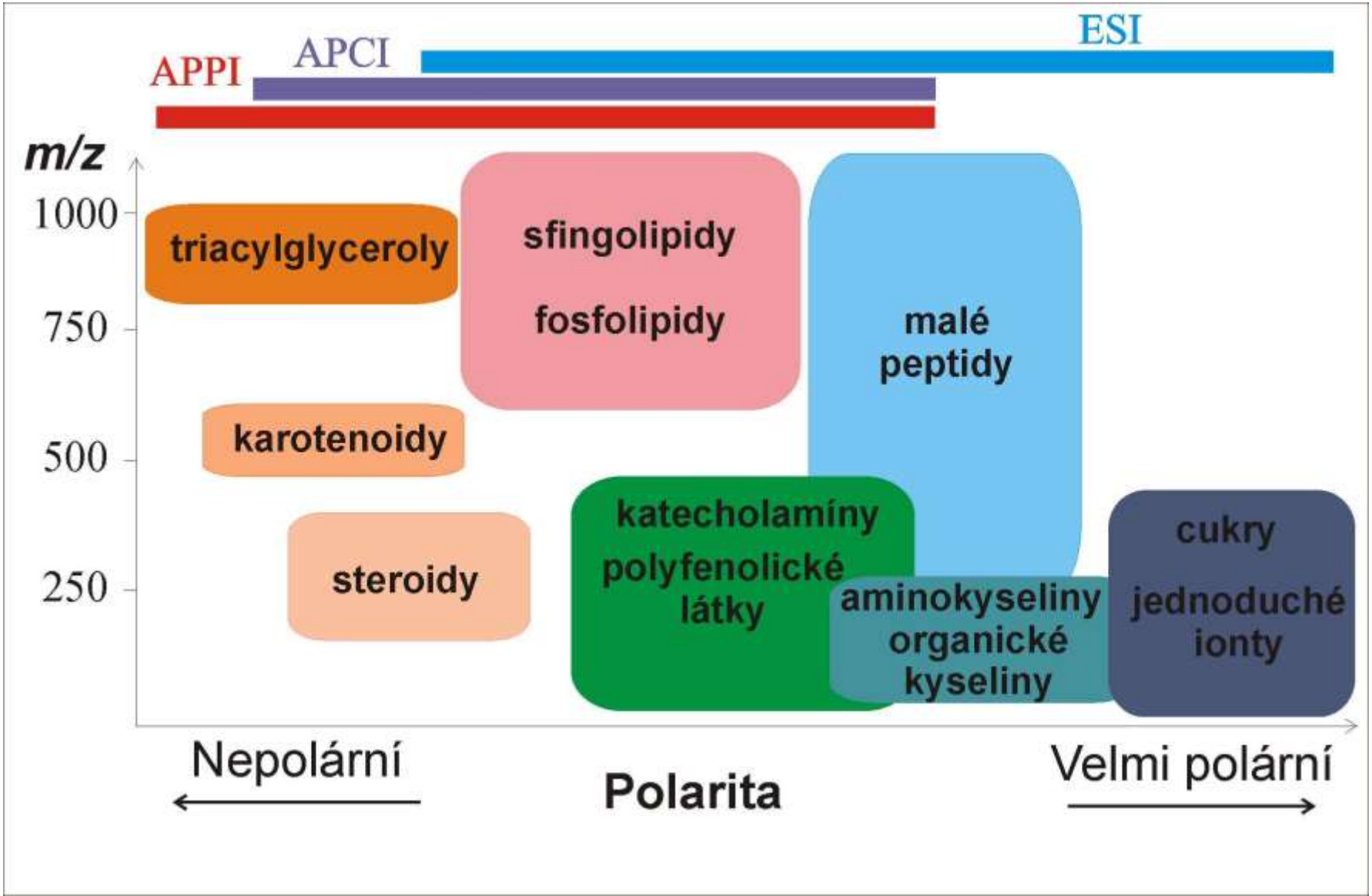


Volba ionizační techniky a polarity záznamu

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



Volba ionizační techniky – malé molekuly (M<1000)



ESI

(Electrospray Ionization)

John B. Fenn
(2002, Nobelova cena za chemii)

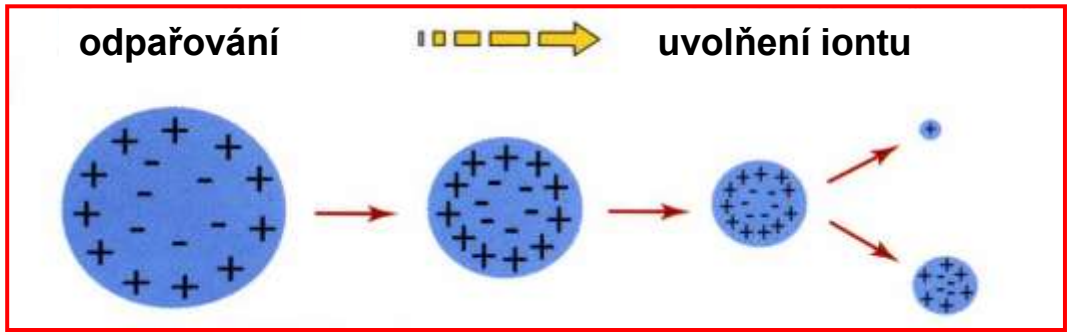
Ionizace elektrosprejem

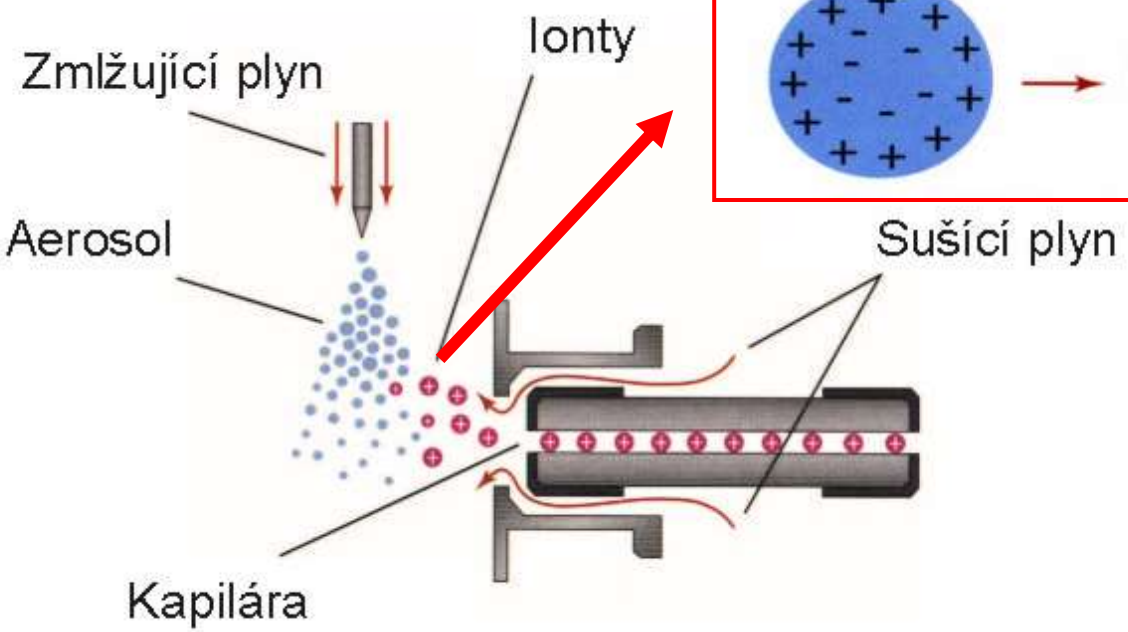
- ESI je nejčastěji používaná ionizační technika pro spojení HPLC/MS
- pro látky středně polární až iontové
- nelze použít při práci s nepolárními mobilními fázemi a pro nepolární sloučeniny
- průtok HPLC eluentu ca. 0.1 - 1.0 ml/min, přímá infúze jednotky až desítky µl
- umožňuje tvorbu vícenásobně 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 ($[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+HCOO]^-$, atd.)
  - fragmentové ionty nejsou pozorovány nebo jen ve velmi nízké intenzitě (závisí na sloučenině a použitých experimentálních podmínkách)
  - vícenásobně nabité ionty ($[M+2H]^{2+}$, $[M+3H]^{3+}$….. $[M+nH]^{n+}$)

- peptidy, proteiny, sacharidy, lipidy, nukleové kyseliny, organometalické i anorganické sloučeniny

Ionizace elektrosprejem

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





Elektrosprej – rozbor mechanismu

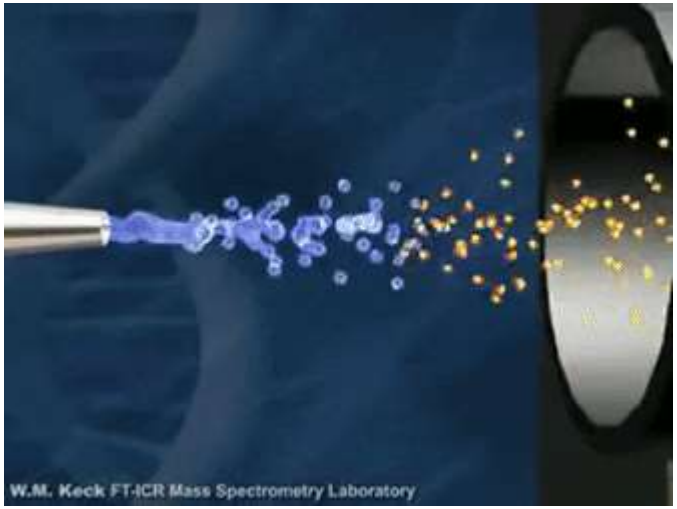
Celý proces elektrospreje lze rozdělit na 3 základní kroky:

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

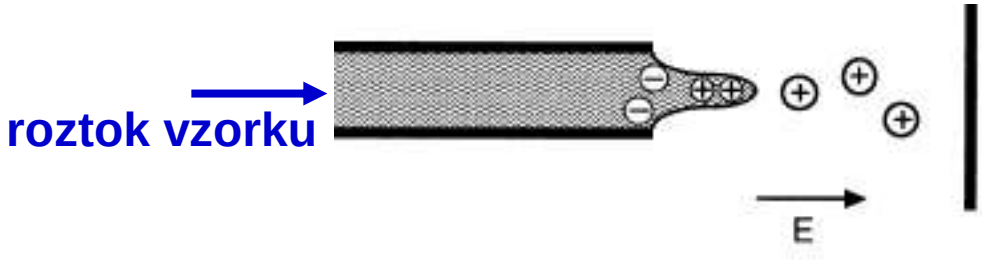
ad 1/ Zmlžení roztoku vzorku, tvorba elektrospreje

Tvorba nabitých kapiček závisí na:

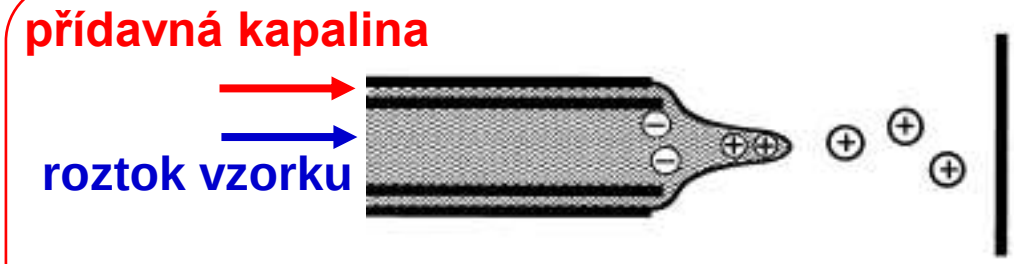
- vloženém napětí na kapiláru
- složení a průtoku eluentu
- obsahu a koncentraci aditiv (zejména iontových a povrchově aktivních látek)
- průměru a geometrii kapiláry
- zmlžujícím plynu (typ, průtok, teplota)
- analytu (koncentrace, struktura)
- čistotě ESI jehly



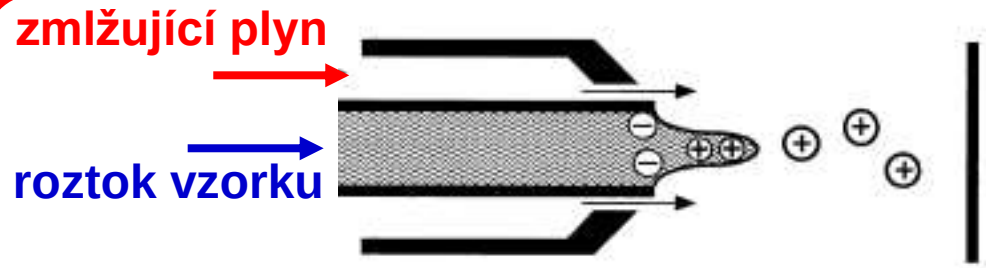
Způsoby ESI zmlžování



A/ „čistý“ elektrosprej roztoku analytu (dnes méně časté, vhodné jen pro velmi nízké průtoky, např. nanosprej)

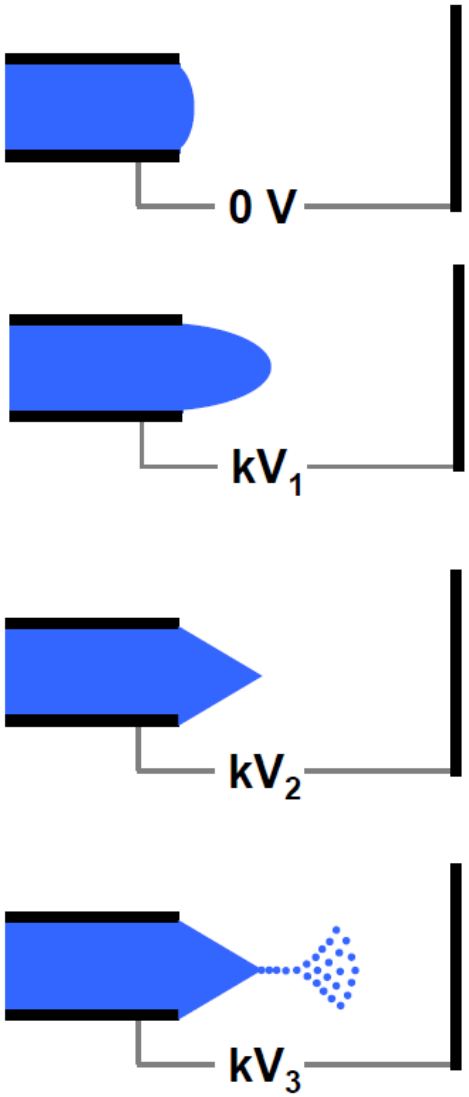


B/ elektrosprej roztoku analytu s přídavným tokem kapaliny (vodivé spojení pro CZE/MS, podpora ionizace, např. přídavek NH_4^+ pro preferenční tvorbu aduktů $[M+NH_4]^+$



C/ elektrosprej roztoku analytu s pneumatickou podporou zmlžení (standardní použití v HPLC/MS, dříve nazýván iontový sprej)

Tvorba elektrospreje



Výchozí stav (kapalina v kapiláře, napětí není vloženo)

Vkládání napětí, postupně se zvyšuje intenzita el. pole. Nabité částice (ionty v roztoku) jsou „vytahovány“ z kapiláry, zmenšuje se poloměr zakřivení menisku.

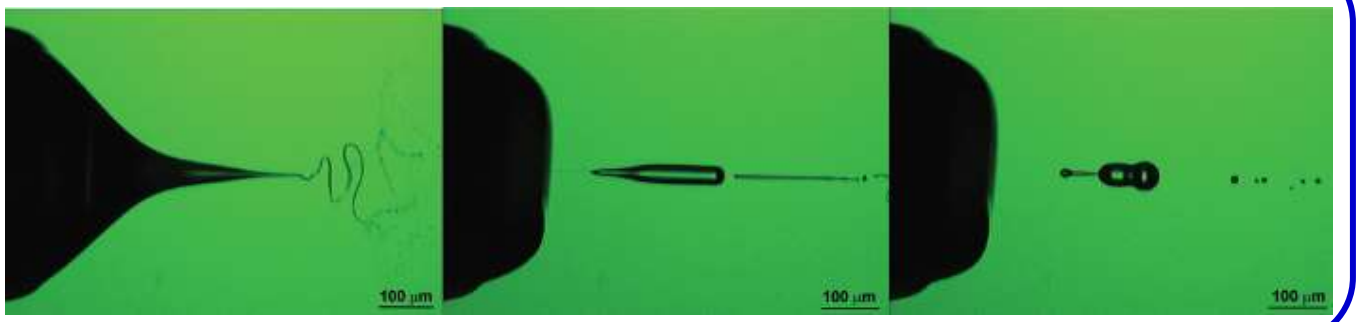
Při určité intenzitě el. pole ($kV_2 > kV_1$) se zakřivení menisku limitně blíží k nule a tvoří se stabilní „Taylorův kužel“

Z Taylorova kužele se začnou okamžitě vypuzovat jemné nabité kapky, které se vzájemně odpuzují, neboť mají souhlasné náboje ($kV_3 \approx kV_2$).

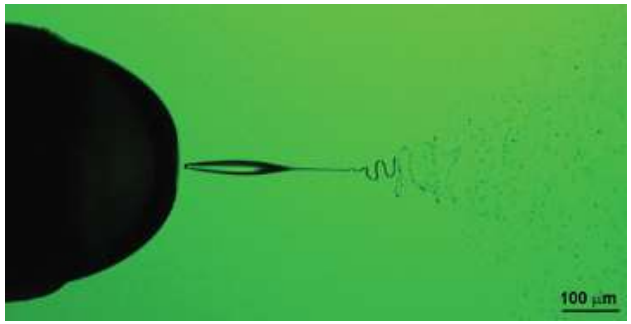
- *snímek převzat z přednášky doc. J. Cvačky (ÚOCHB, Praha)*

Základní typy sprejovacích režimů

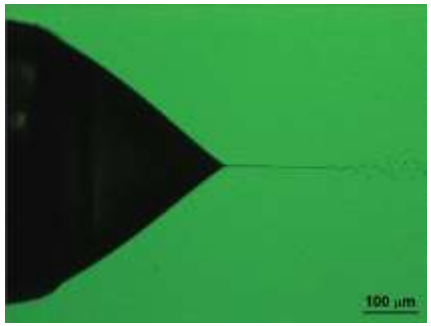
1/ explodující („burst“)
- trimodální distribuce velikosti částic
- minimální tvorba iontů analytu
- pro ESI bez významu



2/ pulzující Taylorův kužel („pulsating Taylor cone“)
- bimodální nebo monodisperzní distribuce částic podle použitého napětí
- velikost částic <10 µm

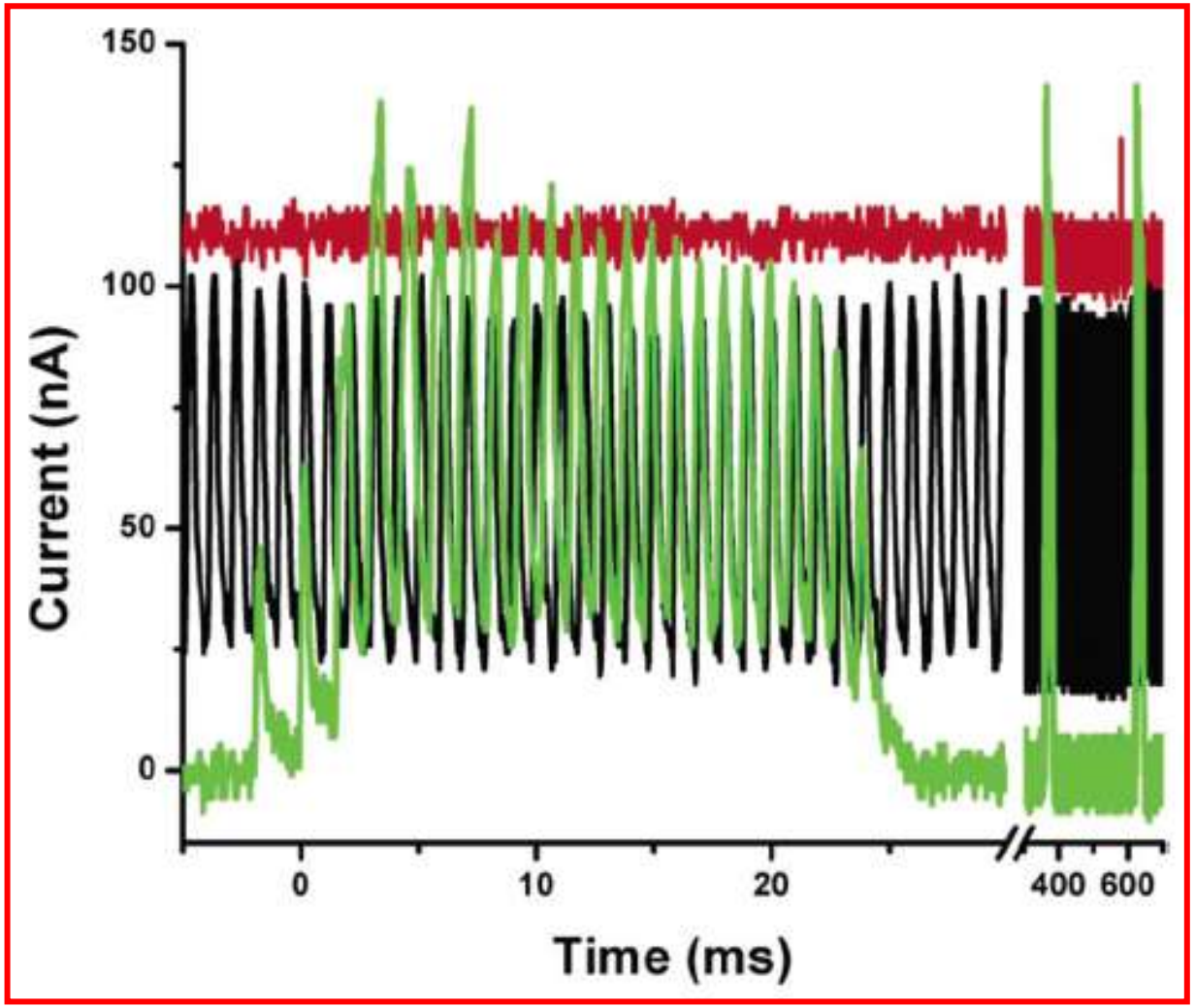


3/ tryskající kužel („cone-jet“)
- stabilní sprej bez pulzace, výrazně vyšší signál oproti prvním dvěma režimům, nižší fragmentace a potlačení oxidace, velikost částic <3 µm
- pouze tento režim má význam pro ESI-MS !!!



P. Nemes a kol., Anal. Chem. 79 (2007) 3105

Průběh závislosti proudu na sprejovacím režimu



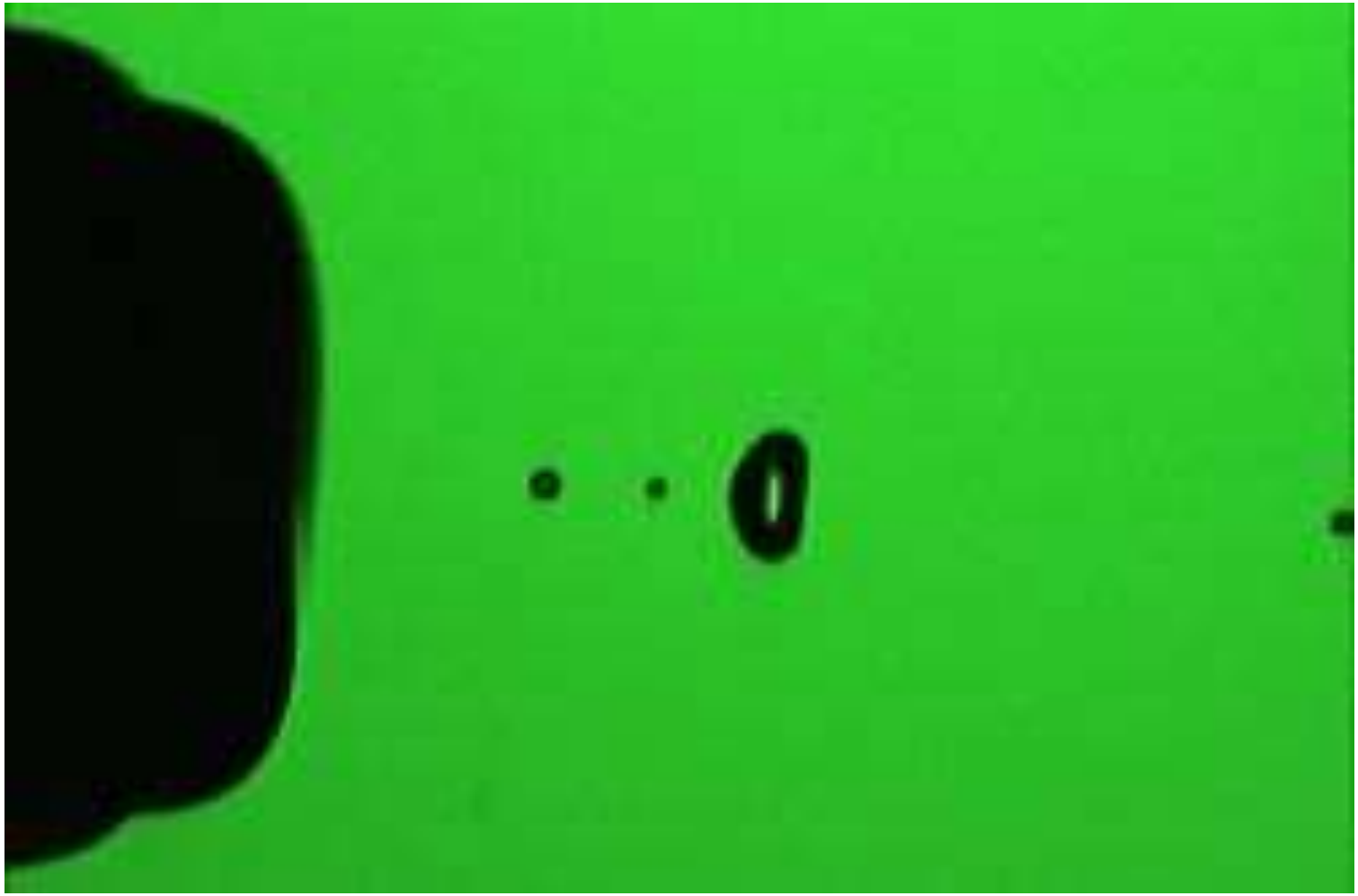
1/ zeleně – explodující (2.75 kV)

2/ černě – pulzující Taylorův kužel (2.95 kV)

3/ červeně – tryskající kužel (4.05 kV)

- průtok konstantní 1 μl/min, 50% methanol/voda

Sprejovací režim 1 - explodující („burst“)

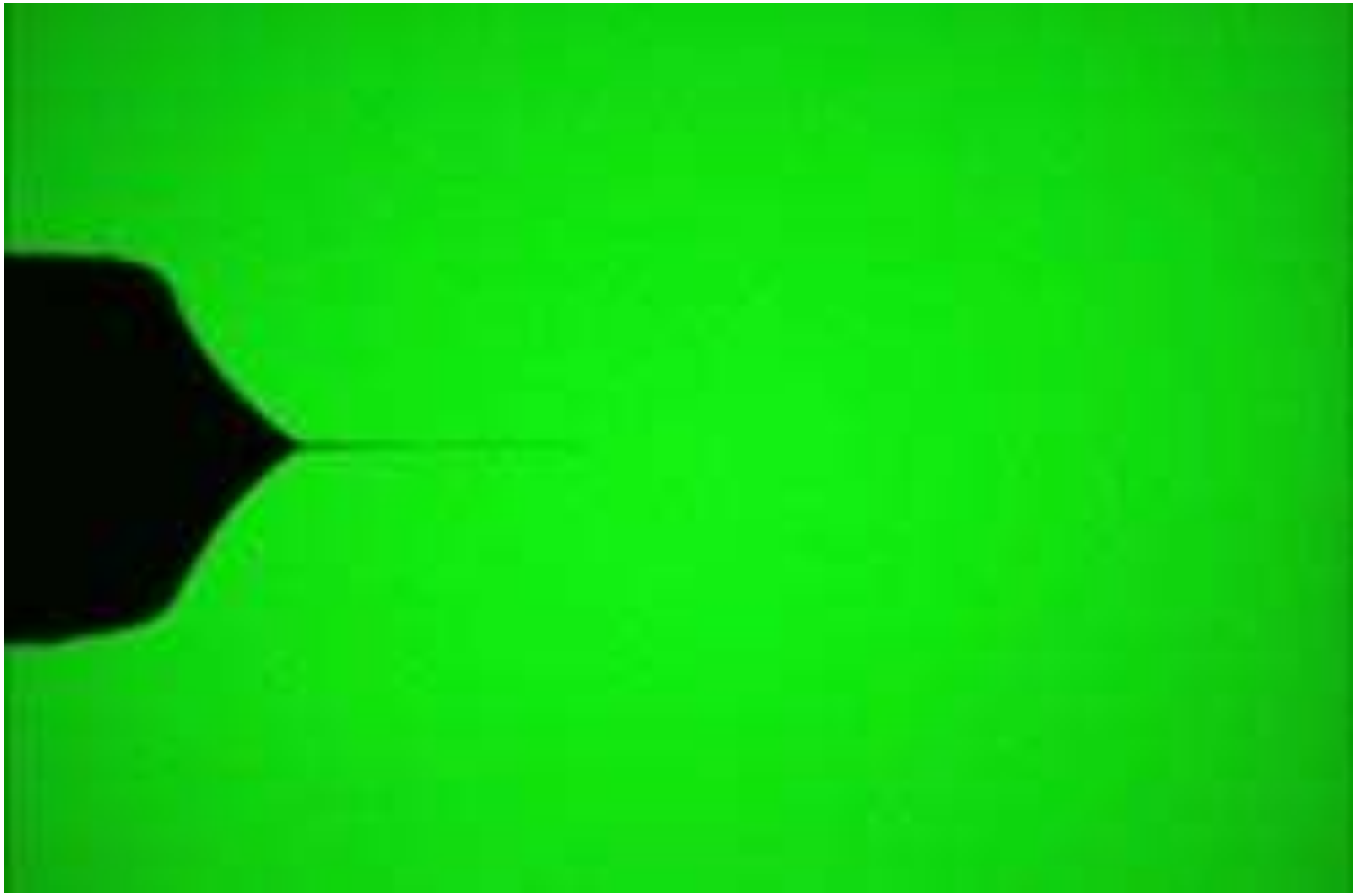


Podmínky: 50% methanol – voda, 2 μl/min, 3.4 kV

P. Nemes a kol., Anal. Chem. 79 (2007) 3105

Sprejovací režim 2 – pulzující Taylorův kužel

(menší průměr kapiláry – O.D. / I.D. = 260 / 130 mm)

