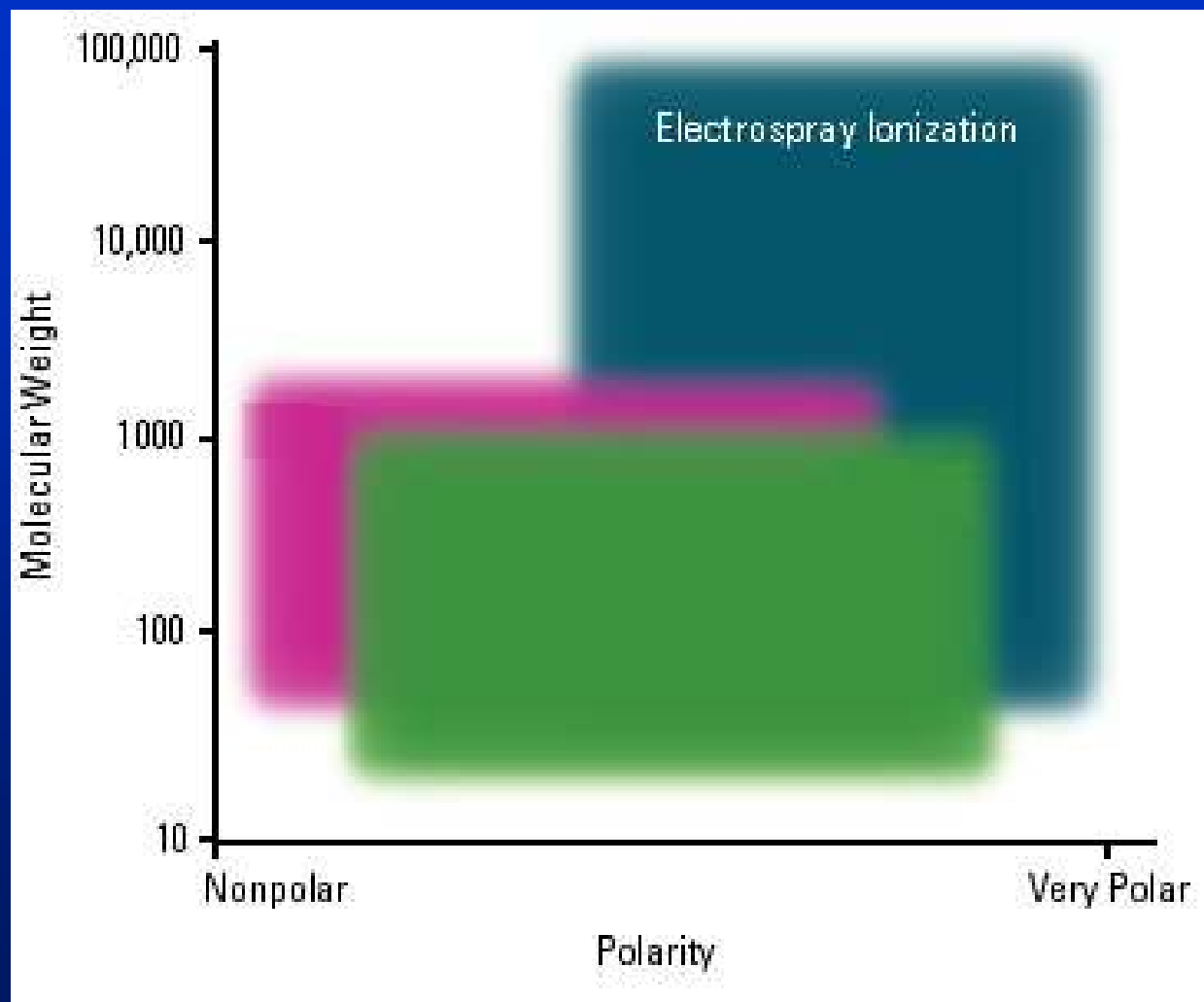




Van élet az elektroporlasztásos ionizáción kívül?

