

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI
KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

VYUŽITÍ UHPLC S RŮZNÝMI TYPY DETEKCE
V OBLASTI ENVIRONMENTÁLNÍ A
POTRAVINOVÉ ANALÝZY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Hradec Králové 2009

David Rejman

Na úvod bych velmi rád poděkoval PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za její trpělivé, pečlivé a odborné vedení. Děkuji jí za cenné rady a připomínky, které jsem využil při tvoření této diplomové práce. Chci zde také poděkovat mé rodině, která mi byla při psaní práce významnou oporou. Zároveň prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a veškeré podklady jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Využití UHPLC s různými typy detekce v oblasti environmentální a potravinové analýzy

Abstrakt

Cílem práce bylo seznámení s možnostmi využití UHPLC instrumentace ve spojení s různými typy detekce při chromatografických separacích látek v oblasti environmentální a potravinové analýzy. Dalším cílem bylo vyhledat a prostudovat větší počet odborných článků týkajících se UHPLC metodiky, které jsou v současnosti dostupné v internetových databázích ScienceDirect a Web of Science. Na základě informací z odborných článků je v práci uveden grafický přehled týkající se počtu vyhledaných článků a skupin analyzovaných látek v jednotlivých letech.

V úvodu práce jsou zmíněny van Deemterova, Giddingsova a Knoxova teorie pro účinnost chromatografického systému. Jedná se o teorie, které jsou podstatné pro pochopení principu účinnosti chromatografické separace. Následující kapitoly se zabývají problematikou vývoje chromatografie v posledních desetiletích především v oblasti délky a typu analytických kolon, velikosti náplňových částic či teploty a tlaku v chromatografickém systému. Vývoj dospěl v dnešní době až ke kolonám o rozměrech 50 x 1 mm, které jsou plněny částicemi menšími než 2 μm a jsou schopny pracovat za tlaků kolem 100 MPa. V dalších kapitolách je zmíněna problematika týkající se hmotnostní spektrometrie, konvenčních a nových ionizačních technik, hmotnostních analyzátorů a detektorů. Důležitou částí práce je kapitola, která pojednává o výše zmíněných odborných článcích vyhledaných v internetových databázích ScienceDirect a Web of Science. Z uvedeného grafického přehledu vyplývá, že v posledních letech se stále zvyšuje počet odborných článků týkajících se UHPLC metodiky a že možnost jejího využití se stále rozšiřuje. Další část práce obsahuje tabulkové přehledy, které popisují různé aplikace UHPLC metodiky v oblasti environmentální a potravinové analýzy. V závěrečných kapitolách je rozebráno několik zajímavých článků, které popisují konkrétní UHPLC analýzy vybraných druhů látek v oblasti environmentální a potravinové analýzy. Ve všech typech analýz se potvrdilo, že UHPLC metodika poskytuje celou řadu výhod v porovnání s konvenčními separačními technikami.

The use of UHPLC with various types of detection in the field of environmental and food analysis

Abstract

The aim of this work was to inform about possible use of UHPLC instrumentation in connection with various types of detection when chromatographic separating of substances in the field of environmental and food analysis is performed. The next aim was to search and study a number of articles referring to UHPLC methodology, which are at present available in the internet databases ScienceDirect and Web of Science. On the basis of the information from the articles there is a graphic summary in this work relating to the number of found articles and the groups of analysed substances within years.

In the introduction of the work van Deemter's, Gidding's and Knox's theories about the efficiency of the chromatographic system are mentioned. These theories are substantial for understanding the principle of chromatographic separation. Following chapters deal with the problems of the development of chromatography in the last decades, especially concerning the length and type of analytical columns, the size of filling particles or the temperature and pressure in the chromatographic system. Now thanks to the development, the columns dimensions are 50 x 1 mm and are filled with particles less than 2 μm in diameter and are able to work under the pressure of around 100 MPa. In the next chapters the problems concerning mass spectrometry, conventional and new ionization techniques, mass analyzers and detectors are mentioned. An important part of the work is a chapter dealing with the articles, found in the internet databases ScienceDirect and Web of Science. From the stated graphic summary results it follows that in the last years there have been more and more articles referring to UHPLC methodology and that the field of its use has been widening. The next part of the work contains table charts describing various applications of UHPLC methodology in environmental and food analysis. In final chapters we deal with several articles of interest, where particular UHPLC analyses of selected kinds of substances are described. In all the types of analyses it was confirmed that UHPLC methodology provides a number of advantages in comparison with conventional separation techniques.

Obsah

Využití UHPLC s různými typy detekce v oblasti environmentální a potravinové analýzy (abstrakt).....	3
The use of UHPLC with various types of detection in the field of environmental and food analysis (abstract).....	4
Obsah.....	5
Seznam použitých zkratk.....	8
1. Úvod a cíl práce.....	10
1.1. Úvod.....	11
1.2. Cíl práce.....	12
2. Teoretická část.....	13
2.1. Van Deemterova, Giddingsova a Knoxova teorie pro účinnost chromatografického systému.....	14
2.1.1. Van Deemterova a Giddingsova teorie.....	14
2.1.2. Knoxova teorie.....	18
2.2. Chromatografické metody.....	20
2.2.1. Vývoj chromatografie v posledních desetiletích.....	20
2.2.2. Ultra High Performance Liquid Chromatography.....	23
2.2.2.1. UHPLC analýzy prováděné za velmi vysokých tlaků.....	25
2.2.2.2. Dávkování vzorků za vysokých tlaků, moderní UHPLC instrumentace a její využití.....	27
2.2.3. Hmotnostní spektrometrie.....	29
2.2.3.1. Přehled konvenčních ionizačních technik.....	31
2.2.3.2. Přehled novějších ionizačních technik.....	35
2.2.3.3. Hmotnostní analyzátoři.....	38
2.2.3.4. Detektory v hmotnostní spektrometrii.....	44
2.3. Vyhledávání informací v internetových databázích o UHPLC analýzách různých skupin látek.....	45
2.4. Aplikace UHPLC metodiky s různými typy detekce v oblasti environmentální a potravinové analýzy.....	49
2.4.1. Příklady aplikací metodiky UHPLC s různými typy detekce v oblasti environmentální analýzy.....	50
2.4.2. Příklady aplikací metodiky UHPLC s různými typy detekce v oblasti potravinové analýzy.....	54
2.5. UHPLC analýza vybraných druhů látek v oblasti environmentální analýzy.....	59

2.5.1. Analýza androgenů a progestogenů v povrchových a odpadních vodách pomocí UHPLC-ESI-MS-MS	59
2.5.2. UHPLC-MS-MS analýza pesticidů v podzemních vodách.....	63
2.6. UHPLC analýza vybraných druhů látek v oblasti potravinové analýzy	66
2.6.1. UHPLC-MS-MS analýza fenolických kyselin v nápojích	66
2.6.2. UHPLC-MS-MS analýza pesticidů v jablkových extraktech	71
2.6.3. Analýza více než 100 veterinárních léčiv v různých vzorcích masa za využití UHPLC-TOF-MS metodiky.....	74
3. Závěr.....	78
3.1. Závěrečné shrnutí	79
4. Seznam použité literatury	82
4.1. Použitá literatura	83

Seznam použitých zkratek

- APCI - Atmospheric pressure chemical ionization - chemická ionizace za atmosferického tlaku
- APTDI – Atmospheric pressure thermal desorption ionization *
- ASAP – Ambient solid analysis probe*
- BEH – Bridged ethylsiloxane/silica hybrid – hybridní technologie silikagelu a polymeru
- CI – Chemical ionization – chemická ionizace
- DAD – Diode array detector – detektor s diodovým polem
- DAPCI – Desorption atmospheric pressure chemical ionization*
- DAPPI – Desorption atmospheric pressure photo ionization*
- DART - Direct analysis in real time – přímá analýza v reálném čase
- DBDI – Dielectric discharge barrier ionization*
- DESI - Desorption electrospray ionization – desorpční ionizace elektrosprejem
- DESSI – Desorption sonic spray ionization*
- DNA – Deoxyribonukleová kyselina
- EI – Electron ionization – elektronová ionizace
- EESI – Extractive electrospray ionization*
- ELDI – Electrospray laser desorption ionization*
- ESI – Electrospray ionization – ionizace elektrosprejem
- FAB – Fast atom bombardment – ionizace urychlenými atomy
- FD – Field desorption – desorpce polem
- FD-ESI – Fused droplet electrospray ionization*
- FI - Field ionization - ionizace polem
- FIB - Fast ion bombardment - ionizace urychlenými ionty
- FT-ICR – Fourier transformation-ion cyclotron resonance - iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
- GC – Gas chromatography – plynová chromatografie
- HAPGDI – Helium atmospheric pressure glow discharge ionization*
- HETP – Height equivalent of theoretical plate – výškový ekvivalent teoretického patra
- HILIC – Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*
- HPLC – High Performance Liquid Chromatography – Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HTLC – High Temperature Liquid Chromatography – Vysokoteplotní kapalinová chromatografie

ICR – Ion cyclotron resonance – iontová cyklotronová rezonance

IR - Infra-red - infračervená oblast světla, infračervený

LAESI – Laser ablation electrospray ionization*

LC – Liquid chromatography – kapalinová chromatografie

MALDESI – MALDI assisted electrospray ionization*

MALDI – Matrix assisted laser desorption ionization – laserem indukovaná ionizace za účasti matrice

MRM – Multiple reaction monitoring*

MS – Mass spectrometry – hmotnostní spektrometrie

MS-MS – Tandem mass spectrometry – tandemové spojení hmotnostních analyzátorů

ND-EESI – Neutral desorption extractive electrospray ionization*

PADI – Plasma assisted desorption ionization*

PDA – Photo-diode array – fotodiodové pole

Q - Quadrupole - kvadrupolový analyzátor

QqQ - Triple quadrupole - trojitý kvadrupól

RP – Reversed phase – obrácená fáze, reverzní fáze

SIMS - Secondary-ion bombardment mass spectrometry*

SPE - Solid phase extraction - extrakce na pevnou fázi

SSP – Surface sampling probe*

TOF – Time of flight – analyzátor doby letu

TOF-TOF - Tandemové spojení dvou analyzátorů doby letu

TSI – Thermospray ionization – ionizace termosprejem

UHPLC (UPLC) – Ultra High Performance Liquid Chromatography – Ultra vysokoúčinná kapilární kapalinová chromatografie (Ultra Performance Liquid Chromatography – Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie)

UV – Ultra-violet – ultrafialový/á

* český překlad není k dispozici

1. Úvod a cíl práce

1.1. Úvod

UHPLC - Ultra High Performance Liquid Chromatography je zkratka, která je obdobou již od počátku používané zkratky UPLC - Ultra Performance Liquid Chromatography. Pod oběma zkratkami se nachází slovní spojení, které charakterizuje stejné analytické systémy, které pracují na naprosto stejných principech. Bohužel různé označení stejných systémů vnáší do této problematiky určitou nepřehlednost. Odlišnost označení je dána tím, že zkratka UPLC je registrovanou značkou firmy Waters. V dnešní době se můžeme setkat s oběma typy zkratk.

Metodika UHPLC představuje poměrně nový trend v oblasti kapalinové chromatografie. Během posledních několika let dochází k velikému rozvoji této techniky a k jejímu pronikání do nejrůznějších oblastí týkajících se analýzy látek v různých typech materiálů. Těmi nejdůležitějšími důvody, které stojí za vzrůstající popularitou UHPLC jsou vysoká účinnost, rychlost, citlivost, nízká spotřeba rozpouštědel a nízký objem dávkovaného vzorku. Není tedy divu, že v poslední době začíná metodika UHPLC postupně nahrazovat konvenční HPLC – High Performance Liquid Chromatography. K nesporným výhodám v oblasti uplatnění UHPLC patří i její spojení s hmotnostní spektrometrií. Naopak jednou z nevýhod UHPLC instrumentace může být vyšší pořizovací cena v porovnání s HPLC.

UHPLC instrumentace před několika lety již našla, či v brzké budoucnosti najde značné uplatnění především na pracovištích, která se zabývají analýzou látek v oblasti toxikologie, farmaceutických, potravinových či klinických analýz. Již zmíněných výhod UHPLC instrumentace patrně nejvíce využijí takové laboratoře, pro které je typická vysoká produktivita a vytíženost.

V této době se na světě klade stále vyšší důraz na ekologické aspekty, které mohou v budoucnu značně ovlivnit život na celé planetě. Proto dnes zažívá uplatnění UHPLC velikého rozmachu v oblasti environmentální analýzy. Výborné využití UHPLC instrumentace v této oblasti je podmíněno již zmíněnými výhodami této metodiky v porovnání s konvenčními instrumentacemi.

1.2. Cíl práce

Jedním z hlavních cílů diplomové práce je podat základní informace o metodice UHPLC, které se týkají především základních principů separace látek a také stručného historického vývoje této dnes stále více využívané a moderní techniky. Práce pojednává také o různých výhodách, které UHPLC metodika přináší nejen do oblasti environmentální a potravinové analýzy. Diplomová práce má mimo jiné za cíl přiblížit i problematiku hmotnostní spektrometrie, která v dnešní době významně doplňuje UHPLC instrumentaci.

Hlavním cílem této rešeršní práce je zmapování využití UHPLC metodiky v oblasti environmentální a potravinové analýzy na základě zpracování odborných článků z internetových databází. Práce obsahuje přehledné grafické znázornění počtu UHPLC analýz různých skupin látek za posledních několik let. Jedním z důležitých aspektů, které si dává tato práce za cíl, je zpracování názorného tabulkového přehledu, který se týká konkrétních aplikací UHPLC metodiky v oblasti environmentální a potravinové analýzy. V závěru práce je podrobněji popsáno několik vybraných aplikací UHPLC techniky právě v oblasti environmentální a potravinové analýzy.

2. Teoretická část

2.1. Van Deemterova, Giddingsova a Knoxova teorie pro účinnost chromatografického systému

2.1.1. Van Deemterova a Giddingsova teorie¹

Byly prokázány kinetické děje, které různou mírou ovlivňují dělení látek na chromatografické koloně a způsobují takzvané rozmývání zón. Díky těmto dějům získávají chromatografické píky typický Gaussovský tvar. Kdyby neměly tyto děje žádný vliv na separaci látek, píky by byly ostré ohraničené zóny. Toto je ale pouze teoretický jev, který by se projevil jen v případě ideální chromatografie.

Od roku 1956 existuje tzv. Dynamická van Deemterova teorie, která je schopna popsat výše zmíněné děje přispívající k rozmývání zón separovaných látek. Tato teorie je charakterizována rovnicemi popisujícími vztahy pro jednotlivé procesy způsobujícími rozšiřování chromatografických zón. Původně byly tyto rovnice odvozeny pro plynovou chromatografii, ale po několika letech bylo prokázáno, že jsou vhodné i pro chromatografii kapalinovou.

Van Deemterova teorie respektuje neideální chování složek v chromatografické koloně a připisuje projevy tohoto chování třem hlavním vlivům: **vířivé difúzi v mobilní fázi (H_T)**, **molekulární difúzi v mobilní fázi (H_M)** a **odporu vůči převodu hmoty na fázovém rozhraní (H_O)**. Tyto vlivy jsou nezávislé a podílí se na tzv. výškovém ekvivalentu teoretického patra (HETP). Teoretické patro je mírou účinnosti chromatografického systému. Vlivy difúze během chromatografických pochodů se projevují rozšiřováním chromatografických zón. Je-li známa celková délka kolony (L), je možno vypočítat výškový ekvivalent teoretického patra značený též H , na jehož základě se porovnávají účinnosti jednotlivých chromatografických kolon. Výškový ekvivalent teoretického patra lze vyjádřit jako součet dílčích příspěvků:

$$H = H_T + H_M + H_O$$

¹ Kapitola 2.1.1. byla vypracována ze zdrojů [1], [2], [3], [4], [5].

H ... výškový ekvivalent teoretického patra

H_T ... příspěvek vířivé difúze analytu v mobilní fázi k HETP

H_M ... příspěvek molekulární difúze analytu v mobilní fázi k HETP

H_O ... příspěvek odporu proti převodu hmoty na fázovém rozhraní k HETP

Vířivá difúze analytu v mobilní fázi

Tento příspěvek souvisí s tím, že mobilní fáze proudí v širších kanálcích stacionární fáze rychleji a v užších kanálcích zase pomaleji. Molekuly analytu tedy postupují rozdílnou rychlostí v závislosti na různé velikosti kanálků. Příspěvek vířivé difúze k rozmytí zón je závislý jen na velikosti částic a na pravidelnosti uspořádání náplně kolony. Toto tvrzení je možné vyjádřit následovně:

$$H_T = A + \lambda \cdot d_p$$

A ... konstantní člen van Deemterovy rovnice

λ ... koeficient nerovnoměrného plnění chromatografické kolony

d_p ... velikost částic náplně kolony

Se zvětšováním částic náplně stoupá hodnota d_p , avšak klesá hodnota λ . U náplňových kolon není možné člen A van Deemterovy rovnice eliminovat, naopak u kapilárních kolon tento člen odpadá.

Molekulární difúze v mobilní fázi

Pro molekulární difúzi je důležité to, že se uplatňuje zejména při malých průtokových rychlostech, že molekuly analytu difundují z místa s vyšší koncentrací do místa s koncentrací nižší, a že se molekuly takto pohybují ve směru toku mobilní fáze i proti směru jejího toku. Tento příspěvek je dán následujícím vztahem:

$$H_M = \gamma \cdot D_m / u = B / u$$

γ ... korekční faktor charakterizující tvar kanálků v náplni kolony

D_m ... difúzní koeficient

u ... průtoková rychlost mobilní fáze

Z výše uvedené rovnice vyplývá, že s vyššími průtoky mobilní fáze se vliv difúze snižuje. Difúzní koeficient D_m nejvíce ovlivňuje molekulární difúzi.

Odpor vůči převodu hmoty na fázovém rozhraní

Rychlost převodu hmoty na fázovém rozhraní je určována téměř zcela difúzí analytu ve stacionární nebo stagnantní mobilní fázi v pórech nosiče a je rovněž závislá na tvaru a velikosti zrn náplně a na tloušťce vrstvy stacionární fáze. Odpor vůči převodu hmoty na fázovém rozhraní je dán následujícím vztahem:

$$H_O = (C_M + C_S) \cdot u$$

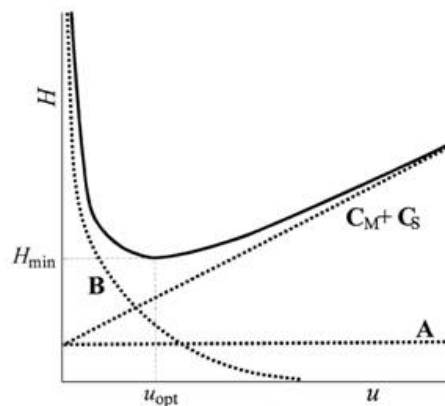
C_M ... konstanta závislá na difúzním koeficientu analytu v mobilní fázi

C_S ... konstanta závislá na difúzním koeficientu analytu ve stacionární fázi

u ... rychlost průtoku mobilní fáze

Z výše uvedených vztahů lze sestavit souhrnnou rovnici pro celkové rozmytí zón:

$$H = \lambda \cdot d_p + \gamma \cdot D_m / u + (C_M + C_S) \cdot u = A + B/u + C \cdot u$$



Obr. 1: Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra (H) na lineární průtokové rychlosti mobilní fáze (u). Výsledná křivka je součtem příspěvků členů A, B a C [1].

V roce 1964 představil Američan J. Calvin Giddings svoji novou teorii, která svým způsobem navazuje na Dynamickou van Deemterovu teorii. Jednoznačnou výhodou jeho teorie vzhledem k Deemterově teorii je fakt, že lépe specifikuje vztahy pro kapalinovou chromatografii. Giddingsova teorie je modifikací Dynamické van Deemterovy teorie, která lépe vystihuje vztahy v kapalinové chromatografii. Podle Giddingsovy teorie je rozmývání chromatografických zón způsobeno následujícími, prakticky stejnými, kinetickými ději, které uvažuje i Deemterova teorie: **vířivá difúze analytu v mobilní fázi, odpor proti převodu hmoty v mobilní fázi, molekulární difúze v mobilní fázi, odpor proti převodu hmoty ve stacionární fázi a odpor proti převodu hmoty ve stagnující mobilní fázi.**

Giddingsova rovnice pro účinnost chromatografického systému je následující:

$$H = 1/[(\lambda \cdot d_p) + D_m / (\omega \cdot d_p^2 \cdot u)] + \gamma \cdot D_m / u + (\omega_s \cdot d_p^2 / D_m + \omega_{sm} \cdot d_p^2 / D_m) \cdot u$$

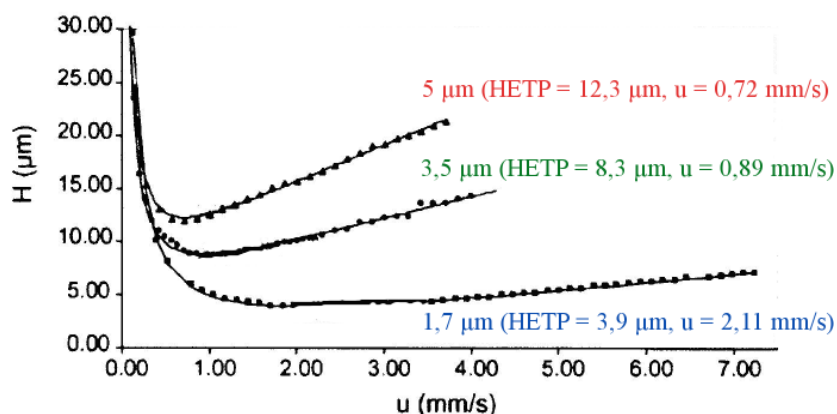
vířivá difúze	odpor proti převodu hmoty v mobil. fázi	molekulární difúze	odpor proti převodu hmoty ve stacionární a stagnující mobilní f.
---------------	--------------------------------------------	-----------------------	---------------------------------------------------------------------

ω ... koeficient závislý na distribuci tvaru částic, velikosti částic a také distribuci pórů

Jednotlivé členy včetně jejich charakterizace vycházejí z van Deemterových rovnic.

2.1.2. Knoxova teorie²

Podle Knoxovy teorie lze říci, že malé částice, které tvoří stacionární fázi v chromatografické koloně, umožňují zvýšit účinnost chromatografického procesu, umožňují lépe pracovat při optimální průtokové rychlosti mobilní fáze a zlepšují vlastnosti systému ve smyslu přenosu hmoty. Čím menší částice jsou použity (5, 3,5, 1,7 μm), tím lepší jsou vlastnosti daného systému. Malé částice způsobují v systému zvýšení tlaku, a proto musí být systém včetně kolon tomuto tlaku přizpůsoben. S použitím sub-2 μm částic je možno dosáhnout vysoké účinnosti separace při kratší době analýzy. Knoxovu teorii dobře vystihuje následující graf:



Obr. 2: Výše uvedený graf znázorňuje závislost HETP (účinnosti chromatografického systému) na lineární průtokové rychlosti mobilní fáze. Jedná se o vliv velikosti částic na průběh tzv. Knoxových křivek při stejných rozměrech kolony [6].

Z grafu je patrné, že se snižující se velikostí částic stoupá hodnota optima průtokové rychlosti mobilní fáze a potažmo i rychlost celé analýzy. Je dokonce možné pracovat při vyšších průtokových rychlostech, než jsou optimální, bez významné ztráty účinnosti, protože převod hmoty je u 1,7 μm částic usnadněn a Knoxova křivka má plošší tvar.

Stejně Knoxovy křivky lze znázornit za použití tzv. **redukovaných parametrů h** a **v**, které jsou zahrnuty do tzv. **Knoxovy rovnice** ve tvaru:

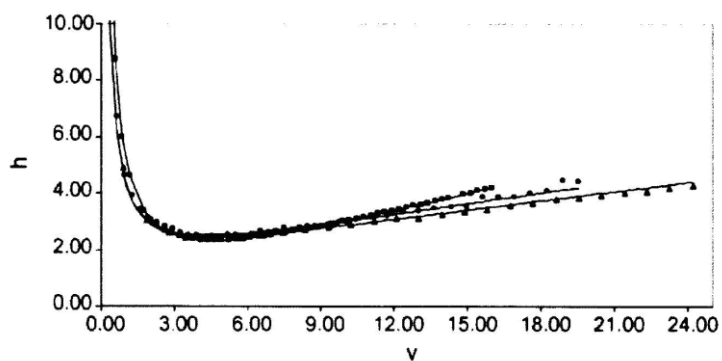
² Kapitola 2.1.2. byla vypracována ze zdroje [6].

$$h = Av^{1/3} + \frac{B}{v} + Cv$$

kde **A**, **B** a **C** jsou systémové konstanty, **h** je hodnota redukováného HETP a **v** je hodnota redukováné rychlosti průtoku mobilní fáze.

