

Detekce a detektory

část 2

Ivan Mikšík

Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.

Praha

Spojení (spřažení) hmotnostní spektrometrie a separačních technik

- Analýza složitých směsí (nejdříve separace, poté analýza)
- Výhody on-line oproti off-line uspořádání
 - pracnost, časová náročnost, separační účinnost)

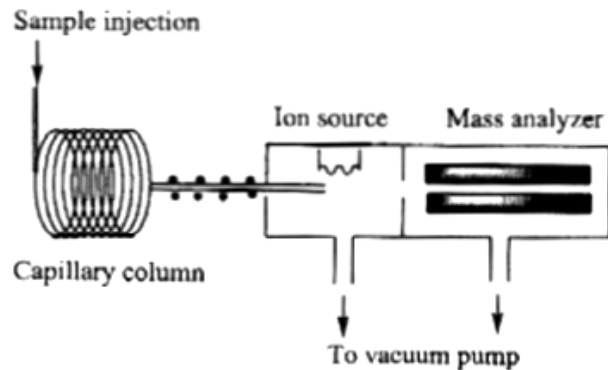
Technické problémy spojení:

- rozdíl tlaků mezi hmotnostním analyzátozem a analyzovanými látkami vstupujícími do iontového zdroje za atmosférického tlaku (tj. 10^5 Pa)
 - kvadrupól či iontová past 10^{-3} Pa = rozdíl nejméně 8 řádů
 - TOF (vakuum 10^{-5} Pa = rozdíl 10 řádů)
 - FTICR (vakuum 10^{-10} Pa = rozdíl 15 řádů)
- velký nadbytek plynu (GC; v kapilárních kolonách 1 ml/min) nebo kapaliny (HPLC; až 1 ml/min) = musí být odstraněny před vstupem do vakuové části přístroje

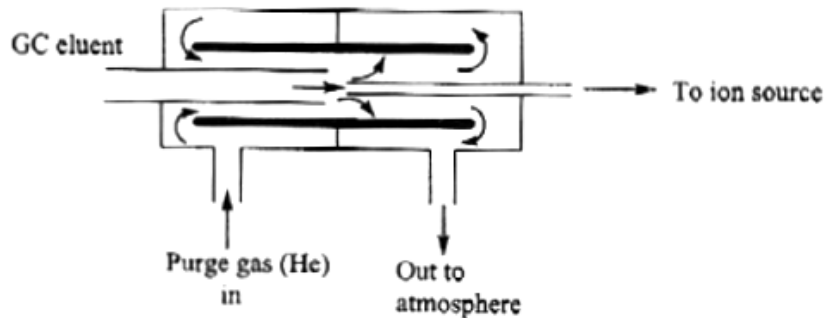
Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC/MS)

- v současné době zcela rutinní metoda
- spojení kapilárních kolon (průtok cca. 1 ml/min) s konvenční **elektronovou ionizací (EI)** nebo **chemickou ionizací (CI)**
 - pro současné vakuové pumpy není problém odčerpat nosný plyn (v minulosti se pro spojení GC/MS s náplňovými kolonami s vyššími průtoky nosného plynu používaly různé separátory, jejichž cílem bylo odstranění nadbytku nosného plynu před vstupem do iontového zdroje a analyzátoru)
- používané koncentrace u GC i MS jsou obdobné, ideální pro detekci
- EI (elektronová ionizace) umožňuje srovnání naměřených spekter s databází spekter (stovky tisíc spekter) a následné kritické posouzení porovnání – knihovny!!!

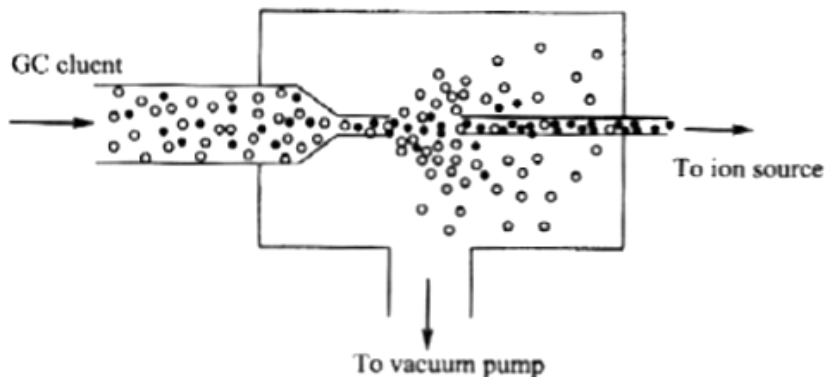
Spojení GC s MS



Přímé spojení kapilárních kolon
(vysokokapacitní pumpy odčerpají plyn z kapilární kolony)



„open-split“ (otevřené rozdělení)
(kolony o větším průměru; průtok „čistícího“ (purge) plynu odstraní většinu z nosného plynu)



Tryskový separátor
(pro plněné kolony; těžší organické sloučeniny proudí v užším úhlu kolem střední osy než lehké molekuly nosného plynu)

