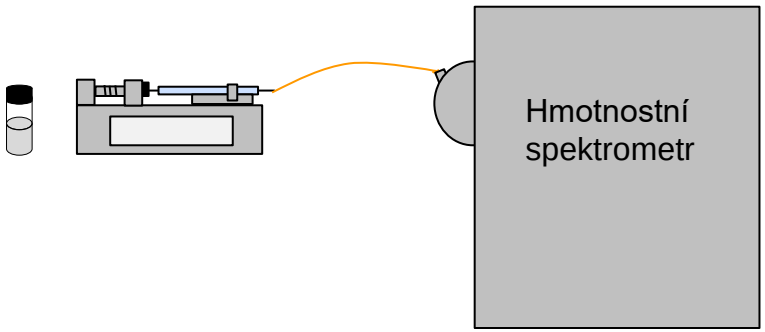
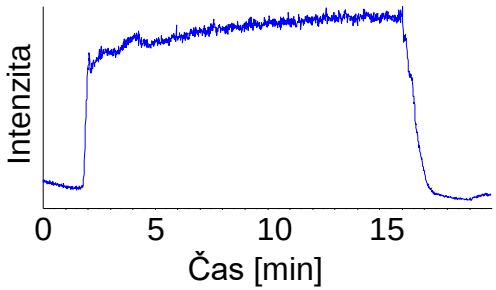
Spojení hmotnostní spektrometrie a separačních technik

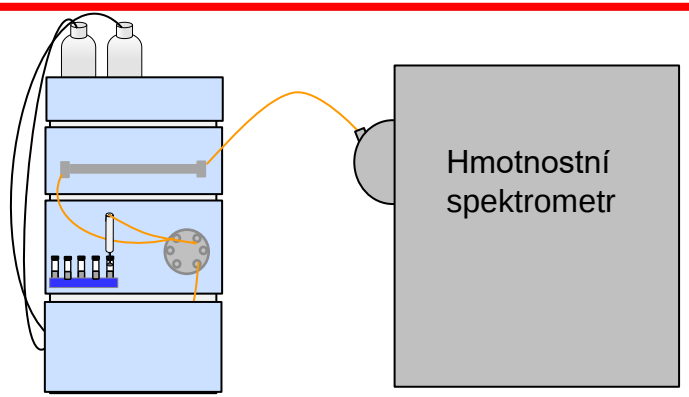
Zavedení vzorku do iontového zdroje

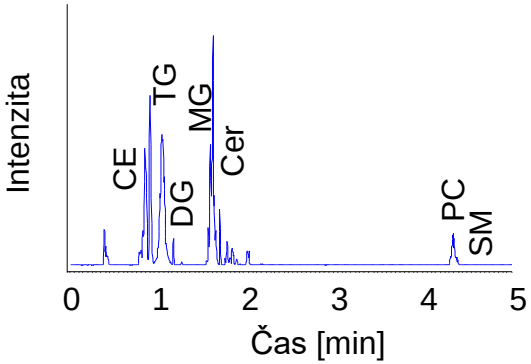
Infuzní pumpa, dávkováni z injekční stříkačky



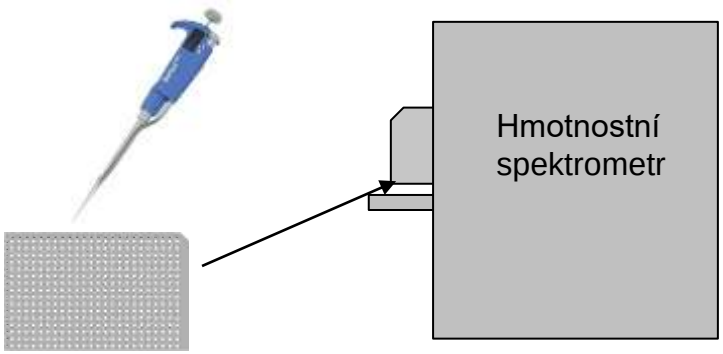


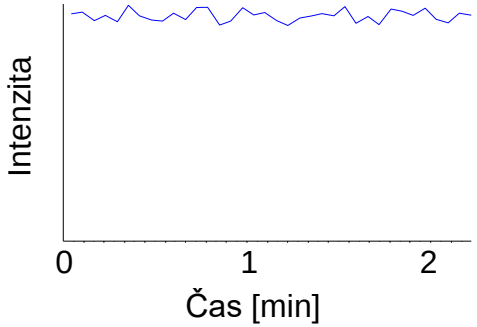
Předřazená separační technika (LC, GC, SFC,..) Dávkování z autosampleru, nebo přes manuální dávkovací ventil





MALDI – zaschnutý vzorek umístěn přímo do stroje





V každém bodě časového záznamu lze zobrazit hmotnostní spektrum

Spojení hmotnostní spektrometrie a separačních technik

Proč spojení?

- můžeme v jedné analýze zároveň separovat, identifikovat a kvantifikovat složitou směs látek (m/z prekurzorů a MS/MS spektra), kombinace výhod obou technik

→ alternativní způsob je izolace látek po jejich chromatografické separaci a následné změření hmotnostních spekter pro jednotlivé látky off-line technikou (pracné, časově náročné a pro složité směsi látek nebo látky ve stopové koncentraci ve směsi nemusí být vůbec proveditelné)

- analyzované látky jsou neseny v toku plynu (GC, průtok u kapilárních kolon asi 1 ml/min) nebo kapaliny (HPLC, asi 1 ml/min nebo méně), které jsou v obrovském nadbytku a musí být odstraněny před vstupem do vakuové části přístroje, v současnosti již rutinní použití

Volba podmínek?

- Často nutný kompromis při optimalizaci podmínek separace a hmotnostního spektrometru (např. u LC/MS určité pH nebo aditiva zlepšují účinnost separace, ale dochází k potlačení tvorby iontů při ionizaci)
- Mobilní fáze a veškerá aditiva musí být kompatibilní s hmotnostním spektrometrem

Vhodnost ionizace a typy analytu pro separační techniky

Separační technika	Vhodný Iontový zdroj	Nejčastější typ analytu
GC/MS	EI, CI, APCI	těkavé termostabilní látky, spíše nepolární
LC/MS	ESI, APCI, APPI	většina analytů – záleží na ionizační technice
CZE/MS	ESI	biopolymery, iontové sloučeniny
SFC/MS	ESI, APCI, APPI	spíše nepolární až středně polární látky
TLC (offline)	MALDI, ambientní techniky, lze i na	různé – spíše separace tříd, přečišťování

- Analyzátory mohou být voleny libovolně podle potřeby – velmi důležitý parametr v případě rychlých separací je skenovací rychlost (záznam alespoň 10 bodů na pík) – nejvyšší u TOF (QqTOF).
- Magnetický sektorový analyzátor je kombinován zejména s technikami pracujícími za vakua EI (CI) – nízká skenovací rychlost (speciální aplikace – analýza dioxinu, PCB).

GC/MS

Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC/MS)

- **1957** první spojení **GC/MS** (Holmes, Morrell), 1967 první komerční GC/MS
- v minulosti se pro spojení GC/MS s náplňovými kolonami s vyššími průtoky nosného plynu používaly různé separátory, jejichž cílem bylo odstranění nadbytku nosného plynu před vstupem do iontového zdroje a analyzátoru
- v současnosti zcela rutinní metoda, téměř výhradně se používá ve spojení s kapilárními kolonami (průtok ca. 1 ml/min)
- nosný plyn s analytem se zavádí přímo do iontového zdroje ve vakuu, kde vakuový systém odstraní přebytečný nosný plyn
- kapilára je před vstupem do iontového zdroje vyhřívána, aby nedocházelo ke kondenzaci analytů při přechodu do vakua
- iontové zdroje: EI nebo CI, (APCI)
- použití EI umožňuje přímé softwarové porovnání naměřených spekter s knihovnami spekter v počítači (stovky tisíc spekter)
- hmotnostní analyzátory: Q, IT, TOF, QqQ, (magnetický sektorový analyzátor – speciální aplikace)

Rozdíl mechanismu ionizace oproti „klasické“ EI

- nosný plyn v GC/MS je nejčastěji helium, protože lze snadno odčerpat vakuovými pumpami, je inertní a také se aktivně účastní ionizačního mechanismu

  1/ He je ionizováno urychlenými elektrony:

  $$He + e^- \rightarrow He^{+\cdot} + 2e^-$$

  a vzniklé ionty potom ionizují analyt přenosem náboje („Charge transfer“)

  $$He^{+\cdot} + M \rightarrow M^{+\cdot} + He$$

  2/ anebo může dojít k vybuzení helia do excitovaného stavu:

  $He + e^- \rightarrow He^* + e^-$ (hvězdička označuje excitovaný stav)

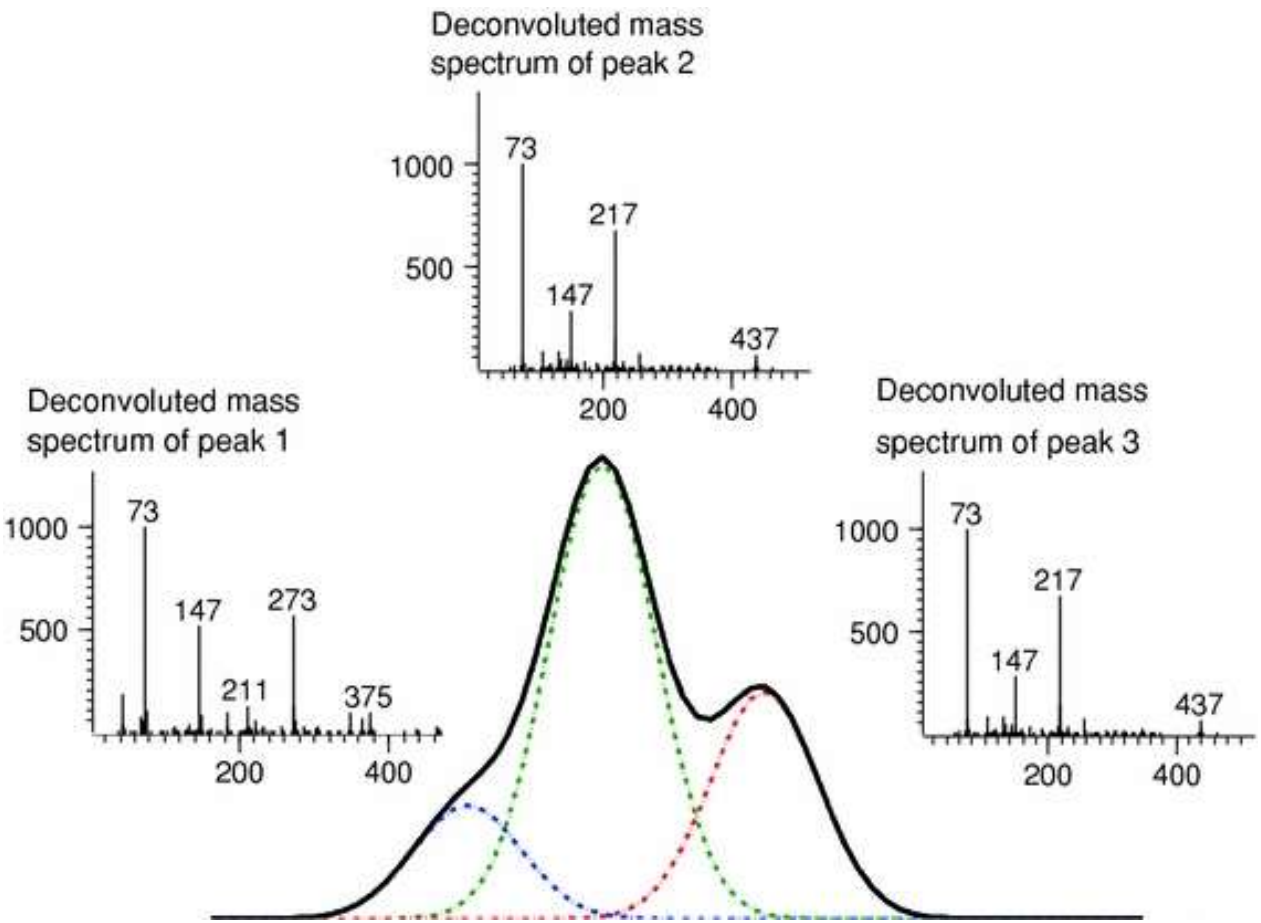
  a následné Penningově ionizaci (na tomto mechanismu je založen DART)

  $$He^* + M \rightarrow He + M^{+\cdot} + e^-$$

- dalšími alternativami nosného plynu jsou H_2 (reaktivní plyn- může dojít k degradaci sloučenin) a N_2 (nelze použít vysoké průtoky, pokles citlivosti, prodloužení doby analýzy)

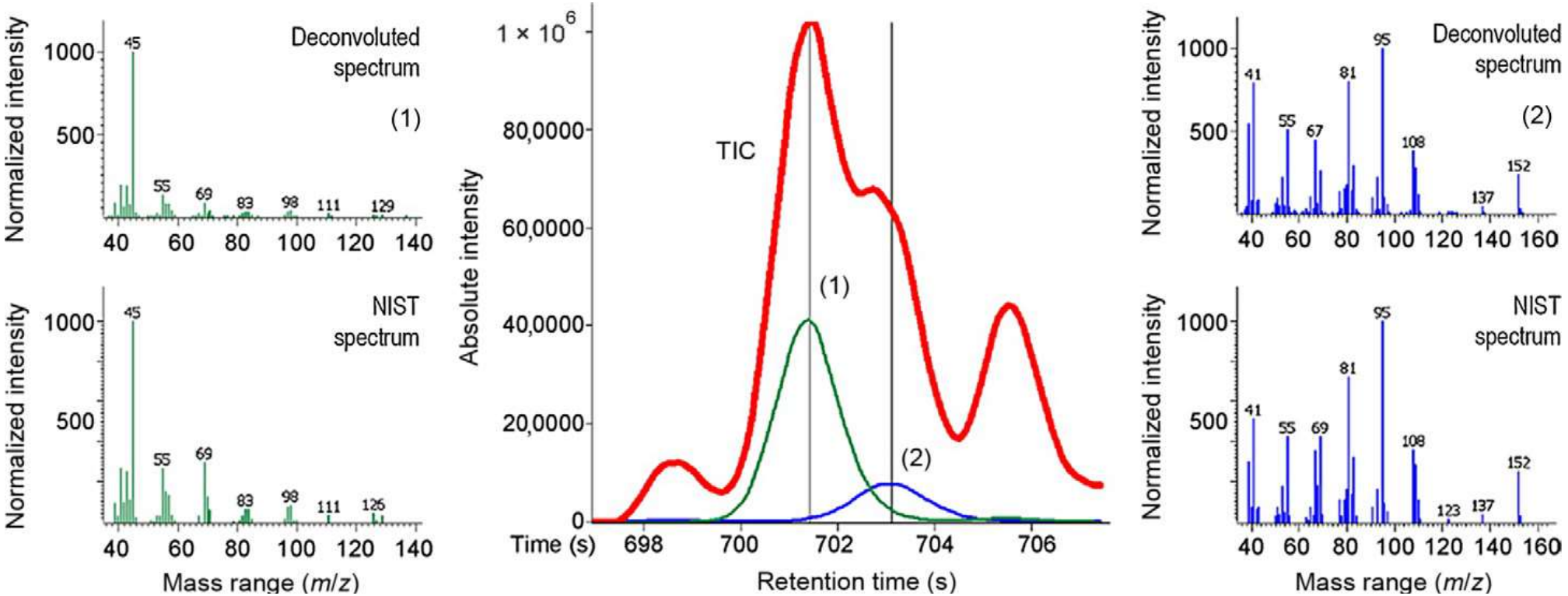
Procesování dat při GC/MS - dekonvoluce

- při rychlých separacích je často problém koeluce píků
- s využitím speciální matematické operace, dekonvoluce, je možné určit, které hodnoty m/z přísluší danému píku a tím tedy pro jednotlivé rekonstruované píky vygenerovat příslušná „přečištěná“ hmotnostní spektra (součástí komerčních softwarů)



Maud M. Koek a kol., *Metabolomics* 7 (2011) 307–328.

Procesování dat při GC/MS – dekonvoluce a následné porovnání spekter s NIST knihovnou

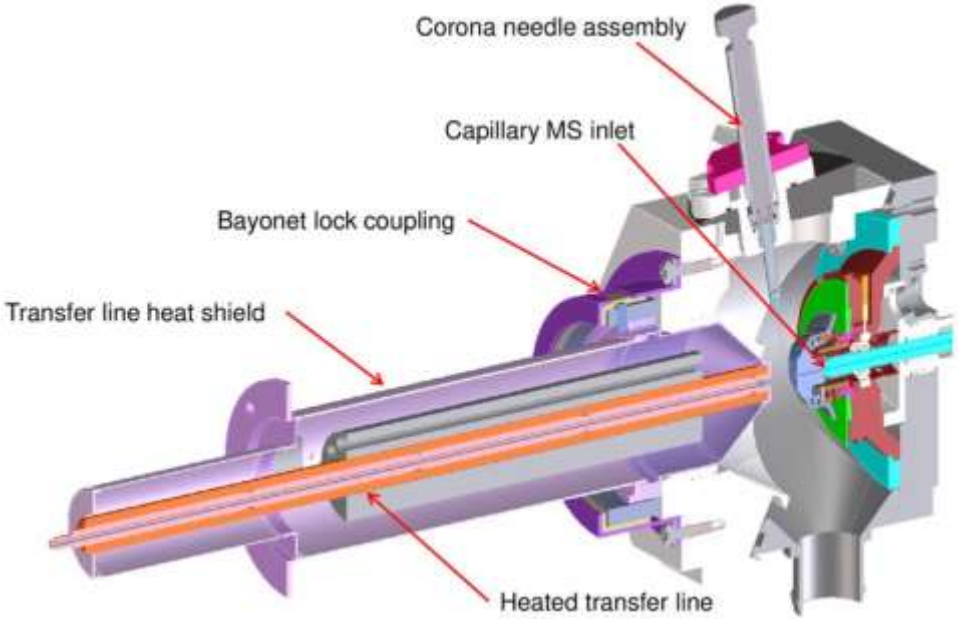


Nonan-2-ol

1,7,7- trimethylnorbornan-2-on (kafr),

T. Čajka, Comprehensive Analytical Chemistry 61 (2013) 271-302.

GC/APCI-MS



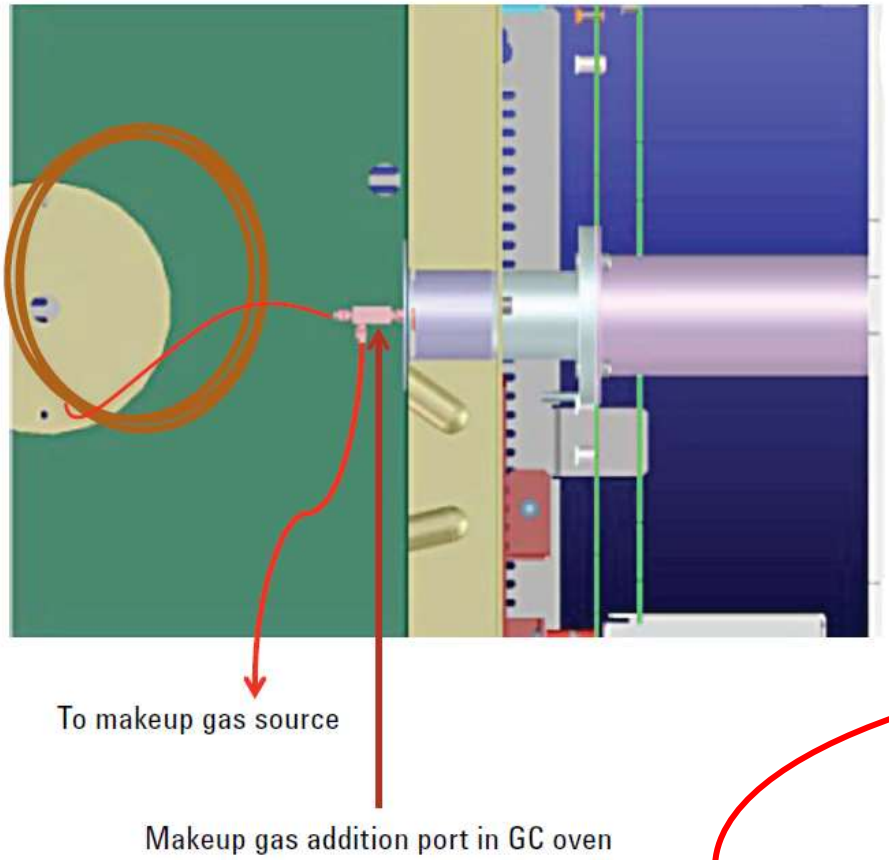
https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/5990-7544en_lo%20CMS.pdf

- Měkká ionizační technika – méně fragmentace než EI – Snížená fragmentace může zajistit vyšší citlivost, MS/MS pro více informací
- Atmosférický tlak na vstupu z GC a vstupu do MS, umožňuje vyšší průtoky plynů (velmi rychlé analýzy), kombinace s různými analyzátory QqQ, QTOF, ICR-MS (petroleomika - ropný průmysl))
- Pro efektivní ionizaci použití make-up plynů (N_2, CO_2, N_2O).
- Lze jednoduše vyměnit ionizační sondu a provádět LC/MS.

