

# Využití HPLC/MS v analýze biologicky aktivních látek

doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.



1

## Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (LC/MS)

- ☺ separace a identifikace složité směsi látek v jedné analýze (elementární složení, izotopy, struktura, kvantita)
- ☹ Komplikace při řešení spojení:
  - velký rozdíl tlaků mezi hmotnostním analyzátozem ( $10^{-3} - 10^{-11}$  Pa) a eluátem z chromatografické kolony ( $10^5$  Pa)
  - velký nadbytek mobilní fáze – odstranění před vakuovou částí
    - technické řešení bylo značně obtížné (náročnější než u GC/MS)
    - zavedení ionizačních technik pracujících za atmosférického tlaku (API) → mobilní fáze se přímo účastní ionizace → nyní rutinní použití

2

# Historie



**Wolfgang Paul**  
University of Bonn,  
Germany

1989 – Nobelova cena za fyziku  
„vývoj iontové pasti“



**John B. Fenn**  
Virginia  
Commonwealth  
University, USA

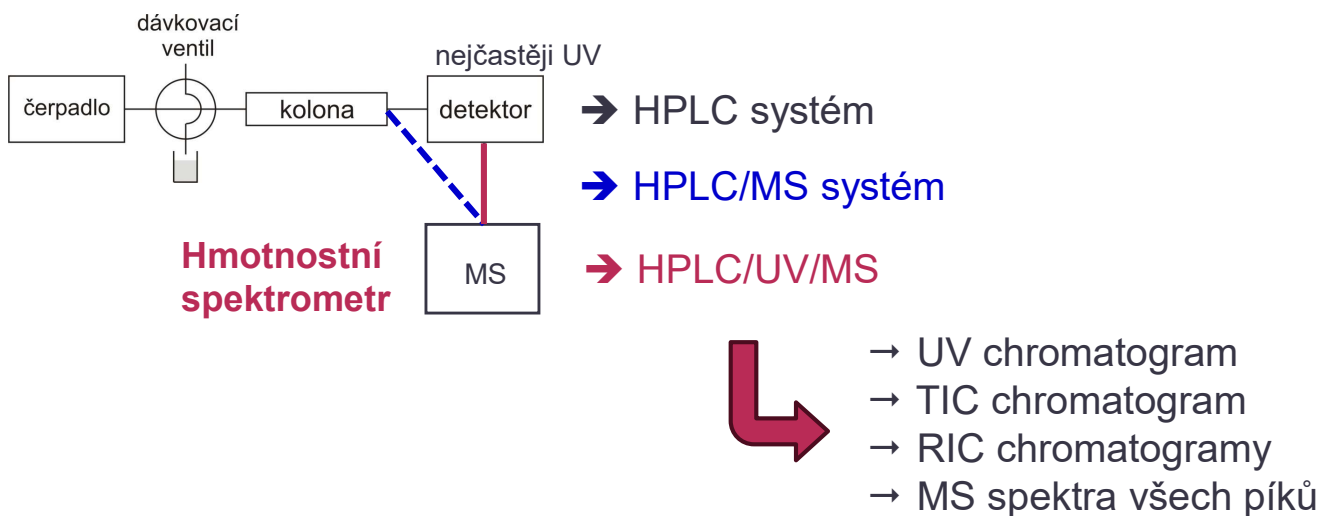
2002 – Nobelova cena za chemii  
„rozvoj metod identifikace a strukturní analýzy  
biologických makromolekul“



**Koichi Tanaka**  
Shimadzu Corp.,  
Japan

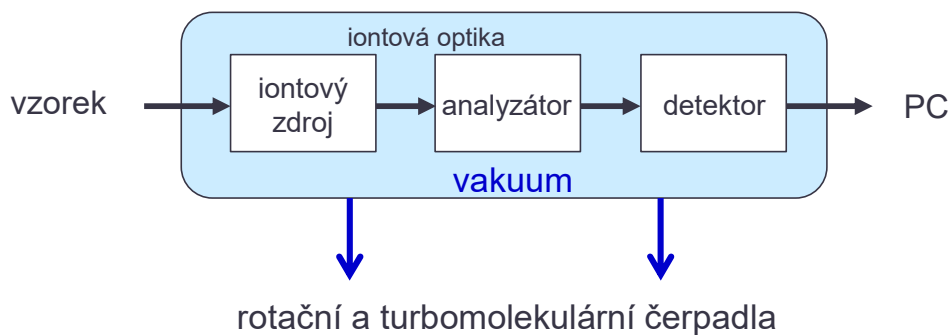


# Schéma HPLC/MS systému



## Hmotnostní spektrometr

- separace iontů v plynné fázi
  - iontový zdroj – ionizace (převedení látek na ionty)
  - analyzátor – separace iontů v plynné fázi podle  $m/z$
  - detektor – detekce separovaných iontů a určení intenzity

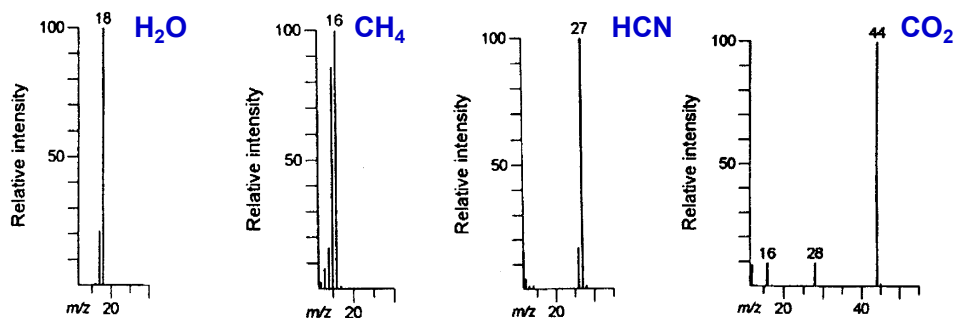


5

## Hmotnostní spektrum

- závislost intenzity iontů na poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ )
- pokud je náboj roven jedné => hodnota na ose x odpovídá přímo M
- normalizace spekter => vztaženo k nejintenzivnějšímu iontu (100 %)

Příklady  
EI spekter



6

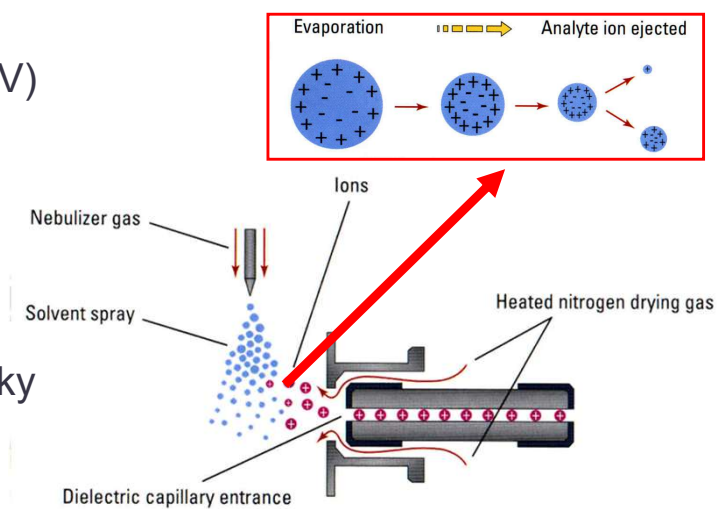
## Historický vývoj spojení

- Spojení s přímým vstupem eluátu (první spojení HPLC/MS, 1973, McLafferty)
- Spojení s nekonečným pásem (Moving Belt, MB)
- Spojení "Particle Beam" (PB)
- Ionizace termosprejem (TSI)
- Ionizace za atmosférického tlaku (API) – ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI)

