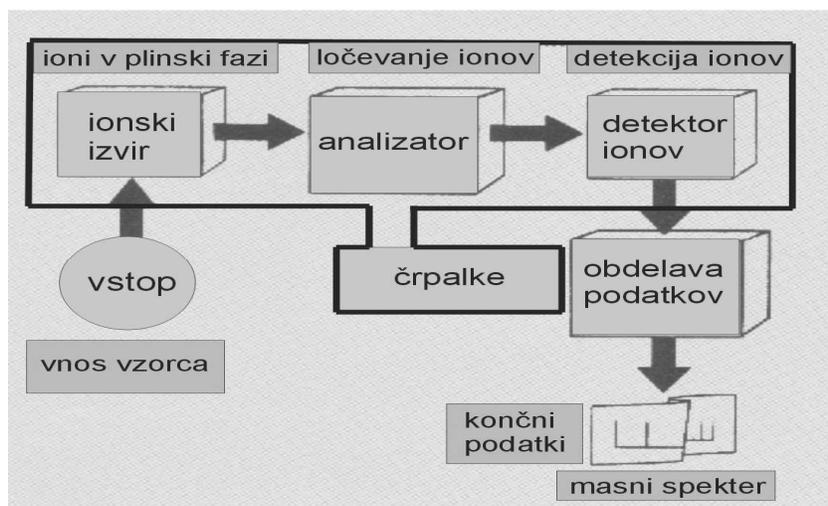


Analizne metode v karakterizaciji materialov in bioloških sistemov

Masna spektrometrija, 2. del

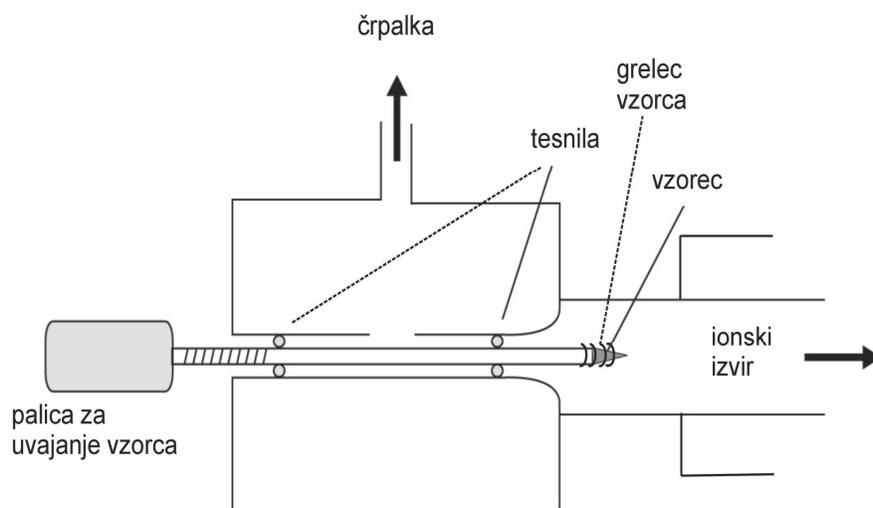
Shema masnega spektrometra



Vnos vzorca v masni spektrometer

- direktno uvajanje (direktna proba, angl. *direct insertion probe - DIP*)
- infuzija plinskega, tekočega ali raztopljenega vzorca
- preko sklopitve z drugimi inštrumenti (korak separacije); v tem primeru govorimo o sklopljenih tehnikah (angl. *hyphenated techniques*):
 - plinska kromatografija (GC-MS),
 - tekočinska kromatografija (LC-MS),
 - superkritična kromatografija (SFC-MS),
 - kapilarna elektroforeza (CE-MS),
 - kapilarna elektrokinetična kromatografija (CEC-MS)...

Direktna proba (DIP)



Prednosti in uporaba:

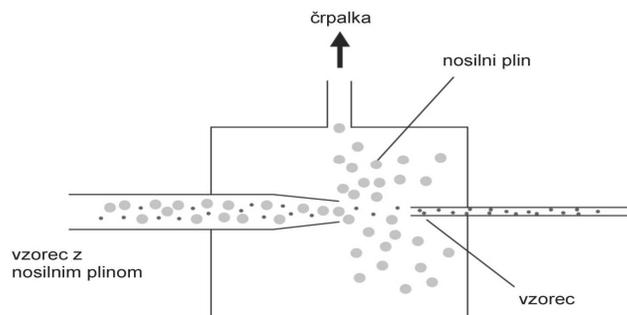
- pretežno čiste spojine z EI in CI
- primerno za manj hlapne in labilne vzorce (počasno gretje)
- zelo malo vzorca potrebnega za spekter (nekaj μg)
- direktna piroliza za nehlapne spojine
- frakcionirana destilacija mešanih vzorcev
- kontrola občutljivosti inštrumenta

Možne težave:

- previsoka temperatura: razpad vzorca
- spojine, ki običajno razpadajo: sp. z ionskimi funkcionalnimi skupinami, sp., ki tvorijo vodikove vezi (zlasti s površino probe), zelo velike molekule
- pomemben položaj probe v ionskem izviru, površina probe (slab adsorbent za vzorec, dobro prevaja toploto)
- preveč vzorca: kontaminacija izvira, popačeni masni spektri

Sklopitev MS s plinsko kromatografijo

- polnjene kolone: pretoki nosilnega plina 10-20 mL/min
uporaba šobe - angl. "jet separator" (50 % izgube vzorca, 10-kratna obogatitev)



Kapilarne kolone:

- pretoki nosilnega plina 1-2 mL/min
- direktno uvajanje v ionski izvor ob uporabi visoko zmogljivih črpalk
- ionizacija analitov v plinski fazi: EI, CI
- moderni sistemi omogočajo menjavo kolon brez izgube vakuumu oz. ugašanja inštrumenta (t.i. "*open-split interface*")
- zaželeni kolone z manjšim notranjim premerom ($\leq 0,3$ mm) in manjšim puščanjem stacionarne faze ("*low bleed*")
– običajno posebna oznaka MS

Sklopitev MS s tekočinsko kromatografijo

Problemi:

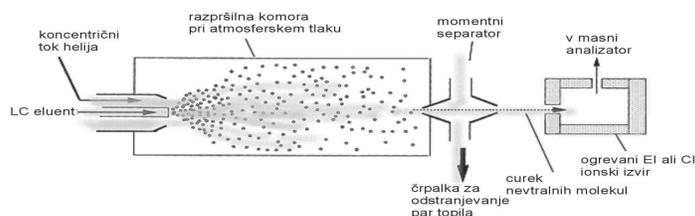
- § visoki pretoki: previsok tlak v EI/CI izvoru
- § nehlapne in termično labilne spojine
- § nehlapne mobilne faze

Možne rešitve:

- § večja hitrost črpanja iz ionskega izvora
- § razcep pretoka iz kolone ("*splitting*")
- § kapilare oz. ozke kolone namesto običajnih kolon
- § odstranitev mobilne faze pred vstopom v ionski izvor
- § ionizacija pri zračnem tlaku: t.i. mehka ionizacija

Začetki sklopitev LC-MS (EI/CI izvor)

- transportni vmesniki: tekoči trak (angl. *moving belt*); nobenih omejitev za LC
- direktno uvajanje tekočine (angl. *direct liquid introduction, DLI*): CI spektri, reagenčni plin je mobilna faza, pretoki do 50 $\mu\text{L}/\text{min}$
- vmesnik na curek delcev (angl. *particle beam interface, PBI*): samo hlapne MF, 50 % izgube vzorca, pretoki do 1 mL/min



