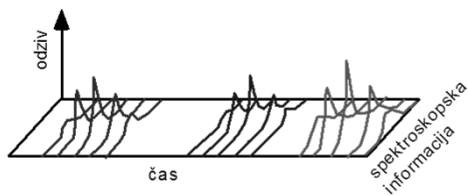


Sklopljene tehnike

- Navadno gre za kombinacijo kromatografskih in spektroskopskih metod, pri čemer izkoriščamo prednosti posameznih tehnik
- Kromatografija: učinkovita ločitev zvrsti
- Spektroskopija: kvalitativna in kvantitativna informacija

Rezultat sklopitve:
Večdimenzionalna slika, ki omogoča tako kvantitativno kot kvalitativno informacijo



Sklopitve

Metode, ki jih najpogosteje uporabljamo:

Plinska kromatografija:

- Masna spektrometrija GC-MS
- Infrardeča spektrometrija. GC-FTIR
- Atomska emisija: GC-AES

Najpogostejše sklopitve

- Kromatografija
- Masna spektrometrija

GC-MS sklopitve

- Nekoliko preprostejše v primerjav z LC
- Vzorec je že v plinski fazi
- Odstraniti moramo nosilni plin, ki predstavlja glavni delež v efluentu

Sklopitve kromatografskih tehnik z masno spektrometrijo

Problem sklopitev GC-MS in LC-MS je vmesnik

Obe kromatografski tehniki imata relativno velik pretok

- GC: 1-50 ml /min
- LC: 0,1-5 ml/min (50 –5000 ml plina)

Masna spektrometrija terja visok vakuum (10^{-5} do 10^{-6} tor)!

GC-MS sklopitve

- Vmesniki:
- Molekularni separator
- »Split« vmesnik
- Kapilarni vmesnik

Vmesnik

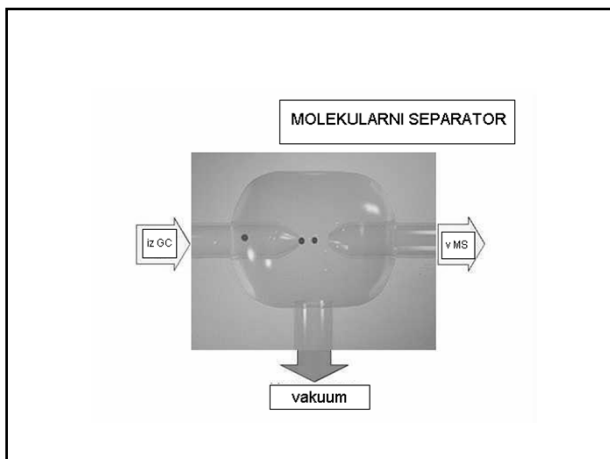
- VLOGA VMESNIKA:
- Kvantitativni prenos analita
- Zmanjšanje tlaka /pretok plinov iz kromatografa !/ do vakuumu v masnem spektrometru
- Idealnega vmesnika za sklapljanje kromatografskih tehnik z masno spektrometrijo še ni!

Vmesnik

- Najenostavnejši pristop:
- Razdelitev pretoka iz kromatografa (splitting!)
- V tem primeru vstopa v masni spektrometer 1/1000 vzorca, kar ni dobro za določevanje sledov.

GC-MS sklopitve

- Molekularni separator:
- Najprimernejši, če uporabljamo polnjene kolone
- Temelji na principu, da se večje molekule gibljejo počasneje, zato jih več doseže vhod v MS



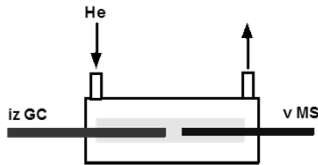
Molekularni separator

- Prednosti:
 - Relativno enostaven in poceni način
- Pomanjkljivost:
 - Difuzija je odvisna od molekulske mase, s tem tudi selektivnost
 - Možnost zamašitve

Direktni vmesnik (“Open Split Interface”):

- Pretok v MS je približno 1 ml/min
- Če je pretok iz kolone večji, presežek plinov odstranimo, če je manjši, ga dopolnimo s He.
- Primeren za pretoke okoli 1 ml/min - kapilarne kolone!