GC/APCI-MS

http://www.waters.com/waters/en_US/Waters-Atmospheric-Pressure-Gas-Chromatography-%28APGC%29/nav.htm?cid=10100362&locale=en_US

GC/APCI-MS (N_2 jako make-up)



$$N_2 + e^- \rightarrow N_2^{+\bullet} + 2e$$ (IE = 15.58 eV)

$$N_2^{+\bullet} + 2N_2 \rightarrow N_4^{+\bullet} + N_2$$

$$N_4^{+\bullet} + H_2O \rightarrow H_2O^{+\bullet} + 2N_2$$ (výměna náboje, IE_{voda} = 12.62 eV)

$$H_2O^{+\bullet} + H_2O \rightarrow H_3O^+ + OH^\bullet$$ (přenos protonu)

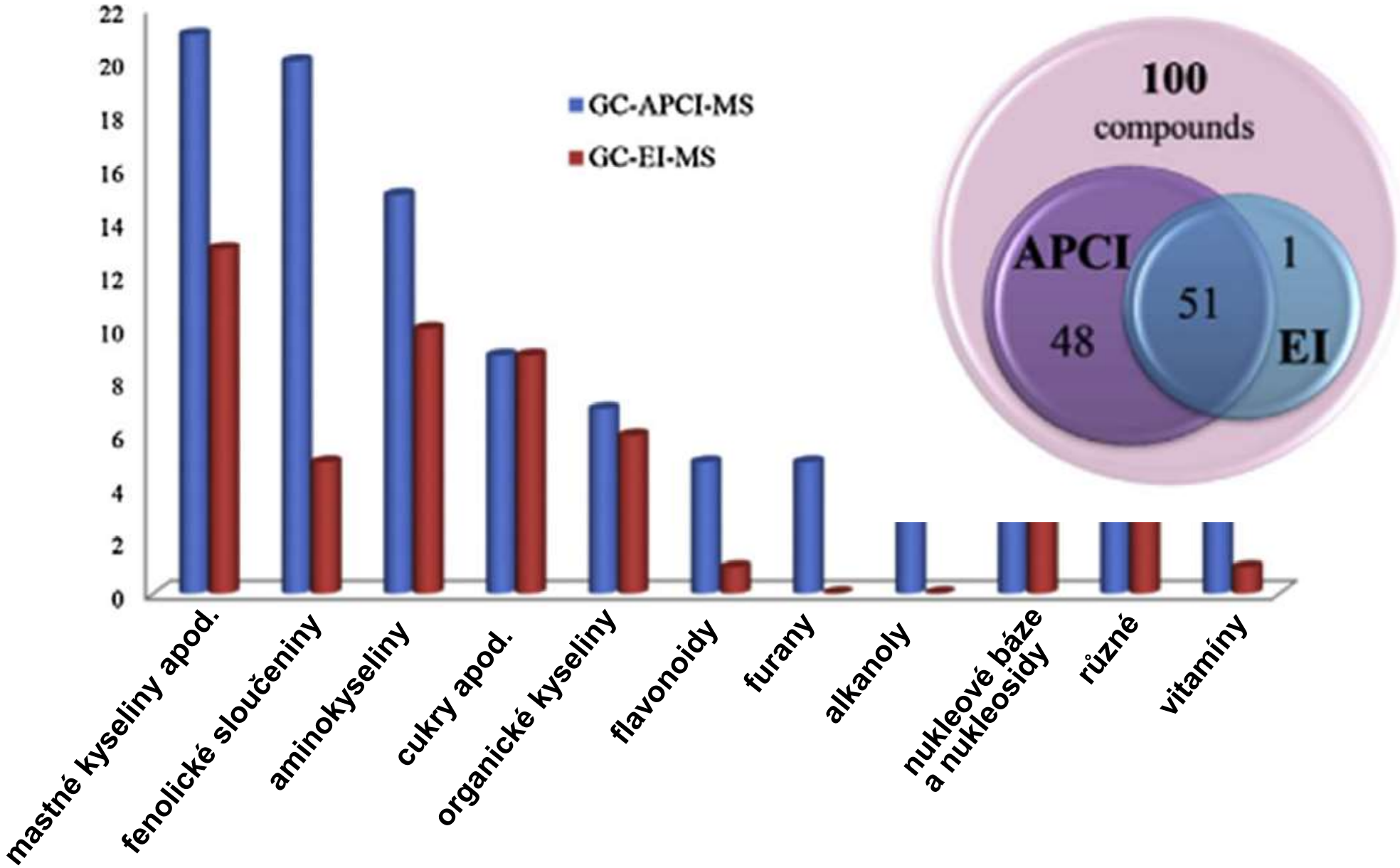
$$H_3O^+ + nH_2O \rightarrow H_3O^+(H_2O)_n$$ (vznik aduktů)

$$N_4^{+\bullet} + M \rightarrow M^{+\bullet} + 2N_2$$ **(výměna náboje)**

$$H_3O^+(H_2O)_{n-1} + M \rightarrow [M+H]^+ + nH_2O$$

(přenos protonu)

GC/EI-MS versus GC/APCI-MS



D. X. Li a kol., *Analytica Chimica Acta* 891 (2015) 43-61.

GC/APCI-MS

Trends in Analytical Chemistry 132 (2020) 116053

Contents lists available at ScienceDirect

Trends in Analytical Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/trac

Atmospheric pressure chemical ionization source as an advantageous technique for gas chromatography-tandem mass spectrometry

Yumin Niu [a], Jingfu Liu [b], Runhui Yang [c], Jing Zhang [a], Bing Shao [a,*]

[a] Beijing Key Laboratory of Diagnostic and Traceability Technologies for Food Poisoning, Beijing Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100013, China

[b] State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

[c] College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China

ARTICLE INFO

Article history:
Available online 24 September 2020

Keywords:
GC-APCI-MS
Key parameters
Current trends
Applications

ABSTRACT

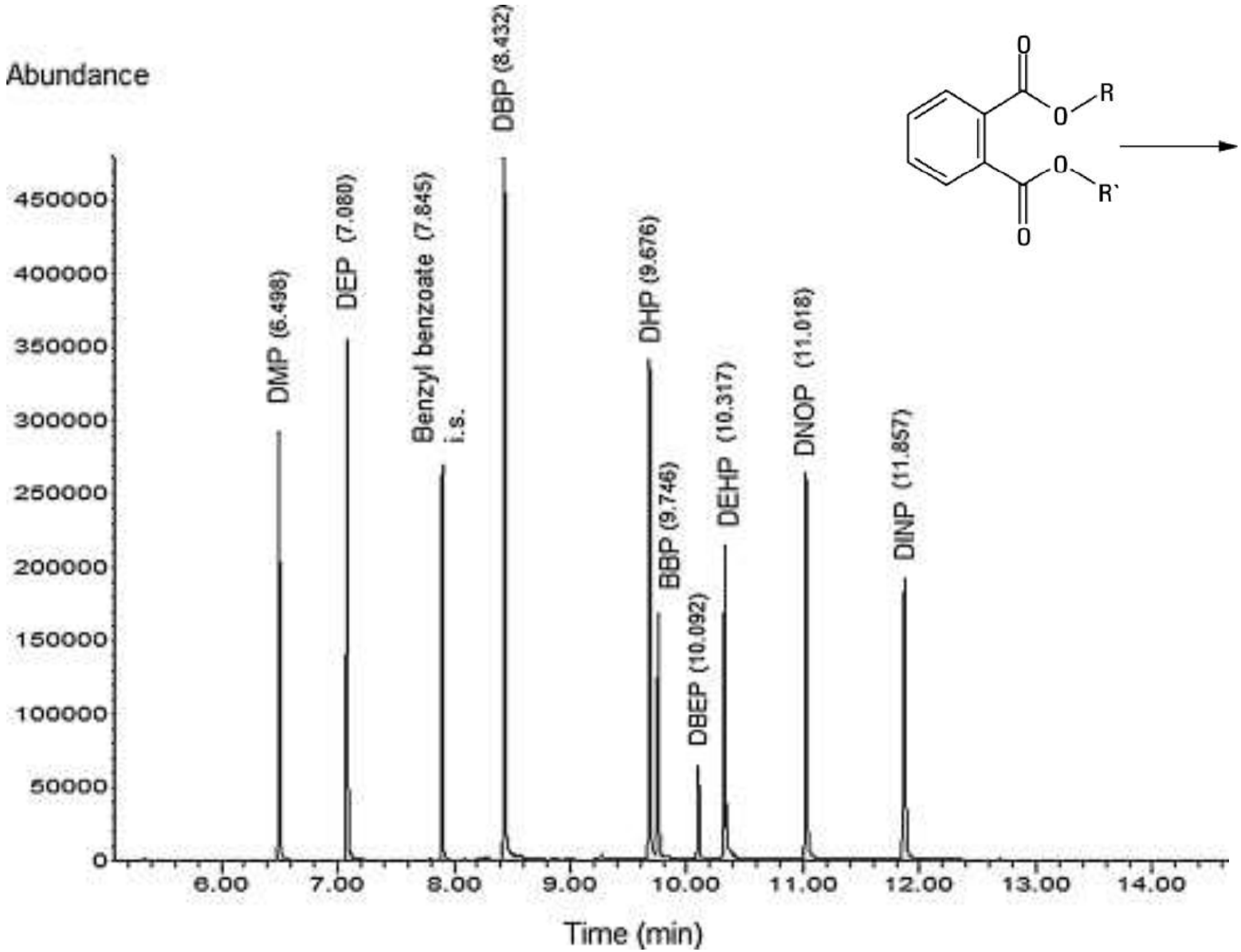
Atmospheric pressure chemical ionization (APCI) has been commercially implemented in gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) instruments within the past decade and is becoming an important complementary tool to traditional GC-electron impact (EI) ionization-MS and liquid chromatography MS (LC-MS) for quantitative and nontarget screening purposes. APCI is a soft ionization technique, so more molecular ions and/or protonated molecules are present than when the traditional EI source is implemented, improving the sensitivity and selectivity of analytical methods. Moreover, this state-of-the-art apparatus facilitates the identification of chemicals not contained in commercial libraries. In this review, parameters inside and outside the APCI source could influence the sensitivity of the analysis are discussed. Trends towards improvement of APCI source and combination with multidimensionality further improve the quantitative and qualitative analysis of GC-MS. Finally, the applications of GC-APCI-MS, especially in nontarget studies are addressed.

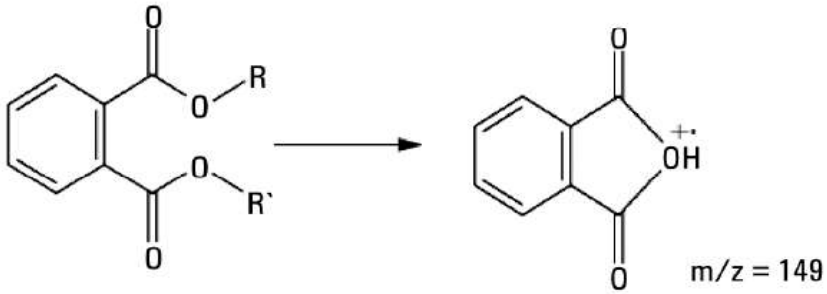
© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Cílené analýzy - využití SIM módu

- **SIM** (selected ion monitoring) – záznam pouze vybraného iontu (víme, co chceme analyzovat).
- Výrazné zvýšení citlivosti – až 100x a zjednodušení interpretace spekter
- Zásadní kritéria v případě měření SIM:
  - m/z by neměla být moc nízká – nízké hodnoty m/z nejsou příliš reprezentativní - jsou běžné pro mnoho sloučenin
  - vybraný ion by měl být strukturně reprezentativní – molekulární ion, nebo jeho přímý fragment
  - vybraný ion by se neměl shodovat s ionty přítomnými v pozadí (m/z 17, 18, 28, 32, 40, 43, 44), ionty v důsledku krvácení kolony (např., m/z 73, 147, 207, 281, 355), termální degradace septa, nebo přítomných plastifikátorů (nejběžnější - m/z 149).
- Někdy se využívá i pro záznam homologické série sloučenin (např. fragmenty o m/z 57, 71, 85 - typické pro n-parafíny; m/z 74 pro methyl estery mastných kyselin; m/z 91, 105 – alkylbenzeny; m/z 149, 167 pro ftaláty).

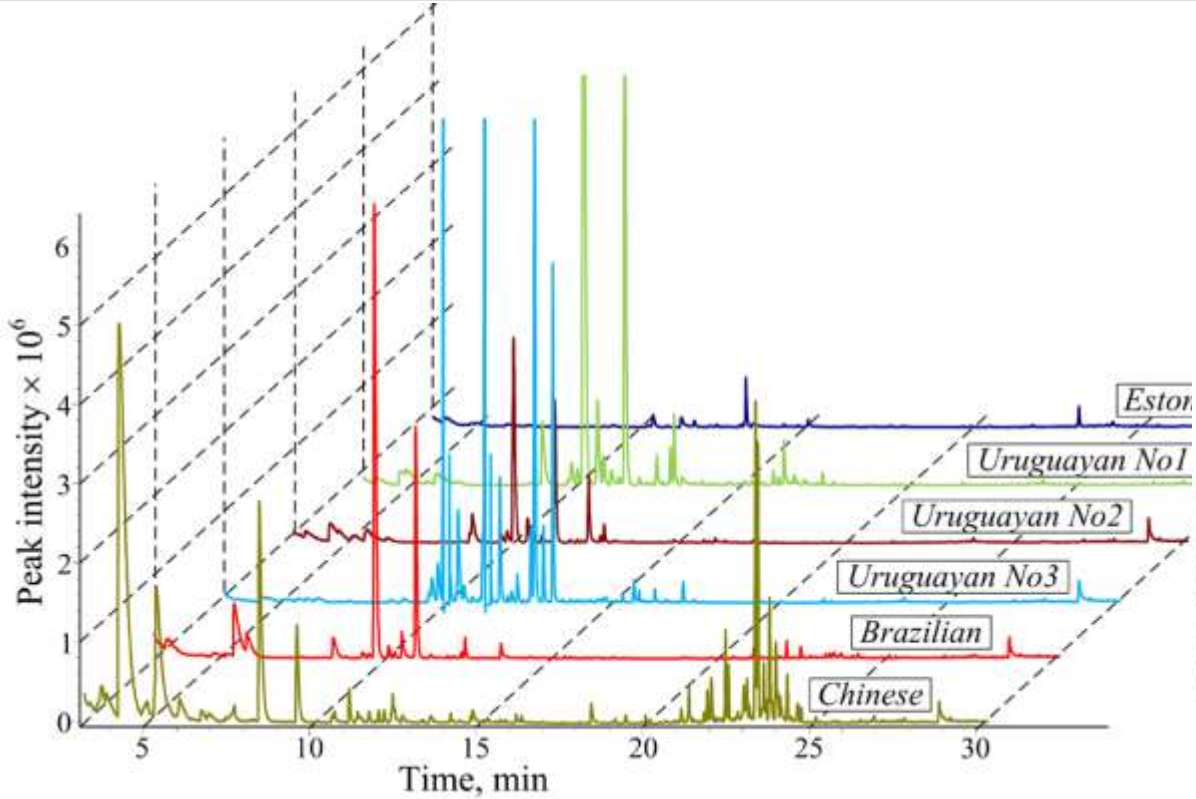
GC/MS - Cílené analýzy - využití SIM módu

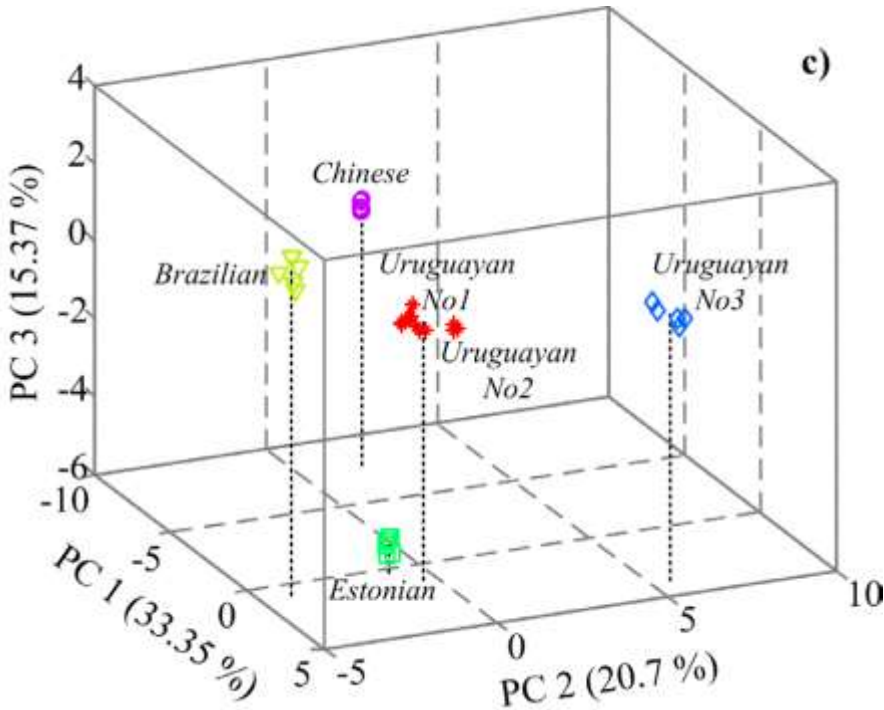




P.Otero, J. Chromatogr. B 997 (2015) 229-235.