Ve výše uvedené rovnici jsou parametry **A**, **B** a **C** systémové konstanty vycházející z van Deemterovy teorie a jsou určeny velikostí rozšiřující se zóny způsobené vířivou difúzí, molekulární difúzí a odporem proti převodu hmoty. Parametr **A** je závislý jednak na kvalitě plnění kolony a také na příspěvku pomalého převodu hmoty přes nosný proud mobilní fáze. V případě špatně plněné kolony bude mít parametr **A** vyšší hodnotu (2-5) a v případě dobře naplněné kolony bude nabývat parametr **A** hodnot nižších (0,5-1). V případě nízkých hodnot parametru **v** druhý příspěvek (B/v) je převládající, zatímco třetí člen Cv se stává převládajícím v případě vyšších hodnot parametru **v**. Parametr **B** je závislý na retenci analytu a je ovlivněn molekulární difúzí. Parametr **B** může dosahovat hodnot vyšších než 5, ale obvykle mu autoři připisují hodnotu 2. Parametr **C** vyjadřuje efekt odporu proti převodu hmoty jednak ve stagnující mobilní fázi, ale také ve stacionární fázi a je kritický pro dobrou účinnost obzvláště při vysokých redukováných lineárních rychlostech. Uspokojivá hodnota parametru **C** pro kvalitní náplň kolony je zhruba 0,1.

Následující graf znázorňuje tři Knoxovy křivky, které se téměř překrývají nezávisle na velikosti částic stacionární fáze. Tyto překrývající se křivky ukazují, že náplňový materiál v koloně a chromatografické podmínky jsou si podobné.



Obr. 3: Efekt 5, 3,5 a 1,7 μm částic na redukované Knoxovy křivky [6].

2.2. Chromatografické metody

2.2.1. Vývoj chromatografie v posledních desetiletích³

V posledních desetiletích byl vývoj chromatografických metod podmiňován především vzrůstajícími nároky na rychlost analýzy díky neustále se zvyšujícím počtům vzorků. Bylo nutno analyzovat velký počet vzorků za co nejkratší dobu s co nejvyšším rozlišením, účinností a citlivostí. Ještě v nedávné době byla standardní doba analýzy kolem 10 minut, což je na vzrůstající nároky poměrně dlouhá doba. Bylo tedy nutné vyvinout rychlejší metody, které by byly časově méně náročné a doba analýzy by se pohybovala v rozmezí od 1 do 5 minut.

V devadesátých letech bylo zjištěno, že jedním z nejjednodušších způsobů, jak dosáhnout kratších analytických časů, je použití kratších kolon o délce 3 - 5 cm a vysokých průtokových rychlostí mobilní fáze. Kolony byly naplněny částicemi o průměru 3 - 3,5 μm a umožňovaly kromě zkrácení doby analýzy i generování nižších zpětných tlaků, které byly kompatibilní s vysokými průtokovými rychlostmi mobilní fáze. Později bylo zjištěno, že kratší délka kolony negativně působí na účinnost separace a tudíž i na účinnost chromatografického procesu. V roce 1998 provedl Mutton separaci směsi látek v gradientovém módu na dvou kolonách o různé délce. První separaci provedl na konvenční koloně (4,6 x 150 mm) a druhou provedl na koloně kratší (4,6 x 33 mm). Obě kolony byly naplněny částicovou stacionární fází o průměru 3 μm . Doba analýzy na delší koloně byla 40 minut, zatímco u kratší kolony bylo dosaženo času pouze 3,5 minuty a rychlost průtoku mobilní fáze vzrostla z 1 na 2,5 ml/min. Bohužel bylo prokázáno, že kratší kolona poskytuje nižší rozlišovací schopnosti než kolona konvenční. Později se ukázalo, že připojení hmotnostního spektrometru jako detektoru a chromatografického systému s kratší kolonou je řešením problémů s nízkým rozlišením. Takto byla úspěšně provedena analýza pesticidů v ovoci a zelenině za použití 10 mm kolony ve spojení s ESI/MS/MS.

³ Kapitola 2.2.1. byla vypracována ze zdroje [7].

Další možností, jak zlepšit chromatografické podmínky, bylo použití monolitických kolon místo kolon plněných porézními částicemi. Monolity na silikagelovém nebo polymerním základě, vyvinuté v minulém desetiletí, mohly akceptovat 3 až 10krát vyšší průtokové rychlosti při zachování konvenční délky kolony bez generování vysokých zpětných tlaků. Navíc byla jejich účinnost a rozlišovací schopnost srovnatelná s kolonami, které byly plněny křemíkovými částicemi o průměru 3 μm . Jejich dobré vlastnosti byly dány přítomností tzv. makro a mezopórů ve struktuře stacionární fáze. Monolity vyrobené z křemíku poskytovaly lepší chromatografickou účinnost než monolity z organických polymerů. Za použití těchto kolon byly analýzy provedeny během několika minut a někdy i během pár sekund. Některé typy monolitických kolon mohly být spojeny za sebou do série, což umožnilo ještě zvýšit účinnost chromatografického procesu. Těchto výhod se i dnes hojně využívá v oblasti proteomických a metabolomických analýz. Nicméně monolitické kolony měly a mají své nevýhody. Jistým omezujícím faktorem je nedostatek komerčně dodávaných stacionárních fází pro různé typy analýz, což v důsledku znamená omezené použití monolitických kolon. Silikagelové monolity jsou použitelné pouze v rozmezí pH od 2 do 8, což může při určitých typech analýz působit jisté problémy. Nevýhodou jsou velké vnitřní průměry některých monolitických kolon, které nejsou plně kompatibilní s MS a způsobují zvýšenou spotřebu organických rozpouštědel. Nicméně kapilární monolitické kolony výše uvedené problémy eliminovaly.

Jednou z dalších alternativ, která umožnila zkrátit dobu analýzy byla Vysokoteplotní kapalinová chromatografie (HTLC), kde je teplota při analýze vyšší než 60 °C. Metodika HTLC využívala kolony o konvenční délce a umožňovala pracovat za nízkých zpětných tlaků. Pro HTLC byla typická snížená viskozita mobilní fáze. Se vzrůstající teplotou stoupá i účinnost a průtoková rychlost mobilní fáze. V roce 2000 Yang a kol. provedli separaci pěti alkylfenonů při teplotě 150 °C. Analýza trvala pouze 20 sekund. V případě konvenční HPLC tato analýza trvala 20 minut. Velkou výhodou HTLC bylo to, že se vzrůstající teplotou klesala hodnota dielektrické konstanty vody, což umožňovalo nahradit vodou velkou část ekologicky nešetrných organických rozpouštědel v mobilní fázi. V dnešní době se technika HTLC běžně nepoužívá díky některým nevýhodám. Prvním problémem byla omezená použitelnost náplňových materiálů, které by byly stabilní při vysokých teplotách. Další nevýhodou bylo to, že se

špatně analyzovaly tepelně nestálé látky a navíc bylo pro tuto metodiku zapotřebí speciálního zařízení, které prudce zahřívá a ochlazuje mobilní fázi.

Již od počátku vývoje kapalinové chromatografie byla snaha stále zlepšovat separaci látek na koloně ve smyslu vyšší rozlišovací schopnosti, produktivity, účinnosti a kratší doby analýzy. Už v padesátých letech se ukázalo, že na tyto chromatografické parametry má zásadní vliv velikost náplňových částic v koloně. Čím byl menší průměr částic, tím lepších vlastností separace bylo dosaženo. V historii vývoje kapalinové chromatografie hraje důležitou úlohu postupné snižování průměru částic, a to od těch prvních, které měly velké průměry (100 – 200 μm) a byly vyvinuty už v padesátých letech, až k těm, které byly vyvinuty poměrně nedávno a nazývají se sub-2 μm částice.

Na počátku 70. let dospěl vývoj velikosti částic až k hodnotám kolem 10 μm (viz. tab. 1). Jedná se o silikagelové částice, které nahradily některé nedostatky dříve používaných větších částic. V 80. letech byly standardně používány částice o průměru 5 μm a na počátku 90. let byly vyvinuty částice o velikosti 3 – 3,5 μm . Později se ukázalo, že za použití 3 μm částic došlo ke zkrácení času analýzy o 30 – 50 % vzhledem k 5 μm částicím. V roce 1996 byly představeny neporézní silikagelové částice o průměru 1,5 μm . Kolony plněné tímto materiálem mohly pracovat v širších rozmezech průtokových rychlostí mobilní fáze, byly více stabilní při vyšších teplotách a odolávaly vyšším tlakům. Kvůli menší ploše neporézních částic v koloně docházelo ke zkrácení retenčních časů v porovnání s porézními částicemi. Proto se dnes tyto částice využívají zejména při separaci makromolekulárních směsí, které pomaleji difundují v mobilní fázi.

History of particles size in LC.		
Years	Particle size	Plates/15 cm
1950s	100 μm	200
1967	50 μm	1000
1972	10 μm	6000
1985	5 μm	12 000
1992	3–3.5 μm	22 000
1996	1.5 μm	30 000
2000	2.5 μm	25 000
2004	1.7 μm	30 000

Tab.1: Historie vývoje velikosti částic [7].

V roce 2004 představila firma Waters první kolonu plněnou porézními silikagelovými částicemi o průměru 1,7 μm , která dosahovala lepších rozlišovacích schopností, než kolony plněné 5 nebo 3,5 μm částicemi. Tyto kolony jsou dnes využívány v chromatografickém systému UPLC od firmy Waters, který je dobře uzpůsoben vysokým tlakům, které díky malým průměrům částic v systému vznikají. V dnešní době existuje mnoho výrobců kolon se sub-2 μm částicemi (viz. tab. 2).

Sub-2 μm supports commercially available		
Manufacturers	Column name	Particle size (μm)
Agilent	Zorbax RRHT	1.8
Alltech	Alltima, Platinum, ProSphere	1.5
Bischoff	ProntoPEARL sub-2 TPP Ace	1.8
Interchim	TSKgel Super-ODS	2.0
Macherey Nagel	Nucleodur	1.8
Sepax	GP Series	2.0
Shimadzu	Pathfinder	1.5
ThermoElectron	Hypersil GOLD	1.9
Waters	ACQUITY BEH	1.7
YMC	YMC ultra-Fast	2.0

Tab. 2: Přehled výrobců a názvů sub-2 μm kolon [7].

2.2.2. Ultra High Performance Liquid Chromatography⁴

Ultra High Performance Liquid Chromatography je relativně novou separační technikou v oblasti kapalinové chromatografie. Separační proces využívá sorbentů připravených patentovanou technologií, které vynikají svojí mechanickou pevností a mimořádnou separační účinností. Celý separační proces probíhá za velmi vysokých tlaků (1000 bar, 100 MPa). UHPLC přináší celou řadu předností vůči konvenční HPLC technice. Jedná se o kratší dobu analýzy, což má za následek zvýšení počtu analyzovaných vzorků za jednotku času. Jednou z výhod je i snížení spotřeby organických rozpouštědel, což znamená jednak nižší ekologickou zátěž a také snížení finančních nákladů na danou analýzu. Dalším významným aspektem je zvýšení separační účinnosti, rozlišení a zvýšení citlivosti. Díky možnosti spojení s MS a jinými typy detekce je možné získat i velké množství kvalitativních informací o analyzovaném vzorku. Kolony využívané v UHPLC metodice jsou plněny částicemi za ultra vysokého

⁴ Kapitola 2.2.2. byla vypracována ze zdrojů [7], [8], [9].

tlaku, který zaručuje optimální uchování částic sorbentu v těle kolony a jejich stabilitu. Koncové spoje kolon jsou přizpůsobeny dosahovanému vysokému tlaku. Velikost sub-2 μm částic poskytuje vyšší rozlišení z důvodu vyšší účinnosti kolony. Pro UPLC kolony od firmy Waters jsou v současné době k dispozici následující stacionární fáze: C18, C8, Shield RP18 (C18 se zabudovanou polární skupinou - karbamát), HILIC stacionární fáze atd. Každá stacionární fáze poskytuje rozdílné kombinace hydrofobicity, silanolové aktivity, hydrolytické stability a chemické interakce s analytem.

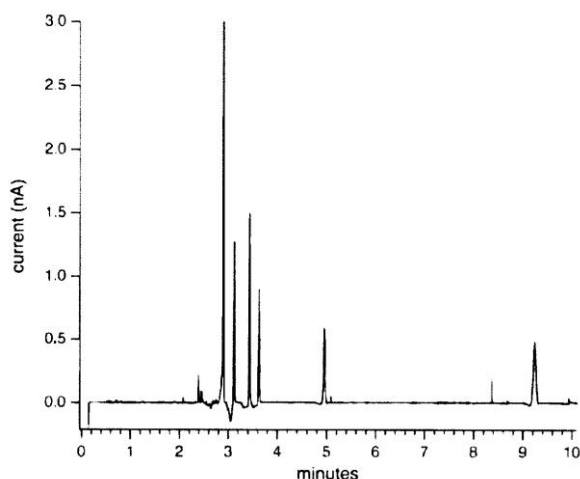


Obr. 4: UHPLC analytický systém doplněný o MS/MS typ detekce [9].

Moderní technika UHPLC je charakteristická tím, že pracuje za velmi vysokých tlaků v rozmezí od 400 do 1000 bar, protože za běžných hodnot tlaků při použití sub-2 μm částic by docházelo k poklesu účinnosti chromatografického procesu a nebylo by plně využito výhod těchto částic. Už od 60. let byla snaha vyvinout právě takovou techniku, která je schopna generovat vysoké tlaky a zároveň jim dobře odolávat. Teprve před několika lety Desmet a kol. při porovnávání účinnosti 4 kolon s různými náplňovými částicemi jasně prokázali, že nejlepších vlastností separace je dosaženo při použití sub-2 μm částic za velmi vysokých tlaků (kolem 1000 bar). Právě těchto poznatků využívá metodika UHPLC.

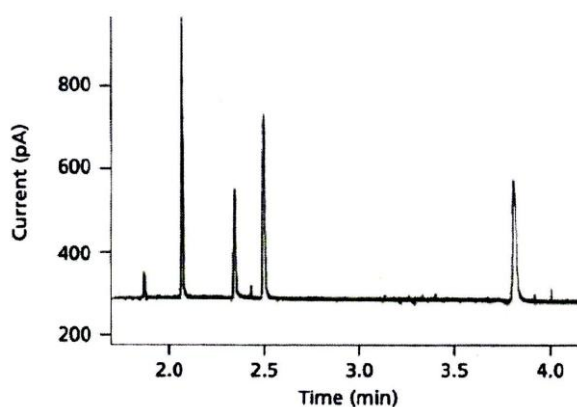
2.2.2.1. UHPLC analýzy prováděné za velmi vysokých tlaků

V roce 1997 byly provedeny první významné separace za tlaků vyšších než 4100 bar. Analýzy byly provedeny na kapilárních kolonách o rozměrech 52 cm x 30 μm , které byly plněny neporézními částicemi o průměru 1,5 μm . Bylo dosaženo počtu teoretických pater v rozmezí od 140 do 190 tisíc. Analýza byla provedena během 10 minut.



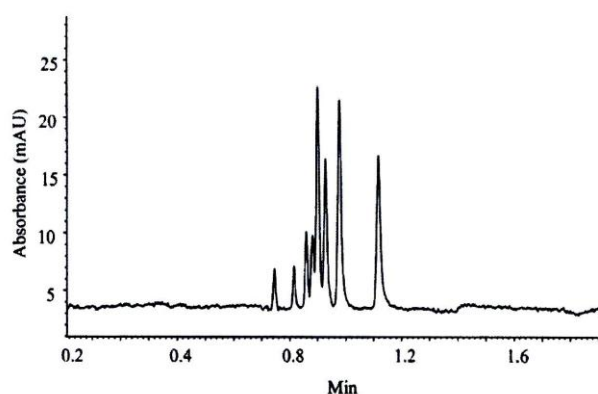
Obr. 5: UHPLC chromatogram z analýzy několika organických látek při tlaku 4100 bar na kapilární koloně (52 cm x 30 μm) plněné 1,5 μm neporézními částicemi [7].

V roce 2003 byla provedena první separace za tlaku 7000 bar, která probíhala na koloně o rozměrech 43 cm x 30 μm . Byly použity neporézní 1,0 μm částice. Čas potřebný pro analýzu byl zredukován na méně než 4 minuty s počtem teoretických pater mezi 190 a 300 000.



Obr. 6: Chromatografický záznam analýzy při tlaku 7000 bar [7].

V pozdější době Lee a kol. provedli UHPLC analýzu na kapilárních kolonách o rozměrech 12,5 cm x 29 μm plněných 1,5 μm neporézními částicemi. Vyvinuli systém schopný pracovat za tlaků vyšších než 3600 bar a separaci benzodiazepinů provedli za méně než 60 sekund. UHPLC systém byl navíc doplněn o ESI-TOF detekci. Kolony o různých rozměrech (13 – 15 cm x 29 – 100 μm) plněné 1,5 μm neporézními částicemi byly použity pro separace, které trvaly méně než 100 sekund s účinností v rozmezí od 20 do 30 000 teoretických pater. Jedná se tedy o kolony, které umožňují vysokou rychlost analýzy za poněkud nižší, ale stále dostačující účinnosti. Bylo prokázáno, že vysoká teplota snižuje viskozitu mobilní fáze, čímž se redukuje pokles tlaku a díky tomuto jevu je možno použít delší kolony a menší částice. Těchto vlastností vysoké teploty využil Lee a kol. při separaci benzodiazepinů. Při analýze byla použita kapilární kolona o rozměrech 14,5 cm x 50 μm plněná 1,0 μm neporézními zirkoniovými částicemi, které jsou stabilní za vysokých teplot. Separace byla provedena za méně než 1,2 minuty při teplotě 100 °C a tlaku 1480 bar.



Obr. 7: Chromatografický záznam analýzy benzodiazepinů při teplotě 100 °C a tlaku 1480 bar [7].

Důležitým aspektem pro provedení úspěšné separace při vysokém tlaku je kvalita a stabilita stacionární fáze. V minulosti mohly být použity v UHPLC technice pouze neporézní částice, které byly stabilní při vysokých tlacích. V pozdější době Mellors a Jorgenson porovnávali 1,5 μm porézní hybridní částice naplněné v 30 μm kapilární koloně od firmy Waters s 1,0 μm neporézními silikagelovými částicemi. Chromatografická účinnost byla hodnocena při tlacích vyšších než 4500 bar. Bylo prokázáno, že porézní hybridní částice jsou stejně stabilní při vysokých tlacích jako

částice neporézní. Tohoto poznatku využila firma Waters a v roce 2004 uvedla na trh jako první novou generaci kolon plněných 1,7 μm hybridními částicemi, které byly stabilní při tlacích vyšších než 1000 bar. Hybridní částice jsou vyráběny tzv. BEH technologií (bridged ethyl/siloxane silica hybrid technology). Tyto částice jsou mechanicky a chemicky odolné při extrémních hodnotách tlaku, teploty a pH (1 – 12). Úzká šíře distribuce velikosti částic přispívá k vyšší účinnosti kolony. Kolony plněné těmito částicemi mají delší životnost vzhledem k měnícím se fyzikálním a chemickým podmínkám a vydrží 1000 až 4000 nástřiků. Nicméně u těchto kolon byly pozorovány i občasné problémy, které se týkaly jejich ucpávání. V důsledku toho se v chromatografických záznamech objevovaly rozdvojené píky. Uvažuje se o tom, že tyto problémy mohou být způsobeny plněním procesem, kdy jsou do kolony vpravovány náplňové částice pod vysokým tlakem přesahujícím 2000 bar. Jednou z příčin problému mohou být i frity s porozitou menší než 1 μm .

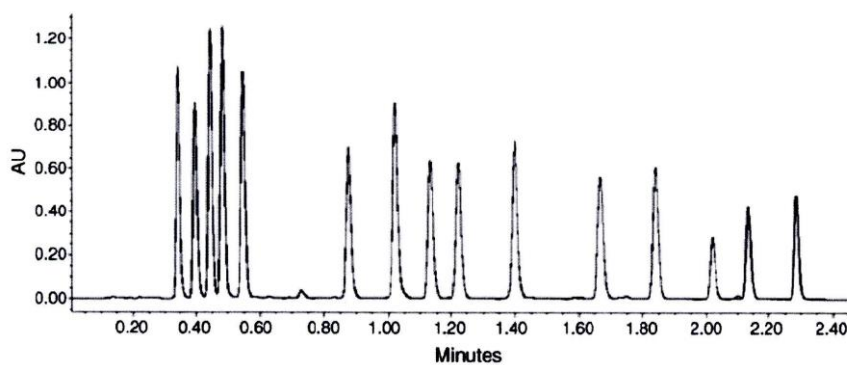
2.2.2.2. Dávkování vzorků za vysokých tlaků, moderní UHPLC instrumentace a její využití

Jedním z nejvíce problematických aspektů v UHPLC technice bylo dávkování vzorků za vysokých tlaků. Při použití tzv. „static split“ dávkovacího módu bylo sice dosaženo vysoké chromatografické účinnosti za použití kapilárních kolon při tlacích v rozmezí od 2700 do 5000 bar, nicméně se s tímto dávkovacím módem pojily i jisté problémy. Prvním nedostatkem byla nutnost dávkování vysokého objemu vzorku (100 – 1500 μl). Dalším problémem bylo to, že dávkovací proces trval 2 až 3 minuty a stával se nereprodukovatelným. V nedávné době byl testován nový dávkovací mód, který využívá tlaku odolný píst. Tato dávkovací technika je spolehlivější, ale vytváří větší disperzi vzorku, což částečně snižuje účinnost chromatografického systému.

Ve snaze vyhnout se výše jmenovaným problémům týkajících se především vysokých tlaků v chromatografickém systému, byla vyvinuta nová technika UHPLC, která pracuje za tlaků kolem 1000 bar. V roce 2004 uvedla firma Waters jako první na trh Acquity UPLC systém a v pozdější době se na trhu objevily i další systémy od různých firem. V dnešní době vyžadují UHPLC separace ne pouze systémy, které jsou odolné vůči vysokým tlakům, ale i systémy, které jsou schopné pracovat v rychlých a

ultra-rychlých módech za snížených objemů analytů a rozpouštědel. Ve spojení s těmito technikami jsou dnes používány kolony o průměru 1 nebo 2,1 mm, které limitují zahřívání mobilní fáze v důsledku tření a umožňují snížení spotřeby organických rozpouštědel. Pro provedení účinné a rychlé separace za použití moderních technik musí být splněny určité požadavky. Ve spojení s UHPLC metodikou je nutné používat takové detektory, které jsou schopné během velmi krátkého času zaznamenat velký počet bodů nutných k vytvoření chromatografického píku. Vzhledem k vysoké rychlosti analýz musí být injikování vzorku prováděno rychlými dávkovacími cykly. Každé UHPLC zařízení musí být vybaveno vysokotlakou binární pumpou, která je schopna dokonale a reprodukovatelně pracovat za velmi vysokých tlaků až do hodnoty 1000 bar stejně jako autosampler. Dalším požadavkem je použití nízkoobjemové detekční cely s dlouhou dráhou pro světelný paprsek či minimalizování systémových objemů.

V dnešní době se UHPLC technika využívá pro různé typy analýz. Jedná se například o farmaceutickou, environmentální, potravinovou či forenzní analýzu. Za využití UHPLC se analyzují drogy, metabolity a jiné biologicky aktivní látky. Metodika UHPLC je dnes především díky své vysoké citlivosti používána i v moderních oborech jako je například genomika či proteomika. Ve všech typech analýz jsou využity výhody UHPLC metodiky, které se týkají především vysoké rychlosti a účinnosti separace v porovnání s konvenční HPLC technikou. Typická rychlá separace za využití UHPLC techniky byla například provedena v oblasti forenzní analýzy, kde krátký čas analýzy hraje důležitou roli. Jednalo se o analýzu 15 analogů anabolických steroidů. Separace byla provedena za 2,5 minuty za použití 30 mm kolony plněné 1,7 μm částicemi.



Obr. 8: UHPLC chromatogram z analýzy 15 analogů anabolických steroidů při tlaku 500 bar [7].

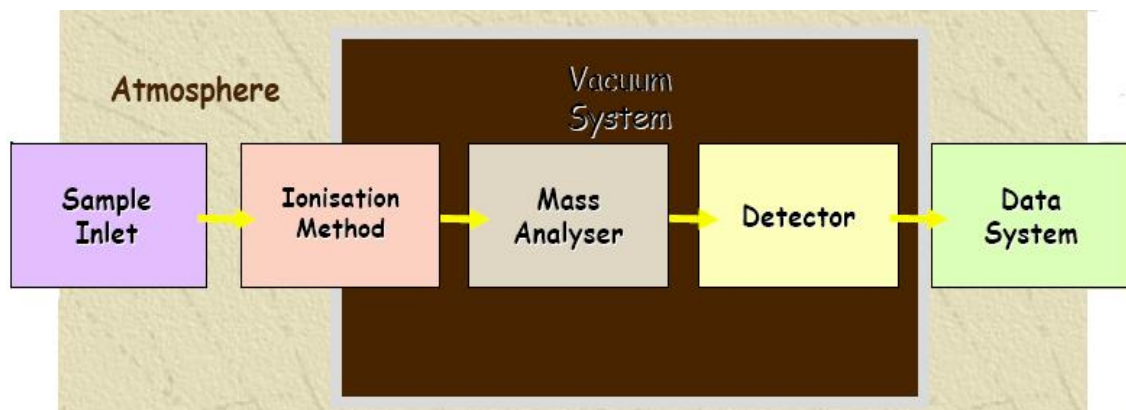
V poslední době se stále více uplatňuje technika UHPLC i v oblasti environmentální a potravinové analýzy. UHPLC – MS/MS metodiky jsou dnes běžně používány pro analýzu pesticidů. Před několika lety byla například vyvinuta technika pro screening 16 různých pesticidů v dětských potravinách, které jsou vyrobeny ze zeleniny, ovoce a cereálií. Metoda je schopna stanovit koncentrace pesticidů od hodnoty 1 µg/kg. Chromatografická separace je provedena 2,5 krát rychleji v porovnání s konvenční HPLC technikou. V pozdější době byla provedena analýza pesticidů v podzemních vodách v koncentračním rozmezí od 0,11 do 7,8 ng/l za méně než 5 minut. UHPLC technika se v dnešní době používá také pro analýzu kosmetických produktů, barviv nebo i výbušnin.

