

# Vícerozměrné kombinované techniky

**Doc. Dr. Ing. Pavel Kuráň**



EVROPSKÁ UNIE  
Evropské strukturální a investiční fondy  
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



STUVIN – Studium, výzkum a inovace – rozvoj přírodovědných a technických doktorských programů na Univerzitě J. E. Purkyně v Ústí n., reg. č. CZ.02.2.69/0.0/0.0/16\_018/0002735

# Vícerozměrné a kombinované techniky

## Struktura

1. Úvod – definice a pojmy, chromatografický systém (CHS)
2. Kombinované techniky - techniky na výstupu CHS, hyphenace, hypernace
3. Kombinované techniky - Chromatografie a techniky na vstupu
4. Vícerozměrné techniky v chromatografii
5. Trendy v oblasti vícerozměrných a kombinovaných technik
6. Vícerozmernost v NMR

# Vícerozměrné a kombinované techniky

## Úvod

### Chromatografie

- Fyzikální metoda separace látek, při které se separované komponenty **(neustále)** rozdělují mezi dvě fáze:
  - nepohyblivou - **stacionární**)
  - pohyblivou – **mobilní** - **pohybuje se definovaným směrem !**



Stacionární fáze – s, l

GC

Do detektoru

Z injektoru mobilní fáze + vzorek

300°C

50°C

# Vícerozměrné a kombinované techniky

## Úvod

### Chromatografické techniky

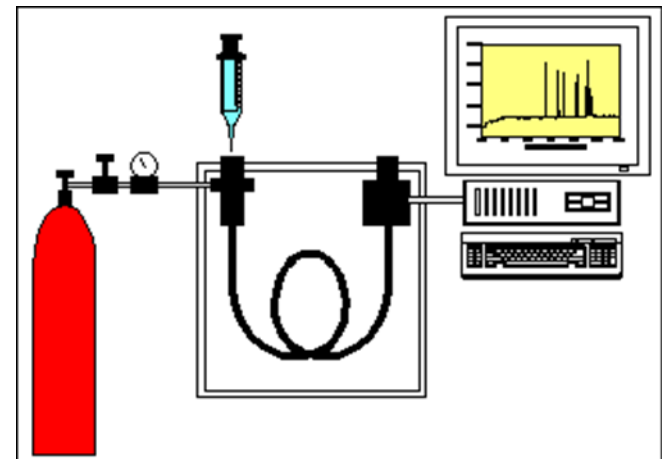
- Význam a přínos - ve všech oblastech vědy
- Vysoká účinnost a univerzálnost
- Soudobé chromatografické systémy - vysoce sofistikované, komplexní – různě koncipovaná separační část a část detekční

# Vícerozměrné a kombinované techniky

## Úvod

### Chromatografický systém (CHS)

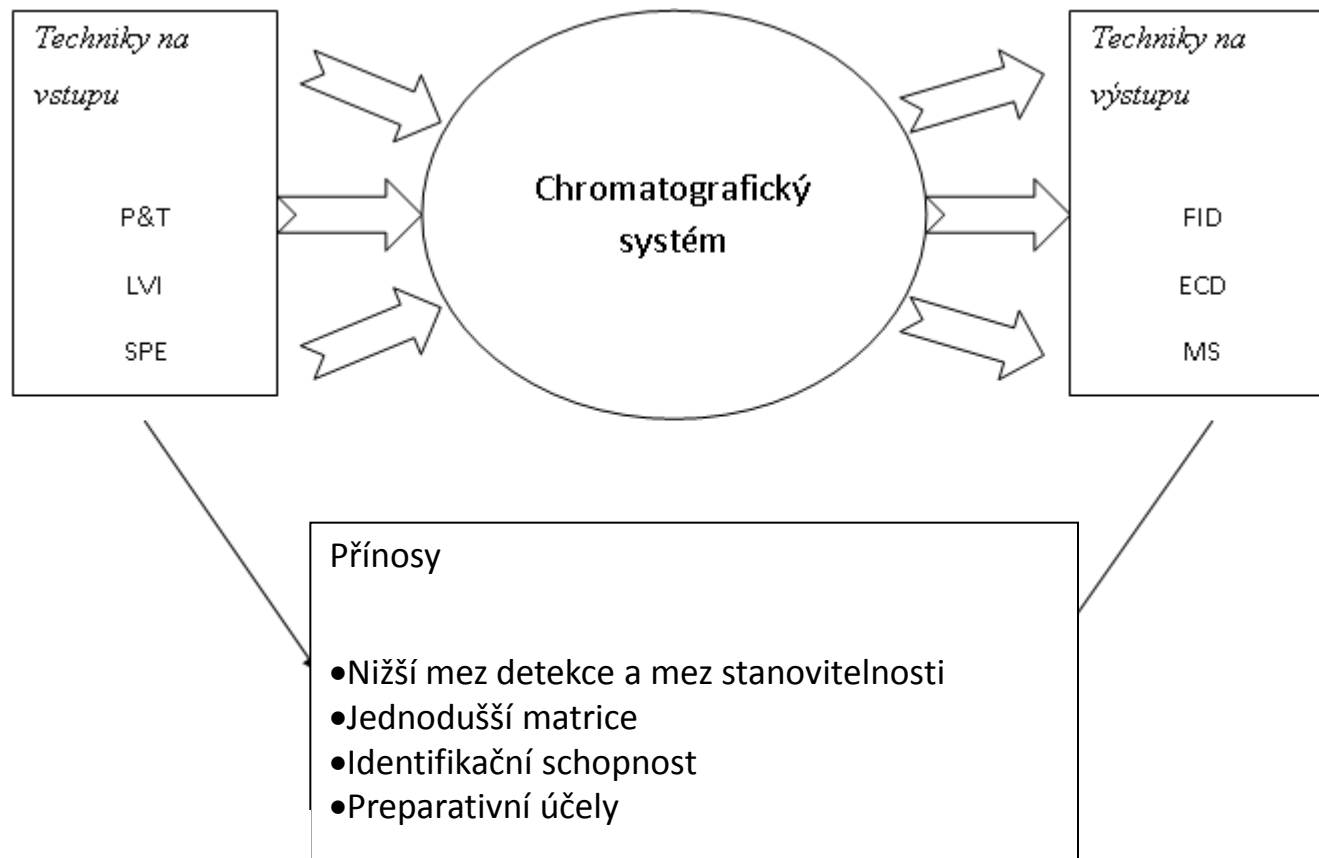
- Plynová chromatografie (GC) - CHS - separační kolona v termostatovaném prostoru - kontrolovaný nárůst teploty
- Kapalinová chromatografie (HPLC) - CHS - separační kolona a vysokotlaké čerpadlo na zabezpečení průtoku a míchání mobilní fáze
- Zvýšení účinnosti CHS – kombinací vhodných technik
  - **na vstupu** - předcházejících chromatografickému ději (pre-column techniky)
  - **na výstupu** - navazujících na chromatografický děj (post-column techniky)



# Vícerozměrné a kombinované techniky

## Úvod

### Schéma kombinace CHS s technikami na vstupu a výstupu



# Vícerozměrné a kombinované techniky CHS a techniky na výstupu

## Historicky první - jednoduché detektory

- Kombinace CHS na výstupu s jednoduchými (nespektrálními) detektory FID, ECD, TCD, jednoduchý UV monitorující při jedné vlnové délce
- U jednoduchých detektorů - žádoucí nebo nutné cíleně modifikovat vlastnosti stanovovaných látek pomocí derivatizace - zvýšení selektivity detekce, zlepšení detekčních limitů

## Hyphenace

- Hirschfeld 90's - „hyphenace“ - kombinace separační techniky (kapilární GC nebo kolonové LC) a spektroskopické metody poskytující strukturní informace o stanovovaných analytech

*I.D.Wilson, U.A.Brinkman: Hyphenation and hypernation. The practice and prospects of multiple hyphenation. J.Chromatogr. A, 1000 (2003) 325-356.*

