

IONIZACE ELEKTROSPREJEM

KAREL LEMR a LUCIE BOROVCOVÁ

*Mikrobiologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20
Praha 4
karel.lemr@upol.cz*

Došlo 8.1.20, přijato 17.2.20.

Klíčová slova: hmotnostní spektrometrie, elektrosprej, nanoelektrosprej, separační techniky, vícenásobně nabitě ionty

Obsah

1. Úvod
2. Elektrosprej
3. Nanoelektrosprej
4. Spojení separačních technik s hmotnostní spektrometrií pomocí elektrospreje
5. Vícenásobně nabitě ionty
6. Závěr

1. Úvod

Elektrosprejová ionizace (ionizace elektrosprejem, electrospray ionization – ESI, electrospray – ES) významně podpořila uplatnění hmotnostní spektrometrie v analýze polárních a iontových malých organických látek i biomakromolekul, především proteinů^{1–5}. Elektrosprejování je způsob rozprašování roztoků působením elektrického pole, při kterém se vytváří velmi malé nabitě kapky. Proces se využívá v řadě odvětví, např. při nanášení barev. S myšlenkou využít elektrosprej jako iontový zdroj pro hmotnostní spektrometrii přišel M. Dole se spolupracovníky⁶. Získali ionty polystyrenu v plynné fázi, vyřešili přechod mezi atmosférickým tlakem, při kterém jsou roztoky rozprašovány, a vakuovaným prostorem, ale ionty nesledovali hmotnostním spektrometrem. Další vylepšení navrhl a propojení s hmotnostním spektrometrem realizoval tým Johna Fenna, který ukázal možnosti elektrospreje při ionizaci malých molekul^{7,8}, peptidů, oligonukleotidů a proteinů^{9,10}. Za uplatnění této ionizační techniky při analýze biomakromolekul byla J. Fennovi v roce 2002 udělena Nobelova cena. Mimochodem tento významný vědec se narodil v roce 1917, v době, kdy se studiem vlivu elektrického pole na povrch kapalin (v podstatě elektrosprejování) zabýval John Zeleny^{11,12}, americký fyzik s českými předky¹³. Zajímavostí rovněž je, že v roce 1984, tedy ve

stejně době jako J. Fenn, publikovali nezávisle elektrosprejová hmotnostní spektra malých molekul L. N. Galla a spol.¹⁴.

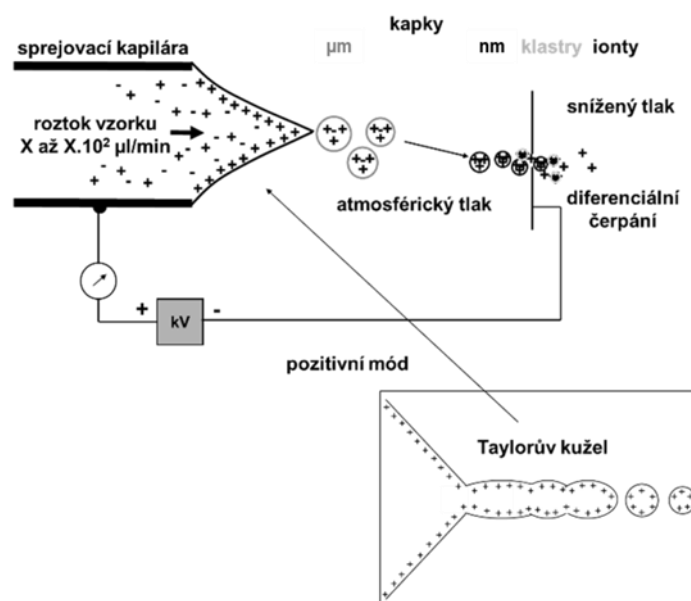
Elektrosprej pracuje s průtoky vzorku v mikrolitrech za minutu. Je-li využito plynu k podpoře zmlžování, zvládá průtoky ve stovkách mikrolitrů za minutu až přes 1 ml min⁻¹. Miniaturizace vedla ke konstrukci nanoelektrospreje, který naopak pracuje s průtoky v řádu desítek nanolitřů za minutu^{15–17}. Elektrosprej se dnes uplatňuje při přímé analýze roztoků nebo jako rozhraní a iontový zdroj při spojení separačních technik (kapalinové chromatografie, superkritické fluidní chromatografie, kapilární elektroforézy) s hmotnostní spektrometrií.

2. Elektrosprej

Elektrosprejování je vyvoláno vložením vysokého napětí (jednotky kV) mezi sprejovací kapiláru a vstup do vakuované části hmotnostního spektrometru^{1–5}. Vzniká elektrické pole o intenzitě v řádu 10⁵ až 10⁶ V m⁻¹. Sprejovací kapilárou je přiváděn roztok analyzované látky (analytu) ve vhodném rozpouštědle. Ionizace elektrosprejem zahrnuje několik kroků: 1) tvorbu nabitých kapek; 2) zmenšování těchto kapek; 3) uvolnění iontů do plynné fáze; 4) sekundární děje v plynné fázi^{18,19}.

Elektrické pole způsobuje polarizaci rozpouštědla a hromadění iontů se stejným nábojem v blízkosti menisku kapaliny ve špičce sprejovací kapiláry (obr. 1). Ionty s opačným nábojem se od něj vzdalují. Při dostatečné intenzitě elektrického pole dochází k deformaci menisku kapaliny a vytváří se tzv. Taylorův kužel^{1,17,20,21}. Z jeho vrcholu tryská jemný proud kapaliny, který se rozpadá na primární nabitě kapky. Jejich stejný náboj vede k vzájemnému odpuzování kapek a tvorbě jemného spreje. Kapky obsahují ionty kladné i záporné, ale podle pracovního módu převažují jedny z nich. Pracovní mód je určován volbou polaritity vkládaného napětí. Kladné napětí na sprejovací kapiláře odpuzuje směrem k povrchu roztoku kationty, záporné napětí pak anionty.

Stabilní rozprašování kapek z Taylorova kužele začíná při určité hodnotě napětí, přesněji intenzitě elektrického pole, která závisí na povrchovém napětí analyzovaného roztoku. Se zvyšováním napětí se charakter spreje mění, objevuje se více kuželů, ze kterých jsou emitovány nabitě kapky. Elektrosprej stále poskytuje ionty, ale signál bývá méně stabilní. Příliš vysoké napětí způsobuje výboj v iontovém zdroji, který výrazně mění hodnotu elektrického proudu ve zdroji a charakter spektra. Nejedná se již o ionizaci elektrosprejem, ale o procesy podobné chemické ionizaci za atmosférického tlaku. Může nastat i situace, kdy dojde k výboji při nižším napětí, než je napětí potřebné pro vznik Taylorova kužele. K výboji je více náchylný



Obr. 1. **Tvorba nabitých kapek v elektrospreji.** V kladném módu nesou kapky nadbytek kladných iontů, v záporném jsou nabitý záporně. Z vrcholu Taylorova kužele tryská jemný proud kapaliny, ze kterého se oddělují primární kapky o poloměru v řádu jednotek až desítek mikrometrů. Postupným odpařováním rozpouštědla a rozpadem z nich vznikají malé vysoce nabitě kapky s poloměrem v nanometrech, z nich se uvolňují solvatované ionty (klastry)

záporný mód, což je pravděpodobně způsobeno emisí elektronů ze špičky kovové sprejovací kapiláry, na níž je vloženo záporné napětí²².

