



VIỆN KIỂM NGHIỆM AN TOÀN VỆ SINH THỰC PHẨM QUỐC GIA  
NATIONAL INSTITUTE FOR FOOD CONTROL

# Sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS)

Trần Cao Sơn

Viện Kiểm nghiệm ATVSTP Quốc gia

## Nội dung



- Sắc ký lỏng (Liquid chromatography)
- Khối phổ (Mass spectrometry)
- Phổ khối (Mass spectrum)
- Những lưu ý khi sử dụng LC-MS

# Sắc ký lỏng (LC)



- Lý thuyết chung về sắc ký
- Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)
- Thiết bị HPLC



3

# Giới thiệu chung về sắc ký

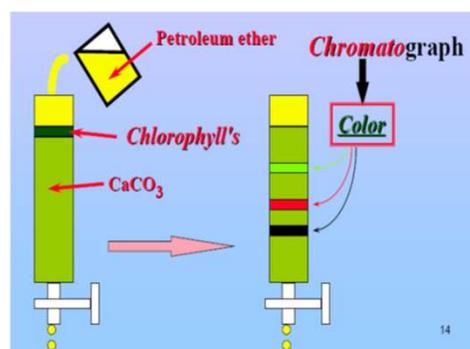


- Sắc ký là một **phương pháp tách** các chất trong một hỗn hợp dựa vào sự khác nhau về tính chất hóa học, vật lý của các chất trong hỗn hợp.

- **Chromatography**

Màu

Đồ thị, hình



14

4

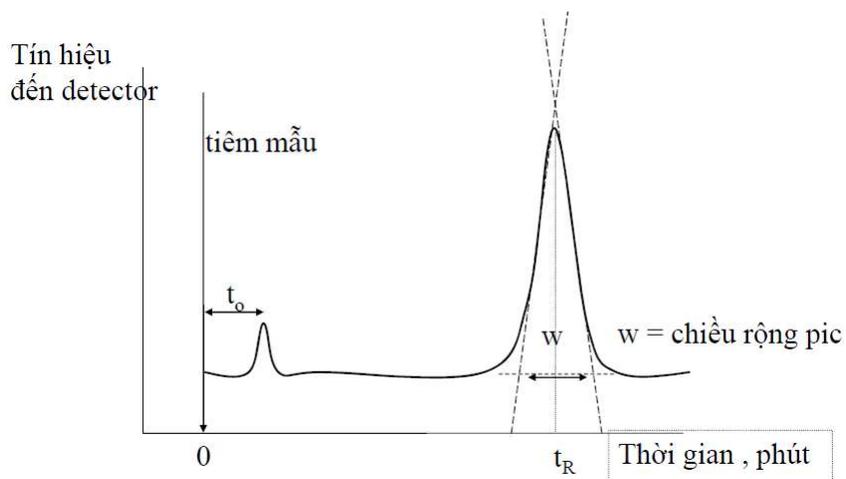
## Các đại lượng đặc trưng của sắc ký



- Thời gian lưu:  $t_R$  và  $t'_R$   $t'_R = t_R - t_0$
- Hệ số dung lượng  $k'$   $k' = t'_R / t_0$
- Hệ số chọn lọc  $\alpha$   $\alpha = k'_B / k'_A \quad (\alpha \geq 1)$

5

## Pic sắc ký

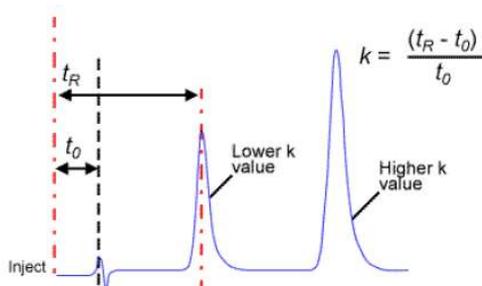


6

## Hệ số dung lượng k



- k mô tả tốc độ di chuyển của chất qua cột



- Nếu k thấp: tốc độ rửa giải nhanh
- Nếu k lớn (>20): quá trình rửa giải kéo dài

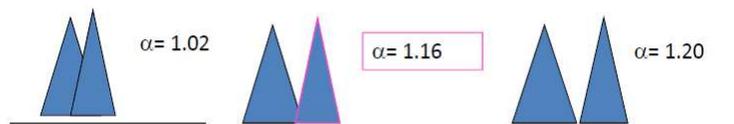
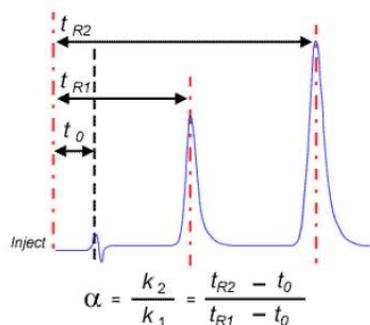
7

## Hệ số chọn lọc $\alpha$



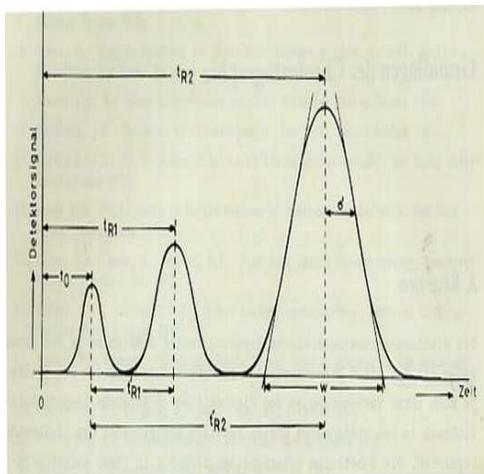
- Đặc trưng cho sự tách 2 chất

- ❖  $\alpha=1$ : không tách được
- ❖ Muốn tách:  $\alpha \neq 1$  nhiều
- ❖ Nếu  $\alpha$  quá lớn, thời gian phân tích sẽ kéo dài



8

## Quá trình tách sắc ký



**Khả năng tách các chất trong sắc ký phụ thuộc chủ yếu:**

- + **Pha tĩnh:** Loại, cỡ hạt, độ xốp, loại xốp, điều kiện chế tạo...
- + **Pha động:** Loại, thành phần, pH, tốc độ...
- + **Chất phân tích:** Tính chất phân cực, độ tan, tương tác...

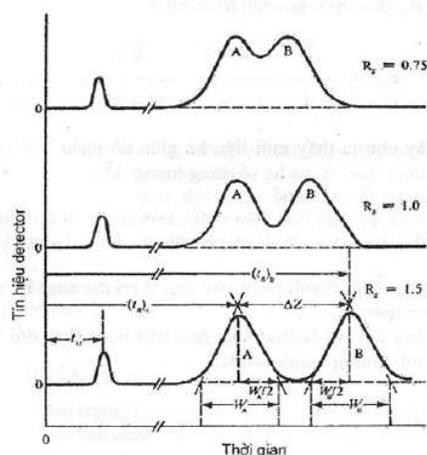
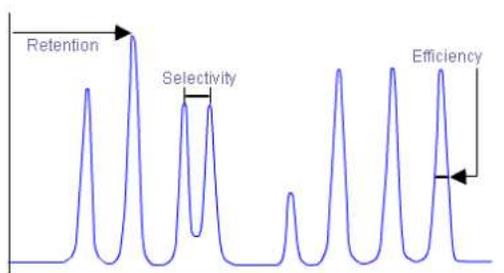
9

## Khả năng tách 2 chất



- Độ phân giải: A và B

$$R_S = \underbrace{1/4\sqrt{N}}_{\text{Efficiency}} \times \underbrace{\frac{\alpha-1}{\alpha}}_{\text{Selectivity}} \times \underbrace{\frac{k}{1+k}}_{\text{Retention}}$$



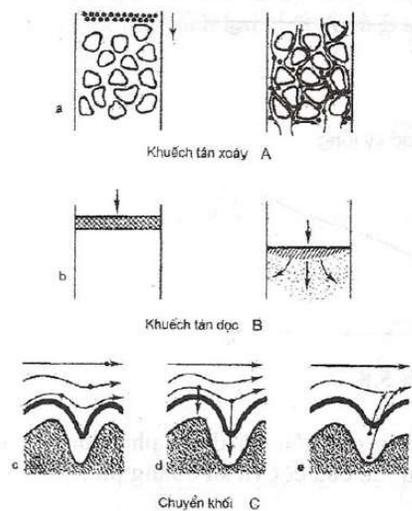
$$R_S = 2(t_{RB} - t_{RA}) / (w_A + w_B)$$

10

# Sự đồng pic – Thuyết động học

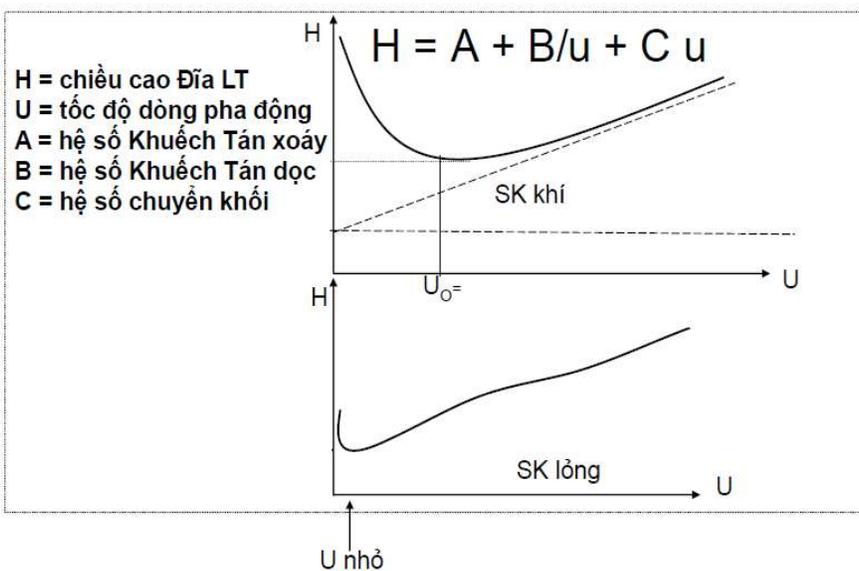


- Khuếch tán xoáy
- Khuếch tán dọc
- Sự chuyển khối (vận chuyển chất)



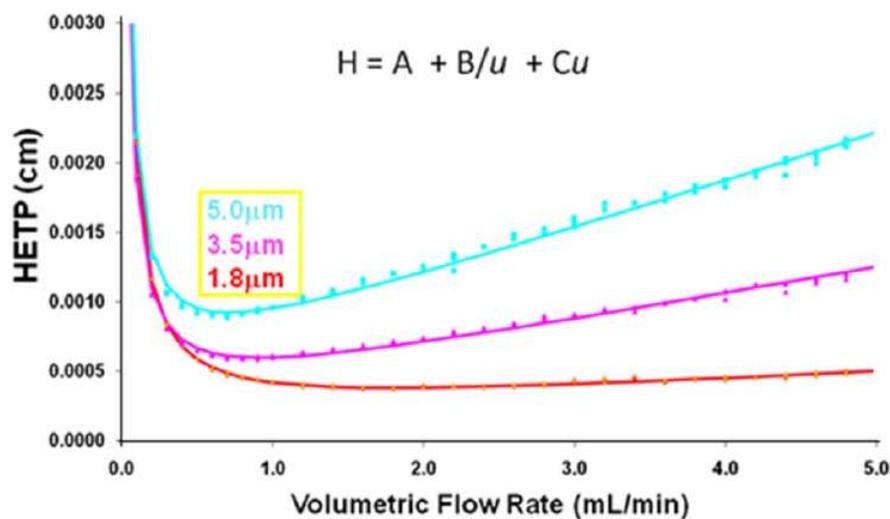
11

# Phương trình Van Deemter



12

## Đường Van Deemter: cỡ hạt nhỏ khác nhau



13

## Đánh giá hiệu lực cột tách



- Chiều cao đĩa lý thuyết H **HETP**  
(*Height Equivalent to the Theoretical Plate*)
- Số đĩa lý thuyết của cột N  $N = L / H$   
Thực nghiệm: Tính N  
$$N = 16 \cdot (t_R / W_B)^2$$
$$N = 5,54 \cdot (t_R / W_{1/2})^2$$
- Số đĩa lý thuyết của 1 m cột n

14

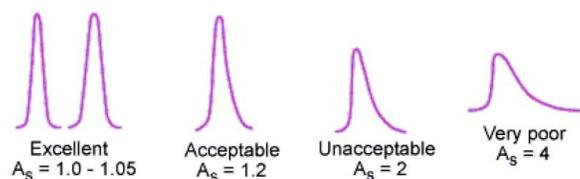
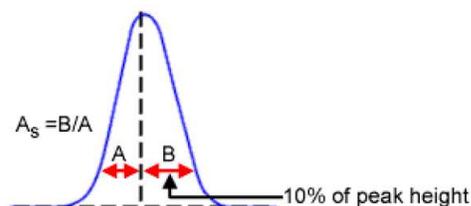
## Sự đối xứng của pic



- Hệ số không đối xứng ( $A_s$ )

- ❖ Mức độ không cân đối của pic

- ❖  $A_s = B/A$  (tính tại 1/10 chiều cao)



15

## HPLC

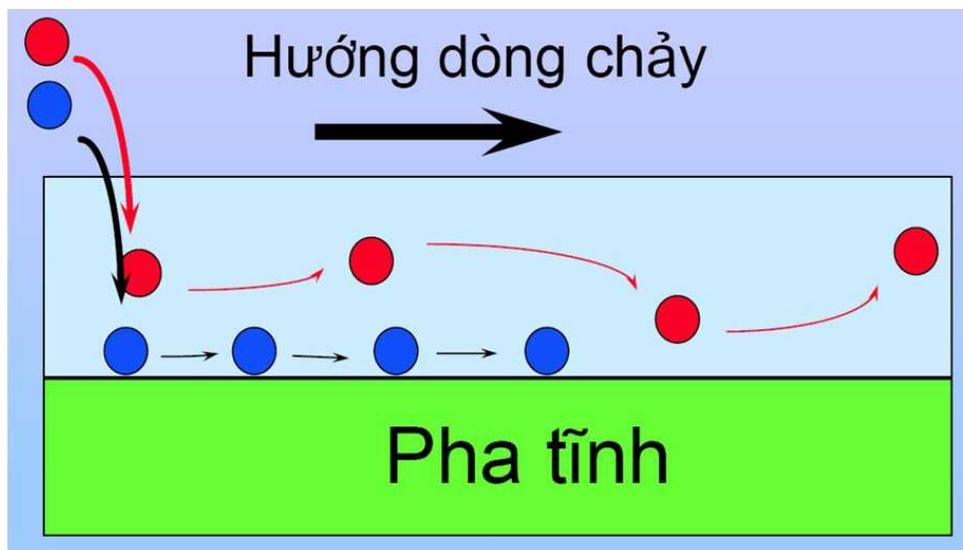


- High **performance** liquid chromatography
- High **pressure** liquid chromatography
- High **price** liquid chromatography
- High **problem** liquid chromatography
- High **pleasure** liquid chromatography



16

## Quá trình tách trong HPLC



17

## Phân loại sắc ký lỏng



- **Theo bản chất của phương pháp**
  - ❖ Hấp phụ, Phân bố, Trao đổi ion, SK theo cỡ, SK ái lực, SK điện
- **Theo bản chất của các pha**
  - ❖ SK pha thuận, SK pha đảo
- **Theo cách tiến hành:**
  - ❖ SK khai triển, SK rửa giải
- **Theo phương tiện:**
  - ❖ SK trên cột, SK trên mặt phẳng (giấy, lớp mỏng)

