

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta  
**Katedra organické a jaderné chemie**

---

**CHROMATOGRAFICKÁ A HMOTOVĚ  
SPEKTROMETRICKÁ ANALÝZA AROMATICKÝCH  
KYSELIN A JEJICH DERIVÁTŮ**

Bakalářská práce  
studijního programu Klinická a toxikologická analýza



Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelů Doc. RNDr. Ladislava Lešetického, CSc. a RNDr. Martina Štíchy, a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne .....  
.....

.....

podpis

## **Poděkování**

V první řadě bych ráda poděkovala svému školiteli panu Doc. RNDr. Ladislavu Lešetickému CSc. za jeho ochotu a trpělivost se mnou pracovat a neméně panu RNDr. Martinu Štíchovi za jeho pomoc při práci na hmotnostním spektrometru.

# OBSAH

<b>Seznam zkratek</b>	<b>5</b>
<b>1 Teoretická část</b>	<b>6</b>
1.1 Cíl práce .....	6
1.2 Úvod do problematiky .....	6
1.3 Historie HPLC/MS analytických metod .....	7
1.4 HPLC .....	8
1.5 ESI-MS .....	9
<b>2 Experimentální část</b>	<b>10</b>
2.1 Studované látky .....	10
2.2 Použité chemikálie .....	10
2.3 Příprava roztoků .....	10
2.4 Použité metody měření a zpracování dat .....	11
2.4.1 HPLC .....	11
2.4.2 ESI-MS .....	11
<b>3 Výsledky a diskuse</b>	<b>12</b>
3.1 Stanovení čistoty analytů HPLC metodou .....	12
3.2 Analýza chování analytů v MS .....	13
3.2.1 Analýza kyseliny benzoové a derivátů .....	13
3.2.2 Analýza L-tyrosinu a derivátů .....	17
3.2.3 Analýza L-DOPA a derivátů .....	19
3.2.4 Analýza askorbátu sodného .....	21
3.2.5 Analýza TM-HIDA .....	22
<b>4 Závěr</b>	<b>24</b>
<b>Literatura</b>	<b>25</b>

## SEZNAM ZKRATEK

ESI	elektrosprejová ionizace
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IEC	chromatografie iontové výměny
IPC	iontově-párová chromatografie
IS	iontový sprej
$M_r$	relativní molekulová hmotnost
$[M + H]^+$	protonizovaný molekulární ion
$[M - H]^-$	deprotonizovaný molekulární ion
MS	hmotnostní spektrometrie
$m/z$	efektivní hmotnost iontu
NPC	chromatografie v systémech s normálními fázemi
RPC	chromatografie v systémech s obrácenými fázemi
$t_R$	retenční čas
UV	ultrafialové záření

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Cíl práce

Cílem předkládané bakalářské práce bylo prostudovat chování aromatických kyselin a jejich solí vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (high performance liquid chromatography, HPLC) a hmotnostní spektrometrií s elektrosprejovou ionizací (electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS) v pozitivním a negativním modu. Úkolem bylo stanovení čistoty HPLC metodou, určení podmínek pro stanovení v hmotnostním spektrometru a analýza chování těchto látek v pozitivním a negativním modu.

## 1.2 Úvod do problematiky

Hmotová spektrometrie je fyzikálně chemická metoda, která se využívá pro určování hmot volných molekul a jejich částí, které je potřeba převést na kladné nebo záporné ionty. Hmotový spektrometr je iontově-optické zařízení, které ionty vytvoří nebo je emituje do plynného stavu. Z plynné směsi molekul separuje nabité částice podle jejich efektivních hmotností  $m/z$  [1].

Registrací molekulárních, quasi-molekulárních a fragmentových iontů se získá záznam zvaný hmotnostní spektrum, který je charakteristický pro danou látku. Organické sloučeniny představují v iontovém zdroji komponenty, které mohou být ionizovány různými způsoby [2]. Podle typu ionizace a způsobu měření podává hmotnostní spektrum cenné informace o struktuře látky a na jeho základě lze odvodit nebo potvrdit strukturu měřené látky [1]. Mohou vznikat i ionty s více náboji a také quasi-molekulární ionty (ionty molekul s určitými adukty nebo ionty molekul bez jednoho vodíkového atomu). Jako jsou např. ionty  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$   $[M+Li]^+$  [1].

Iontové studie zaznamenávají v negativním modu deprotonizovaný ion  $[M-H]^-$ , deprotonizovaný dimerní ion  $[2M-H]^-$  a deprotonizovaný dimerní ion v páru se sodíkem  $[2M-2H + Na]^-$  [3]. Naproti tomu v pozitivním modu se vyskytuje protonizovaný ion  $[M+H]^+$ , protonizovaný dimerní ion  $[2M+H]^+$  a protonizovaný dimerní ion v páru se sodíkem  $[2M+2H+Na]^+$ .

Protonový přídavek ve formě  $[M+H]^+$  a ztráta protonu ve formě  $[M-H]^-$  jsou společně, avšak každý jinak ionizovány [4,5]. Protože sodík ve sloučeninách není, přítomnost

molekulárního aduktu  $[M+Na]^+$  může být způsobena kontaminací vzorku, rozpouštědlem nebo laboratorním sklem [2]. Jeho přítomnost může být také způsobena častým používáním acetátového pufru na bázi  $CH_3COONa$ . Některé analyty jako jsou např. málo polární látky, nedokáží vytvářet ionty v ESI, a proto je pro jejich stanovení v MS nutné přidávat sodík ve formě pufru.

### 1.3 Historie HPLC/MS analytických metod

Již před druhou světovou válkou byly zaznamenány počátky organické hmotnostní spektrometrie. Objevily se první komerční hmotnostní spektrometry, které byly používané v ropné chemii při charakterizaci lehkých benzinových frakcí. Zavedení kombinovaných separačních a hmotnostně spektrometrických technik bylo kvalitativním zlomem pro kvantitativní aplikace [6].

Masivní expanze hmotnostní spektrometrie ve spojení s kapalinovou chromatografií byla způsobena objevem měkkých ionizačních technik [7]. Historický vývoj HPLC/MS nebyl zdaleka tak jednoduchý jako v případě GC/MS. Od popsání prvního „on-line“ systému McLafferty [8] v roce 1973 uplynula řada let, než bylo toto spojení spolehlivě dořešeno [9]. Analytické aplikace iontové pasti byly zavedeny před několika málo lety [10].

V roce 1968 Dole a spolupracovníci použili elektrosprej jako iontový zdroj v hmotnostním spektrometru (ionizace elektrosprejem). K rozšíření této studie přispěly práce Yamashita a Fenna v polovině osmdesátých let minulého století. Význam elektrospreje od té doby významně rostl v oblasti biochemických aplikací [11]. Počátkem roku 1980 byla objevena technika, elektrosprejová ionizace [12,13], pro analýzu vybraných sloučenin v rozsahu od vysokomolekulárních biopolymerů až po kovové ionty [14-18]. Studie J.B.Fenna a spolupracovníků [12,13,15,19] demonstrovala možnou elektrosprejovou ionizaci pro kapilární kapalinovou chromatografii [2]. J.D.Henion a spolupracovníci [20-22] upravili metodu elektrospreje, kterou nazvali iontový sprej (IS) [2]. R.D.Smith a spolupracovníci [23-25] použili ES pro kapilární elektroforézu, kde vhodně objasnili použití ES pro detekci bioorganických iontových analytů [2].

## 1.4 HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie slouží především pro analýzu tepelně nestálých a málo těkavých látek. Používá analytické kolony s jemně zrněnými náplněmi a vysokou separační účinností. Vysoké selektivity separace se dosahuje volbou chromatografických fázových systémů, založených na různých principech distribuce separovaných látek mezi stacionární a mobilní fází [26].

Přístroje pro kapalinou chromatografiu tzv. kapalinové chromatografy - se skládají z transportní části, dávkovacího ventilu, separační části, detektoru a ze zařízení pro záznam a zpracování signálu [26]. Do kolony vzorky zavádíme buď manuálně nebo automaticky ovládanými smyčkovými dávkovacími ventily. Mobilní fázi je potřeba před vstupem do čerpadla zbavit rozpuštěného vzduchu, aby se zabránilo případné netěsnosti zpětných ventilků čerpadla, kolísání průtoku a potíží při detekci [26].

Náplně chromatografické kolony se v současné době připravují buď z pórovitých anorganických materiálů nebo z organických polymerů. Nejčastěji se používají polymery na bázi silikagelu, které mají lepší chemickou stabilitu při vyšším pH, ale nižší separační účinnost. Elučních časů maxim chromatografických píků separovaných látek se využívá k identifikaci složek vzorku. Kvantitativní obsah složek se určuje z výšek nebo ploch píků po kalibraci pomocí standardů. Nejčastěji používáme spektrofotometrické detektory v ultrafialové i ve viditelné oblasti, u kterých si můžeme nastavit vlnovou délku detekce podle potřeby [26].

