

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Barbora Rumlová

VÝVOJ MINIATURIZOVANÉHO IONTOVÉHO ZDROJE PRO  
CHEMICKOU IONIZACI ZA ATMOSFÉRICKÉHO TLAKU

Development of miniaturized ion source for atmospheric pressure chemical  
ionization

Bakalářská práce

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

Praha 2016

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně, a že jsem uvedla všechny použité informační 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 1. května 2016

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Josefu Cvačkovi, Ph.D za odborné rady a vstřícnost při vypracování této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Vladimíru Vrkoslavovi, Ph.D za čas a pomoc, kterou mi věnoval po celou dobu provádění práce.

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

## **Abstrakt**

Tato práce se zabývá miniaturizovaným iontovým zdrojem pro chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (APCI), jehož klíčovou součástí je skleněný vyhřívaný mikrofluidní čip. Iontový zdroj byl sestaven z mikrofluidního čipu umístěného na mikromanipulátoru a jehlové elektrody pro koronový výboj. Geometrické uspořádání těchto prvků vůči vstupní vyhřívané kapiláře hmotnostního spektrometru LCQ Fleet (Thermo) bylo optimalizováno na základě velikosti signálu reserpinu. Roztok reserpinu o koncentraci 10 µg/ml byl kontinuálně přiváděn do vyhřívaného čipu pomocí stříkačkového čerpadla. Dále byl optimalizován průtok nebulizačního plynu. Při stejném hmotnostním toku reserpinu byla velikost signálu protonované molekuly reserpinu o dva řády vyšší než u komerčního iontového zdroje pro APCI (Thermo). Přetrvávajícím problémem testovaného miniaturizovaného zdroje je vysoká nestabilita signálu detekovaných iontů.

Klíčová slova: hmotností spektrometrie, mikro APCI, mikrofluidní čip,

## **Abstract**

This bachelor's thesis discusses miniaturized ion source for atmospheric pressure chemical ionization in which the main component is a heated glass microfluidic chip. The ion source was assembled from the microfluidic chip placed on a micromanipulator and a needle electrode creating a corona discharge. The optimization of geometric arrangement of these components towards to inner heated capillary of the mass spectrometer LCQ Fleet (Thermo) was based on the signal intensity of reserpine. The solution of reserpine with concentration 10 µg/ml was continuously brought to the heated nebulizer chip using a syringe pump. Furthermore, the flow rate of the nebulizing gas was optimized. The signal intensity of protonated molecule was two orders of magnitude higher than the signal generated by the commercial ion source for APCI (Thermo) using the same mass flow rate of the analyte. High signal instability of the detected ions is the persisting problem of the miniaturized ion source.

Key words: mass spectrometry, micro APCI, microfluidic chip

# Obsah

1	Teoretický úvod .....	7
1.1	Princip hmotnostní spektrometrie.....	7
1.1.1	Ionizace .....	8
1.2	Techniky ionizace pracující za atmosférického tlaku.....	8
1.2.1	Elektrosprej .....	8
1.2.2	Fotoionizace za atmosférického tlaku .....	9
1.2.3	Chemická ionizace za atmosférického tlaku .....	10
1.2.3.1	Princip .....	10
1.2.3.2	Uspořádání zdroje pro APCI.....	10
1.2.3.3	Mechanismus .....	11
1.2.3.4	Srovnání APCI s ostatními API technikami .....	12
1.3	Miniaturizace v analytické chemii.....	13
1.3.1	Výhody miniaturizace .....	13
1.3.2	Miniaturizace v LC-MS .....	13
1.3.3	Mikro APCI.....	14
2	Cíl práce .....	15
3	Experimentální část.....	16
3.1	Chemikálie.....	16
3.2	Přístroje.....	16
3.3	Vzorek .....	16
3.4	Instrumentace.....	17
3.5	Zpracování dat .....	20
4	Výsledky a diskuze .....	21
4.1	Optimalizace průtoku nebulizačního plynu a geometrie čipu .....	21
4.2	Porovnání mikro APCI s konvenční APCI.....	23
4.3	Optimalizace průtoku sušícího plynu s použitím teflonové krytky .....	25
5	Závěr .....	27
	Literatura .....	28

## Seznam zkratk a použitých symbolů

APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure chemical ionization)
API	ionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure ionization)
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure photoionization)
CI	chemická ionizace (chemical ionization)
EI	elektronová ionizace (electron ionization)
ESI	ionizace elektrosprejem (electrospray ionization)
$m/z$	poměr hmotnosti iontu a jeho elementárního náboje
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
LC	kapalinová chromatografie (liquid chromatography)

# 1 Teoretický úvod

Trendem kapalinové chromatografie posledních let je snaha o miniaturizaci separačních systémů. Namísto klasických kolon jsou používány chromatografické kolony s výrazně menším průměrem, což má za následek úsporu rozpouštědel a zvýšení účinnosti separace i detekce. V mikro- a nano-HPLC je prakticky jedinou technikou nanoelektrosprej, který je velmi dobře kompatibilní s průtoky řádu desítek či stovek nl/min. Nanoelektrosprej je vhodný pro velkou škálu analytů, od středně polárních až k látkám iontovým. Jeho principiální nevýhodou je však velmi málo účinná ionizace látek nepolárních. Nepolární sloučeniny lze naopak velmi dobře ionizovat pomocí chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Iontové zdroje pro APCI jsou však konstruovány pro vysoké průtoky rozpouštědel v řádech stovek  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Tato práce se snaží přispět k vývoji miniaturizovaného zdroje pro APCI.

## 1.1 Princip hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně chemická metoda, jejíž princip spočívá v převedení vzorku na ionty v plynné fázi a následné separaci těchto iontů podle hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje ( $m/z$ ). Základní kroky hmotnostní analýzy jsou následující: ionizace, urychlení iontů do hmotnostního spektrometru, separace iontů a jejich detekce [1]. Dnes se v běžné praxi používá několik technických řešení, která mají svá pozitiva i negativa a jsou použitelné pro různé typy kvantitativních a kvalitativních analýz. Všechny hmotnostní spektrometry mají tři základní součásti, a to iontový zdroj, analyzátor a detektor [2].

Hlavní rolí iontového zdroje je přivést molekuly do hmotnostního spektrometru a přeměnit je v nabitou nebo ionizovanou formu. Hmotnostní spektrometry pracují za nízkého tlaku, aby se zabránilo kolizím iontů se zbytkovými molekulami plynu. Ideální provozní tlak je takový, ve kterém je průměrná vzdálenost, kterou ion urazí před kolizí s molekulou plynu delší, než je vzdálenost od zdroje k detektoru [3].

Po ionizaci jsou ionty urychleny do hmotnostního analyzátoru, kde jsou separovány podle jejich  $m/z$  za použití elektrického a/nebo magnetického pole. Nakonec jsou ionty vedeny do detektoru, kde poskytují signál. Tento signál je digitalizován a převeden do počítače, kde je zpracován do podoby hmotnostního spektra [1, 3].

### 1.1.1 Ionizace

Pouze nabité částice jsou přístupné hmotnostně spektrometrické analýze. Molekuly a radikály nelze stanovit v jejich neutrální formě [4]. Abychom analyt převedli na ionty v plynné fázi, je potřeba dodat ionizační energii, případně vytvořit vhodný adukt či deprotonovat molekulu. Velikost ionizační energie potřebné k tvorbě iontu závisí na povaze analytu. Hodnota energie, po jejímž překročení se většina organických látek nalézá v ionizovaném stavu, se pohybuje v rozmezí 7-16 eV. Nejobecnější rozdělení ionizačních technik je podle dodaného množství energie, na tvrdé a měkké ionizační techniky [5]. Tvrdé ionizační techniky produkují podstatnou část ionizovaných molekul s vysokou vnitřní energií, následkem čehož molekuly podléhají fragmentaci ještě před opuštěním iontového zdroje. Schopnost fragmentace těchto zdrojů se využívá k získání informace o struktuře organických biomolekul [6].

Měkké ionizační techniky poskytují spektra s minimem fragmentů, což je zvláště užitečné například pro charakterizaci směsí [7].

Dnes existují desítky ionizačních technik a jejich výběr záleží na povaze analytu a na požadovaném typu analytické informace [6].

## 1.2 Techniky ionizace pracující za atmosférického tlaku

Ionizační techniky pracující za atmosférického tlaku patří mezi měkké ionizační techniky [4]. Patří mezi ně ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI). Dnes se tyto techniky těší velké oblibě, a to především ve spojení s kapalinovou chromatografií pro analýzy směsí netěkavých vysokomolekulárních sloučenin speciálně ve farmaceutické chemii, biochemii, a klinické analýze [8].

