

SPOJENÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE (HPLC/MS)

MICHAL HOLČAPEK a PAVEL JANDERA

Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, nám. Čs. legií 565, 532 10 Pardubice; e-mail: Michal.Holcapek@upce.cz

Došlo dne 21.V. 1997

Obsah

1. Úvod
2. Typy spojení HPLC/MS
 - 2.1. Spojení s přímým vstupem eluátu (DLI)
 - 2.2. Spojení s nekonečným pásem (MB)
 - 2.3. Particle Beam (PB)
 - 2.4. Termosprej (TSP)
 - 2.5. Průtoková sonda pro ionizaci FAB (CF FAB)
 - 2.6. Ionizace za atmosferického tlaku (API)
 - 2.6.1. Elektrosprej (ESP) a iontový sprej (ISP)
 - 2.6.2. Chemická ionizace za atmosferického tlaku (APCI)
3. Využití HPLC/MS s ionizací za atmosferického tlaku
4. Závěr

1. Úvod

V posledních letech byl zaznamenán velký pokrok v oblasti přímého spojení separačních a spektrálních technik. V prvním kroku se směs látek rozdělí separační technikou vhodnou pro danou směs (např. GC, HPLC, kapilární elektroforéza, planární chromatografie) a ve druhém kroku po rozdělení látek se vhodnou spektrální metodou (např. hmotnostní spektrometrie, UV/VIS spektrometrie, IČ spektrometrie) získají strukturální informace o jednotlivých sloučeninách. V optimálním případě je možné identifikovat jednotlivé složky neznámé směsi nebo alespoň částečně odvodit jejich strukturu.

V současnosti je nejvíce rozšířena technika spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS), která spojuje vysokou separační účinnost plynové chroma-

tografie a cenné strukturální informace získané hmotnostní spektrometrií, avšak kterou nelze použít pro méně těkavé sloučeniny bez jejich chemické derivatizace. Velký úspěch techniky GC/MS podnítil intenzivní výzkum možností technicky náročnějšího spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (HPLC/MS). Hmotnostní spektrometr pracuje za vysokého vakua (řádově 10^{-3} až 10^{-5} Pa), zatímco na výstupu z kapalinového chromatografu jsou analyzované látky nesené v proudu kapaliny za atmosferického tlaku (průtoky většinou 0,5 až 2 ml.min⁻¹). Převedení analyzovaných látek do plynné fáze a odstranění velkého nadbytku mobilní fáze jsou hlavní problémy spojení HPLC/MS. Byla vyvinuta různá technická řešení tohoto spojení¹⁻¹⁰, z nichž některá mají v dnešní době už jen historický význam. Přehled technik HPLC/MS lze nalézt v několika monografiích¹¹⁻¹⁴.

V počáteční fázi vývoje se využívalo pro spojení HPLC/MS klasické elektronové ionizace (EI), popř. chemické ionizace (CI) u zařízení s přímým vstupem eluátu nebo při spojení s nekonečným dopravním pásem. Tyto techniky byly později překonány tzv. spojením „Particle beam“, které rovněž využívá EI. Nadbytek vnitřní energie iontů získaný při „tvrdé“ ionizaci EI může vést k rozsáhlé fragmentaci (zejména u tepelně nestálých nebo vyššemolekulárních látek), což znemožňuje určení molekulové hmotnosti (M_R) u některých typů látek, které se běžně analyzují kapalinovou chromatografií. Naopak výhodou EI oproti jiným ionizačním technikám je dostupnost rozsáhlých knihoven hmotnostních spekter a podrobně popsána pravidla fragmentace jednotlivých tříd látek¹⁵⁻¹⁷.

V posledních letech byly navrženy speciální ionizační techniky pro spojení hmotnostní spektrometrie s HPLC (termosprej, elektrosprej, chemická ionizace za atmosferického tlaku), které patří mezi tzv. „měkké“ ionizační techniky a umožňují určení M_R i pro sloučeniny, u kterých při ionizaci EI není pozorován molekulární ion. Jednoduchost hmotnostních spekter získaných „měkkými“ ionizačními technikami je výhodná pro určení M_R neznámé látky, ale na druhé straně malé množství fragmentových iontů může znesnadňovat odvození struktury, což lze vyřešit použitím spojení tandemové hmotnostní spektrometrie s HPLC (HPLC/MS/MS).

2. Typy spojení HPLC/MS

2.1. Spojení s přímým vstupem eluátu (DLI)

Spojení s přímým vstupem eluátu (Direct Liquid Introduction) obvykle využívá děličku toku mobilní fáze, takže do hmotnostního spektrometru se dostává jen malá část eluátu, čímž dochází ke ztrátě citlivosti^{1,18-20}. Přímé spojení bez děličky toku je možné využít pouze pro kapilární kolony nebo pro kolony s malým vnitřním průměrem, které používají průtok řádově v desítkách $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ (cit.²¹⁻²³) Mobilní fáze slouží jako reakční plyn pro chemickou ionizaci.

2.2. Spojení s nekonečným pásem (MB)

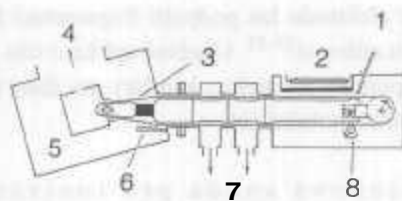
Ve spojení s nekonečným pásem (Moving Belt) je eluát na výstupu z kolony rozprášen pod úhlem 45° na nekonečný dopravní polyimidový pás (obr. 1), mobilní fáze se odpaří pod infračervenou lampou a její páry jsou odsáty vakuovými pumpami ve dvou komorách. Analyzované látky jsou pohyblivým pásem vneseny do iontového zdroje hmotnostního spektrometru, kde jsou bleskovým ohřátím odpařeny a ionizovány EI^{2,24-27} nebo jsou přímo na pásu ionizovány desorpcí laserem²⁸, nárazem urychlených iontů²⁸⁻³⁰ nebo atomů³¹⁻³⁴. Aplikace této techniky je omezena na málo těkavé látky a dochází při ní k určité ztrátě chromatografického rozlišení při převodu separovaných složek vzorku z eluátu na dopravníkový pás.

