

Základy analytické chemie

Separační metody:

**Plynová a kapalinová chromatografie,
hmotnostní spektrometrie**

RNDr. Andrea Vojs Staňová, PhD.

vojsstanova@frov.jcu.cz

Separační metody

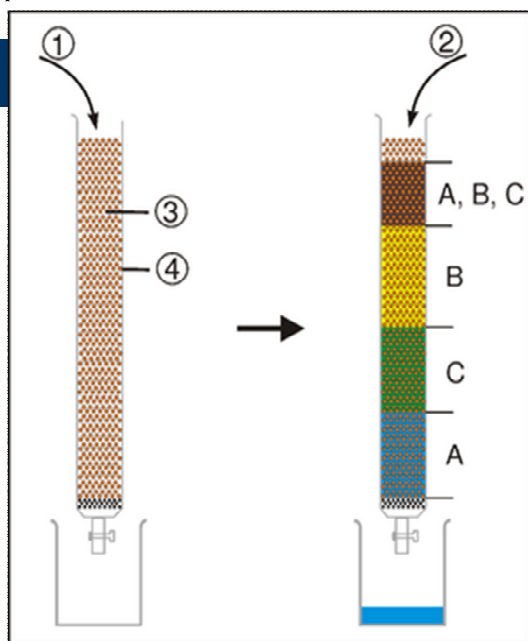
Žádný analytický signál není jedinečný a specifický pro danou látku – nutná separace – oddělení/izolace chemických individuí resp. skupin chem. složek před měřením analytického signálu.

Rovnovážné metody: založené na rovnovážné distribuci složek mezi dvě fáze, např. rozdílná rozpustnost látek (chromatografie, extrakce, ..)

Nerovnovážné metody: látky se dělí na základě rozdílných rychlostí transportu, např. rozdíl v pohyblivosti částic v silovém poli (elektroforéza, izotachoforéza, ...)

Chromatografické metody

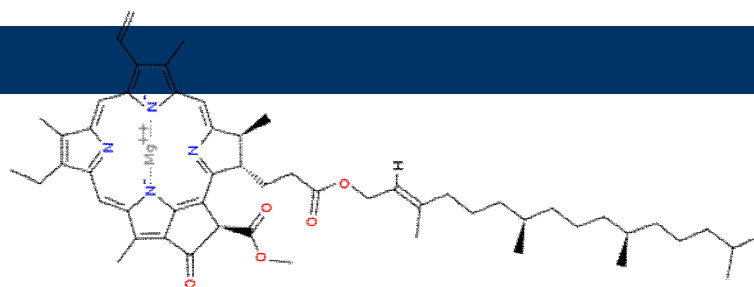
Michail S. Cvet – barva = chroma“ (gre.), psát = graphen
(*M. Tswett, Trav. Soc. Nat. Warsovie, 6 (1903) 14*)



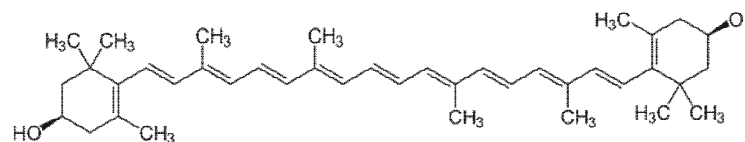
1 - extrakt rostlinných barviv; 2 - čistý petroléter – mobilní fáze;

3 - uhličitán vápenatý – stacionární fáze; 4 - skleněná kolóna;

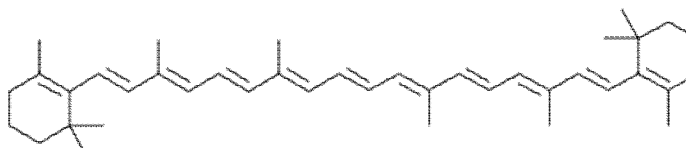
A, B, C - složky separované směsi



chlorofyl a



zeaxantín



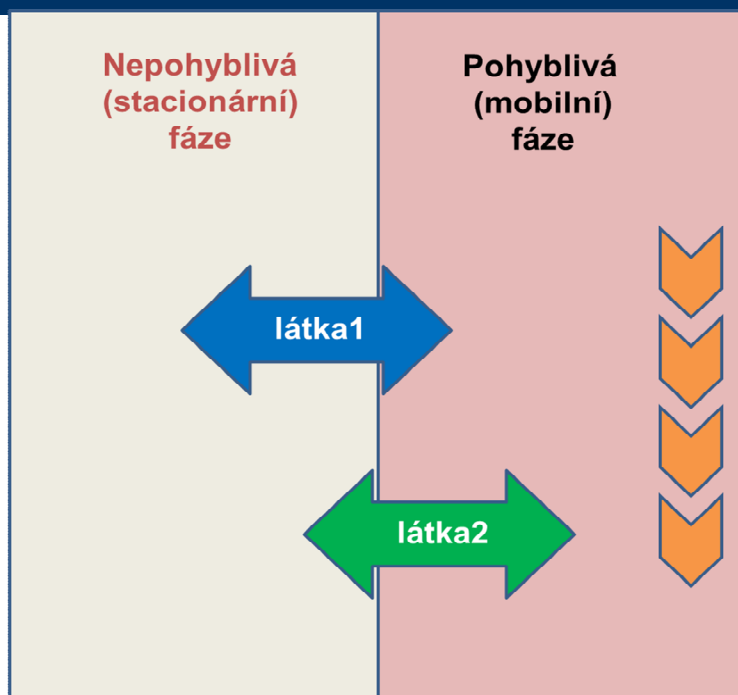
β karotén

Nobelovy ceny za chromatografii:

A. Tiselius (1948) – adsorpční chromatografie a elektroforéza

A. J. P. Martin a R.L.M. Synge (1952) - rozdělovací chromatografie

Chromatografie - princip



fyzikální metoda na separaci látek, přičemž separované látky jsou distribuované mezi dvě fáze, z kterých jedna je nepohyblivá (stacionární fáze) a druhá se pohybuje v definovaném směru (mobilní fáze)

....definice IUPAC 1993

Distribuční (rozdělovací) konstanta

$$K_D = \frac{c_s}{c_m}$$

c_s - koncentrace složky ve stacionární fázi
 c_m - koncentrace složky v mobilní fázi

Rozdělení chromatografických metod

1) Na základě skupenství mobilní fáze:

Plynová chromatografie

(angl. Gas Chromatography, GC) - mobilní fází je plyn

Kapalinová chromatografie

(Liquid Chromatography, LC) - mobilní fází je kapalina

Superkritická fluidní chromatografie

(Supercritical-Fluid Chromatography, SFC) - mobilní fází je látka v nadkritickém stavu (přechod mezi plynem a kapalinou, kritický bod je zde charakterizován kritickou teplotou T_k a kritickým tlakem p_k).

Rozdělení chromatografických metod

2) Dle povahy fyzikálně-chemického děje při separaci:

Adsorpční kapalinová chromatografie

(Liquid-Solid Chromatography, LSC)

Rozdělovací kapalinová chromatografie

(Partition Liquid Chromatography resp. Liquid-Liquid Chromatography, LLC)

Iontově výměnná chromatografie

(Ion-Exchange Chromatography, IEC)

Afinitní chromatografie

(Affinity Chromatography, AC)

Gelová chromatografie

(Gel Chromatography)

Rozdělení chromatografických metod

3. Dle geometrie uspořádání stacionární fáze:

1) **kolonová (sloupcová) chromatografie** - stacionární fáze je umístněná v koloně

2) **plošné techniky:**

a) **papírová chromatografie (Paper Chromatography, PC)** - stacionární fáze je součástí chromatografického papíru

b) **chromatografie na tenké vrstvě (Thin Layer Chromatography, TLC)** - pórovitá stacionární fáze je umístněná na pevném plochém podkladě např. hliníkové fólii anebo skleněné desce

Rozdělení chromatografických metod

4. Dle způsobu získání chromatogramu

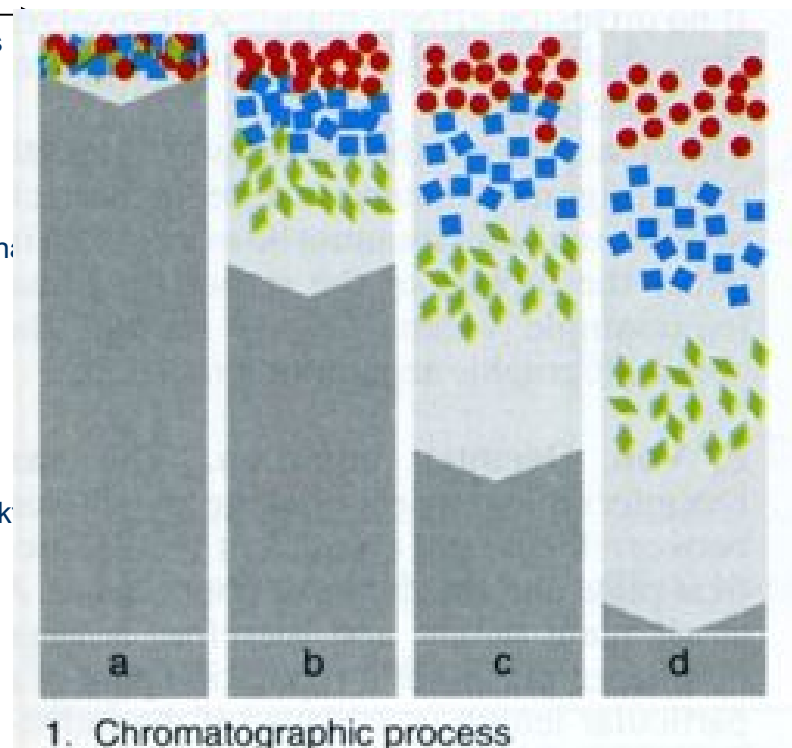
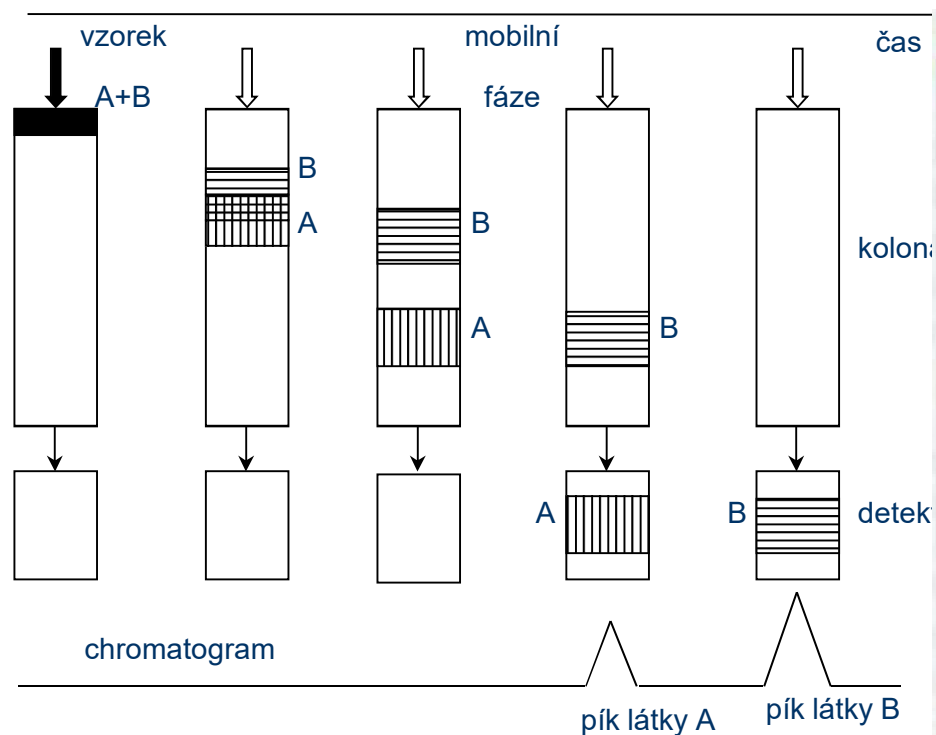
Eluční chromatografie - jednorázové nadávkování vzorku na kolonu a vymývání složek mobilní fáze, přičemž objem vzorku představuje do 1% objemu kolony.

Frontální chromatografie - kontinuální přivádění vzorku na kolonu v mobilní fázi, přičemž objem dávkovaného vzorku je mnohonásobně vyšší než objem kolony.