Kapalinovou chromatografiu rozdělujeme na chromatografiu v systémech s normálními fázemi (NPC), s obrácenými fázemi (RPC), iontově párovou chromatografií (IPC) a chromatografií iontové výměny (IEC) [26].

V předkládané bakalářské práci provádíme chromatografiu v systémech s obrácenými fázemi. Chromatografie v systémech s obrácenými (převrácenými) fázemi se v současné praxi používá nejčastěji. Umožňuje separaci vzorků obsahující nepolární, středně, silně polární, iontové a ionizovatelné látky. Jsou vhodné pro separaci látek, které se liší velikostí hydrofobních částí molekul nebo počtem a charakterem polárních funkčních skupin a dále i slabé organické kyseliny nebo báze, potlačíme-li jejich disociaci přidáním pufru do mobilní fáze [26]. Separované látky se eluují v pořadí podle klesajících polarit.

Mobilní fáze je polárnější než fáze stacionární. Skládají se většinou z vody a jednoho nebo více polárních rozpouštědel (methanol, acetonitril,...). Stacionární fáze jsou nepolární nebo slabě polární látky. Nejvíce používanou polární látkou je silikagel chemicky

modifikovaný silanizačními činidly s oktadecylovými, oktylovými i nitrilovými skupinami [26].

## 1.5 ESI-MS

V současné době je elektrosprej jednou z nejvýznamnějších ionizačních technik používaných v hmotnostní spektrometrii netěkavých látek [11]. Patří mezi měkké ionizační techniky [11] a je nevhodnější pro analýzu polárních až iontových látek [9] za atmosférického tlaku [11]. Umožňuje získat quasi-molekulární ionty  $[M+H]^+$ ,  $[M+ Na]^+$ ,  $[M-H]^-$  [11]. Tato ionizační technika je nejšetrnější a je vhodná i pro nejméně stabilní molekuly [9].

Mechanismus ionizace elektrosprejem je složen z několika dílčích dějů. V první řadě dochází k tvorbě nabitych kapek na výstupu sprejovací kapiláry [11], na kterou je vloženo napětí (3-5kV) [9]. Podle polarity napětí nesou kapičky, vlivem vysokého gradientu elektrického pole, kladný nebo záporný náboj. V důsledku odpařování rozpouštědla a jejich opakovanému rozpadu se nabité kapky zmenšují tzv. Coulombické štěpení, ale počet nábojů v kapkách se nemění [11]. Následuje uvolnění (de)protonované molekuly nebo aduktových iontů do plynné fáze [9]. Nerozpadají se na přibližně stejné části, ale dochází k tzv. „jet fission“, což je děj, při kterém se z jedné rodičovské kapky emituje řada kapek výrazně menších. Konečné jsou sekundární děje, kterých se účastní ionty už v plynné fázi [11]. Nejlepší citlivosti je dosahováno s průtoky 1-100 $\mu$ l/min [9].

Nejdůležitějším píkem spektra je molekulární pík. Poskytuje nám základní informace svojí hmotou, intenzitou a poměrem izotopických píků. Chemická stabilita molekul je shodná s intenzitou píků [27].

Účinnost ionizace je určována vlastnostmi analyzované látky, vstupní kapilárou, napětím na ni vloženým a průtoky pomocných plynů. Jednou z nejvýznamnějších předností ESI v porovnání s jinými iontovými zdroji je schopnost produkovat vícenásobně nabité ionty, což je výhodné pro analýzu větších molekul. Vzorek ve formě roztoku může být přímo zaváděn do ES nebo může být nejprve podroben separaci např. HPLC nebo GC [11].

Tato ionizační technika je hojně využívána v mnoha aplikacích. Počínaje hmotnostní spektrometrií peptidů a proteinů, nukleových kyselin, cukrů, tuků [11], potravin, přes analýzu drog, výbušnin až po analýzu složek životního prostředí [1].

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Studované látky

kyselina benzoová

benzoan sodný

benzoan lithný

L-DOPA(L-3, 4- dihydroxyfenylalanin) – Aldrich

lithná sůl L-DOPA(L-3, 4- dihydroxyfenylalaninát lithný)

L-tyrosin – Aldrich

draselná sůl L-tyrosinu

askorbát sodný, dar UJV Řež

TM-HIDA(N-[(2,4,6-trimethylfenyl)karbamoylmethyl]iminodioctová kyselina), dar UJV Řež

### 2.2 Použité chemikálie

hydroxid sodný, Lachema (ČR)

hydroxid draselný, Lachema (ČR)

hydroxid lithný, Lachema (ČR)

kyselina octová 0,1mol/l, Lach-Ner (ČR)

methanol pro HPLC, Lab-Scan

destilovaná voda

### 2.3 Příprava vzorků

Všechny stanovené látky byly připravovány o koncentraci 0,01M. Kyseliny benzoové bylo naváženo 66 mg. Byla rozpuštěna v 50 ml methanolu a představovala tak i zásobní roztok pro přípravu jejích solí. Na přípravu každé soli bylo použito 10 ml zásobního roztoku kyseliny benzoové 0,01M, ke kterému bylo napipetováno 100  $\mu$ l 1M hydroxidu sodného nebo 1M hydroxidu lithného. L-DOPA bylo naváženo 19,7 mg a rozpuštěno v 10 ml methanolu, pro lepší rozpouštění látky v methanolu bylo k roztoku přidáno 300  $\mu$ l 0,1M kyseliny octové. Protože L-DOPA se lépe rozpouští ve vodě, připravila jsem vodnou lithnou sůl této látky. Pokoušela jsem se o připravení sodné a draselné sole, ale z důvodu barevné změny roztoku do

hněda nebylo možné tyto roztoky použít. Dále jsem připravila roztoky L-tyrosinu, kterého bylo naváženo 18,1 mg a rozpuštěno v 10 ml destilované vody. V methanolu nedocházelo k rozpouštění látky ani za tepla. Z tohoto roztoku byla připravena draselná sůl přidáním 100  $\mu$ l 1M hydroxidu draselného.

## 2.4 Použité metody měření a zpracování dat

### 2.4.1 HPLC

Měření bylo prováděno na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu CHROM SDS 150 s UV detektorem. Pro všechny stanovené vzorky až na TM-HIDU (230 nm) byla zvolena vlnová délka 270 nm. Látky kyselina benzoová, benzoan sodný a benzoan lithný byly separovány na koloně od výrobce WATREX, ReproSil 100 C18, o délce 250 mm, průměru 4 mm a velikostí zrn 5  $\mu$ m při laboratorní teplotě 22°C. Ostatní látky L-DOPA, lithná sůl L-DOPA, L-tyrosin, draselná sůl L-tyrosinu, a askorbát sodný byly separovány na koloně CHROMOLITH (MERCK), RP 18e, o délce 100 mm, průměru 4,6 mm a velikostí zrn 5  $\mu$ m při laboratorní teplotě 22°C. TM-HIDA byla separována na koloně ReproSil C-18 o velikosti zrn 5  $\mu$ m. Pro analýzu byla použita isokratická eluce. Mobilní fáze pro látky kyselina benzoová, benzoan sodný a benzoan lithný byl použit čistý methanol, pro ostatní látky L-DOPA, lithná sůl L-DOPA, L-tyrosin, draselná sůl L-tyrosinu a askorbát sodný byl použit roztok methanol/destilovaná voda (v poměru 7:3) a pro TM-HIDU byl použit roztok methanol/voda (v poměru 6:4) s přídavkem 0,15 %  $H_3PO_4$ . Průtok kolonou byl nastaven na 0,5 ml/min. Rozsah měření 1,0. Dávkování vzorků bylo v rozmezí 2,5-5  $\mu$ l. Celková doba analýzy byla v rozmezí 7-10 min.

### 2.4.2 ESI-MS

K detekci byl použit hmotnostní spektrometr s iontovou pastí a elektrosprejovou ionizací od výrobce BRUKER DALTONICS (Německo), model ESQUIRE 3000. Průtok byl nastaven na 17  $\mu$ l/min. Jako zamlžovací plyn byl použit dusík. Všechny stanovené látky byly proměřeny v pozitivním a negativním modu a následně vyhodnoceny.

# 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

## 3.1 Stanovení čistoty analytů HPLC metodou

Pro analýzu byla zvolena metoda HPLC umožňující separaci polárních látek. První experimenty byly prováděny s jednosložkovou mobilní fází obsahující methanol. Protože HPLC kolona nebyla termostatována, retenční časy studovaných vzorků se mohou lišit. Čistota látek je zohledněna na procenta podle výšky a plochy píků analytů. Bylo zjištěno, že i s velkou opatrností práce při přípravě vzorků docházelo ke kontaminaci, která mohla být způsobena špatně vymytnou injekční stříkačkou nebo zanesenou kolonou s předchozího měření.