### 1.2.1 Elektrosprej

Elektrosprej vzniká působením silného elektrického pole na kapalinu. Vzorek je přiváděn kapilárou z nerezové oceli, přičemž elektrické pole je vytvořeno vložením potenciálu (3-6 kV), mezi tuto kapiláru a protielektrodu, které jsou od sebe vzdáleny přibližně 0,3-2 cm. Protielektroda bývá deska s otvorem vedoucím k vzorkovacímu systému hmotnostního spektrometru [9,10]. Působením pole na kapalinu se tvar kapaliny začíná deformovat a vzniká

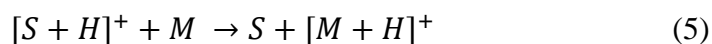


tzv. Taylorův kužel. Z kuželu se postupně odtrhávají kapičky rozpouštědla s analytem a náboj se akumuluje na povrchu kapiček. Odpařováním rozpouštědla dojde ke zvýšení hustoty povrchového náboje, až při dosažení kritické hodnoty dochází k tzv. Coulombické explozi [11,12,13]. Z těchto nabitých kapiček se tvoří menší kapičky a z těch se uvolňují ionty, které jsou vtahovány a fokusovány iontovou optikou do hmotnostního spektrometru [14].

## 1.2.2 Fotoionizace za atmosférického tlaku

Fotoionizace je způsob ionizace, kterým lze analyzovat polární i nepolární látky, a je poměrně tolerantní k matricím analytu, které mohou interferovat v ESI a APCI technikách [15].

Základním principem fotoionizace je tvorba molekulárního radikálového iontu po absorpci fotonu molekulou analytu a emisi elektronu (Obr. 1, reakce č. 1). Tento proces nastává, pokud je energie fotonu vyšší než ionizační potenciál molekuly analytu. Přímá ionizace analytu je však statisticky málo pravděpodobná, a proto se využívá dopantu (D). Ten je ve směsi s analytem v nadbytku a snadno se ionizuje (Obr. 1, reakce č. 2). Dopant poté předá náboj molekule analytu (Obr. 1, reakce č. 3) a to za předpokladu, že ionizační energie dopantu je vyšší než ionizační energie analytu. V případě že je protonová afinita analytu vyšší než protonová afinita ostatních složek fáze, mohou se tyto prvky chovat jako přenašeči protonu mezi dopantem a analytem (Obr. 1, reakce č. 4,5) [16].



*Obrázek 1 Mechanismus fotoionizace. Převzato a upraveno [16].*

Zdroj fotonů by měl být zvolen takový, aby energie emitovaných fotonů byla vyšší než ionizační energie cílových molekul, a nižší než mají složky vzduchu a běžná rozpouštědla. Obvykle se používá kryptonová výbojka (10,0 a 10,6 eV). [17].

### 1.2.3 Chemická ionizace za atmosférického tlaku

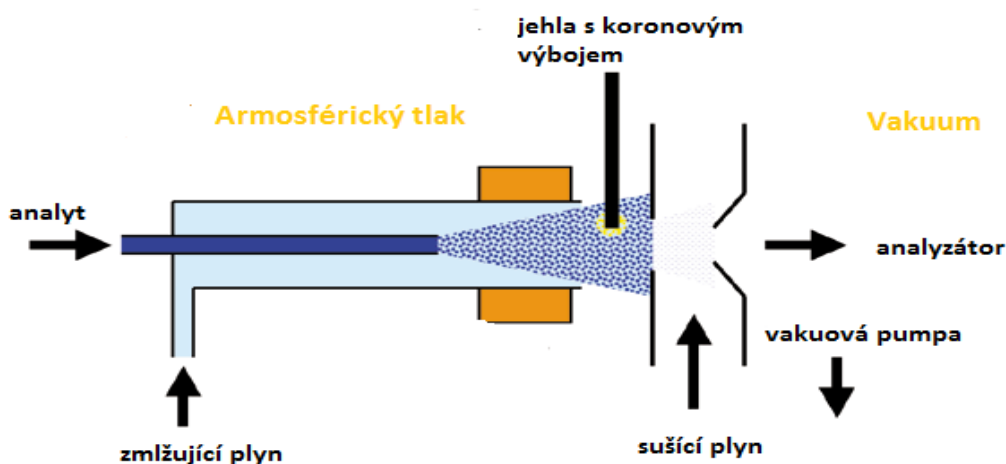
V roce 1970 byl představen APCI zdroj, který pro ionizaci analytů používal  $^{63}\text{Ni}$  [18]. V tomto iontovém zdroji se roztok analytu dávkoval do proudu horkého dusíku a rozpouštědlo se okamžitě odpařilo. Plynná fáze procházela kolem  $^{63}\text{Ni}$  kde emitované elektrony iniciovaly komplexní řadu procesů. Procesy ionizace dusíku a postupné iontové molekulové reakce vedly k tvorbě iontů  $[(\text{H}_2\text{O})_n + \text{H}]^+$ , které byly schopny protonovat analyt [19]. Technika založená na koronovém výboji byla vyvinuta později jako alternativa pro ionizaci látek ve spojení s kapalinovou chromatografií. Dnes se hojně používá právě tato technika [18].

#### 1.2.3.1 Princip

Při APCI reakční ionty přenáší náboj nebo proton na molekulu analytu. Tyto reakce vyžadují efektivní kolize mezi reakčním iontem a neutrální molekulou analytu ve zdroji. Pokud se tento proces uskutečňuje za atmosférického tlaku, je účinnost kolizí vyšší než u klasické chemické ionizace [10]. Dnes je APCI druhou nejpoužívanější ionizační technikou po ESI. V APCI zdroji je reakční plasma udržována koronovým výbojem mezi ostrým hrotem jehly a rozprašovací komorou, která slouží jako protielektroda. Na rozdíl od ESI, APCI ionizace probíhá v plynné fázi a molekuly analytu se odpařují před ionizací [20].

#### 1.2.3.2 Uspořádání zdroje pro APCI

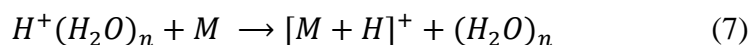
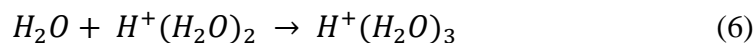
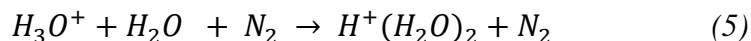
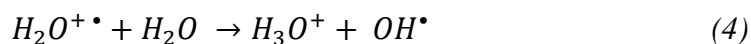
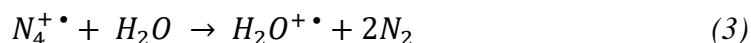
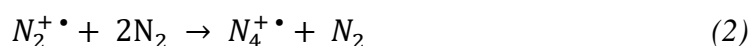
Eluát z kapalinového chromatografu proudí skrze trysku do vyhřívané zóny. Pomocí nebulizačního plynu dochází k desolvaci molekul analytu. Součástí zdroje je také jehla tvořící koronový výboj, která vytváří ionty z molekulární mlhy vystupující z vyhřívané zóny. Pomocný plyn často napomáhá nebulizačnímu plynu v desolvaci. V některých uspořádáních je součástí zdroje také protiproudý plyn [21].



Obrázek 2 Schéma APCI zdroje. Převzato a upraveno z [31].

### 1.2.3.3 Mechanismus

Nebulizační plyn je ionizován elektrony vznikajícími v koronovém výboji. Poté nastává série reakcí, které se liší v závislosti na složení nebulizačního plynu, a která vede ke generaci reakčních iontů. Nejčastěji se jako nebulizační plyn používá dusík.



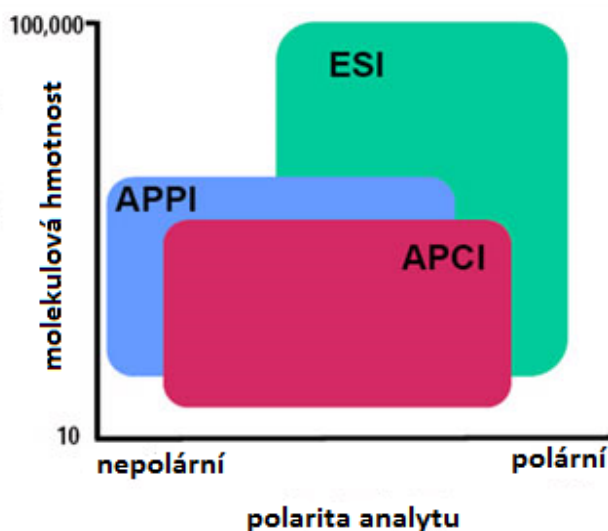
Obrázek 3 Schéma mechanismu APCI. Převzato a upraveno [23].

Elektronová ionizace v koronovém výboji vytváří ionty  $\text{N}_4^{+\bullet}$  a  $\text{N}_2^{+\bullet}$  (Obr. 3, reakce č. 1, 2). Tyto primární ionty s odpařenými molekulami rozpouštědla tvoří sekundární reakční ionty [22]. Reakce č. 6 může pokračovat dalšími reakcemi molekul vody, a to vede k vytvoření velkých klastrů  $\text{H}^+(\text{H}_2\text{O})_n$ . Z reakce č. 4-6 je možné vidět, že přenos protonu je hlavní

ionizační dráhou. Ionizační schopnosti zdroje tedy závisí na acidobazickém chování cílových molekul v plynné fázi. Důležitým faktorem je také počet generovaných reakčních iontů, protože určuje množství analytu, který je jimi ionizován. [23]. Spektra z APCI zdroje obsahují převážně molekulární a aduktové ionty s malou mírou fragmentace [22].

