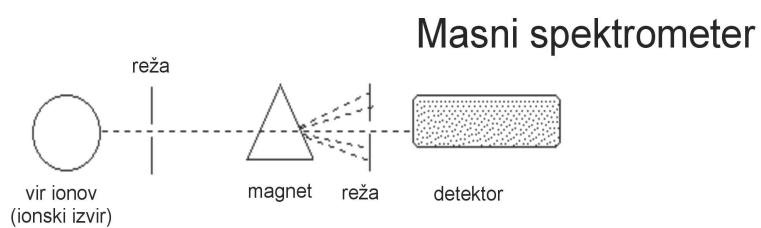
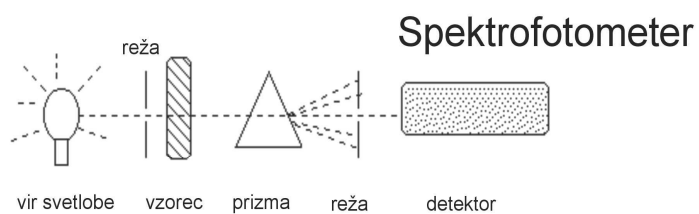


# Analizne metode v karakterizaciji materialov in bioloških sistemov

## Masna spektrometrija, 1. del

### Zakaj spektrometrija?



## Definicija

Masni spektrometer je aparat, ki ločuje ione elementov, molekul ali delov molekul (fragmentov) glede na razmerje med njihovo maso in nabojem ter izmeri množino posameznih ionov. Rezultat tega procesa je masni spekter: množine posameznih ionov kot funkcija razmerja med maso in nabojem ( $m/z$ ).

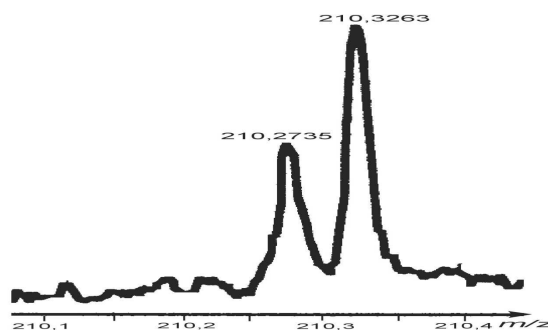
## Kaj je $m/z$ ?

- tudi oznaka  $m/q$  ( $q = ze$ ;  $e = 1,6 \cdot 10^{-19} C$ )
- kot ulomek masnega števila in nabojnega števila je brez enote
- če  $m$  v atomskih masnih enotah (u ali amu = Da, dalton)  $\Rightarrow m/z$  enota thomson - Th

$$u = \frac{1}{12} m(^{12}C) = 1,6605402 \cdot 10^{-27} kg$$

## Masni spekter...

... je zvezni spekter: na  $x$ -osi je  $m/z$ , na  $y$ -osi pa ionski tok. Posamezne ione vidimo kot vrhove pri neki vrednosti  $m/z$  (najvišja točka vrha) in z neko širino ( $\Delta m$  na polovični višini vrha). Na slednjo vpliva predvsem tip masnega analizatorja.



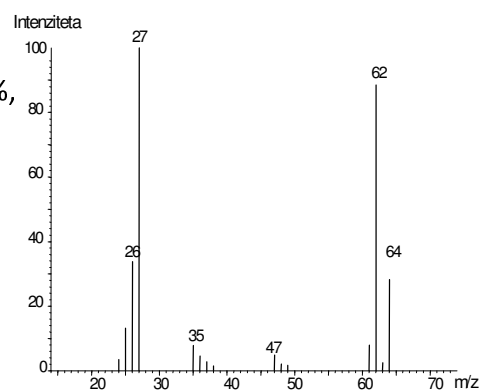
Masne spektre najbolj običajno rišemo kot črtne diagrame (histograme): na  $x$ -osi so  $m/z$  vrednosti, na  $y$ -osi pa (relativne) intenzitete ionov (vsota pri najbližji *nominalni masi*). Relativne intenzitete dobimo

tako, da ionu z največjo intenziteto (*bazni vrh*)

pripišemo vrednost 100 %,

ostale pa potem

normaliziramo nanj.



**Nominalna masa:** seštevek celoštevilčnih mas najbolj pogostega izotopa vsakega elementa.

**Monoizotopska masa:** seštevek točnih mas najbolj pogostega izotopa vsakega elementa.

**Povprečna masa:** seštevek povprečnih atomskih mas elementov.

Element / Spojina	Nominalna <i>m</i>	Monoizotopska <i>m</i>	Povprečna <i>m</i>
ogljik C	12	12,0000	12,0111
vodik H	1	1,0078	1,0080
dušik N	14	14,0031	14,0067
kisik O	16	15,9949	15,9994
fosfor P	31	30,9738	30,9738
žveplo S	32	31,9721	32,0660
tripeptid C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	507	507,1998	507,5476
prašičji inzulin C <sub>256</sub> H <sub>381</sub> N <sub>65</sub> O <sub>76</sub> S <sub>6</sub>	5771	5773,6083	5777,6755

### Naravni izotopski deleži pogostejših elementov

Element	Izotop	<i>M</i> [Da]	Delež [%]	Izotop	<i>M</i> [Da]	Delež [%]	Izotop	<i>M</i> [Da]	Delež [%]
vodik	<sup>1</sup> H	1,007825	99,985	<sup>2</sup> H (D)	2,014102	0,015			
ogljik	<sup>12</sup> C	12,0000	98,89	<sup>13</sup> C	13,003355	1,11			
dušik	<sup>14</sup> N	14,003074	99,634	<sup>15</sup> N	15,000108	0,366			
kisik	<sup>16</sup> O	15,994915	99,762	<sup>17</sup> O	16,999131	0,038	<sup>18</sup> O	17,999160	0,200
žveplo	<sup>32</sup> S	31,972071	95,02	<sup>33</sup> S	32,971457	0,75	<sup>34</sup> S	33,967867	4,21
				<sup>36</sup> S	35,967081	0,02			
fosfor	<sup>31</sup> P	30,973762	100						
silicij	<sup>28</sup> Si	27,976927	92,23	<sup>29</sup> Si	28,976495	4,67	<sup>30</sup> Si	29,973770	3,10
fluor	<sup>19</sup> F	18,998403	100						
klor	<sup>35</sup> Cl	34,968852	75,77	<sup>37</sup> Cl	36,965903	24,23			
brom	<sup>79</sup> Br	78,918336	50,69	<sup>81</sup> Br	80,916289	49,31			
jod	<sup>127</sup> I	126,904473	100						

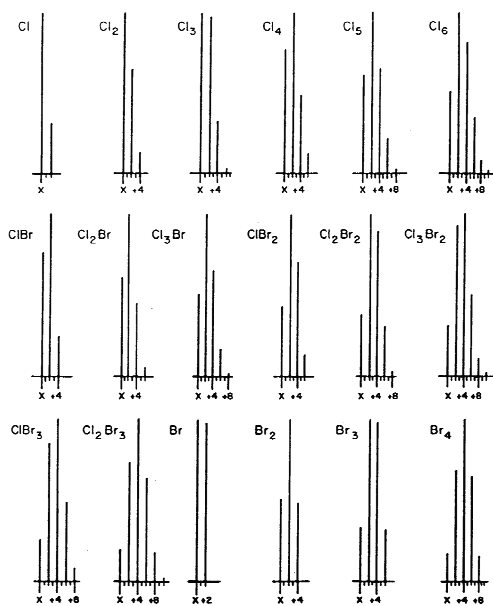
Kako izotope vidimo v masnem spektru?

