

Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií v analýze potravin

Filip Zatloukal

Bakalářská práce
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Filip Zatloukal

Osobní číslo: T11689

Studijní program: B2901 Chemie a technologie potravin

Studijní obor: Technologie a řízení v gastronomii

Forma studia: prezenční

Téma práce: Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií v analýze potravin

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Stručně charakterizovat vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) a hmotnostní spektrometrii (MS)
2. Vypracovat literární rešerši na téma skupiny organických sloučenin obsažených v potravinách a možnosti jejich stanovení pomocí HPLC-MS
3. Pojedenat o příkladech LC-MS analýz u vybraných typů potravin

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

[1] ŠTULÍK, K. Analytické separační metody. 2004, Karolinum, Praha. ISBN 80-246-0852-9.

[2] SCHALLEY, C. A., SPRINGER, A. Mass Spectrometry and Gas-Phase Chemistry of Noncovalent Complexes. 2009, Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. ISBN 978-0-470-13115-2.

[3] Dle provedení literární rešerše s využitím databází SciFinder a Scopus.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Michal Rouchal, Ph.D.**

Ústav chemie

Datum zadání bakalářské práce: **20. ledna 2015**

Termín odevzdání bakalářské práce: **7. května 2015**

Ve Zlíně dne 20. ledna 2015


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




Ing. Jiří Mlček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno:

Obor:

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně

.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělků jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Náplní této bakalářské práce bylo pojednat o aplikačním potenciálu vysokoúčinné kapalinové chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (LC-MS), a to nejen v oblasti analýzy potravin, ale i jiných odvětvích. Úvodní kapitoly práce jsou zaměřeny na popis principu a instrumentace vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Dále je pojednáno o spojení hmotnostní spektrometrie se separačními metodami, včetně výčtu výhod a stručných principů tohoto typu analýz. Významnou část této práce tvoří kapitola pojednávající o vybraných skupinách organických sloučenin, které je možné pomocí LC-MS analyzovat a detekovat v různých typech potravinářských výrobků. V další části práce jsou stručně uvedeny příklady aplikovatelnosti této techniky v potravinářském průmyslu, včetně možností, které reálně nabízí, ale v současné době nejsou běžnou součástí analytické praxe. V poslední kapitole této práce jsou uvedeny možnosti využití spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií v jiných odvětvích.

Klíčová slova: vysokoúčinná kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, analýza potravin, analytická chemie

ABSTRACT

The content of this thesis has been to discuss about the application potential of high liquid performance chromatography with mass spectrometry (LC-MS), but not only in food analysis but also in the other branch. In the introduction this work has been focused on description of basic principles and instrumentation of LC-MS. The next discussed issue is coupling of mass spectrometry with separation methods including advantages and basic mechanisms of this analysis. One of the most important topics of this theses represent the chapter dealing with selected organic compounds which is possible to analyse and detect in various of foodstuff using LC-MS analyses. In the next part of this work, there are some brief examples of applications of these techniques in food industry including possibilities which they do offer to us but unfortunately which has not been used in analytical practise yet. The last chapter is based on description of possibilities of LC-MS applications in other areas.

Keywords: high performance liquid chromatography, mass spectrometry, food analysis, analytical chemistry

Tímto bych rád poděkoval svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Michalovi Rouchalovi, PhD. za cenné rady, připomínky, vstřícnost a čas, který mi věnoval při vytváření této práce. Rovněž děkuji svojí rodině za velkou podporu během mého studia.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	11
TEORETICKÁ ČÁST	13
1 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE	14
1.1 HISTORIE A STRUČNÁ CHARAKTERISTIKA.....	14
1.2 ROZDĚLENÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD	15
1.3 KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE	16
1.4 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE.....	17
1.4.1 Princip HPLC	17
1.4.2 Stacionární a mobilní fáze.....	18
1.4.3 Detektory v HPLC.....	20
2 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	21
2.1 ÚVOD DO INSTRUMENTACE HMOTNOSTNÍHO SPEKTROMETRU	21
2.2 IONTOVÝ ZDROJ.....	22
2.2.1 Elektronová ionizace	22
2.2.2 Chemická ionizace	23
2.2.3 Sprejové ionizační techniky	24
2.2.4 Ionizace laserem za účasti matrice	26
2.2.5 Ambientní ionizační techniky	26
2.3 HMOTNOSTNÍ ANALYZÁTORY	27
2.3.1 Magnetický hmotnostní analyzátor	28
2.3.2 Kvadrupólový analyzátor	28
2.3.3 Iontová past	28
2.3.4 Průletový analyzátor.....	29
2.3.5 Orbitrap	29
2.4 DETEKČNÍ SYSTÉMY V MS	30
3 SPOJENÍ MS A SEPARAČNÍCH METOD	31
3.1 HPLC-MS.....	31
3.2 GC-MS	32
3.3 CE-MS.....	33
4 VYBRANÉ SLOŽKY POTRAVIN DETEKOVATELNÉ METODOU LC-MS	34
4.1 LIPIDY	34
4.1.1 Mastné kyseliny	35
Nasycené mastné kyseliny	35
Nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou	36
Nenasycené mastné kyseliny s více dvojnými vazbami	36
4.1.2 Homolipidy	37
4.1.3 Heterolipidy.....	37
4.1.4 Komplexní lipidy	38
4.1.5 Doprovodné látky lipidů	38
4.2 MYKOTOXINY	38
4.3 SACHARIDY	39
4.3.1 Monosacharidy	39

4.3.2	Oligosacharidy	40
4.3.3	Polysacharidy	41
4.4	VITAMINY	41
4.5	FLAVONOIDY	42
5	PŘÍKLADY HPLC-MS ANALÝZ VYBRANÝCH DRUHŮ POTRAVIN	44
5.1	SÝR44	
5.2	MLÉKO	45
5.3	ŠUNKA.....	46
5.4	VÍNO	46
6	OSTATNÍ APLIKACE HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE.....	48
6.1	SUPRAMOLEKULÁRNÍ CHEMIE	48
6.2	FARMACIE A FARMAKOKINETIKA	50
6.3	FORENZNÍ CHEMIE	50
	ZÁVĚR	52
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	54
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	59
	SEZNAM OBRÁZKŮ	61
	SEZNAM TABULEK.....	62
	SEZNAM PŘÍLOH.....	CHYBA! ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.

ÚVOD

Chromatografie je separační metoda, při které se od sebe oddělují složky přítomné v matrici. Tato separace se uskutečňuje na základě vnášení vzorku mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze – fázi stacionární (nepohyblivou) a fázi mobilní (pohyblivou). Objev chromatografie sahá až do 90. let 19. století, kdy ruský botanik, M. S. Cvět použil skleněnou kolonu naplněnou uhličitanem vápenatým pro dělení a izolaci barviv z rostlinných extraktů. Ovšem teprve v roce 1941 byly položeny teoretické základy separace látek touto metodou Arherem Johnem Porterem Martinem a Laucerencem Milingtonem Syngem. Od té doby prošla řadou modifikací a až v posledních letech byl zaznamenán významnější pokrok ve spojení těchto separačních technik s hmotnostní spektrometrií.

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda určená pro zjištění hmotností atomů, molekul a jejich částí po jejich převedení na kladné či záporné ionty. Tato metoda má vynikající vypovídací schopnost o strukturách měřených látek a tím se stává cenným analytickým nástrojem. Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří základních částí – iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Mimo tyto základní části velmi podstatnou roli hraje také vakuový čerpací systém, vhodný vstup do iontového zdroje a počítač s vhodným systémovým vybavením a s dostatečnou paměťovou kapacitou na úložišti.

Spojení obou výše uvedených metod umožňuje, během jedné analýzy, odseparovat látky přítomné ve složitější matrici a následně je identifikovat. Výhodou této analýzy je především časová nenáročnost a vysoká citlivost.

Potraviny představují složitý systémem sestávající z velkého počtu různorodých chemických sloučenin, v němž dochází k mnoha biochemickým, chemickým a fyzikálním dějům. Při znalosti těchto dějů, především reakčních mechanismů, je možné zabezpečit jejich regulaci a tím optimalizovat daný výrobní proces. Mezi nejvýznamnější organické složky potravin patří zejména lipidy, sacharidy, proteiny, vitaminy, flavonoidy, mykotoxiny, pesticidy, alergeny a některá potravinářská aditiva.

Pomocí LC-MS lze například provést strukturní charakterizaci a kvantifikaci složek potravin odpovědných za chuť, nutriční vlastnosti nebo případnou toxicitu. V souvislosti s tím je možné sledovat také změny způsobené tepelnou úpravou nebo stárnutím potravin.

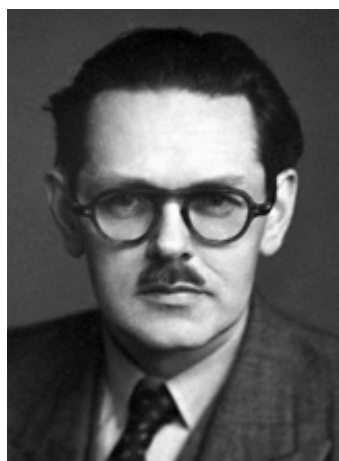
Aplikační oblast LC-MS je však mnohem širší a nelze ji omezovat jen na analýzu potravin. Tuto techniku lze uplatnit celé řadě jiných odvětví a k mnoha rozličným účelům. Jako příklad lze uvést objasňování struktur molekul a jejich chování v plynné fázi, izotopovou analýzu, supramolekulární chemii, farmakokinetiku, hmotnostně spektrometrické zobrazování nebo forenzní chemii.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE

1.1 Historie a stručná charakteristika

Objev chromatografie sahá až do 90. let 19. století, kdy ruský botanik, M. S. Cvět použil skleněnou kolonu naplněnou uhličitanem vápenatým pro dělení a izolaci barviv z rostlinných extraktů. Přes svůj mimořádný úspěch byla metoda zapomenuta a „znovu objevena“ Archerem Johnem Porterem Martinem (**Obrázek 1**, vlevo) a Richardem Laucerencem Milingtonem Syngem (**Obrázek 2**, vpravo) roku 1941, kteří položili teoretické základy separace a popsali možnosti praktického využití, za což získali v roce 1952 Nobelovu cenu v oboru chemie za vynález rozdělovací chromatografie. [1, 2]



Obrázek 1: Archer John Porter Martin a Richard Laurence Millington Synges, laureáti Nobelovi ceny roku 1952 v oboru chemie [3]

Chromatografie je tedy, obecně řečeno, separační metoda, během které se od sebe oddělují složky přítomné v matici. Tato separace se uskutečňuje na základě vnášení vzorku mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze – fázi stacionární (nepohyblivou) a fázi mobilní (pohyblivou). Vzorek se umístí na začátek stacionární fáze a pohybem mobilní fáze přes stacionární je soustavou unášen. Složky poutané ke stacionární fázi silněji se v systému „zdrží“ déle, zatímco v opačném případě dojde k rychlejšímu uvolnění složek. Na základě tohoto principu se jednotlivé složky od sebe oddělí. To z chromatografie činí jednu z neúčinnějších dělicích metod. Velmi důležitou veličinou měřenou během tohoto stanovení je retenční čas, neboli doba, za kterou měřená látka projde kolonou. Vzhledem k občasnému nedokonalému odseparování složek je možné i několikrát za sebou proces opakovat, dokud nedojde k přijatelnému oddělení všech částí vzorku. [2, 4, 5]

1.2 Rozdělení chromatografických metod

Chromatografických metod je poměrně velké množství, a proto je vhodné je dělit dle nejrůznějších hledisek a následně do určitých skupin.

a) Podle skupenství:

- ▶ kapalinová chromatografie (LC; z angl. Liquid Chromatography) – mobilní fází je kapalina často v podobě směsi organického rozpouštědla s vodou či pufrem. Nejběžnějšími rozpouštědly jsou acetonitril, methanol a voda. Stacionární fází je obvykle silikagel s navázanými vhodnými ligandy (kyanoskupina, uhlovodíkové řetězce)
- ▶ plynová chromatografie (GC; z angl. Gas Chromatography) – mobilní fází je tzv. nosný plyn. Nejčastěji se používá vodík, dusík, helium či argon. Stacionární fází může být pevná látka, nebo kapalina. Nejčastěji se využívají polyetylenglykoly a polyestery. [5–8]

b) Podle uspořádání stacionární fáze:

- ▶ kolonová chromatografie – stacionární fáze se nachází v koloně
- ▶ plošné techniky:
 - papírová chromatografie (PC; z angl. Paper Chromatography) – stacionární fáze je součástí chromatografického papíru v podobě nevodných polárních (formamid, propylenglykol, methanol) či nepolárních (parafínový olej, hexan) látek. Mobilní fází je vhodně zvolené rozpouštědlo. Je možné využití nepolárních (lipofilních) i polárních (hydrofilních) rozpouštědel, a to v závislosti na druhu stacionární fáze vázané na chromatografický papír. Nejpoužívanějšími jsou aceton, ethanol, hexan, cyklohexan, benzen.
 - tenkovrstvá chromatografie (TLC; z angl. Thin Layer Chromatography) – stacionární fáze je situována na pevný plochý podklad, jímž může být např. skleněná deska či hliníková folie. Sorbentem je nejčastěji silikagel a oxid hlinitý. Mobilní fáze je zpravidla tvořena směsí organických rozpouštědel. V tomto směru existuje nepřeberné množství kombinací různých druhů rozpouštědel a jejich poměrů. [5, 6, 8]

- c) Podle povahy převládajícího děje – při separaci hraje roli značné množství fyzikálně-chemických procesů současně, jeden ovšem převládá:
- ▶ rozdělovací chromatografie – vliv na separaci má odlišná rozpustnost složek vzorku ve stacionární a mobilní fázi;
 - ▶ adsorpční chromatografie – rozdělení je v tomto případě ovlivněno schopností složek adsorbovat na povrch stacionární fáze;
 - ▶ iontově-výměnná chromatografie – elektrostatické působení mezi funkčními skupinami iontoměniče (stacionární fáze) a složkami vzorku;
 - ▶ gelová chromatografie – pomocí pórovité stacionární fáze (forma gelu) se složky odseparují dle velikosti tak, že menší složky zůstanou v pórech gelu delší dobu (molekulově síťový efekt);
 - ▶ afinitní chromatografie – stacionární fáze může vázat složky vzorku, ke kterým má selektivní vztah (afinitu). [5–7, 9, 10]

1.3 Kapalinová chromatografie

V průběhu uplynulých desetiletí byl zaznamenán poměrně významný rozvoj kapalinové chromatografie. Postupným vývojem chromatografických materiálů s velmi vysokou efektivitou bylo umožněno postoupit metodu na úroveň, při které je použito vysokých tlaků. V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. O separaci jednotlivých složek obsažených ve vzorku nerozhoduje pouze jejich interakce se stacionární fází. Významnou roli v tomto procesu hraje rovněž fáze mobilní, čímž se kapalinovaná chromatografie zásadněliší od chromatografie plynové. [5, 6, 11] Během separace probíhá rozdělení analytu mezi tyto dvě fáze a doba, po kterou zůstanou v jedné či druhé je závislá na afinitě analytu k dané fázi. V současnosti se obvykle tato metoda dělí do tří základních variant, a to na:

- a) nízkotlakou kolonovou kapalinovou chromatografií – téměř shodná s původním Cvetovým návrhem, ale pro analytické potřeby je skoro nepoužitelná, nicméně je možné ji využít pro účely preparativní;
- b) vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC; z angl. High Performance Liquid Chromatography) – tato metoda má nyní v analytické chemii dominující postavení;

- c) planární chromatografii – je instrumentálně jednoduchá, poměrně nenáročná na provedení a použitelná pro analytické i mikropreparativní účely. Patří sem především TLC a PC. [6, 7, 9, 10]

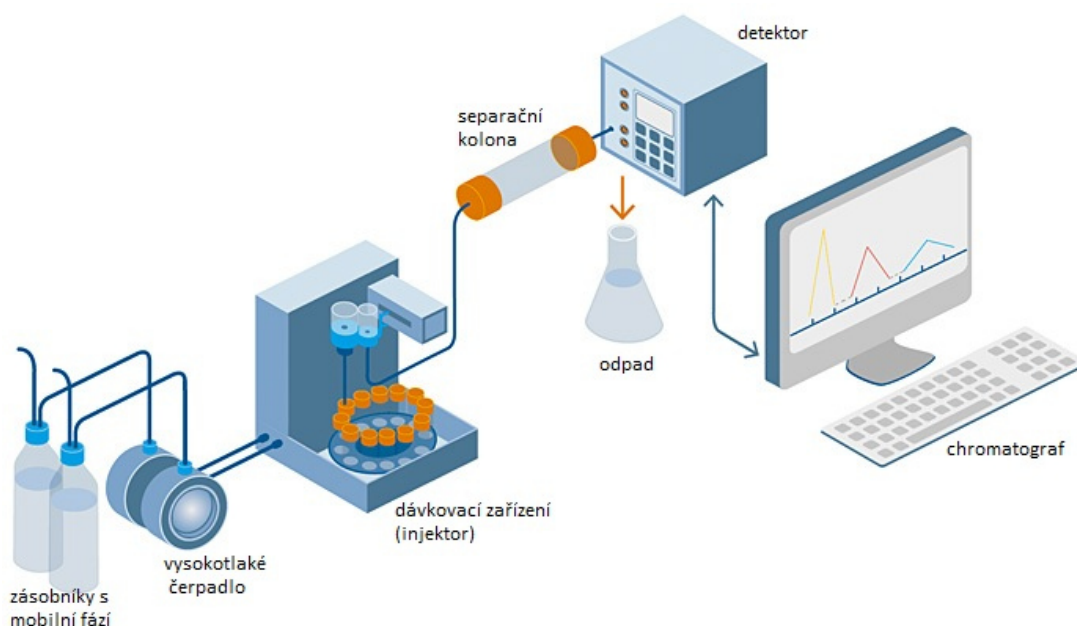
Další dělení může být dle principu separace látek na kapalinovou chromatografii adsorpční, rozdělovací a chromatografii na iontoměničích. [6]

1.4 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie je chromatografická metoda, jejíž použití spočívá v separaci směsi jednotlivých sloučenin ve smyslu identifikace a kvantifikace těchto složek. Jedná se o pokročilejší a instrumentálně náročnou techniku kapalinové chromatografie. Využitím kolon se stacionární fází o malé a dobře definované velikosti částic je možno dosáhnout velmi uspokojivého separačního účinku. [11–14]

1.4.1 Princip HPLC

V separační koloně je umístěna stacionární fáze, kterou lze považovat v podstatě za pevný nosič, což je způsobeno vysokou hustotou a homogenitou náplně. Aby bylo možné přes takto charakterizovanou fázi zajistit přiměřený průtok fáze mobilní, je třeba využít značného přetlaku, jenž se pohybuje v řádech jednotek až desítek MPa a zajišťuje tak průtok mobilní fáze v řádech mililitrů za minutu. [12]



Obrázek 2: Schéma HPLC. [15]

Tento proces je zajišťován vysokotlakým čerpadlem, které se vyskytuje nejčastěji ve dvou provedeních, a to lineárním a recipročním. Reciproční čerpadlo tvoří píst ve válci, který periodicky nasává a vytlačuje mobilní fázi. Dvojice kuličkových ventilů zde napomáhá k navolení směru toku mobilní fáze. Tento typ čerpadla není bezpulsní. Tlakové pulsy je ovšem možné minimalizovat či odstranit zařazením druhého válce pracujícího v opačné periodě. Lineární čerpadlo je též složené z pístu ve válci, ale na rozdíl od recipročního čerpadla o objemu v řádech mikrolitrů, se jedná o objemy v řádech mililitrů. Posunem pístu ve válci je fáze postoupena dávkovacímu ventilu. V praxi je nejběžněji používané čerpadlo reciproční a to především v důsledku možnosti změny nastavení (složení mobilní fáze) během samotné analýzy, což je poměrně velká výhoda na rozdíl od čerpadla lineárního. [2, 5, 6, 16]

Dalším důležitým bodem instrumentace HPLC je dávkovací zařízení, které má za úkol nastříknout do proudu mobilní fáze, protlačované kolonou za přetlaku, přesně definovaný objem vzorku. Právě k tomuto ději je nejčastěji využit šesticestý ventil s dávkovací smyčkou o přesně daném objemu.

Kolony jako takové jsou navrženy k překonání značného tlaku mobilní fáze. Běžně se lze setkat s ocelovými či tlustostěnnými skleněnými trubicemi, jejichž délka činí 30 až 300 milimetrů a průměr 2 až 5 milimetrů. Kolony jsou naplněny stacionární fází (viz kapitola 1.4.2). [2, 5, 6, 16]

Detektory běžné v kapalinové chromatografii se podstatně liší od detektorů využívaných v chromatografii plynové. K samotné detekci je možno využít nejrůznější instrumentální metody, ovšem přímo pro HPLC byla speciálně navržena detekční cela a to především rozměrově. Objem je tak malý, aby nedocházelo k rozmývání zón látek přicházejících po separaci z kolony. [2, 5, 6, 11, 16]

1.4.2 Stacionární a mobilní fáze

Volba stacionární a mobilní fáze velmi úzce souvisí s volbou separačního módu a tyto dva body se často prolínají. Pomocí počátečního screeningu při vývoji dané metody je předem dáno základní aplikační zaměření, díky kterému je následně možné odhadovat, jak se bude analyt v určitém systému chovat. Tedy jak silně nebo slabě se budou základní typy látek v systému zdržovat.

Stacionární fáze je nepohyblivou složkou chromatografického systému. Může mít podobu tuhé látky nebo filmu kapaliny, který je zakotvený, nebo chemicky navázaný

na tuhou matrici, která se nazývá nosič. Je to náplň chromatografické kolony, na které dochází k vlastnímu procesu separace látek. Na stacionární fáze jsou kladeny obecné požadavky, které by měly splňovat. Jedná se zejména o chemickou a tepelnou stabilitu. Dále nesmí docházet k reakci s mobilní fází a nesmí se v ní rozpouštět. Vymýváním stacionární fáze z kolony může být snížena citlivost detekce, nebo její úplné znemožnění. Tento jev je ve většině případů způsoben nevhodným zvolením mobilní fáze nebo teploty. Velmi důležitou roli hrají také charakteristiky částicových stacionárních fází. Patří sem průměrná velikost a tvar částic, relativní objem a průměrná hodnota velikosti pórů. Obecně platí, že je separace účinnější, mají-li tyto částice stejnou velikost, kulovitý tvar a kolona je jimi naplněna homogenně. Rovněž délka a vnitřní průměr kolony mají podstatný vliv na účinnost a dobu separace. Nejpoužívanější stacionární fází bývá oxid křemičitý různé zrnitosti, na který byly pomocí chemické modifikace navázány vhodné funkční skupiny, které současně udávají výslednou polaritu stacionární fáze. Běžně jsou používány hydrofobní fáze s navázanými uhlovodíkovými řetězci, podle jejichž délky bývá fáze nazývána. Jako příklad lze uvést oktylsilikagel (C8) či oktadecylsilikagel (C18). Na postu stacionární fáze ovšem může být využit granulovaný iontoměnič, síťovaný polystyrenem s kationogenními či anionogenními skupinami. Tato technika chromatografie se nazývá iontově výměnná chromatografie (IEC; z angl. Ion Exchange Chromatography). Při střetu s analytem vykazuje zmíněný materiál síťovací efekt, který vede k separaci složek vzorku dle velikosti molekul.

Mobilní fáze je velmi důležitým prvkem v separačním procesu. Ovlivnění retence analytů je možné změnou eluční síly mobilní fáze, tedy použitím rozpouštědel o různé polaritě. Volba mobilní fáze pro dané aplikační zaměření pak závisí na typu analytu, jeho fyzikálně-chemických vlastnostech, zvoleném typu detekce a na vybrané stacionární fázi. Možností složení mobilní fáze nejsou striktně omezeny a významně určuje účinnost kolony, rozlišení měření a citlivost. Vzhledem ke skutečnosti, že se dnes téměř výhradně používají stacionární fáze chemicky vázané na inertním nosiči, které jsou svojí povahou nepolární, se při volbě rozpouštědel pro fázi mobilní nelze než zaměřit na rozpouštědla polární. Nejčastěji se tak používá směs vody či pufru s organickými rozpouštědly, zejména pak s methanolem a acetonitrilem. Vzhledem ke skutečnosti, že dříve byla polarita stacionární a mobilní fáze opačná (polární stacionární a nepolární mobilní fáze), se při použití polární mobilní fáze hovoří o HPLC na reverzní fázi. Nezastupitelnou úlohu má v separačním procesu rovněž volba typu eluce (v plynové chromatografii je analogií tzv.

teplotní program). V HPLC se používají dva základní typy eluce, a to izokratická, kdy je složení mobilní fáze po celou dobu separace konstantní a gradientová, při níž se složení mobilní fáze během samotné analýzy mění. [5, 9, 11, 17, 18]

1.4.3 Detektory v HPLC

Detektorů užívaných v kapalinové chromatografii je celá řada. Jednodušším rozdělením se dají zařadit do následujících skupin:

- ▶ fotometrický – sledovaným parametrem je absorbance látek přicházejících z kolony v ultrafialové a viditelné oblasti. Skrz kyvetu prochází světelný paprsek ze zdroje. Typ zdroje závisí na oblasti sledovaných vlnových délek – deuteriová výbojka pro UV (ultrafialovou) oblast a halogenová žárovka pro VIS (viditelnou) oblast. Pro téměř všechny organické látky se jedná o všestranné provedení detekční techniky.
- ▶ fluorimetrický – využití zejména pro fluorescentní látky. Často se aplikuje využití miniaturní vysokotlaké xenonové výbojky či laseru. Dva monochromátory, jež jsou součástí systému, umožňují výběr délky vlnového záření fluorescenčního zařízení. Detekce je možná i při velmi nízkých mezích.
- ▶ hmotnostní – pomocí produkce hmotnostních spekter je možné charakterizovat (identifikovat) látky vycházející z kolony s velmi uspokojivou citlivostí. (viz kapitola 2)
- ▶ elektrochemický – jedná se o alternativní možnost detekce užívané v HPLC. Ve své podstatě se jedná o detektory založené na měření vodivosti (ampérometrické) látek, které lze elektrochemicky redukovat či oxidovat. [2, 5, 6, 8, 19]

2 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

V případě hmotnostní spektrometrie (MS; z angl. Mass Spectrometry) se jedná o fyzikálně-chemickou metodu určenou pro zjištění relativní hmotnosti atomů, molekul a jejich částí po jejich převedení na kladné či záporné ionty. Při vhodné interpretaci naměřených výsledků, má výbornou vypovídací schopnost o struktuře analyzovaných látek. Velmi důležitou skutečností je rovněž to, že pomocí této metody je možné provést stopovou analýzu organických látek s důrazem na zjištění jejich struktury. Spojení této metody s metodami separačními výrazně zvyšuje selektivitu a umožňuje provádět identifikaci komponent vzorku i ve složité matici. [13, 20]

Jde tedy o instrumentální analytickou metodu, která se běžně využívá k analýzám širokého spektra biologicky významných látek, jejíž počátky sahají až do 19. století, od kdy byla postupem času zdokonalována až do dnešní podoby. [21, 22]

2.1 Úvod do instrumentace hmotnostního spektrometru

Nejběžněji používané hmotnostní spektrometry musí splňovat tři základní požadavky: a) převést studovanou sloučeninu do plynného stavu (zde hraje významnou úlohu dostatečná termická stabilita sloučeniny), b) ionizovat molekuly plynné fáze, c) rozdělit ionty podle poměru hmotnosti k počtu elementárních nábojů iontu. Tato kritéria jsou zajišťována základními stavebními prvky, které, i přes značné konstrukční rozmanitosti současných instrumentací, jsou u všech přístrojů tohoto typu velmi podobné. Jedná se především o iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor. Vyjma iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor patří k hmotnostnímu spektrometru další významné části. Protože je hmotnostní spektrometr zařízení pracující za velmi nízkých tlaků, je jeho nedílnou součástí i výkonný, nejčastěji dvoustupňový vakuový čerpací systém. Ten umožňuje udržet dostatečně nízký tlak za všech provozních podmínek. Důležitý je samozřejmě i vhodný vstup, jenž umožňuje převedení vzorku analyzované látky z vnějšího prostředí do prostoru iontového zdroje. V případě kombinace zařízení s kapalinovou či plynovou chromatografií je do prostoru iontového zdroje mimo látky vystupující z chromatografické kolony přiváděna také mobilní fáze. Z toho důvodu jsou tyto látky přiváděny buď přímo, anebo přes vhodné rozhraní, které částečně eliminuje podíl mobilní fáze. Nelze opomenout také počítač s vhodným softwarovým vybavením a dostatečnou paměťovou kapacitou na úložišti, vzhledem k obsáhlosti vycházejících dat. [13, 20, 23]



Obrázek 3: Schéma hmotnostního spektrometru

2.2 Iontový zdroj

Ionizace zkoumané látky je naprosto nezbytným předpokladem analýzy provedené pomocí hmotnostního spektrometru a to z toho důvodu, že veškeré informace poskytované hmotnostním spektrometrem se týkají pouze částic nesoucích náboj. Energetická náročnost ionizace závisí na typu analyzované látky, ale obecně pro organické sloučeniny platí, že prahová ionizační energie se pohybuje v intervalu 7–16 eV. Energetické děje nad touto hraniční energií vedou k převedení látky do iontového stavu. [13, 23] Použitý způsob ionizace zásadně ovlivňuje aplikační možnosti metody. V posledních letech konstrukce nových iontových zdrojů rozšířila použití hmotnostní spektrometrie na netěkavé látky s vysokou molekulovou hmotností. Výtěžek ionizace se u většiny používaných ionizačních technik pohybuje okolo 0,01 %, což znamená, že proces ionizace významně ovlivňuje citlivost měření a mez detekce metody. Když energie dodaná molekule v průběhu ionizace významně převyšuje její prvotní ionizační energii, může poté docházet ke spotřebování nadbytečné vibračně-rotační energie fragmentací vzniklého iontu. [13, 23]

