

# 9. Kombinace chromatografických metod s hmotnostní spektrometrií II.

## *Kapalinová chromatografie (LC/MS)*

### **Technika LC/MS**

Analýza látek s většími M, větší polaritou nebo menší T stabilitou, než látky analyzované prostřednictvím GC (dnes hlavně bioanalytická chemie – velké M)

**vzorek → roztok → separace na koloně → hmotn. detekce**

***! Rozdíl tlaků mezi LC a MS je podstatně větší než u GC/MS !***

***0,5 - 5 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> (l fáze) ≈ 100 – 3000 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> (g fáze) → srovnej GC: 5-20 cm<sup>3</sup> atm min<sup>-1</sup>***

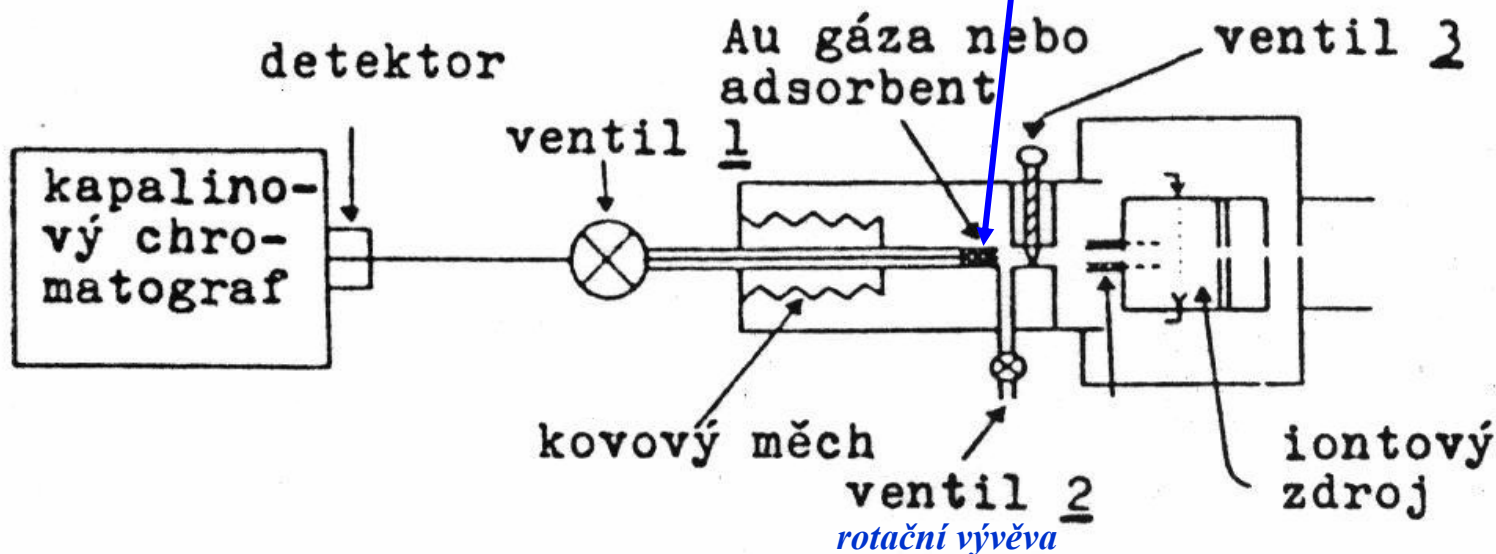
- *Srovnání průtokových množství aplikovaných u metody GC a LC:*

Flow considerations in GCMS and LCMS

GC	Packed column	Capillary column
	30 cm <sup>3</sup> helium min <sup>-1</sup>	1 cm <sup>3</sup> helium min <sup>-1</sup>
LC	Conventional column	Microbore column
Methanol	1 cm <sup>3</sup> liquid min <sup>-1</sup> requiring 16 W to provide 550 cm <sup>3</sup> vapour min <sup>-1</sup>	60 μL liquid min <sup>-1</sup> requiring 1 W to provide 34 cm <sup>3</sup> vapour min <sup>-1</sup>
Water	1 cm <sup>3</sup> liquid min <sup>-1</sup> requiring 43 W to provide 1240 cm <sup>3</sup> vapour min <sup>-1</sup>	60 μL liquid min <sup>-1</sup> requiring 2.6 W to provide 74 cm <sup>3</sup> vapour min <sup>-1</sup>

# Historie vývoje technik LC/MS

- Hledání co nejvhodnějšího způsobu zohledňujícího vysoké přetlaky (jejich případná eliminace)
- Následující způsob je nepřímý
  - *System přerušovaného dávkování:*



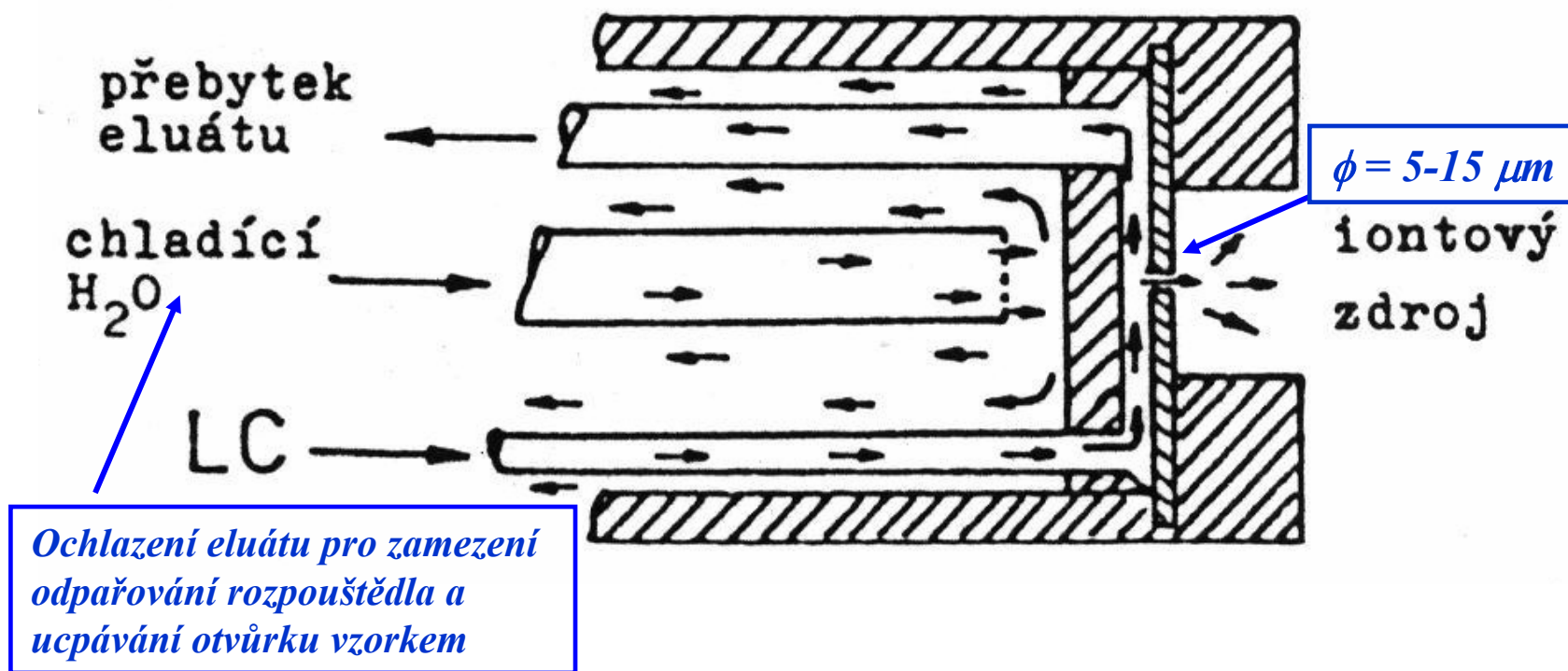
- Technika umožňuje provádět také techniku EI
- Bohužel existuje časová prodleva analýz (3-5 min) => *nezachytí se všechny eluované zóny*

# Historie vývoje technik LC/MS - pokrač.

- Následující techniky patří do přímých metod
- Tzv. **DLI** (direct liquid introduction) – 1970
- **Typické rysy:**
  - Převážně **CI** od rozpouštědla nebo pro zamezení nutnosti odstranění nosného média (např. jako u *nepřímé metody*)
  - Kromě **CI** lze využít také možnost ionizace **FAB**
  - **CI** je schopna pracovat s průtoky 5-50  $\mu\text{l min}^{-1}$
  - Technika *split*: klasické průtoky 1-2  $\text{ml min}^{-1}$   
*splitless*: mikrochromatografie ( $\mu\text{l min}^{-1}$ )

# Historie vývoje technik LC/MS - pokrač.

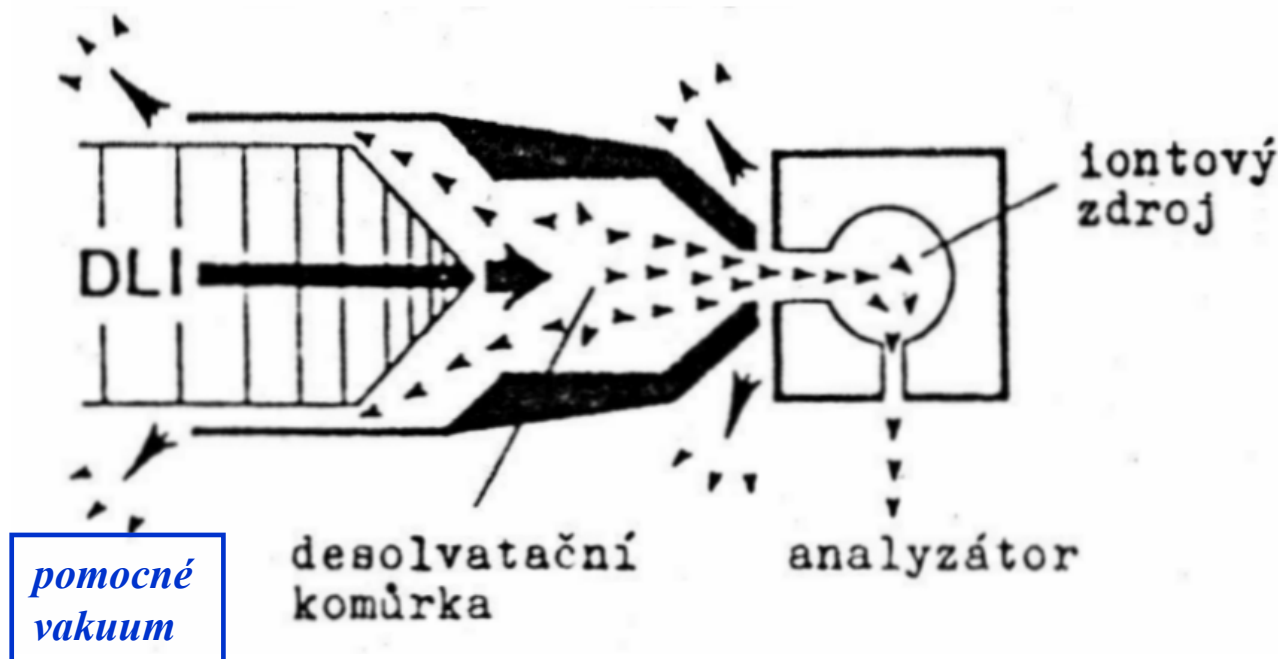
- *Přímé spojení za použití splitru eluátu:*



- Prochází jen část eluátu => *klesá citlivost*  
(analyt včetně média)

# Historie vývoje technik LC/MS - pokrač.

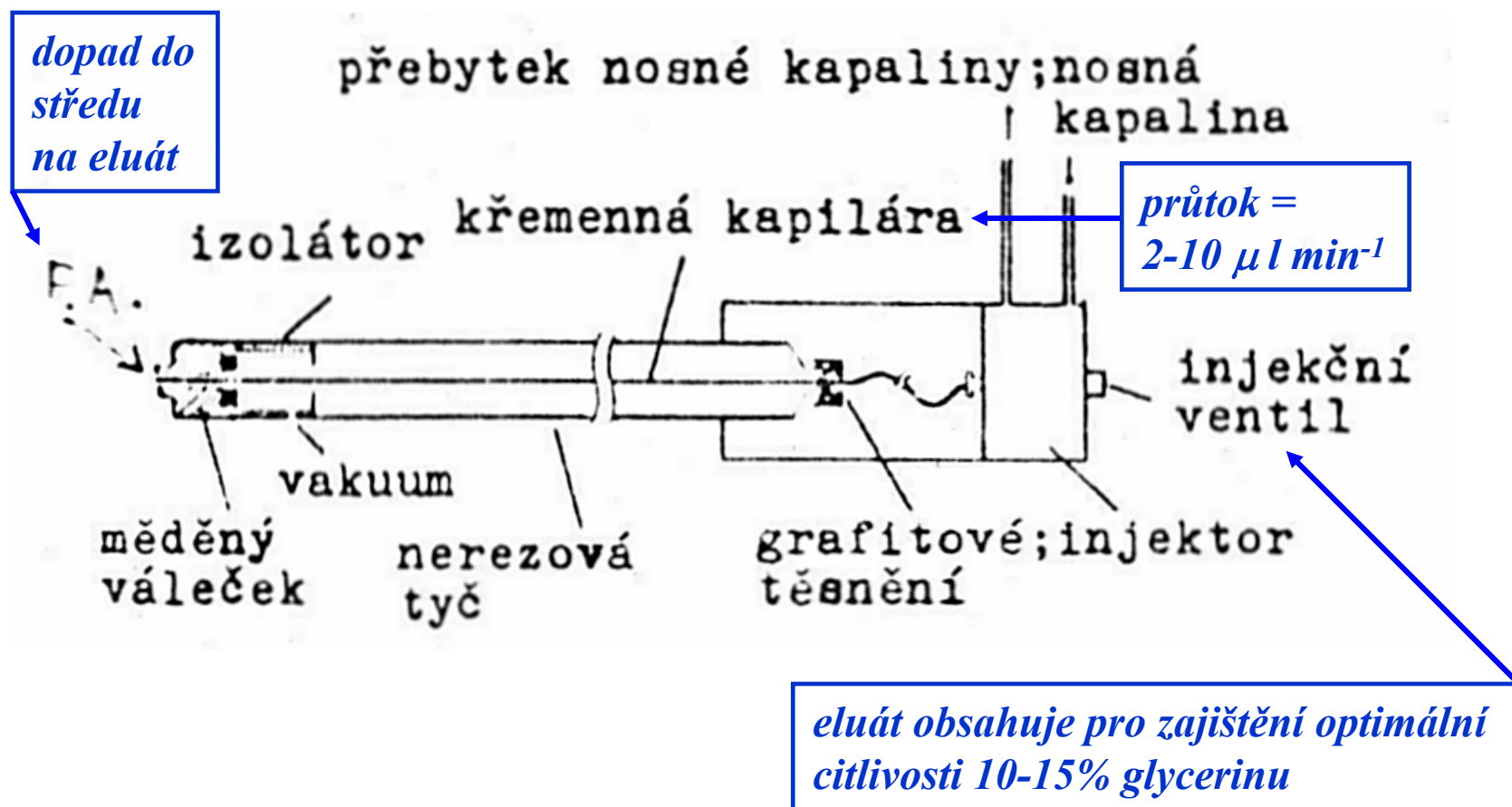
- *Přímé spojení s odčerpáváním par rozpouštědla:*



- V závislosti na obsahu rozpouštědla je získána kromě CI eventuelně také (EI)
- Desolvatace probíhá pod vakuem
- Interface řešitelný také např. *(nečerpaná a ukončená tryskou)* vyhřívanou trubičkou, fungující jako desolvatační komůrka, a dovnitř IZ pak prochází v parách vše

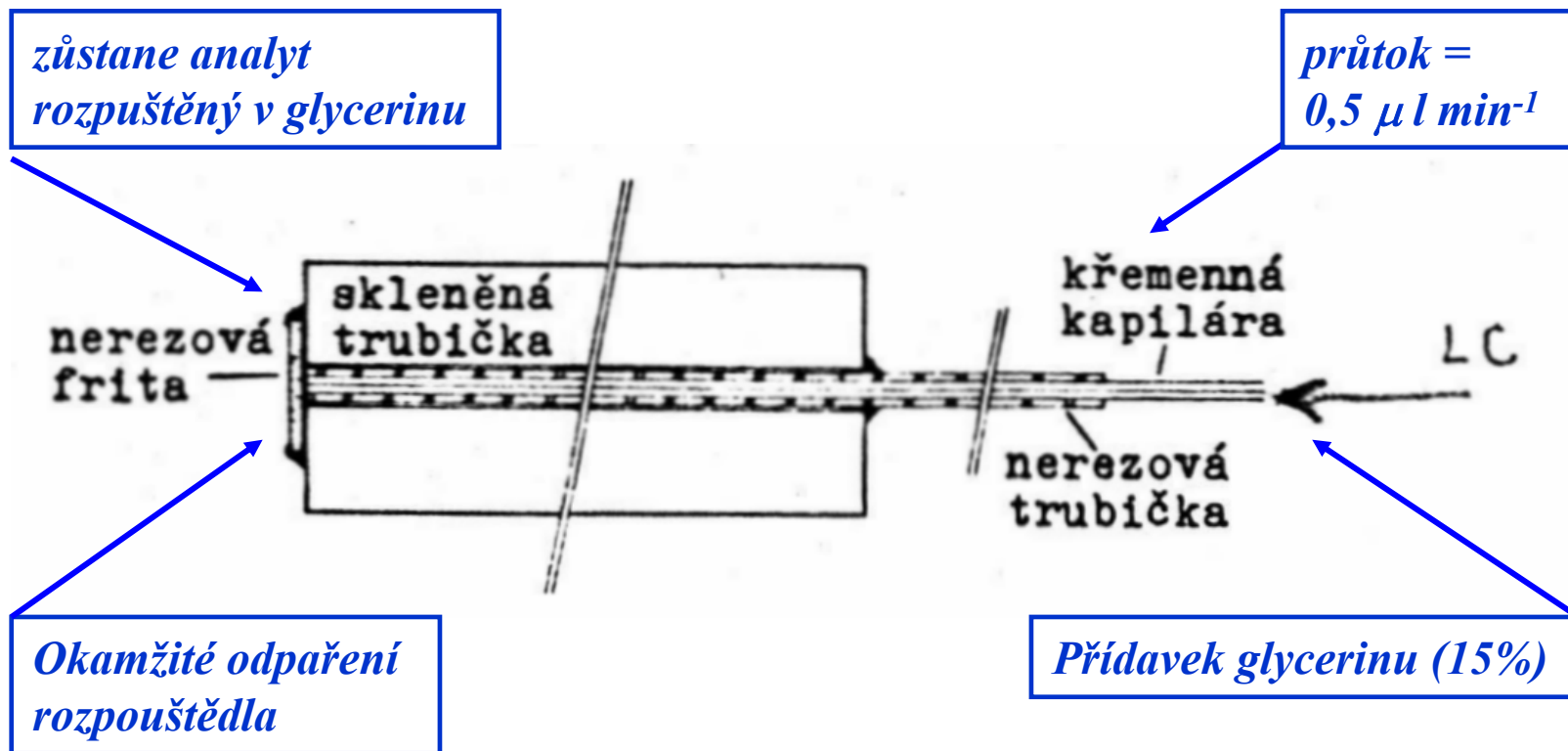
# Historie vývoje technik LC/MS - pokrač.