#### 1.2.3.4 Srovnání APCI s ostatními API technikami

APCI je technika, která je schopná účinně ionizovat jak středně polární tak nepolární sloučeniny. Výhodou APCI je možnost použití polárních i nepolárních rozpouštědel, schopnost tolerovat vyšší koncentrace elektrolytu a také lepší tolerance vůči přítomnosti povrchově aktivních látek, které v ESI snižují účinnost ionizace a tím i citlivost. APPI přináší obdobné výhody, ale je má širší uplatnění v oblasti polárních látek než APCI. APCI a APPI nejsou vhodné k ionizaci velkých molekul a tyto metody je vhodné aplikovat na sloučeniny o molekulové hmotnosti pod 1000 Da [24,25]. V pozitivním režimu APCI vznikají téměř výhradně  $[M+H]^+$  ionty, kdežto ESI produkuje i adukty s kationty jako je sodný a draselný ion [16].



Obrázek č. 4 Využití API technik pro různé polaridy analytu. Převezato a upraveno z [32].

## 1.3 Miniaturizace v analytické chemii

Stejně jako v ostatních oborech i v analytické chemii se miniaturizace v měřeních těší velké oblibě. Hnací silou této rostoucí poptávky po nízkonákladových nástrojích je schopnost velmi rychlé analýzy při spotřebě malých objemů vzorků [26].

Analytický proces zahrnuje tyto fáze: odběr vzorku, uchování vzorku, příprava vzorku, separace, detekce, zpracování dat a vyhodnocení. Do dneška byl téměř každý z těchto kroků podroben miniaturizaci. Jednotlivé kroky analytického procesu však nebyly miniaturizovány ve stejném rozsahu. Například sběr vzorku a jeho uchování je krok analytického procesu, jehož miniaturizace nese menší výhody. S nástupem miniaturizace separačních a detekčních systémů je obecně předpokládána i nutnost miniaturizace v přístupech přípravy vzorku [27].

### 1.3.1 Výhody miniaturizace

Redukce velikosti analytického systému není jediným důvodem k jeho miniaturizaci. Výhodou, kterou přináší, je snížení množství vzorku, které je významné, pokud pracujeme se vzácnými vzorky. Také se sníží spotřeba použitých chemických látek a rozpouštědel. To je zvláště důležité v případě analytických metod, kde se používají drahá reakční činidla, jako jsou imunochemikálie a enzymy, ale i u metod používajících toxická reakční činidla či organická rozpouštědla. To má za následek redukci odpadu [27]. Mezi další výhody patří například zkrácení doby analýzy a možnost provádění paralelních analýz [28].

### 1.3.2 Miniaturizace v LC-MS

Cílem miniaturizace v LC je především snížení průměru kolon, vývoj a zvýšení detekčních limitů. Konkrétně se jedná o systémy mikro-LC, nano-LC a LC na čipu. Typické vnitřní průměry kolony při klasické LC jsou od 2,1 do 4,6 mm. Velikost částic stacionárních fází se pohybuje mezi 3-10  $\mu\text{m}$ . Nano-LC oproti tomu pracuje s průměry kolon menšími než 150  $\mu\text{m}$ , s průtoky ve stovkách  $\text{nl}/\text{min}$  a s detekčním limitem pod 1  $\mu\text{g}$ . V důsledku snížení chromatografického zředění se zvýší citlivost. Použití menších částic v kolonách se promítá do zvýšení účinnosti, protože se snižuje odpor proti přenosu hmoty v mobilní fázi [29].

Pro detekci látek v miniaturizovaných separačních systémech nejsou vhodné detektory založené na absorpci záření, protože kratší dráhy paprsku vedou k méně citlivé detekci.

Nejčastější hmotnostně-spektrometrickou detekcí ve spojení s nano-LC a mikro-LC se stala ESI [30].

V kombinaci s nízkými průtoky se používá téměř výhradně nanoelektrosprej. Při použití elektrospreje je za potřebí mnohem větší množství vzorku. Tryska s velkým rozměrem vytváří velké kapičky. Napětí na kapiláře je větší, a tak musí být větší i vzdálenost trysky a vzorkovací kapiláry. Výsledkem toho je, že pouze malý zlomek kapiček se dostane skrz vzorkovací otvor do hmotnostního spektrometru. Tryska nanoelektrospreje má mnohem menší rozměry, které se pohybují v řádech  $\mu\text{m}$  [9]. Menší rozměr trysky má za následek, že se může použít menší napětí, které dovoluje umístit trysku blíže vstupu do hmotnostního spektrometru. Do hmotnostního spektrometru se tedy dostane více iontů analytu [26].

### 1.3.3 Mikro APCI

Nanoelektrosprej je vhodný k ionizaci polárních látek, avšak jeho účinnost při ionizaci nepolárních a iontových sloučenin může být nízká. Proto byla publikována metoda APCI využívající vyhřívaného čipu, který je schopný pracovat s průtoky od 0,05-5  $\mu\text{l}$ , což ho dělá kompatibilním s nano-LC i s mikrofluidními systémy [24]. Schopnost použít průtoky nižší než 1  $\mu\text{l}$  otevírá nové možnosti v analýze neutrálních sloučenin v minimálních množstvích, což umožní pochopení významu malých nepolárních látek v biologických systémech. Porovnání citlivosti mikročipové a komerční APCI ukazuje, že citlivosti při zjišťování koncentrace ve vzorku jsou srovnatelné, ale citlivost v oblasti hmotnostní analýzy vykazuje 100-200x větší citlivost než metoda nová. Jedním z důvodů větší účinnosti ionizace může být velikost oblaku produkující APCI. Prostor, kde probíhá ionizace, je totožný, i napětí vkládané na jehlu je stejné. Mikročip ale produkuje menší oblak než komerční APCI, tudíž velká část neutrálního analytu může být ionizována, což zvětšuje účinnost. To má za následek, že analýzu lze provést s menšími objemy vzorku bez snížení citlivosti [24]. Později byl vyvinut nový typ čipu, který pro sprejování v APCI dosud nebyl testován [34].

## 2 Cíl práce

Cílem práce je nalézt optimální pracovní podmínky miniaturizovaného zdroje pro chemickou ionizaci za atmosférického tlaku založeného na nové verzi mikrofluidního vyhřívaného čipu.

Jednotlivé dílčí úkoly jsou:

- sestavení a připojení miniaturizovaného zdroje ke hmotnostnímu spektrometru
- optimalizace vzdáleností mezi mikrofluidním čipem, elektrodou pro koronový výboj a vstupní kapilárou do spektrometru
- optimalizace průtoku nebulizačního plynu
- porovnání citlivosti měření s komerčním iontovým zdrojem

## 3 Experimentální část

### 3.1 Chemikálie

- reserpin, 99 %, Sigma Aldrich, (St. Louis, MO, USA)
- 2-propanol, 99,9 % LC-MS Chromasolv, Sigma Aldrich, (St. Louis, MO, USA)
- deionizovaná voda z přístroje Milli-Q Water Purification System (Darmstadt, Germany)

### 3.2 Přístroje

- hmotnostní spektrometr LCQ Fleet, Thermo Fisher Scientific, (Waltham, MA, USA)
- průtokoměr pro nastavení a kontrolu průtoku sušícího plynu Mass flow controller GFC 17, Aalborg, (Orangeburg, NY, USA)
- napájecí zdroj IPS 603, ISO-TECH (Merseyside, Velká Británie)
- HPLC čerpadlo, Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific, (Waltham, MA, USA)

### 3.3 Vzorek

Experimenty byly prováděny se vzorkem reserpinu o koncentraci 10 µg/ml. Jako rozpouštědlo byla použita směs 2-propanolu a deionizované vody v poměru 1:1. Na každý experiment byl vždy připraven čerstvý roztok reserpinu. Pokud není uvedeno jinak, průtok roztoku vzorku byl 5 µl/min.



