

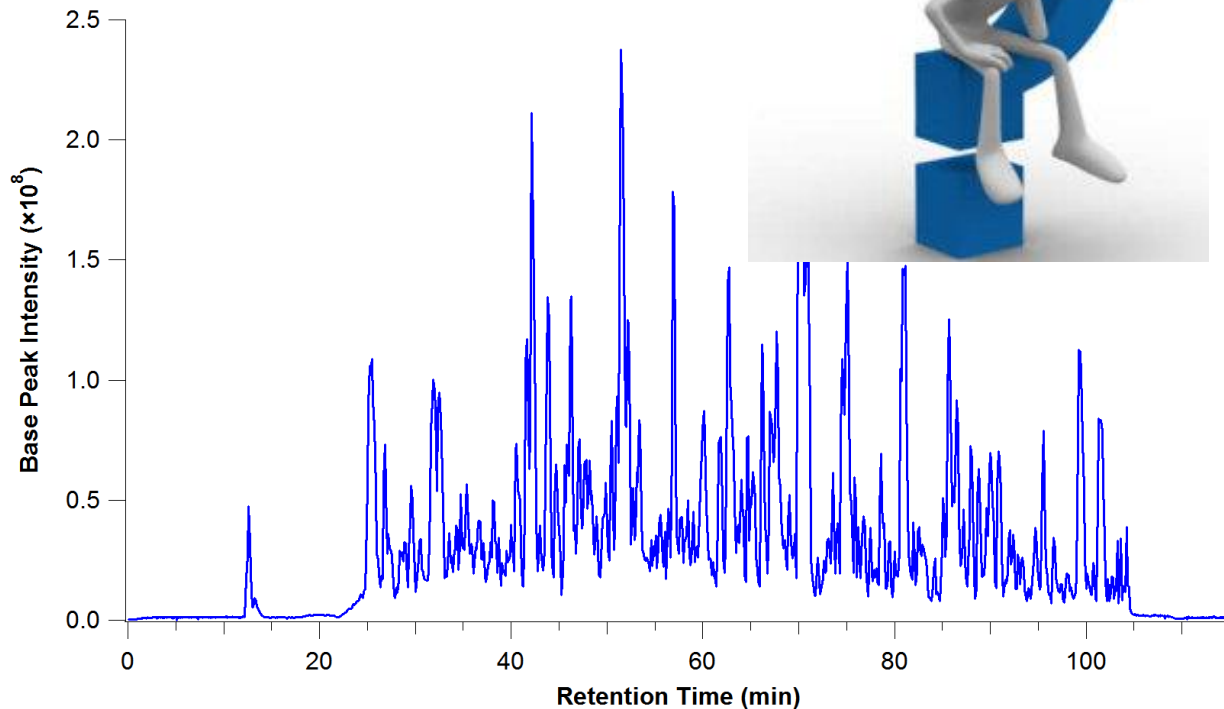
Klinická a farmaceutická analýza

Petr Kozlík

Katedra analytické chemie

e-mail: kozlik@natur.cuni.cz

<http://web.natur.cuni.cz/~kozlik/>



Spojení separačních technik s hmotnostní spektrometrem

Separací 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

Separační metody



Spojení separačních technik s hmotnostní spektrometrem

Proč spojení?

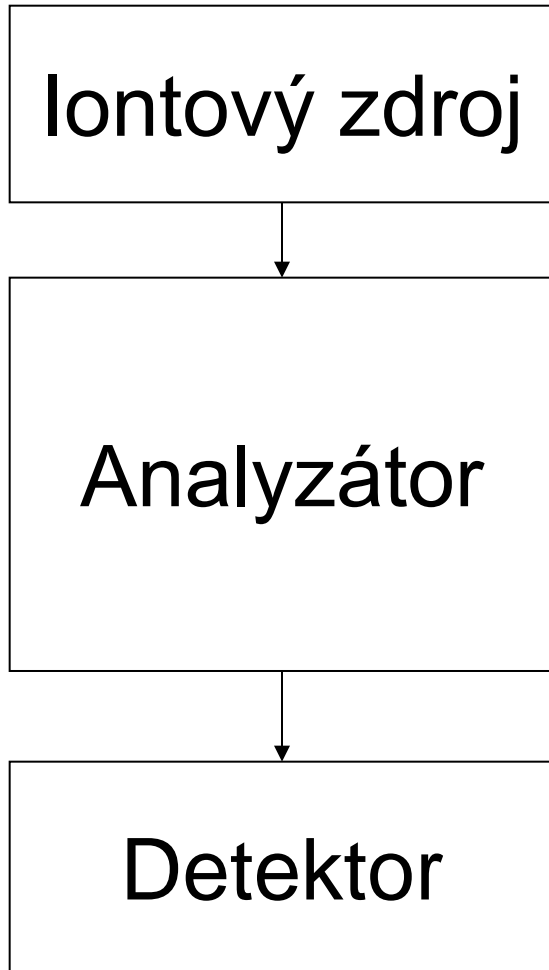
- můžeme v jedné analýze zároveň separovat i identifikovat složitou směs látek
- izolaci látek po jejich chromatografické separaci a následném změření hmotnostních spekter pro jednotlivé látky off-line technikou

Složitost spojení MS se separačními technikami?

rozdíl tlaků mezi hmotnostním analyzátozem (např. kvadrupól či iontová past 10^{-3} Pa) a analyzovanými látkami vstupujícími do iontového zdroje za atmosférického tlaku (10^5 Pa) je nejméně 8 řádů

analyzované látky jsou nesený v toku plynu u GC nebo kapaliny LC, které jsou v obrovském nadbytku a musí být odstraněny před vstupem do vakuové části přístroje

Hmotnostní spektrometr



- produkuje ionty vzorku k analýze
- rozděluje 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

Iontový zdroj

slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabité částice (ionty), které jsou dále analyzovány hmotnostním analyzátozem

