

Spojení hmotové spektrometrie se separačními metodami



RNDr. Radomír Čabala, Dr.

Katedra analytické chemie

Přírodovědecká fakulta

Univerzita Karlova Praha

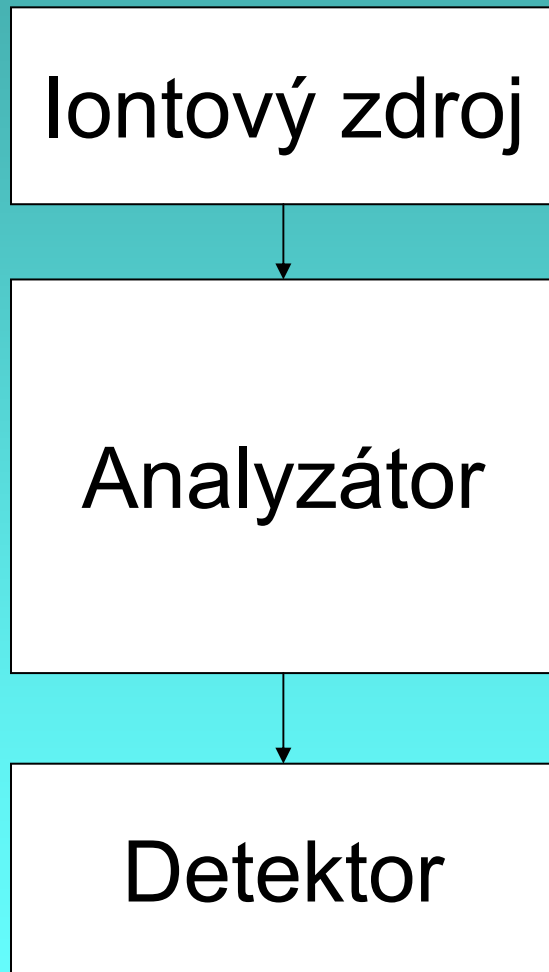
Separační metody

- vysoká separační účinnost
- malá informační obsažnost dat o kvalitativním složení (i při použití selektivních detektorů)

Spektrální metody

- velké množství informací využitelných k identifikaci složek
- nutnost práce s čistou látkou
- žádná možnost separace

Hmotový spektrometr



- produkuje ionty vzorku k analýze
- rozděljuje ionty podle jejich hmotnosti, resp. poměru hmotnosti a náboje
- štěpí ionty na menší
- deteguje ionty a měří jejich hmotnost, resp. poměr hmotnosti a náboje, a jejich intenzitu

Iontové zdroje pro MS

Klasifikace druhů ionizace

- **Podle fáze**

- Z plynné fáze: EI, CI
- Z kondenzované fáze: ESI, APCI, APPI, FAB, MALDI, ICP

- **Podle tlaku**

- Za nízkého tlaku: EI, CI
- Za atmosférického tlaku: SI, APCI, APPI, FAB, MALDI, ICP, (PB)

Iontové zdroje pro MS

Metody používané pro ionizaci látek ve spojení separačních metod a MS:

Ionizace

Za nízkého tlaku

- nárazem elektronu (Electron Impact, EI)
- chemická (Chemical Ionization, CI)
- bombardováním rychlými atomy/ionty (Fast Atom/Ion Bombardment, FAB)
- desorpcí polem (Field Desorption, FD)
- MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption)
- termosprayem (Thermospray, TS)

Za atmosférického tlaku

- elektroprayem (Electrospray i., ESI)
- chemická za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI)
- fotoionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Photoionization, APPI)
- indukčně vázanou plazmou (Inductively Coupled Plasma i., ICP)

Ionizace nárazem elektronu (EI)

$$\lambda = \frac{h}{mv}$$

- De Broglie (1892-1987)
- dualizmus vlna-částice

Letící elektron o kinetické energii E_k

$E_k = 20 \text{ eV} \dots \lambda = 27 \text{ nm}$

$70 \text{ eV} \dots 14 \text{ nm}$

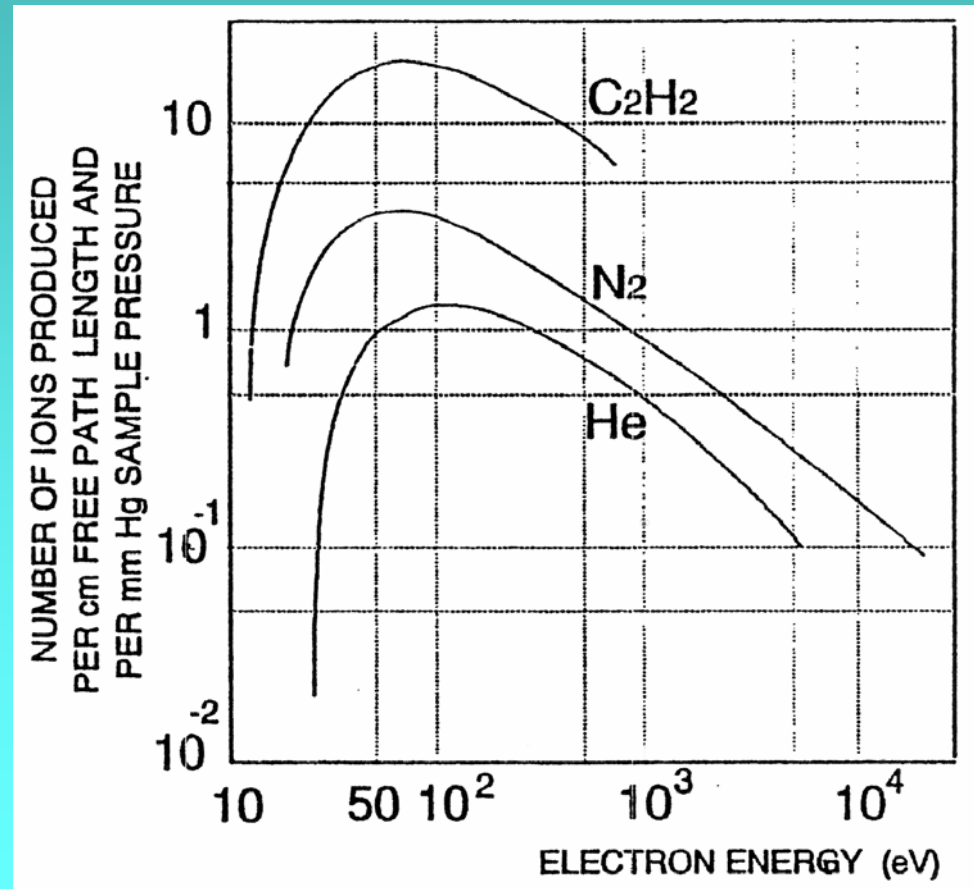
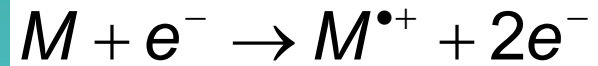
$$N_i = k p i V$$

N_i ... počet iontů produkovaných za jednotku času

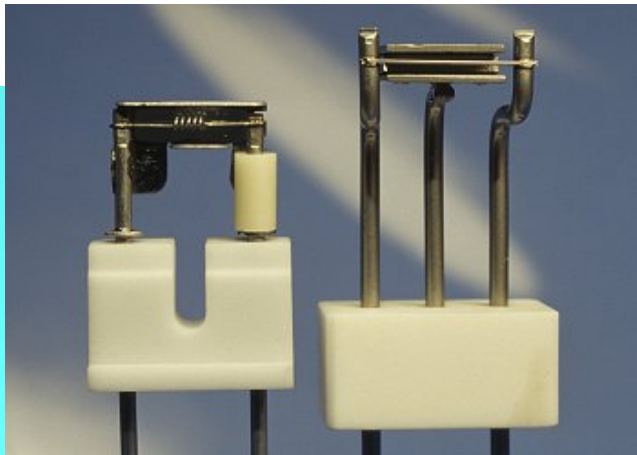
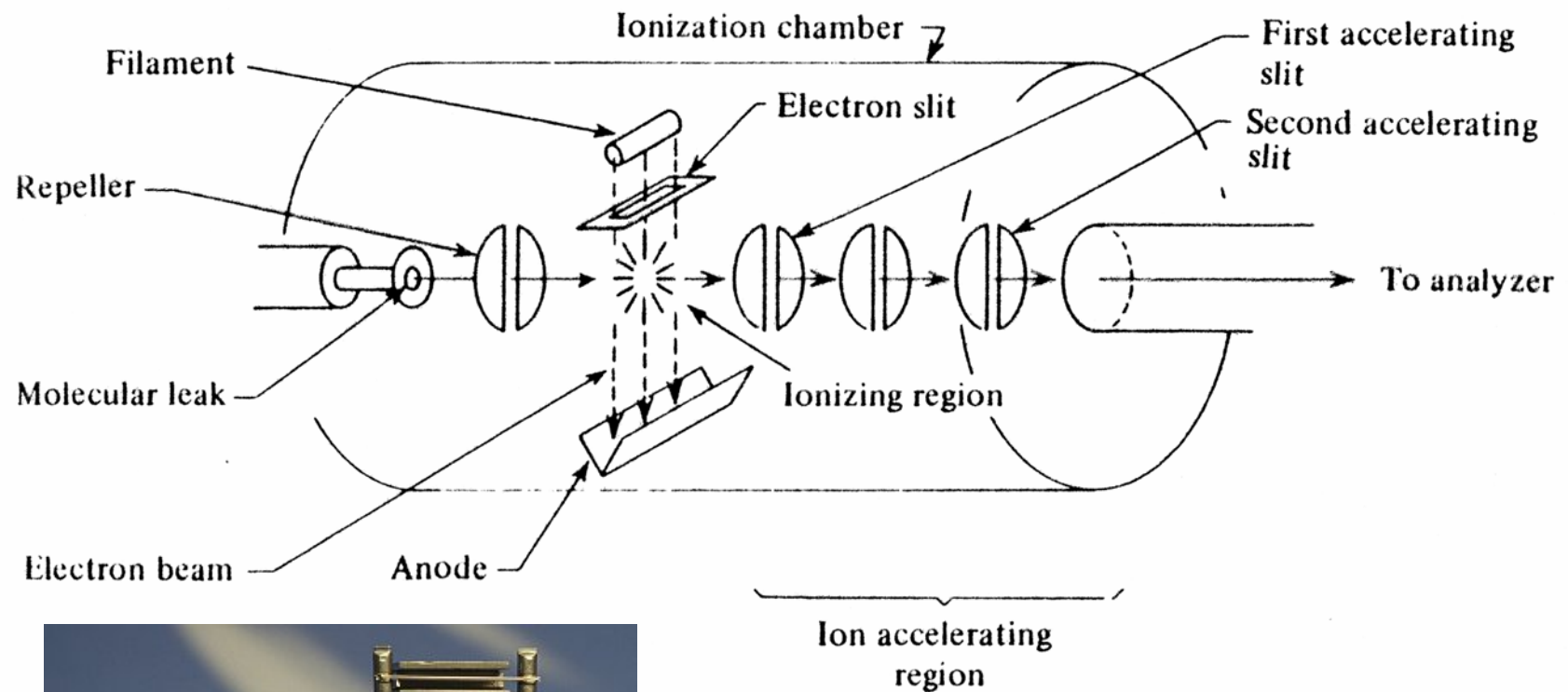
p ... tlak

