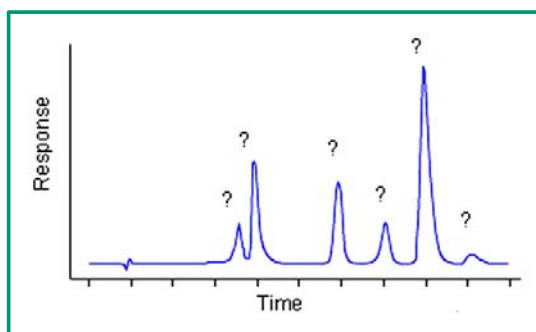


Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Kvalitativní analýza

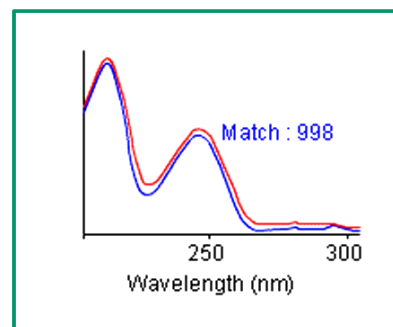
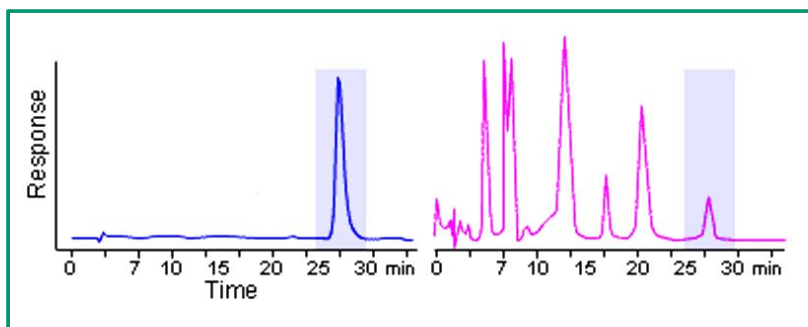
Josef Cvačka, 24. 10. 2023

Kvalitativní analýza



Porovnání (interpretace)
retenčních dat

Porovnání (interpretace)
spektrálních dat



Detektory pro kvalitativní analýzu

Detektory pro kvalitativní (spektrální) analýzu

NMR. . . **mg- μ g**

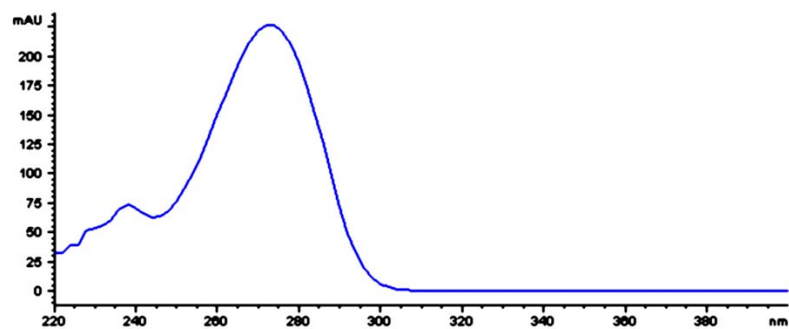
IR. . . **μ g**

UV/VIS . . . **ng**

Fluorescenční . . . **pg**

Hmotnostně-spektrometrický. . . **pg**

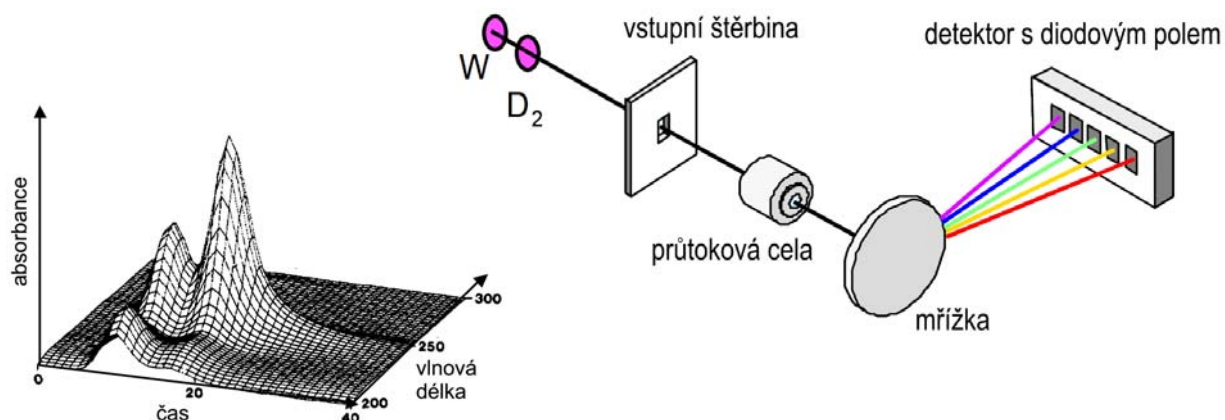
Vysokoučinná kapalinová chromatografie s detekcí UV/Vis záření



UV/Vis detektory s diodovým polem

UV / VIS detektory s diodovým polem (PDA, DAD)

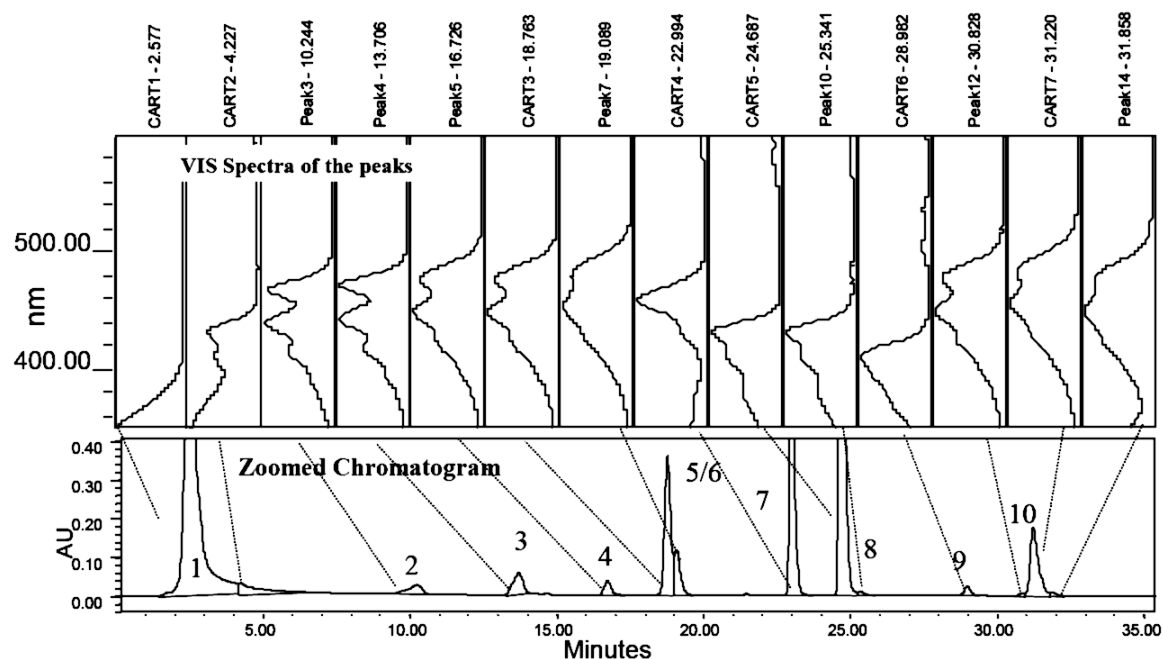
zaznamenávají celé spektrum v reálném čase bez přerušení chromatografické separace. Detektorem je pole fotodiod, jejich počet určuje spektrální rozlišení detektoru. Umožňují detekci analytu při jakékoliv zvolené vlnové délce, porovnávat spektra s knihovnou spekter, vypočítat čistotu píku.



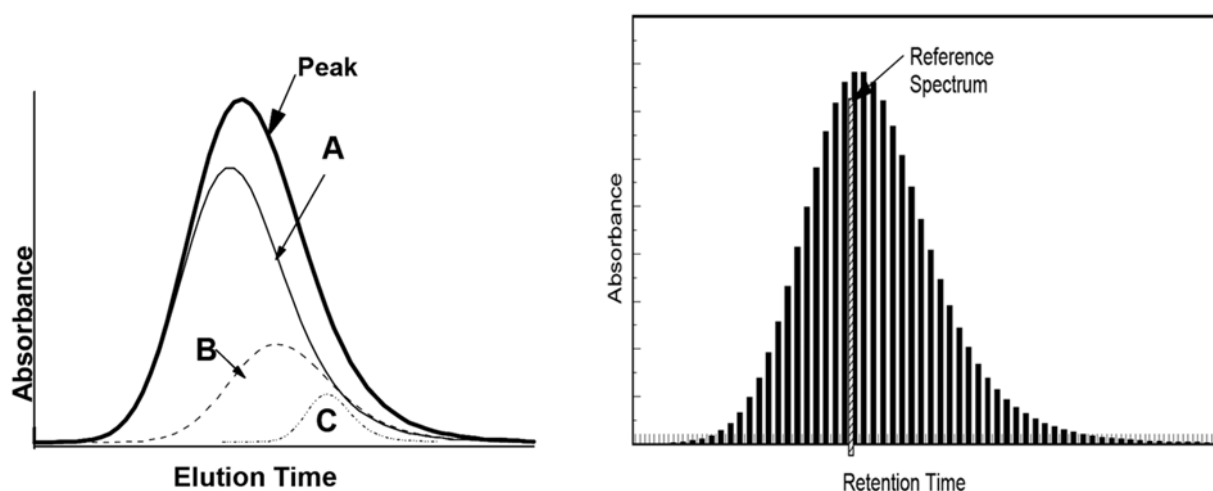
Grafika upravena z Jasmina Zdralic, Bachelor thesis, Lunds universitet

UV/Vis detektory s diodovým polem

Př: HPLC/DAD analýza karotenoidů v extraktu listů



Peak purity - “čistota píku”

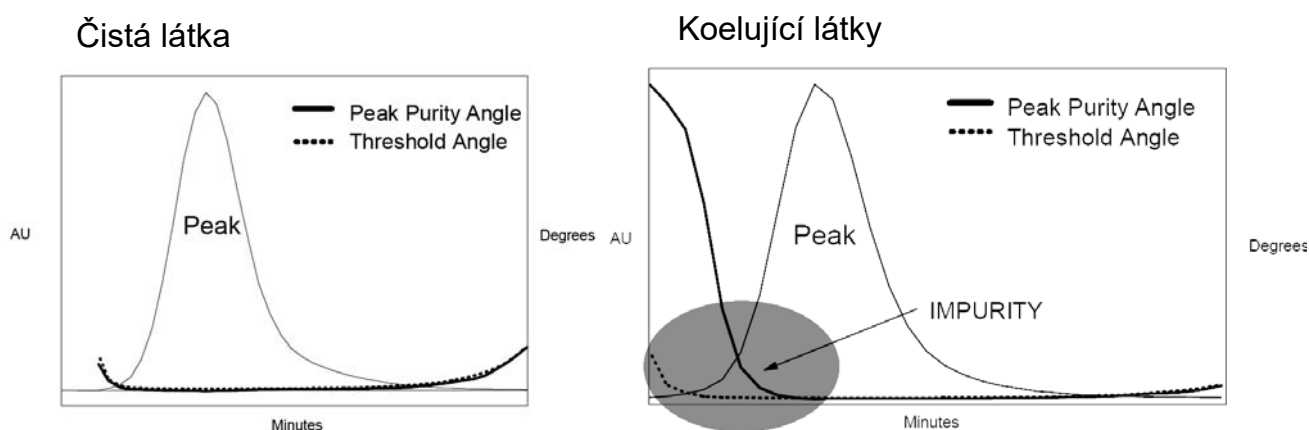


Koelující píky – celkový signál může být bez lokálních minim a bez chvostování

Analýza čistoty píku – porovnávání jednotlivých UV/Vis spekter v rámci píku

Waters

Peak purity - “čistota píku”

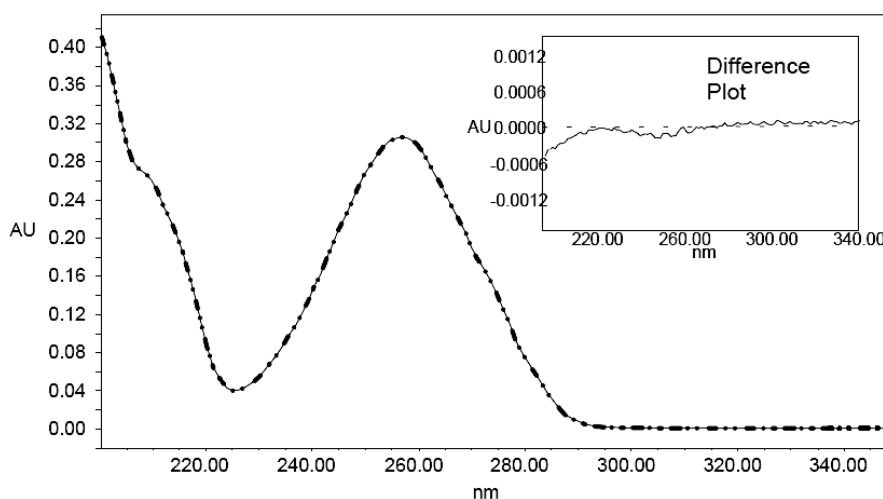


“Peak purity angle”:

Vektorová analýza rozdílů ve spektrech v jednotlivých částech píků. Čím bližší si spektra jsou, tím je hodnota “peak purity angle” bližší nule. Čím jsou spektra rozdílnější, tím víc se hodnota blíží maximu (90°).

Waters

Porovnávání spekter s databázemi



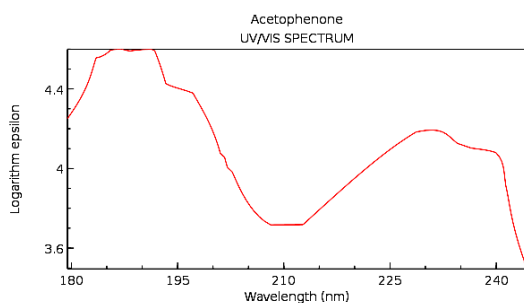
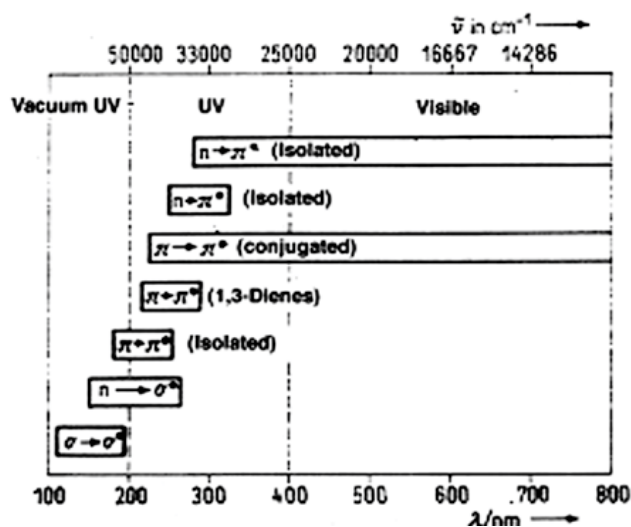
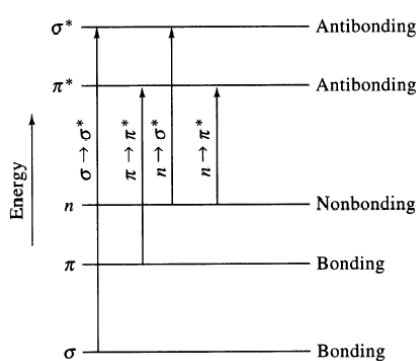
- ▶ Match Angle = 0.063
- ▶ Good match
- ▶ Peak ID = ethylparaben

Porovnávání spekter s databází na základě parametru "match angle". Čím nižší hodnota, tím lepší shoda.

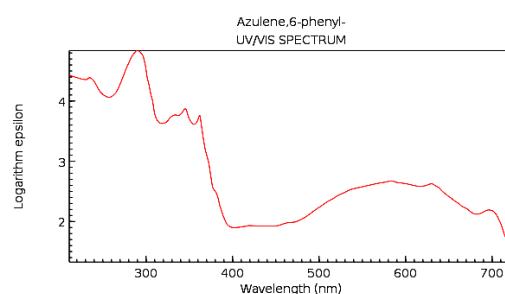
- i při velmi dobré shodě nemusí být identifikace správná!

Waters

Interpretace UV spekter

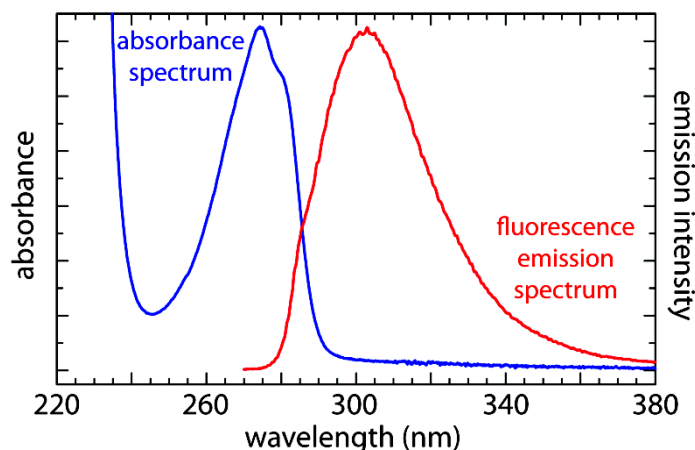


NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)



NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

Vysokoučinná kapalinová chromatografie s detekcí fluorescenčního záření

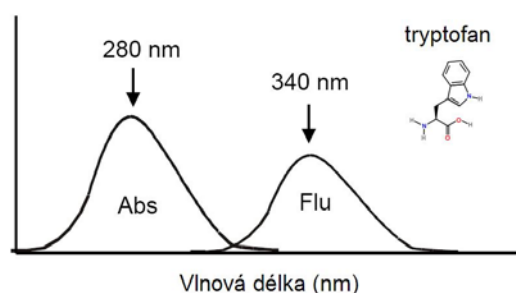
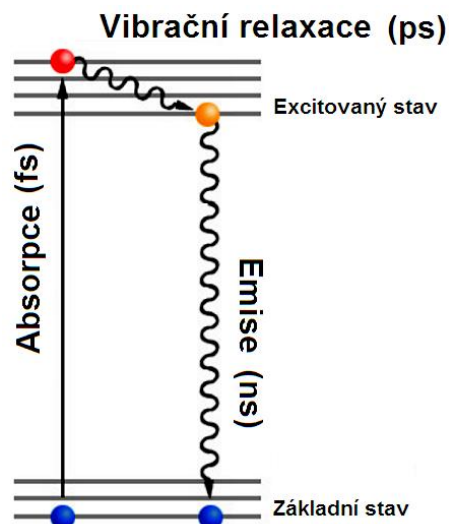


Fluorescenční detektor

Fluorescenční (fluorimetrický) detektor

měří sekundární (emisní) záření, které látka vyzáří po absorpci primárního (excitačního) elektromagnetického záření.

Absorbci elektromagnetického záření přecházejí molekuly látek ze základního stavu do vyšších vibračních hladin. Absorbovanou energii může analyt vyzářit jako fluorescenci. Vlnová délka emitovaného záření bývá větší než u excitačního v důsledku vibrační relaxace.



Excitační/emisní spektra

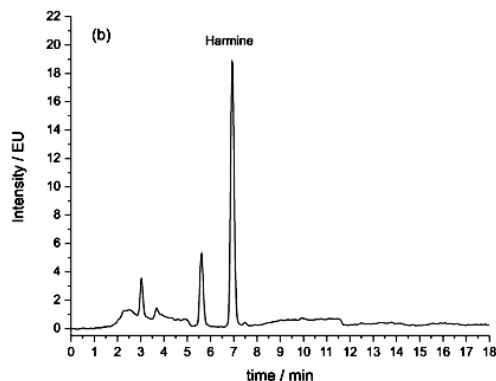
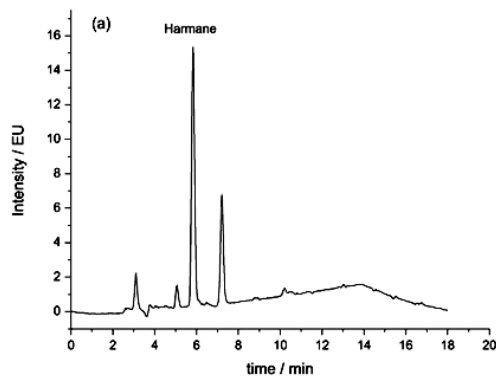
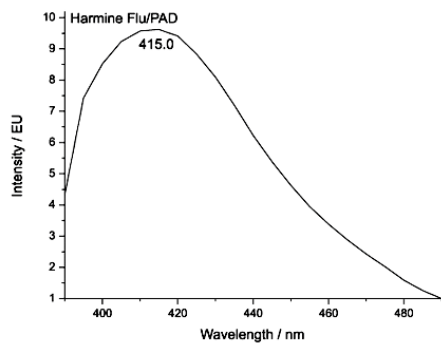
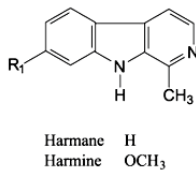
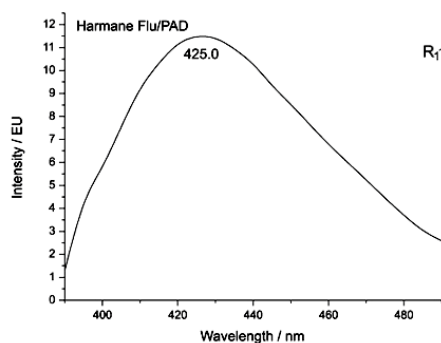
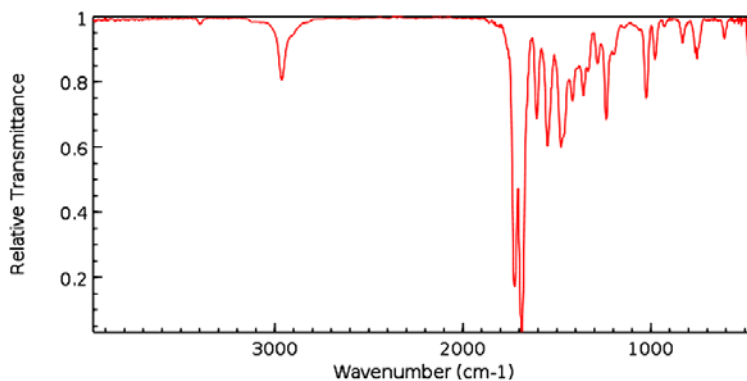


Figure 6. Typical HPLC-Flu/PAD chromatograms of the passion fruit pulp samples obtained by the dual SBSE-LC/Flu method: (a) detection at $\lambda_{\text{excitation}} = 254 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emission}} = 425 \text{ nm}$ (best conditions for detection of harmane); (b) detection at $\lambda_{\text{excitation}} = 254 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emission}} = 410 \text{ nm}$ (best conditions for detection of harminine).

J. Braz. Chem. Soc. vol.25 no.8 São Paulo Aug. 2014

Vysokoučinná kapalinová chromatografie s detekcí infračerveného záření



HPLC-IR

Infračervená spektroskopie

Metoda založená na absorpci IČ (IR) záření vzorkem, při níž dochází ke změnám rotačně-vibračních energetických stavů molekuly. Absorpční pásy jsou vhodné pro identifikaci funkčních skupin (např. –OH, C=O, N-H, CH₃ aj.). Spektra lze prohledávat vůči knihovně IČ spekter, spektra lze i simulovat pomocí výpočtu.

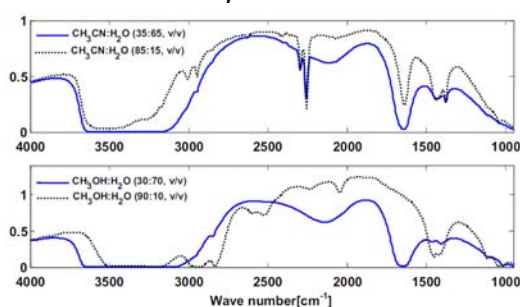
Problémy spojené s HPLC/IR:

- nízká citlivost metody
- na rozdíl od UV/Vis silná absorpce rozpouštědel

HPLC-IR

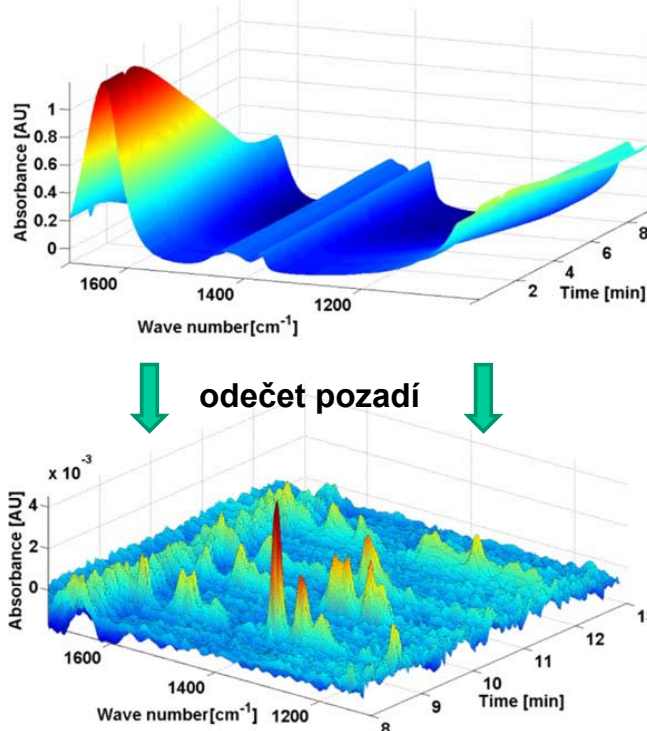
- on-line (měření ve volných "oknech", odečet pozadí)
- off-line (měření spekter po odstranění rozpouštědla)

IR spektra mobilních fází

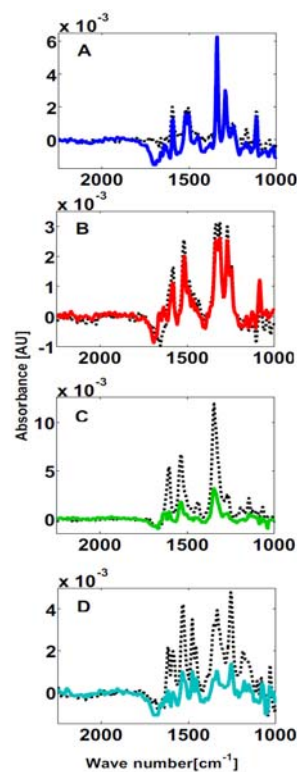


HPLC-IR

on-line měření – separace nitrofenolů



Extrahovaná spektra



HPLC-IR: komerční instrumentace



DiscovIR-LC™



- off-line uspořádání, avšak sběr dat v reálném čase
- mikrodepozice vzorku ve vakuu na chlazený rotující transparentní ZnSe disk, měření spekter při průchodu paprsku vzorkem
- možnost opakované analýzy (zvýšení S/N)
- průtoky 0.25 to 1.5 mL/min
- kompatibilní rozpouštědla: voda, acetonitril, methanol, tetrahydrofuran, chloroform
- kompatibilní aditiva: těkavé pufrы, kyselina trifluoroctová, triethylamin
- citlivost: ~1µg

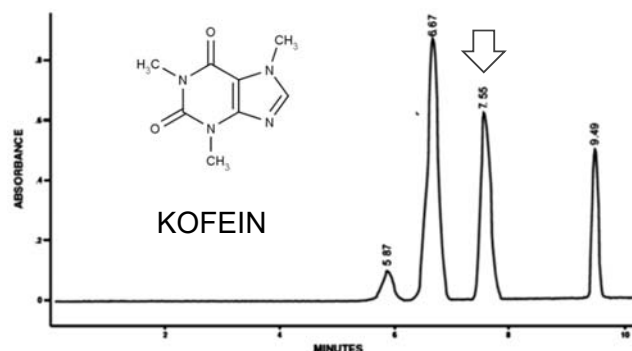
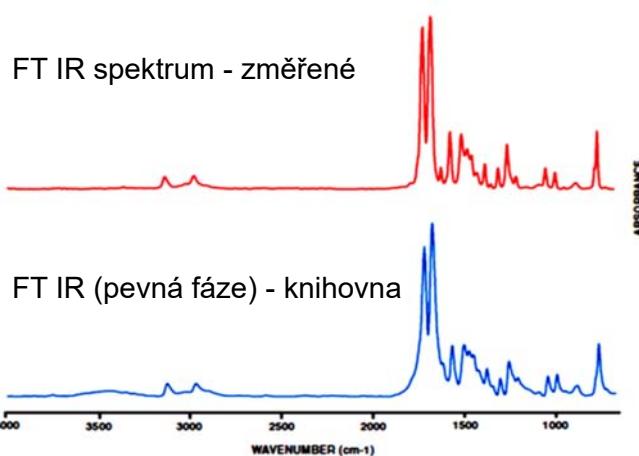
<http://www.spectra-analysis.com/>

HPLC-IR: aplikace

Př.: Analýza alkaloidů

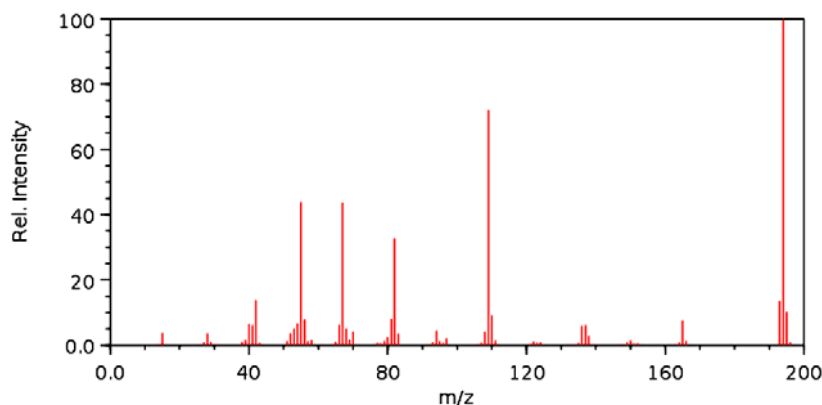
- spektra nejsou ovlivněná rozpouštědly (mobilní fázi)
- shoda s knihovnou FTIR spekter v pevné fázi
- vhodné pro termálně nestálé sloučeniny, které nelze analyzovat pomocí GC/IR

Kolona C18 Nova-Pak 3.9 x75mm,
10min gradient z 98% H₂O / 2%
CH₃OH do 100% CH₃OH, 1ml/min



<http://www.spectra-analysis.com/>

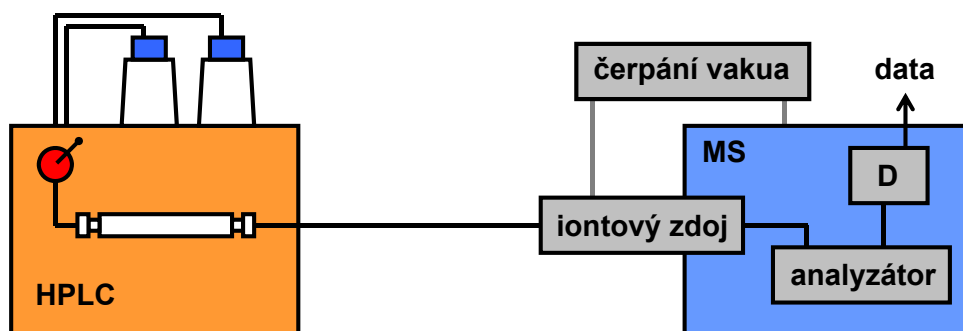
Vysokoučinná kapalinová chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí



Spojení HPLC s hmotnostním detektorem

Hmotnostní detektor

Zaznamenává intenzitu vybraných iontů, které vznikají v iontovém zdroji. Univerzální a vysoce selektivní, citlivý detektor. Umožňuje identifikaci analytů na základě jejich hmotnostních spekter.

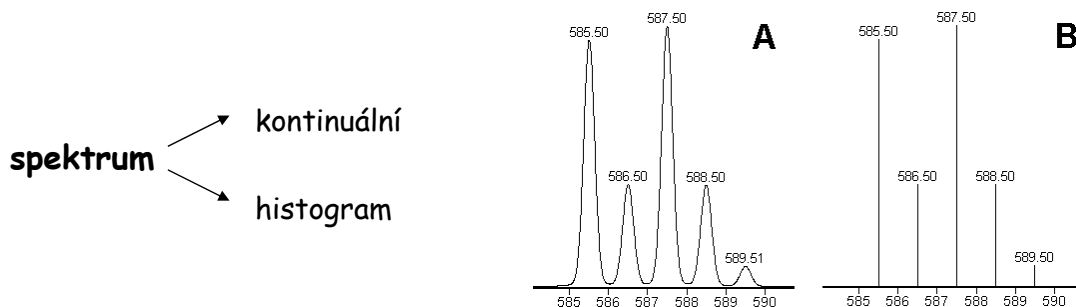


Kapalná mobilní fáze se sprejuje do části iontového zdroje, která je při atmosférickém tlaku (tzv. API zdroje, elektrosprej, APCI, APPI). Vakuový systém v další části zdroje odstraní přebytečný plyn vytvořený sprejováním kapalné mobilní fáze.

Hmotnostní spektrum

Hmotnostní spektrum:

grafické znázornění závislosti intenzity iontů na jejich poměru hmotnosti ku náboji (m/z).



Kontinuální spektrum (profilové):

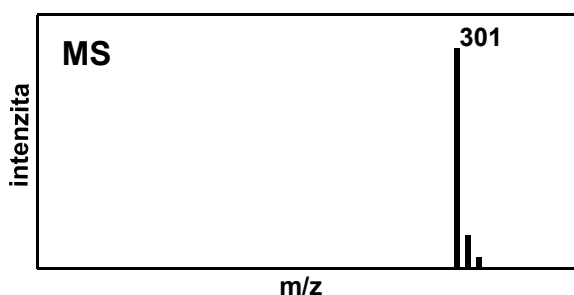
spektrum, jak je zaznamenáno detektorem (umožňuje odečíst šířku píku); A

Centroidové spektrum (histogram):

spektrum je převedeno na sloupcový graf, poloha (m/z) signálu je odečtena v těžišti píku, intenzita odpovídá ploše nebo výšce píku (přehlednější); B

Spektra jsou většinou normalizována, intenzity (osa y) jsou 0-100%.

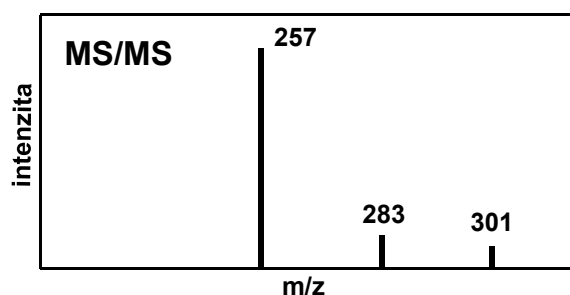
Spektra MS a MSⁿ



Spektrum MS

Lonty vzniklé ionizací analytu (neutrální molekula) a případnou fragmentací molekulárního iontu (aduktu)

Př. MS spektrum (ESI) sloučeniny s molekulární hmotností 300 g/mol
->molekulární adukt - ion m/z 301



Spektrum MS/MS (MS²)

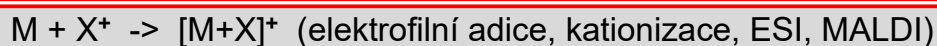
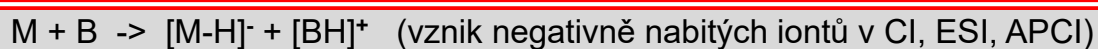
Lonty vzniklé fragmentací iontu prekurzoru.

Př. MS/MS spektrum (ESI) sloučeniny s molekulární hmotností 300 g/mol, fragmentace iontu m/z 301
-> fragmenty, ionty m/z 283 a m/z 257

Ionizace

Ionizace: převedení neutrálních molekul, případně iontů v roztoku na ionty v plynné fázi

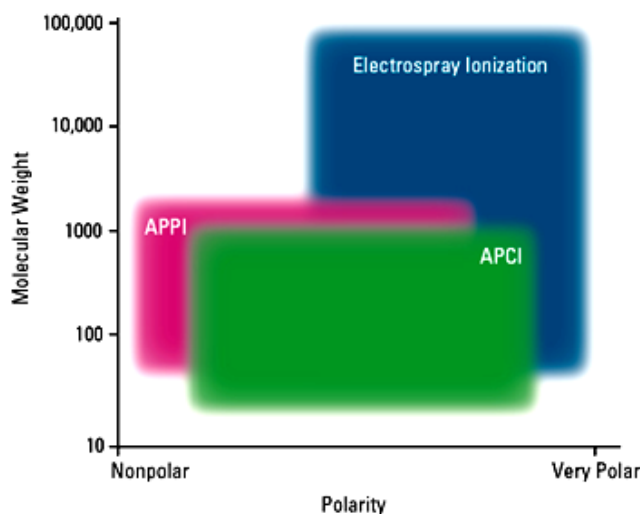
Příklady ionizací:



molekulární ion ($M^{+\bullet}$) vs. molekulární adukt ($[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$)

Ionizační techniky a zdroje

Neexistuje univerzální ionizační technika pro všechny molekuly, pro různé typy sloučenin jsou vhodné různé ionizace, které vedou k molekulárním iontům nebo aduktům.

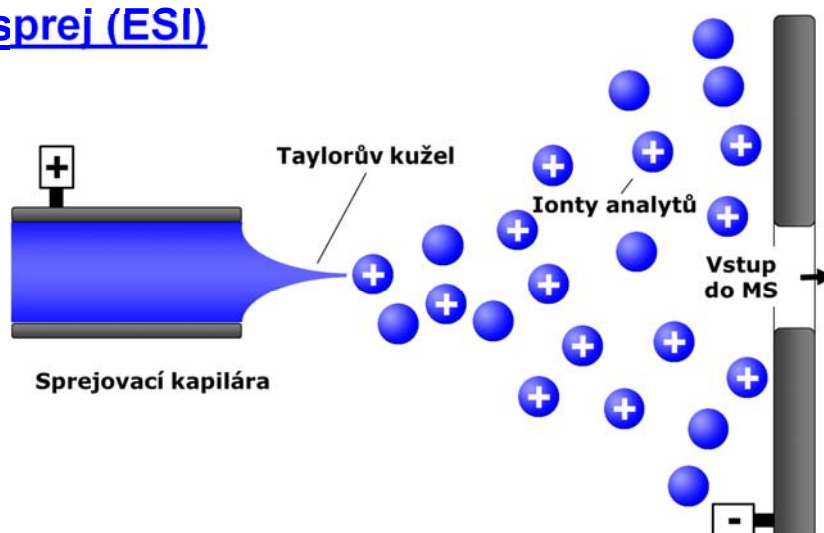


ESI: ionizace elektrosprejem

APCI: chemická ionizace za atmosférického tlaku

APPI: fotoionizace za atmosférického tlaku

Elektrosprej (ESI)



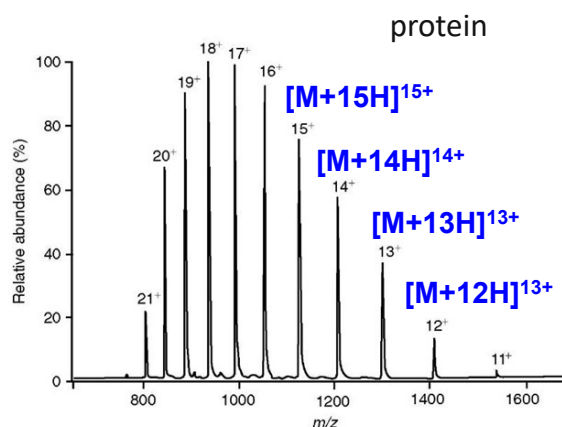
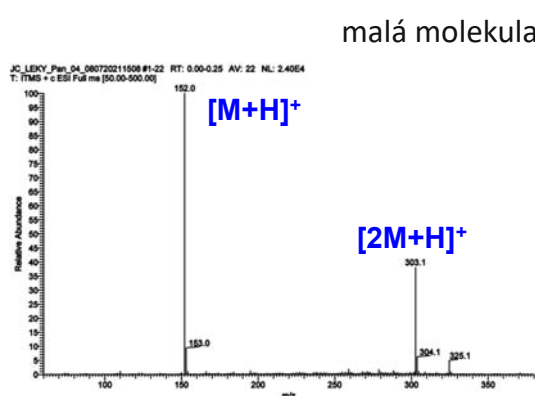
Eluát prochází kapilárou, na niž je vloženo vysoké napětí. Intenzivní pole na konci kapiláry tvoří kónický meniskus (Taylorův kužel), ze kterého se uvolňuje sprej vysoce nabitých kapiček. Následným postupným odpařením rozpouštědla vznikají ionty. Pokud je více ionizačních míst v molekule mohou vznikat vícenásobně nabité ionty.

ESI – převod iontů, které již existují v kapalně fázi do fáze plynné.

Ionty vytvořené elektrosprejem

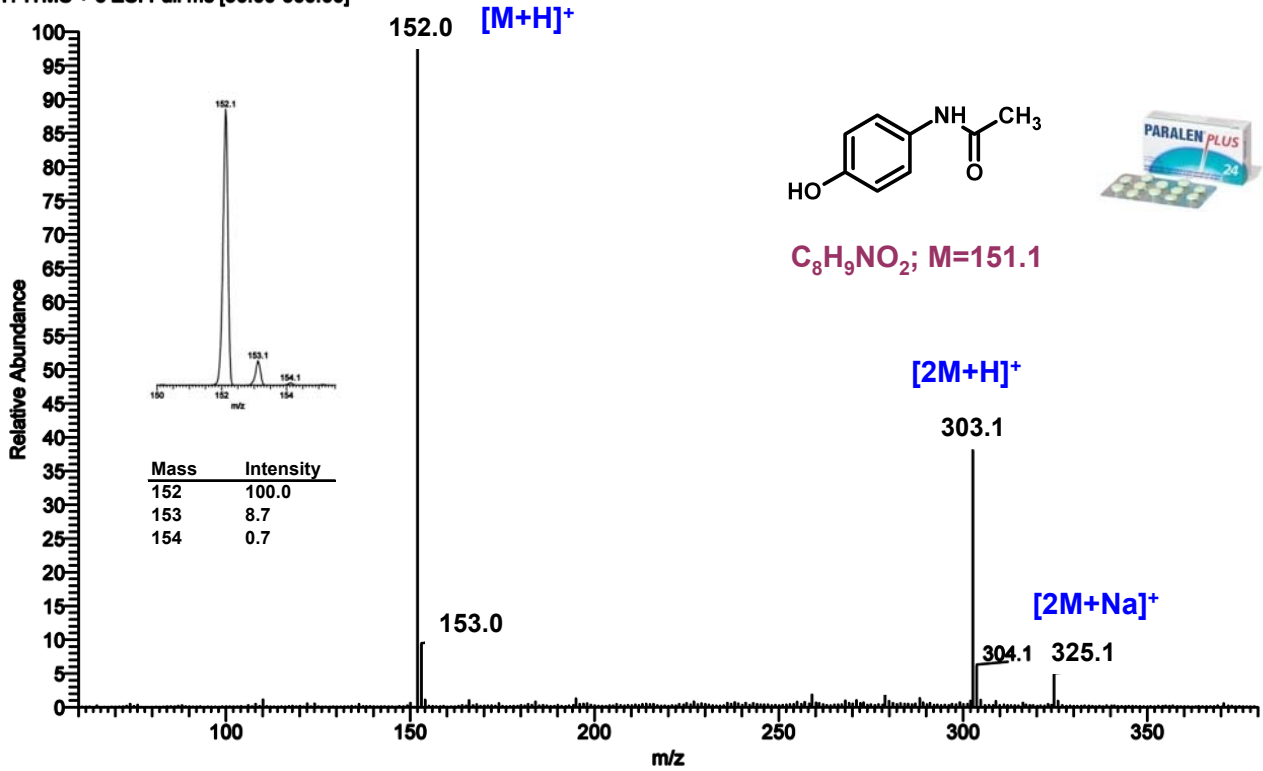
Měkká ionizační technika (minimum fragmentace)

- tvorba jedenkrát nabitých iontů $[M + H]^+$, $[M + Na]^+$, $[M + NH_4]^+$ (pozitivní mód) a $[M - H]^-$, $[M + Cl]^-$ (negativní mód) v závislosti na složení mobilní fáze
- tvorba vícenásobně nabitých iontů $[M + nH]^{n+}$, $[M + nNa]^{n+}$ (pozitivní mód) a $[M - nH]^{n-}$ (negativní mód) u látek s větším počtem polárních funkčních skupin, typicky biomakromolekuly – proteiny, oligonukleotidy apod.



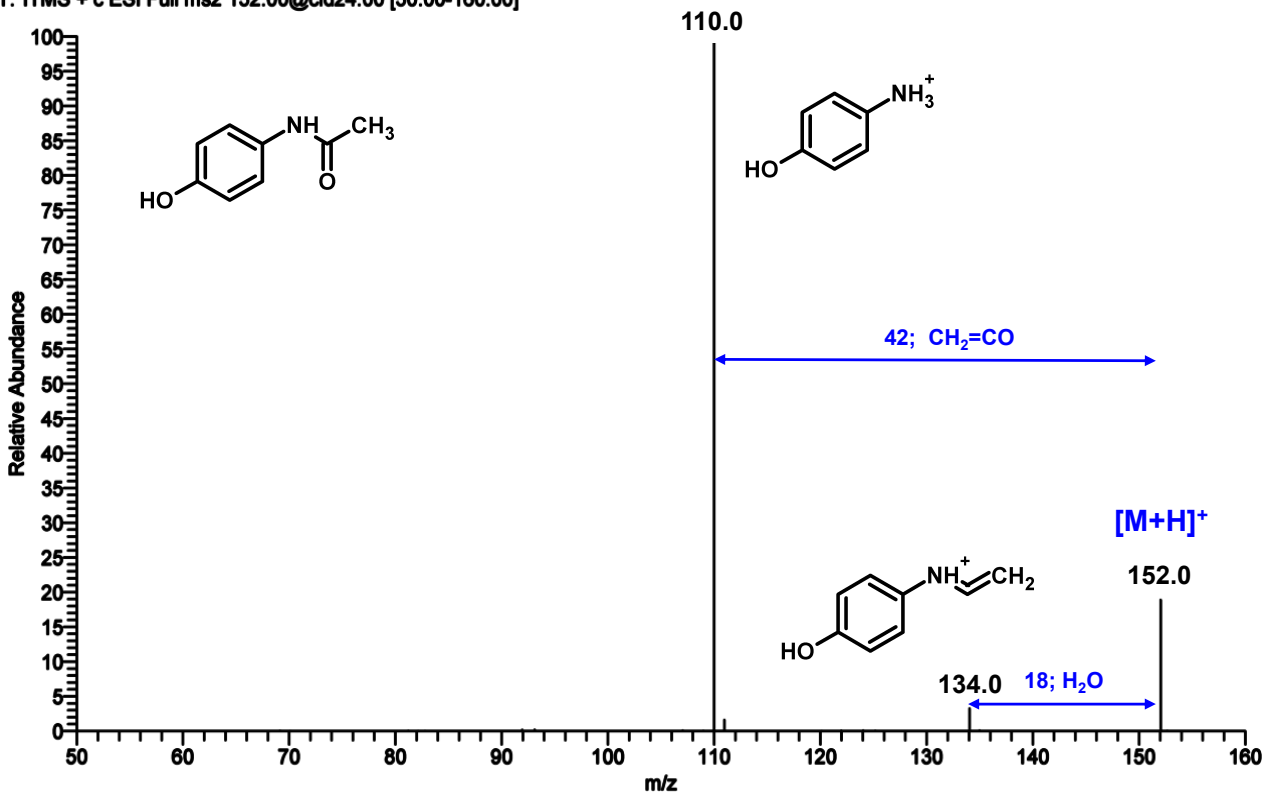
ESI spektrum MS: Paracetamol N-(4-hydroxyfenyl)acetamid

JC_LEKY_Pan_04_080720211508 #1-22 RT: 0.00-0.25 AV: 22 NL: 2.40E4
T: ITMS + c ESI Full ms [50.00-500.00]



ESI spektrum MS²: Paracetamol N-(4-hydroxyfenyl)acetamid

jc_leky_pan_03_080720211358 #1-36 RT: 0.00-0.24 AV: 35 NL: 1.07E3
T: ITMS + c ESI Full ms2 152.00@cid24.00 [50.00-160.00]

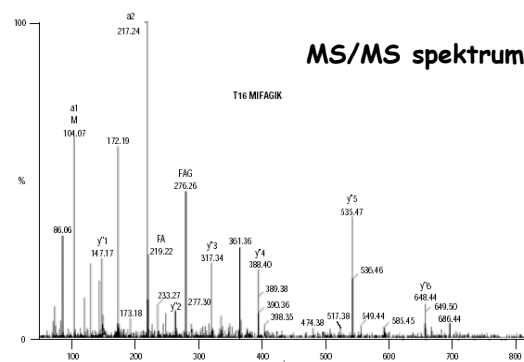
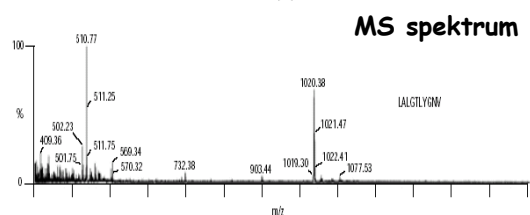
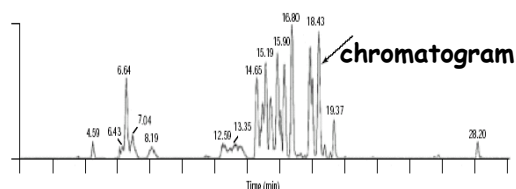


NanoESI (nanosprej)



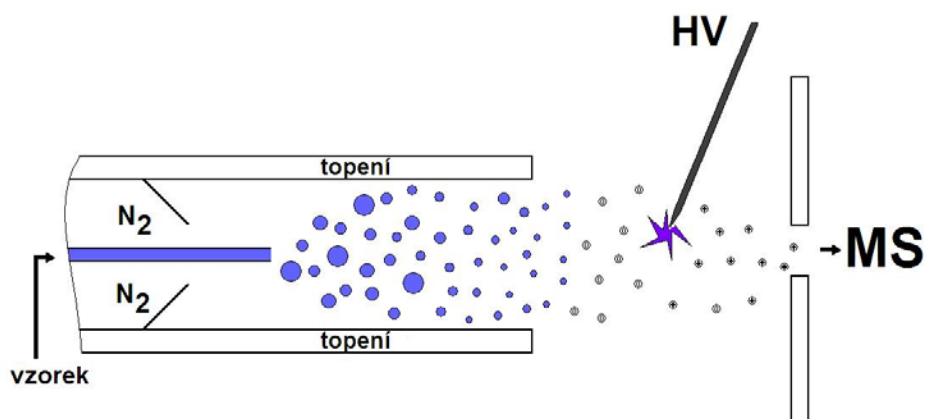
NanoESI - obdoba ESI pracující s průtoky nl/min. Sprejuje se z kapilár o velmi malém průměru (několik μm), tvoří se menší kapky, které snáze desolvatují, zvyšuje se účinnost ionizace.

Práce je experimentálně náročnější, polohu sprejeru je nutno optimalizovat.



Nanoelektrosprej je používán pro kapilární a nano-HPLC/MS a CE/MS.

Chemická ionizace za atmosférického tlaku - APCI

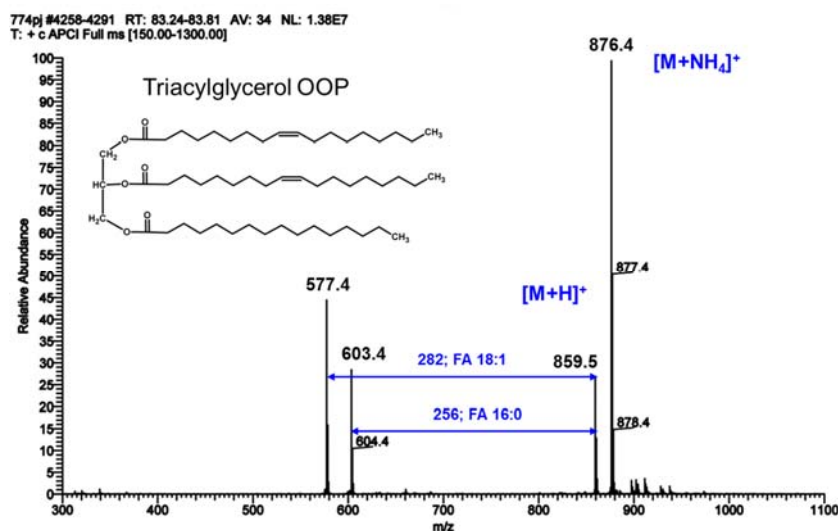


Eluát je rozprašován do vyhřívané komůrky ($\sim 400\text{-}500\text{ }^\circ\text{C}$). Koronový výboj je zdrojem elektronů, které ionizují plyny ve zdroji (zmlžovací plyn N_2 , vzduch). Vzniklé ionty koludují s molekulami rozpouštědla za tvorby sekundárních reakčních iontů (např. $(\text{H}_2\text{O})_n\text{H}^+$). Tyto ionty ionizují molekuly analytu (záleží na jejich protonové afinitě).

Lonty vytvořené při APCI

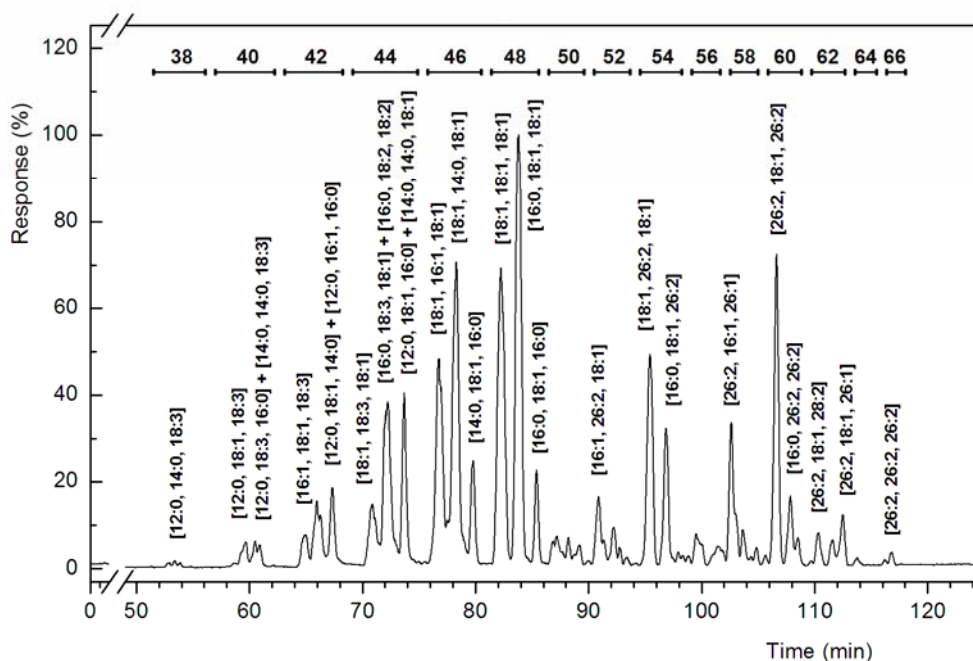
Měkká ionizační technika (určitá fragmentace)

- Lonty se sudým počtem elektronů: $[M + H]^+$, $[M + NH_4]^+$, produkty reakcí s rozpouštědly (pozitivní mód) a $[M - H]^-$ (negativní mód)
- Lonty s lichým počtem elektronů: $M^{+•}$, produkty reakcí s rozpouštědly
- fragmenty

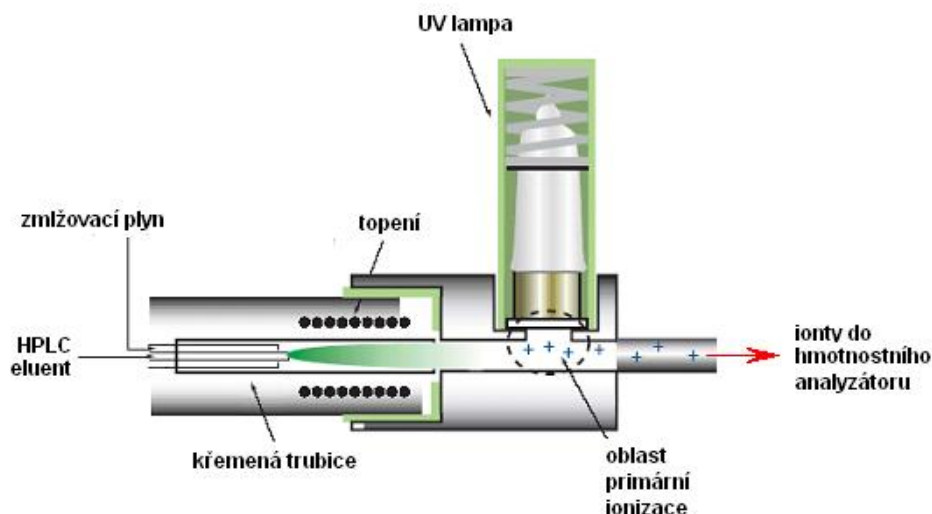


Chemická ionizace za atmosférického tlaku - APCI

Příklad: analýza triacylglycerolů v tukovém tělese čmeláků, RP-HPLC

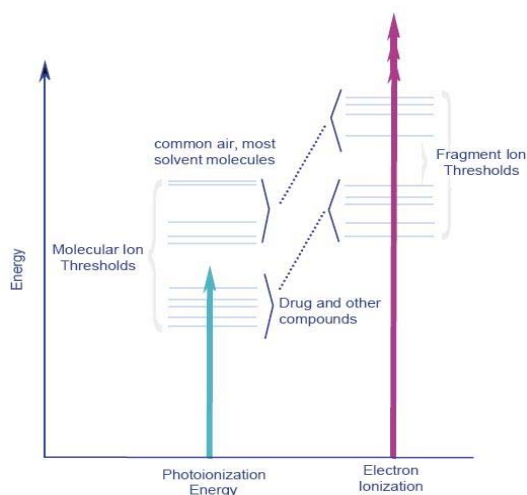


Fotoionizace za atmosférického tlaku - APPI



Eluát je rozprašován do vyhřívané komůrky. VUV lampa je zdrojem fotonů (energie ~ 10 eV), které jsou absorbovány molekulami analytu. Analyt ztrácí elektron a vznikají molekulární ionty $M^{+\bullet}$. Do zdroje se může přivádět dopant s nízkou ionizační energií (toluen, aceton) ke zvýšení koncentrace ionizovaných molekul a tím i ke zvýšení účinnosti ionizace analytu.

Fotoionizace za atmosférického tlaku - APPI



Energie fotonů je volena tak, aby byla dostatečná pro ionizaci analytů, ale zároveň dostatečně nízká, se neionizoval vzduch a rozpouštědla (voda, MeOH, MeCN). Dochází k přímé ionizaci analytů.

☺ detekce látek s velmi nízkou polaritou, velký lineární dynamický rozsah

APPI je vhodná pro:

látky, které se obtížně ionizují v ESI a APCI (APPI není závislá na acidobazických reakcích v plynné fázi).

průtoky 0,5 – 2,0 ml/min

API metoda, měkká ionizace. Tvorba $M^{+\bullet}$, $M^{\bullet-}$, $[M+H]^+$, $[M-H]^-$ iontů, aduktů se solventem.

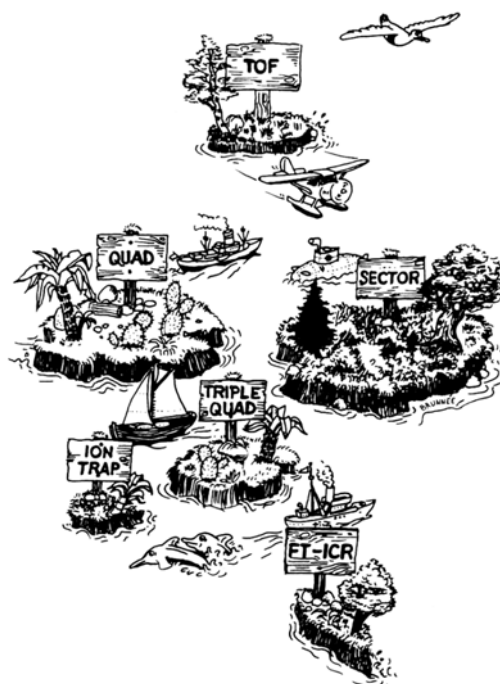
Hmotnostní analyzátořy

Hmotnostní analyzátoř je zařizení, které využívá elektromagnetických polí k separaci iontů v plynné fázi podle jejich poměru hmotnost/náboj (m/z).

TOF	Analyzátoř doby letu
B	Magnetický sektorový analyzátoř
Q	Lineární kvadrupól
LIT	Lineární kvadrupólová iontová past
IT	Iontová past
OT	Orbitrap
ICR	Iontová cyklotronová rezonance

Hmotnostní analyzátořy se liší principem měření, a tedy i svými vlastnostmi.

Vhodný typ analyzátořu volíme dle aplikace.



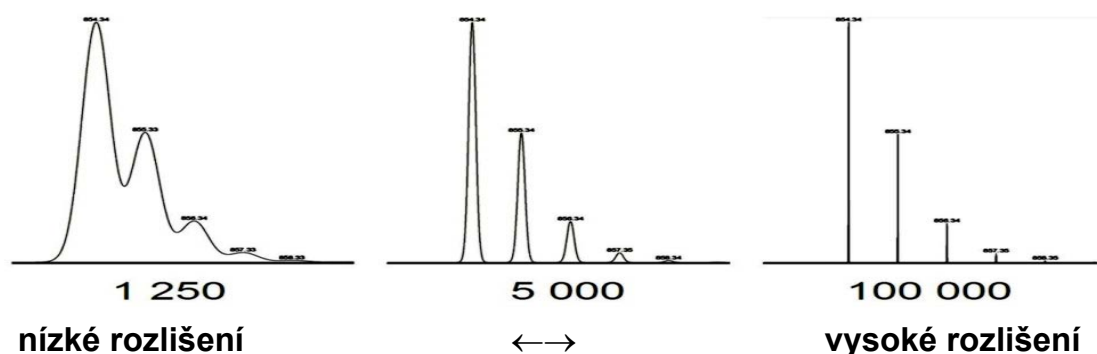
doi:10.1016/0168-1176(87)80030-7

Parametry hmotnostních analyzátořů

Hmotnostní rozsah – nejnižší a nejvyšší hodnota m/z , kterou lze s daným analyzátořem měřit

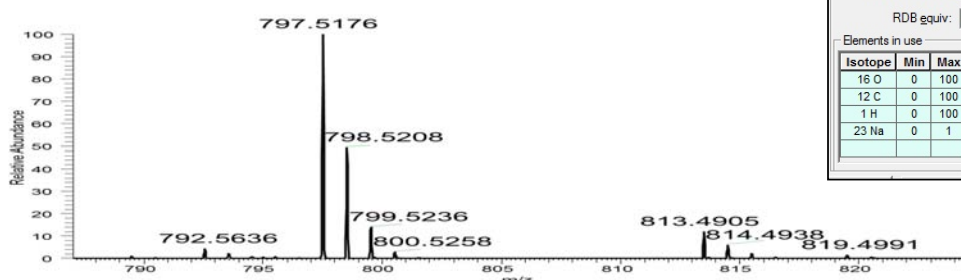
Rozlišovací schopnost – schopnost poskytnout rozlišené signály pro ionty s malým rozdílem hmotností

Přesnost určení hmotnosti – přesnost, se kterou lze měřit m/z iontů (udává se pro vnitřní i vnější kalibraci)



roste přesnost určení hmotnosti

Výpočet elementárního složení



Limits				
Charge:	1			
Nitrogen-Rule:	Do not use			
Mass tolerance:	20.00 ppm			
RDB equiv.:	-1.0-100.0			
Elements in use				
Isotope	Min	Max	DB eq.	Mass
16 O	0	100	0.0	15.995
12 C	0	100	1.0	12.000
1 H	0	100	-0.5	1.008
23 Na	0	1	-0.5	22.990

tolerance 5 ppm (3 možnosti)

Elemental composition search on mass 797.52				
m/z	Theo. Mass	Delta (ppm)	RDB equiv.	Composition
797.5176	797.5174	0.20	8.5	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₀ Na
	797.5198	-2.81	11.5	C ₄₇ H ₇₃ O ₁₀
	797.5140	4.55	20.5	C ₅₄ H ₆₉ O ₅

tolerance 20 ppm (13 možnosti)

Elemental composition search on mass 797.52				
m/z	Theo. Mass	Delta (mmu)	RDB equiv.	Composition
797.52	797.52	0.16	8.5	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₀ Na
	797.52	-2.24	11.5	C ₄₇ H ₇₃ O ₁₀
	797.51	3.63	20.5	C ₅₄ H ₆₉ O ₅
	797.52	-5.71	-0.5	C ₃₈ H ₇₈ O ₁₅ Na
	797.51	6.03	17.5	C ₅₂ H ₇₀ O ₅ Na
	797.53	-8.12	2.5	C ₄₀ H ₇₇ O ₁₅
	797.53	-9.22	21.5	C ₅₆ H ₇₀ O ₂ Na
	797.51	9.50	29.5	C ₆₁ H ₆₅
	797.53	-11.63	24.5	C ₅₈ H ₆₉ O ₂
	797.51	11.91	26.5	C ₅₉ H ₆₆ Na
	797.50	13.01	7.5	C ₄₃ H ₇₃ O ₁₃
	797.53	-15.10	12.5	C ₄₉ H ₇₄ O ₇ Na
	797.50	15.42	4.5	C ₄₁ H ₇₄ O ₁₃ Na

Tandemová hmotnostní spektrometrie

Tandemová hmotnostní spektrometrie (MSⁿ)

Metody, při kterých je sledovaný ion vybrán (první MS), fragmentován a produkty sledovány analyzátozem (další MS)

K fragmentaci může dojít: 1/ **spontánně** (metastabilní ionty); PSD

2/ **aktivací iontů** (kolizemi s neutrálními částicemi, interakcemi s fotony či elektrony); CID, IRMPD, ECD, ETD

tandemová MS → v prostoru (dva analyzátozy)
 → v čase (jeden analyzátoz)

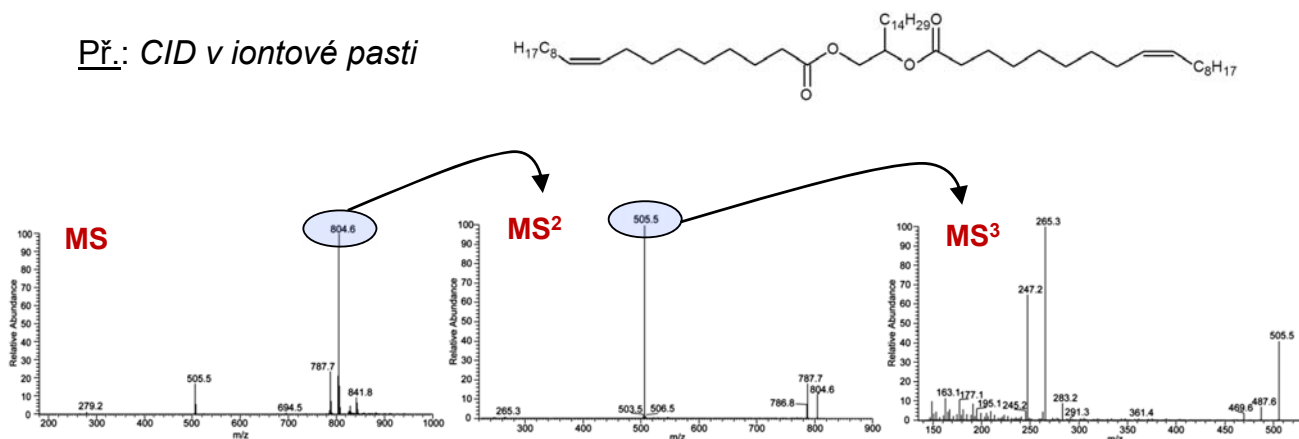
Tandemová hmotnostní spektrometrie

Disociace vyvolaná srážkou (Collision Induced Dissociation, CID)

Nejčastější způsob MS/MS analýzy. Fragmentace iontů založená na jejich srážkách iontů s neutrálními částicemi (He, Ar, N₂). Po srážce dochází k rychlému převedení translační energie na energii vibrační a k její rychlé distribuci po všech kovalentních vazbách. Dochází ke štěpení nejslabších vazeb.

CID se provádí v kolizní cele (srážkové komoře)

Př.: CID v iontové pasti



Interpretace hmotnostního spektra

1. Určíme, které ionty souvisí s analytem a které ne
2. Určíme molární hmotnost - hledáme molekulární ion M⁺, adukty (M+H)⁺, (M+Na)⁺, (M+HCOO)⁻ nebo deprotonované molekuly (M-H)⁻, příp. vícenásobně nabití ionty
3. Odhadneme prvky, které jsou přítomny: inspekce izotopového klastru, aplikace dusíkového pravidla
4. Určíme elementární složení na základě měření přesné hmotnosti
5. Porovnáme spektrum s knihovnou, pokusíme se najít alespoň podobná spektra
6. Řešíme fragmentaci (vyžaduje znalost fragmentačních mechanismů a empirických pravidel)

Chcete vědět více o LC/MS?

Základy hmotnostní spektrometrie - MC230P83

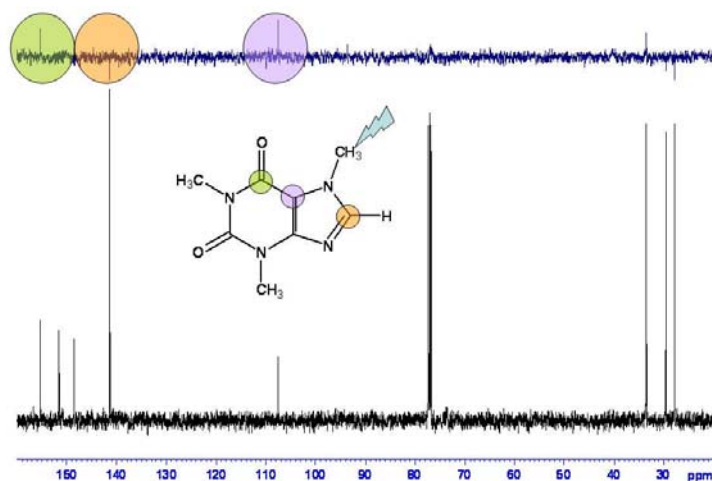
- letní semestr, 2/1 Z+Zk, 4 kredity

Pokročilá hmotnostní spektrometrie - MC230P91

- letní semestr, 2/0 Zk, 3 kredity

... bakalářské, diplomové a disertační práce

Vysokoučinná kapalinová chromatografie s detekcí nukleární magnetickou rezonancí



Spektroskopie nukleární magnetická rezonance

NMR spektroskopie je fyzikálně-chemická metoda využívající interakce atomových jader s nenulovým jaderným spinem (např. ^1H , ^{13}C) s magnetickým polem. Zkoumá rozdělení energií jaderného spinu v magnetickém poli a přechody mezi jednotlivými spinovými stavy vyvolané působením radiofrekvenčního záření.

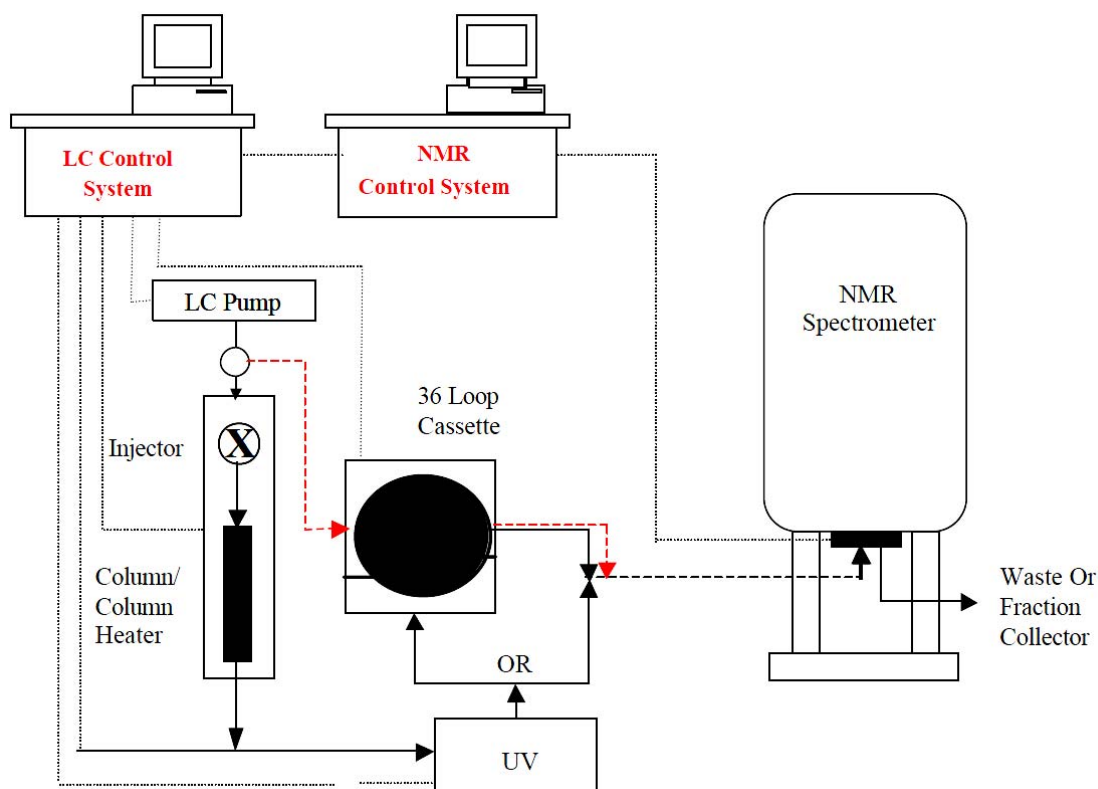
Z NMR spekter lze určit strukturu molekul zkoumané látky i jejich množství. Nedestruktivní metoda (na rozdíl od MS)

Aplikace HPLC-NMR: farmaceutické aplikace, přírodní produkty, metabolismus léků, léčiv, degradační produkty, charakterizace nečistot

Problémy spojení HPLC-NMR

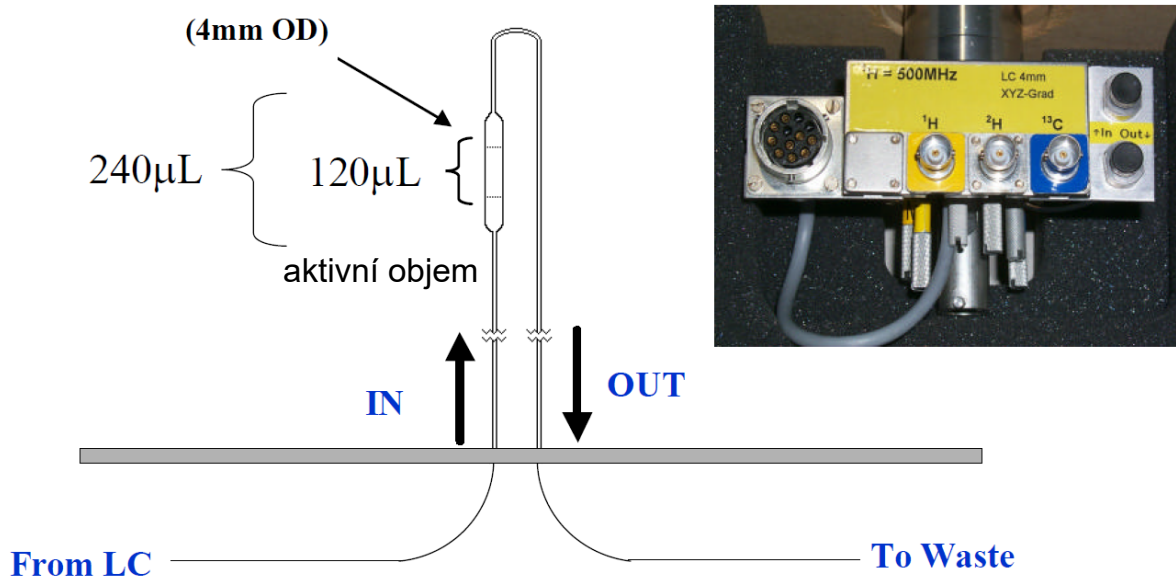
- nutnost používat drahá deuterovaná rozpouštědla
- nízká citlivost

Schéma LC-NMR



Průtoková cela pro NMR

Detekční cívka na průtokové cele



Marquez, Pfizer Inc., LC-NMR in drug discovery

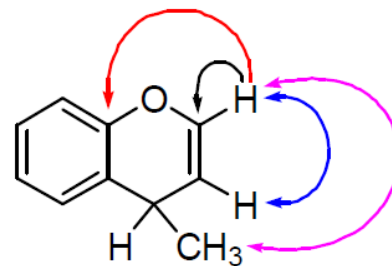
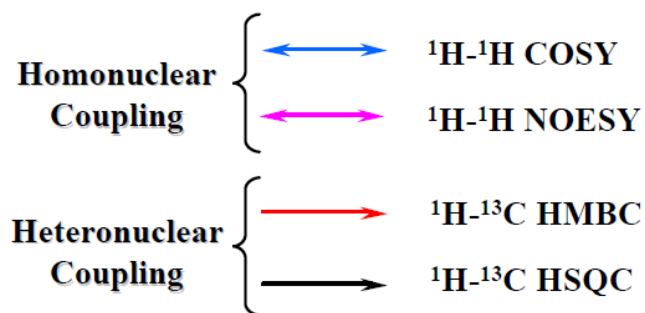
Způsoby měření

Měření s kontinuálním průtokem: on-line měření bez přerušení toku mobilní fáze. Záznam všech látek, ale nutná vyšší koncentrace látek (1-5 mg v nástřiku).

Měření se zastaveným tokem (stop-flow): Zastavení toku mobilní fáze, sběr dat delší dobu. Signál pro zastavení průtoku (vrchol píku) indikuje UV detektor. Vyšší citlivost, možnost 2D experimentů. Většinou se neovlivní chromatografické rozlišení.

Měření se smyčkou: odběr HPLC frakcí do smyček pro pozdější analýzu, případně pro archivaci vzorku.

Typy experimentů

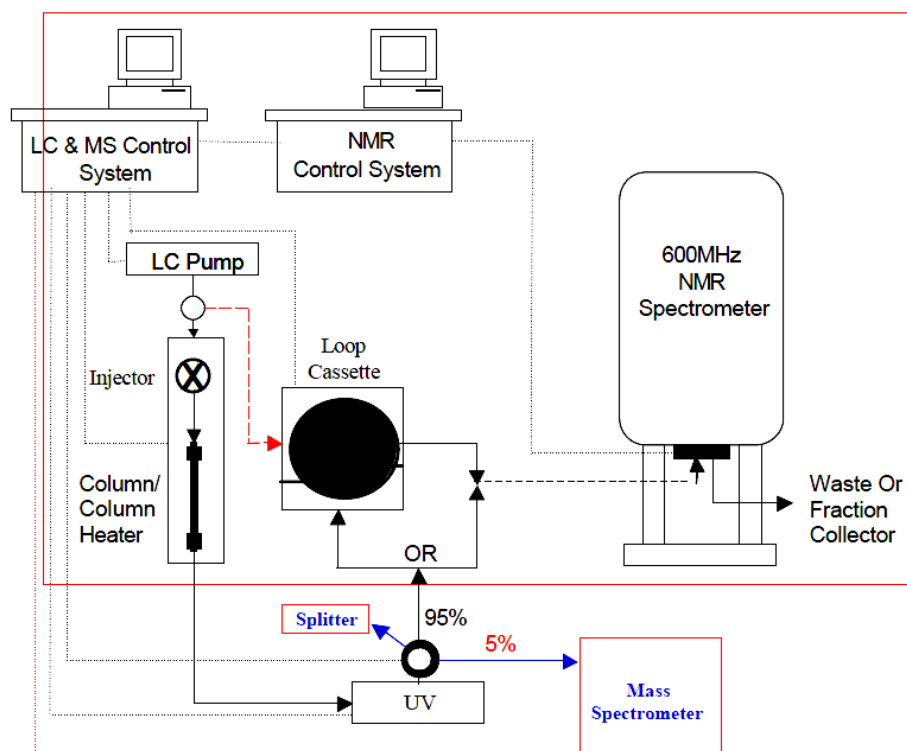


1D ^1H a 2D homonukleární NMR experimenty jsou dostatečně citlivé, vhodné pro LC-NMR

1D ^{13}C a 2D heteronukleární NMR experimenty jsou málo citlivé a typicky nevhodné pro LC-NMR

Marquez, Pfizer Inc., LC-NMR in drug discovery

HPLC-NMR-MS



Marquez, Pfizer Inc., LC-NMR in drug discovery



HPLC-NMR-MS

- propojení systémů LC-MS a LC-NMR je poměrně jednoduché, ale existují praktické problémy, které je třeba překonat: kompatibilita s rozpouštědlem, citlivost a efekty magnetického pole.

Použití rozpouštědel s minimálními signály v ^1H NMR spektrech:

-acetonitril v D_2O , pH upravené fosforečnanem sodným (kontaminace MS zdroje fosforečnanem); úprava pH kyselinou mravenčí/mravenčanem (signály v NMR spektrech)

Deuterovaná rozpouštědla, (D_2O , methanol- d_4) způsobují H / D výměnu u analytu a tedy i posun m/z v MS spektrech

Rozdílná citlivost NMR a MS:

Řeší se splitováním, pouze 2-5% jde do MS

Efekty magnetického pole:

NMR přístroje pracují se silným magnetickým polem, a mohou tak ovlivnit provoz MS. Moderní supravodivé NMR magnety jsou aktivně stíněny.