ionizace

měkká

ESI, APCI,
APPI, MALDI

tvrdá

EI

ionizace

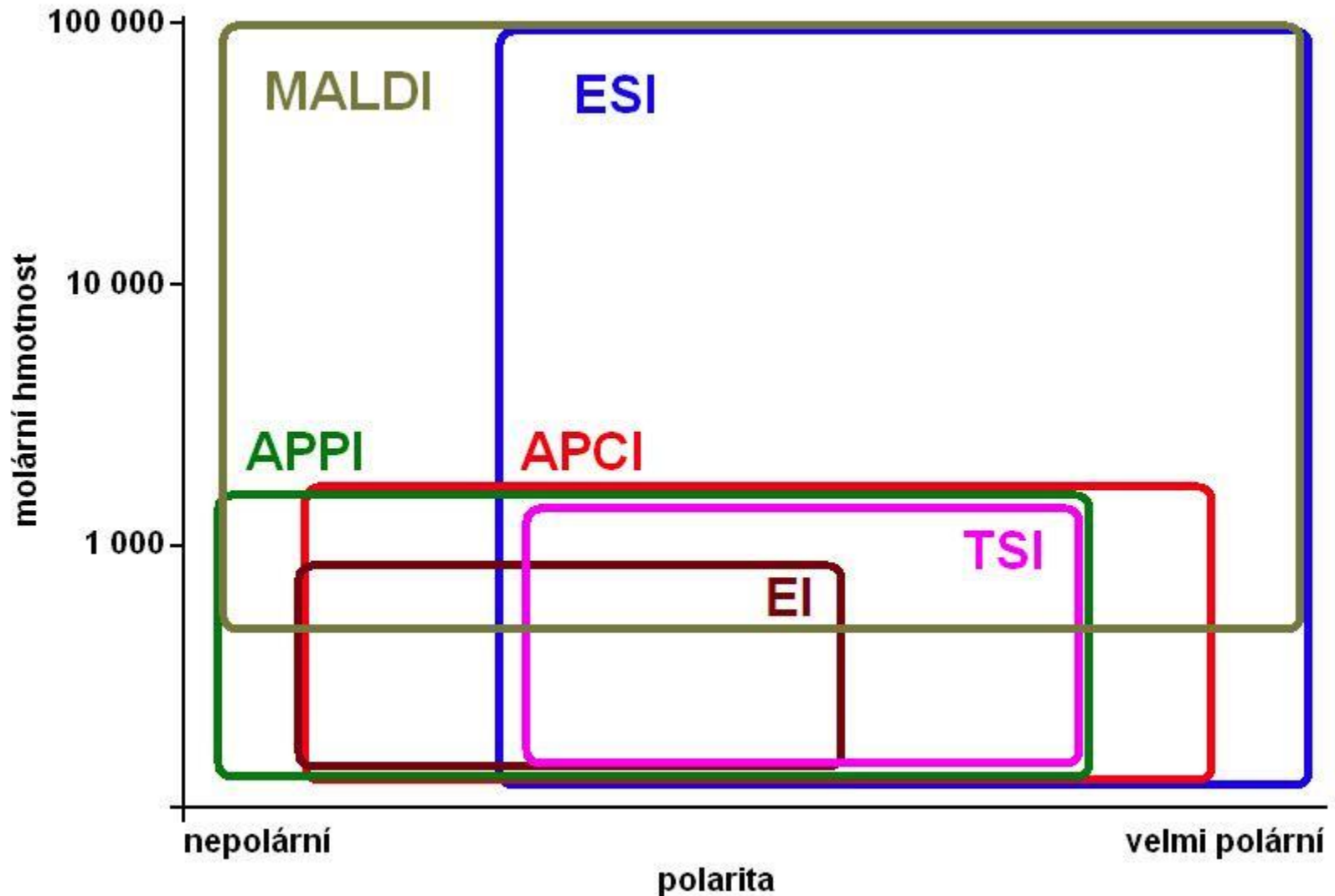
za sníženého tlaku

EI, MALDI

za atmosférického tlaku

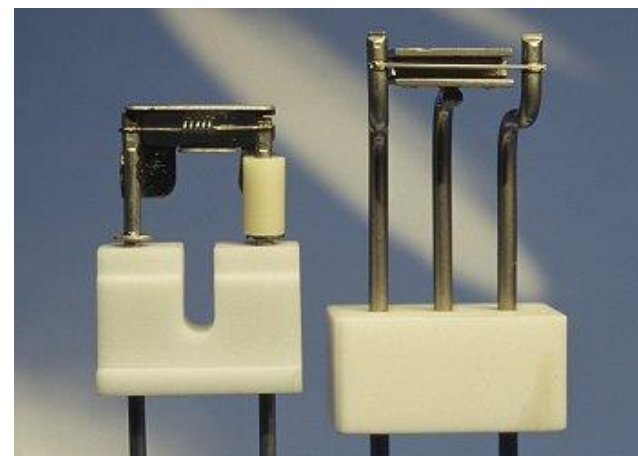
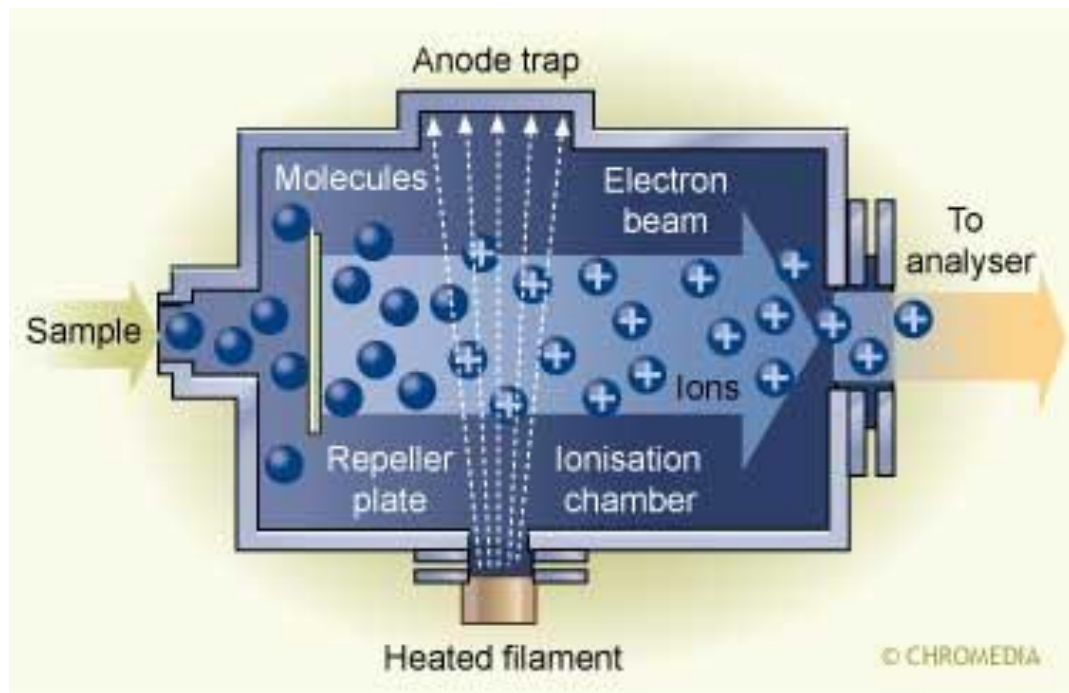
ESI, APCI,
APPI

Ionizační techniky



Ionizace za sníženého tlaku

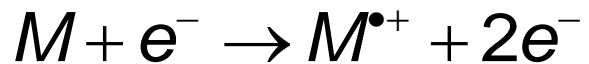
Elektronová ionizace EI



Molekuly interagují s elektrony emitovanými ze žhaveného wolframového vlákna. Vznikají radikál-kationty ($M^{\bullet+}$), přebytek energie vede k jejich rozsáhlé fragmentaci.