Sklopitev LC-MS z vmesniki pri zračnem tlaku

- ionizacija s hitrimi atomi pri stalnem pretoku (angl. *continuous-flow fast atom bombardment, CF FAB*; tudi *dynamic FAB*)
- termorazprševanje (angl. *thermospray, TS*)
- kemijska ionizacija pri zračnem tlaku (angl. *atmospheric pressure chemical ionization, APCI*) oz. razprševanje v ionizirano plazmo (angl. *plasma spray, PS*)
- elektrorazprševanje (angl. *electrospray, ES*; tudi *ion spray, IS*)
- fotoionizacija pri zračnem tlaku (angl. *atmospheric pressure photoionization, APPI*)

Sklopitev MS z drugimi separacijskimi tehnikami

- CE-MS in CEC-MS: podobno kot LC-MS, vendar nižji pretoki: mikro- in nano-vmesniki (npr. nanoESI, nESI)
- SFC-MS: restriktorji, vmesniki za LC-MS
- TLC-MS: desorpcijske metode ionizacije, npr. FAB, SIMS, desorpcija z laserjem (LD); elucija s topilom (t.i. elucijska glava)



Razdelitev ionizacijskih metod

Trde ionizacijske metode

§ elektronska ionizacija (angl. *electron impact ionization, EI*)

Mehke ionizacijske metode

§ kemijska ionizacija (angl. *chemical ionization, CI*)

§ ionizacije pri zračnem tlaku (angl. *atmospheric pressure ionization, API*): ESI, APCI...

§ desorpcijske ionizacijske metode: MALDI, FD, FAB/SIMS...

Ionizacijske metode v plinski fazi

§ elektronska ionizacija, EI

§ kemijska ionizacija, CI

§ ionizacija v električnem polju (angl. *field ionization, FI*)

Desorpcijske ionizacijske metode

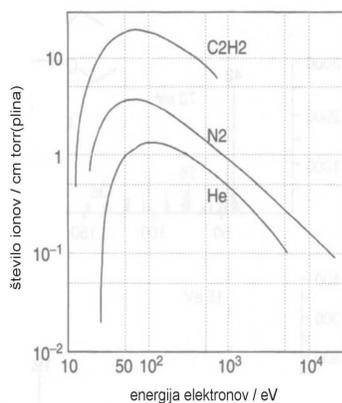
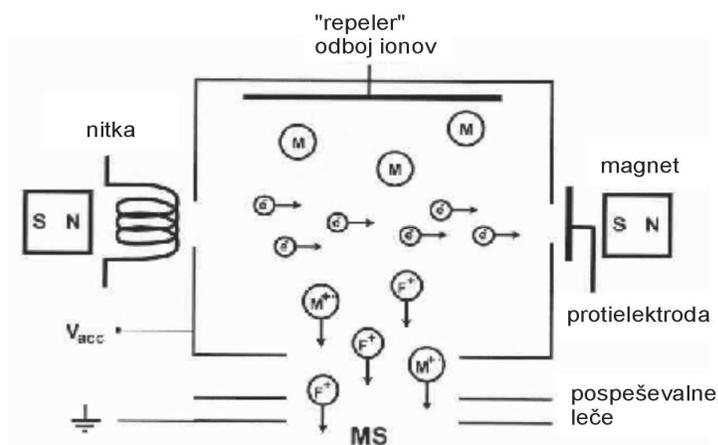
§ elektrorazprševanje, ESI

§ laserska desorpcija (angl. *laser desorption, LD*) in LD s pomočjo matrice (angl. *matrix-assisted LD, MALDI*)

§ desorpcija v električnem polju (angl. *field desorption, FD*)

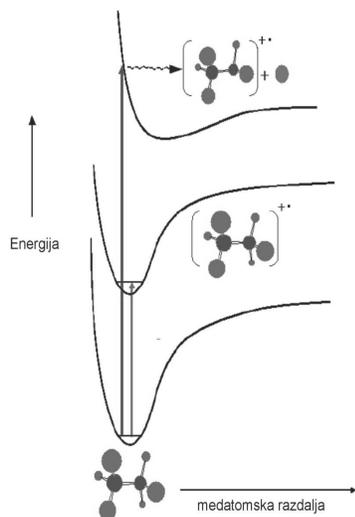
§ ionizacija s hitrimi atomi (FAB) ali ioni (angl. *secondary ion MS, SIMS*)

Elektronska ionizacija, EI



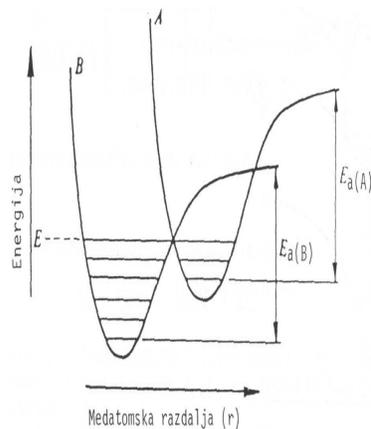
- § energija e^- 70 eV (dogovor)
- § IE organskih molekul 8-10 eV, prejmejo pa 10-20 eV
- § učinkovitost ionizacije 0,001-0,1 %
- § zelo hiter proces: 10^{-16} - 10^{-15} s
- § po $\approx 10^{-8}$ s ion odda presežno energijo z radiacijo
- § čas zadrževanja v ionskem izviru: $\approx 10^{-6}$ s

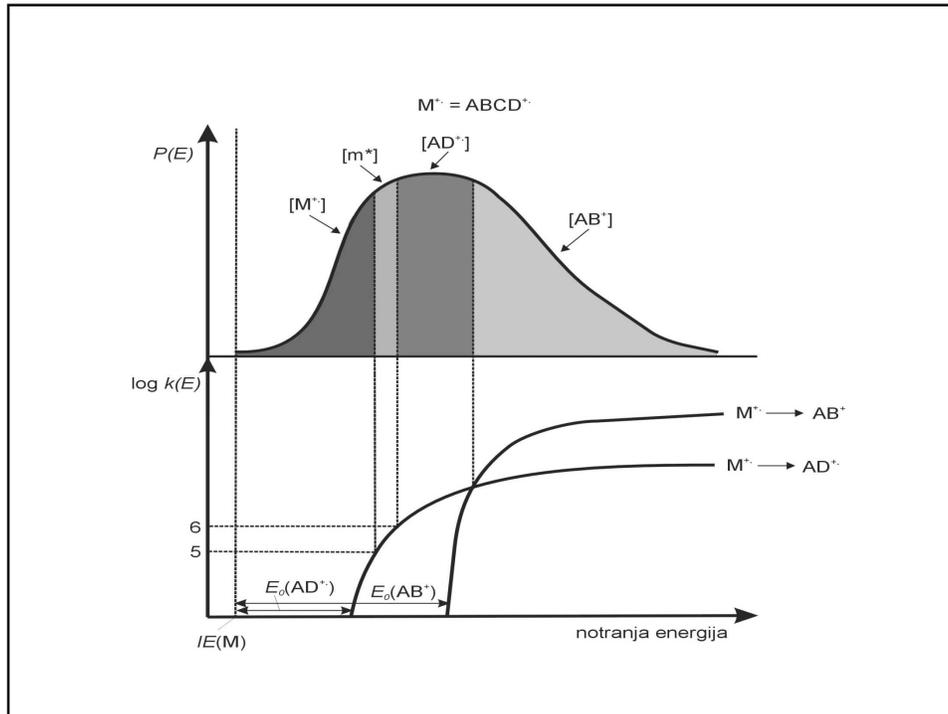
Teorija unimolekularnih reakcij



- § med ionizacijo vertikalni ali Franck-Condonov prehod: medatomska razdalja se ne spremeni
- § ionizirane molekule imajo prebitno notranjo energijo (\approx do 10 eV)
- § vakuum: ne more priti do trkovne relaksacije
- § hitri procesi: največ 10^{-6} s

