

Kõrgefektiivne vedelik- kromatograafia - massispektromeetria

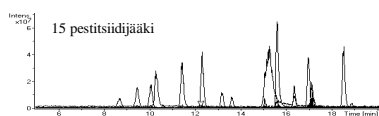
LC-MS

LC ja MS meetodid

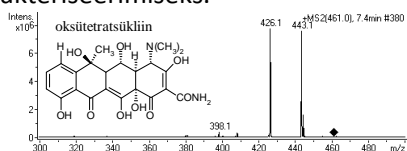
- LC (vedelikkromatograafia) - meetod(id) segude komponentide eraldamiseks.
- MS (mass-spektromeetria) - meetod ainest tekitatud **ioonide massi ja laengu suhte** (m/z) mõõtmiseks.

LC ja MS ainete segudes

- LC - ongi ette nähtud segude lahutamiseks.



- MS - eriti efektiivne just individuaalsete ühendite karakteriseerimiseks.



LC ja MS tulemused

- LC tulemusena saadakse üksteisest eraldatud komponendid (lahustatuna mobiilses faasis).
- MS spektrist võib saada aine kohta järgmist infot:
 - molekulmass
 - laeng
 - molekuli struktuur

Ühendame LC ja MS kokku!

LC ja MS töökeskkond

- LC segude lahutamine toimub vedelas faasis, komponendid saadakse lahustatuna **eluendis**.
- MS vajab ionide juhtimiseks ja registreerimiseks kõrget **vaakumit**.



?

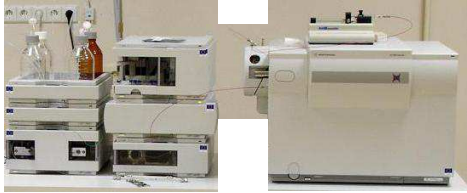


LC ja MS sobitamine

- LC ja MS ühendav liides peab tagama LC poolt eraldatud ainete sisenemise mass-spektromeetrisse.
- Liides peab vältima eluendi pääsu mass-spektromeetrisse.
- Liides LC väljundi ja MS sisendi vahel on olnud suurimaks takistuseks LC-MS meetodi levikul.

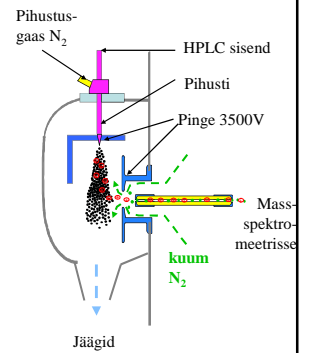
ESI – elektropihustus-ionisatsioon

- Elektropihustus-ionisatsiooni uurimise eest omistati **John B. Fennile** 2002. aastal Nobeli preemia (tema 1980-1989 tööde eest).



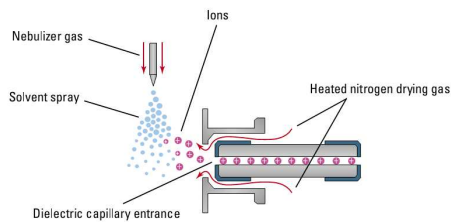
API-ESI-MS

- LC-st väljuv vedelikuvoov pihustub elektrivälja toimel peeneteks laenguga tilgakesteks.
- Analüüdi ioonid aurustuvad tilkadest.
- Ioonid juhatakse MS sisendisse.



API ionallikad

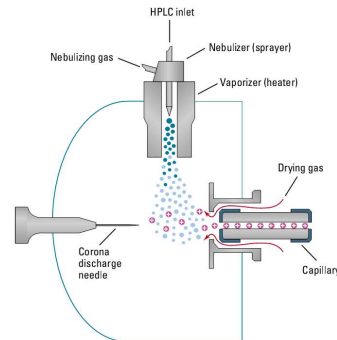
- API (*atmospheric pressure ionization*) LC ja MS liides, milles ionisatsioon toimub atmosfäärirõhul.
- ESI (*electrospray ionization*) - elektrivälja abil genereeritakse laetud tilgakesed, millest aurustuvad analüüdi ioonid.



Agilent Technologies
Innovating the HP Way

API ionallikad

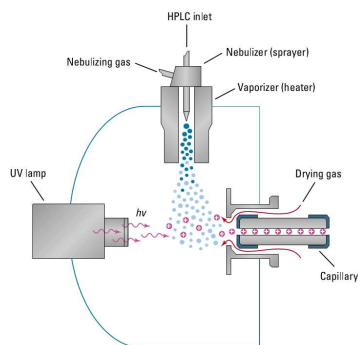
- APCI (*atmospheric pressure chemical ionization*) - gaasifaasiline keemilise ionisatsiooni (CI) protsess, kus solvent osaleb CI reagentina ja ioniseerib analüüdi molekule.