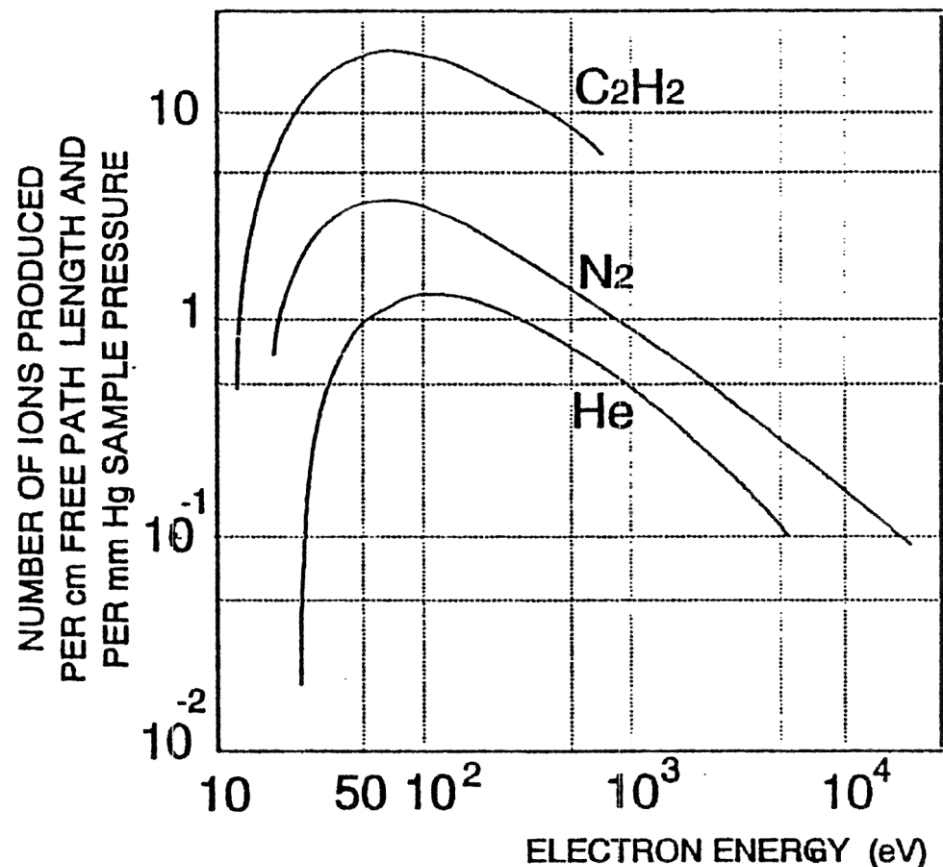
Ionizace za sníženého tlaku

Elektronová ionizace EI



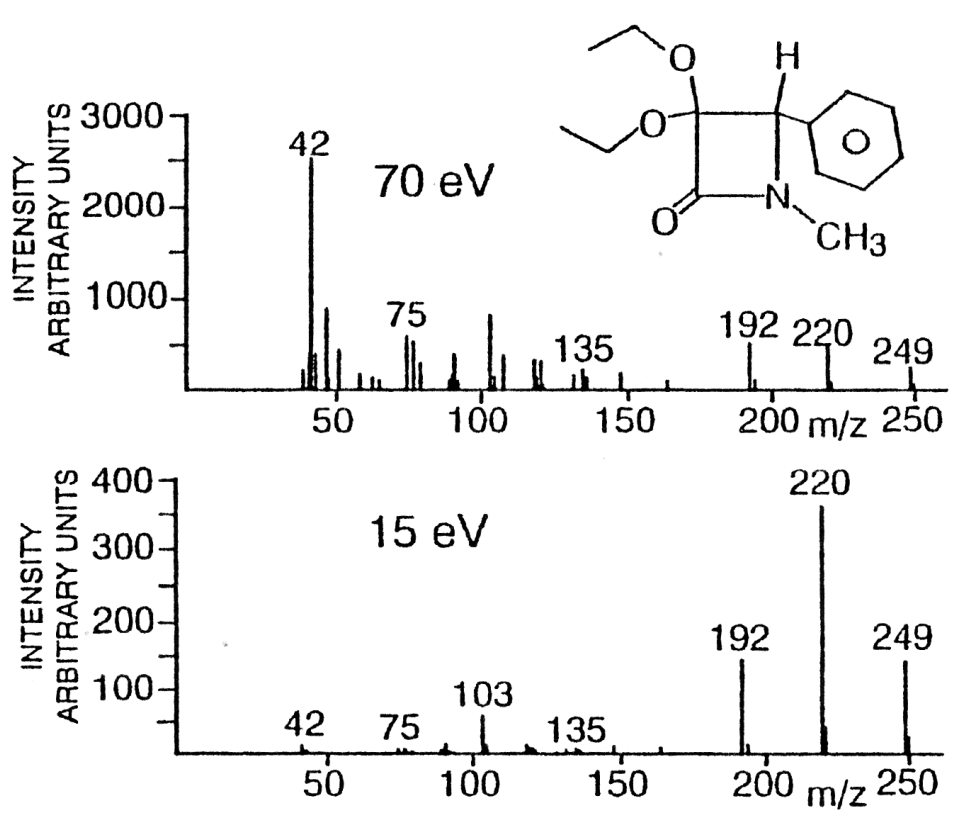
Ionizační energie IE:

IE pro většinu molekul je v rozmezí 7-15 eV.
Nejvyšší účinnost ionizace je kolem 70 eV.



Ionizace za sníženého tlaku

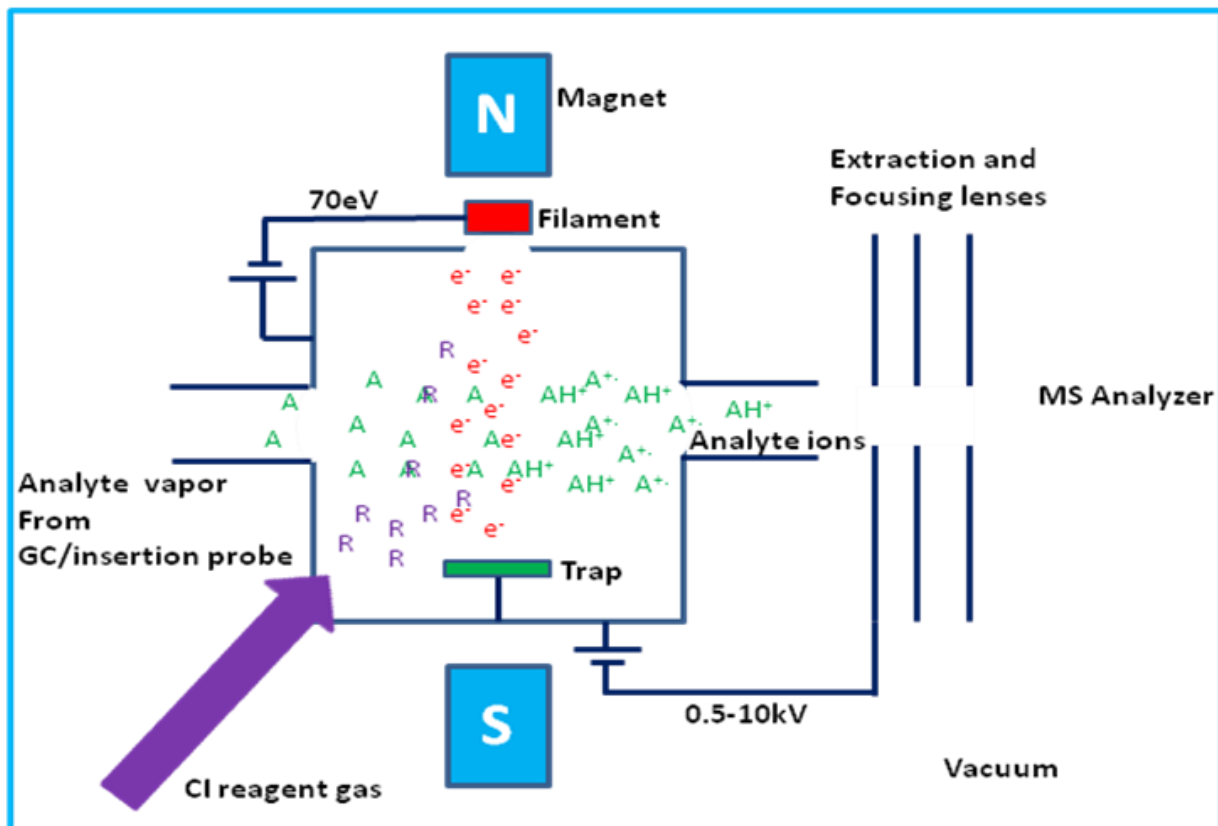
Elektronová ionizace EI



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

Ionizace za sníženého tlaku

Chemická ionizace CI

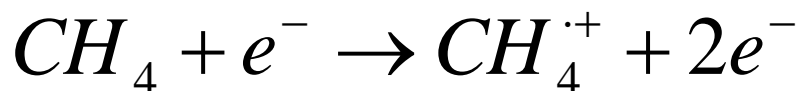


Reakční plyn - interaguje s elektrony. Vzniká reaktivní plasma, která ionizuje analyt přenosem protonu ($[M+H]^+$). Fragmentace je silně potlačena.

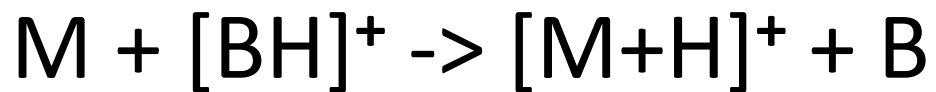
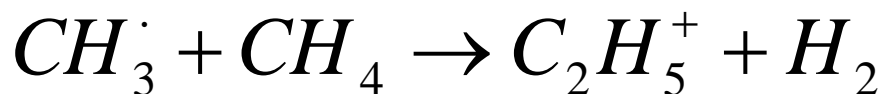
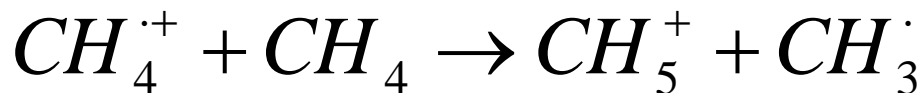
Ionizace za sníženého tlaku

Chemická ionizace CI

Primární proces:



Sekundární procesy:

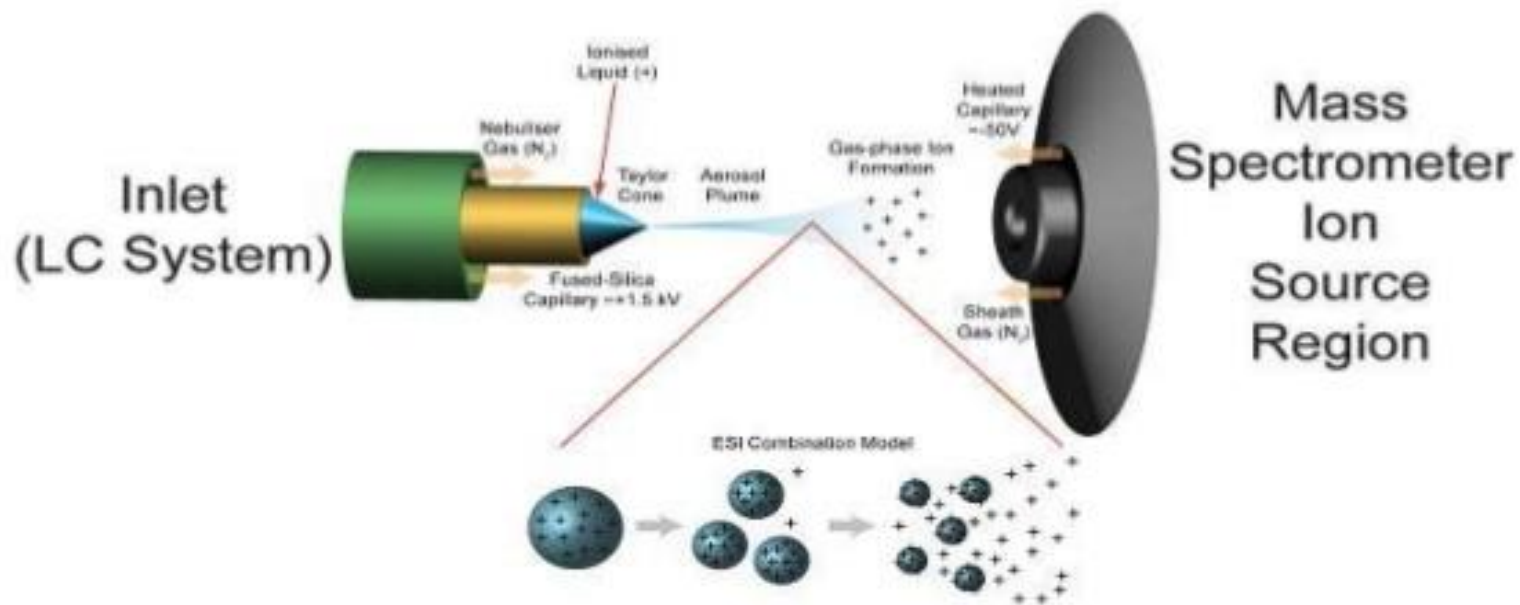


Ionizace za atmosférického tlaku

Ionizace elektrosprejem ESI

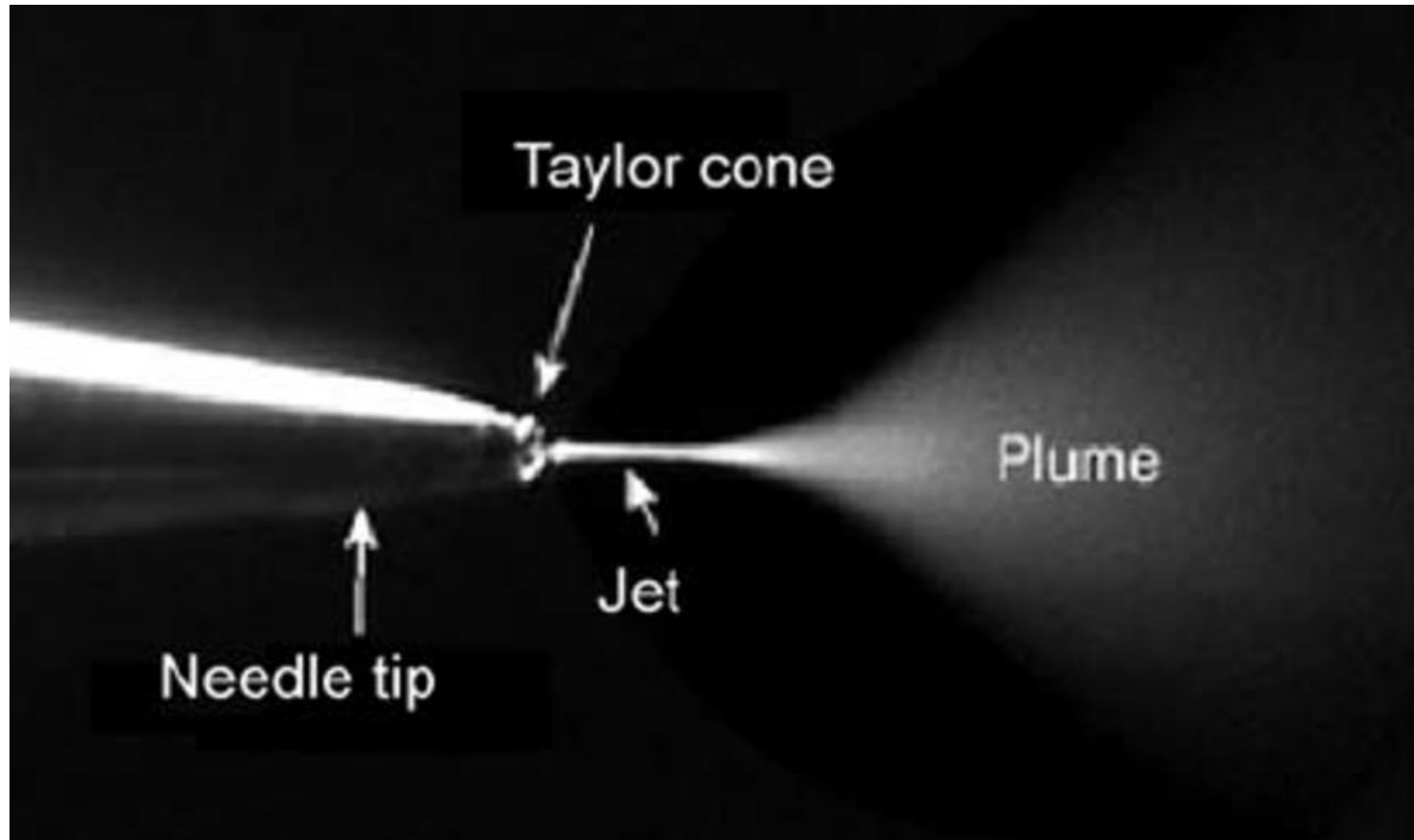


Electrospray Ionization (ESI)