- interna konverzija med vzbujenimi stanji molekulskega iona
 - pretvorba elektronske energije v vibracijsko in rotacijsko
 - razpad vezi (fragmentacija)
- poleg potrebne prebitne notranje energije važni še kinetični vidiki: dovolj visoka konstanta reakcijske hitrosti ($> 10^6 \text{ s}^{-1}$)





Metastabilni ion

- označimo z m^*
- nastane pri unimolekularni disociaciji molekulskega iona (masa m_p) do fragmentnega iona (masa m_f) izven ionskega izvora (v področjih brez polja)
- nastali fragment ima manjšo kinetično energijo kot enak fragment, ki je nastal v ionskem izvoru, zato se pojavi pri navidezni vrednosti m/z : $m^* < m_f$
- izračun:
$$m^* = \frac{m_f^2}{m_p}$$
- iz njih možno ugotoviti potek fragmentacije (zgodovinsko), iz česar se je razvila tandemska masna spektrometrija

Prednosti:

- univerzalna ionizacijska metoda: vse spojine
- precejšnja učinkovitost: dobra občutljivost
- nastanek fragmentov: značilni masni spektri ("prstni odtis"), možnost identifikacije spojin
- dobra ponovljivost spektrov
- knjižnice referenčnih spektrov

Slabosti:

- nujna predhodna uparitev vzorca: možna termična razgradnja
- pogosto v spektru ne vidimo molekulskega iona
- ne dobimo negativno nabitih ionov

Kemijska ionizacija, CI

- običajno kombiniran EI/CI izvor
- uvajamo reagenčni plin pri tlaku $\approx 0,1-1$ torr: srednja prosta pot $\approx 0,1$ mm
- razmerje reagenčni plin : vzorec $\approx 1000:1$
- elektroni (70 eV) ionizirajo pretežno plin
- nastaja ionizacijska plazma plina, s katero reagira vzorec: nastanek pozitivnih in negativnih ionov

Reagenčni plini za Cl:

Metan (CH₄): protonska afiniteta PA 5,7 eV

ioni CH₄⁺, CH₃⁺, CH₂⁺, CH₅⁺, C₂H₅⁺ idr.

Izobutan (C₄H₁₀): PA 8,5 eV

ioni C₄H₁₀⁺, C₄H₉⁺, C₃H₇⁺, C₃H₃⁺

Amoniak (NH₃): PA 9,0 eV

ioni NH₃⁺, NH₄⁺, N₂H₇⁺

Uporabljajo se še: N₂O, NO, N₂, Ar, He, CO, CO₂,
CS₂... (sami ali v mešanicah z zgornjimi plini)

Mehanizmi nastanka ionov pri Cl:

Pozitivni ioni:

§ prenos protona
 $M + BH^+ \rightarrow MH^+ + B$

§ prenos naboja
 $M + X^{+\bullet} \rightarrow M^{+\bullet} + X$

§ elektrofilna adicija
 $M + X^+ \rightarrow MX^+$

§ odcep aniona
 $AB + X^+ \rightarrow B^+ + AX$

Negativni ioni:

§ zajem elektrona: več načinov,
npr.: $AB + e^- \rightarrow AB^{\bullet-}$

§ prenos protona
 $M + X^- \rightarrow (M-H)^- + XH$

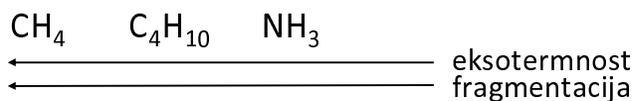
§ prenos naboja
 $M + X^- \rightarrow M^- + X$

§ nukleofilna adicija
 $M + X^- \rightarrow MX^-$

§ nukleofilna izmenjava
 $AB + X^- \rightarrow BX + A^-$

Pozitivni ioni pri CI

- angl. *positive ion chemical ionization, PICI*
- pretežno prenos protona: psevdomolekulski ion
 $PA(M) > PA(B)$ eksotermna rkc



- adicija: CH_4, NH_3 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$)
- prenos naboja: He, Ar, N_2 , CO
precej fragmentacije
- odcep aniona:
za spojine z nizko PA; kjer je prenos naboja endotermen proces

Negativni ioni pri CI

- angl. *negative ion chemical ionization, NICI*
- pretežno zajem elektrona:
asociativni ali disociativni resonančni zajem, nastanek ionskega para
reagenčni plin: nastanek termičnih e^- , trkovna stabilizacija ionov
- prenos protona: $PA(X^-) > PA(M)$
mešanice reagenčnih plinov, npr. $\text{CH}_4 + \text{N}_2\text{O}$
- ionsko-molekulske rkc pomembne pri drugih načinih ionizacije, kjer nastajajo negativni ioni
- prilagoditev ostalih delov MS za delo z negativnimi ioni:
pozitivna pospeševalna napetost na lečah
prilagoditev analizatorja: magnetni in elektrostatski sektor
prilagoditev detektorja: konverzijska dinoda

Drugi vplivi na ionizacijo pri CI:

- temperatura v ionskem izvoru:
velik vpliv na fragmentacijo, če mili pogoji ionizacije
- tlak reagenčnega plina:
nastanek različnih ionov reag. plina
- primesi v reagenčnem plinu
- pri inštrumentih z zadrževalnimi (angl. *storage*) analizatorji (IT, FT-ICR): nižji tlaki reagenčnega plina in precej drugačni spektri

Prednosti / slabosti CI

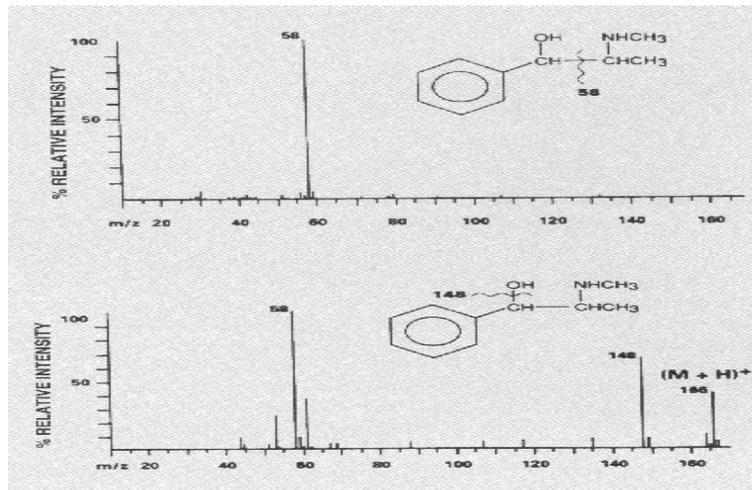
Prednosti:

- možna določitev molekulske mase
- pri milih pogojih se ohrani (stereo)izomerna struktura spojin
- direktna analiza mešanic
- zlasti NCI bolj selektivna in občutljiva za nekatere spojine

Slabosti:

- vzorec potrebno najprej upariti
- malo fragmentacije - malo podatkov o strukturi
- psevdomolekulski ioni
- fragmentacija spojin in ponovljivost spektrov odvisni od pogojev
- ni referenčnih spektrov
- zahteva večjo izurjenost operaterja

