

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

**ANALÝZA VYBRANÝCH PŘÍRODNÍCH LÁTEK  
MODERNÍMI SEPARAČNÍMI METODAMI**

Disertační práce

2008

Mgr. Ivana Citová

## Poděkování

Ráda bych poděkovala mému školiteli Prof. RNDr. Petru Solichovi, CSc. za to, že mne přijal pod svá křídla a v jejich závětrí mi svým profesionálním a přátelským přístupem pomáhal po celou dobu doktorského studia nejen s odbornými problémy. Velice děkuji za příležitost získat spoustu zkušeností a poznat mnoho krásných míst díky účasti na zahraničních konferencích a studijní stáži v Rakousku.

Se zápasením s analytickými přístroji a s vlastními experimenty mi velmi ochotně pomáhali Dr. Radek Sladkovský a Dr. Lucka Nováková, kterým nejen za tuto podporu patří velký dík.

Nedovedu si představit lepší pracoviště pro absolvování doktorského studia nežli Katedru analytické chemie. Děkuji celému kolektivu za milé a přátelské prostředí, na které budu vždy velmi ráda vzpomínat.

Bezvadná parta doktorandů této katedry stála za spoustou ne zcela studijních aktivit, které však mile doplňovaly akademické prostředí a přispívaly k příjemnému prožití doktorských let. Hlavně za pocit, že jsem byla mezi kamarády, děkuji všem (i těm již bývalým) doktorandům, především však Katce Mervartové, Pavlíku Jáčovi a Petru Chocholoušovi.

Zapomenout nemohu na mého milého Lubora Urbánka, který za mnou vždycky stál a byl mi velkou a láskyplnou oporou, za což mu z celého srdce děkuji.

V neposlední řadě chci poděkovat mým rodičům, kteří mě ve studiu podporovali a dokázali vždycky povzbudit.

Ivana Citová

## Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Ivana Citová

# Obsah

<b>Obsah</b> .....	<b>4</b>
<b>Seznam zkratek</b> .....	<b>7</b>
<b>Úvod</b> .....	<b>8</b>
<b>1 Cíl práce</b> .....	<b>10</b>
<b>2 Teoretická část – studované látky</b> .....	<b>13</b>
2.1 Látky s antioxidační aktivitou .....	13
2.1.1 <i>Vznik volných radikálů, oxidačního stresu a funkce antioxidantů</i> ..	13
2.1.2 <i>Polyfenolické sloučeniny</i> .....	18
2.1.3 <i>Antioxidační vitamíny</i> .....	22
2.1.4 <i>Mastné kyseliny</i> .....	32
2.2 Ostatní studované přírodní látky .....	37
2.2.1 <i>Hořec žlutý (Gentiana lutea L.)</i> .....	37
<b>3 Teoretická část – separační metody</b> .....	<b>40</b>
3.1 Plynová chromatografie .....	40
3.1.1 <i>Princip plynové chromatografie</i> .....	40
3.1.2 <i>Mobilní fáze v plynové chromatografii</i> .....	42
3.1.3 <i>Stacionární fáze v plynové chromatografii</i> .....	42
3.1.4 <i>Dávkovací zařízení</i> .....	44
3.1.5 <i>Detektory v plynové chromatografii</i> .....	45
3.1.6 <i>Nastavitelné parametry v plynové chromatografii</i> .....	46
3.2 Spojení Mikroextrakce na tuhou fázi s plynovou chromatografií (SPME- GC).....	47
3.2.1 <i>Princip SPME</i> .....	47
3.2.2 <i>Praktické provedení SPME</i> .....	49
3.2.3 <i>Druhy sorbentů</i> .....	51
3.3 Ultra účinná kapalinová chromatografie (UPLC).....	53
3.3.1 <i>HPLC versus UPLC</i> .....	53
3.4 Hmotnostní spektrometrie (MS).....	64
3.4.1 <i>MS instrumentace</i> .....	64
3.4.2 <i>Hmotnostní spektrum</i> .....	70
3.4.3 <i>Spojení HPLC - MS</i> .....	71
3.5 Kapilární elektroforéza (CE) .....	73
3.5.1 <i>Provedení kapilární elektroforézy</i> .....	74

3.5.2	<i>Princip kapilární elektroforézy</i> .....	76
3.5.3	<i>Elektrolyty v CE</i> .....	79
3.5.4	<i>Chirální separace v CE</i> .....	80
<b>4</b>	<b>Experimentální část</b> .....	<b>82</b>
4.1	Analýza fenolických kyselin pomocí SPME-GC.....	83
4.1.1	<i>Úvod</i> .....	83
4.1.2	<i>Výsledky a diskuse</i> .....	83
4.1.3	<i>Závěr</i> .....	85
4.2	Hodnocení obsahu mastných kyselin v doplňcích stravy s rybím olejem metodou plynové chromatografie.....	87
4.2.1	<i>Úvod</i> .....	87
4.2.2	<i>Experimentální část</i> .....	87
4.2.3	<i>Výsledky a diskuse</i> .....	91
4.2.4	<i>Závěr</i> .....	97
4.3	Stanovení retinolu a $\alpha$ -tokoferolu v lidském séru metodou UPLC.....	99
4.3.1	<i>Úvod</i> .....	99
4.3.2	<i>Výsledky a diskuse</i> .....	99
4.3.3	<i>Závěr</i> .....	101
4.4	Separace kyseliny retinové, retinolu a $\alpha$ -, $\gamma$ - a $\delta$ - tokoferolu pomocí UPLC-MS.....	102
4.4.1	<i>Úvod</i> .....	102
4.4.2	<i>Experimentální část</i> .....	103
4.4.3	<i>Výsledky a diskuse</i> .....	106
4.4.4	<i>Závěr</i> .....	112
4.5	Stanovení gentisinu, isogentisinu a amarogentinu v hořci žlutém pomocí kapilární elektroforézy.....	114
4.5.1	<i>Úvod</i> .....	114
4.5.2	<i>Výsledky a diskuse</i> .....	114
4.5.3	<i>Závěr</i> .....	116
<b>5</b>	<b>Přílohy</b> .....	<b>117</b>
5.1	Přehled publikovaných článků.....	117
5.2	Přehled plakátových sdělení.....	118
5.3	Příloha 1.....	120
5.4	Příloha 2.....	132
5.5	Příloha 3.....	140

5.6	Příloha 4 .....	148
5.7	Příloha 5 .....	155
5.8	Příloha 6 .....	157
5.9	Příloha 7 .....	159
5.10	Příloha 8 .....	161
5.11	Příloha 9 .....	163
5.12	Příloha 10 .....	165
5.13	Příloha 11 .....	167
<b>6</b>	<b>Shrnutí .....</b>	<b>169</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>171</b>
<b>8</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>173</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použité literatury.....</b>	<b>175</b>

## Seznam zkratek

ACN	Acetonitril	IT	Iontová past
ALA	Kyselina alfa-linolenová	ITP	Izotachoforéza
AOAC	Association of Official Analytical Chemists	LC	Kapalinová chromatografie
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku	LDL	Lipoproteiny o nízké hustotě
API	Ionizace za atmosférického tlaku	LLE	Extrakce kapaliny kapalinou
ATRA	All- trans retinová kyselina	LOD	Limit detekce
BHT	Butylhydroxytoluen	LOQ	Limit kvantifikace
CAR	Carboxen	MAE	Mikrovlákná extrakce
CAT	Kataláza	MCF	Methyl chloroformiát
CD	Cyklodextrin/y	ME	Methyl ester/y
CE	Kapilární elektroforéza	MEKC	Micelární elektrokinetická chromatografie
CEC	Kapilární elektrochromatografie	MeOH	Methanol
CGE	Kapilární gelová elektroforéza	MF	Mobilní fáze
CI	Chemická ionizace	MK	Mastná/é kyselina/y
CID	Kolizí indukovaná disociace	MS	Hmotnostní spektrometrie
CIEF	Kapilární izoelektrická fokusace	M <sub>R</sub> isotop.	Isotopická molekulová hmotnost
CZE	Kapilární zónová elektroforéza	MUFA	Mononenasyčené mastné kyseliny
DAD	Detektor diodového pole	NP	Normální fáze
DHA	Dokosaheptaenová kyselina	ODS	Oktadecyl silika
DNA	Deoxyrybonukleová kyselina	PA	Polyakrylát
DVB	Divinylbenzen	PDMS	Polydimethylsiloxan
E	Intenzita elektrického pole	PUFA	Vícenenasyčené mastné kyseliny
ECD	Detektor elektronového záhytu	RP	Reverzní fáze
ECF	Ethyl chloroformiát	RNS	Reaktivní dusíkaté částice
EI	Ionizace elektronem	ROS	Reaktivní kyslíkové částice
EOF	Elektroosmotický tok	SF	Stacionární fáze
EPA	Eikosapentaenová kyselina	SFA	Nasyčené mastné kyseliny
ESI	Ionizace elektrosprejem	SFE	Superkritická fluidní extrakce
EtOH	Ethanol	SIM	Single Ion Monitoring
FAME	Methyl estery mastných kyselin	SOD	Superoxid-dismutáza
FID	Plamenově-ionizační detektor	SPE	Extrakce na pevnou fázi
GC	Plynová chromatografie	SPME	Mikroextrakce na tuhou fázi
GLC	Gas Liquid Chromatography	SRM	Single Reaction Monitoring
GSC	Gas Solid Chromatography	TCD	Tepelně-vodivostní detektor
GPX	Glutathion-peroxidáza	TLC	Tenkovrstvá chromatografie
GSH	Glutathion	TOF	Průletový analyzátor
H	Výška teoretického patra	TSI	Ionizace termosprejem
HETP	Výškový ekvivalent teoretického patra	UPLC	Ultra účinná kapalinová chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie		
ISO	International Organisation for Standardisation		

# Úvod

Přírodní léčiva stále představují významnou skupinu prostředků používaných k léčbě či prevenci různých onemocnění. Léčivé rostliny a fytoterapeutika, tedy léčivé prostředky připravené z léčivých rostlin, tvoří přibližně 25% všech předepisovaných léčiv a zhruba polovinu podílu volně prodejných léčivých přípravků [1]. Přestože jsou léčiva přírodního původu zařazována spíše do oblasti alternativní medicíny, jejich praktické využití, jak při léčbě akutních zdravotních problémů, tak jako prevence či doplňková terapie, je zcela nesporné, o čemž svědčí i fakt, že v lékárnách neustále roste prodej doplňků stravy založených na ryze přírodní bázi a také zvyšující se zájem pacientů o jejich zdravotní stav.

Významnou skupinou látek, které hrají důležitou roli v ochraně organismu před negativním působením vnějšího prostředí, jsou antioxidanty – současný trend zdravého životního stylu. Antioxidanty jsou látky omezující aktivitu volných radikálů, které vznikají v lidském těle působením různých škodlivin z životního prostředí či stravy, ale například i při fyzické aktivitě. Volné radikály prokazatelně přispívají ke vzniku a průběhu diabetu, zánětů a nádorů, neurodegenerativních chorob či kardiovaskulárních onemocnění a podporují stárnutí [2, 3, 4]. Agresivita kyslíkových radikálů je dána snahou vytrhnout z jiné sloučeniny chybějící elektron, čímž vzniká řetězová reakce, jejímž produktem je opět volný radikál. Proto je potřeba tyto látky v těle eliminovat. Přísun antioxidantů v přirozené formě pomáhá chránit organismus před oxidativním poškozením prostřednictvím zhášení volných radikálů. Mezi nejvýznamnější přirozené antioxidanty patří vitamíny A, E, C, dále karotenoidy, fenolické látky a některé sloučeniny selenu [5]. Současný klinický výzkum je zaměřen také na sledování role antioxidantních vitamínů (A, E) v prevenci a terapii nádorových onemocnění [6].

Přírodní léčiva v přirozené formě či v podobě komerčně vyráběného doplňku stravy musí splňovat určitá kritéria z hlediska bezpečnosti a účinnosti. Hodnocení obsahu účinných látek v přírodním materiálu, jakož i monitorování hladin různých látek v biologických vzorcích, je již dlouhou dobu zájmem analytických chemiků, jejichž úkolem je vyvíjet vhodné analytické postupy pro separaci, identifikaci a kvantifikaci sledovaných analytů ve vzorku. Při vývoji analytických metod je hlavní důraz kladen na jednoduchost, rychlost, vysokou citlivost a opakovatelnost celého postupu. Moderní instrumentace a nové trendy v



oblasti analytické chemie velkou měrou přispívají k úspěšnému řešení analytických úkolů se zaměřením na analýzu rozmanitých látek s biologickým účinkem v komplexních matricích.

# 1 Cíl práce

Analýza látek s antioxidační aktivitou či jiných biologicky účinných sloučenin je předmětem studia mnoha analytických laboratoří. Tato disertační práce je zaměřena na využití různých separačních metod pro analýzu farmaceuticky zajímavých látek přírodního původu s cílem vyvíjet vhodné analytické postupy pro hodnocení daných látek jak na úrovni standardů, tak v přírodním či biologickém materiálu anebo v doplňcích stravy. Předmětem mého vědeckého zájmu se stala různorodá skupina látek, jejichž společným jmenovatelem je významná antioxidační aktivita. Patří sem polyfenolické látky, vícenenasycené mastné kyseliny a vitamíny A a E. Fenolické látky vykazující jiné než antioxidační účinky jsou obsaženy v hořci žlutém (*Gentiana lutea L.*), jehož analýza byla jedním z posledních řešených témat a uzavírá tak pestrou skupinu studovaných sloučenin.

Před započítím vlastní praktické činnosti bylo důležité, aby byl důkladně prostudován biologický význam vybraných látek, jejich fyzikálně-chemické vlastnosti a již publikované možnosti analýzy. K tomu bylo využito odborné literatury – české i zahraniční učebnice, Český lékopis a původní vědecké publikace získané z dostupných databází (Web of Science, Science Direct, Analytical Abstracts, vyhledávač Google).

V rámci studia látek s antioxidační aktivitou byla pozornost zaměřena především na fenolické kyseliny představující významnou skupinu polyfenolických látek a na možnosti jejich analýzy pomocí moderních separačních technik, konkrétně plynové chromatografie (GC). Jako předseparační krok nezbytný pro zakoncentrování cílových analytů pro dosažení vyšší citlivosti byla zvolena metoda mikroextrakce na tuhou fázi (SPME) ve spojení s GC.

Další skupinu studovaných látek představují vícenenasycené mastné kyseliny (PUFA), což jsou esenciální látky, které kromě hlavních účinků (úprava hladin cholesterolu a nasycených tuků, snižování nadměrné krevní srážlivosti, příznivé působení na kožní problémy atd.) vykazují i antioxidační vlastnosti díky přítomnosti konjugovaného systému dvojných vazeb. Hlavním zdrojem těchto kyselin je rybí tuk, který je na trhu dostupný ve formě želatinových kapslí, s uvedenými hladinami neaktivnějších látek - eikosapentaenové (EPA) a dokosahexaenové (DHA) kyseliny. Cílem mého studia mastných kyselin byla jejich

analýza pomocí plynové chromatografie a kontrola obsahu EPA a DHA v různých parafarmaceutických přípravcích s obsahem rybího tuku.

Vitamíny A a E patří k nejdůležitějším přirozeným antioxidantům. Vedle jejich antioxidační aktivity je v současné době zaměřena pozornost na monitorování hladin těchto látek v lidském séru u onkologických pacientů za účelem nalezení souvislostí mezi jejich příjmem a vlivem na léčbu nádorových onemocnění. Retinol (hlavní složka vitamínu A) a  $\alpha$ -tokoferol (nejčastější forma vitamínu E) jsou rutinně stanovovány pomocí kapalinové chromatografie s UV detekcí. Novým trendem v oblasti HPLC je uvedení inovativní techniky Ultra účinné kapalinové chromatografie (UPLC), která umožňuje vysoce účinnou a rychlou separaci látek díky použití hybridních stacionárních fází s velmi malým průměrem částic (1,7  $\mu$ m) a vysokých provozních tlaků. Aplikace UPLC přináší významnou úsporu času i množství mobilní fáze, jak bylo studováno v rámci úkolu stanovení retinolu a  $\alpha$ -tokoferolu v lidském séru. Součástí této práce bylo také srovnání nové UPLC metody s tradiční kapalinovou chromatografií a HPLC s využitím monolitní stacionární fáze, a to na úrovni rychlosti, účinnosti, validačních parametrů a celkové finanční náročnosti jednotlivých metod.

V návaznosti na tento projekt byl zahájen vývoj UPLC metody pro stanovení dalších látek ze skupiny vitamínů A a E ve spojení s hmotnostně-spektrometrickou detekcí. Cílem je vyvinout vhodný postup pro současné stanovení retinolu, kyseliny retinové a  $\alpha$ -,  $\gamma$ - a  $\delta$ - tokoferolu v lidském séru pomocí techniky UPLC-MS s dosažením co nejvyšší citlivosti daného stanovení.

Posledním řešeným tématem byla optimalizace a validace metody pro separaci obsahových látek hořce (*Gentiana lutea* L.) pomocí kapilární elektroforézy (CE), které jsem se věnovala v rámci studijního pobytu na Univerzitě Innsbruck. Hořcový kořen (*Gentianae radix*) obsahuje pestrou škálu různých sloučenin, z nichž nejvýznamnější jsou hořké sekoiridoidy a xantony a jejich CE stanovení představuje zajímavou alternativu k tradičnímu použití kapalinové chromatografie.

Vzhledem k širokému záběru používaných separačních metod je nasnadě zamyslet se nad výhodami a nevýhodami jednotlivých technik a jejich využitím v analýze biologicky aktivních látek, především sloučenin vykazujících antioxidační aktivitu. Různé skupiny látek jsou tradičně analyzovány ustálenými, „zaběhnutými“ metodami. Z hlediska alternativních přístupů a nových trendů v analytické chemii

se nabízí mnoho možností jak moderně a inovativně přistoupit k analýze farmaceuticky zajímavých látek.

## 2 Teoretická část – studované látky

### 2.1 Látky s antioxidační aktivitou

Společnou vlastností látek, jež byly předmětem mého studia, je jejich vysoký antioxidační potenciál a možné využití v prevenci a terapii různých onemocnění způsobených vlivem oxidačního stresu. Vzhledem k obsáhlosti a složitosti problematiky týkající se vzniku volných radikálů v organismu, jejich působení a také mechanismů obrany proti oxidačnímu stresu, bude první část teoretického úvodu věnována stručnému objasnění biochemických procesů a vysvětlení funkce antioxidantů v lidském těle.

#### 2.1.1 Vznik volných radikálů, oxidačního stresu a funkce antioxidantů

[Kapitola byla kromě odkazů uvedených v textu vypracována ze zdrojů 7, 8, 9]

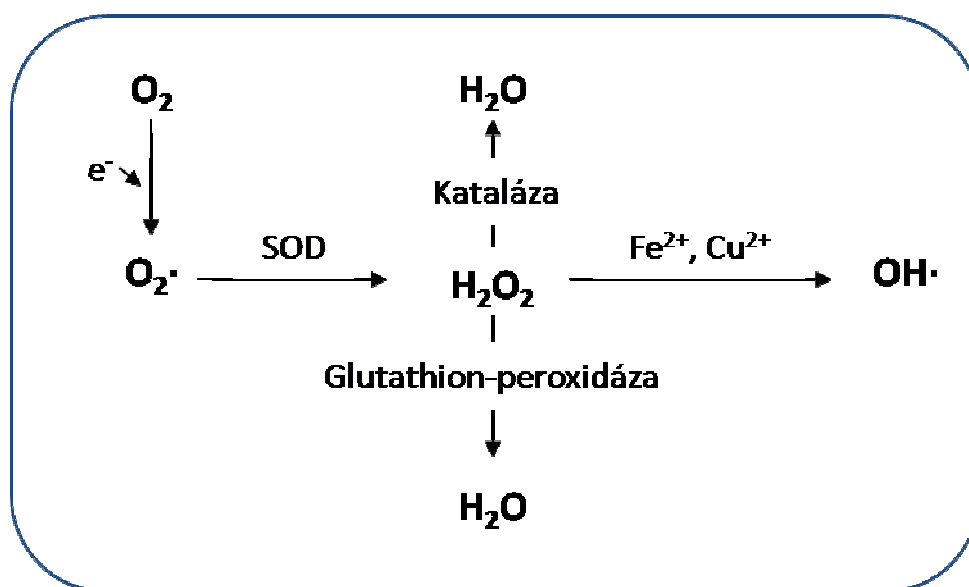
##### ***Vznik volných kyslíkových radikálů a reaktivních kyslíkových částic***

Volné radikály jsou molekuly nebo jejich části nesoucí jeden či více nepárových elektronů. Přítomnost nepárového elektronu způsobuje vysokou reaktivitu těchto částic, čímž dochází k napadání vazeb v jiných molekulách za vzniku dalších radikálů a vzniká tak řetězová reakce. Z hlediska působení v živých organismech jsou za nejvýznamnější považované především kyslíkové radikály a jejich metabolické produkty, souhrnně označované jako tzv. reaktivní kyslíkové částice (ROS - reactive oxygen species). Neméně významné jsou také jejich dusíkaté analogy – RNS (reactive nitrogen species).

Volné radikály a reaktivní částice hrají v biologických systémech dvojí roli. Jednak působí prospěšně – účastní se obranných mechanismů při bakteriální či virové infekci a podílí se na signalizačních procesech v buňce, naopak ve vyšších koncentracích způsobují poškození buněk, lipidových membrán, proteinů či DNA. Tyto škodlivé účinky ROS a RNS jsou za normálních okolností vyváženy antioxidačním účinkem přirozených antioxidačních mechanismů (enzymových i neenzymových).

Volné radikály vznikají v organismu přirozeně jako vedlejší produkty normálního či patologicky změněného metabolismu, ale navíc pronikají do těla i

z vnějšího prostředí. Proto rozlišujeme endogenní a exogenní příčiny tvorby ROS a RNS. V dýchacím řetězci dochází v mitochondriích ke spotřebě kyslíku  $O_2$  za vzniku energie a jako nevyhnutelné vedlejší produkty tohoto procesu vznikají volné superoxidové radikály  $O_2\cdot^-$ , které tvoří přibližně 1-2% celkové spotřeby kyslíku. Samovolně nebo působením superoxiddismutázy (SOD) dochází k přeměně na peroxid vodíku  $H_2O_2$ , který sice nemá nepárový elektron, ale je neméně reaktivní a má schopnost pronikat přes buněčné membrány.  $H_2O_2$  je přirozeně odbouráván působením enzymů katalázy (CAT) a glutathion-peroxidázy (GPX) na vodu, ovšem v přítomnosti železnatých či měďnatých kationtů se rozkládá za vzniku vysoce nebezpečného hydroxylového radikálu  $OH\cdot$  (tzv. Fentonova reakce). Schéma řetězové reakce je znázorněno na Obrázek 1.



**Obrázek 1: Schematické znázornění vzniku volných kyslíkových radikálů a reaktivních kyslíkových částic (ROS)**

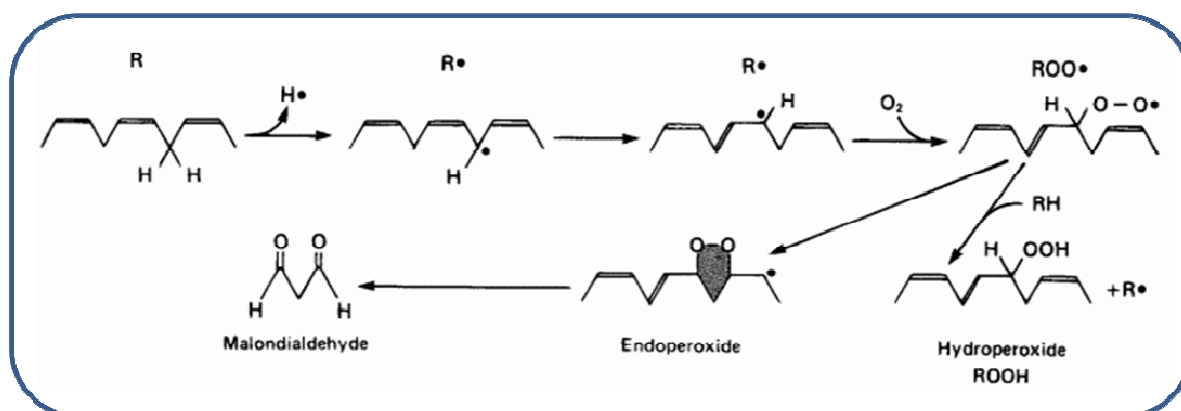
Při virové nebo bakteriální infekci, ale i při chronickém zánětu, se organismus brání tvorbou oxidantů jako  $NO$ ,  $O_2\cdot^-$ ,  $H_2O_2$  či chloristanových radikálů  $ClO\cdot$ ; podobně jsou odbourávány toxické látky přijaté z potravy, a to prostřednictvím enzymů cytochromu P450 za vzniku vedlejších oxidačních produktů. Volné radikály jsou tvořeny také po intenzivní fyzické námaze.

Za vznik radikálů z tzv. exogenních příčin jsou zodpovědné četné faktory související s negativním působením vnějšího prostředí. Patří sem cigaretový kouř, UV, rentgenové a gama záření nebo nesprávná strava – železo obsažené v mase

v podobě barviva hem katalyzuje již zmíněnou Fentonovu reakci a opět vznikají nebezpečné radikály. [2, 3, 4, 10, 11, 12]

### ***Peroxidace lipidů jako zdroj volných radikálů***

Lipidy slouží v těle jako zdroj energie či tepelná izolace a také jsou důležité pro správnou funkci nervové tkáně. Lipoproteiny (kombinace tuků a proteinů) jsou nezbytnou součástí buněčných membrán a umožňují transport lipidů krví. Konjugované dvojně vazby obsažené v molekulách nenasycených mastných kyselin snadno podléhají oxidaci za vzniku nebezpečných peroxidových radikálů. Peroxidace lipidů je řetězová reakce poskytující neustálý přísun volných radikálů, které působí další peroxidaci a mohou mít ničivé účinky [13]. Schéma peroxidace lipidů a vznik volných radikálů je znázorněno na Obrázek 2.



**Obrázek 2: Peroxidace lipidů. Reakce je iniciována světlem nebo ionty kovů. Peroxidaci podléhají mastné kyseliny obsahující tři a více dvojných vazeb. [13]**

### ***Oxidační stres***

Pro správnou funkci organismu je nezbytné, aby byla udržena rovnováha mezi volnými radikály (oxidanty) a látkami, které jsou schopné reaktivní částice odstraňovat (antioxidanty). Při nadměrné produkci volných radikálů či při nedostatečné funkci obranných antioxidačních mechanismů vzniká tzv. oxidační stres. Jeho příčinou může být opět vlastní tělní metabolismus (např. při zánětlivé reakci) anebo vnější stresory životního prostředí (smog, výfukové plyny, ozón, chemická rozpouštědla, plísňové toxiny, psychické napětí). Oxidační stres má za následek vratné či nevratné změny v organismu a může vést ke vzniku závažných onemocnění jako rakovina, kardiovaskulární onemocnění, zánětlivé procesy, neurodegenerativní choroby či snížená aktivita imunitního systému. Většina těchto

projevů také souvisí s věkem. Oxidativní poškození se po celý život hromadí, a proto se ve vyšším věku častěji vyskytují choroby způsobené vlivem oxidačního stresu. [2, 3, 4]

### ***Antioxidační obranné mechanismy***

K nezbytným předpokladům správné činnosti organismu patří přirozená schopnost odstraňovat volné radikály a napravovat poškození vzniklá jejich škodlivým působením. Antioxidační obranné mechanismy zahrnují dvě základní skupiny antioxidantů. Páteř obranných procesů uvnitř buňky tvoří enzymové systémy zastoupené enzymy superoxiddismutásou (SOD), která odbourává superoxidový radikál na peroxid vodíku, katalázou (CAT), která přeměňuje peroxid vodíku na kyslík a vodu a glutathion-peroxidázou (GPX), která kromě peroxidu vodíku umí zničit i nebezpečný hydroxylový radikál, a to s pomocí glutathionu (GSH), jenž funguje jako donor elektronu. Ve zdravém organismu nepodléhajícím oxidačnímu stresu jsou tak volné radikály udržovány na nízké hladině pomocí vyváženého účinku těchto antioxidačních enzymů.

Druhou, neméně důležitou skupinu antioxidantů představují neenzymové „sběrači“ volných radikálů zastoupené různými lipofilními a hydrofilními molekulami či částmi bílkovin, které likvidují volné radikály a jejich kyslíkové metabolity (ROS) uvnitř i vně buňky. Mezi tělu vlastní endogenní antioxidanty patří glutathion, kyselina močová, bilirubin či ubichinon (koenzym Q<sub>10</sub>). Glutathion kromě výše zmíněné funkce dárce elektronu při odbourávání H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pomocí GPX i sám vychytává volné superoxidové a hydroxylové radikály, a dokonce je schopen i opravit některá poškození DNA. V současné době je však největší pozornost věnována exogenním antioxidantům zastoupeným lipofilními a hydrofilními vitamíny – vitamín E (především  $\alpha$ -tokoferol),  $\beta$ -karoten (metabolický prekurzor vitamínu A), vitamín C a v neposlední řadě přírodními polyfenolickými látkami (flavonoidy a fenolické kyseliny) či stopovými prvky (selen, zinek). Určité antioxidanty jsou schopné regenerovat jiné antioxidanty a tím obnovit jejich původní funkci. Příkladem mohou být redoxní cykly vitamínů E a C, kdy kyselina askorbová regeneruje  $\alpha$ -tokoferol v membránách a lipoproteinech. [4, 10, 11, 12]



## ***Antioxidační terapie***

Vzhledem k vědecky prokázanému vlivu oxidačního stresu na vznik a progresi rakoviny je již několik desetiletí upřena pozornost na použití exogenních antioxidantů v prevenci a terapii nádorových onemocnění. Nelze ovšem zjednodušeně říci, jestli užívání antioxidantů jak v přirozené formě (tedy konzumací ovoce a zeleniny) tak ve formě potravních doplňků, má prospěšný vliv na prevenci či terapii rakoviny. V současné době probíhá ve vědeckých sférách rozsáhlá diskuze na toto téma, přičemž názory a také vědecky podložené výsledky různých studií jsou rozporuplné.

V 60. a 70. letech minulého století byly postupně objeveny biologické účinky antioxidantů a jejich vliv na vznik různých onemocnění. Proto není překvapivé, že se velmi rozšířilo běžné užívání antioxidantů ve formě potravních doplňků. O nějaký čas později však stále více vyplouvaly na povrch i jiné než prospěšné účinky těchto látek, především vitaminu E, C,  $\beta$ -karotenu a selenu. Dokonce byly prokázány i zhoubné účinky antioxidantů vysvětlené na základě teorie, že buňky lidského těla pro svoji normální funkci potřebují reaktivní kyslíkové částice a volné radikály, a to například pro uskutečnění apoptózy (řízená smrt buňky) u rozpoznaných pre-kancerogenních či jinak změněných buněk. Ve studii Amese *a kol.* z roku 1993 [4] je diskutován význam konzumace antioxidantů v ovoci a zelenině s takovým závěrem, že dostatečný přísun těchto potravin je spojen s nižším rizikem vzniku degenerativních onemocnění, a naopak nedostatečná konzumace vede k vyššímu výskytu těchto nemocí. Naopak Dreher a Junod v roce 1995 [11] publikovali práci, kde připouští, že vysoké hladiny  $\alpha$ - tokoferolu v séru souvisí se sníženým výskytem rakoviny, ale přísun Vitaminu E a  $\beta$ -karotenu v doplňcích stravy nesnížil incidenci rakoviny plic u kuřáků. Nejnovější studie z let 2006-2007 [12, 14, 15, 16, 17] se již plně zabývají tzv. paradoxem role antioxidantů („antioxidant paradox“) a diskutují o zajímavém rozporu vyplývajícího ze dvou faktů: 1. antioxidanty prokazatelně vylučují volné radikály, které způsobují poškození tkání a tím vyvolávají nebezpečná onemocnění, avšak 2. konzumace antioxidačních doplňků nesnižuje výskyt rakoviny a naopak může v některých případech i škodit.

Druhou neméně kontroverzní oblastí je používání antioxidačních doplňků během chemoterapie při nádorovém onemocnění. Zde proti sobě stojí dvě odlišná stanoviska, z nichž první konstatuje, že antioxidanty snižují toxicitu některých

chemoterapeutik, a tím umožňují zvýšit podanou dávku a zesílit tím účinek chemoterapie. Druhé tvrzení naopak poukazuje na nebezpečí antioxidantů, které mohou v průběhu terapie působit jako ochrana nádorové tkáně, a tím bránit účinku cytostatik. H. E. Seifried a kol. [15] shrnují situaci tak, že nelze zjednodušeně prohlásit, jestli je používání antioxidantů při prevenci či léčbě závažných onemocnění užitečné či nikoliv. Vždy záleží na každém konkrétním případě, stavu pacienta, typu onemocnění či charakteru léčby. Avšak v populaci s nedostatečnou výživou je zvýšený přísun antioxidantů v potravě či ve formě doplňků vždy blahodárný.

## 2.1.2 Polyfenolické sloučeniny

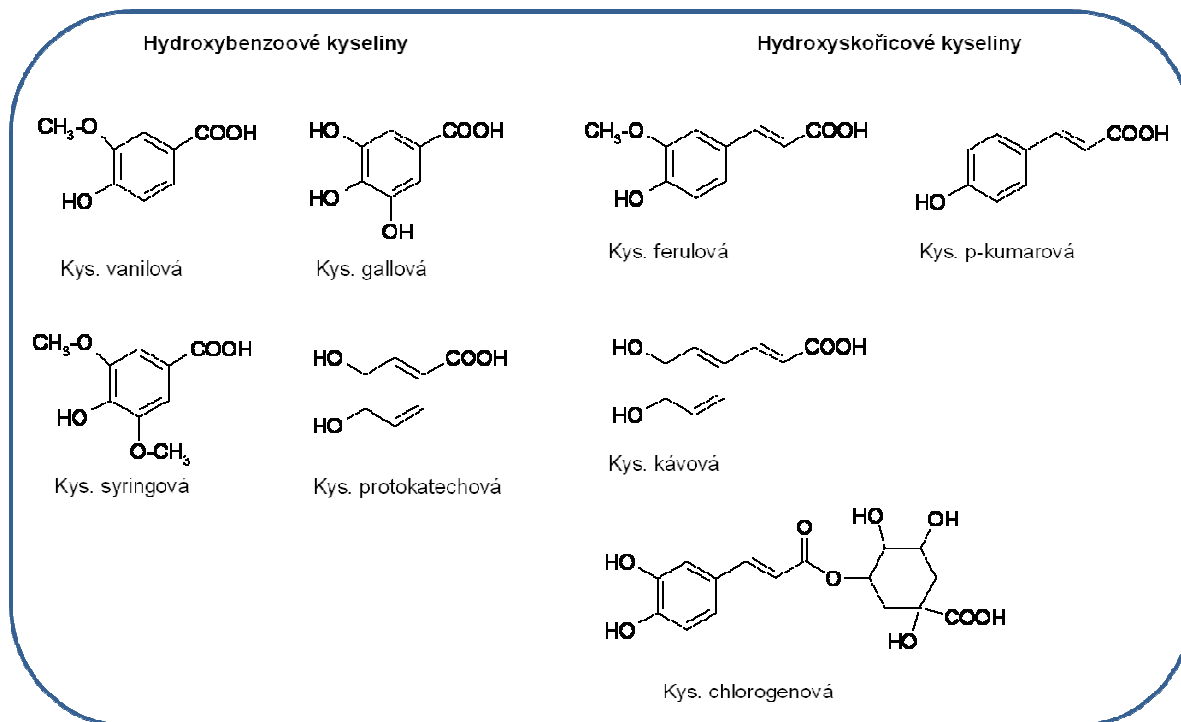
Z chemického hlediska tvoří fenolické látky velmi rozsáhlou skupinu sloučenin charakterizovanou přítomností alespoň jednoho aromatického jádra s alespoň jednou navázanou fenolickou (hydroxylovou) skupinou, která je volná nebo vázaná jako ester, ether či glykosid. Rostlinné fenoly jsou pak sekundární metabolity rostlin splňující tyto strukturní podmínky, avšak řadí se do různých fytochemických skupin [18]. Polyfenolické látky lze rozdělit na flavonoidy a fenolické kyseliny, přičemž fenolické kyseliny tvoří asi třetinu všech přírodních fenolických látek [19].

### Fenolické kyseliny

Všechny sloučeniny obsahující ve své struktuře alespoň jednu karboxylovou skupinu a hydroxyl vázaný na aromatickém jádře lze označit jako fenolické (příp. fenolové) kyseliny. Fenolické kyseliny přítomné v rostlinách a rostlinných produktech zahrnují dvě skupiny látek - deriváty odvozené od kyseliny hydroxybenzoové a hydroxyskořicové. Chemické vzorce a rozdělení fenolických kyselin je znázorněno na Obrázek 3. Hydroxybenzoové kyseliny se vyskytují volné nebo ve formě esterů či glykosidů a k nejvýznamnějším patří kyselina gallová, vanilová, syringová a protokatechová. Kyselina gallová slouží v rostlinném organismu jako substrát pro syntézu taninů, které chrání rostlinu před působením hmyzu a různých patogenů.

Hydroxyskořicové kyseliny se vyskytují většinou ve formě esterů a jsou zastoupené kyselinou kávovou, hojně obsaženou v kávě, a kyselinami ferulovou, p-kumarovou či sinapovou. Spojením molekul kyseliny kávové a chinové pomocí

esterové vazby vzniká kyselina chlorogenová, která je velmi rozšířená v ovoci a zelenině, především v jejich vnějších vrstvách [18, 20]. Bohatými zdroji fenolických látek jsou nápoje, především červené víno, ovocné džusy, čaje, káva, ale také například čokoláda [19].



**Obrázek 3: Chemická struktura fenolických kyselin – derivátů hydroxybenzoové a hydroxyskořicové kyseliny**

### **Biologická aktivita fenolických kyselin**

Farmakologický účinek fenolických látek, potažmo fenolických kyselin, vyplývá z jejich schopnosti se snadno oxidovat, a tedy působit jako antioxidant. V nedávné době se markantně zvýšil zájem o fenolické látky právě díky jejich antioxidačním vlastnostem a možném pozitivním dopadu na lidské zdraví, především v oblasti léčby a prevence rakoviny či kardiovaskulárních onemocnění [12, 21]. Fenolické kyseliny v organismu pravděpodobně působí jako „terminátory“ řetězových reakcí – ochotně poskytují atom vodíku za vzniku fenoxylového radikálu (PhO·), který je relativně stálý a již neinicuje další radikálové reakce. Fenoxylový radikál může ukončit řetězovou reakci i tím, že sám reaguje s jiným volným radikálem. Z vědeckých výzkumů ovšem vyplývají i negativní účinky fenolických látek. Při jejich vysoké koncentraci, přítomnosti redukcujících kovů (Cu, Fe) a v bazickém prostředí mohou tyto látky působit jako pro-oxidanty [12].

## ***Fyzikálně-chemické vlastnosti***

Fenolické kyseliny jsou rozpustné v organických rozpouštědlech, přičemž zvýšení rozpustnosti lze dosáhnout přidáním uhličitanu. Kyseliny vázané ve formě glykosidů jsou rozpustné i ve vodě. Všechny látky se snadno oxidují, a to především v bazickém prostředí, a proto jsou velmi nestálé. Při manipulaci s nimi se doporučuje pracovat v inertní atmosféře, vyhýbat se extrémním hodnotám pH a vyšší teplotě (nad 30°C).

## ***Extrakce fenolických kyselin***

Tradičním a stále nejvíce rozšířeným způsobem extrakce fenolických látek z rostlinného vzorku je extrakce pomocí organických rozpouštědel (methanol, ethanol, ethylacetát, aceton, hexan). U málo lipofilních látek lze použít směs alkoholu a vody. Tímto postupem se však do rozpouštědla vyextrahují nejen cílové analyty, ale i jiné nežádoucí látky. Selektivní separace jednotlivých strukturních skupin lze dosáhnout využitím dalších extrakčních technik, například extrakcí kapaliny kapalinou (LLE), kdy separaci volných kyselin, esterů a glykosidů provedeme pomocí řady nemísitelných rozpouštědel o zvyšující se polaritě [18]. Pro extrakci fenolických kyselin do organického rozpouštědla je důležité okyselení vodné fáze, neboť jen kyseliny v neionizované formě přejdou do organické vrstvy. Často se také přidává k rozpouštědлу i antioxidační přísada (např. kyselina askorbová či butylhydroxytoluen (BHT)), aby se zabránilo samovolné oxidaci fenolických látek. Nevýhodou všech „rozpouštědlových“ extrakčních metod je však velká spotřeba organických rozpouštědel zatěžující životní prostředí.

Proto se během nedávných let pozornost obrátila směrem k alternativním extrakčním postupům, které jsou méně nebezpečné pro lidské zdraví. Publikované nekonvenční extrakční metody umožňující izolaci fenolických látek z přírodních materiálů zahrnují např. extrakci na pevnou fázi (SPE) [22, 23, 24, 25, 26, 27], superkritickou fluidní extrakci pomocí kapalného oxidu uhličitého (SFE) [28, 29], mikrovlnnou extrakci (MAE) [30], extrakci směsí ethanolu s vodou pomocí ultrazvuku [27], či extrakci vroucí vodou za vyššího tlaku [31]. V poslední citované práci [31] bylo popsáno zajímavé srovnání čtyř extrakčních postupů pro izolaci vybraných polyfenolických látek včetně fenolických kyselin z různých bylinek, a to (1) extrakcí do zředěného ethanolu/methanolu, (2) vodní destilací, (3) vyluhováním a následným promýváním 100% methanolem a (4) tzv. dynamickou ultrazvukovou

extrakcí ethanolem (Dynamic Sonication Assisted Extraction – DSAE). Poslední zmíněný postup prokázal nejlepší výtěžnost (100%), významnou úsporu času (15 min.) a rozpouštědla (10 ml).

Novinkou v oblasti extrakce na pevnou fázi je tzv. Matrix Solid-phase Dispersion (MSPD), která byla popsána v práci M. S. Dopico-Garcíi [27] při izolaci fenolických sloučenin z hroznů. Vzorek je rozdrobněn na velmi malé částice a smíchán s C18 sorbentem. Z této směsi se vytvoří homogenní vrstva, přes kterou je pomocí vakua protlačován okyselený methanolký roztok a dochází tak k eluci cílových látek. Ve srovnání s klasickou SPE však poskytuje nižší výtěžnost.

### ***Analýza fenolických kyselin***

Vzhledem k hojnému výskytu polyfenolických látek v přírodě a také díky velkému zájmu o sledování jejich obsahu v různých rostlinných zdrojích či v potravinách, nebo dokonce i v biologických vzorcích, bylo během posledních desetiletí publikováno mnoho původních vědeckých prací zabývajících se analýzou flavonoidů a fenolických kyselin. Metodou volby, a tedy nejčastěji používanou technikou, se zdá být vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Separace je většinou dosažena pomocí reverzní C18 stacionární fáze, k eluci analytů je použita směs okyselené vodné fáze a polárního organického rozpouštědla (methanol či acetonitril), často v gradientovém módu [28]. Nejběžnějším typem detekce je spektrofotometrie v UV oblasti v rozsahu vlnových délek 280-320 nm, v mnoha pracích využívající detektor diodového pole (DAD) [32]. V nejnovějších publikacích se stále častěji objevuje zapojení hmotnostně-spektrometrického detektoru (MS) [26, 33], což umožňuje zvýšení citlivosti a selektivity daného stanovení. K méně častým způsobům detekce pak patří elektrochemický detektor [34] či detektor rozptylu světla (Evaporative Light Scattering Detector) [35].

Alternativní přístup k analýze fenolických kyselin představuje použití elektromigračních metod, které nabízejí vysokou účinnost separace a nízké náklady. V posledních dvou letech bylo publikováno několik prací prezentujících analýzu fenolických kyselin v různém rostlinném materiálu pomocí kapilární zónové elektroforézy (CZE) [36, 37], kapilární elektrochromatografie (CEC) [38] či micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC) [39].

Využití plynové chromatografie (GC) sice vyžaduje derivatizaci, tedy převedení netěkavých analytů (látek s vysokou teplotou varu nebo takových, které se při vyšší teplotě rozkládají) na těkavé deriváty, což se může jevit jako nepříjemná komplikace analytického postupu, přesto má GC v analýze fenolických látek také svůj význam a přináší výhodu například ve spojení s MS detekcí. V případě analýzy fenolických kyselin lze pro bezvodou derivatizaci použít silylační činidla anebo ethyl či methyl- chloroformiáty, které umožňují derivatizaci i za přítomnosti vody [32, 40, 41].

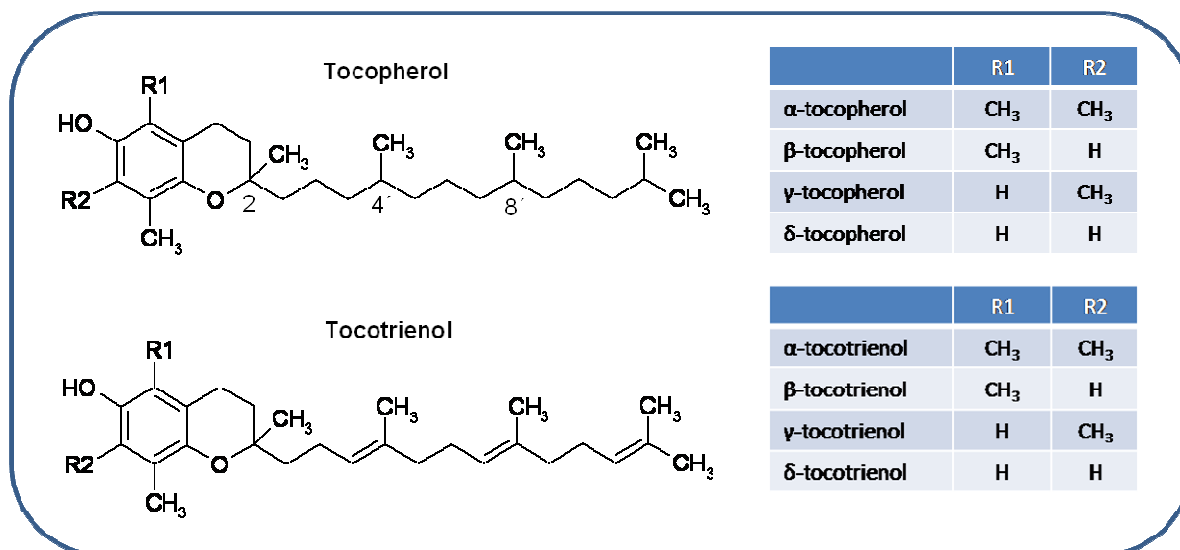
### 2.1.3 Antioxidační vitamíny

Jednu z nejdůležitějších složek neenzymového obranného systému organismu tvoří antioxidační vitamíny – lipofilní vitamín E a hydrofilní vitamín C. Antioxidační aktivita jiného lipofilního vitamínu - vitamínu A a jeho prekurzoru  $\beta$ -karotenu – je v současné době intenzivně zkoumána a dokonce je sledován i opačný, pro-oxidační účinek karotenoidů. Vitamín A má však i jiné než antioxidační vlastnosti, pro které je v medicíně využíván.

V rámci disertační práce jsem se hlouběji zabývala analýzou vitamínů A a E, proto budou následující kapitoly věnovány právě těmto látkám (především tokoferolům, retinolu a kyselině retinové) s cílem představit jejich význam, vlastnosti a možnosti analýzy v biologických vzorcích.

#### Vitamín E

Hlavním antioxidantem plazmy a buněčných membrán je v tučích rozpustný vitamín E. V přírodě se vyskytuje v osmi formách -  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -tokoferol a  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -tokotrienol. Všechny formy se skládají z chromanového kruhu a postranního isoprenoidního (fytylového) řetězce tvořeného 16 atomy uhlíku. Tokoferoly obsahují nasycený fytylový řetězec, zatímco tokotrienoly nenasycený řetězec.  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  a  $\delta$ -formy se navzájem liší stupněm methylace na chromanovém kruhu a polohou methylových skupin [42, 43]. Chemická struktura vitamínu E je znázorněna na Obrázek 4.



Obrázek 4: Strukturální vzorce různých forem vitamínu E. Polohy 2, 4' a 8' představují centra chiralit v molekulách tokoferolů.

Přirozeně se vitamín E vyskytuje v potravinách bohatých na tuky a nenasycené mastné kyseliny. Nejbohatším zdrojem je olej z pšeničných klíčků, ale také palmový či sojový olej, mandle, burské oříšky a listová zelenina [43, 44]. Vitamín E lze však nalézt i v potravinách živočišného původu – ve vaječném žloutku, másle, sádle, mase či játrech [45]. V rostlinných zdrojích se vyskytuje většinou výrazně více tokoferolů než tokotrienolů, přičemž nejhojněji zastoupenými jsou v rostlinných olejích  $\gamma$ -tokoferol, v ovoci a zelenině  $\alpha$ -tokoferol. V potravinách živočišného původu naopak více než 90% tvoří  $\alpha$ -tokoferol, méně než 10%  $\gamma$ -tokoferol a velmi malé množství tokotrienol [43, 45].

### **Biologická aktivita vitamínu E**

Jednotlivé formy vitamínu E vykazují různou biologickou aktivitu. V molekule tokoferolů se nachází tři chirální centra (C2, C4', C8') umožňující prostorovou rotaci struktury a tvorbu celkem osmi možných stereoizomerů, které se rovněž liší svojí biologickou aktivitou. V přírodě se však nacházejí pouze (2*R*, 4'*R*, 8'*R*)-izomery [45]. Podle literatury představuje (*RRR*)- $\alpha$ -tokoferol (označovaný též D- $\alpha$ -tokoferol) nejaktivnější formu vitamínu E. Naopak synteticky vyrobený vitamin E je tvořen racemickou směsí stereoizomerů a vykazuje pouze 74% účinek čistého D- $\alpha$ -tokoferolu [12, 42]. V nedávné době se vědecký zájem upřel směrem k významu dalších tokoferolů, především  $\gamma$ -tokoferolu. Q. Jiang ve své rešeršní práci [46] poukazuje na specifické vlastnosti  $\gamma$ -tokoferolu oproti  $\alpha$ -tokoferolu, charakterizované například protizánětlivým účinkem či schopností

vychytávat dusíkové radikály. Navíc v rostlinných zdrojích je právě  $\gamma$ -tokoferol nejhojněji zastoupen. Biologický a farmakologický význam  $\beta$ - a  $\delta$ -tokoferolů zatím není přesně objasněn, nicméně také podléhá vědeckému zájmu. Uvádí se, že  $\beta$ -tokoferol vykazuje asi 50% aktivity  $\alpha$ -tokoferolu,  $\gamma$ -tokoferol asi 10% a  $\delta$ -tokoferol zhruba 3% [45].

Dvojné vazby v molekulách tokotrienolů umožňují geometrickou (*cis* a *trans*) izomerii, avšak v přírodě se vyskytují jen *all-trans*-izomery. Přítomnost dvojných vazeb má také za následek pokles biologické aktivity tokotrienolů asi na třetinu ve srovnání s tokoferoly [45].

Vitamin E chrání organismus před peroxidací nenasycených lipidů, což znamená, že brání vícenenasycené mastné kyseliny (PUFA) a lipoproteiny před škodlivým působením radikálů. Hraje velmi důležitou roli v procesu aterosklerózy, neboť chrání lipoproteiny o nízké hustotě (LDL) před oxidací, a tím zabraňuje usazování oxidačně pozměněných LDL na vnitřních stěnách cév [42, 47].

Principem antioxidační aktivity vitamínu E je schopnost fenolické hydroxylové skupiny na chromanovém kruhu poskytnout elektron či atom vodíku pro radikálovou reakci s lipidickým peroxidovým radikálem ROO $\cdot$ . Odevzdáním elektronu z tokoferolu vznikne tzv. tokoferoxylový radikál (Toc $\cdot$ ), který je buď regenerován kyselinou askorbovou, koenzymem Q<sub>10</sub> či jinými látkami (např. glutathionem) zpět na aktivní tokoferol, anebo může reagovat s dalším peroxidovým radikálem za vzniku chinonové formy (Toc=O), která sice již nemůže být regenerována zpět na tokoferol, ale není pro organismus dále nebezpečná [42, 43].

Po přijetí potravou je vitamín E v organismu absorbován asi pouze z 20-40%. Jeho vstřebání v trávicím traktu úzce souvisí s absorpcí dalších lipidů a probíhá ve sliznici tenkého střeva, kde jsou molekuly vitamínu E uzavřeny do tukových částic, tzv. chylomikronů. V této formě pak putují přes sliznici tenkého střeva a dále prostřednictvím lymfatického systému až do krevního oběhu, odkud je vitamín E vychytáván játry – hlavním orgánem zajišťujícím ukládání a exkreci vitamínu E. Z jater je vylučován do krevního řečiště spolu s lipoproteiny. Část vitamínu E je transportována do tukové tkáně [42, 44]. Komerční vitamínové přípravky často obsahují estery  $\alpha$ -tokoferolu (acetát, sukcinát), které jsou ve střevní mukóze hydrolyzovány na aktivní  $\alpha$ -tokoferol podléhající pak stejnému metabolismu.



## ***Fyzikálně-chemické vlastnosti***

Za normální teploty jsou tokoferoly nažloutlé viskózní olejovité kapaliny dobře rozpustné v nepolárních organických rozpouštědlech (hexan, petrolether, chloroform), méně rozpustné v alkoholech (methanol, ethanol) a acetonu a nerozpustné ve vodě. Tokoferoly jsou velmi citlivé vůči vzdušnému kyslíku a působením UV záření se rozkládají, proto je nezbytné uchovávat tyto látky v chladu (do 4°C) a v tmavých obalech.

## ***Analýza vitamínu E v biologickém materiálu***

Pomineme-li analytické postupy používané v 70. letech minulého století využívající kolorimetrické, spektrofotometrické či fluorescenční metody pro kvantifikaci či tenkovrstvou chromatografii (TLC) pro separaci vitamínu E, lze jednoznačně tvrdit, že nejdůležitější technikou pro stanovení těchto látek je vysokoúčinná kapalinová chromatografie [48]. Zapomenout však nesmíme ani na plynovou chromatografii, která, jakožto předchůdkyně HPLC, našla široké uplatnění v analýze tokoferolů především v 60. a 70. letech a dodnes je i lékopisnou metodou [49].

Kritickým krokem při hodnocení jakéhokoliv analytu ve složité matici je příprava vzorku k HPLC analýze, která zahrnuje šetrnou a pokud možno úplnou extrakci cílových látek ze vzorku a jejich převedení do rozpouštědla kompatibilního s HPLC systémem. Při manipulaci s tokoferoly a tokotrienoly je důležité zabránit jejich snadné oxidaci ochranou vzorků před přímým světlem či přidávkem antioxidantu (např. kyseliny askorbové, BHT). Při stanovení vitamínu E v plazmě a séru se nejprve vzorek zbaví krevních bílkovin pomocí deproteinizačního činidla (ethanol, aceton, methanol) a poté se podrobí extrakci do nepolárního organického rozpouštědla, nejčastěji hexanu či heptanu. Závěrem postupu je odpaření rozpouštědla a rozpuštění odparů v mobilní fázi či v rozpouštědle s ní mísitelným. [48]

Klasický přístup k HPLC separaci tokoferolů a tokotrienolů představuje použití normálních stacionárních fází na bázi silikagelu. Molekuly jednotlivých forem vitamínu E jsou zadržovány na normální fázi na základě vodíkových vazeb mezi fenolickou hydroxylovou skupinou tokoferolů/tokotrienolů a silanolovými skupinami silikagelu.  $\alpha$ -tokoferol obsahující tři methylové skupiny je nejméně zadržen a eluuje jako první. Dvojné vazby v molekulách tokotrienolů zvyšují jejich

polaritu, proto jsou tokotrienoly zadrženy více než tokoferoly. Pořadí eluce na normální fázi je tedy následující:  $\alpha$ -tokoferol,  $\alpha$ -tokotrienol,  $\beta$ -tokoferol,  $\gamma$ -tokoferol,  $\beta$ -tokotrienol,  $\gamma$ -tokotrienol,  $\delta$ -tokoferol a jako poslední  $\delta$ -tokotrienol. Nejčastěji používanou mobilní fází je *n*-hexan s příměsí malého množství polárnějšího rozpouštědla, např. dietyléteru, 2-propanolu či 1,4-dioxanu. Nevýhodou chromatografie na normální fázi je nestabilita silikagelu, jeho citlivosti na stopy vlhkosti a používání toxických nepolárních organických rozpouštědel. [48]

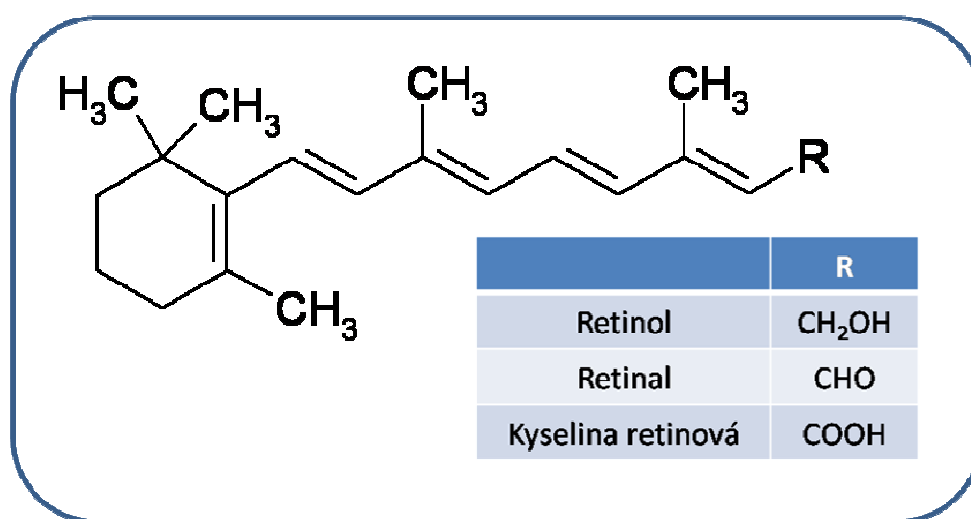
Kapalinová chromatografie využívající chemicky vázané reverzní stacionární fáze patří k nejrozšířenějším metodám analýzy buď samotného vitamínu E, ale také při současném stanovení různých liposolubilních vitamínů (E, A, D). Dostupné jsou chromatografické kolony s oktadecylsilikagelovou (ODS neboli C18) stacionární fází o různé velikosti a tvaru částic, porozitě, rozmanité délky nebo se speciální povrchovou úpravou. V reverzním HPLC systému jsou tokoferoly eluovány v opačném pořadí,  $\alpha$ -tokoferol jakožto nejméně polární látka je nejvíce zadržen. Tokotrienoly opouští kolonu také opačně – eluují před příslušnými tokoferoly. Separace  $\beta$ - a  $\gamma$ -tokoferolu/tokotrienolu, které jsou navzájem polohovými izomery, není většinou možná. Proto při požadavku na rozdělení všech forem vitamínu E se analytici často vrací k normálnímu silikagelovému HPLC systému. Jako mobilní fáze se při reverzní chromatografii používá nejčastěji 100% methanol nebo methanol doplněný malým množstvím organického rozpouštědla – tetrahydrofuranu, ethylacetátu či chloroformu. [48]

Vitamíny rozpustné v tucích se často stanovují v biologickém materiálu současně v rámci jedné analýzy. Jedním z témat této disertační práce bylo právě i současné stanovení vitamínu A a E v séru, proto bude této problematice věnována větší pozornost v následující kapitole.

## Vitamín A

Vitamín A zahrnuje skupinu biologicky významných látek, které hrají zásadní roli v procesu vidění, při růstu, reprodukci či embryonálním vývoji a které jsou důležité pro správnou funkci imunitního systému. V případě vitamínu A často narazíme na nesrovnalosti v názvosloví, neboť různé literární zdroje přistupují k charakteristice vitamínu A odlišným a lehce matoucím způsobem. Správně zahrnuje vitamín A tři látky – retinol, retinal (neboli retinaldehyd) a kyselinu retinovou, každá z nich zastupuje vlastní funkce v organismu. Retinol je „hlavní“

formou vitamínu A v organismu a retinal s kyselinou retinovou patří mezi jeho deriváty. Retinal je nezbytný pro vidění a správnou funkci pokožky a sliznic, kyselina retinová je pak aktivním faktorem pro diferenciaci a vývoj tkání. V literatuře se také setkáme s pojmem „retinoidy“, které označují skupinu látek strukturně a funkčně příbuzných k retinolu. K retinoidům se navíc řadí i syntetické analogy retinolu mající odlišnou strukturu, avšak vykazující biologickou aktivitu vitamínu A. Chemická struktura vitamínu A je znázorněna na Obrázek 5. [42, 50, 47]



**Obrázek 5: Struktura různých forem vitamínu A.**

Vitamín A si umějí syntetizovat sami pouze živočichové a některé bakterie. V lidském organismu vzniká z provitamínu  $\beta$ -karotenu, přičemž hydrolýzou jedné molekuly  $\beta$ -karotenu vznikají v tenkém střevě 2 molekuly retinalu, které jsou pak redukovány na retinol. Zatímco nadbytečný přísun vitamínu A je pro organismus toxický,  $\beta$ -karotenem se naopak předávkovat nemůžeme, neboť z něj vzniká pouze aktuálně potřebné množství vitamínu A a zbytek je vyloučen stolicí. Přírodním zdrojem vitamínu A jsou potraviny živočišného původu - játra, vaječný žloutek, máslo, plnotučné mléko, sýry či smetana; bohatým zdrojem  $\beta$ -karotenu je „barevné“ ovoce a zelenina, především mrkev, meruňky, broskve, špenát, zelí a brokolice. [3, 42, 47]

## **Biologická aktivita vitamínu A**

Systém pěti konjugovaných dvojných vazeb v molekulách retinoidů umožňuje vznik mnoha různých izomerních forem, přičemž nejčastější jsou konfigurace *all-trans*-, *9-cis*, *11-cis* a *9,13-di-cis*. [50]

Přísun vitamínu A zabezpečují jednak potraviny živočišného původu, jednak ovoce a zelenina bohaté na  $\beta$ -karoten, ze kterého vzniká v tenkém střevě retinol. Vitamínové přípravky obsahují vitamín A většinou ve formě retinyl acetátu, tedy esteru, který je ve střevní mukóze hydrolyzován na retinol. Většina retinolu je absorbována a dále opět přeměněna na jeho estery (především retinyl palmitát), které tvoří transportní a zásobní formu vitamínu A. Metabolismus vitamínu A je podobný metabolismu tokoferolů – prostřednictvím chylomikronů je retinyl palmitát dopraven do jater, kde je dále využíván. [42]

Retinol v těle působí také nepřímo prostřednictvím jeho biologicky aktivních metabolitů – především *11-cis*-retinalu a *all-trans*-retinové kyseliny (ATRA). ATRA je aktivnější než retinol při diferenciaci a vývoji tvaru buněčných linií (morfogenezi), avšak nemůže zastupovat funkci retinolu v procesu vidění a reprodukce. Různé izomerní formy kyseliny retinové působí na rozdílné receptory, z čehož také vyplývají rozdíly v jejich biologické aktivitě. [51, 50]

Metabolické funkce vitamínu A jsou tři a zahrnují (1.) zajištění procesu vidění, (2.) syntézu glykoproteinů a (3.) kontrolu proliferace a diferenciaci buněk, což je vědecky nejméně objasněná oblast, avšak potenciálně využitelná v terapii rakoviny. Navíc bylo zjištěno, že nedostatek vitamínu A v těle způsobuje zvýšenou náchylnost k infekcím. Naopak nadbytek přijímaného vitamínu A způsobuje jak akutní tak chronickou toxicitu. Akutní toxicita se projevuje při jednorázovém podání velmi vysokých dávek (>300 mg) nevolností, zvracením, bolestmi hlavy, a u extrémně vysokých dávek dokonce i smrtí. Dlouhodobé podávání vyšších dávek vitamínu A pak vyvolává negativní chronické účinky na centrální nervovou soustavu, játra, kosti a pleť. Kyselina retinová a syntetické retinoidy navíc při předávkování vykazují vysoce teratogenní účinky. [42, 50]

Z farmakologického hlediska se retinoidy používají jednak v dermatologii k léčbě akné či jiných potíží, ale také v terapii některých druhů rakoviny. Využití retinoidů v onkologii vyplývá ze zjištění, že jejich nedostatek v organismu může být rizikovým faktorem pro vznik rakoviny a naopak vysoké dávky mohou být kanceroprotektivní. Zde však narážíme na problém stanovení terapeutické dávky

vzhledem k prokázané vysoké toxicitě retinoidů. I přesto se především kyselina retinová a její deriváty v praxi používají k léčbě různých typů nádorů včetně leukémie. Protinádorové účinky retinoidů jsou vysvětlovány na principu jejich schopnosti inhibovat proliferaci nádorových buněk. Rizikovou skupinu však tvoří kuřáci, u nichž bylo paradoxně zjištěno, že vyšší příjem vitamínu A a  $\beta$ -karotenu z potravních doplňků způsobuje častější výskyt rakoviny. [42, 50, 52]

### ***Fyzikálně-chemické vlastnosti***

Retinol vytváří žluté jehlicovité krystaly mastného vzhledu, je nerozpustný ve vodě a glycerolu, rozpustný v ethanolu, methanolu, chloroformu, etherech a v tucích. Čistá substance i roztok jsou citlivé na vzdušný kyslík a světlo a velmi rychle jejich působením oxidují. Oxidace retinolu je urychlována přítomností těžkých kovů, zejména železa a mědi. Proto se doporučuje před analýzou připravit vždy čerstvý roztok. Ve výjimečných případech lze roztok retinolu skladovat v tmavém obalu a inertní atmosféře při  $-20^{\circ}\text{C}$ . Za stejných podmínek se uchovává i čistá substance.

