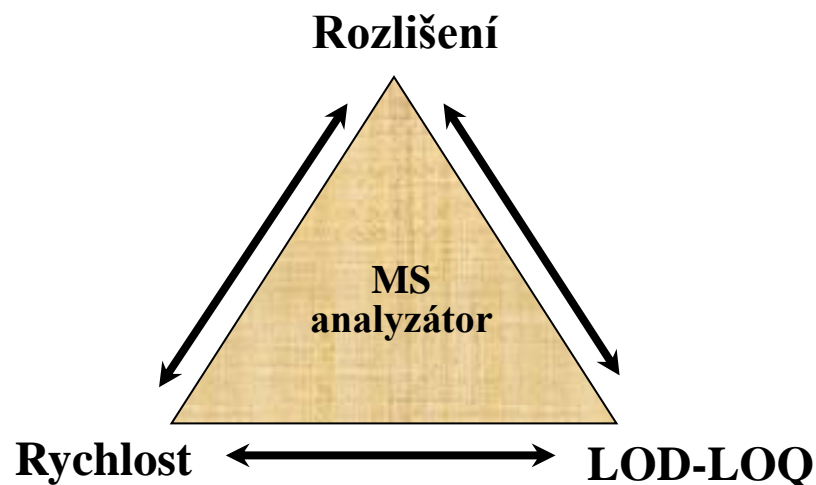


Metody analýzy a detekce iontů v MS

Měření iontů (m/z)	Detekce iontů
rozsah	LOD-LOQ
rozlišení	dynamický rozsah
správnost určení	stabilita v čase
rychlost měření	životnost detektorů



Metody analýzy iontů v MS

- analýzu iontů provádíme pomocí hmotnostního analyzátoru (alternativně se nazývá hmotnostní filtr nebo separátor)
- hmotnostní analyzátor = zařízení, které rozlišuje ionty podle hodnoty m/z
- parametry hmotnostních analyzátorů:
 - a) rozsah analyzovaných hodnot m/z
 - b) rychlost skenu a možnost přepínání různých režimů
 - c) rozlišovací schopnost - rozlišení hodnoty m/z
 - d) přesnost určení hodnoty m/z



Parametry MS analyzátorů

➤ rozsah analyzovaných hodnot m/z :

a) spodní hranice: od technické '0' nebo od vyšší hodnoty

b) horní hranice: do definované maximální hodnoty
(pro vícenásobně nabitě ionty vyšší M)

➤ rychlost skenu a možnost přepínání různých režimů:

a) počet skenů za sekundu: < 1 → nízká rychlost
 $1 - 10$ → střední rychlost
 $10 - 500$ → vysoká rychlost

b) módy měření: plný sken, segment sken, SIM, SRM, MRM

c) módy zobrazení:

- TIC (total ion current) → celkový proud iontů (včetně šumu)
 pro zvolený mód měření

- RIC/EIC (reconstructed/extracted ion chromatogram)
 → záznam pro vybranou hodnotu m/z

- BPC (base peak chromatogram) → záznam pro základní (nejintenzivnější)
 m/z spektra v každém bodě chromatogramu

Parametry MS analyzátorů

- rozlišovací schopnost (resolving power - RP) :
(rozlišovací schopnost hmotnostního analyzátoru nebo spektrometru)
- dvě různé definice – záleží na typu hmotnostního analyzátoru
- jde o vyjádření míry schopnosti hmotnostního analyzátoru rozlišit blízké hodnoty m/z – tj., jaký nejmenší rozdíl umí rozlišit, relativní údaj vztažený k velikosti m/z

1. definice pro dva ionty:

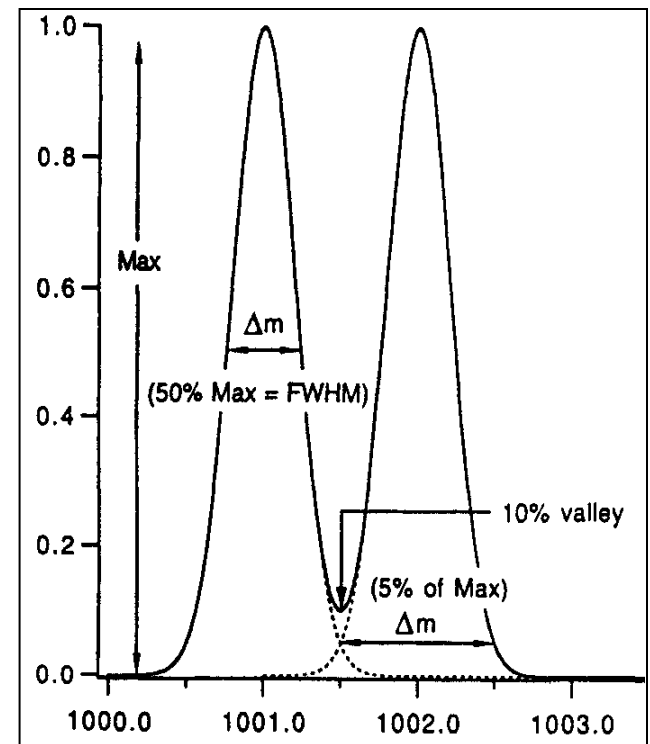
$$RP = m_1 / (m_1 - m_2); z_1, z_2 = 1$$

- píky m_1 a m_2 mají 10 % překryv při stejné výšce

2. definice pro jeden ion:

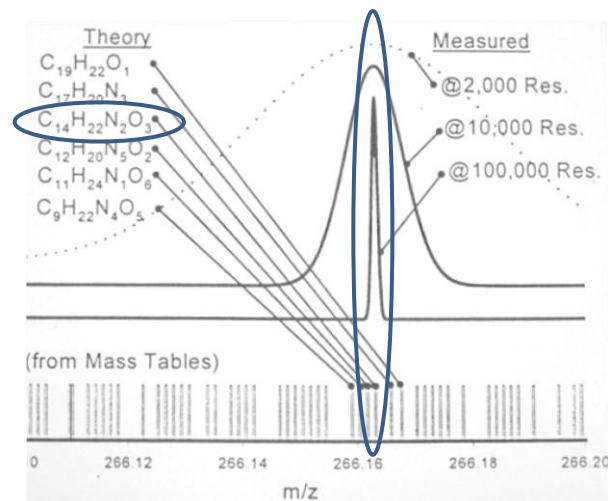
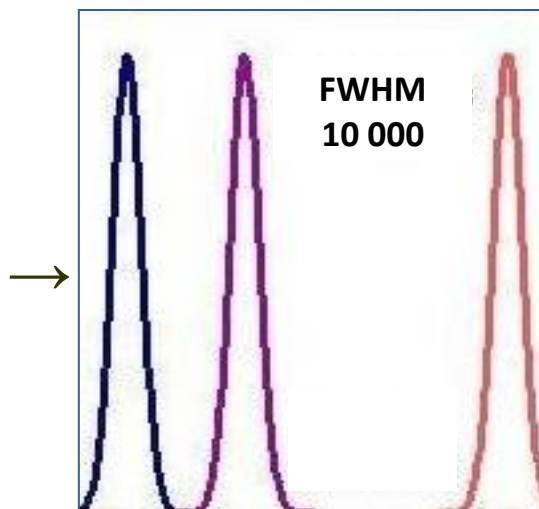
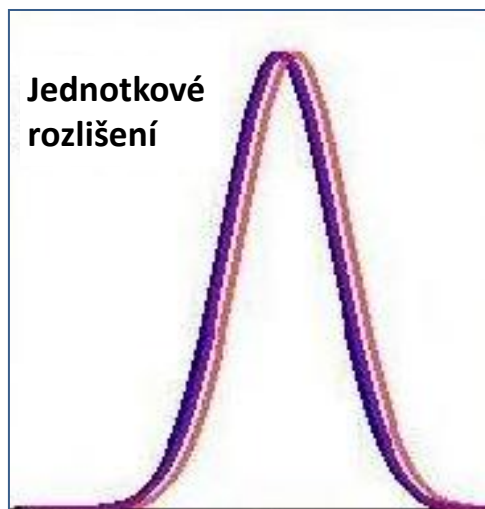
$$RP = m / \Delta m \text{ (alt. } t / 2 \Delta t \text{ - TOF)}$$