- “satelitski ioni”, pridruženi ionu z maso najpogostejšega izotopa

Element	Intenziteta $M^+$	Intenziteta $(M+1)^+$	Intenziteta $(M+2)^+$
ogljik	100 %	$1,1 \% \cdot N(C)$	/
dušik	100 %	$0,4 \% \cdot N(N)$	/
kisik	100 %	/	$0,2 \% \cdot N(O)$
silicij	100 %	$5,1 \% \cdot N(Si)$	$3,3 \% \cdot N(Si)$
žveplo	100 %	$0,8 \% \cdot N(S)$	$4,4 \% \cdot N(S)$
klor	100 %	/	$32 \% \cdot N(Cl)$
brom	100 %	/	$97,5 \% \cdot N(Br)$

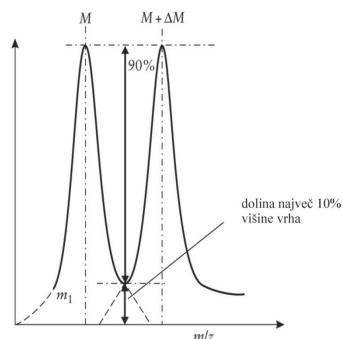
$N(X)$ ... število atomov elementa X v spojini

$M^+$  je oznaka za **molekulski ion** – ion, ki nastane z odcepom  $1 e^-$  iz spojine.



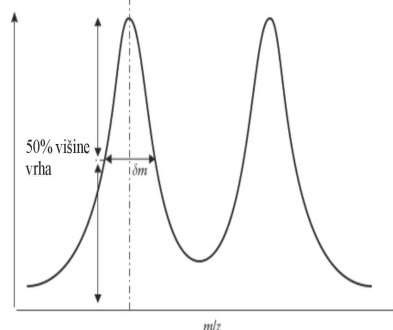
Ločljivost (angl. (*mass*) *resolution power*, *resolution*,  $R$ ) – dve definiciji:

- $\Delta m$  ( $\delta m$ ) je razlika mas dveh sosednjih vrhov, med katerima je največ 10 % dolina



$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{m}{\delta m}$$

- $\Delta m$  ( $\delta m$ ) je širina vrha na 50 % njegove višine

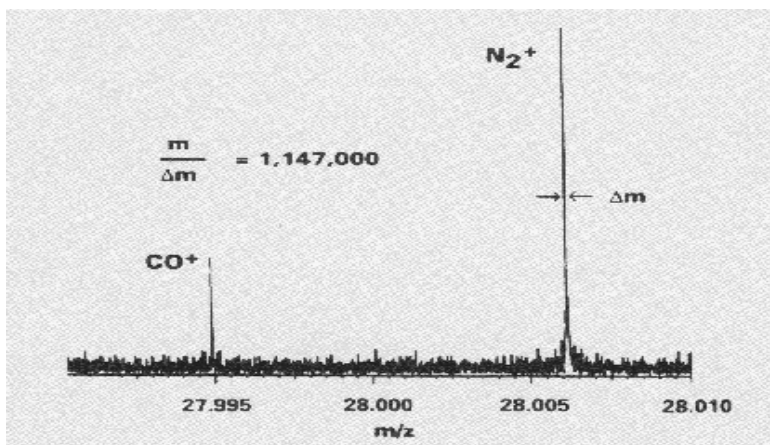


...še o ločljivosti:

- nizka ločljivost: 100-500 (-1000)
- srednja ločljivost: 1000-5000
- visoka ločljivost: nad 10 000 (angl. *high resolution mass spectrometry*, *HRMS*)
- konstantna  $\Delta m$  (npr.  $\Delta m=1$ ; angl. *unit mass resolution*):  $R$  odvisna od  $m/z$   $\Rightarrow$  največji  $R$  pri zgornji meji masnega območja spektrometra
- govorimo še o natančnosti (merilni negotovosti) določitve mase (angl. *accuracy*):

$$\frac{\Delta m}{2 m}$$

## HRMS spekter



Izračun potrebne ločljivosti za primer  $\text{CO}^+$  in  $\text{N}_2^+$ :

$\text{CO}^+$  in  $\text{N}_2^+$ : nominalna masa 28

$\text{CO}^+$ :

$^{12}\text{C}$  12,000000

$^{16}\text{O}$  15,994915

$m = 27,994915$

$\text{N}_2^+$ :

2x

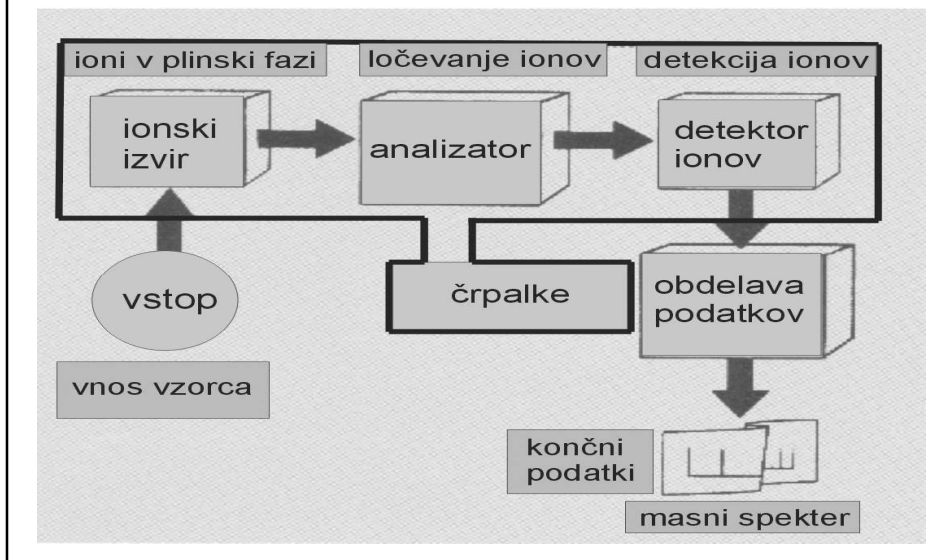
$^{14}\text{N}$  14,003074

$m = 28,006148$

$\Delta m = 0,011233$

$R = 2500$

## Splošna shema masnega spektrometra



## Bistveni procesi v masnem spektrometru

- ionizacija vzorca v ionskem izvoru: ioni molekul in delov molekul (fragmenti) v plinski fazi
- pospešitev ionov
- ločba (separacija) ionov v plinski fazi v masnem analizatorju glede na  $m/z$
- detekcija ionov
- obdelava signala z detektorja: masni spekter