Direktni vmesnik (“Open Split Interface”):



Direktni vmesnik

- Prednosti:
 - Uporabljamo lahko različne plinske mešnice
 - Relativno enostaven in poceni
- Pomanjkljivosti:
 - Prekinjen pretok vzorca lahko vpliva na spremembo pretoka.

Direktni kapilarni vmesnik

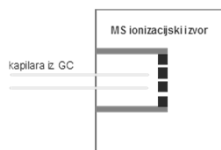
Prednosti:

- Cena, enostavnost
- Majhen mrtvi volumen

Slabosti:

- Omejen na pretok skozi kapilarno
- (notranji premer!)
- Del kolone je »izgubljen«

Direktni kapilarni vmesnik



GC-MS sklopitev

- Dva načina merjenja:
- Opazovanje celotnega masnega spektra (SCAN) maksimalna kvalitativna informacija!
- Selektivno opazovanje ionov (Selective Ion Monitoring (SIM) - Opazujemo ione s predhodno izbrano maso – kvantitativne določitve!

SCAN vs SIM

”SCAN” način: daljši čas zajemanja podatkov

Pri hitrejšem “skeniranju” izgubljam kvaliteto informacij!

- Manjše število merilnih točk! Posledica: Manjša natančnost!



SCAN vs SIM

Način	Število ciklov/sec	RSD
Scan	0,5	6,5
16- ion SIM	2,0	2,5
4-ion SIM	4,0	1,2

SCAN vs SIM

- Minimalno število točk za karakterizacijo vrha: 11
- Optimalno število: 20
- Maksimalno občutljivost in natančnost meritev dosežemo pri pogojih, ko opazujemo manjše število mas

GC-MS sklopitve- možni pristopi

- Večkratne meritve
- Prvo meritev izvedemo v »SCAN« načinu (kvalitativna informacija)
- Nato ponavljamo meritve v SIM načinu in opazujemo posamezne mase (kvantitativna informacija)

Takšen pristop je možen, če imamo na razpolago dovolj časa in dovolj vzorca!

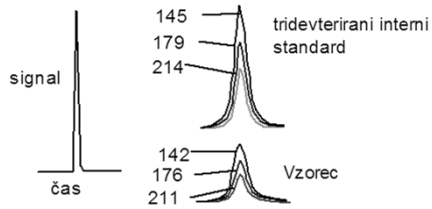
Ciljana analiza

- Izberemo si substanco, ki jo želimo opazovati
- Za vsako substanco si izberemo nekaj značilnih mas (npr. 3)
- Za kvantitativno opredeljevanje uporabimo maso z največjo intenziteto
- Dodatni masi uporabimo za kvalitativno informacijo (potrditev substance). Črti morata biti dobro ločeni!

Ciljana analiza

- SIM: izberemo 6 črt (če uporabimo interni standard, mora ena od izbranih črt predstavljati standard!)
- Osnove za kvalitativno identifikacijo:
 - Retencijski čas
 - Ustrezni ioni
 - Ustrezna razmerja ionov
 - Ujemanje internega standarda

Ciljana analiza: primer določitve učinkovine v urinu



LC-MS sklopitev

- Mnogo težja in zhtevnejša sklopitev
1. Vzorec je tekočina
 2. Večji volumni
 3. Komponente v vzorcu imajo navadno večjo molekulsko maso

POSLEDICA: neznačilni masni spektri

LC-MS vmesniki-”Thermospray”

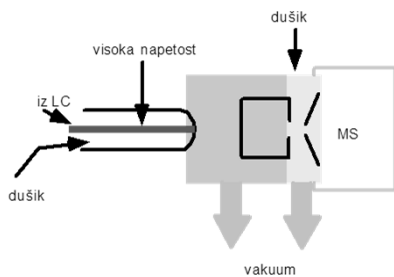
Princip:

- vzorec segrevamo in plinsko fazo “ekspandiramo” v vakuum
- Topilo odpari, trdni delci dobijo statični naboj
- Nabite delce vnašamo v MS s pomočjo vmesnika - »skimmerja«

LC-MS vmesniki- "Elektrospray"

- Naboj se prenaša na kapljice
- Le-te nato razpršujemo v vakumski prostor, kjer se odstrani hlapno topilo
- Ioni nato »izletijo« iz kapljice in vstopajo v masni spektrometer

LC-MS vmesniki-" Elektropray"



