

# Využití spojení a vývoj LC/MS metod



Blanka Vrbková



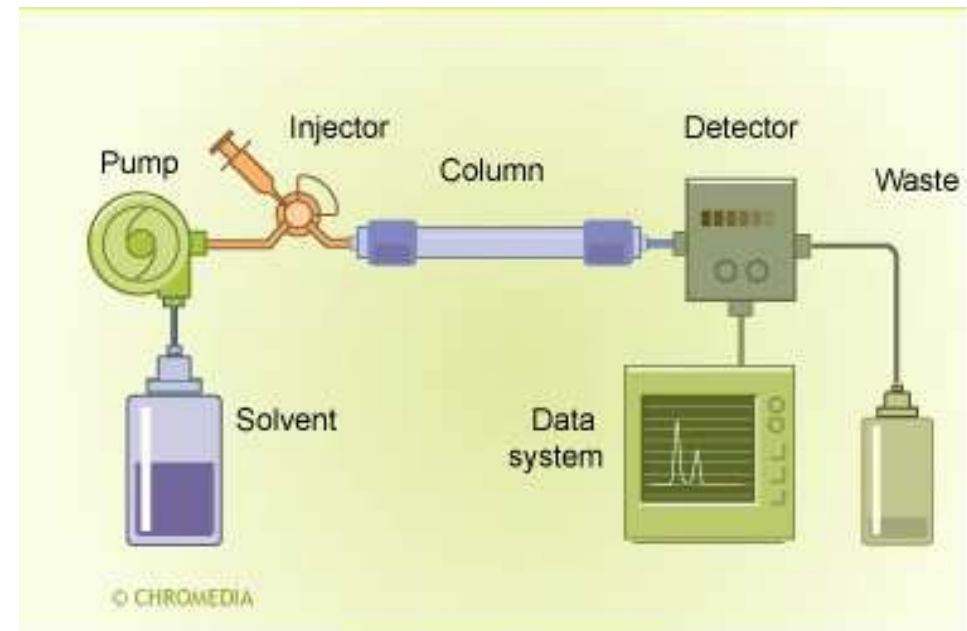
# HPLC

- před 35 lety; nejrozsáhlejší separační technika – kvalitativní a kvantitativní
- Rovnováha mezi dvěma fázemi – mobilní (MF) a stacionární (SF). Separace na základě fyzikálně chemických jevů ve vybraném systému.

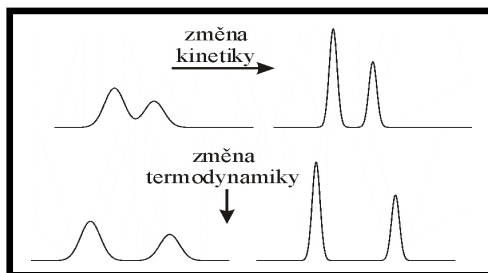
## Dělení chromatografie:

- Způsob provedení - *kolonové uspořádání*  
- uplatňuje se lineární oblast adsorpční izotermy
- Pracovní provedení - *eluční technika*  
- jednorázové zavedení směsi s kontinuálním tokem
- Princip separace – *rozdělovací LC*
- → různá afinita ke SF, různá distribuce mezi MF a SF, a tím různá zadrž (na SF) a zpoždění (v systému)
- Účel - *analytická*

Schéma zapojení kapalinové chromatografie



- Termodynamické a kinetické aspekty separace



→ vlivy, které ovlivňují rozšiřování (rozmývání) zón během postupu kolonou → šířky píku v chromatogramu

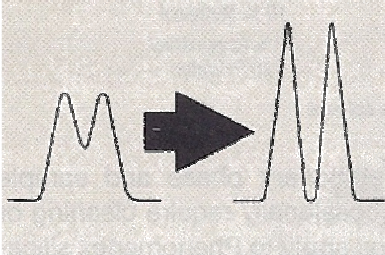
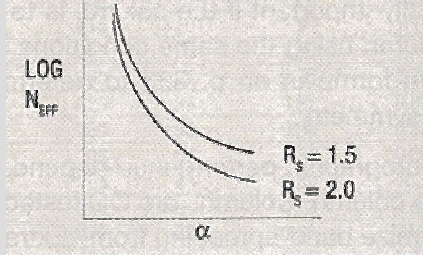
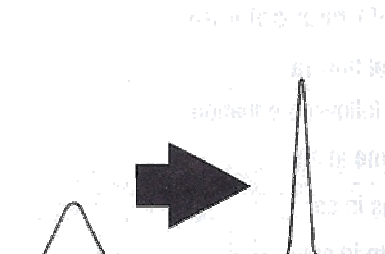
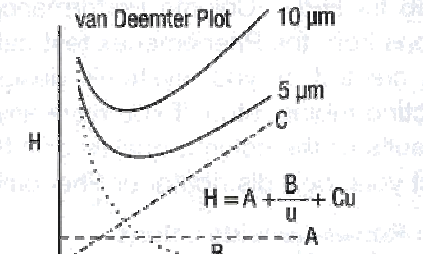
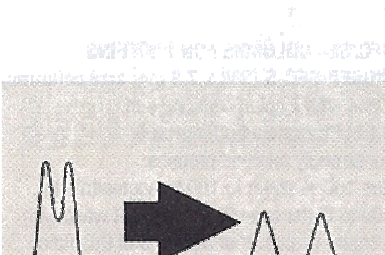
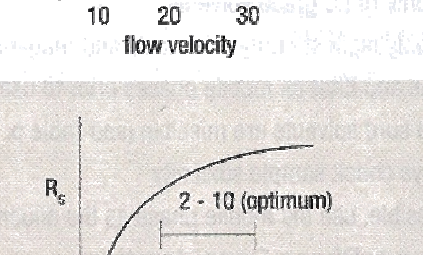
→ vlivy, které ovlivňují velikost interakce mezi sorbentem a analytem, retence, retardace, rychlost pohybu analytu kolonou, rozdíl v  $t_R$ , dělení analytů od sebe navzájem

Parameters	Unit	Symbols <i>Kirkland et al.*</i>	ASTME E-19**	Chromatographia**
Retention time of an unretained solute	s	$t_0$	$t'_M$	$t_m$
Retention time, measured from the start	s	$t_R$	$t_R$	$t_{m+s}$
Reduced retention time	s	$t'_R = t_R - t_0$	$t'_R = t_R - t'_M$	$t_s = t_{m+s} - t_m$
Band width	s	$w$	$y_t$	$w_b$
Capacity factor (Retention factor)	—	$k = \frac{t'_R}{t_0}$	$k = \frac{t'_R}{t'_M}$	$k = \frac{t_s}{t_m}$
Selectivity factor	—	$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}}$	$r_{ji} = \frac{t'_{Rj}}{t'_i}$	$r = \frac{t''_s}{t'_s}$
Resolution	—	$R_s = 2 \left( \frac{t'_{R2} - t'_{R1}}{w_2 + w_1} \right)$	$R_{ji} = 2 \left( \frac{t_{Rj} - t_{R1}}{y_j + y_i} \right)$	$R_s = 2 \left( \frac{t''_{m+s} - t'_{m+s}}{w''_b + w'_b} \right)$
Number of theoretical plates	—	$N = 16 \left( \frac{t_R}{w} \right)^2$	$n = 16 \left( \frac{t_R}{y_1} \right)^2$	$n = 16 \left( \frac{t_{m+s}}{w_b} \right)^2$
Column length	cm	$L$	$L$	$L$
Height equivalent of a theoretical plate (plate height)	cm	$H = \frac{L}{N}$	$H = \frac{L}{n}$	$h = \frac{L}{n}$
Linear velocity of the mobile phase	cm s <sup>-1</sup>	$u = \frac{L}{t_0}$	$\bar{u} = \frac{L}{t'_M}$	$\bar{u} = \frac{L}{t_m}$

\*Modern Practice of Liquid Chromatography, Ed. J.J. Kirkland, Wiley, New York (1971).

\*\*B. Versino and F. Geib, Supplement in: Chromatographia 3 (1970).

$$! \quad R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left( \frac{k}{k + 1} \right)$$

Cíl	Faktor	Kontrola
	<p><b>Faktor selektivity</b>  <math>\alpha = k_2/k_1</math></p> <p><math>\alpha \rightarrow 1!</math> Kdy malé změny mají velký vliv na hodnotu rozlišení.  <i>Zlepšení selektivity</i> – změnou složení MF či SF, příp. další potenciální proměnné – pH a teplota</p>	
	<p><b>Faktor účinnosti</b>  <math>N = 16 (t_R/w)^2</math></p> <p>Rozlišení je fcí druhé odmocniny N <math>\rightarrow</math> významnost účinnosti při rozlišení bývá nadhodnocené! Velké změny účinnosti ovlivní minimálně hodnotu rozlišení.  <i>Zlepšení účinnosti</i> – prodloužením kolony, snížením velikosti částic/zrna, poklesem rychlosti toku MF, minimalizací mrtvých objemů při separaci, teplotou, viskozitou.</p>	
	<p><b>Faktor kapacity</b>  <math>k = (t_R - t_0)/t_0</math></p> <p>V praxi nabývá hodnot <math>k \approx 2-10</math>, obvykle zadrž <math>2 \cdot t_0!</math> Pro hodnoty <math>k &lt; 1</math> výrazně omezuje rozlišení. Naopak se vzrůstající hodnotou kapacitního faktoru se zlepšuje i rozlišení (<math>k = 20</math>, není již zlepšení výrazné).  <i>Zlepšení kapacitního faktoru</i> – změnou MF nebo SF (změna eluční síly).</p>	

$$H = \frac{L}{N}$$

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

$\rightarrow$  vliv rychlosti MF na rozšiřování zón  $\rightarrow H = f(u)$

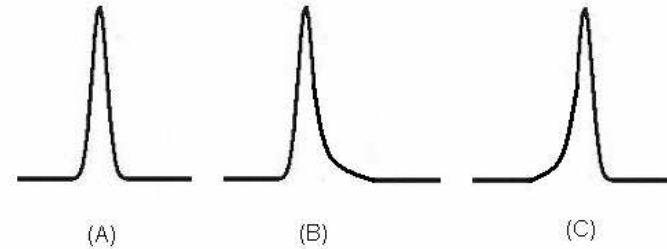
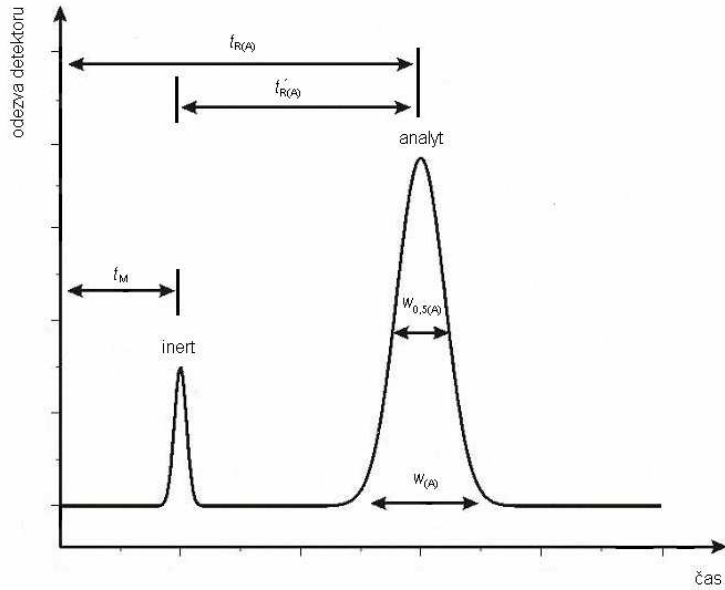
$\rightarrow A =$  Vířivá difúze

$B =$  Podélná difúze

$C =$  Odpor přenosu hmoty ve SF a MF

$u =$  lineární rychlost MF

- Eluční křivka neboli koncentrační profil analytu v zóně = chromatogram



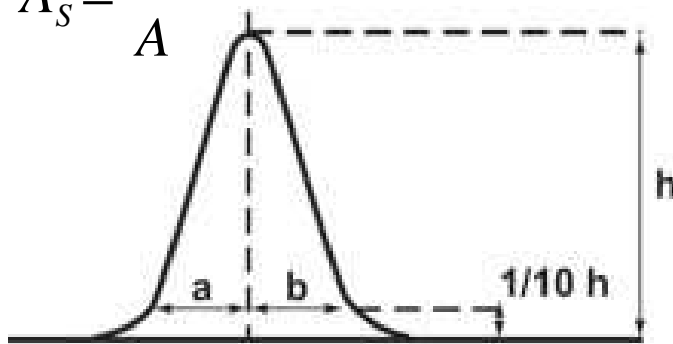
(A) gaussovský pík, (B) chvostování/tailing, (C) hrnutí/frontování

- Distribuční konstanta

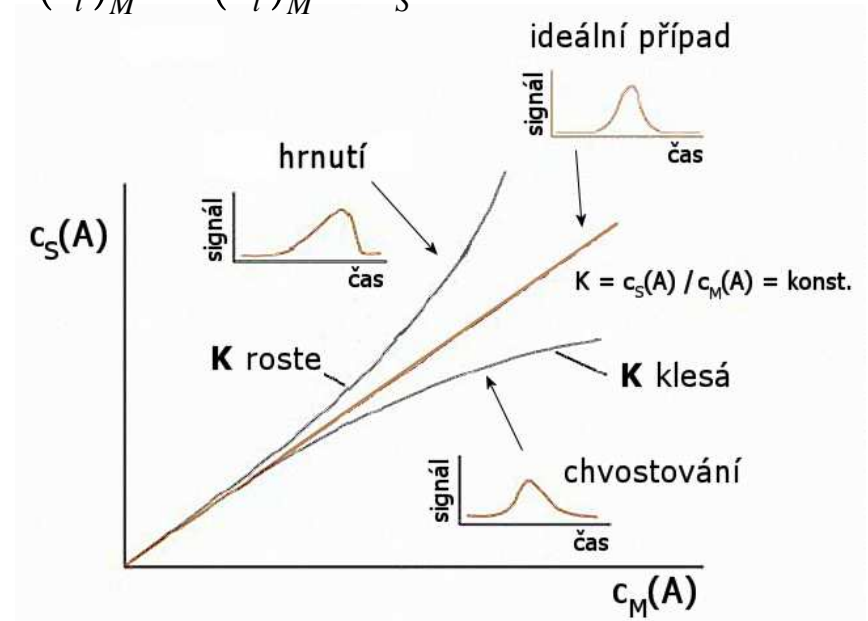
$$K_D = \frac{(c_i)_S}{(c_i)_M} = \frac{(n_i)_S}{(n_i)_M} \cdot \frac{V_M}{V_S}$$

- Asymetrie

$$A_S = \frac{B}{A}$$

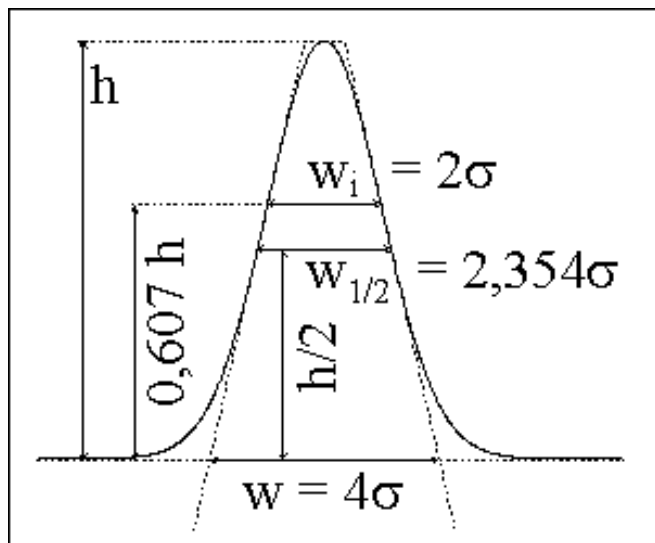
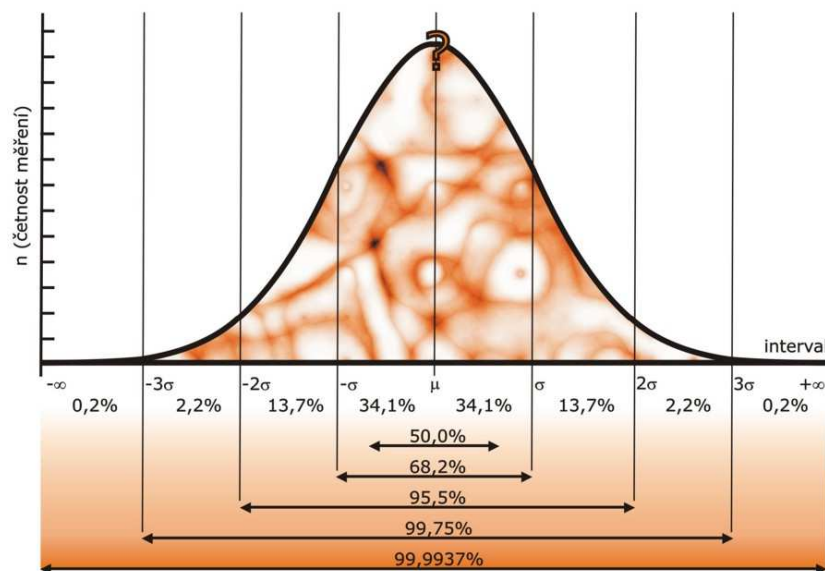


