

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie

Porovnání ESI a APCI ionizace při vývoji UHPLC-
MS/MS metodiky pro stanovení fenolických
kyselin

Autor práce: Stanislav Pecha

Vedoucí práce: doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Vedoucí katedry: prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Datum: 2015 Hradec Králové

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Stanislav Pecha

Školitel: doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Název diplomové práce: **Porovnání ESI a APCI ionizace při vývoji UHPLC-MS/MS metodiky pro stanovení fenolických kyselin.**

Fenolické kyseliny jsou aromatické sekundární metabolity široce rozšířené v celé rostlinné říši. Tato práce byla zaměřena na vývoj metody pro stanovení skupiny fenolických kyselin pomocí ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem typu trojitého kvadrupólu. K separaci analytů byla použita kolona BEH C₁₈ (1,7 μm; 2,1 x 100 mm). V rámci této práce byly optimalizovány parametry hmotnostního spektrometru s využitím ionizace elektrosprejem a chemické ionizace za atmosférického tlaku. Na závěr byla hodnocena citlivost, linearita a opakovatelnost metody.

Nejprve byl proveden základní sken směsi analytů a byly vybrány vhodné prekurzorové ionty. Následovala optimalizace iontového zdroje (ionizace ESI⁻ a APCI⁻). Dalším krokem bylo provedení skenu produktových iontů a výběr vhodných iontových přechodů pro kvantifikační mód SRM a optimalizace jejich kolizních energií. Po optimalizaci nastavení byla změřena opakovatelnost (RSD < 1% pro retenční čas; RSD < 10% pro plochu píků, kromě isoferulové, skořicové a sinapové), citlivost (LOQ = 0,007 – 6,600 μg·ml⁻¹ pro ESI⁻ a 0,007 – 6,600 μg·ml⁻¹ pro APCI⁻) a linearita (všechny analyty $r^2 \geq 0,9900$ mimo isoferulové, skořicové a sinapové).

Elektrosprej v negativním módu byl pro analýzu směsi fenolických kyselin za těchto podmínek vybrán jako nejvhodnější. Citlivost pro kyseliny: vanillovou, isoferulovou a skořicovou byla nízká.

Klíčová slova: kys. shikimová, kys. gallová, kys. protokatechová, kys. gentisová, kys. chlorogenová, kys. vanillová, kys. kávová, kys. syringová, kys. o-kumarová, kys. m-kumarová, kys. p-kumarová, kys. ferulová, kys. isoferulová, kys. sinapová, kys. rozmarýnová, kys. skořicová, UHPLC-MS/MS, fenolické kyseliny.

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Stanislav Pecha

Supervisor: Assoc. Prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Title of Graduation Thesis: **A comparison of ESI and APCI ionization during the development of UHPLC-MS/MS method for the determination of phenolic acids.**

Phenolic acids are aromatic secondary metabolites which are widely spread in the whole plant kingdom. The thesis deals with the development of the method for the determination of the group of phenolic acids by ultra high performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry. Chromatographic column BEH C₁₈ (1.7µm; 2.1 x 100 mm) was used for the separation of analytes. The optimization of the mass spectrometry parameters was conducted for electrospray ionisation (ESI) and atmospheric pressure chemical ionization (APCI). Sensitivity, linearity and repeatability of this method were finally assessed.

The full scan of mixture of analytes was firstly performed and suitable precursor ions were chosen. In the following step the ion source (ESI⁻ and APCI⁻) was optimized. The next step was scanning of product ions and choosing suitable ion transitions for quantification mode SRM and optimizing their collision energies. The repeatability after the optimization of the parameters (RSD < 1% for retention time; RSD < 10% for the area under the curve, except for isoferulic, cinnamic, sinapic acid), sensitivity (LOQ = 0,007 – 6,600 µg·ml⁻¹ for ESI⁻ and 0,007 – 6,600 µg·ml⁻¹ for APCI⁻) and linearity (of all analytes $r^2 \geq 0,9900$ except for isoferulic, cinnamic, sinapic acid) were measured.

Electrospray in negative mode was found to be more suitable for the analyses of the mixture of phenolic acids. The sensitivity for acids was found to be low for: vanillic, isoferulic and cinnamic.

The keywords: shikimic acid, gallic acid, protocatechuic acid, gentisic acid, chlorogenic acid, vanillic acid, caffeic acid, syringic acid, p-coumaric acid, o-coumaric acid, m-coumaric acid, ferulic acid, isoferulic acid, sinapic acid, rosmarinic acid, cinnamic acid, UHPLC-MS/MS, phenolic acids.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 15. 5. 2015

.....

Stanislav Pecha

Děkuji doc. PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce, cenné rady, připomínky, pomoc při zpracování práce a za vstřícnost a veškerý věnovaný čas. Dále děkuji pracovníkům Katedry analytické chemie za pomoc, ochotu a příjemnou atmosféru. Také děkuji rodině a obzvláště přítelkyni za trpělivost a podporu.

Obsah:

1. Úvod.....	10
2. Cíl a zadání diplomové práce	12
3. Teoretická část	13
3.1 Chromatografie	13
3.1.1 Kapalinová chromatografie, HPLC, UHPLC.....	13
3.1.2 Inovace v UHPLC instrumentaci.....	13
3.1.3 Vývoj a inovace kolon pro UHPLC.....	15
3.2 Hmotnostně spektrometrická detekce	18
3.2.1. Ionizace.....	18
3.2.2 Separace iontů	22
3.2.3 Pracovní módy hmotnostního spektrometru, typy záznamů.	25
3.3 Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie	27
3.4 Fenolické kyseliny	28
3.4.1 Struktura a vlastnosti zkoumaných fenolických kyselin.....	28
Extrakt z Třapatky nachové	31
4. Experimentální část	32
4.1 Použité chemikálie a přístrojové vybavení	32
4.1.1 Standardní látky	32
4.1.2 Rozpouštědla	33
4.1.3 Další použité chemikálie a roztoky	33
4.1.4 Přístrojové vybavení.....	33
4.2 Pracovní postup.....	34
4.2.1 Příprava standardů jednotlivých fenolických kyselin a jejich směsí.....	34
4.2.2 Stabilita a uchovávání analytů.....	35
4.2.3 Příprava mobilní fáze	35
4.2.4 Výchozí chromatografické parametry.....	35

4.2.5 Optimalizace nastavení hmotnostního spektrometru.....	35
5. Výsledky a diskuse	38
5.1 Výchozí chromatografické podmínky.	38
5.2 Optimalizace podmínek pro detekci hmotnostním spektrometrem	38
5.2.1 Výběr prekurzorových iontů.....	38
5.2.2 Optimalizace parametrů iontového zdroje s využitím SIM experimentů.....	43
5.2.3 Výběr produktových iontů.....	54
5.2.4 Optimalizace iontových přechodů SRM	64
5.3 Opakovatelnost nástřiku	70
5.4 Ověření linearity a citlivosti metody.....	71
6. Závěr	73
7. Použitá literatura	75

Seznam zkratk:

APCI - chemická ionizace za atmosférického tlaku

C-CF - kyselina cis-kávová

C-CT - kyselina cis-monokafoeolvinová

ESI - ionizace elektrosprejem

Fer - kyselina ferulová

Gall - kyselina gallová

Gen - kyselina gentisová

HBA - kyselina hydroxybenzoová

HFA - kyselina hydroxyfenoctová

HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Chlo - kyselina chlorogenová

IS - vnitřní standard

Isof - kyselina isoferulová

Káv - kyselina kávová

LC - kapalinová chromatografie

LOD - limit detekce

LOQ - limit kvantifikace

mKum - kyselina m-kumarová

MS - hmotnostní spektrometrie

oKum - kyselina o-kumarová

pKum - kyselina p-kumarová

Prot - kyselina protokatechová

Rozm - kyselina rozmrýnová

Sal - kyselina salicylová

Shik - kyselina shikimová

Sin - kyselina sinapová

Skoř - kyselina skořicová

Syr - kyselina syringová

T-CF - kyselina trans-kávová

UHPLC - ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie

UHPLC -MS/MS - ultra vysokoučinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií

Van - kyselina vanillová

1. Úvod

V posledních desetiletích se stále více zvyšují nároky na analytická hodnocení. Roste potřeba metod umožňujících účinnou a rychlou separaci látek a zároveň citlivou detekci a analýzu s využitím minimálního množství vzorku, rozpouštědel a dalších látek potřebných k analýze. Zvyšují se nejen požadavky na přesnost, rychlost separace a analýzy, ale i na kvalitu dat a univerzálnost metody. Neméně významným faktorem je také uživatelská přívětivost, možnost automatizace a snaha snížit náklady na analytický proces.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je jednou z metod, která prošla a stále prochází velkým vývojem. Těší se značnému zájmu a v každodenní praxi ji dnes využívá řada analytických laboratoří. Úspěchy jsou dány hlavně vývojem dokonalejších kolon s náplněmi s menší velikostí a lepší kvalitou částic, dokonalejších pump a celého zařízení schopného pracovat za vyššího tlaku a s menšími objemy. Zároveň jsou využívány detekční systémy schopné provádět analýzy větší rychlostí a provádět sběr dat v kratších intervalech. Široké využití vysokoúčinné a ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie pak umožnily kvalitně zpracované, komerčně dostupné sestavy.

Nejrozšířenějším typem detektorů pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii, jsou pravděpodobně spektrofotometrické detektory. Ovšem hmotnostně spektrometrická detekce umožňuje provést potvrzení identity látky na základě molekulové hmotnosti a strukturně specifických fragmentů.

Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie je klíčové pro analýzu reálných vzorků. Umožňuje velmi rychlé a přesné analýzy složitých směsí s velkým počtem komponent. Spojení těchto technik je vhodné pro analýzu biologických vzorků ve farmaceutickém výzkumu, výrobě, klinické praxi a v řadě jiných oblastí. Je vhodné i k důkazu a stanovení rostlinných obsahových látek jako jsou flavonoidy, fenolické kyseliny a řada dalších.

Fenolické kyseliny patří do široké skupiny antioxidantů – látek, které omezují aktivitu kyslíkových radikálů. Jsou přírodního charakteru a můžeme je nalézt v různých částech rostlin např. v kořenech, listech, plodech a jako jejich složka tvoří nedílnou součást naší potravy. Nejvýznamnějším přínosem fenolických látek je pravděpodobně jejich antioxidační působení v organismu. Působí preventivně proti koronárním

chorobám, snižují riziko rakovinových onemocnění a působí proti virům. Znalosti o tom, zda a v jakém množství jsou rostlinné polyfenoly resorbovány z trávicího traktu, jaké je rozpětí koncentrací v krevní plazmě, jak jsou metabolizovány a vylučovány z organismu, nejsou zcela kompletní. Totéž by se dalo říct i o znalostech o jejich obsahu v potravinách. Vypracování metod pro jejich důkaz a stanovení, ideálně ve složitějších směsích, je klíčové pro zodpovězení těchto otázek.

2. Cíl a zadání diplomové práce

Tato diplomová práce se zabývá stanovením šestnácti fenolických kyselin pomocí ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem typu trojitého kvadrupólu (UHPLC-MS/MS).

Prvním krokem bude provedení základního skenu směsi analytů, aby mohly být vybrány vhodné prekurzorové ionty. Dále bude nutné zjistit optimální hodnoty parametrů hmotnostní detekce. Pro ionizaci bude použit elektrosprej a chemická ionizace za atmosférického tlaku. Laděné parametry zahrnují: napětí na kapiláře, napětí na vstupním kuželu, napětí na extraktoru, napětí na iontové optice, desolvační teplotu, rychlost průtoku desolvačního plynu, rychlost průtoku plynu na vstupním kuželu a proud vkládaný na jehlu. Dalším cílem bude výběr vhodných iontových přechodů a optimalizace nastavení jejich kolizních energií, vhodných pro kvantitativní měření v módu selektivního záznamu jedné reakce (SRM). Nakonec bude změřena opakovatelnost metody, linearita a citlivost.

Na základě výsledků bude posouzena vhodnost této metody pro stanovení zadaných fenolických kyselin s využitím ionizace elektrosprejem a chemické ionizace za atmosférického tlaku.

3. Teoretická část

3.1 Chromatografie

Chromatografie je separační metoda, která je založena na rozdílné distribuci separovaných látek mezi dvě nemísitelné fáze. Z nichž jedna je nepohyblivá (stacionární) a druhá pohyblivá (mobilní), pohybující se skrze nebo podél stacionární fáze určitým směrem. Mobilní fáze může být kapalina, plyn nebo superkritická tekutina. Stacionární fáze může být pevná látka, gel nebo kapalina ukotvená na pevném nosiči, který může nebo nemusí přispívat k separačnímu ději [1][2].

3.1.1 Kapalinová chromatografie, HPLC, UHPLC

V průběhu vývoje kapalinové chromatografie byla zvyšována separační účinnost chromatografických kolon snížením průměru částic náplně kolony, zúžením jejich velikostní distribuce a zlepšením jejich tvaru. S tím souvisel i nárůst vstupních tlaků potřebných k dosažení optimálních průtokových rychlostí. Používané označení HPLC (High Performance Liquid Chromatography) bylo proto někdy chybně interpretováno jako vysokotlaká kapalinová chromatografie (High-Pressure Liquid Chromatography). Zlepšování kvality náplní a kolon doprovázel i vývoj příslušné instrumentace umožňující jejich využití. Se zmenšováním částic až k dnešním rozměrům 1,3 – 5 μm docházelo i ke zmenšování kolon. Dnešní konvenčně používané kolony mají vnitřní průměr 2,1 – 5 mm a délku 10 až 300 mm [1][3].

Při zmenšení částic pod 2 μm již nebyl standardní tlakový limit 40 MPa konvenčních HPLC zařízení dostačující. Proto byla na trh uvedena další generace kapalinových chromatografů označovaná jako UHPLC (ultra-high performance liquid chromatography) umožňující pracovat při tlacích do 100 až 120 MPa [1][4].

3.1.2 Inovace v UHPLC instrumentaci

Použití kolon s náplněmi pod 2 μm nevyhnutelně zvyšuje zpětný tlak, při kterém musí UHPLC systém pracovat. V současnosti jsou komerčně dostupná zařízení schopná pracovat při tlacích v rozmezí asi 60 – 140 MPa. K dispozici je technologie pro tvorbu vysokotlakého i nízkotlakého gradientu. Zařízení pro dávkování vzorku jsou vyladěná pro menší objemy nástřiků. Kolonové termostaty (ohříváče) lépe přispívají ke snížení

tepelných gradientů. Je dostupný také široký výběr detektorů pro UHPLC systémy včetně: spektrometrických (detektor s diodovým polem; s programovatelnou vlnovou délkou), fluorescenčních detektorů, refraktometrických detektorů, univerzálních detektorů na bázi aerosolu (odpařovací detektor rozptylu světla ELSD, detektor nabitého aerosolu CAD a další), elektrochemických detektorů (amperometrické a coulometrické detektory), celé řady hmotnostních spektrometrů a dalších [1, 5].

3.1.2.1 Technická omezení a současný vývoj UHPLC instrumentace

Pro úspěšné fungování UHPLC zařízení musí být zvaženy následující charakteristiky systému[6]:

- horní tlakový limit systému a rozsah průtokových rychlostí
- typ termostatu kolony jeho řízení
- mrtvý objem systému a s tím související mimokolonové příspěvky
- časové zpoždění gradientu
- rychlost sběru dat detektorem

První generace UHPLC zařízení pracovala maximálně při tlaku 100 MPa v případě průtokových rychlostí do 1 ml·min⁻¹. Při navýšení průtokové rychlosti na 2 ml·min⁻¹ horní tlakový limit lineárně klesl na 60 MPa. Dnešní UHPLC systémy umožňují pracovat při tlacích 120 – 140 MPa (horní hranice) při průtokových rychlostech 2 – 5 ml·min⁻¹. V tomto horním rozmezí je ovšem výběr kolon schopných pracovat při tlacích nad 120 MPa zatím omezený. Vzhledem k ceně systému a faktu, že značný nárůst tlaku je způsoben spojovacím zařízením (kapilární spoje), jsou k dispozici jako levnější alternativa dostupné i HPLC/UHPLC hybridní systémy schopné pracovat při tlacích 60 - 80 MPa a průtokových rychlostech 5 ml·min⁻¹[6][7].

Dalším důležitým faktorem je mrtvý objem systému a s tím spojené mimokolonové rozmývání zón. Vliv tohoto faktoru roste s průměrem a délkou kolony. Proto je objem a délka spojovacích zařízení minimalizována a stejný trend je patrný i u dávkovacích zařízení (rychlé a opakovatelné nástřiky a objem 0,1 – 2 µl) a průtokových cel detektoru (objemy 0,5 – 2 µl pro UV detektor bez negativního dopadu na citlivost) [6][7].

Časové zpoždění gradientu (V_d - dwell volume), které vyjadřuje objem od bodu smísení rozpouštědel do čela analytické kolony, musí být také bráno v potaz, obzvláště při rychlých gradientových analýzách. Tento objem vystavuje analyty nechtěným izokratickým podmínkám daným počátečním složením mobilizace. To zvyšuje čas analýzy, snižuje účinnost separace a může způsobovat problémy při přenosu metody na jiný typ zařízení. První UHPLC systémy byly vybaveny vysokotlakým směsným systémem (binární vysokotlaká čerpadla), kdy každé rozpouštědlo bylo čerpáno vlastním čerpadlem (V_d 200 – 300 μ l). Postupný vývoj vedl až k dnešním mikrofluidním směšovačům, které mají objem 20 μ l až 35 μ l. Druhý typ používaného systému (nízkotlaký systém) mísí rozpouštědla před vysokotlakou pumpou. Díky použití pouze jednoho čerpadla jsou nižší nároky na cenu i na údržbu zařízení a často je umožněna větší flexibilita (možnost použití tří i vícerozložkových mobilních fází) ovšem nevýhoda je větší V_d (300 – 900 μ l) snižující chromatografickou účinnost[6][7][8][9].

Vzhledem k úzkým elučním křivkám (píkům) produkovaných kolonami se částicemi < 2 μ m (v některých případech pod 1 s) je třeba, aby použité detektory měly vysokou frekvenci sběru dat (alespoň 10 – 15 bodů na pík). Dnešní spektroskopické detektory (UV – DAD, UV, atd.) dostupné pro UHPLC systém nabízí frekvenci sběru dat v rozmezí 80 – 200 Hz, což je naprosto dostačující pro jakékoli použití. Dosažení vysoké frekvence sběru dat u hmotnostních spektrometrů je ale obtížnější[7][10].

3.1.2.2 Budoucí směry ve vývoji UHPLC

Mezi technická řešení, jejichž zavedení by mohlo zlepšit současný výkon UHPLC technologie patří[7]:

- zvýšení systémového tlaku nad 140 MPa
- zvýšení teploty MF (> 60°C)
- redukce velikosti částic (< 1,5 μ m) nebo modifikace distribuce velikosti částic
- použití povrchově porézních částic < 2 μ m

3.1.3 Vývoj a inovace kolon pro UHPLC

První komerčně dostupné kolony navržené přímo pro UHPLC byly naplněny částicemi o velikosti 1,7 μ m a měly rozměry 2,1 x 50 a 2,1 x 100 mm. Jednalo se o porézní hybridní částice typu (BEH = bridged etylen hybrid) s navázanými

oktadecylovými skupinami a tyto kolony byly určeny pro separace na reverzních fázích pro analyty přibližně do molekulové hmotnosti 5 kDa. Postupem času bylo představeno množství stacionárních fází (s částicemi < 2 μm), jak hybridních, tak silikagelových modifikovaných různými ligandy a s různou povrchovou chemií. Dnes jsou dostupné UHPLC kolony nejen pro chromatografii na reverzních fázích ale i pro chromatografii v systému normálních fází, hydrofilní interakční chromatografii, vylučovací chromatografii, iontově párovou chromatografii a další. Jsou použitelné pro separaci analytů do molekulové hmotnosti až 2 MDa včetně biopolymerů a průmyslových polymerů. Zatímco aplikační různorodost UHPLC kolon byla výrazně rozvíjena, pokrok ve smyslu zvýšení účinnosti na jednotku délky kolony byl menší. Pokrok v tomto směru přinesly povrchně porézní částice (SCPs = solid core particle), nebo také superficiale porous, fused-core, core-shell apod.)[5][11][12]

3.1.3.1 Kolony plněné 2,6 – 2,7 μm SCPs

Na rozdíl od porézních částic běžně užívaných v HPLC, SCPs mají porézní slupku na neporézním jádře. První kolony naplnění SCPs částicemi o velikosti 2,7 μm s průměrem 4,6 mm byly určeny pro HPLC jako alternativa k UHPLC. Měly nabízet větší účinnost bez požadavku na vyšší tlak[13].

SCPs oproti plně porézním částicím s podobnou velikostí poskytují větší účinnost a také dochází pomaleji k poklesu účinnosti při průtokových rychlostech nad optimální hodnotou. Ke zvýšení účinnosti nejvíce přispívá snížení podélné difúze dané nižším objemem pórů a Eddyho difúze, která je způsobena rovnoměrnějším plněním chromatografické vrstvy a také díky snížení odporu proti převodu hmoty a snížení délky difúzních cest[13][5].

3.1.3.2 Kolony plněné částicemi < 2 μm SCPs

V současnosti není technologie SCPs částic vnímána jako alternativa k UHPLC, ale jako významný směr právě ve vývoji UHPLC kolon. Tyto částice poskytují možnost zvýšení účinnosti a rychlosti oproti plně porézním částicím < 2 μm . Za tímto účelem bylo třeba optimalizovat plnění kolon. První kolony s 1,7 μm SCPs částicemi nedosahovaly stabilně vyšší účinnosti, než nejlepší plně porézní částice. Dnes jsou dostupné i SCPs částice o průměru 1,3 μm , ale ve srovnání s 1,7 μm částicemi vyžadují pro stabilní průtok až dvojnásobně vyšší tlak, takže při optimální průtokové rychlosti

mohou být použity pouze kolony o délce 50 mm, a to UHPLC systémech s horním tlakovým limitem 120 MPa. Nově dostupné kolony s SCPs částicemi o velikosti 1,6 μm pak mají díky větší mezipovrchové porozitě a užší distribuci velikosti částic podobné tlakové požadavky jako kolony s 1,7 μm SCPs částicemi[14][15].

3.1.3.3 Technologie povrchově nabitých částic

Vlastnosti analytu a mobilní fáze mohou ovlivnit účinnost separace. Pozitivně nabitě analyty jako protonované báze často vedou ke vzniku širokých chvostujících píků. Jedním způsobem, jak tento efekt zmírnit obzvláště při použití mobilní fáze, jako je 0,1% kyselina mravenčí, je zabudování slabého pozitivního náboje na povrch částic. Kolony s touto technologií (CSH = charged surface hybrid) využívaly nejprve hybridní porézní částice o velikosti 1,7 μm . Nyní jsou k dispozici s touto technologií i kolony s 1,6 μm SCPs částicemi. Tyto kolony jsou vhodné pro separaci peptidů[16][5].

3.2 Hmotnostně spektrometrická detekce

Hmotnostně spektrometrická detekce je analytická metoda založená na rozdělení a detekci iontů v plynné fázi podle poměru hmotnosti a počtu kladných nebo záporných elementárních nábojů (m/z). Tento poměr je bezrozměrná veličina získaná vydělením hmotnosti iontu počtem elementárních nábojů bez ohledu na polaritu. Pro vyjádření hmotnosti může být použita i jednotka Dalton (Da) nebo atomová hmotnostní jednotka. Hmotnostní spektrometrie je velmi specifická metoda a poskytuje spektrální údaje o identitě látky. Je využívána v celé řadě odvětví (potravinová analýza, bioanalytické a environmentální analýzy, při výzkumu a vývoji nových lékových struktur apod.) [1, 10].

Analýza hmotnostním spektrometrem probíhá ve třech krocích. První fází je ionizace, kdy je třeba neutrální molekuly vorku převést do plynné fáze a ionizovat. Následně dochází k rozdělení iontů podle poměru m/z a k jejich urychlení v analyzátoru. Třetím krokem je detekce iontů v detektoru, zesílení signálu a záznam dat do podoby hmotnostních spekter. Součástí přístroje je navíc vakuový systém, ve kterém probíhá analýza a detekce iontů, zařízení pro zavádění vzorků (sonda), iontová optika k urychlení a fokusaci iontů a počítač s obslužným programovým vybavením na ovládání celého systému a ke sběru a zpracování získaných dat[17][18].

3.2.1. Ionizace

Žádná z ionizačních technik nepokrývá kompletní škálu polarit (od iontových až ke zcela nepolárním) a celý rozsah molekulových hmotností zkoumaných látek. Volba ionizační techniky, proto závisí na molekulové hmotnosti, polaritě, ale také na těkavosti látky a její tepelné stabilitě[19][1].

Ve spojení s kapalinovou chromatografií jsou používány nejčastěji techniky ionizace za atmosférického tlaku (API = Atmospheric Pressure Ionization). Mezi ně jsou řazeny ionizace eletrosprejem (ESI = electrospray ionization), chemická ionizace za amtosférického tlaku (APCI = Atmospheric Pressure Chemical Ionization), fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI = Atmospheric Pressure Photoionization) a ionizace desorpcí laserem za účasti matrice (MALDI = Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) [1][19][20].

V průběhu ionizace dochází zároveň k odstranění přebytku rozpouštědla, převedení molekul analytů do plynné fáze a k jejich ionizaci. Tyto techniky jsou řazeny mezi tzv. měkké ionizační techniky, protože v jejich průběhu nedochází k výraznější fragmentaci, jak je tomu u tvrdých ionizačních technik. Podle použitého módu nejčastěji vznikají protonované nebo deprotonované molekuly. Nejšetrnější ionizační techniky jsou ESI a MALDI, které umožňují i analýzu velkých polárních netěkavých molekul. Získaná hmotnostní spektra s využitím měkkých ionizačních technik, se mohou výrazně lišit podle typu ionizační techniky, pracovních podmínek a typu přístroje. Výhodou takto získaných spekter je jednodušší určení relativní molekulové hmotnosti [17][18].