Hodnotu intenzity elektrického pole E_{on} , při které začíná sprejování z Taylorova kužele, lze vypočítat pomocí vztahu²³:

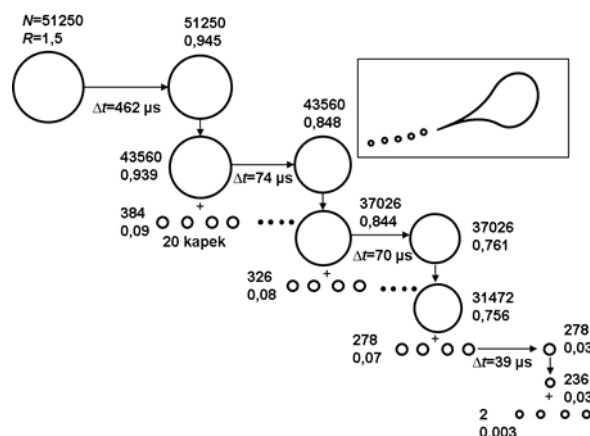
$$E_{on} = [2\gamma \cos 49^\circ / (\epsilon_0 r_c)]^{1/2}$$

kde γ je povrchové napětí, $\cos 49^\circ$ je kosinus polovičního úhlu Taylorova kužele, ϵ_0 permitivita vakua a r_c značí poloměr sprejovací kapiláry. Pro roztoky s větším povrchovým napětím je nutné vkládat vyšší sprejovací napětí, má-li být dosaženo intenzity E_{on} . Je-li například pro methanol (povrchové napětí $0,023 \text{ N m}^{-1}$) sprejovací napětí $2,0 \text{ kV}$, při použití čisté vody ($0,073 \text{ N m}^{-1}$) je třeba nastavit hodnotu $3,6 \text{ kV}$.

Z primárních nabitých kapek se odpařuje rozpouštědlo, a tím se zvyšuje náboj kapky vztážený na jednotku objemu (obr. 2) (cit.¹⁸). Při dostatečném přebytku iontů se stejným nábojem jejich vzájemné odpuzování překonává povrchové napětí, dochází ke coulombickému štěpení. Kapka se deformuje a z protáhlého úzkého konce se uvolňuje asi 20 menších kapek. Primárně vzniklé kapky mají při malých průtocích vzorku poloměr kolem $1,5 \text{ µm}$, kapky druhé generace asi $0,1 \text{ µm}$ (cit.^{18,24}). Střední průměr kapek klesá s menším průměrem sprejovací kapiláry (viz také nanoelektrosprej níže). Kapky druhé generace nesou 10 až 18 % celkového náboje, ale jejich hmotnost odpovídá 1 až 2 % hmotnosti primárních kapek^{18,24–26}. Kulová kapka se stává nestabilní při určité hodnotě náboje kapky q , při tzv. Rayleighově mezi stability:

$$q = 8\pi(\epsilon_0\gamma R^3)^{1/2}$$

kde γ je povrchové napětí, ϵ_0 permitivita vakua a R odpovídá poloměru kulové kapky. Ve skutečnosti jsou v elektrospreji kapky deformované a k jejich štěpení dochází před tímto limitem. Odpařování rozpouštědla a cou-

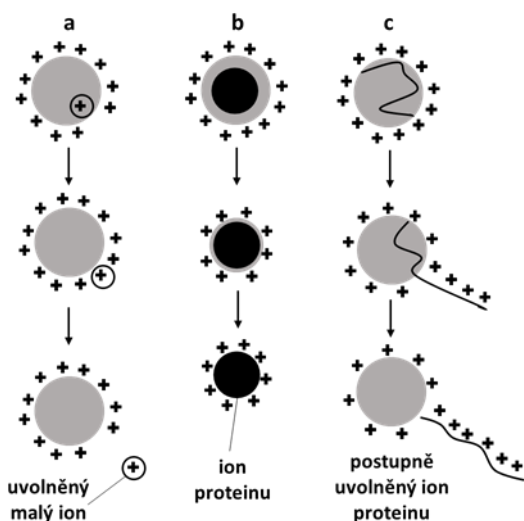


Obr. 2. **Schematické znázornění rozpadu kapek.** Primární kapka vzniká elektrosprejováním (poloměr $1,5 \text{ µm}$ odpovídá malým průtokům roztoku), zmenšuje se odpařováním rozpouštědla, při určité velikosti dochází k rozpadu vlivem odpuzování stejně nabitých částic a děj se opakuje (R – poloměr v µm , N – počet elementárních nábojů v kapce, Δt – doba odpařování rozpouštědla potřebná pro zmenšení kapky před dalším rozpadem, uvedené časové hodnoty odpovídají zhruba methanolu, v detailu je naznačeno asymetrické štěpení kapek, převzato z cit.¹⁸ a přepracováno)

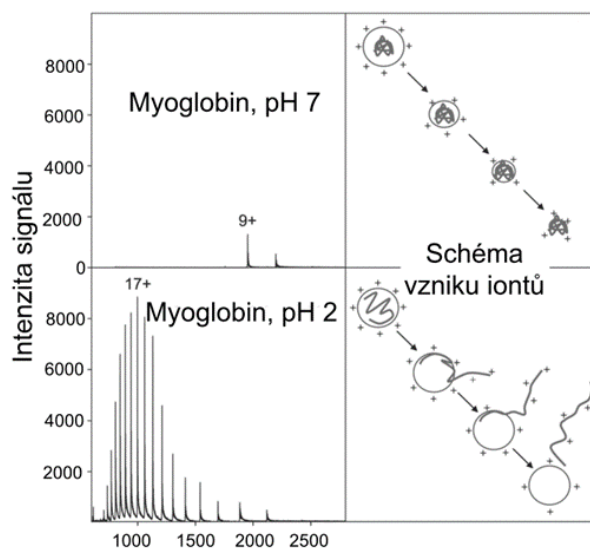
lombické štěpení kapek se opakuje, až se z malých ($R < 10$ nm) vysoce nabitých kapek uvolňují ionty do plynné fáze.

Tradičně jsou popisovány dva mechanismy přenosu iontů do plynné fáze. Malé solvatované ionty jsou uvolňovány z povrchu kapky, čímž dochází ke snížení jejího náboje. Proces je označován jako **vypařování iontů**. V porovnání iontů různých látek se v povrchu kapky více hromadí ty, které mají větší povrchovou aktivitu. Snáze se z kapky „vypařují“ a mohou potlačovat ionizaci povrchově méně aktivních látek. Druhý mechanismus předpokládá postupné odpařování rozpouštědla, až zůstává solvatovaný ion. Tento **model zbytkového náboje** lépe vystihuje ionizaci větších molekul s relativní molekulovou hmotností přes 5 až 10 tisíc, např. proteinů. Počítačové modelování ukázalo ještě na další možnost přenosu iontu proteinu do plynné fáze tzv. **uvolňováním řetězce**. Rozbalený hydrofobní řetězec se v kapce tvořené polárním rozpouštědlem bude vyskytovat na jejím povrchu, zde je na něj přenášen náboj a vzniklý ion postupně kapku opouští (obr. 3) (cit.^{27–31}). U modelu zbytkového náboje je zmenšování kapky doprovázeno „vypařováním“ malých iontů. Kapku opouští například solvatované amonné ionty, což snižuje počet nábojů dostupných pro ionizaci molekuly proteinu. Naopak v procesu uvolňování řetězce je počet nábojů v kapce větší a lze očekávat větší střední náboj iontů proteinu (obr. 4). Roli může hrát i větší dostupnost ionizovatelných skupin u rozbaleného řetězce.