Ionizace za atmosférického tlaku

Ionizace elektrosprejem ESI



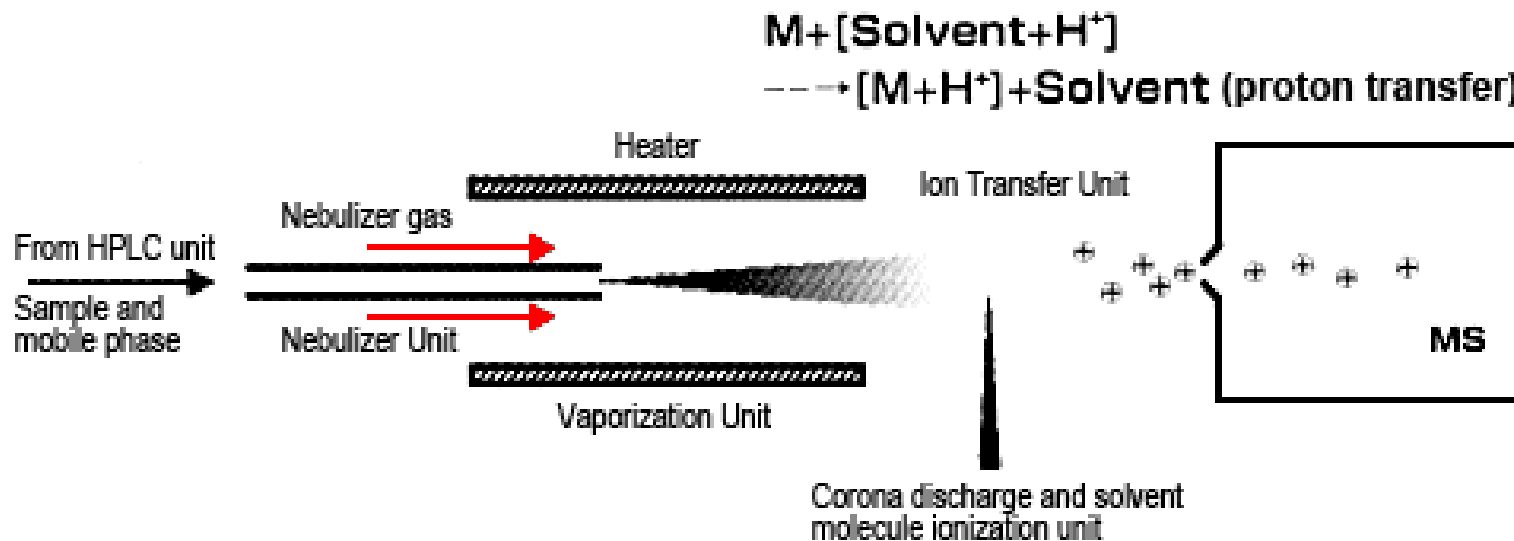
Ionizace za atmosférického tlaku

Ionizace elektrosprejem ESI



Ionizace za atmosférického tlaku

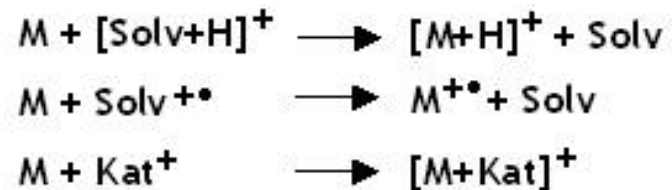
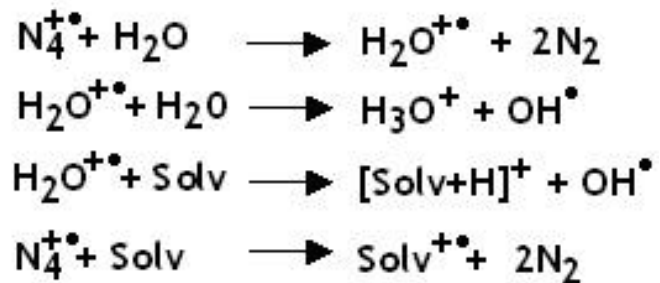
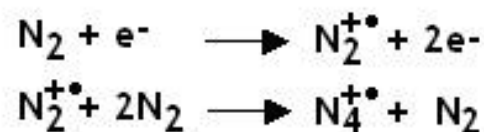
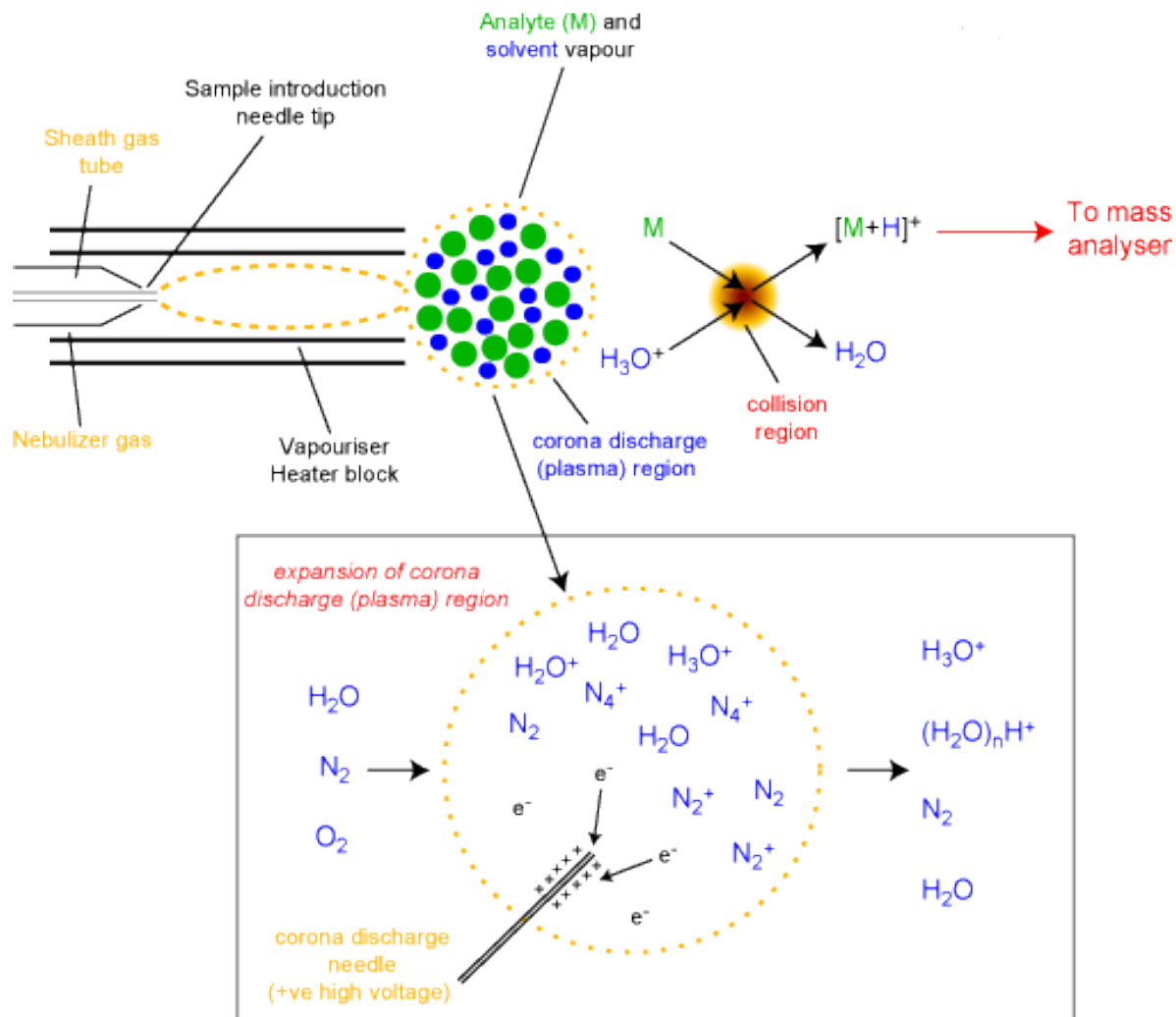
Chemická ionizace za atmosférického tlaku APCI



Eluát je rozprašován do vyhříváné komůrky (~400-500 °C). Ionizace zmlžovacího plynu koronovým výbojem. Kolize iontů s molekulami rozpouštědla za tvorby sekundárních reakčních iontů . Tyto ionty ionizují molekuly analytu .