i ... proud elektronů

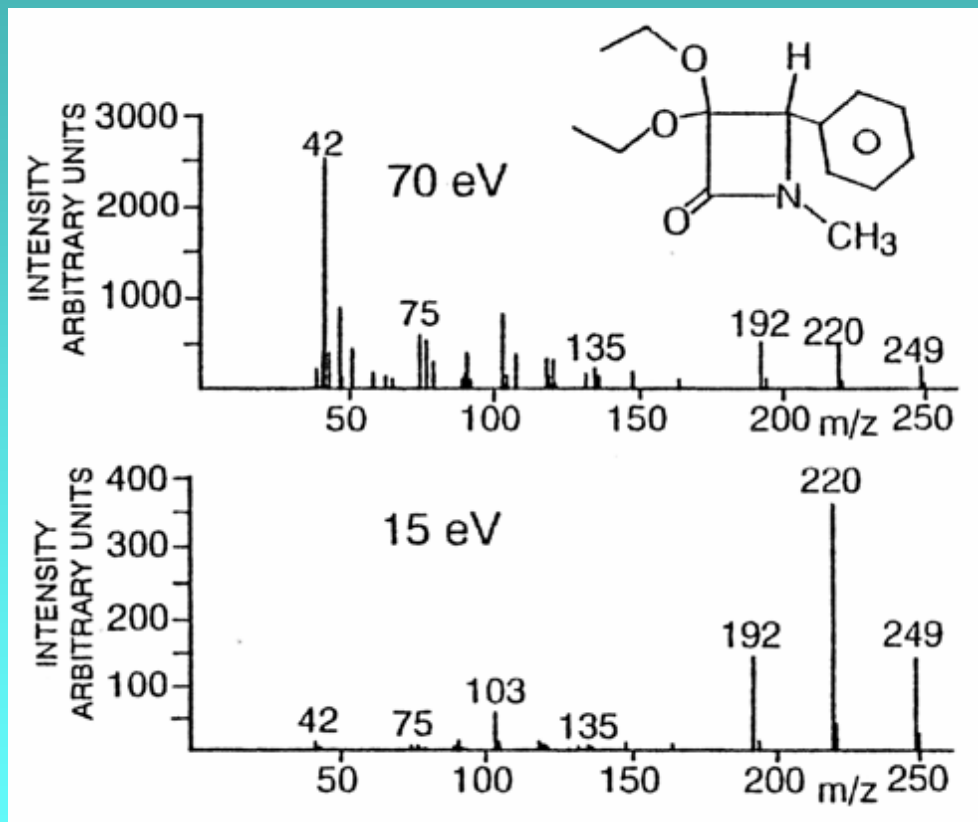
V ... objem



Ionizace nárazem elektronu (EI)



Ionizace nárazem elektronu (EI)



- Při $E_k = 70$ eV je účinnost ionizace asi 1 iont na 10 000 molekul

Chemická ionizace

Střední volná dráha molekul

$$l = \frac{1}{\sqrt{2} \pi d^2 \frac{N_A}{V}}$$

d ... aritmetický
průměr součtu
poloměrů částic
V ... objem

$$l = \frac{1}{p \sigma \sqrt{\frac{2}{kT}}}$$

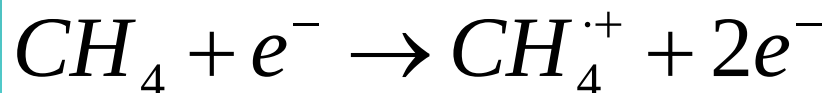
σ... součet průměrů
částic
p ... tlak, Pa
T ... teplota, K

$$l = \frac{0.66}{p} \quad (\text{cm})$$

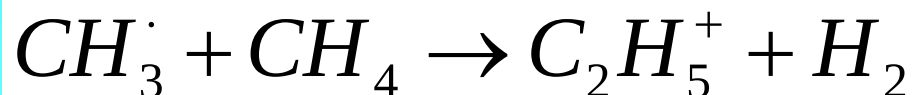
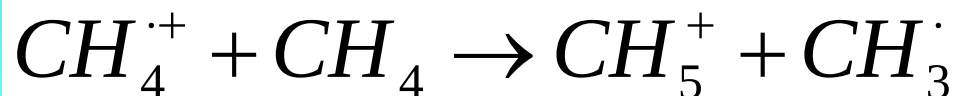
Střední volná dráha		Tlak			Hustota
		Atm	Torr	Pa	molek./cm ³
10 ⁻⁶	m	1	760	10 ⁵	2,7*10 ¹⁹
0,05	mm	10 ⁻³	1	10 ²	3,5*10 ¹⁶
0,5	mm	10 ⁻⁴	10 ⁻¹	10	3,5*10 ¹⁵
0,5	cm	10 ⁻⁵	10 ⁻²	1	3,5*10 ¹⁴
5	cm	10 ⁻⁶	10 ⁻³	10 ⁻¹	3,5*10 ¹³
50	cm	10 ⁻⁷	10 ⁻⁴	10 ⁻²	3,5*10 ¹²
50	m	10 ⁻⁸	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	3,5*10 ¹⁰

Chemická ionizace

Primární proces :



Sekundární procesy :



Analyzátoři v MS

Analýza hmotnosti

- kontrola a řízení pohybu iontů
- parametry ovlivňující pohyb iontů
 - tlakový gradient
 - teplotní gradient
 - elektrické pole
 - magnetické pole
- přesné a citlivé řízení pohybu iontů
 - eliminace vlivu teplotních a tlakových gradientů (mezimolekulových srážek)
 - vakuum

Analyzátory v MS

Odlišnosti pracovních podmínek analyzátorů

Analyzátor	Tlak (mPa)	Tlak (Torr)	Střední volná dráha
FTMS	0,001	$\leq 10^{-8}$	5 km
Sektor	0,1	$\leq 10^{-6}$	50 m
TOF	0,1	$\leq 10^{-6}$	50 m
Kvadrupól	10	$\leq 10^{-4}$	50 cm
Iontová past	10	$\leq 10^{-4}$	50 cm

Propojení s MS

Propojení separačních metod a MS

GC

- ionizace
- snížení tlaku mobilní fáze

LC

- zplynění mobilní fáze
- ionizace
- snížení tlaku mobilní fáze

Propojení GC-MS

Obvyklé pracovní tlaky

(GC: $> 101325 \text{ Pa}$) $\times$ (MS: $10^{-3} - 10^{-5} \text{ Pa}$)

GC-MS interface:

- musí dostatečně snížit pracovní tlak
- musí převést beze ztráty analyty do MS
- nesmí přispívat k disperzi analytů

Propojení GC-MS

Náplňové kolony - běžné průtoky 15 - 30 ml/min

- Dělič toku FID/MS
 - ~ 1:50 - dle výkonu vakuového systému
 - asi 2 % vstupují do MS
 - silné zředění nosným plynem
- Molekulové separátory

Kapilární kolony - průtoky 1 - 2 ml/min

- Dělič toku
 - ~ 1:1
- Přímý vstup

Propojení GC-MS

Molekulové separátory

– úkol

- oddělit co největší část nosného plynu od eluované složky

– výsledek

- podstatné zmenšení objemu nosného plynu
- podstatně vyšší koncentrace analytu

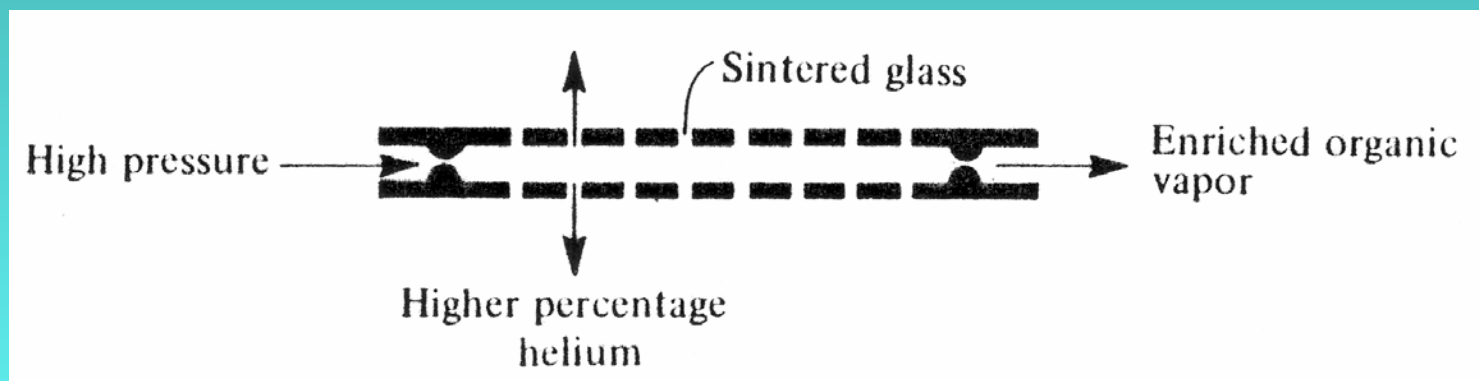
– typy

- tryskový
- solvatačně difuzní
- efúzní

Propojení GC-MS

Efúzní molekulový separátor

Porous barrier separator / Effluent splitter



Princip: He je mnohonásobně lehčí než separované molekuly organických látek a difunduje skrz porézní stěny