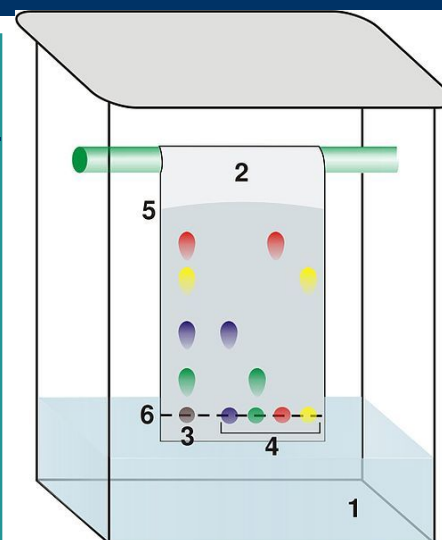
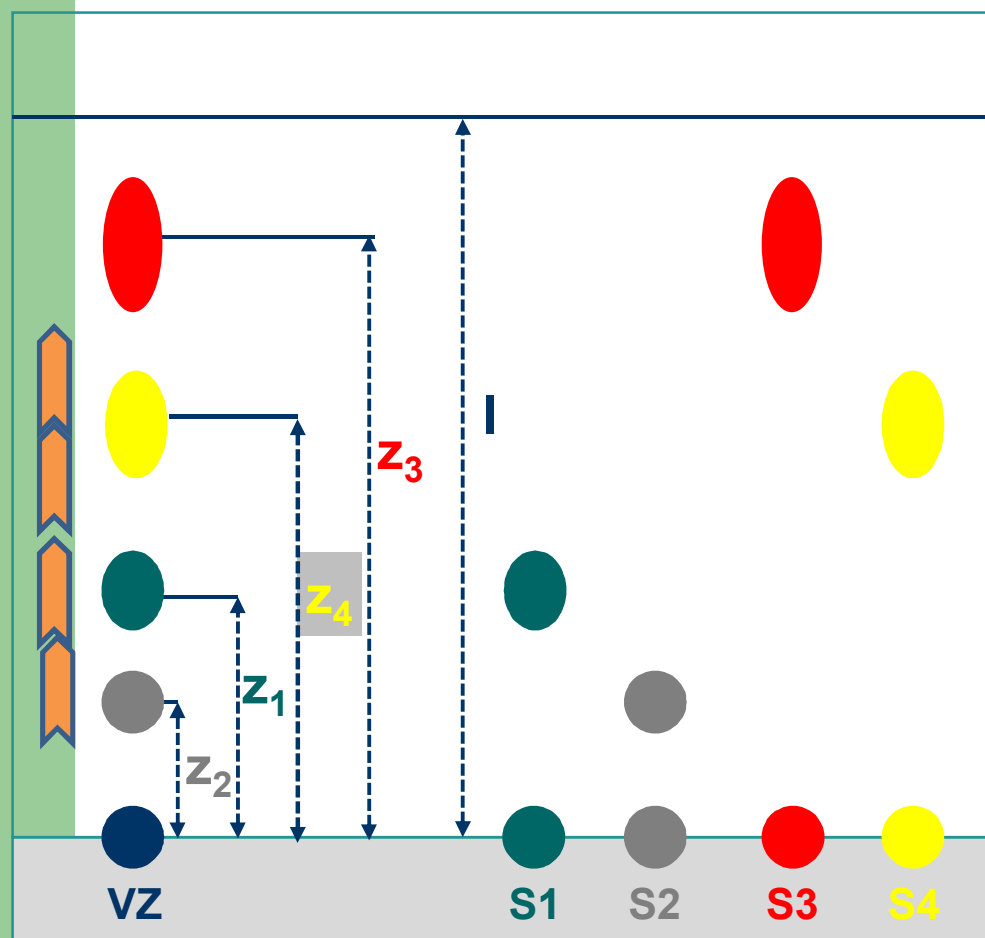
Vytěšňovací chromatografie - dávkování vzorku na kolonu podobně jako při eluční, jen jako mobilní fáze se použije vytěšňovací činidlo, přičemž objem vzorku představuje až 50% objemu kolony.

Eluční chromatografie

- nejpoužívanější forma chromatografie



Chromatografie – plošné techniky



Vzestupné vyvíjení

- 1 - mobilní fáze
- 2 - papír
- 3 - separovaná směs
- 4 - standardy
- 5 - čelo rozpouštědla
- 6 - start

$$R_f = \frac{z_i}{I}$$

R_f – retenční faktor

z_i – vzdálenost chromatografické skvrny od startu

I – vzdálenost čela rozpouštědla od startu

Plynová chromatografie

Principem je rovnovážná distribuce látek mezi dvě fáze – plynnou (mobilní) a kapalnou nebo tuhou (stacionární). Složky jsou separované v plynné fázi.

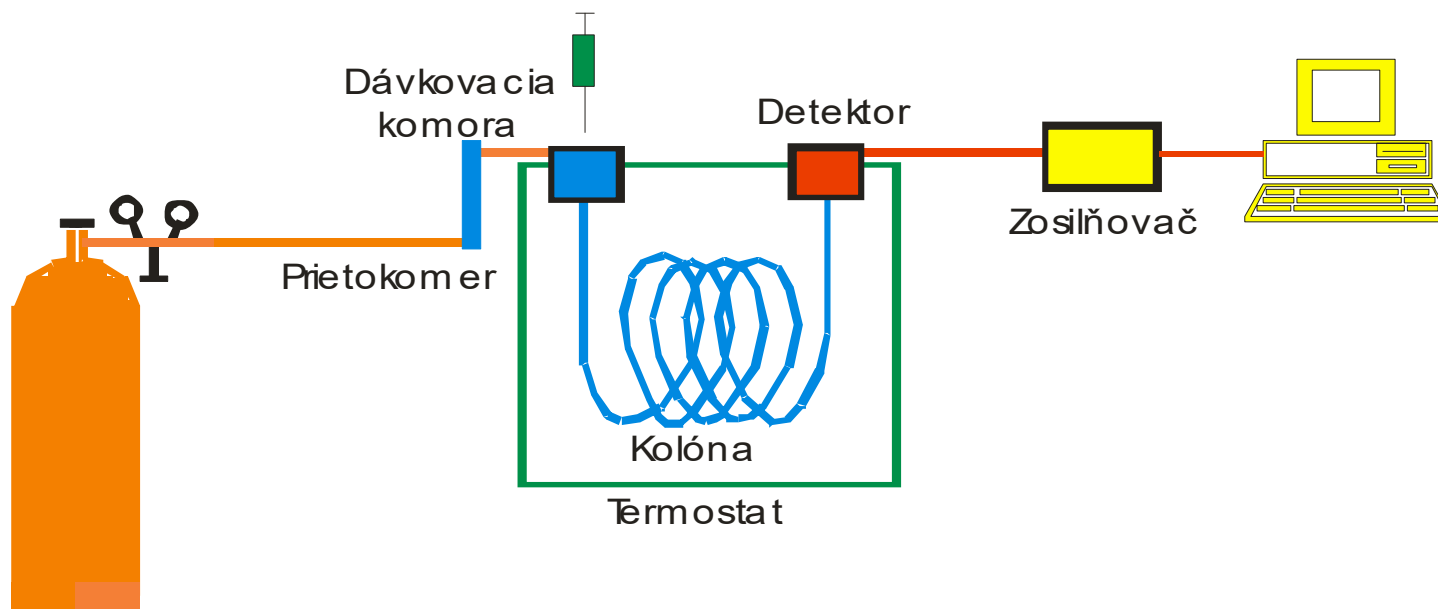
Dle stacionární fáze GC rozdělujeme na:

1. **plynovou adsorpční chromatografii** – separačním procesem je adsorpce složky z plynné fáze na povrch tuhého sorbentu.
2. **plynovou rozdělovací chromatografii** – distribuce složek je mezi plynnou (mobilní) a kapalnou (stacionární) fází.

GC slouží na separaci a stanovení směsi plynů, nebo nízkovroucích kapalin (do 400°C), které se po nadávkování do dávkovací komory odpaří a procházejí kolonou v plynné fázi, přičemž se nesmí rozkládat.

Plynová chromatografie

Nosný plyn z ocelové láhve proudí do dávkovací komory a prochází kolonou, z které vystupuje na detektor. Vzorek se injektuje do dávkovací komory a je unášen nosným plynem. Při průchodu kolonou se rozdělí na jednotlivé složky, které postupně vystupují z kolony přes detektor. Signál z detektoru se zesiluje a zpracovává.



Plynová chromatografie

Na preparativní účely se využívají kolony s průměrem 8 - 100 mm a délkou 2 - 6 m.

Na analytické účely se využívají kolony s průměrem 2 - 5 mm a délkou 0,5 - 5 m, anebo kapilární kolony s průměrem 0,1 - 0,5 mm a délkou 10 - 100 m.

Náplní kolon bývá aktivní uhlí, silikagel, oxid hlinitý, molekulové síto nebo křemelina se zakotvenou kapalnou fází.

Kapilární kolony mají vnitřní stěny potáhnuté vhodnou vrstvou, nejčastěji vysoko vroucí, viskózní kapalinou (např. polyalkoholem).

Jako nosný plyn se nejčastěji využívá dusík, někdy je výhodnější používat argon, pro speciální účely se může využívat hélium, případně jiné plyny.

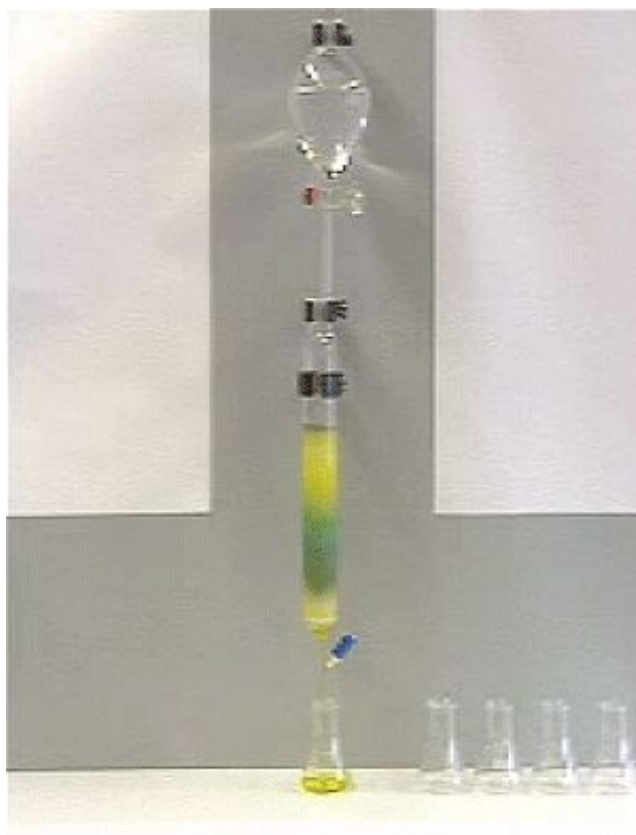
Plynová chromatografie

Nejpoužívanější detektor v GC je **plamenový ionizační detektor**.