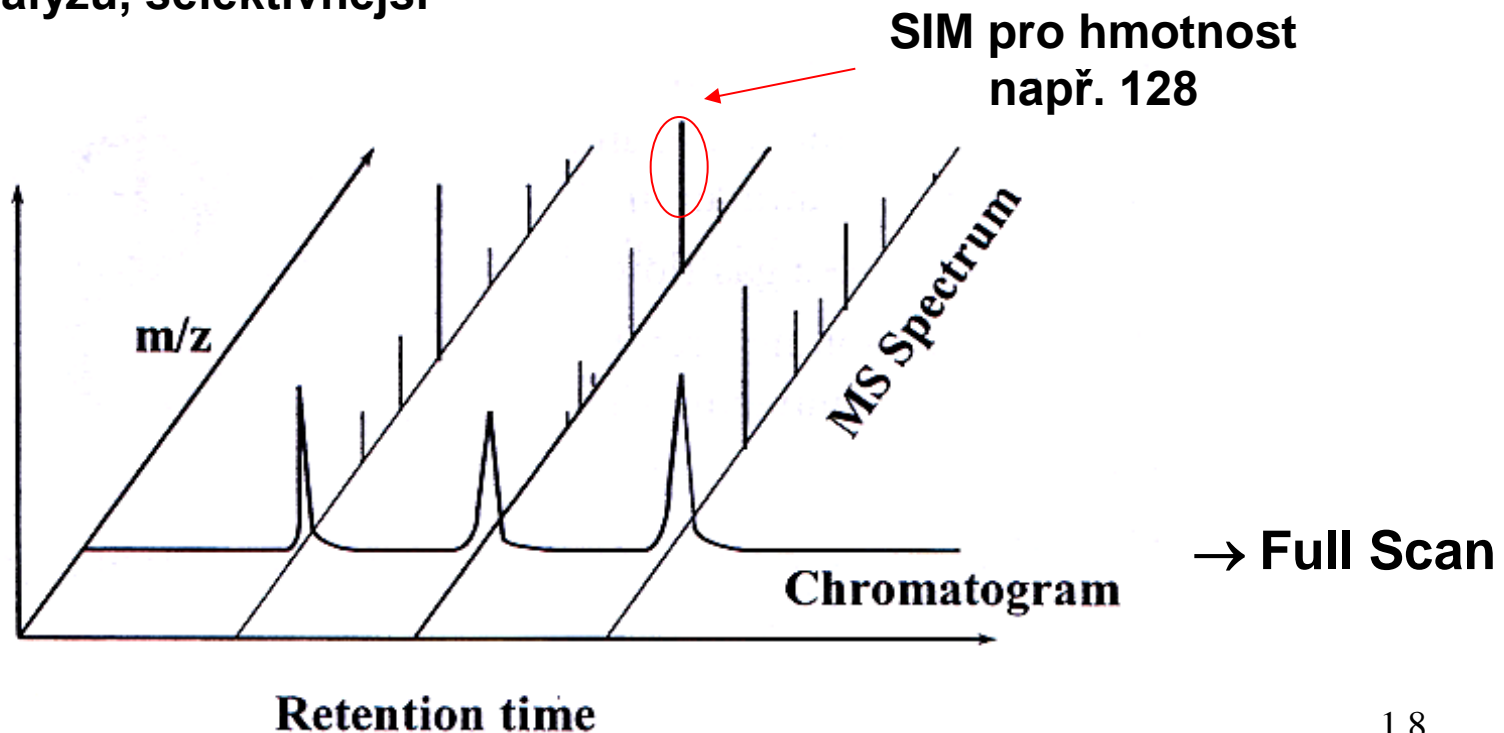
# Vícerozměrné a kombinované techniky

## CHS a techniky na výstupu

### Proč hyphenace ?

#### GC-MS - 2 pracovní režimy :

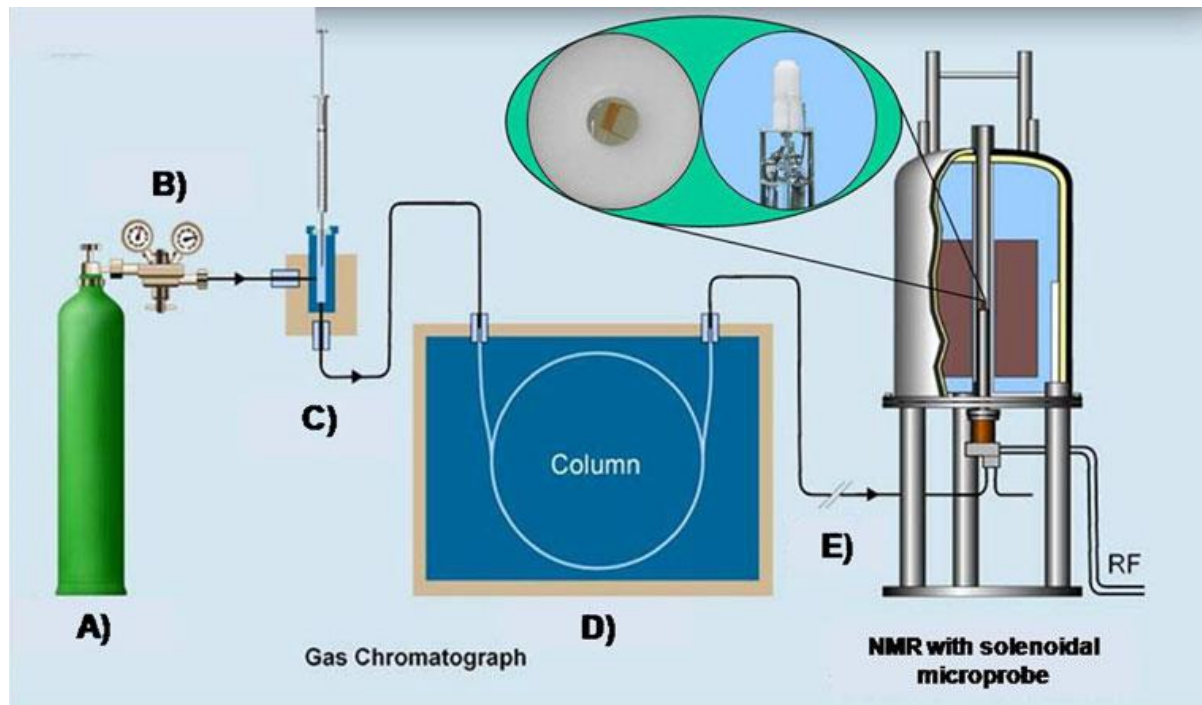
- 1: Full Scan – výsledek – Total Ion Chromatogram („TIC“) + MS spektrum
2. SIM – monitorování zvoleného iontu reps.hmotnosti – pro stopovou analýzu, selektivnější





# Vícerozměrné a kombinované techniky CHS a techniky na výstupu

## Hyphenace – GC-NMR



O. Gökyay, K. Albert: *Anal Bioanal Chem* (2012) 402:647–669

# Vícerozměrné a kombinované techniky

## CHS a techniky na výstupu

### Hyphenace – stav

Metoda	Počet článků			
	2010-2015	2005-2009	2000-2004	1995-1999
GC-MS GC-MS/MS	20 884	13 332	8 424	5 622
LC-MS LC-MS/MS	20 044	10 476	3 979	1 225
GC-IR	5	11	13	21
GC-AED	18	39	64	82
LC-IR	4	6	5	4
LC-NMR	78	89	112	48
TLC-NMR	3	0	0	1
TLC-MS	47	5	6	7
GC-NMR	3	3	0	0
LC-ICP-MS	115	62	20	18
GC-ICP-MS	61	84	66	25
SFC-MS	33	24	11	20
SFC-NMR	0	0	1	3

# Vícerozměrné a kombinované techniky CHS a techniky na výstupu

## Hyphenace

- LC-MS

  - UHPLC

  - nano-HPLC

  - kapilární LC

  - HPLC-chip (LOC)

  - chirální LC

- GC-MS

  - Rychlá GC – časy analýz 5 – 10 minut

  - Velmi rychlá GC – časy analýz – pár minut

  - Ultra rychlá GC – časy analýz – < 1 minuta

- Různé typy MS - single- , triple- kvadrupól, iontová past, TOF

# Vícerozměrné a kombinované techniky CHS a techniky na výstupu

## Hyphenace

- Kam až jít s počtem spojených technik ?
- Je to přínos z hlediska informací o stanovovaných látkách ?

?



- Problémy se zpracováním množství dat, korelace dat

!

# Vícerozměrné a kombinované techniky CHS a techniky na výstupu

## Hyphenace

Použít dva paralelní  
(nezávislé) systémy ?

?

Vícenásobnou (multiplítní)  
hyphenaci v jedné  
sestavě ?

- Paralení systémy  
Výhody - možnost jejich optimálního nastavení nezávisle na druhém přístroji, jednoduchost  
  
Nevýhody - špatná korelace píků mezi oběma systémy zvláště pro minoritní komponenty

### Paralelní, nezávislé systémy hyphenace GC-MS a GC-IRD

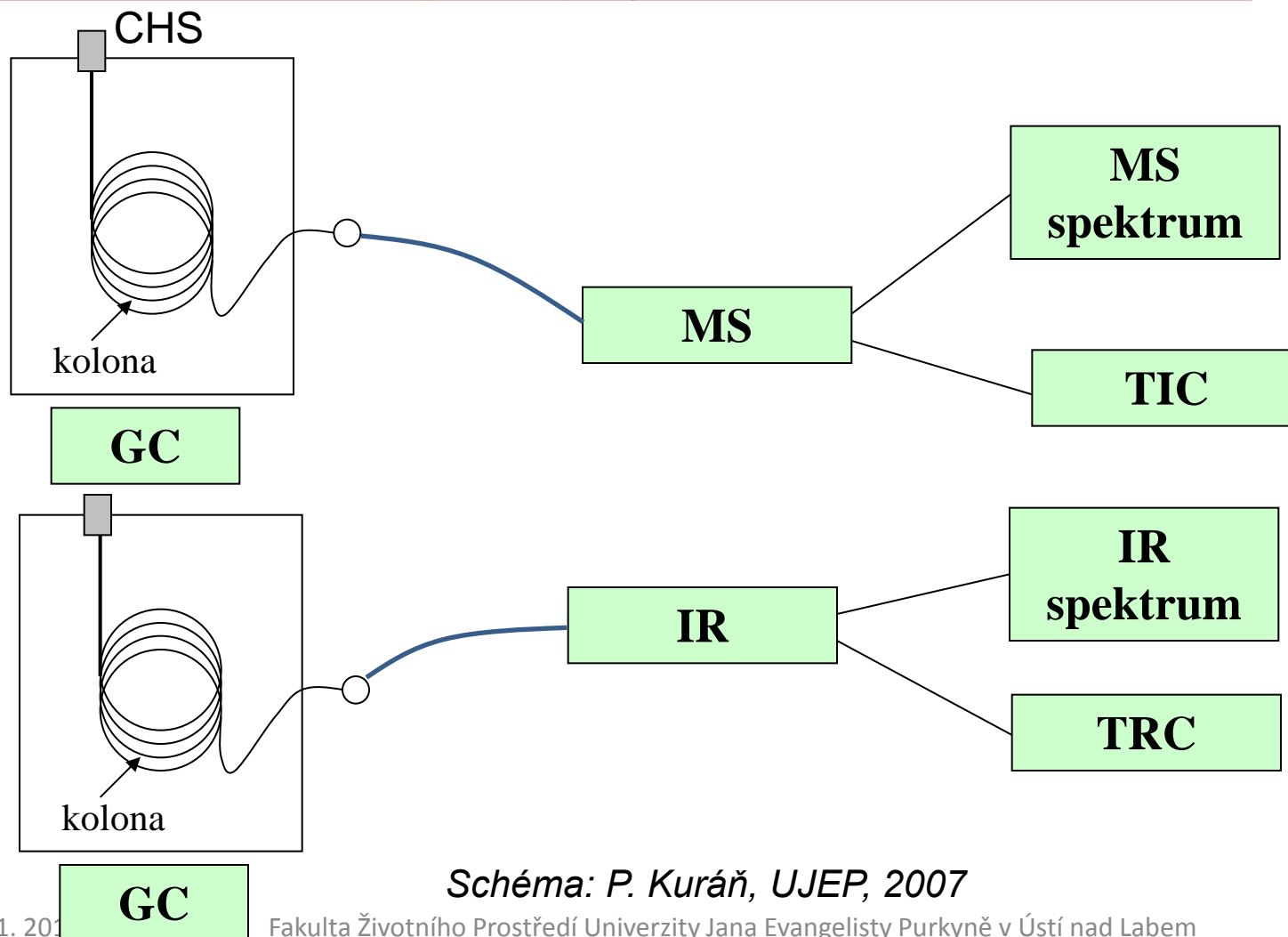


Schéma: P. Kuráň, UJEP, 2007

# Vícerozměrné a kombinované techniky CHS a techniky na výstupu

## Hyphenace

- Vícenásobná hyphenace v jedné sestavě  
**Výhody** – dobrá korelace píků mezi oběma systémy  
**Nevýhody** – složitost zapojení, vzájemná závislost obou systémů



## **Hypernace**

Kombinace separační techniky s více detektory v jednom systému, přičemž **alespoň jeden je spektrální !!!**

**GC-MS/IRD**

**LC-DAD UV-MS**

**GC-FID/MS**

**LC-UV-MS**

# Vícerozměrné a kombinované techniky CHS a techniky na výstupu

## Možné varianty hypernace

- **sériová „hypernace“** - vícenásobná kombinace separační techniky s **více detektory v sérii**, přičemž **alespoň jeden je spektrální**  
GC-IRD-MS, HPLC-DAD UV-MS
- **paralelní „hypernace“** - kombinace separační techniky s **více detektory paralelně**, přičemž **alespoň jeden je spektrální**  
GC-IRD/MS, GC-FID/MS
- **kombinace paralelní a sériové hypernace** - kombinace separační techniky s **více detektory sériově i paralelně**, přičemž **alespoň jeden je spektrální** – GC-IR-FID/MS, LC-DAD UV-NMR/MS-MS