Ionizace za atmosférického tlaku

Chemická ionizace za atmosférického tlaku APCI



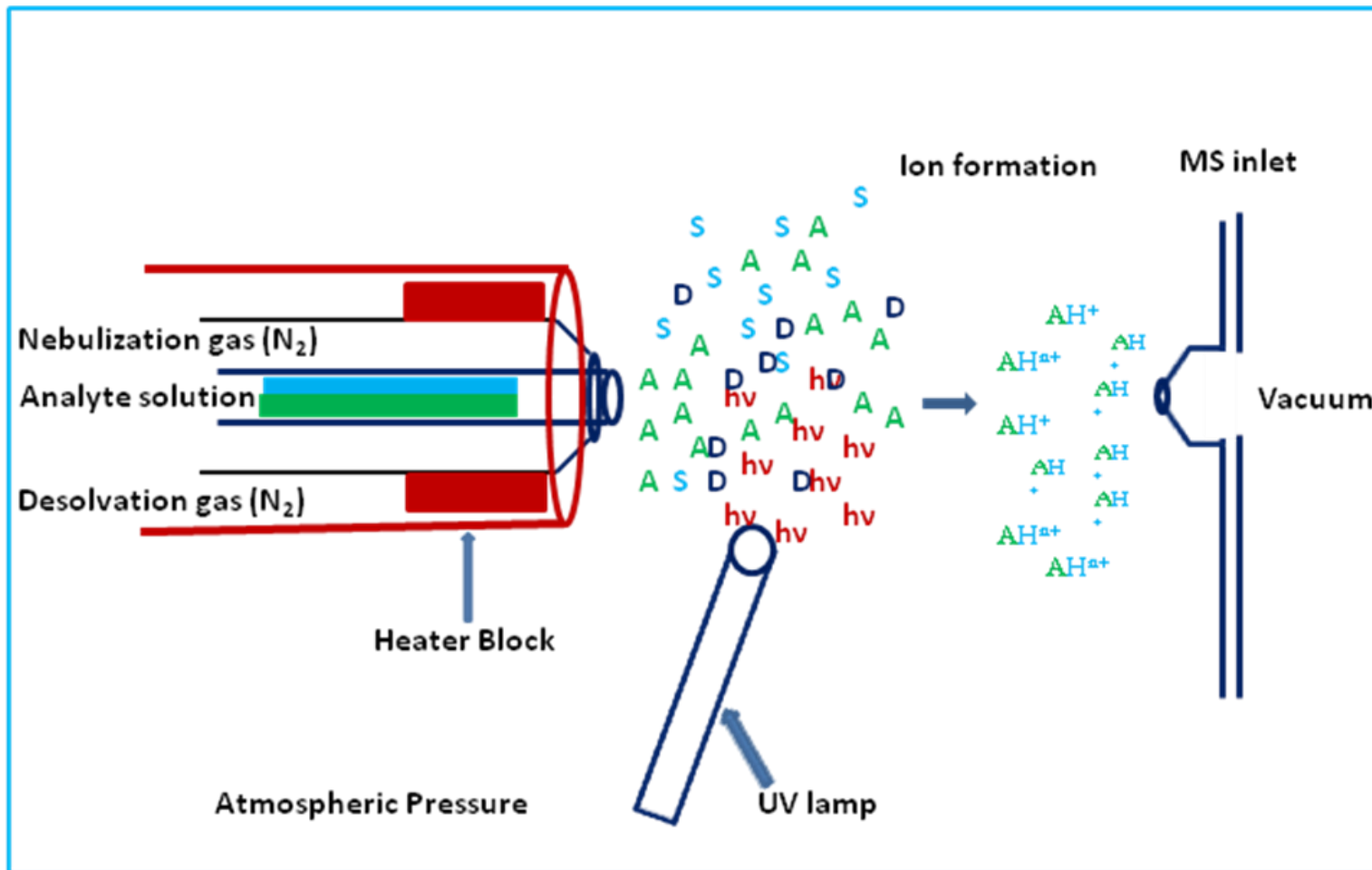
Ionizace za atmosférického tlaku

Chemická ionizace za atmosférického tlaku APCI



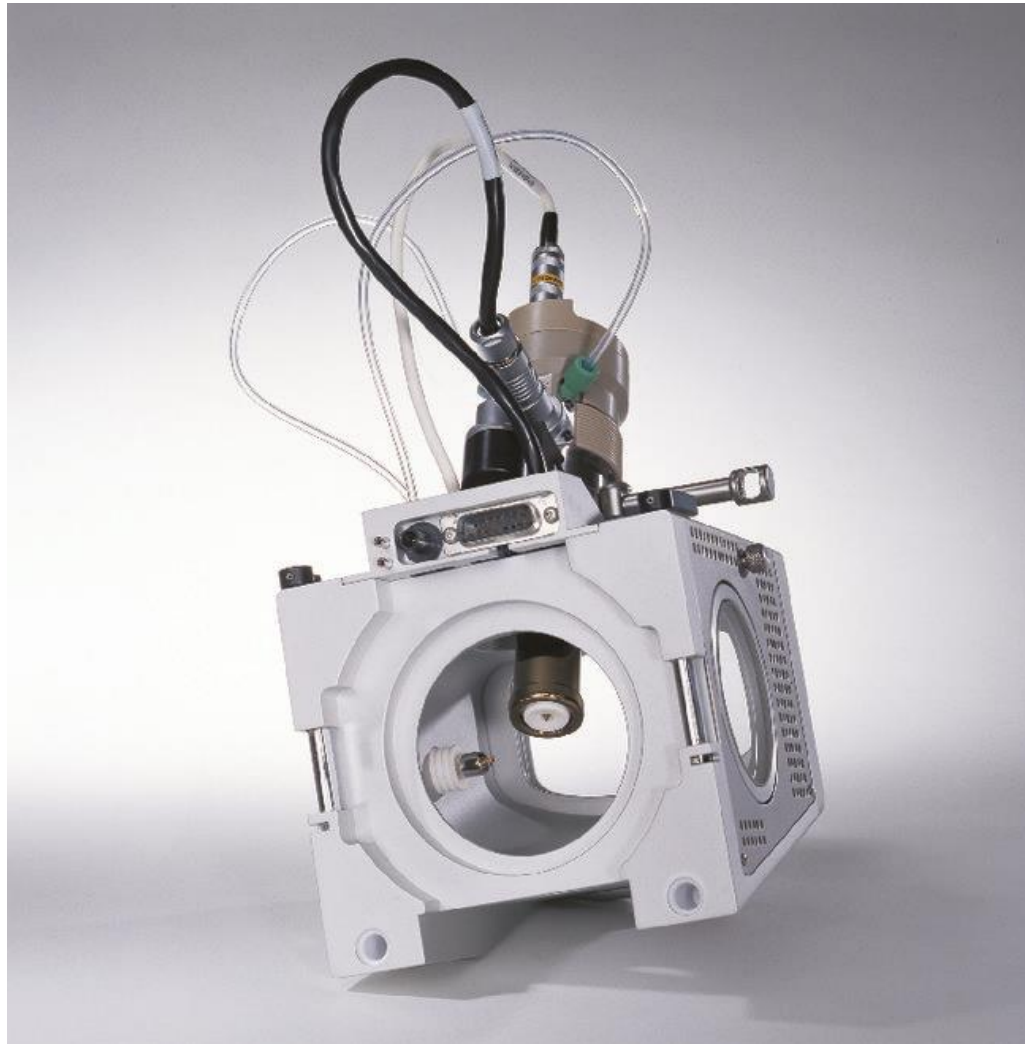
Ionizace za atmosférického tlaku

Fotoionizace za atmosférického tlaku APPI



Ionizace za atmosférického tlaku

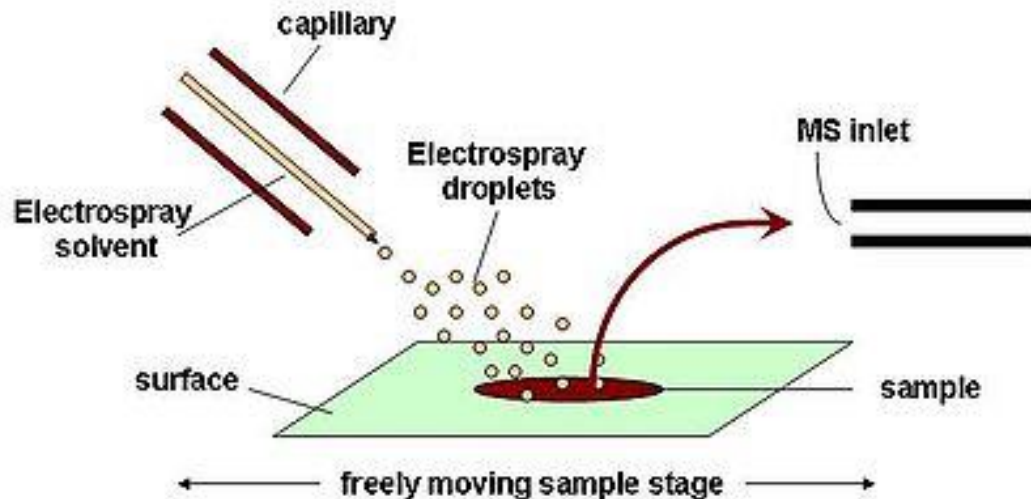
Fotoionizace za atmosférického tlaku APPI



