

Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (LC-MS)

Analýza bílého vína: stanovení organických kyselin

Teoretická část úlohy:

- ✓ Chemické složení hroznů vinné révy a charakteristika stanovovaných analytů: kyselina jablečná, vinná, citrónová, sorbová
- ✓ Základní principy hmotnostní spektrometrie, ionizační techniky za atmosférického tlaku – elektrosprej (ESI) a chemická ionizace (APCI)
- ✓ Spojení separačních technik a hmotnostní spektrometrie

Praktická část úlohy:

- ✓ Příprava přístroje pro měření – ladění, kalibrace
- ✓ Analýza standardů – přímý nástřik a záznam spekter
- ✓ LC separace směsi standardů - identifikace neznámého analytu
- ✓ Analýza bílého vína – identifikace analytů, výběr z databáze

Hrozný vinné révy a jejich chemické složení

Vinná réva (*Vitis vinifera*) je jednou z nejstarších užitkových rostlin, jejíž plody člověk využívá k přímé konzumaci nebo k přípravě vín a vinných moštů. Bobule vinné révy obsahují celou řadu zdraví prospěšných látek, jejichž přítomnost a zastoupení ovlivňuje řada faktorů. Chemické složení hroznů je závislé například na odrůdě vinné révy, klimatických podmínkách při pěstování a době sběru hroznů. Svou roli sehraává také způsob jejich následného skladování, případně napadení plísní či jinými škůdci. Ve zralých hroznech tvoří více než 90 % ve vodě rozpustných látek cukry (zejména glukosa a fruktosa), jejichž fermentací dochází k přeměně na alkohol a oxid uhličitý. Zbytek připadá na organické kyseliny a ostatní látky, mezi které patří dusíkaté látky (aminokyseliny, bílkoviny), minerální prvky (K, Ca, Mg, P, S, Fe, Mn, Zn), vitamíny (zejména C), fenolické kyseliny, aromatické látky apod.

Přítomnost organických kyselin ovlivňuje kvalitu připravovaného vína a určuje jeho organoleptickou kvalitu a stabilitu. K nejvíce zastoupeným patří kyselina jablečná a vinná, které mají největší podíl na kvalitě hroznů. Čím jsou hrozny vyztřejší, tím je vyšší obsah kyseliny vinné a naopak, u nezralých hroznů převažuje chuťově ostřejší kyselina jablečná. Z dalších zastoupených organických kyselin lze jmenovat např. kyselinu citrónovou, jantarovou či fumarovou. Celková koncentrace organických kyselin ve šťávě ze zralých hroznů se obvykle pohybuje v rozmezí 5 - 10 g/l. Hroznový mošt (neboli 100% šťáva) se

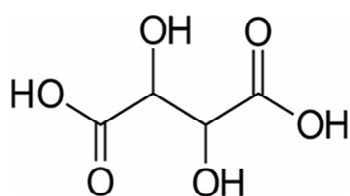
získává lisováním z rozdrčených a odzrněných hroznů a slouží k přímé spotřebě nebo ke kvašení a následné výrobě vína.

Kyselina jablečná patří ve víně k dominantním organickým kyselinám, jejichž obsah se během zrání hroznů výrazně mění. Ve zralých hroznech se její obsah uvádí v rozmezí 1 – 4 g/l, během zrání však může docházet k poklesu až několik g/l týdně. Kyselina jablečná bývá ve víně vnímaná jako ostrá kyselina a proto je snahou vyrábět víno s jejím nízkým obsahem, nicméně velmi nízké koncentrace mohou způsobit plochost a fádnotu vyrobených vín. Kyselina jablečná bývá také lehce zpracovávána mikroorganismy. Pomocí mléčných bakterií (*Oenococcus oeni*) dochází k její fermentaci a přeměně na kyselinu mléčnou, která víno zjemňuje a působí příznivě na jeho chuť i vůni.

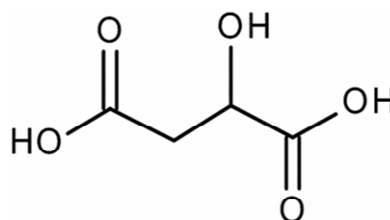
Kyselina vinná je metabolicky a mikrobiálně stabilní kyselina a její obsah při sklizni zralých hroznů se pohybuje v rozmezí 5 – 10 g/l. Změny v obsahu během zrání bobulí jsou pouze malé, ke snižování koncentrace však může docházet např. vlivem častých dešťových srážek či přítomností některých kationtů (např. železné a měďnaté ionty mohou oxidovat kyselinu vinnou na glyoxyl).