3.2.1.1 Ionizace elektrosprejem

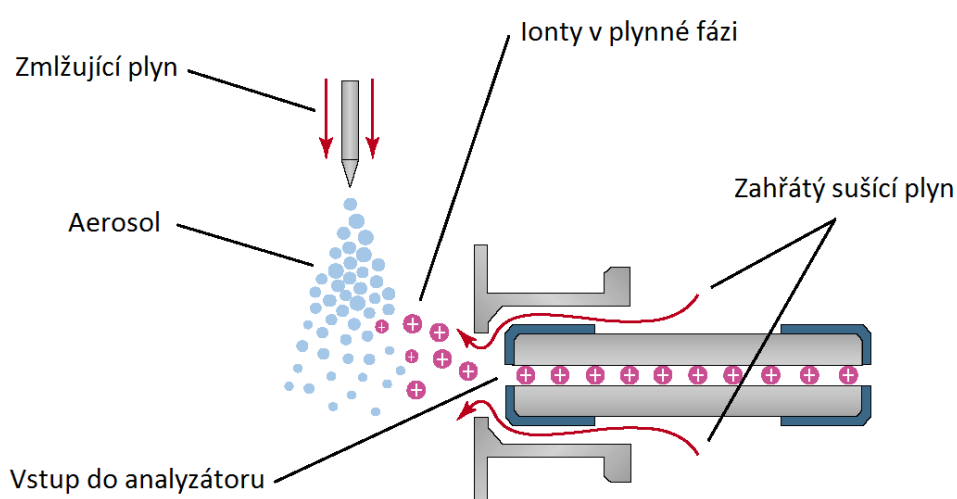
Ionizace elektrosprejem je v současnosti (spolu s APCI) nepoužívanější ionizační technika ve spojení s HPLC a umožňuje analyzovat středně polární až iontové látky. Nedá se použít při analýzách využívajících nepolární mobilní fáze a k analýze polárních sloučenin. Ve spojení s LC jsou nejčastěji používány průtokové rychlosti 1 μl – 1 ml (jednotky až desítky μl v případě přímé infúze). Z měkkých ionizačních technik je považována za nejšetrnější. Ve většině případů vznikají protonované $[M+H]^+$ nebo deprotonované $[M+H]^-$ molekuly v závislosti na použitém módu popřípadě aduktové ionty. K fragmentaci molekuly zpravidla nedochází nebo jen v omezené míře. Ve spektrech jsou pak často pozorovány ionty, které měly tendenci vznikat v roztoku. ESI technika se od ostatních odlišuje ve schopnosti vytvářet vícenásobně nabitě ionty. Díky tomu lze ionizovat molekuly s hmotností v řádech 100 kDa a analyzovat je hmotnostními spektrometry s mnohem menším rozsahem hodnot m/z (např. do 3000 Da). Tato ionizační technika umožňuje ionizovat a analyzovat peptidy, proteiny, sacharidy, nukleonové kyseliny, organické i anorganické sloučeniny [20][21][1]

3.2.1.1.1 Mechanismus ESI ionizace

Roztok s rozpuštěnými analyty je do iontového zdroje přiváděn kovovou kapilárou, na kterou je vloženo vysoké napětí (3 – 5 kV). Na výstupu z kapiláry pak dochází díky elektrochemickým procesům a za pomoci zmlžujícího plynu (desolvační plyn) ke vzniku nabitých kapiček s velkým množstvím kladných nebo záporných nábojů podle polaritě napětí na kapiláře. Vznik nabitých kapiček závisí na vloženém napětí,

složení eluentu, průtokové rychlosti, aditivech (hlavní iontové a povrchově aktivní látky), průměru a geometrii kapiláry, na teplotě a průtoku zmlžujícího plynu a také na koncentraci a struktuře analytu. Dále dochází k odpařování rozpouštědla a ke zvyšování hustoty povrchového náboje až k tzv. Rayleighově mezi stability, kdy odpudivé síly mezi ionty se shodným nábojem na povrchu kapaliny jsou v rovnováze s povrchovým napětím udržujícím kapku pohromadě. Těsně před dosažením tohoto bodu dochází ke štěpení, které je označováno jako Coulombická exploze. Při ní se kapka zpravidla nerozpadá na stejné části, ale uvolňuje množství malých kapének, čímž dochází k opětovné stabilizaci povrchových nábojů. Tento děj se opakuje až do stavu, kdy z malých vysoce nabitých kapiček dochází k uvolnění iontů do plynné fáze[21][18][14].

Přesný mechanismus přechodu iontů z kapiček do plynné fáze není zcela objasněn, hlavně protože tyto finální kapénky je velmi obtížné zkoumat. Jsou navrženy dva základní mechanismy. První předpokládá odpaření rozpouštědla až do vzniku iontů (Charge residue model) model zbytkového náboje. Druhý (ion evaporation = model vypaření iontů) předpokládá přímé uvolňování solvatovaných iontů z nabitých kapiček (s poloměrem $< 10 \mu\text{m}$)[18][21].



Obrázek 3.1: Schéma iontového zdroje ESI [19].

Vzniklé ionty pak přechází z atmosférické oblasti iontového zdroje do oblasti vakua hmotnostního analyzátoru. V průběhu tohoto děje dochází k značnému

ochlazování iontů, a to může vést k nežádoucí tvorbě klastrů. Tomuto ději zabraňuje jednak vyhřívání iontového zdroje a dále protiproud sušícího plynu (plyn na vstupním kuželu). Schéma ESI zachycuje obrázek 3.1[20].

3.2.1.2 Chemická ionizace za atmosférického tlaku

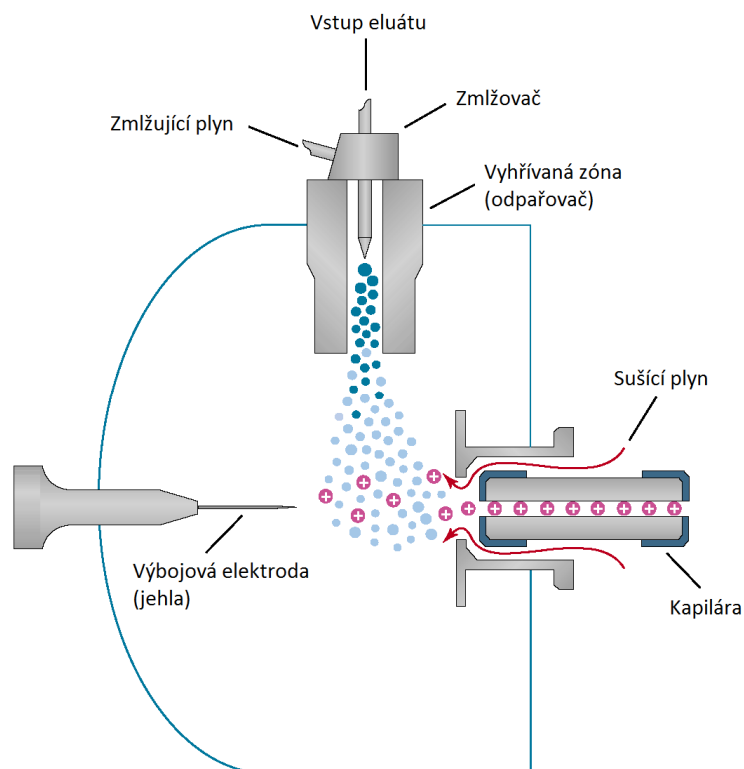
APCI ionizace je pravděpodobně druhá nejpoužívanější ionizační technika (po ESI) ve spojení s HPLC. Umožňuje analyzovat látky nepolární až středně polární. Tato ionizační technika je o něco méně šetrná než ESI. Ve spektrech jsou zpravidla pozorovány protonované nebo deprotonované molekuly analytů popřípadě aduktové ionty. Běžně jsou pak přítomny i fragmentové ionty. Výhodou oproti ESI je, že může být použita pro práci s nepolárními fázemi a k analýze nepolárních sloučenin. Běžně využívané průtokové rychlosti eluentu pro APCI ionizační zdroj ve spojení s LC se pohybují v rozmezí 0,1 – 1,5 ml/min (desítky až stovky pak pro přímou infúzi). APCI umožňuje ionizaci molekul přibližně do molekulové hmotnosti 2000 Da. Jen zřídka dochází ke vzniku vícenásobně nabitých iontů. Proto je tato metoda méně vhodná pro analýzu velkých biomolekul[18][20][21].

3.2.1.2.1 Mechanismus APCI ionizace

Eluent je přiváděn do iontového zdroje spojovací tryskou (kapilárou) skrze vyhřívanou zónu (nejčastěji 250 – 500°C). Účinkem zmlžujícího plynu a zahřívání je eluent téměř zcela převeden do plynné fáze. Po průchodu vyhřívanou zónou je eluent zpravidla kompletně v plynné fázi. Ionizace je zahájena koronovým výbojem, ke kterému dochází na výbojové elektrodě (jehle), na kterou je vloženo vysoké napětí (3 - 4 kV). Je umístěna za odpařovačem v blízkosti kruhového otvoru elektrody na vstupu do analyzátoru. Výboj ionizuje především molekuly rozpouštědla, protože jsou v nadbytku. Účinkem ion-molekulárních reakcí, reakčního plynu (tzn. účinkem ionizovaných molekul mobilní fáze) dochází k ionizaci molekul analytu. Ionizované molekuly jsou pak usměrněny elektrodami do analyzátoru a k rozbití případných nekovalentních klastrů je využit protiproud sušícího plynu. Schéma APCI je znázorněno na obrázku 3.2[18][21][19].

Uspořádání ESI a APCI iontového zdroje je podobné a komerčně dostupné hmotnostní spektrometry zpravidla umožňují přepínání mezi těmito ionizačními technikami bez nutnosti mechanického zásahu. Hlavním rozdílem je místo vloženého

napětí (sprejovou kapilára x koronová jehla), mechanismus vzniku iontů a z toho vyplývající aplikační možnosti[18][20].



Obrázek 3.2: Schéma iontového zdroje APCI [19].

3.2.2 Separace iontů

Separaci iontů provádí hmotnostní analyzátor. Je umístěn za iontovým zdrojem a dochází zde k rozdělení iontů v plynné fázi za vakua podle poměru jejich hmotnosti a náboje. Zároveň dochází k jejich zrychlení a fokusaci. K rozdělení iontů podle hodnoty m/z lze využít několika různých fyzikálních principů [1][22]:

- 1) Zakřivení dráhy letu v magnetickém nebo elektrickém poli či jejich kombinaci (magnetický nebo elektrostatický analyzátor).
- 2) Různá stabilita oscilací iontů v dvoj- nebo trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí (kvadrupól, trojitý kvadrupól, lineární a kvadrupólová iontová past).
- 3) Různá doba letu iontů v oblasti bez pole (analyzátor doby letu).
- 4) Různá frekvence harmonických oscilací (orbitální past).
- 5) Různá absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli (iontová cyklotronová resonance).

Praktickým požadavkem na analyzátor (obzvláště v případě spojení s LC) je zpravidla možnost provedení tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS), malá velikost a nízká cena. V oblasti hmotnostních analyzátorů jsou významné hlavně tandemová hmotnostní spektrometrie a vývoj tzv. hybridních analyzátorů [1].

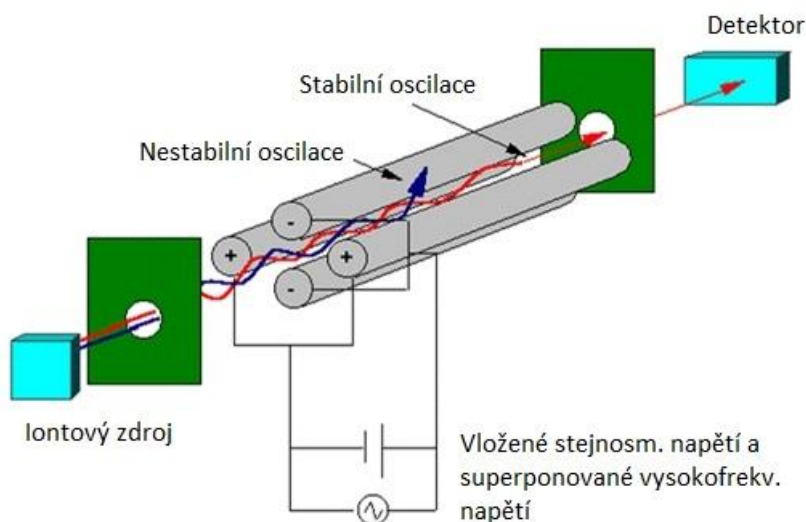
Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) je spojením dvou hmotnostních analyzátorů. Měkké ionizační techniky ionizací neposkytují dostatek strukturních informací. Pomocí MS/MS experimentů je možné, a vlastně i nutné, cíleně získat další informace o analyzovaných látkách. Hlavní uplatnění tandemové hmotnostní spektrometrie je identifikace látek v komplexních směsích, objasnění fragmentačních procesů a též v možnosti kvantifikace látek ve složitých reálných vzorcích. Tandemová hmotnostní spektrometrie může být prováděna v prostoru, čímž je myšleno, že všechny kroky (výběr prekurzorů prvním analyzátozem, jejich kolizně indukovaná disociace a analýza takto vzniklých produktových iontů druhým analyzátozem) jsou provedeny ve třech odlišných zónách. Příkladem je např. multisektorový magnetický analyzátor, trojitý kvadrupól nebo hybridní analyzátozy. Druhou možností je tzv. tandemová hmotnostní spektrometrie prováděná v čase, kdy jsou tyto tři kroky prováděny ve stejném prostoru, ale v jiné časové posloupnosti. Takto pracuje např. lineární iontová past, kvadrupólová iontová past nebo iontová cyklotronová rezonance [1] [2].

Hybridní analyzátozy jsou pak spojením dvou odlišných typů analyzátorů a snaží se využít nejlepších vlastností a výhod obou metod. Příkladem je spojení sektorového analyzátozu a kvadrupólu. Další možností je spojení kvadrupólu a analyzátozu doby letu, kvadrupólu a iontové cyklotronové rezonance, lineární iontové pasti s iontovou cyklotronovou rezonancí apod[1] [2].

3.2.2.1 Kvadrupól a trojitý kvadrupól

Kvadrupólový hmotnostní analyzátor se skládá ze čtyř tyčí o délce 20 – 30 cm kruhového nebo hyperbolického průřezu sestavených rovnoběžně do tvaru čtverce. Vždy na dvě protilehlé tyče je vloženo stejnosměrné napětí se shodnou polaritou. Na všechny tyče je navíc superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí. Ionty analytu z iontového zdroje jsou nasměrovány do středu mezi tyče, kde je generováno elektromagnetické pole, jehož vlivem dochází k oscilaci těchto iontů. Oscilace jsou stabilní

pouze pro ion s určitou hodnotou m/z , který kvadrupólem projde do detektoru. Ostatní ionty s nestabilními oscilacemi jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu. Skenování je prováděno plynulou změnou hodnoty stejnosměrného napětí a amplitudy střídavého napětí vkládaného na tyče kvadrupólu. Takto jsou postupně do detektoru propuštěny všechny ionty (viz obrázek 3.3)[22][18][23].

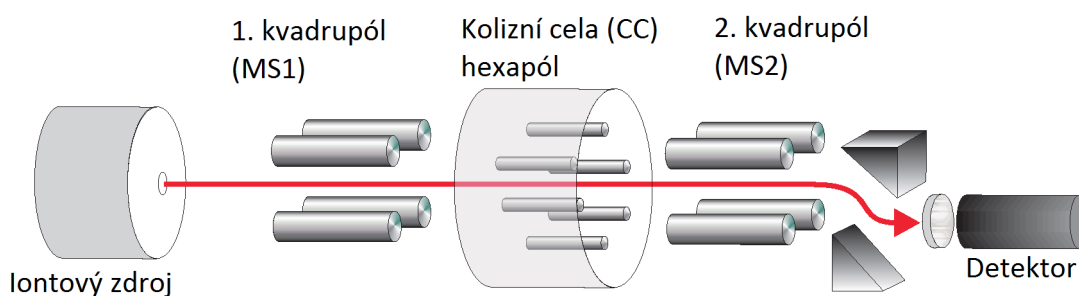


Obrázek 3.3: Schéma kvadrupólu [24].

Trojité kvadrupól je všestranný a jedním z rozšířených typů MS/MS analyzátorů. Je tvořen trojicí kvadrupólů seřazených v jedné linii. Hmotnostní analýzu provádí první a třetí kvadrupól, zatímco druhý slouží jako kolizní cely, kde vlivem zavedeného kolizního plynu dochází ke kolizním excitacím a k fragmentaci analyzovaných iontů. Díky tomuto uspořádání a možnosti ovládat nastavení jednotlivých kvadrupólů je možné provádět celou řadu různých skenů. (viz kapitola 3.2.3) V praxi jsou pak používány i alternativní kolizní cely např. typu hexapolu, oktapolu apod. (viz obrázek 3.4)[22][19].

3.2.3 Pracovní módy hmotnostního spektrometru, typy záznamů.

Obrázek 3.4 znázorňuje schéma tandemového hmotnostního spektrometru, konkrétně trojitého kvadrupólu.



Obrázek 3.4: Schéma MS/MS (trojitý kvadrupól) [25].

Podle činnosti jednotlivých částí můžeme pracovní módy mnohostranného spektrometru rozdělit na:

1) Základní sken (MS sken, Full sken)

V tomto typu měření jsou analyzovány dle nastaveného rozsahu všechny hodnoty m/z a jejich intenzity. Je tedy zaznamenáván celkový iontový proud procházející analyzátozem. V každém bodě tohoto chromatogramu je pak získáno celé spektrum hodnot m/z . Tento sken se provádí za účelem identifikace eluujících látek a k určení jejich molekulových hmotností nebo k tzv. necílené kvantitativní analýze [2]. Je-li prováděn na tandemovém hmotnostním spektrometru typu trojitého kvadrupólu, první kvadrupól (MS1) skenuje v zadaném rozsahu hmot a kolizní cela (CC) s druhým kvadrupólem (MS2) slouží pouze jako iontová optika pro fokusaci iontů. Jde o analogii jednoduchého hmotnostního spektrometru [25][1].

Další možností je provedené měření MS2 a v tomto případě může být využit i kolizní plyn v CC [25][1].

2) *Selektivní záznam jednoho nebo více iontu (SIM - single ion monitoring)*

V tomto případě je skenována intenzita pouze jednoho (nebo více) vybraných iontů v závislosti na čase. MS1 je nastaven na tyto hodnoty a ostatní části systému slouží k fokusaci iontů. Může být prováděn i na jednoduchém hmotnostním spektrometru[25][1].

Následující módy měření je možné provádět pouze na tandemových hmotnostních spektrometrech.

3) *Sken produktových iontů (DG - daughter scan)*

První analyzátor je nastaven na zvolenou hodnotu m/z prekurzorového iontu. Ten je v CC podroben fragmentaci a druhý analyzátor pak zaznamenává tyto fragmenty v zadaném rozsahu hodnot m/z . Vzniklý chromatogram pak obsahuje pouze fragmenty prekurzorového iontu. Toto měření je využíváno při objasňování struktury nebo pro vývoj SRM metod (viz dále) [25][1].

4) *Sken prekurzorových iontů*

V tomto módu MS1 skenuje v zadaném rozsahu m/z a propouští všechny tyto ionty do CC, kde dochází ke kolizně indukované fragmentaci. MS2 je pak nastaven na konkrétní hodnotu m/z , jejíž intenzita je zaznamenávána. Lze takto získat informaci, ze kterých prekurzorových iontů vznikl daný fragment. Tato měření jsou využívána k objasňování struktury, poskytují doplňující a potvrzující informace pro data získaná skenem produktových iontů[25][1].

5) *Selektivní záznam jedné (SRM - single reaction monitoring) nebo více (MRM – multiple reaction monitoring) reakcí*

Tento mód je tandemovou obdobou selektivního záznamu jednoho nebo více iontů. Oba analyzátory MS1, MS2 jsou nastaveny na konkrétní hodnoty m/z představující vybranou fragmentační reakci (reakce). Tento mód je pro analýzu konkrétní hmoty (m/z) nejselektivnější a je používán v kvantitativní analýze[25][1].

6) Sken neutrálních ztrát

V tomto případě jsou sledovány všechny prekurzory podléhající zadané neutrální ztrátě představující například určitý fragment nebo funkční skupinu. Sken prováděný MS1 a MS2 je synchronizován. Když prvním analyzátozem (MS1) prochází specifický prekurzor, MS2 kontroluje, zda dochází ke ztrátě určité hmoty, pokud ano, dojde k záznamu v detektoru[25][1].

3.3 Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie

V řadě případů jsou analyzované látky součástí složitější směsi a role chromatografické techniky je zajistit separaci složek směsi a umožnit jejich identifikaci a nebo stanovení. Z kvalitativního pohledu je hlavním omezením chromatografie neschopnost poskytnout jednoznačnou identifikaci složek směsi, i když se je podaří dokonale oddělit. Identifikace založená na srovnání retenčních charakteristik (zjednodušeně retenčních časů) neznámých látek s retenčními časy srovnávacích standardů, získaných za identických experimentálních podmínek vzhledem k velkému množství existujících sloučenin neposkytne absolutní jistotu, že tyto dvě sloučeniny jsou ty samé. Přes velké množství chromatografických možností, které jsou dnes dostupné, není navíc vždy možné uskutečnit separaci všech součástí směsi, což může zabránit přesné a správné analýze[2].

Výhodou hmotnostní spektrometrie je, že hmotnostní spektra mnoha sloučenin jsou dostatečně specifická na to, aby mohla být identifikována s vysokou jistotou ne-li stoprocentně. Pokud je ale zkoumaná látka součástí složitější směsi, bude hmotnostní spektrum sice obsahovat ionty ze všech látek, ovšem identifikace s významnou mírou jistoty se stane obtížná, obzvláště pokud je zkoumaná látka v minoritním zastoupení [5].

Kombinace HPLC nebo UHPLC velmi účinné separační metody a hmotnostní spektrometrie s jejími identifikačními možnostmi je výhodná, protože umožňuje do hmotnostního spektrometru přivádět čisté látky a zde je spolehlivě identifikovat nebo rozlišit. Spojení těchto technik pak umožňuje identifikaci a přesnější stanovení i v případech, kdy se nepodaří zkoumané látky zcela chromatograficky oddělit[2].

3.4 Fenolické kyseliny

Cévnaté rostliny vytváří spoustu rozdílných organických sloučenin označovaných jako sekundární metabolity. Ty se podílí na nepřeborném množství úkolů v rostlinném organismu. Od strukturních molekul až třeba po látky s protektivní funkcí. Fenolické kyseliny jsou jednou z takových skupin sekundárních metabolitů, které jsou rozšířeny v celé rostlinné říši[26].

Fenolické kyseliny jsou podtřídou větší skupiny metabolitů označovaných jako fenoly. Tento pojem zahrnuje asi 8000 přírodně se vyskytujících sloučenin, kdy každá z nich obsahuje ve své struktuře fenol (aromatický kruh nesoucí alespoň jeden hydroxylový substituent). Současná klasifikace rozděluje tuto velkou skupinu na dvě velké podskupiny, a to na polyfenoly a jednoduché fenoly. Polyfenoly pak na rozdíl od jednoduchých fenolů obsahují ve své struktuře alespoň dva fenolové zbytky [9].

Označení fenolická kyselina pak popisuje fenol, který obsahuje kyselou karboxylovou skupinu. Při popisu rostlinných metabolitů je pak často odkazováno na konkrétní skupinu organických kyselin. Přírodně se vyskytující fenolické kyseliny zpravidla obsahují jeden ze dvou rozdílných uhlíkových základů. A to buď kyselinu hydroxyskořicovou nebo kyselinu hydroxybenzoovou. Ačkoli tyto základní struktury zůstávají stejné, počet a umístění hydroxylových skupin se mění a vytváří množství odlišných látek. V řadě případů jsou zde začleňovány i aldehydy vzniklé odvozením od příslušné hydroxykarboxylové kyseliny (na příklad vanilin)[28].

Kyselina kávová, p-kumarová, vanilová, ferulová a protokatechová jsou kyseliny obsažené téměř ve všech rostlinách. Ostatní kyseliny jako třeba gentisová nebo syringová jsou obsažené jen v některých rostlinách a potravinách[28].

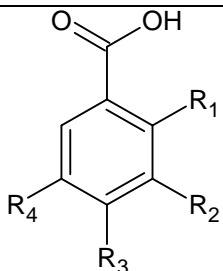
3.4.1 Struktura a vlastnosti zkoumaných fenolických kyselin

Chemická struktura analytů je patrná z tabulek 3.2 až 3.4. Průměrné molekulové hmotnosti zkoumaných analytů leží v rozmezí 148 až 360. Konstanta acidity (pKa) všech analyzovaných fenolických kyselin má hodnotu mezi 2,8 a 4,7. Tyto látky jsou slabé kyseliny a za běžných okolností budou ve vodném roztoku snáze protony odštěpovat než přijímat. Lipofilita vyjádřená jako parametr lipofility (log P) se pohybuje v rozmezí -2,2 až 1,4. Nejpolárnější je kyselina shikimová kvůli absenci aromatického jádra. Naopak, nejméně polární jsou kyseliny skořicová, vanilová a

syringová. Je to způsobeno jejich methoxy- skupinami respektive nepřítomností fenolických skupin. Výše uvedené údaje jsou shrnuty v tabulce 3.1.

Název	Sumární vzorec	Průměrná molekulová hmotnost	pKa	log P
Kys. Shikimová	C ₇ H ₁₀ O ₅	174,15	4,48 ± 0,70	-2,220 ± 0,399
Kys. Gallová	C ₇ H ₆ O ₅	170,12	4,33 ± 0,10	0,531 ± 0,325
Kys. Protokatechová	C ₇ H ₆ O ₄	154,12	4,45 ± 0,10	1,010 ± 0,237
Kys. Gentisová	C ₇ H ₆ O ₄	154,12	3,01 ± 0,10	1,396 ± 0,259
Kys. Chlorogenová	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354,31	3,91 ± 0,50	0,370 ± 0,461
Kys. Vanillová	C ₈ H ₈ O ₄	168,15	4,45 ± 0,10	1,304 ± 0,244
Kys. Kávová	C ₉ H ₈ O ₄	180,16	4,58 ± 0,10	0,663 ± 0,286
Kys. Swingová	C ₉ H ₁₀ O ₅	198,17	4,33 ± 0,10	1,283 ± 0,338
Kys. p-kumarová	C ₉ H ₈ O ₃	164,16	4,65 ± 0,10	1,006 ± 0,267
Kys. m-kumarová	C ₉ H ₈ O ₃	164,16	4,38 ± 0,10	0,928 ± 0,265
Kys. o-kumarová	C ₉ H ₈ O ₃	164,16	4,51 ± 0,10	1,021 ± 0,277
Kys. Nerulová	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,18	4,58 ± 0,10	0,963 ± 0,284
Kys. Isoferulová	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,18	4,53 ± 0,10	0,788 ± 0,280
Kys. Sinapová	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	224,21	4,53 ± 0,10	0,997 ± 0,371
Kys. Rozmarýnová	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	360,31	2,78 ± 0,10	0,871 ± 0,397
Kys. Skořicová	C ₉ H ₈ O ₂	148,16	4,34 ± 0,10	1,212 ± 0,247

Tabulka 3.1: Srovnání vlastností fenolických kyselin [29].

Deriváty kyseliny hydroxybenzoové:				
				
Fenolická kyselina	- R ₁	- R ₂	- R ₃	- R ₄
Kys. Gallová	- H	- OH	- OH	- OH
Kys. Protokatechová	- H	- OH	- OH	- H
Kys. Gentisová	- OH	- H	- H	- OH
Kys. Vanillová	- H	- OCH ₃	- OH	- H
Kys. Swingová	- H	- OCH ₃	- OH	- OCH ₃

Tabulka 3.2: Struktura fenolických kyselin odvozených od kyselina hydroxybenzoové[29].

