

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Pavλίna Nekvasilová

VÝVOJ A APLIKACE MINIATURIZOVANÉHO IONTOVÉHO ZDROJE PRO FOTOIONIZACI ZA ATMOSFÉRICKÉHO TLAKU

Development and application of miniaturized ion source for
atmospheric pressure photoionization

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Josef Cvačka, Ph.D.

Praha 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity

V Praze dne

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Josefu Cvačkovi, Ph.D. za vedení, ochotu a cenné rady při vypracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Vladimíru Vrkoslavovi, Ph.D. za praktické rady a pomoc v průběhu měření.

Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury České republiky, projekt číslo 16-01639S.

Abstrakt

Nejnovějším trendem v analytické chemii je miniaturizace konvenčních analytických technik. Jednou z těchto technik je kapalinová chromatografie, při které se místo klasických kolon používají chromatografické kolony s výrazně menším průměrem. Důsledkem miniaturizace je minimální spotřeba vzorku, rozpouštědel a činidel, zkrácení doby analýzy bez ztráty citlivosti a schopnost dodávat robustní a reprodukovatelné výsledky. Pro detekci v kapalinové chromatografii se do popředí dostává hmotnostní spektrometrie. V mikro- a nano-HPLC je jedinou ionizační technikou nanoelektrosprej, který je kompatibilní s nízkými průtoky z miniaturizovaných HPLC kolon. Nanoelektrosprej je vhodný pro velkou škálu analytů od středně polárních až k látkám iontovým, nevýhodou je špatná ionizace látek nepolárních. Nepolární látky lze naopak dobře ionizovat pomocí APPI zdroje, stejně tak jako řadu látek polárních. Komerční zdroje jsou však konstruovány pro průtoky kolem 1 ml/min, což nelze použít ve spojení s mikro- či nano-HPLC. V této bakalářské práci byl otestován miniaturizovaný iontový zdroj APPI založený na skleněném mikrofluidním čipu. Bylo optimalizováno postavení čipu vůči vstupu do hmotnostního spektrometru a UV lampě, průtok analytu a průtok zmlžovacího plynu.

Klíčová slova: fotoionizace za atmosférického tlaku, hmotnostní spektrometrie, miniaturizace

Abstract

The latest trend in analytical chemistry is the miniaturization of conventional analytical techniques. One of these techniques is liquid chromatography, where chromatographic columns with significantly smaller diameters are used instead of classical columns. Miniaturization results in minimal sample, solvents and reagents consumption, shorter analysis time without loss of sensitivity and the ability to deliver robust and reproducible results. Mass spectrometry is increasingly used for detection in liquid chromatography. In micro- and nano-HPLC, the only ionization technique is nanoelectrospray that is compatible with low flow rates from miniaturized HPLC columns. Nanoelectrospray is suitable for a wide range of analytes from medium polar to ionic substances; unfavorable ionization of non-polar compounds. Nonpolar substances can be well ionized using APPI sources. Commercial sources are designed for flow rates of about 1 ml / min, which cannot be used in connection with nano-HPLC. The aim of the bachelor thesis is the development and testing of miniaturized APPI ion source based on the glass microfluidic chip. In the course of the experiments, the position of the chip relative to the mass spectrometer entrance and the UV lamp was optimized, as well as the flow rate of the sample and nebulizer gas.

Keywords: atmospheric pressure photoionization, mass spectrometry, miniaturization

Obsah

Seznam použitých zkratk	7
1. TEORETICKÁ ČÁST	8
1.1. Hmotnostní spektrometr	8
1.1.1. Iontové zdroje	9
1.2. Ionizační techniky pracující za atmosférického tlaku	9
1.2.1. Ionizace elektrosprejem	10
1.2.2. Chemická ionizace za atmosférického tlaku	10
1.2.3. Fotoionizace za atmosférického tlaku	11
1.2.3.1. Princip ionizace	13
1.2.3.2. Mechanismus	13
1.2.4. Srovnání APPI s ostatními API technikami	14
1.3. Miniaturizace	15
1.3.1. Mikro APPI	16
2. CÍL PRÁCE	17
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	18
3.1. Použité chemikálie	18
3.2. Přístrojové vybavení	18
3.3. Vzorek	19
3.4. Instrumentace	19
3.5. Zpracování dat	22
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	23
4.1. Optimalizace pozice čipu vůči vstupu do hmotnostního spektrometru	23
4.2. Optimalizace průtoku vzorku	25
4.3. Optimalizace průtoku zmlžovacího plynu	26
4.4. Porovnání mikro APPI s konvenční APPI	27
5. ZÁVĚR	30
Seznam použitých zdrojů	31

Seznam použitých zkratek

APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Photoionization)
ESI	Ionizace elektrosprejem (Electrospray ionization)
eV	Elektronvolt
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)
m/z	Poměr hmotnosti iontu a jeho elementárního náboje
MS	Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
PID	Fotoionizační detektor (Photoionization Detector)
VUV	Vakuová UV oblast (Vakuum ultra violet)

1. TEORETICKÁ ČÁST

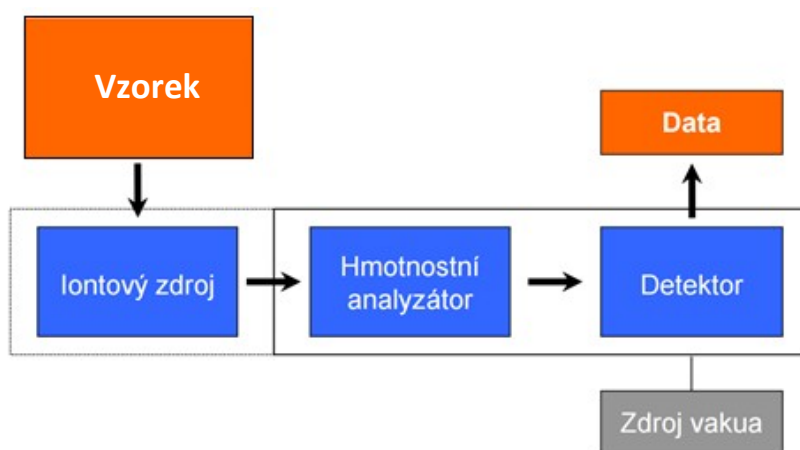
Hmotnostní spektrometrie (MS) je instrumentální metoda, která patří k nejmodernějším analytickým metodám. Principem MS je převod neutrálních molekul analytu na kladně či záporně nabitě ionty v plynné fázi a jejich následná analýza. Výsledkem analýzy je hmotnostní spektrum. Jedná se o graf závislosti intenzity signálu iontů (absolutní či relativní) na jejich m/z (poměr hmotnosti iontu a jeho elementárního náboje).

Hmotnostní spektrometrie se využívá pro kvalitativní i kvantitativní analýzu, určení struktury a izotopického složení látek.

Výhodami metody jsou vysoká citlivost, specifčnost a rychlost, malá spotřeba vzorku a často jednoduchá interpretace dat. Nevýhodami jsou pořizovací a provozní náklady hmotnostních spektrometrů a destrukce analyzovaného vzorku.

1.1. Hmotnostní spektrometr

Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří hlavních částí, a to z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Nedílnými součástmi jsou iontová optika, vstup pro zavedení vzorku a vakuový systém (Obr. 1).



Obrázek 1 Blokové schémahmotnostního spektrometru Převzato z[1].

1.1.1. Iontové zdroje

V iontovém zdroji probíhá ionizace, což je proces převedení neutrálních molekul na ionty. Ionizační techniky lze rozdělit podle dodané energie na měkké a tvrdé. Dále pak podle tlaku v iontovém zdroji na ionizaci probíhající za sníženého tlaku a za atmosférického tlaku.

Tvrdé ionizační techniky

Při nich je ionizované molekule dodán velký přebytek energie, tudíž dochází k rozsáhlým fragmentacím. Výhodou tvrdých ionizačních technik je, že daná látka při dané energii fragmentuje vždy stejně a hmotnostní spektra jsou téměř totožná. Díky tomu existují knihovny hmotnostních spekter, které umožní rychle identifikovat analyzované látky pomocí porovnání spektra naměřeného se spektrem z knihovny.