V tab. 3.1 jsou znázorněny retenční časy a čistota jednotlivých stanovených analytů, která je zohledněna na procenta.

Tab. 3.1: Retenční časy a čistota stanovených analytů v procentech

stanovaná látka	$t_R$ [min.]	výška píku[%]	plocha píku [%]
kyselina benzoová	4,26	99,1	99,7
benzoan sodný	4,16	98,0	96,9
benzoan lithný	4,14	100,0	100,0
L-DOPA	2,88	94,9	92,2
lithná sůl L-DOPA	2,88	94,2	91,5
L-tyrosin	5,90	81,6	74,9
draselná sůl L-tyrosinu	6,12	91,1	87,6
askorbát sodný	5,61	99,8	99,8
TM-HIDA	6,18	99,8	99,8

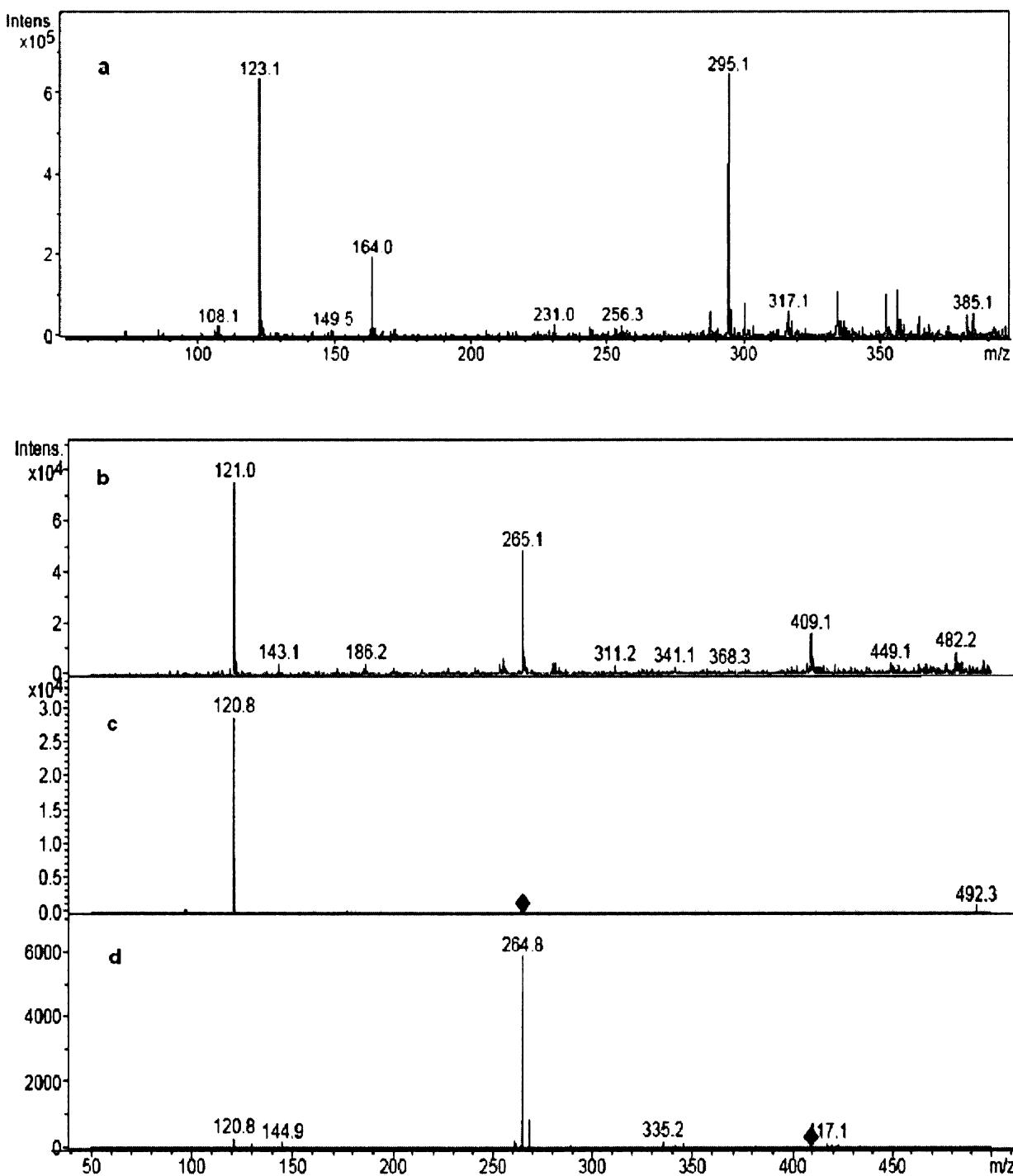
## 3.2 Analýza chování analytů v MS

Na následujících obrázcích jsou zobrazena hmotnostní spektra, kde hlavními ionty jsou molekulární adukty  $[M+H]^+$  a  $[M-H]^-$ . Při analýze analytů v hmotnostní spektrometrii v pozitivním modu se sodík navazuje na většinu stanovených molekul a vzniká tak molekulární adukt  $[M+Na]^+$ . Kromě příslušných molekulových iontů vznikají ještě dimerní a v některých případech i trimerní ionty. V získaných spektrech se podařilo interpretovat nejintenzivnější ionty.

Protonované ionty rozpuštědel můžeme u významnějších stanovených pozorovat pouze u okyselených roztoků [1]. Avšak při kyselém pH menším než hodnota 4 se systém v negativním modu chová chaotivně a tedy naměřené výsledky se obtížně interpretují. Proto je doporučeno stanovovat látky s pH alkalickým nebo slabě kyselým.

### 3.2.1 Analýza kyseliny benzoové a derivátů

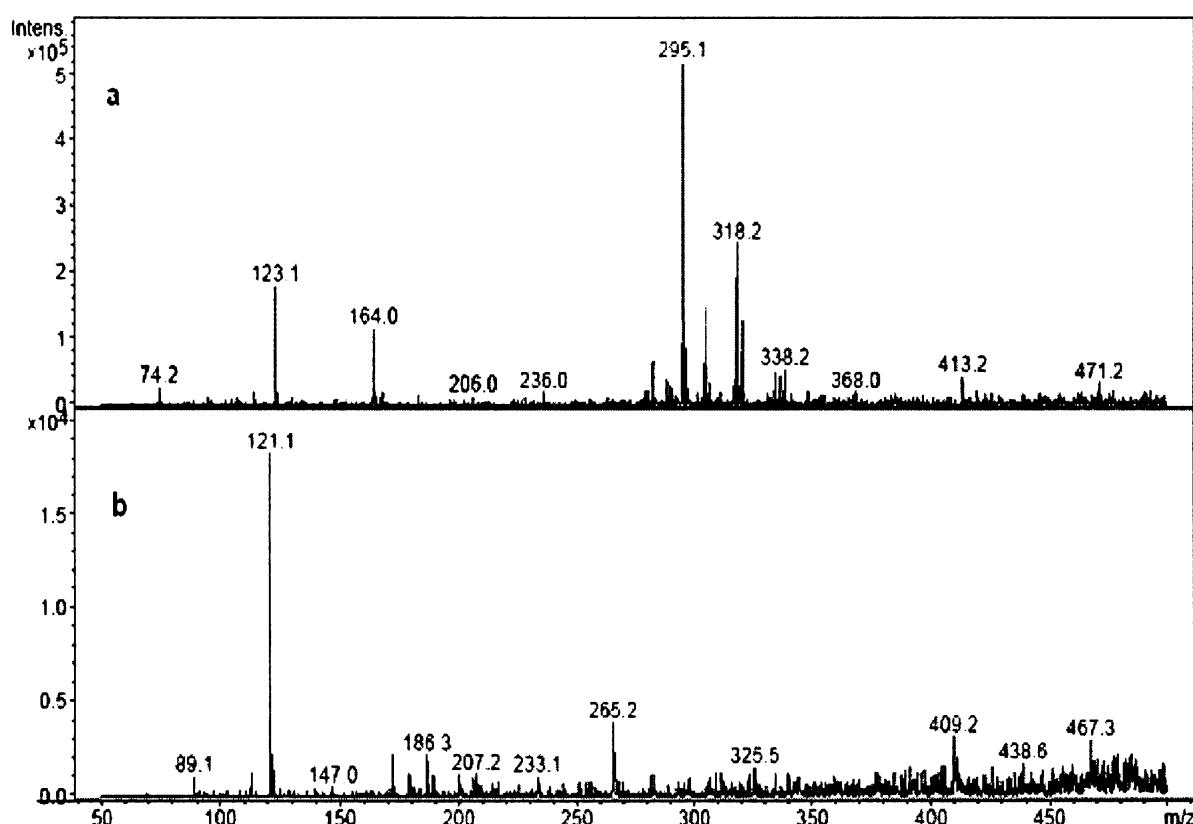
Na obr. 3.1a) je zobrazeno hmotnostní spektrum kyseliny benzoové ( $M_r = 122\text{g/mol}$ ) v pozitivním modu. Jsou zde uvedeny ionty  $m/z$  123,1, který odpovídá protonizovanému molekulárnímu aduktu kyseliny benzoové  $[M+H]^+$ . V negativním modu obr. 3.1b) je zobrazen ion  $m/z$  121,0  $[M-H]^-$ , který odpovídá deprotonizované kyselině benzoové. Molekulární ion  $m/z$  409,1  $[3M-3H+2Na^+]^-$  byl fragmentován obr. 3.1d) v iontové pasti za vzniku dceřiného molekulárního iontu  $m/z$  264,8  $[2M-2H+Na]^-$ . Tento ion byl znova fragmentován v iontové pasti a produkt rozpadu byl zanomenán jako ion  $m/z$  120,8, jehož hmotnostní spektrum je na obr. 3.1c). Na volnou kyselinu benzoovou se navazuje sodík, vznikají tak sodné sole kyseliny benzoové a dimer benzoátu sodného.



