

Spojení MS a separačních technik

Spojení hmotnostní spektrometrie a separačních technik

Proč spojení?

- můžeme v jedné analýze zároveň separovat i identifikovat složitou směs látek, kombinace výhod obou technik
- alternativní způsob spočívající v izolaci látek po jejich chromatografické separaci a následném změření hmotnostních spekter pro jednotlivé látky off-line technikou je pracný, časově náročný a pro složitě směsi látek nebo látky ve stopové koncentraci ve směsi nemusí být vůbec proveditelný

Proč bylo technické řešení spojení GC/MS a zejména HPLC/MS složité?

- rozdíl tlaků mezi hmotnostním analyzátozem (např. kvadrupól či iontová past 10^{-3} Pa) a analyzovanými látkami vstupujícími do iontového zdroje za atmosférického tlaku (tj. 10^5 Pa) je nejméně 8 řádů, pro další typy hmotnostních analyzátozů ještě více, např. TOF (vakuum 10^{-5} Pa, tj. 10 řádů rozdíl) nebo FT-ICR (vakuum 10^{-10} Pa, tj. rozdíl 15 řádů)
- navíc analyzované látky jsou nesený v toku plynu (GC, průtok u kapilárních kolon asi 1 ml/min) nebo kapaliny (HPLC, asi 1 ml/min nebo méně), které jsou v obrovském nadbytku a musí být odstraněny před vstupem do vakuové části přístroje, v současnosti již rutinní použití

GC/MS

Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC/MS)

- **1957** první spojení **GC/MS** (Holmes, Morrell), 1967 první komerční GC/MS
- 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
- v současnosti zcela rutinní metoda, téměř výhradně se používá ve spojení s kapilárními kolonami (průtok ca. 1 ml/min)
- nosný plyn s analytem se zavádí přímo do iontového zdroje ve vakuu, kde vakuový systém odstraní přebytečný nosný plyn
- kapilára je před vstupem do iontového zdroje vyhřívána, aby nedocházelo ke kondenzaci analytů při přechodu do vakua
- iontové zdroje: EI nebo CI
- použití EI umožňuje přímé softwarové porovnání naměřených spekter s knihovny spekter v počítači (stovky tisíc spekter)
- hmotnostní analyzátoři: Q, IT, TOF, QqQ

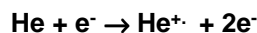
Použití knihoven EI spekter u GC/MS

- výsledkem počítačového porovnání neznámého spektra s knihovnou jsou nejpravděpodobnější možnosti (např. pro prvních 20 možností) seřazené podle klesající podobnosti spekter s vyjádřením **koeficientu shody** v procentech
- obvykle se používají dva způsoby porovnání:
 - a/ **přímý** (forward) - software hledá všechny ionty z knihovního spektra ve spektru neznámé látky
 - vše co chybí oproti knihovnímu spektru zhoršuje koeficient shody
 - co je ve spektru navíc (např. nečistoty) na koeficient shody nemá vliv
 - b/ **zpětný** (reverse) - počítač se snaží najít všechny ionty z neznámého spektra v knihovním spektru
 - všechny píky, které jsou ve spektru navíc zhorší shodu porovnání
- vysoký koeficient shody není důkazem správnosti identifikace, ale pouze velmi rychlou a cennou pomůckou kvalifikovaného operátora, který musí posoudit rozdíly ve spektrech, zejména v případě horší shody nebo významnějších rozdílů ve spektrech
- „běžné“ a dosud popsané látky pravděpodobně v knihovně budou, nově syntetizované látky či látky omezeného významu mohou chybět, pak knihovní porovnání pouze prvním vodítkem a dokončení interpretace musí operátor provést manuálně

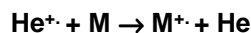
Rozdíl mechanismu ionizace oproti „klasické“ EI

- nosný plyn v GC/MS je výhradně helium, protože lze snadno odčerpávat vakuovými pumpami a také se aktivně účastní ionizačního mechanismu

1/ He je ionizováno urychlenými elektrony:



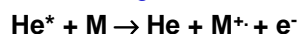
a vzniklé ionty potom ionizují analyt **přenosem náboje** („Charge transfer“)



2/ anebo může dojít k vybuzení helia do excitovaného stavu:



a následné **Penningově ionizaci** (na tomto mechanismu je založen DART)



HPLC/MS

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

- **1973** první spojení **HPLC/MS** (Baldwin, McLafferty), 1977 první komerční LC/MS
- technicky mnohem náročnější ve srovnání s GC/MS
 - místo 1 ml/min nosného plynu (pro GC/MS) musíme před vstupem do hmotnostního analyzátoru odstranit 1 ml/min kapaliny (pro HPLC/MS)
 - př. 18 ml vody ($1, 1 \text{ mol}$) = 22.4 l plynu, tzn. 1 ml vody je po odpaření 1.2 l plynu
- u ionizačních technik pracujících za atmosférického tlaku (ESI, APCI, APPI) se mobilní fáze přímo účastní ionizačního procesu
- spektra není možné porovnávat s knihovnou, protože knihovny pro HPLC/MS spektra většinou neexistují, spektra se výrazně liší podle použité ionizační techniky, pracovních podmínek i typu přístroje (platí kromě EI) - spektra je nutné interpretovat manuálně (zkušenosti operátora, porovnání s analogickými typy látek či literaturou)
- výjimkou v tvorbě knihoven jsou specifické případy proteomických knihoven, laboratorní knihovny pro omezený rozsah látek (např. skupiny zakázaných drog, pesticidů či podobně definovaná skupina známých cílových analytů), většinou se jedná o knihovny MS/MS spekter (na rozdíl od MS spekter u GC/EI-MS), převoditelnost knihoven mezi různými typy hmotnostních analyzátorů může přinést problémy kvůli významným rozdílům