18

## Phân loại theo bản chất



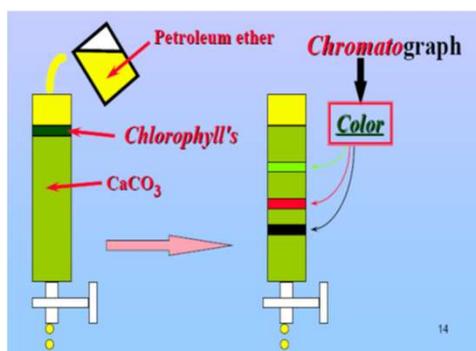
- Sắc ký hấp phụ
- Sắc ký phân bố (pha liên kết)
  - ❖ Pha thường (thuận) : Normal phase NP-HPLC
  - ❖ Pha đảo (ngược): Reversed phase RP-HPLC
  - ❖ Pha đảo ghép cặp ion : Reversed phase ion pairing
- Sắc ký ion : Ion exchange (IC)
- Sắc ký gel (sắc ký loại cỡ) : SEC (GPC/GFC)

19

## Sắc ký pha thường - Normal phase HPLC



- *M. Tswett* : Là người đầu tiên phát triển phương pháp sắc ký, sử dụng để tách Chlorophylls



- Pha tĩnh (cột) : phân cực
- Pha động: không phân cực

20

## Pha tĩnh NP-HPLC



- Các loại cột HPLC pha thuận
  - ❖ Cột Silica gel : dùng đa mục đích (general use)
    - Si – OH
  - ❖ Cột Cyano : dùng đa mục đích (general use):
    - Si-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN
  - ❖ Cột Amino : phân tích đường
    - Si-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>
  - ❖ Cột Diol : phân tích protein
    - Si-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH(OH)-CH<sub>2</sub>(OH)

21

## Liên kết trong NP-HPLC

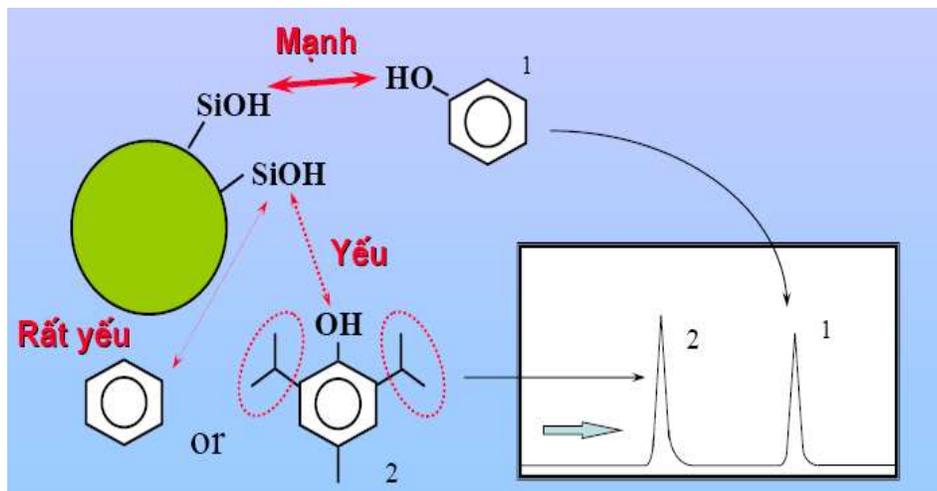


- Liên kết hydro (Hydrogen bonding)
- Nếu chất phân tích có
  - ❖ COOH : Nhóm Carboxyl
  - ❖ NH<sub>2</sub> : Nhóm Amino
  - ❖ OH : Nhóm Hydroxyl

*thì liên kết Hydrogen sẽ mạnh.*
- Nếu mẫu có các nhóm không phân cực lớn -> *Do chương ngại lập thể* dẫn đến *liên kết Hydrogen sẽ yếu*

22

## Liên kết hydro và thời gian lưu?



23

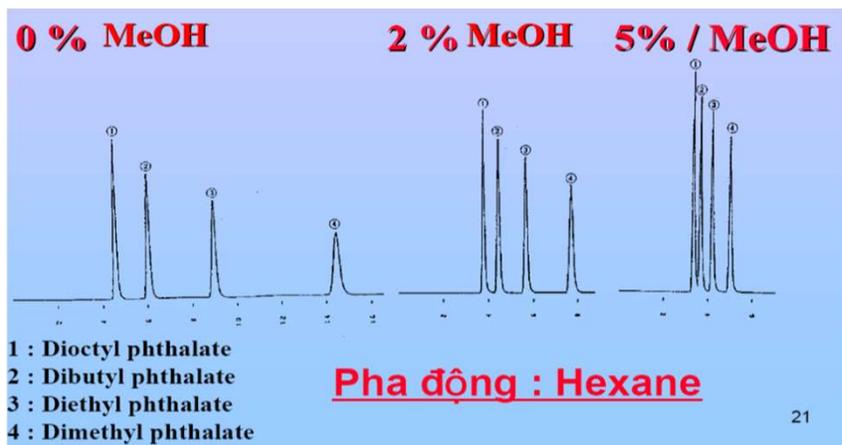
## Pha động sử dụng cho NP-HPLC



- Dung môi chủ yếu (không phân cực) :
  - ❖ Hydrocarbons (Pentane, Hexane, Heptane, Octane)
  - ❖ Hydrocarbons vòng (Benzene, Toluene, Xylene)
  - ❖ Methylene chloride, Chloroform, Carbon tetrachloride
- Dung môi phụ (phân cực hoặc hơi phân cực) :
  - ❖ Methyl-t-butyl ether (MTBE), Diethyl ether, Tetrahydrofuran (THF), Dioxane, Pyridine, Ethyl acetate, Acetonitrile, Acetone, 2-propanol, ethanol, methanol
- Dung môi chủ yếu được sử dụng chính làm pha động, dung môi phụ thường được thêm vào với tỉ lệ nhất định để thay đổi thời gian lưu.

24

# Ảnh hưởng của độ phân cực



25

# Sắc ký pha đảo - Reverse phase HPLC



## • RP-HPLC

- ❖ Pha tĩnh (Cột) : Mang tính không phân cực
- ❖ Pha động : Mang tính phân cực

### **Pha động trong RP-HPLC**

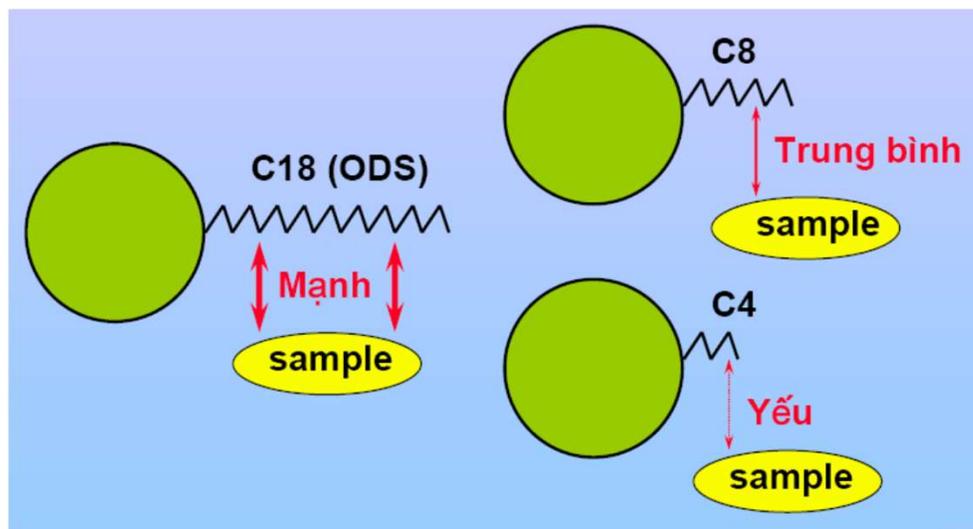
- Nước, dung dịch đệm (nồng độ, pH)
- Methanol (MeOH)
- Acetonitrile (ACN)
- Tetra hydro furan (THF )

## • Các loại pha tĩnh:

- ❖ C18 (ODS)
- ❖ C8 (octyl)
- ❖ C4 (butyl)
- ❖ Cột Phenyl
- ❖ Cột TMS

26

## Ảnh hưởng của các pha tĩnh



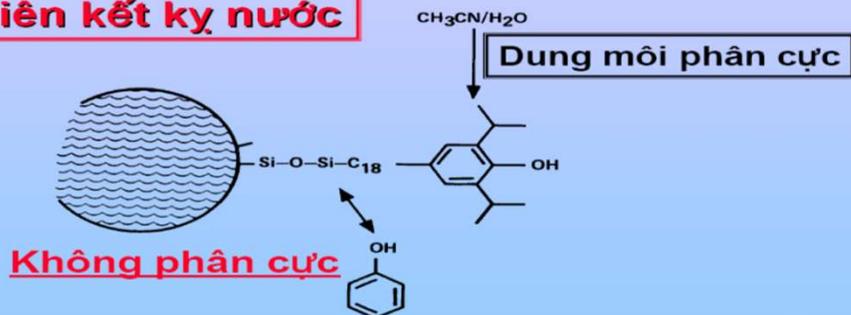
27

## Liên kết trong RP-HPLC



Các liên kết xảy ra thế nào?

**Liên kết kỵ nước**



24

28

## Tính kỵ nước



- Nếu mẫu có nhiều

- ❖  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2-$  : dây Carbon

- ❖ Nhóm thơm (Aromatic)

=> Thì tính kỵ nước sẽ mạnh hơn

- Nếu mẫu có nhiều :

- ❖  $\text{COOH}$  : nhóm Carboxyl

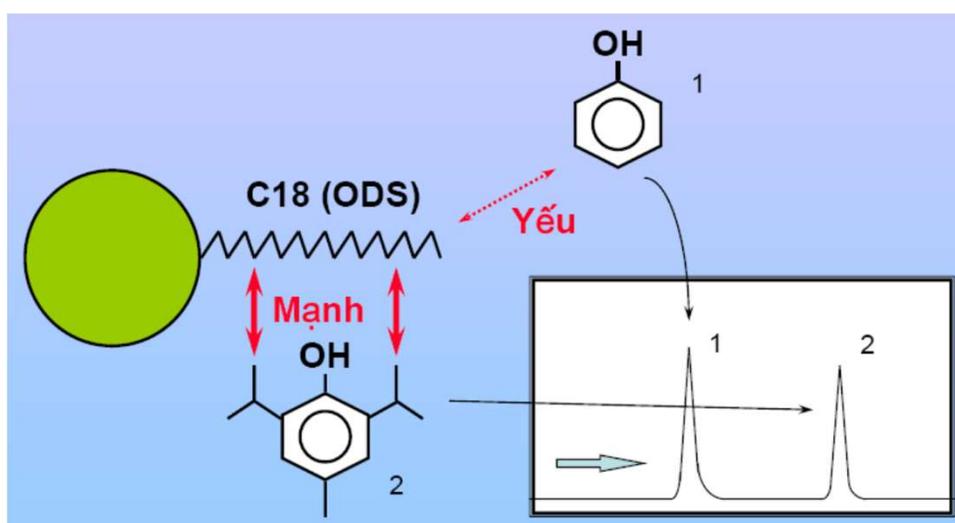
- ❖  $\text{NH}_2$  : Nhóm Amino

- ❖  $\text{OH}$  : Nhóm Hydroxyl

=> Thì tính kỵ nước sẽ yếu hơn.

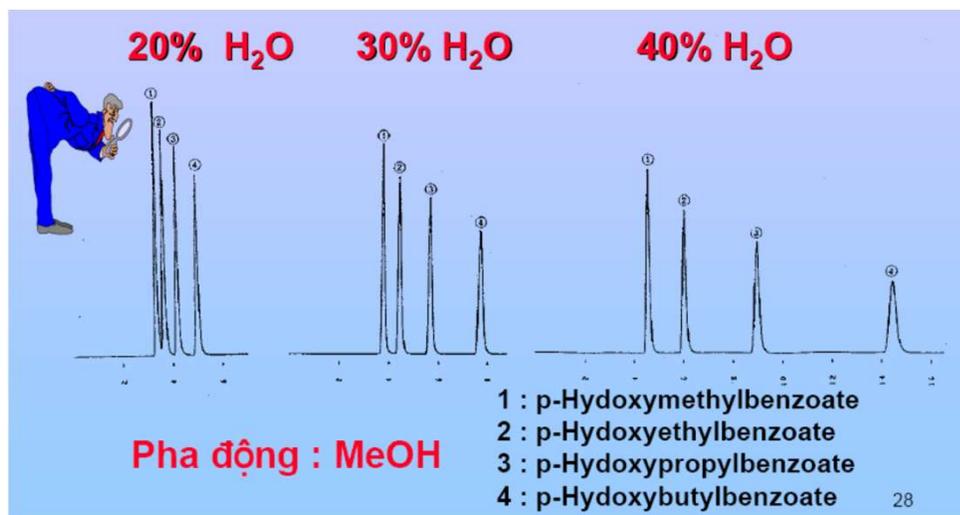
29

## Thời gian lưu và tính kỵ nước



30

# Ảnh hưởng khi tăng độ phân cực



31

# Sắc ký cặp ion pha đảo - RP Ion-Pair Chromatography



## • Các chất ghép cặp ion

### ❖ Ghép cặp với các Anion

- Tetra-n-butylammonium hydroxide (TBA)

### ❖ Ghép cặp với các Cation

- Butanesulfonic acid sodium salt (C4)
- Pentanesulfonic acid sodium salt (C5)
- Hexanesulfonic acid sodium salt (C6)
- Heptanesulfonic acid sodium salt (C7)
- Octanesulfonic acid sodium salt (C8)
- Decanesulfonic acid sodium salt (C10)

32

## Sắc ký trao đổi ion (Sắc ký Ion) - Ion Exchange HPLC



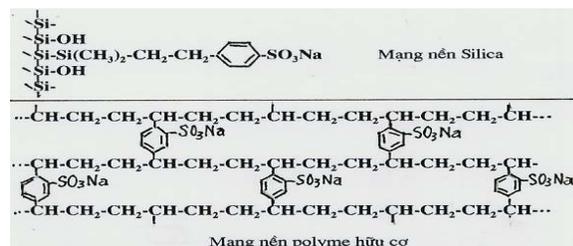
### • Pha tĩnh:

❖ **Nền silica:** các silica loại RP, có gắn thêm các nhóm

➢ Trao đổi cation:  $R-SO_3^-$ ,  $R-COO^-$ ...

➢ Trao đổi anion:  $R_4N^+$ ,  $RNH_2Cl$ ...

❖ **Nền cao phân tử (polymeric)**



33

## Những điểm cần lưu ý trong sắc ký ion



- pH của dung dịch đệm
- Nồng độ của dung dịch đệm
- Phương pháp rửa giải
  - ❖ Đẳng dòng : Isocratic
  - ❖ Gradient pH
  - ❖ Gradient lực ion

34

# Sắc ký gel (sắc ký theo loại cỡ) SEC



Có 2 loại:

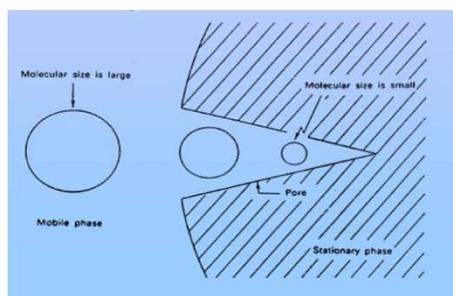
- GPC (Gel Permeation Chromatography) : sắc ký thẩm thấu gel, thường sử dụng trong lĩnh vực polymer.
  - ❖ Sử dụng để xác định trọng lượng phân tử của polymer
- GFC (Gel Filtration Chromatography) : sắc ký tinh lọc gel, thường sử dụng trong lĩnh vực sinh hóa.
  - ❖ Sử dụng để tách các protein

35

# Nguyên lý của SEC

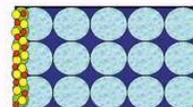


- Không sử dụng hiệu ứng tương tác.
- Tách dựa trên sự khác nhau về thời gian di chuyển của chất.