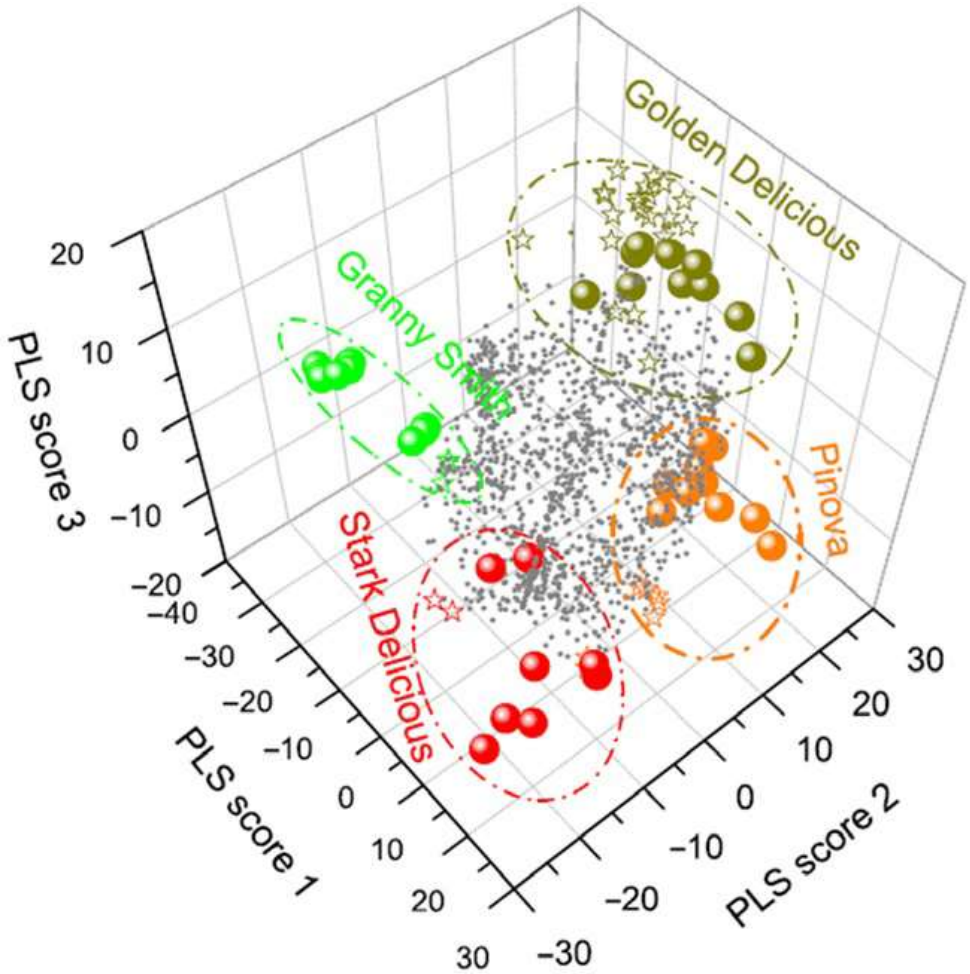
GC/MS profilování pro určení geografického původu propolisu (charakteristický „otisk“)





V.Kaškonieneé, Cent. Eur. J. Chem. 12 (2014) 736-746.

GC/MS profilování - charakteristický „otisk“ přítomných sloučenin



PLS-DA graf znázorňující klástrování vzorků podle odrůdy jablek (SPME-GC-HR-TOF-MS analýza těkavých látek). Jednotlivé proměnné (m/z s charakteristických retenčním časem jsou zobrazeny šedě, hvězdičkou označeny ty významné, které nejvíce přispívají k rozdělení

T. Čajka, Comprehensive Analytical Chemistry 61 (2013) 271-302.

(U)HPLC/MS

Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS)

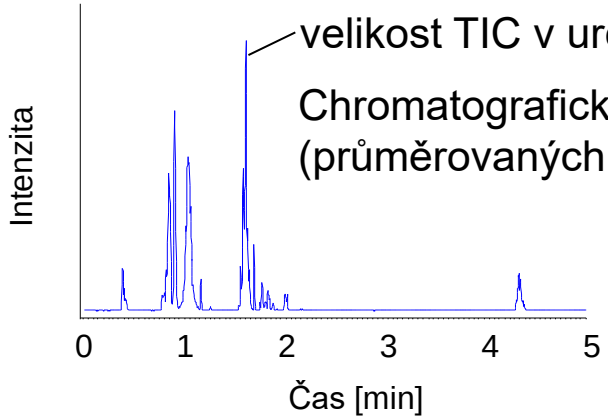
- **1973** první spojení **HPLC/MS** (Baldwin, McLafferty), 1977 první komerční LC/MS
- Pokud bychom chtěli spojit s EI - technicky mnohem náročnější ve srovnání s GC/MS
  - místo 1 ml/min nosného plynu (pro GC/MS) musíme před vstupem do hmotnostního analyzátoru odstranit 1 ml/min kapaliny (pro HPLC/MS)
  - př. 18 ml vody (1 mol) = 22.4 l plynu (1 mol plynu, zaujímá za normálních podmínek objem 22,4 litru), tzn. 1 ml vody je po odpaření 1.2 l plynu
- u ionizačních technik pracujících za atmosférického tlaku (ESI, APCI, APPI) se mobilní fáze přímo účastní ionizačního procesu, dnes už je spojení LC/MS rutinní záležitost
- knihovny pro HPLC/MS spektra jsou řádově menší než pro GC/MS, spektra se výrazně liší podle použité ionizační techniky, pracovních podmínek i typu přístroje (platí kromě EI) - spektra je velmi často nutné interpretovat manuálně (zkušenosti operátora, porovnání s analogickými typy látek či literaturou)
- Knihovny nejsou tak rozsáhlé jako u EI - výjimkou v tvorbě knihoven jsou specifické případy proteomických knihoven, laboratorní knihovny pro omezený rozsah látek (např. skupiny zakázaných drog, pesticidů či podobně definovaná skupina známých cílových analytů), většinou se jedná o knihovny MS/MS spekter (na rozdíl od MS spekter u GC/EI-MS), převoditelnost knihoven mezi různými typy hmotnostních analyzátorů může přinést problémy kvůli významným rozdílům (třeba porovnávat spektra získaná na podobném LC/MS systému)

HPLC/MS analýza

- Použití HPLC umožňuje separaci látek ve směsi a tím identifikaci stopových nečistot, izomerů, atd.

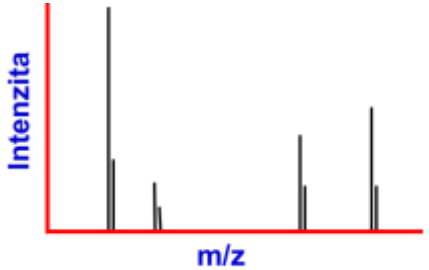
- Výsledek HPLC/MS analýzy je stejně jako u GC/MS záznam intenzity vybraných m/z v čase.

TICC



velikost TIC v určitém čase (jednom spektru/bodě)

Chromatografický pík by měl mít nejméně 8 bodů (průměrovaných spekter)



- Hmotnostní spektra eluátu z HPLC měřená s určitou frekvencí (rychlostí) – závisí na použitém analyzátoru (jeho skenovací rychlosti), šířce píku, kvalitě separace, požadavcích na analýzu (pH, aditiva, apod.), atd.

- Měření spekter v celém rozsahu m/z nebo jen v určitém intervalu (SIM) - ovlivňuje rychlost sběru spekter a citlivost.

- Po analýze máme možnost vyvolat spektrum v určitém čase, lze průměrovat spektra v určitém časovém intervalu (integrace píku), možnost vyvolat záznam intenzity signálu určité m/z v čase (rekonstruovaný iontový chromatogram), atd.

Způsoby záznamu (U)HPLC/MS analýzy

Celkový iontový proud
(Total Ion Current, TIC)
• součet intenzit všech měřených iontů ve spektru (včetně šumu)

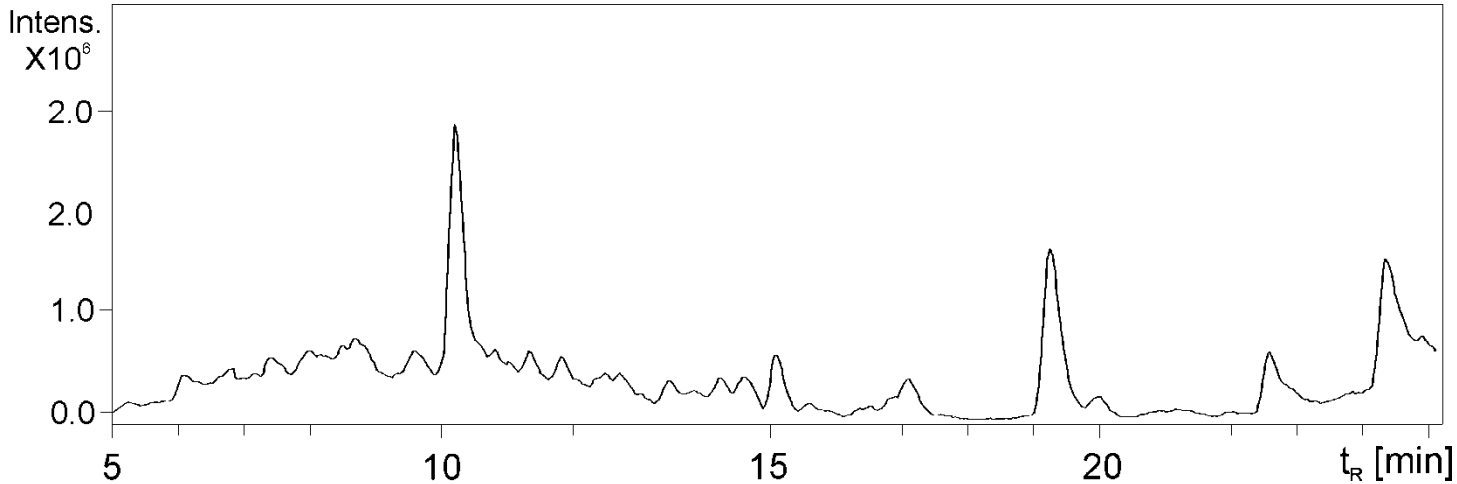
Chromatogram základního píku spektra (ze záznamu)
(Base Peak Chromatogram, BPC)
• záznam intenzity pouze základního píku spektra
• podobný TICu, ale není ovlivňován šumem nebo ionty s nízkou intenzitou

Rekonstruovaný (extrahovaný) iontový chromatogram (ze záznamu)
(Reconstructed/Extracted Ion Chromatogram, RIC/EIC)
• zpětně vyvolaný záznam intenzity jedné m/z v čase
• identifikace koeluce píků
• identifikace stopových koncentrací v šumu, atd.

Chomatogram vybranného iontu (SIM) – viz dříve (u QqQ lze dělat další selektivní skenování sken iontu prekurzoru, sken vybrané iontové reakce (SRM) nebo sken iontů neutrálních ztrát– viz. kvantitativní MS – příští hodina)

Extrakce konkrétního iontového proudu (m/z) z TICC

Chromatogram celkového iontového proudu (signál všech měřených m/z)



Rekonstruovaný (extrahovaný) iontový chromatogram (signál pouze konkrétní m/z)

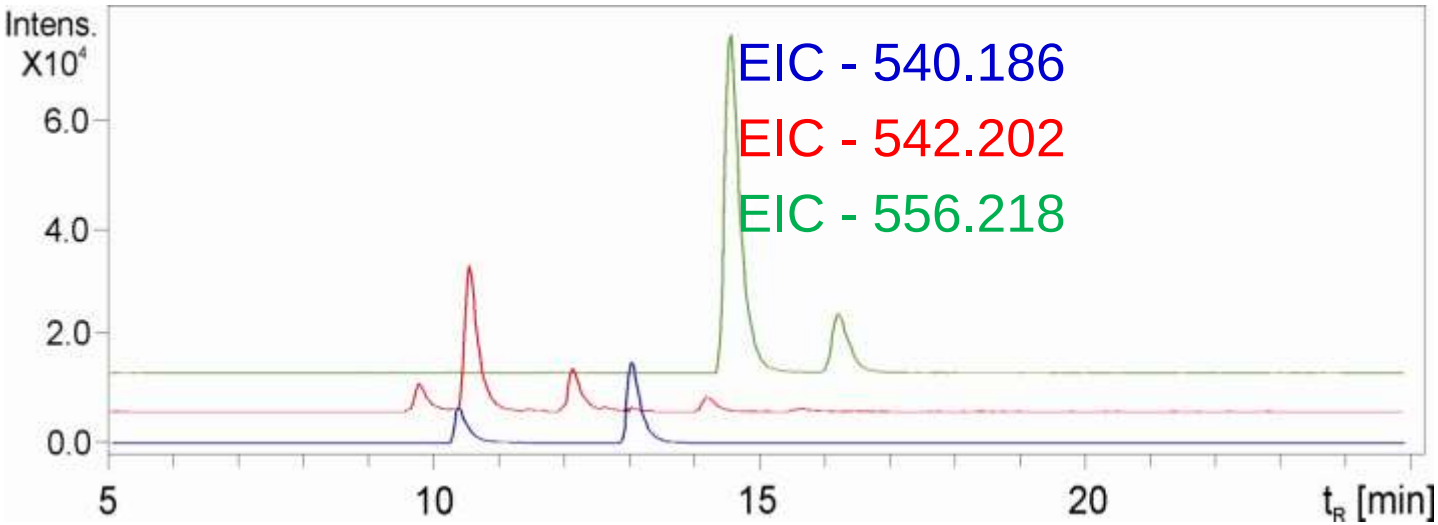
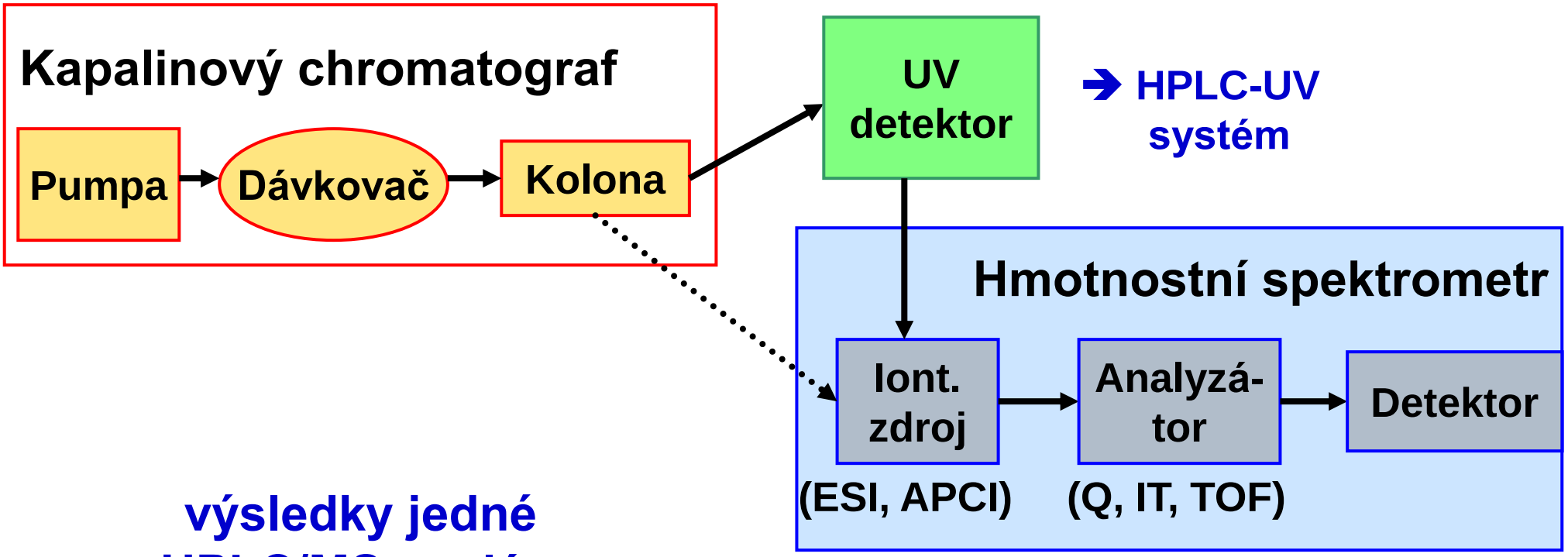


Schéma HPLC/MS systému



výsledky jedné HPLC/MS analýzy

a) UV chromatogram

b) TIC chromatogram

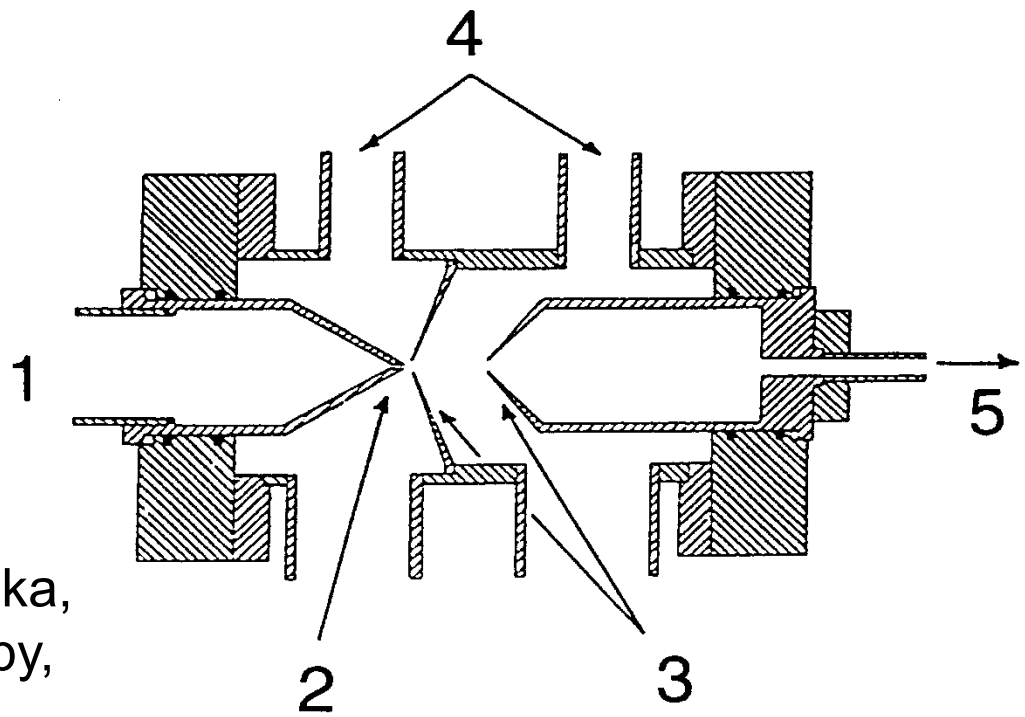
c) RIC chromatogramy

d) MS spektra všech píků

HPLC/MS/MS (analyzátory QqQ, QqTOF, LIT-Orbitrap apod.