- *Spojení kapalinové chromatografie a dávkování roztoků s ionizací FAB: (přímé nevyhřívané spojení)*



# Historie vývoje technik LC/MS - pokrač.

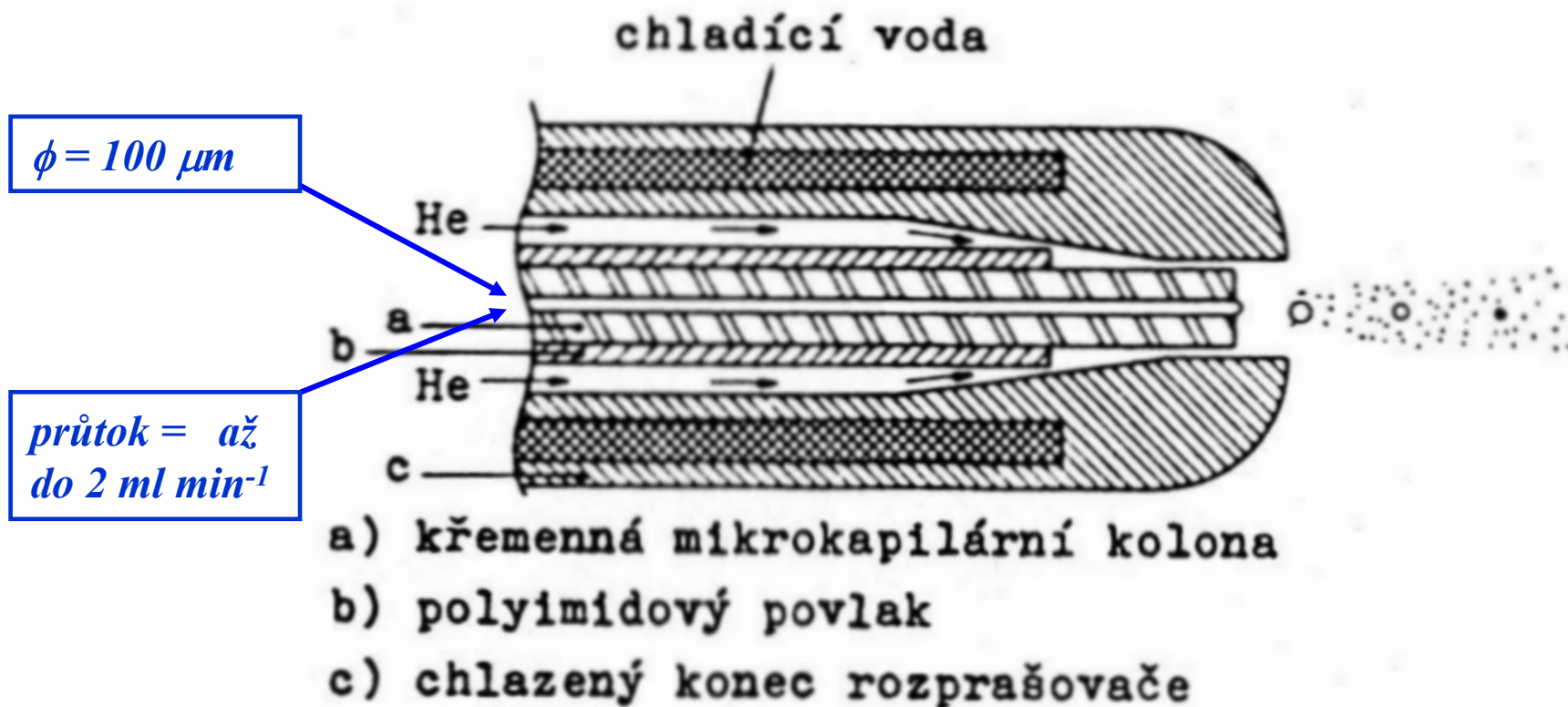
- *Spojení nerezovou fritou pro ionizaci FAB:*





# Historie vývoje technik LC/MS - pokrač.

- *Rozprašovač (rozmlžovač):*



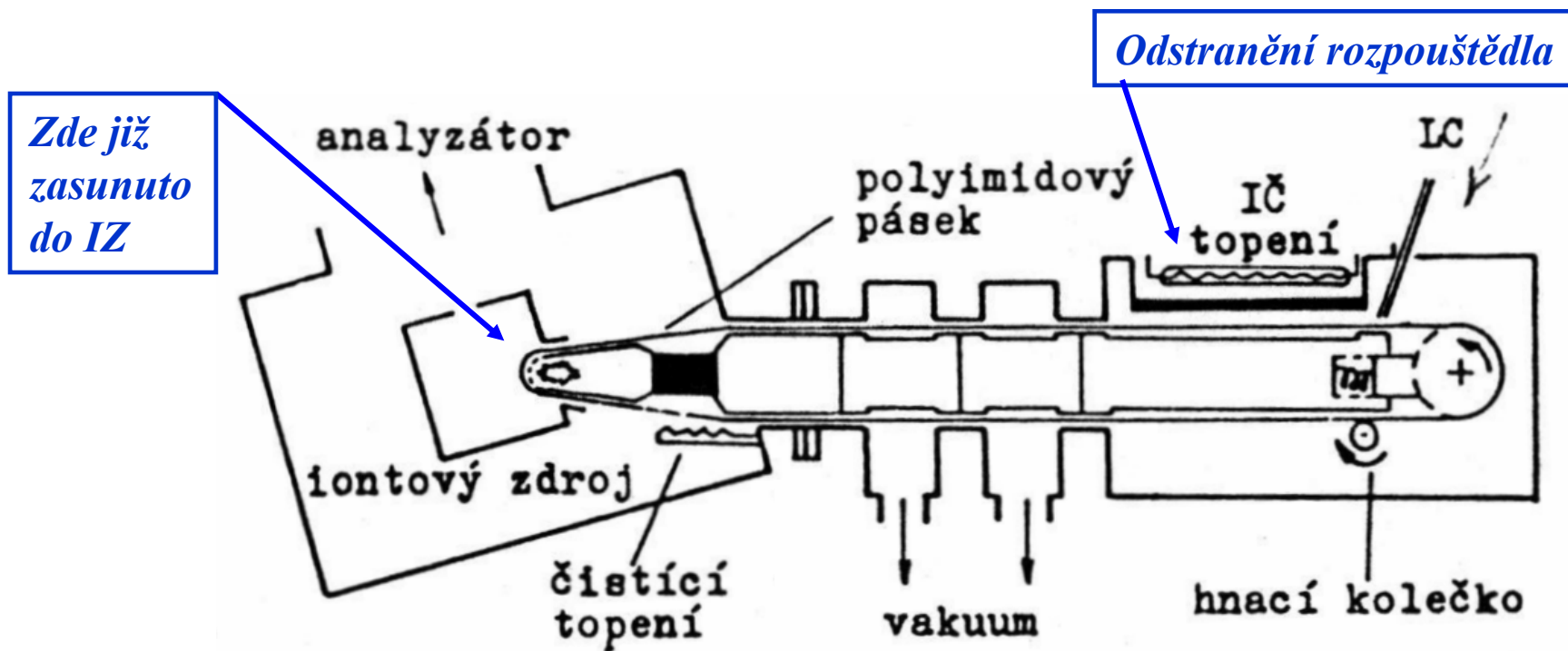
- Rozprašovač může být zaveden přímo do **IZ** nebo funguje jako součást *tryskového separátoru* GC/MS (odstranění nosného plynu a rozpouštědla)

# Historie vývoje technik LC/MS - pokrač.

- Následující techniky založeny na použití “dopravníku”
- Představují snad nejdokonalejší způsob, ale!
- **Typické rysy:**
  - První metoda s použitím drátku, procházejícího vaničkou s eluátem; následovala dvoukomorová desolvatace a těsně před prostorem IZ byla zóna zahřáta a látka odpařena do IZ (využito ca 1% eluátu)
  - **Další vývoj:** kovový pásek (šířka ca 3 mm a přikapávání eluátu)
  - Technika vhodná pouze pro termicky odolné látky
  - Existence paměťového efektu – nevýhoda => **nutnost čištění pásku**
  - Technika umožňuje **EI**, **CI** (i jinými médii), **FAB apod.** (zatím nejuniverzálnější použití pro využití všech typů ionizací)

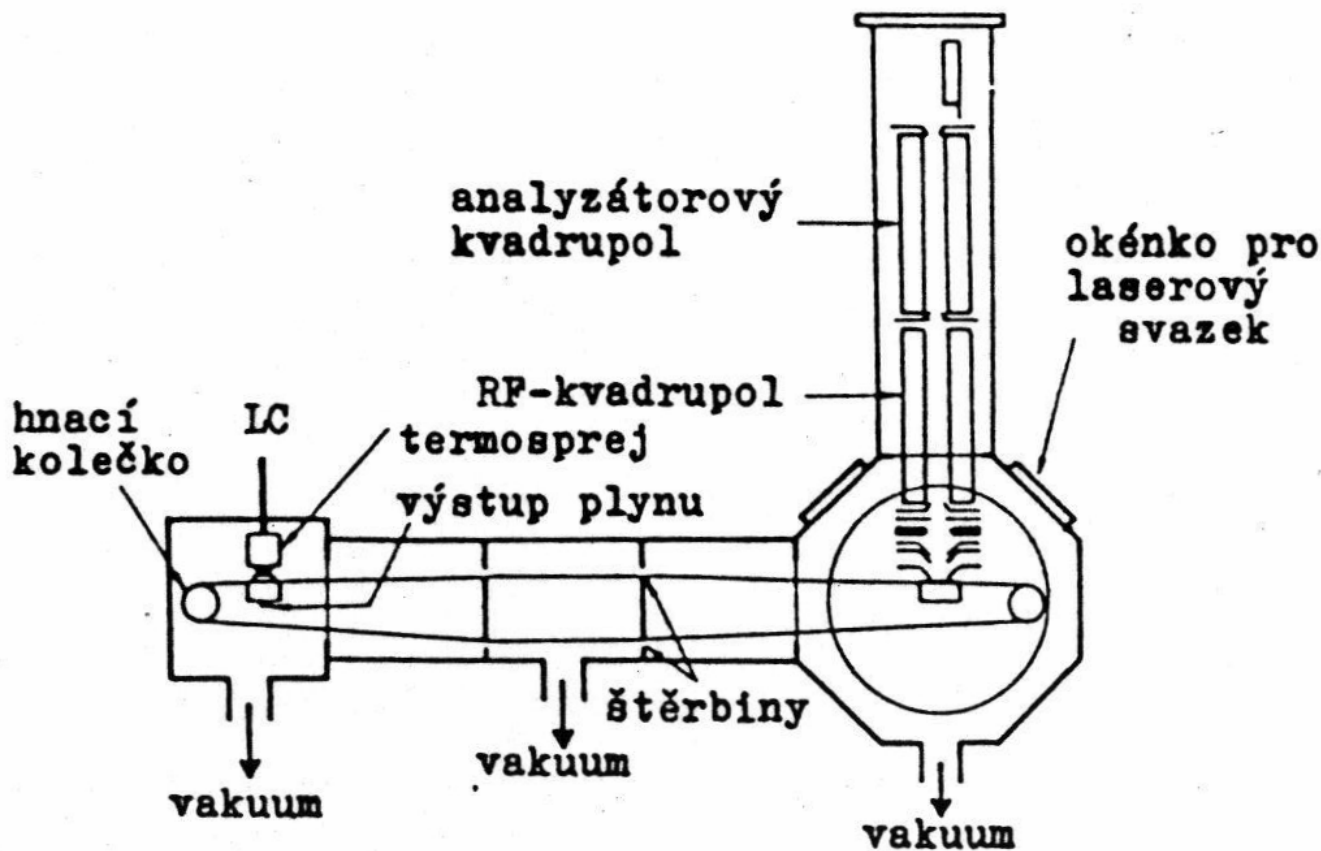
# Historie vývoje technik LC/MS - pokrač.

- *Pohybující se pás:*



# Historie vývoje technik LC/MS - pokrač.

- *Spojení kovového pohybujícího se pásu s desorpcí pulsním laserem:*



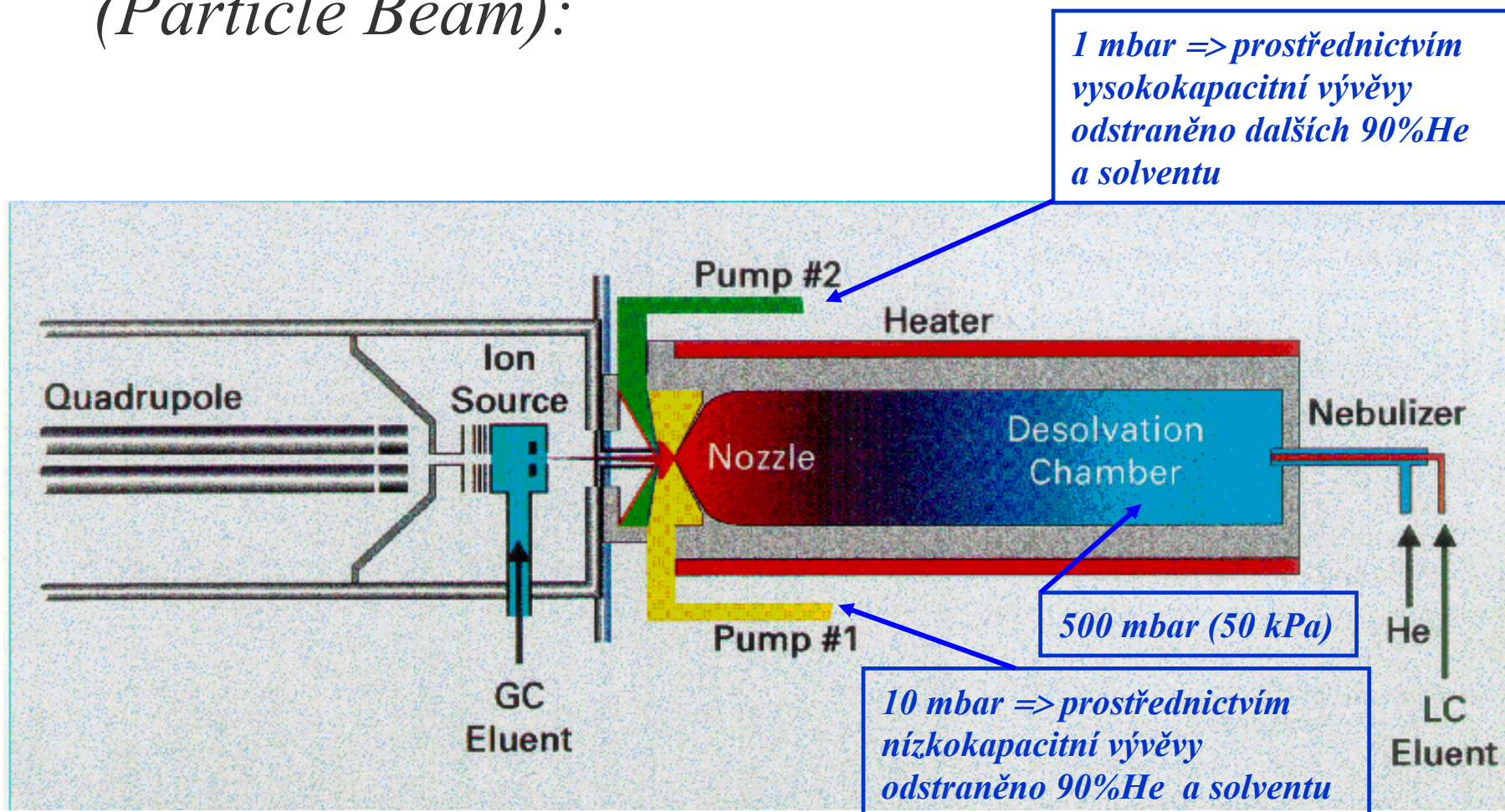
# Současné (komerční) techniky LC/MS

- Využívají spoluúčasti nebo eliminace rozpouštědla
- Při zahrnutí celého objemu (rozpouštědlo, pufry, analyt) je pro ionizaci využito typických efektů v IZ
  
- **Hlavní druhy interface:**
  - Particle Beam (! jediný interface, nevyžadující modifikaci IZ !)
  - Termosprej (TS)
  - Elektrosprej (ES)
  - Speciální odvozené techniky (ionsprej, nanosprej, apod.)
  - APCI
  - (MALDI/TOF)

# Particle Beam (*proud částic*)

- ***součásti:***- zmlžovač (sítka)
- - vyhřívaná desolvatační komora  
(40-70 °C,  $p \approx 50\text{kPa}$ )
- - dvoustupňový separátor
- - dvoustupňové vývěvy (2x)
- ***média:*** - mobilní fáze s rozpuštěným vzorkem  
(0,2-1 ml min<sup>-1</sup>)
- - zmlžující plyn He (1-2 l min<sup>-1</sup>)
- srovnej GC - řádově ml min<sup>-1</sup>

■ *Schematické znázornění spojení LC/MS  
(Particle Beam):*



## ■ *Výhody:*

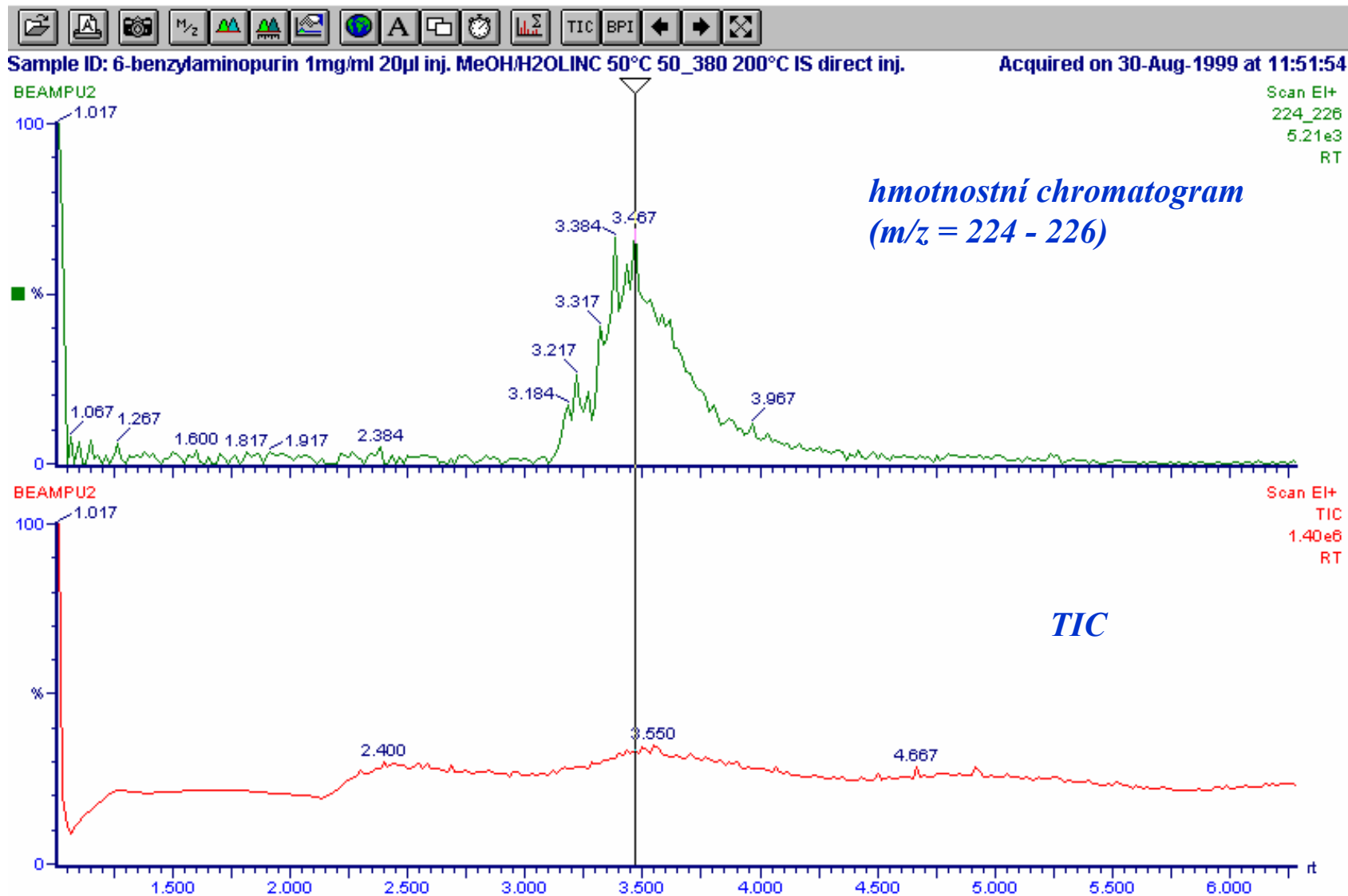
- - bez modifikace IZ
- - získání spekter v módu EI a CI
- - použití běžných rozpouštědel jako mobilní fáze (voda, methanol, acetonitril, hexan ap.)
- - použití pro slabě a středně polární látky do 1000 a.m.u.(steroidy, aflatoxiny, pesticidy ap.)