- FWHM (full width at half maximum)
pro odpovídající m/z



Parametry MS analyzátorů

- rozlišení (resolution - $R = 1/FP$):
(rozlišení hmotnostního analyzátoru nebo spektrometru)
- dvě různé definice – záleží na typu hmotnostního analyzátoru
- jde o vyjádření míry schopnosti hmotnostního analyzátoru rozlišit blízké hodnoty m/z – tj., jaký nejmenší rozdíl umí rozlišit, relativní údaj vztažený k velikosti m/z
 $R = (m_2 - m_1) / m_1$; vyjadřujeme v ppm pro odpovídající m/z



Parametry MS analyzátorů

- správnost určení hodnoty m/z (*mass accuracy*):
- vyjadřuje míru shody mezi naměřenou (EXPERIMENTÁLNÍ) a vypočtenou (TEORETICKOU) hodnotou m/z
- jde o relativní vyjádření míry schopnosti hmotnostního analyzátoru určit správnou hodnotu m/z

Vyjádření správnosti určení m/z :

$$\text{ppm} = 10^6 \cdot (m/z_{\text{EXP}} - m/z_{\text{TEOR}}) / m/z_{\text{TEOR}}$$



Parametry MS analyzátorů

Příklady vztahů mezi hodnotou parametrů a velikostí m/z

1. Rozlišovací schopnost (RP) = 50000

(často uvedeno jako rozlišení FWHM 50000)

- pro $m/z = 1000$ rozlišíme ionty s odchylkou $\pm 0,01$ ($1000/50000 = 0,02$)

- pro $m/z = 100$ rozlišíme ionty s odchylkou $\pm 0,001$ ($100/50000 = 0,002$)

2. Rozlišení (R) pro RP 50000 je 20 ppm (tj. $1/50000 = 20 \cdot 10^{-6}$)

3. Správnost určení hodnoty m/z

a) $\text{ppm} = 10^6 \cdot (266,16315 - 266,16304) / 266,16304 = + 0,41 \text{ ppm}$

b) $\text{ppm} = 10^6 \cdot (266,16187 - 266,16304) / 266,16304 = - 4,40 \text{ ppm}$

c) $\text{ppm} = 10^6 \cdot (266,17087 - 266,16304) / 266,16304 = + 29,4 \text{ ppm}$



Metody analýzy iontů v MS

Princip MS analyzátoru

- analýza iontů probíhá za nízkého tlaku ($< 10^{-4}$ Pa)
- MS analyzátor určuje hodnotu m/z
- kombinace několika MS analyzátorů (vícestupňová MS)

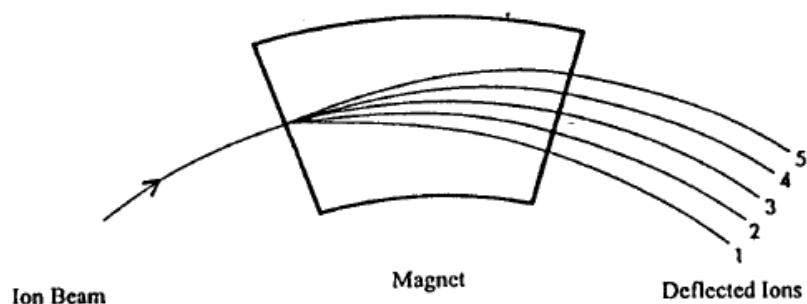
Fyzikální principy analýzy iontů

- ❖ zakřivení dráhy letu iontů v magnetickém nebo elektrickém poli
- magnetický nebo elektrostatický analyzátor
- ❖ různá stabilita oscilací iontů v dvoj- nebo trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí
- kvadrupól nebo iontová past - Q, IT
- ❖ různá doba rychlosti letu iontů - analyzátor doby letu – TOF
- ❖ různá frekvence harmonických oscilací - Orbitrap
- ❖ různá absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli - iontová cyklotronová rezonance – ICR