HPLC/EI-MS - Spojení “Particle Beam” (PB)

- dvoustupňový tryskový separátor analogický k dříve používaných separátorům u GC/MS
- před vstupem do komory (č.1) je mobilní fáze (MF) s analytem zmlžena rozprášením s heliem, zúžením komory v trysku na konci dojde ke vzniku nadzvukového proudu helia, zmlžené MF a analytu, část separátoru je evakuovaná (č. 4), takže molekuly s nižší E_K (He + MF) jsou odtaženy vakuovými pumpami, molekuly s vyšší E_K (analyt) projdou separátorem do iontového zdroje
- dnes se používá pro spojení s EI (méně časté ve srovnání s API)
- nevýhody: ztráta analytu kvůli velké těkavosti a malé M_R (v separátoru) nebo příliš nízké těkavosti (neodpaří se v iont. zdroji), malá citlivost, absence mol. iontů
- výhody: struktura – EI (knihovny)



1. Odpařovací komora, 2. tryska,
3. separátor, 4. vakuové pumpy,
5. iontový zdroj

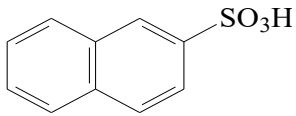
HPLC parametry (ne)ovlivňující MS spektra

- HPLC podmínky musí zaručovat dobrou separaci látek a zároveň nesmí negativně ovlivňovat ionizaci a tím citlivost detekce, většinou se hledá vhodný kompromis
- teplota separace - nemá vliv
- průtok mobilní fáze - nemá přímo vliv na kvalitu signálu, ale nutné změnit průtoky sušících a zmlžujících plynů, případně použít dělič toku
- složení **mobilní fáze** - zásadní vliv na kvalitu spekter (**musí dobře rozpouštět analyt a aditiva, snadno se zmlžovat, odpařovat, umožnovat ionizaci analytu, nesmí poskytovat intenzivní ionty pozadí a kontaminovat iontový zdroj**)
  - změna složení v čase - většinou ovlivnění ionizační účinnosti a tím intenzity signálu (proto u kvantity nutné interní standardy koelující s daným analytem)
  - obsah a složení aditiv – může dojít až k úplnému potlačení signálu, někdy naopak pro podporu ionizace (tvorba aduktů v ESI, např. výbušniny)
  - více vody v mobilní fázi – nutné zvednout teplotu a průtoky sušícího a zmlžujícího plynu – při ionizaci se nesmí tvořit kapičky na vstupu do MS
- typ sorbentu - kvalitní kolona nesmí ovlivňovat MS spektra
- parametry kolony (délka, šířka, velikost sorbentu) - ovlivňují pouze hodnotu průtoku mobilní fáze a tím průtoky sušících a zmlžujících plynů

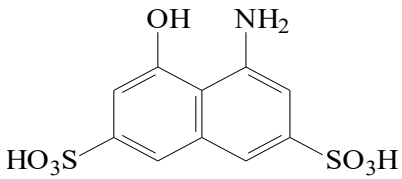
Vliv koncentrace aditiv na ESI odezvu

Testovací látky:

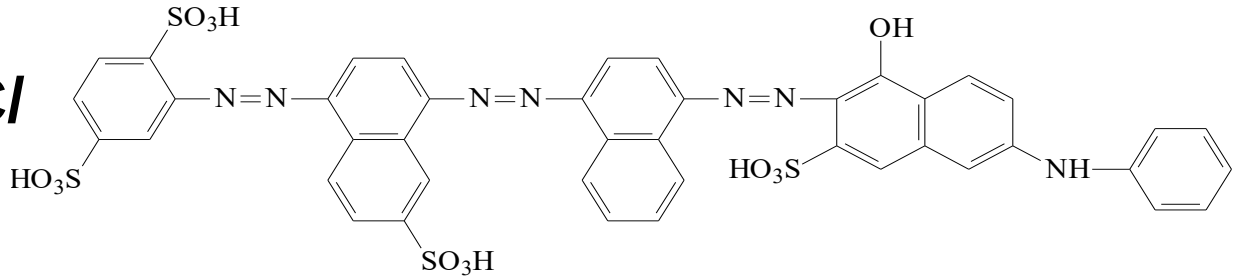
A/

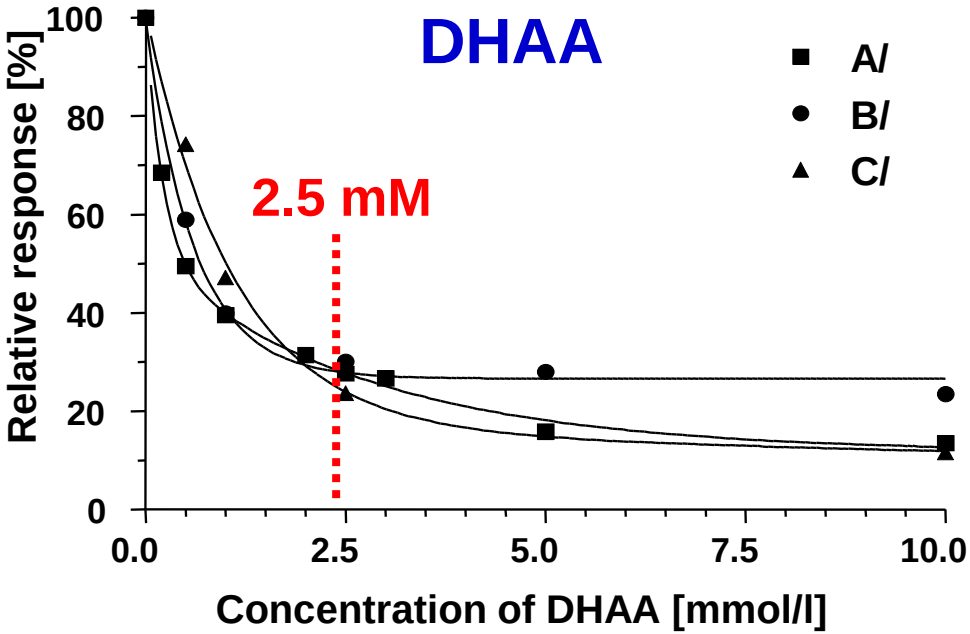


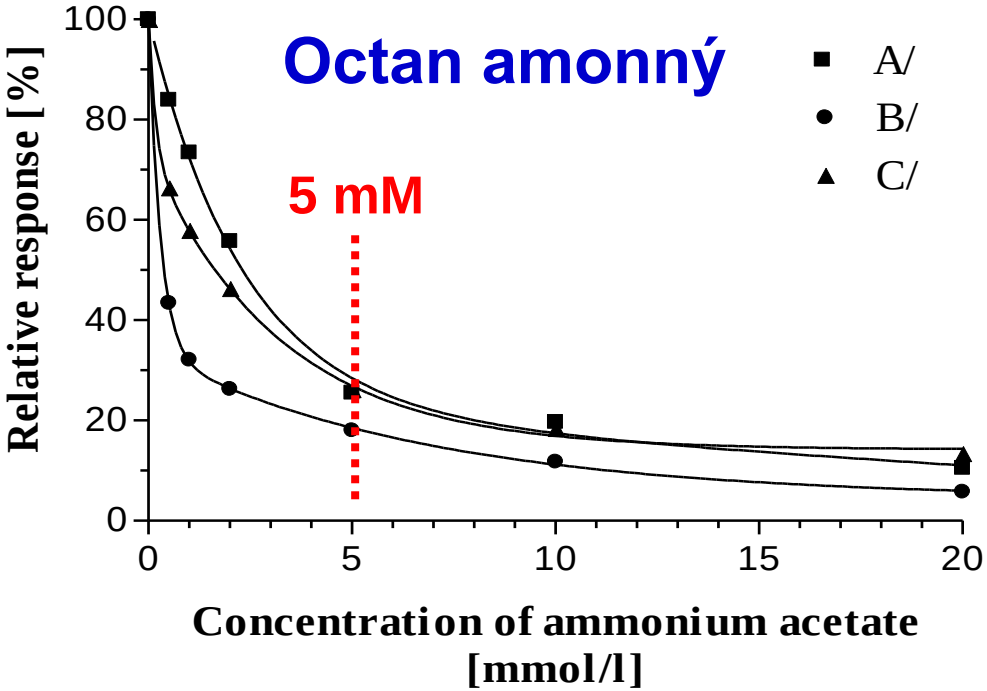
B/



C/



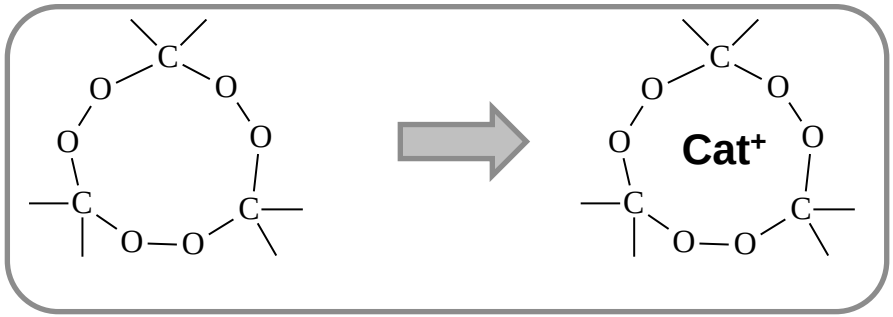




Pokles na 20-30% odezvy při nejnižší chromatograficky použitelné koncentraci!

Adukty s kationty při MS identifikaci TATP

přídavek Na^+, K^+, NH_4^+ do roztoku analytu podpoří ionizaci (komplexace uvnitř kruhu)



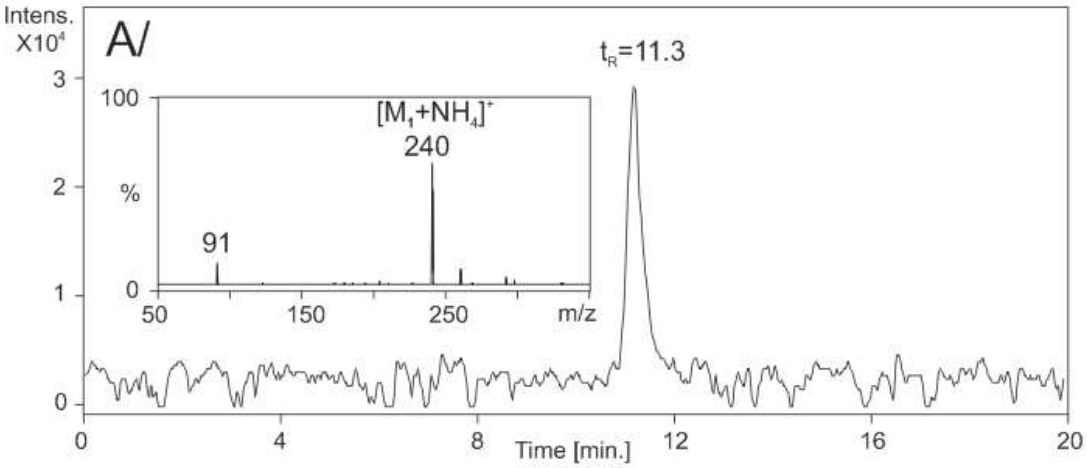
triacetone triperoxid (TATP)

Marrakesh, 30.4.2011 – zdevastovaná kavárna Argana Cafe po výbuchu bomby obsahující TATP

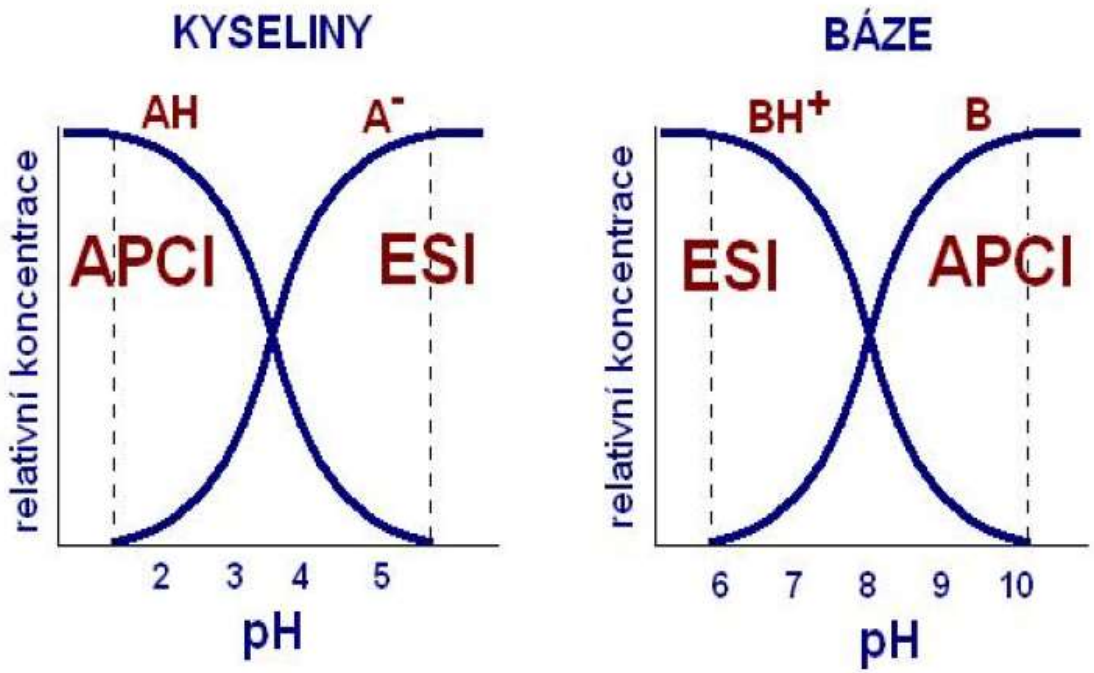
HPLC/ESI$^+$-MS

Mobilní fáze: ACN/5mM CH_3COONH_4

(70:30, v/v)



Vliv pH



Elektrosprej:

bazické látky - detekce pozitivně nabitých iontů (MF kyselá, pH aspoň 2 jednotky pod pKa)

kyselé látky - detekce negativně nabitých iontů (MF bazická, pH aspoň 2 jednotky nad pKa)

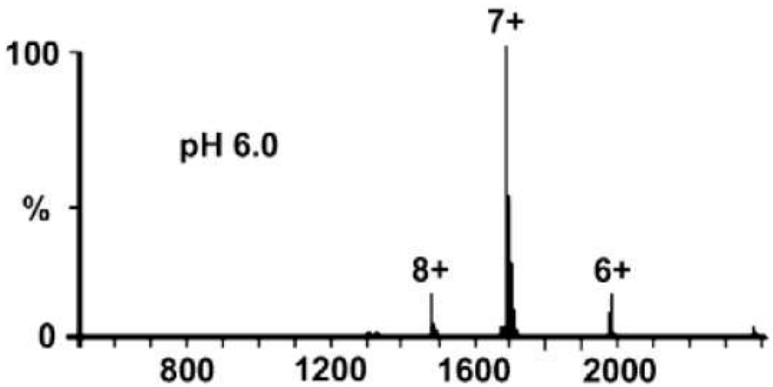
Odezva (účinnost ionizace) je závislá na pH mobilní fáze. Pro techniky, které vyžadují jako první krok odpaření (APCI, APPI) je výhodnější, pokud je analyt neutrální (vyšší těkavost). Pro ESI je výhodnější, aby byla látka v roztoku ionizována (desorpce iontu).

Pokud se optimální pH pro separaci liší od optima pro detekci, je možná pokolonová úprava pH.

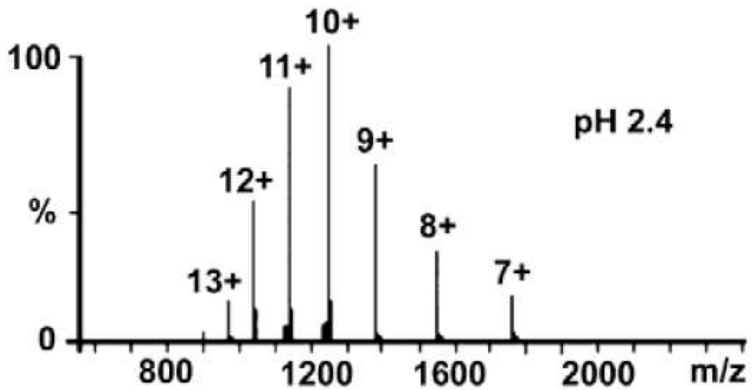
- *snímek převzat z přednášky doc. J. Cvačky (ÚOCHB, Praha)*

Vliv pH v proteomické analýze

ESI spektra β_2-microglobulinu (11860.4 Da)



pH 6.0: nedenaturující podmínky, protein ve “sbaleném” stavu, méně míst pro protonizaci



pH 2.4: denaturující podmínky, protein v “rozbaleném” stavu, více aktivních center pro protonizaci, vyšší protonizace v nízkém pH

DOI: 10.1039/B417724J

- *snímek převzat z přednášky doc. J. Cvačky (ÚOCHB, Praha)*

Volba rozpouštědel pro HPLC/API-MS

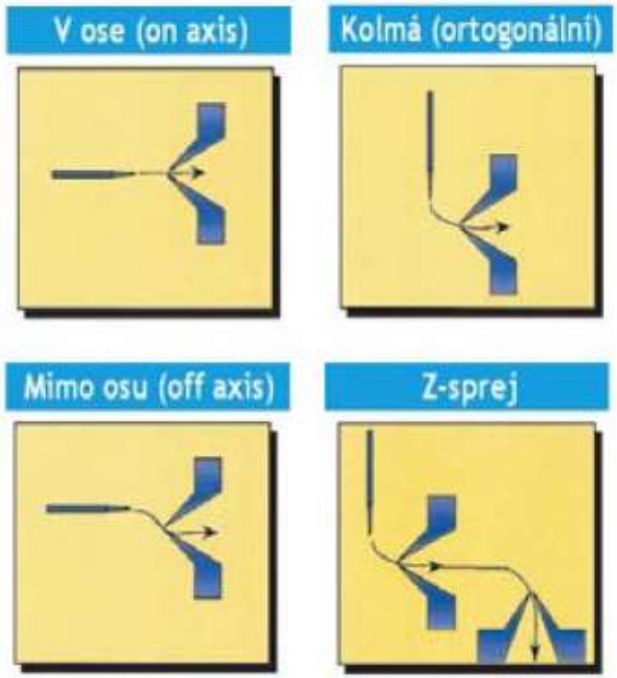
- vždy nejvyšší možná čistota rozpouštědel i aditiv kvůli snížení iontů pozadí (pro kvantitativní analýzy je potřeba validovat, zdali vyhovuje)
- redestilovanou vodu neskladovat (nejméně každý druhý den čistou, pokud není ve směsi s organickým rozpouštědlem)
- odvzdušnění, filtrace
- **mobilní fáze musí umožňovat separaci analytu, snadno se zmlžuje a odpařuje, umožňuje ionizaci analytu, neposkytuje signály pozadí, nekontaminuje iontový zdroj**

- ESI - spíše polárnější rozpouštědla, která **podporují vznik iontů v roztoku**
  - voda, metanol, acetonitril, etanol

- APCI, APPI - **musí podporovat přenos protonu v plynné fázi**, polární i nepolární
  - voda, metanol, acetonitril, 2-propanol, aceton, chloroform, toluen, hexan

Volba MS sytému

- **složení mobilní fáze**
  - RP, HILIC – polárnější rozpouštědla (ACN, Me ESI, APCI, APPI
  - NP - nepolární rozpouštědla, vhodnější APCI,
- **průtok mobilní fáze** – optimalizace průtoků suš
  - APCI, APPI – 0.1 až 1 ml/min (zvládá až 2 ml/
  - ESI – 0.1 až 1 ml/min
  - nanoESI - nl/min
- **geometrie iontového zdroje -** ovlivňuje kvalitu pod určitým úhlem zvyšuje odolnost proti kontamina použít vyšší průtoky



- **hmotnostní analyzátory**
  - MS vs. MS^n - strukturní analýza, rozlišení izobarických sloučenin
  - MS skeny (QqQ) - pro zjednodušení spekter, kvantitativní analýza
  - rozlišovací schopnost a správnost určení m/z - dle požadavků na analýzu
- **rychlost záznamu** hmotnostních spekter - podle použité techniky a šířky píků
  - HPLC - píky v řádech desítek s, většina hmotnostních spektrometrů (analyzátorů)
  - UHPLC - jednotky s, potřeba vysokou skenovací rychlostí (>10 spekter/s, TOF, QqTOF, QqQ, IT, LIT)

Ionizační techniky pro HPLC/MS

• ionizační technika se volí podle typu analytu

• API techniky (ESI, APCI, APPI) - nejběžnější řešení pro většinu aplikací
- tyto techniky znamenaly naprostý průlom v řešení spojení HPLC/MS - nyní díky API je HPLC/MS naprosto rutinní a spolehlivá analytická technika s obrovským významem pro strukturní analýzu organických látek ve směsích, stopovou analýzu a zejména díky ESI zcela nové možnosti v oblasti biochemie