Kyselina citrónová se vyskytuje již v nezralých bobulích hroznů a zráním se její obsah prakticky nemění. Její obsah v hroznovém moštu se uvádí 100 – 300 mg/l, u ledových vín pak dosahuje hodnot přes 600 mg/l. Jedná se o velmi stálou kyselinu, jejímž umělým přidáváním se zlepšuje kvalita a chuť vína. Dle současné legislativy lze kyselinu citrónovou přidávat např. do stolních nebo šumivých vín do maximální koncentrace 1 g/l.

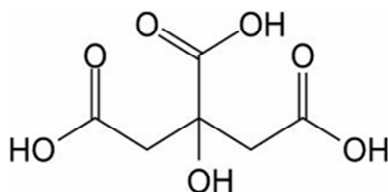
Kyselina sorbová nepatří mezi kyseliny, které by se ve vinných hroznech přirozeně vyskytovaly, bývá však přidávána jako konzervační prostředek k zábraně druhotného kvašení zejména u vín, obsahujících zbytkový cukr. Její tolerovaná koncentrace u zkvašeného hroznového moštu by neměla přesáhnout 200 mg/l.



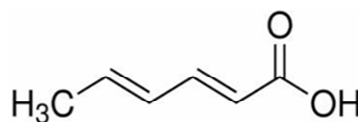
kyselina vinná



kyselina jablečná



kyselina citrónová

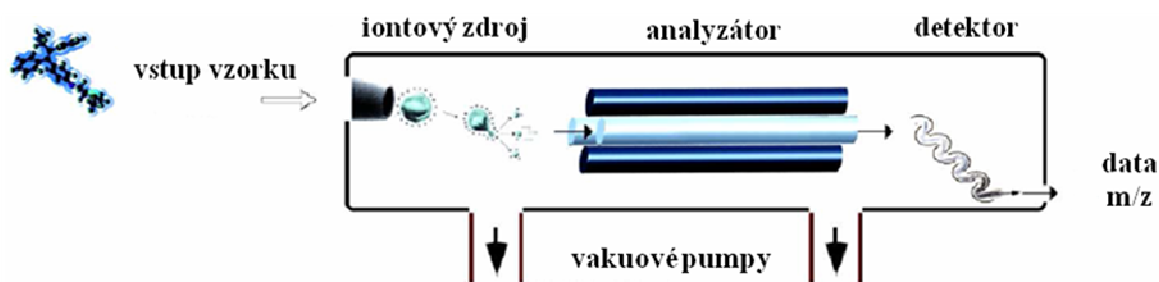


kyselina sorbová

Základní principy hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektrometrie (*Mass Spectrometry, MS*) nachází uplatnění v analytické chemii při identifikaci a charakterizaci molekul. Její podstatou je separace iontů látek na základě jejich poměru relativní molekulové hmotnosti ku elektrickému náboji (m/z) a následná detekce (zaznamenání hmotnostního spektra, na kterém je podle m/z zobrazeno zastoupení jednotlivých iontů).

Základní uspořádání hmotnostního spektrometru se skládá z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Zpravidla je vše uzavřeno v prostoru, ve kterém je pomocí systému pump kontinuálně udržováno vakuum.



K ionizaci vzorku může docházet za atmosférického tlaku nebo za sníženého tlaku. Způsobů ionizace vzorků je několik a volí se podle vlastností měřených látek a kompatibility s analyzátozem. Rozlišujeme mezi tzv. tvrdými technikami ionizace, při kterých je dodána vyšší energie a dochází ve větší míře k fragmentaci iontů (elektronová ionizace EI) a měkkými technikami s nízkou ionizační energií (elektrosprej ESI, chemická ionizace za atmosférického tlaku APCI, laserová desorpce/ionizace za účasti matrice MALDI apod.).

Po převedení vzorku na ionty dochází v analyzátozem k jejich separaci podle m/z . Z běžně používaných analyzátozem můžeme jmenovat například kvadrupólový analyzátozem, průletové analyzátozem, iontové pasti, magnetický sektor nebo ion-cyklotronovou rezonanci. Pro zvýšení citlivosti a selektivity se mohou některé analyzátozem také kombinovat.

V posledním kroku dochází k dopadu iontů na detektor. Poskytnutý signál je úměrný počtu dopadajících iontů a je zaznamenáván jako elektrický proud, který vzniká přímým dopadem iontů nebo pomocí elektronového násobiče, kdy sekundární emisí elektronů dochází navíc k zesílení primárního signálu.