Kyselina skořicová a deriváty kyseliny hydroxyskořicové				
Fenolická kyselina	- R ₁	- R ₂	- R ₃	- R ₄
Kys. skořicová	- H	- H	- H	- H
Kys. kávová	- H	- OH	- OH	- H
Kys. o-kumarová	- OH	- H	- H	- H
Kys. m-kumarová	- H	- OH	- H	- H
Kys. p-kumarová	- H	- H	- OH	- H
Kys. ferulová	- H	- OCH ₃	- OH	- H
Kys. isoferulová	- H	- OH	- OCH ₃	- H
Kys. sinapová	- H	- OCH ₃	- OH	- OCH ₃

Tabulka 3.3: Struktura fenolických kyselin odvozených od kyseliny hydroxyskořicové a kyselina skořicová[29].

Ostatní (a deriváty s objemnějšími substituenty)		
Kys. shikimová	Kys. chlorogenová	Kys. rozmarýnová

Tabulka 3.4: Struktura kyseliny shikimové, chlorogenové a rozmarýnové[29].

LÁTKA	ZDROJ	METODA SEPARACE STACIONÁRNÍ FÁZE, ANALYTICKÁ KOLONA	PROSTŘEDÍ MOBLINÍ FÁZE	DETEKCE	VALIDAČNÍ DATA	CITACE
Gall; Prot; Van; Syr; Káv; Fer; Chlo; oKum; Skoř	Čaj	UHPLC: BEH C18 (100 x 2,1 mm; 1,7 m)	A: 0,1% kyselina mravenčí B: metanol	DAD 280 nm	$r^2 = 0,9990-0,9999$ LOD = 0,01-13,87 mg/L LOQ = 0,4-45,78 mg/L	30.
Káv; Chlo; Fer; pKum; Van; flavonoidy atd.	Plody Licium barbarum	HPLC: Vydac 201TP54 C18 (250 x 4,6 mm; 5 m)	A: 0,5% kyselina mravenčí B: ACN – voda (94:6)	DAD 280 nm ESI-MS [M-H] ⁻ = 179; 353; 163; 192	$r^2 > 0,996$	31.
Gen; HFA; Van; Fer; oKum; mKum; pKum; IS = Sal	Olivový olej	CE: kapilára z křemenného skla (80 cm x 375 m; 75 m) 25 kV; 15 min	10 mM Amonného pufru	ESI-MS [M-H] ⁻ = 193; 163	rec = 92,8-107% $r^2 = 0,9562-0,9993$	32.
Gall; Prot; HBA; Van; Syr; Fer; Káv; pKum; katechiny; C-CT; Procyanidiny; Anthocyaniny; C-CF; Flavonoly; T-CT; T-CF	Červené víno	HPLC: ODS Hypersyl (250 x 4,6 mm; 5 m) ochranná kolona Pelliquard LC-18 (50 x 4,6 mm; 40 m) platné pro fenolické kyseliny	A: 2,5% kyselina mravenčí B: metanol	DAD 280; 320 nm (200-600 nm)	$r^2 = 0,996-0,999$ RSD = 1,5-7% rec = 79-100% LOQ = 0,2-1 mg/L	33.
Fer; Sin; pKum; Chlo; Káv; Prot; HBA; Van; Syr; 6'-O-feruloylsucrose; 6'-O-sinapoylsucrose	Rýže setá	HPLC: Waters Cosmosil 5C ₁₈ -MS-II (150 x 4,6 mm)	A: 0,025% kyselina trifluoroctová B: ACN	DAD 280; 325 nm ESI-MS	$r^2 > 0,9995$ RSD = 0,22-3,95% rec = 99-108%	34.
Chlo; Syr; Fer; pKum; Prot; HBA; Káv; Van; Cichoric acid; Caftaric acid	Extrakt z Třapatky nachové	MEKC: kapilára z křemenného skla (50 cm; 50 m) 20 kV; 36 min	40 mM tetraboritanu sodného (pH 9,2) s 70 mM deoxycholátu sodného	UV 300 nm	$r^2 = 0,998-0,999$ RSD = 1,02-2,54% LOD = 0,127-0,65 g/ml LOQ = 0,381-1,875 g/ml	35.

Tabulka 3.5: Přehled metod stanovení fenolických kyselin.

4. Experimentální část

4.1 Použité chemikálie a přístrojové vybavení

Analytické standardy byly zakoupeny u firmy Sigma - Aldrich. Všechny chemikálie a rozpouštědla použitá při experimentech byly s vysokým stupněm čistoty (označení: LC-MS, p. a.) a všechny použité přístroje byly stálým vybavením Katedry analytické chemie.

4.1.1 Standardní látky

Pro analýzu byly použity standardy šestnácti fenolických kyselin:

Kyselina sinapová $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich); $C_{11}H_{12}O_5$, $M_r = 224,21$

Kyselina o-kumarová 97% (Sigma-Aldrich); $HOC_6H_4CH=CHCO_2H$, $M_r = 164,16$

Kyselina m-kumarová 99% (Sigma-Aldrich); $HOC_6H_4CH=CHCO_2H$, $M_r = 164,16$

Kyselina p-kumarová $\geq 98,0$ (Sigma-Aldrich); $HOC_6H_4CH=CHCO_2H$, $M_r = 164,16$

Kyselina rozmarýnová $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich); $C_{18}H_{16}O_8$, $M_r = 360,31$

Kyselina gentisová 98% (Sigma-Aldrich); $(HO)_2C_6H_3CO_2H$, $M_r = 154,12$

Kyselina shikimová $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich); $C_7H_{10}O_5$, $M_r = 174,15$

Kyselina isoferulová $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich); $HOC_6H_3(OCH_3)CH=CHCO_2H$, $M_r = 194,18$

Kyselina ferulová 99% (Sigma-Aldrich); $HOC_6H_3(OCH_3)CH=CHCO_2H$, $M_r = 194,18$

Kyselina skořicová $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich); $C_6H_5CH=CHCOOH$, $M_r = 148,16$

Kyselina syringová $\geq 95\%$ (Sigma-Aldrich); $HOC_6H_2(OCH_3)_2CO_2H$, $M_r = 198,17$

Kyselina chlorogenová $\geq 95\%$ (Sigma-Aldrich); $C_{16}H_{18}O_9$, $M_r = 354,31$

Kyselina kávová $\geq 98,0\%$ (Sigma-Aldrich); $(HO)_2C_6H_3CH=CHCO_2H$, $M_r = 180,16$

Kyselina vanilová $\geq 97\%$ (Sigma-Aldrich); $HOC_6H_3(OCH_3)CO_2H$, $M_r = 168,15$

Kyselina protokatechová $\geq 97,0\%$ (Sigma-Aldrich); $(HO)_2C_6H_3CO_2H$, $M_r = 154,12$

Kyselina gallová 97,5 – 102,5% (titration), (Sigma-Aldrich); $(HO)_3C_6H_2CO_2H$, $M_r = 170,12$

4.1.2 Rozpouštědla

Pro přípravu mobilní fáze a standardních roztoků analytů byla používána následující rozpouštědla:

Ultračistá voda

Byla vyrobena na katedře analytické chemie za použití přístroje Milli-Q RG a zfiltrována přes celulózový 0,2 µm filtr za pomoci vakuové pumpy vždy před přípravou mobilní fáze.

Methanol

Methanol LC-MS Cromasolv®, Fluca Analytical, 2,5l, o čistotě (GC) ≥ 99%, CH₄O, Mr 32,04

Kyselina mravenčí

Formic acid 98 – 100% puriss p. a., Reag. ACS, Ph. Eur., 1.01, Riedel-de Haën, CH₂O₂, Mr 46,03

4.1.3 Další použité chemikálie a roztoky

Dále byly použity tyto chemikálie a roztoky:

Slabá oplachová kapalina (Weak wash)

Byl použit roztok methanolu (20%)

Silná oplachová kapalina (Strong wash)

Byl použit acetonitril (100%)

Oplachová kapalina pro písky čerpadla (Seal wash)

Byl použit roztok methanolu (20%)

4.1.4 Přístrojové vybavení

V průběhu experimentů byla použita následující instrumentace:

UHPLC chromatografický systém: Acquity-Ultraperformance LC, Waters, ČR

Hmotnostní detektor: Trojitý kvadrupól Quattro Micro, Waters, ČR

Analytická kolona: ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 1,7 µm, 2,1 x 100 mm, Waters, ČR

Analytické váhy: Sartorius, ČR

Automatické mikropipety se špičkami: Biohit, ČR

Vakuová pumpa: Vacc-space, Chromservis, ČR

Membránové filtry: Albet, Chromservis, ČR

Šroubovací vialky z hnědého a bílého skla: Vitrum, ČR

4.2 Pracovní postup

V průběhu experimentální práce byly používány směsi roztoků analytických standardů o koncentracích 10^{-4} g.ml⁻¹, 10^{-5} g.ml⁻¹ a 10^{-6} g.ml⁻¹ v methanolu a ve směsi methanolu a vody (60% methanol). Roztoky byly ředěny přímo ve vialkách.

4.2.1 Příprava standardů jednotlivých fenolických kyselin a jejich směsí

První fází přípravy standardních roztoků bylo navážení jednotlivých analytických standardů do šestnácti vialek. Navážky byly přibližně 1 mg. Poté byla každá z nich doplněna methanolem do 1 ml a řádně protřepána. Takto byly vytvořeny zásobní roztoky analytických standardů o koncentraci 10^{-3} g.ml⁻¹.

V následujícím kroku byly připraveny dvě směsi fenolických kyselin o koncentraci 10^{-4} g.ml⁻¹, kdy v každé z nich bylo obsaženo osm analytických standardů. Pro přípravu každého z nich bylo pipetováno vždy 100 µl z jednotlivých osmi různých roztoků analytických standardů a těchto 800 µl bylo doplněno 200 µl methanolu. Vznikly tak dva zásobní roztoky směsi fenolických kyselin (v následujícím textu označené Mix1 a Mix2), které byly využity pro prvotní MS sken a přípravu dalších směsí všech šestnácti zkoumaných analytů (pracovních roztoků).

Při dalších měřeních pro optimalizaci metody byly používány roztoky směsi fenolických kyselin o koncentracích 10^{-5} g.ml⁻¹ a 10^{-6} g.ml⁻¹ v methanolu respektive ve směsi methanolu a vody (60% methanol). Postup přípravy pracovních roztoků byl následující:

Z obou zásobních roztoků směsí analytů (Mix1 Mix2) o koncentracích 10^{-4} g.ml⁻¹, bylo odpipetováno do jedné společné vialky vždy 100 µl. Vialka byla následně doplněna 800 µl methanolu respektive 400 µl methanolu a 400 µl vody. Vznikl tak příslušný pracovní roztok obsahující šestnáct různých fenolických kyselin s každou o koncentraci 10^{-5} g.ml⁻¹. Pracovní roztok o koncentraci 10^{-6} g.ml⁻¹ byl následně získán desetinásobným zředěním. Pro jeho přípravu bylo odpipetováno 100 µl pracovního roztoku o koncentraci 10^{-5} g.ml⁻¹ a tento objem byl doplněn 900 µl metanolu respektive 500 µl metanolu a 400 µl vody. V případě delších sérií měření a celkově větší spotřebě byl tímto způsobem připraven větší objem pracovního roztoku.

4.2.2 Stabilita a uchování analytů

Zásobní roztoky fenolických kyselin vykazovaly stabilitu během několika denního úseku, kdy byly využity. Nemusely být připravovány znovu každý den. Podmínkou bylo jejich skladování v dobře uzavřených víálkách při teplotě 2 – 8 °C.

4.2.3 Příprava mobilní fáze

Kyselina mravenčí 0,1%

Tento roztok byl připravován v objemu 500 ml. Do odměrné baňky bylo nalito téměř 500 ml vody tak, aby hladina byla dosažitelná pipetou. Následně bylo pipetou vpraveno 0,5 ml kyseliny mravenčí. Při převodu kyseliny do odměrné baňky byla špička pipety ponořena pod vodní hladinu. Odměrná baňka byla následně doplněna vodou po rysku a protřepána. Příprava probíhala v digestoři.

4.2.4 Výchozí chromatografické parametry

Pro optimalizaci nastavení hmotnostního detektoru byla použita kolona ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (1,7 μm; 2,1 x 100 mm). Objem jednoho nástřiku činil 3 μl. Podmínky gradientové eluce jsou shrnuty v tabulce 4.1.

Čas [min.]	0,1% HCOOH [%]	MeOH [%]	Průtok MF [ml·min ⁻¹]
0,00	88,5	11,5	0,450
4,00	88,5	11,5	0,450
4,10	88,5	11,5	0,420
25,00	50,0	50,0	0,420
27,00	88,5	88,5	0,420
33,00	88,5	88,5	0,450

Tabulka 4.1: Podmínky gradientové eluce.

4.2.5 Optimalizace nastavení hmotnostního spektrometru.

K hmotnostní analýze byl použit hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem. Optimalizace podmínek pro hmotnostní detekci byla zahájena základním skenem v pozitivním i negativním módu (MS sken). Následná měření pro optimalizaci probíhala v SIM módu, kdy podle získaných dat ze základního skenu byly do čtrnácti kanálů (kyseliny o-, m-, p-kumarová byly monitorovány společně díky společné molekulové hmotnosti) nastaveny molekulové hmotnosti sledovaných prekurzorových

iontů jednotlivých fenolických kyselin a časová rozmezí pro jejich detekci. Optimalizace byla prováděna s využitím ESI a následně APCI ionizace v negativním módu.

Optimalizační měření probíhala v různých rozmezích nastavení hmotnostního spektrometru, formou sérií měření, kdy zvolený parametr byl v zadaném rozmezí postupně měněn. Zkoumané parametry a rozmezí jejich nastavení pro jednotlivé ionizační módy jsou uvedeny v tabulkách 4.2 a 4.3. Významným parametrem je napětí na vstupním kuželu. Jeho optimalizace byla provedena jako poslední a hodnoty byly určeny individuálně pro každou sloučeninu.

Parametr:	Zkoumané rozmezí
Napětí na kapiláře	1 – 3,5 kV
Napětí na vstupním kuželu	10 – 50 V
Napětí na extraktoru	0 – 20 V
Napětí na iontové optice (RF čočka)	0 – 0,8 V
Desolvační teplota	200 – 450 °C
Rychlost průtoku desolvačního plynu	200 – 800 l.h ⁻¹
Rychlost průtoku plynu na vstupním kuželu	0 – 150 l.h ⁻¹
Teplota iontového zdroje	130 °C (fixní hodnota)

Tabulka 4.2: Optimalizované parametry pro ESI ionizaci v SIM módu.

Parametr:	Zkoumané rozmezí
Proud na jehle	1 – 30 µA
Napětí na vstupním kuželu	10 – 50 V
Napětí na extraktoru	0 – 20 V
Napětí na iontové optice (RF čočka)	0 – 2 V
Desolvační teplota (apci probe temperature)	200 – 450 °C
Rychlost průtoku desolvačního plynu	200 – 800 l.h ⁻¹
Rychlost průtoku plynu na vstupním kuželu	0 – 150 l.h ⁻¹
Teplota iontového zdroje	130 °C (fixní hodnota)

Tabulka 4.3: Optimalizované parametry pro APCI ionizaci v SIM módu.

Dalším krokem bylo provedení skenu produktových iontů. V tomto MS/MS módu byly vybrané prekurzorové ionty podrobeny fragmentaci a ze spekter takto vzniklých produktových iontů byly vybrány fragmenty s dostatečnou intenzitou, vhodné pro kvantifikační mód SRM. Jako kolizní plyn byl použit argon. Sérií měření byla zjištěna nejvhodnější kolizní energie, kterou je nutné dodat do kolizní cely k získání citlivé odezvy SRM přechodu fragmentových iontů.

Po optimalizaci výše uvedených parametrů byla změřena opakovatelnost metody sérií desíti po sobě následujících měření, která byla provedena, za stejných podmínek, na stejném přístroji v krátkém časovém rozmezí. Ze zjištěných dat byla opakovatelnost vyjádřena pomocí relativní směrodatné odchylky pro retenční čas a plochy píků analyzovaných látek. Linearita a citlivost vyvinuté metody byla ověřena změřením kalibračních křivek v negativním módu, a to jak pro ionizační techniku ESI tak APCI. Měřeny byly vzorky v rozmezí koncentrací od $1 \cdot 10^{-9}$ g.ml⁻¹ až $2 \cdot 10^{-6}$ g.ml⁻¹, které byly připraveny technikou postupného ředění směsi všech analytů. Linearita byla ověřena pomocí korelačního koeficientu a citlivost určením limitu detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ). Limit kvantifikace byl určen jako poměr signálu k šumu, který odpovídal hodnotě 10. Hodnoty limitu detekce byly získány výpočtem z LOQ.

5. Výsledky a diskuse

5.1 Výchozí chromatografické podmínky.

Pro všechna měření byla použita kolona ACQUITY UPLC®BEH C₁₈ (1,7 μm; 2,1x100 mm) od firmy Waters, ČR. Podmínky chromatografické separace použité k rozdělení směsi analytů jsou uvedeny v kapitole 4. Analyty byly rozpouštěny v methanolu, v pozdější fázi měření s přidavkem vody (60% methanol) pro zlepšení ionizace v ESI módu.

5.2 Optimalizace podmínek pro detekci hmotnostním spektrometrem

K experimentálním měřením byl použit hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem (Quattro Micro, Waters, ČR). Jedním ze základních cílů této práce bylo porovnat měkké ionizační techniky ESI a APCI při analýze zadané směsi fenolických kyselin.

5.2.1 Výběr prekurzorových iontů

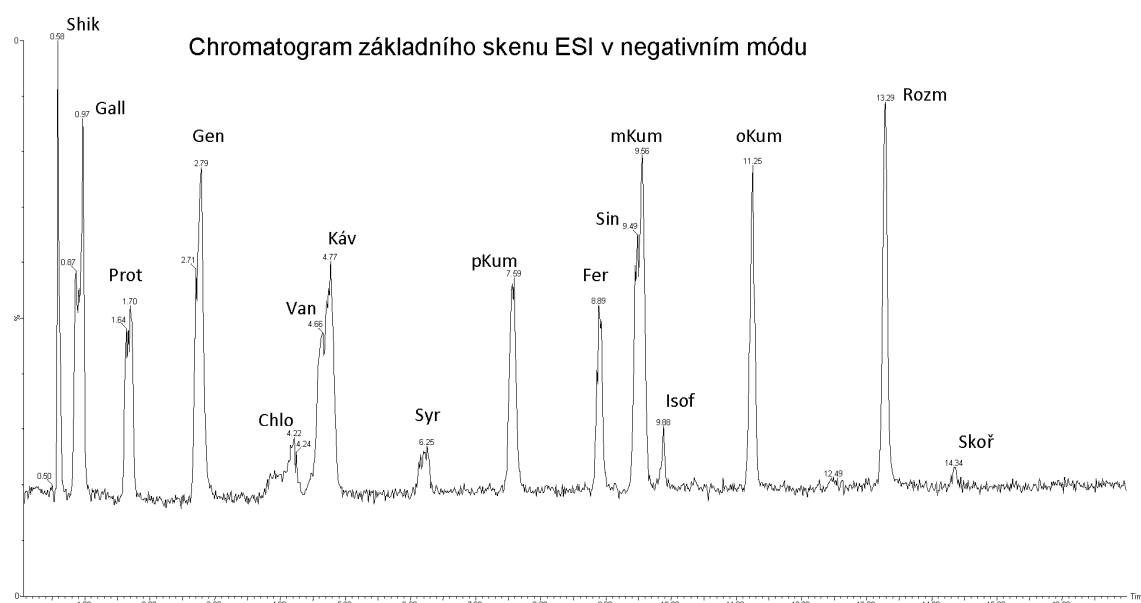
Prvním krokem při hledání optimálních podmínek pro detekci bylo provedení základního skenu (MS sken). Tento mód plynule proměřil iontový proud v rozsahu hodnot m/z od 120 do 500 a umožnil získat kompletní spektrum analyzované směsi v tomto rozsahu. Byl proveden základní sken kompletní směsi fenolických kyselin o koncentracích 10^{-5} a 10^{-6} g·ml⁻¹ s využitím ESI ionizace v negativním i pozitivním módu. Podobně byl proveden základní sken s využitím APCI ionizace. Na základě získaných dat byly vybrány prekurzorové ionty (zpravidla ionty s největší intenzitou) pro další kroky optimalizace. Tato data navíc posloužila k ověření retenčních charakteristik (retenčních časů), pořadí eluce jednotlivých analytů a umožnila nastavení pro SIM módy následujících měření.

Ve všech případech byly jako prekurzorové ionty vybrány deprotonované molekuly $[M-H]^-$, které vykazovaly nejvyšší relativní intenzity. A to jak pro ionizační techniku ESI tak APCI. V pozitivním módu zkoumané analyty vykazovaly při koncentraci 10^{-5} g·ml⁻¹ velmi slabou nebo žádnou odezvu, což je v souladu s chemickou strukturou fenolických kyselin. Proto, pro následující optimalizaci a měření, byly zvoleny metody ESI a APCI v negativním módu. Citlivost detekce pro kyselinu vanilovou, isoferulovou a skořicovou byly v porovnání s ostatními nízké. Vybrané prekurzorové ionty jsou

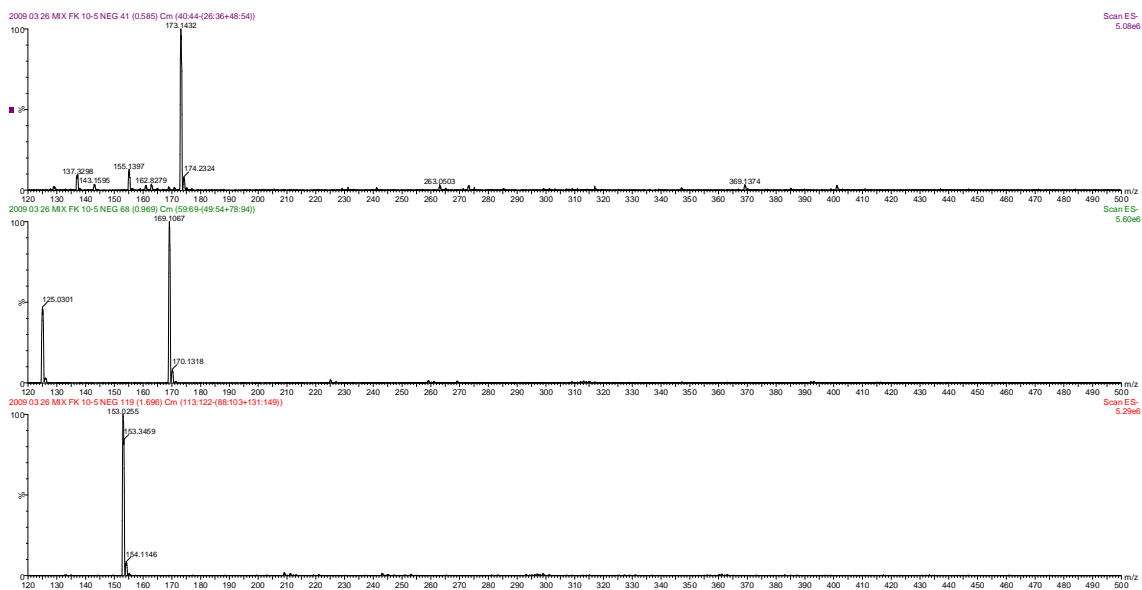
shrnuty v tabulce 5.1. Obrázky 5.2 až 5.6 demonstrují získaná data a volbu prekurzorových iontů a obrázek 5.1 zachycuje celý základní sken. Kyselina vanillová $[M-H]^- = 167,2$ byla v roztoku o koncentraci $10^{-5} \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$, špatně detekovatelná, hodnota byla určena podle výsledku základního skenu MIX2 ($10^{-4} \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Analyt	Prekurzor (m/z)	Analyt	Prekurzor (m/z)
Kys. shikimová	173,3	Kys. o-kurmarová	163,2
Kys. gallová	169,1	Kys. m-kurmarová	163,2
Kys. protokatechová	153,1	Kys. p-kurmarová	163,2
Kys. gentisová	153,1	Kys. ferulová	193,3
Kys. vanillová	167,2	Kys. isoferulová	193,2
Kys. kávová	179,2	Kys. sinapová	223,3
Kys. chlorogenová	353,3	Kys. rozmarýnová	359,3
Kys. syringová	197,1	Kys. skořicová	147,1

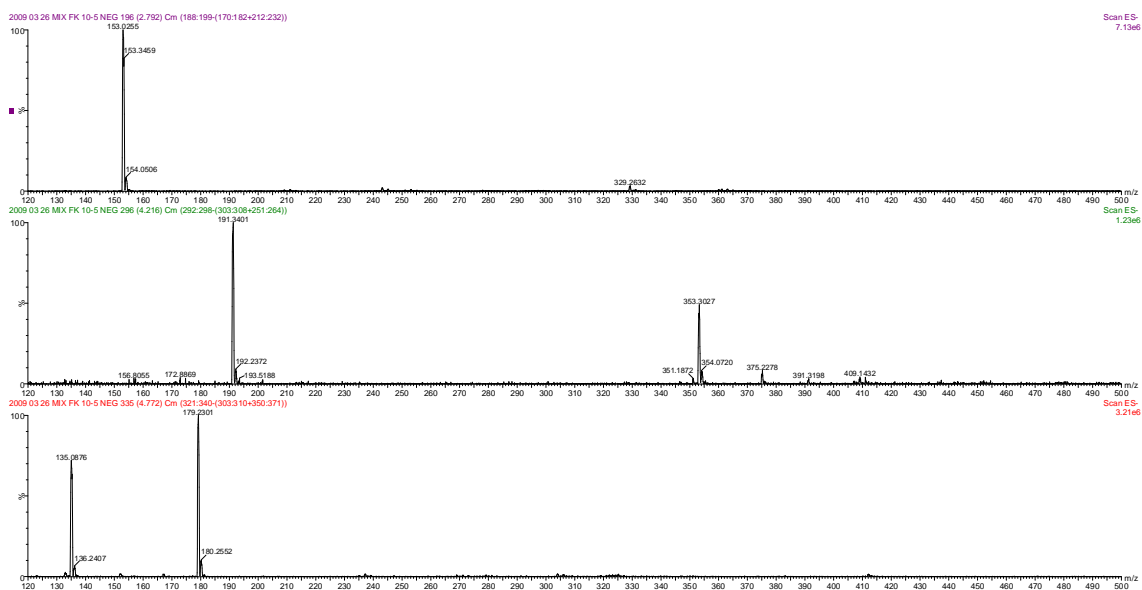
Tabulka 5.1: Vybrané prekurzorové ionty $[M-H]^-$ pro ESI⁻ a APCI⁻ ionizaci



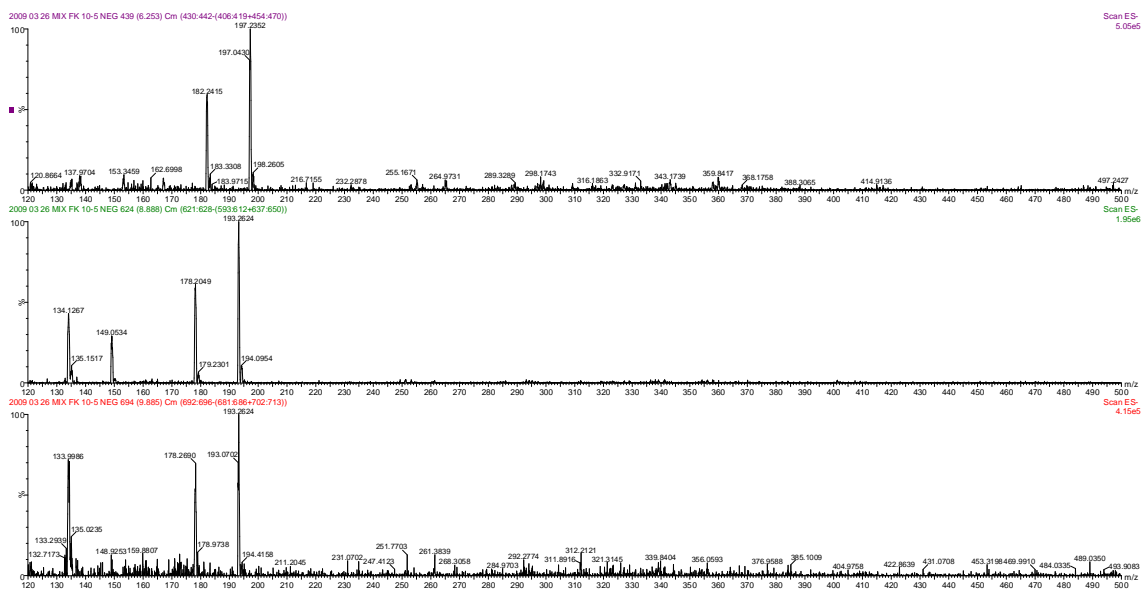
Obrázek 5.1: Chromatogram základního skenu (ESI⁻, $10^{-5} \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$).



