

# VZNIK IONTŮ V HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRII: IONIZACE A FRAGMENTACE

KAREL LEMR a LUCIE BOROVCOVÁ

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

Došlo 5.12.19, přijato 7.1.20.

Klíčová slova: hmotnostní spektrometrie, ionizace, fragmentace, tlak v iontovém zdroji

## Obsah

1. Úvod
2. Způsoby ionizace látek v hmotnostní spektrometrii
3. Vliv tlaku v iontovém zdroji na ionizaci
4. Závěr

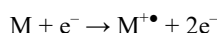
## 1. Úvod

Převedení neutrálních částic na ionty je nezbytným krokem hmotnostně spektrometrické analýzy. Ionty vznikají ionizací látek v iontovém zdroji, případně přeměnou primárních iontů, nejčastěji fragmentací (o základech rozpadových procesů je pojednáno v cit.<sup>1</sup>). Mnohem méně pravděpodobná je následná reakce těchto iontů s molekulami, např. reakce fragmentových iontů s rozpouštědlem<sup>2</sup>, za vzniku dalších iontů odvozených od původní ionizované látky. Ionizace vyžaduje dodání potřebné energie a ve své podstatě se jedná o chemickou přeměnu sledované látky. Iontový zdroj představuje chemický reaktor, kde je ionizační energie neutrální molekule nebo atomu dodána energetickou částicí (např. elektronem, urychleným iontem, fotonem) nebo v průběhu reakce iontu s molekulou. Výtěžek konkrétního iontu, který ovlivňuje intenzitu jeho signálu, závisí na účinnosti ionizace dané látky, na konkurenčních dějích při jeho vzniku (např. soutěž látek o proton) a na jeho následných přeměnách, které způsobují úbytek iontu (např. fragmentace, neutralizace). Ionizace a následné přeměny iontů mohou být ovlivněny doprovodnými látkami přítomnými v iontovém zdroji, jako jsou rozpouštědla, složky mobilní fáze nebo matrice vzorku. Význam zmíněných dějů se liší podle typu iontového zdroje.

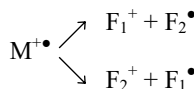
## 2. Způsoby ionizace látek v hmotnostní spektrometrii

**Ztráta elektronu** v důsledku interakce s energetickou částicí (elektronem, metastabilním atomem, fotonem) se uplatňuje např. při elektronové ionizaci nebo fotoionizaci. Účinnost souvisí s ionizační energií analytu (analyzované látky). Vzniká radikál-kation, který v závislosti na množství dodané energie a své struktuře může fragmentovat na kation a radikál (homolytické štěpení vazby), vzácněji na radikál-kation a neutrální částici se sudým počtem elektronů (heterolytické štěpení). Při štěpení radikál-kationtu je preferován vznik radikálu s vyšší ionizační energií a lokalizace náboje na části molekuly, která odpovídá radikálu s nižší ionizační energií (Stevensonovo pravidlo)<sup>3–5</sup>.

### Elektronová ionizace



Při fragmentaci molekulového iontu ( $M^{+\bullet}$ ), je-li ionizační energie  $IE(F_1^\bullet) > IE(F_2^\bullet)$ , bude ve spektru intenzivnější signál  $F_2^+$ :



**Penningova ionizace** je založena na interakci analyzované látky s elektronicky excitovanou částicí  $A^*$ :



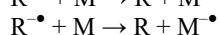
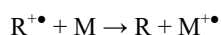
**Fotoionizace** vede podobně jako elektronová ionizace v prvním kroku ke vzniku molekulového iontu:



Zdrojem ionizační energie je jeden nebo více fotonů ( $h$  – Planckova konstanta,  $\nu$  – frekvence záření), což dovozuje přesnější dávkování dodávané energie, a tím i ovlivňování vnitřní energie vznikajících iontů. Absorbací záření vzniká excitovaná částice  $M^*$ , která může uvolnit elektron (k deexcitaci může také dojít emisí fotonu, kdy žádaný ion nevzniká). Technika je vhodná pro měření ionizačních energií nebo prahových energií rozpadu. V prvkové hmotnostní spektrometrii se rezonanční vícefotonová ionizace využívá k selektivní a velmi citlivé analýze isotopů.