## Zakaj vakuum?

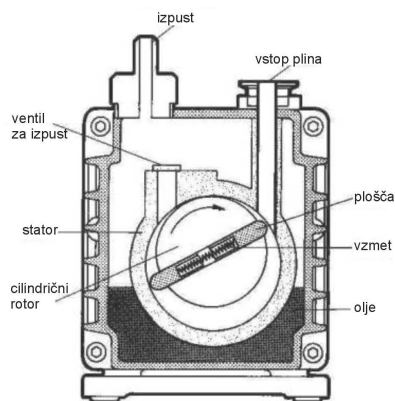
- ioni morajo priti do detektorja, ne da bi vmes trčili ob druge ione ali molekule, sicer:
  - odstopanje od trajektorije  $\Rightarrow$  trki ob stene inštrumenta
  - nezaželene reakcije  $\Rightarrow$  drugačen masni spekter
- srednja prosta pot iona (preden zadene ob drug ion/molekulo):
  - $\geq 1$  m v analizatorju
  - $\approx 0,1$  mm v trkovni celici
- mehanske črpalke: predvakuum do  $10^{-3}$  torr
- turbomolekularne, difuzijske, kriogene črpalke ( $10^{-5}$ - $10^{-10}$  torr) 1 torr  $\approx$  133,3 Pa

$$L = \frac{kT}{\sqrt{2} p \sigma}$$

## Vakuumske črpalke

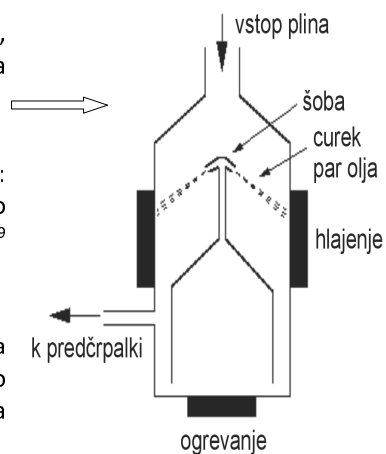
Prva stopnja (predvakuum): mehanske (rotacijske) črpalke

- za delovanje potrebno olje
- kapaciteta pribl. 100 L/min
- doseže vakuum 0,1-10 Pa ( $10^{-3}$ - $10^{-1}$  torr), odvisno od kapacitete



## Druga stopnja: visoki ( $\leq 0,1 \text{ Pa}/10^{-3} \text{ torr}$ ) in ultravisoki vakuum ( $\leq 10^{-5} \text{ Pa}/10^{-7} \text{ torr}$ )

- difuzijske črpalke: potrebno olje, intenzivno (vodno) hlajenje, do  $10^{-6} \text{ Pa}$  ( $10^{-8} \text{ torr}$ ); problem: pare olja
- turbomolekularne črpalke: priljubljene, ker hitro dosežejo polno zmogljivost, brez olja, do  $10^{-7} \text{ Pa}$  ( $10^{-9} \text{ torr}$ )
- kriogene črpalke: potrebujejo za delovanje tekoči helij; omogočajo doseganje najnižjih tlakov do  $10^{-9} \text{ Pa}$  ( $10^{-11} \text{ torr}$ )



## Masni analizator

- loči (separira) v ionskem izviru nastale ione glede na njihovo razmerje  $m/z$
- več izvedb glede na princip delovanja
- pogloblitve lastnosti:
  - masno območje (zgornja meja)
  - transmisija (prenos) ionov
  - ločljivost

## Razdelitev analizatorjev

Statični:

statična električna,  
magnetna polja

Dinamični:

(električno) polje se  
spreminja

---

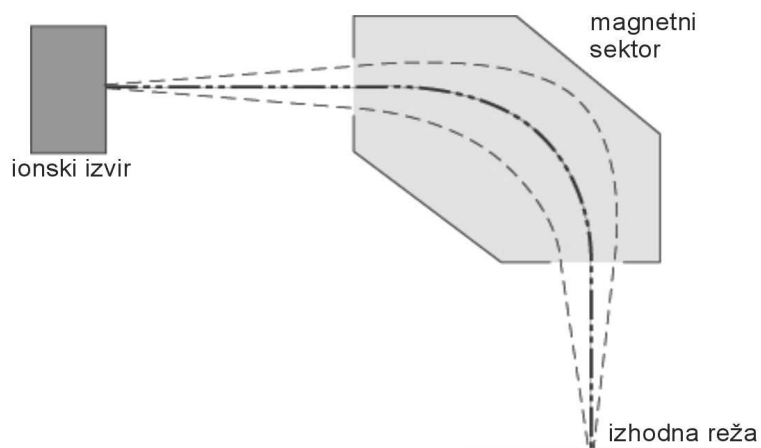
Pregledovalni (angl.  
*scanning*):

zaporedoma prepušča  
ione z določeno  $m/z$  na  
detektor

Zadrževalni (angl.  
*storage*):

v njem se hkrati nahajajo  
ioni vseh  $m/z$  vrednosti

## Magnetni sektor (B)



Ione z neko maso  $m$  in nabojem  $z \cdot e$  pri izstopu iz ionskega izvira pospešimo z napetostjo  $V$ , pri tem dobijo neko kinetično energijo  $E_k$  in vstopijo v magnetno polje s hitrostjo  $v$ :

$$E_k = \frac{m \cdot v^2}{2} = z \cdot e \cdot V \quad (1)$$

Ko prečkajo magnetno polje gostote  $B$  pravokotno na smer polja, nanje deluje centripetalna magnetna (Lorenzova) sila  $F_M$ . Ker je enaka centrifugalni sili ( $F_C$ ), se pot ionov (trajektorija) ukrivi v krožnico s polmerom  $r$ :

$$F_M = z \cdot e \cdot v \cdot B = F_C = \frac{m \cdot v^2}{r} \quad (2)$$

Iz enačb (1) in (2) lahko izpeljemo osnovno enačbo za MS z magnetnim sektorjem:

$$\frac{m}{z} = \frac{e \cdot r^2 \cdot B^2}{2 \cdot V} \quad (3)$$

Če je torej  $r$  fiksni (npr. položaj detektorja) in pospeševalna napetost  $V$  konstantna, bo vrednost  $m/z$  ionov, ki pridejo na detektor, odvisna le od gostote magnetnega polja  $B$ . S spreminjanjem  $B$  torej na detektor zaporedoma dobimo ione z različnimi  $m/z$ . Lahko bi spreminjali pospeševalno napetost  $V$ , vendar je to manj praktično.

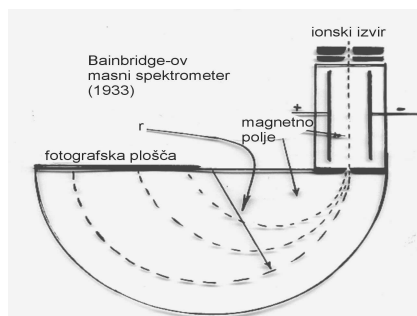
Enačbo (2) lahko preuredimo:  $m \cdot v = z \cdot e \cdot B \cdot r \quad (4)$

Pri nekem  $B$  bodo vsi ioni z enakim nabojem in enako gibalno količino ( $m \cdot v$ ) imeli enak  $r$ . Magnetni analizator torej ločuje ione glede na *gibalno količino*.