[Size Exclusion chromatography (SEC or Gel Permeation Chromatography) (GPC) Separation Mechanism]

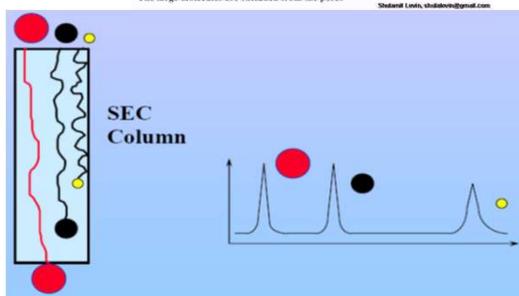
● Large molecule  
● Medium molecule  
● Small molecule



The inside of a column – gel spheres excluding particles of large size

The smaller size molecules explore more pore volume inside the gel spheres.  
The large molecules are excluded from the pores.

Shahnil Lathi, shahnil@gmail.com

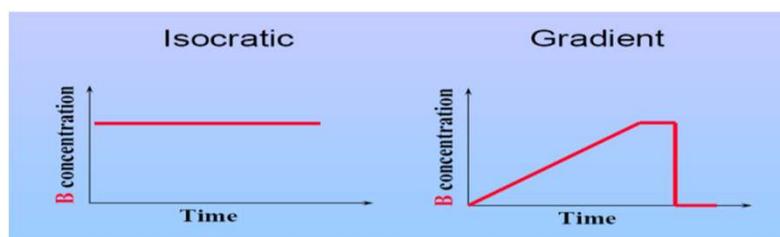


36

## Các cách rửa giải trong HPLC

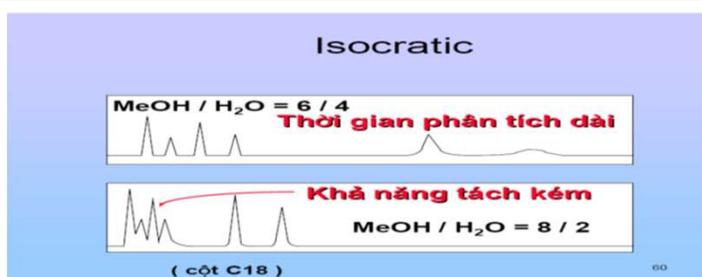


- Isocratic: Thành phần pha động không thay đổi trong suốt quá trình rửa giải.
- Gradient: Pha động với thành phần thay đổi trong quá trình phân tích.

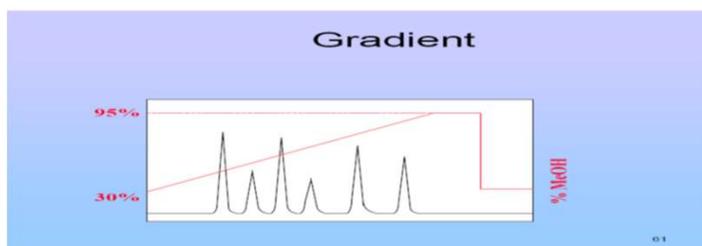


37

## Các cách rửa giải trong HPLC



00



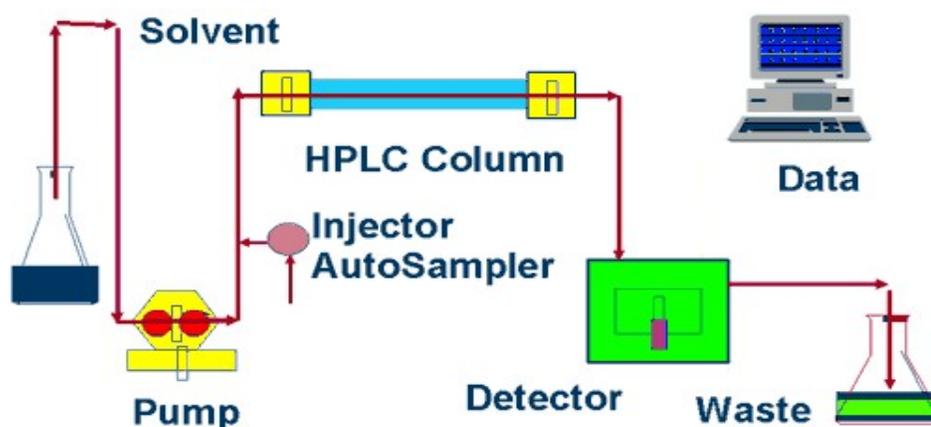
01

38

# Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao



## HPLC System



39

## Bơm cao áp



- Bộ phận quan trọng nhất của máy HPLC
- Đánh giá bơm?
  - ❖ Khoảng áp suất hoạt động
  - ❖ Khoảng tốc độ dòng
  - ❖ Độ chính xác tốc độ dòng
  - ❖ Độ chính xác thành phần pha động
  - ❖ Thể tích chết thấp
  - ❖ Không bị ăn mòn bởi dung môi
  - ❖ Bơm đẳng dòng hay bơm đẳng áp

40

# Injector

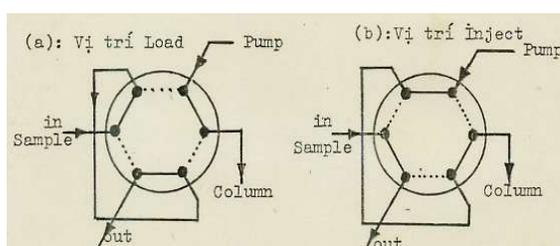


- Có 2 cách:

- ❖ Bơm mẫu tự động (autosampler)

- ❖ Bơm mẫu bằng tay: microxy lanh

loop (vòng mẫu)



41

# Các detector trong HPLC



- UV/VIS
- DAD (Diod array) = PDA
- RID (Refractive index)
- RF (Fluorescence) = FI
- ECD (Electrochemical)
- CDD (Conductivity)
- MS (Mass-spectrometry)
- .....

42

## Khối phổ (Mass Spectrometry)



- Giới thiệu chung về khối phổ
- Máy khối phổ trong LC-MS
- Cơ bản về phổ khối
- Những vấn đề cần lưu ý của LC-MS

43

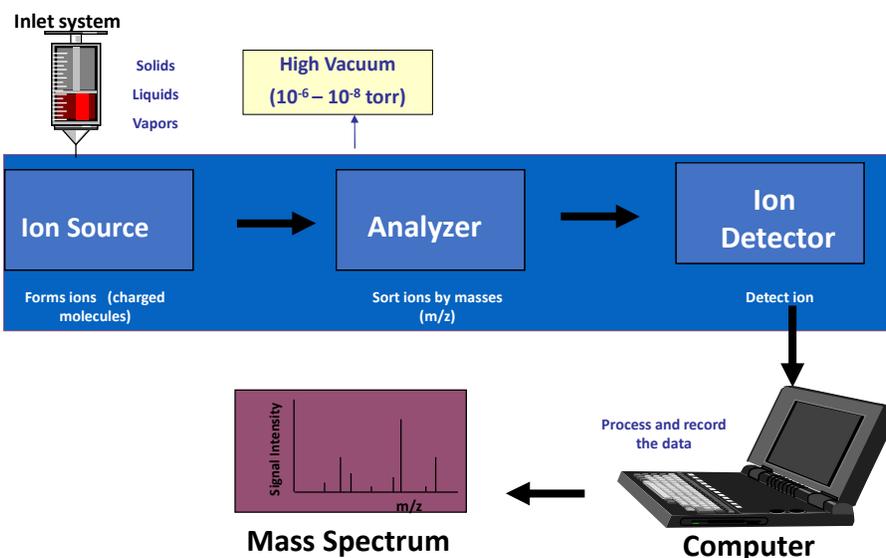
## Thách thức kết nối LC với MS



	LC	MS
<b>Áp suất</b>	Áp suất cao (> 400 bar)	Chân không
<b>Tốc độ dòng</b>	Tương đương 1 L/phút khí	Tối đa 1 ml/phút
<b>Nhiệt độ</b>	Gần nhiệt độ phòng	Nhiệt độ cao
<b>Dung môi</b>	Có thể có muối vô cơ	Cần dung môi bay hơi

44

## Các thành phần của thiết bị MS

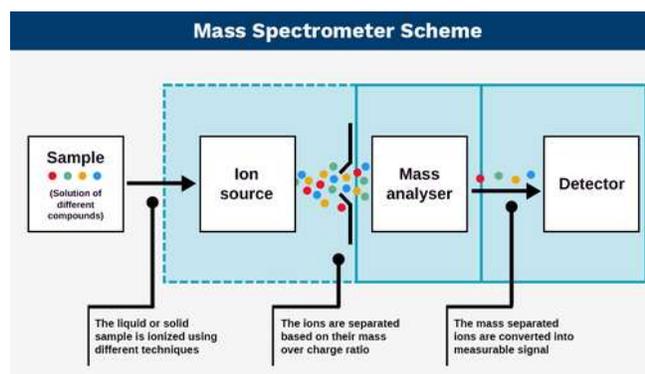


45

## Các thành phần của thiết bị MS



- **Nguồn ion hóa**
  - ❖ Tạo ion
- **Bộ phân tích khối**
  - ❖ Phân tách các ion theo số khối
- **Bộ phát hiện**
  - ❖ Phát hiện các ion

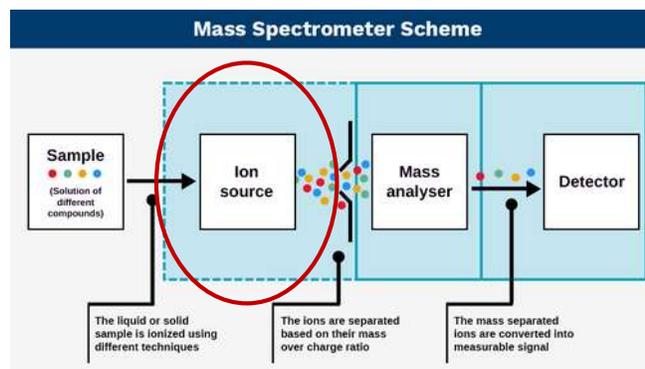


46

# Nguồn ion hóa



- Pha hơi: Gas Phase Ionization Sources
  - ❖ Electron impact (EI)
  - ❖ Chemical ionization (CI)
- **Pha lỏng: Spray Methods - API**
  - ❖ **Electrospray ionization (ESI)**
  - ❖ **Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)**
  - ❖ **Atmospheric Pressure Photo Ionization (APPI)**
- Pha rắn: Desorption Methods
  - ❖ Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)
  - ❖ Fast Atom Bombardment (FAB)



47

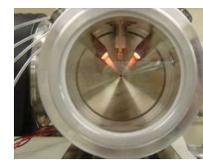
# Nguồn ion hóa trong LC-MS



## • **Electrospray ionization (ESI)**

Các biến thể của ESI:

- ❖ nESI
- ❖ chip ESI
- ❖ HESI
- ❖ multiplexed ESI

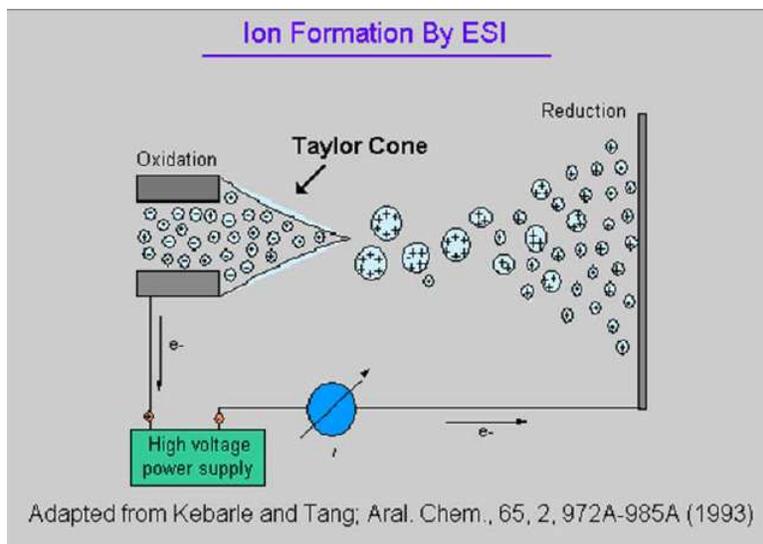


## • **Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)**

- Atmospheric Pressure Photo Ionization (APPI)
- Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI)
- Multi-mode Source

48

# Ion hóa phun điện tử (ESI)

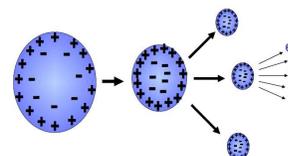


49

## ESI



- ESI capillary được áp điện thế cao
- Đầu ESI phun dung dịch mẫu dạng hạt sương tích điện.
- Hạt bị vỡ chia thành những giọt sương mới nhỏ hơn. Lặp lại cho đến khi tạo ra những hạt sương rất nhỏ.
- Tạo ra những ion pt chuyển vào thể khí bằng lực đẩy tĩnh điện
- Ion vào bộ phân tích khối và được phân tích



50

## Ion hóa trong ESI



- Dương (pos) hoặc âm (neg)
- Ion dương
  - ❖ Hay gặp:  $[M+H]^+$
  - ❖ Có thể gặp:  $[M+nH]^{n+}$  và  $[M+Na^+]^+$
  - ❖  $[M-e]^+$
- Ion âm
  - ❖ Phù hợp với các chất acid
  - ❖  $[M-H]^-$
  - ❖  $[M-nH]^{n-}$ ,  $[M+e]^-$

### Những chất nào ion hóa được bằng ESI

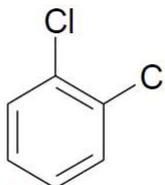
- ❖ Chất có độ phân cực trung bình đến cao
- ❖ Có thể ion hóa các chất có m đến 100.000 Da
- ❖ Chất khi ion hóa trong dung dịch có thể tạo đa tích điện

51

## Các chất phù hợp để phân tích bằng ESI



- Các chất có chứa nguyên tử dị hợp (hetero-atoms)
- Những chất này có khả năng ghép cặp với H (do dư e)
- Ví dụ các chất chlor hóa, brom hóa



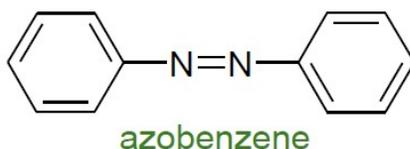
1,2 di-chloro benzene

52

## Các chất phù hợp để phân tích bằng ESI



- Các chất thể tích điện thông qua hiệu ứng cảm ứng (inductive effect):
- VD các hợp chất azo, phthalates, opiates ...