2.3. Particle Beam (PB)

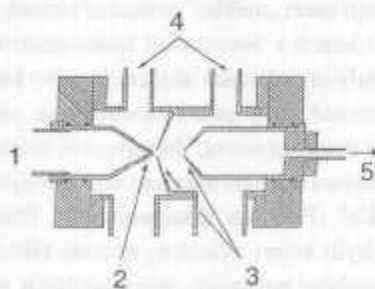
Spojení nazvané Particle beam^{3-35,40} používá proud helia ke zmlžení mobilní fáze po výstupu z chromatografické kolony (obr. 2), která je dále odpařena ve vyhříváné desolvatační komoře. K odstranění nadbytku zplyněné mobilní fáze dochází ve dvoustupňovém tryskovém separátoru (analogie Ryhageho separátoru v minulosti používaného u spojení GC/MS), kde molekuly analytu s větší molekulovou hmotností a tím i s větší kinetickou energií projdou tryskou separátoru, zatímco lehčí molekuly mobilní fáze jsou z větší části odtahovány vakuovými pumpami. K vlastní ionizaci se nejčastěji využívá EI nebo CI. Při tomto spojení se zpravidla nedosahuje příliš vysoké citlivosti detekce.

2.4. Termosprej (TSP)

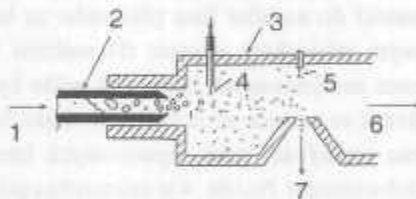
Při ionizaci termosprejem^{4,41-44} (obr. 3) je eluát po vý-



Obr. 1. Spojení s nekonečným pásem; 1 výstup z HPLC, 2 IČ topení, 3 polyimidový pás, 4 analyzátor, 5 iontový zdroj, 6 čistící topení, 7 vakuové pumpy, 8 hnací kolečko



Obr. 2. Spojení Particle Beam; 1 odpařovací komora, 2 tryska, 3 separátor, 4 vakuové pumpy, 5 iontový zdroj



Obr. 3. Termosprej; 1 výstup z HPLC, 2 odporově vyhříváná kapilára, 3 vyhříváný blok iontového zdroje, 4 výbojová elektroda, 5 odpuzovač iontů, 6 vakuové pumpy, 7 hmotnostní spektrometr

stupu z chromatografické kolony veden kapilárou vyhřívanou na konstantní teplotu, kde se rozpouštědlo začíná částečně odpařovat a na výstupu z kapiláry se tvoří nadzvukový proud směsi částečně odpařeného rozpouštědla a malých, elektricky nabitých kapiček. Dalším odpařováním rozpouštědla z povrchu nabitých kapiček dochází k rychlému zvýšení hustoty povrchového náboje, až dojde k uvolnění kvazimolekulárního iontu z povrchu kapičky. Přesný mechanismus vzniku iontů při ionizaci TSP je diskutován v literatuře^{45,49}. Přídavkem iontové látky do mobilní fáze (obvykle 0,1 M octan amonný) se podpoří vznik iontů⁴⁹⁻⁵¹. V případě nedostatečné ionizace analytu lze použít přídavnou ionizaci proudem urychlených elektronů nebo vložením napětí na výbojovou elektrodu (tzv. plasmasprej - viz obr. 3)⁵². TSP umožňuje použití průtoků mobilní fáze v rozmezí $0,5-2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, ale pro úspěšnou ionizaci bez přídavných ionizačních technik je nutný určitý obsah vody v mobilní fázi. Zvýšením napětí vloženého na

odpuzovací elektrodu lze podpořit fragmentaci látek⁵³⁺⁵⁴ a také zvýšit citlivost⁵⁵⁺⁵⁷. Úspěšná aplikace této techniky vyžaduje optimalizaci teploty kapiláry pro daný typ separace a použitou mobilní fázi.

2.5. Průtoková sonda pro ionizaci FAB (CF FAB)

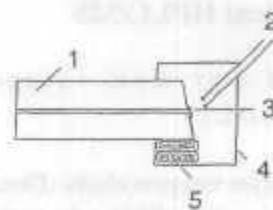
Ionizace nárazem urychlených atomů (Fast Atom Bombardment) patří mezi „měkké“ ionizační techniky, čehož se v posledních letech v hmotnostní spektrometrii často využívá pro analýzu polárních sloučenin nebo látek s vyšší M_R . Analyzované látky jsou rozpuštěny ve viskózní kapalnou matici (např. glycerol, thioglycerol, diethanolamin) a k vlastní ionizaci dochází nárazem urychlených atomů Xe nebo iontů Cs^+ (Fast Ion Bombardment). Přímé spojení s HPLC by bylo velmi výhodné, protože HPLC se často používá k analýze polárních, termolabilních nebo výšemolekulárních látek, pro které klasická ionizace EI není příliš vhodná. Při spojení HPLC/CF FAB je nutné přidávat kapalnou matici do mobilní fáze před nebo za kolonou. Předkolonovým přidavkem matrice do mobilní fáze se ovlivní retence analyzovaných látek, což může být nežádoucí. Přidává-li se matrice až za kolonou, může docházet k částečnému rozmývání pík separovaných látek a ke zhoršení jejich rozlišení. Na obr. 4 je znázorněna průtoková sonda pro ionizaci FAB (Continuous Flow FAB)^{6,58-60}. CF FAB umožňuje použití průtoku mobilní fáze pouze do cca $15 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, takže pro přímé spojení s HPLC je nutné použít dělič toku^{61>62} nebo kapilární kolonu⁶³.