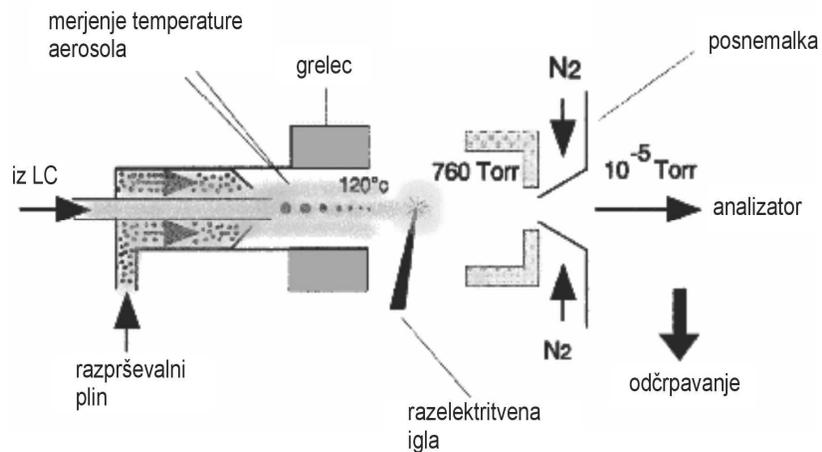
Primerjava EI in CI masnih spektrov



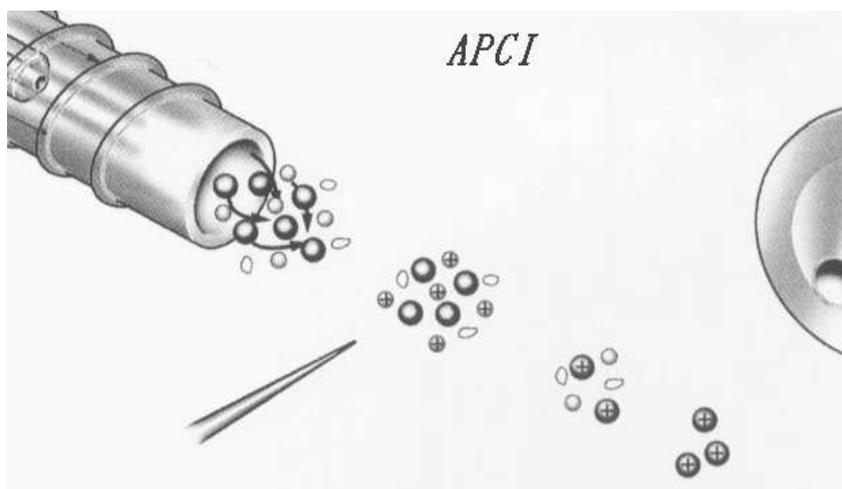
Ionizacija labilnih spojin

- ne moremo jih upariti, ker nehlapne (previsoka M_r) ali termično nestabilne
- dovajamo energijo v tekoč ali trden vzorec, tako da se direktno tvorijo plinski ioni
- metode z desorpcijo v močnih elektrostatskih poljih: ESI, TSP, APCI...
- metode s "sunkom energije": FAB, SIMS, LD/MALDI...

Kemijska ionizacija pri zračnem tlaku, APCI



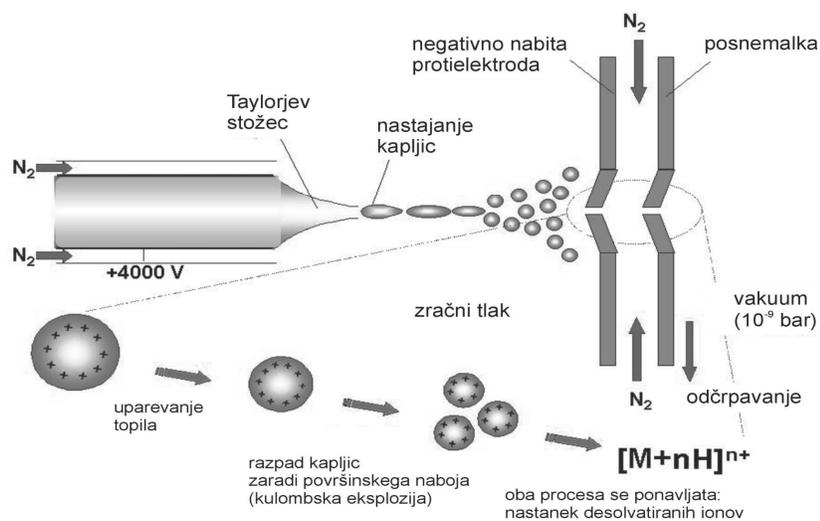
APCI - nastanek ionov



Značilnosti APCI:

- staro ime: razprševanje v plazmo (angl. *plasma spray*, *PS*)
- uspešen vmesnik za sklopitev LC-MS: pretoki MF 0,2-2 mL/min; MF mora biti hlapna!
- polarne in ionske spojine, $M_r \leq 1500$ Da
- mehanizmi nastanka ionov kot pri CI: prenos protona, nastanek aduktov (PI in NI)
- reagenčni plin so pare topila (MF)
- učinkovita ionizacija vzorca (10^3 - 10^4 -krat bolj kot CI)
- pretežno psevdomolekulski ioni, malo fragmentacije

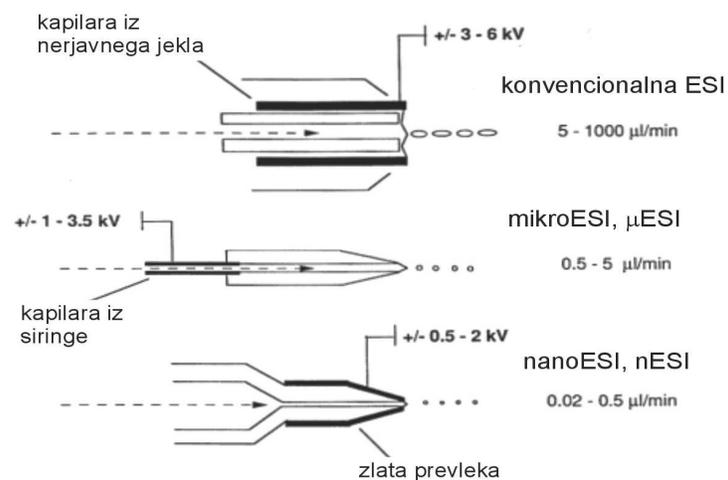
Elektrozprševanje, ESI



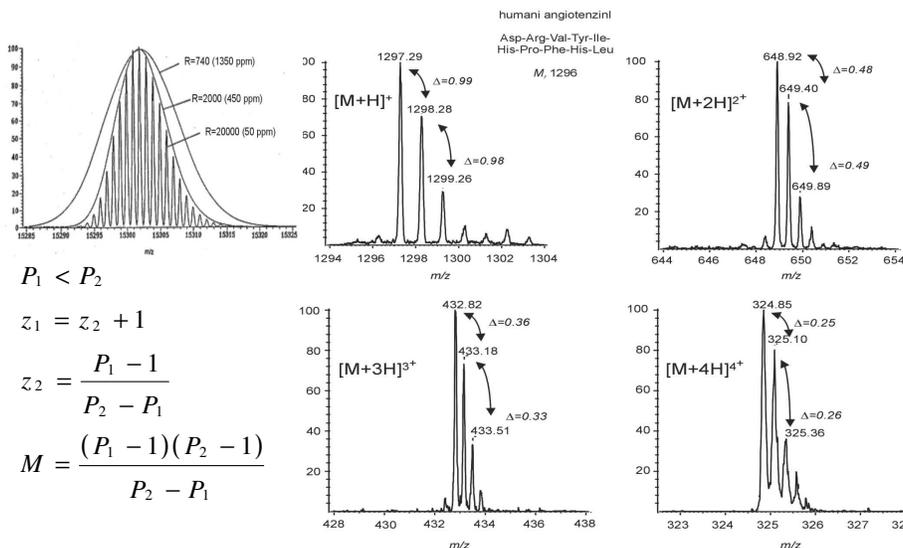
Značilnosti ESI:

- vmesnik za sklopitev LC-MS, CE-MS
- hlapne MF, pretoki do 1 mL/min, za nižje pretoke μ ESI, nESI
- za manjše polarne spojine, polimere, makromolekule
- ioni nastajajo pod vplivom močnega električnega polja (10^4 V/cm): pozitivni in negativni
- enkrat in večkrat nabiti ioni $[M+nH]^{n+}$ (velike molekule), tudi adukti s kationi alkalij ipd.
- občutljivost odvisna od koncentracije, ne od absolutne množine

