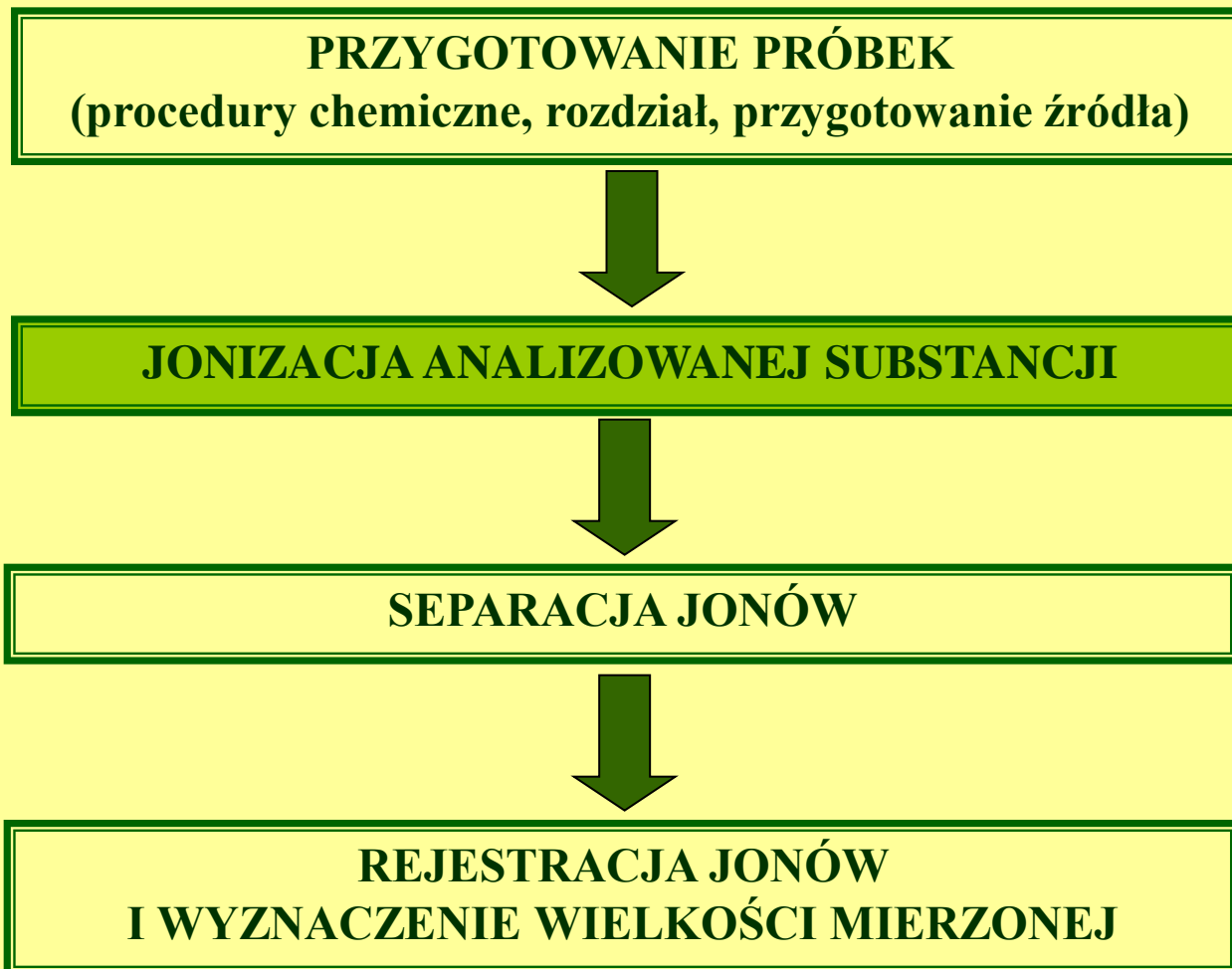
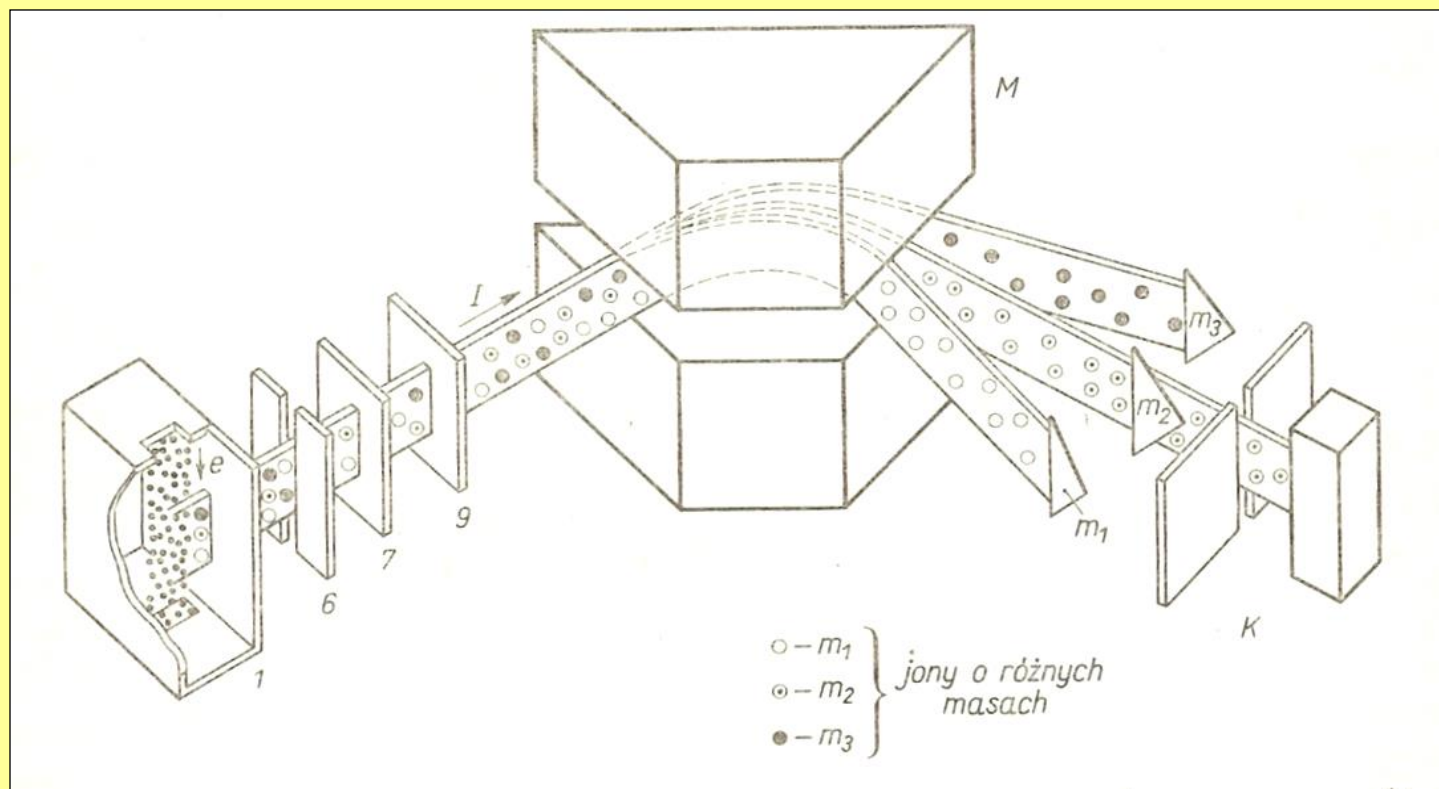


Źródła jonów

SCHEMAT IDEOWY PROCESU ANALIZY MAS Z WYKORZYSTANIEM SPEKTROMETRU MASOWEGO



Źródła jonów służą do przeprowadzania substancji analizowanych w spektrometrze w jony znajdujące się w fazie gazowej pod bardzo niskim ciśnieniem.



Najważniejsze funkcjonalne elementy źródeł jonów:

- **komora jonizacji**
- **układ ekstrakcji jonów (układ szczelin wyciągających jony z obszaru jonizacji)**
- **układ ogniskujący (układ formujący wyciągnięte jony w wiązkę jonową – najczęściej stosuje się ogniskowanie elektrostatyczne)**
- **układ przyspieszający jony do żądanej energii**

Podstawowe parametry źródła jonów:

- o Natężenie całkowitego prądu jonowego I^+ (I), wychodzącego ze źródła w postaci zogniskowanej wiązki jonów;
- o Gęstość prądu jonowego j ;
- o Skład wiązki jonów (z komory jonizacji wyciągane są zarówno atomowe, jak i cząsteczkowe jony badanej substancji oraz jony zanieczyszczeń i domieszek);
- o Rozrzut energetyczny wytwarzanych jonów ΔU ;
- o **Sprawność (lub wydajność) źródła η** - stosunek liczby wyprodukowanych jonów do liczby atomów lub cząsteczek obojętnych dostarczonych do źródła;
- o **Jasność układu jonowo-optycznego k** – stosunek liczby jonów wyprowadzonych ze źródła w postaci zogniskowanej wiązki, do całkowitej liczby jonów powstałych w źródle w jednostce czasu.

Techniki jonizacji

Istnieje wiele metod jonizacji cząsteczek w spektrometrach mas. Do metod najczęściej używanych należą:

Jonizacja elektronami (Electron Ionisation, EI) – jonizacja przy pomocy wiązki elektronów. Jonizacja odbywa się w próżni. Metoda ta powoduje zwykle fragmentację badanych cząsteczek. EI charakteryzuje się stosunkowo małą wydajnością – poniżej 1% cząsteczek ulega jonizacji. Oprócz jonu cząsteczkowego M^+ , obserwuje się jony fragmentacyjne, charakterystyczne dla struktury cząsteczki. Głównym ograniczeniem tej techniki jest konieczność odparowania próbki. Nie nadaje się ona do analizy związków polarnych, nietrwałych termicznie i o dużych masach cząsteczkowych.

Elektrozpylanie (**Electrospray, ESI**) – polegające na rozpylaniu pod ciśnieniem atmosferycznym cieczy zawierającej badaną substancję z igły, do której przyłożono wysokie napięcie (zwykle 1–5 kV). Jest to jedna z łagodnych metod jonizacji – zwykle nie powoduje fragmentacji badanych cząsteczek.

Termorozpylanie (Termospray, TE) – jonizacja przez podgrzanie (przy pomocy prądu elektrycznego) roztworu zawierającego sól i analizowaną substancję wewnątrz stalowej kapilary. Gorąca substancja jest rozpylana w komorze próżniowej z prędkością naddźwiękową.

Jonizacja chemiczna (Chemical Ionisation, CI) – jony wytwarzane są na skutek zderzeń cząsteczek badanego związku chemicznego z jonami pierwotnymi obecnymi w źródle jonów. Jest to metoda niepowodująca fragmentacji cząsteczek (łagodna jonizacja). Używane są gazy takie jak metan, amoniak lub tlen.