HPLC/MS analýza

- použití HPLC umožňuje **separaci látek ve směsi** a tím **identifikaci stopových nečistot, izomerů**, atd.
- výsledek HPLC/MS analýzy je **záznam intenzity vybraných m/z v čase**
- hmotnostní spektra eluátu z HPLC měřená s určitou frekvencí – závisí na použitém analyzátoru (jeho skenovací rychlosti), šířce píku, požadavcích na analýzu, atd.
- měření spekter v celém rozsahu m/z nebo jen v určitém intervalu - ovlivňuje rychlost sběru spekter („sampling“)
- možnost **vyvolat spektrum v určitém čase**
- lze **průměrovat spektra** v určitém časovém intervalu (integrace píku)
- možnost vyvolat **záznam intenzity signálu určité m/z v čase**

Způsoby záznamu HPLC/MS analýzy

Celkový iontový proud

(Total Ion Current, TIC)

- součet intenzit všech měřených iontů ve spektru (včetně šumu)

Chromatogram základního píku spektra

(Base Peak Chromatogram, BPC)

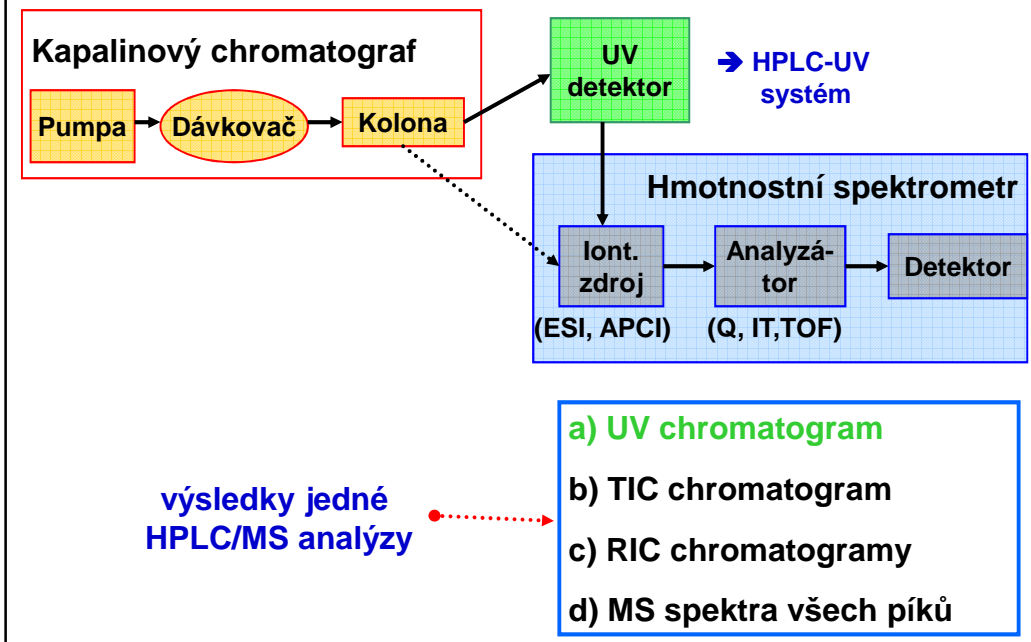
- záznam intenzity pouze základního píku spektra
- podobný TICu, ale není ovlivňován šumem nebo ionty s nízkou intenzitou

Rekonstruovaný iontový proud

(Reconstructed/Extracted Ion Chromatogram, RIC/EIC)

- zpětně vyvolaný záznam intenzity jedné m/z v čase
- identifikace koeluze píků
- identifikace stopových koncentrací v šumu, atd.

Schéma HPLC/MS systému



HPLC parametry (ne)ovlivňující MS spektra

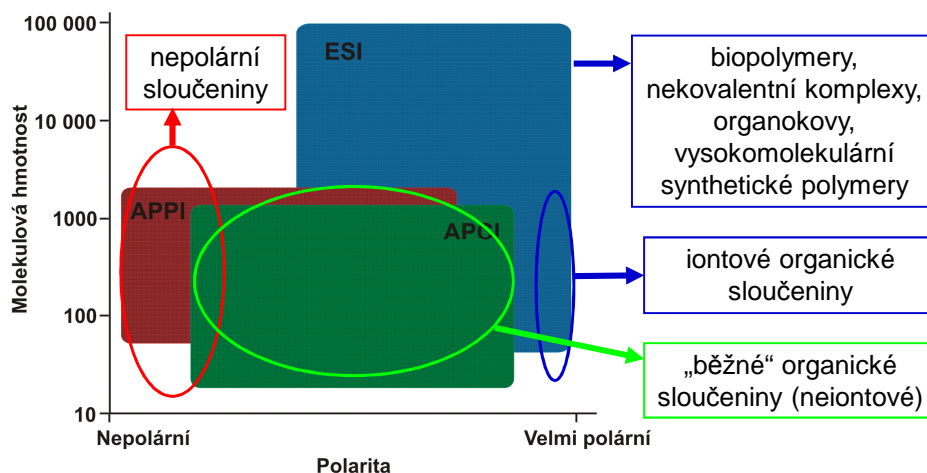
- HPLC podmínky musí zaručovat dobrou separaci látek a zároveň nesmí negativně ovlivňovat ionizaci a tím citlivost detekce, většinou se hledá vhodný kompromis
- **teplota separace** - nemá vliv
- **průtok mobilní fáze** - nemá přímo vliv na kvalitu signálu, ale nutné změnit průtoky sušících a zmlžujících plynů, příp. dělič toku
- **složení mobilní fáze** - zásadní vliv na kvalitu spekter
 - složení rozpouštědel, změna složení v čase - většinou ovlivnění ionizační účinnosti a tím intenzity signálu, změna v čase
 - obsah a složení aditiv - až úplné potlačení signálu, někdy naopak pro podporu ionizace (tvorba aduktů v ESI, neutrální látky)
- **typ sorbentu** - kvalitní kolona nesmí ovlivňovat MS spektra
- **parametry kolony** - ovlivňují pouze hodnotu průtoku mobilní fáze a tím průtoky sušících a zmlžujících plynů