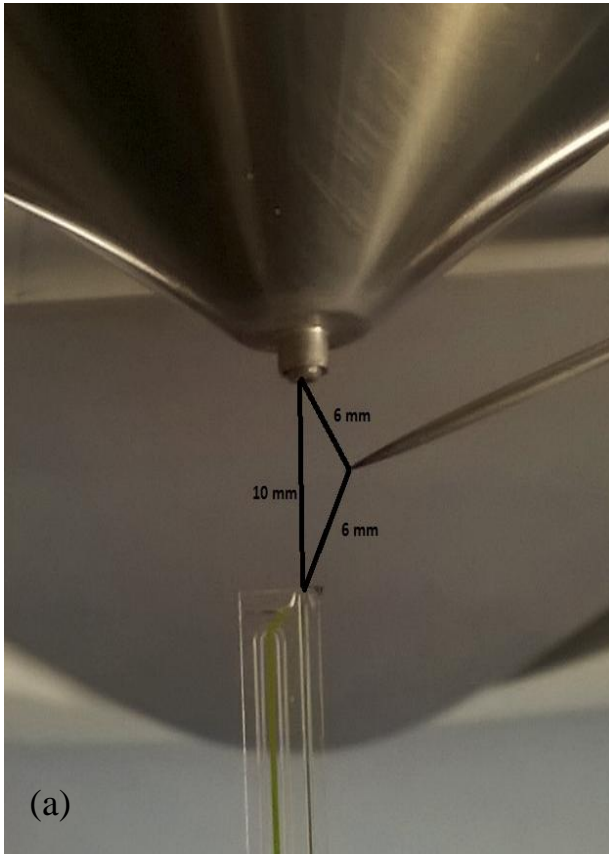
### 3.4 Instrumentace

Ke hmotnostnímu spektrometru LCQ Fleet byla nainstalována příruba z tvrzeného eloxovaného hliníku s dvojicí na něj kolmých ocelových tyčí. Na tyče byl nasunut držák s 3-D mikromanipulátorem (MX10R), který držel čip ve správné pozici vzhledem ke vstupní kapiláře.

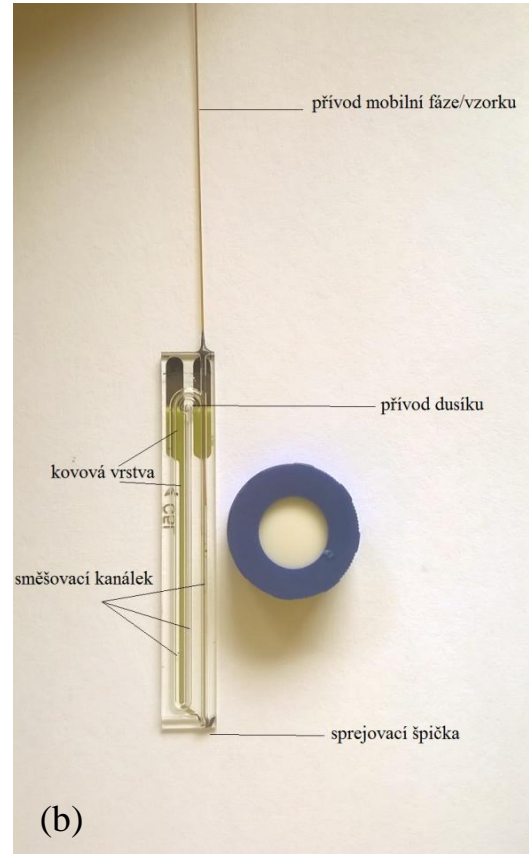


*Obrázek 5 Příruba z eloxovaného hliníku s dvojicí ocelových tyčí. Převzato z [33].*

Mikrofabrikovaný čip (Obr. 6b) byl vyhříván pomocí napájecího zdroje IPS 603 výkonem 4,5 W. Pro počáteční experimenty byl čip umístěn ve vzdálenosti 1 cm od vstupu do hmotnostního spektrometru. Do prostoru mezi čip a vstup do hmotnostního spektrometru byla umístěna APCI jehla k vytvoření koronového výboje. Koronový výboj byl tvořen vkládaným napětím o velikosti 3 kV. Jehla byla umístěna pomocí klemy ve vzdálenosti 6 mm od čipu i od vstupu do hmotnostního spektrometru. Vstupní kapilára spektrometru byla vyhřívána na 300 °C. Roztok reserpinu byl přiváděn Hamiltonovou stříkačkou o objemu 50  $\mu$ l umístěnou ve stříkačkové pumpičce na přední části přístroje. Vzájemné uspořádání čipu, jehly a vstupní kapiláry je znázorněno na Obr. 6a. Celkové experimentální uspořádání miniaturizovaného APCI zdroje je zachyceno na Obr. 7.

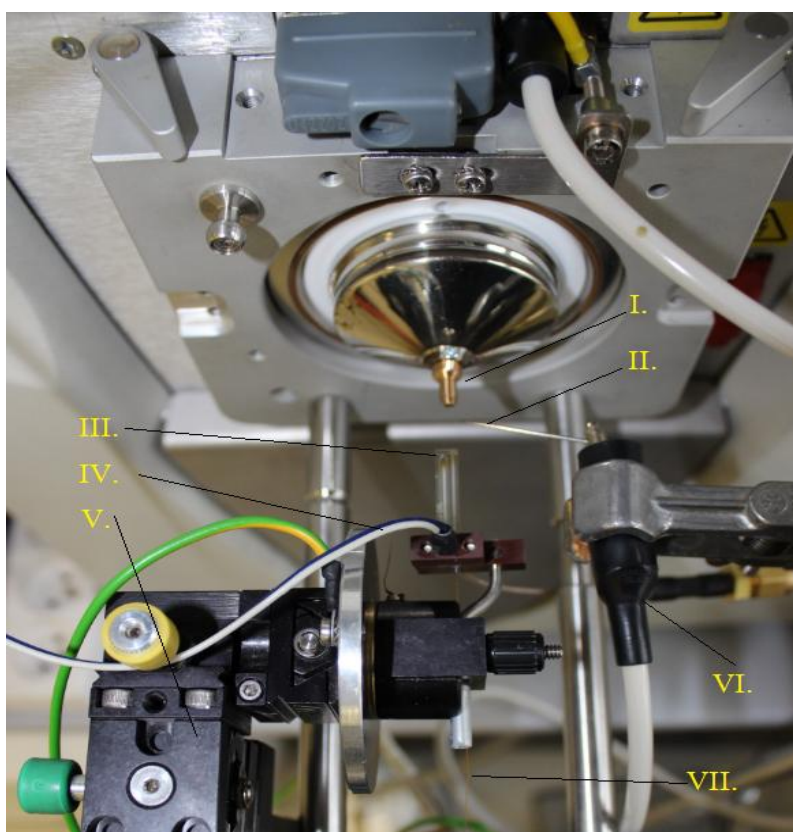


(a)



(b)

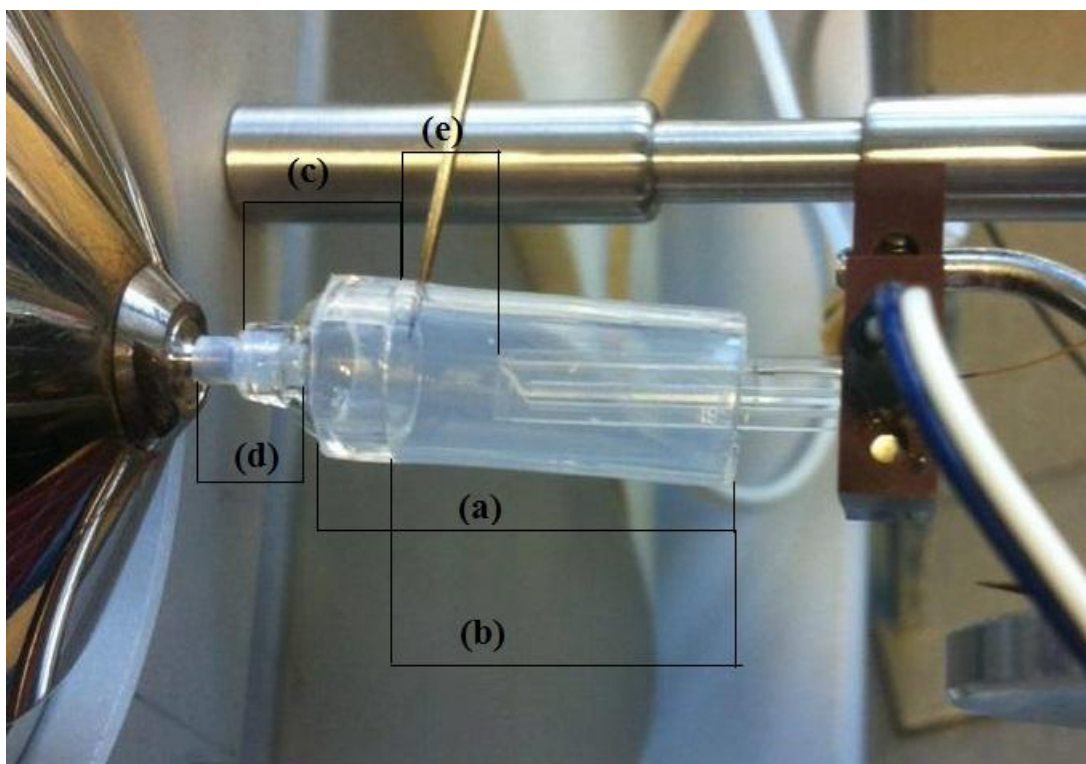
Obrázek 6 Geometrie umístění jehly vzhledem k čipu a vstupu do hmotnostního spektrometru (a). Popis mikrofluidního čipu (b). Foto Vrkoslav V.



