

Ionizační techniky



Základní části hmotnostního spektrometru

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

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

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

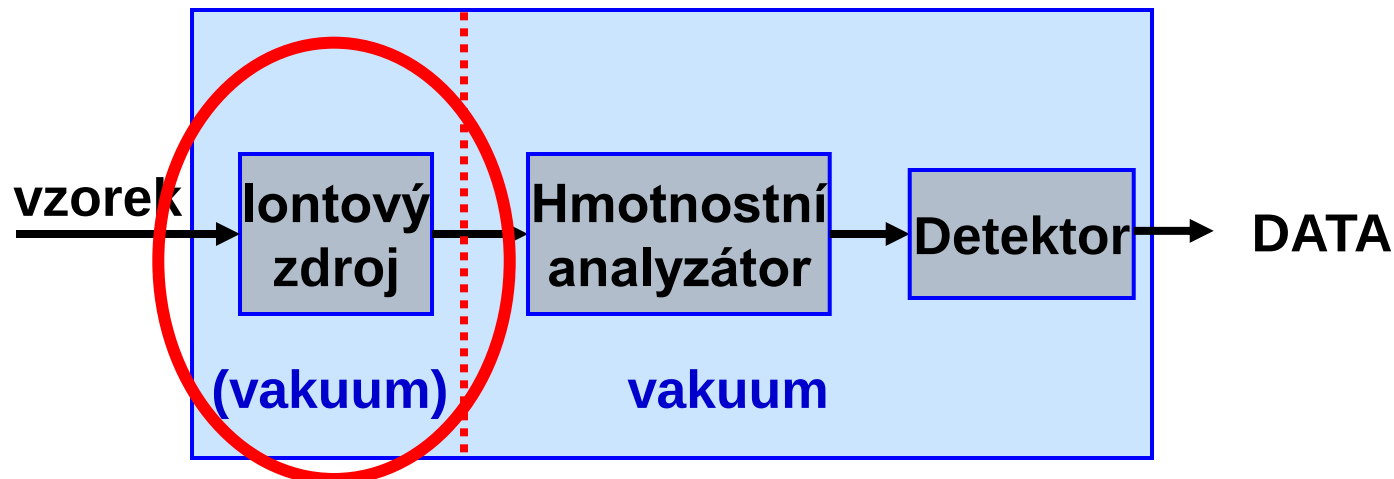
- další důležité části přístroje:

- 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



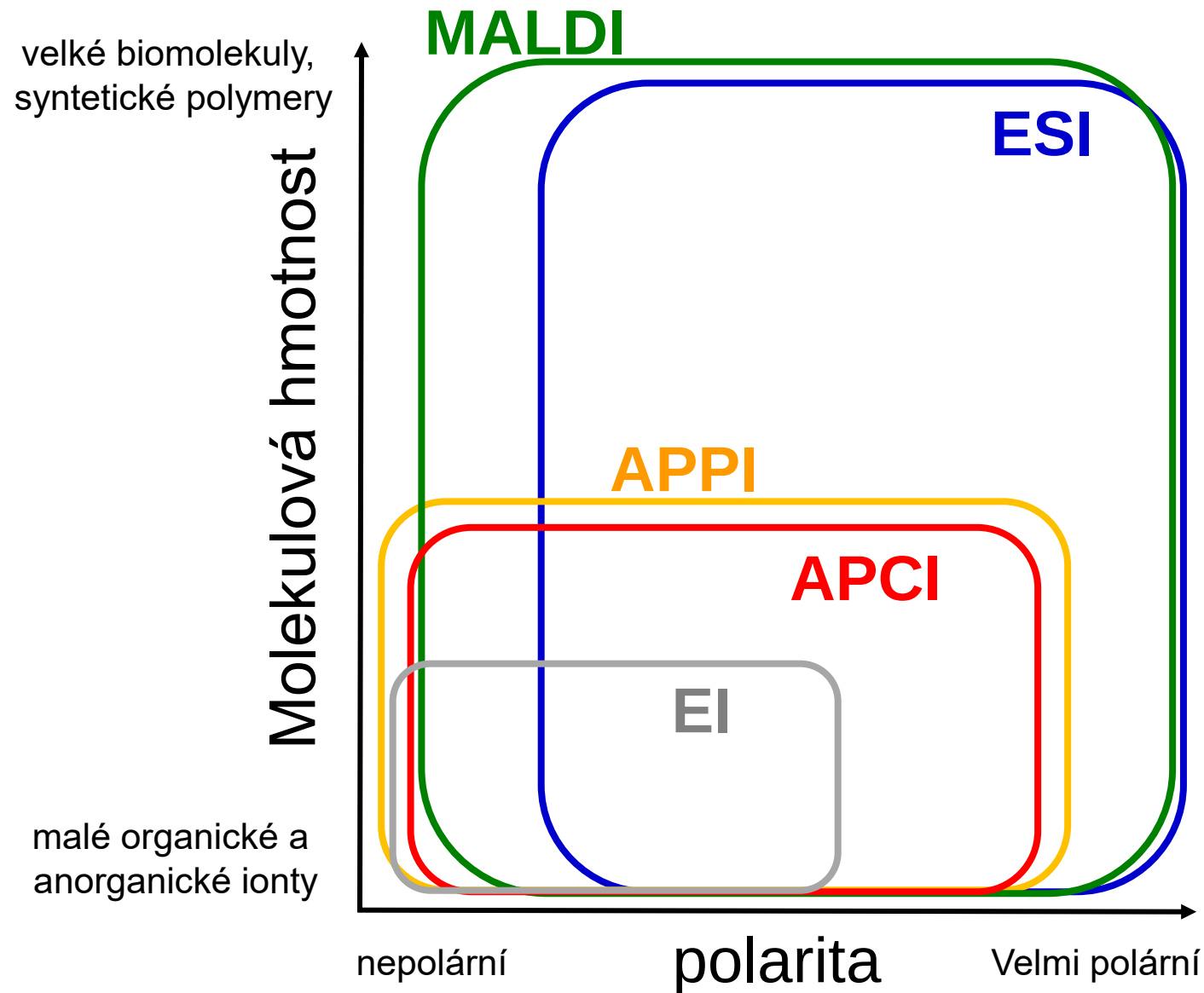
Ionizační techniky

- 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 knihovnamí 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. $[\text{M}+\text{octan}]^-$, $[\text{M}+\text{mravenčan}]^-$, $[\text{M}+\text{Cl}]^-$, apod.

Podle čeho volit způsob ionizace?



EI

(Electron Ionization)

Elektronová ionizace

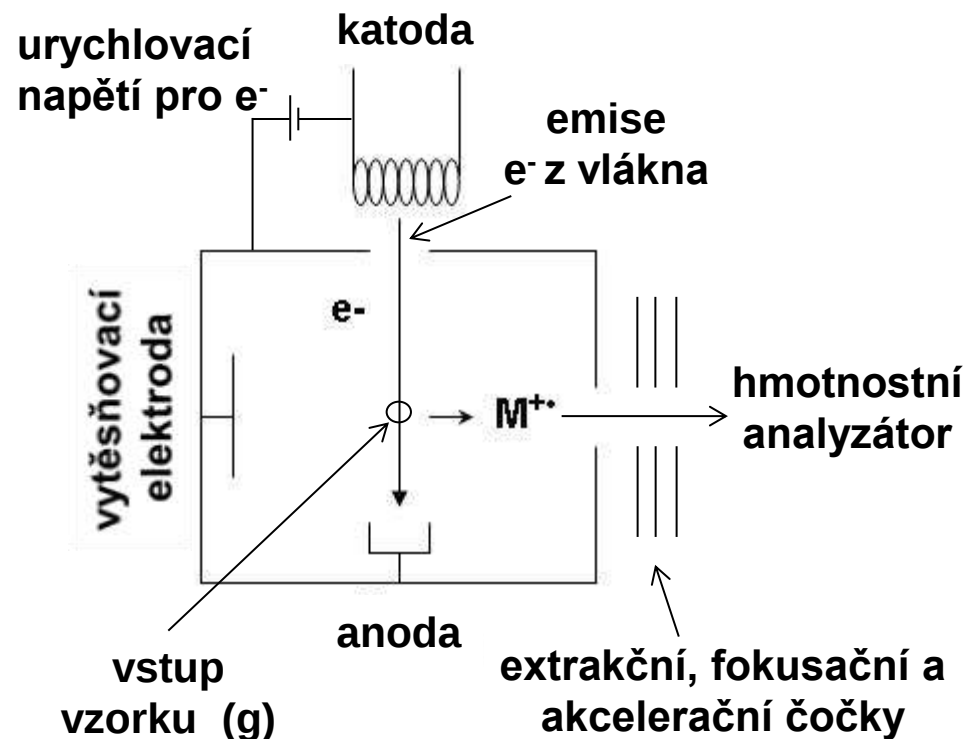
- nejstarší ionizační technika
- “nejtvrdší” ionizační technika - molekula získá velký přebytek vnitřní energie, který se projeví fragmentací molekulárního iontu (někdy v takovém rozsahu, že molekulární ion zcela chybí ve spektru)
- vznikají **ionty s lichým počtem elektronů** ($M^{+\cdot}$)
- pracuje 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 ($1 \text{ eV} = 1.602 \cdot 10^{-19} \text{ J}$), 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^+ .



- účinnost ionizace je velice nízká, vzniká 1 ion z 10^5 interakcí
- vzniklé ionty jsou vytěšňovací 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



ROMETRY - ELECTRON IONIZATION

 = NEUTRAL MOLECULE

 = POSITIVE ION

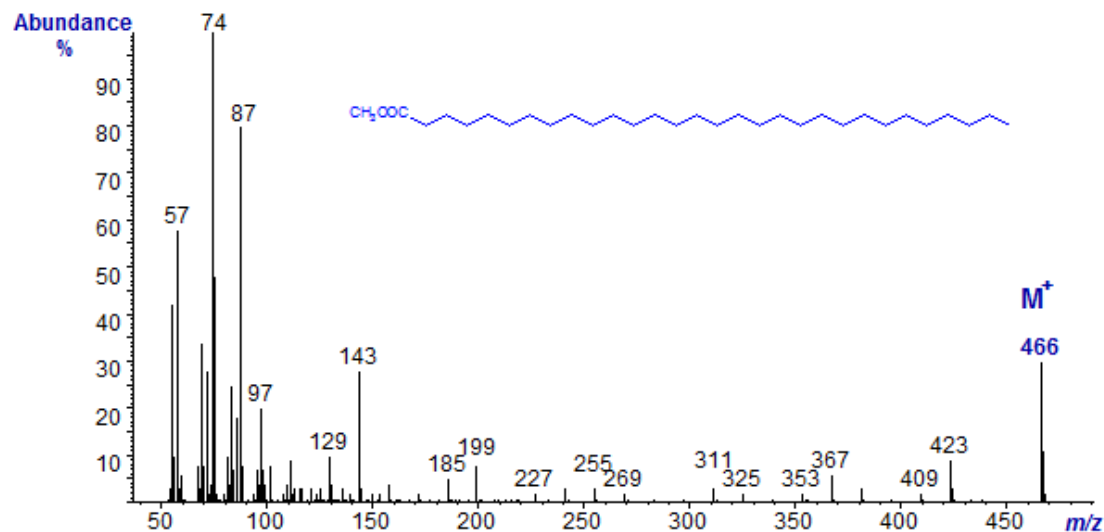
 = ELECTRON



A VAPORIZED SAMPLE IS INTRODUCED TO THE IONIZATION CHAMBER VIA THE SAMPLE INLET

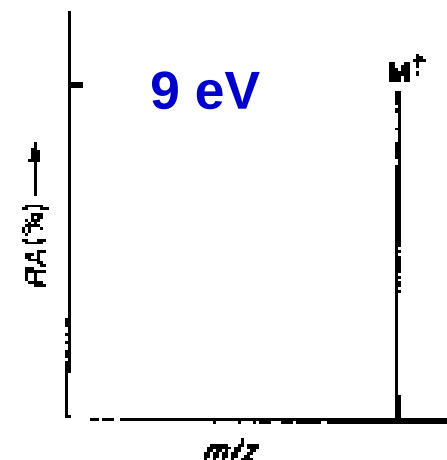
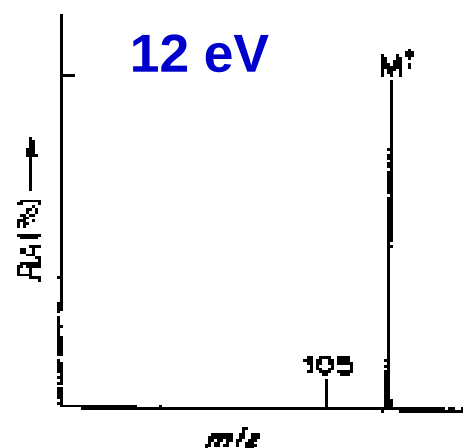
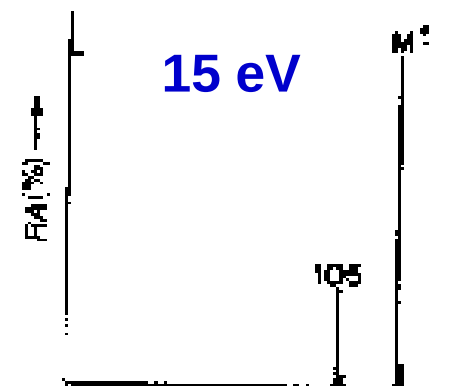
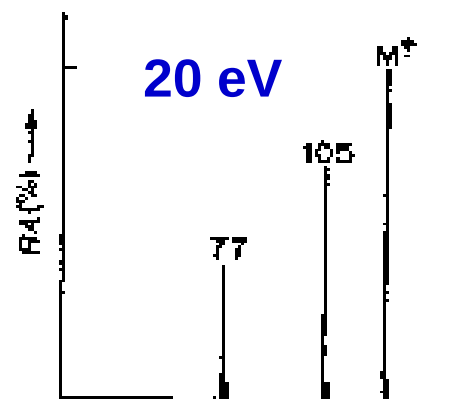
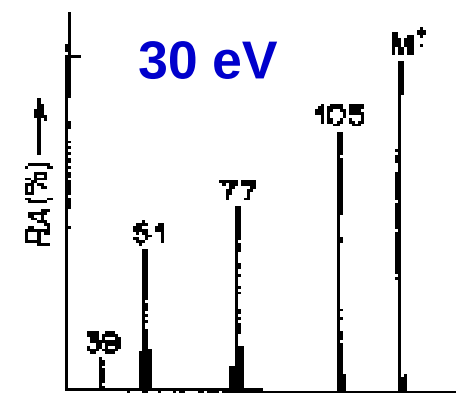
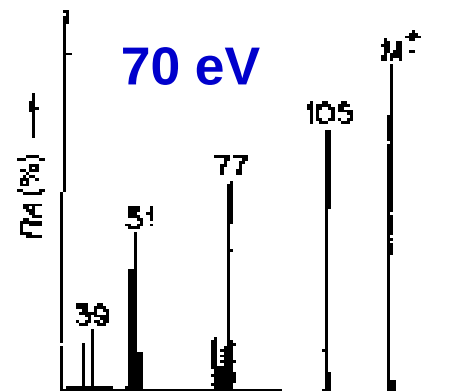
Princip elektronové ionizace

- **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 nabitě a nenabitě 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 $\rightarrow$ 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)

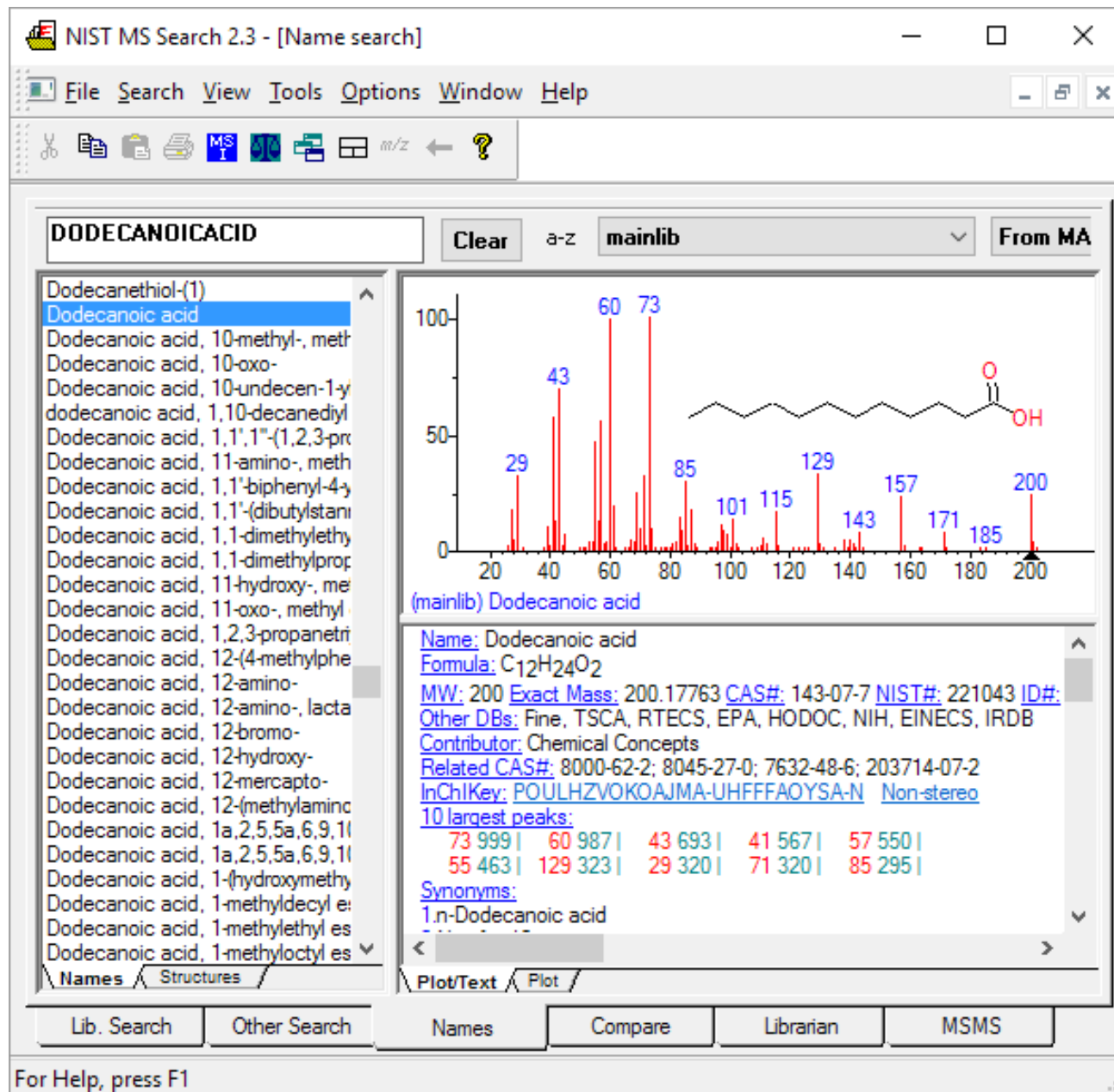
Záporné ionty při elektronové ionizaci

- 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/ $AB + e^- \rightarrow [AB]^-$ - **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

Go 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

1000 900 800 700 600 500 400 300 200

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	Propylbenzoyllecgonine
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	Phenylacetoyecgonine met...
20	M	340	708	0.00	1	0	1,1'-Bicyclohexyl, 2-methyl...

Names Structures Hit List

Lib. Search Other Search Names Compare Librarian MSMS

Name: Cocaine

82

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

35 152 166 182 198 272 303

35 150 166 182 198 272 303

35 150 166 182 198 272 303

707 999R 85.7P

Cocaine

182 198 272 303

15 27 39 47 59 67 135 152 166 182 198 272 303

(mainlib) Cocaine

Name: Cocaine

Formula: C₁₇H₂₁NO₄

MW: 303 Exact Mass: 303.147058 CAS#: 50-36-2 NIST#: 113834 ID#: 44326 DB: mainlib

Plot/Text of Hit Plot of Hit

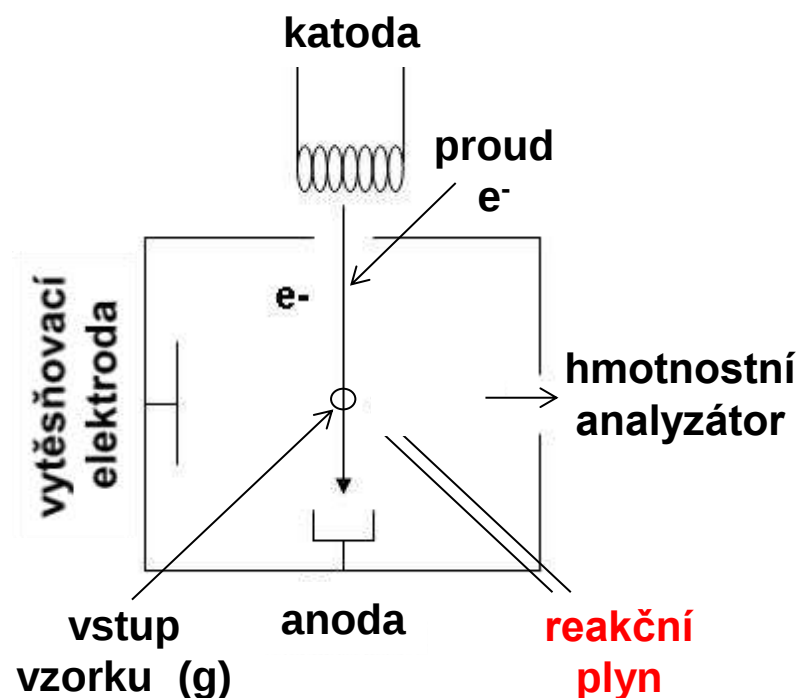
MS/MS in EI MS/MS in EI 303

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):



- ionty vznikají **ion-molekulárními reakcemi**:



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

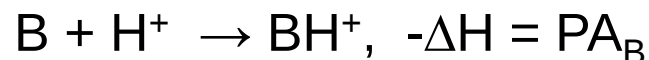
- nejčastější je **přenos protonu** (přenos protonu z plynné Brönstedovy kyseliny $[BH]^+$ na neutrální molekulu M)
- abstrakce hydridu bývá pozorována u alifatických uhlovodíků (vznik $[M-H]\cdot$)
- k výměně náboje dochází u GC/MS: $He^{+\cdot} + M \longrightarrow He + M^{+\cdot}$
- příkladem kondenzace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

Reakční plyny

- nejběžnější reakční plyny:
 - **methan** (vznikající ionty $[\text{CH}_5]^+$, $[\text{C}_2\text{H}_5]^+$, $[\text{C}_3\text{H}_5]^+$)
 - **isobutan** (ion $[\text{C}_4\text{H}_9]^+$)
 - **amoniak** (ionty $[\text{NH}_4]^+$, $[(\text{NH}_3)_2\text{H}]^+$, $[(\text{NH}_3)_3\text{H}]^+$)
- méně časté:
 - propan (ion $[\text{C}_3\text{H}_7]^+$)
 - methanol (ionty $[\text{CH}_3\text{OH}_2]^+$, $[(\text{CH}_3\text{OH})_2\text{H}]^+$)
 - voda (ion $[\text{H}_3\text{O}]^+$)
 - dusík (ion $[\text{N}_2]^+$)
 - vzácné plyny (ionty $[\text{He}]^+$, $[\text{Ar}]^+$) 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).



- 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



- 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		

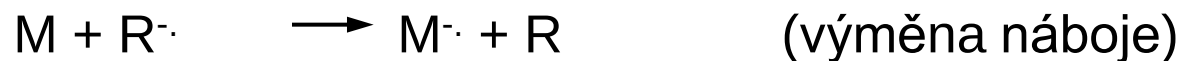
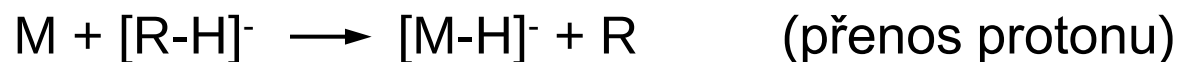
Přenos protonu

- 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 kapalně!

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:



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 $[O]^-$, $[NO]^-$) - velmi citlivé pro molekuly obsahující halogeny nebo jiné elektronegativní prvky

Využití EI a CI - zejména GC/MS aplikace



TSQ 8000 Evo

GC-MS/MS

Triple Quadrupole MS

High performance, easy to use MS/MS for non-experts

Target Analysis in Complex Matrix

Pesticides in Food, Drugs in body fluid



DFS

GC-HRMS

Magnetic Sector HRMS

High-Resolution Full Scan and SIM

Dioxins, PCBs, Other POPs

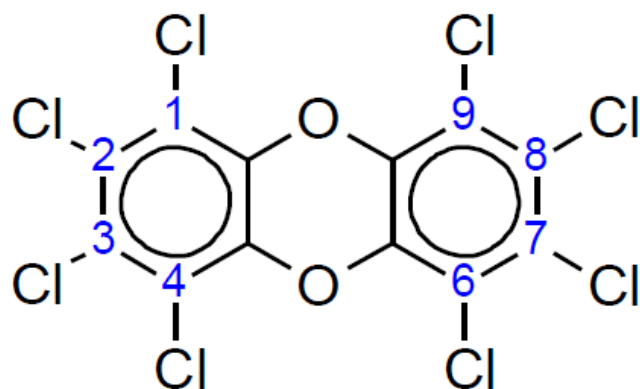
EPA 1613, 8270A, 8290

Využití EI a CI - zejména GC/MS aplikace

GC/HRMS (firma ALS, Pardubice)



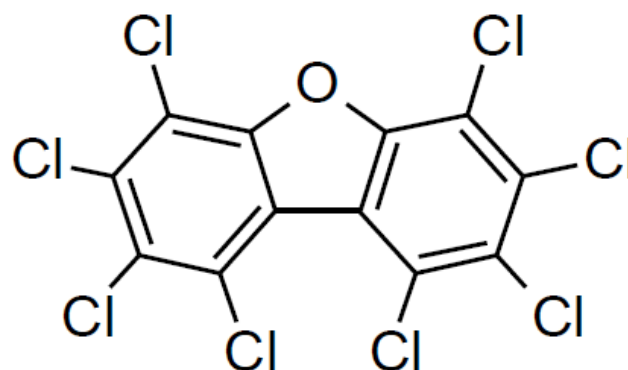
- specializované pracoviště, kde provádí ultrastopové analýzy látek zejména ze skupiny tzv. persistentních organických polutantů (POPs), jako jsou polychlorované dibenzo-p-dioxiny (PCDD) a dibenzofurany (PCDF), polychlorované bifenyly (PCB), polybromované difenylethery (PBDE) a polyaromatické uhlovodíky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



Polychlorinated dibenzo-p-dioxin (PCDD)

“Dioxin”

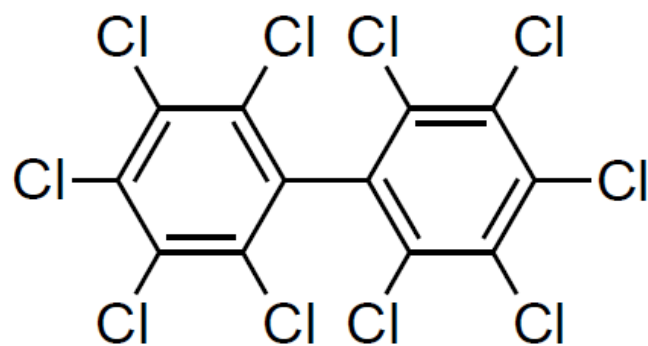
75 congeners



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 spalování 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 $\mu\text{g/L}$ in blood
 - 100 **ppb** - 50,000x higher than normal concentrations



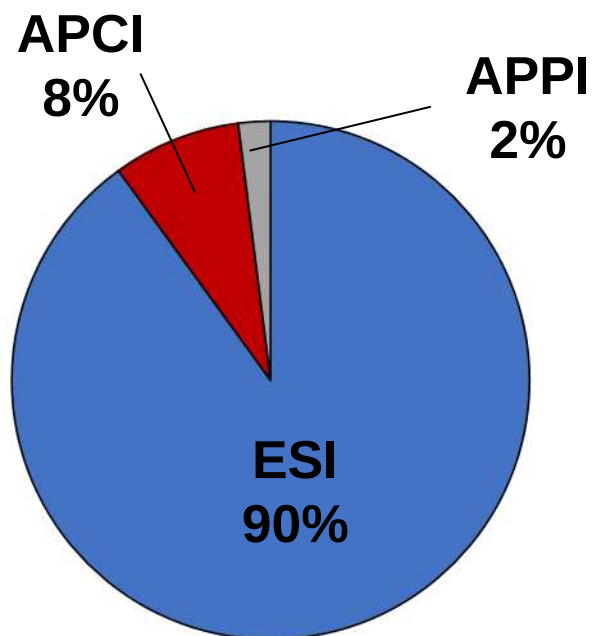
- “Dioxin so pure it was made in a laboratory”