Při hmotnostně spektrometrických analýzách hrají jednu z nejdůležitějších rolí rozlišení (*Resolution*) a správnost stanovení hmotnosti (*Mass Accuracy*). Při nízkém rozlišení dochází k nedostatečnému prokreslení izotopových obálek, což může znesnadnit identifikaci látek. Rozlišení a tím i kvalita záznamů se liší v závislosti na typu použitého analyzátozem.

Správnost určení stanovené hmotnosti udává relativní rozdíl mezi naměřenou a vypočtenou hodnotou m/z vztaženou k vypočtené hodnotě. Jedná se o bezrozměrnou veličinu, vyjádřenou v jednotkách ppm. Pro možnost určení elementárního složení se jako minimum uvádí správnost stanovení m/z 5 ppm s externí kalibrací hmotnostního spektrometru.

$$\frac{(\text{změřená hmotnost} - \text{kalkulovaná hmotnost}) \times 1,000,000}{\text{kalkulovaná hmotnost}} = \text{ppm}$$

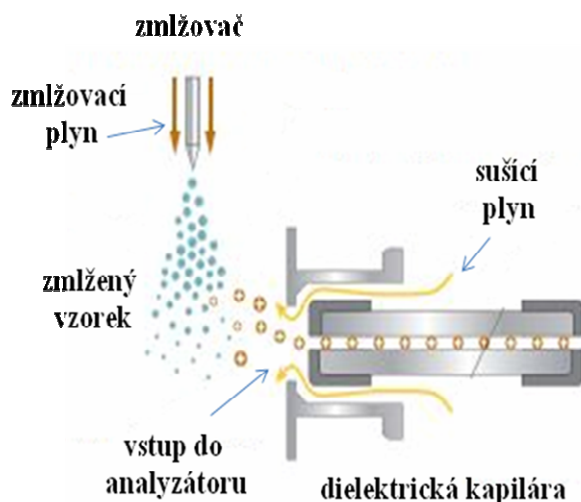
Pro představu, je-li hmotnost 1000 Da stanovená s chybou 0,5 Da, pak se jedná o správnost stanovení ± 500 ppm. Je-li chyba 0,01 Da, jedná se o správnost stanovení ± 10 ppm.

Elektrosprej

Při ionizaci elektrosprejem (*ElectroSpray Ionization, ESI*) je vzorek, rozpuštěný ve vhodném rozpouštědle, přiváděn do zmlžovače pomocí kovové kapiláry, na kterou je vloženo vysoké napětí (kV). Roztok je sprejován, postupně dochází k odpařování rozpouštědla a následující desorpci iontů. Během odpařování se kapičky zmenšují, zvyšuje se hustota povrchového náboje, dochází ke coulombickým explozím a dalšímu zmenšování kapek, až se nakonec uvolní protonovaný molekulární ion. Podle polaritý vkládaného napětí na kapiláru vznikají kladně nebo záporně nabitý ionty. Následně jsou ionty elektrodami usměrněny do vstupu do analyzátoru. Proud sušícího plynu slouží k odstranění par rozpouštědel a neutrálních molekul.

Při ionizaci elektrosprejem dochází k minimálnímu výskytu fragmentů, převážně se tvoří adukty s iontem vodíku a naopak dochází k tvorbě vícekrát nabitých iontů. Tato ionizační technika proto poskytuje možnost analýzy látek s molekulovou hmotností v řádech kDa (analýza biomakromolekul, proteomická analýza). Typickou vlastností je také tvorba aduktů např. se sodnými, draselnými ionty nebo se složkami rozpouštědla.

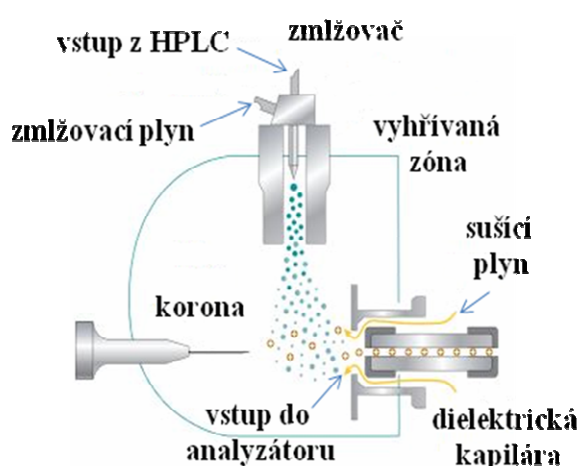
Elektrosprej patří k nejčastěji používaným ionizačním technikám pro spojení s HPLC. Využívá se pro stanovení středně polárních až iontových látek v širokém rozmezí molekulových hmotností.



