

# OBSAH

<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>11</b>
<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>13</b>
<b>2 TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>14</b>
2.1 Flavonoidy .....	14
2.1.1 Antioxidační účinek .....	15
2.2 Prenylované flavonoidy .....	16
2.2.1 Významné prenylované flavonoidy .....	17
2.2.2 Zdroje prenylovaných flavonoidů .....	19
2.2.3 Hořké kyseliny .....	19
2.3 Hmotnostní spektrometrie .....	20
2.3.1 Iontový zdroj .....	21
2.3.1.1 Ionizace elektrosprejem .....	21
2.3.1.2 Chemická ionizace za atmosférického tlaku .....	22
2.3.1.3 Ionizace laserem za účasti matrice .....	23
2.3.2 Hmotnostní analyzátor .....	24
2.3.2.1 Kvadrupólový analyzátor .....	24
2.3.2.2 Iontová past .....	25
2.3.2.3 Průletový analyzátor .....	26
2.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie .....	27
2.4.1 Chromatografie v systémech s normálními fázemi .....	29
2.4.2 Chromatografie v systémech s obrácenými fázemi .....	30
2.4.3 Gradientová eluce .....	30
2.4.4 Detektory v kapalinové chromatografii .....	31
2.5 Spojení HPLC/MS .....	33

<b>3 ANALÝZA PRENYLOVANÝCH FLAVONOIDŮ TECHNIKOU HPLC A HPLC/MS .....</b>	<b>35</b>
3.1 HPLC analýza.....	35
3.2 HPLC/MS analýza.....	37
<b>4 ZÁVĚR.....</b>	<b>40</b>
<b>5 POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>41</b>

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<b>ACN</b>	Acetonitril
<b>APCI</b>	Chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
<b>API</b>	Ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Ionization)
<b>APPI</b>	Fotoionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Photo Ionization)
<b>CI</b>	Chemická ionizace (Chemical Ionization)
<b>CID</b>	Kolizně indukovaná disociace (Collision Induced Dissociation)
<b>CZE</b>	Kapilární elektroforéza (Capillary Zone Electrophoresis)
<b>DXN</b>	Desmethylxanthohumol
<b>ECD</b>	Elektrochemická detekce (ElectroChemical Detection)
<b>EI</b>	Elektronová ionizace (Electron Ionization)
<b>ELSD</b>	Detektor rozptylu světla (Evaporative Light-Scattering Detector)
<b>ESI</b>	Ionizace elektrosprejem (ElectroSpray Ionization)
<b>FT ICR</b>	Analyzátor s iontovou cyklotronovou rezonancí s Fourierovou transformací (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance)
<b>HPLC</b>	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
<b>HPLC/ECD</b>	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí
<b>HPLC/MS</b>	Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií
<b>HPLC/NMR</b>	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie spojená s nukleární magnetickou rezonancí
<b>HPLC/RI</b>	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detekcí indexu lomu
<b>IT</b>	Iontová past (Ion Trap)
<b>IXN</b>	Isoxanthohumol
<b>LLE</b>	Extrakce kapalina-kapalina (Liquid-Liquid Extraction)
<b>MALDI</b>	Ionizace laserem za účasti matrice (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)
<b>MEKC</b>	Micelární elektrokinetická chromatografie (Micellar ElectroKinetic Chromatography)

<b>MEEKC</b>	Mikroemulsní elektrokinetická chromatografie (MicroEmulsion ElectroKinetic Chromatography)
<b>MS</b>	Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
<b>MS/MS</b>	Tandemová hmotnostní spektrometrie
<b>MS<sup>n</sup></b>	Tandemová hmotnostní spektrometrie do n-tého stupně
<b>NMR</b>	Nukleární magnetická rezonance
<b>NP</b>	Normální fáze (Normal Phase)
<b>NP-HPLC</b>	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému s normálními fázemi
<b>PDA</b>	Fotodiodový detektor (PhotoDiode Array detector)
<b>Q</b>	Kvadrupólový analyzátor (Quadrupole)
<b>QqQ</b>	Trojité kvadrupól
<b>QqTOF</b>	Hybridní analyzátor složený z kvadrupólu a analyzátoru doby letu
<b>RI</b>	Index lomu (Refractive index)
<b>RP</b>	Obrácená fáze (Reverse Phase)
<b>RP-HPLC</b>	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému s obrácenými fázemi
<b>RRLC</b>	Kapalinová chromatografie s vysokým rozlišením (Rapid Resolution Liquid Chromatography)
<b>SPE</b>	Extrakce tuhou fází (Solid Phase Extraction)
<b>SRM</b>	Selected Reaction Monitoring
<b>TOF</b>	Aalyzátor doby letu (Time-Of-Flight)
<b>TSI</b>	Ionizace termosprejem (Thermospray ionization)
<b>UPLC</b>	Ultra účinná kapalinová chromatografie (Ultra Performance Liquid Chromatography)
<b>UV</b>	Ultrafialové záření
<b>XN</b>	Xanthohumol
<b>6-PN</b>	6-prenylnaringenin
<b>8-PN</b>	8-prenylnaringenin

# 1 ÚVOD

Prenylované flavonoidy jsou polyfenolické látky, které jsou obsaženy zejména v chmelu a vařením přecházejí do piva. V posledních letech se staly díky svým bioaktivním účinkům předmětem lékařského výzkumu. Byly u nich prokázány antioxidační, protirakovinné, protizánětlivé, estrogenní a antimikrobiální účinky. Hlavním zdrojem prenylovaných flavonoidů je chmel, který patří mezi základní suroviny při výrobě piva. Polyfenolové složky piva mají tedy pozitivní vliv na lidské zdraví, na druhou stranu nelze opomenout v pivu obsažený alkohol, který může být při přílišné konzumaci původcem řady zdravotních potíží.

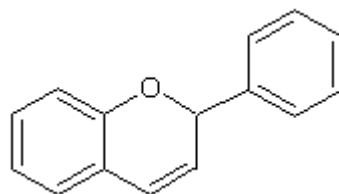
Pro separaci a identifikaci polyfenolických látek se nejčastěji používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie s různými způsoby detekce. Jedním z nejúčinnějších řešení je spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií, kdy v jednom kroku dochází k separaci směsi látek a současně k určení molární hmotnosti jednotlivých složek. Pro identifikaci látek se stejnou molární hmotností a stejným fragmentačním chováním (např. polohové isomery) však samotná hmotnostní spektrometrie nestačí. Pro jednoznačné určení struktury organických sloučenin je možné využít spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s nukleární magnetickou rezonancí, které je však technicky mnohem obtížnější než HPLC/MS.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Flavonoidy

Flavonoidy neboli flavonoidní látky jsou velice rozsáhlou skupinou rostlinných fenolů, jejichž výzkum v posledních letech značně stoupl. Je popsáno více než 4000 sloučenin a jejich výzkum stále trvá<sup>1,2,3</sup>.

Flavonoidy jsou odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny flavanu (Obr. 1<sup>4</sup>), který je tvořen dvěma benzenovými kruhy propojenými heterocyklickým pyranem. Všechny tři kruhy bývají běžně substituovány hydroxyskupinami nebo methoxyskupinami, jednotlivé deriváty se liší pouze stupněm oxidace a substituce<sup>1</sup>. Rozeznáváme následující základní struktury flavonoidů: katechiny, leukoanthokyanidiny, flavanony, flavononoly, flavony, flavonoly a anthokyanidiny<sup>1,2</sup>.

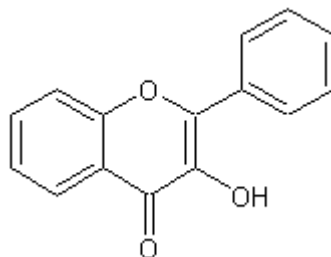


**Obr. 1** : Struktura flavanu

Flavonoidy jsou významnou součástí antioxidantního systému, zabraňují peroxidaci lipidů, likvidují volné kyslíkové radikály, mohou vázat a inaktivovat některé prooxidační kovové ionty (železo, měď)<sup>1</sup>, významně mohou přispět při prevenci chorob majících svůj původ v oxidačním poškození biologických struktur (ateroskleróza, kardiovaskulární onemocnění), mají antikarcinogenní účinky<sup>2</sup>. Jejich antioxidantní aktivita závisí na počtu a poloze hydroxylových skupin v molekule a také na jejich glykosylaci<sup>1</sup>. Ukazuje se, že při terapii a prevenci zmíněných onemocnění je konzumace potravin obsahujících flavonoidy vhodnější než podávání samotných antioxidantů, jako je vitamin C a E<sup>3</sup>. Jejich potenciální zdravotní účinky vyžadují vývoj metod pro jejich identifikaci a stanovení v potravinových produktech, rostlinných extraktech a krevním séru<sup>4</sup>.

Jsou přítomny ve všech rostlinách, jejich množství a zastoupení se však liší. Při zpracování rostlin se mohou dostat do potravin, kde ovlivňují charakteristické vlastnosti –

barvu, vůni a chuť. Můžeme je nalézt v pivu, vínu, džusech, šťávách, čajích atd<sup>2</sup>. V běžně konzumovaném ovoci, zelenině a dalších rostlinných produktech (cibule, papája, brokolice, vinné hrozny, listová zelenina, čokoláda, sója, obilniny a citrusové plody) se vyskytují zejména flavonoly (Obr. 2), u kterých byly zjištěny optimální vlastnosti. Přírodní flavonoidy mají nejčastěji podobu O-glykosidů, obsahují tedy ve své molekule necukernou část (aglykon) a cukernou složku<sup>1</sup>.



**Obr. 2 :** Struktura flavanolu

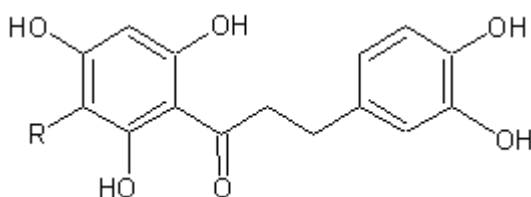
### 2.1.1 Antioxidační účinek

Polyfenolické látky patří mezi látky s antioxidačním účinkem, to znamená, že pomáhají likvidovat reaktivní formy kyslíku a tím přispět k prevenci chorob majících původ v oxidačním poškození biologických struktur<sup>2</sup>.

Reaktivní formy kyslíku jsou agresivní molekuly (volné radikály, reaktivní anionty obsahující atom kyslíku nebo molekuly s kyslíkem, které buď mohou vytvořit volné radikály nebo jsou volnými radikály aktivovány), které vznikají v těle z exogenních nebo endogenních příčin<sup>5</sup>. Mezi exogenní příčiny patří ionizační záření (např. UV-světlo), škodliviny zevního prostředí (výfukové plyny, kouření), ozon, radiové frekvence, mikrovlny, ultrazvuk, některé jedy, některá xenobiotika a léky (např. paracetamol) aj. Hlavním zdrojem endogenních příčin je aerobní metabolismus, dále reaktivní formy kyslíku vznikají během celé řady buněčných pochodů (metabolismu živin, biosyntéze některých látek, transportu elektronů v mitochondriích), fagocytóze a zánětlivých procesech, traumatech i tělesném cvičení.