Obr. 3.1: Hmotnostní spektrum kyseliny benzoové a) +MS b)-MS c) izolace iontu  $m/z$  264,8

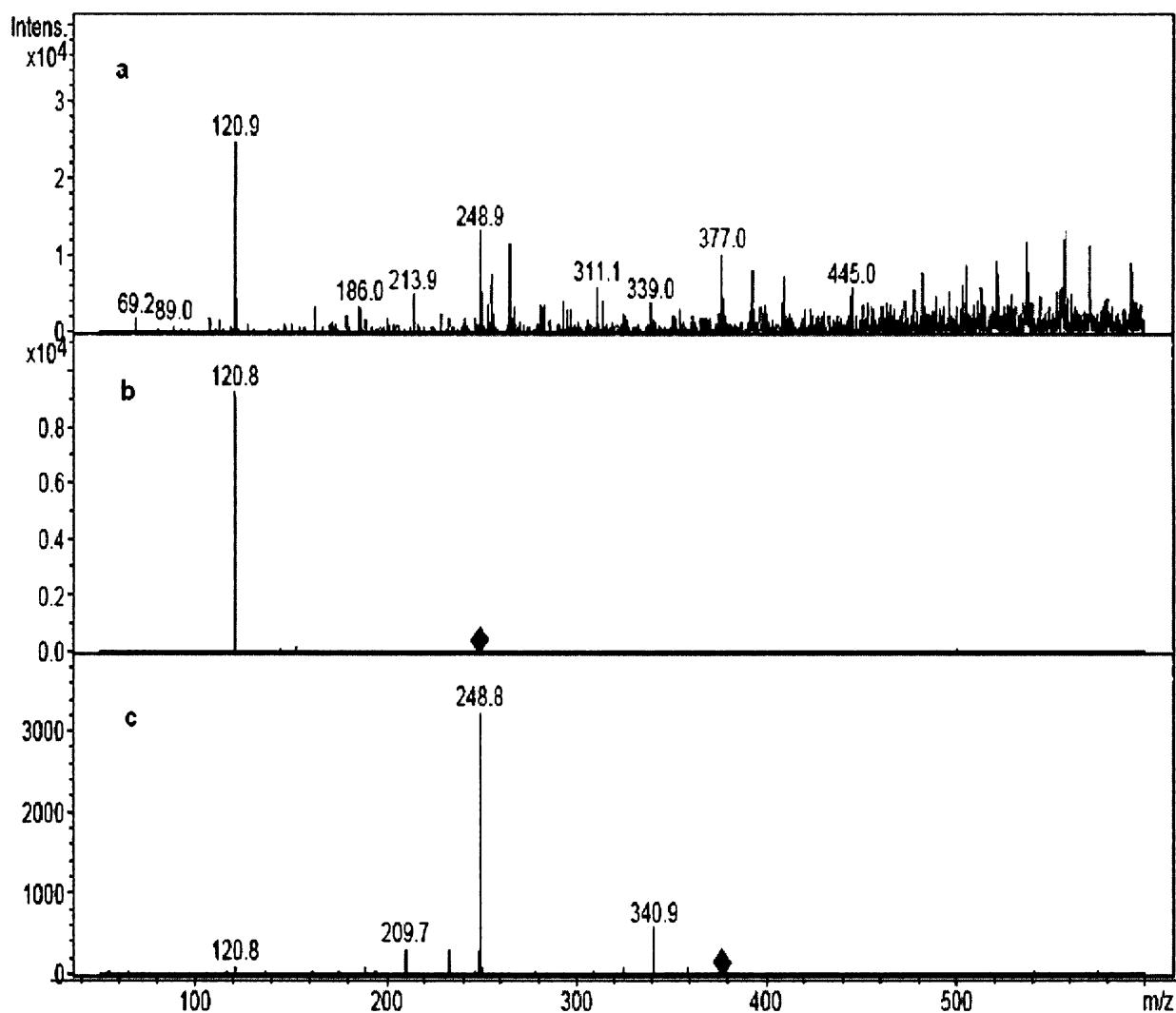
d) izolace iontu  $m/z$  409,1

Při analýze benzoanu sodného ( $M_r = 144\text{g/mol}$ ) jsem došla k velmi podobným spektrům jako u volné kyseliny benzoové. Na obr. 3.2b) jsou zobrazeny ionty  $m/z$  121,1, ion  $m/z$  265,2 a ion  $m/z$  409,1. Tyto tři nejintenzivnější ionty se shodovaly, což vede k závěrům, že volná kyselina benzoová se v negativním modu chová podobně jako sodná sůl kyseliny benzoové. Pozitivní mod je uveden na obr. 3.2a), který se také shoduje s hmotnostním spektrem volné kyseliny benzoové. Ionty  $m/z$  295,1 a  $m/z$  318,2 jsou nečistoty pocházející pravděpodobně z použití NaOH při přípravě benzoanu sodného. Přiřazení konkrétní struktuře se mi nepodařilo.



Obr. 3.2: Hmotnostní spektrum sodné sole kyseliny benzoové a) +MS b) -MS

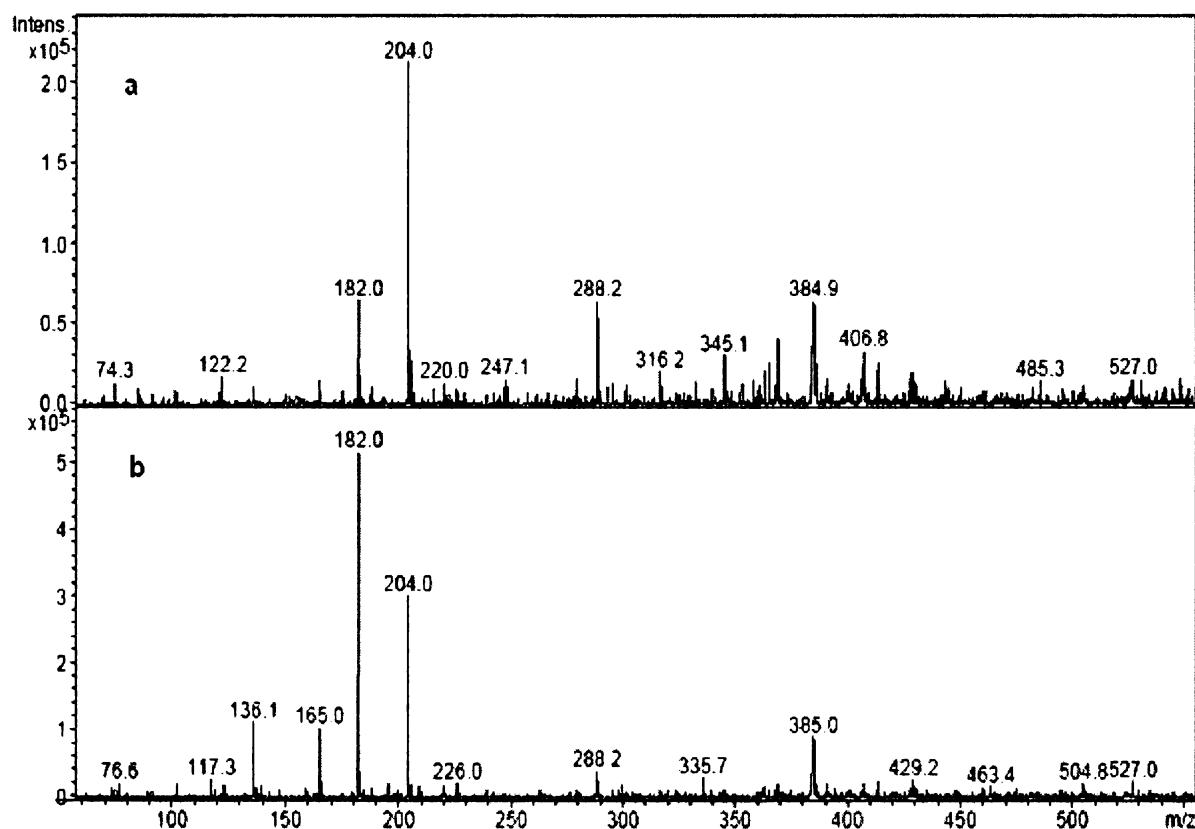
Hmotnostní spektrum v negativním modu benzoanu lithného ( $M_r = 128\text{g/mol}$ ) je uvedeno na obr. 3.3a). Jako prekurzor pro získání dceřiných iontů byl vybrán molekulární ion  $m/z 377,0 [3M-3H+2^7\text{Li}]^-$ . V iontové pasti byl tento ion fragmentován a produkty rozpadu byly zaznamenány jako spektrum dceřiných iontů obr. 3.3c). Ion  $m/z 248,8 [2M-2H+^7\text{Li}]^-$  jsme znova fragmentovali v iontové pasti za vzniku dceřiného iontu  $m/z 120,8$ , který odpovídá deprotonizovanému molekulárnímu aduktu  $[\text{M}-\text{H}]^-$  obr. 3.3b).