Alternativní přístup ke spojení ionizace FAB s technikou HPLC/MS používá fritu z porézního materiálu na konci kapiláry (frit-FAB)⁵⁶⁺⁶⁶. Maximální průtok je nižší než u techniky CF FAB (do $2 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$).

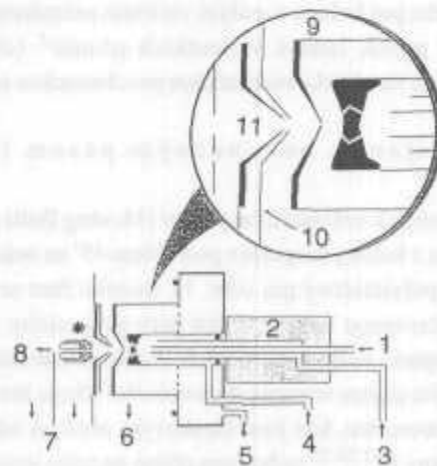
2.6. Ionizace za atmosferického tlaku (API)

2.6.7. Elektrosprej (ESP) a iontový sprej (ISP)

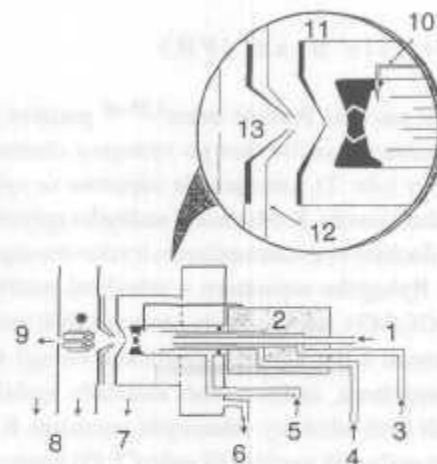
Při ionizaci elektrosprejem^{7,67-72} (obr. 5) prochází eluát po výstupu z chromatografické kolony kapilárou, na které je vloženo vysoké napětí (3-5 kV), takže malé kapičky vznikající na výstupu z kapiláry nesou vlivem vysokého gradientu elektrického pole kladný nebo záporný náboj podle polarit vložení napětí na kapiláru. Dalším odpařováním rozpouštědla dochází ke zmenšení velikosti kapiček a tím i ke zvýšení hustoty povrchového náboje, až



Obr. 4. Průtoková sonda pro ionizaci FAB; 1 přívodní kapilára, 2 urychlené atomy Xe, 3 hmotnostní spektrometr, 4 iontový zdroj, 5 savý knot



Obr. 5. Elektrosprej; 1 výstup z HPLC, 2 sonda, 3 zmlžující plyn, 4 sušící plyn (vstup), 5 sušící plyn (výstup), 6 rotační pumpy, 7 turbomolekulární pumpy, 8 analyzátor, 9 konický vstupní otvor, 10 sběrná elektroda, 11 separátor



Obr. 6. Chemická ionizace za atmosferického tlaku; 1 výstup z HPLC, 2 sonda, 3 zmlžující plyn, 4 nosný plyn, 5 sušící plyn (vstup), 6 sušící plyn (výstup), 7 rotační pumpy, 8 turbomolekulární pumpy, 9 analyzátor, 10 výbojová jehla, 11 konický vstupní otvor, 12 sběrná elektroda, 13 separátor

dojde k rozpadu na menší kapičky a nakonec se uvolní protonovaný molekulární iont $[M+H]^+$ nebo adukt molekuly se sodným iontem $[M+Na]^+$ při snímání kladných iontů, resp. deprotonovaný molekulární iont $[M-H]^-$ při snímání záporných iontů. Fragmentové ionty bývají většími málo intenzivní nebo zcela chybí.

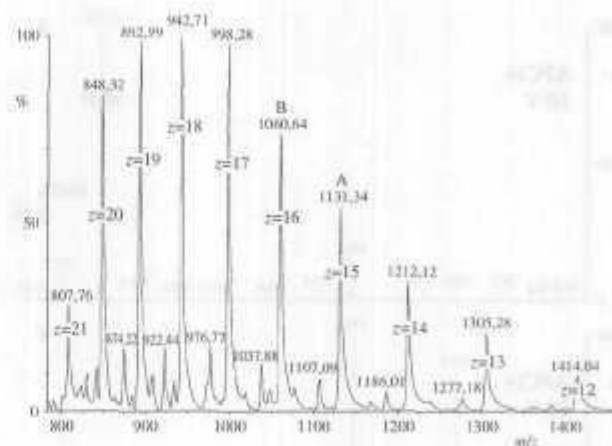
Modifikace elektrospreje nazvaná iontový sprej používá pro snadnější zmlžení eluátu pneumatický zmlžovač na konci kapiláry^{8,73}. Byla také popsána ESP sonda s vyhřívanou kapilárou^{74,75}, obdobně jako u TSP ionizace.