53

## Các chất phù hợp để phân tích bằng ESI



- Các hợp chất có thể ion hóa được.
- VD: Các acid, base
- Điều chỉnh pH có thể thay đổi khả năng ion hóa

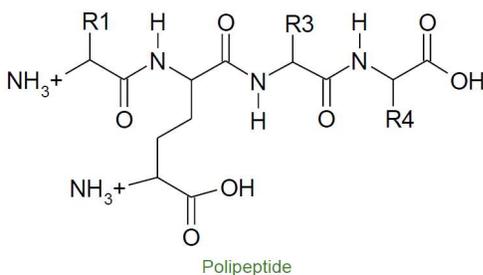


54

## Các chất phù hợp để phân tích bằng ESI



- Các hợp chất có chứa nhiều nhóm tích điện.
- VD: Các peptide, protein
- Các vùng chứa nhóm amino acid có thể ion hóa ở pH thích hợp



55

## ESI – ưu nhược điểm



Ưu điểm	Hạn chế
Ion mẹ	Ít phân mảnh
Có thể áp dụng cho HC có phân tử lượng lớn (>100,000 Da)	Cần mẫu phân cực
Có thể AD các HC không bền nhiệt (<0° C)	Cần hòa tan trong dm phân cực (MeOH, ACN, H <sub>2</sub> O, Aceton)
Dễ thao tác	Nhạy với muối
Kết nối với HPLC	Ảnh hưởng nền thường cao

56

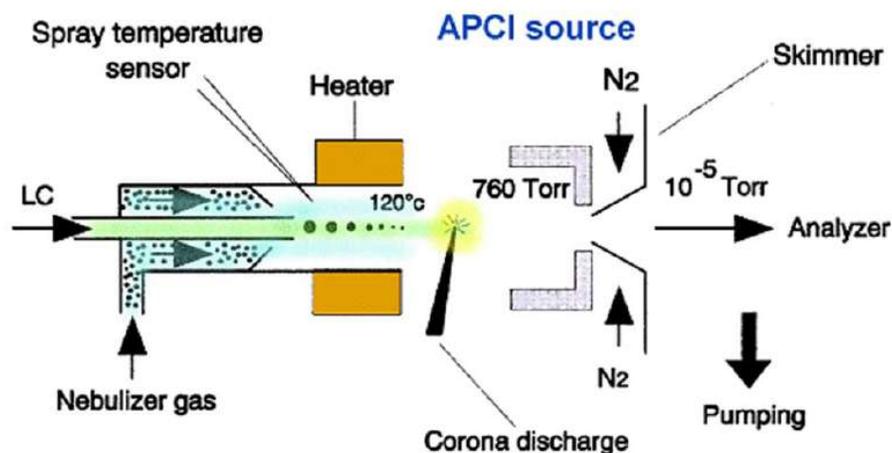
## ESI – một số lưu ý



- Các acid hữu cơ (formic, acetic) tạo ion tốt cho chất base (chứa N).
- Sản phẩm trung tính có chứa O, N có thể cation hóa với kim loại kiềm (Na) hoặc amoni.
- Có thể sử dụng amoni format hoặc acetat (2-10 mM), nồng độ trên 20 mM: ảnh hưởng nền.
- Các muối có thể ảnh hưởng đến quá trình ion hóa.
- Các amin bậc 4 hoặc chất base mạnh ảnh hưởng đến chế độ ion dương.
- Các acid sulfonic ảnh hưởng đến chế độ ion âm.
- Không được sử dụng đệm khó bay hơi: phosphate.

57

## Ion hóa hóa học ở áp suất khí quyển (APCI)



<http://www.rzuser.uni-heidelberg.de/~bl5/ency/ency.html>

58

# APCI



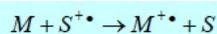
- Các ion được sinh ra và được phân tích như sau:
  - ❖ Đầu APCI phun dung dịch mẫu thành những giọt sương.
  - ❖ Những giọt sương được hóa hơi trong ống thép nhiệt độ cao.
  - ❖ Thế được áp vào kim đặt gần lối ra của ống thép. Thế cao tạo ra sự phóng điện vòng tròn hình thành những ion phản ứng qua chuỗi những phản ứng hóa học với những phân tử dung môi và khí Nitơ bao quanh.
  - ❖ Những ion phản ứng lại phân tử mẫu để hình thành những ion mẫu.
  - ❖ Ion vào bộ phân tích khối và được phân tích

59

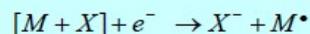
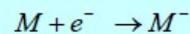
# APCI – chế độ ion hóa



## • Ion dương



## • Ion âm



## • Những hợp chất phù hợp với APCI

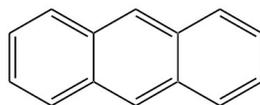
- ❖ Khối lượng phân tử < 1000 Da
- ❖ Độ phân cực trung bình đến kém phân cực
- ❖ Phân tử có khả năng hóa hơi và không bị phân hủy bởi nhiệt

60

## APCI – các chất phù hợp

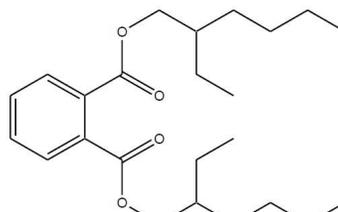


- Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs).



Anthracene

- Phthalates



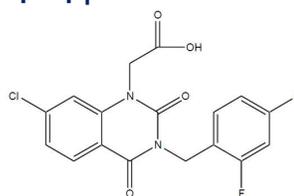
Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)

61

## APCI – các chất phù hợp

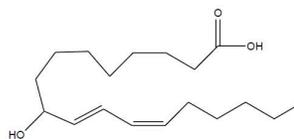


- Hợp chất chứa nguyên tử dị hợp



Zenarestat

- Acid béo



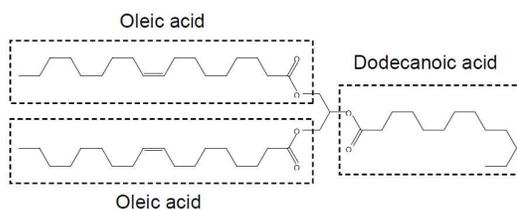
Acid 9-hydroxi-10,12-octadecadiene

62

## APCI – các chất phù hợp



- Triglycerides



- Pesticides

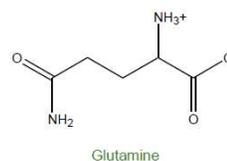


63

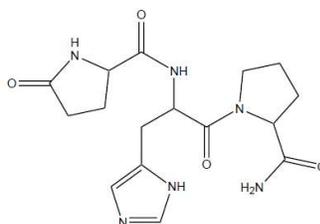
## APCI – chất không phù hợp



- Tránh các hợp chất nhạy với nhiệt độ



- Các chất bị ion hóa trong dung dịch như proteins, peptides ...



Pyroglutamylhistidylprolinamide (a tripeptide)

64

## APCI – ưu nhược điểm



Ưu điểm	Nhược điểm
Ion mẹ	Cần mẫu bay hơi
Không nhạy với muối	Cần bền nhiệt
Kết nối với HPLC	Ứng dụng hẹp hơn ESI
Có thể dùng dung môi pha thường (NP-HPLC)	
Thực hiện được ở tốc độ dòng cao	

65

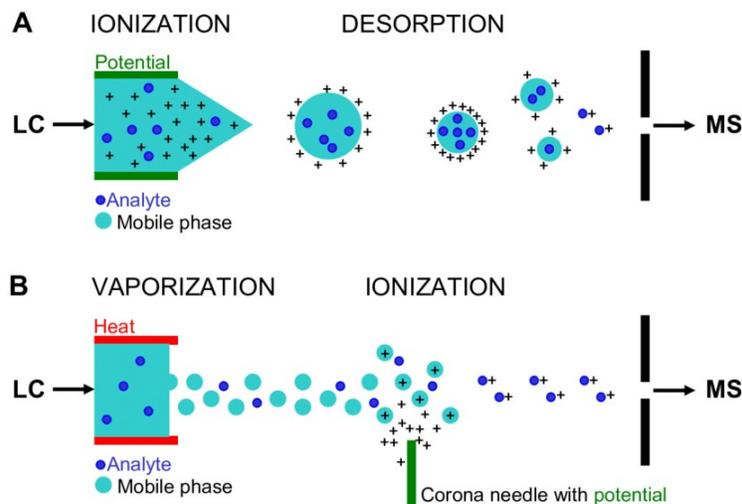
## APCI – các lưu ý



- Không cần đệm hoặc chất bổ chính nền để tạo ion
- Đệm bay hơi có thể sử dụng đến 50 mM.
- Các chất bổ chính nền rất phân cực làm giảm độ nhạy của chất phân tích phân cực.

66

# ESI vs APCI



67

# Ứng dụng: APCI vs ESI



	ESI	APCI
<b>Mẫu phù hợp</b>	Chất tạo ion đa điện tích trong DD: proteins, peptides, oligonucleotides	Phân tử nhỏ, phân cực đến không phân cực: PAHs, PCBs, fatty acids, phthalates, steroids
	Chất dạng ion trong DD: catecholamines, sulfate conjugates, quaternary amines	Chất chứa hetero-atoms như carbamates, benzodiazepines
	Chất chứa hetero-atoms như carbamates, benzodiazepines	
<b>Mẫu cần tránh</b>	Chất không phân cực như PAHs, PCBs	Các chất không bay hơi
		Chất tạo ion đa điện tích trong DD
		Chất không ổn định bởi nhiệt

68

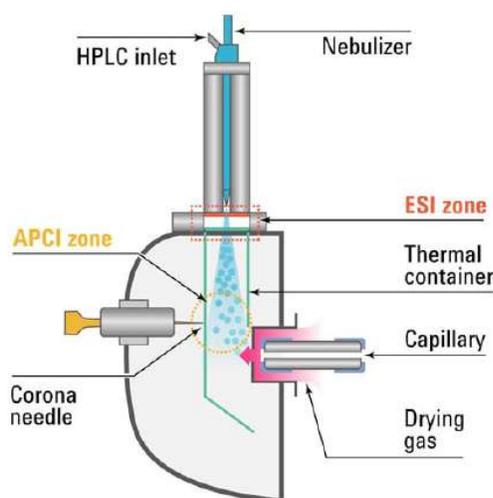
## Ứng dụng: APCI vs ESI



	ESI	APCI
<b>Ảnh hưởng nền</b>	Nhạy với nền mẫu và dung môi hơn APCI	Ít bị ảnh hưởng hơn
	Yêu cầu nồng độ đậm bay hơi thấp	Nồng độ đậm có thể cao
	Có thể tạo các ion với cation (Na <sup>+</sup> ) hoặc cation (COO <sup>-</sup> )	Dung môi hữu cơ ảnh hưởng đến sự ion hóa
<b>Tốc độ dòng</b>	Phù hợp với các tốc độ dòng thấp (<100 $\mu\text{L}/\text{min}$ )	Không phù hợp với các tốc độ dòng thấp (<100 $\mu\text{L}/\text{min}$ )
	Không phù hợp với tốc độ dòng cao (>750 $\mu\text{L}/\text{min}$ )	Đáp ứng tốt hơn ESI với tốc độ dòng cao (>750 $\mu\text{L}/\text{min}$ )

69

## Dual mode source (ESI + APCI)

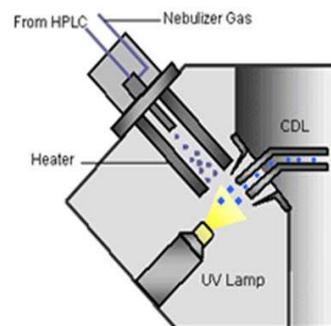


70

## APPI - Atmospheric Pressure Photo Ionization



- Ion hóa quang hóa ở áp suất khí quyển
- Hóa hơi mẫu bằng tia UV có năng lượng khoảng 10 eV tương ứng với các photon từ 83-153 nm.
- Khối phổ đạt được tương tự như EI.
- Do năng lượng nhỏ hơn nên phổ này chủ yếu cho các ion phân tử và một số mảnh có số khối lớn.



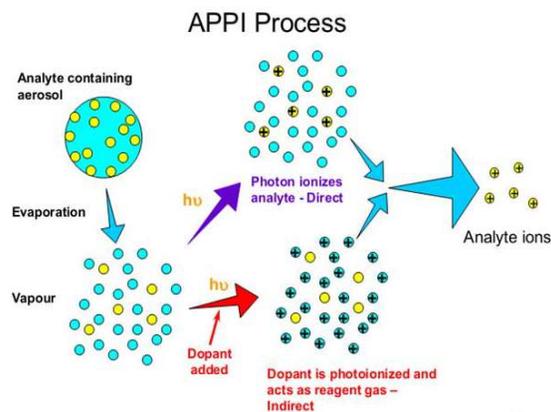
71

## APPI – Quá trình ion hóa



### • Nhược điểm

- ❖ Có thể tạo ra ion nền từ dung môi.
- ❖ Đòi hỏi nhiệt độ cao (350-500°C) cho quá trình hóa hơi => phân hủy nhiệt.

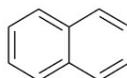


72

# APPI – các chất phù hợp

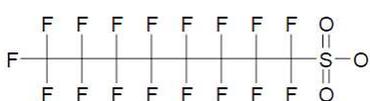


- APPI sử dụng cho các chất không phân cực đến phân cực thấp
- APPI bổ sung cho APCI để phân tích các chất không phân cực



Naftalene

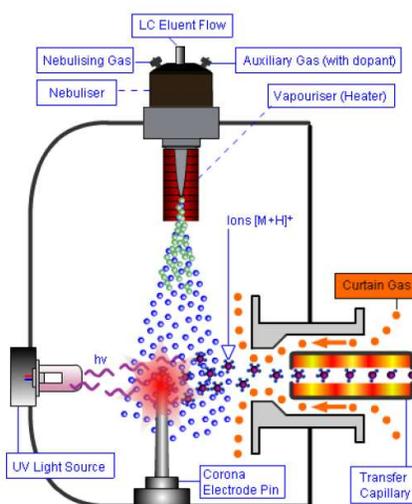
- APPI có thể dùng cho các hợp chất quang hóa để tránh ảnh hưởng nền của ESI



Perfluorooctane sulfonate.

73

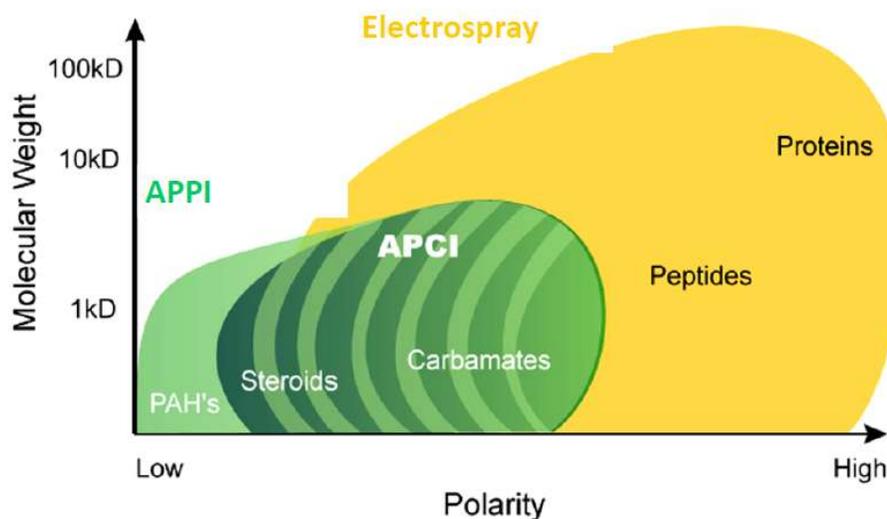
# APCI/APPI dual mode



Dual APPI/APCI ion source

74

## Lựa chọn nguồn ion hóa

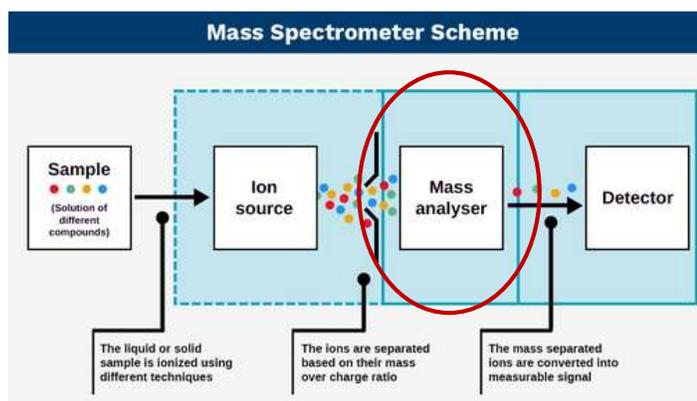


75

## Bộ phân tích khối (mass analyzer)

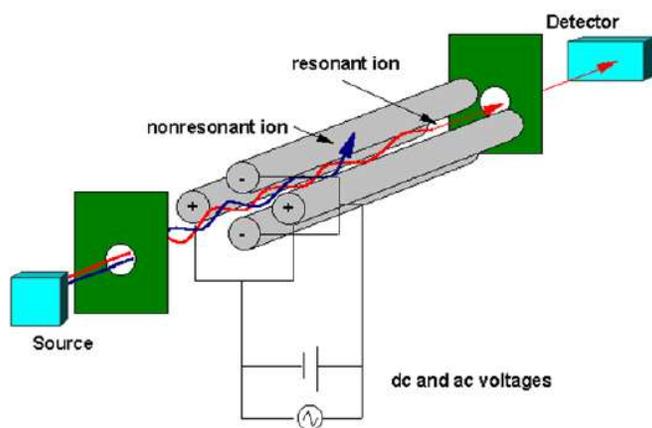


- Quadrupole (Q - tứ cực)
  - ❖ Triple quadrupole (QQQ - ba tứ cực)
- Ion trap (bẫy ion)
  - ❖ Q-Trap
- Time of flight (TOF – thời gian bay)
  - ❖ Q-TOF
- Orbitrap (Thermo)
  - ❖ Q-Orbitrap
- Double Focusing Magnetic Sector
- Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR)