Chemická ionizace za atmosférického tlaku

Chemická ionizace za atmosférického tlaku (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI*) se v porovnání s elektrosprejem vyznačuje výše energetickou ionizací a proto se mohou ve spektru častěji vyskytovat fragmenty stanovovaných látek. Roztok vzorku nebo eluát z LC je sprejován do vyhřívané části iontového zdroje (typicky 250 až 400 °C), kde dochází k odpařování. Vznikající ionty v plynné fázi jsou ionizovány pomocí koronového výboje, který se realizuje na elektrodě (jehle), na kterou je vloženo vysoké napětí (3 – 4 kV). Ionty jsou dále pomocí elektrického pole usměrněny do vstupu analyzátoru. Sušící plyn slouží k rozbití případných klastrů.

APCI se používá k ionizaci nepolárních až středně polárních látek, většinou pro ionizaci molekul do molekulové hmotnosti cca 2000. Umožňuje ionizaci nepolárních látek z nepolárních rozpouštědel. Po elektrospreji se jedná o druhou nejpoužívanější techniku při spojení s HPLC.



Spojení separačních technik a hmotnostní spektrometrie

Smyslem spojení hmotnostní spektrometrie s některou ze separačních technik (např. GC, LC, CE) je možnost oddělit jednotlivé analyty a zároveň je identifikovat v průběhu jedné analýzy. Zpočátku bylo technicky složité převedení látek z kapalinového chromatografu, pracujícího za atmosférického tlaku do prostoru hmotnostního analyzátoru, pracujícího za vysokého vakua (10^{-5} až 10^{-4} Pa). K dalším problémům poté patřilo také odstranění velkého nadbytku mobilní fáze.

V dnešní době patří k nejběžnějším spojení LC/MS s ionizací za atmosférického tlaku, které umožňuje použití průtoků mobilní fáze až 2 ml/min a při které se mobilní fáze přímo účastní procesu ionizace. Důležitou roli hraje také výběr mobilní fáze, která musí být s MS kompatibilní. Podmínkou je používání těkavých pufrů jako přísad mobilní fáze (octan amonný, kyselina trifluoroctová nebo mravenčí). Soli netěkavých anorganických pufrů (fosfátový, borátový apod.) mohou krystalizovat a znečišťovat, případně i ucpávat iontový zdroj hmotnostního spektrometru.

Praktická část úlohy

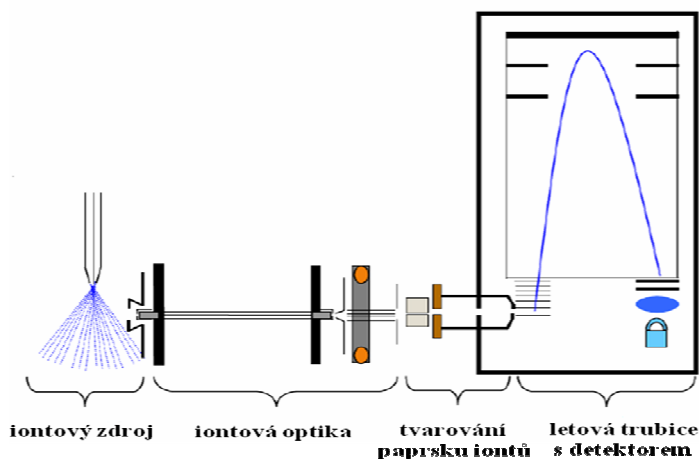
Přístroje a zařízení

- 6224 Accurate-Mass TOF LC-MS system (Agilent Technologies)
- Multimode iontový zdroj (MMI) – kombinace ESI a APCI ionizace
- kdScientific infúzní pumpa
- kolona Phenomenex Luna C18 (250 x 3 mm, 5 μ m)
- ultrazvuková lázeň
- injekční stříkačka (Hamilton)
- odměrné baňky a další běžné laboratorní vybavení

Chemikálie

- methanol pro LC-MS
- kyselina mravenčí
- standardy následujících analytů
 - kyselina jablečná
 - kyselina vinná
 - kyselina citrónová

Schéma přístroje Agilent 6224 TOF LC/MS



Příprava přístroje před vlastním měřením

Ladění a kalibrace – před vlastním měřením je potřeba zkontrolovat nastavení přístroje. Během ladění dochází ke kontrole funkčnosti přístroje, dochází k optimalizaci nastavení iontové optiky, aby bylo dosaženo maximálního přenosu iontů do systému, tj. co nejlepších intenzit signálu a co nejlepšího rozlišení. V procesu kalibrace pak dochází ke kontrole a optimalizaci nastavení osy m/z pomocí kalibračního roztoku o známém složení látek. Kalibrace se provádí pomocí perfluorovaných látek, které díky své vysoké těkavosti udržují nízké pozadí v systému. Po provedení ladění a kalibrace je vyexportován report, sumarizující všechny sledované parametry.