7

## Ionizace elektrosprejem (ESI)

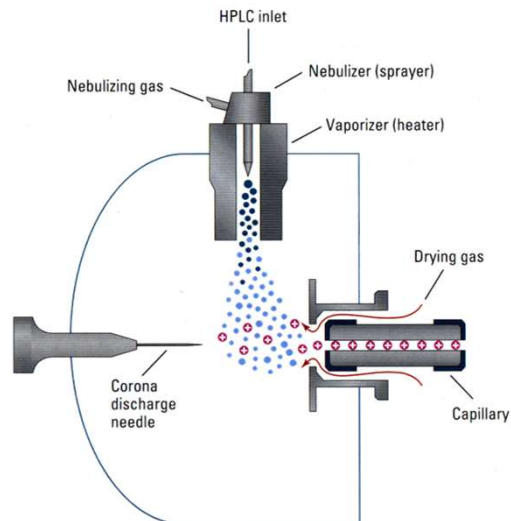
- eluent přiveden kovovou kapilárou (vysoké napětí, 3 - 5 kV)
- po rozprášení vznikají kapičky nesoucí na povrchu velké množství nábojů
- odpařování rozpouštědla => zvýšení hustoty povrchového náboje => tzv. Coulombická exploze (rozpad na menší kapičky s rozdělením původních nábojů)
- opakování tohoto procesu - uvolnění  $[M+H]^+$  iontů



8

## Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)

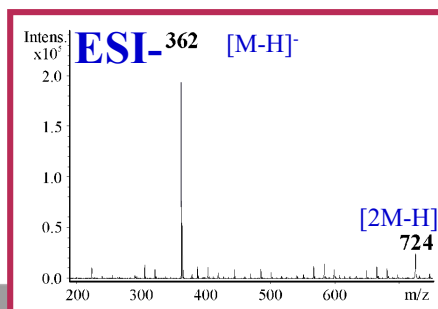
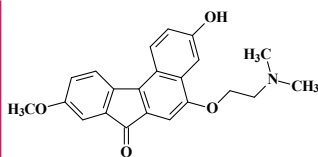
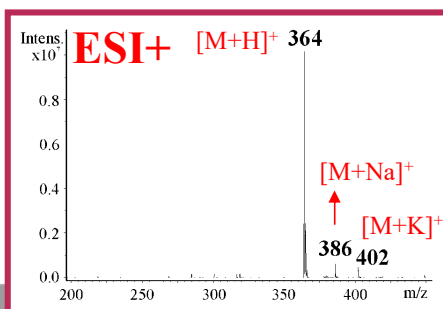
- Ionizace aerosolu výbojovou elektrodou (3-4 kV) → nejdříve je ionizována mobilní fáze a následně ion-molekulárními reakcemi jsou ionizovány molekuly analytu → vzniklé ionty jsou urychleny elektrodami do analyzátoru
- protiproud sušícího plynu (dusík) slouží k rozbití případných nekovalentních klastrů a asociátů



9

## API hmotnostní spektra

- Vznikají ionty se sudým počtem elektronů (kromě některých výjimek)
  - při záznamu kladných iontů:  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$
  - při záznamu záporných iontů:  $[M-H]^-$
- spektra není možné porovnávat s knihovnou (mohou se výrazně lišit podle použité ionizační techniky, pracovních podmínek i typu přístroje → manuální interpretace)

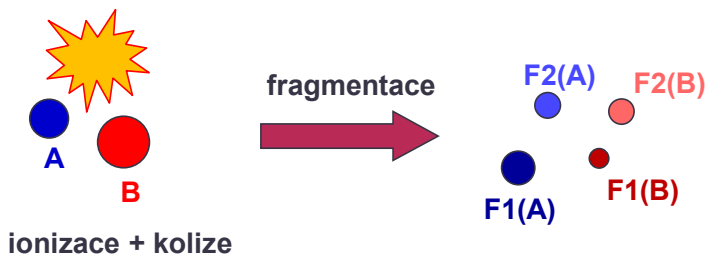


10

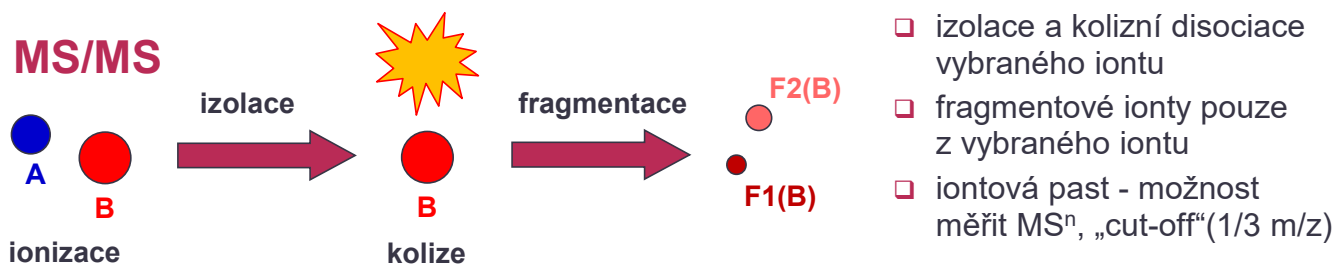
## Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS)

### „In-source“

- kolizně indukovaná disociace (CID) ve zdroji („in-source“)
- všechny ionty - bez možnosti izolace iontu prekurzoru



### MS/MS



- izolace a kolizní disociace vybraného iontu
- fragmentové ionty pouze z vybraného iontu
- iontová past - možnost měřit MS<sup>n</sup>, „cut-off“ (1/3 m/z)

11

## Volba rozpouštědel pro HPLC/MS

- nejvyšší čistota rozpouštědel i aditiv, redestilovaná voda vždy čerstvá
- Průtoky až do 1 ml/min (ESI), do 2 ml/min (APCI). Nanoelektrosprej – nl/min.
- **systemy s obrácenými fázemi**
  - vysoký obsah vody - ↑ průtoku a teploty sušícího a zmlžovacího plynu
  - 100% acetonitril – zanášení výbojové elektrody (tvorba grafitického uhlíku)
  - bezvodé mobilní fáze - při ESI může být problematická ionizace
- **systemy s normálními fázemi**
  - většinou špatně kompatibilní s ESI, lépe s APCI
  - v mobilní fázi musí být určitý obsah (>5%) polárního rozpouštědla (ve 100% hexanu není signál)
  - snaha vyhnout se halogenovaným rozpouštědlům (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>Cl, CCl<sub>4</sub>) kvůli zvýšené kontaminaci a zhoršení stability signálu

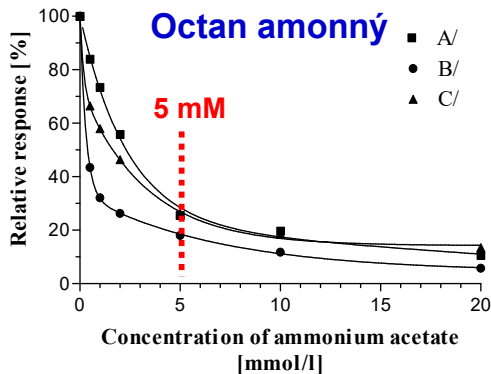
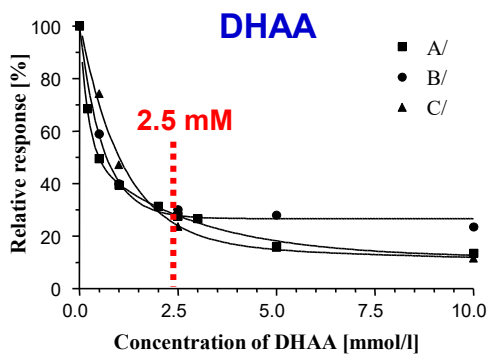
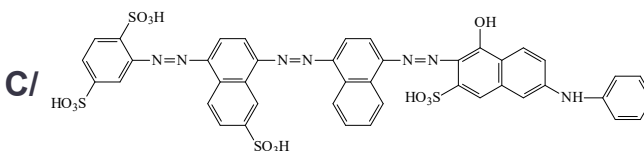
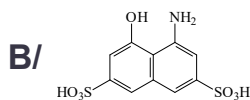
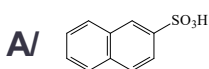
12