# Vícerozměrné a kombinované techniky

## CHS a techniky na výstupu

### Sériová hypernace GC-IRD-MS

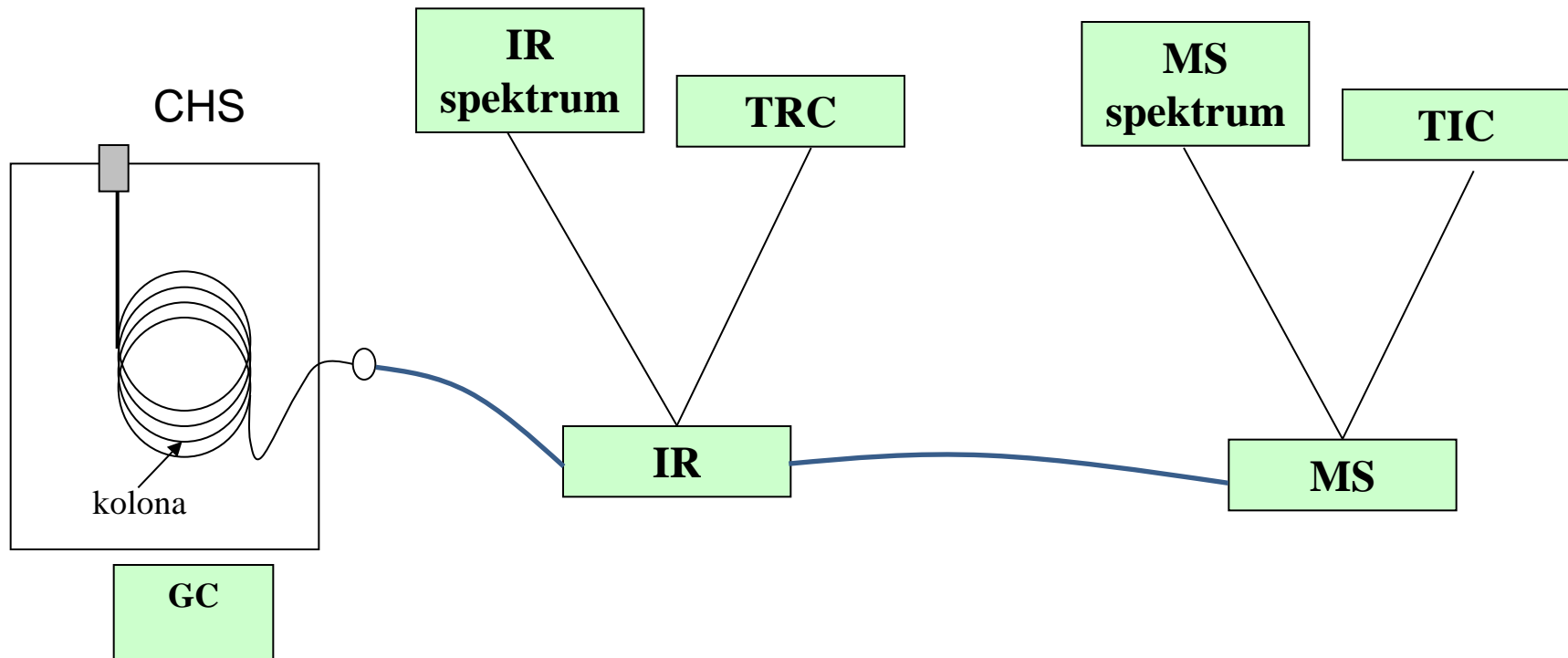
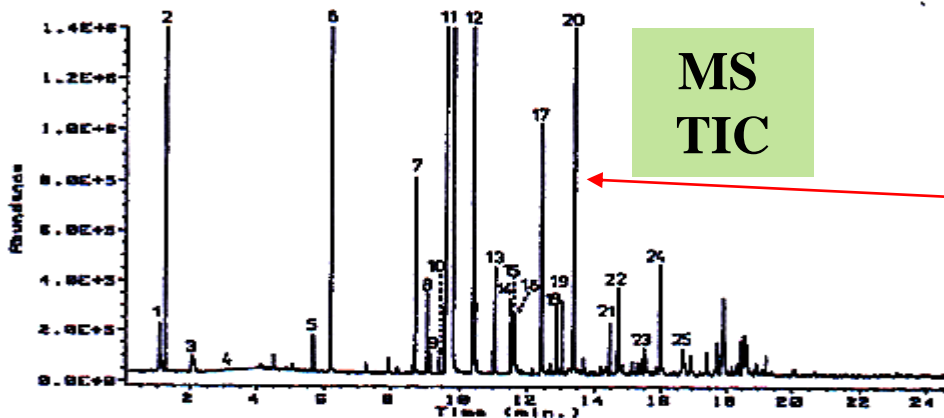
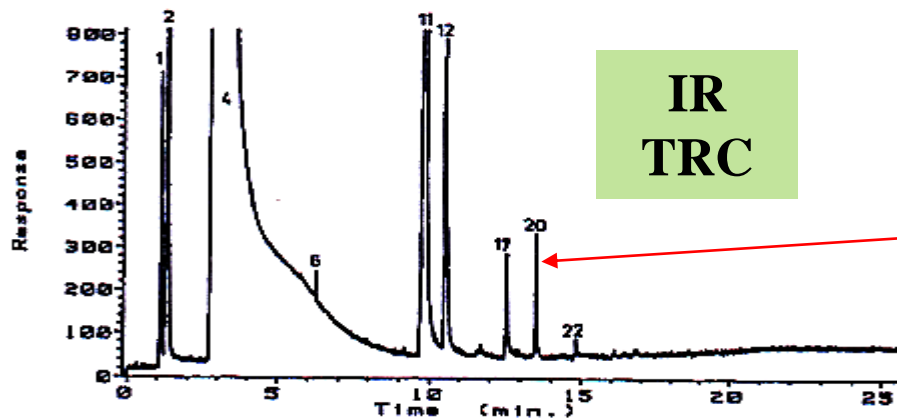
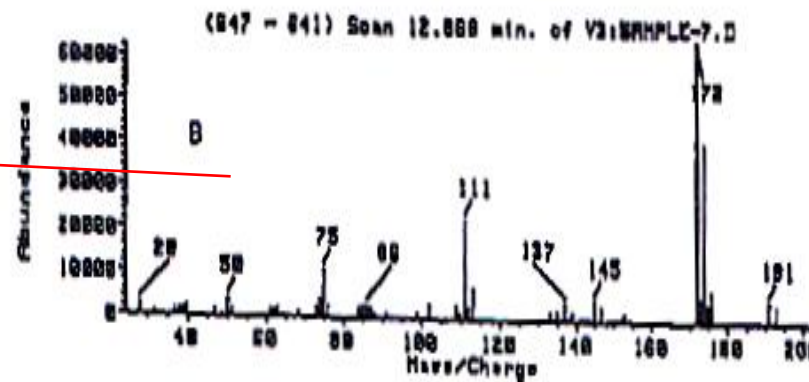


Schéma: P. Kuráň, UJEP, 2007

## Sériová hypernace GC-IRD-MS



## MS spektrum



## IR spektrum

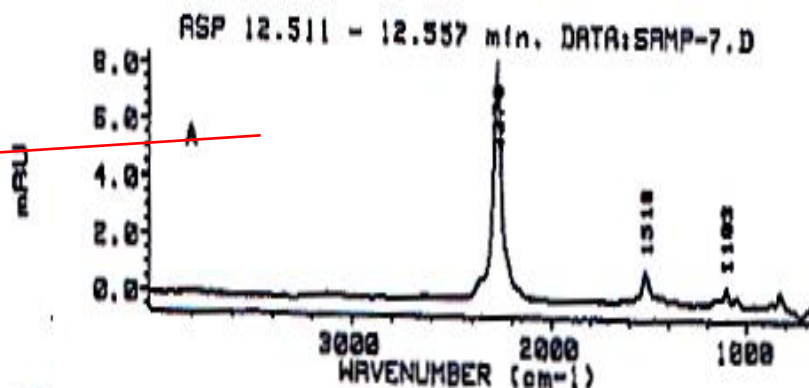


Figure 1  
Total Ion Chromatogram (top) and Total Response Chromatogram  
(bottom) after irradiation of NB-CCl<sub>4</sub> solution.