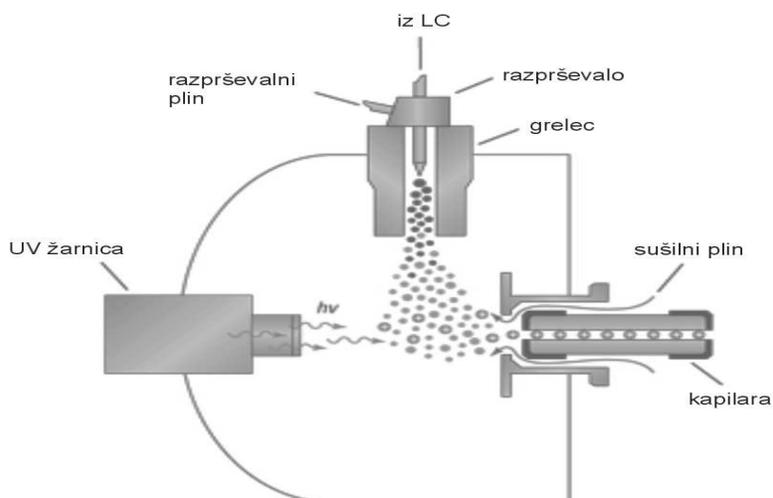
Mikro- in nanoESI



Kolikokrat so ioni nabiti?



Fotoionizacija pri zračnem tlaku, APPI



Direktna:

$M + h\nu \rightarrow M^+$, tudi $[M+H]^+$ v protičnih topilih
 $IE(M) < E_f$ (kriptonova žarnica 10,0 eV, 10,6 eV)

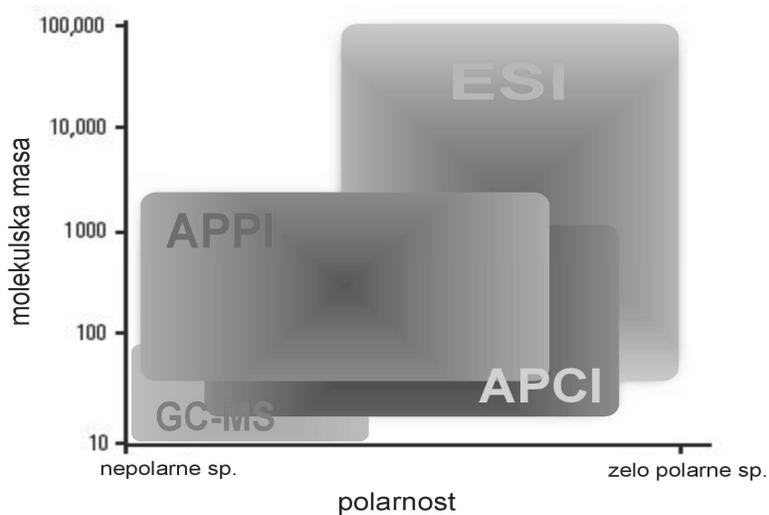
Preko dopanta (dodatno topilo):

prenos protona $M + DH^+ \rightarrow [M+H]^+ + D$
prenos elektrona $D^+ \rightarrow M^+$

Ionizacijske energije topil:

toluen 8,82 eV	acetonitril 12,19 eV
aceton 9,70 eV	voda 12,61 eV
metanol 10,85 eV	

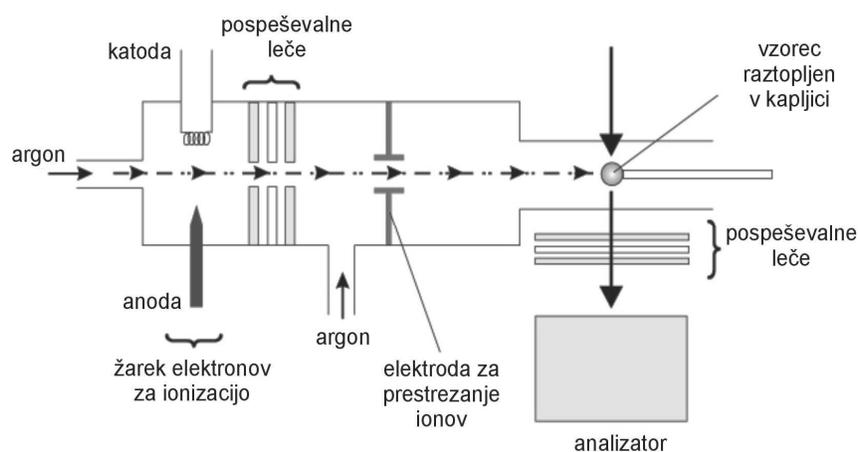
Primerjava API in GC-MS



Ionizacija s hitrimi atomi/ioni, FAB/SIMS

- masna spektrometrija sekundarnih ionov (ki jih izbijemo iz vzorca s curkom primarnih ionov ali atomov)
- trdni vzorci: SIMS (statična, dinamična)
- tekoči vzorci: FAB, LSIMS (angl. *liquid SIMS*)
- primerna matrica: nehlapna, spodbujati ionizacijo (glicerol, tioglicerol, aditivi)
- FAB: hitri atomi Ar (5 keV); SIMS: žarek Cs⁺ (30 keV)
- spektri: molekulski ion, malo fragmentov, PI in NI
- najbolj primerno za polarne spojine z *M* do 10000 Da

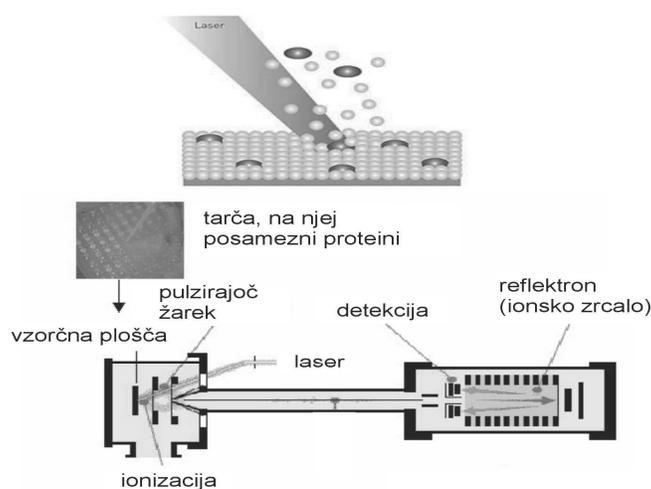
Ionizacija s hitrimi atomi, FAB



Laserska desorpcija (LD), MALDI, DIOS

- LD: pretežno analiza površin, lokalna sestava vzorca; pulzna tehnika: analizatorji na čas preleta (TOF)
- MALDI (*matrix assisted LDI*): vzorec pripravljen v "trdni raztopini" matrice (nikotinska kisl., sinapna kisl. idr.)
- matrica absorbira prebitno energijo, sodeluje pri ionizaciji vzorca (prenos protonov ipd.)
- večja izdatnost ionizacije, boljša občutljivost, manj fragmentacije kot LD
- UV in IR laserji (λ ni pomembna)
- najboljša ionizacija za visokomolekularne, nepolarne spojine
- zelo podobna tehnika DIOS (angl. *desorption/ionization on silicon*): vzorec brez dodatka matrice (ni interferenc \Rightarrow nižje ozadje) nanešen na poroznem siliciju, ki absorbira UV svetlobo

MALDI



Ionizacija anorganskih spojin/elementov

- EI, SIMS, FD, FAB, LD, ESI
- termoionizacija (angl. *thermo ionization, TI*), tudi površinska ionizacija
- ionizacija v električni iskri (angl. *spark source ionization, SSI*)
- ionizacija z induktivno sklopljeno plazmo (angl. *inductively coupled plasma, ICP*)
- ionizacija s tlivno razelektritvijo (angl. *glow discharge ionization, GDI*)