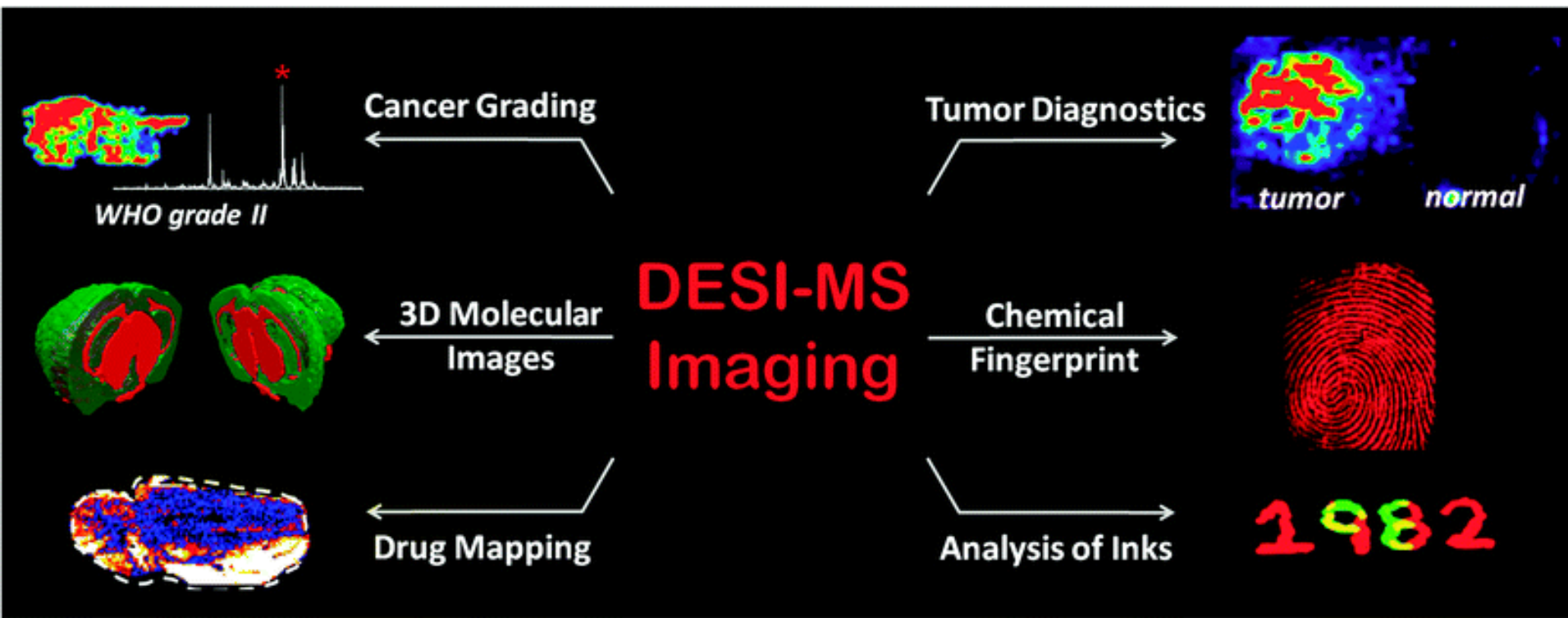
Spojení planárních separačních technik s MS

Tenkovrstvá chromatografie – TLC Papírová chromatografie - PC

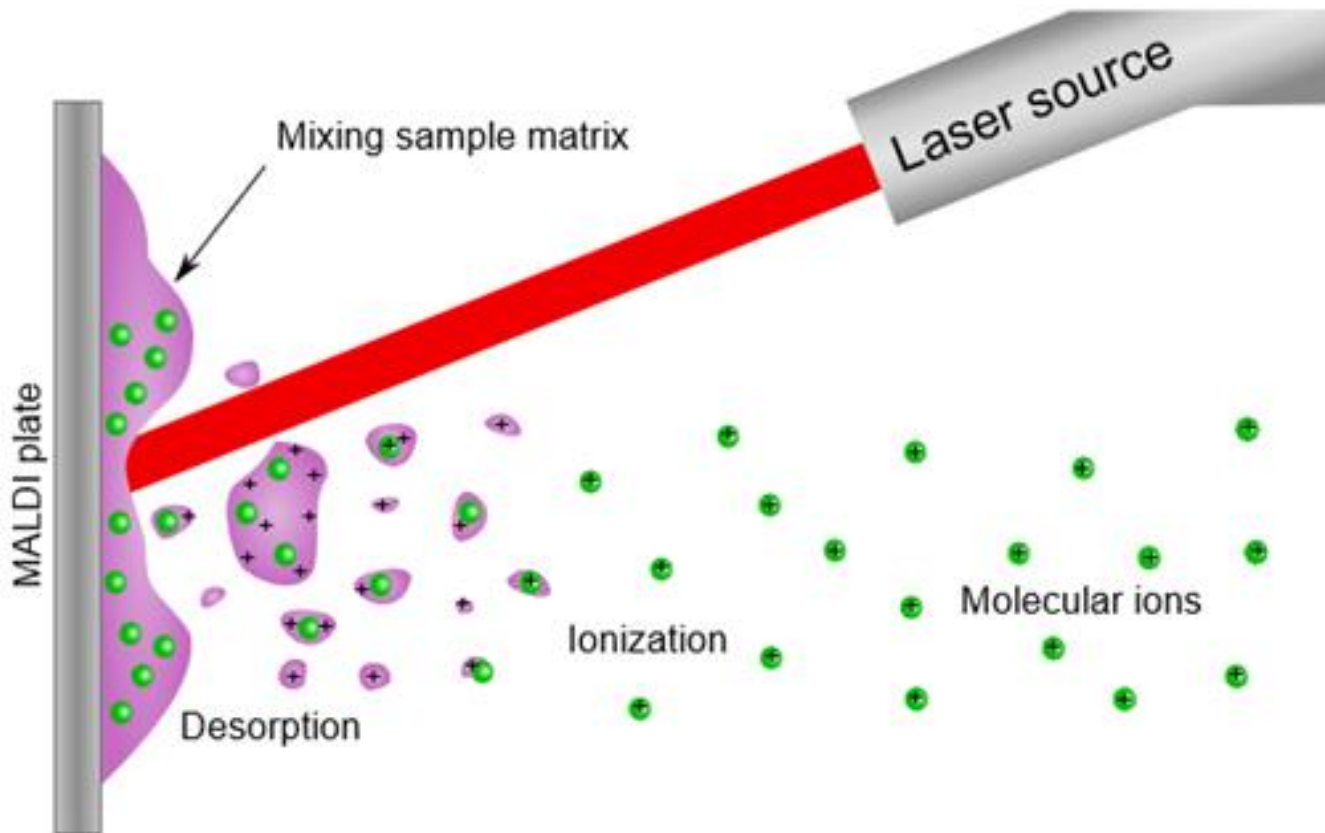
- Extrakce skvrny, MS analýza
- Desorpce analytu, přímá MS analýza



Spojení planárních separačních technik s MS



Ionizace laserem za účasti matrice - MALDI



Matrice – kyselina sinapinová, skořicová, nikotinová, aminobenzoová

GC/MS

Kapilární kolony - průtoky 1 - 2 ml/min

Dělič toku

~ 1:1

Přímý vstup

kapilára je před vstupem do iontového zdroje vyhřívána, aby nedocházelo ke kondenzaci analytů při přechodu do vakua

iontové zdroje: EI nebo CI

Porovnávání naměřených spekter s knihovnou spekter

LC/MS

Použití API

Nejsou knihovny spekter

Interpretace manualní

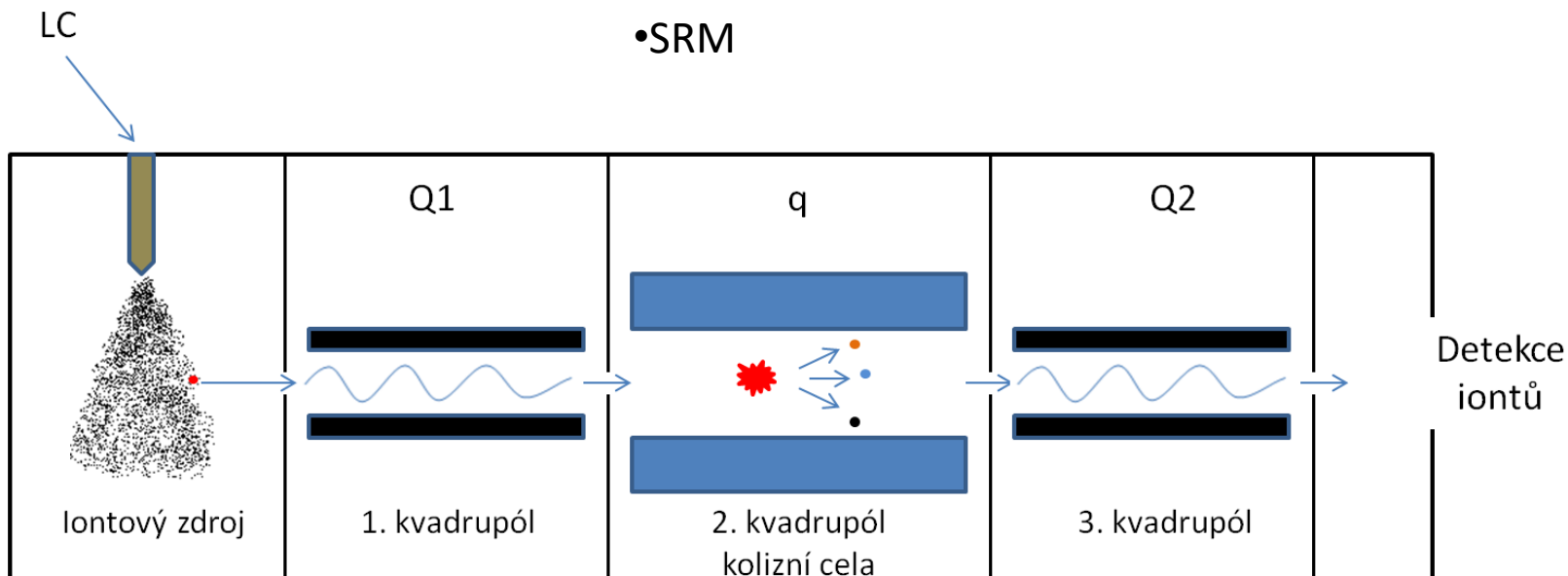
Knihovny spekter pro speciální aplikace – proteomika
(MS/MS spektra)