Ludányi Krisztina
Semmelweis Egyetem
Gyógyszerészeti Intézet

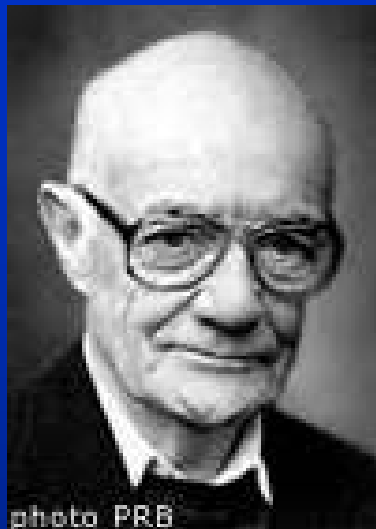
Ionizációs technikák



Történeti áttekintés

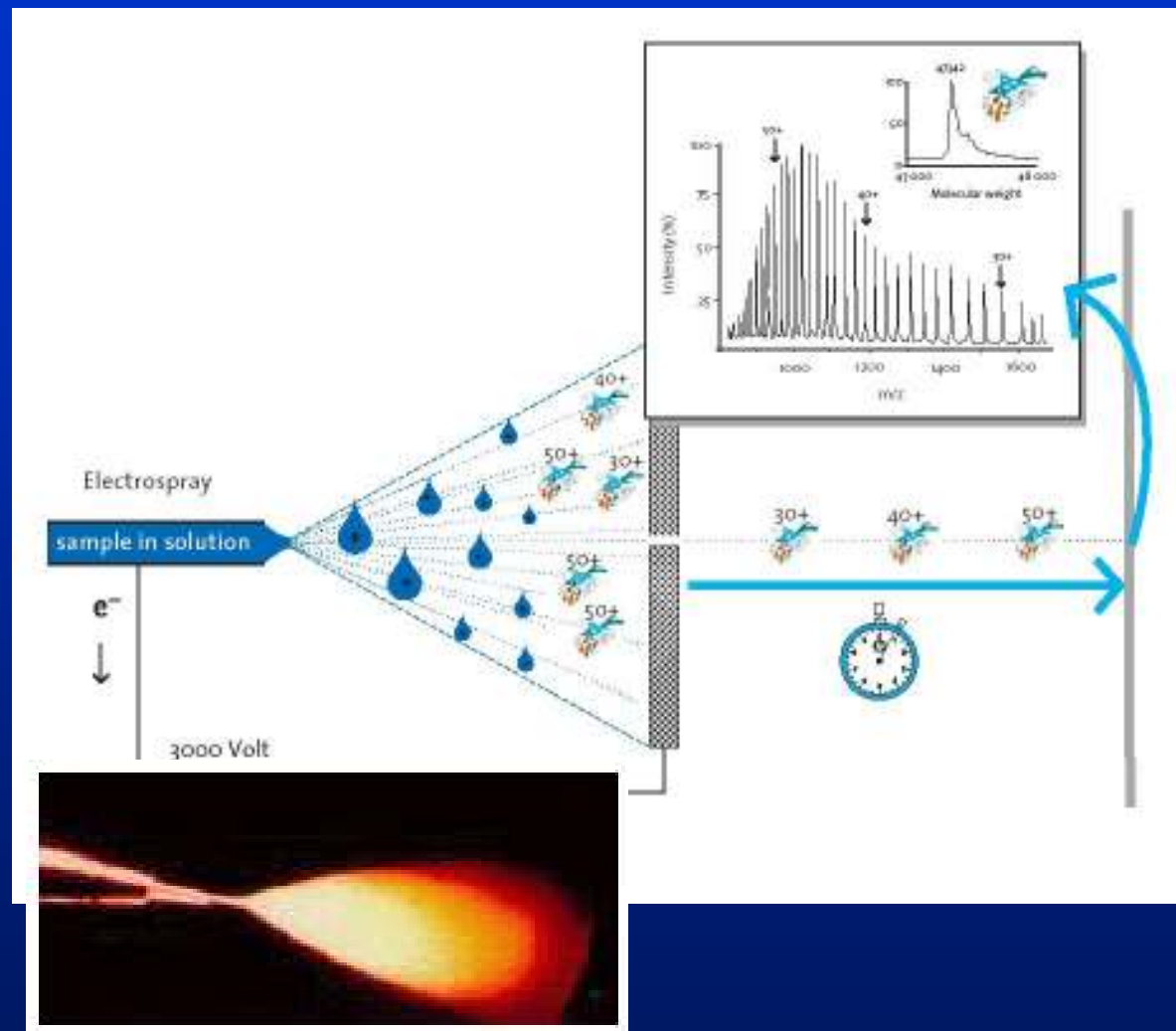
- 1965:** Atmoszférikus nyomású ionizáció β -emitter ^{63}Ni ill. korona kisüléssel (Shahin)
- 1966:** Kémiai ionizáció (Munson and Field)
- 1968:** Polisztirén makromolekulák vizsgálata *Electrospray-vel* (Dole)
- 1973:** API kapcsolása nagyvákuum tömegspektrometriával (Horning)
- 1974:** API LC-MS kapcsolás (Horning)
- 1982:** API LC-MS-MS kapcsolás (Henion)
- 1985:** Jelenleg használt *Electrospray* ionforrás kifejlesztése (Whitehouse és Fenn)
- 1988:** Első kereskedelmi APCI interface
Többszörös töltésű ionok vizsgálata ESI-vel (Fenn)
- 1993-:** Alkalmazások több, mint 35 %-a ESI
- 2000:** APPI (Robb, Covey, Bruins)

Elektroporlasztásos ionizáció- Electrospray (ESI)