Podle množství dodané energie je obvyklé ionizační techniky dělit na:

- ▶ měkké – přebytek dodané energie je malý a pravděpodobnost fragmentace poměrně nízká;
- ▶ tvrdé – přebytek dodané energie je dostačující k fragmentaci iontů vznikajících ve spektrech prvního řádu. [13, 23]

2.2.1 Elektronová ionizace

Elektronová ionizace (EI; z angl. Electron Ionization) je příklad tvrdé ionizační techniky probíhající za vakua. Patří mezi nejběžněji používané a nejlépe propracované způsoby ionizace, které se využívají především v kombinaci GC-MS. Energetickým procesem

vedoucím k tvorbě iontů je interakce analyzované látky s proudem urychlených elektronů. Při tomto procesu může dojít především k následujícím reakcím:



Vzhledem k povaze prostoru udržovanému uvnitř iontového zdroje, tedy vysokému vakuu a z toho vyplývající malé pravděpodobnosti mezičásticových interakcí, je z hlediska energetické stabilizace molekulového iontu upřednostňován děj první. Za určitých podmínek, například za přítomnosti elektronegativního prvku, je možné zvýšit počet záporně nabitých iontů při EI. [13, 23, 24]

Zjednodušený princip spočívá v elektrickém žhavení rheniového či wolframového vlákna (katoda), které slouží jako zdroj proudu elektronů, jež jsou směřovány prostorem iontového zdroje směrem k anodě. Potenciálový rozdíl mezi nimi pak udává energii elektronů, které přicházejí do kontaktu s látkou. Za standard se považuje energie 70 eV, která zajišťuje vznik maximálního počtu iontů a jejich rozsáhlou fragmentaci. Pro zvýšení pravděpodobnosti interakce elektronů s molekulou je možné zakřivit dráhu elektronů polem malého permanentního magnetu. Z prostoru ionizace jsou vznikající ionty směřovány elektrostatickým polem pomocné elektrody (repelerem), udržované na vhodném potenciálu. Proud iontů je dále urychlen a směřován z iontového zdroje soustavou akceleračních a fokusačních elektrod. [13, 23, 24]

2.2.2 Chemická ionizace

Chemická ionizace (CI; z angl. Chemical Ionization) je příkladem měkké ionizační techniky z plynné fáze a spolu s EI je běžně využívána především v kombinaci GC-MS. Primárním zdrojem vzniku iontů je, stejně jako v předchozím případě, proud urychlených elektronů, ovšem potenciálový rozdíl je o mnoho vyšší, až 300 eV. Jejich energie však není přenášena přímo na analyzované molekuly, ale zprostředkovaně přes reakční médium v podobě plynu či kapaliny s nízkým bodem varu. V ionizační komoře je pod relativně vysokým tlakem, pohybujícím se v rozmezí 50–150 Pa, přítomné reakční médium. Vyšší tlak zde výrazně zvyšuje pravděpodobnost mezimolekulových a meziiontových interakcí. Rovněž výběr vhodného reakčního média pro chemickou ionizaci značně ovlivňuje množství předané energie v tomto procesu, a tím má vliv na rozsah možných fragmentací. Při kolizích iontů reakčního plynu s molekulami analyzovaného vzorku se poté vytvářejí protonizované ionty. Takto vzniklý iont s relativní hmotností o jednotku vyšší,

než hmotnost molekuly před ionizací se obvykle nazývá protonovaná molekula (v literatuře se lze také setkat s označením kvazimolekulární iont) $[M+H]^+$. Iont vzniklý chemickou ionizací je stabilnější, než iont vzniklý nárazem elektronů a obecně jsou spektra vytvořená pomocí této metody jednodušší, než v prvním případě. [13, 23, 24]

2.2.3 Sprejové ionizační techniky

Sprejové ionizační techniky jsou řazeny mezi měkké ionizační techniky v kapalně fázi a jsou kompatibilní zejména pro kombinace hmotnostního spektrometru s kapalinovou chromatografií. Komerční instrumentace nejčastěji v současnosti využívá několika typů, kterými jsou především elektrosprejová ionizace (ESI; z angl. Electrospray Ionization), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI; z angl. Atmospheric Pressure Chemical Ionization), fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI; z angl. Atmospheric Pressure Photoionization) a ionizace laserem za atmosférického tlaku (APLI; z angl. Atmospheric Pressure Laser Ionization). Nejpoužívanějšími typy jsou ESI a APCI, o nichž bude níže pojednáno. [13, 25]

Ionizace elektrosprejem

Elektrosprejová ionizace je v současnosti nejběžněji využívanou metodou ionizace v kombinaci LC-MS. Tento způsob ionizace je silně endotermický, protože přenáší ionty z roztoku do plynné fáze. Vyznačuje se vznikem jak kladně, tak záporně nabitých iontů. V závislosti na polaritě vloženého napětí vznikají tedy jak protonované, tak deprotonované molekuly. Zředěný roztok analytu se v množství několika mikrolitrů za minutu zavádí velmi úzkou kapilárou z vodivého materiálu do rozprašovací komůrky. K rozprášení kapalně fáze dochází vlivem nehomogenního elektrického napětí, které se pohybuje v řádu jednotek kilovoltů. Dochází ke vzniku drobných kapiček se značnou hustotou povrchového náboje. Rozpouštědlo se z povrchu aerosolových částic rychle odpařuje, hustota náboje stoupá, až dojde k „výbuchu“ a vzniknou podstatně menší částice, z nichž se molekuly rozpouštědla vypařují ještě rychleji. Ve zředěné plynné fázi tak rychle vznikají ionty zbavené rozpouštědla. Sušící plyn, nejčastěji dusík o teplotě 200–300 °C, napomáhá ionizovaným částicím ke zbavení se rozpouštědla a nadbytečné kinetické energie. Nakonec se systémem vakuových clon a štěrbinových elektrod vytvoří svazek iontů pro hmotnostně spektrometrickou analýzu. Dochází ke vzniku molekulových aduktů dvojího typu v závislosti na módu vkládaného napětí. V pozitivním ionizačním módu dochází, vyjma tvorby protonované molekuly $[M+H]^+$, ke vzniku aduktových iontů, např. $[M+Na]^+$,

$[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$. V některých případech lze pozorovat také vyšší asociáty, např. $[2\cdot M+H]^+$ nebo $[2\cdot M+Na]^+$ apod. V negativním ionizačním módu vznikají nejčastěji ionty $[M-H]^-$ a $[M+Cl]^-$. Z vyšších asociátů pak $[2\cdot M-H]^-$ nebo $[2\cdot M-2\cdot H+Na]^-$. [12, 13, 21, 26] Elektrosprejová ionizace je považována za nejměkčí ionizační techniku vůbec, přičemž její aplikační potenciál je velmi často srovnáván s ionizací laserem za účasti matrice (MALDI; z angl. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization). ESI je aplikovatelná pro hodnoty m/z přibližně do 100 000 a pokrývá studium od středně polárních látek až po sloučeniny iontového charakteru. K problému s ionizací může dojít v případě analýzy málo polárních a nepolárních sloučenin. [13, 27]

Chemická ionizace za atmosférického tlaku

V případě chemické ionizace za atmosférického tlaku se přivádí mobilní fáze pomocí vstupní kapiláry do pneumatického rozprašovače, jehož plášť je vyhříván na teplotu až 700 °C. Tím dojde k efektivnímu rozprášení a odpaření kapalné fáze. Vložení náboje na výbojovou jehlu zapříčiní vznik koronárního výboje. Tak dochází k ionizaci molekul mobilní fáze přítomné v plynné fázi ve velkém nadbytku vůči analytu. Ionty vzniklé z mobilní fáze (tzv. reakční plyn) následně ionizují molekuly analytu, podobně jako je tomu při klasické chemické ionizaci, tedy přenosem protonu za vzniku protonované molekuly $[M+H]^+$, nebo deprotonované molekuly $[M-H]^-$. Vzhledem k relativně malé velikosti kapiček a rychlému procesu sušení, téměř nedochází ke vzniku aduktových iontů, jež lze pozorovat ve spektrech prvního řádu při použití elektrospreje. [12, 13, 26]

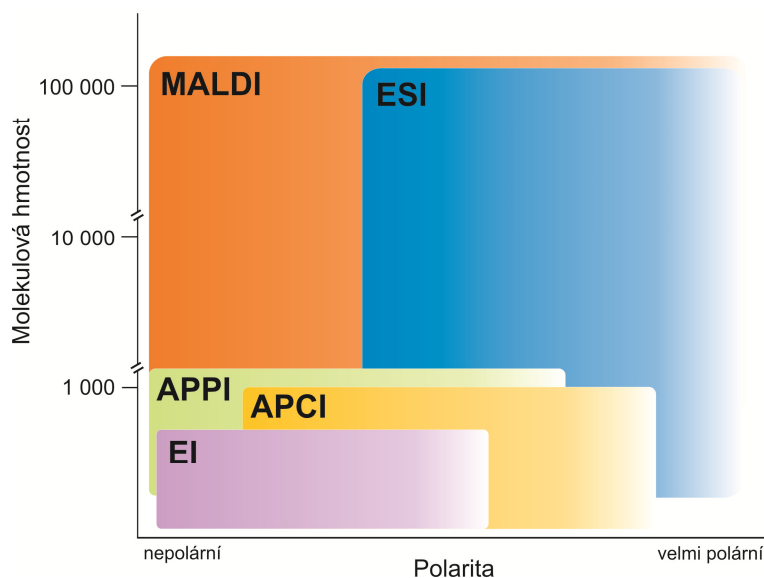
Fotoionizace za atmosférického tlaku

Fotoionizace za atmosférického tlaku je novější metoda používaná k ionizaci analytů pomocí záření. Z konstrukčního hlediska je velmi podobná chemické ionizaci za atmosférického tlaku, avšak na místo jehly produkující koronární výboj je umístěna UV lampa emitující elektrony v úzkém energetickém rozsahu, tak, aby bylo ionizaci podrobeno co nejvíce molekul analytu a co nejmenší množství rozpouštědla. Možnost aplikačního zaměření APPI a APCI jsou dosti podobné, zejména co se týče oblasti analýzy léků, nepolárních lipidů, přírodních látek, pesticidů a různých organických sloučenin. Fotoionizační metoda je ovšem vhodnější pro analýzu vysoce nepolárních látek, jako jsou polyaromatické uhlovodíky a má měkčí charakter, než APCI. [26, 27]

2.2.4 Ionizace laserem za účasti matrice

Pro analýzu extrémně velkých molekul v podobě především syntetických a přírodních polymerů, ale i proteinů a peptidů s velkou molekulovou hmotností slouží měkká ionizační technika známá jako MALDI. Hned po ESI se jedná o nejšetrnější ionizační metodu, při níž je míra fragmentace velmi malá. Před samotnou ionizací se vzorek smíchá s matricí, nejčastěji v podobě organické kyseliny, která snadno absorbuje energii laseru. Poté je směs vysušena a podrobena samotné ionizaci. Proces ionizace zahrnuje krátké intenzivní pulsy laseru, který zahřeje a desorbuje matrici a analyt. Dochází k ionizaci matrice, ze které putuje náboj v podobě protonu k analytu a tím jej ionizuje. Nejčastěji dochází ke vzniku iontů $[M+H]^+$ nebo vícenásobně nabitých iontů $[M+nH]^{n+}$, a to v závislosti na povaze matrice, intenzitě laseru či použitého napětí. Také je možné laserový puls opakovat, dokud není docíleno požadovaných iontů. [26, 27]

Na **Obrázku 4** je pro snadnější představu případného čtenáře graficky naznačena aplikační oblast pro všechny výše komentované ionizační techniky.



Obrázek 4: Aplikační oblast vybraných ionizačních technik

2.2.5 Ambientní ionizační techniky

V případě těchto technik je analyt přítomen na vhodném povrchu vně hmotnostního spektrometru. Poté je vložen před tzv. přímý vstup a na povrch je namířen ionizační impuls, například v podobě laserového paprsku, proudu metastabilních iontů nebo sprejových kapiček rozpouštědla. To má za následek desorpci analytu, jeho ionizaci a v konečné fázi zavedení přímým vstupem do hmotnostního spektrometru. Výhodou

tohoto druhu analýzy je absence přípravy vzorku, velká rychlost analýzy a také fakt, že se nejedná o destruktivní metodu. Nevýhodou je složitost spekter a skutečnost, že některé analyty, zejména větší bílkoviny, nejsou pomocí této techniky ionizovány. [28, 29]

V současné době je popsáno přes 27 ambientních ionizačních technik, mezi nejznámější patří desorpční ionizace elektrosprejem (DESI; z angl. Desorption Electrospray Ionization) a přímá analýza v reálném čase (DART; z angl. Direct Analysis in RealTime)

DESI

Princip DESI vychází z konceptu elektrospreje. Kapalina vycházející z elektrospreje, často směs vody s methanolem, je aplikována na studovaný povrch vzorku pod určitým úhlem (zpravidla 50°) a z určité vzdálenosti (obvykle 5 mm). Po aplikaci je na povrchu vzorku vytvořen tenký film rozpouštědla, přičemž nastává velmi rychlá extrakce či rozpuštění analytu. Interakcí iontů, vzniklých sprejováním, s povrchem vzorku dochází k desorpci iontů analytu, které jsou poté vedeny do hmotnostně-spektrometrického analyzátoru. Tento koncept má řadu výhod, především zjednodušuje úpravu vzorků, nebo ji zcela odbourává. [30, 31]

DART

Jedná se o velmi podobnou techniku jako DESI a je možné ji využít k analýzám pevných, kapalných i plyných vzorků bez jakékoliv úpravy. Molekuly reakčního plynu v podobě hélia, či dusíku jsou excitovány pomocí výboje, za vzniku metastabilních iontů a excitovaných částic. Ionty jsou zachyceny na elektrodě a k reakci se vzorkem tedy postupují pouze excitované částice reakčního plynu. Po reakci těchto částic s molekulami vzorku dochází k ionizaci. [30, 31]

2.3 Hmotnostní analyzátory

Další částí hmotnostního spektrometru, do které postupují již ionizované látky, je hmotnostní analyzátor. V současnosti se v praxi využívá šest základních typů hmotnostních analyzátorů a to magnetický analyzátor, kvadrupólový analyzátor, iontová past, průletový analyzátor, orbitrap a iontová cyklotronová rezonance. V tomto segmentu jsou ionty produkované v iontovém zdroji rozlišovány podle poměru jejich hmotnosti a náboje, tedy m/z . [13, 26, 27,32]

