

3IL-01**SOUČASNÉ TRENDY HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE**

MICHAEL VOLNÝ^a, KAREL LEMR^b, MARIÁN HAJDÚCH^b, VERONIKA VIDOVÁ^a, MIROSLAV ŠULC^a, MAREK KUZMA^a, OLDŘICH BENADA^a a VLADIMÍR HAVLÍČEK^{a*}

^a Mikrobiologický ústav AV ČR v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, ^b Universita Palackého v Olomouci, Tř. 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc
vlhavlic@biomed.cas.cz

Hmotnostní spektrometrie slaví letos stoleté výročí svého vzniku. Během dvacátého století prožívala horší i lepší chvíle, několikrát byla „otci-zakladateli“ označena za mrtvou metodu, aby v osmdesátých letech přispěla ke vzniku zcela nových, zvláště biologických oborů a aplikací. První dekáda XXI století pak charakterizuje hmotnostní spektrometrii (mimo jiného) třemi hesly: ambientní techniky, vysoké rozlišení a hmotnostní zobrazování. Ambientní techniky zahrnují ionizační procesy, které probíhají za normálního tlaku a teploty a v některých případech proto mohou sloužit i k ionizaci/desorpci látek z živých objektů. Vysoce rozlišující analyzátoři se stávají zcela běžnou instrumentací, a to díky své přesnosti a správnosti měření, občas spojené i s dobrým dynamickým rozsahem měření a rychlým sběrem dat. Do této kategorie patří na principu iontové cyklotronové rezonance (ICR), orbitrapu a moderní analyzátoři z doby letu (TOF). Z nových aplikací hmotnostní spektrometrie poslední doby nelze nezmínit hmotnostní mikroskopii (2D hmotnostní zobrazování). V anglosaské literatuře se hovoří o technice „Mass Spectrometry Imaging“. U hmotnostního zobrazení jsou vizualizovány dvourozměrné obrazy povrchu získané počítačovou rekonstrukcí iontových druhů, které jsou ze zobrazovaného objektu desorbovány. Děje se tak rastrovacím způsobem, a to při prostorovém rozlišení zatím v řádu jednotek až stovek mikrometrů podle typu primárního ionizujícího svazku, kterým může být laser (při asistenci matrice hovoříme o MALDI zobrazení), svazek iontů (např. C60) nebo svazek nabitých kapiček (DESI mikroskopie). Oproti ostatním zobrazovacím technikám hmotnostní mikroskopie nedává pouze odpověď typu „je tam něco, vypadá to jako“, ale současně i informaci o chemické povaze příslušného zkoumaného objektu. Hmotnostní zobrazení/mikroskopie je tedy potenciálním nástrojem pro identifikaci a charakterizaci biomarkerů, např. molekul charakterizujících patologický stav. Pokud to dovolu dynamický rozsah, můžeme hodnotit mj. nádorovou tkáň, případně subtypy tumorů na základě souboru bílkovin nebo jiných specifických molekul, které jsou ve zdravých tkáních zastoupeny jinak. Při hledání molekulárních znaků nějakého infekčního onemocnění, lze přímo porovnávat tkáň zdravou a infikovanou. Můžeme se dívat, do jakých orgánů se deponuje podané nízkomolekulární léčivo a jak je metabolizováno. Můžeme sledovat, jaká je molekulární odezva na příslušný léčebný proces. V rámci přednášky budou dokumentovány biologické aplikace s důrazem na analýzu lipidů a peptidů.

Tato práce vznikla za podpory grantů MŠMT ČR LC07017 a MSM6198959216 a výzkumného záměru AV0Z50200510.

3IL-02**VÍCEROZMĚRNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE**

PAVEL JANDERA

*Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice
pavel.jandera@upce.cz*

Při analýze složitých biologických a jiných vzorků je často třeba separovat a stanovit velký počet látek. K tomuto účelu často nepostačuje separace na jedné koloně při tzv. "jednorozměrné" chromatografii. Hlavním cílem vícerozměrné HPLC je zvýšení počtu separovaných látek v průběhu jedné analýzy ve složitých vzorcích. Vedle použití účinných kolon má zásadní význam použití systémů s různými separačními selektivitami v jednotlivých dimenzích, nejlépe tzv. "ortogonálních" systémů, vykazujících velmi nízkou míru korelace retence. Dvourozměrná HPLC byla dosud využívána především v proteomickém výzkumu, v poslední době stále rostou aplikace v dalších oblastech – při analýzách látek rostlinného původu, potravin, životního prostředí, metabolitů léčiv, syntetických polymerů a dalších technických produktů.