Bombardowanie szybkimi atomami (Fast-Atom Bombardment, FAB), polegającą na bombardowaniu cząsteczki obojętnymi atomami o wysokiej energii (zwykle 17 lub 70 eV). Cząsteczki mogą znajdować się w fazie gazowej lub być rozpuszczone w ciekłej, mało lotnej substancji (matrycy) np. glicerolu.

Bombardowanie jonami (spektrometria mas jonów wtórnych – Secondary Ion Mass Spectrometry, SIMS) Metoda ta początkowo była stosowana do substancji przewodzących prąd lub substancji naniesionych na metalowe płytki. Obecnie metodę SIMS stosuje się z powodzeniem do substancji nieprzewodzących prądu. Istnieje odmiana techniki SIMS, w której badana substancja jest rozpuszczona w ciekłej matrycy (najczęściej glicerolu). Technika ta jest nazywana czasami LSIMS (Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry) lub FIB (Fast Ion Bombardment).

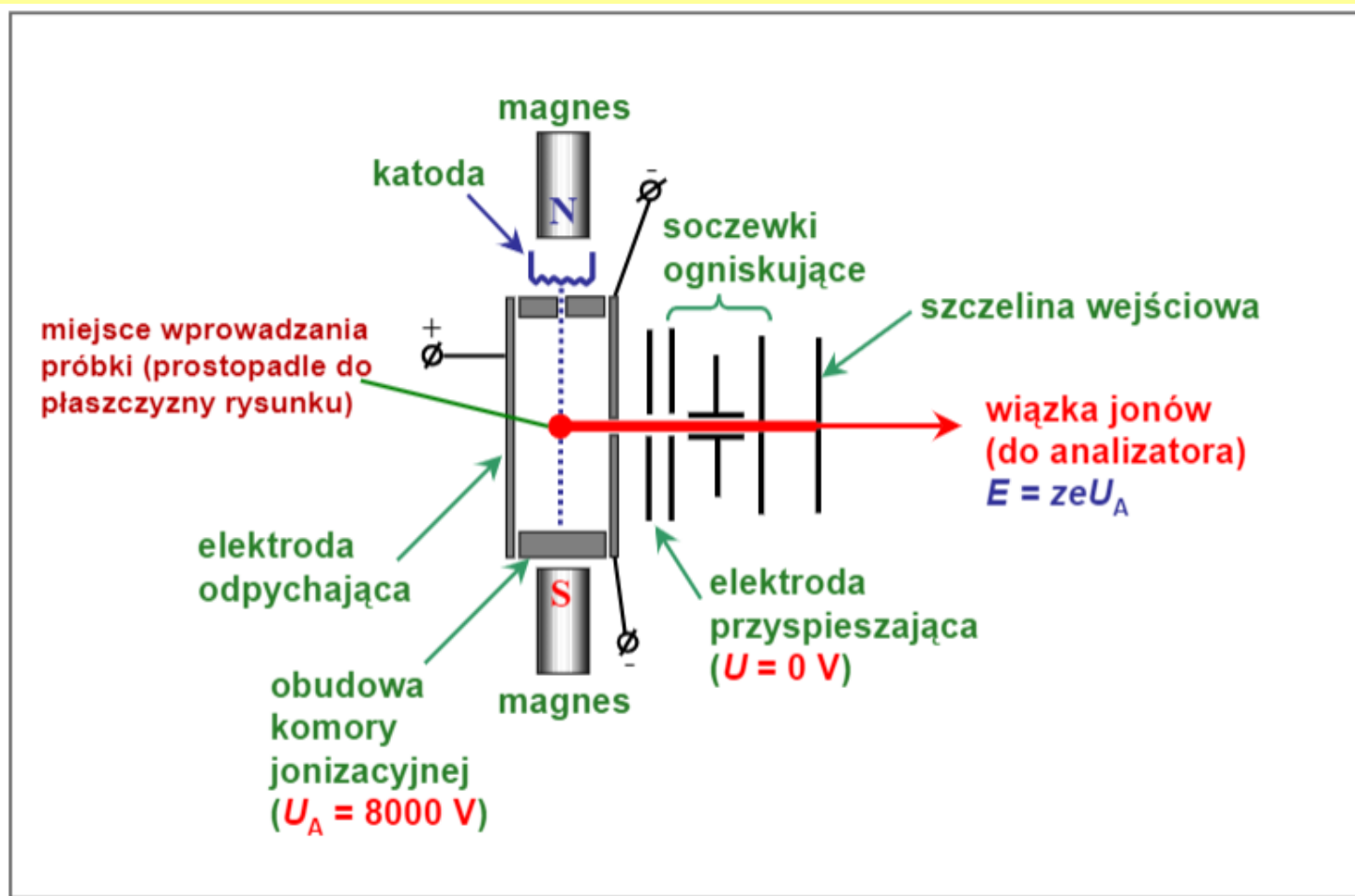
Desorpcja laserowa z udziałem matrycy (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation, MALDI) – w której stosuje się jonizację laserową, ale z tak dobraną energią wiązki, aby nie doprowadzać do fragmentacji cząsteczek (łagodna metoda jonizacji), lecz tylko do ich wybijania ze specjalnie przygotowanej matrycy. Matryca absorbuje energię lasera, która jest później przekazywana do analizowanych cząsteczek. Metoda ta jest bardzo często stosowana w badaniach nad biopolimerami i polimerami syntetycznymi.

Plazma wzbudzona indukcyjnie (Inductively Coupled Plasma, ICP) – jonizowana substancja jest wprowadzana do plazmy płomienia palnika znajdującego się w kwarcowej rurze. Rura otoczona jest cewką, przez którą przepływa prąd zmienny o wysokiej częstotliwości. Plazma ogrzewa się do temperatury rzędu 10000 K w wyniku wzbudzenia polem magnetycznym wytworzonym przez prąd płynący w cewce. Metoda nadaje się doskonale do analizy pierwiastków metalicznych.

Wiele metod jonizacji cząsteczek, takich jak FAB, EI i LD, prowadzi do fragmentacji cząsteczek chemicznych w trakcie jonizacji, co powoduje, że różne spektrometry mogą generować różne widma dla tego samego związku chemicznego. Fragmentacja cząsteczek może pomagać w analizie, gdy badany jest jeden związek chemiczny. Pomiar masy takiego związku często nie wystarcza do jego identyfikacji, na którą pozwala analiza charakterystycznego wzoru fragmentacji takiego związku. W przypadku mieszanin wielu związków chemicznych wtórne reakcje między jonami pochodzącymi z różnych związków uniemożliwiają praktycznie analizę danych.

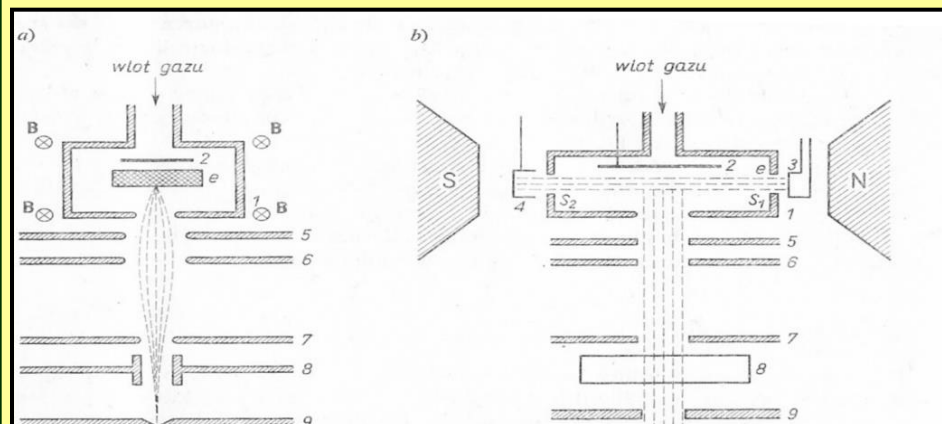
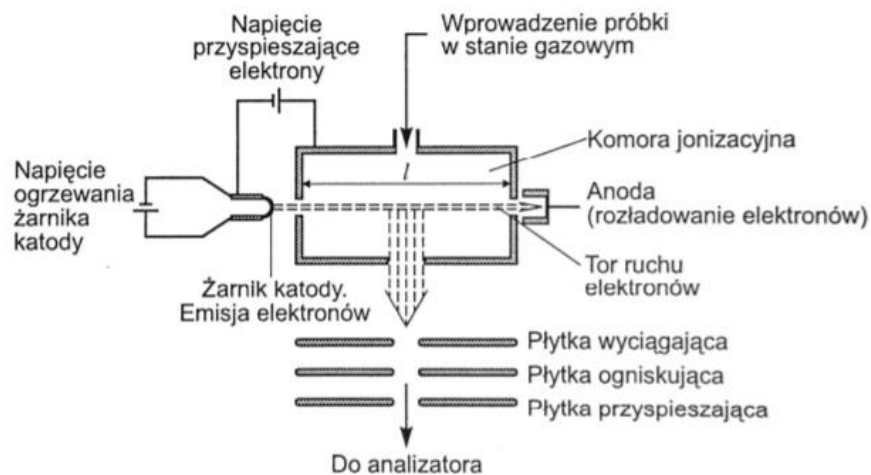
I. ŹRÓDŁO Z JONIZACJĄ ELEKTRONAMI (EI – *electron impact*)