LC-MS IONIZACIJA

- Tako "thermospray" kot "elektrospray" ustvarjata meglico, v kateri so delci nabiti z elektrostatskim nabojem
- Ko kapljice potujejo proti »skimmerju«, topilo odpari
- Povečanje gostote naboja povzročijo prenos naboja na molekule analita

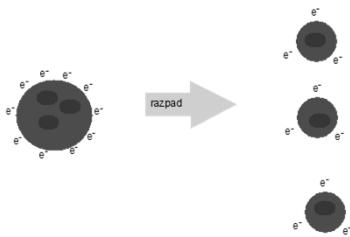
LC-MS-ionizacija



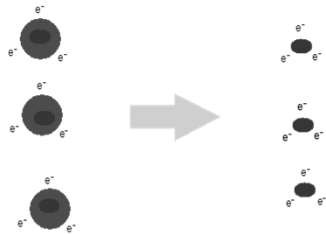
LC-MS-ionizacija



LC-MS-ionizacija



LC-MS-ionizacija

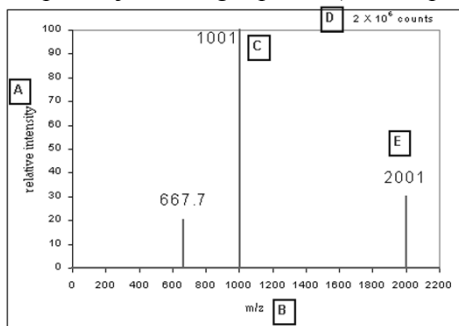


LC-MS -problemi

- Vmesniki so še v razvoju
- Ker gre za prenos nabojev na komponente vzorca, se pogosto pojavljajo večkrat nabiti delci. Posledica so neznačilni spektri

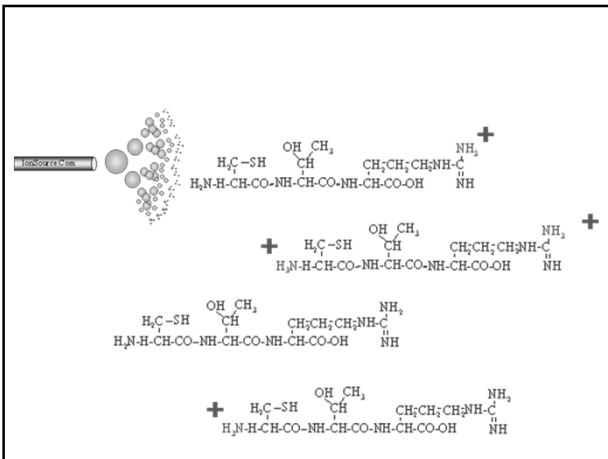
Interpretacija dobljenih spektrov je zahtevna.

Interpretacija Masnega spektra (elektrospray)

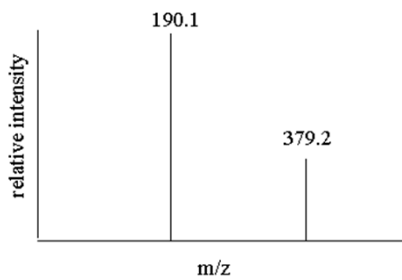


Primer ionizacije z elektroprayem (peptidi) – pozitivna ionizacija

- Pri ionizaciji nastanejo nabiti in nenabiti delci.
 - Število pozitivnih nabojev v molekuli je odvisno od števila bazičnih mest v molekuli.
 - Nastanek pozitivnih ionov je ugoden v kislem mediju.
 - Negativno ionizacijo dosežemo pri pH, ki so nad izoelektrično točko (deprotonacija).
-
- V masnem spektru vidimo nastale ione.
 - (slika spektra)



Dobljeni masni spekter (elektrospray)