76

# Quadrupole



77

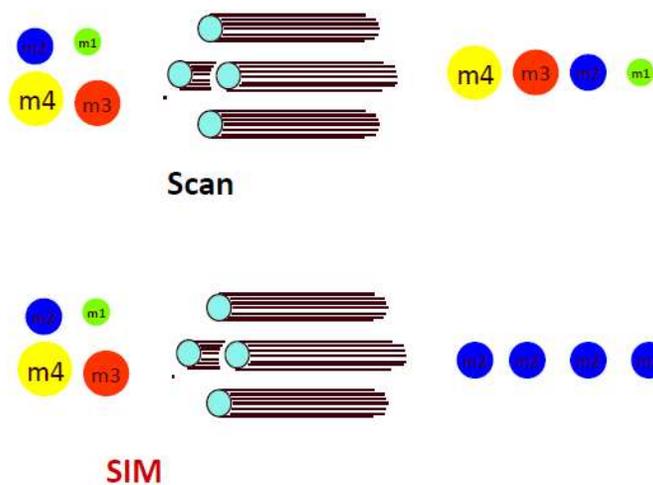
## Tứ cực - Nguyên lý hoạt động



- Gồm 4 thanh hình tròn hoặc lý tưởng là hình hyperbol, xếp song song nhau.
- Các ion di chuyển qua khoảng trống của bốn thanh điện cực và dao động về hai hướng (cực (-) và (+)) vuông góc với đường đi.
- 4 thanh điện cực tạo thành một điện từ trường cho các mảnh ion có tỷ lệ  $m/z$  xác định và đặc trưng đi theo một quỹ đạo xác định trong khoảng trống của 4 thanh điện cực đến Detector

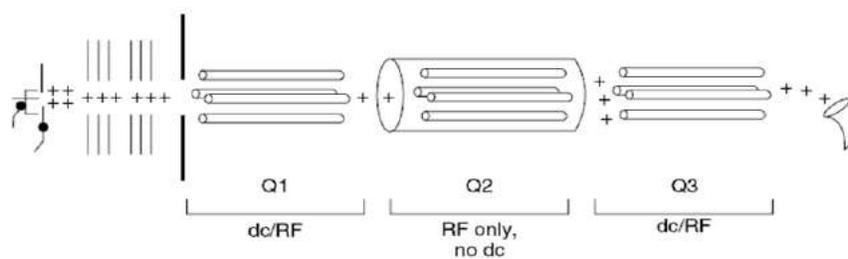
78

## Chế độ phân tích - quadrupole



79

## Triple quadrupole (QQQ)

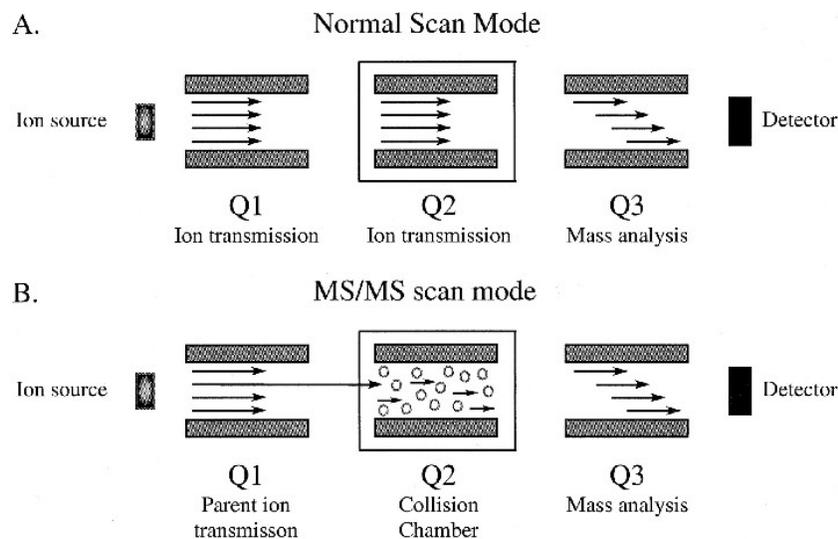


Q1 và Q3 dùng phân tích khối

Q2 là buồng va chạm tạo các phân mảnh con (**Collision cell**)

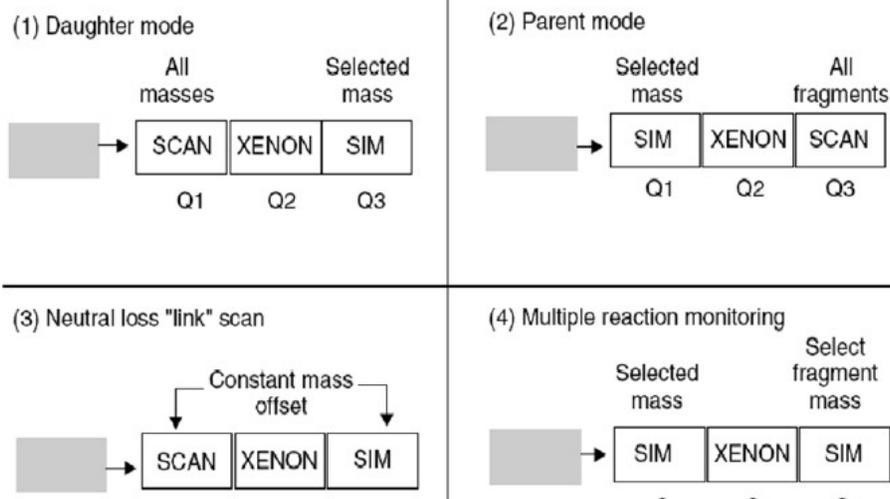
80

# Các chế độ trong QQQ



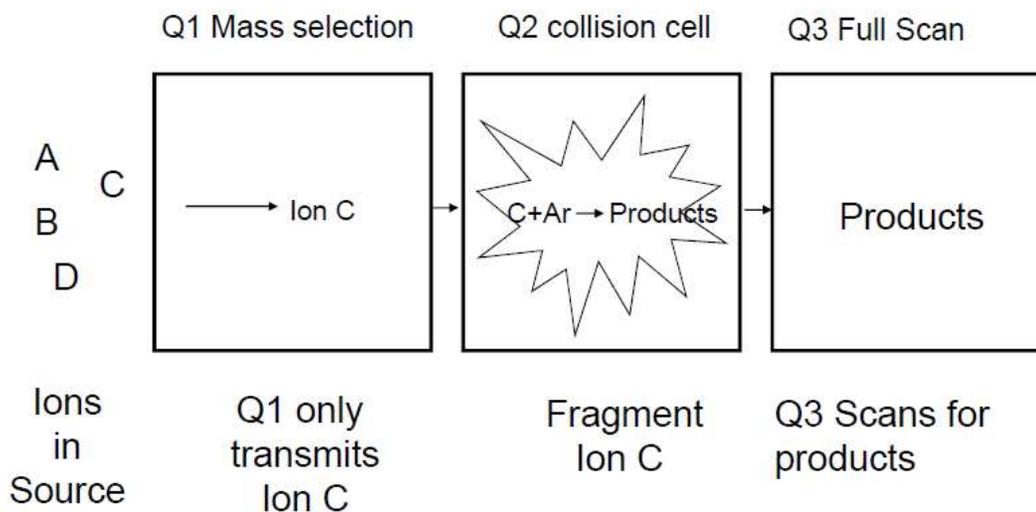
81

# Các chế độ trong QQQ



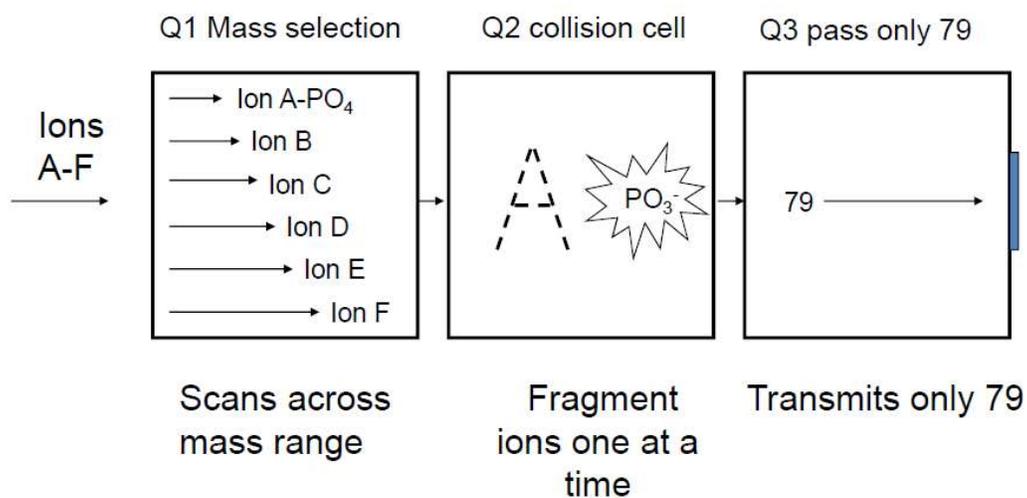
82

## Product Ion Scan Mode



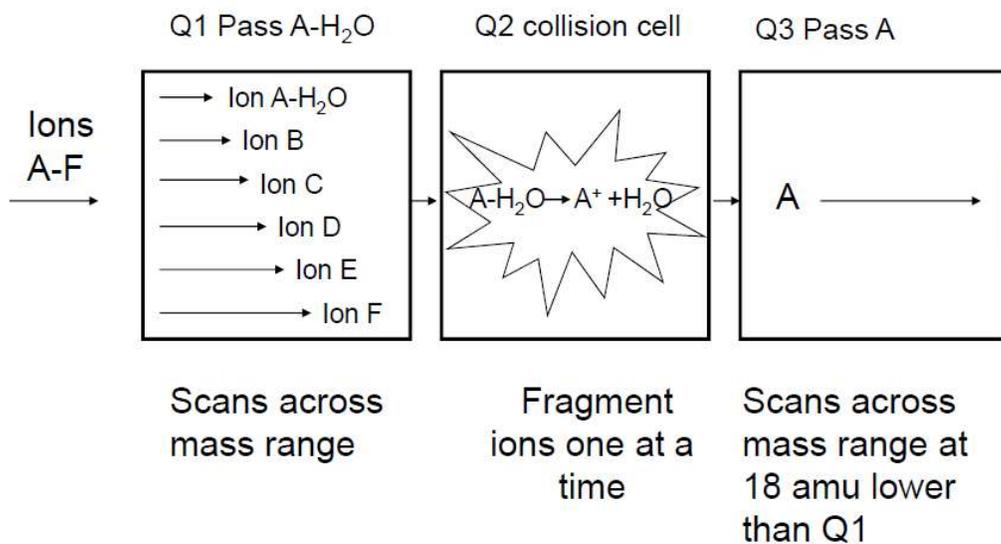
83

## Precursor Ion Scan Mode



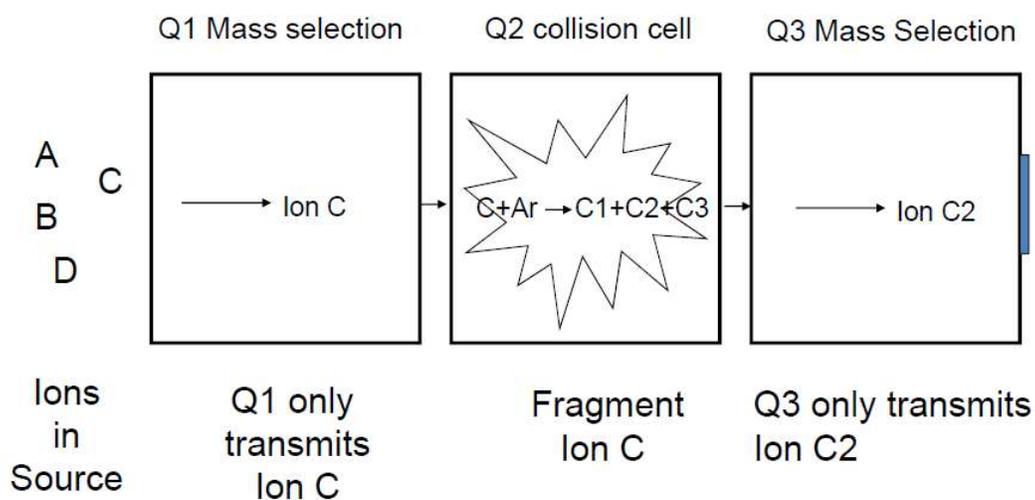
84

## Neutral Loss Scan Mode



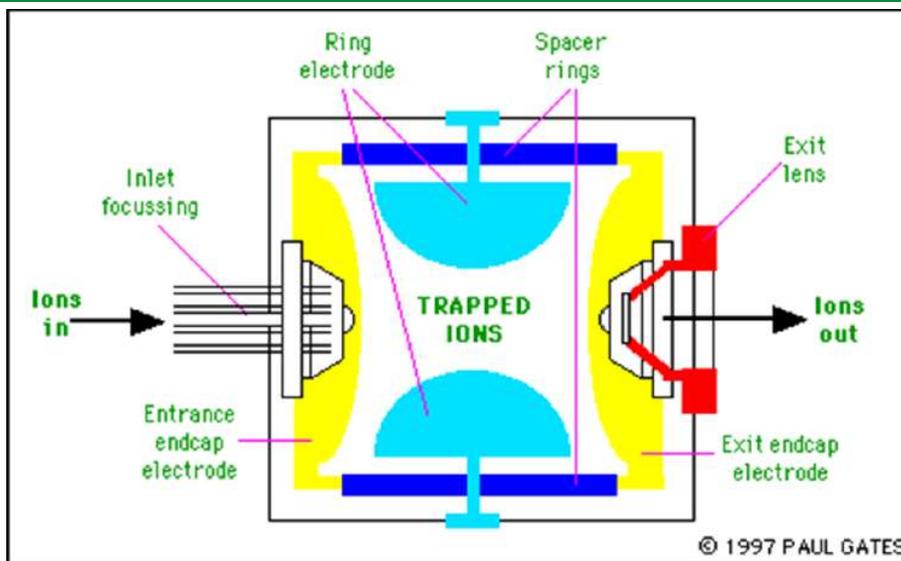
85

## Multiple Reaction Monitoring (MRM)



86

## Bẫy ion (Trap)



87

## Nguyên lý hoạt động



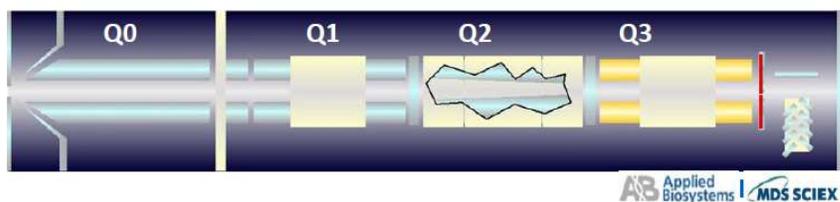
- Quadrupole Ion trap (Paul Ion trap = 3D ion trap)
  - ❖ Các ion được đưa vào buồng ion (gọi là bẫy) sau đó dùng trường điện từ RF để đưa các ion vào quỹ đạo. Dòng RF có thể lần lượt tạo quỹ đạo ổn định cho các khối khác nhau.
  - ❖ Trong kỹ thuật này ta có thể giữ một khối trong quỹ đạo trong một thời gian nhất định, và có thể ion hóa lần thứ hai bằng CI hoặc tạo thêm các mảnh ion con nhờ sự bắn phá tại bẫy. (mảnh khối có thể là của ion phân tử hoặc do sự bắn phá của các ion con).