2.2.3. Hmotnostní spektrometrie⁵

Hmotnostní spektrometrie (MS) je fyzikálně-chemická metoda, která využívá elektrická a magnetická pole. Určuje hmotnosti atomů, molekul a molekulových fragmentů po jejich převedení na ionty. V přístroji, který se nazývá hmotnostní spektrometr, probíhá separace plyných iontů ve vakuu podle poměru jejich hmotnosti a náboje. Každý přístroj obsahuje iontový zdroj, který převádí neutrální i nabitě látky na ionty v plynné fázi. Hmotnostní analyzátor provádí separaci iontů podle poměru m/z a detektor detekuje vznikající ionty. MS vypovídá o primární struktuře analyzované látky, ale neposkytuje informace o sekundární či terciální struktuře proteinů. MS odhaluje posttranslační a chemické modifikace proteinů, např. fosforylace, glykosylace či oxidace a může určit i místo modifikace. Může určit izotopový poměr prvků ve vzorku např. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ – kvantifikace. Hmotnostní spektrometrie umožňuje analýzu komplexních směsí, nekovalentních komplexů či identifikaci proteinů a používá se též ve stopové analýze. Pomocí této techniky se také odhalují mutace a sekvenační chyby na molekule DNA. Nespornými výhodami hmotnostní spektrometrie jsou citlivost, specificita, rychlost, malé množství dávkovaného vzorku a jednoduchá interpretace dat.

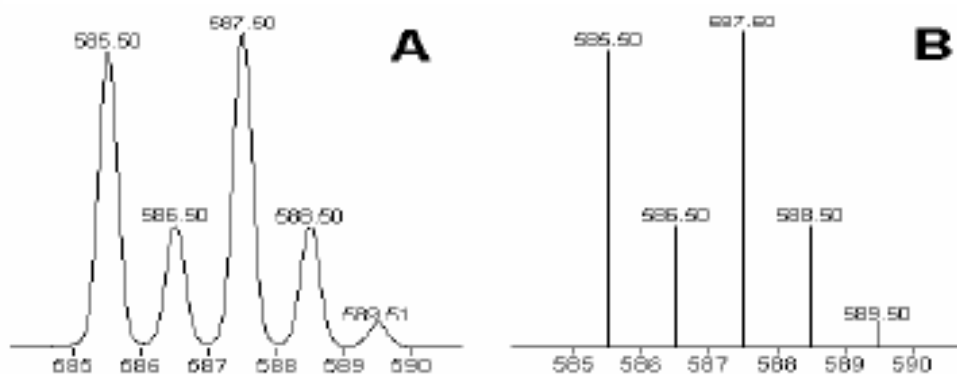
⁵ Kapitola 2.2.3. byla vypracována ze zdrojů [10], [11], [12], [13], [14], [15], [16], [17], [18], [19], [20].

V současnosti se hmotnostní spektrometr používá především jako velmi citlivý detektor ve spojení s různými separačními technikami jako jsou například vysokoúčinná kapalinová chromatografie, kapilární elektroforéza, plynová chromatografie a dnes také UHPLC. UHPLC – MS metodika vyniká především vysokou citlivostí a rychlostí analýzy.



Obr. 9: Schéma hmotnostního spektrometru [10].

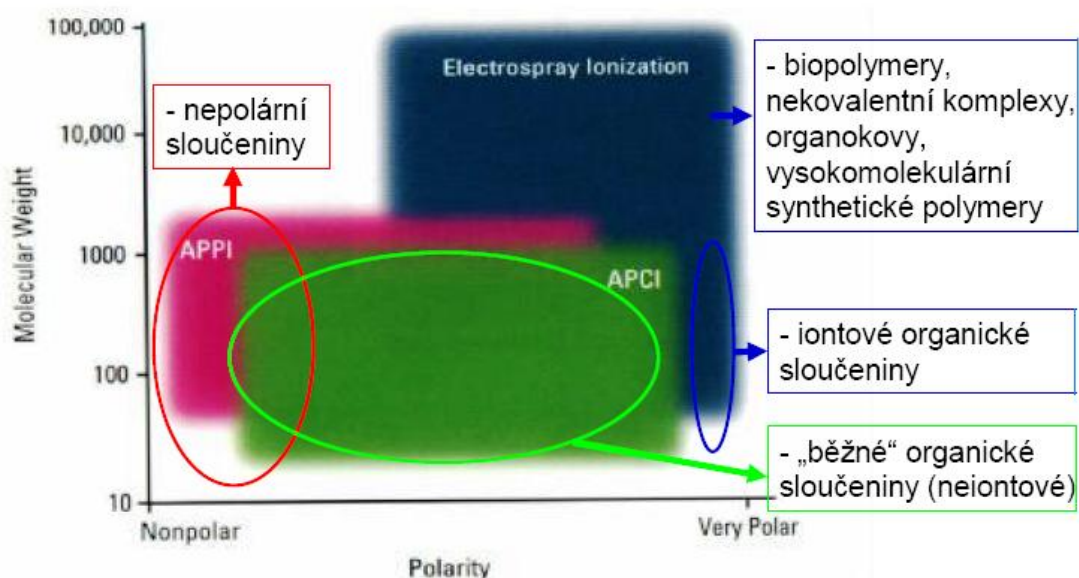
Hmotnostní spektrum je grafické znázornění závislosti intenzity iontů na jejich poměru hmotnosti ku náboji (m/z). Takzvané kontinuální (profilové) spektrum je záznamem přímo z detektoru a umožňuje odečíst šířku píku (A). Centroidové spektrum je spektrum, které je převedeno na sloupcový graf, kde poloha m/z signálu je odečtena v těžišti píku a intenzita odpovídá ploše nebo výšce píku (B). Centroidové spektrum je přehlednější. Spektra jsou většinou normalizována a intenzity (osa y) jsou 0 – 100%.



Obr. 10: Kontinuální (A) a centroidové (B) hmotnostní spektrum [13].

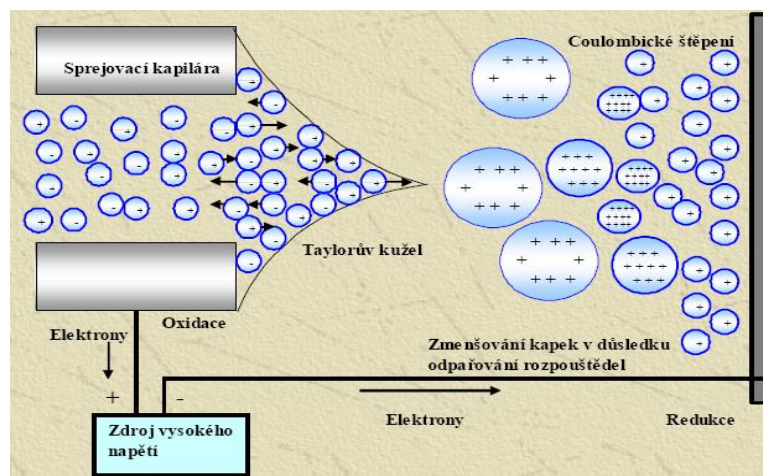
2.2.3.1. Přehled konvenčních ionizačních technik

Vzhledem ke skutečnosti, že v hmotnostní spektrometrii je prováděna manipulace s látkami pomocí elektrického nebo magnetického pole, je potřeba z neutrálních molekul vytvořit ionty. Existuje celá řada ionizačních technik, které toto umožňují. Rozdělují se na měkké a tvrdé ionizační techniky. U měkkých technik je nízká ionizační energie a tedy energetický přebytek dodaný molekule je malý. U těchto technik dochází k vytváření převážně molekulárních nebo quasimolekulárních iontů. Výtěžnost ionizace a tvorba aduktů velmi závisí na zvolených podmínkách (složky mobilní fáze, matrice, pH atd.) Mezi konvenční měkké ionizační techniky patří ESI, APCI, FAB, SIMS, MALDI, CI, FI, FD, TSI aj. (zkratky jsou vysvětleny v seznamu použité literatury). Při použití tvrdých ionizačních technik obsahují spektra ve větší míře fragmenty a tvoří se maximálně molekulární ionty. U těchto technik je dodaná energie vyšší než u technik měkkých. Při zvolené ionizační energii vznikají reprodukovatelná spektra, ze kterých se vytvářejí tzv. knihovny, které následně umožňují snadnější identifikaci látek. Mezi konvenční tvrdé ionizační techniky patří především EI.



Obr. 11: Možnosti uplatnění ionizačních technik vzhledem k polaritě analyzovaných látek a jejich molekulové hmotnosti [17].

Technika **ESI** (electrospray ionization) je jednou z nejvíce využívaných ionizačních technik ve spojení s kapalinovou chromatografií. Jedná se o měkkou ionizační techniku v kapalně fázi za atmosférického tlaku. V ionizační technice ESI dochází ke sprejování vzorku rozpuštěného v kapalně fázi kapilárou, na kterou je vloženo vysoké napětí (kV). Postupnými coulombickými explozemi a odpařováním rozpouštědla vznikají nabité kapky a dochází k desorpci iontů. ESI umožňuje ionizaci semipolárních a polárních analytů v široké škále molekulových hmotností. Vyžaduje alespoň částečně polární rozpouštědla jako donory protonů. Umožňuje analýzy relativně velkých molekul (kDa) i při použití analyzátoru s omezeným rozsahem hmotností.



Obr. 12: Schéma ionizační techniky ESI [10].

V měkké ionizační technice **APCI** (chemická ionizace za atmosférického tlaku) je vzorek přiveden do vyhřívané části iontového zdroje (300-600 °C), kde je odpařen společně s rozpouštědlem. Ionizace probíhá díky koronovému výboji, který vzniká pomocí jehly, na kterou je vloženo vysoké napětí. Ionizace analytu probíhá prostřednictvím ionizace nosného plynu, složek mobilní fáze a následně analytu. Jedná se o výše energetickou ionizaci oproti elektrospreji, kde získaná spektra obsahují více fragmentů. APCI umožňuje ionizaci nepolárních látek v méně polárních rozpouštědlech.

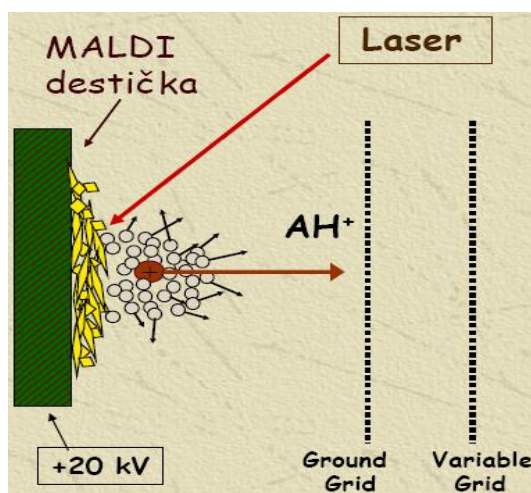
FAB (ionizace urychlenými atomy) je měkká ionizační technika, kde je vzorek nanesen společně s matricí (glycerin, thioglycerin, 2-nitrobenzylalkohol, triethylamin,...) na vzorkovací terčík. Vzorek je ionizován proudem urychlených atomů Xe nebo Ar, v

iontovém zdroji vznikají xenonové ionty, které jsou urychleny a srážkami s neutrálními molekulami Xe jim předají kinetickou energii. Při použití iontů Cs^+ místo neutrálních Xe (Ar) se technika nazývá ionizace urychlenými ionty **FIB**.

Tvrdá ionizační technika **EI** (elektronová ionizace) představuje ionizaci svazkem elektronů emitovaných z wolframového nebo rheniového vlákna. Používá se ionizační energie 5-100eV. Je to ionizační technika, která je velmi často využívána ve spojení s plynovou chromatografií. EI se používá především pro zjištění strukturních informací o malých molekulách.

V měkké ionizační technice **CI** (chemická ionizace) je vzorek ionizován ionty reakčního plynu, které jsou vytvořeny ionizací EI v iontovém zdroji. Jako reakční plyn se používá methan, propan, dusík, methanol, acetonitril nebo amoniak. Díky relativně vysoké energii iontů reakčního plynu se mohou ve spektru nacházet i fragmentové ionty. Citlivost a míru fragmentace lze výrazně ovlivnit volbou podmínek.

Ionizace laserem za účasti matrice **MALDI** je měkká ionizační technika, kde jsou látky nanášeny společně s matricí na terčik. Zde dochází ke kokrytalizaci analytu a matrice. Jako matrice je volena látka, která absorbuje energii laseru a následně ionizuje analyt. Jedná se například o kyselinu α -hydroxyskořicovou či o kyselinu sinapovou. MALDI technika umožňuje ionizovat látky velkého rozsahu molekulových hmotností, a proto umožňuje analyzovat i velké molekuly proteinů.



Obr. 13: Schéma techniky MALDI [10].

Ionizace termosprejem **TSI** byla první ionizační technika speciálně navržena pro spojení HPLC/MS a dnes je překonána technikou ESI. Je to šetrná ionizační technika. Molekuly analytu rozpuštěné ve vhodném rozpouštědle se přivádí kovovou kapilárou do iontového zdroje. Na konci je kapilára vyhřívána v termostatovaném měděném bloku na teplotu 150 – 300°C, čímž dojde k částečnému odpaření rozpouštědla již v kapiláře a tím ke vzniku nadzvukového proudu par částečně odpařeného rozpouštědla a zbylých malých kapiček obsahujících analyzované molekuly. Vzniklé malé kapičky nesou na svém povrchu náboj, jehož povrchová hustota postupně vzrůstá s dalším odpařováním rozpouštědla z povrchu kapiček. Jakmile hustota povrchového náboje dosáhne určité kritické hodnoty, dojde k tzv. Coulombické explozi. Proces Coulombických explozí a odpařování rozpouštědla z povrchu kapiček se opakuje tak dlouho, až je kapička dostatečně malá a může dojít k uvolnění (desorpci) protonované či deprotonované molekuly z jejího povrchu.

Při ionizaci polem **FI** musí být analyzované molekuly před ionizací v plynné fázi. V iontovém zdroji je anoda (emitor) tenký drátek nebo břit z wolframu. Vysokým vloženým napětím (5-20 kV) se na špičce či břitu vytvoří velice vysoký potenciálový gradient, který umožní protunelování nejméně vázaného elektronu pryč z molekuly a jeho záchytu na anodě. Dnes se tato technika nevyužívá vzhledem k malé citlivosti, tvorbě elektrických oblouků a křehkosti anody a je překonána novějšími ionizačními technikami (MALDI, APCI, atd.).

Desorpce polem **FD** je technika analogická k FI, ale analyzované molekuly jsou naadsorbovány na povrchu emitoru, nikoliv v plynné fázi. Emitor je drátek s elektrochemicky vyloučeným uhlíkem, na který je nanesen vzorek v roztoku a odpařen. Poté je emitor se vzorkem zanesen do zdroje a vysokým potenciálovým spádem je vytržen elektron. Jedná se o šetrnou ionizační techniku.

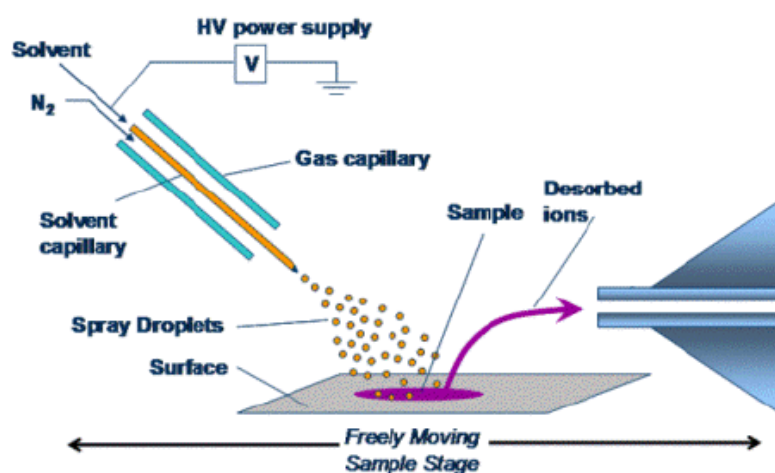
2.2.3.2. Přehled novějších ionizačních technik

Novější ionizační techniky používané v oblasti MS dovolují provádění přímých analýz různých typů vzorků za běžných laboratorních podmínek. Tyto techniky jsou typické tím, že vyžadují minimální nebo žádnou úpravu vzorků před vlastní MS analýzou a umožňují tak zjednodušení práce se vzorky. Od roku 2004, kdy byla představena technika DESI (desorption electrospray ionization) a od roku 2005, kdy byla zavedena metodika DART (direct analysis in real time), začal významný rozvoj těchto i dalších nových ionizačních technik. Všechny nové ionizační techniky v podstatě umožňují analyzovat vzorky přímo v jejich původním stavu a není nutné pro ionizaci používat vakuové prostředí v iontovém zdroji. Nové ionizační techniky se rozdělují na dvě základní skupiny podle toho, jaká původní technika hraje klíčovou úlohu v celkové ionizaci vzorku. První skupina zahrnuje techniky, které souvisejí s konvenční technikou ESI. Jedná se o tyto techniky: DESI, DESSI, SSP, ELDI, MALDESI, LAESI aj. Do druhé skupiny se řadí techniky související s metodikou APCI. Jsou to následující techniky: DAPCI, ASAP, DART, DBDI, HAPGDI, PADI aj. (vysvětlení zkratk viz. následující tabulka).

Technique	Acronym	Date
Desorption Electrospray Ionization	DESI	2004
Surface Sampling Probe	SSP	2004
Direct Analysis in Real Time	DART	2005
Ambient Solid Analysis Probe	ASAP	2005
Electrospray Laser Desorption/Ionization	ELDI	2005
Fused Droplet Electrospray Ionization	FD-ESI	2005
Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization	DAPCI	2005
MALDI Assisted Electrospray Ionization	MALDESI	2006
Extractive Electrospray Ionization	EESI	2006
Desorption Sonic Spray Ionization	DeSSI	2006
Plasma-Assisted Desorption/Ionization	PADI	2007
Dielectric Discharge Barrier Ionization	DBDI	2007
Helium Atmospheric Pressure Glow Discharge Ionization	HAPGDI	2007
Neutral Desorption Extractive Electrospray Ionization	ND-EESI	2007
Laser Ablation Electrospray Ionization	LAESI	2007
Atmospheric Pressure Thermal Desorption Ionization	APTDI	2007
Desorption Atmospheric Pressure Photo Ionization	DAPPI	2007

Tab. 3: Přehled nových ionizačních technik [16].

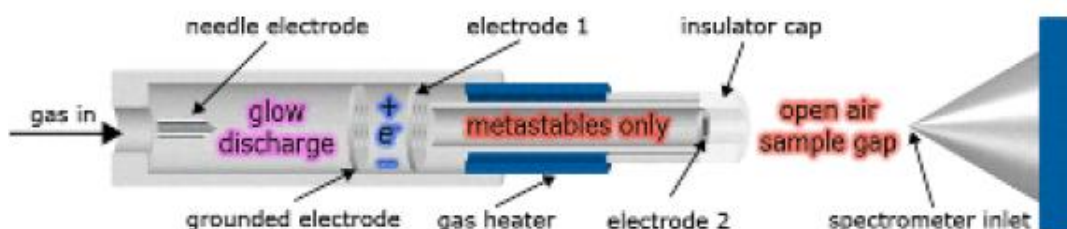
Jednou z nových základních ionizačních technik je technika **DESI** (desorpční ionizace elektrosprejem). Jedná se o techniku související s metodikou ESI a rozdílem oproti konvenční ESI technice je například to, že kapilárou je přiváděno, zmlžováno a ionizováno pouze rozpouštědlo. Vzorek je umístěn před špičkou DESI sondy pod vhodným úhlem ke sprejovací kapiláře a vstupu do MS. Výhodou je to, že lze použít vzorek bez jakékoliv úpravy. Například lze analyzovat kus rostlinné (např. list či jinou část rostliny) nebo živočišné tkáně (např. část kůže člověka nebo výřezy orgánů pokusných zvířat). Typickými aplikacemi DESI techniky jsou rychlé monitorování výbušnin, drog, sledování biologických markerů či prostorové zobrazení vybraných iontů (tzv. MS imaging).



Obr. 14: Schéma DESI techniky [15].

Ionizační techniky **ELDI** a **LAESI** kombinují laserovou desorpci s konvenční technikou ESI. Technika **MALDESI** vyžaduje přidání matrice ke vzorku před vlastní analýzou. V technice ELDI a MALDESI je využíván UV laser k desorpci analytu z povrchu vzorku, zatímco v technice LAESI je použit IR laser. Tyto techniky umožňují produkovat spektra, která jsou podobná ESI technice. V prvním kroku je použit laser k produkci iontů a volných neutrálních pevných částic z povrchu vzorku díky procesu zvaném „energy-sudden activation“. V druhém kroku je heterogenní shluk částic zachycen elektrosprejem. Neutrální molekuly a částice, které jsou dominantní frakcí desorbovaného shľuku, jsou pohlceny nabitými kapénkami stejně tak, jak se tomu děje i v technikách **EESI** a **FD-ESI**.

Jednou z nových technik souvisejících s konvenční APCI je technika **DART** (přímá analýza v reálném čase). Je to technika podobná DESI, kterou lze využít k analýze pevného, kapalného či plynného vzorku bez jakékoliv úpravy. DART technika má podobné aplikace jako DESI. Principem techniky DART je to, že reakční plyn helium nebo dusík jsou excitovány výbojem za vzniku metastabilních iontů a částic. Ionty jsou zachyceny na protielektrodě a s analytem interagují pouze excitované částice reakčního plynu helia podle následující rovnice: $\text{He}^* + \text{M} = \text{M}^+ + \text{He} + \text{e}^-$, která vyjadřuje mechanismus tzv. Penningovy ionizace. Kromě Penningovy ionizace dochází k dalším ion-molekulárním interakcím za vzniku obvyklých iontů se sudým počtem elektronů.



Obr. 15: Schéma techniky DART [15].

V technikách **PADI**, **HAPGDI**, **DAPCI**, **DBDI** a **ASAP** jsou formovány neutrální metastabilní částice pomocí elektrického výboje v plynu. Tyto částice reagují s molekulami vody a vzduchu a vznikají tak reaktivní ionty. V technice DAPPI vznikají primární metastabilní částice v důsledku fotoionizace. Elektrický výboj může mít podobu koronového výboje, jako je tomu v technikách DART, DAPCI a ASAP nebo podobu doutnavého výboje v technikách HAPGDI a PADI či podobu dielektrického bariérového výboje v technice DBDI. Koronové výboje jsou vytvářeny aplikací stejnosměrných napětí na elektricky vodivé jehly. V technikách HAPGDI a PADI jsou stabilní doutnavé výboje generovány za atmosférického tlaku pomocí aplikace stejnosměrných nebo střídavých proudů vkládaných na elektrody, které jsou umístěny v kontinuálním proudu plynu, nejčastěji hélia. V technice DBDI je aplikováno střídavé napětí mezi dvě elektrody, které jsou od sebe navzájem odděleny dielektrickou vrstvou.

2.2.3.3. Hmotnostní analyzátory

Hmotnostní analyzátory slouží k rozdělení iontů podle jejich poměru m/z . Kvalitu rozdělení iontů vyjadřuje rozlišovací schopnost. Hmotnostní analyzátor je vždy umístěn za iontovým zdrojem a před detektorem. Separace iontů podle poměru m/z lze například dosáhnout zakřivením dráhy letu iontů v magnetickém nebo elektrickém poli (**magnetické analyzátory**). **Kvadrupóly** a **iontové pasti** pracují na principu různé stability oscilací iontů v dvoj- nebo trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí. **Analyzátory doby letu (TOF)** využívají různou dobu letu iontů v oblasti bez pole. **Iontová cyklotronová rezonance (ICR)** pracuje na principu různé absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli.

Magnetický analyzátor s jednoduchou fokusací iontů ve svém principu využívá toho, že při průchodu magnetickým polem dojde k většímu zakřivení dráhy iontů s nižší hodnotou m/z . Dráhy těžších iontů se tolik nezakříví kvůli větší odstředivé síle těžšího iontu. Kladné ionty s určitou hodnotou m/z urychlené záporným potenciálem V vstupují do magnetického pole s magnetickou indukcí B , čímž dojde k zakřivení pohybu iontů na trajektorii o poloměru r . Při vstupu do magnetického pole ionty mají kinetickou energii E_K odpovídající $z \cdot V$ získanou v urychlujícím elektrickém poli bez ohledu na hodnotu m , takže platí:

$$E_K = z \cdot V = 1/2 m \cdot v^2,$$

kde v je rychlost urychleného iontu. V magnetickém poli působí na ion dostředivá síla $B \cdot z \cdot v$, která musí být v rovnováze s odstředivou silou $m \cdot v^2/r$, takže platí:

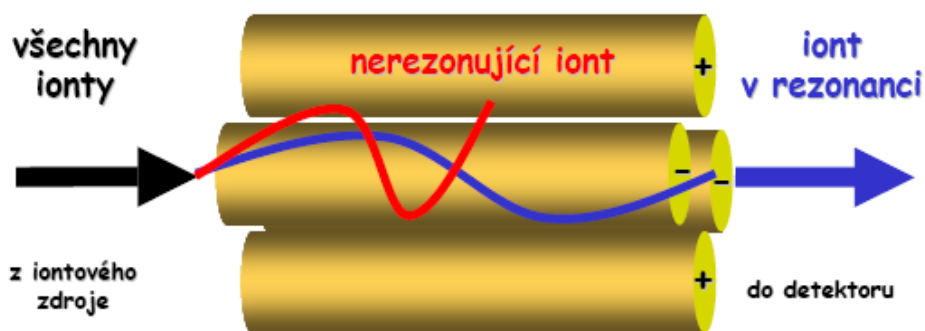
$$B \cdot z \cdot v = m \cdot v^2/r$$

Z výše uvedeného vztahu lze odvodit tzv. rovnici pro magnetický analyzátor:

$$m/z = B^2 \cdot r^2 / 2 \cdot V$$

Magnetický analyzátor s dvojitou fokusací iontů využívá mimo magnetické fokusace ještě elektrostatickou fokusaci iontů, čímž dojde k výraznému zvýšení maximální rozlišovací schopnosti z jednotek na desítky tisíc. Jestliže do elektrického pole v analyzátoru vstoupí ionty s různou E_k a m/z , dojde k zakřivení jejich dráhy v závislosti na jejich E_k bez ohledu na hodnotu m/z .