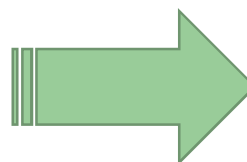
K nosnému plynu, který proudí z kolony je přivedený proud vodíku. Do komory detektoru se přivádí vzduch. Vodík reaguje s kyslíkem ze vzduchu a tvoří plamen. Nad plamenem se nacházejí dvě elektrody, na které je přivedené stabilizované napětí 100 až 500 V. Plamen ionizuje vzduch mezi elektrodami a obvodem protéká proud. Když do plamenu vstupuje organická látka (složka analyzovaného plynu) nastává spalování složky, zvýší se teplota plamene, zvýší se ionizace plynu mezi elektrodami a zvýší se proud protékající obvodem. Signál z galvanometru se zvýší a po průchodu složky detektorem opět poklesne na původní hodnotu. Plamenový ionizační detektor má vyšší citlivost, ale je vhodný jen pro hořlavé (organické) látky.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC (angl. *high-performance liquid chromatography*)



100 let



Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

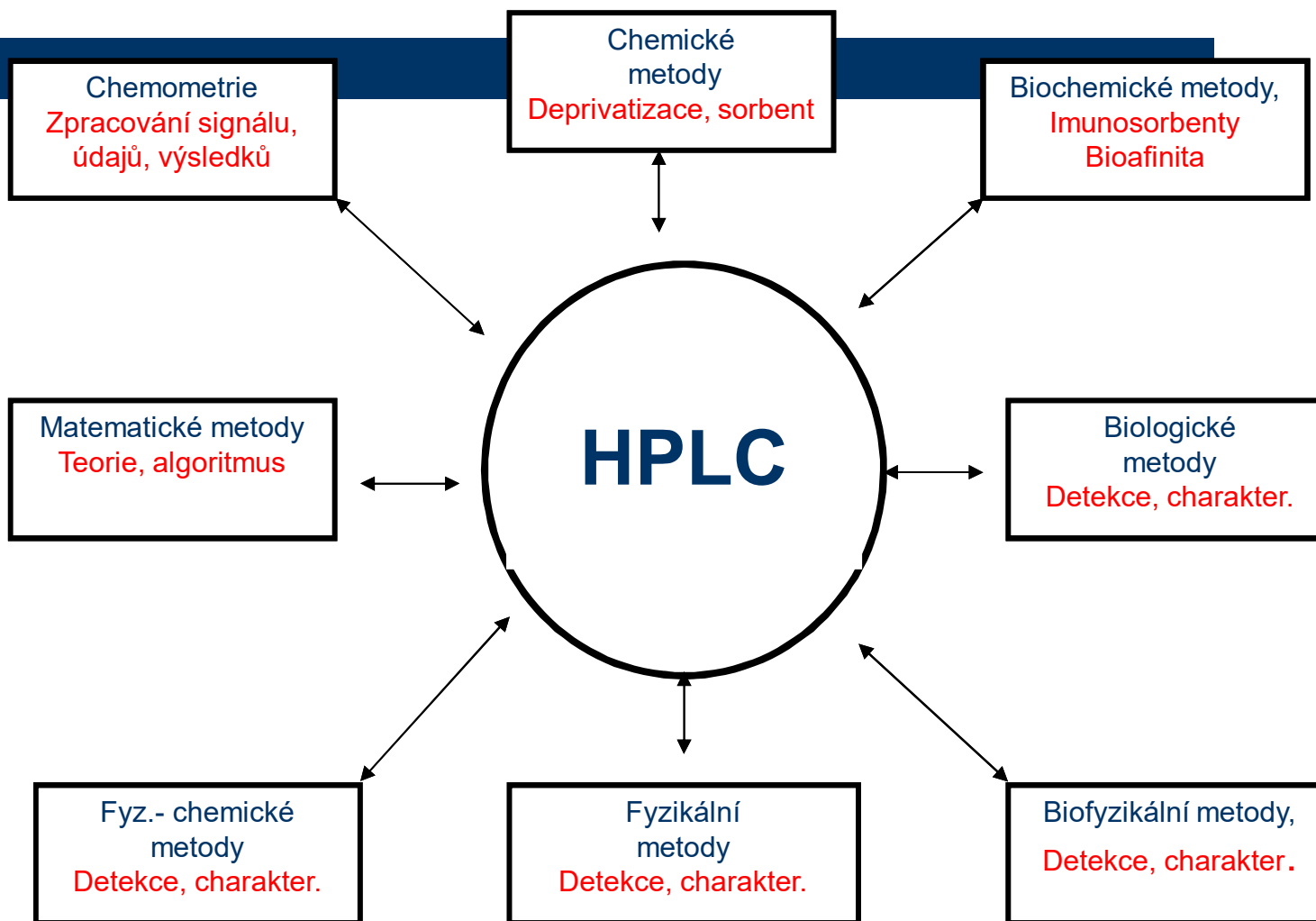
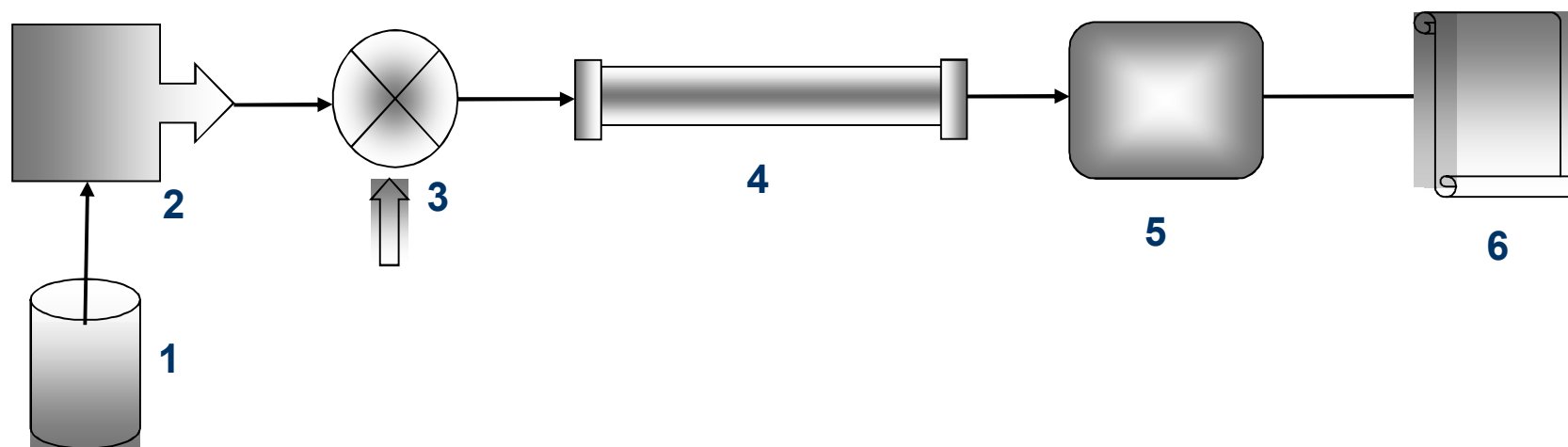


Schéma chromatografického experimentu

Eluční činidlo ze zásobní láhve proudí za pomoci čerpadla přes tlumič pulzu na kolonu a protéká jí směrem k detektoru. Vzorek se pomocí injekční stříkačky dávkuje na začátek kolony. Při postupu kolonou se rozdělí na jednotlivé složky, které postupně vstupují na detektor.

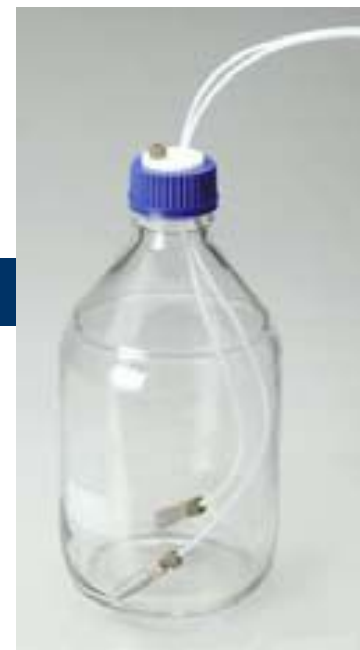


Základní schéma kolonového chromatografického experimentu:

1 - rezervoár pohyblivé fáze; 2 - vysokotlaké čerpadlo; 3 - dávkovací zařízení; 4 - chromatografická kolona; 5 – detektor; 6- vyhodnocovací jednotka.

Zásobníky mobilní fáze

nejčastěji skleněné nádoby objemu 0,1-2,5 l,
s ryskami a uzávěrem z inertního plastu
s předvrtanými otvory pro teflonové hadičky



Filtry - 2-20 μm



Nerezový (Hastalloy) filtr pro práci s halogenovanými rozpouštědly



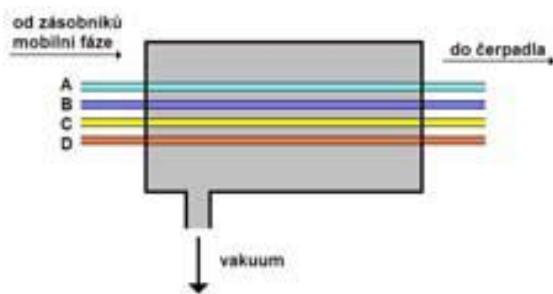
Plastový filtr pro bio-chromatografické aplikace

Odplyňovací zařízení

1. Odplyňování filtrací
ve vakuu resp. ultrazvukem

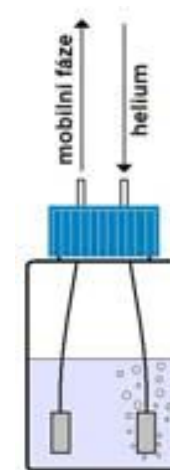


2. Membránové vakuové odplyňovací zařízení
mobilní fáze protéká semipermeabilní hadičkou umístěnou ve vakuu



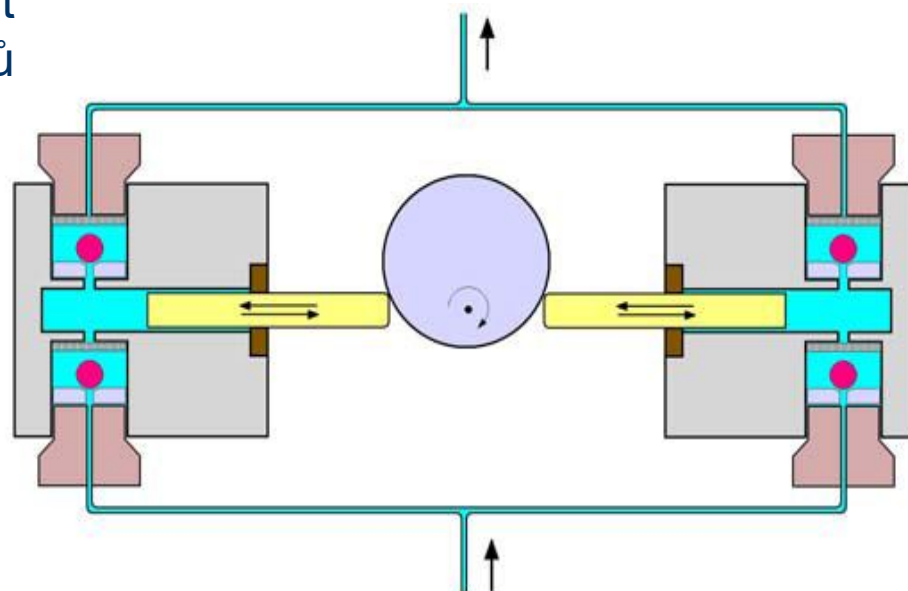
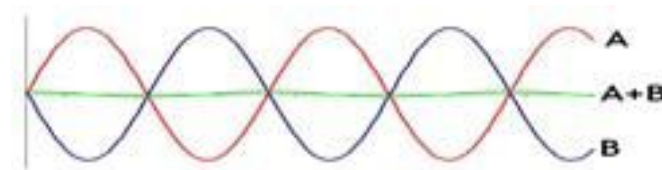
3. Héliové odplyňovače

- mobilní fáze se probublává He, které vytěsňuje rozpuštěné plyny (rozpustnost He v rozpouštědlech je minimální)



Čerpadla mobilní fázy

Duální čerpadlo pohání jeden motor - jedna část se plní, druhá vytlačí kapalinu do systému, což má za následek bezpulzní čerpání. Lepších výsledků je možné dosáhnout elektronickou kontrolou pohybu pístů - pulzace tlaku je minimalizována.