Měkké ionizační techniky

Energie dodávané ionizovaným molekulám jsou malé, tudíž k fragmentacím dochází minimálně. Ve spektru proto nalézáme většinou pouze pík molekulového aduktu či deprotonované molekuly. Protože ionizace silně závisí na konstrukci zdroje, experimentálních podmínkách a složení rozpouštědla či matrice, knihovny MS spekter nejsou k dispozici [2]. Existují však specializované databáze MS/MS spekter, např. mzCloud [3].

1.2. Ionizační techniky pracující za atmosférického tlaku

Ionizační techniky pracující za atmosférického tlaku patří mezi měkké ionizační techniky. Tyto techniky mohou být použity k ionizaci tepelně labilních vzorků, jako jsou peptidy, proteiny a polymery přímo z kapalně fáze [4]. Tyto techniky jsou často využívány ve spojení s kapalinovou chromatografií. Mezi ionizační techniky pracující za atmosférického tlaku patří ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI).

1.2.1. Ionizace elektrosprejem

Elektrosprejová ionizace je nejpoužívanější technika ionizace pro spojení HPLC-MS. Je využívána pro látky středně polární až iontové. Pro látky nepolární a nepolární rozpouštědla tuto metodu většinou nelze použít [5].

Zdroj pro ionizaci elektrosprejem je tvořen kapilárou z nerezové oceli a protielektrodou, kterou bývá vstupní štěrba hmotnostního spektrometru. Vzdálenost mezi kapilárou a protielektrodou bývá přibližně 0,3-2 cm. Špička kapiláry je vystavena vysokému elektrickému poli. To může být tvořeno trojím způsobem. Vložením napětí na kapiláru, vložením napětí na protielektrodu či vložením různých napětí na kapiláru a protielektrodu. Výběr jedné z těchto možností závisí na typu hmotnostního analyzátoru a na způsobu přechodu iontů z atmosférického tlaku do vakua [6].

Rozpuštěný analyt je přiváděn kovovou kapilárou, na jejímž konci je odpařen a postupně se tvoří menší a menší kapičky. Desolvatace způsobí, že se zvětší hustota povrchového náboje kapiček. Při dosažení kritické hodnoty dochází k rozpadu tzv. Coulombické explozi. Tím se kapičky rozpadávají až na poloměr $\sim 10 \mu\text{m}$. Tyto částice tvoří tzv. Taylorův kužel, ze kterého jsou uvolňovány ionty a vtahovány do hmotnostního spektrometru [7].

1.2.2. Chemická ionizace za atmosférického tlaku

V současné době se jedná o druhou nejpoužívanější ionizační techniku (po elektrosprejové ionizaci) v HPLC/MS. APCI je využívána pro látky nepolární až středně polární. Na rozdíl od ESI probíhá ionizace v plynné fázi, proto je tato metoda nevhodná pro ionizaci biomakromolekul [5, 8].

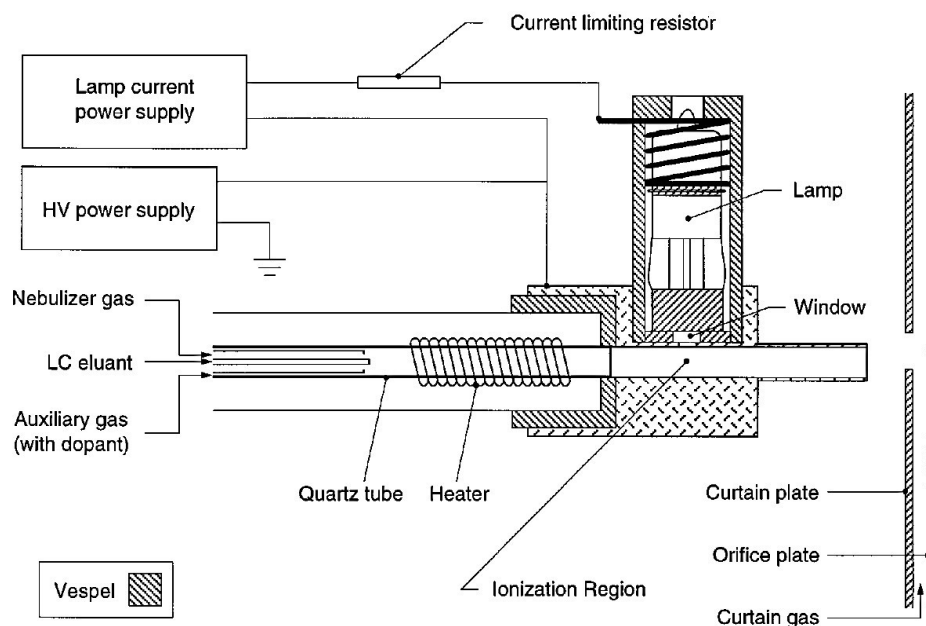
Roztok vzorku protéká kapilárou vloženou do koaxiálního pneumatického rozprašovače. Mísí se plynem (obvykle dusík), který napomáhá procesu zmlžení. Směs dusíku a kapalného vzorku prochází vyhřívanou zónou, která pomáhá odpařování rozpouštědla. I přes vysokou teplotu vyhřívání dochází k minimální degradaci vzorku, jelikož dodané teplo se spotřebuje pro odpařování rozpouštědla a teplota vzorku obvykle nepřesahuje 80-100 °C. Mezi

nebulizérem a vstupem do hmotnostního spektrometru je umístěna jehla, na kterou je přiváděno vysoké napětí, čímž vzniká koronový výboj [9].

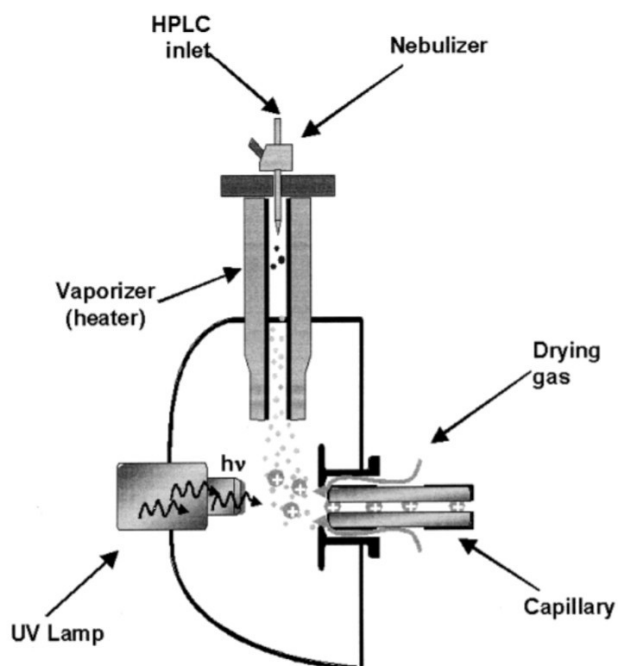
1.2.3. Fotoionizace za atmosférického tlaku

Fotoionizace za atmosférického tlaku je měkká ionizační technika, která byla vyvinuta pro ionizaci látek, které jsou obtížně ionizovatelné v ESI nebo APCI zdroji.

Fotoionizace byla poprvé použita v polovině 70. let jako detekční metoda pro plynovou chromatografii (PID) s cílem dosáhnout lepší citlivost pro nepolární látky než pro plamenný ionizační detektor (FID). Ve stejném desetiletí byl tento detektor použit i pro kapalinovou chromatografii. Použití fotoionizace za atmosférického tlaku poprvé prezentoval M. A. Baim a kol. v roce 1983, kdy byla tato ionizační technika spojena s iontově mobilním spektrometrem [10]. V roce 1991 byly publikovány studie týkající se spojení fotoionizace s hmotnostním spektrometrem [11]. A v roce 2000 bylo poprvé publikováno spojení LC/MS s fotoionizačním zdrojem fungujícím za atmosférického tlaku [13]. Současně byla uvedena na trh dvě technická řešení APPI zdroje. D. B. Robb a kol. vytvořili zdroj nazvaný Photospray (Obr. 2). Současně bylo vytvořeno i druhé, ortogonální, uspořádání zdroje zvané Photomate (Obr. 3). To vytvořil Syage a kol. [13].



Obrázek 2 Schéma in-line uspořádání APPI zdroje. Převzato z [12].