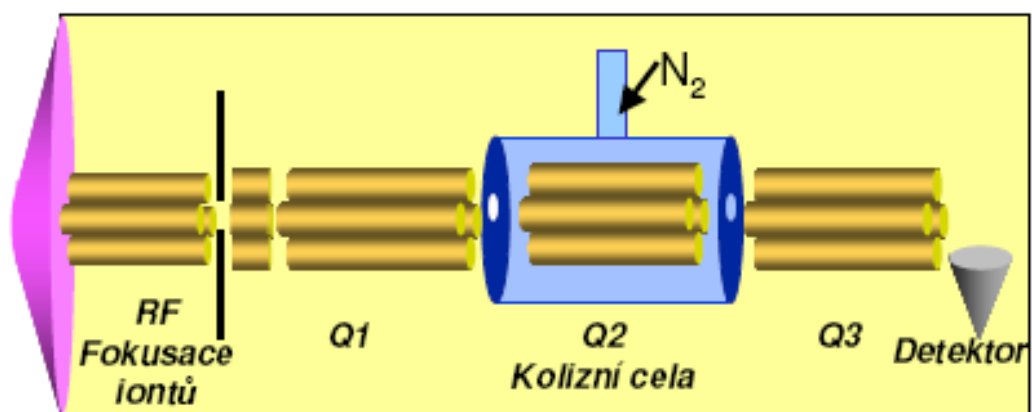
Kvadrupólový analyzátor je tvořen čtyřmi stejnými kovovými tyčemi kruhového průřezu délky 20 - 30 cm. Na dvě protilehlé tyče je vloženo kladné stejnosměrné napětí a na zbývající dvě záporné stejnosměrné napětí. Na všechny je superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí. Kvadrupól je velmi jednoduchý a relativně levný hmotnostní analyzátor, který se velice rozšířil zejména u tzv. stolních ("bench-top") hmotnostních spektrometrů pro spojení se separačními technikami (GC/MS, HPLC/MS). U kvadrupólového analyzátoru je ion přiveden do středu osy kvadrupólu a začne oscilovat. V daný časový okamžik při určitém poměru stejnosměrného napětí U a amplitudy V jsou oscilace stabilní pouze pro ion s určitou hodnotou m/z , který projde kvadrupólem a dostane se na detektor. Všechny ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu a plynulou změnou (skenováním) hodnot stejnosměrného napětí U a amplitudy V (jejich poměr zůstává konstantní) jsou postupně propuštěny na detektor všechny ionty (jedná se vlastně o hmotnostní filtr).



Obr. 16: Schéma kvadrupólového analyzátoru [19].

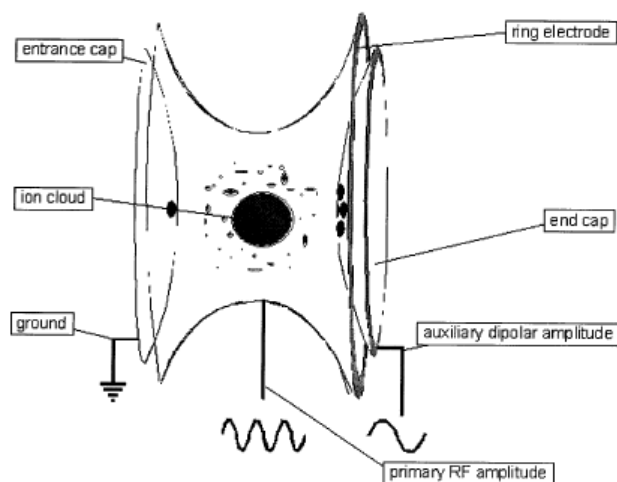
Trojítý kvadrupólový analyzátor je sestaven ze 3 jednotlivých kvadrupólů řazených za sebou, přičemž prostřední z nich (q_2) slouží jako kolizní cela. Zavedení kolizního plynu do q_2 způsobí kolizní aktivaci iontů vybraných kvadrupólovým

analyzátořem Q1 s kolizním plynem a jejich následnou fragmentací. Můžet docházet k opakovaným kolizním aktivacím díky opakovaným srážkám iontů (jak prekurzoru, tak i produktového iontu) a kolizního plynu. Trojitý kvadrupól se používá v MS/MS analýzách. Pro měření MS^3 by bylo nutné spojit 5 kvadrupólů za sebou QqQqQ, což se prakticky nepoužívá. Pro MS^n do vyššího stupně než MS^2 je výhodnější iontová past nebo iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR).



Obr. 17: Schéma trojitého kvadrupólu [19].

Iontová past (Ion Trap) je typ hmotnostního analyzátořu, kde jsou ionty pulzně přiváděny do pasti, kde jsou zachyceny, a potom jsou postupně vypuzovány na detektor podle jejich m/z . Jedná se v podstatě o trojrozměrný kvadrupól. Iontová past je složena ze 2 koncových elektrod a jedné kruhové elektrody. Iontová past může být lineární nebo sférická. Množství iontů dávkovaných do pasti musí být regulováno, protože v případě přeplnění pasti může dojít ke vzniku tzv. prostorového náboje, což se projeví horším rozlišením a citlivostí. Rozdíl mezi izotopickými píky bude mírně nižší než 1 a v mezním případě může nastat posun m/z k vyšším hodnotám. Prostorový náboj způsobí ovlivnění harmonického pohybu a rezonance iontů každé hodnoty m/z .



Obr. 18: Schéma iontové pasti [17].

U **analyzátoru doby letu (TOF)** se ionty s menší hodnotou m/z o stejné kinetické energii pohybují rychleji v oblasti bez pole, takže se rychleji dostanou na detektor. Jedná se o typicky pulzní hmotnostní analyzátor, protože nejdříve jsou velmi krátkým pulzem ionty urychleny na vstupu do analyzátorové trubice, a potom se přesně měří čas (řádově ns – ms), za který ionty „dolétnou“ k detektoru, podle čehož se určí jejich m/z . Skenování je velice rychlé a hmotnostní rozsah m/z není teoreticky omezen. Často se využívá tandemové spojení dvou analyzátorů doby letu (TOF-TOF). Při ionizaci získají ionty přibližně stejnou energii a jsou urychleny elektrickým potenciálem V , takže platí:

$$E_k = 1/2 m \cdot v^2 = z \cdot V$$

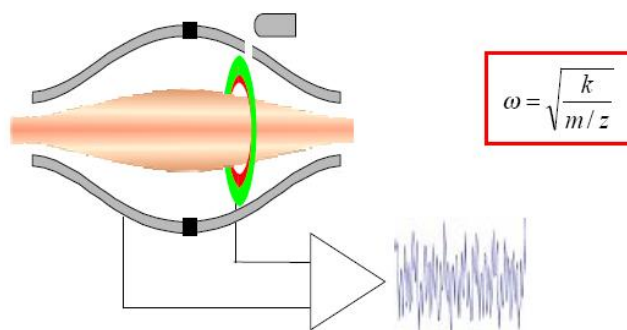
Doba dráhy letu iontu t je vyjádřena rovnicí: $t = l/v$, kde l je délka analyzátorové trubice (= dráha letu) a v je rychlost iontu. Řešením rovnic získáme vztah pro výpočet m/z :

$$m/z = 2 \cdot V \cdot t^2 / l^2$$

Rozlišení lineárního TOF analyzátoru není příliš vysoké (1000 – 3000), ale použitím **analyzátoru doby letu s reflektorem** lze zvýšit rozlišovací schopnost až na 15 – 25 000. Vzhledem k tomu, že při ionizaci získají ionty kinetickou energii s určitou

distribucí, což vede k rozšíření jejich píků a tím i ke zhoršení rozlišovací schopnosti, je použit reflektrom neboli tzv. iontové zrcadlo, které slouží k vyrovnání různých kinetických energií pro ionty se stejnou hodnotou m/z a tím dojde ke zvýšení rozlišovací schopnosti.

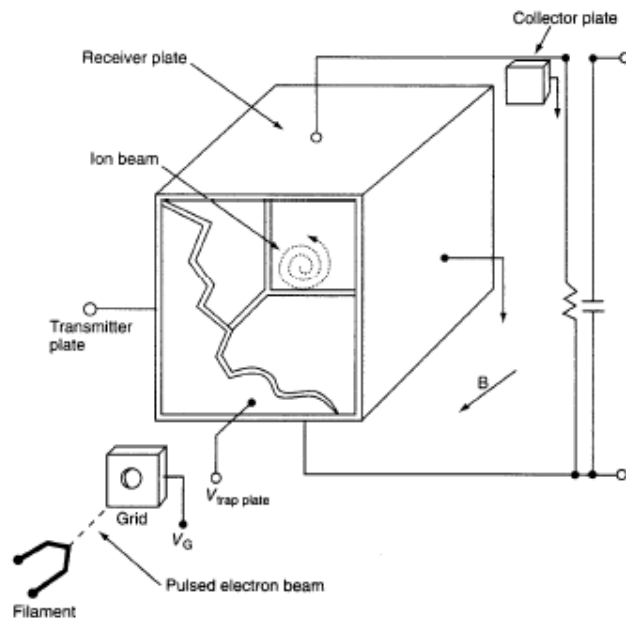
Orbitrap je nejnovější typ hmotnostního analyzátoru, který byl popsán ruským fyzikem Makarovem v roce 2005. Frekvence iontů jsou zde určeny pomocí Fourierovy transformace. Pro funkci analyzátoru je nutné ultravysoké vakuum. Analyzátor dosahuje vysoké přesnosti určení hmoty (< 1 ppm s interní kalibrací) a vysokého rozlišení ($>100\ 000$).



Obr. 19: Orbitrap – schéma [18].

Parametry **Iontové cyklotronové rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR)** vybočují z rámce všech ostatních analyzátorů díky vysoké ceně, rozlišení a ultravysokému vakuu. Vznik iontů, MS i MS^n analýza může být provedena ve stejném místě nebo s přivedením z externího zdroje. Všechny ionty jsou detekovány zároveň. Původní poloměr dráhy iontů v cyklotronu je velmi malý (0.01 - 0.1 mm) a není fázově koherentní. Excitací se poloměr dráhy zvýší na zhruba 1 cm, což je poloměr, který je použitelný pro měření. V cyklotronu se nachází silné magnetické pole B v rozsahu 1-12 Tesla, nejběžněji 7 Tesla. Jestliže se ion dostane do silného magnetického pole (7 Tesla), začne se pohybovat po cykloidální trajektorii s cyklotronovou frekvencí $\omega_c = Bz / m$. Rychlý sken (cca 1 ms) přes velký rozsah frekvencí způsobí simultánní excitaci všech iontů v cyklotronu vysokofrekvenční energií. Excitace IR paprskem nebo záchytem elektronů může sloužit k disociaci. Každá hodnota m/z má charakteristickou

cyklotronovou frekvenci a Fourierovou transformací se přepočtou tyto frekvence do škály m/z , čímž se získá hmotnostní spektrum.



Obr. 20: FT-ICR schéma [18].

V dnešní době se hodně využívají takzvané hybridní hmotnostní analyzátoři, které kombinují různé principy jednotlivých hmotnostních analyzátořů. Jedná se například o tyto typy analyzátořů: Q-TOF, Q-trap, trap-TOF nebo trap-ICR. Následující tabulka uvádí pro názornost přehledné porovnání hmotnostních analyzátořů v oblasti rozlišovací schopnosti, rozsahu m/z , rychlosti skenu a pořizovací ceny.

ANALYZÁTOR	RP (FWHM)	ROZSAH M/Z	RYCHLOST SKENU	CENA [mil. Kč]
Magnetosektorový	10^5	10^4	nízká	10 – 15
Kvadrupólový – přímý	10^3	10^3	střední	2 – 4
Kvadrupólový – past	10^3	10^4	vysoká	3 – 6
Průletový	10^4	$10^3 (10^6)$	velmi vysoká	6 - 8
Ionový rez. cyklotron	10^6	10^8	vysoká	30

Tab. 4: Rámcové porovnání hmotnostních analyzátořů [19].

2.2.3.4. Detektory v hmotnostní spektrometrii

Detektory v hmotnostní spektrometrii se dělí do dvou skupin. **Detektory pro přímá měření** detegují elektrický proud vznikající přímým dopadem stanovovaných iontů. Jsou často používané pro určení přesného izotopového zastoupení prvků například při zjišťování stáří hornin. **Násobičové detektory** využívají efekt násobení elektronů uvolněných z první konverzní dynody po dopadu iontů. Tyto detektory jsou schopny poskytnout měřitelný signál pro jednotlivé ionty a jedná se o nejčastěji používaný typ detektorů v hmotnostní spektrometrii.

Násobič elektronů s diskretním dynodovým polem je typ detektoru, který se skládá ze série kovových elektricky propojených dynod. Po vložení napětí mezi první a poslední dynodu mohou být elektrony postupně urychlovány k následujícím dynodám, a poté jsou zachyceny kolektorem. Po dopadu iontu jsou z materiálu první konverzní dynody vyraženy elektrony, jejichž počet se dopadem na další dynody násobí. Tyto detektory jsou často konstruovány i jako dvacetistupňové a dosahují hodnot zesílení 10^7 až 10^8 .

Násobič elektronů s kontinuální dynodou je tvořen zakřivenou trubicí z olovnatého skla s vysokým elektrickým odporem. Trubice je na vnitřní straně pokryta vrstvičkou oxidu berylnatého nebo hlinitého a při ústí a na jejím konci jsou kontakty připojeny ke zdroji vysokého napětí. Po dopadu iontu jsou z materiálu trubice vyraženy elektrony, které jsou elektrickým polem urychlovány směrem ke kolektoru. Opakované nárazy elektronů na stěnu trubice způsobují emisi dalších elektronů a tak jejich počet roste geometrickou řadou. Účinnost tohoto typu detektoru je srovnatelná s výše uvedeným typem, ale jeho životnost a citlivost k iontům s vyšší hmotností je nižší.

U **Scintilačního fotonásobičového detektoru** jsou dopadající ionty nejprve na scintilačním stínítku konvertovány na fotony, které jsou následně detegovány konvenčním fotonásobičem. Tenký film kovu na povrchu scintilačního stínítka zabraňuje růstu povrchového náboje, který by bránil volnému dopadu iontů. Hlavní výhodou scintilačního fotonásobičového detektoru je možnost jeho umístění mimo oblast vysokého vakua.

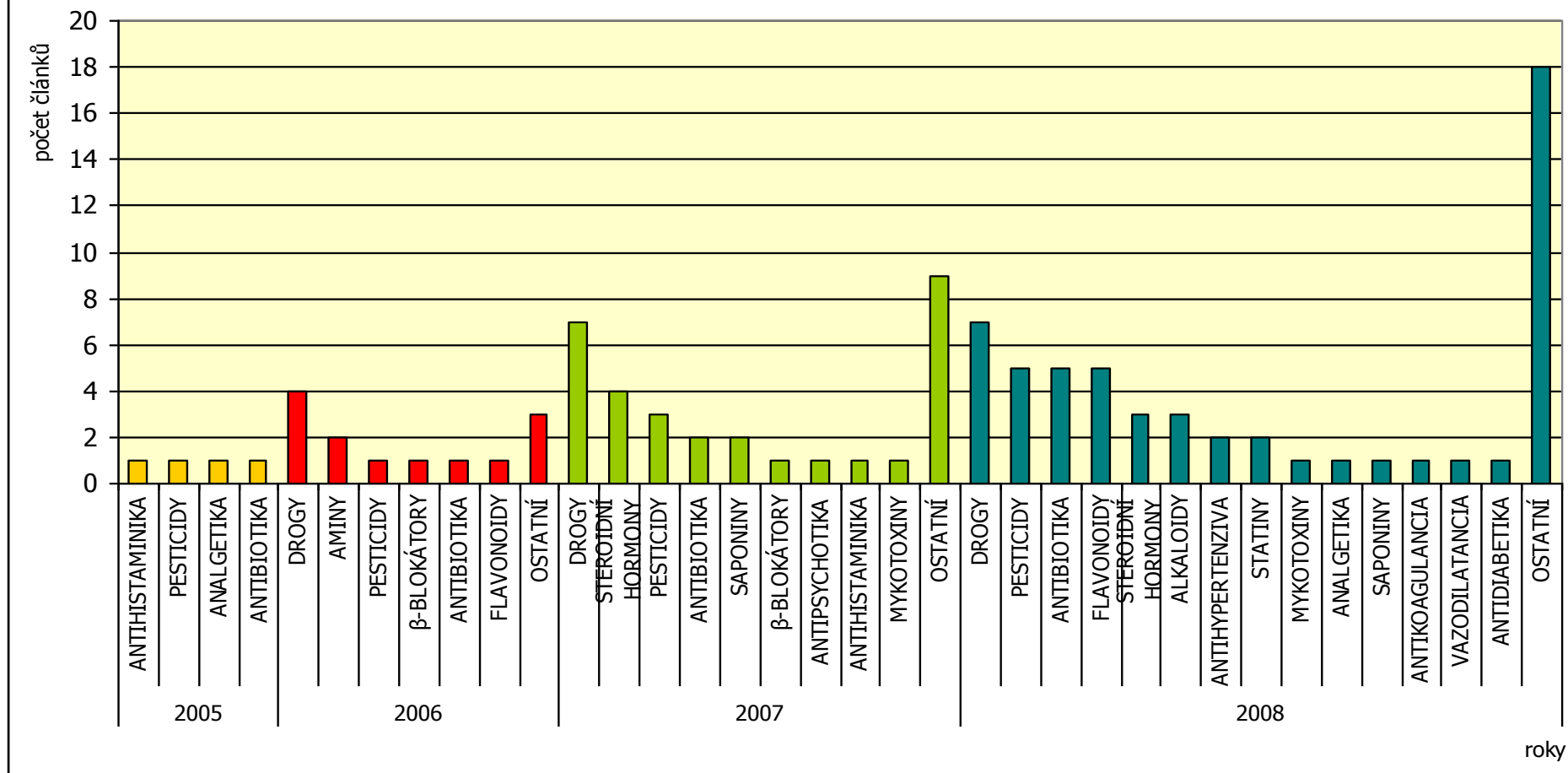
2.3. Vyhledávání informací v internetových databázích o UHPLC analýzách různých skupin látek

Metodika UHPLC se v dnešní době stále více rozvíjí a uplatňuje v různých typech analýz. Díky tomuto trendu je možné čerpat stále vyšší počet různých informací o této problematice z různých zdrojů. Jednou z mnoha možností, jak získat věrohodné a aktuální informace, je využití internetových databází. Výhodou internetových databází je mimo výše uvedené i jejich dostupnost, přehlednost a vysoký počet relevantních odborných článků v nich obsažených. V naprosté většině se jedná o celosvětově uznávané databáze vědeckých společností, vysokých škol či odborných pracovišť.

Pro vyhledávání odborných článků, které pojednávají o problematice UHPLC analýz různých skupin látek, byly využity dvě internetové databáze. Jedná se o databáze ScienceDirect a Web of Science. ScienceDirect lze využít pro přístup ke článkům z nakladatelství Elsevier. Databáze Web of Science zahrnuje obrovské množství odborných článků z různých nakladatelství a je částečně propojena i se ScienceDirectem. Pro vyhledávání byly využity právě tyto dvě databáze, především kvůli jejich přehlednosti a velkému množství článků týkajících se dané problematiky.

V databázi ScienceDirect bylo nalezeno celkem 104 článků, které se týkaly UHPLC analýz různých skupin látek. Z níže uvedeného grafického přehledu je patrné, že od roku 2005 se počet článků nepřetržitě zvyšuje až do současnosti. Články vydané v roce 2005 byly pouze 4 a týkaly se např. analýzy antibiotik či pesticidů (viz. obr. 21). V roce 2006 se počet publikovaných článků zvýšil na 13 a nejvíce z nich (4) řešily problematiku analýzy drog v biologickém materiálu. V roce 2007 stoupl počet článků na 31 a nejvíce z nich (7) se týkalo analýzy drog, steroidních hormonů (4) či pesticidů (3). V grafu je uvedena celá řada dalších skupin látek, o kterých bylo pojednáno v různých počtech článků vydaných v roce 2007. Do 10. listopadu roku 2008 bylo k dispozici na databázi ScienceDirect 56 článků o UHPLC analýzách různých skupin látek. Hlavními skupinami analyzovaných látek byly opět drogy (7 článků), pesticidy, antibiotika, flavonoidy (po 5 člancích) a steroidní hormony (3). Mezi ostatní skupiny látek lze řadit např. fenolické kyseliny, fosfolipidy, mikrocystiny, neurotransmitery, glykosidy, polyfenoly atd.

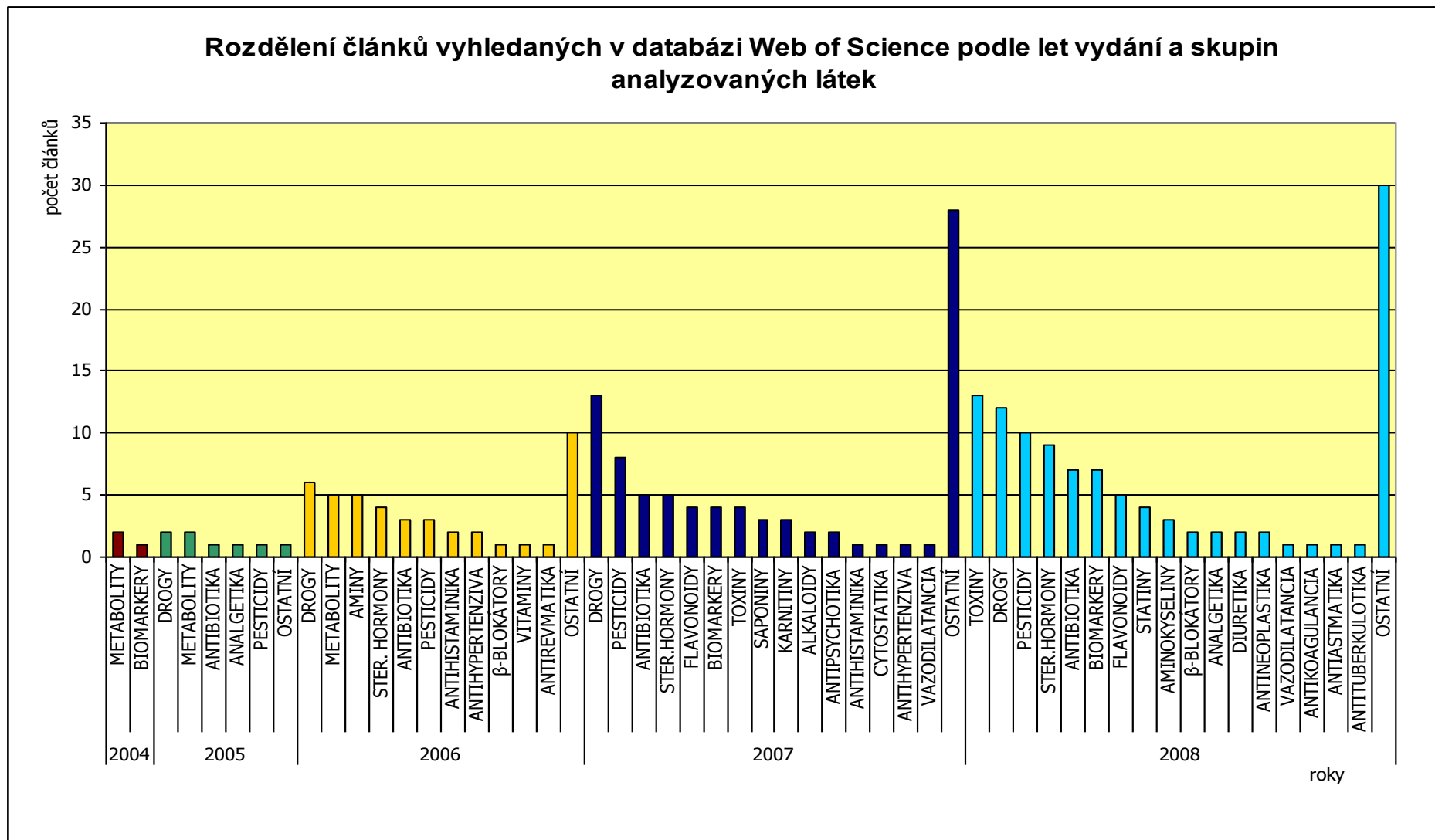
Rozdělení článků vyhledaných v databázi Science Direct podle let vydání a skupin analyzovaných látek



Obr. 21: Grafický přehled článků vyhledaných v databázi ScienceDirect podle let vydání a skupin analyzovaných látek.