API techniky

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

Ionizace za atmosférického tlaku

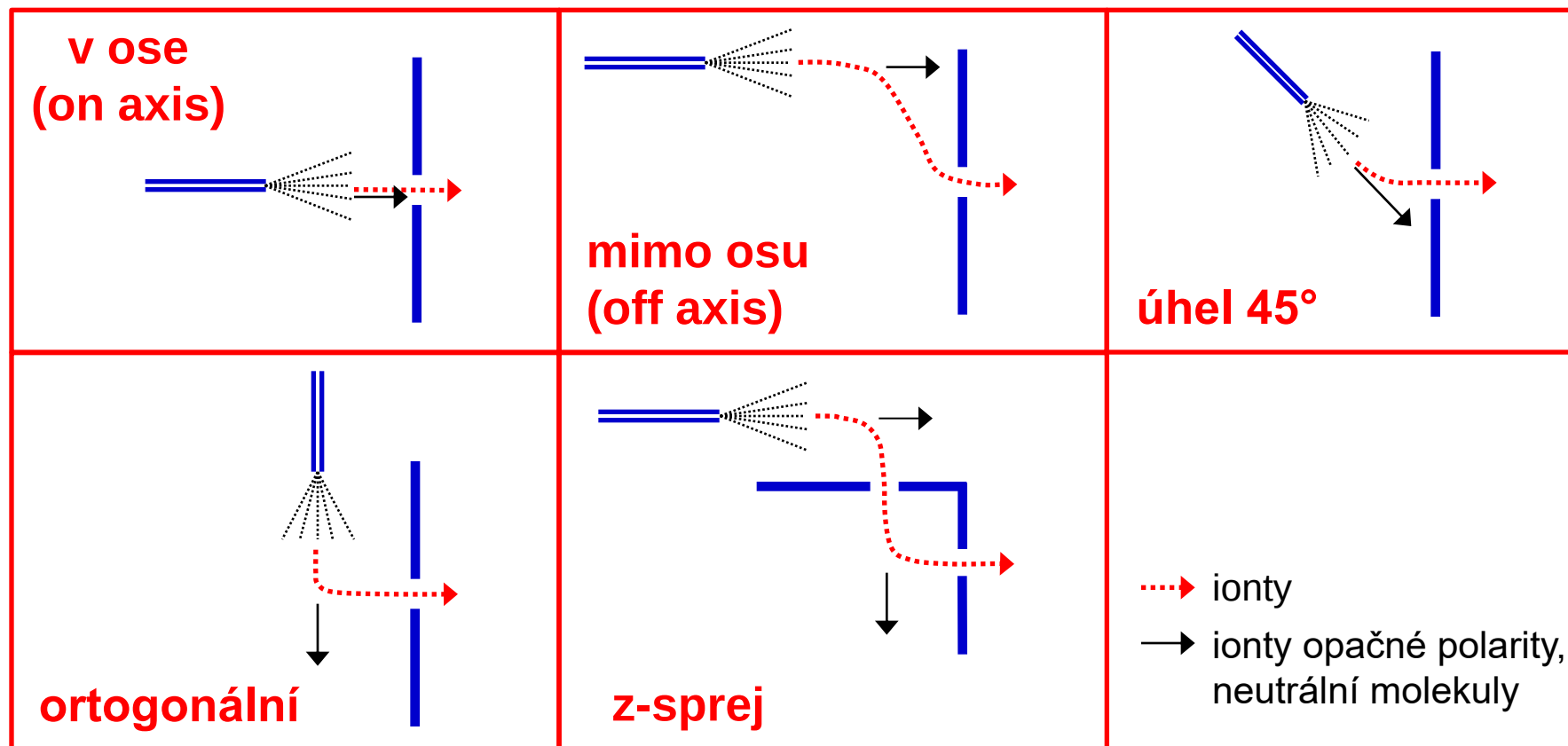
- ionizační techniky **ESI**, **APCI**, **APPI** pracující **za atmosférického tlaku** znamenaly naprostý průlom v řešení spojení **HPLC/MS**
- v současnosti jsou techniky ESI + APCI standardem pro komerční HPLC/MS systémy, APPI je považována za vhodnou alternativu pro nepolární nebo velmi labilní látky
- 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

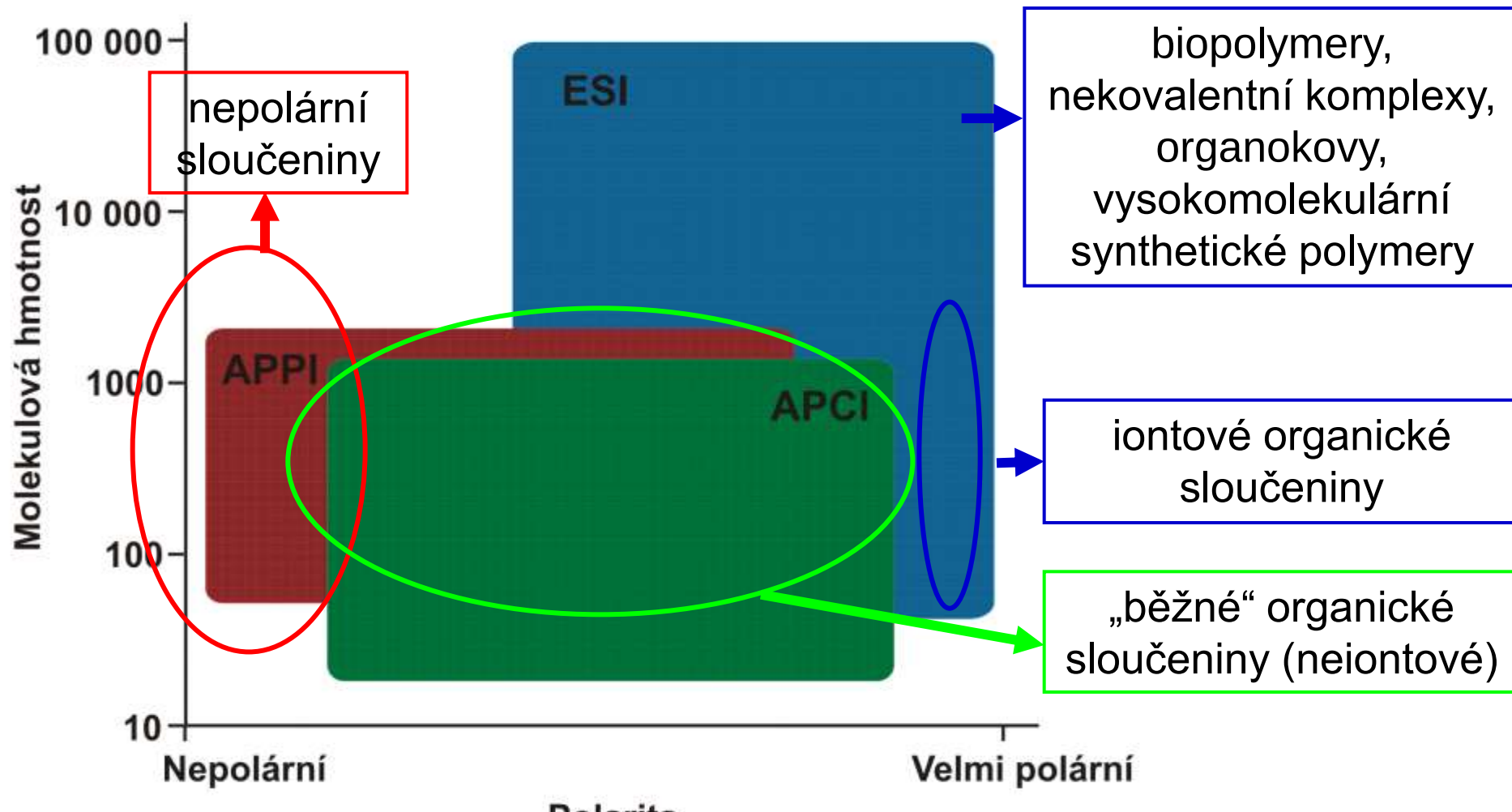
API techniky

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

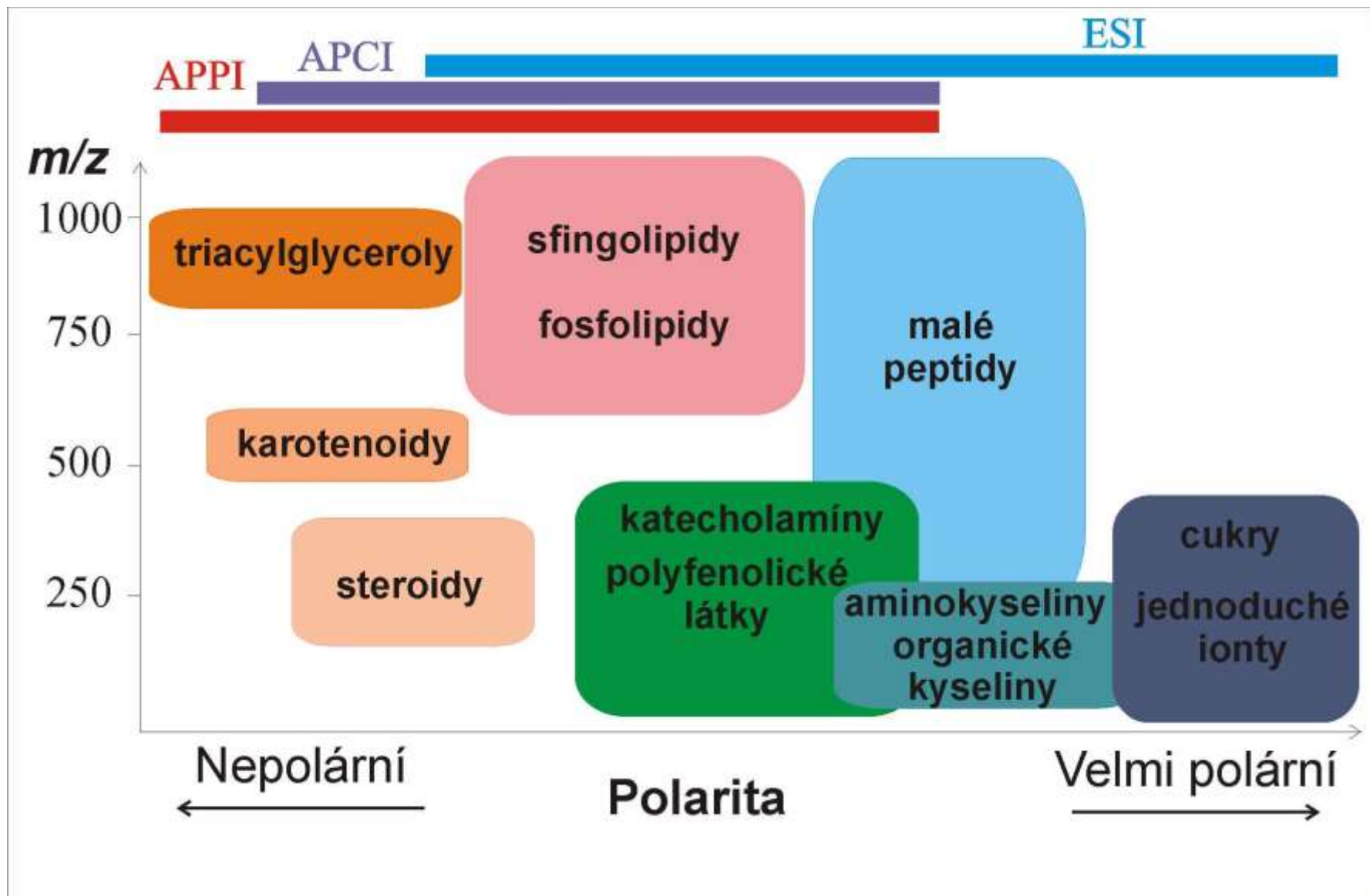


Volba ionizační techniky a polarity záznamu

- **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)



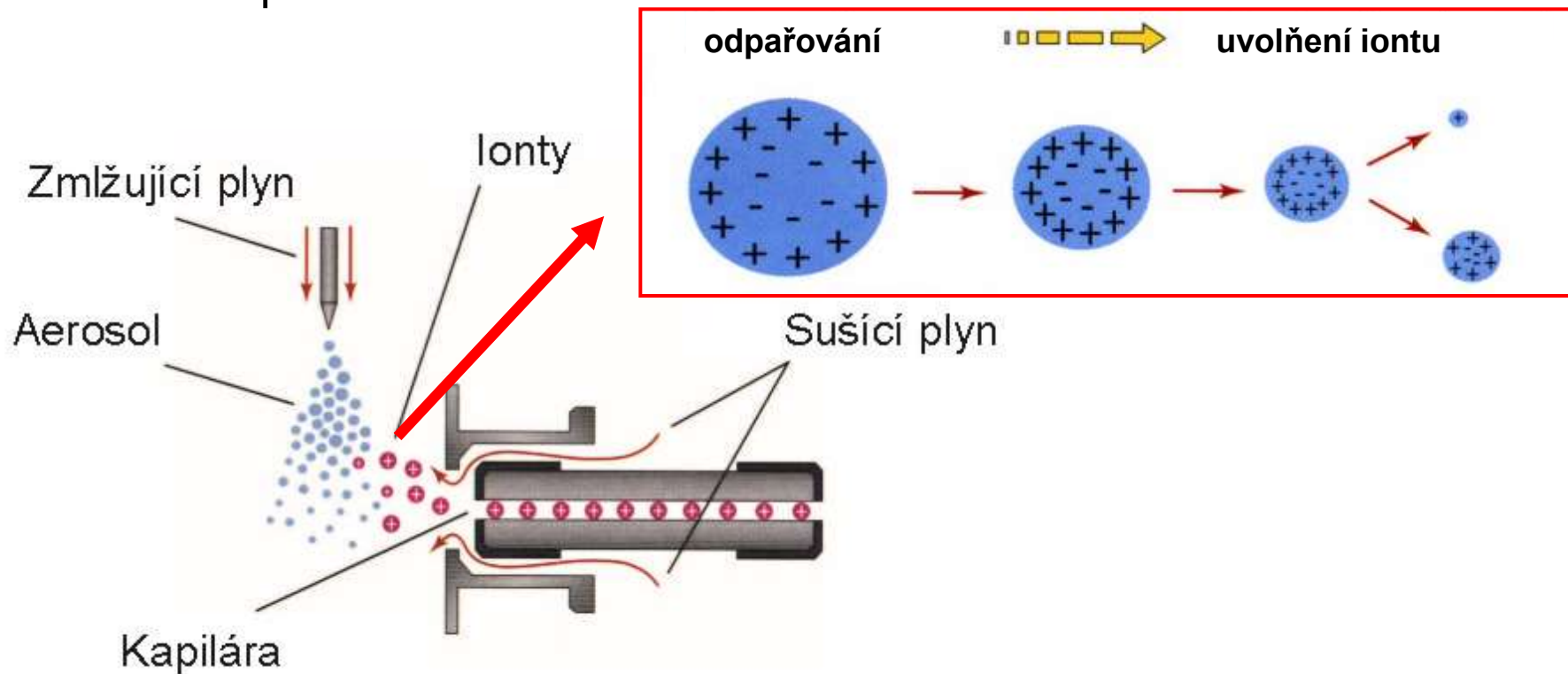
John B. Fenn
(2002, Nobelova cena za chemii)

Ionizace elektrospřjem

- 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

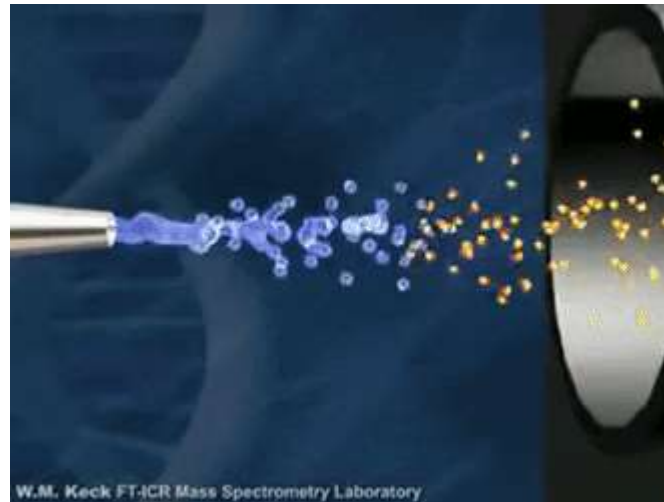
Celý proces elektrospreje lze rozdělit na 3 základní kroky:

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

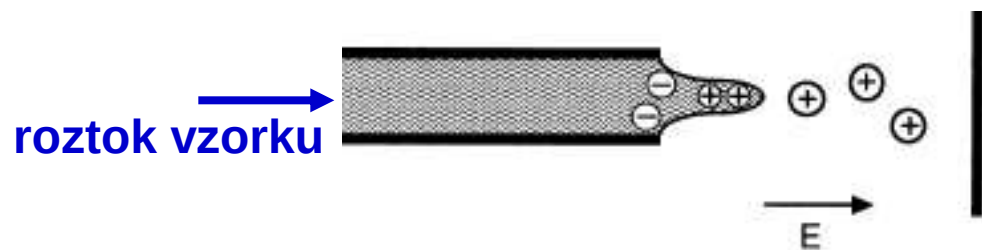
ad 1/ Zmlžení roztoku vzorku, tvorba elektrospreje

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



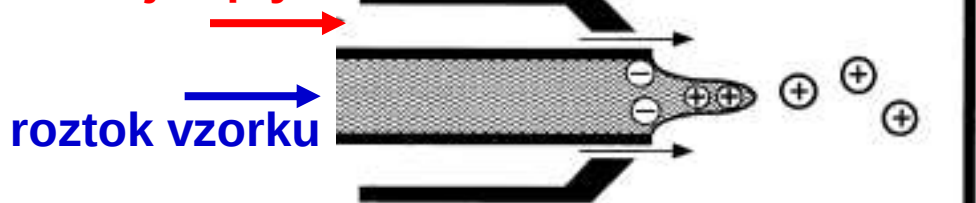
A/ „čistý“ elektrosprej roztoku analytu
(dnes méně časté, vhodné jen pro
velmi nízké průtoky, např. nanosprej)

přídavná kapalina



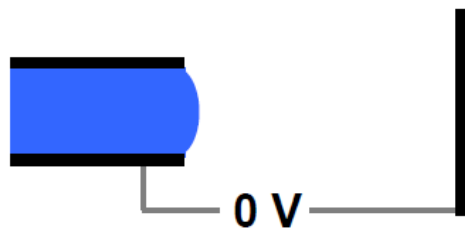
B/ elektrosprej roztoku analytu s
přídavným tokem kapaliny
(vodivé spojení pro CZE/MS, podpora
ionizace, např. přídavek NH_4^+ pro
preferenční tvorbu aduktů $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$)

zmlžující plyn

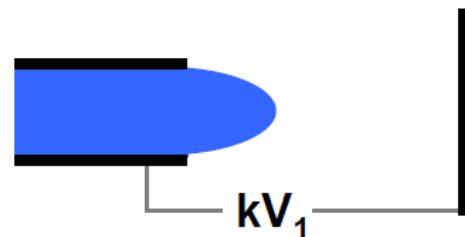


C/ elektrosprej roztoku analytu s
pneumatickou podporou zmlžení
(standardní použití v HPLC/MS, dříve
nazýván iontový sprej)

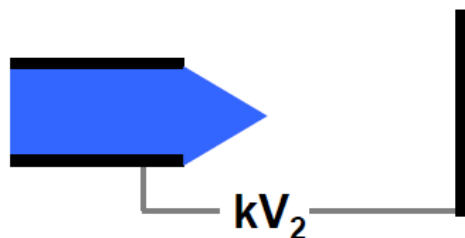
Tvorba elektrospreje



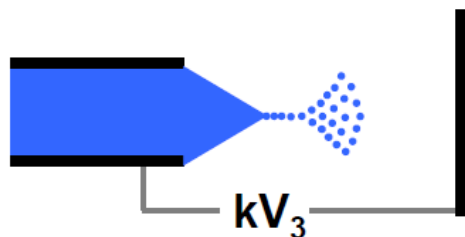
Výchozí stav (kapalina v kapiláře, napětí není
vloženo)



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“



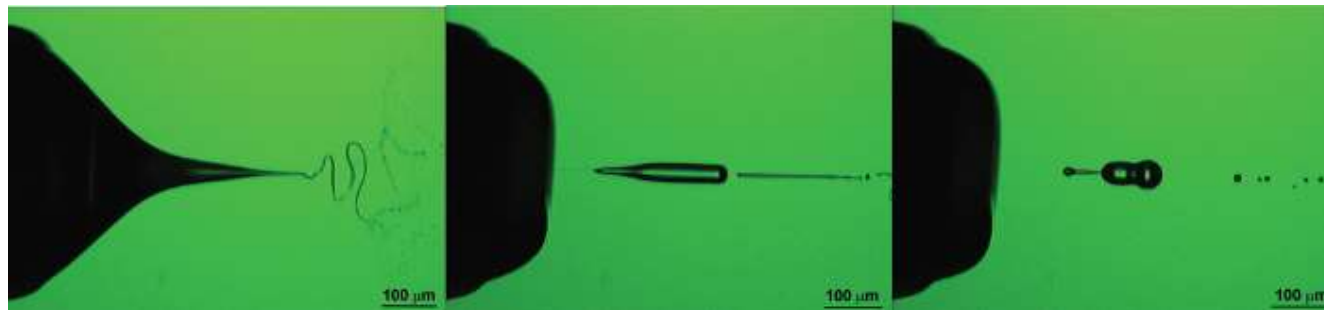
Z Taylorova kužele se začnou okamžitě vypuzovat
jemné nabitě kapky, které se vzájemně odpuzují,
neboť mají souhlasné náboje ($kV_3 \approx kV_2$).

- 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 $< 10 \mu\text{m}$

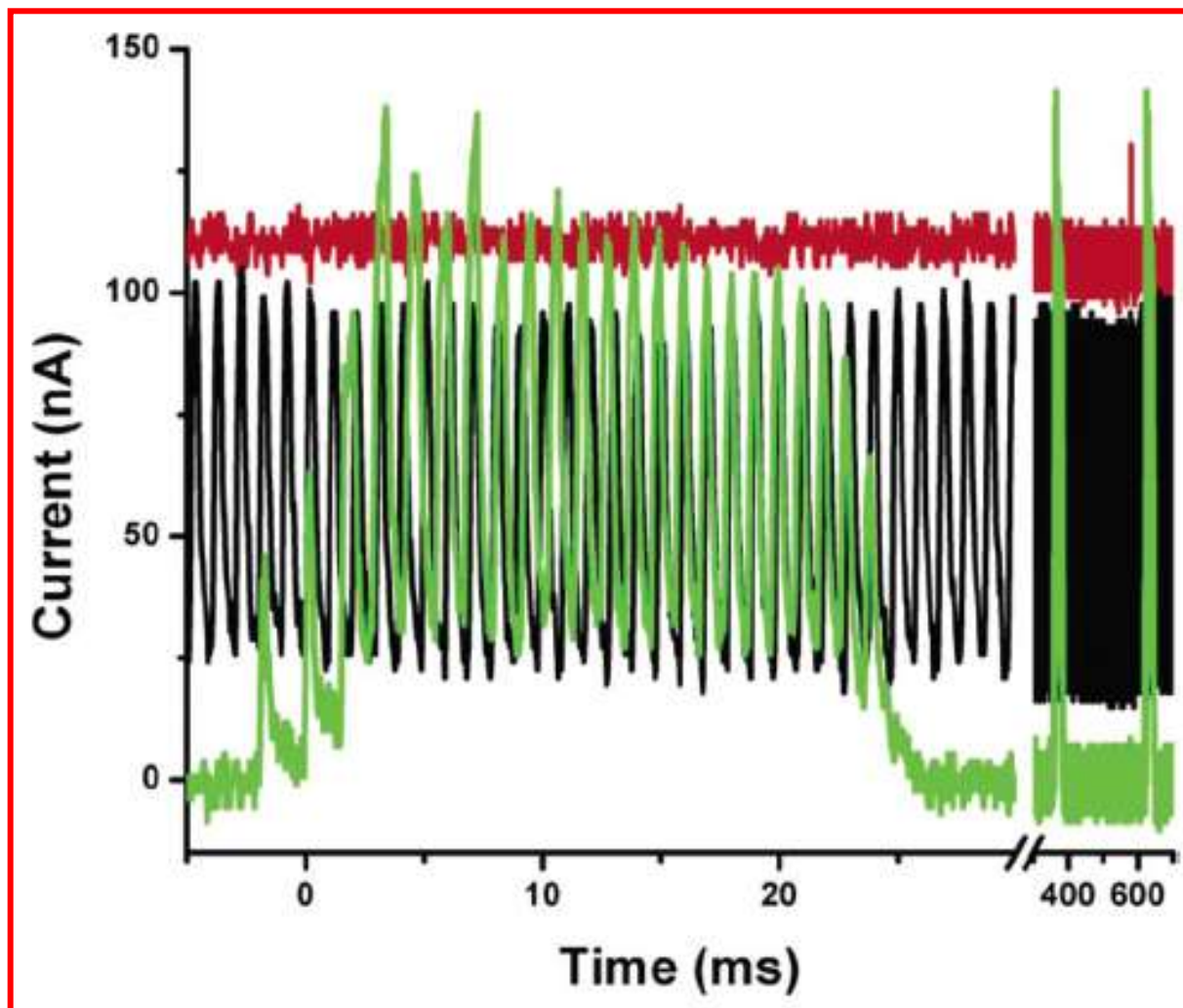


3/ tryskající kužel („cone-jet“)

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



Průběh závislosti proudu na sprejovacím režimu



1/ zeleně – explodující (2.75 kV)

2/ černě – pulzující Taylorův kužel (2.95 kV)

3/ červeně – tryskající kužel (4.05 kV)

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

Sprejovací režim 1 - explodující („burst“)

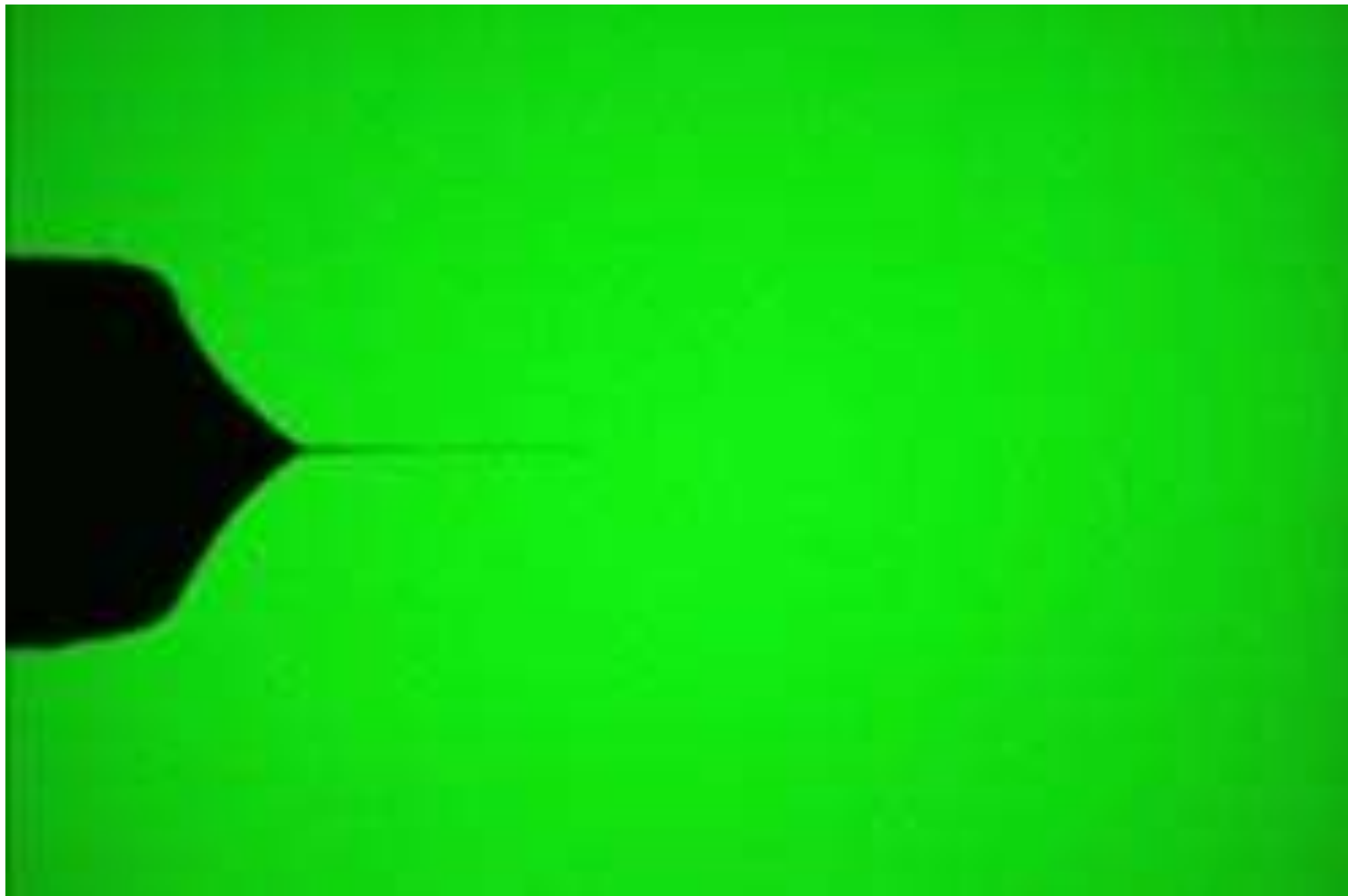


Podmínky: 50% methanol – voda, 2 $\mu\text{l}/\text{min}$, 3.4 kV

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 $\mu\text{l}/\text{min}$, 3.4 kV

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

Sprejovací režim 3 – tryskající kužel

- vyšší potenciál spreje, velikost částic $< 3 \mu\text{m}$, stabilní sprej



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

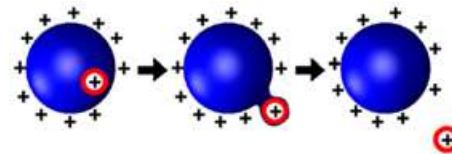
P. Nemes a kol., Anal. Chem. 79 (2007) 3105

ad 2/ Uvolnění iontů z kapiček

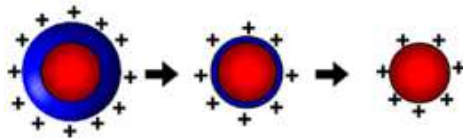
- vzniklé kapičky nesou na povrchu náboj
- odpařováním rozpouštědla se zvyšuje **hustota náboje** na povrchu
- **Rayleighův limit** - repulzní síly mezi náboji jsou stejné jako povrchové napětí kapičky, které udržuje kapku pohromadě
- po překročení Rayleighova limitu dojde ke **Coulombické explozi**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

- tři modely vzniku iontů:

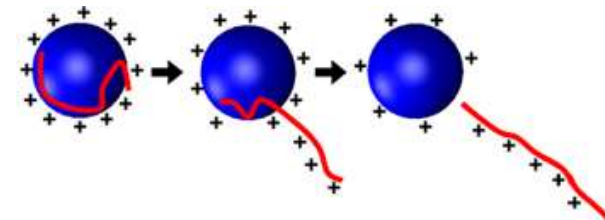
a) **vypaření iontů** (ion evaporation) - povrchové napětí vytrhne ion analytu z kapičky
v povrchu kapky se soustředí více ty ionty, které mají větší povrchovou aktivitu – snáze se z kapky vypařují.