Popsaný proces ionizace, ať již je způsob přenosu iontů do plynné fáze jakýkoli, předpokládá vytvoření iontu v kapalné fázi, což je pro elektrosprej typické. Molekula analytu může být ale také ionizována až v plynné fázi její reakcí s iontem, např. přenosem protonu, který poskytují amonné ionty. Jiné sekundární děje v plynné fázi mohou naopak snižovat výtěžek ionizace. Patří k nim přenos protonu z iontu analytu na molekulu jiné látky vyskytující se



Obr. 3. Přenos iontů do plynné fáze lze vystihnout modelem: a) vypařování iontů; b) zbytkového náboje; c) uvolňování řetězce (převzato z cit.²⁸ a upraveno)



Obr. 4. Elektrosprejové hmotnostní spektrum myoglobinu měřené při pH 7 (sbalená molekula, mechanismus zbytkového náboje) vykazuje menší střední počet nábojů proteinu než spektrum získané při pH 2 (rozbalená molekula, mechanismus uvolňování řetězce) (převzato z cit.²⁹ a upraveno)

ve sprejovaném roztoku. V záporném módu vede ke snížení signálu přijetí protonu záporně nabitým analytem. V obou případech je ion analytu neutralizován, neutrální molekula není detegována. Signál iontu analytu dále ovlivňuje jeho případná fragmentace ve zdroji (viz níže).

Procesy vedoucí k nabití molekuly analytu lze zahrnout do čtyř skupin^{1,2,4,5}:

1. Oddělení nábojů – iontová látka poskytuje v roztoku kation a anion: $CA \rightarrow C^+ + A^-$, ve spektru kromě samotných iontů mohou být pozorovány klastry $[C(CA)_x]^+$, $[A(CA)_x]^-$.

2. Přijetí nebo odevzdání protonu či tvorba aduktů: $[M+H]^+ \sim M+1$; $[M+Na]^+ \sim M+23$; $[M+K]^+ \sim M+39$; $[M-H]^- \sim M-1$; $[M+Cl]^- \sim M+35/37$; $[M+HCOO]^- \sim M+45$, $[M-H+2Na]^+$, $[M-2H+Na]^-$, objevují se klastry $[2M+C]^+$, vícenásobně nabitě ionty $[M+zC]^{z+}$ aj. Typické hmotnostní difference 22 (mezi $[M+H]^+$ a $[M+Na]^+$), 38 ($[M+H]^+$ a $[M+K]^+$) a 16 ($[M+Na]^+$ a $[M+K]^+$) jsou užitečné při interpretaci spektra (určení molekulové hmotnosti).

3. Reakce v plynné fázi: např. $M + NH_4^+ \rightarrow MH^+ + NH_3$. Přidavek amonné soli nebo hydroxidu amonného do roztoku někdy podporuje ionizaci v kladném módu, i když je roztok bazický.

4. Elektrochemická oxidace nebo redukce může vést k ionizaci nepolárních látek (obecně nevhodných pro ionizaci elektrosprejem): např. oxidace perylenu poskytuje radikál-kation s m/z 252, za vzniku záporných iontů se redukuje chinony.

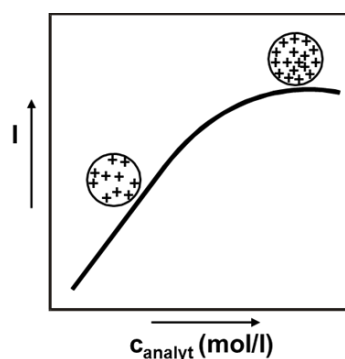
Byť elektrochemické děje vedou k přímému nabití molekuly analytu spíše výjimečně, jsou pro elektrosprejování nezbytné. V kladném módu je jejich prostřednictvím generován oxidací přebytek kladného náboje (v opačném módu vzniká redukcí nadbytek záporného náboje). Nabitě

částice jsou unášeny kapkami a jejich náboj je posléze využit k ionizaci. Na elektrosprej se lze dívat jako na elektrochemický článek pracující za konstantního proudu. Elektrochemické reakce probíhají ve sprejovací kapiláře (v kovové kapiláře na několika posledních mikrometrech). K ní tvoří protielektrodu kovové části přístroje, na které dopadají ionty. Materiál sprejovací kapiláry nebo složky roztoku, jejichž obsah je výrazně větší než obsah analytu, se oxidují (např. $\text{Fe} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + 2\text{e}^-$, $\text{HCOOH} \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$, $\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCOOH} + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$, $4\text{OH}^- \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 + 4\text{e}^-$, $\text{Cl}^- + 2\text{OH}^- \rightarrow \text{ClO}^- + \text{H}_2\text{O} + 2\text{e}^-$, $2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{H}^+ + 4\text{e}^- + \text{O}_2$) nebo redukují (např. $\text{Fe}(\text{OH})_3 + \text{e}^- \rightarrow \text{Fe}(\text{OH})_2 + \text{OH}^-$, $\text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^- \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$, $2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 + 4\text{e}^- \rightarrow 4\text{OH}^-$, $\text{HCOOH} + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^- \rightarrow \text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$, $2\text{H}_2\text{O} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2 + 2\text{OH}^-$) (cit.¹).

Elektrochemicky generovaný náboj je akumulován v kapkách, což může způsobit „neočekávaný“ průběh ionizace. Například byly pozorovány záporné ionty myoglobinu při analýze jeho roztoku o pH 3 (dle hodnot pK v takovém roztoku nese jeden záporný náboj pouze jedna molekula z přibližně 3500). Úspěšná ionizace za vzniku vícenásobně nabitých iontů je vysvětlována hromaděním záporného náboje v kapkách. Poměr signálu k šumu byl dokonce lepší než u spektra naměřeného při pH 10 (cit.³²). Není na škodu testovat ionizaci látek v záporném i kladném módu při nízkém i vysokém pH. Okyselení octovou nebo mravenčí kyselinou případně zalkalizování hydroxidem amonným může významně zlepšit signál analytu, ale může také zvyšovat pozadí ve spektru.