Při velkém nahromadění vznikajících reaktivních forem kyslíku, které není schopen organismus likvidovat, vzniká oxidační stres. Poškozuje buňky, zejména buněčné membrány, proteiny, enzymy a genetický materiál, a přispívá ke vzniku infekčních i degenerativních onemocnění<sup>5</sup>.

Kromě fenolických látek mezi antioxidanty dále řadíme například mangan, zinek, glutathion, koenzym Q10, kyselina močová, beta-karoten, vitamín E, vitamín C a selen. Najdeme je v barevném ovoci (borůvky, brusinky, atd.), zelenině (rajčata, brokolice, atd.) a čaji<sup>5</sup>, který je významným zdrojem flavonoidů. Jejich obsah se však v různých druzích čajů liší. Nejvyšší zastoupení (hlavně katechinů) je v zeleném čaji, v černém a Rooibos čaji je jejich obsah nižší. Rooibos je naopak jediným zdrojem aspalathinu (Obr. 3), který patří do skupiny velmi silných antioxidantů<sup>6</sup>.



**Obr. 3 :** Struktura aspalathinu

## 2.2 Prenylované flavonoidy

Prenylované flavonoidy jsou látky přírodního původu nacházející se zejména v chmelu<sup>7</sup>. Mají připojený prenylový radikál (3,3-dimethylallyl)<sup>8</sup> jako acyklický nebo cyklický řetězec na základní C15 strukturu.

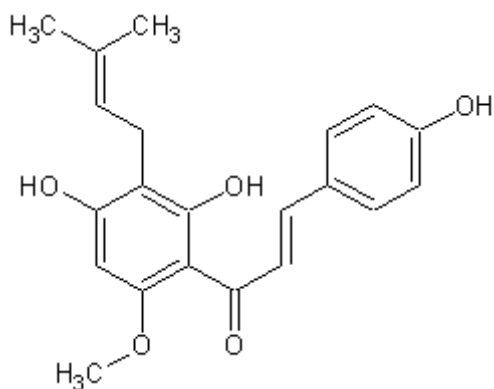
Biosynteticky příbuzné prenylovaným flavonoidům jsou acylfluoroglucinoly, humulony ( $\alpha$ -kyseliny), lupulony ( $\beta$ -kyseliny), které mají význam pro pivovarský průmysl, ale v biomedicíně nebyla tato skupina terpenfenolů dosud použita<sup>9</sup>.

Díky pozoruhodným bioaktivním účinkům se staly v posledních letech předmětem lékařského a farmaceutického výzkumu. Nejdůležitějším prenylflavonoidem je xanthohumol, který tvoří největší podíl prenylovaných flavonoidů v samičích hlávkách chmelu<sup>9</sup>. Z dalších zástupců se v chmelu nachází desmethylxanthohumol, isoxanthohumol a 8-prenylnaringenin. U těchto látek byly mimo jiné prokázány protirakovinné<sup>10,11,12,13</sup>, protizánětlivé<sup>12</sup>, estrogenní<sup>10,12,13</sup> a antimikrobiální<sup>14,12</sup> účinky. Taxonomicky patří prenylflavonoidy mezi polyfenoly chalkonové řady<sup>9</sup>.

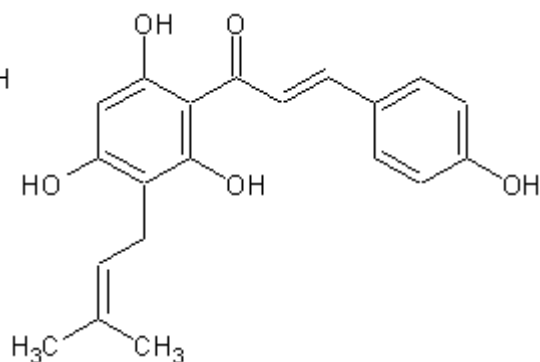


## 2.2.1 Významné prenylované flavonoidy

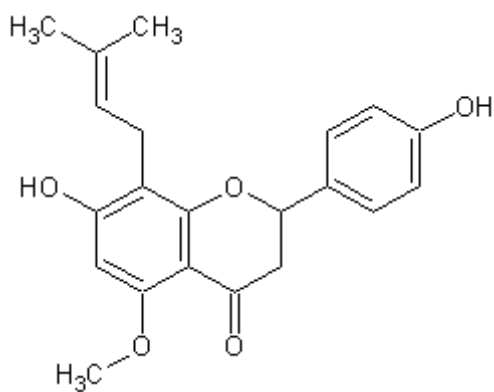
Nejvýznamnějšími zástupci jsou xanthohumol (XN, Obr. 4a<sup>15</sup>), isoxanthohumol (IXN, Obr. 4b<sup>15</sup>), desmethylxanthohumol (DXN, Obr. 4c<sup>16</sup>), 6-prenylnaringenin (6-PN, Obr. 4d<sup>15</sup>) a 8-prenylnaringenin (8-PN, Obr. 4e<sup>15</sup>)<sup>15</sup>.



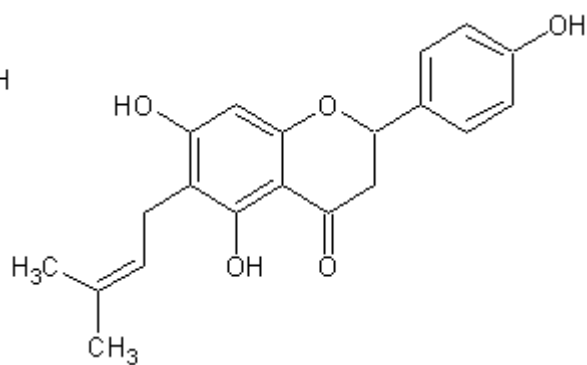
**Obr. 4a : XN**



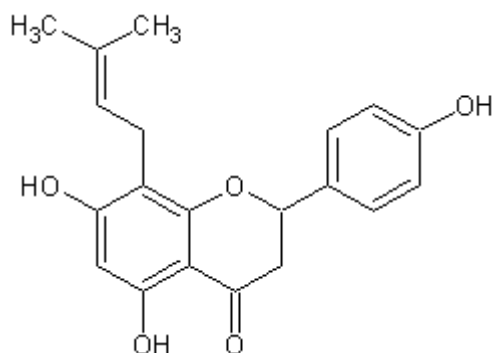
**Obr. 4b : DXN**



**Obr. 4c : IXN**



**Obr. 4d : 6-PN**



**Obr. 4e :** 8-PN

**Obr. 4 :** Struktury xanthohumolu, desmethylxanthohumolu, isoxanthohumolu, 6-prenylnaringenu a 8-prenylnaringenu

Hlávky samičích rostlin chmele (*Humulus lupulus* L.) čeleď Cannabinaceae jsou jednou ze základních surovin na výrobu piva. Obohacují pivo nejen o tolik oblíbenou hořkost, plnost chuti a vůni, ale i o řadu látek, jež zvyšují jeho hodnotu z pohledu pivovarské technologie, moderního lékařství a farmakologie. Mezi tyto látky patří polyfenoly chalkonové řady, prenylovaný flavonoid xanthohumol a jeho isomer flavanon isoxanthohumol<sup>7</sup>. Xanthohumol tvoří s obsahem 0,1 – 1% hm. sušiny hlavní podíl prenylflavonoidů v samičích hlávkách. Xanthohumol je vylučován jako část chmelové pryskyřice (lupulin) pomocí žlázatých chlupů na konci šištic, může se objevit i na spodní straně mladých listů. V pryskyřici je xanthohumol doprovázen nejméně 13 příbuznými chalkony, které jsou v 10 - 100krát menší koncentraci než xanthohumol. Většina chalkonů obsahuje volnou hydroxy skupinu a může tedy proběhnout jejich izomerace na příslušné flavanony<sup>9</sup>.

Xanthohumol byl poprvé izolován, částečně charakterizován a pojmenován v roce 1913. V roce 1957 byla Verzelem získána podobná sloučenina, která byla pojmenována humulol, později identifikována jako flavanon isoxanthohumol. V následujících letech přetrvávala nejistota ohledně polohy prenylového radikálu v xanthohumolu vzhledem k methoxy skupině. Později dvě nezávislé skupiny<sup>17,18</sup> potvrdily Verzeleho strukturu xanthohumolu jako správnou pomocí studia postupné syntézy a chemické degradace<sup>9</sup>.

Nezájem o umělou výrobu této sloučeniny je pravděpodobně spojený s dostupností xanthohumolu v přírodních zdrojích jako je např. chmel<sup>9</sup>.

U izomeru xanthohumolu, isoxanthohumolu, byl prokázán antikancerogenní potenciál. Při blokování škodlivě působících enzymů je dokonce účinnější než xanthohumol<sup>19</sup>.

V poslední době se zájem soustředí na 8-prenylnaringenin jako nový fytoestrogen syntetizovaný z naringenu a prenylového alkoholu<sup>9</sup>. Estrogenní aktivita byla zjištěna také u 6-prenylnaringenu, 8-geranylnaringenu a 6,8-diprenylnaringenu<sup>20</sup>.

### 2.2.2 Zdroje prenylovaných flavonoidů

Hlavním zdrojem prenylovaných flavonoidů je chmel a následně i pivo. Největší zastoupení má xanthohumol, který je přítomen v rozmezí koncentrací 0,2 – 1,1 hm. %, přičemž záleží na odrůdě chmele. Nejvyšší obsah xanthohumolu byl zjištěn v odrůdě Agnus, Sládek vykazoval nejvyšší hodnotu podílu xanthohumol/ $\alpha$ -kyseliny. Desmethylxanthohumol je přítomen v koncentraci 0,05 – 0,2 hm. % a isoxanthohumol méně než 0,02 hm. %. V pivu je isoxanthohumol zastoupen naopak nejvíce, protože vzniká během vaření isomerací xanthohumolu<sup>21</sup>.

Analýzou českých piv bylo zjištěno, že nejvíce prenylovaných flavonoidů je v 12% ležáku Pilsner Urquell. V ležácích je obecně obsah prenylflavonoidů vyšší, než v ostatních pivech<sup>21</sup>.

Z přehledu uvedeného v předchozí kapitole jsou zřejmé pozitivní účinky polyfenolových složek piva na lidské zdraví. Na druhou stranu nelze opomenout v pivu obsažený alkohol, který naopak může být při přílišné konzumaci původcem řady zdravotních poškození. Zdraví prospěšná konzumace, tzv. řízené neboli moderované pití by nemělo přesáhnout podle různých zdrojů 0,5 až 1 litr denně, posuzováno však vždy s ohledem na celkový zdravotní stav konzumenta. Při konzumaci piva je doporučováno jeho požívání během jídla, aby jeho vstřebávání bylo pomalejší a ochranný účinek delší<sup>19</sup>.