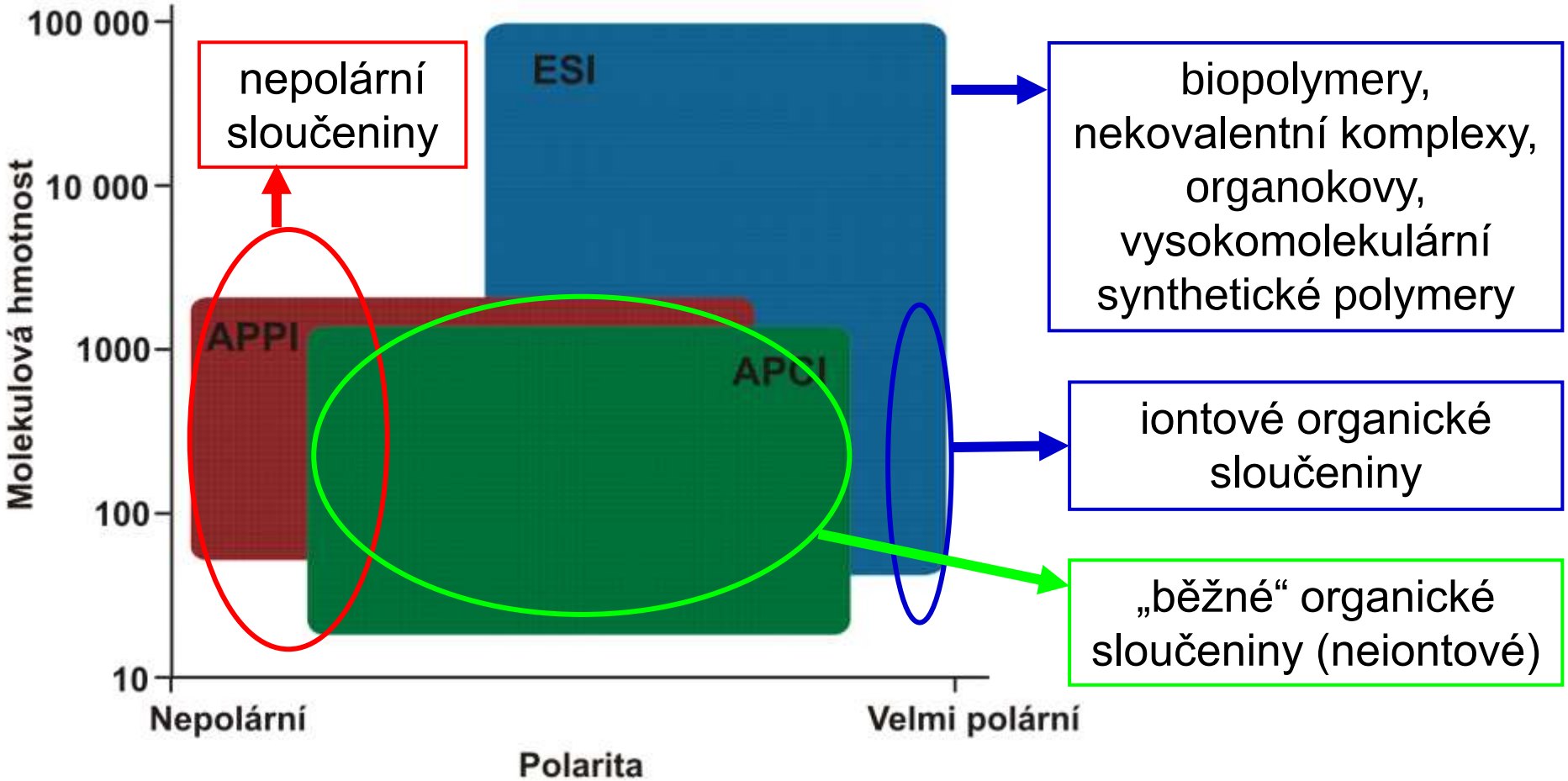
• ionizace a desorpce laserem za účasti matrice (MALDI) - on-line (není tak časté) nebo off-line spojení

• konvenční elektronová ionizace (EI) s použitím Particle Beam převodníku – méně obvyklé, ale pro specifické aplikace může být smysluplné kvůli možnosti využití EI knihoven spekter

• v minulosti další techniky: ionizace termosprejem (TSI), ionizace urychlenými atomy či ionty (FAB/FIB), atd. - dnes se prakticky nepoužívají vzhledem k výrazným přednostem a univerzálnosti API technik

Volba ionizační techniky a polarity záznamu

- ESI a APCI (APPI) standard většiny komerčních HPLC/MS systémů
- polarita záznamu iontů
  - záznam kladných iontů – většina sloučenin
  - záznam záporných iontů – sulfonové a karboxylové kyseliny, (poly)hydroxysloučeniny, nitrosloučeniny, halogensloučeniny, apod.



Kompatibilita HPLC systémů s API technikami

RP-HPLC (systémy s obrácenými fázemi) – **ESI**, (APCI, APPI)

- nejběžnější, polární mobilní fáze - obvykle vodný methanol nebo acetonitril, lze i ethanol, 2-propanol, atd. (aditiva HCOOH, CH_3COOH (případně amonné pufry))
- nejlepší odezva obvykle při vysoké koncentraci organického rozpouštědla ca. 70 – 90% (nemusí platit univerzálně) – obvykle se ale zvedne i pozadí (šum)
- při vysokém až 100% obsahu vody zvýšit průtok a teplotu sušícího a zmlžujícího plynu (nižší citlivost)
- 100% acetonitril při APCI vyžaduje častější čištění výbojové elektrody (tvorba grafitického uhlíku na elektrodě), obecně je lepší 100% organiku nepoužívat

NP-HPLC (systémy s normálními fázemi)

- většinou špatně kompatibilní s ESI, lepší kompatibilita s **APCI (APPI)**
- Použití nepolární mobilní fáze (hexan, toluen) v mobilní fázi musí být určitý obsah (>5%) proton-donorního rozpouštědla (mísitelného), např. 2-propanol (ve 100% hexanu většinou není žádný signál)
- snaha vyhnout se halogenovaným rozpouštědlům (CH_2Cl_2, CH_3Cl, CCl_4) kvůli zvýšené kontaminaci a zhoršení stability signálu

HILIC (chromatografie hydrofilních interakcí)

- směs acetonitrilu nebo metanolu a vody, případně aditiv (min. 2.5 % H_2O (v/v))
- kompatibilní s ESI i APCI, volba podle povahy analytů

Kompatibilita mobilních fází pro HPLC/MS

- HPLC systémy s obrácenými i normálními fázemi, HILIC
  - **bezvodé mobilní fáze bez proton-donorního rozpouštědla mohou působit potíže zejména při ionizaci elektrosprejem**

- aditiva v mobilní fázi
  - obsah a povaha aditiv je kritický parametr pro správnou ionizaci analytu
  - u ESI: kyselé mobilní fáze vhodné pro měření kladně nabitých iontů, bazické mobilní fáze pro měření záporně nabitých iontů (např. kyselin) (viz výše) – sloučeniny chceme v roztoku ionizované
  - přednost mají těkavá činidla v co nejnižších koncentracích
  - **vhodná pro MS:** kys. mravenčí nebo octová, amoniak (0.05 – 1%), octan nebo mravenčan amonný (0.5 – 10 mmol/l), TFA (0.05 - 0.2%) méně vhodná (výrazné potlačení ionizace)
  - **nevhodná pro MS**: anorganické kyseliny (fosforečná, sírová), alkalické hydroxidy, anorganické pufry (např. fosfátový), detergenty, atd. obecně látky s nízkou těkavostí
  - ion-párová HPLC – konvenční netěkavá činidla (tetraalkylamonné soli, sulfonové kyseliny) musí být nahrazeny těkavějšími analogy (di- a trialkylamonium acetáty, perfluorované karboxylové kyseliny, cca 1 –5 mmol/l)

Vliv složení mobilní fáze na potlačení odezvy

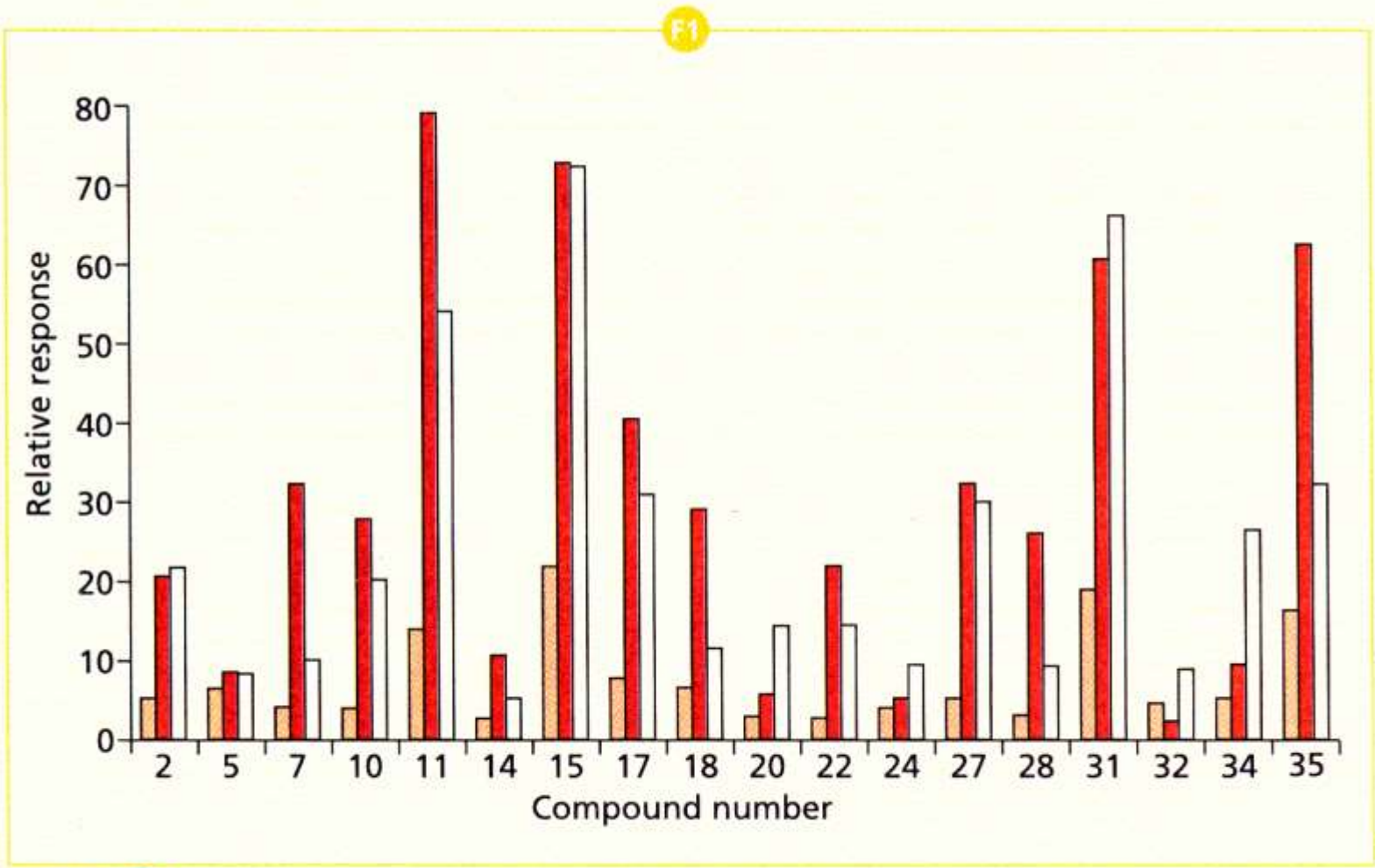


Figure 1: *A comparison of the relative responses shown by a selection of compounds studied in the methanol-based eluents. ( ) TFA, ( ) formic acid and ( ) ammonium formate.*

D. Temesi & B. Law, LC GC International 12, 175 (1999)

HPLC/MS iontových sloučenin

Nekompatibilní s MS detekcí

- vysolovací HPLC – 0.1 - 1 mol/l anorganických solí v mobilní fázi

- konvenční ion-párová HPLC pro analýzu aniontů – 1 - 20 mmol/l tetrabutylamonium hydrogensulfátu

- konvenční ion-párová HPLC pro analýzu kationtů – 1 - 20 mmol/l sulfonových kyselin

Lepší kompatibilita s MS detekcí

- 5 mmol/l octanu amonného
  – nižší separační účinnost, omezené použití

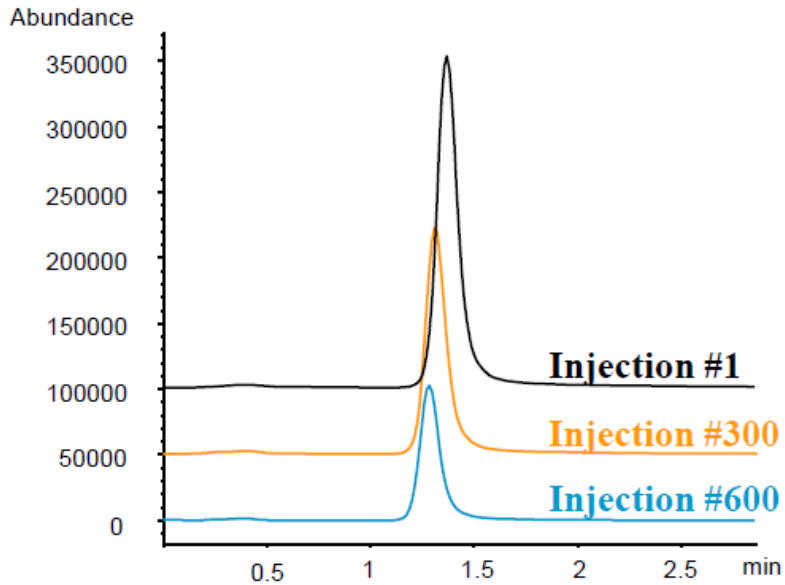
- 1 - 5 mmol/l di- nebo trialkylamonium acetátu pro anionty
  - velmi dobrá separace včetně rozdělení polohových izomerů

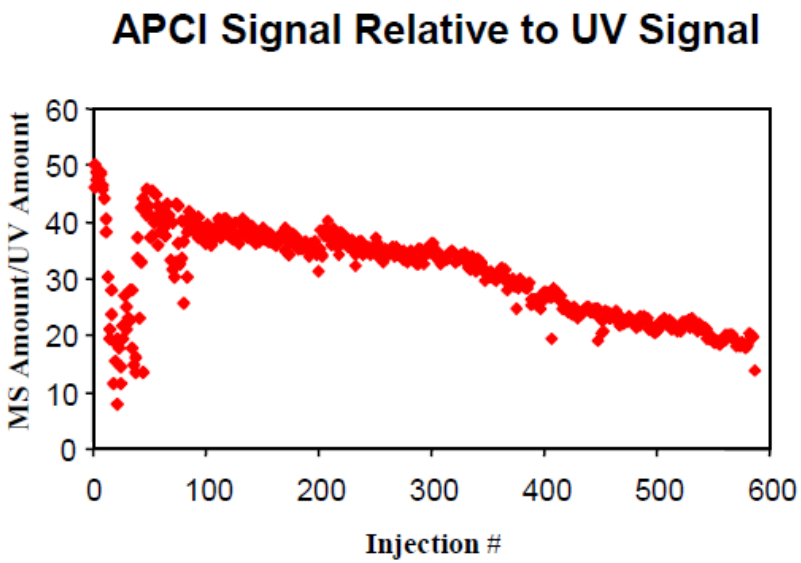
- 1 - 5 mmol/l perfluorovaných karboxylových kyselin pro kationty

- **přesto dochází k potlačení odezvy a kontaminaci**

Kompatibilita mobilních fází pro HPLC/MS

APCI Signal After 600 Injections of Salt Solution



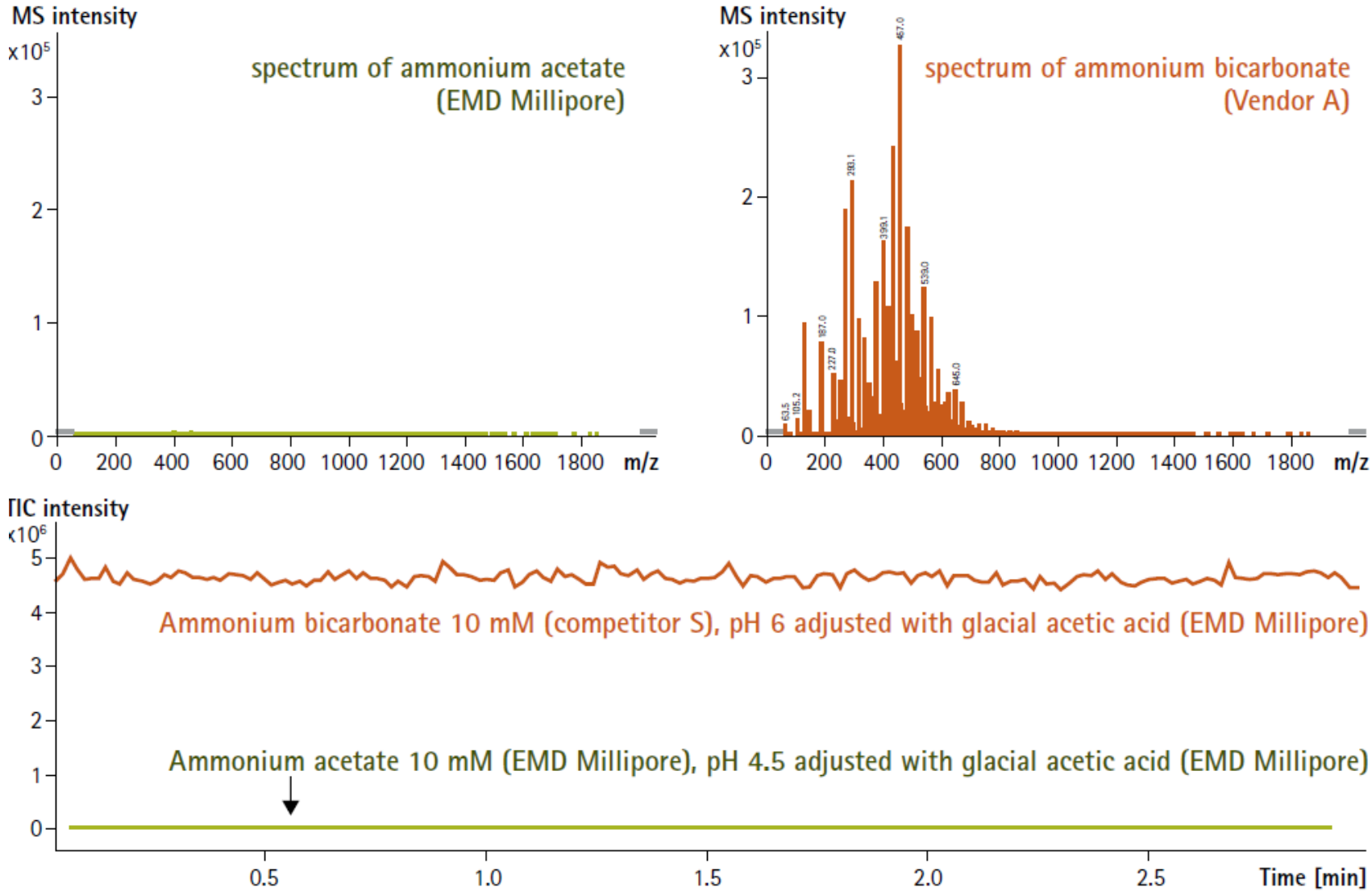


- Initial instability in the signal is probably due to changing electric fields as salt deposits in the source.

Agilent Technologies

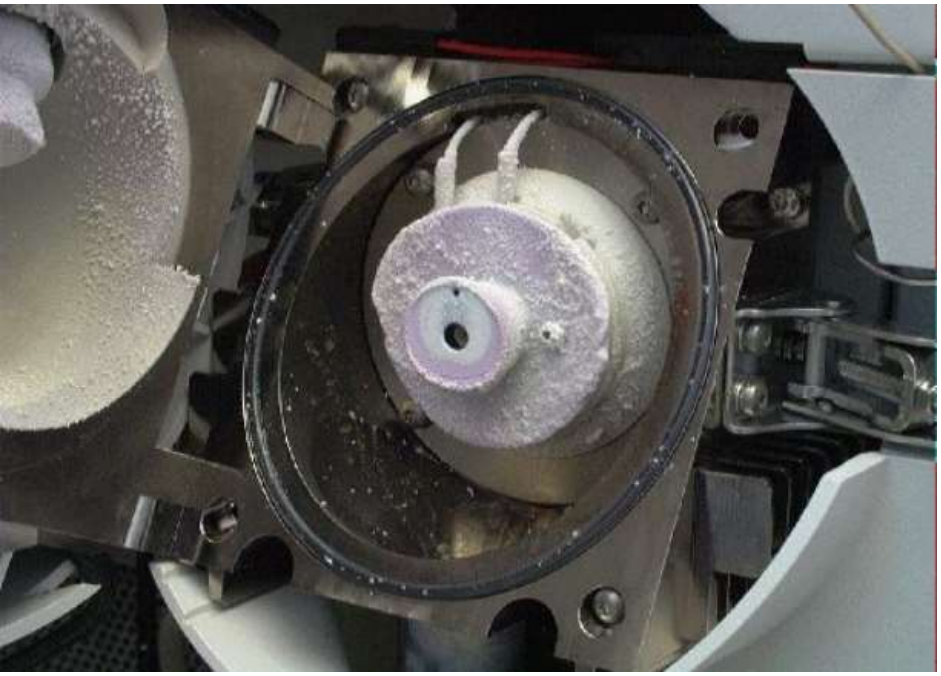
https://www.agilent.com/cs/library/eseminars/public/Making%20LC%20Methods%20MS%20Friendly.pdf

Vliv aditiv mobilních fází na hmotnostní spektra



Contaminants Brochure - EMD Millipore

Následky použití nevhodných aditiv



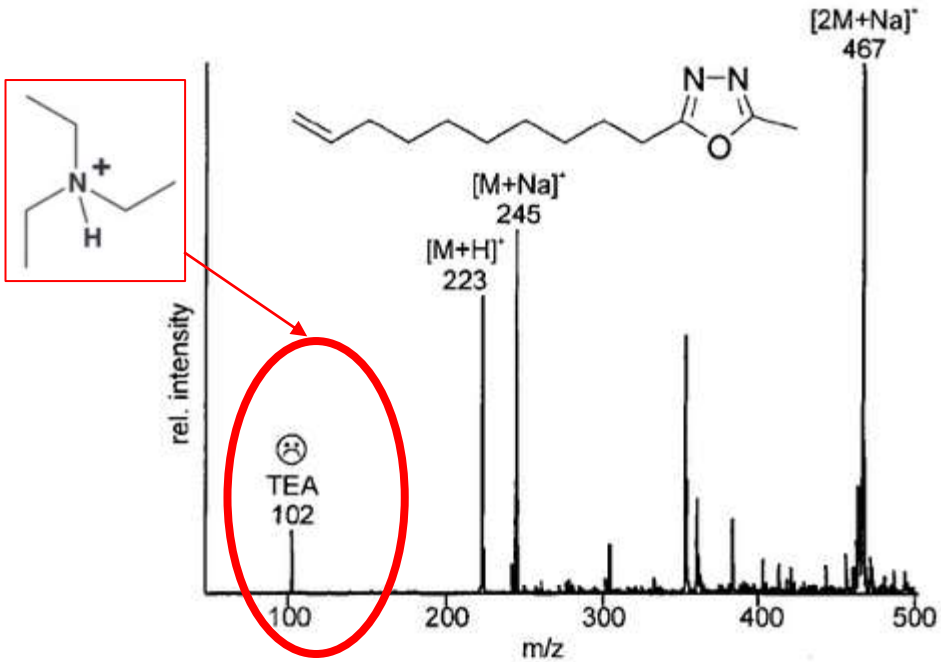


Figure 2. ESI mass spectrum of 2-(9-decenyl)-5-methyl-1,3,4-oxadiazole (ca. 100 μg/mL in methanol).

Nevhodná aditiva mohou mít z následek:

- v případě použití netěkavých pufrů → výrazné znečištění iontového zdroje (potlačení ionizace, snížení cítivosti)
- velmi intenzivní ionty na pozadí (interference, potlačení ionizace, nežádoucí tvorba aduktů s těmito ionty) – paměťový efekt - mohou být přítomny i několik měsíců → často tedy nutné kompletně vyčistit iontový zdroj a iontovou optiku a případně i kvadrupól a kolizní celu (analyzátory pracující za vysokého vakua – TOF, ICR, Orbitrap se nečistí)

H. Rutters a kol., Rapid Commun. Mass Spectrom. 14, 122–123 (2000)

Nežádoucí signály v hmotnostních spektrech

• nečistoty, signály pozadí, matriční ionty

• je nutné používat co nejčistší rozpouštědla a aditiva určené pro LC/MS - vyšší stupeň čistoty, nižší obsah nežádoucích kovů

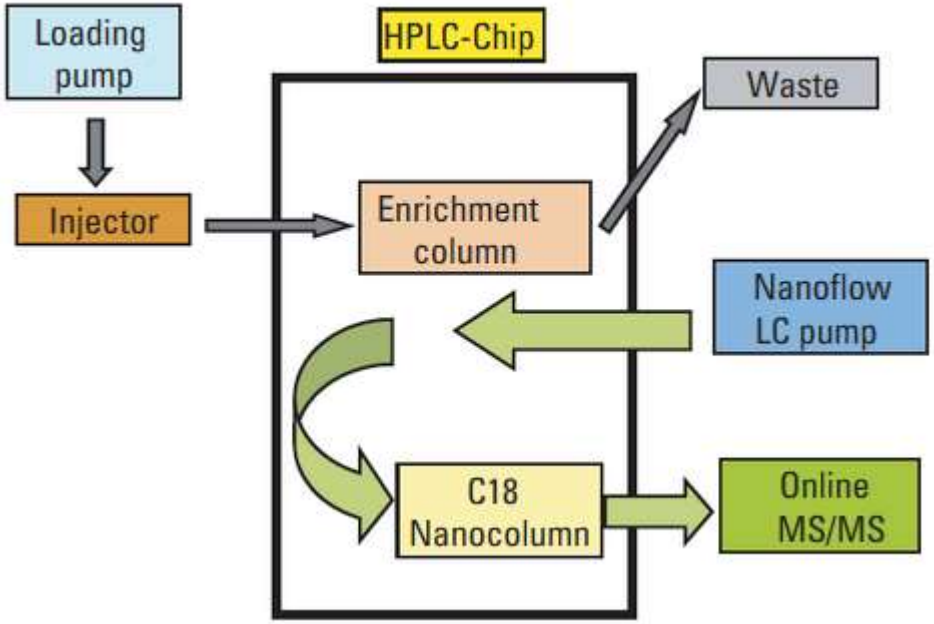
• vyvarovat se kontaminaci změkčovadly z plastů (plastové nádobí, rukavice, špičky pipet), krémů na ruce, atd.

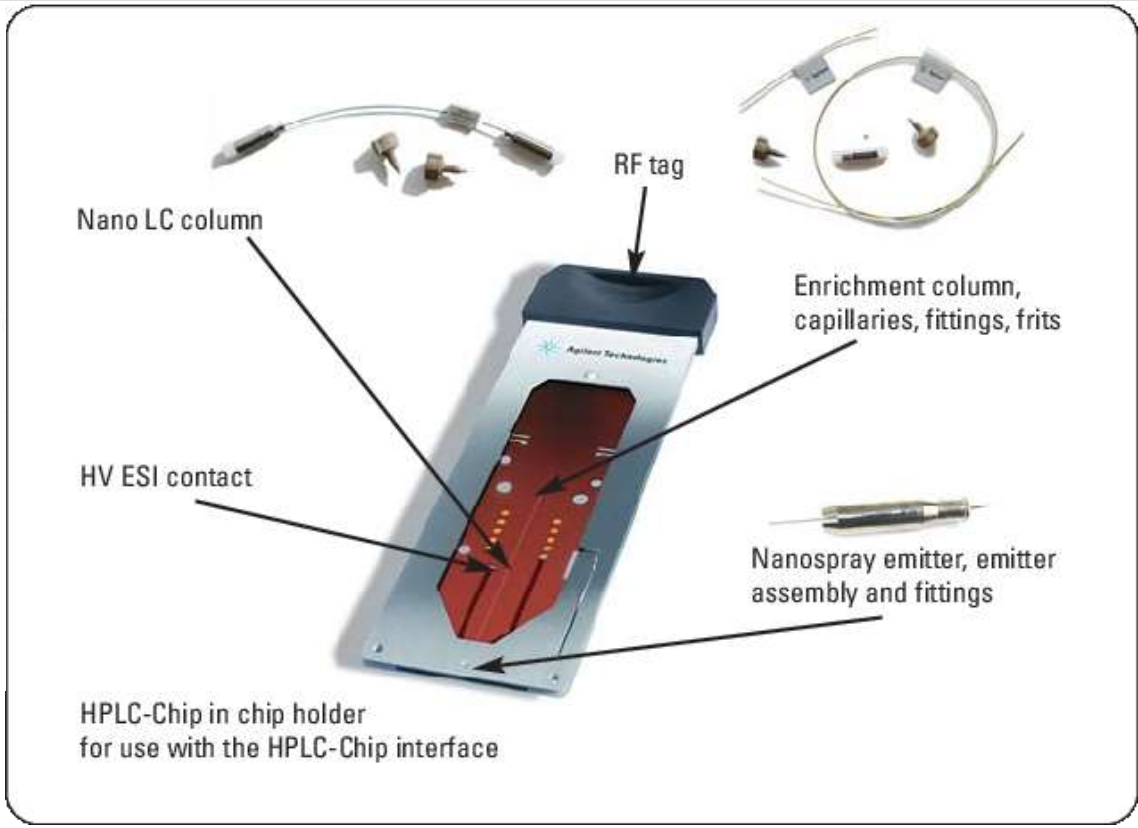
• běžné kontaminanty v MS - ftaláty, silikony, polymery, atd.

Shrnující článek:
Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry

B. O. Keller, a kol., *Analytica Chimica Acta* 627 (2008) 71–81.
(v přílohách excel soubor se seznamy iontů, které přísluší potenciálním interferencím)

HPLC-Chip-MS





M. Ghitun, E. Bonneil, L. Côté, G. L Gauthier and P. Thibault, Advantages of using Intelligent Sample Loading with the HPLC-Chip for automated sample enrichment, 2019.

HPLC-Chip-MS

https://www.selectscience.net/selectscience-tv/videos/agilent-hplc-chip+ms-a-breakthrough-microfluidics-based-technology/?videoID=164

CZE/MS

Spojení kapilární zónové elektroforézy a hmotnostní spektrometrie (CZE/MS)

- **1987** první spojení CZE/MS (Smith)
- alternativa k HPLC pro separaci iontových látek
- technicky obtížnější oproti HPLC/MS, nelze považovat za zcela rutinní, určité problémy s citlivostí a robustností systému
- složitější řešení vkládání separačního a sprejovacího napětí, aby se navzájem neovlivňovala
- nekompatibilita použitých pufrů s MS (potlačení ionizace – snížení citlivosti, kontaminace)
  - vhodná náhrada konvenčních netěkavých pufrů (např. fosfátové nebo borátové) za těkavější látky, např. 10 mM octan amonný
  - průtok v CZE je dán elektroosmotickým tokem, který je značně závislý na **pH**
- velmi nízké průtoky - většinou nanoESI

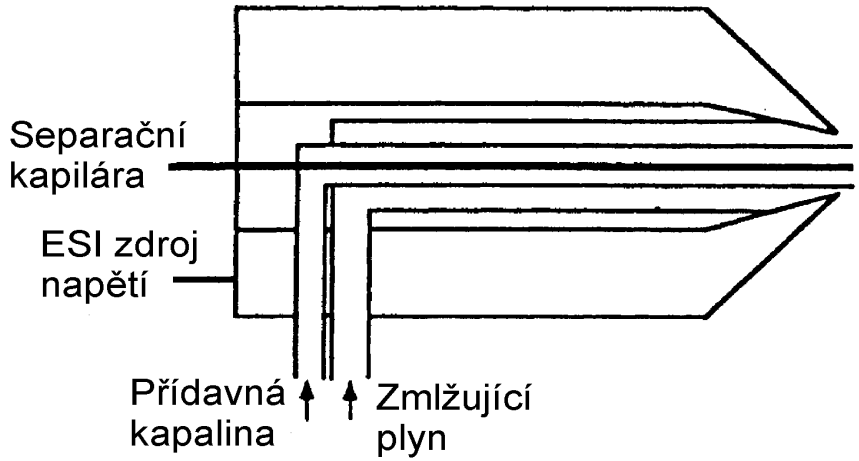
Základní typy spojení CZE/ESI-MS

1/ CZE/MS s přídavným tokem (pomocné) kapaliny (“Sheath-Flow Interface”)
• nejrozšířenější, nejrobustnější
• problémy s citlivostí kvůli naředění eluátu (ale zvýšením průtoku lze následně kombinovat i s klasickým ESI

2/ CZE/MS s vodivým kapalným spojením (“Liquid-Junction Interface”)
• méně rozšířené, oblíbené u čipových technik

3/ CZE/MS bez přídavného toku (pomocné) kapaliny (“Sheathless Interface”)
• spojení on-line s nanoESI
• nejcitlivější, ale nejméně robustní
• technicky náročné, časté problémy

CZE/MS s přídavným tokem kapaliny



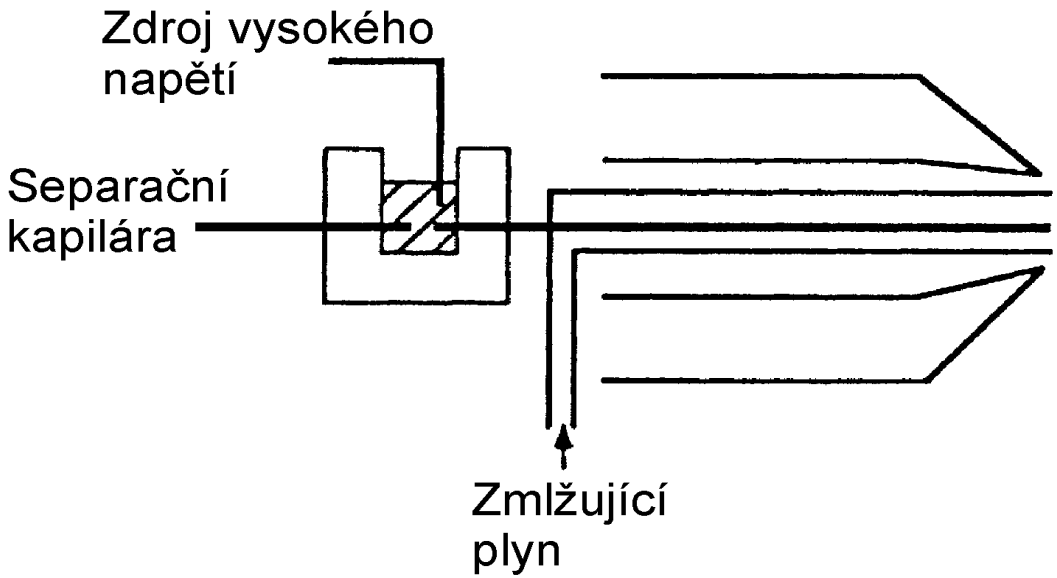
• separační CZE kapilára je vyvedena až na konec ESI sondy, kde dochází ke smísení s vodivou přídavnou kapalinou přiváděnou koaxiální vnější kapilárou

• na špičku kapiláry je vloženo napětí 2 – 5 kV - zároveň uzavření elektrického obvodu pro CZE a napětí potřebné pro funkci elektrospreje

• průtok CZE řádově desítky až stovky nl/min, přídavná kapalina 1 – 3 µl/min - zředění ca. 10 – 100krát

• přídavná kapalina s přídavkem elektrolytu je nutná kvůli:
- dosažení minimálního průtoku pro stabilní sprej (obvykle ≥ 1 µl/min)
- vodivému spojení
- 60 - 80% voda/metanol (2-propanol, ne acetonitril - rozpouští polyimidové pokrytí kapiláry) s obsahem elektrolytu (obvykle 0.1 - 2% organické kys. nebo amoniaku, popř. 10 mM octan amonný), průtok 1 - 3 µl/min (co nejnižší kvůli zředění analytu)

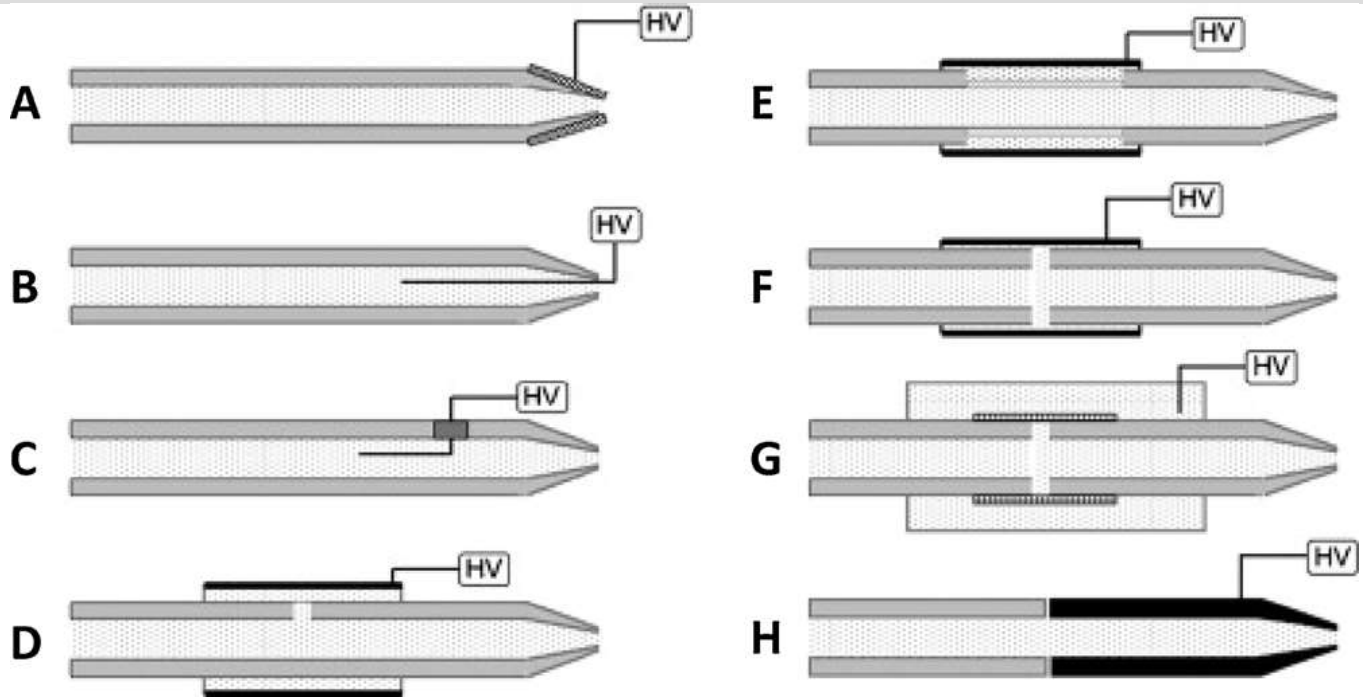
CZE/MS s vodivým kapalným spojením



• CZE kapilára nedosahuje do špičky elektrospreje, ale končí v nádobce s elektrolytem, kde je vloženo napětí potřebné pro ESI (sprejovací napětí) a zároveň pro ukončení elektrického obvodu CZE (separační napětí)

• přesné nastavení mezery mezi separační a ESI kapilárou - 10 – 20 μm (jinak ztráta počtu teoretických pater)

CZE/MS bez přídavného toku kapaliny



Pracuje ve velmi nízkých průtocích (10 – 1000 nl/min) – nanoelektrosprej (speciální úprava špičky - vytažení do zúženého konce 5 – 30 µm (náchylné k ucpávání)