Ionizační techniky pro HPLC/MS

- ionizační technika se volí podle typu analytu
- API techniky (ESI, APCI, APPI) - nejběžnější řešení pro většinu aplikací
 - tyto techniky znamenaly naprostý průlom v řešení spojení HPLC/MS - nyní díky API je HPLC/MS naprosto rutinní a spolehlivá analytická technika s obrovským významem pro strukturní analýzu organických látek ve směsích, stopovou analýzu a zejména díky ESI zcela nové možnosti v oblasti biochemie
- 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, ale pro specifické aplikace může být smysluplné kvůli možnosti využití EI knihoven spekter
- v minulosti další techniky: ionizace termosprejem (TSI), ionizace urychlenými atomy či ionty (FAB/FIB), atd. - dnes se prakticky nepoužívají vzhledem k výrazným přednostem a univerzálnosti API technik

Volba ionizační techniky a polaroty záznamu

- ESI a APCI standard většiny komerčních HPLC/MS systémů, nově APPI
- polarita záznamu iontů
 - záznam kladných iontů – většina sloučenin
 - záznam záporných iontů – sulfonové a karboxylové kyseliny, (poly)hydroxysloučeniny, nitrosloučeniny, halogensloučeniny, apod.



Volba MS systému

- **složení mobilní fáze**
 - RP, HILIC - ESI, APCI, APPI
 - NP - nepolární rozpouštědla, vhodnější APCI, APPI
- **průtok mobilní fáze** - průtoky sušících a zmlžujících plynů
 - APCI, APPI - 1 ml/min (až 2 ml/min)
 - ESI - 1 ml/min, někdy méně, podle obsahu vody
 - nanoESI - nl/min
- **geometrie iontového zdroje**
 - geometrie zdroje ovlivňuje kvalitu spekter, obecně sprejování pod určitým úhlem zvyšuje odolnost proti kontaminaci maticí, solemi, umožňuje použít vyšší průtoky
- **hmotnostní analyzátoři**
 - MS vs. MSⁿ - strukturní analýza, rozlišení izobarických sloučenin
 - MS skeny - pro zjednodušení spekter, kvantitativní analýza
- **rozlišovací schopnost a správnost určení m/z** - dle požadavků na analýzu
- **rychlost záznamu** hmotnostních spekter - podle použité techniky a šířky píků
 - HPLC - píky v řádech desítek s, většina hmotnostních spektrometrů
 - UHPLC - jednotky s, nové přístroje s vysokou skenovací rychlostí (>10 spekter/s, TOF, QqTOF, QqQ, IT, LIT)

Volba rozpouštědel pro HPLC/API-MS

- vždy **nejvyšší možná čistota** rozpouštědel i aditiv kvůli snížení iontů pozadí
- redestilovanou vodu neskladovat (nejméně každý druhý den čistou, pokud není ve směsi s organickým rozpouštědlem)
- odvodušnění, filtrace
- mobilní fáze musí umožňovat separaci analytu, snadno se zmlžuje a odpařuje, umožňuje ionizaci analytu, neposkytuje signály pozadí, nekontaminuje iontový zdroj
- **ESI** - spíše polárnější rozpouštědla, která podporují vznik iontů
 - voda, metanol, acetonitril, etanol
- **APCI, APPI** - musí podporovat přenos protonu v plynné fázi, polární až nepolární
 - voda, metanol, acetonitril, 2-propanol, aceton, chloroform, toluen, hexan

Kompatibilita HPLC systémů s API technikami

RP-HPLC (systémy s obrácenými fázemi)

- nejběžnější, obvykle vodný metanol nebo acetonitril, lze i etanol, 2-propanol, atd.
- nejlepší odezva obvykle při vysoké koncentraci organického rozpouštědla ca. 70 – 90% (nemusí platit univerzálně)
- při vysokém až 100% obsahu vody zvýšit průtok a teplotu sušícího a zmlžujícího plynu (nižší citlivost)
- 100% acetonitril při APCI vyžaduje častější čištění výbojové elektrody (tvorba grafitického uhlíku na elektrodě)

NP-HPLC (systémy s normálními fázemi)

- většinou špatně kompatibilní s ESI, lepší kompatibilita s APCI
- v mobilní fázi musí být určitý obsah (>5%) proton-donorního rozpouštědla, např. 2-propanol (ve 100% hexanu většinou není žádný signál)
- snaha vyhnout se halogenovaným rozpouštědlům (CH_2Cl_2 , CH_3Cl , CCl_4) kvůli zvýšené kontaminaci a zhoršení stability signálu

HILIC (chromatografie hydrofilních interakcí)

- směs acetonitrilu nebo metanolu a vody, případně aditiv
- kompatibilní s ESI i APCI, volba podle povahy analytů

Kompatibilita mobilních fází pro HPLC/MS

- **HPLC systémy** s obrácenými i normálními fázemi, HILIC
 - bezvodé mobilní fáze bez proton-donorního rozpouštědla mohou působit potíže zejména při ionizaci elektrosprejem
- **průtoky** mobilní fáze
 - od 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ (ESI) do 1 ml/min (APCI, ESI) nebo až 2 ml/min (APCI); pro průtoky v nl/min – on-line nanoelektrosprej
- **aditiva** v mobilní fázi
 - obsah a povaha aditiv je kritický parametr pro správnou ionizaci analytu
 - přednost mají těkavá činidla v co nejnižších koncentracích - kys. mravenčí nebo octová, amoniak (0.05 – 1%), octan nebo mravenčan amonný (5 – 10 mmol/l), TFA není příliš vhodná
 - nevhodné pro MS jsou anorganické kyseliny (fosforečná, sírová), alkalické hydroxidy, anorganické pufrý (např. fosfátový), detergenty, atd. obecně látky s nízkou těkavostí
 - ion-párová HPLC – konvenční netěkavá činidla (tetraalkylamonné soli, sulfonové kyseliny) musí být nahrazeny těkavějšími analogy (di- a trialkylamonium acetáty, perfluorované karboxylové kyseliny, cca 1 – 5 mmol/l)