### 2.2.3 Hořké kyseliny

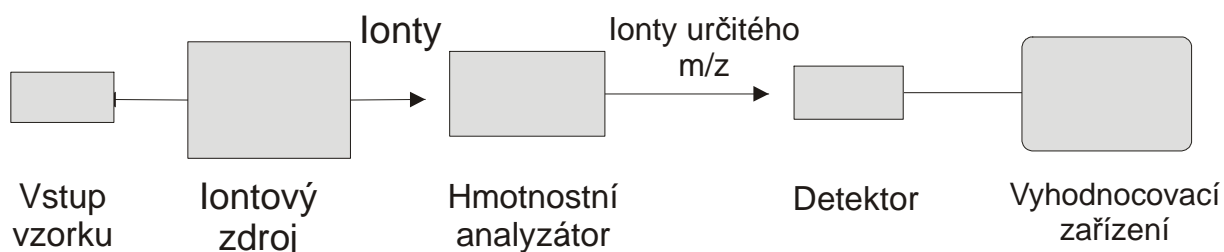
Chmel obsahuje velké množství hořkých kyselin. Do piva přechází varem na isomerizované kyseliny, které jsou zodpovědné za hořkou chuť, antibakteriální účinky a v neposlední řadě za stabilitu pěny piva. Pěna patří mezi kvalitativní a kvantitativní znaky charakterizující pivo, je jedním z prvních vjemů vnímaných spotřebitelem. Faktorů, které ovlivňují stabilitu a trvání pěny, je velké množství, kromě hořkých kyselin jsou to také bílkoviny, kovové ionty, lipidy a aminokyseliny. Hořké kyseliny jsou fenolické kyseliny, které se dělí na  $\alpha$ -kyseliny a  $\beta$ -kyseliny. Mezi hlavní  $\alpha$ -kyseliny patří humulon, kohumulon

a adhumulon. Hlavní  $\beta$ -kyseliny jsou lupulon, kolupulon a adlupulon. Hořké  $\beta$ -kyseliny mají na rozdíl od  $\alpha$ -kyselin o jednu prenylovanou skupinu na benzenovém jádře více<sup>22,41</sup>.

### 2.3 Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry, MS)

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda sloužící k převedení molekul na ionty, rozlišení těchto iontů podle poměru hmotnosti a náboje  $m/z$  a následnému záznamu relativních intenzit jednotlivých iontů. Tato metoda má velmi dobré vypovídací schopnosti o struktuře analyzované látky, je navíc velmi citlivá při malé spotřebě vzorku. Jedná se však o metodu destruktivní. Výsledkem je hmotnostní spektrum, což je závislost relativní intenzity iontového proudu na efektivní hmotnosti  $m/z$ . Relativní intenzita nejintenzivnějšího iontového proudu je 100%<sup>22</sup>.

Hmotnostní spektrometr (Obr. 5<sup>23</sup>) je iontově optické zařízení, které separuje ionty podle poměru jejich  $m/z$ . Pracuje za velmi nízkých tlaků. Je složen ze tří základních částí: iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor<sup>22</sup>.



**Obr. 5 :** Obvyklé schéma hmotnostního spektrometru

Nedílnou součástí přístroje je nejčastěji dvoustupňový vakuový systém umožňující udržet dostatečně nízký tlak<sup>22</sup>.

Základními kroky v této technice jsou: odpaření vzorku, ionizace, akcelerace iontů do hmotnostního analyzátoru, separace iontů hmotnostním filtrem, detekce iontů<sup>23</sup>.

Hmotnostní spektrometrie je rychlá a citlivá analytická metoda, která je často využívána ke kvalitativní i kvantitativní chemické analýze, protože poskytuje velké množství informací o vzorku a jeho složení. Významně napomáhá k identifikaci, určení struktury

organické látky a určení její relativní molekulové hmotnosti. Je velmi užitečná pro základní výzkum vysoce reaktivních molekul v plynné fázi<sup>23</sup>.

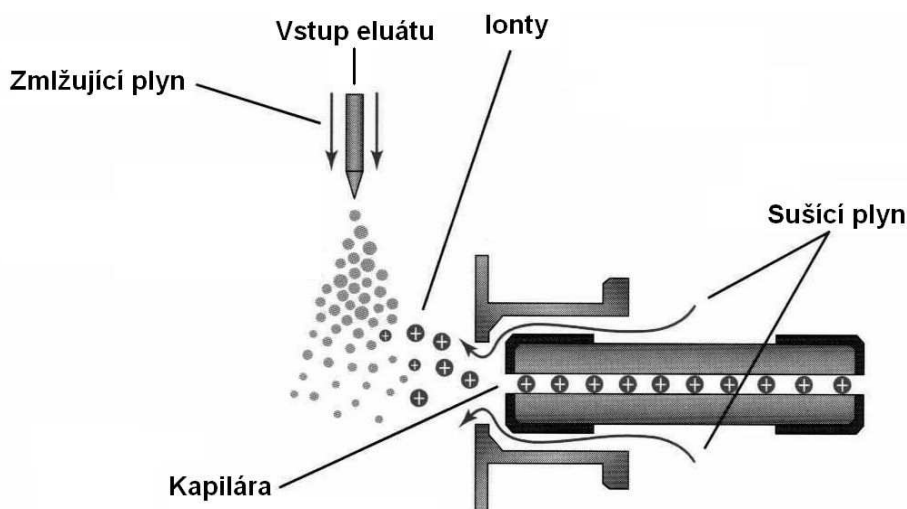
### 2.3.1 Iontový zdroj

Iontový zdroj slouží k převedení neutrální analyzované látky do ionizovaného stavu. Ionizace je naprosto nezbytným předpokladem analýzy. Podle množství dodané energie při ionizaci se ionizační techniky dělí na tzv. měkké a tvrdé. Mezi měkké ionizační techniky patří např. termosprej (TermoSpray Ionization, TSI), ionizace laserem za účasti matrice (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI) a ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Ionization, API). Mezi API techniky se řadí ionizace elektrosprejem (ElectroSpray Ionization, ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI) či fotoionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Photo Ionization, APPI). Mezi tvrdé ionizační techniky patří např. elektronová ionizace (Electron Ionization, EI) či chemická ionizace (Chemical Ionization, CI)<sup>22</sup>. Hmotnostní spektra získaná měkkými ionizačními technikami se obecně zásadně liší od EI hmotnostních spekter v řadě aspektů. Ve spektrech obvykle nepozorujeme žádné intenzivní fragmentové ionty (jsou některé výjimky, zejména pro labilní sloučeniny). Ionty umožňující určení molekulové hmotnosti jsou ve velké většině případů nejintenzivnějšími píky ve spektru. Narozdíl od EI můžeme ve spektrech pozorovat téměř výhradně ionty se sudým počtem elektronů<sup>24</sup>.

#### 2.3.1.1 Ionizace elektrosprejem (ESI)

Jedná se o jednu z nejšetrnějších měkkých ionizačních technik<sup>22</sup> (společně s MALDI)<sup>24</sup>. V současnosti patří mezi nejčastěji používané iontové zdroje i pro spojení HPLC/MS<sup>22</sup>. Lze ji použít pro velmi široký okruh bioorganických a organických sloučenin v rozsahu od středně polárních až po iontové sloučeniny<sup>24</sup>. K rozprášení kapalně přivedené do kovové kapiláry dochází vlivem nehomogenního elektrického pole mezi ústím této kapiláry, na níž je přivedeno vysoké napětí<sup>22</sup> (cca 3 – 5 kV)<sup>24</sup>, a protielektrodou, jež je uzemněna<sup>22</sup>. Vznikající mikrokapičky nesou díky vloženému napětí na kapiláru na svém povrchu velké množství nábojů (podle polarit vložení napětí je náboj kladný nebo

záporný)<sup>24</sup>. Ty jsou protiproudem horkého inertního plynu rychle vysušeny, disociované látky mechanismem iontového vypařování přecházejí přímo do fáze plynné a vzniklé ionty se vedou vstupní štěrbinou přes iontovou optiku do hmotnostního analyzátoru (Obr. 6). V procesu mohou vznikat kladně i záporně nabité ionty v závislosti na polaritě napětí vloženého na elektrodu. Při záznamu kladných iontů vznikají nejčastěji protonované molekuly  $[M+H]^+$ , dále adukty se sodným  $[M+Na]^+$ , draselným  $[M+K]^+$  či amonným  $[M+NH_4]^+$  iontem. V některých případech můžeme pozorovat méně intenzivní adukty s mobilní fází. Při záznamu záporných iontů vznikají deprotonované molekuly  $[M-H]^-$  či ve výjimečných případech adukty  $[M+Cl]^{-22}$ .



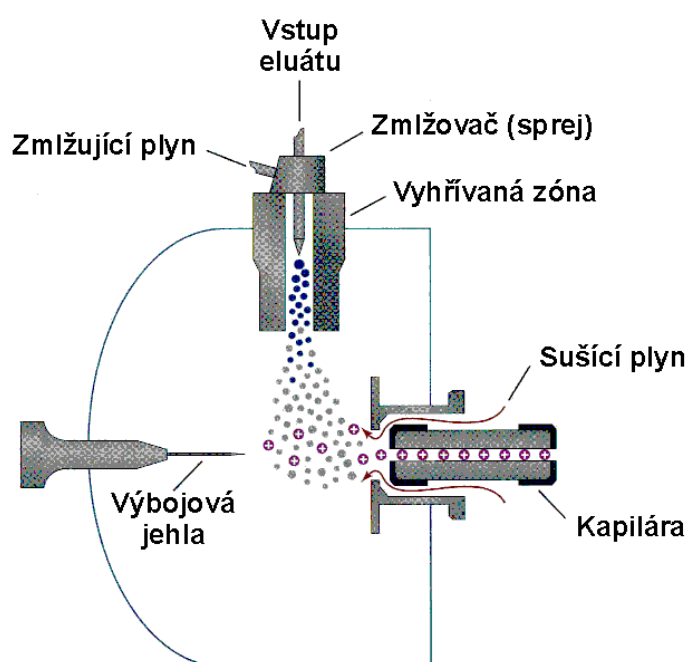
Obr. 6 : Schéma ESI

### 2.3.1.2 Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)

APCI je analogií konvenční chemické ionizace, ale probíhá za atmosférického tlaku. Tato technika byla navržena pro spojení s HPLC a téměř výhradně se pro tento účel používá<sup>24</sup>. Je vhodná pro středně polární i nepolární látky<sup>22</sup>. Uspořádání iontového zdroje je podobné jako u ESI, avšak na kapiláru není vloženo napětí, na konci kapiláry je vysokoteplotní topení a u jejího konce je umístěna výbojová elektroda (Obr. 7). Mobilní fáze je na výstupu z kolony vedena kovovou kapilárou do zmlžovače, kde je obdobně jako u ESI rozprášena na jemný aerosol. Vzniklý aerosol je rychle odpařen v krátké zóně vyhřívané na vysokou teplotu (300 – 650 °C). Vložením napětí na výbojovou jehlu dochází ke vzniku koronového výboje, jímž jsou ionizovány molekuly 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 při chemické ionizaci. Vznikající ionty jsou stejně jako u ESI urychleny a fokusovány dalšími elektrodami a potom analyzovány některým z hmotnostních analyzátorů<sup>24</sup>.

Tato ionizace je dostatečně šetrná a při záznamu kladných iontů vznikají především protonované molekuly  $[M+H]^+$  a při záznamu záporných iontů deprotonované molekuly  $[M-H]^-$ . Fragmentované ionty bývají také zastoupeny, ale jejich intenzita závisí na typu analyzované látky a na napětí vloženém na konický vstupní otvor. Vložení vyššího napětí lze významně podpořit fragmentaci, což je možné využít pro získání určitých strukturních informací<sup>22</sup>.