Obr. 3.3: Hmotnostní spektrum a) benzoanu lithného –MS b) izolace iontu  $m/z 376,9$   
c) izolace iontu  $m/z 248,8$

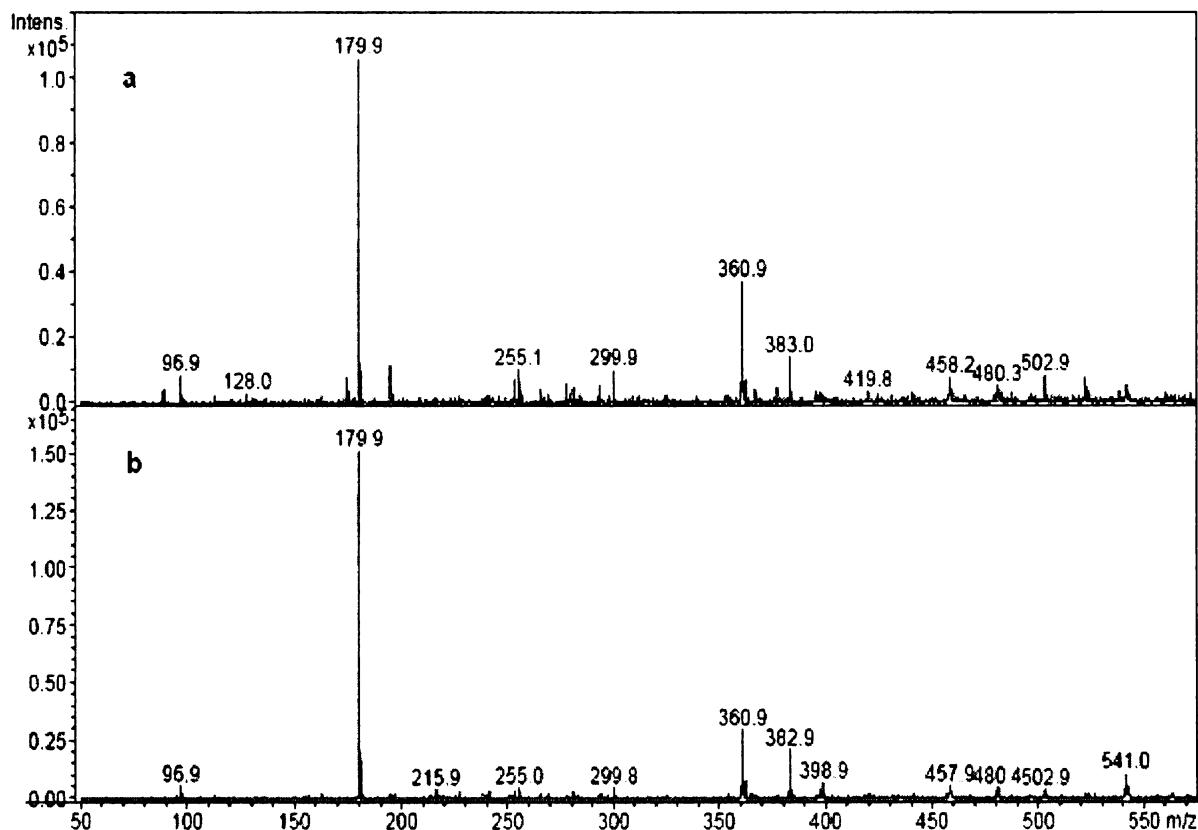
### 3.2.2 Analýza L-tyrosinu a derivátů

Následujícím stanoveným analytem je L-tyrosin ( $M_r = 181\text{g/mol}$ ). Na obr. 3.4 jsou zobrazena hmotnostní spektra, pozitivním mod, a) volného L-tyrosinu, b) draselné sole L-tyrosinu. Základním iontem je ion  $m/z$  182,0, což je protonizovaný molekulární adukt  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Nejvíce intenzivním iontem v tomto hmotnostním spektru je  $m/z$  204,0. Tento ion vzniká navázáním sodíku na molekulu L-tyrosinu. Jedná se o molekulární adukt  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . Ion  $m/z$  288,2 nepoukazuje na navázání dalšího sodíku ani na dimerní ion L-tyrosinu, proto se s největší pravděpodobností jedná o nečistotu z předchozího měření. Dalším důležitým iontem je  $m/z$  384,9. Tento ion odpovídá molekulárnímu aduktu  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ . Protože sodík není ve sloučenině, jeho přítomnost může být pravděpodobně způsobena nežádoucí kontaminací analytu, což je uvedeno v kapitole 1.2. Spektrum draselné sole L-tyrosinu je až na intenzitu iontů shodné se spektrem volného L-tyrosinu.



Obr. 3.4: Hmotnostní spektrum +MS: a) volný L-tyrosin b) draselná sůl L-tyrosinu

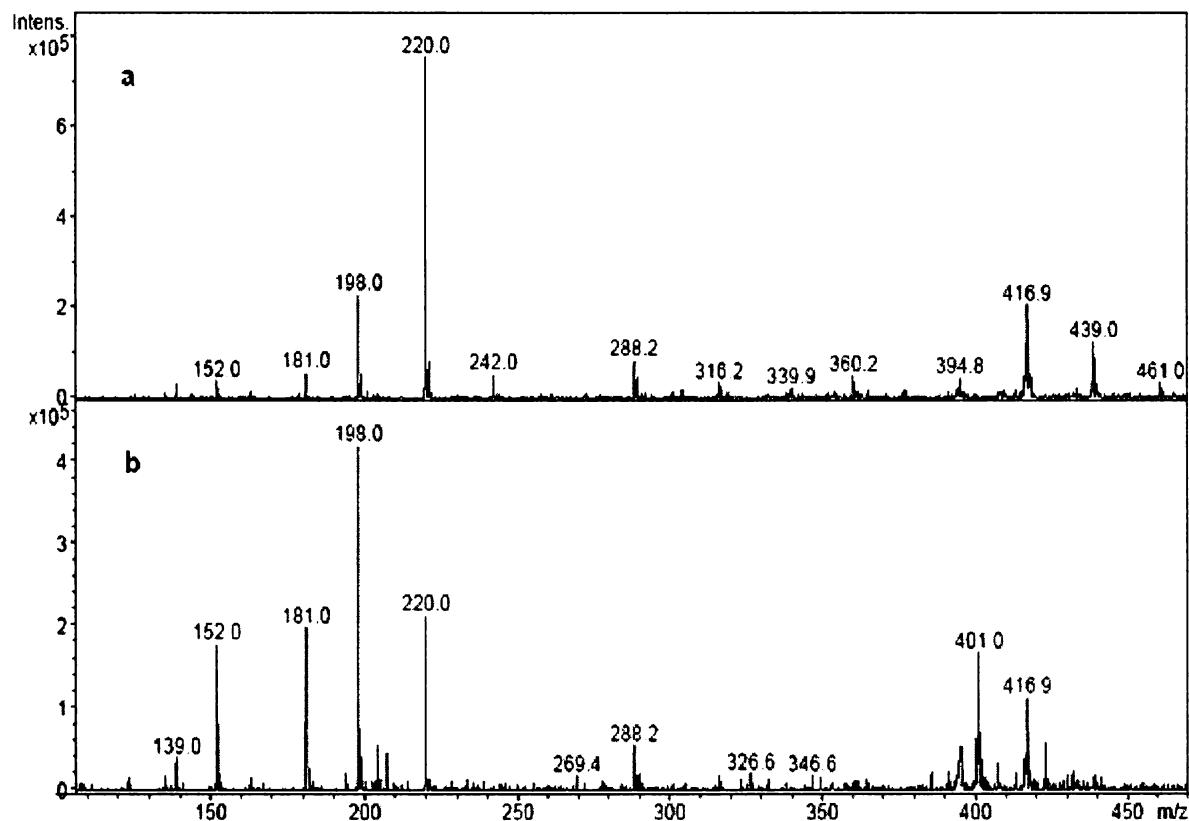
Na hmotnostním spektru obr. 3.5 byly zaznamenány a zinterpretovány získané ionty, které byly analyzovány v negativním modu, a) volný L-tyrosin b) draselná sůl L-tyrosinu. Nejintenzivnější ion  $m/z$  179,9 odpovídá molekulárnímu aduktu  $[M-H]^-$ , ion  $m/z$  360,9  $[2M-H]^-$  a ion  $m/z$  383,0  $[2M-2H, +Na]^-$ . Obě hmotnostní spektra jsou shodná.