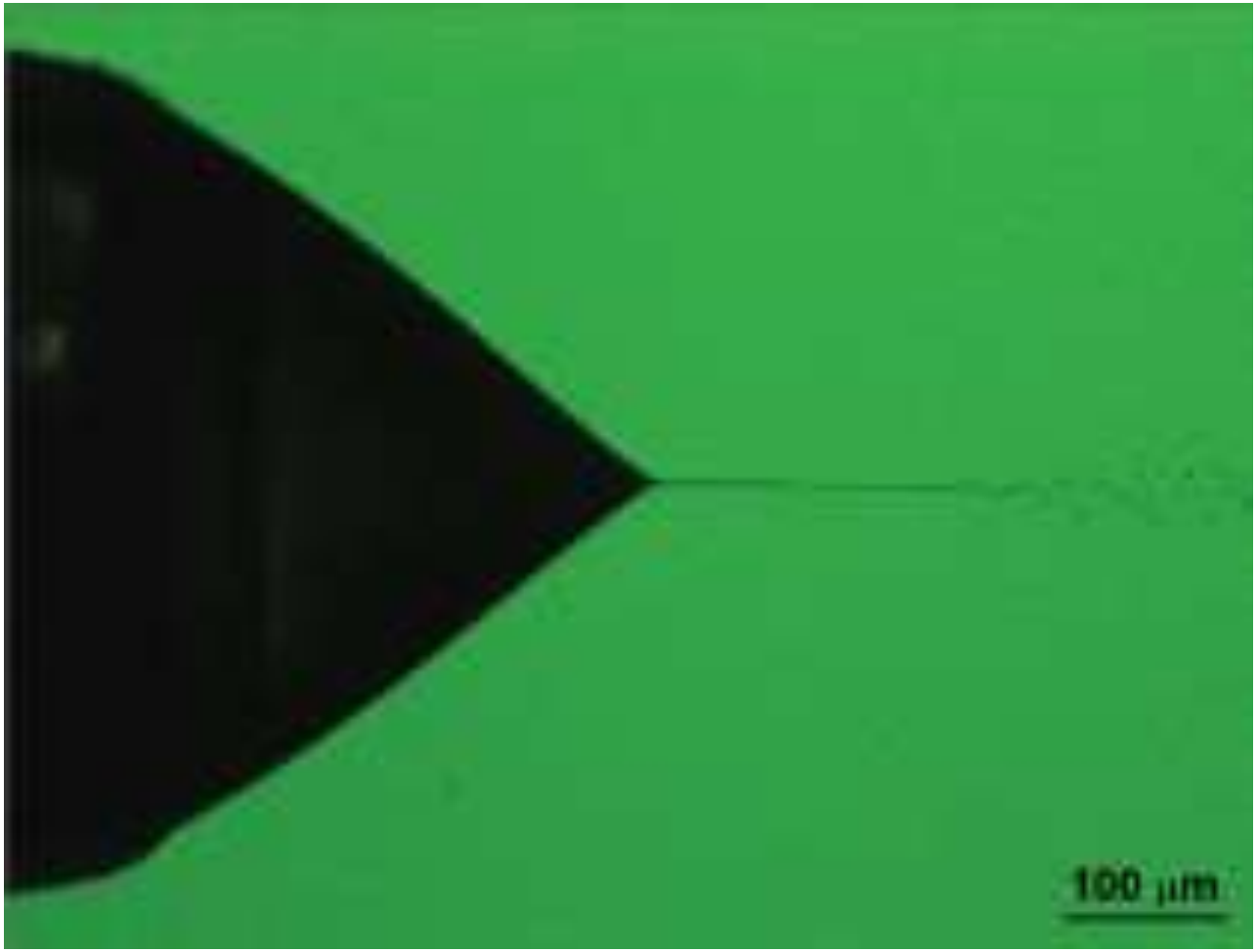


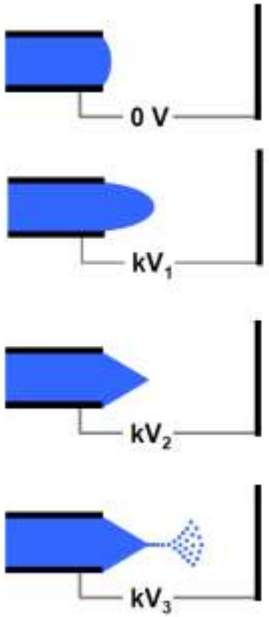
Podmínky: 50% methanol – voda + 0.1% k. octová, 2 μl/min, 3.4 kV

P. Nemes a kol., Anal. Chem. 79 (2007) 3105

Sprejovací režim 3 – tryskající kužel

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





Podmínky: 50% methanol – voda, 2 μl/min, 4 kV

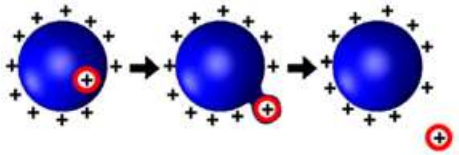
P. Nemes a kol., Anal. Chem. 79 (2007) 3105

ad 2/ Uvolnění iontů z kapiček

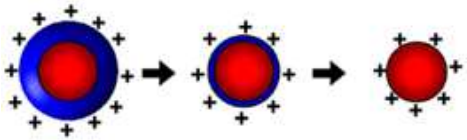
- vzniklé kapičky nesou na povrchu náboj
- odpařováním rozpouštědla se zvyšuje hustota náboje na povrchu
- Rayleighův limit - repulzní síly mezi náboji jsou stejné jako povrchové napětí kapičky, které udržuje kapku pohromadě
- po překročeni Rayleighova limitu dojde ke Coulombické explozi = rozpad na menší kapičky, mezi kterými je distribuován původní náboj
- tři modely vzniku iontů:

a) vypaření iontů (ion evaporation) - povrchové napětí vytrhne ion analytu z kapičky

v povrchu kapky se soustředí více ty ionty, které mají větší povrchovou aktivitu – snáze se z kapky vypařují.

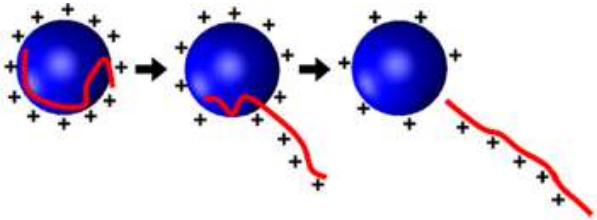


b) zbytkový náboj (charge residue) - odpaření rozpouštědla z nabité kapičky za vzniku iontů



c) uvolňováním řetězce (chain ejection)

rozbalený hydrofobní řetězec se v kapce tvořené polárním rozpouštědlem bude vyskytovat na povrchu, zde je na něj přenášen náboj a vzniklý ion postupně kapku opouští



ad 3/ Transport iontů

- při vstupu do vakua dochází k velkému ochlazení iontů a nežádoucí tvorbě klastrů
- preventivní opatření proti tvorbě klastrů:

  1/ protiproud dusíku jako sušícího plynu (volba teploty a průtoku plynu podle průtoku a složení mobilní fáze) - odstranění vodních par a dalších neutrálních molekul z transportní části vakuového systému

  2/ vyhřívání iontového zdroje na T=250°C - teplota plynu i vzniklých iontů zůstane dostatečně vysoká i po expanzi do vakua, aby nemohlo dojít ke vzniku klastrů

Vliv složení mobilní fáze na potlačení odezvy

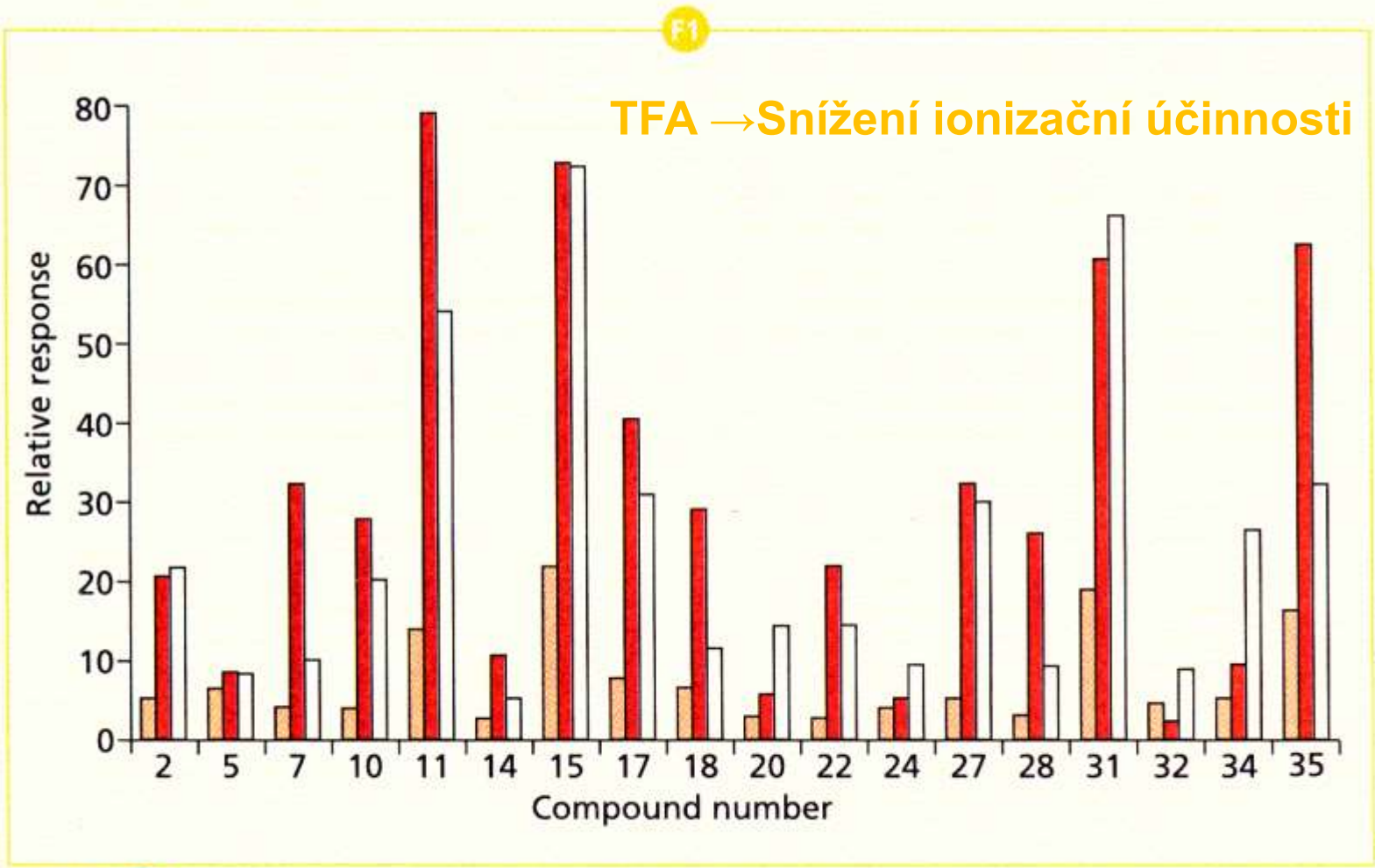
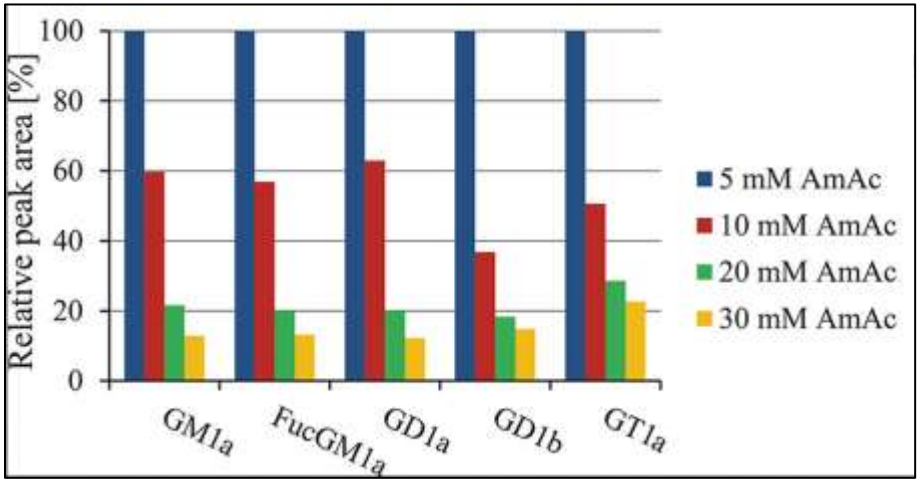


Figure 1: *A comparison of the relative responses shown by a selection of compounds studied in the methanol-based eluents. ( ) TFA, ( ) formic acid and ( ) ammonium formate.*

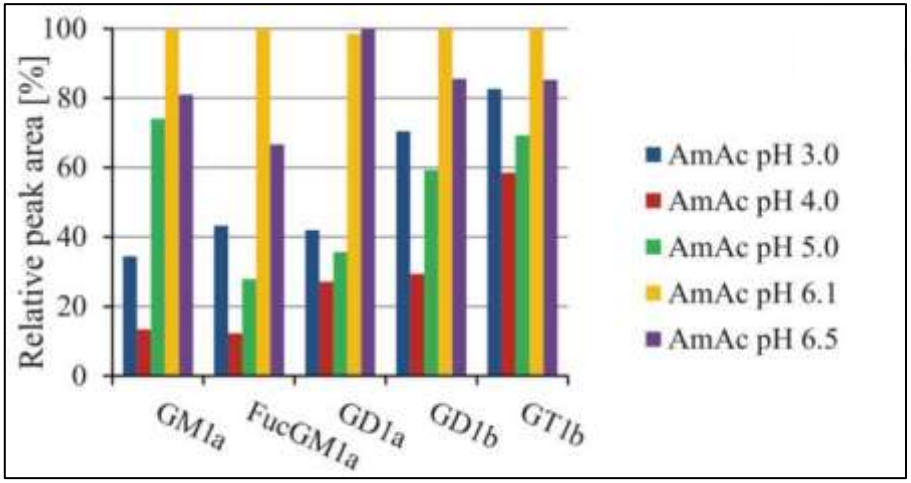
D. Temesi & B. Law, LC GC International 12, 175 (1999)

Vliv složení mobilní fáze u LC/ESI-MS

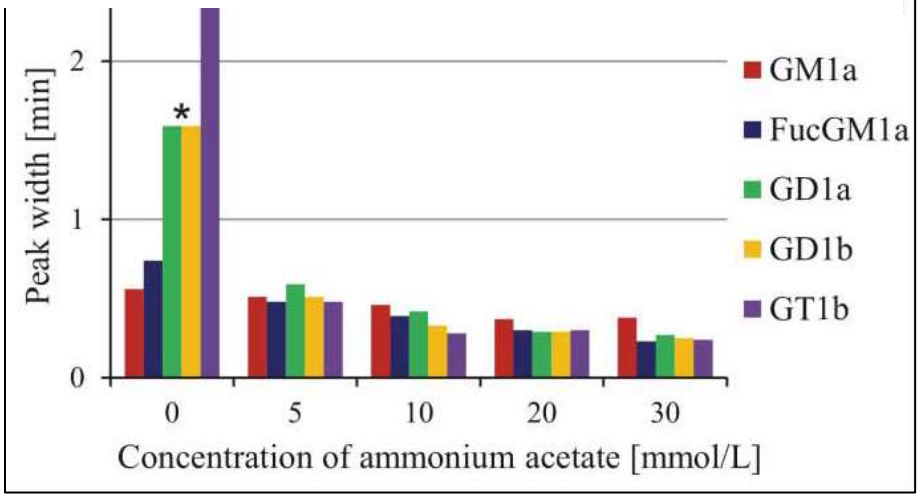
Vliv koncentrace aditiva na MS signál



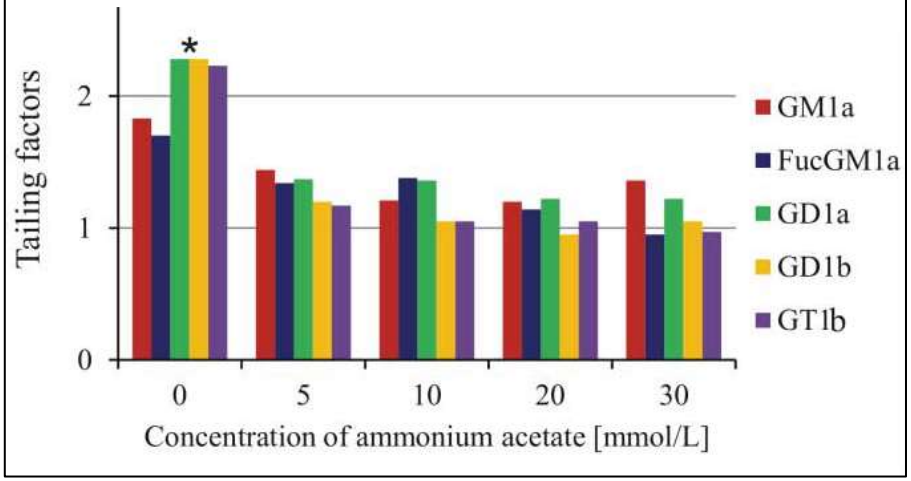
Vliv pH na MS signál



Vliv koncentrace aditiva na šířku chromatografického píku



Vliv koncentrace aditiva na kvalitu chromatografického píku



R. Hájek a kol., Anal. Chem. 2017, 89, 12425-12432.

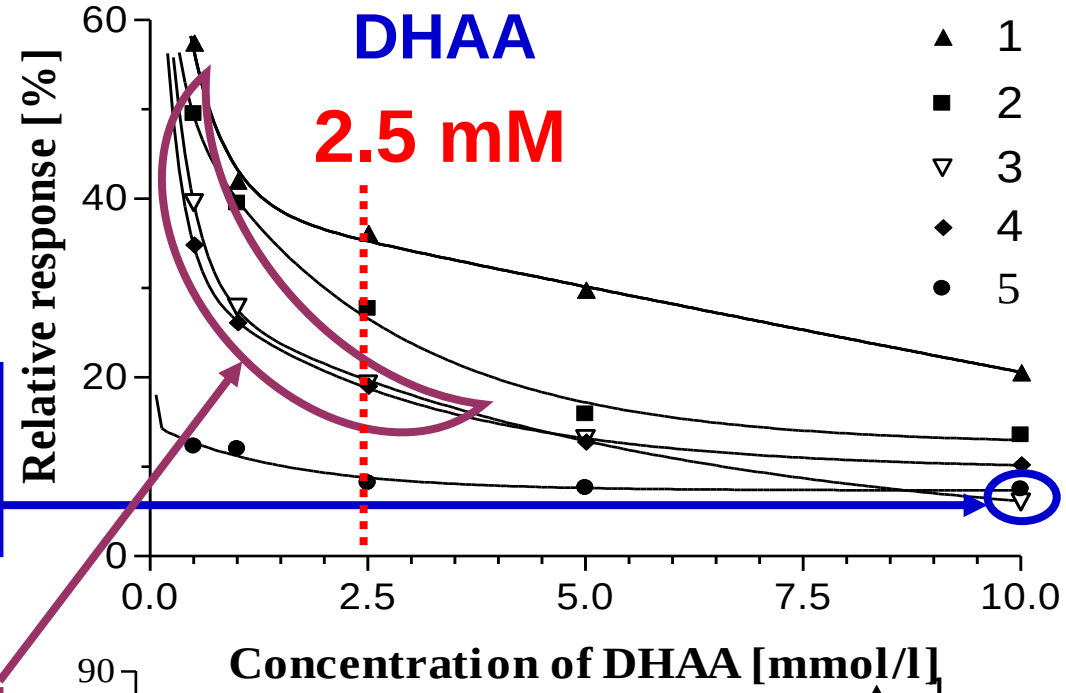
Vliv geometrie iontového zdroje na potlačení ESI odezvy

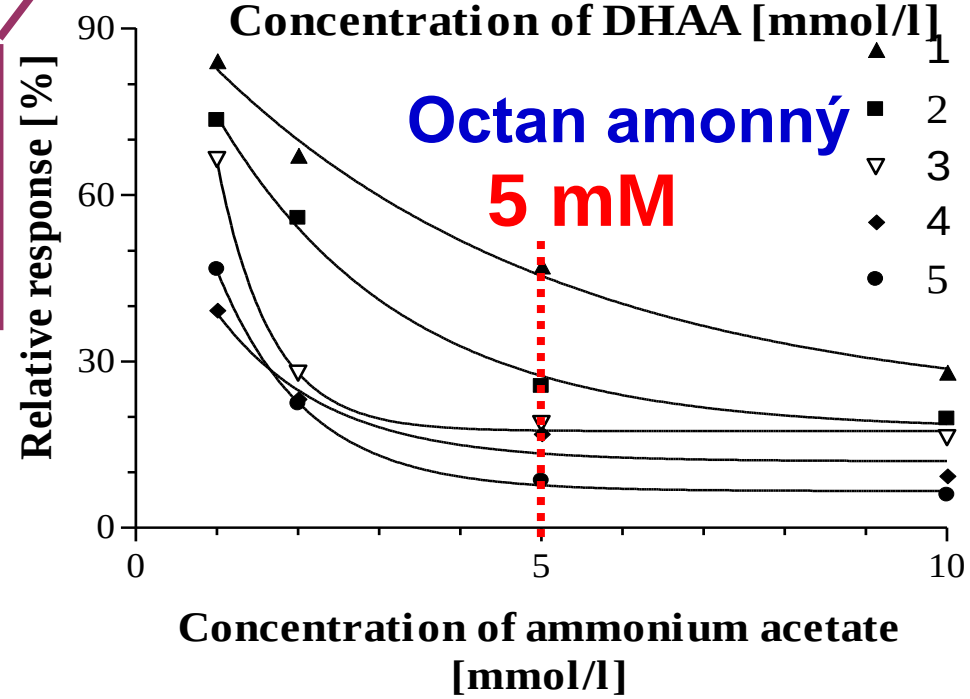
- pro všech 50 bodů kromě 1 platí:

Z-sprej < orthogonální < lineární

- přístroje od 1 výrobce (č. 3 a 4) dávají velmi podobné výsledky = nejde pouze o vliv úhlu elektrospreje, ale o celkové uspořádání přístroje

1/ Z-sprej Q
2/ orthogonální IT
3/ orthogonální Q
4/ lineární IT
5/ lineární Q





M. Holčapek a kol., J. Mass Spectrom. 2004, 39, 43-50.

Potlačení odezvy - konkurenční ionizace

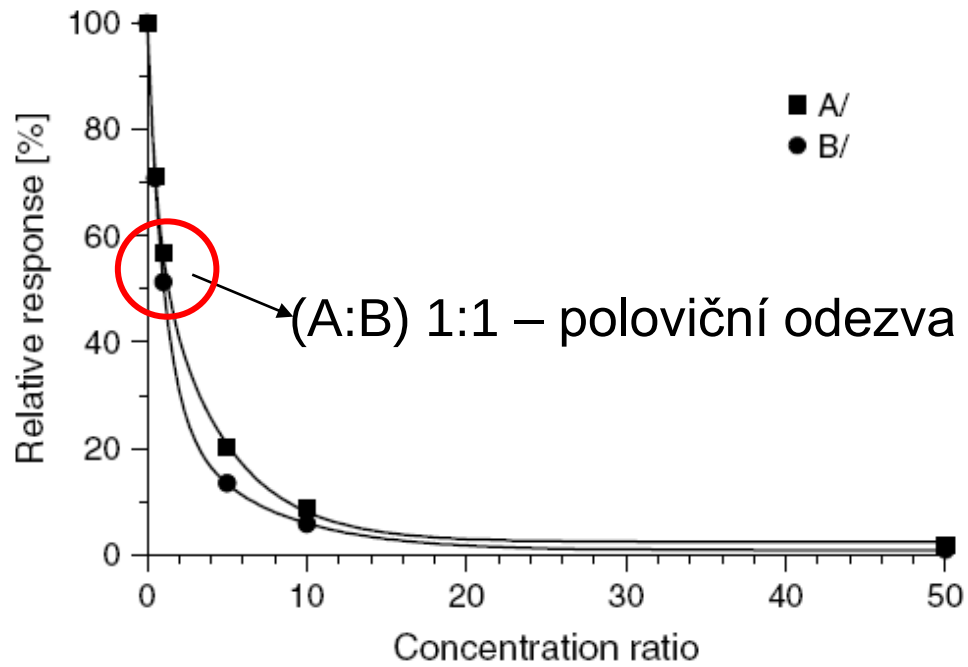


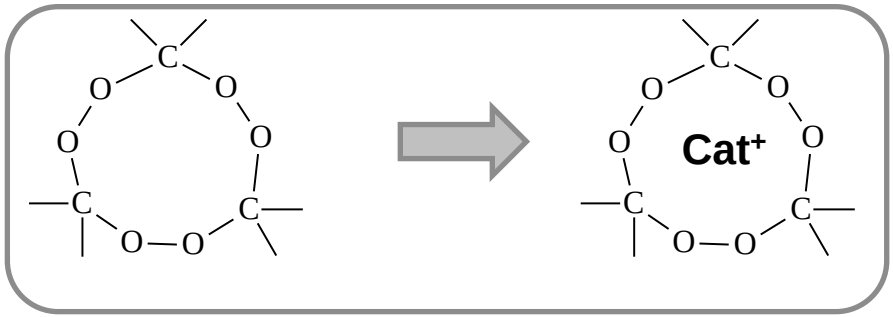
Figure 4. Competitive ionization of two monosulphonated dyes, Egacid Yellow M and Egacid Blue A2G. Concentration of the 'target' compound is 3 mg l^{-1}; the 'interfering' compound is added to 50% aqueous acetonitrile at various concentration ratios (1 : 0.5, 1 : 1, 1 : 5, 1 : 10 and 1 : 50). The target compound is Egacid Yellow M (plot A) and Egacid Blue A2G (plot B).

- 2 monosulfonovaná barviva
- jedno barvivo je „analyt“ o konstantní koncentraci 3 mg/l, druhé barvivo je přidávané v různém koncentračním poměru jako „interferující“ iontová látka
- relativní odezva je vztažena k odezvě látky v roztoku bez „interferentu“
- teoreticky by odezva „analytu“ měla být vždy 100%, ale prakticky je díky konkurenční ionizaci „interferentu“ výrazně nižší

- v prvním případě se barvivo A přidává v různých poměrech ke konstantní koncentraci barviva B
- v druhém je to naopak (barvivo B se přidává ke konstantní koncentraci barviva A)

Adukty s kationty při MS identifikaci TATP

přídavek Na^+, K^+, NH_4^+ do roztoku analytu podpoří ionizaci (komplexace uvnitř kruhu)



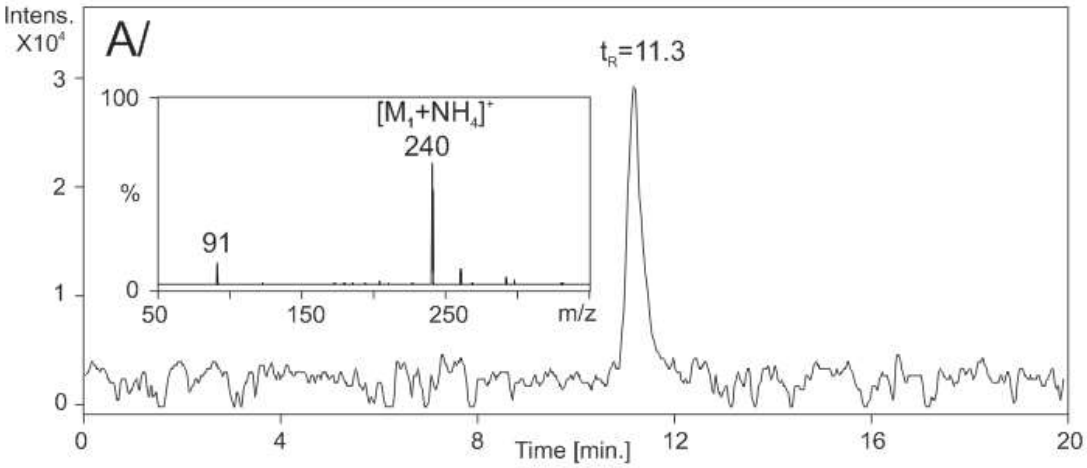
triacetone triperoxid (TATP)

Marrakesh, 30.4.2011 – zdevastovaná kavárna Argana Cafe po výbuchu bomby obsahující TATP

HPLC/ESI$^+$-MS

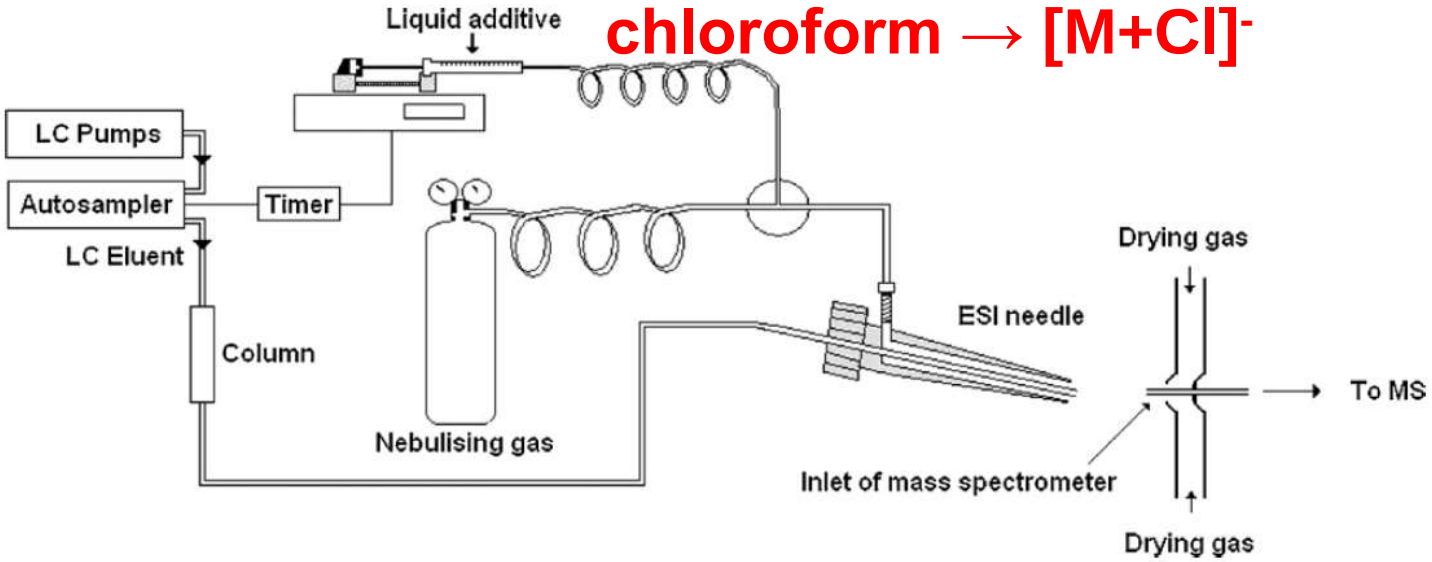
Mobilní fáze: ACN/5mM CH_3COONH_4

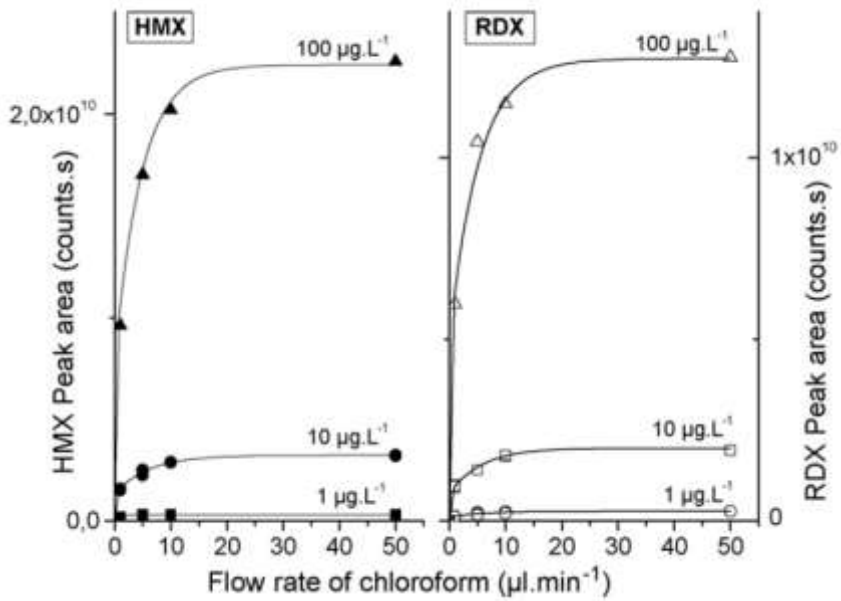
(70:30, v/v)