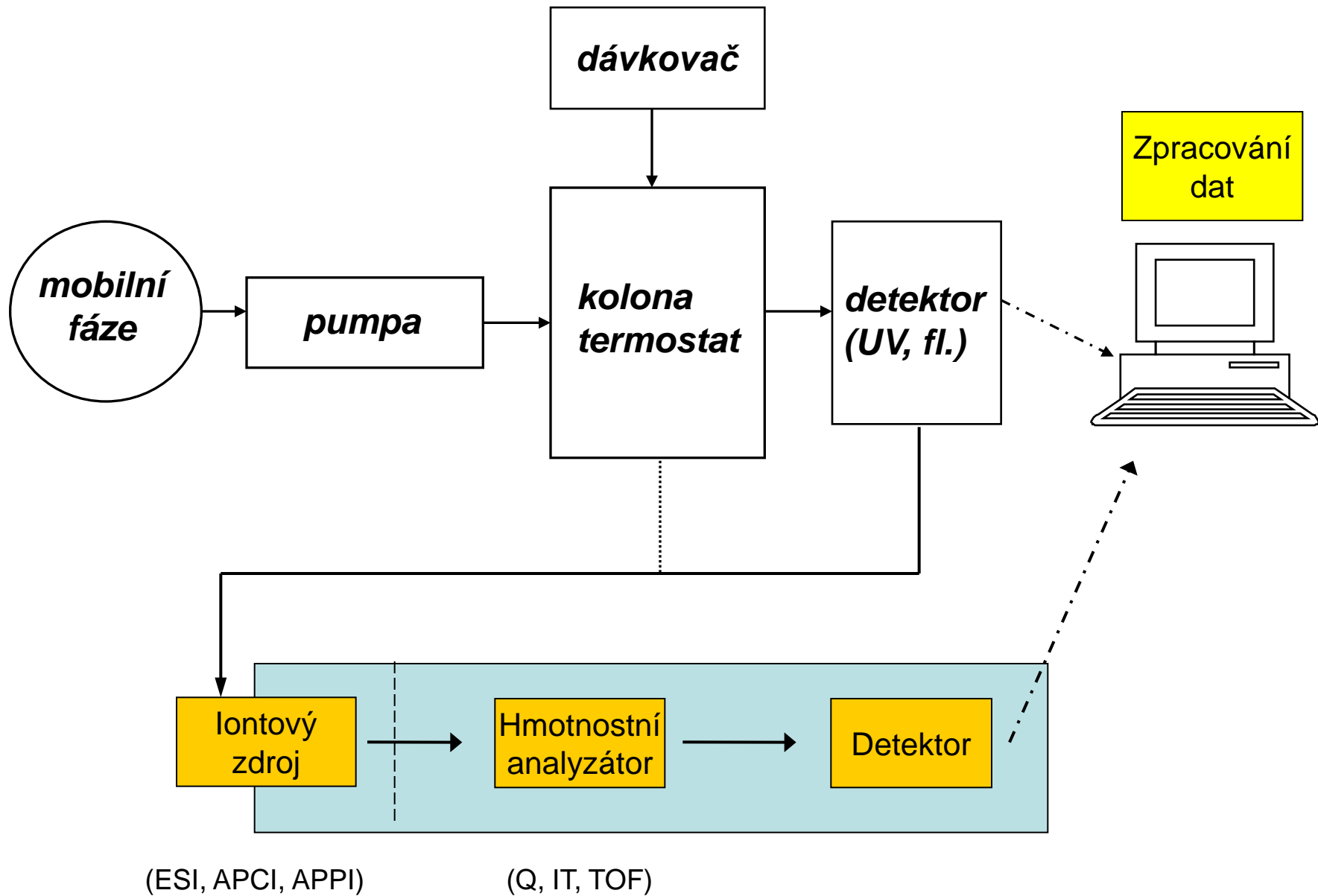
GC/MS

- většinou ve spojení s **elektronovou (EI)** nebo **chemickou ionizací (CI)**
- nejběžnější hmotnostní analyzátory pro GC/MS:
 - Q (cca 1.5 mil. Kč), IT (3 mil. Kč), TOF (5 mil. Kč), QqQ (6 mil. Kč)
- obvykle ve spojení s kapilárními kolonami
 - průtok helia jako nosného plynu řádově 1 ml/min stačí odčerpávat vakuové pumpy
- v praxi hlavně porovnávání s knihovny spekter (parametry shody)
 - málo se využívají možnosti MS

Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS)

Rozdíly ve spojení MS s HPLC nebo GC

- 1 ml/min kapaliny X 1 ml/l nosného plynu = technicky náročnější
- u ionizačních technik pracujících za atmosférického tlaku (ESI, APCI, APPI) se mobilní fáze se přímo účastní ionizačního procesu
- u měkkých ionizačních technik není možné porovnávat spektra s knihovny
 - neexistují
 - liší se podle ionizační techniky, pracovních podmínek (mobilní fáze), typu přístroje
- proteomické knihovny
- omezené, např. zakázané drogy, pesticidy apod.; většinou MS/MS



V jedné analýze více dat: chromatogramy (UV, TIC atd.) a spektra (UV, MS, MS/MS)

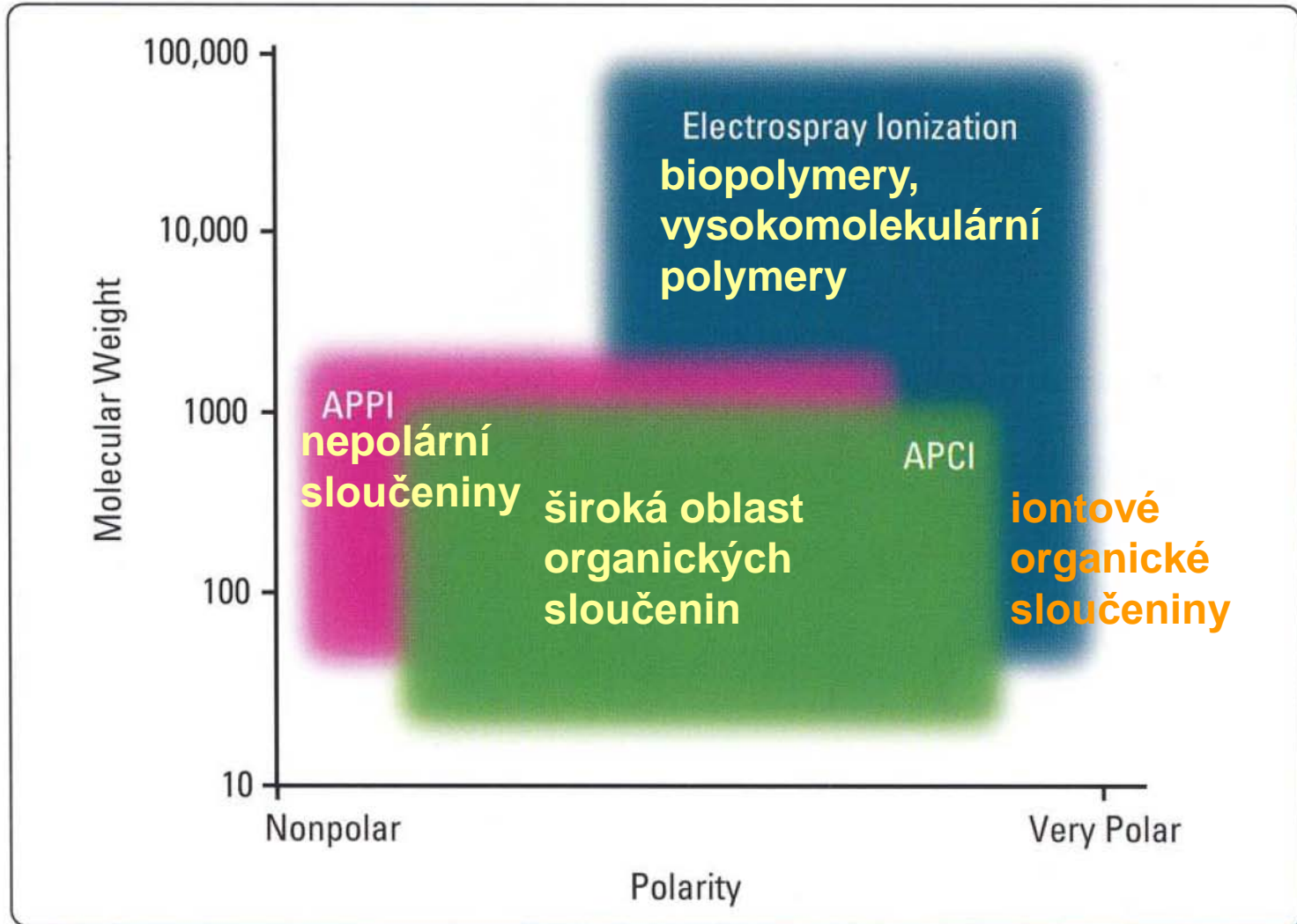
Ionizační techniky pro HPLC/MS

- ✓ ionizační techniky pracující za atmosférického tlaku (API)
 - ionizace elektrosprejem (ESI)
 - chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)
 - fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI)

 - ✓ ionizace a desorpce laserem za účasti matrice (MALDI)
 - on-line nebo off-line spojení

 - ✓ konvenční elektronová ionizace (EI) s použitím Particle Beam převodníku
 - méně obvyklé, specifické aplikace (EI knihovny spekter)
- v minulosti další techniky (dnes se prakticky nepoužívají):
- ionizace termosprejem (TSI)
 - ionizace urychlenými atomy či ionty (FAB/FIB)

Volba ionizační techniky



Ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Ionization, API)

V současné době běžně a rutinně používané 3 ionizační techniky (ESI, APCI, APPI) pracující za atmosférického tlaku.

Průlomová metoda pro spojení HPLC/MS s obrovským potenciálem v řadě oborů (chemie, biochemie, lékařství atd.)