Agilent Technologies
Innovating the HP Way

API ionallikad

- APPI



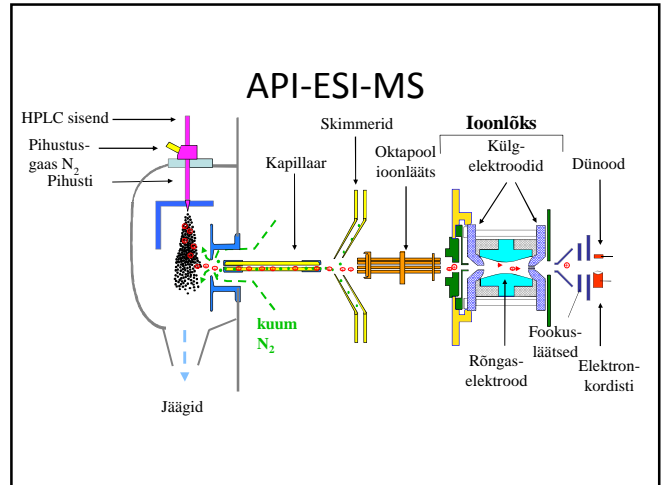
Agilent Technologies
Innovating the HP Way

- (AP-MALDI)

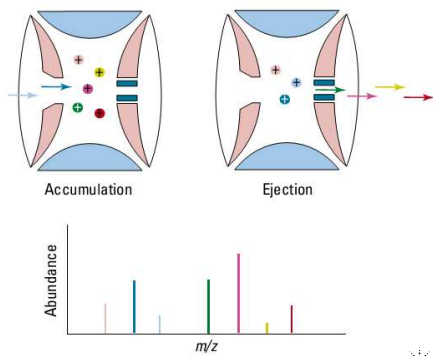
Massianalüsaatorid

Ioonlõks-MS

- IT (*ion-trap*) - ioonlõks
- Ioonlõks koosneb ringelektroodist ja kahest külgelektroodist.
- Ringelektroodile rakendatakse raadiosageduslik pinge, mis tekitab lõksus pulseeriva välja.
- Pulseeriv väli lõksustab raku sattunud ioonid.
- Ringelektroodi pinge amplituudi suurenedes väljuvad ioonid lõksust alates väiksemast massist.

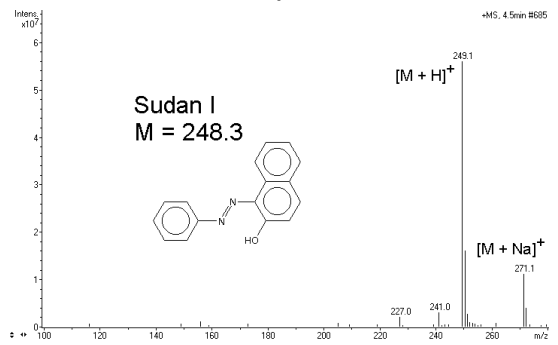


Ioonlõks



Agilent Technologies
Innovating the HP Way

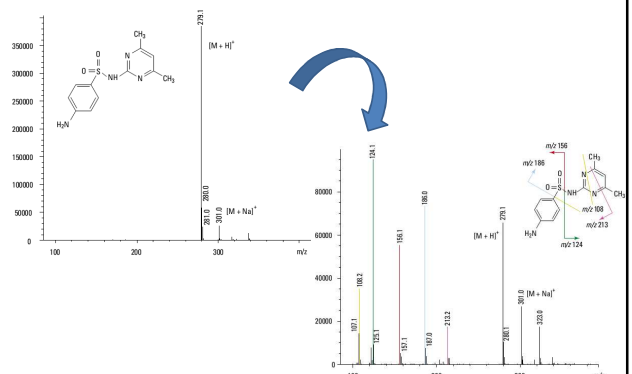
Mass-spekter



MS², MS³ ... MSⁿ

- Ioonlõks-MS võimaldab registreerida ka ionide fragmenteerimisel saadavaid mass-spektreid.
 - Isoleeritakse analüüdi ioonid.
 - Fragmenteeritakse.
 - Skaneeritakse fragmentioonide spekter
- Isoleerimist-fragmenteerimist võib korrata n -korda, mis annab MSⁿ-spektri.
- MSⁿ-spektrid annavad analüüdi struktuuri kohta lisainfot.