**Záchyt elektronu** poskytuje ionty záporné a může nastat, pokud se v iontovém zdroji vyskytují pomalé elektrony (jejich energie je blízká termální energii) a analyty mají elektronegativní atomy nebo skupiny. Vede ke vzniku radikál-aniontů ( $M^{-\bullet}$ ).

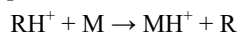
**Výměna náboje** probíhající mezi reakčním činidlem (obvykle radikál-kationem, případně radikál-aniontem připraveným např. fotoionizací, ale činidlem může být také ion se sudým počtem elektronů např.  $NO^+$ ) a neutrálním analytem spočívá v přenosu elektronu.



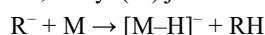
**Odebrání aniontu**  $A^{-}$  (příkladem je odebrání  $H^{-}$ ) je založeno na reakci kationtu reakčního činidla s molekulou analytu.



**Přenos protonu** vede ke vzniku kationtů případně aniontů dle zvoleného módu ionizace. V kladném módu je reakční činidlo ( $RH^{+}$ ) donorem protonu, analyt ( $M$ ) jeho akceptorem.



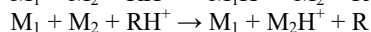
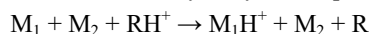
V záporném módu je reakční činidlo ( $R^{-}$ ) akceptorem protonu, analyt ( $M$ ) je donorem protonu.



Akceptor protonu (neutrální částice nebo anion) musí mít větší protonovou afinitu než donor (kation nebo neutrální částice). Protonová afinita charakterizuje látku v plynné fázi. U elektrospreje se uvedené ionty mohou uvolňovat přímo z roztoku. Kyselost a zásaditost látek v roztoku je obecně odlišná od plynné fáze.

Ionty  $MH^{+}$  a  $[M-H]^{-}$  mohou rovněž vznikat z aduktů<sup>6,7</sup>. Ve vakuované části přístroje mezi iontovým zdrojem pracujícím za atmosférického tlaku a samotným hmotnostním analyzátozem může v důsledku zvýšení vnitřní energie iontu ohřevem (pomocí horkého plynu nebo vyhřívání kapiláry) nebo nastavením napětí na iontové optice docházet např. k uvolnění molekuly  $NH_3$  z aduktu  $[M+NH_4]^{+}$  popř.  $CH_3COOH$  z  $[M+CH_3COO]^{-}$ . Vznikají ionty  $MH^{+}$  (lze také psát  $[M+H]^{+}$ ) popř.  $[M-H]^{-}$  a vzhledem k nízkému tlaku ve zmíněné části přístroje je jejich zpětná reakce s  $NH_3$  nebo  $CH_3COOH$  málo pravděpodobná.

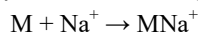
Při přenosu protonu mohou probíhat konkurenční děje závislé na protonové afinitě reagujících látek  $M_1$  a  $M_2$ , převažovat budou ionty látky s větší protonovou afinitou.



Podobně v záporném módu budou převažovat ionty odvozené od látky s větší kyselostí v plynné fázi. Přenosem protonu se tvoří ionty se sudým počtem elektronů, při jejichž fragmentaci obvykle vznikají fragmentové ionty rovněž se sudým počtem elektronů. Dochází k heterolytickému štěpení vazeb. V kladném módu náboj zůstává na fragmentu s vyšší zásaditostí, v záporném s vyšší kyselostí.

Pozn.: Dříve pro protonovanou ( $[M+H]^{+}$ ) a deprotonovanou ( $[M-H]^{-}$ ) molekulu užívané termíny kvazimolekulový nebo pseudomolekulový ion již nejsou doporučovány (viz Projekt české terminologie v hmotnostní spektrometrii<sup>8</sup>).

**Tvorba aduktů** označuje spojení neutrální molekuly s jiným iontem než protonem. V kladném módu jde často o vznik sodných aduktů, méně často jsou pozorovány draselné adukty nebo adukty s amonným kationtem (není-li jejich vznik podpořen přidávkem odpovídajících solí do analyzovaného roztoku).