Techniky ESI a APCI jsou standardem pro komerční HPLC/MS systémy, APPI je vhodnou alternativou pro nepolární nebo velmi labilní látky

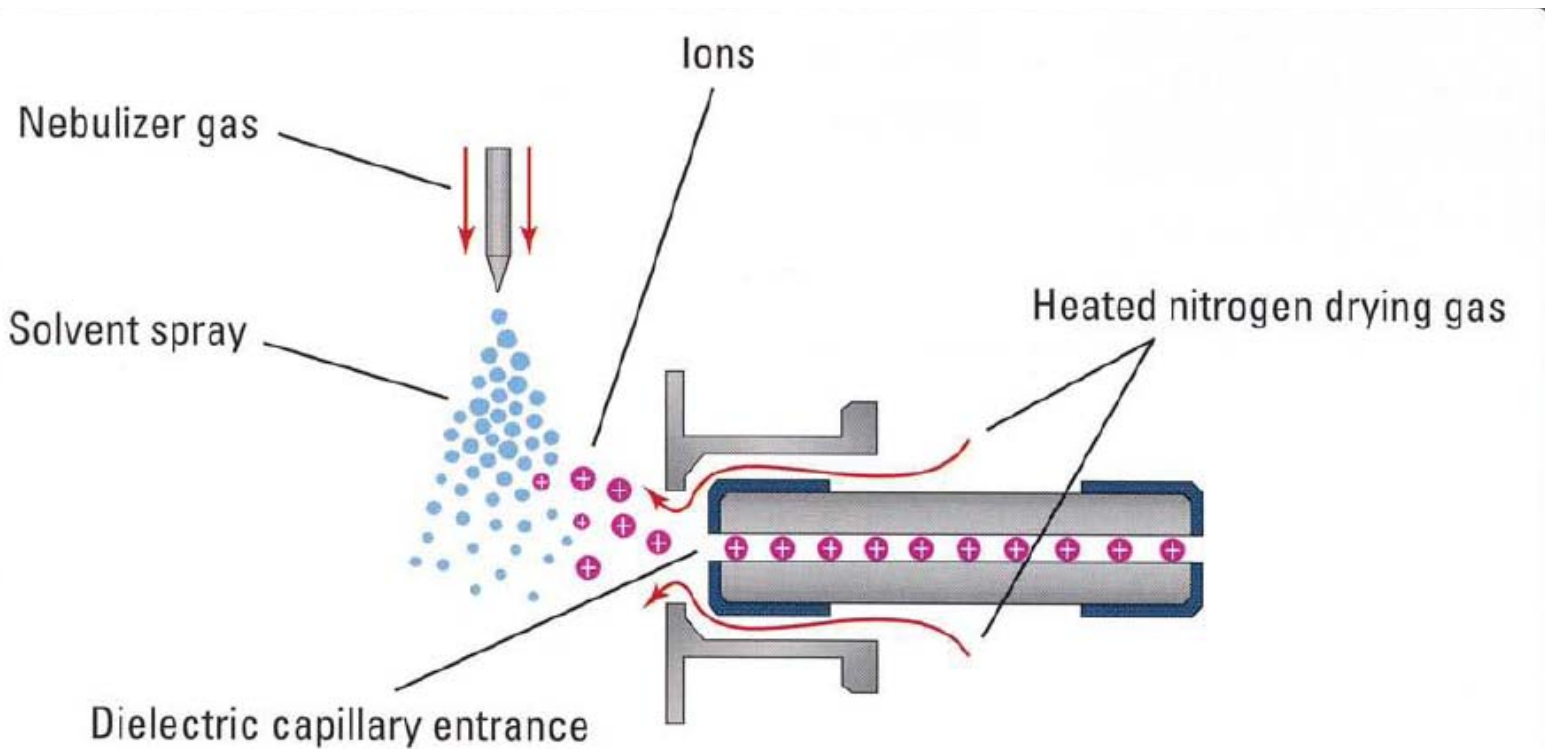
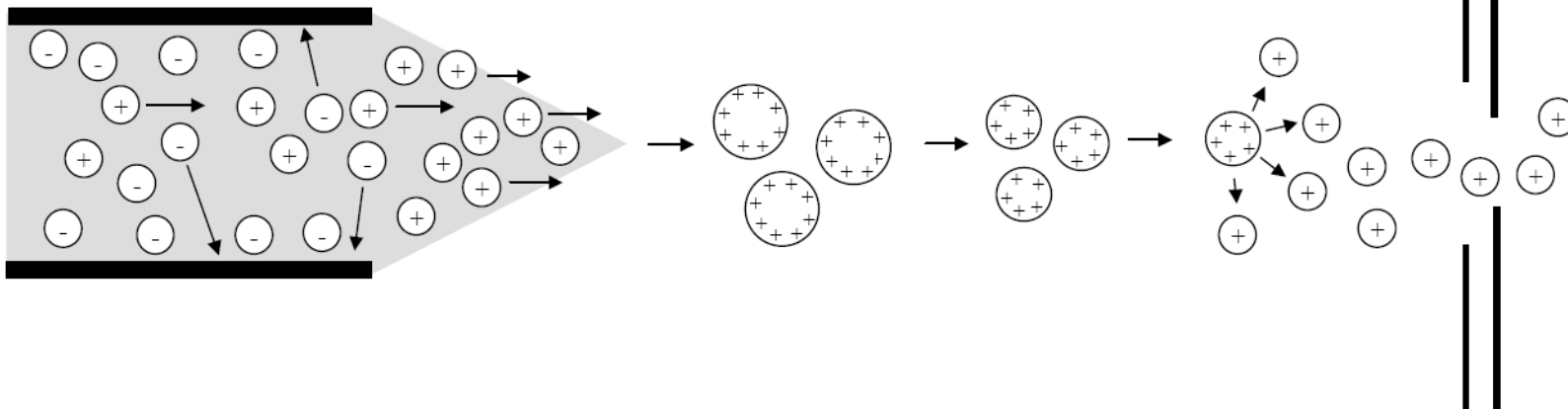
Vznikají převážně ionty se sudým počtem elektronů (existují výjimky)

- při záznamu kladných iontů: $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ (většina sloučenin, poměrně univerzální)
- při záznamu záporných iontů: $[M-H]^-$ (sloučeniny obsahující sulfo, karboxy, (poly)hydroxy nebo nitro skupiny, halogenované sloučeniny, organokovy, atd)

Ionizace elektrosprejem (ESI)