Collision-induced dissociation (CID)



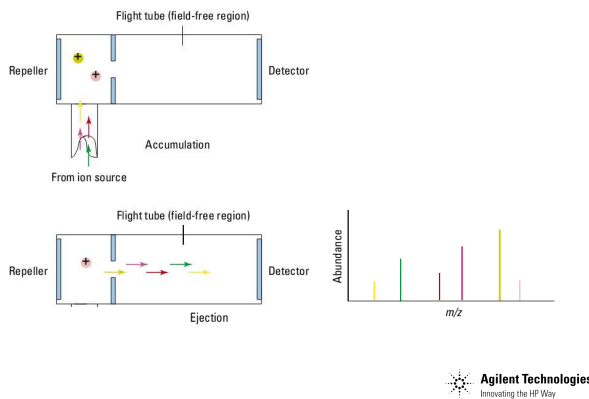
Olulist ioonlõksu MS-töotsükli

- Ioonlõksu töö on tsükliline: ioonide sisenemine, stabilisatsioon ja väljaskaneerimine.
- Ioonlõks võimaldab ioone koguda:
 - (+) suureneb tundlikkus
 - (-) lõksu ülelaadimise oht (vähendab lahutusvõimet)

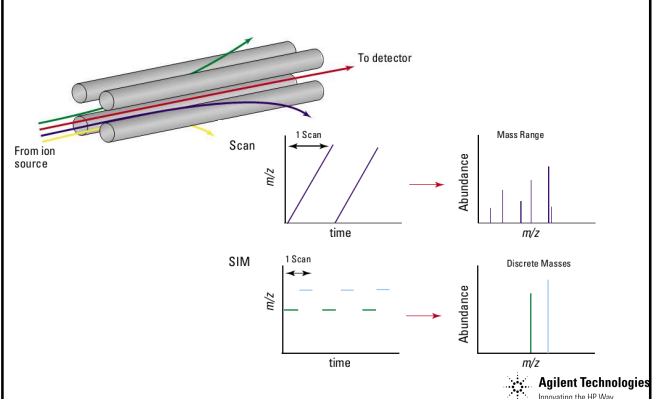
Olulist ioonlõksu MSⁿ-töotsükli

- Eellas-ioonide isoleerimine ja fragmenteerimine toimub samas kohas - ioonlõksus. Kõik see võtab aega ...
- Ioonlõksus tekkinud fragmentioonid ei oma liigset energiat ega fragmenteeru seetõttu edasi. Ioonlõksu MSⁿ spektris on fragmentioonidel suuremad massid ja saadavad spektrid on reprodutseeruvad.

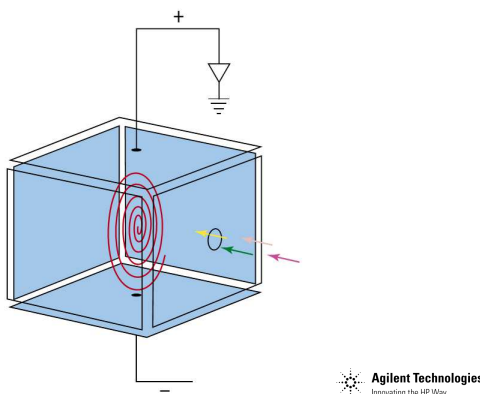
Lennuaia MS – Time-of-flight (TOF)



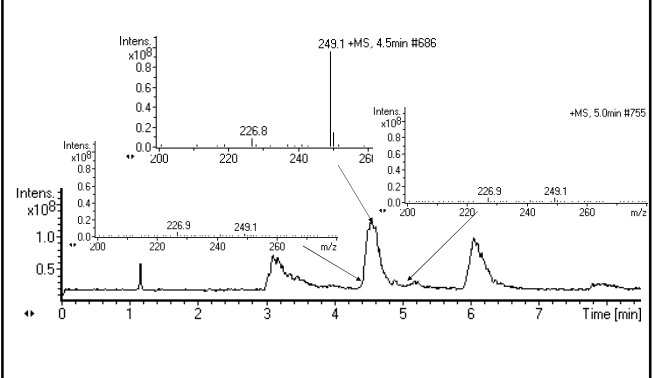
Kvadrupool MS



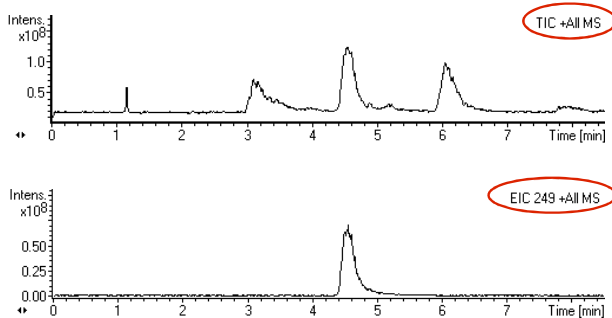
Fourier¹ teisendusega ioonsüklotron resonants (FT-ICR)