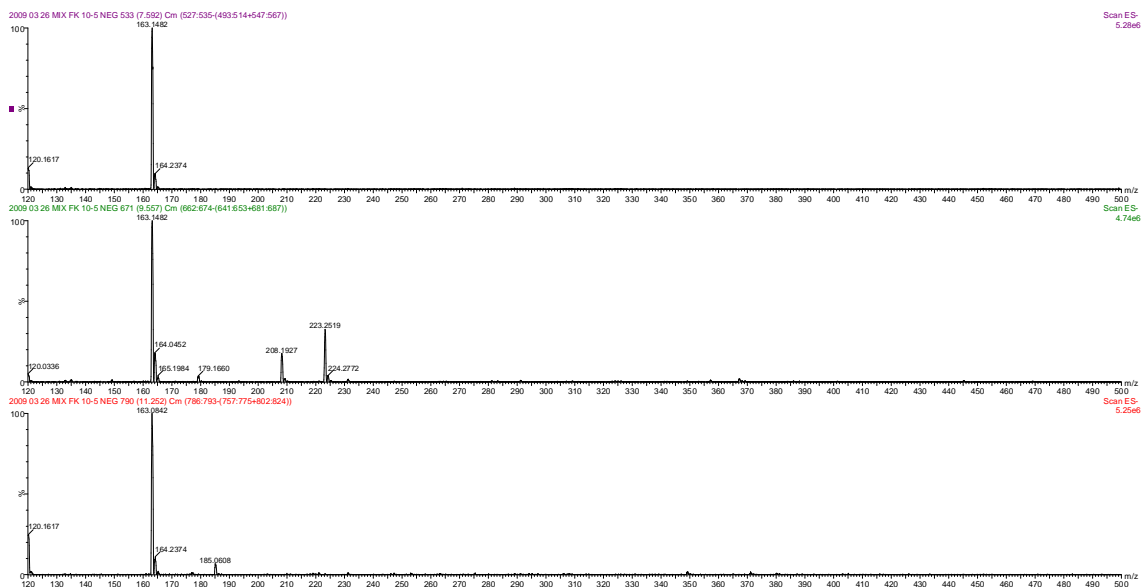
Obrázek 5.2: Spektra základního skenu (ESI^- , $10^{-5} \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$) zachycující píky molekulárních iontů kyselin shikimové $[\text{M}-\text{H}]^- = 173,3$, galové $[\text{M}-\text{H}]^- = 169,1$ a protokatechové $[\text{M}-\text{H}]^- = 153,1$.



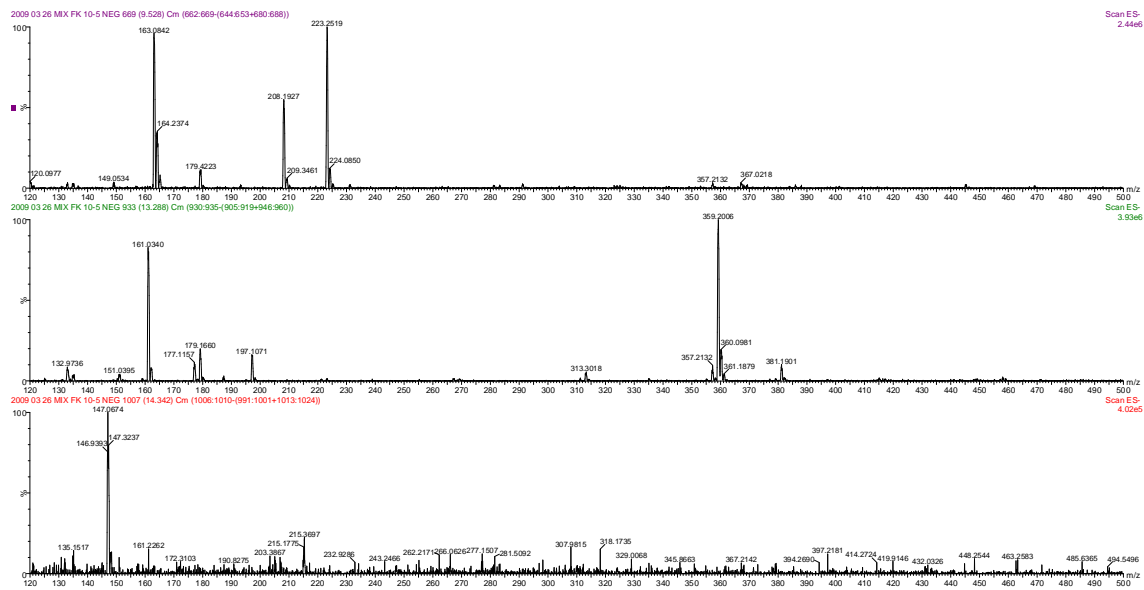
Obrázek 5.3: Spektra základního skenu (ESI^- , $10^{-5} \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$) zachycující píky molekulárních iontů kyselin gentisové $[\text{M}-\text{H}]^- = 153,1$, chlorogenové $[\text{M}-\text{H}]^- = 353,3$ a kávové $[\text{M}-\text{H}]^- = 179,2$.



Obrázek 5.4: Spektra základního skenu (ESI⁻, 10⁻⁵ g·ml⁻¹) zachycující píky molekulárních iontů kyselin syringové [M-H]⁻ = 197,1, ferulové [M-H]⁻ = 193,3 a isoferulové [M-H]⁻ = 193,2.



Obrázek 5.5: Spektra základního skenu (ESI⁻, 10⁻⁵ g·ml⁻¹) zachycující píky molekulárních iontů kyselin p-kumarové [M-H]⁻ = 163,2, m-kumarové [M-H]⁻ = 163,2 a o-kumarové [M-H]⁻ = 163,2.



Obrázek 5.6: Spektra základního skenu (ESI^- , $10^{-5} \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$) zachycující píky molekulárních iontů kyselin sinapové $[\text{M}-\text{H}]^- = 223,3$, rozmarýnové $[\text{M}-\text{H}]^- = 359,3$ a skořicové $[\text{M}-\text{H}]^- = 147,1$.

5.2.2 Optimalizace parametrů iontového zdroje s využitím SIM experimentů

Po provedení základních skenů, ověření retenčních časů a výběru nejvhodnějších prekurzorových iontů pro jednotlivé analyty byly prováděny série měření v módu SIM. Při těchto experimentech byly zjišťovány ideální parametry pro nastavení iontového zdroje (viz. tabulka 4.2 a 4.3) sledováním intenzit signálů prekurzorových iontů. Cílem bylo najít takové podmínky ionizace, aby intenzity prekurzorových iontů byly co nejvyšší.

V každé sérii měření byla postupně měněna hodnota jednoho z parametrů a výsledky byly vyhodnoceny na základě ploch píků ze získaných chromatogramů. V případě SIM experimentů to byl zpravidla průměr hodnot ze dvou měření. Získaná data byla následně vynesena do příslušných grafů.

5.2.2.1 Ionizace elektrosprejem v negativním záznamu iontů

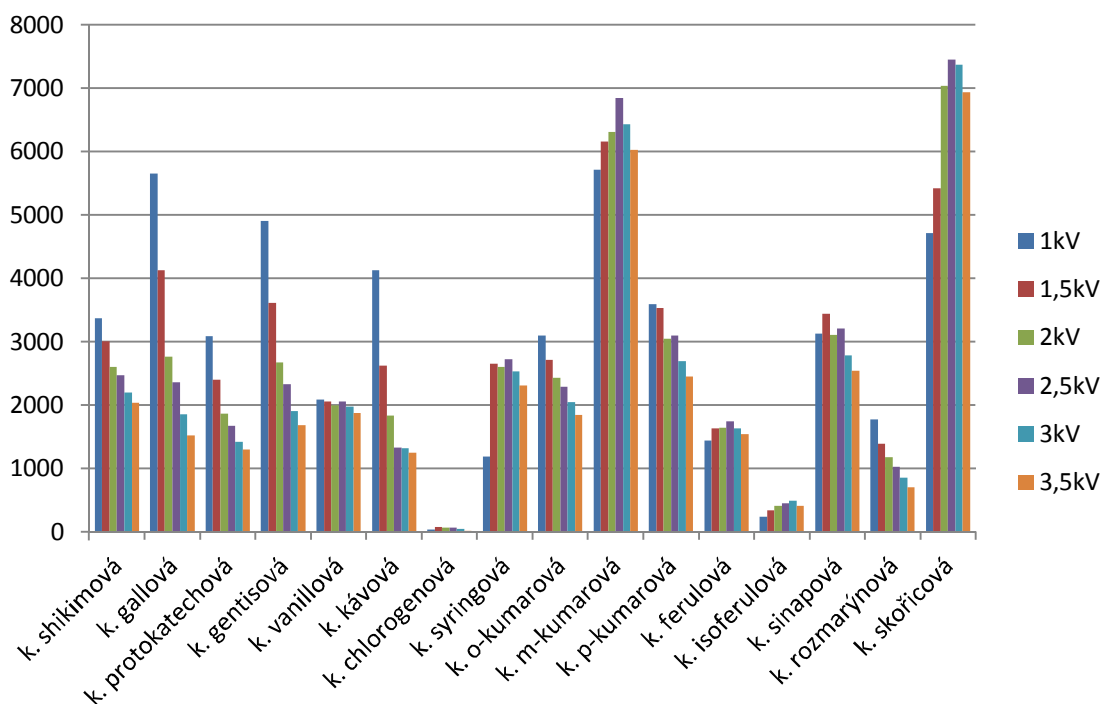
K měření byly použity pracovní roztoky (směs všech fenolických kyselin) o koncentracích 10^{-6} g.ml⁻¹. Jako první parametr bylo optimalizováno napětí na kapiláře (capillary voltage) v rozmezí hodnot od 1 kV do 3,5 kV. Výsledky jsou znázorněny na obrázku 5.7. Žádné napětí neposkytovalo nejlepší odezvu u všech zkoušených látek a volba „ideální“ hodnoty 2,5 kV byla kompromisem. Tato hodnota poskytovala dobrou odezvu u většiny zkoumaných látek a zároveň nikdy neposkytovala tu nejhorší. Navíc se jevila vhodná pro kyselinu skořicovou, vanilovou a isoferulovou, které v základním skenu neposkytovaly dobrou odezvu. Použití hodnot nad 3,5 kV pak může vést k výbojům na kapiláře a k „jiskření“, které je pro proces ionizace nežádoucí.

Dalším optimalizovaným parametrem bylo napětí na extraktoru (extractor). Byly zkoušeny hodnoty 0 V až 20 V. V tomto případě, jak je patrné z obrázku 5.8, byly výsledky jednoznačnější. Za nejvhodnější hodnotu byly zvoleny 2 V.

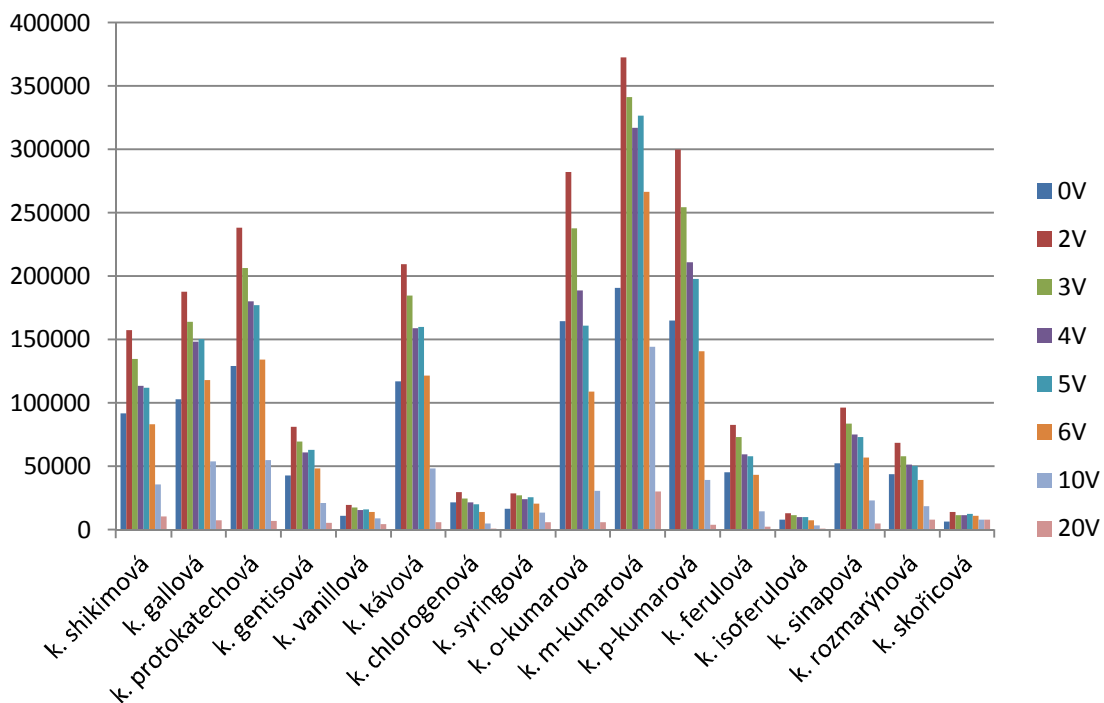
Následujícím krokem bylo vyladění napětí na iontové optice (RF lens). Tento parametr byl proměřen pro hodnoty 0 V až 0,8 V. Obrázek 5.9 shrnuje dosažené výsledky. Z těchto hodnot bylo vybráno, jako přijatelný kompromis, napětí 0,5 V.

Dalším důležitým parametrem pro vyladění, byla desolvační teplota (desolvation temperature). Pracovní roztok byl analyzován při desolvačních teplotách v rozmezí od 200 °C do 500 °C. Z obrázku 5.10 je vidět, že se vzrůstající desolvační teplotou roste i citlivost. Pouze u kyseliny chlorogenové a isoferulové je tento trend opačný. Jako

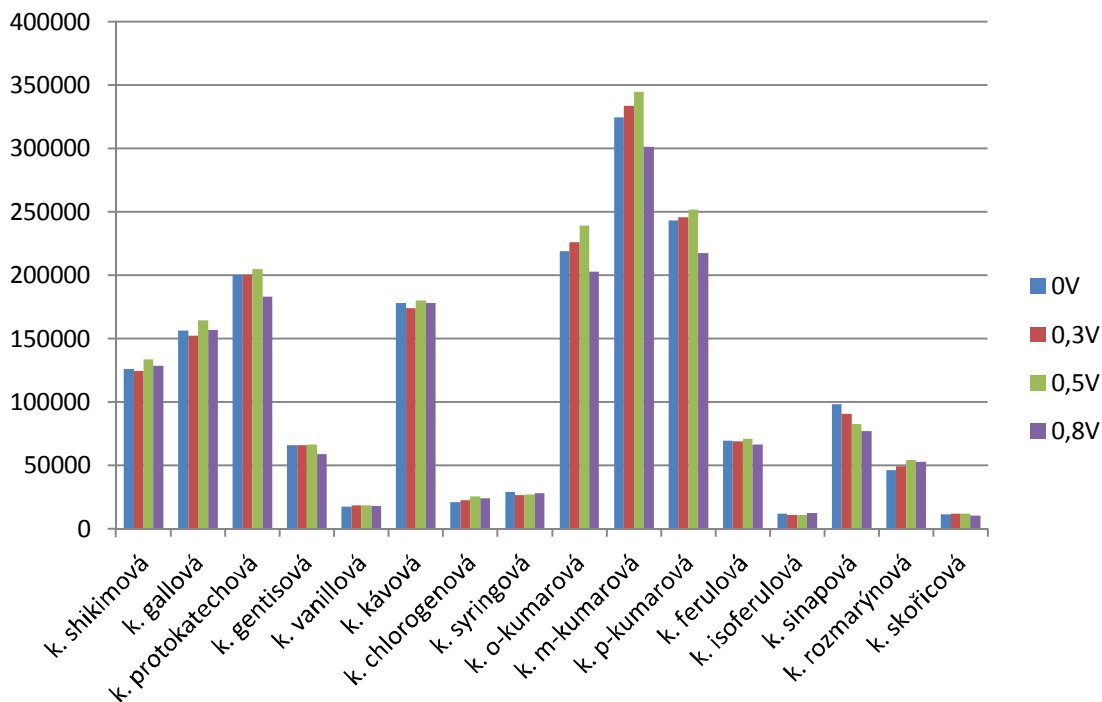
ideální hodnota byla vybrána teplota 425 °C, která u všech analytů, s výjimkou kyseliny chlorogenové a isoferulové podávala pro směs nejlepší výsledky.



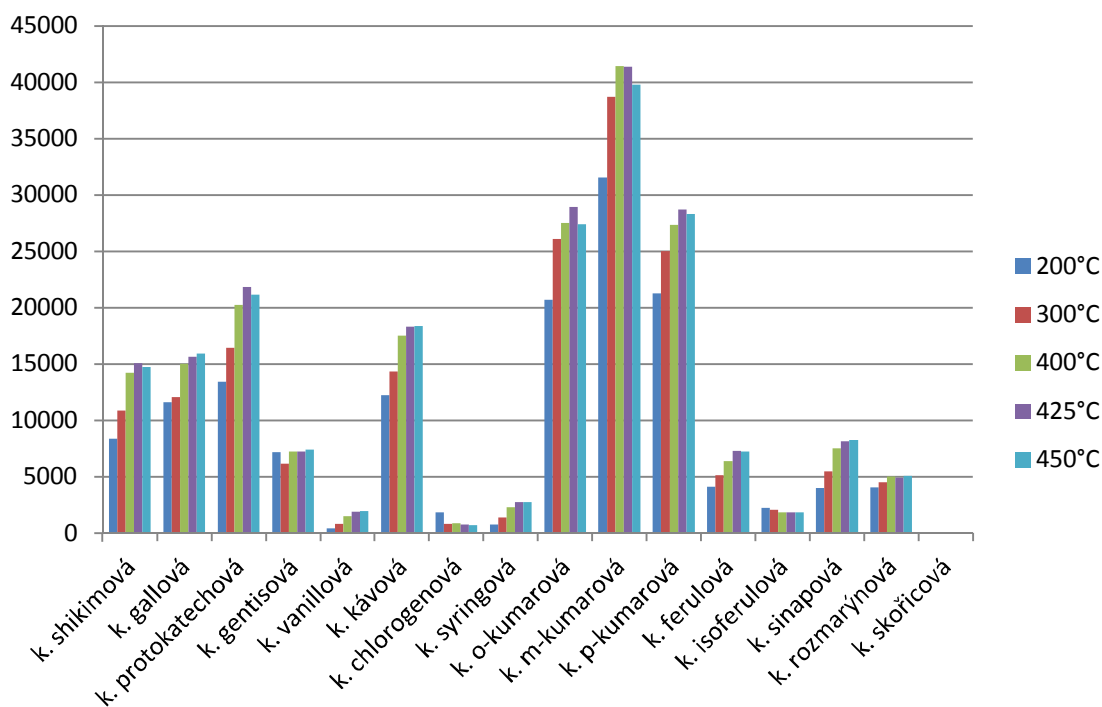
Obrázek 5.7: Optimalizace napětí na kapiláře při ESI ionizaci.



Obrázek 5.8: Optimalizace napětí na extraktoru při ESI ionizaci.



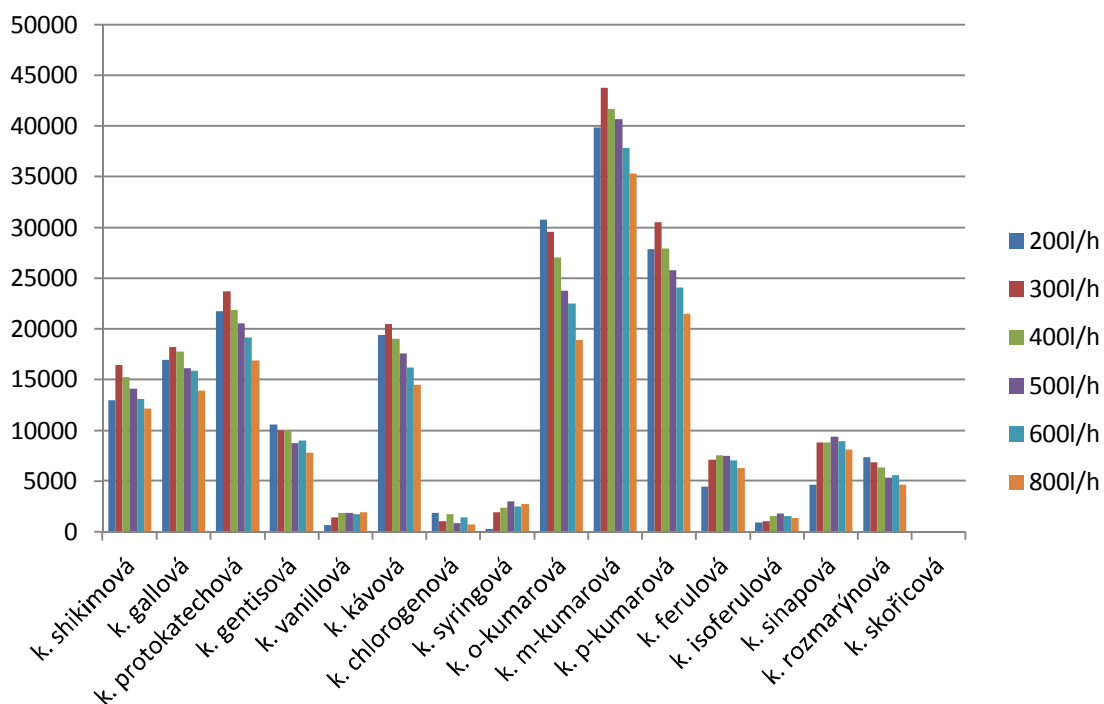
Obrázek 5.9: Optimalizace napětí na iontové optice při ESI⁻ ionizaci.



Obrázek 5.10: Optimalizace desolvační teploty při ESI⁻ ionizaci.

Dále byla optimalizována rychlost průtoku desolvačního plynu (gas flow) v rozmezí nastavení od 200 l.h⁻¹ do 800 l.h⁻¹. Podle výsledků shrnutých v obrázku 5.11, byla vybrána hodnota průtoku 300 l.h⁻¹, která pro všechny fenolické kyseliny s dobrou

odezvou podávala dobré výsledky a zároveň nebyla nejhorší variantou pro většinu hůře detekovatelných analytů.

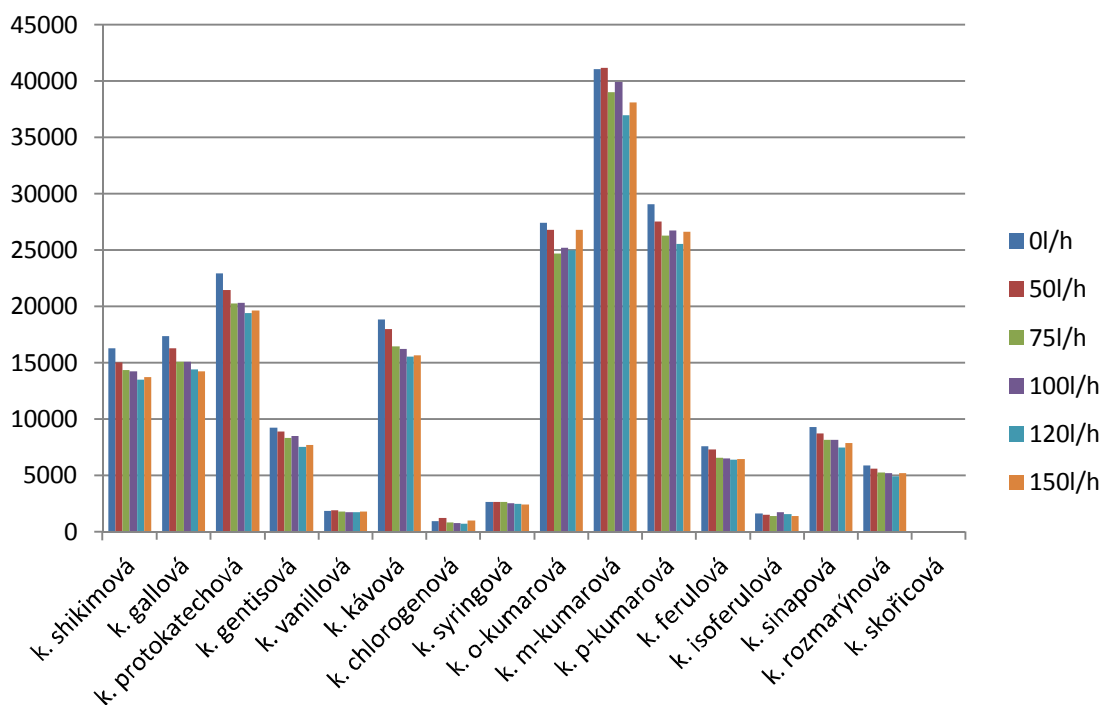


Obrázek 5.11: Optimalizace průtoku desolvačního plynu při ESI⁻ ionizaci.