Obrázek 7 Popis experimentálního uspořádání mikroAPCI. (I) Vstupní vyhřívaná kapilára spektrofotometru. (II) Jehla koronového výboje. (III) Čip jako nebulizér. (IV) Přívod elektrického proudu pro vyhřívání čipu. (V.) 3D manipulátor. (VI) Přívod vysokého napětí pro koronový výboj. (VII) Přívod roztoku reserpinu. Foto Vrkoslav V.

Při pokusu, kdy byla porovnáována citlivost s konvenčním zdrojem pro APCI, byla na výstupní kapiláru ze stříkačkové pumpičky se vzorkem umístěna spojka ve tvaru T. Vzorek v Hamiltonově stříkačce o objemu 50  $\mu\text{l}$  byl mísen s rozpouštědlem přiváděným HPLC pumpou. Toto uspořádání umožnilo měnit celkový průtok roztoku vzorku při konstantním hmotnostním toku standardu (50 ng/min).

V dalších experimentech bylo testováno upořádání s teflonovou krytkou na vstupní kapiláře. Krytka se skládá ze skleněné a teflonové části. Na skleněné části je z jedné strany nasazena teflonová část o vnitřním průměru 9 mm. Na druhé straně se skleněná část zužuje a na ni je připojena krátká teflonová část, kterou je krytka spojena s kapilárou hmotnostního spektrometru. Podrobnější popis i s parametry lze nalézt na Obr. 8. Skrze krytku byla propíchnuta jehla a čip byl vsunut do krytky. Vzdálenost jehly od vstupní kapiláry byla v tomto uspořádání 1,4mm. Vzhledem k omezené tepelné stabilitě materiálu krytky bylo nutno snížit vyhřívání vnitřní kapiláry na 220 °C.



Obrázek 8 Experimentální uspořádání s použitím teflonové krytky. Teflonová část s délkou 26 mm a s vnitřním průměrem 9 mm (a). Vzdálenost od konce skleněné části ke konci teflonové části - 23 mm (b). Skleněná část - 14 mm (c). Teflonová část spojující skleněnou část s hmotnostním spektrometrem - 5 mm (d). Vzdálenost konce skleněné části od čipu, která byla měněna při optimalizaci. Na obrázku je nastavena vzdálenost, která byla optimalizována tj. 8 mm (e).

### 3.5 Zpracování dat

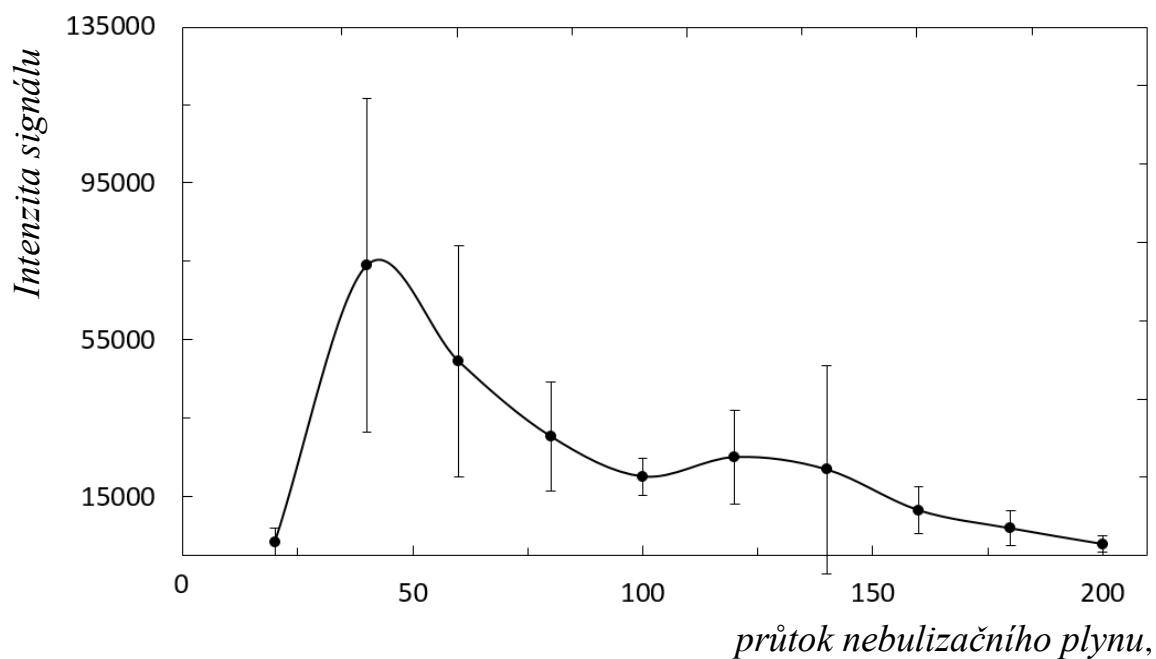
Sběr dat probíhal prostřednictvím ovládacího programu Xcalibur ver. 2.0.7. (Thermo) v rozsahu  $m/z$  300-1000. Byla provedena vždy tři měření, přičemž spektra byla snímána po dobu dvou minut. Dvouminutové záznamy byly poté zrekonstruovány pro  $m/z$  609.2 ( $[M+H]^+$  reserpinu) a hodnoty intenzit tohoto iontu zprůměrovány. Pro takto získané tři hodnoty signálu byl vypočten průměr a směrodatná odchylka.

## 4 Výsledky a diskuze

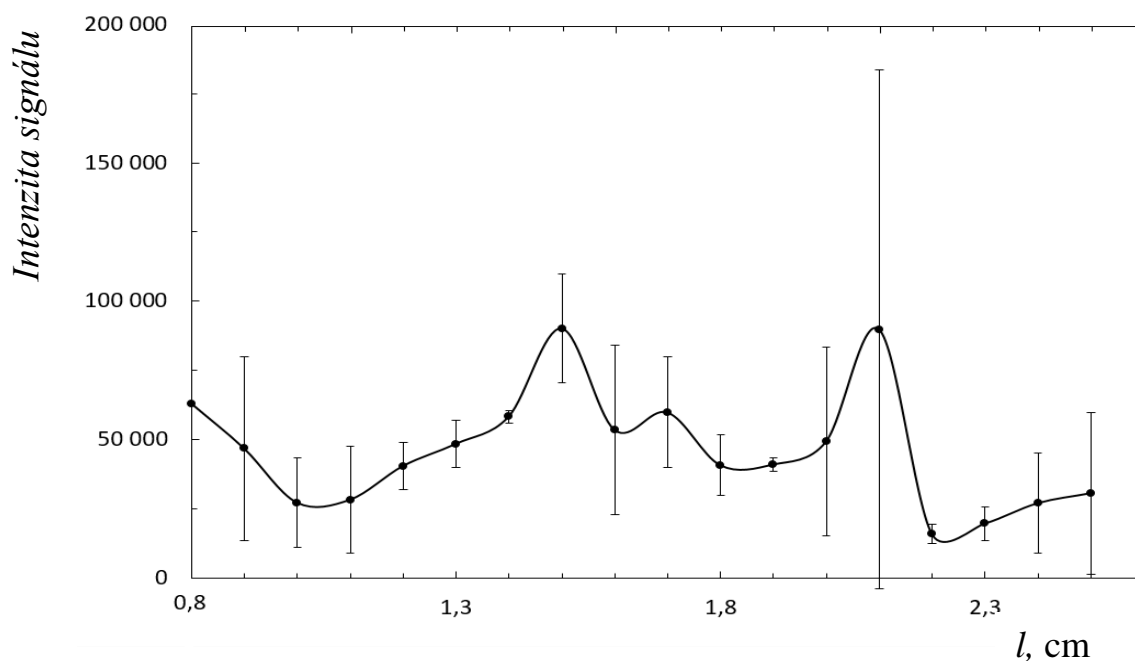
### 4.1 Optimalizace průtoku nebulizačního plynu a geometrie čipu

Nejprve byla optimalizována velikost průtoku nebulizačního plynu. Průtok byl postupně zvyšován od 20 do 200 ml/min. Vždy po 20 ml/min byla sbírána data po dobu 2 minut. Tato škála byla proměřena třikrát a ze tří měření byl spočítán průměr a směrodatná odchylka. Maximální signál reserpinu byl nalezen při průtoku 40 ml/min (Obr. 9). U konvenční APCI jsou běžně používány průtoky v řádech desítek l/min. Vzhledem k použití nižších průtoků mobilní fáze při mikro APCI se nižší optimální hodnota průtoku nebulizačního plynu dala očekávat. Reprodukovatelnost měření intenzity signálu reserpinu však byla malá, což je zřejmé z velikosti chybových úseček na Obr. 9. Jedním z důvodů nízké reprodukovatelnosti je rušení proudu sprejeru průvanem z klimatizace, či otevírání a zavírání dveří, což způsobuje nestabilitu signálu. Iontový zdroj je otevřený, bez přítomnosti jakéhokoliv stínění, které by okolní vlivy eliminovalo. Dalším faktorem je postavení jehly vzhledem k čipu a vstupu do hmotnostního spektrometru. Vzhledem k jednoduchému experimentálnímu uspořádání a umístění jehly pouze do klemy nebylo stoprocentně zajištěno, že se poloha jehly nemohla v průběhu měření měnit. Poloha jehly je přitom důležitým parametrem a zásadně ovlivňuje intenzitu signálu. Dalším vysvětlením může být problematické odpařování 2-propanolu při nízkých teplotách a malých průtocích nebulizačního plynu. Pro další experimenty byl nastavován průtok nebulizačního plynu podle již výše uvedeného maxima 40 ml/min, ale s ohledem na postavení jehly byl přizpůsobován tak, aby byl signál nejvyšší. Jako nejvhodnější se ukázalo rozmezí mezi 40 ml/min až 80 ml/min.

