

SPRZEŻENIE CHROMATOGRAFII ZE SPEKTROMETRIĄ MAS

W celu wykonania analizy mieszaniny, przed pomiarem widma masowego, dokonuje się z reguły jej rozdziału za pomocą chromatografu gazowego (GC/MS) lub cieczowego (LC/MS). Produkty rozdziału chromatograficznego są następnie kolejno wprowadzane w fazie gazowej do źródła jonów spektrometru.

Chromatograf przepływowy po wyjściu z kolumny dostarcza znacznych ilości gazu nośnego lub ciekłego eluatu, znajdujących się w zasadzie pod ciśnieniem atmosferycznym. Trzeba więc opracować sposób, aby substancje wymywane z kolumny, rozproszone zazwyczaj w pokaźnej ilości gazu nośnego lub ciekłej fazy ruchomej, znalazły się w źródle jonów spektrometru mas, gdzie powinna panować wysoka próżnia.

Związek między średnią drogą swobodną L a ciśnieniem gazu ma następującą postać:

$$L = 0,66/p$$

gdzie p oznacza ciśnienie w Pa, a L długość w cm.

Ciśnienie rzędu 0,01 Pa, odpowiadające średniej drodze swobodnej rzędu 50 cm, stanowi jednocześnie górną granicę ciśnienia dopuszczalnego w źródle jonów.

1 cm³ gazu o ciśnieniu atmosferycznym będzie miał przy tym ciśnieniu objętość 10⁷ cm³. Przepływ gazu z szybkością 1 cm³/min będzie więc wymagać odpompowania 10⁷ cm³/min gazu pod tym ciśnieniem, czyli 150 l/s. Jeżeli eluat jest ciekły, to 1 mol odpowiada ok. 24 l gazu pod ciśnieniem atmosferycznym.

Przy założeniu, że eluat jest wodą o szybkości przepływu 0,1 cm³/min, do jego odpompowania należałoby użyć pompy o wydajności ok. 2x10⁴ l/s. Jest to oczywiście nadmierna szybkość przepływu i dlatego faza ruchoma nie może ulec całkowitemu odparowaniu w źródle jonów. Należy znaleźć inne rozwiązanie tego problemu.

W praktyce, wydajność pomp stosowanych w spektrometrii mas wynosi 50-1000 l/s, a przepływ eluatu wprowadzanego z chromatografu do spektrometru mas może wynosić około 5 cm³/min gazu pod ciśnieniem atmosferycznym.

Sprzężenie chromatografii gazowej i spektrometrii mas (GC/MS)

Kolumny pakowane pracują przy szybkości przepływu gazu nośnego przynajmniej ok. 20 cm³/min, natomiast kolumny kapilarne funkcjonują doskonale przy przepływie ok. 1 cm³/min.

Szybkość przepływu gazu nośnego przy wyjściu z kolumn pakowanych jest zbyt duża do bezpośredniego sprzężenia ze spektrometrem mas, podczas gdy kolumny kapilarne mają możliwy do przyjęcia przepływ gazu nośnego, co upraszcza połączenie GC/MS z punktu widzenia przepływu gazu.

Drugim istotnym czynnikiem który należy rozważyć, jest stężenie badanej substancji w gazie nośnym. Oznaczmy przez Q ilość μg substancji o masie cząsteczkowej M wprowadzonej do kolumny chromatografu, przez d przepływ gazu przy wyjściu z kolumny (w cm³/min) i przez I szerokość pików chromatograficznych w połowie jego wysokości wyrażoną w s.

Można uznać (w przybliżeniu), że średnie stężenie jest równe stosunkowi ilości wstrzykniętej substancji przekształconej w objętość odpowiadającego jej gazu V_e do objętości V_p gazu nośnego przepływającego w ciągu czasu I . Objętość 1 mola gazu pod ciśnieniem atmosferycznym wynosić będzie około 25000 cm³ w temperaturze zbliżonej do pokojowej (32°C), stąd:

$$V_e = 25000 \cdot 10^{-6} \cdot Q/M \text{ (cm}^3\text{)}$$

Rozważmy przykład kolumny pakowanej. Objętość 10 μg wstrzykniętej substancji o m.c. 100 Da odpowiada, zgodnie z powyższym wzorem, 0,0025 cm^3 . Przy szerokości połówkowej piku $I=10\text{s}$, objętość gazu nośnego V_p przy przepływie 20 cm^3/min będzie wynosiła:

$$V_p = 20/(10/60) = 3 \text{ cm}^3$$

Stąd stosunek:

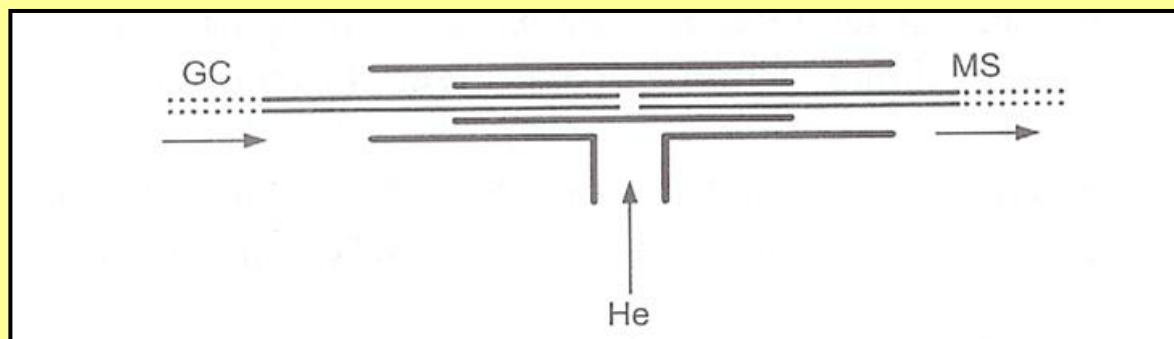
$$V_e/V_p = 0,0025/3 \approx 0,1\%$$

Stosunek V_e/V_p jest niezależny od ciśnienia i temperatury. Należy zauważyć, że podwyższenie rozdzielczości chromatograficznej oznacza zmniejszenie szerokości piku, a co za tym idzie, poprawienie wartości tego stosunku. Będzie więc on zdecydowanie korzystniejszy przy zastosowaniu kolumn kapilarnych.

Połączenie otwarte GC/MS

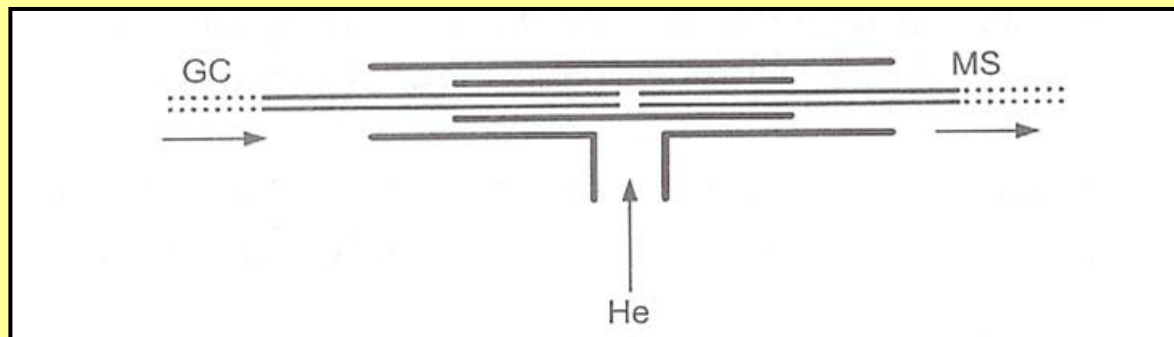
Połączenie otwarte (open split coupling) przedstawiono pokazano na rysunku poniżej. Zakończenie kapilarnej kolumny chromatograficznej jest wprowadzone do odcinka rurki kapilarnej o nieco większej średnicy, umieszczonej z kolei w rurce w kształcie litery T. Do tego samego odcinka rurki jest wprowadzona kapilara, prowadząca do źródła jonów spektrometru mas.

Kapilara ta jest odpowiednio uszczelniona od strony źródła, aby mogła pracować w wysokiej próżni oraz ogrzewana - w celu uniknięcia kondensacji wszelkich substancji ciekłych. Rurka w kształcie litery T jest zamknięta na obu końcach, lecz nie jest uszczelniona - po to, aby ciśnienie w niej było równe atmosferycznemu. Przez prostopadłe ramię rurki wprowadza się strumień helu, aby uniknąć utlenienia eluowanych substancji w wyniku kontaktu z tlenem atmosferycznym.



Średnica kapilary, która prowadzi do spektrometru mas oraz jej długość są tak dobrane, aby do źródła jonów wprowadzić strumień gazu o przepływie bliskim dopuszczalnemu maksimum, biorąc pod uwagę przewodnictwo gazowe źródła oraz wydajność pomp. Na przykład, kapilara o wewnętrznej średnicy 0,15 mm i długości 50 cm, ogrzewana do 250°C, ograniczy ilość doprowadzanego do źródła jonów gazu do 2,5 ml/min. Umożliwia to w praktyce wprowadzenie wszystkiego co wychodzi z kolumny kapilarnej.