Obrázek 3 Schéma ortogonálního uspořádání APPI zdroje. Převzato z [13].

1.2.3.1. Princip ionizace

APPI využívá fotonů k ionizaci molekul v plynné fázi. V iontovém zdroji dochází k odpařování a rozprašování vzorku vyhřívaným zmlžovačem. Odpařený analyt interaguje s fotony emitovanými z VUV lampy [14]. Fotony mohou ionizovat molekuly, které mají ionizační energii nižší než je energie emitovaných fotonů. Ionizační energie sloučeniny závisí na velikosti a struktuře sloučeniny. Velké molekuly a molekuly vykazující vysoký stupeň konjugace mají obvykle nižší ionizační energii než malé a alifatické molekuly. Většina analytů má ionizační energie v rozmezí 7–10 eV, zatímco běžně používaná rozpouštědla a plyny nacházející se ve zdroji (O_2 , N_2) mají energii vyšší a neionizují se. Z tohoto důvodu je možné selektivně ionizovat analyty. Nejčastěji se používá kryptonová výbojka, která emituje fotony s energií 10,03 eV a 10,64 eV v poměru 4:1 [15]. Dalšími používanými výbojkami jsou xenonová a argonová.

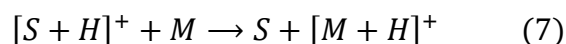
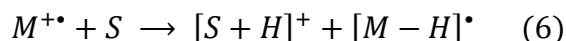
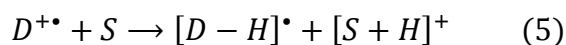
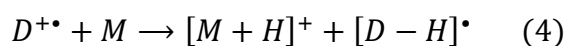
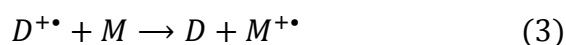
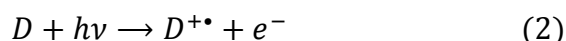
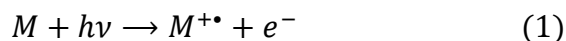
Přímá ionizace analytů je charakteristická svou slabou účinností. To je z části způsobeno rozpouštědly s vysokou ionizační energií, které se při interakci s fotonem pouze fotoexcitují. Tím je však snížen počet fotonů pro přímou ionizaci vzorku a v důsledku dochází i ke snížení účinnosti ionizace [16]. Tomuto negativnímu efektu lze zamezit přidávkem vhodné látky v relativně velkém nadbytku oproti analytu, která zapříčiní významné zvýšení počtu vzniklých iontů. Taková látka se nazývá dopant.

Dopant je účinný, pokud ho lze fotoionizovat a funguje jako intermediát mezi reakcemi fotonů s analytem. Dopant musí být volen tak, aby jeho ionizační energie byla nižší než je energie fotonů emitovaných VUV lampou [12]. Nejčastějšími dopanty jsou aceton, toluen, anisol, benzen, tetrahydrofuran.

1.2.3.2. Mechanismus

V pozitivním módu APPI za účasti dopantu je počáteční reakcí tvorba radikál kationtu dopantu v případě, že je ionizační energie dopantu nižší než energie fotonů emitovaných VUV lampou (Obr. 4, reakce 2). Pokud je ionizační energie dopantu vyšší než neutrálního analytu dochází k výměně náboje (reakce 3). Alternativně může být analyt ionizován přenosem protonu pokud je

protonová afinita analytu vyšší než protonová afinita deprotonovaného radikál kationtu dopantu (reakce 4), obdobným způsobem je ionizován solvent (reakce 5). Podobně radikál kation analytu lze deprotonovat a převodem protonu ionizovat molekuly rozpouštědla, za předpokladu, že protonová afinita rozpouštědla je vyšší než deprotonovaného radikál kationtu analytu (reakce 6). Protonované molekuly rozpouštědla pak mohou protonovat analyt v případě, že protonová afinita analytu je vyšší než rozpouštědla (reakce 7) [17].



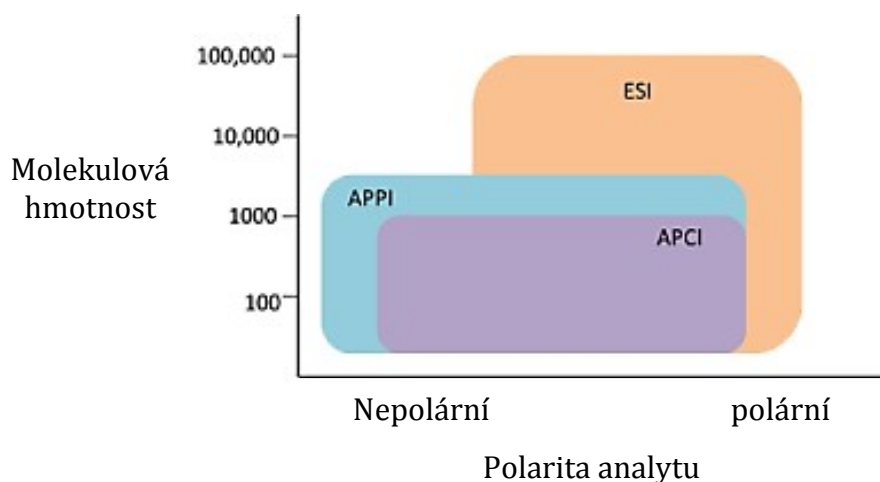
Obrázek 4 Mechanismus fotoionizace

M... analyt; S... solvent, D... dopant

1.2.4. Srovnání APPI s ostatními API technikami

APPI je relativně méně populární ve srovnání s ostatními ionizačními technikami, které pracují za atmosférického tlaku. Jedná se o ionizační techniku, která umožňuje ionizovat méně polární a nepolární molekuly. Ionizace elektrosprejem probíhá v kapalně fázi a aplikuje se hlavně na polární sloučeniny. Zatímco ionizace APCI probíhá, stejně jako ionizace APPI, v plynné fázi a může být použita pro ionizaci méně polárních molekul. Fotoionizace je nejčastěji volena pro ionizaci molekul, které jsou špatně ionizovatelné pomocí ESI a APCI [18].

Na základě polaritě a molekulové hmotnosti analyzovaných sloučenin se liší použití ionizačních technik, což je znázorněno na Obr. 5.



Obrázek 5 Využití technik pracujících za atmosférického tlaku pro různé polarity a rozsah molekulových hmotností pro jednotlivé techniky. Převzato a upraveno z [18]

1.3. Miniaturizace

Miniaturizace analytických přístrojů využívajících technologii mikrofabrikace byla v posledním desetiletí příčinou zvýšeného zájmu o analytickou chemii. Hnací silou je rostoucí poptávka po nízkonákladových přístrojích, které dokáží rychle analyzovat sloučeniny ve velmi malých objemech vzorků s vysokou úrovní automatizace. Tyto mikrofabrikované systémy jsou nazývány „Micro Total Analysis System“ (μ -TAS) [19]. Název μ -TAS vyjadřuje snahu o zkrácení cesty vzorku laboratoří a sloučení co největšího množství jednotkových operací do analyzátoru velikosti např. kreditní karty. Vrcholem tohoto vývoje by pak mohla být laboratoř na čipu (Lab-on-a-chip) [20].

Miniaturizace s sebou přináší mnoho výhod. Hlavní výhodou je snížení množství vzorku potřebného k provedení odpovídající analýzy, což je obzvláště výhodné, jedná-li se o vzácné vzorky. Dále je to snížená spotřeba analytických činidel a organických rozpouštědel, což může být důsledkem miniaturizace jakéhokoli analytického kroku procesu. To je obzvláště důležité u analytických metod zahrnujících drahá a vzácná činidla, jako jsou enzymy a imunochemikálie, stejně jako v případě analytických metod zahrnujících toxická činidla nebo

organická rozpouštědla. S tím souvisí i redukce odpadu vznikajícího v průběhu celého analytického procesu. Miniaturizace separační techniky umožňuje významné snížení spotřeby mobilní fáze nebo elektrolytu a také množství materiálů stacionární fáze. Co se týče detekčních technik, mohou být významné úspory spotřeby činidel a plynu. Miniaturizace umožňuje zdokonalit dva nejčastěji časově náročné kroky, jmenovitě předběžné zpracování vzorku a analytickou separaci. Zmenšení analytických systémů se také pozitivně odráží ve snížení energetických nároků [21].