2.6.2. Chemická ionizace za atmosferického tlaku (APCI)

Chemická ionizace za atmosferického tlaku¹⁰⁻⁷⁶⁻⁷⁷ (Atmospheric pressure chemical ionization) patří spolu s ESP mezi ionizační techniky, kdy ke vzniku iontů dochází za atmosferického tlaku. Uspořádání iontového zdroje (obr. 6) je podobné jako u ESP, avšak na kapiláře není vloženo napětí a u jejího konce je umístěna výbojová jehla (elektroda). Na konci kapiláry dochází k rozprášení eluátu pneumatickým zmlžovačem. Vzniklý aerosol je rychle odpařen v krátké zóně vyhřívané na vysokou teplotu (až 600 °C). Vložím napětí na výbojovou jehlu dochází ke vzniku koronárního výboje, jímž jsou ionzovány molekuly mobilní fáze přítomné v plynné fázi ve velkém nadbytku vůči analytu. Ionty vzniklé z mobilní fáze (tzv. reakční plyn) následně ionizují molekuly analytu, podobně jako při klasické chemické ionizaci. Dříve se místo koronárního výboje používala k ionizaci radioaktivní folie ⁶³Ni jako zdroj β -záření^{9,78,79}.

3. Využití HPLC/MS s ionizací za atmosferického tlaku

V současné době se jako nejperspektivnější ionizační technika pro spojení HPLC/MS jeví ionizace za atmosferického tlaku^{80,81} (tzn. APCI a ESP), která umožňuje použití průtoků mobilní fáze až do 2 ml.min⁻¹ pro mobilní fáze v rozsahu od 100 % organické složky do 100 % vody, což umožňuje práci s mikrokolonami i s konvenčními kolonami v systémech s obrácenými i s normálními fázemi při běžných pracovních podmínkách používaných v HPLC. Výhodou obou API technik je vysoká citlivost. Jediným omezením je možnost použití pouze těkavých elektrolytů jako přísad do mobilní fáze (octan amonný, kyselina mravenčí nebo trifluoroctová). Netěkavé pufrý, např. fosfátové nebo borátové, se nedoporučují používat vzhledem k mož-



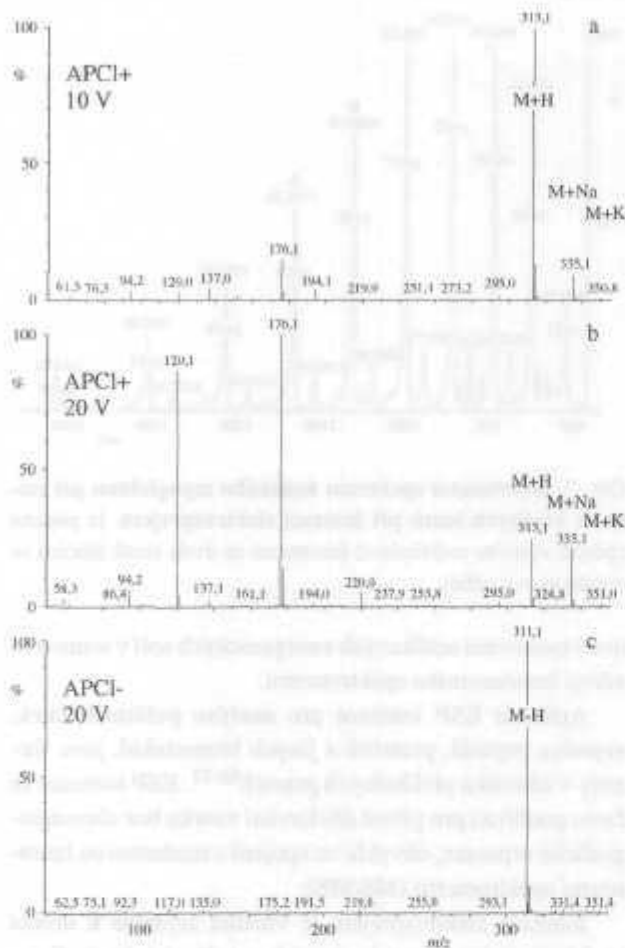
Obr. 7. Hmotnostní spektrum koňského myoglobinu při snímání kladných iontů při ionizaci elektrosprejem. Je popsán způsob výpočtu molekulové hmotnosti ze dvou iontů lišících se o jednotkový náboj

nosti usazování netěkavých anorganických solí v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru.

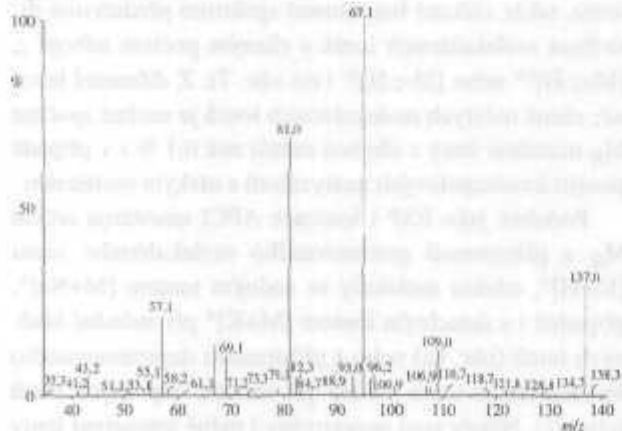
Aplikace ESP ionizace pro analýzu polárních látek, zejména peptidů, proteinů a jiných biomolekul, jsou shrnuty v několika přehledných pracích⁶⁹⁻⁷¹. ESP ionizace se často používá i pro přímé dávkování vzorku bez chromatografické separace, obvykle ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS).