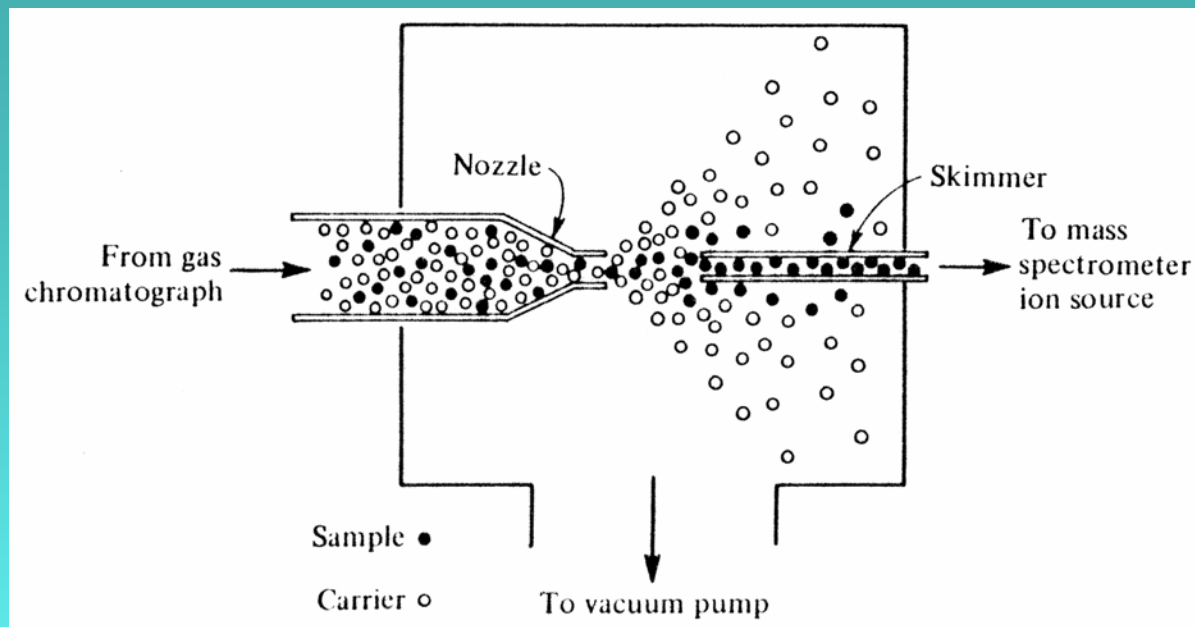
MS: 10-20 % vzorku

Obohacení: 50-100 krát

Propojení GC-MS

Tryskový
molekulární
separátor

Jet/Orifice



Princip: He je mnohonásobně lehčí než separované molekuly organických látek a je silněji rozptylováno od proudu efluentu, který má tendenci se zakonzentrovat ve středu nadzvukového paprsku

MS: ~ 20 % vzorku při 20 ml/min

Propojení GC-MS

Solvatačně difuzní molekulární separátory

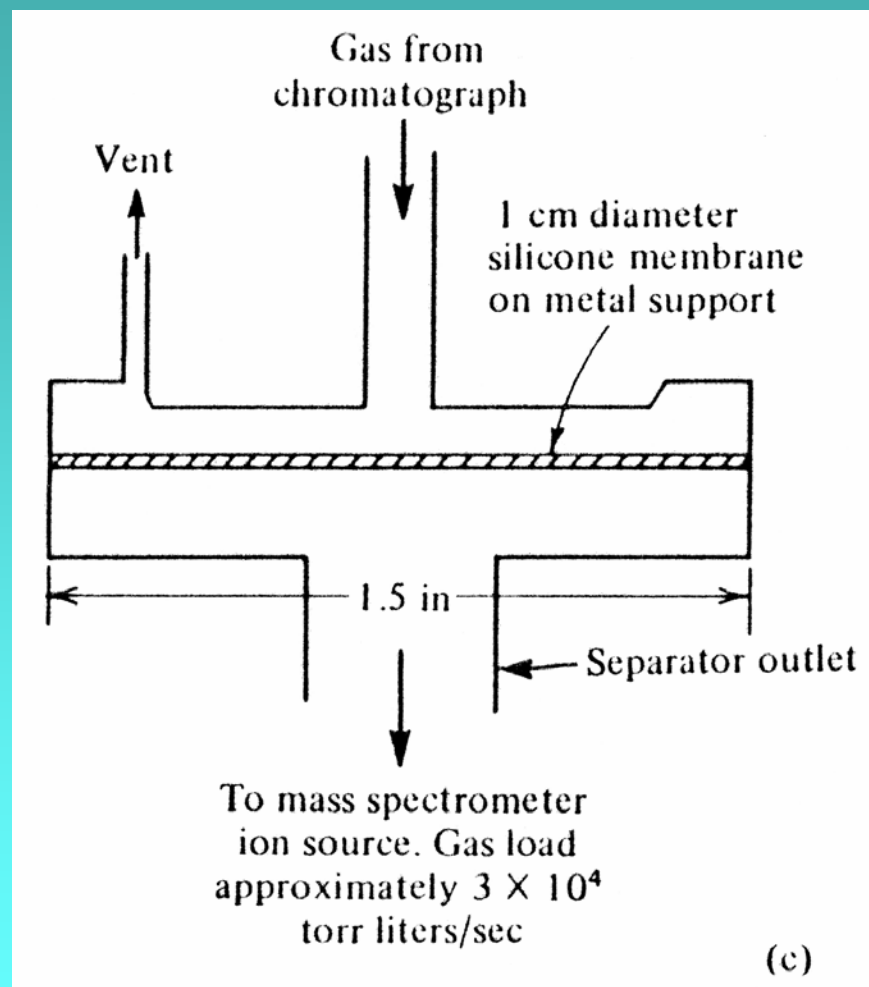
Princip: veliký rozdíl mezi
permeabilitou molekul organických
látek a He skrz silikonovou
membránu

MS: 50-90 % vzorku

Obohacení: 500 -1000 krát

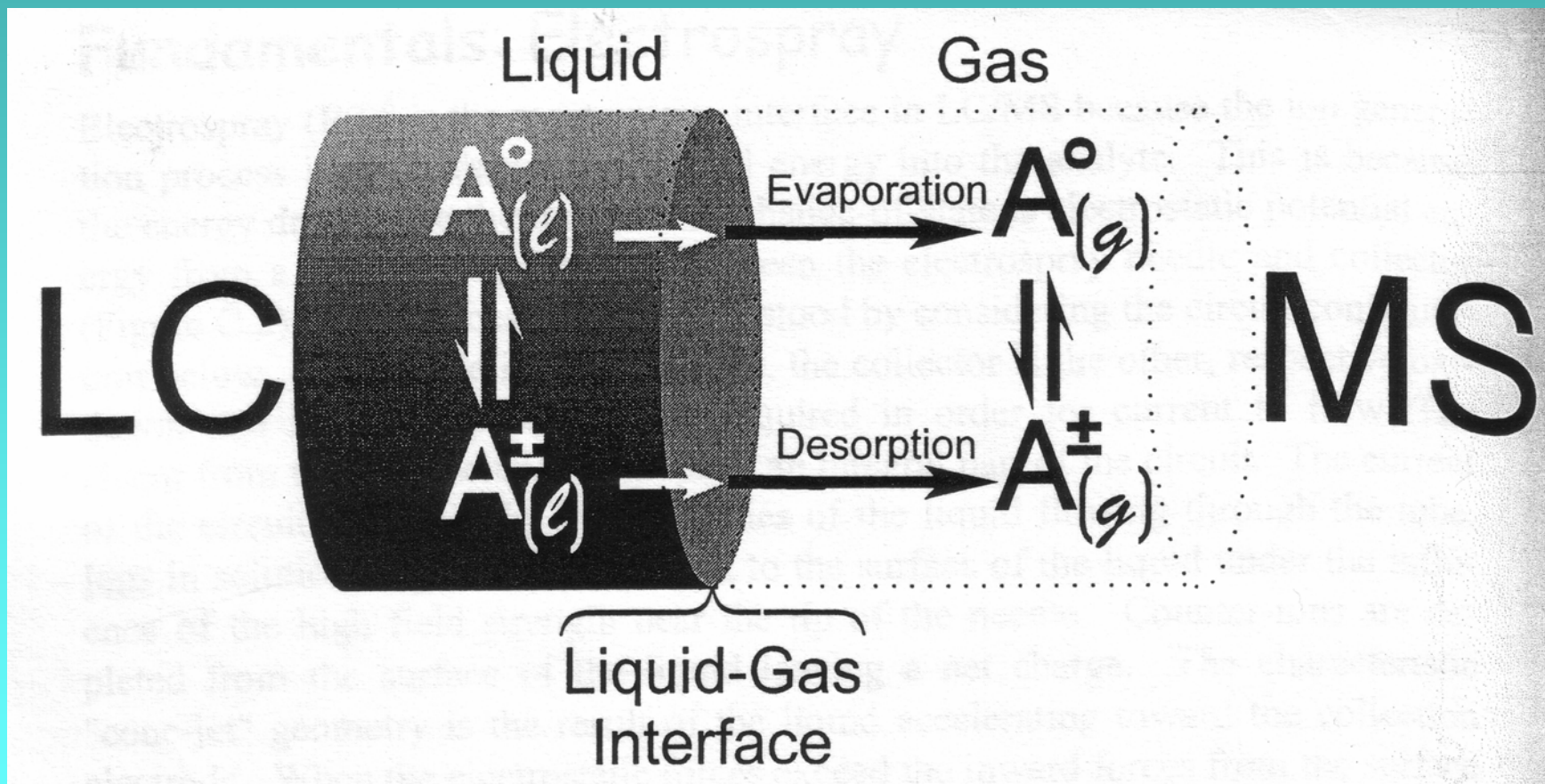
Nevýhody:

- časová prodleva asi 0,1 s
- velký mrtvý objem
- diskriminace vzorku podle velikosti