# Vícerozměrné a kombinované techniky CHS a techniky na výstupu

## Paralení hypernace GC-MS/IRD

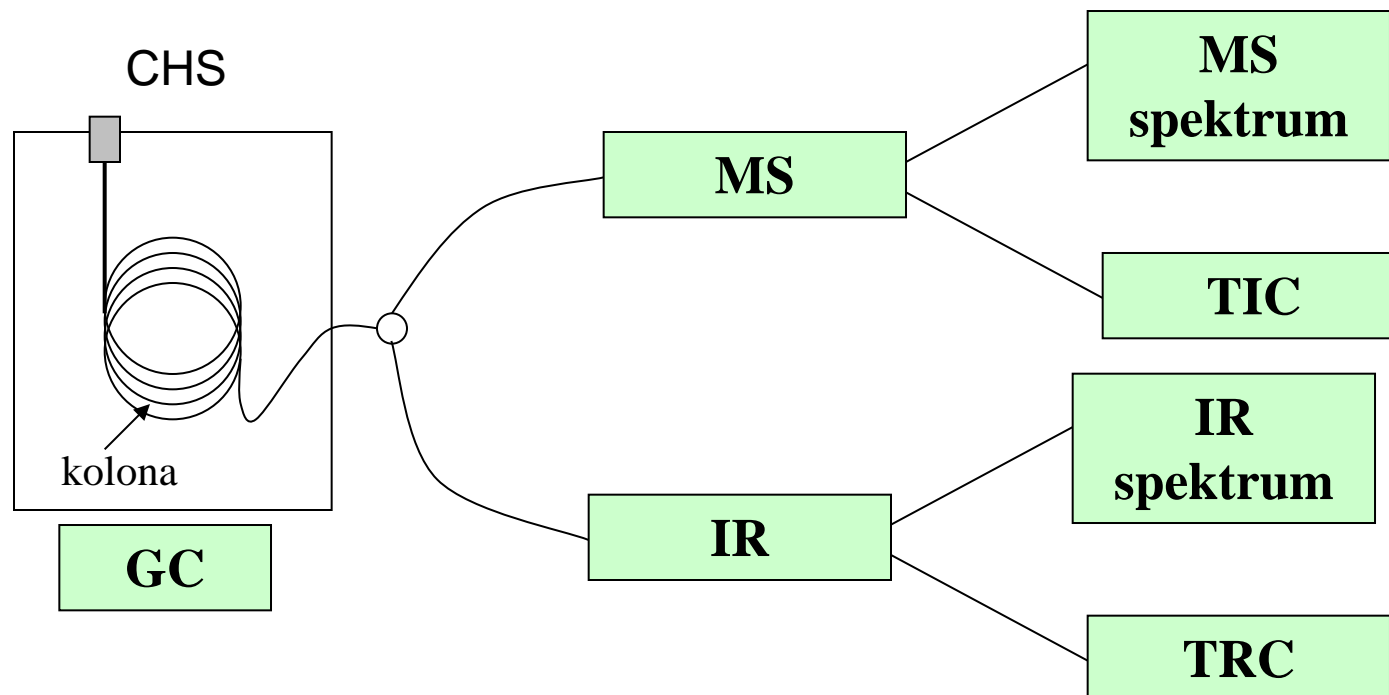


Schéma: P. Kuráň, UJEP, 2007

### Sériově-paralení hypernace LC-DAD UV-NMR/MS-MS

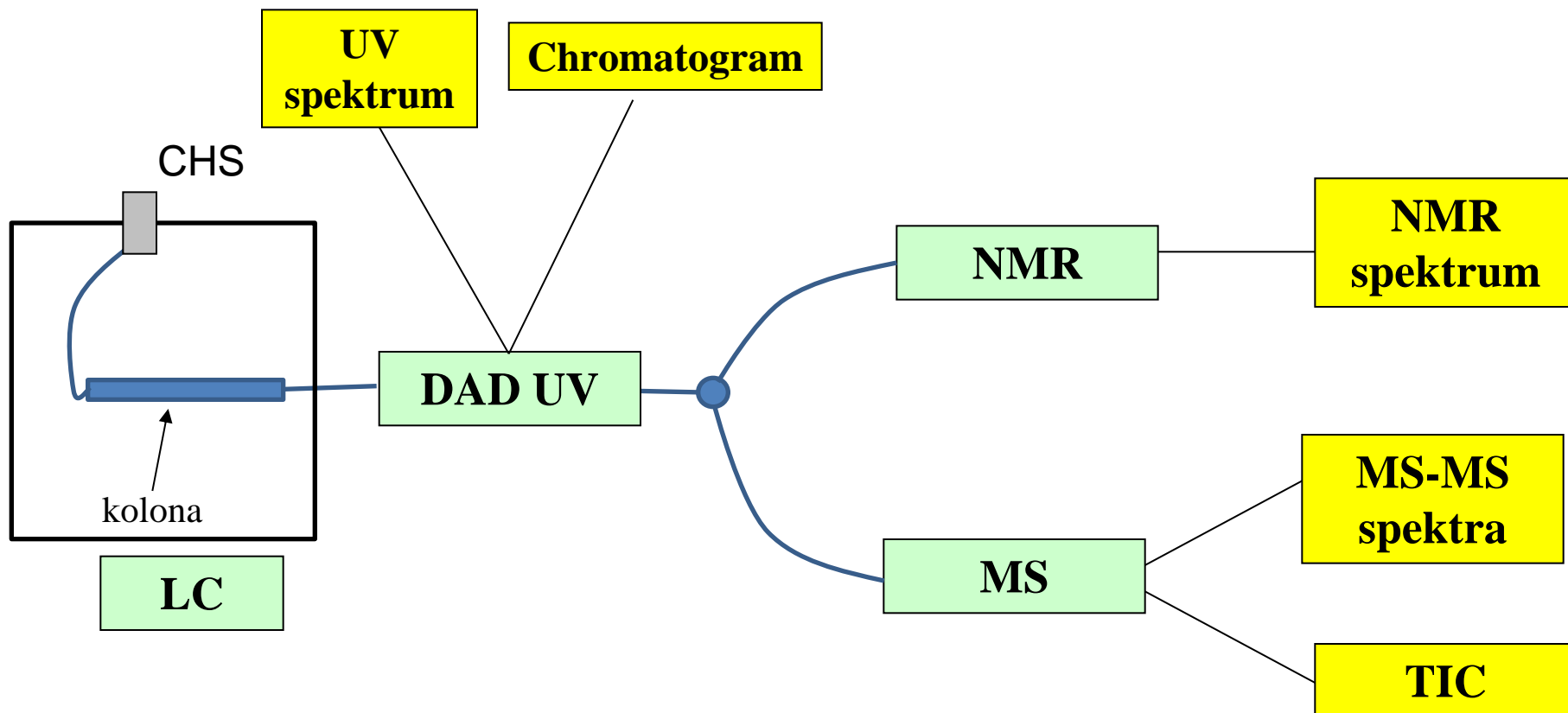
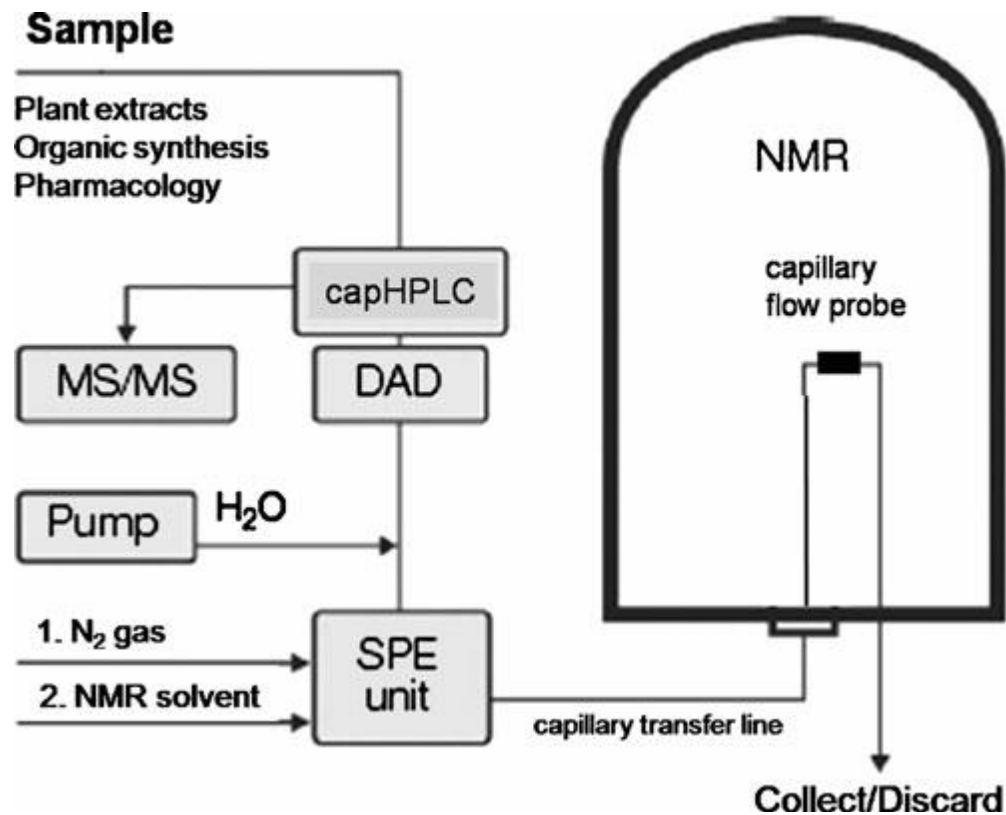


Schéma: P. Kuráň, UJEP, 2015

# Vícerozměrné a kombinované techniky CHS a techniky na výstupu

## Paralelně-sériová hypernace – LC-MS/UV-NMR



*Anal Bioanal Chem* (2012) 402:647–669

# Vícerozměrné a kombinované techniky CHS a techniky na výstupu

## Hypernace - současný stav

Metoda	Počet článků			
	2010-2015	2005-2009	2000-2004	1995-1999
GC-IR-MS	2	2	2	3
LC-NMR/MS	5	8	17	2
LC-UV-NMR/MS LC-MS/UV-NMR	2	2	0	0
LC-DAD UV-MS	67	48	17	1
LC-UV-NMR	0	4	2	0
LC-UV-IR-NMR-MS	0	0	2	0