TI, SSI, ICP, GDI:

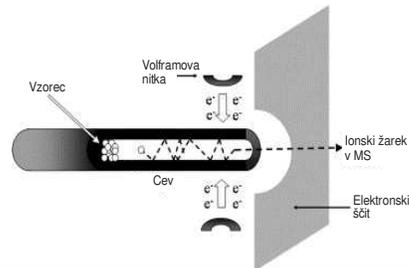
- izvori se uporabljajo tudi za optično spektroskopijo
- podobnost: popolna razgraditev vzorca na sestavne elemente, atomizacija in ionizacija
- razlika: ne zanima nas ekscitacija atomov in emisija svetlobe, temveč ionizirane atome vodimo v MS analizator

EI, SIMS, FD, FAB, LD, ESI:

- v izvoru dobimo nabito molekulo v plinastem stanju in morebitne fragmente

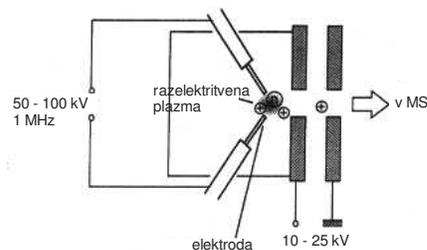
Termoionizacija (TI):

- vzorec nanese (v raztopini ali z elektrodepozicijo) na kovinsko nitko (W, Pt, Re), ki jo električno segrevamo
- izvedbe z dvojno ali trojno nitko (ločena procesa uparjanja in ionizacije)
- pride do prenosa e^- na nitko (nastanek kationov; kovine) ali z nitke na delec (nastanek anionov; nekovine, polkovine, prehodne kovine in njihovi oksidi); običajno 1x nabiti
- učinkovitost od $<1\%$ do 10% (odvisno od elementa)
- boljša učinkovitost ionizacije v izvoru na termoionizacijsko cev (angl. *thermal ionization cavity, TIC*): namesto nitke votla kovinska cev, ki jo segrevamo z elektronskim bombardiranjem



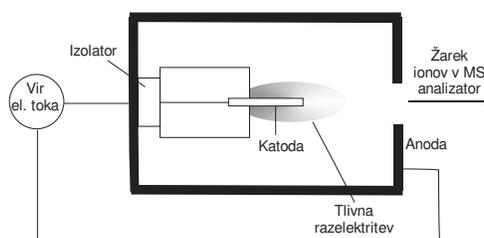
Električna iskra (SSI):

- vzorec (če trdna kovina) je ena od elektrod; sicer ga zmešamo z grafitom in damo v vdolbino na elektrodi
- med elektrodo z vzorcem in dodatno elektrodo pritisnjena pulzirajoča RF (1 MHz) napetost, ki povzroči razelektrove (iskre)
- do atomizacije pride zaradi direktnega segrevanja ali v razelektroveni plazmi
- v plazmi pride še do ionizacije s pospešenimi e^- in kemijskih rkc, nastajajo skupki (klastri), asociacije s H, C, N, O iz matrice
- samo pozitivni ioni: 1x, večkrat nabiti (intenziteta pada)
- slabše uporabno za kvantitativno analizo



Tlivna razelektritev (GDI):

- vzorec (če prevoden) je sam, sicer stisnjen z grafitom katoda; med njim in anodo se v plinu (običajno Ar, 0,1-10 torr) vzpostavi plazma ioniziranega plina in e^-
- Ar^+ ioni bombardirajo katodo: pride do odprševanja (angl. *sputtering*) atomov vzorca, ki jih odnese v negativno nabiti del plazme, kjer se ionizirajo:
 - elektronska ionizacija:
 $M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^-$
 - Penningova ionizacija:
 $M + Ar^+ \rightarrow M^+ + Ar + e^-$



- vir enosmernege toka (500-1000 V; 1-5 mA); pulzirajoči tok: lahko višja U in I ; izmenični (RF) tok za slabo prevodne vzorce
- dobimo samo pozitivno nabite ione, 1x nabite
- ozadje: ioni Ar in primesi plinov (N_2 , O_2 , H_2O ...)
- nizka učinkovitost ionizacije: $\leq 1\%$, vendar atomska para reprezentativna za sestavo katode, tudi ionizacijski proces neselektiven \Rightarrow zelo primerno za kvantitativno analizo
- za dosego ravnotežnega stanja potrebno več minut \Rightarrow počasna tehnika
- predvsem za analizo kovinskih in drugih trdnih vzorcev; tankih filmov; raztopine najprej posušimo na grafitni katodi

Induktivno sklopljena plazma (ICP)

- atomizacija in ionizacija potekata v Ar plazmi s $T \approx 5000-10000$ K
- nastanejo 1x nabiti ioni, učinkovitost ionizacije blizu 100 %
- vzorec običajno v raztopini, ki jo uvajamo s pnevmatskim razprševalnikom; tudi elektrotermična uparitev s tokovno grete nitke; laserska ablacija...
- določitve hitre: 20-30 elementov v par minutah
- LOD do 1000x nižje kot pri ICP-AES
- interference zaradi sestavin matrice (zmanjšana ali povečana ionizacija); spektralne ("izobarne") zaradi drugih elementov, oksidov, dvakrat nabitih ionov...
- različni načini korekcije, najbolj neposreden je uporaba HRMS

Ostale ionizacijske tehnike za anorgansko MS

EI, CI: majhna uporabnost zaradi predhodne uparitve analitov; organokovinske spojine

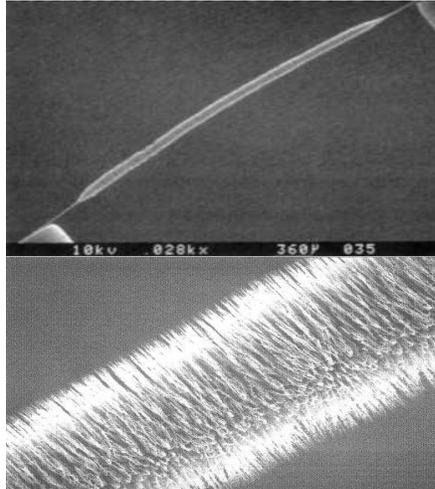
FAB/SIMS: uporabne za analizo analitov v raztopini (z dodatkom ustrezne matrice) ali za analizo trdnih površin

LDI in MALDI: zelo uporabne do M 50000 Da

ESI: uporabna, vendar določene težave (oksidacija v (+)ESI ali redukcija v (-)ESI spremenita oksidacijsko stanje kovin; večkrat nabiti ioni); vedno bolj popularna za anorgansko kemijo raztopin

Desorpcija v električnem polju, FD

- vzorec nanešen na emiter (kovinska nitka prekrita z ogljikovimi iglicami)
- med emiterjem in protielektrodo močno el. polje (do 10^8 V/cm)
- desorbirajo se M^+ , $[M+H]^+$, $[M+X]^+$ ioni - različni mehanizmi nastanka
- primerno za visokomolekularne nepolarne spojine

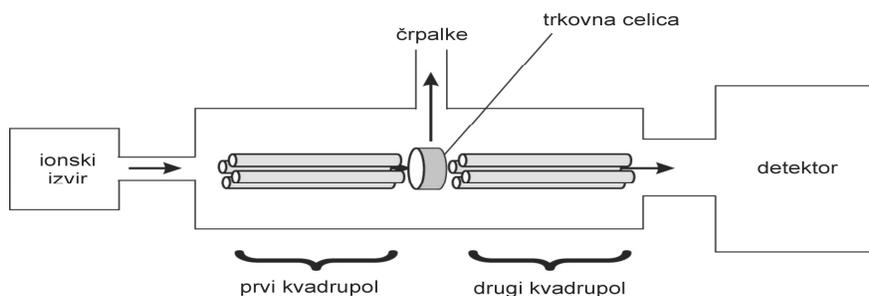


Tandemska MS: definicija

Tandemska masna spektrometrija, kratica MS/MS, je v splošnem metoda z vsaj dvema stopnjama masne analize (ločevanja ionov) v povezavi bodisi z disociacijskim procesom bodisi s kemijsko reakcijo, ki povzroči spremembo v masi ali naboju iona. Več stopenj: MS^n .