Výborné -  $A_S = 1,00-1,05$   
 Příjemné -  $A_S = 1,2$   
 Nevyhovující -  $A_S = 2$



- Šířka chromatografického píku

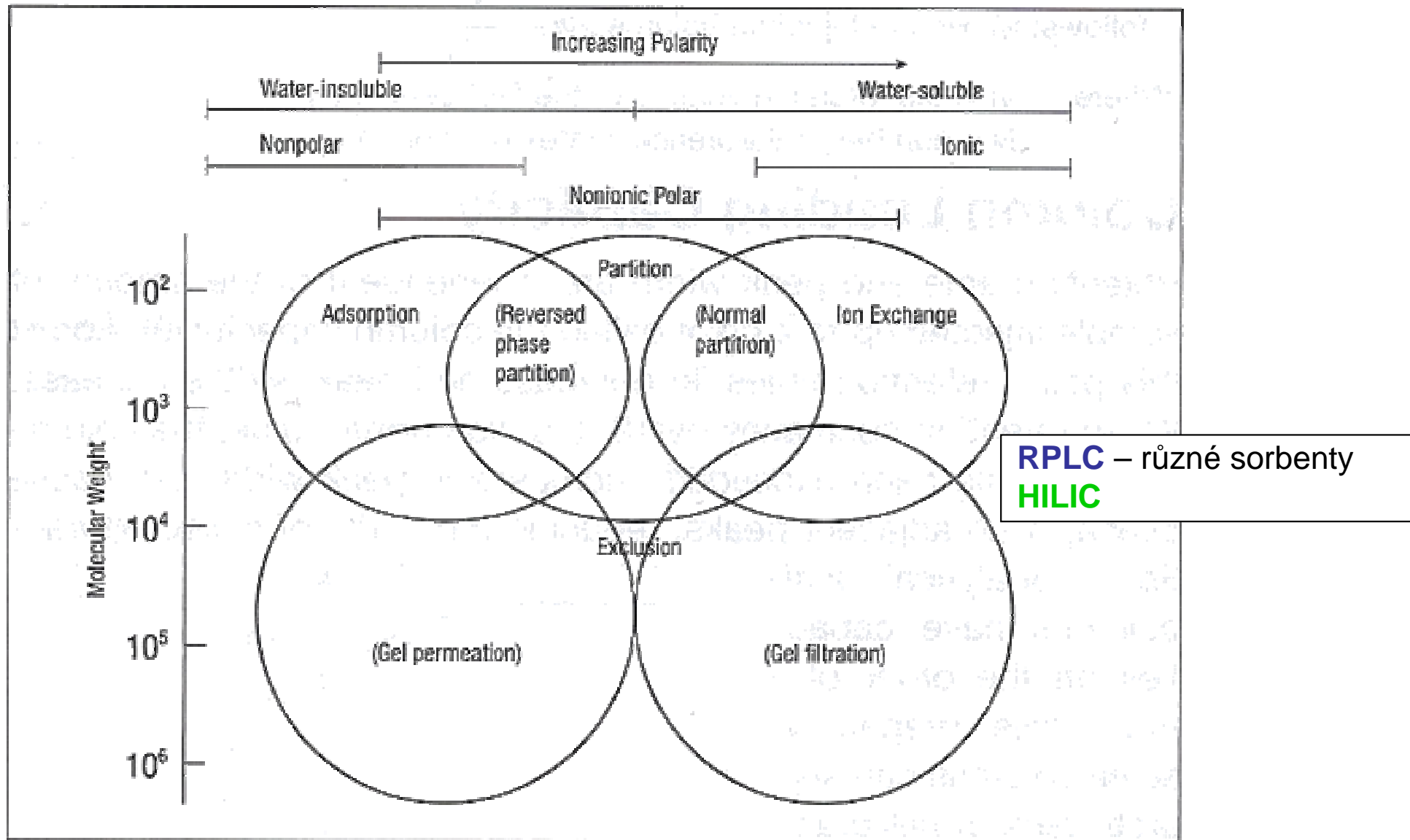
- vycházíme z gaussovského píku
- normální rozdělení
- výběr dat odhad vlastností souboru
  - $\mu$  = odhad pro průměr či medián
  - $\sigma$  = odhad směrodatné odchylky
- určení intervalů v okolí průměrné hodnoty



- šířka píku – délkové [mm, cm] či časové jednotky [s, min]
- $4\sigma$  ..... šířka při základně (tečna v inflexních bodech)
- $2,354\sigma$  ..... šířka v  $\frac{1}{2}$  výšce píku
- $2\sigma$  ..... šířka mezi inflexními body

→ plocha píku  $A = 1,064 \cdot h \cdot w_{1/2}$ ;  $A = \frac{(h \cdot w)}{2}$

- Aplikace kapalinové chromatografie



(From: D.L. Saunders, in Chromatography, 3rd ed, E. Heftmann, Ed., p. 81, Van Nostrand Reinhold: New York, 1975. With permission.)

## RP – HPLC = RPLC

- populární - přes 90 % aplikací v módu RPLC
- SF – nepolární charakter (např. C18, C8, C3, fenyl, atd.)  
separace - různá volba nosiče SF a typu částic
- MF – voda (pufr) + organické rozpouštědlo (MeOH, MeCN, atd.)  
modifikátory MF (např. tenzidy – **IP RPLC**)
- univerzální použití techniky – nepolární, polární, ionizované a iontové molekuly
- ionizované formy látky – menší afinita k SF ↔ potlačení ionizace v systému
- gradientová eluce – přidavek organické složky MF v čase → ↑ eluční síly
- volba výchozích separačních podmínek podle vybrané SF  
*limitní faktory* – obsah organické/vodné fáze
  - koncentrace pufru (zabezpečí vzájemné mísitelnosti) → zasolení
  - volba průtoku → vzniklý hydrodynamický odpor v systému
  - volba teploty, pH → stabilita kolony, vzorku
- vysoké nároky na čistotu MF (min grad grade) a přípravu vzorku (filtrace přes 0,45-0,2 µm filtry)





- **Princip separace u LLC (rozdělovací LC)**

- využívá rozdílné rozpustnosti (tím i distribuce) molekul analytů mezi dvěma zcela nemísitelnými kapalinami.

SF: mechanicky nanesená na inertním nosiči

: chemicky navázaná (polární, nepolární) na inertním nosiči (tj. silkagel)

MF: a) NP – pentan, heptan,  $\text{CHCl}_3$  a jejich směsi

: b) RP – MeOH, MeCN, THF, IPA, voda a jejich směsi

- **Počáteční podmínky v LLC – RPLC**

MF: vodně-organická MF, pufr (citrátový, octanový, fosfátový, borátový) s ohledem na pKa analytu.

SF: -C18 (ODS), -C8, fenyl-, kyano- – vhodné pro neutrální, neionizované analyty, rozpustné v MF

Dosažené výsledky:

- rozlišení  $R > 1,5$

- separační čas 5 – 10min

- kvantifikace do 5% (15%)

- symetrický pík (vs. interferenční píky), vysoká účinnost (úzký pík při základně, poměr  $S/N$ )

- minimální spotřeba rozpouštědla

- optimální tlak (drift základní linie)

## Nosiče – silikagel, polymery, ZrO<sub>2</sub>

- Silikagel

- pracovní oblast pH 2-8 (<2 hydrolyza navázané fáze, >8 rozpouštění silikagenu)

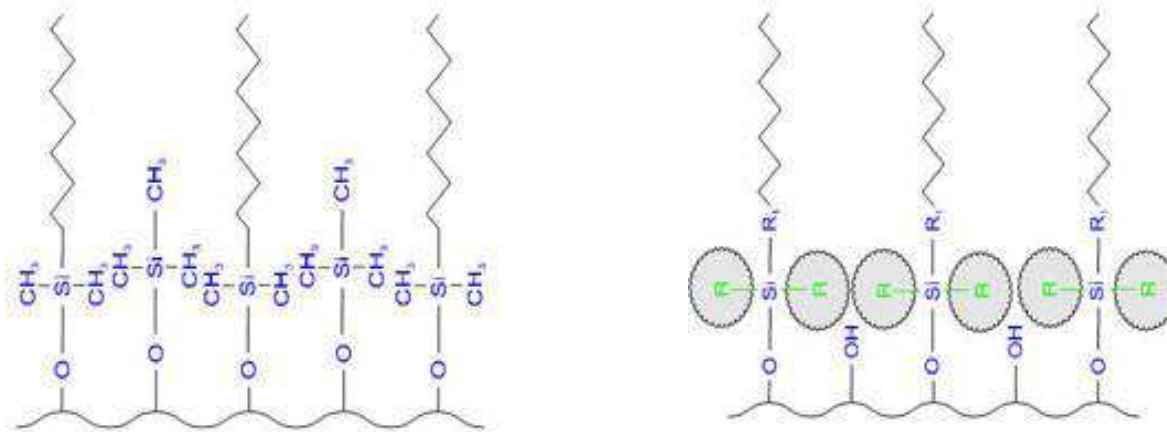
- do T = 45 - 60 °C, p<sub>max</sub> = 400 barů

- kyselý charakter → lepší zadrž pro bazické látky

- dnes tzv. **endcapping**, tj. zaslepování volných silanových skupin

- např. trialkylchlorsilanem – Zorbax Eclipse XDB C18 (Agilent)

Trimethylchlorsilan jako menší molekula než trioktadecylchlorsilan pokryje stéricky bráněné volné silanolové skupiny.

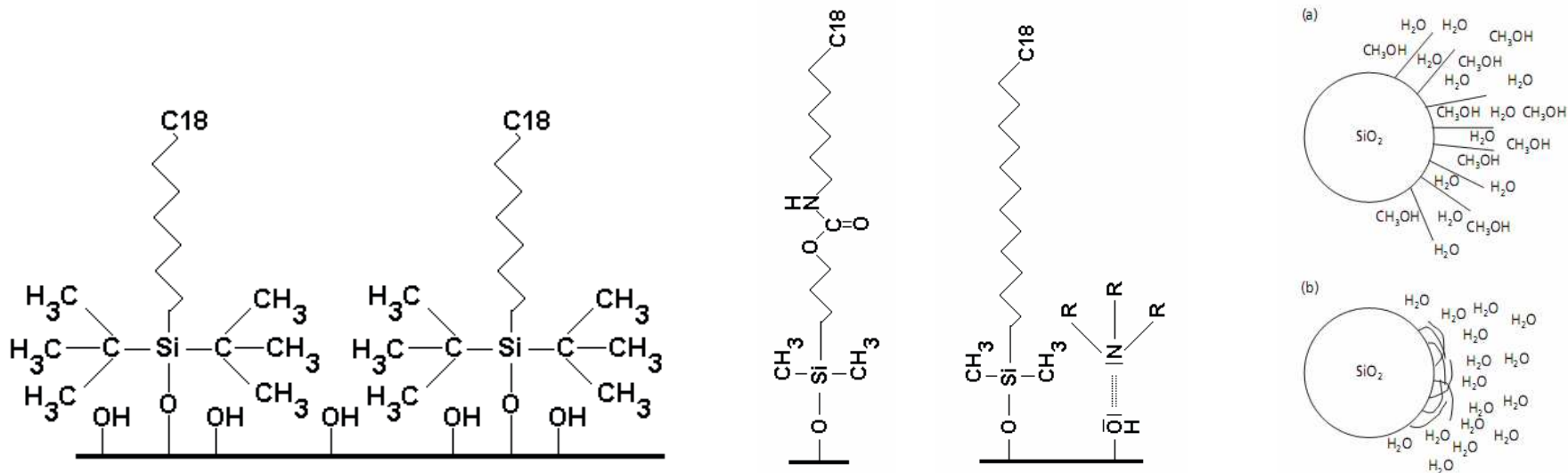


- **stérické stínění volných OH skupin** – odstínění delším uhlíkatým řetězcem a zvýšení obsahu vázaného uhlíku v nepolární fázi, zároveň i retence látek (↑ hydrofobicita SF).

- stabilita při nízkém pH (~ 1), MF obsahující TFA

- odolnost do T = 90 °C

Např. diisobutyl, diisopropyl – Zorbax StableBond C18 (Agilent)



- **modifikace ligandu** – začlenění polární skupiny do organického uhlíkového řetězce SF mezi povrch silikagelu a ligandem.

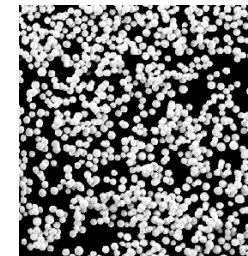
- zmírnění interakce volných silanových skupin s bazickými polárními látkami

- ↑ polarita SF → ↑ adsorpce vody v MF × hydrofóbnímu kolapsu (100% vodná fáze)

- **pH a složení MF** – přidavek organických aminů do MF a tím kompetetice s analytem o aktivní centra zbytkových silanových skupin (jejich eliminace). Limitní podmínky viz SF bez zaslepení.

- Porézní polymery

- řešení separace bazických látek v alkalické oblasti.  
např. polystyren, metylakrylát, akrylamid
- kompatibilní v celém rozsahu pH, hydrofóbní charakter
- stabilita limitovaná fčními skupinami polymeru
- chemická a mechanická stabilita
- limitní nižší tlaky,  $p_{\max} = 200$  barů
- obsahují mikropóry ( $\sim 1\text{nm}$ )  $\rightarrow$  zabraňuje přenosu hmoty zejména pro malé molekuly
- nižší účinnost  $\rightarrow$  nevytlačily chemicky vázané nepolární SF!

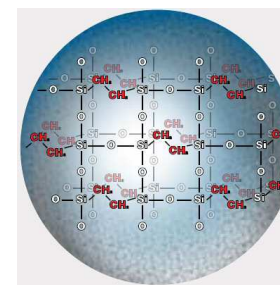
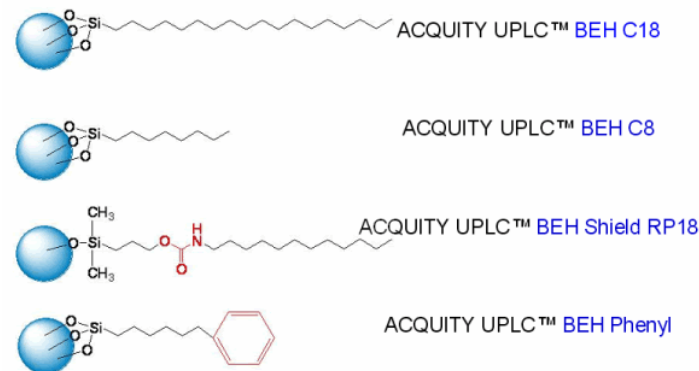
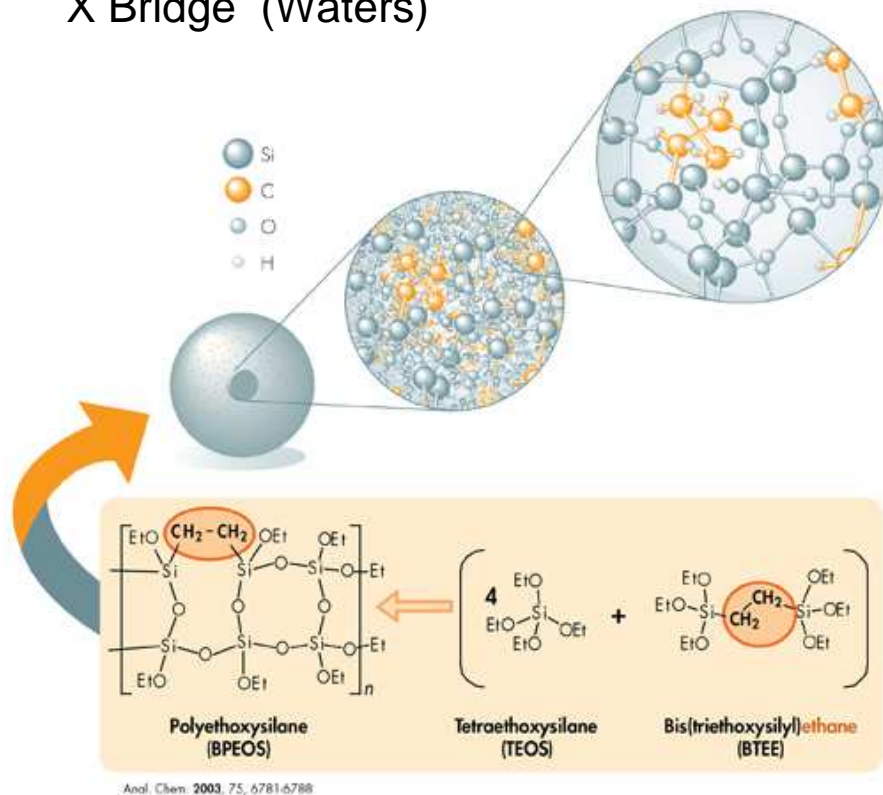


- $\text{ZrO}_2$

(ZirChrom kolona; obchodní zástupce Altech, Chromservis)

- extrémní stabilita - chemická a tepelná stabilita (T až do  $200\text{ }^\circ\text{C}$ )  $\rightarrow$  **HTLC** (High temperature LC)
  - prodloužená životnost kolony a snižuje se cena za analýzu
- pH stabilní 1-14, porézní i neporézní
- normální i reverzní mód (modifikace částic polybutadienem, polystyrenem, pyroliticky vyloučeným uhlíkem, s následnou modifikací C18 ligandem)
- vs. alkylsilikagelová fáze v NP lepší selektivita ohledně separace stereoisomerů, látek lišících se polaritou (steroly), v RP při separaci velmi polárních látek.