Ve spektrech se přítomnost aduktů může projevit diferencí 22 resp. 38 hmotnostních jednotek mezi jednoduše nabitými ionty ( $MH^{+} \sim M+1$ ;  $MNa^{+} \sim M+23$ ;  $MK^{+} \sim M+39$ ). Sodné adukty často konkurují vzniku protonovaných molekul, je-li to na závadu, může pomoci odsolení vzorku. U cukrů, které se obtížně protonují, je vznik sodných aduktů pro jejich ionizaci výhodný. Ve struktuře analytu nemusí být zásadité místo, vznik aduktů podporuje přítomnost elektronových párů. V záporném módu se tvoří adukty např. s  $Cl^{-}$ ,  $HCOO^{-}$  nebo  $CH_3COO^{-}$ .

**Tvorba klastrů** vede k iontům obecného vzorce  $[nM+kat]^{+}$ , kde  $kat^{+}$  může být proton nebo kation kovu. Nejčastěji se ve spektru objevují klastry  $[M+M+kat]^{+}$  a obvykle četnost iontu klastru klesá s rostoucím  $n$ . Vznik klastru musí být exotermním dějem, aby byl kompenzován pokles entropie v důsledku shlukování částic. Naopak, aby nedošlo k fragmentaci při nadbytku vnitřní energie, musí být její část předána srážkou jiné částici. Méně častý je vznik klastrů  $[M_1+M_2+kat]^{+}$  (obvykle snadno fragmentují a náboj je lokalizován na molekule s větší afinitou ke kationtu) a klastrů v záporném módu, kde objemnější distribuce elektronů oslabuje interakce složek klastru.

S uvedenými ději souvisí vlastnosti látek v plynné fázi (cit.<sup>1,3-5</sup>) charakterizované:

1. **ionizační energii**  $IE = \Delta H^0$  pro endotermní reakci  $M \rightarrow M^{\bullet} + e^{-}$ ;

2. **elektronovou afinitou**  $EA = -\Delta H^0$  pro reakci  $M + e^{-} \rightarrow M^{\bullet}$ , která bývá exotermní nebo slabě endotermní;

3. **protonovou afinitou**  $PA = -\Delta H^0$  a **zásaditost v plynné fázi**  $GB = -\Delta G^0$ , které se vztahují k exotermnímu procesu  $M + H^{+} \rightarrow MH^{+}$ ;

4. **kyselost v plynné fázi**  $\Delta H^0_A$  a  $\Delta G^0_A$  charakterizující endotermní proces  $MH \rightarrow M^{-} + H^{+}$ .

Při ionizaci může hrát roli pouze jeden z výše uvedených procesů nebo se jich může uplatnit více současně. Výběr ionizační techniky musí zohledňovat vlastnosti látek. Určují totiž, zda použitý způsob ionizace bude efektivní nebo který ionizační proces bude preferován. Například u fotoionizace za atmosférického tlaku jsou pozorovány ionty  $M^{\bullet}$  a  $MH^{+}$  (cit.<sup>9</sup>). Jejich výskyt ve spektru bude záviset na ionizační energii a protonové afinitě sledované látky. Nízká ionizační energie podporuje vznik radikál-kationtu, vysoká protonová afinita vznik protonované molekuly. Jiným příkladem je elektrosprej. Při jeho použití jsou v hmotnostních spektrech často pozorovány pro tutéž látku protonované molekuly a adukty se sodíkem. Dochází jak k přenosu protonu, tak k tvorbě aduktů.