Kyselina retinová tvoří žluto-oranžový prášek, je prakticky nerozpustná ve vodě, mírně rozpustná v alkoholu, chloroformu a etheru a rozpustná v methylen chloridu. Vykazuje vysokou citlivost vůči světlu, teplu a vzduchu. Působením světla, v kyselém prostředí či účinkem katalyzujících látek dochází k izomerizaci na cis-izomery. Čistá substance i roztok se uchovávají za stejných podmínek jako retinol.

Obecně lze říci, že všechny retinoidy jsou citlivé na světlo, teplo a kyslík. Proto při manipulaci jak se standardy tak s materiálem určeným k analýze těchto látek je nutné dodržovat předepsané skladovací podmínky (tmavé prostředí, inertní atmosféra, teplota  $-20$  až  $-70^{\circ}\text{C}$ ). [50, 53, 54]

### ***Analýza vitamínu A v biologickém materiálu***

Vzhledem k výše zmíněným a pro praktickou analytiku nepříjemným vlastnostem retinoidů a také kvůli poměrně nízkým koncentracím těchto látek v biologických vzorcích, jsou pro dosažení spolehlivých výsledků kladeny vysoké nároky na celý analytický proces. HPLC představuje nejčastější metodu analýzy, a to ve spojení s UV detekcí, která je dostatečně citlivá díky silné absorpenci

retinoidů při specifických vlnových délkách. Fluorescenční a elektrochemická detekce byla také popsána pro analýzu retinoidů. V některých případech lze využít dokonce i kapilární elektroforézu, plynovou chromatografii či hmotnostní spektrometrii. [50]

V klinické praxi se sledují hladiny retinoidů především v séru, plazmě a moči, ale také v různých tkáních či potravinách. Odebrané vzorky musí být vždy chráněny před světlem a vzdušným kyslíkem, nejlépe ihned zpracovány pro analýzu, či pokud to není možné, uchovávány při -80°C. [50]

Způsob úpravy vzorků před analýzou vyplývá z fyzikálně-chemických vlastností retinoidů a představuje velmi důležitý krok pro dosažení spolehlivých výsledků. Cílem je separace kýžených analytů od biologické matrice, čehož je nejčastěji dosaženo extrakcí rozpouštědlem. Postup je analogický extrakci tokoferolů a zahrnuje opět dva kroky: Nejprve se vysráží bílkoviny pomocí rozpouštědla mísitelného s vodou (např. methanol, ethanol) a následně se provede liquid-liquid extrakce (LLE) do rozpouštědla s vodou nemísitelným (hexan). Po jeho odpaření je zbytek rozpuštěn v mobilní fázi či rozpouštědle s ní mísitelným. Jako alternativní postup slouží SPE či on-line úprava vzorku před HPLC analýzou. Pro zajištění dobré výtěžnosti, správnosti a opakovatelnosti celého procesu je doporučeno přidání vnitřního standardu ke vzorku ještě před započítáním jeho úpravy. Tento postup je prakticky shodný s úpravou vzorků pro analýzu tokoferolů, proto je možné extrahovat v jednom kroku jak retinol, tak tokoferoly, ale i další přítomné neutrální lipofilní látky (karotenoidy). Naopak polární ionizovatelné retinoidy, mezi něž patří kyselina retinová a její izomery, lze účinně vyextrahovat až po okyselení vodného média pomocí zředěné octové kyseliny. Jako rozpouštědlo se pak použije ethyl-acetát či jeho směs s hexanem. [50]

Autoři Kane *et al.* [51] použili pro současnou extrakci všech retinoidů následující postup: Nejprve se provede precipitace proteinů pomocí methanolického roztoku KOH a extrakce hexanem. Po centrifugaci se oddělí hexanová vrstva s vyextrahovanými neutrálními lipidy (retinol a estery retinolu). Pro získání kyseliny retinové se ke zbylé vodné fázi přidá kyselina chlorovodíková a po protřepání se provede opět extrakce do hexanu. Oddělená hexanová vrstva pak obsahuje kyselinu retinovou.

V literatuře však byla popsána i často používaná metoda zahrnující pouze přidání vodou mísitelného organického rozpouštědla (EtOH, MeOH, ACN, ACN-

butanol), centrifugaci a nástřik supernatantu. Tento postup je sympatický svojí jednoduchostí (vyhneme se použití organických rozpouštědel pro extrakci), avšak neumožňuje zakoncentrování analyzovaných látek. Toho však lze dosáhnout zařazením jednoho kroku navíc – pomocí odpaření rozpouštědla a rozpuštění zbytku v menším množství (nejlépe) mobilní fáze. Podobně lze vynechat precipitaci bílkovin a provést přímou extrakci organickým rozpouštědlem. Zde se však pro lepší vyextrahování retinoidů vázaných na krevní bílkoviny přidává roztok soli či pufr. [50]

HPLC je metodou volby pro analýzu retinoidů v biologickém materiálu a zahrnuje možnost použití jak normálních, tak reverzních stacionárních fází, přičemž každý systém má různé výhody. Při analýze na normální fázi (silikagel, modifikovaný silikagel) je možné lépe separovat geometrické izomery retinoidů, avšak jako mobilní fáze se používají nevodná organická rozpouštědla (hexan, heptan, příp. přídavek mísitelného polárního rozpouštědla). Naopak reverzní HPLC systém používající nejčastěji C18, C8 či fenylové C18 stacionární fáze umožňuje použití polárních rozpouštědel (MeOH, ACN, příp. přídavek pufru, kyseliny či tetrahydrofuranu nebo butanolu), avšak za běžných podmínek je dosaženo pouze separace jednotlivých tříd retinoidů, nikoliv jejich izomerů. [50]

### ***Současné HPLC stanovení vitamínů A a E v lidském séru***

Podání cytotoxických léčiv či radioterapie v rámci onkologické léčby jsou spojené se vznikem oxidačního stresu a porušením antioxidační rovnováhy. Proto je důležité sledovat u léčených pacientů antioxidační stav jejich organismu, což je umožněno právě monitorováním sérových hladin vitamínů A a E. V současnosti je těmto látkám věnována pozornost také kvůli jejich potenciálním protirakovinným účinkům. Hladiny liposolubilních vitamínů (včetně vitamínů D a K) v séru jsou však sledovány i pro kontrolu nutričního stavu organismu. [6, 55]

K nejčastěji sledovaným látkám patří především *all-trans*-retinol a  $\alpha$ -tokoferol, s použitím retinyl acetátu,  $\alpha$ -tokoferyl acetátu nebo tokolu jako vnitřního standardu. Vedle těchto základních analytů se také stanovují estery retinolu (palmitát, stearát), jejichž hladiny mohou poukazovat na míru poškození stěny tenkého střeva po chemo- a radioterapii [56]. Kromě  $\alpha$ -tokoferolu se často hodnotí i hladiny  $\gamma$ -tokoferolu, který vykazuje velkou antioxidační aktivitu a v současnosti je intenzivně studován jeho biologický význam v organismu [57].

Vzhledem ke společnému lipofilnímu charakteru látek vitamínů A a E nevyžaduje jejich současná analýza významně odlišné podmínky pro úpravu biologického materiálu. Nejčastěji používaný postup pro jednoduchou analýzu retinolu a  $\alpha$ -tokoferolu zahrnuje extrakci pomocí ethanolu a hexanu a analýzu na C18 koloně s použitím mobilní fáze složené buď ze stoprocentního methanolu nebo směsi methanolu s acetonitrem, a to většinou za izokratických podmínek. Komplikovanější směsi (včetně  $\alpha$ -,  $\gamma$ - a  $\delta$ -tokoferolu) je možné separovat pomocí gradientového módu a zvýšením podílu vody v mobilní fázi. Konvenčním způsobem detekce je UV spektrofotometrie, a to při 325 nm pro retinol a 295 nm pro tokoferol [55, 58]. Popsané je však i spojení kapalinové chromatografie s fluorescenčním detektorem [57] či hmotnostní spektrometrií [59, 60].

#### 2.1.4 Mastné kyseliny

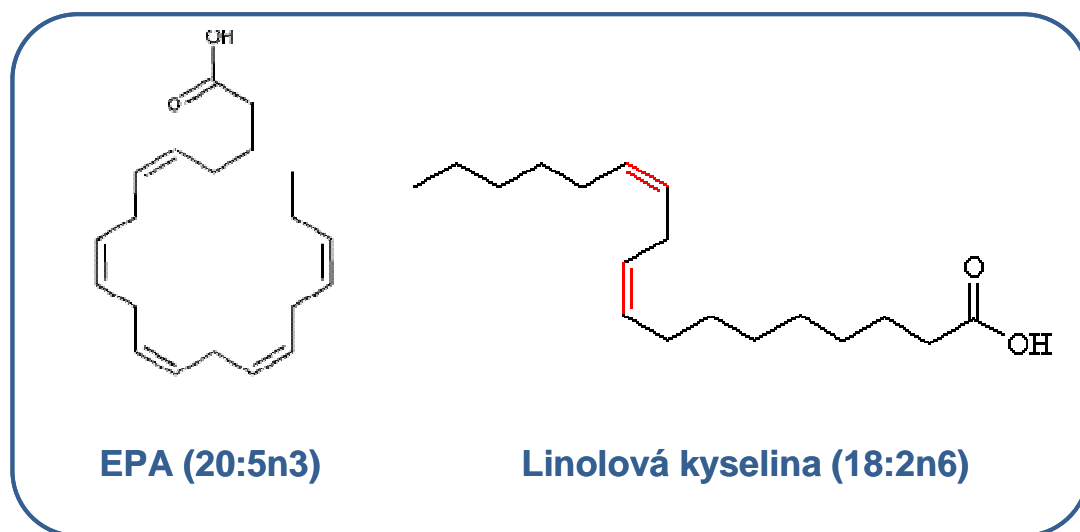
Mastné kyseliny (MK) jsou z hlediska výživy nejdůležitější složkou lipidů. Jedná se o karboxylové kyseliny s alifatickým či méně často s aromatickým či alicyklickým uhlíkovým řetězcem přítomné v přírodních lipidech a průmyslových tucích ve formě triacylglycerolů – esterů glycerolu a tří molekul mastných kyselin. MK se dělí do tří základních skupin – nasycené mastné kyseliny (SFA), nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou (MUFA) a nenasycené mastné kyseliny s několika dvojnými vazbami (také vícenasycené, polynenasycené, PUFA). Vícenasycené mastné kyseliny hrají důležitou roli ve výživě, ve stavbě tkání a jsou nezbytnou součástí lipidů tvořících membrány buněk a zajišťujících jejich správné vlastnosti a funkce. Jelikož jsou PUFA zapojeny do procesů zahrnujících transport elektronů a kyslíku, zařadila jsem je také mezi látky s antioxidační aktivitou, přestože jejich význam spočívá v jiných úlohách. [3, 61, 62]

##### Vícenasycené mastné kyseliny (PUFA)

Vícenasycené mastné kyseliny obsahují ve své molekule 2-6 dvojných vazeb. Podle polohy první dvojně vazby od koncové methylové skupiny je dělíme na  $\omega$ -6 (také  $n$ -6) a  $\omega$ -3 ( $n$ -3) kyseliny. Strukturu jednotlivých kyselin lze jednoduše znázornit zkráceným názvem (např.  $\alpha$ -linolenové kyselině odpovídá zkratka 18:3n3, kde 18 vyjadřuje počet uhlíků, 3 je počet dvojných vazeb a  $n$ -3 znázorňuje polohu první dvojně vazby. Mezi nejvýznamnější zástupce patří kys. linolová



(18:2n6),  $\alpha$ -linolenová (18:3n3),  $\gamma$ -linolenová (18:3n6), eikosapentaenová (EPA, 20:5n3) a dokosahexaenová (DHA, 22:6n3). Chemická struktura kyseliny eikosapentaenové a linolové je znázorněna na Obrázek 6. [61, 63]



Obrázek 6: Chemická struktura dvou vícenenasycených mastných kyselin

### ***Výskyt a biologická aktivita PUFA***

Člověk přijímá MK ve formě lipidů (fosfolipidy, triglyceridy), které se v tenkém střevě štěpí na volné mastné kyseliny a jako takové se vstřebávají střevní stěnou. Některé MK je lidský organismus schopen sám syntetizovat. Avšak polynenasycené n-3 a n-6 kyseliny ( $\alpha$ -linolenová, linolová) si neumí sám vytvářet, přestože je k životu nezbytně potřebuje. Tyto látky se proto označují jako tzv. esenciální mastné kyseliny a musíme je přijímat v dostatečném množství potravou.

V lidském organismu se linolová a  $\alpha$ -linolenová kyselina (získané z potravy) prodlužují o 2-6 atomů uhlíku (tzv. elongace) a tvoří se i další dvojně vazby (tzv. desaturace), což vede ke vzniku mastných kyselin s 20 - 24 atomy uhlíku a se 3-6 dvojnými vazbami. Tyto látky kromě důležité role stavebních kamenů biologických membrán zajišťujících jejich fluiditu a flexibilitu fungují jako nezastupitelné prekurzory pro syntézu tromboxanů, prostaglandinů a leukotrienů, které jsou mimo jiné nezbytné pro regulaci imunitního systému a krevního tlaku, srážení krve či pro metabolismus cholesterolu. [61, 64]

Vícenenasycené mastné kyseliny jsou přítomné v tukách rostlinného i živočišného původu v různých koncentracích a složení. Zatímco rostlinné oleje

obsahují především  $\omega$ -6-PUFA, rybí tuk je naopak bohatý na  $\omega$ -3-kyseliny. Tuk sladkovodních a mořských ryb se také liší složením mastných kyselin. Hlavním zdrojem  $\omega$ -3-kyselin je však tuk ryb mořských, především z tresky, makrely a tuňáka. Kyseliny eikosapentaenová (EPA) a dokosahexaenová (DHA) patří mezi nejdůležitější  $\omega$ -3-kyseliny, které lidské tělo přímo využívá. Ve vysoké koncentraci se nacházejí např. v mozku. Jejich schopnost snižovat hladinu lipidů v krvi spolu s omezením srážení krevních destiček hraje významnou roli v léčbě a prevenci kardiovaskulárních onemocnění vyvolaných v důsledku vysokých hladin cholesterolu a vysokého krevního tlaku. Kromě EPA a DHA je významná i  $\alpha$ -linolenová kyselina (ALA), zástupkyně  $\omega$ -3-kyselin rostlinného původu, vyskytující se hojně v řepkovém či lněném oleji. [3, 64]

Zvýšení příjmu vícenenasycených mastných kyselin hojnou konzumací mořských ryb však paradoxně není příliš doporučováno, a to především kvůli vysoké kontaminaci mořských živočichů těžkými kovy a jinými toxickými látkami. Jako alternativa se nabízí užívání potravinových doplňků obsahujících rybí olej o vysoké koncentraci mastných kyselin, navíc často doplněných o vitamíny B9 a B12, které zlepšují vstřebání mastných kyselin. Široká škála takových přípravků je běžně k dostání v lékárnách. [3]

Přírodní nenasycené mastné kyseliny mají většinou konfiguraci *cis*. *Trans* kyseliny vznikají hydrogenací nenasycených MK, a proto se vyskytují ve značném množství ve ztužených tucích. *Trans* izomery mají rigidní nepružnou strukturu, a proto i jejich chování v organismu je odlišné – zvyšují koncentrace triglyceridů a LDL cholesterolu v krvi a vykazují i kancerogenní účinky. Proto bychom se jejich konzumaci měli spíše vyhnout. [61, 63]

### ***Fyzikálně-chemické vlastnosti***

Vlastnosti mastných kyselin se odvíjí od jejich struktury. Rozpustnost ve vodě je velmi nízká vzhledem k hydrofobnímu charakteru alifatického řetězce. Většina nenasycených mastných kyselin jsou netěkavé viskózní kapaliny nerozpustné ve vodě a rozpustné v organických rozpouštědlech. Methyl estery mastných kyselin jsou v organických rozpouštědlech lépe rozpustné než volné kyseliny, čehož se využívá při analýze plynovou chromatografií. Reaktivní část molekuly je tvořena karboxylovou skupinou, která poskytuje v přítomnosti alkoholu a katalyzátoru esterifikační reakci. [61, 65]

## ***Analýza mastných kyselin v tucích***

Jeden z možných postupů charakterizace tuků a olejů rostlinného či živočišného původu představuje GC analýza mastných kyselin převedených na příslušné methyl estery. Většina jedlých tuků a olejů obsahuje celou škálu mastných kyselin, s dvanácti až dvaadvaceti uhlíky v molekule. Zastoupené jsou v různých poměrech nasycené, mono- i polynenasycené mastné kyseliny. Složení a koncentrace jednotlivých MK je pro různé oleje charakteristické a umožňuje tak jejich identifikaci.

Obecný postup analýzy MK je založen na hydrolýze (zmýdelnění) triglyceridů na glycerol a volné kyseliny (resp. jejich soli), derivatizace na methyl estery (ME) a následná GC analýza na vhodných stacionárních fázích. Přestože je možné analyzovat i volné kyseliny, analýza methyl esterů představuje mnohem robustnější a používanější postup. Pro analýzu MK existuje celá řada metod, většina z nich však více či méně kopíruje následující postup: Nejprve jsou triglyceridy zmýdelněny pomocí methanolického roztoku alkalického hydroxidu (NaOH, KOH) za vzniku jejich alkalických solí (= mýdel), které jsou následně převedeny na methyl estery s použitím derivatizačního činidla ( $\text{BF}_3$ ). Vzniklé lipofilní ME se vytřepou do organického rozpouštědla (např. hexan, heptan, isooktan), organická vrstva se oddělí a případně zakoncentruje před nástřikem do plynového chromatografu. Popsány jsou i alternativní postupy bez použití bortrifluoridu. Mezi oficiální metody patří AOAC metody [66, 67], normy ISO [68], metody uvedené v příslušných člancích Evropského lékopisu [69] a Českého lékopisu [49], České normy [70] nebo aplikační listy Agilent Technologies [71]. Obsah mastných kyselin se vyjadřuje buď jako procentuální zastoupení jednotlivých kyselin (všechny MK dohromady tvoří 100%) a nebo (hlavně u stanovení EPA a DHA v rybím tuku) v absolutním množství (miligramy MK v 1 g vzorku). Ve druhém případě je nutné použít vnitřní standard – doporučované jsou methyl estery MK s lichým počtem uhlíků, které se v přírodních tucích prakticky nevyskytují (17:0, 19:0, 21:0, 23:0). [66, 71, 72]

Pro chromatografickou separaci methyl esterů máme dnes k dispozici široký výběr různých GC kolon lišících se délkou, typem stacionární fáze a tloušťkou vrstvy sorbentu. K tomuto účelu používané stacionární fáze zahrnují jednak fáze polyglykolové (Omegawax, Supelcowax, DB-Wax) vhodné pro

charakterizaci rostlinných olejů, a také kyanopropylové sorbenty (DB-23, SP-2380) určené pro analýzu složitějších vzorků, např. rybího tuku. [71]

## 2.2 Ostatní studované přírodní látky

### 2.2.1 Hořec žlutý (*Gentiana lutea* L.)

Hořec žlutý je vytrvalá rostlina z čeledi hořcovitých (*Gentianaceae*) přirozeně rostoucí v alpských oblastech střední a jižní Evropy a také v západní Asii v nadmořských výškách 1000 – 2500 m. n. m.. Jedná se o 1 – 1,5 m vysokou bylinu se světle žlutými květy (viz Obrázek 7). Volně rostoucí hořec žlutý je přísně chráněný.



Obrázek 7: *Gentiana lutea* L., kvetoucí rostlina a kořen

Droga (*Gentianae radix*), uvedená v mnoha lékopisných monografiích, je tvořena usušenými fermentovanými oddenky a kořeny hořce žlutého. Nesmí obsahovat příměsi jiných druhů hořců ani podzemních částí jiných bylin rostoucích ve stejných lokalitách. Hořcový kořen je tradičně používán jako účinný prostředek pro podporu trávení, a to ve formě odvaru, tinktury či jako prášková droga v tuhých lékových formách. [18, 73, 74, 75]

Analýze obsahových látek hořce žlutého jsem se věnovala během studijní stáže na Katedře farmakognosie University v Innsbrucku. Ačkoliv hořec obsahuje i látky vykazující antioxidační aktivitu (fenolické kyseliny) [18], a tím by velmi dobře tématicky zapadal do studované skupiny látek, přesto je nezbytné jej zařadit mimo tuto oblast. Předmětem analýzy hořcového kořene byla totiž separace hořčin a xanthonů, které nepůsobí antioxidačně, avšak mají jiné farmakologicky významné účinky.

### Obsahové látky *Gentiana lutea*

Obsahové látky hořcového kořene zodpovědné za cholagogní a další účinky tvoří sekoiridoidové hořčiny. Nejhojněji (ze 2-3%) je zastoupen gentiopicrosid (také známý jako gentiamarin), doplněný o amarogentin, swerosid a swertiamarin. Tyto látky patří k vůbec nejhořčím známým sloučeninám a působí stimulačně na trávicí systém. Sekoiridoidy jsou doprovázeny xanthy gentiseinem, gentisinem a isogentisinem, fenolickými kyselinami (gentisová, kávová, protokatechová), fytosteroly, alkaloidy či polysacharidy (inulin, pektin). [18, 74, 75, 76]

### Farmakologické účinky a použití

Hořčiny působí jako látky podporující chuť k jídlu a stimulující trávení, a to skrze zvýšení slinění a vylučování žluči, ale také podporu sekrece žaludečních šťáv. Pro tyto účinky se hořcový kořen používá jako složka cholagog, roborancií, tonik a prostředků při onemocnění trávicího traktu. Nezastupitelný význam má v tradiční lidové medicíně a při výrobě likérů. U frakce extrahované z příbuzné rostliny *Swertia chirata* bohaté na amarogentin byl objeven dokonce i protinádorový účinek. Zaznamenány byly však i nežádoucí účinky přípravků s hořcem (občasné bolesti hlavy u citlivých osob) a také kontraindikace při gastroduodenální vředové chorobě. [18, 74, 75, 77]

Xanthy patří mezi rostlinné fenoly a v hořcovém kořeni jsou reprezentovány polohovými izomery gentisinem a isogentisinem. Obě látky mohou působit jako antidepresiva vzhledem k jejich prokázané schopnosti inhibovat monoaminoxidázu typu A a B, a isogentisin samotný vykazuje silné antituberkulotické účinky. V nedávné době byly zjištěny i určité cytoprotektivní účinky isogentisinu, avšak nikoliv gentisinu. [78, 79, 80, 81, 82]

### Analýza obsahových látek *G. lutea*

V dostupných informačních databázích překvapivě nenalezneme velké množství prací věnujících se analýze hořce. Publikovány byly postupy pro analýzu hlavních látek *G. lutea* využívající HPLC, tenkovrstvou chromatografii (TLC) či micelární elektrokinetickou chromatografii (MEKC). Vědecký tým A. Aberham *et al.* [83] nedávno vyvinul původní metodu pro stanovení všech doposud známých obsahových látek hořcového kořene pomocí HPLC-MS. Součástí této disertační práce je separace gentisinu, isogentisinu a amarogentinu pomocí kapilární elektroforézy, která kromě posledně zmíněné práce (publikované na stejném Innsbruckém pracovišti) nebyla nikdy popsána. [84, 85, 86, 87]

## 3 Teoretická část – separační metody

### 3.1 Plynová chromatografie

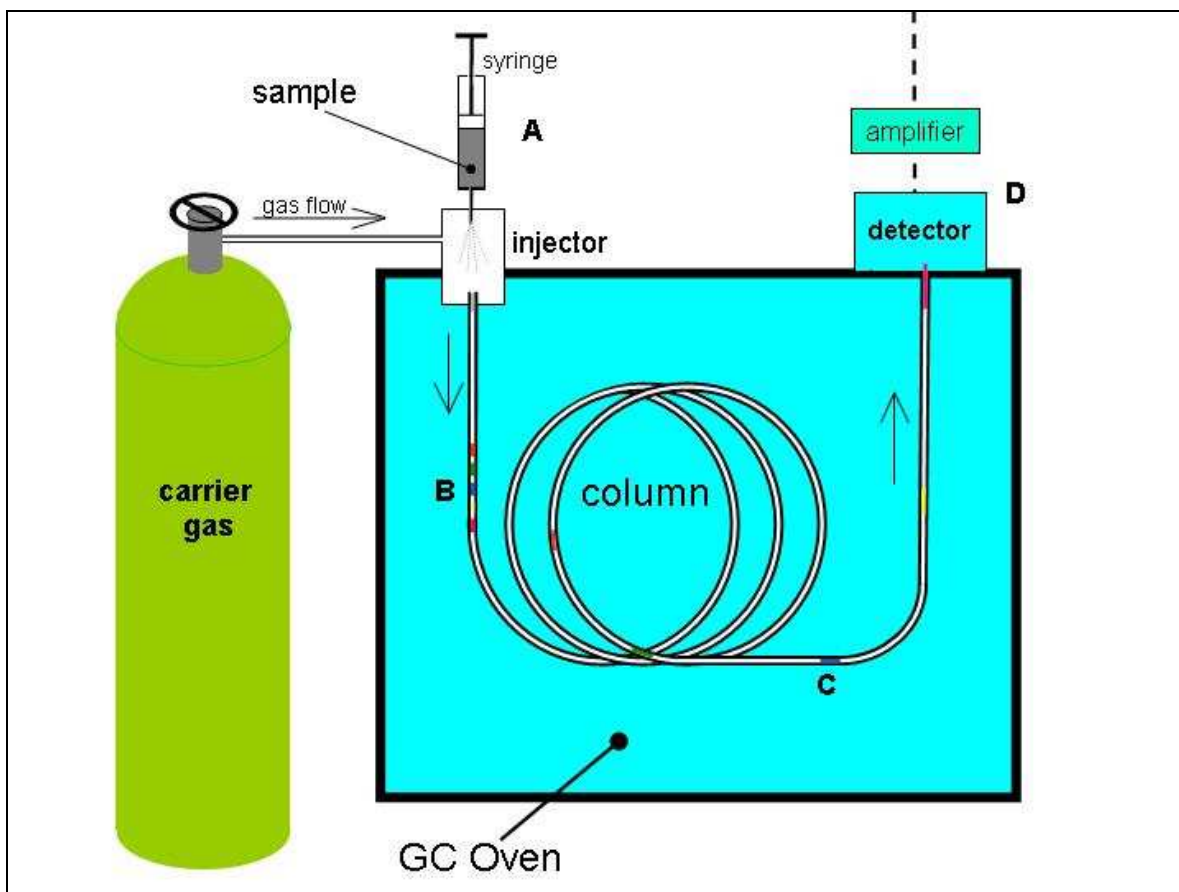
Chromatografické techniky dnes patří k nejvýznamnějším analytickým metodám umožňující separaci, identifikaci a kvantifikaci velkého počtu látek různého charakteru. Počátky chromatografie sahají do raných let 20. století, kdy ruský botanik Tswett rozdělil na sloupci sorbentu chlorofylová barviva s použitím petroletheru jako kapalné fáze. Někteří autoři datují počátky chromatografie dokonce již do poloviny 19. století, kdy se tehdejší vědci věnovali dělení různých barviv či jiných látek na papíře. Tswettův objev však zůstává považován za základ dalšího rozvoje širokého spektra chromatografických technik. [88, 89]

Plynová chromatografie (Gas chromatography, GC) byla vyvinuta v roce 1952 v Anglii pány Martinem a Jamesem, kteří představili výhody použití tenké vrstvy stacionární fáze a plynu jako mobilní fáze, což umožňovalo velmi účinnou separaci látek. Od 70. let 20. století byla plynová chromatografie nejvíce rozvíjenou a studovanou separační technikou a dosažené objevy pak významně ovlivnily vývoj dalších chromatografických technik, především moderní vysokoúčinné kapalinové chromatografie. [89, 90]

#### 3.1.1 Princip plynové chromatografie

Při plynové chromatografii je mobilní fáze plynná a také analyzované látky se během separace nacházejí v plynném stavu. Podle charakteru stacionární fáze dělíme GC na Gas-Solid Chromatography (GSC), kde se využívá principu adsorpce analytu na pevný sorbent, a na Gas-Liquid Chromatography (GLC), kdy je stacionární fází kapalina ukotvená na inertním nosiči a analyzované látky se separují na základě rozdělávání a rozpouštění v kapalné a plynné fázi. Stacionární fáze je uspořádána v koloně a mobilní fáze - nosný plyn - tlakovým spádem prochází kolonou. Na základě vzájemných interakcí mezi analytem, stacionární a mobilní fází pak dochází k rozdělení jednotlivých složek v koloně, které jsou unášeny nosným plynem až k detektoru. Jednoduché schéma plynového chromatografu je znázorněno na Obrázek 8.





Obrázek 8: Schéma plynového chromatografu.

A – Směs látek je nastříknuta do vyhřívaného nástřikového prostoru, kde dojde k jejich zplynění. Páry vzorku jsou unášeny nosným plynem na kolonu. B – Látky s vyšší afinitou ke stacionární fázi jsou zadrženy déle a procházejí kolonou pomaleji než látky s menší afinitou, čímž dojde k jejich separaci. C – Při průchodu kolonou se látky dále rozdělují. D – Separované složky vstupují do detektoru, který poskytuje signál úměrný množství analytu. (Zdroj: [http://www.srs.fs.usda.gov/4501/what\\_is\\_gc.htm](http://www.srs.fs.usda.gov/4501/what_is_gc.htm), 10.2.2008)

GC může být použita pro separaci plyných, kapalných i pevných těkavých látek. Tedy obecně všech látek, které mohou být převedeny do plynného stavu, aniž by došlo k jejich rozkladu, při teplotách do 350°C. Takové látky tvoří přibližně 15 % všech známých sloučenin. Avšak i netěkavé látky lze analyzovat plynovou chromatografií, a to s využitím derivatizačních technik, jejichž prostřednictvím vznikají těkavé deriváty analyzovaných látek.

Význam GC spočívá především v ohromné separační účinnosti, která vyplývá z velkého počtu teoretických pater v koloně (počet teoretických pater může dosahovat až 1 milion), což je dáno nízkou viskozitou plynné mobilní fáze a použitím dlouhých analytických kolon. S tím souvisí i dosažení dobrého rozlišení a možnosti dělení látek s velmi blízkými teplotami varu. Výběrem selektivní stacionární fáze můžeme separovat molekuly s podobnými fyzikálními i chemickými vlastnostmi. Vysoká citlivost GC stanovení je další parametr, který podmiňuje široké využití plynové chromatografie. Detekční limity závisí na

zvoleném detektoru, čímž může být dosaženo citlivosti až v řádech  $10^{-9}$  mg/ml. [88, 89, 90]

### 3.1.2 Mobilní fáze v plynové chromatografii

Jako nosný plyn se pro GC analýzy používá nejčastěji helium a dusík, méně často pak vodík či argon. Volba mobilní fáze v plynové chromatografii je zdánlivě nevýznamná, neboť prakticky nemá vliv na selektivitu chromatografického systému. Záměna dusíku za helium při zachování průměrné průtokové rychlosti neovlivní vzájemné pořadí píků separovaných složek. Avšak nosný plyn hraje důležitou roli v účinnosti chromatografického systému, rozlišení píků a rychlosti analýzy. Z tohoto pohledu je nejlepší volbou helium, které umožňuje zachování maximální separační účinnosti v širokém rozmezí lineárních průtoků mobilní fáze. Vodík není z hlediska bezpečnosti preferovaný nosný plyn, avšak pro rychlé analýzy s použitím velmi úzkých kolon je považován za ideální. Dusík je naopak všeobecně označován jako nejméně vhodná mobilní fáze kvůli úzkému rozmezí optimálního průtoku při zajištění maximální separační účinnosti. [90, 91]

### 3.1.3 Stacionární fáze v plynové chromatografii

V plynové chromatografii je známo několik set různých stacionárních fází. Obecně však rozlišujeme pouze dva typy, a to fáze pro **adsorpční mechanismus** (GSC) a fáze pro **rozpouštěcí mechanismus** separace (GLC).

Chromatografické kolony se dělí také do dvou hlavních skupin, ty však nekopírují druh separačního mechanismu, nýbrž způsob ukotvení stacionární fáze. Starší a dnes již méně používané jsou **náplňové kolony** plněné pevným adsorbentem (GSC) a nebo inertním nosičem smočeným zakotvenou kapalnou fází (GLC). Náplňové kolony jsou zatočené trubičky ze skla, mědi či nerezové oceli o průměru 3-6 mm a délce 1-2 m. V dnešní době však většina analytiků používá téměř výlučně **kapilární kolony**, což jsou tenké kapiláry z křemenného skla shora potažené polyimidovým polymerem, který zajišťuje jejich pružnost a nelámavost. Kapalná stacionární fáze v případě GLC je ukotvena na nosiči nebo přímo na vnitřním povrchu kapiláry a tvoří velmi tenkou homogenní vrstvu. Na vnitřní povrch kapiláry však může být navázaný i pevný adsorbent (např.  $Al_2O_3$ ), kde se pak uplatňuje adsorpční mechanismus separace. Kapilární kolony jsou

charakterizovány čtyřmi základními parametry: druhem stacionární fáze, tloušťkou její vrstvy, vnitřním průměrem a délkou kolony.

**Tloušťka vrstvy** stacionární fáze se pohybuje v rozmezí 0,1- 1 um. Přitom platí pravidlo, že s rostoucí tloušťkou stacionární fáze dochází k prodloužení analýzy, jelikož se zvyšuje retence analytu ve stacionární fázi. **Vnitřní průměr** se pohybuje v rozmezí 0,1 – 0,53 mm a **délka** od několika po desítky metrů. Podle průzkumu z roku 2003 přibližně 90% GC uživatelů používá kapilární kolony, z nichž k nejčastěji zmiňovaným patří kolony o délce 20 – 30 m a úzkém vnitřním průměru (0,2 – 0,32 mm). Kolony s takto malým vnitřním průměrem poskytují rychlejší analýzy a vyšší citlivost. Přestože mají menší kapacitu ve smyslu objemu nastříknutého vzorku, s použitím moderních a citlivých detektorů je tento fakt zanedbatelný. [92, 93]

Volba **stacionární fáze (SF)** je klíčový faktor v GC analýze, protože se jedná o jeden z mála způsobů ovlivnění selektivity separačního procesu. Ideální stacionární fáze pro GLC by měla umožnit rozdělení separovaných látek na základě jejich rozdílné rozpustnosti v ní. Současně by měla být chemicky a teplotně stálá, vykazovat nízkou tenzi par při pracovní teplotě (tzn. netěkat) a měla by disponovat širokým pracovním teplotním rozmezím. Selektivita chromatografického systému může být dále ovlivněna koncentrací stacionární fáze a teplotou (použití teplotního programování). [89]

Stacionární fázi vybíráme především podle charakteru analyzovaných látek, přičemž hlavním kritériem je jejich polarita. Polární látky lze separovat na polárních SF, zatímco nepolární analyty dělíme na nepolárních fázích. Čím je SF polárnější, tím je její působení selektivnější, což vyplývá z tvorby vodíkových vazeb mezi sorbentem a sorbovanými látkami. Na nepolárních fázích se složky dělí podle svých teplot varu. Proto při dělení látek s blízkými teplotami varu, které mají na nepolárních fázích téměř shodné eluční vlastnosti, lze použít polárnější sorbent, který umožní jejich selektivnější separaci. [88]

V současnosti je na trhu dostupná široká škála kolon s různými stacionárními fázemi. Pro analýzu nepolárních látek se používají fáze na bázi polysiloxanu s různým procentuelním zastoupením vnesených funkčních skupin (methylová, fenylová, kyanopropylová a různé kombinace). Mezi nejméně polární sorbenty patří 100% polysiloxan, polydimethylsiloxan či poly-(5%dimethyldifenylsiloxan). Polárnější analyty lze naopak separovat na fázích s vyšším podílem polárních funkčních skupin, např. poly-(65%dimethyl/

35% difenylsiloxan) či polyethylenglykol [92]. Přehled nejčastěji používaných stacionárních fází je uveden v Tabulka 1.

Název stacionární fáze	Název komerční kolony od firmy Supelco
poly(50% n-octyl/50% methylsiloxan)	SPB-Octyl
100% poly(dimethylsiloxan)	Equity-1
poly(5% diphenyl/95% dimethylsiloxan)	Equity-5
poly(35% diphenyl/65% dimethylsiloxan)	SPB-35
poly (14% kyanopropylphenyl/86% dimethylsiloxan)	Equity-1701
(50% kyanopropylphenyl) methylpolysiloxan	SPB-225
100% poly(ethylenglycol)	Supelcowax 10

Tabulka 1: Přehled GC stacionárních fází řazených od nejméně polárních po nejpolárnější. (Zdroj: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) 1.3.2008)

### 3.1.4 Dávkovací zařízení

V plynové chromatografii je nezbytné, aby byl vzorek vstupující do dělicího systému v plynné fázi. Tato podmínka však neomezuje využití plynové chromatografie pouze na plynné vzorky. Kapalné vzorky lze hodnotit díky jejich okamžitému zplynění v nástřikovém prostoru a následnému transportu do kolony již v podobě par. Obecně je možné pomocí GC analyzovat látky plynné, kapalné i tuhé (po jejich rozpuštění ve vhodném rozpouštědle), pokud jsou dostatečně těkavé (teplota varu do 350°C) a působením vysoké teploty přejdou do plynného stavu, aniž by došlo k jejich chemickému rozkladu. Netěkavé látky lze v GC hodnotit po jejich převedení na vhodný těkavý derivát příslušnou chemickou reakcí. [90, 92]

Vzorek se většinou dávkuje mikrostříkačkou, často pomocí automatického dávkovače (autosampleru). Při dávkování vzorku do systému je nezbytné, aby došlo k okamžitému odpaření všech složek, proto se teplota nástřikového prostoru (tzv. injektoru) nastavuje o 20 – 50°C vyšší než teplota kolony. Injektor se skládá ze septa, které utěsňuje nástřikový prostor a zabraňuje úniku par, a tzv. lineru, což je zpravidla skleněná trubička tvořící chemicky neaktivní prostředí pro zplyněný vzorek, ve kterém dochází k homogenizaci plynů a úpravě proudění. Na liner navazuje tzv. dělič (splitter), který umožňuje rozdělit vzorek podle nastaveného poměru (např. 100:1) za účelem odvedení nadbytečného vzorku mimo kolonu. Podle způsobu vpravení vzorku na kolonu se rozlišují injekční techniky jako split (s

úvedením poměru rozdělení plynného vzorku), splitless (ponechání proudění vzorku na kolonu po určité době (obvykle 0,5 min.) a následné otevření splitteru, kdy zbytek par je odvedeno pryč), on-column (bez použití lineru, vzorek je dávkován přímo na kolonu) a další. [89, 90, 92]

### 3.1.5 Detektory v plynové chromatografii

Detektory obecně slouží k převodu fyzikálně-chemické vlastnosti analytu na měřitelný signál. Jsou rozlišovány podle využití vlastnosti analyzované složky (tepelná vodivost, teplota, ionizace, fotoemise apod.), a dále podle citlivosti či selektivity. GC poskytuje mezi ostatními separačními metodami největší variabilitu detekčních technik.

Mezi nejčastěji používané detektory patří tepelně vodivostní detektor (TCD), plamenově ionizační detektor (FID), detektor elektronového záchytu (ECD), plamenově fotometrický detektor či hmotnostně spektrometrický detektor (MS). Ionizační detektory (FID, ECD, MS) tvoří největší skupinu detektorů, jejichž princip je založen na tom, že elektrická vodivost plynů je určena počtem ionizovaných (nabitých) částic, a tím je úměrná množství složky vstupující do detektoru. [88, 92]

#### ***Plamenově ionizační detektor (FID)***

FID patří mezi nejpoužívanější detektory v plynové chromatografii, a to především díky jeho univerzálnosti a vysoké citlivosti. Umožňuje detekci všech organických sloučenin s výjimkou HCOH, HCOOH a CCl<sub>4</sub>. Princip detekce je následující: Do nosného plynu s analyzovanou složkou opouštějící kolonu je přimíchán vodík. Směs přichází do hořáku, kde za přítomnosti vzduchu hoří plamenem o teplotě cca 2100°C, čímž dochází k ionizaci látek za vzniku iontů a elektronů, které jsou zachytávány na sběrných elektrodách umístěných nad ústím hořáku. Zachycené ionty a elektrony umožní průchod elektrického proudu mezi elektrodami (= měřený signál). Signál detektoru je úměrný počtu ionizovatelných uhlíkových atomů v molekule. Detektor je vyhříván na teplotu max. 400°C a nezávisí na rozdílu aktuálních teplot přicházejících plynných složek, proto je vhodný i při použití teplotního programování. [88, 90, 92]

### 3.1.6 Nastavitelné parametry v plynové chromatografii

Úspěšná separace směsi látek pomocí plynové chromatografie závisí především na volbě stacionární fáze, která vyplývá z chemické povahy analytů. Kromě výběru správné SF lze však celý proces ovlivnit zajištěním optimálních podmínek GC analýzy, a to správným nastavením různých parametrů chromatografického systému, které ovlivňují jak separaci hodnocených složek tak celkovou dobu analýzy. Na začátku optimalizace musíme znát teploty varu analyzovaných látek. Nastavitelné parametry a jejich vliv na analýzu jsou uvedeny v Tabulka 2.

Parametr	Rozsah	Vliv na analýzu	Co vzít v úvahu?
<i>NÁSTRĚK VZORKU</i>			
<b>Objem vzorku</b>	1 – 10 $\mu\text{l}$	- zvýšení citlivosti stanovení	- kapacita kolony - koncentrace vzorku
<b>Teplota injektoru</b>	o 20°C vyšší než T kolony	- zajištění rychlého zplynění vzorku	- znát teploty varu analytů
<b>Split/ splitless</b>	Split: 1:10 – 1:1000	- úprava množství vzorku vstupující na kolonu - ovlivnění citlivosti stanovení	- kapacita kolony - koncentrace vzorku
<i>KOLONA</i>			
<b>Teplota kolony</b>	konstantní	- látky s blízkými teplotami varu se nerozdělí	- pro správné určení T kolony je třeba znát teplotu varu nejnižší a nejvyšší vroucí složky
<b>Teplotní gradient</b>	postupné zvyšování teploty kolony (rozsah dle $t_v$ analytů)	- lepší separace látek s blízkými teplotami varu - ovlivnění délky analýzy	- znát teploty varu analytů
<i>DETEKTOR</i>			
<b>Teplota detektoru</b>	- slabě vyšší než teplota kolony - FID max. 400°C	- zajištění kvantitativní detekce analytů	- teplota kolony a $t_v$ analytů
<i>NOSNÝ PLYN</i>			
<b>Průtoková rychlost</b>	- není ve všech místech kolony konstantní - nastavení prostřednictvím úpravy tlaku plynu [kPa] či lineární rychlosti [ $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ] v přístroji	- ovlivnění rozlišení píků - vliv na délku analýzy	- druh plynu

Tabulka 2: Přehled některých nastavitelných parametrů při GC analýze a jejich vliv na stanovení

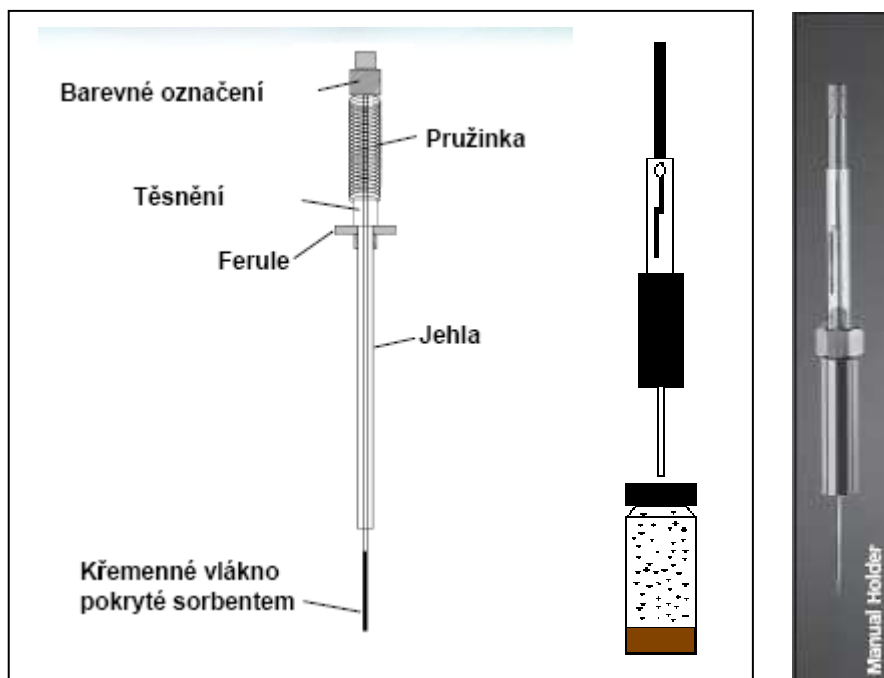
## 3.2 Spojení Mikroextrakce na tuhou fázi s plynovou chromatografií (SPME-GC)

Téměř každé analýze reálného vzorku rostlinného, potravinového či biologického charakteru předchází extrakční krok. Extrakce látek, které jsou předmětem analytického zájmu, představuje mnohdy problematičtější i časově náročnější část celého analytického postupu. Na základě moderních a ekologických přístupů k extrakčním metodám, jenž zahrnují především použití malého množství rozpouštědel k extrakci či nejlépe využití zcela „bezrozpouštědlových“ (z anglického „solvent-free“) technik, byla v devadesátých letech 20. století vyvinuta nová extrakční technika Mikroextrakce na tuhé fázi (Solid phase microextraction - SPME). Jelikož je s výhodou aplikována především na extrakci těkavých látek, hlavním těžištěm jejího významu je spojení s plynovou chromatografií jakožto metodou volby pro separaci těkavých analytů. Spojení SPME-GC nalézá uplatnění zejména v oblasti analýzy životního prostředí, ale není tím omezeno; tato disertační práce představuje možnost využití SPME-GC například pro analýzu fenolických kyselin.

### 3.2.1 Princip SPME

Metodu SPME vyvinul tým vědců University ve Waterloo v Kanadě v čele s Januszem Pawliszynem s cílem vyřešit potřebu rychlé a jednoduché techniky pro přípravu vzorku v laboratoři či v terénu. Nápad vyplýval z předchozích experimentů založených na použití optických vláken pro přenos analytů do plynového chromatografu a jejich rychlém zplynění prostřednictvím laserového pulsu. Analyty byly na vlákno nanášeny jeho ponořením do roztoku extraktu a tento krok (extrakce cílových analytů z materiálu + jejich nanášení na optické vlákno) představoval mnohonásobně vyšší časové nároky než pak samotná laserová desorpce s ultra rychlou GC analýzou. Jako výsledek vědeckých experimentů bylo vyvinuto křemenné optické vlákno potažené tenkou vrstvou kapalnou či pevnou polymerní fází (10 – 100  $\mu\text{m}$ ). Ponořením vlákna do vodného roztoku analytů došlo k jejich extrakci na povrch fáze a následným vložením do GC a odpařením analytů z vlákna v nástřikovém prostoru byl zajištěn rychlý a jednoduchý přenos analyzovaných látek z matrice až do přístroje, navíc zcela bez použití organických rozpouštědel. Tento originální princip dal vzniknout nové

extrakční technice SPME. Na Obrázek 9 je znázorněna konstrukce SPME zařízení. [94]



Obrázek 9: Základní části SPME zařízení. Vlevo je znázorněna vnitřní konstrukce (kovová jehla chránící křemenné vlákno, jehož konec je potažen sorbentem). Tato konstrukce je šroubováním upevněna v umělohmotném držáku (prostřední a pravý obrázek), který umožňuje snadnou manipulaci s vláknem. Vpravo je vyobrazen design SPME zařízení od firmy Supelco.

Zdroj: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) 1.3.2008

Existují dvě základní provedení SPME, jedno má charakter duté kapiláry, jejíž vnitřní povrch je potažen polymerním sorbentem, druhé a obecně více používané má formu vlákna, jehož vnější povrch je potažen tenkou vrstvou polymeru. U obou přístupů je princip shodný: vlákno se sorbentem je na určitou dobu umístěno do kontaktu s matricí vzorku a dojde k extrakci analytů na polymer. Pokud probíhá extrakce dostatečně dlouhou dobu, ustaví se koncentrační rovnováha mezi matricí a sorbentem a dalším prodlužováním expozice vlákna již nedojde ke zvýšení koncentrace vyextrahovaných analytů, čili extrahované množství látek je konstantní. Extrakční rovnováha je popsána rovnicí

$$n = \frac{K_{fs} \times V_f \times V_s \times C_0}{K_{fs} \times V_f + V_s},$$

kde  $n$  je počet molů extrahovaných na sorbent,  $K_{fs}$  je distribuční konstanta mezi sorbentem a matricí vzorku,  $V_f$  je objem (tloušťka) vrstvy sorbentu,  $V_s$  je objem vzorku a  $C_0$  je počáteční koncentrace daného analytu ve vzorku. Tato rovnice správně platí pouze pro kapalné polymery jako je polydimethylsiloxan (PDMS), ale

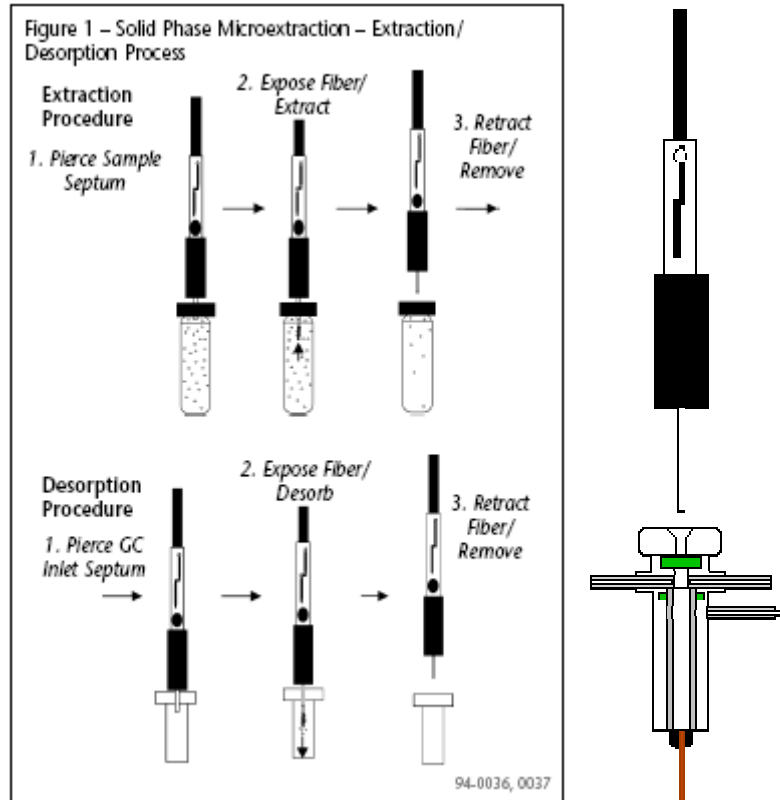


v případě roztoků o nízké koncentraci je aplikovatelná i na pevné sorbenty. Z rovnice také vyplývá, že po dosažení rovnováhy platí přímá úměra mezi koncentrací analytu ve vzorku a množstvím vyextrahovaného analytu, což je základ pro kvantifikaci látek extrahovaných z matrice pomocí SPME. [95]

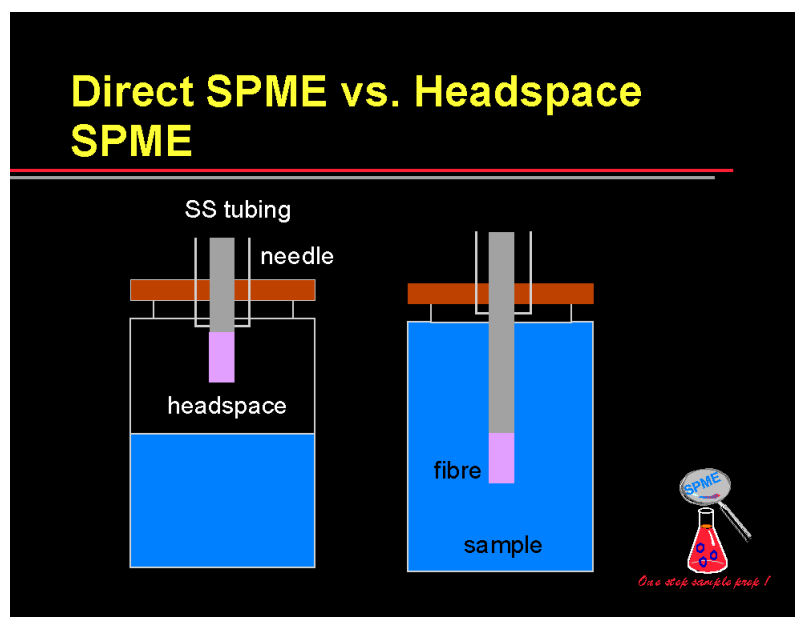
### 3.2.2 Praktické provedení SPME

Prakticky zahrnuje technika SPME dva kroky: 1. extrakce analytů z matrice na vlákno a 2. desorpce analytů z vlákna do analytického přístroje (GC, ale lze i HPLC). Při dosažení rovnováhy mezi sorbentem a matricí je množství extrahované látky přímo úměrné koncentraci vzorku, objemu vzorku a objemu sorbentu. Desorpce pak probíhá v prostoru injektoru použitého chromatografického systému. U GC je jehla s vláknem přímo vsunuta do nástřikového portu a dochází k desorpci po určitou dobu při vysoké teplotě (zvolená podle teplot varu analytů, shodná s nastavenou teplotou injektoru). Spojení SPME-HPLC vyžaduje speciální adapter umožňující kontakt mobilní fáze s vláknem, desorpci analytů a přenos na HPLC kolonu. Oba dva kroky jsou znázorněny na Obrázek 10.

Rozlišujeme dva základní módy SPME: přímá extrakce a tzv. „head-space“ technika. U přímé extrakce je vlákno se sorbentem vloženo přímo do vzorku a analyty přecházejí z matrice do polymerní fáze. Pro zajištění co nejrychlejší extrakce je nezbytné míchání vzorku. Druhým módem je extrakce z prostoru nad kapalinou (Head-space), kde analyty přecházejí přes vzduchovou bariéru, než dospějí k sorbentu. Výhodou head-space provedení je ochrana vlákna před poškozením vysokomolekulárními látkami či netěkavými nečistotami přítomnými ve vzorku (např. proteiny, vlhkost apod.). Head-space technika také umožňuje např. úpravu pH matrice, aniž by došlo k poškození vlákna. Na extrakční kinetiku však zde má velký vliv těkavost látek (těkavé analyty přecházejí z matrice do prostoru nad ní rychleji, a tudíž i extrakce je rychlejší), míra míchání vzorku a také teplota. Z výše uvedeného vyplývá, že mezi hlavní faktory ovlivňující průběh mikroextrakce na tuhou fázi patří koncentrace a objem vzorku, teplota, doba expozice, intenzita míchání, hloubka ponoření vlákna, pH vzorku a obsah solí v něm. Stejně jako u GC je velmi důležitý druh sorbentu, který je zvolen podle chemické povahy extrahovaných látek. Znázornění přímé a head-space techniky můžeme vidět na Obrázek 11. [94, 95, 96]



Obrázek 10: Schéma provedení SPME (extrakce a desorpce). Obrázek vpravo znázorňuje možnost jednoduchého vložení SPME zařízení do nástřikového prostoru plynového chromatografu. SPME držák nesoucí vlákno s vyextrahovanými analyty tak supluje injekční stříkačku, která normálně slouží k nástřiku vzorku. Zdroj: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) 1.3.2008



Obrázek 11: Dva typy provedení SPME: přímá a head-space extrakce.

Zcela nové vlákno se před použitím aktivuje zahřáním v nástřikovém prostoru GC. Mezi jednotlivými analýzami se provádí čištění vlákna opět tepelnou desorpcí v GC a nebo vymytím v organickém rozpouštědle. Výrobci deklarují, že jedno vlákno lze opakovaně použít i pro několik set analýz, ovšem je třeba podotknout, že životnost vlákna je omezena např. jeho křehkostí – při běžné manipulaci se vlákno často snadno zlomí či zohne. Vlákna také nesmí být vystavována působení chlorovaných rozpouštědel a při desorpci nesmí být překročena maximální povolená teplota, která se liší dle druhu sorbentu. [96]

### 3.2.3 Druhy sorbentů

U SPME vláken rozlišujeme charakter polymeru (a podle toho i mechanismus extrakce) a tloušťku vrstvy nanesené na povrch vlákna. Tloušťka vrstvy sorbentů se pohybuje v rozmezí 7 – 100  $\mu\text{m}$  a ovlivňuje citlivost extrakce. Více sorbentu umožňuje extrakci vyššího množství látek, ale naopak prodlužuje dobu dosažení rovnováhy. Těkavé látky vyžadují vlákna se silnější vrstvou sorbentu, naopak pro semivolatilní sloučeniny jsou určena tenkovrstvá vlákna. Proto je důležité zvolit správné vlákno pro danou aplikaci. Mezi hlavní kritéria při volbě vlákna patří polarita, molekulová hmotnost a těkavost analytu, tedy můžeme zde spatřit značnou podobnost s volbou stacionární fáze u GC. [95]

Polymery používané pro potahování SPME vláken mohou být kapaliny, pevné látky či směsné polymery se suspendovanými porézními částicemi. Polydimethylsiloxan (PDMS, kapalina) a polyakrylát (PA, pevná látka) jsou čisté polymery, u kterých se uplatňuje mechanismus **absorpce** (difúze) analytů dovnitř fáze. Naopak u směsných polymerů reprezentovaných například kombinací karboxenu s PDMS (CAR/PDMS), PDMS a divinylbenzenu (PDMS/DVB) převažuje spíše princip **adsorpce** na povrch porézních částic. Obrázek 12 znázorňuje přehled komerčně dostupných typů SPME vláken od firmy Supelco. [94]

## Types of SPME Fibers

<u>Bare Fused Silica</u>	<u>Adsorbent</u>	<u>Unknown</u>
7µm Polydimethylsiloxane (PDMS)	Absorbent	Nonpolar
30µm PDMS	Absorbent	Nonpolar
100µm PDMS	Absorbent	Nonpolar
85µm Polyacrylate (PA)	Absorbent	Polar
65µm PDMS-DVB, StableFlex™	Adsorbent	Bipolar
65µm CW-DVB, StableFlex	Adsorbent	Polar
85µm Carboxen-PDMS, StableFlex	Adsorbent	Bipolar
55µm/30µm DVB/Carboxen™-PDMS, StableFlex	Adsorbent	Bipolar

©1999 Sigma-Aldrich Co.  
00-0004

**S** SUPELCO

Obrázek 12: Přehled typů SPME vláken dodávaných firmou Supelco. Vlákná se liší druhem sorbentu, tloušťkou jeho vrstvy a mechanismem extrakce. Označení „Stable Flex“ upozorňuje na použití moderní technologie a materiálů, které zvyšují odolnost vláken proti zlomení či zohnutí. Zdroj: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) 1.3.2008

## 3.3 Ultra účinná kapalinová chromatografie (UPLC)

V roce 2004 byla firmou Waters představena nová unikátní technologie Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC), přinášející zcela nový směr v kapalinové chromatografii. UPLC poskytuje výrazně lepší rozlišení, vyšší rychlost a citlivost díky použití hybridní stacionární fáze tvořené částicemi o velikosti 1,7  $\mu\text{m}$ . Separace probíhá za velmi vysokého tlaku, proto je celý systém konstrukčně navržen tak, aby extrémním podmínkám odolal a naopak zajistil vysoce účinnou separaci látek v krátkém čase při dosažení maximální citlivosti analýzy. Firma Waters spojila všechny tyto parametry v přístroji Acquity UPLC System, který zahrnuje revoluční přístup k dělení látek kapalinovou chromatografií. [97]

### 3.3.1 HPLC versus UPLC

Ultra účinná kapalinová chromatografie sice představuje novou technologii v oblasti separačních technik, avšak principiálně vychází ze zásad HPLC. V následujícím textu budou shrnuty základní fakta o HPLC z hlediska obecných principů, používaných stacionárních fází a instrumentace. Jelikož HPLC není hlavní metodou využitou v této disertační práci, zaměřím se pouze na stručnou charakteristiku HPLC za účelem možného porovnání a především detailnějšího pohledu na techniku UPLC.

#### Vysokoúčinná (vysokotlaká) kapalinová chromatografie (HPLC)

[vypracováno ze zdrojů 88, 92, 97, 98, 99]

HPLC byla vyvinuta počátkem 70. let a vycházela z principů a velkého rozmachu chromatografie plynové. Vysoké účinnosti je dosaženo použitím stacionárních fází obsahujících malé částice pravidelného tvaru a jednotné velikosti (3 – 15  $\mu\text{m}$ ), kterými je homogenně naplněna chromatografická kolona. Vysoký tlak (jednotky až desítky MPa, max. 60 MPa) umožňuje průtok mobilní fáze skrz kolonu, jejíž vnitřní náplň působí odpor, a proto by bez vyvinutí vysokých tlaků analýza nebyla možná. Oblast použití HPLC vhodně doplňuje GC, neboť umožňuje analýzu iontů, polárních i nepolárních organických látek, málo těkavých či tepelně nestabilních sloučenin. HPLC tedy slouží jako vhodná metoda pro

dělení téměř všech organických látek, které jsou rozpustné v běžných organických rozpouštědlech, ve vodě a nebo zředěných kyselinách. V HPLC lze využít různé separační mechanismy zahrnující adsorpci, chemisorpci, iontovou výměnu, rozdělování mezi dvě nemísitelné kapaliny či separaci na základě velikosti částic (vylučovací chromatografie) aj. Společným jmenovatelem pro všechny typy separací je kapalná mobilní fáze a vysoký tlak při analýze.

HPLC separaci lze významně ovlivnit jak volbou stacionární fáze, jejichž široká škála je dnes různými výrobci nabízena, tak složením fáze mobilní, která na rozdíl od GC není inertní, ale naopak interaguje s analyty a ovlivňuje jejich chování v chromatografickém systému.