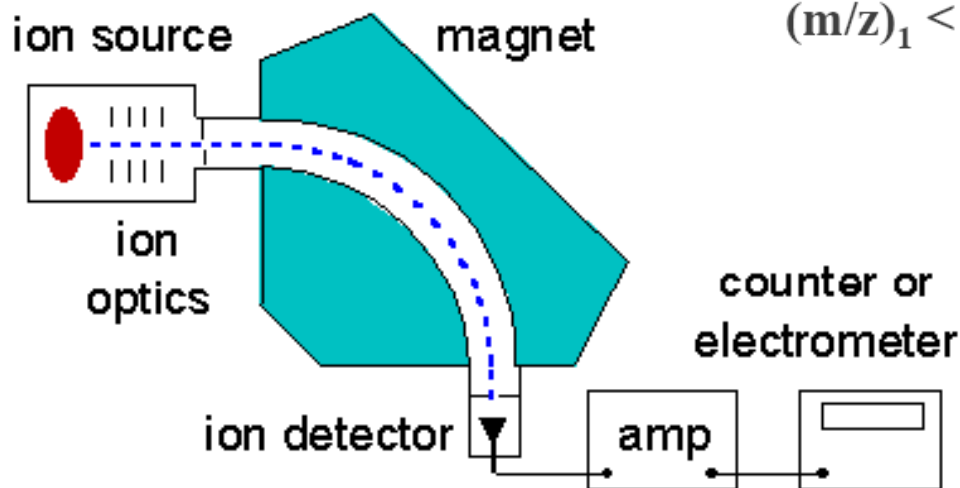


Principy MS analyzátorů

Magnetické sektory

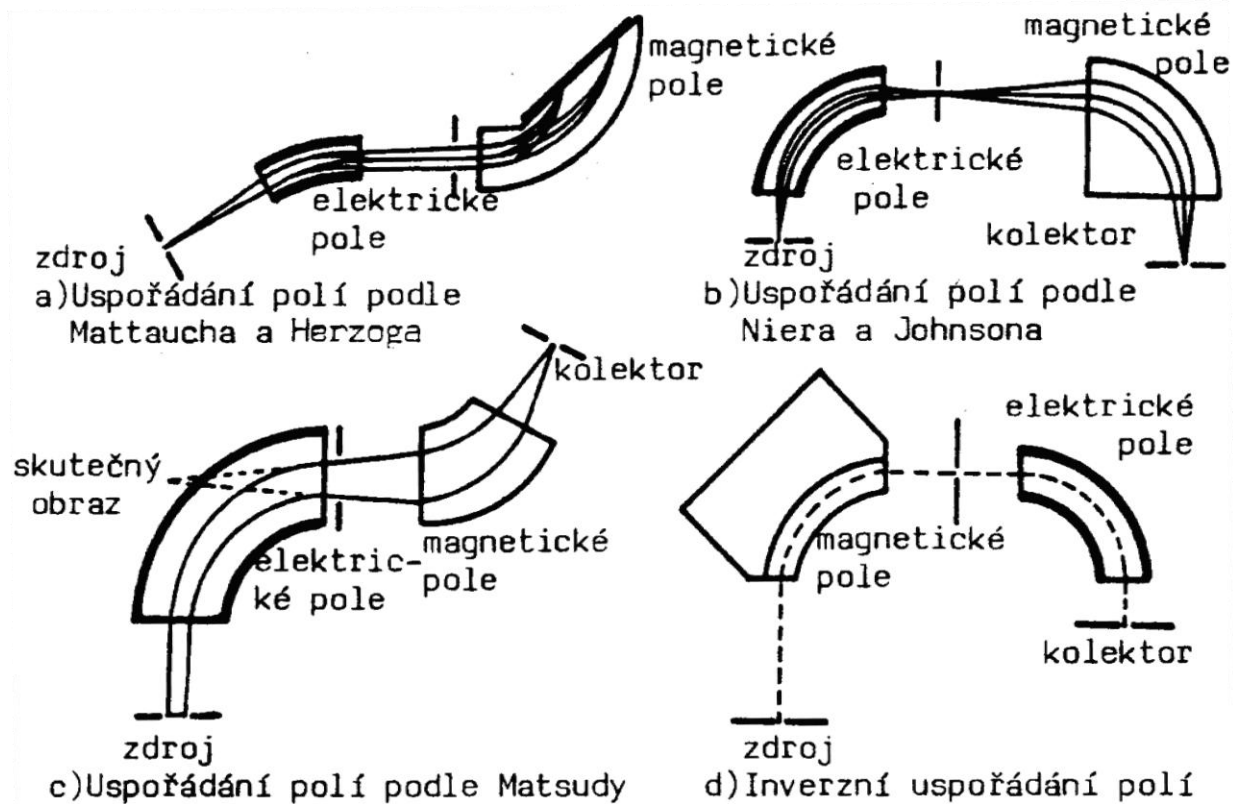


$$(m/z)_1 < (m/z)_2 < \dots < (m/z)_5$$



Principy MS analyzátorů

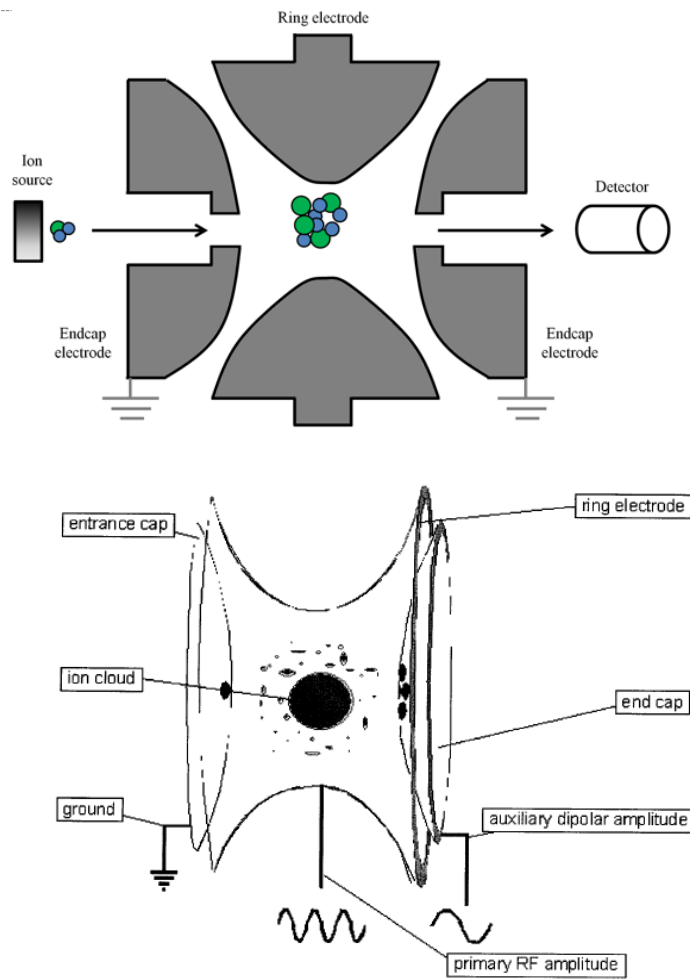
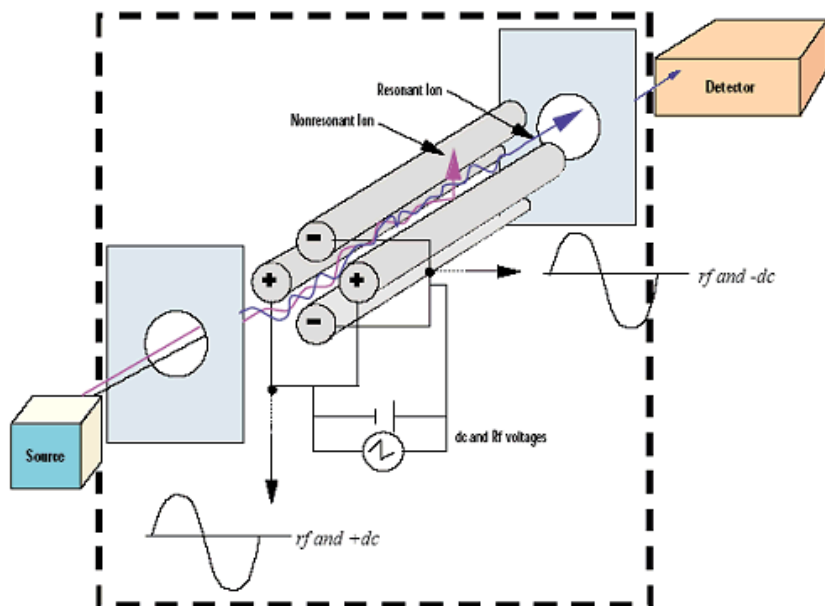
Sektory s dvojí fokusací → elektrostatická + magnetická



Principy MS analyzátorů

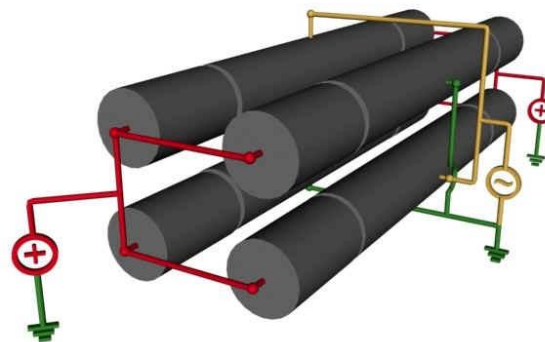
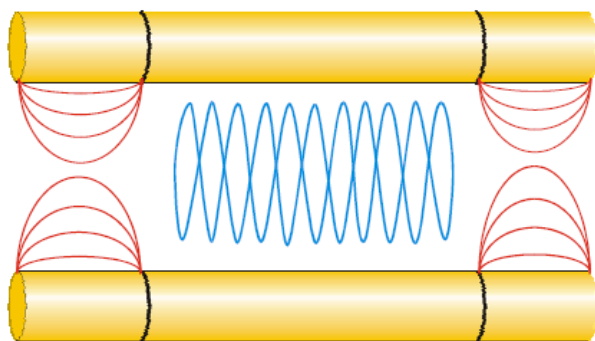
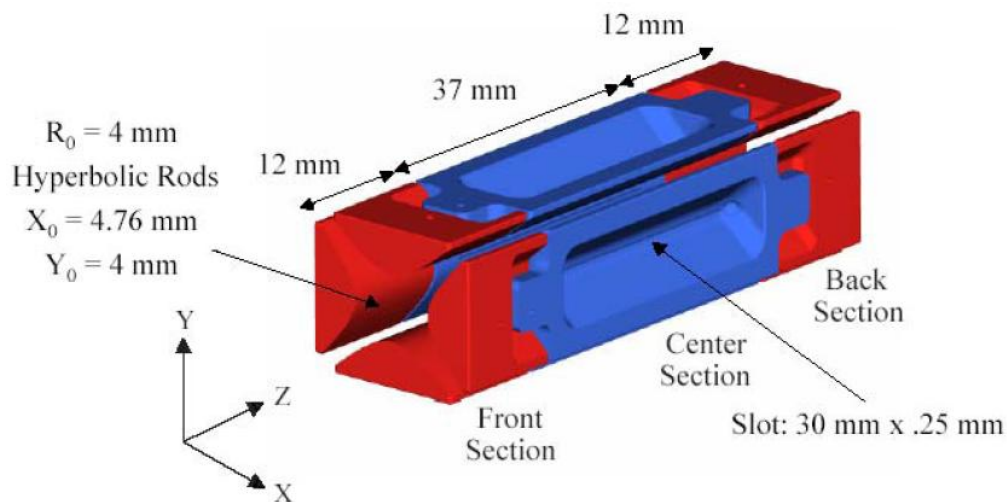
Kvadrupól: a) přímý (Q)

b) sférický - 3D past (IT)