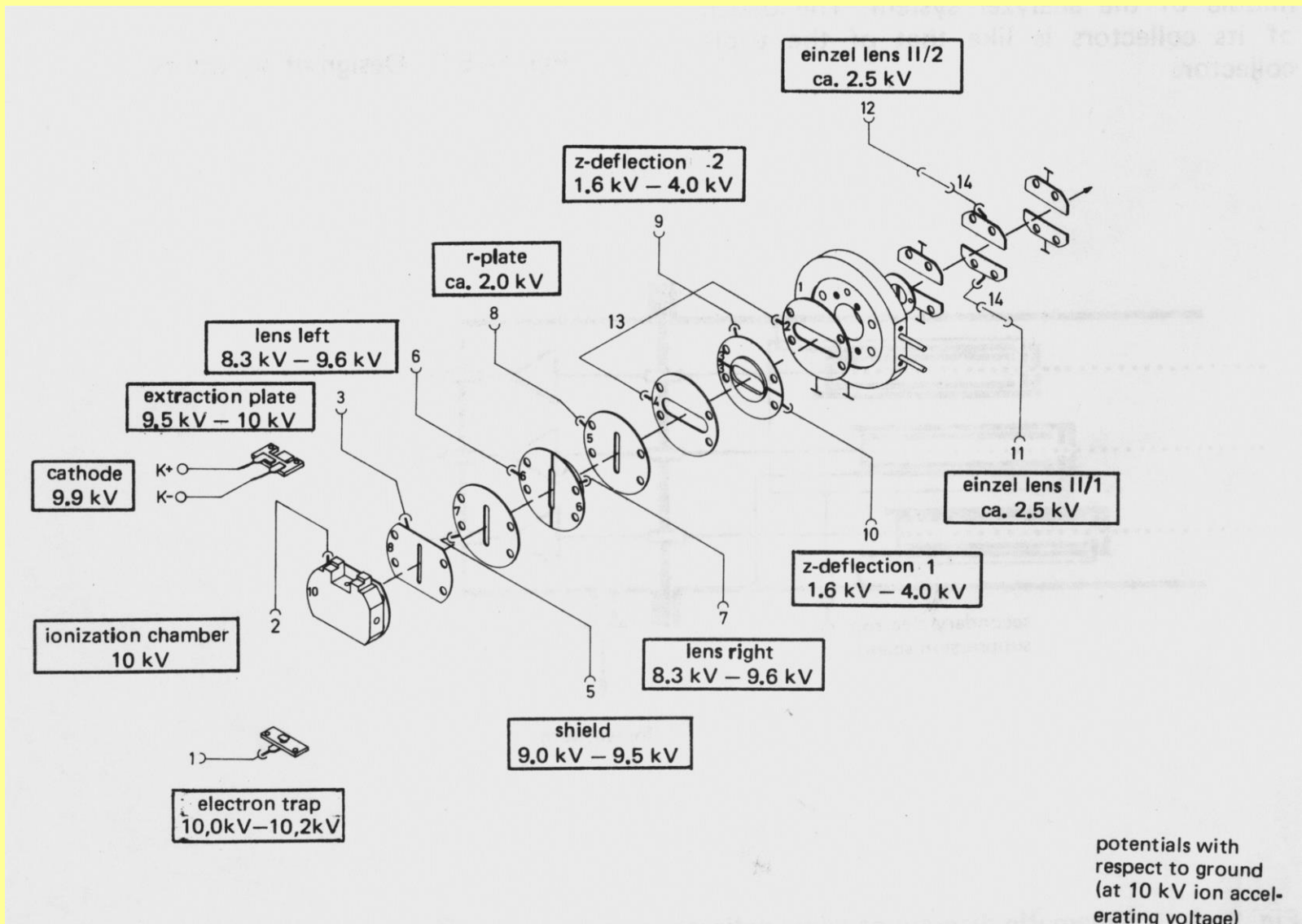
Metoda EI, nazywana także jonizacją przez bombardowanie elektronami, wynaleziona została przez DEMPSTERA, a udoskonalona przez BLEAKNEYA i NIERA.



I. ŹRÓDŁO Z JONIZACJĄ ELEKTRONAMI (EI – *electron impact*)

Przykładowe konstrukcje



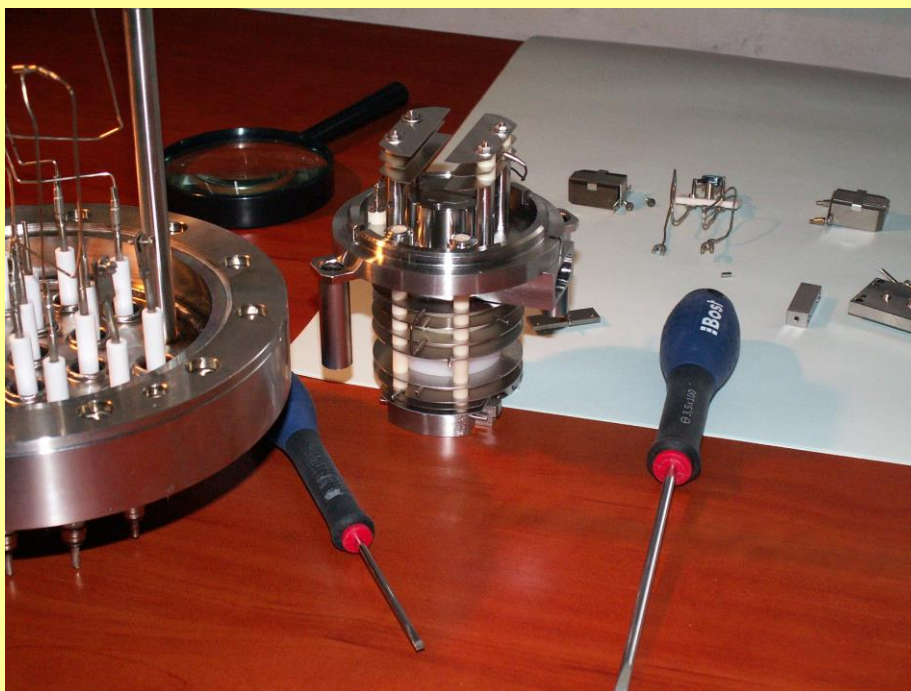


Potencjały w źródle jonów Finnigan Mat 251

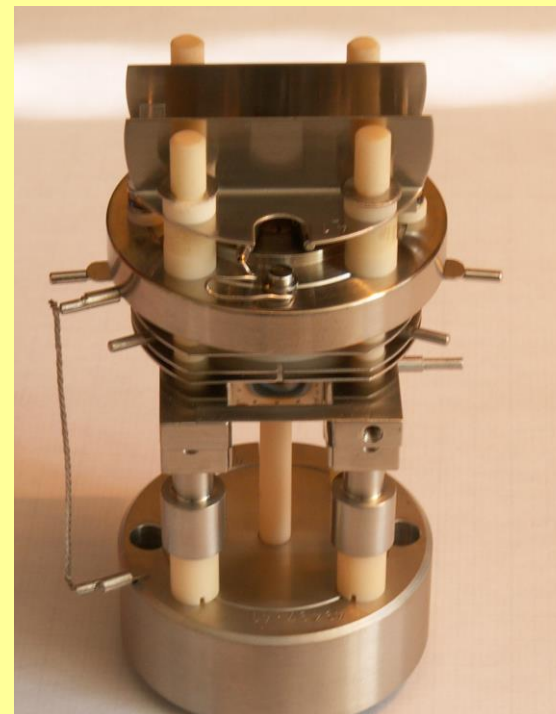
I. ŹRÓDŁO Z JONIZACJĄ ELEKTRONAMI (EI – *electron impact*)

Przykładowe konstrukcje (Finnigan):

MAT 252



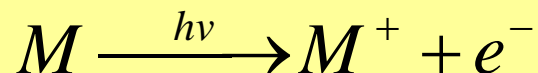
delta S



Proces jonizacji cząsteczek przez elektrony można opisać na gruncie mechaniki kwantowej. Z każdym elektronem można związać falę, której długość λ jest powiązana z masą m i prędkością elektronu V zgodnie z równaniem de Broglia:

$$\lambda = h/p = h/mV$$

Elektronom o energii 20 eV odpowiada długość fali $\lambda=0,27$ nm, a o energii 70 eV – 0,14 nm. Jeżeli długość fali elektronu jest rzędu długości wiązań w cząsteczce, to w skutek interferencji fala jest zakłócana i staje się falą złożoną. Gdy jedna z jej częstotliwości ν ma energię $h\nu$ odpowiadającą przejściu elektronu w cząsteczce, to może przekazywać jej energię. Jeżeli będzie przekazana wystarczająca ilość energii, to może nastąpić wybitcie elektronu z cząsteczki (jonizacja):



Przy niskim napięciu przyspieszającym energia elektronów jest mniejsza od energii jonizacji cząsteczki. Przy podwyższonych napięciach długość fali elektronu staje się zbyt mała. Cząsteczki są "przezroczyste" dla tych elektronów. Dla cząsteczek organicznych szerokie maksimum znajduje się w pobliżu 70 eV.

Przy danym napięciu przyspieszającym i stałej objętości źródła, w stałej temperaturze, liczba jonów wytwarzana w jednostce czasu (prąd jonowy I^+) jest powiązana z ciśnieniem p i prądem elektronów i równaniem:

$$I^+ = K p i$$

w którym K oznacza stały współczynnik proporcjonalności.

Z równania tego wynika, że prąd jonowy jest wprost proporcjonalny do ciśnienia gazu próbki w źródle jonów i dzięki temu możliwe jest zastosowanie tego typu źródła jonów do pomiarów ilościowych.

W zwykłych warunkach ciśnienia w spektrometrach mas, przy energii strumienia elektronów równej 70 eV, jonizacji ulega średnio jedna na tysiąc cząsteczek wprowadzonych do źródła jonów.

Jonizacja elektronami przebiega w fazie gazowej, dlatego też jej zastosowanie ogranicza się do substancji w formie gazowej, bądź też takich które można odparować bez rozkładu w warunkach wysokiej próżni. Jedną z możliwych modyfikacji, rozszerzających zakres stosowania metody EI polega na desorpcji próbki z ogrzewanego żarnika, wprowadzonego w pobliże wiązki elektronów.

Typowe parametry źródeł EI:

$$\Delta U \leq 1 \text{ eV}$$

$$I^+ = 10^{-9} \div 10^{-10} \text{ A}$$

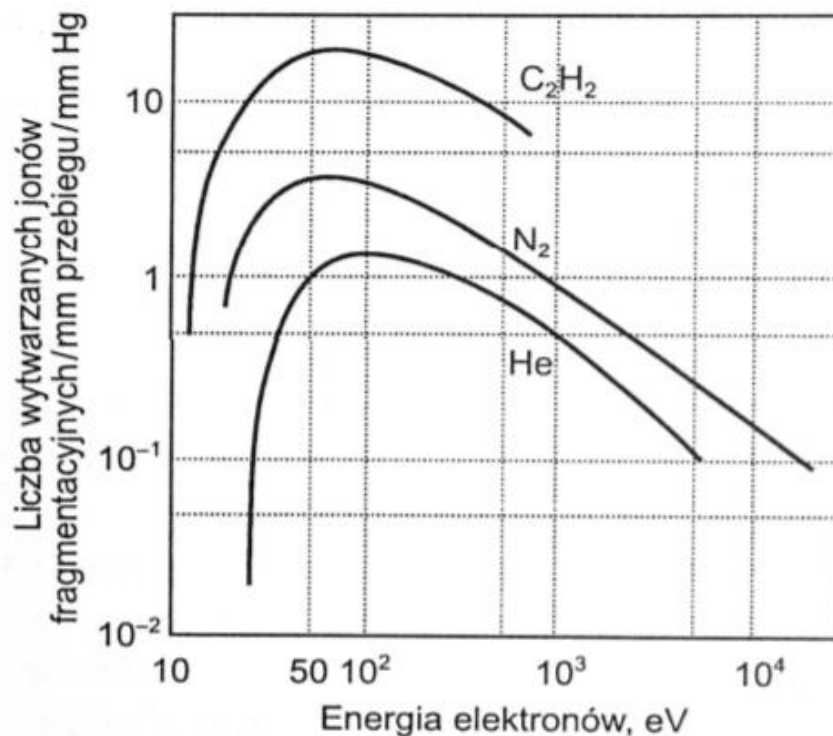
$$\eta = 10^{-4} \div 10^{-5}$$

Czynniki wpływające na wydajność źródła oraz natężenie prądu jonowego:

Geometria źródła - podczas pracy katoda nagrzewa się do wysokiej temperatury (ok. 2000°C) – możliwa zmiana geometrii → zmiana rozkładu gęstości elektronów w jonizującej gaz wiązce elektronowej → zmniejszenie natężenia prądu jonowego wychodzącego ze źródła i wydajności źródła.