1.3.1. Mikro APPI

Nízké průtoky (0,05-5 $\mu\text{l}/\text{min}$) používané v mikro-APPI umožňují kombinaci mikro / nano-LC nebo mikrofluidních zařízení s MS, což není možné s komerčním APPI zdrojem, jehož průtoky jsou řádově ve stovkách $\mu\text{l}/\text{min}$. Kromě toho jsou výrobní náklady na mikroAPPI mnohem nižší než náklady na konvenční APPI. Schopnost mikro-APPI analyzovat polární a nepolární analyty z velmi malých objemů vzorků je výhodou oproti současným ESI čipům a činí tak z mikro-APPI vhodnou alternativu pro propojení systémů s nízkým průtokem s MS [22].

2. CÍL PRÁCE

Cílem práce je nalézt optimální pracovní podmínky miniaturizovaného zdroje pro fotoionizaci za atmosférického tlaku, který využívá mikrofluidní vyhřívaný čip. Konkrétním záměrem je zejména:

- optimalizace vzdálenosti mezi mikrofluidním čipem a vstupem do hmotnostního spektrometru
- optimalizace úhlu, který svírá mikrofluidní čip a osa vstupní kapiláry do hmotnostního spektrometru
- optimalizace průtoku zmlžovacího plynu
- porovnání citlivosti s komerčním vysokoprůtokovým iontovým zdrojem

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Použité chemikálie

Deionizovaná voda	z přístroje Milli-Q Water Purification System (Darmstadt, Germany)
Kyselina octová	99 %, Lach-Ner (Neratovice, ČR)
Methanol	≥ 99,9 % Chromasolv® pro HPLC, gradient grade, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Propan-2-ol	≥ 99,9 % Chromasolv® pro HPLC, gradient grade, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Reserpin	99 %, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

3.2. Přístrojové vybavení

Hmotnostní spektrometr LCQ Fleet (Thermo Fisher Scientific) s 3D iontovou pastí a hmotnostním rozsahem m/z 50-2000 (Waltham, MA, USA).

Program Xcalibur (Thermo Fisher Scientific) pro počítačové ovládání přístroje, úpravu experimentálních podmínek, prohlížení a zpracovávání spekter.

Nízkotlaká kryptonová výbojka PKR 106, 58 mm × 12,7 mm, Heraeus Noblelight (Hanau, Německo) pro fotoionizaci.

Zdroj stejnosměrného proudu pro UV lampu MANSION SDP-2405, Manson Engineering Industrial (Hong Kong).

Externí zařízení pro elektrické vyhřívání mikročipu ISO-TECH programable power supply IPS-603 ISO-TECH (Northamptonshire, Velká Británie).

Zařízení pro kontrolu průtoku zmlžovacího plynu čipu MASS FLOW CONTROLLER GFC, Aalborg (New York, USA).

HPLC čerpadlo, Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific, (Waltham, MA, USA)

Externí stříkačková pumpa Harvard Apparatus 11 Plus Syringe Pump 70-2208 (Holliston, USA)

3.3. Vzorek

Optimalizace geometrického uspořádání byla prováděna s roztokem reserpinu. Nejprve byl připraven zásobní roztok reserpinu o koncentraci 1 mg/ml v 1 % kyselině octové v methanolu. Tento roztok byl dále ředěn na koncentraci 10 µg/ml směsí propan-2-olu a deionizované vody v poměru 1:1.

3.4. Instrumentace

Na hmotnostní spektrometr LCQ Fleet byla nasazena příruba z tvrzeného eloxovaného hliníku s dvojicí na něj kolmých ocelových tyčí (Obr. 6). Na tyče byl připevněn držák s 3-D mikromanipulátorem MX10R (Siskiyou corporation, USA), jehož úlohou bylo držet čip v optimální pozici vůči vstupní kapiláře.

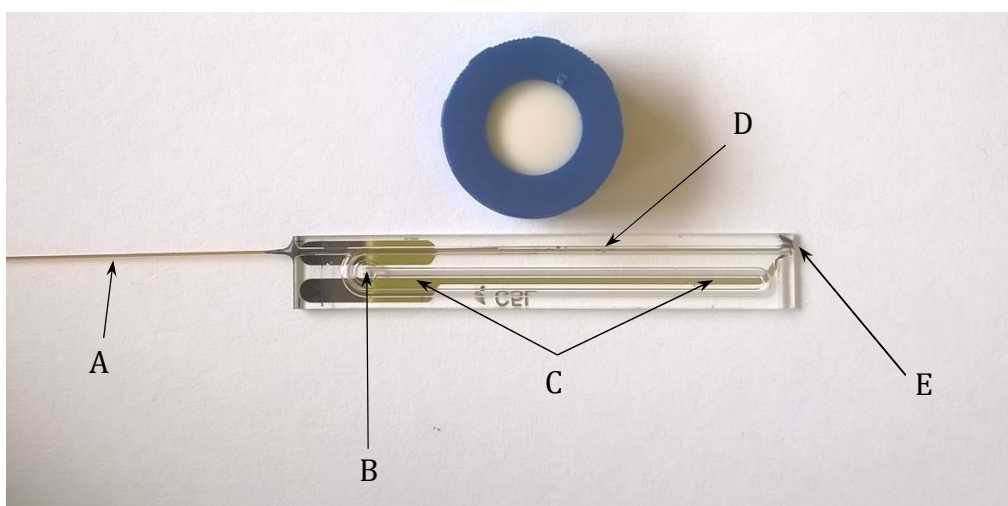
Mikrofabrikovaný čip (Obr. 7) byl zkonstruován skupinou prof. R. Konsiainena a sestává se ze dvou skleněných destiček. Na spodní destičce je napařena platinová vrstva sloužící jako odporové topení, na vrchní destičce je umístěn vstup pro zmlžovací plyn, odpařovací drážka, přívod analytu a tryska. Analyt je přiváděn křemennou kapilárou do čipu, kde je mísen se zmlžovacím plynem a následně je tryskou vytvářen úzký proud par analytu a zmlžovacího plynu [23].

Čip byl vyhříván napájecí zdrojem IPS-603 výkonem 4,5 W. Z pravé strany čipu byla umístěna UV lampa PKR 106, jejíž elektrody byly připojeny ke zdroji stejnosměrného proudu pro MANSION SDP-2405. Celkové experimentální uspořádání miniaturizovaného zdroje je zachyceno na Obr. 8. Detailní uspořádání i s optimální pozicí čipu je vyobrazeno na Obr. 9.

Čip byl pro prvotní experiment umístěn do vzdálenosti 1 mm od vstupu do MS tak, že osa vstupní kapiláry a směšovací kanálek čipu tvořily přímku. Roztok reserpinu byl přiváděn do čipu Hamiltonovou stříkačkou o objemu 50 µl umístěnou ve stříkačkové pumpě v přední části přístroje.