Połączenie to nie prowadzi do jakiegokolwiek wzbogacenia strumienia gazu w substancje eluowane. Możliwa jest jednak praca w rutynowych warunkach chromatograficznych; zakończenie kolumny pozostaje pod ciśnieniem atmosferycznym. Nie wymaga też specjalnych regulacji, a wymianę kolumny można przeprowadzić bardzo łatwo. System ten może być zastosowany przy wszystkich typach kolumn.



Połączenie bezpośrednie

Połączenie to polega na wprowadzeniu kolumny kapilarnej bezpośrednio do źródła jonów spektrometru przez zestaw złączy uszczelniających. Odpompowanie nadmiaru gazu nie przedstawia większych problemów, gdyż przedłużająca kolumnę kapilara bywa zazwyczaj bardzo długa. Dla kolumny o średnicy wewnętrznej 0,25 mm konieczna jest kapilara długości co najmniej 15 m. W stosunku do połączenia otwartego niedogodnościami są niemożliwość usunięcia rozpuszczalnika i skomplikowana wymiana kolumny. Tę ostatnią niedogodność można zmniejszyć, łącząc kolumnę chromatograficzną ze szklaną kapilarą wchodzącą do źródła za pomocą bloku teflonu w którym wykonano otwory o takich średnicach, aby połączenie było szczelne.

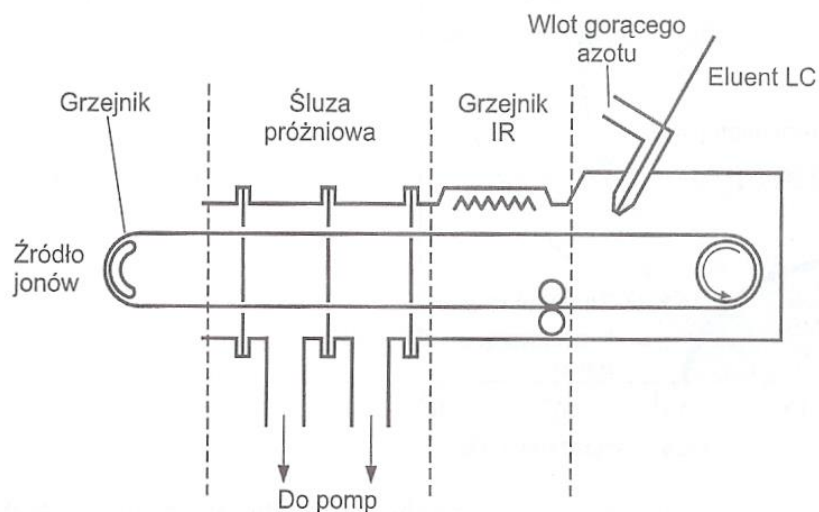
Sprzężenie chromatografii ciekowej i spektrometrii mas (HPLC/MS)

Sprzężenie z chromatografią ciekową jest problemem trudniejszym, ponieważ spektrometria mas wymaga wytworzenia jonów w fazie gazowej. Chromatografia ciekowa natomiast jest używana najczęściej do rozdziału substancji trudno lotnych, dla których wykonanie chromatografii gazowej jest niemożliwe. Ważnym zagadnieniem jest też konieczność pozbycia się ciekłej fazy ruchomej, czyli rozpuszczalnika eluującego.

Rodzaje połączeń:

- przesuwający się pasek
- strumień cząstek
- bombardowanie szybkimi atomami z ciągłym przepływem matrycy
- rozpylanie termiczne
- jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym
- rozpylanie w polu elektrycznym i rozpylanie jonów

A. Połączenie przez przesuwający się pasek

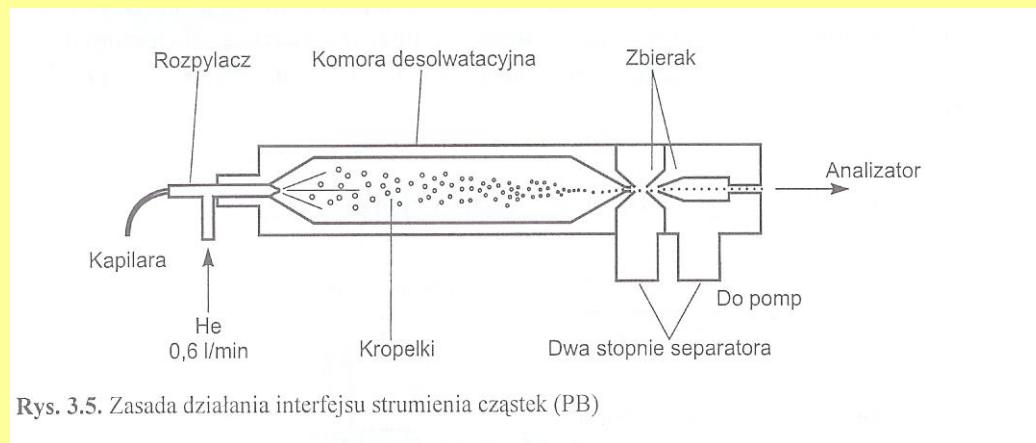


Rys. 3.4. Schemat interfejsu LC/MS z przesuwającym się paskiem. Stosowane są źródła z jonizacją elektronami, chemiczną i FAB (wg dokumentacji firmy Finnigan MAT)

Ten typ połączenia ma dziś znaczenie historyczne.