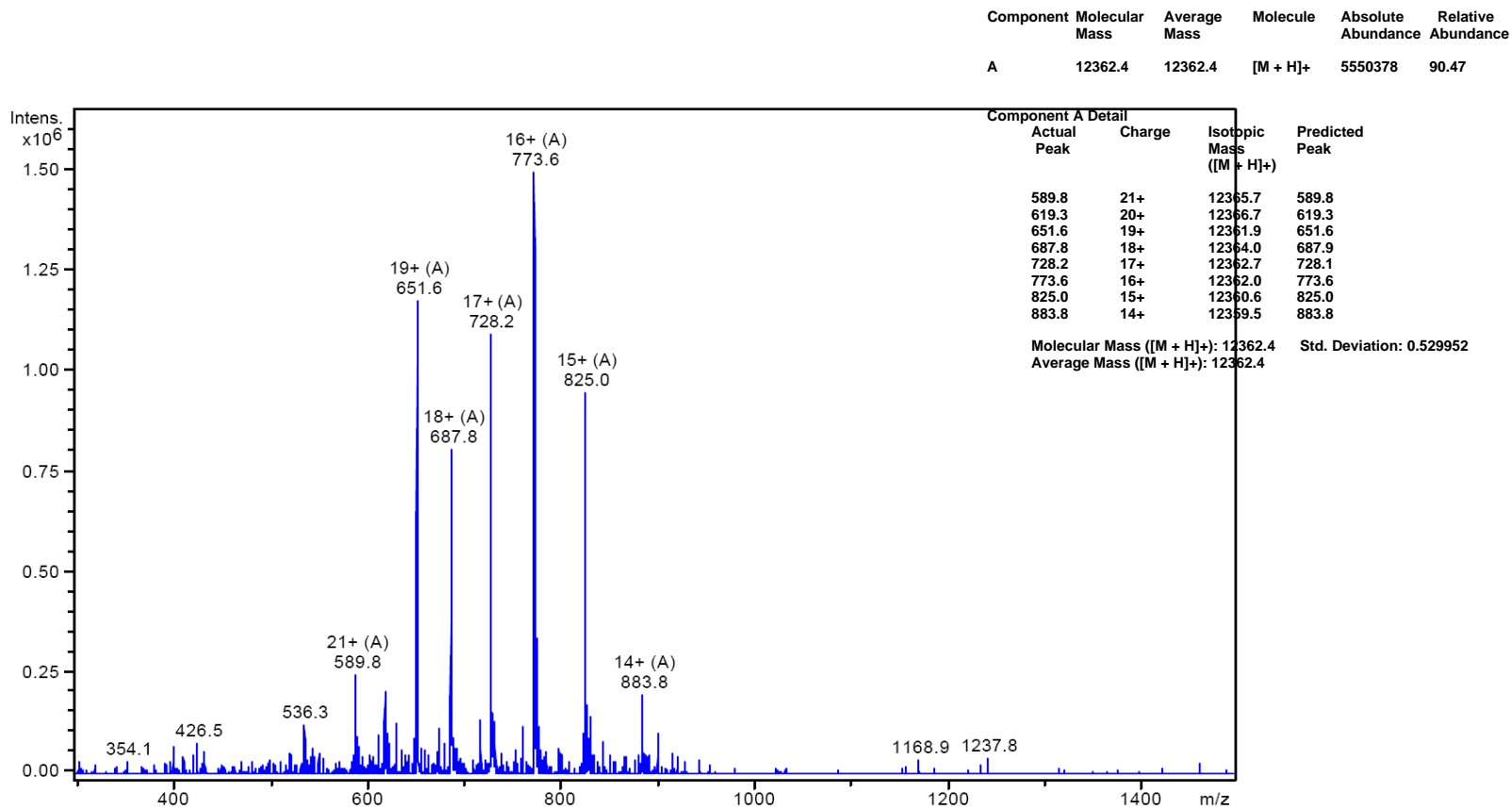
- produkce iontů začíná s nabitými polárními analyty v HPLC rozpouštědle
- LC eluent je rozprášen (nebulizován) do komory za atmosférického tlaku v přítomnosti silného elektrostatického pole a vyhřátého sušícího plynu:
- Eluent — špička jehly — vysoké napětí a tlak proudu plynu — aerosol nabitých kapének; odpařování — nabitý analyt migruje k povrchu, kapénka exploduje — menší nabité kapénky
- když aerosol analytu dosáhne kritického rozměru (10 nm) — ionty analytu vytrženy z kapénky do plyné fáze; tyto ionty jsou přitahovány a prochází skrz kapiláru do hmotnostního analyzátoru
- **Vhodnost:** velké biomolekuly (proteiny, peptidy, oligonukleotidy); mají často více než 1 náboj, proto lze analyzovat až 150 000 (3000 m/z)

Steel capillary at high voltage



Aplikace ESI – určení M_R proteinů

Cytochrom c



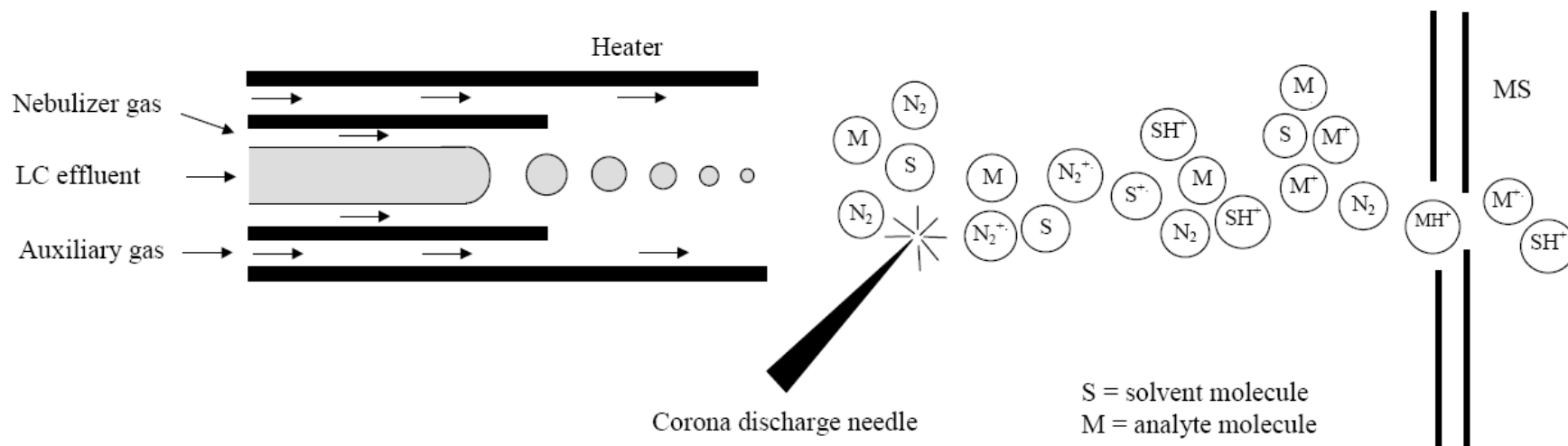
Chemická ionizace (APCI)

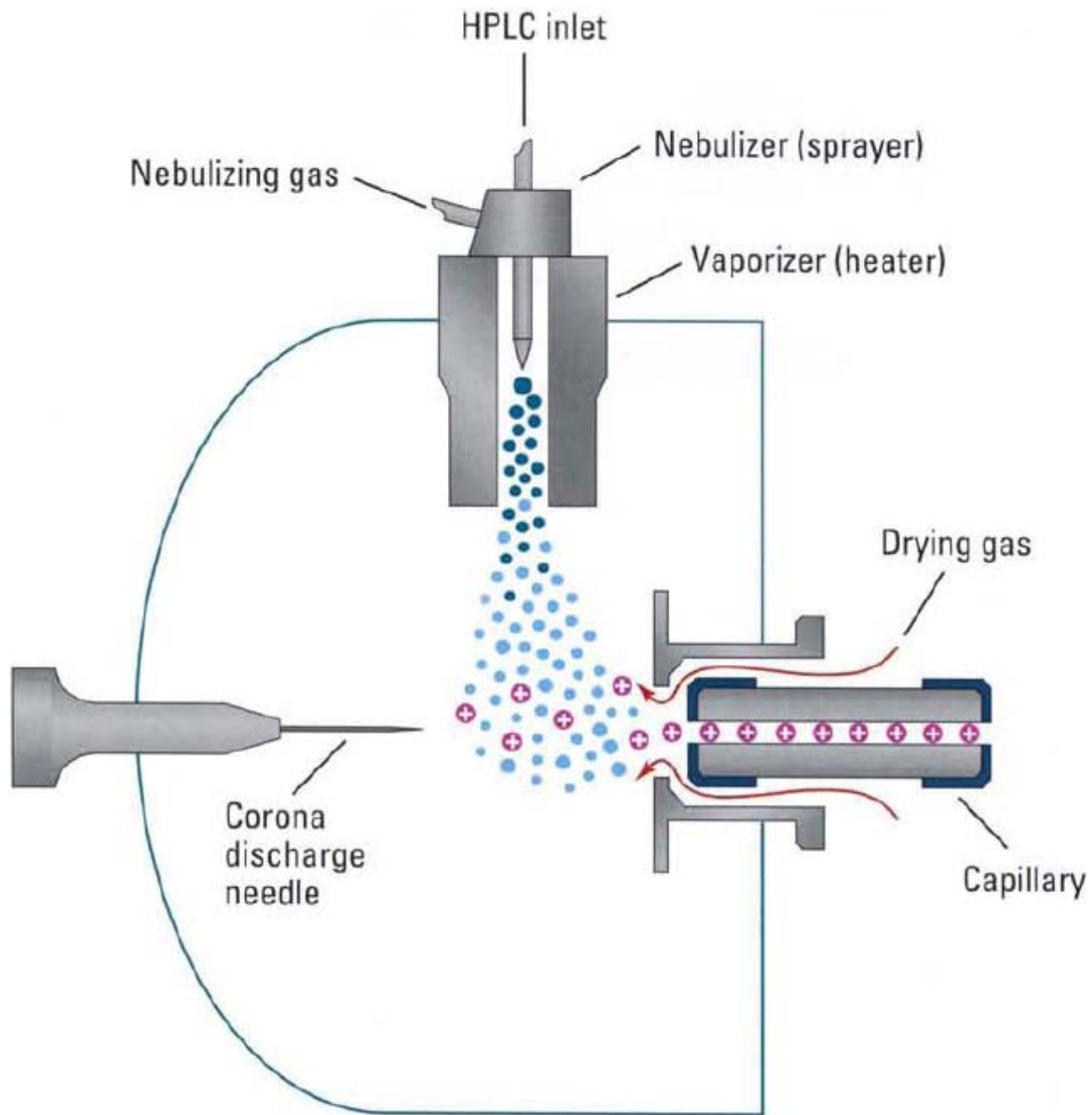
oproti ESI tvoří **ionty v plynné fázi** (spíš než v HPLC eluentu) —
analyt musí mít určitou těkavost