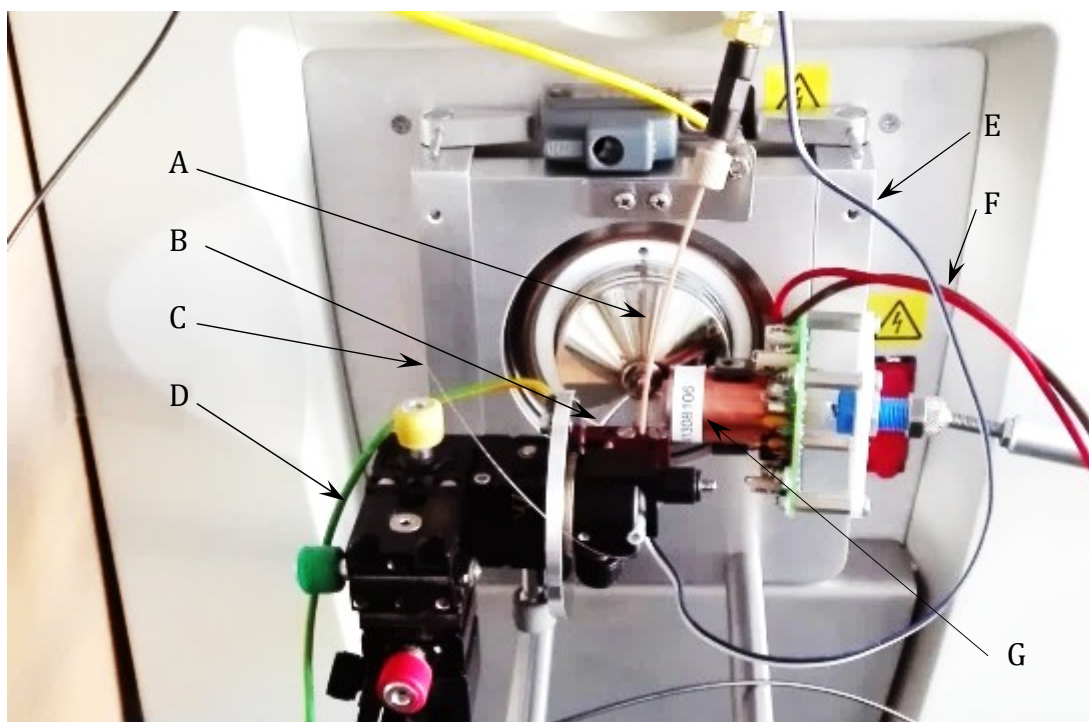


Obrázek 6 Příruba z eloxovaného hliníku s dvojicí ocelových tyčích.



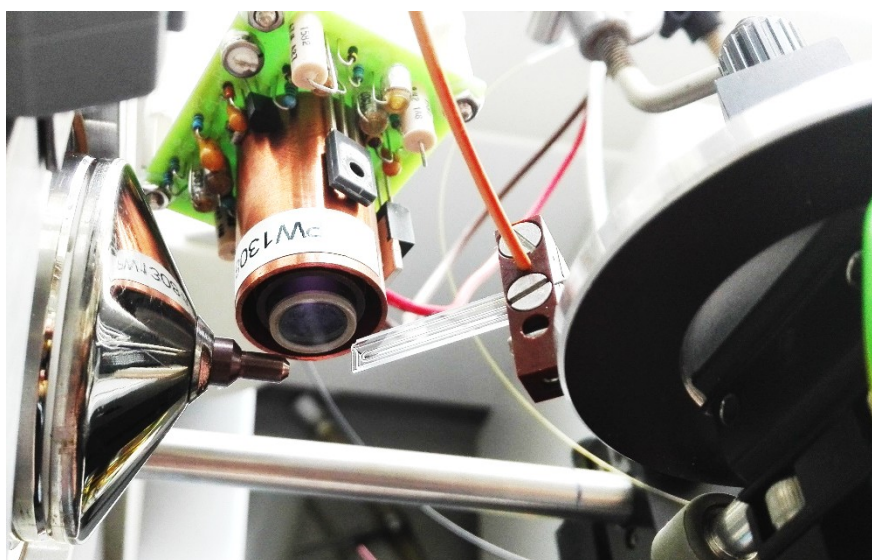
Obrázek 7 Odporově vyhříváný čip. Foto Vrkoslav V.

- (A) Přívod mobilní fáze/vzorku;
- (B) Přívod dusíku;
- (C) Kovová vrstva - odporové vyhřívání;
- (D) Směšovací kanálek;
- (E) Sprejovací kapilára



Obrázek 8 Popis experimentálního uspořádání pro mikro APPI

- (A) Přívod dusíku; (B) Upevnění čipu;
- (C) Přívod mobilní fáze / vzorku; (D) 3-D mikromanipulátor;
- (E) Přívod elektrického proudu pro vyhřívání čipu;
- (F) Přívod elektrického proudu pro UV lampu; (G) UV lampa



Obrázek 9 Experimentální uspořádání mikro APPI zdroje s optimálním postavením čipu vůči vstupu do MS.

3.5. Zpracování dat

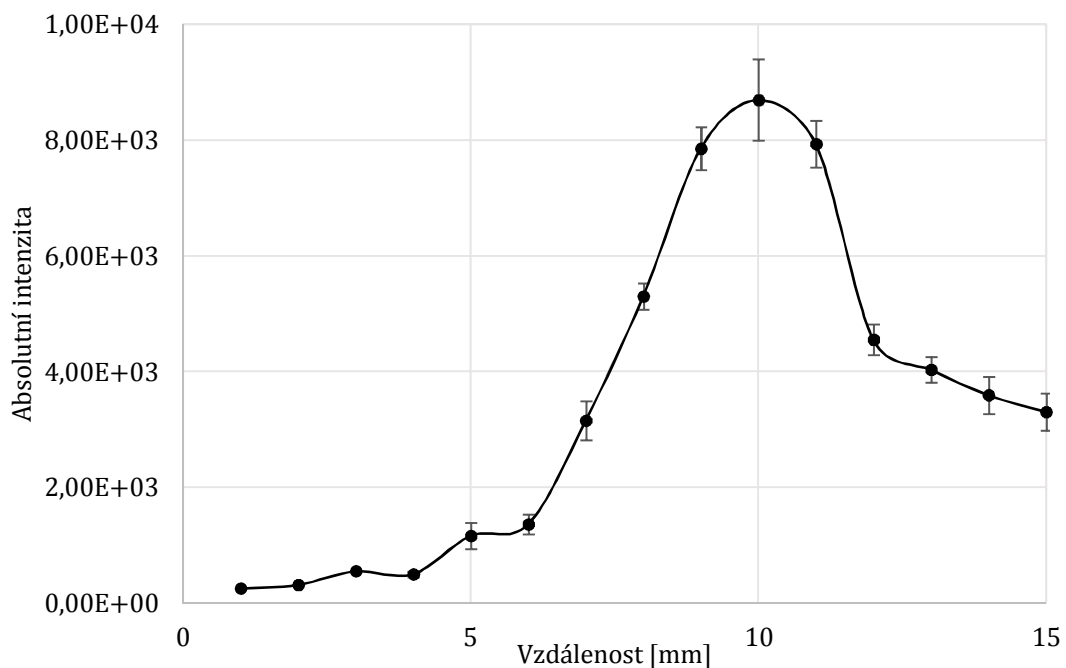
Ke sběru dat a zpracování spekter byl použit ovládací program Xcalibur ver. 2.0.7. (Thermo Fisher Scientific). Jednotlivá spektra byla snímána po dobu dvou minut v rozsahu m/z 300-1000. Každé měření bylo provedeno třikrát. Z jednotlivých záznamů byly vyhodnoceny intenzity signálu molekulárního aduktu reserpinu ($[M + H]^+$ m/z 609,2). Hodnoty intenzit tohoto iontu byly zprůměrovány a následně byla vypočítána směrodatná odchylka.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

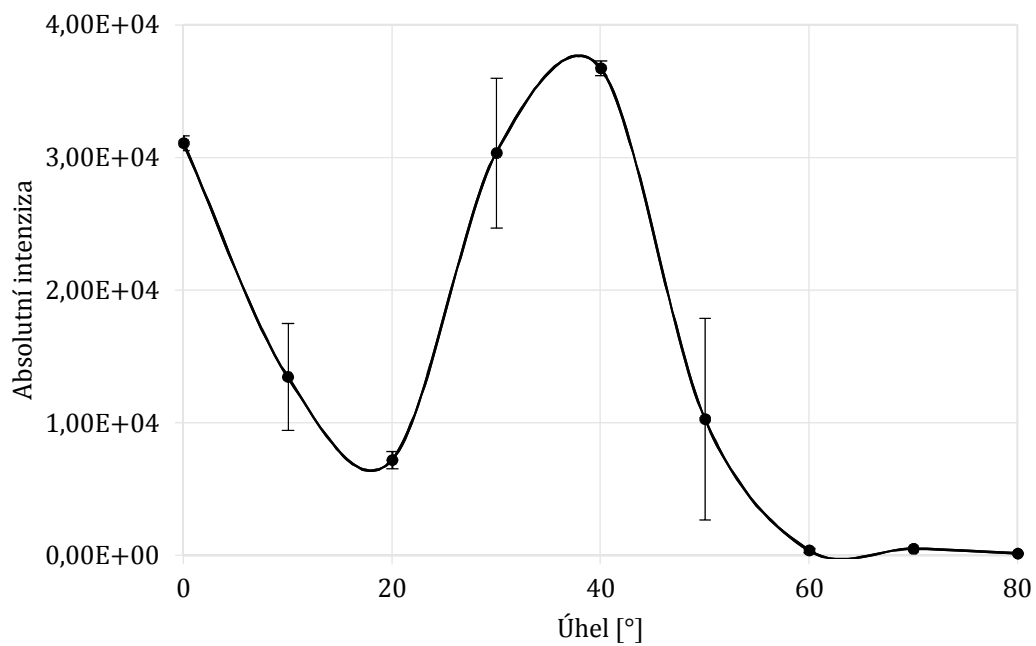
4.1. Optimalizace pozice čipu vůči vstupu do hmotnostního spektrometru