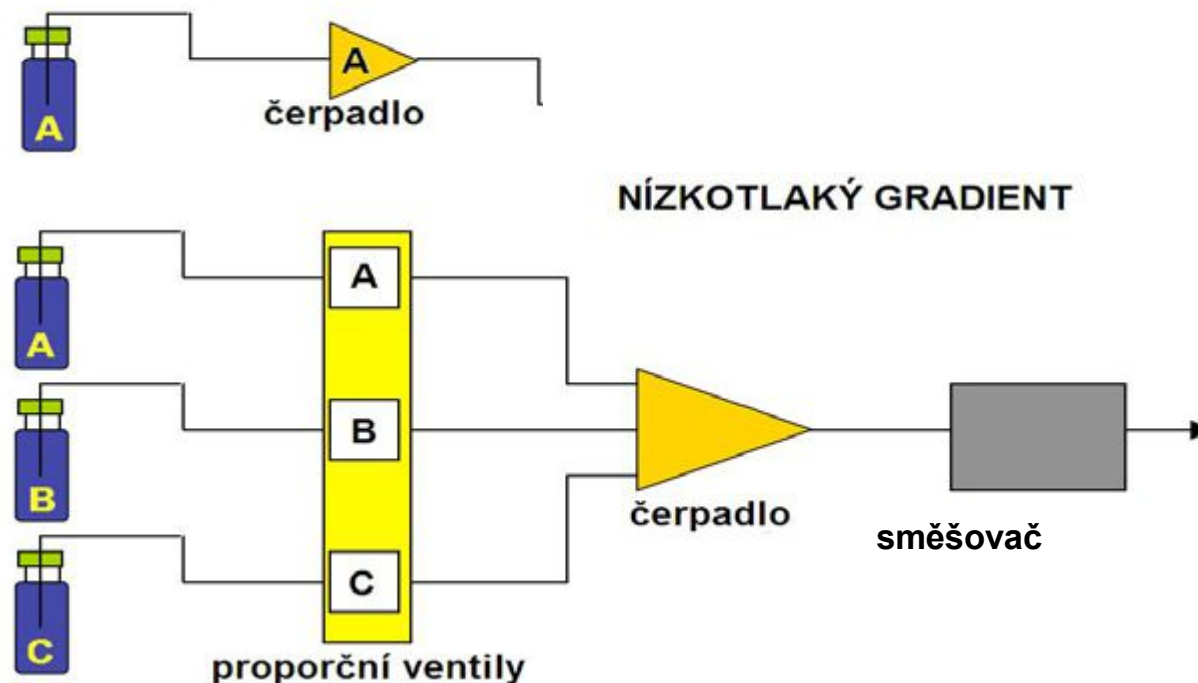
Jednotky tlaku v HPLC:

1 bar $\approx$ 1 atm

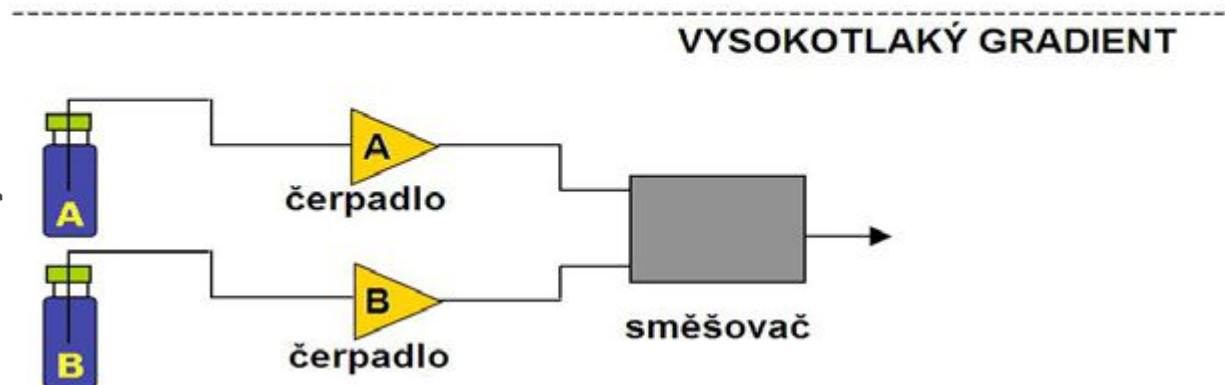
1 bar = 14,5 psi (pound per square inch)

Izokratická vs. gradientová eluce

izokratická eluce:
složení mobilní fáze
(eluční síla) se během
analýzy nemění.



gradientová eluce:
eluční síla mobilní fáze
vzrůstá během analýzy.



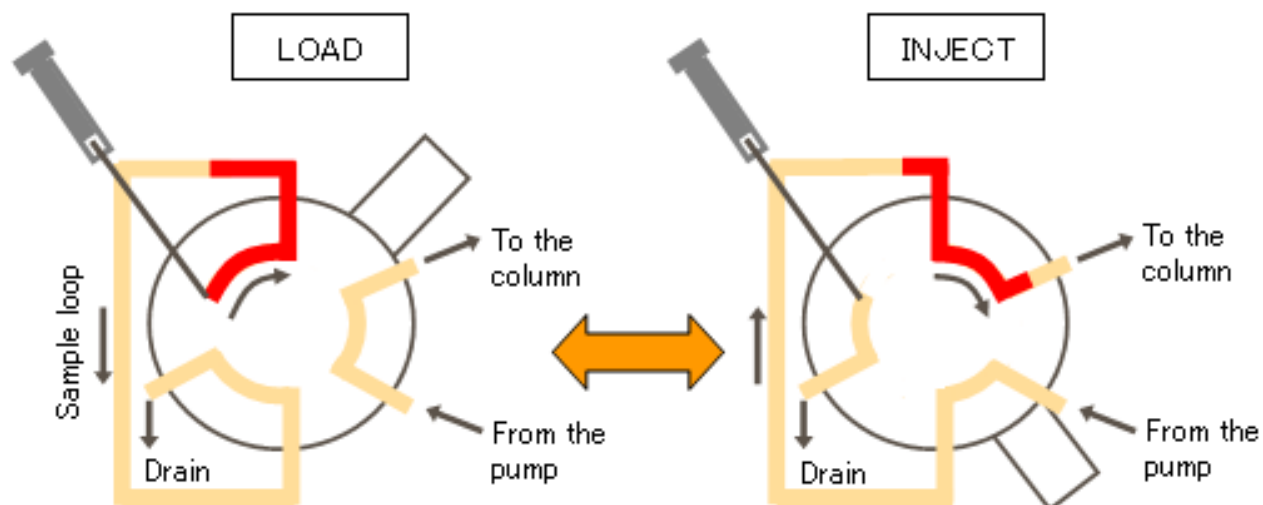
Dávkovací ventily

Instrumentace HPLC

Manuální



Automatický (autosampler)



Dvě polohy dávkovače:

1. poloha plnění smyčky
2. dávkovací poloha

Dávkovaný objem je dán velikostí smyčky – standardně 1-100 μ l



Chromatografické kolony

Kolona je rourka (kovová, skleněná, křemenná resp. plastová) obsahující stacionární fázi (náplňové resp. monolitické).

Specifikace kolony

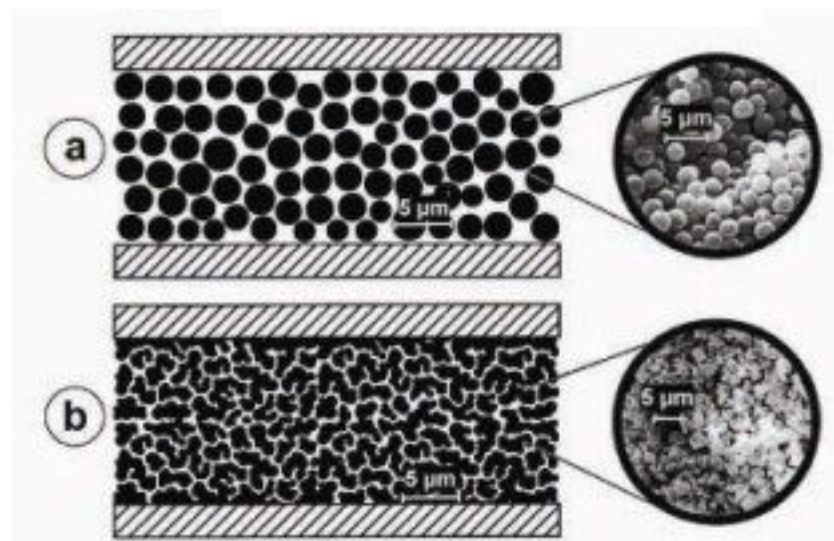
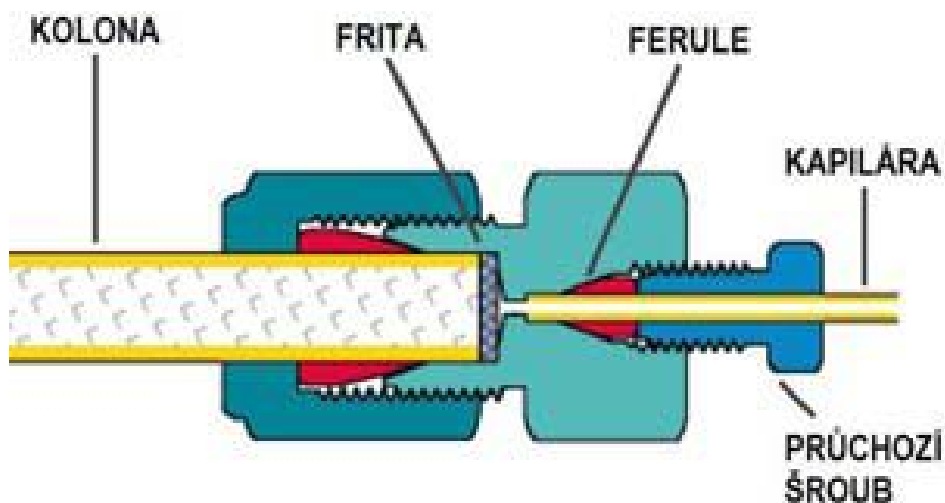
C18; 4,6 x 250 mm; 5 μ m; 100 Å

↑
typ fáze

↑
rozměr kolony

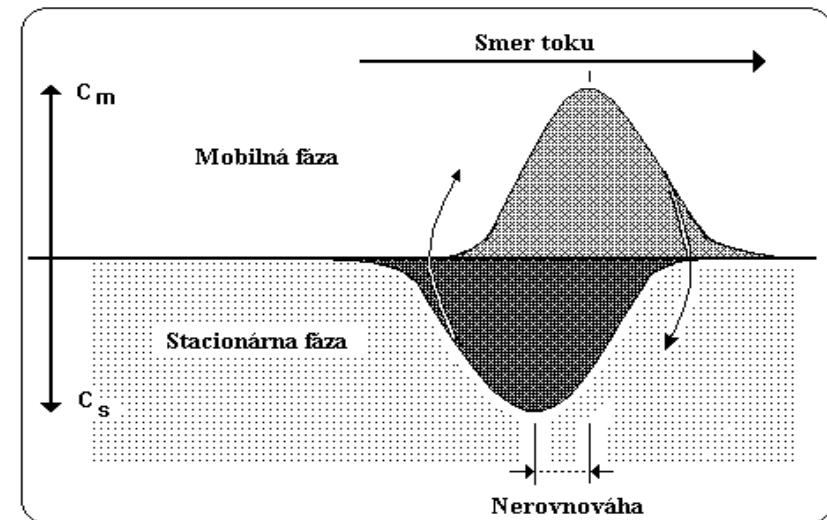
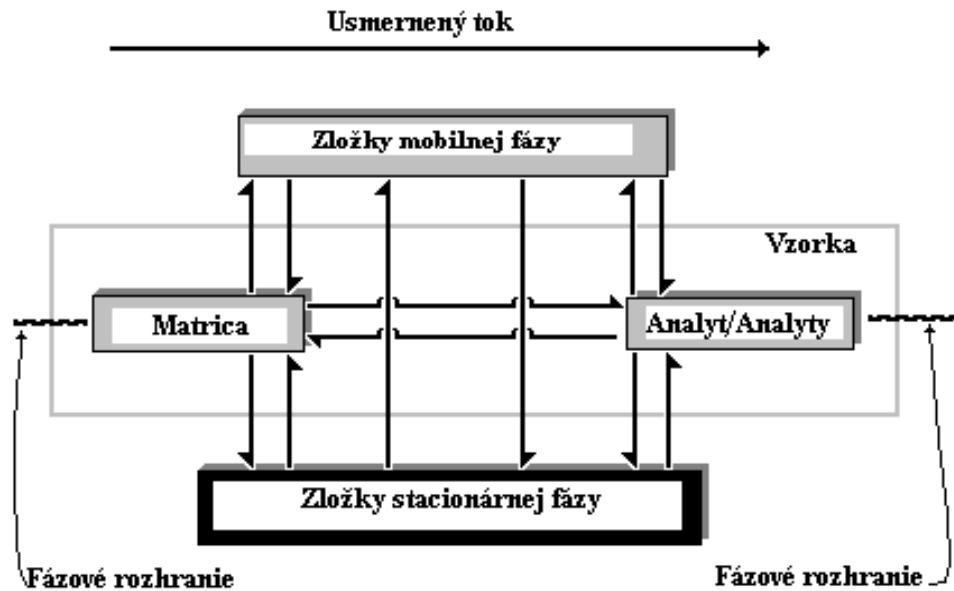
↑
velikost částic

↑
velikost pórů



Složky separačního systému jsou voleny tak, aby měli různé separované analyty rozdílnou **afinitu** k stacionární a k mobilní fázi.

Různé analyty podléhají různé **distribuci** (rozdělování) mezi mobilní fází a stacionární fází. V důsledku toho jsou separované analyty rozdílně **zadržované** (retence) a rozdílně se vzájemně zpožďují (retardace).