- UPLC** – ↓ průměr částic, ↑ specifický povrch a ↑ účinnost
- $\rho \sim \text{GPa}$
  - při stejném průtoku jsou analýzy až 3x rychlejší než v klasickém analytickém uspořádání (konkurence monolitům)
  - **BEH technologie** (Ethylene Bridged Hybrid) - vysoká pH stabilita 1-12 (+ třibodová vazba ligandu na hybridní částici); brání hydrolyze silikagelu. Např. Acquity UPLC kolona, X Bridge (Waters)

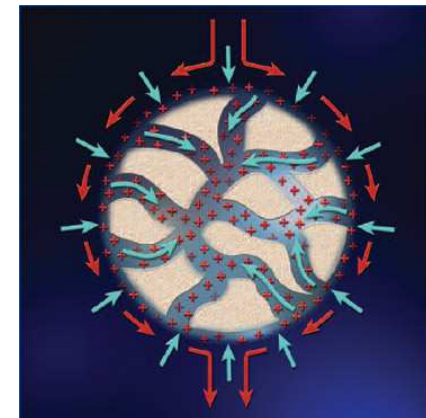
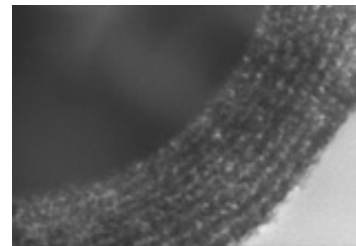
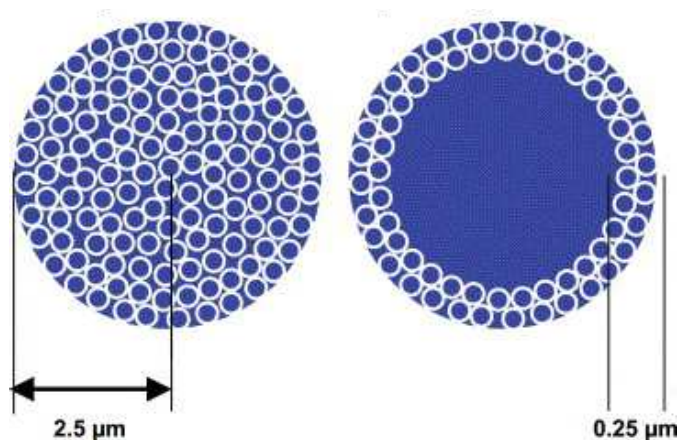


- stabilizace pH (pH 1- 12) **zesítěním ethanovým můstkem**, skupiny jsou začleněné do vrstev na povrchu silikagelu při zachování čistého křemenného jádra. Zároveň i ↑ mechanická stabilita silikagelových částic.

Např. technologie TWIN-NX, Gemini-NX kolona (Phenomenex)

## Sorbenty

- **totálně porézní mikročástice**
  - nejběžnější – kompromis mezi účinností, kapacitou, životností, tlakovou odolností, atd.
  - zrnění 3 - 8  $\mu\text{m}$  analytický systém, pórovitost  $\sim 60\%$  (5  $\mu\text{m}$ )
- **mikropelikulární částice**
  - tvrdé jádro, na povrchu tenký film (0,25  $\mu\text{m}$ )  $\rightarrow$  rychlá analýza, vysoká účinnost, malá kapacita (pozor na dávkované množství), rychlý přenos hmoty
  - zrnění 1,5 -2,5  $\mu\text{m}$
- **perfúzní mikročástice**
  - objemné póry se síti menších pórů, vysoká rychlost MF, malé rozmytí píků
  - aplikace u perfúzní chromatografie

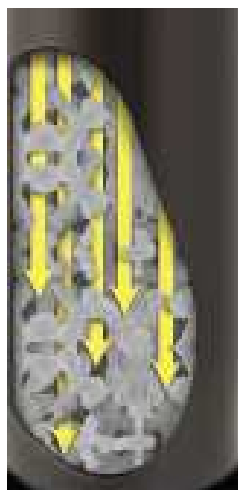


- monolitický sorbent

- nejběžnější – kompromis mezi účinností, kapacitou, životností, tlakovou odolností, atd.



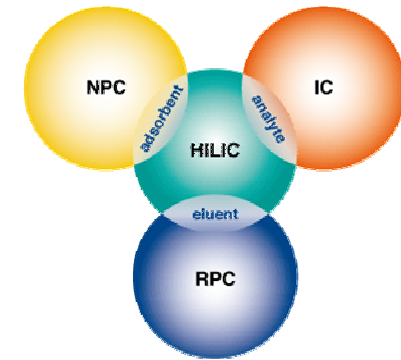
- jednotlivé částice sorbentu (3 – 5  $\mu\text{m}$ )
- výborná separační účinnost ( $\downarrow$  velikost sorbentu stoupá zpětný tlak)
- omezená max. rychlost průtoku MF
- doba analýzy
- pórovitost ~ 60 % (5  $\mu\text{m}$  částic)



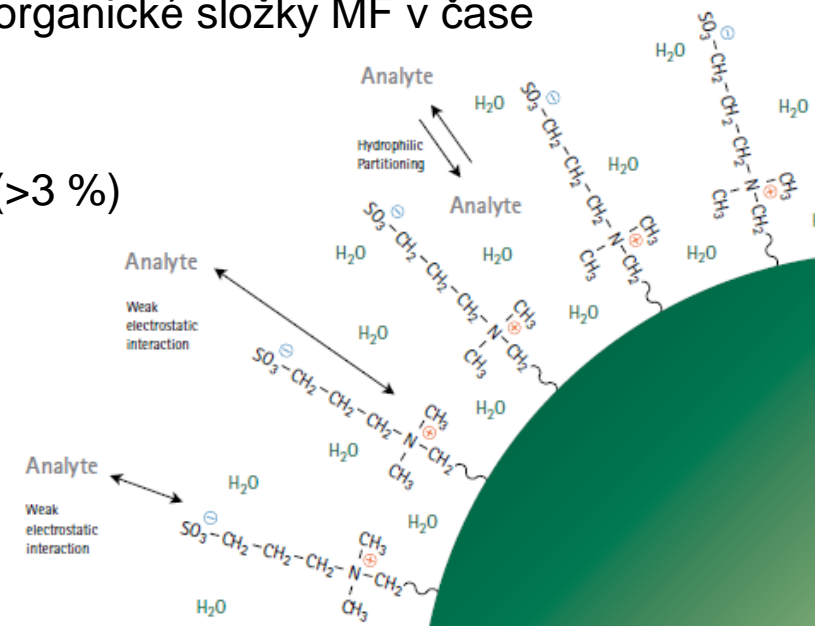
- jediný kus pórovitého materiálu - makropóry (zrychlený přenos hmoty mezi SF a MF)  
mesopóry (specifický povrch)
- anorganické, polymerní
- přednosti: doba analýzy  
hydrodynamické vlastnosti
- rychlý konvektivní tok MF bez přílišného zvýšení tlaku a bez ztráty separační účinnosti
- pórovitost ~ 80 %
- nevýhoda: reprodukovatelnost výroby (polymerizace přímo v koloně)



# HILIC



- HILIC = Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography
- NPLC typ separace za RPLC podmínek
- SF – obojetný ion (sulfoalkylbetain), polyfunkční polymer (např. polymethylmetakrylát)
  - hydrofilní (extrakce L-L) i elektrostatické interakce
  - ↑ retence s hydrofilitou a s nábojem analytu (ionizované funkční skupiny)
- MF – voda, pufr (acetátový, mravenčnanový, hydrogenuhličitan), vysoká koncentrace vodou-mísitelného org. rozpouštědla (MeCN)
  - gradientová eluce – eluční síla roste ↓ obsahu organické složky MF v čase
- *limitní faktory* – obs. organické MF cca 80% MeCN
  - + malé množství těkavé vodné složky (>3 %)
  - pufr 2-20mM, horní limit do 250 mM
  - pH 2 – 10
  - max. teplota 50 °C
  - max. tlak p = 20 MPa
  - ↓ průtok MF





# HILIC



- dobrá retence pro polární látky
- symetrické tvary píků pro bazické látky
- snadno nahradí NPLC
- ortogonální selektivita k RPLC (2D-LC, matricové efekty)
- vhodná pro spojení s ESI, často vyšší citlivost (↑ obsah MeCN v MF)

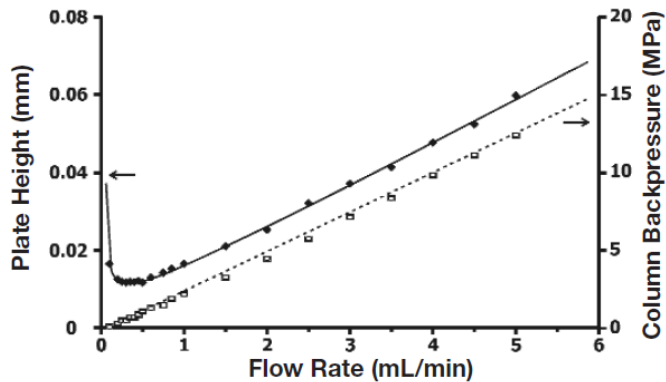
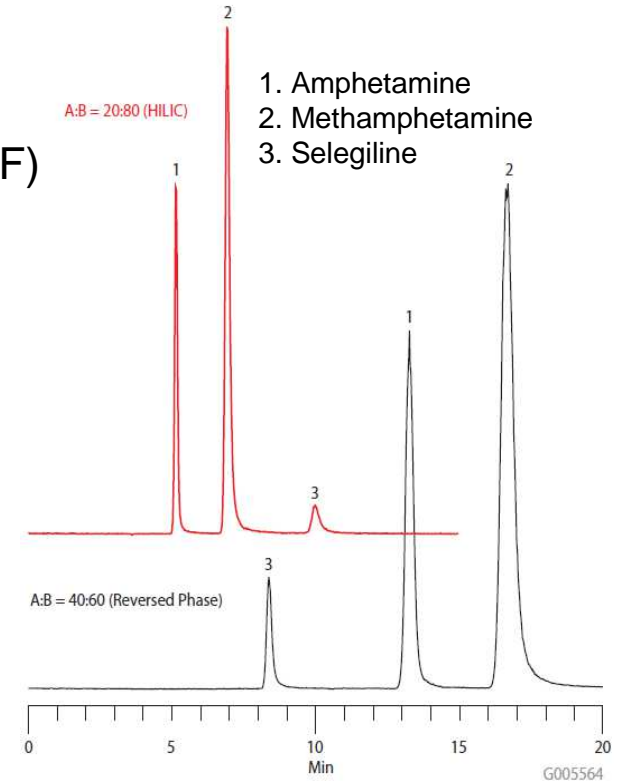
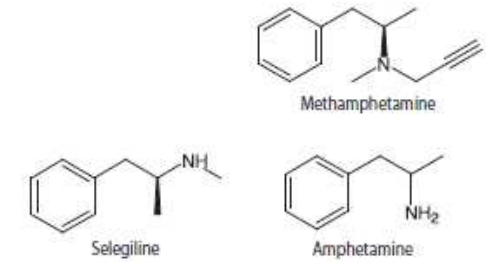


Table: Flow-rate, backpressure and injection volume

Column I.D. (mm)	Injection volume (μL)	Flow-rate (mL/min)	Backpressure	
			Expected (MPa)	Max (MPa)
2.1	0.5-5	0.1	2-10	20
4.6	5-50	0.5	2-10	20

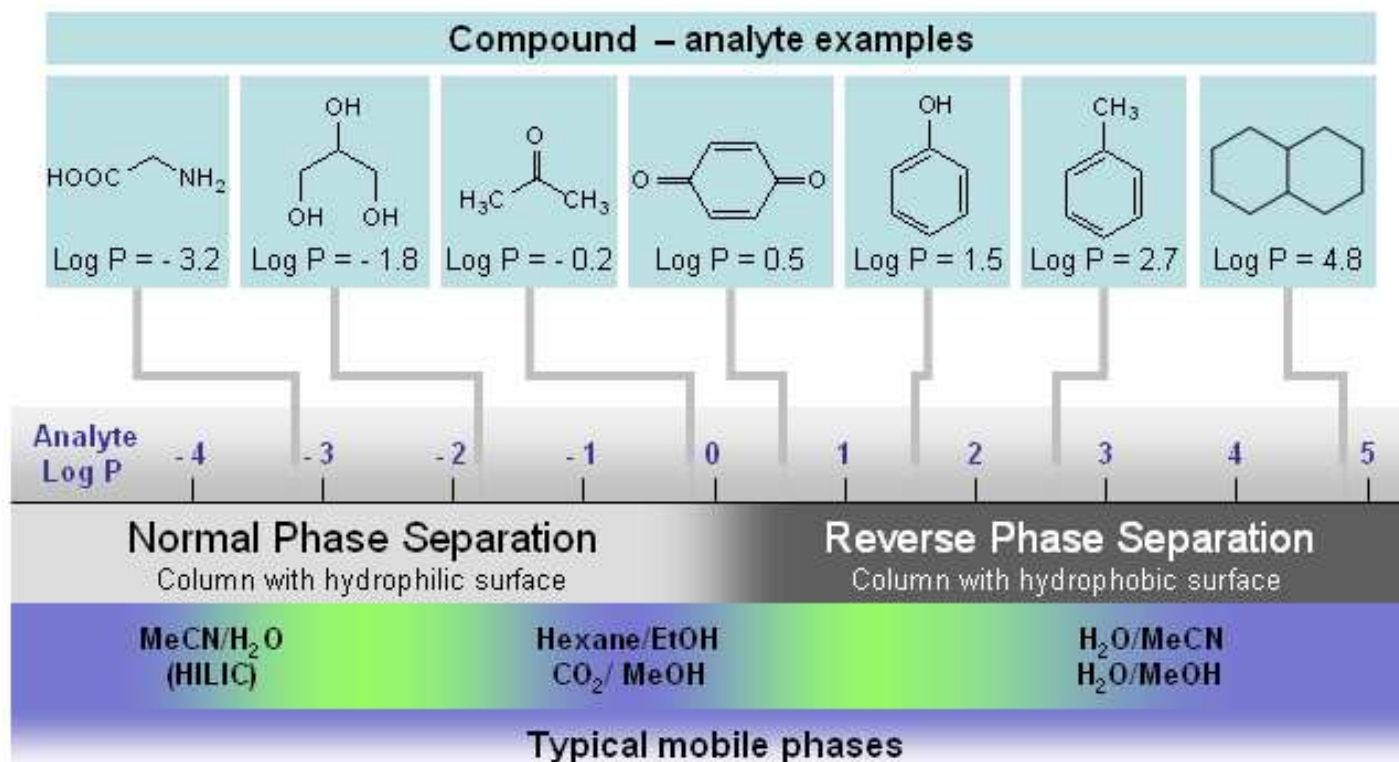


- vliv rozpouštědla vzorku na tvar chromatografického píku
- vliv dávkovaného objemu na tvar píku
- pomalejší ustalování chromatografické rovnováhy
- komplexnější mechanismus separace (složitější predikce)
- hydrofóbní látky nejsou zadržovány



column: Ascentis Express F5, 10 cm x 4.6 mm I.D.,  
2.7 μm particles (53590-U)  
mobile phase: (A) 10 mM ammonium acetate, pH 4.0 with acetic acid; (B) acetonitrile; (20:80, A:B - HILIC), (40:60, A:B - reversed phase)  
flow rate: 0.6 mL/min  
pressure: 260 bar (2300 psi)  
temp.: 35 °C  
det.: MS ESI (+), SIR m/z 136, 150, 188  
injection: 2 μL  
sample: 10 μg/mL in methanol