**Obr. 7 : Schéma APCI**

### 2.3.1.3 Ionizace laserem za účasti matrice (MALDI)

Při použití této metody se nechá studovaná látka (nebo směs látek) vykrystalovat na kovové podložní desce s tzv. matricí. Tou bývají deriváty nízkomolekulárních aromatických kyselin, které mohou absorbovat energii laserového záření ve viditelné nebo blízké ultrafialové oblasti<sup>25</sup>.

MALDI vyniká nízkými nároky na spotřebu vzorku. Na rozdíl od ostatních ionizačních technik lze pomocí MALDI analyzovat vzorky obsahující běžně používané soli, složky pufrů a denaturační činidla. Odpadá tedy nutnost úpravy vzorku a eliminují se jeho

ztráty. Příprava vzorku pro analýzu je navíc velmi rychlá. Významnou výhodou MALDI je tvorba pouze jedenkrát nabitých iontů, což usnadňuje analýzu komplexních směsí jako jsou polymery. Ačkoli byla MALDI-MS původně zaměřena na analýzu bílkovin a peptidů, našla využití i v daleko širším měřítku. Vzhledem k pulsnímu charakteru ionizace je v současnosti MALDI nejčastěji používaná v kombinaci s průletovým analyzátozem<sup>24</sup>.

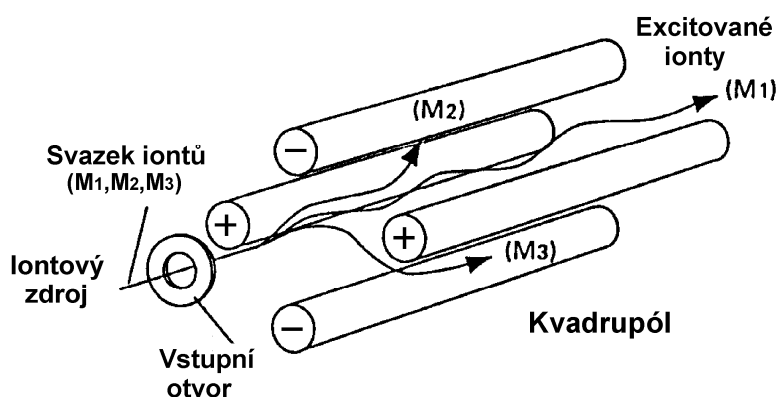
### 2.3.2 Hmotnostní analyzátor

Hmotnostní analyzátor slouží jako disperzní prvek a umožňuje rozdělit v prostoru nebo v čase směs iontů o různých poměrech  $m/z$ <sup>22</sup>. V současnosti je na trhu celá řada různých typů hmotnostních analyzátorů, a proto je při jeho volbě nutné přihlídnout k požadovaným vlastnostem analyzátoru a samozřejmě také k ekonomickým možnostem. S rostoucí cenou se zvyšují možnosti jednotlivých analyzátorů (zejména rozlišení, přesnost určení hmoty, možnost měření  $MS^n$ , apod.) a také složitost instrumentace a nároky na jejich obsluhu a údržbu<sup>24</sup>.

#### 2.3.2.1 Kvadrupólový analyzátor (Q)

Je nejčastěji používaným hmotnostním analyzátozem pro spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Jedná se o jeden z nejlevnějších analyzátorů, jeho obsluha a spojení s HPLC jsou velice snadné. Kvadrupólový analyzátor se vyznačuje robustností a stabilitou kalibrace hmotností po dlouhou dobu a poskytuje dobré výsledky pro kvantitativní analýzu<sup>24</sup>. Konstrukčně se jedná o čtyři kovové tyče kruhového nebo hyperbolického průřezu, které jsou připojeny ke zdrojům stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí (Obr. 8)<sup>22</sup>. Na jednu dvojici protilehlých tyčí je vloženo kladné a na druhou dvojici záporné napětí<sup>24</sup>. Ionty, které vlétnou do prostoru mezi tyčemi, se dostanou do střídavého elektrického pole a začnou oscilovat. Při vhodně zvolených hodnotách stejnosměrného a střídavého napětí projdou kvadrupólem pouze ionty o určitém  $m/z$ , které mají stabilní oscilaci. Ostatní ionty se pohybují po nestabilních drahách a zachytí se na tyčích kvadrupólu nebo na stěnách přístroje<sup>22</sup>. Postupnou změnou střídavého a stejnosměrného napětí při jejich konstantním poměru jsou postupně detekovány všechny ionty ve zvoleném skenovacím rozsahu. Nevýhodou kvadrupólového analyzátoru je pouze jednotkové nebo o málo vyšší rozlišení a chybějící možnost měření  $MS/MS$  spekter<sup>24</sup>.





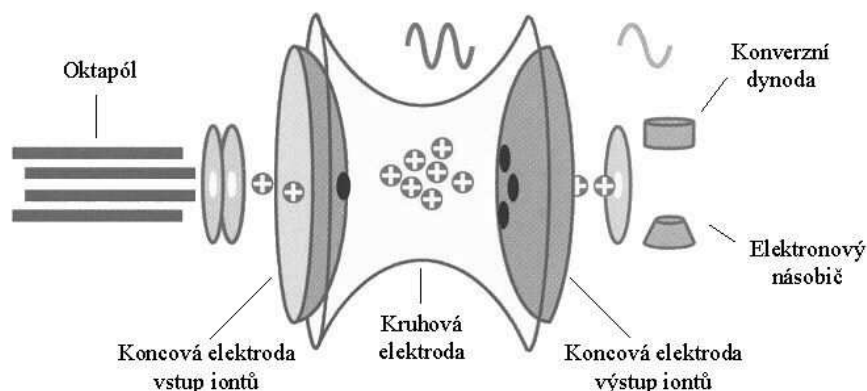
Obr. 8 : Schéma Q

Spojením tří kvadrupólů za sebou získáme tzv. **trojitý kvadrupólový analyzátor** (QqQ), přičemž první kvadrupól umožňuje izolaci zvoleného iontu prekursoru, druhý kvadrupól slouží jako kolizní cela pro MS/MS měření a třetí kvadrupól slouží k rozdělení produktových iontů vzniklých fragmentací zvoleného iontu prekursoru v kolizní cele. Tímto způsobem můžeme, na rozdíl od jednoduchého kvadrupólu, měřit i MS/MS spektra, avšak cena tohoto analyzátoru je vyšší a vzrůstá složitost instrumentace<sup>24</sup>.

### 2.3.2.2 Iontová past (IT)

Dalším typem analyzátoru je iontová past (Ion Trap, IT), což je trojrozměrná obdoba kvadrupólového analyzátoru<sup>22</sup>, ale na rozdíl od kvadrupólu se neuplatňuje stejnosměrné napětí (Obr. 9)<sup>24</sup>. Kromě příznivé ceny má velkou výhodu v možnosti MS<sup>n</sup> analýzy. Další výhodou tohoto analyzátoru spočívá v tom, že hmotnostní spektra vyššího řádu měříme v jediném analyzátoru teoreticky bez omezení do n-tého stupně. V praxi jsme omezeni citlivostí a stabilitou iontů přibližně do třetího až pátého stupně v závislosti na typu sloučeniny<sup>24</sup>. Pomocí střídavého elektrického pole umožňuje uzavřít ionty v ohraničeném prostoru. Iontová past se skládá ze vstupní a výstupní kruhové elektrody hyperbolického průřezu a prstencové středové elektrody. Ionty se po zachycení v iontové pasti pohybují po velmi složitých drahách. Na počátku skenovacího cyklu je prstencová elektroda udržována na nízké hodnotě amplitudy vysokofrekvenčního napětí, která se postupně zvyšuje, čímž jsou na detektor vypuzovány ionty s rostoucí  $m/z$ <sup>22</sup>.

Výhody trojitého kvadrupólu a iontové pasti v sobě spojuje **lineární iontová past**<sup>24</sup>.



Obr. 9 : Schéma IT

### 2.3.2.3 Průletový analyzátor (TOF)

Pro vysokou citlivost detekce a velký rozsah detekovatelných hmotností se stále více používá průletový analyzátor (Time Of Flight, TOF). V principu jde o nejjednodušší hmotnostní analyzátor<sup>22</sup>. Rozděluje ionty na základě doby letu. Ionty analytu jsou urychleny silným elektrickým polem (25 – 30 kV) a přes uzemněnou mřížku vstupují do evakuované letové trubice (Obr. 10)<sup>24</sup>. Ionty s různou hodnotou  $m/z$  mají při stejné kinetické energii různou rychlost, proto se ion s vyšší molární hmotností pohybuje pomaleji a dorazí na detektor později než ion s menší molární hmotností. Časová diference, a tím i rozlišení, závisí na délce dráhy, kterou ionty v trubici průletového analyzátoru urazí. Pro zlepšení citlivosti se používá reflekttronové uspořádání. Reflekttron je elektrostatische zrcadlo, které kompenzuje drift kinetické energie iontů o stejné molární hmotnosti a tím zpřesňuje měření hmoty<sup>22</sup>.

V biochemii se dnes často používá kombinace MALDI-TOF, ESI s trojitým kvadrupólem (QqQ) nebo hybridní spojení kvadrupólu s TOF (QqTOF)<sup>25</sup>.

Hmotnostní spektra s vysokým rozlišením (až 100 000) je možné měřit **magnetickým analyzátozem** s dvojitou fokusací iontů, což umožňuje přesné určení sumárního vzorce molekuly i jednotlivých fragmentových iontů<sup>24</sup>.

Mezi hmotnostní analyzátory nejvyšší třídy řadíme magnetické analyzátory s dvojitou fokusací iontů a zejména **analyzátozem s iontovou cyklotronovou rezonancí s Fourierovou transformací** (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance, FT ICR). FT ICR analyzátozem výrazně převyšuje ve všech parametrech všechny ostatní analyzátory, bohužel včetně jeho ceny<sup>24</sup>.

## 2.4 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

Chromatografie je fyzikálně-chemická separační metoda založena na ustalování rovnováhy mezi dvěma fázemi. Kapalinová chromatografie využívá opakovaného procesu distribuce látek mezi kapalnou mobilní a ve většině případů tuhous stacionární fází<sup>22</sup>. Kapalinové chromatografy se skládají z částí, které zajišťují transport mobilní fáze, dávkování vzorku, separaci jeho složek, jejich následnou detekci, záznam a zpracování signálu<sup>24</sup>. Látky ve směsi migrují různou rychlostí ve směru toku mobilní fáze. Při průchodu chromatografickým prostředím tak dochází k vzájemné separaci těchto látek. Nejpoužívanější technikou kapalinové chromatografie je tzv. vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Chromatografickým prostředím je kolona obvykle o délce 50 – 300 mm a vnitřním průměrem 2 – 6 mm plněná vhodnou náplní<sup>22</sup>. Kolona má rozhodující význam pro kvalitu chromatografické separace. Dobrá chromatografická kolona musí umožnit separaci látek s vysokou účinností a požadovanou selektivitou, má mít dlouhou životnost a dobrou mechanickou odolnost vůči vysokým pracovním tlakům běžným v současné praxi HPLC a musí být rezistentní vůči složkám mobilních fází<sup>24</sup>. Vysoké účinnosti a rychlosti se dosahuje s použitím kolon plněných velmi malými částicemi (3 – 7  $\mu\text{m}$ ) a průtoků mobilní fáze (0,5 – 2 ml/min)<sup>22</sup>.