Nejprve byla optimalizována poloha čipu vzhledem ke vstupu do hmotnostního spektrometru, a to vzdálenost čipu od vstupní kapiláry a úhel mezi čipem a osou vstupní kapiláry. Pro tyto experimenty byl použit roztok reserpinu o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ a průtoku 1 $\mu\text{l/min}$. Jako první byl proveden experiment, kdy byl čip umístěn do vzdálenosti 1 mm od vstupní kapiláry tak, že osa vstupní kapiláry a směšovací kanálek čipu tvořily přímku. Postupně byl čip vzdalován po 1 mm do vzdálenosti 15 mm. Výsledky experimentu shrnuje graf na Obr. 10, kde je vidět maximum při vzdálenosti 10 mm od vstupu do hmotnostního spektrometru. I vzhledem k poměrně malým směrodatným odchylkám byla tato vzdálenost brána jako optimální.

Dále byl optimalizován sklon čipu k ose vstupní kapiláry. Pro tento experiment byl vždy čip postaven do konstantní vzdálenosti od vstupu do hmotnostního spektrometru, a to 10 mm. Následně byl měněn sklon čipu od 0° do 80 ° vždy po 10 °. Experiment při sklonu 90° nemohl být z prostorových důvodů proveden. Výsledky jsou shrnuty v grafu na Obr. 11, kde jsou vidět dvě maxima, a to při sklonu 0° a 40°. Jako optimální úhel byl vyhodnocen sklon 40° z důvodu vyšší intenzity signálu.



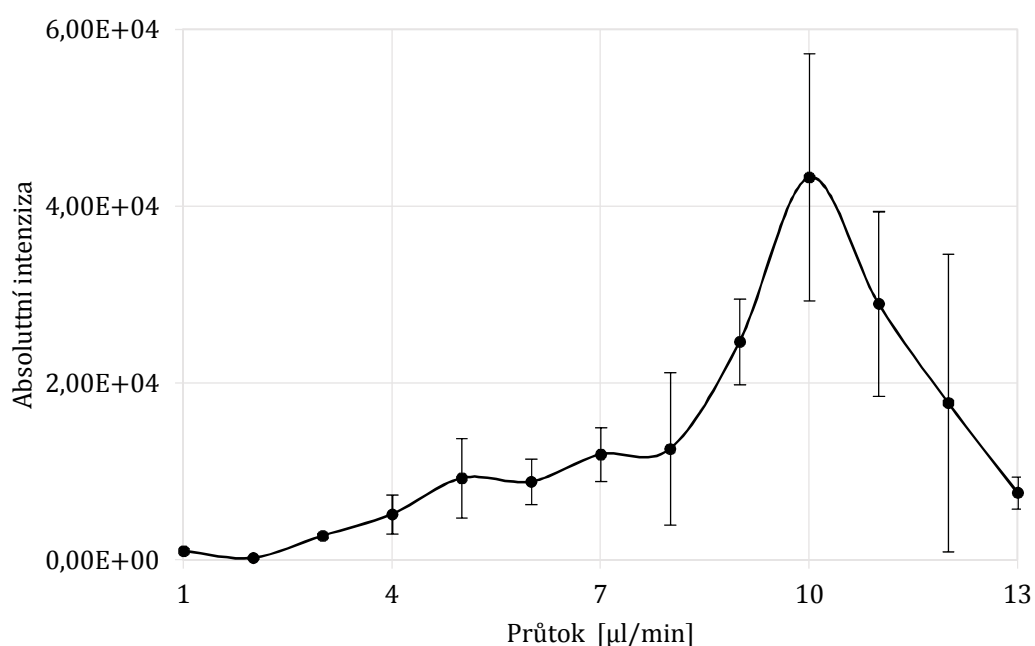
Obrázek 10 Závislost intenzity signálu reserpinu ($[M + H]^+$) na vzdálenosti mikrofluidního čipu vstupu do hmotnostního spektrometru.



Obrázek 11 Závislost intenzity signálu reserpinu ($[M + H]^+$) na úhlu, který svíral mikrofluidní čip a vstupní kapilára hmotnostního spektrometru

4.2. Optimalizace průtoku vzorku

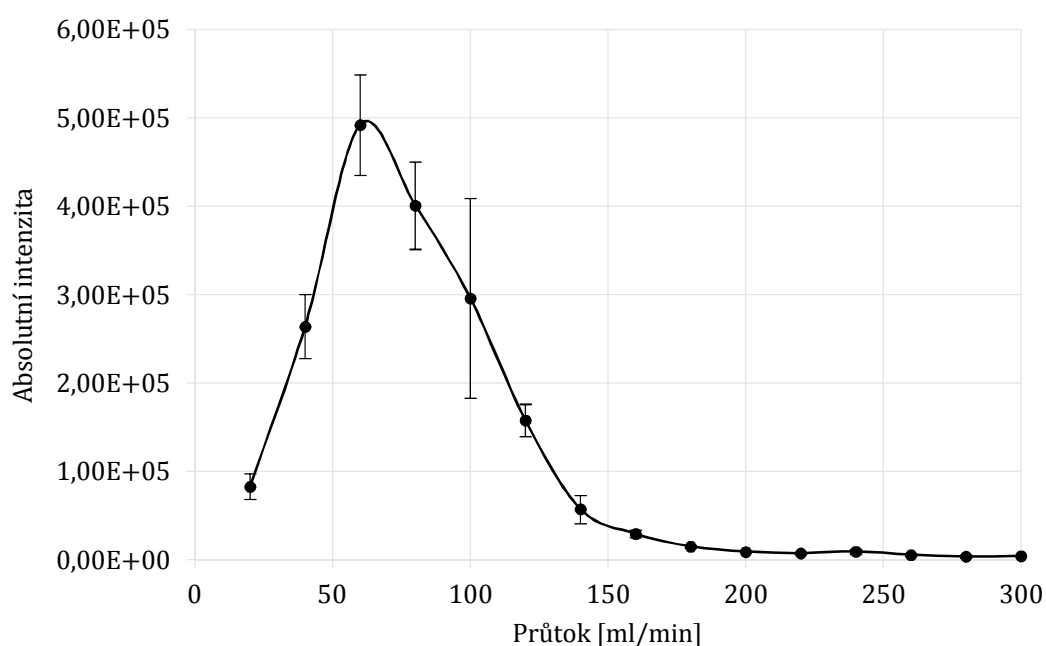
Při optimálním geometrickém uspořádání, tj. ve vzdálenosti čipu 10 mm a sklonu čipu 40° byla provedena optimalizace průtokové rychlosti vzorku. Průtok roztoku reserpinu o koncentraci 10 µg/ml byl měněn od 1 µl/min do 13 µl/min vždy po 1 µl/min. Výsledky shrnuje graf na Obr. 12. Z grafu vyplývá, že odezva roste s průtokem vzorku až do 10 µl/min, což naznačuje, že nejde o koncentrační, ale o hmotnostní detektor. Nejvyšší odezvy bylo dosaženo při průtoku 10 µl/min. Směrodatné odchylky znázorněné chybovými úsečkami jsou při vyšších průtocích značné.



Obrázek 12 Závislost intenzity signálu reserpinu ($[M+H]^+$) na průtoku roztoku reserpinu

4.3. Optimalizace průtoku zmlžovacího plynu

V dalším kroku byl optimalizován průtok zmlžovacího plynu. Čip byl nastaven do vzdálenosti 10 mm od vstupu do hmotnostního spektrometru se sklonem k ose vstupní kapiláry 40°. Pro tento experiment byl použit roztok reserpinu o koncentraci 10 µg/ml a průtoku 10 µl/min. Průtok zmlžovacího plynu byl postupně zvyšován od 20 ml/min do 300 ml/min vždy po 20 ml/min. Jednotlivá měření byla provedena třikrát, kdy byla spektra snímána po dobu dvou minut. Z nasbíraných dat byla spočítán průměr a směrodatná odchylka a následně vynesena do grafu, který je zobrazen na Obr. 13.