## ■ *Nevýhody:*

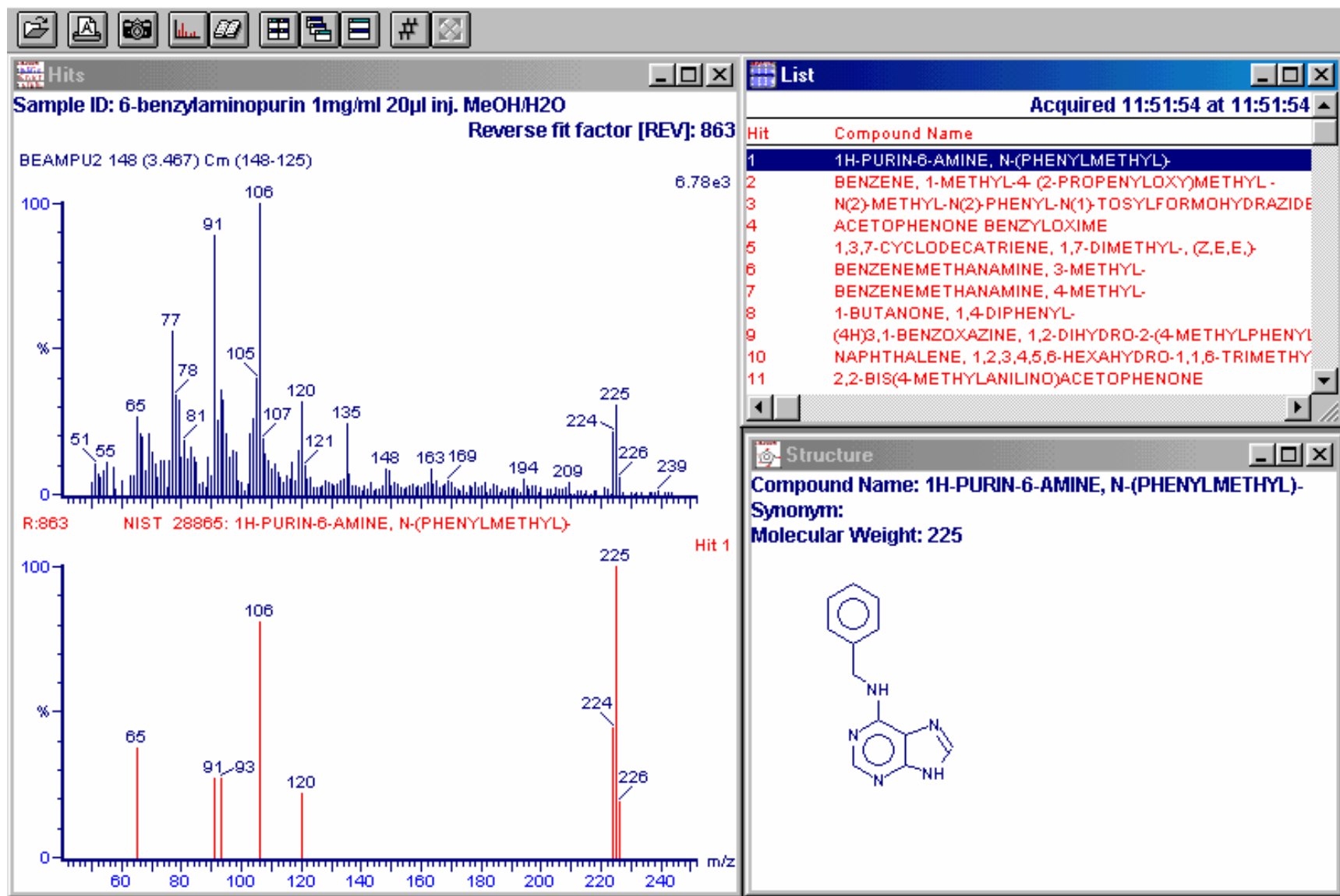
- - omezení na nepufrované prostředí
- - nelze použít pro těkavé látky (odsátí)
- - polární a vysokomolekulární látky se obtížně zplyňují



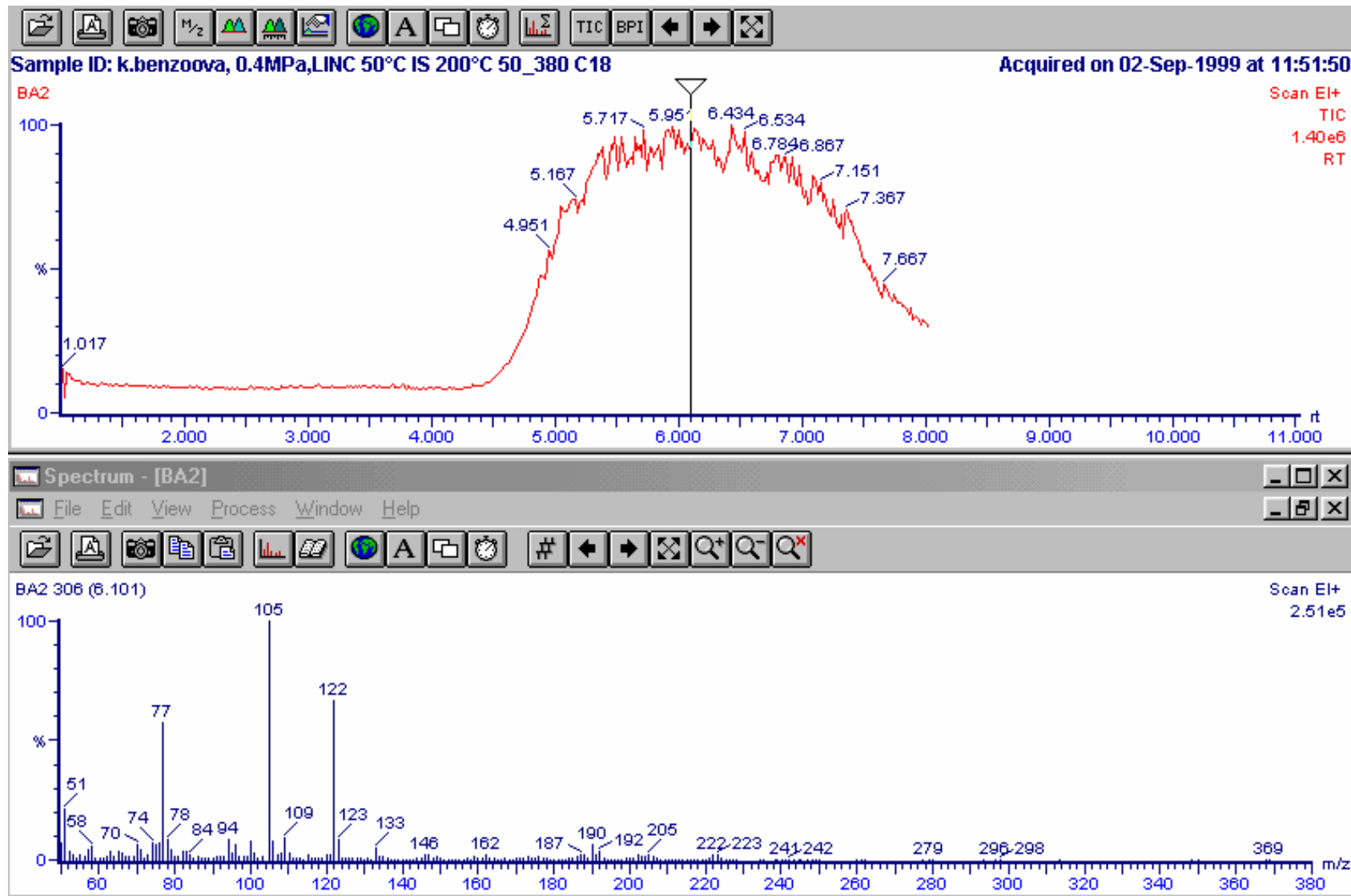
- Analýza 6-benzylaminopurinu metodou HPLC/LINC/MS  
(1mg/ml, 20 $\mu$ l do MeOH:H<sub>2</sub>O=1:1,  $p_{He}$ =0,3MPa, LINC 50 °C)



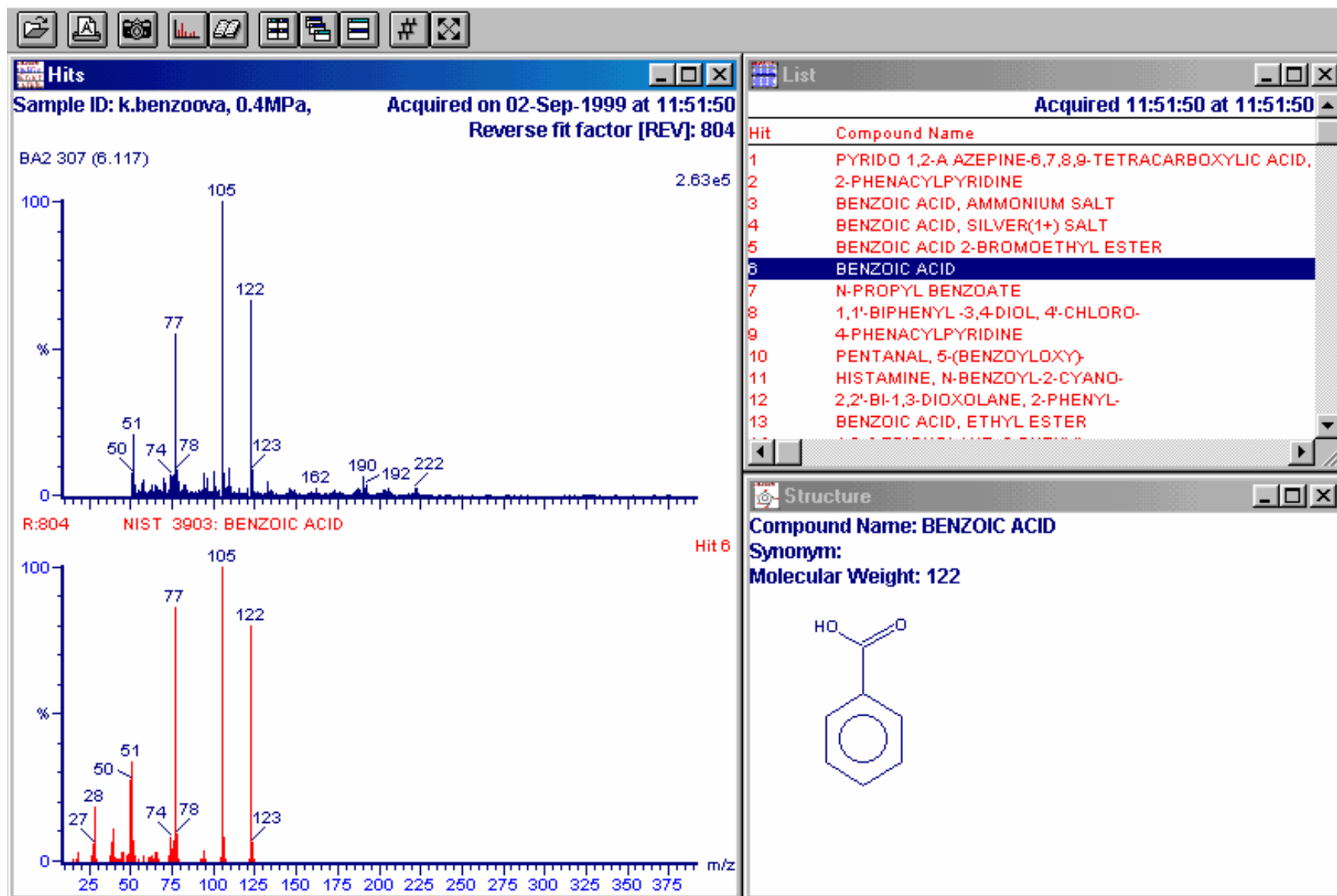
■ *Porovnání spektra 6-benzylaminopurinu s knihovnou NIST*



- Analýza kys. benzoové metodou HPLC/LINC/MS  
(2mg/ml, 20µl do MeOH:H<sub>2</sub>O=1:1, p<sub>He</sub>=0.4MPa, LINC 50 °C)



■ *Porovnání spektra kys. benzoové s knihovnou NIST*



# Thermospray (TS)

## ■ Princip:

*(prudké odpaření eluátu)*

- Eluát zaveden přes vyhřívanou kapiláru (ca 150 °C) přímo do IZ (tvorba “*nadzvukového*” proudu par s kapičkami a částicemi)
- Dochází k postupné desolvataci kapiček
- Vznik vysokého potenciálového spádu na povrchu kapiček – povrchový náboj ( $10^7 \text{ V m}^{-1}$ ), který vzrůstá se zmenšující se velikostí při jejich odpařování (odpařování rozpouštědla) –  
– dáno přenosem náboje mezi ionty solí a analytem
- **3 spolupůsobící druhy ionizace:**
  - *desorpce polem* (potenciálový spád na povrchu kapiček)
  - *CI* (pufry – octan sodný apod.)
  - *EI* (při použití pomocné katody – u látek, kde selhávají předešlé druhy nebo k provedení dodatečné fragmentace)

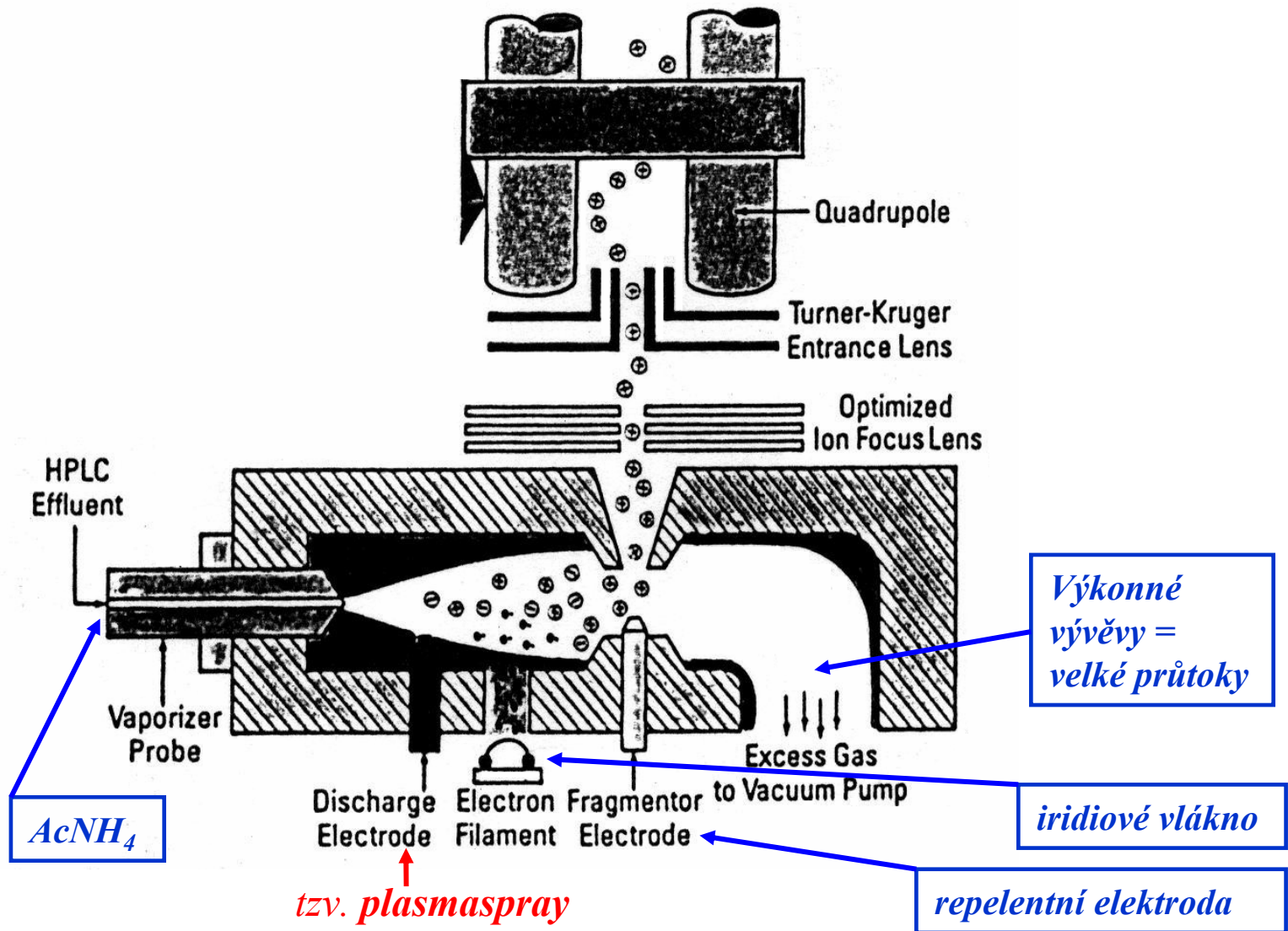
*fragmentační elektroda*

# Thermospray

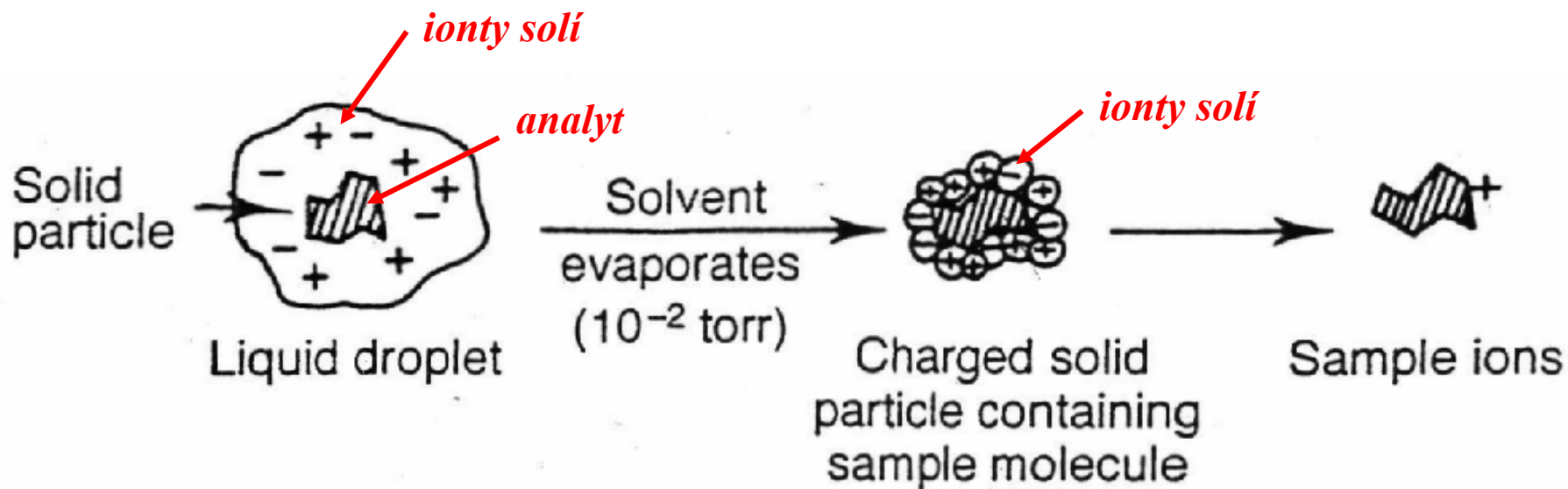
- pokrač.