Elektrony wtórne - w procesie jonizacji dużą rolę odgrywają elektrony wtórne, powstające zarówno w wyniku jonizacji obojętnych cząsteczek gazu, jak również na skutek wybijania ich z brzegów szczelin elektronowych. Jonizacja gazu w źródle powinna odbywać się jedynie wzdłuż pierwotnej wiązki elektronowej emitowanej z katody. Elektrony wtórne mogą powodować jonizację w całym obszarze komory jonizacyjnej. Jony uzyskane w procesie jonizacji elektronami wtórnymi mają bardzo duży rozrzut energetyczny, wywołujący zmniejszenie zdolności rozdzielczej spektrometru (analogia do aberracji chromatycznej w optyce). W normalnych warunkach pracy źródła 20-30% wszystkich elektronów obecnych w komorze jonizacyjnej stanowią elektrony wtórne.

Energia elektronów pierwotnych – natężenie prądu jonowego wytwarzanego w źródle jonów zależy od energii elektronów pierwotnych (przekrój czynny na jonizację jest funkcją energii elektronu pierwotnego).



Na rysunku powyżej przedstawiono typowe krzywe liczby jonów produkowanych przez dany strumień elektronów (prąd pułapki), przy stałym ciśnieniu próbki w źródle jonów, gdy zmienia się napięcie przyspieszające elektrony → energia kinetyczna.

Temperatura źródła jonów – duży wpływ na wydajność źródła i natężenie prądu jonowego ma jego temperatura, a w szczególności temperatura pracy komory jonizacyjnej. Temperatura robocza komory wynosi zwykle ok. 200°C. Wzrost temperatury powoduje wzrost prędkości wypływu gazu z komory → spadek gęstości gazu w komorze → zmniejszenie natężenia prądu jonowego.

Gdyby jonizacja próbki przebiegała pod ciśnieniem atmosferycznym, należałoby oczekiwać 10^3 - 10^4 -krotnie większych wydajności jonizacji, niż w zwykłym źródle EI pod obniżonym ciśnieniem. Problemem technicznym jest skonstruowanie połączenia źródła jonów (pod ciśnieniem atmosferycznym) z analizatorem, w którym ciśnienie powinno być zredukowane przynajmniej do 10^{-8} hPa.

II. Termoemisyjne źródła jonów TI

Termoemisyjne źródła jonów oparte są o zjawisko jonizacji powierzchniowej. Jonizacja powierzchniowa lub termoemisja jonowa polega na powstawaniu jonów na powierzchni ciała stałego podczas podgrzewania go do wysokiej temperatury. Zjawisko to zostało odkryte przez Gehrkego i Reichenheima w 1906 roku i zastosowane w 1918 roku przez Dempstera w jego spektrografie mas. Dempster stwierdził wówczas, że metoda otrzymywania jonów drogą termoemisji nie może być zastosowana do badania wszystkich pierwiastków.

Metodą termoemisji można szczególnie łatwo otrzymywać jony dodatnie metali alkalicznych, co jest związane z niską energią jonizacji atomów tych pierwiastków.

ZASADA DZIAŁANIA TERMOEMISYJNYCH ŹRÓDEŁ JONÓW

Atom obojętny w stanie podstawowym lub w stanie wzbudzonym w zetknięciu się z powierzchnią metalu traci elektron przechodząc w jon dodatni. Utracony przez atom elektron przyłącza powierzchnia metalu, przy czym wydziela się energia równa pracy wyjścia elektronu z powierzchni metalu. Proces ten przebiega samorzutnie, jeżeli praca związana z jonizacją atomu $V \cdot e$ (gdzie V jest potencjałem jonizacji atomu, e - ładunkiem elementarnym) będzie wykonana kosztem energii przyłączenia elektronu równej pracy wyjścia elektronu z powierzchni metalu $\varphi \cdot e$ oraz energii wzbudzenia atomu $U \cdot e$ (gdzie φ jest potencjałem wyjścia elektronu z powierzchni metalu, U - potencjałem wzbudzenia atomu).

Warunek emisji jonu dodatniego z powierzchni metalu można zatem zapisać w ogólnej postaci w formie nierówności:

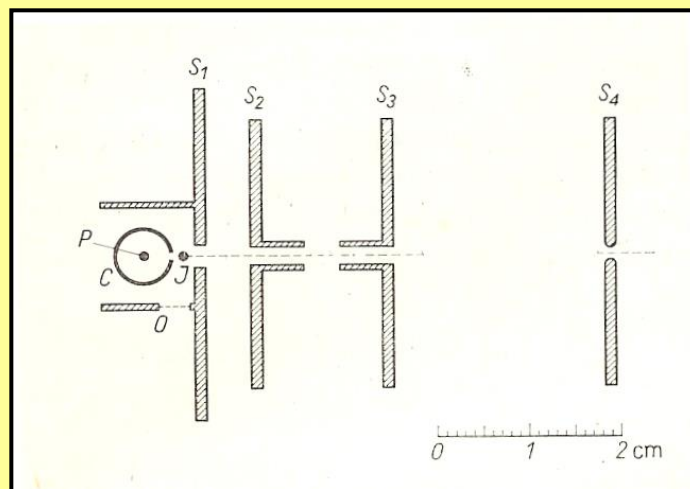
$$\varphi \cdot e + U \cdot e \geq V \cdot e$$

Jeżeli atom nie znajduje się w stanie wzbudzonym ($U \cdot e = 0$), wówczas praca wyjścia elektronu z powierzchni metalu $\varphi \cdot e$, powinna być nie mniejsza niż energia jonizacji.

Wybór **materiału**, na który należy nanosić badaną próbkę, zależy od wielu czynników. Głównymi z nich są: wartość pracy wyjścia elektronu z powierzchni tego materiału oraz jego temperatura topnienia. Materiałami takimi mogą, być: platyna, wolfram, tantal, ren.

Efektywna praca wyjścia z powierzchni jonizatora określona jest stanem jego warstwy powierzchniowej i często bardzo znacznie różni się od pracy wyjścia $\varphi \cdot e$ dla czystego metalu. Na przykład, w temperaturach $T < 1800$ K powierzchnia wolframu jest utleniona i znajdujący się na niej tlenek wolframu ma znacznie niższą pracę wyjścia ($\varphi \cdot e = 6,5 \text{ eV}$), co jest głównym powodem częstszego stosowania wolframu niż platyny - nawet wtedy, gdy ze względu na warunki temperaturowe można używać platyny.

BUDOWA TERMOEMISYJNEGO ŹRÓDŁA JONÓW



Przy zastosowaniu tej metody badaną próbkę nanosi się na jedno włókno i ogrzewa w celu jej odparowania. Drugie, bardziej nagrzane włókno - umieszczone w pobliżu pierwszego - wykorzystuje się w celu jonizacji powstałych par. Zaletą tej metody jest to, że próbkę można odparowywać przy niskiej temperaturze, a powstałe pary mogą być jonizowane przy znacznie wyższej temperaturze. Ma to szczególne znaczenie przy badaniu próbek lotnych, które nie mogły być odparowywane i jonizowane na jednym włóknie.

Zalety i wady źródeł termoemisyjnych

Źródła jonów z jonizacją powierzchniową mają pewne zalety w porównaniu z innymi typami źródeł. Główną ich zaletą jest **brak wiązki elektronowej** jonizującej gaz, która mogłaby jonizować gazy resztkowe i przez to dawać intensywne tło w widmie mas. Ciśnienie w komorze spektrometru pracującego z termoemisyjnym źródłem jonów w wyniku wydzielania się gazów podczas żarzenia włókna i ogrzewania elementów konstrukcyjnych źródła jest zwykle nieco wyższe niż w spektrometrze z innymi źródłami jonów.

Inną zaletą tego typu źródeł jest **bardzo małe zużycie analizowanej substancji**, przeciętnie $10\mu\text{g}/\text{mm}^2$.

Wady:

- Konieczność częstej wymiany próbek, w związku z czym źródło musi być łatwe do demontowania. Istnieje zatem konieczność wprowadzenia śluzy próżniowej albo, w przypadku jej braku, konieczność otwierania spektrometru podczas wymiany próbki.
- Ze względu na wydzielanie się dużej ilości gazów zaadsorbowanych w grzejących się częściach źródła prędkość pompowania w obszarze jonizacji powinna być możliwie duża (w źródle z bombardowaniem elektronami nie ma takiego warunku).
- W źródle z jonizacją powierzchniową występuje "efekt pamięci", który można usunąć, stosując dla każdej próbki nowy układ włókien. Jednak w przypadku stosunkowo lotnych próbek zachodzi zwykle konieczność czyszczenia części źródła przylegających do włókien, ponieważ części te grzeją się i osiadłe na nich poprzednio substancje mogą z nich parować.

III. ŹRÓDŁO Z JONIZACJĄ CHEMICZNĄ (CI)

W przypadku dużych molekuł organicznych jonizacja elektronami powoduje rozpad jonu molekularnego na wiele fragmentów, pośród których niekiedy trudno go odnaleźć.

Przewagą jonizacji chemicznej (CI) nad jonizacją elektronami jest otrzymanie widma, w którym obserwuje się jon (lub jony) o masie związanej w określony sposób z masą cząsteczkową badanej substancji (najczęściej M^{+1} jako rezultat przyłączenia jonu H^{+}). Jony te mają mniejszą energię i są zatem łatwiej rozpoznawalne niż w widmach EI. Jest to jedna z metod "miękkiej jonizacji".