HPLC/MS ionových sloučenin

Nekompatibilní s MS detekcí

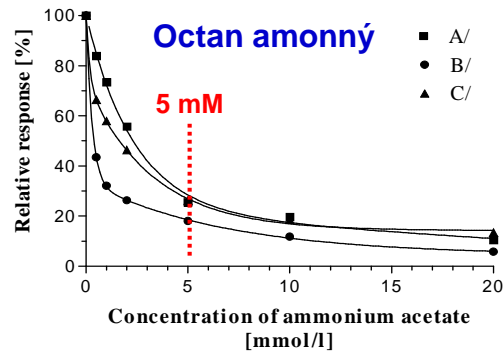
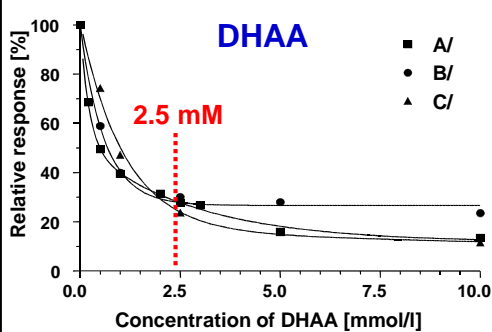
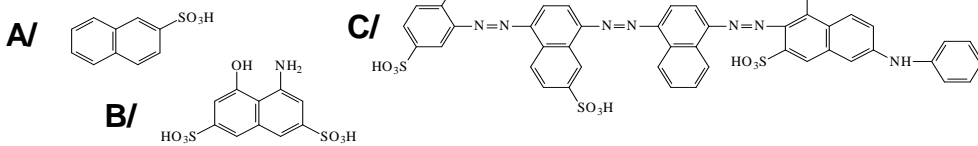
- vysolovací HPLC – 0.1 - 1 mol/l anorganických solí v mobilní fázi
- konvenční ion-párová HPLC pro analýzu aniontů – 1 - 20 mmol/l tetrabutylamonium hydrogensulfátu
- konvenční ion-párová HPLC pro analýzu kationtů – 1 - 20 mmol/l sulfonových kyselin

Lepší kompatibilita s MS detekcí

- 5 mmol/l octanu amonného
 - nižší separační účinnost, omezené použití
- 1 - 5 mmol/l di- nebo trialkylamonium acetátu pro anionty
 - velmi dobrá separace včetně rozdělení polohových izomerů
- 1 - 5 mmol/l perfluorovaných karboxylových kyselin pro kationty
- přesto dochází k potlačení odezvy a kontaminaci

Vliv koncentrace aditiv na ESI odezvu

Testovací látky:



Pokles na 20-30% odezvy při nejnižší chromatograficky použitelné koncentraci!

Nežádoucí signály v hmotnostních spektrech

- nečistoty, signály pozadí, matriční ionty
- je nutné používat co nejčistší rozpouštědla a aditiva určené pro LC/MS - vyšší stupeň čistoty, nižší obsah nežádoucích kovů
- vyvarovat se kontaminaci změkčovadly z plastů (plastové nádobí, rukavice, špičky pipet), krémů na ruce, atd.
- běžné kontaminanty v MS - ftaláty, silikony, polymery, atd.

HPLC/MALDI-MS

Spojení HPLC/MALDI-MS

Off-line

- nanášení kapek eluentu ze separační kolony na MALDI terčik
- terčiky s hydrofilními místy
- mikrometody používající piezoelektrické pipety 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

HPLC/MALDI-MS

Přídavek MALDI matrice

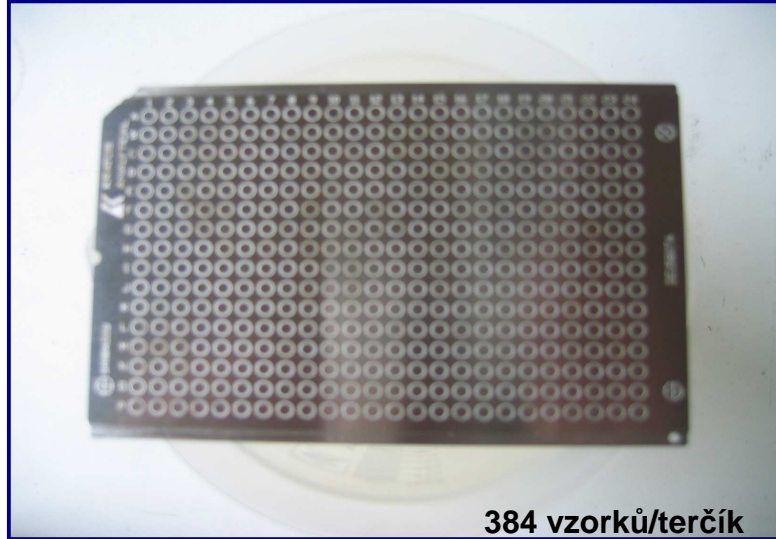
- smíchání s roztokem analytu (sheath flow, T, liquid junction)
- nanosení roztoku na terčik předem pokrytý vrstvičkou matrice

Sběr eluentu

- diskrétní frakce
 - komerčně dostupné automatizované přístroje
 - kompatibilní s HPLC
 - 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