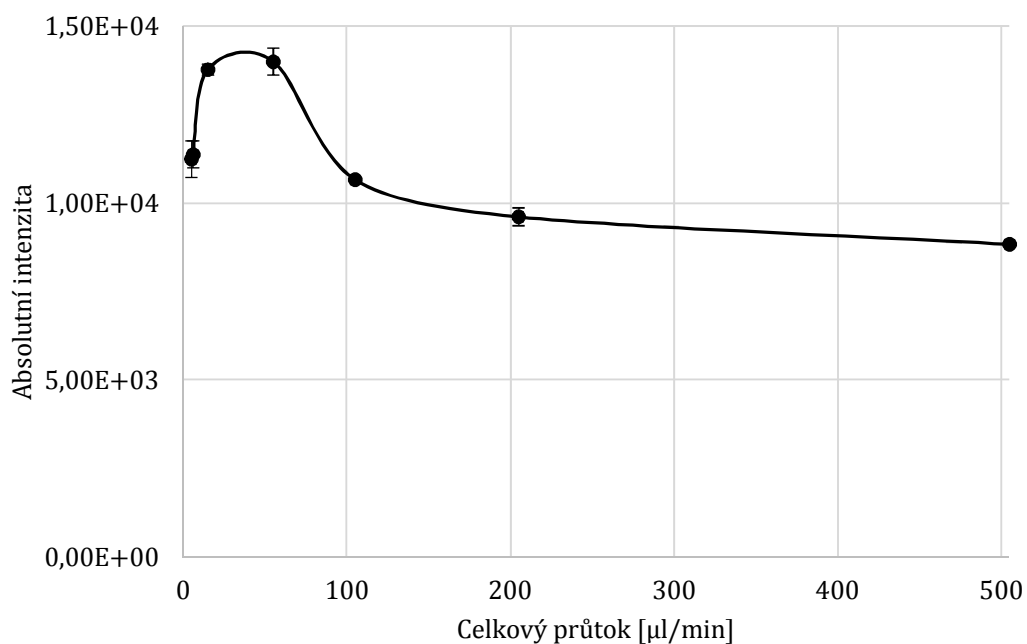


Obrázek 13 Závislost intenzity signálu reserpinu ($[M+H]^+$) na průtoku zmlžovacího plynu (N_2).

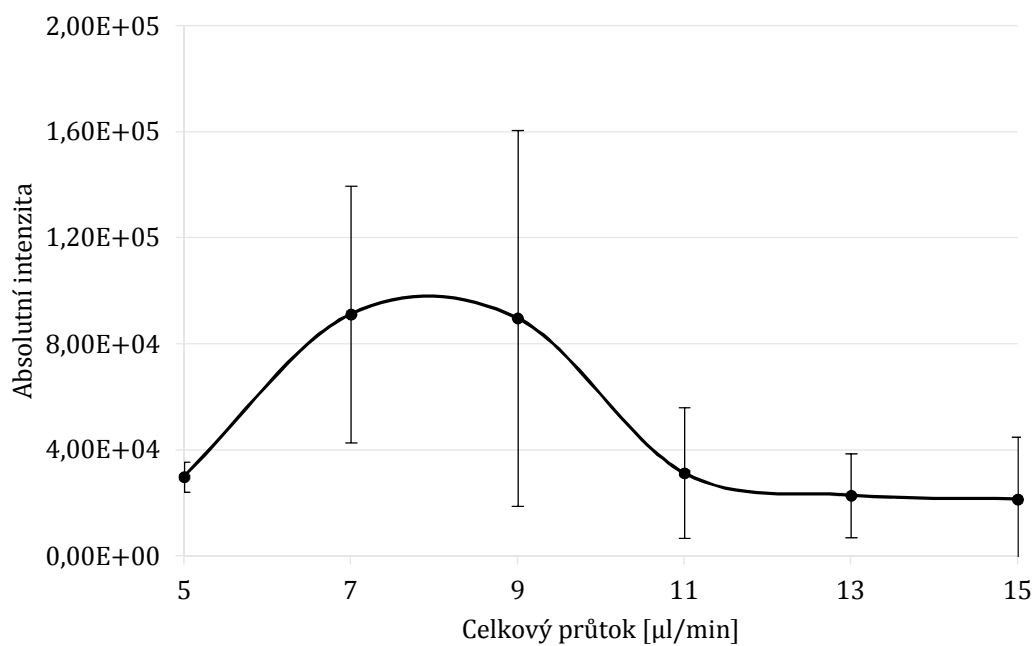
4.4. Porovnání mikro APPI s konvenční APPI

Následně byla porovnána citlivost mikro APPI zdroje s konvenčním zdrojem. Pro miniaturizovaný zdroj byla použita optimální pozice čipu, a to vzdálenost čipu od vstupu do hmotnostního spektrometru 10 mm a sklon čipu k ose vstupní kapiláry 40°. A optimální průtok zmlžovacího plynu 60 ml/min. Při obou experimentech byl vzorek reserpinu o koncentraci 10 µg/ml přiváděn rychlostí 5 µl/min 50 µl Hamiltonovou stříkačkou umístěnou ve stříkačkové pumpě na přední straně přístroje. Rozpouštědlo (směs propan-2-olu a deionizované vody v poměru 1:1) bylo přiváděno pomocí HPLC pumpy (v případě konvenčního zdroje) nebo externí stříkačkové pumpy Harvard Apparatus 11 Plus Syringe Pump 70-2208 (v případě mikro zdroje). Rozpouštědlo bylo pumpováno při různých průtocích, a to vždy od vyšších průtoků k nižším. Rozpouštědlo a vzorek reserpinu se mísily ve spojce tvaru T, odkud byly přiváděny do zdroje. Pro každý zdroj byla provedena vždy 3 měření při daném průtoku rozpouštědla.

Výsledky experimentu jsou shrnuty na Obr. 14 a Obr. 15. Je na nich vidět, že maximálního signálu pro konvenční APPI zdroj bylo dosaženo při celkovém průtoku 55 µl/ml a pro mikro APPI 7 µl/min. Při srovnání absolutních intenzit signálů obou APPI zdrojů bylo zjištěno, že miniaturizovaný zdroj poskytuje při stejném hmotnostním toku šestkrát až sedmkrát vyšší signály oproti konvenčnímu zdroji. Z velikostí chybových úseček lze vyvozovat dobrou reprodukovatelnost konvenčního zdroje ve srovnání s mikro zdrojem, jehož chybové úsečky vypovídají o výrazně horší reprodukovatelnosti, což může být způsobeno okolními vlivy, jelikož zdroj pro mikro APPI je otevřený bez jakýchkoliv stínění, které by tyto vlivy mohly eliminovat. Důvodem nízké reprodukovatelnosti a s tím související nestability signálu mohlo být rušení proudu sprejeru průvanem z klimatizace či otevírání a zavírání dveří.