Obr. 3.5: Hmotnostní spektrum –MS: a) volný L-tyrosin b) draselná sůl L-tyrosinu

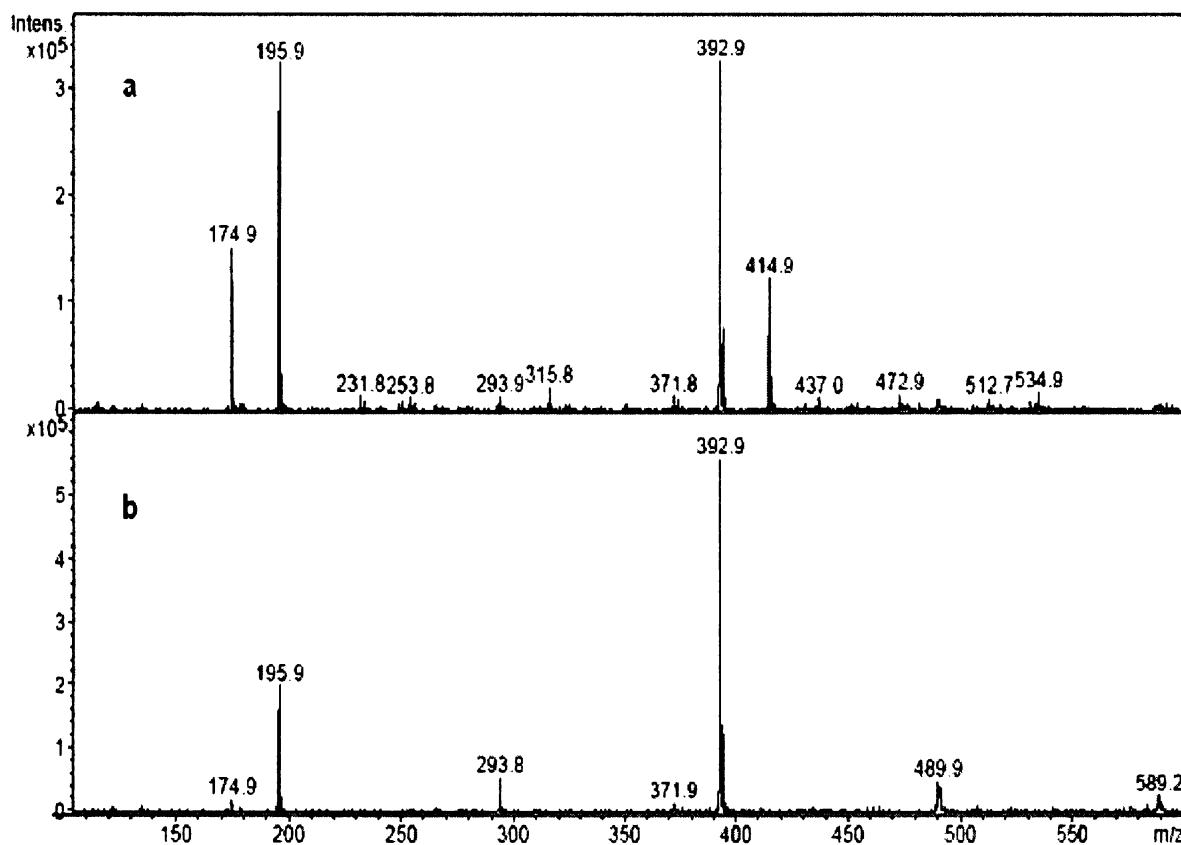
### 3.2.3 Analýza L-DOPA a derivátů

Následujícím zobrazovaným spektrem je a) volná L-DOPA ( $M_r = 197\text{g/mol}$ ) a b) lithná sůl L-DOPA v pozitivním modu obr. 3.6. Nacházejí se zde nečistoty z předchozího měření ve formě iontů  $m/z$  152,0 a ion  $m/z$  181,0. Dále jsou zde interpretovány ionty  $m/z$  198,0, který odpovídá L-DOPA protonizované vodíkem  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , ion  $m/z$  220,0  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  a ion  $m/z$  416,9  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ . Odlišným iontem v hmotnostním spektru lithné soli je ion  $m/z$  401,0, který odpovídá molekulárnímu aduktu  $[2\text{M}+{}^7\text{Li}]^+$ . K dekarboxylaci molekuly nedochází.



Obr. 3.6: Hmotnostní spektrum +MS: a) volná L-DOPA b) lithná sůl L-DOPA

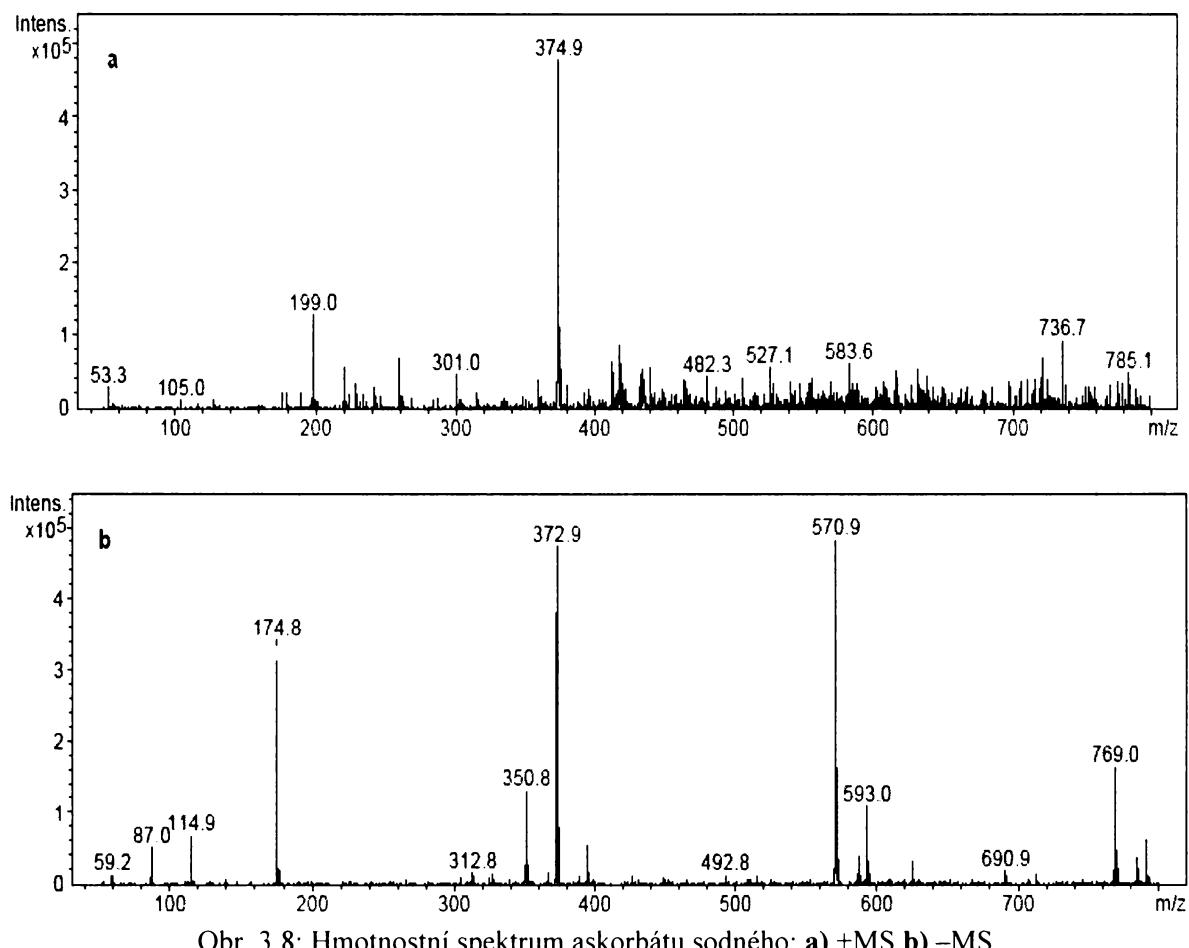
Na obr. 3.7 je zobrazeno hmotnostní spektrum a) volná L-DOPA, b) lithná sůl L-DOPA v negativním modu. Jsou zde interpretovány nejintenzivnější ionty  $m/z$  195,9, který odpovídá deprotonizovanému molekulárnímu aduktu  $[M-H]^-$ , ion  $m/z$  392,9  $[2M-H]^-$  a v hmotnostním spektru volné kyseliny ještě navíc ion  $m/z$  414,9 odpovídající  $[2M-2H, +Na]^+$ . Jedná se o navazování sodíku na volnou L-DOPU a k vytvoření tak její sodné sole. Ion  $m/z$  174,9 je pravděpodobně nečistota z předešlého měření.