88

# Q-TRAP



## Kết nối tứ cực và bẫy ion



- Q3 là tứ cực lai đóng vai trò như bẫy ion  
(LIT = Linear ion trap)
- Q3 có thể hoạt động như tứ cực hoặc bẫy ion

89

# Q-TRAP



A better ion trap—with all the functionality of a high-performance triple quadrupole

	ION TRAP	TRIPLE QUAD	Q TRAP™ SYSTEM
FULL SCAN SENSITIVITY	✓		●
NO LOW MASS CUT-OFF		✓	●
MS <sup>2</sup> – STRUCTURAL ELUCIDATION	✓		●
NEUTRAL LOSS/PRECURSOR ION		✓	●
QUANTITATION – MRM		✓	●
RESOLUTION	✓		●
MASS ACCURACY			●
EASE-OF-USE	✓		●
SMALL FOOTPRINT	✓	✓	●
AFFORDABLE	✓	✓	●

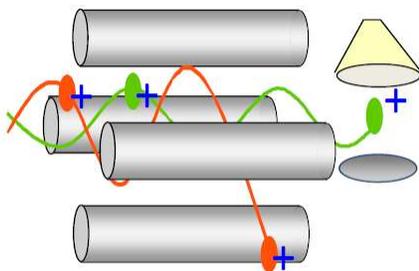
90

## Quad vs Trap



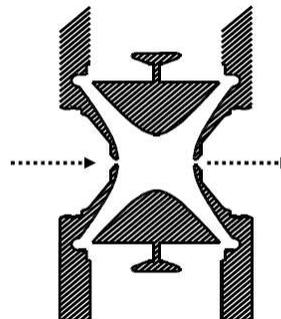
### • Quadrupole

❖ separation in space



### • Ion Trap

❖ separation in time



91

## Quad vs Trap: Độ nhạy



### • Quadrupole

- ❖ Độ nhạy ở Fullscan kém hơn
- ❖ Nhạy ở chế độ SRM, SIM

### • Ion Trap

- Nhạy ở chế độ Fullscan, phổ tạo ra phong phú ứng dụng tốt trong phân tích định tính, đặc biệt trong xác định các hợp chất chưa biết.
- Độ nhạy chế độ SRM kém hơn
- Một số trường hợp đặc biệt độ nhạy chế SIM còn tốt hơn ở chế độ SRM

92

## Quad vs Trap: Độ phân giải



### • Quadrupole

- ❖ Độ phân giải thấp hơn
- ❖ Độ phân giải FWHM ( $m/z$  1000): 2000

### ▪ Ion Trap

- Có thể đạt đến độ phân giải cao
- Độ phân giải FWHM ( $m/z$  1000): 4000
- Đặc biệt độ phân giải cao gấp 2 khi là LIT (Linear Ion trap)

93

## Quad vs Trap: Độ lặp lại



### • Quadrupole

- ❖ Độ lặp lại kết quả ở lượng vết rất tốt, thang tuyến tính cao.
- ❖ Ứng dụng tốt hơn trong định lượng.

### ▪ Ion Trap

- Hạn chế hơn về độ lặp lại
- Thang tuyến tính hẹp hơn

94

## Quad vs Trap: Ứng dụng



### • Quadrupole

- ❖ Ứng dụng và được chấp nhận trong đa số trường hợp để khẳng định (confirmation) sự có mặt của các hợp chất cấm.
- ❖ Chỉ có khả năng tạo khối phổ 2 lần MS/MS
- ❖ Tốc độ cao, cho phép phân tích đa cấu tử ở một lần chạy mẫu (nhiều máy khối phổ có khả năng phân tích 500 thuốc trừ sâu ở một lần bơm mẫu)

### ▪ Trap

- Bẫy ion tốt trong ứng dụng định tính. Có khả năng ứng dụng trong định lượng.
- Có khả năng tạo khối phổ nhiều lần, có thể ứng dụng để xác định cấu trúc.
- Bẫy ion có sự hạn chế về dung lượng và thời gian ion tồn tại trong bẫy.

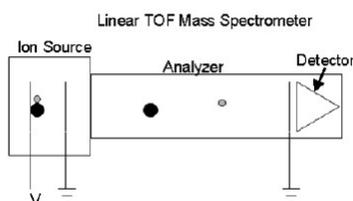
95

## TOF (Time of flight)



### • Phân tích thời gian bay.

- ❖ Các ion có m khác nhau nhận một năng lượng như nhau => đến detector ở những thời điểm khác nhau.
- ❖ Những ion nhẹ sẽ đến trước vì vận tốc của chúng lớn hơn.
- ❖ Những ion nặng đến sau do vận tốc của chúng thấp hơn.



96

# Hai kiểu TOF

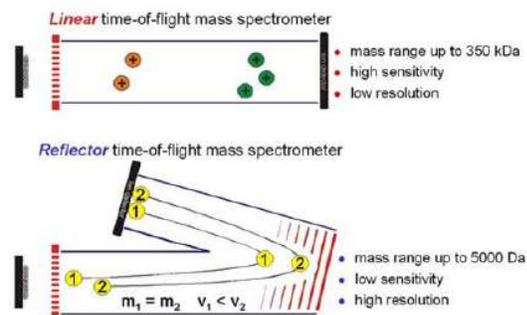


- Linear TOF

- Reflection TOF

❖ kéo dài khoảng đường đi =>  
tăng độ phân giải.

## Linear and reflector TOF MS

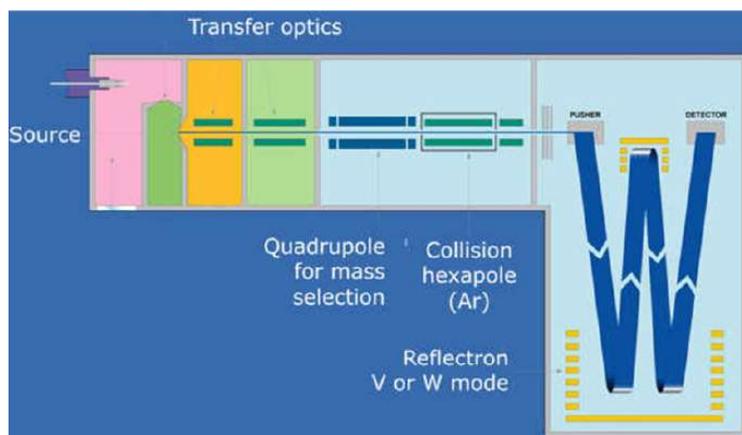


97

# Q-TOF



- Lai giữa Quadrupole và TOF



98

## Ưu nhược điểm của Q-TOF



### • Ưu điểm

- ❖ Khoảng khối rộng, có thể đến vài chục nghìn Da
- ❖ Độ phân giải cao, đến 40.000 FWHM
- ❖ Độ chính xác khối cao: < 2 ppm
- ❖ Q-TOF có thể phân tích định tính và định lượng

### • Nhược điểm

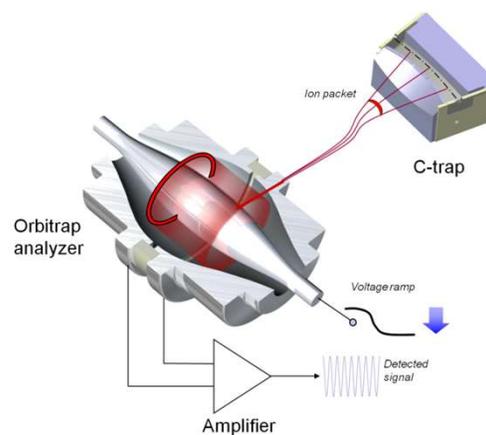
- ❖ Thiết bị khó sử dụng, kỹ thuật cao
- ❖ Giá thành cao, chi phí bảo trì lớn
- ❖ Độ ổn định không tốt
- ❖ Chưa thực sự là HRMS

99

## Orbitrap

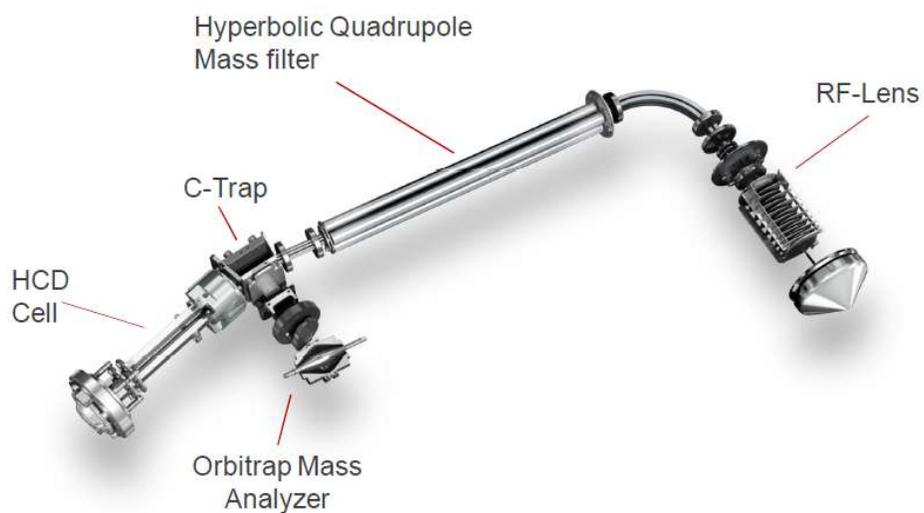


- Kỹ thuật phát triển bởi Thermo dựa trên nguyên lý về Kingdon trap 1920.
- Thiết bị MS đầu tiên 2005
- Ion trap-Orbitrap
- Q-Orbitrap



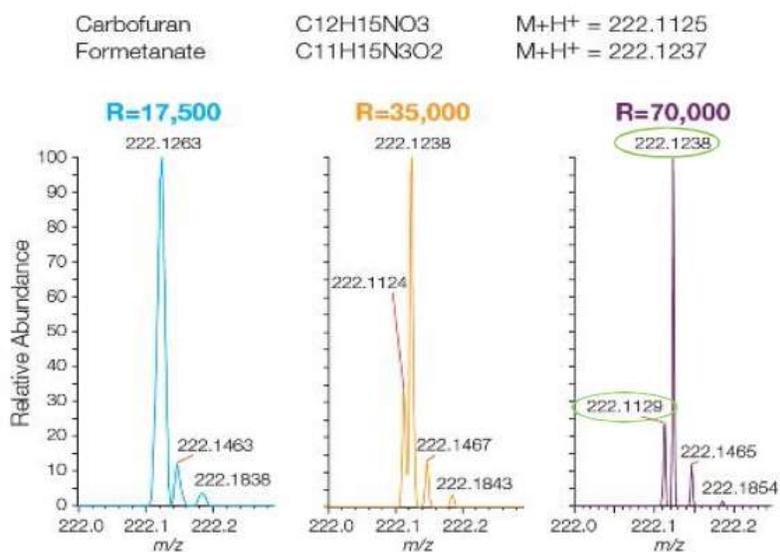
100

# Q-Orbitrap



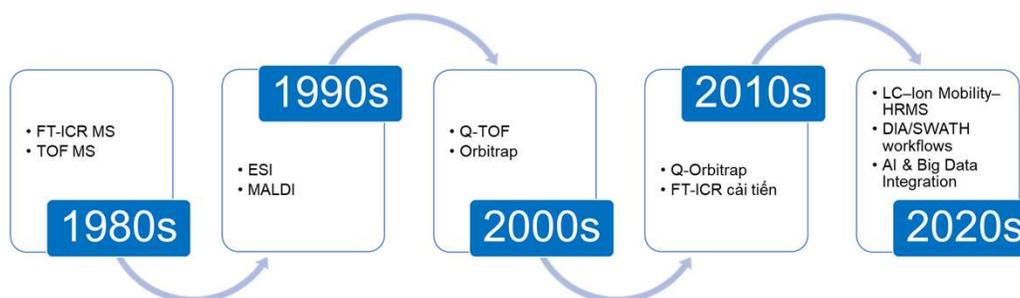
101

# Độ phân giải (Q-Orbitrap)



102

## HRMS (High resolution MS)



103

## So sánh các kỹ thuật khối phổ



### • LRMS:

- ❖ Quadrupole
- ❖ Triple-Quadrupole
- ❖ Ion trap

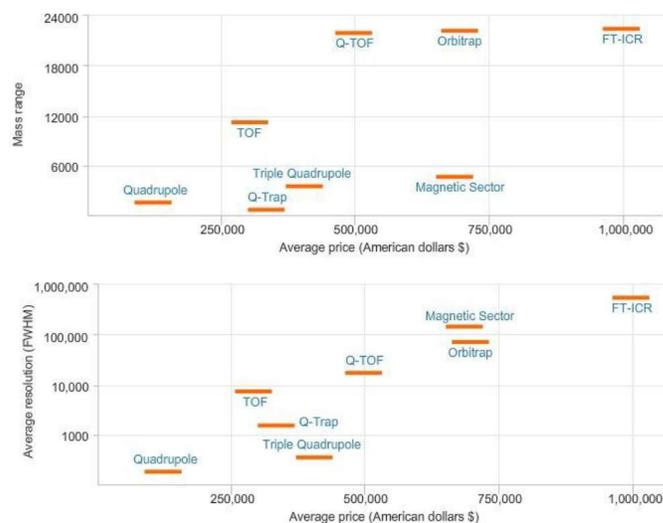
### • HRMS:

- TOF, Q-TOF, IT-TOF
- Orbitrap, IT-Orbitrap, Q-Orbitrap
- Magnetic Sector
- FT-ICR

Mass Spectrometer	Resolving power (FWHM)	Mass Accuracy (ppm)	Sensitivity (g)
Quadrupole	Unit resolution Modern instruments can reach up to 5000	50	10 <sup>-15</sup> (SRM)
Quadrupole Ion Trap	10000	50	10 <sup>-15</sup>
Time of Flight	20000	3	10 <sup>-12</sup> (full scan)
Magnetic Sector	50000	~1	10 <sup>-12</sup>
Orbitrap	100000	2	10 <sup>-15</sup> (full scan)
FT-ICR	1000000	~1	10 <sup>-12</sup> (full scan)

104

## So sánh các kỹ thuật khối phổ

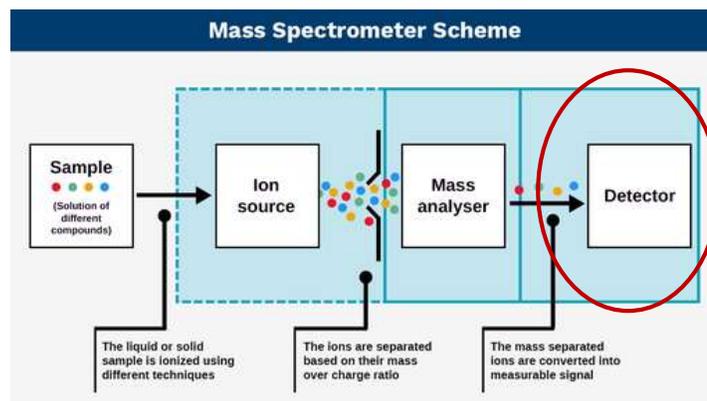


105

## Bộ phận phát hiện (detection)



- Faraday cup
- Array detector
- **Electron multiplier**
- **Photomultiplier**
- Charge Detector

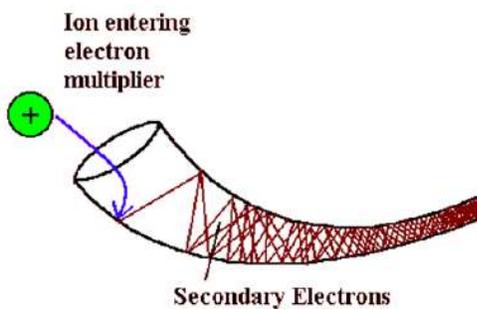


106

## Nhân điện



- Các ion va chạm bề mặt bán dẫn => electron. tăng tốc, va chạm tiếp => nhiều electron => phát hiện.