B. Połączenie poprzez strumień cząstek

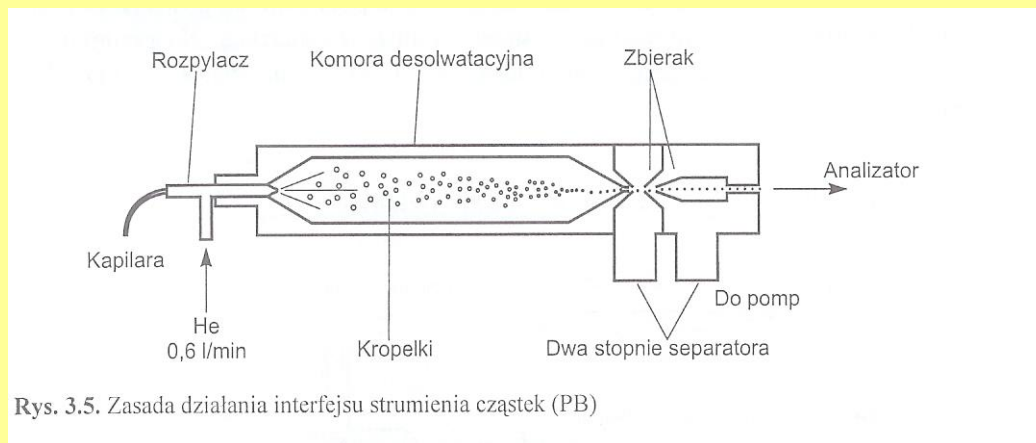
Eluat z chromatografu jest pompowany przez kapilarę do szklanego rozpylacza, w którym za pomocą strumienia helu ulega przekształceniu w chmurę drobnych kropelek. Tak otrzymany aerozol wędruje następnie w strumieniu gazu wzdłuż komory desolwatacyjnej o ogrzewanych ściankach, w której utrzymywane jest ciśnienie nieco niższe od atmosferycznego. Podczas tego przejścia cząsteczki analizowanej substancji ulegają częściowej desolwatacji. Komora desolwatacyjna jest połączona z dwustopniowym separatorem molekularnym, działającym na zasadzie odrzutu cząstek.



Rys. 3.5. Zasada działania interfejsu strumienia cząstek (PB)

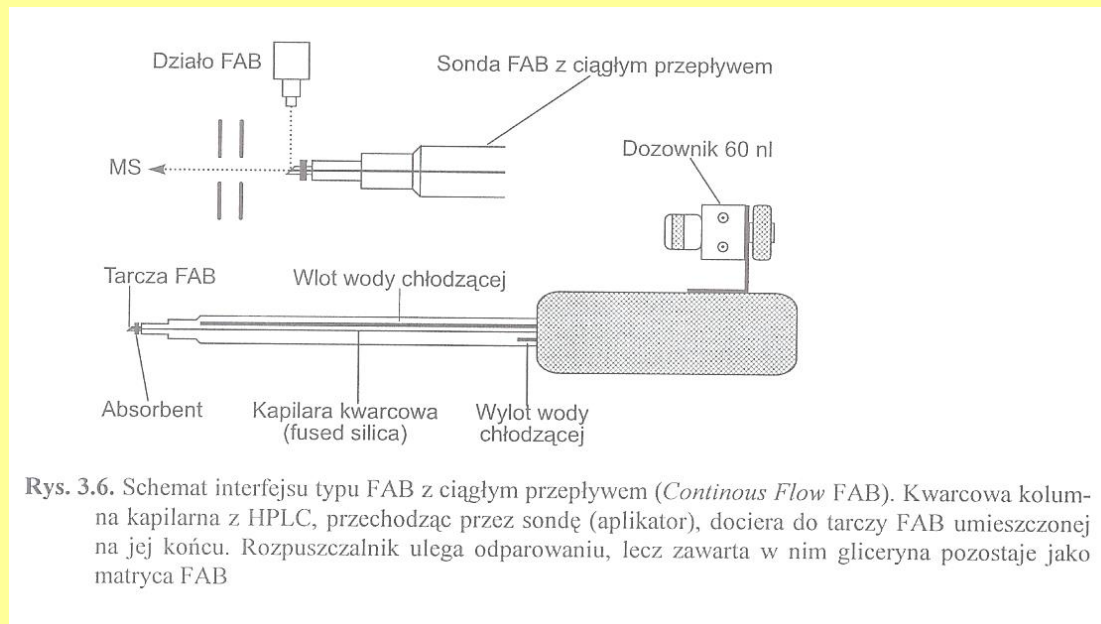
Opuszczająca komorę mieszanina helu, par rozpuszczalnika i analizowanych cząstek ulega rozprężeniu z szybkością naddźwiękową w pierwszym stopniu separatora, w którym utrzymywana jest próżnia rzędu 10^3 Pa. Pierwszą dyszę separatora opuszcza strumień gazu o wielkiej szybkości, zawierający cząstki eluowanej substancji. Ponieważ różnica mas między cząsteczkami gazu i rozpuszczalnika a cząstkami analizowanej substancji jest znaczna, te ostatnie ulegną mniejszemu rozproszeniu z centrum strumienia w kierunku jego brzegów.