### 3. Vliv tlaku v iontovém zdroji na ionizaci

Ionizaci lze provést za vysokého vakua (např. elektronová ionizace, fotoionizace), ale i při středním až nízkém vakuu (např. chemická ionizace) a dokonce při atmosférickém tlaku (tzv. ionizace za atmosférického tlaku, jakou je např. elektrosprej nebo fotoionizace za atmosférického tlaku). Zatímco za vysokého vakua se jedná o ionizaci ztrátou elektronu a reakce iontů s molekulami se neuplat-

## Tabulka I

Stručný přehled vývoje ionizačních technik<sup>3–5,9,12–16</sup>

Ionizační technika	
Elektronová ionizace (Electron ionization, EI)	1921 – popsána A. Dempsterem (bombardování zahřívajícího povrchu elektrony); 1922 – Smyth použil elektrony k ionizaci par rtuti pro určení ionizačních energií; 1929 – W. Bleakney a 1940 – A. O. Nier navrhli doposud používaná technická řešení; široce využívaná tvrdá ionizační technika pro dostatečně těžké látky, zejména se uplatňuje ve spojení GC/MS;
Chemická ionizace (Chemical ionization, CI)	1966 – zavedena M. S. B. Munsonem a F. H. Fieldem, měkká ionizační technika vhodná pro těžké látky, dodnes nabízena pro spojení GC/MS;
Ionizace polem (Field ionization, FI)	1954 – M. G. Inghram a R. Gomer spojili iontovou mikroskopii (field ion microscopy) s hmotnostní spektrometrií; 1957 a v následujících letech H. D. Bekey se spolupracovníky studoval ionizaci polem a úspěšně vyvíjel iontové zdroje pro měkkou ionizaci těžkých látek;
Desorpce polem (Field desorption, FD)	1969 – H. D. Bekey rozšířil možnosti ionizace v oblasti netěkavých a termolabilních látek;
Chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric pressure chemical ionization, APCI)	1974 – E. C. Horning, D. I. Carroll, I. Dzidic, K. D. Haegele, M. D. Horning a R. N. Stillwell navrhli tuto techniku pro analýzy roztoků; jedna ze základních ionizačních technik v LC/MS;
Bombardování rychlými atomy (Fast atom bombardment, FAB)	1980 – M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick a A. N. Tyler popsali iontový zdroj, který přinesl nové možnosti v analýze peptidů a malých proteinů, později byl jeho význam zastíněn elektrosprejem a MALDI;
Termosprejová ionizace (Thermospray ionization, TSP)	1983 – C. R. Blakney a M. L. Vestal navrhli techniku vhodnou pro spojení LC/MS založenou na ionizaci tepelným rozprašováním (později nahrazena ESI a APCI);
Elektrosprejová ionizace (Electrospray ionization, ESI)	1984 – úspěšné technické řešení představili M. Yamashita a J. B. Fenn (za analýzu biomakromolekul obdržel J. B. Fenn Nobelovu cenu v roce 2002); jedná se o nejrozšířenější řešení analýzy roztoků, běžný iontový zdroj pro LC/MS, významnou ionizační techniku v analýze proteinů; koncept byl navržen již v roce 1968 (M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson a M. B. Alice);
Laserová desorpce a ionizace za účasti matrice (Matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI)	1985 – M. Karas, D. Bachmann a F. Hillenkamp popsali nové řešení analýzy organických látek v pevné fázi; 1987 – K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida a T. Yoshida analyzovali velké molekuly s velikostí poměru hmotnosti ku náboji až do sto tisíc (K. Tanaka za využití MALDI v analýze biomakromolekul získal v roce 2002 Nobelovu cenu); spolu s elektrosprejem znamenala průlom v analýze proteinů;
Fotoionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric pressure photoionization, APPI)	1985 – I. A. Revel'skii, Y. S. Yashin, V. N. Voznesenskii, V. K. Kurochkin a R. G. Kostyanovskii využili fotoionizace za atmosférického tlaku v hmotnostní spektrometrii; 2000 – D. B. Robb, T. R. Covey a A. P. Bruins popsali spojení LC/MS realizované pomocí APPI;
Ambientní ionizace (Ambient ionization, AI)	2004 – byla popsána desorpční ionizace elektrosprejem (desorption electrospray ionization, DESI, Z. Takáts, J. M. Wiseman, B. Gologan a R. G. Cooks); 2005 – byla představena přímá analýza v reálném čase (direct analysis in real time, DART, R. B. Cody, J. A. Laramée, H. Dupont Durst); byl odstartován bouřlivý rozvoj ambientních ionizačních technik, při kterých je vzorek během analýzy přístupný (není uzavřen v hmotnostním spektrometru) a není nijak nebo jen omezen pro analýzu připravován;

