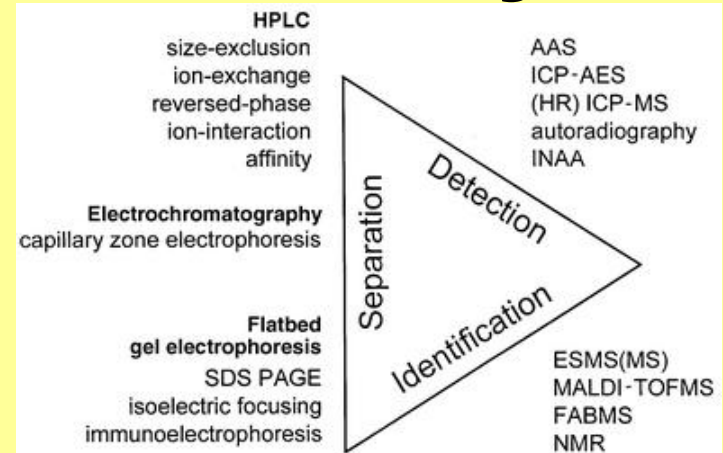
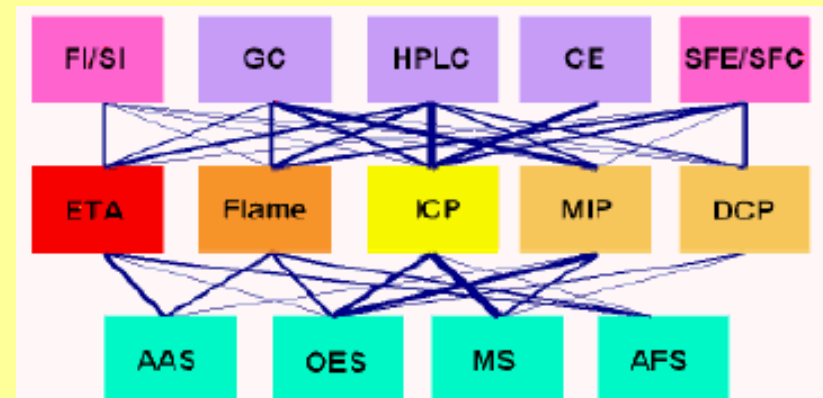


Kombinované techniky

- Separace/izolace složek
- Identifikace frakcí
- Kvantifikace složek
- Řešení



- multidisciplinární přístup - postupná aplikace metod
- simultánní přístup – spřažené techniky – „pomlčkové techniky“ (“hyphenated techniques”, “hybrid techniques“)
 - LC-MS, LC-MS-MS, GC-MS, GC-FTIR, TGA-FTIR, CE-MS, GC-ICP-MS, LC-ICP-MS, LC-NMR, GC-IMS (ion mobility spectrometry)

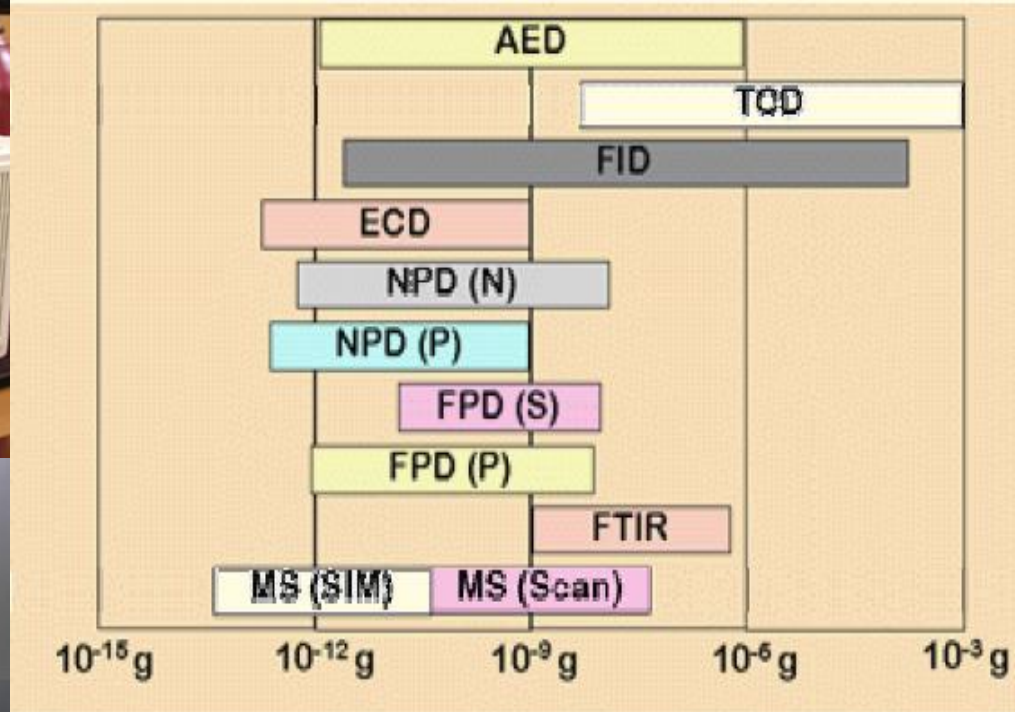


Kombinované techniky

- **multidisciplinární přístup**
 - **Elementární analýza – C, H, N, halogeny atd.**
 - **Empirický vzorec**
 - **Infračervená/Ramanova spektrometrie**
 - **Typ skeletu, funkční skupiny - substituenty**
 - **MS spektrometrie**
 - **Pík molekulového ion-radikálu, sumární vzorec**
 - **Charakteristické fragmentace, efekty přirozeného izotopického zastoupení pro různé prvky**
 - **NMR spektrometrie**
 - **Skelet – uhlíky a vodíky, některé substituenty**
 - **RTG difraktometrie – strukturní parametry u krystalických vzorků**
 - **UV-vis spektra – doplňkové, spíš využití databází spekter**

Kombinované techniky

- **Spřažené techniky**
 - Úspora času – separace, identifikace, kvantifikace
- **Spřažené techniky s plynovou chromatografií**
 - GC-MS, GC-FTIR, GC-ICP-MS



GC-MS

- **Plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí**
 - 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 krvi a moči pro farmakologické i forenzní aplikace
 - Potřebné množství - běžně 1 až 100 pg na složku

GC-MS

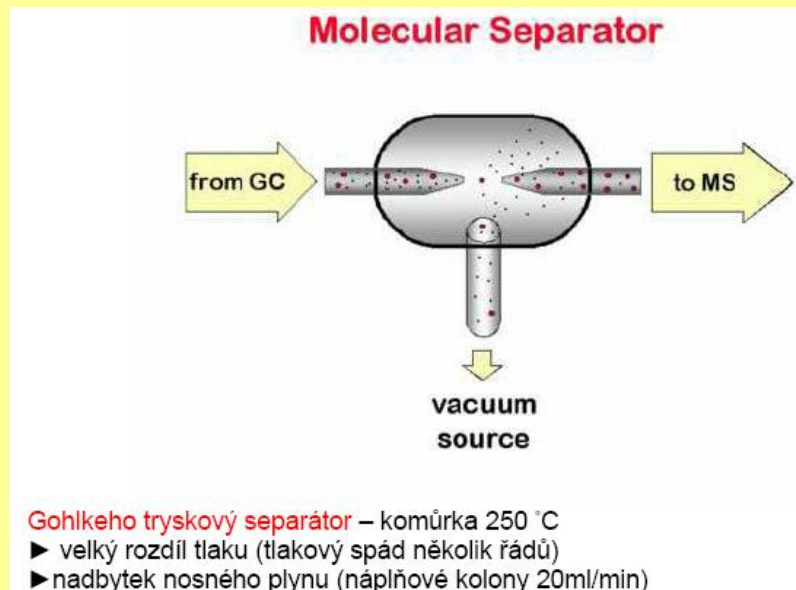
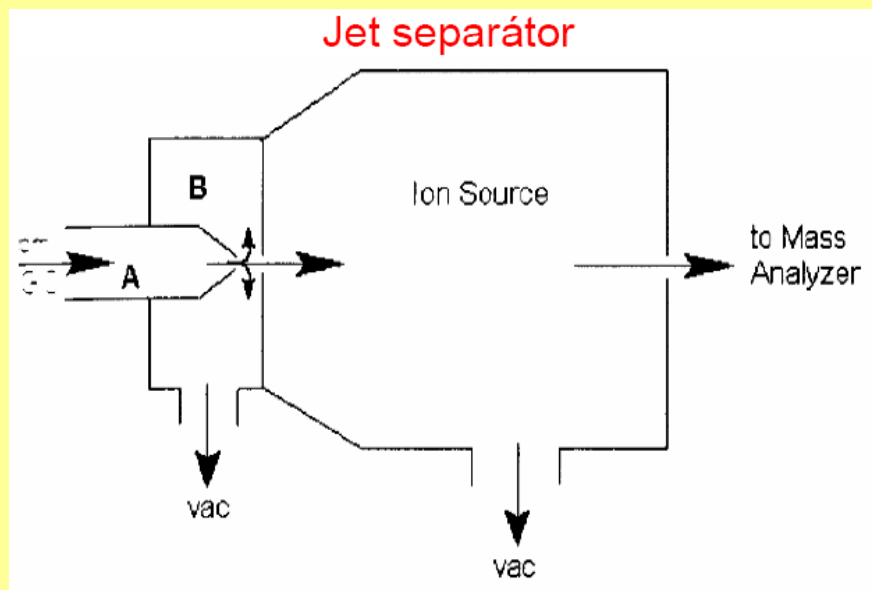
- **Plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí**
 - Čas analýzy – 20 až 100 minut
 - Doba zpracování dat – 1 až 20 hodin

 - Pouze těkavé, termostabilní látky, nebo látky po derivatizaci (trimethylsilyl- ethery)
 - Těžko určit polohy substituentů na Ar jádře
 - Problém „polohových“ izomerů (hmotnostně spektrometricky je např. obtížné rozlišit naftalen a azulen)

 - Rozdíl mezi GC a MS – pracovní tlak (*zhruba 8 až 9 řádů*), přítomnost nosného plynu - INTERFACE

GC-MS

- Rozdíl mezi GC a MS – pracovní tlak (zhruba 8 až 9 řádů), přítomnost nosného plynu – INTERFACE
- různá řešení
 - nejstarší - oddělení malé frakce (1 – 5 %) jako vstup do MS
 - problém citlivosti a limitu detekce
 - interface snižující tlak separací nosného plynu se vstupem prakticky veškerého množství vzorku do MS (zakoncentrování vzorku) – sondy – separátory – tryskové, „jet“ separátor



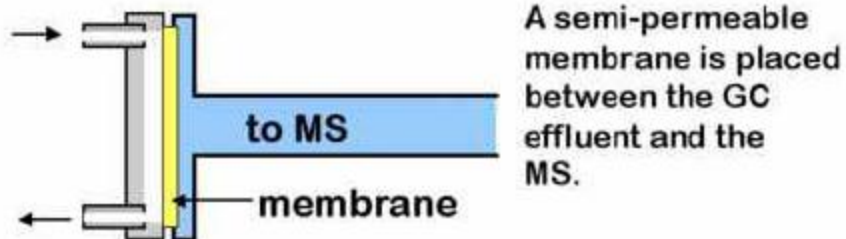
GC-MS

- Rozdíl mezi GC a MS – pracovní tlak (*zhruba 8 až 9 řádů*), přítomnost nosného plynu – INTERFACE
- různá řešení
 - interface snižující tlak separací nosného plynu se vstupem prakticky veškerého množství vzorku do MS (zakoncentrování vzorku) – sondy – separátory – tryskové, „jet separator“
 - **ODLIŠNÁ VELIKOST MOLEKUL NOSNÉHO PLYNU a SEPAROVANÝCH ORGANICKÝCH MOLEKUL** – odlišné hodnoty difusního koeficientu – mnohem menší pro organické molekuly
 - při rozprášení trysků se nosný plyn „rozpráší“ do mnohem většího prostorového úhlu než analyt – organická látka – ta zachycena sběračem
 - skleněná kapilára zatavená do vakuované „obálky“ , tryska a sběrač musí být precizně nastaveny vůči sobě
 - použitelné v případě náplňových kolon, riziko ucpání trysky

GC-MS

- Rozdíl mezi GC a MS – pracovní tlak (zhruba 8 až 9 řádů), přítomnost nosného plynu – INTERFACE

Permeation interface



Major problems with this approach

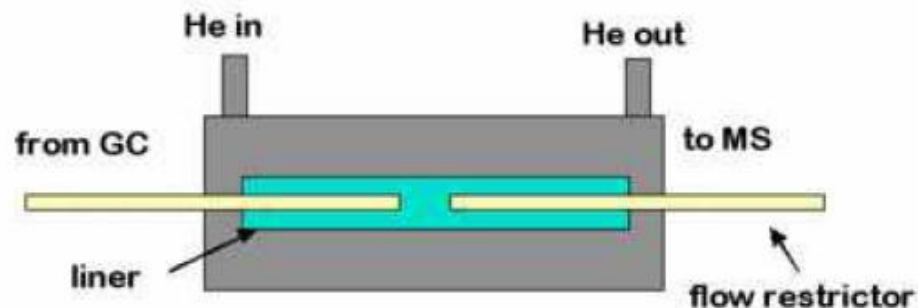
Membrane selectivity based on polarity & MW

Slow to respond

Only a small fraction of analyte actually permeates through membrane

MIMS

Open split interface



The MS pulls in about 1 ml/min through a flow restrictor.