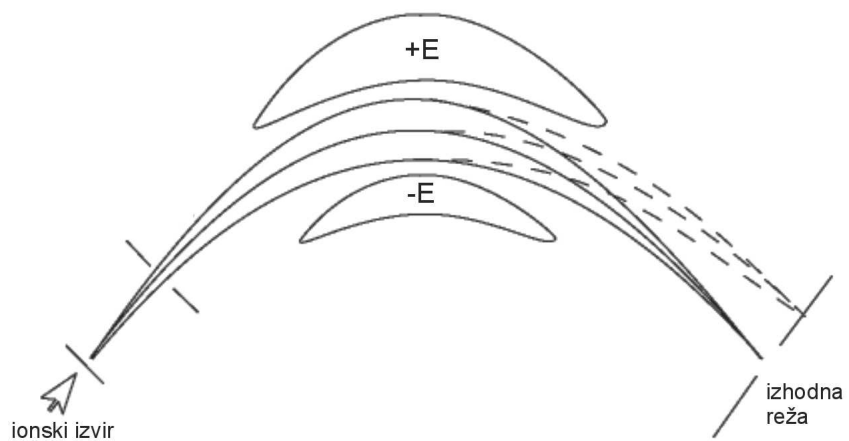
Iz kombinacije enačb (1) in (2) lahko izpeljemo še:

$$r = \frac{1}{B} \sqrt{\frac{2 \cdot m \cdot V}{z \cdot e}} = \frac{\sqrt{2 \cdot m \cdot E_k}}{z \cdot e \cdot B} \quad (5)$$

Razvidno je, da bodo pri enakih  $B$  in  $V$  ioni z različnimi  $m/z$  imeli različne radije  $r$ . Vse ione hkrati lahko detektiramo s t.i. *disperzijskimi* masnimi spektrometri, kjer je detektor fotografska plošča (nekadaj) ali detektorska plošča s (foto)diodami.



## Elektrostatski sektor (ESA, E)



Smer ionov, ki vstopijo v radialno elektrostatsko polje (valjasti kondenzator), je pravokotna na smer električnega polja intenzitete  $E$ . Ioni imajo zaradi začetne pospešitve z napetostjo  $V$  neko hitrost  $v$  in kinetično energijo  $E_k$ . Elektrostatska sila  $F_{ESA}$  ukrivi njihovo pot v krožnico s polmerom  $r$ , uravnoteža pa jo centrifugalna sila:

$$F_{ESA} = z \cdot e \cdot E = \frac{m \cdot v^2}{r} \quad (6)$$

Če enačbo preuredimo in uporabimo še enačbo (1), dobimo:

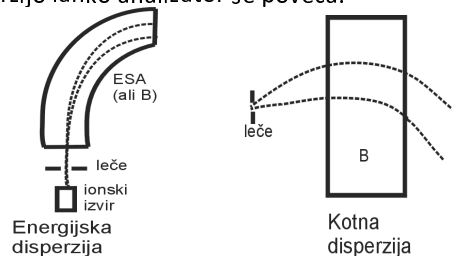
$$r = \frac{2 \cdot E_k}{z \cdot e \cdot E} = \frac{2 \cdot V}{E} \quad (7)$$

Elektrostatski sektor torej ločuje ione glede na kinetično energijo, tirnica ionov je neodvisna od njihove mase. ESA (ali E) praktično nikoli ni v uporabi kot samostojni masni analizator, temveč le v kombinaciji z magnetnim sektorjem.

## Disperzija ionov

Čeprav so vsi ioni pri izhodu iz ionskega izvora pospešeni z isto napetostjo  $V$ , pa so tik pred pospešitvijo različno oddaljeni od pospeševalnih leč, zato se njihove  $E_k$  nekoliko razlikujejo. Spomnimo se na drugi del enačbe (5). Iz njega je razvidno, da bodo ioni z enakim razmerjem  $m/z$  imeli v magnetnem polju različne radije, če imajo različno kinetično energijo. To imenujemo *energijska disperzija*. Prav tako iz enačbe (7) vidimo, da do nje pride tudi v elektrostatskem sektorju.

Drugi problem je *kotna disperzija* ionov. Ioni, ki zapuščajo ionski izvor, se gibljejo proti analizatorju (smer  $z$ ), nekateri pa nekoliko tudi v smeri  $x$  in  $y$ . To disperzijo lahko analizator še poveča.



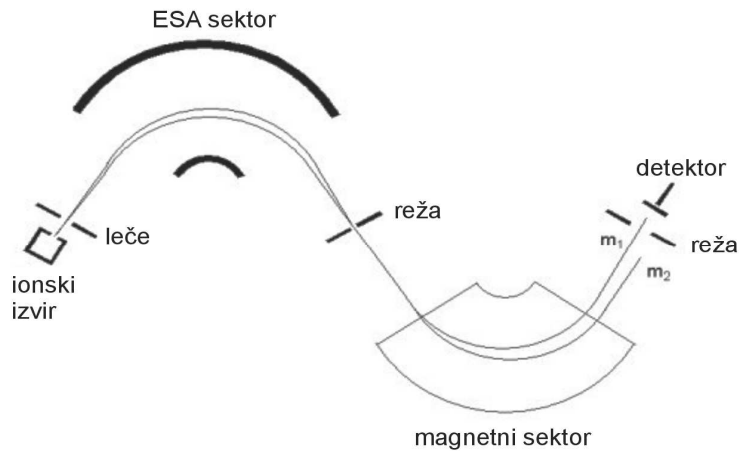
## Dvojno fokusiranje

Zaradi disperzije je ločljivost analizatorja zmanjšana. Problem odpravimo s t.i. *dvojnim fokusiranjem* s kombinacijo B in E sektorja: masni spektrometer visoke ločljivosti (HRMS).

V magnetnem polju je radij  $r$  nekega iona neodvisen od hitrosti  $v$ , s katero se giblje pravokotno na smer polja - enačba (5). Enako velja za ion v elektrostatskem polju - enačba (7). Ker imajo enak  $r$ , lahko za ione iste  $m/z$  ne glede na njihovo kotno disperzijo s primerno geometrijo magnetnega ali ESA sektorja dosežemo, da konvergirajo v isto točko - *smerno fokusiranje*.

Če kombiniramo dva sektorja (B in E) z enako energijsko disperzijo, bo disperzijo prvega sektorja korigirala konvergenca drugega. Na ta način dosežemo tudi *energijsko fokusiranje*.

## Inštrument z dvojnim fokusiranjem

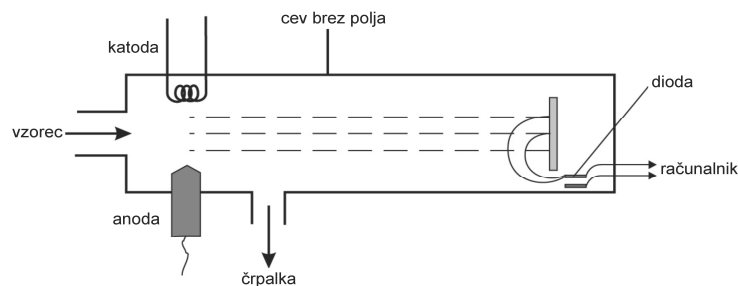


## Lastnosti sektorskih MS z dvojnim fokusiranjem

- običajna postavitev je ESA pred B (angl. *forward geometry*, EB), obratno je potem "*reverse geometry*" (BE)
- visoka ločljivost, vendar konstantna po celem masnem območju  $\implies \Delta m$  se spreminja z  $m \implies$  pri nižjih masah zazna proporcionalno manj ionov kot pri višjih (masna diskriminacija)  $\implies$  rešitev: različen čas zadrževanja glede na maso
- potrebna visoka pospeševalna napetost, posledično tudi visok vakuum v ionskem izviro
- kako povečati masno območje: višji  $B$  (odvisno od zlitine magneta) ali večji  $r \implies$  daljša žariščna razdalja in večji inštrument; novejša rešitev: nehomogena magnetna polja

## Analizator na čas preleta, TOF

TOF analizator (angl. *time of flight*) ločuje ione glede na čas, v katerem preletijo področje brez polja (angl. *field-free region*). TOF v dokaj preprosti izvedbi (linearni TOF - cev brez polja) je nastal okrog l. 1950, a predvsem zaradi slabe ločljivosti ( $R = 100-500$ ) ni zaživel. Z znatnimi izboljšavami se je v zadnjih 20-ih letih uvrstil med HRMS, njegova prednost je praktično neomejeno masno območje.