Chromatografická separace

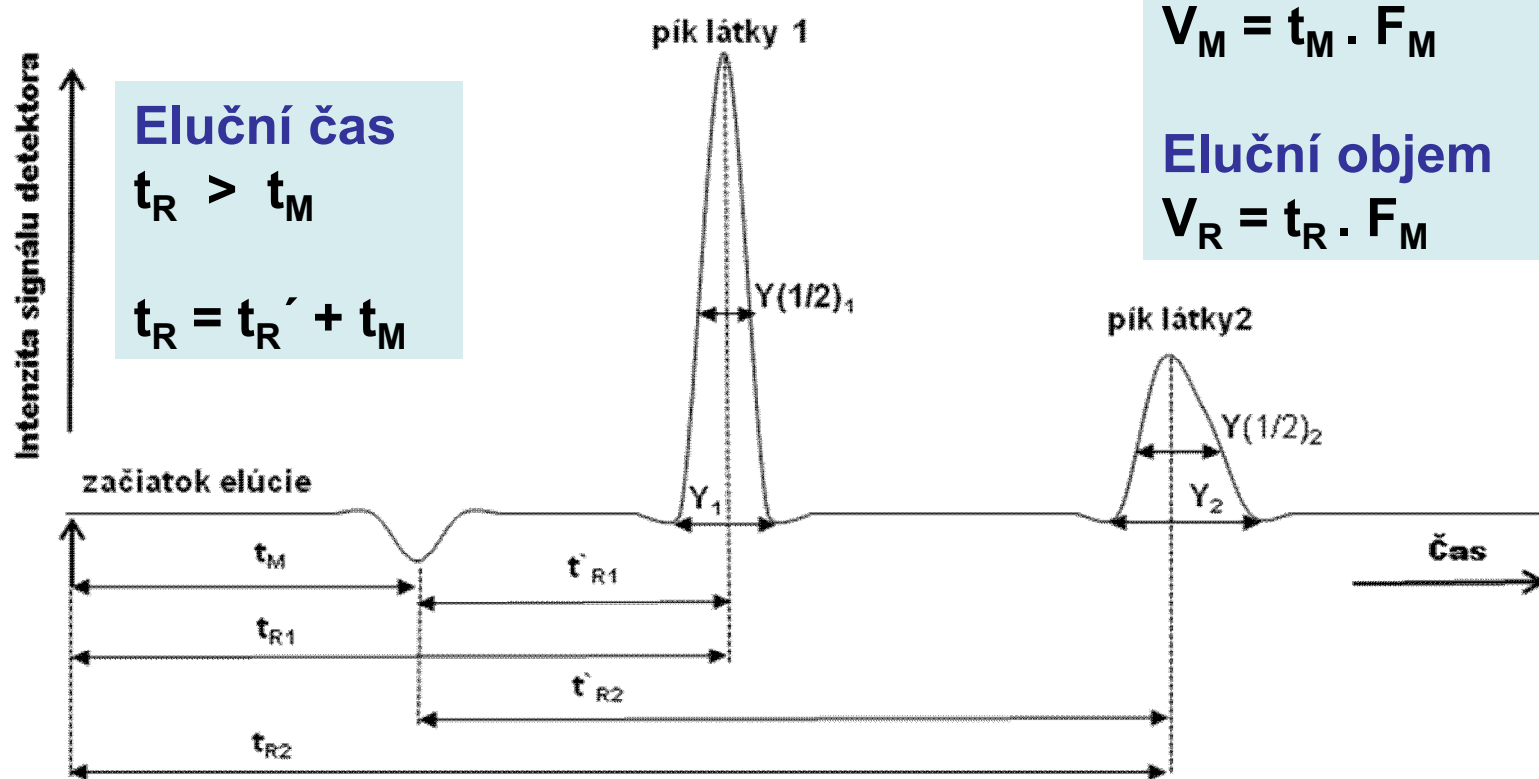
Základní charakteristiky mezimolekulových interakcí v chromatografii

Interakce	Schéma	Interakční energie (kJ / mol)	Orientace	Výskyt v LC
kovalentní	$R-X-Y-R$	400 - 800	ano	chelatace
iontová	$R^{\oplus} \quad \ominus \quad R$	200 - 800	ne	iontová výměna
vodíková vazba	$R-\overset{\ominus}{\delta} \quad \overset{\oplus}{\delta}-R$	20 - 40	ano	reverzní fáze
dipól - dipól	$\overset{\ominus}{\delta}-\overset{\oplus}{\delta} \quad \overset{\ominus}{\delta}-\overset{\oplus}{\delta}$	12 - 14	ano	normální fáze
dipól – induk. dipól	$\overset{\ominus}{\delta}-\overset{\oplus}{\delta} \quad \overset{\ominus}{\delta}-\overset{\oplus}{\delta}$	8 - 25	ne	reverzní fáze
disperzní síly	$\overset{\oplus}{\delta}-\overset{\ominus}{\delta} \quad \overset{\oplus}{\delta}-\overset{\ominus}{\delta}$	4 - 20	ne	všudy-přítomné



Eluční charakteristiky

Chromatogram dělení dvousložkové směsi



Eluční čas

$$t_R > t_M$$

$$t_R = t'_R + t_M$$

Mrtvý objem kolony

$$V_M = t_M \cdot F_M$$

Eluční objem

$$V_R = t_R \cdot F_M$$

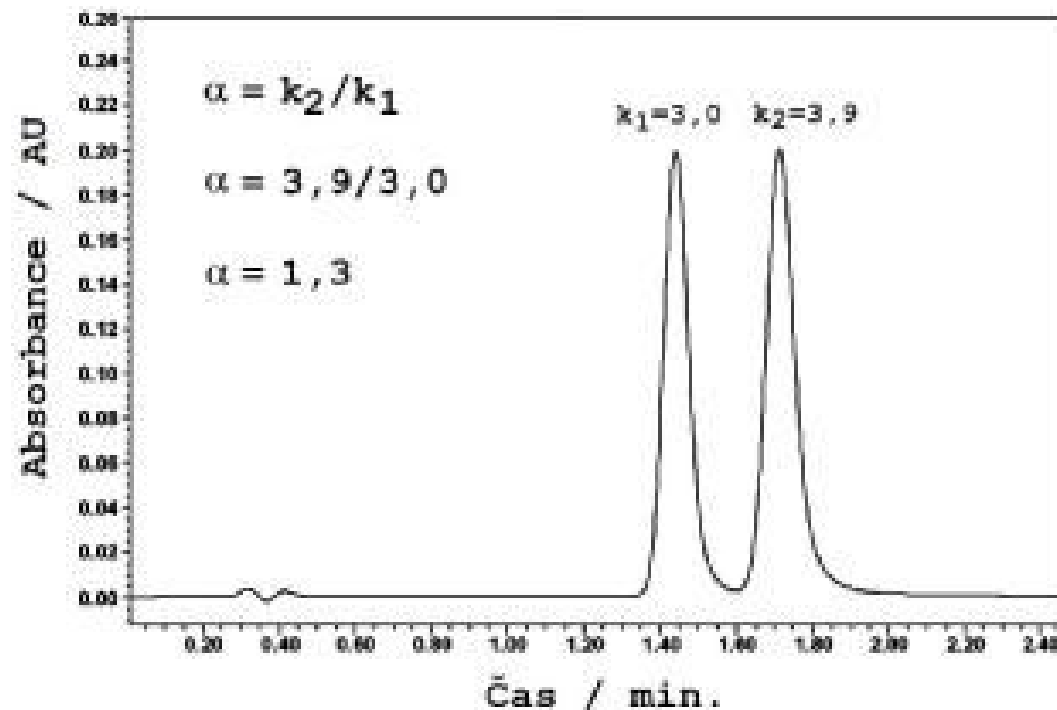
Eluční čas $t_R = t_M (1 + k)$

Retenční faktor $k' = t'_R / t_M = n_S / n_M$



Selektivita

Separační faktor



$$\alpha = k_2 / k_1 = K_{D,2} / K_{D,1}$$

Separační faktor (selektivita) α

– parametr charakterizující vzájemnou retenci dvou látek



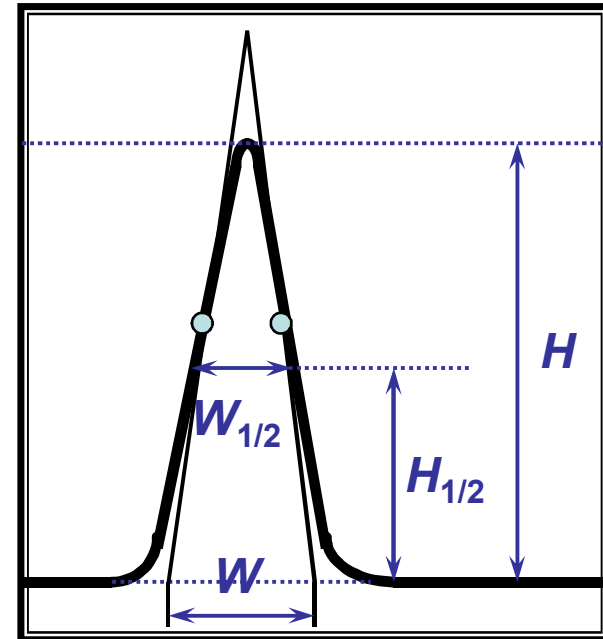
Účinnost separace

Počet teoretických pater :

$$n = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 = 5,545 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$$

W - šířka píku při základně

$W_{1/2}$ - šířka píku v polovině výšky



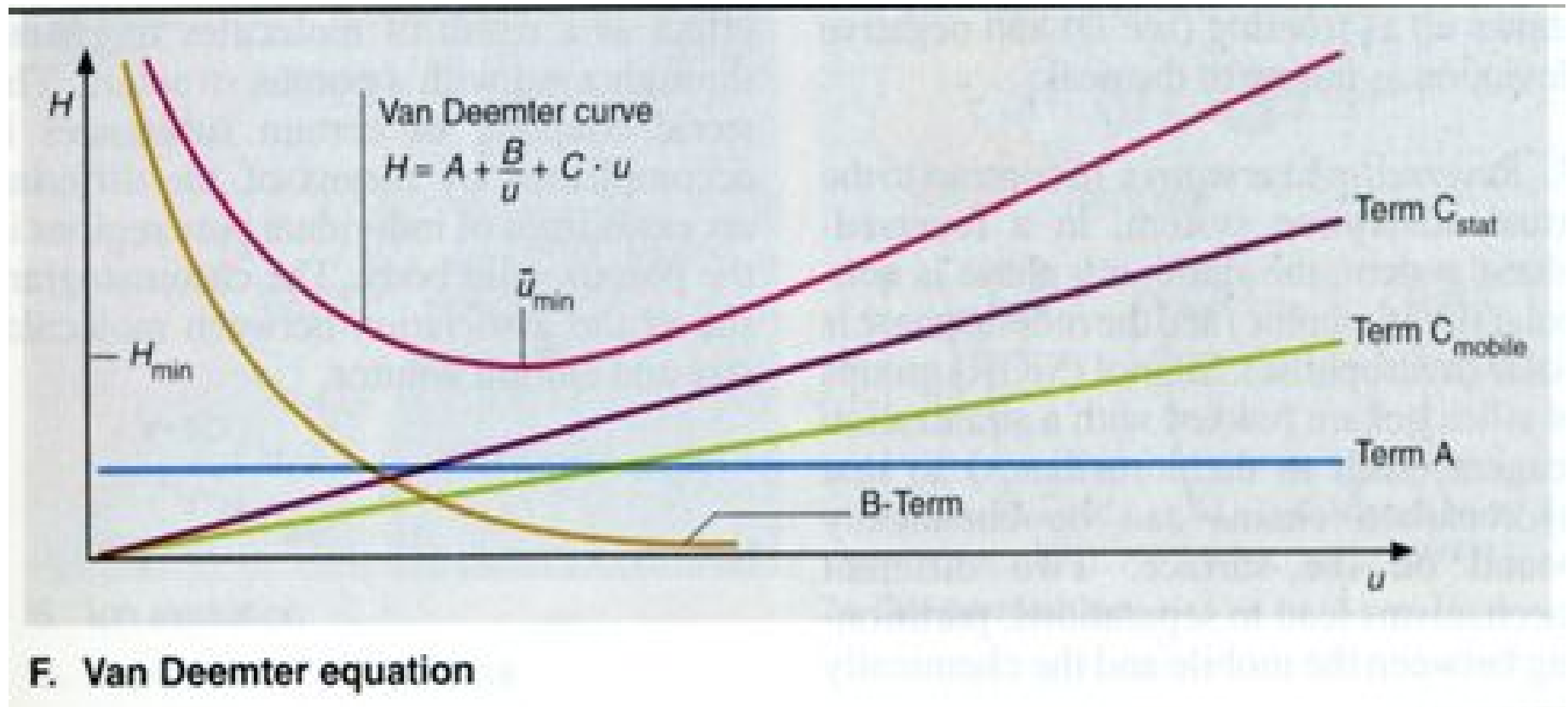
Výškový ekvivalent teoretického patra:

$$\downarrow H = L / n \uparrow$$



van Deemterova rovnice

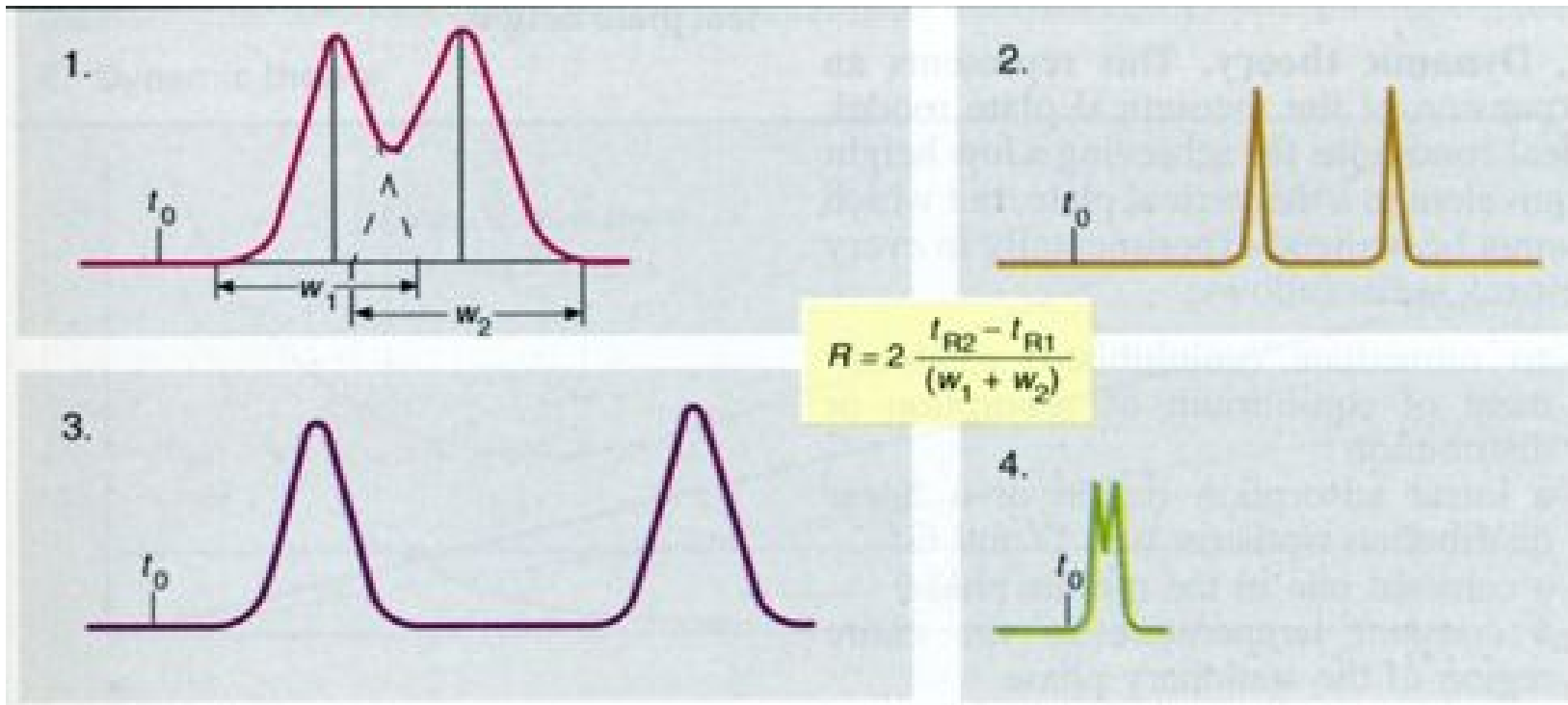
$$H = H_A + H_B + H_C = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$



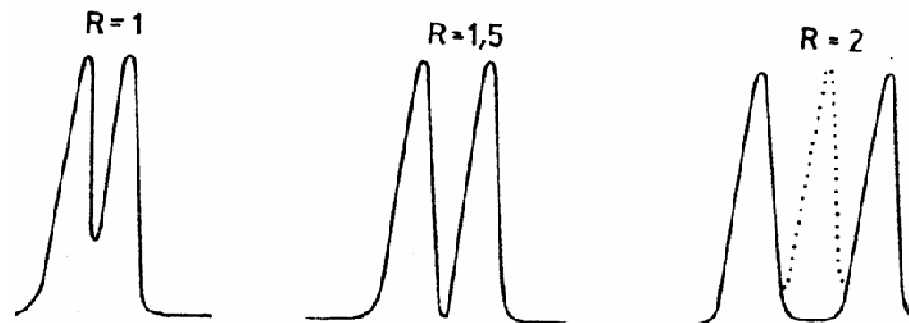
A - vířivá difuze, B - podélná difuze v PF, C - odpor proti přenosu hmoty mezi fázemi



Rozlišení



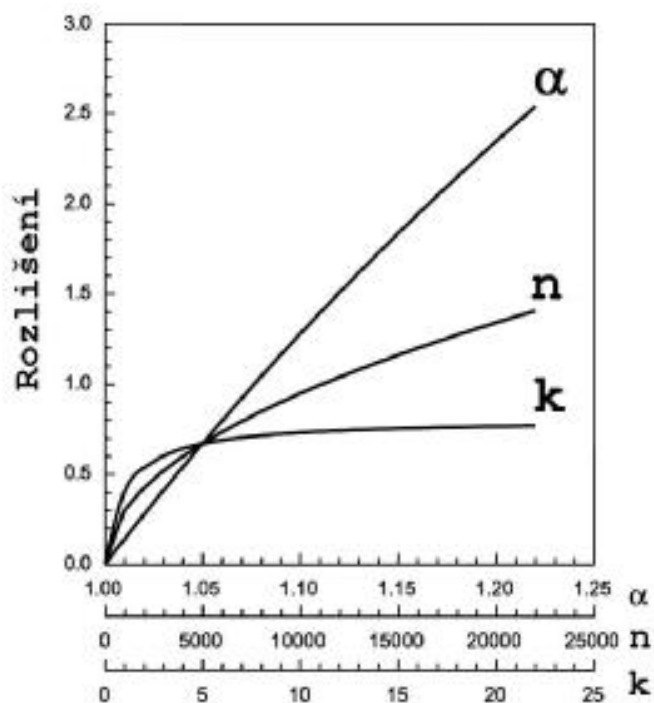
Rozlišovací faktor $R_S = \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{0,5 \cdot (w_1 + w_2)}$





$$R_s = \frac{\sqrt{n}}{4} \times \frac{a-1}{a} \times \frac{k}{1+k}$$

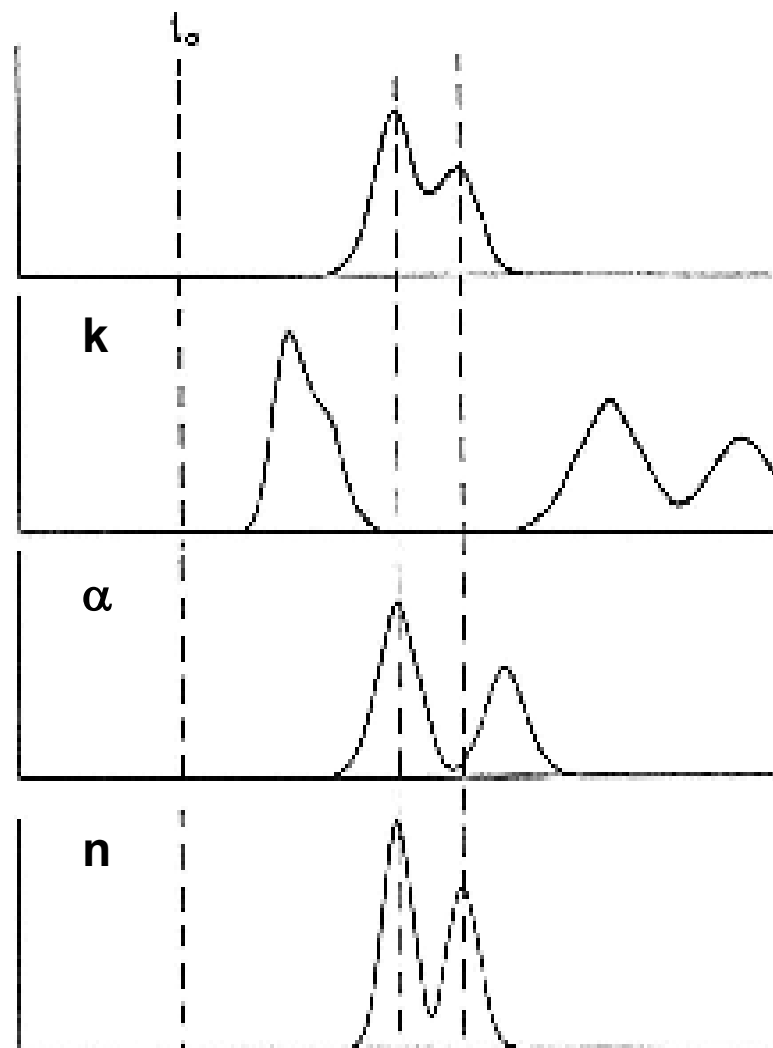
účinnost selektivita retence



Ovlivnění účinnosti

Délka kolony, velikost částic, průtok MF.

Rozlišení



Ovlivnění selektivity a retence

Volba mobilní resp. stacionární fáze, teplota.

Hmotnostní spektrometrie

- vysoce přesná a citlivá analytická metoda poskytující z ng-pg množství látky dobře reprodukovatelné strukturní informace, které svojí kvalitou a kvantitou předčí informace získané ostatními metodami strukturní analýzy
- destrukční metoda
- separační technika, nikoli spektrální – neměří se rozdíl energií mezi dvěma stavy molekuly ani nesleduje pravděpodobnost přechodu - formální podobnost získaných záznamů (hmotnostních spekter) s jinými spektry (UV, IR, NMR) a podobné využití (strukturní informace)

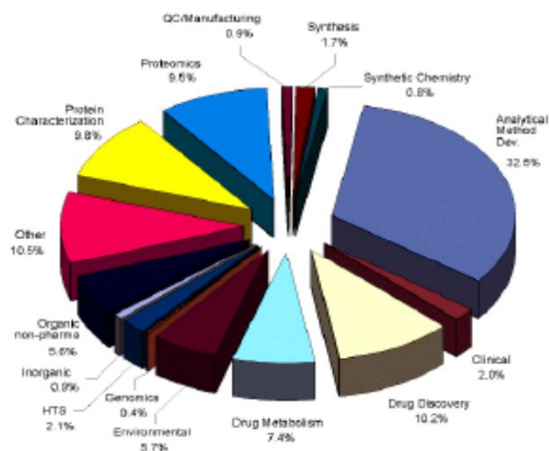
Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometr – zařízení se schopností rozdělit plynné ionty podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z)

Hlavní funkce hmotnostního spektrometru:

- 1) **ionizace** - generování iontů ze sledovaných atomů a molekul
- 2) **separace** – separovat/rozlišit tyto ionty dle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z)
- 3) **detekce** - měření zastoupení jednotlivých druhů rozdělených iontů

Mass Spectrometry Moves across the Disciplines



*Medicine, Life Sciences &
Food Chemistry (2000)*

*Biology and Pharmaceutical
Science (1990)*

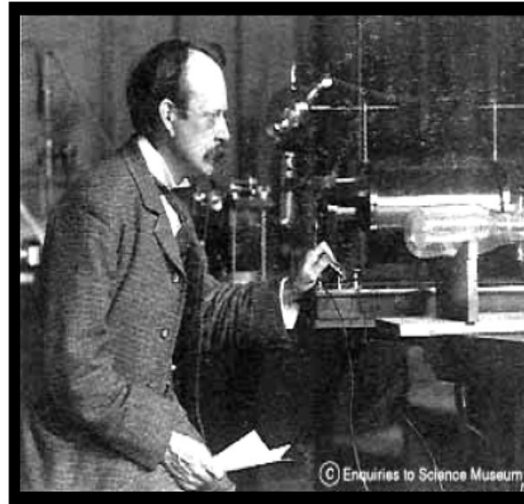
**Earth & Atmospheric Sciences and
Material Science (1955)**

Chemistry (1945)

Physics (1910)

Historie

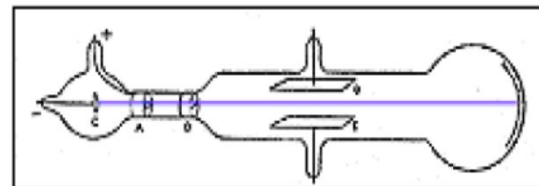
- 1912-1913 – J.J.Thomson – hmotnostní spektra O_2 , N_2 , CO , CO_2 a $COCl_2$,
- objevil izotopy ^{20}Ne a ^{22}Ne (Nobelova cena 1906)
považovaný za zakladatele hmotnostní spektrometrie
- 1924 – J. J. Thomson, F. W. Aston – charakteristika izotopického zastoupení asi 50 prvků



Joseph John Thomson (1856-1940), the father of mass spectrometry, was an english physicist at Cambridge University. He performed the first important experiments that led to an understanding of the atom composition. By using the "first mass spectrometer", i.e., partially evacuated tubes called "cathode-ray tubes", he measured the deflection of a beam of electrons (produced by electrical discharges) in a magnetic field, thus determining the mass-to-charge (m/z) ratio of an electron.