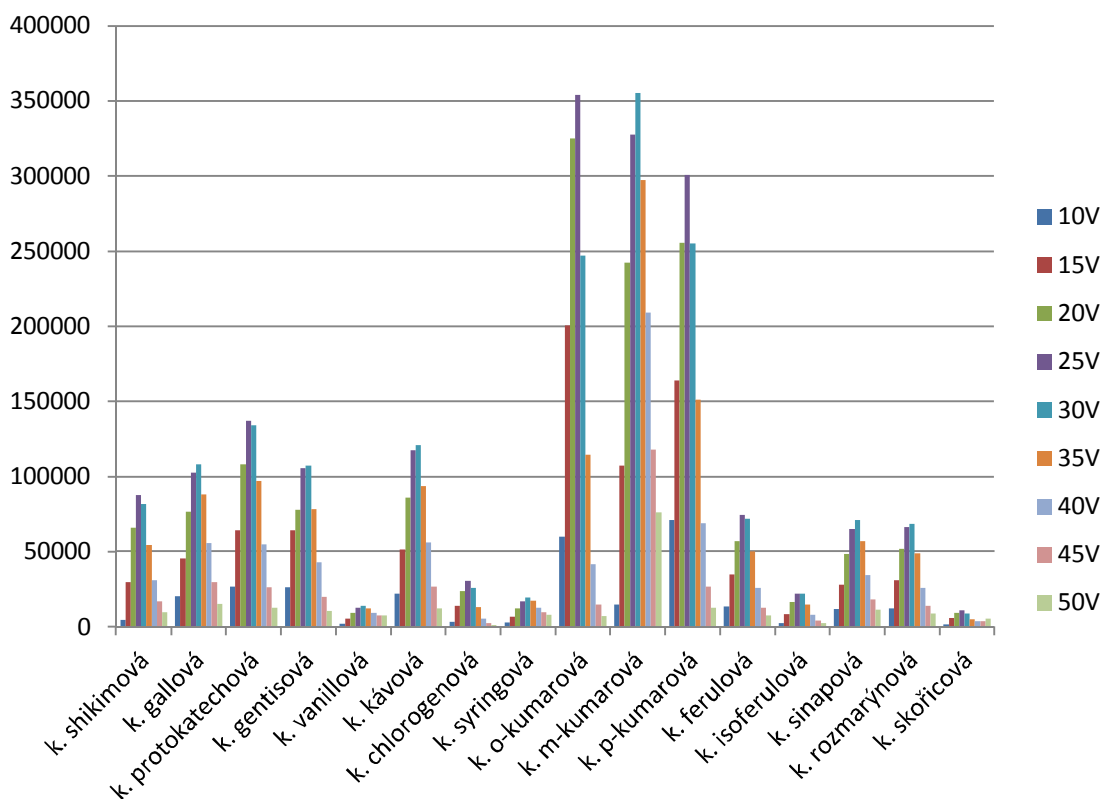
Také byla vyladěna rychlost průtoku plynu na vstupním kuželu (cone gas flow). Výsledky z měření pro rozmezí hodnot od 0 l·h⁻¹ do 150 l·h⁻¹ shrnuje obrázek 5.12. Z vyzkoušených nastavení byla vybrána hodnota 50 l·h⁻¹. Pro nulovou hodnotu byly získány o něco lepší výsledky, ale pro zachování čistoty iontové optiky nebyla zvolena.

Teplota iontového zdroje (source temperature) je parametr jehož nastavení nebylo optimalizováno. Nastavená hodnota 130 °C respektuje obecné doporučení pro hmotnostní spektrometry při použití ve spojení s LC.

Na závěr byl laděn parametr napětí na vstupním kuželu (cone voltage). Jeho hodnota výrazně ovlivňuje, zda daný ion projde dál do analyzátoru. Ideální hodnoty byly na základě výsledků shrnutých v obrázku 5.13 určeny individuálně pro každý analyt. Zkoušené rozmezí hodnot bylo od 10 V do 50 V a nejlepší odezvy byly dosaženy při hodnotách 25 V a 30 V. V tabulce 5.2 jsou zaznamenány optimální hodnoty pro jednotlivé analyty.



Obrázek 5.12: Optimalizace průtoku plynu na vstupním kuželu při ESI⁻ ionizaci.



Obrázek 5.13: Optimalizace napětí na vstupním kuželu při ESI⁻ ionizaci.

Iontový zdroj byl v průběhu SIM experimentů podle postupně získávaných a vyhodnocovaných dat nastavován na ideální hodnoty pro detekci analyzované směsi. Tato optimalizace byla výběrem nejvhodnějších podmínek pro napětí na vstupním

kuželu dovršena. Výsledné hodnoty optimalizace nastavení ESI zdroje jsou shrnuty v tabulce 5.3.

Analyt	Napětí [V]	t _R [min.]	Analyt	Napětí [V]	t _R [min.]
Kys. shikimová	25	0,60	Kys. o-kumarová	25	11,24
Kys. gallová	30	0,95	Kys. m-kumarová	30	9,57
Kys. protokatechová	25	1,71	Kys. p-kumarová	25	7,59
Kys. gentisová	30	2,81	Kys. ferulová	25	8,94
Kys. vanillová	30	4,57	Kys. isoferulová	30	9,87
Kys. kávová	30	4,77	Kys. sinapová	30	9,57
Kys. chlorogenová	25	4,17	Kys. rozmarýnová	30	13,26
Kys. syringová	30	6,21	Kys. skořicová	25	14,34

Tabulka 5.2: Optimální hodnoty napětí na vstupním kuželu pro jednotlivé analyty pro ESI ionizaci v záporném módu. Kyseliny o-, m-, p-kumarová byly měřeny v rámci nastavení společného kanálu s definovanou hodnotou 25V.

Parametr	Optimální hodnota
Napětí na kapiláře	2,5 kV
Napětí na extraktoru	2,0 V
Napětí na iontové optice	0,5 V
Desolvační teplota	425 °C
Průtok desolvačního plynu	300 l·h ⁻¹
Průtok plynu na vstupním kuželu	50 l·h ⁻¹
Teplota iontového zdroje	130 °C
Napětí na vstupním kuželu	Nastaveno individuálně podle tabulky 5.2

Tabulka 5.3: Optimální nastavení parametrů ESI ionizace pro měření v záporném módu pro detekci [M-H]⁻ prekurzorových iontů zadaných fenolických kyselin.

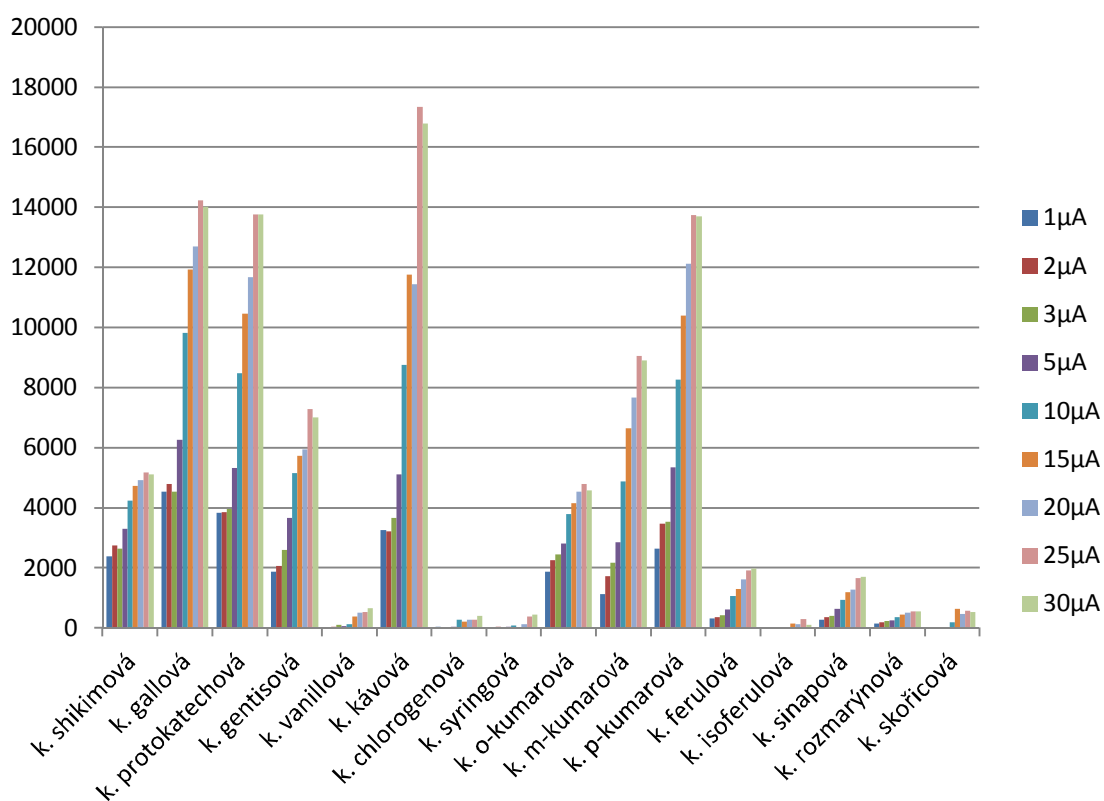
5.2.2.2 Chemická ionizace za atmosférického tlaku v negativním záznamu iontů

Optimalizace metody ionizace za atmosférického tlaku probíhala obdobným způsobem jako v případě ionizace elektrosprejem. Měření probíhala v SIM módu a v jejím průběhu byly sledovány stejné prekurzorové ionty [M-H]⁻. Tato metoda se liší v tom, že na sprejovací kapiláru, kterou je do iontového zdroje přiváděn roztok analytů, není vloženo napětí. Místo toho je u jejího ústí jehla, na které dochází ke koronárnímu výboji. Ladění probíhalo obdobně v sériích měření pro jednotlivé parametry (viz. tabulka 4.3). Podle získaných a vyhodnocených dat byl iontový zdroj nastavován. Ke všem měřením byl použit pracovní roztok o koncentraci 10⁻⁶ g·ml⁻¹.

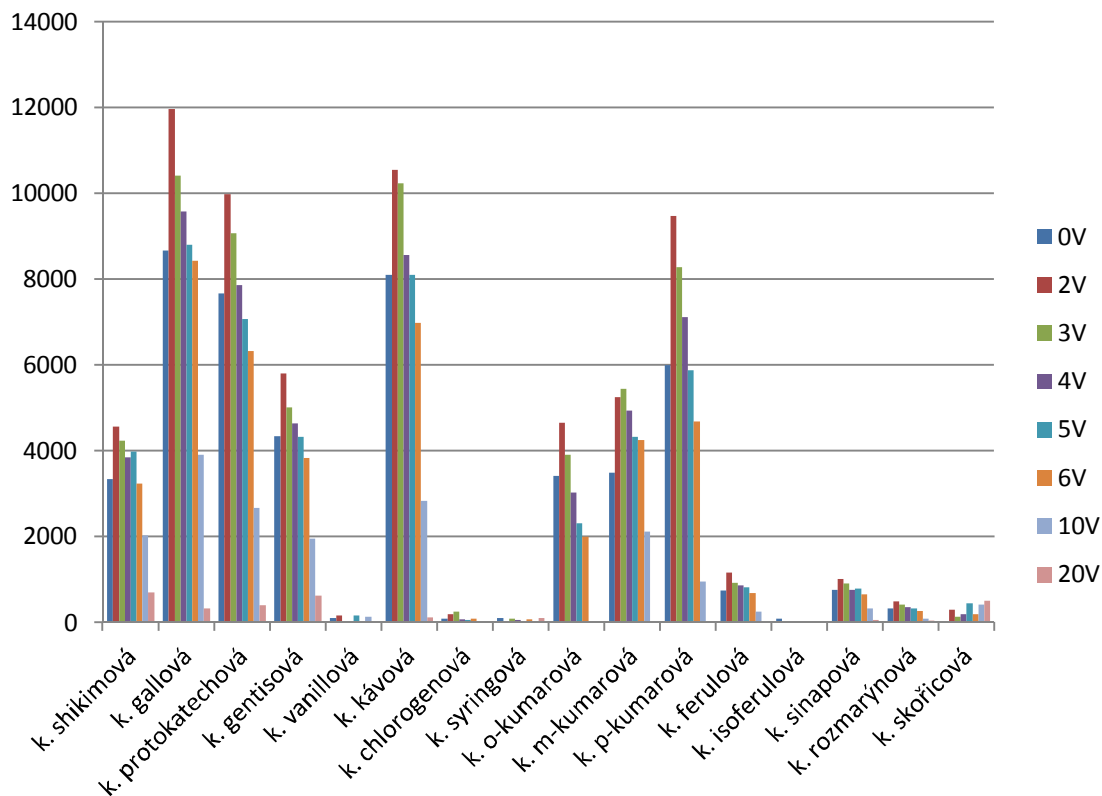
Jako první byl optimalizován proud vkládaný na jehlu (corona). Zkoušené rozmezí bylo od 1 μA do 30 μA . Výsledky jsou zaznamenány v obrázku 5.14. Jako nejvhodnější byla vybrána hodnota 30 μA , protože měla nejlepší výsledky právě u analytů s nízkou odezvou.

Napětí na extraktoru (extractor) bylo sledováno v rozmezí 0 V až 20 V. Jak je patrné z obrázku 5.15, kyselina vanillová, chlorogenová, syringová, isoferulová, skořicová i rozmarýnová byly při použité koncentraci $10^{-6} \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$ obtížně detekovatelné. Jako nejvíce vyhovující bylo zvoleno napětí 2 V.

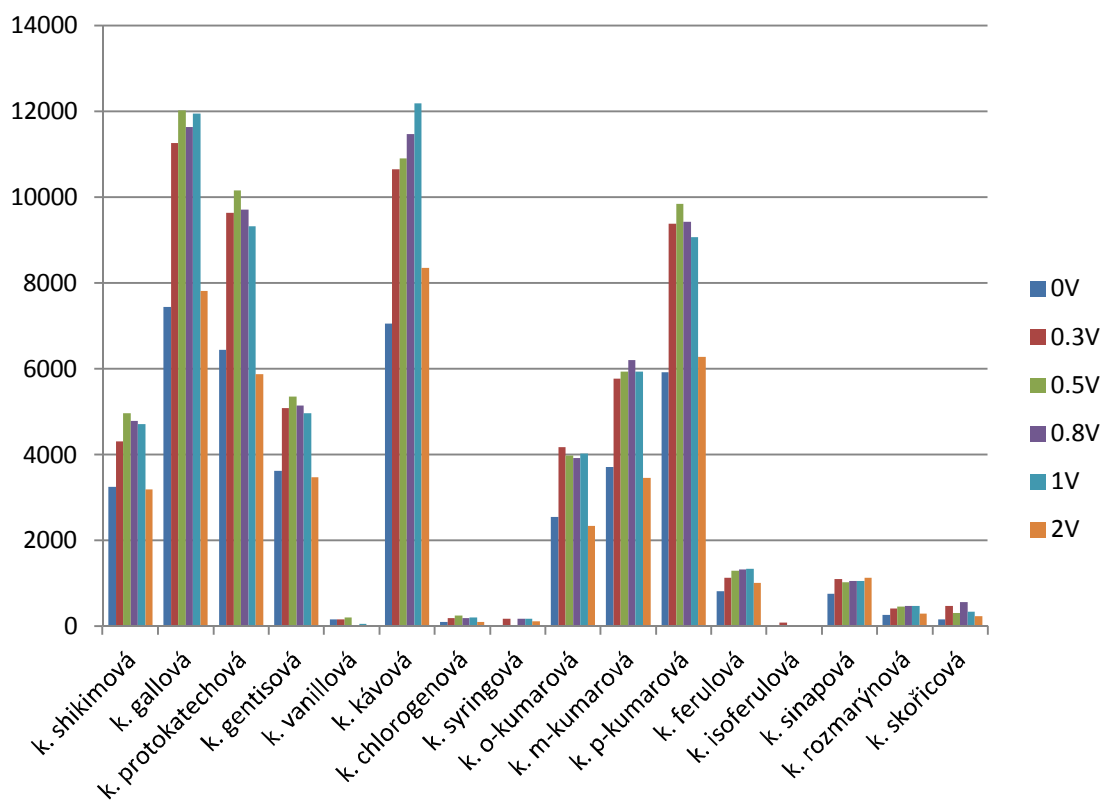
Další parametr, napětí na iontové optice (RF lens), byl proměřen v rozmezí hodnot od 0 V do 2 V. Z obrázku 5.16 je patrné, že osm z fenolických kyselin mělo dobrou odezvu v detektoru pro většinu hodnot. Napětí 0,5 V, které bylo vybráno se jevílo jako nejvhodnější vzhledem k analytům s nízkou citlivostí.



Obrázek 5.14: Optimalizace proudu na jehle při APCI ionizaci.

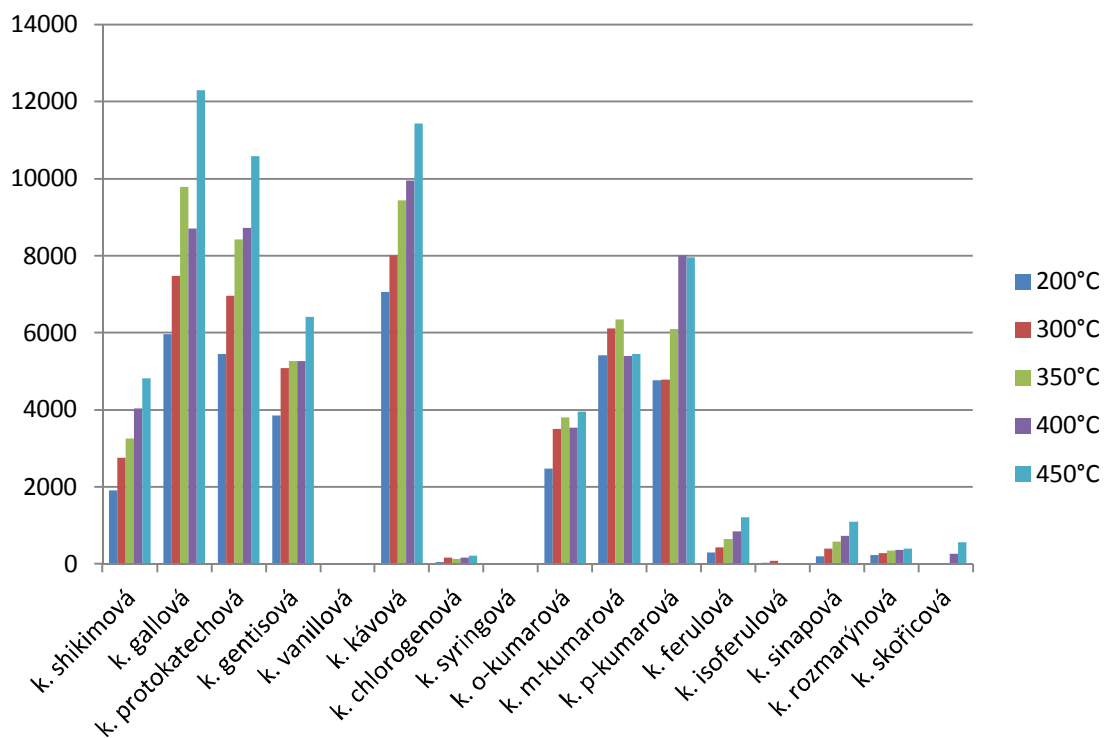


Obrázek 5.15: Optimalizace napětí na extraktoru při APCI ionizaci.



Obrázek 5.16: Optimalizace napětí na iontové optice při APCI ionizaci.

Dále byla vyladěna desolvační teplota. Ze zkoušeného rozmezí hodnot od 200 °C do 450 °C byla vybrána teplota 450 °C. U detekovatelných analytů s rostoucí teplotou vzrůstala odezva detektoru, jak je znázorněno na obrázku 5.17.

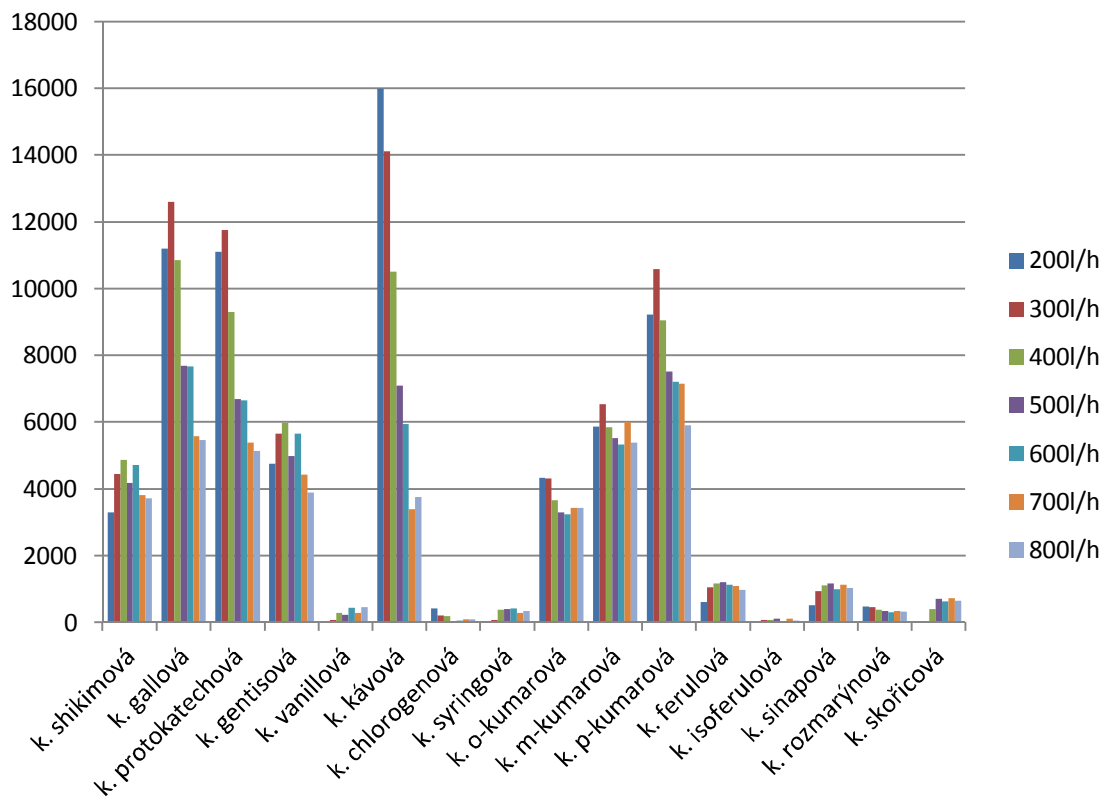


Obrázek 5.17: Optimalizace desolvační teploty při APCI ionizaci.

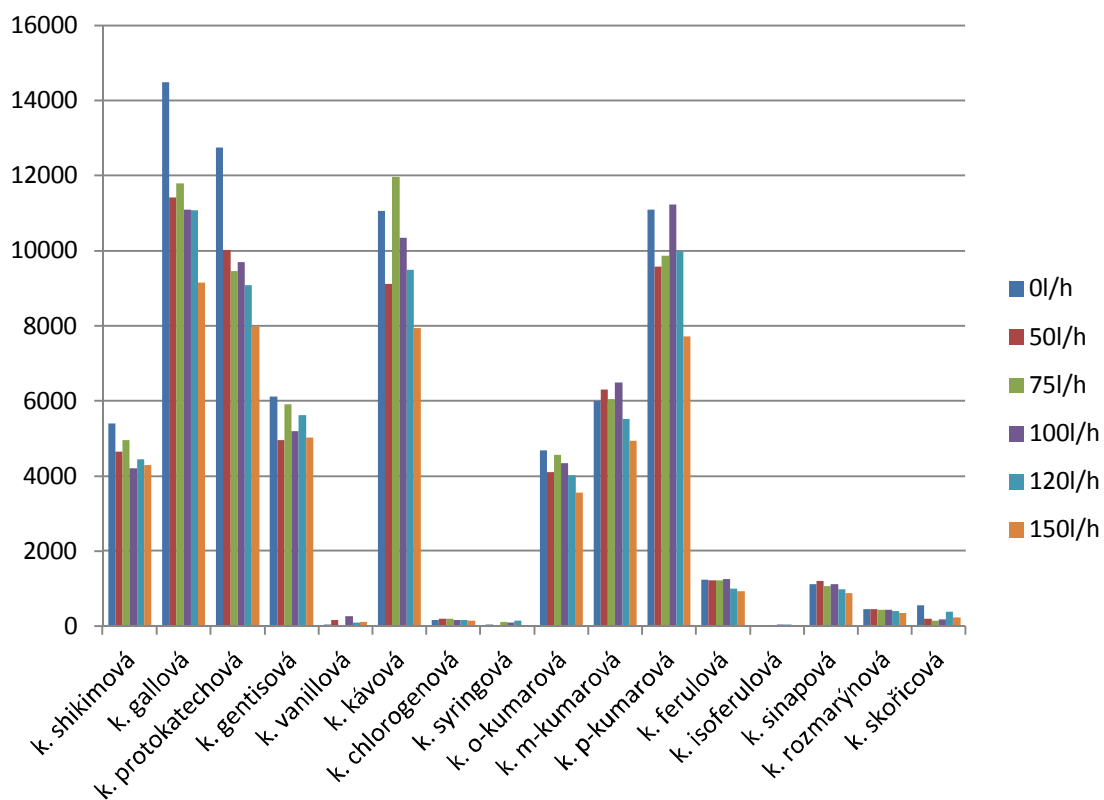
Rychlost průtoku desolvačního plynu (gas flow) byla při měřeních nastavována v rozsahu od 200 l·h⁻¹ do 800 l·h⁻¹. Za nejvhodnější hodnotu byl zvolen průtok 300 l·h⁻¹. Výsledky měření jsou shrnuty v obrázku 5.18.

Podobně rychlost průtoku plynu na vstupním kuželu (cone gas flow) byla měřena v rozmezí od 0 l·h⁻¹ do 150 l·h⁻¹. Intenzita odezvy klesala s vzrůstající hodnotou průtoku. U analytů s horší odezvou byly ale ideální hodnoty kolem průtoku 100 l·h⁻¹ a 120 l·h⁻¹. Jako kompromis byla zvolena hodnota 110 l·h⁻¹. Výsledky znázorňuje obrázek 5.19.

Teplota iontového zdroje, podobně jako v případě optimalizace ESI ionizace byla v průběhu všech experimentálních měření nastavena na doporučenou hodnotu 130 °C.