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



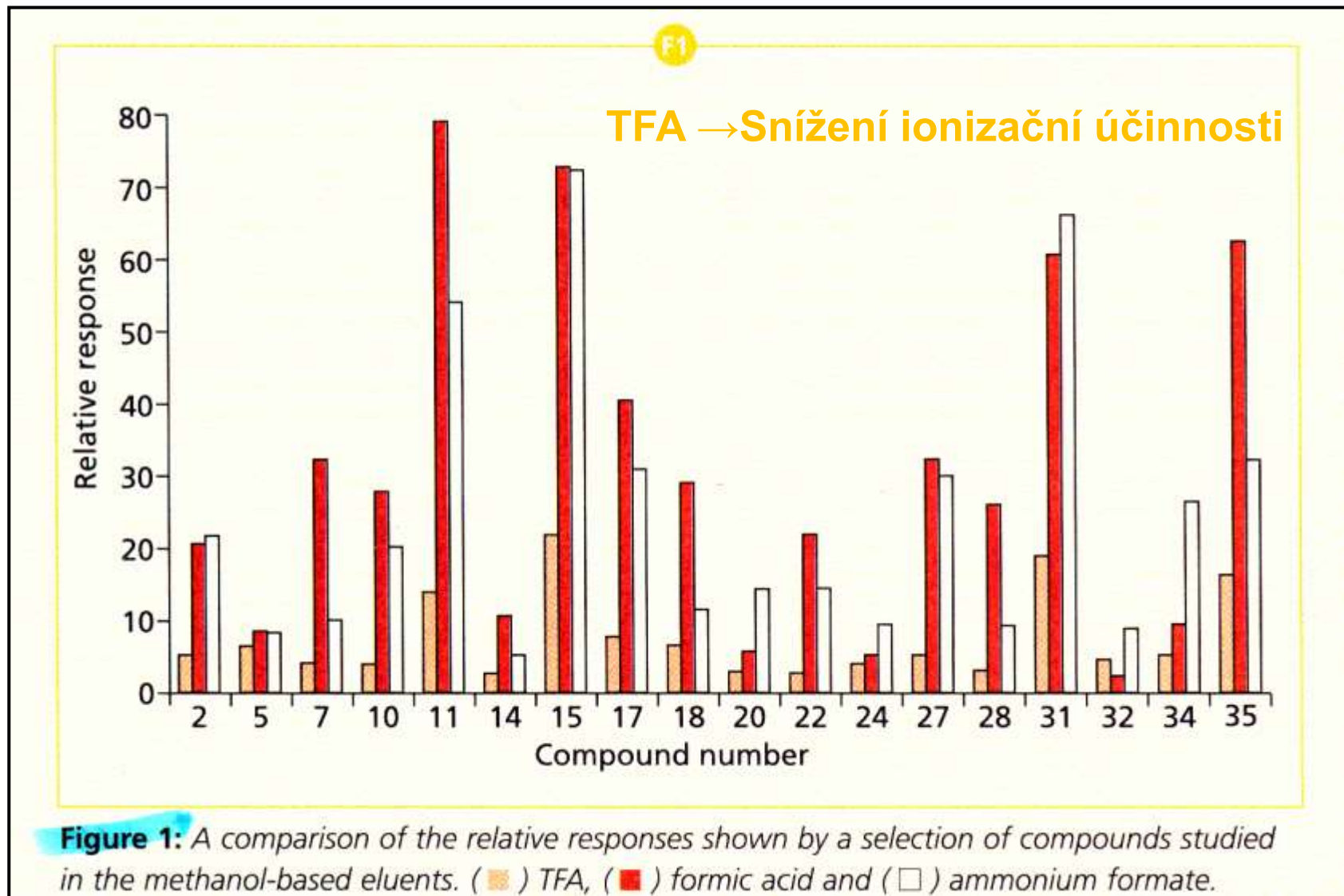
c) **uvolňováním řetězce** (chain ejection) - rozbalený hydrofobní řetězec se v kapce tvořené polárním rozpouštědlem bude vyskytovat na povrchu, zde je na něj přenášen náboj a vzniklý ion postupně kapku opouští



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 $T=250^{\circ}\text{C}$ - 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



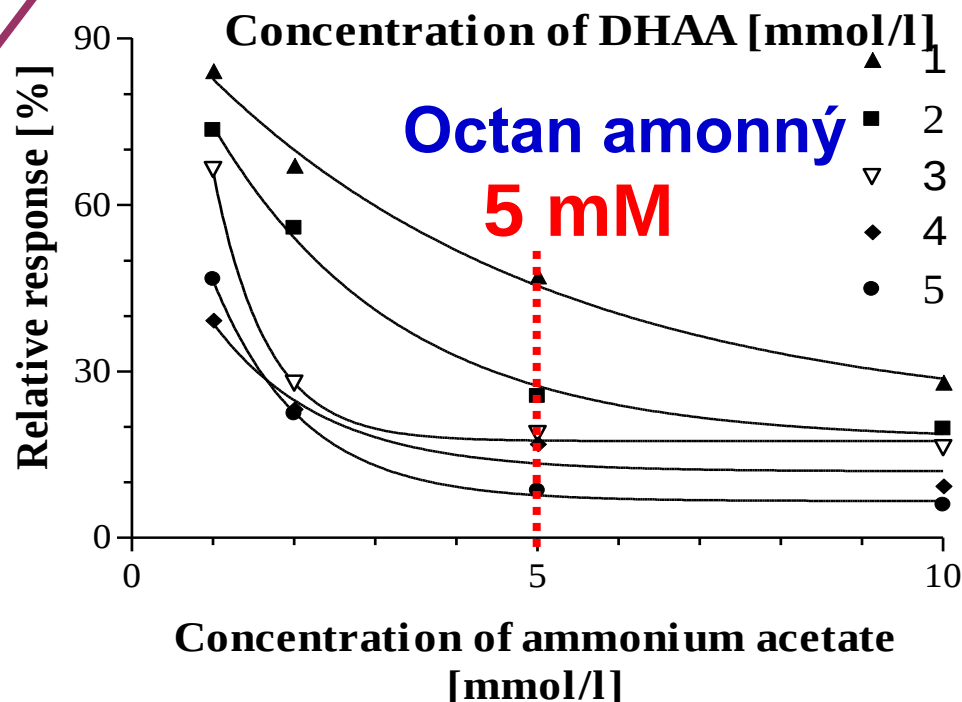
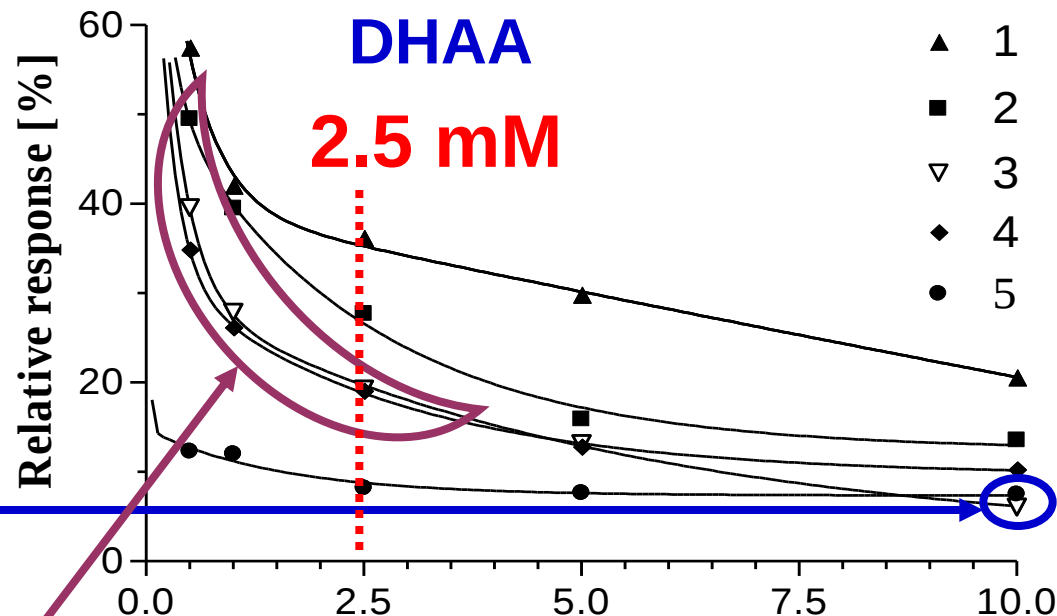
Vliv geometrie iontového zdroje na potlačení ESI odezvy

Potlačení ionizace / snížení odezvy

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



Potlačení odezvy - konkurenční ionizace

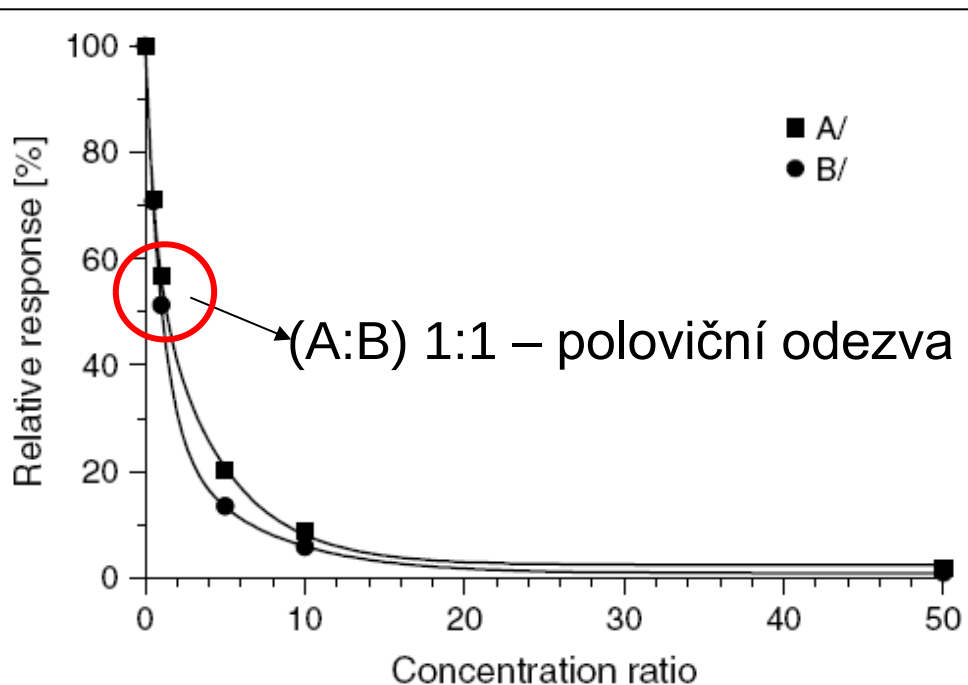


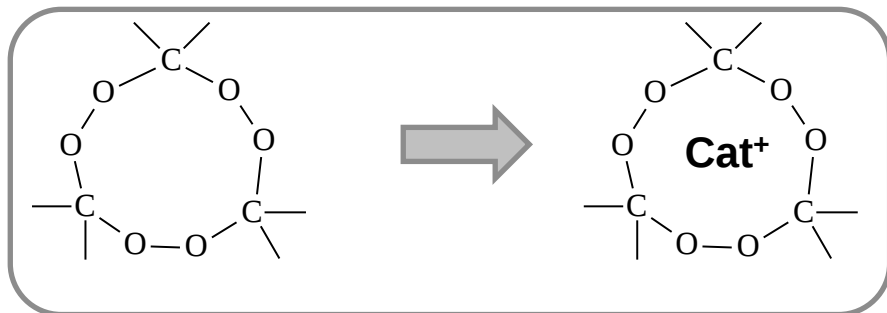
Figure 4. Competitive ionization of two monosulphonated dyes, Egacid Yellow M and Egacid Blue A2G. Concentration of the 'target' compound is 3 mg l^{-1} ; the 'interfering' compound is added to 50% aqueous acetonitrile at various concentration ratios (1:0.5, 1:1, 1:5, 1:10 and 1:50). The target compound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

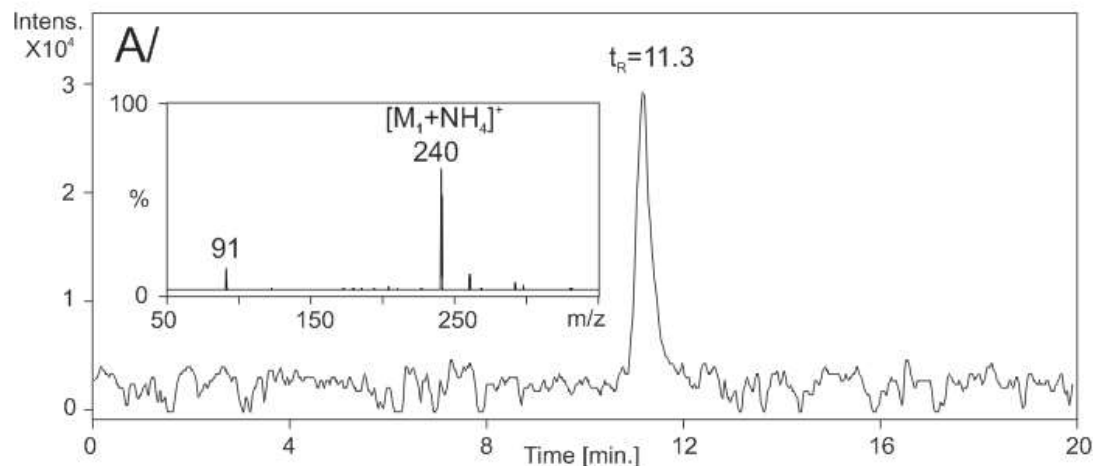


Marrakesh, 30.4.2011 – zdevastovaná kavárna Argana Cafe po výbuchu bomby obsahující TATP

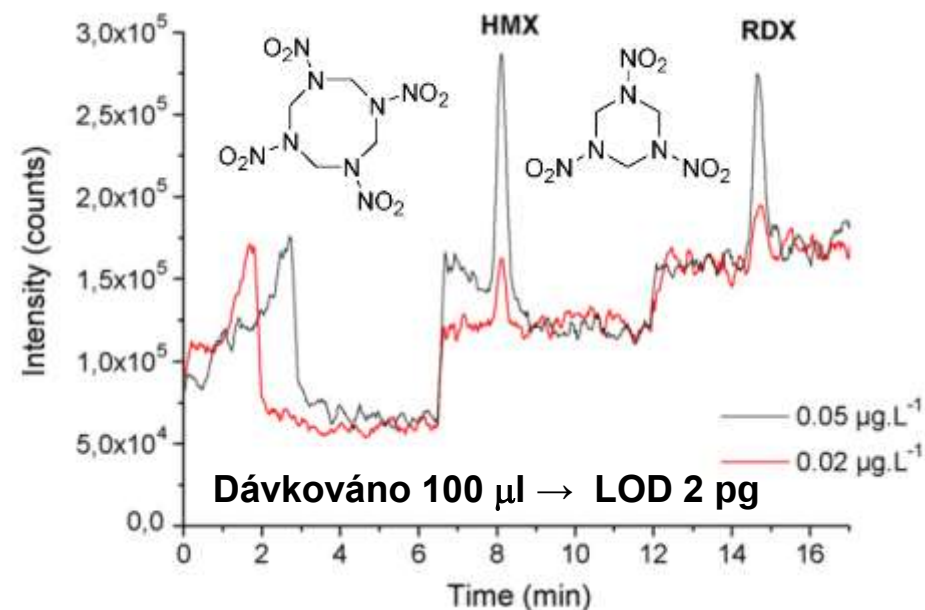
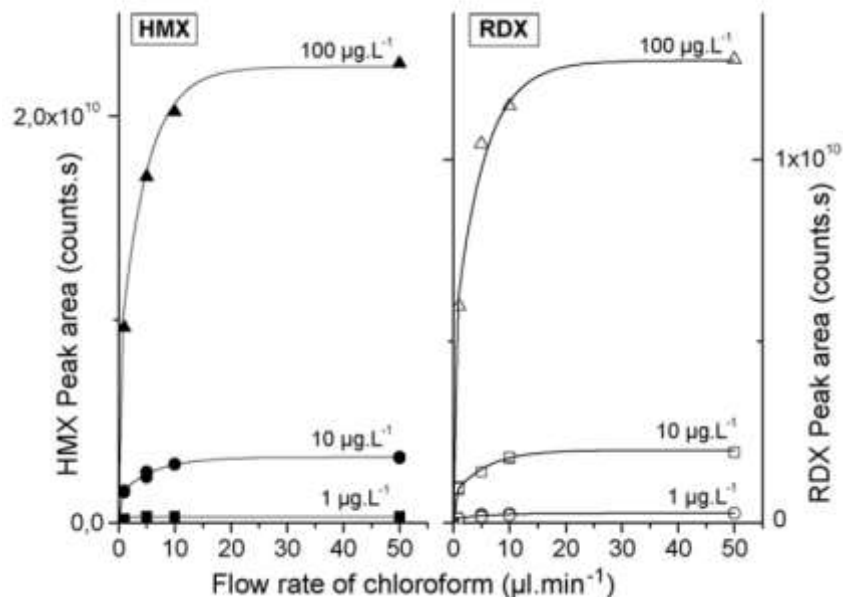
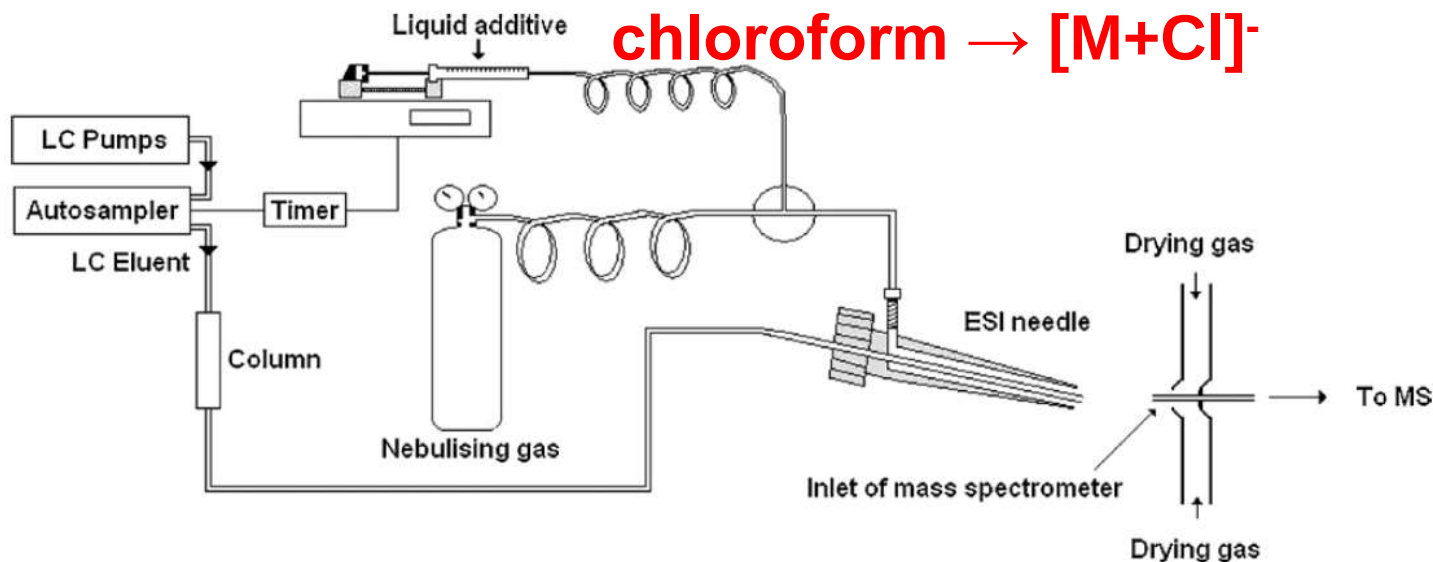
HPLC/ESI⁺-MS

Mobilní fáze: ACN/5mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$

(70:30, v/v)



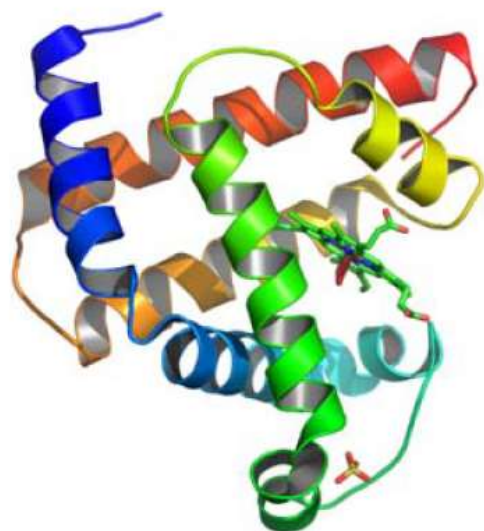
HPLC/MS - přídavek aditiva do zmlžujícího plynu



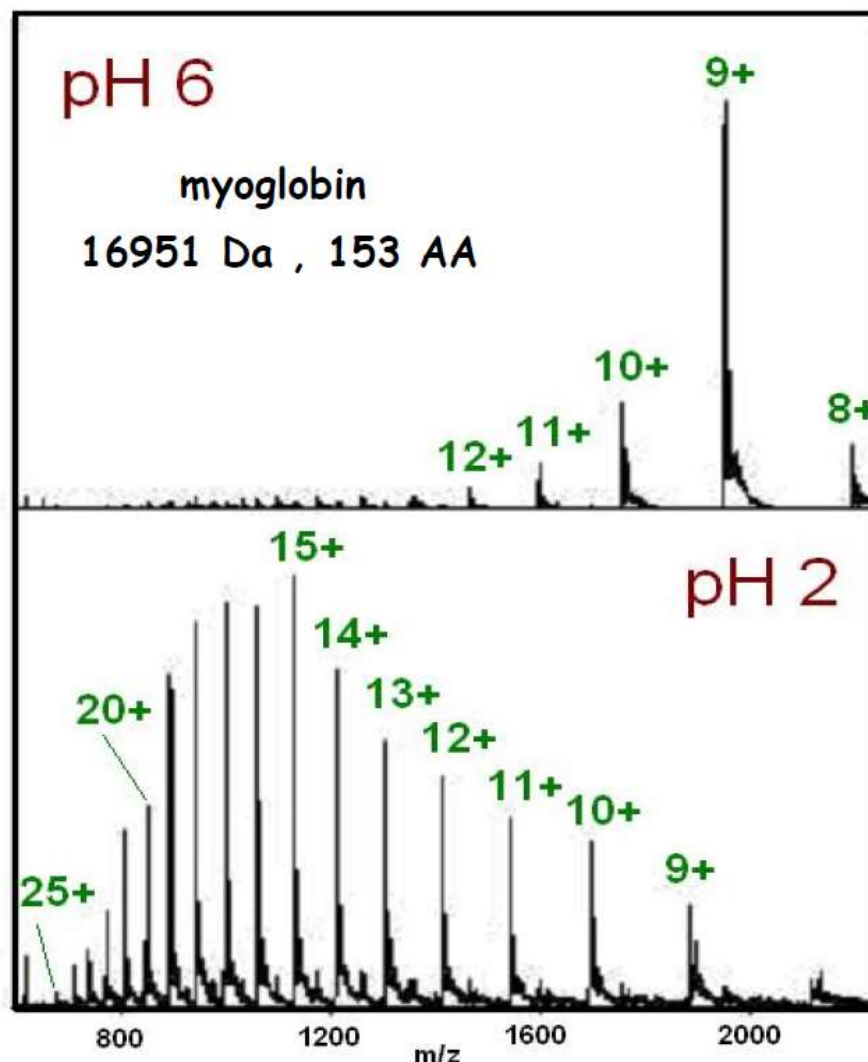
Aplikace ESI - určení M_R proteinů

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)

Nanoelektrosprej

- někdy se zkráceně nazývá nanosprej
- průtoky jednotky až stovky nl/min, sprejovací kapilára (velmi malý průměr několik μm)
- rozdíl 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 sprejovací 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

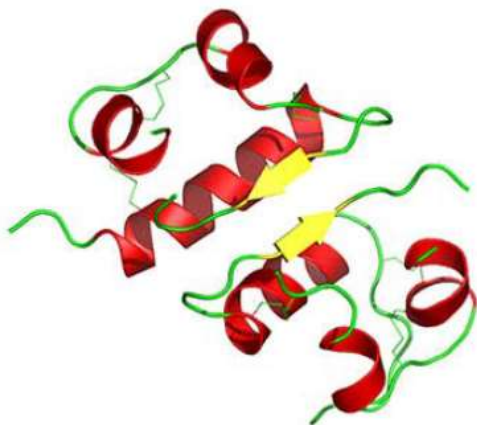


Nanoelektrosprej

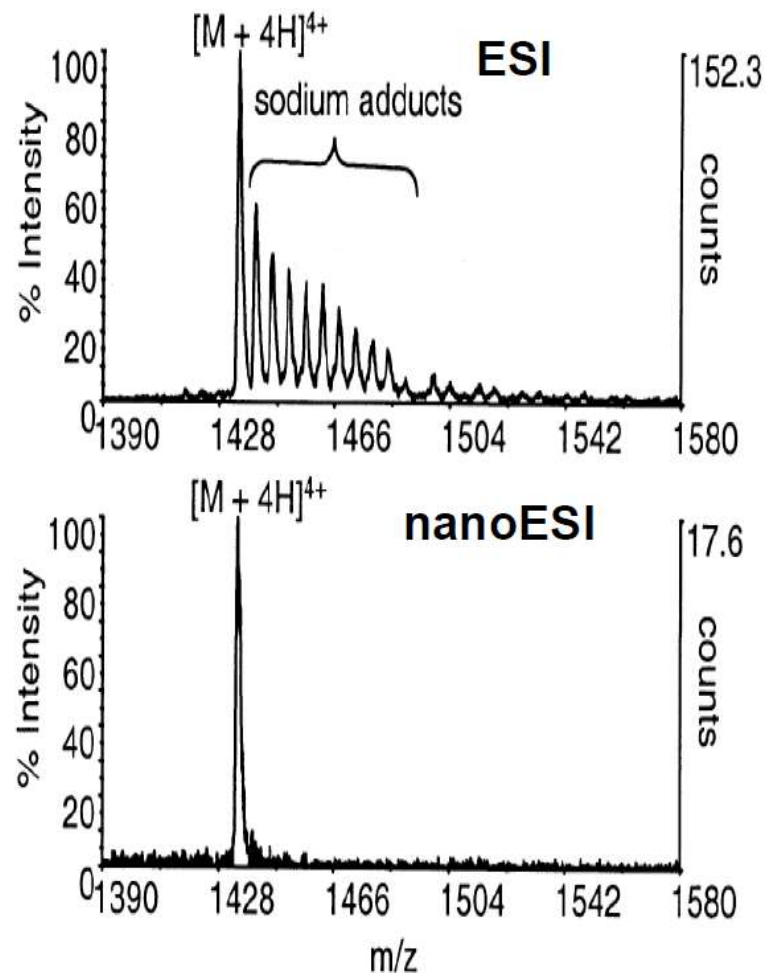
- extrémně nízká spotřeba vzorků
- vysoká koncentrační citlivost (lze analyzovat pouhé stovky molekul - attomoly až zeptomoly)
- vyšší tolerance vůči obsahu solí v roztoku
 - snižuje nároky na úpravu vzorků před analýzou
 - **menší průměr primárně vzniklých nabitých kapiček** ve srovnání s konvenčním 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.

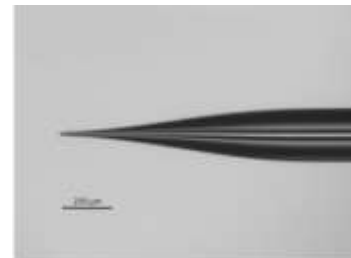


Schmidt et al., *J Am Soc Mass Spectrom.* 2003 14(5):492.