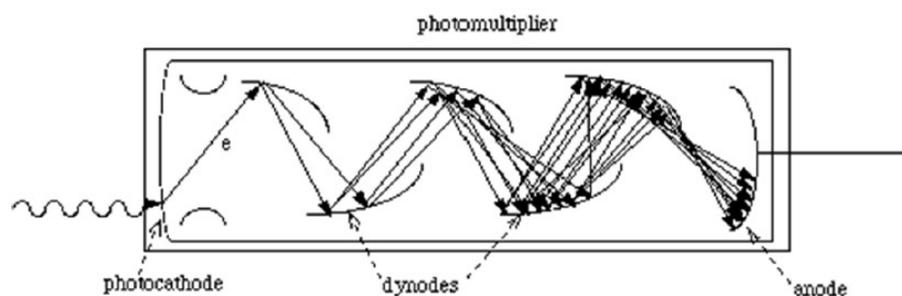


107

## Nhân quang



- Các ion va chạm với một bề mặt phát quang => photon => khuếch đại => phát hiện.

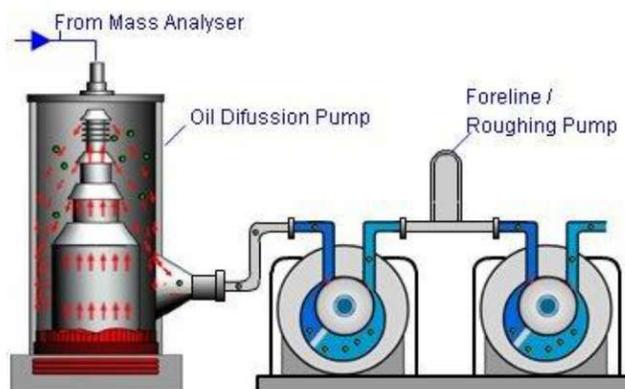


108

## Bộ tạo chân không



- Thường gồm 2 bộ bơm: rotary và turbo pump



109

## Hệ thống khí



- Khí mang mẫu (nebulization gas)
- Khí làm khô (desolvation gas, drying gas)
- Khí màn (curtain gas)
- Khí phân mảnh (CAD gas)
- Khí hay dùng:
  - ❖  $N_2$
  - ❖ Ar
  - ❖ He



110



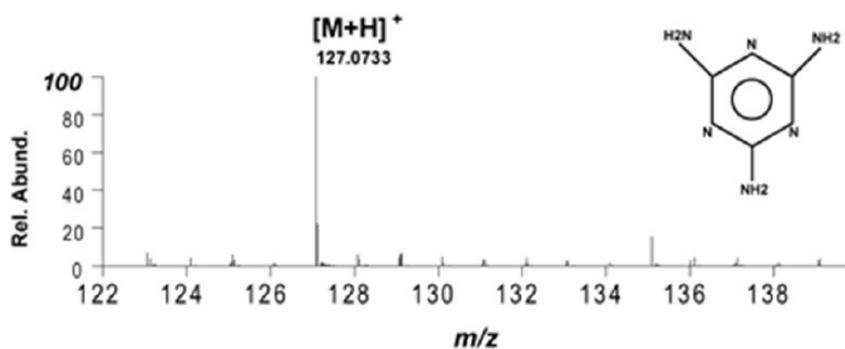
VIỆN KIỂM NGHIỆM AN TOÀN VỆ SINH THỰC PHẨM QUỐC GIA  
NATIONAL INSTITUTE FOR FOOD CONTROL

# Cơ bản về phổ khối

## Phổ khối



- Mas spectrum



# Phổ khối



- **Dalton(Da)**

- ❖ 1Da = khối lượng 1p hoặc 1n

- ❖ 1Da =  $1/12m(^{12}\text{C} = 12,00000)$

- **Mass**

- ❖ Carbon: 98,892%  $^{12}\text{C}$  và 1,108%  $^{13}\text{C}$  (13,00335)

$$m(\text{C}) = 0,98892 \times (12 \text{ Da}) + 0,01108 \times (13,00335 \text{ Da})$$

$$\approx 12,01 \text{ Da}$$

- **Mass to charge ratio**

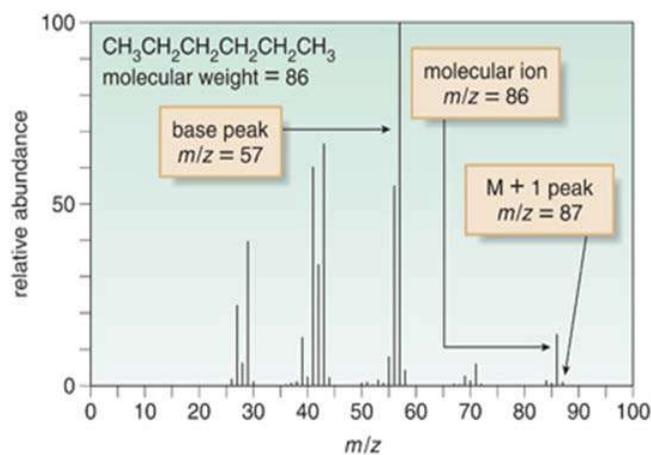
- ❖  $m/z$  (Da/e)

113

# Các mảnh khối



- Molecular ion
- Parent ion
- Daughter ion
- Fragmentation peaks
- Base peak

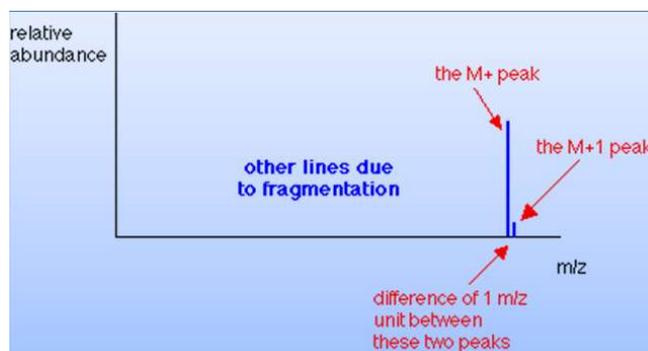


114

## Ion phân tử



- Hình thành do phân tử mất một điện tử hay cộng hợp một điện tử để tạo thành cation hay anion.
- Parent ion?

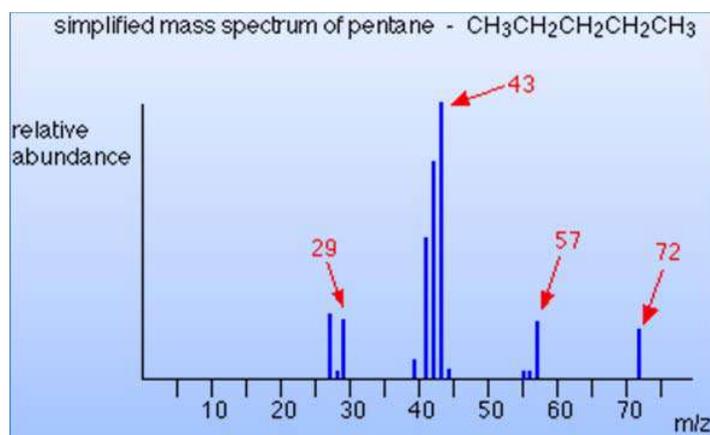


115

## Pic mảnh (Fragmentation peaks)



- Tạo thành do sự phân mảnh của hợp chất.

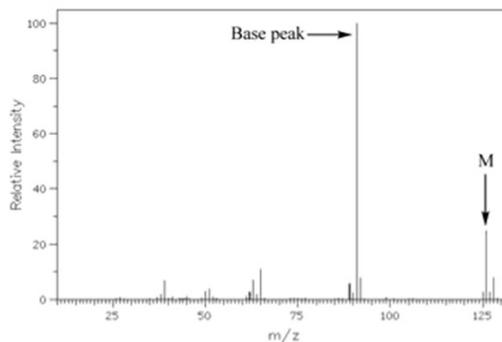


116

## Pic cơ bản (base peak)



- Pic có cường độ lớn nhất trong phổ đồ.
- Có thể là pic mẹ hoặc không phải pic mẹ.



117

## Thuật ngữ về khối



- Nominal mass
- Monoisotopic mass
- Most abundant mass
- Average mass

118

## Nominal mass & average mass



- Nominal mass: Khối lượng (làm tròn về số nguyên) tính từ khối lượng của đồng vị nguyên tố có cường độ lớn nhất (*khối lượng danh nghĩa*)
- Average mass: Tính từ khối lượng trung bình của các nguyên tố, tính tất cả các đồng vị (*khối lượng tb*)
- Monoisotopic mass: Khối tính từ các đồng vị nhẹ nhất

119

## Nominal mass & average mass



### • VD: Butyric acid ( $C_4H_8O_2$ )

❖ Nominal mass:

$$4 \times 12 + 8 \times 1.00783 + 2 \times 15.9949 = 88.05244 \text{ Da}$$

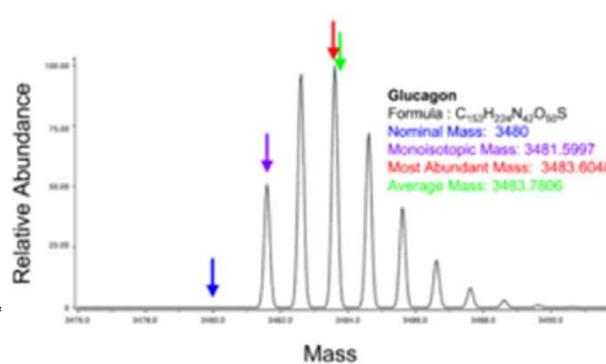
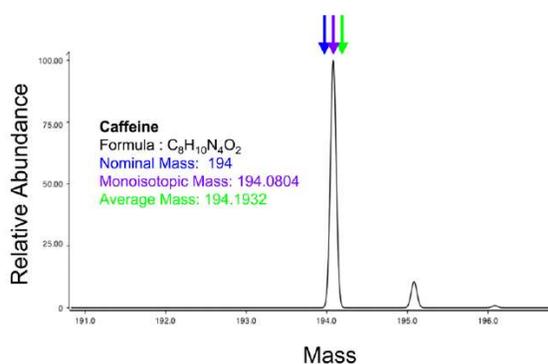
❖ Average mass:

$$4 \times 12.0107 + 8 \times 1.00794 + 2 \times 15.9994 = 88.10512 \text{ Da}$$

Nguyên tố	Khối lượng trung bình (Da)	Khối lượng đồng vị chính (Da)
H	1.00794	1.00783
C	15.9994	15.9949
O	12.0107	12

120

# Thuật ngữ về khối



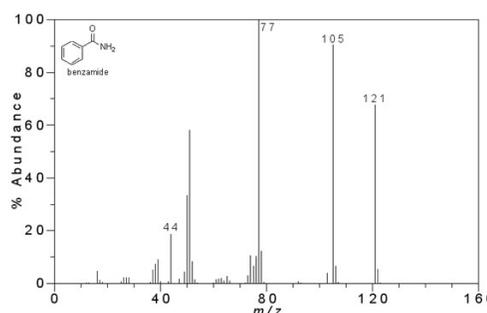
121

# Nguyên tắc Nitơ



- Nếu hợp chất có chứa một số chẵn N (hoặc không có N), ion phân tử của nó có khối lượng là số chẵn.
- Nếu một hợp chất có chứa một số lẻ N, ion phân tử của nó sẽ có giá trị khối lượng lẻ

- VD: Nếu biết một chất không có N và cho ion  $m/z = 121$   
 => Ion này không phải là ion phân tử

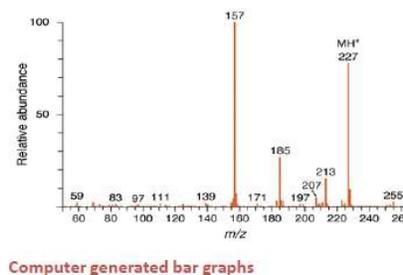
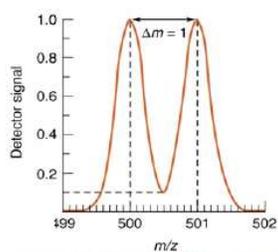


122

## Độ phân giải khối



- Resolving power: Sự phân biệt các khối gần nhau ( $\Delta m$ )
- Mass resolution: Độ phân giải ( $R = m/\Delta m$ ) IUPAC



123

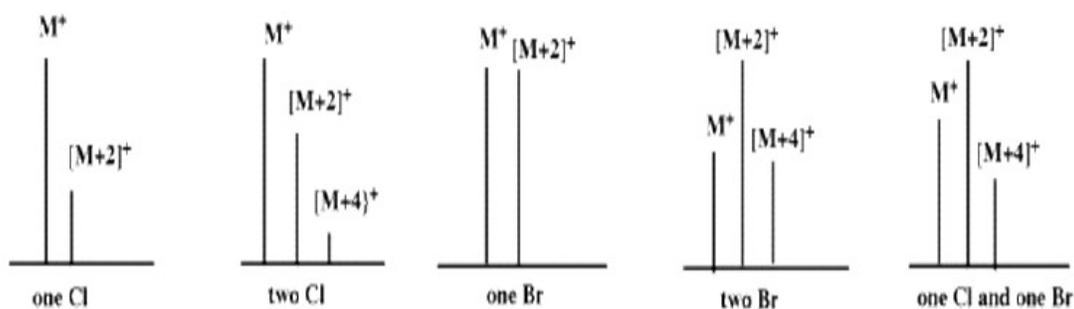
## Hiệu ứng đồng vị



Nguyên tố	Đơn vị C (Da)	Tỷ lệ (%)
$^1\text{H}$	1,00783	99,98
$^2\text{H}$ (D)	2,01410	0,02
$^{12}\text{C}$	12,0000	98,89
$^{13}\text{C}$	13,0034	1,11
$^{14}\text{N}$	14,0031	99,64
$^{15}\text{N}$	15,0001	0,36
$^{16}\text{O}$	15,9949	99,76
$^{17}\text{O}$	16,9991	0,04
$^{18}\text{O}$	17,9992	0,20

124

## Cl và Br



125

## Hiệu năng thiết bị MS



- Độ chính xác khối – Mass accuracy
- Độ phân giải khối – Mass resolution
- Độ nhạy – Sensitivity

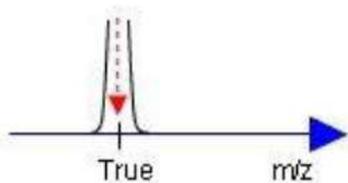
126

## Độ chính xác khối

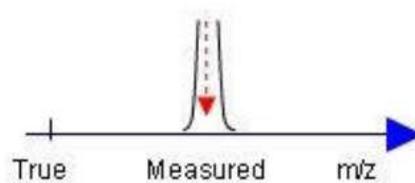


- Độ chính xác khối (mass accuracy) chênh lệch giữa khối đúng (true mass) và khối đo được (measured mass)