V současné době patří mezi významné vývojové trendy v kapalinové chromatografii miniaturizace vnitřního průměru chromatografických kolon. Používané kolony se dělí podle vnitřního průměru na konvenční s vnitřním průměrem nad 1 mm, mikrokolony (pod 1 mm), kapilární kolony (100 – 500  $\mu\text{m}$ ) a „nanoscale“ kolony (pod 100  $\mu\text{m}$ ). K eluci se používají nízké průtoky řádově  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Dalším moderním trendem využívajícím kolony naplněné částicemi o velikosti 1 – 2  $\mu\text{m}$  je UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) firmy Waters či RRLC (Rapid Resolution Liquid Chromatography) firmy Agilent. Používají se kolony o průměru 2 mm a délce 30 – 100 mm. Při analýze se dosahuje tlaků až 100 MPa<sup>22</sup>. Náplně kolon se připravují z pórovitých anorganických materiálů nebo z organických polymerů. Nejčastěji se používají materiály na bázi silikagelu, buď bez úprav nebo chemicky modifikované navázáním nepolárních, středně či silně polárních stacionárních fází, případně i fází s iontovými nebo ionizovatelnými funkčními skupinami<sup>24</sup>. Pokud jsou náplní pevné částice, hovoříme o konvenčních stacionárních fázích nebo mohou mít charakter polymeru (monolitu), pak je řeč o monolitických stacionárních fázích. Konvenční stacionární fáze

se skládají z jednotlivých částic o přesně definované velikosti, oproti tomu monolit tvoří jediný kus pórovitého materiálu, který vzniká zesílením polymerní směsi. Tyto typy kolon dosahují velmi vysokých rozlišovacích schopností a zkrácení doby analýzy. Další výhodou těchto technik je nízká spotřeba mobilních fází a s tím spojená možnost použití drahých rozpouštědel a aditiv (např. cyklodextriny). Výhodou je i využití těchto technik při stopové analýze a snadné propojení se spektrálními metodami (hmotnostní spektrometrie, infračervená spektroskopie)<sup>22</sup>.

Instrumentace pro klasickou HPLC vyžaduje použití vysokotlakých čerpadel<sup>22</sup> vyrobených z materiálů odolných vůči agresivním látkám a schopných dávkovat kapaliny při pracovních tlacích<sup>24</sup> 30 – 60 MPa, u UPLC či RRLC až 100 MPa<sup>22</sup>. Mobilní fáze je dále vedena do chromatografické kolony, pro dobrou reprodukovatelnost výsledků zpravidla umístěnou v termostatovém prostoru<sup>24</sup>. Přístroje pro HPLC jsou mnohem složitější než pro klasickou sloupcovou chromatografii, kde se mobilní fáze pohybuje gravitační silou. Vzorek je zaveden do proudu mobilní fáze pomocí automatických dávkovačů<sup>22</sup>, dříve pomocí injekčních stříkaček či smyčkového dávkovacího ventilu<sup>24</sup>. Mobilní fázi před vstupem do čerpadla je třeba zbavit rozpuštěného vzduchu, aby se zabránilo případné netěsnosti zpětných ventilů čerpadla, kolísání průtoku a potížím při detekci<sup>24</sup>. Jako čerpadla mobilní fáze se používají taková zařízení, která dokáží vytvořit konstantní průtok čerpané kapaliny. Pro běžné analytické kolony se nejčastěji používají pístová dvoučinná čerpadla. Jejich nevýhodou je pulsní chod, který však lze vykompenzovat s použitím dvou nebo více čerpadel současně, přičemž písty se nepohybují rovnoměrně, ale parabolicky s časem a jejich činnost je fázově posunuta<sup>22</sup>. Eluát z kolony je veden do detektoru, poskytujícího elektrický signál jako odezvu úměrnou změně sledované vlastnosti eluátu<sup>24</sup>. Detektor by měl mít malý vnitřní objem, aby co nejméně přispíval k rozmývání elučních křivek. Signál detektoru by měl být reprodukovatelný, lineárně závislý na koncentraci v co nejširším rozsahu, citlivý a s co nejnižší mezí detekce<sup>22</sup>.

K detekci se využívá analytická vlastnost systému, která je ve známém a reprodukovatelném vztahu ke koncentraci analytu. Rozlišujeme detektory univerzální a selektivní. Univerzální detektor měří vlastnost systému jako celku tj. index lomu, tepelnou vodivost, relativní permitivitu. Selektivní detektor měří určitou vlastnost specifickou pro danou látku nebo skupinu látek, např. absorbanci při určité vlnové délce, elektrolytický proud při určitém potenciálu atd. Selektivní detekce je obvykle citlivější a vhodnější zejména při analýze složek přítomných v komplikovaných matricích. Mezi nejběžnější detektory používané v HPLC patří spektrofotometrický, fluorimetrický, elektrochemický

a refraktometrický detektor, stále častěji se používá spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií<sup>22</sup>.

Záznam závislosti signálu detektorem na čase se nazývá chromatogram. Z polohy maxim a elučnicích vln (píků) na chromatogramu, které je charakteristické pro určitou strukturu chromatografované látky v daném systému, usuzujeme na přítomnost určitých látek. Každá látka daného chromatografického systému je popsána tzv. retenčním faktorem,  $k$ , pro který platí:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (1)$$

kde  $t_R$  je retenční čas zadržované látky a  $t_M$  je mrtvý čas, resp. retenční čas látky, která se na koloně nesorbuje<sup>22</sup>.

Z výšek píků či ploch pod píky lze kvantitativně vyhodnotit obsah dané látky v analyzované směsi<sup>22</sup>.

#### 2.4.1 Chromatografie v systémech s normálními fázemi (NP-HPLC)

Je-li stacionární fáze polárnější než fáze mobilní, mluvíme o systémech s normálními fázemi, v opačném případě jde o systémy s obrácenými fázemi<sup>22</sup>. Chromatografie v systémech s normálními fázemi využívá polárních stacionárních fází a nepolárních mobilních fází. Jako stacionární fáze se používají buď anorganické adsorbenty (nejčastěji silikagel, někdy i oxid hlinitý) nebo polární chemicky vázané fáze na silikagelovém nosiči (kyanopropylové, aminopropylové a další)<sup>24</sup>. Ve srovnání s chromatografií v systému s obrácenými fázemi je vliv stacionární fáze u systému s normálními fázemi výraznější. Jako mobilní fáze se zpravidla používají směsi dvou různě polárních organických rozpouštědel. Volba polárního rozpouštědla (propanol, acetonitril, dichlormethan) významně ovlivňuje retenční časy a selektivitu separace. Méně polární rozpouštědlo (většinou alifatický uhlovodík – heptan, hexan) má na retenci mnohem menší vliv. Retence látek se obvykle zvyšuje s klesající koncentrací polárnějšího rozpouštědla v mobilní fázi a s rostoucí polaritou stacionární fáze a separovaných látek, které se elují v pořadí rostoucích polarit<sup>22</sup>.

## 2.4.2 Chromatografie v systémech s obrácenými fázemi (RP-HPLC)

V dnešní době se tyto chromatografické systémy používají v HPLC nejčastěji, protože umožňují separovat vzorky obsahující nepolární, středně nebo silně polární a často i iontové či ionizovatelné látky<sup>24</sup>. Charakteristickým znakem chromatografie s obrácenými fázemi je nízká polarita použité stacionární fáze ve srovnání s mobilní fází. Jako stacionární fáze se obvykle používá chemicky modifikovaný silikagel. Modifikován může být oktadecylovými, oktylovými či jinými alkylovými skupinami. Mobilní fáze jsou polárnější než fáze stacionární a skládají se většinou z vody a jednoho či více polárních rozpouštědel, nejčastěji methanolu či acetonitrilu (ACN). Charakter organického rozpouštědla a typ chemicky vázané nepolární stacionární fáze ovlivňuje retenční časy i selektivitu separace<sup>22</sup>. Systémy s obrácenými fázemi jsou vhodné pro separace látek, které se liší velikostí hydrofobních částí molekul, případně počtem a charakterem polárních funkčních skupin<sup>24</sup>. Pro popis systému s obrácenými fázemi se často používá zjednodušené lineární vyjádření:

$$\log k = a - m \cdot \varphi \quad (2)$$

kde  $\varphi$  je koncentrace organického rozpouštědla a  $a$  a  $m$  jsou konstanty závisující na typu použité mobilní a stacionární fáze. Konstanta  $m$  je mírou eluční síly organického rozpouštědla a roste s jeho klesající polaritou a s velikostí molekuly analyzované látky. Konstanta  $a$  roste s klesající polaritou a rostoucí velikostí látky<sup>22</sup>.

Retence látek klesá s rostoucí koncentrací a klesající polaritou organického rozpouštědla v mobilní fázi a s rostoucí polaritou stacionární fáze a separovaných látek, které se eluují v pořadí klesajících polarit, opačně než při chromatografii v systémech s normálními fázemi<sup>22</sup>.

## 2.4.3 Gradientová eluce

Chromatografická separace probíhající za konstantního složení mobilní fáze (nemění se eluční síla) se nazývá izokratická eluce. U komplexních vzorků, které obsahují velké množství sloučenin s velmi rozdílnou retencí, izokratická eluce často neposkytuje vyhovující separaci všech složek během jedné chromatografické analýzy. Při použití mobilní fáze s vysokou eluční silou se dobře separují silně se zadržující látky, zatímco slabě zadržované

látky jsou eluovány v mrtvém objemu. Pokud se použije mobilní fáze s eluční silou vhodnou pro slabě zadržované látky, jsou dobře separovány, ale eluce silně zadržovaných látek trvá velmi dlouho a dochází k rozmytí píků. Proto byla zavedena gradientová eluce, u které postupným zvyšováním eluční síly mobilní fáze dochází k poklesu retence jednotlivých látek. Obecně může být gradient proveden změnou iontové síly, pH nebo složením mobilní fáze, dále také změnou průtoku nebo teploty. Nejběžnější je změna složení mobilní fáze v závislosti na čase. Gradientový program může navíc obsahovat i několik izokratických kroků. Mezi hlavní výhody gradientové eluce patří kratší doba analýzy, zvýšení citlivosti detekce pro později eluující látky. Podle tvaru gradientu lze rozdělit gradienty na lineární, konvexní a nebo konkávní. Nejběžnější je lineární gradient, kde se složení mobilní fáze v průběhu gradientu mění lineárně pod určitou směrnici a splňuje rovnici:

$$\varphi = \varphi_0 + \frac{\varphi_z - \varphi_0}{t_G} \cdot t \quad (3)$$

kde  $\varphi_0$  a  $\varphi_z$  jsou hodnoty koncentrace organického rozpouštědla  $\varphi$  na začátku a na konci gradientu a  $t_G$  je čas gradientu<sup>22</sup>.