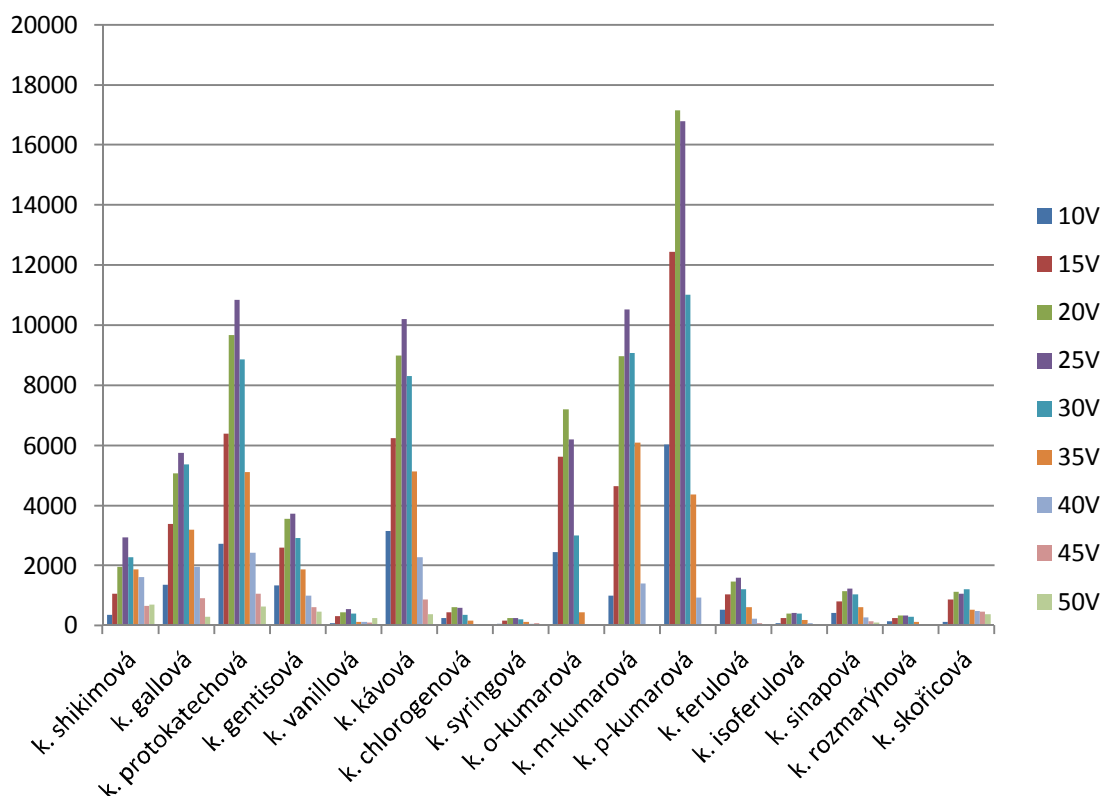


Obrázek 5.18: Optimalizace rychlosti průtoku desolvačního plynu při APCI ionizaci.



Obrázek 5.19: Optimalizace rychlosti průtoku plynu na vstupním kuželu při APCI ionizaci.

Posledním krokem optimalizace APCI ionizace bylo vyladění napětí na vstupním kuželu (cone voltage). Stejně jako v případě ESI ionizace byla tato hodnota určena a následně nastavena individuálně pro každý analyt. Výsledky měření shrnuje obrázek 5.20, kde mohou být také odečteny optimální hodnoty zaznamenané v tabulce 5.4.



Obrázek 5.20: Optimalizace napětí na vstupním kuželu při APCI ionizaci.

Analyt	Napětí [V]	t _R [min.]	Analyt	Napětí [V]	t _R [min.]
Kys. shikimová	25	0,60	Kys. o-kumarová	20	11,24
Kys. gallová	25	0,95	Kys. m-kumarová	25	9,57
Kys. protokatechová	25	1,71	Kys. p-kumarová	20	7,59
Kys. gentisová	25	2,81	Kys. ferulová	25	8,94
Kys. vanillová	25	4,57	Kys. isoferulová	25	9,87
Kys. kávová	25	4,77	Kys. sinapová	25	9,57
Kys. chlorogenová	20	4,17	Kys. rozmarýnová	25	13,26
Kys. syringová	25	6,21	Kys. skořicová	25	14,34

Tabulka 5.4: Optimální hodnoty napětí na vstupním kuželu pro jednotlivé analyty pro APCI ionizaci v záporném módu. Kyseliny o-, m-, p-kumarová byly měřeny v rámci nastavení společného kanálu s definovanou hodnotou 20V.

Po vyhodnocení dat a získaných výsledků výše uvedených měření bylo vyladěno nastavení APCI iontového zdroje. Hodnoty udávající optimální podmínky pro ionizaci analytů a detekci vybraných prekurzorových iontů shrnuje tabulka 5.5.

Parametr	Optimální hodnota
Proud na jehle	30 μA
Napětí na extraktoru	2 V
Napětí na iontové optice	0,5 V
Desolvační teplota	450 $^{\circ}\text{C}$
Průtok desolvačního plynu	300 $\text{l}\cdot\text{h}^{-1}$
Průtok plynu na vstupním kuželu	110 $\text{l}\cdot\text{h}^{-1}$
Teplota iontového zdroje	130 $^{\circ}\text{C}$
Napětí na vstupním kuželu	Nastaveno individuálně podle tabulky 5.4

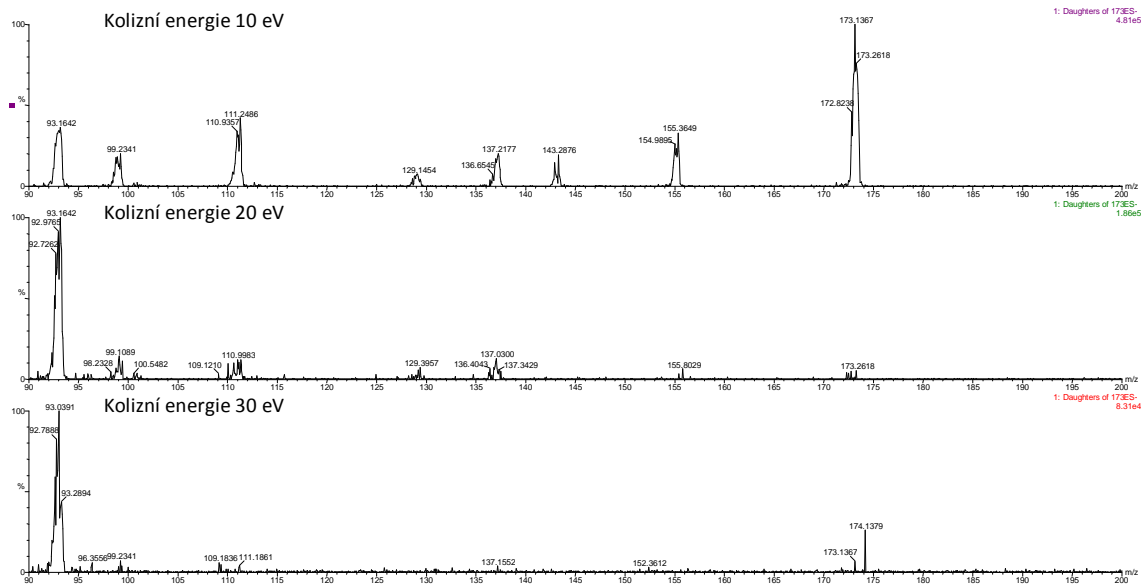
Tabulka 5.5: Optimální nastavení parametrů APCI ionizace pro měření v záporném módu pro detekci $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ prekurzorových iontů zadaných fenolických kyselin.

5.2.3 Výběr produktových iontů

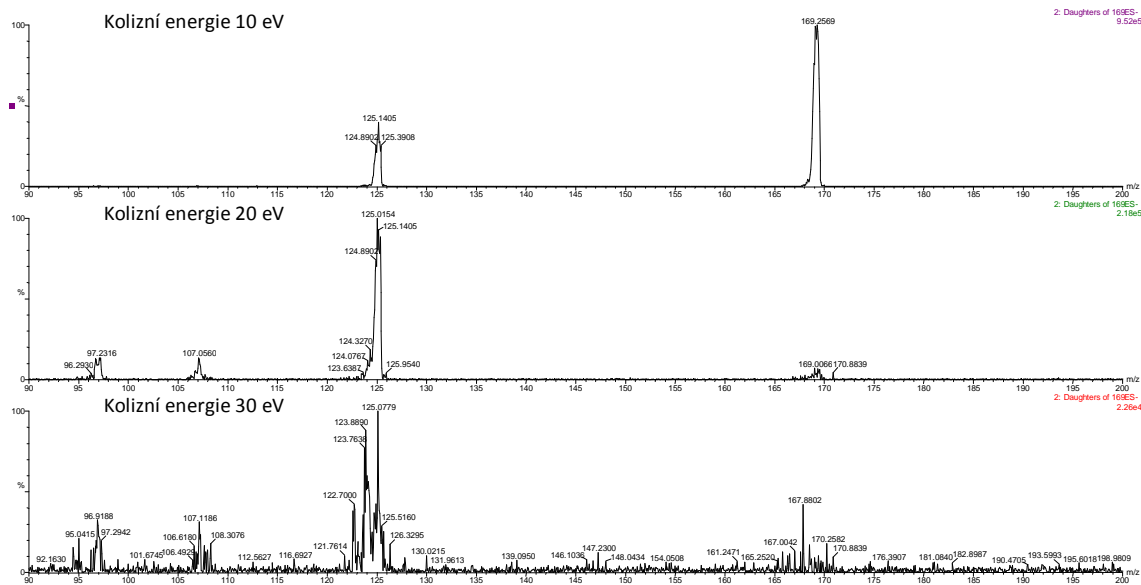
Předchozími měřeními bylo získáno optimální nastavení iontového zdroje, které bylo využito při výběru produktových iontů. Při tomto typu měření byly vybrané prekurzorové ionty fragmentovány v kolizní cele analyzátoru působením kolizního plynu respektive vložené kolizní energie. Vznikající fragmenty byly sledovány v rozsahu hodnot m/z od 90 do 400. Jako kolizní plyn byl použit argon.

Byly provedeny skeny produktových iontů pro ionizační techniky ESI a APCI v negativním záznamu iontů. K analýze byly použity pracovní roztoky o koncentracích $10^{-5} \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Cílem bylo pro jednotlivé analyty a zvolené ionizační techniky vytipovat fragmenty vhodné pro další optimalizaci a následná měření v SRM módu.

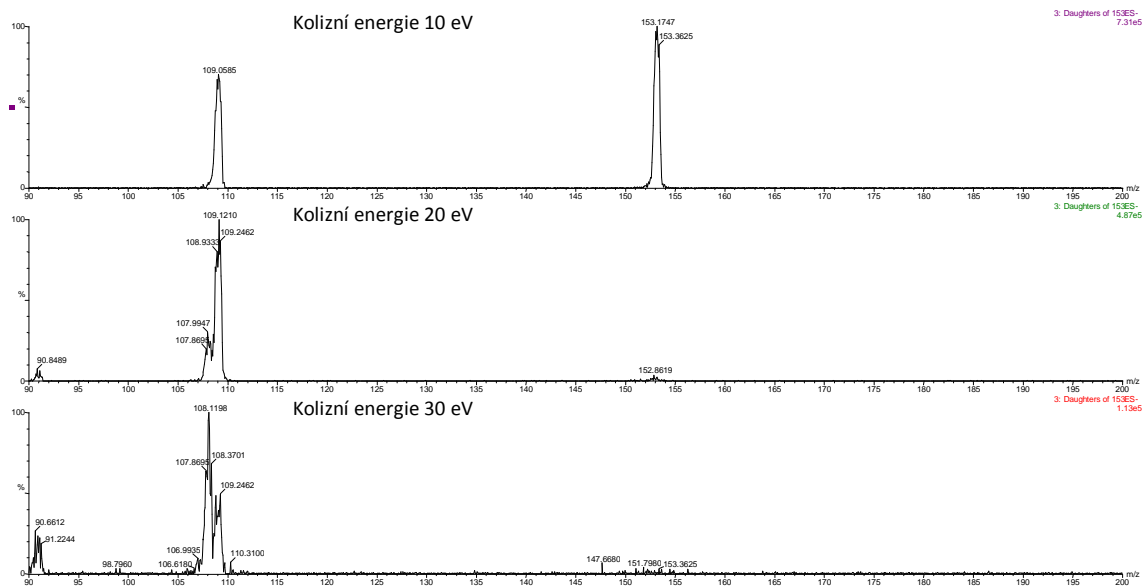
Produktové ionty byly vybírány na základě spekter produktových iontů pro kolizní energie 10eV, 20eV a 30eV uvedených na obrázcích 5.21 až 5.37. Vytipované fragmenty jsou shrnuty pro ESI ionizaci v tabulce 5.6 a pro APCI ionizaci v tabulce 5.7.



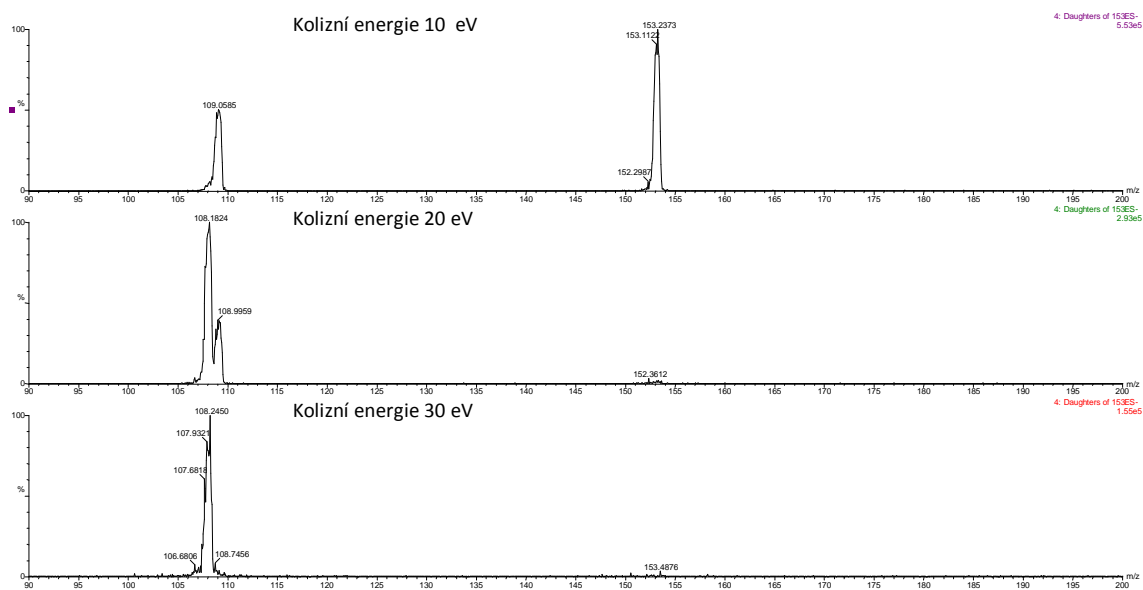
Obrázek 5.21: Produktová spektra (ESI) kys. shikimové pro kolizní energie 10, 20 a 30 eV.



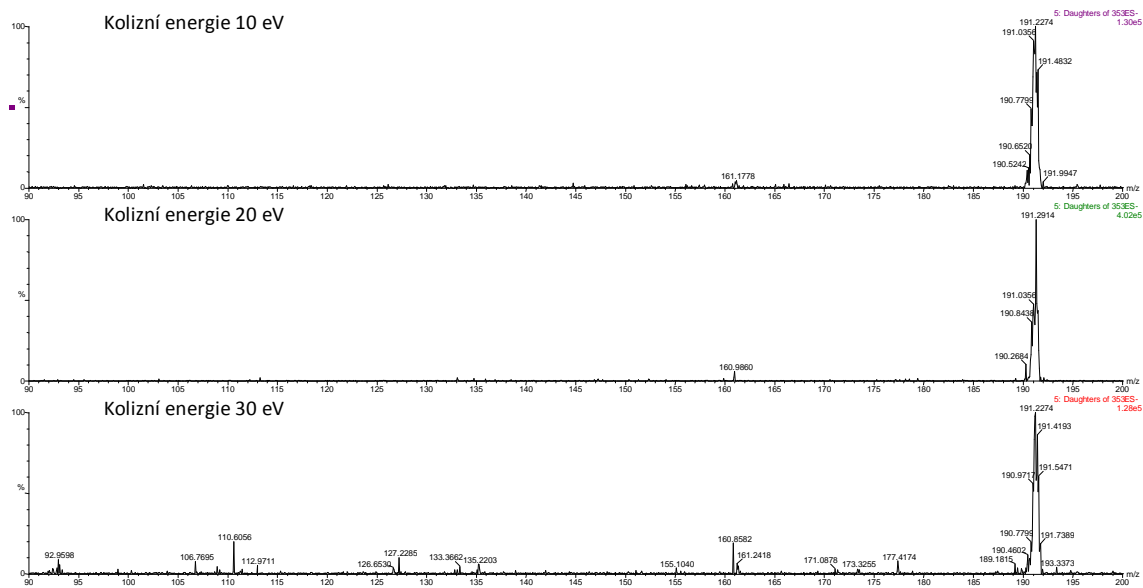
Obrázek 5.22: Produktová spektra (ESI) kys. galové pro kolizní energie 10, 20 a 30 eV.



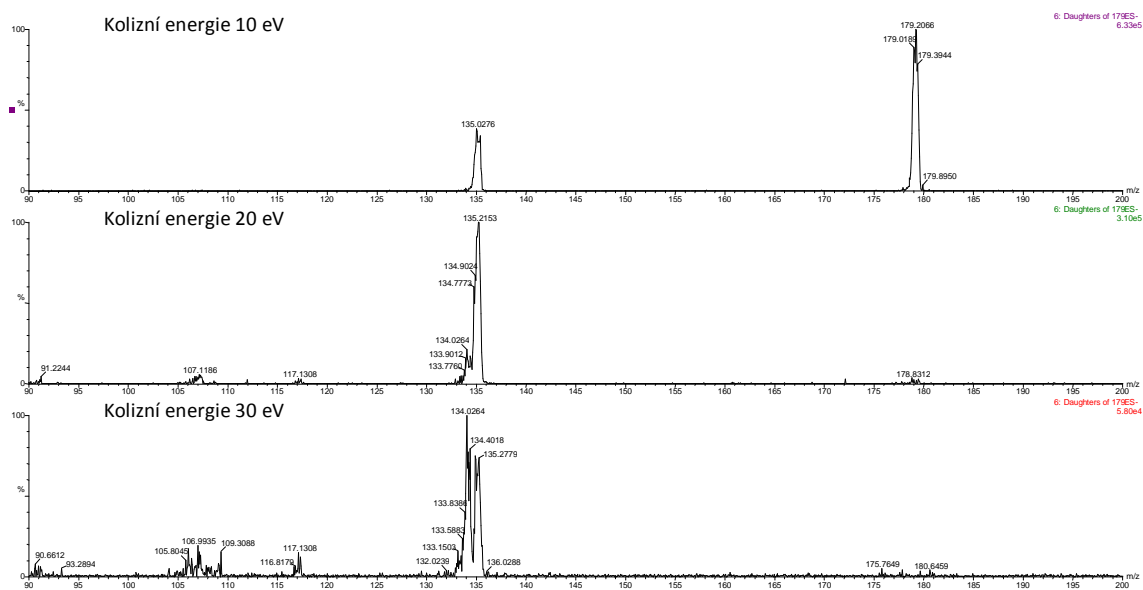
Obrázek 5.23: Produktová spektra (ESI) kys. protokatechové pro kolizní energie 10, 20 a 30 eV.



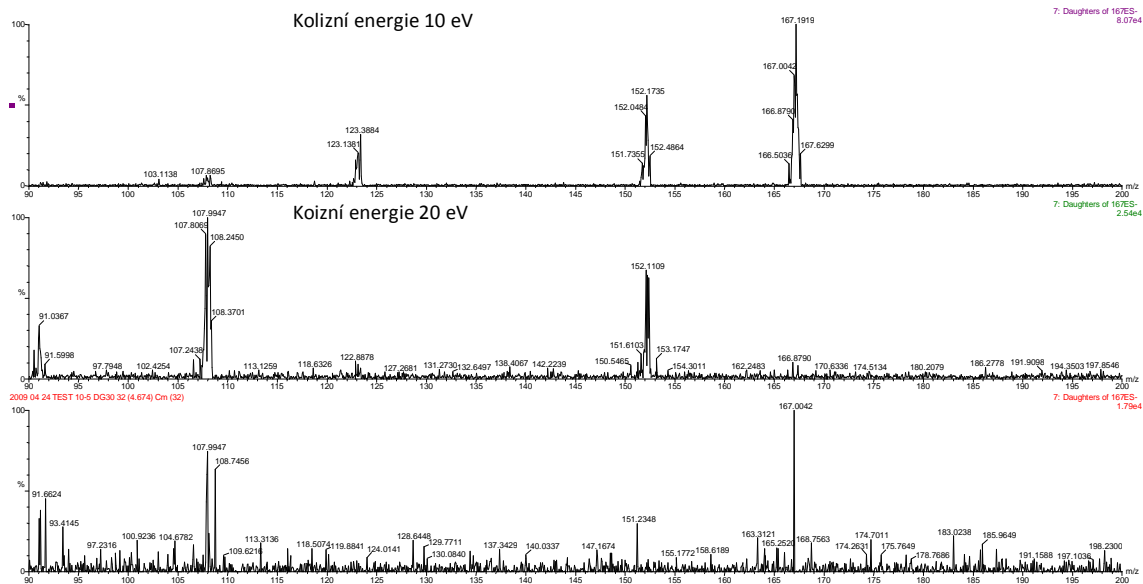
Obrázek 5.24: Produktová spektra (ESI) kys. gentisové pro kolizní energie 10, 20 a 30 eV.



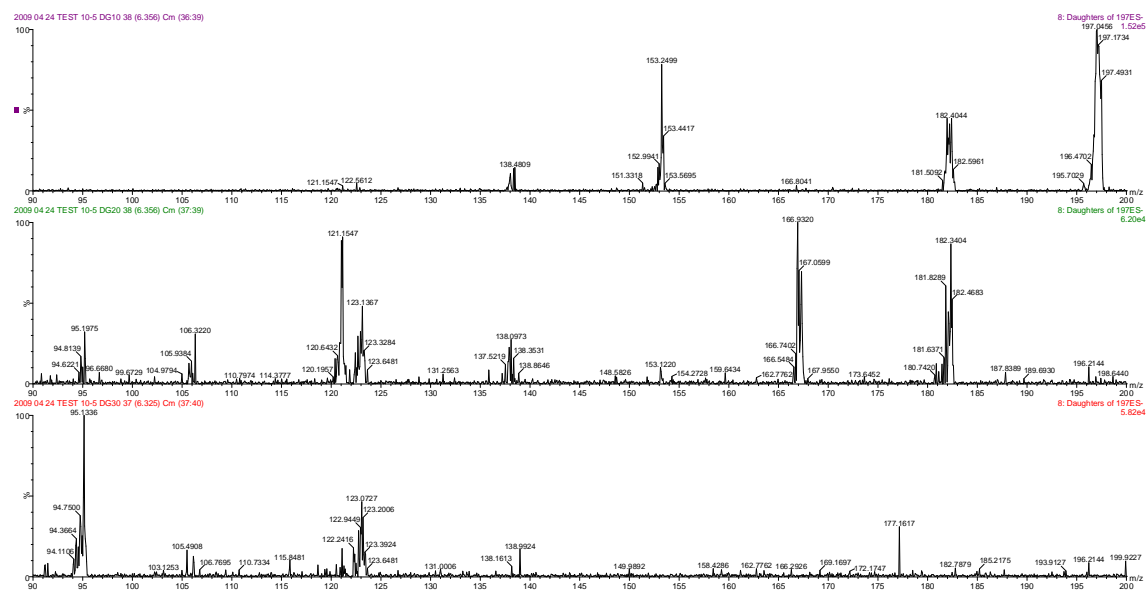
Obrázek 5.25: Produktová spektra (ESI) kys. chlorogenové pro kolizní energie 10, 20 a 30 eV.



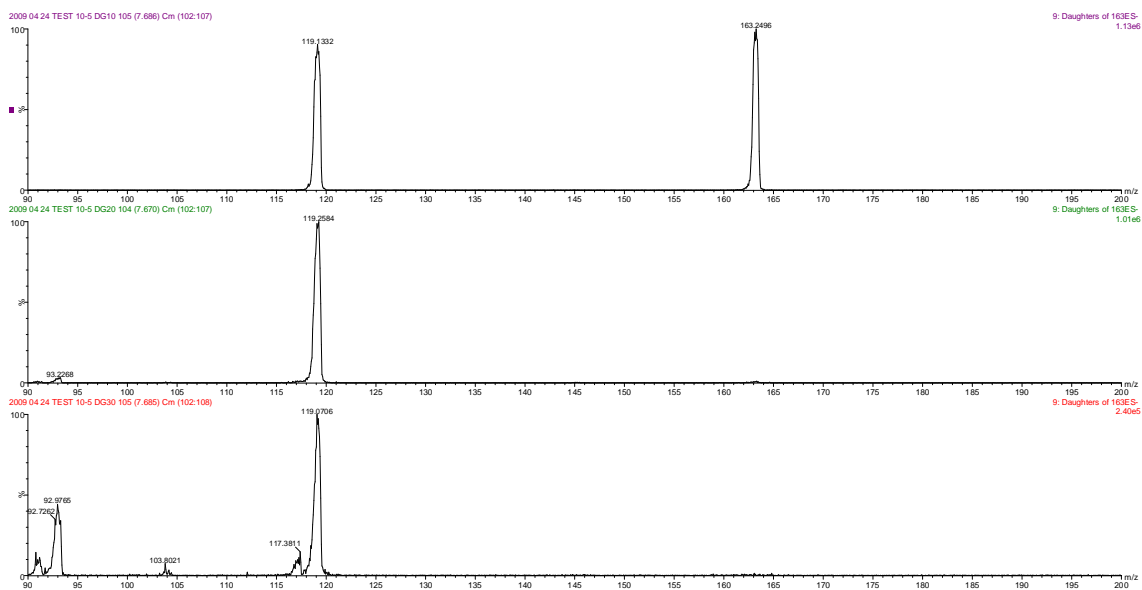
Obrázek 5.26: Produktová spektra (ESI) kys. kávové pro kolizní energie 10, 20 a 30 eV.



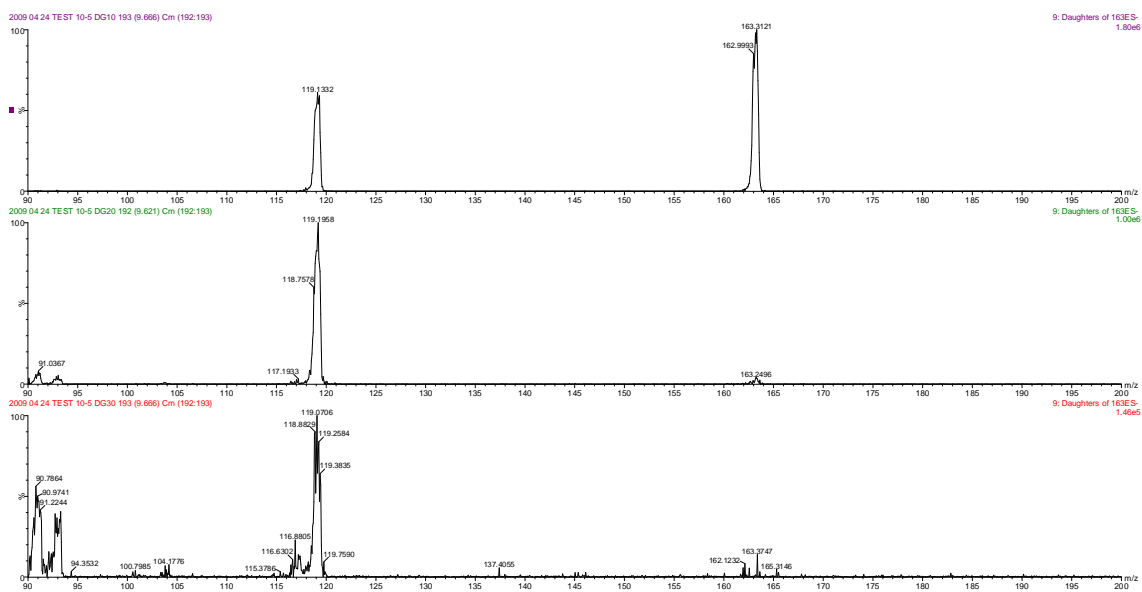
Obrázek 5.27: Produktová spektra (ESI) kys. vanilové pro kolizní energie 10, 20 a 30 eV.