Techniky dvourozměrné HPLC se již dlouho využívaly v tzv. off-line uspořádání, kdy se izolovala část vzorku separovaného v jednom systému a potom se podrobila separaci v jiném systému. Občas se používalo i on-line zapojení, kde se vybraná frakce eluátu z jedné kolony převáděla pomocí šesticestného přepínacího ventilu do jiné kolony. Obě tyto pracovní techniky umožňovaly získat podrobné informace pouze o vybrané části vzorku.

Úplnou informaci o složení celého vzorku lze získat při poměrně nové technice tzv. "comprehensive" (úplné, celostní) LCxLC kapalinové chromatografie, kde se převádí veškerý eluát z kolony v první dimenzi v malých frakcích přímo (inline) do druhé dimenze ve dvou střídavých cyklech s předem nastavenou frekvencí odběru frakcí z kolony v první dimenzi. Tímto způsobem je celý vzorek podroben separaci v obou dimenzích a lze získat úplnou informaci o jeho složení. Zatím co se předchozí frakce z první smyčky (obohacovací kolony) analyzuje na koloně ve druhé dimenzi, následující frakce se jímá ve druhé smyčce (či na druhé obohacovací kolonce). Zařízení pro praktickou realizaci této techniky lze sestavit z běžného kapalinového chromatografu, pomocného HPLC čerpadla pro druhou dimenzi a převodníku frakcí mezi první a druhou dimenzí, obvykle deseticestného nebo dvou šesticestných ventilů se dvěma stejnými dávkovacími smyčkami nebo krátkými obohacovacími mikrokolkami. Mobilní fáze v obou systémech je třeba volit s ohledem na vzájemnou kompatibilitu. Je výhodné aby mobilní fáze použitá v první dimenzi měla malou eluční sílu v druhé dimenzi. Protože separace ve druhé dimenzi musí proběhnout v čase, vyhrazeném pro jímání následující frakce z kolony v první dimenzi, je nezbytné sladit rozměry kolon, velikost částic náplně, průtok mobilní fáze v obou systémech s frekvencí cyklů převodu frakcí. Pro úspěšnou aplikaci je vedle volby "ortogonálních" separačních systémů s nekorelovanými selektivitami pro dosažení maximální píkové kapacity velmi důležité i potlačení rozšiřování zón látek, ředění vzorku a snížení citlivosti detekce ve druhé dimenzi využitím různých modulačních technik při

automatickém převodu frakcí z první do druhé dimenze.

V prezentaci jsou ukázány možnosti modulace převodu frakcí s využitím dvou střídavě pracujících identických kolon v druhé dimenzi, obohacovacích kolonek a "back-flushing" techniky, využití mikrokolon v první dimenzi a krátkých účinných kolon, dále kombinace paralelní gradientové eluce v obou dimenzích a vysokoteplotní HPLC v druhé dimenzi. Tyto postupy jsou demonstrovány na analýze přírodních antioxidantů ve vzorcích piva, vína a rostlinných extraktů při kombinaci různých typů stacionárních fází v první a druhé separační dimenzi – silikagelu modifikovaného chemicky vázanými C₁₈, polyethylenglykolovými, fenylovými, diolovými a dalšími skupinami. Vedle náplňových kolon lze ve druhé dimenzi s výhodou využít monolitických kolon nebo kolon s povrchově porézními částicemi.

Řada postupů a aplikací uvedených v tomto příspěvku vznikla za podpory MŠMT ČR v rámci výzkumného záměru 253100002 a Grantové Agentury ČR v rámci projektu 203/07/0641.

LITERATURA

1. Jandera P.: J. Sep. Sci. 29, 1763 (2006).
2. Jandera P., Česla P., Hájek T., Vohralík G., Vyňuchalová K., Fischer J.: J. Chromatogr., A 1189, 207 (2008).
3. Jandera P.: J. Sep. Sci. 31, 1421 (2008).
4. Česla P., Hájek T., Jandera P.: J. Chromatogr., A 1216, 3443 (2009).