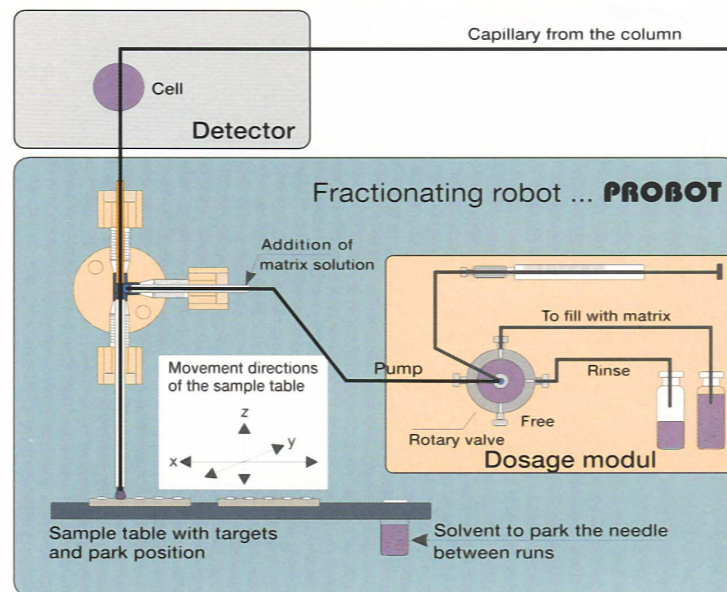
MALDI terčik

1, 10, 96, 100, 384, 1536 ... vzorků/terčik



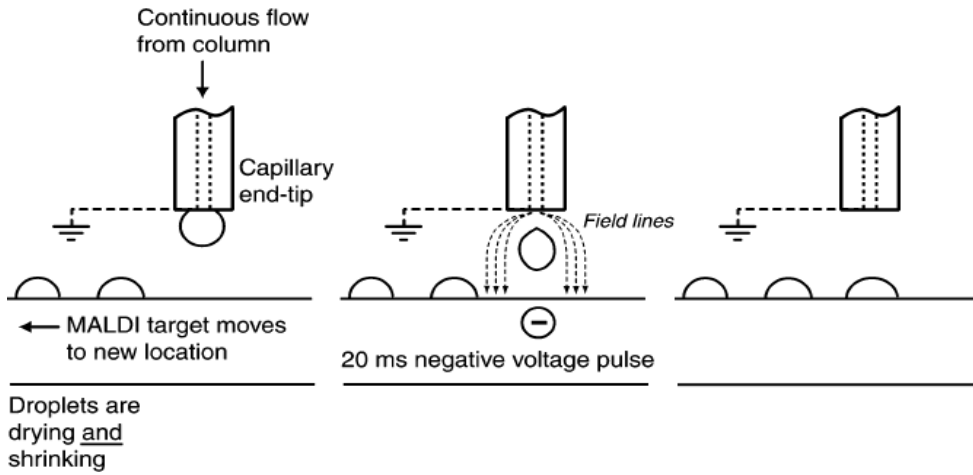
(autorem následujících 7 snímků je doc. Jan Preisler, MU Brno, převzato se souhlasem)

Off-line nanášení



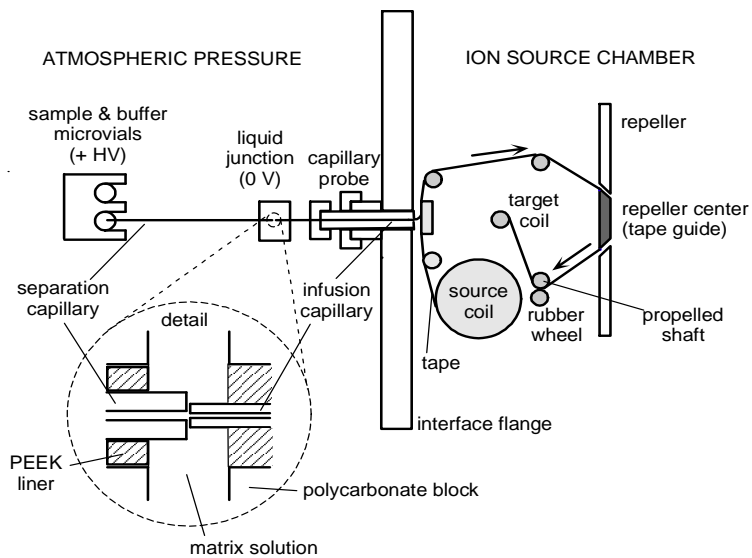
www.lcpackings.com

Off-line nanášení s pulzním elektrickým polem



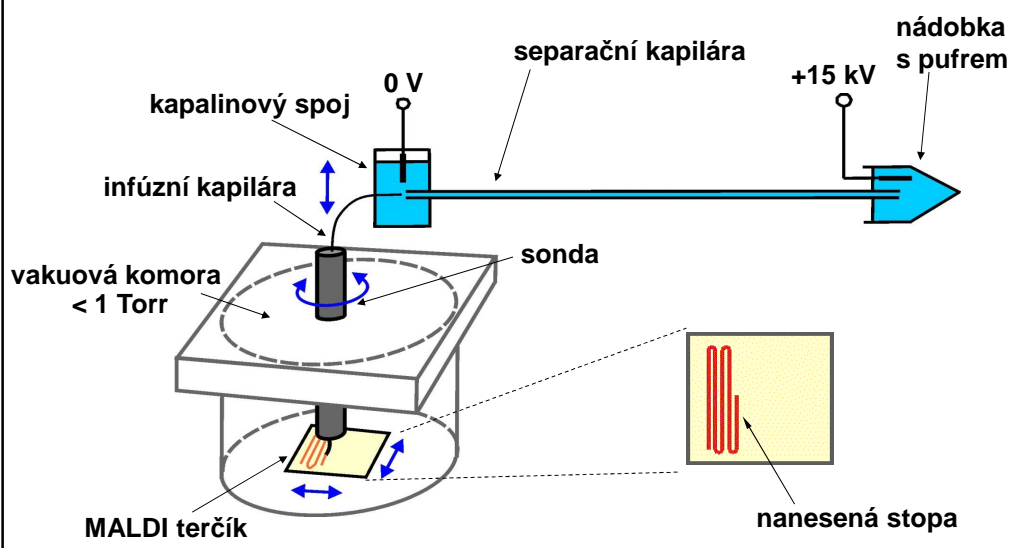
C. Ericson, Q. T. Phung, D. M. Horn, E. C. Peters, J. R. Fitchett, S. B. Ficarro, A. R. Salomon, L. M. Brill, A. Brock *Anal. Chem.* 2003, 75, 2309-2315