2.3.1 Magnetický hmotnostní analyzátor

Magnetický hmotnostní analyzátor je nejstarší, s vysokým rozlišením a širokým hmotnostním rozsahem. Vyskytuje se většinou v hmotnostních spektrometrech s velkým rozlišením a málokdy bývá spojen přímo se separační metodou. Ve své podstatě jde o elektromagnet, mezi jehož pólovým nastavci prochází urychlené ionty. Ty na základě různého chování v magnetickém poli, způsobeném různými hodnotami m/z , opisují dráhy o jiných poloměrech a tím se prostorově rozdělují. [13, 23]

2.3.2 Kvadrupólový analyzátor

Kvadrupólový typ analyzátoru skýtá běžně uplatnění u hmotnostních spektrometrů v kombinaci s plynovou a kapalinovou chromatografií či kapilární elektroforézou. Tvoří jej čtyři tyče kruhového nebo hyperbolického průřezu, které jsou připojeny ke zdrojům stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí. Při vhodně zvoleném napětí se analyzátor kvadrupólového typu chová jako filtr, který dovoluje propustit z oscilujících iontů výhradně ty, o určité hodnotě m/z . Ostatní částice přítomné v analyzátoru se dostávají na nestabilní dráhy, následkem čehož je způsobeno jejich zachycení buď na stěnách přístroje či na tyčích kvadrupólu. Postupnými změnami v nastavení vkládaného napětí na kvadrupól je možné nechat tímto filtrem postupně projít ionty ve zvoleném intervalu hodnot m/z . Mezi další výhody této komponenty také patří jeho kompaktní velikost, rychlost skenování, účinnost a nenáročné požadavky na vakuum. Právě proto je často včleňován do menších a levnějších přístrojů. Výhodou kvadrupólového analyzátoru je také to, že může být začleněn do tzv. tandemové hmotnostní spektrometrie neboli spektrometrie s více analyzátory. Nejčastější variantou tandemového zapojení kvadrupólu je tzv. trojitý kvadrupól. Ten je složen ze tří kvadrupólových jednotek, přičemž střední kvadrupól tvoří nízkoenergetická kolizní cela, na kterou je vloženo pouze vysokofrekvenční napětí. Jedná se o tzv. kolizí-indukovanou disociaci. Tímto způsobem lze například detekovat produktové ionty ze zvoleného prekursoru, nebo naopak se mohou k danému produktovému iontu najít jeho prekursory, případně detekovat prekursory eliminující stejné neutrální částice. [13, 23, 24, 26, 33, 34]

2.3.3 Iontová past

V případě iontové pasti (IT; z angl. Ion-trap) se jedná o trojrozměrnou obdobu kvadrupólového filtru, jež umožňuje v ohraničeném prostoru uzavřít ionty za využití střídavého elektrického pole. Ve své podstatě jde o soustavu tří elektrod – vstupní

a výstupní kruhové elektrody hyperbolického průřezu a prstencovou středovou elektrodu, na kterou je přiváděno vysokofrekvenční napětí s proměnlivou amplitudou. Iontová past pracuje ve dvou různých fázích. Ve fázi první dochází k zavedení analyzované molekuly otvorem ve vstupní kruhové elektrodě a k ionizaci pomocí pulzu elektronů. Během toho dojde k akumulaci dostatečného množství iontů v iontové pasti. Doba této akumulace se obvykle pohybuje v rozmezí 10 μ s až 200 ms, ovšem v případě velmi malého množství vzorku se může prodloužit až na 1 s. Při následném zvyšování amplitudy střídavého napětí, jsou ionty s rostoucí hodnotou m/z vypuzovány z pasti skrz otvor výstupní kruhové elektrody, odkud putují do detektoru. [13] Vysoce ceněnou předností, kterou iontová past oplývá, je možnost měřit tzv. tandemová spektra (MS^n). To znamená, že ionty pozorované ve spektrech prvního řádu mohou být vyizolovány a následně rozfragmentovány. Tento proces může být opakován dle schopností daného přístroje. Vícenásobná fragmentace může poskytnout velmi cenné informace o chování iontů v plynné fázi. [35]

2.3.4 Průletový analyzátor

Z hlediska principu je průletový analyzátor (TOF; z angl. Time of Flight) nejjednodušším hmotnostním analyzátozem. Není zde potřeba využití magnetického pole. Je tvořen pouze evakuovanou trubicí a k rozdělení iontů dochází v čase na základě jejich odlišné doby letu z iontového zdroje k detektoru. Při odlišných hodnotách m/z různých iontů, vycházejících z iontového zdroje při stejné kinetické energii dochází k nabrání jiné rychlosti. Z toho důvodu se těžší iont bude pohybovat pomaleji, než iont lehčí a do detektoru dorazí později. Dosažitelné rozlišení, tedy časová diference závisí na délce dráhy, kterou ionty musí urazit. Aby nebylo zapotřebí příliš rozměrného zařízení, jsou často konstruovány s tzv. reflektorem, neboli elektrostatickým zrcadlem, které znásobuje průletovou dráhu iontů. Hlavní výhodou tohoto hmotnostního analyzátoru je teoreticky neomezený hmotnostní rozsah. Je často využíván v kombinaci LC-MS pro analýzu vysokomolekulárních látek. [5, 13, 26]

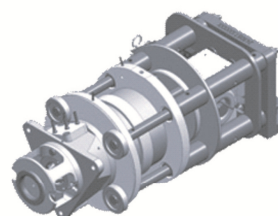
2.3.5 Orbitrap

Orbitrap je jedním z nejnovějších typů hmotnostního analyzátoru. Jedná se o kombinaci iontové pasti a hmotnostního spektrometru s Fourierovou transformací. Ve své podstatě se jedná o typ elektrostatické iontové pasti. Pohyblivé ionty jsou uvězněny v nehomogenních elektrostatických polích podél centrální válcovité elektrody. Ionty se

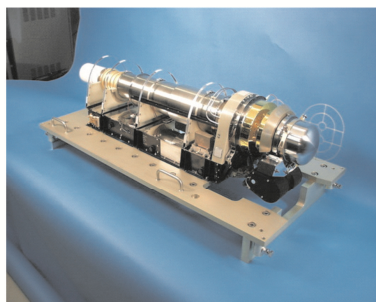
vnáší do elektrostatického pole a začínají kmitat po složitých spirálových vzorech, právě kolem střední elektrody. Největší výhodou obritrapu je vysoká kvalita rozlišení. [36- 38]



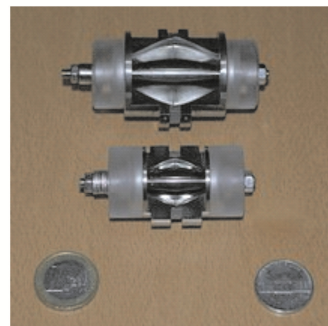
kvadrupól



iontová past



průletový analyzátor



orbitrap

Obrázek 5:Hmotnostní analyzátoři [39–42]

2.4 Detekční systémy v MS

Detektory využívané v hmotnostní spektrometrii lze dělit do dvou kategorií

- 1) detektory pro přímá měření, jež detekují elektrický proud vzniklý přímým dopadem iontů;
- 2) detektory násobičové, jež využívají efektu násobení elektronů vzniklých po dopadu iontů a jsou schopny poskytnout měřitelné signály i pro jednotlivé ionty. Jedná se o elektronnásobičové a fotonásobičové detektory. [13]

3 SPOJENÍ MS A SEPARAČNÍCH METOD

Spojení hmotnostní spektrometrie se separačními metodami umožňuje v jedné analýze od sebe látky separovat a následně identifikovat, i když se jedná o složitou matici. Výhodou je časově nenáročná a méně pracná analýza, oproti metodám využívající tyto komponenty zvlášť. Jako komplikaci metody lze uvést užití rozdílných tlaků v obou komponentech, tedy přechod z atmosférického tlaku do vakua, nebo vysoké průtoky analytu v separačních technikách. [12, 13] Mezi nejběžněji užívané spojení hmotnostní spektrometrie patří zejména LC-MS, GC-MS a kapilární elektroforéza s MS (CE; z angl. Capillary Electrophoresis).

3.1 HPLC-MS

V posledních letech byl zaznamenán velký pokrok v oblasti přímého spojení separačních technik s technikami spektrálními. Spojením kapalinové chromatografie, jakožto metody s velmi vysokou a účinnou schopností separace jednotlivých složek analyzovaného vzorku s hmotnostní spektrometrií, kterou lze považovat za velmi citlivou a spolehlivou identifikační techniku, je docíleno poměrně důležité výhody v podobě možnosti analýzy především netěkavých, velmi polárních a z pohledu termiky nestabilních látek. Tyto látky jsou obtížně analyzovatelné jinými postupy či instrumentací např. pomocí plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie, při nichž je i dostatečná těkavost látky podmínkou pro uskutečnění měření a tím i celkové analýzy. [2, 12, 32]

V uplynulých letech byl také zaznamenán značný pokrok právě ve sféře přímých spojení separačních metod se spektrálními. Vhodnou separační technikou se v prvním kroku rozdělí směs látek obsažených ve vzorku a poté se v kroku druhém získají informace o struktuře jednotlivých sloučenin. V ideálním případě je možno identifikovat jednotlivé složky směsi o neznámém složení či alespoň přibližně odvodit jejich strukturu.

Základním předpokladem pro úspěšné spojení kapalinového chromatografu a hmotnostního spektrometru je ovšem dostatečně účinné odstranění složek mobilní fáze před tím, než je uskutečněna samotná ionizace. [32, 13]

Z hlediska využití v potravinářském průmyslu je vhodné zmínit, že tato metoda je často využívána právě pro strukturní charakterizaci a kvantifikaci netěkavých složek. Tyto složky dodávají jak surovinám samotným, tak i finálním výrobkům potravinářského průmyslu jejich nutriční vlastnosti, chuť, ale i možnou toxicitu. Nejčastěji se jedná

o analýzu lipidů, sacharidů, glykoproteinů, peptidů, proteinů, vitaminů, umělých i přírodních barviv, farmak typu antibiotik a růstových hormonů v potravinách živočišného původu, které významným způsobem ovlivňují nutriční hodnotu. Také je možné sledovat změny ve struktuře výše zmíněných látek, které mohou nastat při skladování, tepelných procesech, ale i při stárnutí potravin. Z pohledu zajištění zdravotní nezávadnosti potravin je poměrně důležitá také informace o struktuře a obsahu netěkavých xenobiotik, jakožto látek tělu cizích a potenciálně nebezpečných v závislosti na druhu xenobiotika. Významné uplatnění pak nachází i ve farmaceutickém průmyslu, kde je uplatňována zejména pro strukturní charakteristiku a kvantifikaci léčiv, jejich syntetických meziproduktů, ale i nečistot či rozkladných produktů. V oblasti toxikologie je spojení separačních a spektrálních metod v současné době nejběžněji používaným a nejvýznamnějším nástrojem pro provádění kontrol novější generace dopingových látek ve vrcholových sportech, nebo pro popsání polárních návykových látek a jejich metabolitů v nejrůznějších tělních tekutinách. Ekologické analýzy využívající tuto techniku se zaměřují hlavně na stanovení polárních netěkavých polutantů ze vzorků vody a půd. [1, 13, 38]

O typech sloučenin významných pro potravinářský průmysl, které lze pomocí LC-MS detekovat bude blíže pojednáno v kapitole 4. Analýzy vybraných druhů potravin budou komentovány v kapitole 5. Poslední kapitola tohoto rukopisu pak podá stručný přehled o dalších aplikačních oblastech LC-MS.

3.2 GC-MS

Spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií lze využít pouze pro analýzu těkavých nízkomolekulárních a termálně stabilních látek. Obecně se jako hranice detekce uvádí hodnota $500 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. I přes tuto skutečnost proniká tato metoda do širokého spektra rutinních chemických analýz, a to především z důvodů časové nenáročnosti, citlivosti měření a možnosti uskutečnit stopovou a ultrastopovou analýzu. Nejčastěji je využívána pro analýzy komplikovaných směsí látek, u kterých je identifikace jednotlivých složek na základě retenčních časů nemožná. Také komplexní vzorky, které obsahují neznámé složky, mohou být tímto způsobem prozkoumány.

Základní problematikou úspěšného spojení obou zařízení je jejich tlaková nekompatibilita, tedy přechod z přibližně atmosférického tlaku na výstupu z chromatografické kolony do prostoru iontového zdroje, kde je vysoké vakuum. To může

vést k poklesu citlivosti a ke zhoršení charakteru spekter. Dalším předpokladem pro spojení GC s MS je dostatečně výkonný čerpací systém, který je schopen odčerpat nadbytek nosného plynu z prostoru ionizace.

Přestože se při většině analýz vnáší vzorek do nástřikového prostoru v podobě roztoku, který převeden do plynné fáze, existují typy analýz, při nichž je do nástřikového prostoru nanášen již plynný vzorek. Takový typ analýzy se označuje jako tzv. headspace GC. Tento typ analýzy lze použít například při analýze sensoricky aktivních látek alkoholických nápojů (pivo, víno), ale také při studiu různých typů polymerů, které nejsou v běžných typech rozpouštědel rozpustné.

Velkou výhodou GC-MS, ve srovnání s LC-MS, představuje možnost využít při charakterizaci jednotlivých sloučenin tzv. knihovny spekter, které jsou běžnou součástí softwarového vybavení. Jedná se o databáze obsahující desítky tisíc hmotnostních spekter získaných metodou EI-GC-MS, což je umožněno tím, že elektronová ionizace se standardně provádí za přesně daných podmínek (200 °C, 70 eV).

V potravinářském průmyslu je GC-MS standardně používanou analytickou technikou pro objektivní hodnocení vůní a chutí, jejichž nositelem jsou často právě těkavé látky. Dále je možné tuto metodu využít například v oblastech toxikologie, ekologie nebo ve farmaceutickém průmyslu. [13, 43, 44]

3.3 CE-MS

V případě spojení kapilární elektroforézy s hmotnostním spektrometrem se v podstatě jedná o komplementární metodu k LC-MS. Jedná se o elektromigrační metodu, která nachází významné uplatnění především v oblasti analýzy látek iontové povahy v komplikovaných maticích. Důležitou aplikační oblastí je například farmaceutická analýza, kde se často využívá pro stanovení obsahu a strukturní charakterizaci peptidových léčiv. V praxi je CE-MS analýza uplatňována při studiích biopolymerů typu bílkovin a fragmentů nukleových kyselin. [13, 43, 45]

4 VYBRANÉ SLOŽKY POTRAVIN DETEKOVATELNÉ METODOU LC-MS

Potraviny patří k velmi složitým systémům, tvořeným velkým počtem chemických sloučenin. Chování těchto systémů se proto může za určitých podmínek výrazně lišit. Dochází zde k mnoha biochemickým, chemickým a fyzikálním dějům. Znalost těchto dějů, především reakčních mechanismů, je nezbytným předpokladem pro jejich regulaci, a tím i pro možnosti různých optimalizací výrobních procesů. Ty vedou k efektivnosti výroby i k nutnosti produkovat potraviny takové jakosti, resp. užitné hodnoty odpovídající zabezpečení správné, racionální výživy populace a eliminace látek škodlivých. Látky obsažené v potravinách lze různými způsoby dělit do několika kategorií. Důležitou roli při tom hrají především různé strukturální specifika, biologické vlastnosti, ale i původ v potravine, či odlišně nutriční vlastnosti. [46–48]

V rámci této kapitoly bude stručně pojednáno o vybraných skupinách organických sloučenin, které hrají v potravinářství významnou úlohu a jejichž přítomnost v příslušné potravinářské matici lze potvrdit či vyloučit použitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií.