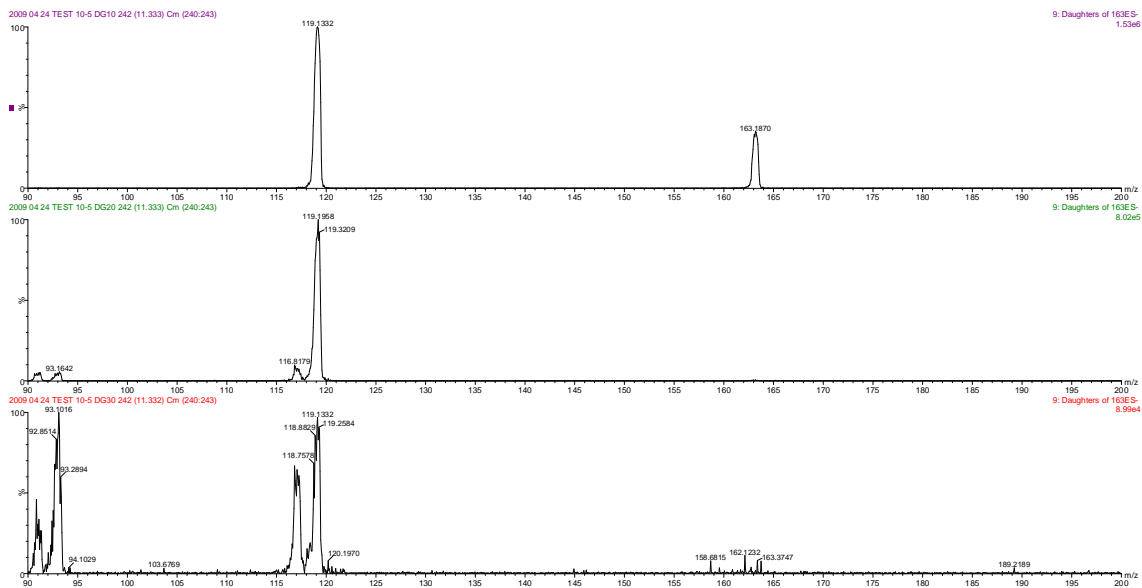
Obrázek 5.28: Produktová spektra (ESI) kys. syringové pro kolizní energie 10, 20 a 30 eV.



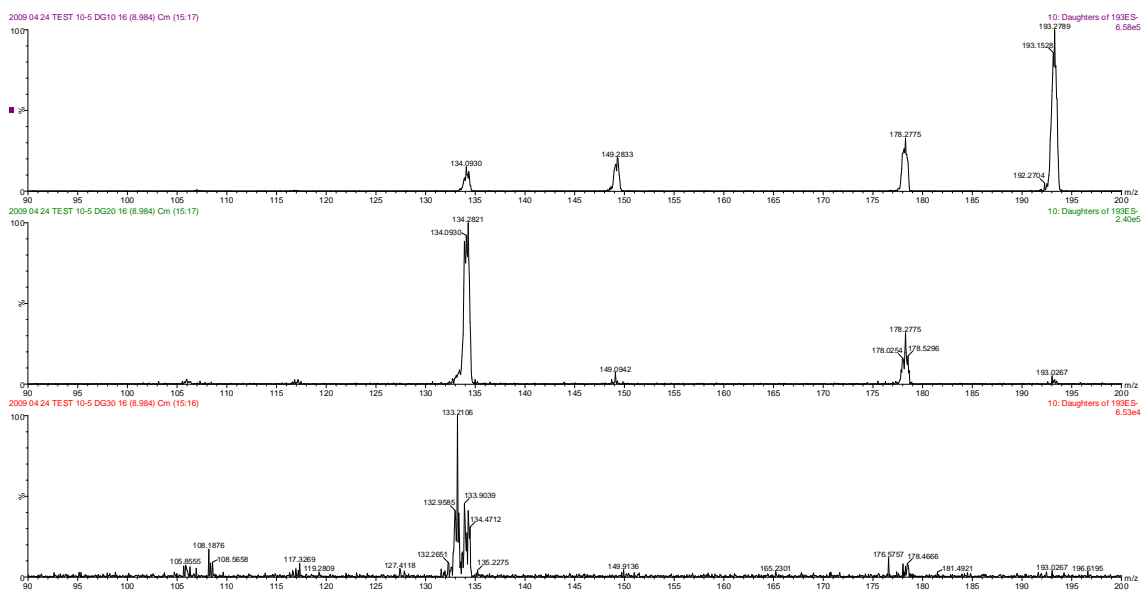
Obrázek 5.29: Produktová spektra (ESI⁻) kys. p-kumarové pro kolizní energie 10, 20 a 30 eV.



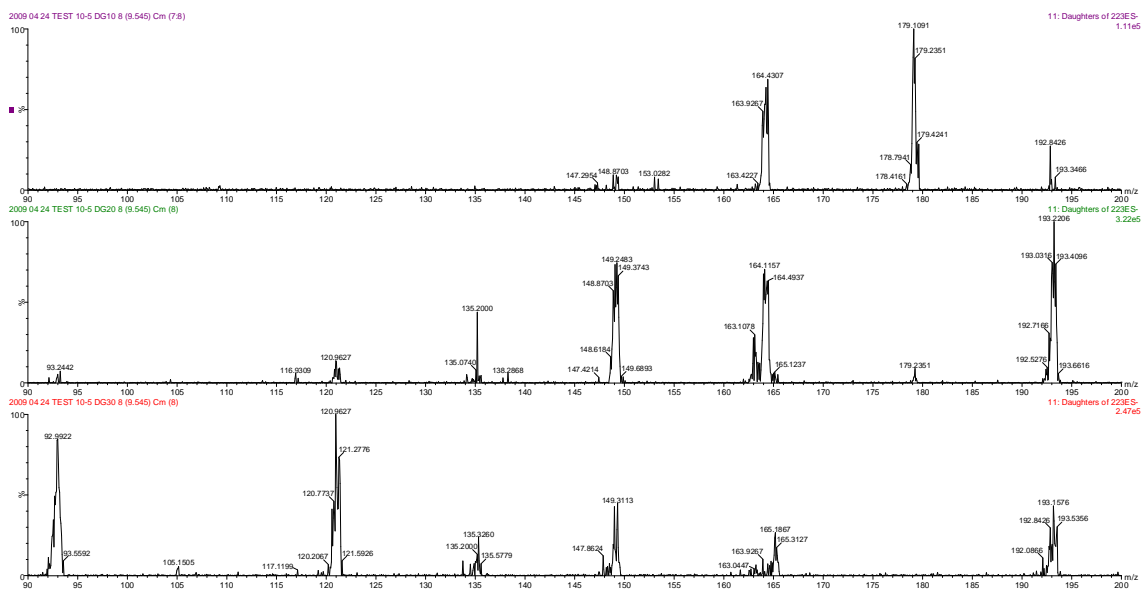
Obrázek 5.30: Produktová spektra (ESI⁻) kys. m-kumarové pro kolizní energie 10, 20 a 30 eV.



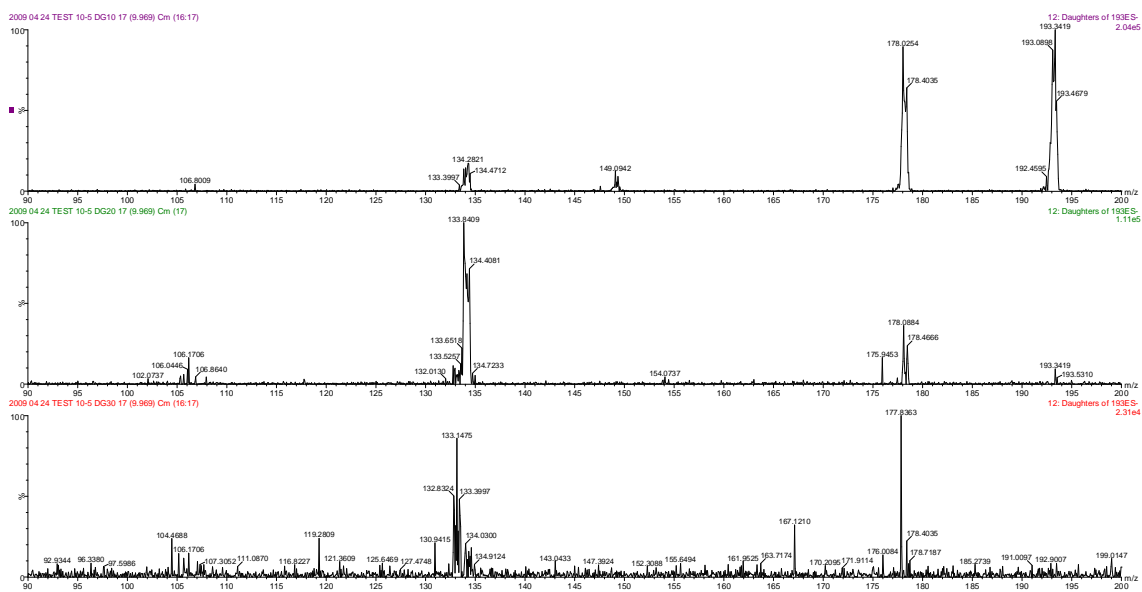
Obrázek 5.31: Produktová spektra (ESI⁻) kys. o-kumarové pro kolizní energie 10, 20 a 30 eV.



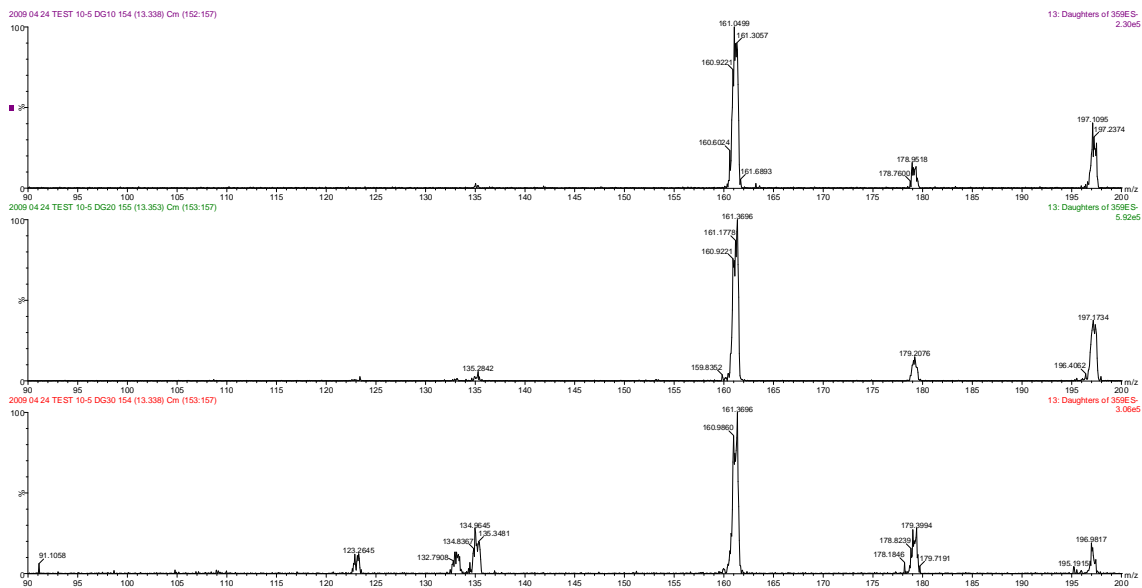
Obrázek 5.32: Produktová spektra (ESI⁻) kys. ferulové pro kolizní energie 10, 20 a 30 eV.



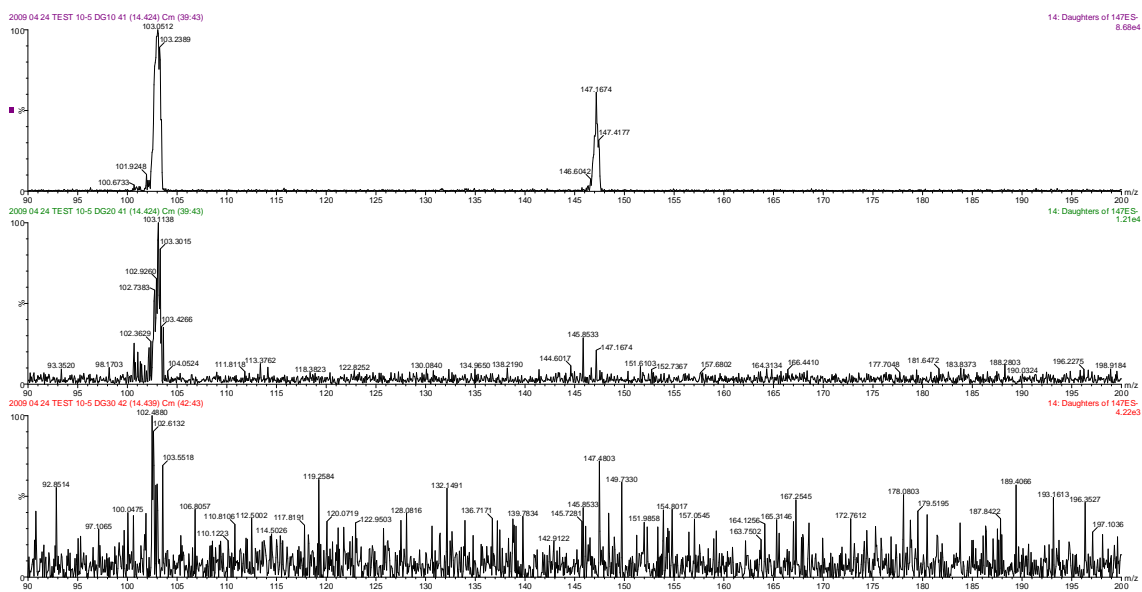
Obrázek 5.33: Produktová spektra (ESI⁺) kys. sinapové pro kolizní energie 10, 20 a 30 eV.



Obrázek 5.34: Produktová spektra (ESI⁺) kys. isoferulové pro kolizní energie 10, 20 a 30 eV.



Obrázek 5.35: Produktová spektra (ESI⁻) kys. rozmarýnové pro kolizní energie 10, 20 a 30 eV.



Obrázek 5.36: Produktová spektra (ESI⁻) kys. skořicové pro kolizní energie 10, 20 a 30 eV.

Analyt	Prekurzor (m/z)	Vybrané produktové ionty (m/z)		
		1.	2.	3.
Kys. shikimová	173,3	93,0	137,3	111,3
Kys. gallová	169,1	125,1	107,1	96,7
Kys. protokatechová	153,1	109,1	91,0	-
Kys. gentisová	153,1	109,1	108,2	-
Kys. chlorogenová	353,3	191,2	161,0	-
Kys. kávová	179,2	135,0	117,1	107,1
Kys. vanillová	167,2	152,2	108,0	123,4
Kys. syringová	197,1	182,4	138,5	153,3
Kys. o-kumarová	163,2	119,2	93,1	-
Kys. m-kumarová	163,2	119,2	93,1	-
Kys. p-kumarová	163,2	119,2	93,1	-
Kys. ferulová	193,2	178,3	134,1	149,3
Kys. isoferulová	193,2	178,0	149,1	134,0
Kys. sinapová	223,3	208,2	164,4	193,2
Kys. rozmarýnová	359,3	161,3	197,1	179,2
Kys. skořicová	147,1	103,1	134,4	-

Tabulka 5.6: Vybrané produktové ionty při ionizaci ESI v negativním módu.

Analyt	Prekurzor (m/z)	Vybrané produktové ionty (m/z)		
		1.	2.	3.
Kys. shikimová	173,3	155,2	92,9	111,3
Kys. gallová	169,1	125,1	97,0	106,7
Kys. protokatechová	153,1	109,1	91,3	-
Kys. gentisová	153,1	109,3	-	-
Kys. chlorogenová	353,3	191,4	148,4	-
Kys. kávová	179,2	135,3	106,4	117,0
Kys. vanillová	167,3	107,7	152,1	122,8
Kys. syringová	197,2	182,2	138,3	120,8
Kys. o-kumarová	163,2	119,1	91,0	93,2
Kys. m-kumarová	163,2	119,1	91,0	93,2
Kys. p-kumarová	163,2	119,1	91,0	93,2
Kys. ferulová	193,2	178,2	149,4	134,4
Kys. isoferulová	193,2	178,5	148,8	134,6
Kys. sinapová	223,3	208,3	192,9	163,9
Kys. rozmarýnová	359,3	161,4	197,2	179,1
Kys. skořicová	147,1	103,1	119,1	-

Tabulka 5.7: Vybrané produktové ionty při ionizaci APCI v negativním módu.

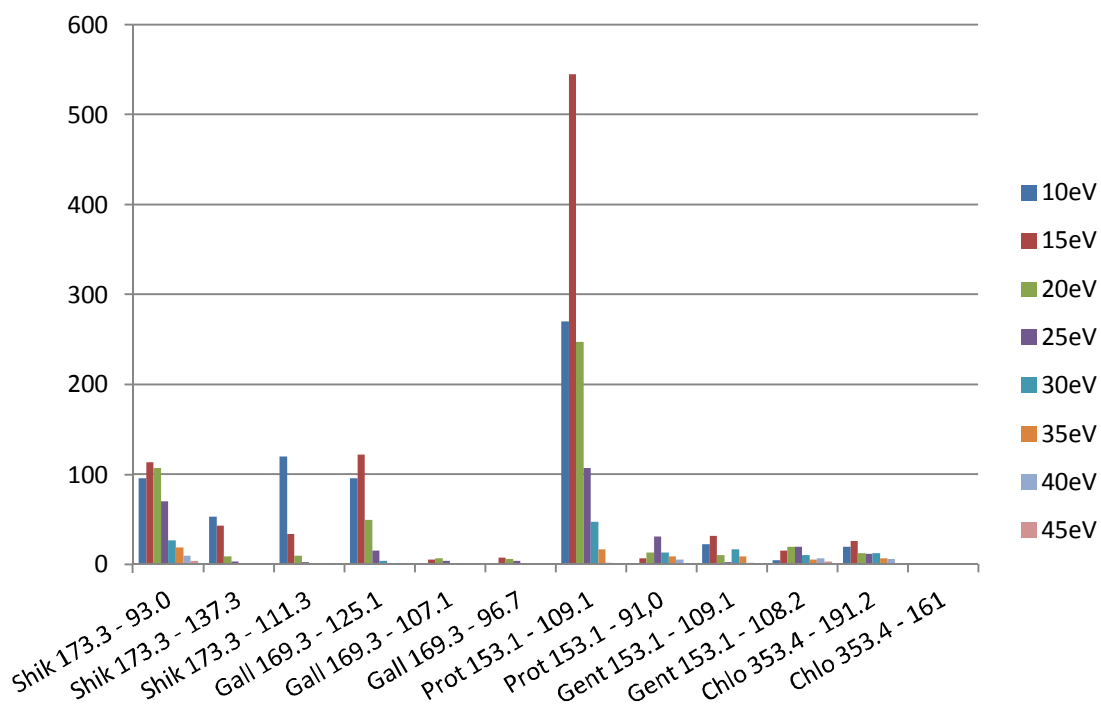
5.2.4 Optimalizace iontových přechodů SRM

Díky výsledkům ze skenů produktových spekter byly identifikovány vhodné iontové přechody. Tedy konkrétní hmoty vzniklých iontů, které byly produkovány fragmentací přesně definovaných prekurzorových iontů. Znalost těchto přechodů je nutná pro měření v módu SRM. Tato měření jsou díky vyfiltrování konkrétního prekurzoru z celého iontového proudu, jeho fragmentaci a opět sledování jedné konkrétní hodnoty m/z velice selektivní a citlivá. Mohou se s výhodou použít při kvantitativní analýze složitých směsí.

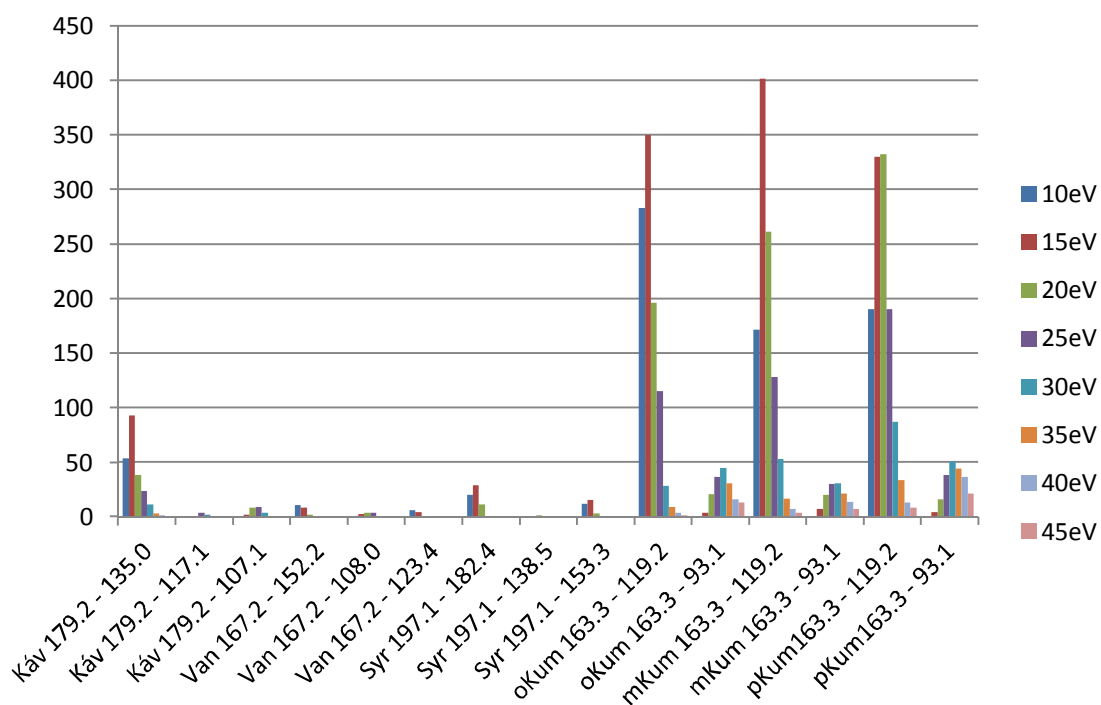
Pro tento účel bylo ale nejprve nutné vyladit kolizní energii tak, aby intenzita sledovaného produktového iontu byla maximální a podle výsledků zvolit ten nejvhodnější iontový přechod. Pro všechny vytipované přechody byly provedeny série měření s odstupňovaným nastavením hodnoty kolizní energie v rozmezí od 10eV do 45eV. K měření byl použit pracovní roztok o koncentraci $10^{-6} \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a získaná data byla vyhodnocena na základě průměrů ploch píků ze dvou měření.

5.2.4.1 Optimalizace iontových přechodů pro ESI

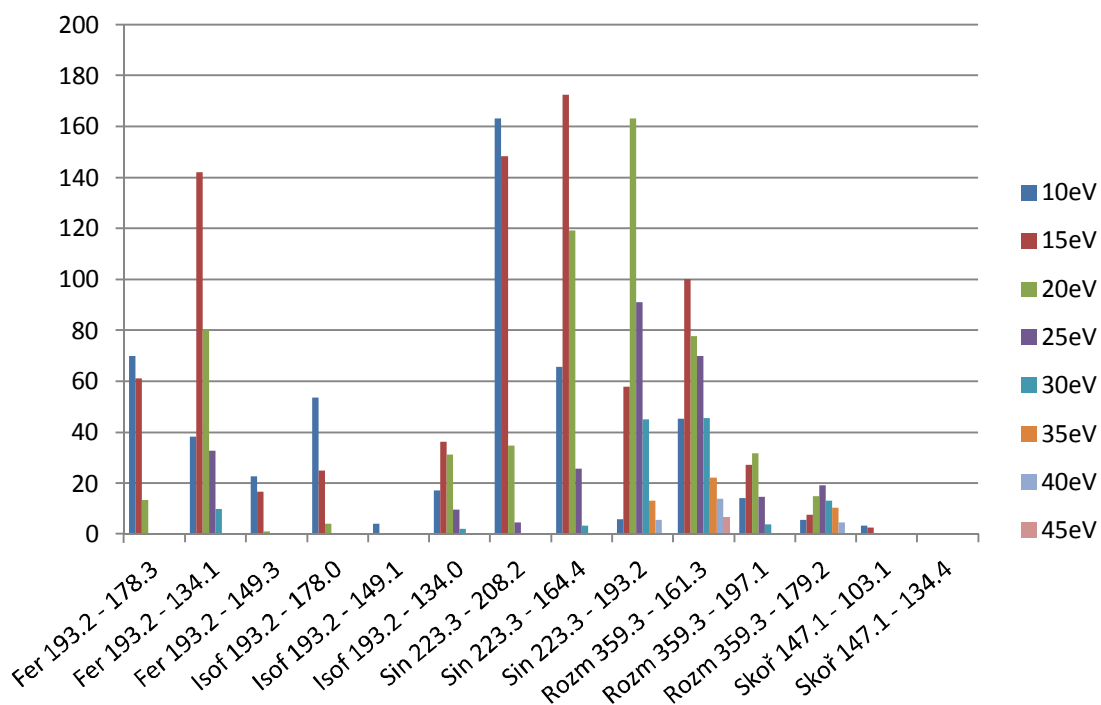
Měření probíhala v SRM negativním módu a byl sledován iontový přechod mezi prekurzorovým iontem $[\text{M}-\text{H}]^-$ a vybranými produktovými ionty. Na základě výsledků byl zvolen nejvhodnější iontový přechod a odpovídající kolizní energie pro každý analyt. Obrázky 5.37 až 5.39 zachycují výsledky měření těchto fenolických kyselin. Nejvhodnější iontové přechody a příslušné kolizní energie pro jednotlivé analyty jsou shrnuty v tabulce 5.8.



Obrázek 5.37: Optimalizace iontových SRM přechodů ESI⁻ pro kyseliny: shikimovou (Shik), gallovou (Gall), protocatechovou (Prot), gentisovou (Gen) a chlorogenovou (Chlo).



Obrázek 5.38: Optimalizace iontových SRM přechodů ESI⁻ pro kyseliny: kávovou (Káv), vanillovou (Van), Syringovou (Syr), o-kumarovou (oKum), m-kumarovou (mKum) a p-kumarovou (pKum).



Obrázek 5.39: Optimalizace iontových SRM přechodů ESI⁻ pro kyseliny: ferulovou (Fer), isoferulovou (Isof), sinapovou (Sin), rozmarýnovou (Rozm) a skořicovou (Skoř).