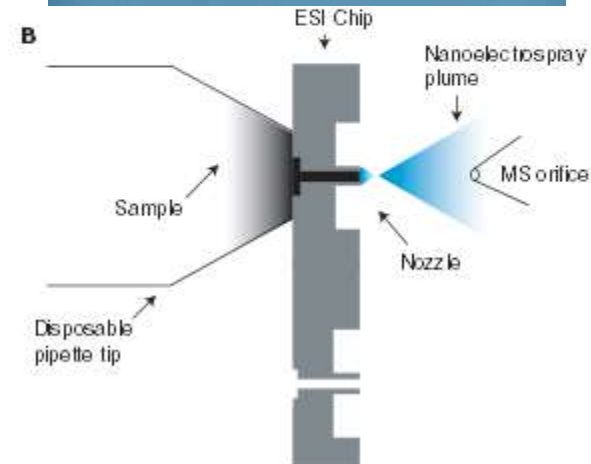
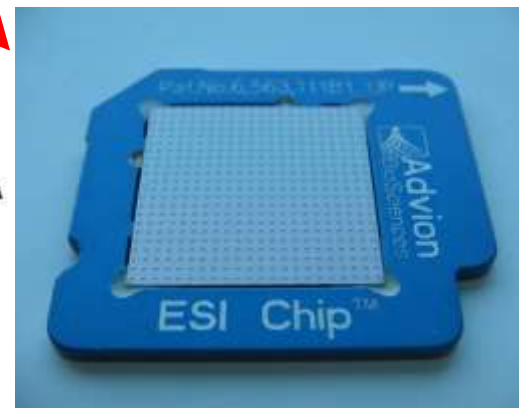
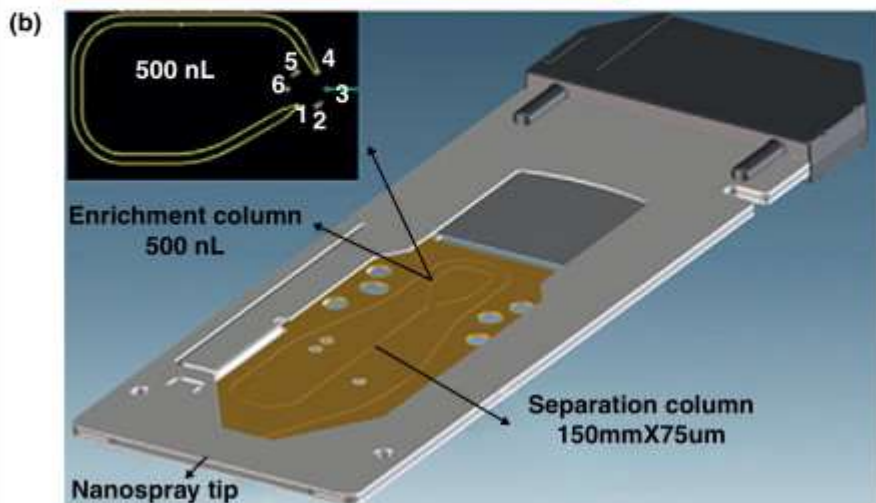
- snímek převzat z přednášky doc. J. Cvačky (ÚOCHB, Praha)

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

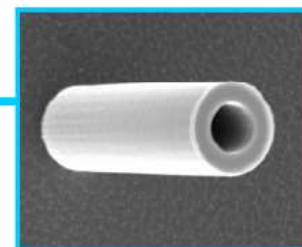
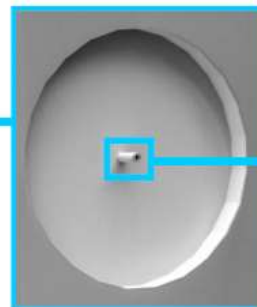
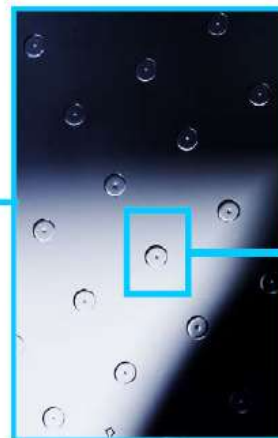
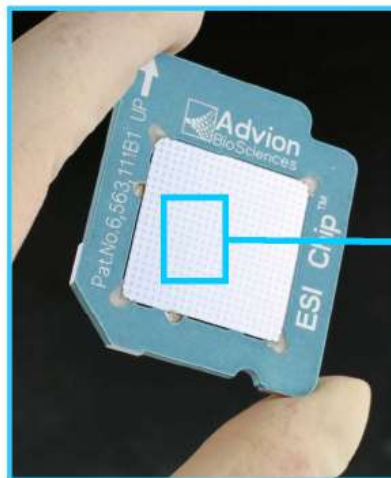
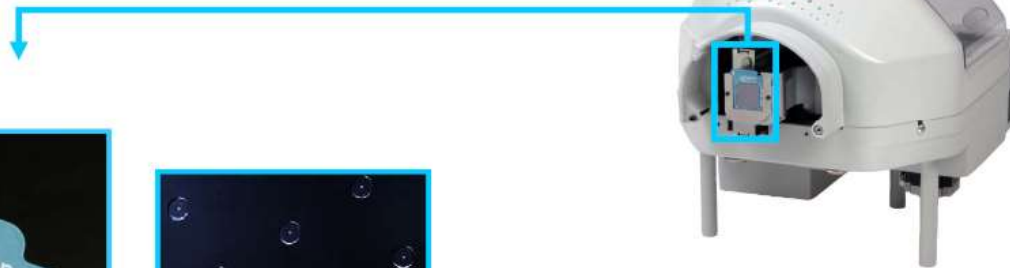
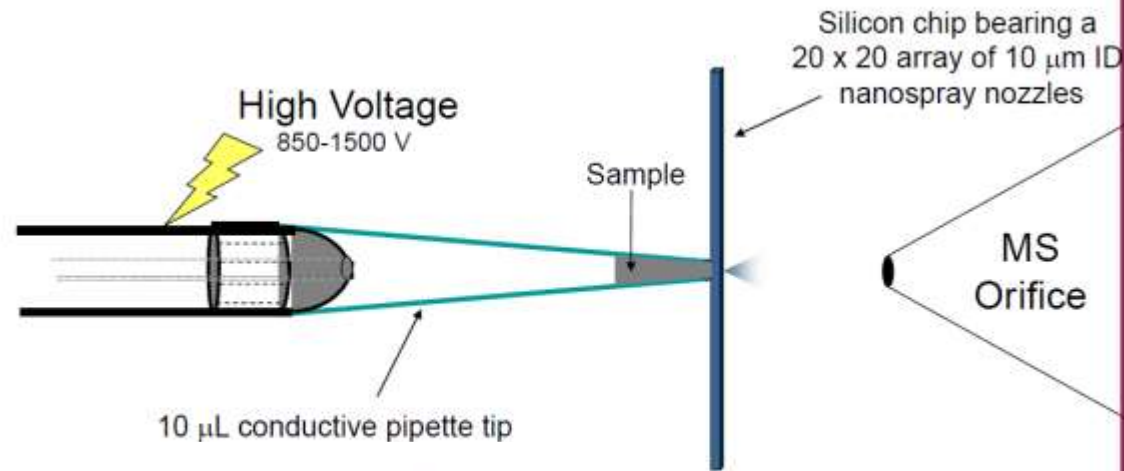


Triversa NanoMate® robotic system



Advion

NanoESI flow rates approx 100 to 500 nL/min



detail nanoESI trysky

Nanomate robotic system



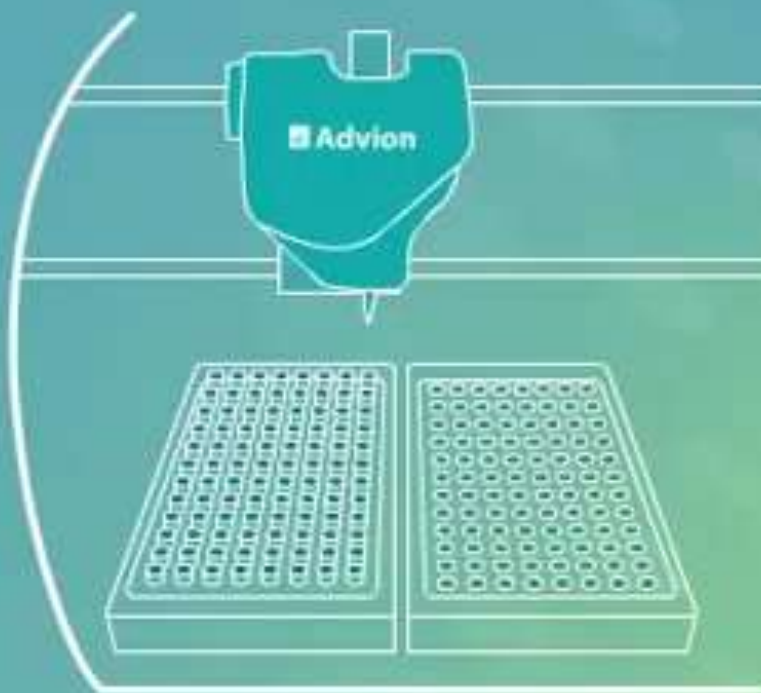
Mode 1:
Chip-based Infusion

Advion
www.advion.com

Infusion

Step 1:

Robot picks up pipette tip from rack



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
 - $[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}-\text{H}]^-$, **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

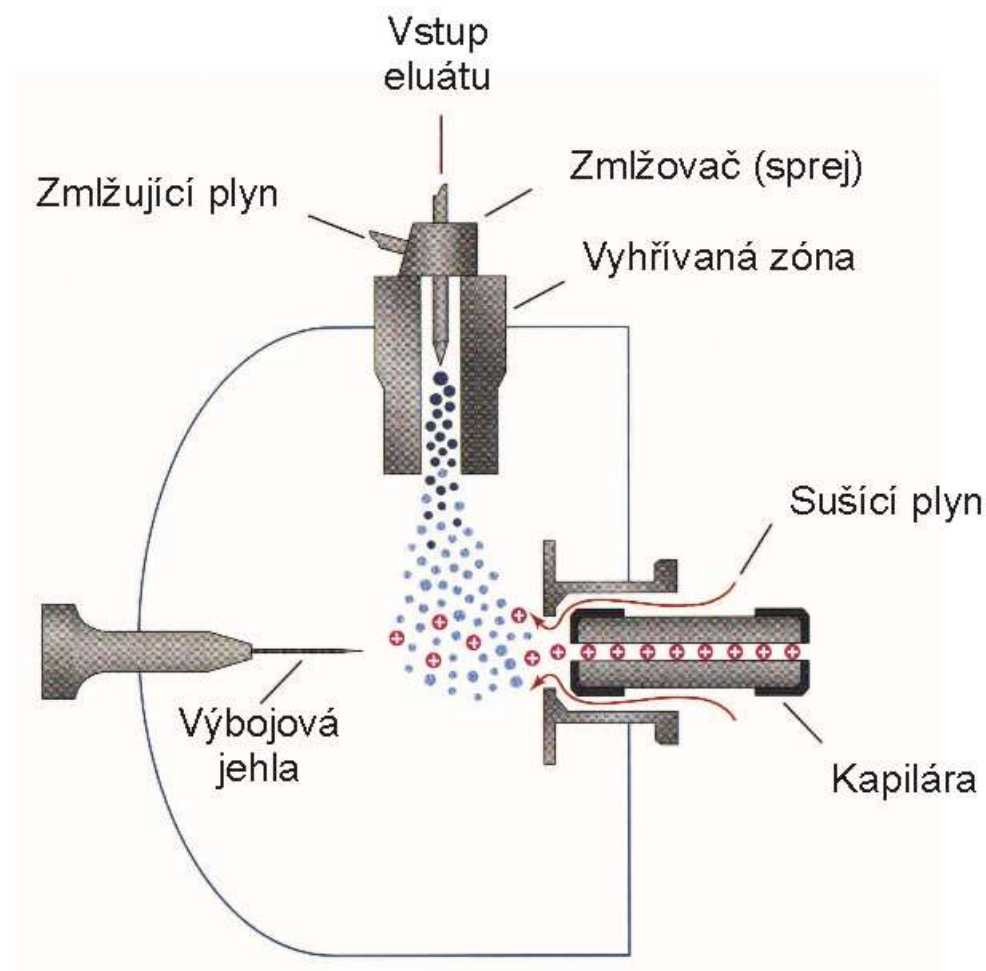
- eluát je na konci kapiláry zmlžen do vyhřívané zóny a rychle odpařen (ionizace v plynné fázi)

- 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

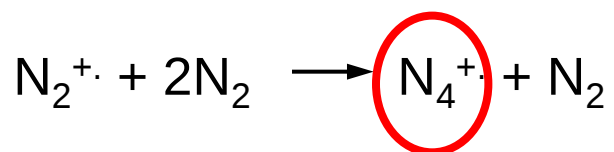
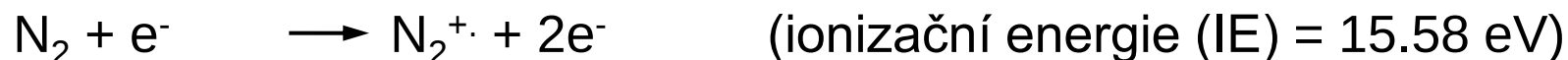
- 1/ Tvorba primární iontů ze zmlžujícího plynu - elektronová ionizace
- 2/ Tvorba reakčních iontů z mobilní fáze a aditiv
- 3/ Hlavní mechanismy ionizace analytu

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



Good A. a kol., J. Chem. Phys. 52 (1970) 212

Carroll D.I. a kol., Appl. Spectr. Rev., 17 (1981) 337

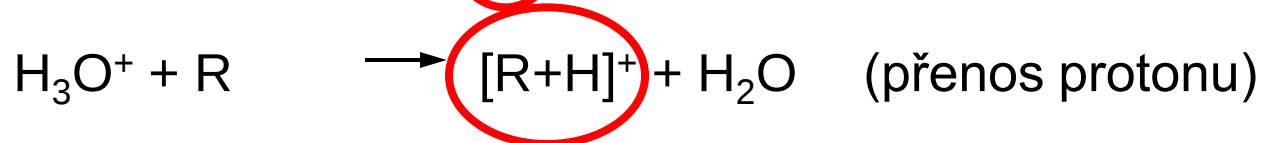
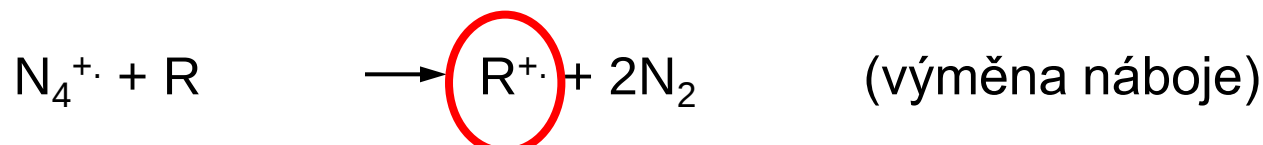
Kostiainen R. a kol., J. Chromatogr. A 1216 (2009) 685

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



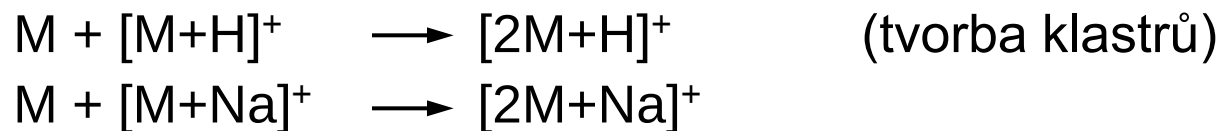
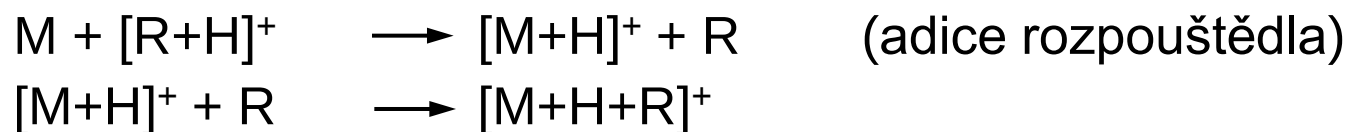
R ... rozpouštědlo (=reakční plyn)
např. metanol, acetonitril

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

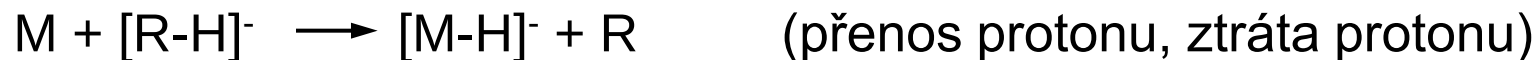


M ... molekula analytu

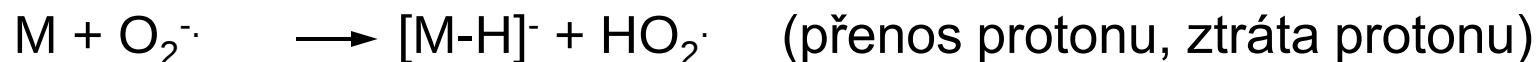
R ... rozpouštědlo (=reakční plyn)

X ... halogen, anorganický aniont

Základní mechanismy tvorby záporných iontů



- důležité reakční ionty vznikají z kyslíku z iontového zdroje



M ... molekula analytu

R ... rozpouštědlo (=reakční plyn)

X ... halogen, anorganický aniont

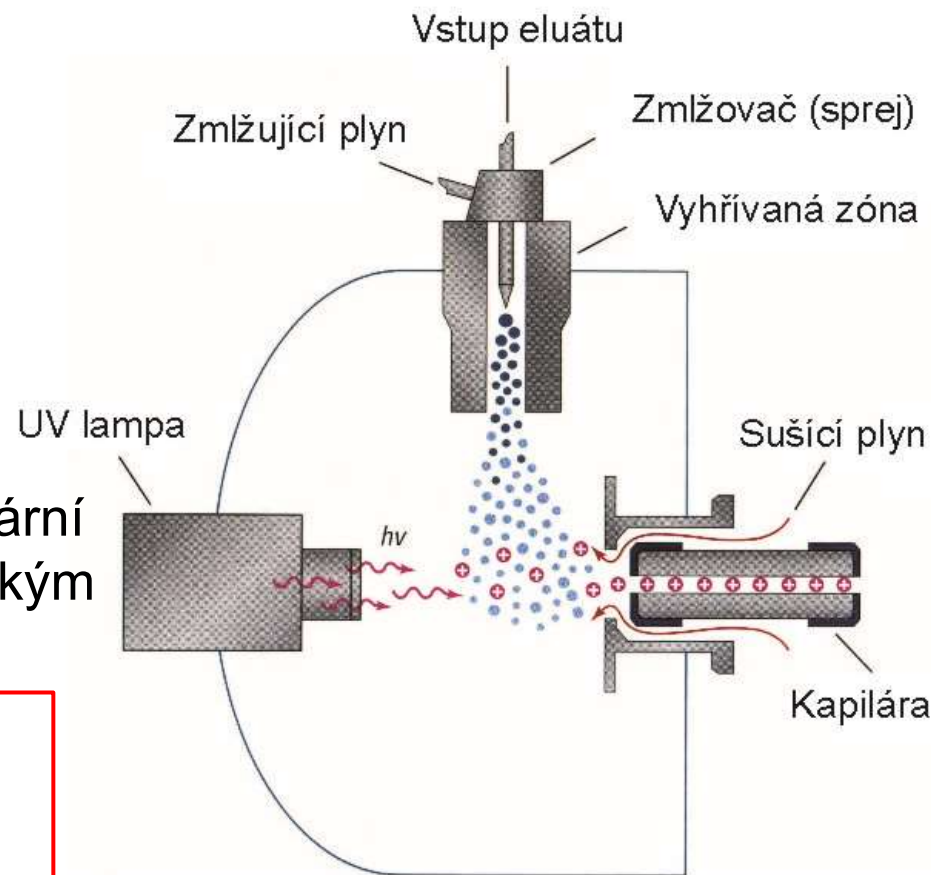
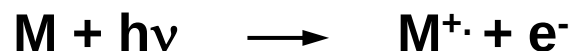
APPI

(Atmospheric Pressure Photoionization)

Fotoionizace za atmosférického tlaku

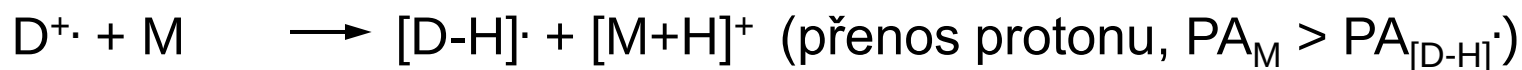
- stejné uspořádání zdroje jako pro APCI, jen se pro ionizaci molekul místo jehly s vloženým napětím používá zdroj **UV záření**
- průtoky HPLC eluentu ca. 0.1 - 1.5 ml/min, přímá infúze desítky až stovky μl
 - v porovnání s APCI pracuje lépe při nižších průtocích
- možnost práce v NP-HPLC
- pro látky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

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



Použití dopantu v APPI

- přímá ionizace molekul je statisticky málo pravděpodobná (i pokud je $IE < h\nu$), 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



- 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

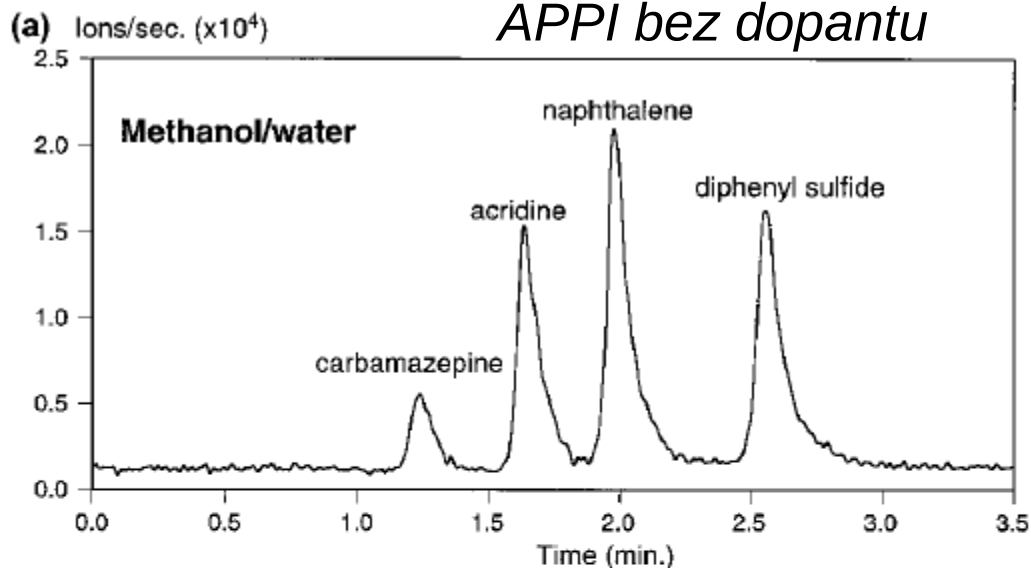
Volba výbojky a dopantu v APPI

- 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

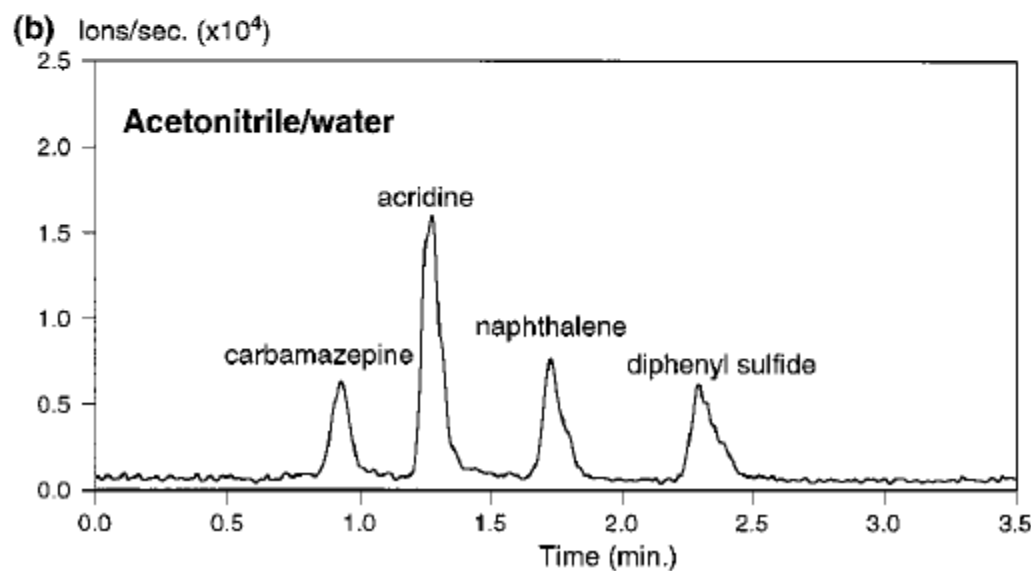
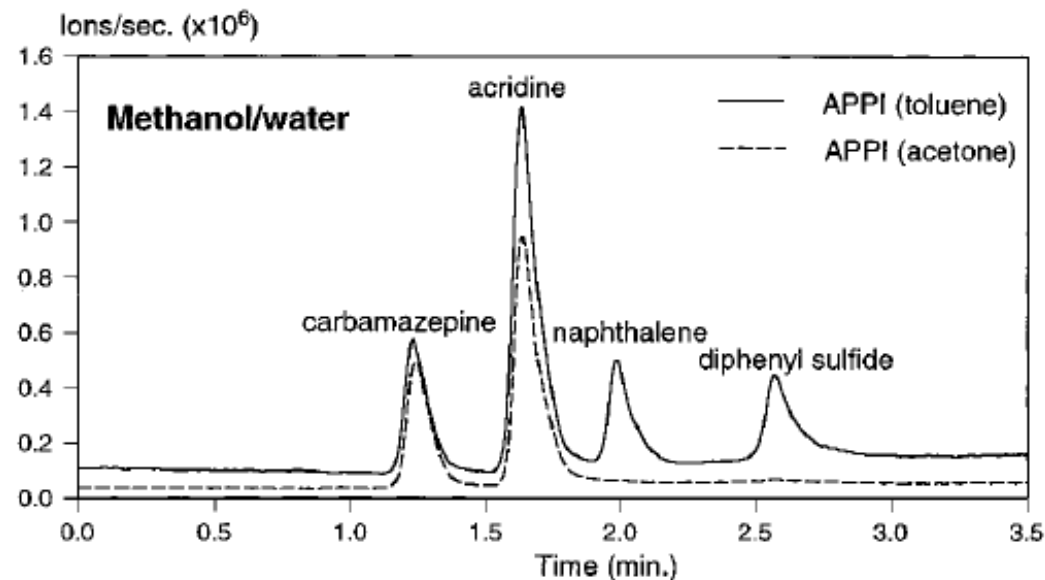
Compound	IE (eV)	PA (kJ mol^{-1})
Nitrogen	15.58	493.8 ^a
Water	12.62	691.0 ^b
Acetonitrile	12.20	779.2 ^c
Oxygen	12.07	421.0 ^b
Ar: 11.7		
Chloroform	11.37 ^c	n.a.
Methanol	10.84	754.3 ^c
Acetic acid	10.65 ^b	783.7 ^b
Kr: 10.6		
Isopropanol	10.17	793.0 ^a
Hexane	10.13	n.a.
Ammonia	10.07 ^b	853.6 ^b
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

Vliv dopantu v APPI

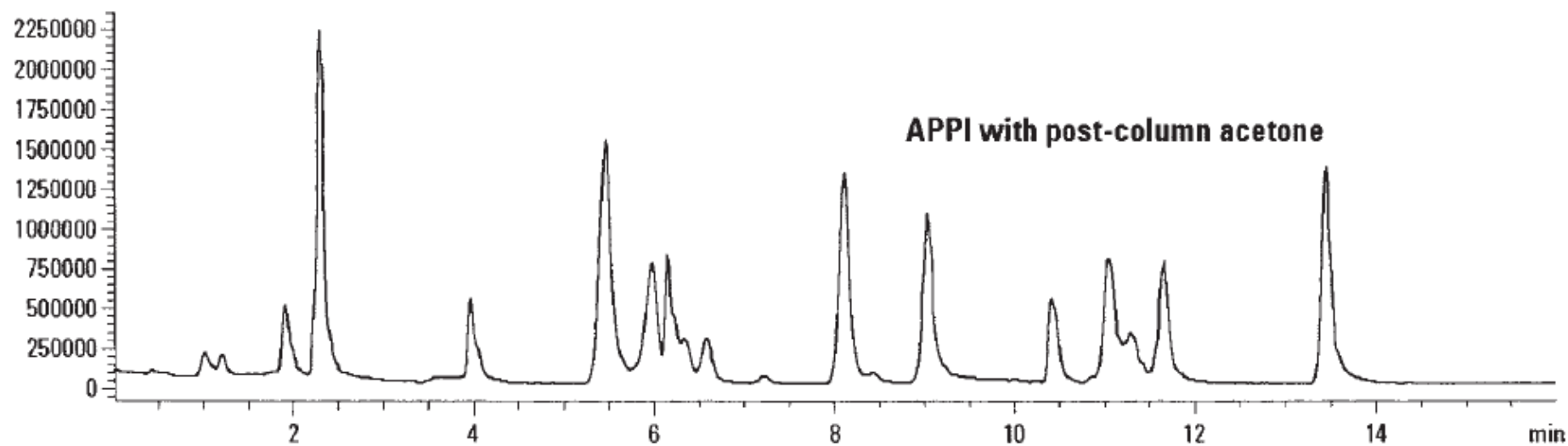
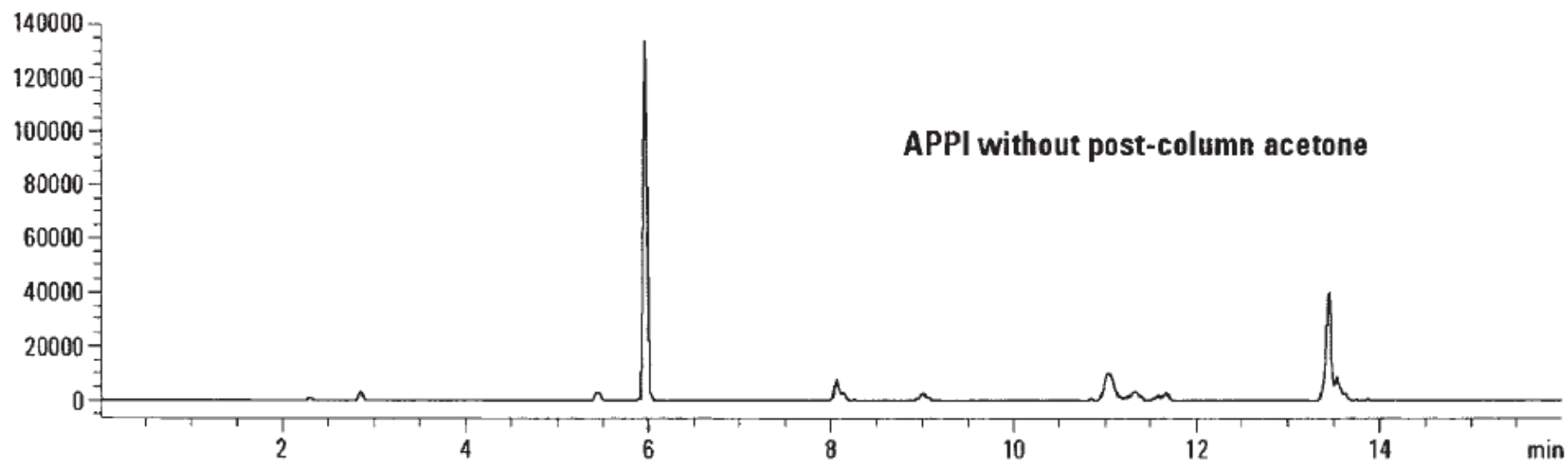
APPI bez dopantu



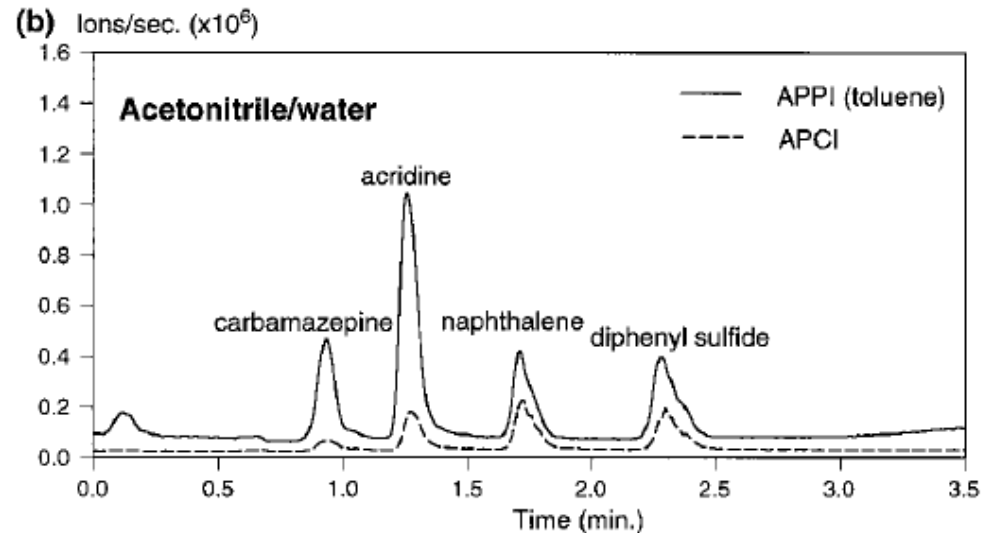
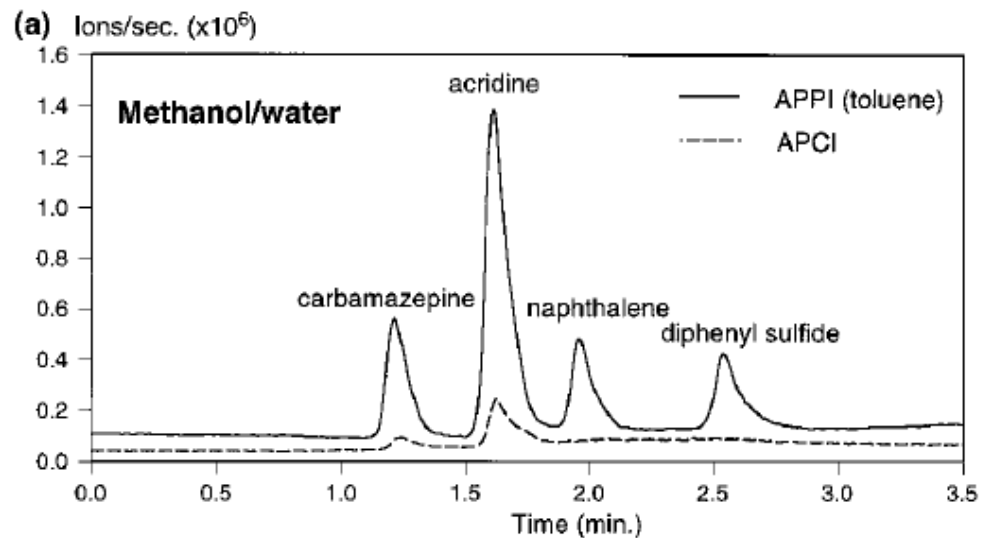
APPI s dopantem