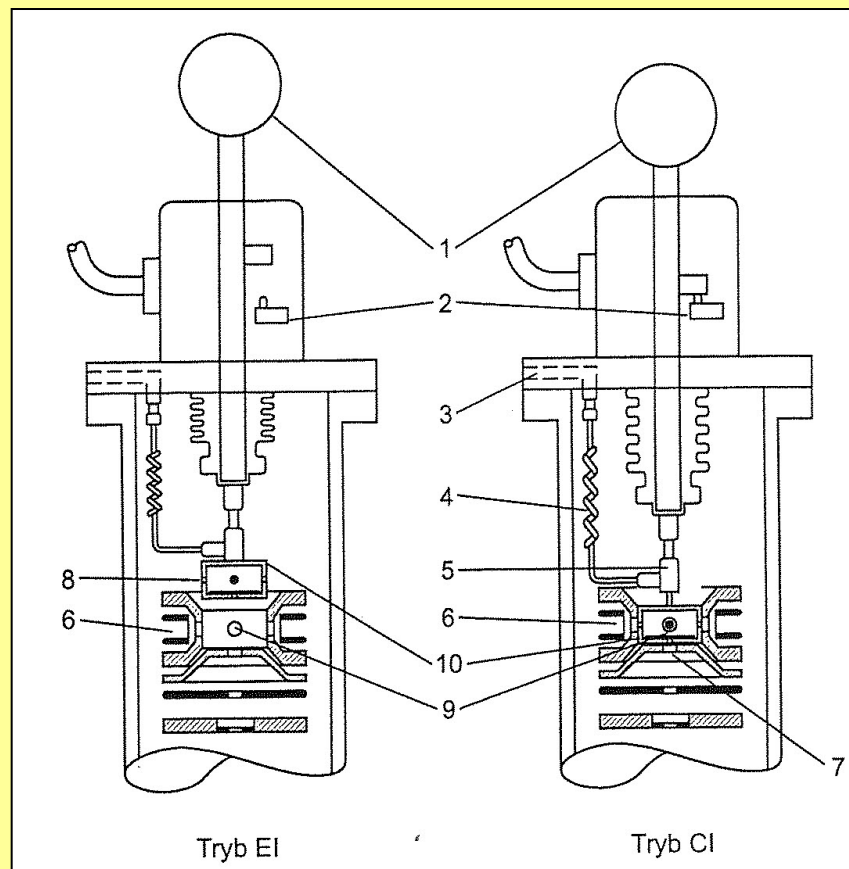
W jonizacji chemicznej jony są wytwarzane na skutek zderzeń jonizowanej cząsteczki z obecnymi w źródle jonami pierwotnymi. W źródle jonów pracującym w reżimie jonizacji chemicznej stwarza się więc warunki umożliwiające kolizję jonów z cząsteczkami w ograniczonej jego części. W tym celu konieczne jest wytworzenie lokalnie ciśnienia wystarczająco wysokiego aby zderzenia były częste.

III. ŹRÓDŁO Z JONIZACJĄ CHEMICZNĄ (CI)

Przy ciśnieniu rzędu 60 Pa średnia droga swobodna jest rzędu dziesiątych części mm. Źródło jonów musi być tak zaprojektowane, aby lokalnie utrzymać ciśnienie tego rzędu. Jednym z rozwiązań jest umieszczenie w źródle jonów niewielkiej puszkki o krawędzi ok. 1 cm. Ciśnienie w puszcze jest rzędu 10 Pa a poza nią rzędu 10^{-3} Pa.

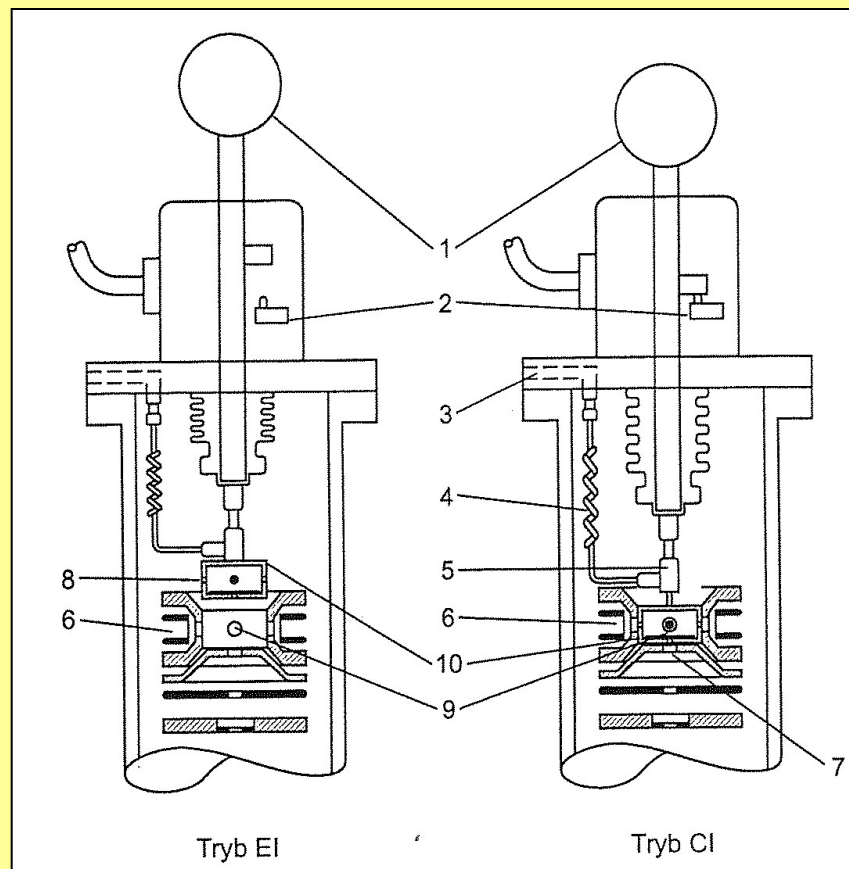
Kombinowane źródło jonów EI i CI

1 – dźwignia przełącznika, 2 – mikroprzełącznik, 3 – wlot gazu reagującego, 4 – elastyczna kapilara doprowadzająca gaz reagujący, 5 – przesłona, 6 – żarnik, 7 – wyjście jonów do analizatora, 8 – przejście elektronów jonizujących, 9 – otwór wprowadzenia próbki, 10 – puszcza (wg dokumentacji MAT 44 S)

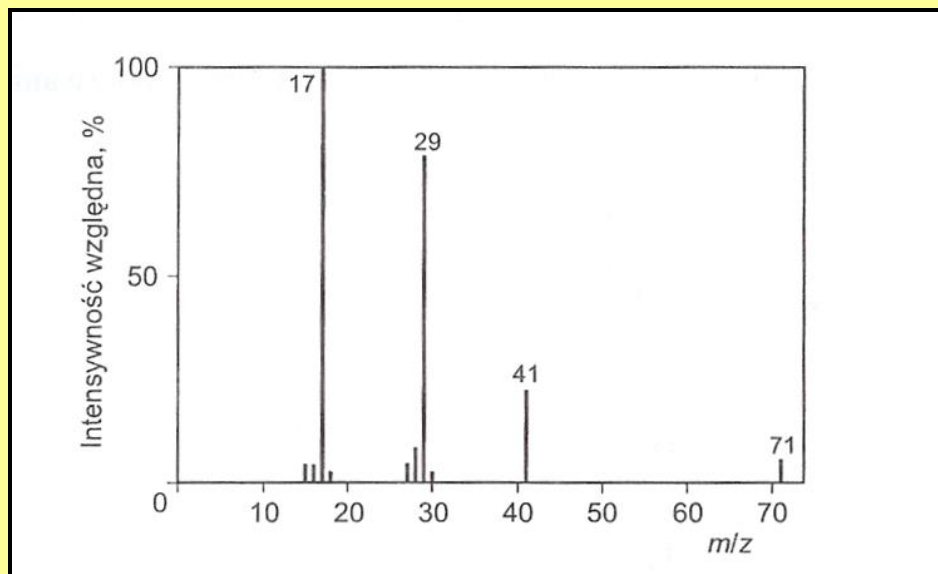


III. ŹRÓDŁO Z JONIZACJĄ CHEMICZNĄ (CI)

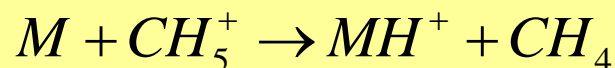
Ciśnienie substancji jonizowanej wewnątrz puszkki jest niewielką częścią ciśnienia gazu reagującego i dlatego przede wszystkim gaz reagujący ulegnie jonizacji elektronami wchodzącymi do puszkki (EI). Tak utworzone jony wejdą w kolizję przede wszystkim z innymi cząsteczkami gazu reagującego (najczęściej amoniaku, izobutanu lub metanu), tworzącego w ten sposób, po serii reakcji, plazmę jonizującą.



Względna intensywność produkcji wszystkich tych jonów zależy od ciśnienia. Na rysunku poniżej przedstawiono widmo plazmy dla jonizacji chemicznej metanu otrzymane przy 200 μbar (20 Pa). Przyjmując jon CH_5^+ o najwyższej intensywności za 100%, względna intensywność jonu C_2H_5^+ wynosi 83%, a C_3H_5^+ - 14%.



W większości przypadków, z wyjątkiem węglowodorów nasyconych, podczas jonizacji chemicznej metanem następuje przyłączenie protonu do cząsteczki analizowanej substancji w reakcji typu kwas-zasada z jonami gazu reagującego, np.:



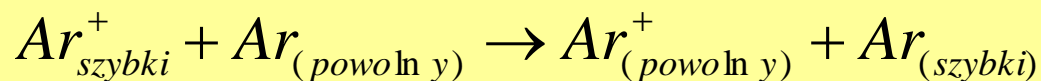
IV. JONIZACJA PRZEZ BOMBARDOWANIE SZYBKIMI ATOMAMI (SIMS, FAB)

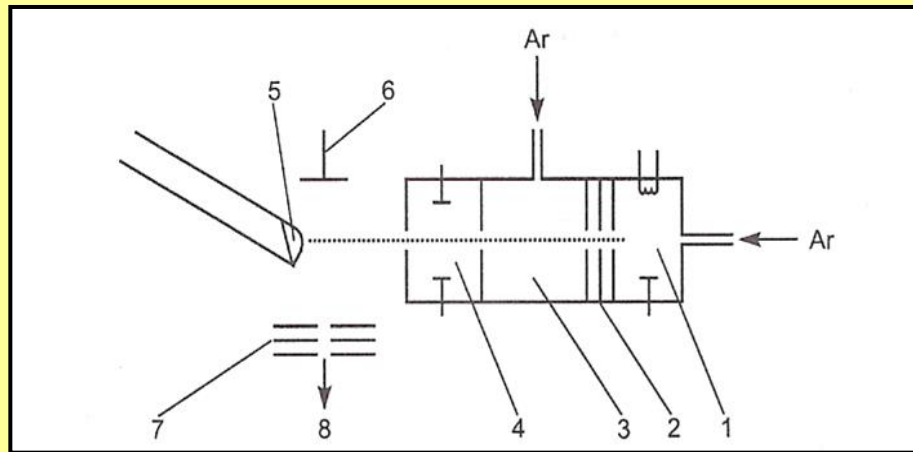
Spektrometria mas jonów wtórnych w ciekłej matrycy (**LSIMS**, *Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry*) i bombardowania szybkimi atomami (**FAB**, *Fast Atom Bombardment*) polega na zogniskowaniu na próbce odpowiednio wiązki jonów lub cząstek obojętnych.

Spektrometrię mas jonów wtórnych (**SIMS**, *Secondary Ion Mass Spectrometry*) stosuje się tylko do ciał stałych. Jest ona szczególnie przydatna w badaniach powierzchni przewodzących, natomiast nie można jej stosować do substancji nieprzewodzących, a więc do związków organicznych, ponieważ akumulują one ładunki pochodzące z padającej wiązki jonów.

Wiązka obojętnych atomów jest otrzymywana przez jonizację argonu, niekiedy ksenonu. Jony są przyspieszane różnicą potencjałów rzędu kilku do kilkunastu kV. Przechodząc przez komorę kolizyjną, jony są zobojętniane w wyniku wymiany ładunku między cząsteczkami i jonami, ale ich pęd jest jeszcze wystarczający do zachowania kierunku ogniskowania.