Databáze Web of Science obsahovala celkem 251 odborných článků o UHPLC analýzách různých skupin látek, což je více než dvojnásobek v porovnání s databází ScienceDirect. Velká část článků byla však publikována ve formě abstraktů nebo byla shodná s články, které byly nalezeny na ScienceDirectu. Níže uvedený grafický přehled ukazuje, že první články o dané problematice byly v databázi publikovány už v roce 2004. Jedná se o 3 články pojednávající o analýze metabolitů a biomarkerů. V pozdějších letech je podle grafu patrný strmý nárůst počtu článků zahrnutých do této databáze. V roce 2005 obsahovala databáze Web of Science 8 odborných článků, které se nejčastěji zabývaly problematikou analýzy drog a metabolitů v biologickém materiálu. Jeden článek se týkal i analýzy pesticidů. V roce 2006 bylo publikováno celkem 43 článků. Opět se jich nejvíce zabývalo analýzou návykových látek v biologickém materiálu (6). Další pojednávaly např. o metabolitech (5), aminech (5), steroidních hormonech (4) nebo pesticidech (3). Prakticky vždy se jednalo o analýzy těchto a jiných látek v tělních tekutinách nebo v případě pesticidů v potravinách a odpadních vodách. V roce 2007 obsahovala databáze Web of Science celkem 85 článků o UHPLC analýzách. Nejvíce se jich věnovalo problematice drog (13) a pesticidů (8). Další často analyzované látky byly steroidní hormony, antibiotika, flavonoidy, biomarkery, atd. Mezi ostatní méně často analyzované skupiny látek patří např. glykosidy, vitaminy nebo neurotoxiny. Do 10. listopadu roku 2008 bylo publikováno na databázi Web of Science celkem 112 článků, což je dvojnásobek jejich počtu v porovnání s databází ScienceDirect. Nejvíce se jich týkalo analýzy toxinů (13), drog (12), pesticidů (10) a steroidních hormonů (10) v tělních tekutinách a v potravinách. Mezi ostatními analyzovanými skupinami látek jsou např. ceramidy, fenolické kyseliny, glykosidy, alkaloidy, neurotransmitery, kumariny, atd.

Nejčastěji byly látky analyzovány v biologickém materiálu jako jsou např. tělní tekutiny nebo části rostlin. Analýzy pesticidů a jiných látek byly nejčastěji prováděny v odpadních vodách a v potravinách. Z uvedených grafických přehledů je patrné, že se v posledních letech věnuje stále více pozornosti analýze pesticidů a jiných kontaminujících látek (farmaka) v různých typech materiálu jako jsou například potraviny či materiál mající vztah k životnímu prostředí. Vzhledem k tomuto novému trendu v oblasti využití UHPLC budou této problematice věnovány následující kapitoly.



Obr. 22: Grafický přehled článků vyhledaných v databázi Web of Science podle let vydání a skupin analyzovaných látek.

2.4. Aplikace UHPLC metodiky s různými typy detekce v oblasti environmentální a potravinové analýzy

Pro lepší přehlednost a srozumitelnost budou v následujících kapitolách uvedeny tabulkové přehledy, které se zabývají různými aplikacemi metodiky UHPLC v oblasti environmentální a potravinové analýzy. Pro tvorbu všech uvedených tabulek byly použity dostupné odborné články, které byly publikovány v internetových databázích ScienceDirect a Web of Science. Následující tabulkový přehled je rozdělen na část environmentální analýzy a na část druhou, týkající se analýzy potravinové. Z každého odborného článku byly do tabulkového přehledu vybrány následující informace: 1. jaká látka či skupina látek byly analyzovány, 2. v jakém typu materiálu, 3. který typ kolony a stacionární fáze byl použit pro analýzu, 4. jaké složení měla mobilní fáze, 5. jaký typ detekce byl využit ve spojení s UHPLC metodikou. V některých případech poskytovala databáze Web of Science pouze abstrakty daných článků, což je v tabulkovém přehledu znázorněno. U všech informací z jednotlivých článků jsou uvedeny citace.

Z níže uvedeného přehledu je patrné, že v oblasti environmentální analýzy bylo studováno velké množství různých látek, například léčiv či pesticidů. Nejčastějším typem materiálu, ve kterém byly analýzy prováděny, byly odpadní, povrchové a podzemní vody. V oblasti potravinové analýzy byla opět prostudována celá řada různých typů látek, například pesticidů, mykotoxinů, fenolických kyselin či antibiotik. Analýzy byly prováděny v nejrůznějších matricích. Jedná se například o ovoce, zeleninu a různé produkty z nich, cereálie, maso, mléko, různé nápoje či krmivo pro zvířata. V obou typech analýz byla nejčastěji použita kolona Acquity UPLC BEH C18, 1,7 μm . Nejvíce využívaným typem detekce byla hmotnostní spektrometrie. Nejčastěji použitá ionizační technika byla ionizace elektrosprejem. Kvadrupólové a průletové hmotnostní analyzátoři byly využity v MS analýzách nejčastěji.

2.4.1. Příklady aplikací metodiky UHPLC s různými typy detekce v oblasti environmentální analýzy

LÁTKA	TYP MATERIÁLU	STACIONÁRNÍ FÁZE	MOBILNÍ FÁZE	TYP DETEKCE	CITACE
analgetika statiny psychofarmaka antineoplastika, atd.	odpadní vody	Acquity UPLC BEH C18 50 x 2,1mm, 1,7µm	voda/octan amonný/ /kys. octová acetonitril/methanol	Q-TOF-MS	[21]
kanabinoidy opiáty	odpadní vody povrchové vody	Acquity UPLC BEH C18 100 x 2,1mm, 1,7µm	methanol/octan amonný /kys. mravenčí	MS-MS	[22]
antiepileptika β-blokátory bronchodilatancia analgetika, atd.	povrchové vody	Acquity UPLC BEH C18 100 x 1mm, 1,7µm	voda/methanol/ /acetonitril	ESI-MS-MS	[23]
lipofilní toxiny	mořští koryši	Acquity UPLC BEH C18 100 x 2,1mm, 1,7µm	voda/octan amonný/ /acetonitril/kys. mravenčí	MS-MS	[24]
β-blokátory antiulcerotika	odpadní vody povrchové vody	Acquity UPLC BEH C18 50 x 2,1mm, 1,7µm	voda/octan amonný/ /kys. mravenčí	ESI-MS	[25]
dimethylsulfonio- propionát	mořské řasy	Acquity UPLC BEH C18 50 x 2,1mm, 1,7µm	voda/kys. octová methanol/THF/kys. octová	ESI-MS	[26]

LÁTKA	TYP MATERIÁLU	STACIONÁRNÍ FÁZE	MOBILNÍ FÁZE	TYP DETEKCE	CITACE
antibiotika anestetika bronchodilatancia antiseptika, atd.	říční a mořský sediment	Acquity UPLC BEH C18 50 x 2,1mm, 1,7µm	voda/methanol/ /acetonitril	MS-MS	[27]
pesticidy	povrchové a podzemní vody	Acquity UPLC BEH C18 50 x 1mm, 1,7µm	voda/kys. mravenčí/ /acetonitril	ESI-MS-MS	[28]
amfetamin metamfetamin kokain fentanyl, atd.	odpadní vody	Acquity UPLC BEH C18 100 x 2,1mm, 1,7µm	acetonitril/kys.mravenčí kys. mravenčí/mravenčan amonný	ESI-MS-MS	[29]
androgeny progestogeny	odpadní vody povrchové vody	Acquity UPLC BEH C18 100 x 2,1mm, 1,7µm	voda/methanol/ /kys. mravenčí	ESI-MS-MS	[30]
mikrocystiny	povrchové vody	Acquity UPLC BEH C18 100 x 2,1mm, 1,7µm	voda/methanol/ /acetonitril	ESI-MS-MS	[31]
flubendazol propikonazol pipamperon cinnarizin, atd.	povrchové vody	Acquity UPLC HSS T3 100 x 2,1mm, 1,8µm	voda/acetonitril/ /octan amonný/ /kys. octová	ESI-MS-MS	[32]

LÁTKA	TYP MATERIÁLU	STACIONÁRNÍ FÁZE	MOBILNÍ FÁZE	TYP DETEKCE	CITACE
estrogeny	podzemní vody odpadní vody povrchové vody	Acquity UPLC BEH C18 50 x 2,1mm, 1,7µm	voda/acetonitril	Q-TOF-MS	[33]
kortisol	sérum mořských ryb	Acquity UPLC BEH C18 100 x 2,1mm, 1,7µm	voda/methanol	Q-TOF-MS	[34]
herbicity	povrchové vody	Acquity UPLC BEH C18 100 x 2,1mm, 1,7µm	acetonitril/voda/ /kys. mravenčí	MS	[35]
triazinové pesticidy	povrchové vody	neuveďeno*	neuveďeno*	MS-MS	[36]
furathiokarb deltamethrin	tkáň z úhoře	Acquity UPLC BEH C18 1,7µm*	neuveďeno*	MS-MS	[37]
pesticidy	podzemní vody	Acquity UPLC BEH C18 100 x 2,1mm, 1,7µm	acetonitril/voda/ /kys. mravenčí	MS-MS	[38]
herbicity	povrchové vody	Acquity UPLC BEH C18 1,7µm*	methanol/voda/ /kys. mravenčí	ESI-MS-MS	[39]
analgetika antibiotika β-blokátory, atd.	voda z vodovodu, odpadní vody	neuveďeno*	neuveďeno*	Q-TOF-MS	[40]
surfaktanty	odpadní vody	neuveďeno*	neuveďeno*	Q-TOF-MS	[41]

* čerpáno z abstraktu

LÁTKA	TYP MATERIÁLU	STACIONÁRNÍ FÁZE	MOBILNÍ FÁZE	TYP DETEKCE	CITACE
thiabendazol diuron, atd. (pesticidy) antibiotika drogy	voda	neuveďeno*	neuveďeno*	TOF-MS	[42]
mikrocystiny	potravinové doplňky z vodních řas, povrchové vody	Acquity UPLC BEH C18 100 x 2,1mm, 1,7µm	kys. mravenčí/voda/ /methanol	ESI-TOF-MS	[43]
analogy mořského biotoxinu azaspiracidu	mořské mušle	neuveďeno*	neuveďeno*	MS-MS	[44]
netěkavé kontaminující látky	PET lahve	Acquity UPLC BEH C18 100 x 2,1mm, 1,7µm	methanol/ethanol/ /kys. octová	ESI-MS	[45]

* čerpáno z abstraktu

2.4.2. Příklady aplikací metodiky UHPLC s různými typy detekce v oblasti potravinové analýzy

LÁTKA	TYP MATERIÁLU	STACIONÁRNÍ FÁZE	MOBILNÍ FÁZE	TYP DETEKCE	CITACE
oxydemeton-S-methyl fensulfothion dimethoát, atd. (pesticidy)	ovocné, zeleninové, cereální potraviny pro děti	Acquity UPLC BEH C18 100 x 2,1mm, 1,7µm	voda/methanol/ /octan amonný	MS-MS	[46]
heterocyklické aminy	lyofilizované masové extrakty	Acquity UPLC BEH C18 50 x 2,1mm, 1,7µm	acetonitril/kys. mravenčí/ /octan amonný	ESI-MS-MS	[47]
karbendazim thiabendazol karbofuran karbaryl, atd. (pesticidy)	jablkové extrakty	Acquity UPLC BEH C18 100 x 2,1mm, 1,7µm	voda/methanol	ESI-MS-MS	[48]
neznámé pesticidy	hruškový extrakt	Acquity UPLC BEH C18 50 x 2,1mm, 1,7µm	mravenčan amonný/ /voda/methanol	Q-TOF-MS	[49]
pymetrozin acetamiprid oxydemeton-methyl methomyl, atd. (pesticidy)	cereální potraviny pro děti, pomeranče, brambory	Acquity UPLC BEH C18 50 x 2,1mm, 1,7µm	voda/methanol/ /kys. octová	ESI-MS-MS	[50]
mykotoxiny	obilná krmiva, arašídové potraviny	Acquity UPLC BEH C18 100 x 2,1mm, 1,7µm	octan amonný/ /voda/methanol	ESI-MS-MS	[51]

LÁTKA	TYP MATERIÁLU	STACIONÁRNÍ FÁZE	MOBILNÍ FÁZE	TYP DETEKCE	CITACE
gallová kyselina 3,5-dihydroxybenzoová k. káвовá kyselina, atd. (fenolické kyseliny)	bílé víno grapefruitový džus lístky zeleného čaje	Acquity UPLC BEH C8 150 x 2,1mm, 1,7µm	acetonitril/voda/ /kys. mravenčí	MS-MS	[52]
akrylamid	bramborové lupínky tepel. upravené potr.	Acquity UPLC BEH C18 50 x 2,1mm, 1,7µm	methanol/kys.mravenčí/ /voda	ESI-MS-MS	[53]
aflatoxin B1 aflatoxin B2 aflatoxin G1 aflatoxin G2	pšenice a arašídové ořechy	Acquity UPLC BEH C18 50 x 2,1mm, 1,7µm	acetonitril/methanol/ /voda	UV	[54]
karbadox olaquinox	krmivo pro drůbež a vepře	Acquity UPLC BEH HILIC 100 x 2,1mm, 1,7µm	octan amonný/ /acetonitril/voda	DAD	[55]
fluroxypyr aciflourfen clopyralid triclopyr, atd. (herbicidy)	rýže	Acquity UPLC BEH C18 100 x 2,1mm, 1,7µm	kys. mravenčí/voda/ /methanol	ESI-MS-MS	[56]
antibiotika	mléko	Acquity UPLC BEH C18 100 x 2,1mm, 1,7µm	methanol/kys.mravenčí/ /voda	ESI-MS-MS	[57]

LÁTKA	TYP MATERIÁLU	STACIONÁRNÍ FÁZE	MOBILNÍ FÁZE	TYP DETEKCE	CITACE
propamokarb pimetrozin oxamyl picloram, atd. (pesticidy)	jablečný, broskvový, ananasový, pomerančový a multivitaminový džus	Acquity UPLC BEH C18 100 x 2,1mm, 1,7µm	kys. mravenčí/voda/ /methanol	ESI-MS-MS	[58]
rezidua 24 sulfonamidů	maso	Acquity UPLC BEH C18 100 x 2,1mm, 1,7µm	kys. mravenčí/voda/ /methanol	ESI-MS-MS	[59]
hymexazol drazoxolon vinklozolin oxadixyl, atd. (fungicidy)	vína ovocné džusy mošt	Zorbax Eclipse XDB-C18 50 x 4.6mm, 1.8µm	acetonitril/ /voda	DAD	[60]
64 pesticidů	jablkové extrakty	neuveдено*	neuveдено*	MS-MS	[61]
více než 50 pesticidů	alkoholické nápoje	Acquity UPLC BEH C18 100 x 2,1mm, 1,7µm	kys. mravenčí/voda/ /methanol	ESI-MS-MS	[62]
veterinární léčiva	mléko	Acquity UPLC BEH C18 50 x 2,1mm, 1,7µm	voda/kys. mravenčí/ /acetonitril	ESI-TOF-MS	[63]
veterinární léčiva	maso	Acquity UPLC HSS T3 100 x 2,1mm, 1,8µm	voda/kys. mravenčí/ /acetonitril	ESI-TOF-MS	[64]

* čerpáno z abstraktu

LÁTKA	TYP MATERIÁLU	STACIONÁRNÍ FÁZE	MOBILNÍ FÁZE	TYP DETEKCE	CITACE
sulfonamidy	vejce, med	Acquity UPLC BEH C18 100 x 2,1mm, 1,7µm	kys. mravenčí/voda/ /acetonitril/methanol	MS-MS	[65]
53 pesticidů	pomeranče, jahody, okurky, olivy	Acquity UPLC BEH C18 100 x 2,1mm, 1,7µm	kys. mravenčí/voda/ /methanol	MS-MS	[66]
32 pesticidů	citróny hrozinky	Acquity UPLC BEH C18 100 x 2,1mm, 1,7µm	kys. mravenčí/voda/ /methanol	ESI-MS-MS	[67]
trans-10-hydroxy-2-decenová kyselina	želé	Acquity UPLC BEH C18 50 x 2,1mm, 1,7µm	methanol/voda/ /kys. fosforová	UV	[68]
fytoosteroly	pšenice, sezam, oves, arašídy	Acquity UPLC BEH C18 100 x 1mm, 1,7µm	methanol/voda/ /acetonitril	APCI-MS	[69]
aflatoxiny B1,B2,G1,G2	pivo	Acquity UPLC BEH shield RP18,150 x 2,1mm,1,7µm	kys. mravenčí/voda/ /methanol	ESI-MS-MS	[70]
107 herbicidů	sojové boby	Acquity UPLC BEH C18 50 x 1mm, 1,7µm	kys. mravenčí/voda/ /acetonitril	ESI-MS-MS	[71]
chlormequat mepiquat	rajčata rajčatové produkty	Acquity UPLC BEH HILIC 100 x 2,1mm, 1,7µm	acetonitril/kys. mravenčí/ /octan amonný	ESI-MS-MS	[72]

LÁTKA	TYP MATERIÁLU	STACIONÁRNÍ FÁZE	MOBILNÍ FÁZE	TYP DETEKCE	CITACE
katechin epikatechin atd. (polyfenoly)	čokoláda	neuveďeno*	neuveďeno*	neuveďeno*	[73]
N-acetylglutamát N-acetylaspartát	sojové boby kukuřice	neuveďeno*	neuveďeno*	ESI-MS-MS	[74]
pesticidy	jahody	neuveďeno*	neuveďeno*	ESI-TOF-MS	[75]
melamin	krmivo pro zvířata	neuveďeno*	neuveďeno*	MS-MS	[76]
10 antioxidantů	tuky oleje	neuveďeno*	neuveďeno*	MS	[77]
tetracyklinová a chinolonová antibiotika	vepřové ledviny, játra, maso	Acquity UPLC BEH C18*	neuveďeno*	ESI-MS-MS	[78]
makrolidová antibiotika	vejce, mléko, med	neuveďeno*	neuveďeno*	Q-TOF-MS	[79]
17 glukokortikoidů	mléko, vejce	kolona se stac. fází C18*	neuveďeno*	ESI-MS-MS	[80]
flavonoidy	semena koňských kaštanů	neuveďeno*	neuveďeno*	ESI-MS-MS	[81]

* čerpáno z abstraktu

2.5. UHPLC analýza vybraných druhů látek v oblasti environmentální analýzy

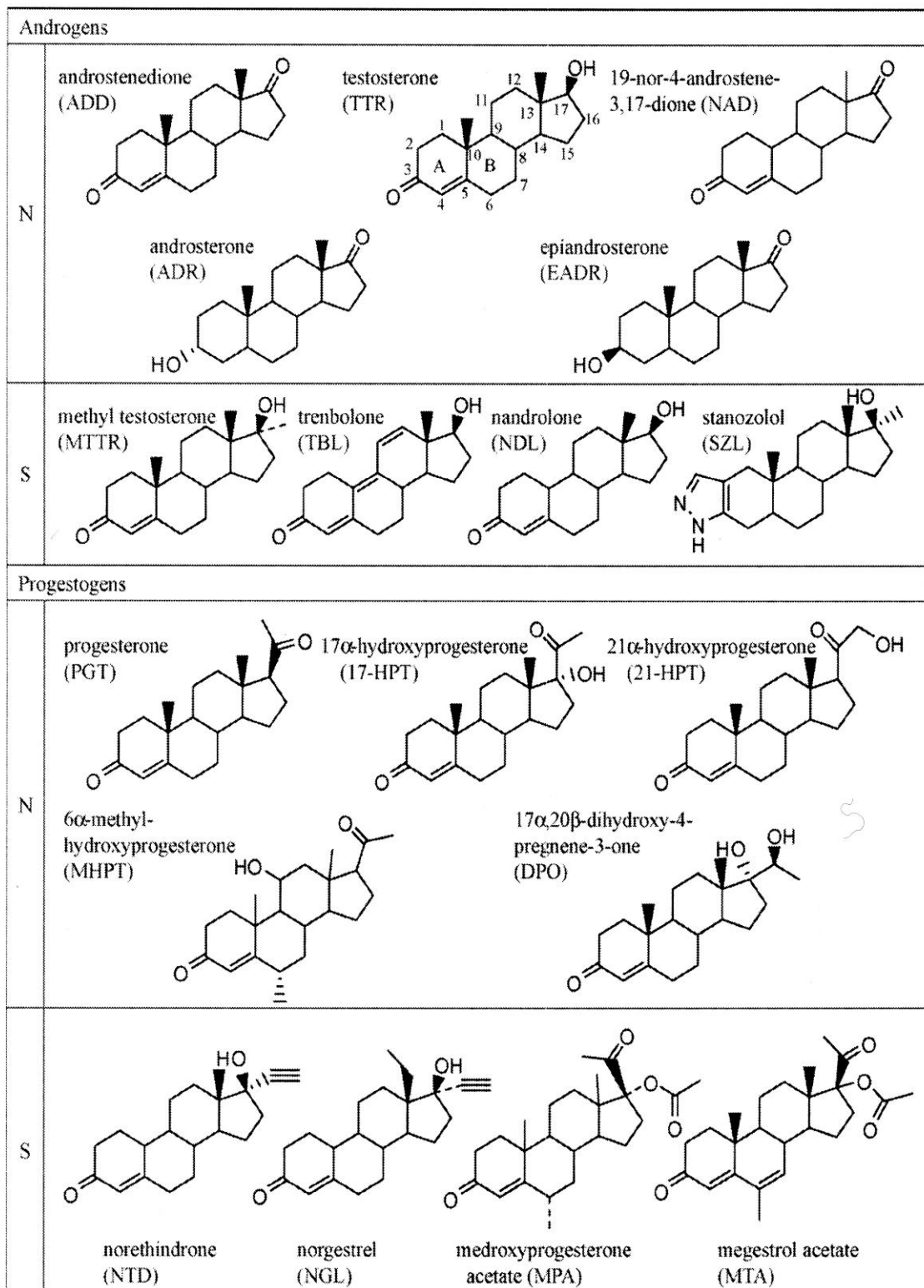
2.5.1. Analýza androgenů a progestogenů v povrchových a odpadních vodách pomocí UHPLC-ESI-MS-MS⁶

Pro analýzu devíti androgenů a devíti progestogenů v environmentálních vodách (viz. tabulka č. 5) byla vyvinuta UHPLC-ESI-MS-MS metodika doplněná o extrakci na pevné fázi. Tato technika byla následně využita pro analýzu reziduí androgenů a progestogenů ve vzorcích odpadních a povrchových vod původem z Japonska.

V posledních letech se stále více využívalo velké množství přírodních či syntetických androgenů a progestogenů jak v humánní tak i ve veterinární medicíně. Vzhledem k jejich častému používání se tyto látky dostávají různými cestami i do odpadních a povrchových vod, kde působí negativním vlivem na vodní živočichy a následně i na lidskou populaci. Vzhledem k této skutečnosti bylo cílem vyvinout dostatečně citlivou a účinnou metodu pro analýzu širokého spektra těchto látek ve vzorcích odpadních a povrchových vod.