Maximální celkový iontový proud ve zdroji je limitován velikostí elektrického proudu generovaného oxidací nebo redukcí a dosahuje hodnot cca 1 μA . Nezávisí na průtoku vzorku (vyjma velmi nízkých průtoků), a proto se elektrosprej chová jako koncentrační detektor (okamžitá odezva závisí na koncentraci roztoku, která se s průtokem nemění, nikoli na okamžitém absolutním množství látky v detektoru, které je průtokem ovlivňováno). Jelikož má velikost elektrického proudu svoji mez, je omezen počet nábojů, které jsou k dispozici pro ionizaci. Pokud by byla ve vzorku pouze jedna ionizovatelná látka, její signál s koncentrací poroste, dokud bude k dispozici dostatečný počet nábojů generovaných elektrochemickou reakcí. Při určité koncentraci však již počet nábojů nebude postačovat na ionizaci přítomných molekul analytu, růst signálu se nejprve zpomalí a nakonec se zastaví (obr. 5). Ke zpomalení jeho růstu a dosažení plata také přispívá konečný povrch kapek. Pro model vypařování iontů si lze představit, že povrch kapky, ze kterého se ionty uvolňují do plynné fáze, je obsazen a další ionty na něj nelze umístit^{1,2,5,18,21,24}.

Za přítomnosti různých ionizovatelných látek dochází ke vzájemné konkurenci při získávání náboje (např. látky „soutěží“ o proton) a při obsazování povrchu kapky. Bude-li se tvořit příliš iontů matrice (například iontů solí), bude významně potlačen signál analytu. Náboj bude vyčerpán na ionizaci matrice a nebude k dispozici pro molekuly analyzované látky. Ionty s vyšší povrchovou aktivitou zase snáze obsazují povrch kapky a mohou potlačit signál iontů s nižší povrchovou aktivitou. Závislost signálu analytu při jeho konstantní koncentraci a zvyšující se koncentraci

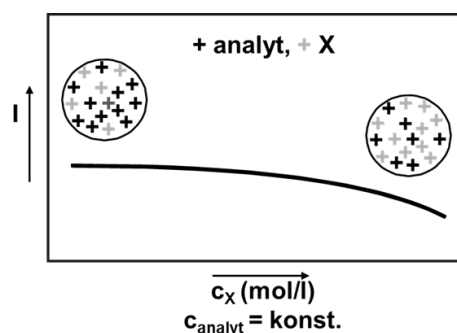


Obr. 5. Závislost intenzity signálu (I) iontu analytu na jeho koncentraci při ionizaci elektrosprejem

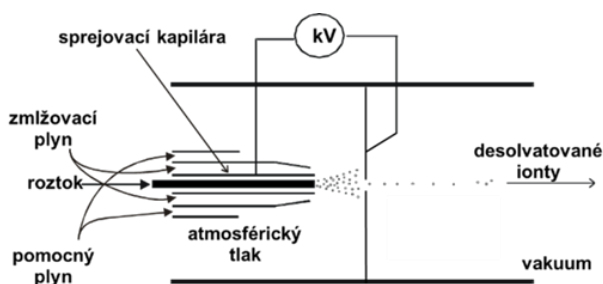
doprovodné látky ukazuje obr. 6. K látkám potlačujícím ionizaci analytu patří mimo jiné povrchově aktivní látky, soli, změkčovadla nebo ion-párová činidla. Iontové páry jsou navenek elektroneutrální a analyt je v nich „skryt“. Vznik iontových párů vysvětluje například pokles signálu kladně nabitých analytů za přítomnosti trifluoroctové kyseliny. Kromě potlačení signálu analytu ionizace doprovodných látek zvyšuje pozadí ve spektru. V důsledku se zhoršuje poměr signálu k šumu.

Pro dosažení kvalitního signálu analytu by koncentrace elektrolytů ve sprejovaném roztoku neměla přesáhnout 0,001 mol l^{-1} . Upřednostňovány jsou těkavé elektrolyty, aby se omezila kontaminace iontového zdroje. Signál lze zlepšit odstraněním elektrolytu ze vzorku nebo alespoň snížením jeho koncentrace, kdy může pomoci i ředění vzorku. Na druhou stranu stabilní sprej vyžaduje přítomnost malého množství iontů zajišťujících vodivost roztoku. V běžných rozpouštědlech je pro potřeby elektrosprejování elektrolytu dostatek, byť se jedná o velmi nízké koncentrace. Při nedostatku elektrolytů a nízkých průtocích se mohou ionty potřebné pro elektrosprejování generovat oxidací nebo redukcí dle zvoleného pracovního módu.

Ionizace v elektrospreji probíhá v iontové komoře za atmosférického tlaku, kdy je analyt rozpouštěn ve vhodném rozpouštědle přiváděn do iontového zdroje přes sprejovací kapiláru o průměru v desítkách μm až 100 μm . Na



Obr. 6. Změna intenzity signálu (I) iontu analytu s rostoucí koncentrací doprovodné látky X při ionizaci elektrosprejem

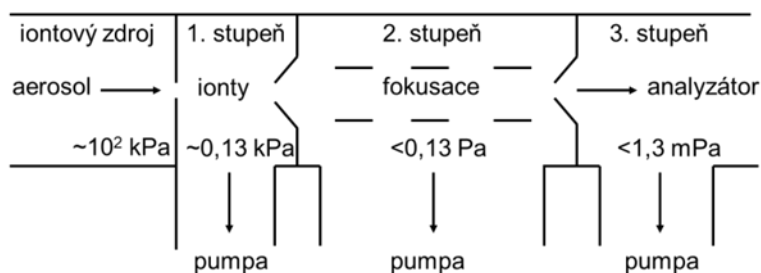


Obr. 7. Schéma konstrukčního řešení elektrospreje

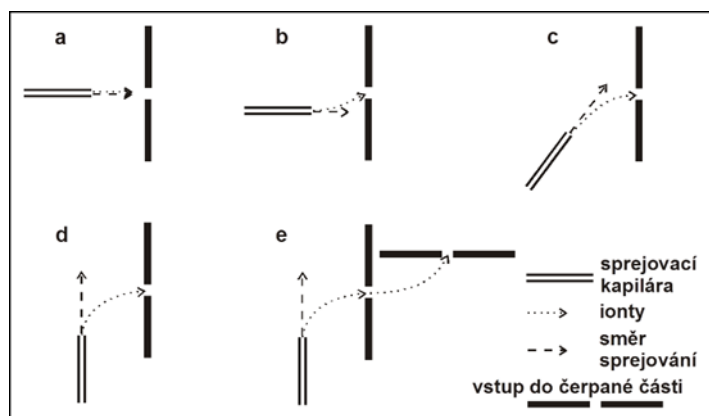
kapiláru se vkládá vysoké napětí typicky 1 až 6 kV (obr. 7) nebo tato kapilára může být uzemněna a napětí vloženo na protielektrodu. Vzdálenost sprejovací kapiláry od vstupu do vakuované části přístroje bývá v rozmezí 1–2 cm. Pro zmlžování roztoků za vyšších průtoků nebo roztoků s vyšším povrchovým napětím (čistě vodné roztoky) byla konstrukce elektrosprejového zdroje doplněna koaxiálním proudem zmlžovacího plynu, případně proudem dalšího pomocného plynu (v obou případech se běžně používá dusík). Zařízení bylo označováno jako pneumaticky podpořený elektrosprej a nazýváno iontový sprej (ionspray). V dnešní době je běžně užíváno označení elektrosprej pro zdroje bez i se zmlžujícím plynem.