Analyzované látky jsou separovány na základě retence (zadržení) na koloně. Vymývání z kolony se nazývá eluce. Separované látky jsou eluovány buď mobilní fází o konstantním složení (izokratická eluce) nebo se složení může průběžně lineárně či nelineárně měnit, a potom se jedná o gradientovou eluci.

Faktory, které ovlivňují separaci látek pomocí HPLC, zahrnují:

- fyzikálně-chemické vlastnosti analytů
- volba a typ stacionární fáze
- složení mobilní fáze
- druh eluce
- průtok MF
- parametry kolony (délka, vnitřní průměr, velikost částic SF)
- pracovní teplota
- nastavení autosampleru
- volba a nastavení detektoru.

### ***Stacionární fáze v HPLC***

Nejobecněji lze stacionární fáze rozdělit na polární a nepolární. Zatímco polární sorbenty (silikagel – oxid křemičitý, alumina – oxid hlinitý) umožňují separaci polárních látek s použitím nepolárních rozpouštědel jako mobilních fází, nepolární SF se používají pro analýzu látek nepolárních a využívají polární mobilní fáze. První zmíněné provedení se nazývá chromatografie na normálních fázích (normal-phase chromatography, NP), naopak druhý typ se označuje jako chromatografie reverzní (reversed-phase chromatography, RP) a v dnešní době představuje nejběžněji používaný analytický systém.

### **a) Chromatografie na normálních fázích (NP)**

Chromatografie na normálních fázích je z historického pohledu starší sestrou chromatografie reverzní. Tradičním sorbentem je silikagel - porézní oxid křemičitý nesoucí na svém povrchu silanolové (Si-OH) a siloxanové (Si-O-Si) skupiny. Silanolové skupiny jsou nezbytné pro separaci látek, neboť umožňují tvorbu specifických interakcí pomocí vodíkových můstků. Naopak siloxanové skupiny způsobují nežádoucí nespecifické interakce s analyty. Pro HPLC se používají silikagelové částice o velikosti 2 – 12  $\mu\text{m}$ . Nevýhodou silikagelu je jeho nestabilita při nízkém a vysokém pH (<2, >8). Silikagel se však dnes používá především jako nosič chemicky vázaných stacionárních fází, a proto, ač je samotný skalním představitel „normální“ chromatografie, využíváme jej mnohem více v rámci chromatografie reverzní.

Jako mobilní fáze se používají nepolární rozpouštědla (hexan, heptan) s 1% přídavkem polárnějších modifikátorů (voda, alkoholy, acetonitril, tetrahydrofuran). NP chromatografie se používá k separaci polárních sloučenin (např. tricyklická antidepresiva). Silikagel lze také s výhodou aplikovat při dělení polohových či cis/trans izomerů.

### **b) Chromatografie na chemicky vázaných fázích**

Přestože by logicky měla následovat charakteristika reverzního systému, zaměřím se nyní na chemicky vázané fáze, které zahrnují jak fáze polární, tak (a to zejména) fáze nepolární, čili reverzní. Chromatografie a problematika stacionárních fází představuje poměrně složité téma, které nelze popsat jako „černo-bílý“ systém, naopak skýtá velmi široké možnosti pro nalezení ideálního chromatografického systému pro analyzovanou skupinu látek.

Chemicky vázané fáze jsou založené na připojení různých funkčních skupin na povrch nosiče. Nejčastěji používaným nosičem je silikagel, jehož volné hydroxylové skupiny poskytují aktivní vodíkové atomy, které umožňují reakci a tvorbu pevných siloxanových vazeb. Podle charakteru navázané funkční skupiny mohou být připraveny stacionární fáze o různé polaritě. Mezi funkční skupiny vázané na silikagel patří kratší i delší alkylové řetězce (methyl, butyl, oktyl, oktadecyl) či fenylové, amino-, kyano- a jiné skupiny. V reverzní chromatografii se nejčastěji používají oktadecylové (C18) stacionární fáze, označované jako ODS (= octadecyl silica).

Nevýhodou chemicky vázaných fází na bázi silikagelu je chemická nestabilita v krajních oblastech pH a také přítomnost volných nezreagovaných silanolových skupin, které způsobují nežádoucí interakce s analyty a z toho vyplývající chvostování píků. Tyto výše zmíněné nedostatky a omezení představují výzvu pro výrobce HPLC stacionárních fází, kteří se snaží alternativními přístupy vytvořit stacionární fáze s výhodnými vlastnostmi – vysokou chemickou a mechanickou stabilitou. Výsledkem jsou pak různé moderní SF založené na:

- blokování volných silanolových skupin u chemicky vázaných fází na bázi silikagelu (tzv. end-capping) – snižuje chvostování píků, avšak neřeší nestabilitu sorbentu v silně kyselém a bazickém pH
- použití organických polymerů (např. akrylamid, styrendivinylbenzen) – jsou stabilní v celém rozmezí pH, ale jejich nevýhodou je malá separační účinnost
- přípravě hybridních stacionárních fází spojením polymeru a silikagelu
- použití jiných nosičů (např. oxid zirkoničitý, titaničitý) – stálost v širším rozsahu pH

Podle druhu náplně rozlišujeme kolony **částicové** a **monolitické**. U **částicových** kolon hraje důležitou roli velikost částic, jejich symetrický (nejlépe dokonale kulovitý) tvar a homogenní uspořádání v koloně. Čím jsou částice menší, tím je dosaženo vyšší separační účinnosti, a proto se v dnešní době přechází od dříve používaných částic o průměru 5 – 10  $\mu\text{m}$  k částicím o velikosti 2 a méně  $\mu\text{m}$  (tzv. sub-2-mikronové částice). Avšak stacionární fáze tvořená takto malými částicemi vyvolává velký vnitřní odpor kolony, a proto vyžaduje použití vyšších pracovních tlaků (až 100 MPa). V souvislosti s tímto problémem bylo nezbytné vyvinout dokonalejší instrumentaci schopnou zajistit a současně odolat tak vysokým tlakům potřebným k protlačení mobilní fáze skrz submikronový sorbent.

**Monolitické** kolony jsou naopak jednoduté tyčinky z polymeru organického nebo anorganického původu. Nejčastěji se používají monolitické kolony na bázi silikagelu. Vnitřní porézní struktura monolitů je charakterizována přítomností mikropórů (2  $\mu\text{m}$ ), které snižují zpětný tlak v koloně, což umožňuje uskutečnit analýzy s vysokým průtokem mobilní fáze, a mezopórů (13  $\mu\text{m}$ ), které zvětšují separační povrch a zajišťují interakce s analyty. Monolitické kolony jsou



mechanicky odolné, stabilní vůči změnám pH a vyznačují se velkou separační účinností i při vysokých průtocích mobilní fáze. [60, 92]

Současné kolony jsou většinou vyrobeny z nerezové oceli, méně často pak ze skla či plastu. Délka kolon se pohybuje v rozmezí 5 – 25 cm a průměr od 1 do 4,5 mm.

### ***Mobilní fáze v HPLC***

Mobilní fáze se v kapalinové chromatografii výrazně podílí na separačním procesu. Pokud je potřeba změnit podmínky chromatografické separace, vždy je jednodušší nejprve vyzkoušet různé mobilní fáze, a až poté změnit fázi stacionární, neboť mobilní fáze určuje selektivitu chromatografického systému. Selektivita vyjadřuje relativní zadržení dvou sousedních látek na koloně.

V reverzní chromatografii se jako MF používají směsi vody a polárních organických rozpouštědel, z nichž nejčastější jsou methanol, ethanol, acetonitril, dioxan, tetrahydrofuran či aceton. Čím je MF méně polární, tím má vyšší eluční sílu. To znamená, že pokud se nedaří separace dvou nepolárních látek, které eluují současně, zvýšením polarity (přídavkem vyššího podílu vody) lze dosáhnout rozdělení analytů, ale současně i prodloužení analýzy.

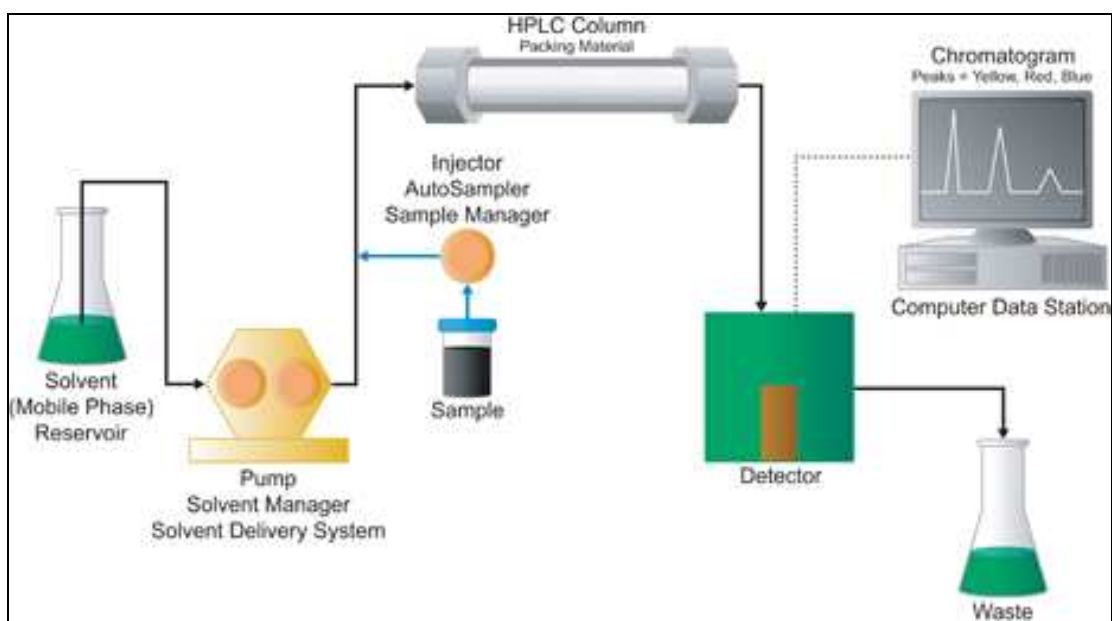
### ***HPLC instrumentace***

Běžný kapalinový chromatograf se skládá z následujících komponent:

- *zásobník mobilní fáze* – uzavíratelné lahve pro odplyněnou mobilní fázi
- *vysokotlaké čerpadlo* – zajišťuje konstantní a reprodukovatelný průtok mobilní fáze přes kolonu, jejíž náplň působí velký odpor, proto se vstupní tlak vyšplhá až k desítkám MPa. U běžných náplňových kolon se průtoky MF pohybují kolem 1 ml/min, avšak čerpadlo by mělo zajistit konstantní průtoky MF v rozmezí 0,1 – 10 ml/min.
- *dávkovací zařízení* – umožňuje nástřik vzorku na kolonu. Dříve se nejvíce používaly dávkovací ventily se smyčkou, které byly plněny injekční stříkačkou. Dnes je u moderních HPLC přístrojů nedílnou součástí autosampler, který zajišťuje automatické nadávkování vzorků. Nástřikové objemy se pohybují v rozmezí 1 – 20  $\mu$ l.

- *kolona* – je nejdůležitější částí chromatografického systému. Současné kolony jsou vyrobeny z nerezové oceli, výjimečně ze skla či plastu. Více informací viz. Stacionární fáze v HPLC
- *detektor* – zajišťuje detekci separovaných analytů. Volba detektoru závisí na vlastnostech analyzovaných látek. Nejběžnější detektory používané v HPLC jsou spektrofotometrické, fluorimetrické, elektrochemické, refraktometrické a hmotnostní.

Obrázek 13 znázorňuje jednoduché schéma kapalinového chromatografu. Současné moderní přístroje jsou již kompletně řízené počítačem pomocí sofistikovaného softwaru. Operátor nastaví v chromatografickém programu všechny parametry analýzy (průtok, velikost nástřiku, dobu analýzy, výběr detektoru a podmínky detekce atd.) a po změření vzorků může záznamy přímo v programu vyhodnotit. Pokrok tak přináší nejen časovou úsporu, ale také vyšší kontrolu nad analýzou a dokonalejší ovládání chromatografického procesu.

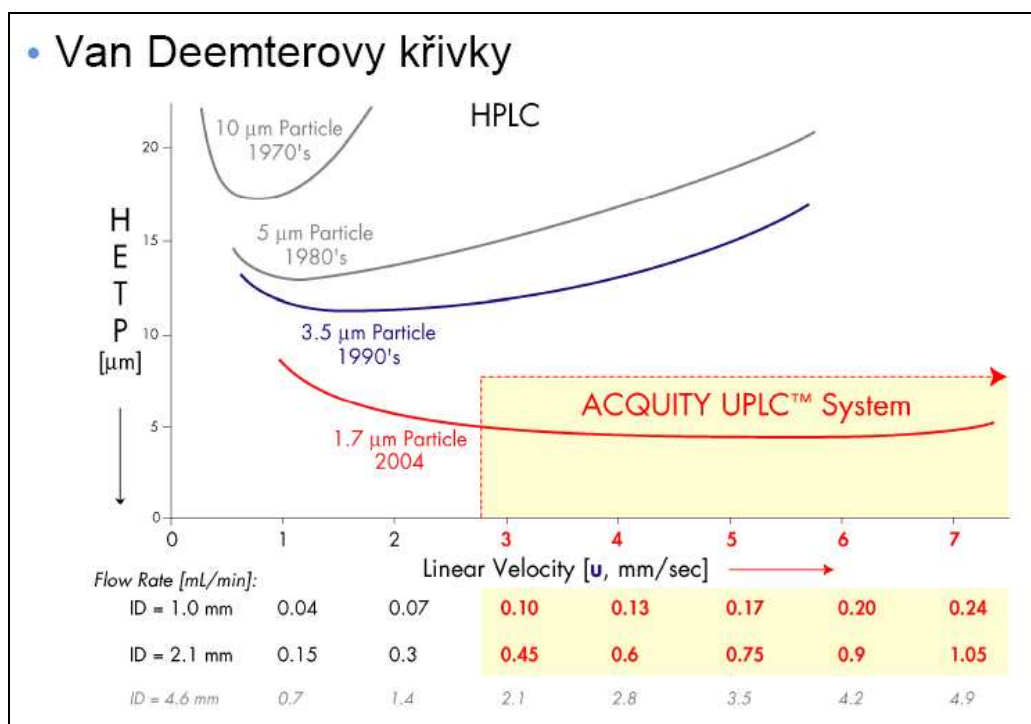


Obrázek 13: Schéma HPLC systému. Zdroj: [www.waters.com](http://www.waters.com) 13.4.2008

## Ultra účinná kapalinová chromatografie (UPLC)

[vypracováno ze zdrojů 88, 97, 100]

Základem UPLC technologie jsou malé 1,7 – mikronové částice stacionární fáze, které zajišťují vysokou separační účinnost a rozlišení, jak vyplývá z Van Deemterovy teorie. Na Obrázek 14 je znázorněna závislost lineární průtokové rychlosti na výškovém ekvivalentu teoretických pater (HETP) v souvislosti s různou velikostí částic sorbentu. HETP vyjadřuje separační účinnost kolony a je nepřímo úměrný počtu teoretických pater ( $H$ ). Zjednodušeně lze říci, že čím je menší hodnota HETP, tím je dosaženo vyšší separační účinnosti. Z Van Deemterových křivek je patrné, že s klesající velikostí částic klesá hodnota HETP, což v praxi znamená zajištění velmi účinné separace a s tím souvisejícího lepšího rozlišení. Rozlišení ( $R$ ) vyjadřuje relativní separaci dvou látek. Ideální rozlišení představuje rozdělení dvou píků až na základní linii.



**Obrázek 14: Van Deemterovy křivky - porovnání separační účinnosti kolon s různou velikostí částic stacionární fáze. Zdroj: [www.waters.cz](http://www.waters.cz)**

Se změnou velikosti částic také souvisí různý tvar křivek ve vztahu k lineární průtokové rychlosti. Lineární průtok mobilní fáze  $u$  [mm/sec] vyjadřuje průměrnou rychlost pohybu separovaných složek kolonou a je dán poměrem délky kolony a retenčního času dané složky. Ideální lineární průtoková rychlost je

taková, při níž je dosaženo nejvyšší separační účinnosti systému. V případě kolon s 10 µm částicemi je takové rozmezí úzké, naopak s klesající velikostí částic se oblast maximální separační účinnosti, a tedy i rozsah ideální průtokové rychlosti, rozšiřuje.

Jak již bylo zmíněno, kolony naplněné sorbentem s 1,7-mikronovými částicemi působí mnohonásobně vyšší zpětný tlak (až 10x vyšší oproti HPLC), kterému musí být uzpůsobené všechny komponenty UPLC systému. Kýženým přínosem je však dosažení až dvojnásobného rozlišení, trojnásobné citlivosti a desetinásobného zvýšení rychlosti analýzy.

### **Acquity UPLC Systém**

**Sestava ACQUITY UPLC™ je znázorněna na Obrázek 15**

Obrázek 15 a zahrnuje binární vysokotlaké čerpadlo (Solvent Manager), automatický dávkovač (Solvent Manager), kolonový termostat (Column Heater/Cooler) a volitelný detektor (na obrázku je dvoukanálový UV/VIS detektor). Acquity systém je ovládán pouze z počítače pomocí softwaru Empower.



Obrázek 15: Acquity UPLC System, Waters (USA). Zdroj: [www.waters.cz](http://www.waters.cz)

## Charakteristika jednotlivých částí Acquity UPLC:

- **Pumpa - Binary Solvent Manager (BSM)**

Binární vysokotlaké čerpadlo zajišťuje konstantní průtok mobilní fáze v rozmezí 0,01 – 2,00 ml/min. BSM umožňuje výběr ze čtyř rozpouštědel (A1, A2, B1, B2). Pro vytvoření gradientu je k dispozici výběr z jedenácti různých gradientových křivek. Maximální pracovní tlak činí 15 000 psi (~ 100 MPa). K dokonalému odplynění rozpouštědel slouží vakuová odplyňovací technologie. Mrtvý objem čerpadla je menší než 120 µl. BSM pumpa (jakož i celý Acquity UPLC systém) je vyrobena z ušlechtilých a vysoce odolných materiálů (nerezová ocel, safír, rubín, titanové slitiny, teflon, polyethylen).

- **Autosampler – Sample Manager (SM)**

Do autosampleru je možné vložit 2 destičky pro umístění vialek se vzorky. Kapacita autosampleru závisí na typu použitých vialek, v případě standardních 2 ml vialek činí 2 x 48 vzorků. Kapacitu je možné rozšířit přidáním doplňkového autosampleru (Sample Organiser) na levý bok UPLC sestavy, který pojme až 336 2 ml vialek.

Nástříkový objem je volitelný v rozmezí 0,1 – 50 µl. Podle požadovaného objemu je nezbytné vybrat odpovídající velikost smyčky (k dispozici jsou smyčky o objemu 1, 2, 5, 10, 20 a 50 µl). Autosampler disponuje termostatem v rozsahu teplot 4 – 40 °C. Požadavky na objem vzorku jsou minimální (5 µl). Nástříkový systém je oplachován dvěma roztoky (strong wash a weak wash).

- **Kolonový termostat – Column Management**

Do kolonového termostatu je možné umístit jednu chromatografickou kolonu o délce 2 – 15 cm a vnitřním průměru 1 – 4,6 mm). Každá kolona je opatřena mikročipem eCord (viz Obrázek 16), jehož připevněním ke snímači, který se nachází na boční straně kolonového termostatu, je zajištěno ukládání všech detailů životního cyklu kolony. U každé zapojené kolony pak lze v přehledné tabulce sledovat celkový počet měřených vzorků (včetně názvu použité metody), počet provedených nástřiků či tlakovou historii kolony (maximální pracovní tlak). První typy dodávaných termostatů umožňovaly pouze vyhřívání prostoru v rozmezí 25 – 65 °C, novější modely již zajišťují i chlazení kolonového prostoru na 5 °C.

- **Detektor**

Jako detektor je volitelně instalován dvoukanálový UV/VIS detektor (Tunable UV detector) nebo detektor diodového pole (PDA detector). Oba typy zajišťují rychlý sběr dat. Inovativní design průtokové cely je optimalizovaný pro rychlou a citlivou detekci.

Novinkou je možnost připojení nového fluorescenčního skenujícího detektoru FLR vhodného pro vysoce citlivou analýzu přirozeně fluoreskujících látek nebo látek derivatizovaných pro fluorescenční detekci.

Kromě toho splňuje Acquity UPLC všechny požadavky pro připojení k hmotnostním detektorům. Malé systémové objemy jsou vhodné především pro spojení s detektory vybavené ESI zdrojem (ionizace elektrosprejem), protože pak již není nutné použít dělič proudu MF, který je v případě vyšších průtoků v HPLC naopak vyžadován. Na Katedře analytické chemie je UPLC sestava vybavena nejen standardním TUV detektorem, ale i hmotnostním detektorem Quattro micro.

- **Hmotnostní detektor – Micromass Quattro micro API**



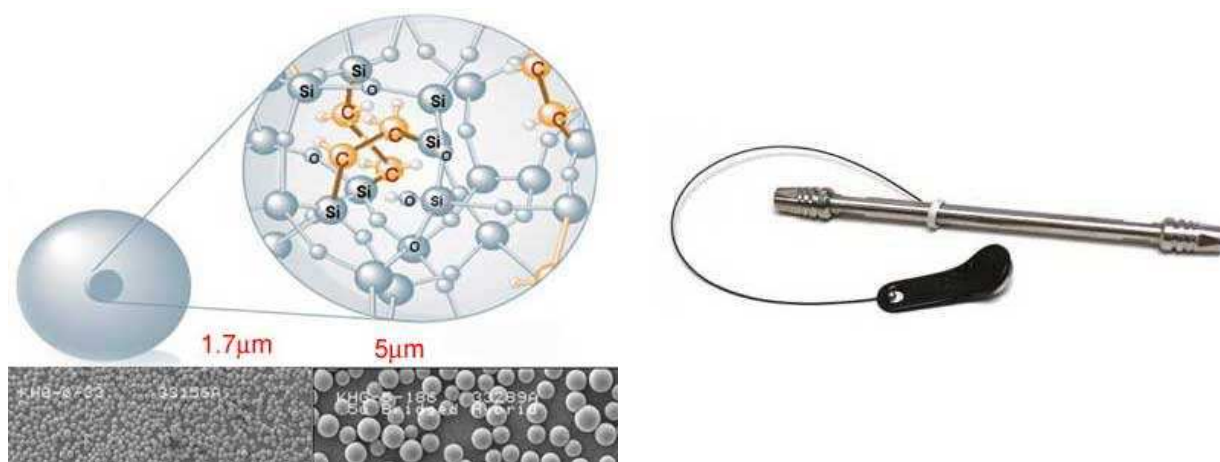
Jedná se o tandemový systém vybavený iontovým zdrojem pro ionizaci za atmosferického tlaku (Atmospheric pressure ionisation – API), a to s možností volby ionizace elektrosprejem (ESI) či chemické ionizace za atmosferického tlaku (Atmospheric pressure chemical ionisation – APci) a dále hmotnostním analyzátozem typu trojitého kvadrupólu, umožňující jak detekci v režimu LC/MS, tak i LC-MS/MS. Teorie hmotnostní spektrometrie bude vysvětlena v následující kapitole. Quattro micro detektor ve spojení s UPLC povyšuje tuto sestavu na univerzální chromatografický systém zajišťující vysokou rychlost, citlivost a rozlišení.

- **Kolony**

Chromatografické kolony pro UPLC jsou naplněny sorbenty připravenými patentovanou BEH technologií (Bridged Ethylsiloxane/silica Hybrid particles). Takto připravené částice vynikají vyšší mechanickou a chemickou odolností. Podstatou BEH sorbentů je jejich hybridní charakter, kdy jsou do struktury

anorganického silikagelu zabudované organické ethylsiloxanové můstky (viz Obrázek 16), čímž materiál získává nové vlastnosti, především ve směru širokého rozmezí pH (1-12) a lepších tvarů píků. Částice sorbentu mají velikost 1,7  $\mu\text{m}$  a jsou plněny do kolon za vysokého tlaku.

V současné době firma Waters dodává UPLC kolony v pěti provedeních: C18, C8, Shield RP18, Phenyl a HILIC. Kolony Shield RP18 představují kombinaci BEH technologie s technologií Shield, která je založená na vsazení karbamátové skupiny do struktury vázané fáze umožňující zvýšenou retenci fenolických látek.



**Obrázek 16: Vnitřní struktura hybridního BEH sorbentu (vlevo) a UPLC kolona vybavená mikročipem eCord (vpravo). Zdroj: [www.waters.cz](http://www.waters.cz)**

Druhým typem UPLC sorbentu vyvinutého firmou Waters jsou HSS částice (High Strength Silica) o velikosti 1,8  $\mu\text{m}$  tvořené chemicky modifikovaným silikagelem speciálně vyvinutým a testovaným tak, aby odolal tlakům až 15 000 psi. HSS kolony jsou dostupné v různých chemických provedeních.

## 3.4 Hmotnostní spektrometrie (MS)

[vypracováno ze zdrojů 92, 101, 102, 103]

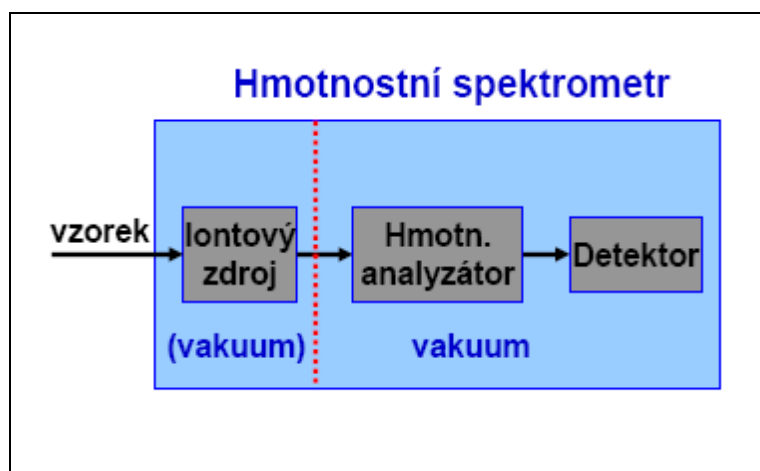
Hmotnostní spektrometrie umožňuje měření hmotností látek (atomů, molekul či jejich částí), které se vyskytují v ionizovaném stavu. Výstupem MS analýzy je hmotnostní spektrum vyjadřující závislost poměru hmotnosti ku náboje daného iontu ( $m/z$ ) a intenzity iontového proudu, která se programově převádí na relativní intenzitu v procentech. Nejintenzivnější iont ve spektru pak odpovídá hodnotě 100%. Hmotnostní spektrum je za daných podmínek pro každou látku charakteristické a při správné interpretaci poskytuje informaci o struktuře analyzované látky. Proto mezi jednu z oblastí využití MS patří stopová analýza a zjištění struktury organických látek. Druhou oblastí je pak spojení MS se separačními metodami (GC, HPLC), což umožňuje jednak identifikaci jednotlivých složek komplexních vzorků, ale také vysoce citlivou analýzu směsí o známém složení. Z řečeného vyplývá, že hmotnostní spektrometrie nalézá uplatnění v širokém spektru laboratoří s různým zaměřením, od rutinních kontrolně-analytických laboratoří až po výzkumná klinická pracoviště či ústavy zaměřené na analýzu životního prostředí.

### 3.4.1 MS instrumentace

Mezi tři základní komponenty hmotnostního spektrometru patří **iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor** (viz Obrázek 17).

V **iontovém zdroji** dochází k ionizaci analyzované látky, tedy k jejímu převedení na kladné nebo záporné ionty. V tomto místě se také mohou odehrávat fragmentační reakce vedoucí ke štěpení chemických vazeb v molekule a ke vzniku fragmentů. Každému iontu odpovídá určitá hodnota  $m/z$ . Z iontového zdroje ionty vletí do **hmotnostního analyzátoru**, který je podle jejich hodnot  $m/z$  rozdělí v čase či prostoru. Proud iontů je pak směřován na **detektor**, který poskytuje signál úměrný počtu dopadajících iontů. Celé zařízení je propojeno s počítačem, jehož prostřednictvím je spektrometr ovládán, a který vyhodnocuje signál z detektoru převedením na hmotnostní spektrum. Nezbytnou součástí hmotnostního spektrometru je i vakuové čerpadlo, které zajišťuje dostatečně nízký tlak pro chod přístroje. Důležité je také vhodné řešení vstupu analytu z chromatografického systému do iontového zdroje.





Obrázek 17: Schéma hmotnostního spektrometru. Zdroj: M. Holčapek, Přednášky k předmětu „Hmotnostní spektrometrie v organické analýze“  
[http://holcapek.upce.cz/teaching/MS\\_prednasky\\_NEW\\_01\\_Uvod.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/MS_prednasky_NEW_01_Uvod.pdf), 24.4.2008

### Iontový zdroj

Ionizace analyzované látky je základní předpoklad hmotnostně-spektrometrické analýzy. Ionizační energie většiny organických látek se pohybuje v rozmezí 7 – 16 eV a děje, jejichž energie je vyšší než prahová ionizační energie analyzované látky, vedou k její ionizaci. Pokud je však energie dodaná molekule výrazně vyšší než její tzv. první ionizační energie, dochází k fragmentaci vzniklého iontu. Ionizační techniky se podle množství dodané energie dělí na **měkké** a **tvrdé**. U měkkých ionizačních technik dochází k ionizaci a omezené fragmentaci iontů, naopak tvrdé ionizační techniky zahrnují dodání velkého přebytku energie, což vede k rozsáhlé fragmentaci iontů.

Mezi tvrdé ionizační techniky patří **ionizace elektronem** (electron ionization, EI). EI probíhá v plynné fázi a používá se především ve spojení s GC. Principem ionizace elektronem je interakce molekul analyzované látky s proudem elektronů o velké energii (70 eV), přičemž většinou dochází k uvolnění elektronu z molekuly analytu a vzniku tzv. radikálkationtu  $M^+$ . S menší pravděpodobností je elektron zachycen molekulou analyzované látky za vzniku záporně nabitého radikalaniontu  $M^-$ . Druhá zmíněná reakce probíhá snadněji za přítomnosti elektronegativního prvku ve struktuře molekuly. Jelikož se jedná o nejstarší ionizační techniku a pro jednotlivé třídy látek jsou podrobně popsána pravidla jejich ionizace, existují rozsáhlé knihovny spekter, které umožňují identifikaci látek na základě porovnání jejich hmotnostních spekter s knihovnou (při dodržení

stejných podmínek ionizace). V současné době obsahují knihovny kolem 500 000 spekter.

Měkké ionizační techniky zahrnují chemickou ionizaci a větší skupinu sprejových ionizačních technik. **Chemická ionizace** (chemical ionization, CI) probíhá v plynné fázi, a proto je také běžně používaná v kombinaci s GC. Při chemické ionizaci je energie z rychle letících elektronů předána molekulám analytu prostřednictvím reakčního média nejčastěji tvořeného plynem nebo parami nízkovroucí kapaliny. Reakční médium je umístěno v ionizační komůrce pod velkým tlakem. Vlivem energie urychlených elektronů vzniká nejprve radikalkationt molekuly reakčního média, ze kterého je potom (po vnesení analyzované látky) přenesen proton na neutrální molekulu analytu za vzniku kationtu  $MH^+$  (tzv. kvazi-molekulární iont). Mezi nejčastěji používaná reakční média patří helium, vodík, methan, propan, butan či amoniak. Konstrukce ionizačního zdroje pro EI a CI je téměř stejná, proto se často vyrábí kombinovaný zdroj EI-CI.

Mezi sprejové ionizační techniky patří ionizace termosprejem, elektrosprejem a chemická ionizace za atmosferického tlaku. Probíhají v kapalně fázi, a proto se kombinují s kapalinovou chromatografií či kapilární elektroforézou.

U **termospreje** (thermospray ionization, TSI) vstupuje mobilní fáze z kolony do kovové kapiláry vyhřívané na teplotu 200 – 300°C. Působením vysoké teploty mobilní fáze vře a rozpráší se na malé kapičky, které se dále postupně odpařují a zmenšují, až vzniknou disociované ionty, které samovolně přejdou do plynné fáze. Pomocí elektrody s vloženým napětím jsou ionty vedeny do hmotnostního analyzátoru. Tímto procesem vznikají kladné i záporné ionty, přičemž výtěžnost ionizace velmi závisí na složení mobilní fáze a teplotě kapiláry. Ionizace termosprejem není vhodná pro tepelně nestabilní analyty.

V současné době nejpoužívanější ionizační techniku pro spojení HPLC-MS představuje **ionizace elektrosprejem** (electrospray ionization, ESI). Kapalina je rozprášena z ústí tenké kovové kapiláry působením elektrického pole za vzniku drobných kapiček, které jsou v protiproudu dusíku o teplotě až 200°C vysušeny. Disociované látky opět přechází přímo do plynné fáze a dále do hmotnostního analyzátoru. Podle polarity napětí, které je vkládáno na elektrodu, vznikají buď kladné či záporné ionty a rozlišuje se tzv. pozitivní ( $ESI^+$ ) či negativní ( $ESI^-$ ) mód.

**Chemická ionizace za atmosferického tlaku** (atmospheric pressure chemical ionization, APCI) se od ionizace elektrosprejem liší tím, že mobilní fáze z HPLC je rozprášena pomocí pneumatického rozprašovače vyhříváného až na

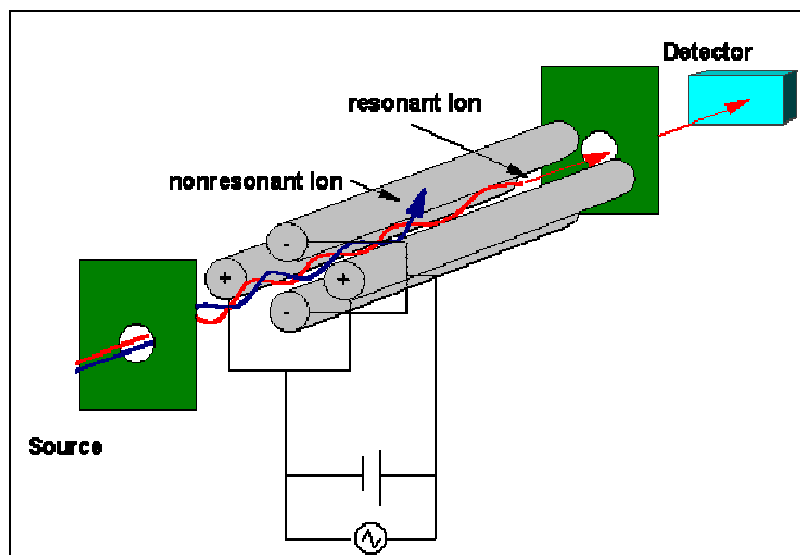
700°C, čímž dojde k efektivnímu rozprášení a odpaření kapalné fáze. V prostoru zdroje se nachází tzv. koronová jehla, jejímž výbojem dojde nejprve k ionizaci par mobilní fáze a molekul zmlžovacího plynu za vzniku chemicko-ionizačního plazmatu. Prostřednictvím plazmatu jsou pak molekuly analytu ionizovány stejným mechanismem jako u chemické ionizace.

### Hmotnostní analyzátory

V analyzátoru jsou ionty opouštějící iontový zdroj rozděleny podle jejich hodnoty  $m/z$ . K nejpoužívanějším hmotnostním analyzátorům patří magnetický analyzátor, který je současně i nejstarším prototypem, dále kvadrupólové analyzátory, iontové pasti a průletové analyzátory.

**Magnetický hmotnostní analyzátor** je tvořen elektromagnetem, mezi jehož póly procházejí ionty. Působením homogenního magnetického pole ionty o rozdílném  $m/z$  opisují trajektorii o různých poloměrech, čímž dojde k jejich prostorovému rozdělení. Magnetický analyzátor je charakterizován vysokým rozlišením a používá se v samostatných spektrometrech bez spojení se separační metodou.

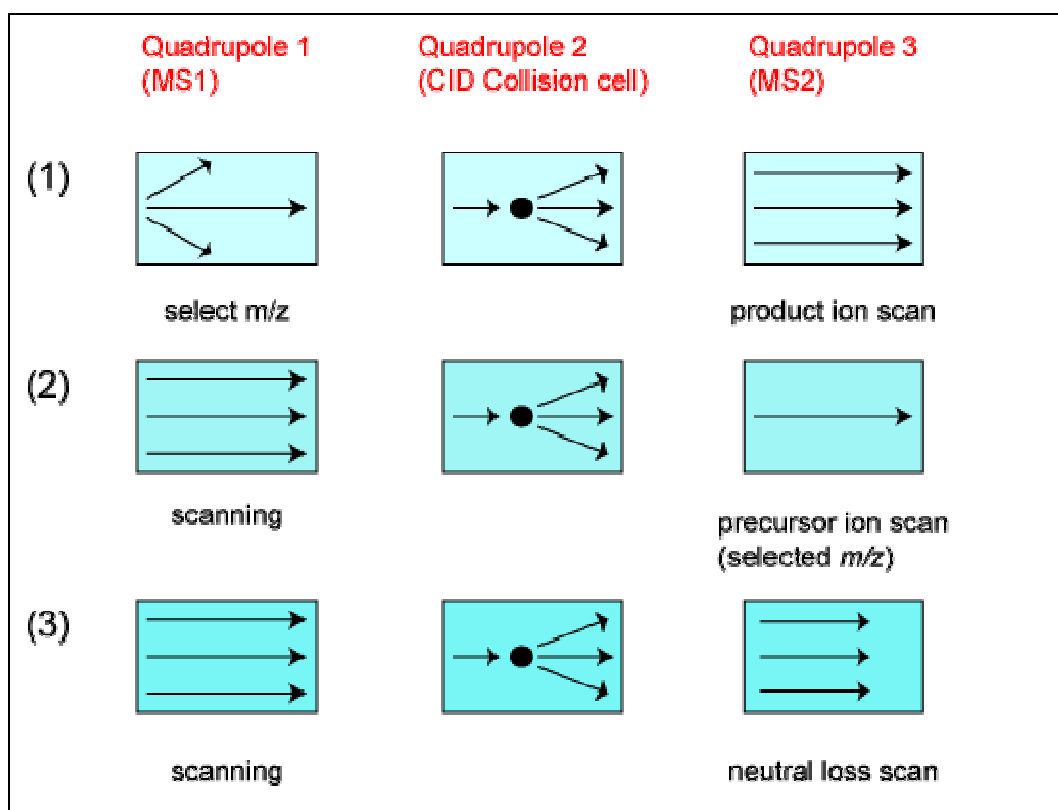
Naopak v kombinaci s kapalinovou či plynovou chromatografií je v konstrukci hmotnostního spektrometru často uplatňován **kvadrupólový analyzátor**, který je tvořen čtyřmi tyčemi s vkládaným stejnosměrným a vysokofrekvenčním střídavým napětím (viz Obrázek 18). Do prostoru mezi tyčemi vniknou letící elektrony a ve střídavém elektrickém poli začnou oscilovat. Kvadrupól funguje jako filtr, protože ionty o určitém  $m/z$  projdou pouze v okamžiku vhodně vloženého napětí na tyče. Postupnou změnou napětí vkládaných na kvadrupól procházejí mezi tyčemi postupně všechny ionty dál do detektoru hmotnostního spektrometru. Tomuto průběžnému filtrování iontů na základě změny vkládaných napětí se říká tzv. skenování.



Obrázek 18: Schéma kvadrupólového analyzátoru. Zdroj: webové stránky University of Bristol, <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/tandem-ms.html>, 25. 4. 2008

Kvadrupóly mohou být umístěny tandemově, tzn. za sebou, za účelem provádění cílené fragmentace vybraných iontů. Tandemové techniky se zkráceně označují jako MS/MS nebo MS<sup>2</sup>. Nejběžnějším zařízením tohoto druhu je **trojitý kvadrupól** (triple quadrupole, QQQ), který je s výhodou používán ve spojení s měkkými ionizačními technikami, jež narozdíl od EI samy o sobě neposkytují mnoho fragmentů. Trojitý kvadrupól je tvořen třemi za sebou řazenými jednoduchými kvadrupóly. Prostřední z nich (Q2) funguje jako kolizní cela, kde dochází k fragmentaci iontů pomocí tzv. **kolizí indukované disociace** (collision induced dissociation, CID) probíhající v prostředí kolizního plynu (He, Ar, N<sub>2</sub>). První a třetí kvadrupól (Q1, Q3) slouží jako hmotnostní filtry. V prvním kvadrupólu je vybrán iont o určitém m/z (iont prekursoru neboli mateřský iont), který je vpuštěn do kolizní cely, kde vznikají fragmenty vybraného iontu. Fragmentové ionty jsou následně zanalyzovány třetím kvadrupólem a dopadají na detektor. Takový záznam z detektoru se nazývá produktové (dceřiné) spektrum.

Výše popsaný princip (nazývaný jako **sken produktových iontů**) představuje pouze jeden z několika možných typů MS/MS experimentů a je znázorněn na Obrázek 19 (příklad č. 1). Mezi další typy patří **skan iontů prekursoru** (dříve sken rodičovských iontů), kdy podle fragmentových iontů zjistíme původní produktový iont, a **skan neutrálních ztrát**, jehož prostřednictvím zjistíme charakterické dvojice iontů prekursorů a produktů, u kterých dochází k odštěpení vybrané hmotnostní ztráty, např. m/z = 18 pro odštěpení vody (viz Obrázek 19, příklady č. 2 a 3).

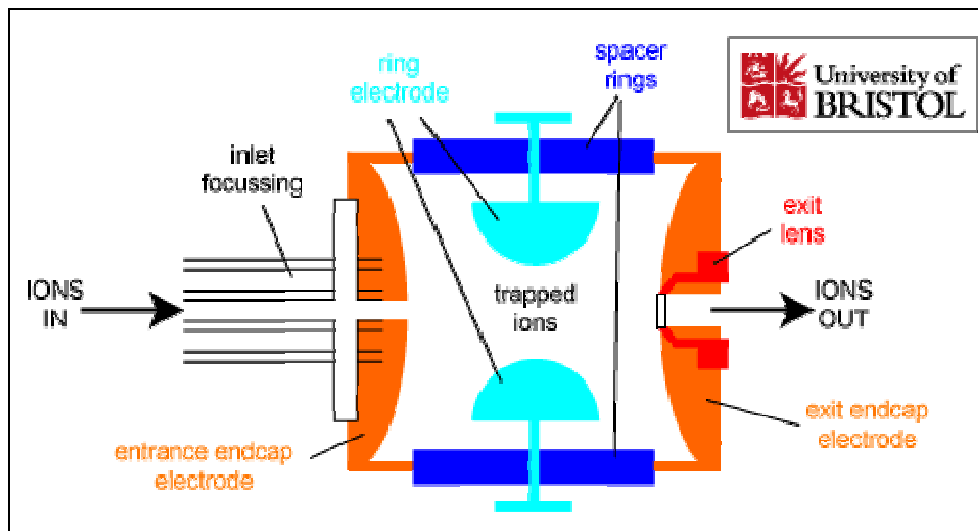


Obrázek 19: Různé typy MS/MS experimentů. Zdroj: webové stránky University of Bristol, <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/tandem-ms.html>, 25. 4. 2008

Dalším druhem hmotnostního analyzátoru je **iontová past** (iont trap, IT) sestávající ze dvou kruhových elektrod a jedné prstencové elektrody, na kterou se přivádí střídavé napětí. Princip iontové pasti spočívá v pulzním přivedení iontů o širokém rozsahu m/z do pasti, kde jsou zachyceny, neboť se působením střídavého napětí o malé amplitudě udržují na stabilních drahách. Zvýšením amplitudy střídavého napětí přiváděného na prstencovou elektrodu jsou ionty postupně vypuzovány z pasti na detektor podle jejich hodnoty m/z. Jedná se v podstatě o trojrozměrnou variantu kvadrupólu. Přiváděné ionty mohou pocházet buď z externího iontového zdroje (často u spojení HPLC/MS) a nebo mohou vznikat i přímo v iontové pasti pomocí ionizace pulsem elektronů (GC/MS). Iontová past existuje ve sférickém a lineárním provedení.

V iontové pasti lze provádět i tzv.  $MS^n$  analýzu spočívající v několikanásobné fragmentaci vybraného iontu, což s výhodou umožňuje určení struktury neznámé látky. Vybraný iont prekurzoru je zadržen v pasti (ostatní ionty jsou z pasti vypuzeny) a pomocí kolize v přítomnosti He dojde k fragmentaci iontu a zaznamenání MS/MS spektra. Stejným způsobem lze pokračovat dále (výběr iontu-fragmentu, vypuzení ostatních, nová fragmentace), teoreticky až k  $MS^{10}$ ,

avšak prakticky jsme omezeni citlivostí detekce a životností iontů. V praxi se dosahuje řádu  $MS^3$  až  $MS^5$ , což plně dostačuje k provedení strukturní analýzy.



Obrázek 20: Schéma iontové pasti. Zdroj: webové stránky University of Bristol, <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/qit-massspec.html> , 25. 4. 2008

Posledním zmíněným analyzátozem je **průletový analyzátor** (time of flight, TOF), který sestává z evakuované trubice. Ionty s rozdílnou hodnotou  $m/z$  letí trubicí různou rychlostí, čímž dochází k jejich separaci. „Těžší“ iont letí pomaleji, zatímco „lehčí“ rychleji, a proto dopadá na detektor dříve. TOF se používá pro analýzu vysokomolekulárních látek.

### Detektory

Ve hmotnostní spektrometrii se používají dva druhy detektorů – detektory pro přímá měření a násobičové detektory. Druhé zmíněné bývají součástí veškerých komerčních MS zařízení a jsou zastoupeny elektronásobičovými a fotonásobičovými detektory, které vykazují vyšší citlivost a životnost, a proto bývají upřednostňovány.

### 3.4.2 Hmotnostní spektrum

Základním výsledkem MS analýzy je hmotnostní spektrum analyzované látky. Vodorovná osa odpovídá hodnotě  $m/z$ , svislá osa představuje odezvu detektoru vyjádřenou nejčastěji v procentech odpovídajícím relativní intenzitě

iontového proudu. Nejintenzivnější pík ve spektru je charakterizován relativní intenzitou 100%. Většinou se setkáváme s čarovými spektry, ve skutečnosti však každé „čáře“ ve spektru odpovídá reálný pík, který je jen pomocí softwaru nahrazen úsečkou, jejíž poloha na ose m/z odpovídá maximu daného píku. Čarová spektra představují přehlednější formu pro jejich interpretaci.

V případě spojení MS s chromatografickou metodou, nachází se ve spektru analyzované látky i píky iontů mobilní fáze. Tuto složku spektra lze odstranit odečtením signálu odpovídajícímu situaci před a po průchodu chromatografického píku. Tento postup je proveden pomocí sofistikovaných MS programů a přináší jednak zjednodušení spektra pro interpretaci, ale také snížení šumu a tím zvýšení citlivosti analýzy.

### 3.4.3 Spojení HPLC - MS

Výhoda spojení chromatografických metod s hmotnostní spektrometrií spočívá v možnosti separace a identifikace složité směsi látek během jedné analýzy. Spojení HPLC/MS však nebylo zpočátku jednoduché, a to z důvodu velkého rozdílu tlaků mezi hmotnostním analyzátozem (tlak  $10^{-3}$  Pa) a látkami vstupujícími do iontového zdroje z kapalinového chromatografu ( $10^5$  Pa). Další problém spočíval v nutnosti odstranění obrovského nadbytku mobilní fáze před vstupem do vakuové části přístroje. Vývoj měkkých ionizačních technik pracujících za atmosférického tlaku (ESI a APCI), kde se mobilní fáze přímo účastní ionizačního procesu, však znamenal naprostý průlom v řešení spojení HPLC/MS, které dnes představuje velice spolehlivou metodu využívanou ve všech oblastech organické analýzy.

Před HPLC/MS analýzou je třeba nejprve zvolit vhodnou ionizační techniku na základě typu analyzovaných látek: APCI je určena pro polární i nepolární nízkomolekulární látky do molekulové hmotnosti cca 1000 Da (g/mol), naopak ESI lze použít pro makromolekulární látky (středně až velmi polární) do 100 000 Da. Podle chemické povahy analytu také volíme záznam kladných či záporných iontů. Zatímco kladný mód je aplikovatelný na většinu sloučenin, záporný mód je upřednostňován v případě sulfonových a karboxylových kyselin, hydroxysloučenin či nitrosloučenin.

U reverzní HPLC/MS se jako mobilní fáze používají tradiční rozpouštědla (methanol, acetonitril, ethanol, 2-propanol a jejich směsi s vodou), vždy však

musíme dbát na nejvyšší možnou čistotu. Nežádoucí je přítomnost anorganických sodných a draselných solí používaných jako pufrů, pro pufrovací efekt lze využít těkavé soli typu octanu či mravenčanu. Pro podpoření ionizace analytů se k mobilní fázi často přidávají v malých koncentracích těkavá aditiva (0,05 – 1% kyselina mravenčí, octová, amoniak). Průtok mobilní fáze je omezen do 1 ml/min, v případě UPLC/MS do 0,5 ml/min.

Získaná spektra nelze porovnávat s knihovnou spekter, protože se mohou výrazně lišit podle použité ionizační techniky či pracovních podmínek. Při použití měkkých ionizačních technik vznikají téměř výhradně ionty se sudým počtem elektronů s vysokou relativní intenzitou molekulárních aduktů. V pozitivním módu se často objevují adukty  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ , v negativním naopak adukty  $[M-H]^-$ .

Oblast aplikace HPLC/MS leží jak v potravinářské či farmaceutické analýze, tak v oboru toxikologie a ekologie. Vzhledem k neustále se rozšiřujícímu spektru látek, které nás obklopují a působí na lidský organismus, je třeba věnovat velkou pozornost kontrole potravin či léčiv, osudu toxických látek v těle či monitorování látek znečišťujících životní prostředí. Pro všechny tyto úkoly nám může být hmotnostní spektrometrie (v jakékoliv podobě a kombinaci) dobrým a spolehlivým pomocníkem.



## 3.5 Kapilární elektroforéza (CE)

[Vypracováno ze zdrojů 92, 104]

Kapilární elektroforéza patří do skupiny elektromigračních separačních metod, jejichž princip je založen na elektroforetické migraci iontů v elektrickém poli probíhající v tenké kapiláře. Úplné počátky elektromigračních metod sice sahají již do 19. století, hlavní rozvoj však tyto techniky zaznamenaly až v 80. letech minulého století a od té doby se stále vyvíjejí. Právě z důvodu jejich poměrně krátkého působení na poli separačních analytických metod ve srovnání s „chromatografickou klasikou“ nenalézají zatím elektromigrační metody tak široké praktické uplatnění. Nicméně technický pokrok a špičkové přístroje dodávané renomovanými zahraničními výrobci postupně vydobývají těmto metodám čestné místo na slunci a prosazují se tak i do oblasti praktické analytiky a rutinních měření. K hlavním výhodám elektromigračních metod patří malá spotřeba rozpouštědel, vysoká separační účinnost, rychlost analýzy a relativně snadná a rychlá optimalizace separačních podmínek. Horší reprodukovatelnost a nižší citlivost představují naopak jisté nedostatky těchto separačních technik.

Kapilární elektromigrační metody zahrnují šest základních technik lišících se mechanismem separace a charakterem elektrolytu v kapiláře:

1. Kapilární zónová elektroforéza (CZE)
2. Kapilární gelová elektroforéza (CGE)
3. Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC)
4. Kapilární elektrochromatografie (CEC)
5. Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF)
6. Kapilární izotachoforéza (ITP)

Všechny zmíněné metody lze použít pro separaci iontů. MEKC a CEC je navíc možné aplikovat i na dělení elektroneutrálních molekul. První čtyři vyjmenované metody se často označují souhrnně jako kapilární elektroforéza (CE) či vysokoúčinná kapilární elektroforéza (HPCE).

### 3.5.1 Provedení kapilární elektroforézy

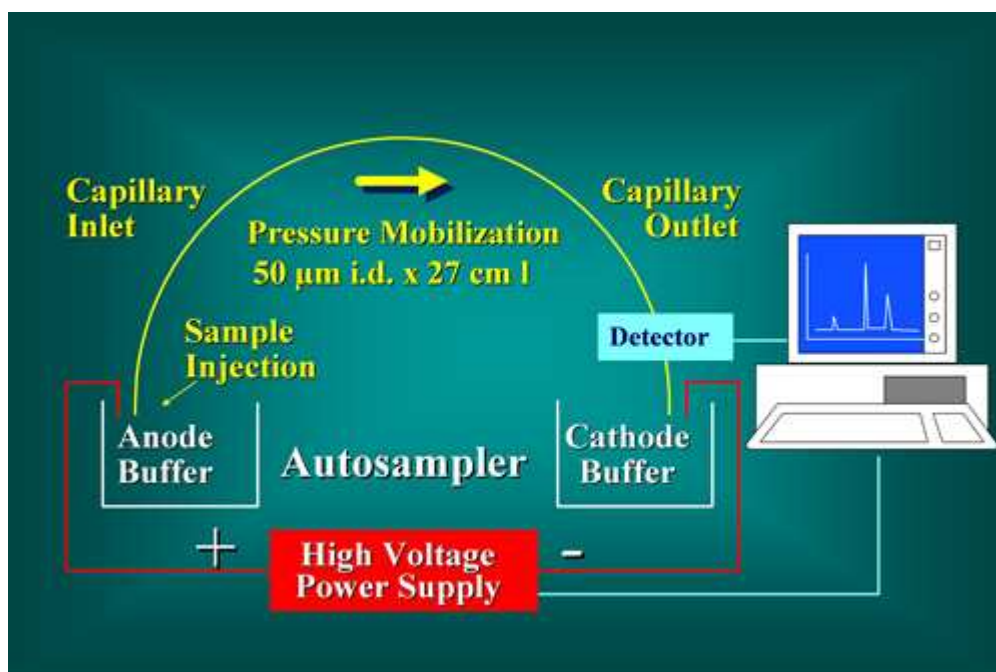
Mezi základní charakteristiky CE patří:

- použití křemenných kapilár o vnitřním průměru 25 – 75  $\mu\text{m}$  a vnějším průměru 300 – 400  $\mu\text{m}$ ; vnější povrch kapiláry je potažen polyimidovou vrstvou, která zajišťuje její pružnost a ohebnost
- vložení vysokého napětí (10 – 30 kV) a silného elektrického pole na kapalinu v kapiláře
- velká odolnost kapiláry bránící generaci vysokého proudu
- vysoká separační účinnost (až  $10^6$  teoretických pater)
- detekce se uskutečňuje přímo v kapiláře, není potřeba žádné externí detekční cely
- dostatečný malý objem vzorku, nástřik vzorku 1 – 50 nl
- možnost volby různých módů pro optimalizaci selektivity
- analýza ve vodném médiu, minimum organiky
- dostupné automatizované přístroje

Obrázek 21 znázorňuje provedení kapilární elektroforézy. Základem je roztok separačního elektrolytu naplněný do vstupní a výstupní nádoby (inlet a outlet vial). Kapilára spojuje obě nádoby a před každým měřením je také naplněna roztokem elektrolytu. Do vstupní a výstupní nádoby jsou umístěny elektrody - ve vstupní vialce anoda, ve výstupní katoda. Před započítím analýzy je dobré nechat systém ustálit prostřednictvím připojení napětí po dobu nejméně 15 minut. V okamžiku vložení napětí začne systémem procházet proud, který by neměl přesáhnout hodnotu 100  $\mu\text{A}$ , aby se kapilára při měření příliš nezahřívala. Pro nadávkování vzorku se vstupní nádoba vymění za nádobku se vzorkem.

Dávkování lze uskutečnit dvěma základní způsoby: elektrokineticky či hydrodynamicky. Při elektrokinetickém dávkování se na elektrody na několik sekund vloží dávkovací napětí (např. 5 kV na 6 sekund). Během této doby se do kapiláry nasaje malé množství vzorku (jednotky až desítky nanolitřů). Nevýhodou tohoto způsobu je odlišné složení vzorku vstupujícího do kapiláry od složení vzorku v nádobce, a to z důvodu zvýhodnění kationtů oproti aniontům, neboť kationty jsou vtahovány dovnitř kapiláry, zatímco anionty naopak. Pro zajištění správných výsledků je možné tuto chybu korigovat použitím vnitřního standardu.

Zcela reprezentativní nadávkování vzorku umožňuje hydrodynamická metoda, kdy se do nádoby se vzorkem a s ponořeným vstupním koncem kapiláry přivede stlačený vzduch o tlaku několika set Pascalů po dobu několika sekund (např. 1 kPa na 5 s). Přetlak nad hladinou vzorku způsobí vtlačení několika nanolitů vzorku do kapiláry. Tento postup se používá častěji, avšak nelze aplikovat u kapilární gelové elektroforézy a kapilární elektrochromatografie.



Obrázek 21: Schéma provedení kapilární elektroforézy. Zdroj: <http://www.chnola-research.org/faculty/hempe/projects/capillary.htm>

Po nadávkování vzorku se kapilára spolu s elektrodou znovu ponoří do inletové vialky s elektrolytem a analýza vzorku se spustí vložení napětí na elektrody. Ionty jsou separovány na základě jejich rozdílných elektroforetických pohyblivostí a současně jsou pomocí elektroosmotického toku unášeny směrem ke katodě. K detekci jednotlivých zón se používá většinou absorpční fotometrický detektor pro oblast viditelného a ultrafialového světla. Detektor se nachází před výstupním koncem kapiláry. Detekce je uskutečněna na základě měření absorbance roztoku procházejícího kapilárou. K tomu, aby mohl paprsek světla procházet, je kapilára v příslušném místě opatřena detekčním okénkem o velikosti několika milimetrů, které se vytvoří odstraněním polyimidové vrstvy opálením a nebo naleptáním. V okamžiku, kdy kapilárou projde zóna s analytem, který absorbuje záření při zvolené vlnové délce, zaznamená detektor změnu absorbance a výsledkem je pík na záznamu z analýzy, který odpovídá separované zóně. Záznam se nazývá elektroferogram a vyjadřuje závislost migračního času

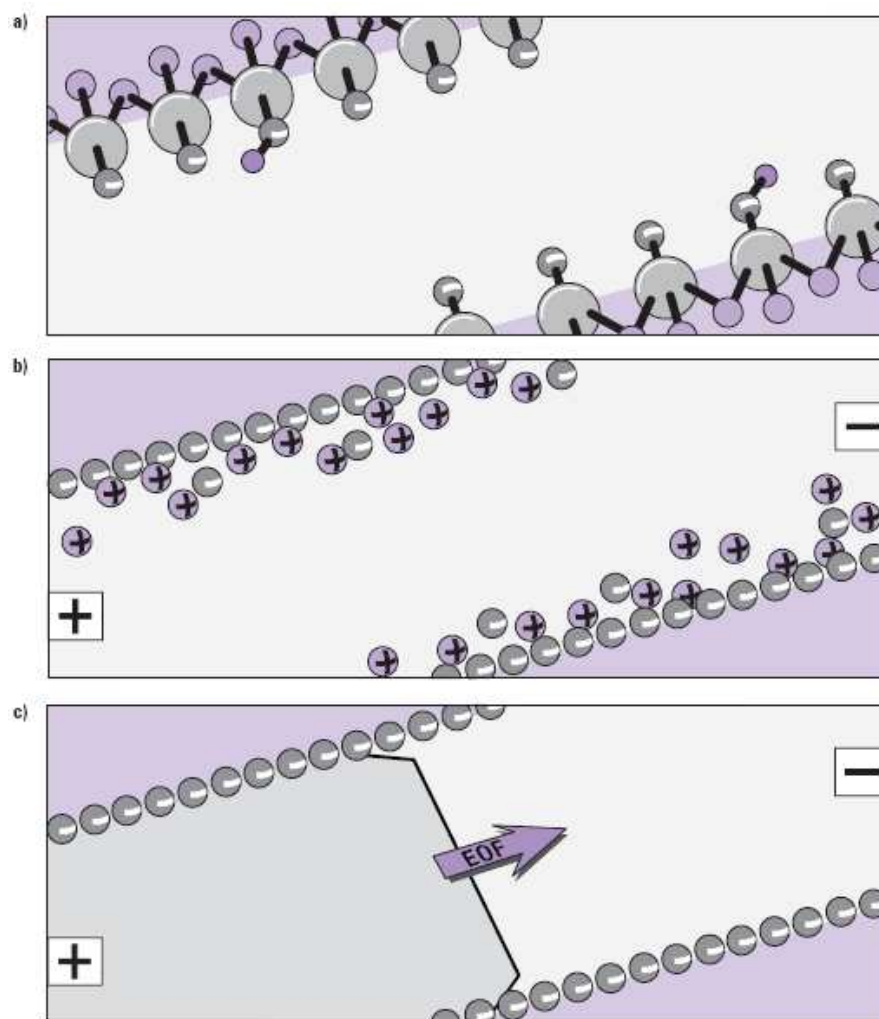
na odezvě detektoru (absorbanci). Migrační čas představuje dobu od počátku analýzy po vstup separované zóny do detekčního okénka.

### 3.5.2 Princip kapilární elektroforézy

Separace látek v kapilární elektroforéze je uskutečněna na základě dvou mechanismů, a to **elektroforetické migraci iontů** v elektrickém poli a **elektroosmotickém toku** elektrolytu v kapiláře.

Elektroforetická migrace iontů představuje pohyb iontů v elektrickém poli, které v kapiláře vzniká po vložení elektrického napětí. Ionty jsou přitahovány elektrostatickými silami k opačně nabitým elektrodám a pohybují se k nim konstantní elektroforetickou rychlostí  $v_{ef}$ , která je přímo úměrná intenzitě elektrického pole  $E$  a elektroforetické pohyblivosti daného iontu. Elektroforetická pohyblivost iontu  $\mu_{ef}$  je pro každý iont charakteristická a závisí na celkovém náboji iontu, jeho poloměru a dynamické viskozitě prostředí. Vyjadřuje se v jednotkách  $\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ; pro kationty má hodnotu kladnou, pro anionty naopak zápornou.

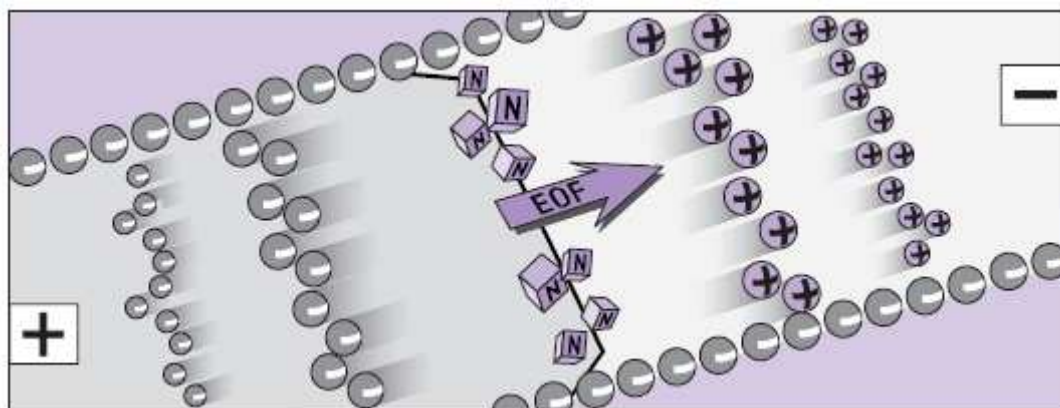
Elektroosmotický tok (electroosmotic flow, EOF) představuje celkový průtok kapaliny v kapiláře, která je pod napětím. EOF vzniká jako důsledek negativního náboje na povrchu vnitřní stěny křemenné kapiláry, která je pokryta silanolovými skupinami Si-OH, jež disociují za vzniku záporně nabitých skupin Si-O<sup>-</sup>. Tyto vytvářejí souvislý záporný náboj na vnitřním povrchu kapiláry. Současně vzniká při kapilární stěně dvojvrstva, neboť uvolňované protony vodíku ze silanolových skupin vytváří kladně nabitý film. Po vložení elektrického napětí se hydratované vodíkové kationty uvedou do pohybu směrem ke katodě a strhávají s sebou veškerý roztok uvnitř kapiláry, čímž vzniká elektroosmotický tok. Graficky je vznik EOF znázorněn na Obrázek 22.