# Vícerozměrné a kombinované techniky

## CHS a techniky na vstupu

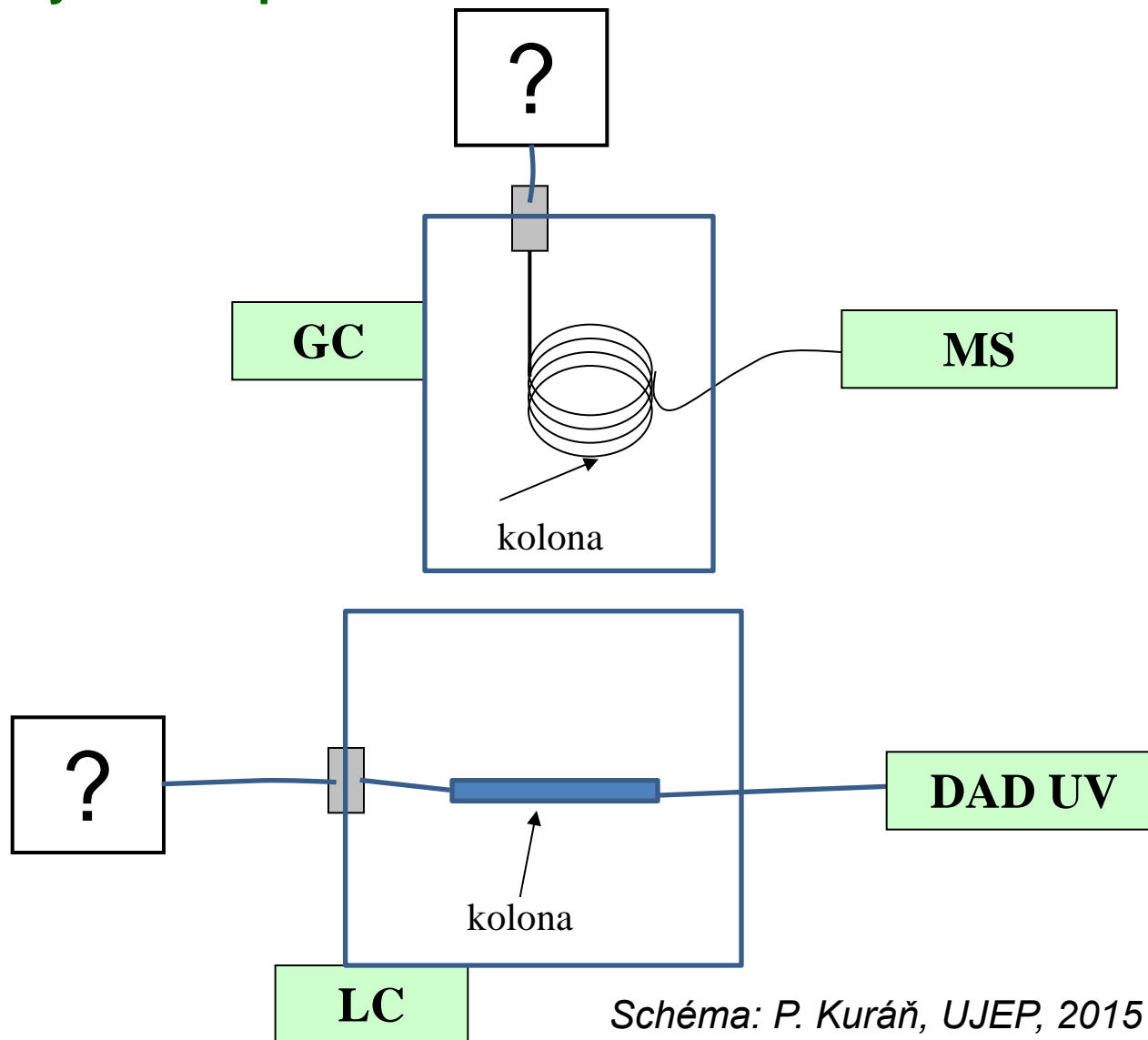


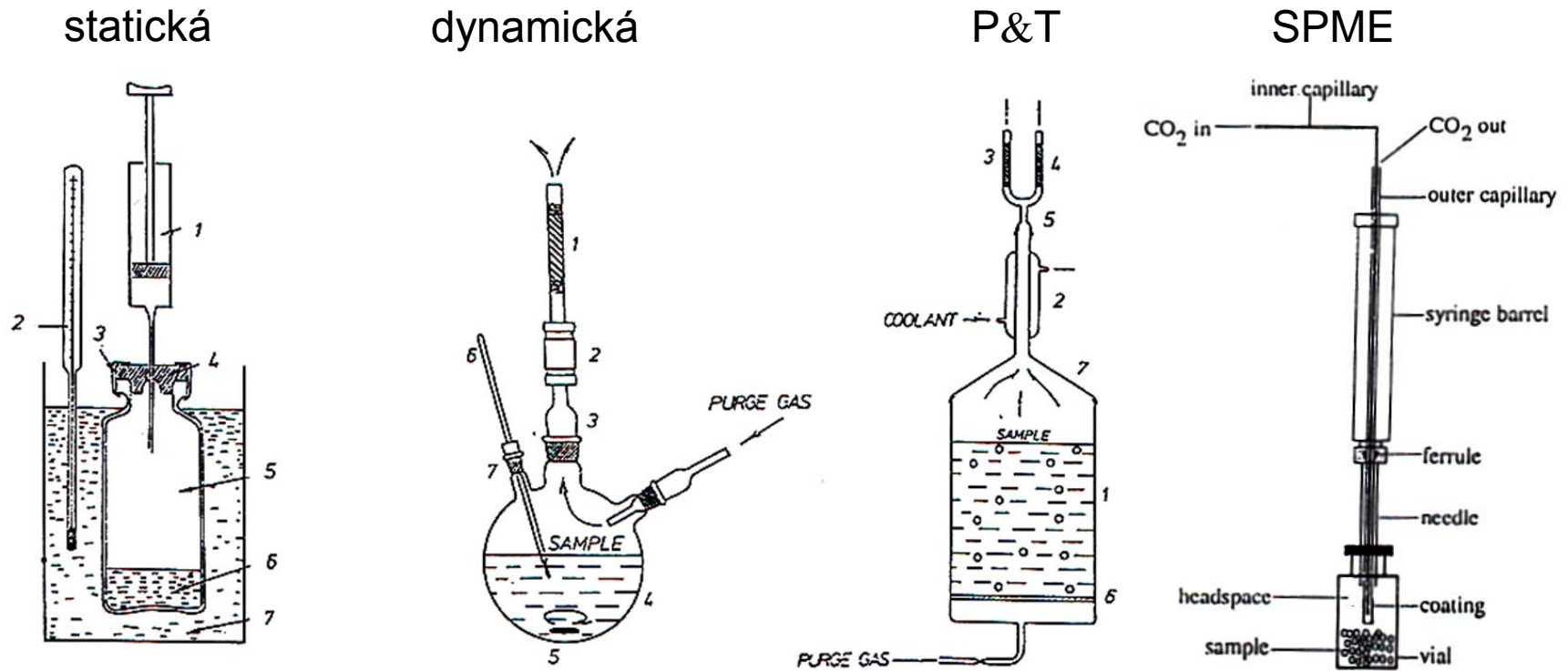
Schéma: P. Kuráň, UJEP, 2015

# Vícerozměrné a kombinované techniky CHS a techniky na vstupu

## Pro GC - on-line „headspace“ techniky

- Smysl – izolace a prekoncentrace analytů z matrice

P. Kuráň, L. Soják / J. Chromatogr. A 733 (1996) 119–141



P. Kuráň, L. Soják: J. Chromatogr. A 733 (1996) 119-141

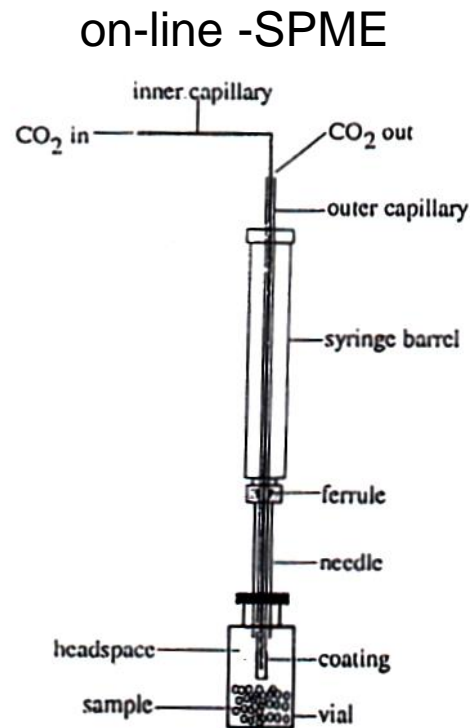
Fakulta Životního Prostředí Univerzity Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem



# Vícerozměrné a kombinované techniky CHS a techniky na vstupu

## Pro LC – on-line SPE a SPME techniky

- Smysl – izolace a prekoncentrace analytů z matrice



on-line SPE

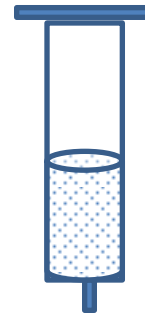


Schéma: P. Kuráň, UJEP, 2015

# Vícerozměrné a kombinované techniky

## Multidimensionální techniky

### Multidimensionální plynová chromatografie GC x GC

- ŽP - komplexní směsi 20-100 látek – nemožné separovat všechny složky jedinou chromatografickou metodou
- Důvody limitace – konečné rozlišení, píková kapacita, náhodná distribuce píků
- Teoretické řešení – kolony dlouhé několik km
- Praktické řešení – využití více separačních dimenzí
- **Dimensionalita separační metody** – počet různých separačních mechanismů, kterým je vzorek podroben, dobře funguje v TLC

# Vícerozměrné a kombinované techniky

## Multidimensionální techniky

### Multidimensionální plynová chromatografie GC x GC

- Dimensionalita separační metody – počet různých separačních mechanismů - TLC

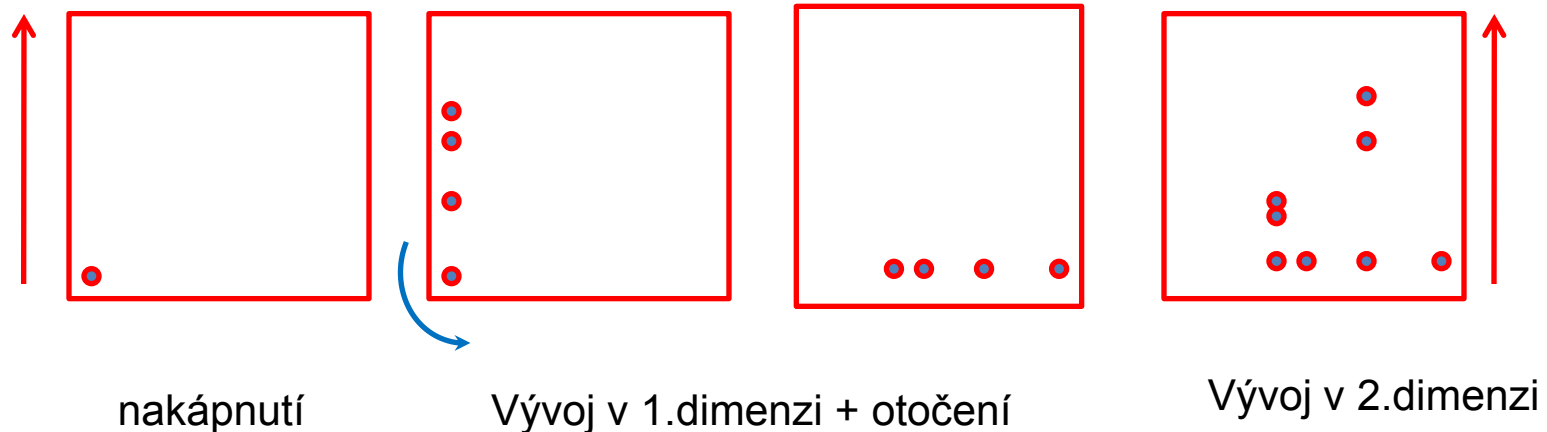


Schéma: P. Kuráň, UJEP, 2007

# Vícerozměrné a kombinované techniky

## Multidimensionální techniky

### Multidimensionální plynová chromatografie GC x GC

- **GC – případ 2D separace v prostoru (kolonová chromatografie)**
- **Teoreticky** : stop separace těsně před elucí prvního píku, rozsekat kolonu na kousky s jednotlivými píky připojit kousky na velký počet paralelních kolon
- **Prakticky** : 2D separace v čase
- **Vždy jenom část vzorku podrobena GC x GC analýze**

# Vícerozměrné a kombinované techniky

## Multidimensionální techniky

### Multidimensionální plynová chromatografie GC x GC

#### ➤ A. „heart-cut“ GCxGC

Typický postup:

**nástřik vzorku,**

**normální separace,**

**přepnutí a převedení**

**frakce**

**přepnutí zpátky –**

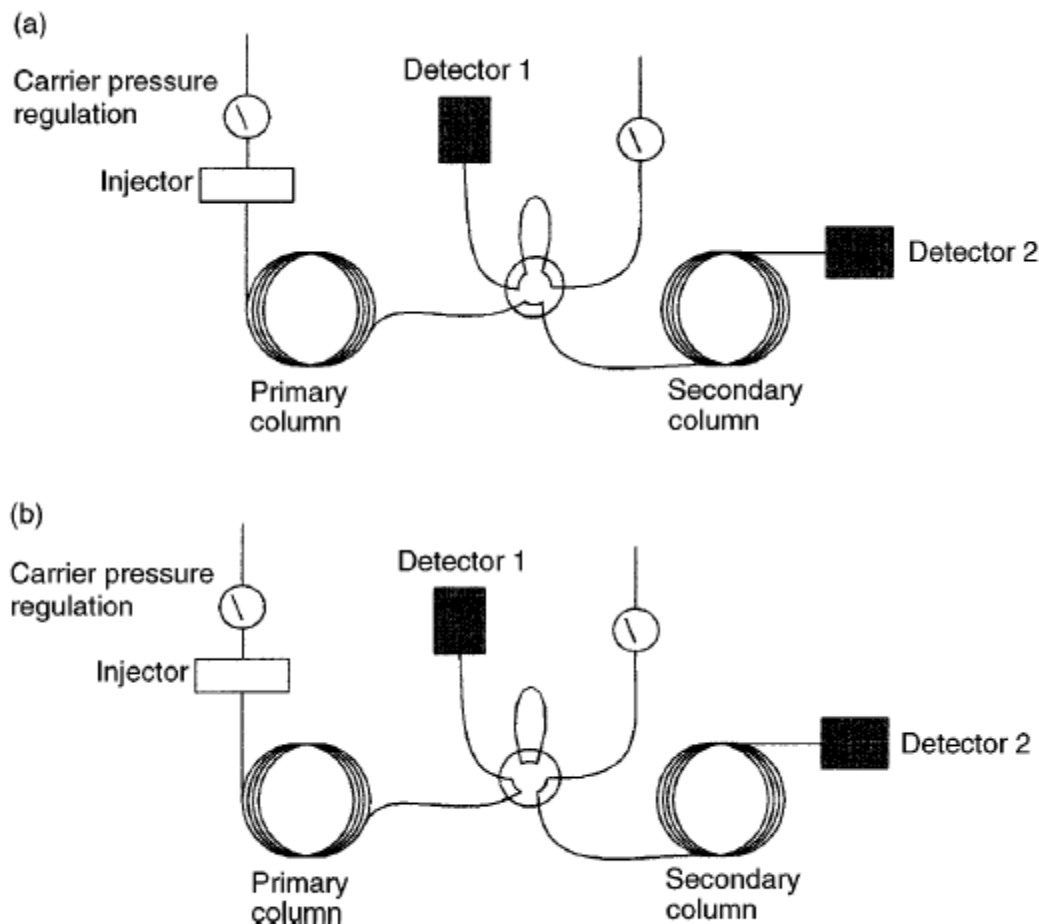
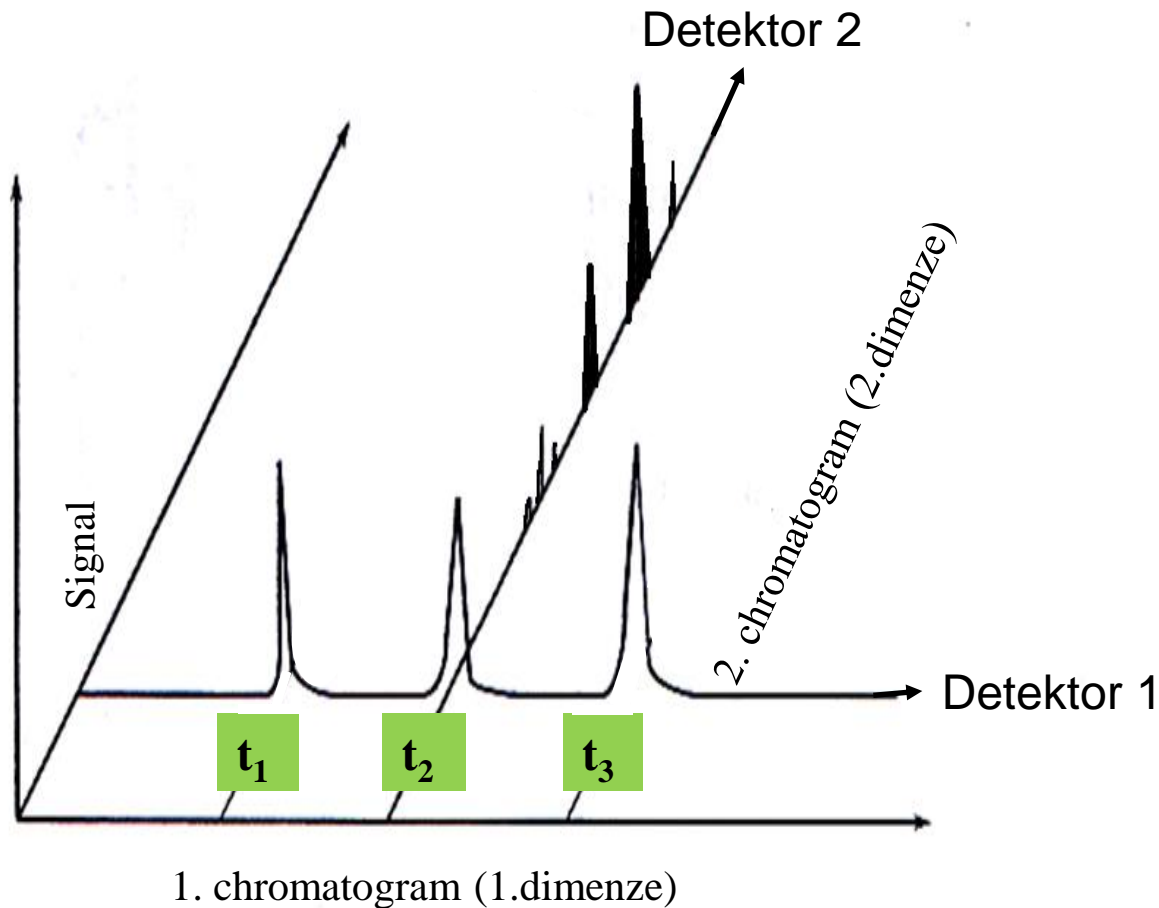


Figure 3.2 Valve switching interfaces in (a) heart-cut position and (b) primary column monitor/secondary column analyse position.

# Vícerozměrné a kombinované techniky

## Multidimensionální techniky

### „heart-cut“ GC - GC



1. chromatogram (1.dimenze)

Schéma: P. Kuráň, UJEP, 2010

# Vícerozměrné a kombinované techniky

## Multidimensionální techniky

### Všeobecná (komprehensivní) GCxGC analýza

- Zavedena v 90-tých letech – John Phillips

#### Typický postup:

- **nástřík vzorku**
- **normální separace** **celého vzorku** na 1. koloně
- **zachytávání** části materiálu z 1. kolony krátkou dobu v **modulátoru**
- **injektáž zachycené části** z modulátoru na 2. kolonu a detektor  
– **chromatografický puls**
- **opakování** vzorkování v průběhu celé separace  
– sada lineárních chromatogramů
- **konverze** lineárních chromatogramů na 3D graf

## Multidimensionální plynová chromatografie GC x GC

### ➤ B. Všeobecná (komprehensivní) GCxGC analýza

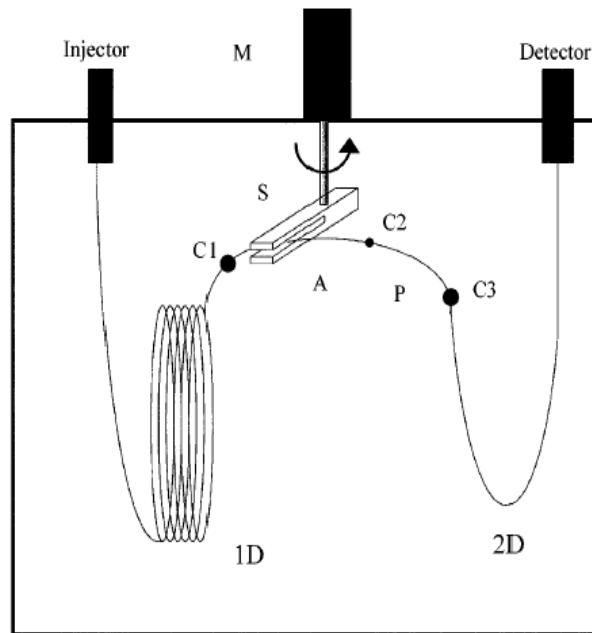


Figure 4.3 Schematic diagram of a thermal sweeper system located between two columns in the gas chromatograph; C1, C2 and C3 are column connections, with C2 being small enough to allow the slotted heater S to pass over the connection. The accumulator column A retards the travel of solutes through this section until the sweeper expels them out to the uncoated column (called a pigtail (P)), which then delivers them as a narrow band to the second column. The modulation drive, M, is external to the GC oven.