Mezi hlavní složky potravin detekovatelné metodou LC-MS patří:

- ▶ lipidy
- ▶ sacharidy
- ▶ proteiny, peptidy, aminokyseliny
- ▶ vitaminy
- ▶ flavonoidy
- ▶ mykotoxiny
- ▶ pesticidy
- ▶ alergeny
- ▶ potravinová aditiva. [46]

4.1 Lipidy

Lipidy jsou jednou z nejdůležitějších komponent potravin nacházejících se ve všech rostlinných i živočišných produktech, a jsou esenciální složkou podílející se na udržení životních funkcí organismu. Lipidy se významně podílejí na nutriční i senzorické hodnotě

většiny druhů potravin. Z energetického hlediska se také jedná o nejbohatší zdroj. Jsou to přírodní sloučeniny, které obsahují vázané mastné kyseliny s více jak třemi atomy uhlíku. Z chemického hlediska se jedná o strukturně velmi nesourodou skupinou látek, přičemž jejich hlavním souhrnným znakem je přítomnost dlouhých nepolárních uhlovodíkových řetězců, které úzce souvisí s dobrou rozpustností těchto sloučenin v nepolárních rozpouštědlech (např. chloroform, benzen) a částečnou rozpustností, nebo úplnou nerozpustností ve vodě. [46–51]

Dle chemického složení je lze dělit na:

- ▶ homolipidy
- ▶ heterolipidy
- ▶ komplexní lipidy
- ▶ doprovodné látky lipidů. [47, 48]

4.1.1 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny (FA; z angl. Fatty Acids) jsou alifatické monokarboxylové kyseliny, které lze z lipidů uvolnit hydrolýzou. Z výživového hlediska jde o nejpodstatnější součást lipidů. Ve vázané podobě se od sebe odlišují délkou a charakterem uhlovodíkového řetězce, stupněm nasycenosti a v několika případech i přítomností dalších substituentů. Ve většině případů jsou vázány estery či amidy v homolipidech nebo heterolipidech, lze se ovšem setkat i s mastnými kyselinami volnými. Volné mastné kyseliny vznikají hydrolytickým štěpením lipidů za přítomnosti enzymu hydrolázy.

Lze se setkat s těmito typy mastných kyselin:

- ▶ nasycené mastné kyseliny
- ▶ nenasyčené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou
- ▶ nenasyčené mastné kyseliny s více dvojnými vazbami
- ▶ mastné kyseliny s trojnými vazbami a různými substituenty. [48, 49, 51]

Nasyčené mastné kyseliny

Nasyčené mastné kyseliny (SAFA; z angl. Saturated FA) jsou obvykle obsaženy v lipidech se sudým počtem uhlíkových atomů a nerozvětveným řetězcem. Počet uhlíkových atomů se pohybuje v rozmezí 4 až 60 a ve většině případů se vyskytují esterově vázány na další složky lipidů. Nasyčené mastné kyseliny jsou chemicky velmi stálé a mění se teprve při dlouhodobém záhřevu nebo za vysokých teplot. Za běžných podmínek

zpracování a skladování potravin se téměř nemění. Jejich obsah v potravinách se velmi liší, největší zastoupení mají však kyseliny palmitová a stearová.[48, 49]

Tabulka 1: Příklady nasycených mastných kyselin [48]

Triviální název	Systematický název	Počet atomů uhlíku
máselná	butanová	4
myristová	tetradekanová	14
palmitová	hexadekanová	16
stearová	oktadekanová	18
arachová	ikosanová	20

Nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou

Tyto mastné kyseliny, označované také jako MUFA (z angl. Monounsaturated FA), obsahují pouze jednu dvojnou vazbu ve svém řetězci, navzájem se přitom odlišují polohou této vazby, délkou uhlíkového řetězce a prostorovou konfigurací. Z nutričního hlediska jde o nezanedbatelnou součást stravy. Mezi nejvýznamnější zástupce patří především kyselina olejová, nacházející se zejména v rostlinných olejích a v lipidech tvořící biologické membrány. [48, 49, 51]

Tabulka 2: Příklady monoenoových mastných kyselin [49]

Triviální název	Systematický název	Počet atomů uhlíku	Poloha dvojně vazby	Isomer
myristolejová	tetradec-9-enová	14	9	cis
palmitolejová	hexadec-9-enová	16	9	cis
olejová	oktadec-9-enová	18	9	cis
elaidová	oktadec-9-enová	18	9	trans
eruková	dokosa-9-enová	22	13	cis

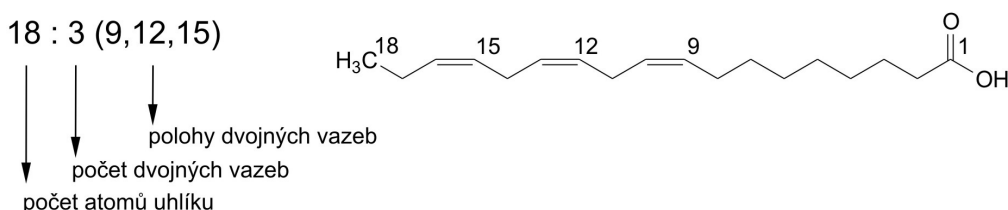
Nenasycené mastné kyseliny s více dvojnými vazbami

Jedná se o sloučeniny známé také pod označením polyenové mastné kyseliny (PUFA; z angl. Polynsaturated FA) mající ve své struktuře dvě nebo více dvojných vazeb, které se nachází v navzájem izolované poloze. Zvláštní postavení zaujímá skupina tzv. esenciálních mastných kyselin. Rozeznáváme mezi nimi mastné kyseliny řady n-6 a n-3. U řady n-3 se nachází první dvojná vazba na třetím atomu uhlíku od koncové methylové skupiny, v případě řady n-6 na uhlíku šestém.

Příklady esenciálních mastných kyselin:

- ▶ řada n-3 – kyselina α -linolenová, eikosapentaenová, dokosaheptaenová
- ▶ řada n-6 – kyselina linolová, γ -linolenová, arachidonová. [48, 52]

Vyjma systematického názvosloví lze při vyjadřování struktury mastných kyselin použít tzv. zkrácený zápis obsahující počet atomů uhlíku a počet dvojných vazeb (za dvojtečkou). Poloha dvojných vazeb se vyjádří číselnými lokanty atomů uhlíku, ze kterých dvojně vazby vycházejí. Na **obrázku 6** je pro ilustraci znázorněno použití zkráceného zápisu pro kyselinu α -linoleovou.



Obrázek 6: Zkrácený zápis a strukturní vzorec kyseliny α -linoleové

4.1.2 Homolipidy

Homolipidy jsou estery mastných kyselin a alkoholů, které neobsahují žádnou další složku. Dělí se dle struktury přítomného alkoholu na:

- ▶ estery jednosytných alkoholů (vosky)
- ▶ estery dvojsytných alkoholů (glykoly)
- ▶ estery trojsytných alkoholů (glyceroly)
- ▶ estery vícesytných alkoholů.

Z potravinářského hlediska jsou nejvýznamnější glyceroly. Podle počtu navázaných mastných kyselin se dělí na monoacylglyceroly, diacylglyceroly a triacylglyceroly. Při běžné laboratorní teplotě (25 °C) se některé z výše uvedených typů homolipidů mohou vyskytovat ve formě kapalin či tuhých látek. Podle toho se pak dělí na oleje (kapalné) a tuky (tuhé). Dle původu pak na rostlinné a živočišné. Jsou-li na glycerol navázány tři stejné mastné kyseliny, jde o jednoduché triacylglyceroly, pokud se navázané mastné kyseliny liší, jde o triacylglycerolymíšené.[48, 49, 50, 51]

4.1.3 Heterolipidy

Heterolipidy obsahují mimo mastných kyselin a alkoholu také kovalentně vázané složky (kyselina fosforečná, cukerná složka aj.).

Dělení heterolipidů dle navázané složky:

- ▶ fosfolipidy – lipidy obsahující esterově vázanou kyselinu fosforečnou
- ▶ glykolipidy – deriváty mastných kyselin obsahující cukernou složku
- ▶ sulfolipidy – lipidy obsahující esterově vázanou kyselinu sírovou
- ▶ ceramidy a cerebrosidy – lipidy obsahující sfingosin nebo jiné aminoalkoholy
- ▶ sialolipidy – lipidy obsahující kyselinu sialovou, nebo její zbytky.[48–51]

4.1.4 Komplexní lipidy

Komplexní lipidy jsou makromolekulární látky obsahující kromě kovalentně vázaných mastných kyselin ve formě výše uvedených lipidů, také složky vázané například hydrofobními vazbami či vodíkovými můstky. Patří mezi ně zejména lipoproteiny, komplexní glykolipidy, mukolipidy a další. [48, 49]

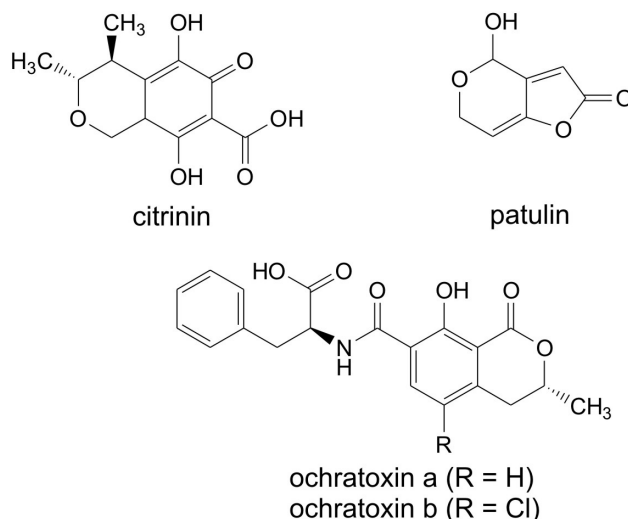
4.1.5 Doprovodné látky lipidů

Lipofilní látky obsažené v surovinách a potravinových výrobcích, které ovšem nejsou lipidy, se nazývají lipoidy. Do této skupiny doprovodných látek patří zejména lipofilní vitaminy, steroly, steroidy, vyšší uhlovodíky, vyšší alkoholy a další látky. [48, 49]

4.2 Mykotoxiny

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity mikroskopických vláknitých hub, které často kontaminují potraviny i krmiva. Ke kontaminaci zemědělských produktů může dojít v různých fázích předcházejících jejich konzumaci. Vedle exogenní kontaminace mohou být potraviny kontaminovány i v souvislosti s cíleným využíváním plísní v různých potravinářských a biotechnologických procesech. Problémem je také jejich stabilita při vysokých teplotách a v kyselém prostředí. Díky tomu nemohou některé úpravy potravin a krmiv přítomné mykotoxiny odstranit. Z chemického hlediska se mykotoxiny liší jak stavbou své molekuly, tak svými účinky. Mohou to být hepatotoxiny, neurotoxiny, a karcinogeny. U některých mykotoxinů jsou uváděny i teratogenní účinky.

Mezi nejvýznamnější producenty mykotoxinů patří plísně rodů *Aspergillus*, *Fusarium* a *Penicillium*. Významnými mykotoxiny jsou například aflatoxiny, ochratoxin A, patulin, citrinin, fusarin C, fumonisiny a další. Strukturní vzorce vybraných mykotoxinů jsou uvedeny na **Obrázku 7**. [46, 48, 53–55]



Obrázek 7: Strukturní vzorce vybraných mykotoxinů

V současnosti je známo přes 470 mykotoxinů. Mezi často napadenými potravinářskými komoditami bývají zpravidla kukuřice, pšenice, ječmen, rýže, oves, různé druhy ořechů, mléko a sýry. [53, 54]

4.3 Sacharidy

Sacharidy jsou biologicky aktivními látkami a základní složkou všech živých organismů. Z chemického pohledu jsou to polyhydroxyaldehydy a polyhydroxyketony obsahující ve své molekule nejméně tři alifaticky vázané atomy uhlíku. Za sacharidy jsou také považovány molekuly vzniklé jejich kondenzací za vzniku acetalových, glykosidových vazeb. [48, 49, 56]

Sacharidy lze dělit dle následujících kritérií:

- ▶ podle funkční skupiny – aldosity a ketosity
- ▶ podle počtu atomů uhlíku v molekule – triosy, tetrosy, pentosy, hexosy...
- ▶ podle počtu monosacharidových jednotek – monosacharidy, oligosacharidy, polysacharidy. [49]

4.3.1 Monosacharidy

Monosacharidy jsou nejjednoduššími cukry, které vzhledem k obsahu pouze jedné sacharidové jednotky nemohou být hydrolyzovány na jednodušší sacharidy. Vyskytují se jak volné, tak vázané v oligosacharidech či polysacharidech. Monosacharidy obsahují poměrně velké množství hydroxylových skupin, jsou tedy velmi polární a dobře rozpustné ve vodě. V potravinářství jsou z monosacharidů důležité pouze pentosy a hexosy.

K významným fyzikálním vlastnostem monosacharidů patří optická otáčivost, tedy schopnost stáčet rovinu polarizovaného světla buď doprava, nebo doleva. Na základě toho je lze dále dělit na D-nebo L-formy. [48, 49, 51]

Mezi sacharidy s nejmenší molekulovou hmotností patří glyceraldehyd a dihydroxyaceton. Glyceraldehyd obsahuje jeden asymetrický uhlík, proto se vyskytuje ve dvou formách, jako L-glyceraldehyd a D-glyceraldehyd. Od těchto dvou sloučenin jsou dále odvozeny vyšší cukry, lišící se počtem atomů uhlíku v molekule. [48, 50]

Nejvýznamnějšími monosacharidy nacházejícími se v potravinách jsou zejména hexosy glukóza, fruktóza a galaktóza. Jsou běžnou složkou většiny potravin, ovšem v proměnlivém množství a zastoupení. Ve větším množství se monosacharidy vyskytují například v ovoci. Zde hraje velkou roli druh ovoce, stupeň zralosti, posklizňové skladování a zpracování. Do velké části potravinářských produktů jsou monosacharidy přidávány za účelem zlepšit jejich organoleptické vlastnosti. Častým jevem je přídavek ve formě invertního cukru či sirupů. [49, 57]

4.3.2 Oligosacharidy

K oligosacharidům patří sacharidy skládající se ze dvou až deseti monosacharidových jednotek. Monosacharidové jednotky jsou spojeny glykosidovou vazbou. Takto vzniklé oligosacharidy lze dle počtu monosacharidových molekul ve struktuře dále dělit na di-, tri- až dekasacharidy. Významné místo v potravinářství zaujímají disacharidy laktóza a sacharóza. [56, 49] Laktóza (systematicky 4-O-(β -D-galaktopyranosyl)-D-glukopyranosa) neboli mléčný cukr, je disacharid skládající se z galaktózy a glukózy. Kravské mléko obsahuje průměrně 3–5 % tohoto cukru. Vstřebávání probíhá v tenkém střevě po enzymatickém štěpení na monosacharidové jednotky. Enzym zajišťující tento proces se nazývá laktáza a často je jeho činnost s rostoucím věkem snížena. To má za následek značný rozvoj střevních bakterií a s tím spojené zažívací problémy. Důležitou roli také hraje při výrobě mléčných výrobků, kterým dodává vhodné senzorycké vlastnosti a poskytuje substrát pro bakterie mléčného kvašení při výrobě některých výrobků, např. jogurtů.