**Obrázek 22: Vznik elektroosmotického toku. Zdroj: [104]**  
 a) znázornění negativně nabitého vnitřního povrchu křemenné kapiláry  
 b) hydratované kationty nashromážděné při stěně kapiláry a tvořící dvojrstvu  
 c) směr elektroosmotického toku po vložení napětí na elektrody

Elektroosmotický tok unáší směrem ke katodě všechny molekuly přítomné v kapiláře bez ohledu na jejich velikost či náboj. Anionty jsou také neseny EOF, byť jsou samy přitahovány opačným směrem (k anodě), neboť jejich elektroosmotická pohyblivost může být až o řád menší než EOF. Proto je možné analyzovat kationty, neutrální molekuly i anionty během jedné CE analýzy, neboť všechny částice putují stejným směrem. Situaci v kapiláře při analýze směsi neutrálních (N), záporných (-) a kladných (+) molekul znázorňuje Obrázek 23. Kationty migrují nejrychleji, neboť jsou jednak samy přitahovány k záporné elektrodě, a jednak je tento pohyb umocněn působením elektroosmotického toku. Za nimi následují neutrální molekuly, které proudí rychlostí EOF, a jako poslední postupují anionty, které rovněž unáší EOF, avšak současně jsou přitahovány anodou na opačnou stranu, což jejich pohyb zpomaluje. Z obrázku je také zřejmé,

že pokud vzorek obsahuje více druhů kladně i záporně nabitých iontů, budou tyto na základě jejich rozdílných elektroforetických pohyblivostí rozděleny na jednotlivé zóny, čímž dojde k jejich separaci. Naopak elektroneutrální molekuly plynou všechny současně v jedné zóně, a pokud se ve vzorku nachází více různých neutrálních látek, separovány nebudou.



Obrázek 23: Rozdílná migrace iontů a neutrálních molekul při kapilární zónové elektroforéze. Zdroj: [104]

Neutrální látky, které lze dobře detekovat a jsou dobře rozpustné ve vodných roztocích, se používají jako tzv. značkovače EOF (EOF markers) pro výpočet elektroosmotického toku, a patří k nim např. thiomocovina, methanol či formamid.

Přestože je EOF vnímán většinou jako prospěšný a nezbytný pro analýzu, za určitých podmínek (např. při vysokém pH elektrolytu) může být tak velký, že molekuly analytů dorazí k detektoru dříve, než dojde k jejich separaci. Velikost elektroosmotického toku je ovlivňována různými faktory, jejichž prostřednictvím lze EOF kontrolovat tak, aby bylo dosaženo optimálních analytických podmínek:

- **pH elektrolytu**

Čím je vyšší pH roztoku elektrolytu, tím větší záporný náboj je soustředěn při vnitřní stěně kapiláry, což způsobuje zvýšení rychlosti elektroosmotického toku.

- **Koncentrace elektrolytu**

Čím je vyšší koncentrace tlumivého roztoku, tím pomalejší EOF je pozorován. Roztoky o příliš nízké koncentraci (pod 10 mmol/l) nejsou doporučovány, neboť takto zředěné elektrolyty nemají dostatečnou

pufrovací kapacitu, což vede k nestejnému rozložení pH podél kapiláry a tím k nereprodukovatelným výsledkům.

- **Intenzita elektrického pole**

Snížením  $E$  dochází ke snížení rychlosti EOF a současně k prodloužení analýzy, zhoršení separační účinnosti a rozlišení píků.

- **Teplota**

- **Přídavek organického rozpouštědla**

- **Chemická modifikace stěny kapiláry**

Během analýzy, kdy je na elektrody vloženo napětí a kapilárou prochází proud, vzniká tzv. Jouleovo teplo, které je vedeno stěnou kapiláry do okolního prostředí. Aby nedocházelo k přehřívání elektrolytu v kapiláře a tím k negativnímu ovlivňování analýzy, bývá u komerčních přístrojů kapilára chlazena proudícím vzduchem nebo kapalinou.

### 3.5.3 Elektrolyty v CE

Kapalina proudící uvnitř kapiláry se označuje jako separační elektrolyt, pufr či tlumivý roztok. Výběr pufru je velice důležitý pro dosažení úspěšné separace. Vzhledem k citlivosti EOF na změnu pH je nezbytné, aby zvolený tlumivý roztok zajišťoval konstantní pH ve všech místech kapiláry. Oblast efektivního pufrovacího rozmezí pH je přibližně  $\pm 2$  jednotky pH od  $pK_a$  hodnoty vybraného tlumivého roztoku. Pufr použitelný pro CE analýzu by měl poskytovat dobrou pufrovací kapacitu ve zvoleném rozmezí pH, nízkou absorpenci při vybrané vlnové délce pro fotometrickou detekci a nízkou vodivost, aby samotný pufr generoval minimální elektrický proud. Mezi nejčastěji používané tlumivé roztoky patří tetraboritanový či fosforečnanový pufr, TRIS (trishydroxymethylaminomethan) a citrátový či octanový pufr v koncentracích 10 – 100 mmol/l. V Tabulka 3 je uveden přehled tlumivých roztoků používaných v kapilární elektroforéze a jejich hodnoty  $pK_a$ .

Pufr	pKa	Pufr	pKa
Fosfátový 1	2,12 (pK <sub>a1</sub> )	Fosfátový 2	7,21 (pK <sub>a2</sub> )
Citrátový 1	3,06 (pK <sub>a1</sub> )	TES	7,50
Mravenčanový	3,75	HEPES	7,55
Citrátový 2	4,74 (pK <sub>a2</sub> )	HEPPS	8,00
Octanový	4,75	TRICINE	8,15
Citrátový 3	5,40 (pK <sub>a3</sub> )	TRIS	8,30
MES	6,15	BICINE	8,35
ADA	6,60	Morpholine	8,49
BIS-TRIS	6,80	Borátový	9,24
PIPES	6,80	CHES	9,50
ACES	6,90	CHAPSO	9,60
MOPSO	6,90	CAPS	10,40
Imidazol	7,00	Fosfátový 3	12,32 (pK <sub>a3</sub> )
MOPS	7,20		

Tabulka 3: Přehled běžně používaných elektrolytů pro CE. Zdroj: [104]

### 3.5.4 Chirální separace v CE

Pro separaci izomerních látek či molekul s velmi podobnou chemickou strukturou se v kapilární elektroforéze velmi často používají chirální selektory jako např. cyklodextriny, soli žlučových kyselin nebo crown-ethery. Chirální separace lze dosáhnout přidáním selektoru k roztoku elektrolytu, přičemž můžeme velmi snadno ovlivnit selektivitu separačního procesu, a to volbou typu selektoru, změnou jeho koncentrace či přidávkem organických modifikátorů (alkoholy, povrchově aktivní látky, močovina, ionty kovů). Chirální separace v kapilární elektroforéze je proto mnohem snazší než např. v HPLC, kdy je taková analýza podmíněna použitím chirálních stacionárních fází, které jsou jednak poměrně finančně nákladné a také přísně selektivní pro konkrétní aplikace.

Právě cyklodextriny (CD) patří k nejčastěji používaným chirálním selektorům v CE. Jedná se o neionogenní cyklické oligosacharidy skládající se z šesti, sedmi či osmi glukózových jednotek (podle počtu jednotek rozlišujeme  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ - cyklodextriny). Molekula CD má tvar dutého komolého kužele s různě velkou vnitřní dutinou, která je hydrofóbní, zatímco její vnější povrch má naopak hydrofilní charakter. Obvod pomyslného kužele navíc obsahuje chirální sekundární hydroxylové skupiny. Chirální separace spočívá v uzavření hydrofóbních částí analytů uvnitř dutiny a současně ve vytvoření vodíkových vazeb mezi molekulou analytu a chirálními hydroxylovými skupinami. Pro zlepšení selektivity lze



vyzkoušet širokou škálu různých cyklodextrinových derivátů nabízených pro účely chirální elektroforetické separace látek.

## 4 Experimentální část

V experimentální části budou postupně prezentovány jednotlivé praktické práce, které se obecně týkají analýzy vybraných přírodních látek pomocí různých analytických metod.

- **GC**

Plynová chromatografie byla využita jednak pro analýzu fenolických kyselin spolu s možností zakoncentrování pomocí SPME, ale také pro stanovení obsahu mastných kyselin v kapslích s rybím olejem.

- **UPLC**

Kapalinová chromatografie, konkrétně moderní technika UPLC posloužila jako účinný nástroj pro analýzu vitamínů A a E (retinolu a  $\alpha$ -tokoferolu) v lidském séru. Pro analýzu širšího spektra látek patřících také do skupiny těchto vitamínů (retinol, kyselina retinová a  $\alpha$ -,  $\gamma$ - a  $\delta$ - tokoferol) byla vyvinuta metoda využívající UPLC separaci s hmotnostně-spektrometrickou detekcí.

- **CE**

Pro stanovení vybraných obsahových látek hořce žlutého byla využita metoda kapilární elektroforézy.

Teoretické základy a principy jednotlivých analytických metod jsou shrnuty v teoretické části v kapitolách 3.1, 3.2, 3.3 a 3.4. Charakteristika biologických a fyzikálně-chemických vlastností studovaných látek spolu se stručným nastíněním běžných způsobů jejich analýzy je taktéž popsána v teoretické části, a to v kapitolách 2.1 a 2.2.

## 4.1 Analýza fenolických kyselin pomocí SPME-GC

### 4.1.1 Úvod

Ve vědecké literatuře se většinou setkáme s analýzou fenolických kyselin pomocí kapalinové chromatografie, a to s využitím reverzní stacionární fáze ve spojení se spektrofotometrickou, elektrochemickou či hmotnostně-spektrometrickou detekcí. V rámci této disertační práce byla nejprve vyvinuta metoda pro analýzu sedmi fenolických kyselin (kávové, ferulové, gallové, *p*-kumarové, protokatechové, syringové a vanilové) zahrnující derivatizaci pomocí methyl- a ethyl-chloroformiátu (MCF, ECF) a následnou separaci plynovou chromatografií s plamenově-ionizační detekcí. Jako druhý krok byla vyvinuta metoda pro několikanásobné zakoncentrování připravených derivátů (methyl- či ethyl-esterů fenolických kyselin) prostřednictvím mikroextrakce na tuhou fázi, opět následovanou GC separací. Cílem experimentů bylo jednak nalézt optimální podmínky pro derivatizaci fenolických kyselin probíhající ve vodném médiu tvořeném směsí alkoholu, acetonitrilu, pyridinu a vody, ale také vybrat nejvhodnější sorbent a extrakční podmínky pro zakoncentrování derivátů na SPME vlákno.

### 4.1.2 Výsledky a diskuse

#### Derivatizace

Chloroformiáty se používají jako silná a rychlá derivatizační činidla pro reakce karboxylových kyselin ve vodném prostředí. Každá složka reakčního média hraje důležitou roli pro správný průběh derivatizační reakce. Pyridin slouží jako katalyzátor, alkohol (methanol při použití MCF, ethanol u ECF) je nezbytný pro esterifikaci karboxylové skupiny. Voda a acetonitril pak musí být ve vhodném poměru, aby nedocházelo ke vzniku vedlejších reakčních produktů. Za účelem nalezení optimálního složení reakčního média bylo postupně měněno množství jednotlivých komponent a sledoval se vliv na výtěžnost reakce či vznik vedlejších produktů. Výsledné médium vyhodnocené jako ideální pro přípravu těkavých esterů fenolických kyselin se při použití methylchloroformiátu skládá ze 14 dílů

ACN, 10 dílů H<sub>2</sub>O, 2 dílů MeOH a 3 dílů pyridinu, pro reakci s ethylchloroformiátem je poměr 4:4:3:1, přičemž methanol je nahrazen ethanolem.

Postup derivatizace zahrnuje smíchání standardní směsi s reakčním médiem a následným postupným přidáváním derivatizačního činidla. Po důkladném protřepání se ke směsi přidá chloroform, do něhož za intenzivního třepání přecházejí nově vzniklé estery fenolických kyselin. Nakonec se do reakční nádoby přidá roztok hydrogenuhličitanu sodného. Po ustálení rovnováhy se odebere spodní chloroformová vrstva a po přidání vnitřního standardu squalenu je možné vzorek nastříknout do plynového chromatografu.

### GC separace

Pro separaci esterů fenolických kyselin byla zvolena kapilární kolona Equity-5 obsahující 5% diphenyl/ 95% dimethylsiloxanovou stacionární fázi s použitím dusíku jako nosného plynu. Původní chromatografické podmínky byly optimalizovány za účelem dosažení separace všech sedmi látek až na základní linii. V tomto směru se jako problematické jevílo rozdělení esterů kávové a gallové kyseliny. Změnou teplotního gradientu se podařilo oba píky separovat s uspokojivým rozlišením.

#### Výsledné optimální chromatografické podmínky:

- průtok nosného plynu: 3,5 ml/min
- teplotní gradient: počáteční teplota 100°C 2 min.,  
10°C/min do 200°C,  
5°C do 280°C.
- délka analýzy: 24 minut pro methyl estery  
30 minut pro ethyl estery
- teplota injektoru: 240 °C
- teplota detektoru: 280°C.

#### Validace metody:

- kalibrační křivka - vyhodnocení korelačního koeficientu a lineárního rozsahu
- stanovení limitů detekce a kvantifikace (LOD a LOQ)

- intra- a inter-denní opakovatelnost (opakovatelnost plochy píků a retenčního času v rámci jednoho dne a v rámci více dní)

### SPME

Zakoncentrování látek na pevný sorbent SPME vlákna předcházela mírná úprava reakčních podmínek. Složení reakčního média zůstává shodné, avšak přídavek chloroformu byl zcela vypuštěn, jednak z důvodu nevhodnosti styku SPME sorbentů s chlorovanými rozpouštědly, a jednak proto, že by v prostředí chloroformu nedocházelo téměř k žádné sorpci analytů na vlákno, neboť by tyto byly opakovaně z vlákna chloroformem smývány. Proto namísto chloroformu a hydrogenuhličitanu sodného byl zvolen přídavek ekvivalentního množství vody. Po extrakci analytů na SPME vlákno provedené za takto upravených podmínek následuje desorpce v plynovém chromatografu. Výsledný chromatogram obsahuje všech sedm píků s retenčními časy shodnými s analýzou standardní směsi bez předchozího zakoncentrování, což prokazuje úspěšné vyextrahování vzniklých derivátů.

V rámci optimalizace SPME podmínek byly vyzkoušeny jednotlivé komerčně dostupné SPME sorbenty (CAR/PDMS, PDMS/DVB, PDMS a PA) a současně byla optimalizována doba extrakce, teplota lázně a doba desorpce v GC. Nejvyššího zakoncentrování bylo dosaženo při použití polyakrylátového vlákna za pokojové teploty (25°C) po dobu 50 minut. Vlákno s extrahovanými analyty se poté nechá desorbovat v nástřikovém prostoru plynového chromatografu po dobu 10 min. Pomocí mikroextrakce na tuhou fázi bylo dosaženo několikanásobného zakoncentrování jednotlivých fenolických kyselin. Míra účinnosti extrakce u jednotlivých látek závisí rovněž na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech, z nichž vyplývá také rozdílná míra extrakce na pevný sorbent.

#### **4.1.3 Závěr**

Pro analýzu fenolických kyselin byla vyvinuta a validována netradiční metoda derivatizace a následné separace pomocí plynové chromatografie. Současně byly nalezeny optimální podmínky pro mikroextrakci na pevnou fázi, jež by mohla být využita jako předseparační extrakční technika umožňující zakoncentrování cílových analytů ze vzorku přírodního materiálu.

Popsaná metoda byla publikována v časopise *Analytica Chimica Acta*. Vydaná publikace je uvedena v Příloha 1.

## 4.2 Hodnocení obsahu mastných kyselin v doplňcích stravy s rybím olejem metodou plynové chromatografie

### 4.2.1 Úvod

Doplňky stravy s obsahem rybího oleje představují plnohodnotný zdroj vícenenasycených mastných kyselin (PUFA) doporučovaný u pacientů se zvýšenou hladinou cholesterolu, vysokým krevním tlakem, cévními a srdečními onemocněními či jinými zdravotními potížemi. V lékárnách jsou běžně dostupné přípravky ve formě želatinových kapslí obsahující čištěný rybí olej - nažloutlou kapalinu se silným rybím aroma, a to v množstvích 500 nebo 1000 mg oleje v jedné kapsli.

Přestože někteří výrobci či distributoři těchto přípravků uvádějí na obalu jak celkový obsah PUFA, tak obsah dvou nejdůležitějších kyselin - eikosapentaenové (EPA) a dokosahexaenové (DHA), spotřebitel si nemůže být stoprocentně jistý skutečným množstvím účinných látek už jen z toho důvodu, že doplňky stravy nepodléhají zdaleka tak přísným kontrolním procesům jako léčivé přípravky. Vzhledem k nemalé ceně těchto přípravků však zákazník právem požaduje vysokou kvalitu, která navíc může být poměrně snadno zkontrolována pomocí moderních kontrolně-analytických metod.

Cílem této dílčí práce proto bylo ověření složení tří preparátů s rybím olejem dostupných na našem trhu – HEMA Rybí tuk, GS MAX EPA a Medpharma Rybí olej. U všech přípravků byla nejprve identifikována totožnost rybího oleje pomocí zjištění charakteristického zastoupení jednotlivých mastných kyselin. Současně byl stanoven obsah EPA a DHA v mg na gram oleje. Zjištěné výsledky byly porovnány s informacemi deklarovanými na obalech hodnocených preparátů.

### 4.2.2 Experimentální část

#### Chemikálie

- Standardy: Supelco 37 FAMES Standard Mixture, Methyl heptadecanoate, Methyl oleate, Methyl palmitate a Menhadden rybí olej (vše od fy Supelco, Sigma Aldrich, ČR)
- Činidla: bortrifluorid BF<sub>3</sub> (Supelco, Sigma Aldrich, ČR)

- Rozpouštědla: n-heptan, methanol (Supelco, Sigma Aldrich, ČR).
- Ostatní: NaOH p.a., NaCl p.a. (PENTA, ČR)
- Nosný plyn: Helium 5.0 (Linde, ČR)
- Testované preparáty:
  - HEMA Rybí tuk 500 (HEMAX, ČR)  
Složení 1 tobolky: Rybí tuk EPAX 3000 TG 500 mg  
EPA 77 mg, DHA 55 mg  
D Alpha tocopherol - vitamín E 1000in/g  
USP
  - GS MAX EPA (Green-Swan Pharmaceuticals, ČR)  
Složení 1 tobolky: Rybí olej 1000 mg  
Omega-3-nenasycené kyseliny 300 mg  
EPA 180mg, DHA 120 mg  
Vitamin E 0,9 mg
  - MedPharma Rybí olej 1000 mg (MedPharma, ČR)  
Složení 1 tobolky: Rybí olej 1000 mg  
EPA 180 mg  
DHA 120 mg

### Příprava methyl esterů MK

*Zmýdelnění triacylglycerolů:* Do skleněné derivatizační zkumavky se šroubovacím uzávěrem se napipetuje 1 ml roztoku vnitřního standardu (roztok methyl esteru kyseliny heptadekanové v n-heptanu, c=1 mg/ml) a rozpouštědlo se odpaří pod proudem dusíku do sucha. Do takto připravené zkumavky se naváží přibližně přesně 25 mg oleje, přidá se 1,5 ml methanolického roztoku NaOH (c=0,5 mol/l), zkumavka se těsně uzavře, protřepe a zahřívá se 5 minut na vodní lázni při 100°C (v digestoři).

*Esterifikace:* Po ochlazení zkumavky se opatrně přidá 2 ml BF<sub>3</sub>, zkumavka se dobře uzavře, promíchá a zahřívá ve vodní lázni 30 min. při 100°C. Směs se ochladí na 30 – 40°C, přidá se 1 ml n-heptanu a směs se 30 s intenzivně protřepává.

*Vysolení:* Do zkumavky se přidá 5 ml nasyceného roztoku NaCl a opět dobře protřepe. Horní heptanová vrstva se přenesení do čisté vialky s uzávěrem. Ke zbylé vodné fázi se znovu přidá 1 ml n-heptanu, protřepe se a po ustavení



rovnováhy se odebere heptanová vrstva, která se spojí s heptanovou fází v čisté vialce. V průběhu celého postupu se před každým uzavřením zkumavky odstraní vzduch proudem dusíku, aby se zabránilo vzdušné oxidaci MK. Spojené heptanové vrstvy se nakonec odpaří pod jemným proudem dusíku na objem přibližně 1 ml. Do GC se nastříkne 1  $\mu$ l vzorku.

### Plynová chromatografie

- Kolona: DB-23, 0,32 mm ID x 30 m x 0,25  $\mu$ m  $d_f$  (Agilent Technologies, HPST, ČR)
- GC instrumentace: plynový chromatograf Shimadzu 17 A s FID autosampler AOC-20i (Shimadzu, ČR)
- Chromatografické podmínky:
  - Teplota injektoru: 260°C
  - Teplota FID: 260°C
  - Teplotní gradient: 140°C 5 min.,  
4°C/min. do 190°C,  
2°C/min. do 210°C  
4°C/min. do 240°C
  - Průtok nosného plynu: 30 cm/s
  - Nástřik: 1  $\mu$ l, mód split 1:50
  - Délka analýzy: 29 min.

Identifikace píků byla provedena porovnáním se standardní směsí 37 methyl esterů MK zanalyzované při výše popsaných chromatografických podmínkách.

### Validace metody

Vzhledem k aplikaci oficiální AOAC metody, která je prověřena, validována a zaručuje správnost výsledků, byla validace metody provedena ve zkrácené formě. Validace sestávala z:

- Testování vhodnosti systému
  - 5 nástřiků standardní směsi 37 methyl esterů MK
  - určení počtu teoretických pater a hodnoty HETP
  - rozlišení a asymetrie píků

- opakovatelnost retenčních časů a ploch píků vybraných MK (opakovatelnost nástřiku byla vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka (v %) z pěti po sobě následujících nástřiků standardní směsi)
- Intra-denní opakovatelnosti metody
  - provedení pěti analýz vzorků standardního rybího oleje během jednoho dne a vypočtení relativní směrodatné odchylky hodnot retenčních časů a ploch píků vybraných MK

### *Analýza vzorků rybího oleje v doplňcích stravy*

Z každého přípravku bylo vybráno 10 kapslí, jejichž tekutý obsah byl převeden do uzavíratelné skleněné nádoby a představoval vzorek rybího oleje ke zkoušení. Každý vzorek byl analyzován třikrát a výsledná hodnota byla vypočítána jako průměr ze tří měření. Zjištěné výsledky byly porovnány s informacemi deklarovanými na obalech doplňků stravy.

### 4.2.3 Výsledky a diskuse

#### Analýza MK

Standardní metoda stanovení mastných kyselin v olejích spočívá v převedení mastných kyselin na příslušné methylestery a jejich následné analýze plynovou chromatografií. Existuje několik oficiálních metod, od lékopisných (Český lékopis – metoda uvedená v monografii *Oleum Jecoris Aselli*), přes České národní a ISO normy, oficiální AOAC metody, až po aplikační listy např. firmy Agilent Technologies. V rámci tohoto projektu byly vyzkoušeny všechny výše zmíněné metody a pro validaci a hodnocení vybraných přípravků byl zvolen postup vycházející z oficiální metody AOAC [66] s některými úpravami, které spočívaly v použití heptanu jako rozpouštědla, methylesteru kyseliny heptadekanové (C17:0) jako vnitřního standardu a v přesnějším nastavení teplotního programu, které zajistilo kratší dobu analýzy při zachování dostatečného rozlišení píků. V AOAC metodě je jako rozpouštědlo doporučen isoocetan, nicméně v literatuře se často setkáme s použitím hexanu či heptanu, v němž jsou methyl estery MK také velmi dobře rozpustné. Jako IS byl doporučen methyl ester kyseliny trikosanové (C23:0), kvůli vysoké ceně však byl nahrazen výše zmíněným methyl heptadekanoátem. Kyselina heptadekanová se také v rybím tuku přirozeně nevyskytuje a v literatuře je často uváděna jako vhodný vnitřní standard pro hodnocení nenasycených mastných kyselin (viz kapitola 2.1.4).

#### Validace

Výsledky zkrácené validace jsou shrnuty v

Tabulka 4. Pro vyhodnocení daných parametrů byly vybrány v rybím oleji nejhojněji zastoupené mastné kyseliny – palmitová, palmitolejová, olejová,  $\alpha$ - a  $\gamma$ -linolenová, EPA a DHA.

	Methyl estery vybraných mastných kyselin						
Zkrácený název	C16:0	C16:1n7	C18:1n9c	C18:3n6c	C18:3n3c	C20:5n3	C22:6
Triviální název/ zkratka	<i>palmit.</i>	<i>palmitol.</i>	<i>olejová</i>	<i>γ-linolen.</i>	<i>α-linolen.</i>	<i>EPA</i>	<i>DHA</i>
<i>Supelco standard</i>							
Počet teoretických pater	265063	227549	391644	466610	401637	663112	837315
HETP (mm)	0,0113	0,0132	0,0077	0,0064	0,0075	0,0045	0,0036
Rozlišení	13,2	5,9	1,8	5,3	5,8	8,6	3,3
Asymetrie	0,67	0,88	0,67	0,88	1,00	0,90	0,91
Opakovatelnost (% RSD)							
- t <sub>R</sub>	1,59	1,60	1,61	1,64	1,71	1,98	1,93
- A	4,68	4,95	5,90	4,37	4,64	4,02	4,77
<i>Standard rybího oleje</i>							
Opakovatelnost metody							
- opakovatelnost t <sub>R</sub> (%)	1,92	1,89	1,87	1,82	1,88	2,15	2,05
- opakovatelnost A (%)	2,07	2,00	2,36	2,48	2,09	2,23	2,46
<i>HETP = výškový ekvivalent teoretického patra</i>							
<i>RSD = relativní směrodatná odchylka (%)</i>							
<i>t<sub>R</sub> = retenční čas</i>							
<i>A = plocha</i>							

**Tabulka 4: Výsledky testu vhodnosti chromatografického systému změřeném na standardní směsi 37 methyl esterů MK a na standardu rybího oleje.**

### Složení vzorků rybího oleje – procentuelní zastoupení mastných kyselin

Totožnost oleje obsaženého v kapslích vybraných doplňků stravy byla ověřena pomocí analýzy zastoupení jednotlivých mastných kyselin přítomných ve vzorku a srovnáním se standardem rybího oleje zakoupeným od firmy Supelco. Procentuelní obsah MK se vypočítá podle vzorce

$$\% (MK) = [A_{MK} / (A_T - A_{IS})] \times 100,$$

kde  $A_{MK}$  vyjadřuje plochu píku odpovídající dané MK,  $A_T$  je součet ploch píků všech identifikovaných mastných kyselin na chromatogramu a  $A_{IS}$  je plocha píku vnitřního standardu. Zjednodušeně lze výpočet vysvětlit tak, že všechny přítomné mastné kyseliny (kromě IS) tvoří 100% a obsah jednotlivých kyselin je vyjádřen jako procentuelní podíl.

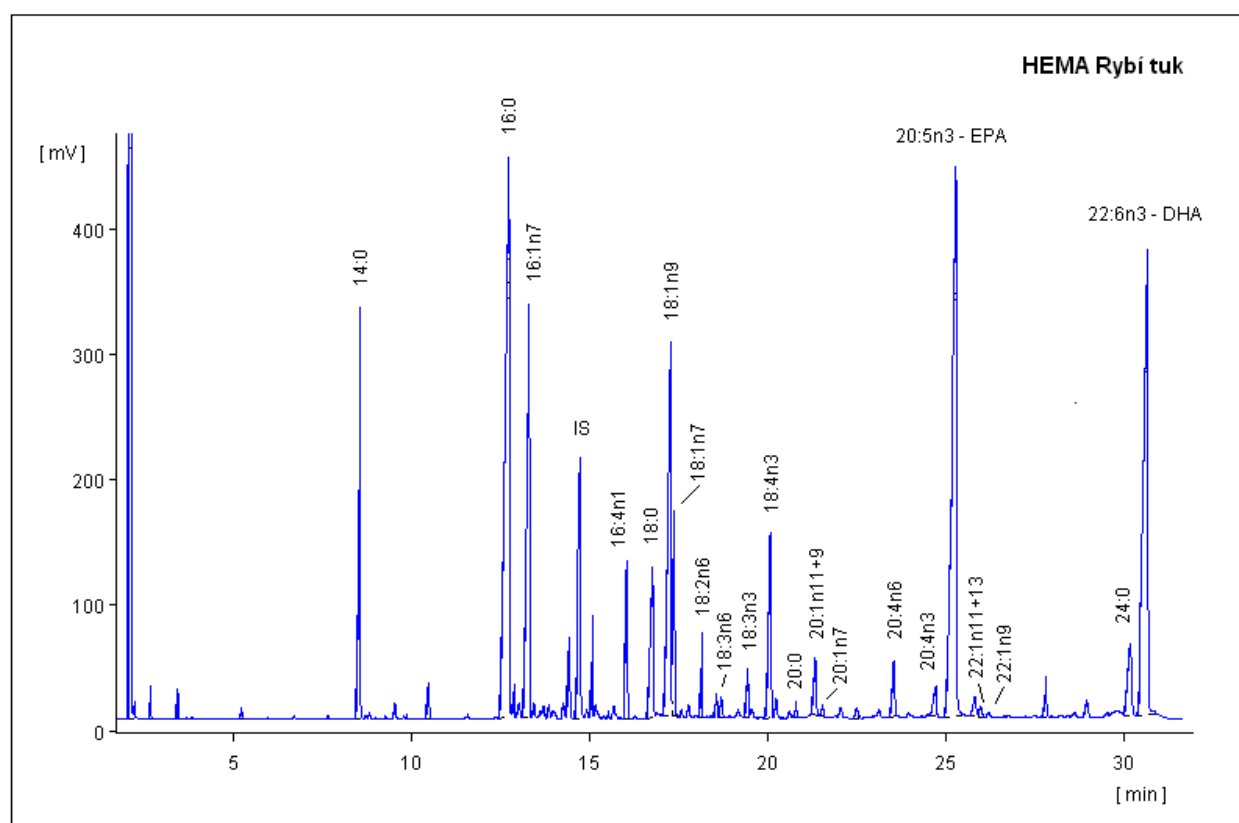
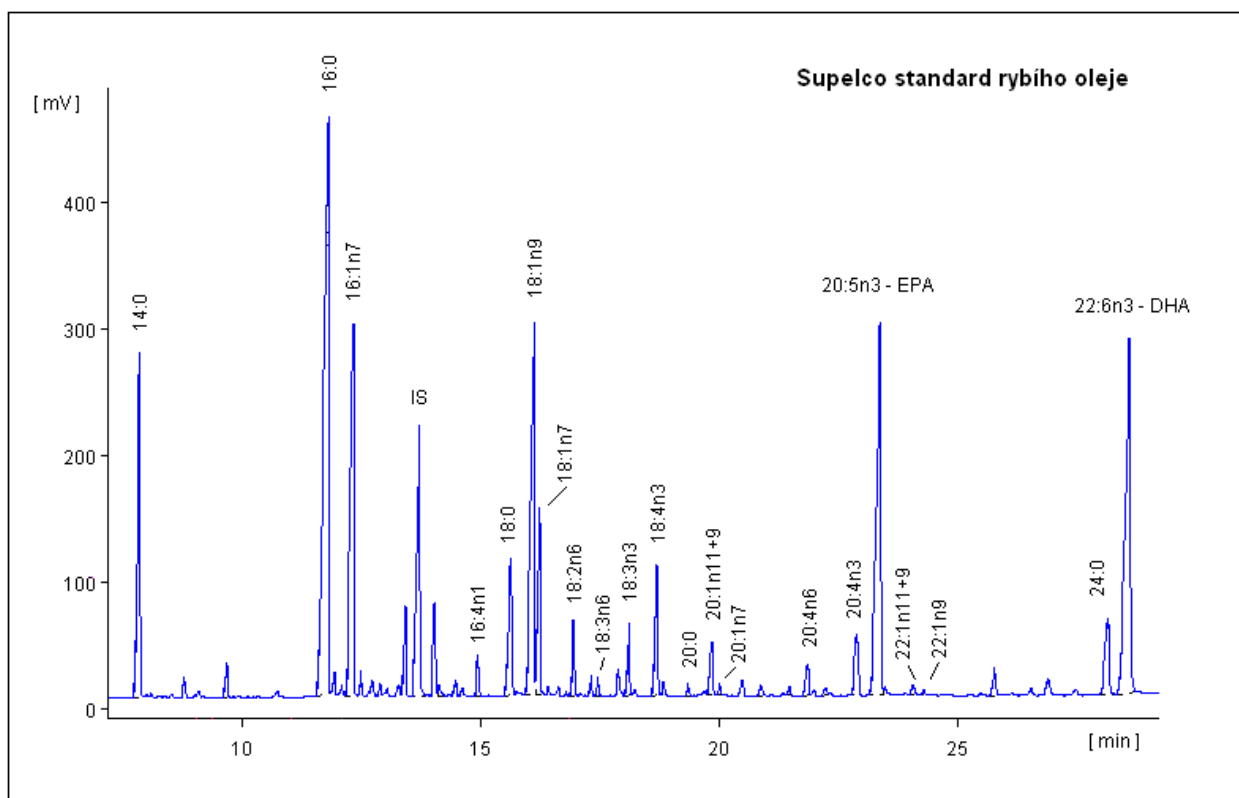
Zjištěné složení MK ve vzorcích rybího oleje znázorňuje Tabulka 5. Na základě srovnání testovaných olejů a standardního rybího oleje lze konstatovat, že ve všech komerčních přípravcích je skutečně obsažen rybí olej, neboť procentuelní zastoupení jednotlivých MK koresponduje se složením standardního oleje. Pouze v případě některých kyselin, jako např. EPA, je množství obsažené v doplňcích stravy vyšší než u standardu, což lze pravděpodobně vysvětlit

rozdílným druhem mořské ryby, z níž byl tuk izolován. Pro doplňky stravy je záměrně používán olej z ryb s maximálním přirozeným obsahem vícenenasycených mastných kyselin (treska, makrela a tuňák), zatímco standardní rybí olej pocházel ze sledě. Toto tvrzení lze také doložit vzájemným porovnáním složení olejů testovaných preparátů, které je u všech tří přípravků prakticky shodné. Na základě prezentovaných výsledků analýz je také možné názorně demonstrovat, že rybí olej představuje velmi bohatý zdroj vícenenasycených mastných kyselin, neboť přibližně 40 % přítomných MK tvoří právě  $\omega$ -3 PUFA.

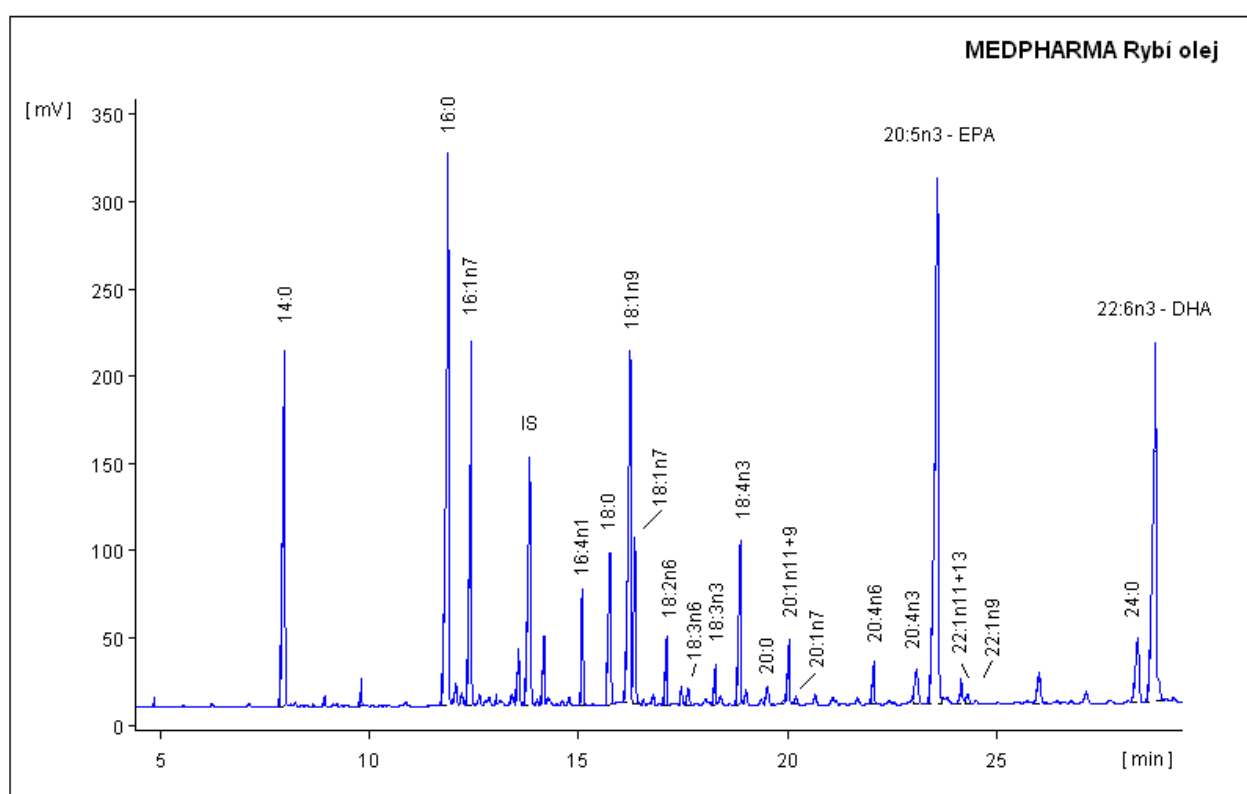
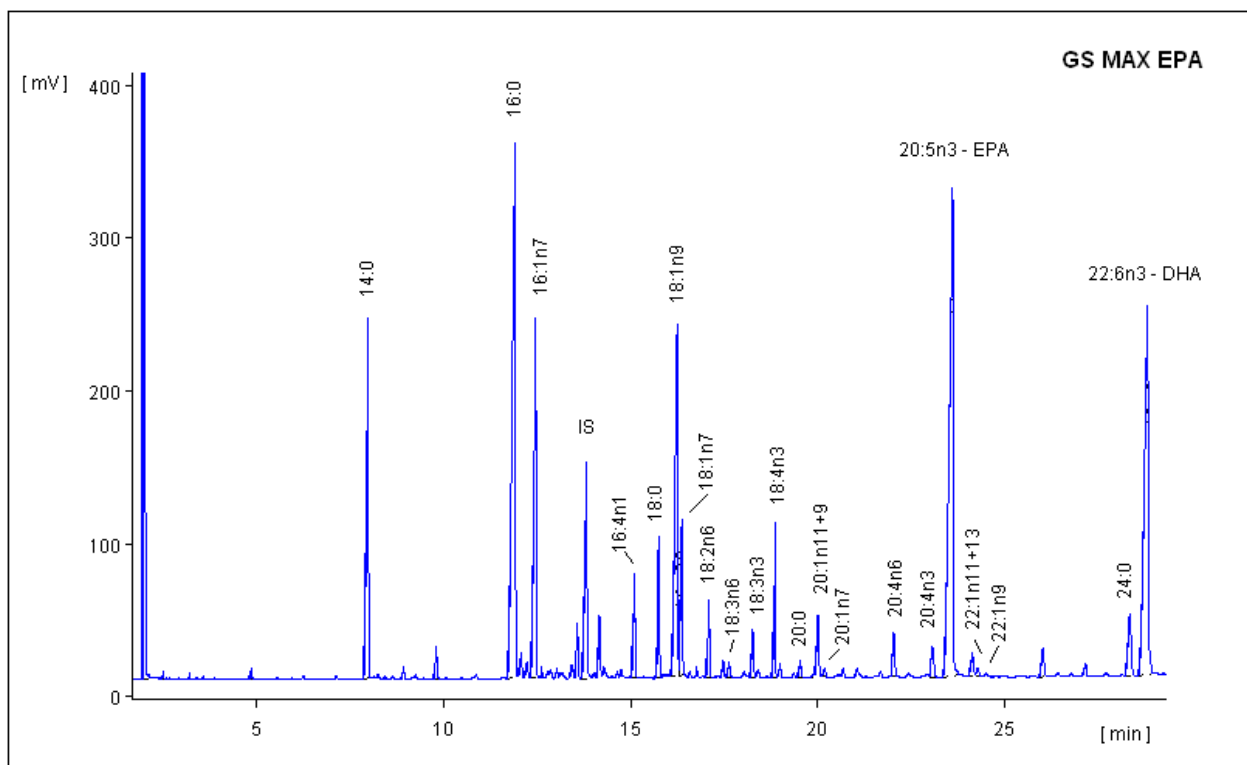
Pro vizuální posouzení totožnosti rybího oleje a také pro názornou představu komplexního zastoupení mastných kyselin jsou níže prezentovány i chromatografické záznamy analýz jednotlivých vzorků (viz Obrázek 24 a Obrázek 25). Na chromatogramech bylo identifikováno celkem 21 píků odpovídajících nejdůležitějším mastným kyselinám.

Mastné kyseliny		Supelco standard rybího oleje	Testované doplňky stravy		
			HEMA	GS MAX EPA	MEDPHARMA
Zkratka	Triviální název	Obsah kyselin (%)			
C8:0	kaprylová	0,00	0,19	0,05	0,00
C10:0	kaprinová	0,00	0,20	0,05	0,00
C12:0	laurová	0,00	0,12	0,14	0,12
C14:0	myristová	7,25	6,88	7,05	6,95
C14:1	myristolejová	0,00	0,12	0,00	0,03
C15:0		0,59	0,49	0,57	0,49
C16:0	palmitová	21,18	16,93	17,54	17,58
C16:1n7	palmitolejová	10,09	8,28	8,25	8,70
C17:1		0,25	0,00	0,00	0,00
C16:4n1		0,76	2,31	2,01	2,29
C18:0	stearová	3,78	3,37	3,40	3,43
C18:1n9 cis		10,54	9,16	9,59	8,75
C18:1n7		3,42	3,11	3,06	3,10
C18:1n9+7cis	olejová	13,96	12,27	12,65	9,85
C18:2n6 cis	linolejová	1,37	1,26	1,44	1,27
C18:3n6 cis	γ-linolenová	0,35	0,35	0,36	0,36
C18:3n3 cis	α -linolenová	1,31	0,75	0,93	0,79
C18:4n3		3,31	3,30	3,44	3,69
C20:0	arachová	0,24	0,30	0,38	0,42
C20:1n11		1,56	1,21	1,47	1,55
C20:1n7		0,24	0,20	0,20	0,20
C20:1n7+11		1,80	1,41	1,67	1,75
C20:2n6		0,26	0,20	0,00	0,00
C20:4n6	arachidonová	0,70	0,99	0,99	0,99
C20:3n3		0,14	0,00	0,00	0,00
C20:4n3		1,74	0,88	0,93	1,09
C20:5n3	EPA	<b>13,05</b>	<b>20,47</b>	<b>19,60</b>	<b>20,29</b>
C22:1n11+13		0,21	0,51	0,64	0,68
C22:1n9	eruková	0,12	0,22	0,24	0,27
C23:0		0,73	0,83	0,77	0,84
C24:0	lignocerová	2,64	2,10	2,02	2,05
C22:6	DHA	<b>14,18</b>	<b>15,26</b>	<b>14,87</b>	<b>14,07</b>
<b>Celkem ω-3 PUFA</b>		<b>33,73</b>	<b>40,66</b>	<b>39,77</b>	<b>39,93</b>

Tabulka 5: Procentuelní zastoupení jednotlivých mastných kyselin v hodnocených vzorcích rybího oleje – Supelco standard a testované preparáty



**Obrázek 24: Chromatografické záznamy analýzy standardu rybiho oleje a přípravku HEMA Rybí tuk**



**Obrázek 25: Chromatografické záznamy analýz přípravků GS MAX EPA a MEDPHARMA Rybí olej**



## Obsah EPA a DHA ve vzorcích rybího oleje

Absolutní obsah EPA a DHA v testovaných doplňcích stravy je vyjádřen jako množství látky v miligramech vztažené na 1 gram oleje. Pro výpočet slouží rovnice

$$m(\text{EPA/ DHA}) = \frac{A_X \times W_{IS} \times CF_X}{A_{IS} \times W_S \times 1,04} \times 1000 \quad [\text{mg/g}],$$

kde  $A_X$  vyjadřuje plochu píku EPA/ DHA,  $A_{IS}$  je plocha píku vnitřního standardu,  $CF_X$  je teoretický korekční faktor FID (0,99 pro EPA, 0,97 pro DHA),  $W_{IS}$  vyjadřuje množství vnitřního standardu přidaného ke vzorku v mg,  $W_S$  je navážka vzorku v mg a hodnota 1,04 představuje faktor pro vyjádření výsledku v mg MK na gram oleje (převod hodnoty odpovídající methyl esterům).

Zjištěné hodnoty obsahu EPA a DHA v testovaných preparátech jsou shrnuty v Tabulka 6. U všech hodnocených doplňků stravy byly nalezeny nižší hladiny EPA a DHA, než je deklarováno na krabičkách.

	Množství MK [mg/g oleje]								
	HEMA Rybí tuk			GS MAX EPA			MEDPHARMA Rybí olej		
	zjištěné	dekl.	% dekl.	zjištěné	dekl.	% dekl.	zjištěné	dekl.	% dekl.
EPA	130,70	154,00	85	140,97	180,00	78	146,77	180,00	82
DHA	95,45	110,00	87	104,78	120,00	87	99,74	120,00	83

*dekl. = deklarované množství*  
*% dekl. = procento deklarovaného množství*

**Tabulka 6: Hladiny EPA a DHA v rybím oleji z testovaných doplňků stravy ve srovnání s hodnotami uvedenými na obalech výrobků**

### 4.2.4 Závěr

Pro hodnocení obsahu MK v doplňcích stravy s rybím olejem byla zvolena upravená oficiální AOAC metoda zahrnující esterifikaci MK a následnou GC analýzu příslušných methyl esterů. Na základě analýzy testovaných vzorků byla ověřena totožnost rybího oleje obsaženého v přípravcích a současně zjištěny hladiny dvou nejdůležitějších mastných kyselin – EPA a DHA. U všech hodnocených preparátů se skutečné obsahy EPA a DHA pohybovaly v rozmezí 78 - 87 % deklarace.

Řešení prezentovaného projektu umožnilo proniknout do poměrně široké problematiky analýzy mastných kyselin v komplexním vzorku přírodního materiálu, kterým rybí olej bezpochyby je. Ačkoliv je oblast analýzy MK dobře prostudovaná

a plynová chromatografie představuje metodu volby pro tuto aplikaci, nejedná se o jednoduché stanovení, ale naopak poměrně složitý proces zahrnující několik dílčích kroků. Což také potvrzuje fakt, že analýza přírodního materiálu vždy vyžaduje pečlivý přístup a může přinést spoustu problémů či komplikací daných komplexitou přírodního vzorku. Prezentovaná práce tvořila součást projektu Fondu rozvoje vysokých škol zaměřeného na zavedení nové úlohy do praktických cvičení předmětu Speciální instrumentální metody. Zvolené téma bylo vybráno s cílem představit studentům možnosti analýzy komplexního přírodního materiálu. Práce nebyla dosud publikována, avšak výsledky byly prezentovány formou plakátového sdělení na konferenci ISC (viz příloha 5.10).

Řešení prezentovaného projektu navazovalo na diplomovou práci, která byla vypracována v rámci programu Erasmus na Univerzitě Porto v Portugalsku a věnovala se hodnocení obsahu sterolů a mastných kyselin v olejích z vlašských a lískových ořechů pomocí plynové chromatografie. Výsledky diplomové práce byly publikovány v roce 2006 v časopise European Food Research and Technology (viz příloha 5.4).

## 4.3 Stanovení retinolu a $\alpha$ -tokoferolu v lidském séru metodou UPLC

### 4.3.1 Úvod

Záměr této dílčí práce zahrnoval vývoj a validaci nové UPLC-UV metody pro stanovení retinolu a  $\alpha$ -tokoferolu v lidském séru. Cílem bylo porovnání nové metody s již dříve vyvinutými a v praxi používanými analytickými metodami klasické HPLC využívající částicovou a monolitickou kolonu, a to prostřednictvím vybraných parametrů (doba analýzy, citlivost, spotřeba mobilní fáze, výsledky validace a finanční náklady). Vyhodnocení nejvhodnějšího separačního systému z hlediska rychlosti, citlivosti, jednoduchosti a finanční náročnosti umožňuje nalezení optimálního analytického postupu pro rutinní analýzu velkého množství vzorků biologického materiálu. Projekt byl řešen v rámci úzké spolupráce s Výzkumnou laboratoří gerontologické a metabolické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové.

### 4.3.2 Výsledky a diskuse

#### Chromatografické podmínky

Pomocí moderní techniky UPLC se podařilo vyvinout vhodnou metodu pro stanovení retinolu a  $\alpha$ -tokoferolu v lidském séru. Optimální chromatografické podmínky byly následující:

- Kolona: UPLC Acquity BEH C18, 100 mm x 2,1 mm i.d., 1,7 $\mu$ m
- Mobilní fáze: 100% methanol
- Průtok: 0,48 ml/min
- UV detekce: 325 nm (retinol), 290 nm ( $\alpha$ -tokoferol)
- Celková doba analýzy: 2 min.

Výše zmíněná metoda byla porovnána se dvěma HPLC metodami prováděnými také na reverzních C18 stacionárních fázích, avšak ve formě klasické kolony (velikost částic 5  $\mu$ m) a monolitní kolony. V obou srovnávacích metodách byl jako mobilní fáze použit 100% methanol, avšak s odlišnými průtoky – 1,5 ml/min u částicové kolony a 2,5 ml/min v případě monolitu. Z hlediska spotřeby mobilní fáze tedy zcela neekonomičtěji vychází UPLC systém.

Zatímco monolitní kolona umožňuje díky vysokému průtoku alespoň rychlou analýzu stanovovaných vitamínů (do 1,8 min), analýza provedená na částicové koloně trvá přibližně 6 minut, tedy zhruba trojnásobek. Zvýšení průtoku u částicové kolony však není možné z důvodu limitujících hodnot zpětného tlaku. Proto ve směru časové úspory jednoznačně vítězí použití monolitní kolony, hned v závěsu však úspěšně konkuruje UPLC. V rámci optimalizace UPLC metody byla vyzkoušena i 5 cm kolona, která přinášela další zkrácení analýzy, avšak na úkor rozlišení a separace analytů od balastních látek, které i přes zvládnutý extrakční proces jsou ve vzorku přítomny. Proto byla 10 cm UPLC kolona shledána jako optimální.

Při posouzení finanční náročnosti popsaných metod je třeba vzít v úvahu jednak spotřebu MF, cenu kolony, ale také její životnost. V tomto ohledu zajišťuje nejekonomičtější provoz právě využití UPLC systému. UPLC kolona zachovává shodné separační vlastnosti i po cca 2200 analýzách, což je výrazně delší životnost než u částicové kolony (700 analýz), i u monolitní kolony (1800 analýz). Na druhou stranu v případě zvážení pořizovací ceny chromatografické sestavy patří UPLC technika k těm dražším, což také hraje nezanedbatelnou roli.

### Validace

Validace metod sestávala z:

- Testování vhodnosti systému
- Určení přesnosti (opakovatelnost retenčních časů a ploch píků)
- Určení správnosti (výťažnost metody po přidání standardního přídatku ke vzorku séra)
- Ověření linearity
- Určení limitů detekce a kvantifikace

Validační parametry všech srovnávaných metod splňovaly interní požadavky, avšak mezi jednotlivými chromatografickými systémy je možné nalézt určité rozdíly v přesnosti, správnosti a citlivosti daných metod. Zatímco UPLC zajišťuje nejpresnější analýzy, jak vyplývá z minimálních hodnot relativních směrodatných odchylek opakovatelnosti ploch píků a retenčních časů (do 0,6%), použití monolitické kolony je naopak nejméně přesné, neboť hodnota odchylek přesahuje i 5%. Z hlediska správnosti však vítězí právě monolitní stacionární fáze. Citlivost posuzovaných metod vyjádřená limity detekce a kvantifikace není u

jednotlivých systémů markantně rozdílná, v absolutních hodnotách se ale jeví jako nejcitlivější technika UPLC.

### 4.3.3 Závěr

Vyvinutá UPLC metoda představuje vhodný analytický systém pro sledování hladin retinolu a  $\alpha$ -tokoferolu v lidském séru. Ve srovnání s částicovou kolonou zajišťuje rychlé, přesné a citlivé analýzy při minimální spotřebě mobilní fáze, což je výhodné především pro rutinní analýzu velkého počtu vzorků. Monolitická kolona sice také přináší časovou úsporu, avšak její použití je spojeno s vysokou spotřebou MF. Oba systémy však splňují veškeré požadavky na v praxi uplatnitelnou analytickou metodu pro stanovení důležitých antioxidantních vitamínů v séru. Bližší podrobnosti k této problematice jsou uvedeny v příloze 5.5 (publikace v časopise Analytical and Bioanalytical Chemistry).

## 4.4 Separace kyseliny retinové, retinolu a $\alpha$ -, $\gamma$ - a $\delta$ - tokoferolu pomocí UPLC-MS

### 4.4.1 Úvod

Hodnocení antioxidačních vitamínů A a E v séru onkologických pacientů slouží ke sledování oxidačního stresu v organismu, který je způsoben např. drastickou protirakovinnou léčbou. Přestože se většinou sledují především hladiny retinolu a  $\alpha$ -tokoferolu, které lze analyzovat poměrně jednoduchou HPLC, eventuelně UPLC metodou s UV detekcí (viz předchozí kapitola), v současné době se zvyšuje zájem lékařů o monitorování hladin i dalších látek ze skupiny těchto vitamínů, především kyseliny retinové a  $\beta$ -,  $\gamma$ - a  $\delta$ - tokoferolů. Současné stanovení retinolu a kyseliny retinové, jejichž separace může být problematická, stále představuje předmět studia klinických analytických laboratoří. Podobně i nalezení vhodného způsobu separace jednotlivých tokoferolů vychází ze stoupajícího zájmu o jejich rozdílné biologické a antioxidační vlastnosti a představuje důležitý nástroj pro možnost jejich citlivého hodnocení v biologickém materiálu.

Z výše zmíněného vyplývá i cíl tohoto projektu, který zahrnoval vývoj a validaci nové UPLC metody pro současné stanovení retinolu, kyseliny retinové a  $\alpha$ -,  $\gamma$ - a  $\delta$ - tokoferolu v lidském séru s využitím hmotnostně-spektrometrické detekce. Rychlost analýzy a citlivost stanovení představovaly hlavní požadavky na novou metodu.

Zatímco chemická struktura  $\alpha$ -,  $\gamma$ - a  $\delta$ -tokoferolu se liší počtem methylových skupin na chromanovém kruhu,  $\beta$ - a  $\gamma$ - tokoferoly jsou izomery lišící se pouze polohou methylových skupin, a jejich separace na C18 stacionárních fázích je prakticky nerealizovatelná. Vzhledem k tomu, že sérové hladiny  $\beta$ -tokoferolu jsou výrazně nižší než v případě jeho polohového izomeru, zaměřila jsem se pouze na analýzu  $\gamma$ - tokoferolu. V séru lze pak tyto vitamíny stanovit jako sumární hodnotu obou látek.

Vývoj jakékoliv analytické metody spočívá v optimalizaci podmínek na standardech stanovovaných látek a teprve poté je možné aplikovat vyvinutou metodu na reálný vzorek. Často tento transfer ze standardu na vzorek vyžaduje upravení analytických podmínek vzhledem k různým vlivům vyplývajícím z nestandardních vlastností reálných vzorků, a v případě biologického materiálu to

platí dvojnásob. Postup práce na tomto úkolu sestával nejprve z optimalizace podmínek pro MS detekci standardů daných látek a nalezení prostředí, ve kterém jsou všechny látky uspokojivě ionizovány a poskytují dobrý signál. Poté byly optimalizovány podmínky pro UPLC separaci ve spojení s MS detekcí a vyvinutá metoda byla validována.

#### 4.4.2 Experimentální část

##### Chemikálie

- Standardy: Retinol, Kyselina retinová (Sigma Aldrich, ČR), Tocopherol set ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  a  $\delta$ -tokoferoly, Merck, ČR)
- Methanol (čistota LC-MS), Kyselina mravenčí p.a. (Sigma Aldrich, ČR)
- Dusík pro MS (Linde, ČR)
- Standardní roztoky:
  - zásobní roztoky retinolu a kyseliny retinové –  $c = 1000 \mu\text{mol/l}$ , rozpuštění v methanolu, roztoky uchovávat v tmavém skle v mrazničce při  $-15^\circ\text{C}$
  - zásobní roztoky tokoferolů –  $c = 500 \mu\text{mol/l}$ , nejprve rozpustit v malém množství hexanu a poté doplnit methanolem, uchovávat v tmavém skle v lednici při  $+4^\circ\text{C}$
  - ze zásobních roztoků byly ředěním připraveny pracovní roztoky pro optimalizaci ( $c(\text{retinol, kyselina retinová}) = 0,4 \mu\text{mol/l}$ ;  $c(\text{tokoferoly}) = 1 \mu\text{mol/l}$ ) a kalibrační roztoky pro změření kalibrační křivky (kalibrační rozmezí viz kapitola Výsledky a diskuse)

##### UPLC podmínky

- Kolona: Acquity BEH C18, 2,1 mm x 50 mm; 1,7  $\mu\text{m}$  (Waters, ČR)
- Instrumentace: kapalinový chromatograf Acquity UPLC s TUV detektorem (Waters, ČR)
- Mobilní fáze: MeOH : 0,2% HCOOH 94:6 (v/v)
- Průtok MF: 0,38 ml/min.
- Délka analýzy: 3,5 min.

## MS podmínky

- Instrumentace: hmotnostní spektrometr Micromass Quattro Micro API vybavený trojitým kvadrupólovým analyzátozem (Waters, ČR)
- Ionizace: ESI<sup>+</sup>
- Zmlžující a sušící plyn: N<sub>2</sub>
- Kolizní plyn: Ar
- Podrobné podmínky MS detekce viz níže a v Tabulka 7 a Tabulka 8

V rámci MS detekce byly optimalizovány podmínky pro dva detekční módy – SIM a SRM. Mód SIM (Single Ion Monitoring) umožňuje sledování určitého iontu (charakterizovaného hodnotou  $m/z$ ) v čase. SIM mód vyplývá z prosté ionizace látky v iontovém zdroji a nevyužívá fragmentace iontů, čili lze provést i na přístroji, který je vybaven pouze jednoduchým kvadrupólem. U trojitého kvadrupólu je při měření v módu SIM použit jeden kvadrupól jako hmotnostní analyzátor a ve zbylých dvou dochází pouze k urychlení letících iontů. Naopak mód SRM (Single Reaction Monitoring) lze aplikovat při cílené fragmentaci vybraného iontu a slouží ke sledování určité fragmentační reakce neboli přechodu mateřského iontu na iont dceřiný. MRM měření je citlivější, neboť sledování určité kolizní reakce je mnohem selektivnější než skenování vybrané molekulové hmoty. Záznam z měření v těchto módech má podobu chromatogramu – každému analytu přísluší pík, jehož plocha je přímo úměrná jeho koncentraci.

### • **Mód SIM**

Sledované ionty:

- retinol:  $M_{R \text{ isotop.}} = 286.23$ ; sledování fragmentu  $[M-H_2O]^+ = m/z 269$  (odštěpení molekuly vody)
- kys. retinová:  $M_{R \text{ isotop.}} = 300.21$ ; sledování molekulového iontu  $[M+H]^+ = m/z 301$
- δ-tokoferol:  $M_{R \text{ isotop.}} = 402.35$ ; sledování molekulového iontu  $[M+H]^+ = m/z 403$
- γ-tokoferol:  $M_{R \text{ isotop.}} = 416.37$ ; sledování molekulového iontu  $[M+H]^+ = m/z 417$
- α-tokoferol:  $M_{R \text{ isotop.}} = 430.38$ ; sledování molekulového iontu  $[M+H]^+ = m/z 431$



	Sledovaný iont (m/z)	Cone voltage (kV)	Capillary voltage (kV)	Teplota zdroje (°C)	Průtok N <sub>2</sub> (L/hod)	Dwell time (sec)	Retenční čas (min)
retinol	269	25	3.5	400	600	0.7	0.79
kyselina retinová	301	20				0.6	0.79
δ-tokoferol	403	35				0.7	2.15
γ-tokoferol	417	40				0.7	2.61
α-tokoferol	431	30				0.7	3.02

Tabulka 7: Optimální podmínky MS detekce v módu SIM.

Cone voltage = napětí na vstupním kuželu, Capillary voltage = napětí na kapiláře, Dwell time = délka jednoho skenu vybraného iontu

- **Mód SRM**

	Sledovaný přechod (m/z)	Cone voltage (kV)	Capillary voltage	Teplota zdroje (°C)	Průtok N <sub>2</sub> (L/hod)	Dwell time (sec)	Collision voltage	Cone gas flow (L/hod)
retinol	269 → 193	15	3.5	400	600	0.7	25	100
kyselina retinová	301 → 123	10				0.6	15	
δ-tokoferol	403 → 137	25				0.7	20	
γ-tokoferol	417 → 151	25				0.7	30	
α-tokoferol	431 → 165	25				0.7	30	

Tabulka 8: Optimální podmínky MS detekce v módu SRM.

Cone voltage = napětí na vstupním kuželu, Capillary voltage = napětí na kapiláře, Dwell time = délka skenu vybraného přechodu, Collision voltage = kolizní napětí, Cone gas flow = průtok dusíku kolem vstupního kužele, zabraňuje znečištění kužele a často zvyšuje signál detektoru

### Validace metody

V rámci validace metody byly pro SIM i SRM hodnoceny tyto parametry:

- Opakovatelnost ploch píků a retenčních časů (5 nástřiků standardní směsi)
- Kalibrační křivka, korelační koeficient, lineární rozsah
- Limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) (Limit detekce vyjadřuje minimální detekovatelnou koncentraci analytu a byl určen experimentálně pomocí postupného ředění roztoku standardu. LOD bývá také definován jako trojnásobek šumu měření. Limit kvantifikace je poté vypočítán jako desetinásobek šumu pomocí zjištěné hodnoty LOD (LOQ = 10 x LOD / 3).

### 4.4.3 Výsledky a diskuse

#### Optimalizace podmínek MS detekce

Prostřednictvím přímého nástřiku pracovních roztoků jednotlivých standardů do hmotnostního spektrometru byla provedena optimalizace podmínek, která sestávala z testování různých rozpouštědel a jejich směsí s těkavými aditivami usnadňujícími ionizaci analytů. Za tímto účelem byl vyzkoušen methanol a acetonitril ve směsi s HCOOH, CH<sub>3</sub>COOH, NH<sub>4</sub>OH, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup> a methyl-*tert*-buthyletherem. Koncentrace aditiv ve směsi s rozpouštědly ležela v rozmezí 0,001-0,05 % (v/v). Současně byly laděny i podmínky přístroje:

- Vyzkoušení ionizace elektorsprejem (ESI) a chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI) v kladném módu (sledování kladných iontů)
- Napětí na kapiláře a vstupním kuželu
- Teplota zdroje
- Průtok dusíku

Intenzita signálu byla sledována pomocí „full scan“ měření, kdy je proměřován rozsah zadané molekulové hmoty a výsledkem je hmotnostní spektrum analyzované látky. Navíc byla u každého analytu proměřena i dceřiná spektra, z nichž lze určit intenzivní fragment pro SRM měření. Jako optimální podmínky byly stanoveny ty, které zajišťovaly stabilní signál a intenzivní odezvu. Pro každý analyt tak byly zjištěny vhodné parametry měření, avšak pro jejich společnou analýzu musel být nalezen kompromis, při kterém bylo možné všechny látky uspokojivě detekovat. Tímto kompromisem se zdála být ionizace ESI<sup>+</sup> a směs methanolu a 0,1% HCOOH v poměru 95:5 (v/v), která byla použita jako startovací mobilní fáze pro optimalizaci podmínek UPLC-MS.