Podobně jako u jiných iontových zdrojů pracujících za atmosférického tlaku musel být u elektrospreje vyřešen přenos iontů z oblasti s atmosférickým tlakem do vakuované části hmotnostního spektrometru. Kromě udržení vakua bylo nutné vyřešit ochlazování vzorku při jeho adiabatické expanzi. Ochlazování může způsobit vznik klastrů iontů s molekulami rozpouštědel, a tím ztrátu signálu. Tlakový spád je zajištěn diferenčním čerpáním v několika stupních (obr. 8), kdy je svazek iontů pomocí iontové optiky (radiofrekvenční multipóly, iontové nálevky aj.) veden řadou komor oddělených štěrbinami. Menší štěrby usnadňují čerpání vakuovým systémem a dosažení potřebného vakua, ale zhoršují transmissi iontů. Při konstrukci přístrojů je nutné volit vhodný kompromis. K překonání nežádoucího ochlazování při expanzi do vakuovaného prostoru a k narušení klastrů slouží ohřev horkým plynem (obvykle dusík) nebo vyhřívanou vstupní kapilárou oddělující atmosférickou a vakuovanou část. Desolvatace je dále podpořena srážkami klastrů s molekulami plynů a par v prvním stupni čerpání, kde je tlak v rozsahu desetin kPa (obr. 8). Klastry iontů jsou za tímto účelem urychlovány napětím vloženým na iontovou optiku. Přílišné urychlení iontů může vést ke srážkám, které způsobí jejich fragmentaci. Proces je označován jako fragmentace ve zdroji (in-source fragmentation).

Při přenosu iontů z atmosférického tlaku do vakua nezbytně dochází ke ztrátám, které ale vynahrazuje vyšší iontový výtěžek. Za atmosférického tlaku je dosahováno



Obr. 8. Schéma rozhraní pro ionizaci za atmosférického tlaku s diferenčním čerpáním (naznačeny tři stupně)



Obr. 9. Příklady konstrukčního uspořádání iontového zdroje za atmosférického tlaku: a) v ose, b) mimo osu, c) diagonální, d) ortogonální, e) Z-sprej

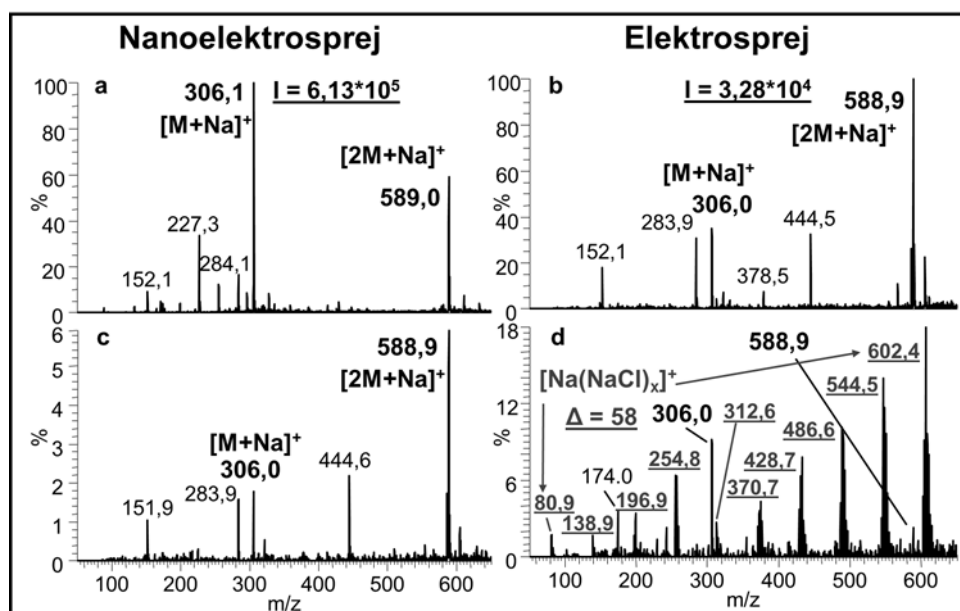
řádově vyšší účinnosti ionizace (větší podíl molekul je ionizován) v porovnání například s chemickou ionizací za sníženého tlaku. Oproti původnímu axiálnímu uspořádání je dnes tok (sprejování) vzorku vůči vstupu do vakuované části směřován pod určitým úhlem, v případě ortogonálního uspořádání pod úhlem 90° (obr. 9). Na vstup přímo nedopadá rozprašovaný roztok a vstupní otvor může být větší. Omezuje se kontaminace vstupního otvoru a riziko jeho ucpaní, snižuje se pozadí ve spektru. Zlepšuje se robustnost přístroje, poměr signálu k šumu a lze pracovat za vyšších průtoků. Projevit se může nežádoucí diskriminace iontů v závislosti na jejich hmotnosti nebo náboji^{1–3,5}.

3. Nanoelektrosprej

Zmenšení vnitřního průměru sprejovací kapiláry na jednotky μm vedlo ke konstrukci nanoelektrospreje (nanoelectrospray ionization, nanoESI) (cit.^{15–17,33,34}). Sprejovací kapilára nanoESI je obvykle vyrobena z borosilikátového skla nebo z křemene. Může být jednorázově naplněna roztokem vzorku (off-line/statický nanoelektrosprej) nebo lze roztok pod tlakem přivádět kontinuálně (on-line/dynamický nanoelektrosprej). V prvním případě se využívá sprejovacích špiček s vnitřním průměrem v jednotkách μm , ve druhém s průměrem v jednotkách až desítkách μm , i když efekty spojené s nanoelektrosprejováním se plně projevují až u průměrů pod $10 \mu\text{m}$ (cit.³⁴). Vodivý kontakt pro vložení napětí je zajišťován pokovením sprejovací kapiláry nebo umístěním kovového drátku do vnitřku této kapiláry případně do mikrokapalino-

vého spoje, který je tvořen malým objemem kapaliny na rozhraní kapiláry, kterou je přiváděn roztok, a sprejovací kapiláry.

Oproti ESI se aplikuje nižší sprejovací napětí, typicky 500 až 1200 V, zároveň se ale sprejovací špička umísťuje až na 1–2 mm od vstupu do vakuované části přístroje, takže intenzita elektrického pole je stále vysoká. Důsledkem zmenšení průměru sprejovací špičky je snížení průtoku roztoku až na desítky nl min^{-1} (odtud označení nanoelektrosprej), což ale nesnižuje odezvu látek. Primární kapky jsou ve srovnání s konvenčním elektrosprejem menší, mají průměr cca 200 nm. Zlepšuje se desolvatace, ionizace a přenos iontů do vakuované části přístroje, a tím je zajištěna citlivost měření při nižší spotřebě vzorku ($1 \mu\text{l}$ vzorku postačuje na měření v desítkách minut). Bylo dosaženo detekčních limitů na úrovni attomolů (10^{-18} mol). Počet štěpení kapek je menší oproti ESI, a tím je menší i zakoncentrování solí. NanoESI je tolerantnější k přítomnosti solí v roztoku (obr. 10). Nezanedbatelné rozdíly jsou i mezi sprejovacími špičkami o průměru $10 \mu\text{m}$ a $1 \mu\text{m}$, kdy v prvním případě byl ve spektru pozorován významný signál sodných aduktů, v druhém nikoli³⁴. Nanoelektrosprejem jsou v porovnání s ESI snáze rozprašovány kapaliny s vyšším povrchovým napětím (vodné roztoky). Experimentální práce s nanoESI je však náročnější (nastavení potřebné geometrie, riziko ucpaní úzké špičky sprejovací kapiláry mechanickými nečistotami). Možným řešením je použití křemíkového čipu se čtyřmi sty sprejovacími kapilárami, kdy každá je určena pro jednorázové použití (Advion ESI chip³⁵). K dispozici jsou tři vnitřní průměry sprejovacích kapilár (mezi 2,5 až 5,5 μm)