Dále byla optimalizována poloha čipu vzhledem k jehle. Vzdálenost byla měřena od vstupní kapiláry k čipu vzhledem k lehčí manipulaci Obr. 6 kapitola 3.4. Výsledky experimentu shrnuje graf na Obr. 10. Můžeme vidět dvě maxima při vzdálenosti 1,5 cm a 2,1 cm od vstupního otvoru hmotnostního spektrometru. Vzhledem k velikosti směrodatných odchylek jednotlivých měření však nelze považovat tato maxima za významná. Z tohoto experimentu tedy nelze určit ideální polohu jehly vzhledem k čipu, resp. signál se ve studovaném rozmezí statisticky významně neměnil. A k dalším experimentům byla využívána vzdálenost čipu 1 cm od vstupní kapiláry. Mezi nimi byla nastavena jehla ve vzdálenosti 6 mm od vstupní kapiláry i čipu (Obr. 6 kapitola 3.4).



Obrázek 9 Závislost intenzity signálu reserpinu ( $[M+H]^+$ ) na průtoku nebulizačního plynu ( $N_2$ ). Průtok roztoku reserpinu  $5\mu\text{l}/\text{min}$ . Chybové úsečky odpovídají směrodatným odchylkám ( $n = 3$ ).

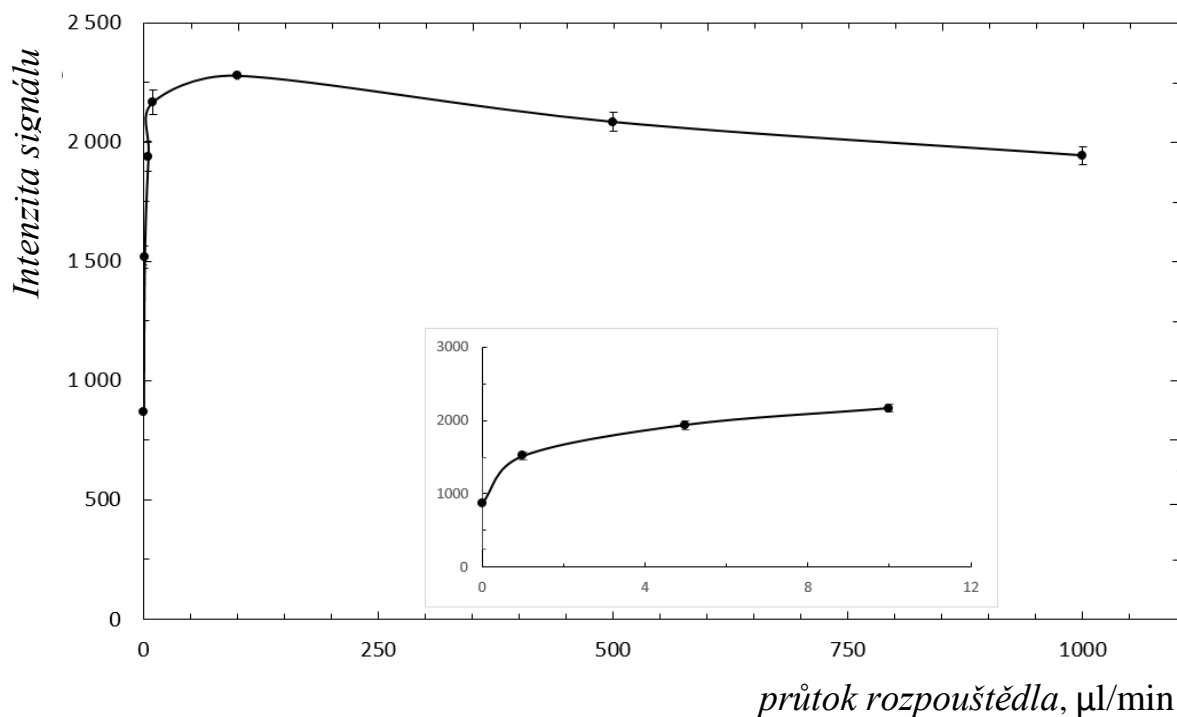


Obrázek 10 Závislost intenzity signálu reserpinu ( $[M+H]^+$ ) na vzdálenosti čipu od vstupní kapiláry hmotnostního spektrometru. Průtok roztoku reserpinu  $5\mu\text{l}/\text{min}$ . Průtok nebulizačního plynu  $60\text{ ml}/\text{min}$ . Chybové úsečky odpovídají směrodatným odchylkám ( $n=3$ .)

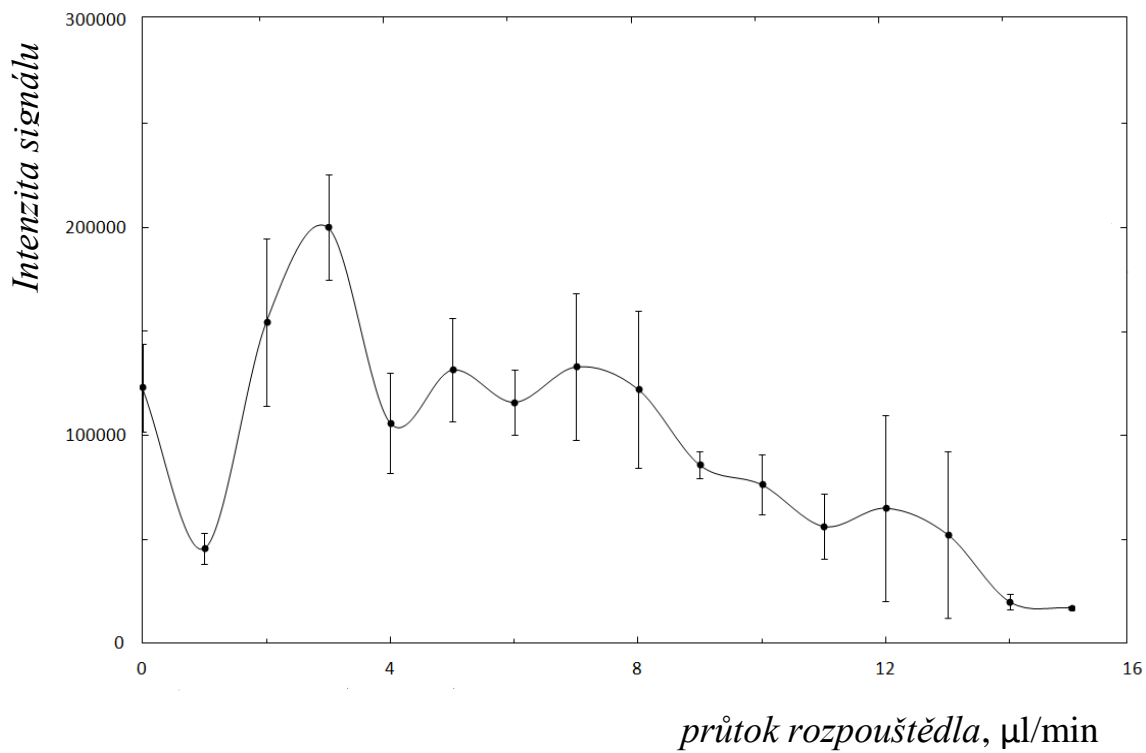
## 4.2 Porovnání mikro APCI s konvenční APCI

Dále byla porovnávána citlivost mikro a konvenčního zdroje pro APCI. Vzorek byl v obou případech zaváděn pomocí Hamiltonovy stříkačky umístěné ve stříkačkové pumpičce při průtoku 5  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Rozpouštědlo (směs 2-propanolu a vody v poměru 1:1) bylo přiváděno při různých průtocích pomocí HPLC pumpy. Vzorek a rozpouštědlo se mísily ve spojce tvaru T a dále putovaly do zdroje. U každého zdroje byla provedena tři měření při daném průtoku rozpouštědla.