Pri linearnem TOF analizatorju ione pospešimo z napetostjo  $V$ , da dobijo neko kinetično energijo - velja enačba (1). Ioni imajo hitrost  $v$ , s katero preletijo razdaljo  $d$  v cevi brez polja:

$$t = \frac{d}{v} \quad (8)$$

Kombinacija enačbe (1) in (8) nam da:

$$\frac{m}{z} = t^2 \cdot \frac{2 \cdot e \cdot V}{d^2} \quad (9)$$

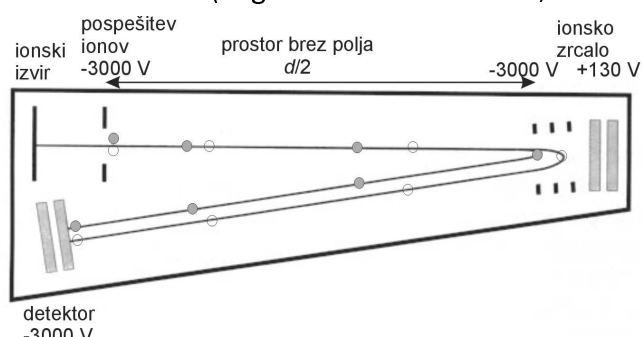
Ker je vse ostalo konstantno, lahko  $m/z$  določimo iz časa preleta  $t$ . Lažji ioni hitreje preletijo cev.

Problem linearnega TOF je slaba ločljivost, do katere pride zaradi disperzije  $t$  za ione iste  $m/z$ . Ta je predvsem posledica porazdelitve začetne kinetične energije ionov. Preprosta rešitev je podaljšanje  $d$  na 1-2 m, kar pa ni praktično.



## Pristopi k boljši ločljivosti TOF

- fokusiranje na časovni zamik (angl. *time-lag focusing*, TLE)  
- drugi imeni oz. različici sta zakasnela pulzna ekstrakcija (angl. *delayed pulsed extraction*, DPE ali DE) ter pulzna ekstrakcija ionov (angl. *pulsed ion extraction*, PIE)
- reflekttron (angl. *reflectron*) - druga imena so reflektor ionov (angl. *ion reflector*), ionsko zrcalo (angl. *ion mirror*), elektrostatsko zrcalo (angl. *electrostatic mirror*)

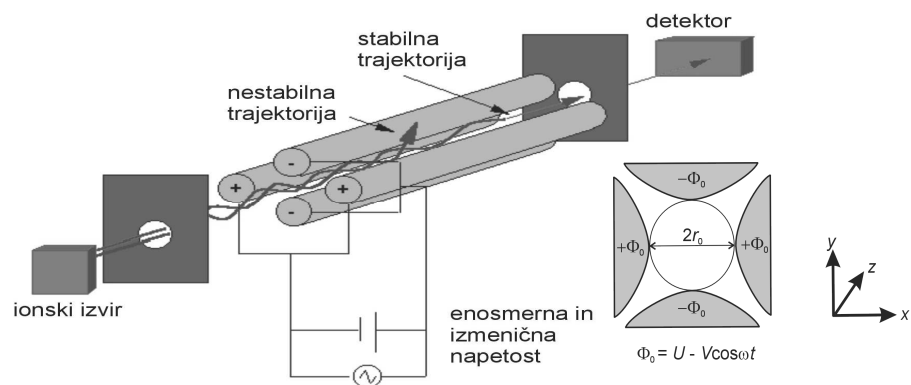


## Lastnosti modernih TOF

- najbolj kompatibilni s pulznimi ionizacijskimi tehnikami (npr. MALDI); pri kontinuirnih ionizacijah potrebna vmesna "past", od koder v pulzih ekstrahiramo ione v cev brez polja (pravokotna postavitev)
- natančnost določitve mase do 200 ppm, ločljivost 1500 - 20 000
- zgornja meja masnega območja nad 300 000 Da
- 100 % transmisija ionov

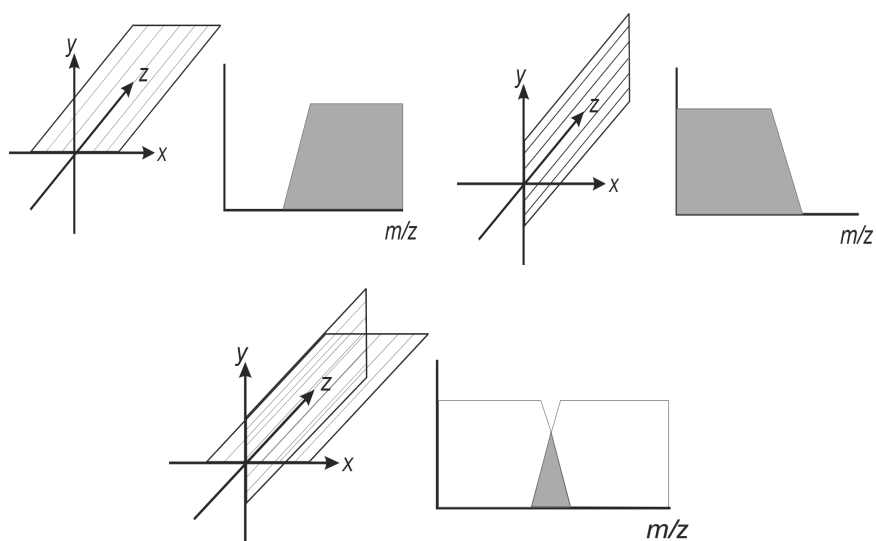
## Kvadrupolni analizator, Q

Štiri vzporedne palice (idealna je hiperbolična oblika): po dve nasprotni enako nabiti (enosmerna napetost  $U$ ), na vseh še izmenična napetost  $V\cos\omega t$



## Kvalitativni opis delovanja kvadrupolnega analizatorja

(Miller, Denton, J. Chem. Educ. 63, 1986, 617-622)



Gibanje ionov (v smereh  $x$  in  $y$ ) v kvadrupolu opišemo z diferencialnimi enačbami:

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \frac{2ze}{mr_0^2}(U - V \cos \omega t)x = 0 \quad (10) \quad \frac{d^2y}{dt^2} - \frac{2ze}{mr_0^2}(U - V \cos \omega t)y = 0 \quad (11)$$