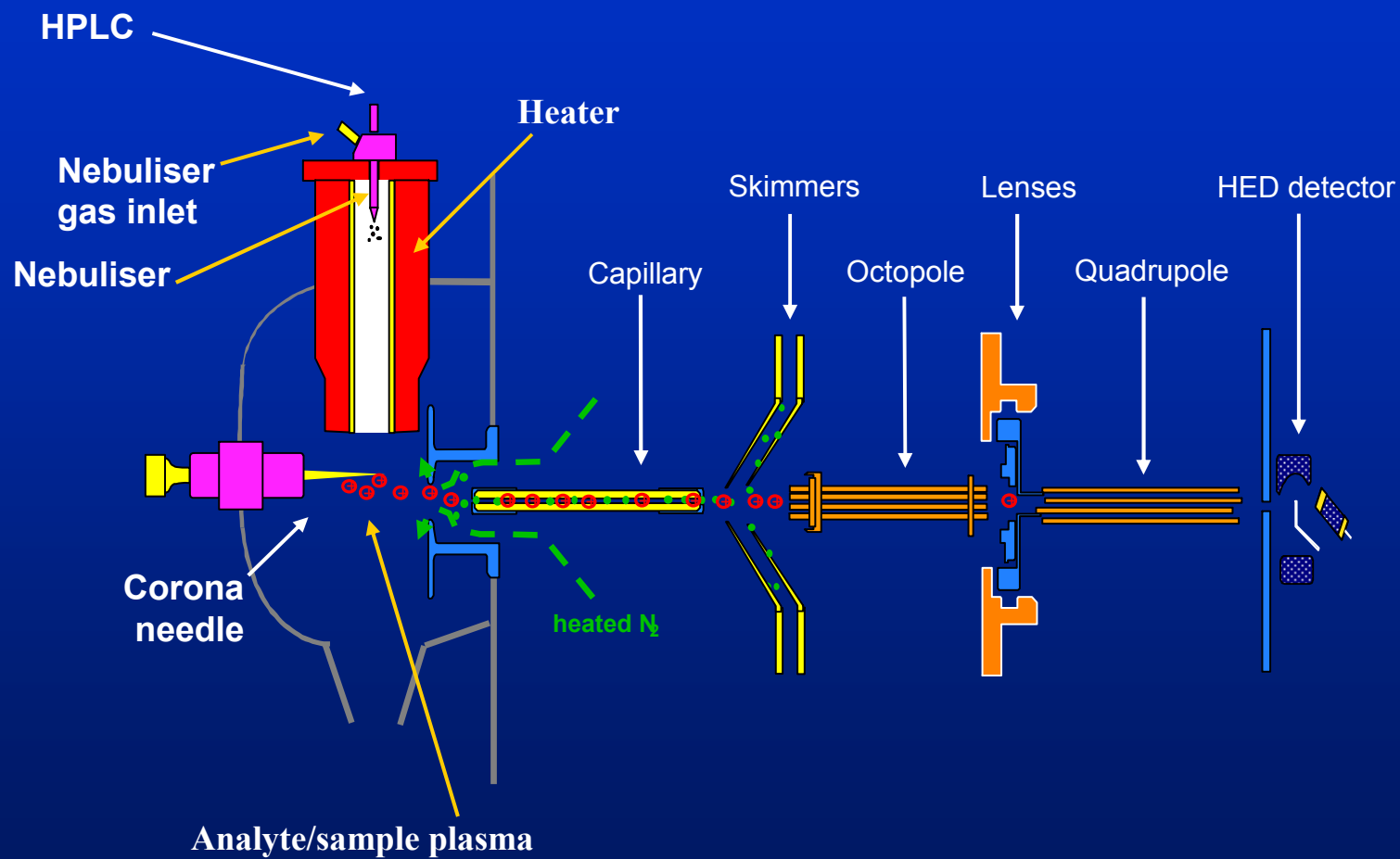
J. B. Fenn

Kémiai Nobel
díj
2002

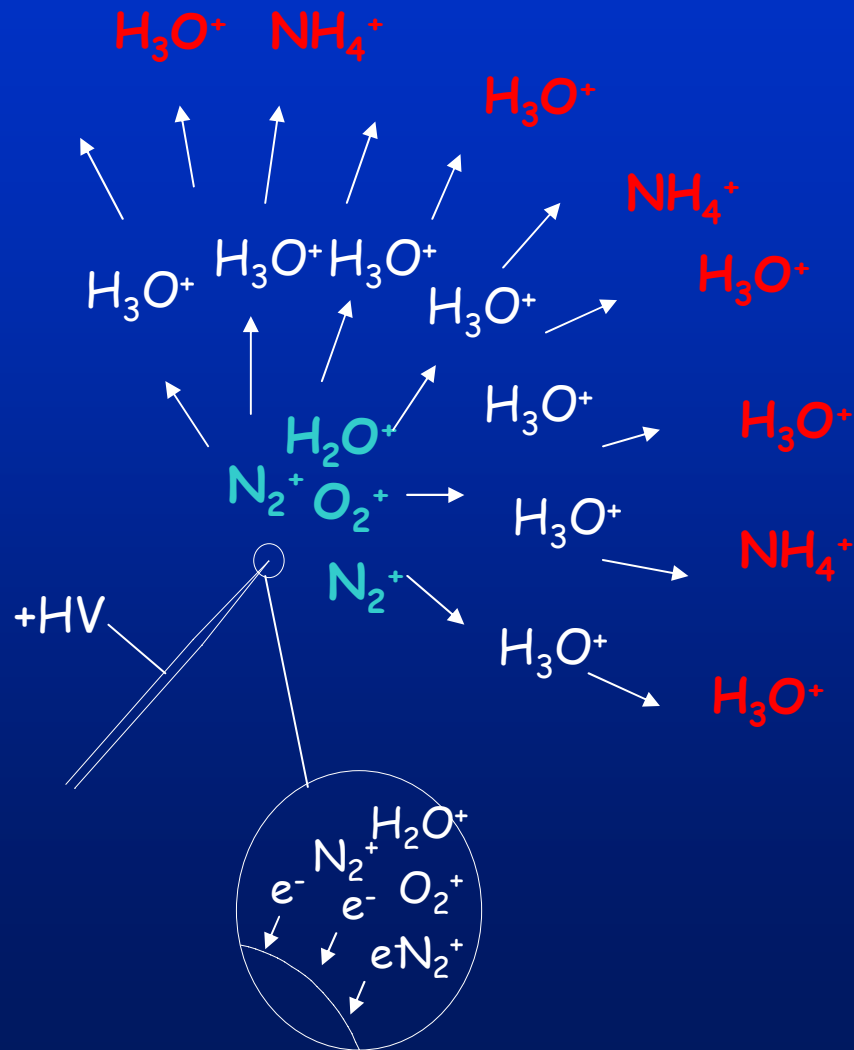


"for the development of methods for identification and structure analyses of biological macromolecules"

Atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció – APCI

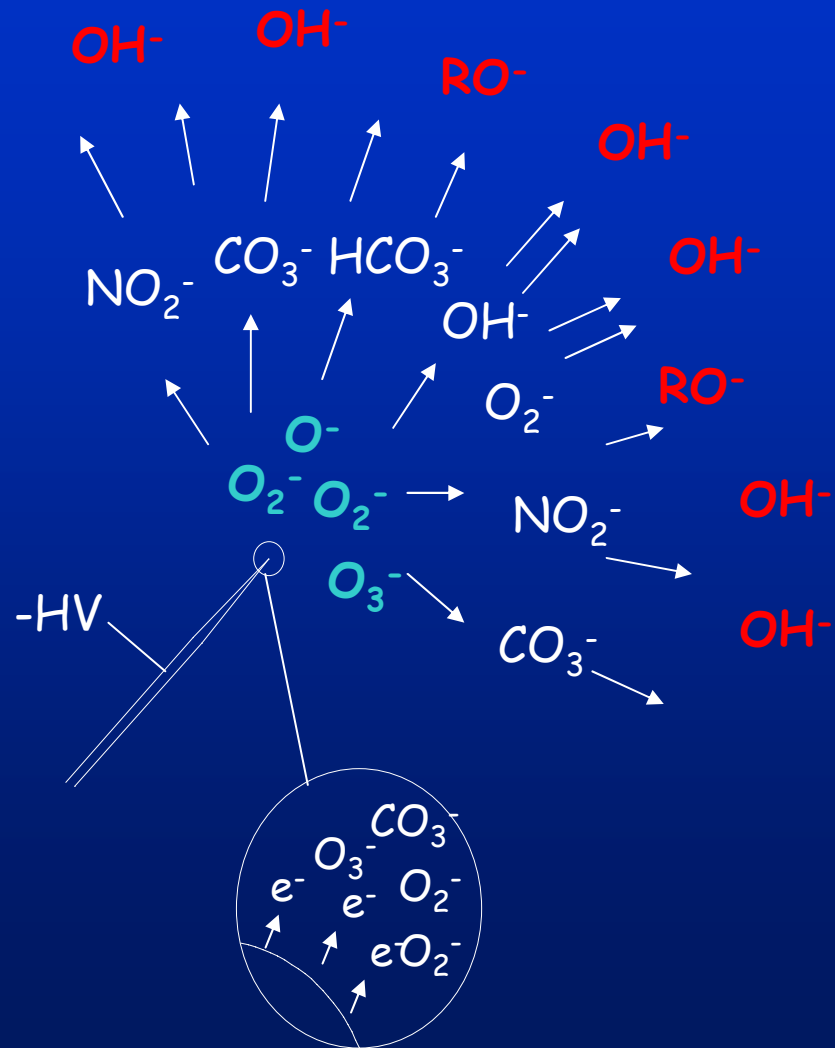


Koronakisülés: pozitív ion képződés mechanizmusa



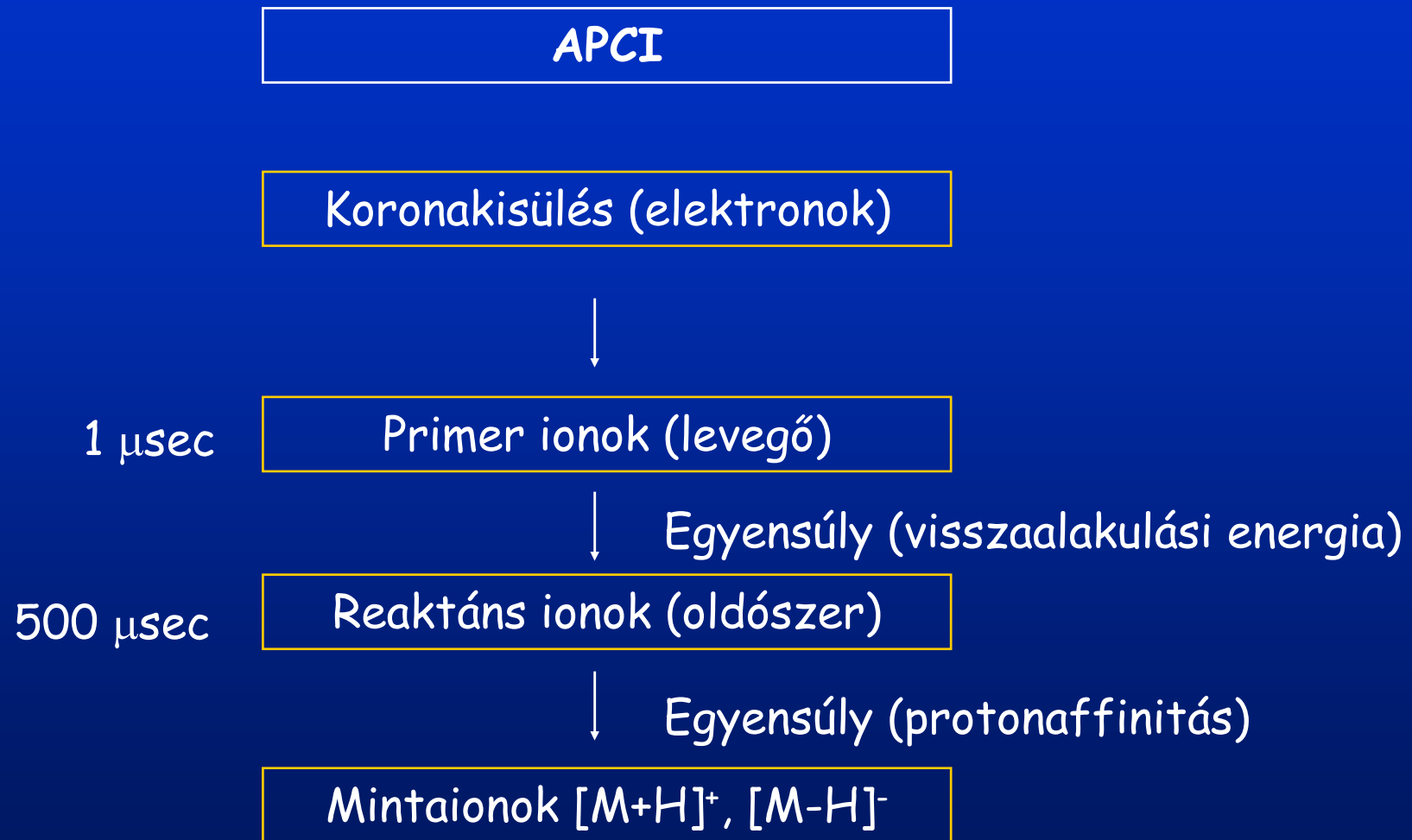
- Az első fázisban a tű elektronokat fog be és N_2^+ , O_2^+ , H_2O^+ ... ionok (primer ionok) képződnek.
- A primer ionok rövid élettartamúak: átadják töltésüket az oldószernek, H_3O^+ , NH_4^+ , RH_2O^+ ... (reaktáns ionok) keletkeznek.
- A reaktáns ionok átadják töltésüket a vizsgálandó vegyületnek, $[M+H]^+$ képződik.

Koronakisülés: negatív ion képződés mechanizmusa



- Az első fázisban a tű elektronokat bocsát ki és O_3^- , O_2^- , NO_2^- , CO_3^- (primer ionok) képződnek.
- A primer ionok rövid élet-tartamúak : átadják töltésüket az oldószernek, OH^- , HCO_3^- , RO^- (reaktáns ionok) keletkeznek.
- A reaktáns ionok átadják töltésüket a vizsgálandó vegyületnek, $[\text{M}-\text{H}]^-$ képződik.