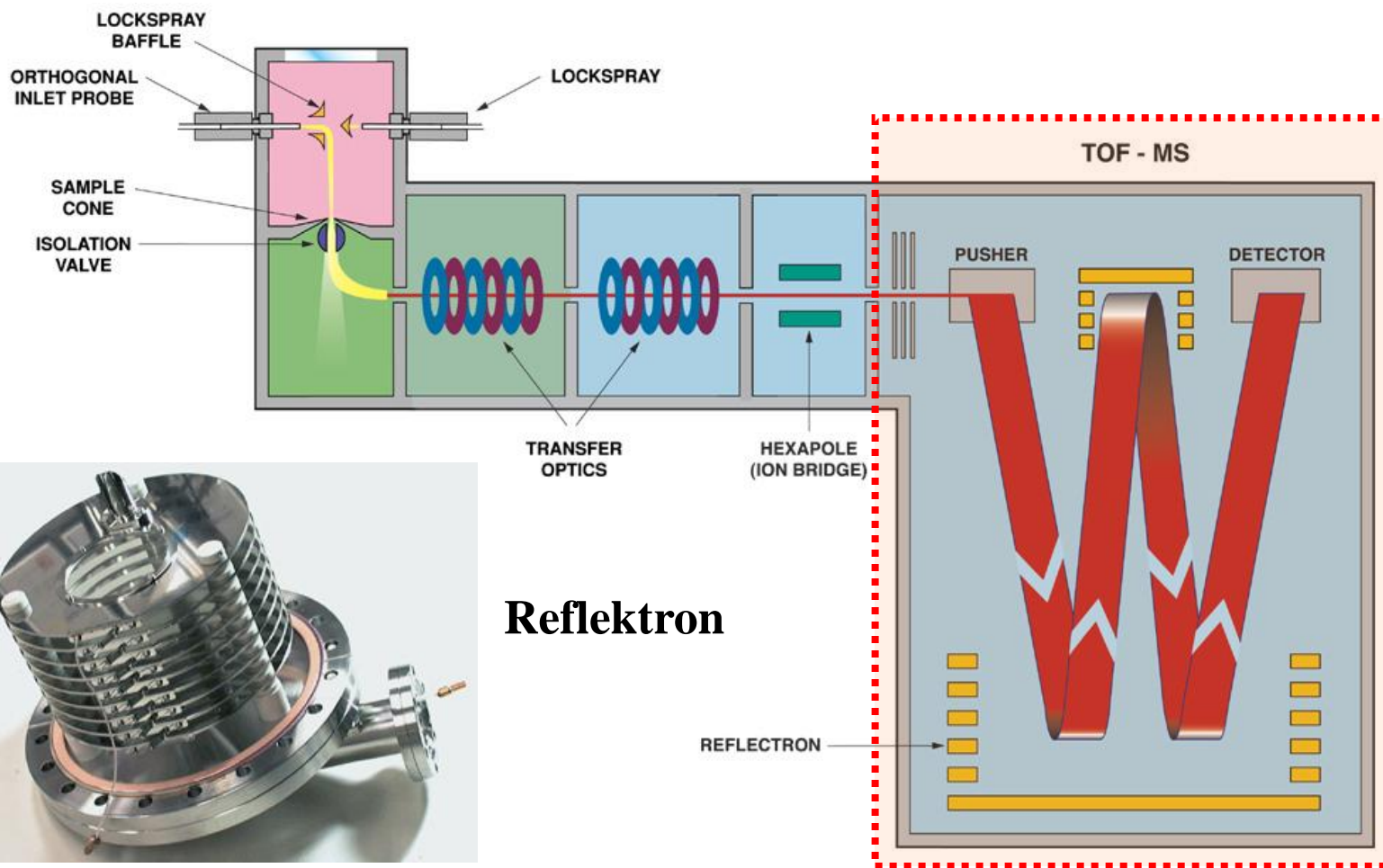
Principy MS analyzátorů

Kvadrupól: c) segmentovaný - lineární iontová past 2D past (IT)



Principy MS analyzátorů

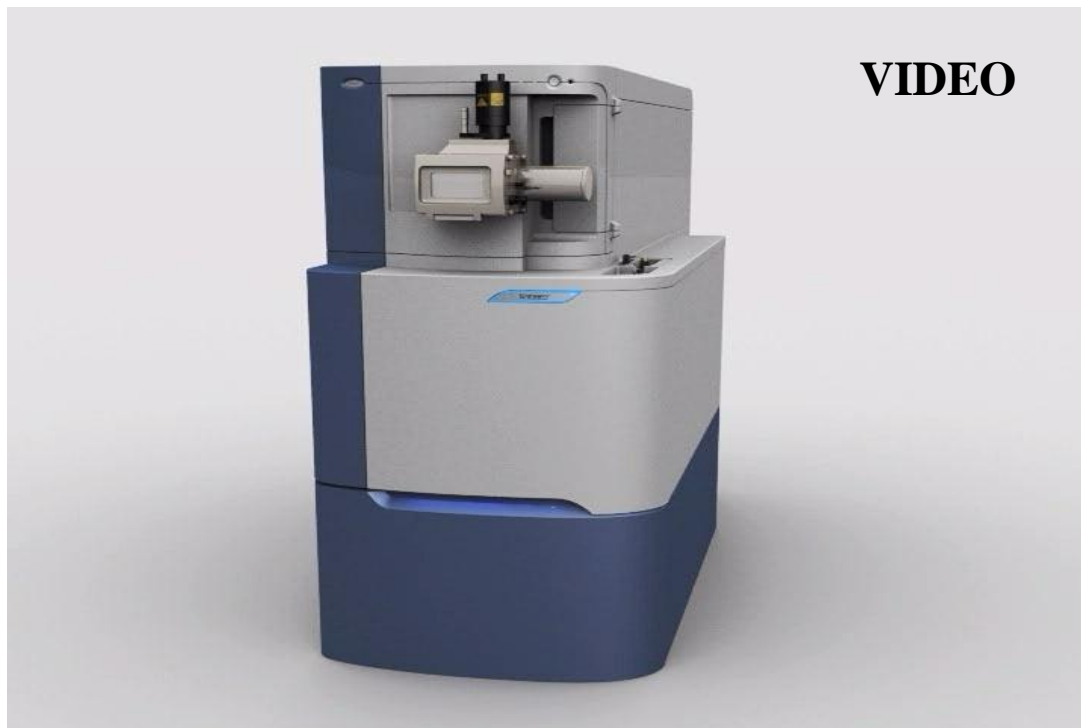
Analyzátor doby letu - Time Of Flight (TOF)