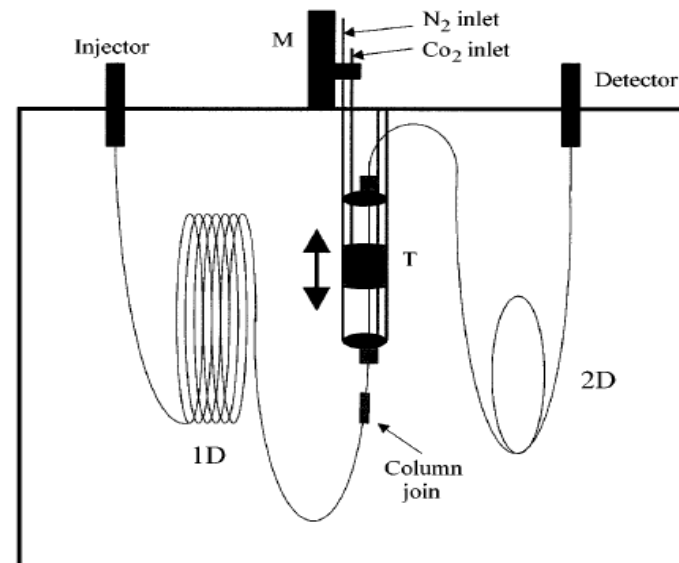


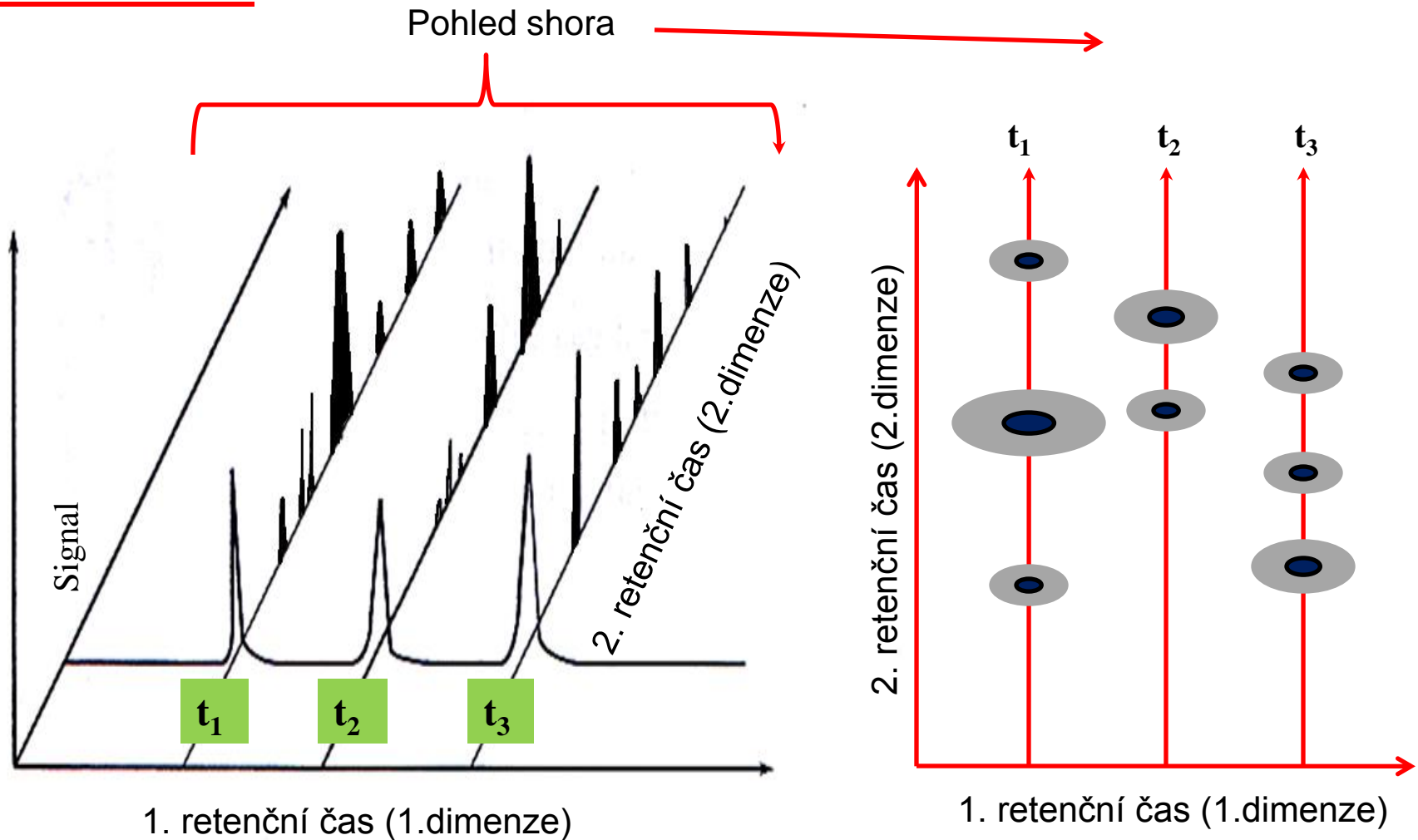
Figure 4.6 The LMCS system incorporates a moveable cryogenic trap T through which the capillary column is passed. The modulator (M) can be a pneumatic or motor driven device that moves T up and down as required, according to either preselected times (for a selective mode) or at a fast constant period for GC x GC.