Ionizációs folyamat: koronakisülés



APCI LC-MS Interface előnyei és hátrányai

Előnyök

- ☺ CI spektrumok: molekulatömeg információ
- ☺ Pozitív és negatív ionok, közepesen poláros/illékony komponensek
- ☺ Lágy és 'kemény' ionizációra is alkalmas
- ☺ Nincs nemkívánatos fragmentáció
- ☺ Kvalitatív és kvantitatív meghatározás
- ☺ 0,2-2 ml/perc áramlási sebesség
- ☺ pH nem befolyásolja az ionizációt
- ☺ Jobban tolerálja a puffereket, mint az ESI (nagyobb érzékenység)
- ☺ Könnyű installálni és üzemeltetni
- ☺ Egyszerűen kapcsolható HPLC-vel

Hátrányok

- ☹ Nincs fragmentáció
- ☹ Hőbomlás következhet be
- ☹ Nem illékony pufferek???
- ☹ Csak egyszeres töltésű ionok keletkeznek
- ☹ Nem alkalmas apoláros molekulák vizsgálatára
- ☹ Poláros vegyületek - ESI érzékenyebb

Példa: Hosszú láncú zsírsavak meghatározása

- eltérés peroxisomális zavarok esetén
- ált.: extrakció, származékképzés, GC-MS
(hosszadalmas, munkaigényes)
- ált. tendencia: GC-MS \Rightarrow HPLC-MS
- fejlesztés: **származékképzés nélküli HPLC-MS**
 - gyors, hatékony, érzékeny
 - alkalmas vér analízisére
(szűrőpapírra szárított vércsepp)



Nagy et al, Anal Chem 76, 1935 (2004)
Nagy et al, J. Chrom. A 1078, 90 (2005)

Zsírsavak vizsgálata

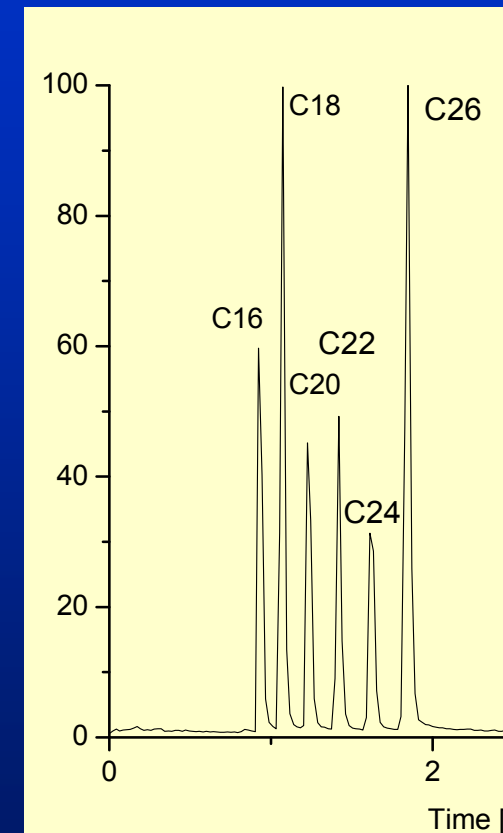
- std. keverék ill. vér-extraktum vizsgálata
beszárított vér (~50 μ l) + belső std.
foszfolipidek, gliceridek, észterek hidrolízise ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{HCl}$)
extrakció hexánnal
- új HPLC módszer - szokatlan gradiens:
metanol-víz vs. metanol-hexán, gyors gradiens

részben elegyedő oldószerek!

- negatív ionok detektálása APCI ionizációval

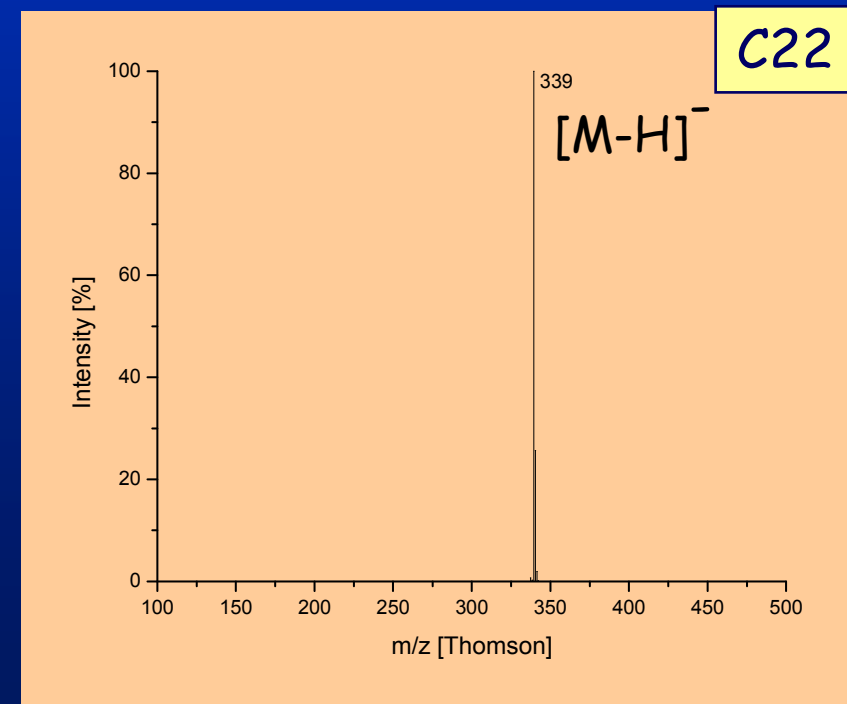
HPLC módszer

- jól reprodukálható, robusztus
- gyors elválasztás
0.7 ml/perc áramlás mellett a zsírsavak elválasztása 2 percen belül
- kiváló apoláros vegyületek vizsgálatára
- az oszlopnak csak kis hatása van az elválasztásra
pl. trigliceridek, szteroidok, szterolok