#### 2.4.4 Detektory v kapalinové chromatografii

Ideální detektor pro kapalinovou chromatografii by měl umožňovat detekci všech typů látek, měl by poskytovat okamžitou a lineární koncentrační odezvu v co nejširším rozmezí koncentrací látky, měl by mít vysokou citlivost a nízkou úroveň šumu, neměl by být citlivý ke změnám tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty, měl by mít minimální příspěvek k rozšiřování elučních zón látek a měl by umožňovat použití gradientové eluce či jiných technik s programovanou změnou pracovních podmínek. Takový detektor v praxi neexistuje, různé detektory se jednotlivým požadavkům pouze do jisté míry přibližují<sup>24</sup>.

Nejčastěji používanými detektory v HPLC jsou **spektrofotometrické detektory**. Detegované látky musí absorbovat v ultrafialové nebo viditelné oblasti elektromagnetického záření. Vlnovou délku detekce lze u přístrojů s monochromátorem volit v rozsahu vlnových délek zdroje záření. Některé přístroje tohoto typu umožňují snímat UV spektra látek v měrné kyvetě při zastaveném průtoku mobilní fáze, případně u rychle skenujících spektrofotometrů i bez přerušení toku mobilní fáze. Pro rychlý záznam spektra separovaných látek se nejčastěji

používá detektorů s tzv. fotodiodovým polem, které umožňují současnou detekci a integraci chromatogramů při větším počtu vlnových délek<sup>24</sup>.

**Refraktometrický detektor** je nejstarší univerzální detektor pro HPLC. Při průchodu látky měrnou kyvetou poskytuje odezvu úměrnou rozdílu indexu lomu mezi měrnou kyvetou a kyvetou srovnávací, naplněnou čistou mobilní fází. Tento detektor sice umožňuje detekci všech látek, ale jeho odezva silně závisí na teplotě, na rychlosti průtoku a na složení mobilní fáze<sup>24</sup>.

Vysoce selektivní a citlivé jsou **fluorimetrické detektory**. Detegovaná látka v cele detektoru absorbuje budící záření z ultrafialové oblasti, jehož část vyzáří ve formě fluorescenčního záření o vyšší vlnové délce, které se zpravidla měří pod úhlem 90° k záření budicímu<sup>24</sup>.

Další skupinou selektivních a citlivých detektorů jsou **detektory elektrochemické**. Tyto detektory měří proud vyvolaný při průchodu redukovatelné či oxidovatelné látky měrnou celou s elektrodami, na něž je vloženo napětí potřebné k průběhu elektrochemické reakce<sup>24</sup>.

**Vodivostní detektory** měří elektrickou vodivost eluátu z kolony v průtokové cele, obvykle válcového tvaru, se dvěma vzájemně izolovanými kovovými elektrodami. Dalším univerzálním detektorem je **detektor rozptylu světla** na tuhých částicích v proudu plynu, po předchozím odpaření mobilní fáze (Evaporative Light-Scattering Detector – ELSD). Detektor rozptylu světla poskytuje řadu výhod oproti refraktometrickému (RI) nebo spektrofotometrickému detektoru. Stejně jako s RI se dají analyzovat látky neabsorbující UV záření a také použít k eluci absorbujících rozpouštědel. Narozdíl od RI má ELSD výbornou stabilitu základní linie, která není citlivá na změnu teploty okolí, nedriftuje se změnou eluentu (možnost gradientové eluce) a neovlivňují ji ani pulsy čerpadla<sup>24</sup>.



## 2.5 Spojení HPLC/MS

Spojení hmotnostního spektrometru se separačními metodami, zejména s plynovou a kapalinovou chromatografií, výrazně zvyšuje selektivitu a umožňuje provádět identifikaci látek ve složité matici<sup>22</sup>. Hmotnostní spektrometr je univerzální a vysoce selektivní detektor. První spojení HPLC/MS bylo popsáno v roce 1973, kdy byl pro spojení využit jednoduchý dělič toku mobilní fáze v poměru přibližně 1:100 a mobilní fáze sloužila jako ionizační plyn pro chemickou ionizaci. Nevýhodou byla nižší citlivost, ale poprvé bylo možné změřit hmotnostní spektra látek po jejich separaci<sup>24</sup>. Vývoj instrumentace pro spojení HPLC/MS byl rychlý a v současnosti jsou systémy HPLC/MS komerčně dostupné v přijatelných cenových relacích v závislosti na uspořádání<sup>22</sup>.

Základním předpokladem úspěšného spojení HPLC/MS je účinné odstranění složek mobilní fáze před vlastní ionizací. K tomuto účelu byla vyvinuta řada technických zařízení, avšak většina má v současnosti pouze historický význam<sup>22</sup>. Jako ionizační techniky se nejprve využívalo zejména klasické elektronové (EI) nebo chemické ionizace (CI). Nevýhodou "tvrdé" ionizace EI je velký nadbytek vnitřní energie iontů, který vede k rozsáhlé fragmentaci a znemožňuje určení molární hmotnosti<sup>24</sup>. V dnešní době se pro spojení HPLC/MS výhradně používají API techniky, mezi které patří ionizace ESI, APCI a nově zavedená APPI<sup>22</sup>. ESI a APCI umožňují rutinní "on-line" spojení se zcela minimálními omezeními pro volbu separačních podmínek a pokrývají prakticky celý rozsah molekulových hmotností a polarit analyzovaných látek<sup>24</sup>. Tyto ionizační techniky jsou principiálně přizpůsobeny pro práci s průtokem kapalně mobilní fáze a jsou schopny odvést většinu těkavých složek mimo prostor hmotnostního spektrometru. Volba iontového zdroje je určena dle typu analyzované látky<sup>22</sup>.

Spojení HPLC/MS lze využít v RP i v NP systémech, přičemž pro práci v NP systémech je výhodnější využít APCI, zatímco v RP systémech lze použít obě ionizační techniky<sup>24</sup>.

Z hlediska instrumentální kompatibility s kapalinovým chromatografem neexistuje žádné omezení volby hmotnostního analyzátoru. Konkrétní volba se řídí především požadovaným hmotnostním rozsahem, rozlišením a samozřejmě pořizovacími a provozními náklady<sup>22</sup>.

Při použití sprejovacích ionizačních technik dochází k zanedbatelné fragmentaci. Strukturní informace získané při použití průletového či kvadrupólového hmotnostního analyzátoru jsou omezeny na určení molární hmotnosti separované látky na základě

pozorovaného molekulárního iontu. Pro účely podrobnějších strukturních studií je nutno použít komplexní systém hmotnostní spektrometrie umožňující MS/MS či MS<sup>n</sup> analýzu. Klasickým instrumentálním uspořádáním tandemového hmotnostního spektrometru schopného MS/MS analýzy je spojení tří kvadrupólových analyzátorů (QqQ), z nichž prostřední slouží jako kolizní cela, či spojení dvou kvadrupólových a průletového analyzátoru (QqTOF). Pro MS<sup>n</sup> analýzu se využívá jako analyzátoru iontové pasti<sup>22</sup>.

Použití hmotnostního spektrometru jako detektoru nijak nezužuje výběr typu stacionární fáze. Nejběžnější je použití chromatografie v systémech s obrácenými fázemi, kde se jako stacionární fáze používají kolony s chemicky vázanou stacionární fází nejčastěji C8 nebo C18. Určitá omezení jsou kladena na volbu použité mobilní fáze, a to zejména z hlediska průtoku mobilní fáze a těkavosti složek. API techniky tolerují průtoky mobilní fáze až do 2 ml/min u ionizace APCI, u ESI je to maximálně 1 ml/min. Je nutná minimalizace množství anorganických sodných a draselných solí, které způsobují rychlé zanesení zdroje. Často se používá úpravy pH pro podpoření ionizační účinnosti – například přidavek kyseliny mravenčí nebo octové, které jsou těkavé. Běžně používané netěkavé pufrы musí být nahrazeny těkavějšími analogy (např. octan amonný)<sup>22</sup>.

HPLC není jedinou separační technikou vhodnou pro spojení s MS. Bylo popsáno spojení dalších separačních technik s hmotnostní spektrometrií, např. kapilární zónové elektroforézy, kapilární chromatografie, superkritické fluidní chromatografie nebo "off-line" spojení s tenkovrstvou chromatografií<sup>24</sup>.

### 3 ANALÝZA PRENYLOVANÝCH FLAVONOIDŮ TECHNIKOU HPLC a HPLC/MS

Nejlepší způsob kompletní analýzy flavonoidů včetně jejich detailních struktur, konfigurace dvojných vazeb na kruhu, počet dvojných vazeb, umístění hydroxylových a substituovaných skupin je založen na přítomnosti a použití dobré separační techniky a detektoru s možností identifikace jednotlivých látek<sup>22</sup>.

#### 3.1 HPLC analýza

Polyfenolické látky jsou nejčastěji separovány v systémech s obrácenými fázemi na C18 kolonách.

Běžně užívaným systémem v laboratořích analyzujících biochemický materiál a potraviny je spojení HPLC s UV detekcí<sup>26</sup>. Touto metodou byly stanoveny flavonoidy v lidské plasmě<sup>27-29</sup> (rhoifolin, daidzin, kvercetin, naringinin a naringenin), v lidské moči<sup>30,31</sup> (naringinin, naringenin, kvercetin a kaempferol), v krysí krvi<sup>32</sup> (kvercetin a katechiny), a krysí plasmě<sup>33</sup> (apigenin). V červených grepech byly separovány anthokyany<sup>26</sup>. Pro stanovení množství XN v chmelu a pivu byla také využita HPLC s UV detekcí<sup>15</sup>. Pro kvantitativní analýzu ostatních prenylflavonoidů však tato metoda nemá dostatečnou citlivost a selektivitu.

K detekci deseti polyfenolických látek v nealkoholických pivech byla použita metoda založená na extrakci vzorku tuhou fází (Solid Phase Extraction, SPE) a následné analýze pomocí HPLC/UV<sup>34</sup>.

Na speciální spektrální charakteristice flavonoidů je založena UV detekce s využitím PDA (PhotoDiode Array detection) detektoru<sup>26</sup>. Touto metodou byly stanoveny flavonoidy v mnoha matricích: biologických tekutinách<sup>35</sup>, nápojích z různých druhů ovoce<sup>36</sup> (např. pomeranče a grepy), červeném ovoci<sup>37</sup> (brusinky, maliny, jablka), v extraktech z čerstvého ovoce<sup>38</sup> (borůvky, různé odrůdy jablek, grep), v zeleninových extraktech<sup>39</sup> (cibule, celer) a luštěninách<sup>40</sup>, v odvarech z čajů<sup>41</sup> a v extraktech různých bylinek<sup>42</sup> (Crataegus, Sideritis).

Vzhledem k vysoké selektivitě a citlivosti je pro analýzu přírodních antioxidantů v potravinách a nápojích vysoce využívána HPLC s elektrochemickou detekcí<sup>43,26</sup>. Amperometrický i coulometrický detektor se používají pro RP-HPLC obvykle s C18 kolonou s vodně-organickou mobilní fází obsahující kyselý pufr k potlačení disociace slabě kyselých fenolických sloučenin. Při isokratické HPLC fenolických kyselin a flavonoidů v pivu se používá amperometrická detekce. Coulometrická detekce však obvykle poskytuje lepší

citlivost a stabilitu v porovnání s amperometrickou. Pro HPLC analýzu fenolických sloučenin a flavonoidů s mobilní fází obsahující kyselinu mravenčí nebo kyselinu octovou ve vodném roztoku methanolu nebo ACN se používá detektor Coulochem II s dvěma coulometrickými detekčními celami zapojenými v sérii<sup>43</sup>. Dále je možné použít multi-kanálový CoulArray detektor se čtyřmi, osmi, dvanácti nebo šestnácti tříelektrovými elektrochemickými celami zapojenými v sérii<sup>43</sup>.