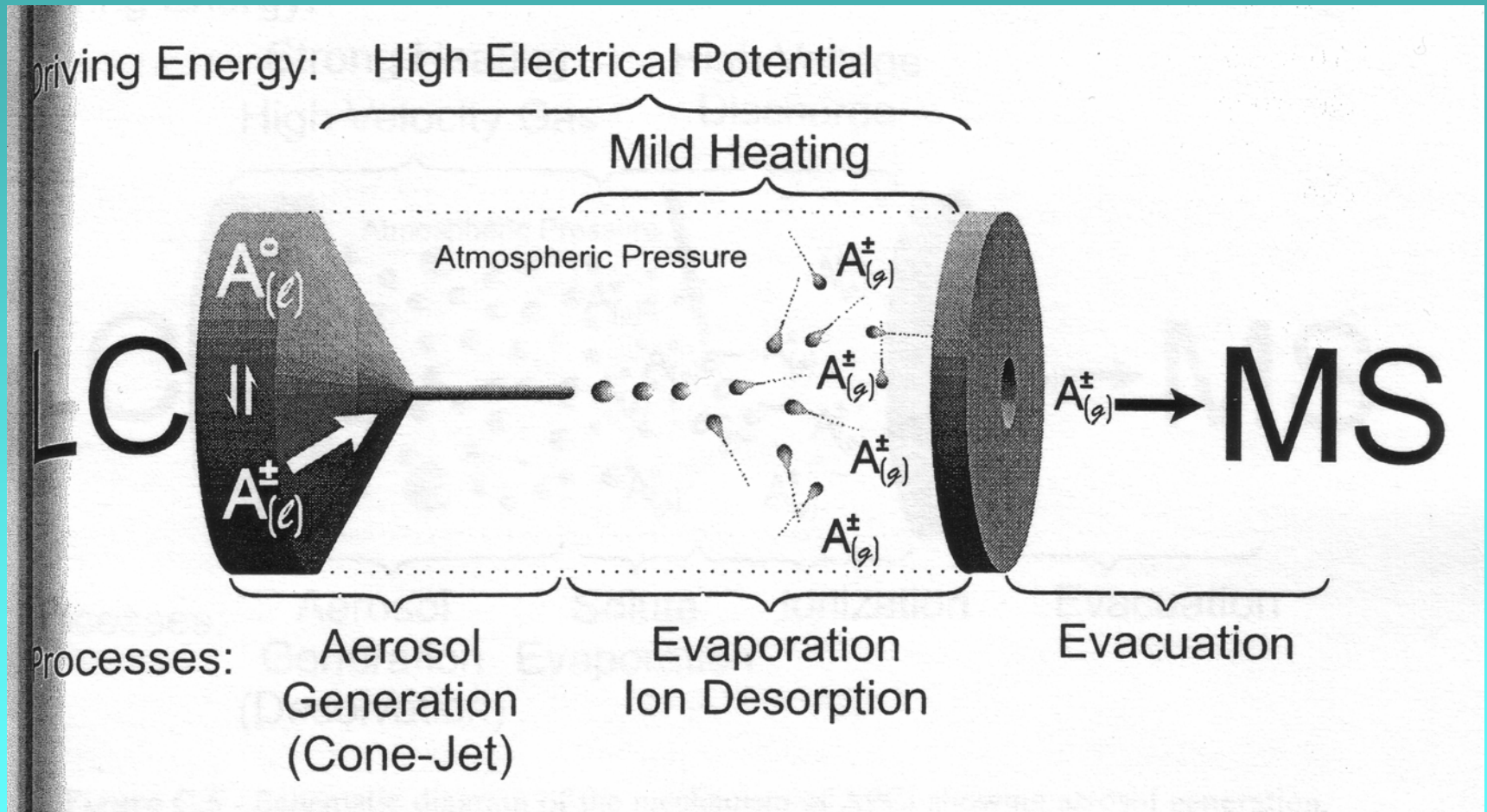


Permeabilita = rozpustnost $\times$ rychlost difuze

Obečné procesy pro LC-MS

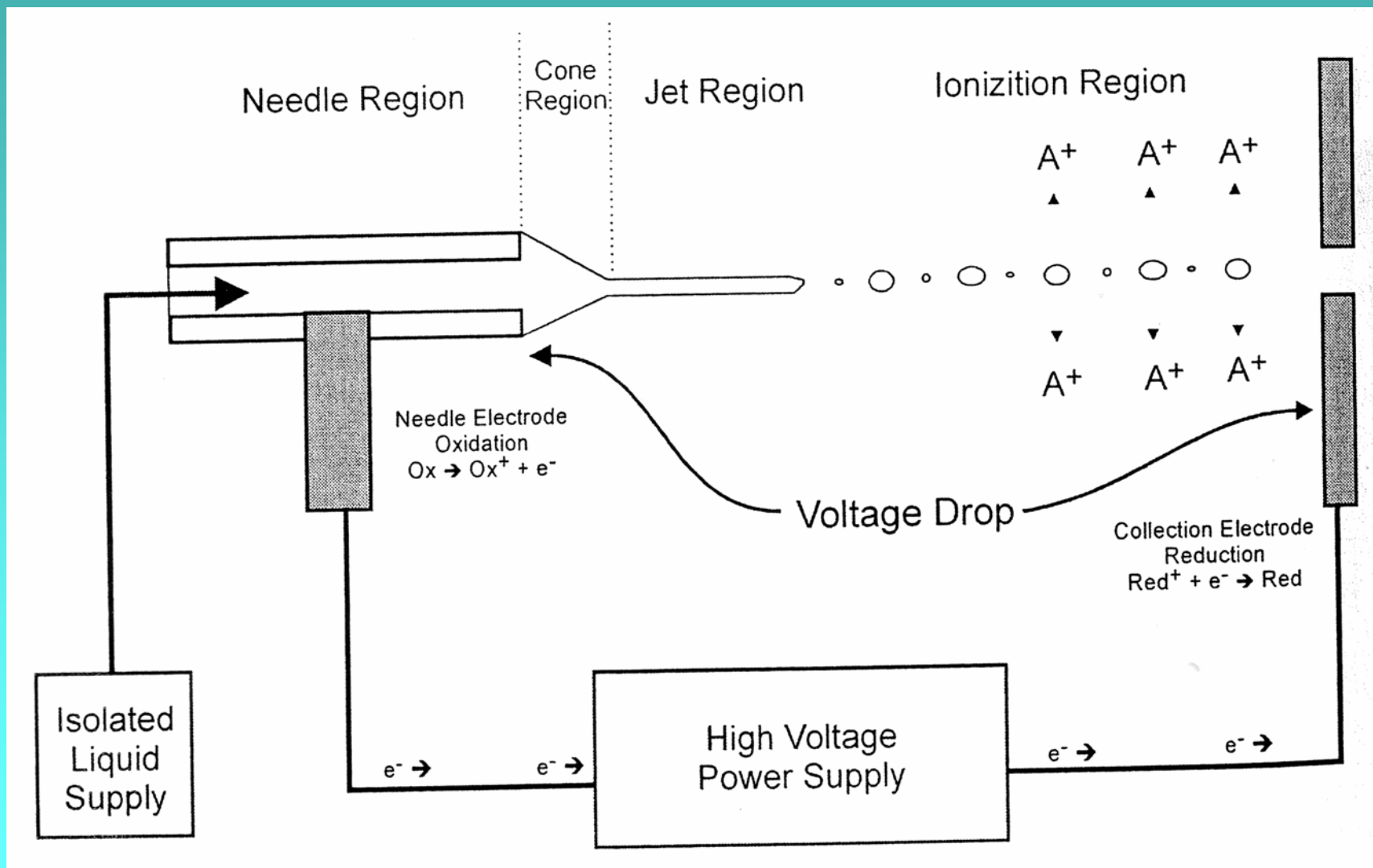


Electrospray (ESI)

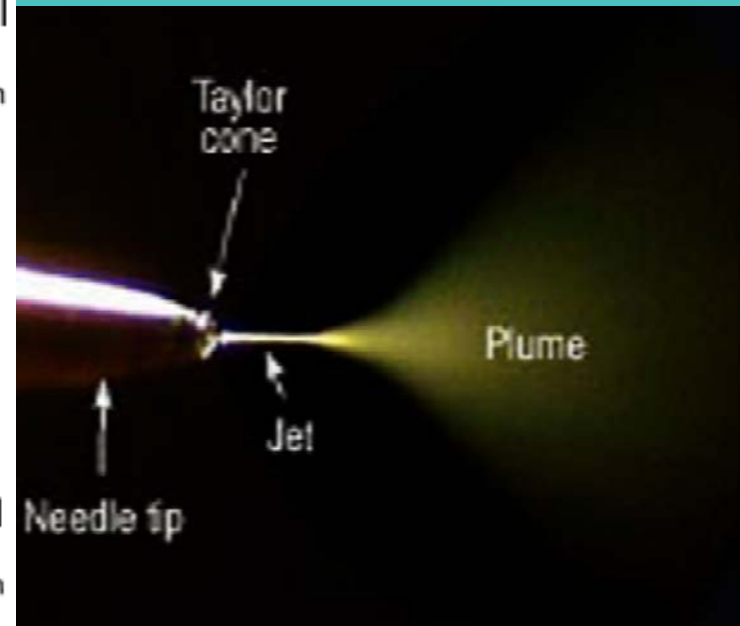
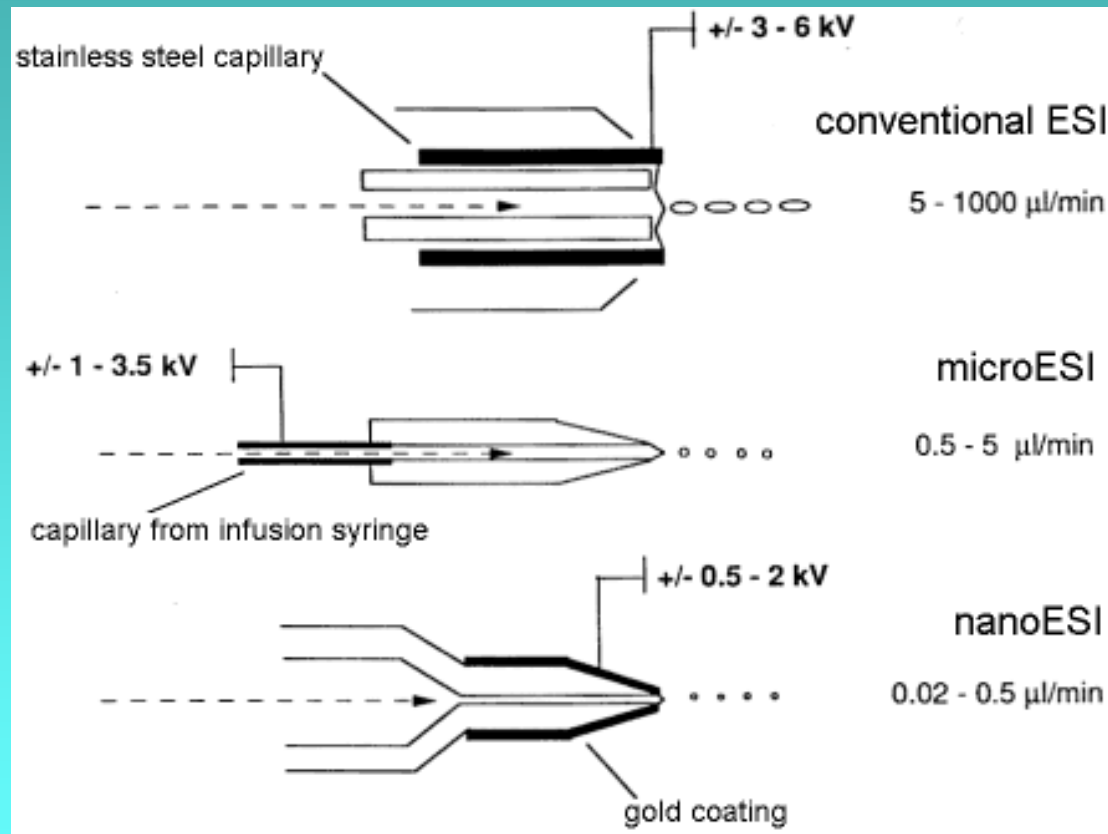