ňují, vyšší tlak zvyšuje pravděpodobnost srážek částic v iontovém zdroji a tyto reakce mohou hrát klíčovou úlohu. Ionizovaný reakční plyn poskytuje proton analyzované molekule za vzniku  $MH^+$ , v záporném módu anion přítomný v iontovém zdroji odebírá proton molekule analytu. Kromě přenosu protonu mohou současně vznikat adukty

a klastry. Za obvyklých experimentálních podmínek však nedochází ke vzájemným srážkám iontů stejného náboje (vzhledem k jejich odpuzování) ani k interakci iontů s neutrálními produkty fragmentace (malá pravděpodobnost v důsledku jejich malých množství v iontovém zdroji). Výjimkou je vzájemná reakce produktů fragmentace,

tj. při ní vznikajícího iontu a neutrální částice, pokud zůstanou asociovány.

Při ionizaci za vysokého vakua je nutné dopravit analyty do iontového zdroje ve formě plynů či par, což je možné u látek dostatečně těkavých a teplotně stálých. Alternativou pro látky nesplňující tyto požadavky je jejich ionizace ze vzorku v kondenzované fázi. Současně dochází k odpaření analytů a jejich ionizaci. Látky jsou zaváděny do iontového zdroje ve formě roztoku nebo v pevném skupenství. Například při desorpci a ionizaci laserem za účasti matrice (MALDI) je vzorek vkládán do vakuovaného prostoru na terčiku v pevné fázi (ve směsi s matricí). Energie laseru způsobí rychlé odpaření vzorku, aniž by došlo k tepelné degradaci molekul. Ačkoli MALDI pracuje za vysokého vakua (k dispozici je také MALDI za atmosférického tlaku) v oblačku odpařeného vzorku je tlak vyšší a mohou v něm probíhat reakce iontů s molekulami<sup>10</sup>. Tím jsou vytvořeny vhodné podmínky i pro ionizaci velkých biomakromolekul s relativní molekulovou hmotností v řádu stasticů.

Snaha o analýzu větších nebo termolabilních molekul byla a je významným hybatelem vývoje iontových zdrojů. Uplatňování nových ionizačních principů provázelo historii hmotnostní spektrometrie, rozšiřovalo její aplikační možnosti a bylo oceněno udělením Nobelovy ceny za chemii v roce 2002. J. B. Fenn a K. Tanaka ji získali „za vývoj metod umožňujících analýzu biologických makromolekul“<sup>11</sup>. V posledním desetiletí značný rozvoj zaznamenaly ambientní ionizační techniky, které zjednodušují přípravu vzorku před analýzou<sup>12</sup>. Stručný přehled vývoje ionizačních technik nabízí tab. I.

#### 4. Závěr

Volba ionizační techniky, a tím i mechanismu ionizace, se řídí vlastnostmi analytu, charakterem vzorku a cílem analýzy. Z praktického hlediska roli hraje dostupnost ionizační techniky v dané laboratoři. U tvrdých ionizačních technik (např. elektronová ionizace) vznikají ionty s vysokým obsahem vnitřní energie a podléhají bohaté fragmentaci, což je výhodné při identifikaci látek porovnáním spekter. Nemusí však být pozorován ion odpovídající celé molekule, ve spektru pak chybí informace o molekulové hmotnosti. U měkkých ionizačních technik (např. chemická ionizace) je situace opačná. Nižší obsah vnitřní energie znamená omezenou fragmentaci, lze určit molekulovou hmotnost, ale pro nedostatek fragmentových iontů může chybět informace o struktuře.

Vhodný postup ionizace by měl být účinný, a tím umožňovat nízké detekční limity. Současně by měl poskytovat stabilní iontový proud (stabilní signál), úzkou distribuci vnitřní energie iontů, minimální iontový proud pozadí a zanedbatelnou křížovou kontaminaci mezi následnými vzorky<sup>5</sup>. Během let došlo ke značnému rozvoji způsobů ionizace látek, ale stále platí, že žádná ionizační technika není univerzální a výběr nejvhodnějšího přístupu je pro úspěch analýzy důležitým rozhodnutím.