- Kombinace ionizačních technik umožňuje aplikaci širokého spektra mobilních fází s různými průtoky
- Tlak v IZ je 500 – 2000 Pa
- Velikost kapiček ca  $1\ \mu\text{m}$
- Častá tvorba aduktů  $\text{MH}^+$  a  $\text{MX}^+$  z pufrů (Na, K,  $\text{NH}_4^+$  apod.)
- U řady polárních látek vznikají se snižující se hodnotou pH často více protonované ionty (2, 3, 4 apod.)
- Při použití rozpouštědel jako metanol a etanol nepozorován téměř žádný mechanismus ionizace polem (FI) – zvýšení až po přidavku vody
- Běžná koncentrace pufru  $\text{Ac}^-\text{NH}_4^+ = 0,1\text{M}$
- Frangmentační elektroda může vést i k CI z pufrů u látek, které nebyly ochotny podlehnout CI (nepolární látky)

■ *Schematické znázornění spojení LC/MS (Themospray):*



- *Schematické znázornění tvorby iontů během procesu v termospreji (vypařování iontů):*



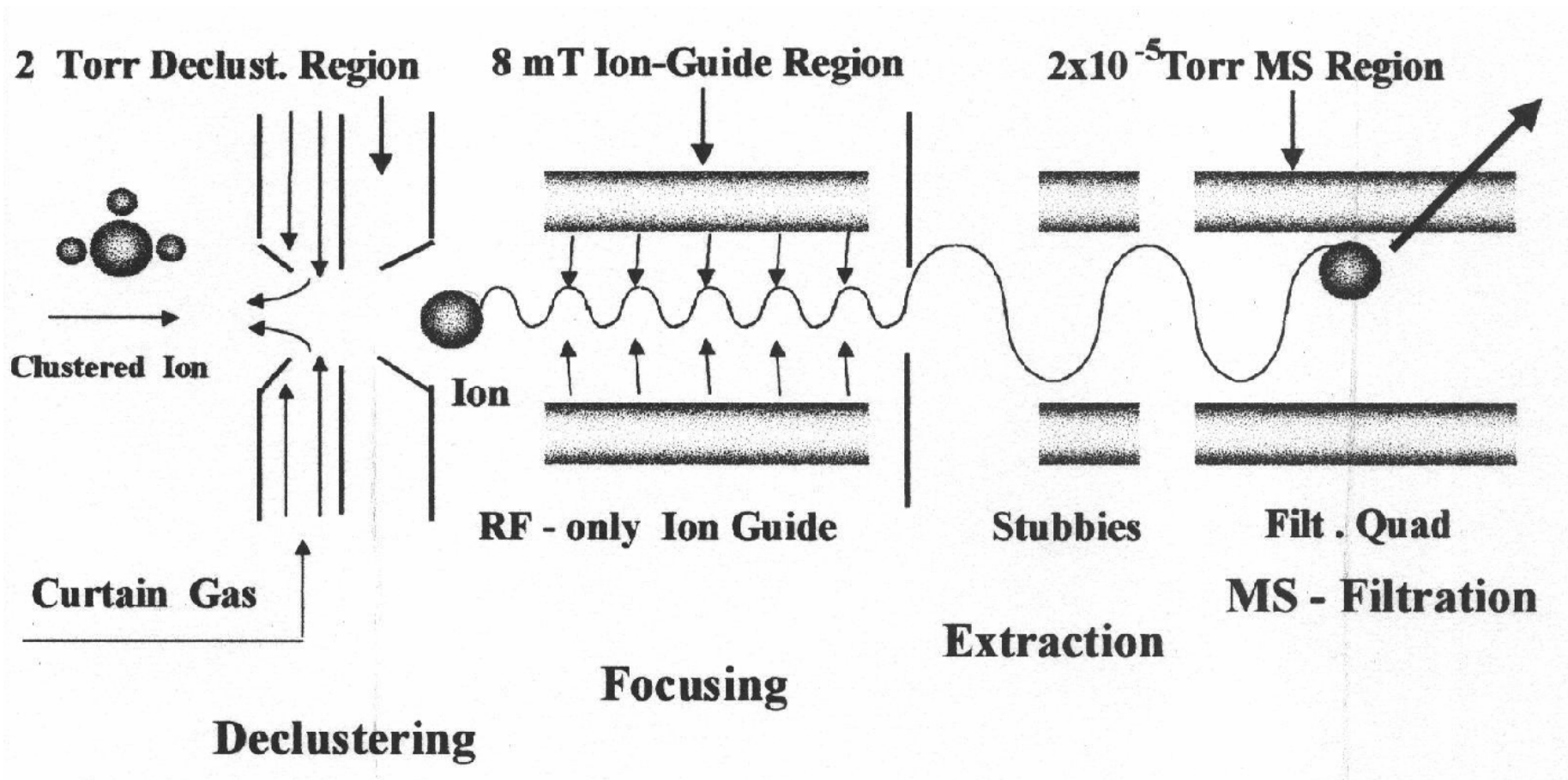


# *Další interface založeny na ionizaci za atmosférického tlaku* - **API**

**ESI** (elektrosprej a jeho modifikace)

**APCI** (*viz. již dříve u metody CI*)

■ *Schematické znázornění rozhraní API:*



*(podrobný rozbor metody a technik – viz. dále)*

# Electrospray (*ES*)

## ■ **Princip:**

- Proces probíhá za atmosférického tlaku
- Eluát zaveden přes trysku (velice úzká kapilára) přímo do IZ
- Dochází ke vzniku “*nadzvukového*” proudu kapaliny
- Mezi ústí kapiláry a zaostřovací clony vloženo napětí (5 kV)
- Do prostředí IZ zaváděn sušící plyn ( $N_2$ )
- Vzájemné působení tlaku kapaliny, povrchové tenze a vysokého pole na povrchu kapaliny na konci kapiláry vznikají nabitě kapičky
- Kapičky roztoku rozstříkovány proti proudu  $N_2$  – rychlé odpaření rozpouštědla
  
- ***Důležité:*** technika šetrná pro termicky labilní látky

# Electrospray

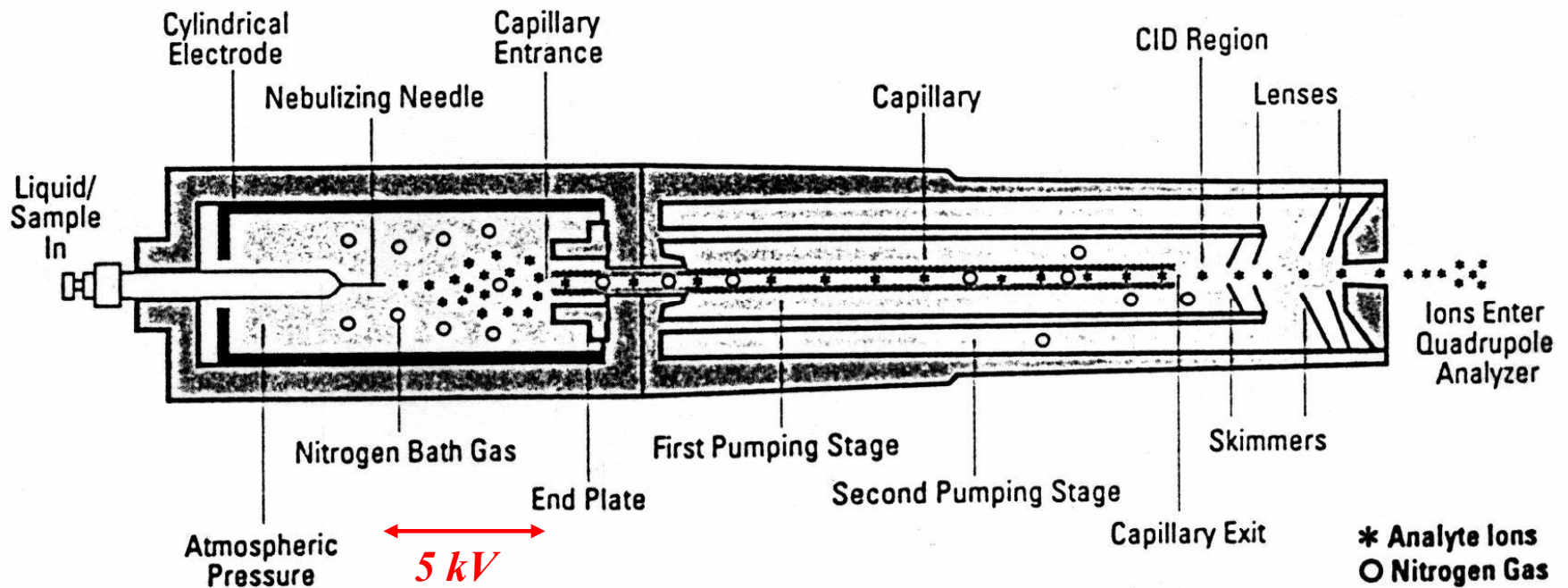
- pokrač.

- *Způsob ionizace:*
  - *Coulombická exploze*  
(při převýšení kohézních síl Coulombickými)
- Většinou dochází k řetězové explozi => vznik *několikanásobně nabitých iontů* **typické**

**=> aplikovatelné pro studium biomolekul (velké snížení  $m/z$ )**

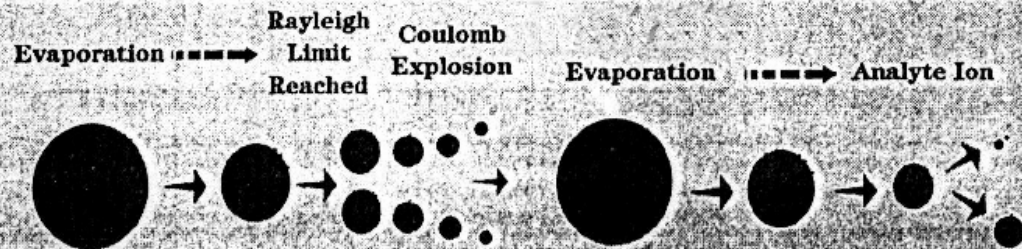
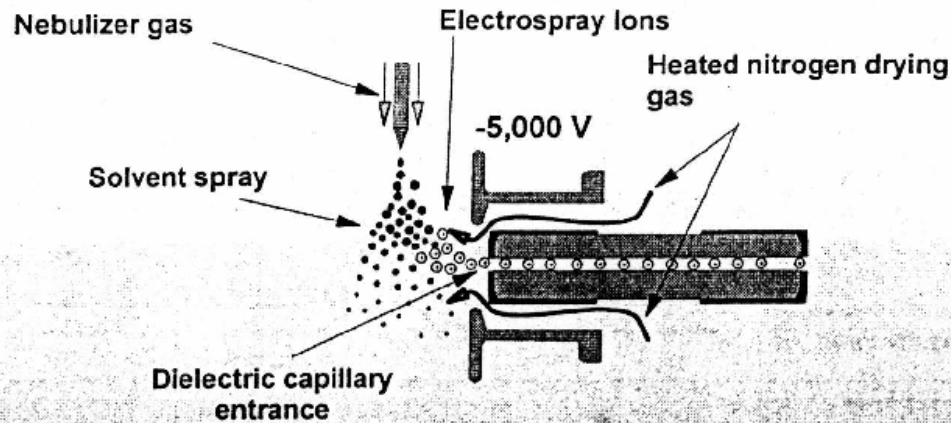
- Typické průtoky 5-15  $\mu\text{l min}^{-1}$
- Technika aplikovatelná i na látky, neochotně tvořící ionty (pak vznik aduktů s Na, K apod.)

■ *Schematické znázornění spojení LC/MS (Electrospray):*



- *Schematické znázornění techniky Electrospray a Coulombických explozí:*

## API-Electrospray Ionization



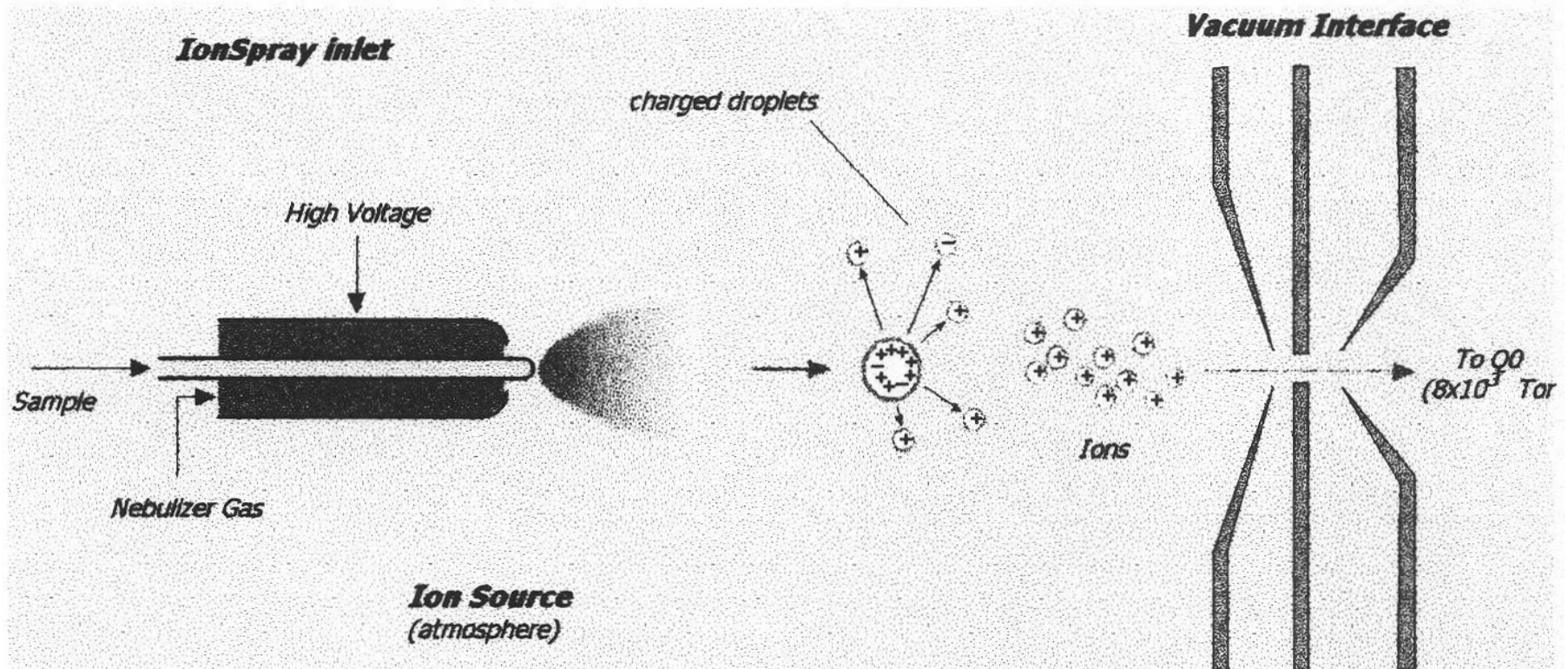
# Electrospray

- pokrač.

## Odvozené techniky:

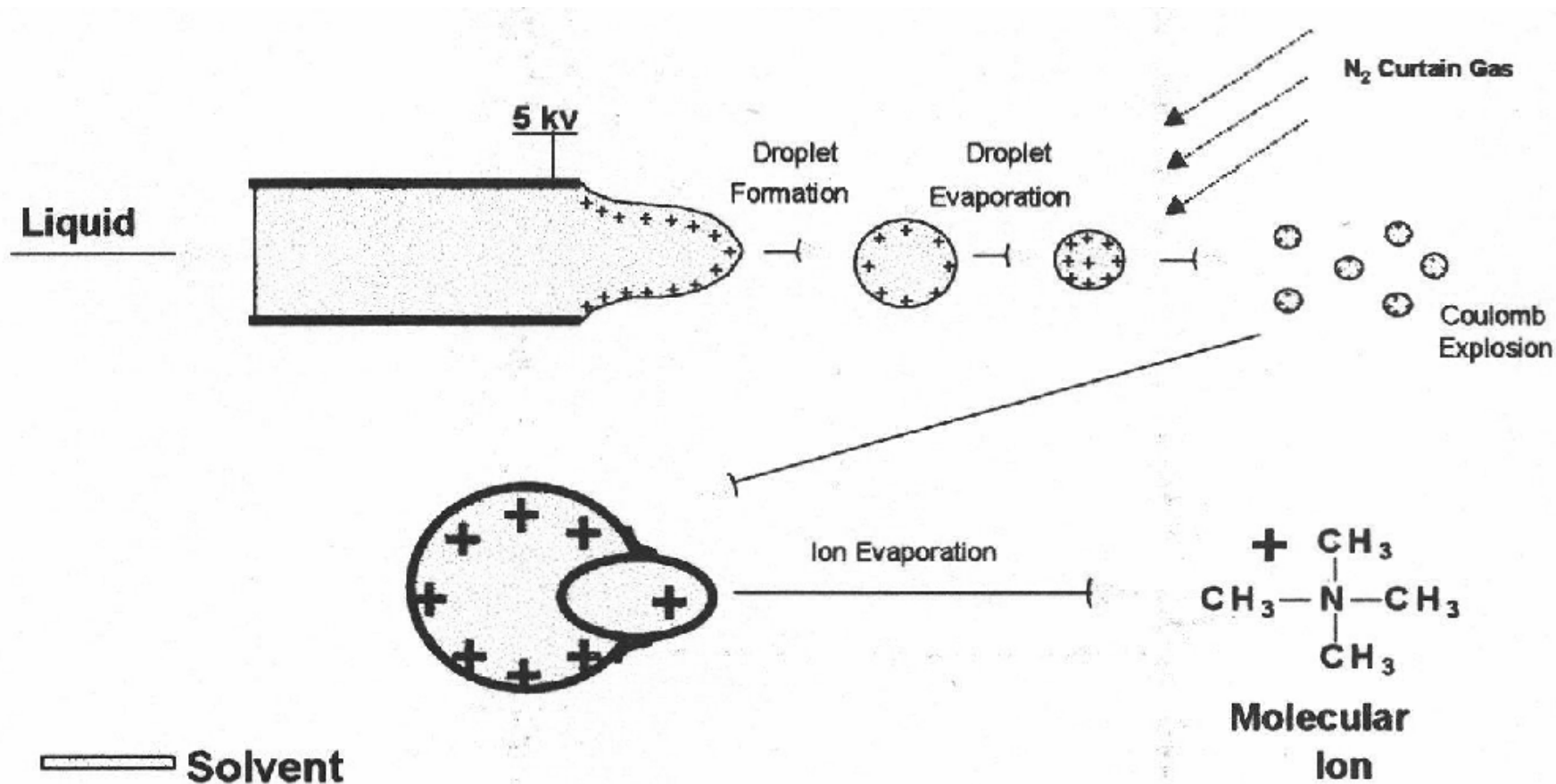
- **Ionspray** – místo trysky použít rozmlžovač => *vyšší průtokové rychlosti (jako u TS)*  
– běžně  $50-200 \mu\text{l min}^{-1}$  a při použití stínících clon (splitter), zamezujících kondenzaci kapiček při vysokých průtokových rychlostech, až  $2 \text{ ml min}^{-1}$   
a vznik mlhy méně závislé na povaze kapalné fáze
- **Nanospray** – nl množství => *snížení citlivosti na atomární úroveň (fmoly, attomoly)*
- **MikroIonspray** – ionspay s nízkými průtoky
- **Photospray** – použití zdroje UV záření pro ionizaci látky fotony

- *Schematické znázornění spojení LC/MS (Ionspray):*





- *Schematické znázornění teorie iontového vypařování u techniky Ionspray:*



- *Schematické znázornění spojení LC/MS (Nanospray):*

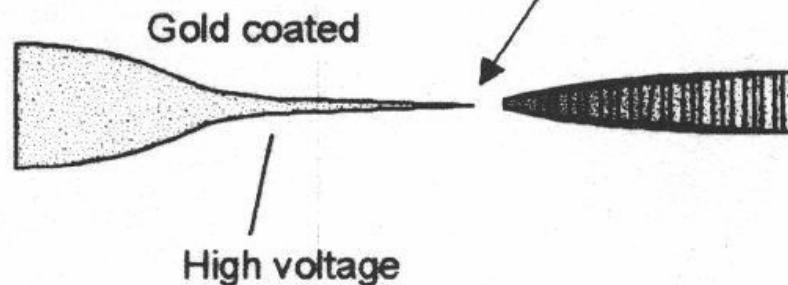
**10 - 100 nL/min**

**NanoSpray**

**Discrete Sample Introduction**

Drawn 1mm  
borosilicate glass

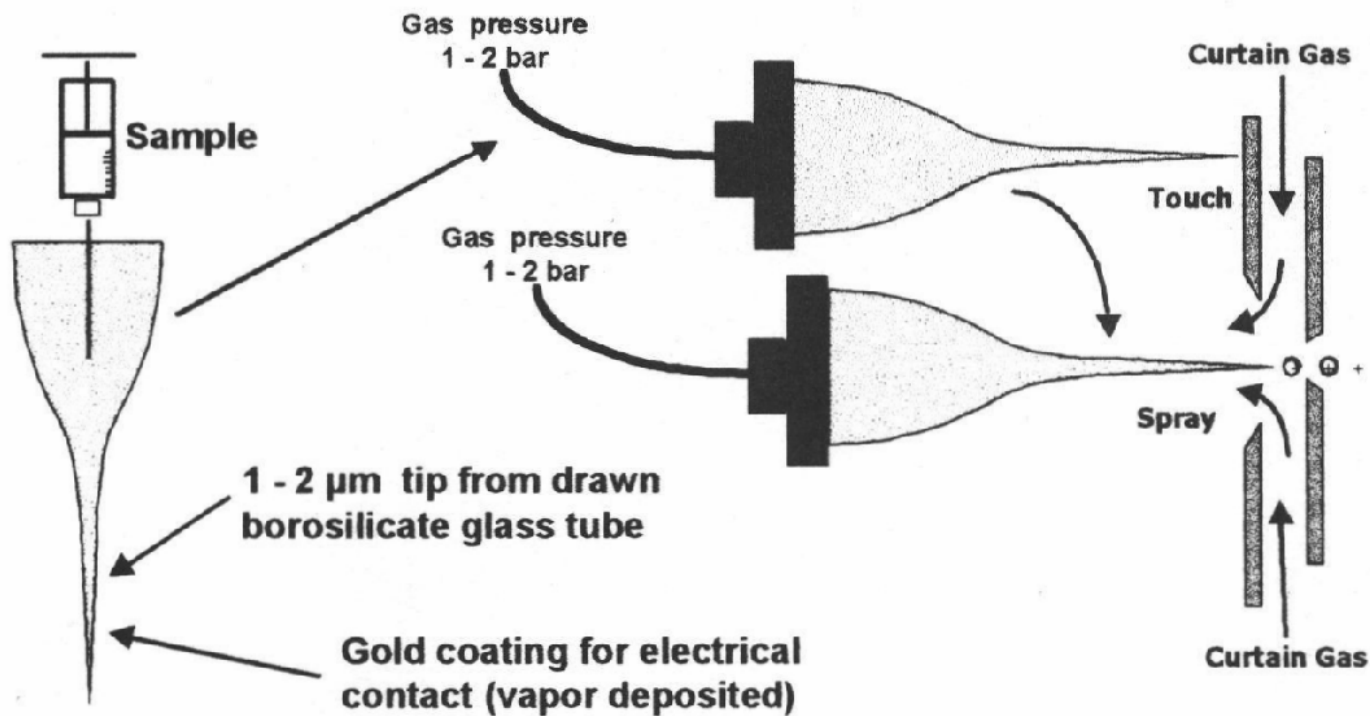
- 1 micron I.D.



*Matthias Mann & Matthias Wilm at EMBL, Heidelberg*

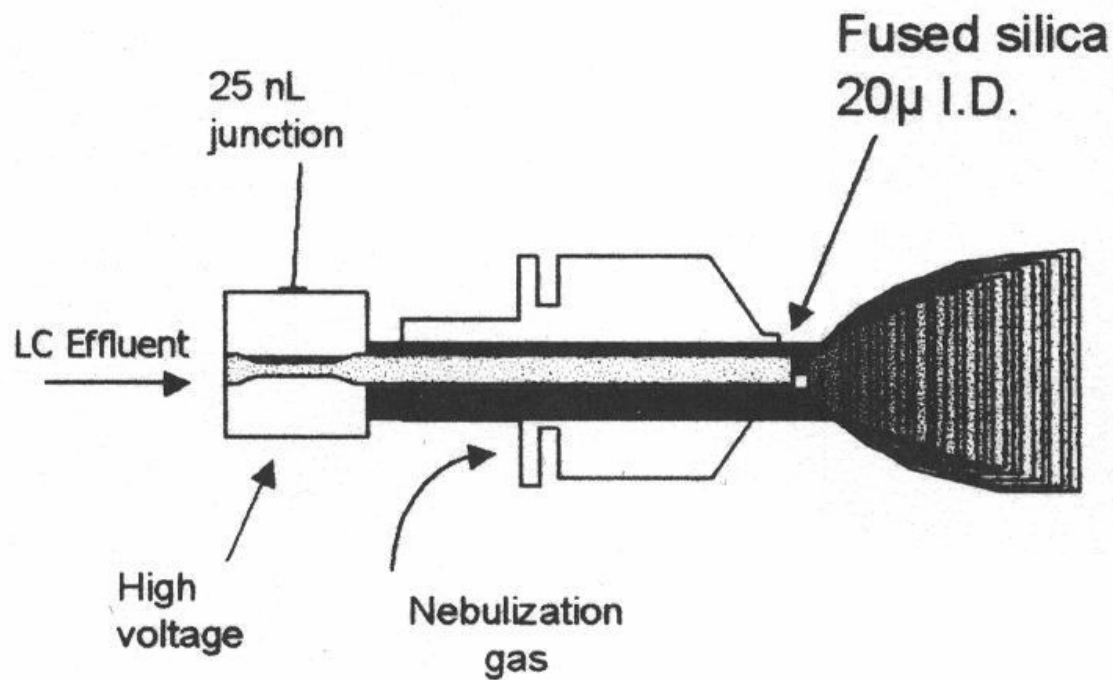
## NanoSpray Operation

- Discrete Sample Introduction.
- Typically 1  $\mu\text{L}$  lasts 30-50min (20-30 nL/min)



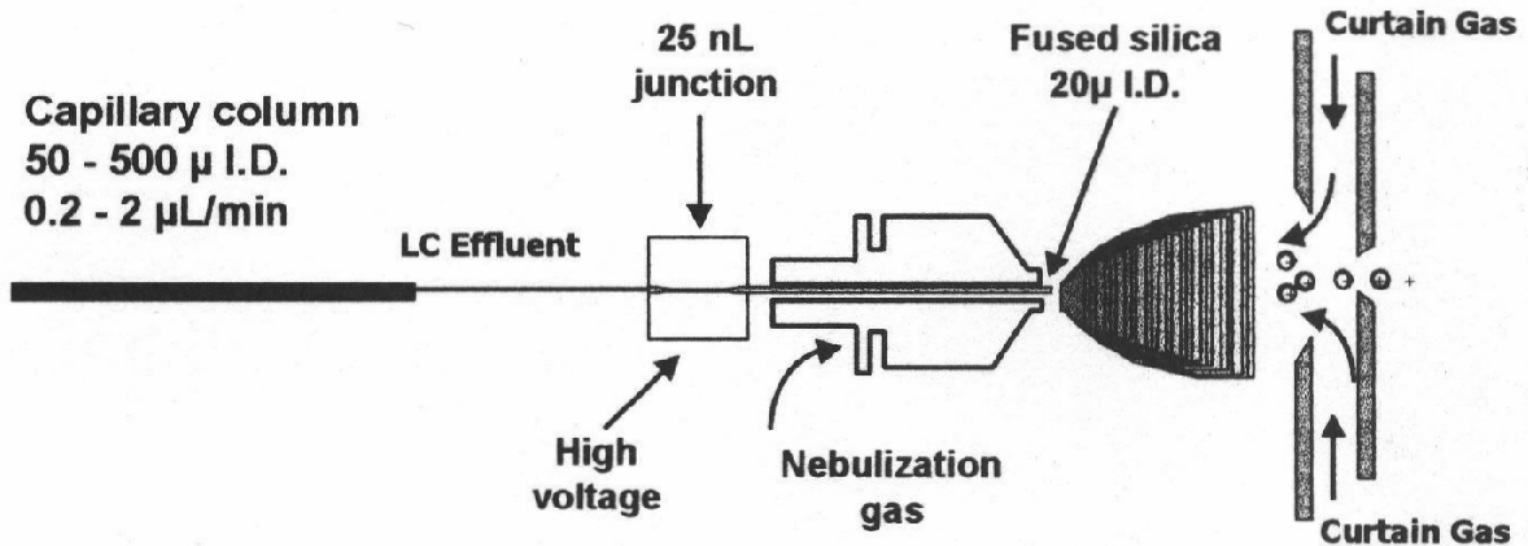
- *Schematické znázornění spojení LC/MS (MicroIonSpray):*

**50 - 2000 nL/min**  
**MicroIonSpray**  
**Capillary Chromatographic Inlet**



# MicrolonSpray

- Packed Capillary Liquid Chromatography Inlet (0.2- 2  $\mu\text{L}/\text{min}$ )



# Electrospray

- pokrač.

- ***Dekonvoluce:***

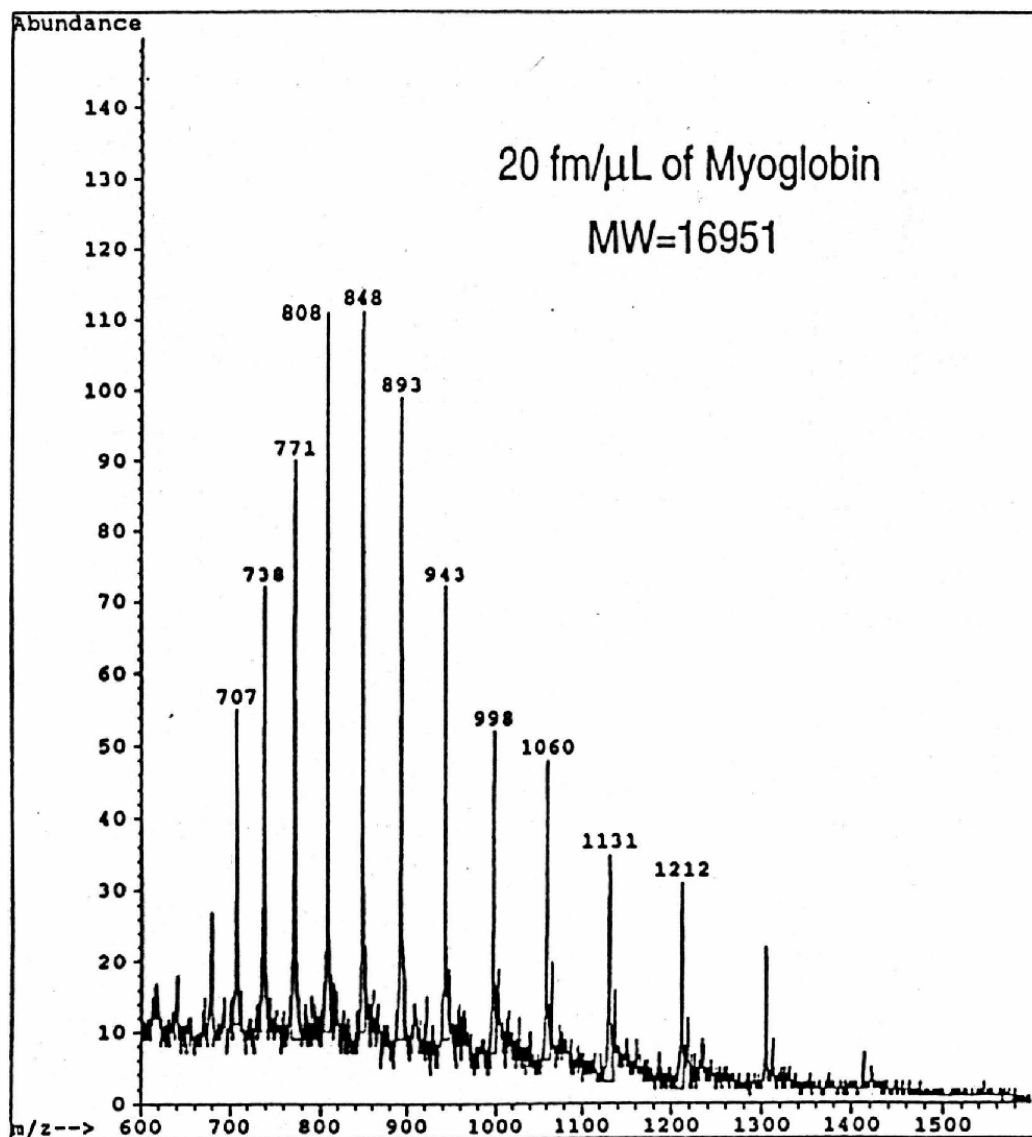
pro vyhodnocení struktury komplikovaných biopolymerních látek (*proteiny = bílkoviny, glykoproteiny - enzymy, hormony apod.*) a jejich směsí využito:

- vysokého náboje iontů (*molekula + fragmenty*) a
- rozsáhlých knihoven spekter + statistických metod

- Statistické rozdělení na vícemocné ionty => ***počítačovou dekonvolucí lze zjistit  $M^{+•}$  (aplikace programových algoritmů)***

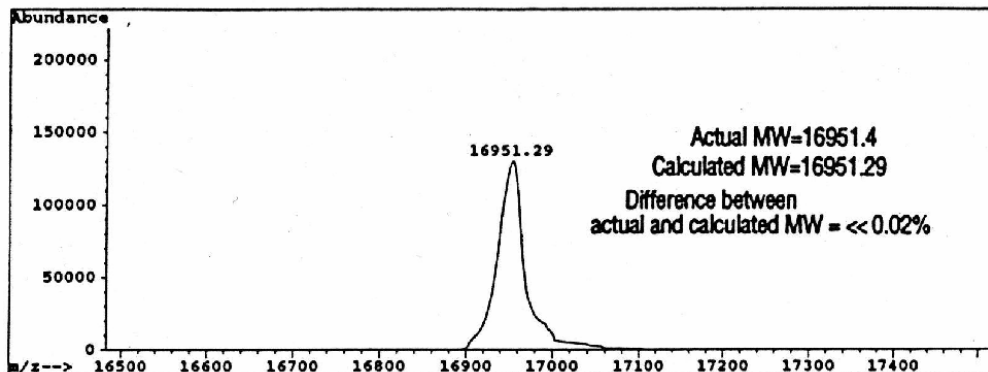
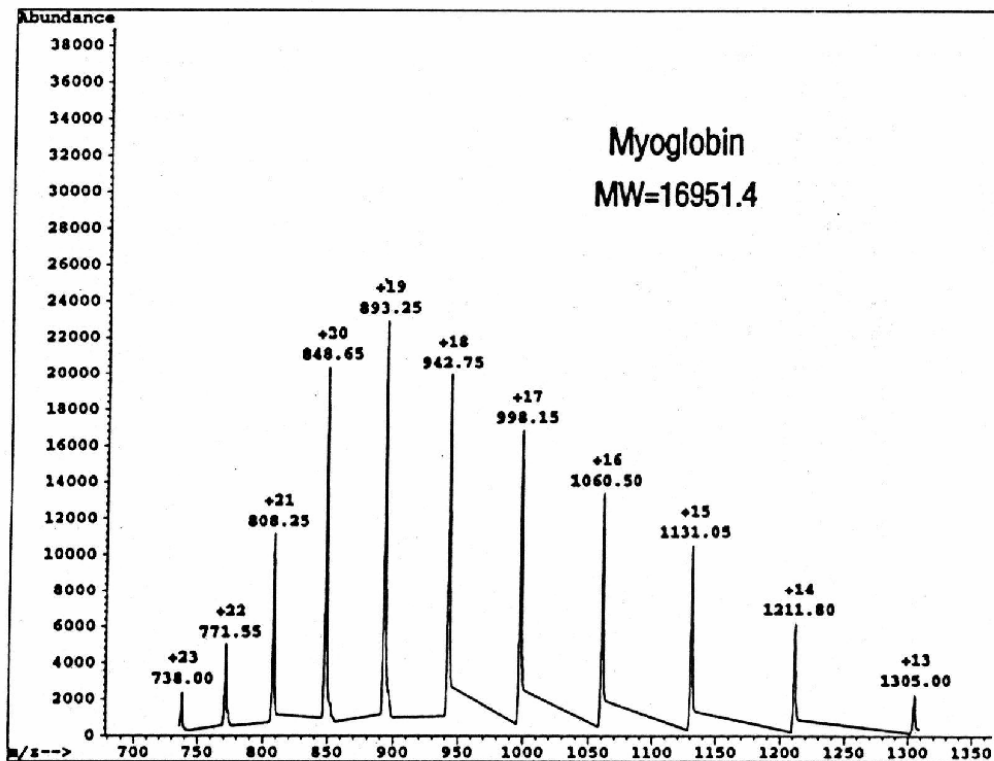
- ***Pozn.:*** funguje zatím pouze pro jednoduché směsi

- *Určení molekulové hmotnosti (M) myoglobinu:*



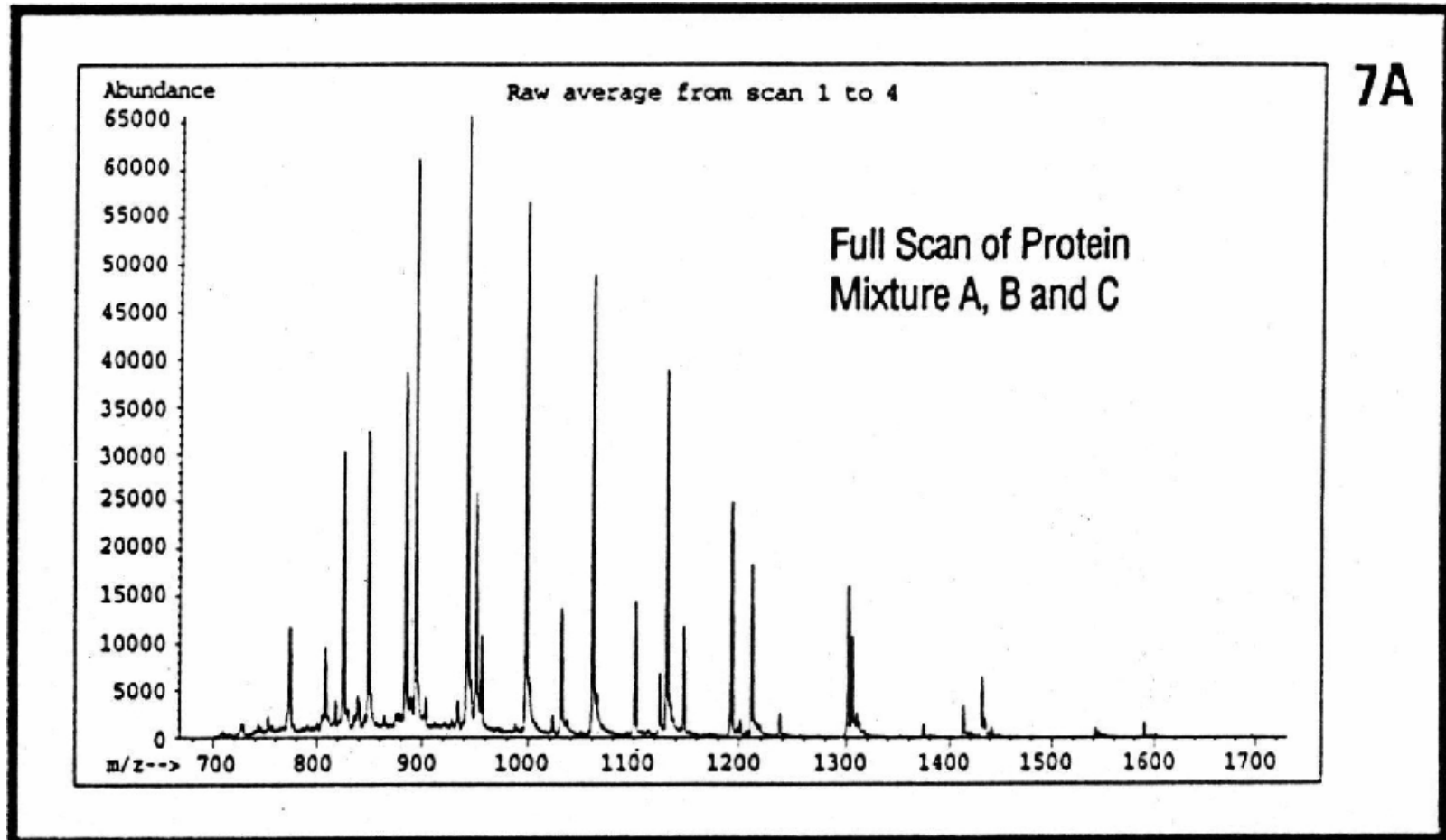
# ■ *Určení M myoglobinu:*

- pokrač.





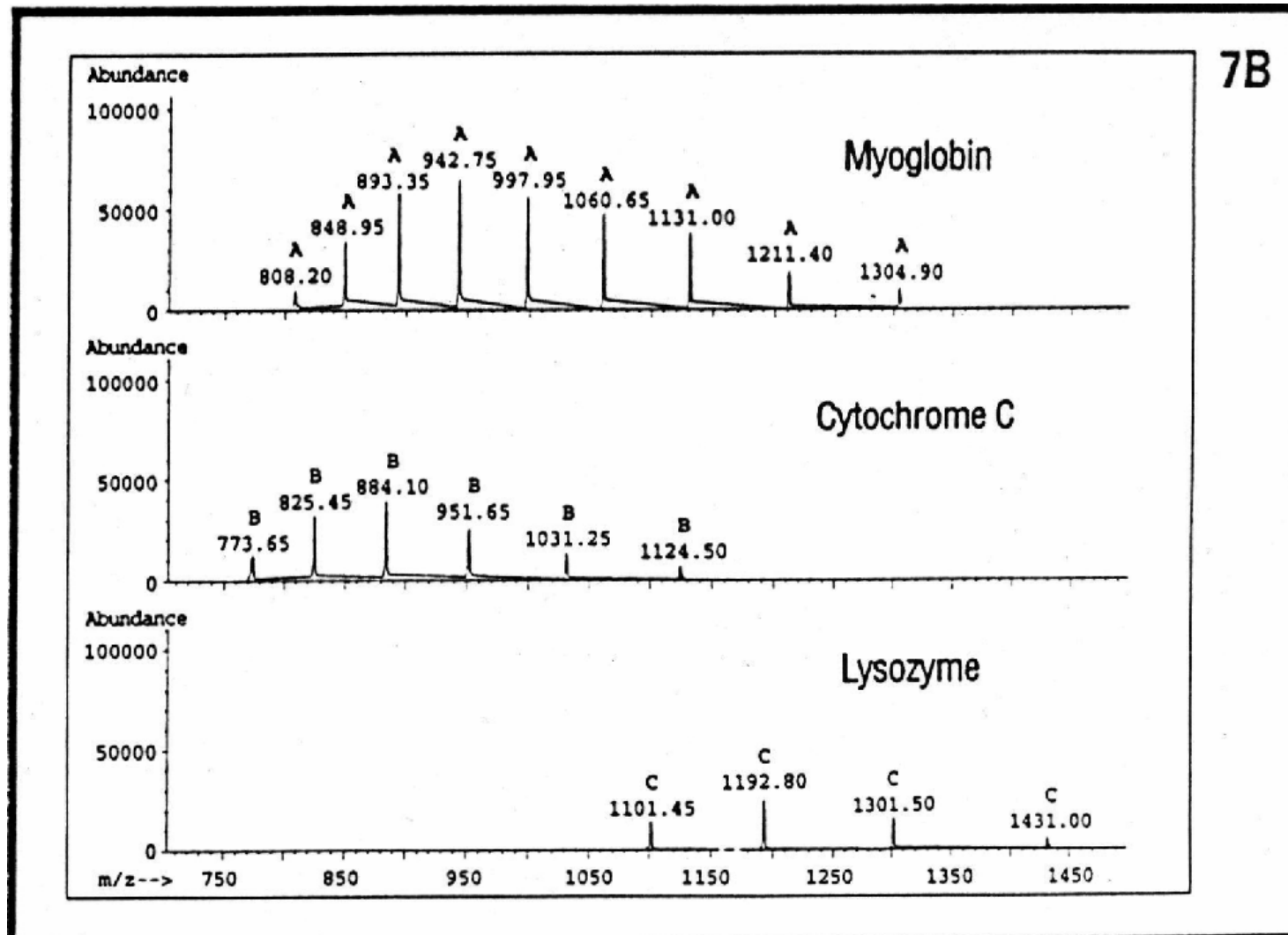
- *Určení molekulové hmotnosti ( $M$ ) tří proteinů ve směsi:*



- Spektrum směsi cytochromu C, myoglobinu a lysozimu

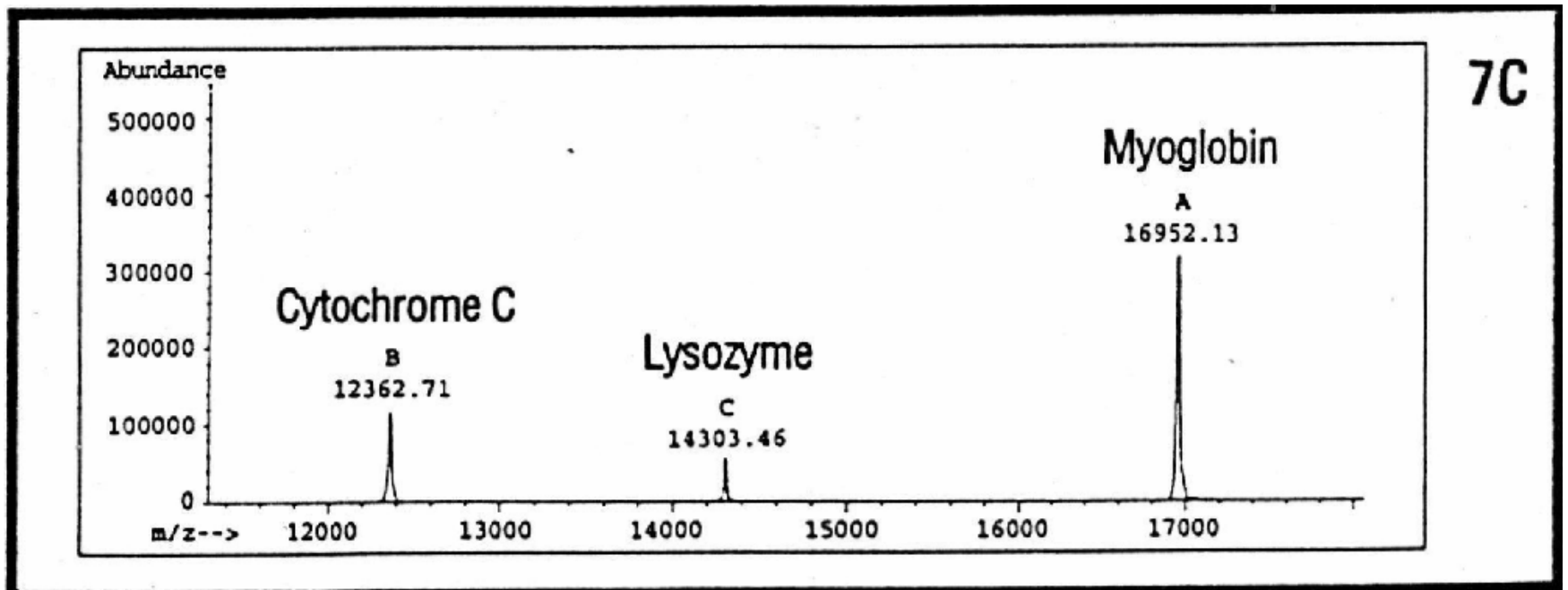
■ *Určení M tří proteinů ve směsi:*

- pokrač.



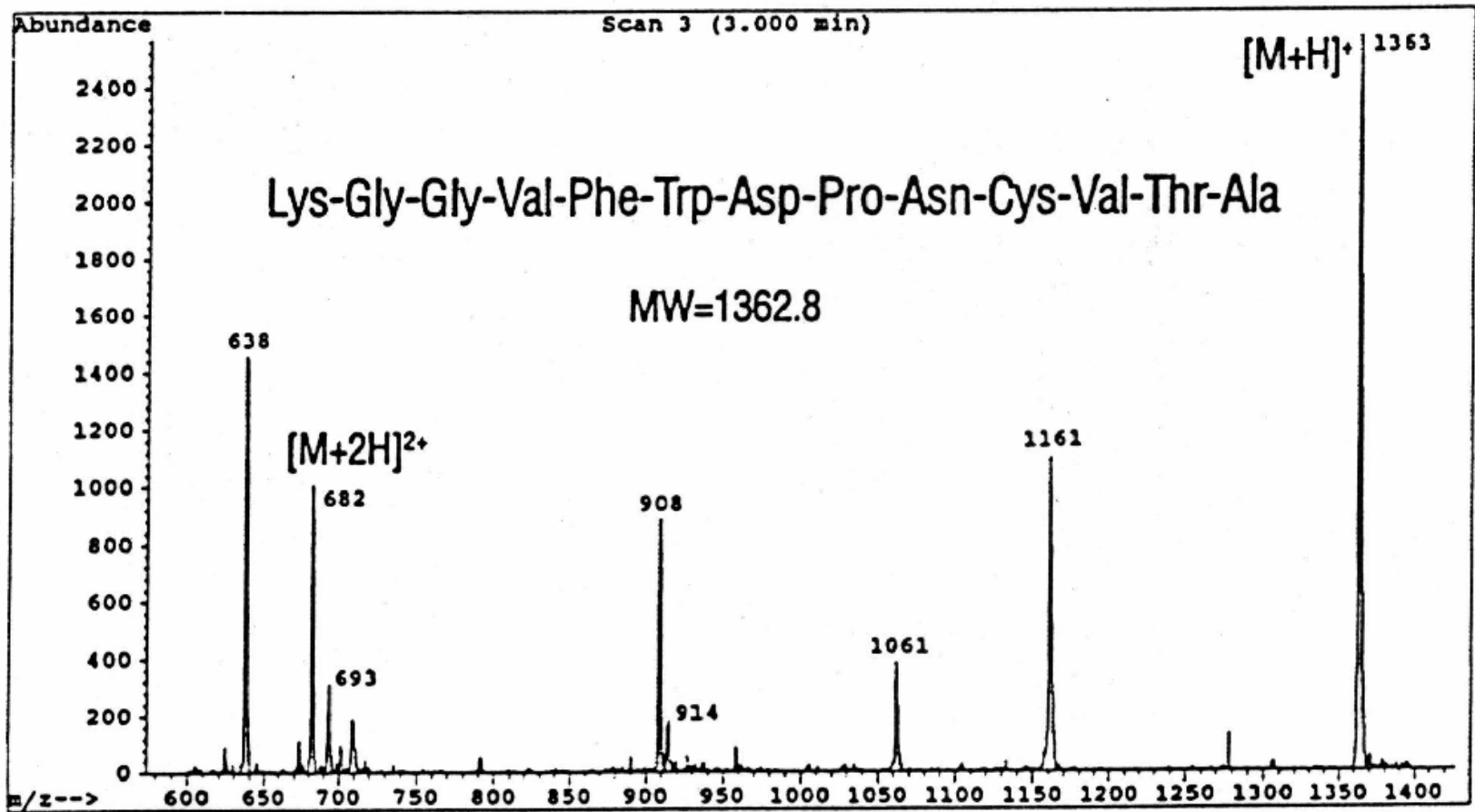
- Počítačová dekonvoluce výchozího spektra směsi

- *Určení M tří proteinů ve směsi:* - pokrač.



- Automaticky počítačově vypočítané M tří sloučenin

■ *Potvrzení syntézy peptidu prostřednictvím ES:*



- Peptid KGGVFWDPNCVTA s molekulovou hmotností 1362 Da
- Peptid obsahuje jedno a dvojně nabitě ionty a fragmenty

# API - opakování (viz. již přednáška č.4)

**ESI**

(velice podobné uspořádání iontových zdrojů)

(elektrosprej)

(realizovatelnost díky výkonným vývěvám)

(pro kladné i záporné ionty) (podobná citlivost)

**APCI**

■ **Princip:** ionizace prostřednictvím *koronárního výboje*

APCI nebo  *$\beta$  zářiče*

■ **Výsledek:** vznik aduktů s molekulami mobilní fáze

solí -  $[M+1]^+ \Rightarrow H$ ,  $[M+23]^+ \Rightarrow Na$ ,  $[M+39]^+ \Rightarrow K$ ,  
 $[M+18]^+ \Rightarrow NH_4$  apod.)

! voda, metanol, aceton apod. mohou také ionizovat !

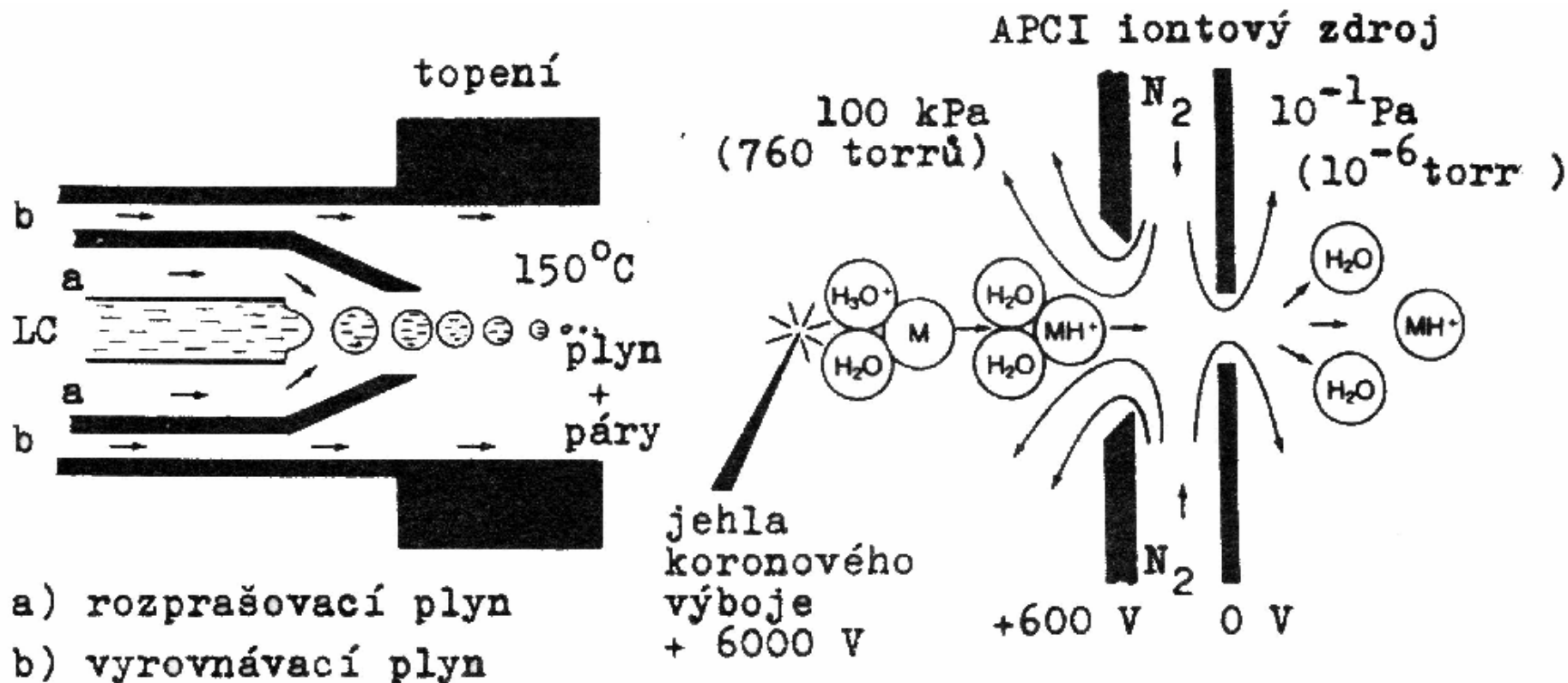
(na konci kapiláry dochází ale obecně k odpaření rozpouštědla)