Na Obr. 11 můžeme vidět, že maximálního signálu u konvenční APCI bylo dosaženo při celkovém průtoku 105  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Dále můžeme pozorovat malou velikost chybových úseček, což ukazuje na dobrou reprodukovatelnost měření. Maximální signál u mikro APCI byl nalezen při celkovém průtoku 8  $\mu\text{l}/\text{min}$ , reprodukovatelnost měření však byla nízká. Srovnáme-li absolutní intenzity signálu u obou typů APCI zdrojů, zjistíme, že při stejném hmotnostním toku reserpinu poskytuje mikro APCI zdroj zhruba o dva řády vyšší signály oproti konvenčnímu zdroji.



Obrázek 11 Závislost intenzity signálu reserpinu ( $[M+H]^+$ ) na přidavku rozpouštědla do konstantního průtoku roztoku analytu 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  za použití konvenčního APCI zdroje. Chybové úsečky odpovídají směrodatným odchylkám ( $n=3$ ).

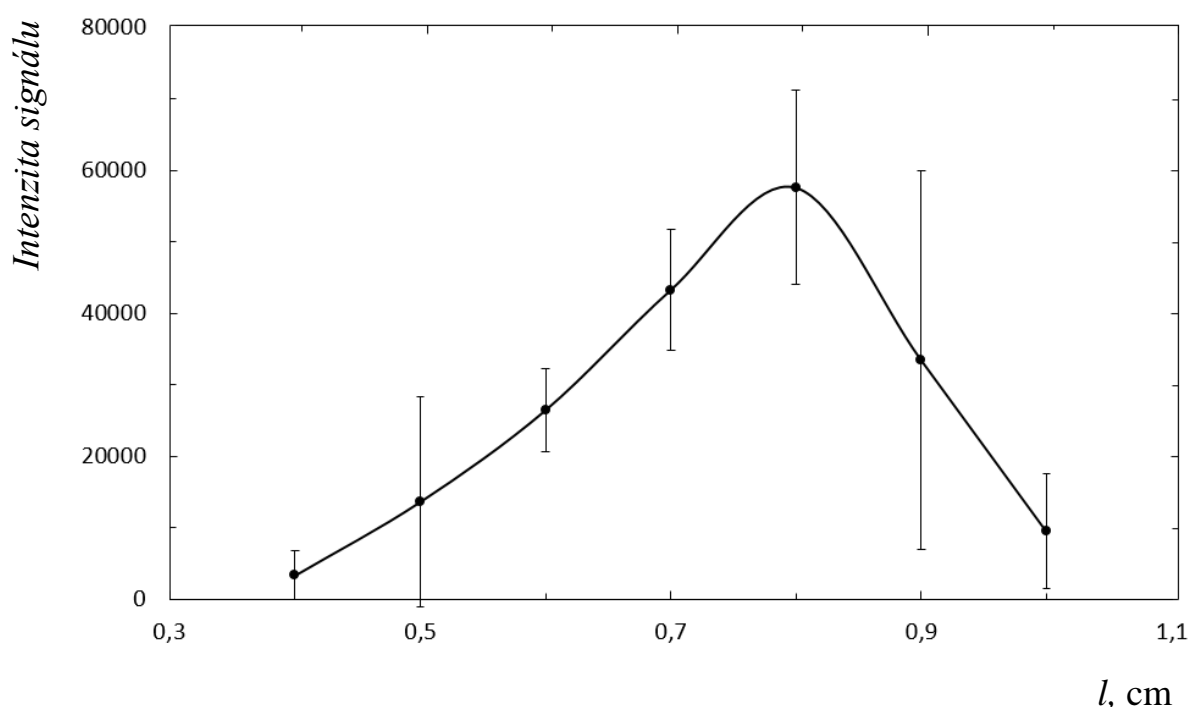


Obrázek 12 Závislost intenzity signálu reserpinu ( $[M+H]^+$ ) na přidavku čisté mobilní fáze do konstantního průtoku analytu  $5\mu\text{l}/\text{min}$  za použití mikro APCI zdroje. Průtok nebulizačního plynu  $80\text{ ml}/\text{min}$ . Chybové úsečky odpovídají směrodatným odchylkám ( $n=3$ ).



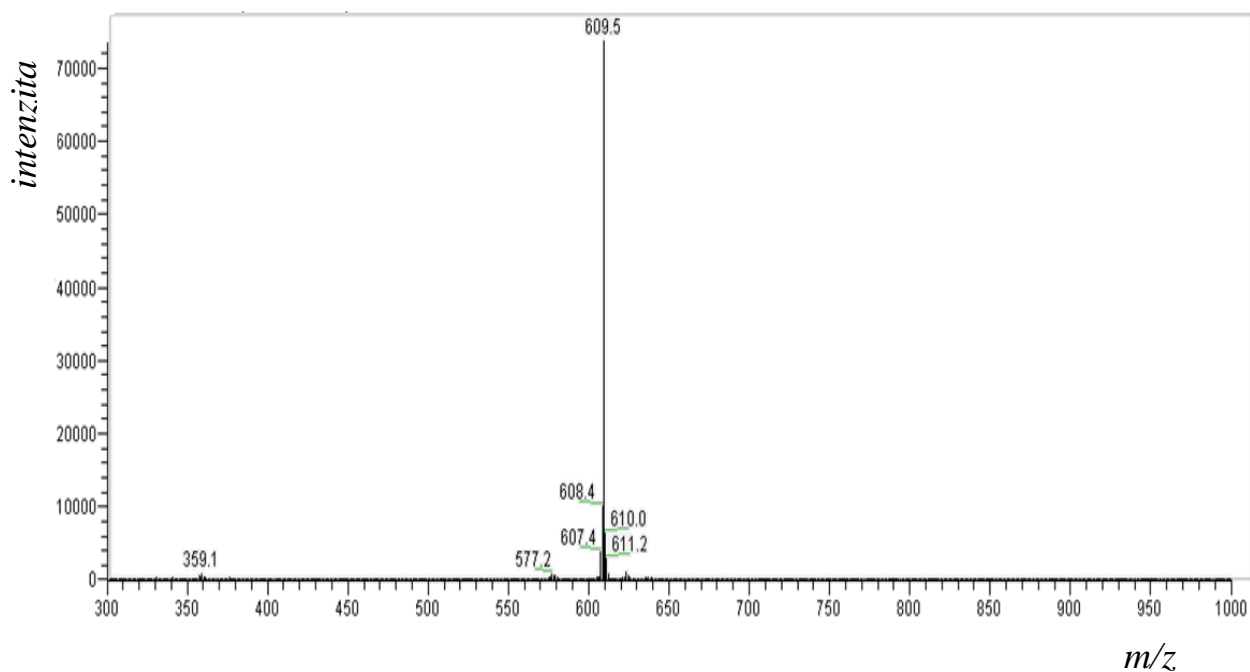
### 4.3 Optimalizace průtoku sušícího plynu s použitím teflonové krytky

Pro zlepšení reprodukovatelnosti výsledků byla vyzkoušena teflonovo-skleněná krytka. Jehla byla propíchnuta skrze teflonovou část ve vzdálenosti 1,4 mm od vstupní kapiláry. Experimentální uspořádání lze vidět na Obr. 8. kapitola 3. 3. Čip byl po 1 mm posouván dál od konce skleněné části směrem dál od vstupní kapiláry hmotnostního spektrometru. Optimalizovaná vzdálenost je naznačena na Obr. 8 (e) kapitola 3. 3. Ze tří měření byl vypočítán průměr a směrodatné odchytky. Na Obr. 14 můžeme pozorovat, že maximum signálu reserpinu ( $[M+H]^+$ ) se nachází při vzdálenosti 0,8 cm. Bohužel se však nepodařilo zlepšit reprodukovatelnost měření vyjádřenou velikostí chybových úseček v grafu na Obr. 14. Absolutní hodnota maxima signálu se výrazněji nelišila od varianty zdroje bez teflonové krytky (Obr. 10). Jisté zlepšení však přesto bylo pozorováno, a to na úrovni dvouminutových záznamů, ze kterých byla počítána průměrná hodnota jednotlivých měření. Opakovatelnost signálu mezi jednotlivými skeny se výrazně vylepšila.



Obrázek 14 Závislost intenzity signálu reserpinu ( $[M+H]^+$ ) na vzdálenosti čipu od zúžení teflonové krytky. Měření bylo prováděno třikrát s teflonovou krytkou, byl použit průtok vzorku 5 $\mu$ l/min, průtok nebulizačního plynu byl použit 80 ml/min. Chybové úsečky odpovídají směrodatným odchytkám ( $n=3$ ).

Miniaturizovaný APCI zdroj s teflonovou krytkou poskytl s optimalizovanou geometrií základních prvků a optimalizovaným průtokem sušícího plynu hmotnostní spektrum reserpinu zobrazené na Obr. 15. Hmotnostní spektrum obsahuje pouze intenzivní signál protonované molekuly na  $m/z$  609.5 s velmi dobrým odstupem od šumu.