#### Optimalizace UPLC-MS podmínek

Přestože lze pomocí přímého nástřiku vytipovat vhodné podmínky pro MS detekci analyzovaných látek, v okamžiku spojení separační techniky s hmotnostním detektorem nastává druhý optimalizační krok. Jednak je žádoucí zajistit separaci látek pomocí kapalinové chromatografie, a jednak je nutné vyladit průtok mobilní fáze a znovu i její složení, neboť tyto faktory mají významný vliv na UPLC-MS analýzu. Stejně tak i ostatní technické parametry jako napětí v iontovém

zdroji, teplota, průtok dusíku atd. je nutné znovu optimalizovat v užším rozmezí s použitím informací získaných z počáteční optimalizace MS jako výchozích podmínek pro přesné doladění. Pro oba módy SIM a SRM musí být provedena optimalizace i následná validace zvláště, protože se v podstatě jedná o dvě samostatné analytické metody.

- **Mód SIM**

Optimalizované parametry:

1. Průtok MF

- MF MeOH : 0,1% HCOOH 95:5 (v/v)
- rozmezí 0,38 – 0,48 ml/min
- optimum 0,38 ml/min (nižší průtoky výrazně prodlužovaly analýzu, což bylo nežádoucí)

2. Podíl HCOOH v MF

- rozmezí 5-10% HCOOH 0,1%, pak zvýšena koncentrace HCOOH na 0,2% a sledování odezvy v rozmezí 4-6% HCOOH 0,2%
- optimum MeOH : 0,2% HCOOH 94:6 (v/v)
- zvyšováním podílu vodné fáze (aditiva) se sice zvyšuje i odezva, ale také se výrazně prodlužuje čas analýzy. Při 10% HCOOH 0,1% byla sice odezva nejvyšší, ale analýza trvala více než 8 minut

3. Capillary voltage v rozmezí 2,5 - 4 kV, optimum 3,5 kV

4. Teplota 300 - 450°C, optimum 400 °C

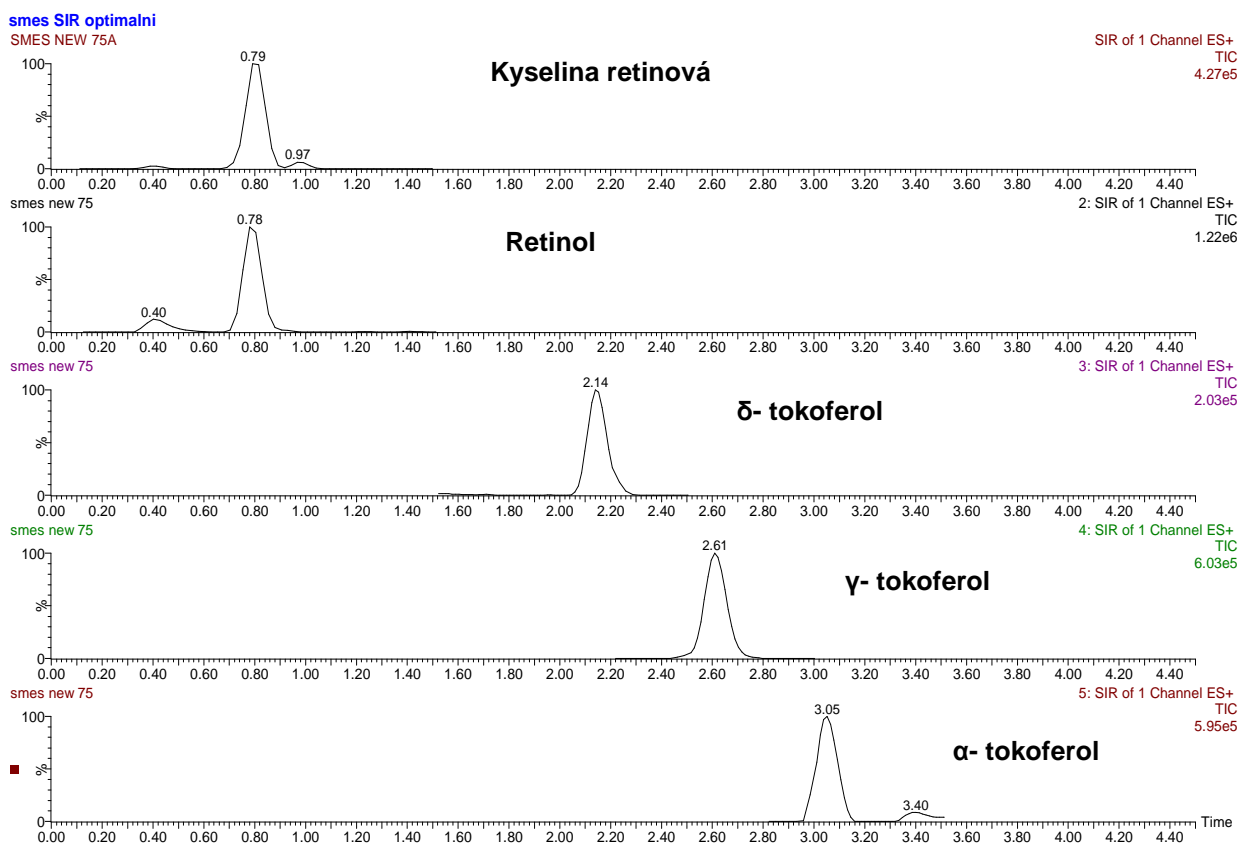
5. Průtok dusíku 500 - 700 L/hod., optimum 600 L/hod

6. Cone voltage – retinol + kyselina retinová – rozmezí 10 - 30 kV

- tokoferoly – 30 - 50 kV, optimální hodnoty viz Tabulka 7

Za výše zmíněných optimálních podmínek bylo dosaženo separace retinolu a všech tokoferolů až na základní linii v čase cca 3,2 min. Retinol a kyselinu retinovou nelze za těchto podmínek separovat na koloně (obě látky eluují v totožném retenčním čase), avšak využitím separačních možností hmotnostního spektrometru je dosaženo rozlišení pomocí sledování rozdílných iontů (iont 269 pro retinol a 301 pro kyselinu retinovou). To znamená, že během jednoho okamžiku jsou v hmotnostním detektoru sledovány dva různé ionty a získáme tak

dva samostatné záznamy. Vzorový záznam UPLC-MS analýzy standardní směsi všech vitamínů změřený za optimálních podmínek v módu SIM je znázorněn na Obrázek 26.



**Obrázek 26: Záznam z UPLC-MS analýzy standardní směsi za optimálních podmínek v módu SIM. Koncentrace retinolu a kyseliny retinové = 0,4 µmol/l, tokoferolů = 1 µmol/l.**

### Validace:

Výsledky validace UPLC-MS metody v módu SIM jsou shrnuty v Tabulka 9: Výsledky validace UPLC-MS metody v módu SIM. Kalibrační rozmezí byla zvolena podle průměrných hladin vitamínů v lidském séru, které činí přibližně 20 µmol/l (α-tokoferol), 3 µmol/l (γ-tokoferol), 0,3 – 1,3 µmol/l (α-tokoferol), 0,7 – 2,8 µmol/l (retinol) a 0,01 µmol/l (kyselina retinová) [50].

	Retinol	Kys. retinová	δ-tokoferol	γ-tokoferol	α-tokoferol
Opakovatelnost plochy (%RSD)	3,69	1,09	2,31	1,52	1,43
Opakovatelnost ret. času (%RSD)	0,00	0,00	0,00	0,16	0,00
Kalibrační rozmezí (μmol/L)	0,05-4,05	0,05 – 2,00	0,02-5,00	0,03-5,00	0,27 – 50,00
Korelační koeficient	0,998	0,992	0,996	0,998	0,999
LOD (μmol/L)	0,02	0,004	0,01	0,02	0,005
LOQ (μmol/L)	0,07	0,013	0,03	0,07	0,017

**Tabulka 9: Výsledky validace UPLC-MS metody v módu SIM**

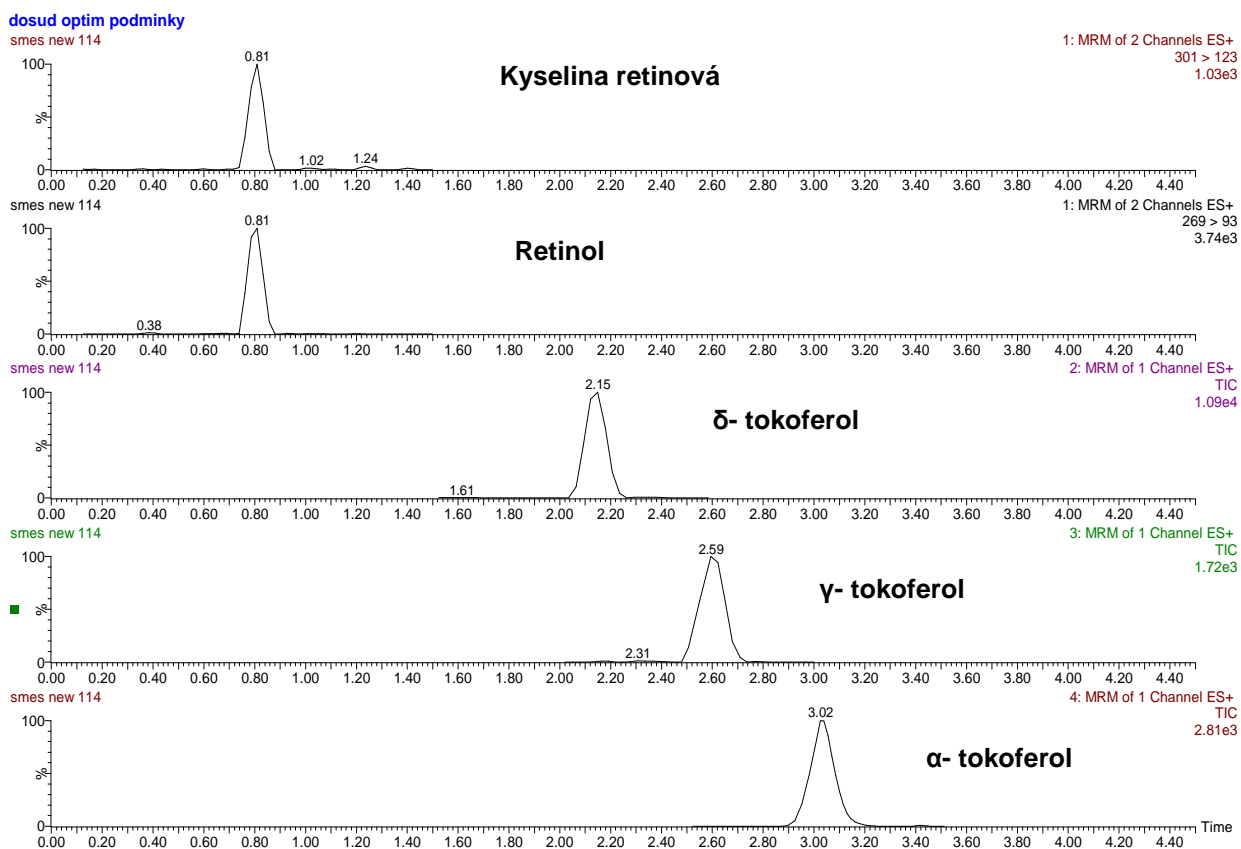
- **Mód SRM**

V druhém módu byly optimalizovány stejné parametry jako v případě SIMu, jen doplněné o kolizní napětí a „Cone gas flow“ (viz Tabulka 8). Podmínky UPLC separace byly zcela shodné, odlišný je pouze způsob detekce, kdy se v případě módu SRM sleduje kolize mateřského na dceřiný iont. Vzorový záznam UPLC-MS analýzy standardní směsi všech vitamínů změřený za optimálních podmínek v módu SRM je znázorněn na Obrázek 27 a výsledky validace jsou shrnuty v Tabulka 10 .

	Retinol	Kys. retinová	δ-tokoferol	γ-tokoferol	α-tokoferol
Opakovatelnost plochy (%RSD)	2,80	4,07	4,30	5,16	2,00
Opakovatelnost ret. času (%RSD)	0,00	1,21	0,00	0,00	0,42
Kalibrační rozmezí (μmol/L)	0,05-4,05	0,05 – 2,00	0,02-5,00	0,03-5,00	0,27– 50,00
Korelační koeficient	0,999	0,994	0,998	0,995	0,994
LOD (μmol/L)	0,003	0,01	0,003	0,013	0,007
LOQ (μmol/L)	0,01	0,03	0,01	0,04	0,023
LOD (HPLC-UV)	0,02	n.a.	n.a.	n.a.	0,1
<i>n.a. = hodnoty nejsou k dispozici</i>					

**Tabulka 10: Výsledky validace UPLC-MS metody v módu SRM.**

**V posledním řádku jsou pro srovnání uvedeny hodnoty LOD dosažené při použití metody UPLC-UV.**



**Obrázek 27: Záznam z UPLC-MS analýzy standardní směsi za optimálních podmínek v módu SRM. Koncentrace retinolu a kyseliny retinové = 0,4 µmol/l, tokoferolů = 1 µmol/l.**

### Srovnání SIM a SRM

Na délku analýzy nemá výběr měřicího módu žádný vliv, v obou případech analýza trvá 3,5 minuty. Oba módy však lze srovnávat z pohledu validačních výsledků. Co se týče přesnosti nástřiku hodnocené jako opakovatelnost retenčních časů, jsou výsledky v obou případech perfektní, směrodatná odchylka nepřesahuje 0,5 % a ve většině analýz byly retenční časy analytů zcela shodné. Mírně rozdílné výsledky můžeme pozorovat u opakovatelnosti plochy píků. Z tohoto hlediska se jeví mód SRM jako méně přesný, avšak hodnota RSD u všech látek kromě γ-tokoferolu nepřekračuje 5 %. Co se týče citlivosti vyjádřené jako LOD, lze konstatovat, že obě metody jsou také srovnatelné, mód SRM poskytuje jen velmi mírně nižší detekční limity. V případě aplikace metody na biologický materiál by však využití kolize mohlo zvýšit citlivost stanovení, protože by se tak mohly odstranit interferující nečistoty.

## Analýza biologického materiálu

Při měření reálných vzorků séra, které byly před analýzou vhodně upraveny pomocí LLE ve Výzkumné laboratoři gerontologické a metabolické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové, se povedlo detekovat retinol a všechny druhy tokoferolů. Bohužel nebylo možné identifikovat pík kyseliny retinové, z čehož vyplývá potřeba upravení extrakční metody se zaměřením na extrakci této látky. Při opakovaném měření vzorků a také při hodnocení správnosti metody pomocí standardního přídávku ke vzorkům séra se však vyskytly problémy projevující se postupně klesající odezvou detektoru, a proto nebylo možné výtěžnost vyhodnotit. Narazili jsme zde zřejmě na problém iontové suprese, která představuje jeden z hlavních problémů využití hmotnostní spektrometrie v klinických laboratořích. Příklad UPLC-MS analýzy séra v obou módech je znázorněn na Obrázek 28.

Iontová suprese je způsobena přítomností netěkavých či méně těkavých látek, které mění účinnost vzniku kapiček a jejich odpařování, což významně ovlivňuje počet nabitých iontů, které dorazí až k detektoru. Na iontové supresi se podílí různé vlivy z matrice, nejčastěji soli, endogenní látky, léčiva či jejich metabolity. Navíc je prokázáno, že právě ionizace elektrosprejem je k iontové supresi náchylnější a také, že molekuly o vyšší molekulové hmotnosti mohou potlačovat signál menších molekul. Polární analyty jsou obecně iontovou supresí více ovlivněny. [105]

V rámci pokračujících experimentů je proto nezbytné vzít jev iontové suprese v úvahu a zaměřit se na jeho potlačení například úpravou extrakčních postupů, použitím vnitřního standardu či změnou chromatografických podmínek.

Návrhy na další experimenty:

- Optimalizace extrakčního postupu
- Pokusit se o separaci retinolu a kyseliny retinové již na koloně úpravou složení mobilní fáze či použitím jiné fáze stacionární, i za cenu delší analýzy – možné dosažení citlivější a selektivnější analýzy
- Nalezení vhodného vnitřního standardu
- Ověření správnosti metody na vzorcích séra
- Revalidace metody

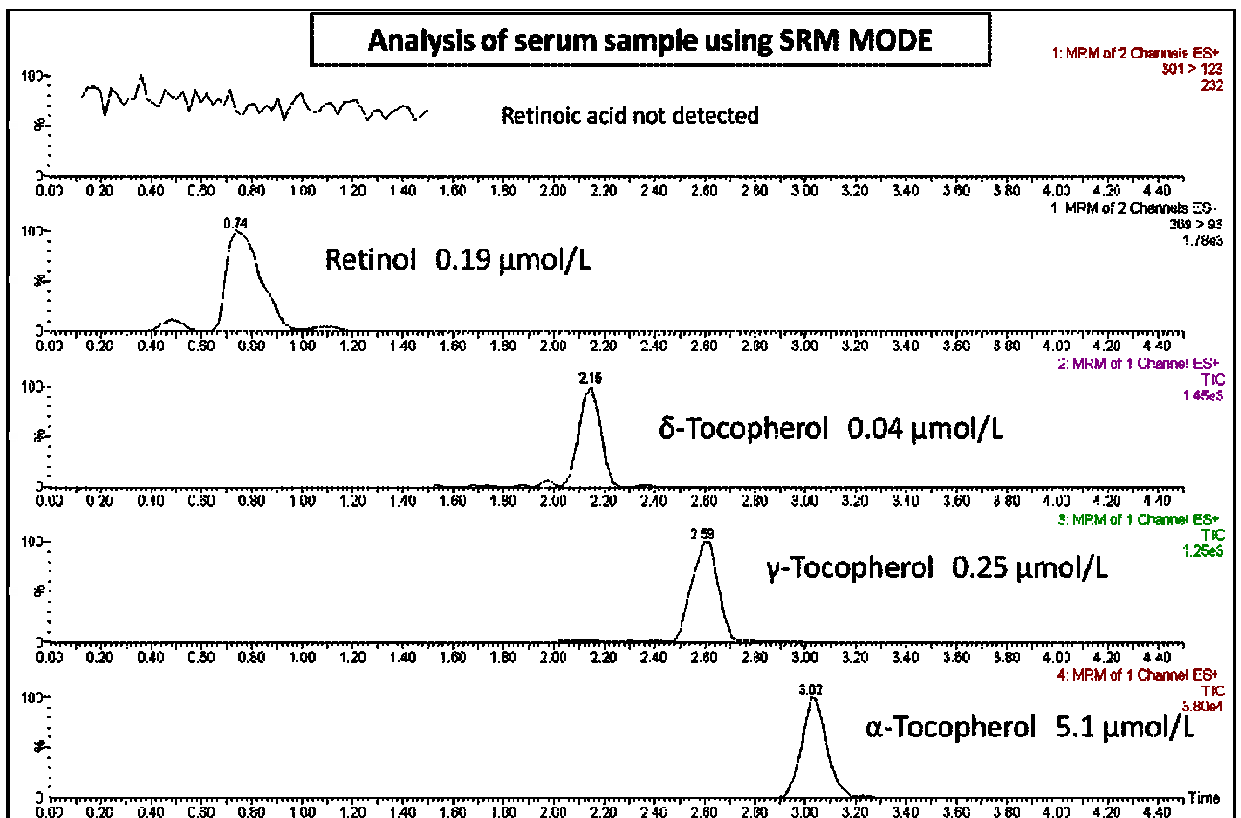
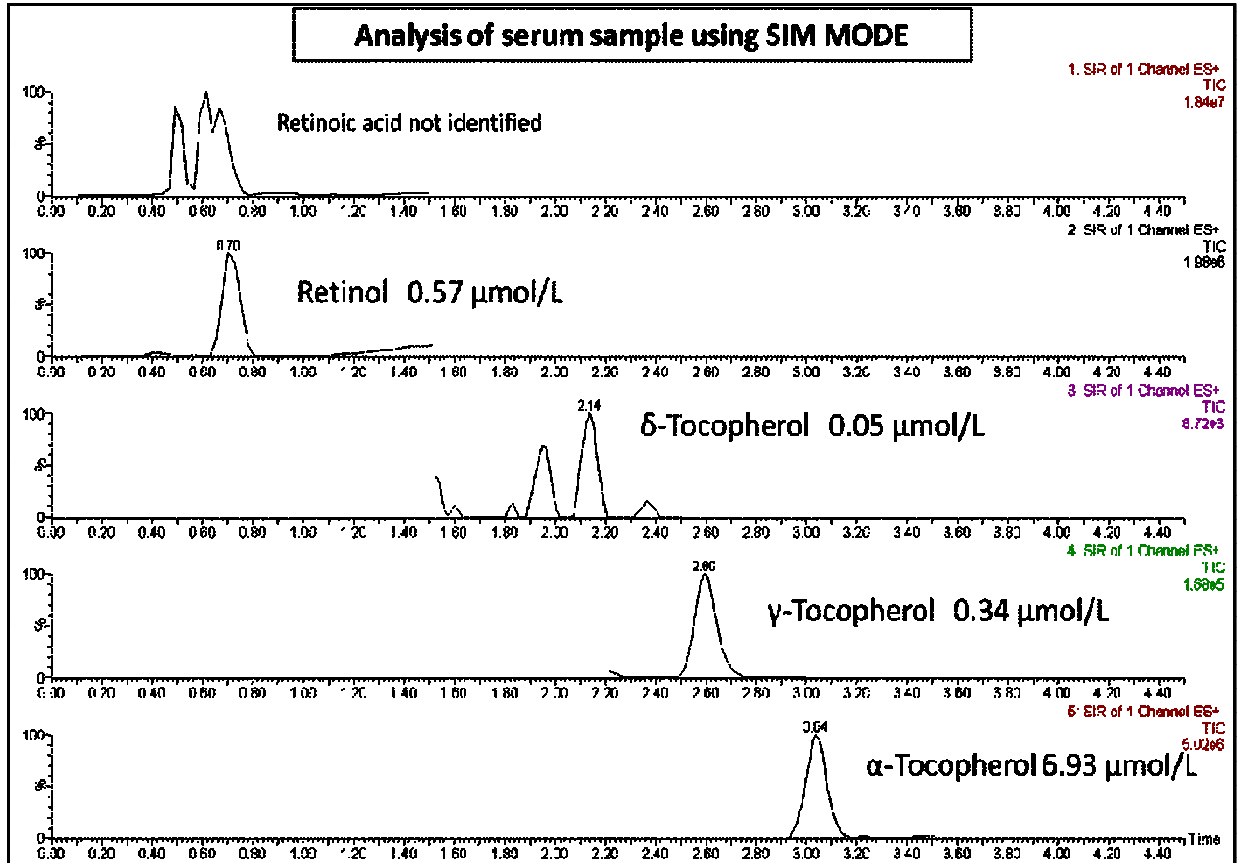
#### 4.4.4 Závěr

Pro separaci retinolu, kyseliny retinové a  $\alpha$ -,  $\gamma$ -, a  $\delta$ - tokoferolu byla vyvinuta nová a rychlá UPLC metoda s hmotnostně-spektrometrickou detekcí v módech SIM a SRM. Validace metody byla provedena zatím jen s použitím standardů. Aplikace UPLC-MS metody na biologický materiál přinesla nečekané problémy se správností (výťažností) vyplývající ze zkreslení výsledků daných přítomností rušivých látek ve vzorku upraveného séra. Jedná se pravděpodobně o vliv iontové suprese, která může způsobovat změnu signálu MS detektoru a tím zkreslovat výsledky analýzy. Tato problematika však již přesahuje rámec této disertační práce, neboť vzniklé potíže z časových důvodů nebylo možné odstranit a aplikace vyvinuté UPLC-MS metody na biologický materiál nyní představuje úkol pro „služebně mladší“ studenty doktorského studia na Katedře analytické chemie. Součástí diskuse jsou proto i různé návrhy a nápady na směřování dalších experimentů v návaznosti na doposud dosažené výsledky.

Vyřešení vzniklých potíží způsobených komplexitou biologické matrice a získání tak citlivé a rychlé metody pro analýzu důležitých antioxidačních vitamínů v séru by přineslo nový účinný analytický nástroj pro klinický monitoring daných látek např. v rámci lékařského výzkumu.

Dosavadní výsledky byly prezentovány formou plakátového sdělení na konferenci RDPA (viz příloha 5.13).





Obrázek 28: Příklady analýzy vzorku séra metodou UPLC-MS v módu SIM (nahore) a SRM (dole)

## 4.5 Stanovení gentisinu, isogentisinu a amarogentinu v hořci žlutém pomocí kapilární elektroforézy

### 4.5.1 Úvod

Během studijní stáže na Farmaceutickém institutu Univerzity Innsbruck, Katedře farmakognosie, jsem se věnovala vývoji CE metody pro stanovení obsahových látek kořene hořce žlutého (*Gentiana lutea*), konkrétně hořkého sekoiridoidu amarogentinu a dvou xanthonů – gentisinu a isogentisinu, které jsou navzájem polohovými izomery. Vzhledem ke komplexnímu složení hořcového extraktu bylo hlavním úkolem nalézt optimální CE podmínky pro separaci, identifikaci a kvantifikaci vybraných sloučenin. Experimenty zahrnovaly testování různých pufovacích roztoků v určitém rozmezí pH, použití micelárních systémů, přidavek organických modifikátorů a vyzkoušení různých druhů cyklodextrinů pro chirální separaci gentisinu a isogentisinu. V rámci optimalizace byl sledován vliv teploty, koncentrace a pH pufru, koncentrace cyklodextrinů a vlnová délka pro přímou UV detekci. Součástí projektu byla i validace vyvinuté metody v rozsahu ověření linearity, citlivosti, přesnosti a správnosti, a finálně byla metoda aplikována na analýzu několika komerčně dostupných vzorků hořcového kořene. Shodou okolností vědecký tým zmíněného pracoviště nedávno vyvinul novou HPLC-MS metodu pro stanovení všech obsahových látek hořce [83], která proto posloužila ke srovnání obou metod z různých hledisek.

### 4.5.2 Výsledky a diskuse

#### Podmínky CE analýzy

- Kapilára: křemenná kapilára potažená polyimidovou vrstvou, 50  $\mu\text{m}$  i.d. x 60 cm efektivní délka (Polymicro Technologies, Phoenix, USA)
- Pufr: 100 mM  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ , pH = 9,3 + 10 mM  $\beta$ -cyklodextrin
- Napětí: 25 kV
- Teplota: 30°C
- Nástřík: hydrodynamicky, 50 mBa, 5 sec.
- Detekce: DAD, gentisin, isogentisin – 260 nm, amarogentin – 242 nm

Všechny analyzované sloučeniny jsou elektroneutrální látky s hodnotami  $pK_a$  kolem 7 a slabě kyselým charakterem daném přítomností hydroxylových skupin na aromatických jádrech. Gentisin a isogentisin jsou vzhledem k jejich polohové izomerii v elektrolytovém systému zcela shodně nabity, a proto lze CE separace dosáhnout buď přidavkem chirálního modifikátoru (cyklodextrin) a nebo vytvořením micel v rámci micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC). Během optimalizace metody byly vyzkoušeny obě zmíněné varianty. Při MEKC s použitím standardní směsi bylo dosaženo dobrého rozlišení, které se avšak při analýze hořcového extraktu výrazně zhoršilo z důvodu smývání píků stanovovaných látek s jinými interferujícími látkami v extraktu. Proto se jako vhodnější ukázalo využití  $\beta$ -cyklodextrinu, které zajišťovalo úspěšnou separaci obou látek jak ve standardu, tak v extraktu.

Na dobu analýzy, rozlišení a tvar píků měla také výrazný vliv koncentrace pufru a jeho pH. S rostoucí molaritou tetraboritanového tlumivého roztoku v rozmezí 25 – 125 mM se sice prodlužovala délka stanovení, avšak rozlišení cílových analytů od ostatních látek v rostlinném materiálu se zlepšovalo, proto byla jako ideální zvolena 100 mM koncentrace. Výsledný generovaný proud byl za těchto podmínek poměrně vysoký (přibližně 115  $\mu A$ ), avšak nezpůsobil nestabilitu systému ani problémy se vznikem Joulova tepla.

### Validace

Linearita použité metody byla ověřena v širokém koncentračním rozsahu (přibližně 2 – 100  $\mu g/ml$  pro gentisin a isogentisin a 3 – 180  $\mu g/ml$  pro amarogentin) s korelačními koeficienty 0,9988 – 0,9994. Citlivost metody vyjádřená hodnotami LOQ se pohybovala v rozmezí 2,3  $\mu g/ml$  (gentisin) – 4,1  $\mu g/ml$  (amarogentin). Správnost hodnocená metodou standardního přídatku na třech koncentračních úrovních a vyjádřená jako výtěžnost se nacházela v přijatelném rozmezí 95 – 105 %. Přesnost metody a nástřiku byla hodnocena v rámci jednoho dne (intra-denní) a tří dní (inter-denní) a kromě jedné výjimky nepřesáhla relativní směrodatné odchylka hodnotu 5%.

### Analyza komerčních vzorků *G. lutea*

Pět vzorků mleté drogy bylo extrahováno methanolem v ultrazvukové lázni a připravený extrakt byl analyzován vyvinutou CE metodou. Ve všech vzorcích obsah isogentisinu převažoval nad gentisinem. Koncentrace amarogentinu byla oproti xanthonům výrazně nižší, u dvou vzorků dokonce nedosahovala ani LOQ, a proto nemohla být kvantifikována.

### Porovnání s HPLC

Rozdílný chemický charakter obsahových látek a/ či jejich strukturní podobnost představují velkou výzvu pro analytika stojícího před úkolem nalézt optimální metodu pro analýzu hořcového extraktu. Ačkoliv se v HPLC metodě [83], která se nabízí ke srovnávání, podařilo separovat všechny obsažené sloučeniny, kapilární elektroforéza přináší také svá pozitiva. Kromě obecně známé a pozitivní malé spotřebě rozpouštědel CE umožňuje nápadně lepší separaci gentisinu a isogentisinu, navíc ve více než polovičním retenčním čase (HPLC analýza trvala 30 min.). Naopak CE nemůže konkurovat v dosažené citlivosti, která je u HPLC až o dva řády nižší. Zodpovědně však lze konstatovat, že obě metody poskytují správné a přesné výsledky, neboť zjištěné hladiny sledovaných analytů byly v rámci směrodatné odchylky srovnatelné.

### **4.5.3 Závěr**

Pro analýzu tří farmakologicky zajímavých látek obsažených v kořenu hořce žlutého byla vyvinuta a validována nová CE metoda, která současně posloužila i k hodnocení obsahu cílových látek v reálných vzorcích drogy. Celková doba CE analýzy činila 11 minut. Na základě srovnání použité CE metody s HPLC technikou byla vyzdvižena výrazně lepší separace gentisinu a isogentisinu, a také rychlost analýzy dosažená při použití CE. Kapilární elektroforéza tak může být pro danou aplikaci právem považována za plnohodnotnou alternativu k HPLC.

Bližší podrobnosti k této problematice jsou uvedeny v příloze 5.6 – publikace vyvinuté metody v časopise *Journal of Separation Science*).

## 5 Přílohy

### 5.1 Přehled publikovaných článků

- **Analysis of phenolic acids as chloroformate derivatives using solid phase microextraction–gas chromatography**  
Ivana Citová, Radek Sladkovský, Petr Solich  
*Analytica Chimica Acta 573–574 (2006) 231–241*
- **Characterization of several hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars based in chemical, fatty acid and sterol composition**  
Joana S. Amaral, Susana Casal, Ivana Citova, Alberto Santos, Rosa M. Seabra, Beatriz P. P. Oliveira  
*European Food Research and Technology 222 (2006) 274–280*
- **Comparison of a novel ultra-performance liquid chromatographic method for determination of retinol and  $\alpha$ -tocopherol in human serum with conventional HPLC using monolithic and particulate columns**  
I. Citová, L. Havlíková, L. Urbánek, D. Solichová, L. Nováková, P. Solich  
*Analytical and Bioanalytical Chemistry 388 (2007) 675–681*
- **Determination of gentisin, isogentisin and amarogentin in *Gentiana lutea* L. by capillary electrophoresis**  
Ivana Citová, Markus Ganzera, Hermann Stuppner, Petr Solich  
*Journal of Separation Science 31 (2008) 195 - 200*

## 5.2 Přehled plakátových sdělení

- Ivana Citová, Radek Sladkovský, Olga Žižková, Petr Solich, Marie Pospíšilová: **Separace chloroformátových derivátů fenolických kyselin metodou plynové chromatografie**  
*Chiranal 2005 – Pokroky v chromatografii a elektroforéze, 7. - 10. 2. 2005, Olomouc*
- Ivana Citová, Lucie Havlíková, Radek Sladkovský, Petr Solich: **Moderní trendy v analýze polyfenolických látek chromatografickými metodami**  
*34. Syntéza a analýza léčiv, 12.-14. 9. 2005, Brno*
- Ivana Citová, Radek Sladkovský, Petr Solich: **Derivatization and solid phase microextraction of phenolic acids followed by gas chromatography**  
*4th International Conference on Instrumental Methods of Analysis - Modern Trends and Applications, 2.-6.10. 2005, Iraklion, Crete*
- Ivana Citová, Petr Solich: **Gas chromatography determination of fatty acid composition of nutraceuticals containing encapsulated fish oil**  
*International Symposium on Chromatography 2006, 21.-25.8. 2006, Kodaň, Dánsko*
- Citová I., Nováková L., Urbánek L., Solichová D., Solich P.: **Simultaneous analysis of vitamins A and E by Ultra Performance Liquid Chromatography – tandem mass spectrometry**  
*Joint Meeting Marburg 2006, 4.-7.10. 2006, Marburg, Německo*

- Ivana Citová, Markus Ganzera, Hermann Stuppner, Petr Solich:  
**Determination of gentisin, isogentisin and amarogentin in *Gentiana lutea* by capillary electrophoresis**  
*Advances in Chromatography and Electrophoresis & Chiranal 2007, 24.-27.6.2007, Olomouc*
- I. Citová, L. Nováková, L. Urbánek, L. Krčmová, D. Solichová, P. Solich:  
**Determination of retinoic acid, retinol and tocopherols in human serum by Ultra Performance Liquid Chromatography – mass spectrometry**  
*Recent Developments in Pharmaceutical Analysis 2007, 23. – 27. 9. 2007, Elba, Italy*

## 5.3 Příloha 1

**Analysis of phenolic acids as chloroformate derivatives using solid phase microextraction–gas chromatography**

Ivana Citová, Radek Sladkovský, Petr Solich

*Analytica Chimica Acta 573–574 (2006) 231–241*



## Analysis of phenolic acids as chloroformate derivatives using solid phase microextraction–gas chromatography

Ivana Citová, Radek Sladkovský, Petr Solich\*

*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, Hradec Králové 500 05, Czech Republic*

Received 29 November 2005; received in revised form 26 April 2006; accepted 27 April 2006

Available online 9 May 2006

### Abstract

In the presented study, a simple and original procedure of phenolic acids derivatization treated by ethyl and methyl chloroformate performed in an aqueous media consisting of acetonitrile, water, methanol/ethanol and pyridine has been modified and optimized. Seven phenolic acid standards—caffeic, ferulic, gallic, *p*-coumaric, protocatechuic, syringic and vanillic were derivatized into corresponding methyl/ethyl esters and subsequently determined by the means of gas chromatography connected to the flame-ionisation detector (FID). Some selected validation parameters as linearity, detection and quantitation limits and peak area repeatability were valued. The total time of gas chromatography (GC) analysis was 24 min for methyl chloroformate and 30 min for ethyl chloroformate derivatization. The more suitable methyl chloroformate derivatization was used for further experiments on the possibility of multiple pre-concentration by the direct solid phase microextraction technique (SPME). For this purpose, polyacrylate (PA), polydimethylsiloxane (PDMS), carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) and polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB) fibres were tested and the extraction conditions concerning time of extraction, temperature and time of desorption were optimized. The most polar PA fibre gave the best results under optimal extraction conditions (50 min extraction time, 25 °C extraction temperature and 10 min desorption time). As a result, the total time of SPME–GC analysis was 74 min and an increase in method sensitivity was reached. The limits of quantitation (LOQ) of *p*-coumaric, ferulic, syringic and vanillic acid esters after SPME pre-concentration were 0.02, 0.17, 0.2 and 0.2 µg mL<sup>-1</sup>, respectively, showing approximately 10 times higher sensitivity in comparison with the original GC method.  
© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Phenolic acids; Derivatization; Gas chromatography; Solid phase microextraction

### 1. Introduction

In recent years, high attention is paid to natural substances with antioxidant activity due to increasing incidence of serious pathologies such as cancer, cardiovascular diseases or inflammation, which are caused, among others, by harmful effects of free radicals. Naturally occurring plant compounds (vitamins, flavonoids, phenolic acids, etc.) may inhibit various stages in the cancer process and protect the body tissues against oxidative stress [1,2]. Polyphenolic compounds comprising flavonoids and phenolic acids occur ubiquitously in foods of plant origin and count to the most abundant antioxidants in our diet. It was reviewed that the metabolites formed in our tissues after ingestion of polyphenols significantly contribute to the antiox-

idant capacity and prevention of oxidative stress and play an important role in the prevention of human pathologies [3]. Vegetables, fruits, chocolate and beverages such as wine, fruit juices, tea or coffee are sources rich in polyphenols and their consumption may reduce the risk of above mentioned diseases [4–7].

Phenolic acids belong to an important group of antioxidants naturally present in all plant materials. They form approximately one third of total phenols and comprise hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid derivatives (Fig. 1). The major representative of hydroxycinnamic acids, acting as flavonoid precursors, is caffeic acid, plentifully included in coffee. Gallic acid, serving as a substrate for tannins production, belongs to the most important hydroxybenzoic acids in plants due to the protective role of tannins against pathogens and insects [8]. Besides their primary antioxidant activity, polyphenols also display a wide variety of biological functions, such as antiproliferative and cytotoxic activity [9], hypocholesteremic and hypolipidemic properties or

\* Corresponding author. Fax: +420 495 518 718.  
E-mail address: [solich@faf.cuni.cz](mailto:solich@faf.cuni.cz) (P. Solich).

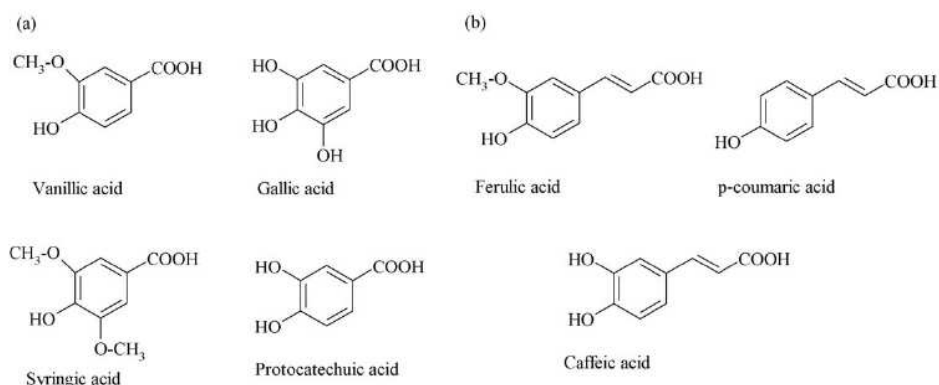


Fig. 1. The chemical structure of different phenolic acids: (a) hydroxybenzoic acids; (b) hydroxycinnamic acids.

antibacterial and antiviral activities for which they are widely used in phytotherapy [8].

Therefore, reliable and practical methods for separation, identification and quantitative analysis of phenolic compounds are frequently required. There are many publications dealing with phenolic acids determination, most of them are based on reverse-phased high performance liquid chromatography (HPLC) techniques with a binary solvent system commonly coupled with spectrophotometric, electrochemical or mass spectrometry (MS) detection [10]. The most applied way of detection is UV–vis spectrophotometry, including diode-array detection, used for assessment of phenolics in wine [11,12] fruit juices [13], tea [14], plant materials [15,16] or in human plasma [17]. An HPLC–MS technique was employed for phenolic acids and flavonoids determination of apples and pears [18]. Electromigration techniques, e.g. isotachopheresis coupled with capillary zone electrophoresis [19] or microchip capillary electrophoresis [20], represent another way of phenolic acids analysis. Besides the above mentioned methods, these compounds may be also determined by gas chromatography techniques with preceding derivatization step and combined with flame-ionisation (FID) [21–23], electron-capture (ECD) [24] or MS detection [8,21,25].

Although the HPLC method seems to be the preferred choice, GC can also serve as a suitable and reliable way of determination, chiefly in case of complex natural matrices, such as plant extracts or biological fluids, where an analytical system of high resolution is required. Moreover, in these examples, the necessity of derivatization resulting from non-volatility of studied substances means a sort of isolation of the target compounds from the complex sample and might be advantageous.

There is a wide range of derivatization methods of hydroxy compounds comprising silylation and non-silylation techniques (alkylation, acylation, condensation) [26,27]. A difficulty of the silylation process may be the need of non-aqueous environment for the reaction, while some non-silylating derivatization techniques allow to be performed in presence of water.

Concerning specifically the phenolics determination, besides employing the silylating applications, e.g. analysis of phenolic acids in plant tissues, propolis and grasses [8] or microwave-accelerated derivatization of standards treated with

bis(trimethylsilyl)acetamide [28], some papers concerning non-silylation ways have also been reported. A smooth and simple procedure for derivatization of urinary hydroxycarboxylic acids and some phenolic acids by treatment with ethyl and methyl chloroformates enabling water surrounding has been developed [23,29]. Furthermore, an in-vial method for combined derivatization and extraction of eight phenolic acids and four flavonoids from plant extracts using phase transfer catalysis followed by GC–MS determination has been described [30].

Extraction techniques enable evaluation of micronutrients contained in plant sources in very low concentrations ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). Many different extraction methods exist for antioxidant phytochemicals, most of them are based on solvent extraction using water, organic solvent or liquefied gas or combinations of them. However, solvent extraction requires the use of large amounts of organic solvents which is environmentally unfriendly and poses health risks. Alternative extraction methods such as solid phase extraction (SPE) [16,17,31–33] microwave assisted extraction (MAE) [34], supercritical fluid extraction (SFE) [10] or solid phase microextraction (SPME) might be advantageous through their suitable extraction efficiency, selectivity, concentration potency and lower financial and environmental demands in comparison with conventional extraction processes.

SPME is a simple extraction technique based on the concentration of an analyte on a fibre coated with different sorbents. Several experimental coatings have been prepared and investigated for a range of applications [35] including simple polydimethylsiloxane (PDMS) and polyacrylate (PA) coatings or mixed polymers with suspended porous particles such as carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) or polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB). PDMS is a liquid coating and PA is a solid polymer of low density, both involving predominantly absorption of the analytes, i.e. diffusion of the analyte molecules into the absorbent. Mixed coatings enable interactions mainly determined by the adsorption process on the porous particles [35]. After the extraction, the SPME device is simply inserted into the tempered injection port of a gas chromatograph and the analytes are desorbed from the fibre and drifted by the carrier gas onto the column. This modern technique, developed by Pawliszyn [35], provides concentrating of

studied compounds from liquid samples or headspace without high solvent usage or need of complicated apparatus.

This paper introduces a development and modification of an original and simple procedure for seven phenolic acid standards (caffeic, ferulic, gallic, *p*-coumaric, protocatechuic, syringic and vanillic) employing methyl and ethyl chloroformates derivatization, followed by GC–FID determination. Furthermore, the possibility of multiple pre-concentration of the phenolic acid derivatives by the means of SPME before the GC determination is also described. The optimal SPME fibre and conditions for extraction of standard phenolic acid esters have also been investigated in order to find another possible way of extraction and pre-concentration of desirable components from natural sources. No applications of direct SPME of phenolic acid derivatives in an aqueous environment connected to the GC–FID have been reported yet.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents and chemicals

Standards of all phenolic acids (vanillic, gallic, syringic, protocatechuic, ferulic, caffeic, *p*-coumaric), HPLC grade solvents methanol, ethanol and acetonitrile were purchased from Sigma–Aldrich (Prague, Czech Republic). The derivatization reagents (methyl and ethyl chloroformate), HPLC grade chloroform and squalen were obtained from Fluka (Sigma–Aldrich, Prague, Czech Republic). Pyridine p.a. and sodium hydrogencarbonate p.a. were from Lachema Neratovice (Chemapol, Prague, Czech Republic) and *n*-hexane p.a. was acquired from Fluka AG (Switzerland). HPLC grade water was prepared by Milli-Q reverse osmosis Millipore (Bedford, MA, USA).

### 2.2. Instrumentation

The Shimadzu GC-17A system with FID detector, split/splitless injector and AOC-20i autosampler (Shimadzu, Japan) was used for all chromatographic analyses. For the GC separation the Equity-5 (0.32 mm ID  $\times$  30 m, 1.0 mm  $d_f$ ) fused-silica capillary column (Supelco, Sigma–Aldrich, Prague, Czech Republic) was employed. The solid phase microextraction procedure was accomplished by 85  $\mu$ m polyacrylate (PA), 75  $\mu$ m carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS), 65  $\mu$ m polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB) and polydimethylsiloxane (PDMS) fibres, using the solid phase microextraction fibre holder for manual use and sampling stand with 4 mL vial puck and holder cartridge bar (Supelco, Sigma–Aldrich, Prague, Czech Republic). For sample heating and stirring the IKAMAG RCT basic stirring instrument with heating function and the IKATRON ETS-D4 fuzzy instrument for precise control of temperatures (IKA-WERKE GMBH & Co., KG, Staufen, Germany) were used. All collected data were processed by chromatographical software CSW 1.7 for Windows (Data Apex, Prague, Czech Republic). For sample preparation an ultrasonic bath TESON 1 (Tesla, Prague, Czech Republic) and analytical scales Sartorius Genius (Sartorius AG, Göttingen, Germany) were employed.

### 2.3. Derivatization

The derivatization of phenolic acids was based on the reaction with methyl and ethyl chloroformate (MCF, ECF) in aqueous medium [23,29]. The reaction medium consisted of acetonitrile (AcCN), water (H<sub>2</sub>O), methanol/ethanol (MeOH/EtOH) and pyridine (Pyr). The precise ratio of individual medium components significantly influence the reaction recovery, therefore a wide range of different ratios was tested.

The stock solutions of phenolic acid standards of 3 mg mL<sup>-1</sup> concentration were prepared by dissolving the substances in acetonitrile using the ultrasonic bath. Working solutions were prepared by further dilution of stock solutions to the final 0.3 mg mL<sup>-1</sup> concentration. As an internal standard the 0.1% squalen solution in acetonitrile was used. For the derivatization process, the 1 mol L<sup>-1</sup> aqueous solution of sodium hydrogencarbonate (NaHCO<sub>3</sub>) was prepared.

#### 2.3.1. Derivatization with methyl chloroformate

The reaction medium was prepared by mixing AcCN, H<sub>2</sub>O, MeOH and Pyr finally in the optimal ratio 14:10:2:3. The derivatization procedure, firstly for the mixture of phenolic acids and consecutively for the peak identification by the standard addition method was performed as follows: 80  $\mu$ L of working standard solution and 1 mL of reaction medium were pipetted into 3.5 mL vial and mixed in the ultrasound bath for 1 min. An amount of 150  $\mu$ L of methyl chloroformate was added dropwise, then 1 min shaken and afterwards 1 mL of chloroform was added. By shaking the mixture for another 2 min the newly formed methyl esters came into the organic chloroform layer. Finally, 1 mL of NaHCO<sub>3</sub> was added to facilitate the decarboxylation. After 2 min of agitating and waiting for settling the interface, 900  $\mu$ L of the bottom organic layer with phenolic acid methyl esters was transferred into a GC vial and 100  $\mu$ L of the internal standard (0.1% squalen solution) was added.

#### 2.3.2. Derivatization with ethyl chloroformate

In case of derivatization treated by ethyl chloroformate the reaction procedure was almost coincident with the previous method, except using ethanol instead of methanol in the reaction medium. The optimal ratio of medium components was 2:4:2:2 (AcCN/H<sub>2</sub>O/EtOH/Pyr).

### 2.4. Chromatographic analysis

Nitrogen was used as the carrier gas with initial column pressure 100 kPa and flow rate 3.5 mL min<sup>-1</sup>. The 0.5 min splitless mode and 1  $\mu$ L injection volume was set. The temperatures of injector, column and detector were 240, 100 and 280 °C, respectively. The temperature gradient was following: 100 °C held for 2 min, then increased at a rate 10 °C min<sup>-1</sup> up to 200 °C and 5 °C min<sup>-1</sup> to 280 °C. The total time of analysis was then 24 min for MCF and 30 min for ECF derivatization.

### 2.5. Calibration and repeatability

Following validation characteristics were determined according to the ICH analytical guidelines [36,37]. The linear range was

calculated by the linear regression method. Linearity of peak area response expressed as the correlation coefficient was tested in the concentration range 0.002–0.2 mg mL<sup>-1</sup> in MCF derivatization and 0.006–0.2 mg mL<sup>-1</sup> in ECF derivatization, in eight concentration levels, using squalen as an internal standard. Limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) were determined according to the recorded data experimentally by the means of signal-to-noise ratio method (LOD = triple noise, LOQ = 10 × noise). Finally, the method repeatability was determined according to the data acquired during 1 day (intraday repeatability) and within different days (interday repeatability). Each day the sample was measured in six replicates, using squalen as an internal standard. In case of SPME, only interday repeatability was evaluated, after processing of six analyses in 2 days. The repeatability was expressed as the relative standard deviation (%R.S.D.).

### 2.6. Solid phase microextraction

For the solid phase microextraction technique the 0.5 mg mL<sup>-1</sup> methanolic solution of seven phenolic acids was prepared. Four SPME fibres were chosen, from the most polar PA fibre, through middle-polar CAR/PDMS and PDMS/DVB fibres, up to the non-polar PDMS fibre, in order to experience fibres of different polarity and find out the most suitable one.

After conditioning and completing a blank analysis of each fibre, the extraction process was performed by dipping and exposing the fibre in the phenolic acids methyl esters solution immediately after the derivatization carried out in a 4 mL SPME vial. The derivatization procedure preceding the SPME was modified according to different conditions required for the extraction. On that account, the standard solution used was of 0.5 mg mL<sup>-1</sup> concentration, no chloroform was added and the NaHCO<sub>3</sub> solution was substituted by 2 mL of ultra pure water. The extraction parameters were optimized in the temperature range 25–40 °C, time of extraction 30–60 min and time of desorption in the GC injection port for 10 min. During the extraction, the sample solution was agitated by a magnetic stirrer at approximate rotation speed 500 rpm. Between each extraction process, fibres were cleaned by standard cleaning method recommended by the fibre producer.

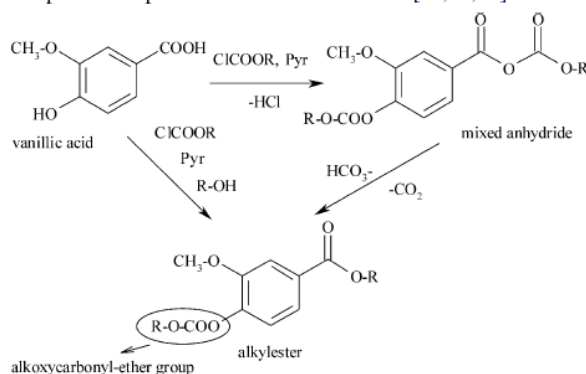
## 3. Results and discussion

### 3.1. Derivatization process

Chloroformates have been known as strong and rapid derivatizing reagents for a long time, being suitable for reactions in aqueous media. They have been used in the analysis of amino acids and non-amino organic acids [38–40], fatty acids and organic acids in plasma [41,42], alkaloids [43], herbicides [44] and in food analysis [45].

As it has been mentioned in Section 2, the derivatization process takes place in a reaction medium consisting of acetonitrile, water, alcohol and pyridine. Pyridine serves as a catalyst and it is necessary for the reaction. Alcohol is needful for the esterification of the carboxylic group, and should be in precise ratio to water and acetonitrile in order to minimize the side products for-

matation. The water amount should be as low as possible because of its decreasing effect on the reaction yields [23,46]. During the reaction, carboxylic groups are transformed either to undesirable alkoxycarbonyl esters (“mixed anhydrides”), decomposing slowly in time, or to the target alkyl esters. The direction of the reaction depends on the composition of the reaction medium and on the molar ratio of the reagent to the organic base. By the straight coupling of the reagent to the carboxylic group excluding alcohol from the medium, mixed anhydrides are formed preferably. Conversely, the alkyl esters may arise either by rapid decarboxylation of the mixed anhydrides in aqueous bicarbonate solution, but always accompanied by the free acids release, or better by an exchange reaction with alcohol added to the reaction medium. Concerning the hydroxyl groups, both those linked to the benzene ring and those joined to the side chain, are simultaneously converted into alkoxycarbonyl ethers [23]. The undermentioned orientational reaction scheme illustrates possible process of phenolic acids derivatization [23,29,47].



Reaction scheme of the phenolic acids derivatization treated with chloroformates (possible formation of mixed anhydride and alkylester via different pathways).

#### 3.1.1. Volume of the derivatization reagent

In order to set an optimal volume of the derivatization reagent (MCF, ECF) necessary for complete esterification of phenolic acids, a range of 30–180 μL of MCF/ECF volumes were tested, using constant sample volume 80 μL. An increasing reaction recovery with increasing amount of derivatization agent at range of 30–150 μL was observed. By another volume lifting, the response in the plateau phase. Hence, the MCF/ECF volume of 150 μL was used for further experiments.

#### 3.1.2. Derivatization with methyl chloroformate

The primary composition of the reaction medium was formed by AcCN/H<sub>2</sub>O/MeOH/Pyr in the ratio 14:8:1:2 [23]. This proportion was modified in order to study the influence of individual components on the reaction recovery. As a first step, we attempted continuous changing of individual component ratios by gradual increasing and decreasing of their portions in the reaction medium. However, these experiments did not result in significant improvement of the reaction recovery. In most cases, after the alteration of particular component, the recovery of desirable methyl esters either stayed unchanged or slightly

decreased with higher formation of undesirable side products (e.g. mixed anhydrides), which was manifested by unknown peaks on the chromatogram. According to these findings, we based our further experiments on an idea of varying the ratios comprehensively, not one by one, but by changing two components together with reserving the relative proportions of certain medium components. Accordingly, the reaction medium may be divided into two pairs in which the component proportions should be kept unchanged. The first pair comprises methanol with pyridine and the second one consists of acetonitrile and water.

Concerning the first MeOH–Pyr pair, the contents of methanol and pyridine were firstly reduced with keeping their relative proportion identical (ratio 14:8:0.5:1) and it did not return in any improvement. This effect may be explained by the important role of pyridine as the reaction catalyst and the necessity of methanol for the esterification and formation of target methyl esters. Therefore, the MeOH–Pyr amounts were lifted up to the complex ratio 14:8:2:3, which resulted in significantly higher yields in comparison with the original suggested medium (14:8:1:2).

For the derivatization, the water amount should be as low as possible; nevertheless it cannot be put down totally by reason that the derivatization process in a waterless medium could lead to the turn of the reaction run towards higher formation of undesirable side products. By another experiments we have found out that a moderate amplification of water content up to the ratio 14:10:2:3 might be positive and brings higher reaction yields. On the contrary, great increasing or decreasing of the AcCN–H<sub>2</sub>O amount is undesirable. From all these experiments of modifying the component concentrations flows that the optimal reaction medium providing suitable reaction recovery with minimal side products formation consists of 14 parts of acetonitrile, 10 parts of water, 2 parts of methanol and 3 parts of pyridine.

### 3.1.3. Derivatization with ethyl chloroformate

The reaction conditions of ethyl chloroformate (ECF) derivatization were in principle the same as in case of methyl chloro-

formate (MCF) reaction. Analogically, ethyl chloroformate was used as derivatization reagent and in the medium methanol was substituted by ethanol. The initial ratio of components in the reaction medium was 4:4:3:1 (AcCN/H<sub>2</sub>O/EtOH/Pyr) [23]. This proportion was again modified in order to find out an optimal composition with the best reaction yields and the lowest side products formation. Our further steps resulted from the experience gained during previous optimization of MCF reaction and although the ratio of individual components was different, the dependencies were similar and helped us to find the optimum.

From our experiments was concluded that the pyridine amount should not be reduced, conversely it might be enlarged to get higher yields. Therefore better results were obtained when EtOH–Pyr ratio was 2:2. When dealing with acetonitrile and water content, again both increasing and decreasing of its proportions was tested. As a result we have stated the optimal composition of the reaction medium for ECF derivatization 2:4:2:2 (AcCN/H<sub>2</sub>O/EtOH/Pyr), providing better recovery than the initial suggested medium (4:4:3:1).

### 3.2. GC analysis

The initial column pressure was 100 kPa with the flow rate 2.7 mL min<sup>-1</sup>. The beginning temperatures of injector, column and detector were 240, 100 and 280 °C, respectively, with following temperature gradient: initial 100 °C held for 2 min, then increased in rate 10 °C min<sup>-1</sup> up to 280 °C. Due to the poor resolution of caffeic and gallic acid peaks achieved within the initial conditions, the chromatographic parameters were optimized by a slight increase of mobile phase flow rate and by modifying the temperature gradient with keeping the time of analysis as short as possible. After a series of experiments the optimal conditions were set to final flow rate 3.5 mL min<sup>-1</sup> and temperature gradient 100 °C (2 min held), increased at rate 10 °C min<sup>-1</sup> to 200 °C and 5 °C min<sup>-1</sup> to 280 °C. The total time of analysis was then 24 min for MCF and 30 min for ECF derivatization and satisfactory resolution of all peaks was accomplished. Fig. 2 illustrates the chromatogram of phenolic acid esters separation after MCF

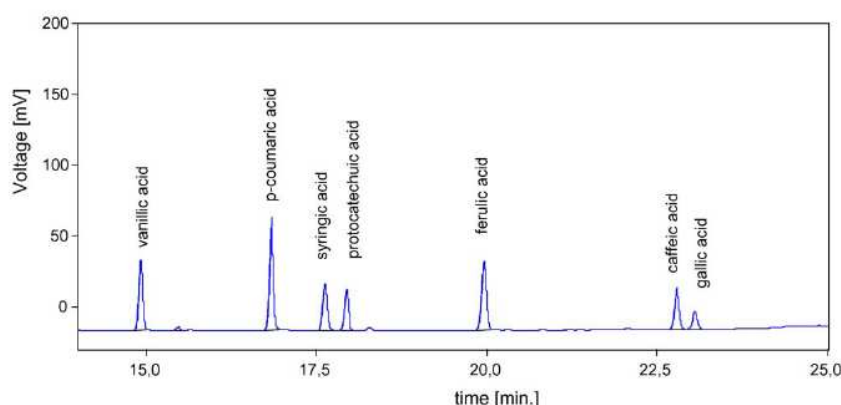


Fig. 2. The chromatogram of separation of phenolic acid methyl esters after derivatization treated by MCF (0.5 mg mL<sup>-1</sup> concentration of standard solution, optimal chromatographic conditions).

Table 1  
Method calibration results for individual substances using derivatization by methyl chloroformate

Compound (methyl ester of)	Retention time (min)	Regression line	Correlation coefficient	Linear range (mg mL <sup>-1</sup> )	LOD (µg mL <sup>-1</sup> )	LOQ (µg mL <sup>-1</sup> )
Vanillic acid	14.98	$y = 1.665x - 0.0069$	0.99951	0.0060–0.2496	1.9	6.0
<i>p</i> -Coumaric acid	16.98	$y = 3.784x - 0.0228$	0.99934	0.0022–0.2416	0.6	2.2
Syringic acid	17.74	$y = 1.299x - 0.0101$	0.99900	0.0041–0.2568	1.3	4.1
Protocatechuic acid	18.03	$y = 1.608x - 0.0160$	0.99930	0.0119–0.2368	3.5	11.9
Ferulic acid	20.05	$y = 3.328x - 0.0269$	0.99901	0.0063–0.2384	1.8	6.3
Caffeic acid	22.91	$y = 2.372x - 0.0250$	0.99900	0.0072–0.2456	2.3	7.2
Gallic acid	23.12	$y = 0.147x + 0.0005$	0.96900	0.0598–0.3544	17.9	59.8

LOD: limit of detection; LOQ: limit of quantification.

Table 2  
Method calibration results for individual substances using derivatization by ethyl chloroformate

Compound (methyl ester of)	Retention time (min)	Regression line	Correlation coefficient	Linear range (mg mL <sup>-1</sup> )	LOD (µg mL <sup>-1</sup> )	LOQ (µg mL <sup>-1</sup> )
Vanillic acid	17.14	$y = 1.1201x + 0.00467$	0.99997	0.0198–0.2496	5.8	19.8
<i>p</i> -Coumaric acid	19.54	$y = 4.315x - 0.023$	0.99914	0.0068–0.2416	2.0	6.8
Syringic acid	20.07	$y = 0.808x - 0.0017$	0.99968	0.0295–0.2568	8.8	29.5
Protocatechuic acid	21.03	$y = 0.9529x - 0.0051$	0.99990	0.0238–0.2368	6.1	23.8
Ferulic acid	22.55	$y = 3.067x - 0.0043$	0.99975	0.0111–0.2384	3.0	11.1
Caffeic acid	26.33	$y = 2.225x - 0.0109$	0.99931	0.0130–0.2456	3.8	13.0
Gallic acid	26.97	$y = 0.0896x - 0.00277$	0.99978	0.0709–0.3544	21.4	70.9

LOD: limit of detection; LOQ: limit of quantification.

derivatization under optimal derivatization and chromatographic conditions.

### 3.3. Calibration and repeatability

After the method development and optimization, the method validation was accomplished under the optimal conditions. The calibration data including correlation coefficients, range of linearity, limits of quantitation (LOQ) and detection (LOD) as well as repeatability values are summarized in Tables 1–4. The values of correlation coefficients of all determined phenolic acids for both MCF and ECF derivatization make minimally 0.999, with the exception of gallic acid with 0.969 value for MCF reaction. This can be explained by low recovery and unsatisfactory

sensitivity of investigated method for this substance. The peak resolutions of all substances were sufficient, except of gallic and caffeic acids which were problematically separated. However, after the optimization of chromatographic conditions, finally good resolution of both peaks was reached (1.95).

Table 3 shows average data of peak area repeatability expressed as the relative standard deviation (%R.S.D.) acquired within 1 day (intraday repeatability) and within 3 different days (interday repeatability) by both methyl and ethyl chloroformate derivatization process. The repeatability gives in most cases less than 2% with some exceptions where the R.S.D. values moderately exceed 2%. Due to the unsatisfactory calibration data of gallic acid in MCF derivatization, the repeatability for this compound was not defined.

Table 3  
Peak area repeatability of individual phenolic acid esters

Compound	<i>c</i> (mg mL <sup>-1</sup> )	Repeatability				
		MCF		ECF		SPME
		Intraday (%R.S.D.)	Interday (%R.S.D.)	Intraday (%R.S.D.)	Interday (%R.S.D.)	Interday (%R.S.D.)
Vanillic acid	0.2496	1.00	1.46	2.53	2.06	11.42
<i>p</i> -Coumaric acid	0.2416	1.89	1.99	2.01	1.86	9.78
Syringic acid	0.2568	0.27	1.31	1.59	2.03	11.21
Protocatechuic acid	0.2368	1.98	1.89	0.13	0.74	11.19
Ferulic acid	0.2384	1.98	2.04	1.52	1.85	10.52
Caffeic acid	0.2456	0.47	0.64	1.18	1.15	16.91
Gallic acid	0.3544	nd	nd	0.10	0.36	17.89

MCF: methyl chloroformate derivatization; ECF: ethyl chloroformate derivatization; R.S.D.: relative standard deviation; nd: not defined.

Table 4

The comparison of results of GC analyses without and after SPME (optimal chromatographic conditions, SPME-PA fibre, 25 °C, 50 min extraction)

Compound (methyl ester of)	Without SPME		After SPME	
	LOD ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	LOD ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
Vanillic acid	1.9	6.2	0.06	0.20
<i>p</i> -Coumaric acid	0.6	1.9	0.01	0.02
Syringic acid	1.3	4.3	0.06	0.20
Protocatechuic acid	3.5	11.7	0.18	0.59
Ferulic acid	1.8	6.1	0.05	0.17
Caffeic acid	2.3	7.7	0.13	0.45
Gallic acid	17.9	59.8	1.77	5.91

LOD: limit of detection; LOQ: limit of quantitation.

According to the calibration and repeatability data, shorter time of analysis and lower side products formation, the derivatization treated by MCF was found more suitable for further experiments with solid phase microextraction (SPME).

The LOD, LOQ and repeatability values of SPME method are expressed in Tables 3 and 4. The involvement of an SPME resulted in the decline of repeatability, which gets around 11%, with exceptions of caffeic and gallic acids showing worse results (16.91 and 17.89%, respectively). On the other hand, the SPME has increased the method sensitivity at about one order of magnitude (Table 4).

### 3.4. Solid phase microextraction

Our first SPME experiments were carried out with the medium-polar CAR/PDMS fibre. Originally, the extraction was performed in the aqueous solution of phenolic acid methyl esters. The derivatization was carried out by the same procedure as it was mentioned in Section 2, but with minor modifications: instead of 1 mL of chloroform and 1 mL of  $1 \text{ mol L}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$  solution in the original reaction conditions, 2 mL of  $\text{NaHCO}_3$  solution was added without any addition of an organic solvent (chloroform), so that the newly formed esters occurred in the aqueous solution and not in the organic layer. The presence of the esters in the organic solvent would cause a continuous elution of extracted compounds from the fibre with current damage of the fibre coating which is not recommended to be exposed to chlorinated solvents. Nevertheless, these conditions seemed not to be suitable because of occurrence of many small peaks and the missing peak of gallic acid methyl ester on the chromatogram, which might have been caused by a rapid decomposition of newly formed methyl esters in presence of big amount of hydrogencarbonate. Esterification is a reversible reaction and the hydrogencarbonate surrounding supports the reverse hydrolysis of arisen esters. Therefore only 2 mL of water were added, without any addition of hydrogencarbonate, which finally resulted in seven single peaks with retention times exactly corresponding to those obtained in the original analysis (without SPME). All fibres were tested afterwards, firstly the CAR/PDMS fibre and later on the PDMS/DVB, PDMS and PA fibres. The time of extraction, temperature and time of desorption were optimized for all fibres with the exception of PDMS fibre because of evident unsuitability of this sorbent for the extraction of phenolic

acid methyl esters, presumably due to high affinity of the analytes toward the matrix solution and not toward the non-polar PDMS coating.

The optimization of time of extraction was performed by prolonging the extraction time from 30 min up to 60 min. The temperature optimization was accomplished by increasing the temperature of water bath from ambient temperature (25 °C) up to 50 °C. Concerning the effect of desorption time, three times (8, 10 and 12 min) were checked out and the 10-min desorption was found as optimal. After all experiments the dependences of individual parameters (temperature/peak area, time/peak area) for each phenolic acid were evaluated and expressed in simple graphs (Figs. 3 and 4). The chromatogram of separation of phenolic acid methyl esters after pre-treatment by the PA fibre under optimal conditions is shown in Fig. 5.

In all fibres, by prolonging the extraction time, responses increased with maximum peak areas at 50 min extraction. When longer extraction (60 min) was performed, the peak areas decreased, which might be caused by back loosening of bound methyl esters from the fibre into the solution after reaching the equilibrium at approximately 50 min extraction time.

Concerning the temperature optimization, a significant negative effect of growing temperature on the peak areas was observed. With increasing temperature the distribution coefficient decreases, which is attended by fasting of extraction kinetics but also lowering of sensitivity. The extraction equilibrium is drifted toward the sample solution and not toward the fibre sorbent. In addition, the volatile methyl esters can slightly evaporate above the surface while their concentration in the solution moderately descends. Higher temperature combined with shorter time also resulted in unwanted lower recovery. In all cases, either ambient temperature (25 °C) or 30 °C were defined as optimal.

It is obvious from the diagrams in Figs. 3 and 4 that the highest response was observed at the most polar PA fibre, namely in case of *p*-coumaric, ferulic and syringic acid. The second most suitable fibre seemed to be the mid-polar CAR/PDMS one, also providing satisfactory extraction efficiency, in comparison with the non-polar PDMS/DVB fibre giving worse results. The non-polar PDMS sorbent is completely inappropriate for the extraction of these compounds and therefore these experiments are not covered in the graphic diagrams. A small exception of all phenolic acids is vanillic acid, showing slightly different

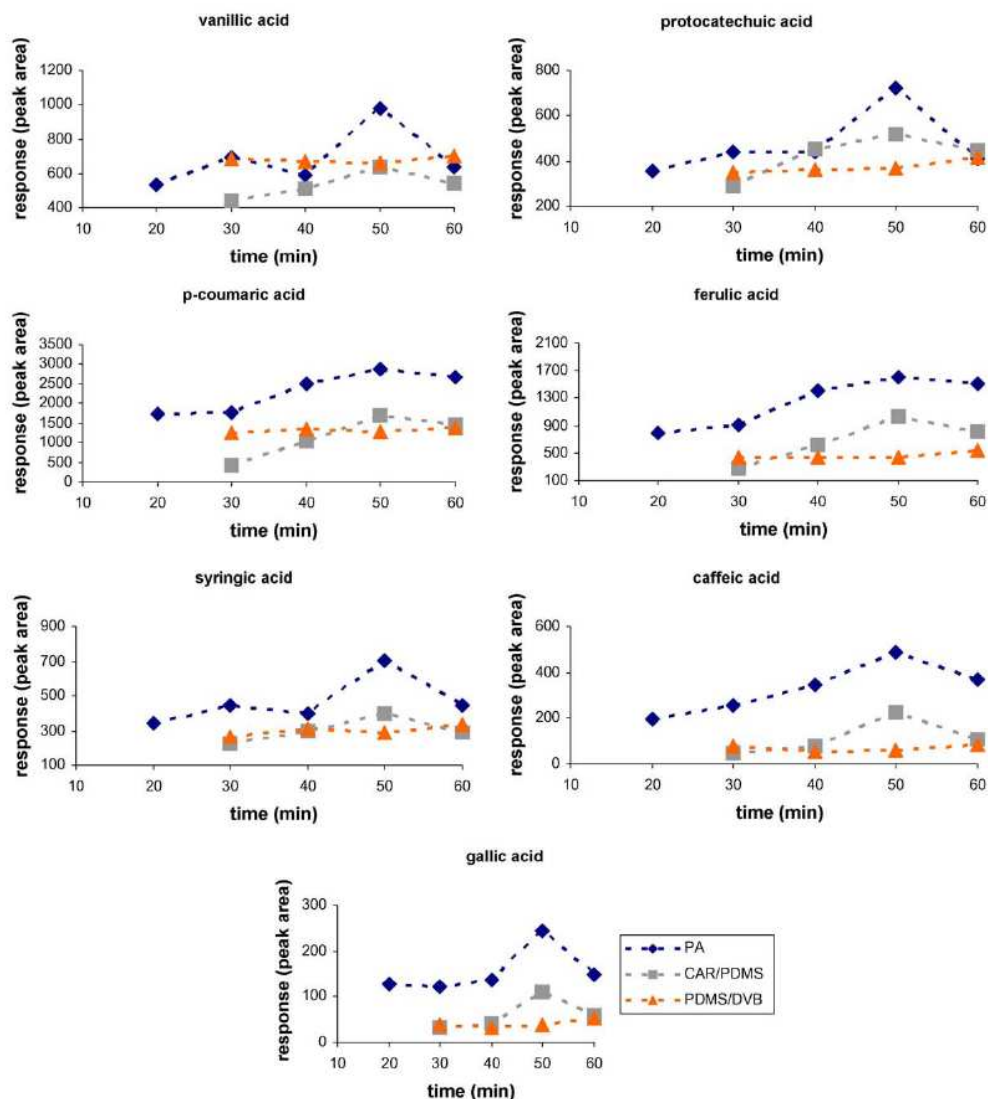


Fig. 3. Extraction time–peak area interaction plots of all target methyl esters ( $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$  concentration of the standard solution). *Note:* there is no function relationship between the points. The dashed lines serve only for illustration of the extraction time profile of each compound and tested fibre.

behaviour within the used sorbents. Surprisingly, the mid-polar PDMS/DVB fibre gives quite nice results with vanillic acid methyl ester, probably due to the lowest polarity of this compound among others and its higher affinity to less polar sorbents.

As it follows from the obtained data of optimal analysis, individual substances are not absorbed on the PA fibre in the same extent. Concerning the sorption rate of studied compounds, an obvious dominant absorption of *p*-coumaric and ferulic acid methyl esters was observed. These compounds are well absorbed into the porous structure of the sorbent and have high affinity toward the coating. Vanillic, syringic, protocatechuic and caffeic acid methyl esters have comparable but lower affinity to the sor-

bent, whereas the worst extraction results of gallic acid methyl ester were observed.

Finally, the approximate extraction efficiency, expressing the rate of concentration effect, was calculated as a comparison of analyses without and after SPME, using standard solutions of the same concentration of analyzed compounds. The comparison of detection and quantitation limits gained in the analyses without SPME and after SPME is demonstrated in Table 4. Although the detection and quantitation limits of both analytical procedures (without and after SPME) seem not to be excellent, the values obtained after SPME represent significant increase of method sensitivity supported by the LOD and LOQ values mentioned



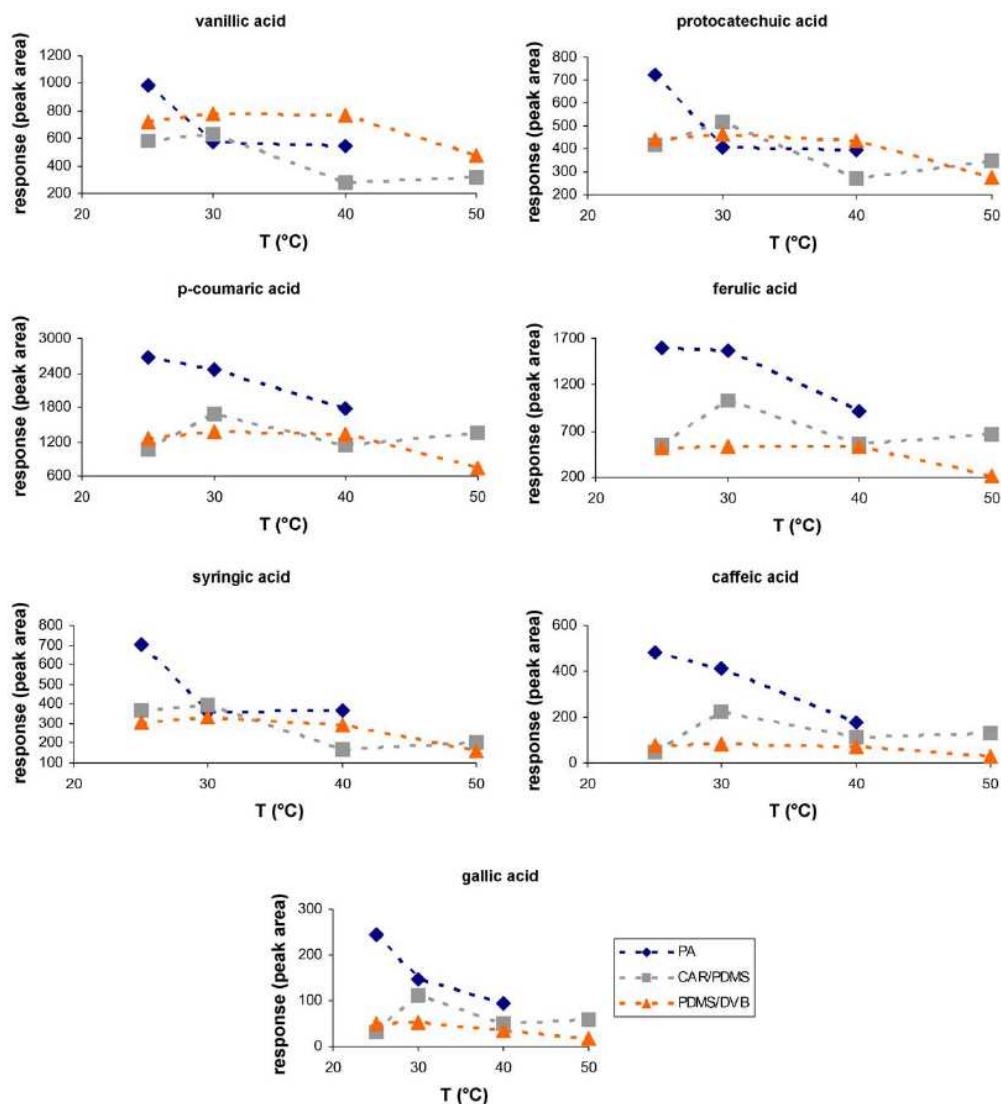


Fig. 4. Extraction temperature–peak area interaction plots for all target methyl esters ( $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$  concentration of the standard solution). *Note:* there is no function relationship between the points. The dashed lines serve only for illustration of the extraction temperature profile of each compound and tested fibre.

in Table 4. The best results were reached in *p*-coumaric, ferulic, vanillic and syringic acids with LOQ values after SPME  $0.02$ ,  $0.17$ ,  $0.2$  and  $0.2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. This might be optimistic for potential target of utilizing the SPME method for extracting of desirable analytes from complex natural material (e.g. wine, honey) before GC analysis. However, in this case there would be supposed a need of another pre-concentration and selective technique (LLE, SPE) before the derivatization and SPME, not only because of low sensitivity of presented method, but also due to the presence of many interfering compounds with similar structural and chemical properties (free acids, flavonoids, other polar substances), which would be extracted from the natu-

ral matrix simultaneously with our target compounds. Low levels of phenolic acids in these materials also cannot be neglected; conversely they often complicate the experiment.

Nevertheless, the method sensitivity is also limited by the use of flame-ionisation detector which is considered to be not optimally sensitive in contrast to other detection techniques suitable for trace analysis, such as electron-capture detector or mass spectrometric one. Though, the use of ECD is usually confined to the determination of halogenated substances which are not recommended to be extracted on SPME sorbents and therefore an employment of MS detection would be highly beneficial.

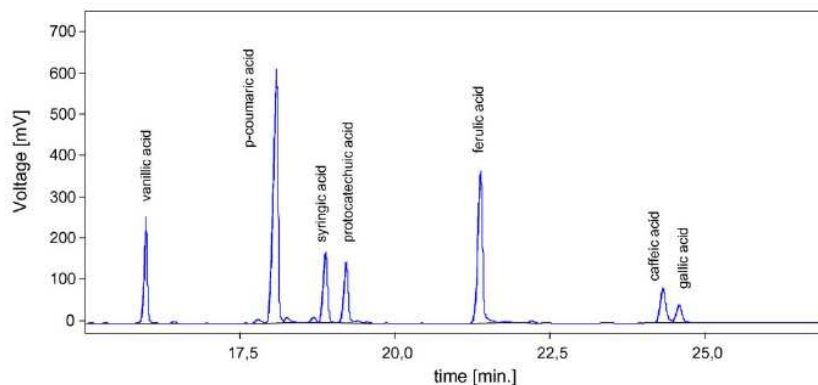


Fig. 5. The chromatogram of separation of phenolic acid methyl esters after SPME with the PA fibre under optimal conditions (50 min, 25 °C).

#### 4. Conclusion

Phenolic acids represent an important group of naturally occurring antioxidants ubiquitously present in foods of plant origin. Their indisputable protective and antioxidant properties following from many publications call on a deeper survey of these substances as well as on the searching for suitable analytical methods. In the present study, an original and simple derivatization technique for the gas chromatographic analysis of phenolic acids was modified and optimized using methyl- and ethyl chloroformate as the derivatization agent in order to get volatile methyl esters possible to be analyzed by the means of gas chromatography. As it followed from the experiments, the derivatization treated by methyl chloroformate seemed to be more convenient method and it was used for further work dealing with the solid phase microextraction (SPME) of phenolic acid methyl esters.

The second task of the presented work was to find an optimal SPME fibre and appropriate extraction conditions for the pre-concentration of studied compounds by the modern SPME method. The polyacrylate sorbent used under optimal conditions (50 min, 25 °C, 10 min desorption) showed the best results above all other occasions and significant concentration effect was achieved (concretely for *p*-coumaric acid methyl ester). The obtained results indicate a possible future utilization of the developed derivatization–SPME–GC technique for the processing of complex natural matrices with high content of phenolic compounds.

#### Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Grant Agency of Charles University (GAUK 296/2005) and the Grant Agency of Czech Ministry of Education (MSM 0021620822).

#### References

[1] P.C.H. Hollman, M.B. Katan, *Biomed. Pharmacother.* 51 (1997) 305.

- [2] P.M. Kris-Etherton, K.D. Hecker, A. Bonanome, S.M. Coval, A.E. Binkoski, K.F. Hilpert, A.E. Griel, T.D. Etherton, *Am. J. Med.* 113 (2002) 71S.
- [3] H. Taipero, K.D. Tew, G. Nguyen Ba, G. Mathé, *Biomed. Pharmacother.* 56 (2002) 200.
- [4] A. King, G. Young, *J. Am. Diet. Assoc.* 99 (1999) 213.
- [5] K.A. Steinmetz, J.D. Potter, *J. Am. Diet. Assoc.* 96 (1996) 1027.
- [6] W.J. Craig, *J. Am. Diet. Assoc.* 97 (Suppl. 2) (1997) S199.
- [7] J. Wollgast, E. Anklam, *Food Res. Int.* 33 (2000) 449.
- [8] M. Waksmundzka-Hajnos, *J. Chromatogr. B* 717 (1998) 93.
- [9] S.M. Fiuzza, C. Gomes, L.J. Teixeira, M.T. Girao da Cruz, M.N.D.S. Cordeiro, N. Milhazes, F. Borges, M.P.M. Marques, *Bioorg. Med. Chem.* 12 (2004) 3581.
- [10] R. Tsao, Z. Deng, *J. Chromatogr. B* 812 (2004) 85.
- [11] F. Buiarelli, G. Cartoni, F. Coccioli, Z. Levetsovitou, *J. Chromatogr. A* 695 (1995) 229.
- [12] R.J. Robbins, S.R. Bean, *J. Chromatogr. A* 1038 (2004) 97.
- [13] S. Shahrzad, I. Bitsch, *J. Chromatogr. A* 741 (1996) 223.
- [14] Y. Zuo, H. Chen, Y. Deng, *Talanta* 57 (2002) 307.
- [15] O. Negishi, T. Ozawa, *J. Chromatogr. A* 756 (1996) 129.
- [16] K. Glowniak, G. Zgórká, M. Kozyra, *J. Chromatogr. A* 730 (1996) 25.
- [17] M.V. Martínez-Ortega, M.C. García-Parrilla, A.M. Troncoso, *Anal. Chim. Acta* 502 (2004) 49.
- [18] A. Schieber, P. Keller, R. Carle, *J. Chromatogr. A* 910 (2001) 265.
- [19] R. Hamoudová, M. Urbánek, M. Pospíšilová, M. Polásek, *J. Chromatogr. A* 1032 (2004) 281.
- [20] M. Scampicchio, J. Wang, S. Mannino, M.P. Chatrathi, *J. Chromatogr. A* 1049 (2004) 189.
- [21] M. Packert, H. Steinhart, *J. Chromatogr. Sci.* 33 (1995) 631.
- [22] D. Heimler, A. Pieroni, *Chromatographia* 38 (1994) 475.
- [23] P. Hušek, *Chromatographia* 34 (1992) 621.
- [24] R. Christov, V. Bankova, *J. Chromatogr.* 623 (1992) 182.
- [25] P. Mejanelle, J. Bleton, S. Goursaud, A. Tchaplá, *J. Chromatogr. A* 767 (1997) 177.
- [26] I.G. Zenkevich, in: J. Cases (Ed.), *Encyclopedia of Chromatography*, Marcel Dekker Inc., New York, 2001, pp. 221–224, 237–240.
- [27] R.J. Wells, *J. Chromatogr. A* 843 (1999) 1.
- [28] T.-Y. Chu, Ch.-H. Chang, Y.-Ch. Liao, Y.-Ch. Chen, *Talanta* 54 (2001) 1163.
- [29] P. Hušek, *J. Chromatogr.* 547 (1991) 307.
- [30] Y.C. Fiamegos, Ch.G. Nanos, J. Vervoort, C.D. Stalikas, *J. Chromatogr. A* 1041 (2004) 11.
- [31] Y. Amakura, M. Okada, S. Tsuji, Y. Tonogai, *J. Chromatogr. A* 891 (2000) 183.
- [32] G. Zgórká, K. Glowniak, *J. Pharmaceut. Biomed.* 26 (2001) 79.
- [33] M. del Álamo, L. Casado, V. Hernández, J.J. Jiménez, *J. Chromatogr. A* 1049 (2004) 97.

- [34] D. Štěrbová, D. Matějčíček, J. Vlček, V. Kubáň, *Anal. Chim. Acta* 513 (2004) 435.
- [35] J. Pawliszyn, *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*, Wiley, New York, 1997.
- [36] Proceedings of the International Conference on Harmonization (ICH), Q2A: Text on Validation of Analytical Procedures, vol. 60, US FDA Federal Register, March 1995, p. 11260.
- [37] Proceedings of the International Conference on Harmonization (ICH), Q2B: Validation of Analytical Procedures: Methodology, vol. 62, US FDA Federal Register, March 1997, p. 27463.
- [38] S.G. Villas-Boas, D.G. Delicado, M. Akesson, J. Nielsen, *Anal. Biochem.* 322 (2003) 134.
- [39] C. Haberhauer-Troyer, G. Álvarez-Llamas, E. Zitting, P. Rodríguez-González, E. Rosenberg, A. Sanz-Medel, *J. Chromatogr. A* 1015 (2003) 1.
- [40] L. Yang, R.E. Sturgeon, S. McSheehy, Z. Mester, *J. Chromatogr. A* 1055 (2004) 177.
- [41] P. Hušek, H.M. Liebich, *J. Chromatogr. B* 656 (1994) 37.
- [42] P. Hušek, P. Šimek, E. Tvrzická, *Anal. Chim. Acta* 465 (2002) 433.
- [43] T. Herraiz, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 483.
- [44] S. Butz, H.-J. Stan, *J. Chromatogr.* 643 (1993) 227.
- [45] T. Herraiz, F. Sanches, *J. Chromatogr. A* 765 (1997) 265.
- [46] P. Hušek, *J. Chromatogr.* 630 (1993) 429.
- [47] A.P.J.M. DeJong, C.A. Cramers, *J. Chromatogr.* 276 (1983) 267.

## 5.4 Příloha 2

### **Characterization of several hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars based in chemical, fatty acid and sterol composition**

Joana S. Amaral, Susana Casal, Ivana Citova, Alberto Santos, Rosa M. Seabra, Beatriz P. P. Oliveira

*European Food Research and Technology* 222 (2006) 274–280

Joana S. Amaral · Susana Casal · Ivana Citová ·  
Alberto Santos · Rosa M. Seabra ·  
Beatriz P. P. Oliveira

## Characterization of several hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars based in chemical, fatty acid and sterol composition

Received: 25 February 2005 / Published online: 21 September 2005  
© Springer-Verlag 2005

**Abstract** Nineteen cultivars of hazelnuts (*Corylus avellana* L.) collected during the 2001 crop, from Vila Real, Portugal, were analysed for chemical composition, including moisture, total oil content, crude protein, ash, carbohydrates and nutritional value. Fat was the predominant component, ranging from 59.3 to 69.0%. Total oil was extracted and analysed for fatty acid and sterol compositions and oxidative stability. Fatty acid and sterol compositions were determined by Gas–Liquid Chromatography coupled to a Flame Ionisation Detector (GLC/FID). Monounsaturated fatty acids, particularly oleic acid, were predominant (78.7–84.6%). Total phytosterol content ranged from 133.8 to 263.0 mg/100 g of oil. Among the nine sterols identified and quantified,  $\beta$ -sitosterol was the major one with a mean percentage of 83.6%, while  $\Delta^5$ -avenasterol and campesterol were the second and the third components of the group with mean values of 6.1 and 5.8%, respectively. Since hazelnut oil can be used in olive oil adulteration, the values obtained were compared with published mean values of olive oils from different geographical origins.

**Keywords** *Corylus avellana* L. · Hazelnut oil · Nutritional value · Chemical composition · Fatty acid composition · Sterol composition · Olive oil

### Introduction

Populations from Mediterranean countries, when compared with those from US and northern Europe, present lower mortality rates from coronary heart disease (CHD) and cancer, which could be related to the consumption of the typical Mediterranean diet [1, 2]. This diet is low in meat and higher in fish, fruits and vegetables, also having nuts as valuable components. Although nuts are rich in fat, they are generally low in saturated fatty acids (SFA) and high in monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated (PUFA) fatty acids. There is evidence that a MUFA rich diet can lower the risk on CHD and also has preventive effects on atherosclerosis [3–5]. There is also a growing interest in evaluating nut's role in a heart-healthy diet and several studies have been made supporting a role for nuts in reducing CHD risk [2, 6–8].

Among nut species, hazelnuts are widely appreciated. Besides being consumed as a fruit they are mainly used as an ingredient in confectionary products, as raw materials for pastry and chocolate industry, and also add flavour and texture to an increasing variety of sweet and savoury food products such as bakery, cereal and dessert formulations [9]. Hazelnuts are about 60% fat (fresh weight) with oleic acid being the major fatty acid. Besides a favourable fatty acid profile, hazelnuts are rich in phytosterols, which are known for their ability in reducing blood cholesterol, but have also been reported to have anticancer and immune system modulating properties [10–13].

The possibility of using hazelnut oil in adulteration of olive oil is another issue of current interest [14–22]. In fact, adulteration of virgin olive oil with other cheap vegetable oils has frequently represented a problem for regulatory agencies, oil suppliers and consumers. Assessment of authenticity of vegetable oils in the food industry involves many tests, being the analysis of fatty

J. S. Amaral · R. M. Seabra (✉)  
REQUIMTE, Serviços de Farmacognosia, Universidade do Porto,  
R. Aníbal Cunha, 164,  
4099-030 Porto, Portugal  
e-mail: rseabra@ff.up.pt  
Tel.: +351-222078934  
Fax: +351-222003977

J. S. Amaral  
Escola Superior de Tecnologia e de Gestão, Instituto Politécnico de Bragança, Quinta de Sta. Apolónia,  
Apartado 134,  
5301-857 Bragança, Portugal

S. Casal · I. Citová · B. P. P. Oliveira  
REQUIMTE, Bromatologia, Faculdade de Farmácia,  
Universidade do Porto,  
R. Aníbal Cunha, 164,  
4099-030 Porto, Portugal

A. Santos  
Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro,  
5001-911 Vila Real, Portugal

acids and sterol compositions currently used [23–26]. Since hazelnut and olive oils have similar lipidic compositions, adulterations are difficult to detect. Fatty acids [20], triacylglycerols [15, 20], sterols [15, 18], tocopherols [15] and polar components [21] have already been used with this purpose.

As the cultivar and geographical origin are important factors that can influence compositional values [27–30] it is important to characterize (qualitatively and quantitatively) hazelnut oil composition in order to draw up profiles that will not only bring more information in what hazelnut oil composition is concerned, but can also be used in future works concerning virgin olive oil adulterations. As possible, comparisons of hazelnut and olive oils are discussed.

In this study, 19 cultivars of hazelnuts growing in the same experimental orchard and subjected to the same agricultural practices were analysed. In this way, any variability found among the samples can be attributed to the influence of the cultivar. Samples were analysed for total fat, moisture, crude protein, ash, carbohydrates and oxidative stability. The chemical study was extended to 15 fatty acids and 9 phytosterols. Some works have already been published concerning some of the parameters studied in the work herein, but some reported only mean values without referring the cultivars under study [23, 26, 31, 32], other works studied different cultivars [27, 28, 30, 33] and other studied a reduced number of cultivars [34–38]. As far as we know, this is the first report on hazelnut cultivars grown in Portugal and nine of the cultivars were now studied for the first time.

## Materials and methods

### Chemicals

The standard mixture of 37 FAMES and the fatty acid isomers *cis*-9-*trans*-12-octadecadienoate (C18:2 $\omega$ 6 $ct$ ), *trans*-9-*cis*-12-octadecadienoate (C18:2 $\omega$ 6 $tc$ ) and *cis*-11-octadecenoate (C18:1 $\omega$ 7) were all purchased from Supelco (Bellefont, PA, USA). Betulin, cholestanol, cholesterol, campesterol, stigmaterol,  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitostanol, 1-methylimidazole and boron trifluoride methanol solution, 14% (BF<sub>3</sub>) were all from Sigma (St. Louis, MO, USA). *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)-hepta-fluorobutyramide (MSHFBA) was obtained from Macherey-Nagel (Düren, Germany).

### Samples

Nineteen hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars (Butler, Campanica, Cosford, Couplat, Daviana, Ennis, Fertille de Coutard, Grossal, Gunsbert, Lansing, Longa d'Esanha, Merveille de Bolwiller, Morell, Negreta, Pautet, Round du Piemont, Santa Maria de Jesus, Segorbe and Tonda de Giffoni) were studied. An experimental plantation was established in March 1984, in Vila Real, in the northeastern region of Portugal (41°19'N, 7°44'W, 470 m

elevation). The trees were planted at a 5×3 m spacing with no pruning, in a completely randomised design for fruit sampling. The hazelnuts were harvested in the crop year 2001 (September) and a final sample of about 2 kg was randomly taken. After harvest, hazelnut fruits were dried at ambient temperature in the dark. The fruits were stored in shell, closed in plastic bags, flushed with nitrogen, and frozen to -20 °C, until the analyses.

### Sample preparation

Before chemical analysis the hazelnuts were manually cracked and shelled, and then chopped in a 643 MX coffee mill (Moulinex, Spain). Crude oil was obtained from finely chopped nuts (ca. 15 g) extracted with light petroleum ether (b.p. 40–60 °C) in a Soxhlet apparatus; the remaining solvent was removed by vacuum distillation. The extracted oil was stored at 4 °C in tubes with anhydrous sodium sulphate, protected from light with aluminium foil and flushed with nitrogen.

### Chemical analysis

Moisture, total fat, ash and protein contents analysis were carried out in duplicate. Moisture was determined at 100±2 °C (ca. 5 g test sample) using an SMO 01 infrared moisture balance (Scaltec, Goettingen, Germany). Ash, crude protein ( $N \times 5.3$ ) and total fat contents were determined according to AOAC Official Methods [39]. The percentage of total carbohydrates was calculated subtracting the total percentage of the other components from 100. Energy was expressed as kcal, using the factors proposed by Greenfield and Southgate [40].

### Oxidative stability (OS)

The oxidation induction time was measured on a Rancimat apparatus (Metrohm CH series 679, Herisau, Switzerland). A flow of air (20 l/h) was bubbled through the oil (ca. 3.0 ml) heated at 110±0.2 °C. The volatile oxidation products released were led into a conductimetric cell containing water, while the change of conductivity of the solution was plotted on a graph. OS was determined as the time taken to reach the conductivity inflection point, and recorded as the induction time (IT).

### Fatty acid composition

Fatty acids were determined by GLC/FID/capillary column using the same methodology as Amaral et al. [41]. Fatty acids were measured as their methyl esters after hydrolysis with a 11 g/l methanolic potassium hydroxide solution, methyl esterification with BF<sub>3</sub>/MeOH and extraction with *n*-heptane. The analysis was carried out on a Chrompack CP 9001 chromatograph (Chrompack, Middelburg, The

Netherlands) equipped with a split-splitless injector, a FID and a Chrompack CP-9050 autosampler. The temperatures of the injector and detector were 230 °C and 270 °C, respectively. Separation was achieved on a 50 m×0.25 mm i.d. fused silica capillary column coated with a 0.19 µm film of CP-Sil 88 (Chrompack, Middelburg, The Netherlands). The column temperature was 160 °C held for 1 min, and then programmed to increase to 239 °C at a rate of 4 °C/min and then held for 10 min. Helium was used as carrier gas at an internal pressure of 120 kPa. The split ratio was 1:50 and the injected volume was 1.2 µl. The results are expressed in relative percentage of each fatty acid, calculated by internal normalization of the chromatographic peak area. Fatty acids were identified by comparing the relative retention times of FAMES peaks from samples with standards.

#### Sterol composition

Sterol composition was evaluated by GLC/FID/capillary column following the NP EN ISO 12228 method [42]. Briefly, after addition of 1.0 ml of internal standard solution (betulin 1.0 mg/ml) ca. 250 mg of oil was saponified with an ethanolic potassium hydroxide solution; the unsaponifiable fraction was isolated by solid phase extraction on an aluminium oxide column and the steroid fraction was obtained after TLC with *n*-hexane/diethyl ether 1:1 (v/v) as developing solvent and a methanol spray to visualize the band. The trimethylsilyl ethers were obtained by the addition of 1-methylimidazole and MSHFBA. The sterol profile was analysed on the same equipment used for fatty acid analysis, with a 30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm DB-5MS column (J & W Scientific, Folsom, CA, USA) with

a maximum operating temperature of 325 °C. The temperature of the injector and the detector were both 320 °C. The column temperature was 250 °C and programmed to increase at a rate of 2 °C/min to 300 °C and then held for 12 min. The carrier gas used was helium at an internal pressure of 100 kPa. The split ratio was 1:50 and the injected volume was 1.5 µl. Total sterol content was determined considering all peaks of sterols eluted between cholesterol and  $\Delta^7$ -avenasterol. Identification was achieved by comparing the relative retention times from samples with those obtained with standards. Clerosterol,  $\Delta^5$ -avenasterol,  $\Delta^7$ -stigmastanol and  $\Delta^7$ -avenasterol were tentatively identified by comparison with references [23, 26, 41] and with samples of olive and sunflower oils.  $\beta$ -Sitosterol and  $\Delta^5$ -avenasterol eluted very close and therefore were quantified as  $\Delta^5$ -avenasterol.

#### Results and discussion

The proximate composition results and caloric value of the studied samples are showed in Table 1. Fat was the predominant component with a mean value of (64.0%) and ranging from 59.3% in *cv*. Merveille de Bollwiller to 69.0% in *cv*. Negreta. The cultivars grown in Portugal, generally presented higher values for fat content when compared to the average values of hazelnuts grown in Spain (56.1%) [32], in New Zealand (58.4%) [33] and in Turkey (59.8%) [9], but identical values to hazelnuts grown in Italy (64.1%) [36]. As already pointed out, several factors can be responsible for these variations, besides the nature of the cultivar. To illustrate this, we can point the differences registered between the oil contents of *cv*s. Butler, Campanica, Ennis and

**Table 1** Proximate chemical composition (g/100 g fresh weight) of 19 hazelnut cultivars grown in Portugal (mean±SD)

Cultivar	Moisture	Crude protein	Lipid	Ash	Carbohidrates	Energy (kcal)
Butler	4.36±0.04	11.27±0.08	61.79±1.90	2.72±0.02	19.86±1.54	681
Campanica	4.68±0.09	10.80±0.20	64.95±0.25	2.74±0.02	16.83±0.37	695
Cosford	4.52±0.23	10.20±0.01	61.96±0.07	2.59±0.02	20.73±0.22	681
Couplat	3.75±0.09	9.90±0.07	67.00±0.22	2.44±0.03	16.91±0.38	710
Daviana	5.35±0.06	11.37±0.06	60.92±0.07	2.90±0.00	19.47±0.07	672
Ennis	6.43±0.04	9.48±0.07	60.19±0.08	2.80±0.09	21.11±0.07	664
F. Coutard	6.29±0.16	10.89±0.09	62.67±0.23	2.69±0.08	17.46±0.37	677
Grossal	5.20±0.17	9.57±0.03	65.29±0.17	2.53±0.08	17.41±0.39	696
Gunsbert	5.85±0.19	12.62±0.16	60.16±0.51	3.39±0.06	17.99±0.82	664
Lansing	4.89±0.05	10.09±0.10	63.05±0.02	2.82±0.01	19.15±0.10	684
L. Espanha	3.79±0.08	10.27±0.00	65.39±0.14	2.62±0.01	17.93±0.06	701
M. Bollwiller	4.61±0.10	12.69±0.06	59.25±0.16	3.06±0.05	20.39±0.02	666
Morell	4.12±0.21	10.83±0.01	64.77±0.09	2.42±0.06	17.87±0.23	698
Negreta	3.46±0.20	10.58±0.03	69.03±0.19	2.43±0.01	14.50±0.28	722
Pauetet	5.62±0.27	10.72±0.08	65.65±0.13	2.57±0.00	15.45±0.09	695
R. Piemont	4.19±0.04	10.93±0.06	66.69±0.01	2.40±0.02	15.79±0.01	707
Segorbe	4.85±0.19	12.38±0.05	63.02±0.32	2.57±0.01	17.19±0.31	685
St. M. Jesus	4.39±0.09	12.40±0.04	68.30±1.48	2.81±0.01	12.09±1.41	713
T. Giffoni	6.30±0.04	9.34±0.17	65.30±0.05	2.63±0.05	16.44±0.18	691
Mean	4.87	10.86	63.97	2.69	17.61	689.57
Range	3.5–6.4	9.3–12.7	59.2–69.0	2.4–3.4	12.1–21.1	664–722

Table 2 Fatty acid composition (%) and oxidative stability (h) of oil extracted from analysed walnut samples (mean±SD)

Cultivar	C14:0	C15:0	C16:0	C17:0	C18:0	C18:1n7	C18:2n6	C18:3n3	C22:0	C21:0n7	SFA	MUFA	PUFA	O.S. (h)	
Baker	0.03±0.00	0.01±0.00	5.84±0.01	0.20±0.00	0.04±0.00	0.07±0.00	3.05±0.00	0.14±0.01	0.18±0.00	0.73±0.00	0.04±0.00	9.15	81.65	9.20	15.3
Campanica	0.03±0.00	0.01±0.00	5.02±0.01	0.16±0.00	0.05±0.00	0.08±0.00	2.74±0.00	0.13±0.01	0.13±0.00	0.16±0.00	0.05±0.00	8.01	84.59	7.37	9.7
Conford	0.03±0.00	0.01±0.00	5.55±0.03	0.19±0.00	0.05±0.00	0.07±0.00	2.81±0.00	0.13±0.00	0.10±0.00	0.16±0.00	0.05±0.00	8.61	82.77	8.59	13.7
Couplat	0.03±0.00	0.01±0.00	5.41±0.01	0.20±0.00	0.04±0.00	0.07±0.00	2.87±0.00	0.12±0.00	0.12±0.00	0.16±0.00	0.04±0.00	8.50	83.27	8.20	14.5
Deviana	0.03±0.00	0.01±0.00	5.32±0.01	0.18±0.00	0.04±0.00	0.07±0.00	2.69±0.01	0.14±0.00	0.14±0.00	0.17±0.01	0.08±0.01	8.26	82.40	9.34	16.3
Fernis	0.03±0.00	nd	6.05±0.01	0.22±0.00	0.05±0.00	0.08±0.00	2.82±0.01	0.13±0.01	0.13±0.00	0.13±0.00	0.04±0.00	9.11	82.41	8.48	16.2
F. Couard	0.04±0.00	0.01±0.00	5.38±0.01	0.21±0.00	0.04±0.00	0.08±0.00	2.70±0.00	0.15±0.01	0.12±0.00	0.17±0.00	0.07±0.00	7.83	80.67	11.48	8.9
Grossi	0.03±0.00	0.01±0.00	5.71±0.01	0.24±0.00	0.04±0.00	0.07±0.00	2.76±0.01	0.13±0.00	0.15±0.00	0.16±0.01	0.10±0.00	8.73	83.91	7.30	15.1
Gunsbert	0.03±0.00	0.01±0.00	5.97±0.03	0.22±0.00	0.06±0.00	0.08±0.00	3.70±0.00	0.14±0.01	0.17±0.00	0.17±0.00	0.07±0.00	9.97	78.65	11.36	10.7
Lansing	0.04±0.00	nd	6.75±0.02	0.25±0.00	0.05±0.01	0.07±0.00	2.77±0.00	0.17±0.03	0.15±0.00	0.12±0.00	0.10±0.01	9.79	81.79	8.35	13.0
L. Engenha	0.05±0.00	0.02±0.00	5.19±0.01	0.20±0.00	0.04±0.00	0.09±0.00	2.08±0.00	0.17±0.03	0.12±0.00	0.20±0.02	0.12±0.00	7.54	82.59	9.88	15.3
M. Belleville	0.04±0.00	0.01±0.00	5.91±0.31	0.21±0.00	0.05±0.00	0.10±0.00	2.21±0.05	0.14±0.05	0.11±0.00	0.14±0.01	0.11±0.00	8.36	81.66	10.01	14.4
Morell	0.03±0.00	0.01±0.00	4.84±0.01	0.14±0.00	0.05±0.00	0.08±0.00	2.81±0.00	0.13±0.00	0.13±0.00	0.18±0.01	0.10±0.00	7.90	83.23	8.84	14.8
Negreta	0.03±0.00	nd	5.31±0.00	0.19±0.00	0.05±0.00	0.08±0.00	2.59±0.00	0.12±0.30	0.10±0.00	0.13±0.00	0.10±0.00	8.12	81.38	10.50	11.9
Pauetet	0.03±0.00	nd	5.82±0.01	0.21±0.00	0.04±0.00	0.07±0.00	2.49±0.01	0.17±0.03	0.12±0.00	0.14±0.00	0.05±0.00	8.53	81.48	10.00	12.7
R. Piemont	0.03±0.00	0.01±0.00	6.02±0.00	0.26±0.00	0.05±0.00	0.09±0.00	3.01±0.00	0.12±0.12	0.13±0.00	0.14±0.00	0.11±0.00	9.26	81.84	8.89	13.4
Sagarbe	0.03±0.00	0.01±0.00	4.99±0.01	0.16±0.00	0.05±0.00	0.07±0.00	2.82±0.01	0.15±0.14	0.12±0.00	0.18±0.01	0.11±0.00	8.05	82.94	8.85	12.5
St. M. Jean	0.04±0.00	nd	5.21±0.01	0.18±0.00	0.06±0.00	0.09±0.00	2.96±0.00	0.13±0.06	0.14±0.00	0.16±0.01	0.11±0.00	8.44	82.70	8.74	13.4
T. Giffoni	0.02±0.00	0.01±0.00	5.14±0.03	0.17±0.00	0.05±0.00	0.08±0.00	2.46±0.00	0.16±0.05	0.12±0.00	0.15±0.01	0.10±0.00	7.81	81.75	10.39	11.4
Mean	0.03	0.01	5.55	0.20	0.05	0.08	2.73	0.13	0.13	0.15	0.10	8.52	82.19	9.25	13.33
Range	0.02-0.05	nd-0.02	4.84-6.75	0.14-0.26	0.04-0.06	0.07-0.10	2.08-3.70	0.11-0.17	0.11-0.17	0.12-0.20	0.08-0.12	7.5-10.0	78.7-84.6	7.3-11.5	8.9-16.3

nd: not detected; O.S.: oxidative stability

Tonda de Giffoni, that in this study showed values of 61.8, 64.9, 60.2 and 65.3%, respectively, while the same cultivars collected during 1995 in New Zealand presented values of 57.1, 56.1, 54.6 and 63.2%, respectively [33]. The caloric value of the studied cultivars was in average 690 kcal/100 g of hazelnuts, confirming that these fruits are a good source of energy.

Table 2 reports the results obtained for fatty acid composition, total saturated fatty acids (SFA), monounsaturated fatty acids (MUFA), polyunsaturated fatty acids (PUFA) and the oxidative stability of the studied cultivars. Fifteen fatty acids were identified in Portuguese samples, among which oleic acid (C18:1n7) was by far the predominant one ranging from 76.7% in cv. Gunsbert to 82.8% in cv. Campanica. The second, third, fourth and fifth acids were always linoleic (C18:2n6), palmitic (C16:0), stearic (C18:0) and vaccenic (C18:1n7) acids with mean values of 9.2, 5.6, 2.7 and 1.4%, respectively. All other acids were present in amounts lower than 1%. The individual fatty acid content was, in general terms, in agreement with those already reported to occur in other hazelnuts cultivars [27–29, 31, 33–36]. As expected, MUFA was the main group of fatty acids. PUFA and SFA contents were in the same order of magnitude, although the percentages of PUFA were slightly higher in almost all the studied cultivars. It has been reported that the ratio of oleic to linoleic acid varies among hazelnut cultivars and that their contents were inversely related [28, 34]. This is reasonably consistent with the results herein reported, since the cvs. Campanica and Grossal were the ones with higher oleic acid and lower linoleic acid contents while cvs. Gunsbert and Fertille de Coutard were the ones with lower oleic and higher linoleic acid contents. However, this relation was not observed for all the cultivars. The ratio oleic to linoleic acid varied from 6.8 to 11.4 and this can really point to different behaviours for the several cultivars studied.

When comparing the fatty acid profile of olive oils from different countries [43–45] with the one herein reported for hazelnuts, they seem to be slightly different since in olive oil the second and third major fatty acids are always palmitic and linoleic acids, while in hazelnut oils this order is the inverted one. Consequently, total SFA content in hazelnuts is lower than in olive oils.

The values obtained for oxidative stability are listed in Table 2 and ranged from 8.9 to 16.3 h. The induction times (IT) obtained with the cultivars grown in Portugal, were higher than those reported for cultivars grown in Spain by Parcerisa et al. (2.8–10.0 h) [37] and by Bonvehí and Coll (4.4–9.6 h) [38], what can be explained by the different temperatures used on the apparatus. No matter what, on comparing the values obtained with the now studied cultivars Couplat (14.5 h), Morell (14.8 h), Negreta (11.9 h) and Pauetet (12.7 h) with the values obtained by Bonvehí and Coll [38] for the same cultivars (9.0, 8.8, 5.7 and 6.9 h, respectively) in both studies cvs. Negreta and Pauetet were the ones with lower stability, and this points to differences in resistance to oxidation among cultivars. Research has shown that IT is related mainly with two parameters: the degree of saturation of the fatty acids present in the oil



(the higher the degree of unsaturation the lower the IT and, consequently, the shelf life), and the presence of natural antioxidants and prooxidants in the oil. On analysing the IT of the samples now studied it can be observed that the obtained values are not strictly related with the PUFA amounts. This may therefore be attributed to variations in the nature and amounts of tocopherols or phytosterols which are known to have some antioxidants properties. For instance, the high IT obtained for *cv. Daviana* may probably be due, at least in part, to an abnormally high amount of phytosterols.

The obtained values for total phytosterol contents in the studied samples were in good agreement with the mean values described for hazelnuts [23, 27]. There were, however, important differences among the studied cultivars, from the lowest content in *cv. Grossal* (133.8 mg/100 g oil) to the highest in *cv. Daviana* (263.0 mg/100 g oil). The identified compounds are listed in Table 3.  $\beta$ -sitosterol was the major sterol found in all cultivars, followed by  $\Delta^5$ -avenasterol and campesterol, approximately in the same order of magnitude. Besides these compounds, cholesterol, stigmasterol, clerosterol and  $\Delta^7$ -avenasterol were also found in all samples. The presence of cholestanol was also checked but it was not detected. Qualitative differences among the studied cultivars were only found for  $\Delta^7$ -stigmasterol that was not detected in four of the cultivars.

Parcerisa et al. [32] studied 17 cultivars grown in USA, and 7 of them (*cvs. T. Giffoni, Segorbe, Negreta, F. Coutard, Daviana, Butler* and *Ennis*) were common with the ones herein studied. In general, the individual and consequently the total phytosterol content were lower (93.9–153.9 mg/100 g of oil) in the cultivars grown in USA than in the same 7 cultivars grown in Portugal and herein studied (163.0–263.0 mg/100 g of oil). When comparing relative

percentages, the cultivars studied by Parcerisa et al. [29] presented higher values for  $\beta$ -sitosterol (85.3–90.8%) than those grown in Portugal (82.1–85.6%). This may be due to the fact that only four sterols were detected and quantified in that work (campesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol and  $\Delta^5$ -avenasterol).

The evaluation of the total sterol content and the sterol profile have already been used as a tool to assess vegetable oils authenticity [15, 16, 23–26, 31, 47, 49], and according to some authors can be a useful tool methods for the control of adulterations of olive oil with hazelnut oil [15, 16]. The adulteration of olive oil with high amounts of hazelnut oil can be checked by the study of the sterol profile. In fact, when comparing hazelnut and olive oils sterol profiles (Tables 3 and 4) important qualitative and quantitative differences can be observed. When taking into account the regulations established by the European Union, the Codex Alimentarius of the FAO/WHO and by the International Olive Oil Council, all of the hazelnut studied samples exceeded the upper limit of 4% established by the EU (Regulation 2568/91/EEC and later amendments) for olive oil campesterol content; besides, hazelnut samples exceeded the established upper limits of cholesterol (0.5%) (except *cvs. Daviana* and *Grossal*) and of  $\Delta^7$ -stigmasterol ( $\leq 0.5\%$ ) (except *cvs. Cosford, Daviana, Ennis, Lansing, L. Espanha, M. Bollwiller* and *Segorbe*). The European Union also establishes that the apparent  $\beta$ -sitosterol content (sum of clerosterol,  $\beta$ -sitosterol,  $\Delta^5$ -avenasterol,  $\beta$ -sitosterol and  $\Delta^{5,24}$ -stigmasterol) in olive oils should be  $\geq 93\%$ , but in the studied hazelnut cultivars those values ranged from 90.0 to 93.5% and only four cultivars were within the limits imposed for olive oils. From the results here reported it seems that the sterol profile allows differentiating between

**Table 3** Sterol content (mg/100 g of oil) of oil extracted from hazelnut samples (mean $\pm$ SD)

Cultivar	Cholesterol	Campesterol	Stigmasterol	Clerosterol	$\beta$ -Sitosterol	$\beta$ -Sitostanol + $\Delta^5$ -Avenasterol	$\Delta^7$ -Stigmasterol	$\Delta^7$ -Avenasterol	Total
Butler	0.91 $\pm$ 0.01	7.83 $\pm$ 0.12	1.41 $\pm$ 0.01	1.50 $\pm$ 0.01	132.05 $\pm$ 0.14	10.23 $\pm$ 0.10	0.96 $\pm$ 0.02	0.66 $\pm$ 0.04	155.5
Campanica	1.02 $\pm$ 0.02	7.54 $\pm$ 0.02	1.57 $\pm$ 0.04	2.29 $\pm$ 0.02	120.82 $\pm$ 0.13	8.32 $\pm$ 0.05	2.17 $\pm$ 0.02	0.87 $\pm$ 0.01	144.6
Cosford	2.38 $\pm$ 0.01	15.97 $\pm$ 0.03	2.32 $\pm$ 0.01	1.87 $\pm$ 0.03	170.41 $\pm$ 0.11	12.54 $\pm$ 0.02	nd	0.82 $\pm$ 0.06	206.3
Couplat	1.40 $\pm$ 0.06	9.63 $\pm$ 0.04	2.04 $\pm$ 0.04	1.85 $\pm$ 0.04	151.86 $\pm$ 0.47	11.82 $\pm$ 0.01	1.07 $\pm$ 0.03	4.44 $\pm$ 0.04	184.1
Daviana	1.24 $\pm$ 0.05	16.36 $\pm$ 0.03	2.50 $\pm$ 0.03	2.99 $\pm$ 0.08	219.60 $\pm$ 0.04	18.22 $\pm$ 0.02	1.03 $\pm$ 0.06	1.10 $\pm$ 0.02	263.0
Ennis	1.42 $\pm$ 0.01	8.07 $\pm$ 0.06	1.99 $\pm$ 0.02	1.62 $\pm$ 0.03	152.36 $\pm$ 0.09	12.14 $\pm$ 0.02	nd	0.47 $\pm$ 0.02	178.1
F. Coutard	2.86 $\pm$ 0.01	9.47 $\pm$ 0.05	1.64 $\pm$ 0.06	1.74 $\pm$ 0.06	135.85 $\pm$ 0.10	9.41 $\pm$ 0.11	1.19 $\pm$ 0.00	0.87 $\pm$ 0.03	163.0
Grossal	0.65 $\pm$ 0.02	7.72 $\pm$ 0.01	1.21 $\pm$ 0.01	1.59 $\pm$ 0.06	112.90 $\pm$ 0.10	7.77 $\pm$ 0.01	1.40 $\pm$ 0.05	0.51 $\pm$ 0.02	133.8
Gunslobert	1.01 $\pm$ 0.04	10.54 $\pm$ 0.04	1.68 $\pm$ 0.01	1.93 $\pm$ 0.05	146.21 $\pm$ 0.27	10.57 $\pm$ 0.03	1.42 $\pm$ 0.02	2.94 $\pm$ 0.01	176.3
Lansing	2.17 $\pm$ 0.03	8.27 $\pm$ 0.10	2.26 $\pm$ 0.03	2.48 $\pm$ 0.07	149.84 $\pm$ 0.08	11.03 $\pm$ 0.01	nd	1.16 $\pm$ 0.04	177.2
L. Espanha	1.71 $\pm$ 0.01	9.94 $\pm$ 0.07	2.06 $\pm$ 0.02	1.45 $\pm$ 0.05	149.92 $\pm$ 0.14	7.47 $\pm$ 0.02	0.53 $\pm$ 0.03	1.08 $\pm$ 0.03	174.2
M. Bollwiller	1.69 $\pm$ 0.01	12.98 $\pm$ 0.03	1.93 $\pm$ 0.01	2.05 $\pm$ 0.04	156.62 $\pm$ 0.11	112.36 $\pm$ 0.05	nd	0.75 $\pm$ 0.03	188.4
Morell	1.83 $\pm$ 0.02	12.45 $\pm$ 0.02	1.54 $\pm$ 0.02	1.79 $\pm$ 0.02	155.50 $\pm$ 0.06	11.85 $\pm$ 0.07	2.96 $\pm$ 0.03	1.42 $\pm$ 0.03	189.3
Negreta	1.51 $\pm$ 0.01	9.89 $\pm$ 0.02	1.67 $\pm$ 0.01	1.50 $\pm$ 0.07	152.53 $\pm$ 0.27	9.31 $\pm$ 0.03	1.50 $\pm$ 0.04	0.87 $\pm$ 0.01	178.8
Pauetet	1.65 $\pm$ 0.03	10.95 $\pm$ 0.15	2.33 $\pm$ 0.06	2.27 $\pm$ 0.10	152.62 $\pm$ 0.14	11.84 $\pm$ 0.07	1.58 $\pm$ 0.01	2.72 $\pm$ 0.00	186.0
R. Piemont	1.02 $\pm$ 0.02	7.21 $\pm$ 0.03	1.36 $\pm$ 0.02	1.77 $\pm$ 0.04	107.98 $\pm$ 0.25	9.73 $\pm$ 0.02	3.61 $\pm$ 0.09	1.48 $\pm$ 0.03	134.2
Segorbe	1.16 $\pm$ 0.02	12.35 $\pm$ 0.03	1.59 $\pm$ 0.04	1.97 $\pm$ 0.02	148.86 $\pm$ 0.20	13.15 $\pm$ 0.00	0.98 $\pm$ 0.07	1.28 $\pm$ 0.01	181.3
St. M. Jesus	1.17 $\pm$ 0.01	8.04 $\pm$ 0.01	1.62 $\pm$ 0.01	1.56 $\pm$ 0.05	123.39 $\pm$ 0.02	7.97 $\pm$ 0.03	1.83 $\pm$ 0.02	0.67 $\pm$ 0.03	146.3
T. Giffoni	1.49 $\pm$ 0.05	9.72 $\pm$ 0.06	1.79 $\pm$ 0.03	2.03 $\pm$ 0.16	162.89 $\pm$ 0.18	10.95 $\pm$ 0.06	1.29 $\pm$ 0.11	1.19 $\pm$ 0.06	191.3
Mean	1.49	10.3	1.82	1.91	147.5	10.88	1.57	1.33	176.4
Range	0.9–2.9	7.2–16.4	1.2–2.5	1.5–3.0	108.0–219.6	7.5–18.2	nd–3.6	0.7–2.9	134–263

nd: not detected

**Table 4** Sterol content range (mg/100 g of oil) of olive oil (OO) samples from different geographical origins

Cultivar	Cholesterol	Campesterol	Stigmasterol	Clerosterol	$\beta$ -Sitosterol	$\Delta^5$ -Avenasterol	$\Delta^7$ -Stigmasterol	$\Delta^7$ -avenasterol	Total
European OO <sup>a</sup>	<i>nr</i>	2.5–11.4	0.5–6.7	<i>nr</i>	68.3–261.0	3.4–26.6	<i>nr</i>	<i>nr</i>	$\geq 100$
North African OO <sup>a</sup>	<i>nr</i>	5.9–6.4	1.6–2.6	<i>nr</i>	154.5–185.1	15.8–21.4	0.1–0.4	0.8–1.4	180–230
Turkish OO <sup>a</sup>	<i>nr</i>	3.3–7.4	1.5–1.7	<i>nr</i>	100.0–202.5	3.0–21.8	0.2–0.9	0.5–3.0	110–170
Spanish OO <sup>b</sup>	0.5–1.0	2.9–8.1	0.7–1.5	1.1–2.3	89.8–177.2	8.8–21.9	0.2–0.5	0.2–0.7	111–203

<sup>a</sup>Ref. [43]<sup>b</sup>Ref. [54]*nr*: not reported.  $\epsilon$ :  $\beta$ -Sitosterol+ $\Delta^5$ -Avenasterol

hazelnut oils and olive oils. However, adulterations with low percentages of hazelnut oil may not be detected by this method and several parameters must be evaluated to assess the presence of hazelnut oil in olive oil as mentioned by Christopoulou et al. [21] and Parcerisa et al. [15].

In conclusion, hazelnuts are a rich source of oleic acid (about 80%), which have been associated with beneficial health effects, and compared to olive oil has the advantage of presenting lower contents of saturated fatty acids. Hazelnuts also contain several phytosterols generally in higher amounts than most of the olive oil samples, which appears to be important bioactive compounds since they can inhibit intestinal absorption of cholesterol. Although some differences were noticed among cultivars, more data are needed in order to confirm if the composition of hazelnut lipid fraction differs enough to say if some of the cultivars are more suited in what health is concerned. Results from other crops and extending to other parameters, namely tocopherols and triglycerides, will be useful for such purpose.

**Acknowledgment** J.S. Amaral is grateful to Programa para o Desenvolvimento Educativo para Portugal (PRODEP III) for financial support.

## References

- Medeiros DM (2000) In: Wildman R (ed) Handbook of nutraceuticals and functional foods. CRC Press, London, pp 261–267
- Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, Rimm EB, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE, Hennekens CH, Willett WC (1998) *Br Med J* 317:1341–1345
- Pérez-Jiménez F, López-Miranda J, Mata P (2002) *Atherosclerosis* 163:385–398
- Pérez-Jiménez F, Castro P, López-Miranda J, Paz-Rojas E, Blanco A, López-Segura F, Velasco F, Marín C, Fuentes F, Ordovas JM (1999) *Atherosclerosis* 145:351–358
- Kris-Etherton P (1999) *Circulation* 100:1253–1258
- Sabaté J, Radak T, Brown J Jr (2000) In: Wildman R (ed) Handbook of nutraceuticals and functional foods. CRC Press, London, pp 478–495
- Fraser GE, Sabaté J, Beeson WL, Straham M (1992) *Arch Intern Med* 152:1416–1424
- Durak I, Köksal İ, Kaçmaz M, Büyükoçak S, Çimen B, Öztürk H (1999) *Clin Chim Acta* 284:113–115
- Ozdemir F, Akinci I (2004) *J Food Eng* 63:341–347
- Wong NC (2001) *Can J Cardiol* 17:715–721
- Plat J, Mensink RP (2001) *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 11:31–40
- Awad AB, Fink CS (2000) *J Nutr* 130:2127–2130
- Quílez J, García-Lorda P, Sala-Salvadó (2003) *J Clin Nutr* 22:343–351
- Tapiero H, Townsend DM, Tew KD (2003) *Biomed Pharmacother* 57:321–325
- Parcerisa J, Casals I, Boatella J, Codony R, Rafecas MJ (2000) *Chrom A* 881:149–158
- Cercaci L, Rodríguez-Estrada MT, Lercker G (2003) *J Chrom A* 985:211–220
- Ozen BF, Mauer LJ (2002) *J Agric Food Chem* 50:3898–3901
- López-Díez EC, Bianchi G, Goodacre R (2003) *J Agric Food Chem* 51:6145–6150
- Vigli G, Philippidis A, Spyros A, Dais P (2003) *J Agric Food Chem* 51:5715–5722
- Christopoulou E, Lazaraki M, Komaitis M, Kaselimis K (2004) *Food Chem* 84:463–474
- Zabaras D, Gordon MH (2004) *Food Chem* 84:475–483
- Blanch GP, Caja MM, Castillo MLR, Herraiz M (1998) *J Agric Food Chem* 46:3153–3157
- Firestone D, Reina RJ (1996) In: Ashurst PR, Dennis MJ (ed) Food authentication. Chapman & Hall, London, pp. 198–285
- Ulberth F, Buchgraber M (2000) *Eur J Lipid Sci Technol* 102:687–694
- Aparicio R, Aparicio-Ruiz R (2000) *J Chrom A* 881:93–104
- Kamm W, Dionisi F, Hischenhuber C, Engel K (2001) *Food Rev Int* 17:249–290
- Ozdemir F, Açıktur F, Kaplan M, Yıldız M, Loker M, Gurcan T, Birigen G, Okay A (2001) *Food Chem* 73:411–415
- Alasalvar C, Shahidi F, Ohshima T, Wanasundara U, Yurttas HC, Liyanapathirana CM, Rodrigues FB (2003) *J Agric Food Chem* 51:3797–3805
- Parcerisa J, Richardson DG, Rafecas M, Codony R, Boatella J (1998) *J Chrom A* 805:259–268
- Açıktur F, Ozdemir M, Birigen G, Loker M (1999) *Food Chem* 65:309–313
- Benítez-Sánchez PL, León-Camacho M, Aparicio R (2003) *Eur Food Res Technol* 218:13–19
- Bada JC, León-Camacho M, Prieto M, Alonso L (2004) *Eur J Lipid Sci Technol* 106:294–300
- Savage GP, McNeil DL (1998) *Int J Food Sci Nutr* 49:199–203
- Parcerisa J, Boatella J, Codony R, Rafecas M, Castellote AI, García J, López A, Romero A (1995) *J Agric Food Chem* 43:13–16
- Parcerisa J, Richardson D, Rafecas M, Codony R, Boatella J (1997) *J Agric Food Chem* 45:3887–3890
- Ruggeri S, Cappelloni L, Gambelli S, Carnovale E (1998) *Ital J Food Sci* 3:243–252
- Parcerisa J, Rafecas M, Castellote AI, Codony R, Farrán A, García J, Gonzalez C, López A, Romero A, Boatella J (1995) *Food Chem* 53:71–74
- Bonvehí JS, Coll FV (1993) *Food Chem* 48:237–241
- AOAC (2000) In: Horwitz W (ed) Official methods of analysis of AOAC international Vol. II, 40:1–3
- Greenfield H, Southgate DAT (1992) Food composition data. Production, management and use. Elsevier Applied Science, London and New York
- Amaral JS, Casal S, Pereira JA, Seabra RM, Oliveira BPP (2003) *J Agric Food Chem* 51:7698–7702
- NP EN ISO 12228 (1999) Animal and vegetable fats and oils – Determination of individual and total sterols contents – Gas chromatographic method

43. Salvador MD, Aranda F, Gómez-Alonso S, Fregapane G (2003) *Food Chem* 80:359–366
44. Mannina L, Dugo G, Salvo F, Cicero L, Ansenelli G, Calgagni C, Segre A (2003) *J Agric Food Chem* 51:120–127
45. Ollivier D, Artaud J, Pinatel C, Burbec JP, Guèrère MJ (2003) *Agric Food Chem* 51:5723–5731
46. Bernardo-Gil MG, Grenha J, Santos J, Cardoso P (2002) *Eur J Lipid Sci Technol* 104:402–409
47. Casas JS, Bueno EO, García MM, Cano MM (2004) *Food Chem* 87:225–230
48. Álamo RMR, Fregapane G, Aranda F, Gómez-Alonso S, Salvador MD (2004) *Food Chem* 84:533–53

## 5.5 Příloha 3

**Comparison of a novel ultra-performance liquid chromatographic method for determination of retinol and  $\alpha$ -tocopherol in human serum with conventional HPLC using monolithic and particulate columns**

I. Citová, L. Havlíková, L. Urbánek, D. Solichová, L. Nováková, P. Solich  
*Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388 (2007) 675–681

## Comparison of a novel ultra-performance liquid chromatographic method for determination of retinol and $\alpha$ -tocopherol in human serum with conventional HPLC using monolithic and particulate columns

I. Citová · L. Havlíková · L. Urbánek · D. Solichová ·  
L. Nováková · P. Solich

Received: 14 January 2007 / Revised: 26 February 2007 / Accepted: 1 March 2007 / Published online: 28 March 2007  
© Springer-Verlag 2007

**Abstract** Retinol and  $\alpha$ -tocopherol are biologically active compounds often monitored in blood samples because of their evident importance in human metabolism. In this study a novel ultra-performance liquid chromatographic (UPLC) method used for determination of both vitamins in human serum has been compared with conventional HPLC with particulate and monolithic  $C_{18}$  columns. In UPLC a sub-two-micron particle-hybrid  $C_{18}$  stationary phase was used for separation, in contrast with a five-micron-particle packed column and a monolithic column with a highly porous structure. Methanol, at flow rates of 0.48, 1.5, and 2.5 mL min<sup>-1</sup>, respectively, was used as mobile phase for isocratic elution of the compounds in the three methods. Detection was performed at 325 nm and 290 nm, the absorption maxima of retinol and  $\alpha$ -tocopherol, respectively. Analysis time, sensitivity, mobile-phase consumption, validation data, and cost were critically compared for these different chromatographic systems. Although cost and mobile-phase consumption seem to make UPLC the method of choice, use of the monolithic column resulted in almost the same separation and performance with a slightly shorter analysis time. These methods are alter-

natives and, in routine laboratory practice, more economical means of analysis of large numbers of biological samples than use of a traditional particulate column.