- použití techniky: makromolekulární analyty nevhodné pro eluci na RPLC, tj. cukry, metabolity, kyseliny i báze, org. kyseliny, proteiny, peptidy, báze → **nízká nebo záporná LogP hodnota**



- **LogP** – logaritmus distribučního koeficientu látky v systému dvou nemísitelných kapalin, voda/oktanol, popisuje polární vlastnosti molekuly
- vyšší hodnota LogP = vyšší hydrofobicita
- pro RPLC: **LogP > 1**

$$\log P_{oct/voda} = \log \left( \frac{[\text{Analyt}]_{\text{octanol}}}{[\text{Analyt}]_{\text{neionizovaná voda}}} \right)$$

## Separace purinových a pirimidinových bazí:

### Chromatografické podmínky:

Kolona: ZIC-pHILIC, PEEK, 150×4,6 mm,  
5µm

Injektováno: 5 µL

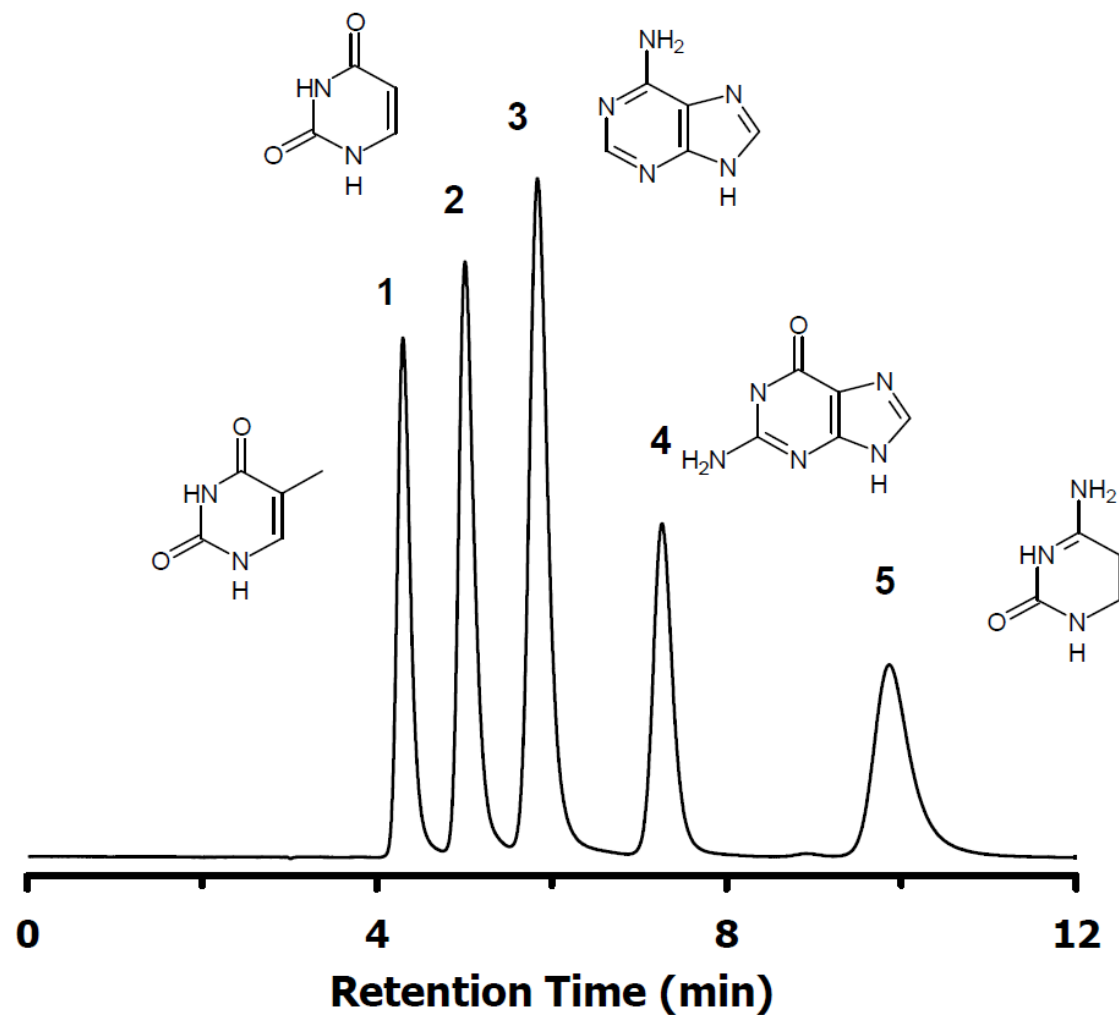
Průtok MF: 0,5 mL/min

MF (v/v): 80% MeCN

20%  $(\text{HN}_4)_2\text{CO}_3$ , 20 mM, pH 8,8

Detekce: 254 nm

Thymin (1), Uracil (2), Adenin (3), Cytosin (4), Guanosin (5)

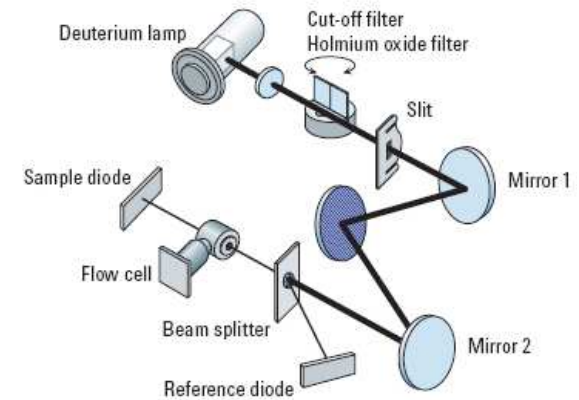


# Typy detektorů v kombinaci s LC

Volba – selektivita, citlivost, dynamický rozsah

## 1. UV-VIS ( $10^{-10}$ g/ml)

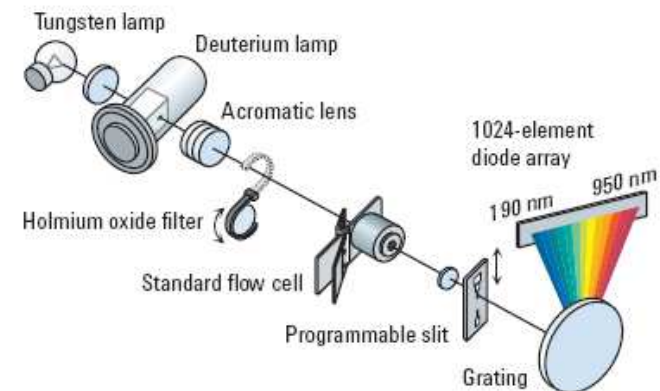
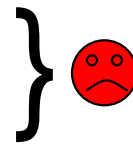
- Absorpční fotometrický detektor
- PDA/DAD – porovnání s knihovnou spekter
- aplikovatelný pro širokou škálu látek
- velký lineární dynamický rozsah
- možnost snadného změření spekter



## 2. MS = API techniky ( $10^{-13}$ g/ml)



- vysoká citlivost, selektivita a univerzálnost
- destruktivní technika
- cena, provozní náklady, nároky na čištění
- matriční efekty (rozdílnost odezvových faktorů)



## 3. Fluorimetrický (fluorescenční) detektor ( $10^{-9}$ - $10^{-12}$ g/ml)

(zdroj, monochromátor, čočka, měrná cela, fotonásobič, zesilovač, zapisovač)

## 4. Refraktometrický detektor ( $10^{-7}$ g/ml)

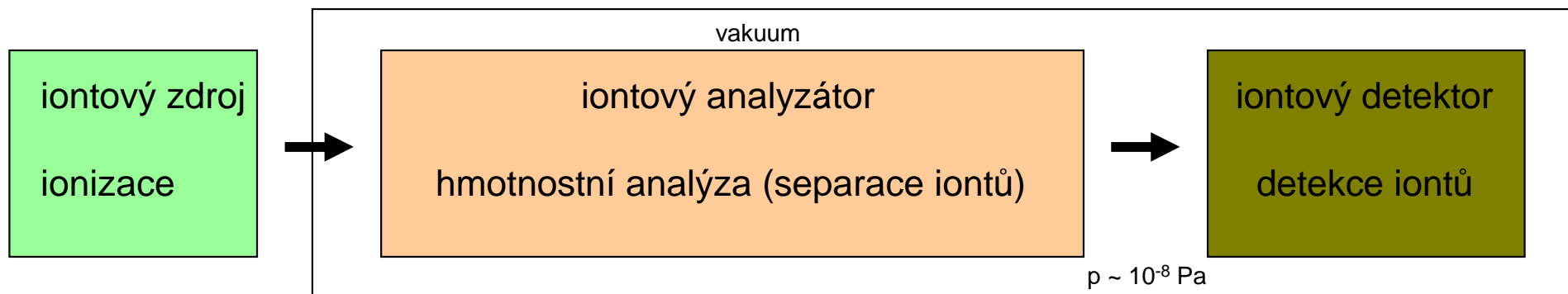
(zdroj světla, zrcadlo, měrná a referentní cela, fotonásobič, zesilovač, zapisovač)

## 5. Ampérometrický detektor ( $10^{-9}$ g/ml)

(pracovní, referentní, pomocná elektroda, zdroj napětí, zapisovač)

## *MS = hmotnostní spektrometrie*

- fyzikální metoda – primárně (určení molekulové nebo atomové hmotnosti analytu)  
sekundárně (identifikace sloučenin, objasnění struktury, *kvantifikace*)
- *princip*: molekuly analytu se ionizují v plynné fázi, následně jsou rozděleny buď v prostoru nebo v čase podle jejich hmotnosti a náboje ( $m/z$ )



- **ionizace** – různé zdroje – plem, vysokoenergetickými částicemi ( $e^-$ , foton, atom)  
měkká vs. tvrdá ionizace
- **hmotnostní analyzátor** (separátor) – TOF, QqQ, IT
- **detekce iontů** – systém dynod – elektronový násobič, mikrokanálková destička

# Pojmy v MS

- jednotky

hlavní jednotka SI: kilogram

kg

vedlejší jednotka SI: atomová hmotnostní jednotka

u (a.m.u.)

(1/12 hmotnosti izotopu uhlíku o protonovém čísle Z=6 a nukleonovém čísle A=12.  $u=1,66057 \cdot 10^{-27}$  kg)

jednotka: dalton

Da

thomson

Th

(1Th = 1u/e = 1Da/e)

veličina: m/z

*pozn: molekulová hmotnost M (hmotnost molekuly/prvku; -) vs. molární hmotnost  $M_R$  (1 mol molekuly; g/mol)*

- hmotnost iontů v MS (např. pro CO<sub>2</sub>)

nominální

- vypočítaná z celočíselných hmotností prvků (12u + 2x 16u = 44u)

- použití pouze v nízkém hmotnostním rozsahu ↔ hmotnostní úbytek/nadbytek

monoizotopická

- z přesných hmotností prvků (nejvíce zastoupené izotopy) (12,0000u + 2x 15,9949u = 43.9898u)

průměrná

- vážený průměr hmotností jednotlivých izotopů podle jejich zastoupení (12,01 + 2x 16,00u = 44,01u)

- výpočet elementárního složení vs. přesnost!

- přesnost určení hmotnosti

$$\Delta m \text{ (v mmu)} = 10^3 \cdot (M_{\text{zmerena}} - M_{\text{vypocitana}})$$

$$\Delta m \text{ (v ppm)} = 10^6 \cdot \frac{M_{\text{zmerena}} - M_{\text{vypocitana}}}{M_{\text{vypocitana}}}$$

- výpočet a vliv přesnosti určení hmotnosti

G.Audi, A.H. Waspra, C. Tribault, Nucl. Phys. A, 729 (2003) 337-676

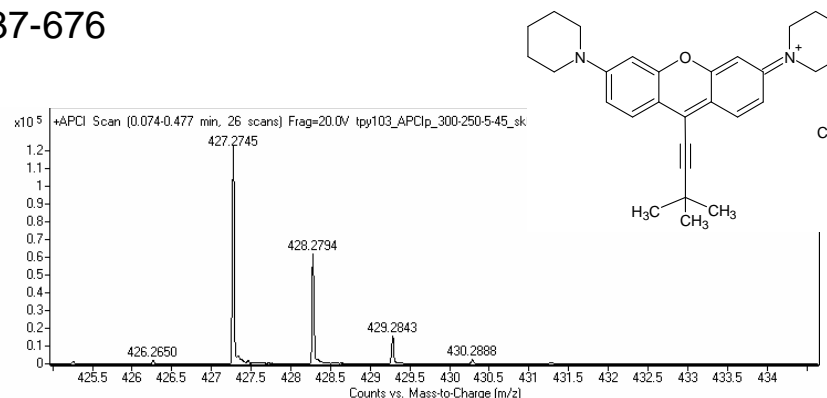
$$M([C_{29}H_{35}N_2O]) = 427,2749$$

$$M([C_{29}H_{35}N_2O]^{+\bullet}) = 427.27435 \text{ (-1,29 ppm)}$$

$$M([C_{29}H_{35}N_2O+H]^+) = 428,2822$$

$$M([C_{29}H_{35}N_2O]^{-\bullet}) = 427,27545 \text{ (+1,29 ppm)}$$

$$M([C_{29}H_{35}N_2O-H]^-) = 426,2677$$



- hmotnost elektronu hraje významnou roli (0,5486 mmu)

- typy iontů:

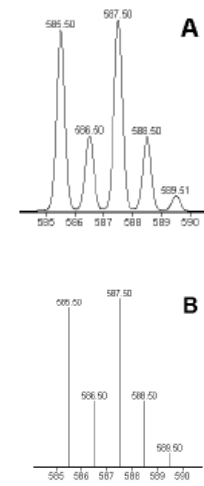
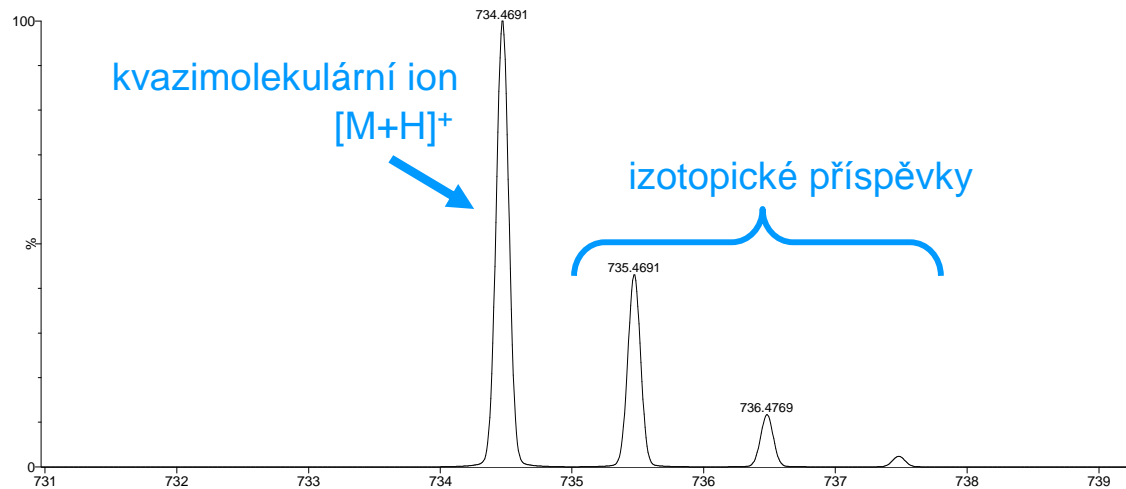
$[M\pm e]^\pm$  molekulární ionty (přirozený náboj; po ztrátě nebo přijetí elektronu)

$[M\pm H]^\pm$  kvazimolekulární ionty (disociace nebo asociace protonu)

$[M\pm X]^\pm$  pseudomolekulární ionty (adukty, asociáty)  
(disociace/asociace iontu; nekovalentní komplex s jinou složkou)

$[(M-N)\pm \dots]^\pm$  fragmentové ionty (štěpením kovalentní vazby analytu)

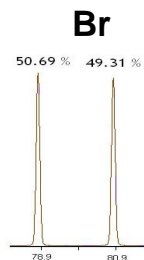
- Hmotnostní spektrum – grafické zobrazení intenzity iontů na jejich poměru hmotnosti ku náboji ( $m/z$ ). Spektra jsou normalizována, y-osa (intenzita) je 0-100 %.