Reflektron

Principy MS analyzátorů

Analyzátor doby letu - Time Of Flight (TOF)



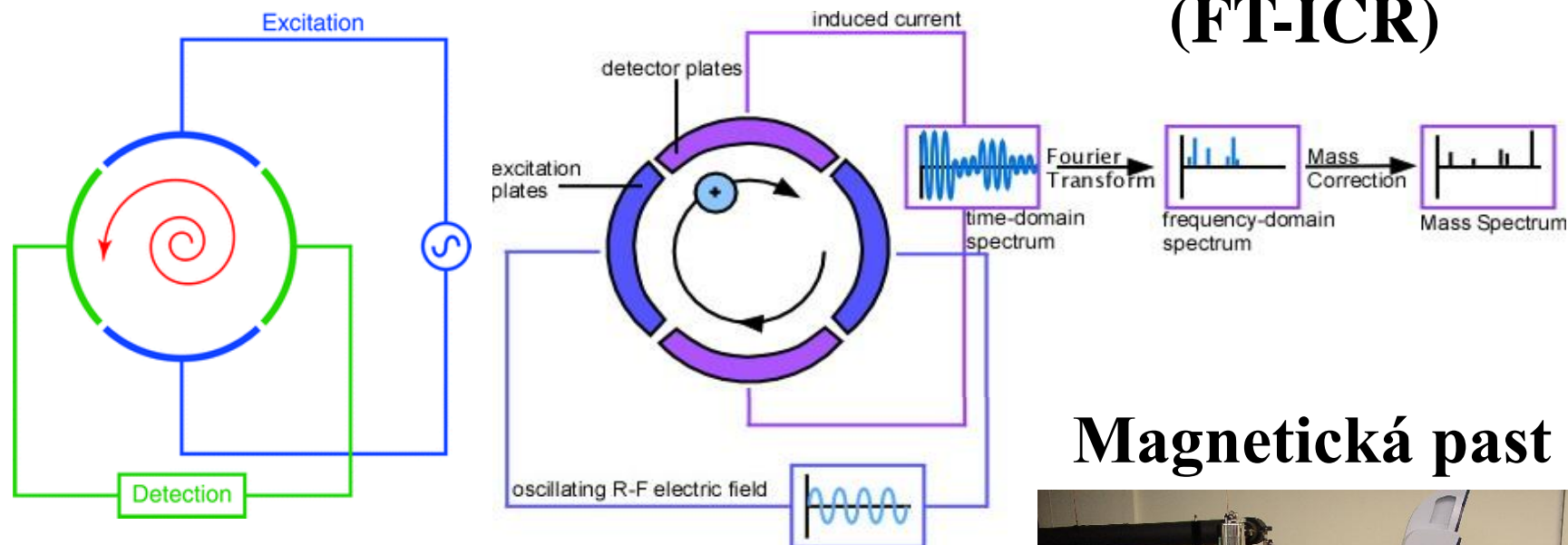
**Ukázka Ion Mobility (Travelling wave)
- TOF MS (s reflektorem)**



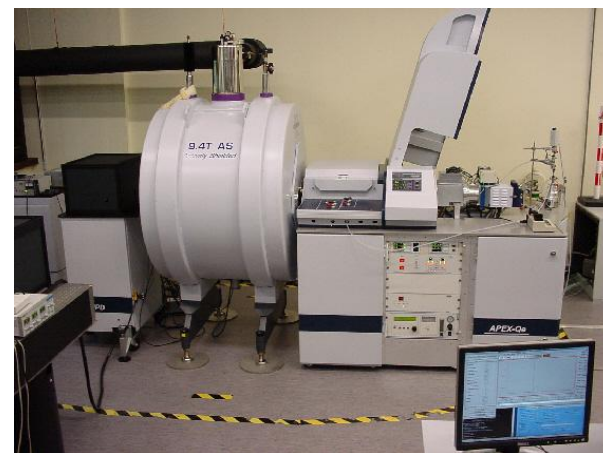
Principy MS analyzátorů

Iontový rezonanční cyklotron s Fourierovou transformací

(FT-ICR)

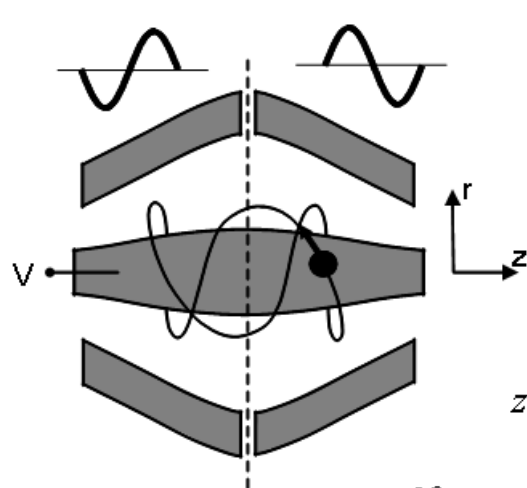


Magnetická past



Principy MS analyzátorů

Elektrostatická orbitální past - ORBITRAP



Undamped harmonic oscillator
(normal operation) $m\ddot{z} + kz = 0$

Forced, undamped harmonic oscillator
at resonance $\omega_{AC} = \omega_0$

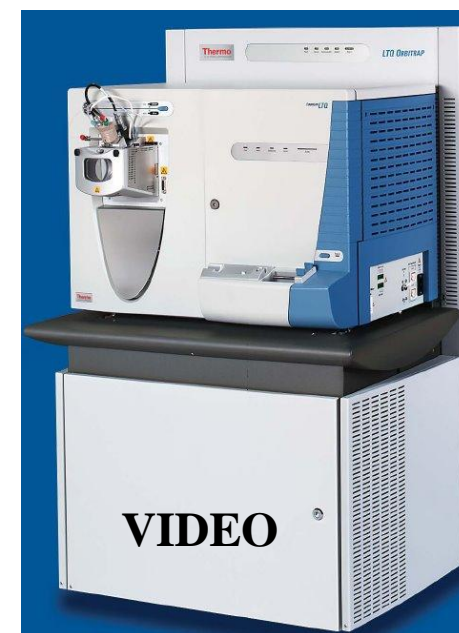
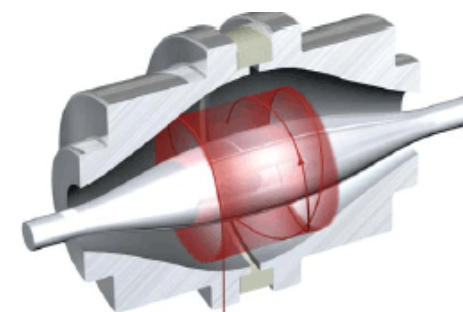
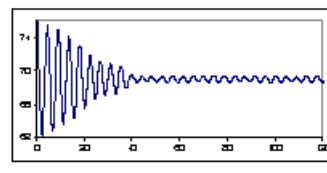
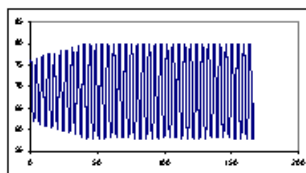
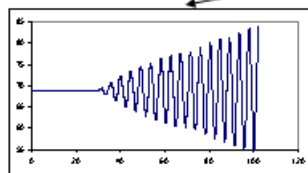
$$m\ddot{z} + kz = F_0 \sin(\omega_0 t)$$

$$z \approx z_0 \cos(\omega_0 t) + \frac{F_0}{2m\omega_0} \cos(\omega_0 t - \varphi)$$