Obr. 3.7: Hmotnostní spektrum –MS: a) volná L-DOPA b) lithná sůl L-DOPA

### 3.2.4 Analýza askorbátu sodného

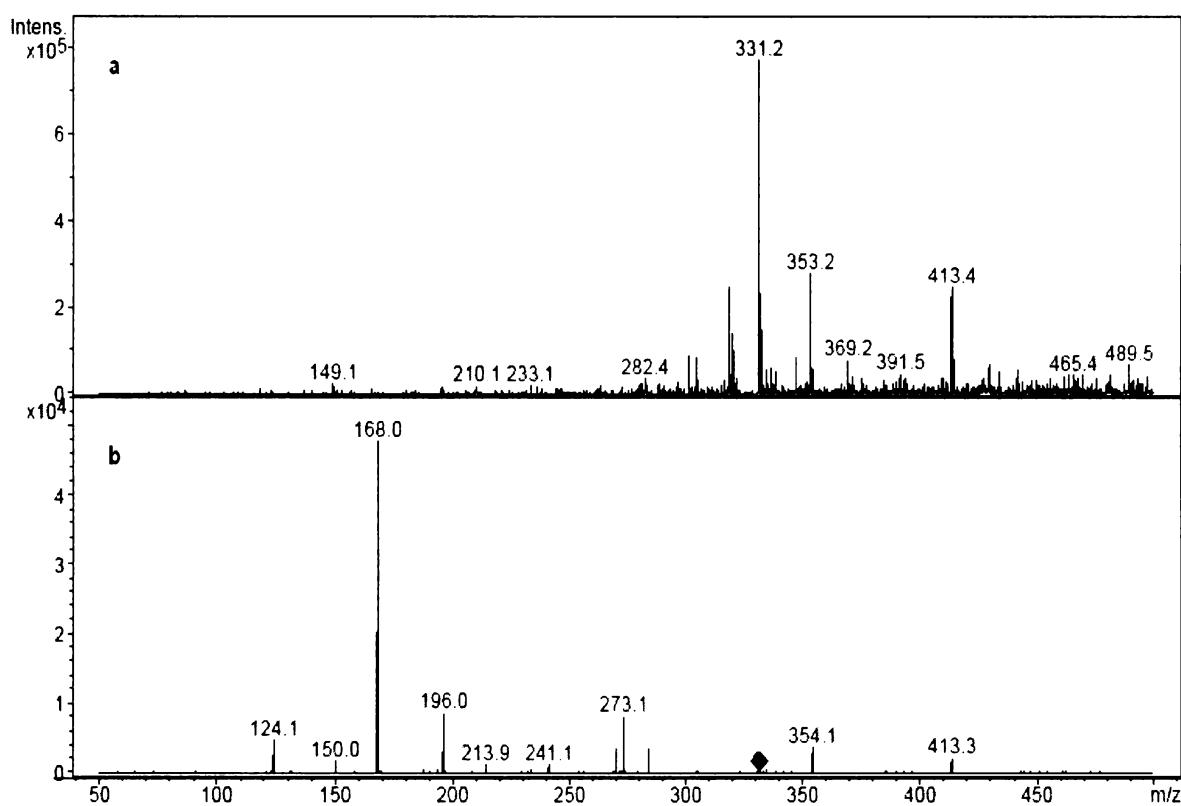
Na obr. 3.8a) je uvedeno hmotnostní spektrum askorbátu sodného ( $M_r = 374\text{g/mol}$ ) v pozitivním modu. Jsou zde zobrazeny nejintenzivnější ionty  $m/z$  199,0 odpovídající molekulárnímu aduktu  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  a ion  $m/z$  374,9, který odpovídá  $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ . Na obr. 3.8b) je zaznamenané hmotnostní spektrum v negativním modu. Zinterpretována byla většina iontů. Ion  $m/z$  174,8  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , ion  $m/z$  372,9  $[\text{2M}-2\text{H}, +\text{Na}]^-$ , ion  $m/z$  570,9  $[\text{3M}-3\text{H}, +2\text{Na}]^-$  a ion  $m/z$  769,0  $[\text{4M}-4\text{H}, +3\text{Na}]^-$ . Jedná se o analogickou řadu s postupným přídavkem molekulárního aduktu  $[\text{M}-\text{H}, +\text{Na}]$ .



Obr. 3.8: Hmotnostní spektrum askorbátu sodného: a) +MS b) -MS

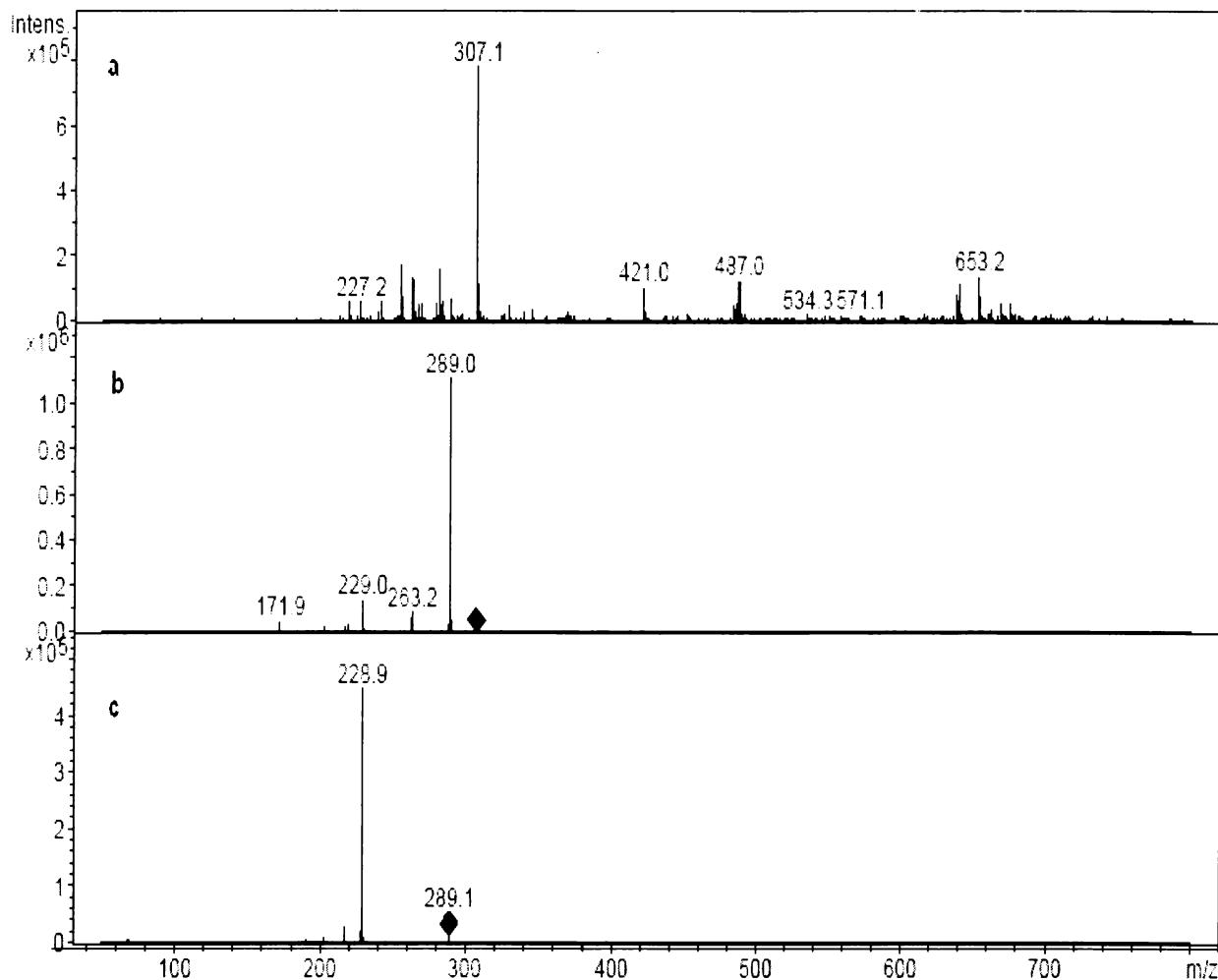
### 3.2.5 Analýza TM-HIDA

Na následujícím hmotnostním spektru je zobrazena analýza TM-HIDA ( $M_r = 308$  g/mol) obr. 3.9. V pozitivním modu byly zaznamenány ionty  $m/z$  331,2 odpovídající molekulárnímu aduktu  $[M+Na]^+$ . Tento ion jsme fragmentovali v iontové pasti za vzniku dceřiného iontu  $m/z$  168,0. Vzniklý ion odpovídá monosodné soli kyseliny N-methyl iminodioctové. Ionty  $m/z$  353,2 a  $m/z$  413,4 jsou pravděpodobně nečistoty.