Sacharóza, jejíž systematický název je β -D-fruktofuranosyl- α -D-glukopyranosid, se skládá z glukózy a fruktózy a často je nazývána také jako třtinový cukr. Vyskytuje se v ovocných šťávách a rostlinných tekutinách. Surovinami pro průmyslovou výrobu tohoto cukru představuje cukrová třtina nebo cukrová řepa. [48, 49, 57]

4.3.3 Polysacharidy

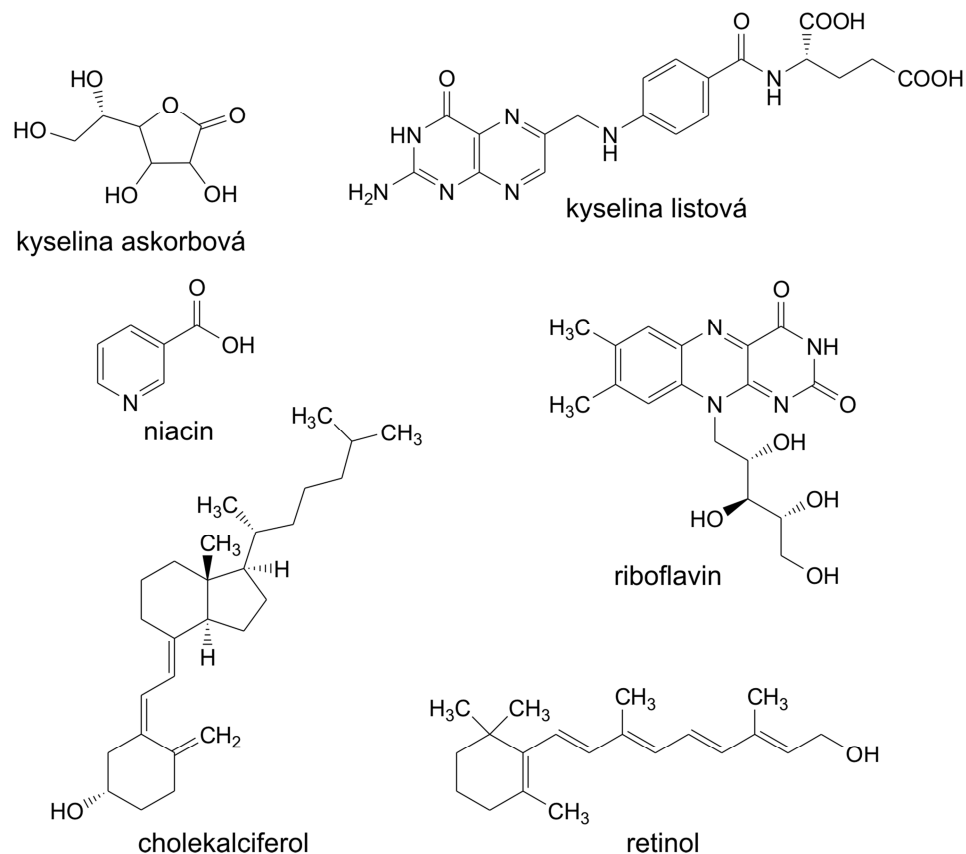
Polysacharidem je označována látka obsahující ve své struktuře více jak deset monosacharidových jednotek, vzájemně propojených glykosidovou vazbou. Jsou to velmi polární makromolekuly, které ve vodě tvoří viskózní roztoky nebo gely, nebo jsou ve vodě zcela nerozpustné. Řetězce polysacharidů mohou být jak lineární (větvené, nevětvené), tak cyklické. Dle obsažených složek ve struktuře se dělí na homopolysacharidy (homoglykany) a heteropolysacharidy (heteroglykany).

Nejdůležitějším rostlinným zásobním polysacharidem je škrob, který tvoří škrobová zrna charakteristického tvaru pro danou rostlinu. Škrob je složen ze směsi dvou hlavních složek – amylosy a amylopektinu. Je obsažen v mnoha surovinách, které jsou považovány za základní v lidské výživě. Patří sem například brambory, kukuřice, pšenice, rýže a další. [48, 49, 50]

4.4 Vitaminy

Vitaminy jsou organické nízkomolekulární látky, které jsou syntetizované autotrofními organismy. U heterotrofních organismů probíhá tato syntéza pouze v omezené míře a primárně je získávají jako látky exogenní, především potravou. V metabolismu člověka vystupují jako biokatalyzátory a jsou nezbytné pro látkovou přeměnu a regulaci metabolismu. Proto jsou označovány za exogenní esenciální biokatalyzátory. Vitaminy se nepodílejí na krytí energetických potřeb organismu, ani se nejedná o stavební či strukturní jednotky organismu. Plní však důležitou úlohu v oxidačně-redukčních systémech, mohou také vystupovat jako prekurzory kofaktorů různých enzymů. [46, 48, 58]

Důležitým kritériem dělení těchto látek je jejich rozpustnost, na základě které se dělí na vitaminy hydrofilní, rozpustné ve vodě a lipofilní, rozpustné v tucích. Mezi vitaminy rozpustné ve vodě patří vitaminy B-komplexu a vitamin C (kyselina askorbová a dehydroaskorbová). Vitaminy skupiny B zahrnují vitamin B₁ (thiamin), B₂ (riboflavin), B₃ (niacin), B₅ (pantothénová kyselina), B₆ (pyridoxin), B₉ (folacin, kyselina listová) a B₁₂ (kobalamin). Vitaminy rozpustné v tucích jsou vitaminy A (all-*trans*-retinoidy), D (cholecalciferol a ergocalciferol), E (tokoferoly a tokotrienoly), K (fylochinon a farnochinon). [58] Na **Obrázku 8** jsou znázorněny strukturní vzorce vybraných vitaminů.



Obrázek 8: Strukturní vzorce vybraných vitaminů

Vitaminy jsou termolabilní látky, které snadno oxidují. Tato skutečnost z nich činí poměrně nestálé složky potravin. Vzhledem ke své nestabilitě jsou považovány za ukazatele aplikace správného technologického postupu, skladování, či kulinární úpravy v potravinářském průmyslu. Mnohé z nich jsou běžně využívány jako potravinářská aditiva, například jako antioxidanty či látky upravující barvu. Možné využití často nachází také ve fortifikaci potravin, tedy při obohacování potravin složkami, které mohly být v průběhu technologického zpracování ztraceny. [48, 58]

4.5 Flavonoidy

Flavonoidní látky, neboli flavonoidy jsou běžnými sekundárními metabolity rostlin. Jedná se o podskupinu polyfenolických látek. Ve své struktuře obsahují dva benzenové kruhy spojené tříuhlíkatým řetězcem v uspořádání $C_6-C_3-C_6$. Jsou známé jako barevné pigmenty s antioxidační aktivitou, která je ovlivněna především počtem a polohou hydroxylových skupin ve skeletu příslušné molekuly. Svými vlastnostmi se liší od jiných fenolových rostlinných pigmentů, z toho důvodu jsou vyčleněny samostatně. Dělení je poměrně nejednoznačné, nejčastěji se ovšem lze setkat s rozčleněním flavonoidů dle

stupně oxidace C₃ řetězce na katechiny (flavan-3-oly), leukoanthokyanidiny (flavan-3,4-dioly), flavanony, flavanonoly, flavony, flavonoly a anthokyanidiny. [46, 48, 58]

V přírodě je často pozorován výskyt flavonoidů vázaných na sacharidy. Tyto látky jsou nazývány flavonoidní glykosidy, které se většinou nacházejí ve formě *O*-glykosidů, v nichž je aglykonový kruh navázán přes hydroxylovou skupinu, obvykle v poloze C7. Nejběžnějšími cukernými složkami jsou D-glukosa, L-rhamnosa, D-galaktosa, L-arabinosa a další. Flavonoidy se ovšem mohou vyskytovat jako volné látky.

V současné době je popsáno přes 5000 flavonoidních látek. Ve větším množství se vyskytují v potravinách jako je například ovoce a zelenina. U některých látek tohoto typu byly prokázány silné antioxidační, antimutagenní, protikarcinogenní a protizánětlivé účinky. [46, 48, 58]

5 PŘÍKLADY HPLC-MS ANALÝZ VYBRANÝCH DRUHŮ POTRAVIN

Pomocí HPLC-MS analýzy je možné zkoumat potraviny z nejrůznějších hledisek. Vzhledem k vysoké všestrannosti této metody lze provést strukturní charakterizaci a kvantifikaci složek podmiňující chuť, nutriční vlastnosti a případnou toxicitu potravinářských surovin a produktů. Rozsah aplikovatelnosti této metody v potravinářském průmyslu je obrovský. Vztahuje se jak k analýzám zahrnujícím všestranné prozkoumání stopových látek v potravinách, s důrazem na toxické látky typu agrochemikálií, mykotoxinů, reziduí veterinárních léčiv, růstových hormonů či jiných farmak, tak na analýzu látek vyskytujících se zde v nesrovnatelně větším měřítku. Ze základních složek potravin lze uvést například peptidy, proteiny, lipidy, sacharidy, glykoproteiny či vitaminy. Využitím HPLC-MS lze sledovat strukturní změny výše zmíněných typů látek během procesů tepelné úpravy a stárnutí potravin. Touto metodou lze studovat také strukturu a obsah netěkavých xenobiotik, jakožto látek potenciálně se vyskytujících v potravinách. [13, 46]

5.1 Sýr

Hmotnostní spektrometrií lze posoudit zdravotní nezávadnost sýrů. Je možné stanovit například přítomnost mykotoxinů pocházejících z mléka, nebo vznikajících činností mikroorganismů během procesu zrání (např. alfatoxin M1, roquefortine). HPLC-MS metody jsou schopné detekovat obsah těchto toxinů i při velmi nízkých koncentracích. Kvalita těchto výrobků může být také prověřena pomocí podrobné analýzy peptidových frakcí, ty jsou zde přítomny díky přírodním proteolytickým procesům. Peptidy jsou generovány při proteolytických reakcích vznikajících při technologickém zpracování, tedy při výrobě a zrání sýrů. K průběhu proteolytických reakcí dochází díky enzymům bakterií mléčného kvašení, použitému syřidlu nebo enzymům přítomným ve zpracovávaném mléce. Vzhledem ke složitosti peptidových frakcí je jejich úplná charakteristika v sýrech možná pouze za využití HPLC-MS. Peptidy přítomné v sýru lze využít ke stanovení autenticity složek uvedených na výrobku, k charakterizaci výrobní technologie, ale také například ke stanovení druhu mléka, které bylo k výrobnímu procesu použito (kravské, ovčí, buvolí apod.) nebo doby zrání sýru. [59, 60, 61]

5.2 Mléko

Mléko je jednou ze základních složek lidské výživy a klíčovou roli hraje jako prvek především výživy kojenecké. Mimo to se jedná o důležitou komoditu ve světové ekonomice. Proteiny nacházející se v mléce se dělí do dvou důležitých skupin – bílkoviny mléčného séra a kaseinové bílkoviny. Kaseinové bílkoviny jsou členěny do čtyř základních frakcí na α_{s1} , α_{s2} , β a κ kaseiny. Mezi hlavní představitele bílkovin mléčného séra, tedy syrovátkových, lze zařadit například β -laktoglobuliny, α -laktoglobuliny, sérum albumin, imunoglobuliny, laktoferrin a proteoso-peptony. Nachází se zde i další proteiny, ovšem v ne příliš významném množství. Frakce syrovátkových bílkovin jsou považovány za látky s významnou biologickou aktivitou, které mají pozitivní zdravotní účinky. Z tohoto důvodu jsou běžně produkty na bázi hydrolyzovaných sérových proteinů podávány při kojenecké výživě za účelem prevence gastrointestinálního snášení kravského mléka.

Vzhledem k tomu, že je mléko složitou maticí sloučenin, je k analýze jeho i od něj odvozených produktů spektrálních a chromatografických metod často využíváno. V případě HPLC-MS zejména pro účely identifikace, kvantifikace a charakterizace mléčných proteinů, tuků a sacharidů. Nejčastěji bývá vyšetření mléka zacíleno právě na mléčné bílkoviny. Využívá se také k objasnění vztahů mezi zastoupením jednotlivých bílkovin a nutričních vlastností za použití různých technologií zpracování a padělání mléčných výrobků. Mléko je jedním z hlavních zdrojů alergenů v potravinách. Proto jsou analýzy založené na spojení s hmotnostní spektrometrií využívány k detekci a charakterizaci alergenních proteinů. [48, 61, 62, 63]

U mléka a mléčných výrobků (např. sušených mlék pro novorozence), ale mléčných výrobků, které nejsou určeny pro lidskou spotřebu (krmiva pro zvířata) je LC-MS s úspěchem používáno při odhalování přítomnosti melaminu (2,4,6-triamino-1,3,5-triazin), který obsahuje 67 % dusíku a je do výrobků přidáván s cílem zamaskovat nedostatečný obsah bílkovin. V nedávné době bylo zaznamenáno několik případů nedovoleného přidávání melaminu do potravin (Čína, 2008 – sušené mléko pro kojence) či krmiv pro zvířata (USA, 2007 – krmivo pro zvířata), které mělo za následek tisíce nemocných dětí v Číně a tisíce uhynulých zvířat v USA. [64] Nejen s ohledem na tyto případy jsou neustále vyvíjeny citlivější, rychlejší a ekonomičtější analytické metody určené pro stanovení melaminu v potravinách. [65]

5.3 Šunka

Díky HPLC-MS je možné odhalit nederivatizované biogenní aminy v šunce, ale i jiných masných výrobcích. Biogenní aminy, vznikající dekarboxylací aminokyselin, jsou důležité při posuzování otázky kvality a zdravotní nezávadnosti masných výrobků. U šunky je možné například stanovit přítomnost kadaverinu, histaminu, agmatinu, fenylethylaminu, spermidinu a dalších biogenních aminů. Pro stanovení a posouzení těkavých složek tohoto typu produktů je ve většině případů upřednostňována analýza pomocí GC-MS. Nepolární komponenty, jež šunka obsahuje, jako například peptidy a bílkoviny jsou analyzovány pomocí HPLC-MS. V některých případech proteomických analýz je ovšem možné analyzovat vzorky za vyloučení HPLC, aplikovat přímý nástřík vzorku do hmotnostního spektrometru a tím urychlit analýzu.