HPLC eluent je zmlžen ve vyhřívané komoře (analyt i solvent
vypařen)

korónový výboj ionizuje páry rozpouštědla („vybíjené“ elektrony)
— ionty rozpouštědla předají náboj molekulám analytu
chemickými reakcemi (chemická ionizace)

Vhodnost: široká oblast polárních a nepolárních látek,
Mw menší než 1.500, ne pro nestabilní látky,
normal-phase HPLC, protože většinou nepolární látky





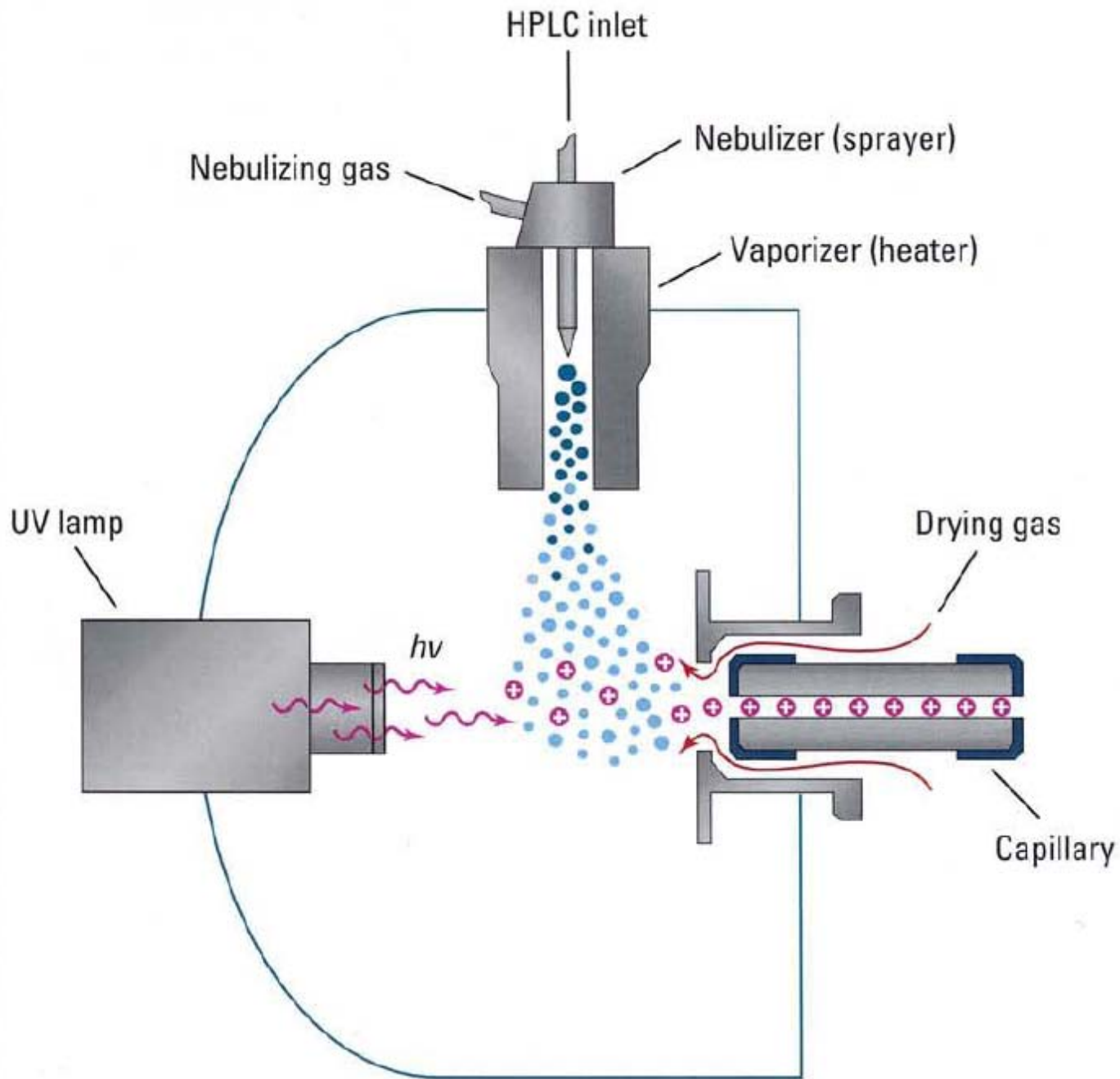
Fotoionizace (APPI)

Velmi podobná APCI – „vybíjecí“ lampa produkuje fotony v úzké oblasti ionizačních energií (opatrně zvolena k ionizaci co největšího množství molekul analytu a přitom k minimalizaci ionizace molekul rozpouštědla) — vzniklé ionty jdou skrz kapiláru do hmotnostního analyzátoru

Zdroj UV – kryptonová výbojka

Na rozdíl od ESI a APCI běžně vznikají ionty s lichým počtem e^-

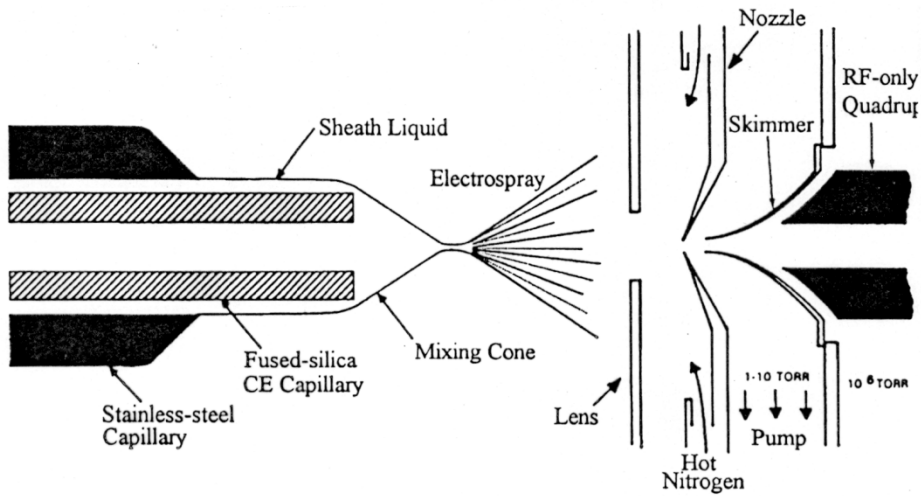
Použití: velmi nepolární nebo labilní sloučeniny v porovnání s APCI