Vliv dopantu v APPI



Porovnání APCI a APPI



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

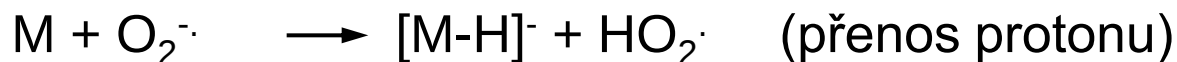
Pro nepolární sloučeniny je APPI výbornou volbou, ale je nutná optimalizace typu dopantu a jeho koncentrace (zavádíme t- spojkou) před vstupem do ionizace

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



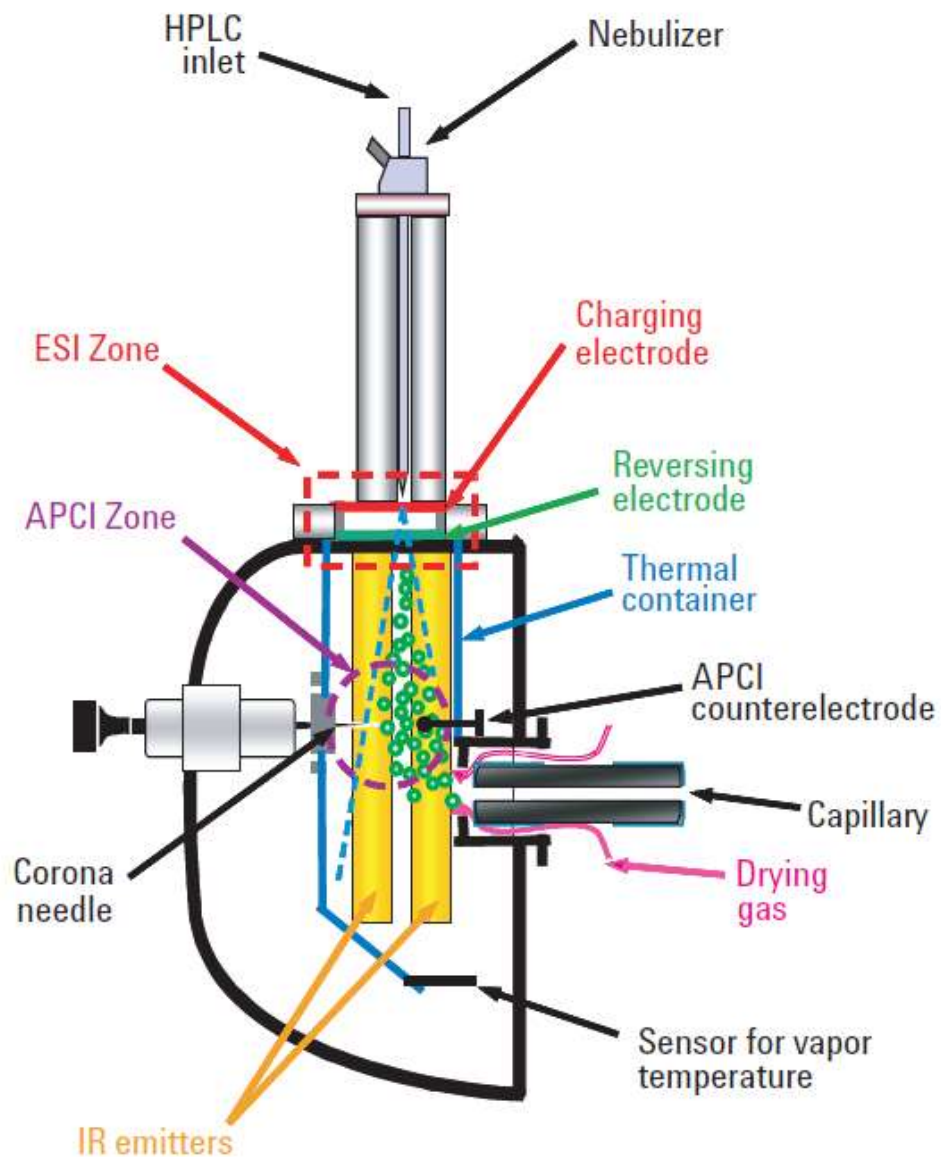
- ionizace se může účastnit i kyslík z iontového zdroje



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

Kombinované (duální) iontové zdroje

ESI / APCI



APCI / APPI



Kombinované (duální) iontové zdroje



Agilent Technologies

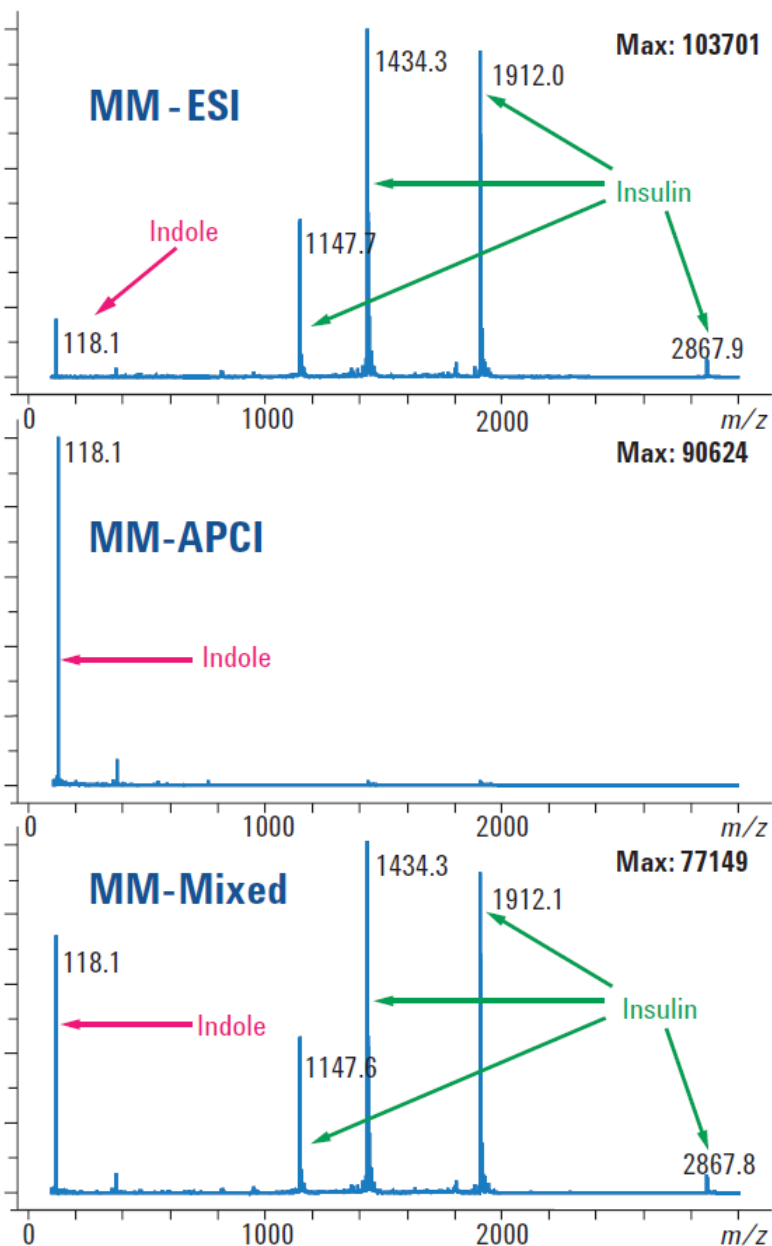
Agilent Multimode Source



Kombinované (duální) iontové zdroje



Agilent Technologies



Proof of concept of simultaneous (mixed mode) ESI and APCI using a mixture of indole (50 pmol/ μ L) and bovine insulin (9 pmol/ μ L). (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

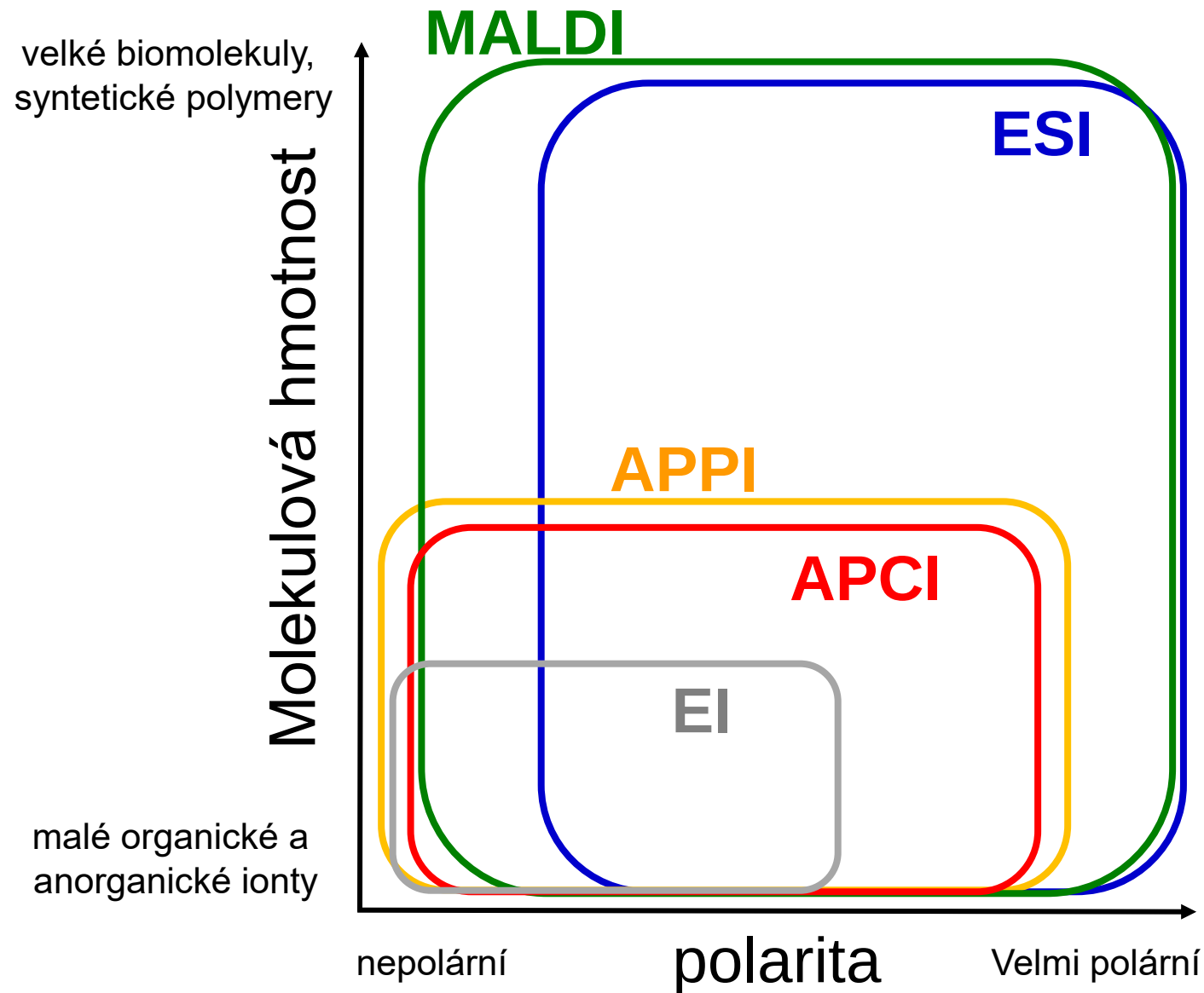
- **ESI** – středně polární až iontové sloučeniny, mnohonásobně nabité ionty pro biopolymery, nejšetrnější ionizační technika
 - méně vhodné pro bezvodé mobilní fáze a systémy s normálními fázemi
 - optimální průtok jednotky až desítky $\mu\text{l/min}$, lze do 1 ml/min
- **APCI** – málo až středně polární sloučeniny ca. do M_R 1000 až 2000, větší tolerance k obsahu solí v eluentu, méně aduktových iontů
 - optimální průtok stovky $\mu\text{l/min}$, použitelný rozsah desítky $\mu\text{l/min}$ 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 $\mu\text{l/min}$, 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:

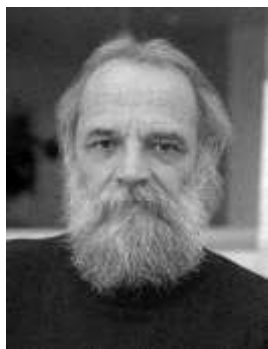
ESI (nejšetrnější) < MALDI ~ APPI < APCI < CI < EI (nejtvrdší)

Podle čeho volit způsob ionizace?



MALDI

(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)



Michael Karas



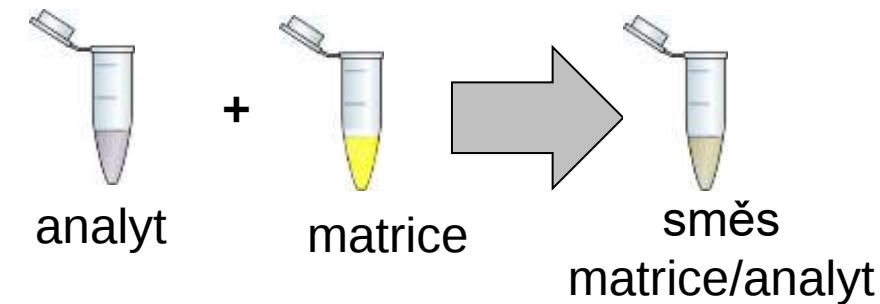
Franz Hillenkamp



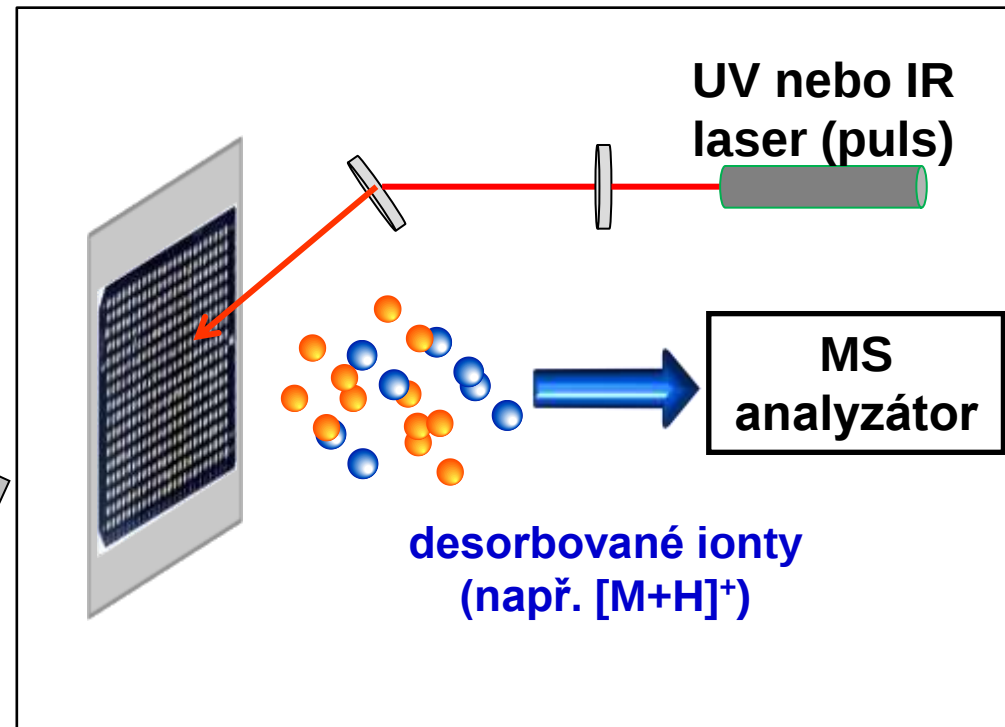
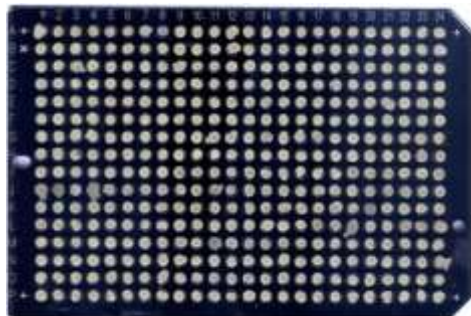
Koichi Tanaka (MALDI)
(2002, Nobelova cena za chemii)

Ionizace laserem za účasti matrice

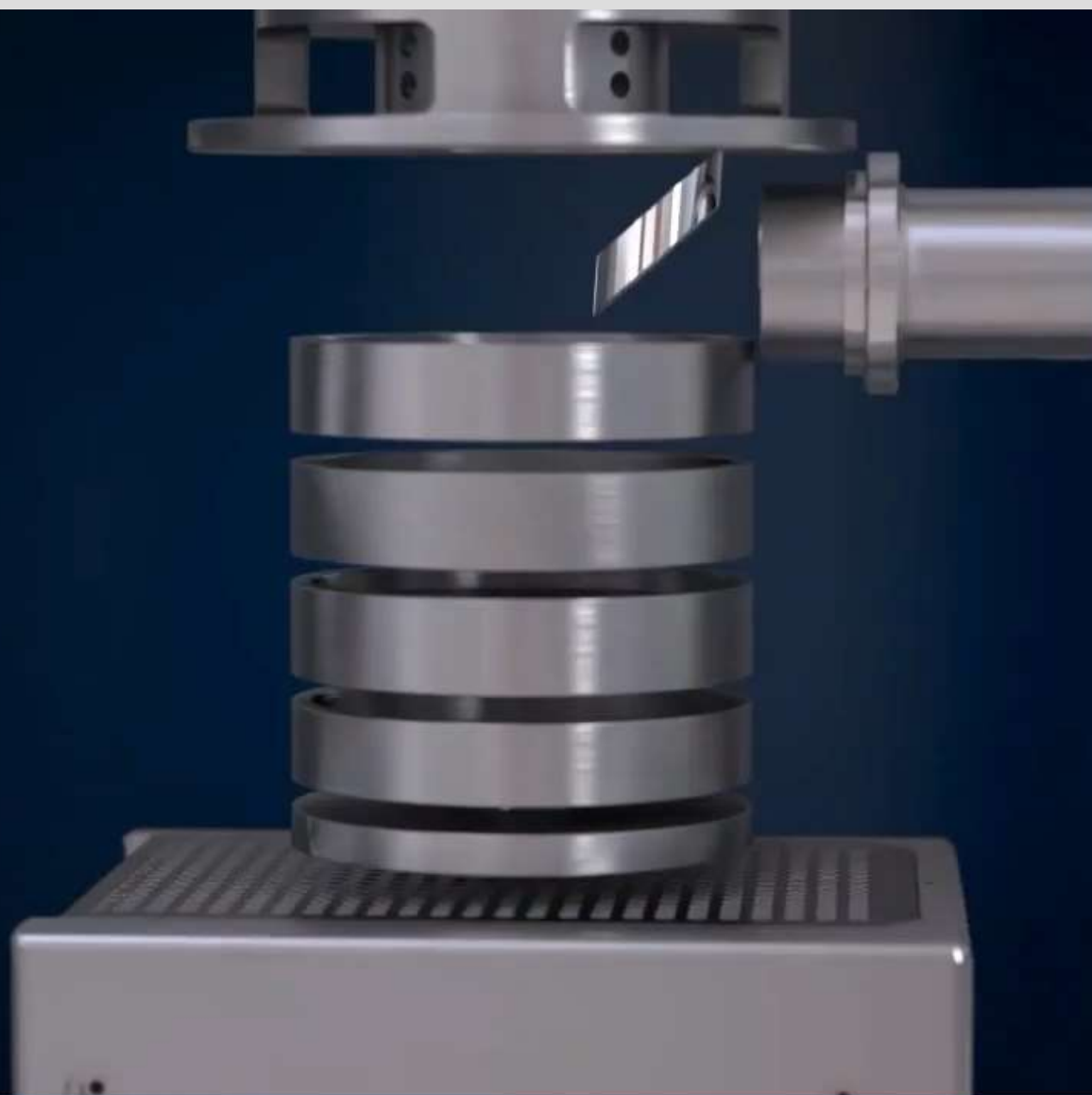
- vzorek je společně s matricí nanesen na MALDI terčik (různé postupy)
- energie krátkého laserového pulsu je absorbována matricí
- následně dojde k lokální desorpci matrice a analytu (v desorbovaném „oblaku“ vznikají klastry matrice a analytu)
- excitované molekuly matrice jsou stabilizovány přenosem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



**MALDI
terčik**



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, polymery, ale i menší molekuly, např. lipidy
- 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 spojitě stopy na terčík nebo sběr frakcí
- možnost archivace vzorku a jeho opětovné přeměření
- obtížná kvantitativní analýza
- ionty matrice ve spektrech

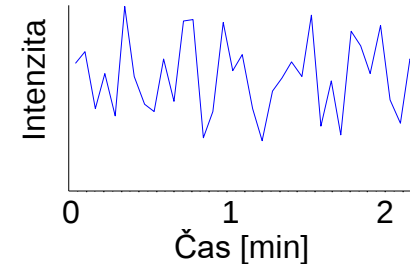
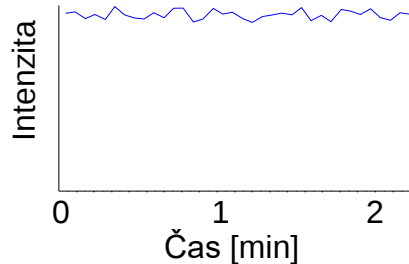
Ionizace laserem za účasti matrice

- **pulzní** ionizační technika - nejčastěji ve spojení s TOF analyzátozem, 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

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)

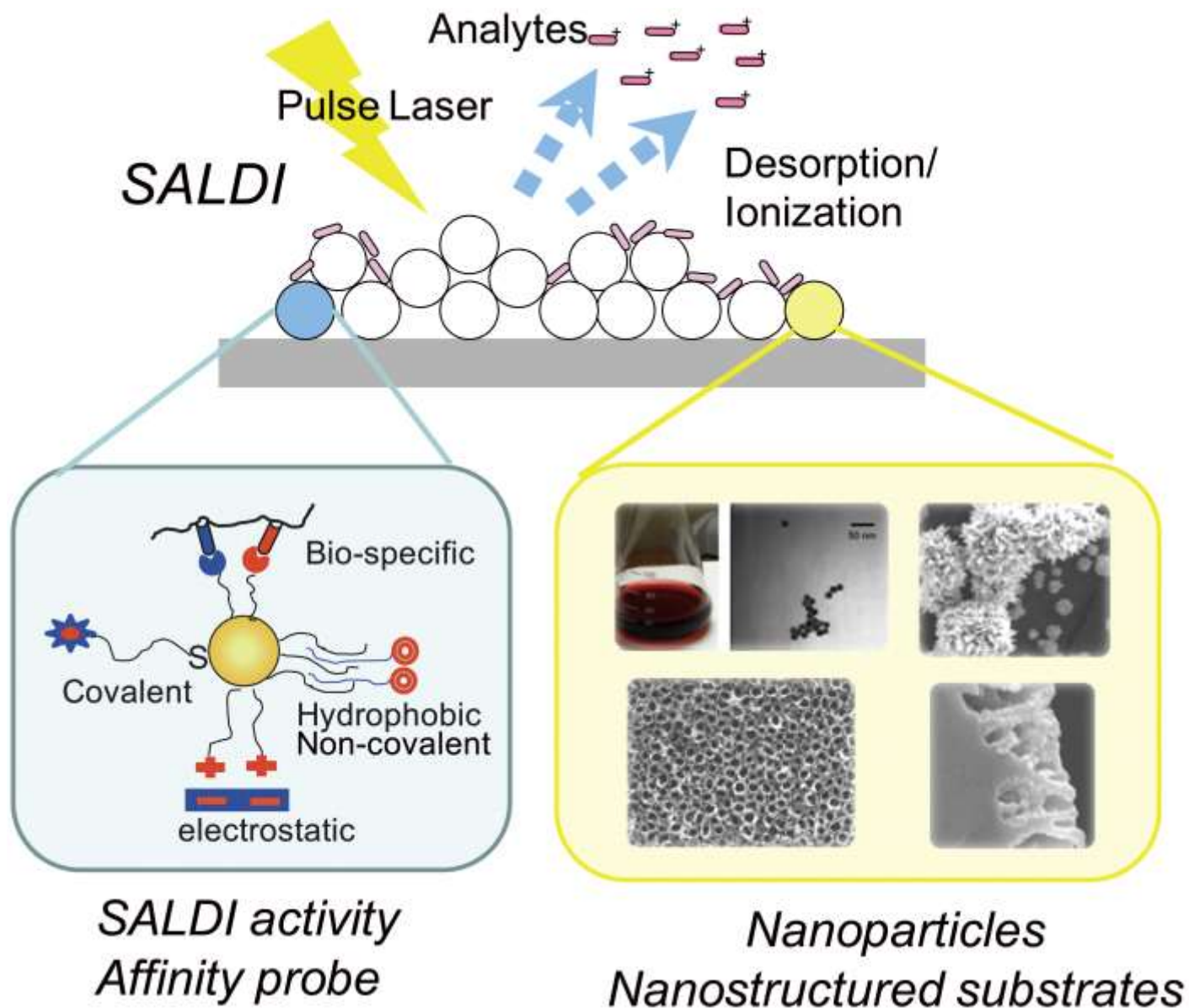


- matrice pro **IČ lasery** – cokoliv co absorbuje IČ záření (voda ve vzorku)
- LDI** (Laser desorption/ionization) – vlastní analyt zároveň plní i funkci matrice, protože intenzivně absorbuje záření při vlnové délce laseru (např. polyaromatické sloučeniny), pak tedy není nutné matrici přidávat vůbec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

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

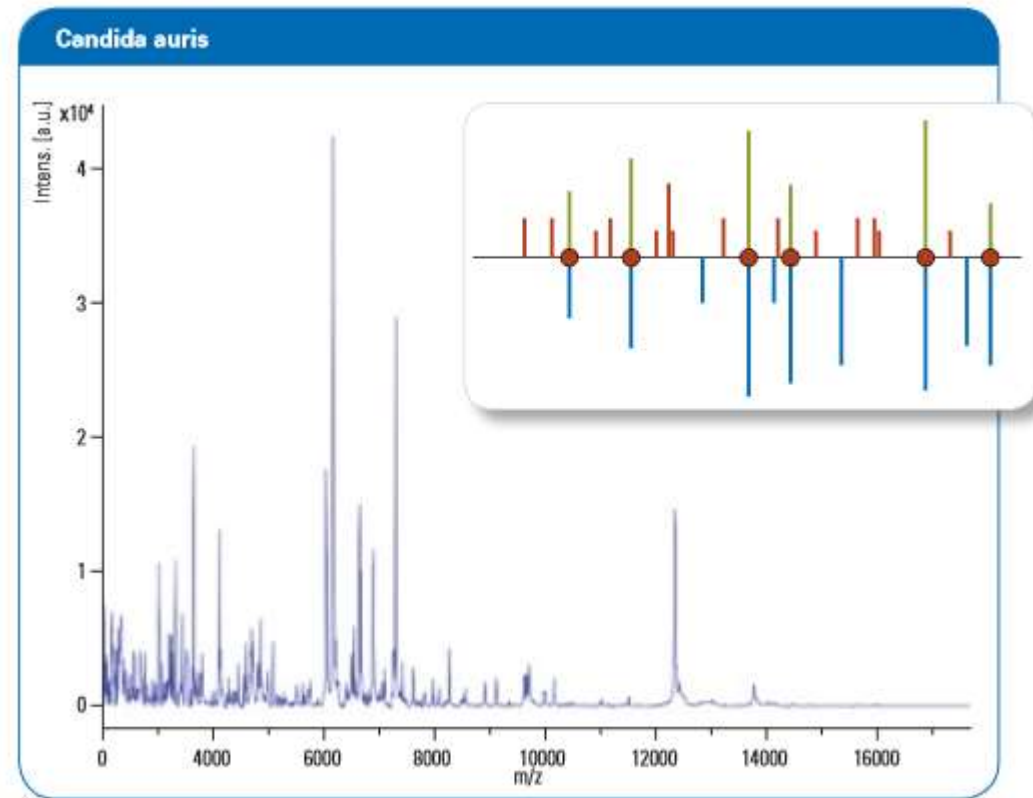
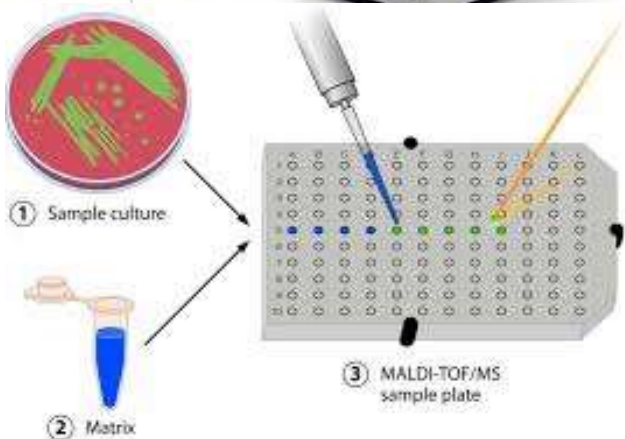
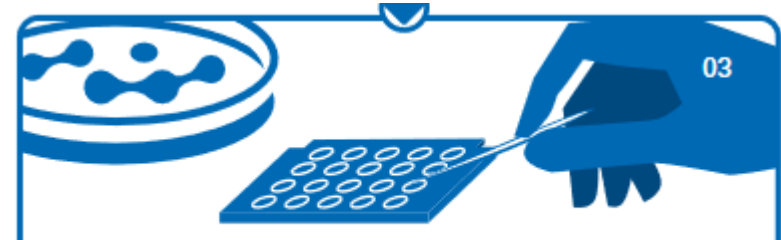
SALDI



MALDI uplatnení v mikrobiologii

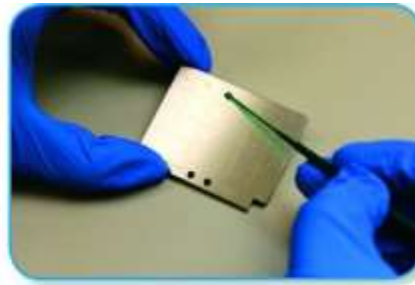
„MALDI Biotyper“

identifikace mikroorganismů na úrovni rodu, druhu a často i kmenu

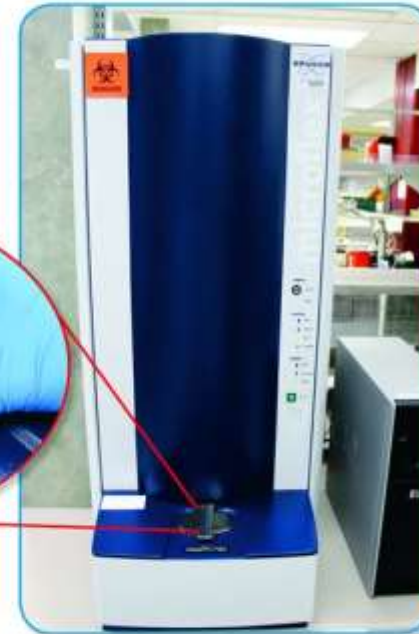
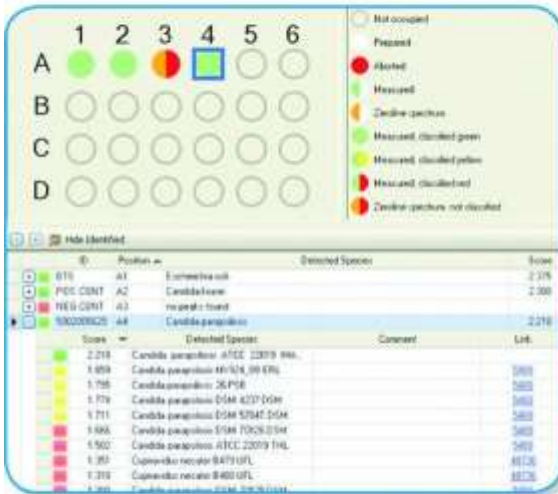


Adaptováno z materiálů firmy Bruker

„MALDI Biotyper“



Add Formic Acid
and Matrix and Dry



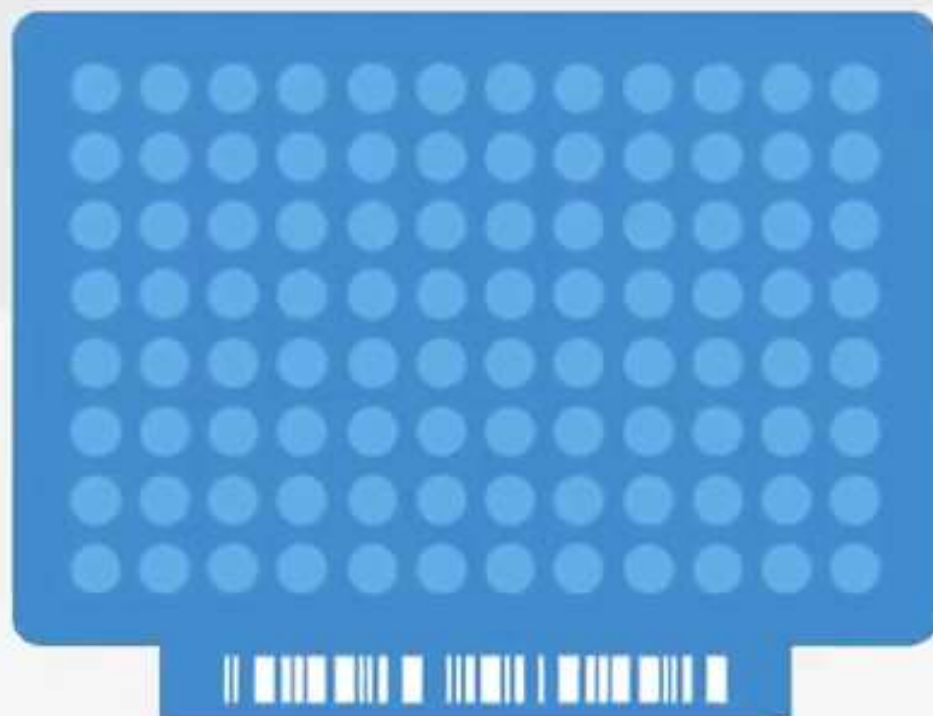
Mayo Clinic
Laboratory Services Report
MICROBIOLOGY

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

CANDIDA PARASILOSIS Many
identified by mass spectrometry

Mayo Clinic Dept. of Laboratory Medicine and Pathology, 200 First Street SW, Rochester, MN 55905

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



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

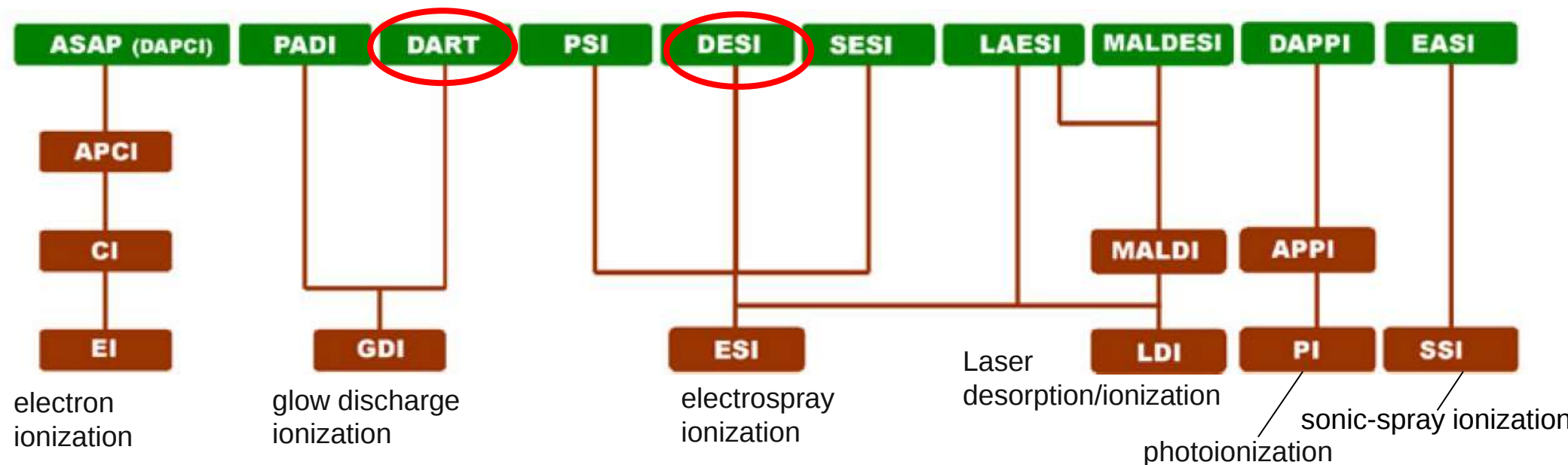
Acronym	Description	Basic technique ^a	Year
SESI	Secondary electrospray ionization	SESI	2000 ^b
DESI	Desorption electrospray ionization	ESI	2004
DART	Direct analysis in real time	GDI	2005
ASAP	Atmospheric solids analysis probe	(AP)CI	2005
FD-ESI	Fused-droplet ESI	ESI	2002
DAPCI	Desorption atmospheric 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 chemických reakcí apod.

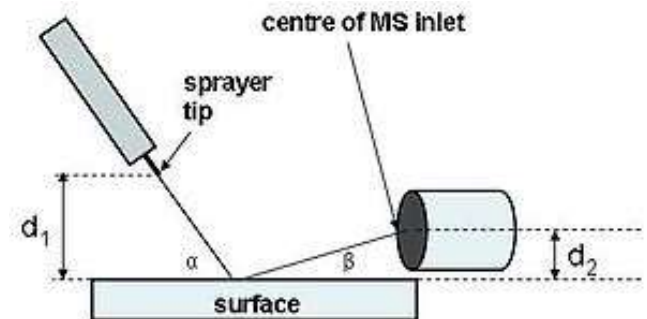
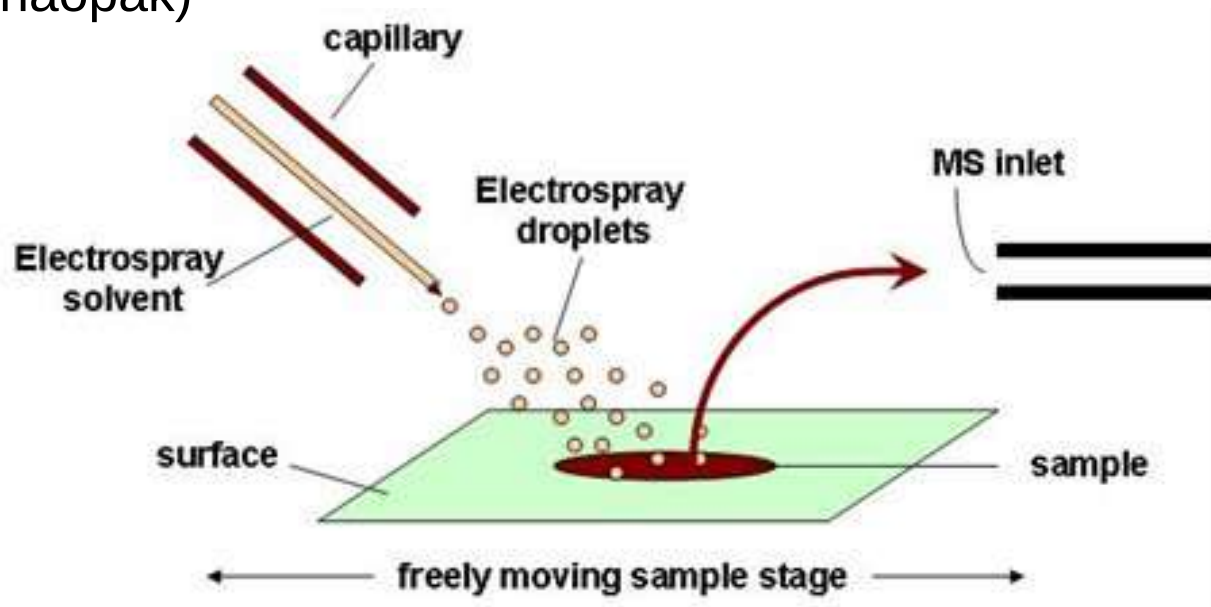
Jaké sloučeniny se analyzují: výbušniny, léčiva, pesticidy, lipidy, metabolity, peptidy a proteiny, apod.

Desorpční ionizace elektrosprejem (DESI)

- kombinuje ESI a desorpční ionizační techniky
- na rozdíl od ESI spíše pro menší molekuly
- 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 (tzv. MS imaging)
- **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

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 polaritý 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>

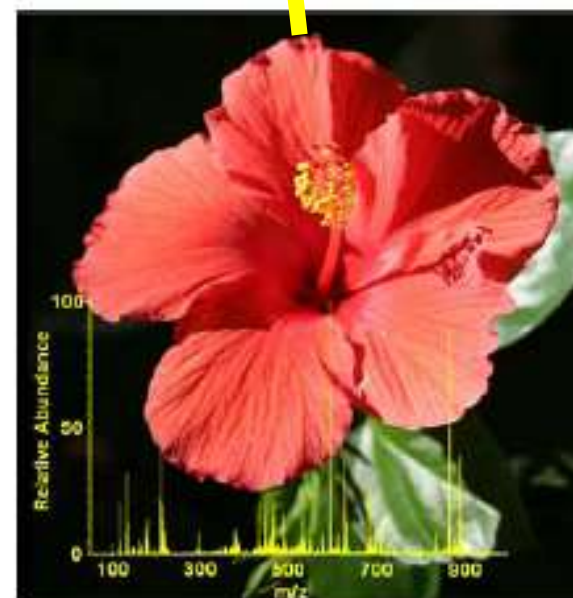
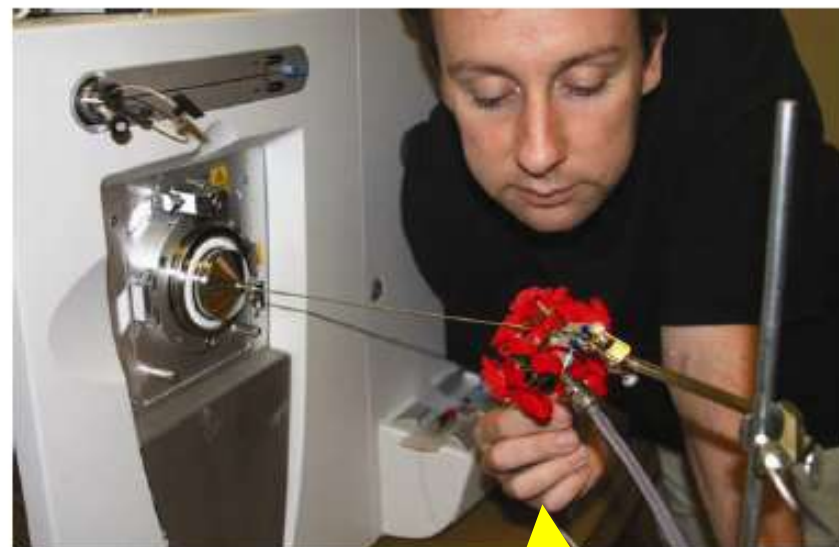
Praktické ukázky DESI

- 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)



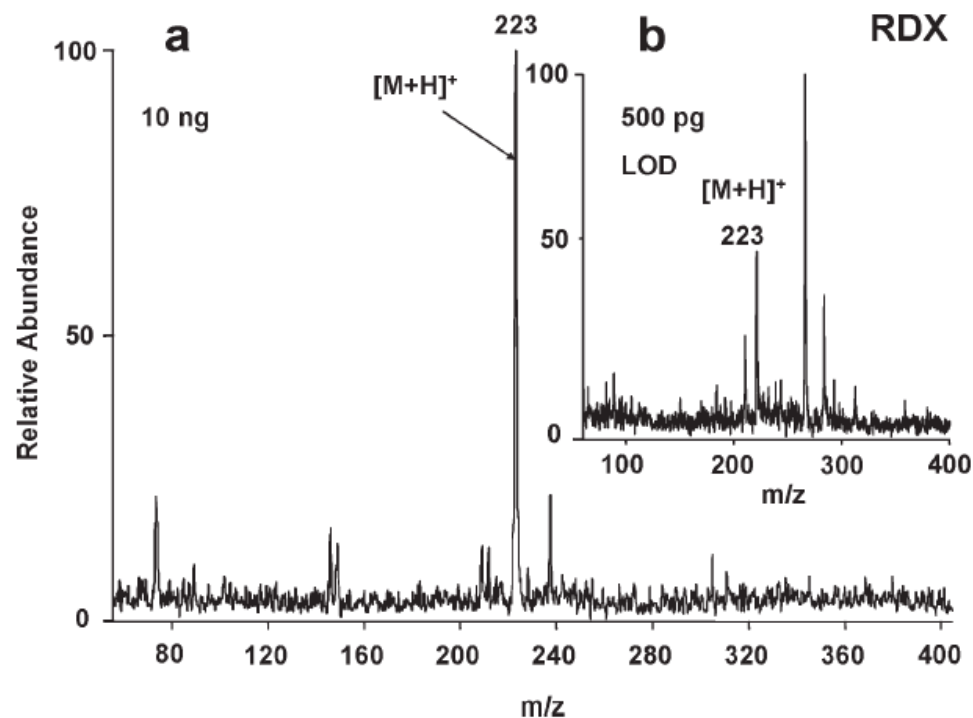
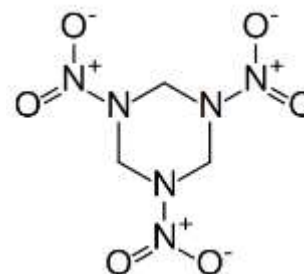
naneseno na povrch papíru (1 cm²)



DESI⁺/CIT (cylindrická iontová past)

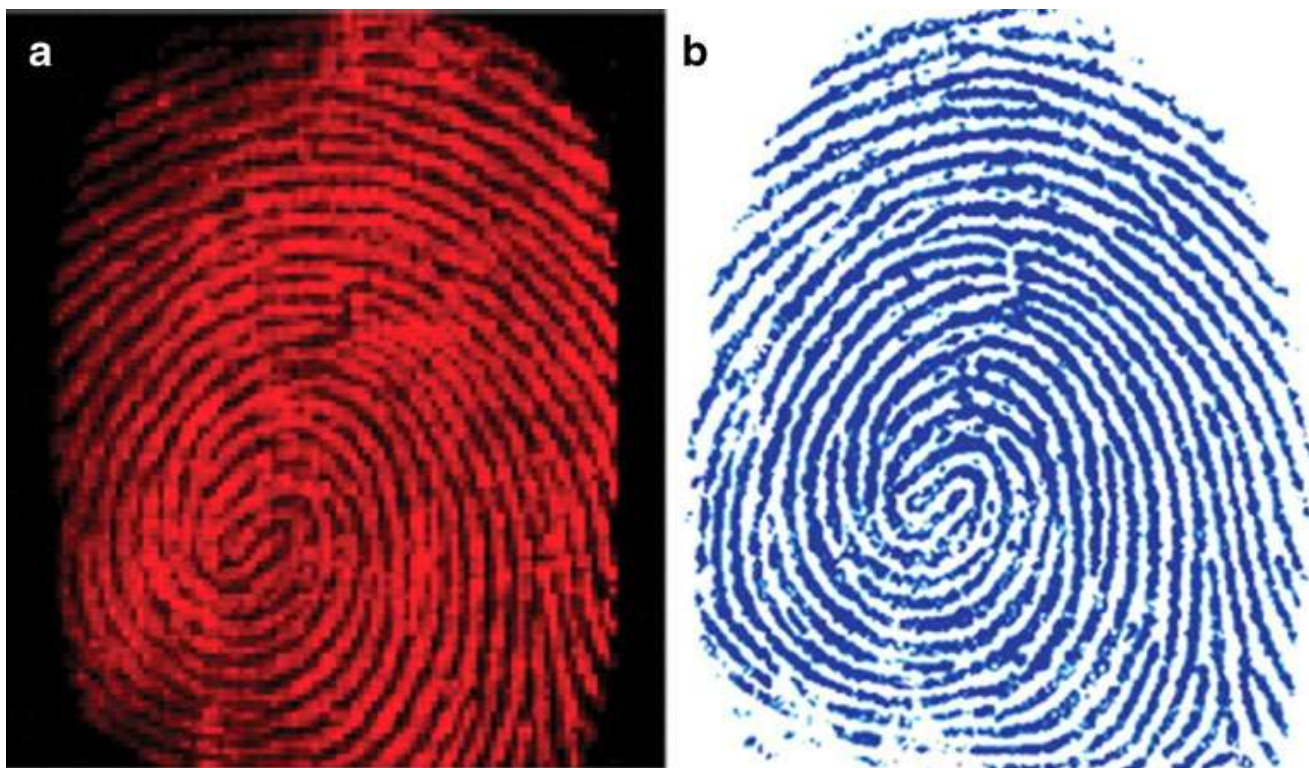


doba analýzy (5-10s); [M+H]⁺



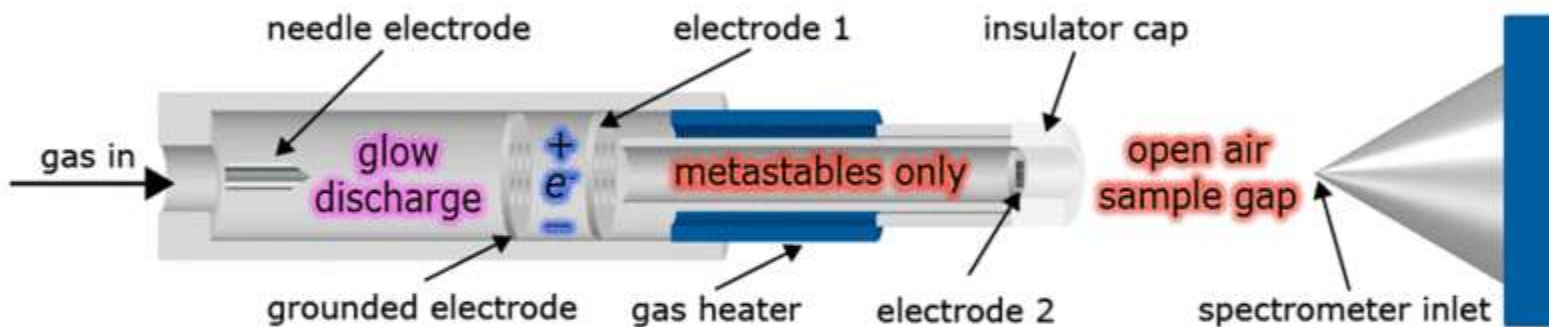
Praktické ukázky DESI

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



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 nenabitě metastabilní částice projdou a interagují s analytem**)
- s analytem interagují pouze excitované částice reakčního plynu He* (hvězdička označuje excitovanou částici)

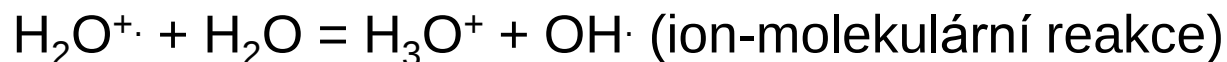
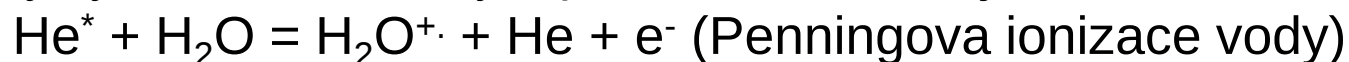


Přímá analýza v reálném čase (DART)

- reakce vzniku iontů:



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



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

Přímá analýza v reálném čase (DART)



TOF™ DART™

☒ AccuTOF DART

☐ What is DART?

☐ Mass Analyzer

☐ Why DART?

☐ Applications

☐ DART Sightings

1 2 3

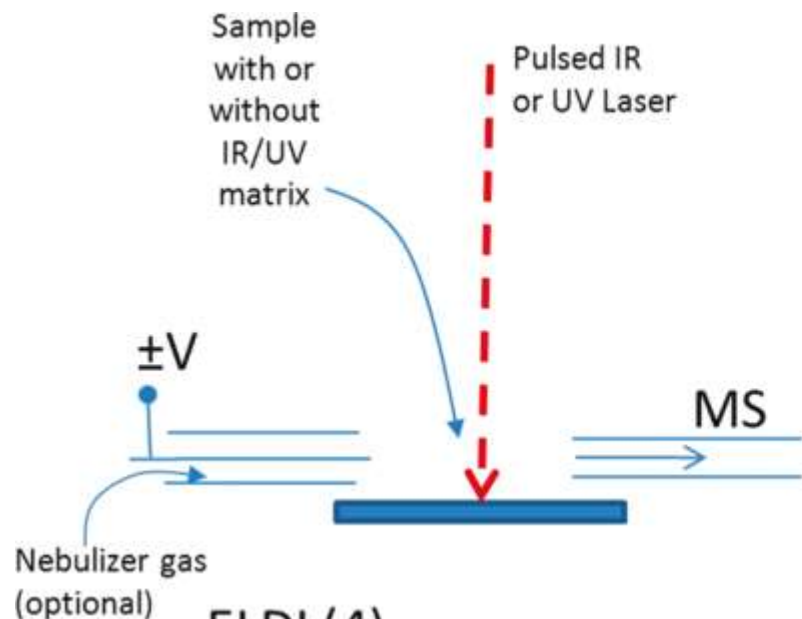




The DART™ ion source is shown here
on an **AccuTOF** Mass Spectrometer

Intro Application Examples More Info **JEOL**

Ambientní ionizace – další vybrané mechanismy

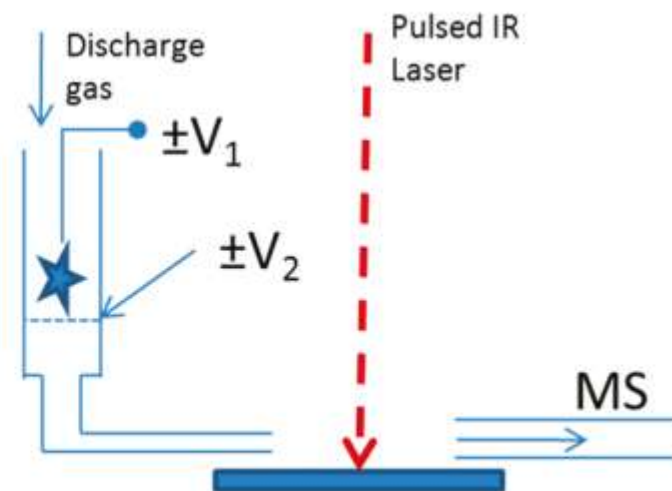


ELDI (4)

LAESI/LADESI/LDESI (11)

MALDESI (3)

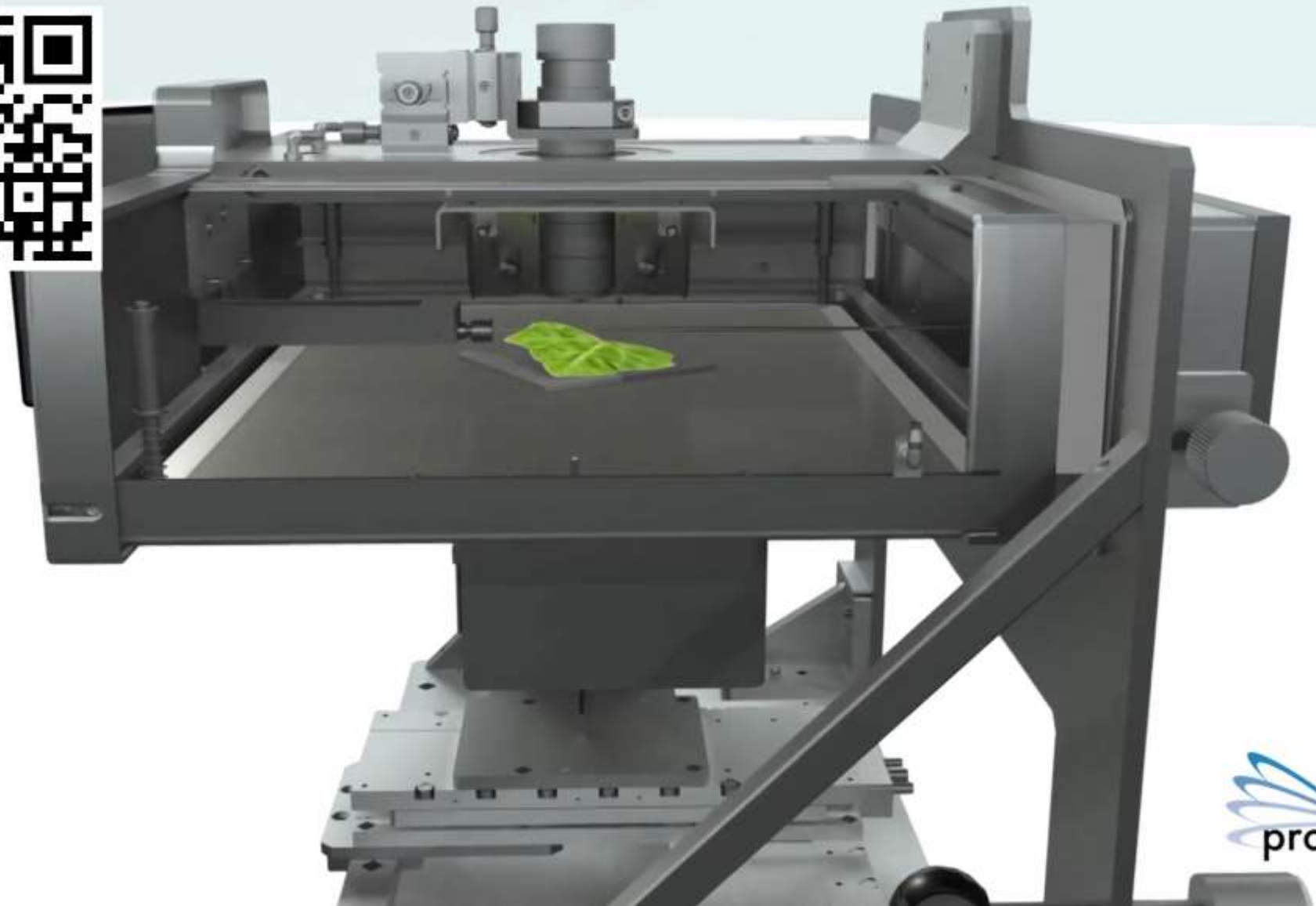
- IR or UV Laser desorbs/ablates neutrals from sample surface. Analyte can also be desorbed via IR or UV MALDI mechanisms if matrix is present.
- Neutral plume is entrained by electrospray droplet cloud. Analyte dissolves in droplets. Analytes in droplets ionize through ESI mechanisms.
- Sample is positioned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



IR-LAMICI (1)

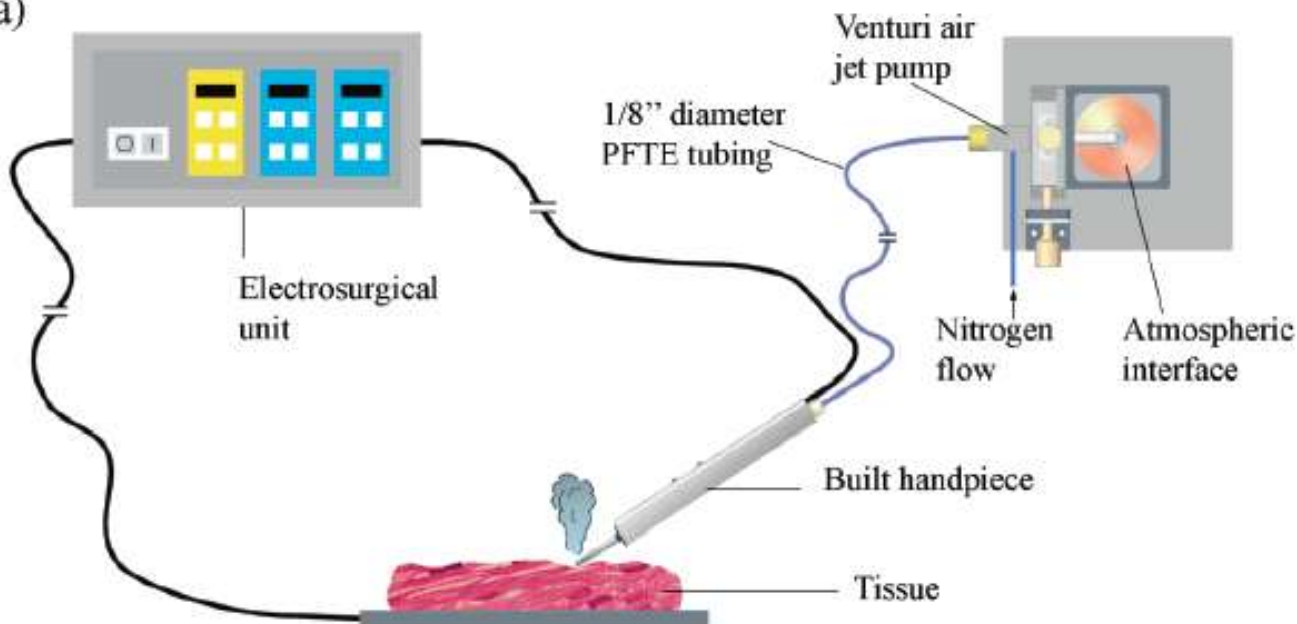
- Glow discharge generates metastables. Ions from discharge are removed. In most cases this stream does not need to be heated.
- IR Laser desorbs/ablates neutrals from sample surface.
- Metastables stream merges with neutral plume, reacting with analyte through proton transfer reactions. Sample is positioned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