Obr. 3.9: Hmotnostní spektrum: a) TM-HIDA +MS b) izolace iontu  $m/z$  331,2

Hmotnostní spektrum v negativním modu TM-HIDA je uvedeno na obr. 3.10. Jako prekurzor pro získání dceřiných iontů byl vybrán molekulární ion  $m/z$  307,1  $[\text{M}-\text{H}]^-$ . V iontové pasti byl tento ion fragmentován a produkty rozpadu byly zaznamenány jako spektrum dceřiných iontů obr. 3.10b). Ion  $m/z$  289,0  $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^-$  jsme znova fragmentovali v iontové pasti za vzniku dceřiného iontu  $m/z$  228,9, který odpovídá odštěpení kyseliny octové  $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{COOH}]^-$  obr. 3.10c).



Obr. 3.10: Hmotnostní spektrum: a) TM-HIDA -MS b) izolace iontu  $m/z$  307,1  
c) izolace iontu  $m/z$  289,0

## 4 ZÁVĚR

Předkládaná bakalářská práce byla zaměřena na chromatografickou a hmotově spektrometrickou analýzu s elektrosprejovou ionizací aromatických kyselin a derivátů. Ke stanovení čistoty byla použita metoda HPLC s isokratickou elucí. Čistota látek byla zohledněna na procenta podle výšky a plochy píků analytů. Na základě naměřených hmotnostních spekter metodou ESI/MS bylo zjištěno chování aromatických kyselin a jejich derivátů v negativním a pozitivním modu. V hmotnostních spektrech byly interpretovány nejintenzivnější ionty.

Pro analýzu v negativním modu bylo použito prostředí o pH větším než 4, protože při kyselejším pH se systém chová chaotivně a naměřené výsledky se obtížně interpretují. Analýza pozitivního modu však vyžaduje slabé okyselení pro lepší tvorbu protonizovaných aduktů. Proto je doporučeno stanovovat látky s pH alkalickým nebo slabě kyselým v závislosti na stanovovaném modu.

Iontové studie zaznamenávají v negativním modu deprotonizovaný ion  $[M-H]^-$ , deprotonizovaný dimerní ion  $[2M-H]^-$  a deprotonizovaný dimerní ion v páru se sodíkem  $[2M-2H + Na]^-$ , jak i konstatuje práce [3]. Naproti tomu v pozitivním modu se vyskytuje protonizovaný ion  $[M+H]^+$ , protonizovaný dimerní ion  $[2M+H]^+$  a protonizovaný dimerní ion v páru se sodíkem  $[2M+2H+Na]^+$ . V některých případech se můžou vyskytovat i trimerní ionty.

Přítomnost sodíku, který ve sloučenině není, může být způsobena kontaminací vzorku, rozpouštědlem nebo laboratorním sklem [2]. Jeho přítomnost může být také způsobena častým používáním acetátového pufru na bázi  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , protože některé polární látky nejsou schopny v ESI vytvářet ionty. Tato teorie by se mohla prokázat změnou používaného pufru, a tedy změnou pozadí. Avšak tato teorie nemohla být ověřena z důvodu velkého využití přístroje a možného poškození tak výsledků jiných analýz, které jsou kalibrovány na hodnoty se sodíkovým pozadím.

Některé výsledky analýz, např. analýza kyseliny benzoové lze porovnat s jinými podobnými studiemi [28]. Analýza této látky se shoduje se známými údaji popsané v literatuře.

# LITERATURA

- [1] Ubík K.: *Spojení vysokoučinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS)* (Holčapek M.-editor), Univerzita Pardubice, kapitola 1, Úvod do organické hmotové spektrometrie 6 (2001).
- [2] Galceran M.T., Moyano E.: *Journal of Chromatography A* **683**, 9 (1994).
- [3] Schug K., McNair H.M.: *Journal of Separation Science* **25**, 760 (2002).
- [4] Horning E.C., Horning M.G., Carroll D.I., Dyadic I., Stillwell R. N.: *Analytical Chemistry* **45**, 936 (1973).
- [5] Carroll D.I., Dzidic I., Stillwell R.N., Horning M.G., Horning E.C.: *Analytical Chemistry* **46**, 706 (1974).
- [6] Ryska M.: *Spojení vysokoučinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS)* (Holčapek M.-editor), Univerzita Pardubice, kapitola 14, Kvantita v HPLC/MS 113 (2001).
- [7] Novák P.: *Spojení vysokoučinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS)* (Holčapek M.-editor), Univerzita Pardubice, kapitola 17, Praktické aspekty spojení LC/MS: miniaturizace pro bioaplikace 125 (2001).
- [8] Baldwin M.A., McLafferty F.W.: *Organic Mass Spektrometry* **7**, 1111 (1973).
- [9] Holčapek M.: *Spojení vysokoučinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS)* (Holčapek M.-editor), Univerzita Pardubice, kapitola 3, HPLC/MS od pohyblivého pásu k elektrospreji 31 (2001).
- [10] Navrátil L., Kubeš V.: *Spojení vysokoučinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS)* (Holčapek M.-editor), Univerzita Pardubice, kapitola 15, Iontová past vs. trojitý kvadrupól v kvantitativní HPLC/MS analýze 117 (2001).

- [11] Lemr K.: *Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS)* (Holčapek M.-editor), Univerzita Pardubice, kapitola 6, Ionizace elektrosprejem 51 (2001).
- [12] Yamashita M., Fenn J.B.: *Journal of Physical Chemistry* **88**, 4451 (1984).
- [13] Yamashita M., Fenn J.B.: *Journal of Physical Chemistry* **88**, 4471 (1984).
- [14] Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.K., Whitehouse C.M.: *Science* **246**, 64 (1989).
- [15] Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.K.: *Mass spectrometry* **9**, 37 (1990).
- [16] Smith R.D., Loo J.A., Edmonds C.G., Barinaga C.J., Udseth H.R.: *Analytical Chemistry* **62**, 882 (1990).
- [17] Huang E.C., Wachs T., Conboy J.J., Henion J.D.: *Analytical Chemistry* **62**, 713A (1990).
- [18] Mann M.: *Organic Mass Spectrometry* **25**, 575 (1990).
- [19] Whitehouse C.M., Dreyer R.N., Yamashita M., Fenn J.B.: *Analytical Chemistry* **57**, 675 (1985).
- [20] Bruins A.P., Covey T.R., Henion J.D.: *Analytical Chemistry* **59**, 2642 (1987).
- [21] Covey T.R., Bonner R.F., Shusham B.I., Henion J.D.: *Rapid Commun. Mass Spectrometry* **2**, 249 (1988).
- [22] Huang E.C., Henion J.D.: *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1**, 158 (1990).
- [23] Olivares J.A., Nguyer J.A., Yonker C.R., Smith R.D.: *Analytical Chemistry*, **59** 1230 (1987).
- [24] Smith R.D., Olivares J.A., Nguyen N.T., Udseth H.R.: *Analytical Chemistry*, **60** 436 (1988).
- [25] Udseth H.R., Loo J.A., Smith R.D.: *Analytical Chemistry* **60** 1948 (1988).

- [26] Verner P.: *Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS)* (Holčapek M.-editor), Univerzita Pardubice, kapitola 4, Úvod do techniky získávání dat technikou HPLC/MS 39 (2001).
- [27] Ubik K.: *Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS)* (Holčapek M.-editor), Univerzita Pardubice, kapitola 10, Spojení HPLC/EI-MS a interpretace EI hmotových spekter 80 (2001).
- [28] Shug K., McNair H.M.: *Journal of Chromatography A* **531**, 985 (2003)