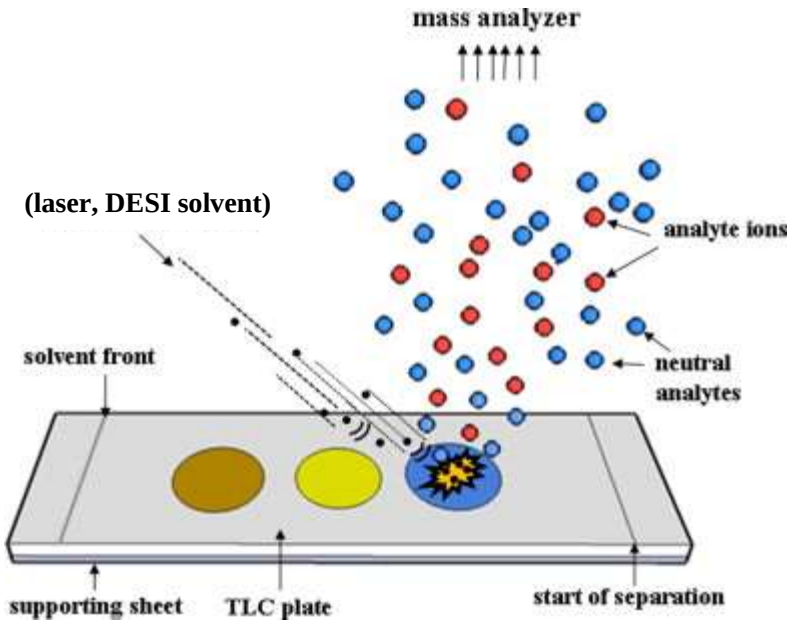
- vodivé spojení přes (A) pokovenou špičku, (B, C) kovový drátek vložený přes špičku nebo přes díru v nanoESI kapiláře, (D) dělení toku s kovovým pouzdrem, (E, F) spojení přes kovový rukáv, (G) spojení na principu mikrodialýzy, (H) kovový emiter
- **zóny nejsou zřeďovány → nejvyšší citlivost (až attomoly) × nejnižší robustnost**

G.Bonvin a kol. *J. Chromatogr. A* **1267 (2012) 17–31**

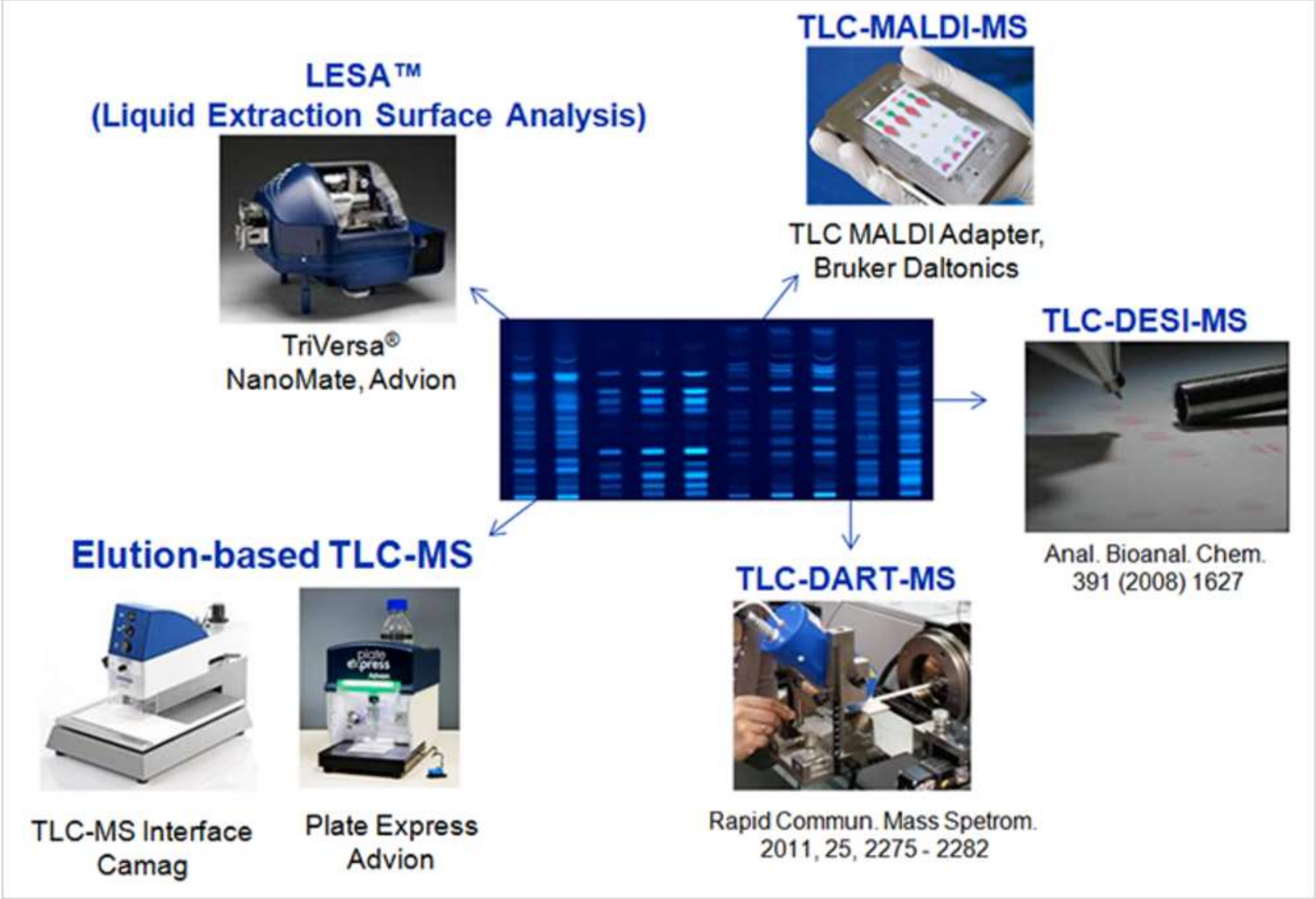
TLC/MS

Spojení tenkovrstvé chromatografie a hmotnostní spektrometrie (TLC/MS)

- **1969** první spojení TLC/MS (Kaiser), odpaření molekul z TLC skvrn do proudu plynu
- TLC se využívá pro svou jednoduchost, širokou škálu povrchů, možnost derivatizace atd.
- off-line spojení - látky jsou nejdříve separovány a následně jsou TLC skvrny obsahující molekuly analytu měřeny pomocí MS
- laserové techniky - MALDI, SALDI
- ambientní ionizační techniky - DESI, DART
- extrakce rozpouštědlem a následný přenos do MS (LESA, eluční TLC/MS) – ESI
- alternativní způsob spočívá v izolaci skvrny (seškrábání, vystřižení), extrakci analytu do kapaliny a následné analýze pomocí MS – pracné a riziko kontaminace stacionární fází

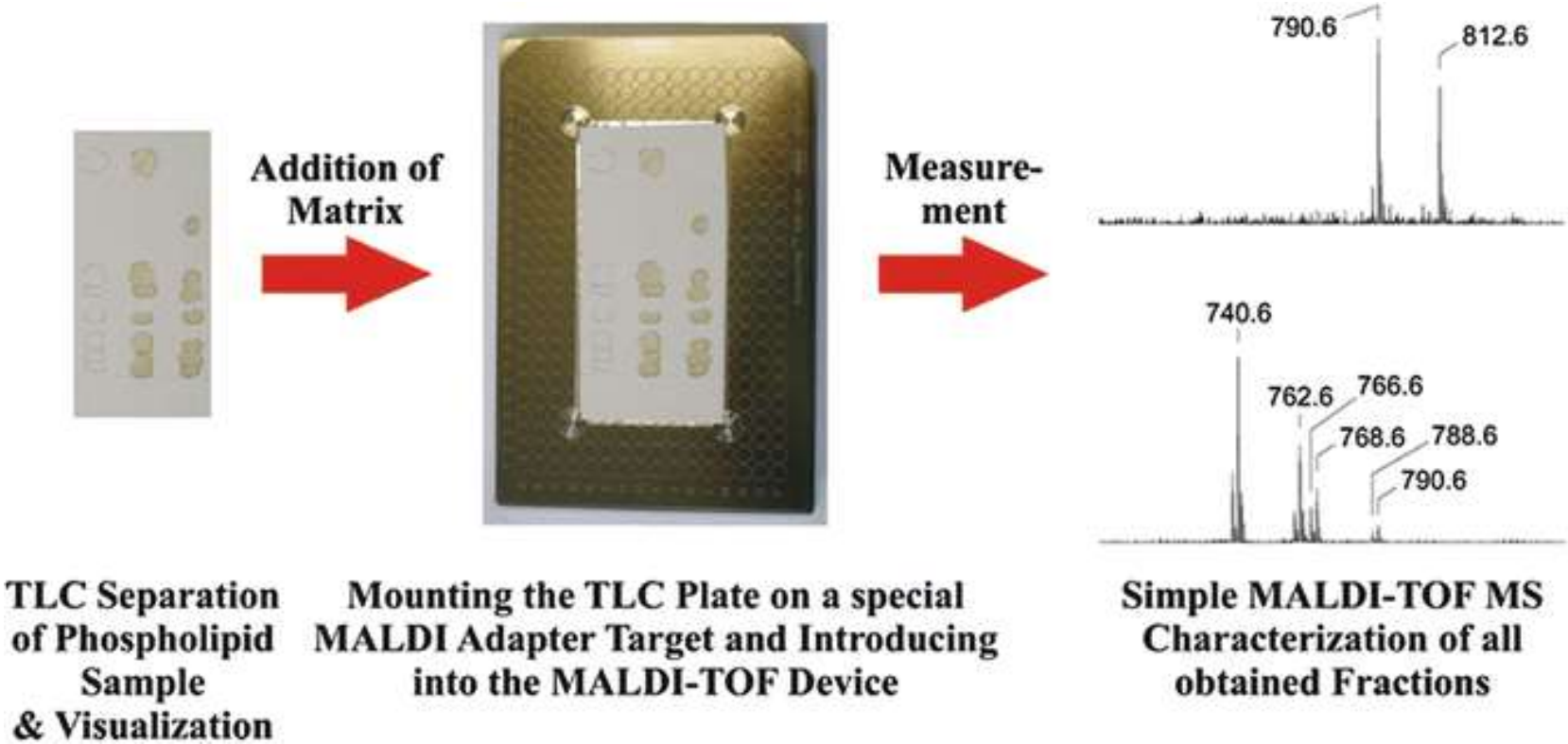


TLC/MS



https://theanalyticalscientist.com/techniques-tools/state-of-the-art-tlc-ms

TLC/MALDI-MS



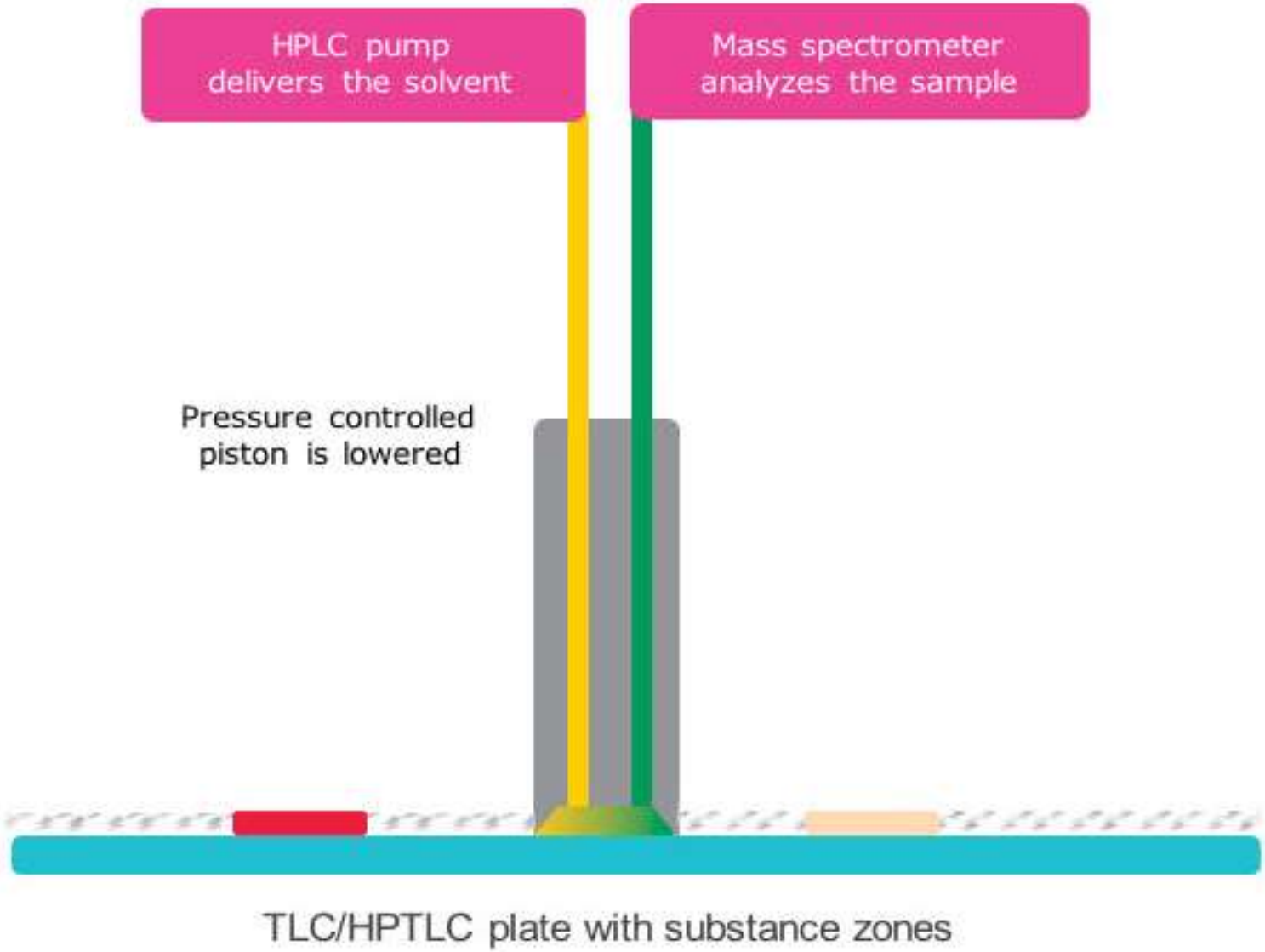
- nalepení TLC destičky na MALDI destičku nebo použití speciálního adaptéru (identický postup jako při hmotnostně spektrometrickém zobrazování) – x, y posuvný systém pro 2D analýzu
- v případě DART nebo DESI analýzy odpadá krok nanášení matrice

https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-94-007-7864-1_62-1

TLC/LESA-ESI-MS

https://www.youtube.com/watch?v=ERayC_xg_d8

„Eluční“ TLC/MS



https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytix-reporter/50-years-of-tlc-ms.html

„Eluční“ TLC/MS

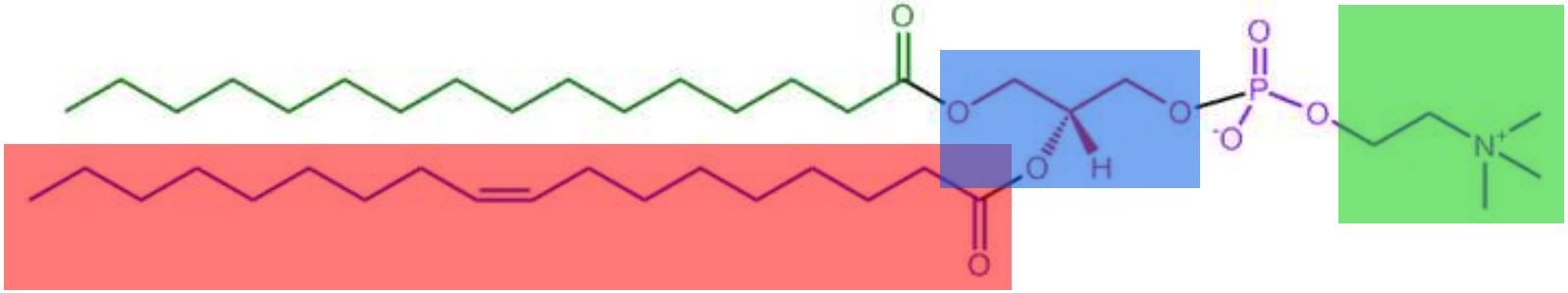
https://advion.com/products/expression-2/plate-express/

TLC je vhodná pro separaci tříd sloučenin

Glycerol

- Different positions of fatty acyl chains
- Regioisomers ($R^1R^2R^1$ *vs.* $R^2R^1R^1$/$R^1R^1R^2$)
- Enantiomers ($R^1R^1R^2$ *vs.* $R^2R^1R^1$)

Example: Glycerophospholipids



Aliphatic chains (hydrophobic part)

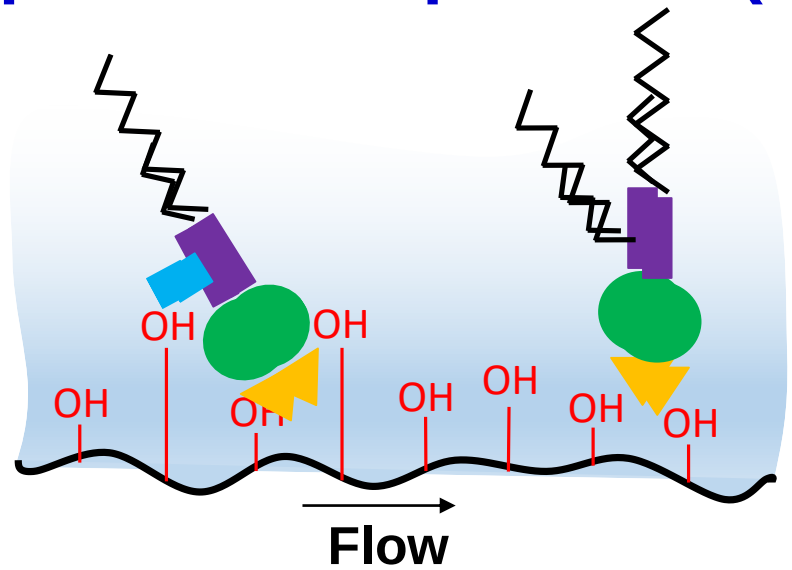
- Acyl (-OCO-R)
- Alkyl (-O-CH_2-R, ether)
- Alkenyl (-OCH=CH–R, plasmalogen)
- Chain length
- Linear *vs.* branched
- Saturated *vs.* mono/polyunsaturated
- cis- *vs.* trans- double bonds
- Positions of double bonds

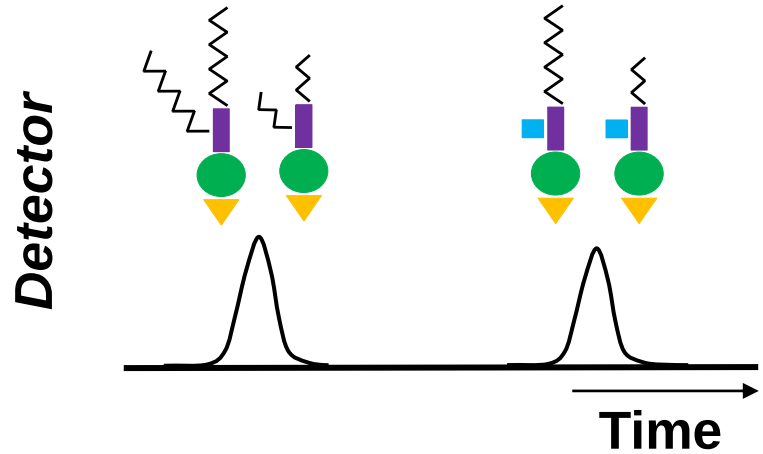
Polar head groups (hydrophilic part)

- H - phosphatidic acid (PA)
- $CH_2CH_2N(CH_3)_3^+$ - choline (PC)
- $CH_2CH(CO_2)NH_3^+$ - ethanolamine (PE)
- $CH_2CH(CO_2)$-NH_3^+ - serin (PS)
- $CH_2CH(OH)CH_2OH$- glycerol (PG)