$\varphi = 0^\circ$

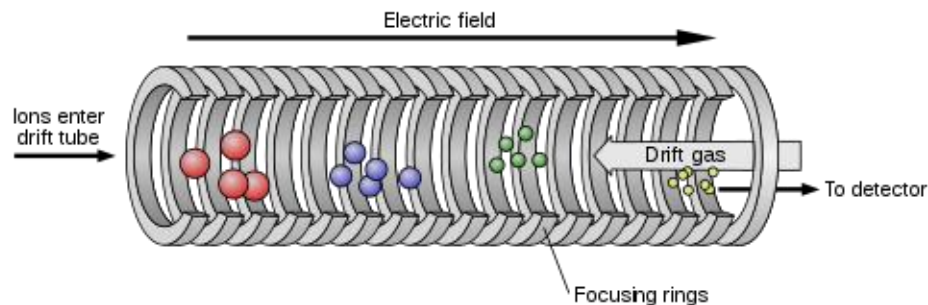
$\varphi = 90^\circ$

$\varphi = 180^\circ$

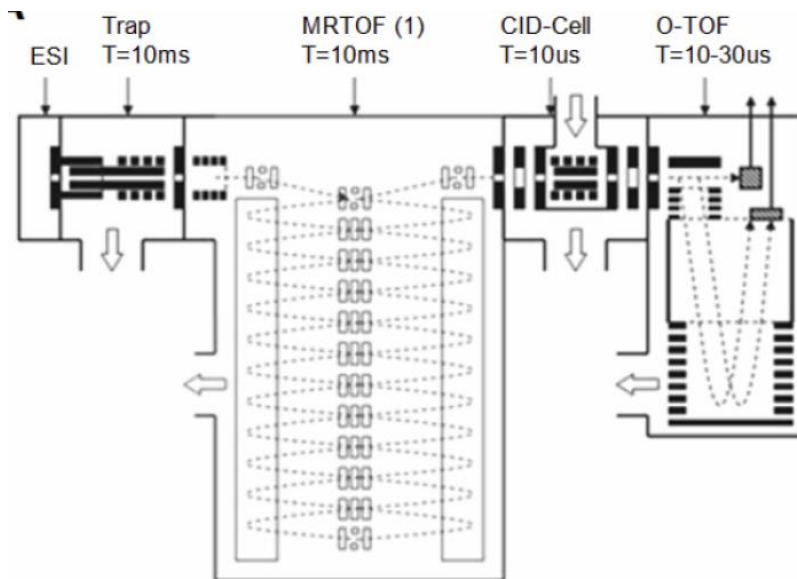


Principy dalších částí MS

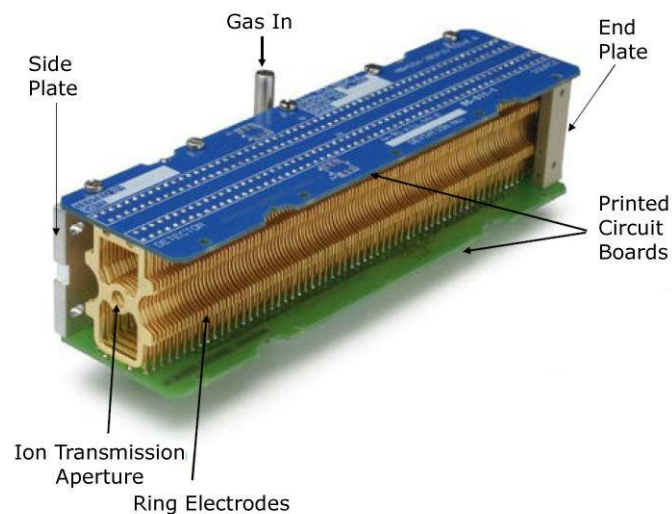
Iontová mobilita



Multireflexní TOF



Cestovní vlna



Porovnání parametrů MS analyzátorů

ANALYZÁTOR	Max. RP FWHM	Správnost <i>ppm</i>	Rozsah <i>m/z</i>	Rychlost skenu	Cena
Magneto-sektorový	10^5	< 5	10^4	nízká	vysoká
Q	10^3	nízká	10^3	střední	nízká
IT	10^3	nízká	10^4	střední	střední
TOF	10^4	< 5	10^4	velmi vysoká	střední
Orbitrap	10^5	< 3	10^3	nízká	vyšší
FT-ICR	10^6	< 1	10^4	nízká	vysoká



Realizace vícestupňové (vícenásobné) MS

➤ vícestupňová nebo vícenásobná hmotnostní analýza
= multistage nebo multiple MS

→ MS/MS = MS² = tandemová MS; MS/MS/MS = MS³

Princip: v prvním stupni vybíráme primární (rodičovské) ionty, které se v kolizní cele rozpadají na sekundární (dceřinné) ionty, které jsou analyzovány v druhém stupni [parent ions → daughter ions]

Technická realizace:

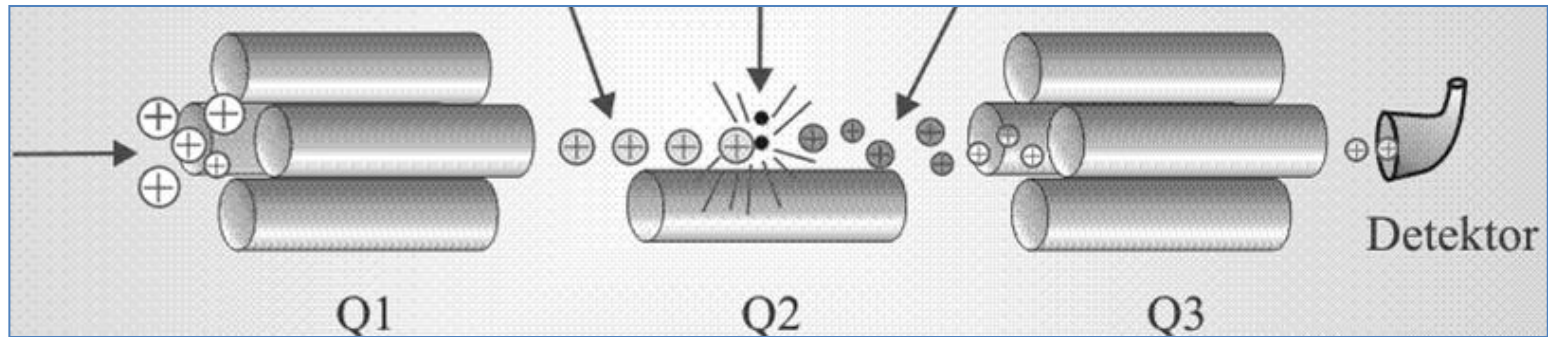
a) **v prostoru** – sériová kombinace stejných nebo různých hmotnostních analyzátorů (QqQ, Q-TOF) (řetězení experimentů v prostoru)

b) **v čase** – probíhá v jednom hmotnostním analyzátoru prostřednictvím časovaných změn parametrů (IT) (řetězení experimentů v čase)