Parametrem kvality, často vnímaným ze strany spotřebitelů, je jasně červená barva, která ovšem není způsobena přidávkem pomocných aditivních látek. Dříve byl důvod, proč jsou „stařené šunky“ schopné udržet si svoji charakteristickou barvu přehlížen. Nyní je pomocí hmotnostní spektrometrie objasněno, že za uchování červené barvy těchto šunek (Parmská apod.) jsou odpovědné Zn-porfyrinové komplexy obsahující jako majoritní složku chromofor. [66–68]

5.4 Víno

Hroznové víno a víno z něj produkované obsahuje velmi složité přírodní látky a je aktuálním a oblíbeným tématem chemických analýz. Pomocí HPLC-MS a GC-MS byly u tohoto typu potravin identifikovány stovky komponent odpovědných za aroma, chuť a barvu. HPLC-MS je využívána zejména při studiu netěkavých látek této komodity. Jako příklady lze uvést polyfenolické látky (anthokyaniny, flavonoly a taniny), které udávají daným vínům charakteristickou barvu. Při analýzách zabývajících se anthokyaniny a flavonoidy je využívána metoda HPLC-MS/MS, která umožňuje prozkoumání, jak aglykonových částí, tak částí cukerných. Také obsah jedné z nejznámějších antioxidačních složek vína se silným účinkem, resveratrolu, je velmi často určován touto instrumentací. Resveratrol je zde přítomen ve dvou isomerních formách a různých glykosilovaných verzích, proto jeho analýza není zcela jednoduchá. Navzdory tomu je daná metodika schopna, při zakomponování ionizačních technik APCI a ESI schopna identifikovat a kvantifikovat všechny formy této sloučeniny.

Proteiny přítomné ve víně hrají důležitou roli při posuzování kvality vína. Mají významný vliv na chuť a jakost vína, popřípadě způsobují nežádoucí zákal. Mohou se zde také vyskytovat mykotoxiny, například ochratoxin A. Tyto skupiny látek jsou pomocí HPLC-MS analýzy stanovitelné. [69–71]

6 OSTATNÍ APLIKACE HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Hmotnostní spektrometrie představuje dynamicky se rozvíjející oblast analytické chemie a hmotnostní spektrometr pak jeden z nejmodernějších a nejsofistikovanějších přístrojů, které jsou v analytické chemii využívány. Přestože je předložená práce svojí povahou úzce zaměřena na aplikace hmotnostní spektrometrie v kombinaci s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií v oblasti analýzy potravin, považují za vhodné se ve stručnosti zmínit i o dalších odvětvích, v nichž je hmotnostní spektrometrie s úspěchem využívána. Aplikační oblast hmotnostní spektrometrie je relativně široká, přičemž tak jak jde vývoj hmotnostních spektrometrů každým rokem dopředu, je možné pozorovat také neustále narůstající počet aplikací, v nichž je služeb hmotnostní spektrometrie využíváno. Jedná se například o:

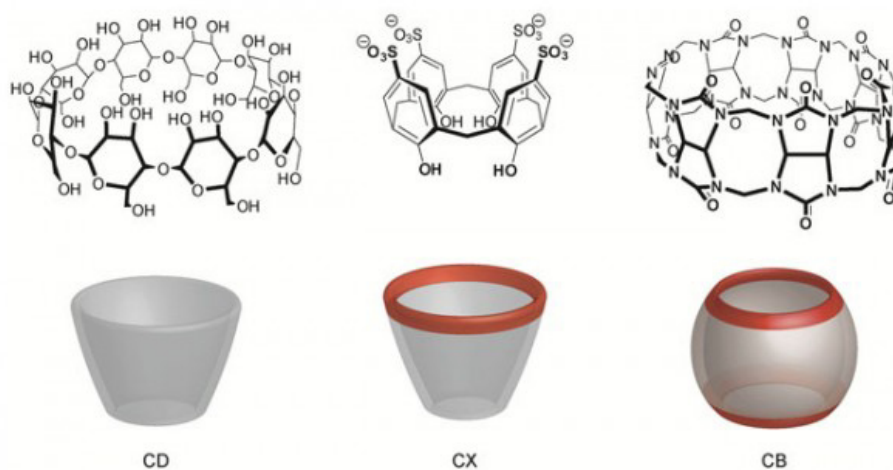
- ▶ objasnění struktury molekul a jejich chování v plynné fázi
- ▶ izotopovou analýzu
- ▶ supramolekulární chemii
- ▶ chemie léčiv a farmakokinetiku
- ▶ „omiky“ (proteomika, genomika, lipidomika, metabolomika)
- ▶ hmotnostně-spektrometrické zobrazování
- ▶ forenzní chemii (analýza léčiv a drog, prokazování dopingu nebo analýza inkoustů a barev).

V následující části této kapitoly bude o některých výše uvedených oblastech stručně pojednáno.

6.1 Supramolekulární chemie

Jedná se o vědeckou disciplínu, která se, přes svoji bohatou historii, do širšího povědomí odborné veřejnosti dostala až v 80. letech minulého století. Oním klíčovým okamžikem se stalo udělení Nobelovy ceny v oblasti chemie Jean-Marie Lehnovi, Charlesi J. Pedersenovi a Donaldu J. Cramovi v roce 1987. [72] Supramolekulární chemie představuje obor zahrnující v sobě několik vědeckých disciplín, a sice organickou, anorganickou, fyzikální a analytickou chemii. Hovoří-li se o supramolekulární chemii, je velmi často používán termín „*host-guest chemistry*“, čímž je vyjadřována interakce mezi molekulou hosta a hostitele. Hostitelem je obvykle molekula o větší molekulové hmotnosti, uvnitř jejíž kavity může být inkludována molekula hosta. Hostitelské makromolekuly jsou někdy označovány termínem „molekulární kontejner“.

Nejvýznamnějšími a nejznámějšími hostitelskými molekulami jsou kalixareny, crown-ethery, cyklodextriny a cucurbit[n]urily. Strukturní vzorce a grafické znázornění skutečného vzhledu vybraných hostitelských molekul jsou pro ilustraci znázorněny na **Obrázku 9**. Struktura molekuly hosta se do značné míry odvíjí od typu hostitelské molekuly, protože určitý typ hostitelské molekuly je obvykle schopen vytvářet supramolekulární komplexy jen s některými typy molekul. Molekula hosta tak může být představována jak jednoatomovým aniontem či kationtem, tak větší organickou či anorganickou sloučeninou. Vzniklý komplex je stabilizován nekovalentními interakcemi (van der Waalsovy síly, vodíkové můstky, halogenové vazby, π - π interakce či elektrostatické síly). [73–76]



Obrázek 9: Vybraní zástupci molekulárních kontejnerů. [77]

Kromě toho, že mohou být děje odehrávající se mezi hostem a hostitelem studovány pomocí řady instrumentálních metod v roztoku, lze se také zaměřit na popisování dějů odehrávajících se v plynné fázi. K tomuto účelu velmi dobře poslouží hmotnostní spektrometrie. [78]

V nedávné době bylo publikováno velké množství zajímavých prací týkajících se chemie molekulárních kontejnerů (hostitelských makromolekul) v plynné fázi. [79] Jako příklad lze uvést recentní práci výzkumné skupiny prof. Naua, zabývající se studiem komplexů typu hostitel-host, přičemž jako hostitele vystupují různé typy cucurbit[n]urilů a jako hosté tři sloučeniny na bázi bicyklo azoalkanů. [80] Pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie byly, u různých komplexů typu cucurbituril-azoalkan, pozorovány odlišné typy disociačních reakcí probíhajících v plynné fázi. Reaktivita jednotlivých typů

komplexů se lišila s ohledem na velikost kavity hostitelské molekuly a strukturu příslušného bicyklo azoalkanu.

6.2 Chemie léčiv a farmakokinetika

Chemie léčiv, neboli farmakochemie je obor zabývající se studiem chemoterapeutik (chemických léčiv) a farmaceutických pomocných látek, které jsou dostupné metodami chemické syntézy.

Farmakokinetika se oproti tomu zabývá působením organismu na aplikované léčivo a zabývá se teoretickými možnostmi, které mohou po podání léčiva do organismu nastat. [81]

Metoda HPLC-MS nalézá významné uplatnění v oblasti charakterizace a kvantifikace léčiv, jejich syntetických meziproductů, doprovodných nečistot a rozkladných produktů. Často je využívána také při studiu kinetiky a mechanismu odbourávání léčiv v organismu a strukturní identifikaci vznikajících metabolitů. LC-MS je rovněž nezbytnou součástí pro strukturní charakterizaci proteinů nebo enzymů (resp. jejich aminokyselinových zbytků) jako potenciálních vazebných míst pro syntetická léčiva. Mimo to je v řadě zdravotnických institucí využívána pro terapeutické monitorování cílené protinádorové léčby, například prostřednictvím tyrosinkinázových inhibitorů (TKI). Díky velmi dobré přesnosti a správnosti naměřených výsledků napomáhá klinikům v rozhodovacím procesu, zda v léčbě pacientů pokračovat a při jakých dávkách TKI aplikovaných do organismu. [21, 22, 82]

6.3 Forenzní chemie

Možnosti praktického uplatnění hmotnostní spektrometrie lze velmi dobře dokumentovat na řadě příkladů z oblasti forenzní chemie.

Prvním příkladem může být určení poměru stabilních izotopů atomu uhlíku hmotnostním spektrometrem, které umožňuje odhalit dopování vrcholových sportovců testosteronem, přičemž za hlavní výhody lze považovat rychlost a přesnost provedených analýz. Hmotnostní spektrometrie tak představuje velmi účinný nástroj antidopingových kontrol, který je používán i při vrcholných sportovních událostech typu olympijských her. [83]

Do oblasti analýzy organických molekul patří značný počet aplikací věnovaných analýze drog, kontrole potravinových doplňků, kdy může být účinek přírodního materiálu podpořen přidáním syntetizované účinné látky, analýze inkoustů a barev či odhalování výbušnin na zkoumaném povrchu, které má možné využití například při letištních kontrolách. Při tomto typu analýz jsou, vyjma obvyklých hmotnostně-spektrometrických metod, relativně často aplikovány ambientní ionizační techniky umožňující přímou analýzu vzorků bez jejich předchozí úpravy. Velmi zajímavým příkladem je analýza kokainu v bankovkách. Nedávno publikovaná studie uvádí, že zatímco v roce 1994 bylo 75 % oběživa používaného v Los Angeles (USA) kontaminováno kokainem, pak o 15 let později, tedy v roce 2009, byla přítomnost kokainu prokázána na všech testovaných bankovkách. [84] Analýza drog byla v nedávné době provedena také na eurobankovkách, kdy bylo analyzováno 7 až 15 náhodně vybraných bankovek napříč zeměmi o nominální hodnotě 5, 10, 20, 50, 100, 200 a 500 €. Použitou metodou bylo UPLC-MS/MS, přičemž všechny analyzované vzorky byly studovány v pozitivním skenovacím módu. Za zmínku stojí, že nejvíce kontaminovány byly bankovky o nižší nominální hodnotě. Nejčastěji detekovanými drogami byly kokain, benzoylekgonin (degradační produkt kokainu), heroin, morfin a methamfetamin. [85] Výše zmíněná analýza inkoustů a barev může být použita nejen při určování pravosti bankovek, ale také při ověřování původnosti či datování historických listin či uměleckých děl. [86]

Uvedený přehled zahrnuje i metody, které ještě nejsou běžnou součástí vyšetřovací práce, ale dokládá potenciál hmotnostní spektrometrie při odhalování trestných činů. Pro plné využití této metodiky je zapotřebí kvalifikovaný analytik, který je nejen schopen efektivně spolupracovat s kriminalisty a ostatními odborníky, kteří se na vyšetřování podílejí, ale také v kontextu vyšetřování správně interpretovat získaná data. [83]

ZÁVĚR

Byla zpracována rešeršní práce na téma „Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie v analýze potravin“, v níž je popsána charakteristika vysokoúčinné kapalinové chromatografie, hmotnostní spektrometrie, dále možnosti a výhody spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. V další části je stručně pojednáno o vybraných skupinách organických látek obsažených v potravinách a o možnostech reálného i teoretického využití této fyzikálně-chemické analytické metody při analýzách vybraných druhů potravin. V poslední části je poukázáno na obrovský potenciál této instrumentace a na široké možnosti využití i v dalších odvětvích.

První část práce je věnována vysokoúčinné kapalinové chromatografii, zejména pak historii chromatografických metod, principu separace, rozdělení chromatografických metod dle nejrůznějších kritérií, charakterizaci stacionární a mobilní fáze, jakožto komponent, které hrají důležitou roli při separaci jednotlivých složek, jež jsou v matrici zastoupeny. V závěru této kapitoly jsou popsány jednotlivé části instrumentace kapalinového chromatografu.

Další část této práce se zabývá charakteristikou hmotnostní spektrometrie, jakožto významné fyzikálně-chemické analytické metody zaměřené na zjištění relativní hmotnosti atomů, molekul a jejich částí po převedení na kladné či záporné ionty. Popsány jsou zde hlavní části hmotnostního spektrometru včetně jejich principu.

Spojením hmotnostního spektrometru se separačními metodami lze v jedné analýze provést separaci a následnou identifikaci či charakteristiku látek obsažených i ve velmi složitém systému. Tímto tématem se zabývá třetí kapitola. Dále je zde popsán princip separačních metod, které jsou nejběžněji využívány pro spojení s hmotnostní spektrometrií, včetně jejich možností.

Vzhledem k faktu, že jsou potraviny složitou matricí chemických sloučenin, je důležitá znalost fyzikálních, chemických a biochemických dějů, které zde probíhají, včetně jejich mechanismů, jež mohou významně napomoci optimalizaci výrobního procesu. Jsou zde uvedeny a popsány vybrané organické sloučeniny, které hrají v potravinách důležitou roli a které lze stanovit pomocí LC-MS

Předposlední část je věnována vybraným skupinám potravin, k jejichž analýze lze vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií ve spojení s hmotnostní spektrometrií využít. Je zde poukázáno na všestrannost této techniky při analýzách různých druhů potravin, na

možnosti stanovení nežádoucích látek v potravinách (mykotoxiny, biogenní aminy) či na posouzení kvality potravin.

V závěrečné kapitole je věnována pozornost aplikačnímu potenciálu LC-MS v jiných odvětvích. Pojednáno je o využití LC-MS např. v supramolekulární chemii, farmakokinetice či forenzní chemii.