In-line nanášení ve vakuu pro CZE/MALDI-MS

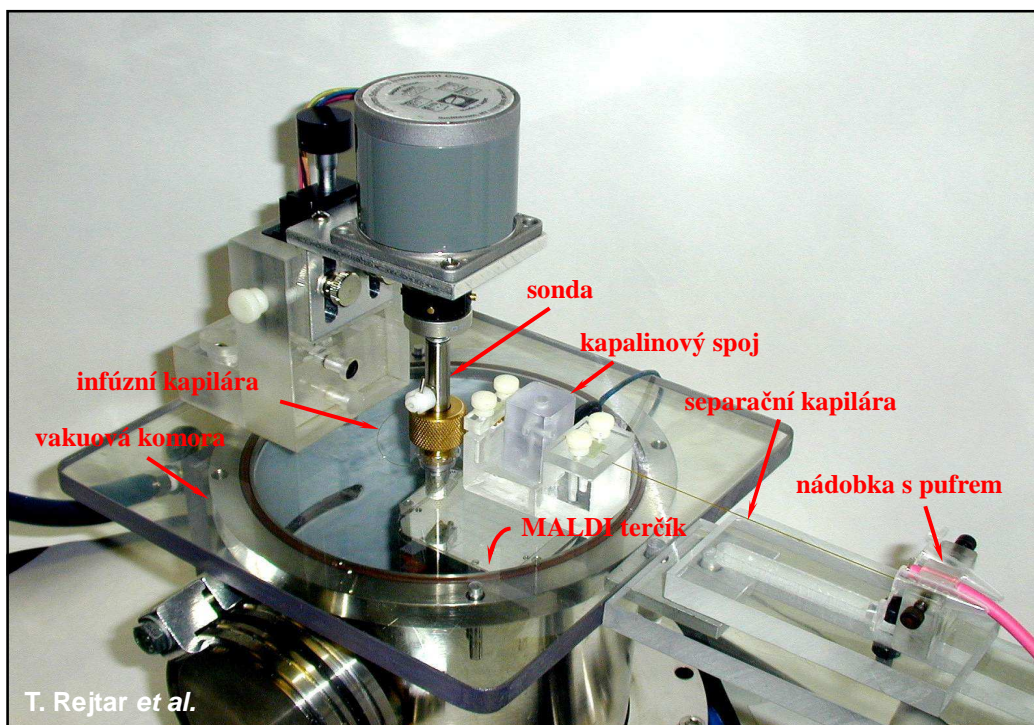


Preisler, J.; Hu, P.; Rejtar, T.; Karger, B. L. *Anal. Chem.*, 72, 4785-4795, 2000

Off-line nanášení ve vakuu CZE/MALDI-MS

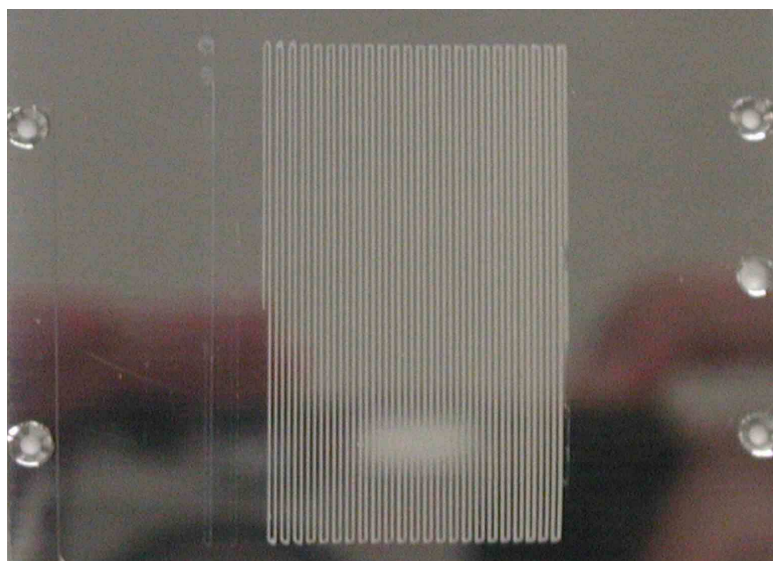


T. Rejtar *et al.*



T. Rejtar *et al.*

Záznam gradientové HPLC, 1 hodina



T. Rejtar *et al.*

CZE/MS

Spojení kapilární zónové elektroforézy a hmotnostní spektrometrie (CZE/MS)

- **1987** první spojení CZE/MS (Smith)
- alternativa k HPLC **pro separaci iontových látek**
- **technicky obtížnější** oproti HPLC/MS, nelze považovat za zcela rutinní, určité problémy s citlivostí a robustností systému
- složitější řešení vkládání separačního a sprejovacího napětí, aby se navzájem neovlivňovali
- nekompatibilita použitých pufrů s MS
 - vhodná náhrada konvenčních netěkavých pufrů (např. fosfátové nebo borátové) za těkavější látky, např. 10 mM octan amonný
 - průtok v CZE je dán elektroosmotickým tokem, který je značně závislý na pH
- velmi nízké průtoky - většinou nanoESI

Základní typy spojení CZE/ESI-MS

1/ CZE/MS **s přídavným tokem kapaliny** ("Sheath-Flow Interface")

- nejrozšířenější, nejrobustnější
- problémy s citlivostí kvůli naředění eluátu

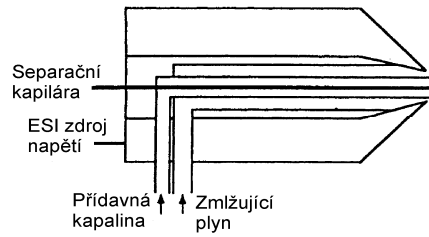
2/ CZE/MS **s vodivým kapalným spojením** ("Liquid-Junction Interface")

- méně rozšířené, oblíbené u čipových technik

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

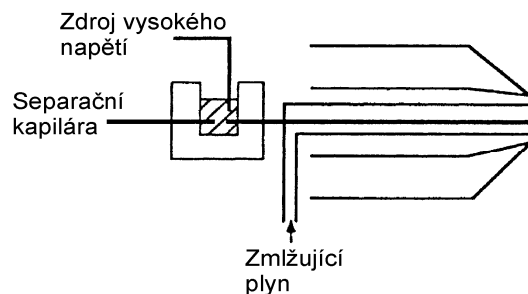
- spojení on-line s nanoESI
- nejcitlivější ale nejméně robustní
- technicky náročné, časté problémy