Joseph John ThoMSON
1897

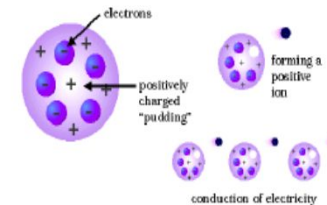
MarcoS



Discovery of the electron and the measurement of its m/z !!



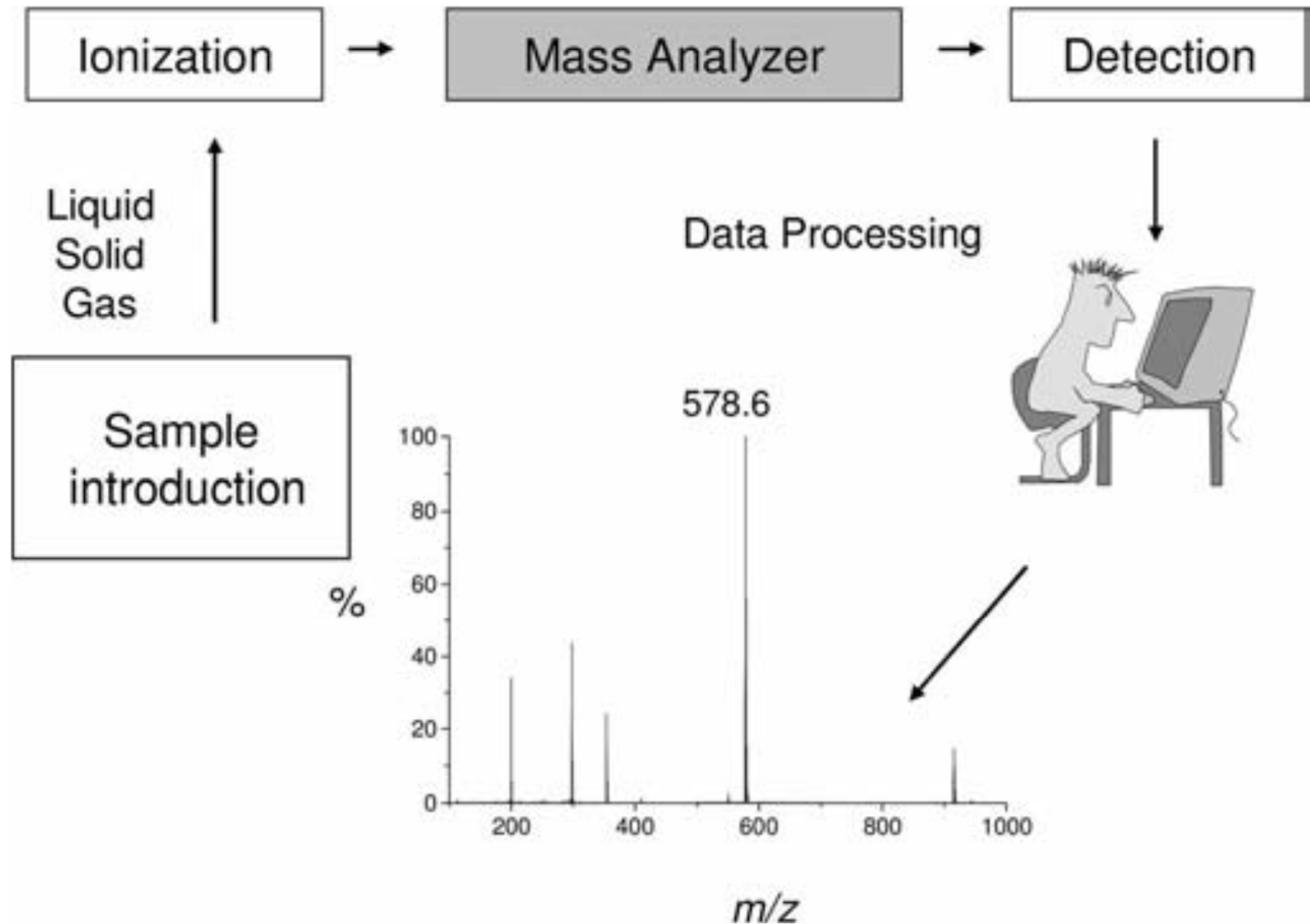
Nobel Prize in Physics 1906



First Atomic Model !

- 1930 - C.Berry – elektronová ionizace (Electron ionization, EI)
- 1948 - A.E.Cameron – objev měření doby letu iontů (TOF)
- 1953 - W.Paul a H.S.Steinwedel – kvadrupólový analyzátor a iontová past
- 1957 – Holmes, Morrell – první pokus o spojení GC-MS
- 1966 – M.S.B.Munson, F.H.Field – objev chemické ionizace (první měkká ionizační technika)
- 1973 – Baldwin, McLafferty – pokus o spojení HPLC-MS
- 1976 – McFadden – „Moving belt“ pro spojení HPLC-MS
- 1980 – H.L.Vestal – termosprej (TSI)
- 1982 – Henion, Thomson, Dawson – chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)
- 1984 – M. Yamashita, J.B.Fenn – ionizace elektrosprejem (J.B.Fenn za ESI Nobelova cena 2002)
- 1985 – M.Karas, F.H.Hillenkamp – objev MALDI
- 1999 – Makarov, Orbitrap

Hmotnostní spektrometr - schéma

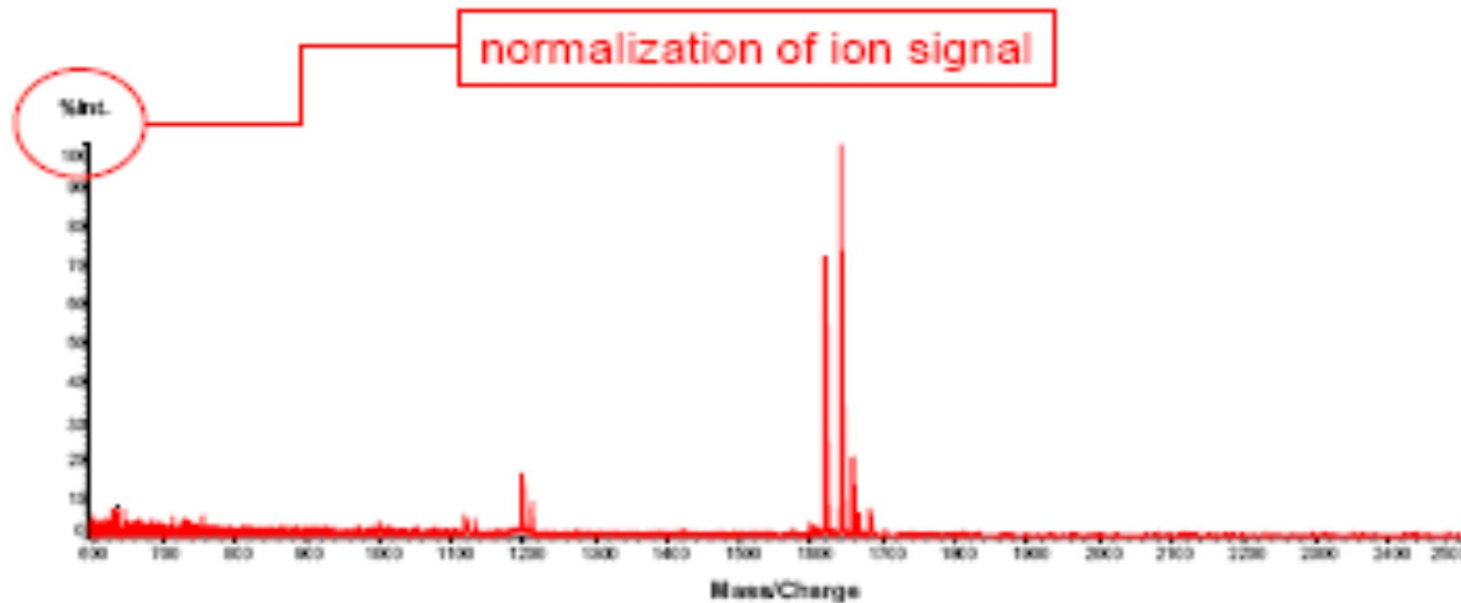


1. Zařízení na vkládání vzorku do přístroje
2. Iontový zdroj – slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice
různé konstrukce podle použité ionizační techniky
3. Hmotnostní analyzátor – slouží na rozdělení iontů, které vznikly v iontovém zdroji podle poměru hmotnosti a náboje (m/z)
4. Detektor – slouží k detekci iontů po jejich separaci a k určení jejich relativní intenzity
5. Zpracování signálů z detektoru, jejich přenos do počítače a umožnění jejich dalšího zpracování

- Další části hmotnostního spektrometru:
 - Vakuový systém
 - Iontová optika sloužící na urychlení a fokusaci iontů
 - Počítač na ovládaní a ladění přístroje, na sběr a ukládání dat, vyhodnocování spekter a porovnávání s knihovnami spekter

Hmotnostní spektrum

- **iontový signál vs. m/z**
- **iontový signál** - charge, current, often converted to voltage, arbitrary units
signal normalization: intensity of the dominant peak = 100%



Ionizační techniky

- neexistuje univerzální ionizační technika pro všechny látky
- existuje velká skupina ionizačních technik
- podle množství vnitřní energie pro ionizaci ionizační techniky dělíme na "tvrdé" a "měkké,"
ESI<MALDI<TSI<FAB/FIB<APCI<CI<EI
- Ionizace probíhá za atmosférického, resp. sníženého tlaku
- V současnosti největší praktický význam má skupina ionizačních technik pracujících za atmosférického tlaku (API):
 - ESI, APCI, APPI spojení HPLC/MS
 - ESI, MALDI - analýza biomolekul
 - EI - GC/MS, možnost porovnání s knihovnamí spekter, strukturní informace, jasně popsané pravidla fragmentace

Výběr ionizační techniky

1. Těkavost látky (analytu) (polarita)
2. Tepelná stabilita
3. Molekulová hmotnost
4. Polarita ionizace (platí pro měkké ionizační techniky)
 - kladné ionty – snadná protonizace (přítomnost heteroatomu)
 - záporné ionty – snadná deprotonizace (sulfonové a karboxylové kyseliny, a pod.)
5. Studium prostorového uspořádání molekul (např. biomolekuly) – ESI
6. Chemické individuum anebo směs – spojení s vhodnou separační technikou (GC/MS, HPLC/MS, CE/MS, ...)