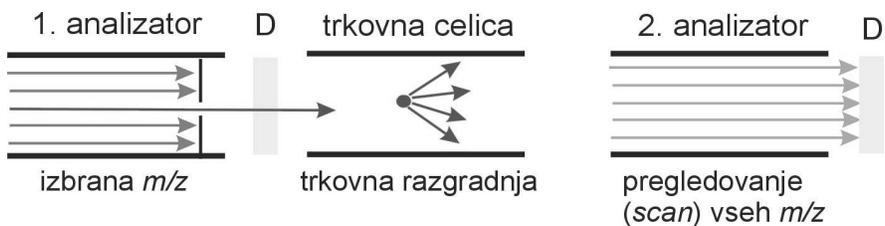
Lahko poteka **v prostoru** (angl. *in space*): dva ločena masna analizatorja. Lahko poteka **v času** (angl. *in time*): isti analizator, zaporedoma (zadrževalni analizatorji).

- začetki: opazovanje razpada metastabilnih ionov m^* v B in E sektorskih inštrumentih
- danes: namenoma izzvana razgradnja ionov v trkovni celici (angl. *collision cell*) - trkovno vzbujena/aktivirana razgradnja (angl. *collision induced dissociation, CID* ali *collisionally activated decomposition, CAD*)



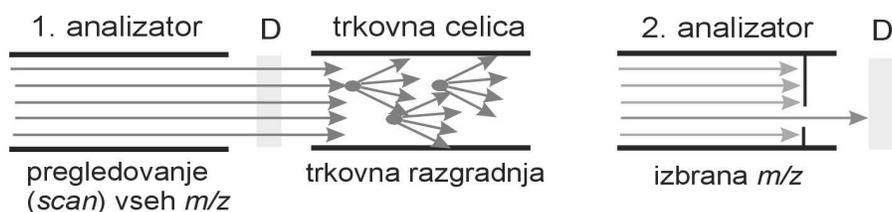
Pregledovanje produktnih ionov

- angl. *product ion scan*; star izraz hčerinski ioni ali ioni potomci (angl. *daughter ion*)
- v 1. analizatorju izberemo želeni ion (analizator prepušča le izbrani m/z), ga v trkovni celici fragmentiramo in v 2. analizatorju določimo nastale produktne ione (pregleduje vse m/z)



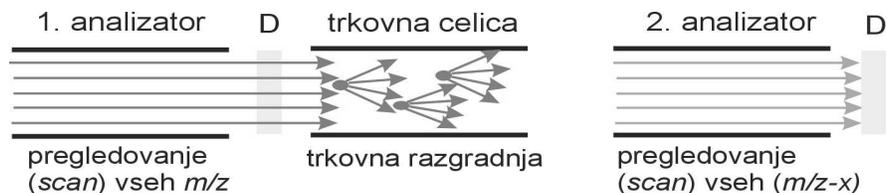
Pregledovanje prekurzorskih ionov

- angl. *precursor ion scan*; star izraz starševski ioni ali ioni predniki (angl. *parent ion*)
- 2. analizator nastavimo tako, da prepušča le izbrani produktni ion, v 1. analizatorju pregledujemo po vseh m/z in tako ugotovimo, kateri ioni dajo po trkovni razgradnji izbrani produktni ion
- ta način ni možen pri MS/MS v času



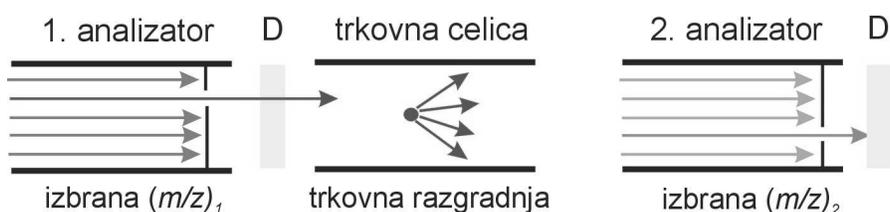
Pregledovanje pri stalni razliki

- angl. *constant neutral loss scan, CNLS*
- 1. analizator pregleduje po vseh m/z , 2. analizator prav tako, vendar s stalnim masnim zamikom x
- na ta način ugotovimo, kateri ioni fragmentirajo tako, da oddajo nek (nevtralni) fragment z maso x (npr. H_2O , C_2H_4)
- ni možno pri MS/MS v času



Opazovanje izbranih reakcij

- angl. *selected reaction monitoring, SRM* (tudi: *multiple reaction monitoring, MRM*)
- 1. analizator nastavimo tako, da prepušča le izbrani ion $(m/z)_1$, ki ga v trkovni celici fragmentiramo; 2. analizator je nastavljen tako, da prepušča le enega (ali več) od nastalih fragmentov $(m/z)_2$
- zlasti za kvantitativno analizo: visoka občutljivost in selektivnost

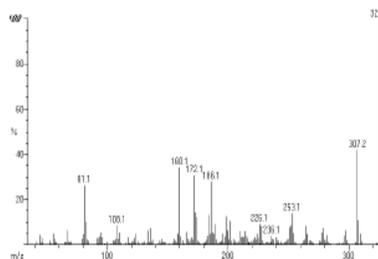


Trkovna razgradnja

- poteka v trkovni celici: samo celica, kvadrupol (q , samo izmenična napetost /*RF-only*/), heksapol, LINAC™...
- pospešeni ioni trčijo ob molekule/atome plina: del E_{kin} iona se pretvori v notranjo E - to imenujemo trkovna aktivacija (angl. *collisional activation, CA*)
- sledi unimolekularna razgradnja vzbujenega iona: nastanek fragmentov (produktni ioni)
- koliko notranje E bo na voljo za fragmentacijo, je odvisno od mase prekursorskega iona in mase trkovnega plina
- zahteve za trkovni plin: nereaktiven, visok IP (ne pride do prenosa naboja), če večji atom/molekula, več E se prenese na prekursorjski ion

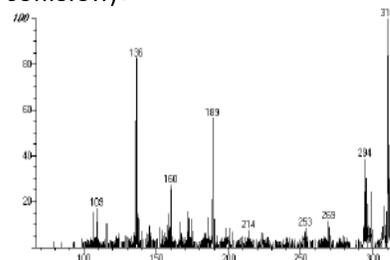
Trki pri nižji energiji (angl. *low-energy collision*):

- E_{kin} prekursorjev do nekaj 100 eV
- težji plini Ar, Xe, Kr
- večkratni trki zaradi počasnih ionov
- slabše ponovljivi spektri
- Q-Q-Q in hibridni inštrumenti
- fragmentacija v ionskem izviru ("*in-source*")



Trki pri višji energiji (angl. *high-energy collision*):

- E_{kin} prekursorjev do 30 keV
- plini He, Ar, Xe
- dobro ponovljivi, bolj preprosti spektri
- sektorski inštrumenti



Slika: CID spekter kinina

Površinsko inducirana disociacija (angl. *surface-induced dissociation, SID*): ione usmerimo pod kotom 60-90° na trdno ali tekočo površino; 100 % učinkovitost, zlasti za večje ione; problem je sipanje ionov in posledične izgube.

Fotonsko inducirana disociacija (angl. *photon-induced dissociation, PID*): primerno za ione, ki absorbirajo svetlobo, uporablja se laser; ioni morajo biti upočasneni (IT, ICR); problem je izkoristek procesa.