**Keywords** UPLC · Retinol ·  $\alpha$ -Tocopherol · Human serum · Monolithic column

### Introduction

In recent decades much research has been performed on vitamins A and E, because of their biological activity and their possible use for prevention and treatment of different diseases. Vitamin A includes the compounds retinol, retinal, and retinoic acid. Vitamin E, comprising  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , and  $\delta$ -tocopherol and tocotrienol, is an important micronutrient with high antioxidant activity which protects plant and animal tissues against lipid peroxidation [1–3].

To study the biological properties of both vitamins and to search for significant links between their intake and effects on health, determination of these compounds in biological samples by suitable analytical methods is of high importance. Analysis of fat-soluble vitamins may be useful for monitoring their nutritional status, the effectiveness of vitamin therapy [4], or oxidative stress as one of the negative side-effects of anticancer drugs [5].

Many papers have recently been published on the quantification of retinol, tocopherols, and carotenoids in biological liquids, usually human serum and plasma, using, almost exclusively, reversed-phased high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) with UV, fluorimetric, or electrochemical detection, which enable very good detection limits (ng mL<sup>-1</sup>) [6–15, 18]. Although RP-HPLC on octadecyl-modified silica (ODS) columns seems the method

I. Citová · L. Havlíková · L. Urbánek · L. Nováková · P. Solich  
Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy,  
Charles University in Prague,  
Heyrovského 1203,  
500 05 Hradec Králové, Czech Republic

L. Urbánek · D. Solichová (✉)  
Department of Metabolic Care and Gerontology,  
Faculty of Medicine and University Hospital in Hradec Králové,  
Charles University in Prague,  
Sokolská 581,  
500 05 Hradec Králové, Czech Republic  
e-mail: solich@lfhk.cuni.cz

of choice, use of normal-phase HPLC for analysis of retinol,  $\beta$ -carotene, and tocopherol in adipose tissue has also been described [16] and an original microemulsion electrokinetic chromatographic method has been used for separation of vitamins A, E, and D [17]. A modern approach to analysis of retinol and  $\alpha$ -tocopherol in human serum, application of a monolithic column, leads to time and cost benefits [5].

Clinical interest in retinol and  $\alpha$ -tocopherol has increased substantially since study of the cancer chemoprotective properties of these compounds began [1]. In clinical laboratories, time and cost-reducing methods are important tools for processing large numbers of samples. Application of novel approaches in liquid chromatography, for example use of monolithic stationary phases or high-resolution chromatographic systems utilizing sub-two-micron particles in routine practice might therefore be of economic interest, because of their potential to reduce analysis time, improve resolution, increase sensitivity, and reduce mobile-phase consumption. We have previously shown that use of a  $C_{18}$  monolithic column enabled reduction of analysis time for both vitamins by a factor of four compared with a particulate  $C_{18}$  column [5]. Because of the high porosity of the monolithic silica matrix it is possible to perform analyses with higher flow rates and significantly reduced back pressure compared with conventional particulate columns [19–21].

Ultra-performance liquid chromatography (UPLC), first introduced by the Waters Corporation two years ago, is a novel advance in rapid, sensitive, and high-resolution liquid chromatography. UPLC utilizes special columns with a bridged ethylsiloxane–silica hybrid (BEH) adsorbent, as 1.7- $\mu$ m particles, which ensure a wide pH operating range. The apparatus embraces minimized system volumes and greater throughput with detection of more peaks and faster analysis. The particles are also designed to be able to resist high back pressures (up to 100 MPa), in contrast with conventional liquid chromatography (maximum pressures approx. 35–40 MPa). All system components, including high-pressure fluidic modules (binary pump), efficient autosamplers characterized by fast injection cycles, low injection volumes, negligible carryover, temperature control, and high-speed detectors, are designed to achieve this new performance [22, 23].

Use of UPLC for assay of biological fluids has benefits in clinical, toxicological, and forensic analysis. Since 2005 several authors have reported determination of different compounds in urine and rat or human plasma by UPLC, almost exclusively with mass spectrometric detection [24–31]. In most of these papers conventional liquid chromatography has been compared with novel UPLC methods, which result in higher sensitivity (up to 3–10 times), shorter analysis times, and narrow peaks with excellent resolution and a minimization of matrix effects. To protect the system,

treatment of the biological material before UPLC analysis should ensure the sample is very clean. All the work cited reports use of either liquid–liquid (LLE) or solid-phase extraction (SPE). Filtration of samples and all aqueous buffers through 0.2- $\mu$ m filters is always recommended.

The objective of this work was to develop a novel method for determination of retinol and  $\alpha$ -tocopherol in serum by use of ultra-performance liquid chromatography with UV detection. Another objective was comparison of analysis time, sensitivity, mobile phase consumption, validation data, and demands on instrument equipment and operation for three different chromatographic systems—UPLC and conventional HPLC with either a 5- $\mu$ m particulate or a monolithic column. Our prime concern was finding the most suitable analytical method for rapid, simple, sensitive, and reproducible analysis of both vitamins in biological samples of oncological patients being treated with aromatase inhibitors. As far as we are aware simultaneous UPLC analysis of retinol and  $\alpha$ -tocopherol in human serum with UV detection has not been described previously.

## Experimental

### Instrumentation and chromatography

UPLC analysis was performed with a Waters Acquity ultra-performance liquid chromatograph (Waters, Prague, Czech Republic) equipped with a tuneable UV detector (TUV), sample manager module (autosampler), and column compartment/heater, both enabling temperature control. Data were collected and processed by Empower chromatographic software (Waters). An Acquity UPLC BEH  $C_{18}$  column (2.1 mm  $\times$  100 mm, 1.7- $\mu$ m particles) was used for separation. Methanol (100%) was used as mobile phase; the flow rate was 0.48 mL min<sup>-1</sup>. UV detection was accomplished at 325 nm for retinol and 295 nm for  $\alpha$ -tocopherol; the sampling rate was 20 points per second. Injection was performed by the partial loop with needle-overfill mode. Injection volume was 5  $\mu$ L and both compounds were separated within 2 min.

### Chemicals and reagents

Retinol and DL- $\alpha$ -tocopherol were obtained from Fluka (Sigma–Aldrich, Prague, Czech Republic). HPLC-grade methanol and *n*-hexane for preparation of standard solutions were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Ethanol denatured with 5% methanol for deproteination was obtained from Lachema (Brno, Czech Republic). Distilled methanol of p.a. purity for the HPLC mobile phase was supplied by Penta (Prague, Czech Republic). Helium 4.6 and nitrogen 6.0 were purchased from Linde (Prague, Czech Republic).

LC–MS grade methanol from Riedel–de Hen (Sigma–Aldrich) was used for UPLC analysis. Formic acid p.a. and acetic acid for trace analysis were obtained from Riedel–de Hen and Fluka, respectively. HPLC-grade water was prepared with Millipore (Bedford, MA, USA) Milli-Q reverse-osmosis equipment and filtered by use of a Vacc-space 50 vacuum filter (Chromservis, Prague, Czech Republic), using 0.2- $\mu\text{m}$  pore-diameter Nylon membrane filters (Albet, Barcelona, Spain).

#### Preparation of standards and samples

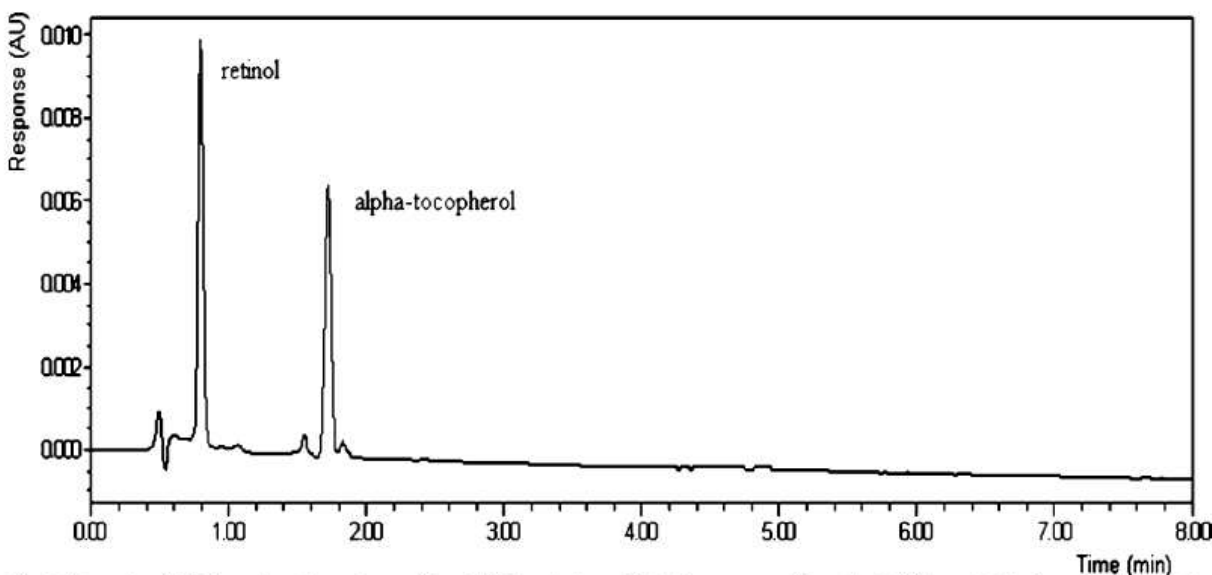
Stock solutions of retinol and  $\alpha$ -tocopherol were prepared for both HPLC and UPLC analysis. Retinol solution ( $1\text{ mmol L}^{-1}$ ) was prepared by dissolution in methanol. Tocopherol was first dissolved in *n*-hexane ( $1\text{ mmol L}^{-1}$ ) then diluted with methanol to furnish  $0.5\text{ mmol L}^{-1}$  solution. Retinol and tocopherol standard solutions were stored at  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectively. For the calibration, working solutions of both standards were diluted with methanol, in volumetric flasks, in the concentration ranges  $0.25\text{--}10.00\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$  for retinol and  $0.5\text{--}50.0\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$  for  $\alpha$ -tocopherol. Calibration was performed at six concentrations. The stock and working solutions were stable for 6 months.

Blood samples were drawn from the peripheral vein after overnight fast for 12 h. The samples were then centrifuged ( $1600\text{ g}$ , 10 min,  $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) and serum was separated. In the liquid–liquid extraction (LLE) procedure  $500\text{ }\mu\text{L}$  serum was

deproteinated by addition of cool ethanol denatured with 5% methanol ( $500\text{ }\mu\text{L}$ , 5 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). *n*-Hexane ( $2.5\text{ mL}$ ) was then added and the mixture was extracted for 5 min by vortex mixing. After centrifugation ( $1600\text{ g}$ , 10 min,  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ),  $2\text{ mL}$  of the clean extract was isolated and evaporated under nitrogen ( $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). The residue was dissolved in  $400\text{ }\mu\text{L}$  methanol and analyzed using external standard calibration.

#### Validation

For method validation a system suitability test (SST) was performed and validation data were evaluated in accordance with ICH guidelines [32, 33]. For the SST standard solutions were injected ten times and theoretical plate number/height equivalent of theoretical plate (HETP), asymmetry factor, resolution, repeatability of retention times ( $t_{\text{R}}$ ), and peak area ( $A$ ) were calculated. Repeatability was expressed as relative standard deviation (%RSD). Method validation was accomplished by analysis of serum samples and entailed determination of precision (repeatability of  $t_{\text{R}}$  and  $A$ ), accuracy (recovery), linearity, and detection and quantification limits (LOD, LOQ). Method precision was evaluated for ten samples prepared individually from one sample of lyophilized human serum at one concentration. Recovery was determined by spiking serum with standard additions of retinol and  $\alpha$ -tocopherol. Linearity was measured at six concentrations in the ranges  $0.25\text{--}10.00$  and  $0.5\text{--}10.0\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$  for retinol and  $0.5\text{--}50.0$  and  $5.0\text{--}50.0\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$  for  $\alpha$ -tocopherol. Each solution was



**Fig. 1** Example of UV absorption chromatogram from UPLC analysis of retinol and  $\alpha$ -tocopherol in patient serum. The concentrations of retinol and  $\alpha$ -tocopherol were  $0.87$  and  $11.39\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectively.

Detection was performed at  $325\text{ nm}$  (retinol) and  $290\text{ nm}$  ( $\alpha$ -tocopherol). Retention times: retinol,  $0.83\text{ min}$ ;  $\alpha$ -tocopherol,  $1.77\text{ min}$

injected three times. The limit of detection (LOD) was defined as the compound concentration for which the signal-to-noise ratio was greater than three. The limit of quantification (LOQ) was evaluated as the concentration for which the signal-to-noise ratio was ten.

## Results and discussion

### Chromatographic conditions

UPLC has been proved to be an effective technique for the analysis of retinol and  $\alpha$ -tocopherol in serum samples. A typical chromatogram obtained by UPLC from a patient serum is presented in Fig. 1. Total analysis time was 2.0 min and the retention times of retinol and  $\alpha$ -tocopherol were 0.83 min and 1.77 min, respectively. For correct detection, the detector wavelength was switched from 325 nm to 290 nm after 1.2 min. Peak widths were 0.20 min for retinol and 0.24 min for  $\alpha$ -tocopherol. Other performance data for UPLC are discussed below in the critical comparison of UPLC analysis with use of particulate and monolithic columns for assay of the vitamins. Use of classical HPLC, with particulate and monolithic columns, for this purpose has been reported elsewhere [5].

The conditions used for each type of chromatography are compared in Table 1. Methanol was always used as mobile phase (MP) and all the stationary phases were based on octadecylsilica; there were, however, significant differences between other properties of the columns used, especially particle size, porosity (monolithic column), internal diameter,

and column length. As would be expected, analysis time was longest for the conventional HPLC particulate column. The monolithic column, because of its porous structure and much lower back-pressure, can operate with higher MP flow rates, resulting in fourfold faster analysis than on the particulate column. Better resolution, speed, and sensitivity were obtained by use of the UPLC column packed with 1.7- $\mu$ m particles, but at higher back-pressure, which the UPLC system can resist. Because of the high separation efficiency, small particle size, and narrow column internal diameter, UPLC uses very low mobile-phase flow rates and analysis times are short. In summary, use of monolithic and UPLC columns results in time saving of approximately 7 h for analysis of one-hundred samples. Chromatograms obtained from analysis of human serum samples by use of all three chromatographic systems studied are shown in Figs. 1, 2 and 3.

There is, however, almost no difference between analysis times on the monolithic and UPLC columns. When a 50-mm UPLC column was tested for separation of the standard mixture even shorter retention times were obtained with similar or lower flow rates; when these conditions were used for analysis of serum, however, resolution of target analytes from ballast compounds was poor. These problems might be because of the complexity and variability of the serum matrix, which is, even after extraction, still contaminated with interfering compounds. Mobile phase consumption in UPLC is approximately one fifth that in HPLC with a monolithic column, which is economically important to laboratories processing large numbers of samples. When the different internal diameters of the columns are taken into account (4.6 mm for the monolithic column), this effect

**Table 1** Comparison of chromatographic conditions

	UPLC column	Particulate column	Monolithic column
Stationary phase	Bridged ethylsiloxane/silica, hybrid C <sub>18</sub> particles	C <sub>18</sub> reversed-phase	C <sub>18</sub> monolithic reversed-phase
Column dimensions	100 mm×2.1 mm i.d., 1.7 $\mu$ m	150 mm×4.6 mm i.d., 5 $\mu$ m	100 mm×4.6 mm i.d.
Mobile phase	100% methanol	100% methanol	100% methanol
Mobile phase flow rate (mL min <sup>-1</sup> )	0.48	1.50	2.50
Retention time (min)			
Retinol	0.8	2.0	0.8
$\alpha$ -Tocopherol	1.8	5.3	1.4
Analysis time (min)	2.0	6.0	1.8
System pressure (psi) <sup>a</sup>	4800–4900	950–1000	470–500
Mobile phase consumption (mL) <sup>b</sup>	96	900	450
Column price (€)	743	394	626
Approximate column lifetime <sup>c</sup>	2200	700	1800
Costs (€) <sup>b,d</sup>	36	72	44
Time saving <sup>b,e</sup>	6 h 40 min	–	7 h

<sup>a</sup> System pressure one first use of the column

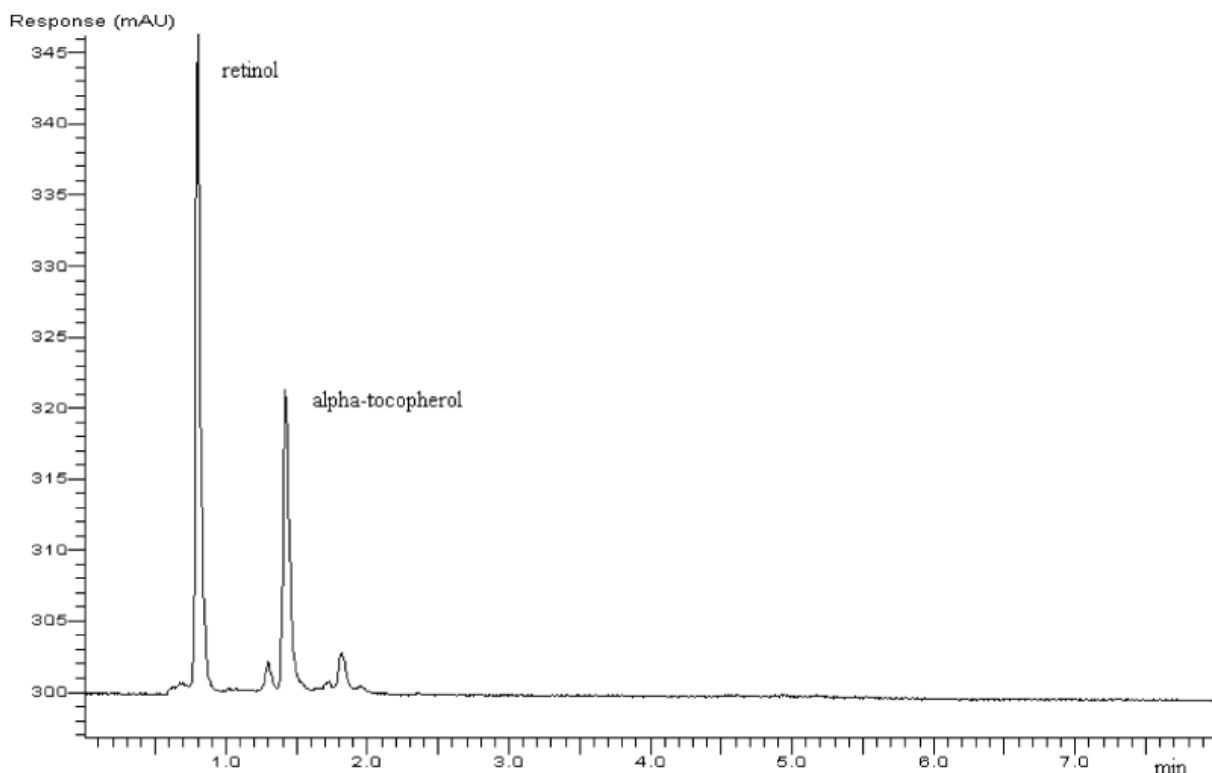
<sup>b</sup> Calculated for one hundred injections

<sup>c</sup> Expressed as the number of analyses without any change of the initial properties.

<sup>d</sup> Approximate calculation; comprises mobile phase consumption and column cost; does not include instrument price.

<sup>e</sup> Comparison of monolithic and UPLC columns with the particulate column.





**Fig. 2** UV absorption chromatogram from analysis of retinol and  $\alpha$ -tocopherol in patient serum using the monolithic column. The concentrations of retinol and  $\alpha$ -tocopherol were 1.89 and 18.76  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectively. Detection performed at 325 nm (retinol) and 290 nm ( $\alpha$ -tocopherol). Retention times: retinol, 0.8 min;  $\alpha$ -tocopherol, 1.4 min

on solvent consumption can, nevertheless, be regarded as insignificant.

We calculated the approximate cost of analysis of one hundred samples, taking into consideration mobile-phase consumption and column price. For the latter we took account of both price and column lifetime. Our experience of analysis of many sets of samples is that approximately 700 analyses are possible on the Pecosphere particulate column whereas more than 1800 injections are possible on the Chromolith column without noticeable changes in separation efficiency, retention times, or back pressure. Because of the insufficiency of our own data relating to UPLC column lifetime, we calculated the cost of UPLC on the basis of information in the literature. An Acquity UPLC BEH  $\text{C}_{18}$  column used for analysis of protein-precipitated rat plasma maintained initial peak capacity and selectivity for over 2200 injections [34]. Although the most economical system seems to be UPLC, the markedly higher price should also be taken into consideration.

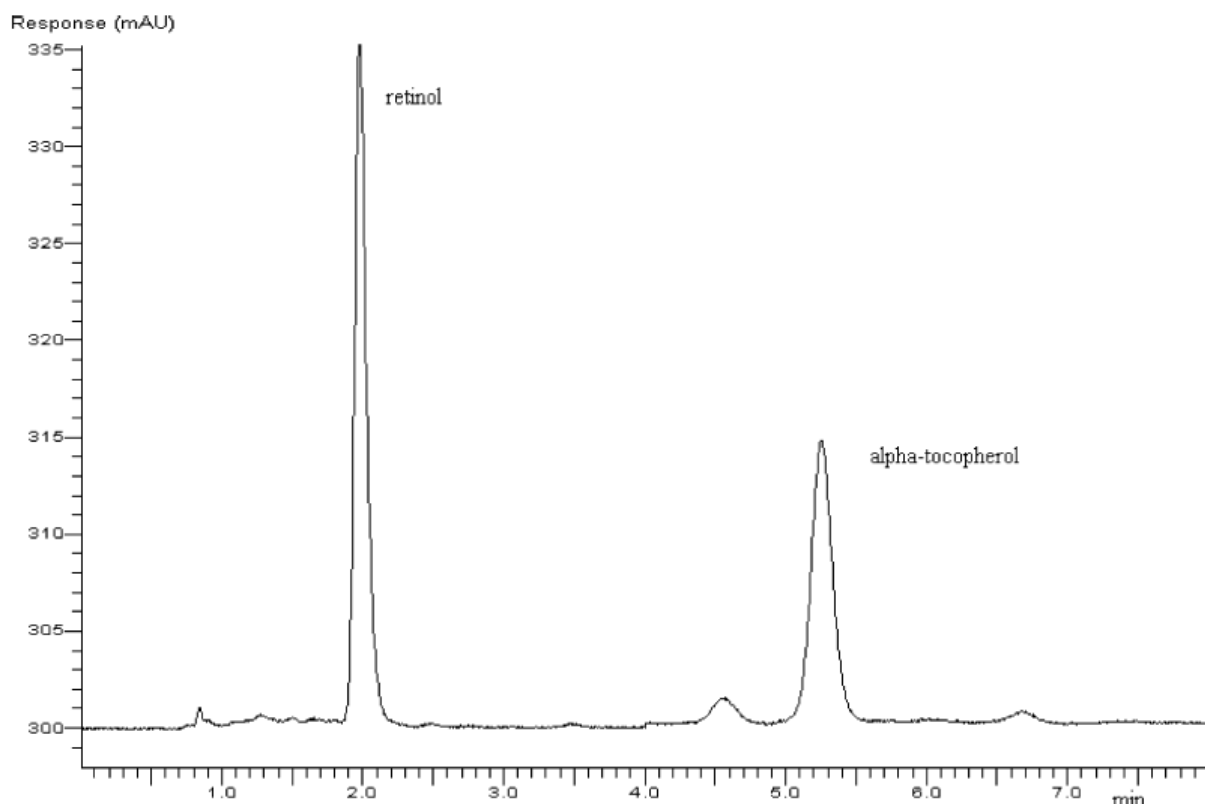
Another interesting comparison of monolithic and UPLC columns for analysis of drug metabolites in urine has been published [24]. UPLC was approximately three times as sensitive and enabled detection of more metabolites than

the monolithic column. Although consumption of mobile phase was a factor of four lower in UPLC, retention times were longer than on the monolithic column. It is apparent both from this work and from our results that monolithic stationary phases enable substantial time saving but at the cost of high mobile-phase consumption. Although such time saving is not always possible with UPLC, its benefits include use of much less mobile phase.

#### Validation

Validation data for analysis of retinol and  $\alpha$ -tocopherol by use of the three chromatographic systems are compared in Table 2. Application of internal validation requirements reveals all the data are acceptable; there are, however, slight differences between some of the values.

Area and retention time repeatability for retinol are perfect for analysis by UPLC, not exceeding 0.5% RSD. The excellent injection precision is ensured by the partial loop with needle-overfill injection mode developed by Waters for the Acquity UPLC system. In this mode the needle and the valve are first overfilled with sample while the loop is in-line with the pump. When the loop is switched to off-line, the



**Fig. 3** UV absorption chromatogram from analysis of retinol and  $\alpha$ -tocopherol in patient serum using the particulate column. The concentrations of retinol and  $\alpha$ -tocopherol were 1.13 and 13.33  $\mu\text{mol}$

$\text{L}^{-1}$ , respectively. Detection was performed at 325 nm (retinol) and 290 nm ( $\alpha$ -tocopherol). Retention times: retinol, 2.0 min;  $\alpha$ -tocopherol, 5.3 min

syringe fills the loop with the appropriate volume of sample. To complete the injection the valve is switched back to in-line direction. With full-loop injection, this type of sample injection is among the most precise injection techniques. The correlation coefficients show that response is a linear function of concentration in the calibration ranges selected.

Accuracy, determined for spiked human serum, is best for conventional HPLC and UPLC. Although method sensitivity is expected to be higher for UPLC than for the other two techniques, this was not apparent for retinol analysis.

Similar validation data were obtained for assay of  $\alpha$ -tocopherol. The detection and quantification limits also

**Table 2** Comparison of validation data for retinol and  $\alpha$ -tocopherol

	Retinol			$\alpha$ -Tocopherol		
	UPLC	Particulate column	Monolithic column	UPLC	Particulate column	Monolithic column
Area repeatability (RSD%)	0.51	4.51	5.58	0.62	0.91	5.93
Retention time repeatability (RSD%)	0.11	0.08	0.10	0.21	0.29	0.37
Accuracy (RSD%) <sup>a,b</sup>	3.78	3.24	5.98	4.61	1.68	2.06
Calibration range ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) <sup>c</sup>	0.25–10.00	0.50–10.00	0.25–10.00	0.50–50.00	5.00–50.00	0.50–50.00
Correlation coefficient ( $R^2$ )	0.9997	0.9992	0.9999	0.9999	0.9996	0.9997
LOD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0.019	0.020	0.020	0.05	0.10	0.10
LOQ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0.06	0.07	0.07	0.15	0.30	0.30

<sup>a</sup> Retinol–serum spiked with 0.5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  retinol; spike volume 5  $\mu\text{L}$ .

<sup>b</sup>  $\alpha$ -Tocopherol–serum spiked with 5.0  $\mu\text{mol L}^{-1}$   $\alpha$ -tocopherol; spike volume 5  $\mu\text{L}$ .

<sup>c</sup> Linearity was measured for six concentration levels.

showed that UPLC was the most sensitive method for analysis of  $\alpha$ -tocopherol.

### Conclusion

A novel UPLC method for determination of retinol and  $\alpha$ -tocopherol in human serum has been presented as a tool suitable for clinical monitoring of these compounds in serum. The developed and validated UPLC method was compared with two other chromatographic methods—conventional HPLC with a particulate column and HPLC with a monolithic column. Analysis time, sensitivity, mobile phase consumption, validation data, and demands on instrument equipment and operation were compared for all three methods.

UPLC, and HPLC with a monolithic column, are valuable methods for routine monitoring of oncological patients before and during treatment with aromatase inhibitors. The appropriate method should be low cost and highly sensitive, reproducibility should be acceptable, analysis time should be short, and the method should be simple to perform; all these requirements are met by both methods. Surprisingly, in our work UPLC analysis took slightly longer than analysis with the monolithic column; mobile phase consumption was almost a factor of five lower, however. UPLC, and HPLC with a monolithic column, are both ideal for busy laboratories analysing large numbers of samples.

**Acknowledgements** The authors gratefully acknowledge financial support from the Grant Agency of the Ministry of Education MSM 0021620822, MZO 00179906, the Grant Agency IGA MZ NR/8048-3, and the Grant Agency of Charles University, Project No. 296/2005.

### References

- Arnold T, Nau H, Ruehl R (2000) In: Song WO, Beecher GR, Eitenmiller RR (eds) *Modern analytical methodologies in fat- and water- soluble vitamins*. Wiley, New York, p 3
- Stocker P, Lesgards JF, Vidal N, Chaliel F, Prost M (2003) *BBA Gen Subjects* 1621:1–8
- Piironen VI (2000) In: Song WO, Beecher GR, Eitenmiller RR (eds) *Modern analytical methodologies in fat- and water- soluble vitamins*. Wiley, New York, p 81
- Granado-Lorencio F, Olmedilla-Alonso B, Herrero-Barbudo C, Blanco-Navarro I, Blázquez-García S, Pérez-Sacristán B (2006) *Clin Biochem* 39:180–182
- Urbánek L, Solichová D, Melichar B, Dvořák J, Svobodová I, Solich P (2006) *Anal Chim Acta* 573/574:267–272
- Sirimanee SR, Patterson DG Jr, Ma L, Justice JB Jr (1998) *J Chromatogr B* 716:129–137
- Talwar D, Ha TKK, Cooney J, Brownlee ChJ, O'Reilly DS (1998) *Clin Chim Acta* 270:85–100
- Alvarez JC, De Mazancourt P (2001) *J Chromatogr B* 755:129–135
- Gimeno E, Castellote AI, Lamuela-Raventós RM, de la Torre-Boronat MC, López-Sabater MC (2001) *J Chromatogr B* 758:315–322
- Rodríguez-Delgado MA, Díaz-Flores Estévez JF, Díaz-Flores Estévez F, Hernández Calzadilla C, Díaz Romero C (2002) *J Pharm Biomed Anal* 28:991–997
- Taibi G, Nicotra CMA (2002) *J Chromatogr B* 780:261–267
- Ortega H, Coperías JL, Castilla P, Gómez-Coronado D, Lasunción MA (2004) *J Chromatogr B* 803:249–255
- Chatzimichalakis PF, Samanidou VF, Papadoyannis IN (2004) *J Chromatogr B* 805:289–296
- Mata-Granados JM, de Castro MDL, Quesada JM (2004) *J Pharm Biomed Anal* 35:575–582
- Karpinska J, Mikoluc B, Motkowska R, Piotrowska-Jastrzebska J (2006) *J Pharm Biomed Anal* 42:232–236
- Casal S, Macedo B, Oliveira MBPP (2001) *J Chromatogr B* 763:1–8
- Bustamante-Rangel M, Delgado-Zamarreno MM, Sánchez-Pérez A, Carabias-Martínez R (2006) *J Chromatogr A* 1125:270–273
- Rupérez FJ, Mach M, Barbas C (2004) *J Chromatogr B* 800:225–230
- Miyabe K, Guiochon G (2004) *J Sep Sci* 27:853–873
- <http://www.chromolith.com>, 20.12.2006
- Tanaka N, Motokawa M, Kobayashi H, Hosoya K, Ikegami T (2003) In: Švec F, Tennikova TB, Deyl Z (eds) *Monolithic materials preparation, properties and applications*, chap 8. Elsevier, Amsterdam, p 173
- <http://www.waters.com>, 6.1.2007
- Nováková L, Matysová L, Solich P (2006) *Talanta* 68:908–918
- Johnson KA, Plumb R (2005) *J Pharm Biomed Anal* 39:805–810
- Yu K, Little D, Plumb R, Smith B (2006) *Rapid Commun Mass Spectrom* 20:544–552
- O'Connor D, Mortishire-Smith R (2006) *Anal Bioanal Chem* 385:114–121
- Apollonio LG, Pianca DJ, Whittall IR, Maher WA, Kyd JM (2006) *J Chromatogr B* 836:111–115
- Sun X, Li X, Cai S, Quin F, Lu X, Li F (2007) *J Chromatogr B* 846:323–328
- Li R, Dong L, Huang J (2005) *Anal Chim Acta* 546:167–173
- Kalovidouris M, Michalea S, Robola N, Koutsopoulou M, Panderi I (2006) *Rapid Commun Mass Spectrom* 20:2939–2946
- Al-Dirbashi OY, Aboul-Enein HY, Jacob M, Al-Qahtani K, Rashed MS (2006) *Anal Bioanal Chem* 385:1439–1443
- International Conference on Harmonization (ICH) (1995) Q2A: text on validation of analytical procedures, vol 60. US FDA Federal Register, p 11260
- International Conference on Harmonization (ICH) (1997) Q2B: validation of analytical procedures: methodology, vol 62. US FDA Federal Register, p 27463
- LC/GC, Separation science redefined, May 2005, p 40

## 5.6 Příloha 4

**Determination of gentisin, isogentisin and amarogentin in *Gentiana lutea* L. by capillary electrophoresis**

Ivana Citová, Markus Ganzera, Hermann Stuppner, Petr Solich

*Journal of Separation Science* 31 (2008) 195 – 200

Ivana Citová<sup>1,2</sup>  
Markus Ganzera<sup>2</sup>  
Hermann Stuppner<sup>2</sup>  
Petr Solich<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Charles University of Prague,  
Faculty of Pharmacy,  
Department of Analytical  
Chemistry, Hradec Králové,  
Czech Republic

<sup>2</sup>University of Innsbruck,  
Institute of Pharmacy,  
Pharmacognosy, Innsbruck,  
Austria

## Short Communication

### Determination of gentisin, isogentisin, and amarogentin in *Gentiana lutea* L. by capillary electrophoresis

A novel, fast, and simple capillary electrophoresis method has been developed for the analysis of gentisin, isogentisin, and amarogentin in roots of *Gentiana lutea* (yellow gentian), an herb traditionally used as gastric stimulant. Gentisin and isogentisin are xanthenes showing potent inhibition of monoamine oxidase type A and B, amarogentin represents one of the bitter principles of *Gentiana*, responsible for its gastric-robortant effects. Optimal CE-separation conditions comprise a 100 mM sodium tetraborate buffer of pH 9.3, containing 10 mM  $\beta$ -cyclodextrin as additive; optimum temperature and applied voltage were found to be 30°C and 25 kV, respectively. Direct diode array detection at 260 nm (gentisin, isogentisin) and 242 nm (amarogentin) was performed, and the required analysis time was only 11 min. The developed method was validated for linearity, sensitivity, precision, and accuracy, and utilized to assay several commercially available *G. lutea* samples. Quantitative data obtained with the developed CE method are compared with HPLC results, and the advantages of each approach are discussed.

**Keywords:** Amarogentin / Capillary electrophoresis / *Gentiana lutea* / Gentisin / Isogentisin

Received: July 18, 2007; revised: September 3, 2007; accepted: September 4, 2007

DOI 10.1002/jssc.200700325

## 1 Introduction

*Gentiana lutea* (Gentianaceae) is a perennial herb commonly growing in alpine areas of central and southern Europe and in western Asia [1]. The officinal drug *Gentianae radix*, listed in many pharmacopoeial monographs, consists of dried fermented rhizomes and roots of *Gentiana*. It is traditionally used as a bitter tonic in gastrointestinal ailments. The active principles of *Gentiana* were found to be secoiridoid bitter compounds, such as gentiopicroside, amarogentin, and swertiamarin, followed by xanthenes, phenolic acids, phytosterols, and alkaloids [1, 2]. Whilst the bitter principles, particularly amarogentin, act as appetite or digestive stimulants and gastroprotective agents [3], xanthenes, including gentisin, isogentisin, and genistein, show different biological activities. Gentisin and isogentisin possess a potential antidepressant effect by inhibition of monoamine oxidase type A and B [4–6], and isogentisin also demonstrated strong antitubercular activities [7]. Recently, significant cytoprotective properties of isogentisin (but not gentisin) were discovered [8]. Moreover, amarogentin

rich fractions of *Swertia chirata* showed an anticarcinogenic effect [9], and it has been known for a long time that the methanol extract of *Gentianae radix* possess mutagenic activity [10].

With respect to the wide range of different pharmacological actions of *Gentiana* and its medicinal use, an analytical assessment of this plant is of great importance. According to the publications available on common scientific databases, HPLC, TLC, and MEKC have been used for the analysis of major *Gentiana* compounds [11–14]. An original HPLC–MS assay enabling the determination of all currently known bioactive compounds in *gentiana* roots has not been published until recently [15]. Except for the latter, all other methods did not allow the separation of gentisin and isogentisin, two compounds that, owing to recent pharmacological studies, are of utmost interest. Thus, in this study we developed and validated a CE method for this purpose and compared the obtained quantitative results to the already established HPLC approach.

## 2 Experimental

### 2.1 Instrumentation and CE analysis

Capillary electrophoresis was performed on a 3D-CE instrument (Agilent Technologies, Waldbronn, Ger-

**Correspondence:** Priv. Doz. Dr. Markus Ganzera, University of Innsbruck, Institute of Pharmacy, Innrain 52, 6020 Innsbruck, Austria  
E-mail: Markus.Ganzera@uibk.ac.at  
Fax: +43 512 507 2939

many) equipped with diode array detector, thermostatable capillary compartment and autosampler. Electrophoretic separation was achieved using a fused silica capillary of 50  $\mu\text{m}$  id and effective length 60 cm (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA).

Optimal results were obtained with a 100 mM sodium tetraborate solution of pH 9.3 containing 10 mM  $\beta$ -cyclodextrin as additive, at an applied voltage of 25 kV and a temperature of 30°C. Analyzed samples were injected using the hydrodynamic mode (50 mbar for 5 s) and detected at 260 nm (gentisin, isogentisin) and 242 nm (amarogentin). Prior to each injection, the capillary was rinsed with water (2 min), 0.1 M phosphoric acid (2 min), water (2 min), and finally with running electrolyte (3 min). All standard and sample solutions as well as buffers were filtered through a 0.45- $\mu\text{m}$  membrane filter (Minisart SRP15; Sartorius, Göttingen, Germany) before analysis.

## 2.2 Chemicals

All solvents and chemicals were of HPLC or p.a. grade (methanol, sodium tetraborate,  $\beta$ -cyclodextrin, sodium hydroxide, phosphoric acid, water) and were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Amarogentin standard was bought from Chromadex (Santa Ana, CA, USA) and standards of gentisin and isogentisin were isolated in our laboratory as described earlier [8]. Five *G. lutea* root samples (S1–S5) were obtained from three different Austrian and German suppliers, samples S1, S2, and S4 were different batches supplied by one vendor.

## 2.3 Sample preparation

150 mg of powdered *G. lutea* root was extracted three times with 3 mL of 100% methanol in an ultrasonic bath (10 min, room temperature) and centrifuged. The extracts were collected in a 10-mL volumetric flask and filled up to the mark with 100% methanol.

## 2.4 Validation

The developed method was validated for linearity, sensitivity, precision, and accuracy. Linearity was tested at seven calibration levels. A stock standard solution was prepared by dissolving approximately 0.8 mg of each standard in 4 mL of methanol; seven additional levels were prepared by serial dilution with methanol (Table 1). Each calibration solution was injected four times. Method sensitivity expressed as limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) was determined experimentally by the means of signal-to-noise ratio method (LOD refers to triple noise; LOQ refers to ten-fold noise).

Method precision was expressed as relative standard deviation (RSD%) of peak area and retention time. It was

**Table 1. A) Calibration data and accuracy of the developed CE method.**

Parameter	Gentisin	Isogentisin	Amarogentin
<i>Calibration</i>			
Linear range ( $\mu\text{g/mL}$ )	1.76–112.50	1.54–98.75	2.89–185.00
Regression line	$y = 1.441x$	$y = 0.853x$	$y = 0.580x$
Correlation coefficient	0.9988	0.9988	0.9994
LOD ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>a)</sup>	0.69	1.22	1.24
LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>b)</sup>	2.30	4.07	4.13
<i>Accuracy (%)<sup>c)</sup></i>			
Spike 1	95.94	96.95	96.03
Spike 2	98.01	95.11	95.32
Spike 3	104.57	96.46	98.29

<sup>a)</sup> LOD = Limit of detection.

<sup>b)</sup> LOQ = Limit of quantification.

<sup>c)</sup> Accuracy expressed as recovery in percent (see Experimental).

**Table 1. B) Method and injection precision.**

Parameter	Gentisin		Isogentisin		Amarogentin	
	A	$t_R$	A	$t_R$	A	$t_R$
<i>Method precision (RSD%)<sup>d)</sup></i>						
1. day	3.35	0.57	3.28	1.03	1.05	0.45
2. day	4.18	0.68	2.55	0.48	2.71	0.73
3. day	3.76	0.31	5.79	0.41	2.29	0.80
Inter-day	2.50	0.67	4.36	0.39	1.91	1.52
<i>Injection precision (RSD%)<sup>e)</sup></i>						
	2.20	0.13	3.99	0.17	2.12	0.25

<sup>d)</sup> Method precision expressed as relative standard deviation (RSD) of peak area (A) and retention time ( $t_R$ ); using one plant sample.

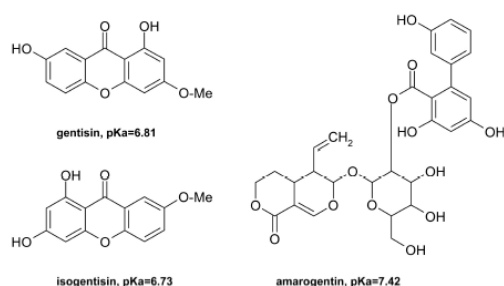
<sup>e)</sup> Repeatability of injection expressed as relative standard deviation (RSD) of peak area (A) and retention time ( $t_R$ ); determined after 10 injections of a standard mixture.

evaluated by analyzing samples of the same specimen within one day (intra-day precision) and within three days (inter-day precision). For the purpose, individual samples were prepared and analyzed in five replicates per day. Injection precision was calculated after ten injections of one standard mixture solution (concentration of isogentisin, amarogentin and gentisin, was 12.3, 13.1, and 14.1  $\mu\text{g/mL}$ , respectively), and expressed as RSD of peak area and retention time in percent.

Accuracy was determined by spiking one *G. lutea* root sample with 100  $\mu\text{L}$  (Spike 1), 200  $\mu\text{L}$  (Spike 2), and 300  $\mu\text{L}$  (Spike 3) of standard mixture (concentration of gentisin, isogentisin, and amarogentin was 94.0, 111.0, and 97.0  $\mu\text{g/mL}$ , respectively). Method accuracy was then expressed as recovery in percent.

## 3 Results and discussion

All determined analytes represent electro-neutral compounds with  $\text{p}K_a$  values around 7 and a weak acidic char-



**Figure 1.** Chemical structures and  $pK_a$  values of analyzed compounds.

acter due to the presence of hydroxyl groups on the aromatic rings (see Fig. 1). Gentisin and isogentisin are positional isomers with identical molecular weight and the same number of ionizable groups, *i.e.* in the electrolyte system they are identically charged. Therefore, CE separation of these compounds might theoretically be achieved either by addition of a chiral selector (*e.g.* cyclodextrins), or by formation of micelles utilizing micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC).

The most important features of method development as well as our results concerning method validation, quantification, and comparison of the proposed CE method with HPLC results are further briefly discussed.

### 3.1 CE method optimization

For initial screening, a methanol solution of *G. lutea* crude extract ( $c = 15$  mg/mL) and a standard mixture were utilized. Primarily, different buffer systems including sodium tetraborate, sodium phosphate, and Tris solutions were tested in the pH range between 7.5 and 11.5. These experiments showed that sodium tetraborate is the optimum electrolyte for the intended purpose. Additionally, two different micellar systems containing 25–100 mM sodium dodecylsulphate (SDS) or 75 mM sodium cholate (SC) were tested, but a successful separation of all three analytes was achieved only on using the standard mixture; in the case of extract the target peaks merged with other interfering compounds. An addition of organic modifiers (methanol, ethanol, propanol, or acetonitrile) to the buffer did not show any improved results. As a second alternative, different concentrations of cyclodextrins ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, 2-hydroxypropyl- $\alpha$ - and 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin) were added to the running electrolyte. The best results were obtained using  $\beta$ -cyclodextrin.

In order to separate the selected analytes with sufficient resolution and in the shortest possible time all relevant separation parameters were carefully optimized. Migration time, resolution, peak shape, and symmetry

were considered as relevant indicators. Concentration and pH of tetraborate buffer showed a major influence on analysis time and resolution of all compounds present in the extract. By increasing molarity stepwise from 25 to 125 mM tetraborate, analysis was prolonged; however, resolution of target analytes was improved (especially in case of separation of amarogentin from other compounds). By increasing the buffer pH (tested from pH 8.0 to 10.0), the analysis time was prolonged too, but at a pH higher than 9.5 the separation as well as peak shapes were insufficient. For the analysis of gentisin, isogentisin, and amarogentin a 100 mM tetraborate buffer at pH 9.3, containing 10 mM  $\beta$ -cyclodextrin as additive proved to be ideal. The resulting current was rather high (115  $\mu$ A), but it did not cause perturbing Joule heating of the capillary nor unstable results. The optimal separation temperature was 30°C; any higher or lower temperature was not advantageous.

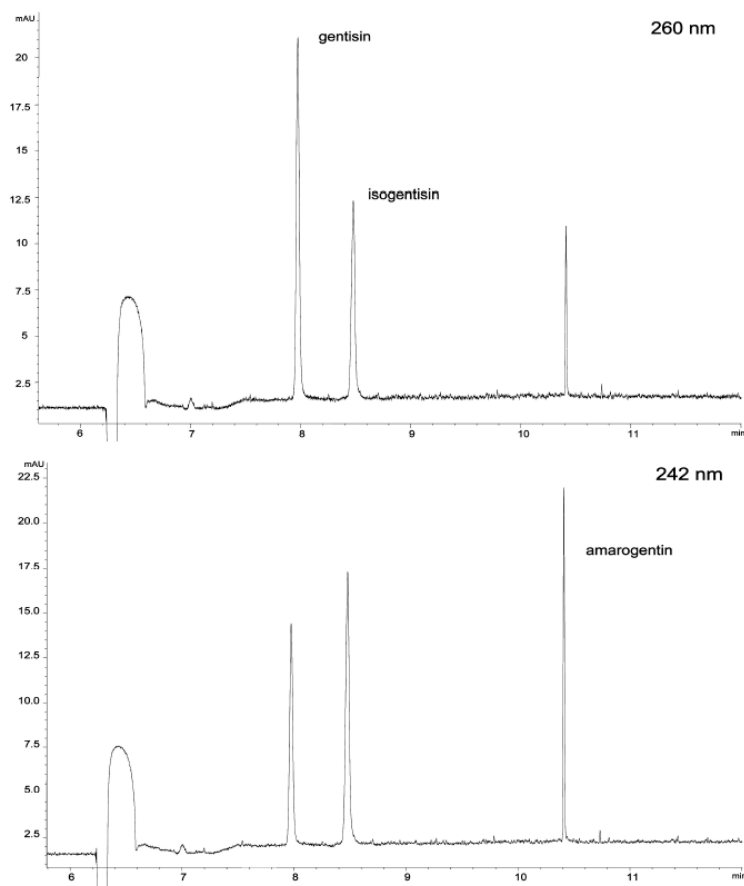
Detection wavelengths were set according to the absorption maxima of analyzed compounds. Although isogentisin shows a maximum at 230 nm (as determined by the DAD spectrum), a wavelength of 260 nm was used for validation and quantification due to better selectivity when analyzing some of the extracts. An electropherogram showing the separation of a standard mixture under optimal conditions is represented in Fig. 2, and displays a short analysis time not exceeding 11 min.

### 3.2 CE method validation

Results of method validation in terms of calibration, accuracy and precision are presented in Table 1. Linearity of the developed CE assay was confirmed in a more than 50-fold concentration range, with correlation coefficients between 0.9988 and 0.9994. Concerning sensitivity, the LOQ ranged from 2.3  $\mu$ g/mL (gentisin) to 4.1  $\mu$ g/mL (amarogentin). Accuracy was evaluated as recovery after spiking one plant sample with standards at three concentration levels ranged between 95.11 and 104.57%. Method and injection precision calculated both for peak area and retention time were within the limit of 5%, except for isogentisin measurements on the third day where the RSD reached 5.79%. Baseline separation of all target compounds and resolutions higher than 1.5 demonstrate the selectivity of the proposed method.

### 3.3 Assay of *G. lutea* samples

Five *G. lutea* samples were assayed using the developed CE method. The procedure of sample preparation was adopted from a previous publication [15], assuring an exhaustive extraction of the target analytes. Peak identification was performed by comparison of migration times and UV spectra with those of the reference compounds, and confirmed by spiking of the samples with



**Figure 2.** Electropherograms of a standard mixture obtained under optimal CE conditions; gentisin and isogentisin detected at 260 nm, amarogentin at 242 nm. Concentrations of gentisin, isogentisin, and amarogentin were 31.33, 37.00, and 32.33  $\mu\text{g/mL}$ , respectively.

**Table 2.** Quantification of five commercially available *G. lutea* samples by means of the developed CE method; standard deviation in parenthesis ( $n = 4$ ).

Sample	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	Gentisin	Isogentisin	Amarogentin
S 1	7.84 ( $\pm 0.26$ )	9.56 ( $\pm 0.28$ )	4.22 ( $\pm 0.20$ )
S 2	9.08 ( $\pm 0.11$ )	12.30 ( $\pm 0.35$ )	n.d. <sup>a)</sup>
S 3	9.72 ( $\pm 0.42$ )	10.81 ( $\pm 0.09$ )	n.d. <sup>a)</sup>
S 4	4.27 ( $\pm 0.21$ )	8.97 ( $\pm 0.23$ )	4.49 ( $\pm 0.25$ )
S 5	8.46 ( $\pm 0.25$ )	11.98 ( $\pm 0.43$ )	7.68 ( $\pm 0.19$ )

<sup>a)</sup> n.d. = not defined (the value was below the limit of quantification).

the standards (if required). As shown in Table 2, in all samples isogentisin (ranging from 8.97 to 12.30  $\mu\text{g/mL}$ ) was dominant compared to gentisin (4.27–9.72  $\mu\text{g/mL}$ ). Values of amarogentin were substantially lower, not exceeding 7.68  $\mu\text{g/mL}$  (0.05%). In two analyzed samples

(S2 and S3) amarogentin level did not reach LOQ and for that reason it was not quantified. The determined quantitative values correspond well with data stated in literature [2].

A typical electropherogram for a sample solution is depicted in Fig. 3. The most abundant component in *Gentiana*, the secoiridoid glycoside gentiopicroside, elutes in the first peak. Unfortunately, it was not possible to include this analyte in quantification, because it always merges with other structurally very similar compounds such as swertiamarine and xanthone glycosides. This trend was observed when injecting respective standards, which were available from a previous study [15].

### 3.4 Comparison with HPLC

For *G. lutea* analysis the analytical challenge lies in the diverse chemical character of constituents and/or in their structural similarity. High performance liquid



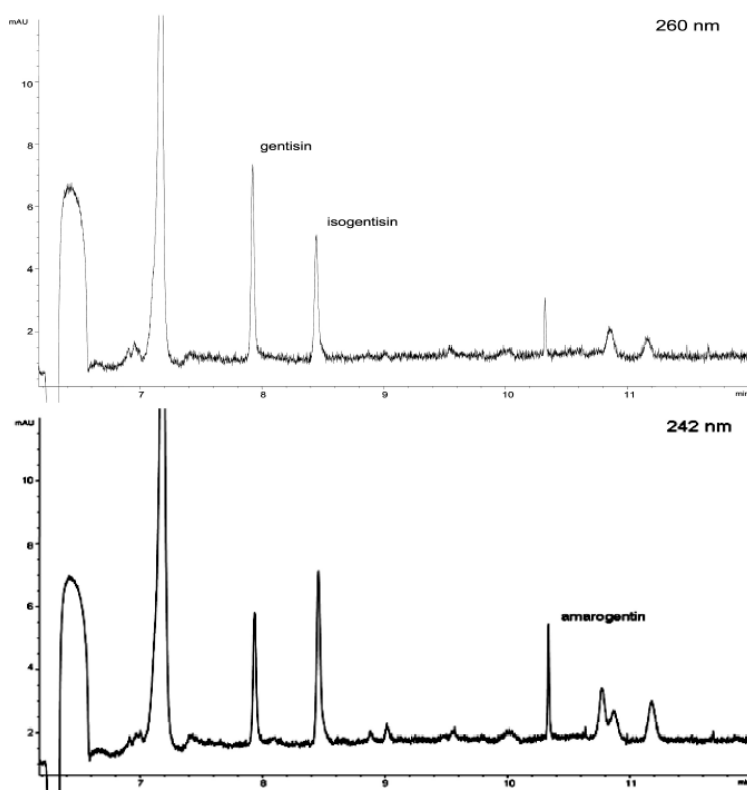


Figure 3. Electropherograms of *G. lutea* root sample (S5) obtained under optimum CE conditions.

chromatography is generally considered the method of choice in the field of phytoanalysis due to its universal use, extensive range of available stationary phases and various detection possibilities. We recently reported an HPLC method for the analysis of biologically active compounds in *Gentiana* [15] and the current study should evaluate the applicability of CE for the same purpose. When comparing both approaches, their respective pros and cons are obvious. Although CE does not allow separation of the same number of compounds, it offers many significant advantages compared to HPLC. Besides the general benefits of low solvent and sample consumption, CE enables significantly improved separation of gentisin and isogentisin in less than half the time (HPLC runtime is 30 min) in a very complex sample matrix. On the other hand, because of very low quantification limits (0.04, 0.05, and 0.11  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for gentisin, isogentisin, and amarogentin, respectively), the substantially higher sensitivity of the HPLC method should be pointed out. Last but not least, quantitative results of gentian root samples assayed by CE and HPLC showed that both techniques enable an accurate and precise determination of the compounds of interest (Table 3).

Table 3. Comparison of quantitative results obtained by CE and HPLC method; concentration expressed in percentage.

Sample	Concentration (%)					
	Gentisin		Isogentisin		Amarogentin	
	CE	HPLC <sup>a)</sup>	CE	HPLC <sup>a)</sup>	CE	HPLC <sup>a)</sup>
S 1	0.05	0.05	0.06	0.08	0.03	0.03
S 2	0.06	0.07	0.08	0.11	n.d.	0.01
S 3	0.06	0.07	0.07	0.08	n.d.	0.03
S 4	0.03	0.05	0.06	0.11	0.03	0.04
S 5	0.06	0.06	0.08	0.10	0.05	0.05

n.d.= not defined

<sup>a)</sup> Result obtained according to [15].

#### 4 Concluding remarks

*G. lutea*, a medicinal herb used worldwide for its varied health benefits, represents an interesting drug to be studied from phytochemical, pharmacological, and analytical points of view. In order to assess its biological activity as well as the chemical composition, precise, reliable, and simple analytical techniques are required. In addi-

tion to an already established HPLC method, we have now successfully developed, validated, and applied a CE method for the analysis of three pharmacologically highly interesting compounds in *Gentiana*. Although HPLC might offer more versatility in respect to the number of analytes determined, the newly developed CE method enables a much faster, yet improved separation and quantitation of gentisin, isogentisin, and amarogentin. Therefore, it surely can be considered as an equivalent alternative to HPLC.

The authors would like to thank the Austrian Exchange Office (ÖAD) and the Ministry of Education of the Czech Republic (grant MSM 0021620822) for their financial support.

## 5 References

- [1] Blumenthal, M., Goldberg, A., Brinckmann, J., *Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs*, American Botanical Council, Austin 2000.
- [2] Newall, C. A., Anderson, L. A., Phillipson, J. D., *Herbal Medicines – A Guide for Health-Care Professionals*, The Pharmaceutical Press, London 1996.
- [3] Niiho, Y., Yamazaki, T., Nakajima, Y., Yamamoto, T., Ando, H., Hirai, Y., Toriizuka, K., Ida, Y., *J. Nat. Med.* 2006, 60, 82–88.
- [4] Haraguchi, H., Tanaka, Y., Kabbash, A., Fujioka, T., Ishizu, T., Yagi, A., *Phytochemistry* 2004, 65, 2255–2260.
- [5] Harborne, J. B., Baxter, H., *Phytochemical Dictionary – A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*, Taylor & Francis, London 1993.
- [6] Suzuki, O., Katsumata, Y., Oya, M., Chari, V. M., Klapfenberger, R., Wagner, H., Hostettmann, K., *Biochem. Pharm.* 1978, 27, 2075–2078.
- [7] Menkovic, N., Savikin-Fodulovic, K., Cebedzic, R., *Pharm. Pharmacol. Lett.* 1999, 9, 74–75.
- [8] Schmieder, A., Schwaiger, S., Csordas, A., Backovic, A., Messner, B., Wick, G., Stuppner, H., Bernhard, D., *Atherosclerosis* 2007, 194, 317–325.
- [9] Saha, P., Mandal, S., Das, A., Das, S., *Cancer. Lett.* 2006, 244, 252–259.
- [10] Morimoto, I., Nozaka, T., Watanabe, F., Ishino, M., Hirose, Y., Okitsu, T., *Mutat. Res.* 1983, 2, 103–117.
- [11] Pettei, M. J., Hostettmann, K., *J. Chromatogr. A* 1978, 154, 103–105.
- [12] Szűcs, Z., Dános, B., Nyiredy, S., *Chromatographia Suppl.* 2002, 56, S19–S23.
- [13] Vanhaelen, M., Vanhaelen-Fastre, R., *J. Chromatogr. A* 1983, 281, 263–271.
- [14] Glatz, Z., Pospíšilová, J., Musil, P., *J. Liq. Chromatogr. Rel. Techn.* 2000, 23, 1831–1839.
- [15] Aberham, A., Schwaiger, S., Stuppner, H., Ganzera, M., *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 2007, 45, 437–442.

## 5.7 Příloha 5

Ivana Citová, Radek Sladkovský, Olga Žižková, Petr Solich, Marie Pospíšilová: **Separace chloroformátových derivátů fenolických kyselin metodou plynové chromatografie**

*Chiranal 2005 – Pokroky v chromatografii a elektroforéze, 7. - 10. 2. 2005, Olomouc*

Plakátové sdělení



# SEPARACE CHLOROFORMÁTOVÝCH DERIVÁTŮ FENOLICKÝCH KYSELIN METODOU PLYNOVÉ CHROMATOGRAFIE

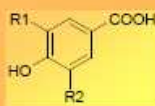
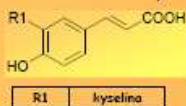
Ivana Citová, Radek Sladkovský, Olga Žižková, Petr Solich, Marie Pospíšilová  
 Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta, Katedra analytické chemie,  
 Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové; email: citovai@faf.cuni.cz

## Úvod

Fenolické kyseliny tvoří spolu s flavonoidy skupinu polyfenolických sloučenin, které patří mezi významné látky s antioxidační aktivitou vyskytující se téměř ve všech rostlinných a v potravinách rostlinného původu. Tato práce se věnuje hodnocení standardů fenolických kyselin, které se v přírodních materiálech nejčastěji vyskytují. Jedná se o hydroxyderiváty kyseliny skořicové (kyselina ferulová, kávová, kumarová) a benzoové (kyselina gallová, protocatechová, syringová a vanilová).

## Experimentální část

### 1. Hodnocené látky:

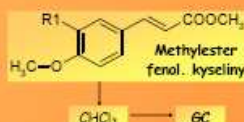
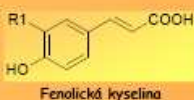


R1	R2	kyselina
OH	H	protocatechová
OH	OH	gallová
O-CH <sub>3</sub>	H	vanilová
O-CH <sub>3</sub>	O-CH <sub>3</sub>	syringová

R1	kyselina
H	kumarová
OH	kávová
O-CH <sub>3</sub>	ferulová

### 2. Příprava vzorku a derivatizace:

Byly připraveny standardní roztoky jednotlivých kyselin ve směsi methanol/acetonitril (1:1) o koncentraci 3 mg/ml a podle potřeby dále ředěny. Připravili jsme také směs hodnocených kyselin o téže koncentraci. Derivatizace pomocí chloroformátů probíhá ve vodním médiu složeném ze čtyř komponent - acetonitril, voda, methanol/ethanol a pyridin, přičemž průběh derivatizace z velké míry závisí na poměru jednotlivých komponent v médiu. Jako derivatizační činidlo byl použit methyl- (MCF) a ethylchloroformát (ECF).



- Postup:**
- 100 µl vzorku + 1 ml média → 1 min ultrazvuk
  - přidání po kapkách 250 µl derivatizačního činidla → třepání 1 min
  - vytřepání vzniklých alkylesterů do 1 ml chloroformu
  - přidání 1 ml 1M NaHCO<sub>3</sub> → třepání 1 min
  - nástřík spodní chloroformové vrstvy do plynového chromatografu

### 3. Plynová chromatografie (GC)

**Sestava:** plynový chromatograf Shimadzu GC-17A s autosamplerem a FID detektorem kolona Equity-5 (30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm; poly(5% difenyl/95% DM5)) chromatografický software CSW 1.7 pro Windows

**Podmínky:** Injektor - 240°C  
 Kolona - 100°C - 2 min, 10°C/min do 200°C, 5°C/min do 280°C  
 Detektor - 280°C  
 Mobilní fáze - N<sub>2</sub>, průtok 3,5 ml/min  
 Nástřík 1 µl, mód „splitless“



### 4. SPME - GC

**Vzorek:** 100 µl standardu + 1 ml média + 250 µl methylchloroformátu + 2 ml vody

**SPME vlákno:** PDMS/DVB (málo polární) a CAR/PDMS (polárnější)

**Podmínky:** doba extrakce 30 - 60 min, teplota 25 - 50°C, míchání 500 otáček/min., desorpce v GC 8 min

Následná GC analýza proběhla za výše uvedených podmínek.

U obou vláken jsme optimalizovali dobu extrakce a teplotu.