**Interpretacija Masnega spektra
(elektrospray)**

1. stopnja: Določitev naboja

$190,1 = \text{masa/naboj}$ in $379,2 = \text{masa/naboj}$

$\text{masa} = 190,1 * \text{naboj}$ in $\text{masa} = 379,2 * \text{naboj}$

$m+1 = 190,1 * (z+1)$ in $m = 379,2 * z$

$m = [190,1 * z + 189,1 = 379,2 * z]$

Sledi: $z = 1$

**Interpretacija Masnega spektra
(elektrospray)**

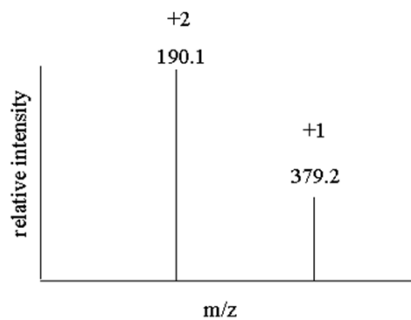
2. stopnja: Določitev mase (neprotonirane molekule):

naboj 1+ : $(379,2 - 1) * 1 = 378,2$

naboj 2+ : $(190,1 - 1) * 2 = 378,2$

Povprečje: 378,2

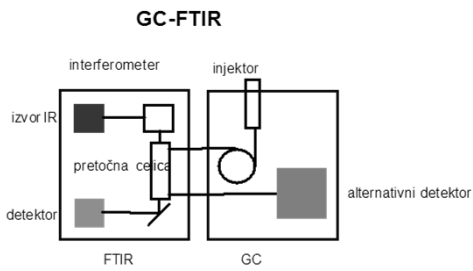
Interpretacija Masnega spektra



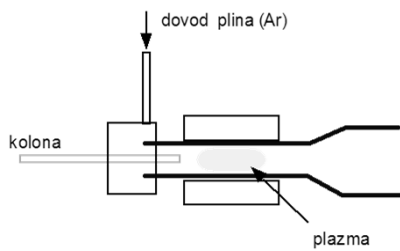
Ostale sklopljene tehnike

- GC-FTIR
- GC-AES
- Oba pristopa omogočata »direktno« povezavo

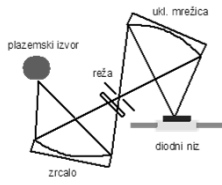
GC-FTIR sklopitev



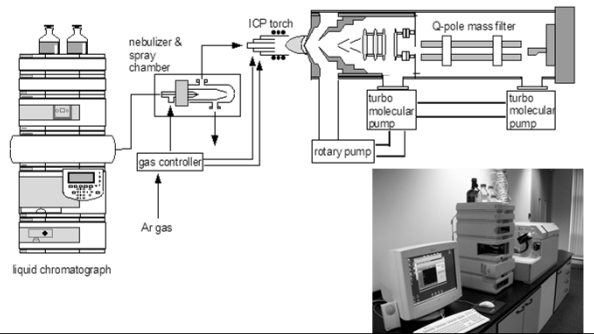
GC-AES sklopitev



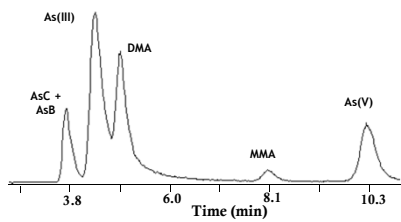
Emisijski spektrometer



SKLOPITEV LC-ICP-MS



ICP-MS speciacijska analiza: Ločitev As zvrsti (sklopitev LC -ICP-MS)



Primer speciacije As zvrsti z LC-ICP-MS

$\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{HO}-\text{As}-\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{matrix}$ Arsenate	$\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{HO}-\text{As}-\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{matrix}$ Arsenite
$\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_3\text{C}-\text{As}-\text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{matrix}$ Methylarsonic acid (DMA)	$\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_3\text{C}-\text{As}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$ Dimethylarsinic acid (DMAO)
$\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{As}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$ Trimethylarsine oxide (TMAO)	$\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{As}=\text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$ Tetramethylarsotriazene (TMA)
$\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{As}-\text{CH}_2-\text{COO}^- \\ \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$ Arsenobetaine (AsBet)	$\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{As}-(\text{CH}_2)_2-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$ Arsenocholine (AsCho)
Anenoxigani $\text{H}_3\text{C}-\text{As}(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{R}$	

1) Dimethylarsinothioamide derivatives
 2) Trimethylarsinothioamide derivatives

a) R = -SO₂H
 b) R = -OSO₂H
 c) R = -OH
 d) R = -OPO(O)CH₂CH(OH)CH₂OH

As zvrsti:

Anorganske zvrsti As so večinoma toksične, organske zvrsti pa so človeku neškodljive.

Potencialna toksičnost arsenoskladkorjev še ni dokazana.

Toksične!

Netoksične

?