## Aditiva do mobilních fází

- Těkavá činidla v co nejnižších koncentracích
- Kyseliny, zásady a pufrы
  - kyselina mravenčí nebo octová, amoniak (0.05 – 1%), octan nebo mravenčan amonný (5 – 10 mmol/l), v některých případech TFA
- Ionpárová činidla
  - di- a trialkylamonium acetáty, perfluorované karboxylové kyseliny (cca 1 – 5 mmol/l)

13

### Testovací látky:



**Pokles na 20-30% odezvy při nejnižší chromatograficky použitelné koncentraci!**

14

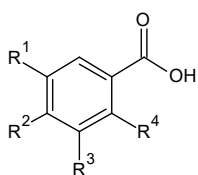
## Biologicky aktivní látky v přírodních matricích

- Pozitivní účinky na zdraví člověka
  - Vitamíny, aminokyseliny, antioxidanty a další organické látky s prospěšnými vlastnostmi
- Negativní účinky na zdraví člověka
  - Polyacetyleny, alkaloidy, hydroxymethylfurfural, pesticidy a další polutanty
  - Koncentrace
- Přirozeně se vyskytující látky v přírodních matricích
- Cirkulace v životním prostředí

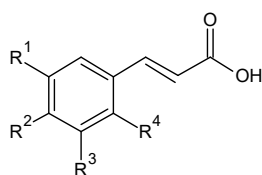
15

## Fenolické látky

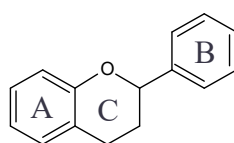
- Sekundární metabolity rostlin
- Antioxidační vlastnosti – reagují s volnými radikály, pozitivní vlastnosti pro člověka, prodlužují trvanlivost potravin
- Fenolické kyseliny (deriváty kyseliny benzoové a skořicové), flavonoidy (flavonoly, flavony, flavanony, isoflavony, flavanoly a anthokyanidiny), stilbeny a lignany.



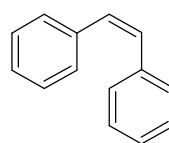
kys. benzoová



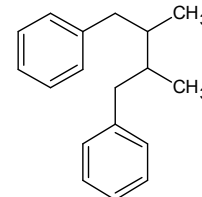
kys. skořicová



flavan



stilbeny



lignany

16



# Analýza fenolických látek

## Spektrofotometrické metody

- Měření antioxidační aktivity (DPPH, ABTS, FRAP, ORAC atd.)
- Stanovení celkového množství fenolických látek (Folin-Ciocalteu metoda)
- Stanovení celkového množství flavonoidů
- Stanovení celkového množství anthokyaninů

## HPLC, HPLC/MS a HPLC/MS/MS

- Separace, identifikace a kvantifikace

17

# Analýza fenolických látek v přírodních matricích



18

## Příprava vzorku k analýze

- Izolace (zakoncentrování) cílových analytů, odstranění matrice
- Kapalné vzorky:
  - Extrakce nemísitelnou kapalinou (ethyl acetát, diethyléter).
- Pevné vzorky:
  - Extrakce rozpouštědlem - vodný výluh (čaj, káva, bylinky), organická rozpouštědla (metanol, etanol, aceton a jejich vodné roztoky).
  - Homogenizátor, ultrazvuk, třepání, za zvýšeného tlaku atd.
  - Hydrolýza (kyselá, zásaditá nebo enzymatická).
- QuEChERS (pesticidy, léčiva, mykotoxiny atd.)
- Optimalizace pomocí „Plánování experimentu“.

19

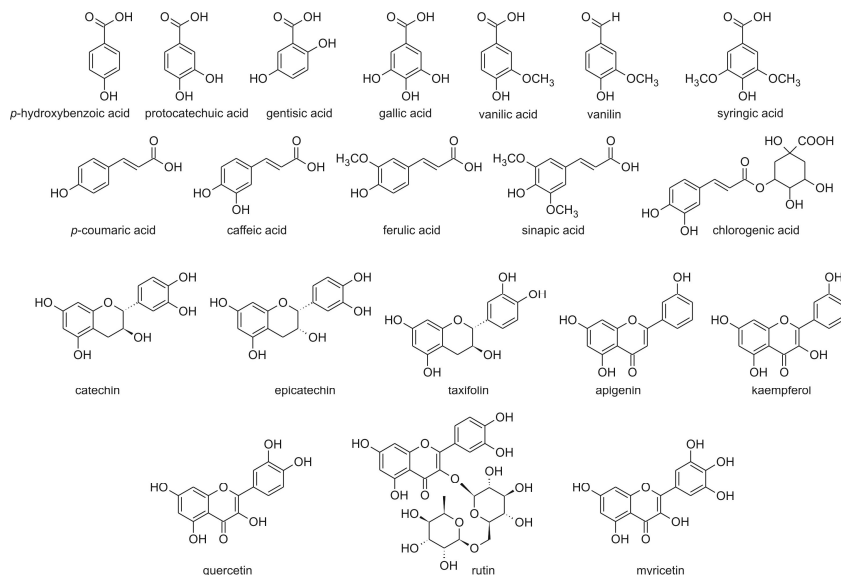
## Stanovení volných a vázaných fenolických látek ve sladovnickém ječmeni

- Monitorování změny obsahu fenolických látek
  - v závislosti na odrůdě a lokalitě
  - v průběhu sladování
  - v průběhu vaření piva
- Optimalizace extrakce:
  - volných fenolických látek
  - vázaných fenolických látek po alkalické a kyselené hydrolýze
- Optimalizace rychlé chromatografické separace a hmotnostně spektrometrické detekce (MRM mód)



20

Sledováno 20 vybraných fenolických látek



21

Optimalizace RP-HPLC/UV/MS analýzy

SF: Ascentis Express C18 (150 x 3 mm; 2,7 μm)  
 MF: HCOOH ve vodě (pH 2.3)/acetonitril  
 Gradientová eluce, průtok 0.5 mL/min, teplota 30 °C.

UV: 280 and 330 nm

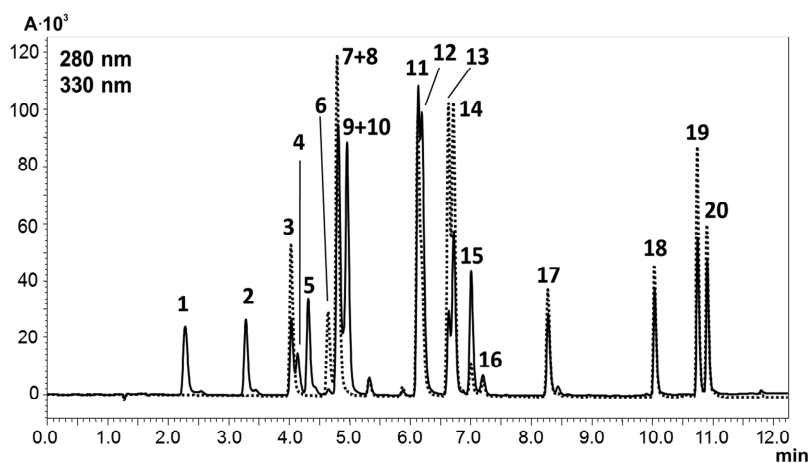
MS: snímání záporných iontů  
 MRM režim skenování

**Kyseliny:**

- 1. gallová, 2. protokatechová, 3. chlorgenová
- 5. p-hydroxybenzoová, 6. gentisová, 7. vanilová,
- 8. kávová, 10. syringová, 11. p-kumarová,
- 3. sinapová, 14. ferulová.

**Flavonoidy:**

- 4. katechin, 9. epicatechin, 12. vanilin,
- 15. taxifolin, 16. rutin, 17. myricetin,
- 18. quercetin, 19. apigenin, 20. kaempferol.