- Nobelova cena 2002: John B. Fenn, Koichi Tanaka

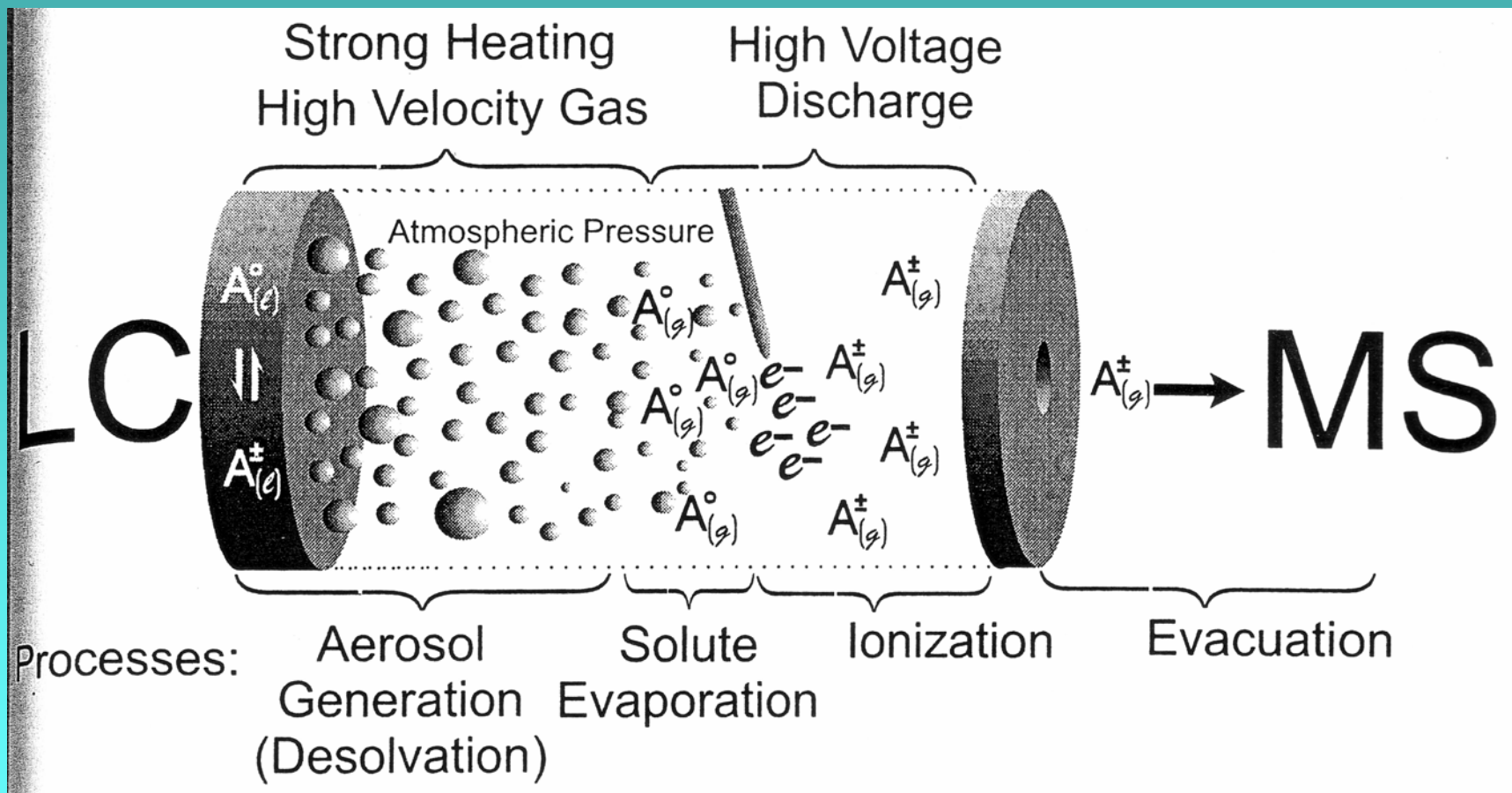
Electrospray (ESI)



Electrospray (ESI)