Mass-kromatogramm (TIC)



Mass-kromatogramm (EIC)

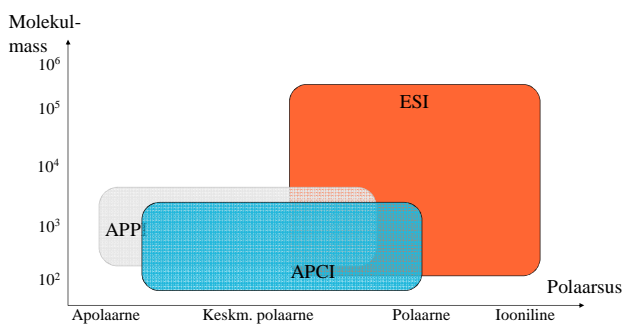


LC-MS meetodi plussid

- Väga tundlik meetod. Näiteks:
 - pestitsiidijääkide määramisel sisestatakse 0.01 ppm standardlahust 10 µl.
- Annab lisainfot:
 - molekulmass
 - struktuuri kohta (MSⁿ)

Märkus. LC-MS jaoks mass-spektrite teke saada ei ole, kuna spektrid sõltuvad instrumendi tüübist ja seadistusest.

LC-MS rakendusala



Mida saab LC-MS meetodil analüüsida?

- Keelatud (piiratud) lisandid toiduainetes. Näiteks:
 - pestitsiidijäägid
 - sudaanid
 - veterinaaria preparaadid lihas ja piimas (antibiootikumid)
- Keskkonna-analüüsid
- Toiduainete koostis, näiteks:
 - vitamiinid
 - toiduaine autentsuse tõestamine

Mida saab LC-MS meetodil analüüsida?

- Keemia ja farmaatsiatööstus
 - Sünteesiproductide tõestamine
 - Võimalike kõrvalproduktide analüüs
 - Molekulmasside jaotuse ja polüdisperssuse määramine polümeerides
 - Orgaaniline peensüntees
 - Ravimite väljatootamine

Mida saab LC-MS meetodil analüüsida?

- Narkootiliste ainete tuvastamine (ka organismis).
- Dopingainete tuvastamine.
- Meditsiin. Näiteks:
 - ravimi sisalduse jälgimine organismis
 - vastsündinute skriining (metabolismi häired)
- Proteoomika.
- Farmaatsia.

LC-MS meetodi plussid

- LC-MS puhul on määratava aine jaoks põhiliselt vaid üks nõue:
 - Aine peab olema suhteliselt polaarne
- Erinevalt GC-MS meetodist puuduvad LC-MS puhul paljud piirangud:
 - Aine molekulmass võib olla väga suur, kuni 100 000
 - Määratav aine ei pea olema lenduv
 - Määratav aine võib olla iooniline
 - Määratav aine võib olla termiliselt ebapüsiv

LC-MS eluendid

- Vesi
- Metanool
- Atsetonitril
- Heksaan
- Iso-propanool
- ...

Eluendi modifikaatorid

- Kõik lisandid peaks olema lenduvad!
 - sipelghape, äädikhape
 - NH_4OH
 - NH_4OAc
 - dietüülamiin, trietüülamiin
- Kontsentratsioonid < 10 mM (ESI), < 100 mM (APCI)
- ...

Agilent 1100 Series LC-MSD Trap-XCT

- Vedelikkromatograaf
 - degasaator
 - binaarne pump solvendi valiku klapiga (0.001 - 5 ml/min)
 - autosampler (0.1 - 100 μl)
 - kolonni termostaat kolonni valiku klapiga (kuni 80°C)
 - dioddrivi (DAD, PDA) detektor (190 - 950 nm)
- Ionisatsiooniallikad
 - ESI (voolukiirused kuni 1 ml/min)
 - APCI (voolukiirused kuni 1.5 ml/min)

Agilent 1100 Series LC-MSD Trap-XCT

- Massispektromeeter
 - ioonlõks, MS ... MS¹¹
 - tundlikkus: 1 pg reserpiini annab signaal-müra suhte 50:1
 - Lahutusvõime:

Režiim	Mass (m/z)	Piigi laius (FWHM)	Kiirus amu/s
UltraScan	50 - 2200	0.6	26 000
Enhanced	50 - 2200	0.35	8 100
Maximum	50 - 2200	0.25	800
Extended	200 - 4000	3	27 000

Polüetüleenglükool

- PEG-1500