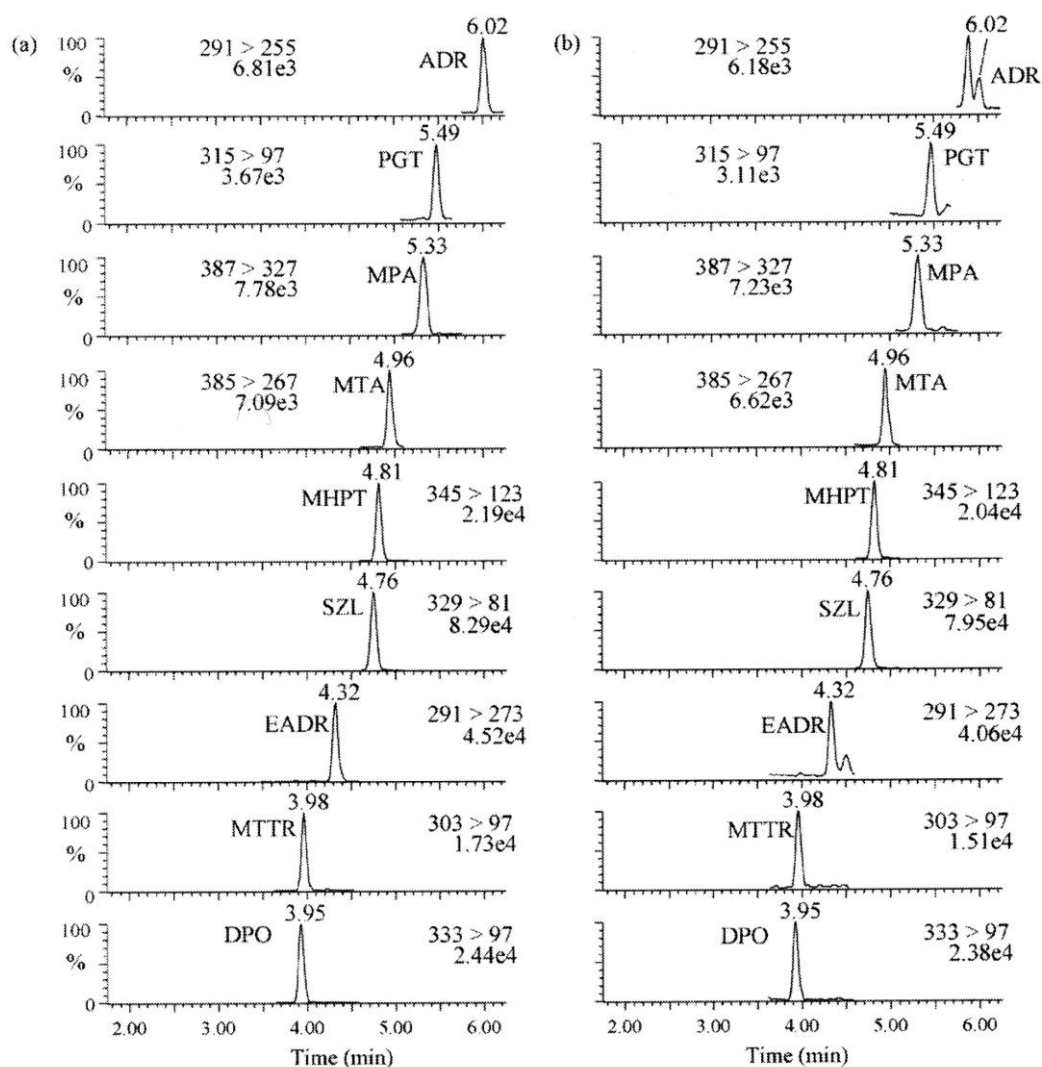
Analýza androgenů a progestogenů byla provedena na přístroji Acquity UPLC od firmy Waters. Pro chromatografickou separaci výše uvedených látek byla použita kolona Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 μm). Kolona byla temperována na 40 °C, rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,3 ml/min a objem dávkovaného vzorku činil 5 μl. Jako mobilní fáze při gradientové eluci byl použit methanol a voda s obsahem 0,1% kyseliny mravenčí. Hmotnostně spektrometrická detekce byla provedena za použití přístroje TQ detektor od firmy Waters, který využíval ionizaci elektrosprejem v pozitivním iontovém módu.

⁶ Kapitola 2.5.1. byla vypracována ze zdroje [30].

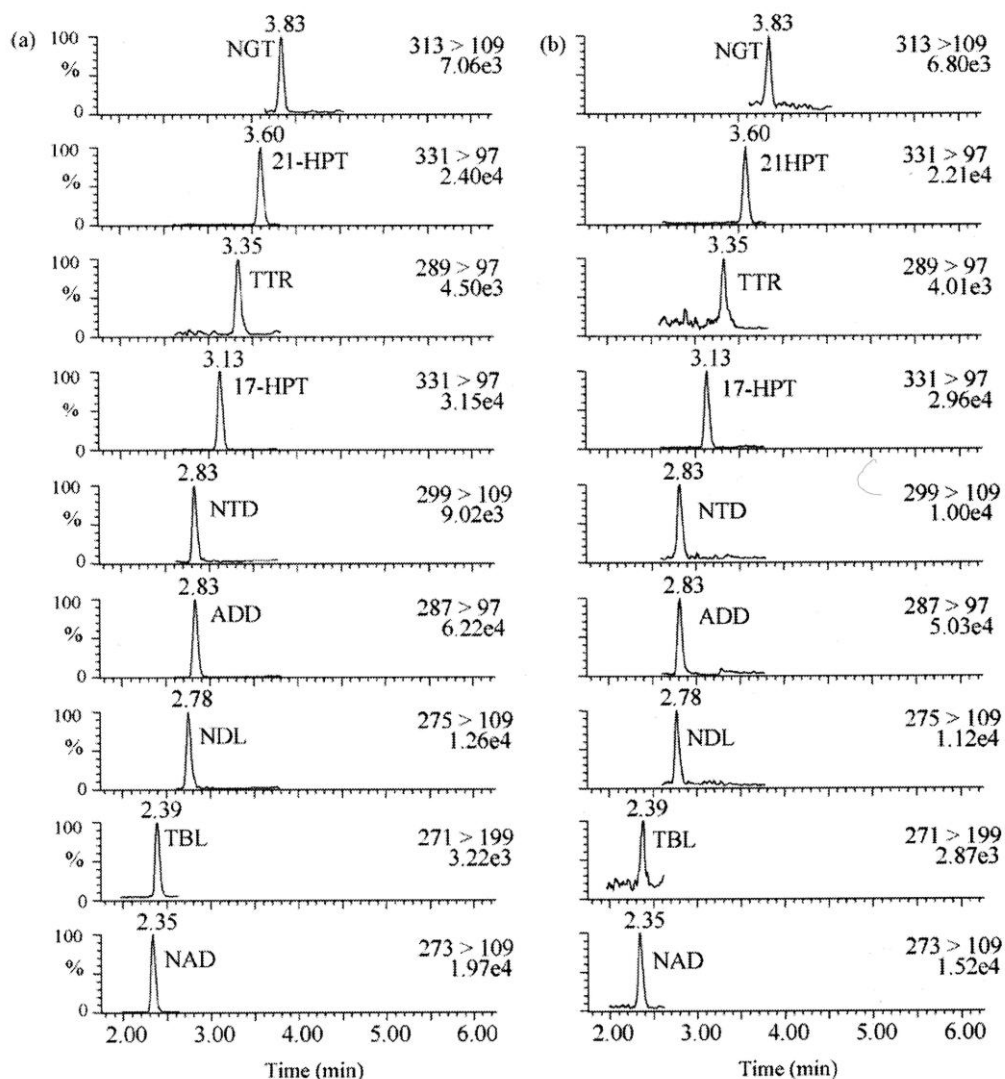


Tab. 5: Struktura analyzovaných androgenů a progestogenů, N: přírodní steroid, S: syntetický steroid [30].

Nalezení optimálních podmínek pro UHPLC-MS-MS analýzu je velmi důležité pro přesnou a citlivou identifikaci a kvantifikaci androgenů a progestogenů, které jsou v odpadních a povrchových vodách obsaženy ve velmi nízkých koncentracích. Vzhledem k tomu, že ionizace elektrosprejem je velmi citlivá na složení mobilní fáze, bylo jedním z cílů použít takové složení mobilní fáze, které zajistí co nejvyšší citlivost analytického systému. Při optimalizaci metody se prokázalo, že mobilní fáze tvořená methanolem a vodou s obsahem kyseliny mravenčí umožňuje 3 – 4x zvýšit intenzitu signálu v porovnání s mobilní fází tvořenou acetonitrilem a vodou s obsahem kyseliny octové.



Obr. 23: UHPLC-MS-MS chromatogramy 9 androgenů a 9 progestogenů (1–100 µg/l) ve standardních vzorcích (a) a vzorcích odpadních vod (b). Zkratky jsou vysvětleny v tab. 5 [30].



Obr. 24: UHPLC-MS-MS chromatogramy 9 androgenů a 9 progesteronů (1–100 µg/l) ve standardních vzorcích (a) a vzorcích odpadních vod (b) pokrač.

Zkratky jsou vysvětleny v tab. 5 [30].

Pro analýzu androgenů a progesteronů byla dříve využívána i plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Vzhledem k nutnosti derivatizace širokého spektra těchto látek se tato metodika příliš neosvědčila. Ukázalo se, že ne všechny androgeny a progesterony je možné účelně derivatizovat a tudíž i přesně stanovit. Kapalinová chromatografie (UHPLC) ve spojení s hmotnostní spektrometrií, která se vyznačuje vysokou citlivostí, specifičtostí a nevyžaduje derivatizaci, se stala metodou volby pro analýzu těchto látek, i když se v některých případech vyskytují problémy s interferencí matrice.

2.5.2. UHPLC-MS-MS analýza pesticidů v podzemních vodách⁷

Pro rychlou, účinnou a citlivou analýzu devíti pesticidů v podzemních vodách byla využita UHPLC-MS-MS technika, která poskytuje vysoké rozlišení a velmi ostré chromatografické píky. Díky využití této techniky bylo dosaženo vysoké účinnosti a rychlosti separace, která trvala méně než 5 minut. Cílem analýzy bylo co nejefektivněji aplikovat UHPLC-MS-MS metodiku pro analýzu devíti pesticidů a využití výhod, které UHPLC instrumentace ve spojení s hmotnostní spektrometrií poskytuje. Analyzované pesticidy byly následující: atrazin, trifluralin, simazin, chlorpyrifos, diuron, terbutilazin, pentachlorofenol, isoproturon a alachlor.

Vzorky vod, které byly použity pro validaci metody, byly odebrány ze studny, která je zdrojem pitné vody pro 2000 osob. Vzorky byly podrobeny extrakci na pevné fázi, která byla provedena pomocí automatického extrakčního systému ASPEC. Před vlastní extrakcí byly kolony kondicionovány 4 ml methanolu a 4 ml vody. Poté bylo na kolony aplikováno 300 ml vzorku o pH 4,0. Před elucí byly kolony vysušeny pod proudem dusíku. Vlastní eluce byla provedena za použití 4 ml methanolu. Získané eluáty byly zakoncentrovány do konečného objemu 1 ml pod mírným proudem dusíku.

Chromatografická separace pesticidů probíhala na přístroji Acquity UPLC od firmy Waters za využití kolony Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 μm). Vzorek o objemu 10 μl byl dávkován na kolonu pomocí Acquity UPLC autosampleru. Mobilní fáze pro gradientovou eluci byla složena z vody s obsahem 0,1% kyseliny mravenčí a acetonitrilu. Hmotnostně spektrometrická detekce byla prováděna na přístroji Micromass Quattro Premier LC/MS/MS od firmy Waters. Molekuly analytů byly ionizovány za využití techniky ESI (ionizace elektrosprejem). V přístroji byl jako hmotnostní analyzátor použit trojitý kvadrupól. Jako kolizní plyn byl v hmotnostním analyzátoru použit argon při tlaku $3,7 \times 10^{-3}$ mBar. Pro získávání dat byl využit QuanOptimize software, který pracoval v tzv. multiple reaction monitoring (MRM) módu. Výběr podmínek MRM módu byl prováděn pro každý analyt individuálně.

⁷ Kapitola 2.5.2. byla vypracována ze zdroje [38].

Pesticide	Ionisation mode	Cone voltage (V)	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Collision energy (eV)	Product ion (<i>m/z</i>)	Dwell time (ms)
Simazine	ESI+	35	202	20	132	50
Atrazine	ESI+	32	216	20	174	50
Isoproturon	ESI+	25	207	20	72	50
Diuron	ESI+	30	233	16	72	50
Terbutylazine	ESI+	30	230	20	174	50
Alachlor	ESI+	15	270	10	238	50
Pentachlorophenol	ESI-	45	265	15	265	50
Chlorpyrifos	ESI+	30	352	20	200	50
Trifluralin	ESI+	25	336	15	236	50

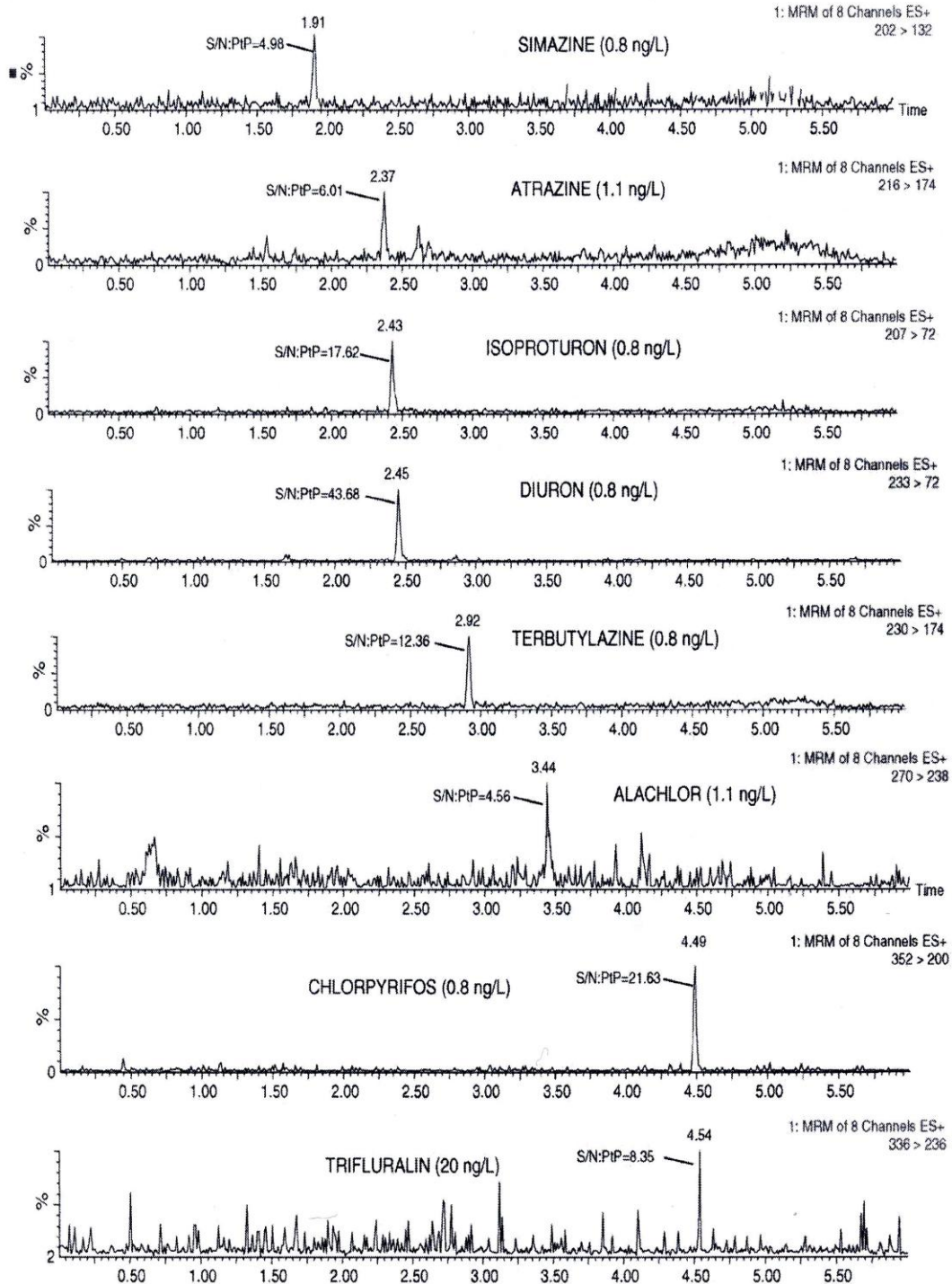
Tab. 6: MS-MS podmínky pro analýzu jednotlivých pesticidů [38].

Provedené analýzy vybraných pesticidů ukázaly, že UHPLC metodika doplněná o tandemovou hmotnostní spektrometrii je vhodná pro jejich přesné a rychlé stanovení. Vzhledem k vysoké rychlosti provedených analýz je možné tuto metodiku v budoucnu s výhodou využít pro screeningové analýzy větších množství vzorků. UHPLC technika poskytla velmi ostré chromatografické píky s šířkou nižší než 2 s při jejich základně. Při analýzách se jednoznačně potvrdil vzestup chromatografické účinnosti a citlivosti v porovnání s dříve používanou konvenční HPLC instrumentací. Detekční limity se pohybovaly v rozmezí od 0,11 do 7,8 ng/l. Mezi další charakteristiky této analytické metody validované pro analýzu pesticidů patří dobrá linearita, přesnost a selektivita.

Pesticide	Retention time (min)	Linearity (<i>r</i>)	LOD (ng/L)	Recovery (%) (<i>n</i> = 3)		Repeatability ^a (%)
				0.1 µg/L	0.005 µg/L	
Simazine	1.91	0.994	0.8	93	98	2.0
Atrazine	2.37	0.998	0.6	97	105	2.5
Isoproturon	2.43	0.999	0.1	98	99	3.8
Diuron	2.45	0.999	0.1	99	104	2.7
Terbutylazine	2.92	0.998	0.2	100	110	3.5
Alachlor	3.44	0.999	1.0	95	97	4.1
Pentachlorophenol	3.84	0.992	13	75	n.d.	6.3
Chlorpyrifos	4.49	0.999	0.1	100	115	2.0
Trifluralin	4.54	0.998	20	56	n.d.	2.1

^a Ten replicates injection of a spiked sample at 0.1 µg/L.

Tab. 7: Základní charakteristiky UHPLC-MS-MS metodiky pro jednotlivé pesticidy [38].



Obr. 25: Chromatografické záznamy vybraných pesticidů analyzovaných UHPLC-MS-MS technikou [38].

2.6. UHPLC analýza vybraných druhů látek v oblasti potravinové analýzy

2.6.1. UHPLC-MS-MS analýza fenolických kyselin v nápojích⁸

Pro kvantitativní a kvalitativní analýzu 17 fenolických kyselin ve třech druzích nápojů byla vyvinuta metodika využívající UHPLC-MS-MS techniku. Analyty byly detekovány v tzv. multiple reaction monitoring módu (MRM) a kvantifikovány za využití vnitřních standardů. Jako vnitřní standardy byly použity deuteriem značená 4-hydroxybenzoová kyselina a salicylová kyselina. Limity detekce se pohybovaly v rozmezí od 0,15 do 15 pmol. Využitelnost tohoto analytického přístupu byla potvrzena úspěšnými analýzami reálných vzorků bílého vína, grapefruitového džusu a odvaru ze zeleného čaje. V analyzovaných nápojích bylo stanoveno celkem dvanáct fenolických kyselin o koncentracích v rozmezí od 40,8 do 9046 µg/l.

Dříve využívané konvenční analytické metody pro stanovení fenolických kyselin jsou obvykle založené na vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC) na reverzních fázích nebo na jiných separačních technikách jako je například plynová chromatografie či kapilární elektroforéza. Tyto techniky se využívaly nejčastěji ve spojení s ultrafialovým, elektrochemickým, fluorescenčním nebo hmotnostně spektrometrickým detektorem. Nevýhodou většiny těchto technik byla nutnost komplexní extrakce, hydrolýzy nebo derivatizace analytů, což se často negativně projevvalo ve výsledcích analýz. Vzhledem k těmto skutečnostem bylo cílem vyvinout takový analytický přístup, který by výše uvedené nedostatky efektivně eliminoval.

Standardní roztoky byly nejprve připraveny za použití methanolu o koncentraci 10^{-3} mol/l a poté byly postupně ředěny na pracovní koncentrace. Vnitřní standardy (deuteriem značená 4-hydroxybenzoová kyselina a salicylová kyselina) o koncentracích 10^{-5} mol/l byly přidány do každého standardního roztoku.

⁸ Kapitola 2.6.1. byla vypracována ze zdroje [52].

Bílé víno (Ryzlink Rýnský, Víno Valtice, Czech Republic), grapefruitový džus (Grapefruitová Šťáva, Linea Nivnice, Nivnice, Czech Republic) a lístky zeleného čaje (Gunpowder, Jemča, Jemnice, Czech Republic) byly zakoupeny v obchodech v Olomouci a využity jako reálné vzorky pro analýzu. Odvar ze zeleného čaje byl připraven z 20 mg suchých čajových lístků zalitých 1,5 ml destilované vody po dobu 10 minut při 80 °C. Do všech vzorků nápojů byly přidány vnitřní standardy. Před vlastní analýzou byly všechny roztoky vzorků centrifugačně přefiltrovány (3500 rpm, 5 min) přes 0,2 µm nylonovou mikrofiltrační membránu.

UHPLC-MS-MS analýzy byly provedeny na přístroji Acquity UPLC od firmy Waters ve spojení s detektorem PDA 2996 (Waters) a Micromass Quattro micro hmotnostním spektrometrem (Waters) s trojitým kvadrupólem a ESI (electrospray ionization) iontovým zdrojem pracujícím v negativním iontovém módu. Roztoky vzorků byly dávkovány na kolonu Acquity UPLC BEH C8 (150 x 2,1mm, 1,7µm), která byla temperována na teplotu 30 °C. Rychlost průtoku mobilní fáze, která se skládala z acetonitrilu, vody a kyseliny mravenčí, byla 250 µl/min. Jednotlivé analyty vycházející z kolony byly detekovány v PDA detektoru (scanovací rozmezí 210 – 600 nm, rozlišení 1,2 nm) a následně byly ionizovány v iontovém zdroji. Jako kolizní plyn byl použit argon.

Compound	Time (min)	Dwell time (s)	MRM (<i>m/z</i>)	Fragments	LOD (pmol/inj)	Slope	c	r ²
Gallic acid	2.59 ± 0.01 ^a	0.5	169 > 125		3	0.142	-0.854	0.9990
3,5-Dihydroxybenzoic acid	3.59 ± 0.01	0.5	153 > 109		1	0.236	0.151	1.0000
Protocatechuic acid	3.86 ± 0.01	0.5	153 > 109		1	0.285	0.452	0.9994
Chlorogenic acid	4.49 ± 0.01	0.5	353 > 191	217	1.5	0.296	4.235	0.9983 ^b
Gentisic acid	4.79 ± 0.01	0.15	153 > 109		10	0.114	-3.301	0.9969
4-Hydroxybenzoic acid	4.99 ± 0.01	0.15	137 > 93		1	0.671	0.907	0.9999
Caffeic acid	5.31 ± 0.01	0.15	179 > 135	161	3	0.532	-5.687	0.9990
Vanillic acid	5.44 ± 0.01	0.15	167 > 108	152, 123	15	0.056	-0.548	0.9994
Syringic acid	5.55 ± 0.01	0.15	197 > 123	182, 167	15	0.042	0.036	0.9997
3-Hydroxybenzoic acid	5.96 ± 0.00	0.5	137 > 93		1	0.300	0.133	1.0000
4-Coumaric acid	6.62 ± 0.01	0.15	163 > 119		1	1.026	-3.298	0.9979
Sinapic acid	6.92 ± 0.01	0.15	223 > 164	208, 149	10	0.083	-0.836	0.9995
Ferulic acid	7.04 ± 0.02	0.15	193 > 134	178, 149	5	0.322	-0.863	0.9996
3-Coumaric acid	7.57 ± 0.01	0.5	163 > 119		0.15	1.536	1.956	0.9998
2-Coumaric acid	8.13 ± 0.00	0.15	163 > 119		0.75	0.841	-1.485	0.9995
Salicylic acid	8.25 ± 0.02	0.15	137 > 93		1.5	0.764	1.228	0.9987
<i>Trans</i> -cinnamic acid	9.19 ± 0.01	0.5	147 > 103		10	0.051	-0.966	0.9975
4-Hydroxybenzoic acid (IS) ^c	4.95 ± 0.01	0.15	141 > 97					
Salicylic acid (IS) ^c	8.21 ± 0.01	0.15	141 > 97					

^a Values are means ± SD (*n* = 6) of inter-day assays.

^b Calibration range of 5–800 pmol was used.

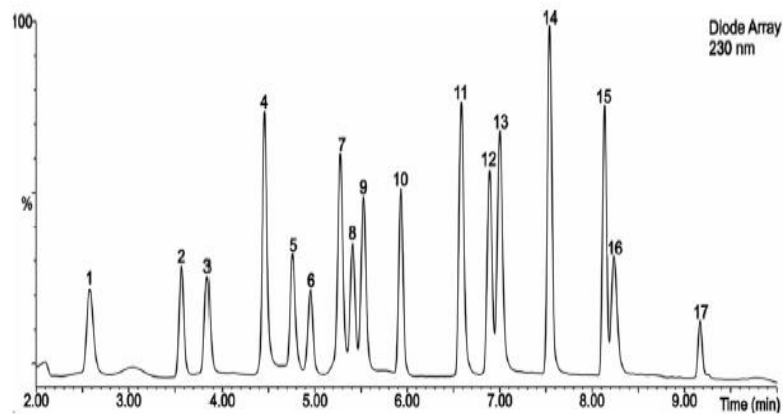
^c Internal standards of deuterium-labeled 4-hydroxybenzoic (2,3,5,6-D4) and salicylic (3,4,5,6-D4) acids.

Tab. 8: Chromatografické a hmotnostně spektrometrické charakteristiky jednotlivých fenolických kyselin a vnitřních standardů [52].

Fenolické kyseliny byly identifikovány na základě porovnání retenčních časů a hmotnostně spektrometrických dat s údaji charakteristickými pro kalibrační standardy. Koncentrace analytů ve vzorcích byly vypočítány podle následující rovnice:

$$\text{koncentrace analytu} = \text{IS}_c \times \text{slope} \times A \times 2(\text{IS}_1 + \text{IS}_2)^{-1} + c,$$

kde IS_c je koncentrace vnitřního standardu ve vzorku, A je plocha píku analytu, IS_1 je plocha píku 4-hydroxybenzoové kyseliny, IS_2 je plocha píku salicylové kyseliny, slope a c jsou parametry lineární regrese (viz výše uvedená tab.).



UHPLC-UV chromatogram of a mixture of the following 17 standard PHAs, detected at 230 nm: gallic acid (1), 3,5-dihydroxybenzoic acid (2), protocatechuic acid (3), chlorogenic acid (4), gentisic acid (5), 4-hydroxybenzoic acid (6), caffeic acid (7), vanillic acid (8), syringic acid (9), 3-hydroxybenzoic acid (10), 4-coumaric acid (11), sinapic acid (12), ferulic acid (13), 3-coumaric acid (14), 2-coumaric acid (15), salicylic acid (16) and *trans*-cinnamic acid (17).