Reakcję zobojętniania można zapisać następująco:





Schemat działającego FAB.

1 – jonizacja argonu, 2 – układ optyki jonowej, 3 – komora, 4 – przejście między elektrodami, 5 – matryca (kropla gliceryny), 6 – popychacz, 7 – elektrody ogniskujące, 8 – analizator

Wiązka obojętnych atomów, uderzając w roztwór analizowanej substancji w ciekłej matrycy, wytwarza falę uderzeniową, która powoduje wyrzucenie z roztworu jonów i cząsteczek. Jony są przyspieszane w polu elektrycznym i kierowane w stronę analizatora.

Metoda FAB prawie nie powoduje jonizacji, z roztworu są bowiem wyrzucane jony już w nim istniejące. Jest to bardzo dobra metoda wytwarzania pozornych jonów molekularnych substancji polarnych o dużych masach cząsteczkowych. Dodatkową korzyścią jest możliwość otrzymywania w wielu przypadkach strumienia jonów który może być stabilny przez długi okres czasu. Metoda FAB wymaga jednak zastosowania rozpuszczalników, których jony komplikują widmo.

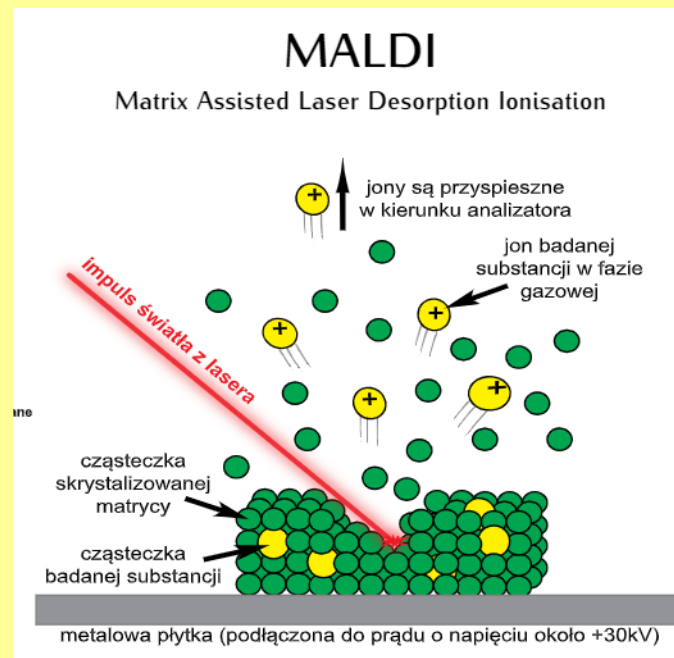
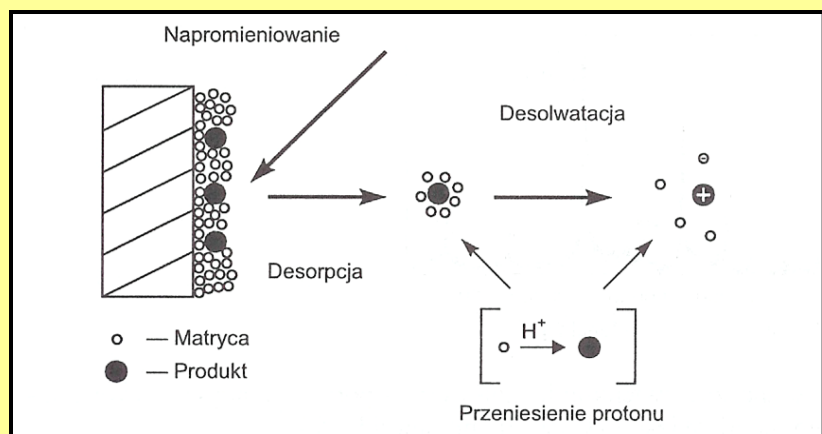
V. DESORPCJA LASEROWA (LD)

Desorpcja laserowa (LD) jest skuteczną metodą otrzymywania jonów w fazie gazowej. Impulsy laserowe o energii 10^6 - 10^{10} W/cm² są ogniskowane na powierzchni 10^{-3} - 10^{-4} cm² próbki, zazwyczaj stałej. Impulsy te powodują wyrzucenie kilku pikomoli substancji w formie jonów i obojętnych cząsteczek, które dodatkowo reagują ze sobą w obszarze o ich zwiększonym stężeniu tuż nad powierzchnią próbki.

Metoda ta jest używana do badań powierzchni i analizy lokalnego składu próbki, jak np. inkluzji w minerałach i organelli w komórkach. Ustawiając długość fali lasera za pomocą tej metody można przeprowadzić wybiórczą jonizację. Ponieważ impuls laserowy i dostarczany sygnał trwają bardzo krótko, metoda LD wymaga analizatorów o jednoczesnej detekcji lub analizatorów czasu przelotu jonów.

V. DESORPCJA LASEROWA (LD)

Jonizacja przez desorpcję laserową w matrycy (**MALDI**, *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization*) polega na zmieszaniu analizowanej substancji z roztworem małych cząsteczek organicznych, zwanym matrycą, silnie absorbującą promieniowanie emitowane przez laser (zwykle w zakresie UV). Napromieniowanie tej mieszaniny laserem powoduje nagromadzenie w niej dużej ilości energii i wzbudzenie elektronów w cząsteczkach matrycy (po poprzednim odparowaniu rozpuszczalnika). Jony utworzone przez przeniesienie protonu między foto-wzbudzoną matrycą a analizowaną substancją ulegają następnie desorpcji. Schemat tego procesu przedstawiony jest na rys. poniżej.

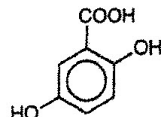
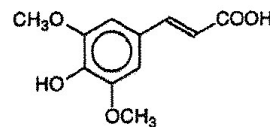
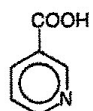


Zasada jonizacji przez desorpcję laserową w matrycy MALDI

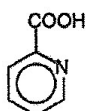
Najczęściej stosowane matryce



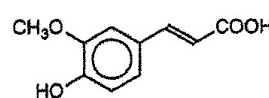
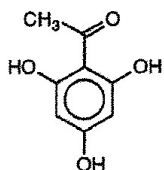
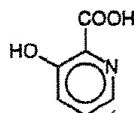
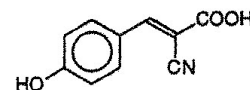
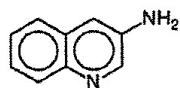
p-nitroanilina (PNA)

kwas 2,5-dihydrokso-
benzoesowy
(gentyzynowy, DHB)kwas 3,5-dimetoksy-4-
hydroksycynamonowy
(synapinowy, SA)

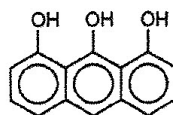
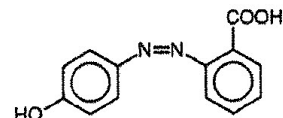
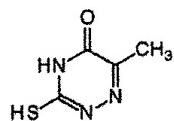
kwas nikotynowy (NA)



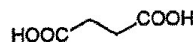
kwas pikolinowy

kwas 3-metoksy-4-
hydroksycynamonowy
(ferulowy, FA)2,4,6-trihydrokso-
acetofenonkwas 3-hydroksypikolinowy
(HPA lub 3HPA)kwas 4-hydrokso- α -
cyjanocynamonowy (4HCCA)

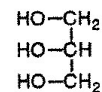
3-aminochinolina

1,8,9-trihydrokso-
antracenkwas 2-(4-hydroksyfenylazo)-
benzoesowy (HABA)

6-aza-2-tiotymina (ATT)



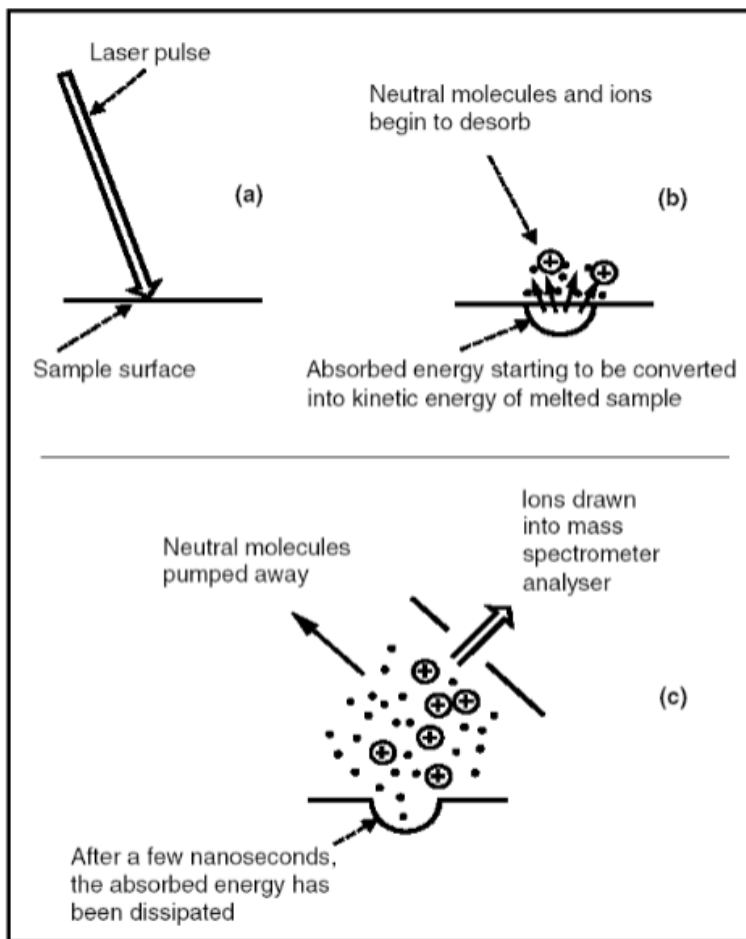
kwas bursztynowy



glicerol

V. DESORPCJA LASEROWA (LD)

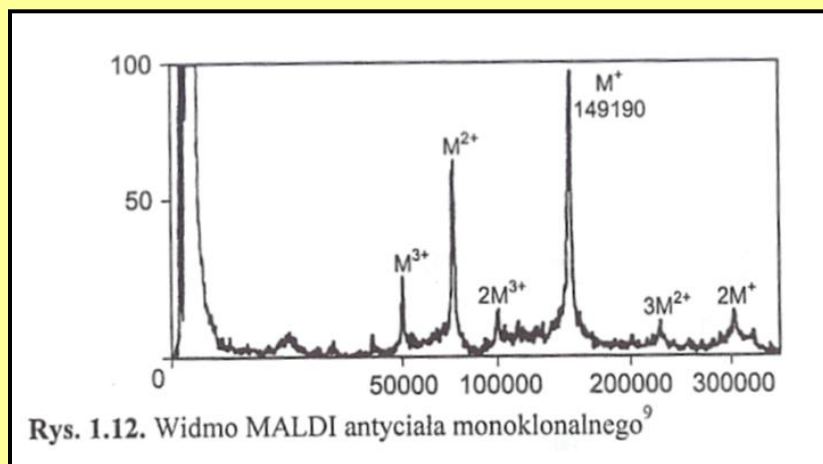
Mechanizm jonizacji w technice MALDI



Impuls laserowy trafia w powierzchnię próbki (a) przekazując jej energię, która powoduje stopienie i odparowanie cząsteczek obojętnych i jonów z małego obszaru próbki (b). Po kilku nanosekundach cząsteczki obojętne zostają odpompowane, a cząstki naładowane (jony) są wciągane polem elektrycznym do analizatora spektrometru masowego (c).