CZE/MS s přídavným tokem kapaliny



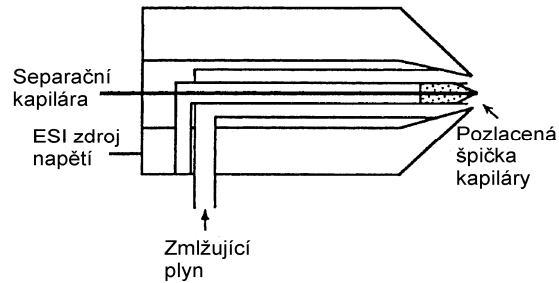
- separační CZE kapilára je vyvedena až na konec ESI sondy, kde dochází ke smísení s vodivou přídavnou kapalinou přiváděnou koaxiální vnější kapilárou
- na špičku kapiláry je vloženo napětí 3 – 5 kV - zároveň uzavření elektrického obvodu pro CZE a napětí potřebné pro funkci elektrospreje
- průtok CZE řádově desítky až stovky nI/min, přídavná kapalina 1 – 3 μ l/min - zředění ca. 10 – 100krát
- přídavná kapalina s přídavkem elektrolytu je nutná kvůli:
 - dosažení minimálního průtoku pro stabilní sprej (obvykle \geq 1 μ l/min)
 - vodivému spojení
 - 60 - 80% voda/metanol (2-propanol, ne acetonitril - rozpouští polyimidové pokrytí kapiláry) s obsahem elektrolytu (obvykle 0.1 - 2% organické kys. nebo amoniaku, popř. 10 mM octan amonný), průtok 1 - 3 μ l/min (co nejnižší kvůli zředění analytu)

CZE/MS s vodivým kapalným spojením



- 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 μ m (jinak ztráta počtu teoretických pater)

CZE/MS bez přídavného toku kapaliny

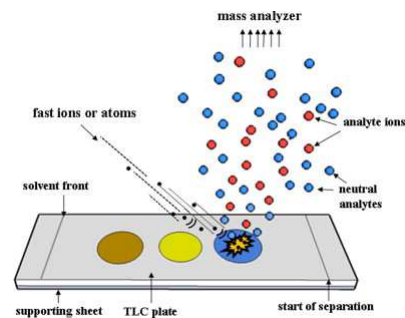


- On-line nanoelectrospray:
 - speciální úprava špičky - vytažení do zúženého konce 5 – 30 μm (náchýlné k ucpávání)
 - stabilní i pro velmi nízké průtoky (10 – 1000 nl/min) kompatibilní s CZE
 - vodivé spojení přes pokovenou špičku nebo vložený zlatý drátek
 - potlačení iontů z pozadí
 - nejvyšší citlivost (až attomoly) \times nejnižší robustnost

TLC/MS

Spojení tenkovrstvé chromatografie a hmotnostní spektrometrie (TLC/MS)

- **1969** první spojení TLC/MS (Kaiser), odpaření molekul z TLC skvrn do proudu plynu
- TLC se využívá pro svou jednoduchost, širokou škálu povrchů, atd.
- ve většině případů off-line spojení - látky jsou nejdříve separovány a následně jsou TLC skvrny obsahující molekuly analytu měřeny pomocí MS
- laserové techniky - MALDI, SALDI, ICP-MS s laserovou ablací
- ambientní ionizační techniky - DESI, DART, EASI
- FAB
- alternativní způsob spočívá v izolaci skvrny (seškrábání, vystřížení), extrakci analytu do kapaliny a následné analýze pomocí MS - pracné a riziko kontaminace stacionární fáze

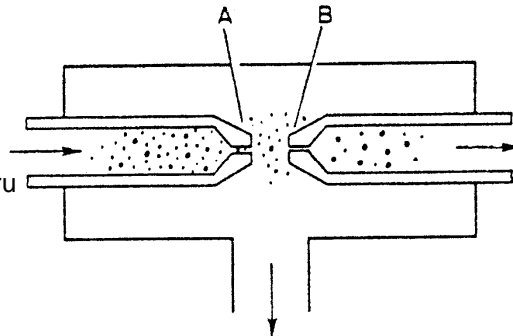


Historické techniky spojení LC/MS a GC/MS

Typy separátorů pro GC/MS

1/ tryskový separátor

- založený na principu dělení podle rozdílných E_K , molekuly s větší molekulovou hmotností projdou separátorem (větší E_K), zatímco "menší" molekuly (nižší E_K) jsou vychýleny a odtaheny vakuovými pumpami v separátoru (princip podle Ryhageho); obvykle se používal dvoustupňový
- dnes se používá pro spojení HPLC/MS s ionizací EI s použitím tzv. Particle Beam převodníku)



2/ difúzní separátor

- v silikonové membráně se snadněji rozpustí a tedy projdou organické molekuly ve srovnání s heliem

3/ efúzní separátor

- porézní skleněná fritra v evakuovaném plášti, kterým snadněji projdou „malé“ molekuly helia ve srovnání s „většími“ molekulami analytu

Využití elektronové ionizace pro HPLC/MS

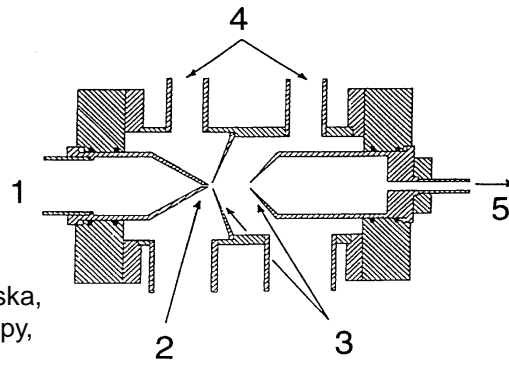
- jedině EI pro HPLC/MS umožňuje porovnání naměřených spekter s běžnými knihovny hmotnostních spekter
- používá se poměrně málo vzhledem k omezenému rozsahu látek, pro které je technika HPLC/EI-MS vhodná, zejména pro farmaceutické analýzy, pesticidy a další látky s molekulovou hmotností cca. 200-1000, střední polaritou a těkavostí
- příliš málo těkavé látky nelze převést do plynné fáze, což je nezbytné pro EI
- příliš těkavé látky s malou molekulovou hmotností jsou odtaheny v separátoru společně s molekulami mobilní fáze
- obecně nižší až výrazně nižší citlivost ve srovnání s běžně používanými technikami HPLC/ESI-MS a HPLC/APCI-MS