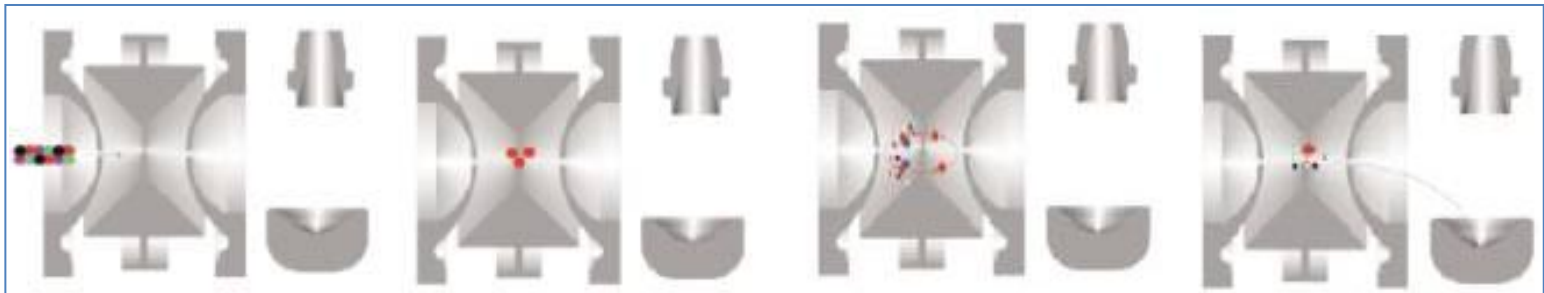


Realizace vícestupňové (vícenásobné) MS

a) MS^2 v prostoru

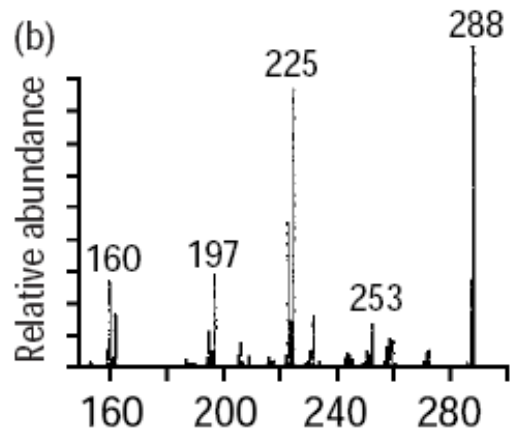
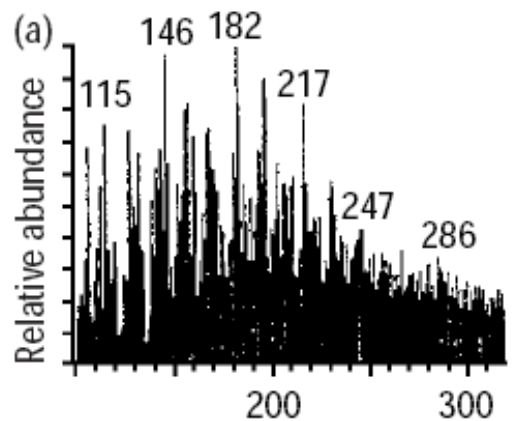
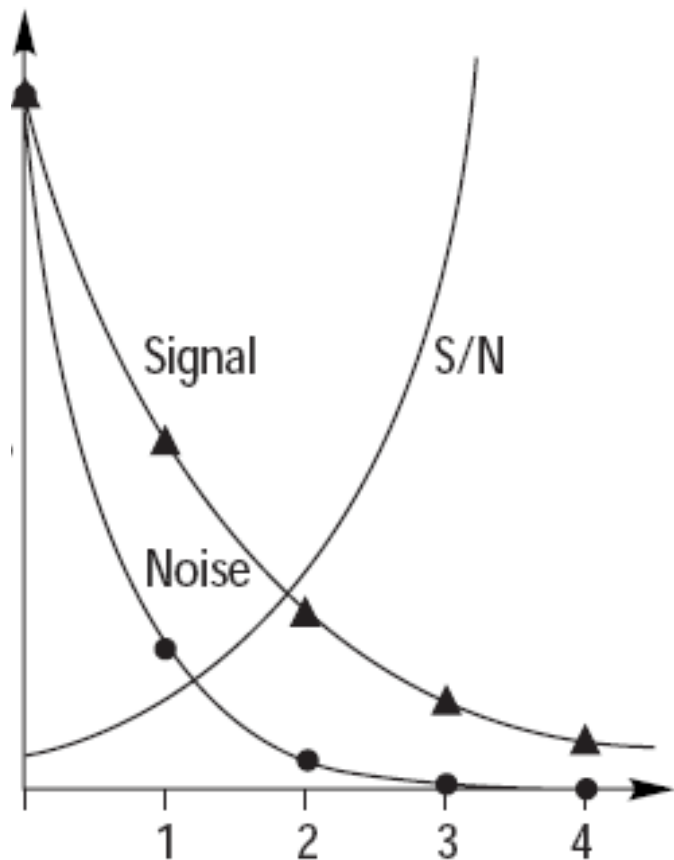