Zalety MALDI:

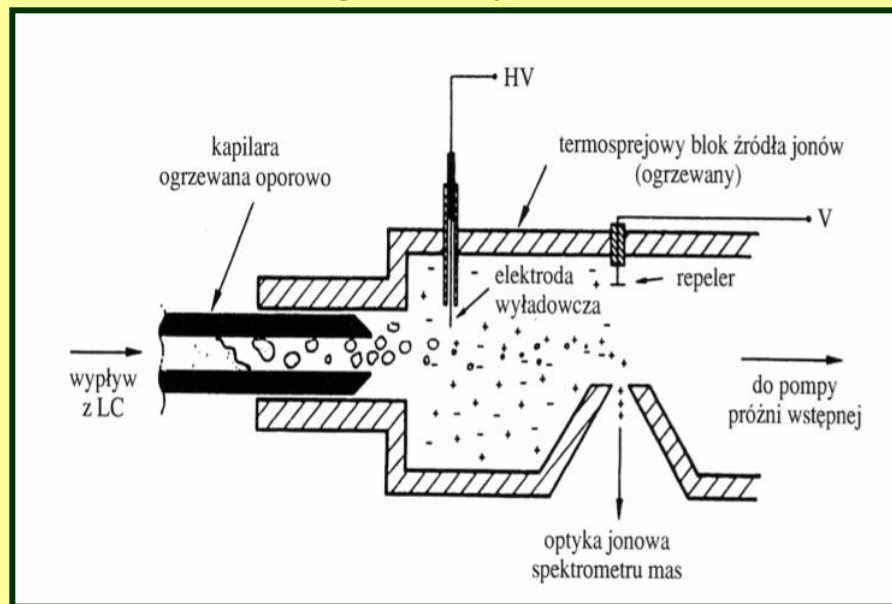
- matryca, występująca w znacznym nadmiarze w stosunku do analitu, rozdziela jego cząsteczki między sobą, co ogranicza tworzenie agregatów i ułatwia powstawanie jonów molekularnych;
- nie jest konieczne dostrajanie długości fali lasera do częstotliwości absorpcji każdego analitu;
- udaje się w ten sposób zdesorbować i zjonizować białka o masach do 300000 Da, ponieważ proces ten nie zależy ani od właściwości absorpcyjnych, ani od rozmiarów cząsteczki analizowanej substancji;
- wysoka czułość - za pomocą matrycy z kwasu nikotynowego możliwe jest wykrywanie pikomoli białek.



VI. TERMOSPREJ (TSP)

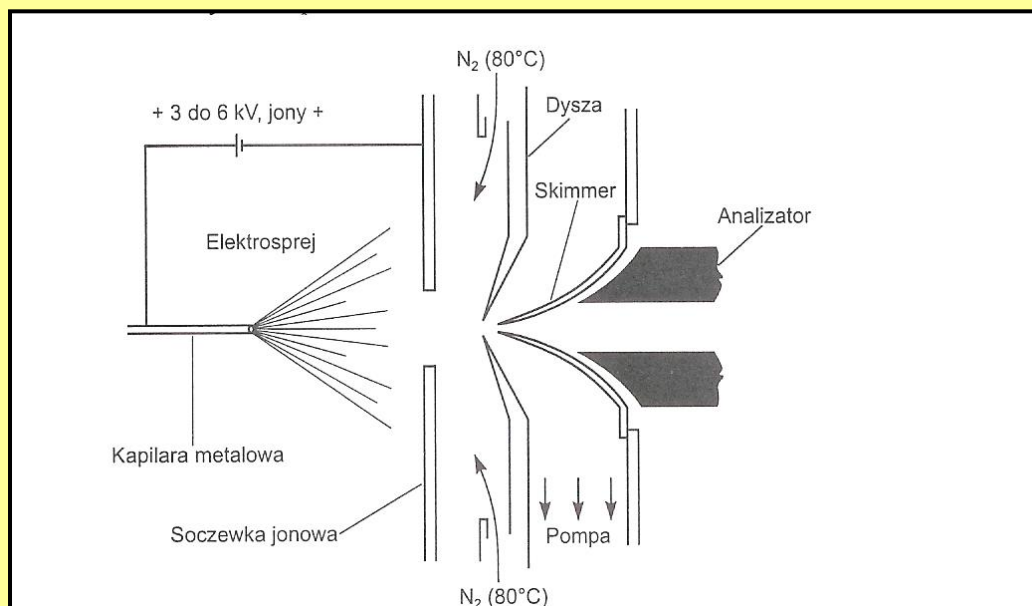
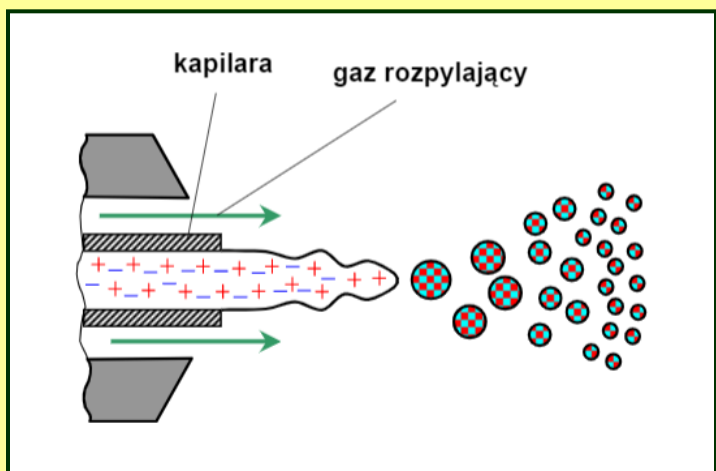
W metodzie termosprej (rozpylanie termiczne) roztwór zawierający sól i analizowaną próbkę jest pompowany silnie ogrzewaną za pomocą prądu elektrycznego stalową kapilarą i rozpylany z prędkością naddźwiękową w komorze próżniowej. Powstaje aerozol z drobnych kropelek, zawierający jony i cząsteczki badanej próbki oraz rozpuszczalnika.

Ogrzewanie podczas rozpylania jest konieczne, aby zapobiegać kondensacji aerozolu. Powstające jony są wybierane i przyspieszane w kierunku analizatora przez popychacz i elektrody ogniskujące. Kropelki aerozolu są pompowane w sposób ciągły przez otwór umieszczony naprzeciw dyszy. Metoda ta jest często używana do sprzężenia spektrometrii mas z metodami chromatograficznymi.



VII. ELEKTROSPREJ (ES, ESI)

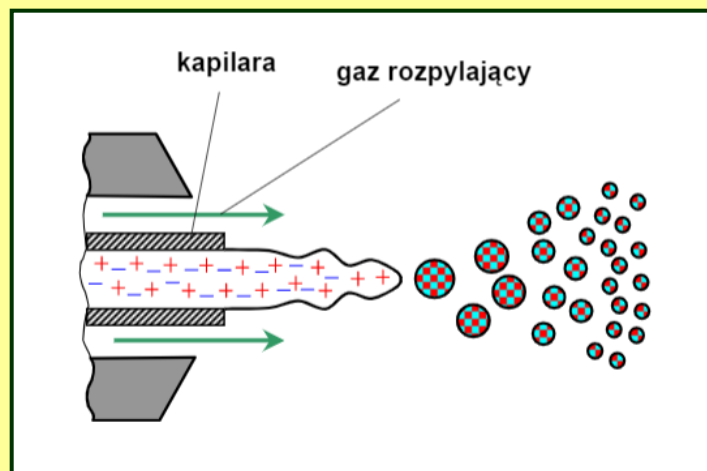
Metoda ES (rozpylanie w polu elektrycznym) polega na wprowadzeniu strumienia cieczy o niewielkim przepływie (zwykle 1-10 $\mu\text{l}/\text{min}$) w silne pole elektryczne pod ciśnieniem atmosferycznym. Pole elektryczne jest wytwarzane przez przyłożenie napięcia rzędu 3-6 kV między kapilarą a elektrodą o przeciwnym znaku, położoną w odległości 0,3-2 cm.



Pole elektryczne powoduje akumulację ładunków w powierzchniowej warstwie cieczy na końcu kapilary, która to warstwa ulega rozerwaniu, a rozpylona ciecz tworzy strumień naładowanych kropelek.

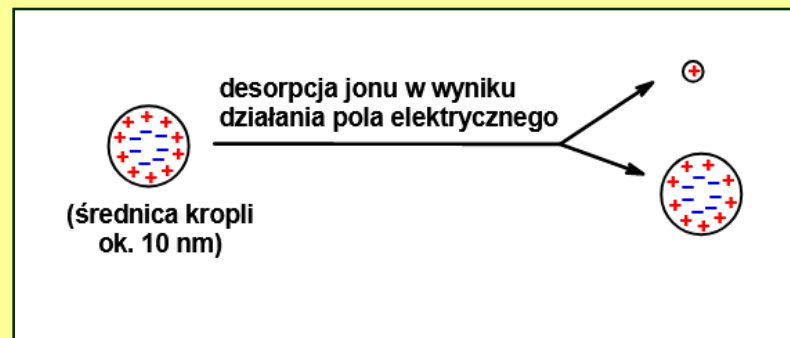
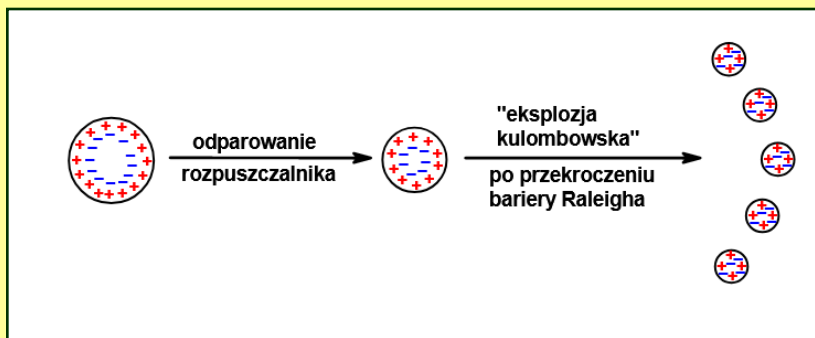
VII. ELEKTROSPREJ (ES, ESI)

Pole elektryczne powoduje akumulację ładunków w powierzchniowej warstwie cieczy na końcu kapilary, która to warstwa ulega rozerwaniu, a rozpylona ciecz tworzy strumień naładowanych kropelek.