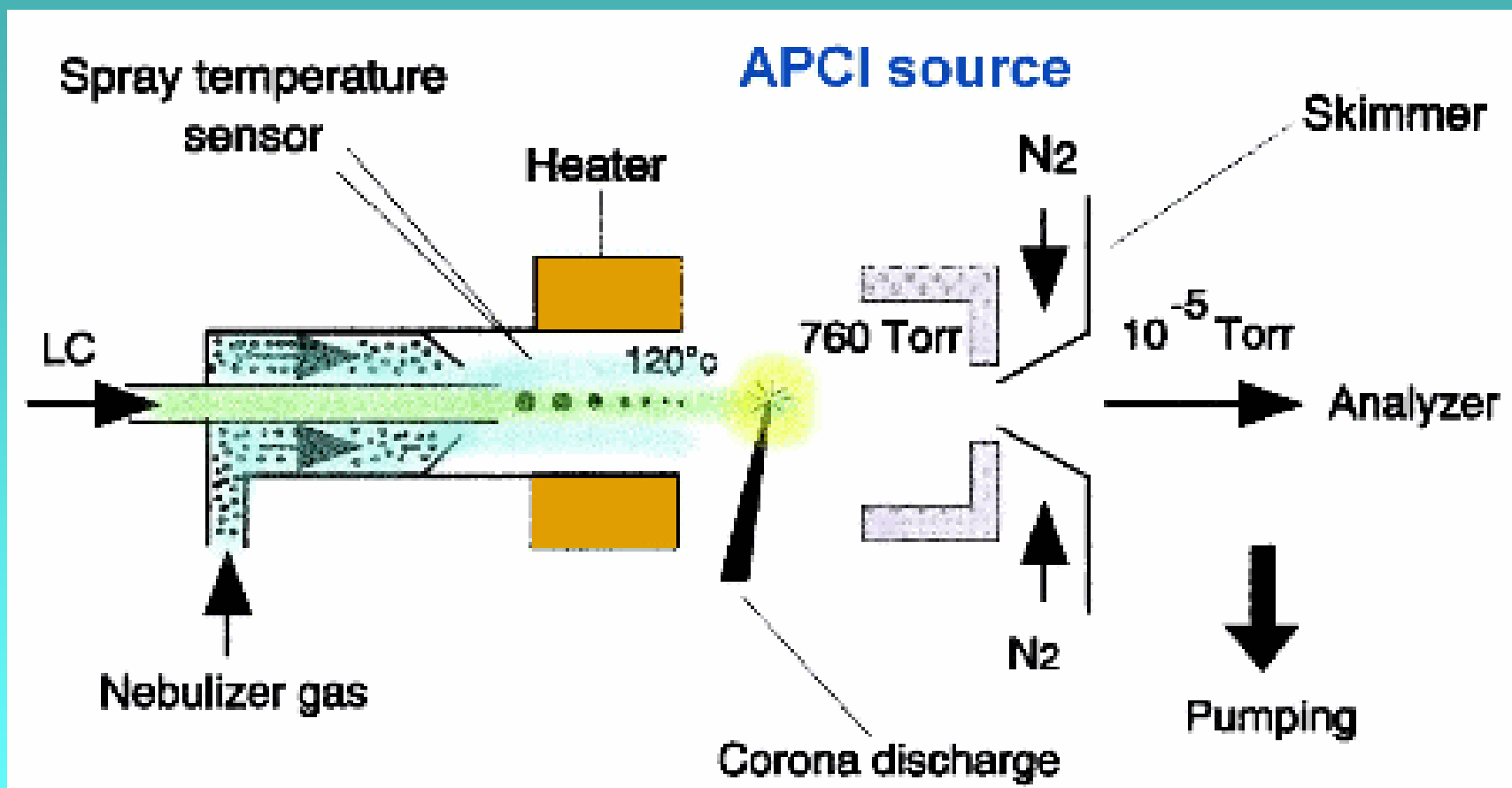


APCI



- Primární reakční iont: $H_3O^+(H_2O)_n$

APCI

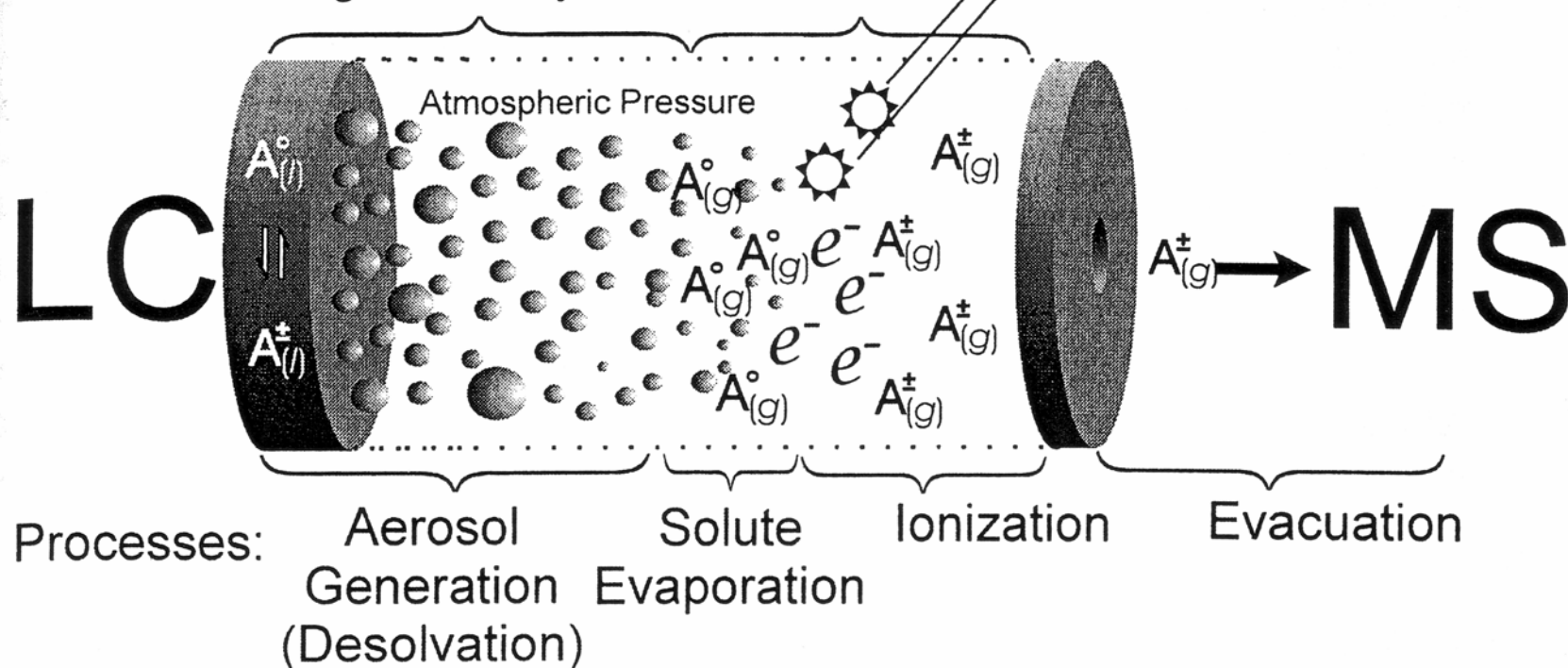


APPI

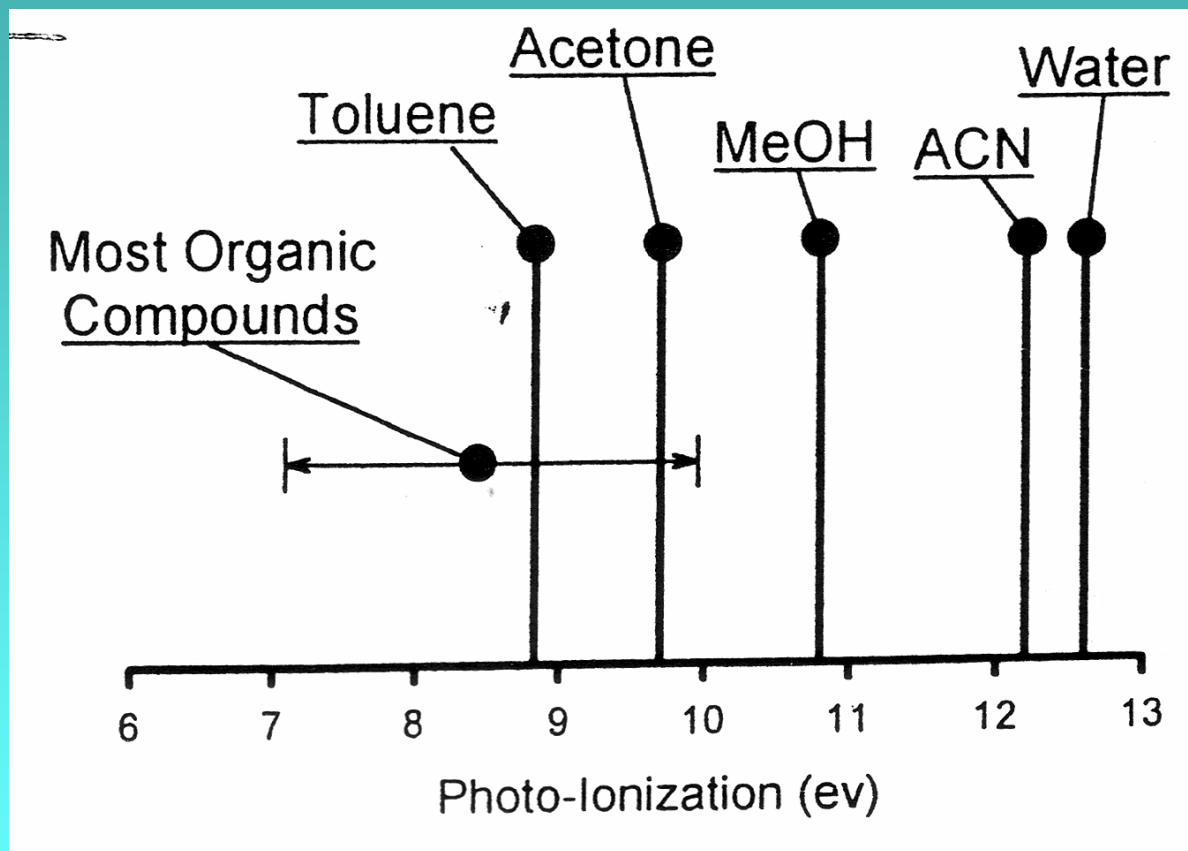
Driving Energy:

Strong Heating
High Velocity Gas

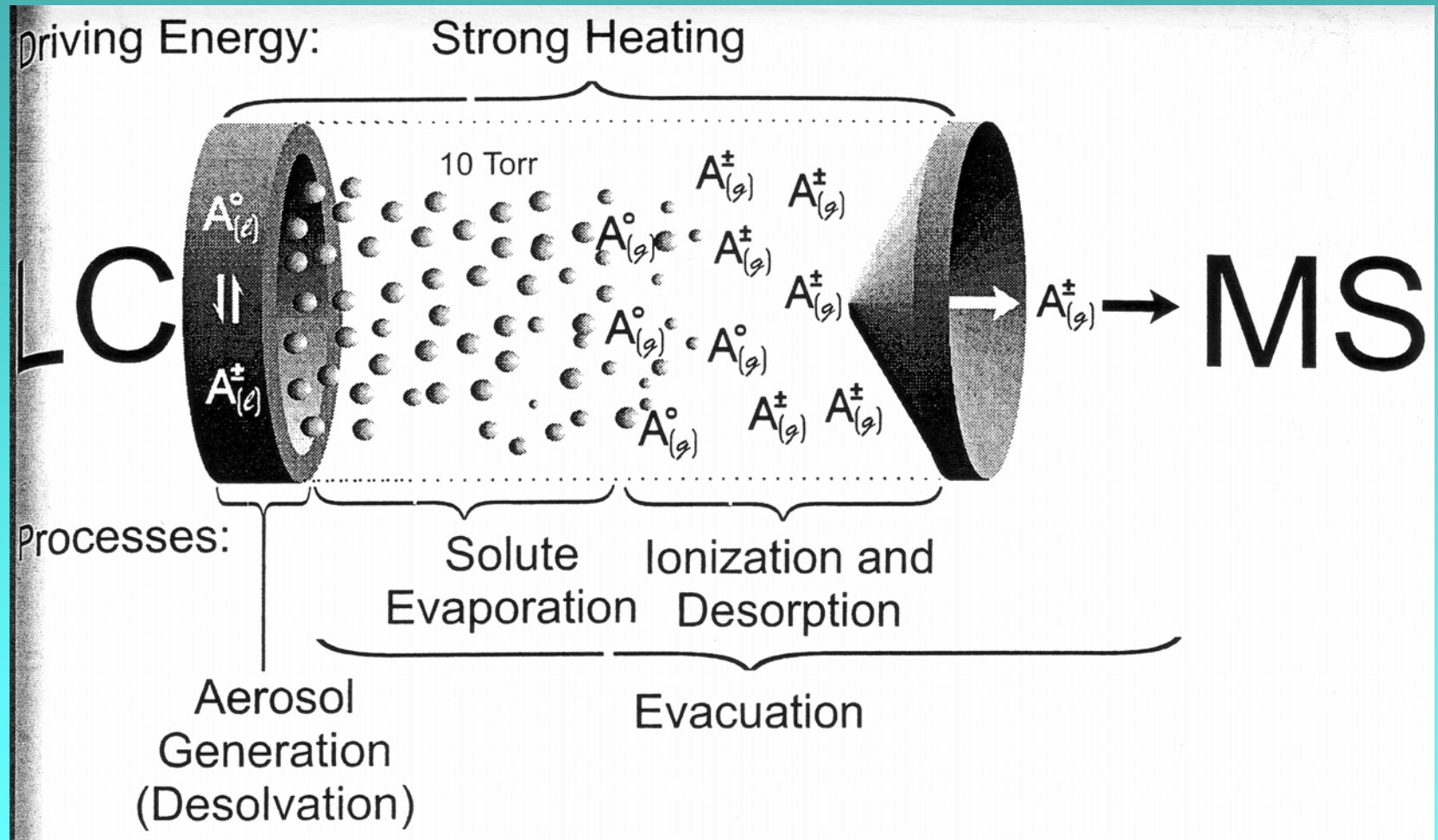
Photons $h\nu$



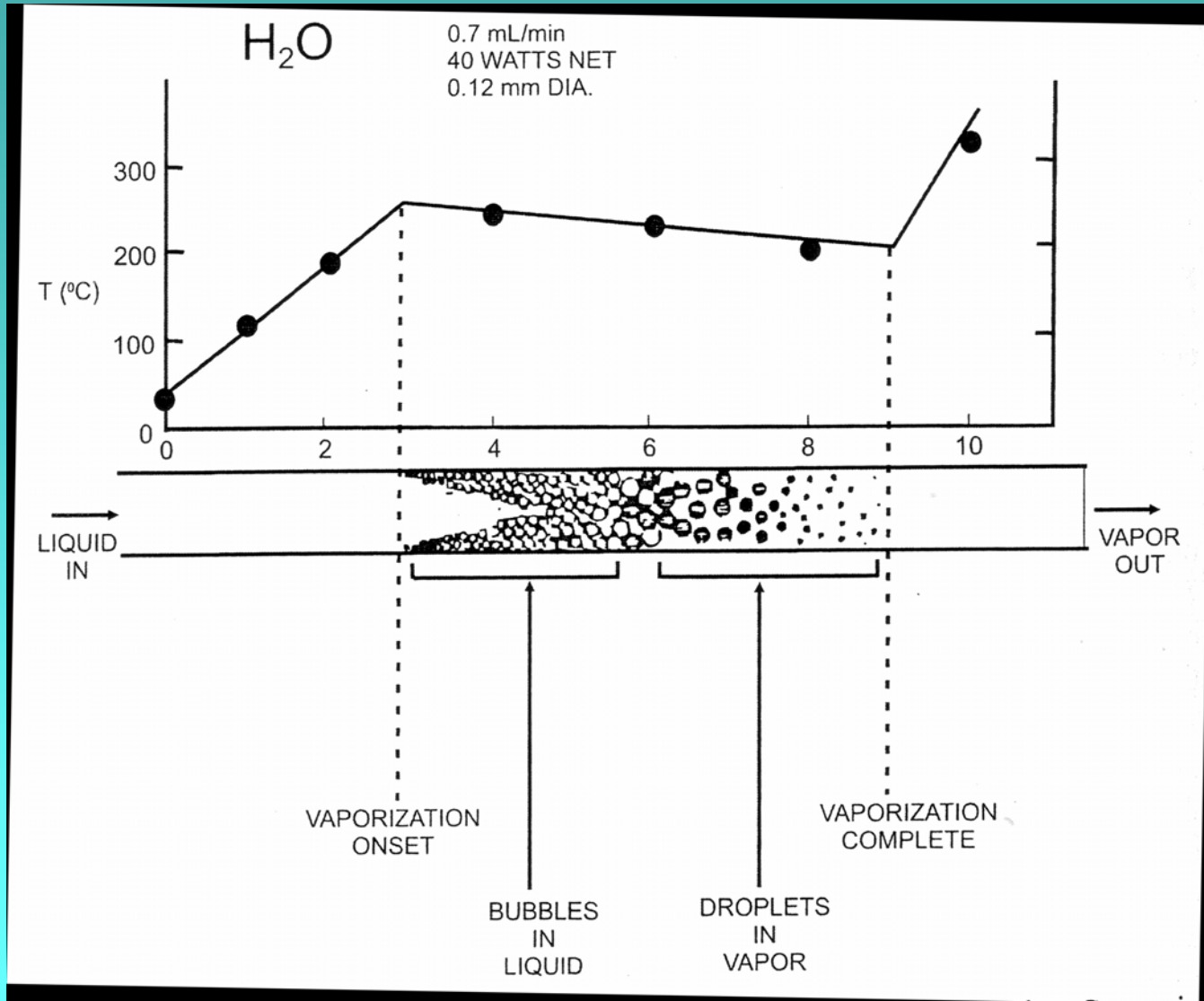
APPI



Ionizace termosprayem (TS)

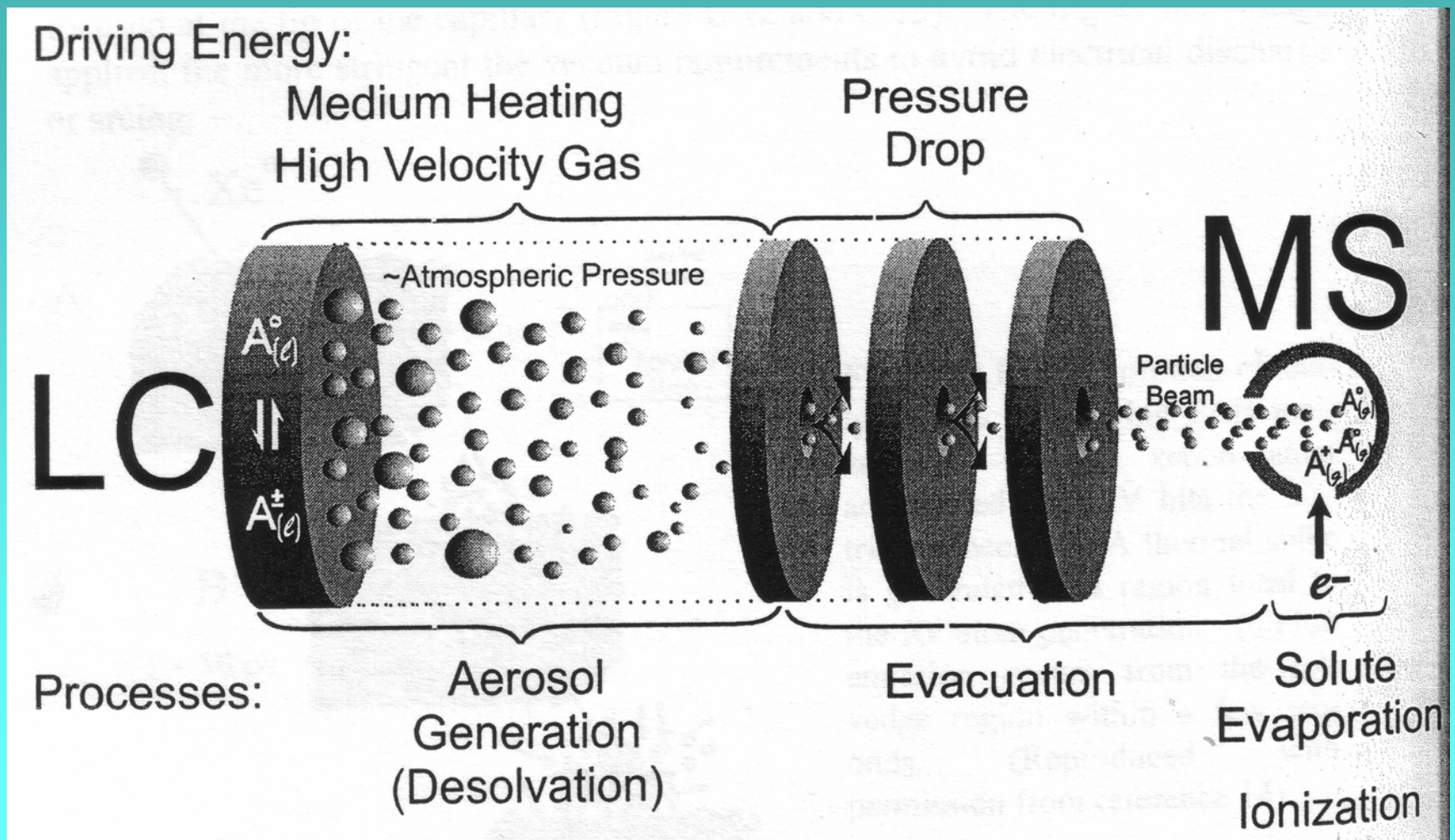


Ionizace termosprayem (TS)



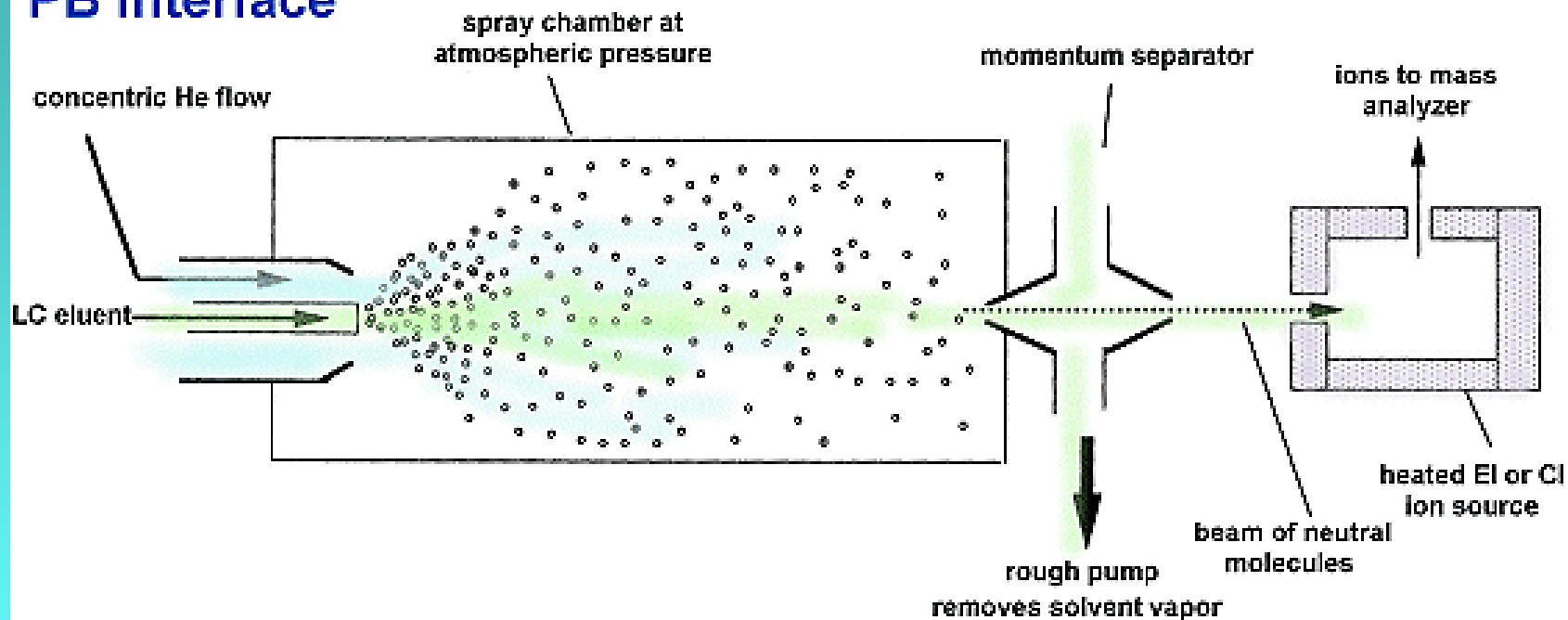
Particle Beam (PB)