■ u  $CI^-$  vzniká často  $[M-1]^-$

■ **Metoda umožňuje** určení molekulové hmotnosti až do 200 kDa

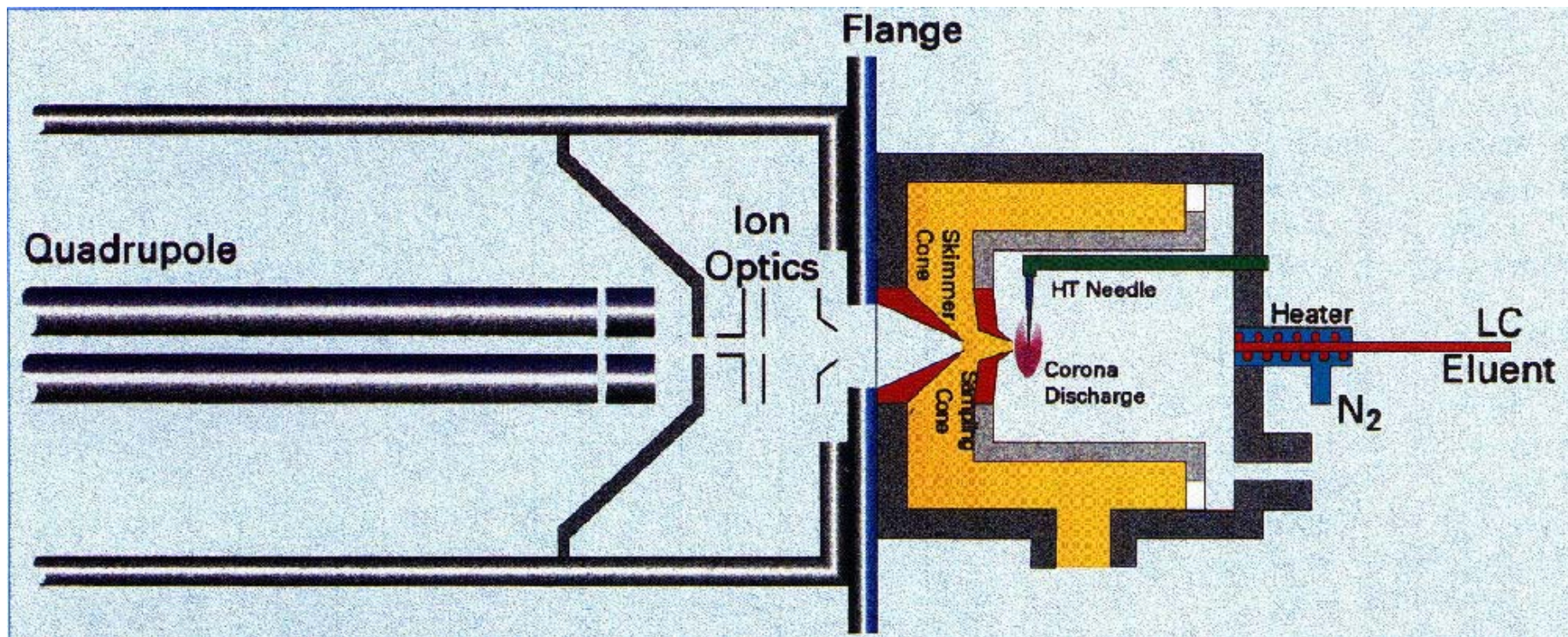
**! Na rozdíl od ES - vznik vícemocně nabitých iontů eliminován !**

- *Schematické znázornění zdroje pro APCI:*



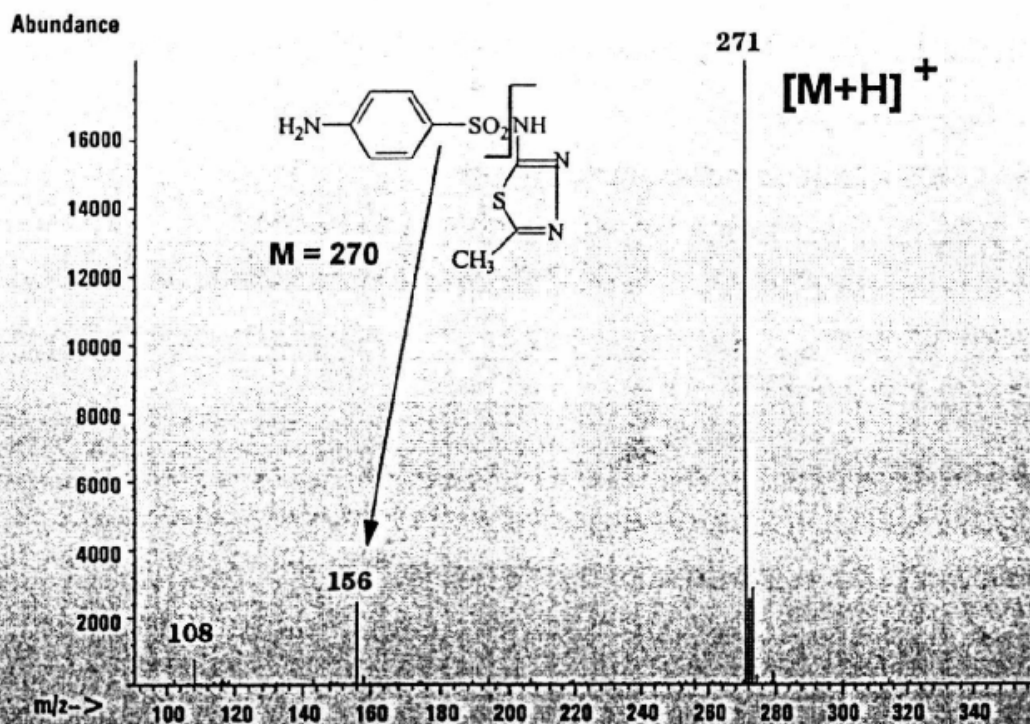
*Pozn.:* v jiných literárních zdrojích je uváděna teplota 300 – 600°C

- *Schematické znázornění zdroje pro APCI: - pokračování*



■ *Analýza látek prostřednictvím APCI:*

**APCI Mass Spectrum of Sulfamethizole**

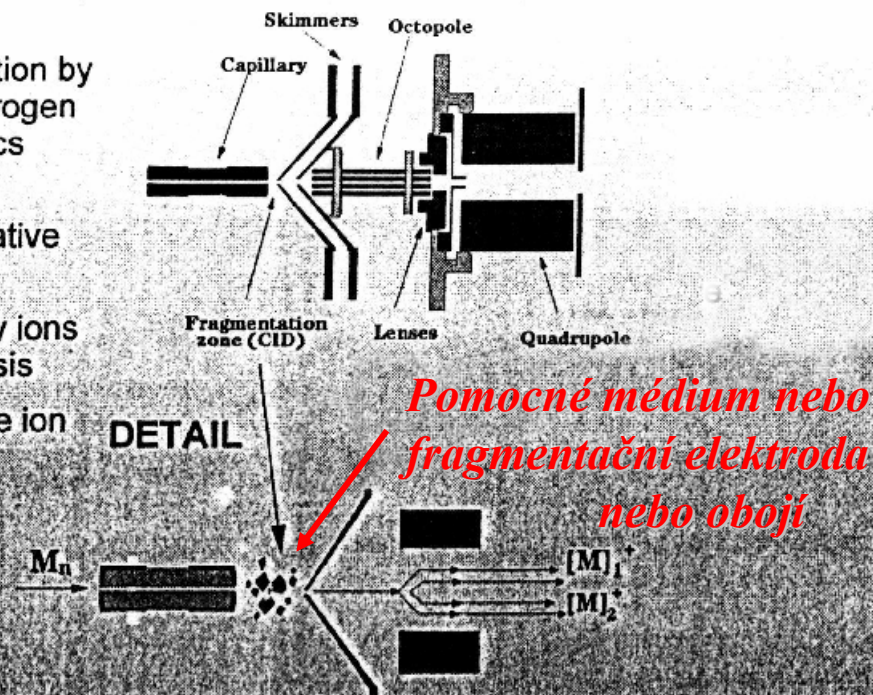




# Kolizí indukovaná disociace (*CID*)

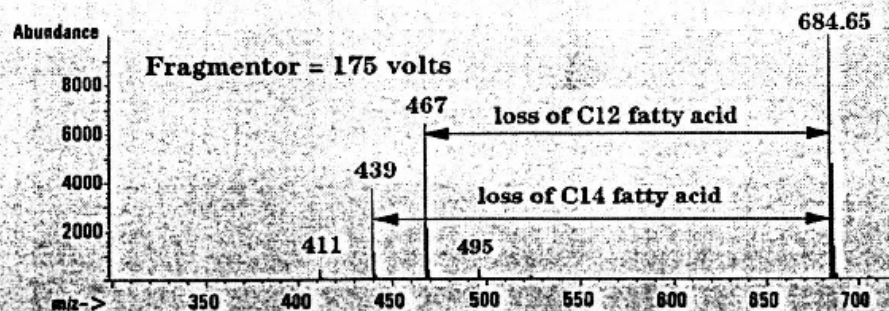
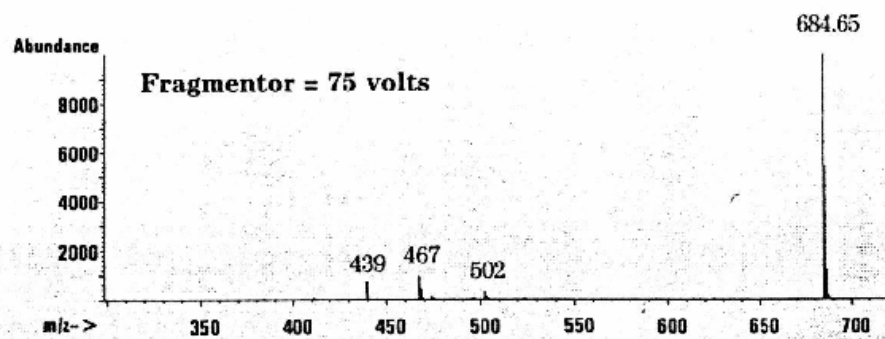
## What is CID (Collision Induced Dissociation)?

- Molecular fragmentation by ion collisions with nitrogen molecules in ion optics
- Provides structural information for qualitative analysis
- Provides confirmatory ions for quantitative analysis
- Controlled via a single ion optics parameter – "fragmentor"



■ *Příklad aplikace techniky CID:*

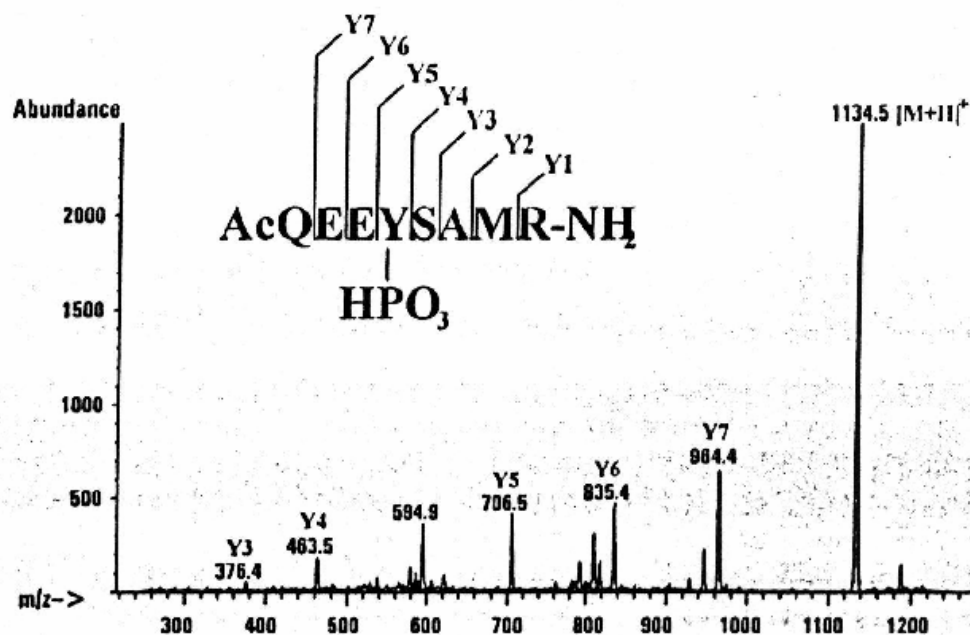
**In-Source CID of a Triglyceride**



■ *Příklad aplikace techniky CID:*

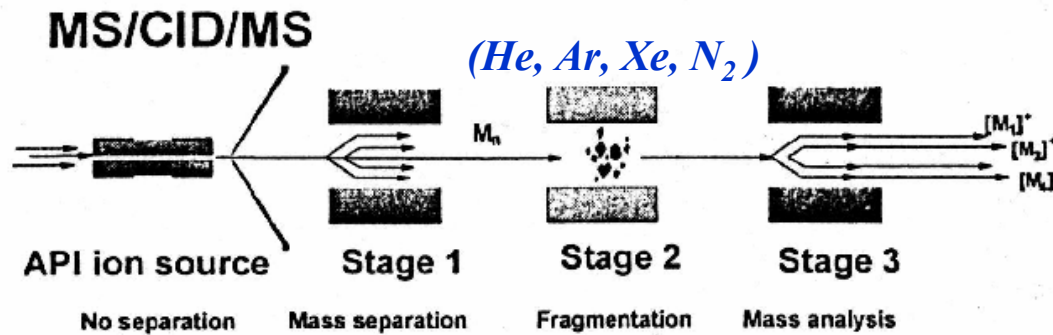
- pokrač.