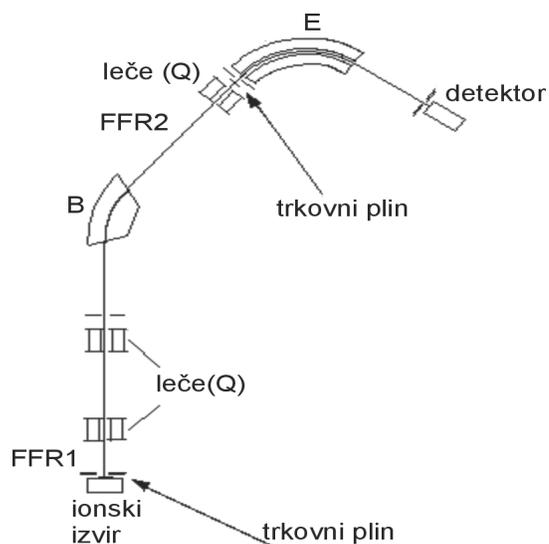
Disociacija po zajetju elektrona (angl. *electron capture dissociation, ECD*): ioni gredo skozi curek visokoenergijskih elektronov; visoko učinkovito, uporablja se zlasti za sekvenciranje proteinov.

Disociacija po prenosu elektrona (angl. *electron transfer dissociation, ETD*): prenos elektrona na ione z drugih radikal-anionov (npr. PAH) in posledična fragmentacija; zlasti v proteomiki.

Tandemska MS s sektorskimi inštrumenti

Običajni inštrument: magnetni (B) in elektrostatski (E) sektor v konfiguraciji EB (najbolj pogosto) ali BE ("reverzna geometrija").

Lahko detektiramo fragmente, nastale v polja prostem območju (angl. *field-free region*, FFR) - spontano (m^*) ali zaradi induciranih trkov v trkovni celici.

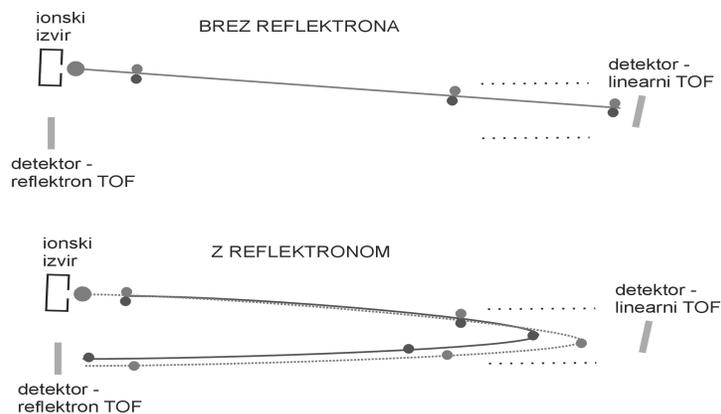


- inštrumenti z več kot dvema sektorjema (3-4): pogoste konfiguracije BEB, EBE, BEE, EBEB, BEBE



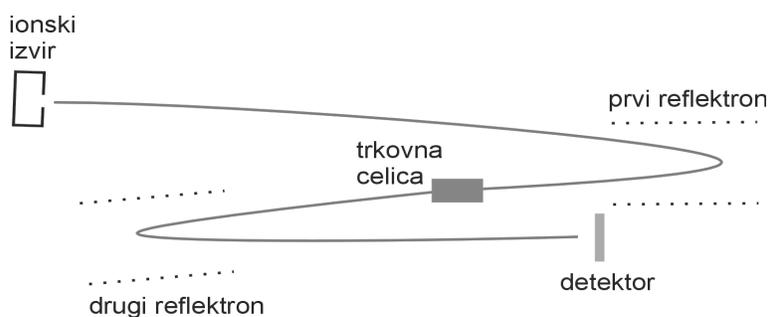
Tandemska MS s TOF inštrumenti

Izvedba z reflektorskim TOF: kombinacija linearnega in reflektorskega delovanja. Ioni fragmentirajo po pospešitvi v TOF cevi - "*post-source decay*", PSD.



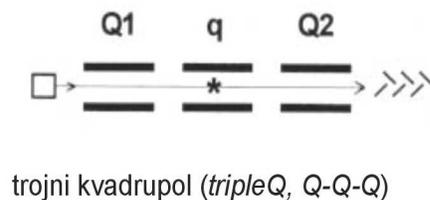
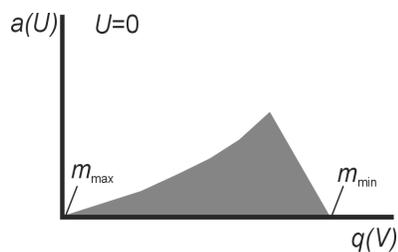
Druge možnosti tandemске MS s TOF:

- dodatna defleksijska elektroda za izbiro prekursorjev takoj po pospešitvi
- dvojni reflektoron s trkovno celico (slika)
- reflektoron z ukrivljenim poljem
- dva zaporedna TOF analizatorja



Tandemska MS s kvadrupolnimi inštrumenti

- izvedba možna le z zaporedno postavljenimi Q analizatorji (do 5)
- najpogosteje "triple-Q": drugi kvadrupol služi kot trkovna celica (samo izmenična napetost), označimo s q
- možni vsi trije načini pregledovanja in SRM, enostavneje izvedljivo kot s sektorskimi inštrumenti, a manjša ločljivost
- problem je prenos (transmisija) ionov skozi q in posledične izgube prekursorjev ali produktov; rešitve iščejo v novih oblikah npr. heksapol ali LINAC™



Tandemska MS z IT in LIT inštrumenti

Poteka "v času" in ne "v prostoru". Stopnje:

- izberemo ione neke m/z (prekursor), ostale ione izvržemo
- izbrane prekursorje fragmentiramo s trki s He atomi in dodatno vzbujamo z njim lastno frekvenco
- pregledamo nastale produktne ione ALI
- ponovno izberemo izmed produktov nek m/z in ponovimo fragmentacijo: MS^n (teoretično do $n=10$)

Spektri po fragmentaciji so enostavnejši kot po fragmentaciji v trkovni celici, razen če uporabimo širokopasovno vzbujanje.

Pregledovanje prekursorskih ionov in pri stalni razliki načeloma ni možno, razen kolikor se da računalniško "obnoviti".

Tandemska MS s FT-ICR, Orbitrap inštrumenti

- s primerno napetostjo (E_0 , ω) na oddajniških ploščah vse ione razen izbranih prekurzorjev nevtraliziramo ob stenah celice
- ione izbrane m/z fragmentiramo (pulz trkovnega plina, vzbujanje s ciklotronsko frekvenco, SORI - *sustained off-resonance irradiation*, fotonsko induciran razpad, razpad z zajetjem elektrona)
- fragmente nedestruktivno detektiramo, lahko večkrat: večja občutljivost
- proces lahko ponavljamo: MS^n

Tandemska MS s hibridnimi inštrumenti

- kombinacija različnih tipov masnih analizatorjev, vmes trkovna(e) celica(e)
- poskušajo kombinirati prednosti različnih analizatorjev
- kombinacije:
 - Q - TOF (pogostejša, ≥ 3 proizvajalci)
 - Q - sektorski analizator (npr. BEqQ, EBqQ; pogostejša)
 - sektorski analizator - TOF
 - Q - LIT (Applied Biosystems)
 - IT - TOF (Shimadzu)
 - sektorski analizator - IT (Thermo Electron Corp.)
 - Q - FT ICR (Bruker Daltonics)
 - LIT - FT ICR ali Orbitrap (Thermo Electron Corp.)
-

Nekatere konfiguracije hibridnih tandemskih inštrumentov