transportní interface, He

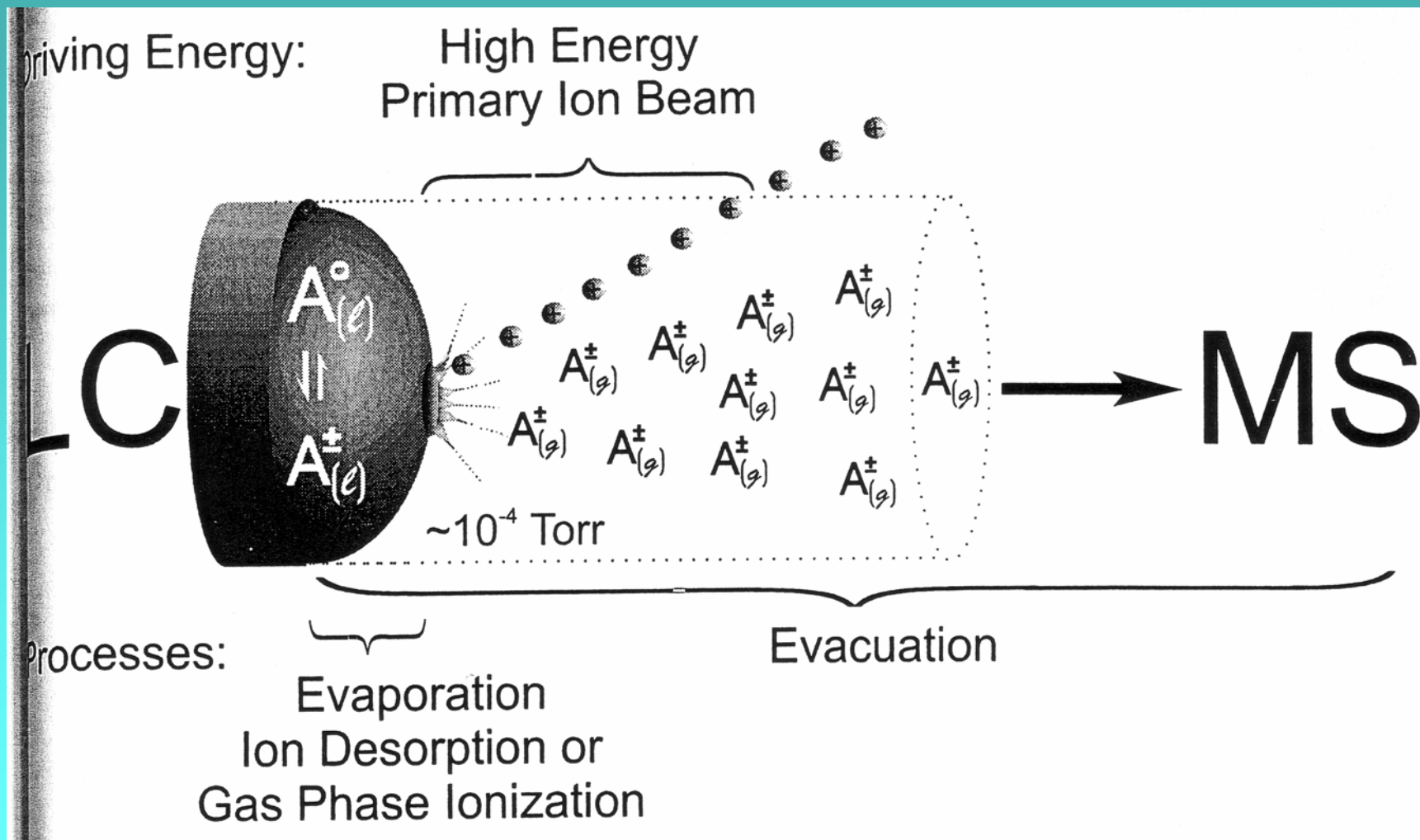


Particle Beam (PB)

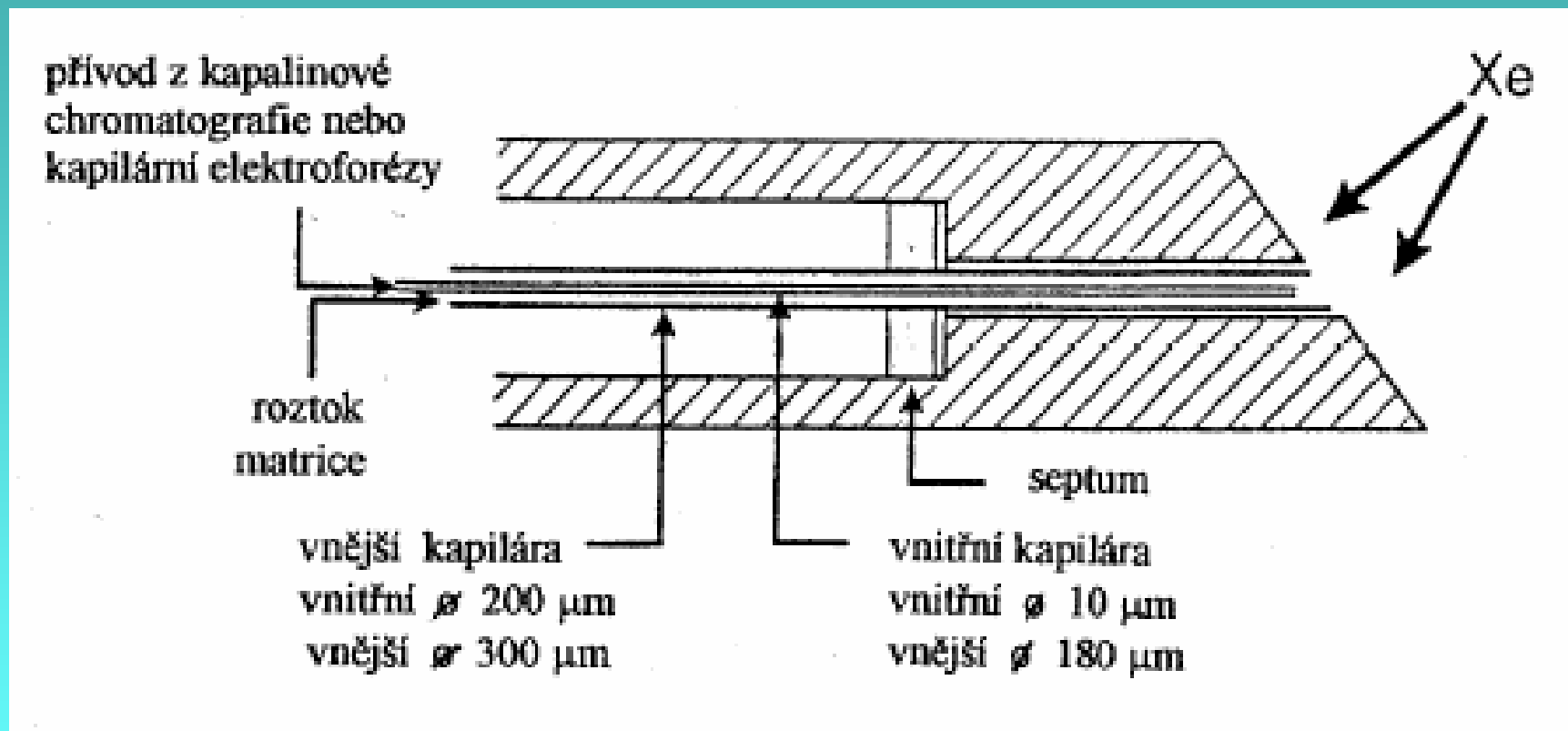
PB interface



Continuous Flow FAB (CF-FAB)

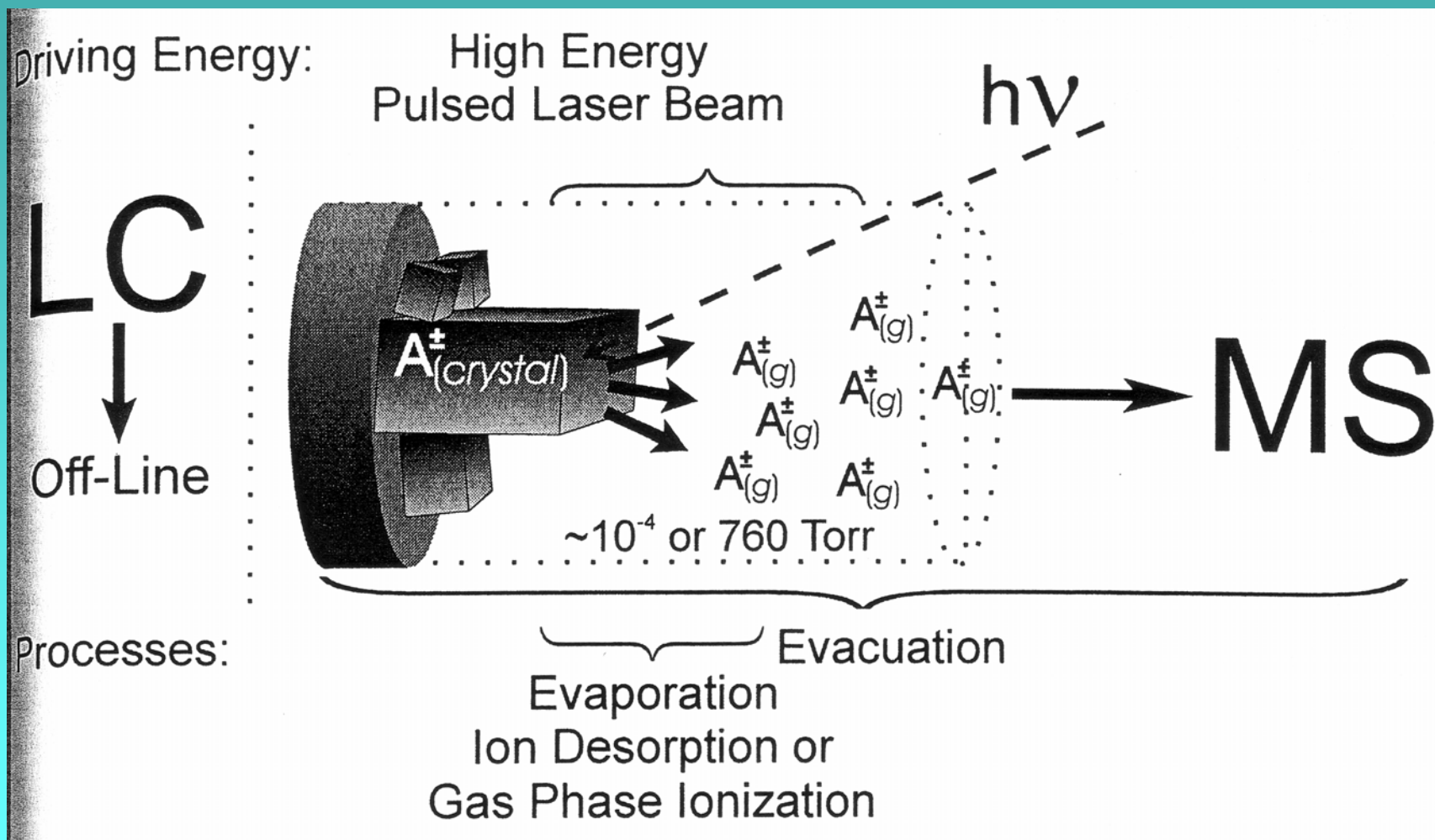


Continuous Flow FAB (CF-FAB)



CF-FAB sonda pro LC- a CE-MS

MALDI



MALDI-Target

Běžně používané matrice:

- kyselina sinapinová
(SA, 3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoová kyselina)
- kyselina dihydroxybenzoová (DHP)
- 2-kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (CHCA)
- kyselina nikotinová
- kyselina aminobenzoová

MALDI aplikace

- molekulová hmotnost proteinů a bílkovin
- sekvence proteinů a bílkovin
- farmakokinetika léčiv
- návykové látky
- syntetické polymery