Amperometrická detekce ale není kompatibilní s gradientovou elucí. Pro uskutečnění HPLC separace látek s rozdílnou polaritou (fenolické látky, flavonoidy) se používá gradientová eluce se zvyšující se koncentrací organického modifikátoru (methanolu, ACN) v mobilní fázi pufované dihydrogenfosfátem sodným a kyselinou fosforečnou s osmi<sup>44</sup> nebo dvanácti<sup>45</sup> kanálovým CoulArray detektorem. Pomocí šestnácti kanálového CoulArray detektoru bylo analyzováno více než třicet fenolických látek v džusech a jiných nápojích<sup>46,47</sup> nebo třicet šest flavonoidů a fenolů v různých druzích piva, červených a bílých vín, v citrónovém džusu, sóji a tabákových extraktech<sup>48</sup>.

Multikanálový detektor CoulArray tvoří s HPLC s gradientovou elucí vysoce selektivní a citlivý systém pro analýzu flavonoidů a fenolických antioxidantů. Nevýhodou je nutnost porovnání se standardy přítomných látek. Pokud nejsou standardy k dispozici, je možné pro analýzu neznámých sloučenin využít spojení HPLC/MS nebo v sérii s dalšími detektory jako UV nebo coulometrický detektor<sup>43</sup>.

Další možností detekce je měření indexu lomu (HPLC/RI). Použití této metody je však limitováno svojí selektivitou a citlivostí. I přesto byla úspěšně aplikována na stanovení leukokyanidinu<sup>49</sup>.

Pro separaci hořkých kyselin a jejich isomerů byla použita HPLC s isokratickou elucí<sup>50</sup>. Rychlejší a kvalitnější separace než s HPLC bylo dosaženo s využitím MEKC (Micellar electrokinetic chromatography) a MEEKC (Microemulsion electrokinetic chromatography)<sup>51-54</sup>.

Ke stanovení  $\alpha$ - a  $\beta$ -kyselin byla použita HPLC s elektrochemickou detekcí (HPLC/ECD)<sup>55</sup>. Tato metoda je velmi přesná a citlivá, v porovnání s UV detektorem, navíc může být použita až dvacetčtyřikrát menší koncentrace analytu<sup>55</sup>. V současné době se však nejvíce používá spojení HPLC/MS, viz. kapitola 3.2.

### 3.2 HPLC/MS analýza

Spojení HPLC/MS je často používanou metodou stanovení flavonoidů obsažených v jídle, nápojích a dalších biologických vzorcích. K analýze se využívá chromatografické separace, při které je chromatografická kolona naplněna chemicky vázanou stacionární fází C18<sup>26</sup> či NH<sub>2</sub><sup>56</sup> a k eluci slouží dvousložková mobilní fáze ACN:voda<sup>57</sup> či methanol:voda<sup>58</sup> s přidavkem kyseliny mravenčí. Jako iontový zdroj se nejčastěji používá elektrosprej<sup>59</sup> nebo chemická ionizace za atmosférického tlaku<sup>15</sup> při záznamu kladných a záporných iontů<sup>22</sup>.

Metoda HPLC/MS byla vyvinuta pro stanovení šesti prenylovaných flavonoidů (xanthohumol, isoxanthohumol, desmethylxanthohumol, 6-prenylnaringenin, 8-prenylnaringenin, 6-geranylnaringenin) v chmelu a pivu. Dovoluje přímo analyzovat pivo a surové methanolicke extrakty piva<sup>15</sup>.

Lepší citlivost získáváme při použití tandemové hmotnostní spektrometrie. Vyšší selektivita umožňuje její využití pro analýzu minoritních komponent v komplexních maticích<sup>15</sup>. S pomocí techniky HPLC/MS/MS bylo v původním vzorku chmelu současně identifikováno dvacet šest sloučenin (mezi nimi i isoxanthohumol a xanthohumol) bez předchozí úpravy<sup>60</sup>. Použitelnost, přesnost a správnost metody byly demonstrovány opakovanou analýzou třinácti vzorků běžně prodávaných piv a dvou bylinných čajů obsahujících chmel<sup>15</sup>.

Pro stanovení prenylflavonoidů v pivu bylo též využito spojení HPLC s trojitým kvadrupólem (QqQ) jako analyzátozem. Také bylo úspěšně aplikováno na kvantitativní analýzu sójových isoflavonů v plasmě, dětské výživě a sójové mouce<sup>15</sup>.

XN a IXN mohou být stanoveny s využitím HPLC/ESI/MS/MS<sup>61</sup>. Analýza se provádí po extrakci vzorku methanolem s kyselinou mravenčí. Tato metoda je velmi dobře reprodukovatelná a má široké meze detekce.

Protože hořkost piva je jednou z nejdůležitějších vlastností tohoto nápoje, je nutné znát metody přesné analýzy sloučenin, které ji ovlivňují, tzn. hořkých kyselin a jejich isomerů. V poslední době byly optimalizovány parametry chromatografické separace a jsou využívány výhody MS detekce, které výrazně zlepšují selektivitu a citlivost analýzy  $\alpha$ -/ $\beta$ -kyselin a iso- $\alpha$ -kyselin. Snižují však linearitu hmotnostní detekce a vliv účinků matrice vyžaduje používání vnitřních standardů pro přesnou kvantitativní analýzu cílové sloučeniny. Vzhledem k tomu, že syntéza stabilních izotopů označených analogickými  $\alpha$ -/ $\beta$ -kyselinami a iso- $\alpha$ -kyselinami, které mají být použity jako vnitřní standardy, je velmi pracná a náročná,

byla vyvinuta ECHO technika. Tato analytická technika byla vyvinuta pro kompenzaci vlivu extrahovaných složek matrice v LC/MS/MS analýze reziduí pesticidů v rostlinách pomocí neznačené cílové sloučeniny jako vnitřního standardu, který se nadávkuje do HPLC/MS systému za několik minut od nástřiku vzorku jako „echo“ analyt. Pro rychlé, přesné a citlivé stanovení hořkých látek v chmelu bylo cílem vyvinout HPLC/MS/MS metodu založenou na ECHO technice<sup>60</sup>.

Vzhledem k tomu, že syntéza izotopově značených vnitřních standardů odvozených z hořkých chmelových sloučenin je velmi náročná, ECHO technika by mohla být použita jako alternativa kvantifikační strategie. K provedení této techniky a kompenzaci vlivů extrahovaných složek matrice v LC/MS/MS analýze jsou využívány izolované neznačené referenční sloučeniny jako interní standardy, které se nadávkuje do HPLC/MS systému před nebo po cílovém vzorku. Získají se eluční časy ECHO standardů, které jsou přibližně stejné jako retenční časy analytů. Aby se tohoto dosáhlo, byl pro každou třídu hořké látky použit jeden ECHO standard: isoxanthohumol pro flavonony, xanthohumol pro chalkony, *trans*-iso-cohumulone pro iso- $\alpha$ -kyseliny, cohumulon pro  $\alpha$ -kyseliny a colupulon pro  $\beta$ -kyseliny. K vyrovnání vlivů extrahovaných složek matrice v LC/MS/MS analýze byly analyty s odpovídajícími ECHO standardy vybírány tak, aby časový posun mezi nimi byl co nejmenší<sup>60</sup>.

Dále se hořké kyseliny analyzují pomocí RP-HPLC/APCI/MS/MS<sup>41</sup> a HPLC/ESI/MS<sup>62</sup>. Často se využívá HPLC s UV detekcí, jejíž citlivost a selektivita však není pro přímou identifikaci dostačující, zvláště pro identifikaci minoritních kyselin, kterou ztěžuje i strukturální podobnost sloučenin<sup>26</sup>.

Analýza pomocí RP-HPLC/APCI/MS/MS s QqQ poskytuje dobrou separaci šesti hlavních chmelových kyselin. Další informace o struktuře lze získat pomocí kolizně indukované disociace (CID). Pro identifikaci minoritních kyselin se používá metoda „SRM“ (Selected reaction monitoring)<sup>63</sup>. Pomocí této techniky je tedy možné detekovat šest hlavních hořkých kyselin spolu s dalšími šesti minoritními kyselinami, mezi které patří například posthumulon, postlupulon a adprehumulon.

Další možností je detekce pomocí hmotnostního spektrometru s ionizací elektrosprejem<sup>62,22</sup>. Tato metoda byla popsána pro dva různé chromatografické systémy. První se zaměřuje na kompletní analýzu kyselin. Je založena na využití gradientu ACN, vody a octanu amonného při pH 6,5. Vzhledem k deprotonovanému stavu hořkých kyselin není citlivost příliš dobrá. Lepší citlivosti bylo dosaženo použitím mobilní fáze s vyšší koncentrací modifikátoru<sup>62</sup>.

Nejrozšířenější metoda stanovení hořkosti piva je založená na spektrofotometrickém měření absorbance iso-oktanového extraktu okyseleného piva při vlnové délce 275 nm<sup>64</sup>. Extrakce byla provedena jak pevnou fází (SPE), tak extrakcí kapalina-kapalina (Liquid-Liquid Extraction, LLE). K okyselení vzorku byla použita kyselina fosforečná<sup>64</sup>.

Kromě použití HPLC/MS byly popsány i jiné techniky, například HPLC/NMR<sup>65</sup>. NMR dokáže objasnit strukturu stereoisomerů isomerizovaných hořkých kyselin<sup>22</sup>, zatímco spojení HPLC/MS od sebe nedokáže rozlišit molekuly se stejnou molekulovou hmotností, ale různou strukturou. Nestabilita a podobnost hořkých kyselin je tedy při analýze problémem.

Spojení HPLC/NMR se poprvé objevilo v 90. letech a v současné době patří mezi nejúčinnější techniky separace, strukturálního určení neznámých látek ve směsi a tedy jednoznačné identifikace organických molekul<sup>66</sup>.

Tandemové hmotnostní spektrometry nebývají spojeny pouze s HPLC. Další možností je spojení kapilární elektroforézy s tandemovým hmotnostním spektrometrem s ESI ionizací (CZE/ESI/MS)<sup>67</sup>. Touto metodou je možné v surovém chmelovém extraktu separovat a identifikovat  $\alpha$ -kyseliny,  $\beta$ -kyseliny a jejich oxidované formy.

## 4 ZÁVĚR

V bakalářské práci byly popsány principy a metody využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie a spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií pro analýzu prenylovaných flavonoidů v chmelu a pivu.

Nejvíce se používá spojení HPLC/MS/MS s ionizací ESI nebo APCI. Tato metoda má vysokou citlivost a selektivitu a s jejím využitím lze v původním vzorku chmelu identifikovat až dvacet šest sloučenin.