**In-Source CID of a Phosphopeptide**

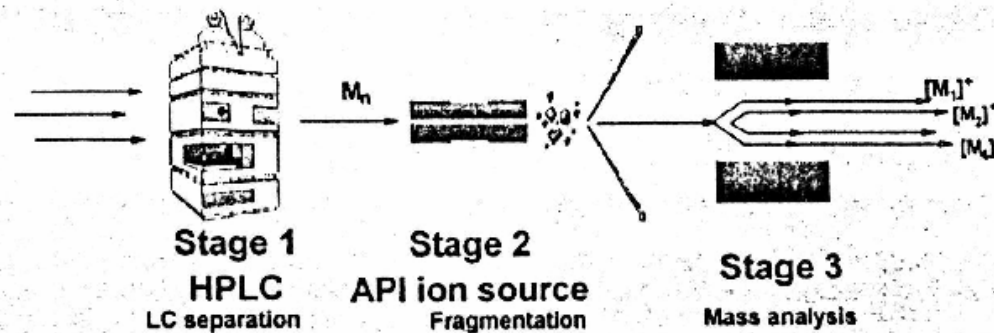


■ *Srovnání techniky MS/CID/MS a LC/CID/MS:*

**MS/CID/MS and LC/CID/MS**



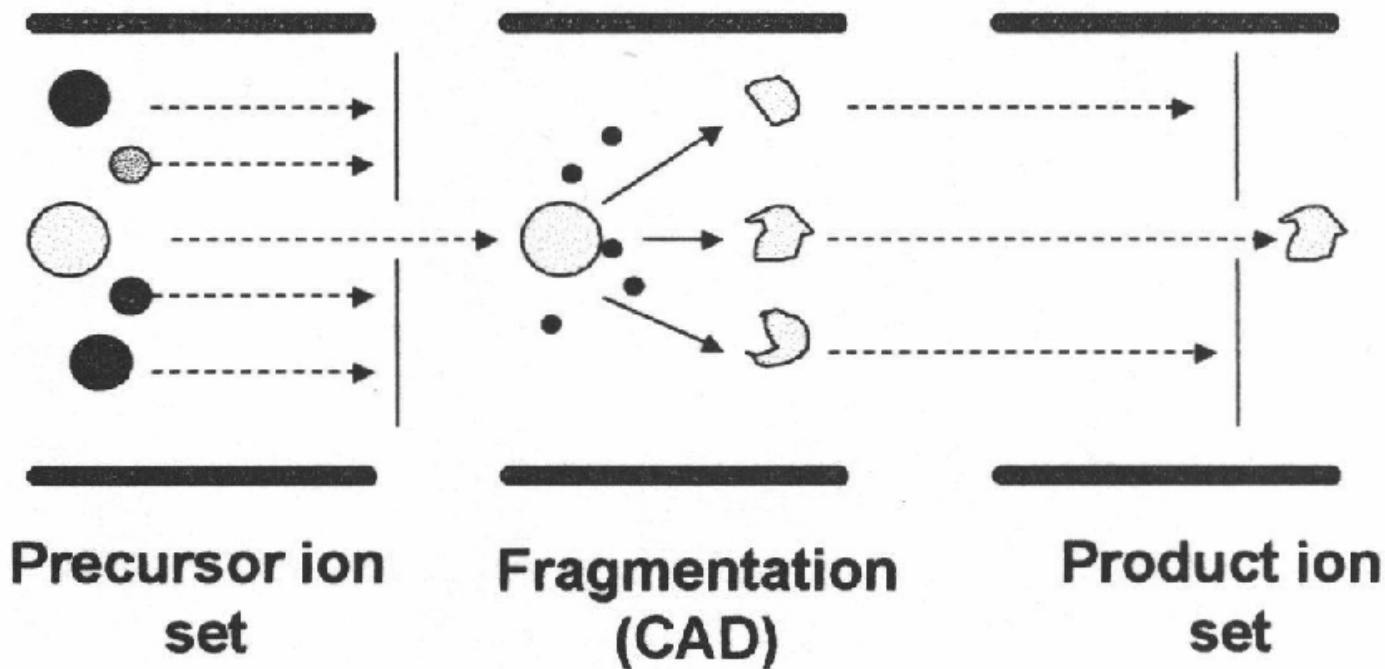
**LC/CID/MS**



- *Schematické znázornění techniky trojitého quadrupólu:*

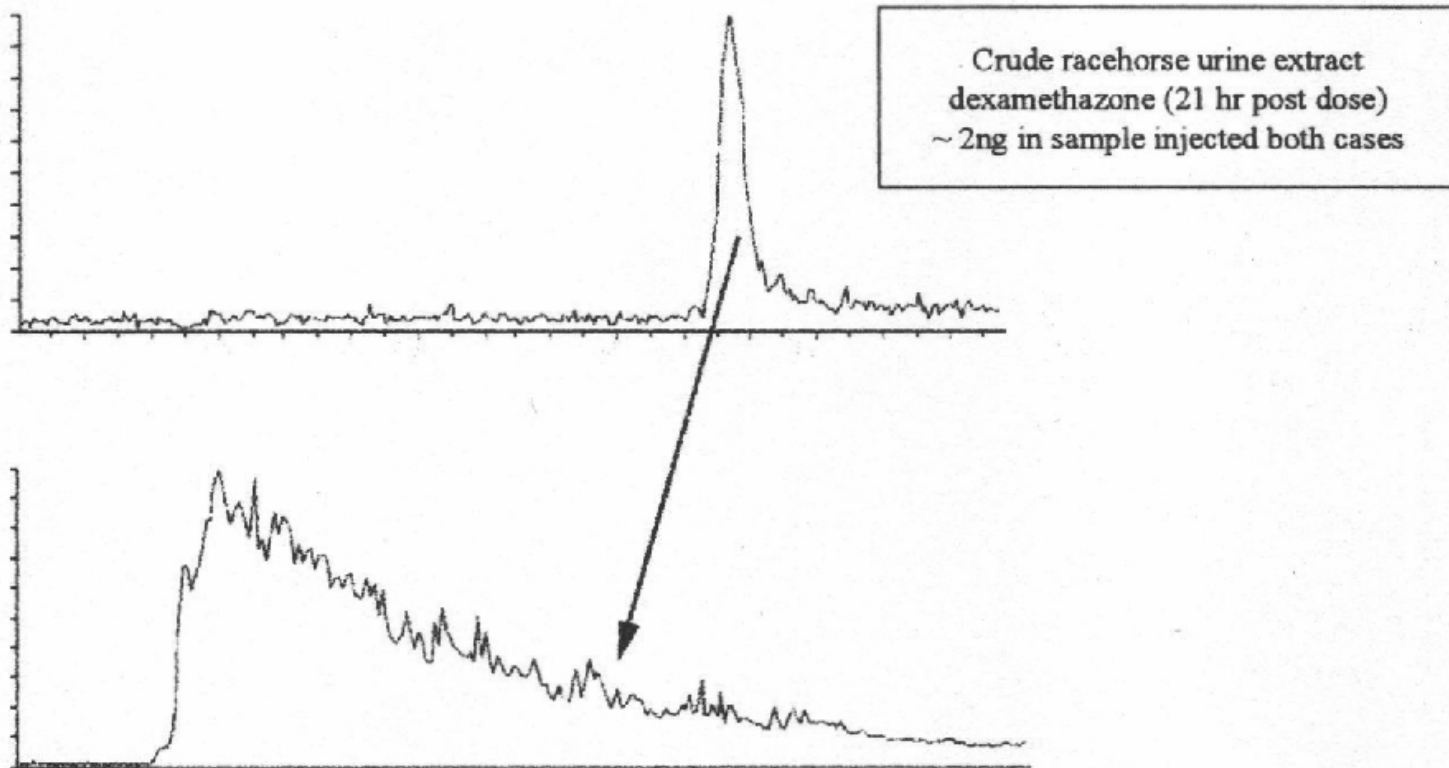
## MS/MS-System

### Multiple Reaction Monitoring (MRM)



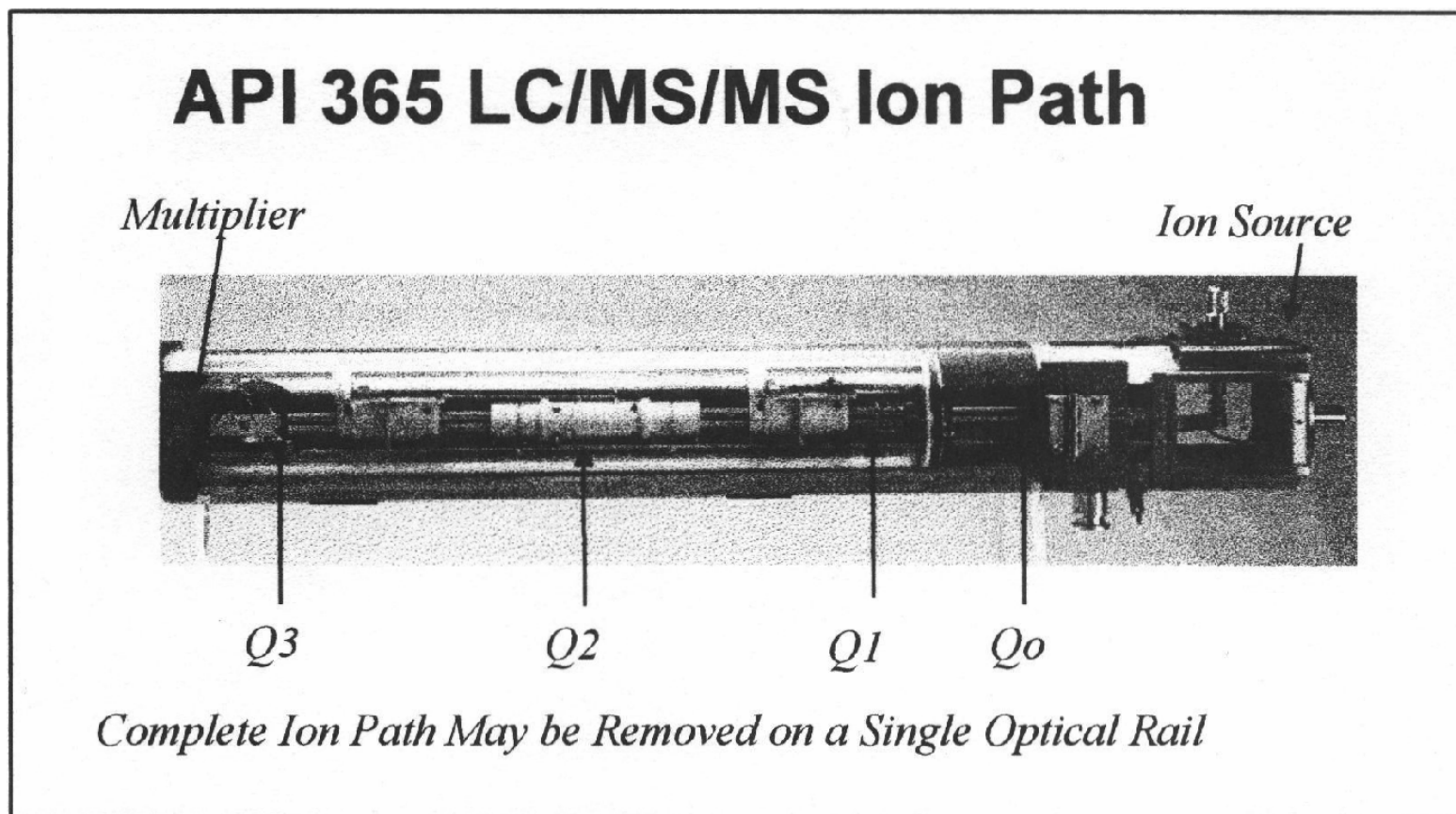
- *Srovnání citlivosti jednoduchého a násobného dělení (jediný a dvojitý quadrupólový analyzátor):*

## Selectivity of LC/MS/MS vs. LC/MS



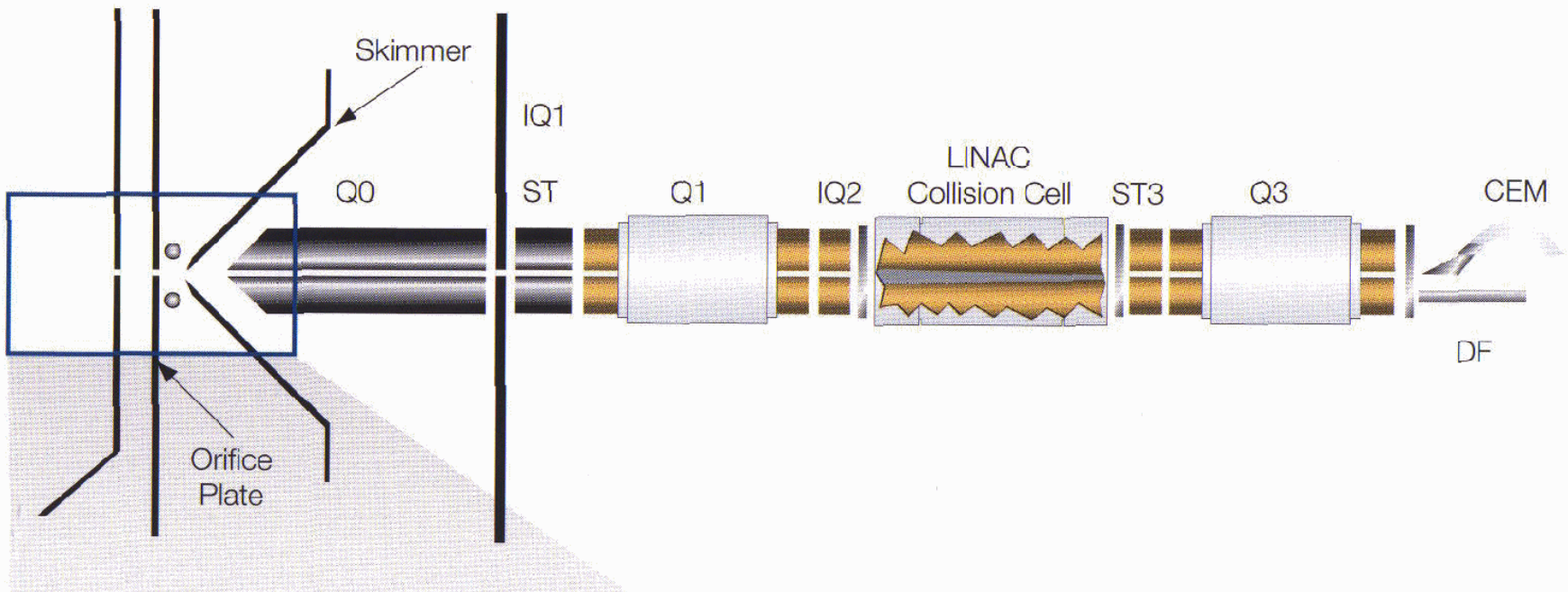
# Komerční přístroje pro LC/MS (*CID*)

- *Schematický obrázek přístroje od firmy Perkin Elmer (skupina Applied Biosystems):*



- *Schematický obrázek přístroje od firmy Perkin Elmer (skupina Applied Biosystems):*

**API 3000™ system ion path with LINAC™ collision cell**



*The patented LINAC™ high-pressure collision cell accelerates ions through the collision quadrupole, providing increased sensitivity at greatly reduced dwell times.*



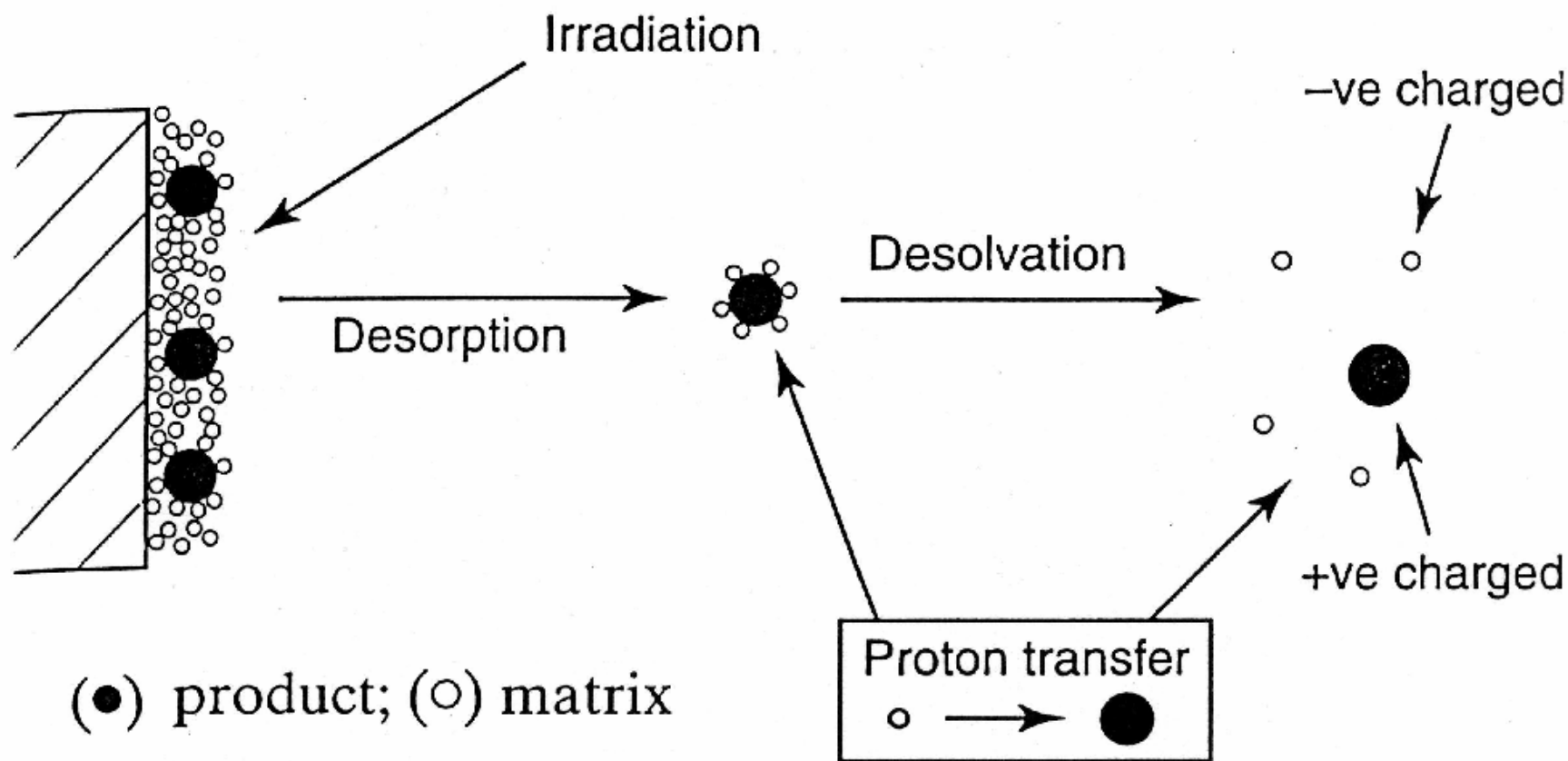
# Matrix assisted laser desorption ionization (*MALDI*) coupled with (*TOF*) analyser

## ■ **Princip:**

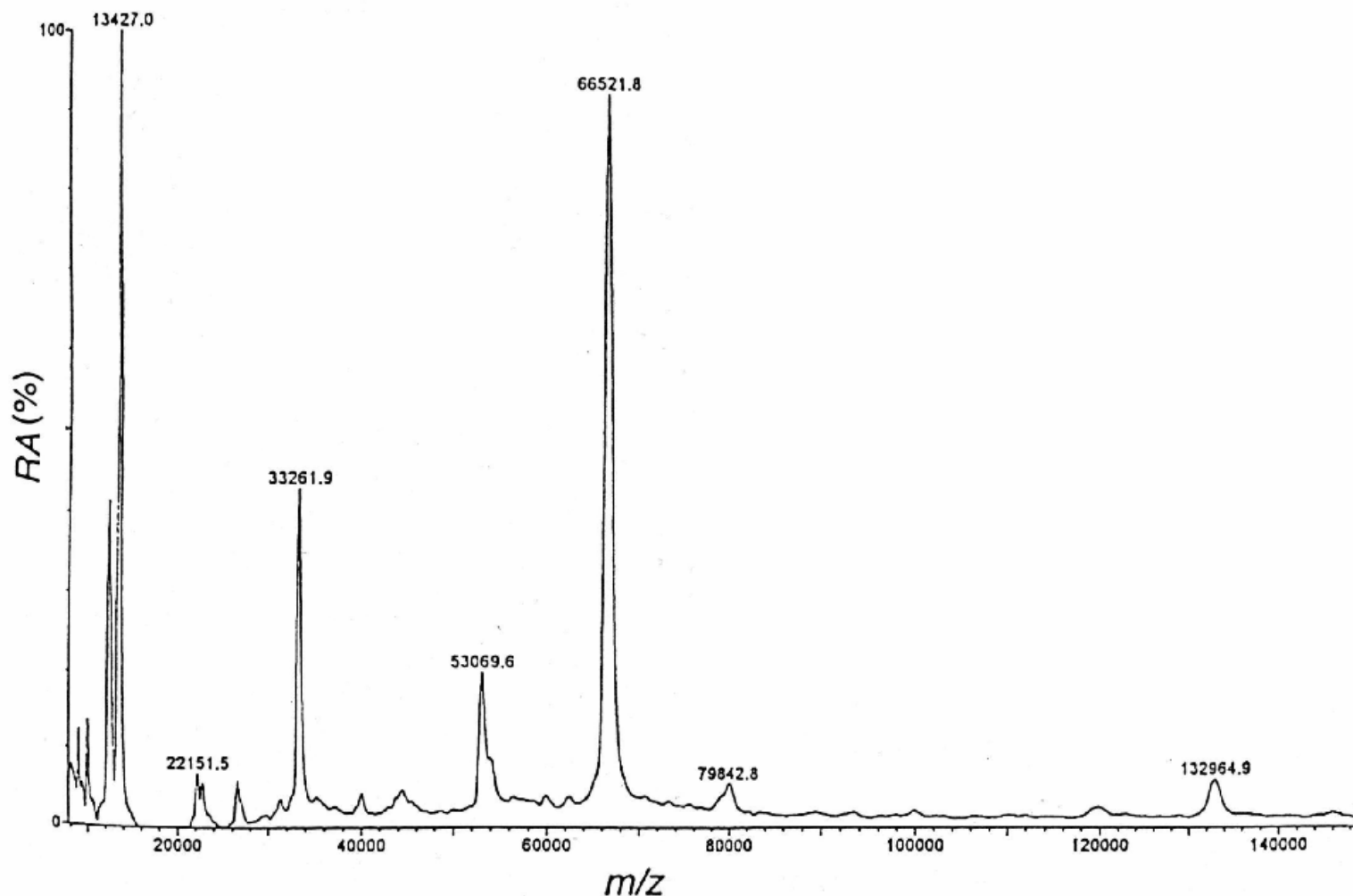
*(glycerol, Li soli, slabé arom. kyseliny)*

- Na podložku na které je nanesen vzorek v prostředí matrice (pomocné médium) je zaměřen pulsní laserový paprsek
- Část matrice se vzorkem je odpařena a ionizována (spolupůsobení pomocného ionizujícího média). **Pozn.** *soli neinterferují se vzorkem (ovlivnění výsledného spektra)*
- Technika je relativně energeticky šetrná (závislost na  $E_{\text{paprsku}}$ )
- Nedochází ke vzniku několikanásobně nabitých iontů jako u elektrospreje a je velice omezena fragmentace
- Ionizační technika kombinována s analyzátozem doby letu (*TOF*), který je schopen velice rychle indikovat ionty až do ca 100 kDa
- **Důležité:** technika šetrná pro termicky labilní látky a velice účinná pro analýzu biomolekul

■ *Schematické znázornění spojení MALDI/TOF:*



- *Hmotnostní spektrum albuminu z hovězího séra v matrici kyseliny sinapinové získané technikou MALDI/TOF (kyselina 3,5-dimetoxy-4-hydroxyskořicové)*



---

---

## Interfacing HPLC to MS

---

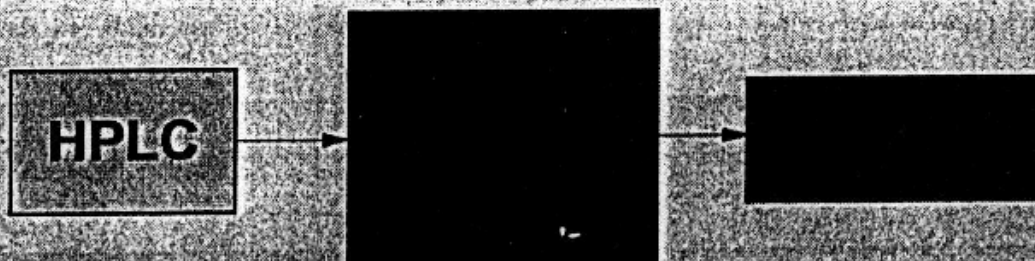
---

- **HPLC**

- High pressure liquid phase separation
- Produces high gas load
- Near-ambient temperature
- No mass range limitation
- Can use inorganic buffers

- **MS**

- High vacuum required
- Tolerates limited gas load
- Elevated temperature
- Depends on  $m/z$  and analyzer
- Prefers volatile buffers



- *Aplikovatelnost techniky LC/MS v závislosti na molekulární hmotnosti látek a jejich polaritě*