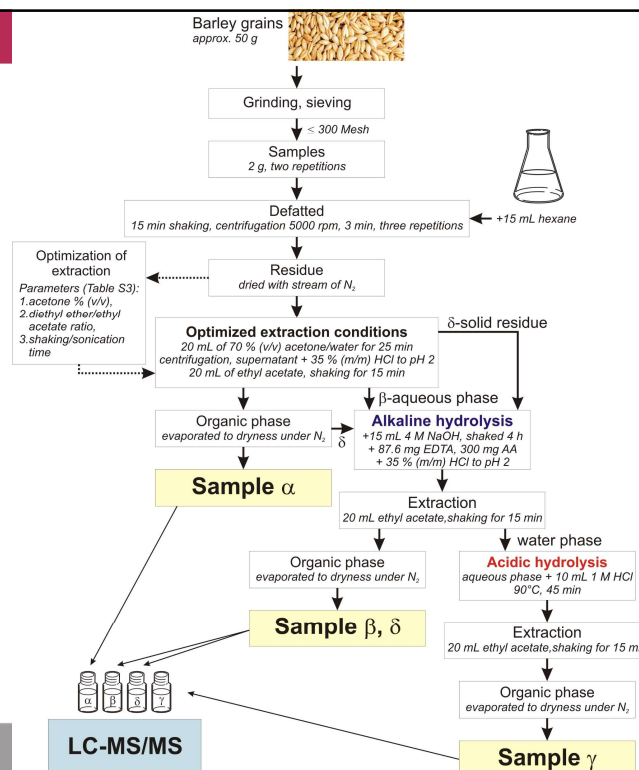
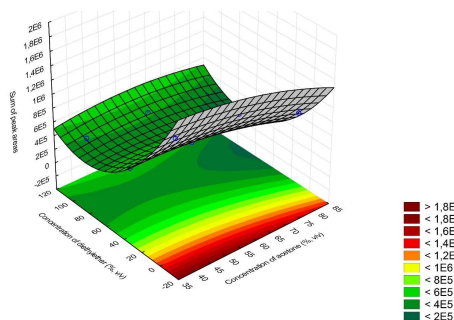


22

## Optimalizace extrakce

### Plánování experimentu

1. Koncentrace acetonu: 40-80 %
2. Poměr diethylether/ethyl acetát: 0-1
3. Doba extrakce: 5-45 min



23

No.	látko	Bojos-Jaroměřice [μg/g]			
		volné-rozp.	rozp.-vázané	rozp.-vázané	Nerozp.-vázané
1	Gallová kyselina	0.015±0.004	0.256±0.013	0.016±0.003	0.042±0.033
2	Protokatechová kys.	0.204±0.012	0.280±0.06	0.048±0.008	0.314±0.048
4	Katechin	<LOD	0.046±0.021	<LOD	<LOD
5	p-hydroxybenzoová k.	13.7±0.6	20.1±2.5	16.6±0.8	38.9±3.1
6	Gentisová kys.	0.005±0.001	0.161±0.016	0.19±0.014	0.024±0.006
7	Vanilová kys.	2.41±0.03	6.32±1.03	5.64±0.39	2.99±0.03
8	Kávoová kys.	0.037±0.001	0.689±0.025	0.281±0.022	6.87±0.23
9	Epikatechin	10.26±0.19	<LOD	<LOD	<LOD
10	Syringová kys.	1.33±0.13	1.18±0.12	0.722±0.128	1.67±0.15
11	p-kumarová kys.	0.588±0.038	1.94±0.08	0.433±0.026	71.1±1.48
12	Vanillin	0.725±0.013	<LOD	0.175±0.013	0.049±0.023
13	Sinapová kys.	0.161±0.060	19.0±3.7	2.09±0.24	1.60±0.16
14	Ferulová kys.	1.17±0.02	8.82±0.73	2.50±0.27	248±10
15	Taxifolin	0.080±0.003	0.715±0.054	<LOD	0.056±0.004
17	Myricetin	<LOD	0.01±0.002	<LOD	<LOD
18	Quercetin	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOD
19	Apigenin	<LOD	<LOD	0.113±0.011	<LOD
20	Kaempferol	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD
Celkové množství (vzorek)		30.7	59.5	28.8	372
Celkové množství (kultivar)		491			
% (m/m)		6.3	12.1	5.9	75.7

Odrůdy:

Bojos  
Sebastian  
Xanadu  
Malz

Lokality:

Jaroměřice  
Uherský Ostroh

24

## Fenolický profil medovin

- Alkoholický nápoj
  - kvašení vodného roztoku medu
  - vařené medoviny vs. nevařené medoviny
- Falšování medoviny
  - nízká kvalita za vysokou cenu
  - nekvalitní med, malé množství medu, jen melasa či glukoso-fruktosový sirup
  - ukazatele kvality medovin - legislativní ošetření
- Profil a obsah fenolických látek



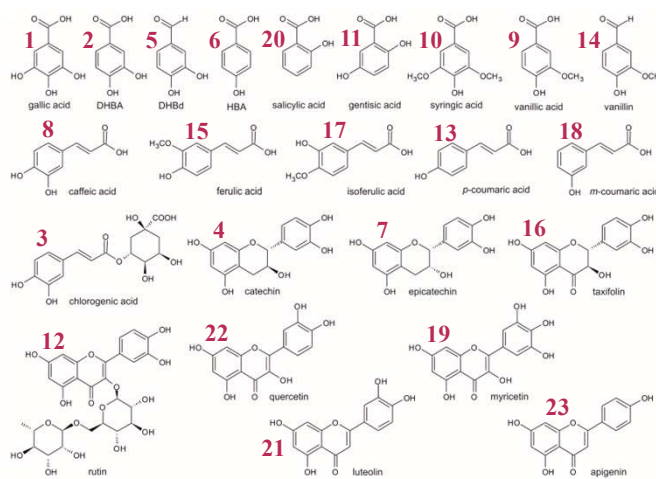
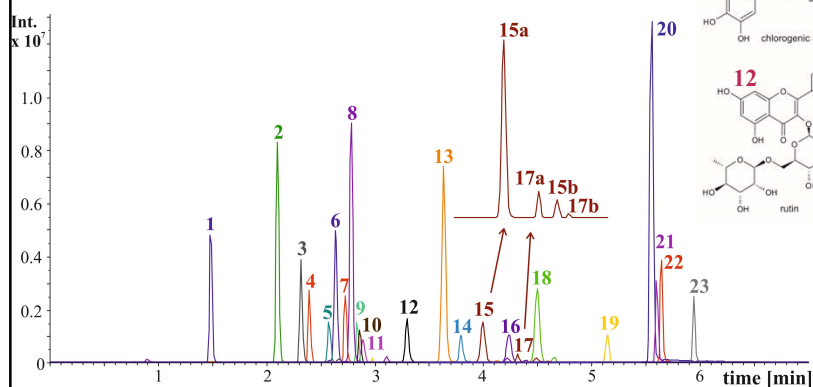
25

### RP-HPLC/MS/MS:

SF: Ascentis Express C18 (150 x 3 mm, 2.7 μm)