Ionizace elektrosprejem je vhodná zejména k určení molekulové hmotnosti iontových a polárních látek. Fragmentové ionty jsou v hmotnostních spektrech při ionizaci elektrosprejem zastoupeny jen v menší míře. Při analýze biopolymerů s molekulovými hmotnostmi 10³-10⁵ dochází k násobné protonaci (při snímání kladných iontů) nebo deprotonaci (při snímání záporných iontů) molekulárního iontu, takže získané hmotnostní spektrum představuje distribuci molekulárních iontů s různým počtem nábojů z, $[M+z.H]^{z+}$ nebo $[M-z.H]^{z-}$ (viz obr. 7). Z diferencí hmot m/z různě nabitých molekulárních iontů je možné spočítat M_R neznámé látky s chybou menší než 0,1 % i v případě použití kvadrupolových analyzátorů s nízkým rozlišením.

Podobně jako ESP i ionizace APCI umožňuje určení M_R z přítomnosti protonovaného molekulárního iontu $[M+H]^+$, aduktu molekuly se sodným iontem $[M+Na]^+$, případně i s draselným iontem $[M+K]^+$ při snímání kladných iontů (obr. 8a) nebo z přítomnosti deprotonovaného molekulárního iontu $[M-H]^-$ při snímání záporných iontů (obr. 8c). Někdy jsou pozorovány i méně intenzivní ionty aduktů molekulárního iontu s rozpouštědly z mobilní fáze, jako např. $[M+H+methanol]^+$ nebo $[M+H+acetonitril]^+$.



Obr. 8. Hmotnostní spektrum $\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_2$ při ionizaci APCI; a - při snímání kladných iontů, napětí vložené na konický vstupní otvor 10 V, b - při snímání kladných iontů, napětí vložené na konický vstupní otvor 20 V, c - při snímání záporných iontů, napětí vložené na konický vstupní otvor 20 V



Obr. 9. Hmotnostní spektrum limonenu při ionizaci APCI při snímání kladných iontů

Při vyšším vloženém napětí na konický vstupní otvor (viz obr. 6) dochází k větší fragmentaci (obr. 8b). Interpretaci fragmentačních spekter je možné získat strukturální informace o neznámé sloučenině nebo potvrdit přítomnost hledané látky. APCI lze použít pro sloučeniny v celém rozsahu polaritě od zcela nepolárních (např. limonen - obr. 9)⁸² až po látky iontového charakteru (sulfokyseliny)^{83,84}.

V literatuře bylo v posledních letech publikováno velké množství aplikací HPLC/MS APCI. Tato technika je hojně užívaná v oblasti klinické chemie pro stanovení různých látek v tělních tekutinách^{85,92}. Rychlé HPLC analýzy na krátkých chromatografických kolonách byly použity např. pro stanovení cholecystokininu⁸⁵, inhibitoru 5α -reduktasy⁸⁶ v krevní plazmě nebo steroidu methandrostenolonu v koňské moči⁸⁷. Pro kvantitativní analýzu byla použita metoda vnitřního standardu. Bylo popsáno stanovení tenidapu a jeho D_3 analogu v lidském séru⁸⁸, stanovení inhibitoru syntetické elastasy⁸⁹ a velmi citlivá HPLC/MS/MS identifikace abanoquilu v krvi⁹⁰. Meze detekce uvedených stanovení jsou řádově v ng až $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ve vzorcích krevní plazmy bylo možno identifikovat paclitaxel (nový lék proti rakovině) a jeho metabolity v množství 50 pmol látky. Při stanovení cystathionsulfoxidu v moči nemocných pacientů⁹² byl objeven jeho nový metabolit. Clenbuterol se nelegálně používá jako růstový stimulant při chovu některých zvířat a také jako zakázaný dopingový prostředek. Bylo popsáno⁹³ jeho stanovení s detekčním limitem 10 ppb.

Byla popsána metoda stanovení sedmnácti běžně používaných pesticidů z různých chemických tříd (triaziny, fenylmočoviny, karbamáty, organofosfáty) v odpadních vodách⁹⁴ a také identifikace a kvantitativní stanovení pesticidů diflubenzuronu a clofentezinu v ovocných nápojích⁹⁵.

Použitím HPLC/MS v systémech s obrácenými fázemi byly separovány a identifikovány různé triacylglyceroly⁹⁶, což bylo využito i pro stanovení těchto látek v přírodních produktech⁹⁷. Byla vypracována metodika⁹⁸ stanovení methyl esterů mastných kyselin, di- a triacylglycerolů, přítomných ve směsi při výrobě bionaftů z řepkového oleje a na základě změřených hmotnostních spekter byla navržena obecná fragmentační schémata di- a triacylglycerolů při snímání kladných iontů technikou APCI.

Použitím MS/MS techniky byla stanovena antibiotika na bázi chinolonu v extrémně nízkých koncentracích (meze detekce 80–160 ppt)⁹⁹. Pomocí APCI detekce byly identifikovány oligomery polyethoxylovaných alkoholů používaných jako tenzidy¹⁰⁰, APCI technika byla použita ve

spojení se superkritickou fluidní chromatografií při analýze polyaromatických uhlovodíků¹⁰¹. Polyaromatické sirné heterocykly byly identifikovány vedle dalších polyaromatických sloučenin technikou MS/MS¹⁰².