# Vícerozměrné a kombinované techniky

## Multidimensionální techniky

### 2D - GC x GC

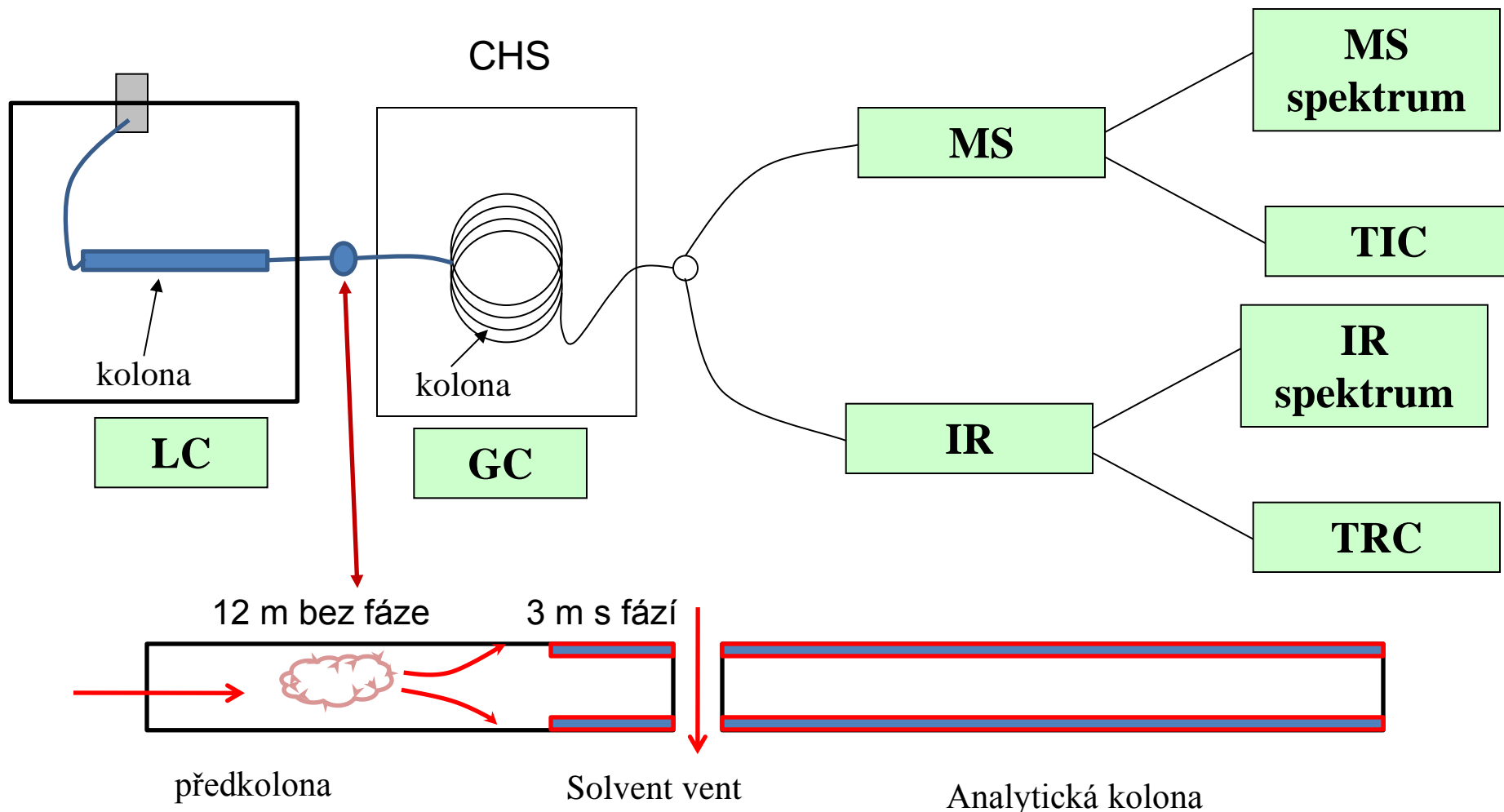


# Vícerozměrné a kombinované techniky

## Multidimensionální techniky

### LC x GC-MS/IRD

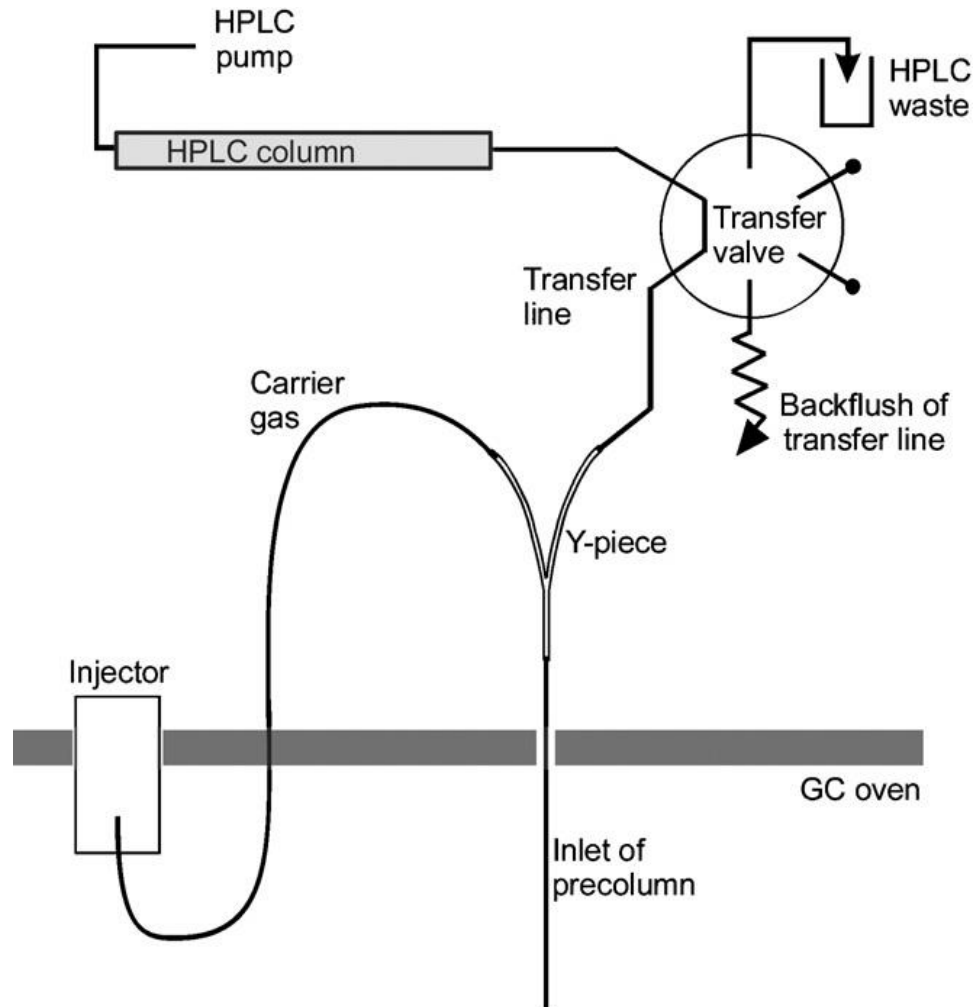
Schéma: P. Kuráň, UJEP, 2015



# Vícerozměrné a kombinované techniky

## Multidimensionální techniky

### LC x GC

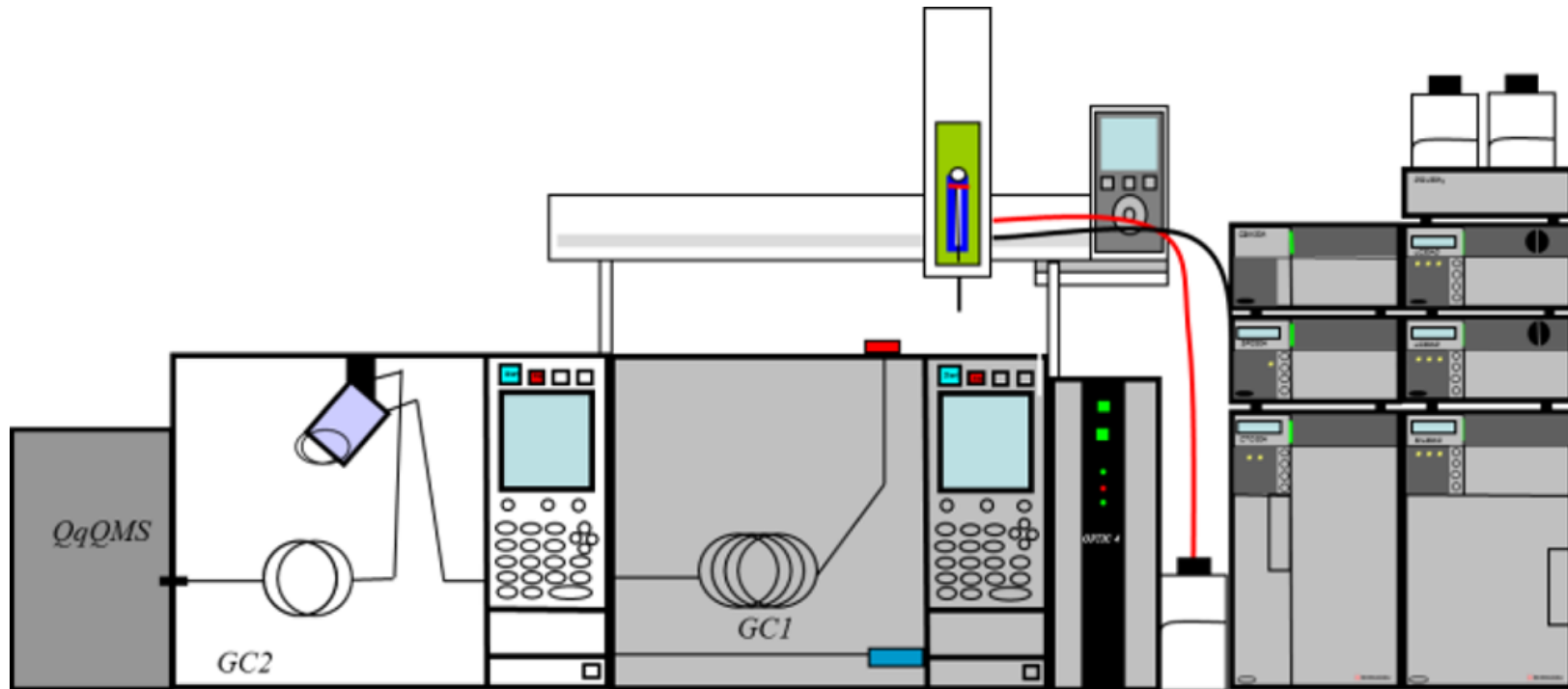


*M. Biedermann, K. Grob / J. Chromatogr. A 1255 (2012) 56– 75*

# Vícerozměrné a kombinované techniky

## Multidimensionální techniky

### LC x GC x GC - MS



*M. Zoccali, P. Q. Tranchida, L. Mondello: Anal. Chem. 2015, 87, 1911–1918*

# Vícerozměrné a kombinované techniky

## Závěr – shrnutí a perspektivy

- **Hyphenace**

**GC-MS, LC-MS** → dominance **LC-MS/MS**

**LC-NMR, TLC-MS, LC(GC)-ICP-MS, GC – IRD** – na ústupu  
GC-AED – málo, SFC-MS - nárůst

GC x GC – X  
LC x GC – X  
LC x GPC - X

LC x GC x GC - X

- **Hypernace**

**LC-DAD UV-MS, LC-DAD UV-NMR, GC-IR-MS, chirální LC-CD-NMR**

LC x GC – X/Y  
GC x GC – X/Y

LC x GC x GC – X/Y

**LC –DAD UV – NMR/MS**

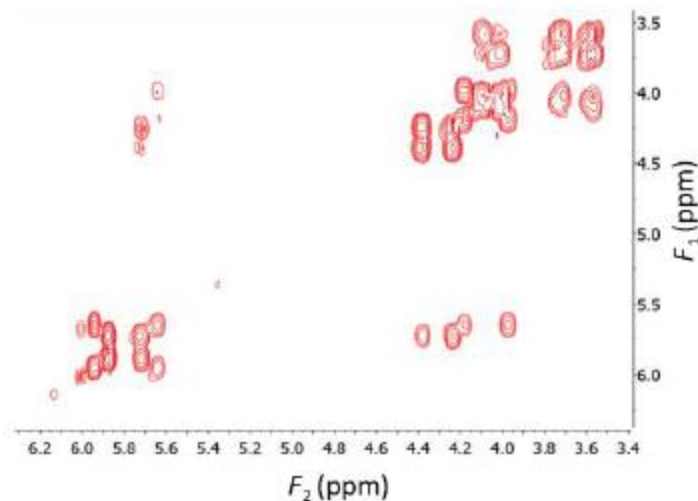
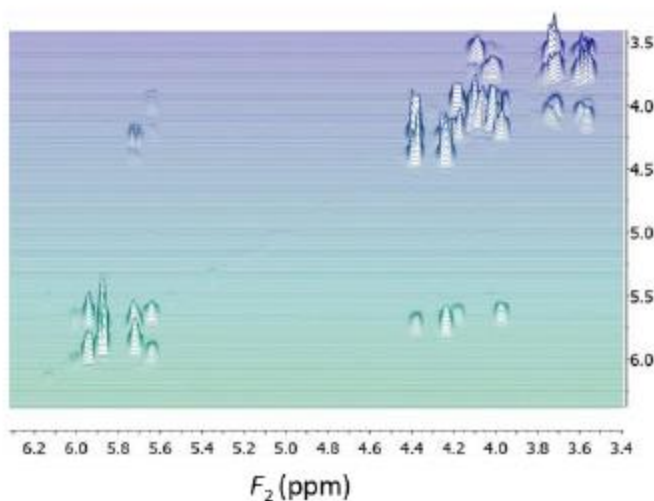
**LC x GC – MS/IR**

# Vícerozměrné a kombinované techniky

## Vícerozmernost v NMR

### 2) 2D NMR

- 2D NMR experimenty - **korelované a rozlišené**.
- Korelované experimenty - Ve 2D spektrech korelovaných experimentů na obou frekvenčních osách ( $F_1$  i  $F_2$ ) **chemické posuny**;  
u homonukleárních korelovaných experimentů - posuny téhož izotopu ( $^1\text{H}$ ),  
u heteronukleárních korelovaných experimentů - na každé ose chemické posuny jiného izotopu ( $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$ ).
- Rozlišené experimenty - na jedné frekvenční ose ( $F_2$ ) **chemický posun** a na druhé ose ( $F_1$ ) skalární **interakční konstanta**.

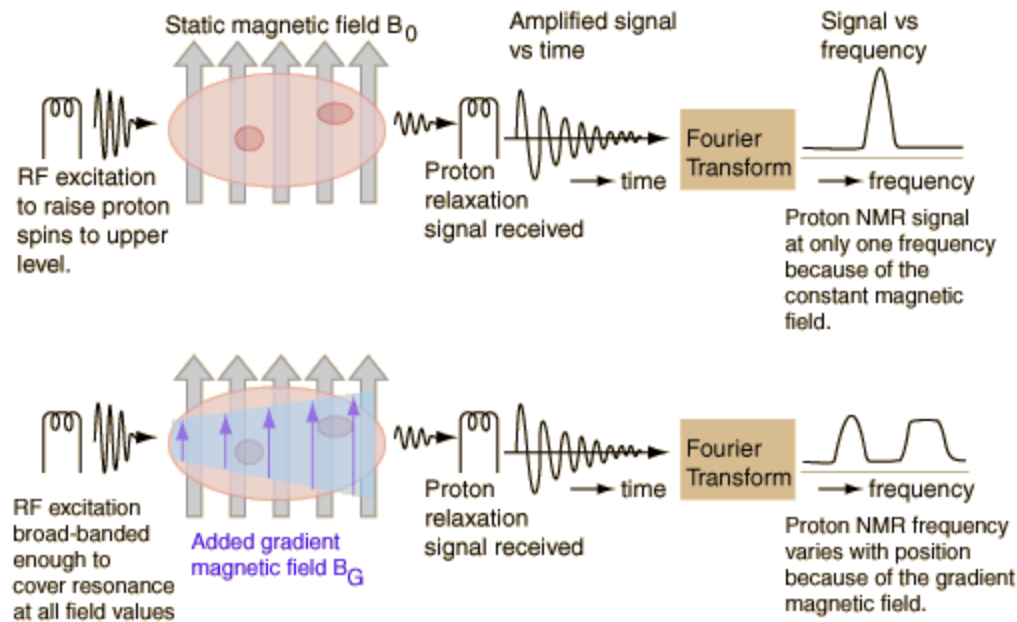
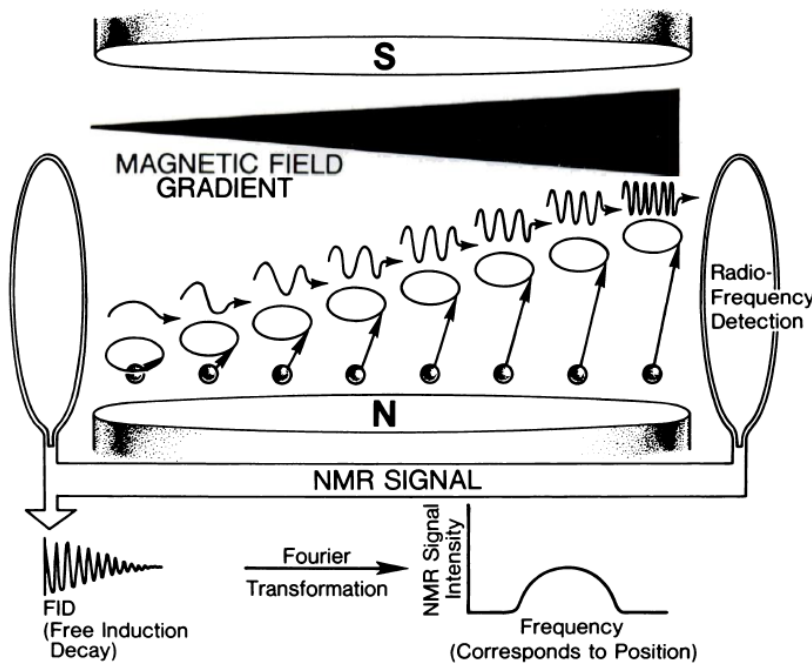


# Vícerozměrné a kombinované techniky

## Vícerozmernost v NMR

### 2) 3D NMR

- klasické  $^1\text{H}$  NMR experimenty neposkytují prostorovou informaci – jenom statické  $B_0$
- Prostorová informace – statické  $B_0$  + gradient magnetického pole -



**Figure 14**  
**Frequency-Encoding Gradients**

A small magnetic field called a gradient is superimposed upon the static magnetic field. The magnetic field gradient produces a known variation in the magnetic field across the sample volume. This variation in the magnetic field strength produces a corresponding variation in resonance frequencies across the sample volume. Thus, position is encoded with a known frequency. The free induction decay (FID) is detected and converted to a frequency versus intensity signal by Fourier transformation (FT). Since frequency corresponds to position, the NMR signal shown represents a one-dimensional projection.

# Vícerozměrné a kombinované techniky

Děkuji za pozornost