Rozdział otrzymuje się odcinając skrajne warstwy strumienia za pomocą specjalnie wyprofilowanej dyszy zbieraka (skimmer). Cząsteczki helu i oddzielonego rozpuszczalnika są usuwane za pomocą pomp próżni wstępnej. Proces ten jest powtarzany w drugim stopniu separatora, w którym próżnia wynosi około 70 Pa. Opuszczająca separator, wzbogacona w cząsteczki analizowanej substancji, wąska wiązka cząstek o średnicy poniżej 100 nm kierowana jest następnie do źródła jonów spektrometru.



C. Połączenie przez bombardowanie szybkimi atomami z ciągłym przepływem matrycy (Continuous Flow FAB, CF-FAB)

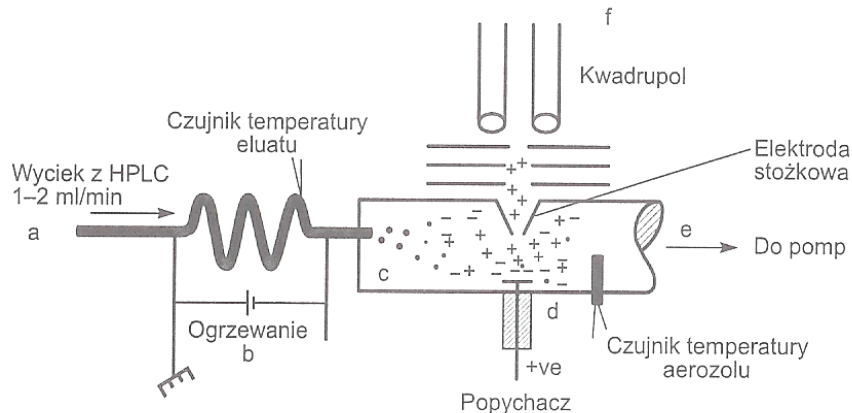
Połączenie FAB z ciągłym przepływem matrycy polega na połączeniu kapilarnej kolumny chromatograficznej z tarczą umieszczoną na końcu sondy FAB za pomocą przechodzącej przez nią kapilary. Do fazy ruchomej zastosowanej w chromatografii cieczy dodaje się 1-5% gliceryny. Szybkość przepływu wynosi 1-5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Zapewnia to łatwe odpompowanie odparowanego rozpuszczalnika. Gliceryna pozostaje na powierzchni tarczy razem z rozpuszczoną substancją i służy za matrycę.



Rys. 3.6. Schemat interfejsu typu FAB z ciągłym przepływem (*Continuous Flow FAB*). Kwarcowa kolumna kapilarna z HPLC, przechodząc przez sondę (aplikator), dociera do tarczy FAB umieszczonej na jej końcu. Rozpuszczalnik ulega odparowaniu, lecz zawarta w nim gliceryna pozostaje jako matryca FAB

D. Połączenie przez rozpylanie cieplne (termosprej, TSP)

Podczas wprowadzania do źródła jonów faza ciekła musi być silnie ogrzewana, aby uniknąć zamarzania kropelek podczas gwałtownego rozprężania cieczy w próżni. Ogrzewanie kapilary doprowadzającej jest regulowane sprzężeniem zwrotnym z odczytem temperatury strumienia aerozolu w próżni. Kapilarę ogrzewa się przepuszczając przez nią prąd elektryczny, pełni więc ona sama rolę grzałki.