Độ chính xác cao



Độ chính xác thấp

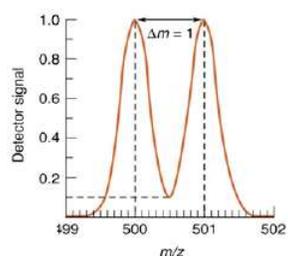


127

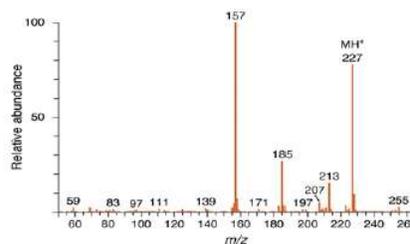
## Độ phân giải khối



- Resolving power: Sự phân biệt các khối gần nhau ( $\Delta m$ )
- Mass resolution: Độ phân giải ( $R = m/\Delta m$ ) **IUPAC**



Actual detector signal (Gaussian)



Computer generated bar graphs

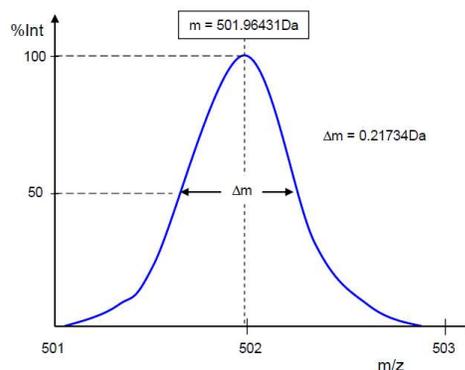
128

## Độ phân giải của khối đơn lẻ



- FWHM = Full Width at Half Maximum

- $m = 501,96431 \text{ Da}$
- $\Delta m = 0.21734 \text{ Da}$
- $R_m = m/\Delta m = 2309$



129

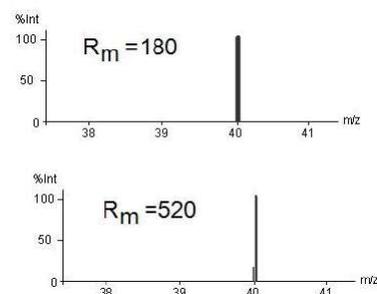
## Độ phân giải khối cao



- Độ phân giải đơn vị (unit mass resolution)
- Độ phân giải cao (high mass resolution)

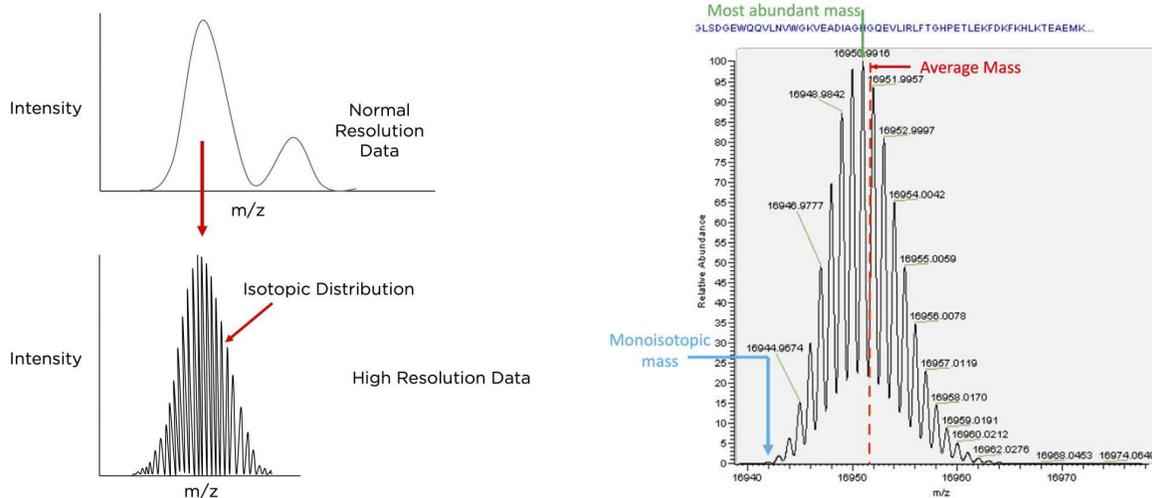
❖ VD: Ar 39,96239  
 $\text{C}_3\text{H}_4$  40,06386

$R_m = 394$



130

# Vai trò độ phân giải khối

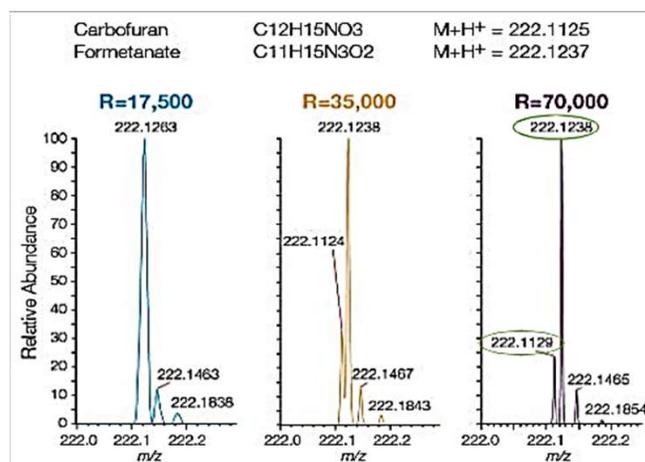


131

# Độ phân giải khối và độ chính xác khối



- Độ phân giải cao dẫn đến độ chính xác khối cao



132

## Khoảng khối (mass range)



- Khoảng làm việc từ khối thấp nhất đến khối cao nhất
- Phụ thuộc vào kỹ thuật phân tích khối
- ATTP: m/z 50-1000

133

## So sánh một số kỹ thuật MS



Kỹ thuật MS	Độ phân giải	Khoảng khối	Độ chính xác khối
<b>Tứ cực</b>	500 – 2.000	2 – 2000 Da	0.1 Da
<b>Bẫy ion</b>	500 – 2.000	100 – 2000 Da	0.1 Da
<b>Thời gian bay</b>	500 – 12.000	50 – $1 \times 10^6$ Da	0.0001 Da
<b>Cung từ</b>	800 – 50.000	2 – 15.000 Da	0.0001 Da

134



VIỆN KIỂM NGHIỆM AN TOÀN VỆ SINH THỰC PHẨM QUỐC GIA  
NATIONAL INSTITUTE FOR FOOD CONTROL

# Lưu ý khi sử dụng LC-MS/MS

## Một số lưu ý khi sử dụng LC-MS/MS



### • Phần LC

- ❖ Cần tối ưu hóa để tách chất phân tích tốt nhất (pha động, pha tĩnh, nhiệt độ lò cột). Đảm bảo  $k' > 1$ .
- ❖ Hiện tượng kéo đuôi, chệch đôi phần lớn là do cột bẩn
- ❖ Tránh bơm thể tích lớn dẫn đến quá tải cột
- ❖ Cần sử dụng và bảo quản cột tách tốt để tăng tg sử dụng
- ❖ Nên sử dụng tiền cột

## Một số lưu ý khi sử dụng LC-MS/MS



### • Phân MS

- ❖ Tuyệt đối không sử dụng đệm khó bay hơi vào MS
- ❖ Cần đảm bảo chân không hệ thống. Nên để bơm chân không hoạt động liên tục. Thường xuyên thay dầu theo định kỳ cho bơm. Thay dầu đúng loại.
- ❖ Khi sử dụng nhiều, nguồn ion có thể bị bắn dẫn đến giảm tín hiệu và tăng ảnh hưởng nền => rửa nguồn
- ❖ Sử dụng chức năng divert để giảm lượng mẫu vào MS
- ❖ Không nên sử dụng khi trời có sấm sét

137

## Tương thích giữa HPLC và ESI/APCI



HPLC TYPE	MODE	
	ESI	APCI
Reversed Phase	High	Moderate
Normal Phase	Low	High
Size Exclusion/Gel filtration	High	Low
Size Exclusion/Gel permeation	Low	High
Ion Exchange	Low	Low

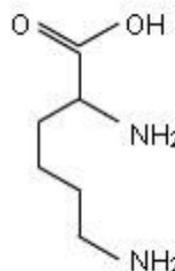
138

## Hiểu biết về chất phân tích



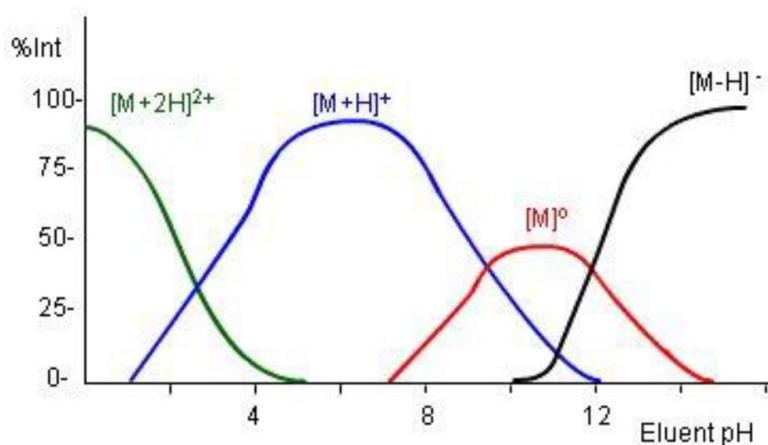
- VD: Lysine có 3 nhóm chức năng (1 nhóm acid và 2 nhóm  $\text{NH}_2$ ); dưới các điều kiện pH khác nhau có thể tạo ra các trạng thái tích điện khác nhau

Lysine (142.18da)  $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$   
 $\text{pI} \approx (10.79 + 9.18) / 2 \approx 9.8$   
 $\text{pKa}_1 = 10.79$   
 $\text{pKa}_2 = 9.18$   
 $\text{pKa}_3 = 2.2$



139

## pH ảnh hưởng đến sự ion hóa



Lysine acid base equilibrium

140

## Pha động trong ESI?



- Dung môi phù hợp: methanol, isopropanol, acetonitril
- Không sử dụng phosphates, sulphates, borates, và citrates
- Thay thế bằng ammonium acetate, ammonium formate, ammonium hydroxide, formic acid, acetic acid, trifluoroacetic acid (TFA)
- Loại trừ các muối và chất tạo cặp có thể gây hình thành các adduct (VD: Na, K)

141

## Một số ion có thể tạo ra ở ESI(+)



Observed	Explanation	Mass
$[M+H]^+$	Protonation.	$M + 1$
$[M+H+NH_4]^+$	Mainly seen when using $CH_3NH_4$	$M + 18$
$[M+H+nH_2O]^+$	$M + H_2O$ adduct	$M + 1 + 18 \times n$
$[M+H+H_2O]^+$	$M + H_2O$ adduct	$M + 19$
$[M+H+Na]^+$	$M + Na$ adduct	$M + 24$
$[M+H+K]^+$	$M + K$ adduct.	$M + 40$
$[M+H+CH_3CN]^+$	Mainly when using acetonitrile	$M + 42$
$[2M+H]^+$	Analyte dimerisation.	$2 \times M + 1$
$[M+H+CH_3CN]^+$	In presence of $CH_3CN$	$M + 42$
$[M+H+CH_3CN+nH_2O]^+$	Adduct of $CH_3CN$ and $H_2O$	$M + 42 + 18 \times n$

142

## Một số ion có thể tạo ra ESI(-)



Observed	Explanation	Mass
$[M-H]^-$	Deprotonation.	$M - 1$
$[M-H-nH_2O]^-$	Deprotonation and dehydration	$M - 1 - 18 \times n$
$[M+Cl]^- / (M+35.5)$	Ion attachment.	$M + 35.5$
$[M-2H+Na]^-$	$M + Na$ adduct	$M + 21$
$[M-H-CO_2]^-$	Carbon dioxide loses.	$M - 45$

143

## Vấn đề lớn nhất của ESI-MS



# Matrix Effects

## Ảnh hưởng nền



It is still a pain!

144

## Ảnh hưởng nền?



- Tăng ion
  - ❖ Ion enhancement, coelution
- Khử ion
  - ❖ Ion suppression
- **Nguyên nhân**
  - ❖ Nền mẫu quá phức tạp, quá trình chuẩn bị mẫu chưa đáp ứng
  - ❖ Điều kiện phân tích chưa tối ưu

145

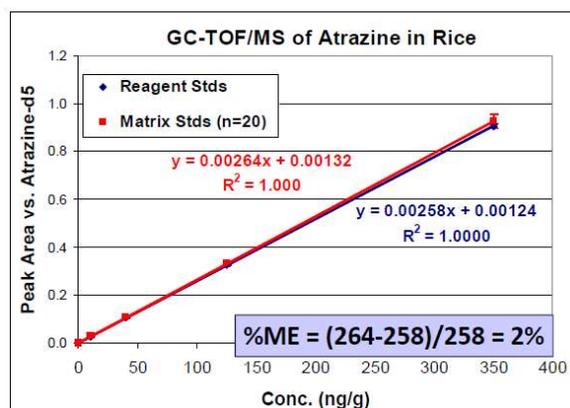
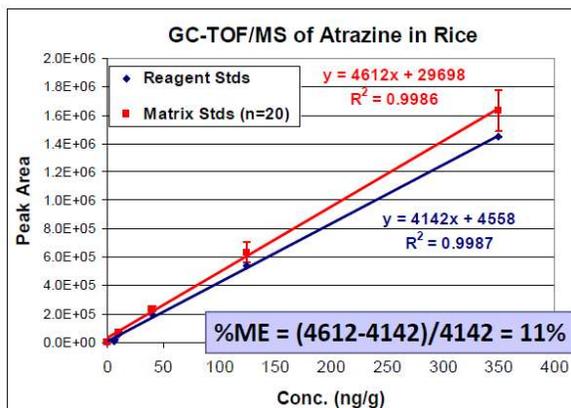
## Đánh giá ảnh hưởng nền



- **Cách 1:** So sánh tín hiệu trung bình của các pic sắc ký của dung dịch chuẩn pha trên nền mẫu với pha trên nền dung môi.
- **Cách 2:** Lập các đường chuẩn trên nền dung môi và nền mẫu; dựa vào hệ số góc để xác định ảnh hưởng nền.

146

# Tính Matrix Effects



147

# Để khắc phục ảnh hưởng nền



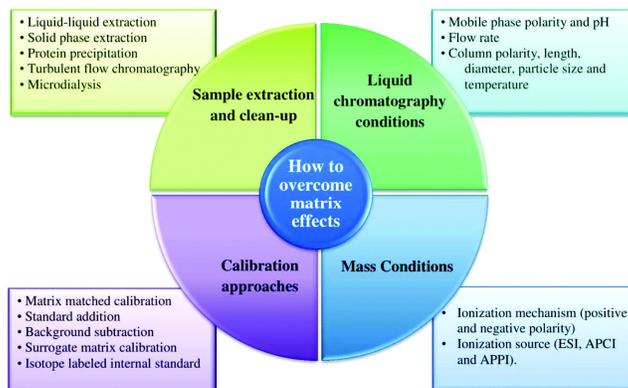
- Cải thiện quá trình xử lý mẫu: làm sạch, pha loãng...
- Cải thiện hiệu quả tách sắc ký
- Cải thiện điều kiện khối phổ: pos & neg, APCI & ESI(-) & ESI(+)
- Kỹ thuật hiệu chuẩn
  - ❖ Dùng nội chuẩn, đặc biệt là nội chuẩn đồng vị
  - ❖ Xây dựng đường chuẩn trên nền mẫu...

148

## Điều quan trọng cần nhớ



**Không kiểm soát được ảnh hưởng nền,  
độ nhạy tốt đến đâu cũng thành vô nghĩa!**



149



# Xin chân thành cảm ơn!