LC/MS

Hybridní MS: QqQ, QTOF, IT-TOF; IT-orbitrap

Možnost měřit v různých skenech:

- Full scan
- SIM
- Sken produktových iontů
- Sken prekurzorových iontů
- Sken neutrálních ztrát
- SRM



CE/MS

1987 první spojení CE/MS (Smith)

složitější řešení vkládání separačního a sprejovacího napětí, aby se navzájem neovlivňovali

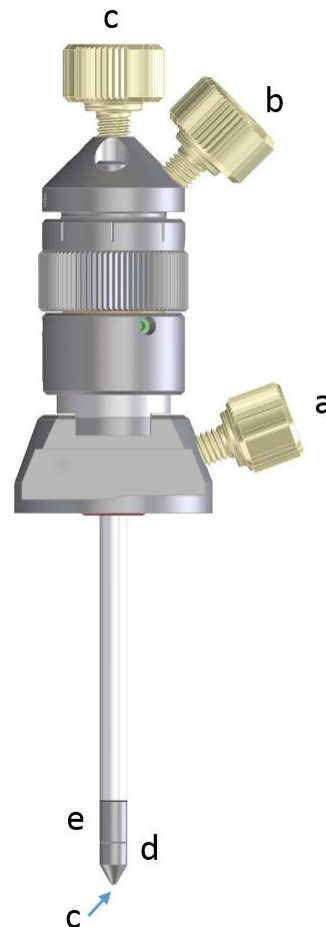
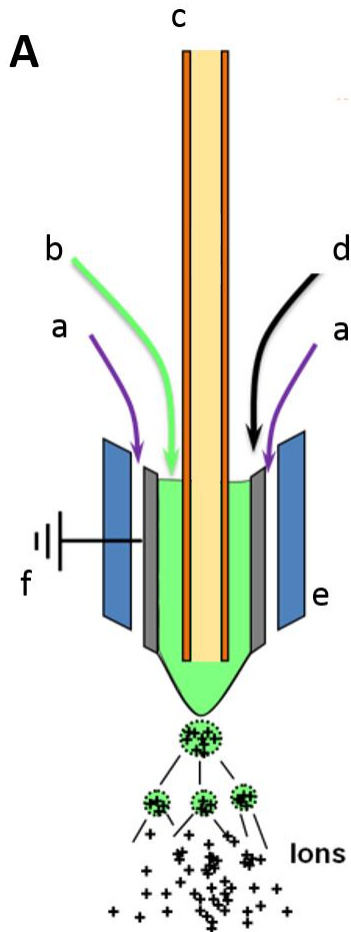
Spojení s přídatným tokem kapaliny – sheath flow interface – nejrobustnější, problém s citlivostí

Spojení s vodivým kapalným spojením – liquid junction interface – čipové techniky

Spojení bez přídatného toku kapaliny – sheathless interface – spojení napřímo, nerobustní

CE/MS

Spojení s přidavným tokem kapaliny

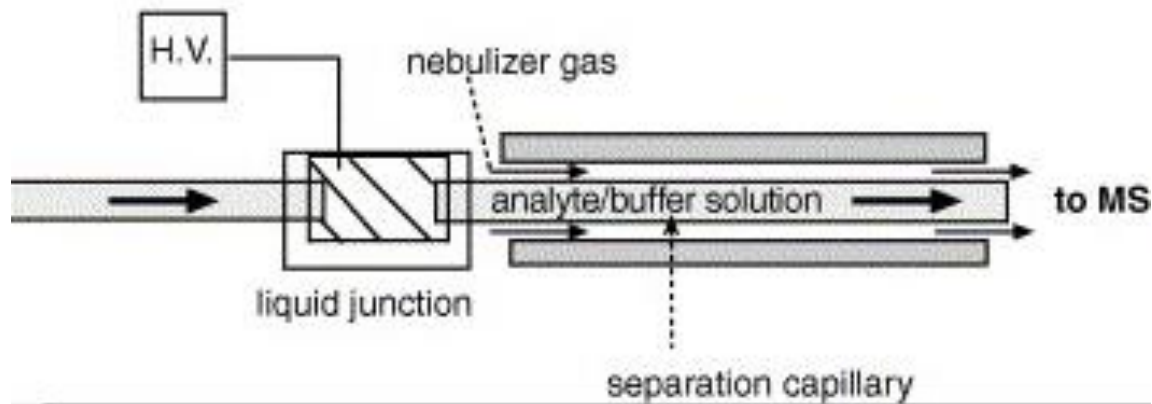


na špičku kapiláry je vloženo napětí 3 – 5 kV - zároveň uzavření elektrického obvodu pro CE a napětí potřebné pro funkci elektrospreje

průtok CZE řádově desítky až stovky nl/min, přidavná kapalina 1 – 3 μ l/min

CE/MS

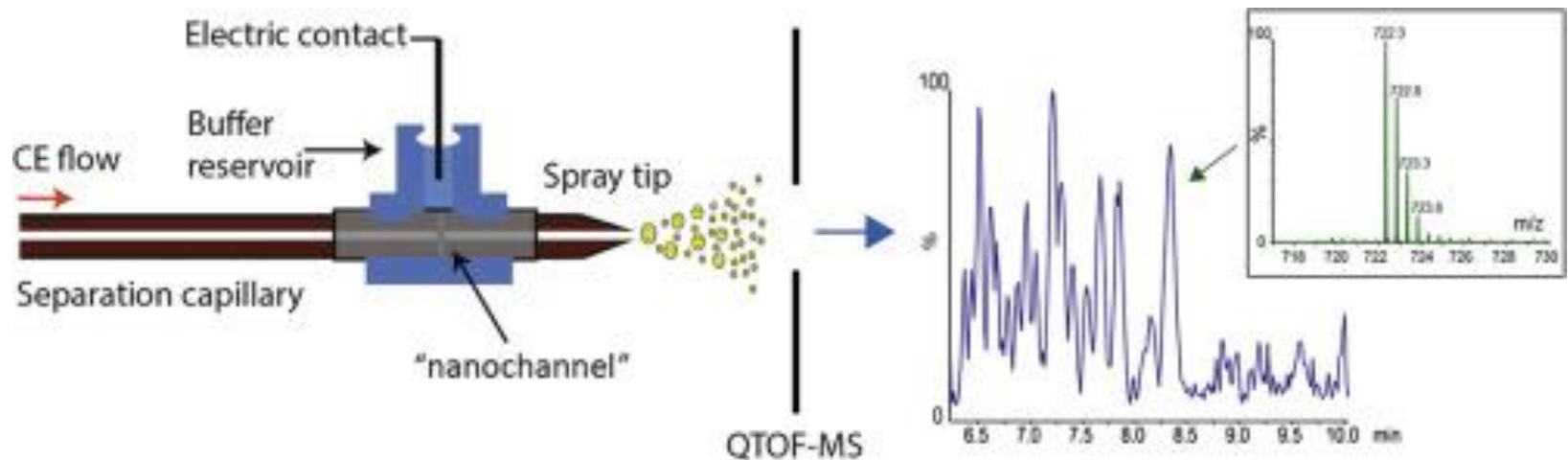
Spojení s vodivým kapalným spojením



CE kapilára nedosahuje do špičky elektrospreje, ale končí v nádobce s elektrolytem, kde je vloženo napětí potřebné pro ESI (zároveň ukončení elektrického obvodu CE)

CE/MS

Spojení bez přídavného toku kapaliny



speciální úprava špičky - vytažení do zúženého konce 5 – 30 μm
(náchylné k
ucpávání)

stabilní i pro velmi nízké průtoky (10 – 1000 nl/min)