Komerčně dodávané hmotnostní spektrometry s ionizací za atmosferického tlaku (API) jsou většinou vybaveny současně ionizací ESP a APCI, obojí s možností snímání kladných i záporných iontů. Pro spojení HPLC/MS se nejčastěji používají kvadrupólové analyzátory, které umožňují práci za vyššího tlaku než vysokorozlišovací sektorové analyzátory. Nevýhodou kvadrupólového analyzátoru je nízká rozlišovací schopnost (obvykle se uvádí jednotkové rozlišení v celém rozsahu detektoru). Stále častěji se při spojení HPLC/MS používají analyzátory s iontovou pastí, jejichž předností je možnost MSⁿ analýzy, což usnadňuje studium fragmentačních cest jednotlivých látek. Vzhledem k velké citlivosti a selektivitě stanovení látek i v komplikovaných matricích je API technika cenným přínosem pro stopovou analýzu.

4. Závěr

Spojení HPLC/MS s ionizací za atmosferického tlaku umožňuje práci v systémech s normálními i obrácenými fázemi prakticky bez omezení průtoku a složení mobilní fáze i s možností gradientové eluce. Použití netěkavých anorganických pufrů se ve spojení s hmotnostní spektrometrií nedoporučuje vzhledem k možnosti usazování netěkavých sloučenin v hmotnostním spektrometru. Netěkavé pufrы lze nahradit těkavými iontovými přísadami.

Pro spojení HPLC/MS se v současnosti nejčastěji používá ionizace za atmosferického tlaku (APCI a elektrosprej) a termosprej. V menší míře se využívá CF FAB (s omezením pouze na nižší průtoky) nebo spojení Particle beam s klasickou EI. Všechny uvedené techniky kromě spojení Particle beam s EI lze zařadit mezi tzv. „měkké“ ionizační techniky, které ve většině případů umožňují určit molekulovou hmotnost analyzovaných sloučenin z přítomnosti protonovaného molekulárního iontu nebo aduktu molekuly se sodným iontem při snímání kladných iontů a z přítomnosti deprotonovaného molekulárního iontu při snímání záporných iontů.

Vložení vyššího napětí na konický vstupní otvor v případě APCI je možné získat spektra s větším počtem fragmentů, které mohou sloužit k získání strukturních informací bez použití tandemové hmotnostní spektrometrie. Tato fragmentace je reprodukovatelná a APCI spektra jsou

při určitých zkušenostech poměrně dobře interpretovatelná. V nejbližších letech lze očekávat velký nárůst aplikací HPLC/MS s ionizací API, což bude také umožněno komerční dostupností přístrojů tohoto typu. Největším nedostatkem tohoto zařízení je jeho vysoká pořizovací cena a značné provozní náklady, které jsou však kompenzovány hodnotou získaných informací. Vedle určení molekulové hmotnosti a strukturních informací umožňuje toto spojení z hlediska HPLC kombinaci univerzální, vysoce selektivní a citlivé detekce, i při programovaném složení mobilní fáze.

Seznam zkratk převzatých z anglosaské literatury

APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
API	Atmospheric Pressure Ionization
CF FAB	Continuous Flow Fast Atom Bombardment
CI	Chemical Ionization
DLI	Direct Liquid Introduction
EI	Electron Ionization
ESP	Electrospray
GC/MS	Gas Chromatography/Mass Spectrometry
HPLC/MS	High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry
ISP	Ion Spray
MB	Moving Belt
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry
MS ⁿ	Multiple Stage Mass Spectrometry
PB	Particle Beam
TSP	Thermospray

Tato práce byla podporována Grantovou agenturou České republiky, grant č. 203/96/0124.

LITERATURA

1. Baldwin M. A., McLafferty F. W.: *Org. Mass Spectrom.* 7, 1111 (1973).
2. McFadden W. H., Schwartz H. L., Evans S.: *J. Chromatogr.* 122, 389(1976).
3. Willoughby R. C., Browner R. F.: *Anal. Chem.* 56, 2625 (1984).
4. Blakley C. R., Vestal M. L.: *Anal. Chem.* 55, 750 (1983).
5. Ito Y., Takeuchi T., Ishii D., Goto M.: *J. Chromatogr.* 346, 161 (1985).
6. Caprioli R. M., Fan T., Cottrell J. S.: *Anal. Chem.* 58, 2649(1986).