MF: 0,3% HCOOH ve vodě/acetonitril

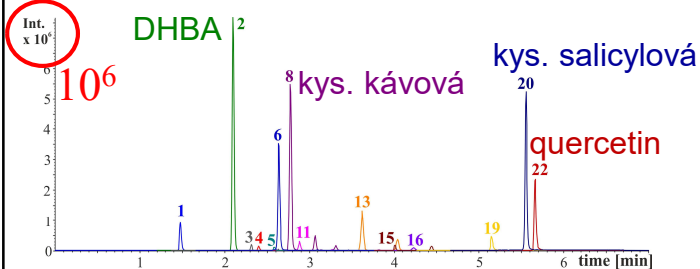
gradientová eluce, MRM režim skenování



26

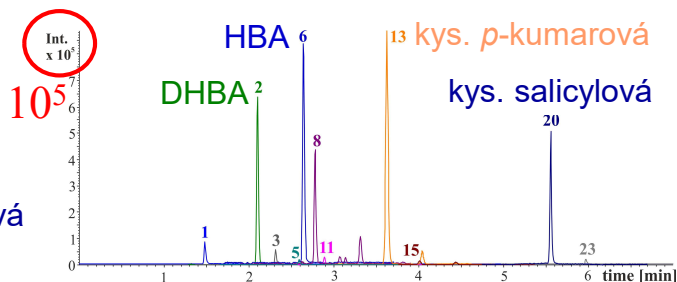
# Nevařené medoviny

Medové víno - včelař

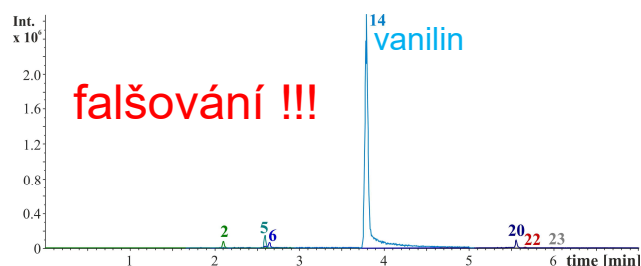


Celkem 22 vzorků medovin

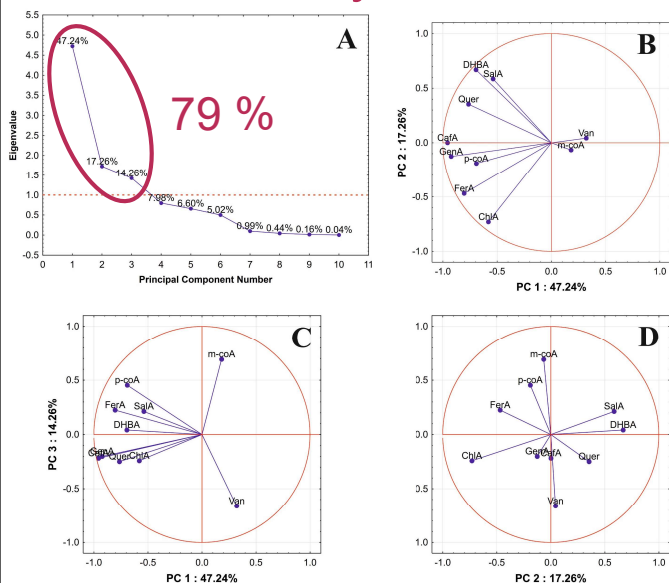
Keltská medovina - kupovaná



Křivoklátská medovina - kupovaná

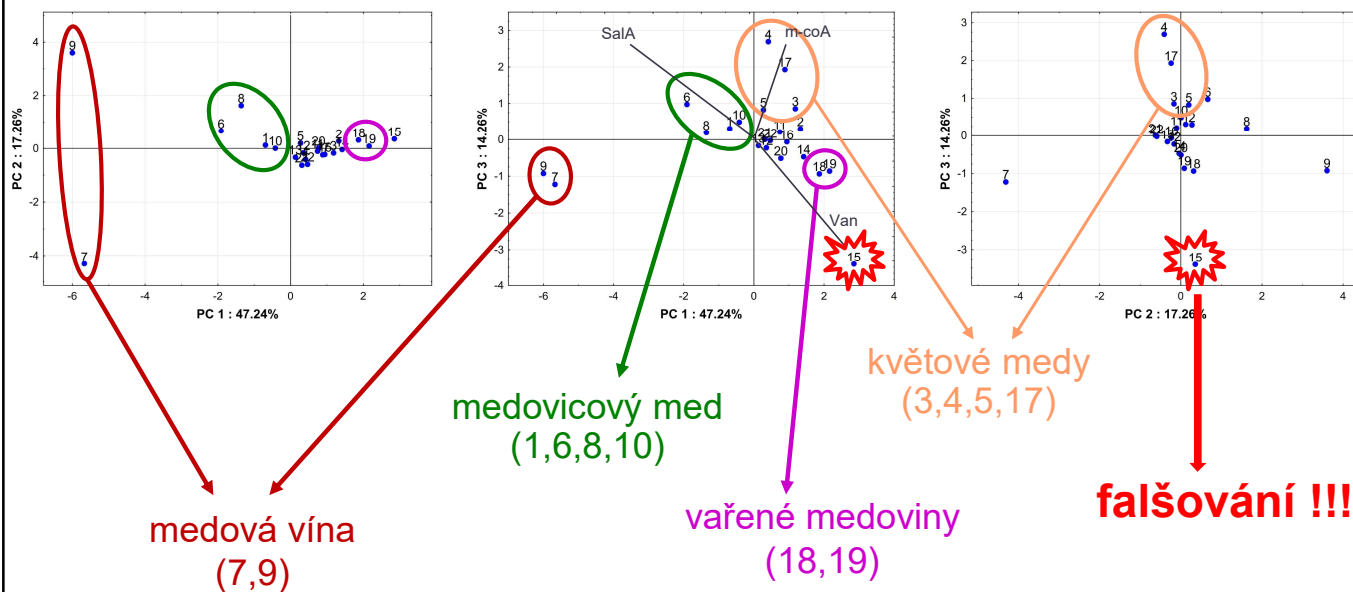


# Analýza hlavních komponent (PCA)



- redukce počtu proměnných
- sutinový graf (A)
  - tři hlavní komponenty
- grafy komponentních vah (B-D)
  - PC1 – celkové množství fenolických látek
  - PC2 – typ medu, přídavek ovocných šťáv
  - PC3 – původ medu a ochucení

Grafy komponentního skóre – podobnost mezi vzorky



29

Stanovení obsahu biologicky aktivních látek v lichořeřišnici (*Tropaeolum majus* L.)

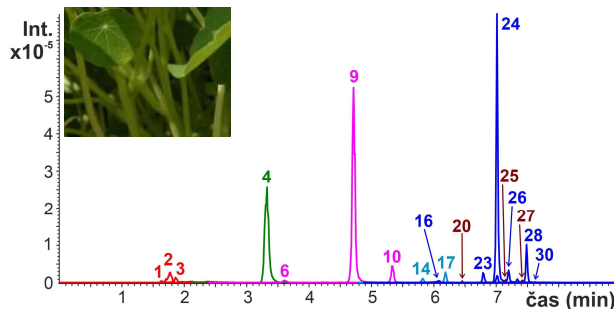
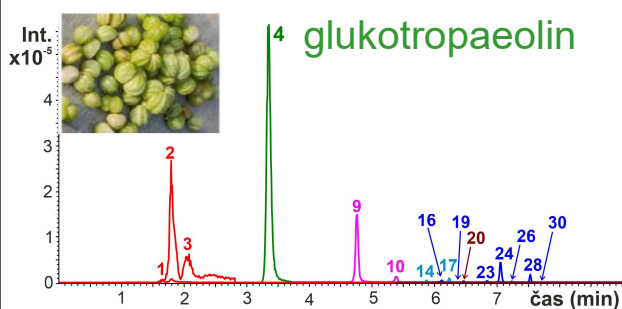
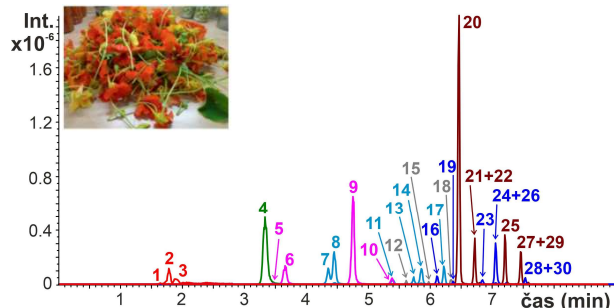
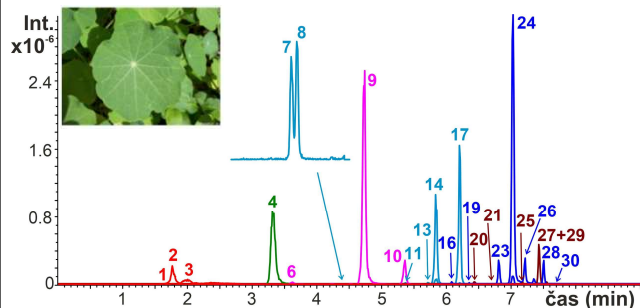


- Identifikace fenolických látek a optimalizace společné separace s glukotropaeolinem (přírodní antibiotikum).
- RP-HPLC/MS/MS stanovení v různých částech byliny (květ, list, semeno, stonek).
- Studium degradace sledovaných látek při skladování (sušení/mražení).