Ambientní ionizace – LAESI



Sledování průběhu operací nádorů pomocí MS

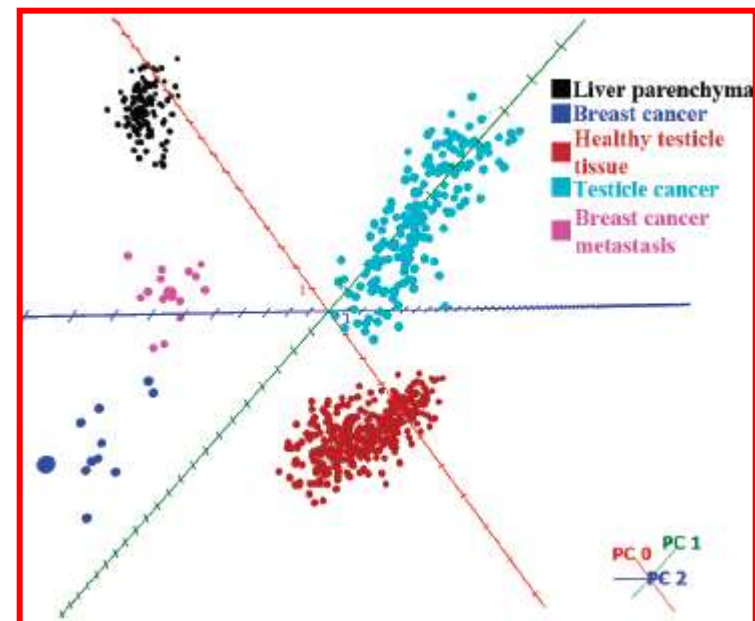
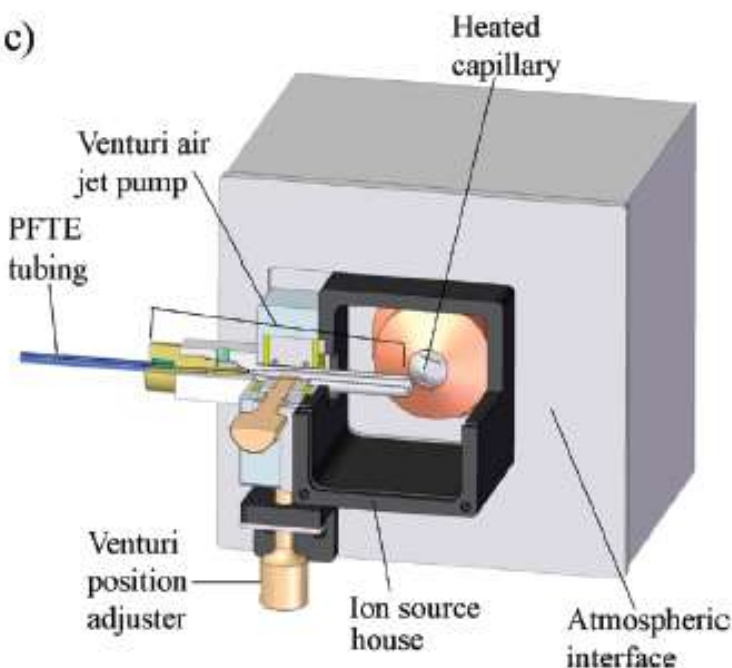
a)



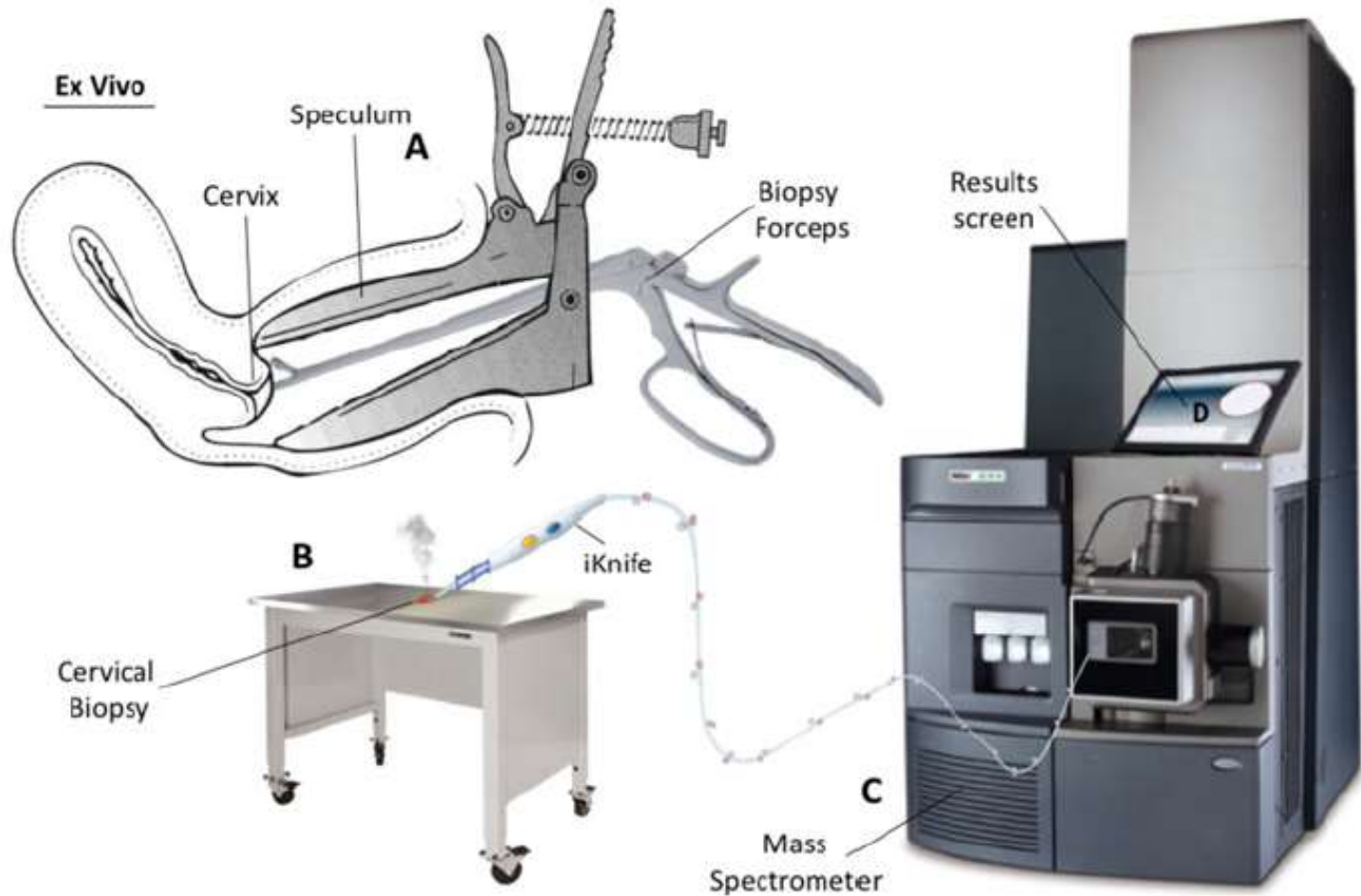
b)



c)



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



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



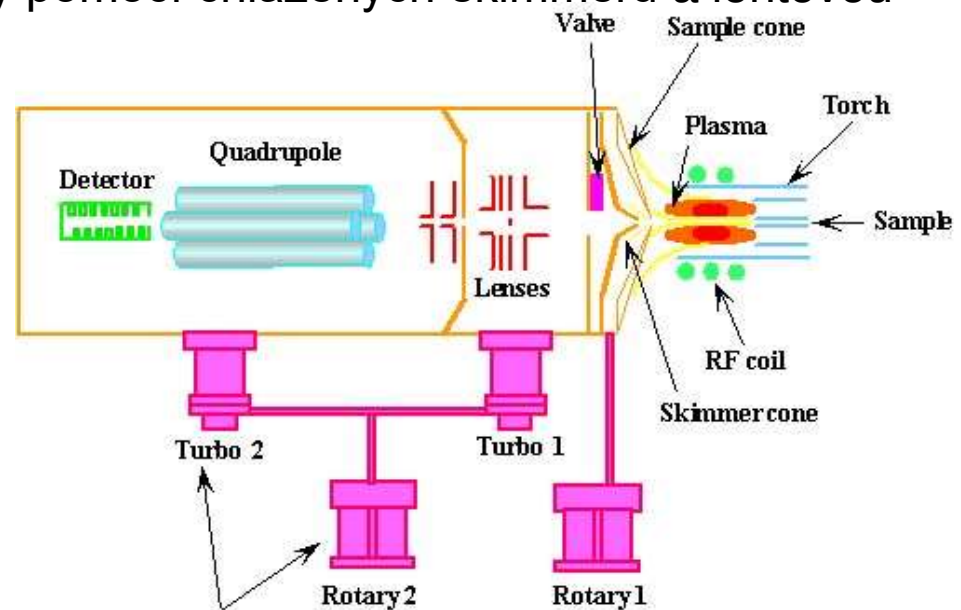
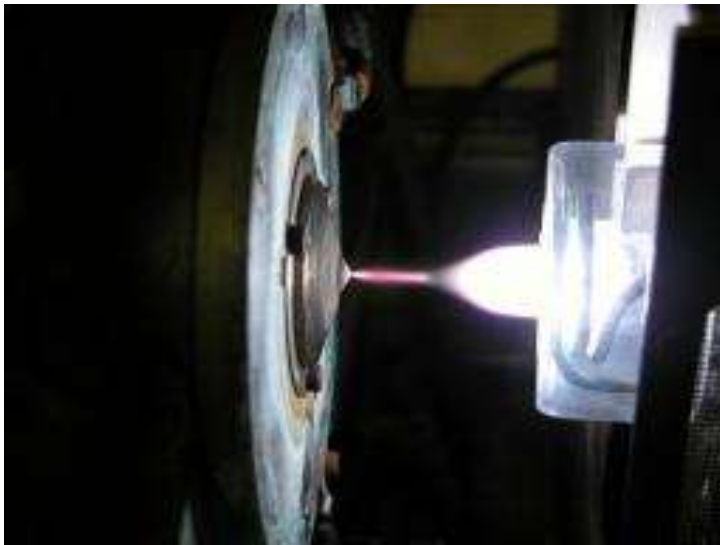
http://www.waters.com/waters/en_AE/REIMS-Research-System-with-iKnife-Sampling-Device/nav.htm?cid=134846529&locale=en_AE

ICP-MS

(Inductively coupled plasma mass spectrometry)

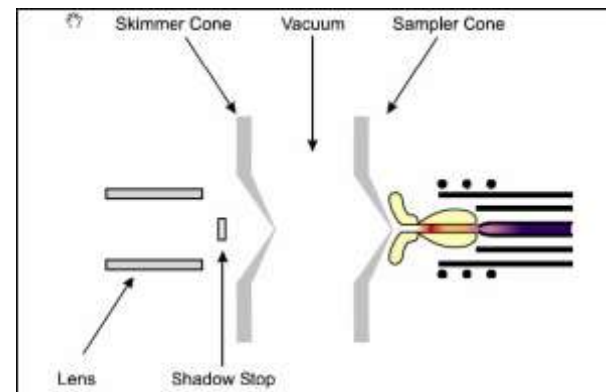
Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

- 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 tkáních)
- 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 $> 6000\text{K}$ → 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



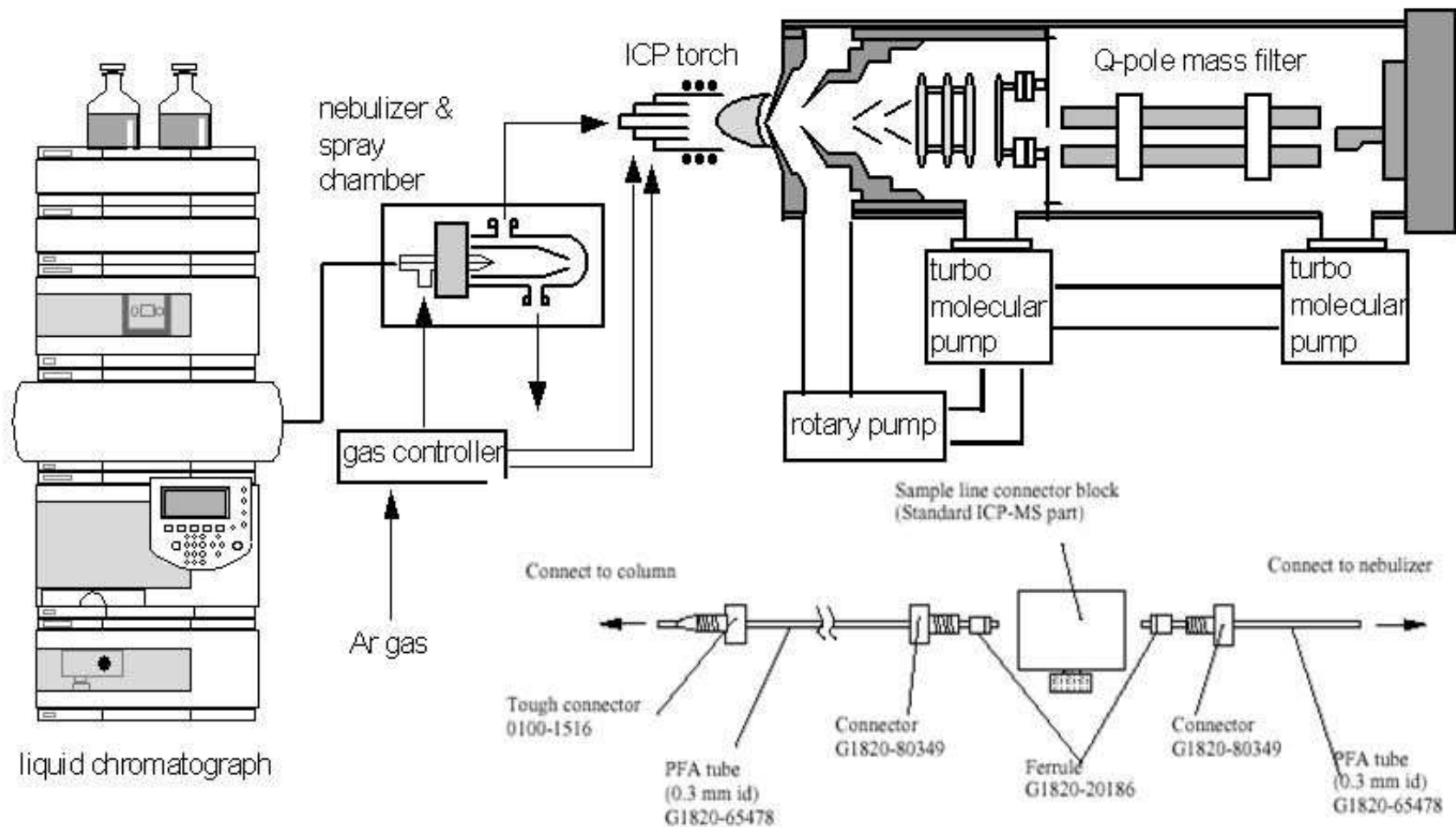
Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

- jsou tvořeny hlavně jednou nabitě **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

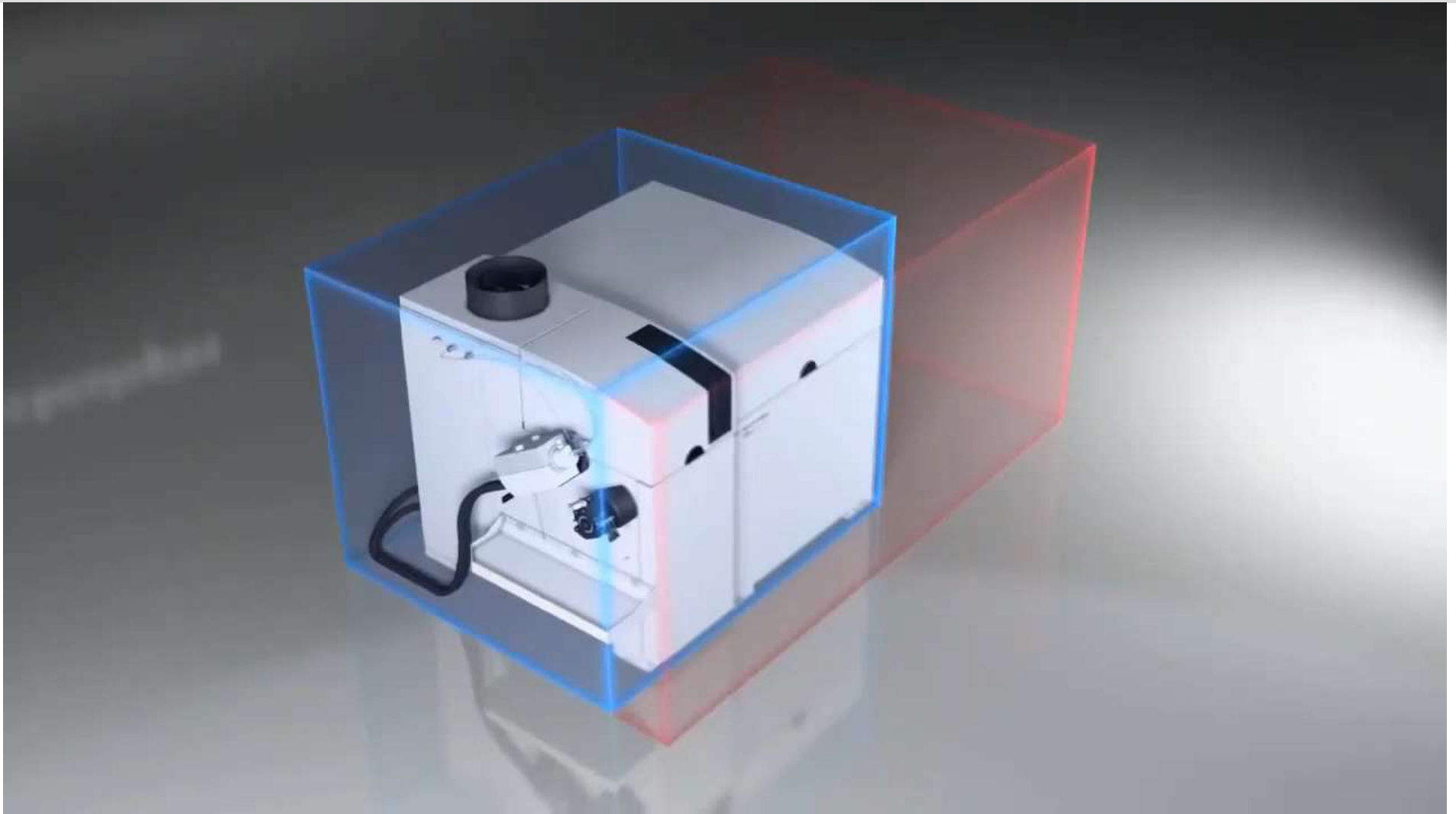


Analyte	Interference	$ \Delta m $	m	R
$^{75}\text{As} = 74.92160$	$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl} = 74.93123$	0.00963	75	7788
$^{52}\text{Cr} = 52.94065$	$^{37}\text{Cl}^{16}\text{O} = 52.96081$	0.02016	53	2629
$^{56}\text{Fe} = 55.93494$	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O} = 55.95729$	0.02235	56	2505
$^{40}\text{Ca}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

LC/ICP-MS



Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem



SIMS

(Secondary ion mass spectrometry)

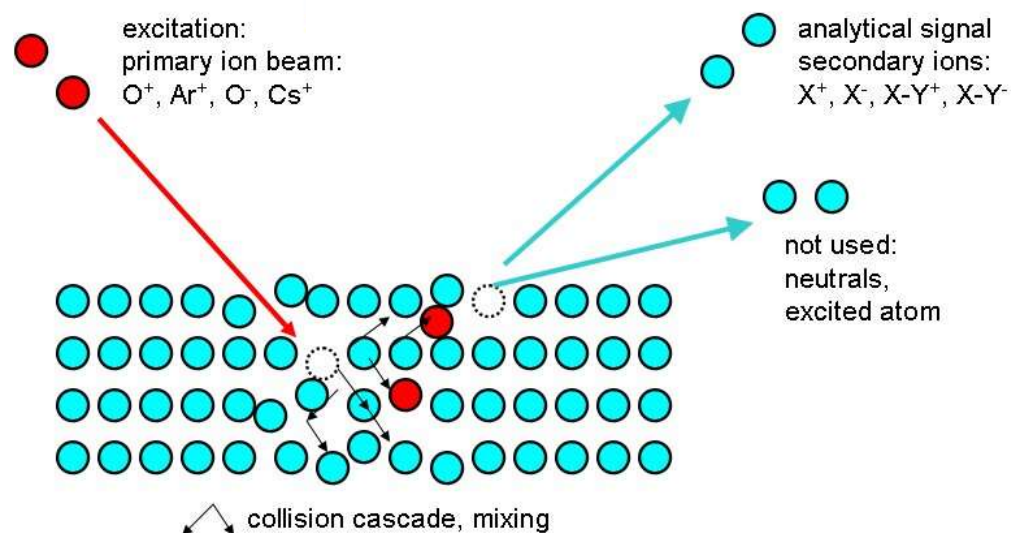
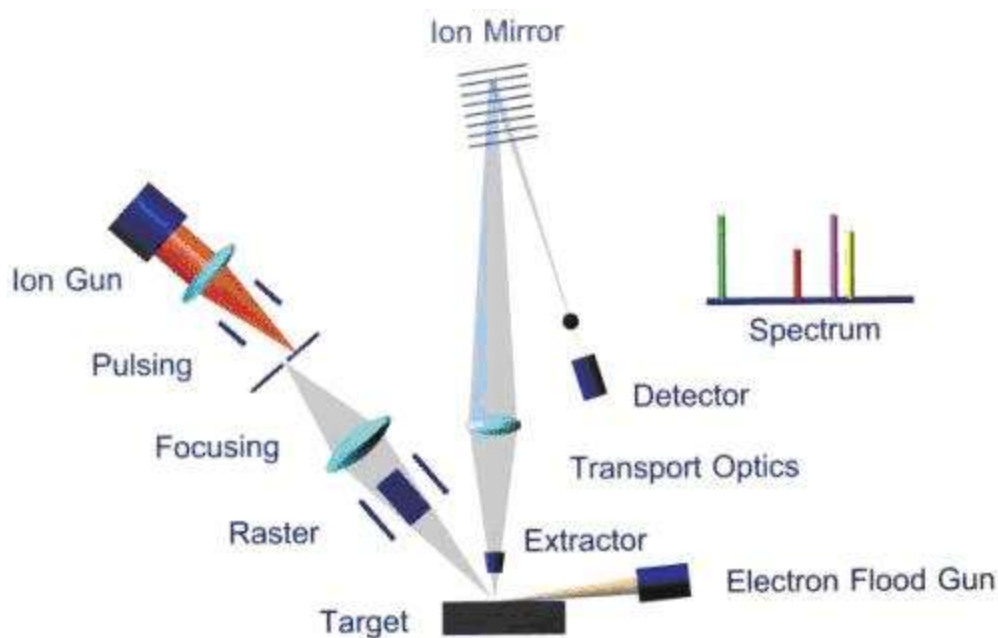
Hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů

- 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)

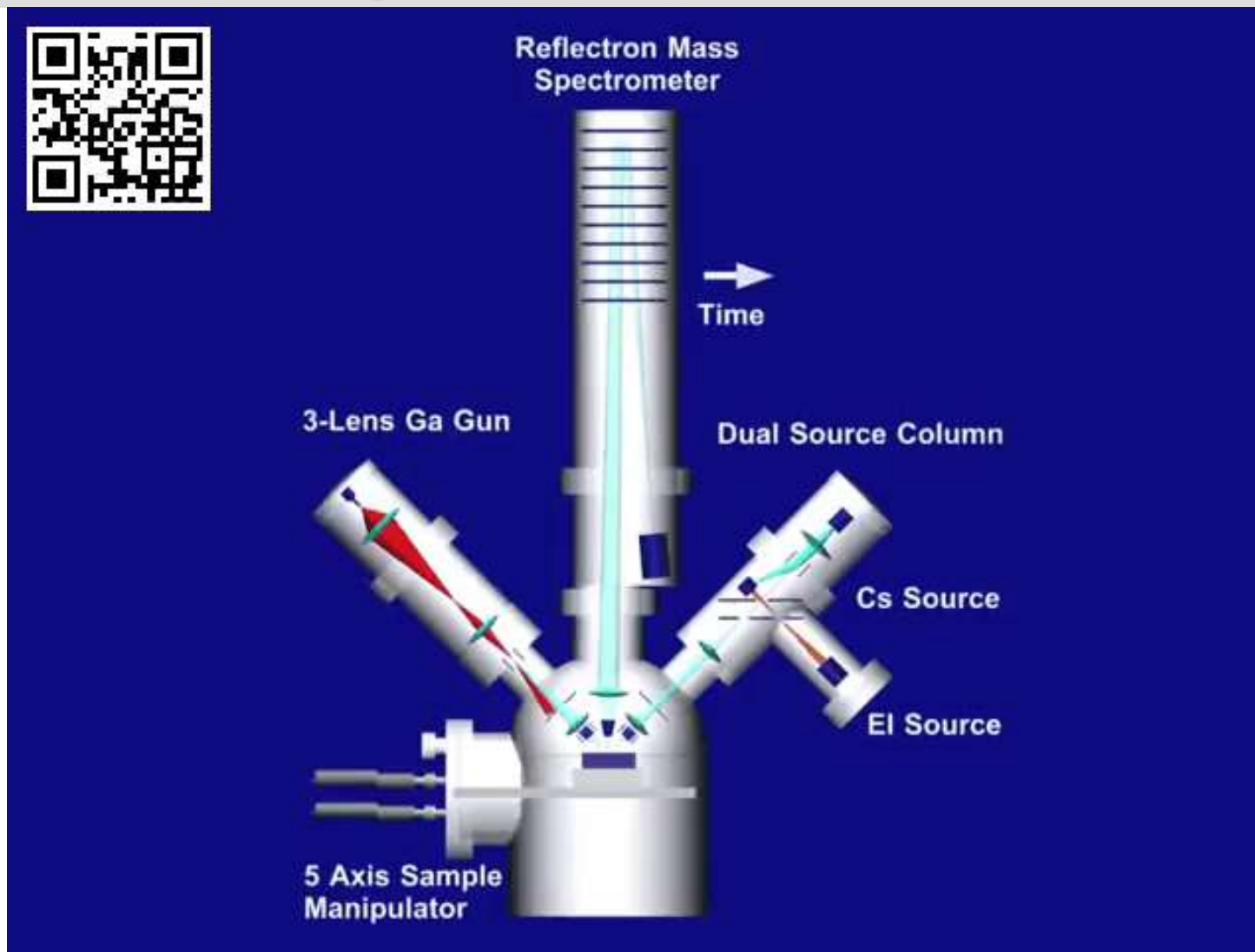


Hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů

- vzorek je bombardován svazkem urychlených (primárních) iontů z iontového děla
 - Ar^+ , Cs^+ , Ga^+ , O^- , O_2^+ , klastrové ionty (C_{60}^+ , Ar_n^+ , $(\text{H}_2\text{O})_n^+$)
- vzniká srážková kaskáda při povrchu a tím dochází k emisi částic z povrchu vzorku
 - neutrální, kladně i záporně nabitě a excitované částice
 - **$\sim 1\%$ 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>

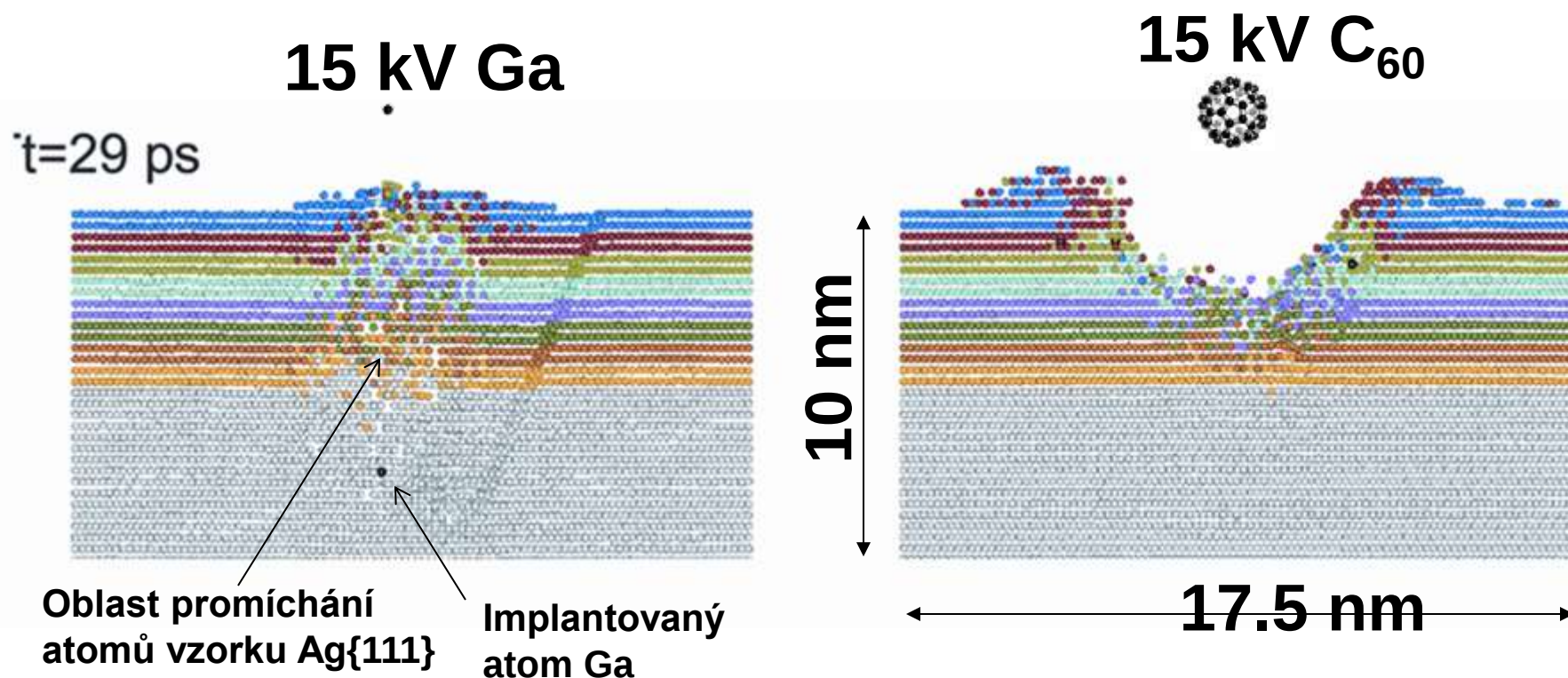
SIMS – tři základní režimy

	Statický SIMS	Dynamický SIMS	Molekulární SIMS
Dávka a typ primárních iontů	$< 10^{12} \text{ cm}^{-2}$ např. Ar^+ , Cs^+ , Ga^+	$> 10^{13} \text{ cm}^{-2}$ např. Cs^+ , O_2^+ , O^-	$> 10^{13} \text{ cm}^{-2}$ velké klastry (C_{60}^+ , Ar_n^+ , $(\text{H}_2\text{O})_n^+$)
Dopad iontů / poškození povrchu	na nepoškozené 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