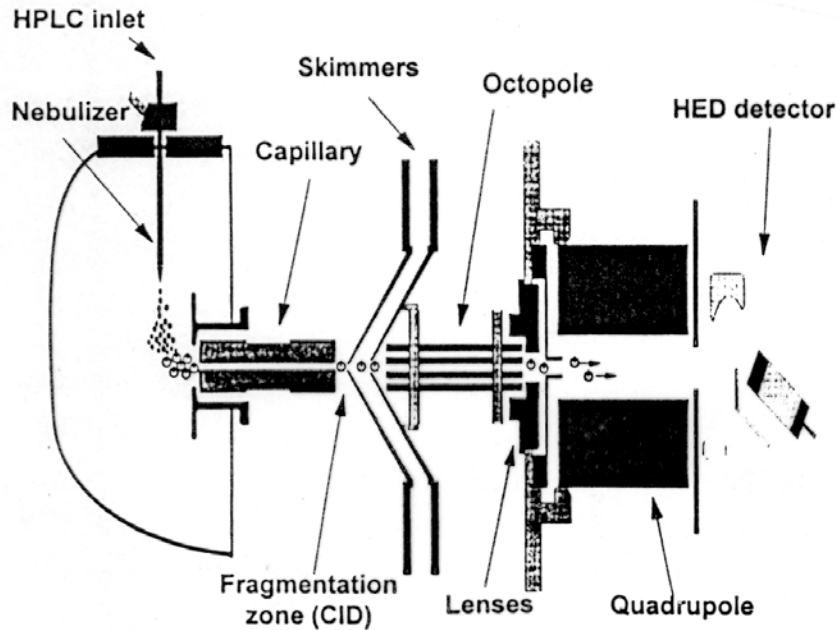
Mobilní fáze pro HPLC/MS

- Maximální čistota všech rozpouštědel, odvzdušnění, filtrace
- **NE** netěkavé pufrы a aditiva
- Těkavé pufrы a aditiva – v nízké koncentraci (pokles odezvy)
 - Kyselina mravenčí, octová; octan amonný (5 mmol/l)
 - TFA méně vhodná („ion-killer“)
- RP-HPLC – hlavně ESI (acetonitril, methanol, isopropanol; voda)
- NP-HPLC – hlavně APCI a APPI
 - v mobilní fázi musí být určitý obsah (>5%) proton-donorního rozpouštědla, např. 2-propanol,
- průtoky 1 μ l – 2 ml/min
 - ESI 1 μ l – 1 ml/min
 - APCI 200 μ l – 2 ml/min

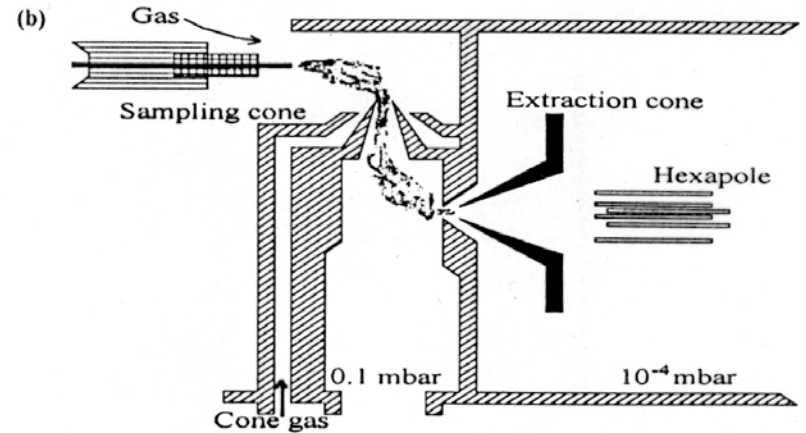
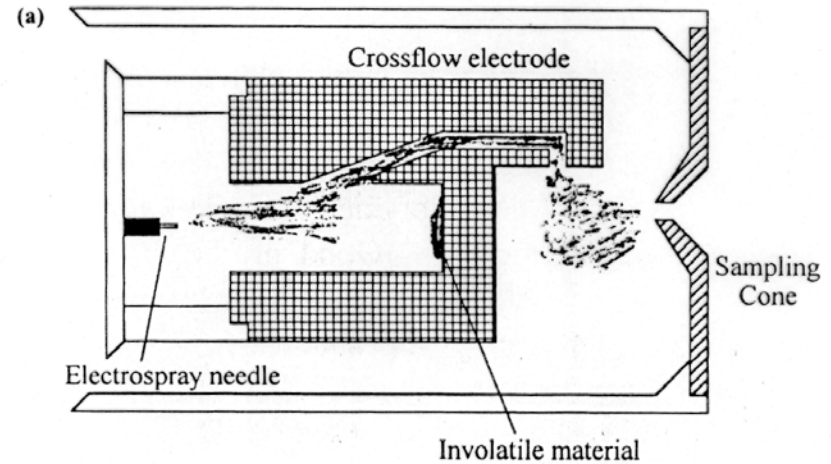
Geometrie iontového zdroje



Schematic diagram of the coaxial sheath-flow electrospray interface for capillary electrophoresis



Schematic diagram of the Hewlett-Packard orthogonal electrospray system



Schematic diagram of the Micromass (a) crossflow, and (b) Z-spray electrospray source.

Spojení HPLC/MALDI-MS

- **Off-line (nejčastější)**
 - Nanášení kapek eluentu ze separační kolony na MALDI terčik
 - Terčiky s hydrofilními místy
 - Mikrometody používající piezoelektrické pipetory a mikroterčiky
 - Nanášení vzorku pomocí elektrospreje
- **In-line**
 - Nanášení eluentu na povrch ve vakuu (též off-line)
 - Interface ROBIN
- **On-line**
 - Průtoková sonda s fritou
 - Průtoková sonda bez frity
 - Zmlžovač pro tvorbu aerosolu

MALDI-MS

Matrix –assisted laser desorption/ionization /TOF time-of-flight

- **makromolekulární látky jsou uloženy do lože nízkomolekulární matrice (značný přebytek, látky schopny absorbovat světlo laserového paprsku). Po krátkém ozáření laserem dochází k iradiaci vzorku a k současné desorpci a ionizaci sledované látky, která vykazuje minimální nebo žádnou absorpci při vlnové délce použitého laseru**
- **peptidy, proteiny, nukl. kys., glykokonjugáty bílkovin – matrice: kys. hydroxyskořicová**

Off-line spojení HPLC/MALDI-MS

- **Přídavek MALDI matrice**

- Smíchání s roztokem analytu (sheath flow, liquid junction)
- Nanesení roztoku na terčik předem pokrytý vrstvičkou matrice

- **Sběr eluentu**

- Diskrétní frakce

klady: - komerčně dostupné automatizované přístroje
- kompatibilní s HPLC

zápory: - nízká vzorkovací frekvence (nedokonalá integrace píků)
- nízké chromatografické rozlišení

- Spojitá stopa

- běžné vzorkovací frekvence ~10 vzorků/s
- vysoké rozlišení separace (složité biologické směsi)
- kompatibilní s CE, nanoLC a separacemi na čipu

Detektory (MS)

- Quadrupól
4 paralelní tyče ve čtverci; ionty analytu jdou skrz; napětí na tyče generuje elektromagnetické pole – toto pole určuje, který poměr hmoty/náboj iontů projde filtrem v daném čase, nejjednodušší a nejlevnější
2 módy: scan a SIM
- Time-of-flight
stejná elektromagnet. síla je aplikována na všechny ionty ve stejném čase, udělí jim akceleraci k letu dolů trubicí; lehčí ionty cestují rychleji a dosáhnou detektoru první – poměry hmoty/náboj iontů jsou určeny dle „času příletu“
široké hmotnostní spektrum, přesné stanovení
- Iontová past z kruhové elektrody a dvou uzávěrů = dohromady komůrka; ionty vstupující do komůrky jsou chyceny elektromagnetickým polem. Jiné pole může být aplikováno k selektivnímu vypuštění iontů z pasti.
Výhoda – může sloužit k mnohonásobné hmot. detekci bez dalšího hmotnostního analyzátoru

Jiná spřažení: s ICP-MS (inductively coupled), AAS, AES, NMR atd, ale i SPE, mikrodialýza ...

Spojení kapilární elektroforézy a MS

technicky náročnější, než HPLC/MS

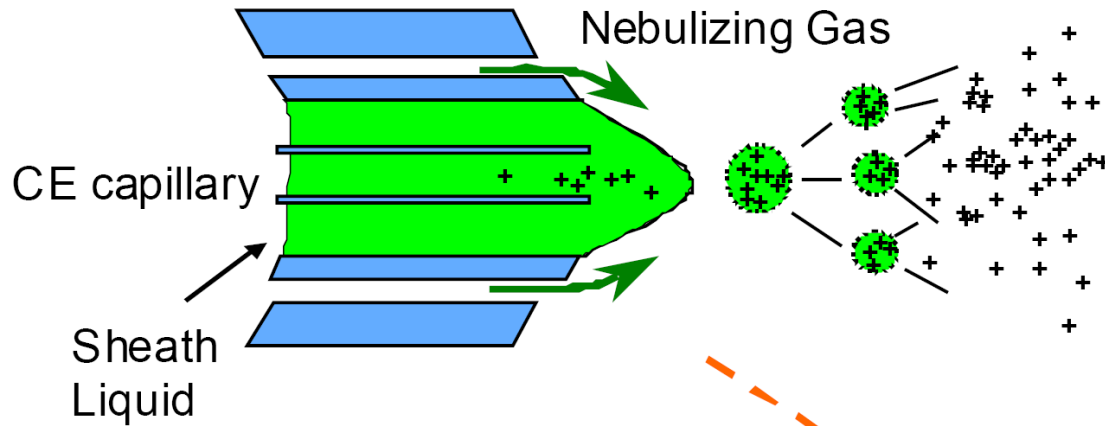
- Náhrada pracovního elektrolytu (netěkavé X těkavé)
- Nízké průtoky (cca desítky nl/min)
- Separace ve vysokém napětí

Základní typy spojení CZE/ESI-MS

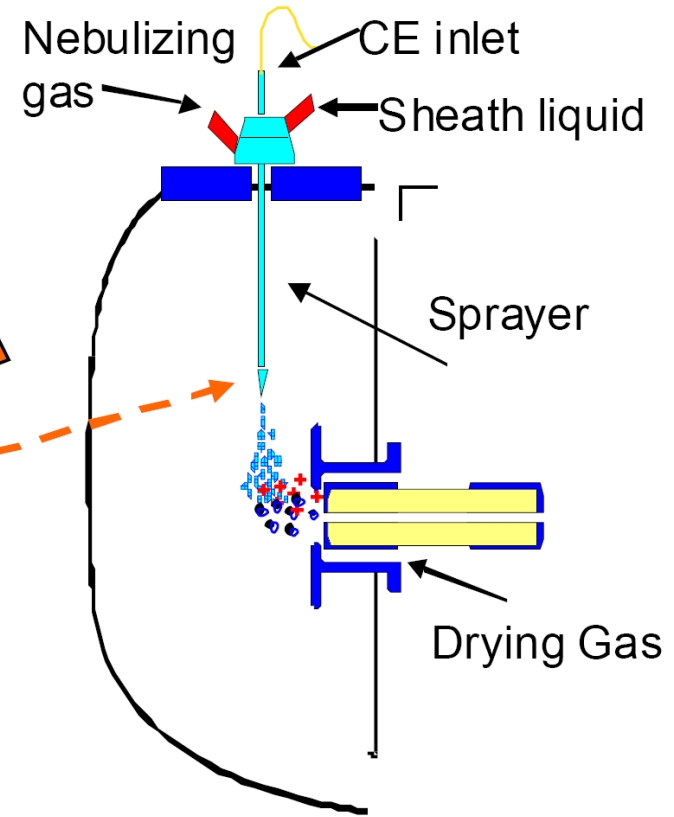
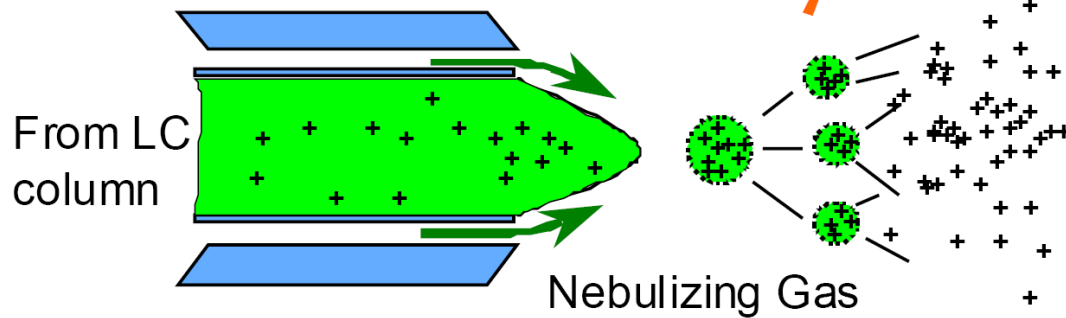
- **s přídatným tokem kapaliny (“Sheath-Flow Interface”)**
 - Nejrozšířenější, nejrobustnější
 - Problémy s citlivostí způsobené naředěním eluátu
- **s vodivým kapalným spojením (“Liquid-Junction Interface”)**
 - Méně rozšířené
- **bez přídatného toku kapaliny (“Sheathless Interface”)**
 - Spojení s on-line nanosprejem
 - Nejcitlivější ale nejméně robustní
 - Technicky náročné, časté problémy

CE/MS (s „sheath liquid“) a LC/MS

CE sprayer tip

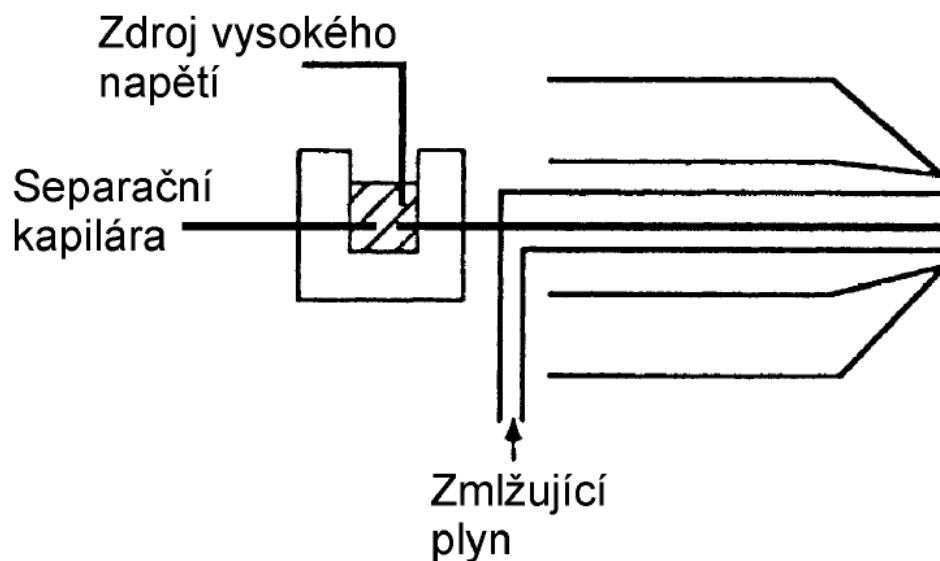


LC sprayer tip



CZE/MS s vodivým kapalným spojením ("Liquid-Junction Interface")

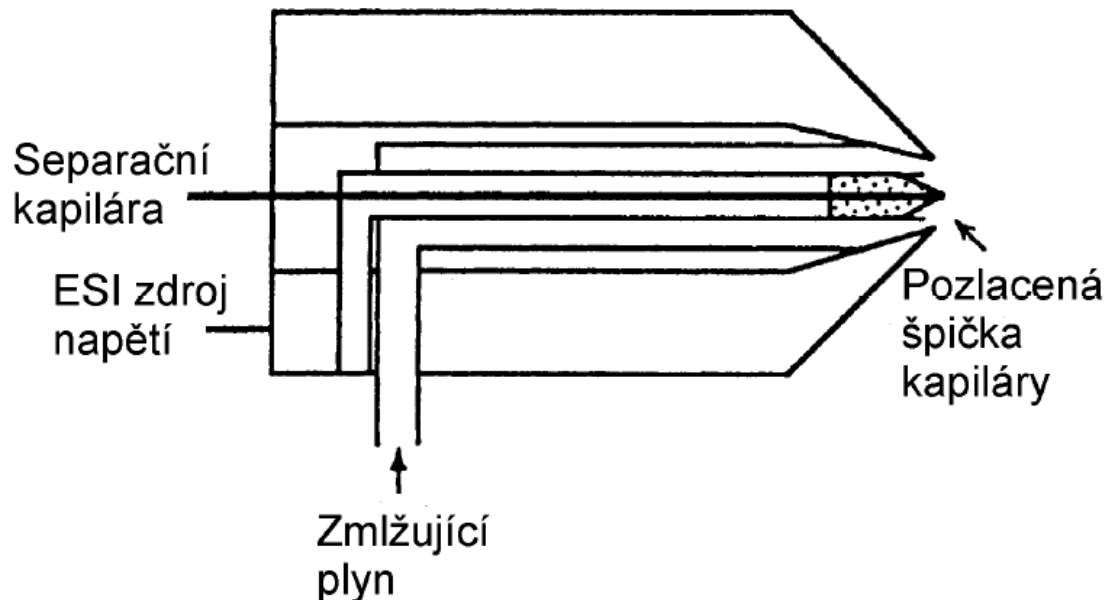
- CZE kapilára nedosahuje do špičky elektrospreje, ale končí v nádobce s elektrolytem, kde je vloženo napětí potřebné pro ESI (zároveň ukončení elektrického obvodu CZE)
- Přesné nastavení mezery mezi separační a ESI kapilárou - 10–20 μm (hrozí ztráta počtu teoretických pater)

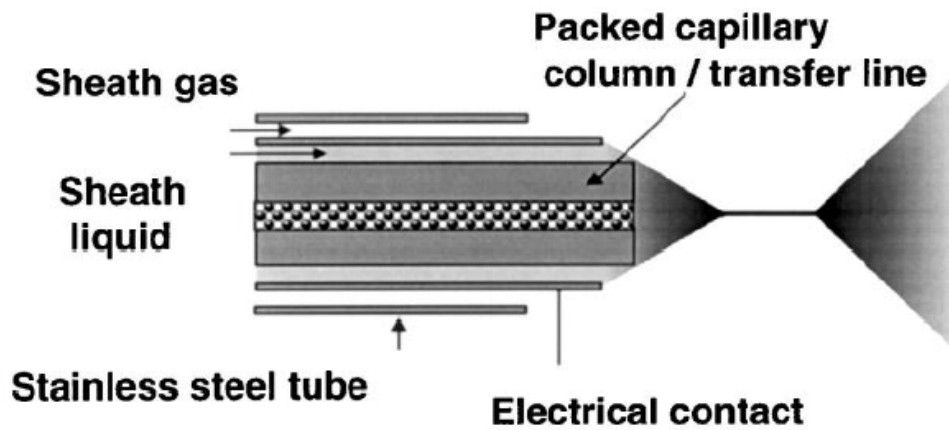


CZE/MS bez přídavného toku kapaliny ("Sheathless Interface")

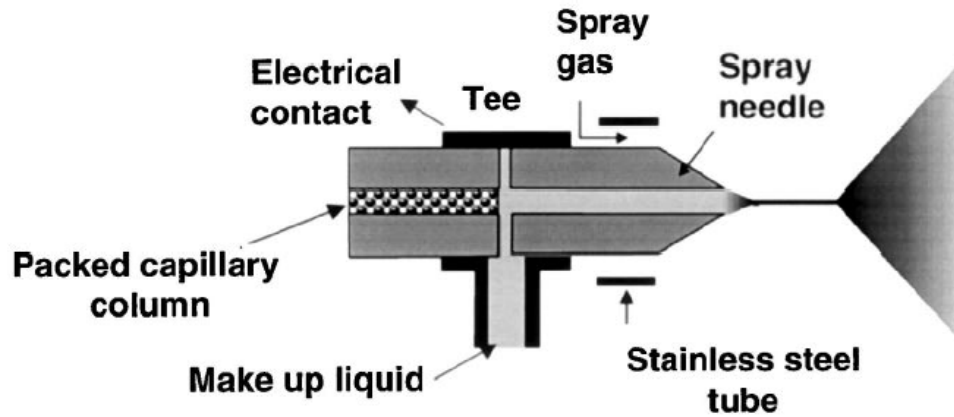
Jedná se o nanoelektrosprej

- Speciální úprava špičky - vytažení do zúženého konce 5–30 μm (náchylné k ucpávání = cca 20 μm)
- Stabilní i pro velmi nízké průtoky (10–1000 nI/min) kompatibilní s CZE
- Vodivé spojení přes pokovenou špičku nebo vložený zlatý drátek
- Potlačení iontů z pozadí
- Nejvyšší citlivost (až attomoly!) x nejnižší robustnost

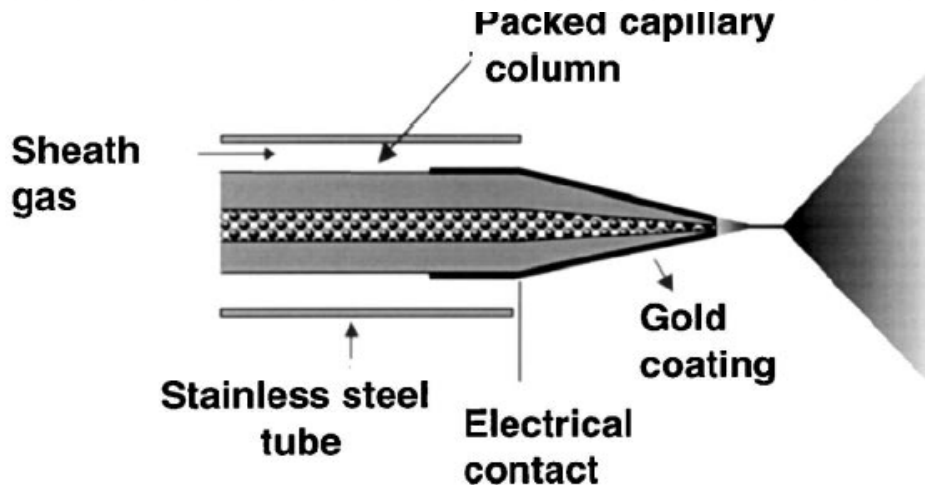




**přídavný tok kapaliny
("Sheath-Flow Interface")**



**vodivé kapalném spojení
("Liquid-Junction Interface")**



**bez přídavného toku kapaliny
("Sheathless Interface")**