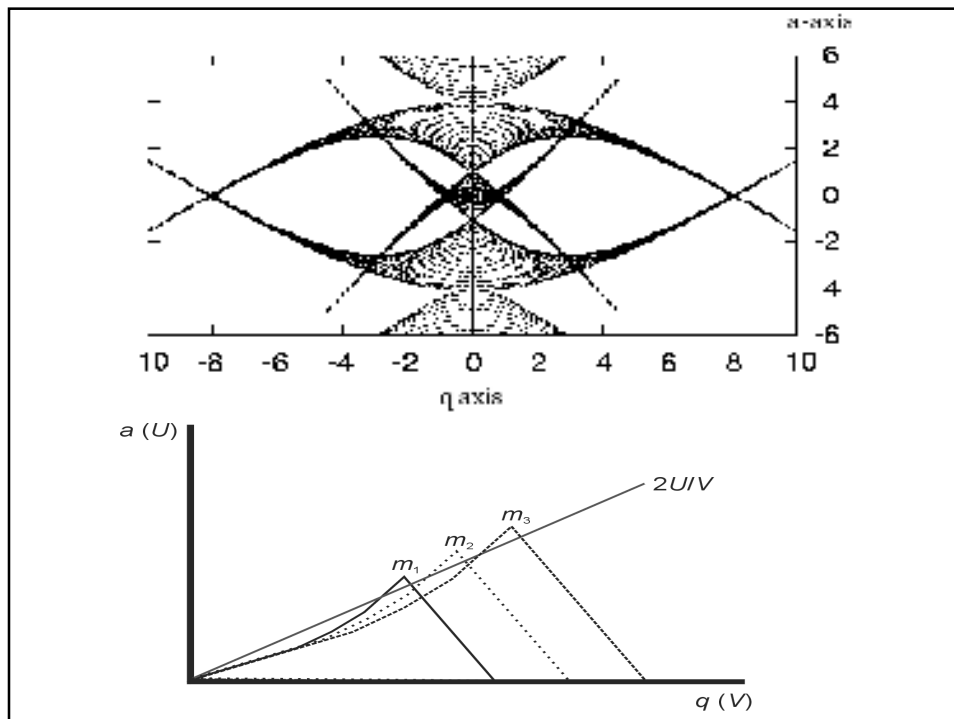
Uvedemo nove spremenljivke ( $u$  je  $x$  ali  $y$ ):

$$a_u = a_x = -a_y = \frac{8zeU}{m\omega^2 r_0^2} \quad (12) \quad q_u = q_x = -q_y = \frac{4zeV}{m\omega^2 r_0^2} \quad (13) \quad \xi = \frac{\omega t}{2} \quad (14)$$

Če v enačbi (10) in (11) vstavimo nove spremenljivke  $a$ ,  $q$  in  $\xi$ , dobimo t.im. *Mathieu*-jevo enačbo:

$$\frac{d^2u}{d\xi^2} + [a_u + 2q_u \cos 2\xi]u = 0 \quad (15)$$

Rešitve te enačbe lahko predstavimo kot  $a$ - $q$  diagrame, iz katerih je razvidno, pri katerih vrednostih  $a$  in  $q$  bodo ioni imeli stabilne trajektorije skozi kvadrupolni analizator.



## Lastnosti kvadrupolnih analizatorjev

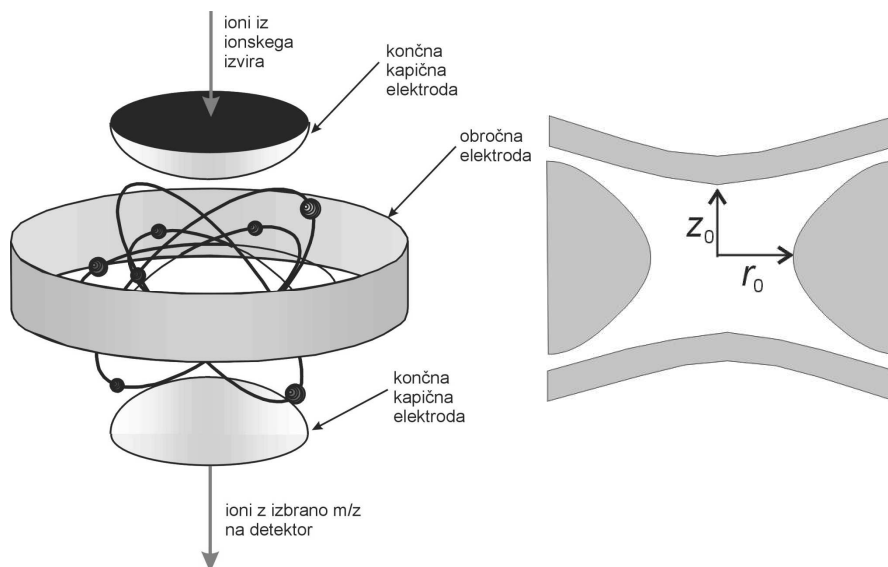
### Prednosti:

- teoretično masno območje do  $m/z$  4000
- zelo hitro pregledovanje  $m/z$  območja (*scan*) - do 1000 Th/s, torej zelo primerni za sklopitev z GC
- neodvisni od  $E_k$  ionov
- nizki pospeševalni potenciali, zato dopušča slabši vakuum v ionskem izviru
- dokaj poceni

### Slabosti:

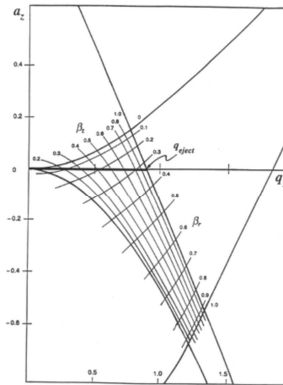
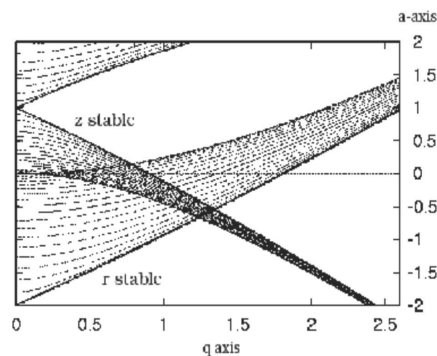
- v praksi masno območje nižje (do  $m/z$  1000-2000)
- konstantna  $\Delta m=1$  ("unit mass resolution"), torej ločljivost odvisna od  $m/z$  in omejena z masnim območjem
- transmisija ionov precej nižja kot pri večini drugih analizatorjev

## Ionska past, IT; Quistor



Ionska past je v bistvu kvadrupol, "zavihan sam vase". Gibanje ionov tudi tu opišemo z diferencialnimi enačbami, ker pa je krožno, uporabimo koordinate  $z$  in  $r$ . Z uvedbo novih spremenljivk  $a$ ,  $q$  in  $\xi$  prav tako kot pri linearnem kvadrupolu dobimo Mathieu-jeve enačbe.

Rešitev teh enačb zahteva uvedbo imaginarne funkcije s parametroma  $\alpha$  in  $\beta$ . Ioni imajo stabilne trajektorije znotraj IT pri vrednosti parametrov  $\alpha=0$  in  $0<\beta<1$ .