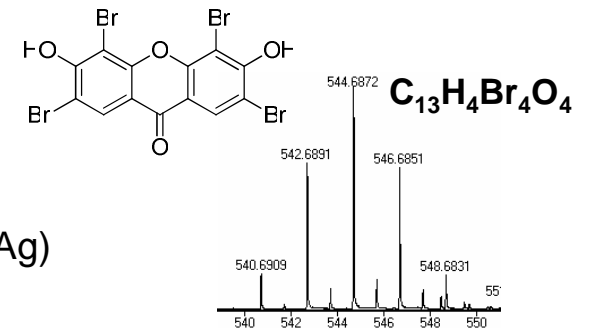
– profilové (kontinuální) – umožňuje odečíst šířku píku

– histogram (centroidní) – spektrum je převedeno na sloupcový graf, poloha signálu ( $m/z$ ) je odečtena v těžišti píku, intenzita odpovídá ploše nebo výšce píku

- Izotopy – atomy chemického prvku, které mají stejný počet protonů, ale rozdílný počet neutronů, tedy stejné atomové číslo a rozdílnou atomovou hmotnost.



- prvky
- X (monoizotopické):  $^{23}\text{Na}$ ,  $^{127}\text{I}$
  - X+1: vodík ( $^1\text{H}$ ,  $^2\text{H}$ ), uhlík ( $^{12}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ )
  - X+2: chlor ( $^{35}\text{Cl}$ ,  $^{37}\text{Cl}$ ), kyslík ( $^{16}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ), stříbro ( $^{107}\text{Ag}$ ,  $^{109}\text{Ag}$ )



Izotopové složení víceatomového iontu je dáno kombinací izotopového složení atomů, které jej tvoří.



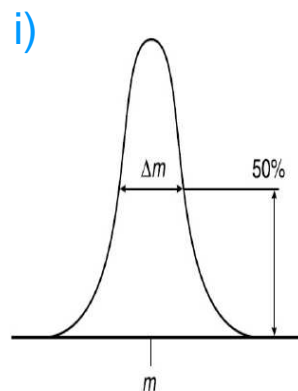
- rozlišení

i) FWHM – poměr hmotnosti iontu a šířky jeho píku v polovině výšky.

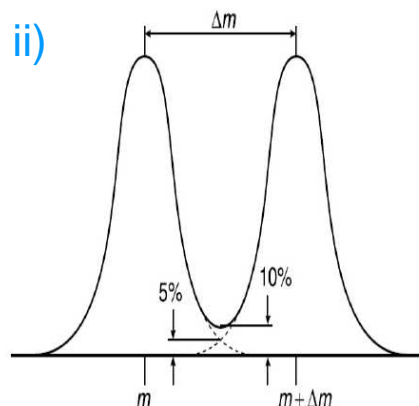
Používá se u analyzátorů, kde je konstantní šířka píku, tedy Q, IT, TOF.

ii) překryv píků – nejmenší rozdíl hmotností mezi stejně vysokými píky u nichž je výška překryvu rovna definovanému zlomku výšky píku (př. 5%, 10% údolí).

Používá se u analyzátorů, kde je konstantní rozlišení pro celý hmotnostní rozsah, např. sektorové přístroje.

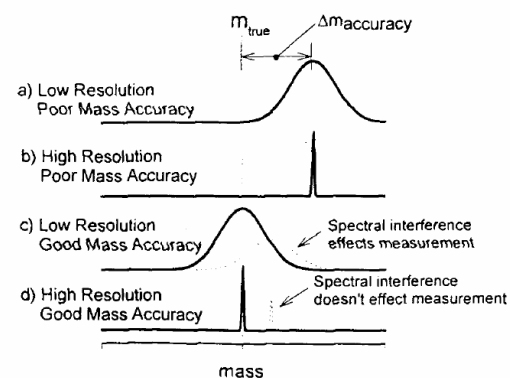
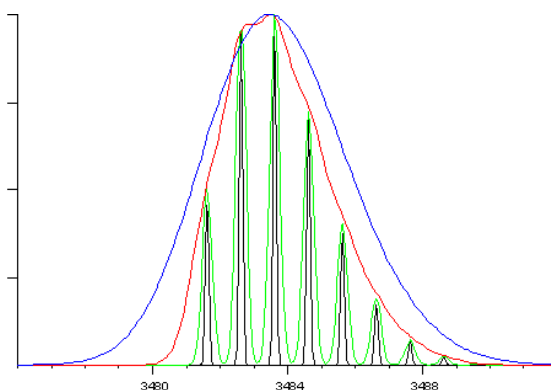


$$R = \frac{m}{\Delta m}$$



$$R_{1,2} = \frac{m_1}{(m_1 - m_2)}$$

- rozlišovací schopnost – schopnost přístroje (analyzátoru) oddělit sousední píky



- ! Kalibrace hmotnostní škály – pro získání správných výsledků.
  - pomocí změření spektra kalibrační směsi a následnou korelací změřených a vypočítaných (a správných) hodnot  $m/z$(před měřením se provádí kalibrace hmotnostní stupnice pomocí kalibračních standardů → chyba naměřené  $m/z$  a skutečné  $m/z$  závisí na rozlišovací schopnosti resp. typu spektrometru a kvalitě kalibrace)

- Typy kalibrací

*Kalibrace externí* – kalibrace probíhá před měřením samotné analyzované látky, tedy odděleně.

*Kalibrace interní* – kalibraci provádíme ze spektra, které obsahuje jak analyzovanou látku, tak píky kalibrační látky. Kalibrace probíhá současně a poskytuje přesnější výsledky.

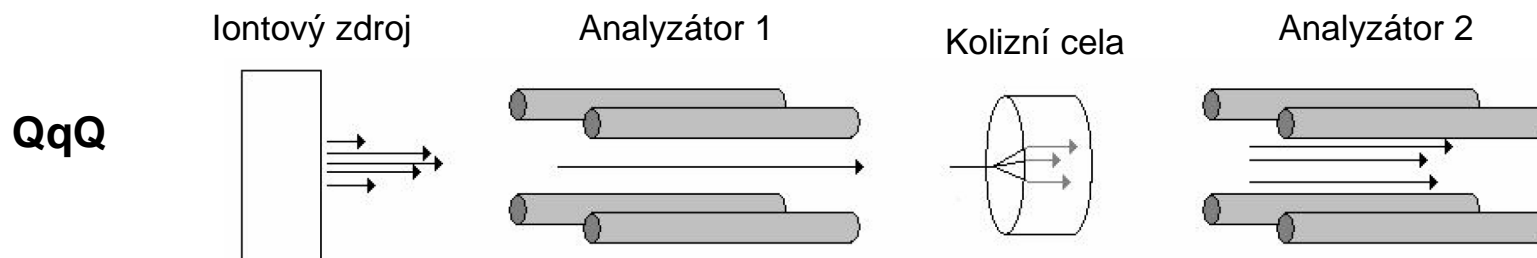
*Kotvící hmotnost (Lock mass)* – druh interní kalibrace. Cíla hmotnostní škála se posunuje podle jednoho kalibračního bodu. Slouží k malým úpravám škály  $m/z$  a vyžaduje předem nakalibrovaný přístroj. Tento kalibrant může být dávkován do iontového zdroje, příp. se může využít nějakého iontu z pozadí.

- Požadavky na kalibrační látky (např. perfluorované látky)

- bez paměťového efektu!, čisté, dostupné, netoxické sloučeniny
- pokrytí celého kalibrovaného rozsahu
- intenzivní píky s jednoduchými izotopovými klastry

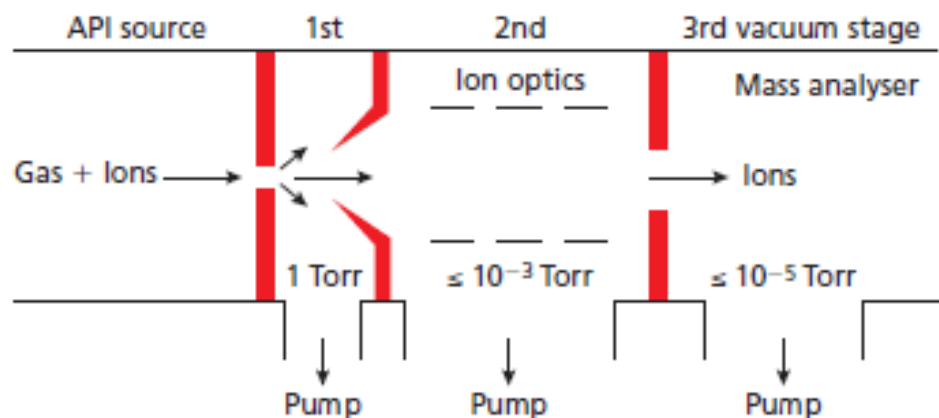
## MS vs MS<sup>n</sup>

- MS spektrum
  - ionty vzniklé ionizací analytu (neutrální molekula) a případnou fragmentací kvazimolekulárního (pseudomolekulárního) iontu.
- MS/MS (MS<sup>2</sup>) spektrum
  - ionty vzniklé fragmentací iontu prekurzoru.
- tandemová MS, MS<sup>n</sup>
  - sériové zařazení několika hmotnostních analyzátorů
    - 1. analyzátor – separace iontů podle  $m/z$   
selekce iontů o určitém  $m/z$
    - kolizní cela – sekundární ionizace/fragmentace
    - 2. analyzátor – rozdělení fragmentů
    - detekce iontů fragmentů
  - v prostoru (více analyzátorů) či čase (jeden analyzátor)
  - použití: objasnění struktury, specifická detekce



## API techniky

- spojení HPLC s hmotnostním spektrometrem - spolehlivá, rutinní metoda
- technicky složitější interface – kapalná MF se sprejuje do části iontového zdroje, která je při atmosférickém tlaku (tzv. API zdroje).  
Vakuový systém v další části odstraní přebytečný plyn vytvořený sprejováním kapalně MF.
- API techniky – ESI, APCI, APPI, TSP, PB, EI, moving belt, ...



V prostoru analyzátoru je vakuum (až  $10^{-10}$  torr, tj.  $10^{-8}$  Pa).

MS analyzátorů a detektorů mohou pracovat jen s nabitými částicemi (ionty).

## Interpretace API spekter

- Určení  $M_R$ 
  - ověření správnosti podle charakteristických aduktů (zásadní význam, aduktové ionty se většinou nevyskytují u fragmentů), nejintenzivnější většinou  $[M+Na]^+$  (méně často adukty s MF,  $[M+H+CH_3OH]^+$ ; někdy i dimery typu  $[2M+H]^+$ ,  $[2M+Na]^+$ )
  - záporné ionty  $[M-H]^-$ , dle složení MF můžeme očekávat např.  $[M+Cl]^-$ ,  $[M+CH_3COO]^-$
  - *typ, relativní intenzita pseudomolekulárních iontů závisí na složení MF, obsahu solí*

- Dusíkaté pravidlo

Počet dusíků	$m/z$ lichá	$m/z$ sudá
Sudý (0, 2, 4,.....)	EE <sup>+</sup>	OE <sup>+</sup>
Lichý (1, 3, 5, ...)	OE <sup>+</sup>	EE <sup>+</sup>

EE<sup>+</sup> ...sudý počet e<sup>-</sup>  
OE<sup>+</sup> ...lichý počet e<sup>-</sup>

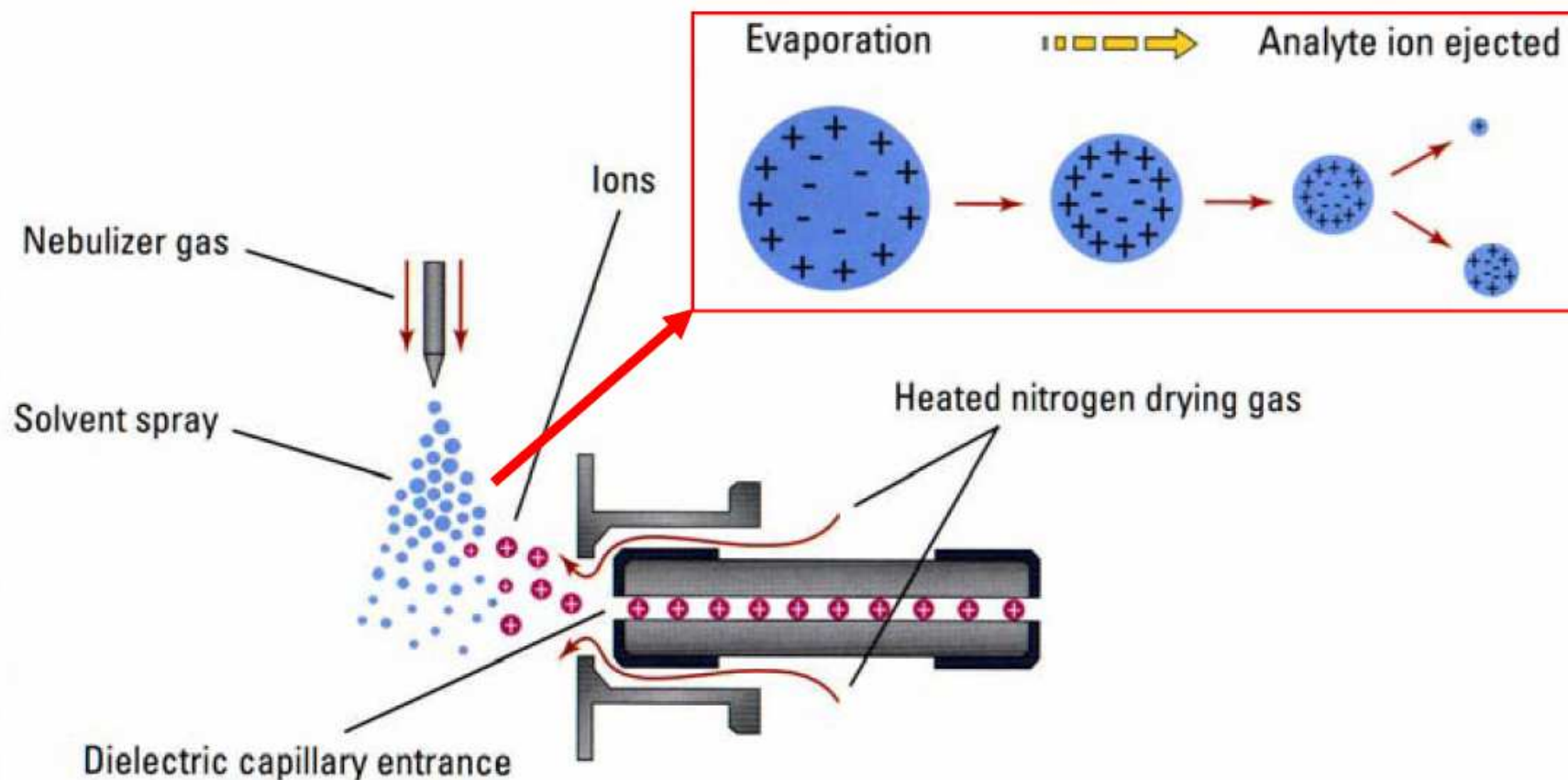
Platí pro běžné organické prvky (C, H, N, O, Si, S, P, F, Cl, Br, I)

- M+2 prvky
  - určení počtu Cl, Br, odhad přítomnosti Si, S
- MS/MS spektra
- sumarizace všech získaných informací
- ověření souladu retenčního chování s návrhem struktury
- potvrzení s komerčním/syntetizovaným standardem

# ESI

- velmi „měkká“ ionizační technika (biomolekuly)
- tvorba vícenásobných iontů, aduktů
- princip: Taylorův kužel → emise kapek v kuželi → ↑ hustoty povrchového napětí kapek a ↓ velikosti kapek ( $\mu\text{m} \rightarrow \text{nm}$ ) → vznik iontů v plynné fázi → jejich transfer do MS

Ke zjištění  $m$  stačí pouze 2 sousední píky:  $(m/z)_n = (m)/n$   
 $(m/z)_{n+1} = (m)/(n+1)$



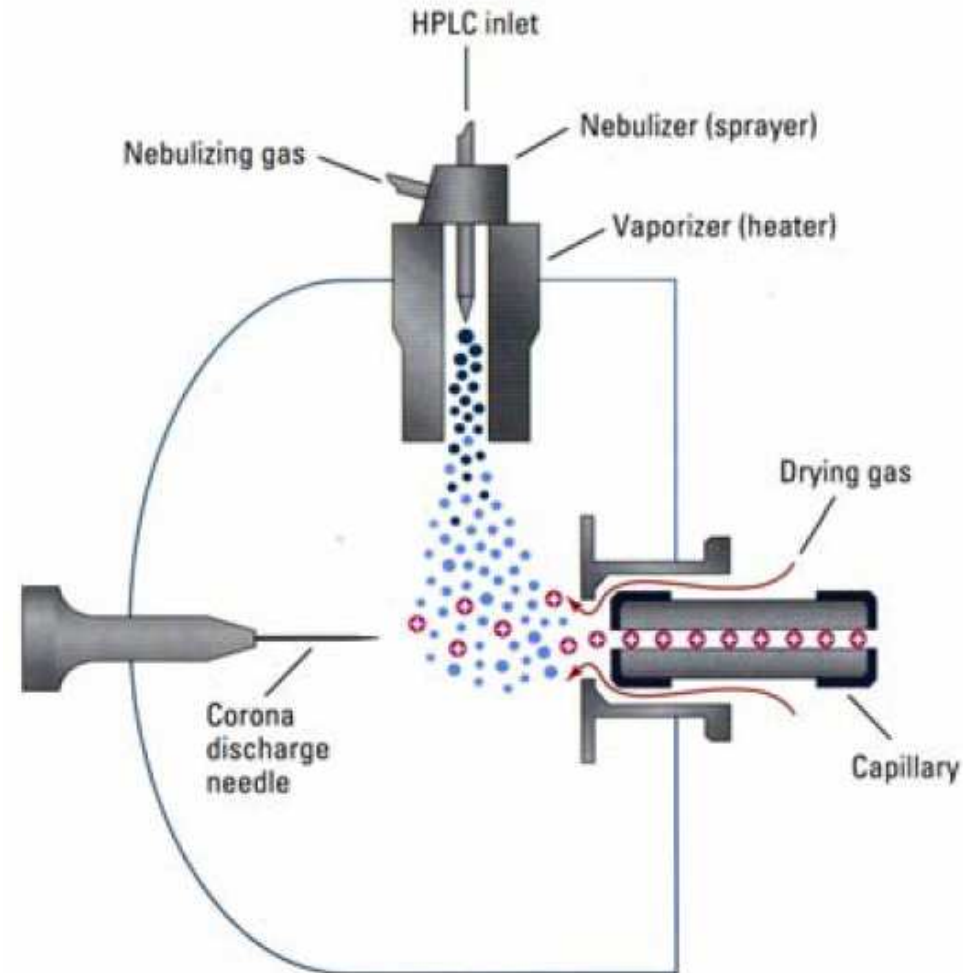
- složení eluentu dle podmínek pro LC separaci (složení, typ eluce)
- koncentrace analytu přicházející do iontového zdroje je určena dávkovaným množstvím na LC kolonu a rozmytím při průchodu kolonou (~ 20-30 naředění)
- volba experimentálních podmínek:
  - zásadité sloučeniny – detekce pozitivních iontů
    - úprava pH ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{HCOOH}$ )
  - kyselé sloučeniny – detekce negativních iontů
    - úprava pH ( $\text{NH}_3$ )
  - neutrální sloučeniny – adukty s kationty, volba jiné techniky (SIMS)
- volba rozpouštědla:
  - dostatečně rozpouští analyzované sloučeniny
  - podporuje vznik iontů v roztoku
  - snadno se zmlžuje, odpařuje a má nízkou solvatační energii

voda (~80%), metanol, etanol, isopropanol, butanol, acetonitril, aceton, tetrahydrofuran, chloroform

- použití:  
středně polární až iontové sloučeniny

# APCI

- princip obdobný jako u CI
- vložené napětí na výbojovou jehlu (3-4kV) → koronový výboj. Nejdříve ionizace molekul MF (přebytek), následně jsou ion-molekulárními reakcemi reakčního plynu (ionizované molekuly MF) ionizovány molekuly analytu
- i) Primární ionty vznikají ze zmlžujícího plynu
- ii) Reakční ionty vznikají z MF a aditiv
- iii) Hlavní mechanismy ionizace analytu (protonace/deprotonace; výměna náboje; tvorba aduktů; adice rozpouštědla; tvorba polymerních klastrů)
- ionty jsou následně elektrodami usměrněny do analyzátoru
- rozbití příp. nekovalentních klastrů protiproudem sušícího plynu





- volba rozpouštědla:
  - dostatečné rozpouštění analyzované sloučeniny
  - snadno se zmlžuje, odpařuje a má nízkou solvatační energii

metanol, propanol, butanol, aceton, chloroform, toluen, alkany (n-hexan, cyklohexan), etanol, isopropanol, voda, dichlormetan, benzen

- úprava pH:  
kyselina octová, kys. mravenčí, mravenčnan amonný, octan amonný, čpavek, triethylamin, tetraethylamonium hydroxid, tetrabutylamonium hydroxid

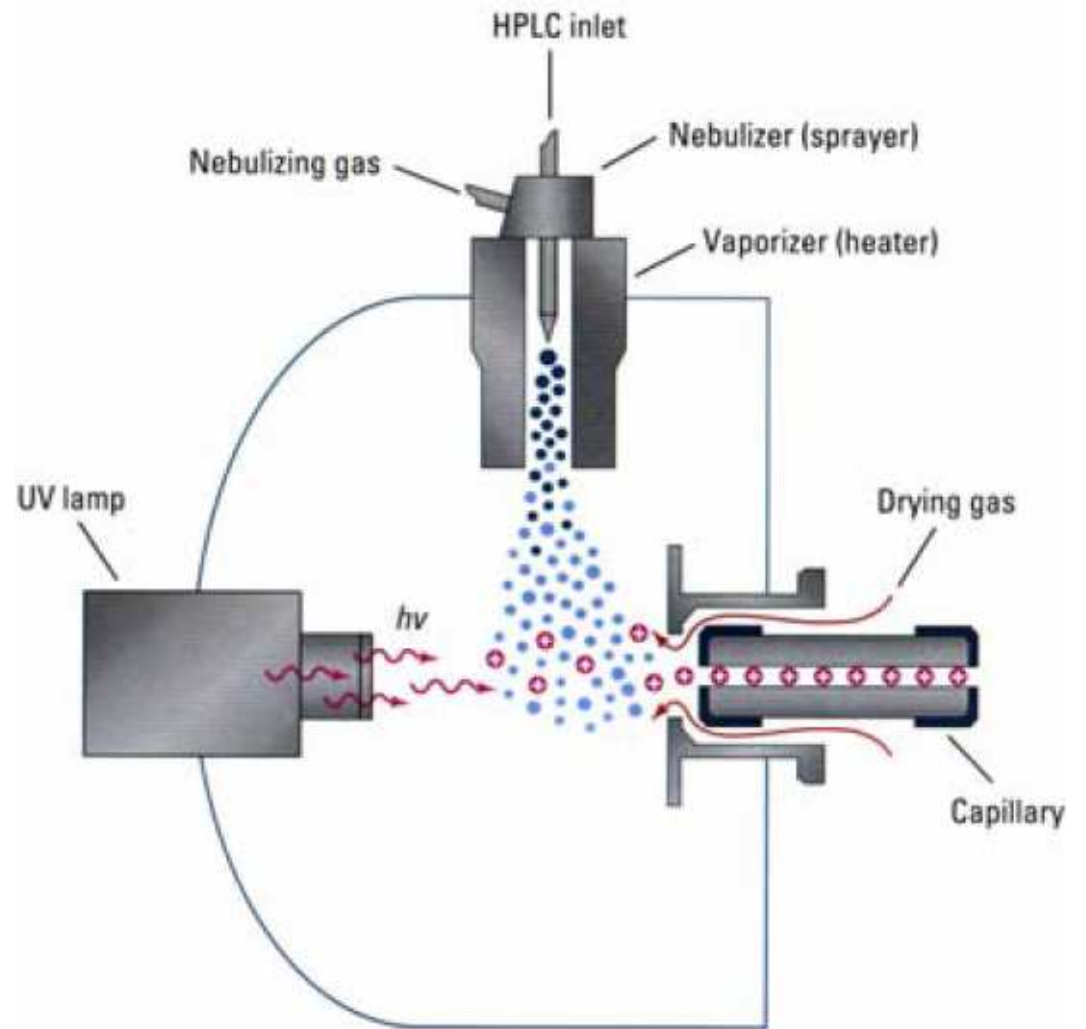
- pouze organické pufrы!  
Anorganické, např. fosfátový pufr:

- použití:  
málo až středně polární sloučeniny,  
do  $M_R \sim 1500$  Da,  
větší tolerance obsahu solí v eluentu,  
méně aduktových iontů



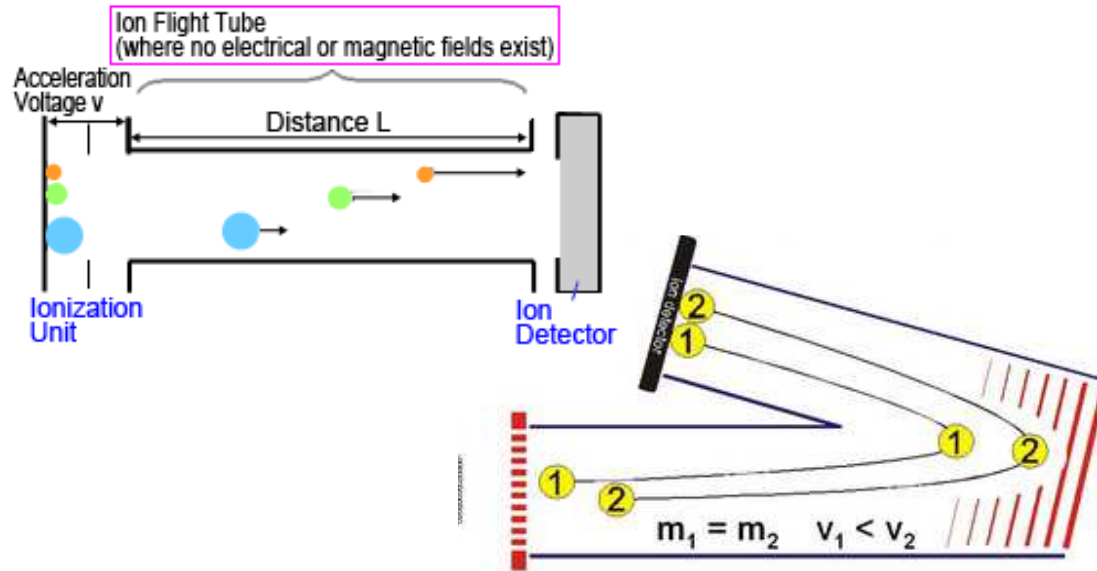
# APPI

- technika podobná APCI
- kryptonová výbojka s energií fotonů 10 eV
  - *selektivní ionizace analytu a nikoliv MF* – energie je větší než IE nepolárních organických molekul, ale menší než IE složek MF (MeOH, MeCN, voda) nebo vzdušného kyslíku!
  - *vyšší citlivost* - použití dopantu (toluen, aceton, IE < 10 eV), který poté reaguje ion-molekulárními reakcemi s analytem a nikoliv s MF
- mechanismus: ovlivněn řadou faktorů
- na rozdíl od ESI a APCI vznikají běžně ionty s lichým počtem elektronů
- použití: velmi nepolární látky nebo labilní látky

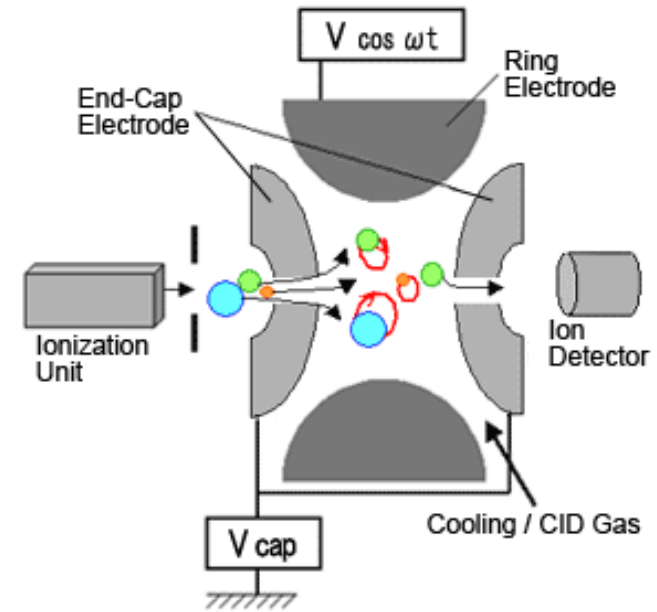


# Vybrané hmotnostní analyzátoři

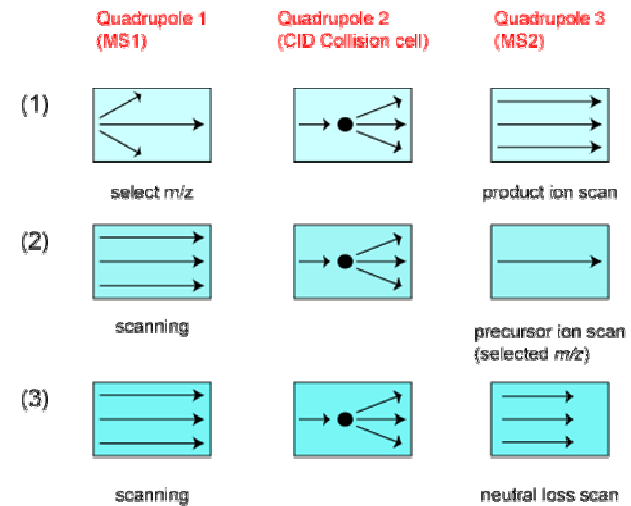
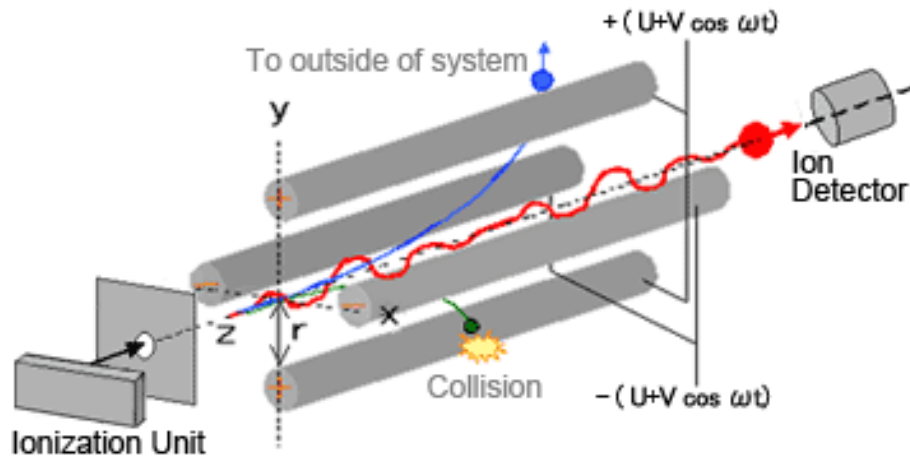
- TOF



- IT

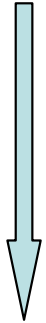


- Q, QqQ



## Rámcové porovnání hmotnostních analyzátorů

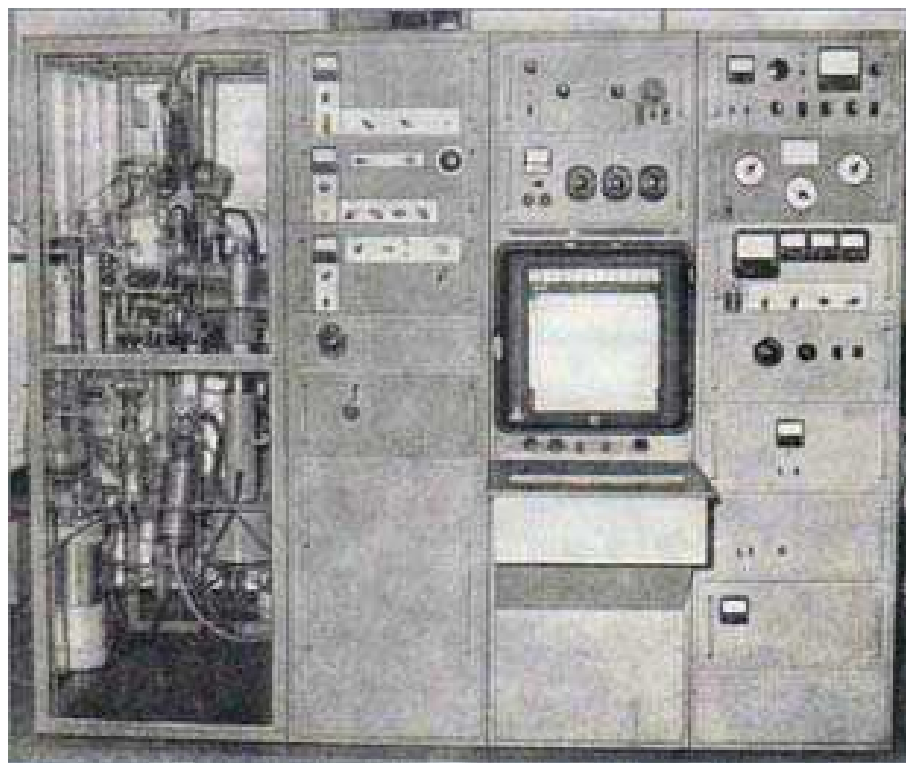
- citlivost jednotlivých technik

Třída	Rozlišovací schopnost [ $\cdot 10^3$ ]	Přesnost hmoty (ppm)	Rozsah m/z [ $\cdot 10^3$ ]	Skenovací rychlost [Hz]	Lineární dynamický rozsah	Cena
Q	3 - 5	50 - 100	2 - 3	2 - 10	$10^5 - 10^6$	
IT	4 - 20	50 - 100	4 - 6	2 - 10	$10^4 - 10^5$	
TOF	10 - 60	1-3	10 - 40	10 - 50	$10^4 - 10^5$	
Magnet	40 - 80	2 - 5	6 - 15	0.2 - 1	$10^6 - 10^7$	
Oritrap	100 - 240	1 - 2	4	1 - 5	$5 \cdot 10^3$	
ICR	750 - 2500	0.5 - 1	4 - 10	0.5 - 2	$10^4$	

# Historie MS a spojení se separačními metodami

2. polovina 19. století – počátky MS

- **1953** – první hmotnostní spektrometr – V. Čermák, V. Hanuš, Č. Jech, J. Cabicar



- **1957** – první spojení GC/MS (Holmes, Morrell) – první komerční GC/MS v r.1967
- **1973** – první spojení HPLC/MS (Baldwin, McLafferty) – první komerční LC/MS v r. 1977
- **1987** – první spojení CZE/MS (Smith)

**1917** – základy elektrospreje – vzniku nabitých kapiček zmlžením kapaliny (Zeleny)

**1953** – princip iontové pasti (Paul, Steinwedel)

**1957** – první spojení GC/MS (Holmes, Morrell) – první komerční GC/MS v r.1967

**1966** – chemická ionizace (Munson, Field)

**1968** – elektrosprej jako zdroj iontů (Dole)

**1973** – první spojení HPLC/MS (Baldwin, McLafferty) – první komerční LC/MS v r. 1977

**1974** – moving wire pro spojení HPLC/MS (Scott)

**1976** – moving belt pro spojení HPLC/MS (McFadden)

→ **1982** – ionizace APCI (Henion, Thomson, Dawson)

**1983** – ionizace termosprejem (Blakley, Vestal)

**1984** – Particle Beam pro spojení HPLC/MS (Willoughby, Browner)

**1987** – první spojení CZE/MS (Smith)

→ **1989** – elektrosprej biomolekul (Fenn)

→ **1989** – MALDI (Hillenkamp, Karas, Tanaka)

## HPLC vs. GC vs. CE

### LC/MS

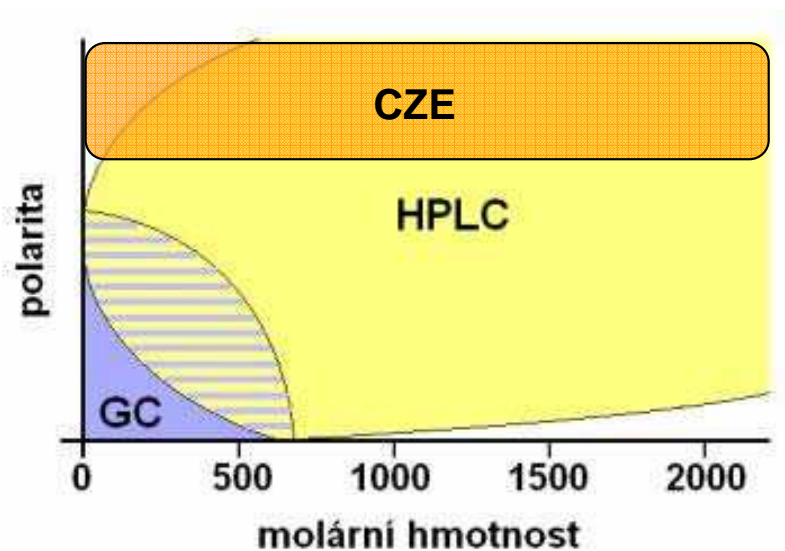
- pro většinu polárních i nepolárních látek
- většina aplikací

### GC/MS

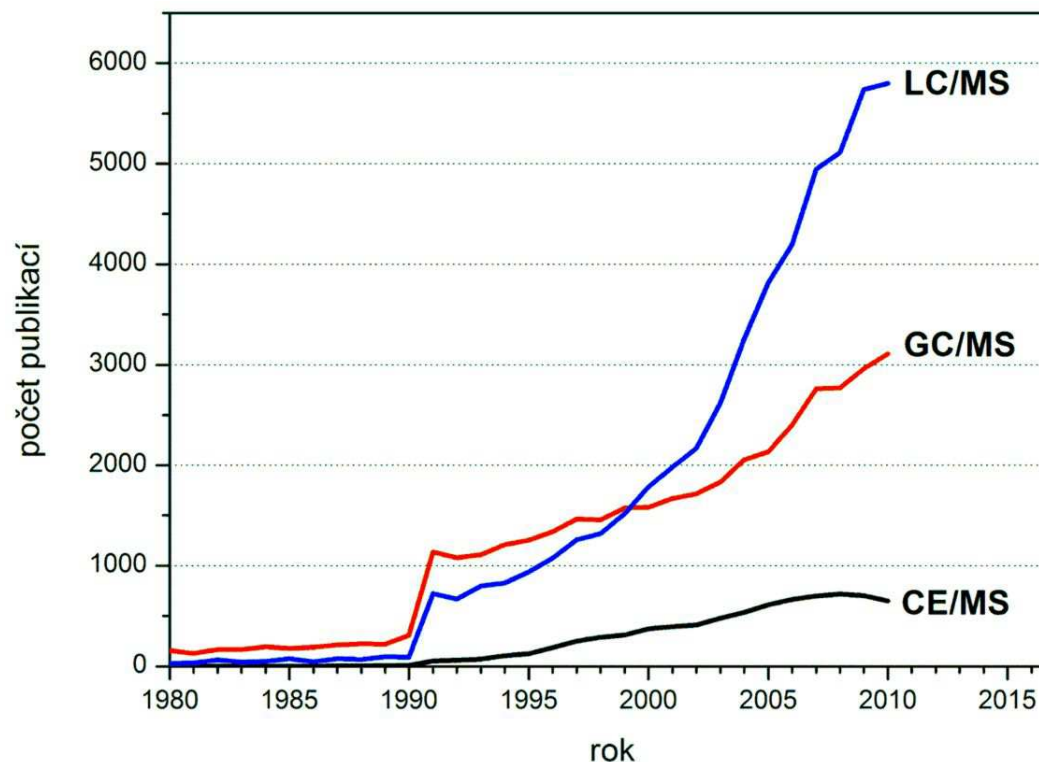
- pro látky nízkomolekulární nepolární nebo málo polární
- množství aplikací

### CE/MS

- pro velmi a středně polární látky
- omezené využití pro rutinní analýzy

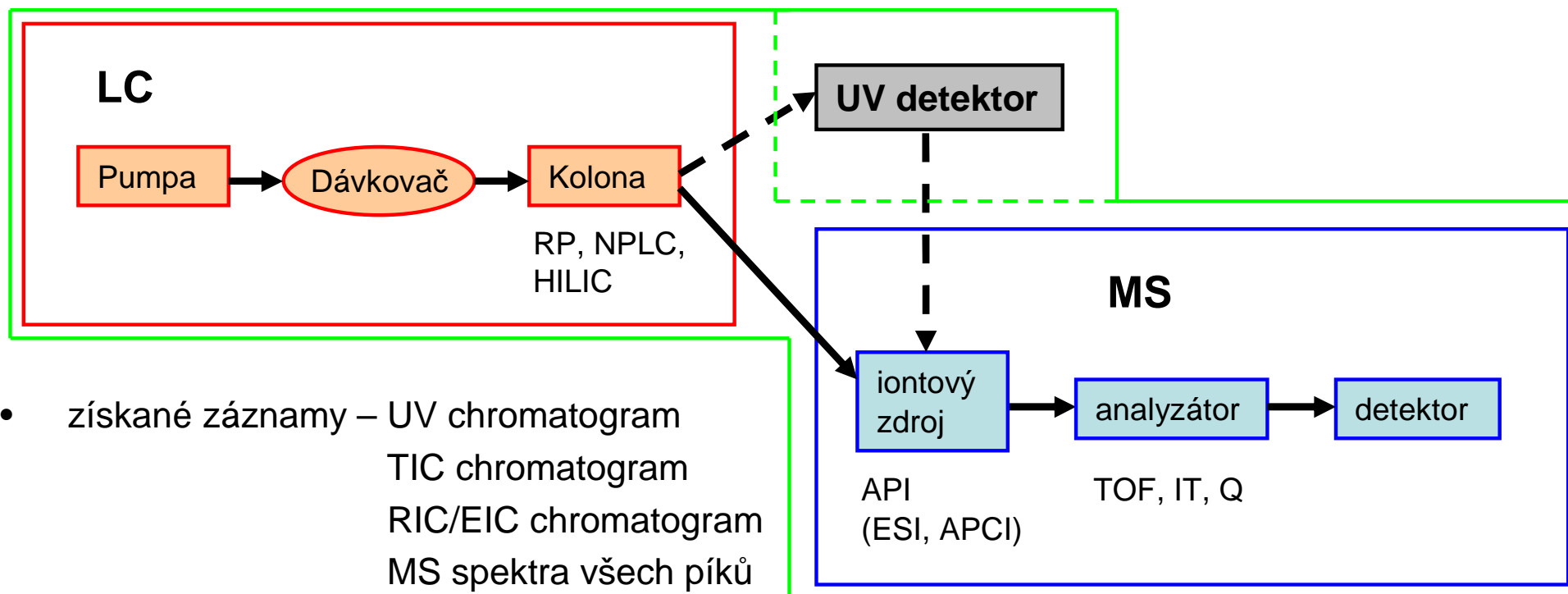


Rozvoj separačních technik ve spojení s MS



## Spojení separačních technik a hmotnostní spektrometrie

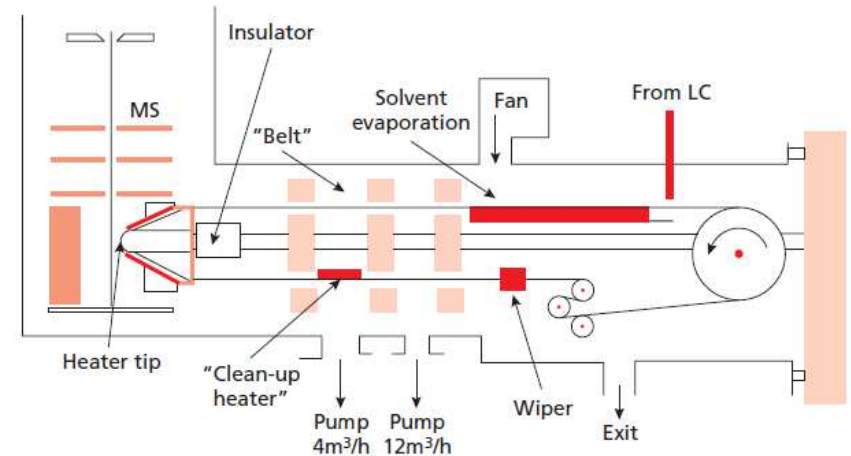
- v rámci jedné analýzy můžeme separovat a identifikovat komplexní směs
- MS<sup>n</sup> – strukturní informace
- kombinace výhod obou technik
- izolace látek na základě chromatografické separace a následné změření hmotnostních spekter pro jednotlivé látky





## Režimy spojení pro přenos hmoty

- 3 režimy, předpoklad úspěchu:
  - eliminace toku MF
  - interface mezi metodami (API techniky)
- **on-line** (komerční spojení)
  - + klasické komerční spojení
  - + široce rozšířené (ESI, APCI,...)
  - interface
  - redukce průtokové rychlosti MF
- **in-line** (pohybující se pás, drát)
  - + redukce tlaků
- **off-line** (nanášecí komora/zařízení, dělič toku, T-valve)
  - + oddělení separace od MS
  - + archivace vzorku
  - + redukce tlaků
  - snížení rozlišení separace při sběru
  - časově náročnější; někdy nerealizovatelné (stopové koncentrace)

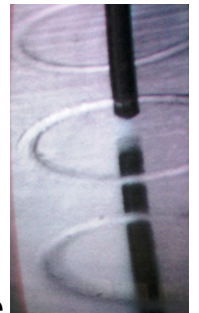


Kalkulace velikosti kapky podle Poiseuille rovnice pro laminární tok:

$$\frac{\text{flow rate}}{t} = \frac{\pi R^4 \Delta p}{8 \eta l}$$

Labels for the equation:

- flow rate:  $\pi R^4 \Delta p$
- capillary radius:  $R$
- pressure difference:  $\Delta p$
- absolute viscosity:  $\eta$
- capillary length:  $l$



# Stanovení priorit u LC analýzy

Druh analýzy – kvalitativní, kvantitativní, analytická, preparativní

1. Informace o vzorku (fyzikálně chemické parametry)
  - počet sloučenin přítomných ve vzorku, strukturní a molekulární vzorec sloučeniny
  - pKa sloučeniny
  - jeho koncentrační rozsah, rozpustnost analytu (pevný vzorek)
  - povaha matrice
2. Předúprava vzorku
  - povaha matrice
  - extrakce, zakoncentrování
  - eliminace interferencí x ochrana kolony
3. Výběr vhodného způsobu detekce (selektivita, citlivost)
  - první volbou je UV-VIS detekce, následně MS
4. Volba počátečních podmínek separace – volba LC módu, typu eluce
5. Optimalizace separačních podmínek – na základě dosažených výsledků
  - $t_R$ , R, N, As, drift základní linie, tlak, interferenční píky, spotřeba rozpouštědla, atd.
6. Úprava separačních podmínek pro daný úkol
7. Validace metody (pro rutinní analýzu)

# Volba chromatografického systému

**Jakou separační techniku vybrat pro kterou látku?**

	Solvent	Mode
Molecular weight <2,000	Organic	Hexane → Normal phase with bare silica (adsorption) Normal phase with bonded phase silica
		MeOH and MeOH:H <sub>2</sub> O or ACN and ACN:H <sub>2</sub> O → Reversed phase
		THF → Gel permeation (small molecules)
	Aqueous	Non-ionic → Reversed phase
		Ionic → Reversed phase with ionization control Reversed phase with ion-pair agent Reversed phase with bare silica Ion exchange
Molecular weight >2,000	Organic → Gel permeation	
	Aqueous → Gel filtration Ion exchange with wide-pore material Reversed phase with wide-pore material	

Zdroj: Agilent technologies

vzorek → stopové kovy (IEC)  
kovové cheláty (RPLC)

organická látka



velikost →  $M_R$  vztažená k 2000 g/mol  
rozpustnost

- voda → neelektrolyt (RP, NP, HILIC)  
→ elektrolyt (IEX, IP)

- org. rozpouštědla  
→ alkoholy (RP, HILIC, NP)  
→ uhlovodíky (RP, NP)

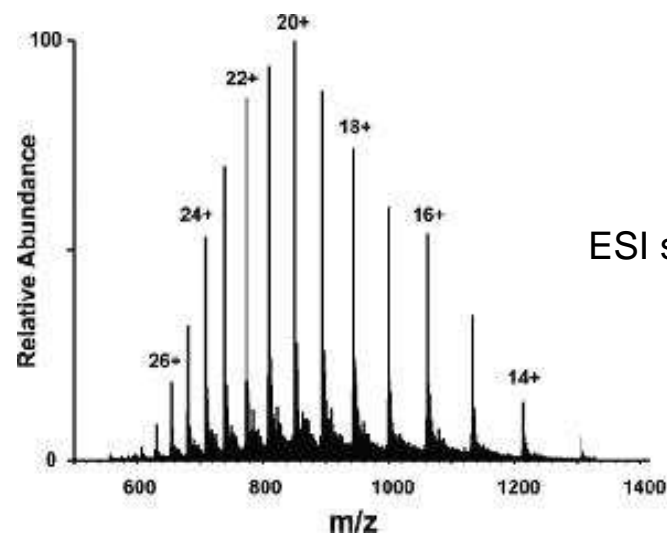
strukturní rozdíly – nepolár. části  
molekuly, fčí skupiny

## Parametry ovlivňující LC separaci

- **teplota** – vliv na viskozitu a difúzní koeficient ( $\uparrow T = \uparrow$  účinnost)
  - vyšší teplota pro urychlení analýz
  - někdy lepší nižší teplota, degradace vzorku
  - někdy omezení ze strany SF
- **typ sorbentu** – vliv retenci solutů a jejich selektivitu
- **průtok MF** – vliv na účinnost separace
- **složení MF** – vliv na selektivitu a rozlišení
  - složení rozpouštědel, lineár vs. gradient (změna v čase)
  - přídavek aditiv,  $pH$
- **parametry kolony**
  - průměr  $\rightarrow$  kapacita roste se čtvercem průměru kolony
  - délka  $\rightarrow$  s  $\uparrow$  délkou se  $\uparrow$  účinnost (počet teoretických pater), tlak a doba analýzy
  - velikost částic  $\rightarrow$  snížením jejich rozměru roste účinnost (specifický povrch), ale i pracovní tlak

## LC parametry (ne)ovlivňující MS spektra

- teplota separace – bez vlivu
- typ sorbentu – kvalitní kolona nesmí ovlivňovat MS spektra
- průtok MF – není přímý vliv na kvalitu signálu, nutné však změnit průtoky plynů
- složení MF – výrazný a zásadní vliv na kvalitu spekter
  - složení rozpouštědel, gradient → ovlivnění ionizační účinnosti (intenzity signálu)
  - přídavek aditiv → potlačení signálu, někdy naopak (neutrální látky, ESI)
- parametry kolony – má vliv na hodnotu průtoku MF, tím volba sušícího a zmlžujícího plynu.