#### Seznam zkratk

AI	ambient ionization, ambientní ionizace
APCI	atmospheric pressure chemical ionization, chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	atmospheric pressure photoionization, fotoionizace za atmosférického tlaku
CI	chemical ionization, chemická ionizace
DESI	desorption electrospray ionization, desorpční ionizace elektrosprejem
EA	electron affinity, elektronová afinita
EI	electron ionization, elektronová ionizace
ESI	electrospray ionization, elektrosprejová ionizace
FAB	fast atom bombardment, bombardování rychlými atomy
FD	field desorption, desorpce polem
FI	field ionization, ionizace polem
GB	gas-phase basicity, zásaditost v plynné fázi
GC/MS	gas chromatography/mass spectrometry, plynová chromatografie/hmotnostní spektrometrie
IE	ionization energy, ionizační energie
MALDI	matrix-assisted laser desorption/ionization, laserová desorpce a ionizace za účasti matrice
PA	proton affinity, protonová afinita
TSP	thermospray ionization, termosprejová ionizace

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

#### LITERATURA

1. Tureček F.: Chem. Listy 114, 89 (2020).
2. Fryčák P., Jirkovský J., Ranc V., Bednář P., Havlíček V., Lemr K.: J. Mass Spectrom. 47, 720 (2012).
3. de Hoffmann E., Stroobant V.: *Mass Spectrometry, Principles and Applications*, 3. vyd. J. Wiley, Chichester 2007.
4. Gross J. H.: *Mass Spectrometry, A Textbook*, 3. vyd. Springer International Publishing AG, Cham 2017.
5. Dass C.: *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*. J. Wiley, Hoboken 2007.
6. Mansoori B. A., Volmer D. A., Boyd R. K.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 11, 1120 (1997).
7. Jiang Y., Cole R. B.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. 16, 60 (2005).
8. <http://terminologie-ms.sci.muni.cz>, staženo 2. 12. 2019.
9. Robb D. B., Covey T. R., Bruins A. P.: Anal. Chem. 72, 3653 (2000).
10. Knochenmuss R., v knize: *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry; Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications*, (Cole R. B., ed.), kapitola 5, str. 149. J. Wiley, Hoboken 2010.
11. Cook K. D.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. 13, 1359 (2002).

12. Feider C. L., Krieger A., DeHoog R. J., Eberlin L. S.: *Anal. Chem.* 91, 4266 (2019).
13. Cole R. B. (ed.): *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry; Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications*, 2. vyd. J. Wiley, Hoboken 2010.
14. Grayson M. A. (ed.): *Measuring Mass, From Positive Rays To Proteins*. American Society for Mass Spectrometry, Santa Fe 2002.
15. Westman-Brinkmalm A., Brinkmalm G., v knize: *Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation, and Applications* (Ekman R., Silberring J., Westman-Brinkmalm A., Kraj A., ed.), kapitola 2, str. 15. J. Wiley, Hoboken 2009.
16. Lattimer R. P., Schulten H.-R.: *Anal. Chem.* 61, 1201A (1989).

**K. Lemr and L. Borovcová** (*Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences, Prague*): **Ion Formation in Mass Spectrometry: Ionization and Fragmentation**

Formation of ions is the first step of mass spectrometric analysis. Neutral species are ionized in an ion source giving primary ions. These ions act as precursors of secondary ones that are produced mainly by fragmentation. Fundamental ionization processes include ejection or capture of an electron, charge exchange, removal of an anion, proton transfer, and formation of adducts or clusters. In a particular ion source, one or more of these processes can be effective for a given analyte. For example, protonated molecules and sodium adducts are simultaneously observed after the electrospray ionization. The ionization is also related to the pressure in the ion source. Under high vacuum, the loss of electron is predominant, while ion-molecule reactions become more important with increasing pressure. Ionization techniques significantly influence the applicability of mass spectrometry. They have been developed to achieve ionization of still less volatile substances, more polar and larger molecules. Nevertheless, universal ionization technique has not been introduced yet. Careful selection of the technique appropriate for the given analysis is still a crucial step.

Keywords: mass spectrometry, ionization, fragmentation, pressure in an ion source

*Acknowledgements*

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