### Delovanje ionske pasti:

- ione bodisi uvedemo v IT iz ionskega izvora ali pa jih tvorimo v IT z injiciranjem curka elektronov
- ioni različnih  $m/z$  se zadržujejo v IT. Masna analiza poteka tako, da zaporedno izvržemo posamezne ione s spreminjanjem izmenične napetosti  $V$  pri stalni frekvenci (izvržba pri meji stabilnosti; angl. *ejection at the stability limit*)
- drugi način masne analize je z resonančno izvržbo (angl. *resonant ejection*): tu spreminjamo tudi frekvenco izmenične napetosti. Ionom, ki pridejo v resonanco, se bo amplituda oscilacij povečala in bodo zapustili IT pri nižji vrednosti  $V$ , kot bi sledila iz stabilnostnega diagrama. Ta način omogoča razširitev masnega območja ionske pasti.
- samo polovica izvrženih ionov pride na detektor, druga polovica se nevtralizira na nasprotni kapični elektrodi
- trajektorije ionov v IT bi se večale zaradi medsebojnega odboja; ta efekt omejimo s prisotnostjo He v pasti (tlak v pasti pribl.  $0,1 \text{ Pa}/10^{-3} \text{ torr}$ )

## Lastnosti ionske pasti

### Prednosti:

- masno območje do  $m/z$  4000
- nizke meje zaznave
- hitro pregledovanje  $m/z$  območja (*scan*), zato primerni za sklopitev z GC
- dopušča slabši vakuum v ionskem izviri, niso potrebne visoko zmogljive črpalke
- majhen in priročen

### Slabosti:

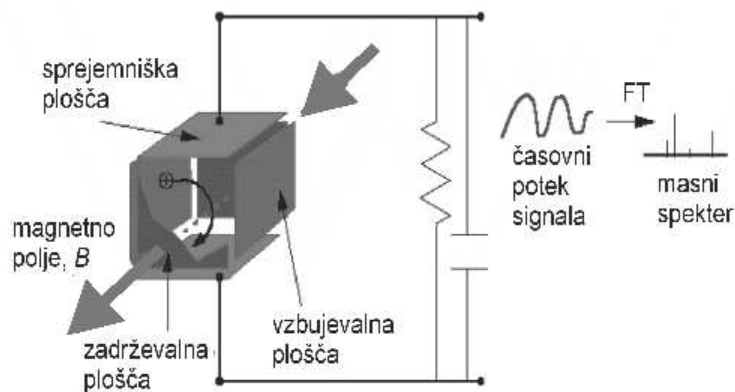
- v praksi masno območje nižje
- problem prostorskega naboja (angl. *space charge effect*): če je v ionski pasti preveč ionov, pride do zamika stabilnostnih diagramov in posledično napak v odčitavanju  $m/z$ ; rešitev: omejeno število ionov v IT (npr. "*automatic gain control*")
- transmisija: polovica ionov

## Linearna ionska past, LIT

V bistvu linearni kvadrupolni analizator, ki na začetku in koncu "zaprt" z dodatnimi elektrodami. Ione izvržemo skozi končno elektrodo ali med palicami kvadrupola (postavitev detektorja). Prednost pred 3D-IT: zaradi večje prostornine širše dinamično območje in nižje meje zaznave.



## MS na osnovi ionske ciklotronske resonance s Fourierjevo transformacijo, FT ICR MS



Za razlago delovanja ICR MS inštrumenta se najprej spomnimo, kaj se dogaja ionu s hitrostjo  $v$ , maso  $m$  in nabojem  $z$  v magnetnem polju jakosti  $B$ :

$$F_M = z \cdot e \cdot v \cdot B = F_C = \frac{m \cdot v^2}{r} \quad (2)$$

V ICR celici se bo torej ion gibal po krožnici s polmerom  $r$ , pravokotni na smer magnetnega polja ( $x$ - $y$  ravnina), v smeri  $z$  je njegovo gibanje omejeno samo zaradi enako nabitih zadrževalnih plošč (angl. *trap plate*). Ion kroži s frekvenco  $\nu$  oziroma s kotno frekvenco  $\omega$ , ki jo imenujemo ciklotronska frekvenca iona:

$$\omega = 2\pi\nu = \frac{v}{r} \quad (16)$$

Iz enačb (2) in (16) izrazimo ciklotronsko frekvenco:

$$\omega = \frac{z \cdot e \cdot B}{m} \quad (17)$$

Vidimo, da je  $\omega$  neodvisna od začetne hitrosti oz. kinetične energije iona. Fokuscija torej ni potrebna, ločljivost pa lahko izrazimo:

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{\omega}{\Delta \omega} \quad (18)$$

Iz enačbe (16) je tudi razvidno, da je polmer krožnice ionov odvisen od njihovega  $m/z$  razmerja in od  $B$ .

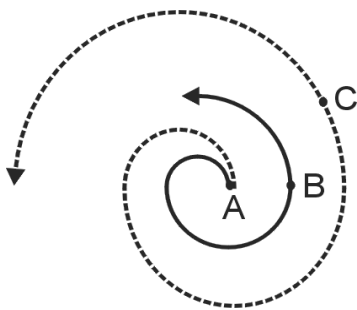
Primer: pri sobni temperaturi in  $B = 3 \text{ T}$  imajo ioni z  $m/z$  10 000 Da polmer krožnice 1 cm.

Ioni iste  $m/z$  se sicer gibljejo po enakih krožnicah, vendar nekoherentno. Če jih preko vzbujevalnih plošč (angl. *emitter plate*) vzbujamo za čas  $T_{\text{exc}}$  z izmeničnim električnim poljem njim lastne frekvence in maksimalne jakosti  $E_0$ , bodo absorbirali električno energijo in jo pretvorili v kinetično energijo, zaradi česar se bodo pričeli koherentno gibati po krožnici večjega radija:

$$r' = \frac{E_0 T_{\text{exc}}}{2 B} \quad (19)$$

Odvisnost  $r'$  iona od  $E_0$  in/ali  $T_{\text{exc}}$ :

- A -  $E_0/T_{\text{exc}} = 0$
- B - srednje velika  $E_0/T_{\text{exc}}$ ,  $r'$  končen in manjši od dimenzij celice
- C - velika  $E_0/T_{\text{exc}}$ ,  $r'$  večji od dimenzij celice, zato ion zadene ob plošče in se nevtralizira

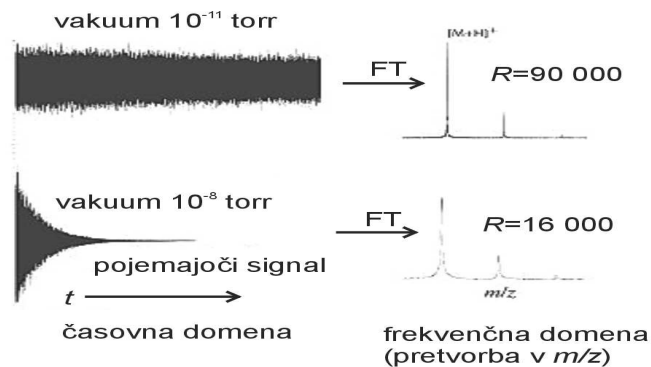




Iz enačbe (19) je razvidno, da  $r'$  ni več odvisen od  $m/z$  iona. Če torej vzbudimo vse ione hkrati s t.im. "širokopasovnim" (angl. *broadband*) izmeničnim poljem, bodo ioni različnih  $m/z$  krožili po krožnici enakega polmera, vendar še vedno s sebi lastno ciklotronsko frekvenco.

Koherentno gibanje "paketa" ionov iste  $m/z$  (angl. *ion package*) med dvema sprejemniškima ploščama (angl. *receiver plate*) inducira na njih izmenični naboj oz. zrcalni tok (angl. *image current*), ki je sorazmeren številu ionov iste  $m/z$ . Preko upora to prevedemo v izmenično napetost. Merimo hkrati napetosti, nastale zaradi ionov v vsem območju  $m/z$ , in dobimo kompleksen časovno odvisen signal (signal v časovni domeni).