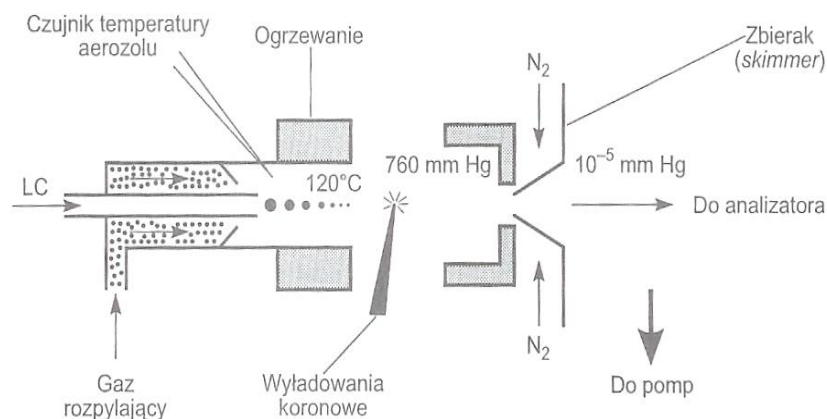


Rys. 3.8. Schemat termospreju (TSP). Wyciek z chromatografu dociera metalową kapilarą (a), która jest bardzo gwałtownie ogrzewana na odcinku (b); w komorze próżniowej (c) wytwarza się strumień rozpylonej cieczy. Strumień ten następnie przechodzi (dla jonów dodatnich) między dodatnio naładowanym popychaczem (*pusher*) (d), a ujemną elektrodą stożkową. Wydobyte w ten sposób z kropelek cieczy jony są przyspieszane w stronę spektrometru (f). Pompa o dużej wydajności (e) utrzymuje odpowiednią próżnię (wg dokumentacji firmy Finigan MAT)

E. Jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI)

Metoda ta wykorzystuje reakcje jon-cząsteczka w fazie gazowej pod ciśnieniem atmosferycznym. Jest to więc metoda analogiczna do powszechnie stosowanej w GC/MS jonizacji chemicznej, lecz jony pierwotne są produkowane przez wyładowania koronowe w aerozolu rozpuszczalnika.

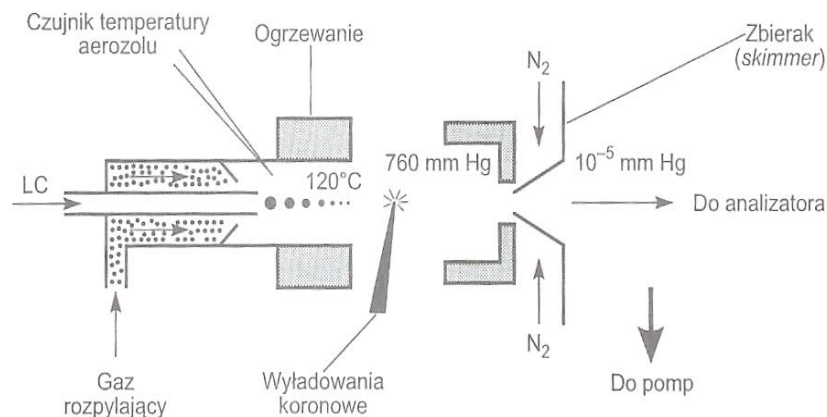
Faza ruchoma z chromatografu, o szybkości przepływu nie większej niż 2 ml/min, wprowadzana bezpośrednio do rozpylacza, gdzie za pomocą strumienia azotu o wysokiej szybkości jest przekształcana w mgłę. Drobną krople ciecicy przemieszczają się następnie w strumieniu gazu przez ogrzewaną rurę kwarcową, zwaną komorą desolwatacyjną lub odparowującą.



Rys. 3.9. Schemat źródła jonów APCI

Ciepło przekazane od kropelek aerozolu powoduje odparowanie fazy ruchomej i próbki w strumieniu gazu. Regulacja temperatury komory umożliwia odparowanie niezależnie od przepływu i natury fazy ruchomej. Gorący gaz, ogrzany do temperatury 120°C i zawierający również odparowane cząsteczki fazy ruchomej i analitu, dociera pod ciśnieniem atmosferycznym do obszaru reakcji w źródle jonów, gdzie zachodzi jonizacja chemiczna analizowanej substancji. Rolę gazu jonizującego odgrywa odparowana faza ruchoma.