Analyt	Iontový přechod	CE [eV]
Kys. shikimová	173,3 → 93,0	15
Kys. gallová	169,1 → 125,1	15
Kys. protokatechová	153,1 → 109,1	15
Kys. gentisová	153,1 → 109,1	15
Kys. chlorogenová	353,3 → 191,2	15
Kys. kávová	179,2 → 135,0	15
Kys. vanillová	167,2 → 152,2	10
Kys. syringová	197,1 → 182,4	15
Kys. o-kumarová	163,2 → 119,2	15
Kys. m-kumarová	163,2 → 119,2	15
Kys. p-kumarová	163,2 → 119,2	15
Kys. ferulová	193,2 → 134,1	15
Kys. isoferulová	193,2 → 134,0	15
Kys. sinapová	223,3 → 164,4	15
Kys. rozmarýnová	359,3 → 161,3	15
Kys. skořicová	147,1 → 103,1	10

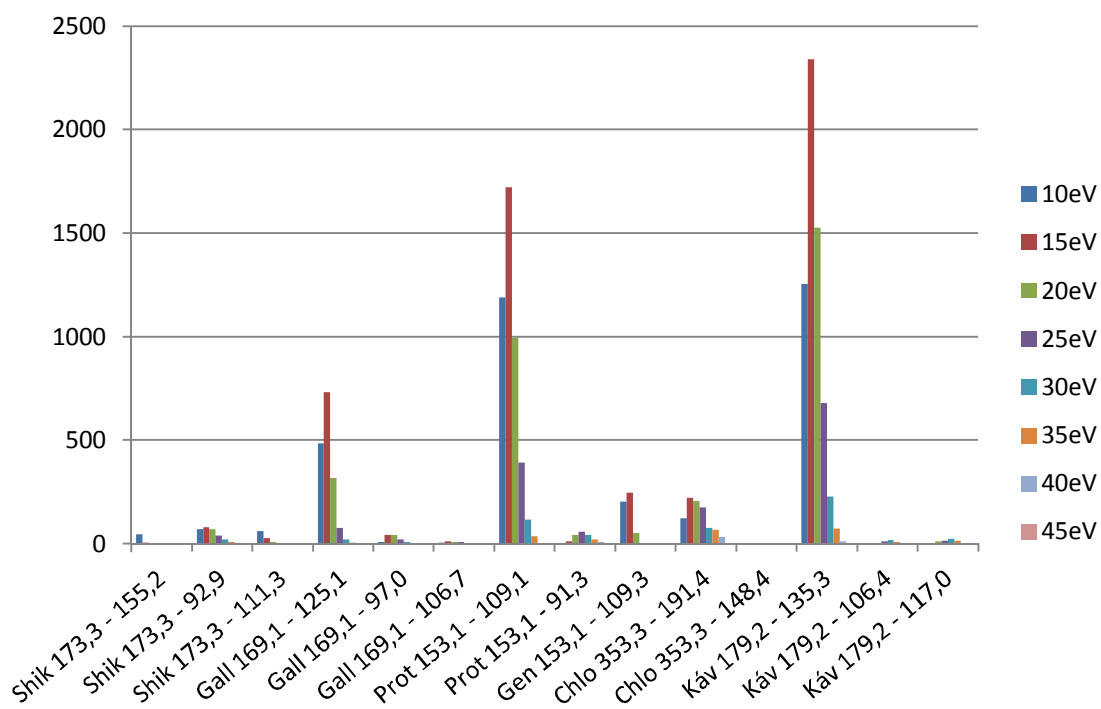
Tabulka 5.8: Vybrané iontové přechody pro SRM mód při ESI⁻ ionizaci.

5.2.4.2 Optimalizace iontových přechodů pro APCI

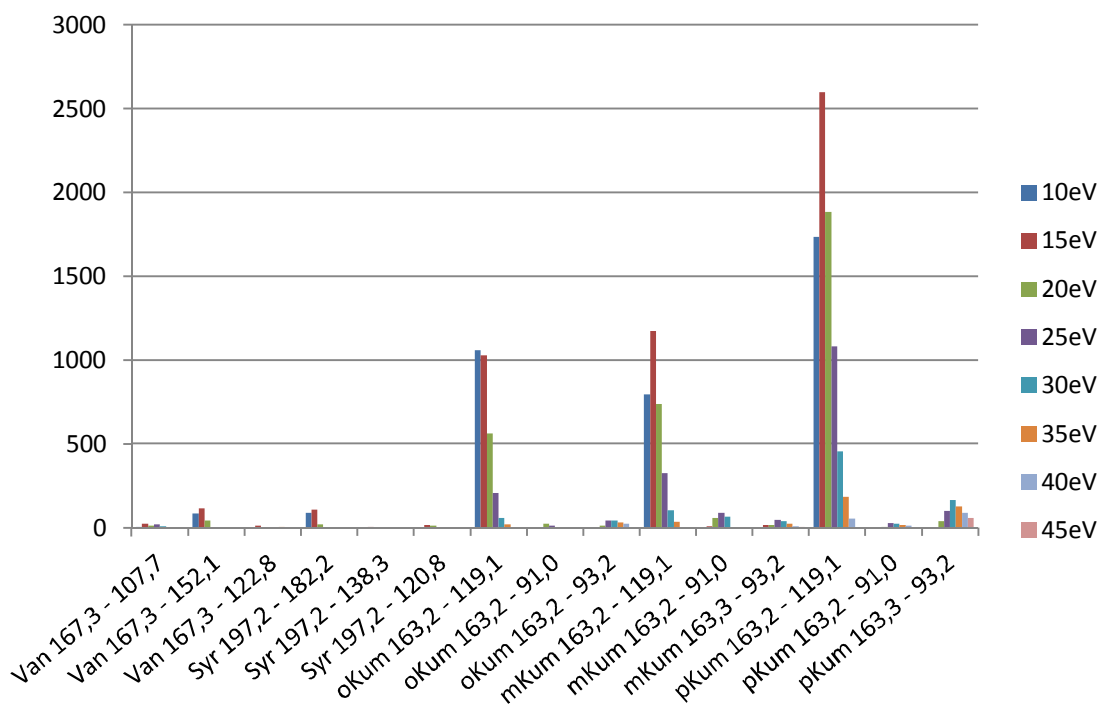
Výběr a optimalizace iontových přechodů probíhala obdobně jako v případě ionizace elektrosprejem. Výsledky měření pro zadané analyty jsou shrnuty na obrázcích 5.40 až 5.42.

Podle měřítka grafu osy y na obrázku 5.35 je vidět, že odezvy vyjádřené plochou píků nejsou vysoké. V některých případech nebylo možné určit plochu píků nebo jejich hodnota výrazně kolísala, proto v případě kyseliny isoferulové a sinapové byly hodnoty zvoleny podle souboru získaných hodnot a vzhledu chromatografických signálů.

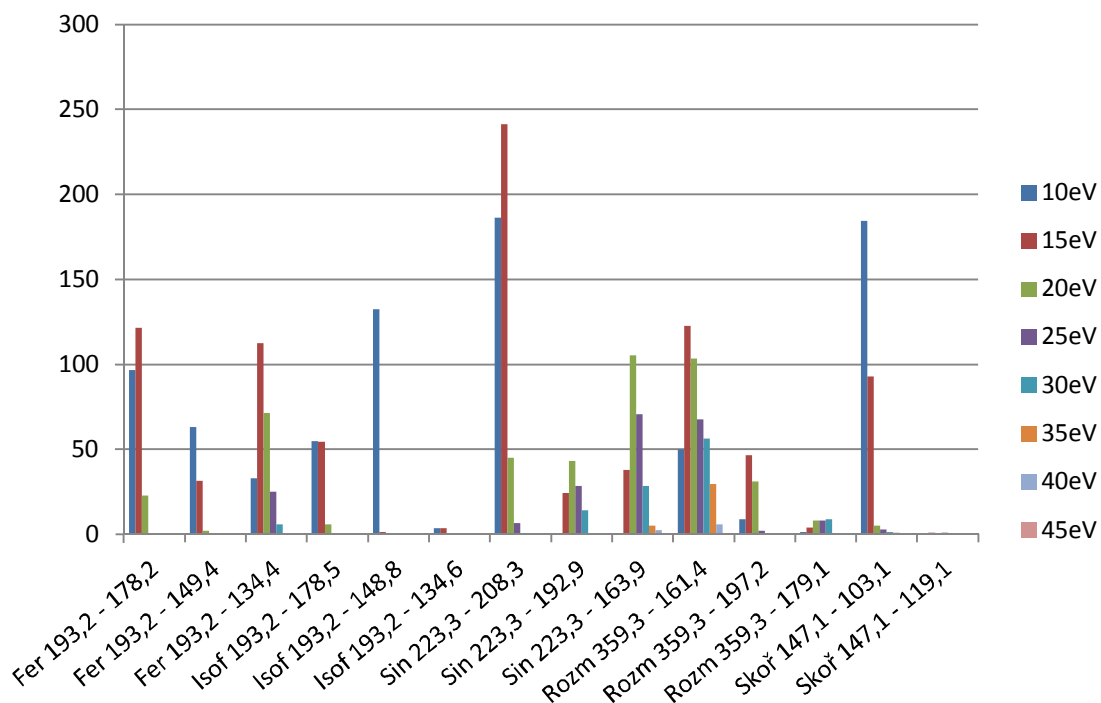
Vybrané hodnoty iontových přechodů a jejich kolizní energie pro každý analyt jsou shrnuty v tabulce 5.9.



Obrázek 5.40: Optimalizace iontových přechodů APCI pro kyseliny: shikimovou (Shik), gallovou (Gall), protokatechovou (Prot), gentisovou (Gen), chlorogenovou (Chlo) kávovou (Káv).



Obrázek 5.41: Optimalizace iontových přechodů APCI⁻ pro kyseliny: vanillovou (Van), Syringovou (Syr), o-kumarovou (oKum), m-kumarovou (mKum) a p-kumarovou (pKum).



Obrázek 5.42: Optimalizace iontových přechodů APCI⁻ pro kyseliny: ferulovou (Fer), isoferulovou (Isof), sinapovou (Sin), rozmarýnovou (Rozm) a skořicovou (Skoř).

Analyt	Iontový přechod	CE [eV]
Kys. shikimová	173,3 → 92,9	10
Kys. gallová	169,1 → 125,1	15
Kys. protokatechová	153,1 → 109,1	15
Kys. gentisová	153,1 → 109,3	15
Kys. chlorogenová	353,3 → 191,4	15
Kys. kávová	179,2 → 135,3	15
Kys. vanillová	167,2 → 152,1	15
Kys. syringová	197,1 → 182,2	15
Kys. o-kumarová	163,2 → 119,1	15
Kys. m-kumarová	163,2 → 119,1	15
Kys. p-kumarová	163,2 → 119,1	15
Kys. ferulová	193,2 → 134,4	15
Kys. isoferulová	193,2 → 134,6	15
Kys. sinapová	223,3 → 163,9	15
Kys. rozmarýnová	359,3 → 161,4	15
Kys. skořicová	147,1 → 103,1	10

Tabulka 5.9: Vybrané iontové přechody pro SRM mód při APCI⁻ ionizaci.

5.3 Opakovatelnost nástřiku

Další sérií experimentů byla změřena opakovatelnost nástřiku. K měření byly použity optimální parametry zjištěné v rámci SIM (viz. kapitola 5.2.2). Byly provedeny série deseti měření, vždy za identických podmínek, pro pracovní roztok o koncentraci $10^{-6} \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$, a to v negativních módech pro ionizační techniky ESI a APCI. Opakovatelnost byla vyjádřena relativní směrodatnou odchylkou pro retenční časy a plochy píků analyzovaných látek. Výsledky shrnuje tabulka 5.10.

Analyt ($10^{-6} \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	ESI ionizace		APCI ionizace	
	A [%RDS]	t_r [%RDS]	A [%RDS]	t_r [%RDS]
Kys. shikimová	2,68	0,65	4,72	0,85
Kys. gallová	1,32	0,30	4,42	0,30
Kys. protokatechová	0,65	0,17	3,44	0,23
Kys. gentisová	30,54	0,39	5,73	0,31
Kys. chlorogenová	34,61	0,46	2,26	0,21
Kys. kávová	2,61	0,24	3,59	0,18
Kys. vanilová	46,71	0,81	6,92	0,22
Kys. syringová	32,04	0,37	5,17	0,16
Kys. o-kumarová	0,80	0,04	3,25	0,06
Kys. m-kumarová	1,34	0,00	2,45	0,05
Kys. p-kumarová	0,95	0,09	3,02	0,14
Kys. ferulová	5,99	0,07	3,99	0,07
Kys. isoferulová	32,74	0,23	4,21	0,11
Kys. sinapová	4,23	0,05	41,12	0,83
Kys. rozmarýnová	1,64	0,06	7,40	0,08
Kys. skořicová	43,55	0,16	14,81	0,01

Tabulka 5.10: Opakovatelnost v negativním módu pro ESI a APCI ionizaci.

Požadavek pro opakovatelnost retenčních časů byl RDS < 1% a pro plochy píků byl RDS < 10%. Parametr opakovatelnosti pro retenční časy byl splněn pro všechny analyty a to při obou typech ionizace. Opakovatelnost plochy píku v negativním módu ESI nebyla splněna pro kyselinu skořicovou, isoferulovou a syringovou. V negativním módu APCI ionizace tento parametr nevyhovoval u sinapové

5.4 Ověření linearity a citlivosti metody

Ověření citlivosti a linearity bylo provedeno proměřením kalibračních křivek. K jejich sestavení byly použity roztoky v rozmezí koncentrací od $2 \cdot 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ do $10^{-6} \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (koncentrace: $2 \cdot 10^{-3}$, 10^{-3} , $5 \cdot 10^{-4}$, $2 \cdot 10^{-4}$, 10^{-4} , $5 \cdot 10^{-5}$, $2 \cdot 10^{-5}$, 10^{-5} , $5 \cdot 10^{-6}$, $2 \cdot 10^{-6}$ a $10^{-6} \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).

Měření probíhala v módu SRM a k nastavení byla použita optimální nastavení (viz. kapitola 5.2.2) a nejvhodnější iontové přechody pro daný analyt s příslušnou kolizní energií. (viz. kapitola 5.2.3 a 5.2.4).

Citlivost metody byla vyjádřena pomocí limitu detekce a limitu kvantifikace. Linearita byla vyjádřena korelačním koeficientem. Výsledky jsou shrnuty v tabulkách 5.11, 5.12 a 5.13. Jak je vidět podle výsledků, hodnoty korelačních koeficientů analytů s dobrou odezvou jsou vysoké a odezva detektoru je lineární. V případě fenolických kyselin se slabší odezvou (kys. isoferulová, skořicová v ESI⁻ a kyselina sinapová v APCI⁻) nebyl získán dostatečný počet bodů kalibrační křivky pro důkaz linearity.

Analyt ($10^{-6} \text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	ESI ⁻ ionizace	APCI ⁻ ionizace
	Korelační koeficient	Korelační koeficient
Kys. shikimová	1,0000	0,9997
Kys. gallová	0,9999	0,9972
Kys. protokatechová	0,9997	0,9966
Kys. gentisová	0,9985	0,9995
Kys. chlorogenová	0,9956	0,9986
Kys. kávová	0,9993	0,9964
Kys. vanilová	0,9945	0,9982
Kys. syringová	0,9874	0,9984
Kys. o-kumarová	1,0000	0,9999
Kys. m-kumarová	1,0000	0,9986
Kys. p-kumarová	0,9995	0,9949
Kys. ferulová	0,9995	0,9995
Kys. isoferulová	0,9533	0,9971
Kys. sinapová	0,9996	0,6882
Kys. rozmarýnová	0,9998	0,9961
Kys. skořicová	0,9337	0,9933

Tabulka 5.11: Ověření linearity metod ESI a APCI v negativním módu.

Analyt	LOD $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	LOQ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	Směrnice přímky
Kys. shikimová	0,020	0,066	576,639
Kys. gallová	0,010	0,033	2867,72
Kys. protokatechová	0,002	0,007	8166,44
Kys. gentisová	1,000	3,300	--
Kys. chlorogenová	2,000	6,600	--
Kys. kávová	0,100	0,330	2467,17
Kys. vanilová	2,000	6,600	--
Kys. syringová	2,000	6,600	--
Kys. o-kumarová	0,010	0,033	8693,67
Kys. m-kumarová	0,005	0,017	6446,15
Kys. p-kumarová	0,005	0,017	9162,18
Kys. ferulová	0,020	0,066	919,599
Kys. isoferulová	2,000	6,600	--
Kys. sinapová	0,020	0,066	657,923
Kys. rozmarýnová	0,050	0,165	1057,91
Kys. skořicová	2,000	6,600	--

Tabulka 5.12: Ověření citlivosti metody v ESI negativním módu.

Analyt	LOD $\mu\text{g}/\text{ml}$	LOQ $\mu\text{g}/\text{ml}$	Směrnice přímky
Kys. shikimová	0,100	0,33	233,871
Kys. gallová	0,002	0,007	3947,15
Kys. protokatechová	0,002	0,007	4401,46
Kys. gentisová	0,050	0,165	743,51
Kys. chlorogenová	0,020	0,066	1207
Kys. kávová	0,020	0,066	10057,9
Kys. vanilová	0,200	0,660	254,979
Kys. syringová	0,100	0,330	150,962
Kys. o-kumarová	0,020	0,066	3882,43
Kys. m-kumarová	0,050	0,165	2713,93
Kys. p-kumarová	0,020	0,066	8394,01
Kys. ferulová	0,020	0,066	737,455
Kys. isoferulová	0,200	0,660	126,157
Kys. sinapová	2,000	6,600	--
Kys. rozmarýnová	0,100	0,330	111,335
Kys. skořicová	1,000	3,300	231,922

Tabulka 5.13: Ověření citlivosti metody v APCI negativním módu.

6. Závěr

Cílem této práce bylo zjistit optimální podmínky pro stanovení směsi fenolických kyselin tandemovým hmotnostním spektrometrem ve spojení s UHPLC a posoudit vhodnost použití ionizačních technik ESI a APCI.

Byl proveden základní sken směsi analytů v pozitivním i negativním módu s využitím ionizačních technik ESI a APCI. V pozitivním módu vykazovaly analyty slabou nebo žádnou odezvu, a proto byla další optimalizace a měření provedena v negativním módu. Podle výsledků ze základního skenu byly jako prekurzorové ionty vybrány deprotonované molekuly analytů $[M-H]^-$, které vykazovaly nejvyšší relativní intenzity. Dále byla provedena série ladících měření v SIM módu a bylo zvoleno optimální nastavení hmotnostního detektoru jak pro ionizační techniku ESI⁻, tak pro APCI⁻. Ionizace elektrosprejem byla shledána při analýze celkové směsi fenolických kyselin jako citlivější. Analyty byly podrobeny skenu produktových iontů při třech různých kolizních energiích a na základě výsledků byly zvoleny potenciálně vhodné iontové přechody pro kvantifikační mód SRM. Tyto iontové přechody byly sledovány v sérii měření pro různé kolizní energie a pro každý z analytů byl zvolen nejvhodnější fragment respektive iontový přechod a jeho optimální kolizní energie. Byla změřena opakovatelnost nástřiku za optimálních podmínek nastavení hmotnostního spektrometru a výsledky byly vyjádřeny směrodatnou odchylkou retenčních časů a ploch píků. Požadavek opakovatelnosti RSD < 1% pro retenční čas byl splněn u všech analyzovaných látek a to pro ESI⁻ i APCI⁻. Opakovatelnost plochy píků vyjádřená RSD < 10% nebyla splněna u některých měření, kvůli nízké odezvě. Byla také ověřena linearita a citlivost metody. Metoda je lineární, pouze analyty se špatnou odezvou měly hodnoty korelačního koeficientu pod 0,9900: kys. isoferulová 0,9533 (ESI⁻) a kys. skořicová 0,9337 (ESI⁻). Pro jednotlivé fenolické kyseliny byly stanoveny limity detekce v rozmezí 0,002 – 2,000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro ESI⁻ a 0,002 – 2,000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro APCI⁻. Limity kvantifikace byly v rozmezí 0,007 – 6,600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Pro ESI⁻ a v tom též rozmezí pro APCI⁻. Kyselina skořicová a isoferulová měla vyšší hodnoty LOD a LOQ při použití APCI ionizace.

Dostatečnou citlivost se nepodařilo získat u všech šestnácti sledovaných fenolických kyselin. Za daných chromatografických podmínek není možné doporučit

ionizaci v pozitivním módu. V případě použití ionizační techniky v záporném módu je pro většinu zadaných fenolických kyselin vhodnější ESI. Kyseliny vanilová, isoferulová a skořicová nepodávaly dobrou odezvu. Zvýšení citlivosti analýzy těchto analytů by mělo být vyřešeno jiným způsobem (vyzkoušením aditiv nebo popřípadě derivatizací).

7. Použitá literatura

1. NOVÁKOVÁ, Lucie. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vyd. Praha: Lucie Nováková, 2013, 299 s. . ISBN 978-80-260-4243-3.
2. ARDREY, R. *Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction* [online]. New York: J. Wiley, c2003, xviii, 276 p. [cit. 2015-03-11]. ISBN 04-714-9801-7.
3. Sborník konference Pitná voda 2010: 10. pokračování konferencí Pitná voda z úrodných nádrží : 17.5 - 20.5.2010 v Táboře. 2010. České Budějovice: W, 441 s. ISBN 978-80-254-6854-8.
4. WU, Naijun a Andrew M. CLAUSEN. Fundamental and practical aspects of ultrahigh pressure liquid chromatography for fast separations. *Journal of Separation Science* [online]. 2007, vol. 30, issue 8, s. 1167-1182 [cit. 2015-03-11]. DOI: 10.1002/jssc.200700026.
5. WALTER, Thomas H. a Richard W. ANDREWS. 2014. Recent innovations in UHPLC columns and instrumentation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **63**: 14-20. DOI: 10.1016/j.trac.2014.07.016. ISSN 01659936. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993614001939>
6. FEKETE, Szabolcs, Isabelle KOHLER, Serge RUDAZ, Davy GUILLARME a SCOTT R. PERRIN. 2014. Importance of instrumentation for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **87**: 91-124. DOI: 10.1016/b978-0-08-041009-8.50008-4.
7. FEKETE, Szabolcs, Julie SCHAPPLER, Jean-Luc VEUTHEY a Davy GUILLARME. 2014. Current and future trends in UHPLC. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **63**: 2-13. DOI: 10.1016/j.trac.2014.08.007.
8. GUILLARME, Davy, Julie SCHAPPLER, Serge RUDAZ a Jean-Luc VEUTHEY. *Coupling ultra-high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry*. ISBN 10.1016/j.trac.2009.09.008.
9. NOVÁKOVÁ, Lucie. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vyd. Praha: Lucie Nováková, 2013, 235 s. ISBN 978-80-260-4244-0.
10. *Český lékopis 2009*. 2009. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 1176 s. ISBN 978-802-4729-947.
11. Mazzeo JR, Neue UD, Kele M, Plumb RS. A new separation technique takes advantage of sub-2-um porous particles. *Anal Chem* 2005;77:460A—467A.

12. K. D. Wyndham, J. E. O'Gara, T. H. Walter et al., "Characterization and evaluation of C18 HPLC stationary phases based on ethyl-bridged hybrid organic/inorganic particles," *Analytical Chemistry*, vol. 75, no. 24, pp. 6781–6788, 2003.
13. S. Fekete, D. Guillarme, M.W. Dong Superficially porous particles: perspectives, practices and trends *LC GC N. Am*, 32 (2014), pp. 2–12
14. GRITTI, Fabrice a Georges GUIOCHON. 2010. Mass transfer resistance in narrow-bore columns packed with 1.7µm particles in very high pressure liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. **1217**(31): 5069-5083. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.05.059. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967310007314>
15. GUIOCHON, Georges a Fabrice GRITTI. 2011. Shell particles, trials, tribulations and triumphs. *Journal of Chromatography A*. **1218**(15): 1915-1938. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.01.080. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967311001610>
16. DE VILLIERS, André, Frédéric LYNNEN a Pat SANDRA. 2009. Effect of analyte properties on the kinetic performance of liquid chromatographic separations. *Journal of Chromatography A*. **1216**(16): 3431-3442. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.11.101. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967308021067>
17. AGILENT TECHNOLOGIES: *Basics of LC/MS Primer*. U. S. A., 2001 [online]. [cit. 2015-05-14]. Dostupné také z: <http://ccc.chem.pitt.edu/wipf/Agilent%20LC-MS%20primer.pdf>
18. http://holcapek.upce.cz/teaching/02_Ionizacni_techiky.pdf [cit. 5. 5. 2015]
19. http://holcapek.upce.cz/teaching/Holcapek_EMSV_MS.pdf [cit. 5. 5. 2015]
20. *Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS): 5.-7.11.2001 Kongresová hala Univerzity Pardubice*. Vyd. 1. Editor Michal Holčapek. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2001, 191 s. ISBN 80-7194-390-8.
21. MEYERS, Robert A. 2000. *Encyclopedia of analytical chemistry: applications, theory, and instrumentation*. New York: Wiley, 15 v. (xxi, 13970 p.). ISBN 04-719-7670-9.
22. http://holcapek.upce.cz/teaching/03_MS_analyzatory.pdf [cit. 5. 5. 2015]

23. MARCH, Raymond E. a John F.J. TODD. 2015. Radio frequency quadrupole technology: Evolution and contributions to mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*. **377**: 316-328. DOI: 10.1016/j.ijms.2014.07.030. ISSN 13873806. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1387380614002929>
24. <https://www.chromservis.eu/i/gc-ms-tof-description?lang=CZ> [cit. 5. 5. 2015]
25. *QUATTRO MICRO API GUIDE: Micromass Quattro API Mass Spectrometer 2010* [online]. [cit. 2015-05-14]. Dostupné také z: http://www.ecs.umass.edu/eve/facilities/equipment/Quattromicro/Quattro_Micro_API_guide_rev_A.pdf
26. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf026182t>
27. Croteau, R., Kutchan, T. M., and Lewis, N. G. (2000) Natural products (secondary metabolites). In B. Buchanan, W. Gruissem, and R. Joneas, eds., *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pp. 1250–1268.
28. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1992. ISSN 1040-8398. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408399209527581>
29. <https://scifinder.cas.org/> [cit. 25. 4. 2015]
30. Spáčil Z. et al., Analysis of phenolic compounds by high performance liquid chromatography and ultra performance liquid chromatography, *Talanta* 2008, doi:10.1016/j.talanta.2008.02.021
31. Inbaraj B.S. et al., Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC-DAD-ESI-MS, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51 (2010) 549-556
32. Nevado J.J.B. et al., New CE-ESI-MS analytical method for the separation, identification and quantification of seven phenolic acids including three isomer compounds in virgin olive oil, *Talanta* 79 (2009) 1238-1246
33. García-Falcón M.S. et al., Determination of phenolic compounds in wines: Influence of bottle storage of young red wines on their evolution, *Food Chemistry* 105 (2007) 248-259

34. Tian S. et al., High performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in rice, *Journal of Chromatography A* 1063 (2005) 121-128
35. Pomponio R. et al., Analysis of phenolic acids by micellar electrokinetic chromatography: application to *Echinacea purpurea* plant extracts, *Journal of Chromatography A* 945 (2002) 239-247 [50] Schieber A. et al., Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 910 (2001) 265-273