Hmotnostní analyzátoři

- úlohou hmotnostního analyzátoru je rozdělit ionty podle m/z
- je umístněný za iontovým zdrojem (molekuly již byly převedeny na ionty) a před detektorem (před detekcí musíme ionty rozdělit podle m/z)
- dělení iontů v analyzátoru probíhá za vysokého vakua (ca. 10^{-3} - 10^{-11} Pa, podle typu hmotnostního analyzátoru) -



Hmotnostní analyzátory

- Podle způsobu dělení iontů:
 - **skenovací** - postupně mění skenovanou veličinu (U, V, B) a propouští ionty o určité m/z (kvadrupólový analyzátor)
 - **iontové pasti** - zadržují ionty pomocí napětí na elektrodách a následně je analyzují (iontová past, orbitální past)
 - **přeletové** – měří se čas iontů potřebný na překonání určité vzdálenosti (TOF)
 - **analyzátory pohyblivosti iontů** – dělení iontů podle jejich velikosti a tvaru

Hmotnostní analyzátory

- **Základní parametry hmotnostních analyzátorů:**
 - **rozlišovací schopnost** – schopnost analyzátoru poskytnout rozlišené signály pro ionty s podobným m/z
 - **správnost určení m/z** - míra schopnosti analyzátoru určit správnou hodnotu m/z
 - **hmotnostní rozsah** – rozsah m/z hodnot, v kterém analyzátor může zaznamenat spektra
 - **dynamický rozsah** - rozmezí koncentrací, v kterém je odezva (lineární) závislá na koncentraci
 - **rychlost** – rychlost záznamu spekter

Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS)

- byla vyvinuta na základě potřeby získání zvýšeného množství informací o povaze zkoumaných analytů, s cílem získání strukturních informací o analytech přítomných v komplexních matricích. Při použití měkkých ionizačních technik (např. ESI), pro které je charakteristická tvorba jen omezeného množství fragmentových iontů, ze získaného hmotnostního spektra je možné získat informaci o molekulové hmotnosti, ale jen omezené informace o struktuře analytů.
- MS/MS se uskutečňuje použitím dvou (případně více) hmotnostních analyzátorů stejného typu. První hmotnostní analyzátor se využívá na selekci iontů s určitým poměrem m/z , které jsou přivedeny do tzv. disociační oblasti, kde jsou vystavené srážkám s neutrálními atomy anebo molekulami plynů, dochází k excitaci iontů a jejich monomolekulárnímu rozpadu.

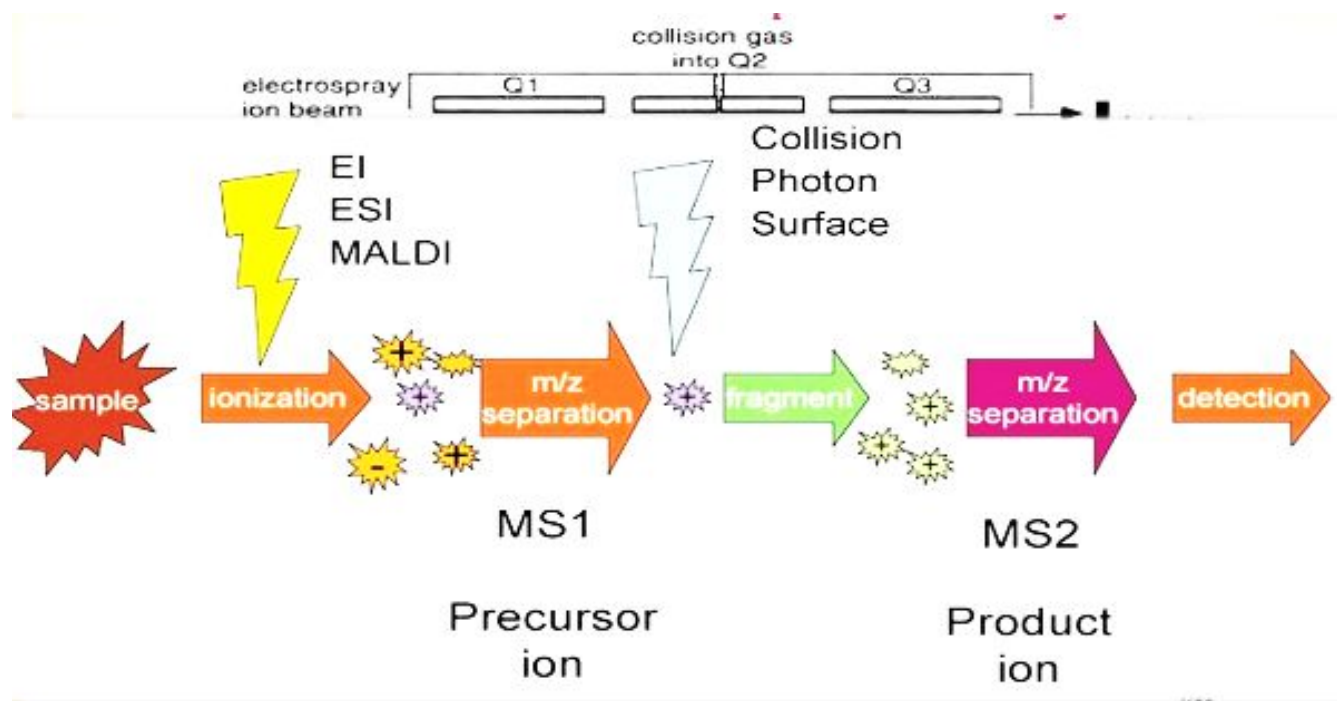
Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS)

- Získané fragmenty iontů jsou následně separovány v druhém hmotnostním analyzátoru (MS₂).
- Počet kroků může být zvýšený v principu až na MSⁿ experimentů v závislosti na intenzitě vzniklých fragmentových iontů.
- Tandemová hmotnostní spektrometrie se může uskutečňovat principiálně dvěma způsoby:
 - 1) v prostoru** – využitím přístrojů umožňujících přelet iontů (přeletové přístroje),
 - 2) v čase** – využitím přístrojů zachytávajících ionty (IT).

Nejpoužívanějším hmotnostním analyzátozem pro MS/MS je trojitý kvadrupól (QQQ), při kterém se jednotlivé stupně MS analýzy vykonávají v rozdílných hmotnostních analyzátozech.

MS/MS, MSⁿ

- Oblast mezi dvěma hmotnostními analyzátory je využita na uskutečnění **kolizně indukované disociace (CID)** - vybraný ion podrobíme kolizní aktivaci (nejčastěji srážkám s inertním plynem, tzv. kolizní plyn), čím může dojít k rozpadu tohoto iontu na fragmentové ionty, kterých hmot. spektrum změříme



Kombinace separačních technik a MS

Proč spojujeme separační techniky a MS?

- můžeme v jedné analýze současně separovat a identifikovat komplexní směs látek, využíváme výhody obou technik
- alternativní způsob založený na izolaci látek po jejich chromatografické/elektroforetické separaci a následném změření hmotnostních spekter pro jednotlivé látky off-line technikou je pracný, časově náročný a pro složité směsi látek anebo látky přítomné na stopové koncentrační úrovni ve směsi nemusí být vůbec uskutečnitelný

Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC/MS)

- 1957 Holmes a Morrell popsali poprvé spojení GC/MS, 1967 první komerční GC/MS přístroj
- Minulost: v spojení GC/MS s náplňovými kolonami s vyššími průtoky nosního plynu se používali různé separátory (odstranění nadbytku nosního plynu před vstupem do iontového zdroje a analyzátoru)
- Současnost: rutinní metoda využívající kapilární kolony
- Nosný plyn s analytem je zaveden přímo do iontového zdroje, kde vakuový systém odstraní nadbytečný nosný plyn, kapilára je před vstupem do iontového zdroje vyhřívána, aby nedošlo ke kondenzaci analytů při přechodu do vakua
- Standardně používané iontové zdroje jsou elektronová ionizace, EI (umožňuje přímé softwarové porovnání naměřených spekter s knihovnamí spekter) anebo chemická ionizace (CI)
- Hmotnostní analyzátory: Q, IT, TOF, QqQ

Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC/MS)

- Identifikace a kvantifikace těkavých látek ve složitých směsích
- Určení molekulové hmotnosti a prvkového složení látek v uvedených směsích
- Strukturní analýza látek v uvedených směsích
- Analýza polutantů v pitných a odpadních vodách
- Analýza léčiv a jejich metabolitů v tělních tekutinách (krev, moč) pro farmakologické i forenzní aplikace
- Potřebné množství - běžně 1 až 100 pg na složku

Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (LC/MS)

- **Baldwin, McLafferty, 1973** poprvé popsali spojení HPLC/MS, 1977 zkonstruovaný první komerční LC/MS přístroj
- technicky podstatně složitější spojení než GC/MS - místo 1 ml/min nosného plynu (GC/MS) musíme před vstupem do hmotnostního analyzátoru odstranit 1 ml/min kapaliny (HPLC/MS).
- při API ionizačních technikách (ESI, APCI, APPI) se mobilní fáze přímo účastní ionizačního procesu
- spektra není možné jednoduše porovnávat s knihovnami, protože spektra se výrazně liší podle použité ionizační techniky, pracovních podmínek a typu přístroje
- výjimkou v tvorbě knihoven jsou specifické případy (např. skupiny zakázaných drog, pesticidů, atd.),
- použití HPLC umožňuje separaci látek přítomných v směsi a tedy i identifikaci stopových nečistot, izomerů, atd.

Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (LC/MS)

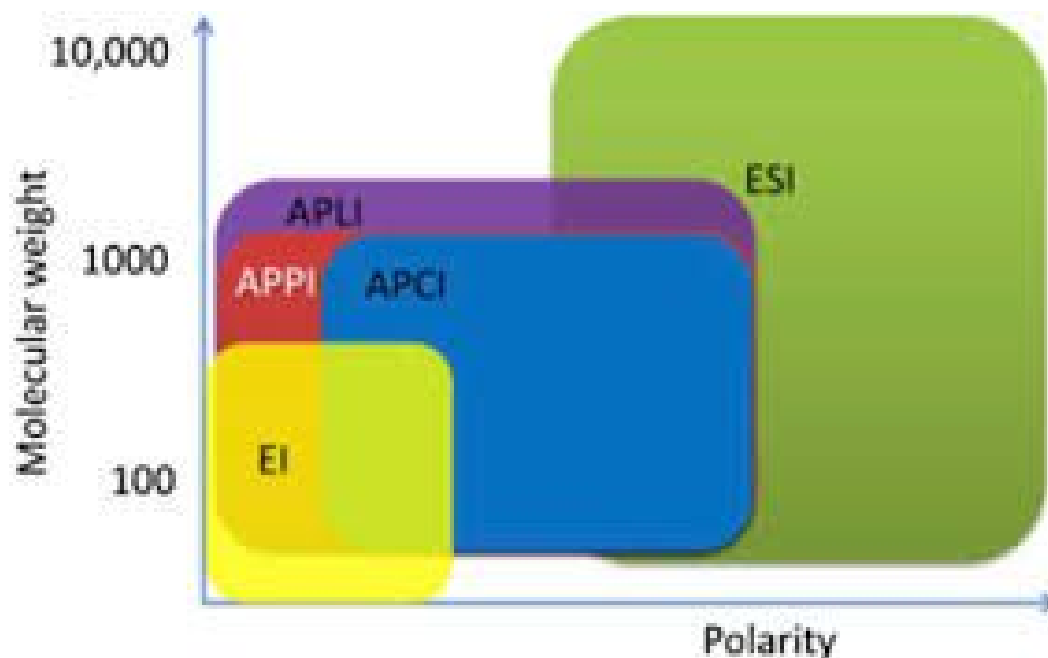
- ESI, APCI standardně používané pro spojení HPLC/MS

Analyzované látky:

APPI – nepolární sloučeniny

APCI - „běžné“ organické sloučeniny (středně polární)

ESI - iontové organické sloučeniny, biopolymery, atd.



Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (LC/MS)

Mobilní fáze:

- vždy nejvyšší čistota rozpouštědel a aditiv
- odvzdušnění, filtrace

ESI - polárnější rozpouštědla - voda, metanol, acetonitril

APCI, APPI - podpora přenosu protonu v plynné fázi, polární až nepolární - voda, metanol, acetonitril, 2-propanol, aceton, chloroform, toluen, hexan

aditiva v mobilních fázích:

- obsah a charakter aditiv je kritický parametr pro ionizaci analytu
- přednost mají těkavá činidla v nízkých koncentracích - kyselina mravenčí, octová, amoniak (0,05 – 1%), octan anebo mravenčan amonný (5 – 10 mmol/l),
- nevhodné jsou netěkavé látky, anorganické kyseliny (fosforečná, sírová), alkalické hydroxidy, anorganické tlumivé roztoky (např. fosfátový).