Obr. 10. Vliv přítomnosti chloridu sodného ve vzorku na hmotnostní spektra guanosinu ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$) měřená nanoelektrosprejem a elektrosprejem, a, b) bez přidavku NaCl; c, d) koncentrace NaCl ve vzorku $10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$; I – absolutní intenzita signálu základního píku ve spektru a, resp. b. Za přítomnosti NaCl dochází k poklesu intenzity signálu iontů analytu, u elektrospreje je navíc pozorováno významné zastoupení iontů aduktů $[\text{Na}(\text{NaCl})_x]^+$

a vzorek je dodáván do kapiláry automatickou pipetou. Vzhledem k mrtvému vnitřnímu objemu čipu v řádu pikolitru postačují tři mikrolitry roztoku vzorku na měření v trvání cca 15 minut.

4. Spojení separačních technik s hmotnostní spektrometrií pomocí elektrospreje

Jednoduché technické řešení elektrospreje, kdy je roztok přiváděn do sprejovací kapiláry a rozprašován, dovoluje přímou analýzu roztoků, průtokovou analýzu a spojení s kapalinovou chromatografií. Pro superkritickou fluidní chromatografií se využívá pomocné kapaliny, která je přidávána k mobilní fázi za kolonou a zajišťuje vhodné podmínky pro elektrosprejování³⁶. Při realizaci spojení kapilární elektroforézy s elektrosprejem (CE/ESI-MS) je nutné zohlednit velmi malý tok základního elektrolytu ze separační kapiláry do spreje. Při takovémto experimentu je nutné současně vložit sprejovací a separační napětí. Elektrické spojení lze zajistit bez nebo s přidavnou kapalinou (obr. 11). V systémech bez přidavné kapaliny se využívá například pokovení zkoseného konce separační kapiláry nebo se do kapiláry vkládá drátková elektroda. V tomto případě nízké průtoky základního elektrolytu předurčují využití nanoelektrospreje. Analyt není zředěn, ale složení roztoku je určováno základním elektrolytem a nelze jej před elektrosprejováním měnit. Omezená může být robustnost a životnost zařízení. Naopak při použití přidavné kapaliny lze základní elektrolyt modifikovat, aby složení roztoku bylo příznivější pro elektrosprejování, ale ana-

lyt je ředěn a samotná přidavná kapalina může být zdrojem kontaminace a pozadí v hmotnostním spektru. Přidavná kapalina může proudit koaxiálně se separační kapilárou nebo ji lze přivádět přes kapalinové spojení^{4,37–40}. Elektroforetickou separaci je možné provést také na čipu (mikrofluidní zařízení) s integrovaným elektrosprejem (cit.^{37–39,41}).

5. Vícenásobně nabitě ionty

Elektrosprej se řadí k měkkým ionizačním technikám, vznikající ionty mají relativně malou vnitřní energii a jejich fragmentace je omezená. Pro analýzu biomakromolekul¹ je navíc jeho významnou schopností tvorba vícenásobně nabitých iontů. Jejich signál je pozorovatelný při nižších hodnotách m/z , což umožňuje provádět měření na hmotnostních analyzátoch s omezeným rozsahem (například do 4000 m/z , jednonásobně nabitě ionty by byly mimo rozsah měření). Jedna látka však poskytuje řadu signálů, což může zhoršovat přehlednost spektra. Zhruba lze předpokládat, že molekula bílkoviny po ionizaci elektrosprejem ponese jeden náboj na jeden tisíc daltonů. Uvedený údaj je orientační, závisí na experimentálních podmínkách (např. pH roztoku, nastavení iontového zdroje) a na struktuře konkrétní bílkoviny (menší počet bazických aminokyselin v řetězci proteinu snižuje počet nábojů, vlivem denaturace mohou být naopak některá bazická místa zpřístupněna). Molekuly daného proteinu v roztoku se mohou nabíjet do různého stupně a vznikají série vícenásobně nabitých iontů (obr. 12). Při protonaci lze pozorovat ionty typu $[M+zH]^{z+}$, při deprotonaci $[M-zH]^{z-}$. Naměřených hodnot m/z lze využít k rychlému a přesnému určení molekulové hmotnosti bílkoviny. Pro jednoduchost je dále postup ukázán na využití dvou píků, ale k dispozici jsou softwarové nástroje pro dekonvoluci hmotnostních spekter, kdy série vícenásobně nabitých iontů dané bílkoviny je transformována na jednu hodnotu molekulové hmotnosti.

Je-li pro jeden pík ve spektru odečtena hodnota m/z m_1 a pro druhý m_2 , platí:

$$m_1 = (M_r + z_1 m_p) / z_1$$

a

$$m_2 = (M_r + z_2 m_p) / z_2$$

kde M_r je relativní molekulová hmotnost proteinu, z je počet nábojů a m_p relativní hmotnost protonu (iontovou sérii zde tvoří ionty odvozené od jedné bílkoviny, ale nesoucí různý počet protonů). Je-li $m_2 > m_1$ a leží-li mezi těmito signály v iontové sérii $(j-1)$ píků (pro sousední píky je $j=1$, mezi sousedními píky žádný další není), získá se úpravou:

$$m_2(z_1 - j) = M_r + (z_1 - j)m_p$$

$$\text{přičemž } z_2 = z_1 - j.$$

$$M_r = m_1 z_1 - z_1 m_p = z_1(m_1 - m_p)$$

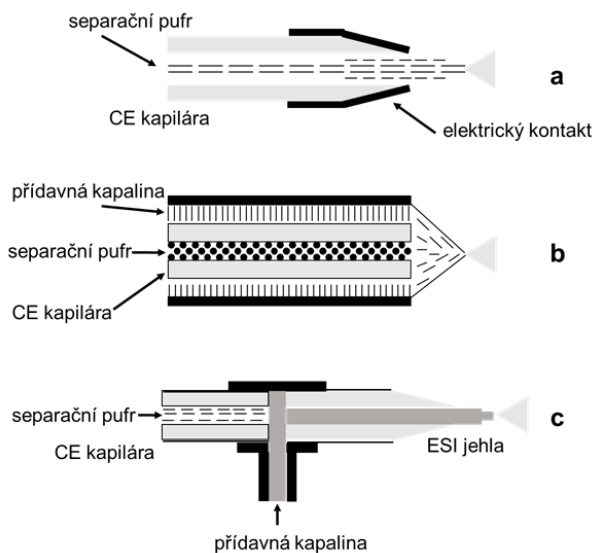
nebo

$$M_r = m_2(z_1 - j) - (z_1 - j)m_p = (z_1 - j)(m_2 - m_p)$$

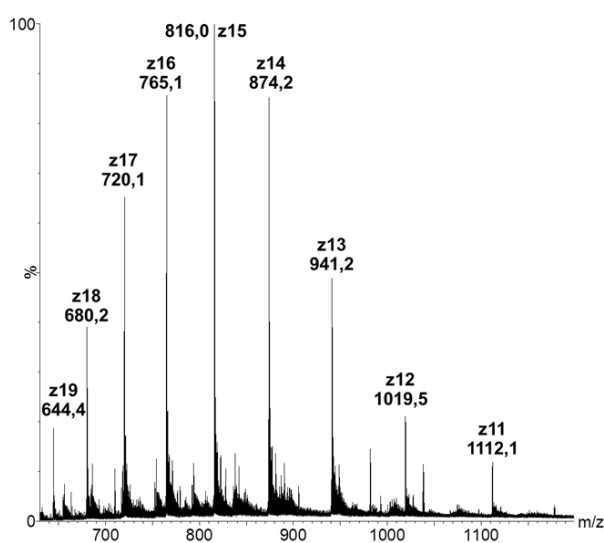
z čehož plyne

$$(z_1 - j)(m_2 - m_p) = z_1(m_1 - m_p)$$

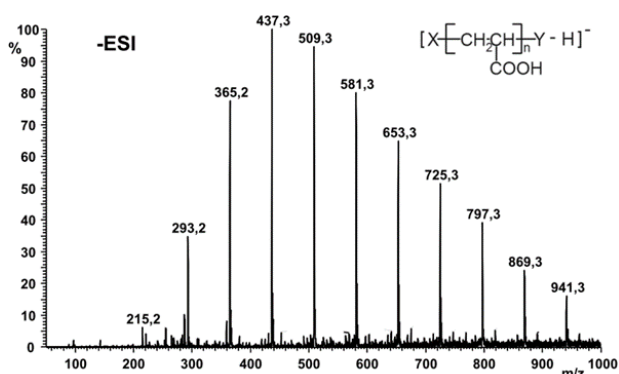
$$z_1 m_2 - z_1 m_p - j m_2 + j m_p = z_1 m_1 - z_1 m_p$$



Obr. 11. Schéma tří technických řešení spojení CE/ESI-MS: a) bez přidavné kapaliny s pokoveným zkoseným koncem separační kapiláry; b) s koaxiálním tokem přidavné kapaliny; c) propojení separační a sprejovací kapiláry mikrokapalinovým spojením naplněným přidavnou kapalinou (vzdálenost mezi kapilárami je v řádu desítek μm) (cit. ^{4,37–40}).



Obr. 12. Elektrosprejové hmotnostní spektrum cytochromu C v kladném módu. U každého iontu je uveden počet nábojů, které nese, např. z15 pro ion m/z 816,0



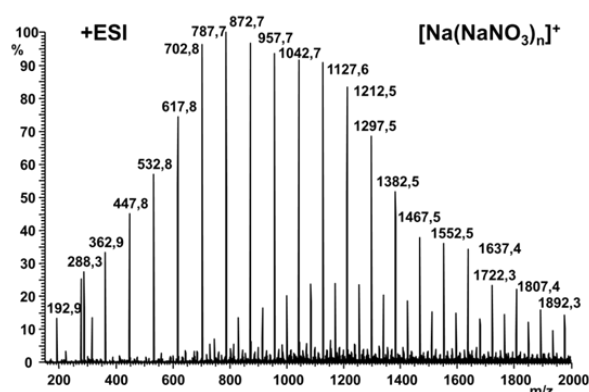
Obr. 13. Elektrosprejové hmotnostní spektrum vzorku polyakrylové kyseliny, v němž jsou zastoupeny různé oligomery. Měřeno v záporném módu, vzdálenost mezi sousedními píky je konstantní a odpovídá poměru m (relativní molekulová hmotnost monomerní jednotky)/ z (počet nábojů iontů) = 72/1

$$z_1 m_2 - z_2 m_1 = j m_2 - j m_1$$

$$z_1 = j(m_2 - m_1)/(m_2 - m_1)$$

Z poslední rovnice se určí počet nábojů z_1 , což dovolu výpočet relativní molekulové hmotnosti bílkoviny M_r případně počtu nábojů z_2 . Z hmotnostního spektra cytochromu C (obr. 12) lze například odečíst $m_1 = 816,0$ a $m_2 = 874,2$ a vypočítat $z_1 = 15$, $z_2 = 14$, přičemž $j = 1$, nebo $m_1 = 720,1$, $m_2 = 941,2$, pak $z_1 = 17$, $z_2 = 13$ při $j = 4$. Z uvedených údajů vypočtená relativní molekulová hmotnost je rovna 12225.

V elektrosprejovém spektru bílkoviny se vzdálenost mezi jednotlivými píky s klesající hodnotou m/z zmenšuje



Obr. 14. Elektrosprejové hmotnostní spektrum vzorku obsahujícího dusičnan sodný. Měřeno v kladném módu, jednotlivé píky odpovídají klastrům dusičnanu a vzdálenost mezi nimi je rovna m (relativní molekulová hmotnost NaNO_3)/ z (počet nábojů iontů) = 85/1

(obr. 12). Příčinou je rostoucí náboj iontů. Na první pohled tak jej lze odlišit od hmotnostního spektra polymeru (obr. 13), ve kterém jednotlivé ionty v dané sérii odpovídají různým oligomerům, liší se hmotností, ale mají stejný náboj. Vzdálenosti mezi píky jsou stejné a odpovídají poměru relativní hmotnosti monomerní jednotky k počtu nábojů (počet nábojů je pro danou sérii iontů stejný). Hmotnostní spektrum s konstantní vzdáleností mezi píky lze pozorovat rovněž při analýze vzorků obsahujících soli, např. dusičnan sodný (obr. 14). Podobné klastry se objevují za přítomnosti NaCl (obr. 10).

6. Závěr

Elektrosprejová ionizace je ovlivňována řadou faktorů. Závisí na struktuře analytu, použitém rozpouštědle, složení a průtoku sprejovaného roztoku, průměru sprejovací kapiláry, vloženém napětí, geometrii zdroje a jeho konstrukci (např. způsobu ohřevu aerosolu). Přesto její použití nebývá složité a iontové zdroje jsou robustní.

Elektrosprej je ionizační technika vhodná pro spojení separačních technik s hmotnostní spektrometrií. Je kompatibilní s řadou rozpouštědel využívaných pro přípravu mobilních fází v kapalinové chromatografii na obrácených fázích nebo v systému hydrofilní interakční chromatografie (voda, methanol, acetonitril, ethanol aj.). Vzhledem k obtížnému elektrosprejování nepolárních rozpouštědel má omezené použití pro systém normálních fází (elektrosprejování lze zlepšit přidávkem polárního rozpouštědla). Osvědčil se pro spojení superkritické fluidní chromatografie nebo kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií. Při spojení se separačními technikami je třeba brát v potaz omezení pro pufrý a aditiva v mobilní fázi, resp. základním elektrolytu, které mohou snižovat signál analytu a zvyšovat pozadí ve spektru. Doporučuje se používat těkavé pufrý nebo soli o co nejnižší koncentraci, což může být v rozporu s požadavky na mobilní fázi. Na-

příklad pro robustní separace v HPLC je doporučována minimální koncentrace pufru 20–25 mmol l⁻¹, což může být pro ionizaci zcela nevhodné.