## Obecné zásady LC/MS analýzy

- **složení MF** – volba rozpouštědla, aditiva (dostatečná těkavost, nekontaminují zdroj)
  - chlorovaná rozpouštědla - ↑ kontaminace zdroje a horší stabilita signálu
  - těkává aditiva – HCOOH (0,1%, 2mM u MeCN), CH<sub>3</sub>COOH (0,2%), amoniak (0,05-1%)
  - pufrů 5-10 mM (HCOONH<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>)
  - POZOR ion-párová činidla (tetraalkylamonné soli, sulfonové kyseliny) – silná až nevratná kontaminace!

**RPLC** – MeOH, MeCN, lze i EtOH, 2-propanol (většinou nejlepší odezva při  $c_{\text{org.roz}} \sim 70-90 \%$ )

- ↑ až 100% obsah vody → nutné ↑ F, teplotu sušícího a zmlžujícího plynu (nižší citlivost)
- 100% MeCN při APCI vyžaduje častější čištění výbojové eldy (tvorba grafického uhlíku na eldě)
- plně kompatibilní s MS – API techniky v závislosti na polaritě analytu a složení MF

**NPLC** – lepší kompatibilita s APCI než-li s ESI

- nutný obsah proton-donorního rozpouštědla (>5%), např. 2-propanol (100% hexan bez signálu)
- kompatibilní s MS – většinou APCI, APPI; ESI nevhodný pro nepolární rozpouštědla

**HILIC** – viz RPLC

- kompatibilní s MS – API, ESI

- **příprava MF**

- rozpouštědla nejvyšší kvality (LC/MS)
- zabezpečit vzájemnou mísitelnost
- filtrace a odplynění MF !



- **příprava vzorku**

- filtrace před analýzou (0,22  $\mu\text{m}$  porozita, PTFE, PVDF, nylon)
- dávkovaný objem dle kapacity kolony  $\times$  zhoršení separace
- oplach dávkovacího zařízení  $\times$  kontaminaci

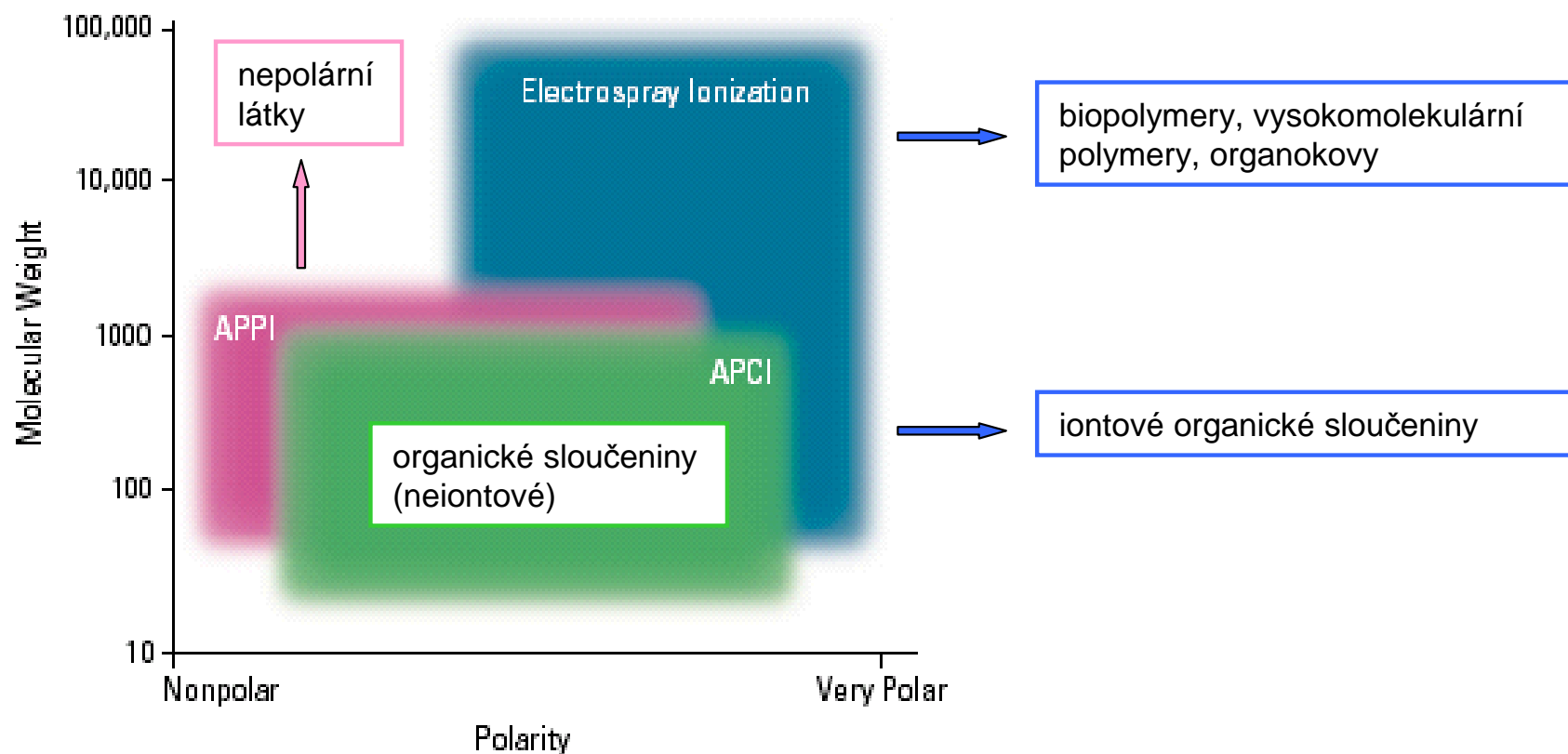
objem (ml)	průměr filtru
<1	4
<5	13
<100	25

- **kolona**

- dostatečná ekvilibrace (10-20x  $V_M$ )
- skladování – vymytí aditiv (pufry, kyseliny)!, uchování ve směsi vody ( $\downarrow$ ) a rozpouštědla
- čištění dle řady protokolů – směs vody ( $\uparrow$ ) a rozpouštědla - IPA/THF - směs vody ( $\downarrow$ ) a rozpouštědla
- předkolony (prodloužení životnosti), in-line filtry (mechanické nečistoty z MF)
- minimalizace mrtvého objemu  $\rightarrow$  co nejkratší a nejužší kolony  
spojky s min. mrtvým objemem
- termostatování kolony

## Volba MS systému

- záznam kladných iontů – univerzální (většina sloučenin)
- záznam záporných iontů – organokovy, halogenované sloučeniny, sloučeniny obs. karboxy, sulfo, nitro skupiny, atd.
- polarita molekul





- složení MF

- NP – nepolární rozpouštědla, vhodné APCI, APPI
- RP – techniky ESI, APCI, APPI

- průtok MF

- až 1 ml/min - APCI, APPI
- < 0,5 ml/min (podle obsahu vody) – ESI
- dle průtoku a složení MF je nutné upravit průtoky sušících a zmlžujících plynů

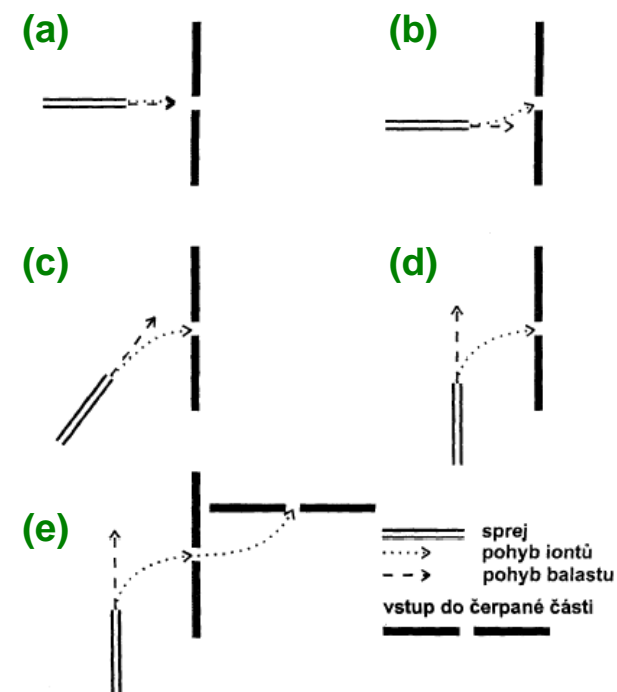
- geometrie iontového zdroje → vliv na odezvu signálu  
odolnost x kontaminaci

(b) vychýlení mimo osu, (c) pod úhlem 45°, (d) ortogonální sprej, (e) Z(M,..)-sprej

- hmotnostní analyzátoři

- MS/MS, MS<sup>n</sup> – strukturní analýza, rozlišení izobarických sloučenin
- MS skeny – jednodušší spektra, kvantitativní analýza

- podle požadavků na analýzu – rozlišení a přesnost určení hmoty



## ! *Optimalizace LC/MS metody*

- požadavky na LC/MS → separace cílových látek  
→ usnadnění identifikace a kvantifikace (rozlišení jednotlivých látek; ion suppression; ↑ citlivosti analýzy; identifikace stopových látek)  
→ LC podmínky co nejméně ovlivňovat kvalitu signálu v MS

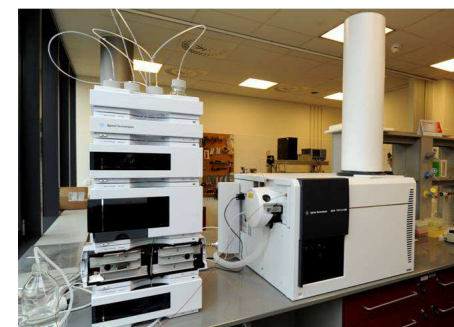
- způsoby optimalizace – metoda pokus a omyl  
matematické modely a statistické postupy

LC cíl? → separace látek pro kvalitativní a kvantitativní analýzu  
→ eliminace vlivu LC na MS signál  
→ max citlivost a co nejnižší LOD

nástroj? → SF; MF; teplota separace  
→ rozměry kolony, příp. jejich kombinace; velikost a typ sorbentu; průtok

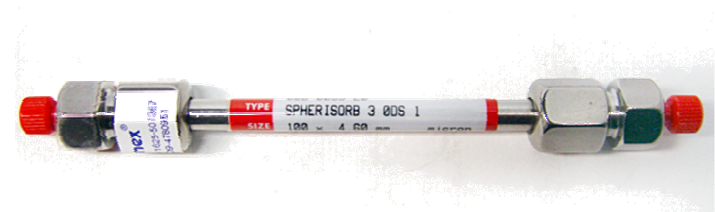
kvalita (závisle proměnné)? → kapacita systému, selektivita, účinnost, rozlišení

- obecný postup
  - výběr podmínek na základě odlišností mezi separovanými látkami (polarita, funkční skupiny, ...)
  - výběr kolony – sorbent, rozměry (začínat s kratší kolonou)
  - volba MF, přídatných aditiv, volba pH (dle vlastností analytů)
  - test navržených podmínek a jejich postupná optimalizace



## Optimalizace RPLC – MS separace

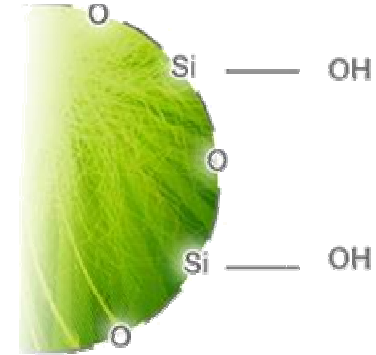
- SF – C18 (C8, fenylová)
- MF – MeCN, MeOH, vodná složka
- pufry – pH 3 a 9



- Postup
  - 1) analýza na C18 koloně při použití MF 100% MeCN
  - 2) přidavek vodné složky do MF podle retence látek, příp. volba jiného separačního systému
  - 3) vliv pH na separaci – hraniční hodnoty pH v kyselé a bazické oblasti
  - 4) zopakování 1-3 kroků pro jinou MF a jinou kolonu/typ sorbentu
  - 5) srovnání výsledků a výběr MF (složení, typ eluce), kolony (typ SF, průměr zrnění) a pH
  - 6) na základě získaných výsledků provedeme případné další testy – kolona, MF, aditiv
  - 7) optimalizace pro dosažení optimálních podmínek -  $\uparrow R$ ,  $\downarrow$  doba analýzy

## Optimalizace NPLC – MS separace

- SF – Si (-NH<sub>2</sub>)
- MF – hexan, heptan/IPA, MeCN (bez zbytkové vlhkosti !)
- NPLC – horší reprodukovatelnost analýz a rozlišení  
– APCI, APPI



- Postup
  - 1) analýza při použití MF 100% hexanu s přidavkem IPA či MeCN
  - 2) ↑ či ↓ modifikátoru podle retence látek, příp. přejít na HILIC systém v případě vysoké retence polárnějšího rozpouštědla
  - 3) test dalších kolon (-NH<sub>2</sub>)
  - 4) optimalizace pro dosažení optimálních podmínek - ↑R, ↓ doba analýzy

## Optimalizace HILIC – MS separace

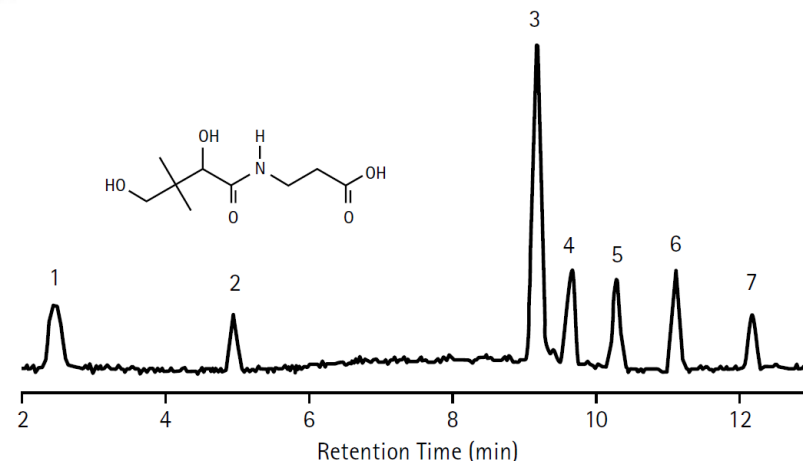
- SF – HILIC
- MF – MeCN, voda > 3 %, aditiva
- HILIC – těkavější solventy – ↑ citlivost v MS v porovnání s RPLC
- Postup
  - 1) analýza při použití MF s vyšším obsahem vody (kontrola retence látek)
  - 2) úprava podmínek podle retence látek (obsah vody, aditiv)
  - 3) na základě získaných výsledků provedeme případné další testy – kolona, MF (aditiv, pH)
  - 4) optimalizace pro dosažení optimálních podmínek - ↑R, ↓ doba analýzy



Gradientová separace pantothenátu (2), Acetyl-CoA (3), AMP (4), CoA (5), ADP (6), ATP (7) na ZIC-pHILIC PEEK koloně 150x2,1mm, 5µm.

MF (v/v): MeCN (A), 10mM (HN<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 0,2% NH<sub>4</sub>OH

Gradient: 0-15min 20-60% B, 15-20 min 60% B, ekvilibrace 15 min 20% B



*Děkuji za pozornost*