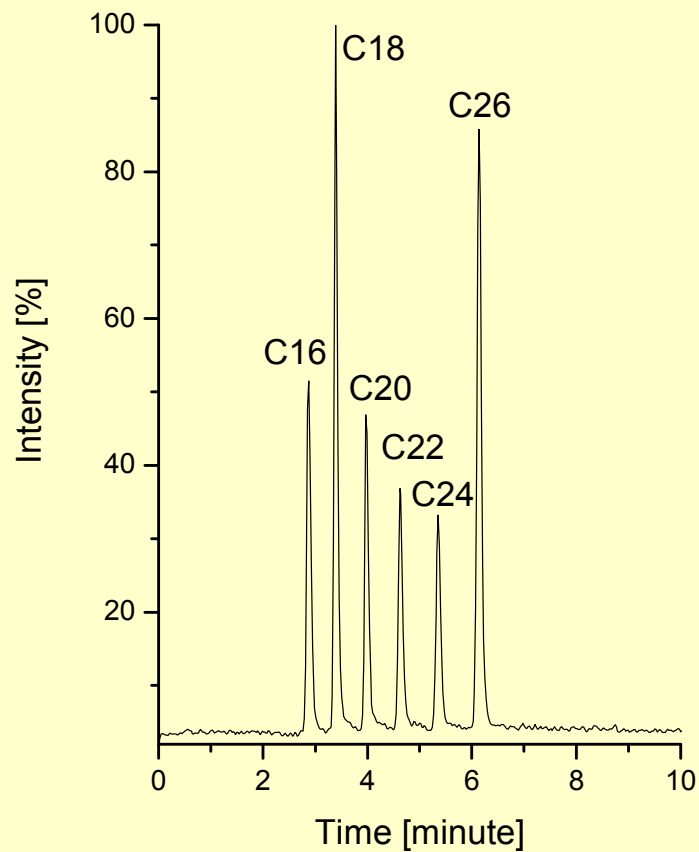
MS

- APCI kedvezőbb mint ESI: pozitív és negatív ionizáció, de
 - pozitív ionizáció esetén gázfázisú metilezés: ront a reprodukálhatóságon
 - negatív ionizáció lényegesen szelektívebb
- intenzív $[M-H]^-$ ion
- kvantitatív meghatározáskor az egyes zsírsavakhoz külön-külön belső std, pl. hexakozánsav (C26)
- jó linearitás a fiziológiai-patologikus koncentrációtartományban
- érzékeny: **kimutatási határ 1-5 pg hasonló a GC-MS-hez !**