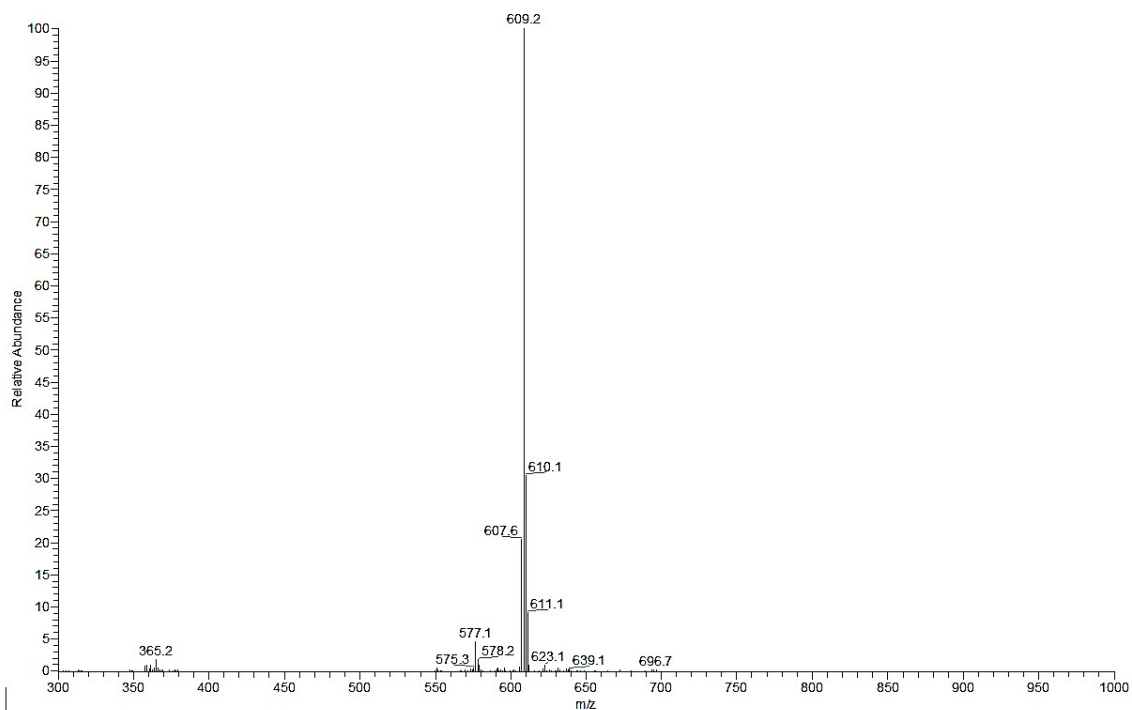


Obrázek 14 Závislost intenzity signálu reserpinu ($[M + H]^+$) na celkovém průtoku za použití konvenčního APPI zdroje.



Obrázek 15 Závislost intenzity signálu reserpinu ($[M + H]^+$) na celkovém průtoku za použití mikro APPI zdroje.

Miniaturizovaný APPI zdroj poskytl s optimalizovaným postavením čipu a průtokem nebulizačního plynu hmotnostní spektrum, které je zobrazené na Obr. 16. Hmotnostní spektrum obsahuje intenzivní signál molekulového aduktu reserpinu na m/z 609,2. Spektrum reserpinu z miniaturizovaného zdroje se nijak nelišilo od spektra získaného konvenčním zdrojem.



Obrázek 16 Hmotnostní spektrum reserpinu ($[M + H]^+$) při optimalizovaných podmínkách: vzdálenost čipu od vstupu do MS 10 mm, úhel svírající čip s osou vstupní kapiláry 40° , průtok vzorku $10 \mu\text{l}/\text{min}$, koncentrace $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ a průtok mlžovacího plynu $60 \text{ ml}/\text{min}$.

5. ZÁVĚR

Pro miniaturizovaný zdroj pro fotoionizaci za atmosférického tlaku byly nalezeny optimální podmínky pro měření, a to pozice čipu ve vzdálenosti 10 mm se sklonem k ose vstupní kapiláry 40° a průtok zmlžovacího plynu 60 ml/min. Nevýhodou je nestabilita signálu, s níž je spojená i nízká reprodukovatelnost měření. Na druhou stranu bylo s miniaturizovaným zdrojem dosaženo vyšší citlivosti oproti zdroji konvenčnímu. Pro další experimenty by bylo vhodné vyvinout kryt na zdroj, díky kterému by se minimalizovala nestabilita odstíněním okolních vlivů. Další možností pro zlepšení analýzy je použití jiného rozpouštědla. Ačkoliv propan-2-ol je běžně používán pro fotoionizaci za atmosférického tlaku, v miniaturizovaném zdroji může být špatně odpařován. Také může čip negativně ovlivňovat nízký průtok zmlžovacího plynu, což má za následek vyšší teplotu vyhřívání.

Seznam použitých zdrojů

1. J. CVAČKA. Úvod základní pojmy. Dostupné z URL <<http://www.muji-web.cz/MC230P75/kestazeni.htm>>
2. I. NĚMCOVÁ a kol. Spektrometrické analytické metody II. 1st ed. Karolinum, 1998.
3. <https://www.mzcloud.org/>
4. S. E. Van Bramer. An Introduction to Mass Spectrometry. Widener University Department of Chemistry, 1997
5. M. HOLČAPEK. Ionizační techniky. Dostupné z URL <http://holcapek.upce.cz/teaching/02_Ionizacni_techiky.pdf>
6. R. B. COLE, *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications* 2nd Edition. John Wiley, 2010.
7. J. GREAVES a J. ROBOZ. *Mass spectrometry for the novice* Boca Raton: CRC Press, 2014.
8. R. REBANE, A. KRUIVE, P. LIIGAND, J. LIIGAND, K. HERODES a I. LEITO. Establishing Atmospheric Pressure Chemical Ionization Efficiency Scale. *Analytical chemistry* **2016**(88), 3435–3439.
9. A. CPPIELLO. *Advances in LC-MS Instrumentation* Elsevier Science, 2006.
10. M. A. BAIM, R. L. EATHERTON a H. H. HILL, Jr. Ion mobility detector for gas chromatography with a direct photoionization source. *Analytical Chemistry* **1983**(55), 1761–1766.
11. I. A. REVEL'SKII, Y. S. YASHIN, V. K. Kurochkin a R. G. Kostyanovskii. 1991. Mass spectrometry with photoionization at atmospheric pressure and the analysis of multicomponent mixtures without separation. *Chemical and physicochemical methods of analysis*. **1991**(57), 243–248 (translated from *Zavodskaya Laboratoriya* 57(3):1–4).
12. D. B. ROBB, T. R. COVEY, A. P. BRUINS. Atmospheric Pressure Photoionization: An Ionization Method for Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2000**(72), 3653–3659.
13. K. A. HANOLD, S. M. FISCHER, P. H. CORMIA, C. E. MILLER a J. A. SYAGE. Atmospheric pressure photoionization. 1. General properties for LC/MS. *Analytical Chemistry* **2004**(76), 2842–51
14. E. DE HOFFMANN, V. STROOBANT. *Mass Spectrometry Principles and Applications*. 3rd ed. John Wiley, 2007.
15. T. J. KAUPPILAA, A. P. BRUINS a R. KONSTIAINEN. Effect of the Solvent Flow Rate on the Ionization Efficiency in Atmospheric Pressure Photoionization-Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. **2005**(16), 1399–1407.

16. I. MARCHI, S. RUDAZ aj. VEUTHEY. Atmospheric pressure photoionization for coupling liquid-chromatography to mass spectrometry: A review. *Talanta* **2009**(78), 1–18.
17. A. KAMEL, P. JEANWILLE, K. COLIZZA, L. E. J. RIVERA. Mechanism of $[M+H]^+$ Formation in Atmospheric Pressure Photoionization Mass Spectrometry: Identification of Propionitrile in Measurement and Tandem Mass Spectrometry and Evidence for Its Involvement in the Protonation Phenomenon. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. **2008**(19), 1579–1589.
18. C. WANG. The Ionization Technology of LC-MS, Advantages of APPI of Detecton of PPCPs and Hormones. *Austin Chromatography* **2015**(2), 1032
19. A. RÍOS CASTRO, A. ESCARPA MIGUEL a B. SIMONET. Miniaturization of analytical systems.: principles, designs and applications. John Wiley, 2009.
20. P. SMEJKAL, F. FORET. Mikrofluidika v bionalytické instrumentaci. *Chemické listy*. **2012**(106), 104-112.
21. F. J. PENA-PEREIRA. From Conventional to Miniaturized Analytical Systems. 2014.
22. T. J. KAUUPPLA, P. BSTMAN, S. MARTTILA, R. A. KETOIA, T. KOTIAHO, S. FRANSSILA a R. KOSTIAIN. Atmospheric Pressure Photoionization-Mass Spectrometry with a Microchip Heated Nebulizer. *Analytical Chemistry*. **2004**(22), 6797-6801.
23. V. SAARELA, M. HAAPALA, R. KOSTIAINEN, T. KOTIAHO, S. FRANSSILA. Glass microfabricated nebulizer chip for mass spectrometry. *The Royal Society of Chemistry*. **2007**(7), 644–646.