b) MS^2 v čase



Realizace vícestupňové (vícenásobné) MS

Redukce šumu s počtem MS analýz → zvýšení S/N



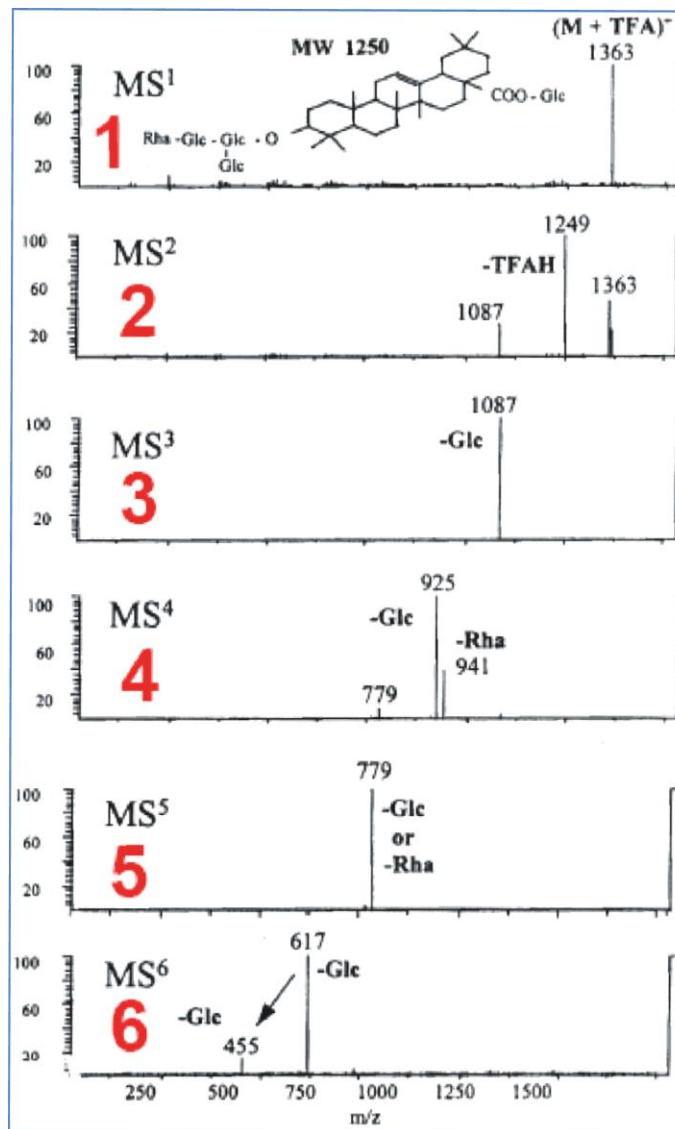
MS¹

MS²



Realizace víceúrovňové (vícenásobné) MS

Postupná fragmentace
v iontové pasti



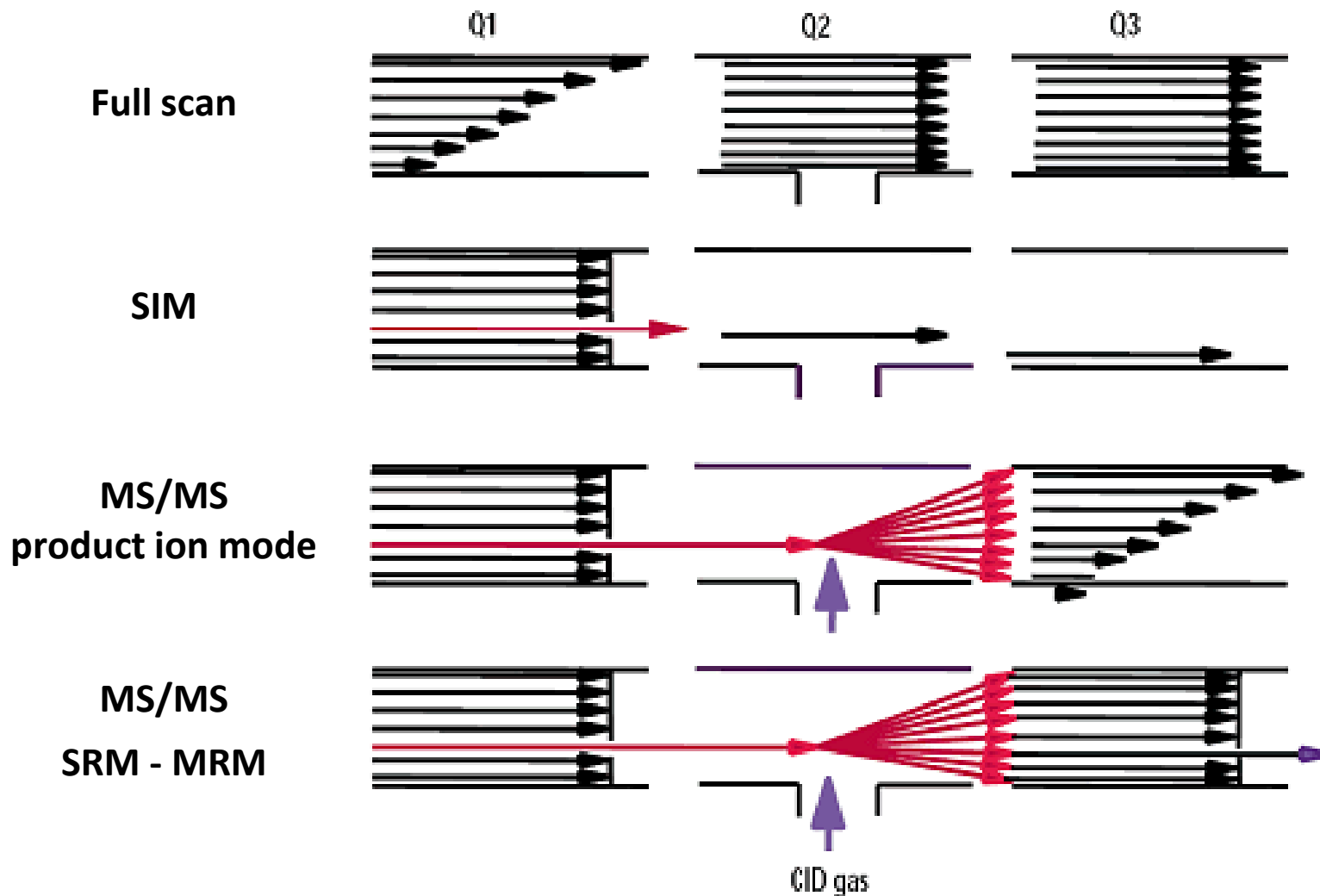
MS¹

MS⁶



Realizace vícestupňové (vícenásobné) MS

Dostupné módy měření při použití tandemové MS



Detekce iontů v MS

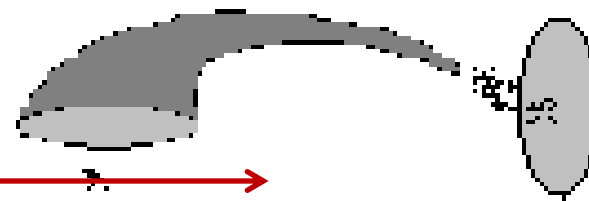
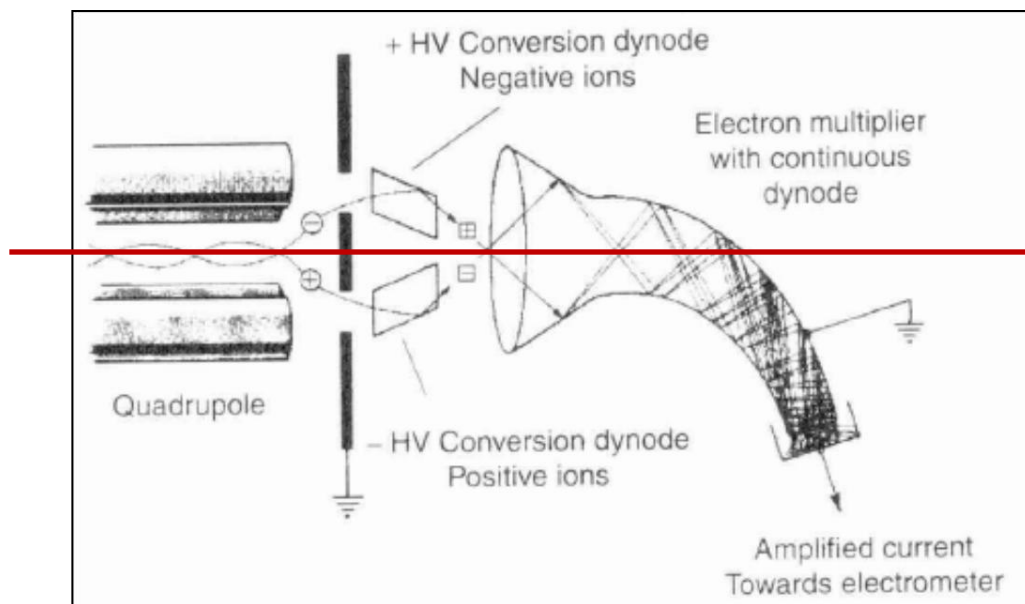
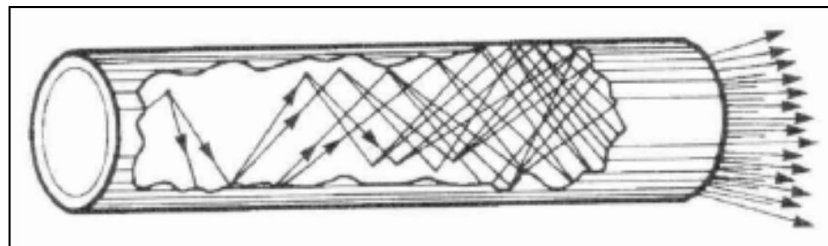
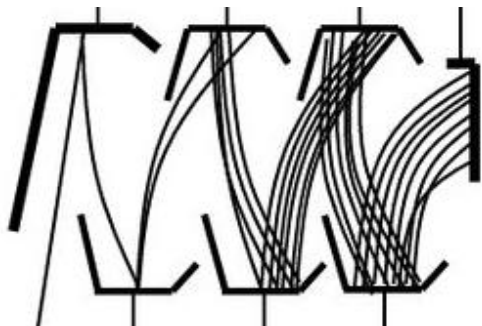
Detektor iontů v MS zaznamenává počty iontů, které projdou hmotnostním analyzátozem

- dopadající ion indukuje elektron(y), jejichž proud se zesiluje dopady na další plochu elektronásobiče (HED - high energy dynodes)
 - a) dynody destičkové
 - b) dynody kontinuální - trubice (přímé, zakřivené)
 - c) dynody paralení - mikrokanálová destička

Parametry: zesílení, životnost, detekce [\pm] iontů, detekce nežádoucích fragmentů,



Detekce iontů v MS



Mikrokanálová destička