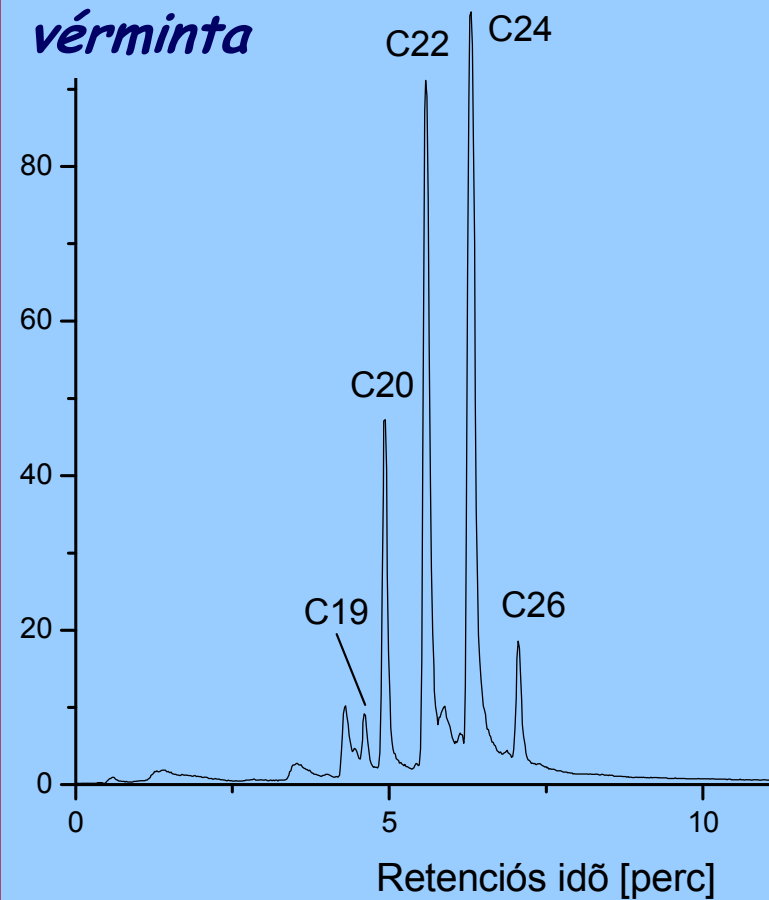


Vérminták vizsgálata

std. keverék



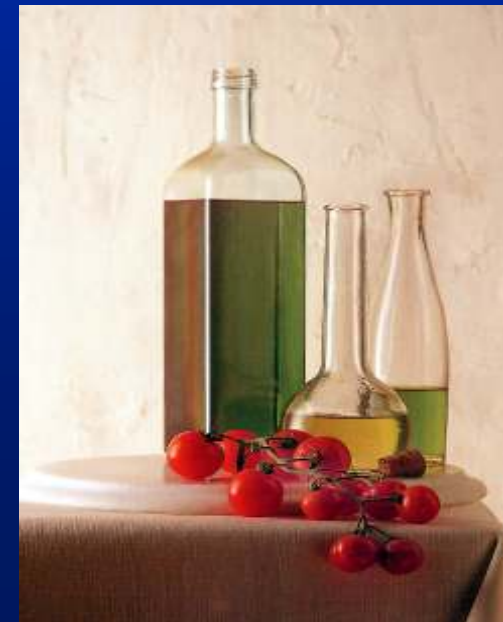
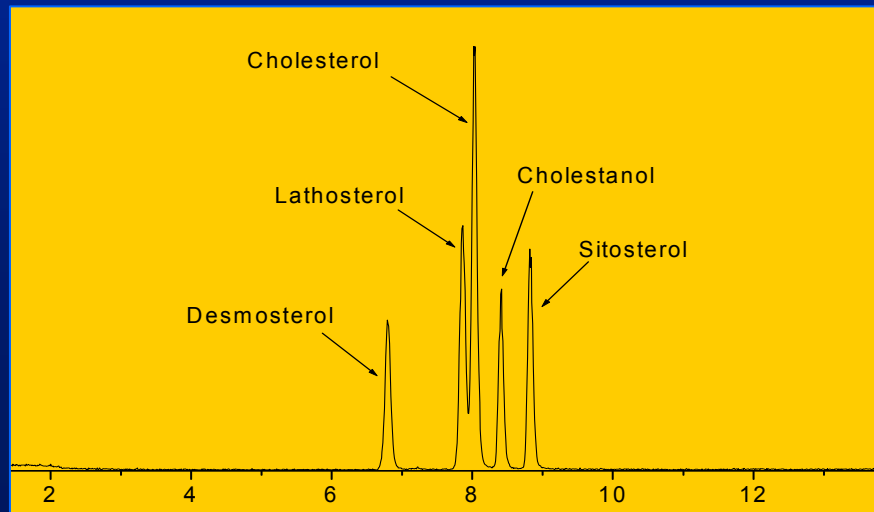
vérminta



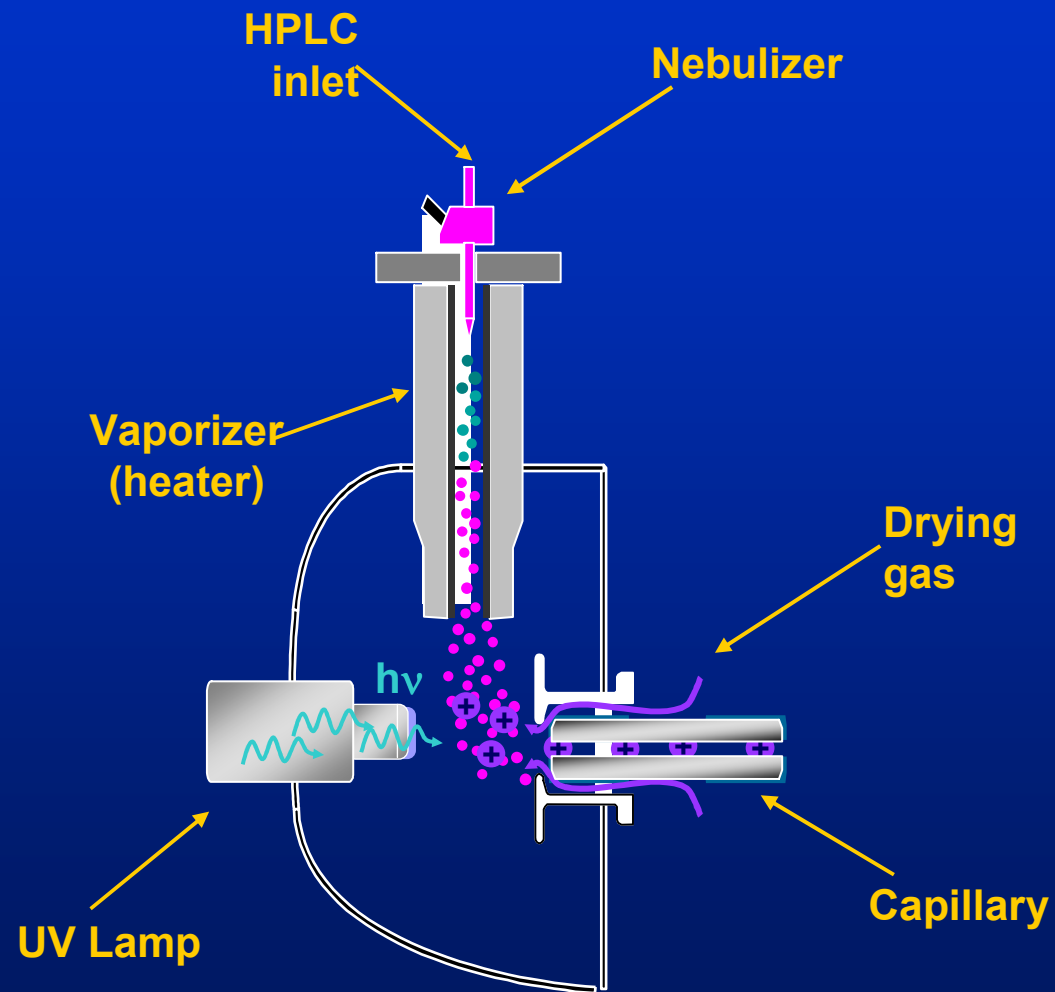
Zsírsavak vérből történő meghatározása:

- betegségek diagnosztikájára
- jó érzékenység, kedvező mennyiségi meghatározás
- gyors mérések, sorozatmérésekhez jól használható
- más apoláris vegyületek vizsgálatára is kiváló

És mire jó még?



Atmoszférikus nyomású fotoionizáció - APPI



Fotoionizáció elve

Fotoionizáció: $h\nu \geq IP$



Gerjesztés (de nem ionizálás): $h\nu < IP$



- ☞ Legtöbb szerves vegyület $IP < 10 \text{ eV}$
- ☞ Tipikus HPLC oldószerek $IP > 10 \text{ eV}$

Szelektív ionizálás

3 lámpa
alkalmazható

Ar: 11.2 eV

Kr: 10.0 eV

Xe: 8.4 eV

Nitrogen	15.58
Water	12.62
Acetonitrile	12.20
Oxygen	12.07
Methanol	10.84
Methyl pentanoate	10.40
Hexane	10.13
Heptane	9.93
Acetone	9.70
Pyridine	9.26
Benzene	9.24
Amphetamine	8.99
Toluene	8.83
Naphthalene	8.14
Reserpine	7.88
Triethylamine	7.53

Ionizációs potenciál (eV)

"Dopant"

Az ionizáció hatékonysága növelhető ún. "dopant" molekula alkalmazásával.