Obrázek 15 Hmotnostní spektrum reserpinu ( $[M+H]^+$ ) při optimalizovaných podmínkách: průtok vzorku 5ul/min, koncentrace 10 $\mu$ g/ml, průtok nebulizačního plynu 80ml/min a vzdálenost od konce skleněné části krytky 0,8 cm viz. Obr 8 (e) kap. 3.4.

## 5 Závěr

Pro miniaturizovaný iontový zdroj na bázi mikrofluidního čipu byly nalezeny tyto optimální podmínky: průtok sušícího plynu dle nastavení jehly 40-80 ml/min, vzdálenost čipu ústí teflonové krytky 0,8 cm, vzdálenost jehly od vstupní kapiláry 1,4 mm. Hlavním problémem miniaturizovaného zdroje je nestabilita signálu a s tím spojená nízká reprodukovatelnost měření. Pozitivním zjištěním je však podstatně vyšší citlivost oproti konveční APCI. Při dalším vývoji zdroje bych navrhovala sestavení pevného nastavitelného držáku pro jehlu, aby bylo možné měnit polohu jehly s větší přesností a zkusit použít ještě jiné alternativy odstínění zdroje než teflonovo-skleněnou krytku. Dalším problémem by mohlo být nedostatečné odpaření 2-propanolu v takto miniaturizovaném zdroji, i když se toto rozpouštědlo běžně používá v klasické APCI. Pro další experimenty navrhuji pro vzorek použít rozpouštědlo obsahující methanol namísto 2-propanolu.

# Literatura

- [1] Klouda, P.: *Moderní analytické metody*. 2. upr. a dopl. vyd. Ostrava, vydavatelství Pavel Klouda 2003.
- [2] Friedecký, D.; Lemr, K.: Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismu*. **20**:41, 152–157 (2012).
- [3] Downard, K.: *Mass Spectrometry: A foundation course*. Dostupné z URL: <<http://site.ebrary.com.ezproxy.is.cuni.cz/lib/cuni/detail.action?docID=10621281>> (cit. 29.3.2016)
- [4] Lebedev, A. T.: *Comprehensive Environmental Mass Spectrometry*. Dostupné z URL: <<http://site.ebrary.com/lib/cuni/detail.action?docID=10840252>> (cit. 30.3.2016)
- [5] Němcová, I.: *Spektrometrické analytické metody II*. Praha, Karolinum 1998.
- [6] Gauglitz, G.; Moore, D. S.: *Handbook of Spectroscopy*.4 Volume set, 2nd ed. Weinheim, Wiley-VCH 2014.
- [7] McLafferty, W. F.; Fred, W.; Tureček, T.: *Interpretation of mass spectra*. 4th ed. Sausalito, University Science Books 1993.
- [8] Robinson, J. W.; Frame, E. M. S.; Frame, G. M.: *Undergraduate instrumental analysis*. 6et ed. New York, Marcel Dekker 2005.
- [9] Cole, B. R.: *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities and Biological Applications*. Dostupné z URL: <<http://site.ebrary.com.ezproxy.is.cuni.cz/lib/cuni/detail.action?docID=10419255>> (cit. 15.4.2016)
- [10] Cappiello, A.: *Advances in LC-MS instrumentation*. Dostupné z URL: <[https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=rJAWmOW\\_HuMC&oi=fnd&pg=PP1&dq=advances+in+lc+ms+instrumentation&ots=jJxceVGVCg&sig=C8MWCfKTKU5IKCforExhxHMy5ck&redir\\_esc=y#v=onepage&q=advances%20in%20lc%20ms%20instrumentation&f=false](https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=rJAWmOW_HuMC&oi=fnd&pg=PP1&dq=advances+in+lc+ms+instrumentation&ots=jJxceVGVCg&sig=C8MWCfKTKU5IKCforExhxHMy5ck&redir_esc=y#v=onepage&q=advances%20in%20lc%20ms%20instrumentation&f=false)> (cit. 19.4.2016)
- [11] De Hoffmann, E.; Charette, J.; Stroobant, V.: *Mass spectrometry: Principles and Applications*. Paříž, Masson 1994.
- [12] Holčapek, M.: Ionizační techniky. Dostupné z URL: <[http://holcapek.upce.cz/teaching/02\\_Ionizacni\\_techiky.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/02_Ionizacni_techiky.pdf)> (cit. 11.4.2016)

- [13] Mobley, R. C.; Ferguson, L. D.; Alice, M. B.: Molecular Beams of Macroions. *The Journal of Chemical Physics* **49**:5, 2240-2249 (1968).
- [14] Ubik, K.: *Fyzikálně chemické metody-Hmotnostní spektrometrie*. 24. svazek cyklu Organická chemie, ÚOCHB AV ČR, Praha 1999.
- [15] Raffaelli, A.; Saba, A.: Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **22**:5, 318-331 (2003).
- [16] Bos, S. J.; Van Leeuwen, S. M.; Karst, U.: From fundamentals to applications: recent developments in atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry* **384**:1, 85-99 (2006).
- [17] Hanold, K. A.; Fischer S. M.; Cormia, P. H.; Miller, C. E.; Syage, J. A.: Atmospheric pressure photoionization. 1. General properties for LC/MS. *Analytical chemistry* **76**:10, 2842-2851 (2004).
- [18] Cheng, S. C.; Chen, Y. T.; Jhang, S. S.; Shiea, J.: Flame-induced atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **30**:7, 890-896 (2016).
- [19] Gross, H. J.: *Mass Spectrometry: A Textbook*. Heidelberg, Springer 2004.
- [20] Rebane, R.; Kurve, A.; Liigand, P.; Lingand, J.; Herodes, K.; Leito, I.: Establishing Atmospheric Pressure Chemical Ionization Efficiency Scale. *Analytical chemistry* **88**:7, 3435-3439 (2016).
- [21] Byrdwell, W. C.: Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids. *Lipids* **36**:4, 327-346 (2001).
- [22] University of Bristol: School of Chemistry, Mass spectrometry facilities. Dostupné z URL: < <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/apci-ionisation.xhtml> > (cit. 10.4.2016)
- [23] Andrade, J. A.; Shelley, J. T.; Wetzel, W. C.; Webb, R. M.; Gamez, G.; Ray, J. S.; Hieftje, M. G.: Atmospheric pressure chemical ionization source. 1. Ionization of compounds in the gas phase. *Analytical chemistry* **80**:8, 2646-2653 (2008).
- [24] Östman, P.; Marttila, S. J.; Kotiaho, T.; Franssilla, S.; Kostianen, R.: Microchip atmospheric pressure chemical ionization source for mass spectrometry. *Analytical chemistry* **76**:22, 6659-6664 (2004).
- [25] Smejkal, P.; Foret, F.: Mikrofluidika v bionalytické instrumentaci. *Chemické listy* **106**, 104-112 (2012).

- [26] Ríos Castro, Á.; Escarpa, A.; Simonet, B.: *Miniaturization of Analytical systems: Principles, Desings and Applications*. Dostupné z URL: <<http://site.ebrary.com.ezproxy.is.cuni.cz/lib/cuni/detail.action?docID=10323387>> (cit. 15.4.2016)
- [27] Pereira, P. F.: *From Conventional to Miniaturized Analytical Systems*. Dostupné z URL: <:[https://www.researchgate.net/publication/271529860\\_From\\_Conventional\\_to\\_Miniaturized\\_Analytical\\_Systems](https://www.researchgate.net/publication/271529860_From_Conventional_to_Miniaturized_Analytical_Systems)> (cit. 15.4.2016)
- [28] Preisler, J. Masarykova Univerzita: *Miniaturizace v analytické chemii*: Dostupné z URL <<http://bart.chemi.muni.cz/content/04-teaching/analytic/Anal%20Chem%20III%20Miniaturizace.pdf>> (cit. 16.4.2016)
- [29] Ehlert, S.; Ulrich, T.: High-pressure liquid chromatography in lab-on-a-chip devices. *Analytical and bioanalytical chemistry* **388**:3, 517-520 (2007).
- [30] Ishihama, Y.: Proteomic LC–MS systems using nanoscale liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1067**:1, 73-83 (2005).
- [31] Dostupné z URL: <[http://www.wikiwand.com/en/Ion\\_source](http://www.wikiwand.com/en/Ion_source)> (cit. 19.4.2016)
- [32] Dostupné z URL: <<http://case.vn/vi-VN/34/96/119/details.case>> (cit.19.4.2016)
- [33] Kaftan, F.: *Využití DESI/DAPPI-MS a MALDI-MS pro studium biologických objektů*. Praha 2013. Disertační práce. Univerzita Karlova. Přírodovědecká fakulta. Katedra analytické chemie.
- [34] Saarel, V.: *Microfabrication of heated nebulizer chips for mass spectrometry*. Espoo, 2010. Disertační práce. Aalto University. School of Science and Technology. Faculty of Electronics, Communication and Automation. Department of Micro and Nanosciences.