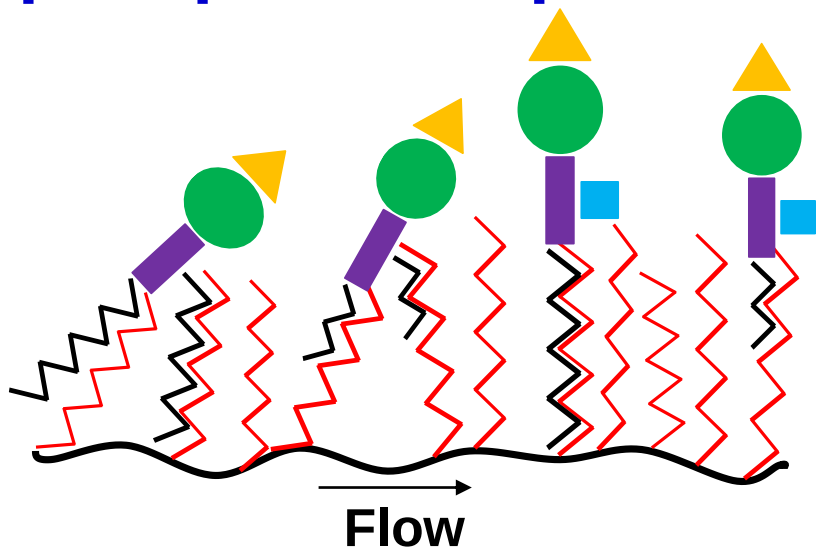
Separace tříd lipidů pomocí HILIC vs. RP-LC

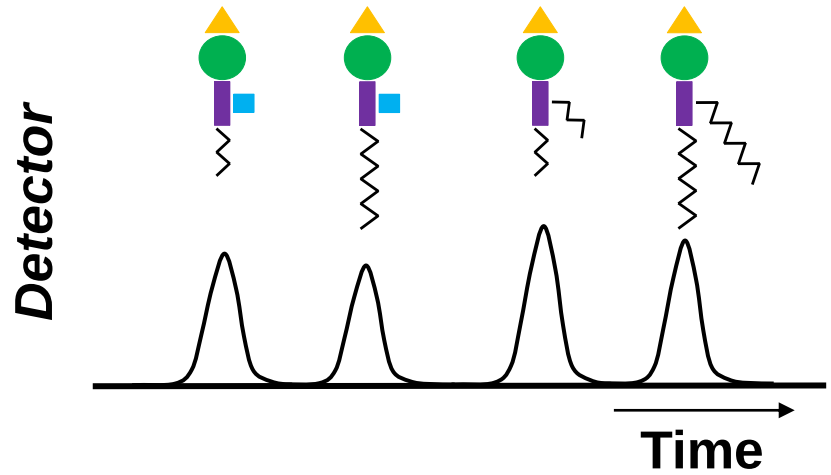
Lipid class separation (HILIC)



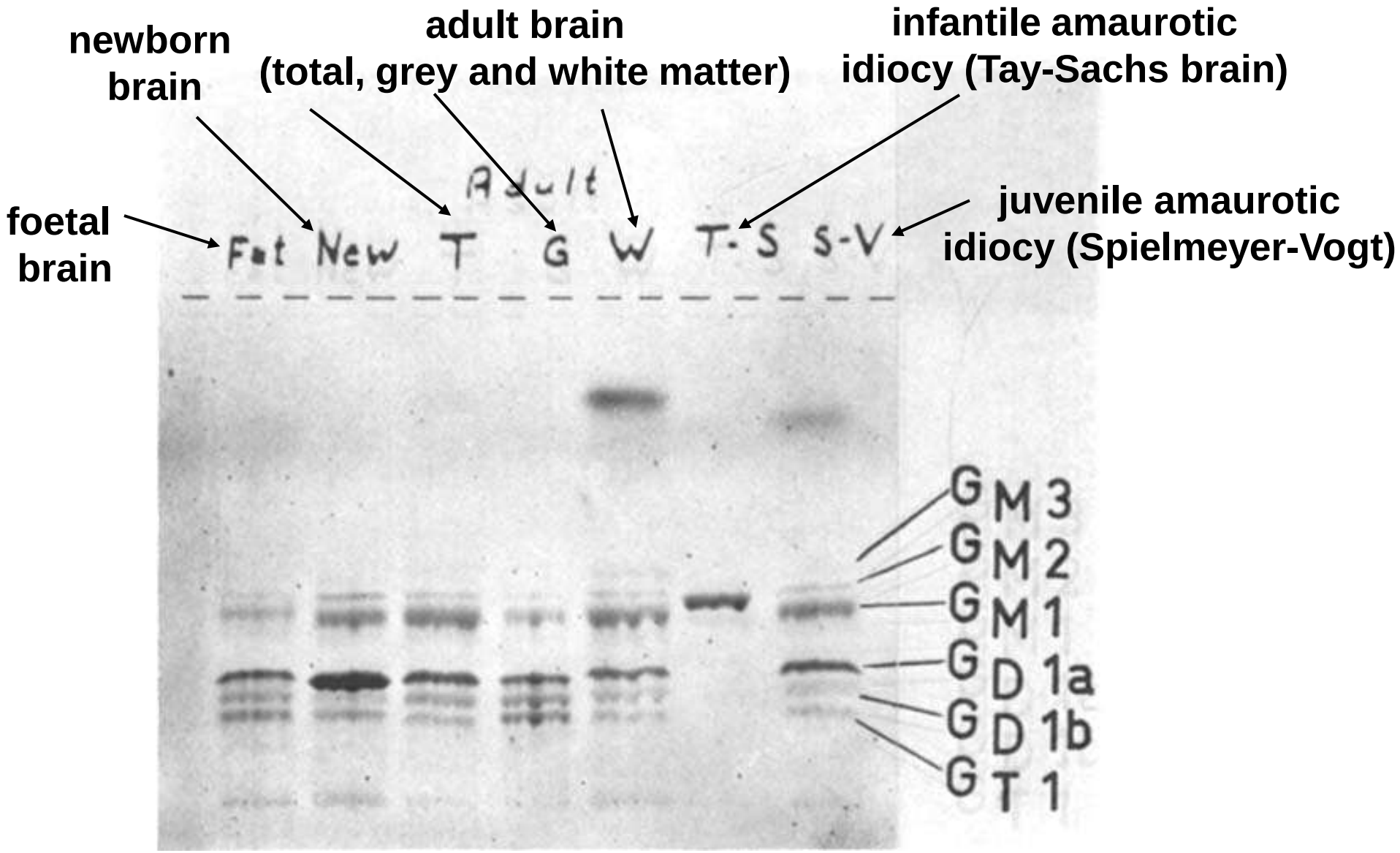


Lipid species separation (RP)





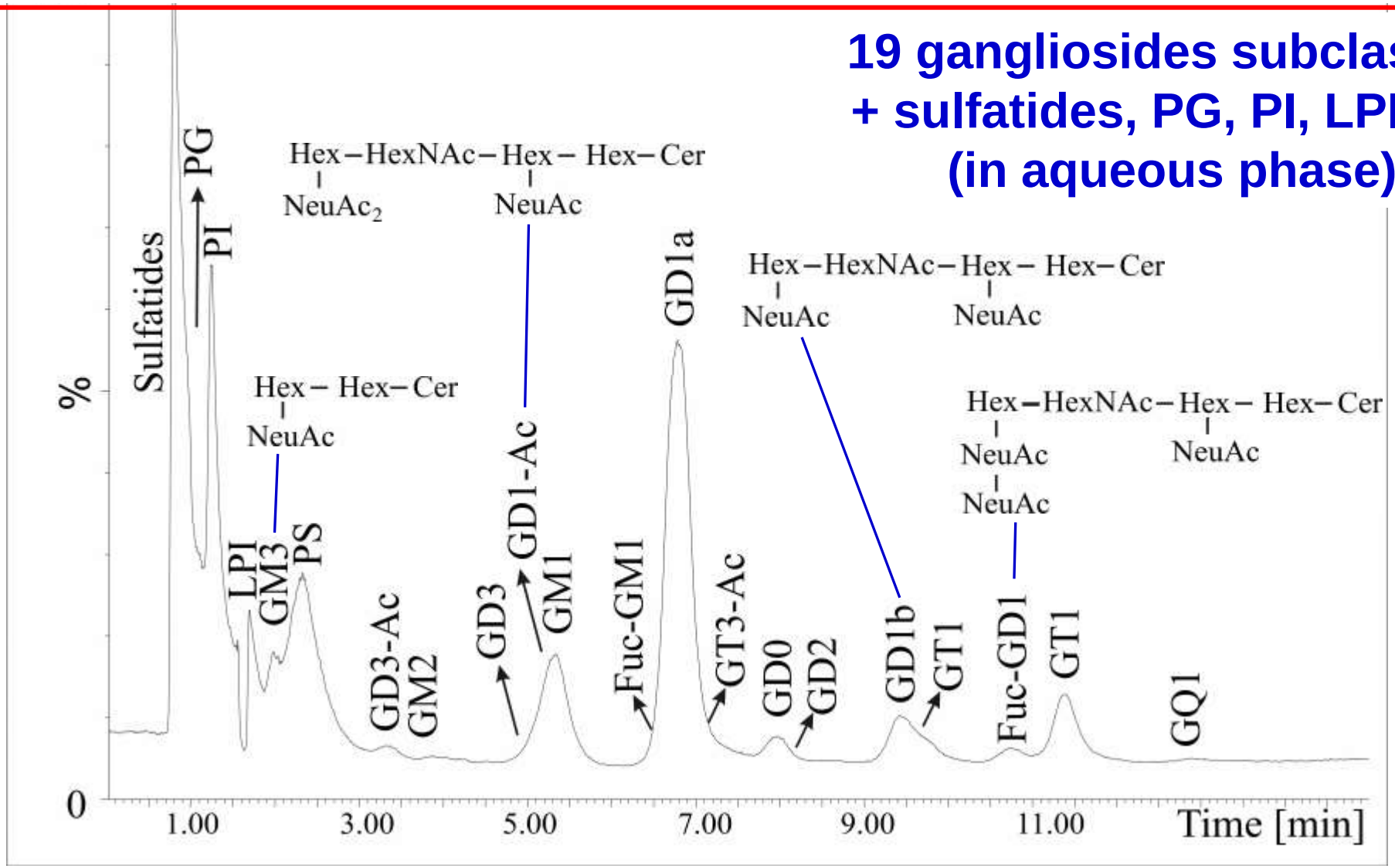
TLC gangliosidů - Svennerholm (1963)



L. Svennerholm, *Chromatographic separation of human brain gangliosides*, J. Neurochem. 10 (1963) 613

HILIC/ESI-MS extraktu gangliosidů

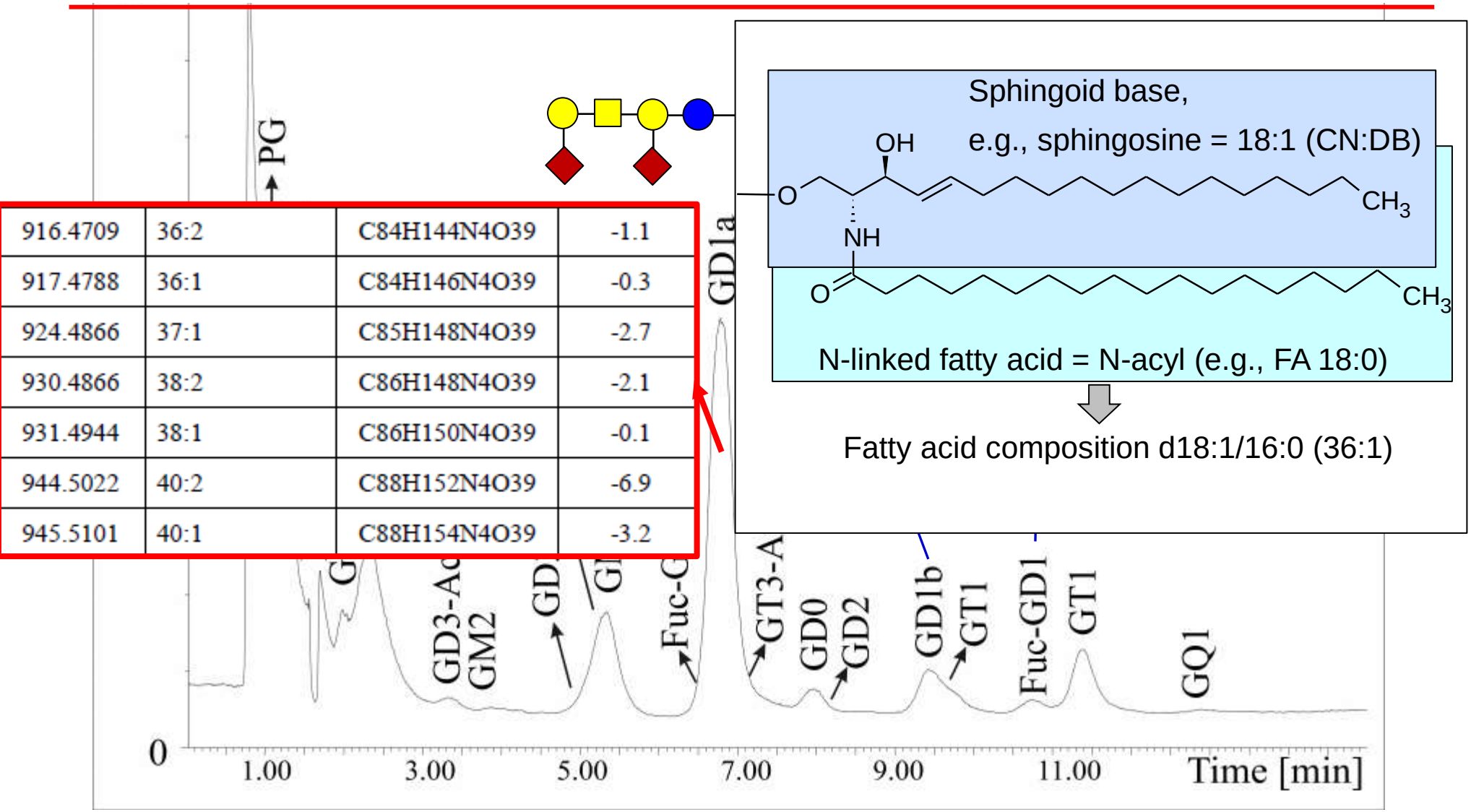
19 gangliosides subclasses + sulfatides, PG, PI, LPI, PS (in aqueous phase)



- ***Conditions:*** *column Ascentis Si (150×2.1, 3 µm), negative-ion ESI, m/z 50−2000, gradient of acetonitrile, 10 mM aqueous ammonium acetate and acetic acid*

R. Hájek, Anal. Chem. 10 (1963) 613

HILIC/ESI-MS extraktu gangliosidů

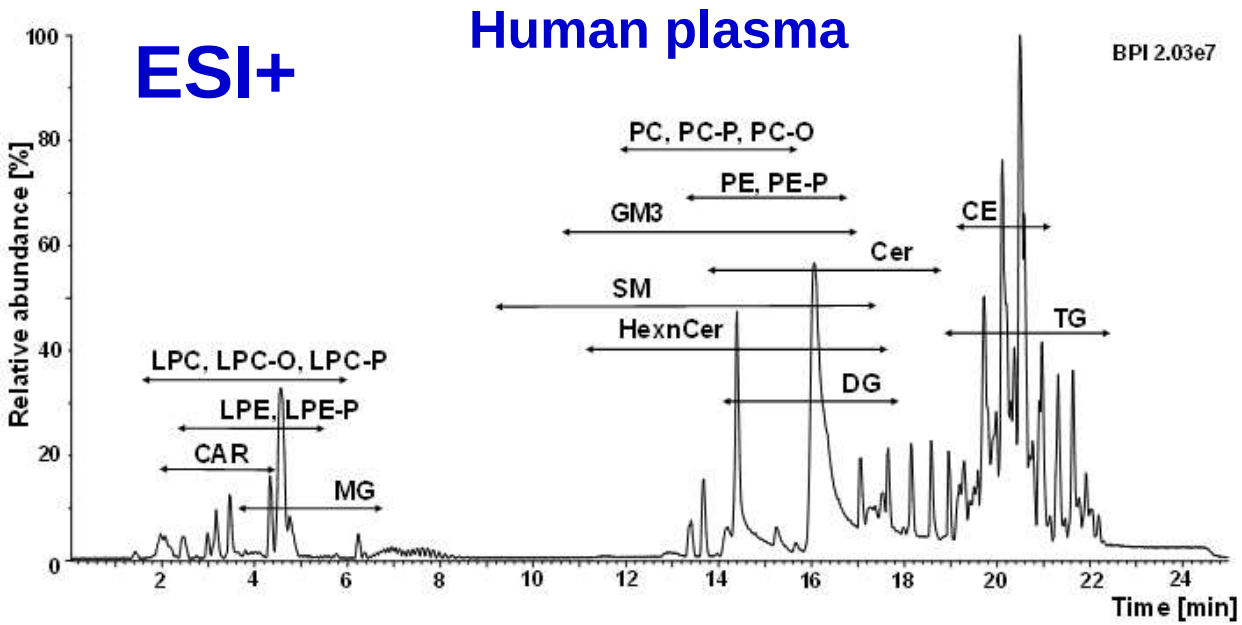


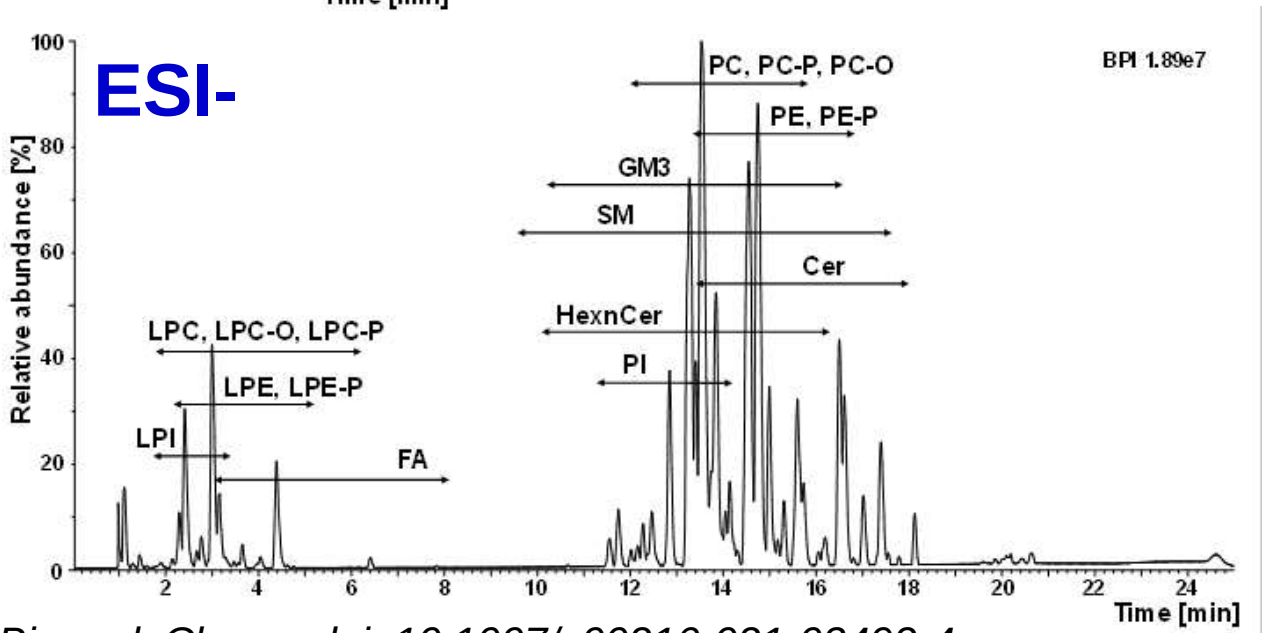
916.4709	36:2	C84H144N4O39	-1.1
917.4788	36:1	C84H146N4O39	-0.3
924.4866	37:1	C85H148N4O39	-2.7
930.4866	38:2	C86H148N4O39	-2.1
931.4944	38:1	C86H150N4O39	-0.1
944.5022	40:2	C88H152N4O39	-6.9
945.5101	40:1	C88H154N4O39	-3.2

- ***Conditions:*** *column Ascentis Si (150×2.1, 3 µm), negative-ion ESI, m/z 50−2000, gradient of acetonitrile, 10 mM aqueous ammonium acetate and acetic acid*

R. Hájek, Anal. Chem. 10 (1963) 613

RP-UHPLC/MS: analýza > 500 lipidů v plazmě





Z. Vaňková et al., Anal. Bioanal. Chem., doi: 10.1007/s00216-021-03492-4