Obr. 26: UHPLC-UV chromatogram směsi 17 standardů fenolických kyselin detekovaných při 230 nm [52].

Ve vzorcích bílého vína bylo identifikováno a kvantifikováno devět fenolických kyselin o koncentracích pohybujících se v rozmezí od 150 do 5826 $\mu\text{g/l}$ (viz tab. 9). Byla zjištěna relativně vysoká koncentrace kyseliny gallové (3675 $\mu\text{g/l}$), která může sloužit jako substrát pro bakterii *Lactobacillus hilgardii* a podporovat tak rychlé zkažení vína. Analýza prokázala, že nejvyšší koncentrace v bílém víně dosahuje kyselina 4-hydroxybenzoová, která vzniká z kyseliny gallové díky působení výše uvedené bakterie.

Ve vzorcích grapefruitového džusu bylo identifikováno a kvantifikováno šest fenolických kyselin o koncentracích pohybujících se v intervalu od 68 do 847 µg/l (viz tab. 9). Byla kvantifikována například kávová, ferulová, či 4-kumarová kyselina v koncentracích 233, 153 a 68 µg/l. Nejvyšší koncentrace byla zjištěna u kyseliny chlorogenové (847 µg/l).

Compound	White wine (µg/L)	Grapefruit juice (µg/L)	Green tea (µg/L)
Gallic acid	3675 ± 84 ^a	nd ^b	9046 ± 272
3,5-Dihydroxybenzoic acid	nd	nd	ta ^c
Protocatechuic acid	2516 ± 85	116 ± 3.4	556 ± 8.5
4-Hydroxybenzoic acid	5826 ± 64	74.3 ± 2.8	758 ± 12
3-Hydroxybenzoic acid	nd	nd	40.8 ± 14
Salicylic acid	335 ± 37	nd	476 ± 34
Chlorogenic acid	nd	847 ± 22	828 ± 93
Gentisic acid	773 ± 25	nd	nd
Vanillic acid	384 ± 51	nd	nd
Caffeic acid	1253 ± 17	233 ± 10	nd
4-Coumaric acid	303 ± 10	68 ± 1.7	127 ± 6.8
Ferulic acid	150 ± 29	153 ± 25	nd
Total	15,215	1491	11,832

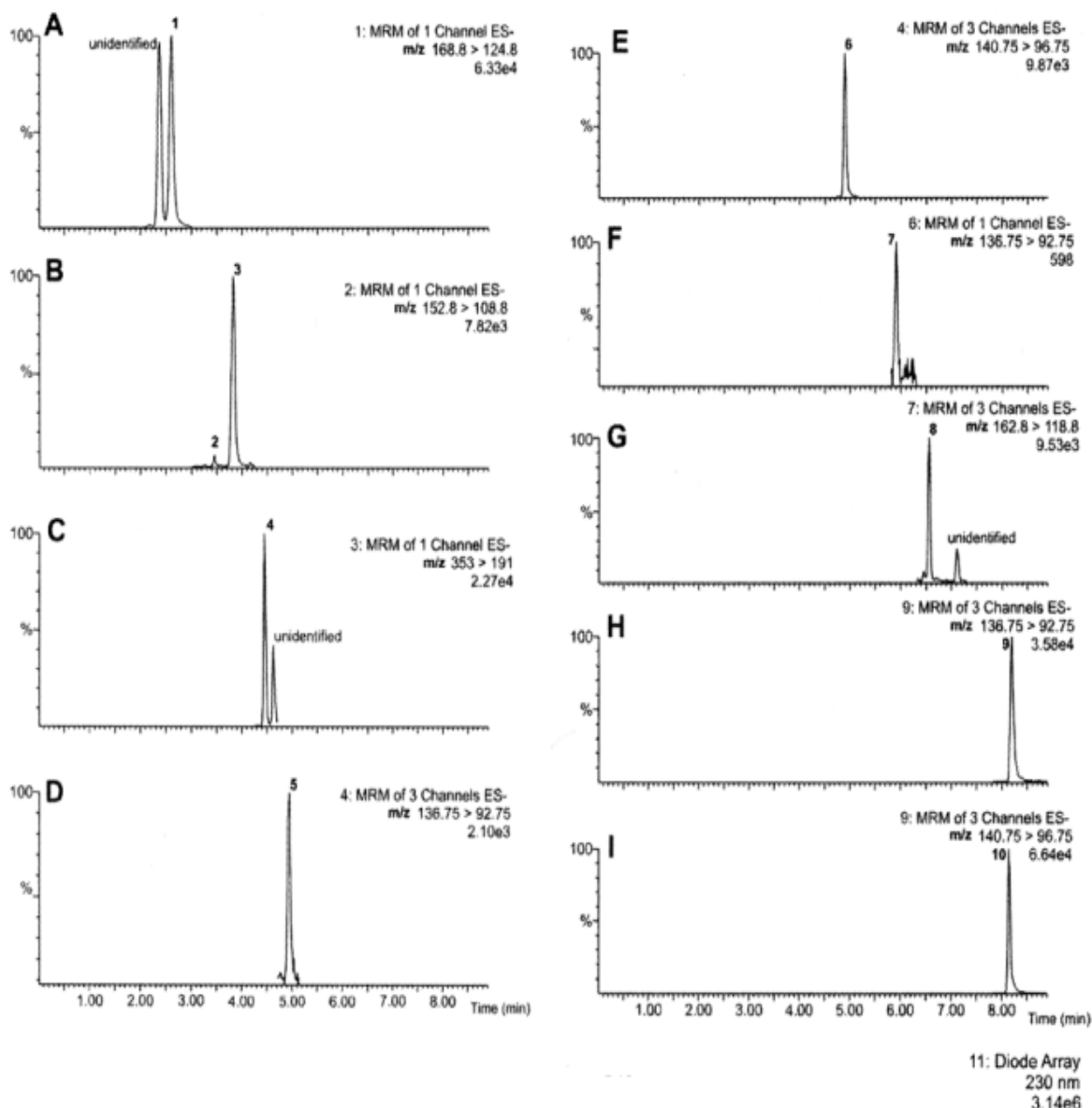
^a Values are means ± SD (n = 3).

^b Not detected.

^c Trace amounts.

Tab. 9: Koncentrace identifikovaných fenolických kyselin ve třech druzích analyzovaných nápojů [52].

Ve vzorku odvaru ze zeleného čaje bylo identifikováno osm fenolických kyselin, ze kterých bylo sedm kvantifikováno a jejich koncentrace se pohybovaly v rozmezí od 40,8 do 9046 µg/l (viz tab. 9). Ve vzorku byla stanovena kyselina gallová a 4-kumarová o koncentracích 9046 a 127 µg/l. Byla například kvantifikována i kyselina chlorogenová, 4-hydroxybenzoová či kyselina salicylová o koncentracích 828, 758 a 476 µg/l. Obzvláště zajímavá látka, která byla stanovena pouze ve stopovém množství, byla kyselina 3,5-dihydroxybenzoová. Jedná se o kyselinu, která není přirozeným sekundárním metabolitem vyskytujícím se v zeleném čaji. Její přítomnost ve vzorku indikuje možnou kontaminaci půdními mikroorganismy nebo zvířecími výkaly.



Obr. 27: UHPLC-MS-MS chromatogramy (A-I) fenolických kyselin ve vzorku odvaru ze zeleného čaje: gallová kys.(1), 3,5-dihydroxybenzoová kys. (2), protokatechuová kys. (3), chlorogenová kys. (4), 4-hydroxybenzoová kys. (5), 4-hydroxybenzoová kys.(vnitřní standard 6), 3-hydroxybenzoová kys. (7), 4-kumarová kys. (8), salicylová kys. (9), salicylová kys. (vnitřní standard 10) [52].

Analýza fenolických kyselin v různých druzích nápojů založená na UHPLC-MS-MS technice poskytuje výhody vzhledem ke konvenčním separačním technikám ve smyslu vysoké rychlosti, účinnosti, selektivity, citlivosti a nízké spotřeby organických rozpouštědel. UHPLC-MS-MS technika je vhodná pro rychlé a účinné monitorování technologických postupů při výrobě různých nápojů.

2.6.2. UHPLC-MS-MS analýza pesticidů v jablkových extraktech⁹

V dnešní době se v zemědělské výrobě používá stále velké množství pesticidů. Moderní semipolární pesticidy, které v minulých letech nahradily dříve používané klasické organochloridové pesticidy, nejsou tak persistentní a nemají tak velkou schopnost akumulovat se v živých organismech. Nicméně i moderní pesticidy jsou považovány za látky, které jsou potenciálně nebezpečné pro lidské zdraví a také pro životní prostředí. K minimalizaci expozičního rizika těmito látkám jsou stanoveny přísné limity, které nesmí překročit hodnotu koncentrace 0,01 mg/kg. Pro přesnou kontrolu dodržování nízkých koncentrací pesticidů v potravinách je nutné využívat moderní a citlivé analytické techniky. Vzhledem k této skutečnosti je hlavním cílem využití UHPLC-MS-MS metodiky pro analýzu 17 pesticidů a její porovnání s dříve používanou konvenční HPLC-MS-MS instrumentací. Separační parametry, jako jsou například počet teoretických pater, výškový ekvivalent teoretického patra, symetrie a kapacita píků, byly určeny na základě dat, získaných z analýzy vzorků jablkových extraktů s obsahem 17 pesticidů. Po provedení UHPLC-MS-MS analýzy se prokázalo, že daná metodika poskytuje kvalitnější separační parametry, umožňuje zkrácení doby analýzy a snížení spotřeby organických rozpouštědel v porovnání s konvenční HPLC-MS-MS technikou.

Jednotlivé zásobní roztoky (0,3-3 mg/ml) byly připraveny rozpuštěním pesticidů v acetonitrilu v přítomnosti benzoylurey obsažené ve směsi acetonitrilu a acetonu. Tyto zásobní roztoky byly použity pro přípravu směsných zásobních roztoků pesticidů s obsahem methanolu, které byly následně použity pro přípravu pracovních standardních roztoků, ve kterých se koncentrace pesticidů pohybovaly v rozmezí od 1 ng/ml do 5 µg/ml.

Při přípravě vzorku byl 1 kg jablek důkladně homogenizován za využití přístroje Homogenizer 2094 (Foss Tecator, Dánsko). K 12,5 g homogenátu bylo přidáno 50 ml acetonitrilu a směs byla míchána po dobu 2 minut. Poté byla za vakua suspenze přefiltrována a filtrační koláč byl třikrát promyt 10 ml acetonitrilu. Objem vzniklého filtrátu byl následně snížen za využití rotačního odpařovače na 1-2 ml.

⁹ Kapitola 2.6.2. byla vypracována ze zdroje [48].

Objem filtrátu byl kvantitativně přenesen do 50 ml odměrné baňky a následně byla baňka doplněna methanolem.

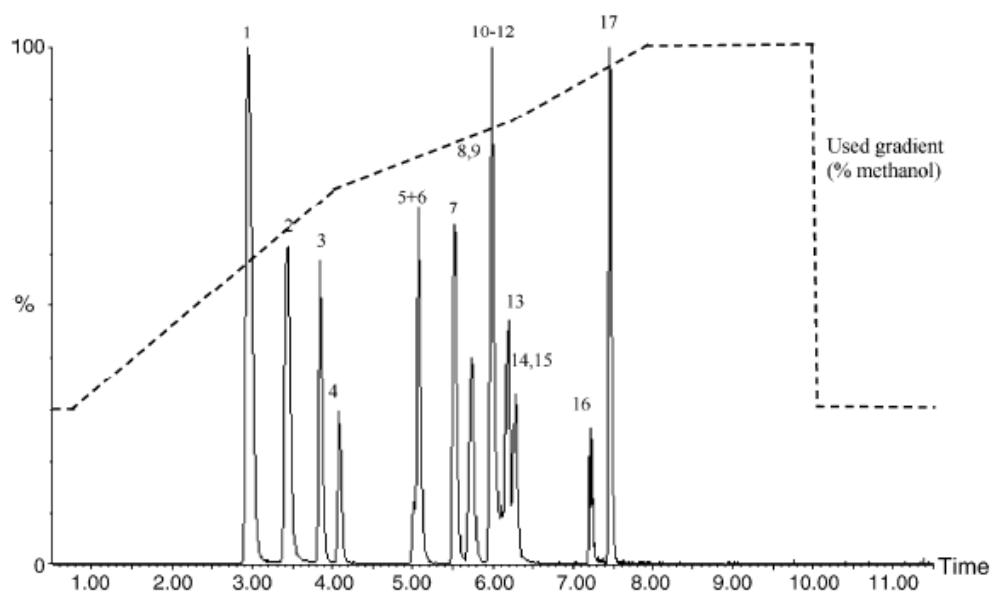
Chromatografické separace pesticidů byly provedeny na přístroji Acquity UPLC od firmy Waters za využití kolony Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 μm) s reverzními fázemi. Gradientová eluce byla provedena za využití mobilní fáze složené z vody a methanolu. Rychlost průtoku mobilní fáze činila 0,3 ml/min. Kolona byla temperována na teplotu 25 °C, objem dávkovaného vzorku činil 5 μl a separace trvala 8 minut. Jako detektor byl použit hmotnostní spektrometr Quattro Premier (Waters) s ESI (electrospray ionization) iontovým zdrojem pracujícím v pozitivním iontovém módu. Jako hmotnostní analyzátor byl využit trojitý kvadrupól. Jako kolizní plyn byl použit argon při tlaku $3,3 \times 10^{-3}$ mbar. Analyty byly detekovány v tzv. multiple reaction monitoring módu (MRM).

Time (min)	Methanol (%)
Initial	30.0
0.50	30.0
4.00	72.0
6.30	85.0
8.00	100.0
10.00	100.0
10.05	30.0
12.00	30.0

Tab. 10: Změna množství methanolu v mobilní fázi během gradientové eluce [48].

Compound		Primary transitions			Secondary transition		
No.	Name	MS/MS (<i>m/z</i>)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)	MS/MS (<i>m/z</i>)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
1	Carbendazim	192 > 160	35	22	192 > 132	35	22
2	Thiabendazole	202 > 175	40	25	202 > 131	40	25
3	Carbofuran	222 > 165	23	12	222 > 123	26	22
4	Carbaryl	202 > 145	16	9	202 > 127	16	17
5	Linuron	249 > 159	33	17	249 > 182	33	17
6	Methiocarb	226 > 169	26	9	226 > 121	26	20
7	Epoxiconazole	330 > 121	30	20	330 > 141	30	20
8	Flusilazole	316 > 247	25	19	316 > 165	25	19
9	Diflubenzuron	311 > 158	25	13	311 > 141	25	29
10	Tebuconazole	308 > 70	34	20	308 > 125	34	30
11	Imazalil	297 > 255	35	20	297 > 201	33	17
12	Propiconazole	342 > 158	43	25	342 > 69	43	20
13	Triflumuron	359 > 156	29	16	359 > 139	29	30
14	Bitertanol	338 > 99	20	11	338 > 269	20	14
15	Prochloraz	376 > 308	24	11	378 > 310	24	11
16	Teflubenzuron	381 > 158	23	13	381 > 141	23	13
17	Flufenoxuron	489 > 158	25	19	489 > 141	25	19

Tab. 11: Optimalizované MS-MS parametry pro jednotlivé pesticidy [48].



Obr. 28: UHPLC-MS-MS chromatogram vzorku jablkového extraktu s obsahem 17 pesticidů. Pro názornost je uveden gradient methanolu v mobilní fázi. Píky odpovídají jednotlivým pesticidům uvedeným v tab. 12 [48].

Time segment	Compound	Rt (min)	R.S.D. Rt (%)	k'
UPLC-MS/MS ($t_0 = 0.98$ min)				
(1)	Carbendazim	2.91	0.3	2.0
	Thiabendazole	3.40	1.0	2.5
	Carbofuran	3.83	0.3	2.9
	Carbaryl	4.06	0.2	3.2
(2)	Linuron	4.98	0.2	4.1
	Methiocarb	5.04	0.5	4.2
	Epoxiconazole	5.49	2.0	4.6
	Flusilazole	5.66	2.0	4.8
	Diflubenzuron	5.67	2.0	4.9
	Tebuconazole	5.95	1.0	5.1
	Imazalil	6.03	0.1	5.2
	Propiconazole	6.03	0.2	5.2
	Triflumuron	6.15	0.1	5.3
	Bitertanol	6.23	0.3	5.4
(3)	Prochloraz	6.24	0.1	5.4
	Teflubenzuron	7.12	0.1	6.3
	Flufenoxuron	7.45	0.1	6.6

Tab. 12: UHPLC-MS-MS charakteristiky jednotlivých pesticidů. k' je kapacitní faktor vypočítaný z rovnice: $k' = (t_R - t_0)/t_0$, kde t_R je retenční čas jednotlivých pesticidů a t_0 je mrtvý retenční čas [48].

2.6.3. Analýza více než 100 veterinárních léčiv v různých vzorcích masa za využití UHPLC-TOF-MS metodiky¹⁰

Při analýze více než 100 veterinárních léčiv ve vzorcích masa je třeba překonat celou řadu analytických problémů. Nízká těkavost a chemická nestabilita většiny veterinárních léčiv výrazně omezuje využití plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií, která je vhodnější například pro analýzu pesticidů. Široké rozmezí polaritý veterinárních léčiv působí problémy při extrakcích. Výtěžnost extrakcí je často značně snížena díky adsorpci či dokonce kovalentním vazbám analytů na molekuly matrice. Dalším komplikujícím faktorem při provádění extrakcí je přítomnost vysoké koncentrace proteinů ve vzorcích masa. Během extrakčního procesu mohou buněčné enzymy degradovat některé analyty. Proteiny mohou precipitovat během promývacího procesu a působit nevratné adsorpce některých analytů. Mimo výše uvedené problémy je nutné detekovat velký počet veterinárních léčiv za nízkých koncentrací, proto bylo cílem práce využít UHPLC-TOF-MS metodiku pro tento druh analýz.

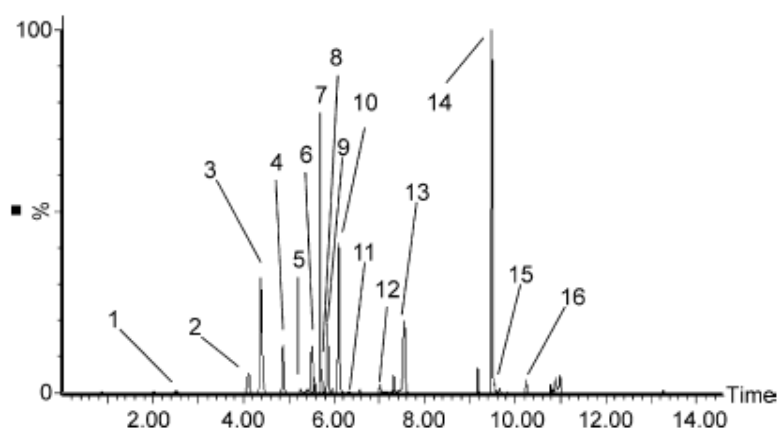
Vzhledem k uvedeným komplikacím byla před vlastní analýzou provedena tzv. bipolární extrakce, která umožňuje extrahování polárních, středně polárních i nepolárních analytů. Důkladným provedením extrakce na reverzních pevných fázích bylo dosaženo odstranění interferujících proteinů a tím získání čistých a stabilních extraktů. Nicméně metodika jako taková nebyla schopna detekovat antibiotikum chloramfenikol, pro jehož detekci je nutné provést ionizaci v negativním iontovém módu. Vzhledem k nutnosti derivatizace nebyly též detekovány nitrofurany. Nebyly detekovány ani aminoglykosidy, které vyžadují provedení extrakce za velmi nízkých hodnot pH. Metoda byla validována pro tři odlišné matrice: svalovou tkáň, jaterní tkáň a ledvinovou tkáň.

Chromatografické separace byly provedeny na přístroji Acquity UPLC od firmy Waters za využití kolony HSS T3 UPLC. Mobilní fáze byla tvořena vodou, kyselinou mravenčí a acetonitrilem. Rychlost průtoku mobilní fáze činila 0,4 ml/min a kolona byla temperována na teplotu 30 °C. Na kolonu byl dávkován vzorek o objemu 5 µl. Jako detektor byl použit hmotnostní spektrometr s ESI (electrospray

¹⁰ Kapitola 2.6.3. byla vypracována ze zdroje [64].

ionization) iontovým zdrojem pracujícím v pozitivním iontovém módu. Napětí vložené na kapiláru v iontovém zdroji mělo hodnotu 3000 V. Ionizace probíhala za teploty 350 °C.

Při přípravě vzorku bylo homogenizováno 6 g masové tkáně s 30 ml acetonitrilu. Po 5 minutách byl přidán 1 g sulfátu amonného a 30 ml extrakčního roztoku. Vzniklý roztok byl centrifugován při 8000 ot./min po dobu 10 minut. Obě vzniklé kapalné vrstvy byly přeneseny na odparku a následně k nim byly přidány 2 g sulfátu amonného. Po odpaření ve vakuu za teploty 50 °C bylo pH zbylého roztoku upraveno na hodnotu 6,5 přidáním 12,5 % hydroxidu amonného. Následovala centrifugace při 14 500 ot./min po dobu 5 minut. Prázdňá odparka byla promyta 6 ml promývacího roztoku. Roztok vzniklý promytím byl centrifugován 5 minut při 14 500 ot./min a následně byl přenesen do kádinky se 14 ml vody. Centrifugovaný promývací roztok byl aplikován na předem aktivovanou Oasis HLB kolonku. Poté byla kolonka promyta 2 ml vody. Po průchodu kolonkou byl eluát jímán do vialky a eluce byla dokončena přidáním 2 ml acetonitrilu a 3 ml elučního roztoku. Vzniklý roztok byl odpařen při teplotě 50 °C pod proudem dusíku. Odpařovací proces byl zastaven, když byl objem zbylého roztoku 0,5 ml. Následně byla k extraktu přidávána voda. Poté byl roztok centrifugován 5 minut při 4000 ot./min. Po provedené centrifugaci byl vzorek připraven pro analýzu.



Obr. 29: UHPLC-TOF-MS chromatogram některých veterinárních léčiv ve vzorku ledvinové tkáně. 1 mebendazol, 2 sulfadiazin, 3 hydroxymetronidazol, 4 sulfamerazin, 5 ampicilin, 6 oxytetracyklin 7 azaperon, 8 ciprofloxacín, 9 tetracyklin, 10 enrofloxacin, 11 oxfendazol, 12 oxybendazol, 13 acepromazin, 14 thiamulin, 15 roxithromycin, 16 dikloxacilin [64].

Analyte	Elemental composition of measured ion	Exact mass of measured ion	Retention time (min)
Acepromacin	C ₁₉ H ₂₃ N ₂ O ₅ S	327.1531	9.19
Acriflavin	C ₁₃ H ₁₂ N ₃	210.1031	6.18
Albendazol	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₂ S	266.0963	8.67
Amoxicillin	C ₁₆ H ₂₀ N ₃ O ₅ S	366.1124	3.46
Ampicillin	C ₁₆ H ₂₀ N ₃ O ₄ S	350.1174	5.26
Azaperol	C ₁₉ H ₂₅ FN ₃ O	330.198	10.13
Azaperon	C ₁₉ H ₂₃ FN ₃ O	328.1825	5.51
Azithromycin	C ₃₈ H ₇₃ N ₂ O ₁₂	749.5164	7.23
Carazolol	C ₁₈ H ₂₄ N ₂ O ₂	299.176	7.64
Cefazolin	C ₁₄ H ₁₅ N ₈ O ₄ S ₃	455.0378	6.23
Cefoperazon	C ₂₅ H ₂₈ N ₆ O ₈ S ₂	646.1502	7.19
Cephalexin	C ₁₆ H ₁₈ N ₃ O ₄ S	348.1018	5.34
Cephapirin	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₆ S ₂	424.0637	4.51
Chlorpromazin	C ₁₇ H ₂₁ ClN ₂ S	319.1036	9.71
Chlortetracycline	C ₂₂ H ₂₄ ClN ₂ O ₈	479.1221	6.41
Ciprofloxacin	C ₁₇ H ₁₉ FN ₃ O ₃	332.141	5.75
Clindamycin	C ₁₈ H ₃₄ ClN ₂ O ₅ S	424.1799	7.42
Cloxacillin	C ₂₂ H ₁₈ ClN ₂	345.1159	9.95
Danofloxacin	C ₁₉ H ₂₁ FN ₃ O ₃	358.1567	6.01
Demeclocycline	C ₂₁ H ₂₆ NO ₅	465.1065	6.46
Diaveridin	C ₁₃ H ₁₇ N ₄ O ₂	261.1352	4.98
Dicloxacillin	C ₁₉ H ₁₈ Cl ₂ N ₃ O ₅ S	470.0344	10.26
Difloxacin	C ₂₁ H ₂₀ F ₂ N ₃ O ₃	400.1473	6.74
Dimetridazol	C ₅ H ₈ N ₃ O ₂	142.0616	2.76
Doxycyclin	C ₂₂ H ₂₅ N ₂ O ₈	445.1611	7.61
Enoxacin	C ₁₅ H ₁₈ FN ₄ O ₃	321.1363	5.47
Enrofloxacin	C ₁₉ H ₂₃ FN ₃ O ₃	360.1723	6.15
Eprinomectin	C ₅₀ H ₇₆ NO ₁₄	900.5109	10.93
Erythromycin A	C ₃₇ H ₆₈ O ₁₃ N	733.4612	8.97
Erythromycin B	C ₃₇ H ₆₈ O ₁₂ N	717.4663	8.82
Erythromycin C	C ₃₆ H ₆₆ O ₁₃ N	719.4456	8.62
Febantel	C ₂₀ H ₂₃ N ₄ O ₆ S	447.1338	10.86
Fenbendazol	C ₁₅ H ₁₄ N ₃ O ₂ S	300.0807	9.54
Fleroxacin	C ₁₇ H ₁₉ F ₃ N ₃ O ₃	370.1379	5.61
Flubendazol	C ₁₆ H ₁₃ FN ₃ O ₃	314.0941	9.01
Flumequin	C ₁₄ H ₁₃ NFO ₃	262.0879	9.40
HMMNI	C ₅ H ₈ N ₃ O ₃	158.0565	2.60
Iprnidazole	C ₇ H ₁₂ N ₃ O ₂	170.0929	6.64
Iso-pirlimycin	C ₁₇ H ₃₂ ClN ₂ O ₅ S	410.1642	5.35
Josamycin	C ₄₂ H ₇₀ NO ₁₅	827.4667	9.82
Lincomycin	C ₁₈ H ₃₅ N ₂ O ₆ S	406.2138	4.73
Lomefloxacin	C ₁₇ H ₂₀ F ₂ N ₃ O ₃	352.1473	5.95
Mebendazol	C ₆ H ₁₀ N ₃ O ₃	172.0722	8.59
Metronidazole	C ₆ H ₁₀ N ₃ O ₃	172.0722	2.50
Metronidazole OH	C ₆ H ₁₀ N ₃ O ₄	188.0671	1.97
Minocycline	C ₂₃ H ₂₈ N ₃ O ₇	458.1927	4.67

Tab. 13: Příklad několika analyzovaných veterinárních léčiv a jejich UHPLC-TOF-MS charakteristiky [64].