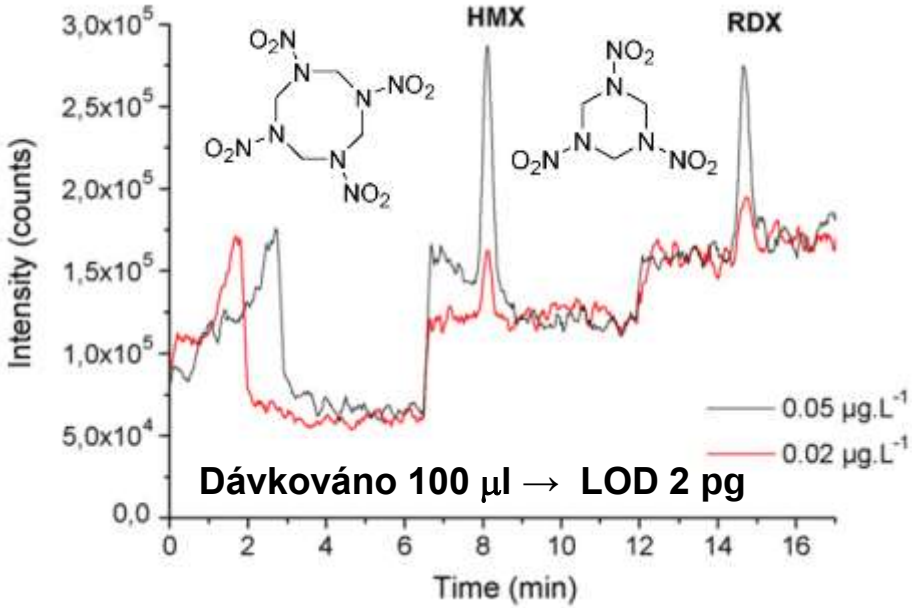


HPLC/MS - přídavek aditiva do zmlžujícího plynu

chloroform → $[M+Cl]^-$





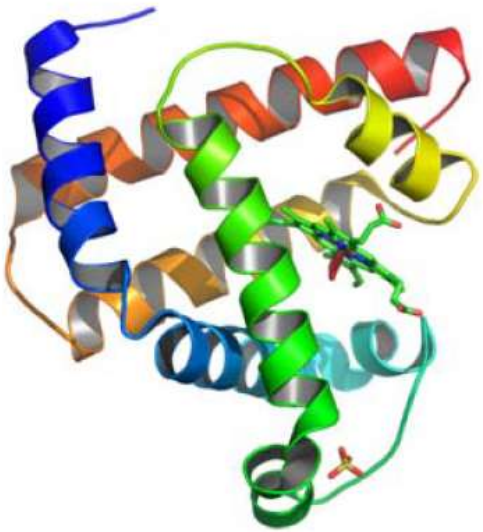


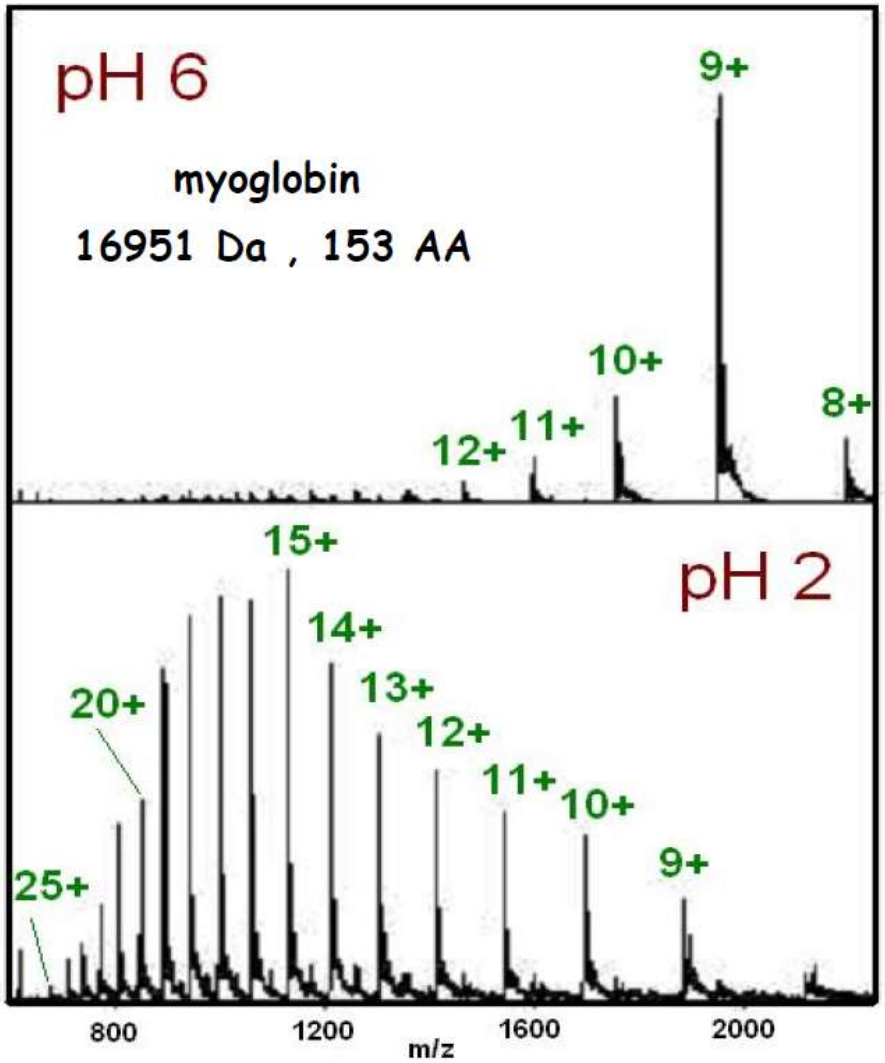
O. Vigneau et al., Talanta (2009) 77: 1609-1613.

Aplikace ESI - určení M_R proteinů

Elektrosprej

Příklad: Analýza proteinů - myoglobin

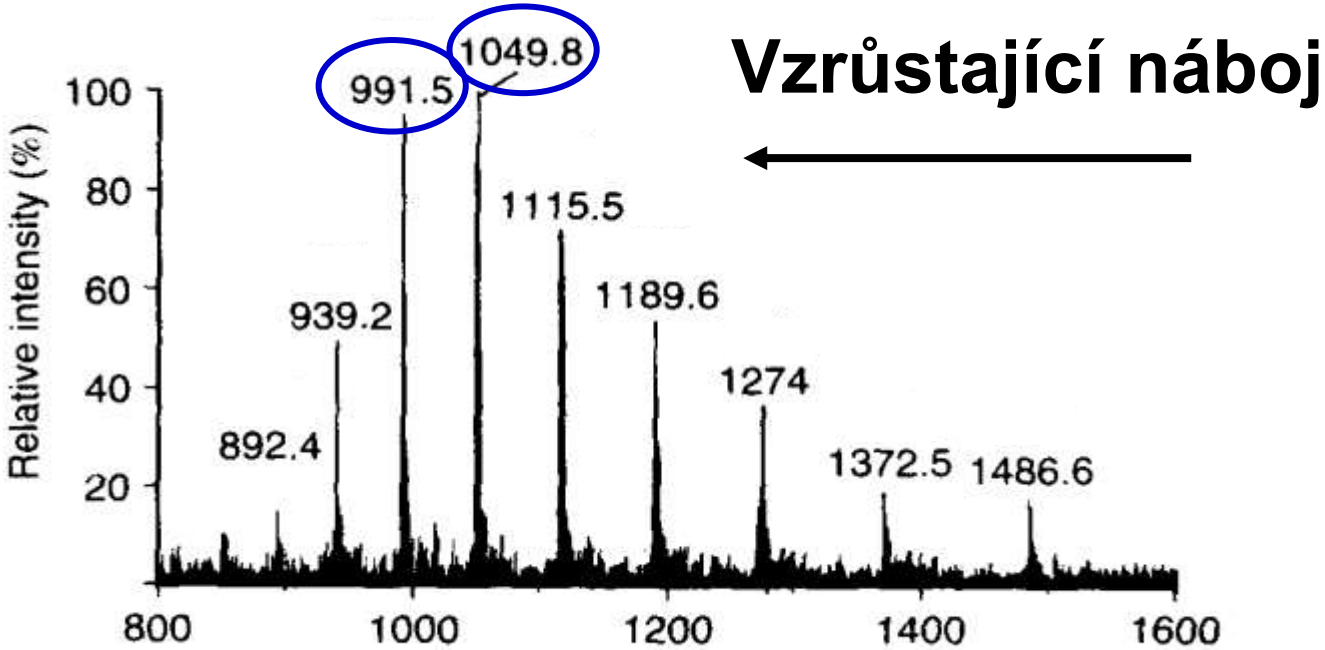




Tvorba vícenásobně nabitých molekulárních aduktů $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[M+3H]^{3+}$, $[M+4H]^{4+}$, atd. Distribuce nábojových stavů závisí na pH mobilní fáze.

- *snímek převzat z přednášky doc. J. Cvačky (ÚOCHB, Praha)*

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: $M_R = 991.5 * 18 – 18 = 17829.0$, atd.
- pak zprůměrování a výpočet M_R (tzv. dekonvoluce), vše automaticky softwarově

Nanoelektrosprej

- někdy se zkráceně nazývá nanosprej
- průtoky jednotky až stovky nl/min, sprejovací kapilára (velmi malý průměr několik μm)
- rozdíly oproti „klasickému“ ESI:
  - nepoužívá se zmlžující plyn
  - tvorba menších kapek – snazší desolvatace
  - vyšší účinnost ionizace
  - nižší teploty sušícího plynu, vkládá se nižší napětí (0,5 – 1,5 kV)

- speciální adjustace konce sprejující kapiláry v rovinách xyz pomocí mikrometrických šroubů a mikroskopu (optimalizace je experimentálně náročnější)
- obvykle se sprejuje přímo proti vstupní kapiláře do analyzátoru (např. pod úhlem 45°) ve vzdálenosti 1 - 2 mm

Nanoelektrosprej

• extrémně nízká spotřeba vzorků (např. studium procesů in vivo)

• vysoká koncentrační citlivost (lze analyzovat pouhé stovky molekul - attomoly až zeptomoly)

• vyšší tolerance vůči obsahu solí v roztoku

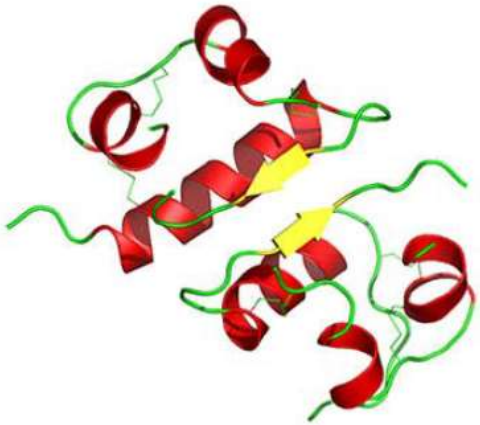
- snižuje nároky na úpravu vzorků před analýzou
- **menší průměr primárně vzniklých nabitých kapiček** ve srovnání s konvenčním ESI, proto **menší počet cyklů Coulombických explozí**, a proto odpařováním rozpouštědla dojde k **menšímu zakoncentrování solí** v jednotlivých kapičkách

• lze použít v uspořádání off-line (přímé čerpání rozpuštěného vzorku infúzní pumpou) nebo online (spojení CE/MS bez přídavného toku kapaliny technikou “sheathless CE/MS” nebo kapilární nano-HPLC/MS)

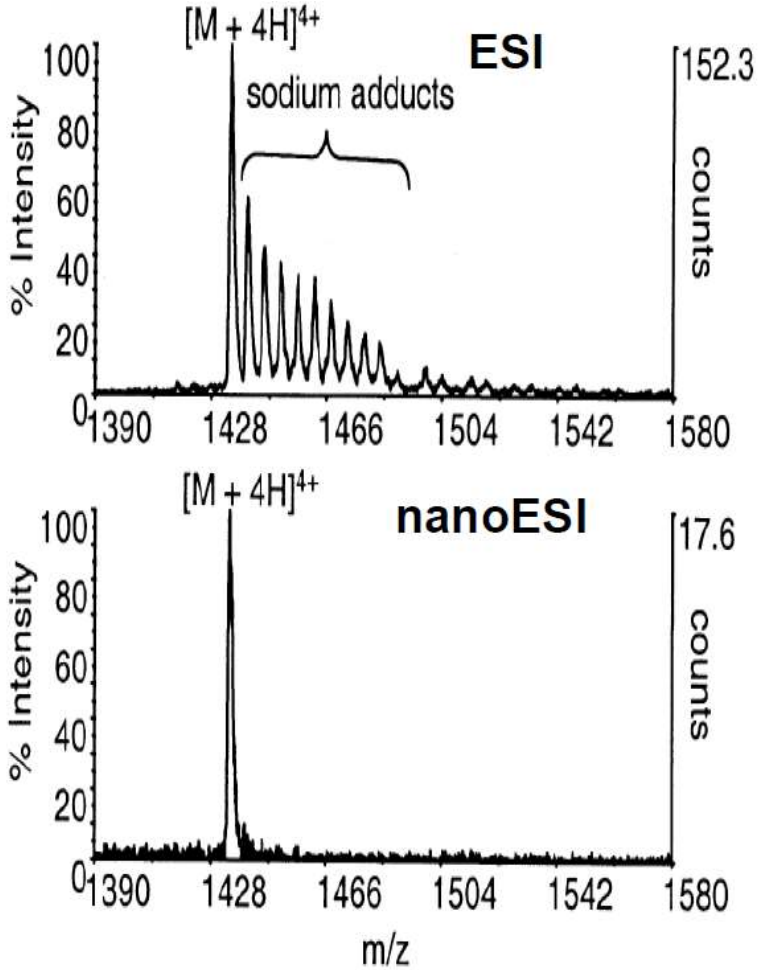
• ve srovnání s konvenčním ESI je experimentálně náročnější a méně robustní

NanoESI versus ESI

Příklad: Analýza inzulínu – srovnání ESI a nanoESI v přítomnosti solí



V přítomnosti sodných kationtů se v případě elektrospreje tvoří vedle $[M+4H]^{4+}$ ještě sodné adukty. NanoESI je méně citlivý na přítomnost solí, proto se adukty s Na^+ netvoří.

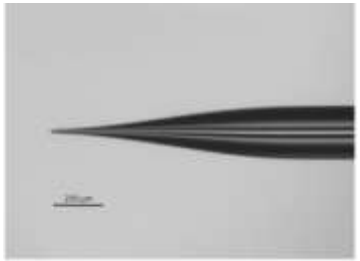


Schmidt et al., *J Am Soc Mass Spectrom.* 2003 14(5):492.

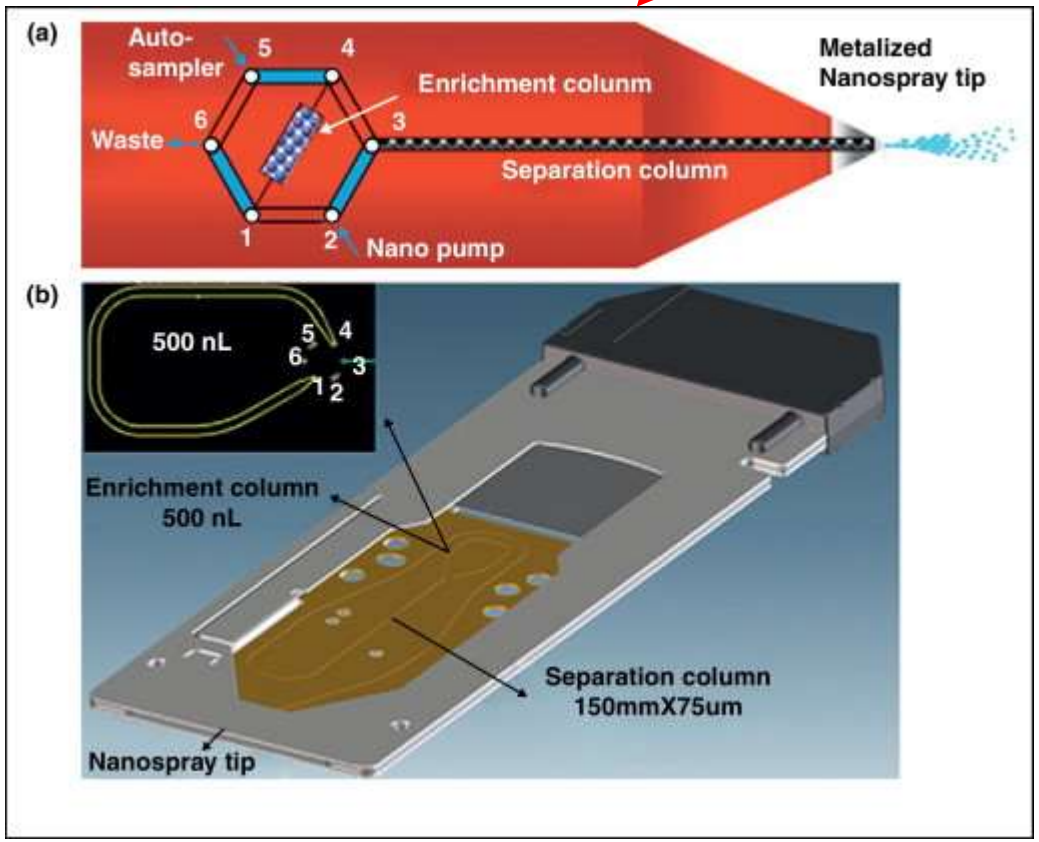
- *snímek převzat z přednášky doc. J. Cvačky (ÚOCHB, Praha)*

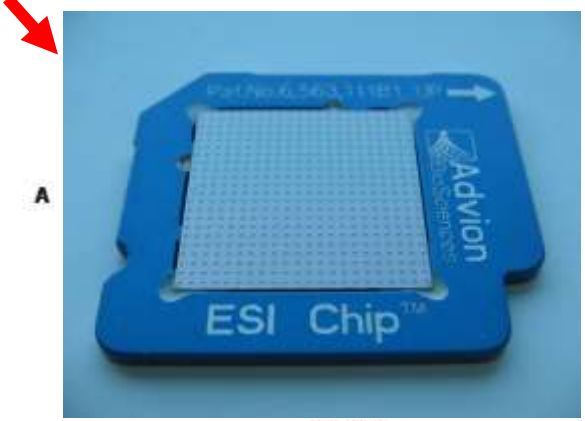
Nanoelektrosprej

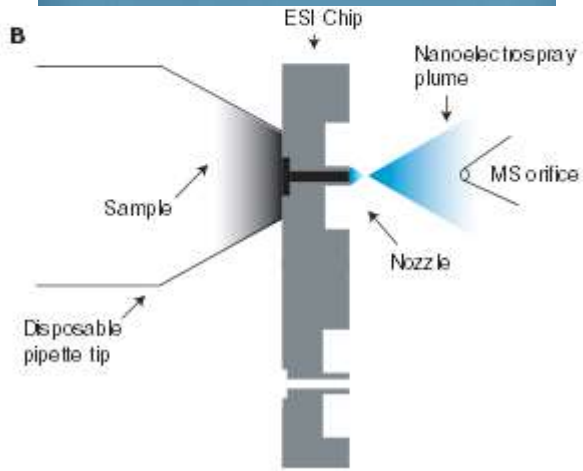
• používají se speciální kovové špičky kapiláry vytažené do velmi úzkého konce o průměru 5 - 10 μm kvůli dosažení stabilního spreje



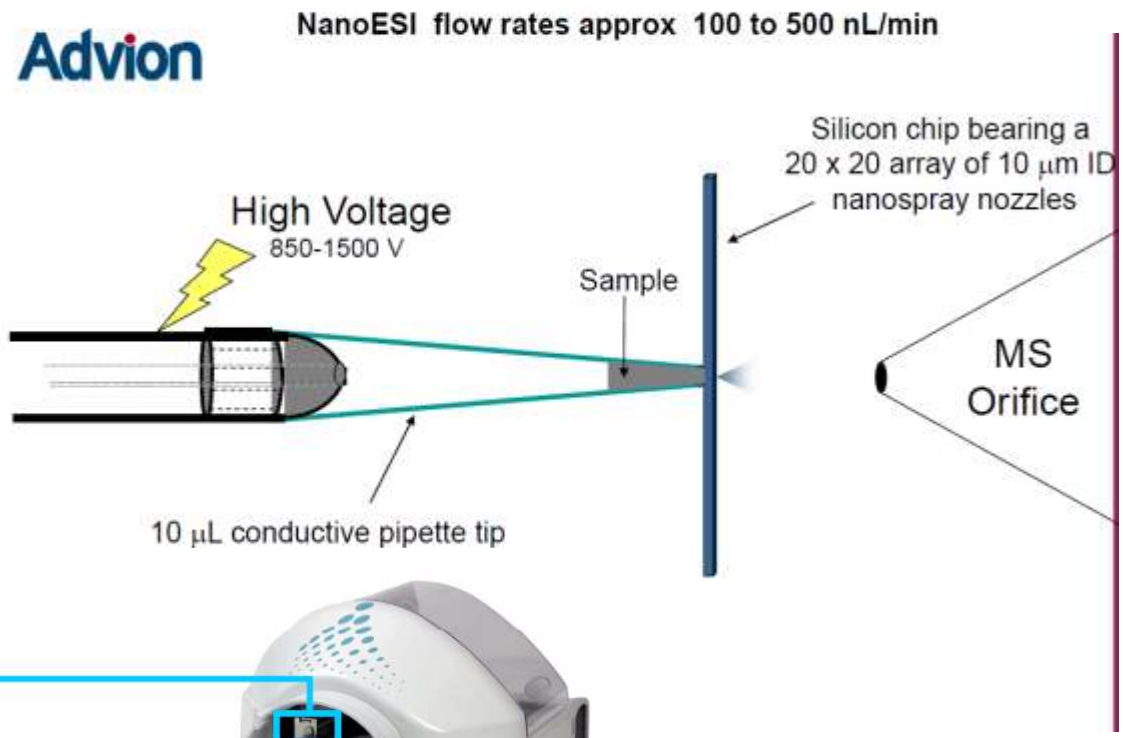
• často součástí čipů pro separaci látek či robotické zařízení pro přímou infúzi vzorků

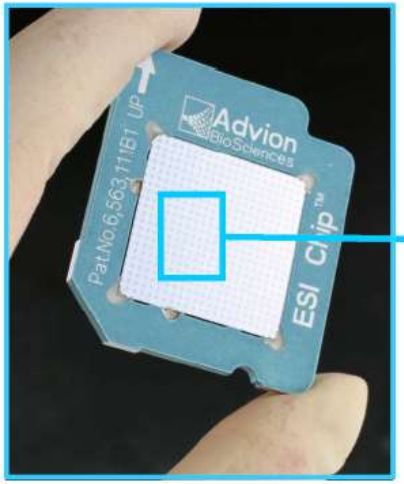


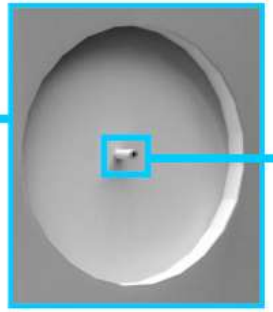


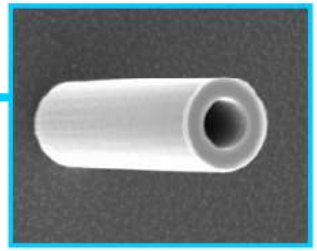


Triversa NanoMate® robotic system



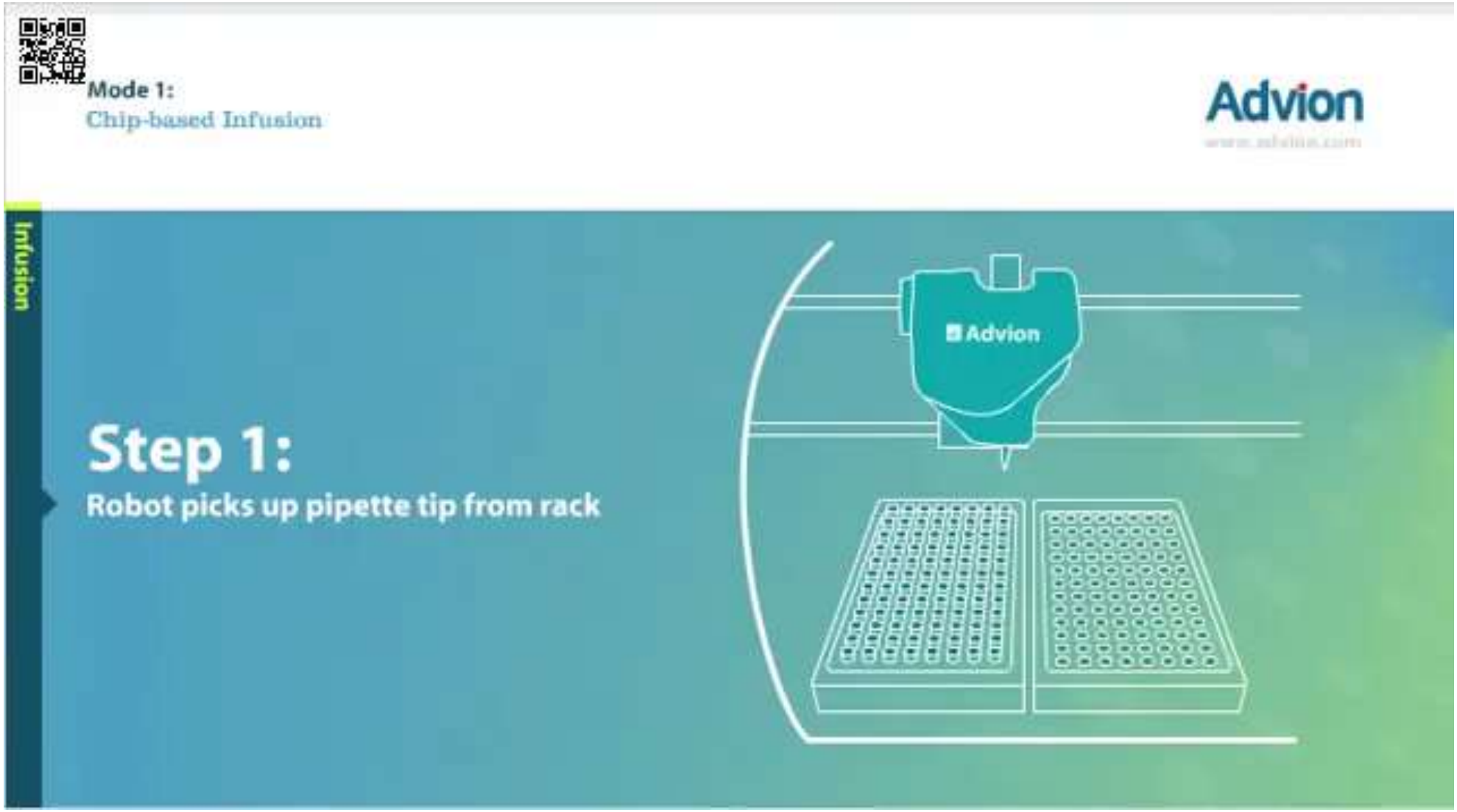






detail nanoESI trysky

Nanomate robotic system



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

APCI

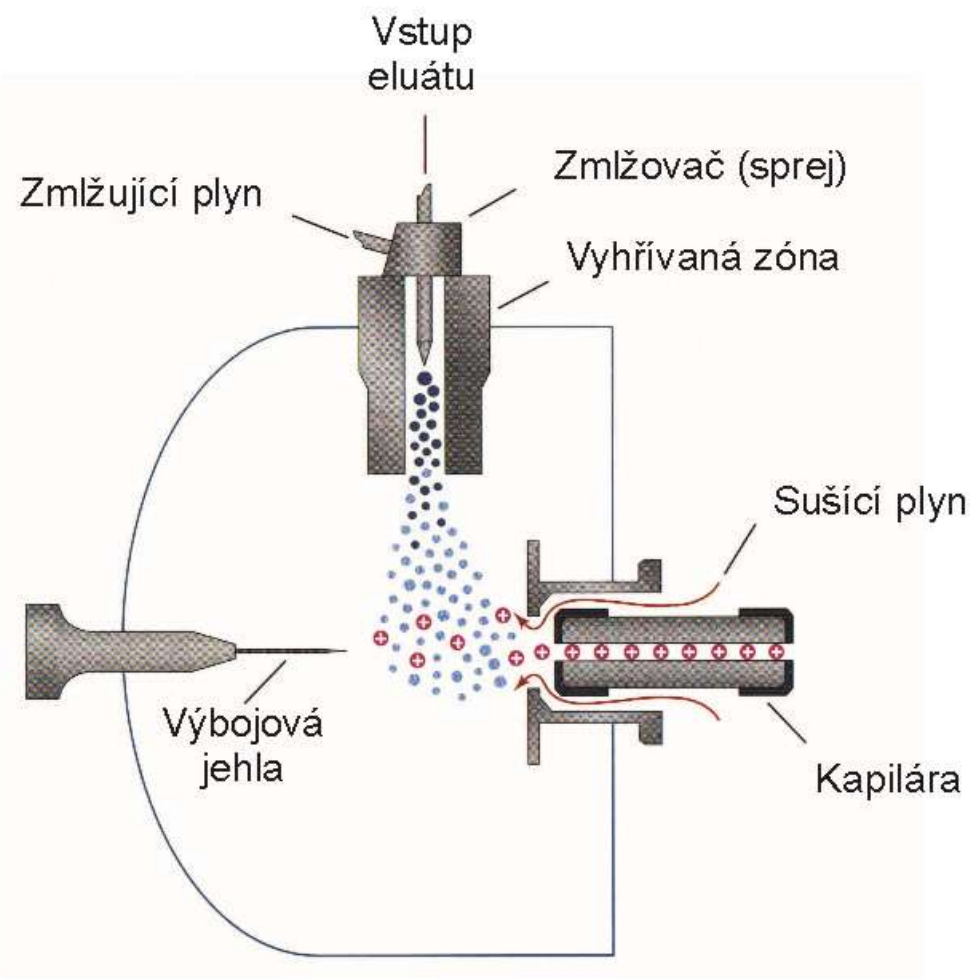
(Atmospheric Pressure Chemical Ionization)

Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)

- dnes je APCI druhá nejčastěji používaná ionizační technika pro spojení HPLC/MS
- oproti ESI ionizace probíhá v plynné fázi ➪ není vhodná pro ionizaci polárních látek, velkých biomolekul
- průtok HPLC eluentu ca. 0.1 - 1.5 ml/min, přímá infúze desítky až stovky µl
- pro látky nepolární až středně polární
- vhodné pro použití s nepolárními mobilními fázemi
- lze ionizovat molekuly s M_R ca. do 1500
- měkká ionizační technika - mírně "tvrdší" ve srovnání s ESI
  - $[M+H]^+$, $[M-H]^-$, vznikají pouze jednou nabité ionty
  - méně častá ionizace tvorbou aduktových iontů
  - běžně jsou pozorovány fragmentové ionty

Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)

- princip APCI je obdobný jako pro konvenční CI, ale ionizace probíhá za atmosférického tlaku
- eluát je na konci kapiláry zmlžen do vyhřívané zóny a rychle odpařen
- na výbojovou jehlu (nahrazuje zdroj e^-) 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 molekuly analytu ion-molekulárními reakcemi s reakčním plynem (tj. ionizovanými molekulami mobilní fáze)
- vzniklé ionty jsou elektrodami usměrněny do analyzátoru
- protiproud sušícího plynu (dusík) slouží k rozbití případných nekovalentních klastrů



Mechanismy tvorby kladných iontů

1/ Tvorba primární iontů ze zmlžujícího plynu - elektronová ionizace

2/ Tvorba reakčních iontů z mobilní fáze a aditiv

3/ Hlavní mechanismy ionizace analytu

Mechanismy tvorby kladných iontů

1/ Tvorba primární iontů ze zmlžujícího plynu - elektronová ionizace

2/ Tvorba reakčních iontů z mobilní fáze a aditiv

3/ Hlavní mechanismy ionizace analytu

$N_2 + e^- \longrightarrow N_2^{+\cdot} + 2e^-$ (ionizační energie (IE) = 15.58 eV)

$N_2^{+\cdot} + 2N_2 \longrightarrow N_4^{+\cdot} + N_2$

Good A. a kol., J. Chem. Phys. 52 (1970) 212
Carroll D.I. a kol., Appl. Spectr. Rev., 17 (1981) 337
Kostiainen R. a kol., J. Chromatogr. A 1216 (2009) 685

Mechanismy tvorby kladných iontů

1/ Tvorba primární iontů ze zmlžujícího plynu - elektronová ionizace

2/ Tvorba reakčních iontů z mobilní fáze a aditiv

3/ Hlavní mechanismy ionizace analytu

$N_4^{+\cdot} + H_2O \longrightarrow H_2O^{+\cdot} + 2N_2$ (výměna náboje, IE_{voda} = 12.62 eV)

$H_2O^{+\cdot} + H_2O \longrightarrow H_3O^{+} + OH^{\cdot}$ (přenos protonu)

$H_3O^{+} + nH_2O \longrightarrow (nH_2O)H^{+}$ (vznik aduktů)

$N_4^{+\cdot} + R \longrightarrow R^{+\cdot} + 2N_2$ (výměna náboje)

$H_3O^{+} + R \longrightarrow [R+H]^{+} + H_2O$ (přenos protonu)

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

Mechanismy tvorby kladných iontů

1/ Tvorba primární iontů ze zmlžujícího plynu - elektronová ionizace

2/ Tvorba reakčních iontů z mobilní fáze a aditiv

3/ Hlavní mechanismy ionizace analytu

$M + [R+H]^+ \longrightarrow [M+H]^+ + R$ (přenos protonu, $PA_M > PA_R$)

$M + R^{+\cdot} \longrightarrow M^{+\cdot} + R$ (přenos náboje, $IE_M < IE_R$)

$M + Kat^+ \longrightarrow [M+Kat]^+$ (tvorba aduktů, Kat ... Na^+, K^+, NH_4^+, Ag^+ atd.)

$M + [R+H]^+ \longrightarrow [M+H]^+ + R$ (adice rozpouštědla)

$[M+H]^+ + R \longrightarrow [M+H+R]^+$

$M + [M+H]^+ \longrightarrow [2M+H]^+$ (tvorba klastrů)

$M + [M+Na]^+ \longrightarrow [2M+Na]^+$

M ... molekula analytu

R ... rozpouštědlo (=reakční plyn)

X ... halogen, anorganický aniont

Základní mechanismy tvorby záporných iontů

$M + e^- \longrightarrow M^{-\cdot}$ (záchyt elektronu, elektronová afinita (EA)>0)

$M + [R\text{-}H]^- \longrightarrow [M\text{-}H]^- + R$ (přenos protonu, ztráta protonu)

$M + R^{-\cdot} \longrightarrow M^{-\cdot} + R$ (výměna náboje)

$M + X^- \longrightarrow [M+X]^-$ (tvorba aduktů)

- důležité reakční ionty vznikají z kyslíku z iontového zdroje

$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{-\cdot}$

$M + O_2^{-\cdot} \longrightarrow [M\text{-}H]^- + HO_2^{\cdot}$ (přenos protonu, ztráta protonu)

$M + O_2^{-\cdot} \longrightarrow M^{-\cdot} + O_2$ (výměna náboje, $EA_M > EA_{O_2} = 0.451$ eV)

$M + O_2^{-\cdot} \longrightarrow [M\text{-}X+O]^- + OX^{\cdot}$ ($X = H, Cl, NO_2$)

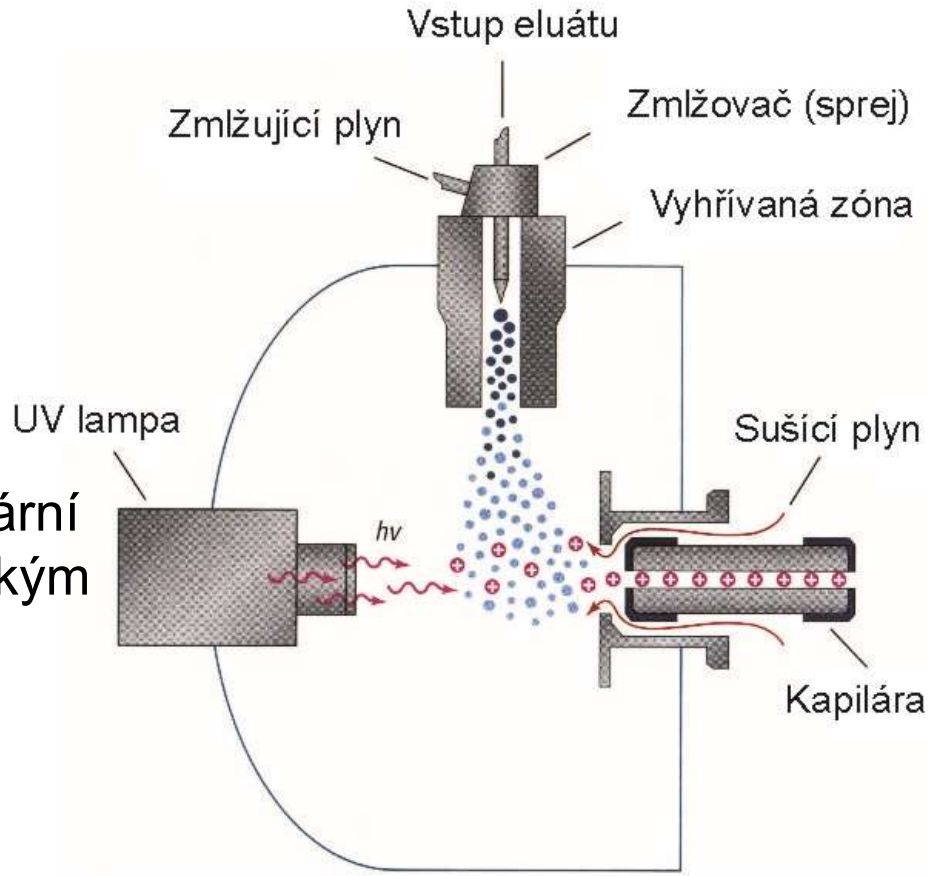
M ... molekula analytu
R ... rozpouštědlo (=reakční plyn)
X ... halogen, anorganický aniont

APPI

(Atmospheric Pressure Photoionization)

Fotoionizace za atmosférického tlaku

- stejné uspořádání zdroje jako pro APCI, jen se pro ionizaci molekul místo jehly s vloženým napětím používá zdroj UV záření
- průtoky HPLC eluentu ca. 0.1 - 1.5 ml/min, přímá infúze desítky až stovky µl
  - v porovnání s APCI pracuje lépe při nižších průtocích
- možnost práce v NP-HPLC
- pro látky nepolární až středně polární
- lze ionizovat molekuly s M_R ca. do 2000
- měkká ionizační technika
  - $[M+H]^+$, $[M-H]^-$
  - běžně vnikají i ionty s lichým počtem elektronů - $M^{+\cdot}$, $M^{-\cdot}$, zejména pro nepolární sloučeniny nebo pro sloučeniny s vysokým stupněm konjugace



Fotoionizace molekul v APPI

- fotoexcitační reakce

$$M + h\nu \longrightarrow M^*$$

$$R + h\nu \longrightarrow R^*$$

$$M^* \longrightarrow M_1 + M_2 \quad \text{(fotodisociace)}$$

$$M^* \longrightarrow M + h\nu \quad \text{(vyzáření energie)}$$

$$M^* + R \longrightarrow M + R^* \quad \text{(předání energie)}$$

$$M^* + \textit{plyn} \longrightarrow M + \textit{plyn}^* \quad \text{(předání energie)}$$

M ... molekula analytu
R ... rozpouštědlo

... stejné reakce platí i pro použité rozpouštědlo

- **pokud $h\nu \geq$ IE (ionizační energie) molekuly**

$$\mathbf{M + h\nu \longrightarrow M^{+\cdot} + e^-}$$

Raffaelli A., Saba A., Mass Spectrom. Rev. 22 (2003) 318

Použití dopantu v APPI

- přímá ionizace molekul je statisticky málo pravděpodobná (i pokud je IE < hν), proto se přidávají látky, které mohou výrazně zvýšit tvorbu iontů, tzv. dopanty
- dopant slouží jako mezičlánek mezi fotony a analytem (má nízkou ionizační energii)
- dopant musí mít IE nižší než je energie emitovaného světla
- nejdříve je dopant ionizován a následně dochází k přenosu protonu nebo k výměně náboje

$D + h\nu$	$\longrightarrow$	$D^{+\cdot}$	(ionizace dopantu)
$D^{+\cdot} + M$	$\longrightarrow$	$M^{+\cdot} + D$	(výměna náboje, $IE_M < IE_D$, $EA_D > EA_M$)
$D^{+\cdot} + M$	$\longrightarrow$	$[D\text{-}H]^{\cdot} + [M+H]^{+}$	(přenos protonu, $PA_M > PA_{[D\text{-}H]^{\cdot}}$)

- převládající mechanismus vzniku iontů závisí na řadě faktorů pro analyt, dopant a mobilní fázi: a/ IE, b/ PA, c/ EA, atd.
- dopanty: aceton (pouze přenos náboje), toluen (upřednostňuje přenos náboje), anisol, benzen, hexafluorobenzen, THF
- účinnost ionizace s dopantem závisí i na zmlžující teplotě, množství použitého dopantu, intenzitě lampy a průtoku rozpouštědla

M ... molekula analytu, D ... dopant

Volba výbojky a dopantu v APPI

- k ionizaci molekuly/dopantu dojde, pokud mají IE menší než je energie výbojky

- lze selektivně volit energii výbojky, při které nedochází k ionizaci mobilní fáze nebo složek vzduchu, ale pouze k ionizaci cílových molekul

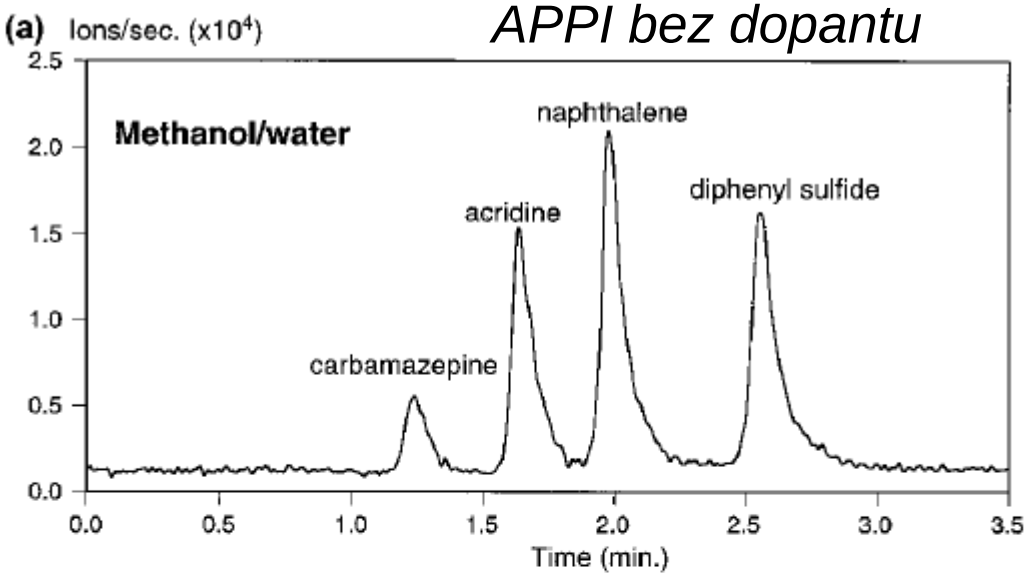
- nejčastěji Kr výbojka (10.0 a 10.6 eV, 4:1), protože energie fotonů je nižší než IE složek vzduchu (N_2, O_2, H_2O) a některých běžných rozpouštědel, ale většina molekul má IE pod 10.0 eV

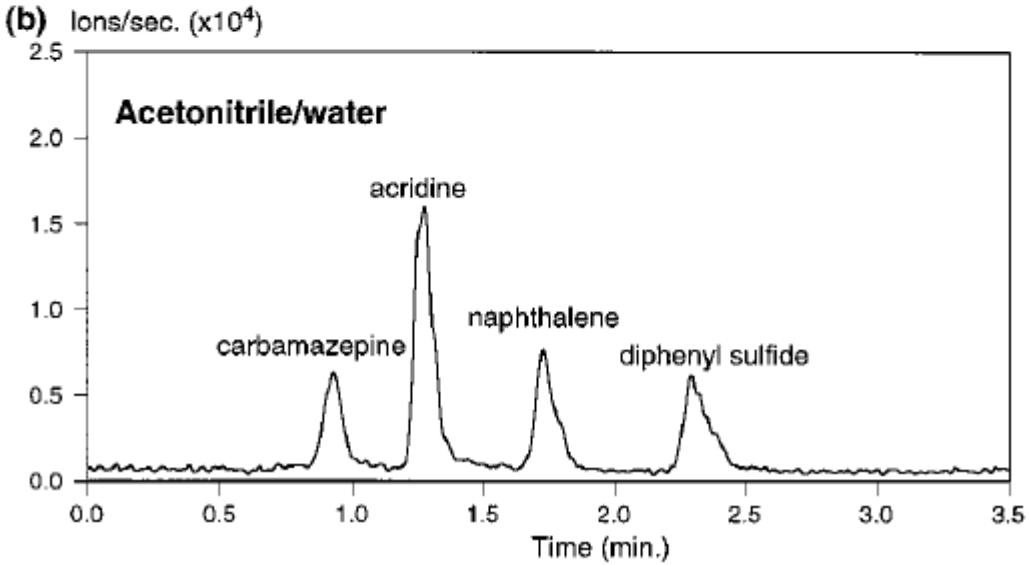
Compound	IE (eV)	PA (kJ mol^{-1})
Nitrogen	15.58	493.8[a]
Water	12.62	691.0[b]
Acetonitrile	12.20	779.2[c]
Oxygen	12.07	421.0[b]
Ar: 11.7		
Chloroform	11.37[c]	n.a.
Methanol	10.84	754.3[c]
Acetic acid	10.65[b]	783.7[b]
Kr: 10.6		
Isopropanol	10.17	793.0[a]
Hexane	10.13	n.a.
Ammonia	10.07[b]	853.6[b]
Kr: 10.0		
Heptane	9.93	n.a.
Isooctane	9.80	n.a.
Methanol dimer	9.74[d]	899.1[d]
Acetone	9.70	812.0[c]
Tetrahydrofuran	9.4[a]	822.1[a]
Pyridine	9.26	930.0[a]
Testosterone	9.2[c]	880.0[c]
Benzene	9.24	750.4[c]
Furan	8.88	803.4[a]
Toluene	8.83	784.0[c]
Xe: 8.4		
Anisole	8.2[c]	839.6[c]
Naphtalene	8.14[c]	802.9[c]
Anthracene	8.10[c]	877.3[c]
Acridine	7.8[c]	972.6[c]
Triethylamine	7.53	981.8[a]
Benzyl radical	7.2[b]	831.4[b]

Marchi I. a kol., Talanta 78 (2009) 1

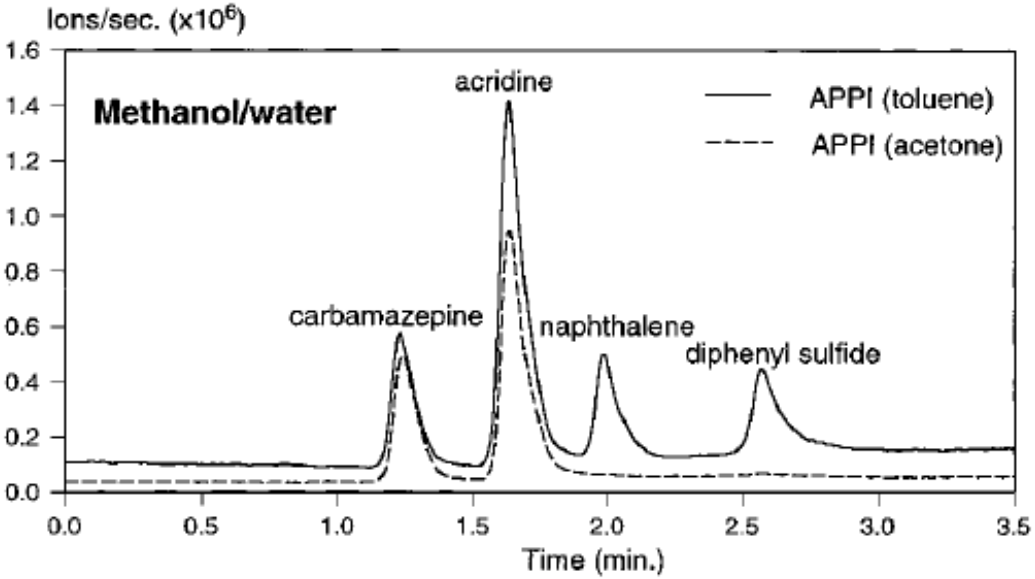
Vliv dopantu v APPI

APPI bez dopantu



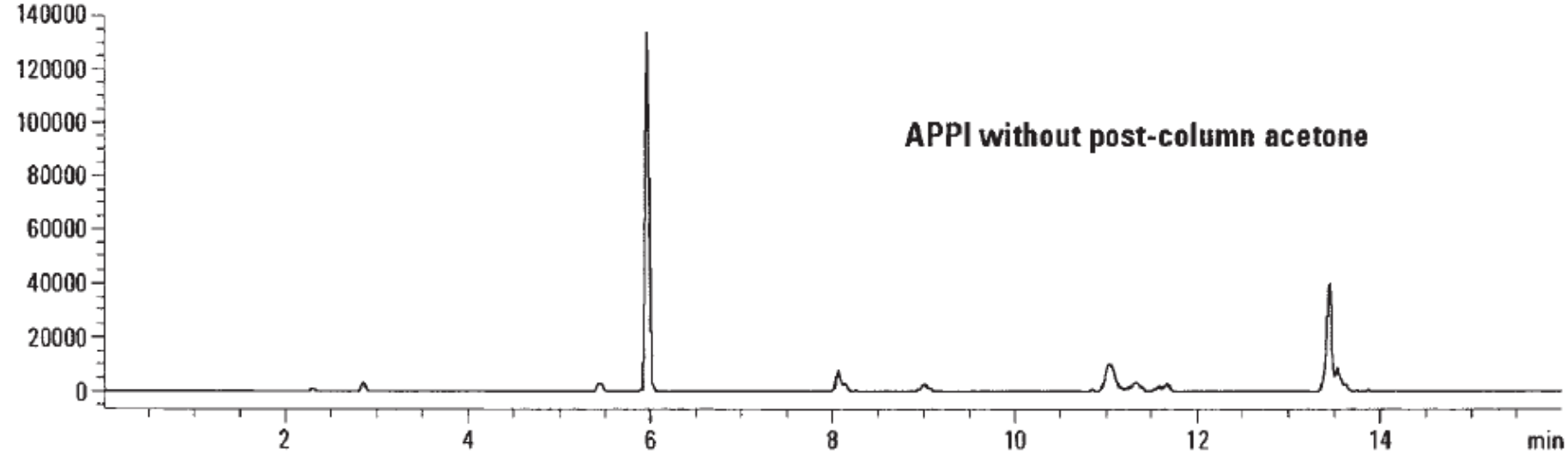


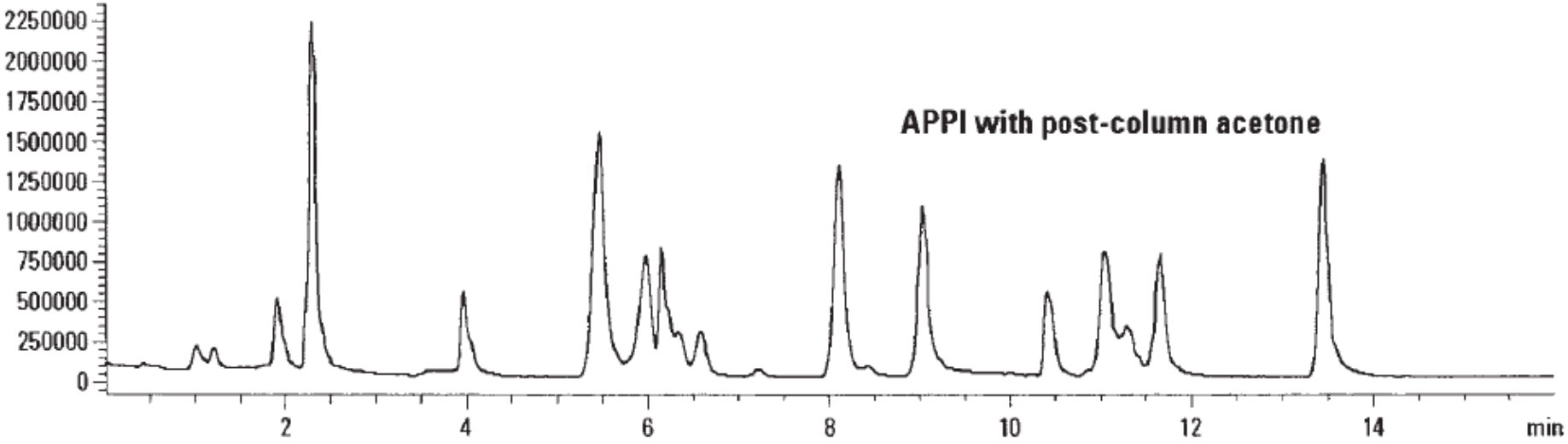
APPI s dopantem



Robb D.B., Anal. Chem. 72 (2000) 3653

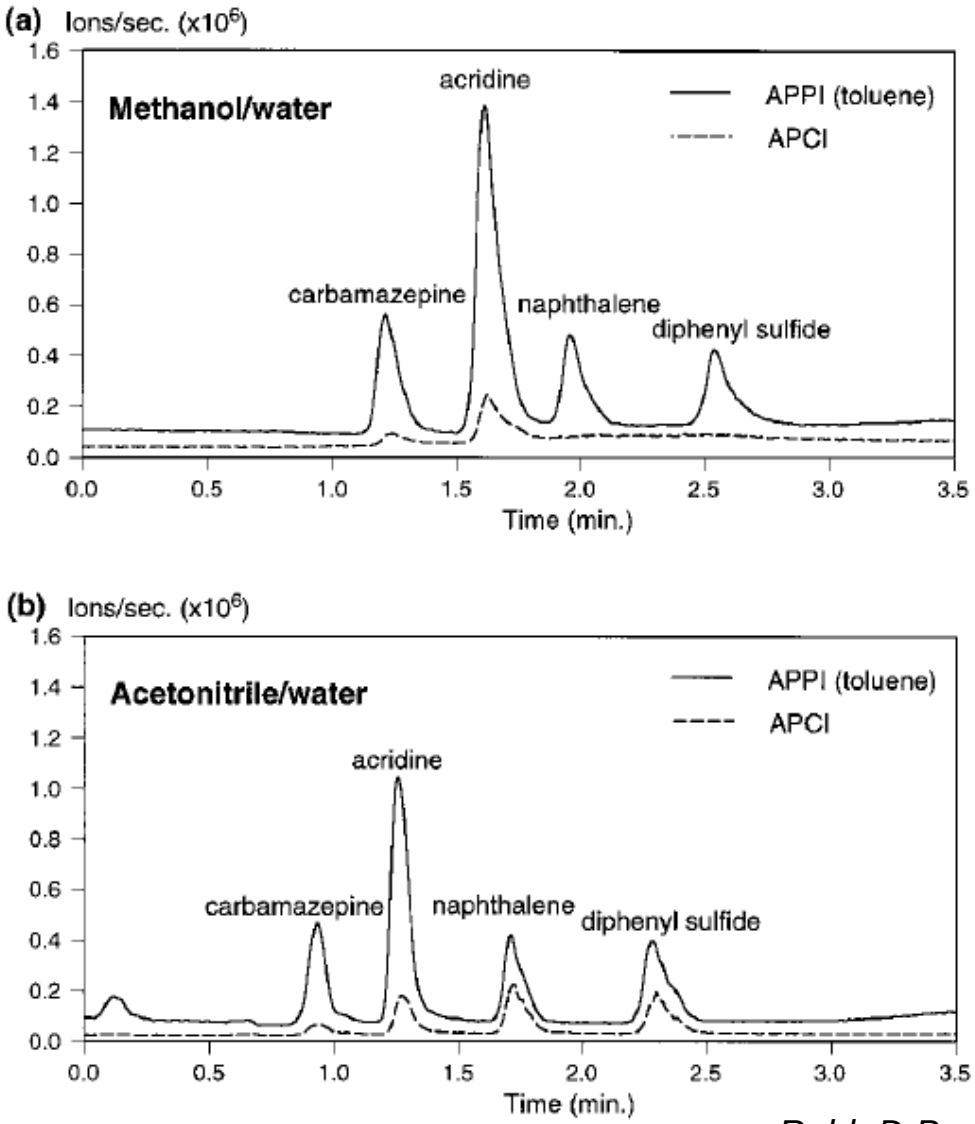
Vliv dopantu v APPI





Raffaelli A., Saba A., Mass Spectrom. Rev. 22 (2003) 318

Porovnání APCI a APPI



Robb D.B. a kol., Anal. Chem. 72 (2000) 3653

Pro nepolární sloučeniny je APPI výbornou volbou, ale je nutná optimalizace typu dopantu a jeho koncentrace (zavádíme t- spojkou) před vstupem do ionizace

Záporné ionty v APPI

- může dojít k výměně náboje, záchytu elektronu a přenosu protonu
- poskytuje nižší šum a umožňuje ionizace více látek než ostatní API techniky
- využití dopantu pro zvýšení citlivosti

$$D + h\nu \longrightarrow D^{+\cdot} + e^-$$

$$R + e^- \longrightarrow R^{-\cdot} \text{ nebo } [R\text{-}F]^{\cdot} + [F]^-$$

$$M + e^- \longrightarrow M^{-\cdot}$$

- ionizace se může účastnit i kyslík z iontového zdroje

$$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{-\cdot} \quad \text{(záchyt elektronu)}$$

$$M + O_2^{-\cdot} \longrightarrow [M\text{-}H]^- + HO_2^{\cdot} \quad \text{(přenos protonu)}$$

$$M + O_2^{-\cdot} \longrightarrow M^{-\cdot} + O_2 \quad \text{(výměna náboje, } \mathbf{EA_M > EA_{O_2}} = 0.451 \text{ eV)}$$

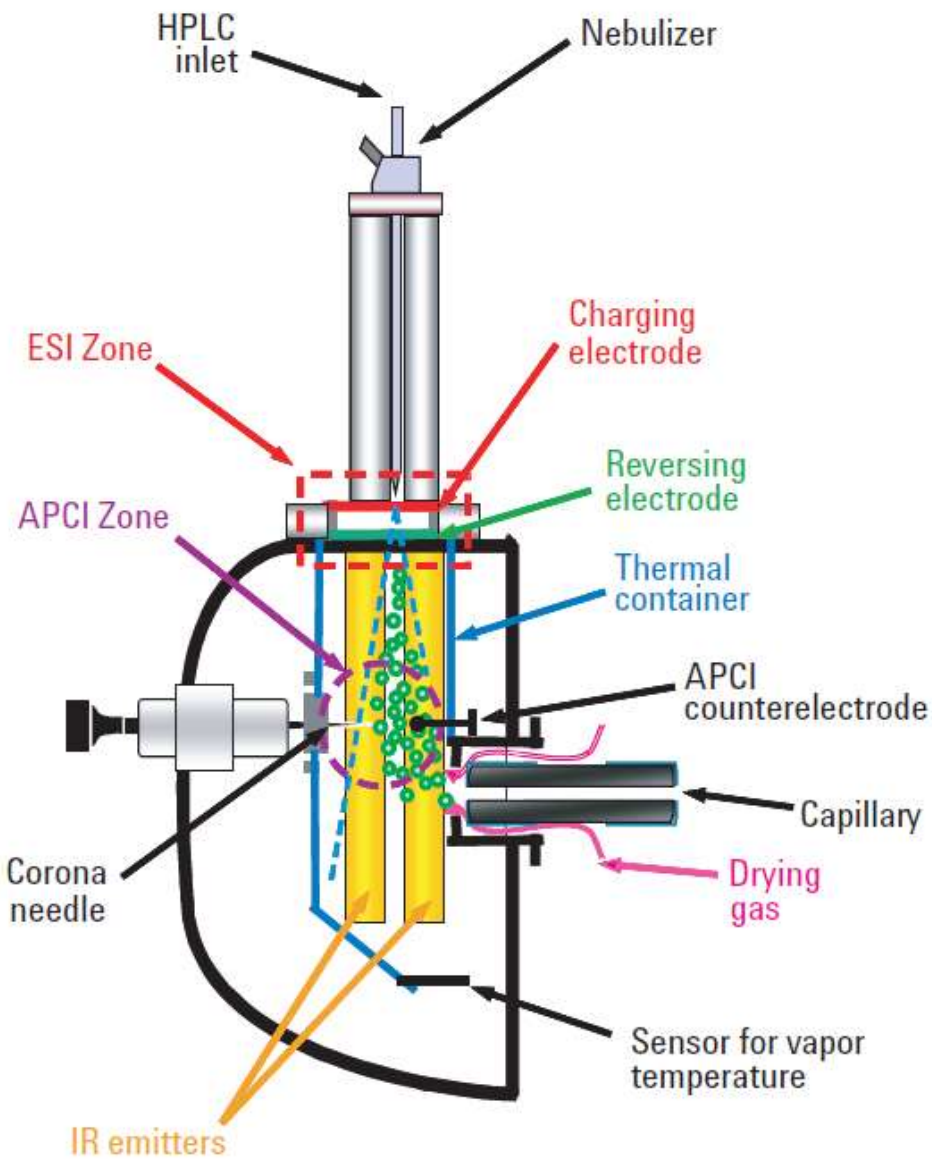
$$M + O_2^{-\cdot} \longrightarrow [M\text{-}X\text{+}O]^- + OX^{\cdot} \quad (X = H, Cl, NO_2)$$

M ... molekula analytu, D ... dopant, R ... rozpouštědlo, F ... fragment

Marchi I. a kol., Talanta 78 (2009) 1

Kombinované (duální) iontové zdroje

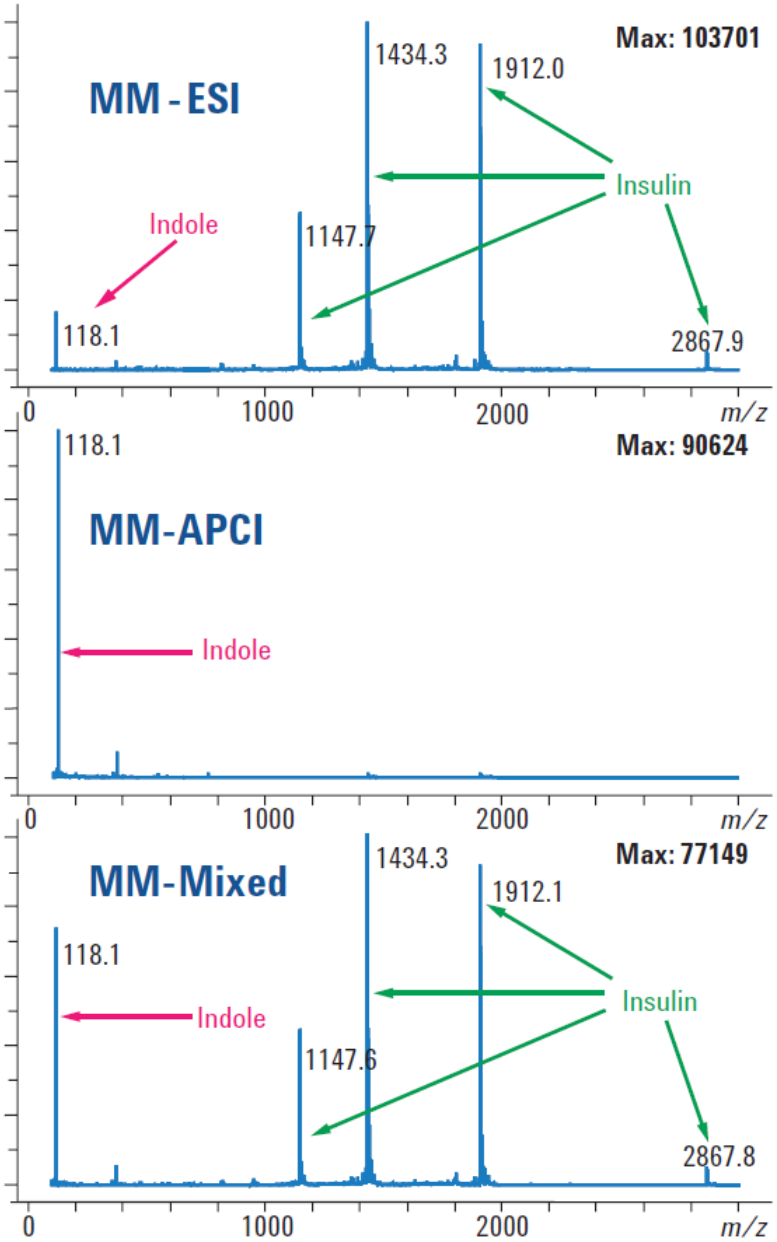
ESI / APCI



APCI / APPI

Kombinované (duální) iontové zdroje

Kombinované (duální) iontové zdroje



Proof of concept of simultaneous (mixed mode) ESI and APCI using a mixture of indole (50 pmol/µL) and bovine insulin (9 pmol/µL). (top) Source in ESI-only mode, exhibiting a response from insulin with a weak response from indole. (middle) Source in APCI-only mode, with only indole showing a response. (bottom) Source in mixed mode, with both indole and insulin showing strong responses.

Porovnání ESI, APCI a APPI

• ESI – středně polární až iontové sloučeniny, mnohonásobně nabité ionty pro biopolymery, nejšetrnější ionizační technika

- méně vhodné pro bezvodé mobilní fáze a systémy s normálními fázemi
- optimální průtok jednotky až desítky μl/min, lze do 1 ml/min

• APCI – málo až středně polární sloučeniny ca. do M_R1000 až 2000, větší tolerance k obsahu solí v eluentu, méně aduktových iontů

- optimální průtok stovky μl/min, použitelný rozsah desítky μl/min až 1.5 ml/min

• APPI – možnost analýzy zcela nepolárních látek, vhodné i pro labilní látky, použití vhodného typu dopantu umožní selektivní analýzu, nízký chemický šum

- ideální pro systém s normálními fázemi
- optimální průtok desítky až stovky μl/min, lze až do 1.5 ml/min

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

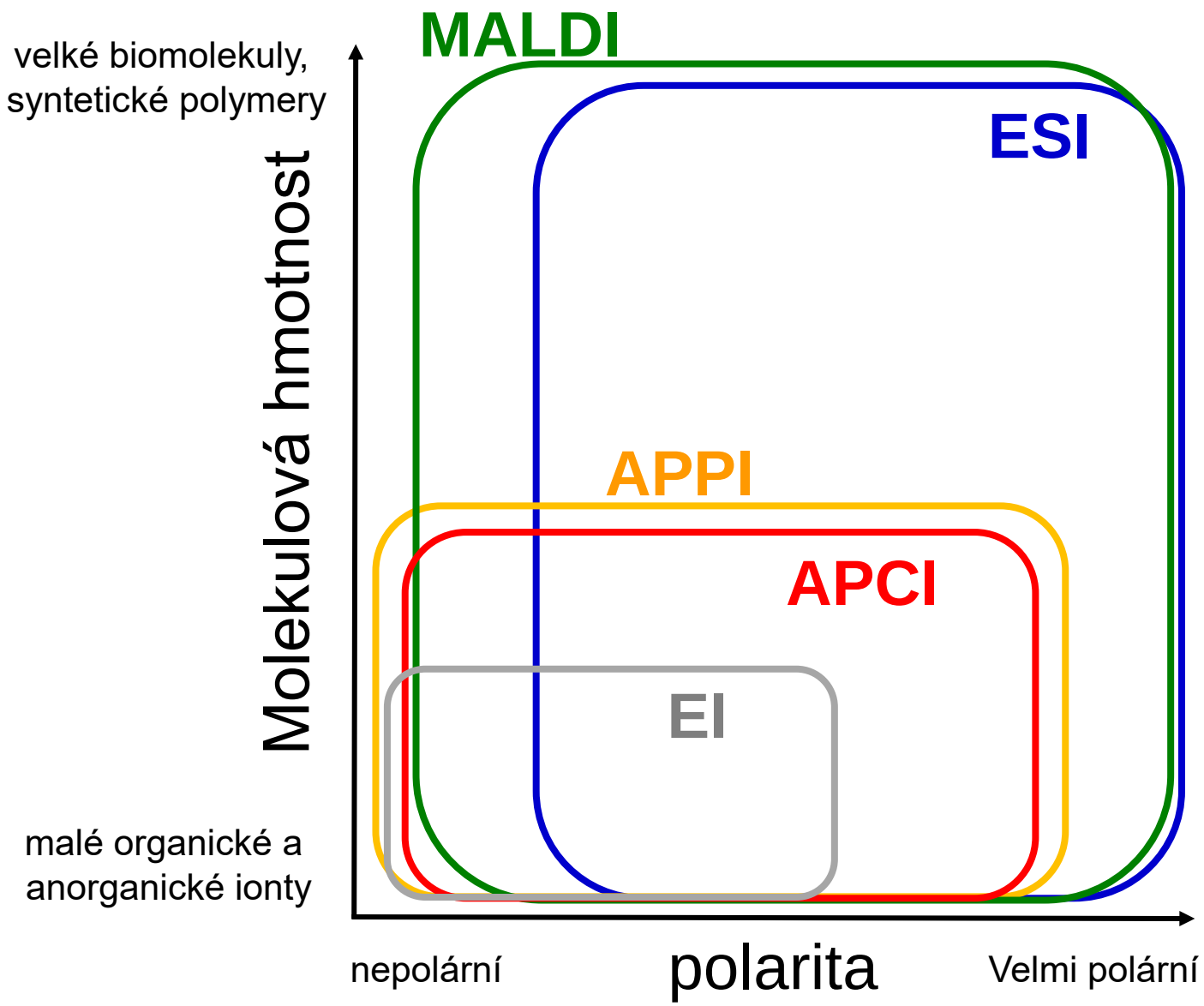
- ve většině případů ve spektrech převládají tyto molekulární adukty, relativní intenzita fragmentových iontů bývá obvykle nízká až mizivá
- chybějící strukturní informace lze získat tandemovou hmotnostní spektromerií (MS/MS)

• 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:

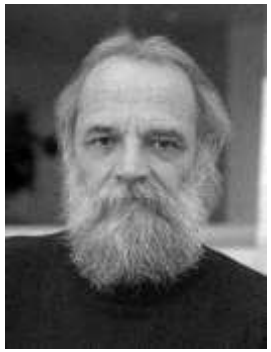
ESI (nejšetrnější) < MALDI ~ APPI < APCI < CI < EI (nejtvrdší)

Podle čeho volit způsob ionizace?



MALDI

(Matrix-Assisted Laser Desoption/Ionization)



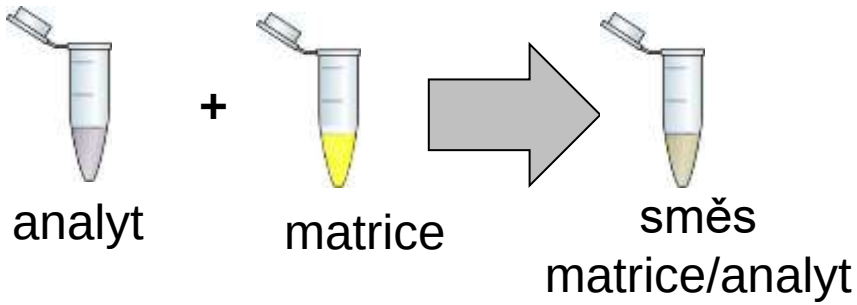
Michael Karas

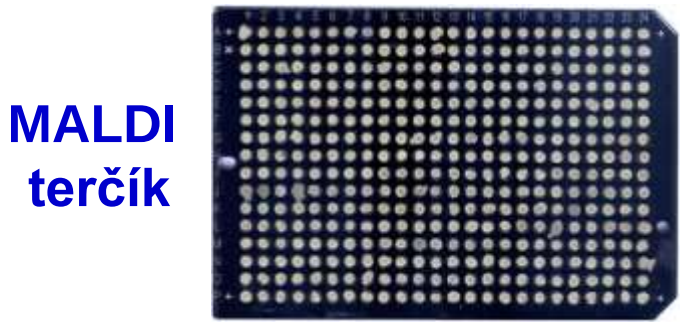
Franz Hillenkamp

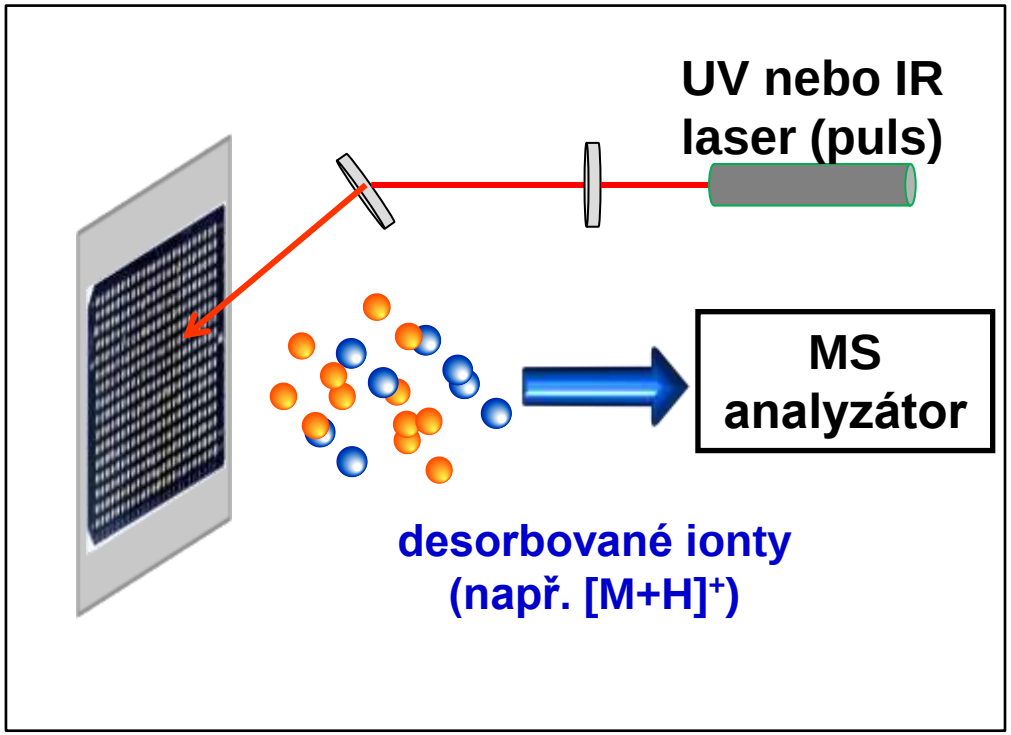
Koichi Tanaka (MALDI)
(2002, Nobelova cena za chemii)

Ionizace laserem za účasti matrice

- vzorek je společně s matricí nanesen na MALDI terčík (různé postupy)
- energie krátkého laserového pulsu je absorbována matricí
- následně dojde k lokální desorpci matrice a analytu (v desorbovaném „oblaku“ vznikají klastry matrice a analytu)
- excitované molekuly matrice jsou stabilizovány přenosem protonu na analyt nebo dochází ke kationizaci molekul analytu, čímž vznikají ionty analytu
- ionty jsou následně urychleny do hmotnostního analyzátoru







Ionizace laserem za účasti matrice

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 (záleží na použité matrici)
- ionizace může probíhat za různých tlaků
  - nízkotlaké MALDI (klasické) - ionizace probíhá v prostředí nízkého vakua (<1 Pa)
  - středně tlaké MALDI – (cca 1-2 Pa) – zvládnou rotační pumpy
  - atmosférické MALDI (AP-MALDI) - pracuje za okolního tlaku, jiné ionty ve spektrech, nižší citlivost
- měkká ionizační technika, většinou jednou či dvakrát nabité ionty (není tak typické)
  - $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[M-H]^-$
  - adukty s alkalickými kovy
- spojení s HPLC v off-line uspořádání - nanášení spojité stopy na terčík nebo sběr frakcí
- možnost archivace vzorku a jeho opětovné přeměření
- obtížná kvantitativní analýza
- ionty matrice ve spektrech

Ionizace laserem za účasti matrice

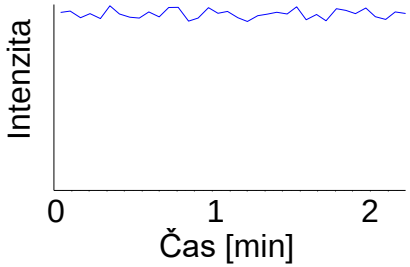
- pulzní ionizační technika - nejčastěji ve spojení s TOF analyzátorem, ale i orbitrap, IT
- matrice musí absorbovat laserový puls, aby mohlo dojít k ionizaci
  - dusíkové UV lasery (4 ns puls, 337 nm), pevné krystalické UV lasery (Nd:YAG, 355 nm), IČ lasery (Er:YAG laser, 2.94 μm)
- důležitá je správná příprava vzorku, volba vhodné matrice a rozpouštědla vzorku, aplikace matrice a vzorku (vzorek naspotován na zaschlý roztok matrice, převrstven roztokem matrice,“sandwich“, smíchání roztoků a pak pipetování směsi na destičku)

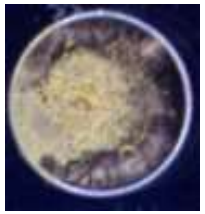
matrix	common analytes
2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB)[45,87,90]	peptides, proteins, lipids, drugs
α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)[45,88,90]	peptides, proteins, lipids, drugs
3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (SA, sinapinic acid)[45,89,90]	proteins
3-hydroxypicolinic acid (3-HPA)[90,98,99]	peptides, oligonucleotides
2,4-dinitrophenylhydrazine (2,4-DNPH)[57,100]	peptides
4,6-trihydroxyacetophenone (THAP)[90,101]	lipids, oligonucleotides, drugs
2,6-dihydroxyacetophenone (DHA)[90,102]	lipids
1,5-diaminonaphthalene (DAN)[103]	lipids

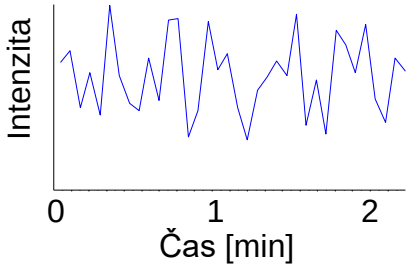
Jeremy L. Norris & Richard M. Caprioli, Chem. Rev. 113 (2013) 2309.

Ionizace laserem za účasti matrice

- matrice pro UV lasery - nejčastěji aromatické karboxylové kyseliny, které absorbují UV záření při vlnové délce laseru, např. kyseliny dihydroxybenzoová, chlorsalicylová, skořicová, deriváty, apod.
- pro kvantitativní analýzy je důležitá homogenní krystalizace analyt/matrice (reprodukovatelný signál napříč zaschlé kapky matrice/vzorek)







- matrice pro IČ lasery – cokoliv co absorbuje IČ záření (voda ve vzorku)

- SELDI (Surface enhanced laser desorption/ionisation) - terčík s navázanou skupinou, na kterou se specificky vážou některé proteiny (afinitní interakce), ostatní jsou odstraněny, pak aplikace matrice a MALDI ionizace

- LDI (Laser desorption/ionization) – vlastní analyt zároveň plní i funkci matrice, protože intenzivně absorbuje záření při vlnové délce laseru (např. polyaromatické sloučeniny), pak tedy není nutné matrici přidávat vůbec

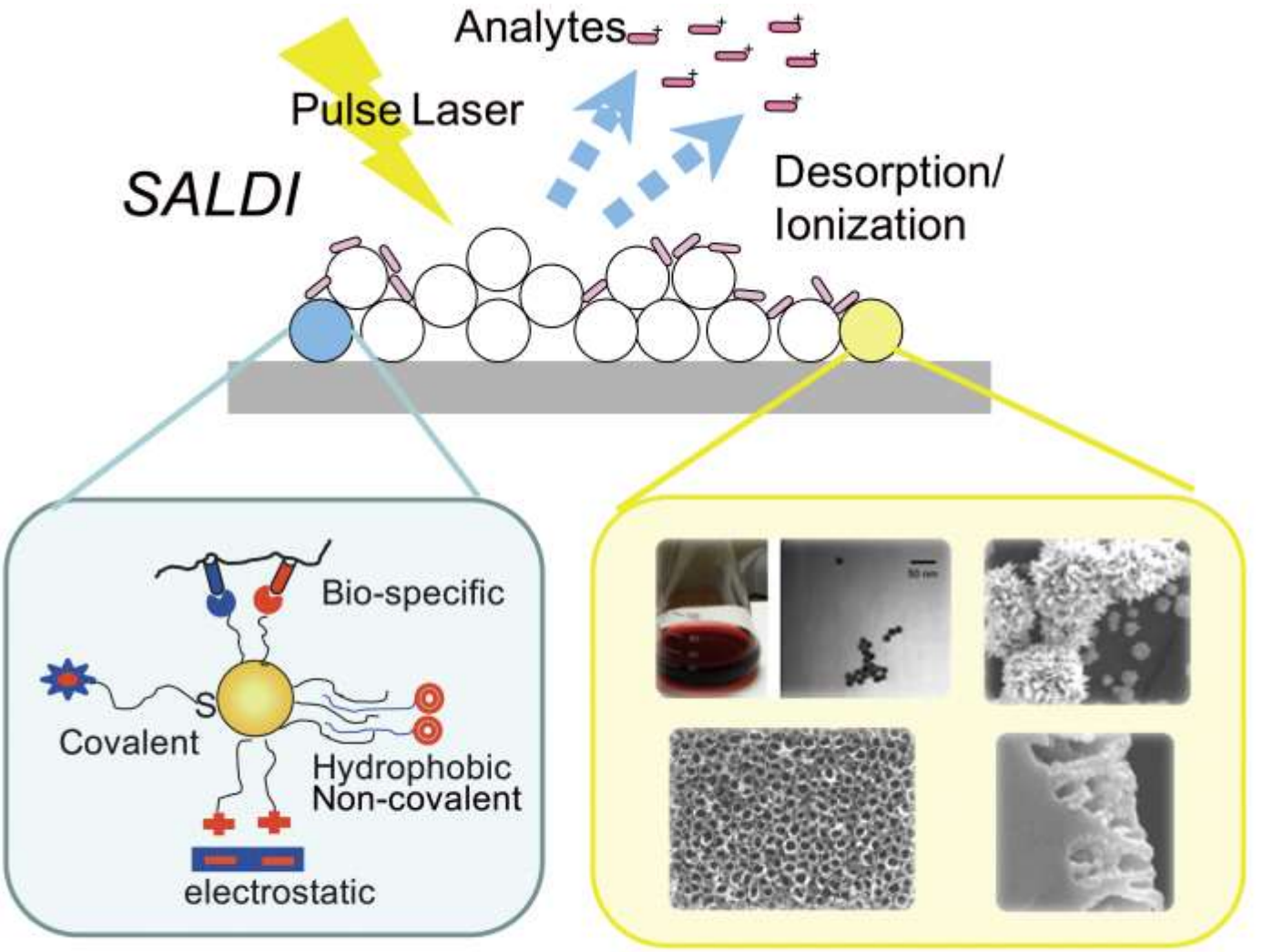
Desorpce/ionizace laserem bez organické matrice

- SALDI (Surface assisted laser desorption/ionisation)

- podobný princip jako MALDI. Hlavní rozdíl je nahrazení organické matrice vhodným anorganickým substrátem (nanočástice různých kovů – např. Au, Li, Ag; nanotrubičky TiO_2 nebo C, nanostrukturované povrchy – NALDI, DIOS)

- NALDI (Nanostructure-Assisted Laser Desorption/Ionization) – komerční destičky z nanostrukturovaných povrchů – firma Bruker Daltonics
- DIOS (Desorption ionization on porous silicon) - použití terčíku z porézního silikonu

SALDI

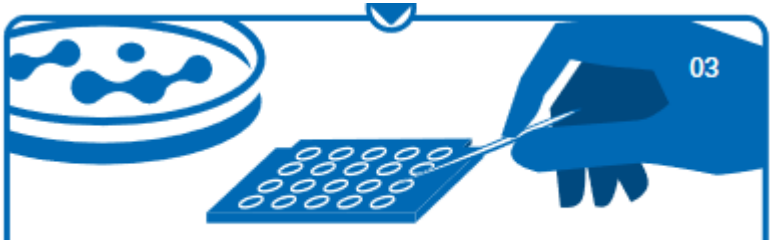


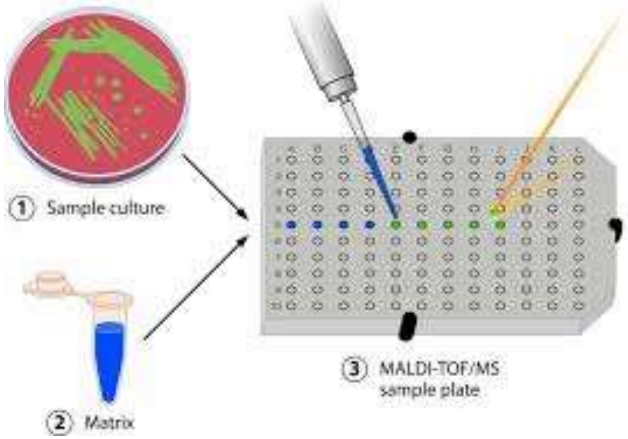
SALDI activity
Affinity probe

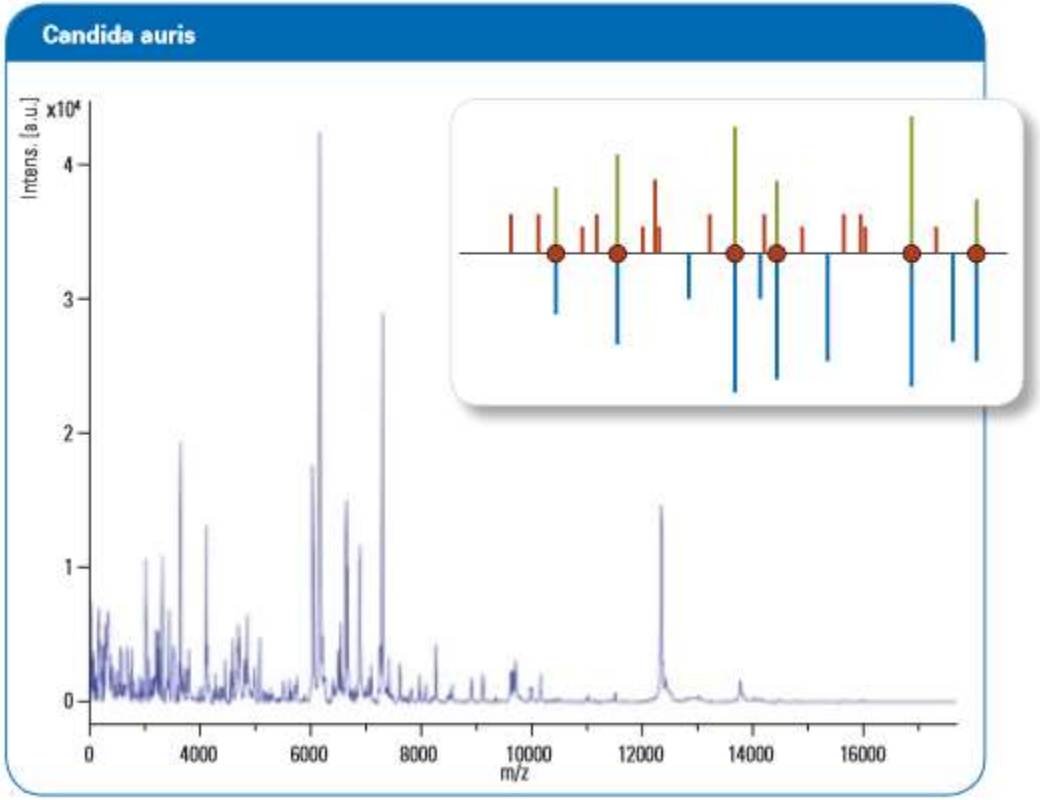
Nanoparticles
Nanostructured substrates

R. Arakawa & H. Kawaski, Anal. Sci., 26 (2010) 1229.

MALDI uplatnění v mikrobiologii „MALDI Biotyper“

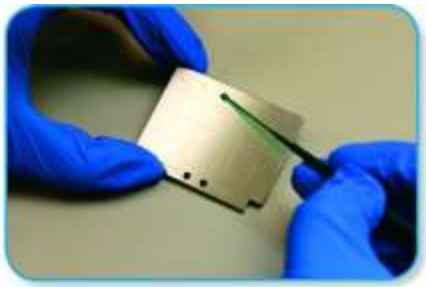






Adaptováno z materiálů firmy Bruker

„MALDI Biotyper“



Add Formic Acid and Matrix and Dry

Mayo Clinic
Laboratory Services Report
MICROBIOLOGY

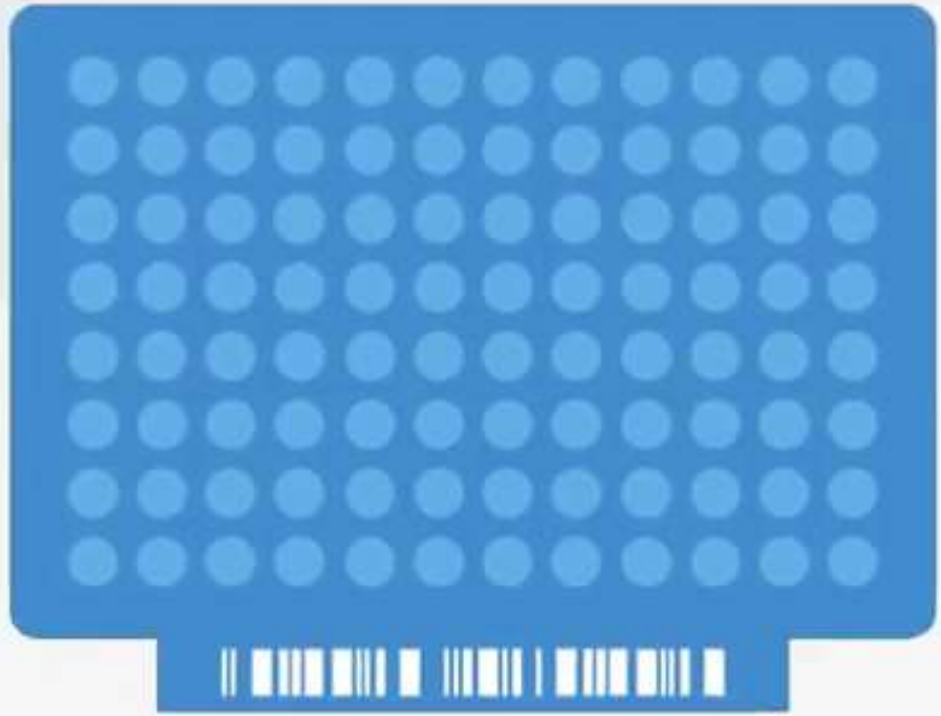
Fungal Culture, Routine FINAL 07/25/2012 14:42 MCR

CANDIDA PARAPSILOSIS Many
identified by mass spectrometry

R. Patel, Clin. Chem., 61 (2015) 100-111.

Apowersoft
Video Converter

Not for use in clinical diagnostic procedures



ADD MALDI

Ambientní ionizační techniky

(Ambient Ionization mass spectrometry)

Ambientní ionizační techniky

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

Ambientní ionizační techniky - přehled

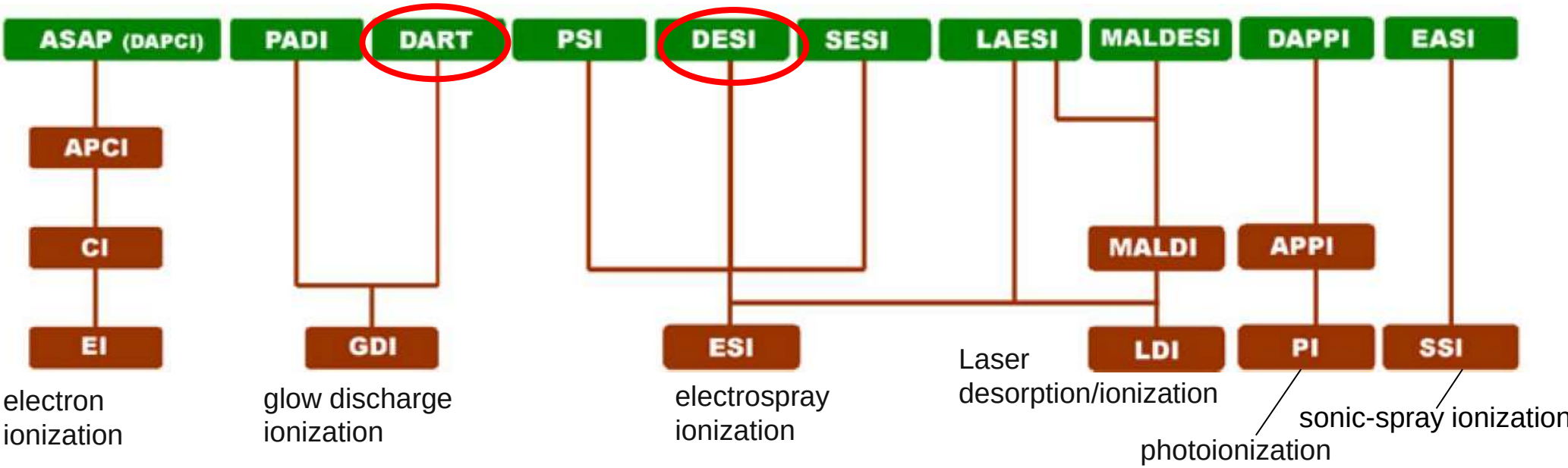
Acronym	Description	Basic technique[a]	Year
SESI	Secondary electrospray ionization	SESI	2000[b]
DESI	Desorption electrospray ionization	ESI	2004
DART	Direct analysis in real time	GDI	2005
ASAP	Atmospheric solids analysis probe	(AP)CI	2005
FD-ESI	Fused-droplet ESI	ESI	2002
DAPCI	Desorption atmospheric pressure chemical ionization	APCI (GDI)[d]	2006
EASI	Easy ambient sonic-spray ionization	SSI	2006
EESI	Extractive electrospray ionization	ESI	2006
ELDI	Electrospray-assisted laser desorption ionization	ESI/LDI	2006
MALDESI[c]	Matrix-assisted laser desorption electrospray ionization	MALDI + ESI	2006
ND-EESI	Neutral desorption EESI	ESI	2007
DAPPI	Desorption atmospheric pressure photon ionization	APPI	2007
PADI	Plasma-assisted desorption/ionization	GDI	2007
DBDI	Dielectric barrier discharge ionization	GDI	2007
LAESI	Laser-assisted ESI	LDI + ESI	2007
FA-APGDI	Flowing afterglow-atmospheric pressure glow discharge	GDI	2008
IR-LADESI	Infrared laser-assisted desorption ESI	LDI + ESI	2008
LTP	Low-temperature plasma ionization	PD	2008
PSI	Paper spray ionization	ESI	2010
V-EASI	Venturi easy ambient sonic-spray ionization	V-EASI	2010

R.M. Alberici a kol., Anal Bioanal Chem (2010) 398:265–294

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

Ambientní ionizační techniky – rozdělení na základě rozdílných ionizačních mechanismů

Využívají principy běžných ionizačních technik, ale v otevřeném prostoru



R.M. Alberici a kol., Anal Bioanal Chem (2010) 398:265–294

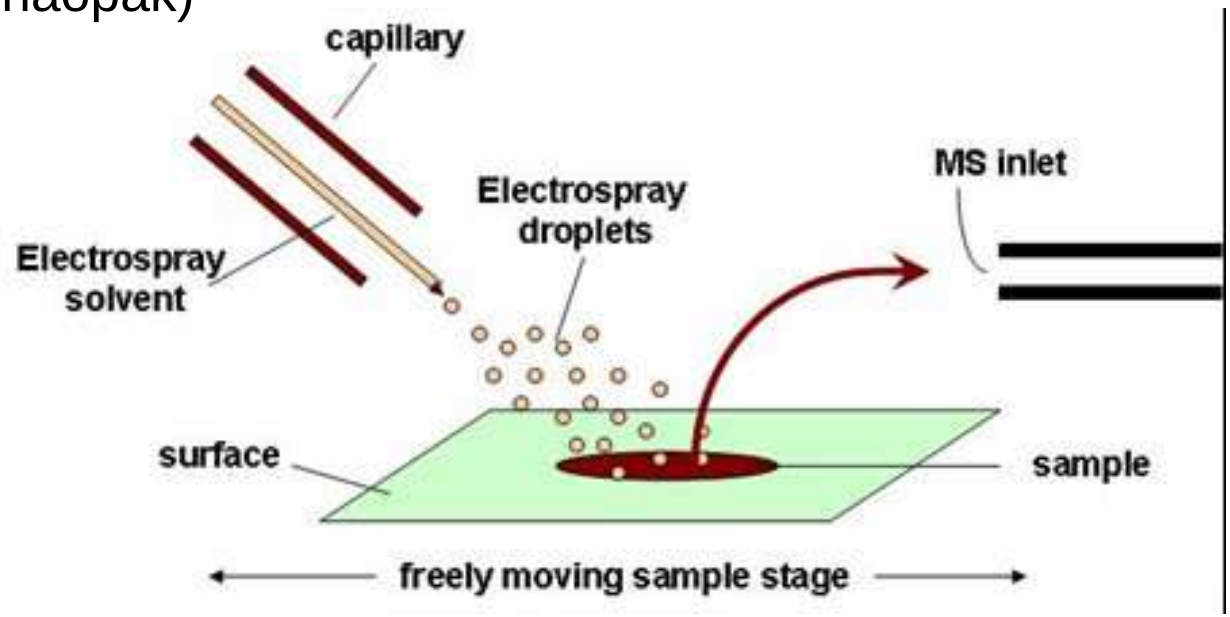
Aplikace: forenzní analýza, výzkum rakoviny a jiných onemocnění, analýza potravin, environmentální analýza, sledování chemický reakcí apod.
Jaké sloučeniny se analyzují: výbušniny, léčiva, pesticidy, lipidy, metabolity, peptidy a proteiny, apod.

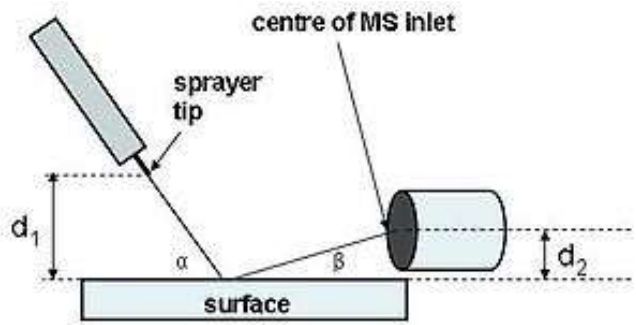
Desorpční ionizace elektrosprejem (DESI)

- kombinuje ESI a desorpční ionizační techniky
- na rozdíl od ESI 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
- hlavní mechanismy - ionizace nabitou kapkou a ionizace pomocí přenosu náboje
- ionty analytu vznikají ze sekundárních kapiček obdobným způsobem jako při ESI
- použití rozpouštědla dle polarity analytu (polární analyt/polární rozpouštědlo a naopak)





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

Desorpční ionizace elektrosprejem

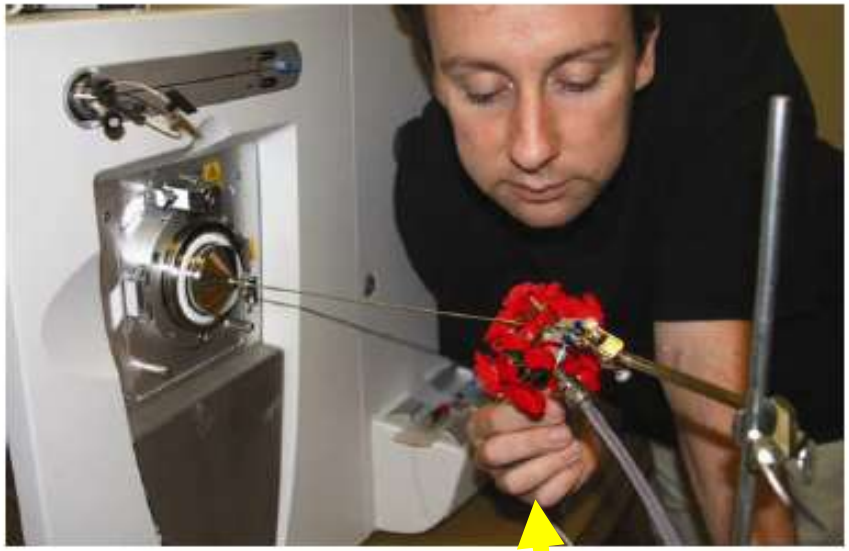
zdroj - https://www.youtube.com/watch?v=7My0VOpKg38

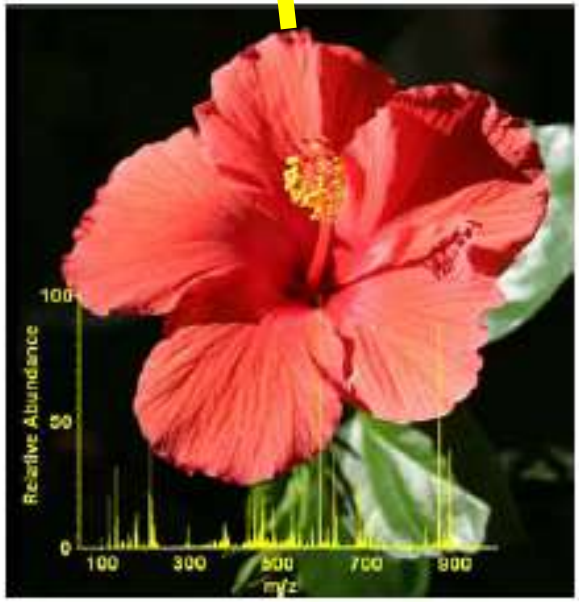
Praktické ukázky DESI

- živočišná tkáň (prst živého člověka)

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

- rostlinná tkáň (kytka)

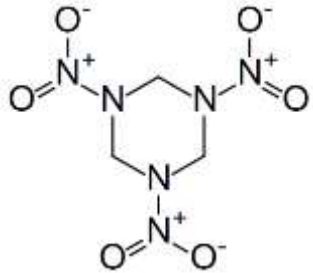




- bez jakékoliv úpravy vzorku!

Praktické ukázky DESI

Praktické ukázky DESI

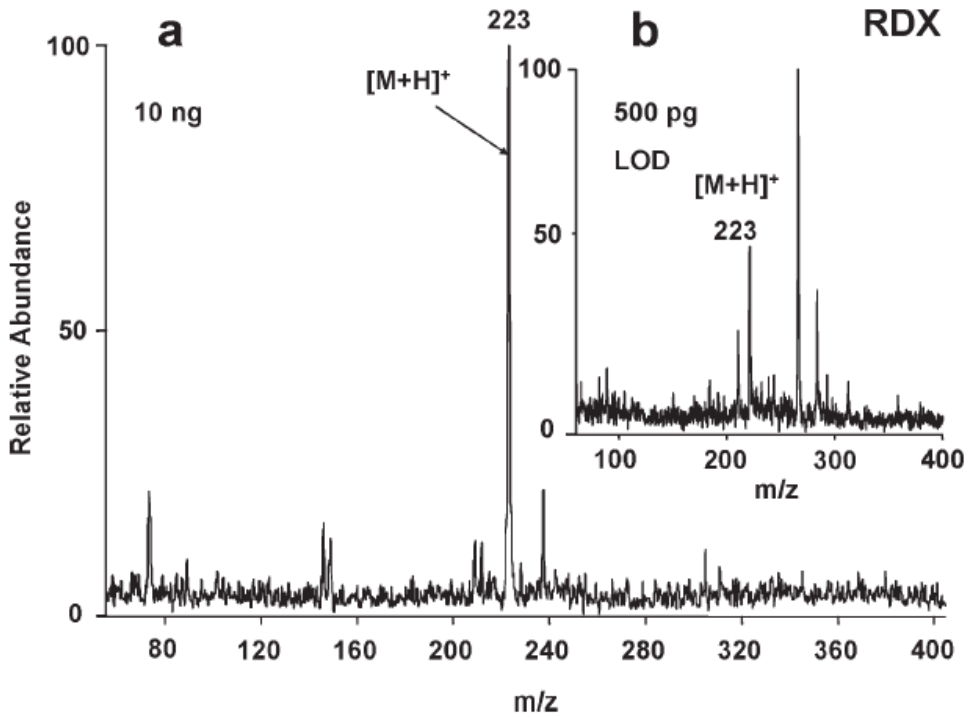


10 ng (500 pg) hexogenu (RDX)

naneseno na povrch papíru (1 cm²)

DESI⁺/CIT (cylindrická iontová past)

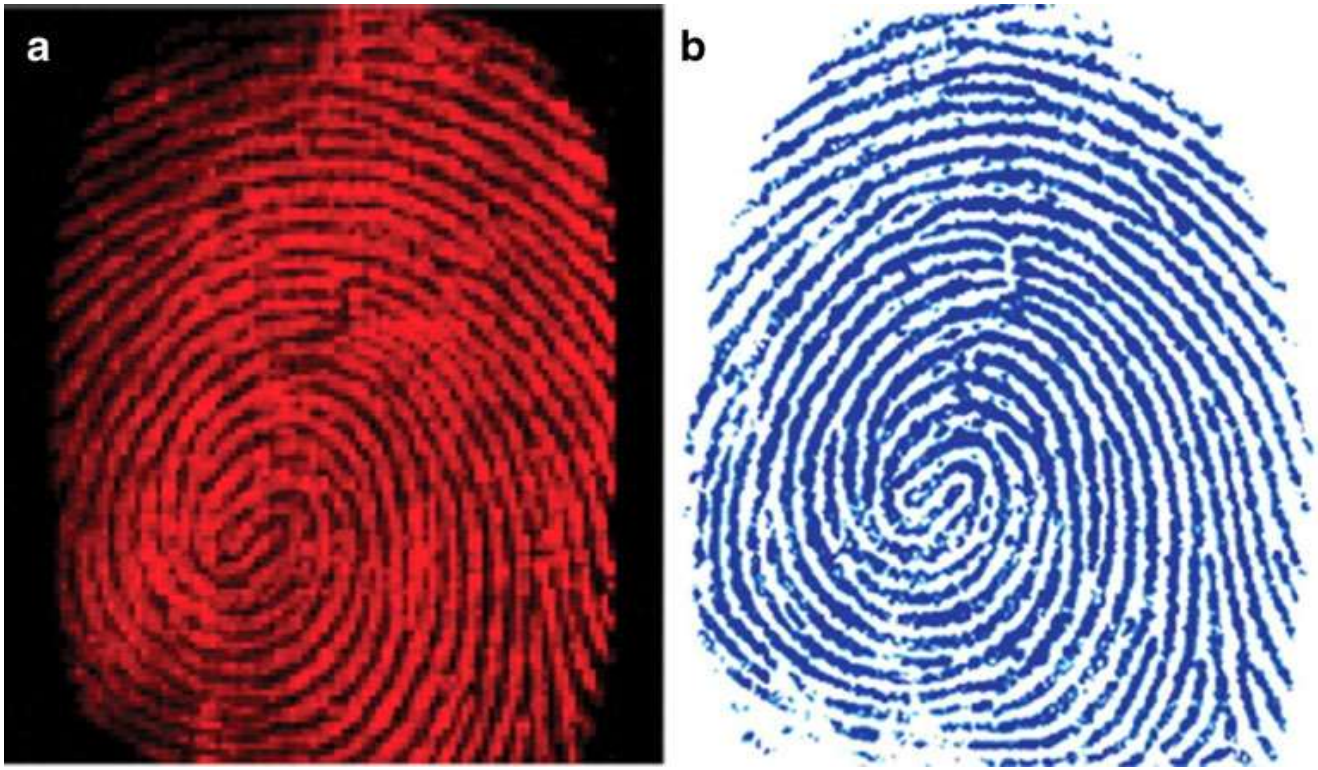
doba analýzy (5-10s); [M+H]⁺



C.C.Mulligan et al., Chem. Commun (2006) 1709-1711.

Praktické ukázky DESI

DESI(+)-MS 2D distribuce kokainu na otisku prstu na skle , b) ingoustový otisk prstu na papíře (optický sken)

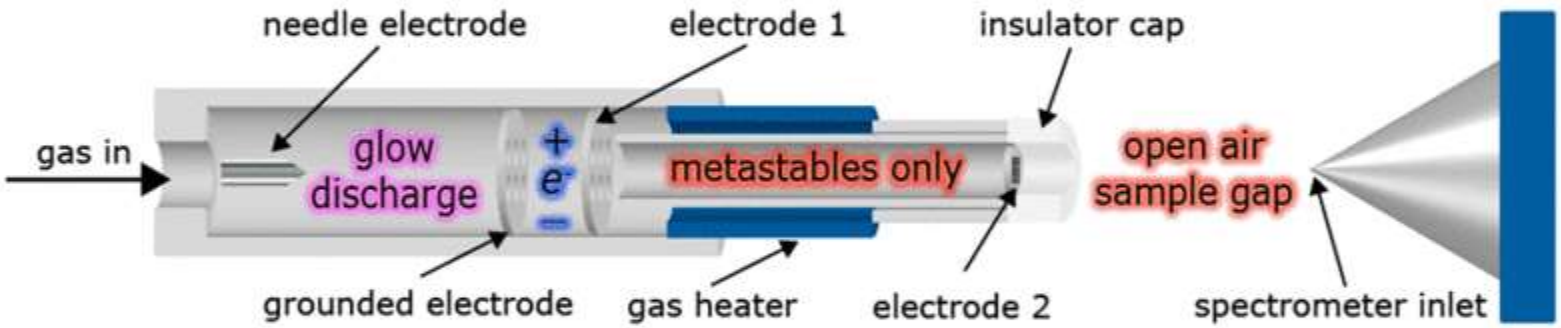


R.M. Alberici a kol., Anal Bioanal Chem (2010) 398:265–294

Přímá analýza v reálném čase (DART)

- podobná technika jako DESI, lze použít k analýze pevného, kapalného či plynného vzorku bez jakékoliv úpravy, aplikace podobné s DESI
- na jehlovou elektrodu ve výbojové komoře se vkládá vysoké napětí – dojde k doutnavému výboji - molekuly reakčního plynu He (Ne) jsou excitovány výbojem za vzniku metastabilních iontů a excitovaných částic (pomocí série elektrod dochází k odchýlení (zachycení) nabitých částic a jen nenabité metastabilní částice projdou a interagují s analytem

- s analytem interagují pouze excitované částice reakčního plynu He^* (hvězdička označuje excitovanou částici)



Přímá analýza v reálném čase (DART)

• reakce vzniku iontů:

$He^{*} + M = M^{+\cdot} + He + e^{-}$ (mechanizmus Penningovy ionizace)

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

$He^{*} + H_2O = H_2O^{+\cdot} + He + e^{-}$ (Penningova ionizace vody)

$H_2O^{+\cdot} + H_2O = H_3O^{+} + OH^{\cdot}$ (ion-molekulární reakce)

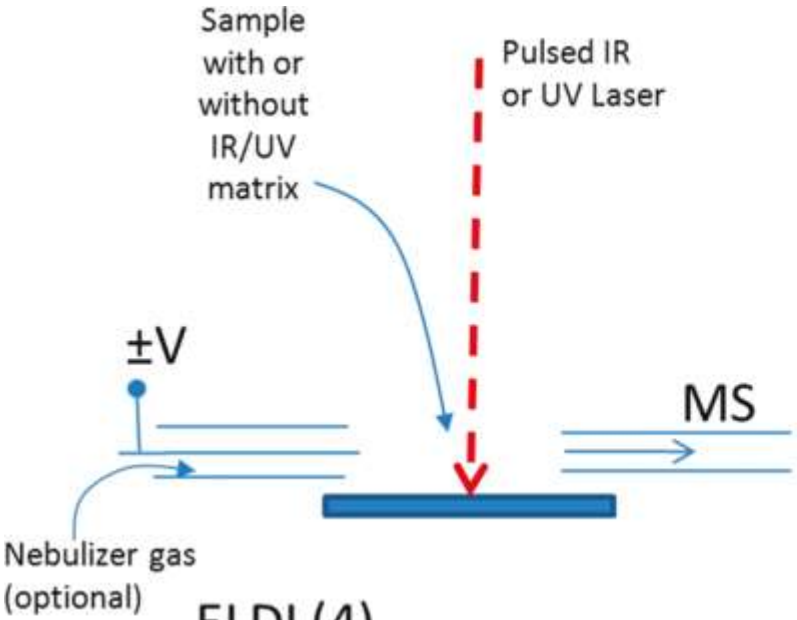
$H_3O^{+} + M = [M+H]^{+} + H_2O$ (protonace molekuly analytu)

- poměrně jednoduchá spektra: charakteristické ionty $M^{+\cdot}$ a/nebo $[M+H]^{+}$ (případně $M^{-\cdot}$ nebo $[M-H]^{-}$ v negativním módu)
- spektra jsou podobná spektrům získaných DESI analýzou, ale nevyskytují se vícenásobně nabité ionty - kvůli tomu menší uplatnění)

Přímá analýza v reálném čase (DART)

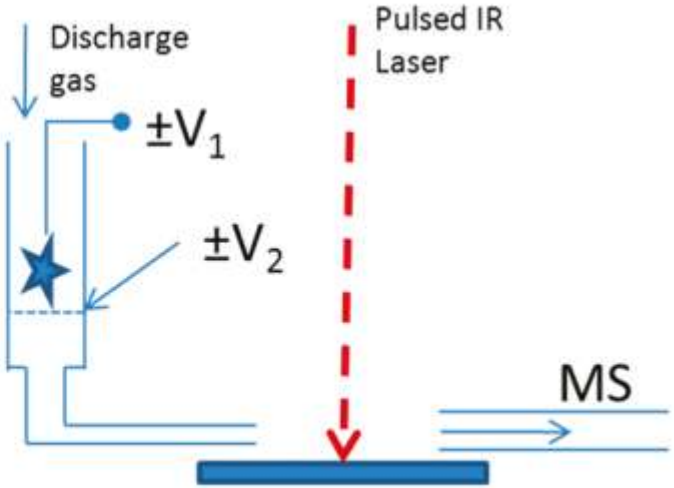
zdroj - https://www.youtube.com/watch?v=y9il3wJ-BM8

Ambientní ionizace – další vybrané mechanismy



ELDI (4)
LAESI/LADESI/LDESI (11)
MALDESI (3)

•IR or UV Laser desorbs/ablates neutrals from sample surface. Analyte can also be desorbed via IR or UV MALDI mechanisms if matrix is present.
•Neutral plume is entrained by electrospray droplet cloud. Analyte dissolves in droplets. Analytes in droplets ionize through ESI mechanisms.
•Sample is positioned to avoid direct interaction with electrospray liquid.

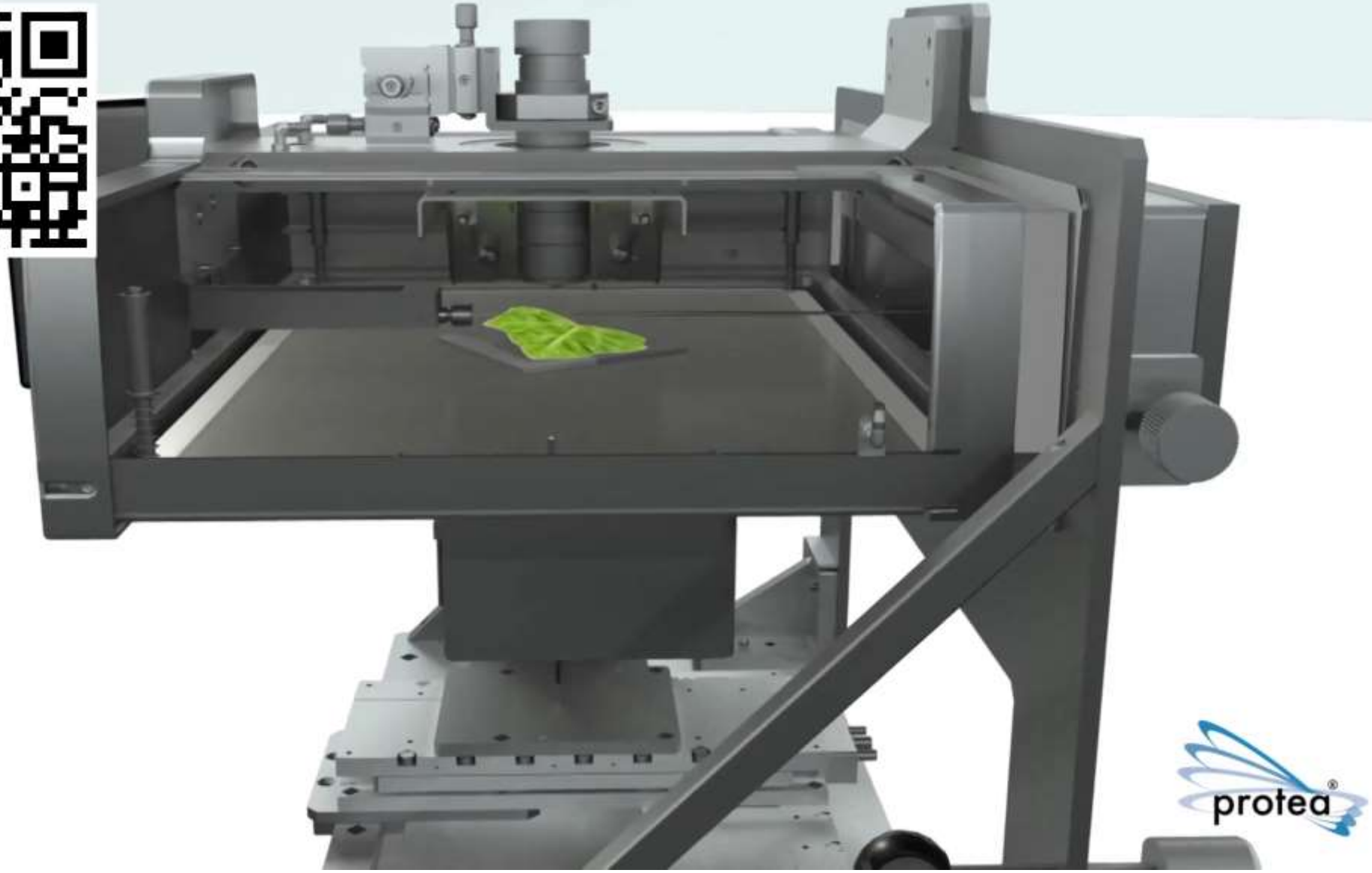


IR-LAMICI (1)

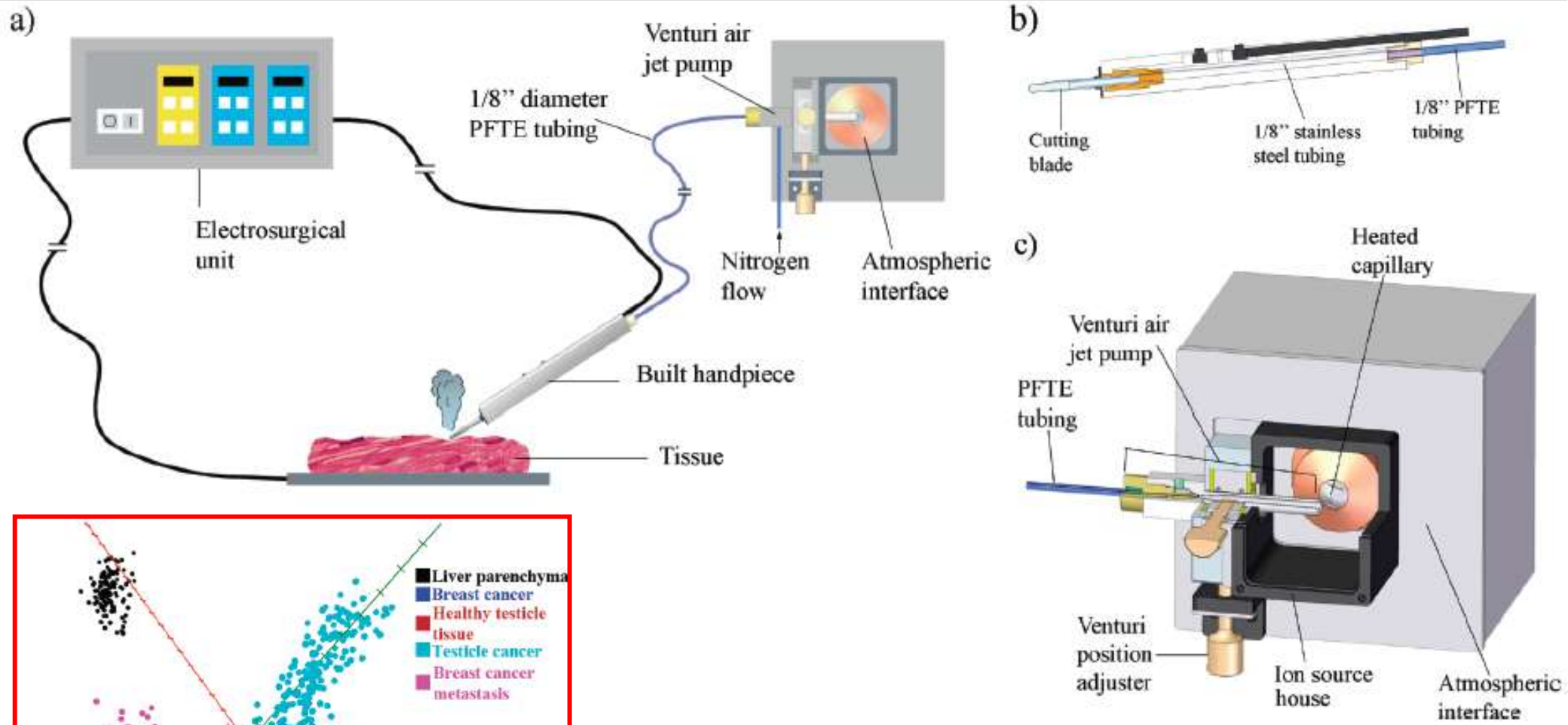
•Glow discharge generates metastables. Ions from discharge are removed. In most cases this stream does not need to be heated.
•IR Laser desorbs/ablates neutrals from sample surface.
•Metastables stream merges with neutral plume, reacting with analyte through proton transfer reactions. Sample is positioned to avoid direct interaction with metastable gas stream.

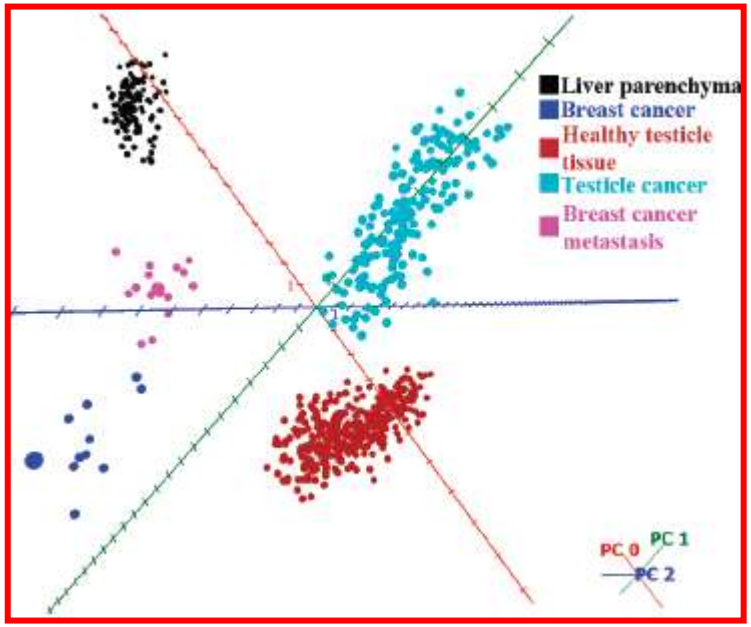
G.A. Harris a kol., Anal. Chem. (2011) 83:4508-4538

Ambientní ionizace – LAESI



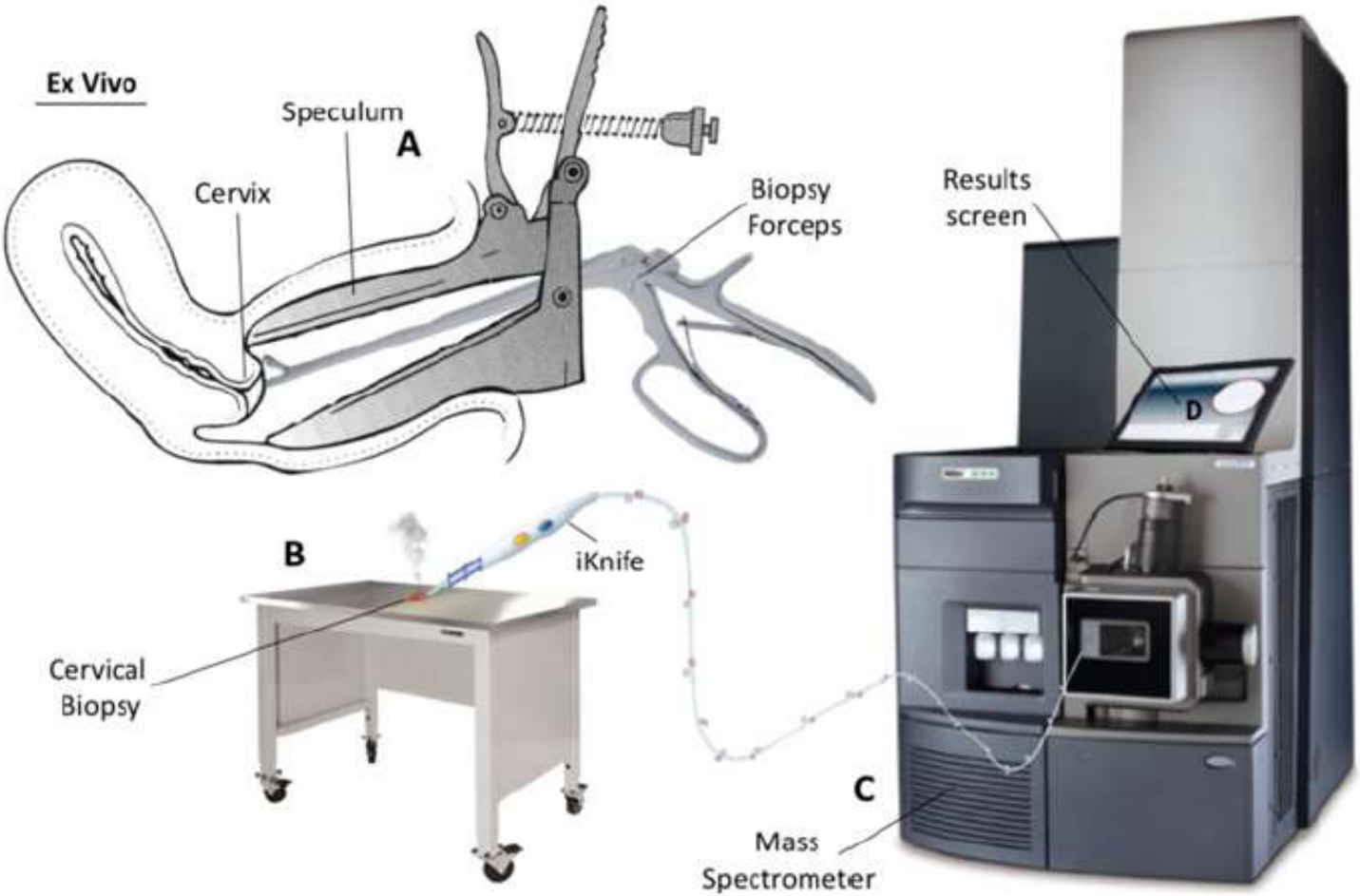
Sledování průběhu operací nádorů pomocí MS





Z. Takáts et al., Anal. Chem. 82 (2010) 7343

Sledování průběhu operací nádorů pomocí MS („rapid evaporative ion mass spectrometry“)



Z. Takats: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1916960117

Sledování průběhu operací nádorů pomocí MS („rapid evaporative ion mass spectrometry“)

http://www.waters.com/waters/en_AE/REIMS-Research-System-with-iKnife-Sampling-Device/nav.htm?cid=134846529&locale=en_AE

ICP-MS

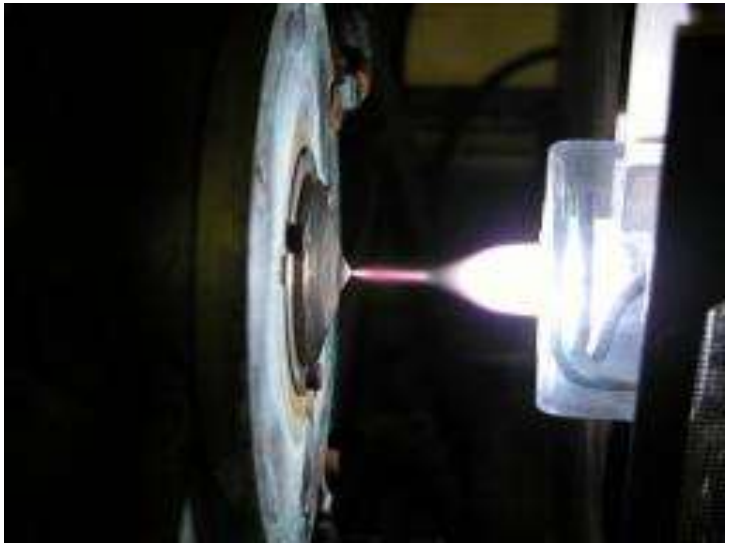
(Inductively coupled plasma mass spectrometry)

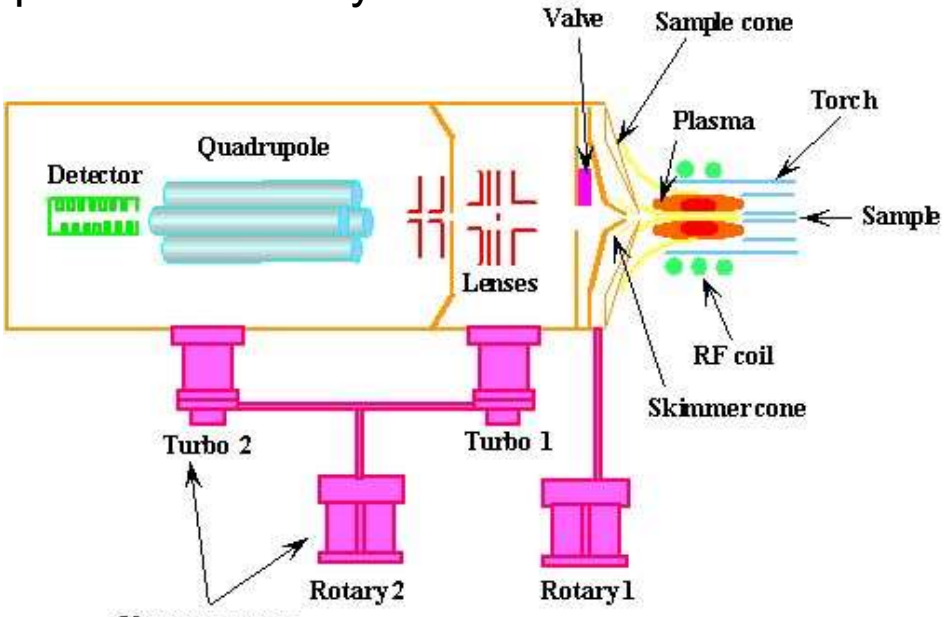
Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

• analytická technika pro prvkovou analýzu (v organické analýze uplatnění např.: kvantitativní analýzu kovů navázaných na organických sloučeninách - metaloproteiny, vyšší detekční limity než AAS, informace o složení izotopů, MSI pro distribuci kovu v tkaních

• k ionizaci analytu využívá indukčně vázaného plazmatu (Ar). ICP je plazma, které je ionizováno indukčním zahříváním plynu s elektromagnetickou cívkou (protékají vysokofrekvenční proud generuje oscilující elektromagnetické pole). Argon je zahříván na vysokou teplotu > 6000K → vznik plazmatu (obsahuje volné elektrony, kladné ionty a neutrální atomy nebo molekuly)

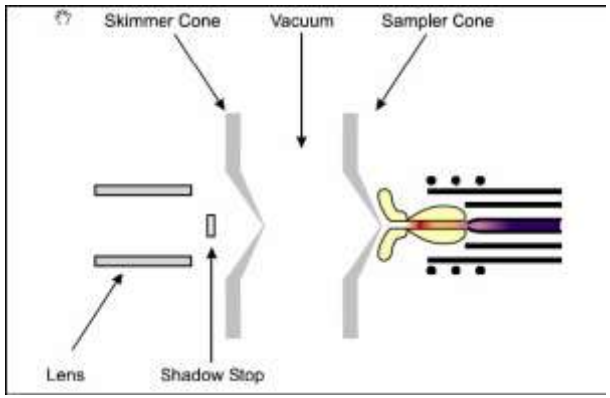
• V horkém plazmatu dochází k desolvataci, atomizaci a ionizaci vzorku (**zanikají chemické vazby**). Ionty jsou následně extrahovány z plazmy pomocí chlazených skimmerů a iontovou optikou vedeny do hmotnostního analyzátoru





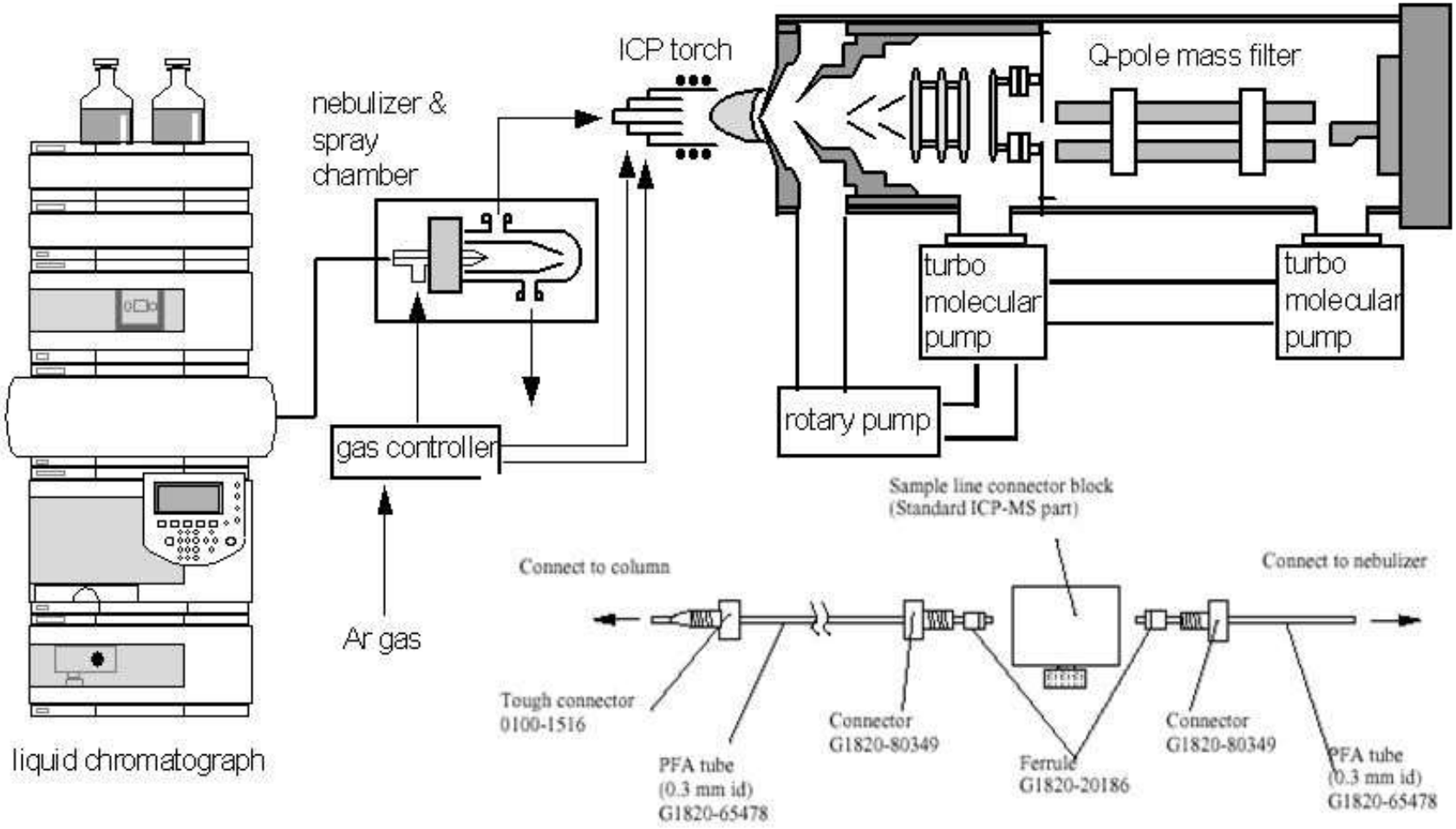
Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

- jsou tvořeny hlavně jednou nabité kladné ionty - obtížná ionizace atomů, které tvoří především záporné ionty (Cl, I, F, atd.)
- přechod z atmosférického tlaku do vakua - přes oblast s nízkým tlakem mezi 2 vstupními elektrodami (sampler cone a skimmerem)
- možnost spojení s HPLC - eluát je zmlžen do plazmatu
- nejběžnější analyzátor je kvadrupól - mohou rušit některé interference kvůli nízkému rozlišení
- sektorové magnetické analyzátory - vysoké rozlišení

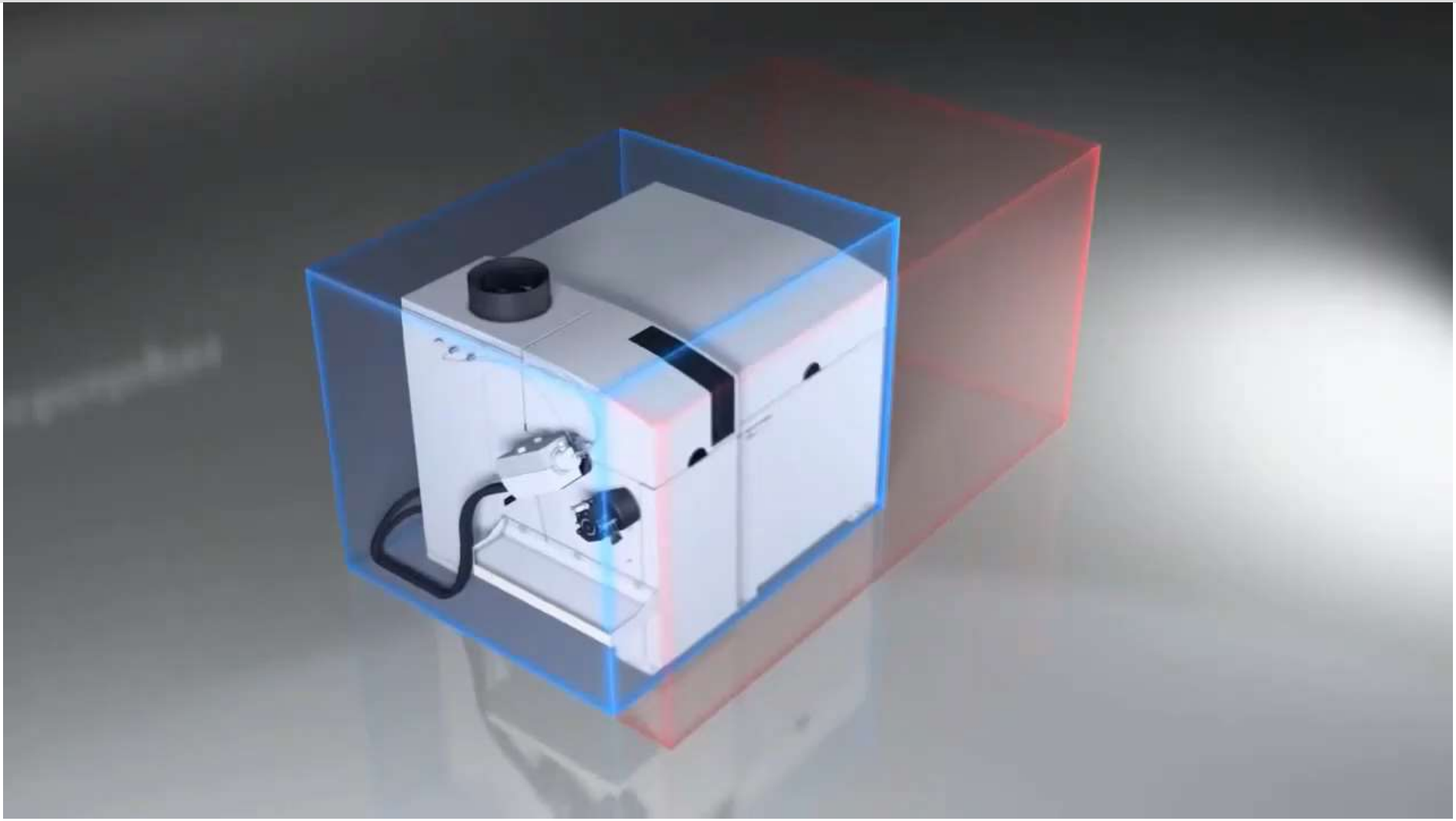


Analyte	Interference	|Δ m|	m	R
^{75}As = 74.92160	$^{40}Ar^{35}Cl$ = 74.93123	0.00963	75	7788
^{52}Cr = 52.94065	$^{37}Cl^{16}O$ = 52.96081	0.02016	53	2629
^{56}Fe = 55.93494	$^{40}Ar^{16}O$ = 55.95729	0.02235	56	2505
^{40}Ca = 39.96259	^{40}Ar = 39.96238	0.00021	40	190476
^{87}Sr = 86.90889	^{87}Rb = 86.90918	0.00029	87	300000

LC/ICP-MS


ICP torch
Q-pole mass filter
nebulizer &
spray
chamber
turbo
molecular
pump
turbo
molecular
pump
rotary pump
gas controller
Ar gas
liquid chromatograph
Sample line connector block
(Standard ICP-MS part)
Connect to column
Connect to nebulizer
Tough connector
0100-1516
PFA tube
(0.3 mm id)
G1820-65478
Connector
G1820-80349
Ferrule
G1820-20186
Connector
G1820-80349
PFA tube
(0.3 mm id)
G1820-65478

Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem



SIMS

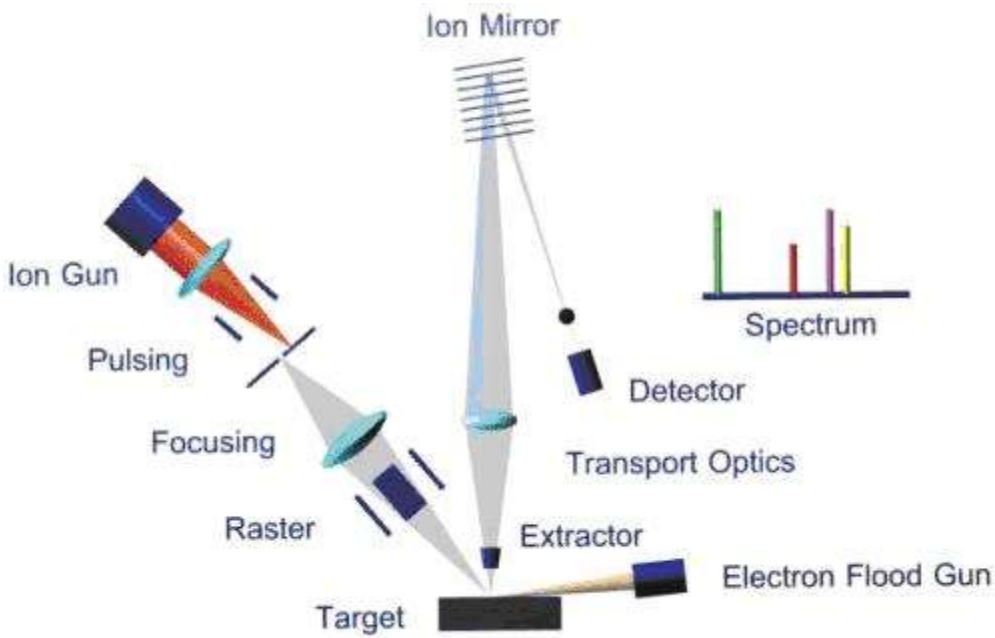
(Secondary ion mass spectrometry)

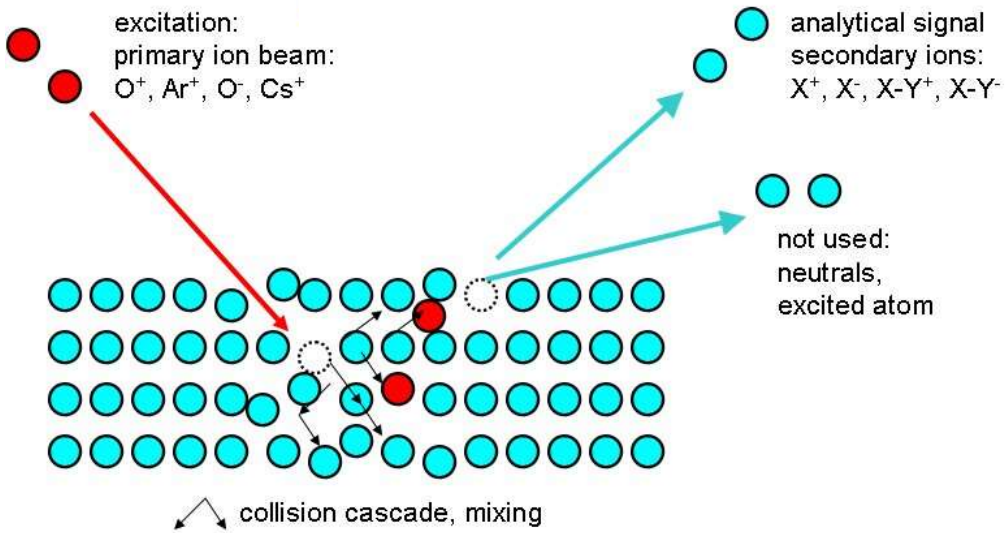
Hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů

- technika pro materiálovou a povrchovou analýzu
- SIMS analyzuje prvkové, izotopické a molekulární složení povrchu, hloubkové profily
- jedná se o odprašování svazkem urychlených iontů a následnou hmotnostně spektrometrickou detekci sekundárních iontů
- použití v organické analýze méně - ve spektru mnoho fragmentových iontů
- vysoká citlivost (až ppt), vysoké prostorové (50 nm) a hloubkové rozlišení (1 nm)

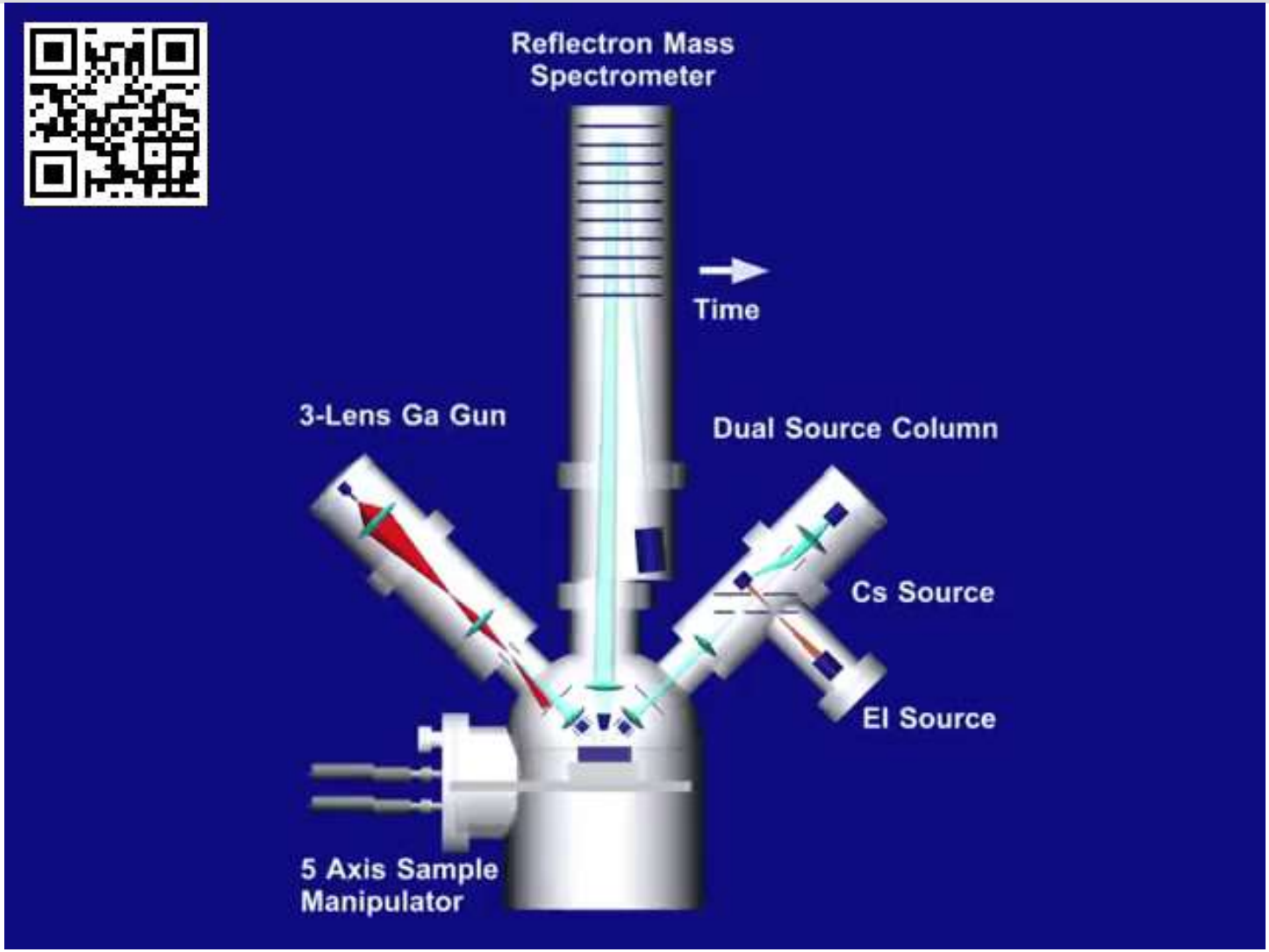
Hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů

- vzorek je bombardován svazkem urychlených (primárních) iontů z iontového děla
  - Ar^+, Cs^+, Ga^+, O^-, O_2^+, klastrové ionty **(**C_{60}^+, Ar_n^+, $(H_2O)_n^+$ **)**
- vzniká srážková kaskáda při povrchu a tím dochází k emisi částic z povrchu vzorku
  - neutrální, kladně i záporně nabité a excitované částice
  - ~1% je ve formě iontů (sekundárních iontů)
- vzniklé sekundární ionty jsou následně analyzovány v hmotnostním spektrometru
- MS instrumentace - magnetické sektory, kvadrupól, TOF





Hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů



zdroj - https://www.youtube.com/watch?v=KAWu6SmvHjc

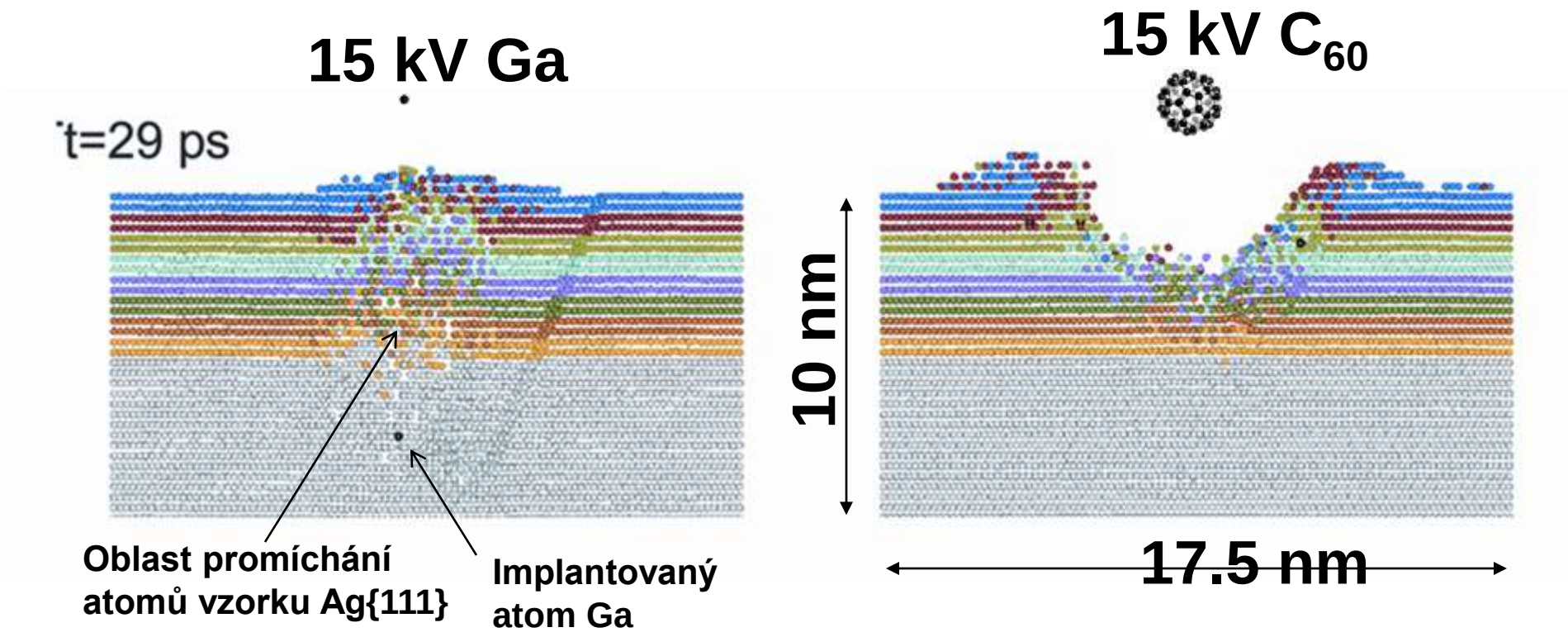
SIMS – tři základní režimy

	Statický SIMS	Dynamický SIMS	Molekulární SIMS
Dávka a typ primárních iontů	$< 10^{12}$ cm^{-2} např. Ar^+, Cs^+, Ga^+	$> 10^{13}$ cm^{-2} např. Cs^+, O_2^+, O^-	$> 10^{13}$ cm^{-2} velké klastry (C_{60}^+, Ar_n^+, $(H_2O)_n^+$)
Dopad iontů / poškození povrchu	na nepožkozené místo	na silně poškozený povrch (pozměněnou vrstvu)	na povrch, jehož poškozené části jsou průběžně odstraňovány
Odprašování/ implementace primárních iontů	Zanedbatelné odprašování	Současná implantace a odprašování, vznik pozměněné vrstvy	Implantace minimální, pozměněná vrstva průběžně odstraňována
Přínos techniky	Desorbce nepoškozených molekul - Informace o molekulárním složení povrchu	Informace o prvkovém a izotopickém složení, hloubkové profily	molekulární složení povrchu, molekulární hloubkové profily
Typ analýzy / rozměr	Kvalitativní analýza/ 2D	Cílená kvantitativní analýza/ 2D a 3D	Kvalitativní a kvantitativní analýza/ 2D a 3D
Nejvhodnější uspořádání	TOF SIMS, quadrupole	Magnetický SIMS	TOF SIMS se dvěma iontovými děly

Hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů

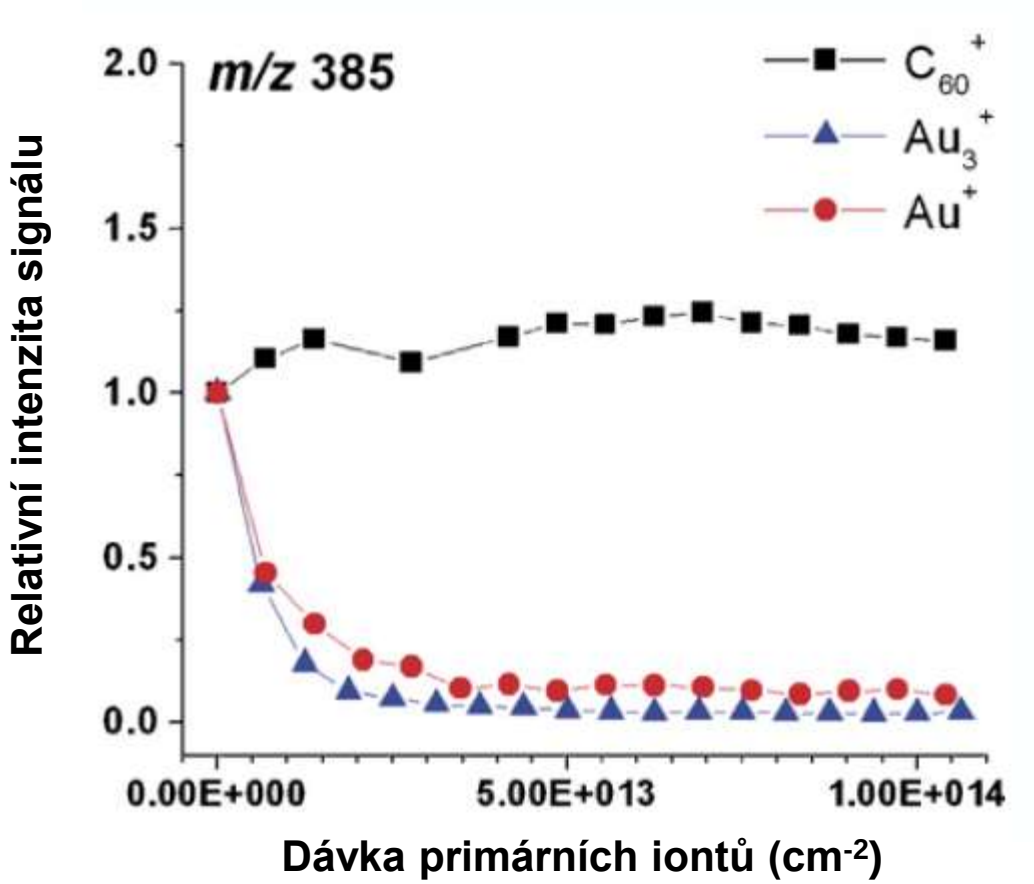
Poškození po dopadu jednoho iontu

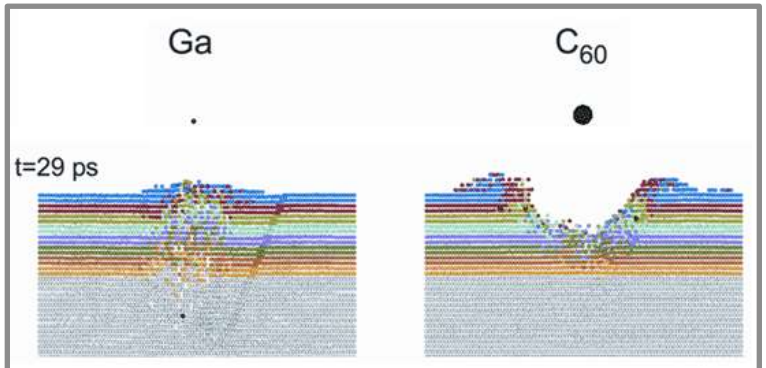
- Větší hloubka a objem poškozen po dopadu Ga
- Větší plocha poškozena pod dopadu C_{60}
- 15x více atomů odprášeno po dopadu C_{60}



Z. Postawa a kol., Microscopic insights into the sputtering of Ag{111} induced by C_{60} and Ga Bombardment, J. Phys. Chem. B, 108, 7831-7838 (2004).

SIMS - molekulární zobrazování





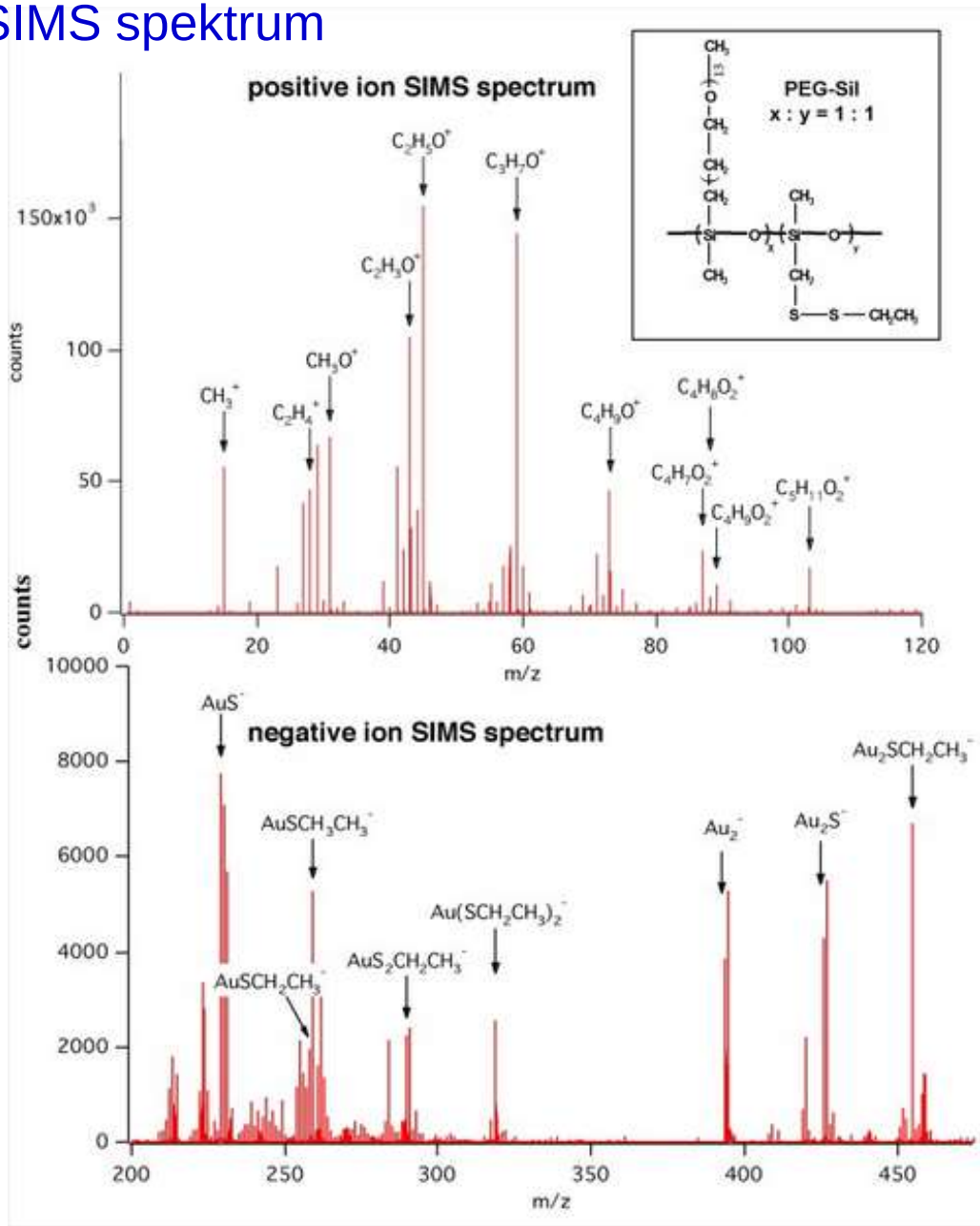
Hloubka podpovrchového poškození u C_{60} podstatně menší než u Ga, Au, Au_3.

Stabilita signálu z tenké vrstvy choleterolu naneseného na Si při bombardování ionty Au^+, Au_3^+, C_{60}^+ o energii 15 kV. Obrázek ukazuje intenzity iontu $[M-H]^+$ o hmotnosti m/z=385 jako funkce dávky primárních iontů.

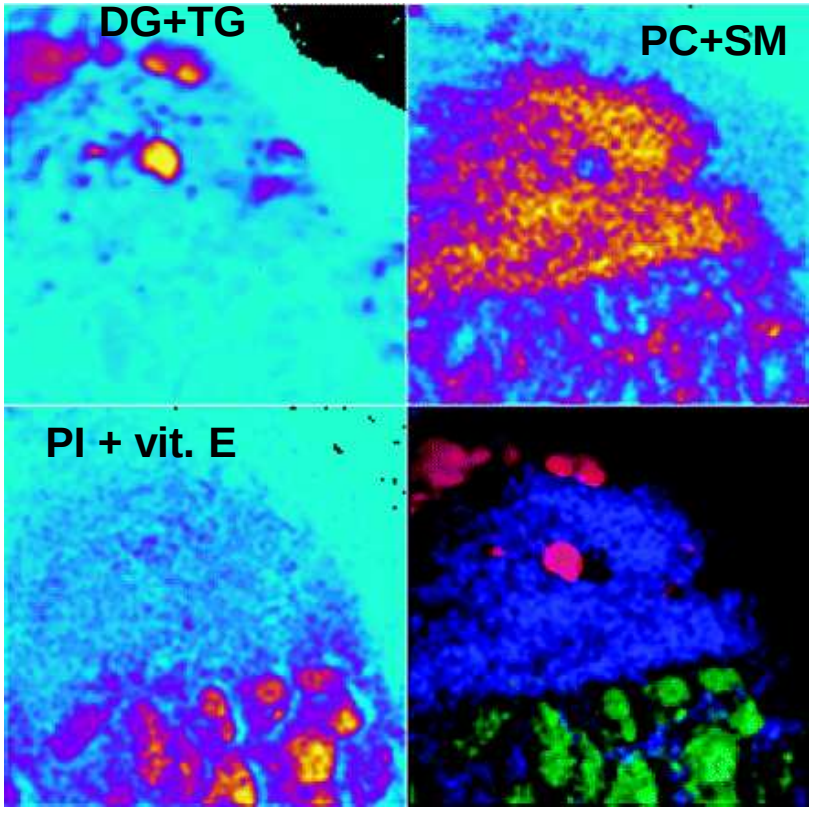
E.A. Jones akol., Int. J. Mass Spectrom. 260 (2007) 146 – 157.

Hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů

SIMS spektrum



SISM zobrazování - svalová tkáň



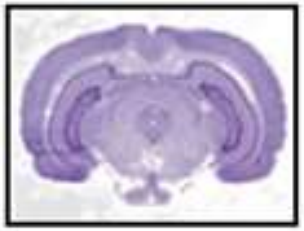
Hmotnostně spekrometrické zobrazování

MSI

(Mass spectrometry imaging)

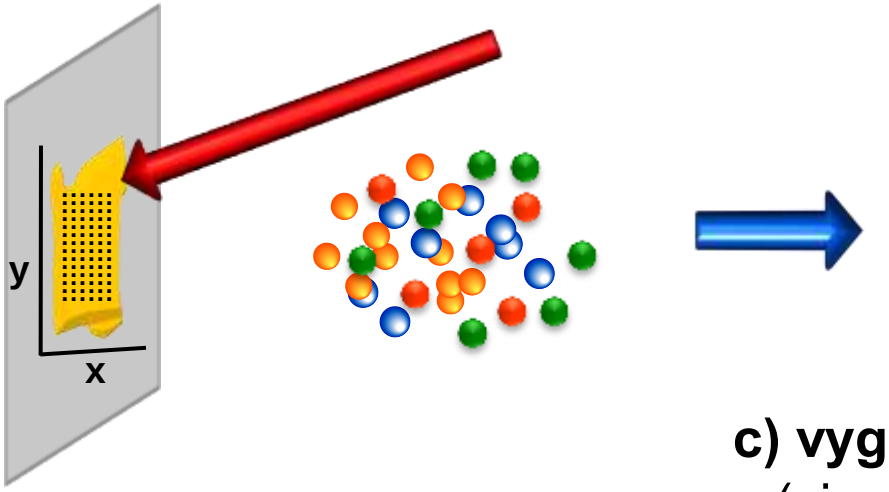
Princip hmotnostně spektrometrického zobrazovaní

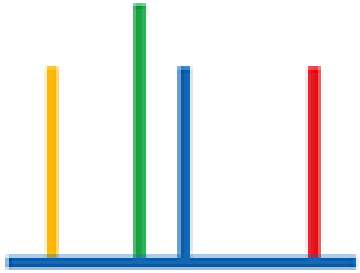
a) tenký řez tkáňě



d) zobrazení jednotlivých *m/z* v prostoru
(distribuce v celém měřeném vzorku)

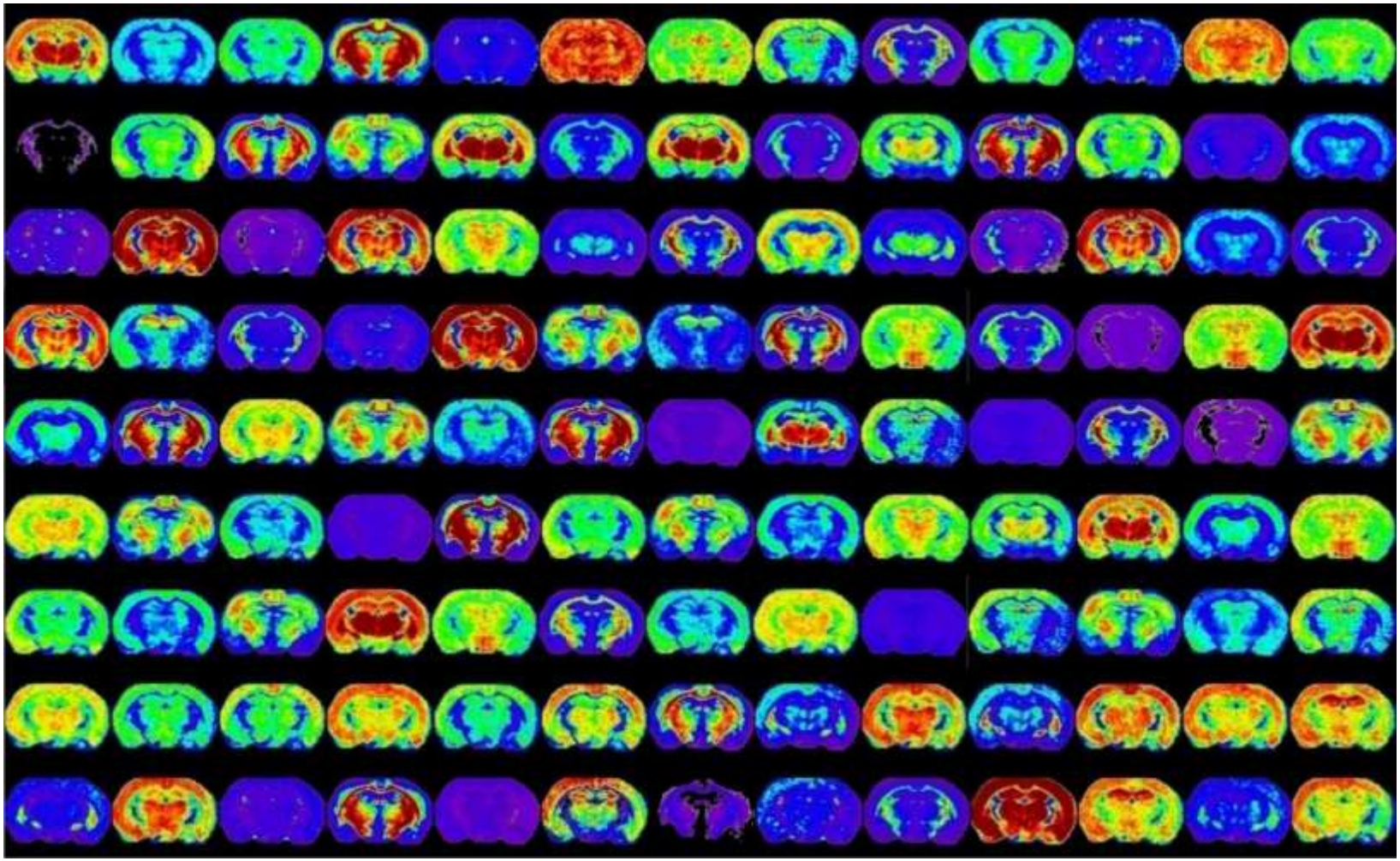
b) vlastní analýza (desorpce z povrchu, ionizace a MS separace)





c) vygenerování hmotnostního spektra
(simultánní detekce jednotlivých *m/z* v každém měřeném bodě [x,y])

Simultánní 2D zobrazení různých molekul



Jeremy L. Norris & Richard M. Caprioli, Chem. Rev. 113 (2013) 2309

Přínos MS zobrazování s ohledem na studované biologické vzorky

- **Zvířecí tkáně** (jednotlivé časti orgánů, celé orgány, nebo „zobrazování celého těla“) *zobrazování exogenních i endogenních látek - uplatnění v medicíně (histologie) a farmacii (distribuce léčiva a jeho metabolitů v orgánech).*

- **Lidské tkáně** (vzorky tkáně - biopsie, nádory, kůže, vlasy) – *zkoumá se kde a k jakým změnám dochází vlivem nemoci (léčby) - porovnávání vzorků a hledání rozdílů v molekulárním složení, histologie, hledání biomarkerů.*

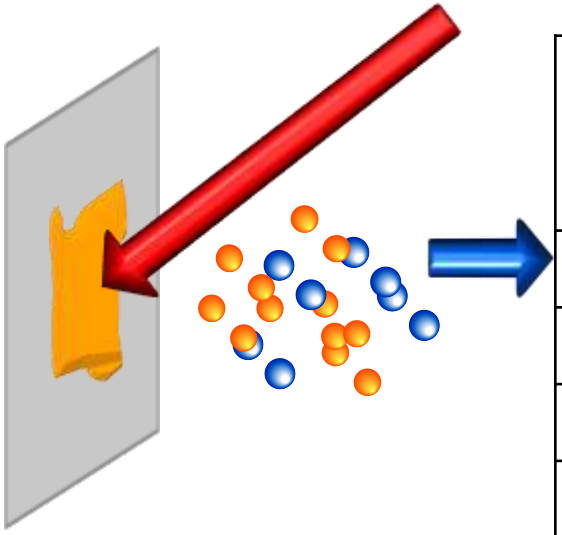
- **Rostlinné tkáně** (listy, stonky) – *sledování biochemických procesů v rostlinách, sledování přítomnosti a distribuce nežádoucích exogenních látek (např. pesticidů) – environmentální analýzy.*

- **Hmyz** - *objasnění biochemie členovců, studium feromonů, atd.*

- **Buňky** (buněčné rozlišení v řádech μm a méně) – *studium metabolismu na buněčné úrovni, charakterizace bakterií, nutné vysoké prostorové rozlišení (význam v lékařství a biochemii)*

Ionizační techniky a analyzátory v hmotnostně spektrometrickém zobrazování

ionizační technika	desorpční impuls	2D rozlišení
SIMS	svazek iontů o vysoké energii	< 1 μm
(MA)LDI	elektromagnetické záření (UV nebo IR laser)	1 - 250 μm
LA ICP-MS	elektromagnetické záření	10 - 100 μm
DESI	nabité kapičky rozpouštědla	50 - 500 μm



MS analyzátor	*m/z* rozsah (horní limit) $*10^3$	rozlišovací schopnost $*10^3$	MA, ppm	rychlost [Hz]
Q	2 - 3	3 - 5	-	2 – 10
IT (LIT)	4 - 6	4 - 30	-	2 – 10
TOF	**10 - 1000**	10 - 60	1 - 5	**10 – 50**
QTOF	10 - 40	20 - 75	1 - 5	**10 – 50**
Orbitrap	4 - 8	**100 - 1000**	**< 1**	1 – 4 (40)
FT-ICR	4 - 10	**750 - 10000**	**< 1**	0.5 - 2

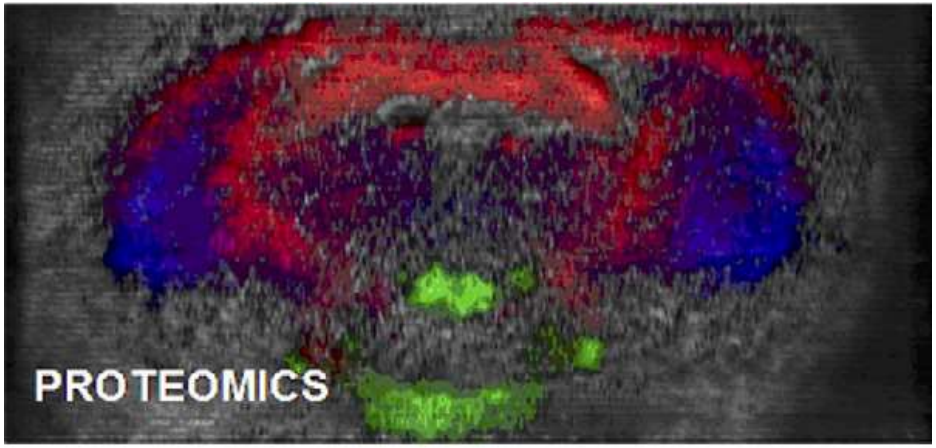
Hlavní aplikace MS zobrazování s ohledem na cílovou skupinu zobrazovaných sloučenin

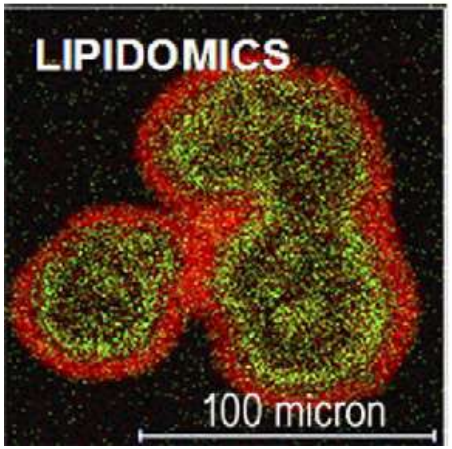
proteomika

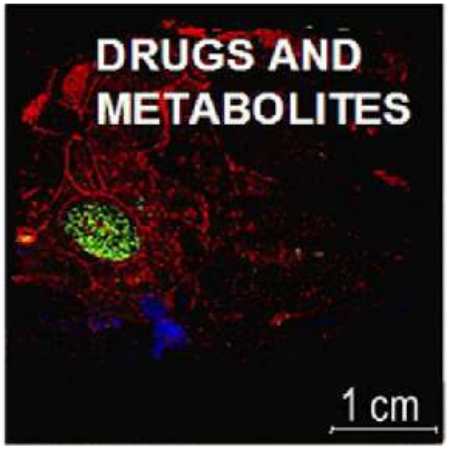
lipidomika

studium metabolismu léčiv

elementární ionty
nanoSIMS a LA-ICP-MS



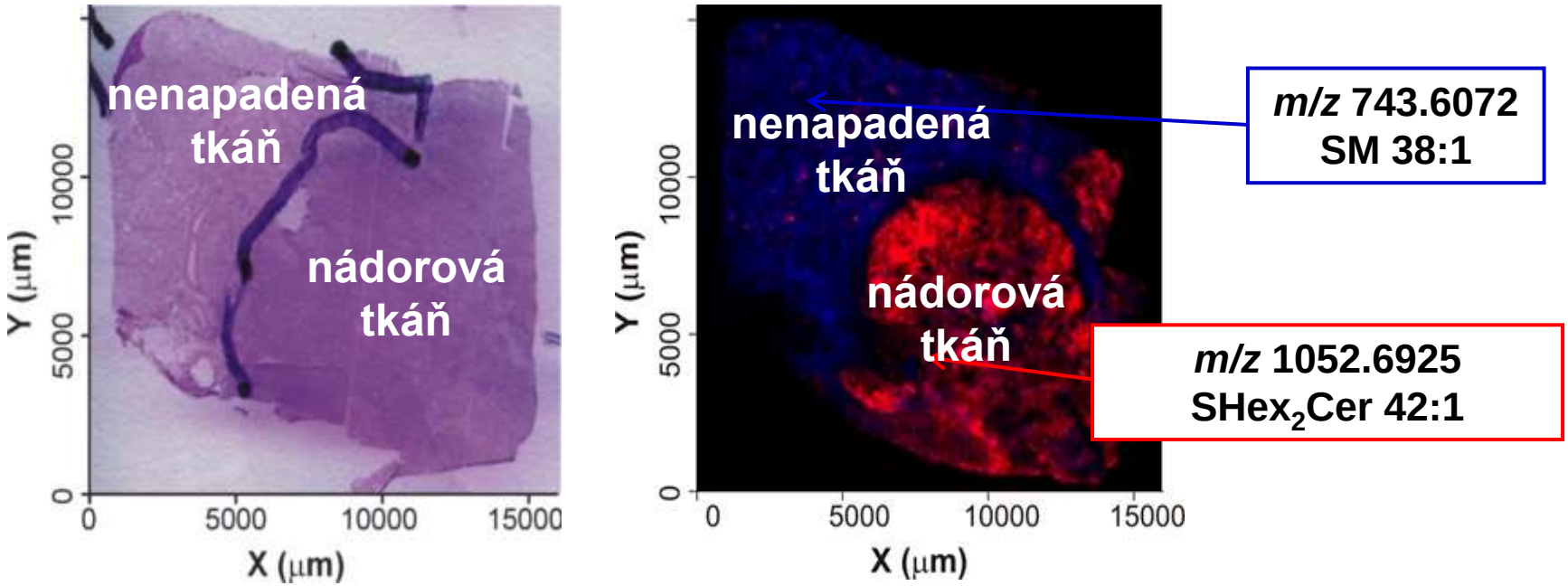




Ron M. A. Heeren a kol., J. Am. Soc. Mass Spectrom.. 20 (2009) 1006

Porovnání histologického barvení a MALDI-MSI

Histologie (H&E barvení) **MALDI-MSI (záporně nabité ionty)**



- Porovnávány jsou sousední plátky tkáně získané okamžitě po chirurgickém vyjmutí nádoru spolu s obklopující nenapadenou částí.
- **Experimentální parametry MSLDI-MSI:** rozsah *m/z* 400 - 2000, laterární rozlišení 120 μm, rozlišení analyzátoru 100 000 (*m/z* 400).

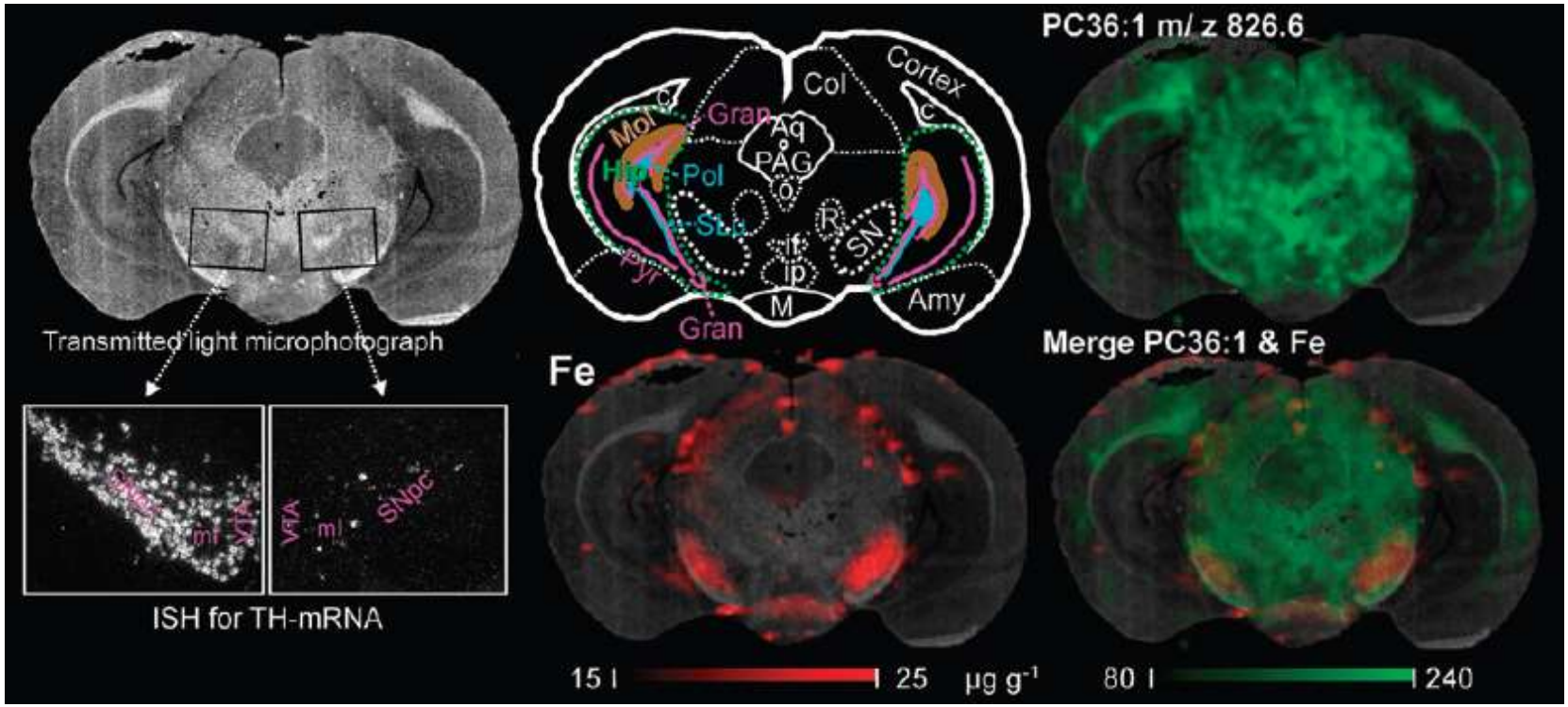
R. Jirásko et al., J. Amer. Mass Spectrom. Soc. 28 (2017) 1562

Kombinace MSI technik

Světelná mikroskopie

Anorganické ionty:
LA-ICP-MSI
(případně SIMS-MSI)

Organické ionty:
MALDI-MSI, DESI-MSI



A. Matusch et al., Anal. Chem. 84 (2012) 3170

- Injekce 6-hydroxydopaminu (neurotoxická syntetická látka) – selektivní zničení dopaminergních a noradrenergních neuronů v mozku → vyvolání Parkinsonovy choroby
- Simultánní zobrazení rozložení železa a lipidů v myším mozku – získání komplexnější informace změn chemického složení vlivem různých onemocnění apod.