Pozn. pro případ naší analýzy bude provedeno ladění pouze na negativní módu MMI

Analýza standardů

Přímý nástřik jednotlivých standardů – pomocí externí pumpy je vhodně naředěný roztok standardu veden do iontového zdroje a po ustálení toku iontů v systému je zaznamenáno jeho hmotnostní spektrum. Pro měření přímého nástřiku použijte nejprve metodu s názvem **Spec_direct_APCIneg.m**, po proměření změňte typ ionizace a proměřte standardy metodou **Spec_direct_ESIneg.m**. Při přepnutí metody je potřeba vyčkat cca 10 minut pro přenastavení parametrů ionizace. Mezi jednotlivými analýzami je potřeba přístroj propláchnout, nejlépe mobilní fází nebo použitým organickým rozpouštědlem (v našem případě použijeme připravenou mobilní fází). Zásobní roztoky vybraných analytů mají koncentraci 10 mg/l, pro analýzu použijte roztoky o koncentraci 1 µg/ml a dávkujte pomocí infuzní pumpy rychlostí 2 ml/min.

	kyselina jablečná	kyselina vinná	kyselina citrónová	kyselina sorbová
sumární vzorec	$C_4H_6O_5$	$C_4H_6O_6$	$C_6H_8O_7$	$C_6H_8O_2$
průměrná hmotnost	134.0874	150.0868	192.1235	112.1265
monoizotopická hmotnost	134.0215	150.0164	192.0270	112.0524

LC-MS separace směsi standardů

LS-MS analýza standardů – po nástřiku směsi standardů organických kyselin a jejich separaci na koloně je eluent veden do iontového zdroje a analyzován. Pro analýzu použijte metodu **Spec_LCMS_ESIneg.m**. Směs kyselin je připravena v koncentraci 10 µg/ml, injektované množství je 10 µl, doba jedné analýzy činí 12 minut. Po analýze přístroj promyjte alespoň 5 minut mobilní fází do odpadu.

Identifikace neznámého analytu – v záznamu separace směsi standardů je ukryt neznámý analyt, pomocí softwarové analýzy a databáze jej identifikujte.

Analýza bílého vína

Analýza bílého vína – proveďte LC-MS analýzu 1000x zředěného vzorku bílého vína (Rulandské šedé, Znovín, 2011). Opět použijte metodu **Spec_LCMS_ESIneg.m**, dobu analýzy nastavte na 20 minut. Po skončení analýzy systém důkladně promyjte mobilní fází. Pomocí softwarové analýzy a databáze identifikujte přítomné analyty. V případě neúspěšného softwarového určení vyhledejte hledané analyty pomocí extrahovaných iontových chromatogramů. Určete, zda byla ve víně přítomná kyselina sorbová.

Vypracování protokolu

Ladění a kalibrace – přiložte k protokolu vytvořený report a zvýrazněte, jakého nejvyššího rozlišení bylo během ladění dosaženo a jaké hmotě toto rozlišení přísluší. Zároveň zvýrazněte chybu, s jakou se přibližně pohybovalo stanovení vašich analytů.

Analýza standardů – vyexportujte naměřená spektra a proveďte jejich interpretaci. Uveďte správnost stanovení hmotnosti všech analytů v jednotkách ppm. Jsou ve spektrech patrné nějaké fragmenty?

LC-MS separace směsi standardů – srovnajte záznamy z UV a MS detektoru, z chromatografického záznamu celkového toku iontů (*total ion chromatogram – TIC*) vyextrahujte hmotnostní spektra pro jednotlivé chromatografické píky a porovnejte s přímým nástřikem, dále proveďte vyhodnocení záznamu a s pomocí databáze kyselin identifikujte proměřené analyty. Identifikujte neznámou organickou kyselinu v analyzovaném vzorku.

Analýza neznámého vzorku – podobně jako v předchozím případě vyextrahujte ze záznamu celkového toku iontů hmotnostní spektra pro pozorované píky. Pokuste se o identifikaci píků pomocí databáze spekter. Byla ve vzorku přítomná kyselina sorbová?

Doporučená literatura

- ✓ Jozef Kuruc, Úvod do hmotnostnej spektrometrie, Omega info, Bratislava 2004