Kromě proteinů a peptidů existuje řada dalších biologicky významných látek ionizovatelných elektrosprejem. Jako příklad lze uvést nukleotidy, oligonukleotidy, oligosacharidy, lipidy, nejruznější metabolity. Elektrosprej se uplatňuje při analýze klinických vzorků, léčiv, syntetických polymerů, povrchově aktivních látek, složek životního prostředí aj. Zavedením elektrospreje se hmotnostní spektrometrie stala významným nástrojem studia živých organismů, kdy lze získávat informace například o metabolických přeměnách látek nebo o změnách proteinů při reakci organismu na vnější podnět. Lze sledovat nekovalentní komplexy proteinů nebo dokonce ionizovat celé mikroorganismy a přitom alespoň u některých zachovat jejich životaschopnost⁴².

Seznam zkratk

CE	capillary electrophoresis, kapilární elektroforéza
ES	electrospray, elektrosprej
ESI	electrospray ionization, ionizace elektrosprejem
nanoESI	nanoelectrospray ionization, ionizace nanoelektrosprejem

Tato práce byla finančně podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (LO1509).

LITERATURA

- Cole R. B. (ed.): *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry; Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications*, 2. vyd. J. Wiley, Hoboken 2010.
- de Hoffmann E., Stroobant V.: *Mass Spectrometry, Principles and Applications*, 3. vyd. J. Wiley, Chichester 2007.
- Fenn J.: *Int. J. Mass Spectrom.* 200, 459 (2000).
- Dass C.: *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*. J. Wiley, Hoboken 2007.
- Gross J. H.: *Mass Spectrometry, A Textbook*, 3. vyd. Springer International Publishing AG, Cham 2017.
- Dole M., Mack L. L., Hines R. L., Mobley R. C., Ferguson L. D., Alice M. B.: *J. Chem. Phys.* 49, 2240 (1968).
- Yamashita M., Fenn J. B.: *J. Phys. Chem.* 88, 4451 (1984).
- Yamashita M., Fenn J. B.: *J. Phys. Chem.* 88, 4671 (1984).
- Whitehouse C. M., Dreyer R. N., Yamashita M., Fenn J. B.: *Anal. Chem.* 57, 675 (1985).
- Fenn J. B., Mann M., Meng C. K., Wong S. F., Whitehouse C. M.: *Science* 246, 64 (1989).
- Zeleny J.: *Phys. Rev.* 3, 69 (1914).
- Zeleny J.: *Phys. Rev.* 10, 1 (1917).
- Rechcigl M., Jr.: *Czech American Timeline: Chronology of Milestones in the History of Czechs in America*. AuthorHouse LLC, Bloomington 2013.
- Alexandrov M. L., Gall L. N., Krasnov N. V., Nikolaev V. I., Pavlenko V. A., Shkurov V. A.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22, 267 (2008).
- Wilm M., Mann M.: *Proceedings of the 42nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Chicago, USA, 29 May - 3 June 1994* (American Society for Mass Spectrometry, ed.), str. 770.
- Wilm M. S., Mann M.: *Anal. Chem.* 68, 1 (1996).
- Wilm M. S., Mann M.: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 136, 167 (1994).
- Kebarle P., Tang L.: *Anal. Chem.* 65, 972A (1993).
- Cole R. B.: *J. Mass Spectrom.* 35, 763 (2000).
- Taylor G.: *Proc. R. Soc. London, Ser. A* 280, 383 (1964).
- Kebarle P.: *J. Mass Spectrom.* 35, 804 (2000).
- Wampler F. M., Blades A. T., Kebarle P.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 4, 289 (1993).
- Smith D. P. H.: *IEEE Trans. Ind. Appl.* 22, 527 (1986).
- Tang L., Kebarle P.: *Anal. Chem.* 65, 3654 (1993).
- Taflin D. C., Ward T. L., Davis E. J.: *Langmuir* 5, 376 (1989).
- Duft D., Achtzehn T., Muller R., Huber B. A., Leisner T.: *Nature* 421, 128 (2003).
- Konermann L., Rodriguez A. D., Liu J.: *Anal. Chem.* 84, 6798 (2012).
- Konermann L., Ahadi E., Rodriguez A. D., Vahidi S.: *Anal. Chem.* 85, 2 (2013).
- Ahadi E., Konermann L.: *J. Phys. Chem. B* 116, 104 (2012).
- Ahadi E., Konermann L.: *J. Am. Chem. Soc.* 132, 11270 (2010).
- Konermann L., Metwally H., Duez Q., Peters I.: *Analyst* 144, 6157 (2019).
- Kelly M. A., Vestling M. M., Fenselau C. C., Smith P. B.: *Org. Mass Spectrom.* 27, 1143 (1992).
- Gibson G. T. T., Mugo S. M., Oleschuk R. D.: *Mass Spectrom. Rev.* 28, 918 (2009).
- Schmidt A., Karas M., Dülcks T.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14, 492 (2003).
- <https://www.advion.com/products/triversa-nanomate/>, staženo 26. 1. 2020
- Guillarme D., Desfontaine V., Heinisch S., Veuthey J.-L.: *J. Chromatogr. B* 1083, 160 (2018).
- Zhong X., Zhang Z., Jiang S., Li L.: *Electrophoresis* 35, 1214 (2014).
- Kleparnik K.: *Electrophoresis* 34, 70 (2013).
- Bonvin G., Schappler J., Rudaz S.: *J. Chromatogr. A* 1267, 17 (2012).
- Wetterhall M., Johnson T., Bergquist J., v knize: *Mass Spectrometry and Hyphenated Techniques in Neuropeptides Research* (Silberring J., Ekman R., ed.), kapitola 4, str. 135. J. Wiley, New York 2002.
- Oleschuk R. D., Harrison D. J.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* 19, 379 (2000).
- Forsberg E., Fang M., Siuzdak G.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 28, 14 (2017).

K. Lemr and L. Borovcová (*Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic*): **Electrospray Ionization**

Electrospray belongs to ion sources most often used in mass spectrometry today. This ionization has enlarged the applicability of mass spectrometry in analysis of polar and ionic compounds or biomacromolecules, especially proteins. Electrospray source also serves as an interface coupling liquid and supercritical fluid chromatography or capillary electrophoresis with mass spectrometry. Applying high voltage (in kV range) to a spray capillary, the solution is nebulized, charged droplets are generated, from which ions (positive or negative according the selected mode) are released to the gas phase. The spray capillary with inner diameter in tens of micrometers is used in electrospray. Applying the miniaturization down to 1–2 μm , nanoelectrospray was proposed and designed. In compari-

son to electrospray, it generates lower flow-rates, which means smaller sample consumption. The source is more tolerant to salts in sample solution but experimental work can be more demanding. Although the electrospray ionization is influenced by various factors (such as the structure of analytes, solvents and other components of sample solution, its flow-rate, setting of spray voltage or the design of the ion source), its use is easy and the source is robust. Electrospray has found many applications, e.g. in analysis of clinical samples, drugs, metabolites, synthetic polymers, surface active compounds, pesticides, peptides or proteins.

Keywords: mass spectrometry, electrospray, nanoelectrospray, separation techniques, multiply charged ions

Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (LO1509).