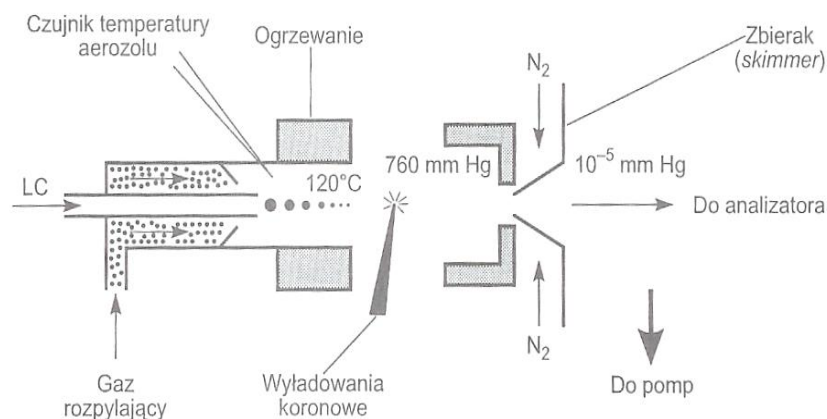
Elektrony niezbędne do otrzymania jonów, pierwotnych nie są wytwarzane przez ogrzewany żarnik, ponieważ pod atmosferycznym ciśnieniem panującym w źródle jonów uległyby one natychmiast przepaleniu. Powstają one na skutek wyładowań koronowych lub pochodzą ze źródeł promieniowania β .



Rys. 3.9. Schemat źródła jonów APCI

Jonizacja pierwotna zachodzi z dużą wydajnością, gdyż pod ciśnieniem atmosferycznym częstotliwość zderzeń jest bardzo duża, dzięki krótkiej średniej drodze swobodnej. Jony wytworzone pod ciśnieniem atmosferycznym są następnie wprowadzane do próżniowej części spektrometru przez otwór o bardzo małej średnicy, ogniskowane i kierowane do analizatora. Otwór ten powinien być wystarczająco duży, aby umożliwić wprowadzenie jak największej ilości jonów, a jednocześnie na tyle mały, aby utrzymywać w analizatorze próżnię umożliwiającą wykonanie analizy.

Najczęściej stosowaną metodą, dzięki której można spełnić oba te przeciwstawne warunki, jest odpompowywanie wielostopniowe, w którym poszczególne stopnie separatora są oddzielane odpowiednio wyprofilowanymi dyszami w kształcie zbieraka (skimmer).



Rys. 3.9. Schemat źródła jonów APCI

F. Połączenia przez rozpylanie w polu elektrycznym (elektrosprej, ESI) i rozpylanie jonów (jonosprej, ISP)

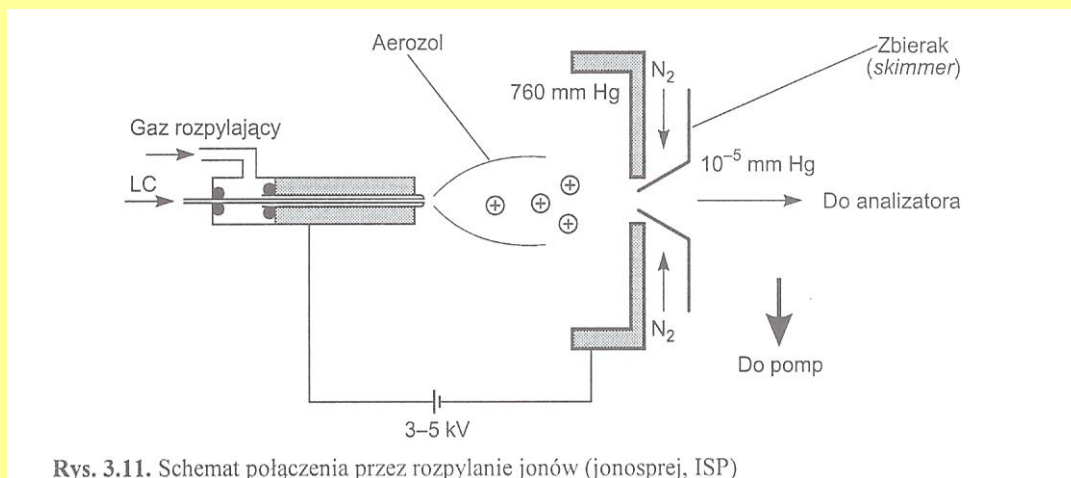
Metoda ta polega na otrzymaniu aerozolu z wypływającej z kapilary cieczy przez zastosowanie napięcia rzędu kilku kV. Silne pole elektryczne, wytworzone na powierzchni opuszczającej kapilarę cieczy, powoduje impuls elektryczny, w wyniku którego powstają naładowane kropelki cieczy. Pole elektryczne jest więc niezbędne do wytworzenia kropelek, lecz jednocześnie nadaje im ładunek elektryczny. Na cechy otrzymanego aerozolu, takie jak średnia wielkość kropelek cieczy i ich ładunek, wpływają: rodzaj rozpuszczalnika, szybkość przepływu fazy ciekłej oraz zastosowane napięcie.