LC-MS v dnešní době představuje jednu z nejvýznamnějších fyzikálně-chemických metod, poskytující rychlou, citlivou a přesnou analýzu s možností kvantifikace a identifikace látek, které se vyskytují ve složitějších systémech.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Sobotníková, J.; Bosáková, Z.; Čabala, R.; Coufal, P.; Pacáková, V.; Štulík, K.: *Chem. Listy* **2010**, 104, 1226
- [2] Mikeš, O.: *Laboratorní chromatografické metody*. SNTL: Praha, **1980**, s. 674
- [3] The Nobel prize in chemistry 1952. [cit. 2015-04-21]. Dostupné z WWW: http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1952
- [4] Churáček, J.; Jandera, P.: *Separace látek*. 2. vyd., SNTL: Praha, **1986**. s. 140
ISBN 05-033-86
- [5] Klouda, P.: *Moderní analytické metody*. 2. vyd., Pavel Klouda: Ostrava. **2003**, s. 132, ISBN 80-86369-07-2
- [6] Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z.: *Základní analytická chemie*. Karolinum: Praha, **2003**, s. 204, ISBN 80-246-0553-8
- [7] Churáček, J.: *Analytická separace látek*. 1. vyd., SNTL: Praha, **1990**, s. 348, ISBN 04-626-90
- [8] Davídek, J.: *Laboratorní příručka analýzy potravin*. Nakladatelství technické literatury: Praha, **1977**
- [9] Voet, D.; Voet, J.: *Biochemistry*. 4th ed., Wiley: Kendallville, **2011**, s.1515, ISBN 978-0470-57095-1
- [10] Surostev, V. I.; Borozenkov, M.; Detushev, K. V.: *Biochemistry*, **2009**, 74, s. 162
- [11] Douša, M.: *Základy separačních metod se zaměřením na HPLC*. 1. vyd., ÚKZUS: Brno, **2002**, s. 129, ISBN 80-86548-09-0
- [12] Holčapek, M.; Jandera, P.: *Chem. Listy*, **1998**, 92, s. 278
- [13] Štulík, K.: *Analytické separační metody*. Karolinum: Praha, **2004**, ISBN 80-246-0852-9
- [14] Lutter, P.; Lutter, M.; Parisod, V.; Weymuth, H.: *J. AOAC Int.* **2011**, 94, s. 1043
- [15] High-Performanceliquidchromatography (HPLC). [cit. 2015-04-21].
Dostupné z WWW:
http://muniche.linde.com/international/web/lg/spg/like35lgspg.nsf/docbyalias/anal_hplc

- [16] Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Dolan, J. W.: *Introduction to modern liquid chromatography*. 2nd ed., Wiley: Canada, **2010**, s. 863, ISBN 0-471-03822-9
- [17] Nováková, L.; Douša, M.: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Lucie Nováková, Michal Douša: Praha, **2013**, s. 299, ISBN 978-80-260-4243-3
- [18] Nováková, L., Douša, M., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Lucie Nováková, Michal Douša: Praha, **2013**, s. 235, ISBN 978-80-260-4244-0
- [19] Weston, A.; Brown, P. R.: *Hplc a Ce: Principles and practice*. W. B. Saunders Company: USA, **1997**, s. 280, ISBN 0-12-136640-5
- [20] Kalous, V.: *Základy fyzikálně chemických metod*. 2. vyd., SNTL: Praha, **1975**, s. 480
- [21] Hanuš, V.; Herman, Z.; Lemr, K.: *Vesmír*, **2003**, 82, s. 312
- [22] Vacek, J.: *Klin. Biochem. Metab.* **2006**, 4, s. 194
- [23] Milata, V.; Segl'a, P.: *Spektrálnemetódy v chémii*. STU: Bratislava, **2004**, s. 327, ISBN 80-227-2049-6
- [24] Beyermann, K.: *Organická stopová analýza*. SNTL: Praha, **1987**, s. 309
- [25] Abian, J.: *J. Mass Spectrom.* **1999**, 34, s. 157
- [26] Bramer, S. E.V.: *An introduction to mass spectrometry*. Chester: Widener University, **1997**
- [27] Holčapek, M.; Jirásko, R.; Lísa, M.: *J. Chromatogr., A*. **2010**, 1217, s. 3908
- [28] Volný, M.: *Chem. Listy*, **2011**, 105, s. 230
- [29] Weston, J. D.: *Analyst (Cambridge, U.K.)*. 2010, 135, s. 662 – 668
- [30] Ranc, V.; Havlíček, V.; Bednář, P.; Lemr, K.: *Chem. Listy*. 2007, 101, s. 524–529
- [31] Harris, G. A.; Galhena, A. S.; Fernández, F. M.: *Anal. Chem.* 2011, 83, s. 4508–4538
- [32] Hao, Ch.; Zhao, X.; Yang, P.: *TrAC*. **2007**, 6, s. 569 – 580
- [33] Friedecký, D.; Lemr, K.: *Klin. Biochem. Metab.* **2012**, 20, s. 152
- [34] Faktor, J.; Struhárová, I.; Fučíková, A.; Hubálek, M.; Vojtěšek, B.; Bouchal, P.: *Chem. listy*. 2011, 105, s. 846–850
- [35] Peng, Y.; Austin E. D.: *TrAC*. **2011**, 30, s. 1560
- [36] Scigelova, M.; Makarov, A.: *Practical proteomics*. **2006**, 1-2, s. 16

- [37] Hu, Q.; Noll, R. J.; Li, H.; Makarov, A.; Hardman, M.; Cooks, R. G.: *J. Mass Spectrom.* **2005**, 40, s. 430
- [38] Virus, E.; Sobolevsky, T.; Rodchenkov, G.: *J. Mass Spectrom.* **2008**, 43, s. 949
- [39] Ion trap. [cit. 2015-04-21]. Dostupné z WWW:
<https://www.bruker.com/products/mass-spectrometry-and-separations/lc-ms/ion-trap/amazon-speed/technical-details.html>
- [40] Orbitrap. [cit. 2015-04-21]. Dostupné z WWW:
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Orbitrap_Mass_Analyzers.jpg
- [41] Quadrupole. [cit. 2015-04-21]. Dostupné z WWW:
<http://www.reliance.co.uk/en/news/66/quadrupole+mass+filters>
- [42] Time-of-flight. [cit. 2015-04-21]. Dostupné z WWW:
<https://www.mps.mpg.de/1979646/ROSINA>
- [43] Halket, M. J.; Waterman, D.; Przyborowska, M. A.; Patel, P. K. R.; Fraser, D. P.; Bramley, M. P.: *J. Exp. Bot.* **2005**, 56, s. 219
- [44] Careri, M.; Bianchi, F.; Corradini, C.: *J. Cromatogr. A*, **2002**, 970, s. 3
- [45] Norková, R.; Jaklová Dyrtrtová, J.; Kašička, V.: *Chem. Listy.* **2013**, 107, s. 949
- [46] Stefano, D. V.; Avellone, G.; Bongiorno, D.; Cunsolo, V.; Muccilli, V.; Sforza, S.; Dossena, A.; Drahos, L.; Vékey, K.: *J. Cromatogr. A*, **2012**, 1259, s. 74
- [47] Zdzislaw, A. K.; Sikorski, Z. E.: *Chemical and Functional Properties of Food Lipids*, **2002**
- [48] DAVÍDEK, J.; JANÍČEK, G.; POKORNÝ, J.: *Chemie potravin*. SNTL ALFA: Praha, **1983**, s 595, ISBN 04-815-83
- [49] VELÍŠEK, J., *Chemie potravin I*. Tábor: Osis, **1999**, 331, s. ISBN: 80-902391-3-7
- [50] HOZA, I.; KRAMÁŘOVÁ, D.: *Potravinářská biochemie I*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, **2005**, s. 168, ISBN: 80-7318-295-5
- [51] Dostál, J.: *Lékařská chemie II*. Masarykova univerzita: Brno–Krávická hora, **2007**, s. 166, ISBN 978-80-210-3789-2
- [52] Zajíc, J.; BAREŠ, M.: *Chemie a technologie tuků*, VŠCHT: Praha, **1988**, s. 244

- [53] Yusuf, K.; Aquel, A.; Ghfar, A. A.; Alothman, Z. A.: *Ultra Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry Evaluation and Applications in food analysis*. CRC Press: US, **2014**, ISBN 978-1-4665-9155-4
- [54] Nielsen, K. F.; Smedsgaard, J.: *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1002, s. 111
- [55] VELÍŠEK, J.: *Chemie potravin 3*. Tábor: OSSIS, **1999**, s. 368, ISBN: 80-902391-5-3
- [56] WILDMAN, R.; MILLER, B.: *Sports and fitness nutrition*. USA, **2004**, s. 335, ISBN 0-534-57564-1
- [57] Černý, M.; Trnka, T.; Buděšínský, M.: *Sacharidy*. 1. vyd., Česká společnost chemická: Praha, **2010**, s. 178, ISBN 978-80-86238-81-4
- [58] Velíšek, J.: *Chemie potravin 2*. OSSIS: Tábor, **1999**, 328 s., ISBN: 80-902391-4-5
- [59] Senyuva, H.; Gilbert, J.; Ozcan, S.; Gurel, N.: *World Mycotoxin J.* **2008**, 1, 229
- [60] Piraino, P.; Upadhyay, V. K.; Rossano, R.; Riccio, P.; Parente, E.; Kelly, A. L.; McSweeney, P. L. H.: *Food Chem.* **2007**, 101, s. 964
- [61] Swaisgood, H. E.: *Advanced Dairy Chemistry, Elsevier, London*, **1992**, s. 63
- [62] Weber, D.; Raymond, P.; Ben-Rejeb, S.; Lau, B.: *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, s. 1604
- [63] Casado, B.; Affolter, M.; Kussmann, M.: *J. Proteomics.* **2009**, 73, s. 196
- [64] Tyan, Y. C.; Yang, M. H.; Jong, S. B.; Wang, C. K.; Shiea, J.: *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 395, s. 729
- [65] Venkatasami, G.; Sowa, J. R.: *Analytica chimica acta*, **2010**, 665, s. 227
- [66] Saccani, G.; Tanzi, E.; Pastore, P.; Cavalli, S.; Rey, A.: *J. Chromatogr. A* **2005**, 43, s. 1082
- [67] Mora, L.; Sentandreu, M. A.; Fraser, P. D.; Toldra, F.; Bramley, P. M.: *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, s. 8982
- [68] Moller, J. K. S.; Adamsen, C. E.; Catharino, R. R.; Skibsted, H. L.; Eberlin, M. N.: *Meat Sci.* **2007**, vol. 75, s. 203
- [69] Flamini, R.: *Mass Spectrom. Rev.* **2003**, 22, s. 218
- [70] Wang, Y.; Catana, F.; Yang, Y. N.; Roderick, R.; van Breemen, R. B.: *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, s. 431

- [71] Leitner, A.; Zollner, P.; Paolillo, A.; Stroka, J.; Papadopoulou-Bouraoui, A.; Jaborek, S.; Anklam, E.; Lindner, W.: *Anal. Chim. Acta.* **2002**, 453, s. 33
- [72] Supramolekulární chemie a cyklodextriny. [cit. 2015-5-1]. Dostupné z WWW: <<http://www.nobelprize.org/>>
- [73] Schalley, Ch.: *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*. WILEY–VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, **2007**, s. 571, ISBN 978-527-31505-5
- [74] Stibor, I.: *Chem. Listy* **2009**, 103, s. 260
- [75] Bazzicalupi, C.; Bianchi, A.; García-España, E.; Delgado-Pinar, E.: *Inorg. Chim. Acta.* **2014**
- [76] Reinhoudt, D.: *Molecul. Sci. Chem. Engineer.* **2013**
- [77] Nau, W.; Norouzy, A.: *Synthetic macrocyclic receptors as tool in drug delivery and drug discovery*, [cit. 2015-04-21]. Dostupné z WWW: <http://www.drugtargetreview.com/1850/topics/targets/synthetic-macrocyclic-receptors/>
- [78] Schalley, CH. A.; Springer, A.: *Mass Spectrometry and Gass-Phase Chemistry of Non-covalent Complexes*, Wiley: New Jersey, **2009**, ISBN 987-0-470-13115-2
- [79] Qi, Z.; Heinrich, T.; Moorthy, S.; Schalley, Ch. A.: *Chem. Soc. Rev.* **2014**,
- [80] Lee, T. C.; Kalenius, E.; Lazar, A. I.; Assaf, K. I.; Kuhnert, N.; Grün, C. H.; Jänis, J.; Scherman, O. A.; Nau, W. M.: *Nat. Chem.* **2013**, 5, s. 376
- [81] Hampl, F.; Rádl, S.; Paleček, J.: *Farmakochemie*, Vysoká škola chemicko technologická v Praze: Praha, **2007**, s. 450, ISBN 978-80-7080-639-5
- [82] Mičová, K., Friedecký, D.; Faber, E.; Adam, T.: *Klin. Biochem. Metab.* **2012**, 20, s. 222
- [83] Lemr, K.: *Chem. Listy.* **2012**, 106, s. 479
- [84] Armenta, S.; Guardia, M.: *Trends Anal. Chem.* **2008**, 27, s. 344
- [85] Wimmer, S.; Schneider, S.: *Forensic Science Int.* **2011**, 206, s. 172
- [86] Eberlin, L. V.; Haddad, R.; Neto, R. C. S.; Cosso, R. G.; Maia, D. R. J.; Maldaner, A. O.; Zacca, J. J.; Sanvido, G. B.; Romão, W.; Vaz, B. G.; Ifa, D. R.; Dill, A.; Cooks, R. G.; Eberlin, M. N.: *Analyst* **2010**, 135, s. 2533

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku.
APLI	ionizace laserem za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
CE	kapilární elektroforéza
CI	chemická ionizace
DART	přímá analýza v reálném čase
DESI	desorpční ionizace elektrosprejem
EI	elektronová ionizace
ESI	elektrosprejová ionizace
FA	mastné kyseliny
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IEC	iontové-výměnná chromatografie
IT	iontová past
LC	kapalinová chromatografie
MALDI	ionizace laserem za účasti matrice
MS	hmotnostní spektrometrie
MUFA	mononenasycené mastné kyseliny
<i>m/z</i>	hmotnost/náboj
PC	papírová chromatografie
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
SAFA	nasycené mastné kyseliny
TKI	tyrosinkinázové inhibitory
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TOF	průletový analyzátor

UPLC ultraúčinná kapalinová chromatografie

UV ultrafialové záření

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Archer John Porter Martin a Richard Laurence Millington Synge, laureáti Nobelovi ceny roku 1952 v oboru chemie	14
Obrázek 2: Schéma HPLC	17
Obrázek 3: Schéma hmotnostního spektrometru	22
Obrázek 4: Aplikační oblast vybraných ionizačních technik	26
Obrázek 5: Hmotnostní analyzátory	30
Obrázek 6: Zkrácený zápis a strukturní vzorec kyseliny α -linoleové	37
Obrázek 7: Strukturní vzorce vybraných mykotoxinů	39
Obrázek 8: Strukturní vzorce vybraných vitaminů	42
Obrázek 9: Vybraní zástupci molekulárních kontejnerů	49

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Příklady nasycených mastných kyselin.....	36
Tabulka 2: Příklady monoenových mastných kyselin.....	36