VII. ELEKTROSPREJ (ES, ESI)

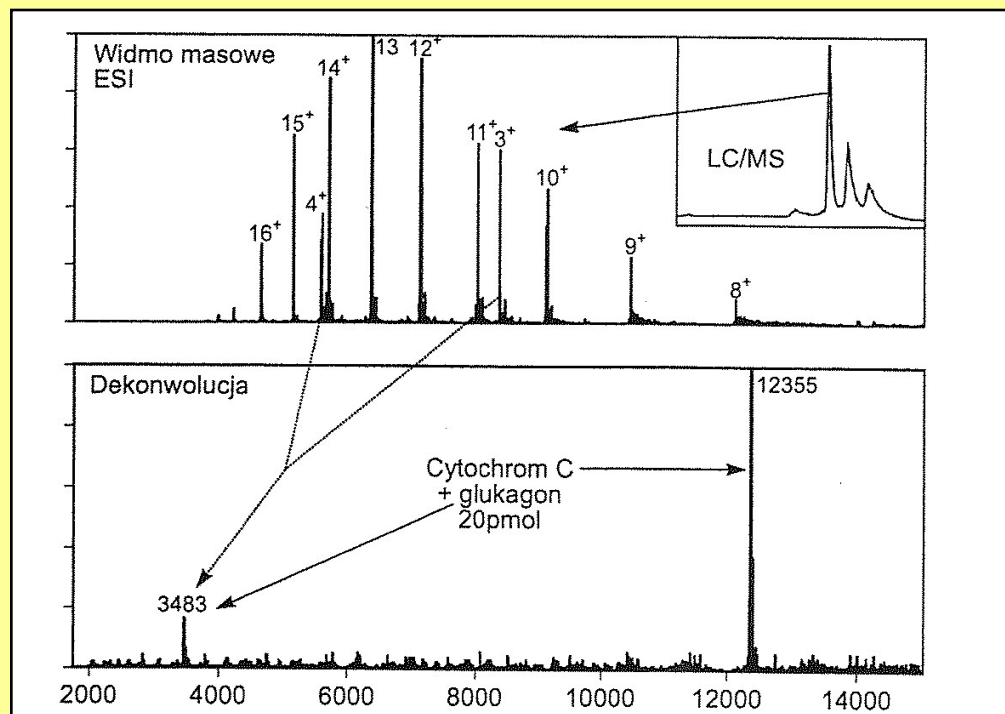
Odparowywanie rozpuszczalnika zawartego w kropelkach powoduje ich kurczenie aż do momentu, w którym siły odpychania kulombowskiego zblizają się do poziomu sił kohezyjnych (spójności) kropelek i spowodują ich rozerwanie. Krople mogą w ten sposób ulegać kaskadowemu rozszczepianiu do coraz to mniejszych kropelek aż do momentu, gdy pole elektryczne na ich powierzchni stanie się wystarczająco duże, aby spowodować desorpcję jonów.



Jeżeli w cząsteczce jest wiele miejsc mogących ulec jonizacji, to otrzymane jony będą wówczas miały ładunek wielokrotny. Otrzymanie jonów wielokrotnie naładowanych umożliwia nie tylko zwiększenie czułości, lecz również analizowanie cząsteczek o bardzo dużych masach cząsteczkowych za pomocą analizatorów o znacznie niższym nominalnym zakresie mas. Dzięki tej metodzie można określić np. masy cząsteczkowe białek aż do ponad 130 kDa, z granicą wykrywalności rzędu pikomoli, za pomocą analizatora kwadrupolowego.

VII. ELEKTROSPREJ (ES, ESI)

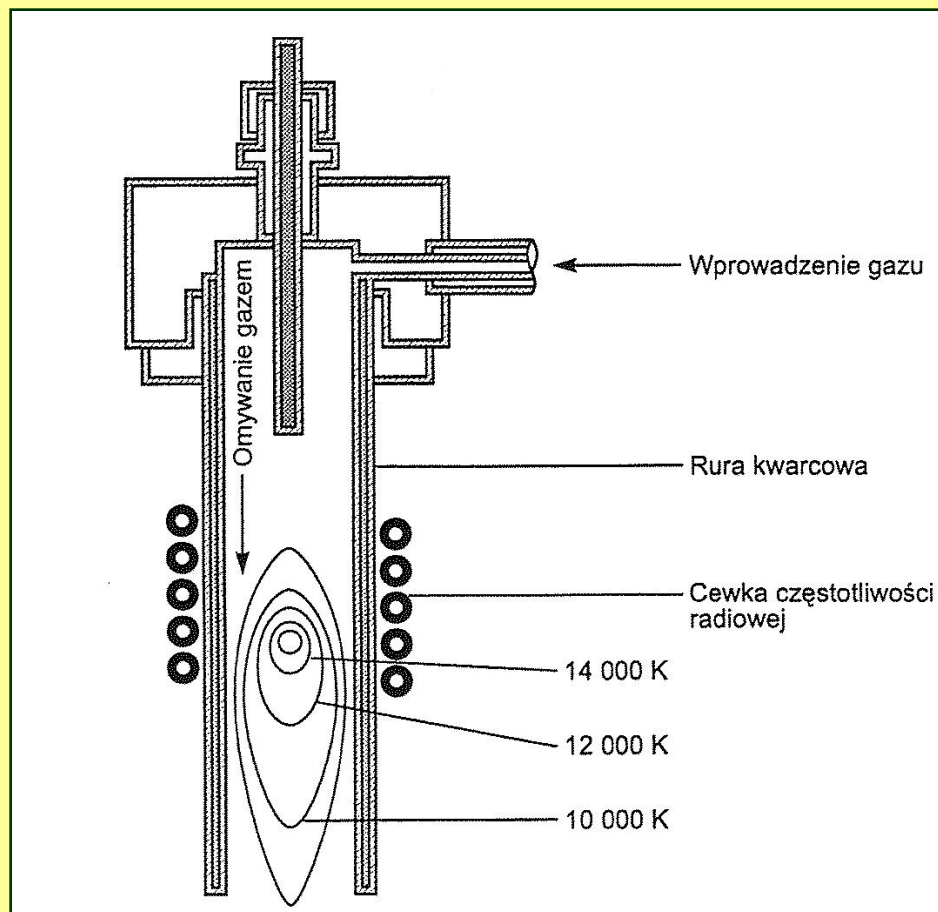
Opracowano algorytmy, za pomocą których można określić masy cząsteczkowe substancji przez przekształcenie obecnej w widmie ESI serii pików wielokrotnie naładowanych w pik o pojedynczym ładunku (dekonwolucja). Niektóre z algorytmów umożliwiają również dekonwolucję widm ESI mieszanin. Ze względu jednak na złożoność widm każdego ze składników, w ten sposób można analizować tylko proste mieszaniny.



(Dekonwolucja widma ESI mieszaniny białek (Finnigan MAT))

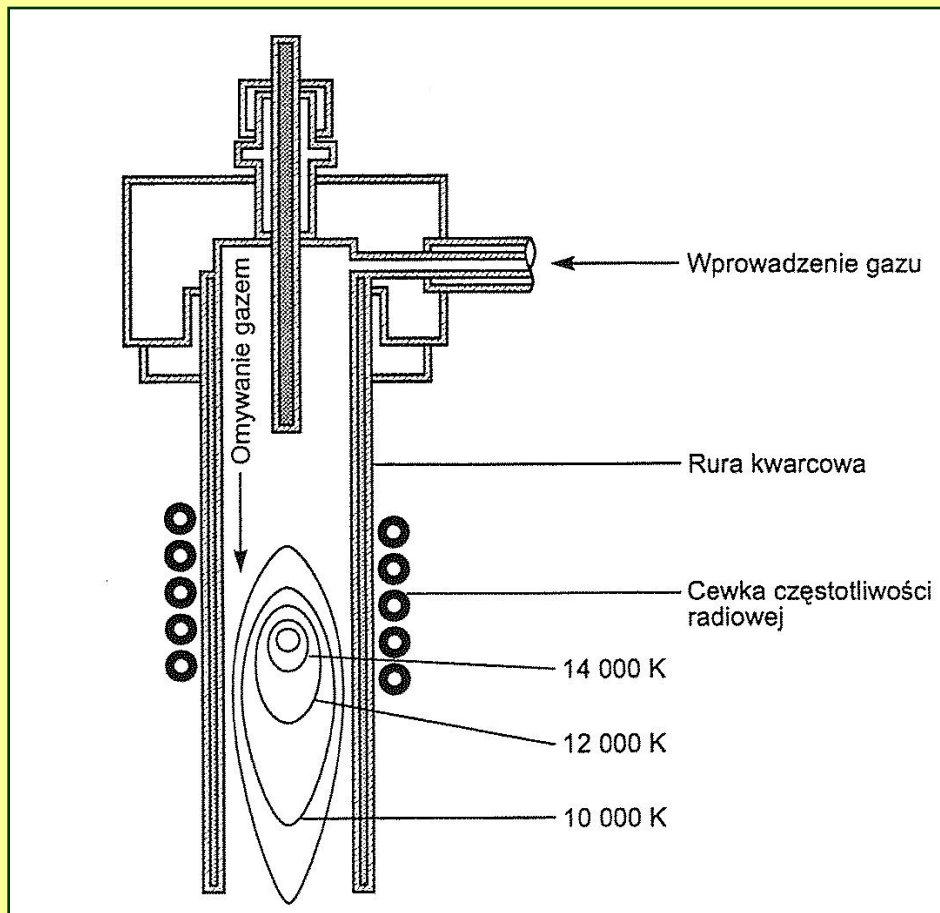
VIII. JONIZACJA W PLAŹMIE WZBUDZONEJ INDUKCYJNIE (ICP)

Źródło jonów z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ICP) umożliwia szybką, jednoczesną analizę dużej ilości pierwiastków metalicznych z wysoką czułością i precyzją.



VIII. JONIZACJA W PLAŹMIE WZBUDZONEJ INDUKCYJNIE (ICP)

Głównym elementem źródła ICP jest palnik plazmowy. Do jego płomienia jest wprowadzony roztwór analizowanej próbki w postaci aerozolu po uprzednim rozpyleniu.



Kwarcowa rura zawierająca plazmę jest otoczona cewką, przez którą przepływa prąd zmienny o częstotliwości radiowej. Prąd ten wzbudza przez indukcję pole magnetyczne B o liniach sił równoległych do rury, które z kolei powoduje ruch obrotowy jonów obecnych w plazmie. W wyniku wzbudzenia plazma ogrzewa się silnie i jej temperatura może przekroczyć 10 tysięcy K, a znajdujące się w niej cząsteczki ulegną jonizacji z wydajnością bliską 100% i przewagą jonów pojedynczo naładowanych. Dzięki temu możliwe jest sprzężenie źródła jonów ze spektrometrem mas (ICP-MS).



DZIĘKUJĘ ZA UWAGĘ