Przy szybkości przepływu ponad 5 ml/min, źródło ESI wytwarza strumień zbyt dużych kropelek i otrzymany aerozol jest nietrwały. Podwyższenie napięcia może poprawić jakość aerozolu lecz jednocześnie powodować wyładowania koronowe, co w dużym stopniu zakłóca wynik analizy. Aby więc otrzymać przepływ odpowiedni do wytwarzania trwałego aerozolu, elektrosprej musi być połączony z kolumnami kapilarnymi lub z kolumnami zaopatrzonymi w dzielnik strumienia wychodzącego.

Aerozol można otrzymać też innymi metodami. Najbardziej klasycznym sposobem jest opisana wyżej APCI, w której strumień gazu o dużej prędkości rozpyla ciekłą fazę ruchomą w postaci drobnych kropelek.

Połączenie LC/MS przez rozpylanie jonów (ionspray, ISP) jest udoskonaloną wersją elektrospreju, w której do wytwarzania naładowanych kropelek cieczy stosowane są zarówno wysokie napięcie, jak i rozpylanie strumieniem gazu. Uzyskuje się w ten sposób możliwość wprowadzania do źródła jonów większych ilości cieczy, a powstający aerozol jest trwalszy i jego jakość jest mniej zależna od rodzaju fazy ruchomej.

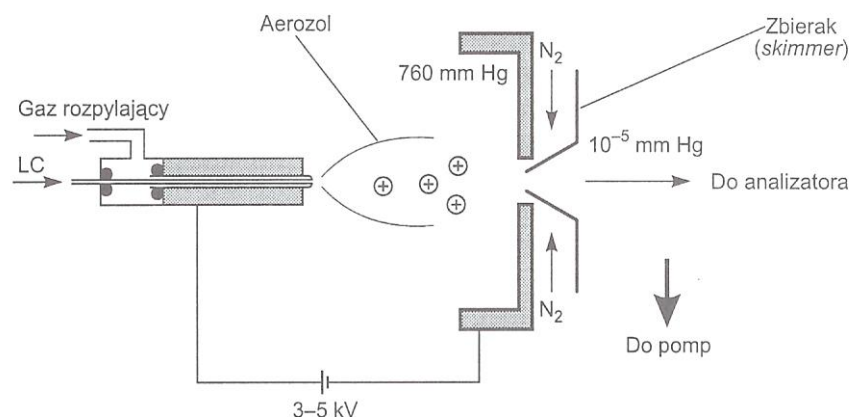
Metoda ISP polega na wprowadzeniu roztworu zawierającego próbkę do znajdującego się pod wysokim napięciem rozpylacza. Gaz rozpylający przekształca ciecz w mgłę naładowanych elektrycznie kropelek nawet przy dużych szybkościach przepływu. Jony wyzwalają się następnie z odparowanych kropelek w procesie niskoenergetycznym, w którym nie zachodzi fragmentacja pozornych jonów molekularnych.



Rys. 3.11. Schemat połączenia przez rozpylanie jonów (jonosprej, ISP)

Jeżeli w roztworze powstają jony wielokrotnie naładowane, będą one również obecne w widmie masowym. Ponieważ jony opuszczają źródło pod ciśnieniem atmosferycznym, przed wprowadzeniem ich do analizatora konieczne jest zastosowanie wielostopniowego systemu obniżania ciśnienia, analogicznego do opisanego dla APCI.

Cały proces jonizacji zachodzi w temperaturze pokojowej, zatem widma masowe nie są komplikowane żadnymi rozpadami termicznymi. Połączenie przez rozpylanie jonów może pracować z przepływem fazy ruchomej około 200 $\mu\text{l}/\text{min}$, chociaż największą czułość uzyskuje się dla przepływów mniejszych, rzędu 50 $\mu\text{l}/\text{min}$. Przy większych przepływach, ISP jest w stanie ciągle wytwarzać aerozol naładowowanych kropelek, lecz nadmiar cieczy ulega kondensacji i aerozol staje się nietrwały. Przeszkodę tę pokonuje się przez umieszczenie uziemionej płytki ekranującej między rozpylaczem a otworem wejściowym do spektrometru. Płytki ekranująca będzie funkcjonować przy większych przepływach jako dzielnik aerozolu i w ten sposób przeciwdziałać kondensacji kropelek cieczy. Tak udoskonalone połączenie ISP może pracować przy przepływach ponad 2 ml/min, bez konieczności wcześniejszego stosowania dzielnika strumienia cieczy.



Rys. 3.11. Schemat połączenia przez rozpylanie jonów (jonosprej, ISP)