Po provedení všech analýz se prokázalo, že UHPLC-TOF-MS metodika je vhodná pro analýzu velkého množství veterinárních léčiv bez ohledu na jejich polaritu a hodnotu disociační konstanty. Ve vzorcích zvířecích tkání byla nejčastěji identifikována a kvantifikována antibiotika, která se v dnešní době často používají. Nicméně některé značně nepolární analyty nebylo možné touto technikou dostatečně identifikovat. Důvodem je to, že do dnešní doby není stále známo, jak úspěšně a dokonale extrahovat velké množství nepolárních analytů bez současné ztráty velmi polárních látek. Budoucí generace HILIC (hydrophilic interaction liquid chromatography) SPE (solid - phase extraction) materiálů nebo HILIC analytických kolon pravděpodobně umožní v budoucnu provádět zcela úspěšně i takové typy analýz. UHPLC-TOF-MS metodiku bude možné i přes jisté problémy, které vyplývají ze značné složitosti matrice, v budoucnu s výhodou využít pro detekci a kvantifikaci velkého množství nově se objevujících veterinárních léčiv v různých vzorcích masa.

3. Závěr

3.1. Závěrečné shrnutí

Hlavním cílem práce bylo podat informace o možnostech využití UHPLC metodiky ve spojení s různými typy detekce v oblasti environmentální a potravinové analýzy a vytvoření tabulkových a grafických přehledů na podkladě odborných článků týkajících se problematiky UHPLC.

V úvodu teoretické části jsou popsány van Deemterova, Giddingsova a Knoxova teorie. Jedná se o teorie, které charakterizují účinnost chromatografického systému. V oblasti kapalinové chromatografie je výhodnější využívat poznatky, které vycházejí z Giddingsovy či Knoxovy teorie, které lépe specifikují vztahy právě pro kapalinovou chromatografii. Protože jsou výše zmíněné teorie důležité pro pochopení principu chromatografické separace, je tato problematika zařazena v úvodu práce.

V další části práce byl zmíněn vývoj chromatografie v posledních desetiletích, při kterém bylo důležité vyvinout takový analytický systém, který by umožňoval zkrátit dobu analýzy a zároveň by disponoval vysokým rozlišením a účinností. Postupem času bylo zjištěno, že nejlepších parametrů dosahují analytické systémy, které využívají krátké kolony s malým vnitřním průměrem plněné porézními sub-2 μm částicemi. Typickým příkladem moderního a dnes často využívaného analytického systému je Acquity UPLC systém od firmy Waters. Vzhledem k využití částic o průměru 1,7 μm pracuje tento systém za tlaků dosahujících hodnot až 100 MPa. Průměry kolon používaných v rámci systému jsou 1 nebo 2,1 mm a systém jako celek vyniká vysokou rychlostí analýz, sníženou spotřebou organických rozpouštědel či vysokou separační účinností a citlivostí.

Práce se také zabývala problematikou hmotnostní spektrometrie, která je v poslední době vzhledem ke svým výhodám často využívanou detekční technikou ve spojení s chromatografickými metodami. V rámci kapitoly o hmotnostní spektrometrii byly pro názornost probrány konvenční ionizační techniky, ze kterých se jich dnes naprostá většina běžně používá. V budoucnu se tyto techniky budou stále více nahrazovat novými a moderními ionizačními technikami, které se vyznačují lepšími ionizačními schopnostmi. Práce také podává informace o hmotnostních analyzátorech, ze kterých se většina používá i v tandemové hmotnostní spektrometrii.

Součástí kapitoly bylo i krátké pojednání o detektorech, které se nejčastěji v hmotnostní spektrometrii využívají.

V další kapitole je věnována pozornost vyhledávání informací o UHPLC analýzách různých skupin látek v internetových databázích. Grafický přehled, který je také součástí dané kapitoly je rozdělen na 2 části podle internetové databáze, ve které byly odborné články publikovány. Jednalo se v podstatě o porovnání databází ScienceDirect a Web of Science. V databázi ScienceDirect bylo nalezeno celkem 104 článků, které byly publikovány od roku 2005 až do listopadu 2008. Nejčastěji analyzované skupiny látek byly drogy, antibiotika, pesticidy a steroidní hormony. Z grafického přehledu je patrné, že UHPLC analýzy se týkaly velmi širokého spektra látek a od roku 2005 se počet publikovaných článků významně zvyšoval. Databáze Web of Science obsahovala více než dvojnásobné množství odborných článků (251) v porovnání s databází ScienceDirect. První články o UHPLC metodice byly v databázi Web of Science publikovány už v roce 2004. Stejně jako v databázi ScienceDirect se počet článků publikovaných v jednotlivých letech prudce zvyšoval a UHPLC analýzy se týkaly velkého množství látek, jak je patrné z grafického přehledu.

V další části práce byl uveden tabulkový přehled týkající se aplikací UHPLC metodiky s různými typy detekce v oblasti environmentální a potravinové analýzy. V tabulkách jsou obsaženy základní informace, které byly v jednotlivých člancích vyhledány. V oblasti environmentální analýzy byly detekovány různé druhy látek nejčastěji v odpadních, podzemních či povrchových vodách. Často byly analyzovány pesticidy nebo různé skupiny léčiv. V oblasti potravinové analýzy se často jednalo o analýzu veterinárních léčiv, pesticidů, antibiotik nebo například mykotoxinů. Jak v oblasti environmentální, tak v oblasti potravinové analýzy byl nejčastěji využit analytický systém Acquity UPLC od firmy Waters za využití kolon Acquity UPLC BEH C18 s 1,7 μm částicemi. Nejčastějším typem detekce byla tandemová hmotnostní spektrometrie.

V závěrečné části práce bylo uvedeno 5 konkrétních příkladů aplikací UHPLC metodiky v oblasti environmentální a potravinové analýzy. U všech příkladů jsou uvedeny příslušné chromatografické záznamy analyzovaných látek. Po provedení

všech uvedených analýz se prokázalo, že UHPLC metodika ve spojení s hmotnostně spektrometrickou detekcí přináší výhody ve smyslu zkrácení doby analýzy, zvýšení separační účinnosti, zvýšení citlivosti a snížení spotřeby organických rozpouštědel.

4. Seznam použité literatury

4.1. Použitá literatura

- [1] http://tomcat.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separa.htm 11/2008
- [2] http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/AJAOF.htm 11/2008
- [3] Nováková Lucie, Využití nových trendů při vývoji a validaci HPLC metod pro analýzu biologicky aktivních látek (disertační práce), Hradec Králové 2005
- [4] <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/233319/J-Calvin-Giddings> 11/2008
- [5] Nováková Lucie, Ultra Performance Liquid Chromatography (seminární práce), Hradec Králové
- [6] Dao T.-T. Nguyen, Davy Guillaume, Serge Rudaz, Jean-Luc Veuthey, Chromatographic behaviour and comparison of column packed with sub-2 μm stationary phases in liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1128, 105 – 113, 2006
- [7] Dao T.-T. Nguyen, Davy Guillaume, Serge Rudaz, Jean-Luc Veuthey, Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure, *J. Sep. Sci.*, 29, 1836 – 1848, 2006
- [8] <http://www.hplc.cz/UPLC/index.htm> 11/2008
- [9] http://www.cps.zju.edu.cn/D.PA&DM/images/IMG_0079.jpg 11/2008
- [10] Hernychová Lenka, Základy hmotnostní spektrometrie (prezentace), Ústav molekulární patologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany Hradec Králové
- [11] http://tomcat.bf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/vybranemet.htm 11/2008
- [12] Nováková Lucie, Analytické a bioanalytické využití hmotnostní spektrometrie (prezentace), Katedra analytické chemie FAF HK
- [13] www.uochb.cz/web/document/cms_library/450.pdf 11/2008
- [14] www.uochb.cz/web/document/cms_library/463.pdf 11/2008
- [15] holcapek.upce.cz/teaching/MS_prednasky_NEW_03_Ionizacni_techiky_web.pdf 11/2008
- [16] Andre Venter, Marcela Nefliu, R. Graham Cooks, Ambient desorption ionization mass spectrometry, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 27, No. 4, 284 – 290, 2008
- [17] holcapek.upce.cz/teaching/MS_prednasky_NEW_04_Hmotnostni_analyzatory_web.pdf 11/2008

- [18] holcapek.upce.cz/teaching/MS_prednasky_NEW_05_Hmotnostni_analyzatory_web.pdf 11/2008
- [19] web.vscht.cz/poustkaj/ISM%20MS%20SEPARACE%20A%20DETEKCE%20IO.. 11/2008
- [20] http://tomcat.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/vybranemet.htm 11/2008
- [21] Mira Petrovic, Meritxell Gros, Damia Barcelo, Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by ultra-performance liquid chromatography–quadrupole–time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1124, 68–8, 2006
- [22] Rosa Boleda, Teresa Galceran, Francesc Ventura, Trace determination of cannabinoids and opiates in wastewater and surface waters by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1175, 38–48, 2007
- [23] B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy, Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography–positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1161, 132–145, 2007
- [24] Elie Fux, Daniel McMillan, Ronel Bire, Philipp Hess, Development of an ultra-performance liquid chromatography–mass spectrometry method for the detection of lipophilic marine toxins, *Journal of Chromatography A*, 1157, 273–280, 2007
- [25] Dolores Hernando, Jose´ Gómez, Ana Aguera, Amadeo R. Fernández-Alba, LC-MS analysis of basic pharmaceuticals (beta-blockers and anti-ulcer agents) in wastewater and surface water, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 26, No. 6, 2007
- [26] Theresa Wiesemeier, Georg Pohnert, Direct quantification of dimethylsulfiopropionate (DMSP) in marine micro- and macroalgae using HPLC or UPLC/MS, *Journal of Chromatography B*, 850, 493–498, 2007
- [27] M. Silvia Díaz-Cruz, Damiá Barcelo, Recent advances in LC-MS residue analysis of veterinary medicines in the terrestrial environment, *Trends in Analytical Chemistry*, 26, 6, 637-646, 2007
- [28] G. Gervais, S. Brosillon, A. Laplanche, C. Helen. Ultra-pressure liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry for multiresidue determination of pesticides in water, *Journal of Chromatography A*, 1202, 163–172, 2008
- [29] Maria Huerta-Fontela, Maria Teresa Galceran, Jordi Martin-Alonso, Francesc Ventura, Occurrence of psychoactive stimulatory drugs in wastewaters in north-eastern Spain, *Science of The Total Environment*, 397, 31 – 40, 2008

- [30] Hong Chang, Shimin Wu, Jianying Hu, Mari Asami, Shoichi Kunikane, Trace analysis of androgens and progestogens in environmental waters by ultra-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1195, 44–51, 2008
- [31] Wei Xu, Qi Chen, Ting Zhang, Zengxuan Cai, Xiaofei Jia, Qing Xie, Yiping Ren, Development and application of ultra performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem triple quadrupole mass spectrometry for determination of seven microcystins in water samples, *Analytica chimica acta*, 626, 28–36, 2008
- [32] Jet C. Van De Steene and Willy E. Lambert, Comparison of Matrix Effects in HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS Analysis of Nine Basic Pharmaceuticals in Surface Waters, *American Society for Mass Spectrometry*, 19, 713–718, 2008
- [33] Marinella Farré, Marina Kuster, Rikke Brix, Fernando Rubio, María-J. López de Alda, Damia Barceló, Comparative study of an estradiol enzyme-linked immunosorbent assay kit, liquid chromatography–tandem mass spectrometry, and ultra performance liquid chromatography–quadrupole time of flight mass spectrometry for part-per-trillion analysis of estrogens in water samples, *Journal of Chromatography A*, 1160, 166–175, 2007
- [34] Xu Ji-Lin, Yang Jia Feng, Yan Xiao-Jun, Wang Ya-Jun, You Zhong-Jie, Li Hai-Ying, Tong Ling, Determination of free cortisol in marine fish sera samples by liquid chromatography-mass spectrometry, *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 36, 7, 905-909, 2008
- [35] María José Farré, Stephan Brosillon, Xavier Doménech, José Peral, Evaluation of the intermediates generated during the degradation of Diuron and Linuron herbicides by the photo-Fenton reaction, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 189, 364–373, 2007
- [36] Drozdzyński Dariusz, Folkman Wojciech, Analysis of triazine herbicides in water using solid phase extraction followed by ultra-performance liquid chromatography with tandem mass detection (UPLC-MS/MS), *Chemia Analytyczna*, 53, 3, 391-400, 2008
- [37] Li Yong-Fu, Gao Hua-Peng, Zhang Jian-Ling, Ying Yue-Kang, Wu Zhi-Yun, Rong Wen-Qin, Simultaneous determination of residual furathiocarb and deltamethrin in eel by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 36,6, 755-759, 2008
- [38] Milagros Mezcua, Ana Agüera, Josep Lluís Lliberia, Miguel Angel Cortés, Bárbara Bagó, Amadeo R. Fernández-Alba, Application of ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry to the analysis of priority pesticides in groundwater, *Journal of Chromatography A*, 1109, 222–227, 2006
- [39] Pastor Montoro Elena, Romero Gonzalez Roberto, Garrido Frenich Antonia, Hernandez Torres M. Elena, Martinez Vidal Jose Luis, Fast determination of herbicides in waters by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass

spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21, 22, 3585-3592, 2007

[40] Farre Marinella, Gros Meritxell, Hernandez Belen, Petrovic Mira, Hancock Peter, Barcelo Damla, Analysis of biologically active compounds in water by ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22, 1, 41-51, 2008

[41] Gonzalez Susana, Petrovic Mira, Radetic Maja, Jovancic Petar, Ilic Vesna, Barcelo Damia, Characterization and quantitative analysis of surfactants in textile wastewater by liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22, 10, 1445-1454, 2008

[42] Ibanez Maria, Sancho Juan V., McMillan Daniel, Rao Ramesh, Hernandez Felix, Rapid non-target screening of organic pollutants in water by ultraperformance liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 27, 5, 481-489, 2008

[43] Didier Orтели, Patrick Edder, Emmanuelle Cognard, Philippe Jan, Fast screening and quantitation of microcystins in microalgae dietary supplement products and water by liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta* 617, 230–237, 2008

[44] Rehmann Nils, Hess Philipp, Quilliam Michael A., Discovery of new analogs of the marine biotoxin azaspiracid in blue mussels (*Mytilus edulis*) by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22, 4, 549-558, 2008

[45] K. Bentayeb, R. Batlle, J. Romeo, C. Nerín, UPLC–MS as a powerful technique for screening the nonvolatile contaminants in recycled PET, *Anal Bioanal Chem* 388, 1031–1038, 2007

[46] Cristiana C. Leandro, Peter Hancock, Richard J. Fussell, Brendan J. Keely, Comparison of ultra-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography for the determination of priority pesticides in baby foods by tandem quadrupole mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1103, 94–101, 2006

[47] E. Barceló-Barrachina, E. Moyano, M.T. Galceran, J.L. Lliberia, B. Bagó, M.A. Cortes, Ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of heterocyclic amines in food, *Journal of Chromatography A*, 1125,195–203, 2006

[48] Tomáš Kovalczuk, Martin Jech, Jan Poustka, Jana Hajšlová, Ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry: A novel challenge in multiresidue pesticide analysis in food, *Analytica Chimica Acta* 577, 8–17, 2006

[49] Yolanda Picó, Marinel. la Farré, Carla Soler, Damía Barceló, Identification of unknown pesticides in fruits using ultra-performance liquid chromatography–

quadrupole time-of-flight mass spectrometry Imazalil as a case study of quantification, *Journal of Chromatography A*, 1176, 123–134, 2007

[50] Cristiana C. Leandro, Peter Hancock, Richard J. Fussell, Brendan J. Keely, Ultra-performance liquid chromatography for the determination of pesticide residues in foods by tandem quadrupole mass spectrometry with polarity switching, *Journal of Chromatography A*, 1144, 161–169, 2007

[51] Yiping Ren, Yu Zhang, Shuangliang Shao, Zengxuan Cai, Liang Feng, Hongfeng Pan, Zhigang Wang, Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1143, 48–64, 2007

[52] Jiří Gruz, Ondřej Novák, Miroslav Strnad, Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC–MS/MS, *Food Chemistry* 111, 789–794, 2008

[53] Yu Zhang, Jingjing Jiao, Zengxuan Cai, Ying Zhang, Yiping Ren, An improved method validation for rapid determination of acrylamide in foods by ultra-performance liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1142, 194–198, 2007

[54] Zhaohui Fu, Xuexiang Huang, Shungeng Min, Rapid determination of aflatoxins in corn and peanuts, *Journal of Chromatography A*, 1209, 271–274, 2008

[55] Giedre Kesienaitė, Evaldas Naujalis, Audrius Padarauskas, Matrix solid-phase dispersion extraction of carbadox and olaquinox in feed followed by hydrophilic interaction ultra-high-pressure liquid chromatographic analysis, *Journal of Chromatography A*, 1209, 83–87, 2008

[56] Urairat Koesukwiwat, Kunaporn Sanguankaew, Natchanun Leepipatpiboon, Rapid determination of phenoxy acid residues in rice by modified QuEChERS extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta* 626, 10–20, 2008

[57] M.M. Aguilera-Luiz, Jose Luis Martínez Vidal, Roberto Romero-González, Antonia Garrido Frenich, Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1205, 10–16, 2008

[58] R. Romero-González, A. Garrido Frenich, J.L. Martínez Vidal, Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Talanta* 76, 211–225, 2008

[59] Zengxuan Cai, Yu Zhang, Hongfeng Pan, Xiaowei Tie, Yiping Ren, Simultaneous determination of 24 sulfonamide residues in meat by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1200, 144–155, 2008

- [60] Pilar Viñas, Nerea Aguinaga, Natalia Campillo, Manuel Hernández-Córdoba, Comparison of stir bar sorptive extraction and membrane-assisted solvent extraction for the ultra-performance liquid chromatographic determination of oxazole fungicide residues in wines and juices, *Journal of Chromatography A*, 1194, 178–183, 2008
- [61] Kovalczuk T., Lacina O., Jech M., Poustka J., Hajslova J., Novel approach to fast determination of multiple pesticide residues using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), *Food Additives and Contaminants* 25, 4, 444-457, 2008
- [62] P. Plaza Bolaños, R. Romero-González, A. Garrido Frenich, J. L. Martínez Vidal, Application of hollow fibre liquid phase microextraction for the multiresidue determination of pesticides in alcoholic beverages by ultra-high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1208, 16–24, 2008
- [63] A. A. M. Stolkem, P. Rutgers, E. Oosterink, J. J. P. Lasaroms, R. J. B. Peters, J. A. van Rhijn, M. W. F. Nielen, Comprehensive screening and quantification of veterinary drugs in milk using UPLC–ToF-MS, *Anal Bioanal Chem* 391, 2309–2322, 2008
- [64] Anton Kaufmann, Patrick Butcher, Kathryn Maden, Mirjam Widmer, Quantitative multiresidue method for about 100 veterinary drugs in different meat matrices by sub 2- μ m particulate high-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1194, 66–79, 2008
- [65] Vytautas Tamošiūnas, Audrius Padarauskas, Comparison of LC and UPLC Coupled to MS–MS for the Determination of Sulfonamides in Egg and Honey, *Chromatographia* 67, 783-788, 2008
- [66] A. Garrido Frenich, J. L. Martínez Vidal, E. Pastor-Montoro, R. Romero-González, High-throughput determination of pesticide residues in food commodities by use of ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem* 390, 947–959, 2008
- [67] O. J. Pozo, M. Barreda, J. V. Sancho, F. Hernández, J. Ll. Lliberia, M. A. Cortés, B. Bagó, Multiresidue pesticide analysis of fruits by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem*, 389, 1765–1771, 2007
- [68] Jinhui Zhou, Jing Zhao, Hancheng Yuan, Ying Meng, Yi Li, Liming Wu, Xiaofeng Xue, Comparison of UPLC and HPLC for Determination of trans-10-Hydroxy-2-Decenoic Acid Content in Royal Jelly by Ultrasound-Assisted Extraction with Internal Standard, *Chromatographia* 66, 185-190, 2007
- [69] Baiyi Lu, Ying Zhang, Xiaoqin Wu, Jiayi Shi, Separation and determination of diversiform phytosterols in food materials using supercritical carbon dioxide extraction and ultraperformance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta* 588, 50–63, 2007

- [70] Ventura Meritxell, Guillen David, Anaya Ivan, Broto-Puig Francesc, Lliberia Josep Lluís, Agut Montserrat, Comellas Lluís, Ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the simultaneous analysis of aflatoxins B1, G1, B2, G2 and ochratoxin A in beer, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20, 21, 3199-3204, 2006
- [71] Chu Xiao-Gang, Yong Wei, Ling Yun, Qiu Wen-Li, Yao Hui-Yuan, Simultaneous determination of 107 herbicides in soybean by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 36, 3, 325-329, 2008
- [72] Wang Jin-Hua, Lu Xiao-Yu, Huang Mei, Wu Zhuan, Ma Gui-Ping, Xu Chao-Yi, Rapid screening and confirmation of chlormequat and mepiquat residues in tomato and its products using liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry, *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 35, 10, 1509-1512, 2007
- [73] Cooper Karen A., Campos-Gimenez Esther, Alvarez Diego Jimenez, Nagy Kornel, Donovan Jennifer L., Williamson Gary, Rapid reversed phase ultra-performance liquid chromatography analysis of the major cocoa polyphenols and inter-relationships of their concentrations in chocolate, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 8, 2841-2847, 2007
- [74] Hession Aileen O., Esery Elizabeth G., Croes Robert A., Maxwell Carl A., N-acetylglutamate and N-acetylaspartate in soybeans (*Glycine max* L.), maize (*Zea mays* L.), and other foodstuffs, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 19, 9121-9126, 2008
- [75] Taylor Michael J., Keenan George A., Reid Kirsty B., Fernandez Diana Uria, The utility of ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionisation time-of-flight mass spectrometry for multi-residue determination of pesticides in strawberry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22, 17, 2731-2746, 2008
- [76] Kim Byungchul, Perkins Lewis B., Bushway Rodney J., Nesbit Stephainie, Fan Titan, Sheridain Robert, Greene Virginia, Determination of melamine in pet food by enzyme immunoassay, high-performance liquid chromatography with diode array detection, and ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *Journal of Aoac International* 91, 2, 408-413, 2008
- [77] Li Xiu-Yong, Mon Jun, Liu Hui-Tao, Hu Zhi-De, Simultaneous determination of 10 antioxidants in oils and fats by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry, *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 36, 3, 369-372, 2008
- [78] Shao Bing, Jia Xiaofei, Wu Yongning, Hu Jianying, Tu Xiaoming, Zhang Jing, Multi-class confirmatory method for analyzing trace levels of tetracycline and quinolone antibiotics in pig tissues by ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21, 21, 3487-3496, 2007
- [79] Wang Jian, Leung Daniel, Analyses of macrolide antibiotic residues in eggs, raw milk, and honey using both ultra-performance liquid chromatography/quadrupole

time-of-flight mass spectrometry and high-performance liquid chromatography/
/tandem mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21, 19,
3213-3222, 2007

[80] Cui Xiaoliang, Shao Bing, Zhao Rong, Yang Yi, Hu Jianying, Tu Xiaoming,
Simultaneous determination of seventeen glucocorticoids residues in milk and eggs
by ultra-performance liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry,
Rapid Communications in Mass Spectrometry 20, 15, 2355-2364, 2006

[81] Kapusta Ireneusz, Janda Bohdan, Szajwaj Barbara, Stochmal Anna, Piacente
Sonia, Pizza Cosimo, Franceschi Federico, Franz Chlodwig, Oleszek Wieslaw,
Flavonoids in horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*) seeds and powdered waste
water byproducts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 21, 8485-8490,
2007