7. Yamashita M., Fenn J. B.: *J. Phys. Chem.* 88, 4451 (1984).
8. Bruins A. P., Covey T. R., Henion J. D.: *Anal. Chem.* 59, 2642 (1987).
9. Horning E. C., Carroll D. I., Dzidic I., Haegele K. D., Horning M. G., Stillwel R. N.: *J. Chromatogr.* 99, 13 (1974).
10. Henion J. D., Thomson B. A., Dawson P. H.: *Anal. Chem.* 54, 451 (1982).
11. Yergey A. L., Edmonds C. G., Lewis I. A. S., Vestal M. L.: *Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. Techniques a Applications.* Plenum Press, New York, 1989.
12. Brown M. A. (ed.): *Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. Applications in Agricultural, Pharmaceutical a Environmental Chemistry.* ACS, Washington 1990.
13. Niessen W. M. A., van der Greef J.: *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry. Principles a Applications.* Marcel Dekker, New York 1992.
14. Barceló D. (ed.): *Applications of LC-MS in Environmental Chemistry.* Elsevier Science B.V., Amsterdam 1996.
15. McLafferty F. W., Tureček F.: *Interpretation of Mass Spectra.* University Science Books, Mill Valey 1993.
16. Kitson F. G., Larsen B. S., McEwen C. N.: *Gas Chromatography a Mass Spectrometry.* Academic Press, Inc., San Diego 1996.
17. Kováč Š., Ilavský D., Leško J.: *Metódy kontroly technologických procesov. Spektrálne metódy v organickej chemii a technológii.* Alfa, Bratislava 1987.
18. Arpino P. J., Baldwin M. A., McLafferty F. W.: *Biomed. Mass Spectrom.* 1, 80 (1974).
19. Melera A.: *Adv. Mass Spectrom.* 8B, 1597 (1980).
20. Talroze V. L., Gorodetsky I. G., Zolotov N. B., Karpov G. V., Skurat V. E., Maslennikova V. Y.: *Adv. Mass Spectrom.* 7, 858 (1978).
21. Henion J. D.: *Anal. Chem.* 50, 1687 (1978).
22. Henion J. D., Maylin G. A.: *Biomed. Mass Spectrom.* 7, 115 (1980).
23. Henion J. D.: *J. Chromatogr. Sci.* 19, 316 (1981).
24. Alcock N. J., Eckers C., Games D. E., Games M. P. L., Lant M. S., McDowall M. A., Rossiter M., Smith R. W., Westwood S. A., Wong H.: *J. Chromatogr.* 251, 165 (1982).
25. Arpino P.: *Mass Spectrom. Rev.* 8, 35 (1989).
26. Hayes M., Lankmayer E. P., Vouros P., Karger B. L., McGuire J. M.: *Anal. Chem.* 55, 1745 (1983).
27. van der Greef J., Tas A. C., Rijk M. A. H., ten Noever de Brauw M. C., Höhn M., Meyerhoff G., Rapp U.: *J. Chromatog.* 343, 397 (1985).
28. Fan T. P., Hardin E. D., Vestal M. L.: *Anal. Chem.* 56, 1870 (1984).
29. Benninghoven A., Eicke A., Junack M., Sichtermann W., Krizek J., Peters H.: *Org. Mass Spectrom.* 15, 459 (1980).
30. Smith R. D., Burger J. E., Johnson A. L.: *Anal. Chem.* 53, 1603 (1981).
31. Dobberstein P., Korte E., Meyerhoff G., Pesch R.: *Int. J. Mass Spectrom.* 46, 185 (1983).
32. Mizuno T., Azuma K., Otsuko K.: *Anal. Sci.* 4, 241 (1988).
33. Stroh J. G., Cook J. C., Milberg R. M., Brayton L., Kihara T., Huang Z., Rinehart K. L., Jr., Lewis I. A. S.: *Anal. Chem.* 57, 985 (1985).
34. Stroh J. G., Rinehart K. L.: *LC-GC* 5, 562 (1987).
35. Winkler P. C., Perkins D. D., Williams W. K., Browner R. F.: *Anal. Chem.* 60, 489 (1988).
36. Baczynskij L.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 4, 198 (1990).
37. Blakley C. R., McAdams M. J., Vestal M. L.: *J. Chromatogr.* 158, 261 (1978).
38. Winkler P. C., Perkins D. D., Williams W. K., Browner R. F.: *Anal. Chem.* 60, 489 (1988).
39. Bellar T. A., Behymer T. D., Budde W. L.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1, 92 (1990).
40. *Vestec Thermospray EI Interface, Performance a Applications* (1989), Vestec, Houston, TX, USA.
41. Blakley C. R., McAdams M. J., Vestal M. L.: *J. Chromatogr.* 158, 261 (1978).
42. Blakley C. R., Carmody J. J., Vestal M. L.: *Anal. Chem.* 52, 1636 (1980).
43. Arpino P. J.: *Mass Spectrom. Rev.* 9, 631 (1990).
44. Arpino P. J.: *Mass Spectrom. Rev.* 11, 3 (1992).
45. Vestal M. L.: *Mass Spectrom. Review* 2, 447 (1983).
46. Bursley M. M., Parker C. E., Smith R. W., Gaskell S. J.: *Anal. Chem.* 57, 2597 (1985).
47. Alexandr A. J., Kebarle P.: *Anal. Chem.* 58, 471 (1986).
48. Katta V., Rockwood A. L., Vestal M. L.: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 103, 129 (1991).
49. Parker C. E., Smith R. W., Gaskell S. J., Bursley M. M.: *Anal. Chem.* 58, 1661 (1986).
50. Voyksner R. D., Haney C. A.: *Anal. Chem.* 57, 991 (1985).
51. Voyksner R. D., Bursley J. T., Pellizzari E. D.: *Anal. Chem.* 56, 1507 (1984).

52. Mellon F. A.: *LiquidChromatography/ Mass Spectrometry, VG Monographs in Mass Spectrometry*. VG Instruments, Manchester 1991.
53. McFadden W. H., Lammert S. A.: *J. Chromatogr.* 385, 201 (1987).
54. McFadden W. H., Garteiz D. A., Siegmund E. G.: *J. Chromatogr.* 394, 101 (1987).
55. Robins R. H., Crow F. W.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2, 30 (1988).
56. Straub K., Chan K.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 4, 267 (1990).
57. Harrison M. E., Langley G. J., Baldwin M. A.: *J. Chromatogr.* 474, 139 (1989).
58. Caprioli R. M.: *Anal. Chem.* 62, 477A (1990).
59. Caprioli R. M. (ed.): *Continuous-Flow Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry*. Wiley, New York 1990.
60. Kokkonen P., Schröder E., Niessen W. M. A., Tjaden U. R., van der Greef J.: *J. Chromatogr.* 511, 35 (1990).
61. Hutchinson D. W., Woolfitt A. R., Ashcroft A. E.: *Org. Mass Spectrom.* 22, 304 (1987).
62. Games D. E., Pleasance S., Ramsey E. D., McDowall M. A.: *Biomed. Env. Mass Spectrom.* 15, 179 (1988).
63. Ashcroft A. E., Chapman J. R., Cottrell J. S.: *J. Chromatogr.* 394, 15 (1987).
64. Takeuchi T., Watanabe S., Kondo N., Ishii D., Goto M.: *J. Chromatogr.* 435, 482 (1988).
65. Takeuchi T., Watanabe S., Kondo N., Goto M., Ishii D.: *Chromatographia* 25, 523 (1988).
66. Ito Y., Takeuchi T., Ishii D., Goto M., Mizuno T.: *J. Chromatogr.* 391, 296 (1987).
67. Yamashita M., Fenn J. B.: *J. Phys. Chem.* 88, 4671 (1984).
68. Whitehouse C. M., Dreyer R. N., Yamashita M., Fenn J. B.: *Anal. Chem.* 57, 675 (1985).
69. Fenn J. B., Mann M., Meng C. K., Wong S. F., Whitehouse C. M.: *Mass Spectrom. Rev.* 9, 37 (1990).
70. Smith R. D., Loo, J. A., Edmonds C. G., Barinaga C. J., Udseth H. R.: *Anal. Chem.* 62, 882 (1990).
71. Mann M.: *Org. Mass spectrom.* 25, 575 (1990).
72. Voess L.: *Anal. Chem.* 66, 481A (1994).
73. Hopfgartner G., Wachs T., Bean K., Henion J. D.: *Anal. Chem.* 65, 439 (1993).
74. Lee E. D., Henion J. D.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 6, 727 (1992).
75. Baczynskyj L., Bronson G. E., Kubiak T. M.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 8, 280 (1994).
76. Covey T. R., Lee E. D., Henion J. D.: *Anal. Chem.* 85, 2453 (1986).
77. Edlund P.-O., Bowers L., Henion J. D., Covey T. R.: *J. Chromatogr.* 497, 49 (1989).
78. Carroll D. I., Dzidic I., Stillwell R. N., Haegele K. D., Horning E. C.: *Anal. Chem.* 47, 2369 (1975).
79. Horning E. C., Carroll D. I., Dzidic I., Lin S. N., Stillwell R. N., Thenot J. P.: *J. Chromatogr.* 142, 481 (1977).
80. Sakairi M., Kambara H.: *Anal. Chem.* 60, 774 (1988).
81. Sakairi M., Kambara H.: *Anal. Chem.* 61, 1159 (1989).
82. Holčápek M., Jandera P.: nepublikované výsledky.
83. Bruins A. P., Weidolf L. O. G., Henion J. D., Budde W. L.: *Anal. Chem.* 59, 2647 (1987).
84. Holčápek M., Jandera P.: připravuje se k publikaci.
85. Gilbert J. D., Hand E. L., Yuan A. S., Olah T. V., Covey T. R.: *Biol. Mass Spectrom.* 27, 63 (1992).
86. Gilbert J. D., Olah T. V., Barrish, A., Greber T. F.: *Biol. Mass Spectrom.* 27, 341 (1992).
87. Edlund P. O., Bowers L., Henion J. D., Covey T. R.: *J. Chromatogr.* 497, 49 (1989).
88. Avery M. I., Mitchell D. Y., Falkner F. C., Fouda H. G.: *Biol. Mass Spectrom.* 27, 353 (1992).
89. Kasuya F., Igarashi K., Fukui M., Fukumori Y., Tokumito H., Fukuda T., Tsuda Y., Okada Y.: *Biol. Mass Spectrom.* 27, 500 (1992).
90. Kaye B., Clark M. W. H., Cussans N. J., Macrae P. V., Stopher D. A.: *Biol. Mass Spectrom.* 27, 585 (1992).
91. Royer I., Alvinerie P., Armand J. P., Ho L. K., Wright M., Monsaraat B.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 9, 495 (1995).
92. Zhang J., Masuoka N., Ubuka T., Kodama H.: *J. Mass Spectrom.* 30, 1296 (1995).
93. Doerge D. R., Bajic S., Lowes S.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 7, 462 (1993).
94. Doerge D. R., Bajic S.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 6, 663 (1992).
95. Barnes K. A., Fussell R. J., Startin J. R., Thorpe S. A., Reynolds S. L.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 9, 1441 (1995).
96. Byrdwell W. C., Emken E. A.: *Lipids* 30, 173 (1995).
97. Neff W. E., Byrdwell W. C.: *J. Liq. Chromatogr.* 18, 4165 (1995).
98. Holčápek M., Jandera P., Fischer J., Prokeš B.: *J. Chromatogr.*, zasláno k publikaci.
99. Doerge D. R., Bajic S.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 9, 1012 (1995).
100. Jandera P., Holčápek M., Theodoridis G.: *J. Chromatogr.*, zasláno k publikaci.

101. Anacleto J. F., Ramaley L., Boyd R. K., Pleasance S., Quilliam M. A., Sim P. G., Benoit F. M.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 5, 149 (1991).
102. Thomas D., Crain S. M., Sim P. G., Benoit F. M.: *J. Mass Spectrom.* 30, 1034 (1995).

M. Holčápek and P. Jandera (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Pardubice*): **Coupling of Liquid Chromatography and Mass Spectrometry**

The on-line combination of liquid chromatography and mass spectrometry with the atmospheric-pressure ioni-

zation makes possible operation in both normal-phase and reversed-phase systems practically without limitation of flow rate and composition of the mobile phase, even under gradient-elution conditions. In the contemporary HPLC/MS systems, atmospheric-pressure ionization techniques (APCI and electrospray) and thermospray ionization are most popular. The continuous-flow fast atom bombardment (CF FAB) is less frequent as it is limited to lower acceptable flow rates of mobile phase or particle-beam interface with the classical electron ionization (EI). In addition to the determination of molecular weights and structure information of sample components, this coupled method makes possible, from the HPLC point of view, a highly selective and sensitive detection.