### Poděkování:

Projekt byl vypracován s podporou grantové agentury MŠMT (grant MSM 0021620822)

## Cíl práce

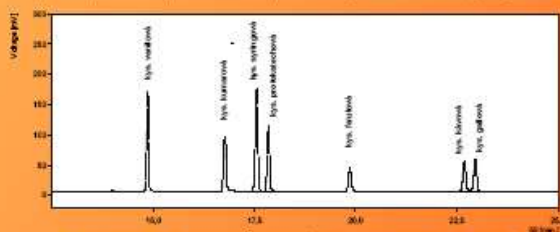
Cílem naší práce bylo nalézt vhodné podmínky pro separaci fenolických kyselin metodou plynové chromatografie (GC). Tyto látky lze hodnotit metodou GC po předchozí derivatizaci na těkavé estery, v našem případě reakcí s methyl- a ethylchloroformátem [1, 2].

Fenolické kyseliny se v přírodním materiálu vyskytují ve velmi nízkých koncentracích (v řádech µg/g), proto jejich hodnocení v takové matici vyžaduje předchozí zakonzentrování. V této práci byla vyzkoušena metoda mikroextrakce na tuhou fázi (SPME), zařazená jako krok následující po derivatizaci hodnocených látek.

## Výsledek

### Derivatizace methylchloroformátem:

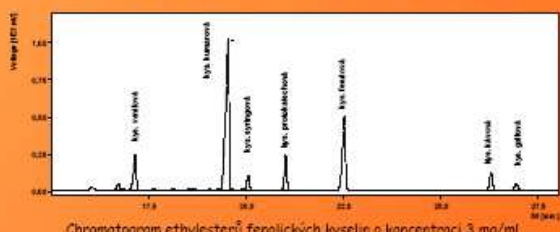
Optimální poměr komponent v médiu byl 14:8:2:3 (ACN:H<sub>2</sub>O:MeOH:Pyridin)



Chromatogram methylesterů fenolických kyselin o koncentraci 3 mg/ml

### Derivatizace ethylchloroformátem:

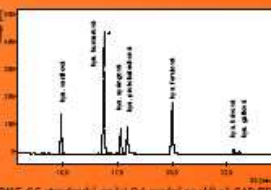
Optimální poměr komponent v médiu byl 4:4:3:1 (ACN:H<sub>2</sub>O:EtOH:Pyridin)



Chromatogram ethylesterů fenolických kyselin o koncentraci 3 mg/ml

### SPME - GC:

U obou vláken byly zjištěny optimální podmínky extrakce při laboratorní teplotě (25°C) a čase 40 min. Míra zakonzentrování analytů bylo u obou vláken přibližně stejná, avšak jednotlivé estery daných kyselin se zakonzentrovaly různou měrou. U kyselin kávové a galové jsme dokonce pozorovali žádný nárůst píků, naopak v některých případech došlo k jejich snížení.



SPME-GC standardní směs 0,6 mg/ml na vlákně CAR/PDMS

## Závěr

Pro separaci fenolických kyselin byla vyvinuta vhodná GC metoda s použitím alkylchloroformátové derivatizace, přičemž jako vhodnější se jevila derivatizace methylchloroformátem (vyšší citlivost, kratší doba analýzy). Jednotlivé kroky byly optimalizovány a validovány.

Metodou SPME jsme dosáhli přibližně pěti- až desetnásobného zakonzentrování analyzovaných látek.

### Literatura:

- [1] P. Hušek, *J. Chromatogr. A*, 547, (1991), 307  
 [2] P. Hušek, *Chromatographia*, 34, (1992), 621

## 5.8 Příloha 6

Ivana Citová, Lucie Havlíková, Radek Sladkovský, Petr Solich:

**Moderní trendy v analýze polyfenolických látek chromatografickými metodami**

*34. Syntéza a analýza léčiv, 12.-14. 9. 2005, Brno*

Plakátové sdělení



# MODERNÍ TRENDY V ANALÝZE POLYFENOLICKÝCH LÁTEK CHROMATOGRAFICKÝMI METODAMI (PŘEHLED)

Citová Ivana, Havlíková Lucie, Sladkovský Radek, Solich Petr

Katedra analytické chemie, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové,  
Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové; Email: ivana.citova@faf.cuni.cz

## 1. Polyfenolické látky

Polyfenolické látky představují významnou skupinu přírodních sloučenin obsažených prakticky ve všech zdrojích rostlinného původu. Spolu s karotenoidy se řadí mezi nejvýznamnější přírodní antioxidanty a hrají významnou roli v prevenci závažných onemocnění jako je rakovina, kardiovaskulární choroby či zánětlivé procesy. Jejich účinek spočívá ve schopnosti zhaššet volné kyslíkové radikály, které vznikají v lidském organismu v důsledku oxidačního stresu<sup>1</sup>.

## 2. Rozdělení a výskyt polyfenolických látek

Rozdělení	Příklad	Výskyt	
Flavonoidy	Anthocyany	cyandin	jahody, třesně, červené víno
	Isoflavony	genistein, daikzein	soja, sojové výrobky
	Flavanoly	katechin, epikatechin	brušky, červené víno, čaj
	Flavony	apigenin, luteolin	celer, olivy, paprika
	Flavonoony	hesperetin	citrusové plody
Fenolické kyseliny	Deriváty kyseliny hydroxy-benzoové	galová	maliny, jahody, grep
		protokatechová	
	Deriváty kyseliny hydroxy-skořicové	vanilová	
Stilbeny	Lignany	syringová	
		chlorogenová	
		ferulová	
resveratrol	káva, ovoce, džusy		
enterodiol	vino		
		lžné semínko	

Polyfenolické sloučeniny se dělí na dvě hlavní skupiny látek – flavonoidy a fenolické kyseliny, doprovázené ještě méně četnými stilbeny a lignany<sup>2</sup>. V současnosti je známo již více než 5000 polyfenolických sloučenin, z nichž přes 2000 látek tvoří flavonoidy<sup>3</sup>. Mezi hlavní zdroje polyfenolů patří ovoce a zelenina, nápoje (káva, čaj, víno) či léčivé rostliny, bojně využívané ve fytoterapii<sup>4</sup>.

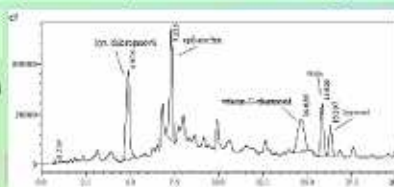
## 3. Analýza polyfenolických látek chromatografickými metodami

### Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

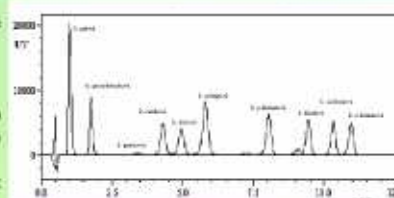
- Nejpopulárnější a nejvíce používaná metoda
- Využití zejména k hodnocení obsahu polyfenolů v potravinách a rostlinném materiálu
- HPLC podmínky:**
- Detekce - DAD (Diode-array), MS
- Stacionární fáze - téměř výlučně reverzní C18 fáze
- Mobilní fáze - binární systém - okyselená vodná fáze a polární organické rozpouštědlo (metanol, acetonitril)<sup>5</sup>

### Nekonenční HPLC metody

- NP HPLC - separace na normální stacionární fázi, vhodná k analýze procyanidinů
- Gelová permeační chromatografie (GPC) - procyanidiny
- Iontově-výmenná chromatografie (IEC) - anthocyany
- Vysokorychlostní protiproudá chromatografie (HSCCC) - moderní metoda, založená na rozdělení analytu mezi dvě kapalnou fáze; využití k analýze flavonoidů v přír. materiálu
- Superkritická fluidní chromatografie (SFC) - oproti HPLC nízká spotřeba rozpouštědel<sup>6</sup>



Chromatografický záznam HPLC analýzy extraktu lžné jednozemníku (*Crotalaria monogyna*) na koloně Zorbax Eclipse XDB-C18 4,6x75mm, 3,5µm  
Podmínky: MF - A; MeOH/0,085% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (15:85); B: 100% MeOH  
0-2 min 100% A, 2-18 min 70% A, průtok 1ml/min

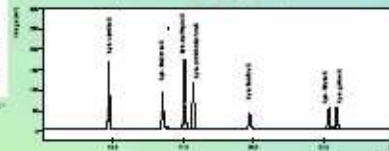


Chromatografický záznam HPLC analýzy standardů fenolických kyselin na koloně Synerge Fusion-IP 4x75mm, 3,0µm  
Podmínky: MF - A; MeOH/0,085% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (15:85); B: 100% MeOH  
0-4 min 15% B, 4-20 min 50% B, průtok 1ml/min

**Poděkování:** Projekt byl podpořen Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (grant G40K Z. 296/2005) a Výzkumnými záměry MSM, MSM 0021620822.

### Plynová chromatografie (GC)

- Výhodou plynové chromatografie je vysoká citlivost a rozlišení, nevýhodou jsou vysoké nároky na čistotu vzorku a nutná derivatizace fenolických sloučenin vzhledem k jejich nedostatečné létavosti
- Derivatizace:**
- silylační techniky - podmínka nevodného prostředí
- čísla - TMS (*N*-trimethylsilyldiethylamin), BSTFA (bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid)
- sesylovační techniky - alkylace methyljodidem, methanolem v prostředí borotrifluoridu či alykylchloroformátů (methyl- a ethylchloroformát)
- GC podmínky:**
- Detekce - nejčastěji MS (hmotnostně-spektrometrická), FID (plamenově-ionizační) či ECD (elektronového zachytu)
- Kolony - kapilární kolony s nepolární stacionární fází (př. 5%bifenyl/95%dimethylpolysiloxan)<sup>7,8</sup>



Chromatografický záznam GC analýzy standardů fenolických kyselin po derivatizaci methylchloroformátem ve vodním metánu na koloně Capillary-S 0,32mm IDx30m, 1,0mm d; HP - N<sub>2</sub>, průtok 3,5ml/min, INJ 240°C, DET 280°C, COL 100°C - 2 min, 10°C/min do 200°C, 5°C/min do 280°C

### Literatura:

- H. Tepper et al., *Biomed. Pharmacother.* 56 (2002) 200-207
- R. Tsao et al., *J.Chromatogr. B* 812 (2004) 95-99
- A. King, G. Young, *J. Am. Diet. Assoc.* 99 (1999) 213-218
- M. Wakamurako-Hajnoc, *J.Chromatogr. B* 717 (1998) 93-118

## 5.9 Příloha 7

Ivana Citová, Radek Sladkovský, Petr Solich:

**Derivatization and solid phase microextraction of phenolic acids followed by gas chromatography**

*4th International Conference on Instrumental Methods of Analysis - Modern Trends and Applications, 2.–6.10. 2005, Iraklion, Crete*

Plakátové sdělení



# DERIVATIZATION AND SOLID PHASE MICROEXTRACTION OF PHENOLIC ACIDS FOLLOWED BY GAS CHROMATOGRAPHY

Ivana Čitová\*, Radek Sladkovský, Petr Solich

Analytical Chemistry Department, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05, Hradec Králové, Czech Republic, E-mail: [ivana.citova@faf.cuni.cz](mailto:ivana.citova@faf.cuni.cz)

## INTRODUCTION

Polyphenols, comprising two main classes - flavonoids and phenolic acids - are important naturally occurring antioxidants present in almost all plants. The concentrations of phenolic acids in natural sources are very low (mg/g), and therefore their separation, identification and quantification require effective and precise analytical methods involving different extraction techniques, such as liquid-liquid extraction, solid-phase extraction or solid phase microextraction (SPME).

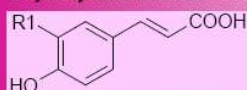
## THE AIM OF WORK

This project deals with the derivatization and gas chromatography (GC) separation of seven phenolic acids in connection with solid phase microextraction (SPME) - a modern extraction technique used for pre-treatment of complex natural matrices before the chromatographical analysis. The target of this work was to find out an optimal procedure of phenolic acids derivatization, convenient chromatographical conditions and the most suitable SPME fibre for the extraction of studied substances.

## EXPERIMENTAL

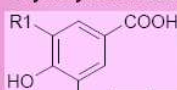
### 1. Substances studied

Hydroxycinnamic acid derivatives:



R1	acid
H	p-coumaric
OH	caffeic
O-CH <sub>3</sub>	ferulic

Hydroxybenzoic acid derivatives:



R1	R2	acid
OH	H	protocatechuic
OH	OH	gallic
O-CH <sub>3</sub>	H	vanilic
O-CH <sub>3</sub>	O-CH <sub>3</sub>	syringic

Derivatization step by step:

- 1.80 µl of standard solution + 1 ml of reaction medium → 1 min. ultrasound bath
- 150 µl of methyl-chloroformate is added dropwise → 1 min. shaking
- The newly formed methyl esters are shaken out into 1 ml of chloroform
- 1 ml of 1M NaHCO<sub>3</sub> solution is added → 2 min. shaking
- The bottom organic layer is separated and injected into the GC

### 2. Sample preparation and derivatization

Standard solutions:

- 3 mg/ml standard solutions of individual phenolic acids and their mixture were prepared by dissolving in acetonitrile using an ultrasound bath.
- The 3 mg/ml standard solution of all phenolic acids was then diluted by acetonitrile to get lower concentrations for the SPME procedure.

Derivatization:

- For the GC analysis phenolic acids must be derivatized into methyl esters using methyl-chloroformate (MCF) as a derivatization agent.
- The derivatization proceeds in an aqueous medium consisting of acetonitrile (AcN), water (H<sub>2</sub>O), methanol (MeOH) and pyridine in the ratio 14:10:2:3.

Reaction scheme:



### 3. Solid phase microextraction (SPME)

Sample preparation: 80 µl of standard solution + 1 ml of reaction medium + 150 µl of methyl-chloroformate + 2 ml of water

SPME fibres: PA (polyacrylate) - the most polar sorbent  
CAR/PDMS (carboxen/polydimethylsiloxane)  
PDMS/DVB (polydimethylsiloxane/divinylbenzene)  
PDMS (polydimethylsiloxane) - the least polar

Conditions:  
Time of extraction - 30 - 60 min.  
Temperature - 25 - 50 °C  
Stirring - 500 rev./min.  
Time of desorption - 8 - 10 min.

these parameters were optimized



### 4. GC analysis

Instrumentation: Shimadzu GC-17A system with autosampler and FID detector  
Equity-5 (30m x 0.32 mm ID, 0.25µm) fused-silica capillary column;  
poly(5% diphenyl/95% dimethylsiloxane)  
CSW 1.7 pro Windows chromatographic software

GC conditions: **Injector** - 240 °C

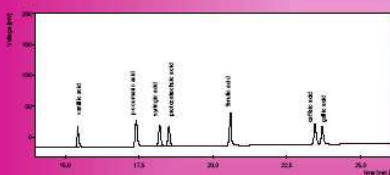
**Column** - 100 °C - 2 min., 10 °C/min. rate up to 200 °C and 5 °C/min. rate up to 280 °C

**Detector** - 280 °C

**Mobile phase** - N<sub>2</sub>, 3,5 ml/min. flow rate  
1 µl injection volume, splitless mode

### Without SPME

- Injection of diluted standard mixture (0,017 mg/ml)
- For comparison of chromatograms of analysis without and after SPME



Chromatogram of separation of phenolic acid methyl esters without previous pre-treatment by SPME (0.17 mg/ml)

### CONCLUSION

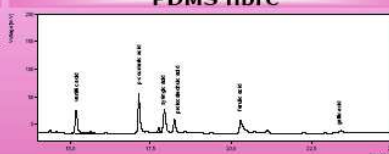
The most suitable SPME fibre for the extraction of phenolic acid methyl esters is the most polar polyacrylate fibre. Using this fibre resulted in approximately twenty-fold concentration effect.

### ACKNOWLEDGEMENT

The project was supported by the Grant Agency of Charles University, GAUK No. 234/2005 and by the Grant Agency of Ministry of Education MŠM 0021620822.

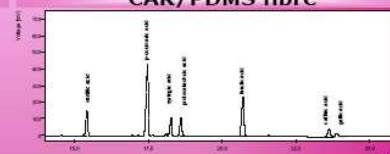
## RESULTS

### PDMS fibre



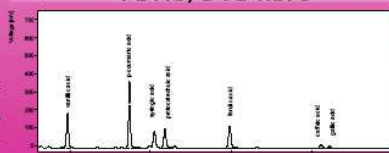
GC chromatogram after previous pre-treatment by the least polar PDMS fibre (0,017 mg/ml)  
CONDITIONS: 25 °C, 30 min. extraction, 10 min. desorption

### CAR/PDMS fibre



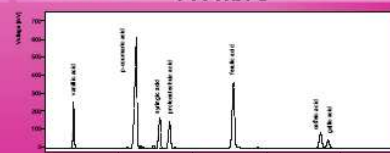
GC chromatogram after pre-treatment by CAR/PDMS fibre (0,017 mg/ml)  
CONDITIONS: 25 °C, 50 min. extraction, 10 min. desorption

### PDMS/DVB fibre



GC chromatogram after extraction by PDMS/DVB fibre (0,017 mg/ml)  
CONDITIONS: 30 °C, 60 min. extraction, 10 min. desorption

### PA fibre



GC chromatogram after pre-treatment by the most polar PA fibre (0,017 mg/ml)  
CONDITIONS: 25 °C, 50 min. extraction, 10 min. desorption



## 5.10 Příloha 8

Ivana Citová, Petr Solich:

**Gas chromatography determination of fatty acid composition of nutraceuticals containing encapsulated fish oil**

*International Symposium on Chromatography 2006, 21.-25.8. 2006, Kodaň, Dánsko*

Plakátové sdělení



## 5.11 Příloha 9

Citová I., Nováková L., Urbánek L., Solichová D., Solich P.:

**Simultaneous analysis of vitamins A and E by Ultra Performance Liquid Chromatography – tandem mass spectrometry**

*Joint Meeting Marburg 2006, 4.-7.10. 2006, Marburg, Německo*

Plakátové sdělení



# SIMULTANEOUS ANALYSIS OF VITAMINS A AND E BY ULTRA PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY



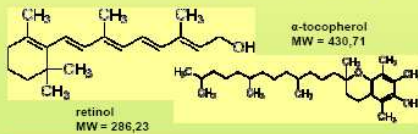
Citová I.<sup>1</sup>, Nováková L.<sup>1</sup>, Urbánek L.<sup>1,2</sup>, Solichová D.<sup>2</sup>, Solich P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, Hradec Králové, Czech Republic

<sup>2</sup>Department of Metabolic Care and Gerontology, Teaching Hospital, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

## 1. VITAMINS A and E

Vitamin A (retinol) and E ( $\alpha$ -tocopherol) are liposoluble micronutrients playing an important role in human organism. Retinol together with other retinoids and carotenoids positively affects reproduction, vision and immunity, and possibly prevents cancer process.  $\alpha$ -Tocopherol is an important antioxidant capable of catching free oxygen radicals and protecting biological membranes and body tissues against their harmful effects.



In order to study biological properties of both vitamins and to search for significant links between their intake and effect on health, determination of these compounds in biological samples by suitable analytical methods is of high importance. The analysis of fat-soluble vitamins may be useful for controlling the nutritional status, effectiveness of vitamin therapy or in the monitoring of oxidative stress as one of the negative side effects of anticancer drugs.

At our workplace, serum levels of retinol and  $\alpha$ -tocopherol are routinely determined within the monitoring of oncological patients before and during treatment with aromatase inhibitors in order to control oxidative stress caused by anticancer drugs.

## 3. ANALYSIS OF VITAMINS

The content of retinol and  $\alpha$ -tocopherol in human serum is commonly determined by the means of liquid chromatography with UV or DAD detection, using C18 stationary phases and 100% MeOH as mobile phase:

### Conventional HPLC - DAD:

Pecosphere C18 column (150 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m)  
Mobile phase flow rate: 1,5 ml/min  
Analysis time: 8 min

### HPLC - DAD using monolithic stationary phase:

Chromolith Performance RP-18 monolithic column (100 mm x 4,6 mm)  
Mobile phase flow rate: 2,5 ml/min  
Analysis time: 1,8 min

### Ultra performance liquid chromatography (UPLC) - UV

Acquity UPLC BEH C18 column (2,1 x 100 mm, 1,7  $\mu$ m)  
Mobile phase flow rate: 0,48 ml/min  
Analysis time: 2 min

## 4. ULTRA PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (UPLC)

UPLC represents a new approach towards the issue of fast, sensitive and high resolution liquid chromatography. The UPLC system use small particles, minimized system volumes and greater throughput to detect more peaks with faster run times, designed to be able to resist high back pressures (up to 103.5 Mpa ~ 15 000 psi). The UPLC system utilizes special columns with bridged ethylsiloxane/silica hybrid (BEH) sorbent made of 1.7  $\mu$ m particles ensuring wide pH operating range.

## 5. THE AIM OF WORK

- Development and validation of a novel UPLC - MS method for simultaneous determination of retinol and  $\alpha$ -tocopherol
- Comparison of possible advantages and disadvantages in contrast to common LC - DAD/UV methods
- Utilisation of the developed method for determination of both vitamins in human serum within medical research

## 6. MS METHOD DEVELOPEMENT

### 1. Instrumentation:

- Waters Acquity Ultra Performance Liquid Chromatography system equipped with Tunable UV detector (TUV) connected to Waters Micromass Quattro Micro API tandem quadrupole mass analyzer
- Column: Acquity UPLC BEH C18 (2,1 x 100 mm, 1,7  $\mu$ m)

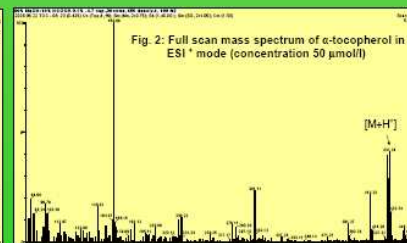
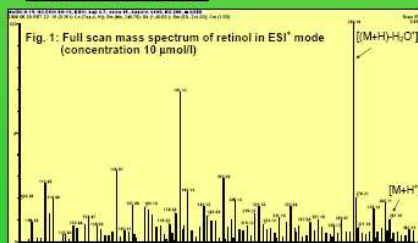
### 2. Searching for optimal ionisation conditions in MS operating mode

- different ionisation techniques:
  - ElectroSpray Ionisation (ESI) Positive mode (+)
  - Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI) Negative mode (-)
- different solvents and additives: 50-100% MeOH, addition of 0,1% and 0,01% HCOOH, 0,1% CH<sub>3</sub>COOH, 0,1% NH<sub>4</sub>OH
- finding out optimal capillary/corona voltage, cone voltage, desolvation temperature and desolvation gas (N<sub>2</sub>) flow

### 3. Optimal conditions found:

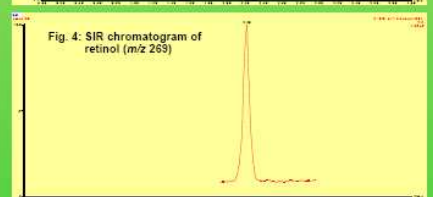
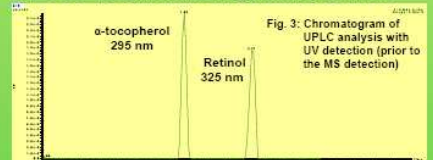
	RETINOL (Figure 1)	$\alpha$ -TOCOPHEROL (Figure 2)
Solvent	MeOH : 0,1% HCOOH 90:10	MeOH : 0,1% HCOOH 90:10
Ionisation mode	ESI +	ESI +
Capillary voltage	3,5 kV	4,7 kV
Cone voltage	20 V	30 V
Desolvation temperature	400 °C	450 °C
Desolvation gas flow	200 l/h	100 l/h

### 4. Full scan mass spectra:



## 7. UPLC - MS CONNECTION

- Mobile phase: MeOH : 0,1% HCOOH 90:10
- Flow rate: 0,35 ml/min
- Single Ion Recording (SIR) and Multiple Reaction Monitoring (MRM) modes were assessed, compared to the UV detector record (Figure 3)
- Retinol was measured as  $[(M+H)-H_2O]^+$  fragment ( $m/z$ 269) with sufficient signal obtained (Figure 4)
- Conditions for detection of  $\alpha$ -tocopherol in SIR and MRM modes are in progress
- UPLC - MS connection is being intensively worked on



## 8. FURTHER STEPS

- Checking out optimal ionisation conditions
- Finding suitable conditions for detection of both vitamins in different modes (SIR, MRM, daughter scan)
- Method validation
- Application of the developed method on the analysis of biological samples

## 9. ACKNOWLEDGEMENTS

The project was supported by the Ministry of Education of the Czech Republic-MSM 0021620322, the Grant Agency of Charles University-GAUK 236/2005 and the Ministry of Health of Czech Republic - MZD 00179608.

## 5.12 Příloha 10

Ivana Citová, Markus Ganzera, Hermann Stuppner, Petr Solich:

**Determination of gentisin, isogentisin and amarogentin in *Gentiana lutea* by capillary electrophoresis**

*Advances in Chromatography and Electrophoresis & Chiral 2007, 24.-27.6.2007, Olomouc*

Plakátové sdělení



# DETERMINATION OF GENTISIN, ISOGENTISIN AND AMAROGENTIN IN *Gentiana lutea* BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS



Ivana Citová<sup>1,2</sup>, Markus Ganzera<sup>2</sup>, Hermann Stuppner<sup>2</sup>, Petr Solich<sup>1</sup>

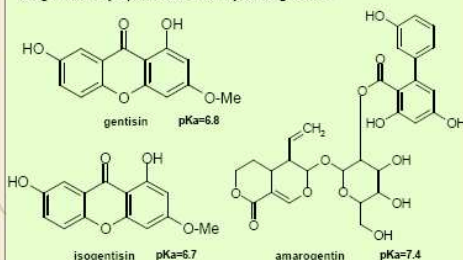
<sup>1</sup> Department of Analytical Chemistry, Charles University of Prague, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

<sup>2</sup> Institute of Pharmacy - Pharmacognosy, University of Innsbruck, Innrain 52, 6020 Innsbruck, Austria



## 1. INTRODUCTION

Roots of *Gentiana lutea* (gentian) are traditionally used as a bitter stomachic, either in form of a tea or as an alcoholic extract. Major bioactive components of gentian are bitter glycosides, such as gentiopicoside or amarogentin, followed by xanthenes like gentisin, isogentisin and gentisein, and other minor compounds (alkaloids, carbohydrates etc.). Amarogentin, the bitterest natural product till date is known for gastric stimulant properties, while gentisin and isogentisin show an inhibition of monoamine oxidase type A and B. Additionally, a recent study has demonstrated a significant cytoprotective activity of isogentisin.



## 2. THE AIM OF WORK

- development and optimization of a capillary electrophoresis (CE) method for separation of gentisin, isogentisin and amarogentin in methanolic extract of gentiana root
- method validation
- quantification of studied compounds in several commercially available *G. lutea* samples
- comparison of the novel CE method with high performance liquid chromatography (HPLC) of *G. lutea*

## 3. EXPERIMENTAL

- Instrumentation:** 3D-CE-instrument (Agilent) equipped with DAD
- Capillary:** fused silica capillary, 50  $\mu\text{m}$  i.d., effective length 60 cm
- Buffer system:** 100 mM borax solution of pH 9.3, containing 10 mM beta-cyclodextrine as additive
- Applied voltage:** 25 kV
- Injection:** hydrodynamic, 50 mbar, 5 sec.
- Temperature:** 30°C
- Detection:** gentisin, isogentisin - 260 nm; amarogentin - 242 nm
- Sample preparation:**
  - 150 mg of gentiana root powder is extracted three times with 3 ml of 100% MeOH in an ultrasonic bath and centrifuged
  - The extracts are collected in a 10 ml volumetric flask and filled up to the mark with 100% MeOH

## 4. RESULTS

### A) OPTIMIZATION

The following parameters were optimized in order to separate the selected analytes with sufficient resolution and in the shortest possible time. Peak shape and symmetry were also considered as relevant parameters.

- Concentration of borax solution: 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 120 mM
- Concentration of beta-cyclodextrine: 0 mM, 5 mM, 10 mM, 12.5 mM, 15 mM
- Buffer pH: 8.5, 9.0, 9.3, 9.5, 10.0
- Temperature: 40, 35, 30, 25, 20°C

Concentration and pH of the borax solution showed a major influence on analysis time and resolution of all compounds present in the extract. By increasing molarity analysis was prolonged; however, resolution of target analytes was improved (especially in case of separation of amarogentin from other compounds). By increasing pH of the buffer solution analysis was prolonged too, but at pH higher than 9.5 the separation as well as peak shapes were insufficient. Optimal temperature of capillary was 30°C, any other higher or lower temperature was not advantageous.

### B) VALIDATION & QUANTIFICATION

The developed method was validated for linearity, sensitivity, precision and accuracy.

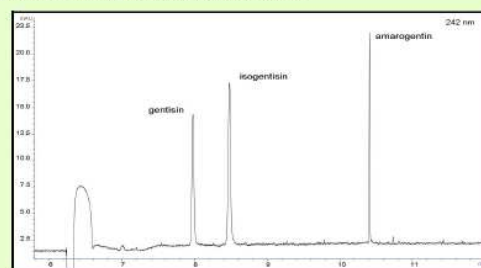
Parameter	gentisin	isogentisin	amarogentin
Linear range ( $\mu\text{g/ml}$ )	1.76 - 112.50	1.54 - 98.75	2.89 - 185.00
Correlation coefficient	0.9988	0.9988	0.9994
LOD / LOQ ( $\mu\text{g/ml}$ )	0.69 / 2.30	1.22 / 4.07	1.24 / 4.13
Accuracy (%) <sup>*</sup>	95.94	96.95	96.03
Repeatability (% R.S.D.) <sup>**</sup> - peak area	2.2	3.99	2.12
- retention time	0.13	0.17	0.25
Method precision (% R.S.D.) <sup>***</sup>	Intraday / interday		
- peak area	3.35 / 2.50	3.28 / 4.36	1.05 / 1.91
- retention time	0.57 / 0.67	1.03 / 0.39	0.45 / 1.52
Quantification - an example of one gentiana root sample			
Concentration in percentage (%) - CE	0.06	0.08	0.05
- HPLC	0.06	0.10	0.05

<sup>\*</sup> expressed as recovery after spiking the gentiana root sample with 100  $\mu\text{l}$  of standard mixture (conc. of gentisin, isogentisin and amarogentin was 94, 111 and 97  $\mu\text{g/ml}$ )

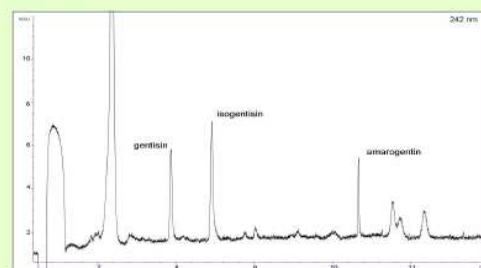
<sup>\*\*</sup> calculated after 10 injections of standard mixture solution

### C) ELECTROPHEROGRAMS

Standard mixture of gentisin (c=31.33  $\mu\text{g/ml}$ ), isogentisin (37.00  $\mu\text{g/ml}$ ) and amarogentin (32.33  $\mu\text{g/ml}$ ), detected at 242 nm.



An example of an electropherogram of one commercially available gentiana root sample. Detection at 242 nm.



<sup>\*\*\*</sup> expressed as relative standard deviation of peak area and retention time within one day (=intraday) and within three days (interday), one plant sample prepared and analyzed in five replicates per day

## 5. CONCLUSION

A novel CE method for the analysis of gentisin, isogentisin and amarogentin in *G. lutea* was developed and validated. Five samples of gentiana roots were quantified and the results were compared with those obtained by HPLC. The percentages of target compounds measured by CE and HPLC were almost identical. For the analysis of these compounds, CE represents a suitable alternative for HPLC.

## 6. ACKNOWLEDGEMENTS

The project was supported by the Ministry of Education of the Czech Republic - grant MSM 0021620822.

## 5.13 Příloha 11

I. Citová, L. Nováková, L. Urbánek, L. Krčmová, D. Solichová, P. Solich:  
**Determination of retinoic acid, retinol and tocopherols in human serum by Ultra Performance Liquid Chromatography – mass spectrometry**

*Recent Developments in Pharmaceutical Analysis 2007, 23. – 27. 9. 2007, Elba, Italy*

Plakátové sdělení

# DETERMINATION OF RETINOIC ACID, RETINOL AND TOCOPHEROLS IN HUMAN SERUM BY ULTRA PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

I. Cítová<sup>1</sup>, L. Nováková<sup>1</sup>, L. Urbánek<sup>1,2</sup>, L. Krčmová<sup>1,2</sup>, D. Solichová<sup>2</sup>, P. Solich<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05, Hradec Králové, Czech Republic, Email: ivana.citova@faf.cuni.cz

<sup>2</sup>Department of Metabolic Care and Gerontology, Teaching Hospital, 500 05, Hradec Králové, Czech Republic

## I. INTRODUCTION

### RETINOIC ACID

**Vitamin A** represents a group of compounds comprising retinol, retinal, retinoic acid and other analogs responsible for right growth and proper function of immune system.

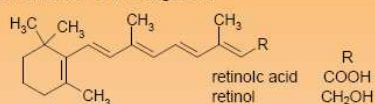
**Retinoic acid** is one of active metabolites of retinol and includes different *cis* and *trans* isomers which activate receptors for gene expression and mediate important functions of Vitamin A.

Retinoic acid is highly light- and thermo-sensitive; direct light and temperature above 45°C cause its isomerization and decomposition, which should be taken into account when handling with the substance, solutions and analyzed serum.

**Retinol** is a precursor of biologically active retinoids, such as retinal (necessary for vision) or retinoic acid.

Both retinol and retinoic acid have been recently investigated due to their potential role in prevention and treatment of cancer.

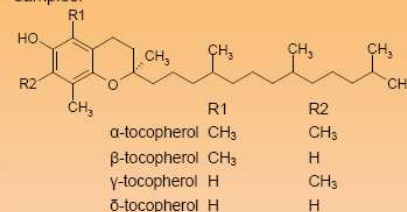
Retinol is commonly determined by HPLC with UV detection providing very low detection limits (20 nmol/l), however simultaneous determination of retinol and retinoic acid in a short retention time is still a matter of investigation.



### TOCOPHEROLS

**Vitamin E** comprises eight naturally occurring forms ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - tocopherols and tocotrienols) and acts as the main antioxidant of plasma, preventing membranes and lipoproteins from oxidative damage.

The growing interest in study of biological and antioxidant activity of different tocopherols calls for suitable analytical methods enabling separation of all isomers and their determination in biological samples.



## II. THE AIM OF WORK

Development and validation of a novel Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) method for simultaneous determination of retinoic acid, retinol and  $\alpha$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - tocopherol in human serum, using mass spectrometry detection. Analysis of retinoic acid, retinol and tocopherols in human serum contributes to the monitoring of oxidative stress in cancer patients.

## III. EXPERIMENTAL

### INSTRUMENT

**LC:** Waters Acquity Ultra Performance Liquid Chromatography system equipped with Tunable UV detector (TUV)

**Column:** Acquity UPLC BEH C18 1.7 $\mu$ m; 2.1 x 50 mm

**Mobile phase:** MeOH: 0.2% HCOOH 94:6 (v/v)

**Flow rate:** 0.38 ml/min

**MS:** Waters Micromass Quattro Micro API tandem quadrupole mass analyzer

**Ionisation:** ESI<sup>+</sup>

**Nebulizer & Desolvation gas:** Nitrogen

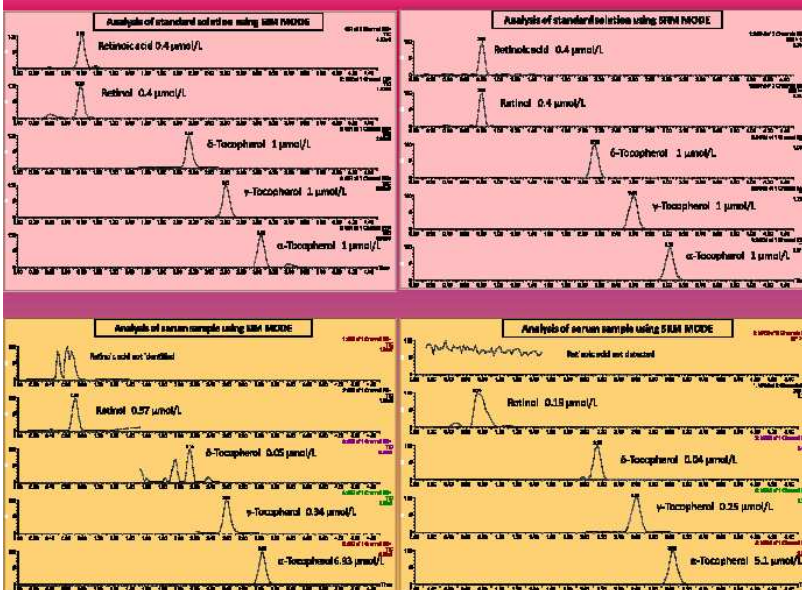
**Collision gas:** Argon

### MASS SPECTROMETRY

	Capillary Voltage (kV)	Desolv. Temp. (°C)	Gas Flow (L/h)	Dwell Time (sec)	t <sub>r</sub> (min)	SIM		SRM		
						Monitored ion	Cone Voltage (kV)	Monitored transition	Cone Voltage	Collision Voltage
Retinoic acid	3.5	400	600	0.6	0.79	[M+H] <sup>+</sup> m/z 301	20	269 → 193	10	15
Retinol				0.7	0.79	[M-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> m/z 269	25	301 → 123	15	25
$\delta$ -Tocopherol				0.7	2.15	[M+H] <sup>+</sup> m/z 403	35	403 → 137	25	20
$\gamma$ -Tocopherol				0.7	2.61	[M+H] <sup>+</sup> m/z 417	40	417 → 151	25	30
$\alpha$ -Tocopherol				0.7	3.02	[M+H] <sup>+</sup> m/z 431	30	431 → 165	25	30

## IV. RESULTS

### VALIDATION



		Retinoic acid	Retinol	$\delta$ -Toc.	$\gamma$ -Toc.	$\alpha$ -Toc.
Linear range ( $\mu$ mol/L)	SIM	0.05-2.0	0.05-4.05	0.02-5.0	0.03-5.0	0.27-50.0
	SRM	0.05-2.0	0.05-4.05	0.02-2.4	0.03-1.0	0.27-27.0
R <sup>2</sup>	SIM	0.992	0.998	0.996	0.998	0.999
	SRM	0.994	0.999	0.998	0.995	0.994
LOD ( $\mu$ mol/L)	SIM	0.02	0.004	0.01	0.02	0.005
	SRM	0.01	0.003	0.003	0.013	0.007
LOQ ( $\mu$ mol/L)	SIM	0.07	0.013	0.03	0.07	0.017
	SRM	0.03	0.01	0.01	0.04	0.023
Area Repeatability (RSD%)	SIM	1.09	3.69	2.31	1.52	1.43
	SRM	4.46	2.72	8.41	6.52	5.64
t <sub>0</sub> Repeatability (RSD%)	SIM	0.00	0.00	0.00	0.16	0.00
	SRM	0.00	0.00	0.00	0.25	0.42

- A novel, fast and sensitive UPLC-MS method for simultaneous analysis of vitamin A and E has been developed
- Both SIM and SRM modes have been tested, SRM enables more sensitive and more selective analysis
- Advantageous resolution of retinoic acid and retinol by monitoring of different ions/transitions at the same time
- Ultra short total analysis time - 3.5 min

### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the financial supports of the Czech Ministry of Education - grant FRVŠ 1164/2007 and project MSM 0021620822 - and Ministry of Health Care NR/9096-4. The project was supported by Zentiva company.



## 6 Shrnutí

Předložená disertační práce se věnuje širokému tématu analýzy vybraných přírodních látek pomocí moderních separačních metod, které je prezentováno z několika různých pohledů.

První pohled zahrnuje teoretické informace o studovaných přírodních látkách, zastoupených hlavně antioxidanty. Nejprve je pojednáno o vzniku volných radikálů a oxidačního stresu v organismu, následně jsou nastíněny funkce antioxidantů a možnosti antioxidantní terapie. Ve skupině přírodních látek s antioxidantní aktivitou, které byly v rámci disertační práce analyticky hodnoceny, jsou postupně charakterizovány biologické a fyzikálně-chemické vlastnosti fenolických kyselin, vitamínů A a E a vícenenasycených mastných kyselin. Současně jsou u každé skupiny látek shrnuty možnosti analytického postupu pro jejich stanovení v různých matricích. Analyty, které vybočují ze zařazení mezi antioxidanty, jsou obsahové látky hořce žlutého. Jejich farmakologické účinky, praktické využití v terapii a také způsoby analytického hodnocení jsou pojednány v poslední kapitole teoretické části věnované studovaným látkám.

Na problematiku analýzy těchto látek je možno také nahlížet z druhého pohledu – skrze představení použitých separačních technik a shrnutí jejich základních principů. Teoretická část věnovaná moderním separačním metodám obsahuje důležité informace o plynové chromatografii, spojení SPME-GC, Ultra účinné kapalinové chromatografii, hmotnostní spektrometrii a kapilární elektroforéze.

Třetí hledisko se týká již vlastní experimentální práce a dílčích úkolů věnujících se analýze vybraných látek. Jako první je prezentován projekt zabývající se analýzou fenolických kyselin ve formě chloroformiátových derivátů pomocí SPME-GC. Vyvinutá metoda byla publikována v časopise *Analytica Chimica Acta* a plný text článku je uveden v kapitole 5.3 (Příloha 1).

V další části je plynová chromatografie využita pro stanovení obsahu mastných kyselin v doplňcích stravy – želatinových kapslích s rybím olejem. Výsledky byly prezentovány formou plakátového sdělení, které je uvedeno v kapitole 5.10 (Příloha 8). Tento projekt tématicky navazoval na diplomovou práci, která se týkala GC analýzy sterolů a mastných kyselin v olejích z vlašských a lískových ořechů, a jejíž výsledky byly publikovány v časopise *European Food and Research Technology* (kapitola 5.4, Příloha 2).

Kapalinová chromatografie, konkrétně moderní technika UPLC byla využita pro následující úkol – vývoj a validaci metody pro stanovení vitamínu A (retinolu) a E ( $\alpha$ -tokoferolu) v lidském séru. Vyvinutá metoda byla porovnána s postupy využívající klasickou HPLC s částicovou a monolitní kolonou v publikaci v časopise *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, která je uvedena v kapitole 5.4 (Příloha 2). Rozšíření spektra hodnocených vitamínů o kyselinu retinovou a  $\gamma$ - a  $\delta$ -tokoferol bylo předmětem dalšího experimentu, který spočíval v separaci těchto pěti látek pomocí UPLC ve spojení s hmotnostně-spektrometrickou detekcí. Dosažené výsledky byly prezentovány ve dvou plakátových sděleních, které jsou k nahlédnutí v kapitolách 5.11 a 5.13 (Přílohy 9 a 11).

Poslední řešené téma zahrnuje stanovení gentisinu, isogentisinu a amarogentinu v hořci žlutém pomocí kapilární elektroforézy. Této problematice jsem se věnovala na studijní stáži na univerzitě v Innsbrucku a výsledkem je publikovaný článek v časopise *Journal of Separation Science*, jehož plný text je uveden v kapitole 5.6 (Příloha 4).

## 7 Summary

The presented dissertation thesis deals with an extensive topic of natural compounds analysis by the means of modern separation techniques described from different points of view.

Firstly, theoretical information about studied natural compounds (mainly antioxidants) has been summarized including characterization of the mechanism of free radicals formation and development of oxidative stress in human organism. Furthermore, the function of antioxidants and key roles of antioxidant therapy have also been discussed. Within the analyzed antioxidants, biological and physicochemical properties of phenolic acids, vitamins A and E and polyunsaturated fatty acids are described. Concurrently, known and published analytical procedures applied on each group of compounds are summarized. Besides antioxidants, content substances of yellow gentian (dried roots of *Gentiana lutea*) have been analyzed. Information about gentian pharmacological action, its practical utilization in therapy and ways of analytical determination represents the last chapter of theoretical part dealing with the studied compounds.

The second point of view comprises characterization of individual separation techniques used in the thesis. Basic principles of gas chromatography (GC), solid phase microextraction connected to GC (SPME-GC), Ultra performance liquid chromatography (UPLC), mass spectrometry (MS) and capillary electrophoresis (CE) are summarized in the second part of thesis theory.

Third point of view includes experimental work and particular projects dealing with the analysis of studied compounds. Analysis of chloroformate derivatives of phenolic acids by the means of SPME-GC is firstly presented. Developed method was published in *Analytica Chimica Acta* magazine, the full text is listed in Chapter 5.3. Furthermore, gas chromatography was utilized for determination of fatty acids in nutraceuticals containing encapsulated fish oil. Results were presented in a form of a poster that is stated in Chapter 5.10.

UPLC, a modern representative of liquid chromatography, was used for development and validation of a novel method for simultaneous determination of vitamin A (retinol) and vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) in human serum. The developed assay was compared with an HPLC method using particulate and monolithic columns within a publication in *Analytical and Bioanalytical Chemistry* magazine (See Chapter 5.4). Another experiment comprised UPLC-MS separation of more

complex mixture of vitamins A and E containing retinol, retinoic acid,  $\alpha$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -tocopherol. The achieved results were presented as two posters that are also stated in Chapters 5.11 and 5.13.

The last topic comprised determination of gentisin, isogentisin and amarogentin in yellow gentian by capillary electrophoresis. This project was studied during a study stage at the University of Innsbruck. As a result a short communication was published in the Journal of Separation Science. The full text is listed in Chapter 5.6.

## 8 Závěr

Přirozená touha člověka po poznání přinesla a stále přináší nové objevy a poznatky, které odhalují taje a zákonitosti přírody. Díky obrovskému pokroku v oblasti analytické chemie a jeho využití v analýze přírodních látek se podařilo identifikovat a kvantifikovat obsahové látky rostlin tak, že dnes u většiny rostlin známe jejich složení a účinky na lidský organismus. Analytická chemie však nalézá nezastupitelné využití také v oblasti lékařství, kde pomocí vhodně zvolené metody umožňuje monitorovat hladiny různých látek ať již přírodního (přirozené působky metabolismu, hormony, vitamíny, ionty atd.) či chemického původu (léčiva a jejich metabolity) v biologických vzorcích. Podobně jsou analytické metody nezbytnou součástí procesu kontroly léčiv, potravních doplňků či potravin, aby byla garantována jejich jakost a bezpečnost pro člověka. S analytickou chemií se tedy setkáváme prakticky na každém kroku. Přestože již bylo mnohé objeveno a objasněno, potřeba vyvíjet nové analytické metody pro rozmanité účely je stále aktuální. O analýze přírodních látek, především těch s antioxidační aktivitou, to možná platí dvojnásob.

Studium antioxidantů představuje současný trend, který vyplývá z lékařských poznatků odhalujících velký význam těchto látek v etiologii civilizačních onemocnění či v procesech stárnutí lidského organismu. Analýza látek s antioxidační aktivitou tedy přináší důležité informace o jejich funkci a vlastnostech skrze sledování hladin jak v přírodním, tak v biologickém materiálu. Volba analytické techniky závisí jednak na fyzikálně-chemických vlastnostech analytu, ale významně také na charakteru matrice, ve které je analyt stanovován. V dnešní době bývá u mnoha aplikací metodou volby vysokoúčinná kapalinová chromatografie, neboť se jedná o poměrně univerzální, přesnou a citlivou metodu, která při nalezení optimálních chromatografických podmínek umožňuje separaci a kvantifikaci složitých směsí látek.

Některé analyty však bývají tradičně hodnoceny plynovou chromatografií a tento ustálený způsob je zakotven i v závazných předpisech (normách, lékopisných metodách apod.). Příkladem může být analýza mastných kyselin či lékopisné stanovení  $\alpha$ -tokoferolu pomocí GC. Nevýhodou plynové chromatografie je nutnost převedení netěkavých hodnocených látek na těkavé deriváty, což často zneprůjemňuje analytický postup. Derivatizace však může přinášet i jistou výhodu

spočívající například ve vyizolování cílových látek z matrice pomocí specifické derivatizační reakce.

Nové a moderní technologie vyvíjené světovými výrobci analytické techniky se předhánějí v účinnosti separace, rychlosti a citlivosti stanovení a také v jednoduchosti ovládání přístroje pomocí dokonalého softwaru. Velký rozvoj můžeme pozorovat například v oblasti kapalinové chromatografie. Nové stacionární fáze, miniaturizace a použití odolnějších materiálů ve spojení s HPLC instrumentací daly vznik nové metodě Ultraúčinné kapalinové chromatografie představené v roce 2004. Použití UPLC umožňuje několikanásobné zvýšení rychlosti a citlivosti analýzy a rovněž snížení spotřeby rozpouštědel, což je prospěšné jak z ekonomického tak z ekologického hlediska.

Vedle kapalinové chromatografie podléhá v posledních letech velkému technickému rozvoji také kapilární elektroforéza. CE se sice stále řadí k alternativním separačním analytickým technikám, ale postupně si mezi nimi buduje svoji důležitou pozici. Mezi nesporné výhody CE patří velmi nízká spotřeba rozpouštědel, jednoduchost provedení a poměrně snadná optimalizace podmínek. Právě pro tato pozitiva si kapilární elektroforéza již našla uplatnění nejen na poli analýzy přírodních látek.

Všechny výše zmíněné metody představují pevné pilíře moderní analytické chemie. Na široké škále strukturně rozmanitých látek (vesměs s antioxidační aktivitou) byla znázorněna variabilita využití těchto metod pro separaci a kvantifikaci studovaných látek v různých matricích. Přestože pro většinu stanovovaných látek existuje tzv. metoda volby, která slouží k jejich běžnému hodnocení, je předložena práce důkazem toho, že i zdánlivě netradiční přístup může vést k úspěšným a prakticky využitelným výsledkům.

## 9 Seznam použité literatury

- 
- [1] S. Sturm, C. Seger, H. Stuppner, 12th International Meeting on Recent Developments in Pharmaceutical Analysis 2007 - Abstract Book, Itálie 2007, str. 12
- [2] <http://www.celostnimediceina.cz/volne-radikaly-a-antioxidanty-mudr-vaclav-holecck-csc.htm>, 15. 10. 2007
- [3] I. Mach, Doplnky stravy, Svoboda Servis, Praha 2004
- [4] B. N. Ames, M. K. Shigenaga, T. M. Hagen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993, str. 7915-7922
- [5] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Antioxidant>, 15. 10. 2007
- [6] B. Melichar, H. Kalábová, L. Krčmová, L. Urbánek, R. Hyšpler, E. Malířová, D. Solichová, Anticancer Res. (27) 2007, str. 4397-4401
- [7] V. Holeček, Klin. Biochem. Metab. 14, 2006, str. 140-145
- [8] K. I. Block, A. C. Koch, M. N. Mead, P. K. Tothy, R. A. Newman, Ch. Gyllenhaal, Cancer Treat. Rev. 33, 2007, str. 407-418
- [9] [http://www.sciencebasedhealth.com/sbh/PDF/Newsletter/06-07\\_Newsletter\\_Antioxidants&Cancer.pdf](http://www.sciencebasedhealth.com/sbh/PDF/Newsletter/06-07_Newsletter_Antioxidants&Cancer.pdf), 15. 10. 2007
- [10] I. Thabrew, R. M. Ayling, C. Wicks, Biochemistry for Clinical Medicine, Greenwich Medical Media LTD., London 2001
- [11] D. Dreher, A. F. Junod, Eur. J. Cancer. 32A, 1996, str. 30-38
- [12] M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Chem.-Biol. Interact. 160, 2006, str. 1-40
- [13] R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes, V. W. Rodwell, Harperova biochemie, Nakladatelství H+H, Praha 2002
- [14] B. Halliwell, Biochem. J. 401, 2007, str. 1-11
- [15] H. E. Seifried, D. E. Anderson, E. I. Fisher, J. A. Milner, J. Nutr. Biochem. 18, 2007, str. 567-579
- [16] H. E. Seifried, J. Nutr. Biochem. 18, 2007, str. 168-171
- [17] G. L. Russo, Biochem. Pharmacol. 74, 2007, str. 533-544
- [18] J. Bruneton, Pharmacognosy, Lavoisier Publishing, Paříž 1999
- [19] H. Taipero, K. D. Tew, G. Nguyen Ba, G. Mathé, Biomed. Pharmacoter. 56, 2002, str. 200-207
- [20] A. King, G. Young, J. Am. Diet. Assoc. 99, 1999, str. 213-218
- [21] P. M. Kris-Etherton, K. D. Hecker, A. Bonanome, S. M. Coval, A. E. Binkoski, K. F. Hilpert, A. E. Griel, T. D. Etherton, Am. J. Med. 113, 2002, str. 71S-88S
- [22] K. Glowniak, G. Zgóřka, M. Kozyra, J. Chromatogr. A 730, 1996, str. 25-29
- [23] Y. Amakura, M. Okada, S. Tsuji, Y. Tonogai, J. Chromatogr. A 891, 2000, 183-188
- [24] G. Zgóřka, K. Glowniak, J. Pharm. Biomed. Anal. 26, 2001, str. 79-87
- [25] M. del Álamo, L. Casado, V. Hernández, J. J. Jiménez, J. Chromatogr. A 1049, 2004, str. 97-105
- [26] A. H. Liu, H. Guo, M. Ye, Y. H. Lin, J. H. Sun, M. Xu, D. A. Guo, J. Chromatogr. A 1161, 2007, str. 170-182

- 
- [27] M. S. Dopico-García, P. Valentao, A. Jagodzinska, J. Klepczynska, L. Guerra, P. B. Andrade, R. M. Seabra, *Talanta* 74, 2007, str. 20-31
- [28] R. Tsao, Z. Deng, *J. Chromatogr. B* 812, 2004, str. 85-99
- [29] I. Hasbay Adil, H. I. Cetin, M. E. Yener, A. Bayindirli, *J. Supercrit. Flu.* 43, 2007, str. 55-63
- [30] D. Štěřbová, D. Matějčėk, J. Vlček, V. Kubáň, *Anal. Chim. Acta* 513, 2004, str. 435-444
- [31] M. Kivilompolo, T. Hyötyläinen, *J. Chromatogr. A* 1145, 2007, str. 155-164
- [32] I. Citová, R. Sladkovský, P. Solich, *Anal. Chim. Acta* 573-574, 2006, str. 231-241
- [33] Ch. Ma, S. Xiao, Z. Li, W. Wang, L. Du, *J. Chromatogr. A* 1165, 2007, str. 39-44
- [34] N. Vanbeneden, F. Delvaux, F. R. Delvaux, *J. Chromatogr. A* 1136, 2006, str. 237-242
- [35] Y. J. Wei, L. W. Qi, P. Li, H. W. Luo, L. Yi, L. H. Sheng, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45, 2007, str. 775-784
- [36] J. Šafra, M. Pospíšilová, A. Kavalířová, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41, 2006, str. 1022-1024
- [37] D. L. D. Lima, A. C. Duarte, V. I. Esteves, *Talanta* 72, 2007, str. 1404-1409
- [38] F. N. Fonseca, M. F. M. Tavares, C. Horváth, *J. Chromatogr. A* 1154, 2007, str. 390-399
- [39] E. M. Risso, R. G. Péres, J. Amaya-Farfan, *Food Chem.* 105, 2007, str. 1578-1582
- [40] M. Waksmundzka-Hajnos, *J. Chromatogr. B* 717, 1998, str. 93-118
- [41] L. Minuti, R. M. Pellegrino, I. Tesei, *J. Chromatogr. A* 1114, 2006, str. 263-268
- [42] D. A. Bender, *Nutritional Biochemistry of the Vitamins*, Cambridge University Press, Cambridge 1992
- [43] J. Mann, A. S. Truswell, *Essentials of Human Nutrition*, Oxford University Press, New York 2002
- [44] M. L. Bishop, J. L. Duben-Engelkirk, E. P. Fody *et al.*, *Clinical Chemistry – Principles, Procedures, Correlations*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2000
- [45] J. Velíšek, *Chemie potravin*, 2. díl, Osis, Tábor 2002
- [46] Q. Jiang, S. Christen, M. K. Shigenaga, B. N. Ames, *Am. J. Clin. Nutr.* 74, 2001, str. 14-22
- [47] J. Racek *et al.*, *Klinická biochemie*, Galén, Praha 2006
- [48] V. I. Piironen v: W. O. Song, G. R. Beecher, R. R. Eitenmiller, *Modern analytical methodologies in fat- and water- soluble vitamins*, Wiley, New York 2000
- [49] *Český lékopis 2005*, 3. díl, Grada Publishing, Praha 2005
- [50] T. Arnhold, H. Nau v: W. O. Song, G. R. Beecher, R. R. Eitenmiller, *Modern analytical methodologies in fat- and water- soluble vitamins*, Wiley, New York 2000
- [51] M. A. Kane, N. Chen, S. Sparks, J. L. Napoli, *Biochem. J.* 388, 2005, str. 363-369



- 
- [52] D. L. Crowe, R. Kim, R. A.S. Chandraratna, *Mol. Cancer. Res.* 1, 2003, str. 532-540
- [53] [http://www.sweb.cz/hplc1/Vitamin/ch\\_vitaminA.htm](http://www.sweb.cz/hplc1/Vitamin/ch_vitaminA.htm) , 2. 1. 2008
- [54] <http://www.sigmaaldrich.com/> , 2. 1. 2008
- [55] R. R. Eitenmiller, W. O. Landen v: W. O. Song, G. R. Beecher, R. R. Eitenmiller, *Modern analytical methodologies in fat- and water- soluble vitamins*, Wiley, New York 2000, str. 171-215
- [56] L. Urbánek, L. Krčmová, D. Solichová, B. Melichar, V. Opletalová, P. Solich, *J. Sep. Sci.* 29, 2006, str. 2485-2493
- [57] D. Siluk, R. V. Oliveira, M. Esther-Rodriguez-Rosas, S. Ling, A. Bos, L. Ferruci, I. W. Wainer, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44, 2007, str. 1001-1007
- [58] L. Urbánek, D. Solichová, B. Melichar, J. Dvořák, I. Svobodová, P. Solich, *Anal. Chim. Acta* 573 Sp. Iss., 2006, str. 267-272
- [59] R. Andreoli, P. Manini, D. Poli, E. Bergamaschi, A. Mutti, W. M. A. Niessen, *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 2004, str. 987-994
- [60] F. P. Capote, J. R. Jiménez, J. M. M. Granados, M. D. Luque de Castro, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21, 2007, str. 1745-1754
- [61] J. Velíšek, *Chemie potravin*, 1. díl, Osis, Tábor 2002
- [62] H.-J. de Geus, I. Aidos, J. de Boer, J. B. Luten, U. A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 910, 2001, str. 95-103
- [63] A. P. Simopolous v: I. Goldberg, *Functional Foods – Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals*, Chapman & Hall, London 1994
- [64] O. V. Sayanova, J. A. Napier, *Phytochemistry* 65, 2004, str. 147-158
- [65] B. G. Semporé, J. A. Bézard v: L. M. L. Nollet, *Handbook of Food Analysis*, Marcel Dekker Inc., New York 1996
- [66] AOAC Official Method 991.39, AOAC International 2000
- [67] AOAC Official Method 963.22, AOAC International 2000
- [68] ISO 5509, International Organisation for Standardisation, 2000
- [69] *European Pharmacopoeia 6th edition (Ph. Eur. 6)*, Council of Europe, Strasbourg, 2007
- [70] Česká norma ČSN ISO 5509 (58 8767), Český normalizační institut, 1994
- [71] F. David, P. Sandra, A. K. Vickers, *Column Selection for the Analysis of Fatty Acid Methyl Esters – Application*, Agilent Technologies, USA 2005
- [72] M. Schreiner, *J. Chromatogr. A* 1095, 2005, str. 126-130
- [73] *Český lékopis 2002, Doplněk 2004*, 2. díl, Grada Publishing, Praha 2004
- [74] J. Tomko a kolektiv, *Farmakognózia*, Osveta, Martin 1999
- [75] M. Blumenthal, A. Goldberg, J. Brinckmann, *Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs*, American Botanical Council, Austin 2000
- [76] C. A. Newall, L. A. Anderson, J. D. Phillipson, *Herbal Medicines – A Guide for Healthcare Professionals*, The Pharmaceutical Press, London 1996
- [77] P. Saha, S. Mandal, A. Das, S. Das, *Cancer Letters* 244, 2006, str. 252-259
- [78] H. Haraguchi, Y. Tanaka, A. Kabbash, T. Fujioka, T. Ishizu, A. Yagi, *Phytochemistry* 65, 2004, str. 2255-2260
- [79] J. B. Harborne, H. Baxter, *Phytochemical Dictionary - A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*, Taylor & Francis, London 1993, str. 532-535

- 
- [80] O. Suzuki, Y. Katsumata, M. Oya, V. M. Chari, R. Klapfenberger, H. Wagner, K. Hostettmann, *Biochem. Pharm.* 27, 1978, str. 2075-2078
- [81] N. Menkovic, K. Savikin-Fodulovic, R. Cebedzic, *Pharm. Pharmacol. Lett.* 9, 1999, str. 74-75
- [82] A. Schmieder, S. Schwaiger, A. Csordas, A. Backovic, B. Messner, G. Wick, H. Stuppner, D. Bernhard, *Atherosclerosis* 194, 2007, str. 317-325
- [83] A. Aberham, S. Schwaiger, H. Stuppner, M. Ganzera, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45, 2007, str. 437-442
- [84] M. J. Pettei, K. Hostettmann, *J. Chromatogr.* 154, 1978, str. 106-109
- [85] Z. Szücs, B. Dános, S. Nyiredy, *Chromatographia Suppl.* 56, 2002, str. S-19-S-23
- [86] M. Vanhaelen, R. Vanhaelen-Fastre, *J. Chromatogr. A* 281, 1983, str. 263-271
- [87] Z. Glatz, J. Pospíšilová, P. Musil, *J. Liq. Chromatogr. R. T.* 23, 2000, str. 1831-1839
- [88] Z. Holzbecher, J. Churáček a kol., *Analytická chemie, Nakladatelství technické literatury, Praha* 1987
- [89] R. L. Grob, E. F. Barry, *Modern Practice of Gas Chromatography*, Wiley – Interscience, New Jersey 2004
- [90] C. E. Meloan, *Chemical Separations – Principles, Techniques and Experiments*, Wiley-Interscience, New York 1999
- [91] J. V. Hinshaw, *LCGC* 19, 2001, str. 1056-1064
- [92] K. Štulík a kol., *Analytické separační metody, Nakladatelství Karolinum, Praha* 2005
- [93] R. E. Majors, *LCGC North America* 21, 2003, str. 960-966
- [94] J. Pawliszyn, *Solid Phase Microextraction Theory and Practice*, John Wiley & Sons, New York 1997
- [95] H. Lord, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 885, 2000, str. 153-193
- [96] *Supelco Bulletin 923: Solid Phase Microextraction: Theory and Optimization of Conditions*, 1998 Sigma-Aldrich Co.
- [97] [www.waters.cz](http://www.waters.cz), [www.waters.com](http://www.waters.com), 30. 3. 2008
- [98] [www.hplc.cz](http://www.hplc.cz), 5. 4. 2008
- [99] K. Bílková, B. Králová, *Izolace biomakromolekul, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha* 1997,
- [100] E. S. Grumbach, T. E. Wheat, M. Kele, J. R. Mazzeo, *LC/GC - Separation Science Redefined*, May 2005, str. 40 - 44
- [101] Webové stránky University of Bristol, School of Chemistry, Mass Spectrometry Resource, <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/mshome.html> , 26. 4. 2008
- [102] [http://en.wikipedia.org/wiki/Mass\\_spectrometry](http://en.wikipedia.org/wiki/Mass_spectrometry) , 26. 4. 2008
- [103] M. Holčapek, Přednášky k předmětu „Hmotnostní spektrometrie v organické analýze“, [http://holcapek.upce.cz/teaching\\_CZ.htm](http://holcapek.upce.cz/teaching_CZ.htm) , 26. 4. 2008
- [104] D. Heiger, *High performance capillary electrophoresis: An introduction*, Agilent Technologies, 2000
- [105] T. M. Annesley, *Clin. Chem.* 49, 2003, str. 1041 - 1044