Spojení s přímým vstupem eluátu (Direct Liquid Introduction, DLI)

- první spojení HPLC/MS (McLafferty - 1973), dnes pouze historický význam
- 10 μm diafragma slouží jako dělič toku, takže do MS se dostane pouze asi 1% eluátu - ztráta citlivosti

HPLC/EI-MS - Spojení "Particle Beam" (PB)

- dvoustupňový tryskový separátor analogický k dříve používaných separátorům u GC/MS
- před vstupem do komory (č.1) je mobilní fáze (MF) s analytem zmlžena rozprášením s heliem, zúžením komory v trysku na konci dojde ke vzniku nadzvukového proudu helia, zmlžené MF a analytu, část separátoru je evakuovaná (č. 4), takže molekuly s nižší E_K (He + MF) jsou odtaženy vakuovými pumpami, molekuly s vyšší E_K (analyt) projdou separátorem do iontového zdroje
- dnes se používá pro spojení s EI (méně časté ve srovnání s API)
- nevýhody: ztráta analytu kvůli velké těkavosti a malé M_R (v separátoru) nebo příliš nízké těkavosti (neodpaří se v iont. zdroji), malá citlivost, absence mol. iontů
- výhody: struktura - EI

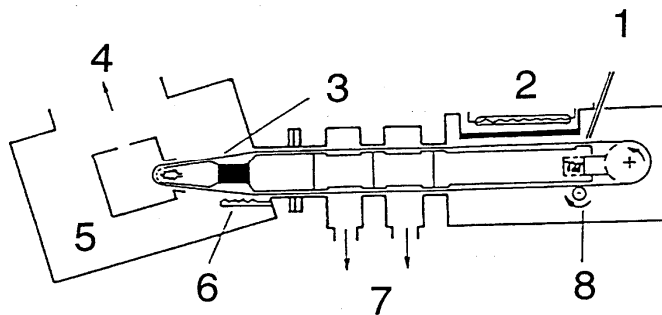


1. Odpařovací komora, 2. tryska,
3. separátor, 4. vakuové pumpy,
5. iontový zdroj

HPLC/MS - spojení s nekonečným pásem (Moving Belt)

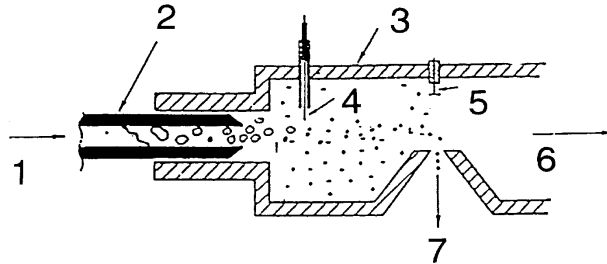
- eluát je na výstupu z kolony rozprášen na dopravníkový pás pod úhlem 45 stupňů, pod IČ lampou se odpaří mobilní fáze a analyt na pásku je vnesen do iontového zdroje, kde lze použít EI, CI (s možností volby ionizačního plynu) nebo FAB s přidáním matrice
- po průchodu pásku s analytem iontovým zdrojem dochází k jeho čištění k pyrolyzní pídce
- nevýhody: paměťové efekty, trhání pásku kvůli mechanickému namáhání, nižší citlivost
- původně se místo pásku používal drátek, který se smáčel mobilní fází
- dnes se již nepoužívá

1. Výstup z HPLC,
2. IČ topení,
3. polyimidový pásek,
4. analyzátor,
5. iontový zdroj,
6. čistící topení,
7. vakuové pumpy,
8. hnací kolečko



HPLC/MS - ionizace termosprejem (TSI)

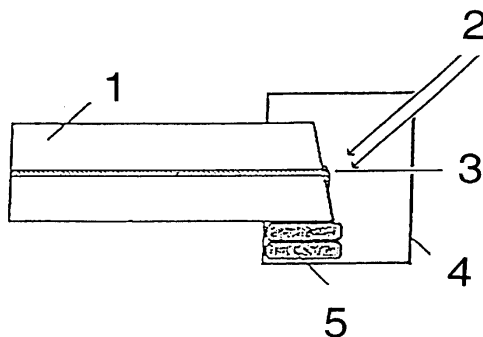
- první ionizační technika navržená výhradně pro spojení HPLC/MS, umožňovala relativně rutinní práce s minimálními omezeními pro volbu HPLC podmínek, průtoky do 1 ml/min, obvykle systémy s obrácenými fázemi minimálně s 10% vody, jinak nutné použít přídavnou ionizaci výbojovou elektrodou nebo urychlenými elektrony
- nutný přídavek octanu amonného 5 – 20 mM pro průběh ionizace



1. Výstup z HPLC, 2. odporově vyhřívaná kapilára,
3. vyhřívaný blok iontového zdroje, 4. výbojová elektroda,
5. odpuzovač iontů, 6. vakuové pumpy, 7. hmotnostní spektrometr

HPLC/MS - ionizace urychlenými atomy s kontinuálním tokem kapaliny (Continuous-Flow FAB)

- lze použít pouze pro průtoky řádově v ml/min (kapilární HPLC nebo dělič toku) – výrazné omezení
- vzhledem k celkově úspěšnějšímu řešení HPLC/MS s použitím API ionizačních technik se téměř nepoužívá



1. Přívodní kapilára
2. urychlené atomy Xe
3. hmotnostní spektrometr
4. iontový zdroj
5. savý knot