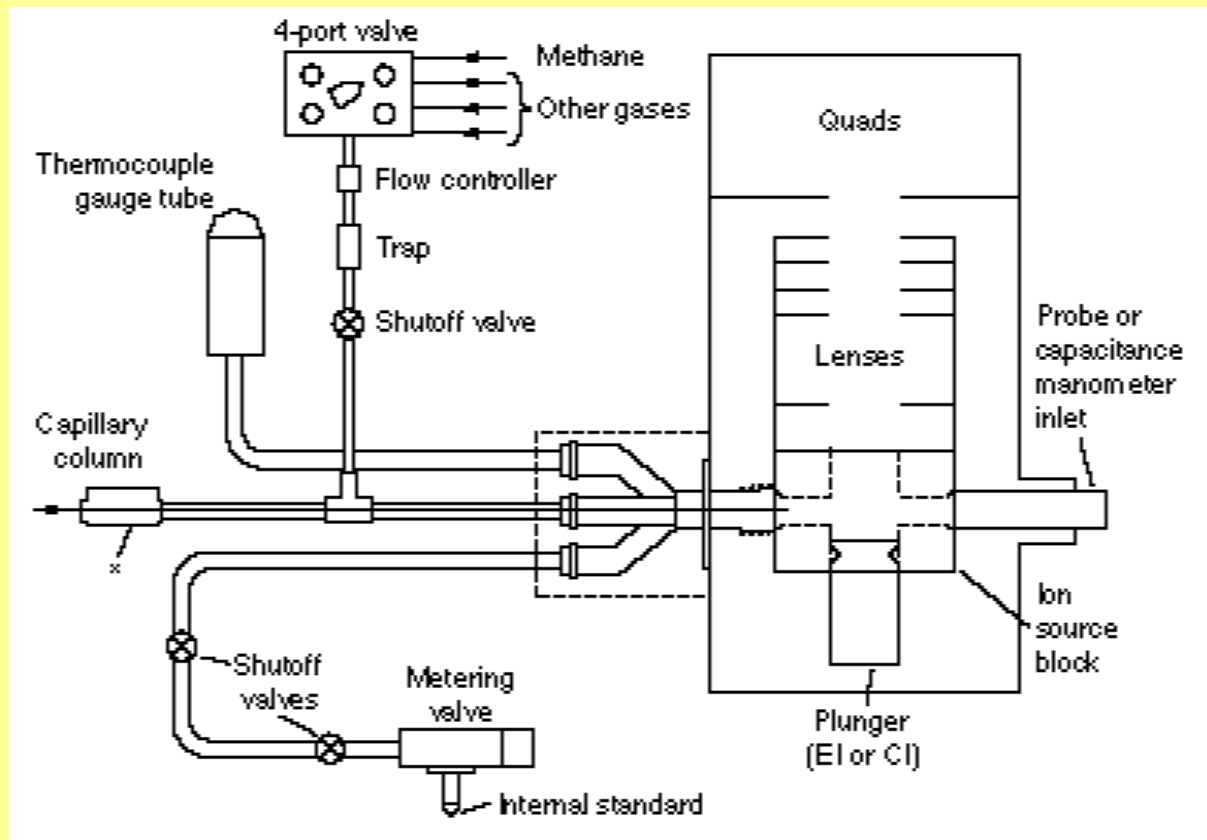
If flow is above that, the excess is vented.

If below, He from external source is pulled in.

Best for sources that have flows close to 1 ml/min like capillary columns

GC-MS

- Rozdíl mezi GC a MS – pracovní tlak (zhruba 8 až 9 řádů), přítomnost nosného plynu – INTERFACE
- Kapilární kolony – nižší průtoky, stačí čerpání vakua ve zdroji, kapilára zavedena přímo do iontového zdroje MS



GC-MS

- MS ionizace – EI, CI
- MS analýza - TOF, iontová past, kvadrupól
- Zpracování dat – ohromný objem dat během jedné analýzy
- Sken MS-spektra běžně – každé 2 s
- Doba analýzy – např. 90 min (20 – 100 min)
- 2 700 MS spekter během jedné analýzy
- Stovky dvojic hodnot – jedno MS spektrum
- Běžně i několik Megabyte dat za analýzu
- Chromatogram – „celkový“ záznam
 - paralelně – detektor FID
 - vyhodnocení TIC – „total ion current“ – integrovaný MS výstup
 - Analýza spekter v maximech chromatografických píků
 - Podrobná analýza všech MS spekter
 - Sledování intenzity vybraného píku při vhodné m/z v čase

GC-MS

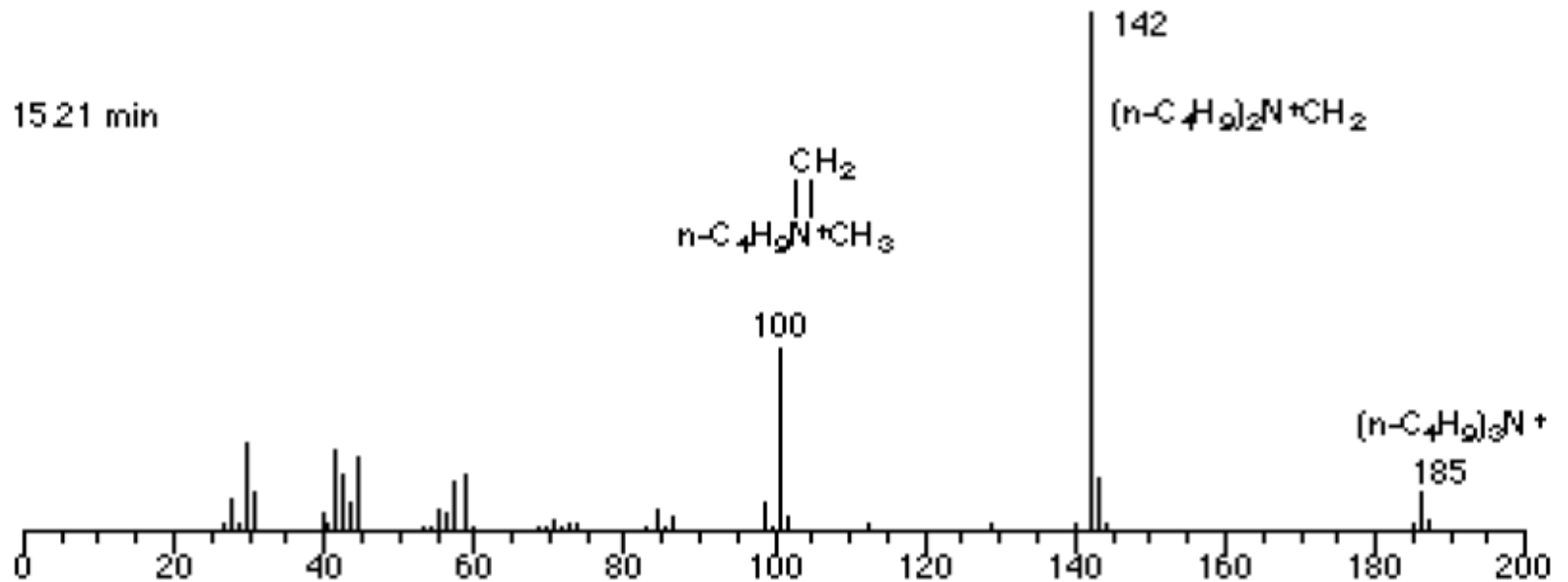
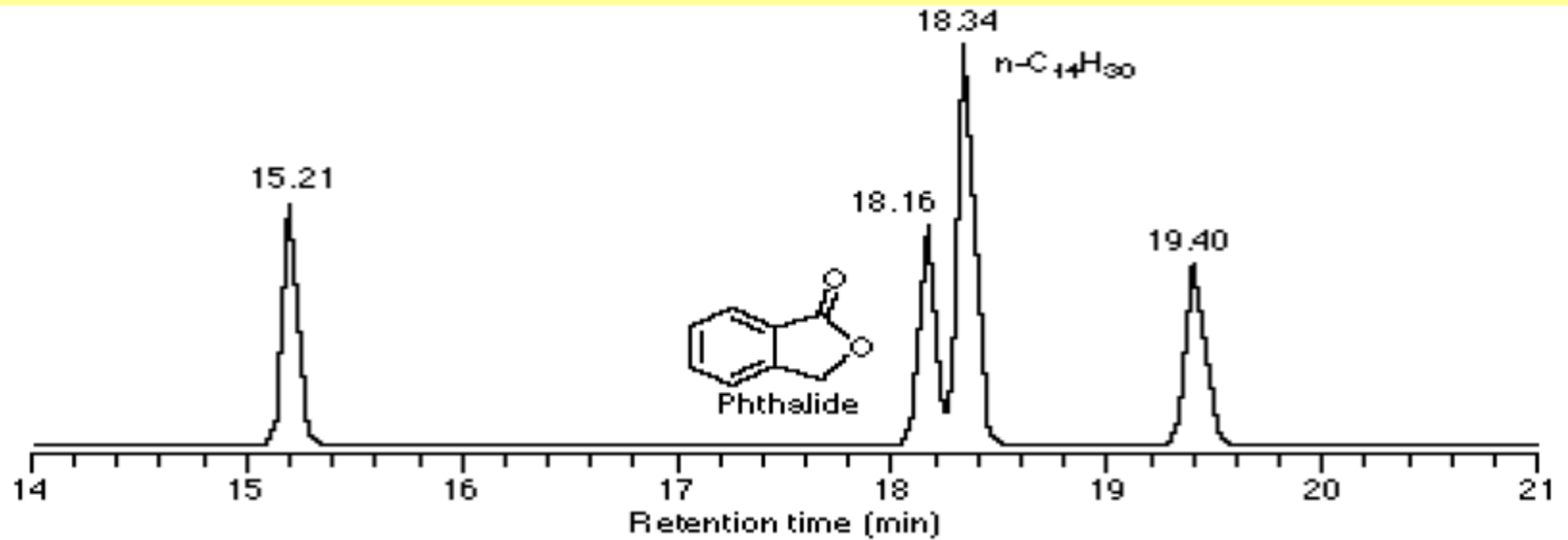
– Kvalitativní informace

- identifikace složek směsi (i nedokonale chromatograficky rozdělených)
- zjištění termální stability látek během analýzy

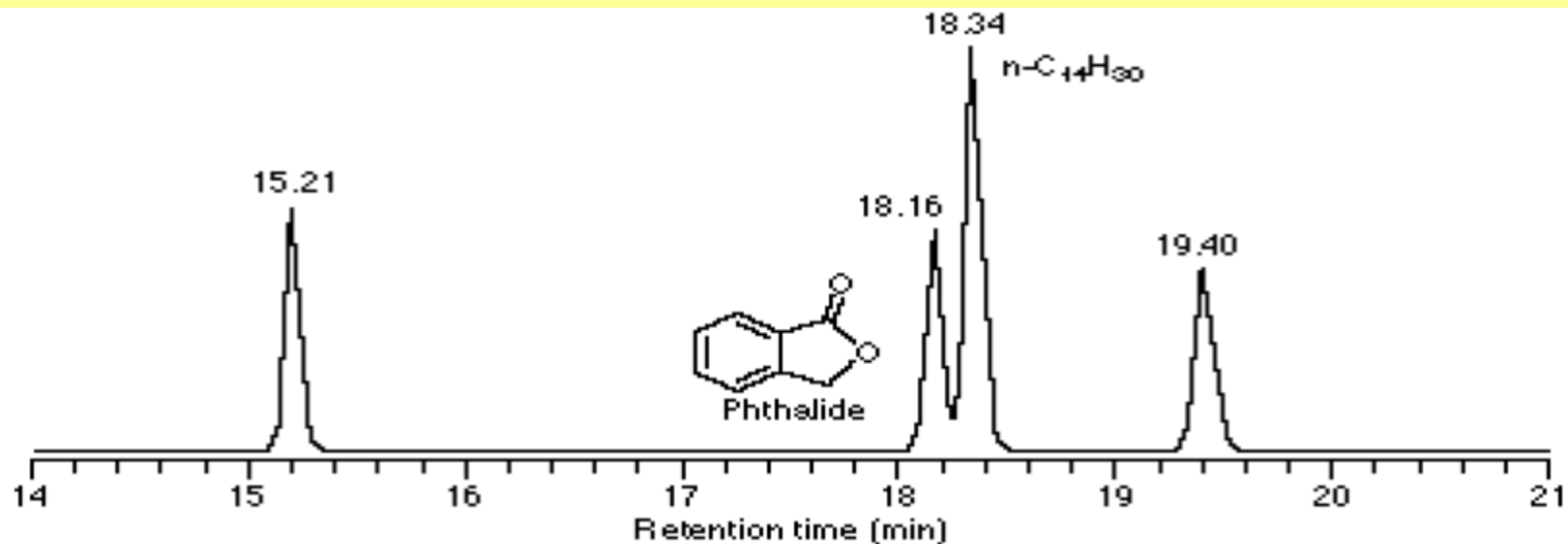
– Kvantitativní informace

- Měření intenzit (ploch) píků
- Selektivní sledování píku při určitém m/z – SIM – selected ion monitoring
- Sledování poměru intenzit dvou píků
- nutná kalibrace – externí či interní
 - Nejlepší – izotopicky značený analog analytu

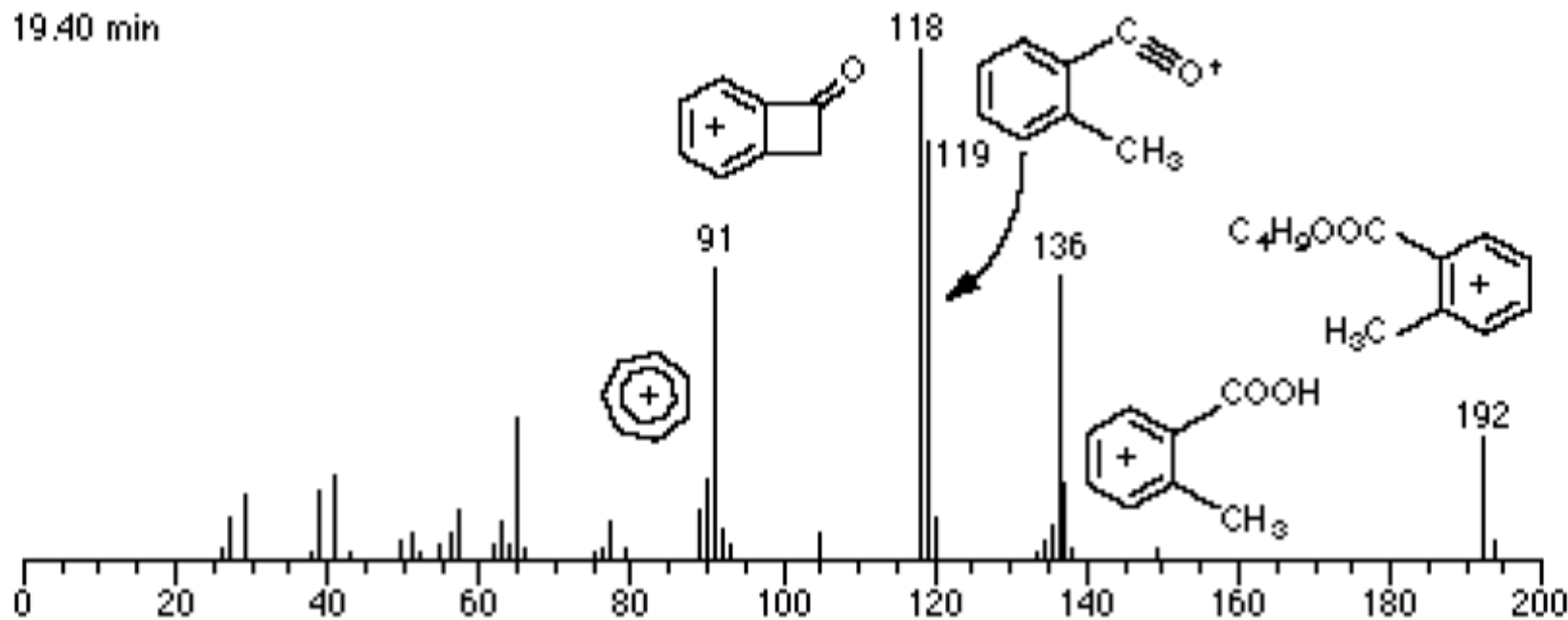
GC-MS



GC-MS

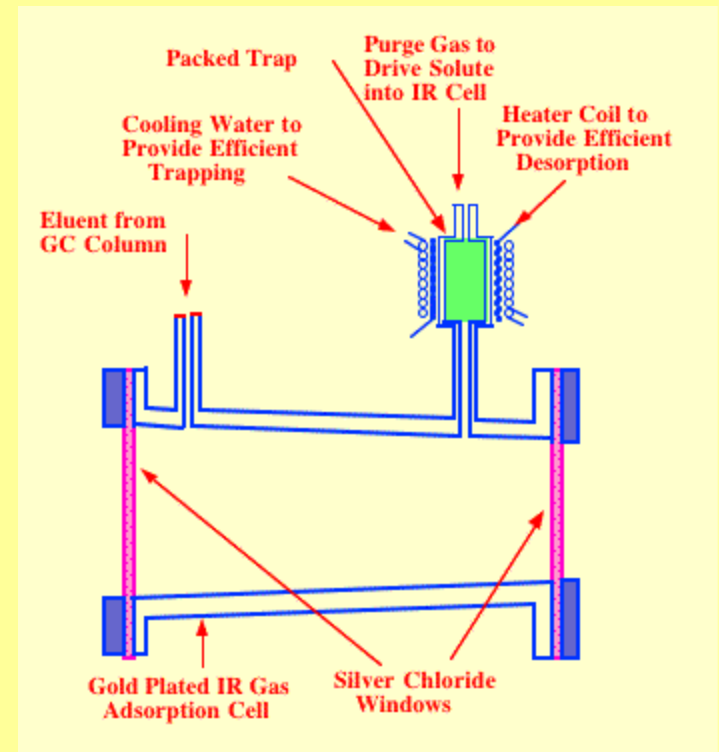
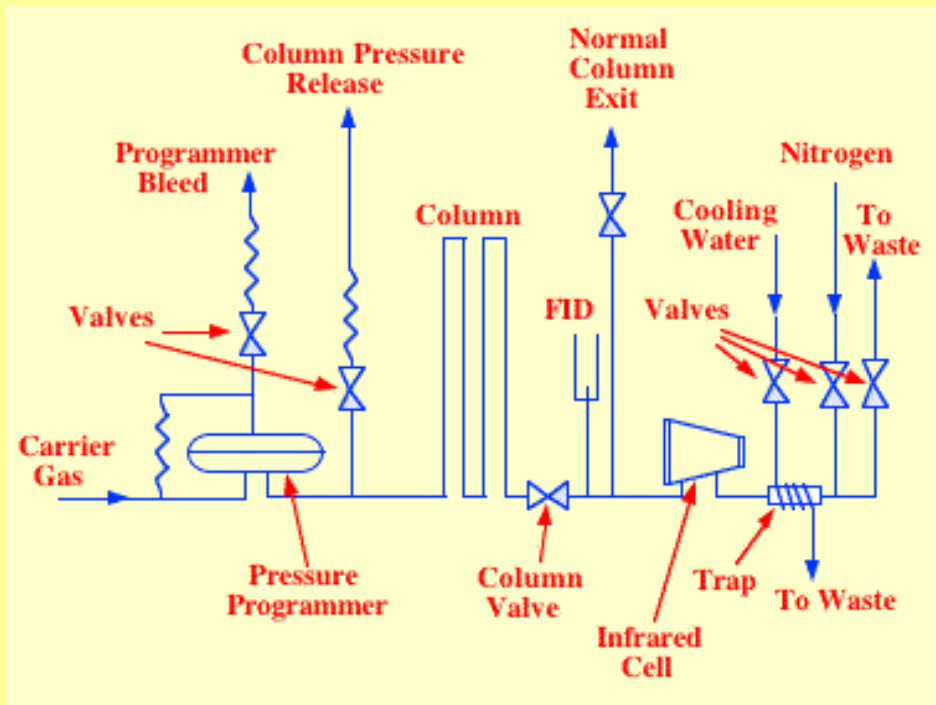


19.40 min



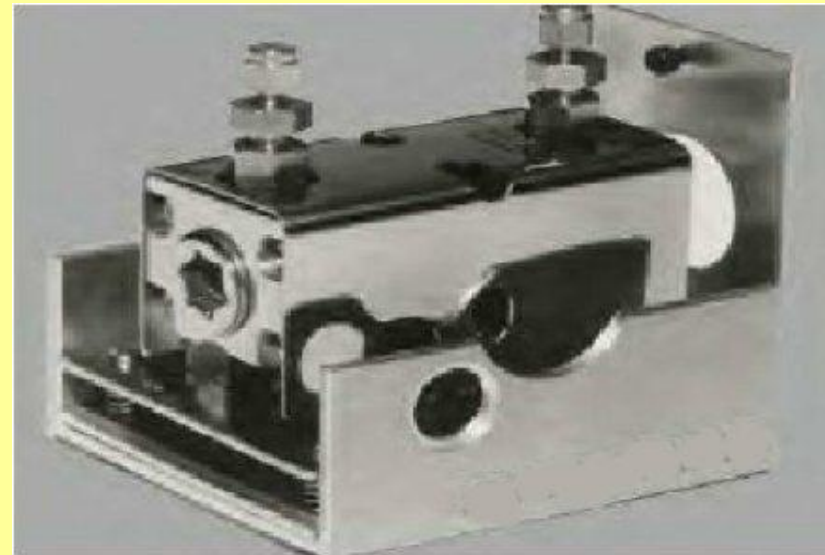
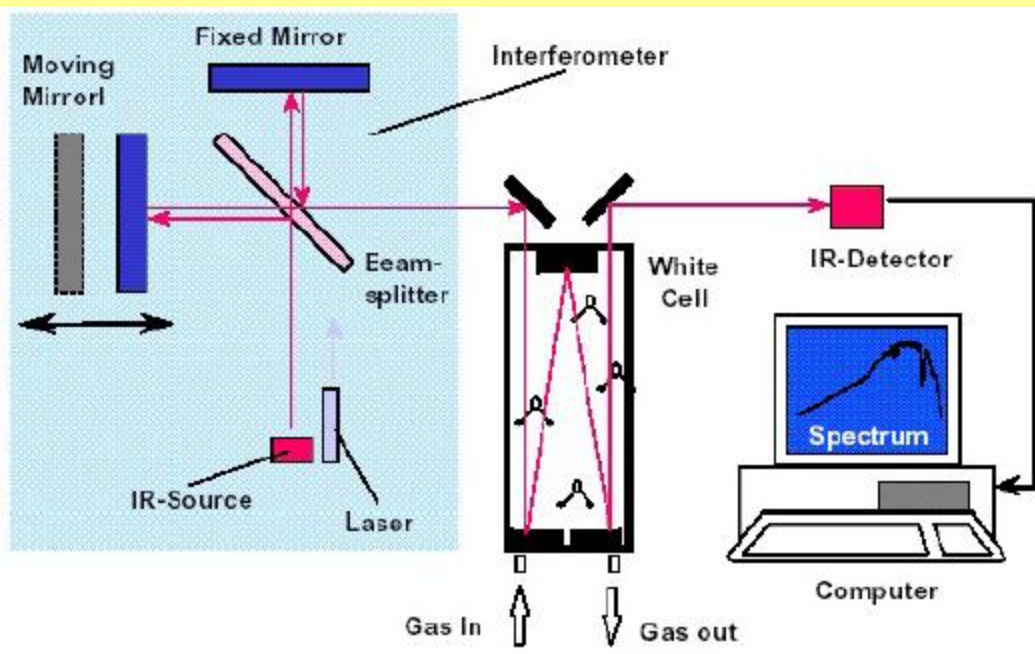
GC-FTIR

- Plynová chromatografie s detekcí pomocí infračervené spektrometrie
 - Identifikace a kvantifikace těkavých látek ve složitých směsích
 - Strukturní analýza látek v uvedených směsích



GC-FTIR

- Plynová chromatografie s detekcí pomocí infračervené spektrometrie
 - FTIR spektrometr – běžný sken – cca 1 s
 - Speciální techniky skenování – step-sken, fast-sken
 - Vysoce citlivý detektor MCT (chlazený kapalným N₂)

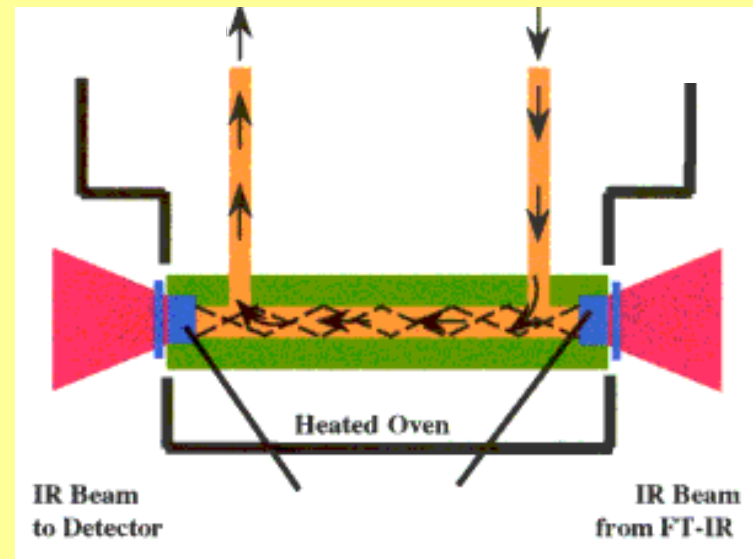


GC-FTIR

- **Plynová chromatografie s detekcí pomocí infračervené spektrometrie**

- **Rychlé měření FTIR spekter v průtočné cele**

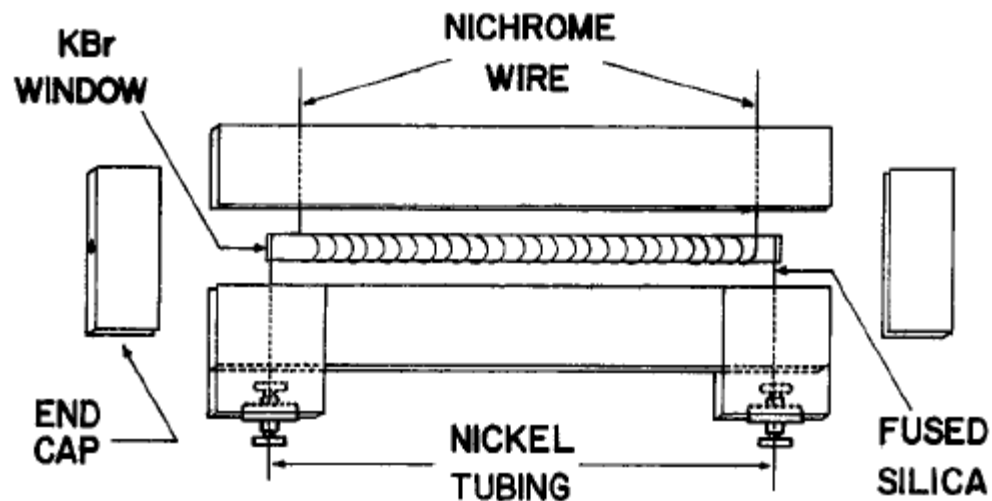
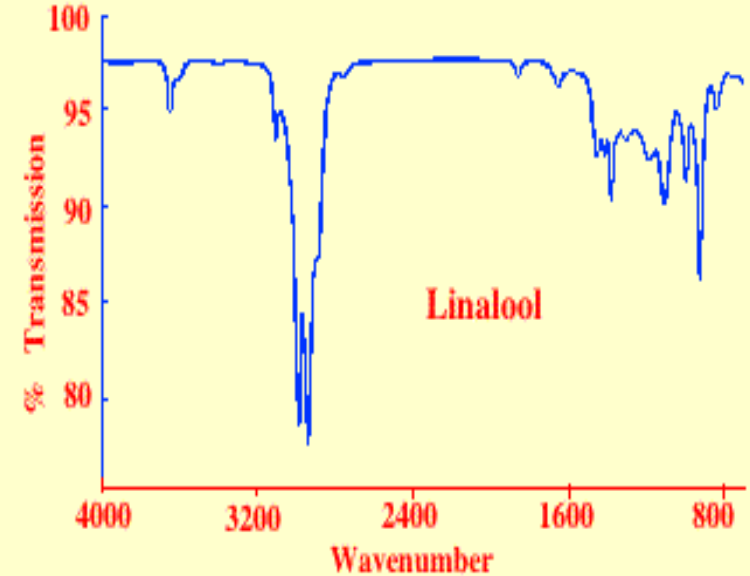
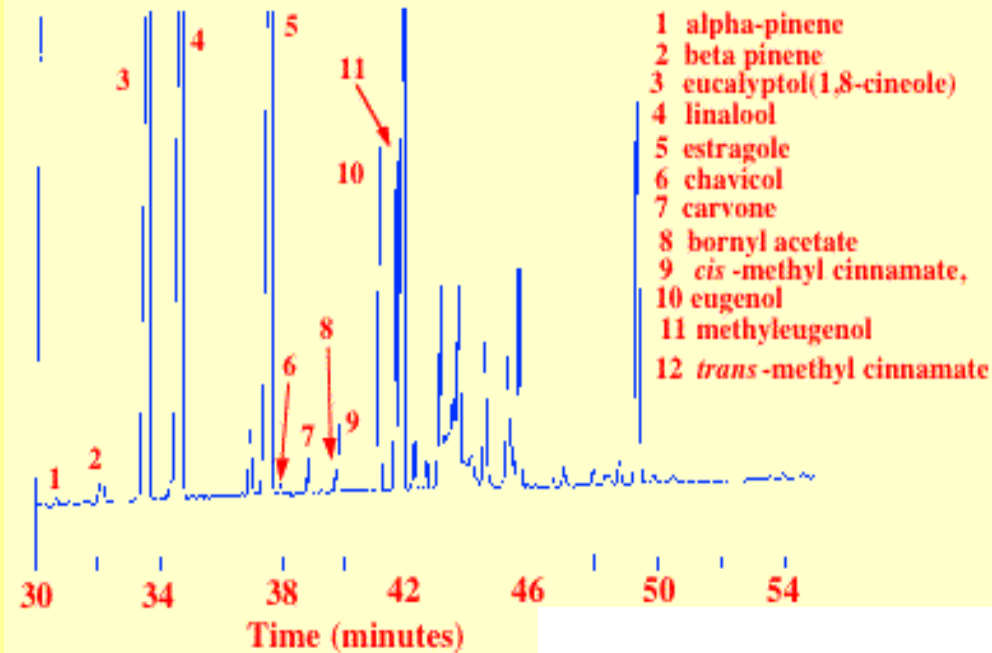
- 10 – 20 (40) cm – délka
- Cca 1-3 mm vnitřní průměr
- Vyhřívané
- IR propustná okénka na koncích
- Pozlacené boční stěny - světlovodný systém



- Měření spektra par – rotačně-vibrační spektrum
- možno změřit desítky ng analytu
- Riziko interakce složek směsi s Au povrchem

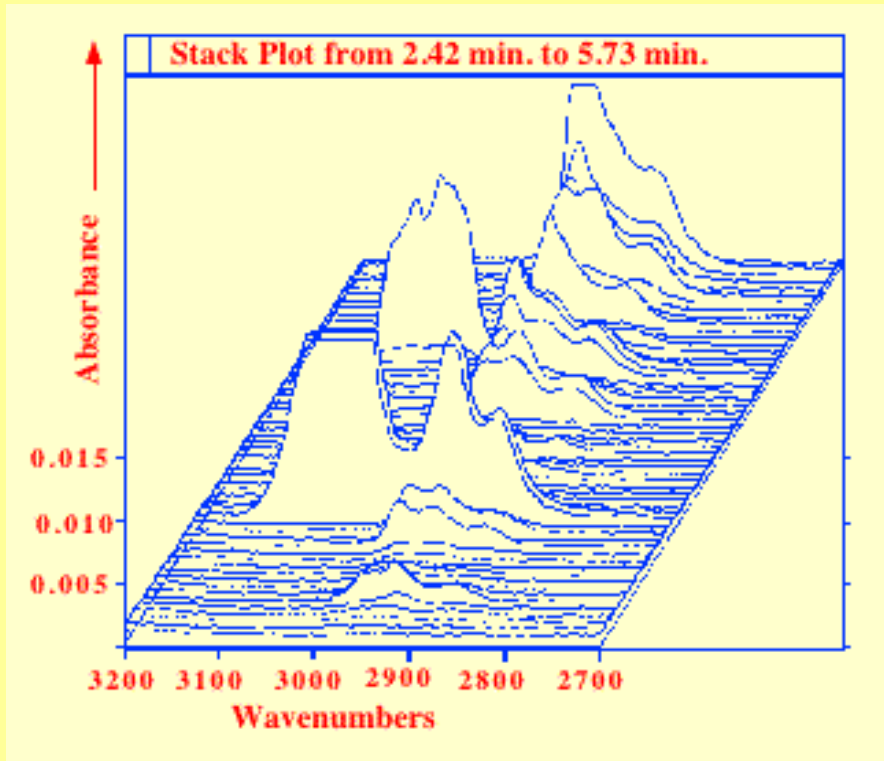
GC-FTIR

– Rychlé měření FTIR spekter v průtočné cele



GC-FTIR

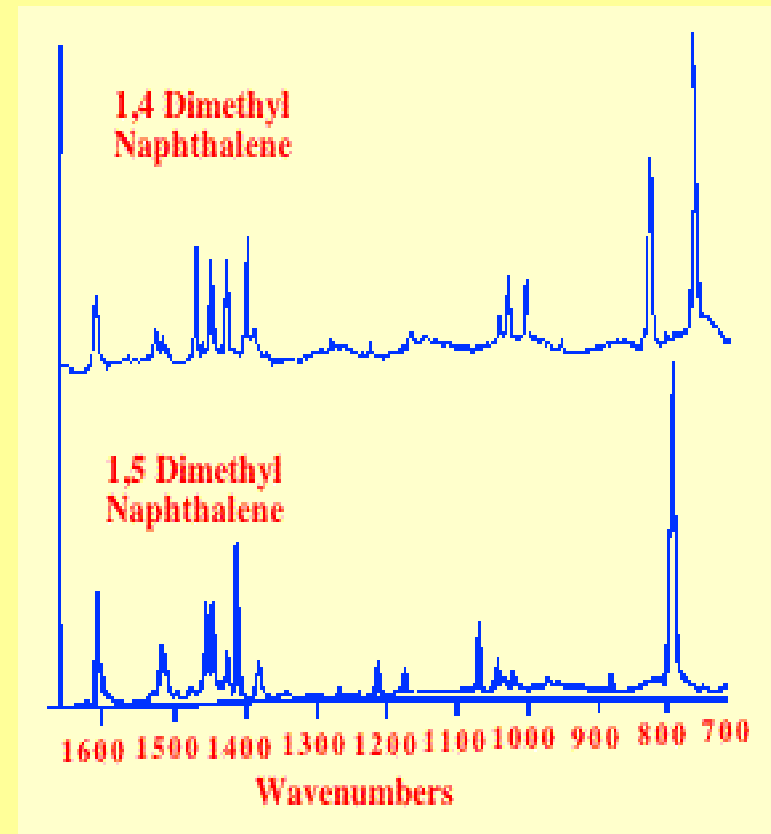
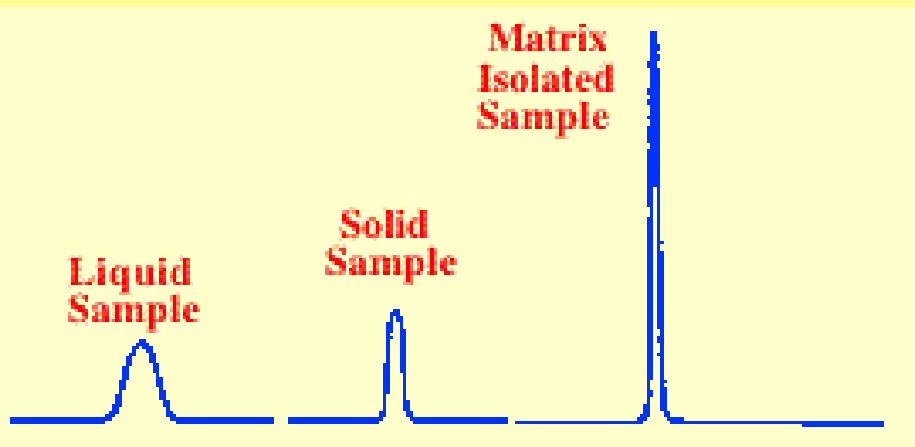
- Plynová chromatografie s detekcí pomocí infračervené spektrometrie
 - Rychlé měření FTIR spekter v průtočné cele



**Dělení
složek
benzínu**

GC-FTIR

- Plynová chromatografie s detekcí pomocí infračervené spektrometrie
 - měření FTIR spekter vymražením látek do argonové matrice – velmi nízký detekční limit – GC-MI-FTIR
 - Kryostatický interface – 12 K
 - Dlouhodobý záchyt frakcí
 - Velmi úzké pásy
 - *drahá metoda*



GC-FTIR

- Plynová chromatografie s detekcí pomocí FTIR
 - měření FTIR spekter ochlazením – přímou depozicí látek na okénko (KBr, ZnSe) - GC-DD-FTIR

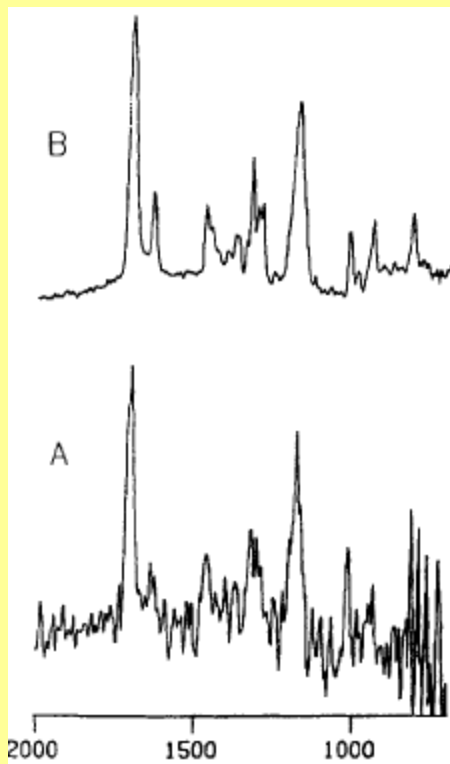
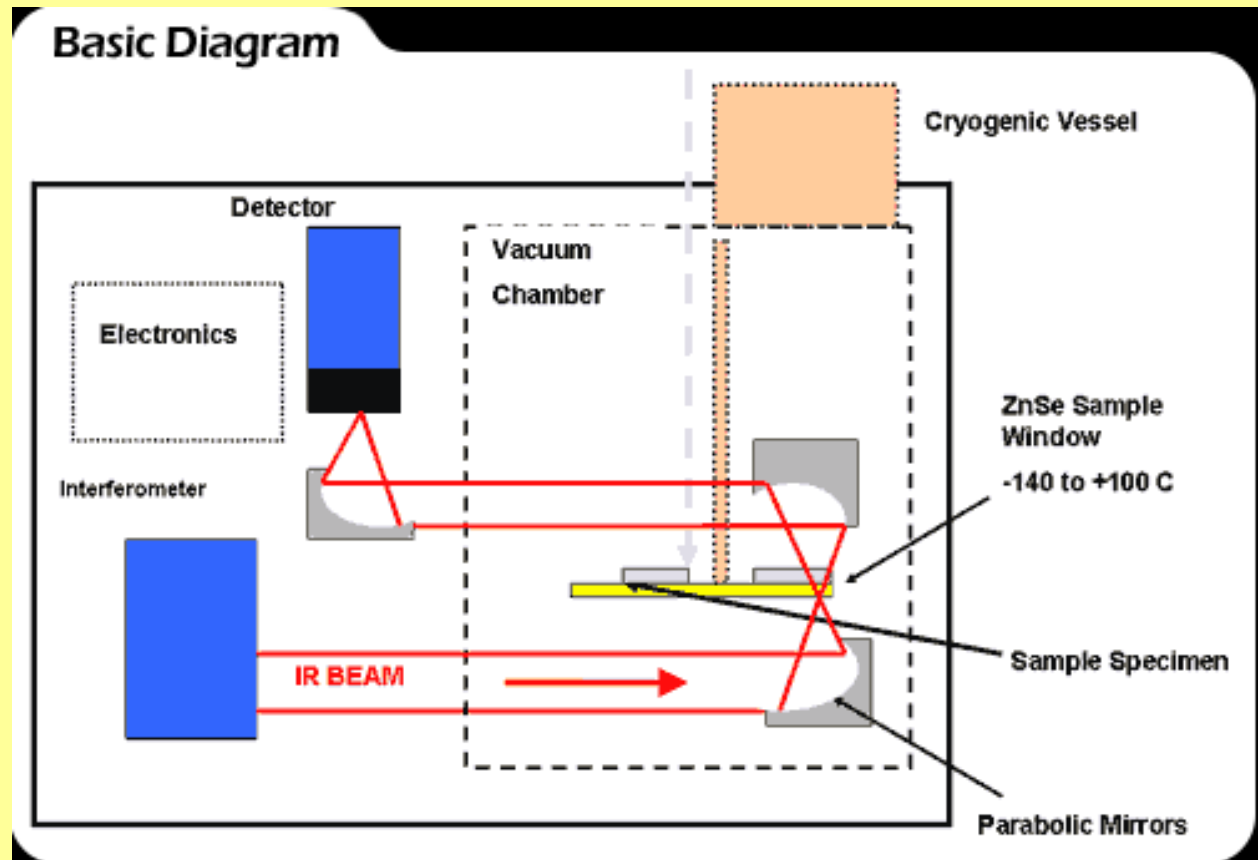


Figure 1

GC-DD-FTIR spectra of 50 pg of isobutyl methacrylate measured (A) in real-time and (B) by post-run signal averaging for one minute. Both spectra have been ordinate-expanded to full scale. The absorbance of the strongest band is 7 milliabsorbance units (mAU).



GC-FTIR/ SFC-FTIR

- **Plynová chromatografie s detekcí pomocí FTIR**
 - měření FTIR spekter ochlazením – přímou depozicí látek na okénko (KBr, ZnSe) - GC-DD-FTIR
 - Běžně teplota okolo -30°C
 - Gausovský profil stop
 - Řada stop proměřena FTIR mikroskopem
 - Sub nanogramová množství látek
 - Velikost pohyblivé ZnSe desky – možnost on-line analýzy s rámci 15 minut
 - Obdobný DD-FTIR systém použitelný pro detekci při SFC chromatografii

GC-FTIR

- Plynová chromatografie s detekcí pomocí FTIR
 - Vyhodnocování spekter
 - Knihovny spekter – kvalitativní - identifikační informace
 - Chemometrická analýza – kvantitativní analýza

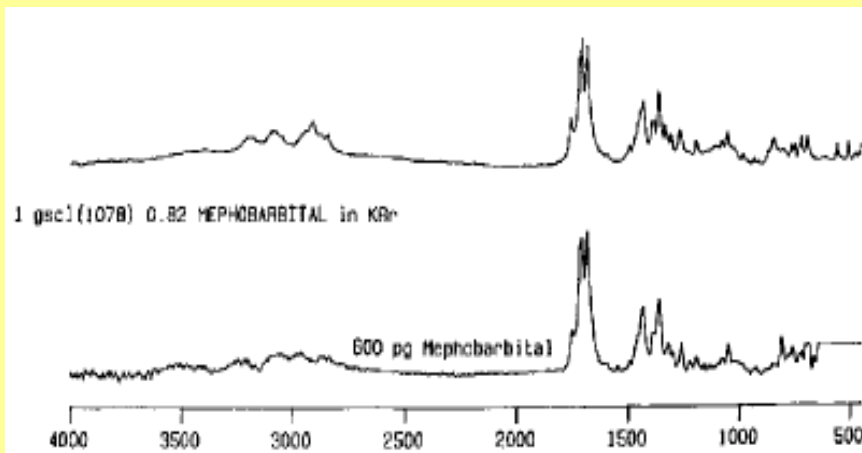


Figure 3

Results from searching the spectrum of 600 pg of mephobarbital against the GSCL Library.

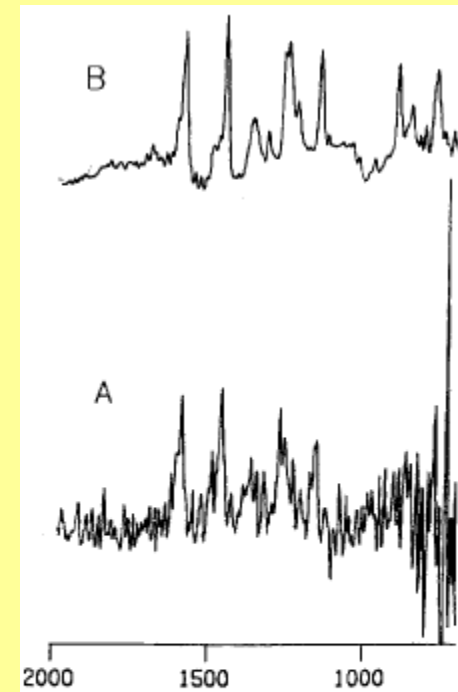


Figure 2

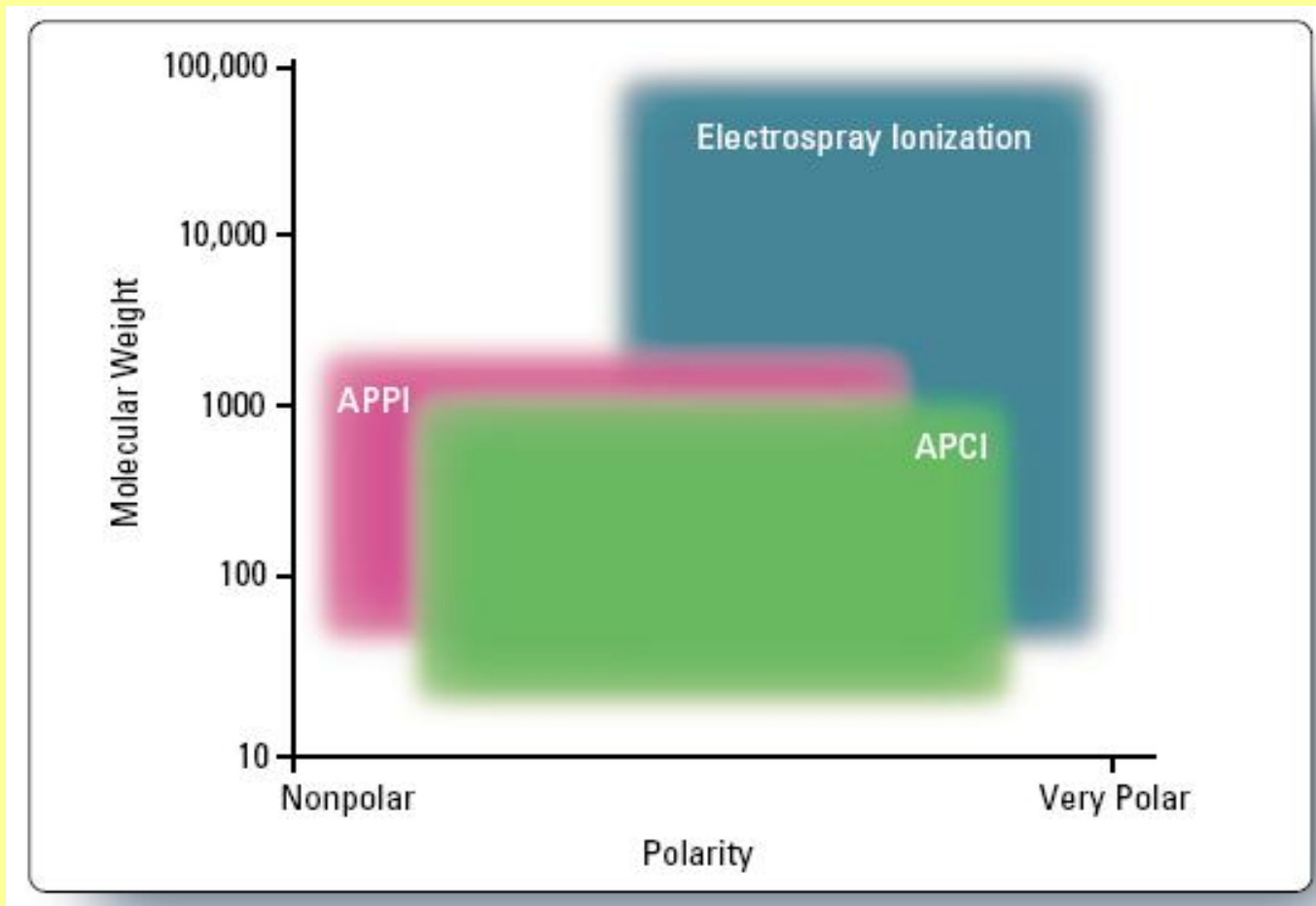
GC-DD-FTIR spectra of 50 pg of 3-ethylphenol measured (A) in real-time and (B) by post-run signal averaging for one minute. Both spectra have been ordinate-expanded to full scale, with the strongest bands having an absorbance of 4 MAU.

LC-MS

- **Kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí**
 - Farmakokinetické studie
 - Proteomika
 - Vývoj léčiv
- **Vhodné malé průměry kolon, nízké průtokové rychlosti**
- **KLÍČOVÝ – INTEFACE**
 - Vhodná ionizační technika – elektrosprej - ESI
 - nanosprej, další – APCI (chemická ionizace při atmosférickém tlaku), APPI (fotoionizace při a.t.), FAB, termosprej
 - offline-MALDI

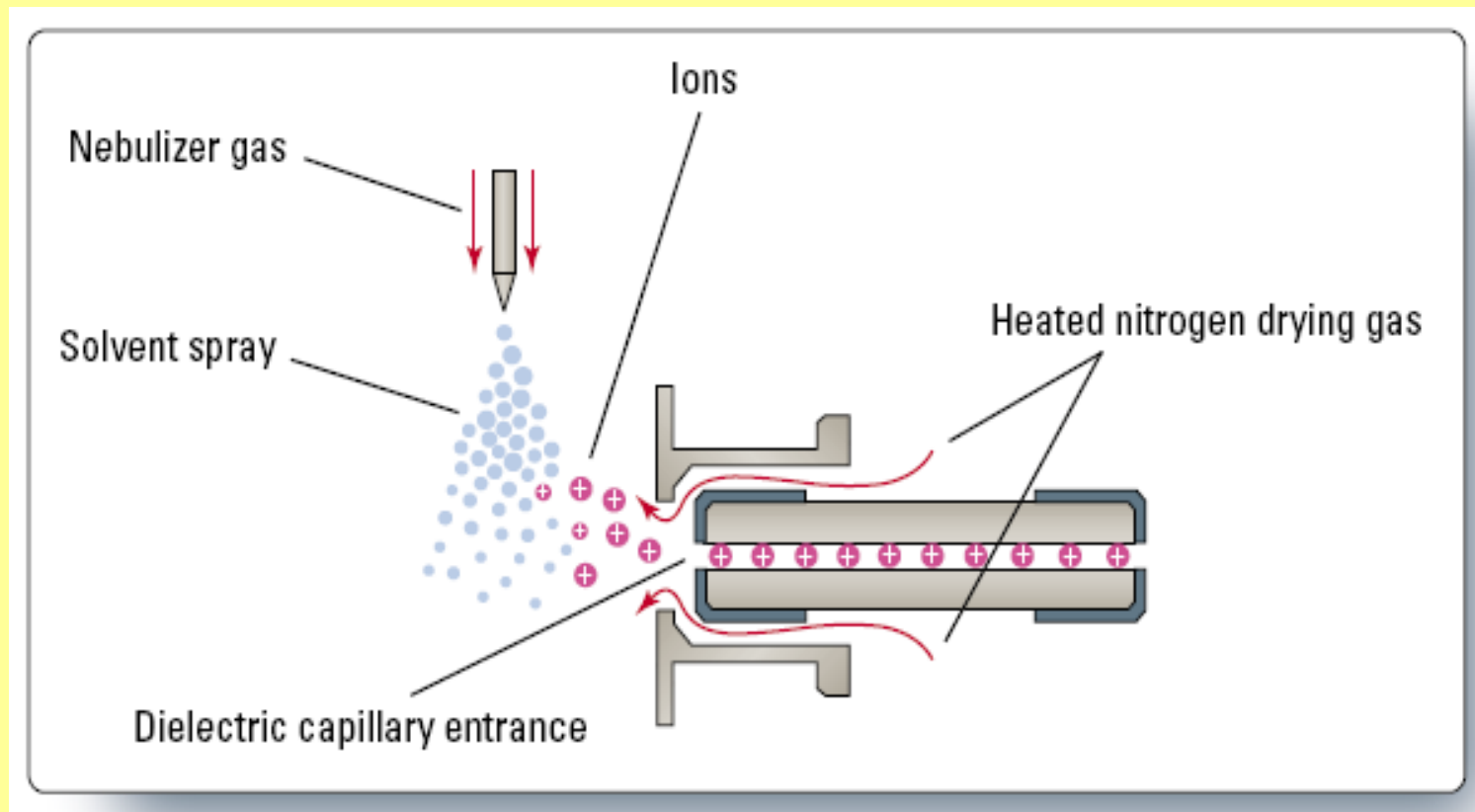
LC-MS

- **Kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí**
 - **Vhodná ionizační technika – ESI, APCI, APPI**



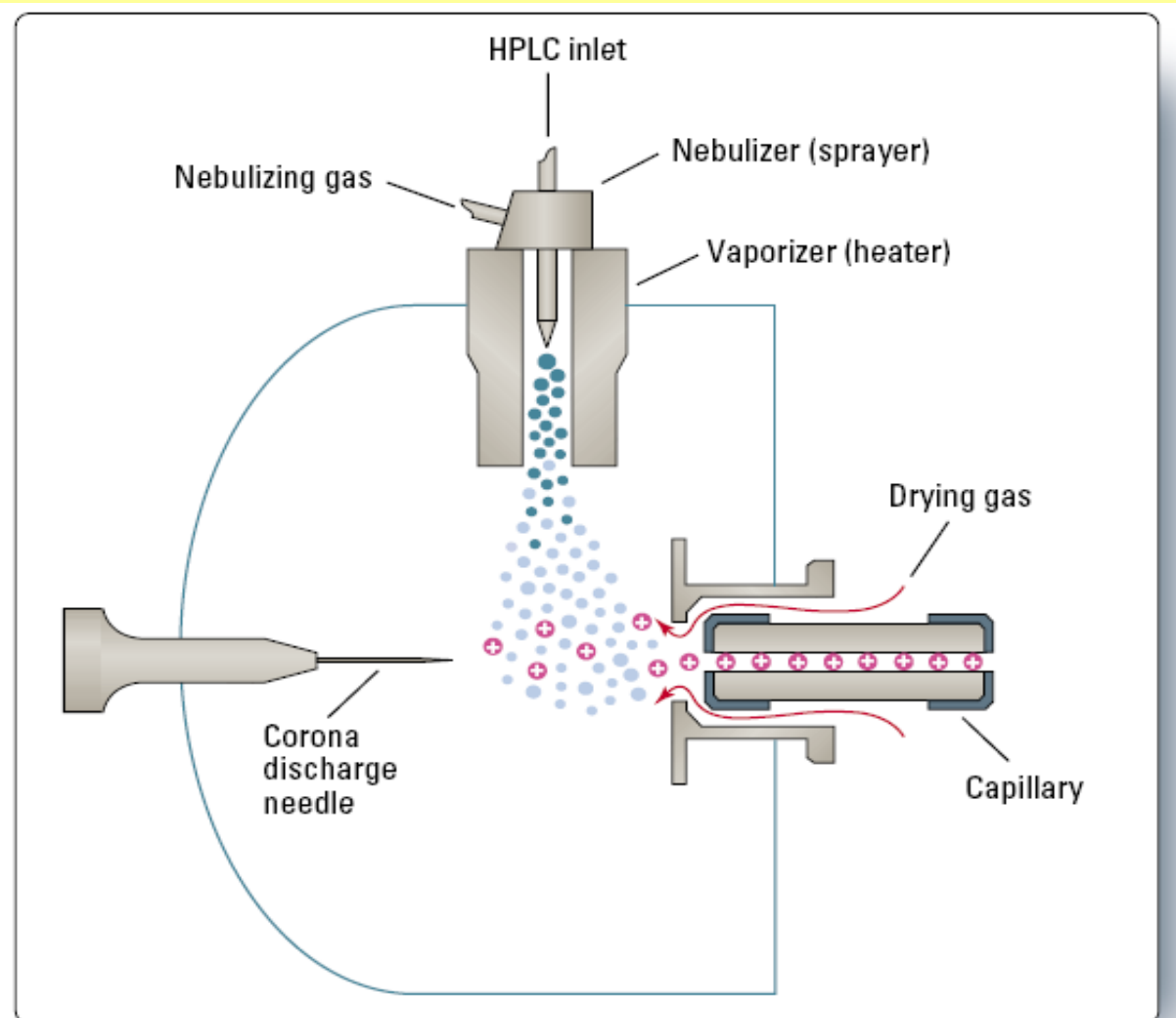
LC-MS

- **Kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí**
 - ESI – vhodné pro polární analyty – RP chromatografie



LC-MS

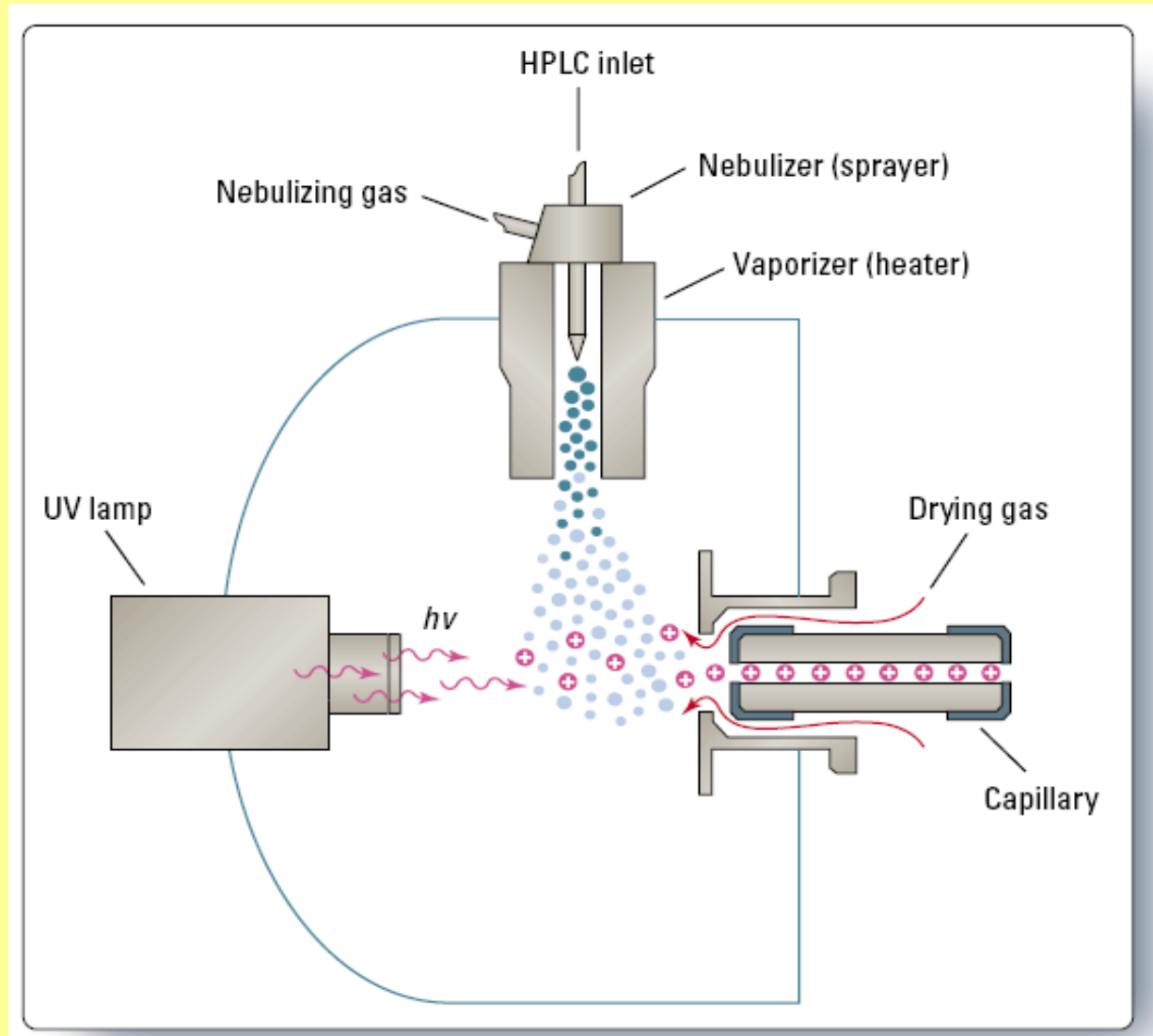
- **APCI – i pro málo polární analyty**
- **vyhříváný rozprašovač (250 – 400°C)**
- **výbojem – ionizace molekul rozpouštědla**
- **chemická ionizace analytů**
- **nevhodné pro velké termolabilní molekuly**



LC-MS

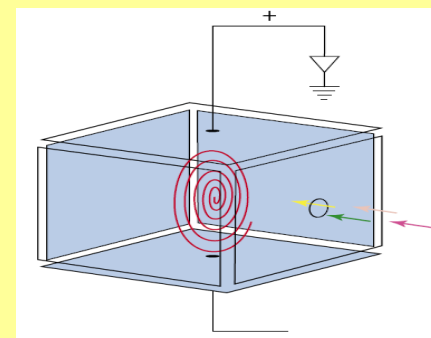
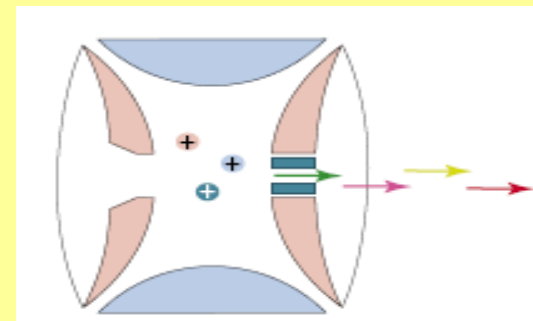
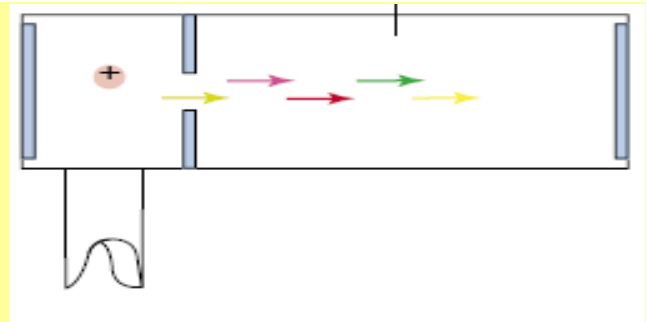
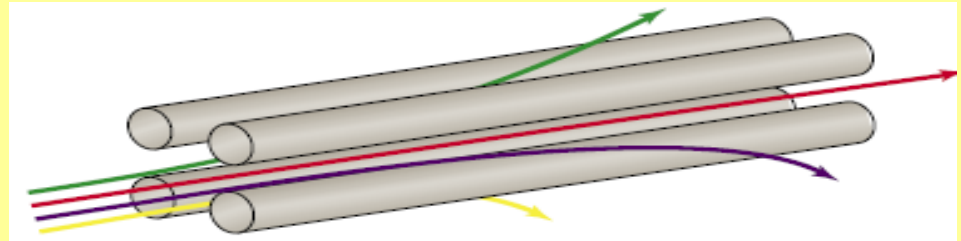
- APPI – i pro nepolární analyty

- vyhřívaný rozprašovač (250 – 400°C)
- odpaření rozpouštědla
- UV výbojka – fotoionizace molekul analytů
- minimalizace ionizace rozpouštědla
- nevhodné pro velké termolabilní molekuly



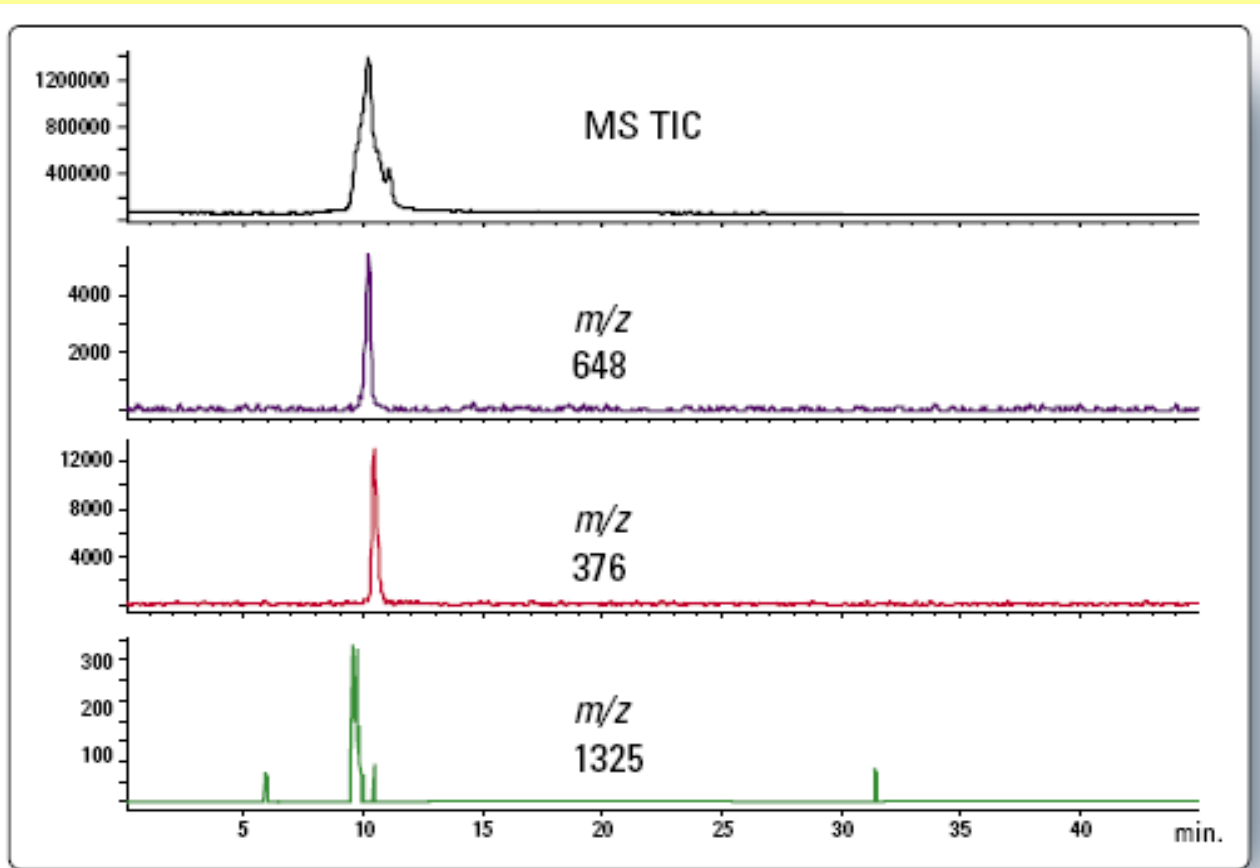
LC-MS

- MS - analýza
- kvadrupól
 - scan mód
 - SIM mód (“selected ion monitoring“)
- TOF
 - možnost velmi přesného určování m/z
- iontová past
 - možnost vícestupňové MS analýzy
- FT-ICR
 - možnost vícestupňové MS analýzy
 - možnost velmi přesného určování m/z



LC-MS

- **Kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí**
 - identifikace více složek v jednom chromatografickém píku

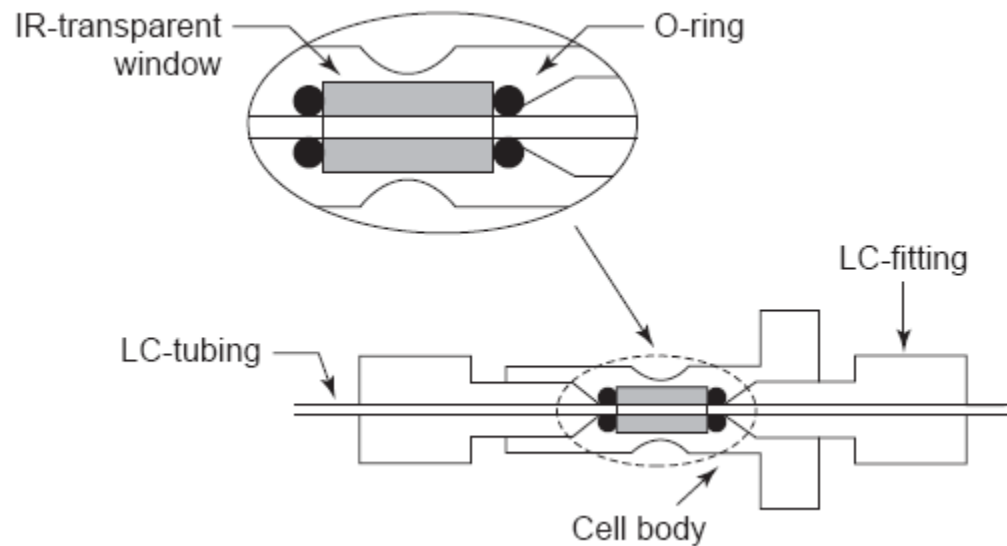
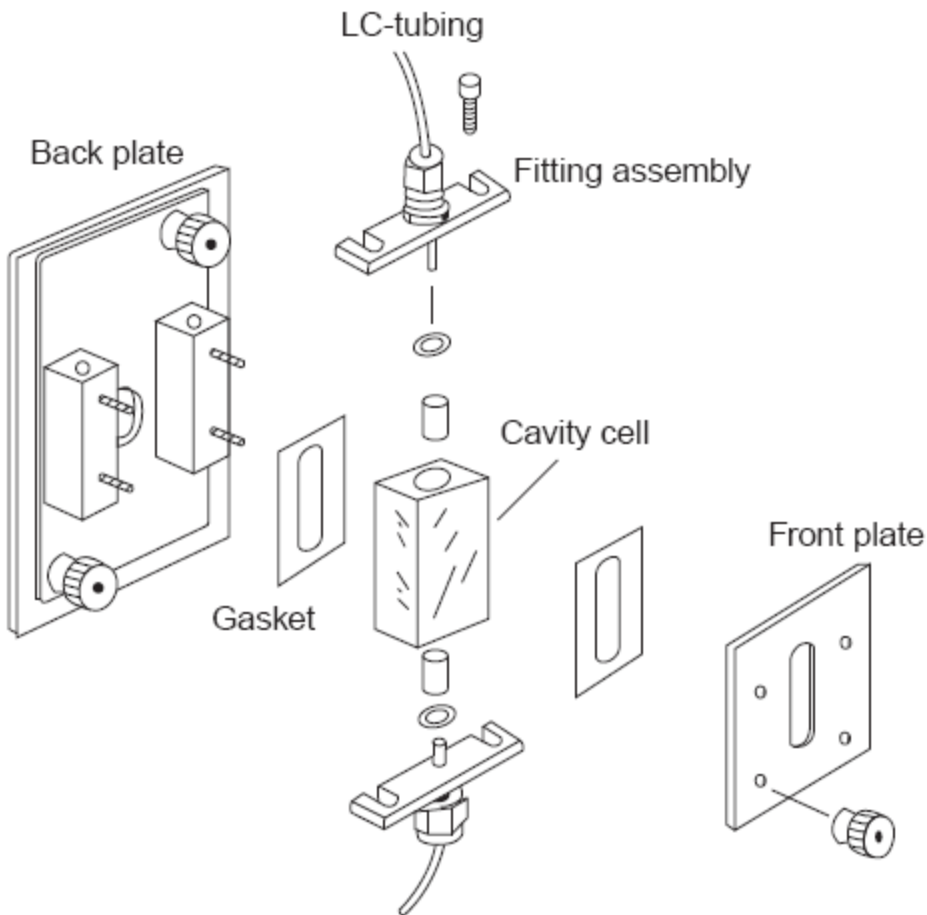


LC-IR

- **Kapalinová chromatografie - infračervená spektrometrie**
 - **Průtočné kyvety – transmisní**
 - **Nejjednodušší způsob propojení LC a IR spektrometrie**
 - **Průběžné měření FTIR spekter (1 sken ~ 1 s)**
 - **Zředěné analyty v mobilní fázi – různé mobilní fáze v různé míře a v různých částech spektra absorbují IR záření**
 - **Často nutný odečet spekter rozpouštědla – problém gradientové eluce – otázka dalšího zpracování spekter**
 - **Slabé pásy zředěných analytů**
 - **Špatný poměr S/N při krátké akumulaci dat**
 - **Problém optické tloušťky kyvet**
 - **Problém vhodných materiálů pro konstrukci cel**

LC-IR

- **Kapalinová chromatografie - infračervená spektrometrie**
 - **Průtočné kyvety -**
 - transmisní**



**Minimalizace
mrtvého objemu**

**Vnitřní objem kyvet
– (0,1 – 10 μ l)**

LC-IR

- **Kapalinová chromatografie - infračervená spektrometrie**
 - **Okénka kyvet propustná pro infračervené záření**
 - **Křemen (sklo) v MIR jen velmi omezená propustnost**
 - **Propustné materiály - často chemicky málo odolné**
 - **Propustné materiály – často problematické mechanické vlastnosti**
 - **RP-HPLC – pozor – vodná rozpouštědla**

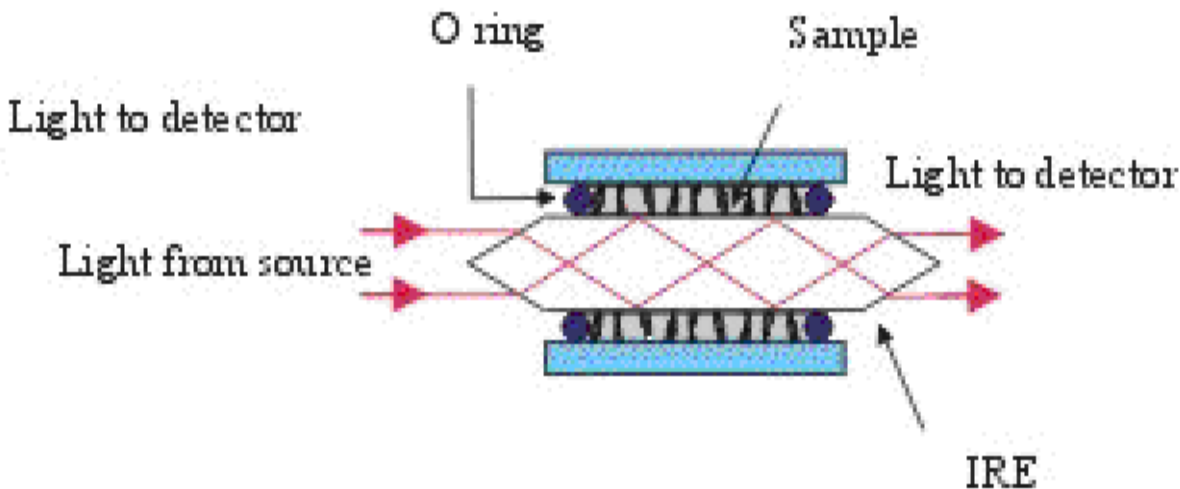
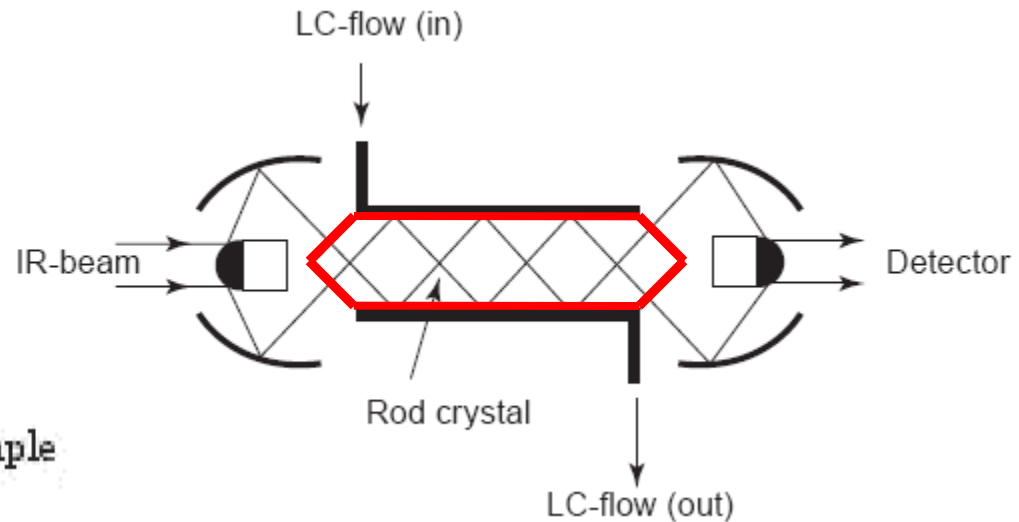
Table 1 Optical materials for use in IR flow cells

Material	Spectral window (cm ⁻¹)	Solubility in water	Sensitive to
Silver chloride	4000–350	slightly soluble	complexing agents
Calcium fluoride	4000–1100	insoluble	ammonium salts; acids
Quartz	4000–2400	insoluble	hydrofluoric acid; hot sulfuric acid
Potassium bromide	4000–400	very soluble	water; methanol
Zinc selenide	4000–450	insoluble	acids; strong alkalis
KRS-5	4000–250	slightly soluble	complexing agents
Polyethylene	630–30	insoluble	organic solvents

LC-IR

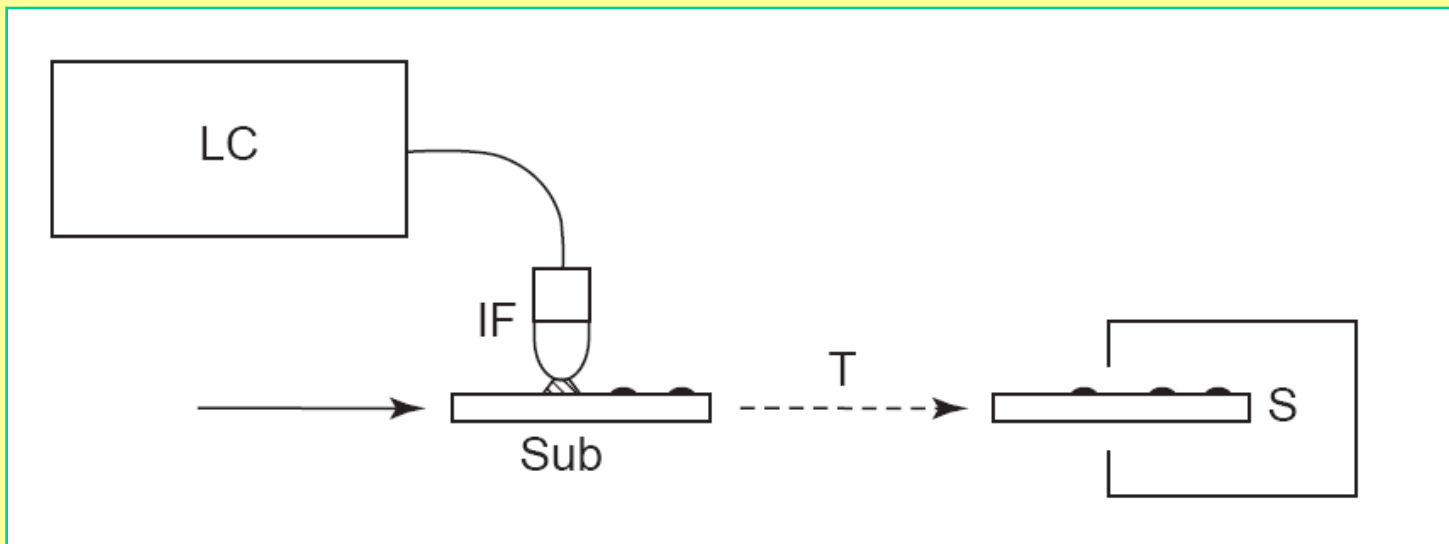
– Jiné typy průtočných cel

- ATR cely – CIRCLE (cylindrical internal reflectance cell)
- Tok efluentu okolo tyčovitého zkoseného válcového krystalu uvnitř protáhlé kyvety ze skla či nerezové slitiny
- Materiál krystalu
 - nejčastěji – ZnSe
- Objem cely 1 – 25 μl
- Chlazení či vyhřívání



LC-IR

- Odstranění rozpouštědla – různé přístupy
- Možnost dodatečného měření IR spekter s delší akumulací
 - Kontinuální immobilizace analytů na vhodném substrátu během chromatografické analýzy s zachovaným rozlišením zón
 - Otázkou je těkavost mobilní fáze a analytů
 - Možnost detekce v sub-ng rozsahu
 - Volba substrátu
 - Volba způsobu měření IR spekter



LC-IR

- **Odstranění rozpouštědla – různé přístupy**
 - Konstrukce interface – on-line vs. off-line
 - Otázka velikosti stop analytů
 - Makro vs. Mikroměření /infračervený mikroskop/
 - Makro měření technikou DRIFT na práškovém substrátu (KBr)
 - Karusel s kalíšky naplněnými KBr
 - Makroměření reflexně-absorpční technikou na kovovém zrcadle
 - Zlaté, stříbrné, nerezové - planární, vysoký úhel dopadu a odrazu
 - Makroměření na transparentním materiálu transmisní technikou
 - Pohyblivá KBr deska, sušení ohřátým plynným dusíkem
 - Rotující KBr disk

LC-IR

• Kapalinová chromatografie - infračervená spektrometrie

Table 2 Characteristics of solvent-elimination RPLC/IR systems^a

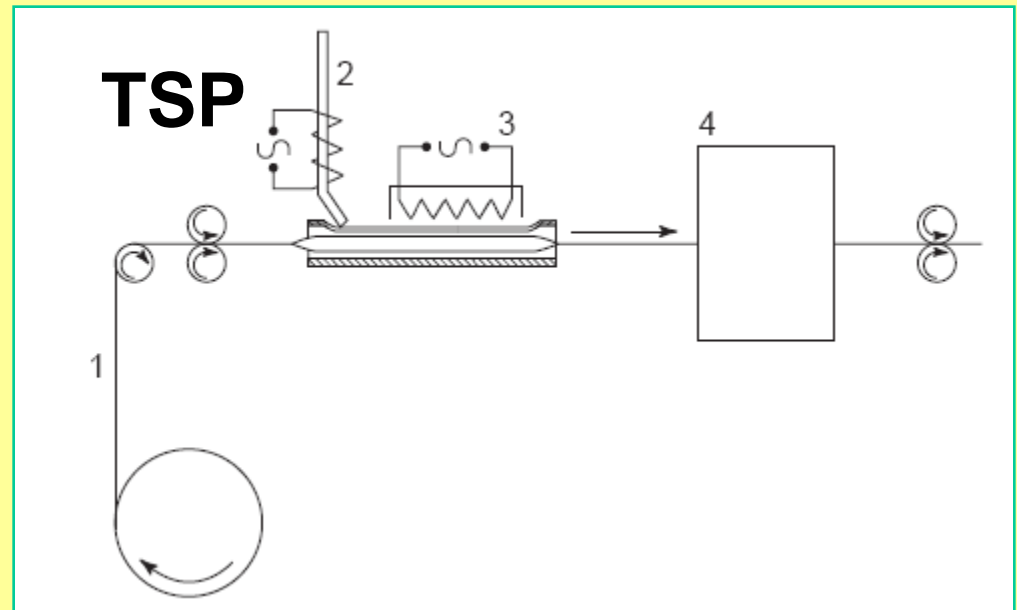
Type of interfacing	IR mode	Substrate	Eluent flow rate ^b ($\mu\text{L min}^{-1}$)	Limit of identification ^b		Refs.
				mass (ng)	conc (mg L^{-1})	
Concentrator after LLE	DRIFT	KCl powder	800	100	10	42
Deposition after DMP	DRIFT	KCl powder	50	1000	1000	44
Buffer memory	trans	SS/WN	4	1000	10 000	49
TSP	R/A	SS tape	500	10 000	–	51
	R/A	SS tape	1000	1000	25	52
PB	trans	KBr window	300	1000	200	56, 58
ESP	trans-micr	ZnSe	4	1	10	62
Pneumatic nebulizer	R/A	Al mirror	30	30	30	38
	trans-micr	ZnSe	50	1	17	69
	trans-micr	ZnSe	20	5	3	39, 73
...after LLE	trans-micr	ZnSe	200	30	0.2	75
...after SPE + LLE	trans-micr	ZnSe	200	50	0.001	76
...after SPE + make-up	trans-micr	ZnSe	2	20	0.02	77
Ultrasonic nebulizer	DRIFT	Diamond powder	40	1000	1000	78
	R/A	Ge disk	500	100	20	81

^a DMP, on-line reaction with DMP; make-up, addition of excess methanol; trans, transmission; trans-micr, transmission with IR microscope; –, concentration and injection volume not stated.

^b Typical values.

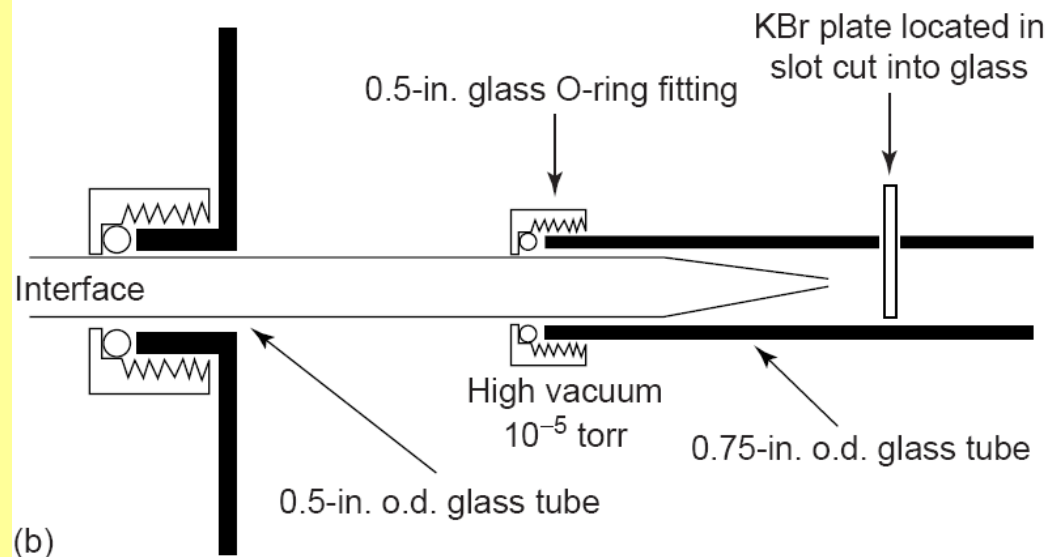
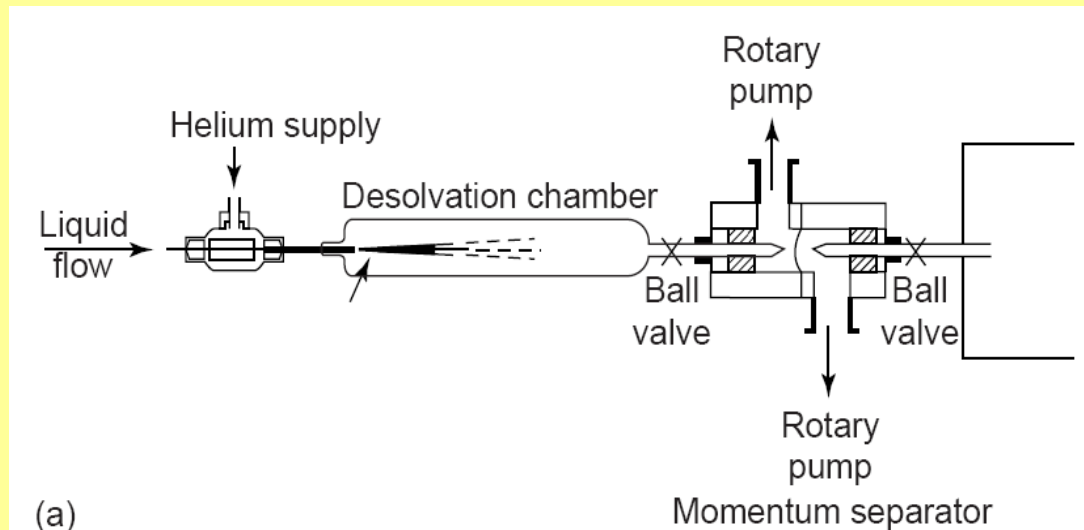
LC-IR

- Odstranění rozpouštědla – různé přístupy
- SPREJOVÉ TECHNIKY
 - TERMOSPREJ – tepelné rozprašování – TSP
 - Při atmosférickém tlaku z ohřáté trysky, proti ohřátému pohyblivému nerezovému pásu, kontinuální měření reflexních IR spekter
 - Sacharidy, aminokyseliny, karboxylové kyseliny, antioxidanty
 - Vodné i nevodné prostředí – NP-HPLC, RP-HPLC
 - Elektrosprej
 - Využití ultrazvukových vln



LC-IR

- Kapalinová chromatografie - infračervená spektrometrie
- Rozprášení proudem plynu – „particle beam“ (PB) - vhodným plynem He vytvoření proudu plynu, par mobilní fáze a částic analytu
- Analyt setrvává v přímočarém pohybu, plyn a páry mobilní fáze jsou odstraněny vývěvou



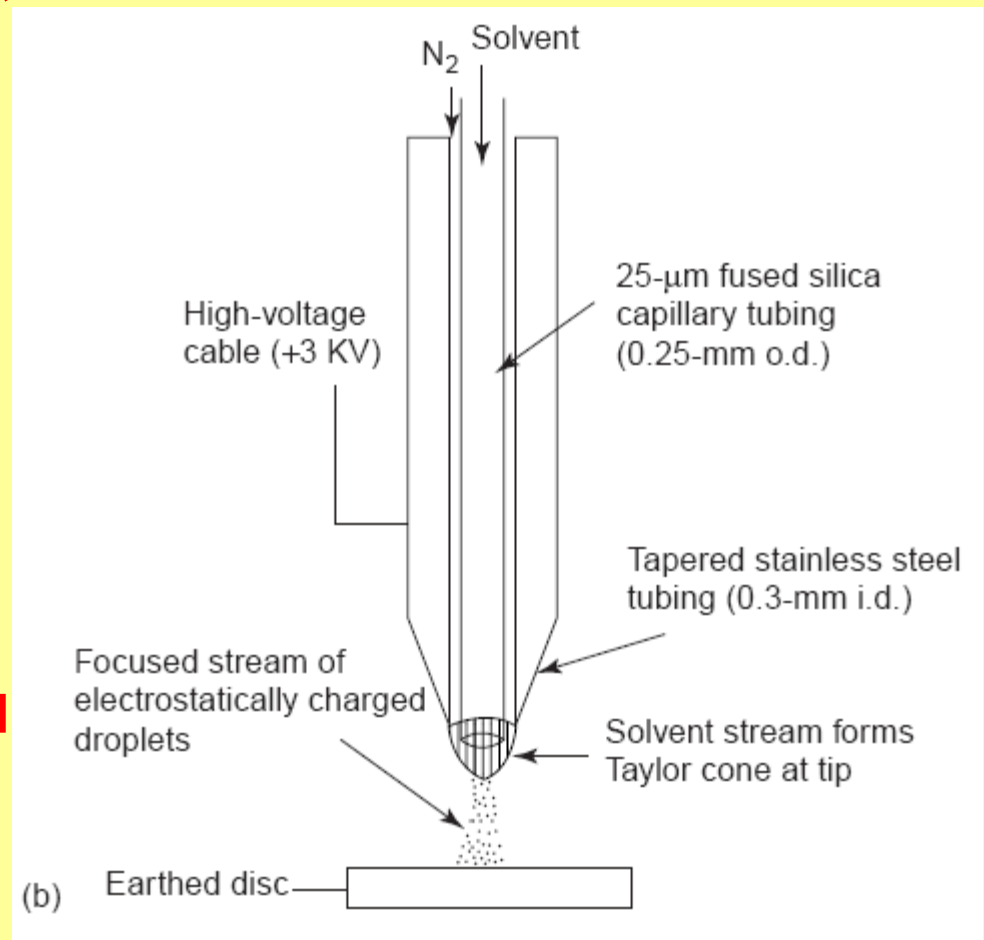
LC-IR

- **Kapalinová chromatografie - infračervená spektrometrie**
- **Rozprášení proudem plynu – „particle beam“ (PB)**
- **Vhodné pro termolabilní látky**
- **Využito při studiu struktury proteinů**
- **Použitelné pro NP i RP HPLC**
- **Problém kontinuální depozice analytů na pohyblivém „terči“ z vhodného materiálu (propustného v IR oblasti)**
- **Problém ztrát analytu u „malých“ molekul**

LC-IR

- Kapalinová chromatografie - infračervená spektrometrie
- ELEKTROSPREJ - ESP za atmosférického tlaku
- Depozice na terč – ZnSe, KBr
- RP i NP LC

- Zkoušena další řada
zmlžovačů
s pohyblivými
depozičními
destičkami a
mikrospektrometrickou
detekcí



LC-IR

HPLC Separation: Fructose & Glucose

(Standard: 25 µl of each compound)