Direkt fotoionizáció



Dopant-közvetített fotoionizáció



Általánosan alkalmazott „dopant” molekulák:
toluol, aceton

Párhuzamos reakciók: protonált ionok keletkezése

Az M^{\bullet} gyökion képződése mellett protonált ionok $[M+H]^+$ is keletkeznek (domináns vagy kizárólagos is lehet):



APPI LC-MS Interface előnyei és hátrányai

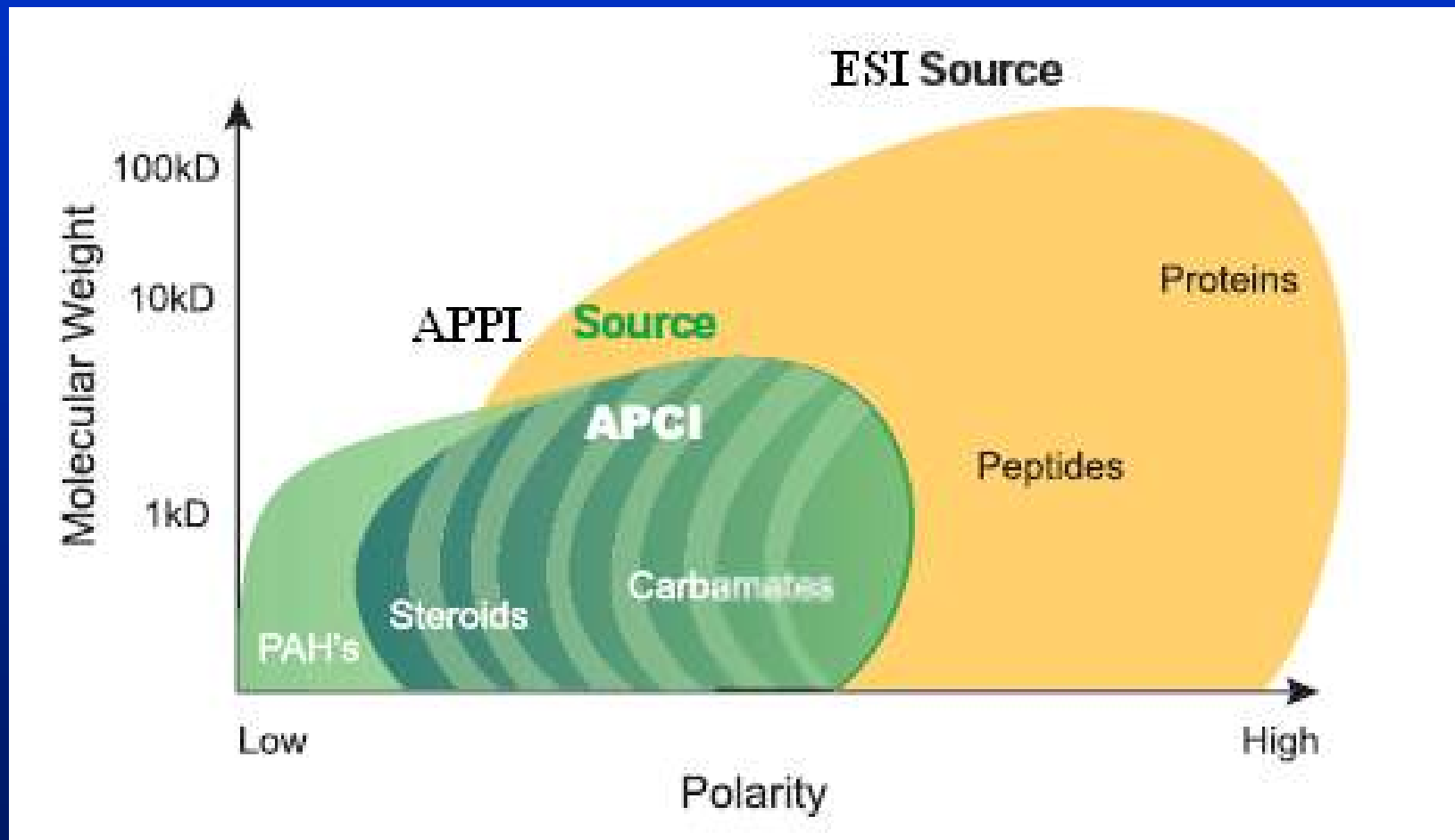
Előnyök

- ☺ Pozitív és negatív ionok, apoláros komponensek
- ☺ Molekulatömeg információ
- ☺ Minimális háttér-interferencia, szelektív ionizáció
- ☺ Könnyű installálni
- ☺ Egyszerűen kapcsolható HPLC-vel
- ☺ Kombinált ionforrások

Hátrányok

- ☹ Új technika...
- ☹ Gyökion vagy protonált molekulaion?
- ☹ Nem illékony pufferek???
- ☹ Nem alkalmas poláros molekulák vizsgálatára

Ionizációs technikák vs. alkalmazások



Problémák, tévhitek

- NEM minden anyag detektálható az MS-ben
- Jelintenzitás arányos a koncentrációval, de különböző típusú anyagok esetén nagyságrendi különbségek lehetnek (lásd előző példa)



- ✗ Tömegspektrométer = tömegszelektív detektor (mint a nitrogén szelektív detektor)
- ✗ Olyan egyszerű, mint a FID vagy UV
- ✗ Nem szükséges érteni hozzá a számítógép mindent megcsinál
- ✗ LC-MS ionforrások bármilyen kromatográfiás körülményekkel használható

Köszönet

MTA KK SZKI MS Osztály:

Prof. Vékey Károly

Dr. Drahos László

Dr. Nagy Kornél

Dr. Jakab Annamária

SE Gyógyszerészeti Intézet: Prof. Klebovich Imre