Zaradi dušenja se ioni polagoma vrnejo na svoj osnovni radij kroženja. Vzbujanje ionov in merjenje signala lahko večkrat ponovimo. Signal v časovni domeni (funkcija v odvisnosti od časa) s Fourierjevo transformacijo pretvorimo v signal v frekvenčni domeni (funkcija v odvisnosti od frekvence), ki ga je mogoče preračunati (enačba (17)) v masni spekter.



## Lastnosti FT ICR masnih spektrometrov

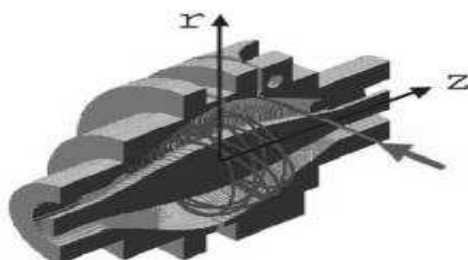
### Prednosti:

- hkratna detekcija ionov vseh  $m/z$
- enostavno je odstraniti šum, izboljšati ločljivost
- izjemna ločljivost (do 100000)
- masno območje do  $m/z$  10000 Da

### Slabosti:

- potreben zelo visok vakuum, močni magneti ( $\geq 21$  T), zato zelo dragi inštrumenti
- slabše kompatibilni z LC

## Orbitrap



Dve elektrodi: centralna vretenasta in zunanja oblike soda.

Princip delovanja podoben kot pri ICR MS: krožeči ioni imajo lastno frekvenco, odvisno od  $m/z$  in neodvisno od prostorske in energijske porazdelitve. Detektiramo zrcalne tokove, nastale zaradi kroženja ionov, in signal s Fourierjevo transformacijo pretvorimo v masni spekter.

Dobre karakteristike:  $R$  do 150 000, masno območje vsaj do  $m/z$  6000.

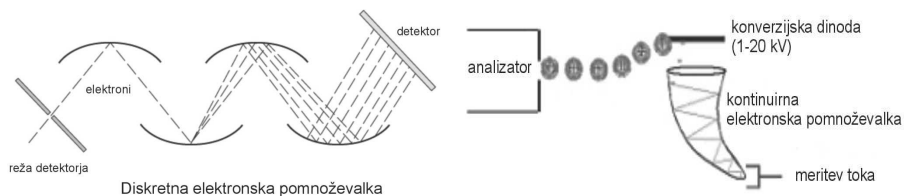
Podobne kakarakteristike kot ICR, le precej cenejši, ker ni magnetnega polja.

## Detektorji v masnem spektrometru

- funkcija: izmerijo intenziteto žarka ionov z določeno  $m/z$
- vsi delujejo preko "pretvorbe" toka ionov v električni tok - razlike v faktorju ojačitve signala (angl. *amplification*)
- detektorji za direktno merjenje: fotografska plošča, Faradayev cilindar, induktivni detektor
- detektorji z ojačitvijo signala: elektronske, fotonske pomnoževalke (fotopomnoževalke), detektorji na niz (foto)diod
- kaj nas pri detektorju zanima: faktor ojačitve signala, hitrost odgovora, robustnost, življenjska doba...

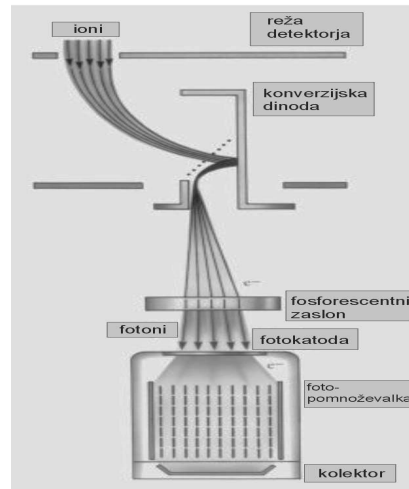
## Elektronske pomnoževalke

- diskretna izvedba: 12-24 dinod pri naraščajočem potencialu, površina  $Al_2O_3$
- kontinuirna (polvodniška) izvedba - *channeltron*
- ojačitev signala (angl. *multiplier gain*)  $10^6-10^7$
- hiter odgovor
- pred pomnoževalko lahko konverzijska dinoda oz. visokoenergijska dinoda (HED) za dodatno pospešitev ionov
- življenjska doba 1-3 leta (kontaminacija)



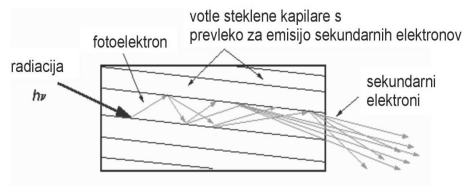
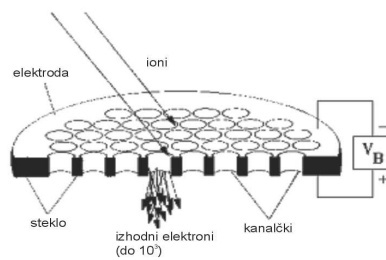
## Fotonska ali fotopomnoževalka

- ioni padejo na fosforescentni zaslon (fosfor): nastanejo fotoni, katerih tok se ojači v fotopomnoževalki
- ojačitev signala  $10^4$ - $10^6$ , življenjska doba  $\geq 5$  let, ker zaščitena pred kontaminacijo



## Detektorska plošča s (foto)diodami

- angl. *multichannel plate, MCP, array detector*
- plošča z vzporednimi cilindričnimi kanalčki ( $2r$  4-25  $\mu\text{m}$ ) s polvodniškim nanosom (elektronska pomnoževalka) ali s fosforescenčnim zaslonom (fotopomnoževalka)
- simultana detekcija ionov v nekem  $m/z$  območju
- boljša občutljivost, slabša ločljivost
- pri TOF analizatorjih; namesto fotografske plošče pri magnetnih sektorjih



## Masna kalibracija

- nujno kalibrirati inštrument na znane spojine, ki dajejo fragmente v želenem masnem območju - kalibracija na  $m/z$  vrednosti in na intenziteto ionov
- prilagodijo se nastavitve analizatorja, pospeševalna napetost, napetost na detektorju...
- zagotovimo točno meritev  $m/z$  vrednosti ionov neznanih spojin in ponovljivost meritve intenzitet (pri kvantitativni analizi)
- spojine za kalibracijo: fluorirane spojine, npr. perfluorotributilamin (PFTBA) pri EI in CI, sintetični polimeri pri ESI in APCI, glicerol pri FAB, kovinski halidi, ki dajejo skupke ionov (angl. *ion cluster*), npr. CsI, CsF

## Računalnik kot del MS

- upravljanje inštrumenta: nastavljanje parametrov v ionskem izvoru, analizatorju...
- pretvorba analognih signalov iz inštrumenta v digitalne
- preračunavanje intenzitete ionov in pozicije vrha za paket ionov neke  $m/z$  glede na predhodno kalibracijo z znanimi spojinami
- prikaz končnega rezultata: masni spektri in/ali časovno odvisni rezultati (npr. kromatogram)
- izračun elementne sestave nekega iona, primerjava masnih spektrov s spektri v knjižnici masnih spektrov