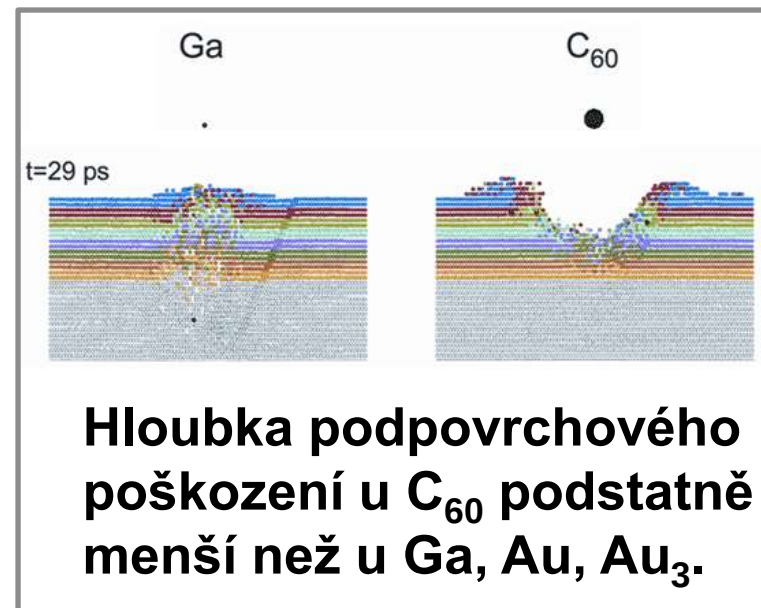
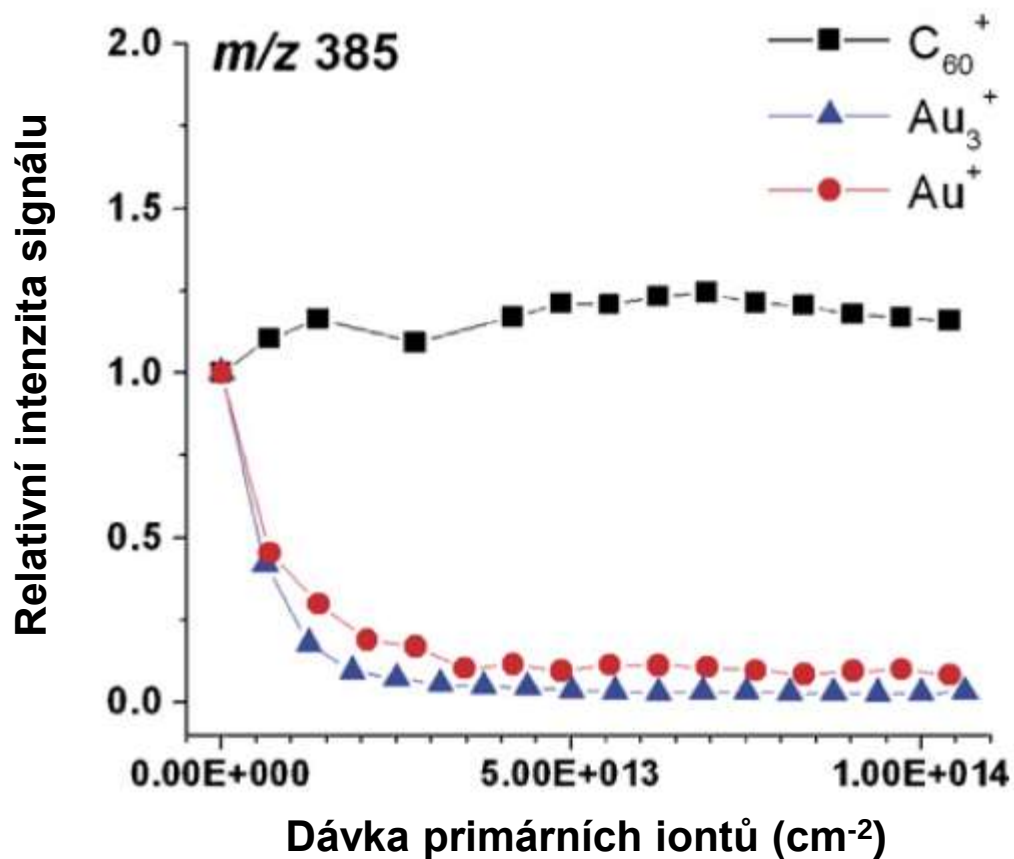
Poškození po dopadu jednoho iontu

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



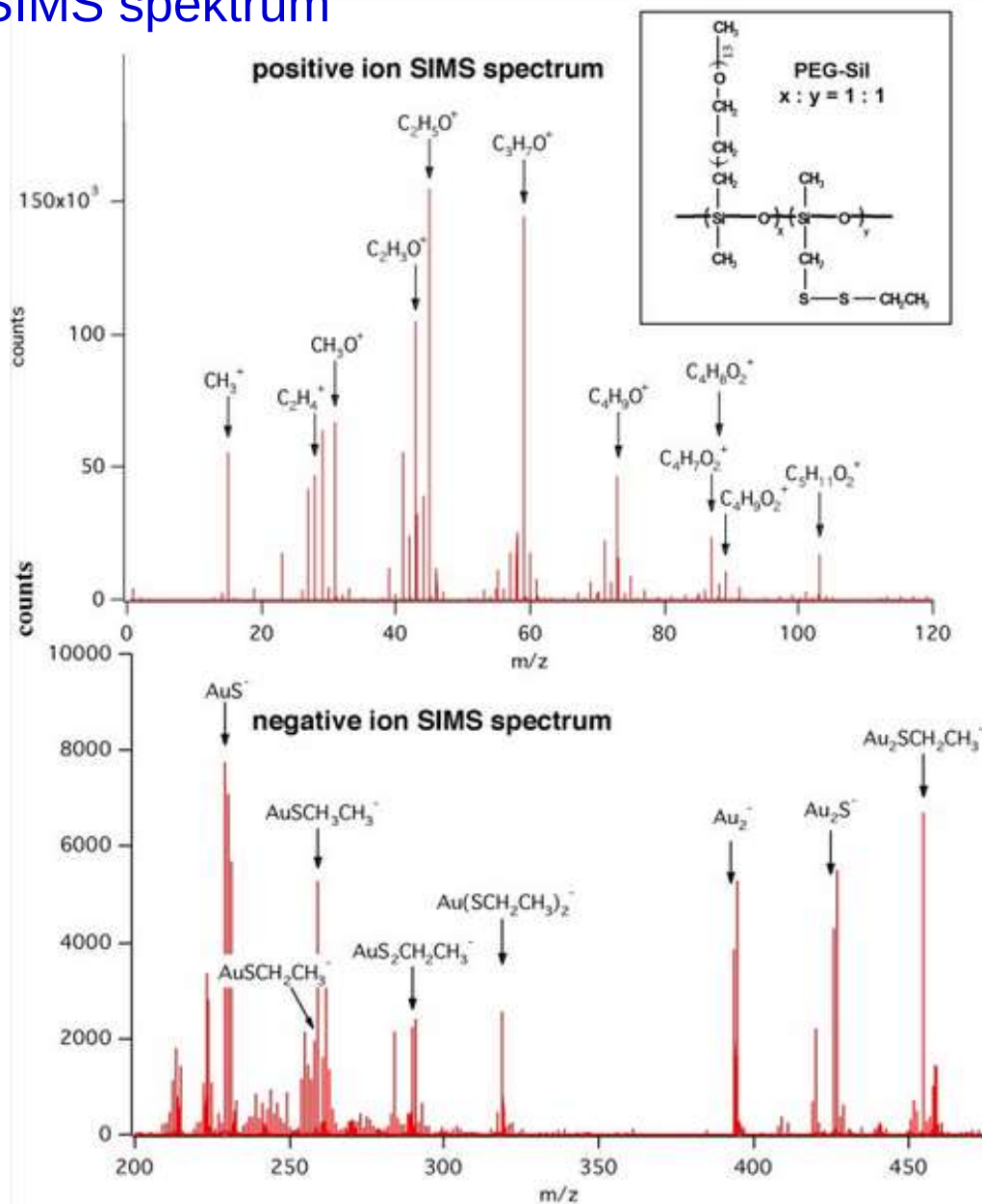
Z. Postawa a kol., Microscopic insights into the sputtering of Ag{111} induced by C_{60} and Ga Bombardment, J. Phys. Chem. B, 108, 7831-7838 (2004).

SIMS - molekulární zobrazování

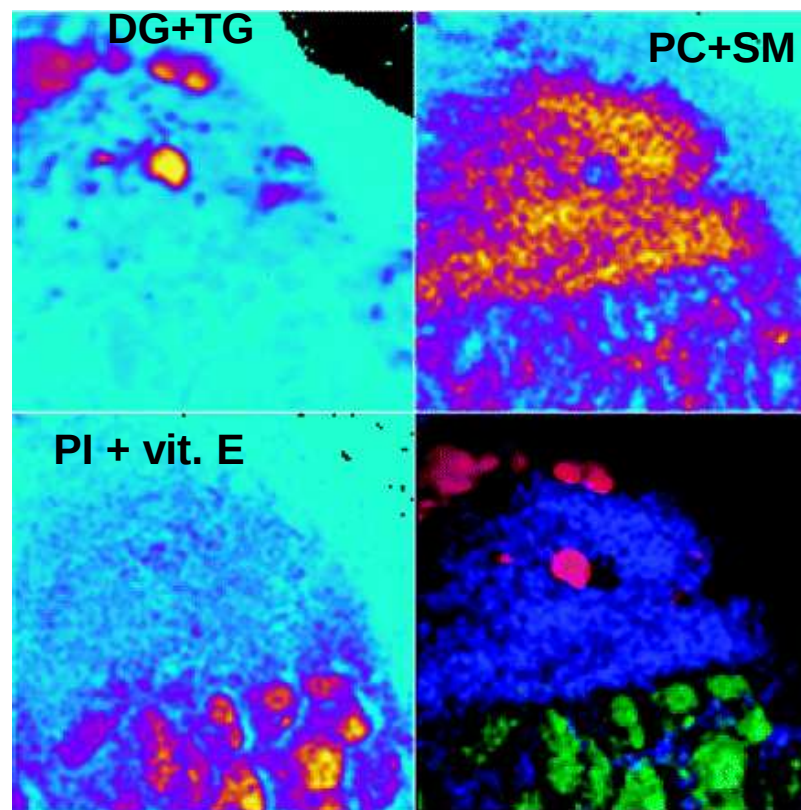


Stabilita signálu z tenké vrstvy cholesterolu naneseného na Si při bombardování ionty Au^+ , Au_3^+ , C_{60}^+ o energii 15 kV. Obrázek ukazuje intenzity iontu $[\text{M-H}]^+$ o hmotnosti $m/z=385$ jako funkce dávky primárních iontů.

SIMS spektrum



SISM zobrazování - svalová tkáň



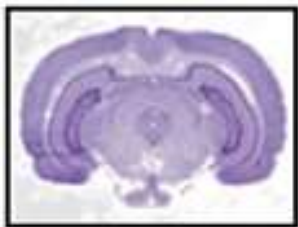
Hmotnostně spekrometrické zobrazování

MSI

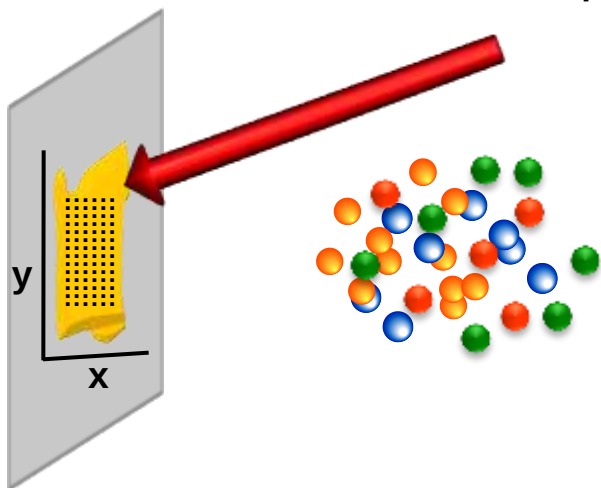
(Mass spectrometry imaging)

Princip hmotnostně spektrometrického zobrazování

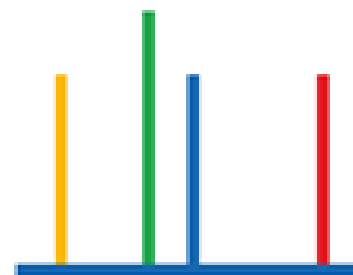
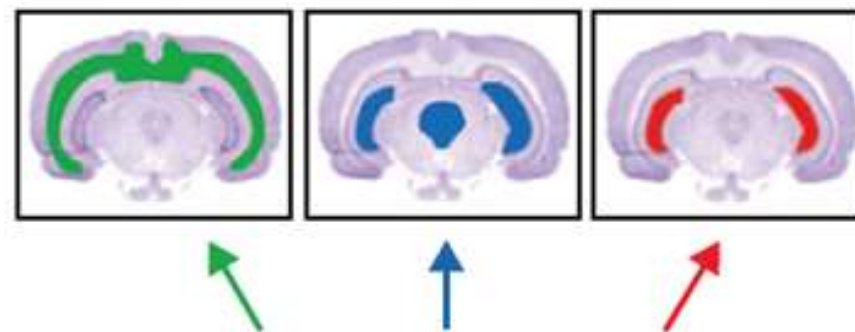
a) tenký řez tkáňe



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

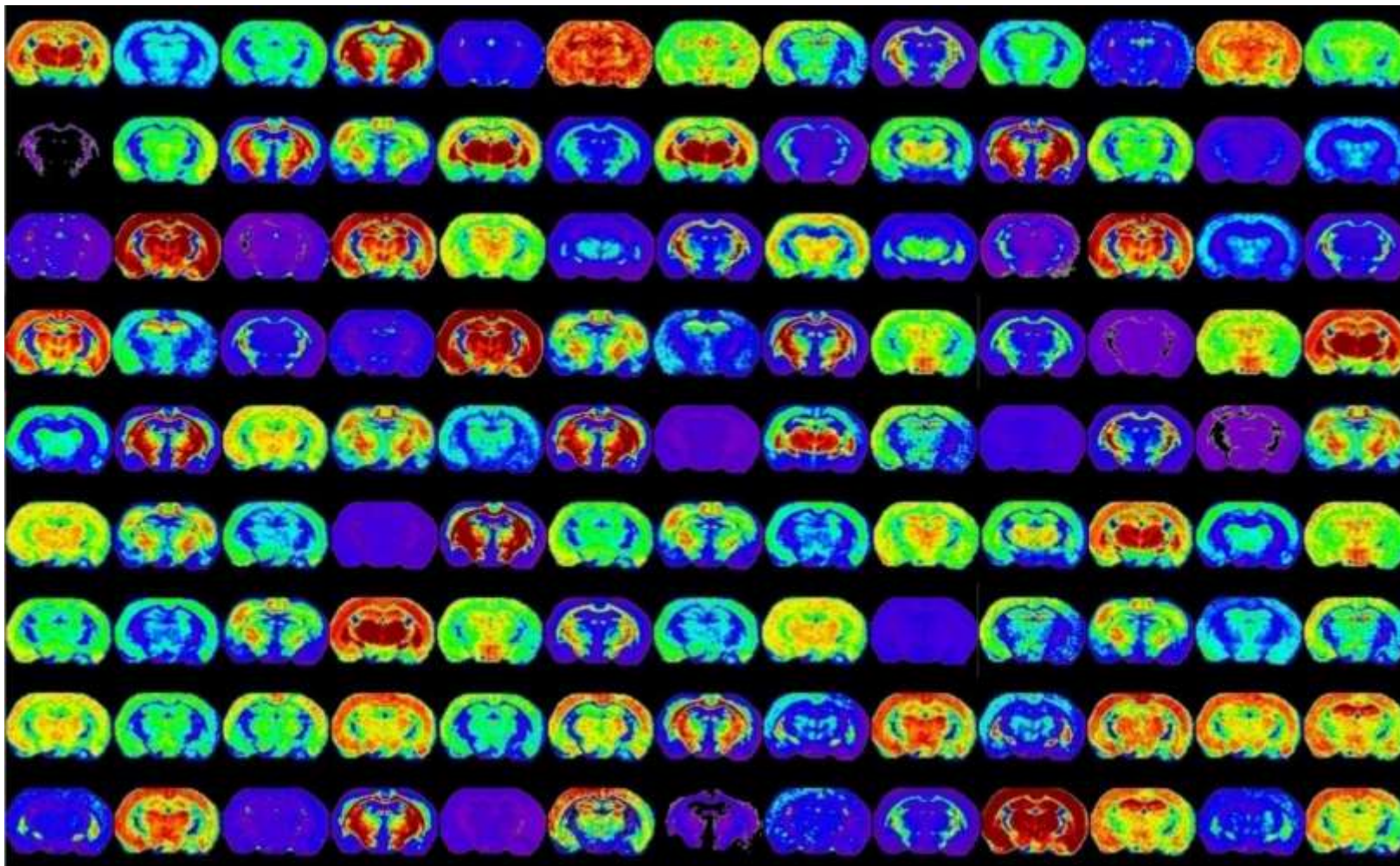


d) zobrazení jednotlivých m/z v prostoru
(distribuce v celém měřeném vzorku)



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

Simultánní 2D zobrazení různých molekul



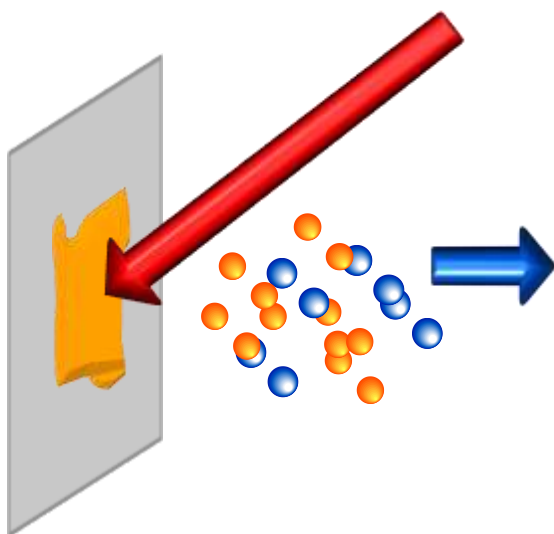
Jeremy L. Norris & Richard M. Caprioli, Chem. Rev. 113 (2013) 2309

Přínos MS zobrazování s ohledem na studované biologické vzorky

- **Zvířecí tkáně** (jednotlivé části 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 analyzátoři 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) $\cdot 10^3$	rozlišovací schopnost $\cdot 10^3$	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

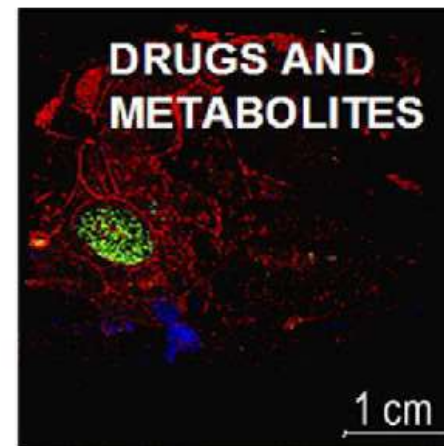
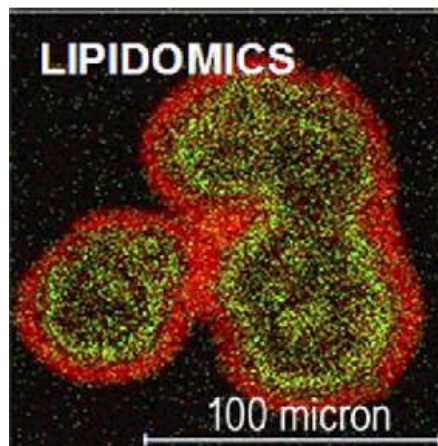
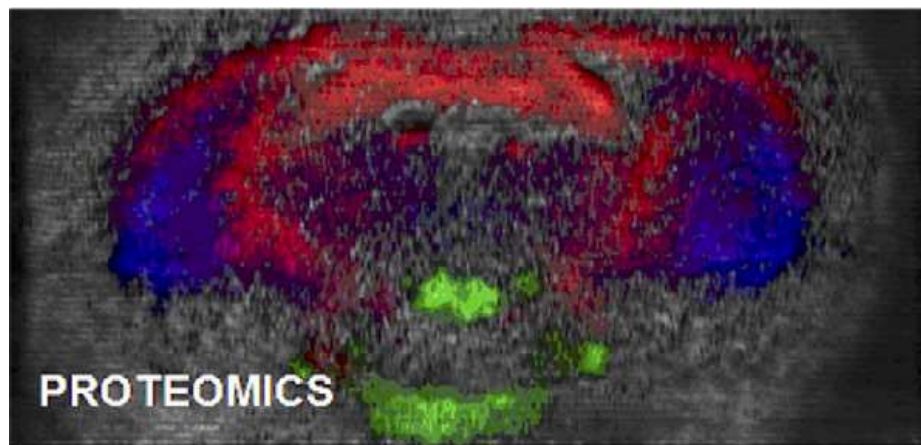
Hlavní aplikace MS zobrazování s ohledem na cílovou skupinu zobrazovaných sloučenin

proteomika

lipidomika

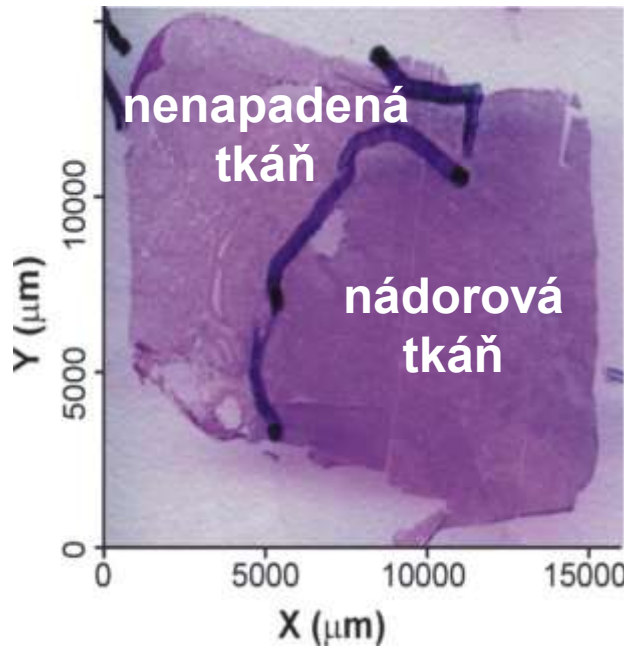
studium
metabolismu léčiv

elementární ionty
nanoSIMS a LA-ICP-MS

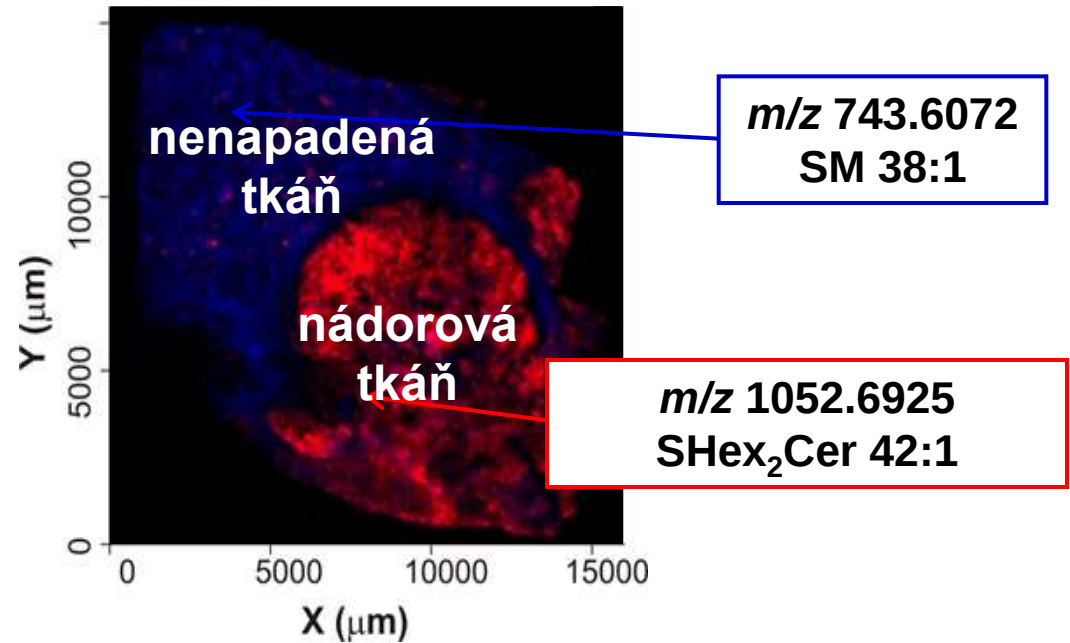


Porovnání histologického barvení a MALDI-MSI

Histologie (H&E barvení)



MALDI-MSI (záporně nabitě ionty)



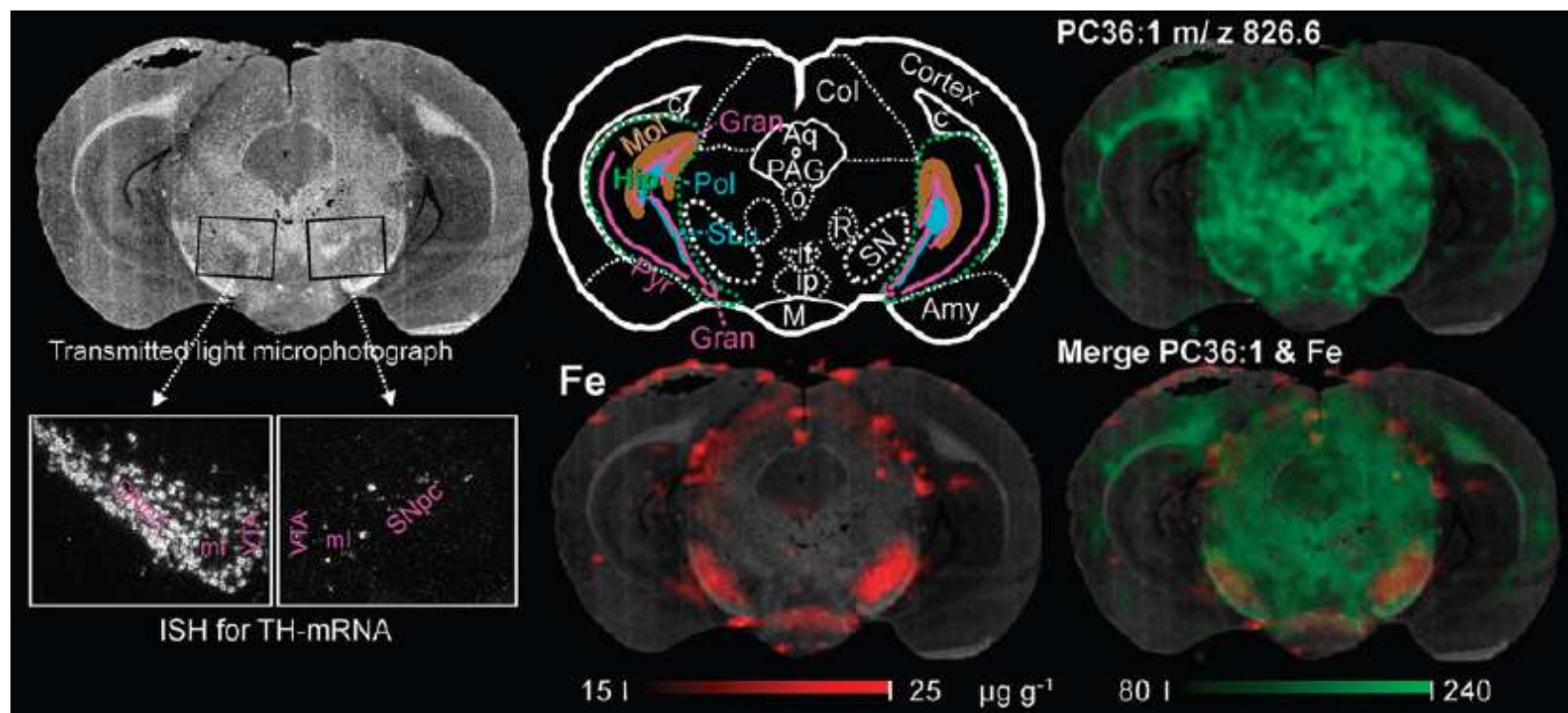
- Porovnávány jsou sousední plátky tkáně získané okamžitě po chirurgickém vyjmutí nádoru spolu s obklopující nenapadenou částí.
- **Experimentální parametry MALDI-MSI:** rozsah m/z 400 - 2000, laterální rozlišení 120 μm, rozlišení analyzátoru 100 000 (m/z 400).

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 noradrenergických 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.