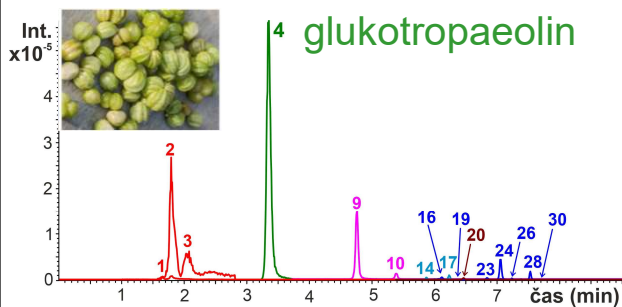
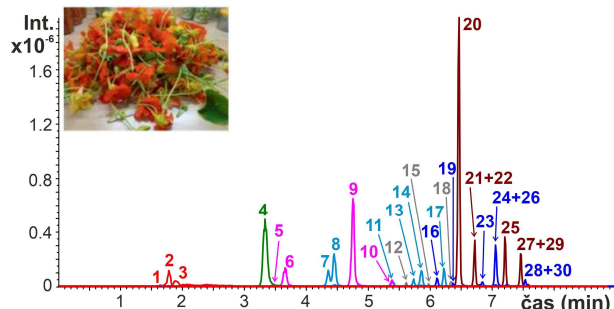
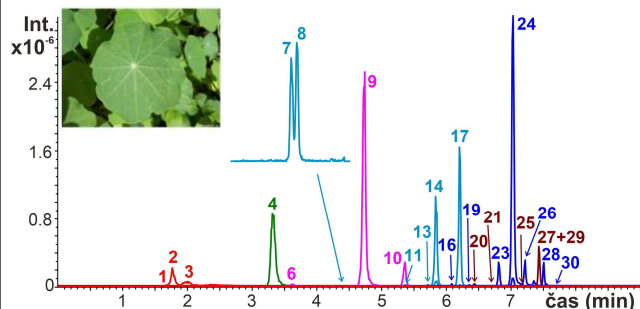
30

## FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ



31

## FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

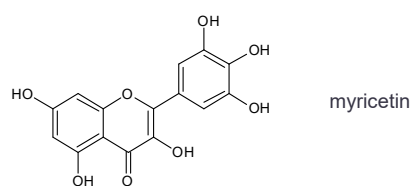
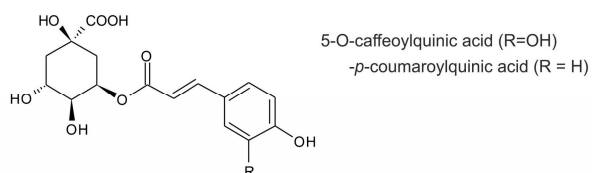
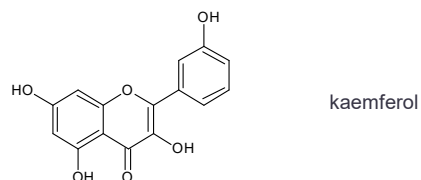
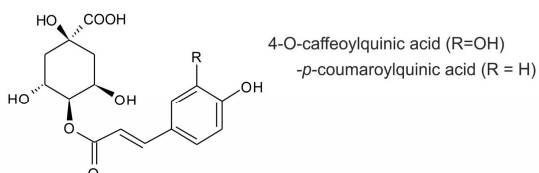
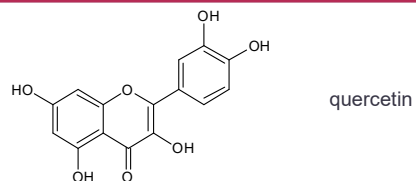
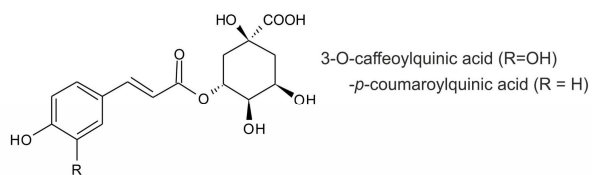


kys. chinová a její deriváty  
 isomery kafeoylchinové kyseliny  
 isomery kumaroylchinové kyseliny  
 deriváty kvercetinu  
 deriváty kaempferolu  
 deriváty myricetinu

32



## FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ



33

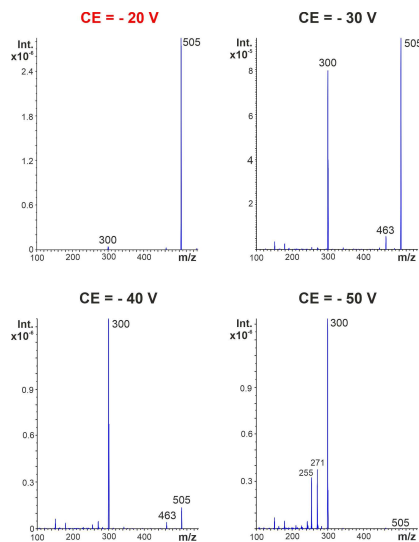
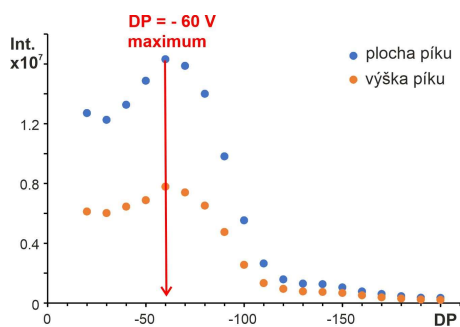
No.	Time (min)	Compound	No.	Time (min)	Compound
1	1.63	quinic acid	16	6.10	quercetin dihexoside (sophoroside)
2	1.11	quinic acid derivative	17	6.21	5-p-coumaroylquinic acid (cis)
3	2.04	quinic acid derivative	18	6.33	myricetin hexoside
4	3.34	glucotropaeolin	19	6.37	quercetin acetyl hexoside derivative
5	3.45	3-caffeoylquinic acid (cis)	20	6.45	kaempferol dihexoside (sophoroside)
6	3.63	3-caffeoylquinic acid (trans)	21	6.70	kaempferol acetyl dihexoside derivative
7	4.36	3-p-coumaroylquinic acid (cis)	22	6.80	kaempferol acetyl dihexoside derivative
8	4.45	3-p-coumaroylquinic acid (trans)	23	6.83	Isoquercitrin
9	4.74	5-caffeoylquinic acid (trans)	24	7.04	quercetin acetyl hexoside derivative
10	5.38	5-caffeoylquinic acid (cis)	25	7.19	Astragalín
11	5.39	4-p-coumaroylquinic acid (cis)	26	7.23	quercetin acetyl hexoside derivative
12	5.60	myricetin dihexoside	27	7.45	kaempferol acetyl hexoside derivative
13	5.73	4-p-coumaroylquinic acid (trans)	28	7.52	methoxy quercetin acetyl hexoside derivative
14	5.85	5-p-coumaroylquinic acid (trans)	29	7.57	kaempferol acetyl hexoside derivative
15	5.98	myricetin acetyl dihexoside	30	7.70	methoxy quercetin acetyl hexoside

34

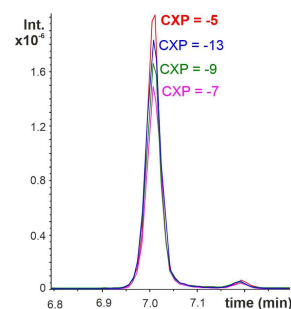
## Optimalizace parametrů pro kvantitativní MS/MS analýzu.

Kolizní energie - výběr nejintenzivnějšího fragmentu

Deklasterační potenciál  
(na vstupu)

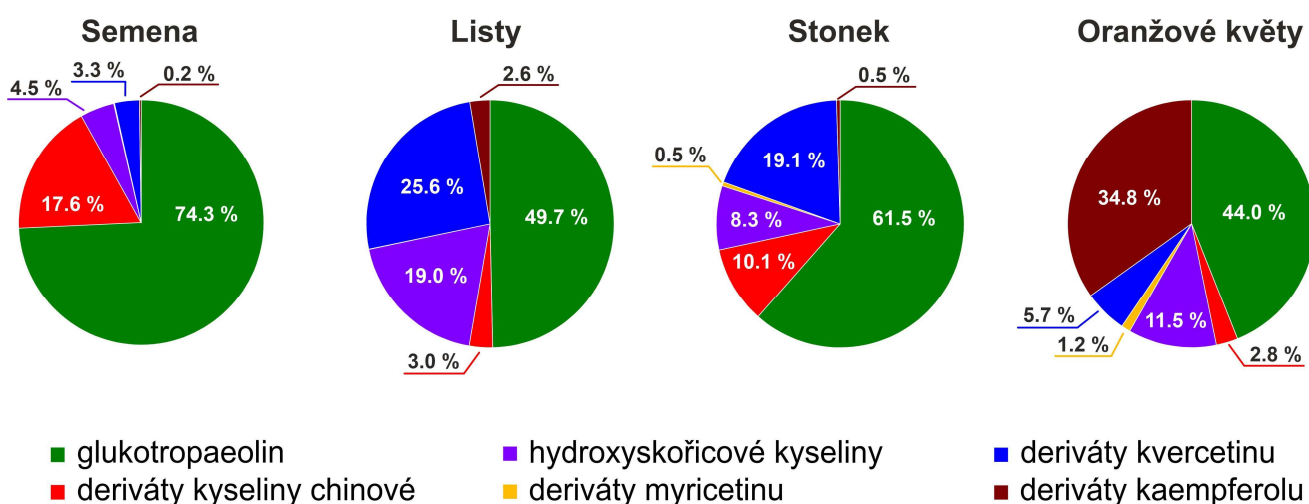


Volba výstupního potenciálu



35

## Zastoupení cílových látek v jednotlivých částech lichořeřišnice

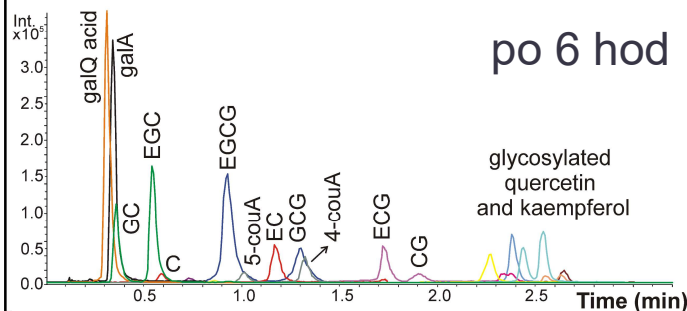
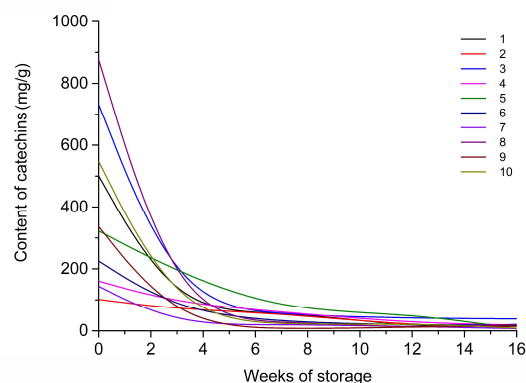
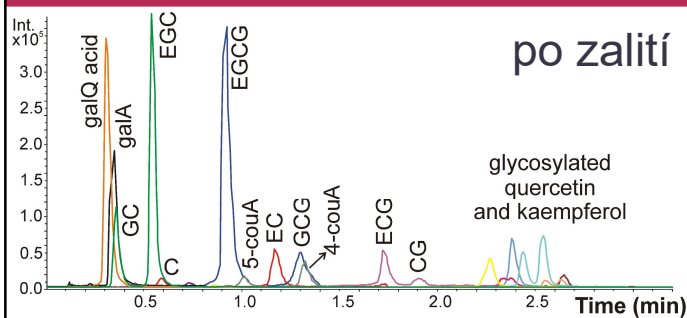


36

## Degradace fenolických látek v zeleném čaji

- Optimalizace rychlé chromatografické separace
- Degradace katechinů
  - Teplota zalévací vody (70, 80 a 90 °C)
  - Čas stání infuze (po jedné hodině 1-6 hodin)
  - Dlouhodobé skladování (po týdnu 16 týdnů)

37

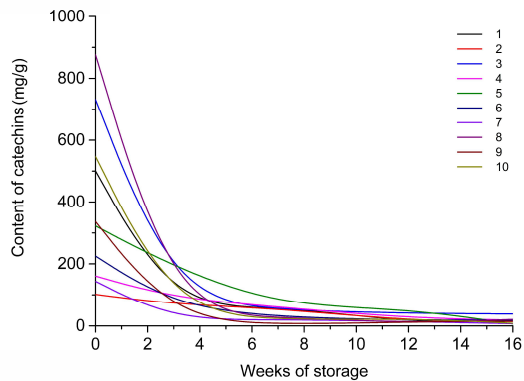


### RP-HPLC/MS/MS:

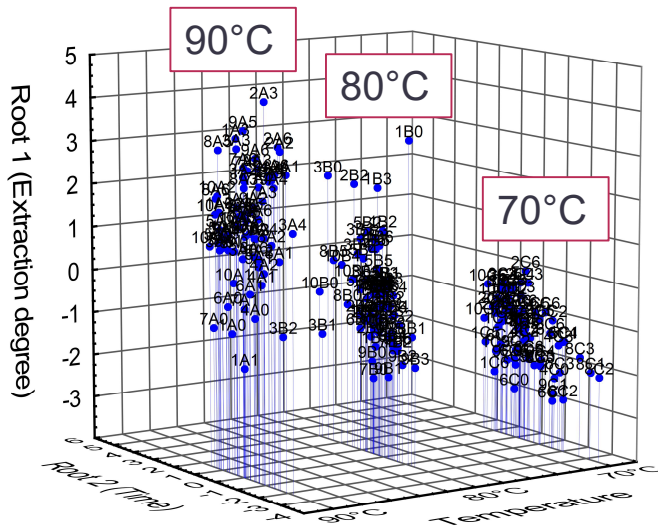
SF: Ascentis Express C18 (50 x 2,1 mm, 2 μm)  
 MF: voda/metanol (+0,1% HCOOH)  
 gradientová eluce

38

### Vliv doby skladování

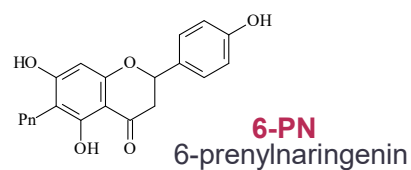
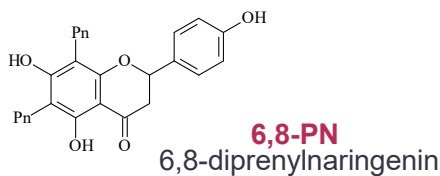
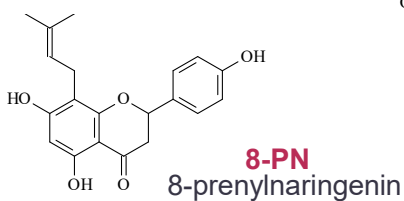
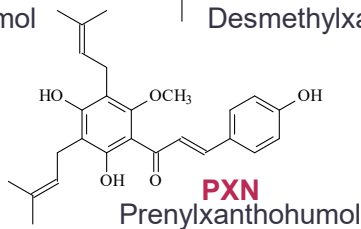
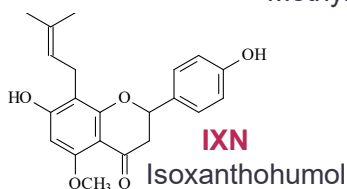
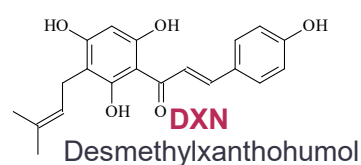
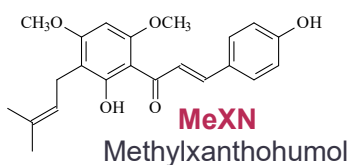
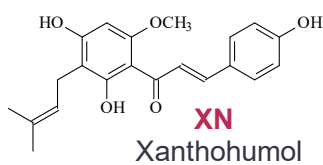


### Vliv teploty zalévání



39

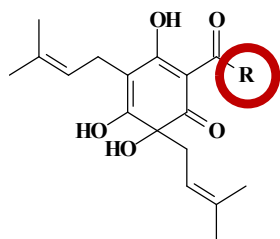
### Flavonoidy v chmelu a pivu



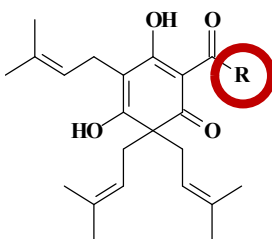
40

## Hořké kyseliny

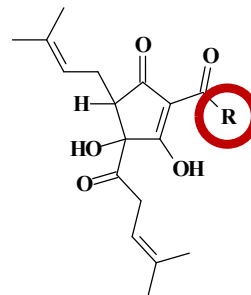
**Humulony**  
( $\alpha$ -hořké kyseliny)



**Lupulony**  
( $\beta$ -hořké kyseliny)

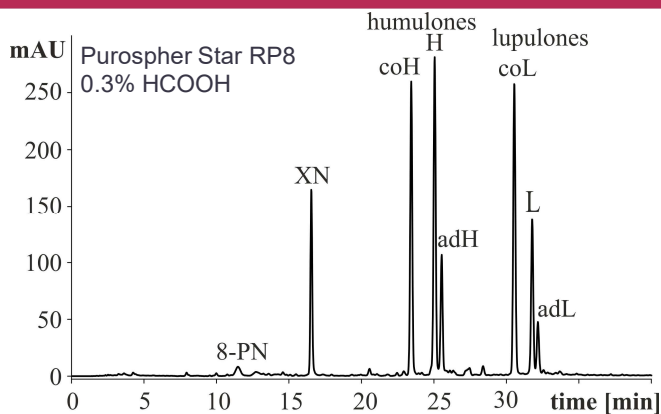
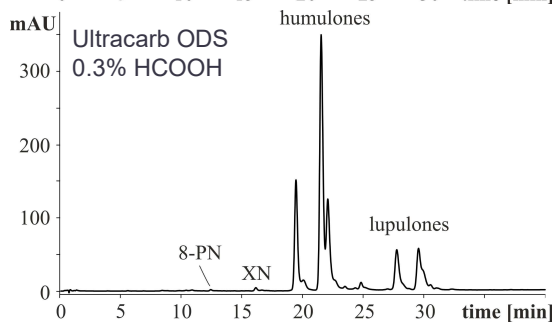
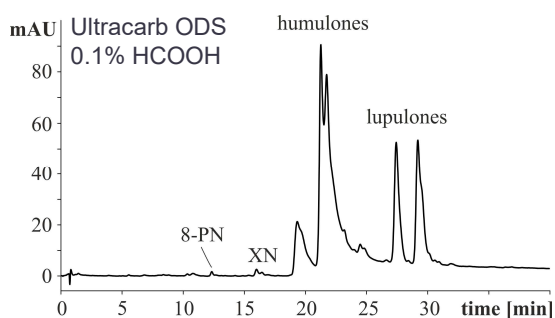


**Isohumulony**  
(iso- $\alpha$ -hořké kyseliny)



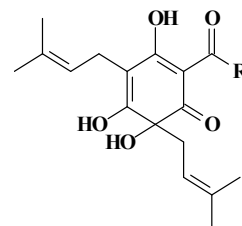
$R =$   $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$       co-  
 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$       n-  
 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$       ad- } humulon nebo lupulon

41



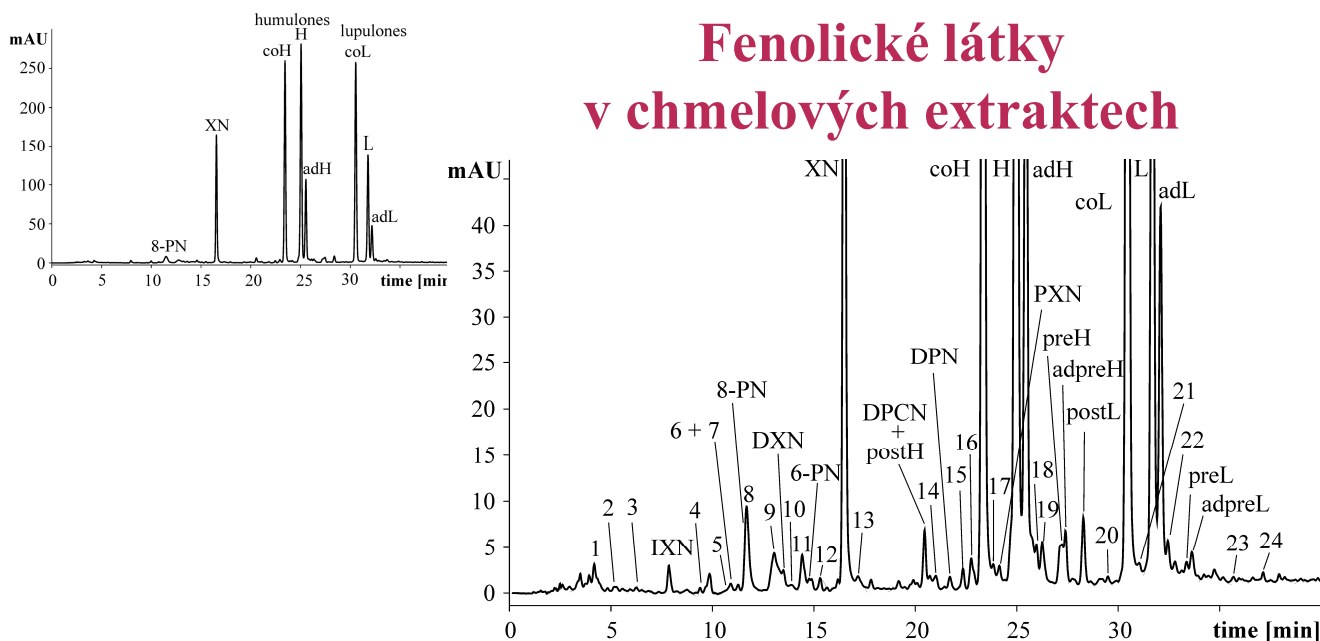
**Humulony**

$co-$   $R = -\text{CH}(\text{CH}_3)_2$   
 $n-$   $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$   
 $ad-$   $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$



42

## Fenolické látky v chmelových extraktech



kolona Purospher Star RP-8e, UV detekce při 330 nm, gradientová eluce 40-100% ACN/voda (+0,3% HCOOH) za 40 min

43

Děkuji za pozornost

44