Spojení HPLC/MS však od sebe nedokáže rozlišit isomery jednotlivých sloučenin, které mají stejnou molekulovou hmotnost, ale ve struktuře se liší. Proto bylo vyvinuto spojení HPLC/NMR, které umožňuje jednoznačnou identifikaci organických látek.



## POUŽITÁ LITERATURA

1. Dadáková, E. : Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích – Zemědělská fakulta – Metoda kvantitativní analýzy kvercetin v rostlinném materiálu.
2. Krejčová, J. : bakalářská práce Epikatechin v druzích rodu *Reynoutria*, **2006**
3. <<http://medicina.ronnie.cz/c-330-flavonoidy.html>> - staženo 2.4.09.
4. Hughes, R. J.; Croley, T. R.; Metcalfe, C. D. a March, R. E. : International Journal of Mass Spectrometry, **2001**, 210 – 211, 371 – 385.
5. <[http://www.upol.cz/fileadmin/user\\_upload/FTK-dokumenty/Katedra\\_fyziologie/Antioxidanty.ppt](http://www.upol.cz/fileadmin/user_upload/FTK-dokumenty/Katedra_fyziologie/Antioxidanty.ppt)> - staženo 23.6.09
6. Ligor, M.; Kornyšova, O.; Matuška, A. a Buszewski, B. : Journal of Planar Chromatography – Modern TLC , **2008**, 5, 355 – 360.
7. Hofta, P.; Dostálek, P. a Basařová, G. : Chem. Listy, **2004**, 98, 825 – 830.
8. Takayama, M.; Fukai, T.; Ichikawa, K. a Nomura, T. : Rapid communications in mass spectrometry, **1991**, 2, 67 – 69.
9. Stevens, Jan F., Page, Jonathan E. : Phytochemistry, **2004**, 65, 1317 – 1330.
10. De Keukeleire, D. a Heyerick, A. : Acta Hort., **2005**, 668, 175 – 189.
11. Dellmulle, L.; Bellahcène, A.; Dhooge, W.; Comhaire, F.; Roelens, F.; Huvaere, K.; Heyerick, A.; Castronovo, V. a De Keukeleire, D. : Phytomedicine, **2009**, 9, 732 – 734.
12. Gerhäser, C. : European Journal of Cancer, **2005**, 13, 1941 – 1954.
13. Monteiro, R.; Faria, A.; Azevedo, I. a Calhau, C. : The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. **2007**, 1 – 5, 124 – 130.
14. Cornelison, J. M.; Yan, F.; Watkins, S. E.; Liold Rigby; Segal, J. B. a Waldroup, P. W. : International Journal of Poultry Science, **2006**, 5, 134 – 136.
15. Stevens, Jan F.; Taylor, Alan W. a Deinzer, Max L. : Journal of Chromatography A, **1999**, 832, 97 – 107.
16. <[http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN.aspx?Chemical%20Name=DESMETHYLXANTHOMOL&CBNumber=CB8371854](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN.aspx?Chemical%20Name=DESMETHYLXANTHOMOL&CBNumber=CB8371854)> - staženo 15.4.2009
17. Vandewalle, M. : Bull. Soc. Chim. Belg., **1961**, 70, 163 – 167.
18. Orth, W. A. a Riedl, W. : Liebigs Ann. Chem., **1963**, 663, 74 – 82.
19. Čepička, J. a Karabín, M. : Chem. Listy, **2002**, 96, 90 – 95.

20. Milligan, S. R.; Kalita, J. C.; Pocock, V.; Van De Kauter, V.; Stevens, J. F.; Deinzer, M. L.; Rong, H. a De Keukeleire, D. : *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **2000**, 2, 4912 – 4915.
21. Krofta, K., Poustka, J., Nováková, K. a Hajšlová, J. : *Acta Hort. (ISHS)*, **2005**, 668, 201 – 206.
22. Fidler, M. : diplomová práce *Analýza prenylovaných flavonoidů v chmelu a pivu.*, **2007**.
23. Klouda, P. : *Moderní analytické metody*, **2003**.
24. Kolářová, L. : disertační práce *HPLC/MS Výšemolekulárních látek.*, **2004**.
25. <<http://biomikro.vscht.cz/maldiman/cz/theory/basics.php>> - staženo dne 1.5.09
26. Molnár-Perl, I. a Füzfai, Zs. : *Journal of Chromatography A*, **2005**, 1073, 201 – 227.
27. Ishii, K.; Urano, S.; Furuta, T. a Kasuva, Y. : *J. Chromatogr. B*, **1994**, 655, 300.
28. Liu, B.; Ferry, D. R.; Seymour, L. W.; deTakáts, P. G. a Kerr, D. J. : *J. Chromatogr. B*, **1995**, 666, 149.
29. Ishii, K.; Furuta, T. a Kasuva, Y. : *J. Chromatogr. B*, **1995**, 683, 225.
30. Ishii, K.; Furuta, T. a Kasuva, Y. : *J. Chromatogr. B*, **1997**, 704, 299.
31. Wang, F. M.; Yao, T. W. a Zeng, S. : *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2003**, 1.
32. Manach, C.; Texier, O.; Morand, C.; Crespy, V.; Régéat, F.; Demigné, C. a Rémésy, C. : *Free Rad. Med.*, **1999**, 27, 1259.
33. Romanova, D.; Grancai, D.; Jozova, B.; Bozek, P. a Vachálková, A. : *J. Chromatogr. A*, **2000**, 870, 463.
34. García, A. A.; Grande, B. C. a Gándara, J. S. : *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1054, 175 – 180.
35. Pietta, P. G.; Gardana, C.; Mauri, P. L.; Maffei-Facino, R. a Carini, M. : *J. Chromatogr. B*, **1995**, 673, 75.
36. Bronner, W. E. a Beecher, G. R. : *J. Chromatogr. A*, **1995**, 705, 247.
37. Goiffon, J. P.; Mouly, P. P. a Gaydou, E. M. : *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 382, 39.
38. Kader, F.; Rovel, B.; Girardin, M. a Metche, M. : *Food Chem.*, **1996**, 55, 35.
39. Crozier, A.; Jensen, E.; Lean, M. E. J. a McDonald, M. S. : *J. Chromatogr. A*, **1997**, 761, 315.
40. Escarpa, A.; Morales, M. D. a Gonzales, M. C. : *Anal. Chim. Acta*, **2002**, 460, 61.
41. Bronner, W. E. a Beecher, G. R. : *J. Chromatogr. A*, **1998**, 805, 137.
42. Rehwald, A.; Meier, B. a Sticher, O. : *J. Chromatogr. A*, **1994**, 677, 25.

43. Jandera, P.; Škeříková, V.; Řehová, L.; Hájek, T.; Baldriánová, L.; Škopová, G.; Kellner, V. a Horna, A. : *J. Sep. Sci.*, **2005**, *28*, 1005 – 1022.
44. Kenyhercz, T. M. a Kissinger, P. T. : *J. Agric. Food Chem.*, **1977**, *25*, 959 – 961.
45. Guo, Ch.; Cao, G.; Sofic, E. a Prior, R. L. : *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, *45*, 1787 – 1796.
46. Nardini, M. a Ghiselli, A. : *Food Chem.*, **2004**, *84*, 137 – 143.
47. Pevrat-Maillard, M. N.; Bonnely, S. a Berset, C. : *Talanta*, **2000**, *51*, 709 – 716.
48. Achilli, G.; Cellerino, G. P. a Gamache, P. H. : *Journal of Chromatography*, **1993**, *632*, 111 – 117.
49. Lewis, D. A.; Fields, W. N. a Shaw, G. P. : *J. Ethnoph.*, **1999**, *65*, 283.
50. Harms, D. a Nitzsche, F. : *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **2001**, *1*, 28 – 31.
51. De Keukeleire, D.; David, D.; Haghebaert, F. a Sandra, P. : *Journal of the Institute of Brewing*, **1998**, *104*, 75 – 82.
52. Szücs, R.; Van Hove, E. a Sandra, P. : *Journal of High Resolution Chromatography*, **1996**, *19*, 189 – 192.
53. Vindevogel, J. a Sandra, P. : *Journal of High Resolution Chromatography*, **1991**, *14*, 795 – 801.
54. Szücs, R.; Vindevogel, J.; Everaert, E.; Decooman, L.; Sandra, P. a De Keukeleire, D. : *Journal of the Institute of Brewing*, **1994**, *100*, 293 – 296.
55. Kac, J. a Vovk, T. : *Journal of Chromatography B*, **2007**, *1 – 2*, 531 – 537.
56. Nogueira, L. C.; Silva, F.; Ferreira, I. a Trugo, L. C. : *Journal of Chromatography A*, **2005**, *1065*, 207 – 210.
57. Rong, H.; Zhao, Y.; Lazou, K.; De Keukeleire, D.; Milligan, S. R. a Sandra, P. : *Chromatographia*, **2000**, *51*, 545 – 552.
58. Hvattum, E. a Ekeberg, D. : *Journal of Mass Spectrometry*, **2003**, *38*, 43 – 49.
59. Almela, L.; Sanchez-Munoz, B.; Fernandez-Lopez, J. A.; Roca, M. J. a Rabe, V. : *Journal of Chromatography*, **2006**, *1120*, 221 – 229.
60. Intelmann, D.; Haseleu, G. a Hofmann, T. : *J. Agric. Food Chem.*, **2009**, *57*, 1172 – 1182.
61. Magalhães, P. J.; Guido, L. F.; Cruz, J. M. a Barros, A. A. : *Journal of Chromatography A*, **2007**, *1 – 2*, 295 – 301.
62. Hofte, A. J. P.; Van Der Hoeven, R. A. M.; Fung, S. Y.; Verpoorte, R.; Tjaden, U. R. a Van Der Greef, J. : *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **1998**, *3*, 118 – 122.

63. Zhang, X.; Liang, X.; Xiao, H. a Xu, Q. : J Am Soc Mass Spectrom, **2004**, *15*, 180 – 187.
64. Jaskulam B.; Goirisi, K.; De Rouck, G.; Aerts, G. a De Cooman, L. : J. Inst. Brew., **2007**, *4*, 381 – 390.
65. Pusecker, K.; Albert, K. a Bayer, E. : Journal of Chromatography A, **1999**, *836*, 245 – 252.
66. Wolfender, J.-L.; Ndjoko, K. a Hostettmann, K. : Phytochemical Analysis, **2001**, *1*, 2 – 22.
67. García-Villalba, R.; Cortacero-Ramírez, S.; Segura-Carretero, A.; Martín-Lagos Contreras, J. A. a Fernández-Gutiérrez, A. : J. Agric.Food Chem., **2006**, *54*, 5400 – 5409.

## ÚDAJE PRO KNIHOVNICKOU DATABÁZI

Název práce	Separace a identifikace prenylovaných flavonoidů s využitím techniky HPLC/MS/MS
Autor práce	Lenka Kovaříková
Obor	Hodnocení a analýza potravin
Rok obhajoby	2009
Vedoucí práce	Ing. Lenka Česlová, Ph.D.
Anotace	Bakalářská práce se zabývá stanovením prenylovaných flavonoidů v chmelu a pivu s využitím HPLC a HPLC/MS.
Klíčová slova	Prenylované flavonoidy, chmel, pivo, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie