

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**



KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

*Využití metody HILIC pro hodnocení stability
kyseliny askorbové*

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Hradec Králové 2008

Mgr. Soňa Pavlovičová

Děkuji PharmDr.Lucii Novákové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a všestrannou pomoc při vypracování rigorózní práce.

Dále děkuji všem pracovníkům katedry analytické chemie za ochotu a pomoc.

Poděkování také patří grantové agentuře GAČR 203/07/P370 za finanční podporu.

Abstrakt

Autor: Soňa Pavlovičová

Název: Využití metody HILIC pro hodnocení stability kyseliny askorbové

Jazyk: český

Klíčová slova: kyselina askorbová, stabilita, HILIC, stabilizační činidlo

Kyselina askorbová, vitamin C, je látka velmi polární, a je proto velmi obtížně analyzovatelná pomocí kapalinové chromatografie na reverzních fázích. Z tohoto důvodu byla vyvinuta metoda HILIC (Hydrophilic interaction liquid chromatography) a optimalizovány podmínky pro analýzu. Analýza probíhala na koloně ZIC-HILIC (150 x 2,1 mm, 3,5 μm), mobilní fáze se skládala z acetonitrilu a 50 mM pufru octanu amonného o pH 6,8. Za daných podmínek trvala analýza asi 4 minuty. Ke kvantifikaci byla použita kyselina chlorogenová. Metoda využívá UV detekci při 268 nm. Byl sledován vliv jednotlivých faktorů, jako je teplota, koncentrace, přítomnost kyslíku, pH vodné části roztoku na stabilitu kyseliny askorbové a byl zkoumán vliv stabilizačních činidel různého typu. Optimálních podmínek bylo dosaženo snížením teploty na 4°C a použitím 10 mM kyseliny šťavelové jako stabilizačního činidla. Dobrých výsledků bylo dosaženo i při použití 5 % kyseliny o-fosforečné. Metoda byla validována a vyhovovala požadavkům lékopisu.

Abstract

Author: Soňa Pavlovičová

Title: The application of HILIC method in the stability evaluation of ascorbic acid

Language: czech

Keywords: ascorbic acid, HILIC, stability, stabilizing agents

Ascorbic acid, vitamin C, is a very polar compound, and is therefore difficult to be analysed by RP-HPLC. For these reason HILIC method (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) was developed and the optimal conditions for the analysis were determined. The analysis occurred on the ZIC-HILIC column (150 x 2.1, 3.5 μm), the mobile phase consisted from acetonitrile and 50 mM ammonium acetate buffer pH 6.8. The method used UV detection at 268 nm. Under these conditions the analysis take approximately 4 minutes. Chlorogenic acid was used for quantification. Various stability factors as temperature, concentration, the presence of oxygen and pH of the solution were studied. This work also solved the troubles with stabilizing agents and their influence on stability of ascorbic acid. Optimal conditions were obtained, when the temperature was decreased to 4°C and 10 mM oxalic acid was used for stabilization. Good results were also obtained with 5 % o-phosphoric acid as stabilizing agent. The method was validated and it met pharmacopea requirements.

Obsah

1	ÚVOD.....	8
2	CÍL.....	9
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
3.1	Kyselina askorbová	10
3.1.1	Metody stanovení kyseliny askorbové	12
3.1.2	Kvantifikace, volba vnitřního standardu	19
3.2	Stabilita kyseliny askorbové.....	20
3.2.1	Stabilita, citlivost, specifita a interference.....	20
3.2.2	Stabilita kyseliny askorbové za různých podmínek	21
3.2.3	Shrnutí	24
3.3	Metoda HILIC	25
3.3.1	Charakteristika metody HILIC	25
3.3.2	Chromatografický systém.....	25
3.3.3	Charakteristiky chromatografického procesu.....	28
3.3.4	Složení mobilní fáze	30
3.3.5	Úprava vzorků	32
3.4	ZIC [®] -HILIC a ZIC [®] -pHILIC	32
3.4.1	Využití metody HILIC	33
4	PRAKTICKÁ ČÁST	34
4.1	Použité chemikálie.....	34
4.2	Použité přístroje.....	35
4.3	Použité roztoky	36
4.4	Vliv jednotlivých faktorů na stabilitu.....	41
5	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	43
5.1	Chromatografické podmínky-optimalizace HILIC podmínek	43
5.1.1	Výběr stacionární fáze	43
5.1.2	Složení mobilní fáze	43
5.1.3	Rychlost průtoku mobilní fáze	45
5.1.4	UV detekce	45
5.1.5	Stabilita AA v mobilní fázi, nastavení teploty kolony	45
5.1.6	Volba vnitřního standardu	45

5.2	Stabilitní testy – vliv stabilitních faktorů	47
5.2.1	Zhodnocení vlivu teploty na stabilitu	47
5.2.2	Zhodnocení vlivu koncentrace kyseliny askorbové na její stabilitu.....	49
5.2.3	Zhodnocení vlivu pH vodné části mobilní fáze na stabilitu.....	50
5.2.4	Zhodnocení vlivu odplynění rozpouštědla na stabilitu.....	51
5.2.5	Zhodnocení vlivu stabilizačních činidel na stabilitu	52
5.3	Test způsobilosti systému a validace.....	59
5.3.1	SST	59
5.3.2	Kalibrace.....	59
5.3.3	Analýza reálného vzorku kyseliny askorbové.....	59
6	ZÁVĚR.....	62

Použité zkratky

AA	Kyselina askorbová
ACN	Acetonitril
DAD	Detektor s diodovým polem
DHAA	Kyselina dehydroaskorbová
2,3-DKG	Kyselina 2,3-diketoglukonová
ED	Elektrochemická detekce
EDTA	Edetan disodný, Chelaton 3
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IS	Vnitřní standard
LOD	Limit detekce
LOQ	Limit kvantifikace
MeOH	Methanol
MF	Mobilní fáze
MPA	Kyselina m-fosforečná
MS	Hmotnostní spektrometr
NP-HPLC	Kapalinová chromatografie na normálních fázích
ODS	Oktadecylsilika
RP-HPLC	Kapalinová chromatografie na obrácených fázích
RSD	Relativní směrodatná odchylka
TCA	Kyselina trichloroctová
TEA	Triethylamin
UV	Ultrafialové/á oblast vlnových délek

1 Úvod

Kyselina askorbová, neboli vitamín C, patří mezi vitamíny rozpustné ve vodě. Je to látka velmi rozšířená, nalézající se přirozeně v různých druzích ovoce a zeleniny. Jako antioxidant je používán k obohacování různých druhů nápojů a potravin. Této látce jsou přikládány různé pozitivní účinky na lidský organismus.

Z analytického hlediska se jedná o látku s relativně malou molekulou, polární, poměrně nestabilní, která snadno oxiduje. Z uvedených důvodů není jednoduché vyvinout jednoduchou, citlivou a spolehlivou metodiku pro její stanovení kapalinovou chromatografií.

2 Cíl

Cílem této práce je optimalizovat metodu HILIC pro analýzu vitamínu C, nalézt vhodné podmínky pro analýzu, jako je stacionární fáze, složení a pH vodné složky mobilní fáze, způsob detekce, teplota. Hlavním dílem práce je pak komplexně zjistit vliv různých faktorů na stabilitu vitamínu C, jedná se konkrétně o vliv teploty, přítomnosti kyslíku, pH roztoku, koncentrace AA a vliv stabilizačních činidel různých typů a v různých koncentracích. Bylo provedeno mnoho prací, které se zabývají stabilitou AA, ale obvykle zohledňují pouze vliv jednoho, dvou či několika málo stabilitních faktorů. Tato práce se zaměřuje na celkové posouzení různých typů stabilizace vitamínu C, snahou je nalézt optimální podmínky při kterých lze provádět analýzu reálných vzorků, tak aby nedocházelo k výraznému snižování jeho obsahu během analýzy. Předpokladem pro analýzu je aby metoda byla spolehlivá, rychlá, jednoduchá, citlivá a relativně levná.

3 Teoretická část

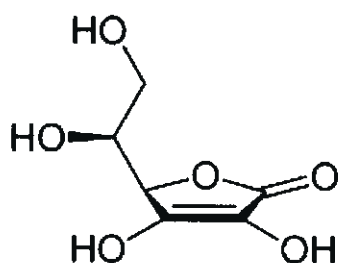
3.1 Kyselina askorbová

Chemicky je kyselina askorbová (5R)-5-[(1S)-1,2-dihydroxyethyl]-3,4-dihydroxyfuran-2-(5H)-on, struktura je na obrázku, Obr. 1.

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Působením vzduchu a vlhkosti mění barvu. Je snadno rozpustná ve vodě, dobře rozpustná v lihu 96% a prakticky nerozpustná v etheru.

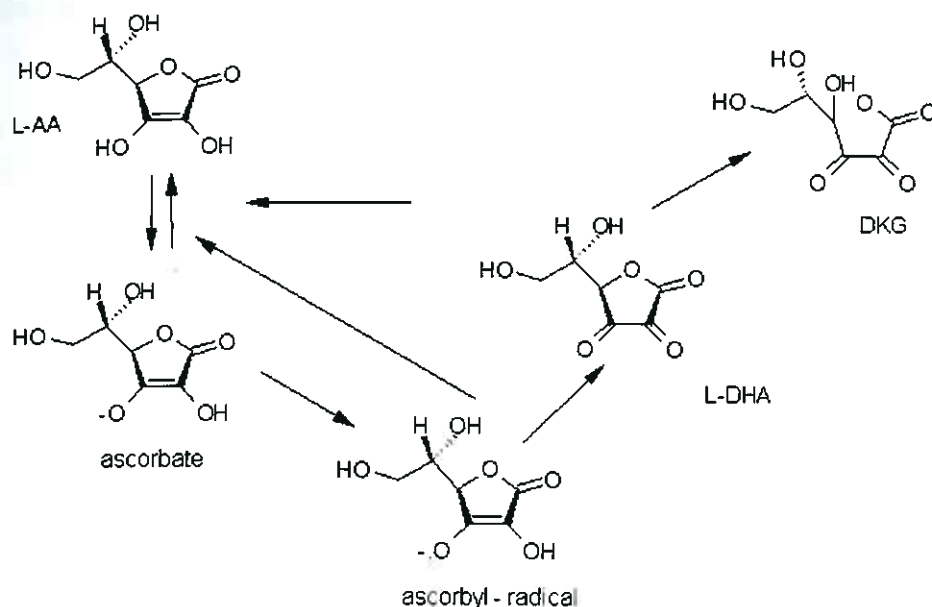
Taje při asi 190 °C, za rozkladu. [1][2]

Obr. 1 - Chemická struktura kyseliny askorbové



Kyselina askorbová, vitamín C, je ve vodě rozpustný vitamín, který je z těla snadno vylučován a je nepostradatelnou složkou naší stravy pro zachování zdravého života. Strukturálně je to jeden z nejjednodušších vitamínů. Ačkoli se jedná o jednoduchou molekulu, dvojná vazba a hydroxylové skupiny způsobují, že se podílí na redoxních chemických reakcích. Je známo mnoho let, že kyselina askorbová je snadno oxidována rozpuštěným kyslíkem [3], působením zvýšené teploty, enzymů, nebo přítomností dvojmocných kationtů kovů [4][5]. Prvním degradačním produktem je kyselina dehydroaskorbová. Tato reakce může být zvrácena silnými redukčními činidly. Kyselina dehydroaskorbová je degradována hydrolýzou a oxidací na 2,3-diketoglukonovou kyselinu, Obr. 2. Obě, jak kyselina askorbová tak dehydroaskorbová jsou biologicky aktivní. Další degradační produkty postrádají biologickou aktivitu nezbytnou pro prevenci kurdějí [3].

Obr. 2 - Reakční schéma oxidace kyseliny askorbové



Kyselina askorbová je silným antioxidantem a vychytávačem volných radikálů [6], je to vitamín důležitý pro prevenci kurdějí, nezbytný pro syntézu kolagenu a v prevenci krvácení [7]. Dále se podílí na tvorbě karnitinu, tyrosinu a reakcích závislých na cytochromu P450 a na imunologických reakcích [8]. Předpokládá se, že hraje důležitou roli v prevenci kardiovaskulárních chorob a rakoviny, pravděpodobně díky jeho schopnosti snižovat tvorbu nitrosaminu a interagovat s volnými radikály [9][10][11][12].

Historicky byla znalost metabolismu kyseliny askorbové soustředěna primárně na prevenci onemocnění z jeho nedostatku, kurděje. Podvýživa spojená s chudobou nebo zdravotním stavem jako je kachexie spojená s rakovinou, malabsorpcí, alkoholismem nebo látkovou závislostí může někdy vyústit v kurděje. Úplný nedostatek kyseliny askorbové se stále vyskytuje ve Spojených státech. Subklinický nedostatek vitamínu C je mnohem běžnější než zjevný nedostatek, protože značná část populace jí méně než jeden kus ovoce nebo zeleniny denně. Současný výzkum kyseliny askorbové je zaměřen na její optimální příjem [13].

3.1.1 Metody stanovení kyseliny askorbové

Metody pro kvantitativní stanovení kyseliny askorbové a její oxidované formy, kyseliny dehydroaskorbové, jsou nepostradatelné při zkoumání funkcí těchto sloučenin.

Metody pro stanovení vitamínu C jsou dostupné od jeho izolace, tedy 60 let, viz Tab. 1. S postupujícími znalostmi stoupá potřeba citlivějších a selektivnějších metod. Mnoho metod stanovení kyseliny askorbové je poznamenáno „syndromem čtyř S“, který označuje nedostatečnou stabilitu, citlivost (sensitivity), specifitu a interferenci s dalšími látkami (substance interference).

Tab. 1 - Metody analýzy askorbové a dehydroaskorbové kyseliny [13]

Metoda	Nejnižší citlivost (pmol/nastříkovaný vzorek)	Objem nastříkovaného vzorku (μl)	Princip metody
Kolorimetrie / Spektrofotometrie			
2,6-DCPIP	34000	600-4000	redukce askorbátu 2,6-dichlorindofenolem
chromogenní komplex železa	400	5-5000	redukce askorbátu Fe ³⁺ a aktivace barevných chelátů
2,4-DNPH	3000	500-4000	tvorba bis-2,4-dinitrofenylhydrazonu
fotochemiluminiscence	50	700	tvorba methanolem derivatizované dehydroaskorbové kyseliny
Fluorimetrie	280	420-2000	tvorba chinozalinových derivátů kyseliny dehydroaskorbové

Plynová chromatografie	17	0,1-50	měření trimethylsilyl eter derivátů kyseliny askorbové a dehydroaskorbové
Enzymatické metody			
Oxidasa kyseliny askorbové	3	10-400	specifická oxidace askorbátu / použití s ostatními metodami
Peroxidasa	330	140	interference askorbátu s peroxidasovou aktivitou
Glutathion dehydrogenasa	1000	400	tvorba kyseliny askorbové z dehydroaskorbové
Kapilární elektroforéza	0,1	0,01-0,03	absorbance UV záření kyselinou askorbovou
HPLC			
HPLC/UV	50	5-450	absorbance UV záření kyselinou askorbovou
HPLC/fluorescenční detekce	50	5-50	fluorescenční detekce derivatizované kys. dehydroaskorbové
HPLC/elektrochemická amperometrická detekce	10	2-50	oxidace askorbátu na povrchu elektrody
HPLC/elektrochemická coulometrická detekce	0,1	5-100	oxidace askorbátu na povrchu elektrody
Analýza in vivo			
Mikroelektrodová analýza	není určeno	není určeno	oxidace askorbátu na povrchu elektrody
Mikrodialýza	není určeno	není určeno	sbírání vzorků mikrodialýzou následováno detekcí

Mnoho metod pro stanovení kyseliny askorbové a dehydroaskorbové je závislých na interkonverzi těchto molekul. Kyselina askorbová je fyziologické redukční činidlo. Oxidace probíhá na uhlíku C2 a C3 a vede k tvorbě kyseliny dehydroaskorbové cestou přes intermediát, volný radikál, semidehydroaskorbovou kyselinu, Obr. 2. Pro účely stanovení, může být oxidace kyseliny askorbové dosažena chemicky nebo enzymaticky. Kyselina dehydroaskorbová může být redukována na kyselinu askorbovou mnoha redukčními činidly, včetně homocysteinu a činidel se sulfhydrylovou skupinou. Kyselina dehydroaskorbová také podléhá ireversibilní spontánní hydrolýze na 2,3-diketoglukonovou kyselinu. V některých metodách je měřena diketoglukonová kyselina nebo její deriváty [13].

Bylo publikováno mnoho metod pro stanovení AA a DHAA, a tyto metody mohou být rozděleny do tří hlavních kategorií - enzymatické, spektrofotometrické a chromatografické [6][8][14]. Objevují se i metody titrační, fluorimetrické a elektrochemické [8][15]. Lékopisné autority stále používají metodu jodometrické titrace pro stanovení AA. Jedná se o titraci AA v kyselém prostředí zředěné kyseliny sírové roztokem jodu. Dochází k oxidaci AA na dehydroaskorbovou kyselinu a současně redukci jodu na jodid. Indikace se provádí škrobovým roztokem, reakcí s jodem vzniká modrofialové zbarvení stanovovaného roztoku [1][16]. Zlatým akceptovaným standardem pro analýzu kyseliny askorbové v biologickém materiálu je HPLC [7][14]. Přehled HPLC metod používaných pro analýzu AA je uveden v tabulce Tab. 2.

Z chromatografických metod se nejčastěji používají tři způsoby analýzy - chromatografie na obrácených fázích [7][17], iontově výměnná chromatografie [18][19] a iontpárová chromatografie [6][20]. Mobilní fáze jsou složité, často obsahují více než dvě složky, někdy s přísadkou různých činidel nebo modifikátorů. Použití iontpárových činidel navíc přináší určité problémy. Nejsou doporučována pro spojení s MS, snižují životnost kolony a je možné riziko precipitace.

AA může být snadno detekována vůbec nejrozšířenějšími HPLC detektory, jako je UV detektor, hmotnostní spektrometr, nebo elektrochemický detektor [6].

Tab. 2 - Přehled HPLC metod používaných pro analýzu kyseliny askorbové

Analyzované látky	Matrice	Stacionární fáze analytické kolony	Mobilní fáze	Detekce	Retenční čas AA	Validační data	Literatura Rok vydání
AA, DHAA (kys. jablečná, citronová, jantarová, šřavelová)	ovoce zelenina nápoje	Spheri-5-RP 18 (110 x 4,6 mm, 5 μm) Polypore H (220 x 4,6 mm, 5 μm)	2 % KH ₂ PO ₄ pH 2,3	DAD 260 nm 215 nm	> 15	výtěžnost = 93,1 % R. S. D. = 0,6 %	[21] 1992
AA, DHAA	plazma	Partisphere 5 C ₁₈ (110 x 4,7 mm, 5 μm)	20 mM dihydrogenfosforečnan amonný 0,015 % kys. m- fosforečná	UV 245 nm ED Ag/AgCl	2,0	r ² = 0,9996 ED r ² = 0,9997 UV výtěžnost = 103,9 – 111,5 % R. S. D. = 5 % UV R. S. D. = 3 % ED LOD = 0,3 ng ED LOD = 1,2 ng UV	[22] 1993
AA	mozková kůra levá komora myokardu	Lichrospher 100 (250 x 4,0 mm, 7 μm)	40 mM octan sodný 0,54 mM edetan disodný 1,5 mM tetrabutylammonium hydroxid 7,5 % methanol pH 4,75	ED 600 mV Ag/AgCl	6		[23] 1996

AA AA-palmitát magnesium askorbyl fosfát	roztoky topické preparáty	Lichrosorb NH ₂ (250 x 4,0 mm, 7 µm)	acetonitril 0,3 M fosfátový pufr pH 4,0 (40:60) methanol 0,02 M fosfátový pufr pH 3,5 (70:30)	UV 255 nm	r ² = 0,9999 [24]1997
AA	potraviny	Inertsil ODS-3 (150 x 4,6 mm, 5 µm)	100 mM dihydrogenfosforečnan draselný pH 3,0 1 mM edetan disodný dihydrát	ED Ag/AgCl	výtěžnost ≥ 90 % AA R. S. D. = 1,8 % LOD = 0,5 ng/5 µl [25] 1998
AA (karoteny, tokoferol)	Brassica oleracea	Rainin Dynamax - 60 Á amine (4,6 x 250 mm, 8 µm)	acetonitril 0,05 M dihydrogenfosforečnan draselný pH 5.95 (75:25)	UV 268 nm	různé, v závislosti na testovaném poddruhu [26]1999
AA, DHA	biologický materiál	ODS-DABS C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) Luna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	methanol (24-60%) 0,05 M fosforečnan sodný jednosytý 0,05 M octan sodný 189 µM dodecyltrimethylammonium bromid 36,6 µM	ED 6-7	[27] 1999
			tetraoctylammonium bromid pH 4,8 - o-fosforečná kys.		

AA Stab. MSG	potraviný	Inertsil ODS-3 (150 x 4,6 mm, 5 µm)	20 mM L- glutamát sodný pH 2,1 – kys. fosforečná	ED Ag/AgCl	výtěžnost ≥ 90 % AA R. S. D. = 2,5 % LOD = 0,1 ng/5 µl	[28] 2000
AA	multivitaminové- multiminerální tablety	Hypersil BDS- C ₁₈ (250 x 4,0mm, 5 µm)	ion párový roztok-ACN (98:2) kyselina hexansulfonová, octová, TEA	DAD	výtěžnost = 89 – 115 % výtěžnost = 95 - 112 % $r^2 = 0,999$	[20] 2001
AA β-karoten	nápoje	Kromasil NH ₂ 5 µm-100Å (250 x 4,0mm, 5 µm)	0,1 M kyselina octová ve vodě	UV 250 nm	$r^2 = 0,9997$ R. S. D. = 2,1 ± 1,5 % LOD = 1,2 mg/l LOQ = 4,0 mg/l	[29] 2002
AA (ostatní ve vodě rozpustné vitamíny a vitamíny rozpustné v tucích)	farmaceutické přípravky potraviný	MetaChem Polaris C18-A (150 x 4,6 mm, 3 µm)	0,010 % kys. trifluoroctová pH 3,9 methanol	DAD (280 nm) ESI -MS	$r^2 = 0,9986$ R. S. D. = 2,1 % LOD = 25,55 ng/ml LOQ = 85,16 ng/ml	[30] 2004
L-AA, D-AA L-DHAA	krev	Chromolith Performance C18 (100 x 4,6 mm)	2,5 mM dihydrogenfosforečnan sodný 2,5 mM dodecyltrimethylamonium chlorid 1,25 mM EDTA 2% acetonitril	UV 264 nm	$r^2 = 0,999$ R. S. D. = 4,2 – 4,5 % R. S. D. = 4,3 – 4,6 % LOD = 1,5 µmol/l LOQ = 4,95 µmol/l	[6] 2005

AA	víno	PLRP-S 100A (150 x 4,6 mm, 5 µm)	A : voda-kys. triflouroctová (99 : 1) B : acetonitril-roztok A (80 : 20)	UV 243 nm	2,3	$r^2 = 0,999$ výťažnost > 95 % R. S. D. = 0,8 – 2,2 % LOD = 1 mg/l LOQ = 5 mg/l	[31] 2006
AA	lipofilní deriváty	Interstil CN-3 (100 x 4,6mm, 5 µm)	MeOH 28,6 mM H ₃ PO ₄ -NaH ₂ PO ₄ pH 2,1 (65 : 35) + 20 mg/l dithiothreitol	UV 240 nm	4,5	$r^2 = 1,000$ výťažnost = 97,3 – 106,3 % R. S. D. = 0,5 – 2,9 %	[32] 2006
AA	IS = kyselina nikotinová	polotuhé farmaceutické/ kosmetické přípravky	LiChrospher 100-RP 18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	UV 254 nm	3,5	výťažnost = 95,46 – 101,54 % R. S. D. = 0,38 % R. S. D. = 1,22 % LOD = 0,05 µg/ml LOQ = 0,17 µg/ml	[8] 2007
AA	ovoce zelenina	a) Spherisorb ODS 2 RP 18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) b) NH ₂ - Spherisorb S5 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	a) 0,01 % kys. sírová pH 2,6 b) 10 mM dihydrogenfosforečnan draselný pH 3,5/ acetonitril (60 : 40) + 20 mg/ml dithiotretiol nebo 2,3- dimerkapto-1- propanolol	UV 245 nm		výťažnost = 93,6 – 104,4 % R. S. D. = 0,6 – 3,9 % LOD = 0,18 mg/100g LOQ = 0,61 mg/100g	[33] 2007

Prvním krokem v každé analýze je příprava vzorku. Na začátku je klíčové zajistit stabilitu vzorku pro přesnou analýzu [13]. Nesmí být žádné prodlení mezi přípravou vzorku a jeho stabilizací [6].

Extrakční činidla jsou určena k precipitaci proteinů, ke stabilizaci kyseliny askorbové a k odstranění interferujících součástí. Mnohá z extrakčních činidel jsou kyseliny, které nejen precipitují proteiny ve vzorku, ale také předchází hydrolýze laktonového kruhu a inhibují oxidaci. Volba extrakčního činidla pro danou metodu je založena na tom, zda vybrané extrakční činidlo neinterferuje s danou metodou. Často kyseliny nebo extrakční činidla použitá v jedné metodě jsou nekompatibilní s jinými metodami. Běžně užívaná činidla zahrnují kyselinu metafosforečnou [6][14][28] a trichloroctovou kyselinu [34]. Šťavelová kyselina [35], ačkoli slabě precipituje proteiny, se také užívá ke stabilizaci kyseliny askorbové. Kyselina šťavelová v kombinaci s TCA stabilizuje kyselinu askorbovou a precipituje proteiny. Také se používá kyselina perchloroctová. Místo kyselin lze použít methanol nebo ethanol. Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA)[28][36] se přidává do mnoha extrakčních rozpouštědel k chelataci divaletních kovových kationtů, např. železa nebo mědi, které urychlují oxidaci kyseliny askorbové a hydrolýzu kyseliny dehydroaskorbové. Ostatní chelátory, jako diethylentriaminpentaoctová kyselina nebo desferoxamin, mohou být mnohem účinnější, ale nebyly intenzivně studovány. Extrakční činidla a chelátory musejí být vybírány velmi obezřetně, protože mohou interferovat s metodou nebo detekčním systémem [13].

3.1.2 Kvantifikace, volba vnitřního standardu

Jako vnitřní standard jsou používány látky podobné struktury, které proto vykazují podobné chování při chromatografii a extrakci. Používá se hydrochinon [37] nebo isomer AA kyselina isoaskorbová [38]. Bohužel kyselina isoaskorbová může být současně přítomna v reálných vzorcích potravin nebo v biologických tekutinách. Navíc obě sloučeniny mohou být oxidovány během skladování a přípravy vzorku. Při použití redukčních činidel (u některých elektrochemických metod) je kvantifikace problematická, a také substrakční metody využívané pro současné určení AA a DHAA nedovolují použití těchto vnitřních standardů [6]. Další vnitřní standardy používané v HPLC analýze AA jsou kyselina nikotinová [17], kyselina hippurová [8], kyselina močová [39] nebo 4-hydroxyacetanilid [40].

3.2 *Stabilita kyseliny askorbové*

Při biologickém pH je hlavní formou vitamínu C askorbát (AA), který je rychle oxidován na dehydroaskorbát (DHAA) a vyloučen do extracelulární tekutiny. Oxidace kyseliny askorbové v roztoku závisí na jeho koncentraci, teplotě, přístupu světla, pH, rozpuštěném kyslíku, rozpouštědle, iontové síle, a přítomnosti železitých iontů nebo oxidačních enzymů. DHAA je také nestabilní a může podléhat irreverzibilní hydrolyze na 2,3-diketoglukonát (2,3-DKG). Důležitost AA a DHAA jako antioxidační dvojice byla uznána a u zdravých dospělých je hodnota DHAA normálně pod 2 % z obsahu AA.

AA snadno oxiduje v přítomnosti některých činidel jako jsou halogeny [20], peroxid vodíku, těžké kovy, hlavně měď a železo, je také nestabilní v alkalickém pH [15][28], ve vodě z vodovodu a při vyšších teplotách, v přítomnosti kyslíku a světla [15]. Z těchto důvodů je důležité nalézt vhodné podmínky pro provedení HPLC analýzy, aby bylo zabráněno působení vyjmenovaných rozkladných vlivů [28].

Další opatření k minimalizaci degradace vzorku během přípravy zahrnují čištění vzorku inertním plynem jako je dusík nebo argon, rychlé zmrazení a skladování vzorku při teplotě -70°C a minimalizaci světelné expozice.

Stabilita vzorků z různých tkání se může velmi lišit, jak během skladování tak zvláště při rozmrazení vzorků. Každý analytik by měl znát stabilitní vlastnosti vzorku při dlouhodobém skladování, ihned po rozmrazení a také během měření. V kontrastu s kyselinou askorbovou v roztocích, kyselina askorbová získaná komerčně (jako prášek) je stabilní při pokojové teplotě nejméně jeden rok, je-li uchovávána v suchu a chráněna před světlem. [13]

3.2.1 *Stabilita, citlivost, specifita a interference*

Při vývoji nové metody pro stanovení AA musíme vzít do úvahy čtyři S: stabilitu, citlivost, specifitu a možnost interference (substance interference). Oxidace kyseliny askorbové a hydrolyza kyseliny dehydroaskorbové jsou ovlivněny jejich koncentrací ve vzorku, teplotou, světlem, pH, rozpuštěným kyslíkem, rozpouštědlem, iontovou silou a přítomností oxidačních enzymů a některých divalentních kationtů, Tab. 3. Další

komplikace mohou nastat při vazbě stanovované látky na bílkoviny. Navíc, protože vzorky mohou současně obsahovat kyselinu dehydroaskorbovou a askorbovou, může v průběhu procesu nastat interkonverze. Rovnováha mezi kyselinou askorbovou a dehydroaskorbovou závisí na zdroji vzorku a vyskytují se určité variability. Analytickým cílem je změřit původní obsah bez umělé změny jejich relativního zastoupení.

Tab. 3 - Stabilita kyseliny askorbové a dehydroaskorbové [13]

Extrakční činidla	Interferující faktory	Chelátory
Kyselina metafosforečná TCA	Teplota Světlo	EDTA Diethylentriaminpentaoctová kyselina Desferoxamin
Kyselina šťavelová Kyselina šťavelová - TCA Kyselina perchloroctová Etanol Metanol	pH Rozpuštěný kyslík Oxidační enzymy Divalentní kationty	

3.2.2 Stabilita kyseliny askorbové za různých podmínek

Stabilita kyseliny askorbové byla zkoušena za různých podmínek s cílem optimalizovat podmínky pro HPLC analýzu a stabilizovat vzorek před a během analýzy.

Vliv pH na stabilitu standardu kyseliny askorbové

Stabilita AA je silně závislá na pH použitého rozpouštědla a zároveň i na teplotě, při které je roztok uchováván. Z hodnot uvedených v tabulce, Tab. 4, vidíme, že optimální prostředím pro AA je v kyselé oblasti pH a při nižší teplotě [28].

Tab. 4 - Efekt pH na stabilitu standardu kyseliny askorbové skladované v hnědé lahvi při teplotách 25°C a 40°C po jedné hodině skladování. (koncentrace standardu 2,5µM; pufr 50mM fosforečnan draselný)

Teplota (°C)	pH					
	3	4,5	6,0	6,8	7,4	8,5
25	99,5	98,2	95,6	84,5	12,7	7,4
40	94,1	72,7	70,9	45,1	0	0

Vliv světla na stabilitu standardu kyseliny askorbové

Iwase et al. [28] studovali vliv denního světla a UV záření (265 nm) na stabilitu kyseliny askorbové s cílem zvolit vhodné laboratorní sklo pro přípravu vzorku. Z pokusu vyplývá, že stabilita kyseliny askorbové je ovlivněna jak denním světlem tak UV zářením. Koncentrace AA ve vodném roztoku, který byl skladován v hnědé lahvi, klesla po jedné hodině skladování při pokojové teplotě na 95,6 % zatímco u roztoku skladovaného v čiré skleněné láhvi klesla koncentrace na 84,2 % původního obsahu. Při vystavení roztoku UV záření poklesla koncentrace po jedné hodině na pouhých 79,7 %. Proto kyselina askorbová skladovaná v hnědé láhvi je mnohem stabilnější [28].

Vliv teploty na stabilitu standardu kyseliny askorbové

Teplota je jeden z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících stabilitu AA v roztoku, protože rozkladné reakce probíhají při vyšších teplotách podstatně rychleji. Studie provedená Iwasem et al. [28] srovnává vliv teploty 25, 40, 60, 80 °C na stabilitu roztoku. Při vyšších teplotách, 60 a 80 °C, klesá koncentrace po jedné hodině skladování pod 20 % původní koncentrace, při 40 °C klesá koncentrace asi na 75 %. Při pokojové teplotě je roztok AA stabilní po dobu jedné hodiny.

Jiné studie prokazují, že zvýšení teploty ze 4°C na pokojovou teplotu vede k rychlému poklesu hodnot kyseliny askorbové v krátkém časovém intervalu [3][6][7].

Vliv koncentrace kyseliny askorbové na její stabilitu

Iwase et al. [28] také studovali vliv koncentrace kyseliny askorbové na její stabilitu. Bylo zjištěno, že kyselina askorbová je stabilnější při vyšších koncentracích roztoku vzorku.

Vliv kovových iontů na stabilitu standardu kyseliny askorbové

Zeng et al. [15] a také Iwase et al. [28] zkoušeli vliv měďnatých a železitých iontů na stabilitu standardu. V těchto pracech nebyl prokázán vliv těchto iontů na stabilitu AA, pH roztoku bylo 2,1.

Naopak jiná studie zabývající se vlivem stopových prvků na stabilitu kyseliny askorbové potvrzuje nestabilitu AA v přítomnosti mědi, pH roztoku se však zde neudává. Mueller et al. [20] sledovali vliv mědi, železa, hořčíku, vápníku, zinku a manganu na výtěžnost vitamínu C, Tab. 5. Množství každého přidávaného prvku koresponduje

s hodnotami používanými v multivitaminových a multiminerálních přípravcích. Prvky byly přidávány k 60 mg kyseliny askorbové ve 100 ml vody. Pouze měď významně ovlivňuje obsah kyseliny askorbové. Koncentrace kyseliny askorbové ve vzorku, který obsahoval všechny prvky kromě mědi nevykazuje zjevný rozklad. To ukazuje že stabilita kyseliny askorbové v kontaktu s mědí je pravděpodobně ovlivněna celkovou koncentrací iontů ve vzorku.

Tab. 5 - Vliv Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} na výtěžnost kyseliny askorbové

AA (mg)	Cu^{2+}	Fe^{2+}	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Mn^{2+}	Zn^{2+}	Obsah AA(mg)	Obsah AA(%)
60		20					58,0	96,7
60			100				58,9	98,2
60				200			58,2	97,0
60					24		55,7	92,8
60						15	57,8	96,3
60		20	100	200	24	15	56,2	93,7
60	0,5						54,8	91,3
60	0,5	20	100	200	24	15	26,8	44,7
60	2,5						26,6	44,3
60	2,5	20	100	200	24	15	5,3	8,8
60	5,0						15,2	25,3

Vliv použitého rozpouštědla na stabilitu AA

Velký podíl na stabilitě roztoku AA má samotné rozpouštědlo. V pracích zabývajících se stabilitou AA jsou často používána tato rozpouštědla:

- kyselina m-fosforečná 2 % [6][14][28] nebo 10 % v kombinaci se EDTA [7][41]
- kyselina trichloroctová [34], v kombinaci s EDTA [42]
- kyselina o-fosforečná [43]
- kyselina citrónová [43][44]
- kyselina šřavelová [35]
- aminokyseliny, např. methionin [28] nebo cystein [45]
- EDTA [28][36]
- L-glutamát sodný [46]
- guanosin-5-monofosfát [46]

V případě aminokyselin pro stabilizaci AA jsou důležité skupiny karboxylové, aminové a thiolové, při jejich esterifikaci (karboxylová) nebo acetylaci (aminová) nebo karbomethylaci (thiolová skupina) je stabilizace AA nižší.

Tab. 6 - Vliv vybraných stabilizačních činidel na stabilitu AA

	Obsah AA (%), teplota 5°C					
	0 hod.	1 hod.	2 hod.	3 hod.	5 hod.	24 hod.
MPA	100	100	100	94,7	89,7	27,7
Cystein	100	100	100	100	100	87,4
Methionin	100	100	100	100	100	94,4
EDTA	100	100	100	100	100	83,5
Kys.citrónová	100	100	100	100	100	85,8

MPA 2 % v/v, ostatní v koncentraci 20 µM, MF dihydrogenfosforečnan draselný, pH 2,1 [46]

3.2.3 Shrnutí

Faktory jako denní světlo, hodnota pH, koncentrace kyseliny askorbové a zejména pak teplota ovlivňují její stabilitu. K optimalizaci HPLC podmínek a zvýšení stability musí být kyselina askorbová ve vzorcích připravována v kyselém prostředí a skladována v hnědé láhvi za snížené teploty. Aminoskupina, karboxylová skupina a síra v molekule mohou předcházet oxidaci kyseliny askorbové. Tyto výsledky jsou také užitečné pro optimalizaci přípravy vzorků před HPLC analýzou kyseliny askorbové.

3.3 *Metoda HILIC*

3.3.1 Charakteristika metody HILIC

HILIC je metoda vhodná pro získání retence a separace velmi polárních látek a hydrofilních sloučenin. Přestože kapalinová chromatografie na reverzních fázích (RP-HPLC) je nejčastěji používanou separační technikou a může být použita v různých aplikacích ve spojení s běžnými typy detektorů, jisté analyty, zvláště polární a hydrofilní sloučeniny, nejsou jednoduchým způsobem zadržitelné na koloně s nepolární stacionární fází [47]. Hydrofilní látky se váží polárními vazbami s mobilní fází, nepolární stacionární fáze není schopna je vázat, a proto jsou eliminovány v mrtvém objemu [48]. Po dlouho dobu byla metodou volby kapalinová chromatografie na normálních fázích, s použitím nevodné mobilní fáze, což není příznivé pro životní prostředí a často je také obtížné rozpustit polární a hydrofilní sloučeniny za těchto experimentálních podmínek [47]. Pokud se jedná o látku polární a nabitou, lze využít metody ion párové a iontově výměnné chromatografie. Pokud je však látka polární a bez náboje, je vhodnou alternativou k RP-HPLC metoda HILIC [48]. Pořadí eluovaných látek je často opačné než při použití RP-HPLC. Jinými slovy, analyty, které mají malou retenci nebo nejsou vůbec zadržovány na RP-HPLC, obvykle vykazují silnou retenci na HILIC kolonách. Metoda HILIC nese podobnost s tradiční NP-HPLC, ale s jedním důležitým rozdílem, a to že HILIC vyžaduje semipolární mobilní fázi. Typický eluent pro HILIC se skládá ze 40-97 % acetonitrilu ve vodě nebo těkavém pufru. Z tohoto důvodu je HILIC velmi vhodná pro použití s hmotnostním spektrometrem a změna z RP-HPLC na HILIC je následována 10-1000 násobným vzrůstem citlivosti obvykle získané pro hydrofilní analyty [47].

3.3.2 Chromatografický systém

Separací systém HILIC je přístrojově identický systému RP-HPLC. Podobnost s mobilní fází RP-HPLC svádí k použití stejných pravidel pro separaci také pro HILIC, to ale vede k problémům při chromatografii.

Analytická kolona

Analytické kolony HILIC obsahují stacionární fázi, která je hydrofilní a často je také nabitá, přinejmenším v určitém rozmezí hodnot pH. Sloučeniny separované na koloně interagují se stacionární fází, a jsou obvykle zadržovány tím více, čím více jsou hydrofilní. Na rozdíl od ostatních chromatografických metod, vodná část mobilní fáze je nedílnou součástí stacionární fáze, a proto je důležité udržovat procento vodné složky v eluentu v určitém množství. Typicky má vodná složka 3-60 % [47].

Stacionární fáze komerčně vyráběných kolon pro HILIC mohou být různé. Jedná se o silikagel, který může být chemicky modifikovaný nebo modifikované polymery. Příkladem jsou chemicky vázané aminopropylové, amidové, diolové nebo sulfonové skupiny, nebo chemicky vázaný oligosacharid cyklodextrin, sulfoalkylbetainové, dihydroxypropylové nebo polyamidové skupiny [48].

Kolona ZIC-HILIC má stacionární fázi se zwitteriontovými skupinami, které jsou kovalentně vázané na pórovitý oxid křemičitý nebo na polymer. Stálost a zwitteriontová funkční skupina činí kolonu vhodnou pro aplikaci na HILIC. Slabé elektrostatické interakce mezi nabitými analyty a na povrchu neutrální zwitteriontová stacionární fáze vedou k jedinečné selektivitě, zvláště pro analyty, které jsou slabě zadržovány na kolonách s reverzními fázemi.

ZIC-HILIC kolona může být použita jako nástroj pro změnu selektivity nebo ke zlepšení rozlišení píků peptidů, sacharidů, trávicích proteinů a různých polárních sloučenin jako jsou aminokyseliny, zwitteriony, akrylamid, cytosin, uracil, močovina, glykosylované a glukuronované sloučeniny.

S kolonou na základě silikagelu se smí pracovat v rozsahu pH 2-8, silně alkalické roztoky a promývání hydroxidem sodným není dovoleno.

Princip retence v HILIC

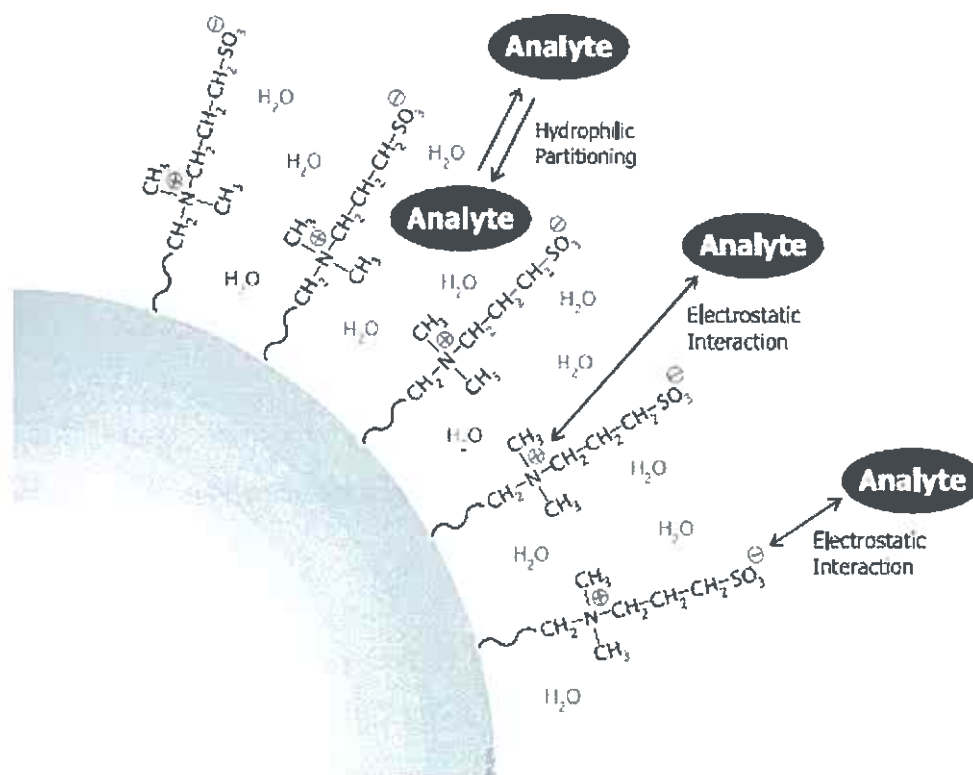
Za HILIC podmínek se na povrchu stacionární fáze ustálí vodou obohacená vodná vrstva. Separace je dosažena rozdělováním rozpuštěné látky z eluentu do tohoto hydrofilního prostředí, proces je typicky exotermní. Z tohoto důvodu, jak vodíkové vazby, jejichž síla závisí na aciditě nebo bazicitě rozpuštěné látky, tak i interakce typu dipól-dipól, které závisí na dipolovém momentu a polarizovatelnosti rozpuštěných látek, jsou faktory řídící retenci. Primární funkcí stacionární fáze HILIC je vázat vodu. Avšak u některých

dostupných nabitých stacionárních fází bude retence také ovlivněna elektrostatickými interakcemi (příkladem je zwitteriontová stacionární fáze), Obr. 3.

Vyšší koncentrace pufru, potřebná pro překonání elektrostatických interakcí, může negativně ovlivnit citlivost MS detektoru. U zwitteriontové stacionární fáze je efekt elektrostatických interakcí slabší, protože podíl elektrostatických sil každého náboje je částečně vyvážen těsnou blízkostí iontu s opačným nábojem. Nižší elektrostatické interakce umožňují použití nižší koncentrace pufru, což je příznivé pro citlivost MS detektoru. Neutrální HILIC stacionární fáze typicky také vyžadují nízké koncentrace pufru, ale postrádají výhody selektivity nabitých stacionárních fází.

Hustota nábojů slabých iontoměníčů používaných v HILIC stacionárních fázích (např. silikagel nebo aminové fáze) závisí na pH. Z tohoto důvodu, síla elektrostatických interakcí rozpuštěných látek s některými materiály bude záviset na komplexu obou, jak na ionizaci analytu tak na stacionární fázi. U materiálů nezávislých na pH, jako jsou permanentní zwitteriontové stacionární fáze, je optimalizace pH mobilní fáze určována pouze analytem [47].

Obr. 3 - Princip HILIC [50]



3.3.3 Charakteristiky chromatografického procesu

Volba vhodné separační kolony je vysoce závislá na separovaném analytu. Matrice vzorku může také hrát důležitou roli při rozhodování. Při výběru kolony jsou důležitými vlastnostmi selektivita a kapacita a separační účinnost kolony.

Separací kapacita

Kapacita kolony je důležitý parametr, který určuje retenční čas a také požadovanou eluční sílu k eluci analytu z kolony. Jestliže je kapacita vysoká, je nezbytně vyžadován silnější eluent, jestliže je kapacita nízká, kolona je snadno přetížena. V HILIC je kapacita kolony ovlivněna povrchovou plochou plnicího materiálu a schopností stacionární fáze vázat vodu. U nabitých stacionárních fází se na kapacitě kolony podílí hustota nábojů [47].

Retenční faktor k (také nazývaný kapacitní faktor k') analytu popisuje relativní rychlost průchodu kolonou a vypočítá se podle vzorce:

$$k_A = \frac{(t_R - t_0)}{t_0}$$

kde t_R je retenční čas rozpuštěné látky a t_0 je čas získaný pro mrtvý objem [51].

Separací selektivita

Selektivita kolony závisí na několika faktorech, například na nosném materiálu a chemické struktuře funkčních skupin. Tedy selektivita je založena na vzájemném ovlivňování mezi parametry kolony a vlastnostech separované rozpuštěné látky. Faktor selektivity, α , pro dvě rozpuštěné látky A a B, které se eluují blízko sebe, je měřítkem toho, jak dobře jsou látky separovány a vypočítá se podle vzorce:

$$\alpha' = \frac{k_B}{k_A}$$

kde, k_A a k_B jsou retenční faktory pro první a poslední elující se sloučeninu.

Separací účinnost

V účinné koloně se všechny analyty určitého druhu eluují společně v malém objemu. Odpovídající pík má malou šířku zóny a je samozřejmě vyšší a lépe rozlišený než pík

eluující se ve velkém objemu. Aby bylo možné kolony srovnávat, musí být také uváženi i retenční čas píku. Účinnost vyjádřena jako počet teoretických pater se vypočítá [51]:

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2$$

kde $w_{1/2}$ je šířka píku v jeho poloviční výšce. Určujícím faktorem pro účinnost kolony je „počet příležitostí“, kdy může rozpuštěná látka interagovat s separačním materiálem během průchodu kolonou. Počet interakcí je nazýván patrem, podle terminologie převzaté z teorie destilace. Vysoký počet pater je dosažen, když je analyt transportován pouze krátkou vzdáleností mezi eluentem a nepohyblivou vodnou vrstvou stacionární fáze pro každou nově ustavenou distribuční rovnováhu mezi mobilní a stacionární fází [47].

Snižování účinnosti při velkém mrtvém objemu

Prázdný objem, také označovaný jako mrtvý objem, je celkový objem kapaliny mezi injektorem a detektorem. Hodnota mrtvého objemu určuje čas (t_0) pro sloučeninu, která není zadržována separačním materiálem, k dosažení detektoru. Mrtvý objem (V_0) je součtem objemu uvnitř a vně kolony:

$$V_0 = V_{kolony} + V_{extra}$$

Objem kolony (V_{kolony}) je objem mezi a uvnitř pórů jednotlivých částic, které celkem tvoří plnicí materiál kolony. Pro stálou velikost kolony, je mrtvý objem kolony prakticky konstantní a nezávislý na průměru plnicích částic. Důležitou příčinou rozšiřování chromatografického pásu je však objem mimo kolonu (V_{extra}), například objem dávkovací smyčky, spojovacích hadiček, a detektoru. Všechny hadičky používané pro spojování součástí systému by měly být krátké, mít co nejmenší možný vnitřní průměr, aby byl minimalizován vliv na rozšiřování chromatografické zóny a nesnižovala se účinnost získaná vysokou kvalitou kolony. Snížení vnitřního průměru hadiček je samozřejmě limitováno zpětným tlakem a rizikem nechtěného ucpání, které stoupá úměrně se snižováním průměru [47].

3.3.4 Složení mobilní fáze

Jak bylo uvedeno dříve, typický eluent pro HILIC se skládá z 40-97 % acetonitrilu ve vodě nebo těkavém pufru. K získání reprodukovatelných výsledků je nutné zachovat alespoň 3 % vody v mobilní fázi. Toto množství vody je nutné k zajištění dostatečné hydratace částic stacionární fáze. Vyšší koncentrace organického rozpouštědla v mobilní fázi zvyšuje retenci.

Metoda HILIC dovoluje použít některá polární s vodou mísitelná organická rozpouštědla, ale acetonitril je zdaleka nejoblíbenější. Síla rozpouštědla je přibližně opačná, než při RP-HPLC separaci [48] a relativní síla rozpouštědla může být rozložena asi takto: tetrahydrofuran < aceton < acetonitril < iso-propanol < etanol < methanol < voda

Acetonitril je jedno ze slabších rozpouštědel v HILIC poskytuje mnohem vyšší retenci ve srovnání s methanolem. Methanol je vhodnou alternativou, může poskytnout větší rozpustnost některých sloučenin, ačkoli retence bude nižší. Z hlediska účinnosti je acetonitril nejlepší volbou.

Míchání organického rozpouštědla s vodným pufrům během přípravy mobilní fáze má často za následek změnu teploty roztoku. Je vhodné nechat teplotu temperovat na laboratorní teplotu před použitím, zvláště jestliže chromatografický systém nemá termostatickou kontrolu.

Doporučení k pufrům

Vhodné pufrы pro HILIC jsou amonné soli octanu nebo mravenčanu, ale rovněž jsou doporučovány kyseliny octová a mravenčí, obě vzhledem k výborné rozpustnosti i při vysoké koncentraci organického rozpouštědla. Fosfátový a jiné pufrы s nižší rozpustností v organických rozpouštědlech mohou být použity s opatností nebo je lépe se jim vyhnout, abychom předešli precipitaci, ačkoli jejich použití je spojeno s vyšší citlivostí UV detektoru. Hydroxid amonný a uhličitán amonný jsou vhodnými alternativami jestliže je požadováno vyšší pH. Koncentrace pufru 5-20 mM je dostatečná pro většinu rozpuštěných látek, horní limit je 200-300 mM v závislosti na rozpustnosti eluentu. Negativně nebo pozitivně nabitě stacionární fáze typicky vyžadují vyšší koncentraci pufru než neutrální nebo zwitteriontové stacionární fáze. Trifluoroctová kyselina a jiná ion párová činidla by neměla být používána, protože mohou interferovat jak s HILIC mechanismem tak i snižují

MS signál. Vhodný rozsah pH je 3-8 pro většinu kolon založených na bázi oxidu křemičitého a 2-10 je interval obvykle doporučovaný pro polymerní HILIC kolony [47].

Isokratická a gradientová eluce

V kapalinové chromatografii je nejběžnějším typem eluce isokratická, to znamená, že eluent má konstantní koncentraci a složení během celého průběhu.

Gradientová eluce v HILIC je zajištěna stoupající polaritou mobilní fáze, snižováním koncentrace organického rozpouštědla, to jest opačným směrem než při RP-HPLC separaci. U nabitých HILIC stacionárních fází je možnost zvyšování koncentrace solí nebo pufru během gradientu k překonání elektrostatických interakcí s rozpuštěnou látkou.

Gradientová eluce se používá k separaci látek s velmi rozdílnými retenčními (kapacitními) faktory. Po gradientové eluci musí být kolona znovu ekvilibrována počáteční koncentrací mobilní fáze před nastříknutím dalšího vzorku.

Nutno zdůraznit, že HILIC stacionární fáze je méně tolerantní k rychlým gradientům a krátkým ekvilibračním časům ve srovnání s RP-HPLC chromatografií. Je to proto, že vodná vrstva na stacionární fázi pochází z eluentu je proto závislá na jeho složení. Ze stejného důvodu nemůže HILIC gradient běžet od 100 % organické fáze ke 100% vodné fáze. Je také nutno zmínit, že při gradientové eluci bude zpětný tlak na koloně stoupat, jestliže je použito rozpouštědlo s nízkou viskozitou, jako je acetonitril.

Chyba při ustalování rovnováhy HILIC kolony způsobí posun retenčních časů a nízkou reprodukovatelnost. V některých případech je ale možno dosáhnout dynamické rovnováhy se stabilními retenčními časy, jestliže je použit rychlý gradient a průběh opakován po dlouhou dobu. Tato situace je ale obtížně dosažitelná a reprodukovatelná [47].

Typický doporučovaný eluční protokol

Podmínky doporučené pro kolony se stacionární fází ZIC[®]-HILIC a ZIC[®]-pHILIC, ale mohou být stejně dobře aplikovány také na ostatní HILIC fáze, někdy s úpravami (jako např. vyšší koncentrace solí u nabitých fází):

- isokratická eluce: 80:20 (v/v) acetonitril/octan amonný nebo kyselina mravenčí (20 mM)

- gradientová eluce: lineární gradient od 90% do 40% acetonitrilu v pufru octanu amonného (20 mM) ve 20 minutách (spád 3 %/min). Ekvilibrační čas je 10 minut [47].

3.3.5 Úprava vzorků

Předběžná úprava vzorku je ovlivněna matricí vzorku. Pro HILIC separaci je důležité, aby vzorek nebyl v prostředí, které je příliš hydrofilní. Jestliže nastříkovaný vzorek obsahuje příliš mnoho vody nebo jiného velmi hydrofilního rozpouštědla, poklesne rozdělování rozpuštěné látky do stacionární fáze. To vede k nižší retenci, horší účinnosti, nižší separaci, zvláště pro nejméně zadržovanou sloučeninu a jestliže je nastříkovaný objem velký. Vodné vzorky proto obvykle nemohou být nastříknuty přímo, ale raději zředěny organickým rozpouštědlem, které by mělo tvořit alespoň 50 %. Je také doporučováno vzorky před nastříknutím zfiltrvat. Vhodnými filtry jsou hydrofilní filtry PTFE nebo PVDF s velikostí pórů 0.45 μm [47].

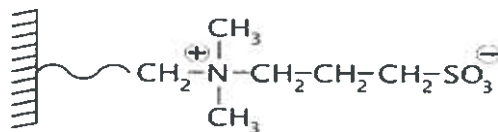
3.4 ZIC[®]-HILIC a ZIC[®]-pHILIC

Firma Sequant vyrábí několik HILIC produktů, včetně kolon s zwitteriontovou ZIC[®]-HILIC a ZIC[®]-pHILIC stacionární fází.

ZIC[®]-HILIC stacionární fáze založené na oxidu křemičitém nesou kovalentně vázané permanentní zwitteriontové funkční skupiny sulfobetainového typu, Obr. 4. ZIC[®]-HILIC je dostupná ve třech velikostech částic 3,5; 5, 10 μm , v různých rozměrech kolony, kde materiál kolony je tvořen sklem vyloženou nerezovou ocelí pro kapilární kolony, PEEK materiálem a nerezovou ocelí pro analytické kolony a nerezovou ocelí pro preparativní kolony.

Kolony ZIC[®]-pHILIC založené na polymerech mají stejné sulfobetainové zwitterionické funkční skupiny a jsou dostupné ve velikosti polymerních částic 5 μm .

Obr. 4 - Zwitteriontová stacionární fáze s funkčními skupinami sulfobetainového typu



Obě, jak ZIC[®]-HILIC tak i ZIC[®]-pHILIC stacionární fáze jsou navrženy pro účinnou HILIC separaci kyselých, zásaditých a neutrálních hydrofilních sloučenin.

Separční kolony.

Obě kolony ZIC[®]-HILIC a ZIC[®]-pHILIC mají stejné funkční skupiny, nehledě na jádro částic, poskytují podobnou selektivitu. Polymerní kolony mohou být použity při vyšším rozsahu pH, 2-10. Stacionární fáze založena na oxidu křemičitém jen v rozsahu pH 3-8.

Průtoková rychlost.

Parametry průtokových rychlostí se u stacionárních fází ZIC[®]-HILIC a ZIC[®]-pHILIC trochu liší od RP-HPLC kolon. Optimální průtoková rychlost je kolem 0,5 ml/min pro kolonu s vnitřním průměrem 4,6 mm [47].

3.4.1 Využití metody HILIC

Jiang et al. [52] využili metodu HILIC pro separaci jednoduchých peptidů, bradykininu a neurotensinu a také k separaci jednotlivých angiotensinů (látky peptidového charakteru). Malé hydrofilní peptidy vykazují nízkou retenci při RP-HPLC.

Jiné studie využívají metodu HILIC pro analýzu látek jako je atenolol, timolol, cholin a acetylcholin, močovina, alantoin, indapamid, některá antibiotika, jako jsou tetracyklíny, nebo některá hydrofilní cytostatika [48].

Příkladem lze také uvést analýzu amoxicilinu v plazmě, trávicích proteinů, purinů a pyrimidinů, nukleotidů, peptidů, alifatických aminokyselin, akrylamidů, kvarterních aminů, kyseliny askorbové a dehydroaskorbové, kyseliny šťavelové, fumarové a citrónové, morfinu a glukuronovaných metabolitů, flavonoidů.

4 Praktická část

4.1 Použité chemikálie

Kyselina citrónová bezvodá, 99 %, Sigma-Aldrich, Praha, Česká Republika
D,L – methionin, >99 %, Fluka, Praha, Česká Republika
D,L – homocystein, min. 95 %, Sigma-Aldrich, Praha, Česká Republika
Kyselina L-askorbová, 99+ %, Sigma-Aldrich, Praha, Česká Republika
Hydroxid amonný, 10 %, p.a. HPLC, Fluka, Praha, Česká Republika
Kyselina octová, >99 %, Fluka, Praha, Česká Republika
Kyselina mravenčí, >99 %, Fluka, Praha, Česká Republika
Octan amonný, p.a., Lachema Brno, Česká Republika
Acetonitril, HPLC gradient grade, Sigma Aldrich, Praha, Česká Republika
Methanol, HPLC gradient grade, Sigma Aldrich, Praha, Česká Republika
Edetan disodný, p.a. >99 %, Fluka, Praha, Česká Republika
Kyselina šťavelová, p.a. >99 %, Fluka, Praha, Česká Republika
Kyselina o-fosforečná 85 % p.a., Merck, Německo
Kyselina m-fosforečná, 40-50 % $(\text{HPO}_3)_n$, 50-60 % $(\text{NaPO}_3)_n$, Riedel de Haen, Německo
Kyselina chlorogenová, ≥ 95 %, Sigma Aldrich, Praha, Česká Republika
Kyselina galová, ≥ 95 %, Sigma Aldrich, Praha, Česká Republika
Kyselina protokatechuová, ≥ 95 %, Sigma Aldrich, Praha, Česká Republika
Voda ultračistá pro HPLC, Millipore

4.2 Použité přístroje

Mili-Q reverzní osmóza Millipore, Bedford, MA, USA

Spektrofotometr Hewlett Packard 8453 se softwarem Chemstation

Shimadzu Prominence LC systém, Shimadzu, Kyoto, Japonsko, software Lab Solution, kolona ZIC[®]-HILIC (150 x 2,1 mm, 3,5 μ m)

Analytické váhy SARTORIUS 2004 MP

Filtrační zařízení Millipore, Bedford, MA, USA

4.3 Použité roztoky

❖ Příprava 50 mM pufru octanu amonného pH 6,8 pro mobilní fázi

Do kádinky bylo naváženo asi 1,9 g octanu amonného, který byl rozpuštěn v ultračisté vodě. Roztok octanu amonného byl kvantitavně převeden do odměrné baňky o objemu 500 ml a doplněn vodou po značku. Poté bylo změřeno pH roztoku, které bylo podle potřeby upraveno pomocí několika kapek roztoku hydroxidu amonného nebo kyseliny octové. Nakonec byl roztok zfiltrován.

❖ Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze byla připravena smísením acetonitrilu a pufru octanu amonného v poměru 78:22. Směs byla připravena pomocí HPLC pumpy, aby bylo složení co nejpřesnější a reprodukovatelné.

❖ Příprava vzorků pro hodnocení vlivu teploty na stabilitu.

Do 100 ml odměrné baňky byl navážen 1,0 mg standardu kyseliny askorbové a rozpuštěn v mobilní fázi zchlazené na 4°C a objem doplněn mobilní fázi po značku.

❖ Příprava rozpouštědla pro hodnocení vlivu přítomnosti kyslíku na stabilitu.

Do Erlenmayerovy baňky bylo odměřeno asi 150 ml mobilní fáze a byla probublávána heliem po dobu 5, 10, 20 minut. Poté byla zchlazena na 4°C.

❖ Příprava vzorků pro hodnocení vlivu přítomnosti kyslíku na stabilitu.

Do 100 ml odměrné baňky byl odvážen 1,0 mg standardu kyseliny askorbové. Kyselina byla rozpuštěna v odplyněné a zchlazené mobilní fázi a objem doplněn po značku.

❖ Příprava vzorků pro hodnocení vlivu koncentrace na stabilitu.

- 0,01 mg . Do odměrné baňky byl navážen 0,01 mg standardu kyseliny askorbové. Kyselina byla rozpuštěna v mobilní fázi zchlazené na 4°C a objem byl doplněn mobilní fázi po značku.

- 0,1 mg. Do odměrné baňky byl navážen 0,1 mg standardu kyseliny askorbové. Kyselina byla rozpuštěna v mobilní fázi zchlazené na 4°C a objem byl doplněn mobilní fází po značku.
 - 1,0 mg. Do odměrné baňky byl navážen 1,0 mg standardu kyseliny askorbové. Kyselina byla rozpuštěna v mobilní fázi zchlazené na 4°C a objem byl doplněn mobilní fází po značku.
 - 10,0 mg. Do odměrné baňky bylo naváženo 10,0 mg standardu kyseliny askorbové. Kyselina byla rozpuštěna v mobilní fázi zchlazené na 4°C a objem byl doplněn mobilní fází po značku.
 - 50,0 mg. Do odměrné baňky bylo naváženo 50,0 mg standardu kyseliny askorbové. Kyselina byla rozpuštěna v mobilní fázi zchlazené na 4°C a objem byl doplněn mobilní fází po značku.
- ❖ Příprava pufrů pro hodnocení vlivu pH na stabilitu.
- pH 3,8. Bylo napipetováno 285,14 µl kyseliny octové k cca 50 ml vody. Bylo změřeno pH roztoku a dále přidáván roztok amoniaku k úpravě pH na požadovanou hodnotu. Poté byl obsah převeden do 100 ml odměrné baňky a doplněn vodou po značku. Pufr byl smíchán s acetonitrilem v poměru 22:78 a zchlazen na 4°C.
 - pH 4,8. Bylo napipetováno 285,14 µl kyseliny octové k cca 50 ml vody. Bylo změřeno pH roztoku a dále přidáván roztok amoniaku k úpravě pH na požadovanou hodnotu. Poté byl obsah převeden do 100 ml odměrné baňky a doplněn vodou po značku. Pufr byl smíchán s acetonitrilem v poměru 22:78 a zchlazen na 4°C.
 - pH 5,8. Bylo napipetováno 285,14 µl kyseliny octové k cca 50 ml vody. Bylo změřeno pH roztoku a dále přidáván roztok amoniaku k úpravě pH na požadovanou hodnotu. Poté byl obsah převeden do 100 ml odměrné baňky a doplněn vodou po značku. Pufr byl smíchán s acetonitrilem v poměru 22:78 a zchlazen na 4°C.
 - pH 6,8. Bylo použito 100 ml pufru octanu amonného, který je součástí mobilní fáze. Pufr byl smíchán s acetonitrilem v poměru 22:78 a zchlazen na 4°C.
 - pH 7,8. K 50 ml pufru pH 6,8 byl postupně po kapkách přidáván roztok amoniaku až po dosažení zvolené hodnoty pH. Poté byl obsah převeden do 100 ml odměrné baňky a doplněn vodou po značku. Pufr byl smíchán s acetonitrilem v poměru 22:78 a zchlazen na 4°C.
 - Voda. Voda byla smíchána s acetonitrilem v poměru 22:78 a zchlazena na 4°C.

❖ Příprava vzorků pro hodnocení vlivu pH na stabilitu.

Do 100 ml odměrné baňky byl navážen 1,0 mg standardu kyseliny askorbové. Kyselina byla rozpuštěna v připravené směsi acetonitrilu a zvoleného pufru (vody) zchlazené na 4°C a doplněna po značku.

❖ Příprava roztoků stabilizačních činidel

- 10 % kyselina m-fosforečné. Bylo naváženo 20 g kyseliny m-fosforečné a rozpuštěno ve 200 ml odměrné baňce ve vodě. Poté bylo množství doplněno po značku. Připravený roztok byl smíchán s acetonitrilem v poměru 22:78 a zchlazen na 4°C.
- 5 % kyselina m-fosforečné. Bylo odpipetováno 50 ml roztoku 10 % kyseliny m-fosforečné a převedeno do 100 ml odměrné baňky a doplněno vodou po značku. Připravený roztok byl smíchán s acetonitrilem v poměru 22:78 a zchlazen na 4°C.
- 1 % kyselina m-fosforečné. Bylo odpipetováno 10 ml 10 % kyseliny m-fosforečné do 100 ml odměrné baňky a doplněno vodou po značku. Připravený roztok byl smíchán s acetonitrilem v poměru 22:78 a zchlazen na 4°C.
- 5 mM EDTA. Do 100 ml odměrné baňky bylo naváženo 0,186 g EDTA. EDTA byl rozpuštěn ve vodě a objem doplněn vodou po značku. Připravený roztok byl smíchán s acetonitrilem v poměru 22:78 a zchlazen na 4°C.
- 1 mM EDTA. Do 100 ml odměrné baňky bylo napipetováno 20 ml 5 mM roztoku EDTA a doplněno vodou po značku. Připravený roztok byl smíchán s acetonitrilem v poměru 22:78 a zchlazen na 4°C.
- 50 mM kyselina šťavelová. Do 100 ml odměrné baňky bylo naváženo 0,6303 g kyseliny šťavelové a rozpuštěno ve vodě a doplněno vodou po značku. Připravený roztok byl smíchán s acetonitrilem v poměru 22:78 a zchlazen na 4°C.
- 10 mM kyselina šťavelová. Do 100 ml odměrné baňky bylo napipetováno 20 ml 50 mM roztoku kyseliny šťavelové a doplněno vodou po značku. Připravený roztok byl smíchán s acetonitrilem v poměru 22:78 a zchlazen na 4°C.
- 1 mM kyselina šťavelová. Do 100 ml odměrné baňky bylo napipetováno 10 ml roztoku 10 mM kyseliny šťavelové a doplněno vodou po značku. Připravený roztok byl smíchán s acetonitrilem v poměru 22:78 a zchlazen na 4°C.

- 10 % kyselina o-fosforečná v/v. Do 100 ml odměrné baňky bylo napipetováno 11,7 ml kyseliny o-fosforečné. Kyselina byla rozpuštěna ve vodě a objem doplněn po značku. Připravený roztok byl smíchán s acetonitrilem v poměru 22:78 a zchlazen na 4°C.
- 5 % kyselina o-fosforečná v/v. Do 100 ml odměrné baňky bylo napipetováno 50 ml roztoku 10 % kyseliny o-fosforečné a objem doplněn vodou po značku. Připravený roztok byl smíchán s acetonitrilem v poměru 22:78 a zchlazen na 4°C.
- 1 % kyselina o-fosforečná v/v. Do 100 ml odměrné baňky bylo napipetováno 10 ml roztoku 10 % kyseliny o-fosforečné a doplněno vodou po značku. Připravený roztok byl smíchán s acetonitrilem v poměru 22:78 a zchlazen na 4°C.
- 1 mM homocystein. Do 100 ml odměrné baňky bylo naváženo 0,0135 g homocysteinu. Homocystein byl rozpuštěn ve vodě a objem doplněn vodou po značku. Připravený roztok byl smíchán s acetonitrilem v poměru 22:78 a zchlazen na 4°C.
- 0,1 mM homocystein. Do 100 ml odměrné baňky bylo napipetováno 10 ml roztoku 1 mM homocysteinu a doplněno vodou po značku. Připravený roztok byl smíchán s acetonitrilem v poměru 22:78 a zchlazen na 4°C.
- 1 mM methionin. Do 100 ml odměrné baňky bylo naváženo 0,0075 g methioninu. Methionin byl rozpuštěn ve vodě a objem doplněn vodou po značku. Připravený roztok byl smíchán s acetonitrilem v poměru 22:78 a zchlazen na 4°C.
- 50 mM kyselina citrónová. Do 100 ml odměrné baňky bylo naváženo 0,4803 g kyseliny citrónové. Kyselina byla rozpuštěna ve vodě a objem doplněn vodou po značku. Připravený roztok byl smíchán s acetonitrilem v poměru 22:78 a zchlazen na 4°C.
- 10 mM kyselina citrónová. Do 100 ml odměrné baňky bylo napipetováno 20 ml roztoku 50 mM kyseliny citrónové a objem doplněn vodou po značku. Připravený roztok byl smíchán s acetonitrilem v poměru 22:78 a zchlazen na 4°C.
- 1 % kyselina octová. Do 50 ml odměrné baňky bylo napipetováno 0,5 ml koncentrované kyseliny octové a doplněno vodou po značku. Připravený roztok byl smíchán s acetonitrilem v poměru 22:78 a zchlazen na 4°C.
- 0,2 % kyselina octová. Do 50 ml odměrné baňky bylo napipetováno 10 ml roztoku 1 % kyseliny octové a doplněno vodou po značku. Připravený roztok byl smíchán s acetonitrilem v poměru 22:78 a zchlazen na 4°C.

- 1 % kyselina mravenčí. Do 50 ml odměrné baňky bylo napipetováno 0,5 ml koncentrované kyseliny mravenčí a doplněno vodou po značku. Připravený roztok byl smíchán s acetonitrilem v poměru 22:78 a zchlazen na 4°C.
- 0,2 % kyselina mravenčí. Do 50 ml odměrné baňky bylo napipetováno 10 ml roztoku 1 % kyseliny mravenčí a doplněno vodou po značku. Připravený roztok byl smíchán s acetonitrilem v poměru 22:78 a zchlazen na 4°C.

❖ Příprava vzorků pro hodnocení vlivu stabilizačních činidel na stabilitu.

Do odměrné baňky byl navážen 1,0 mg standardu kyseliny askorbové. Kyselina byla rozpuštěna v připravené směsi acetonitrilu a zvoleného stabilizačního činidla zchlazené na 4°C a doplněna po značku.

Všechny vzorky byly ihned po dokonalém rozpuštění kyseliny askorbové přeneseny do vialky a umístěny do autosampleru temperovaného na 4°C a byla bezprostředně zahájena jejich analýza.

❖ Příprava standardních roztoků a vzorků

- Roztok vnitřního standardu. Do 100 ml odměrné baňky bylo naváženo 50 mg kyseliny chlorogenové. Kyselina byla rozpuštěna ve směsi složené z acetonitrilu a vodného roztoku stabilizačního činidla v poměru 78:22. Stabilizačním činidlem může být 10 mM kyselina šťavelová nebo 5 % kyselina o-fosforečná.
- Referenční standardní roztok AA. Ve 100 ml odměrné baňce bylo rozpuštěno 25,0 mg kyseliny askorbové ve směsi acetonitrilu a vodného roztoku stabilizačního činidla v poměru 78:22, ochlazeného na teplotu 4°C. K roztoku AA byly přidány 2,0 ml roztoku vnitřního standardu kyseliny chlorogenové. Objem byl doplněn po značku a roztok zchlazen na teplotu 4°C.

Roztok musí být uchováván v temnu, bez přístupu kyslíku, při teplotě 4°C. Takto stabilizovaný roztok lze použít po dobu 72 hodin, v případě stabilizace kyselinou šťavelovou a více než 59 hodin v případě použití kyseliny o-fosforečné v uvedených koncentracích. Bez použití těchto činidel je roztok stabilní jen 3-4 hodiny.

4.4 Vliv jednotlivých faktorů na stabilitu

Vliv světla na stabilitu.

Vliv světla na stabilitu AA nebyl testován, protože test není možné provést za našich laboratorních podmínek. Všechny pokusy byly nadále prováděny bez přístupu světla.

Vliv teploty na stabilitu.

Jak již bylo zmiňováno dříve, teplota má velký vliv na stabilitu AA v roztoku.

Byla sledována stabilita AA při teplotě 20°C, 10°C a 4°C, což je nejnižší teplota na kterou je možno nastavit autosampler, po dobu 72 hodin.

Vliv koncentrace na stabilitu.

Koncentrace AA v roztoku je dalším faktorem, který také významně ovlivňuje stabilitu. V této práci byla srovnávána koncentrace 0,01; 0,1; 1,0; 1,0; 50,0 mg/100 ml.

Vliv rozpuštěného kyslíku na stabilitu.

Je známo, že kyslík může urychlovat oxidační reakce a proto je vhodné eliminovat jeho přítomnost. Byla srovnávána stabilita AA v mobilní fázi, která byla odplyněna jemným proudem helia po dobu 5, 10, 20 minut se stabilitou AA v neodplyněném roztoku.

Vliv hodnoty pH rozpouštědla na stabilitu.

Předpokládáme že kyselina askorbová, jako látka kyselé povahy, bude stabilnější v kyselém prostředí. Kyselé pH zpomaluje oxidaci a hydrolýzu laktonového kruhu. Byl zjišťován vliv pH na stabilitu AA při použití pH 3,8; 4,8; 5,8; 6,8; 7,8 a také nahrazení pufru vodou.

Vliv stabilizačních činidel na stabilitu.

Jak již bylo zmiňováno dříve, stabilitu AA lze příznivě ovlivnit vhodnou volbou stabilizačního činidla. Pro hodnocení bylo vybráno několik běžně používaných stabilizačních činidel a byl srovnáván jejich vliv na stabilizaci AA za HILIC podmínek při různých koncentracích těchto činidel. Jedná se konkrétně o kyselinu citrónovou, kyselinu

šťavelovou, kyselinu m-fosforečnou, o-fosforečnou, methionin, homocystein, edetan disodný, kyselinu octovou a mravenčí.

5 Výsledky a diskuse

5.1 Chromatografické podmínky-optimalizace HILIC podmínek

5.1.1 Výběr stacionární fáze

Byly zkoušeny různé chemicky modifikované stacionární fáze na bázi silikagelu jako je kolona Shield C8, C18 nebo i středně polární kolona s chemicky vázanými CN skupinami. Protože na těchto kolonách byla retence AA vzhledem k její polaritě a velikosti molekuly špatná, byla zvolena kolona ZIC-HILIC. Stacionární fáze kolony je tvořena silikagelem, který je chemicky modifikován sulfobetainovými skupinami.

Parametry analytické kolony

Délka (mm)	150
I.D. (mm)	2,1
Objem kolony (ml)	0,5
Plnicí materiál	ZIC-HILIC
Velikost částic (μm)	3,5
Velikost pórů (Å)	200 [49]

5.1.2 Složení mobilní fáze

Typické HILIC podmínky spojují polární stacionární fázi a mobilní fázi složenou z velké části z organického rozpouštědla, obvykle tvoří 40-97 %, v kombinaci s malým procentem vodného podílu.

Byla sledována závislost složení mobilní fáze (poměru organické a vodné složky) spolu s vlivem pH pufru a jeho koncentrací na retenci AA.

Největší vliv na retenci AA měla změna poměru organické a vodné složky. Jako organická složka byl zvolen acetonitril. Za HILIC podmínek platí, že čím větší koncentrace acetonitrilu byla použita, tím bylo dosaženo vyšší retence AA.

Nižší vliv na retenci AA byl pozorován při změnách koncentrace nebo pH pufru. Funkci pufru plnil octan amonný. Platí, že čím vyšší koncentrace pufru byla použita, tím bylo dosaženo vyšší retence. Byl zkoušen pufr o koncentraci 10 mM, 50 mM a 100 mM. Pro experiment byla vybrána koncentrace 50 mM, protože při této koncentraci bylo dosaženo dostatečné retence a navíc je její použití vhodnější z hlediska životnosti kolony.

S ohledem na požadavky na zacházení a životnost kolony, bylo zkoušeno pH pufru v rozmezí 3,8-7,8. V oblasti pH 5,8-7,8 byly rozdíly v retenčních časech zanedbatelné, v této oblasti je tedy metoda více robustní. To je důvodem proč bylo zvoleno pH 6,8, viz. obrázek Obr. 5. V kyselé oblasti pH byl pozorován větší vliv hodnoty pH roztoku na retenci AA.

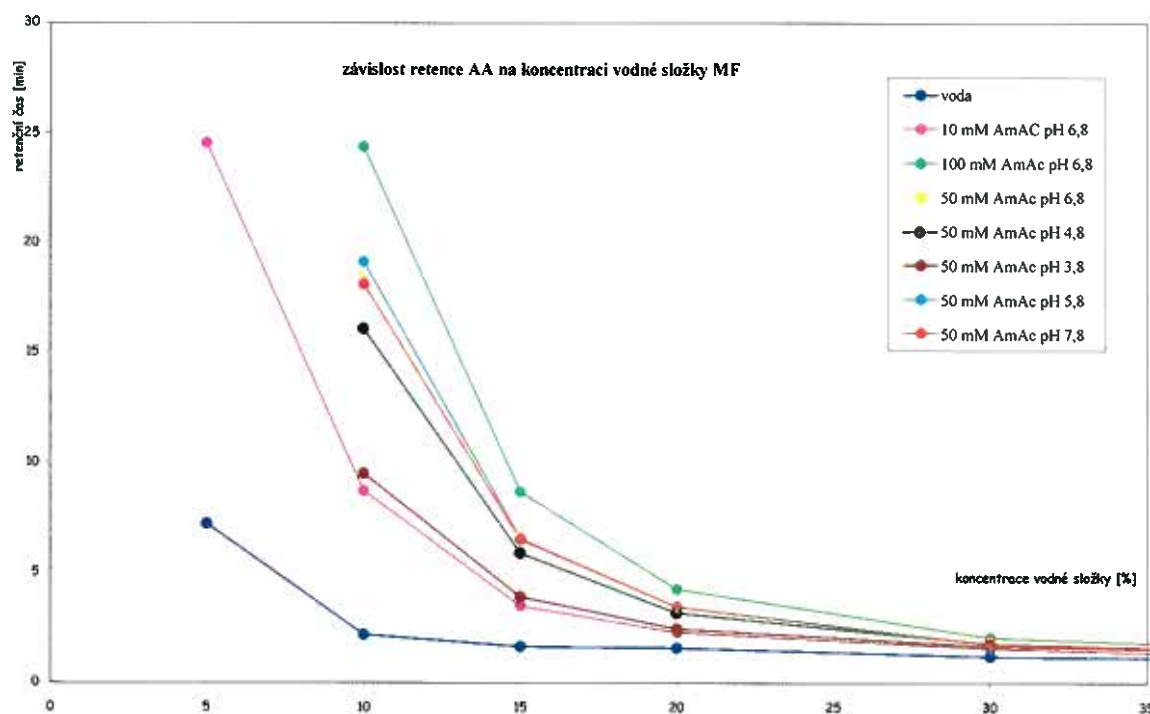
Posledním úkolem bylo vhodně zvolit poměr organické a vodné složky mobilní fáze, aby se retenční čas AA pohyboval kolem 5 minut, tak aby bylo možné použít vnitřní standard, jehož eluce se předpokládá před píkem AA.

Optimální složení mobilní fáze bylo následující:

- acetonitril/50 mM octan amonný pH 6,8, 78:22
- získaný retenční čas byl 4,6 minut

Toto složení mobilní fáze s vysokou těkavostí umožňuje pozdější připojení MS detektoru.

Obr. 5 – Graf závislosti retence AA na koncentraci vodné složky mobilní fáze



5.1.3 Rychlost průtoku mobilní fáze

Průtoková rychlost mobilní fáze byla zvolena s ohledem na retenci AA, její separaci od vnitřního standardu a také na zpětný tlak na koloně a spotřebu rozpouštědla, Tab. 7.

Byl zvolen průtok 0,3 ml/min.

Tab. 7-Optimalizace průtokové rychlosti mobilní fáze

průtok [ml/min]	zpětný tlak na koloně [MPa]	čas analýzy [min]	spotřeba rozpouštědla [ml]
0,2	10,0	8,0	1,60
0,3	12,3	5,5	1,65
0,5	16,8	3,5	1,75
0,7	21,0	2,25	1,58
0,9	25,6	2,0	1,80

5.1.4 UV detekce

AA vykazuje maximální absorpci v rozmezí 244 a 265 nm, v závislosti na složení použitého rozpouštědla [13]. Během zkoumání absorpčních spekter AA v mobilní fázi byl použit jak DAD detektor, tak také nezávislý UV spektrofotometr. Navzdory údajům uváděných v literatuře bylo v obou případech absorpční maximum AA ve směsi acetonitrilu a 50 mM octanu amonného pH 6,8 v poměru 78:22 při 268 nm.

5.1.5 Stabilita AA v mobilní fázi, nastavení teploty kolony

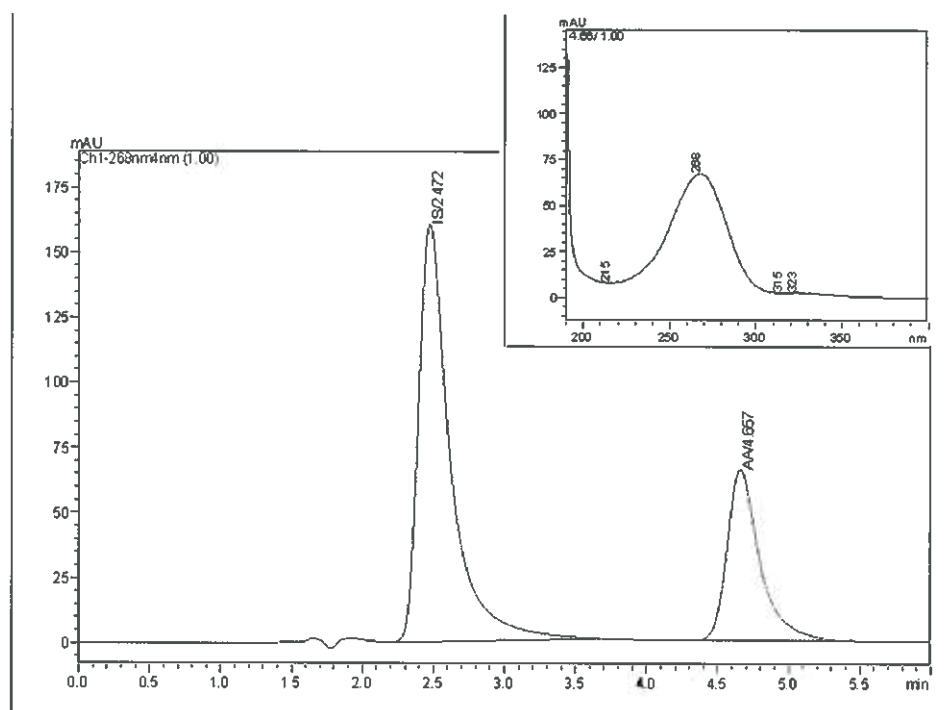
Stabilita AA v mobilní fázi byla zjišťována za laboratorní teploty, 25°C, bez přístupu světla a za použití UV spektrofotometru. Roztok AA byl stabilní (nedochází ke změně koncentrace o více než 1%) po dobu 10 minut, proto může být teplota na koloně nastavena na 23°C bez podstatného rozkladu AA během analýzy.

5.1.6 Volba vnitřního standardu

S ohledem na principy HILIC může být zvolena pouze látka kyselá a polární. Proto byly zkoušeny sloučeniny ze skupiny fenolických kyselin, jmenovitě kyselina galová,

protokatechuová, chlorogenová a některé další, jejichž přítomnost se v biologickém materiálu nepředpokládá. Jako vnitřní standard byla zvolena kyselina chlorogenová, jelikož se eluje před píkem AA a je dobře separována, Obr. 6.

Obr. 6 - Chromatografický záznam analýzy AA s použitím kyseliny chlorogenové jako IS, včetně UV spektra AA (spektrum bylo extrahováno z DAD záznamu v průběhu času eluce píku AA)



Optimálních chromatografických podmínek bylo dosaženo při použití kolony ZIC-HILIC se sulfobetainovou zwitteriontovou modifikací, mobilní fáze byla složena z acetonitrilu a 50 mM octanu amonného pH 6,8 v poměru 78:22, průtoková rychlost byla zvolena 0,3 ml/min a kolona byla temperována na 23°C, nastříkovaný objem vzorku byl nastaven na 5 μ l.

5.2 Stabilitní testy – vliv stabilitních faktorů

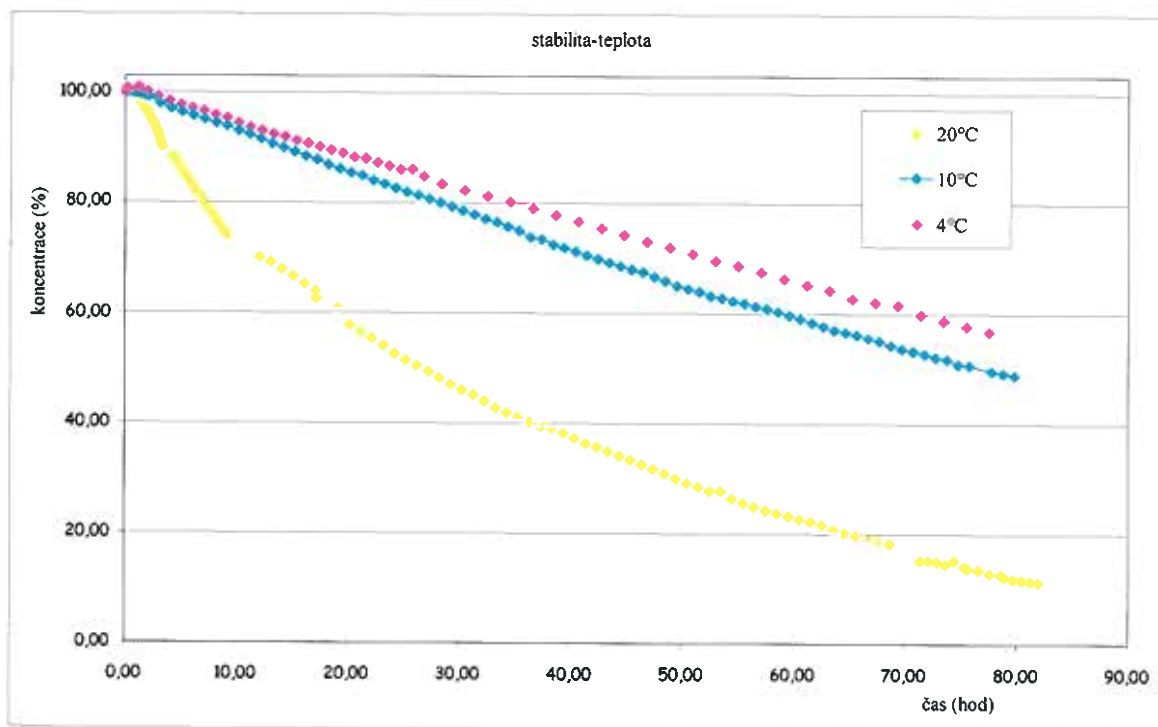
Pojem „stabilní“ během této studie znamená, že změna aktuální koncentrace oproti původní koncentraci roztoku AA není větší než 1 %.

Roztoky standardu byly připraveny při 4°C a ihned chromatografovány, tak aby bylo možné určit počáteční koncentraci kyseliny askorbové. Stabilita byla hodnocena během 72 hodin, vzorek byl umístěn v autosampleru temperovaném na 4°C, bez přístupu světla.

5.2.1 Zhodnocení vlivu teploty na stabilitu

Byl zjišťován vliv teploty 20°C, 10°C a 4°C na stabilitu kyseliny askorbové. Teplota 4°C je nejnižší teplota, kterou je za daných podmínek možno testovat, protože autosampler neumožňuje nižší teplotu. Výsledky jsou shrnuty v tabulce Tab. 8 a přehledně znázorněny v grafu Obr. 7.

Obr. 7 – Vliv teploty na stabilitu kyseliny askorbové



Tab. 8 - Srovnání vlivu jednotlivých faktorů na stabilitu

stabilizující faktor	čas (hod)							
	1	2	4	8	12	24	48	72
teplota	relativní obsah AA (%)							
20 °C	99,0	96,0	88,3	76,8	69,9	52,5	30,4	15,2
10 °C	99,9	99,2	97,1	94,5	91,5	82,6	65,8	52,1
4 °C	101,0	100,5	99,8	96,8	95,0	90,6	79,6	63,5
pH	relativní obsah AA (%)							
voda	99,8	99,2	98,7	97,9	96,8	92,8	83,0	74,6
Am Ac 3,8	100,5	100,3	99,0	98,0	96,8	90,9	78,5	69,9
Am Ac 4,8	100,0	99,3	97,9	93,4	91,7	83,9	68,5	58,9
Am Ac 5,8	99,5	99,3	97,4	94,7	92,6	86,3	72,9	60,4
Am Ac 6,8	100,3	99,7	98,2	95,5	93,1	86,3	72,4	61,2
Am Ac 7,8	99,8	99,1	98,2	96,3	94,4	88,0	73,3	63,0
odplynění	relativní obsah AA (%)							
0 min	100,6	100,1	98,2	95,1	92,2	83,3	67,2	62,9
5 min	100,6	98,7	95,8	91,8	87,3	74,3	49,3	32,4
10 min	100,7	97,7	95,5	92,9	88,9	77,9	58,0	43,0
20 min	98,8	96,4	94,8	91,0	88,6	79,3	62,0	48,1
koncentrace	relativní obsah AA (%)							
0,01mg	98,1	97,5	92,0	83,4	75,6	58,2	33,3	17,5
0,1 mg	100,4	100,3	97,0	92,5	87,7	77,3	57,9	41,2
1,0 mg	100,9	100,1	98,5	96,0	93,1	86,6	71,4	59,4
10,0 mg	100,6	99,0	98,1	94,3	91,5	83,5	71,7	62,2
50,0 mg	100,1	100,3	98,89	96,6	94,1	86,8	76,6	67,4

Nejvyšší stability bylo dosaženo při 4°C, kdy kyselina askorbová zůstává stabilní po dobu cca 4 hodiny, při 10°C je to pouze něco málo přes 2 hodiny, a u 20°C je stabilita zachována pouze 1 hodinu.

Zhodnotíme-li obsah kyseliny askorbové po 72 hodinách, opět dosáhneme výrazně nejlepších výsledků při 4°C, kdy obsah poklesnul na 63,5 %, zatímco při 10°C zůstává jen 52,7 % původní koncentrace a u 20°C je to dokonce pouze 15,2 %.

Teplota 4°C je tedy výhodná jak z hlediska krátkodobé stability tak i dlouhodobé.

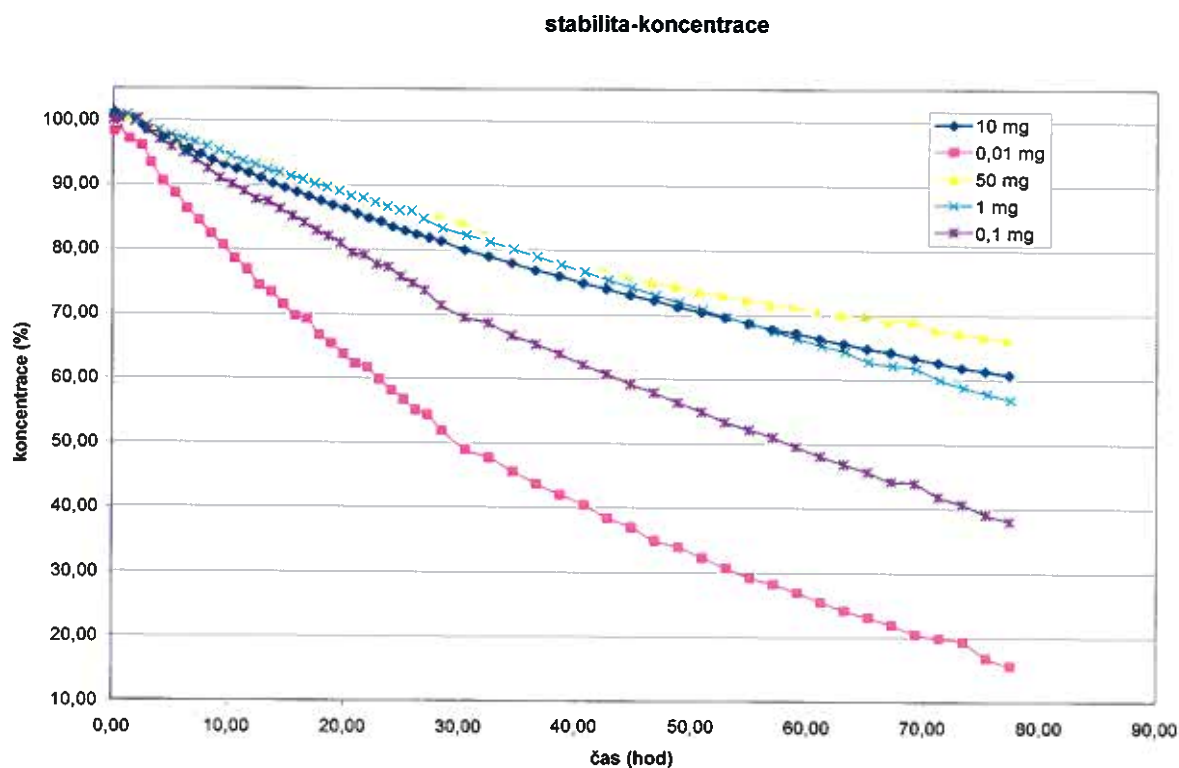
Pro další měření již byla vždy využívána teplota 4°C. Příprava takovýchto vzorků je náročnější. Rozpouštědla je nutno zchladit na teplotu 4°C, a ihned po rozpuštění kyseliny askorbové je nutné vialku umístit do temperovaného autosampleru a bezprostředně dávkovat vzorek na kolonu. Jakékoliv změny teploty ať už zvýšení teploty či podchlazení vzorku při přípravě, má za následek výrazné změny plochy píku.

5.2.2 Zhodnocení vlivu koncentrace kyseliny askorbové na její stabilitu.

Koncentrace roztoku kyseliny askorbové má také významný vliv na stabilitu roztoku. Byla zkoušena koncentrace 0,01; 0,1; 1,0; 10,0; 50,0 mg/100 ml. Výsledky jsou shrnuty v tabulce Tab. 8 znázorněny v grafu Obr. 8. Bylo zjištěno že stabilita se zvyšuje s rostoucí koncentrací, avšak rozdíly mezi 1,0; 10,0 a 50,0 mg nejsou nijak zásadní. Roztoky byly v těchto případech stabilní po dobu asi 3-4 hodin, po 72 hodinách poklesla koncentrace na 67,4 % původní koncentrace při použití 50,0 mg, a na hodnoty kolem 60 % u 10,0 a 1,0 mg/100 ml. Při nižších koncentracích jsou výsledky horší, při koncentraci 0,1 mg je stabilita zachována po dobu 2 hodin a po 72 hodinách dochází k poklesu na 41,2 % původní koncentrace, nejnižší koncentrace roztoku způsobuje, že AA není stabilní ani po dobu 1 hodiny a po 72 hodinách koncentrace klesá jen na 17,5 % původní koncentrace.

Pro další experimenty byla zvolena koncentrace 1 mg/100 ml, která byla dostačující a rozpouštění tohoto množství ve studené mobilní fázi je snadnější. Důvodem může být také nižší spotřeba standardu.

Obr. 8 - Vliv koncentrace kyseliny askorbové na její stabilitu



5.2.3 Zhodnocení vlivu pH vodné části mobilní fáze na stabilitu.

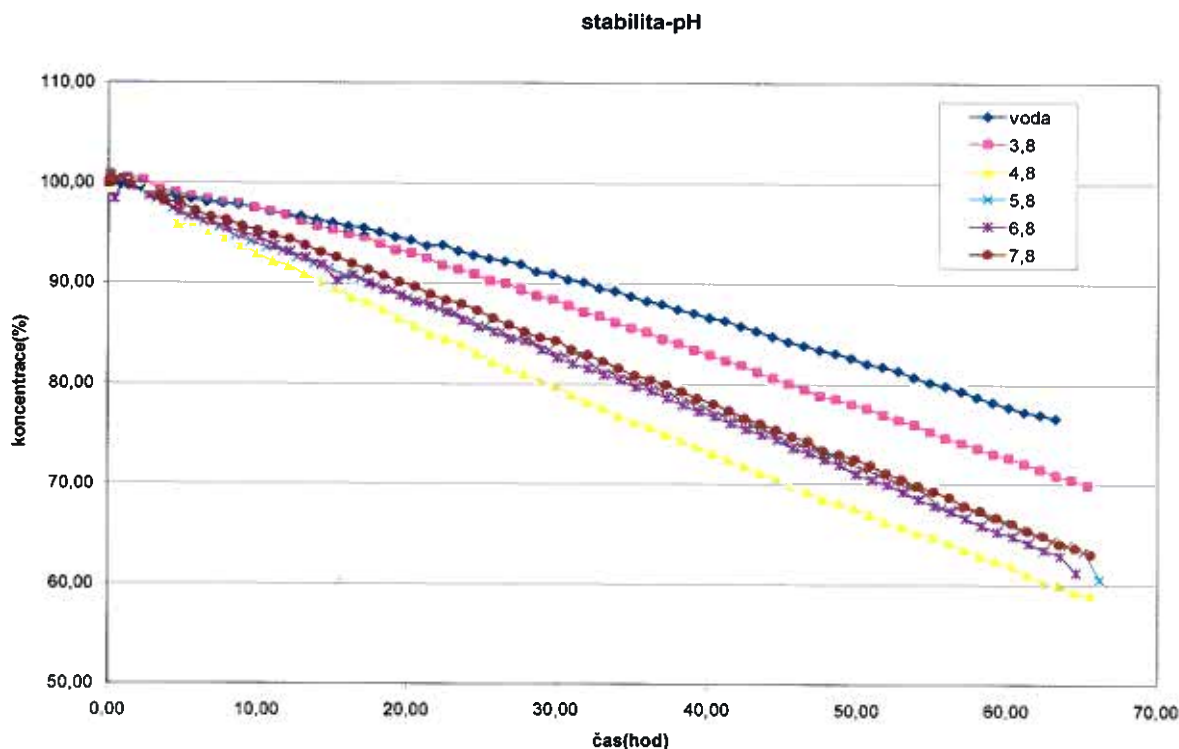
Kyselina askorbová je kyselá sloučenina, je tedy předpoklad, že bude stabilnější v kyselém prostředí. Vyšší hodnoty pH negativně ovlivňují stabilitu AA v roztoku, rozklad AA na kyselinu dehydroaskorbovou.

Vliv pH na stabilitu byl zkoušen v rozsahu pH 3,8-7,8 s ohledem na možnosti stacionární fáze. Jako pufr byl použit octan amonný při hodnotě pH 3,8; 4,8; 5,8; 6,8; 7,8. Byla také zkoušena čistá voda místo pufru. Výsledky jsou shrnuty v tabulce Tab. 8 a znázorněny v grafu Obr. 9.

Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití pH 3,8 nebo vody, u které bylo dokonce dosaženo lepších výsledků po 72 hodinách. Jak při pH 3,8 tak při použití vody byla AA stabilní po dobu 3-4 hodin, liší se však výsledek po 72 hodinách, při pH 3,8 pokles obsah AA na 69,9 % původní koncentrace, zatímco při použití vody na 74,6 %. Výsledky stability při pH 5,8; 6,8; 7,8 se nijak výrazně od sebe neliší, roztok je stabilní asi 2 hodiny a po 72 hodinách koncentrace poklesla na hodnotu kolem 60% výchozí

koncentrace. Při pH 4,8 byly získány o něco horší výsledky, pokles koncentrace byl rychlejší a po 72 hodinách koncentrace poklesla na 58,9 %.

Obr. 9 - Vliv pH na stabilitu kyseliny askorbové

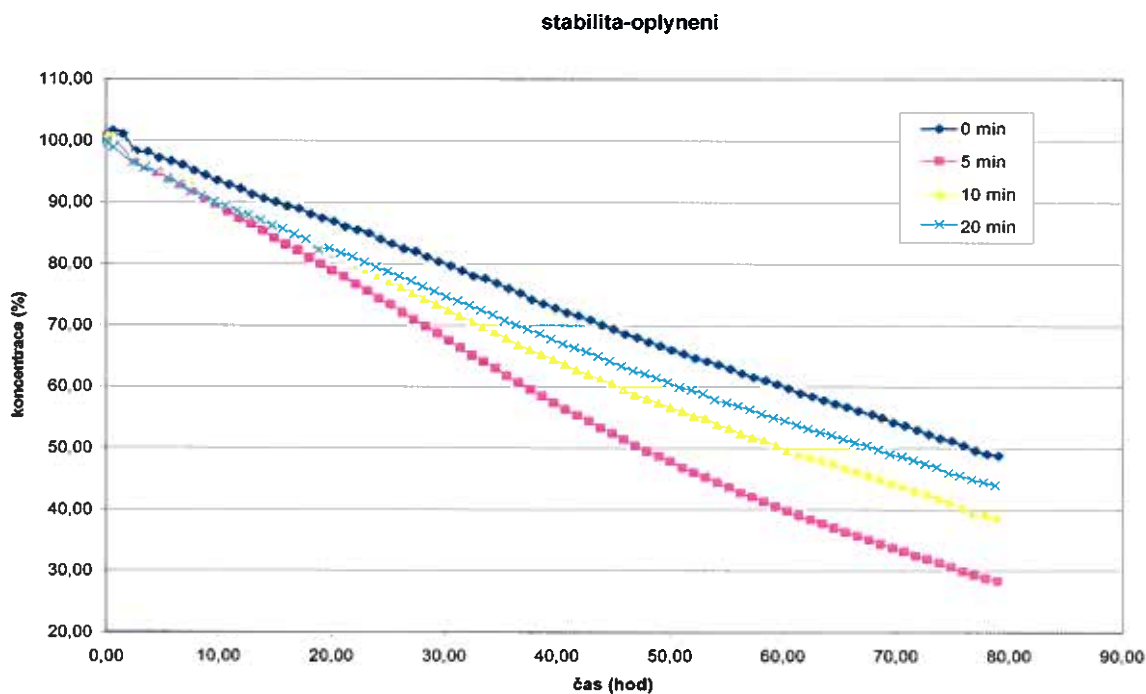


5.2.4 Zhodnocení vlivu odplynění rozpouštědla na stabilitu

Odplyněním směsi používané jako rozpouštědlo kyseliny askorbové eliminujeme kyslík přítomný v roztoku, který by mohl podporovat oxidační proces kyseliny askorbové. Byla srovnávána stabilita kyseliny askorbové v neodplyněném roztoku se stabilitou roztoku po odplynění heliem po dobu 5, 10 a 20 minut. Výsledky jsou shrnuty v tabulce Tab. 8 a znázorněny v grafu na obrázku Obr. 10.

Překvapivě se význam odplynění na stabilitu nepotvrdil, nejhorších výsledků bylo dosaženo při odplynění 5 minut, ale i po 20 minutách byly dosažené výsledky horší než v roztoku bez odplynění. Pro tento jev nemáme žádné logické vysvětlení.

Obr. 10 - Vliv odplynění rozpouštědla na stabilitu



5.2.5 Zhodnocení vlivu stabilizačních činidel na stabilitu

Přídavek různých stabilizačních činidel ve vhodné koncentraci do rozpouštědla může zvýšit stabilitu kyseliny askorbové v roztoku. V této práci byla zkoušena následující činidla: kyselina citrónová, kyselina šťavelová, methionin, homocystein, EDTA, kyselina o-fosforečná, kyselina m-fosforečná, kyselina octová a mravenčí v různých koncentracích. Výsledky jsou shrnuty v tabulce Tab. 9.

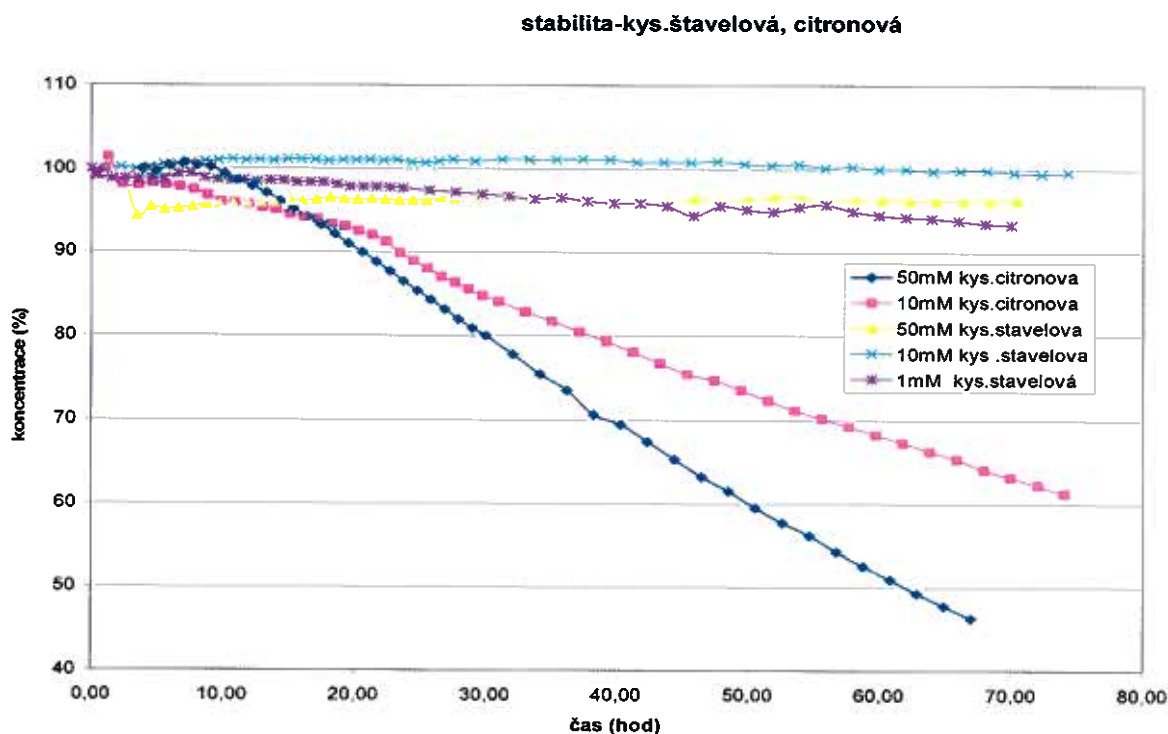
Nejvhodnějším stabilizačním činidlem je kyselina šťavelová v koncentraci 10 mM, při jejím použití je kyselina askorbová stabilní po celých 72 hodin, Obr. 11. Je nutné použít tuto koncentraci, protože při použití koncentrace 50 mM není dosaženo požadovaných výsledků. Použitím slabší koncentrace kyseliny šťavelové, 1 mM, rovněž nebylo dosaženo tak dobrých výsledků jako při koncentraci 10 mM.

Se stejným problémem se setkáváme i při použití kyseliny citrónové. Ve srovnání s kyselinou šťavelovou je však 10 mM kyselina citrónová horším stabilizačním činidlem, Obr. 11.

Tab. 9 - Vliv stabilizačních činidel na stabilitu AA

stabilizační činidlo	koncentrace	čas (hod)							
		1	2	4	8	12	24	48	72
relativní obsah AA (%)									
kys. šťavelová	50 mM	95,1	95,2	95,6	95,9	96,0	96,3	96,2	96,3
	10 mM	100,0	100,2	100,2	100,8	101,0	100,8	100,9	99,5
	1 mM	98,8	98,9	98,9	98,9	98,5	97,4	95,5	93,3
kys. citrónová	50 mM	100,4	100,6	100,3	97,1	93,3	80,9	52,5	40,7
	10 mM	100,0	96,8	96,9	95,8	94,4	87,6	73,0	60,7
homocystein	1 mM	99,2	99,2	98,8	98,4	97,8	95,5	91,7	87,6
	0,1 mM	100,0	99,9	99,9	98,9	97,4	94,5	89,2	83,4
methionin	1 mM	99,9	99,1	99,1	98,6	98,0	95,0	89,9	84,4
EDTA	5 mM	101,0	100,9	99,9	99,2	98,8	95,5	89,3	83,1
	1 mM	98,1	99,8	98,1	96,6	96,3	93,3	86,3	79,2
kys. o-fosforečná	10 %	99,9	99,8	100,0	100,0	100,1	99,9	98,9	98,1
	5 %	100,2	99,9	100,4	100,2	100,2	100,0	99,3	98,5
	1 %	99,4	100,4	100,7	99,4	98,6	96,8	93,4	89,5

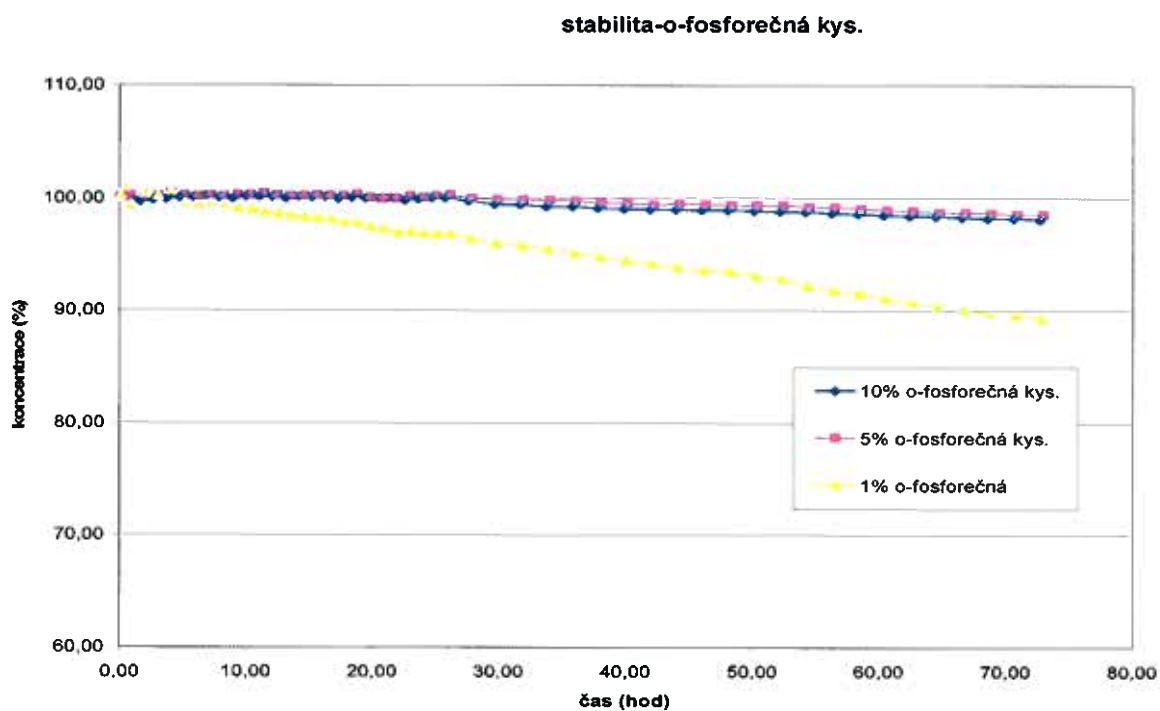
Obr. 11 - Srovnání stability při použití kys. šťavelové a citrónové



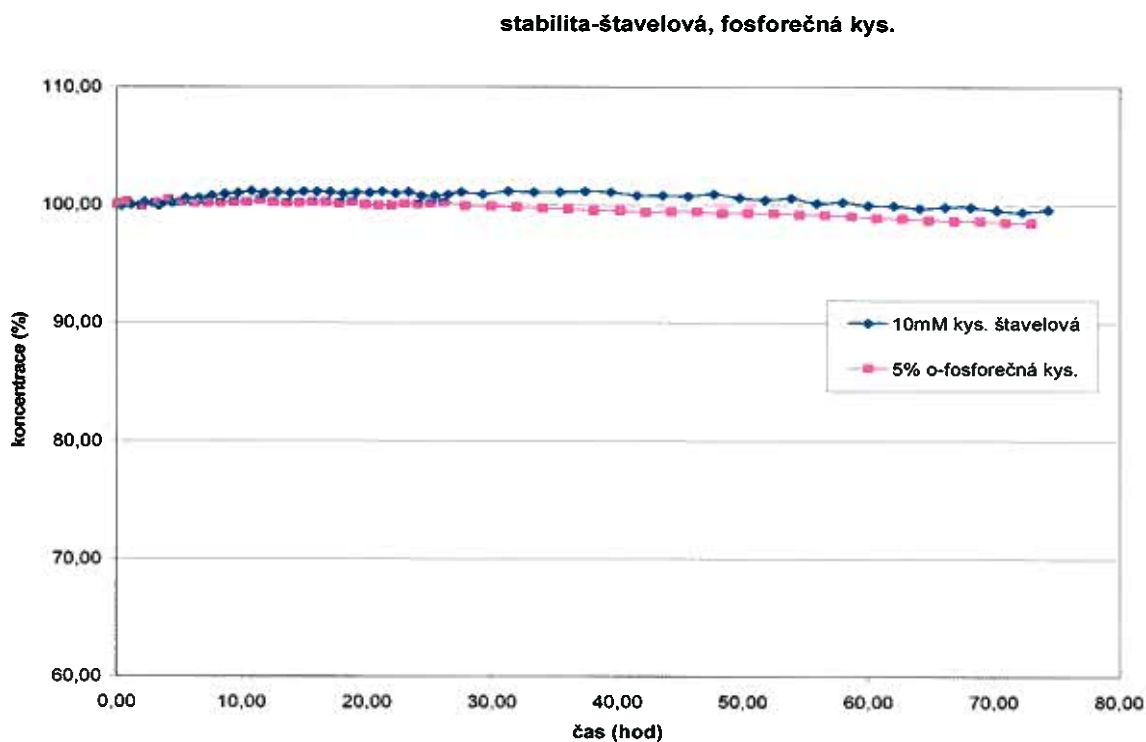
Kyselina o-fosforečná byla zkoušena v koncentraci 1, 5, 10 %. Podobných výsledků jako při použití kyseliny šťavelové, bylo dosaženo při použití 5 % kyseliny o-fosforečné. Při koncentracích 1 a 10 % byla stabilita AA menší než v případě 5 % koncentrace kyseliny o-fosforečné, Obr. 12.

V případě kyseliny o-fosforečné však symetrie píků nevyhovuje přísným požadavkům lékopisu, narozdíl od kyseliny šťavelové. Z tohoto důvodu byla kyselina šťavelová zvolena nejvhodnějším stabilizačním činidlem. Srovnání kyseliny šťavelové a o-fosforečné je v grafu na obrázku Obr. 13.

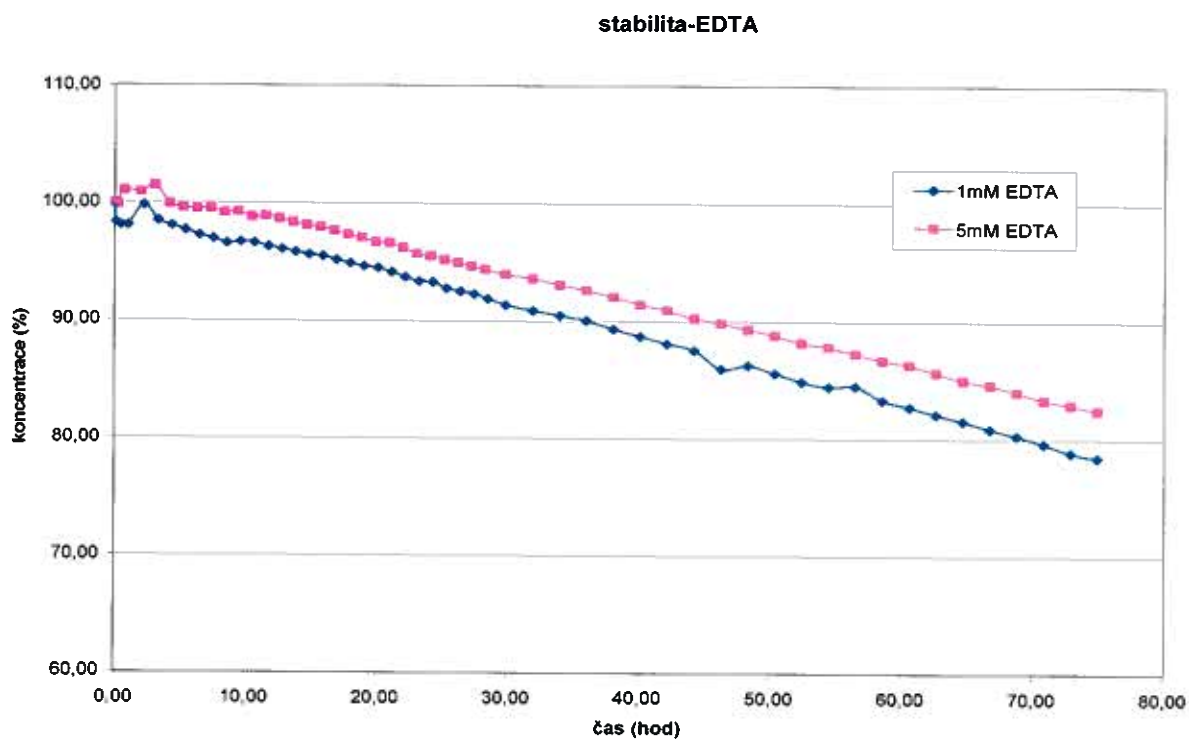
Obr. 12 – Stabilizace kyselinou o-fosforečnou



Obr. 13 - Srovnání stabilizace kyselinou šťavelovou a o-fosforečnou



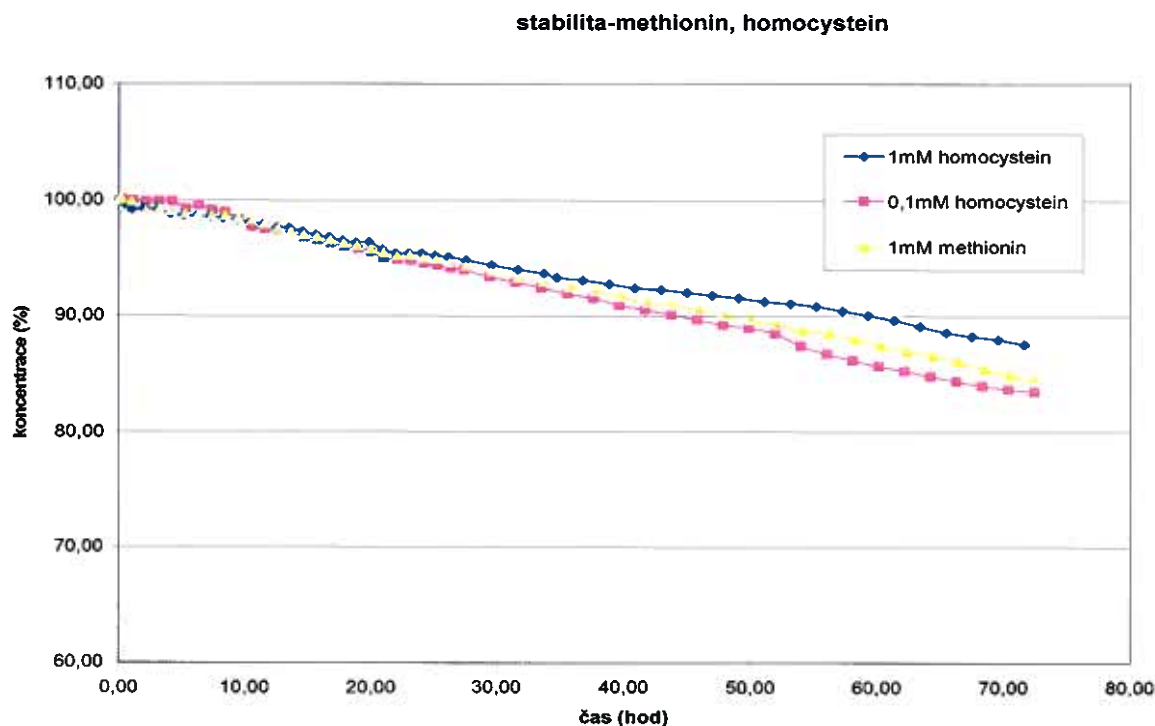
Obr. 14 - Stabilita AA při použití EDTA



Při testování EDTA byla hodnocena koncentrace 5 mM a 1 mM. V případě 5 mM koncentrace je AA stabilní téměř 10 hodin a po 72 hodinách poklesne koncentrace na 83,1 % původní hodnoty, u 1 mM EDTA klesne koncentrace pod 99 % prakticky okamžitě po dávkování na kolonu, po 72 hodinách klesá koncentrace na 79,2 %, Obr. 14.

Byla zkoušena i stabilita AA při použití aminokyselin methioninu a homocysteinu jako stabilizačních činidel, Obr. 15. Homocystein byl testován ve dvou koncentracích, 1 a 0,1 mM, methionin 1 mM. 1 mM homocystein je lepším stabilizačním činidlem než jeho nižší koncentrace. Homocystein je lepším stabilizačním činidlem než methionin. Kyselina askorbová zůstává stabilní po dobu 4 hodin, po 72 hodinách klesá obsah AA na 87,6 % v případě 1 mM homocysteinu a na 84,4 % v případě použití methioninu. Lepších výsledků bylo dosaženo použitím kyseliny šťavelové nebo o-fosforečné. Výsledky jsou shrnuty v tabulce, Tab. 9.

Obr. 15 - Srovnání stability AA při použití methioninu a homocysteinu



Dalším zkoušeným činidlem byla kyselina m-fosforečná. Stabilizaci pomocí kyseliny m-fosforečné nebylo možné prakticky zjistit, protože při jejím smísení s acetonitrilem dochází k oddělení fází a zakalení roztoku. Při nástřiku takového roztoku dochází k ucpávání kolony.

Prakticky nebylo možné hodnotit ani vliv kyseliny octové a mravenčí na stabilitu, protože jednotlivé nástřiky se velmi lišily plochou píku.

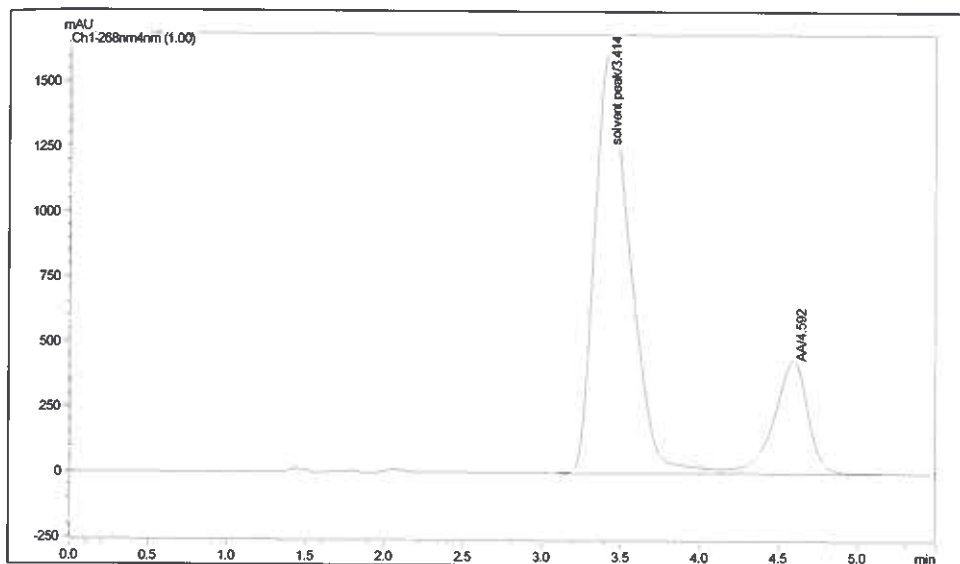
Protože HILIC je druh speciální chromatografie, během této práce bylo zjištěno, že ne všechna rozpouštědla lze pro metodu HILIC využít. Rozpouštědlo vždy musí obsahovat jak organickou tak i vodnou složku, při vynechání organické fáze vznikají dvojité píky, které nelze integrovat, dochází k narušení tvorby obohacené vodné vrstvy a porušení HILIC rovnováhy, Obr. 16A). Při nástřiknutí samotného methanolu se objevuje druhý pík, stejně tak i při použití samotného acetonitrilu. Při nástřiku jen vodného roztoku AA se objevuje několik nesymetrických píků Obr. 16B).

Obr. 16 - Vliv použitého rozpouštědla na výsledek stanovení

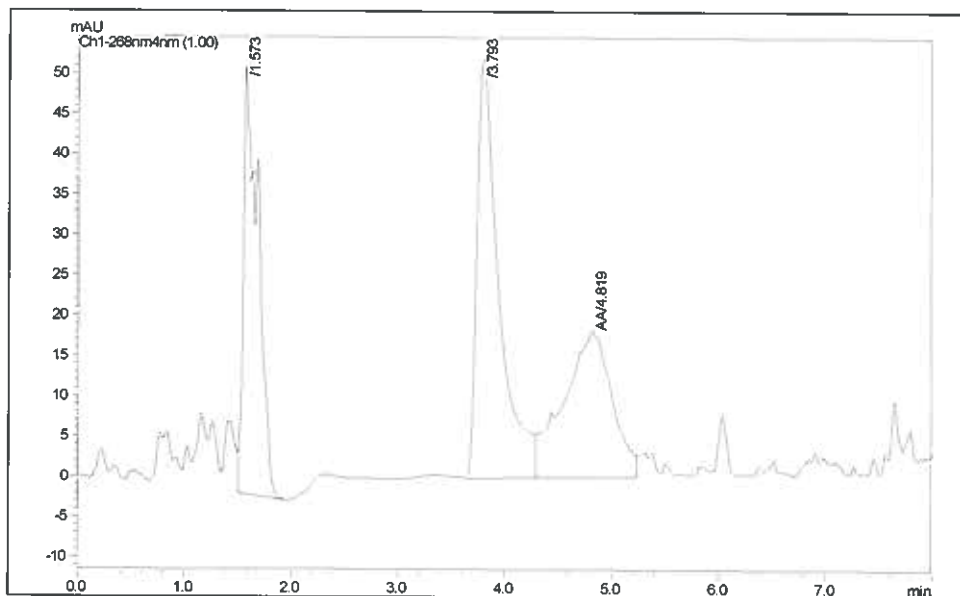
A) nástřik AA v methanolu

B) nástřik AA ve vodném prostředí

A)



B)



5.3 Test způsobilosti systému a validace

5.3.1 SST

Test způsobilosti systému je důležitou součástí validace metody [51]. Byl stanoven počet teoretických pater, symetrie píku, rozlišení, retenční čas, plocha píku a opakovatelnost nástřiku referenčního standardního roztoku.

Test byl proveden opakovaným nástřikem, 10 krát, roztoku AA za optimálních stabilitních podmínek. Parametry jako je počet teoretických pater, symetrie píku, rozlišení, opakovatelnost nástřiku jsou uvedeny v tabulce Tab. 10. Opakovatelnost plochy a retenčních časů píků je vyjádřena jako procento relativní směrodatné odchylky.

Protože bylo dobrých stabilitních výsledků dosaženo jak při použití kyseliny o-fosforečné tak i šťavelové, byl test způsobilosti proveden u obou kyselin. Použití kyseliny o-fosforečné negativně ovlivňuje tvar píku, symetrie píků nevyhovuje striktním požadavkům lékopisu, který požaduje aby faktor symetrie nebyl vyšší než 2,0, opakovatelnost je ale přesto velmi dobrá. Kyselina šťavelová vyhovuje všem požadavkům.

5.3.2 Kalibrace

Byla změřena kalibrační křivka kyseliny askorbové v rozsahu koncentrací 0,1-0,0001 mg/ml. Pro kvantifikaci byla použita kyselina chlorogenová jako vnitřní standard. Výsledky jsou v tabulce, Tab. 10. V definovaném rozsahu byla kalibrační křivka lineární, proto byla metoda za použití kyseliny chlorogenové jako vnitřního standardu zhodnocena jako vhodná pro kvantitativní účely.

5.3.3 Analýza reálného vzorku kyseliny askorbové

Použitelnost metody byla ověřena na reálních vzorcích tablet obsahujících kyselinu askorbovou. Byly zkoušeny dva přípravky, které jsou registrovanými léčivými, mají tedy deklarovaný obsah kyseliny askorbové: Celaskon 500 mg šumivé tablety a Celaskon 100

mg tablety. Byla prokázána přesnost a správnost metody. Bylo testováno šest vzorků každého přípravku. Všechny vzorky obsahovaly $100 \pm 5\%$ kyseliny askorbové, Tab. 10.

Tab. 10 – Test způsobilosti systému

	AA		IS		limit
	kys. šřavelová	kys.o-fosforečná	kys.šřavelová	kys. o-fosforečná	
SST					
počet teoretických pater	962	1779	288	412	N > 200
symetrie píku	1,49	2,08	1,99	2,12	As < 2
rozišení	3,40	4,52	-	-	R _{ij} > 1,5
opakovatelnost - t _R [% RSD]	0,26 %	0,19	0,12 %	0,16	R.S.D. < 1%
opakovatelnost - A [% RSD]	0,59 %	0,20	1,0 %	0,74	R.S.D. < 1%
Validace					
Správnost [%]	Celaskon 100 mg Celaskon 500 mg	97,81 104,45	stabilizace kys. šřavelovou		výtěžnost = 100 ± 5%
Přesnost [% R. S. D.]	Celaskon 100 mg Celaskon 500 mg	3,72 3,04	stabilizace kys. šřavelovou		R.S.D. < 5%
linearita (korelační koeficient)		0,9995	-		r ² > 0,9990
linearita (rovnice)		y = 449,05 * x - 0,6444	-		-

6 Závěr

Byla vyvinuta metoda HILIC pro stanovení kyseliny askorbové. Metoda využívá jednoduchou mobilní fázi složenou z acetonitrilu a vody. Změnou poměru složek mobilní fáze, změnou koncentrace pufru nebo změnou pH lze ovlivnit retenční čas kyseliny askorbové. Vzhledem k tomu, že mobilní fáze je těkavá a jednoduchá, neobsahuje žádná ionpárová činidla ani anorganické pufrы, může být metoda využita i ve spojení s hmotnostním spektrometrem. Pro kvantifikaci lze využít jako vnitřní standard kyselinu chlorogenovou.

V této metodě byla použita mobilní fáze složená z acetonitrilu a 50 mM octanu amonného pH 6,8 v poměru 78:22, retenční čas se pohyboval kolem 4,6 min.

Hlavní problém při analýze AA spočívá v nestabilitě jejího roztoku. Tento problém se podařilo vyřešit nalezením vhodných podmínek, při kterých je roztok stabilní. Jedná se o vliv teploty, pH, koncentrace AA v roztoku, odplynění, stabilizačních činidel.

Optimální stability za HILIC podmínek bylo dosaženo při:

- snížení teploty roztoku na 4°C
- použití vyšší koncentrace AA v roztoku
- kyselého pH nebo vodného roztoku
- stabilizaci 10 mM kyselinou šťavelovou nebo 5 % kyselinou o-fosforečnou

Obě stabilizační činidla poskytovala dobré výsledky, jak bylo ověřeno testem způsobilosti systému. Sledované parametry jako je účinnost, opakovatelnost retenčního času a plochy, symetrie píků a rozlišení při použití kyseliny šťavelové vyhovují požadavkům lékopisu. V případě kyseliny o-fosforečné pouze symetrie píku nevyhovuje požadavkům lékopisu, avšak opakovatelnost je velmi dobrá.

Metoda byla ověřena analýzou reálných vzorků léčivých přípravků obsahujících kyselinu askorbovou. Analýzou byl stanoven obsah AA, který odpovídal obsahu uváděnému výrobcem. Opakovatelnost výsledků byla vyhovující, relativní směrodatná odchylka byla menší než 5 %.

Literatura

- [1] Evropský lékopis 2005 (Ph. Eur. 5), Strassburg, 2004, článek "Ascorbic acid".
- [2] Český lékopis, Grada 2005, článek kyselina askorbová, str. 900.
- [3] E. Gibbons, M. C. Allwood, T. Neal, G. Hardy, J. Pharm. Biomed. Anal. 25 (2001) 605-611.
- [4] F. Teisser, I. Birlouez-Aragon, Ch. Tjani, J.-C. Guillard, Internat. J. Vit. Res. 66 (1996) 166.
- [5] D. M. Miller, G. R. Buettner, G. R. Aust, Free Radic. Biol. Med. 8 (1990) 95.
- [6] A. Karlsen, R. Blomhoff, T. E. Gundersen, J. Chromatogr. B 824 (2005) 132-138.
- [7] P. Emadi-Konjin, Z. Verjee, A. V. Levin, K. Adeli, Clin. Biochem. 38 (2005) 450-456.
- [8] A. M. Maia, A. R. Baby, W. J. Yasaka, E. Suenaga, T. M. Kaneko, M. V. R. Velasco, Talanta 71 (2007) 639-643.
- [9] S. Hercberg, P. Preziosi, S. Briacon, P. Galan, I. Triol, D. Malvy, A. M. Roussel, A. Favier, Control Clinical Trials 19 (1998) 336.
- [10] S. Hercberg, P. Preziosi, P. Galan, H. Faire, J. Arnaud, N. Duport, D. Malvy, A. M. Russel, A. Favier, Food. Chem. Toxicol. 37 (1999) 925.
- [11] G. S. Omenn, G. E., Goodman, M. D. Thornquist, New England of Journal Medicine 334 (1996) 1150.
- [12] J. A. Simon, J. Am. Coll. Nutr. 11 (1992) 107.
- [13] W. O. Song, G.R. Beecher, R.R. Eitenmiller, Modern Analytical Methodologies in Fat- and Water-Soluble Vitamins, Chemical Analysis Vol.154 (2000) John Wiley&Sons, Inc., 411-416.
- [14] M. Romeu-Nadal, S. Morera-Pons, A.I. Castellote, M.C. López-Sabater, J. Chromatogr. B 830 (2006) 41-46.
- [15] W. Zeng, F. Martinuzzi, A. MacGregor, J. Pharm. Biomed. Anal. 36 (2005) 1107-1111.
- [16] United States Pharmacopoeia 30, United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD 20852 (2007).
- [17] P. Lopes, J. Drinkine, C. Saucier, Y. Glories, Anal. Chim. Acta. 555 (2006) 242.
- [18] S. A. Margolis, T. P. Davis, Clin. Chem. 34 (1988) 2217.
- [19] W. D. Graham, D. Anette, J. Chromatogr. 594 (1992) 187.

- [20] L. D. Mueller, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 985-994.
- [21] M. O. Nisperos-Carriedo, B. S. Buslig, P. E. Shaw, *J. Agric. Food. Chem.* 40 (1992) 1127.
- [22] L. S. Liau, B. L. Lee, A. L. New, C. N. Ong, *J. Chromatogr.* 612 (1993) 63.
- [23] P. J. Tsai, J. P. Wu, N. N. Lin, J. S. Kuo, Ch. S. Yang, *J. Chromatogr. B* 686 (1996) 151.
- [24] I. N. Papadoyannis, G. K. Tsioni, V. F. Samanidou, *J. Liq. Chrom. and Rel. Technol.* 20 (1997) 3203.
- [25] H. Iwase, I. Ono, *J. Chromatogr. A.* 806 (1998) 361.
- [26] A. C. Kurilich, G. J. Tsau, A. Brown, L. Howard, B. P. Klein, E. H. Jeffery, M. Kushad, M. A. Wallig, J. A. Juvik, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 1576.
- [27] M. Levine, Y. Wang, S. C. Rumsey, *Methods in Enzymology* 299 (1999) 65.
- [28] H. Iwase, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 317-326.
- [29] M. Rodríguez-Comesana, M. S. García-Falcón, J. Simal-Gándara, *Food. Chem.* 79 (2002) 141.
- [30] B. Klejdus, J. Petřlová, D. Potěšil, V. Adam, R. Mikelová, J. Vacek, R. Kizek, V. Kubáň, *Anal. Chim. Acta* 520 (2004) 57.
- [31] P. Lopes, J. Drinkine, C. Saucier, Y. Glories, *Anal. Chim. Acta.* 555 (2006) 242.
- [32] A. Tai, J. Takebayashi, A. Ueno, E. Gohda, I. Yamamoto, *J. Chromatogr. B* 840 (2006) 38.
- [33] I. O. Serrano, T.H. Jover, O. M. Belloso, *Food Chem.* 105 (2007) 1151-1158.
- [34] P. Fontannaz, T. Kilinc, *Ol. Heudi, Food. Chem.* 94 (2006) 626.
- [35] C. C. Tangney, *Prog. Clin. Biol. Res.* 259 (1988) 331.
- [36] A. Pappa-Louisi, S. Pascalidou, *Anal. Biochem.* 263 (1998) 176.
- [37] D.G. Watson, Z. Iqbal, J.M. Midgley, H. Pryce-Jones, L. Morrison, G.N. Dutton, S. Karditsas, W. Wilson, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 11 (1993) 389.
- [38] M.A. Kutnink, W.C. Hawkes, E.E. Schaus, S.T. Omaye, *Anal. Biochem.* 166 (1987) 424.
- [39] J. Cammack, A. Oke, R. N. Adams, *J. Chromatorgr.* 565 (1991) 529.
- [40] M. J. Steve, R. Fatro, A. Frigola, J. M. Garcia-Cantabella, *J. Chromatogr. B* 688 (1997) 345.
- [41] J. Lykkesfeldt, *Anal. Biochem.* 282 (2000) 89-93.
- [42] I. Salminen, G. Alfthan, *Clin. Biochem.* 2007, in press.

- [43] M. A. Call, C. Andersen, J. Chromatogr. B 730 (1999) 101.
- [44] T. J. Vanderslice, D. J. Higgs, J. Micronutr. Anal. 4 (1988) 109.
- [45] H. Iwase, I. Ono, J. Chromatogr. A 654 (1993) 215.
- [46] H. Iwase, Ajinomoto Co., Inc., Central Research Laboratories, Talanta 60 (2003) 1011-1021.
- [47] Sequant, A Practical Guide to HILIC, A tutorial and application book.
- [48] P. Hemasrtroem, K. Irgum, J. Sep. Sci. 2006, 29, 1784-1821.
- [49] Sequant, instruction for use Zic-HILIC.
- [50] http://www.sequant.com/sn/images/sheet_7.pdf
- [51] Český lékopis, Grada 2005, článek Chromatografické separační metody, str. 177.
- [52] W. Jiang, G. Fischer, Y. Girmay, K. Irgum, J. Chromatogr. A 1127 (2006) 82-91.

Seznam tabulek

Tab. 1 - Metody analýzy askorbové a dehydroaskorbové kyseliny	12
Tab. 2 - Přehled HPLC metod používaných pro analýzu kyseliny askorbové	15
Tab. 3 - Stabilita kyseliny askorbové a dehydroaskorbové	21
Tab. 4 - Efekt pH na stabilitu standardu kyseliny askorbové skladované v hnědé lahvi při teplotách 25°C a 40°C po jedné hodině skladování.	21
Tab. 5 - Vliv Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} na výtěžnost kyseliny askorbové.....	23
Tab. 6 - Vliv vybraných stabilizačních činidel na stabilitu AA	24
Tab. 7-Optimalizace průtokové rychlosti mobilní fáze.....	45
Tab. 8 - Srovnání vlivu jednotlivých faktorů na stabilitu.....	48
Tab. 9 - Vliv stabilizačních činidel na stabilitu AA	53
Tab. 10 – Test způsobilosti systému.....	61

Seznam obrázků

Obr. 1 - Chemická struktura kyseliny askorbové	10
Obr. 2 - Reakční schéma oxidace kyseliny askorbové	11
Obr. 3 - Princip HILIC	27
Obr. 4 - Zwitteriontová stacionární fáze s funkčními skupinami sulfobetainového typu ...	33
Obr. 5 – Graf závislosti retence AA na koncentraci vodné složky mobilní fáze	44
Obr. 6 - Chromatografický záznam analýzy AA s použitím kyseliny chlorogenové jako IS, včetně UV spektra AA.....	46
Obr. 7 – Vliv teploty na stabilitu kyseliny askorbové	47
Obr. 8 - Vliv koncentrace kyseliny askorbové na její stabilitu	50
Obr. 9 - Vliv pH na stabilitu kyseliny askorbové.....	51
Obr. 10 - Vliv odplynění rozpouštědla na stabilitu	52
Obr. 11 - Srovnání stability při použití kys. šťavelové a citrónové.....	54
Obr. 12 – Stabilizace kyselinou o-fosforečnou	55
Obr. 13 - Srovnání stabilizace kyselinou šťavelovou a o-fosforečnou.....	55
Obr. 14 - Stabilita AA při použití EDTA	56
Obr. 15 - Srovnání stability AA při použití methioninu a homocysteinu.....	57
Obr. 16 - Vliv použitého rozpouštědla na výsledek stanovení	58

Příloha

HYDROPHILIC INTERACTION LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD FOR THE DETERMINATION OF ASCORBIC ACID

L. Nováková^{1*}, D. Solichová², S. Pavlovičová¹, P. Solich¹

¹ Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University,
Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

² Department of Metabolic Care and Gerontology, Charles University, Faculty of Medicine
and University Hospital in Hradec Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, Czech
Republic

*Corresponding author. Tel.: +420-495067345, fax : +420-495067164

E-mail address: novakoval@faf.cuni.cz

Abstract

Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) method using internal standard for the determination and stability study of ascorbic acid was developed. HILIC method was very fast and simple using following analytical conditions: ZIC HILIC (150 x 2.1 mm, 3.5 μ m) chromatographic column and mobile phase composed of acetonitrile and 50 mM ammonium acetate buffer pH 6.8 (78:22 v/v). DAD detection was performed and chromatograms were processed at 268 nm, the maximum wavelength of absorbance of ascorbic acid.

An extensive stability study of ascorbic acid as a function of various factors including temperature, stabilizing agents, oxygen presence and its concentration in the solution was performed in order to get the information about quantitative influence of individual stability factors. Low temperature and stabilizing agents (o-phosphoric acid and oxalic acid) were found to be key factors enabling substantial enhancement of stability of ascorbic acid.

Keywords: ascorbic acid, HILIC, vitamins, stability, oxalic acid, o-phosphoric acid

1. Introduction

Ascorbic acid (vitamin C) is widely distributed in plant material, with fruits and vegetables being the major source in human diet. The biologically active isomer is L-ascorbic acid (L-AA), however, there are also some discussions about the activity of L-dehydroascorbic acid [1]. AA is rapidly oxidized to dehydroascorbic acid (DHA), Fig. 1, when it is exposed to an oxidative stress, increased temperature, enzymes or transition of divalent cations of metals [2]. Ascorbic acid is involved in many different biochemical reactions and physiological processes like redox reactions, collagen synthesis, metabolism of amino-acids, synthesis of adrenalin, synthesis of anti-inflammatory steroids, drug detoxification, copper and iron metabolism. AA as antioxidant vitamin (together with A and E) is often used for enriching beverages, foods and as a part of multi-component vitamin preparations. Antioxidant vitamins could counteract the oxidizing effect of lipids by scavenging free radicals which have been found to be major promoters of certain diseases. Ascorbic acid is supposed to play certain role in the prevention of coronary heart disease and cancer, probably due to its ability to prevent formation of nitrosamine and interaction with free radicals [3-5]. Thus in clinical analysis AA could be an important marker of oxidative status of organism. Its decreased levels could indicate some connections with the occurrence of cardiovascular or cancer diseases and it could also play an important role in prevention of many diseases. Therefore, there is a need to develop reliable, fast, simple, sensitive and low cost analytical method convenient for all purposes on various fields of applications (clinical analysis, food analysis or pharmaceutical analysis).

Determination of AA could be performed by various methods. Enzymatic methods, spectrophotometric methods, flow injection methods, electrochemical methods, HPLC and GC methods were applied in the past [6]. Pharmacopoeial authorities describe still iodimetric titration method [7,8] for the assay of AA substance. Enzymatic methods for the determination of AA are based on action of plant peroxidase like peanut peroxidase [9], horseradish peroxidase [10] or ascorbate oxidase enzyme electrode [11]. Electrochemical methods for the determination of AA include voltammetry [12,13] and potentiometry [14]. Spectrophotometric methods employing CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity) method with extractive separation of flavonoids-La complexes [15], using copper (II) – neocuproine method [16], or iron (III)- 2,2'-dipyridyl reagent [17] were applied.

Spectrophotometric method could be applied as well using flow injection [17], or SIA (sequential injection analysis) for AA determination [18]. GC methods were applied in connection with MS detection after derivatization by N-methyl-(tert-butyl)dimethylsilyl trifluoroacetamide using isotope dilution assay [19-20].

HPLC methods are recently the most widely used methods for AA determination, as would be discussed later. There are many problems to be overcome during analysis of ascorbic acid: stability of AA in solutions, selectivity and sensitivity of the assay, the choice of internal standard for the analysis, the choice of appropriate detection and chromatographic approach, which is complicated by polarity of AA molecule.

Stability is a key problem of AA analysis, because the compound is known to be very unstable in aqueous solution. There are lots of factors including the access of light, increased temperature, increased pH, the presence of oxygen or metal ions, which influence stability of AA in solutions. Thus it is necessary to decrease their impact to the minimum [6]. A lot of studies were performed to find optimal conditions for AA analysis however they are usually studying just some of stability influencing factors only. It is necessary to take them into account as a complex to prevent AA degradation. Stabilizing agents are used to improve stability of AA as well as some extractants have stabilizing properties. Typically MPA (m-phosphoric acid) [21,22] which is the most widely used one. Thereafter TCA (trichloroacetic acid) [23], o-phosphoric acid or citric acid [24], homocysteine [25], oxalic acid [26], EDTA [27] or their combinations, often TCA + EDTA [28] or MPA + EDTA [29] were also proven to prolong the stability of AA in solutions. Less common stabilizing agents were tested by Iwase and his research group including eg. L-cysteine [30], L-methionine [31], monosodium L-glutamate (amino acid) [32] and guanosine-5- monophosphate (nucleic acid) [33].

As ascorbic acid belongs to the group of very polar small molecules, it is difficult to be retained in conventional RP-chromatographic systems and to be separated from the dead volume. That is important especially in case of bio-analytical assay, where ballast compounds from biological matrices are eluted together with dead volume or at the beginning of chromatogram.

Three chromatographic modes are generally used for AA determination by HPLC – reversed phase chromatography [29,34] ion exchange [35,36] and ion-pair chromatography [37,38]. The mobile phases are often very complex, with more than two components containing various modifiers or reagents. Reversed phased systems usually suffer from

poor resolution from the dead retention volume. To get sufficient retention, very high percentage of water content being usually inorganic buffer (sometimes even 100 %), must be applied. It is very well known, that water mobile phases, which does not contain organic modifier, could negatively influence separation efficiency on C18 stationary phase or they can even cause so called “hydrophobic collapse of stationary phase” in case of long time use [39].

Ion pairing reagents or inorganic buffers were often used as additives in analysis of AA. Use of inorganic buffers however causes many difficulties. Moreover, inorganic buffers are not compatible with mass spectrometry because they are not volatile and thus should be avoided in LC/MS applications. They are also known to remain often inside of the ion source and give false positive signal even long time after their use. In addition, they also tend to cause instability in the chromatographic separation or gradual pressure increase with each subsequent injection of sample. There is also a danger of possible precipitation with other components of mobile phase [40].

No HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) method has been employed so far for the determination of AA even if recently this methods gains high attention [41]. HILIC is an alternative of conventional RP-HPLC or NP-HPLC and it is very convenient for the analysis of small polar molecules being weakly retained or eluted with dead volume in conventional RP-HPLC systems. Normal phase chromatography was often replaced by this method because of bad reproducibility and great difficulties when connection with MS detection was required.

Under the HILIC conditions, stationary phase is of polar character, containing usually hydroxyl-ethyl or amino groups or it could be special kind of “zwitterionic” stationary phase or others [41]. Mobile phase is composed of high percentage of an organic solvent (typically acetonitrile) and it is complemented by small percentage of water/volatile buffer part. Water-enriched liquid layer is established within stationary phase, thus partitioning of solutes from mobile phase into the hydrophilic layer occurs. Primary mechanism of separation is the partitioning based on hydrogen bonding, secondary mechanism, which could influence the selectivity, is electrostatic interaction with charged stationary phases. Elution is enabled by increasing of polarity of mobile phase, thus the content of water content. The advantage of HILIC conditions is utilizing of a high percentage of organic solvent which enables a possibility of hyphenation of LC with

MS detection together with getting of high sensitivities [41,43]. Some interesting details are given in an extensive recently published review on HILIC approach [41].

The aim of this work was to develop novel fast, simple and reliable method based on HILIC approach for the determination of ascorbic acid. The method should be applicable for stability study, real sample analysis and further for the applications using mass-spectrometry detection.

2. Experimental

2.1 Chemicals and reagents

Working standards of ascorbic acid, gallic acid, protocatechuic acid and chlorogenic acid were used for the purpose of this study. All compounds were obtained from Sigma Aldrich (Prague, Czech Republic). Ammonium acetate, acetic acid, ammonium, all of them reagent grade, were purchased by Sigma Aldrich as was HPLC gradient grade acetonitrile. Stabilizing agents: m-phosphoric acid, o-phosphoric acid, EDTA, homocysteine, methionine, citric acid, oxalic acid and formic acid reagent grade were purchased by Sigma Aldrich. HPLC grade water was prepared by Milli-Q reverse osmosis Millipore (Bedford, MA, USA) and it meets European Pharmacopoeia requirements.

2.2 Chromatography and UV spectra measurement

A Shimadzu Prominence LC 20 system (Shimadzu, Kyoto, Japan) was used to perform all of the analyses. Detection of ascorbic acid was accomplished by diode array detector SPD-M20A. The instrument was equipped with column oven SIL-20 AC enabling temperature control. The built-in auto-sampler CTO-20 AC enables cooling as well. Chromatographic software Lab Solution was used for data collection and processing.

Analytical conditions for HILIC determination of ascorbic acid employed ZIC-HILIC (150 x 2.1 mm, 3.5 μ m) analytical column (Sequant, Sweden) containing zwitterionic stationary phase with sulfobetaine group (Fig. 2), which was kept in column oven at 23 °C because of stability reasons. Binary mobile phase composed of acetonitrile and 50 mM ammonium acetate buffer pH 6.8 (78:22) was pumped at flow-rate 0.30 ml/min. DAD detection at 268 nm was performed. Injected volume was 5 μ l, the

autosampler was cooled at 4 °C. Stock solution of ascorbic acid had to be kept in dark and cool ambient, without the access of oxygen.

UV spectra of tested compounds in mobile phase were measured by spectrophotometer Hewlett Packard 8453 equipped with software Chemstation (UV-VIS for biochemistry).

2.3 Preparation of standard solutions and samples

First the stock solution of internal standard was prepared by dissolving 50 mg of chlorogenic acid working standard in 100 ml of dissolution medium (being ACN 78 % together with 22 % of aqueous solution of stabilizing agent – 10 mM oxalic acid or o-phosphoric acid 5 %). Reference standard solution of ascorbic acid was prepared in 100 ml volumetric flask by dissolving of 25.0 mg of ascorbic acid in dissolution medium, 2.0 ml of internal standard stock solution were added and the flask was made up to the volume with dissolution medium at 4 °C.

Standards of ascorbic acid for stability measurements were prepared by direct dissolution of ascorbic acid in tested dissolution medium at 4 °C. Samples of tablets were prepared by their dissolution in dissolution medium and subsequent addition of internal standard stock solution in order to get concentrations corresponding to the concentrations in reference standard solution. Stock solution of ascorbic acid had to be kept in dark and cool ambient (4 °C), without the access of oxygen. Ascorbic acid solution without stabilization could be used up to 3-4 hours at maximum if above stated conditions are carefully maintained. Thereafter significant decrease of concentration was observed. The addition of stabilizing agents substantially increases the stability. Such a solution could be used for more than 72 hours (stabilizing agent 10 mM oxalic acid) or up to 59 hours (stabilizing agent o-phosphoric acid 5 %).

2.4 Stability study

Before starting the analytical procedure and method validation, ensuring of compound stability in order to get reliable and repeatable results was necessary. Ascorbic acid is known to be very unstable in solutions. The factors influencing the stability of AA are: high temperature, presence of oxygen, light access, high pH values, present metals or

enzymes and the concentration of ascorbic acid in solutions. All these factors were subject of preliminary stability study and optimization of handling with ascorbic acid in solution with the regard to HILIC conditions. Standard solutions (no mobile phase composition changes were done after the optimization of HILIC method) were prepared at various conditions in order to determine the measure of influence of individual factors. They were chromatographed immediately after preparation in order to determine initial concentrations. Short term stability study was performed during 72 hours keeping samples in darkness in autosampler at appropriate temperature.

The influence of light access. The influence of light access was not tested at this study as the access of light could not be ensured at lower temperatures at our laboratory equipment. All experiments were performed without the access of light. Dark glass laboratory glassware and vials were used all over the study.

The influence of temperature. It is already known that lower temperature improves stability of ascorbic acid in solution. Modern autosamplers enable sample cooling during analysis up to 4 °C. As multiple sample analyses during quality control need repeatable injection and long time, stability of ascorbic acid at 20, 10 and 4 °C (the lowest temperature enabled by autosampler) was observed during three days in autosampler in darkness. The samples were dissolved in mobile phase. All stability tests were subsequently performed at low temperature of 4 °C.

The influence of dissolved oxygen. Mobile phase degassing is an important and inherent step during preparation of chromatography. Dissolved oxygen could also influence the stability of ascorbic acid in un-degassed solution. Therefore stability of ascorbic acid in non-degassed solutions and solution degassed for 5, 10 and 20 min by gentle stream of helium were compared. Sample dissolution media was still mobile phase.

The influence of pH value of dissolution medium. Ascorbic acid, as acidic compound, exhibits higher stability in the solution at acidic conditions. The influence of pH of the buffer employed in the preparation of dissolution medium was discovered in a range 3.8 – 7.8 taking into account stability aspects of stationary phase. The pH values of

3.8, 4.8, 5.8, 6.8 and 7.8 were tested, pure water was tested as well by replacing buffer in mobile phase.

The influence of stabilization. Ascorbic acid stability could be enhanced by the addition of different agents as was described in literature and stated above. No study however describes a comparison among various agents and their different concentrations. Stabilizing agents as m-phosphoric acid, o-phosphoric acid, EDTA, citric acid, oxalic acid, acetic acid, formic acid, methionine and homocysteine at different concentrations were tested in this study.

The influence of concentration of ascorbic acid. Concentration of ascorbic acid in solution could also influence its stability. The measure of the influence was also a subject of this study. Concentrations of 0.1, 1.0, 10.0, 100.0 and 500.0 mg/l were tested.

2.5 System Suitability test and Validation

An important part of method validation is SST (System Suitability Test), details of which are usually given in Pharmacopoeias. SST was performed under the optimized chromatographic and stability conditions. A number of theoretical plates, peak asymmetry, resolution of individual compounds and repeatability of reference standard solution injection (retentions times and peak areas were checked) have been established.

Calibration curve of AA in the concentration range 0.1 – 100 mg/l was measured using chlorogenic acid as internal standard for quantitation. The applicability of the method was verified on real samples of pharmaceutical tablets containing ascorbic acid. Two preparations were involved in the test: Celaskon 500 mg effervescent tablets and Celaskon 100 mg tablets, which are registered as drugs, and thus the content of ascorbic acid is assured. Method accuracy and precision was established – six samples of tablets were tested for each preparation at 100% level of AA content, which correspond to ICH requirements.

3. Results and discussion

3.1 Chromatographic conditions – optimization of HILIC conditions

Mobile phase composition

The retention of AA in a conventional RP-HPLC system could be very complicated due to its high polarity. On the other hand, the problems like poor solubility of analytes and irreproducible retention under NP-HPLC conditions are generally known. Using HILIC chromatography approach, there is a possibility to adjust the retention of AA according to the needs of particular analysis by moderate changes of mobile phase composition, buffer pH or buffer concentration. A minimal water content of 3 percent is recommended in order to assure HILIC conditions and thus enable to obtain reproducible results.

During this study the influence of the ratio of organic and water content of mobile phase together with the influence of buffer pH and concentration on retention of AA was studied.

The strongest impact on AA retention was caused by changing water/organic part ratio (Fig. 3). Even using pure water without buffer provided quite a decent retention at acetonitrile contents higher than 15%, which was impossible to observe testing conventional RP HPLC systems, where AA always eluted with the dead volume. Acetonitrile was chosen as organic part of mobile phase. Under HILIC conditions, the higher percentage of acetonitrile was applied, the higher retention of AA was reached, thus we could get up to 25 minutes retention using simple binary mobile phase consisted of acetonitrile and ammonium acetate buffer without the need of application of ion-pairing reagents.

The change of buffer concentration or pH caused lower influence to the retention of AA (Fig. 2). Ammonium acetate was chosen as a buffer for this application. Tested concentrations of buffer were as follows: 10 mM, 50 mM and 100 mM. 50 mM ammonium acetate was chosen for further experiments, because it gave sufficient retention and it is less stress from the point of view of column maintenance. The higher was the buffer concentration, the stronger was the retention of AA. In chromatographic separations based on ionic interactions, a decrease in retention is normally seen as the salt concentration in the eluent is increased. However, as large amount of organic modifier (>40%) was used in this study, the separation was probably affected by both ionic interaction and hydrophilic

interaction. Sulfobetaine modified stationary phase, which we used for our experiments contains zwitterionic moiety (contains quarternary ammonium and sulfonic acid group as well), thus it has a nominal zero net charge. In fact, the stationary phase surface seems to be, however, net negatively charged. Hence, repulsive electrostatic interactions may be activated between the acidic ascorbic acid solute and stationary phase surface which are weakened at high buffer concentrations. Consequently retention times are increased [44].

The pH of buffer was tested in the range of 3.8 – 7.8 (the column is silica based). The influence of the buffer pH to AA retention was weaker at the lower pH values, thus shorter retention times of AA were obtained at pH 3.8 than at 4.8. Maximal retention was observed at pH 5.8 while it slightly decreased at higher and lower pH values. From the only minor variation of retention in the pH range between 5.8 and 7.8 it could be concluded that the method would be more robust in this pH range. That is why the pH of 6.8 was chosen for further experiments.

Finally, the ratio of organic/water content was adjusted in order to get the retention time of AA around 5 minutes, in order to enable the internal standard use (its elution was supposed before the peak of AA). The optimized composition of mobile phase was as follows: acetonitrile- 50 mM ammonium acetate buffer pH 6.8 (78:22), which enabled retention time of AA at 4.7 min and it is compatible with mass spectrometry detection due to its high volatility. According to the spectrum of DAD, the detection was performed at 268 nm. Optimal flow-rate was found to be 0.3 ml/min. The results of the optimization procedure monitoring the influence of mobile phase composition to AA retention could be seen in Fig. 2.

Internal standard choice

The choice of internal standard for AA analysis is often a great problem. Due to HILIC principles only polar acidic compounds could be taken into the account. Thus, reference standard compounds from the group of phenolic acids were tested as potential internal standards, namely gallic acid, protocatechuic acid, chlorogenic acid and some others. Finally, chlorogenic acid was chosen as internal standard for the determination of AA under HILIC condition, because it was eluted before the peak of AA and it was well separated as it could be seen in Fig. 3, which represents typical chromatogram of HILIC analysis of AA using chlorogenic acid as internal standard.

3.2 Stability testing – the influence of stability factors

During this study the term “stable” is defined as a change in original concentration of AA solution lower than 1.00 %.

The influence of temperature. As it was supposed, temperature had a great impact to stability of AA in solution. According to our possibilities, 4 °C was the lowest possible temperature to test. At this temperature the best results were obtained. AA remained stable in the solution of mobile phase up to 3.5 hours without any further stabilization. Comparing to other tested temperatures, at 20 °C AA remained stable only 1 hour, while at 10 °C it was only slightly more. Thus, setting up the temperature of 4 °C in the auto-sampler and also during stock solution storage is very helpful to increase AA stability. The relative percentage of final concentrations after 72 hours makes 63.5 % of initial concentration (10 mg/l) at 4 °C, 49.1 % for the solution kept at 10 °C and only 15.2 % for the solution kept at 20 °C. The comparison of the influence of individual temperature set up could be seen in Table 2.

Great care must be taken during the preparation of solutions at decreased temperature. The medium utilized for the dissolution of AA must be cooled to the temperature of the auto-sampler and it must be injected directly. If the solution has no appropriate temperature, substantial changes in peak area are observed. If long time period elapses while sample cooling would be done in the auto-sampler, the initial concentration of AA would be missed. Due to this strong influence of temperature, all stability tests were subsequently performed at 4 °C.

The influence of pH value of dissolution medium. Ascorbic acid exhibits higher stability in solution at acidic conditions – see Fig. 1, the degradation pathway. Under acidic conditions the formation of ascorbate is not favored. For HILIC chromatography it is extremely important to keep the ratio and composition of dissolution media for standard or sample at the same conditions as HILIC mobile phase, while the pH or concentration of buffers could be changed. Acetonitrile can not be replaced by methanol in dissolution media eg. for solubility reasons. The extremes after repeated injections of inconvenient solution could make AA peak to spread into double-peak difficult to integrate. From above stated information we can conclude, that the best dissolution medium was mobile phase,

which was verified by the injection of AA in many different dissolution media as well as by injection of tested mediums themselves.

The influence of pH of mobile phase was investigated in a range 3.8 – 7.8 taking into account stability aspects of stationary phase. Ammonium acetate buffer (22 % in mobile phase as was optimized during the study) at the pH values of 3.8, 4.8, 5.8, 6.8 and 7.8 was tested. Water was tested as well replacing buffer in mobile phase in accordance with HILIC rules. The results could be seen in Table 2. The highest stability of AA was observed in mobile phase containing ammonium buffer of pH 3.8 or water, which gave surprisingly even better results. In both cases the solutions of AA were stable during 3-4 hours, somewhat better in stability was observed in case of buffer pH 3.8 during the short time period. However, during longer-time, after 72 hours the relative percentage of AA concentration using water without any buffer as a part of mobile phase was 74.5 % of initial concentration while using buffer of pH 3.8 it was 69.9 %. Similar stability was observed at pH of 7.8, 6.8 and 5.8 while the stability at pH 4.8 was somewhat worse. At all conditions the solution was stable during first 2 hours.

The influence of solvent degassing. Mobile phase degassing is an important and inherent step during preparation of chromatography. A lot of modern instruments utilize in-line degasser, thus no prior degassing is necessary any more. Using in-line degasser the influence of oxygen present in mobile phase should be excluded.

Dissolved oxygen could also influence the stability of ascorbic acid in un-degassed dissolution medium. Therefore stability of ascorbic acid in non-degassed solutions (dissolution medium) and solution degassed for 5, 10 and 20 min by gentle stream of helium were compared. Surprisingly, short time (5 minutes) mobile phase degassing by helium had negative impact for AA stability as it is seen in Table 2. Longer period of degassing improved the stability of AA in the solution however it still did not reach the values of un-degassed mobile phase – which ensured stability of AA during 3.5 hours and approached a value of 61.2 % of initial concentration during 72 hours. Moreover, 20 minutes and more time needed for the degassing would be prolonging and complicating analytical procedure, which is undesired, above all if no significant improvement in AA stability was observed.

The influence of concentration of ascorbic acid. Concentration of ascorbic acid in solution could also influence its stability. The rate of its influence was tested at 0.1, 1.0, 10.0, 100.0 and 500.0 mg/l AA levels. The results show, that without any extra stabilization the AA concentrations lower than 1.0 mg/l had significantly decreased stability Table 2. The concentrations of 0.1 mg/l had shown instability within 1 single hour of experiments.. Concentrations higher than 1.0 mg/l allowed the analysis without stabilization up to 2-3 hours or more with increasing concentrations. Slower degradation was observed at the concentrations higher than 10.0 mg/l – about 60 % after three days of stability study comparing to 41.2 % or 17.5 % for concentrations of 1.0 and 0.1 mg/l respectively. As it figures out from this experiment, after 4 hours of experiments and more fresh solutions of ascorbic acid must be prepared always, if no extra stabilization agent was added. This is valid even for the concentrated stock solutions of AA kept in dark at low temperature.

The influence of stabilization. Ascorbic acid stability could be enhanced by the addition of various agents as was described in literature and stated above. In this study the influence of stabilizing agents at different concentrations was tested taking into the account HILIC conditions. Stabilizing agents as a part of dissolution medium of standards/samples were, based on the discovery of solution compatibility with HILIC conditions, always added instead of the water content of mobile phase, 78 % of acetonitrile was kept in all solutions. Stabilizing agents including m-phosphoric o-phosphoric acid, EDTA disodium dihydrate, citric acid, oxalic acid, acetic acid, formic acid, methionine and homocysteine at different concentrations were tested across this study.

The most widely used stabilizing agent is typically m-phosphoric acid. It could not be utilized as stabilizing agent under HILIC conditions, because at tested concentrations (concentrations of 10, 5 and 1%) it precipitated with acetonitrile from mobile phase. As under HILIC conditions it is necessary to keep high percentage of acetonitrile in mobile phase, it was not possible to dissolve well m-phosphoric acid and after verification experiments it was excluded from the study. Very bad compatibility of the stabilizing agents with HILIC system was observed also in case of acetic and formic acid (concentrations of 1.0 and 0.2 % for both). There was very bad repeatability of the peak

area among the individual injections. Thus finally, selected following stabilizing agents were completely evaluated with good repeatability: citric acid 10 and 50 mM, oxalic acid 10 and 50 mM, EDTA 1 and 5 mM, o-phosphoric acid 10, 5 and 1%, homocysteine 1 and 0.1 mM and methionine 1 mM – see Table 3. Except of citric acid in both concentration all tested stabilizing agents showed a positive effect to AA stability and thus its concentration after three days was still about 80 % or more of the original concentration.

The best results were obtained using o-phosphoric acid at the concentration 5 or 10 % as well as using oxalic acid at 10 mM concentration. In case of o-phosphoric acid 5 % solution gave even better results than the 10 % one. On the other hand, the concentration of 1 % was not sufficient for the stabilization and much faster decrease in concentration was observed after 8 hours of testing reaching a relative percentage of 89.5 % within 72 hours. More concentrated solutions were able to stabilize AA within the period of 40 hours (10 % solution) and 59 hours respectively (5% solution). 10 mM solution of oxalic acid was able to stabilize AA in solution all over the stability study, which means 72 hours, where the final concentration of AA in solution was still 99.4 %.

3.3 System Suitability test and validation

System suitability test was performed by 10 times injecting of AA solutions at optimum found chromatography and stability conditions. The parameters of number of theoretical plates, peak asymmetry, resolution of individual compounds and repeatability of reference standard solution injection (retentions times and peak areas were checked, the repeatability was expressed as RSD in %) were established. As very good results in stability testing were obtained for two stabilizing agents, SST was performed for both using 10 mM oxalic acid and 5 % o-phosphoric acid stabilized solutions of AA – Table 4.

Both measurements gave results, which met the requirements of appropriate authorities (see the last column in Table 4) concerning resolution, efficiency and the repeatability of experiment in terms of retention time and peak area. The addition of o-phosphoric acid 5 % as stabilizing agent to the sample solution had slightly negative impact on peak shape, which was expressed by asymmetry factor. Using of o-phosphoric acid it was higher than 2.0 in case of AA and even more in case of internal standard chlorogenic acid. If the requirement to asymmetry factor is not strict, o-phosphoric acid could be used to stabilize AA in solution, because the analysis is well repeatable. Oxalic

acid 10 mM could be used as the stabilizing agent in any case, because it has no negative influence to peak shape and all SST parameters are fulfilled.

Calibration and Analysis of Tablets. Calibration curve of AA in the concentration range 0.1 – 100 mg/l was measured using chlorogenic acid as internal standard for quantitation and oxalic acid as stabilizing agent, results could be seen in Table 4. The calibration curve was linear in defined range, thus it can be concluded, that the method using internal standard chlorogenic acid is convenient for quantitative purposes.

Method accuracy and precision was verified by testing tablets containing ascorbic acid (100 and 500 mg). The results could be seen in Tab. 4 and they are in the correspondence with the requirements for method validation.

Inter-day precision and Batch to batch column repeatability. As the stability study was very time demanding, the experiments were performed during three days each stability influencing factor in different time periods. Thus Inter-day precisions for retention times of AA and IS were also expressed as % of RSD – Table 4. The experiments were performed during three following days, taking 10 injections of standard solutions into the calculation. The results were excellently reproducible, inter-day repeatability for retention times was not higher than 1 % RDS.

More columns of the same type of stationary phase, by the same supplier however, from the different batch were tested. Batch to batch repeatability of columns for retention times of AA was verified – Table 4. Columns from three different batches were compared. 10 measurements from each were taken into calculation. The batch-to-batch repeatability was 0.53 % RSD for AA. This parameter was not established for IS chlorogenic acid.

Conclusion

A novel HILIC method for the determination of AA in solution and tablets using simple binary mobile phase consisting of acetonitrile and ammonium acetate buffer was developed. The main advantage of described HILIC method is that the retention time of AA could be adjusted very easily according to the needs by simple changing of the ratio of water content and organic part of the mobile phase, buffer concentration or pH. No complicated mobile phase mixture using ion-pair reagents or inorganic buffers were needed. This brings another advantage to the method – it could be easily used in

connection with mass spectrometry, because a high volatility of mobile phase is ensured. The method could be applied for quantitation purposes using chlorogenic acid as internal standard during a reasonable time period. Application on real samples was verified.

The key problem of AA analysis is its instability in solutions. The influence of individual factors decreasing AA stability (the influence of temperature, the influence of pH, the influence of degassing of mobile phase, the influence of the mostly used stabilizing agents and the influence of concentration of AA in the solution) taking into account HILIC approach specifics was deeply studied and described. The optimum stability under HILIC conditions could be ensured by decreasing of the autosampler temperature to 4 °C, measuring of more concentrated solutions, if possible and by addition of either 10 mM oxalic acid or 5 % o-phosphoric acid as stabilizing agents to samples/standards, both reagents gave good results as was verified by SST measurements.

Acknowledgement

The authors gratefully acknowledge the financial support of GAČR 203/07/P370.

References

- [1] J. C. Deutsch, *J. Chromatogr. A* 2000, 881, 299-307.
- [2] F. Teisser, I. Birlouez-Aragon, Ch. Tjani, J.-C. Guillard, *Internat. J. Vit. Res.* 1996, 66, 166-170.
- [3] S. Hercberg, P. Preziosi, S. Briacon, P. Galan, I. Triol, D. Malvy, A. M. Roussel, A. Favier, *Control Clinical Trials* 1998, 19, 336-351.
- [4] S. Hercberg, P. Preziosi, P. Galan, H. Faire, J. Arnaud, N. Duport, D. Malvy, A. M. Russel, A. Favier, *Food. Chem. Toxicol.* 1999, 37, 925-930.
- [5] G. S. Omenn, G. E., Goodman, M. D. Thornquist et al., *New England of Journal Medicine* 1996, 334, 1150-1155.
- [6] W.O.Song, G.R. Beecher, R.R. Eitenmiller; *Modern Analytical Methodologies in Fat- and Water-Soluble Vitamins; Chemical analysis Vol. 154; John Wiley & Sons, 2000*
- [7] *European Pharmacopoeia 5th edition (Ph. Eur. 5), Council of Europe, Strasbourg, 2004, Monograph "Ascorbic acid"*
- [8] *United States Pharmacopoeia 30, United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD 20852, 2007*
- [9] T. N. Shekhovtsova, S. V. Muginova, J. A. Luchinina, A. Z. Galimova, *Anal. Chim. Acta* 2006, 573-574, 125-132.
- [10] M. Zhu, X. Huang, J. Li, H. Shen, *Anal. Chim. Acta* 1997, 357, 261-267.
- [11] E. Akylmaz, E. Dinskaya, *Talanta* 1999, 50, 87-93.
- [12] M. H. Pournaghi-Azar, R. Ojani, *Talanta* 1997, 44, 297-303.
- [13] V. S. Ijeri, P. V. Jaiswal, A. K. Srivastava. *Anal. Chim. Acta* 2001, 439, 291-297.
- [14] M. J. Esteve, R. Farre, A. Frigola, J. C. Lopez, J. M. Romera, M. Ramirez, A. Gil, *Food Chem.* 1995, 52, 99-102.
- [15] M. Ozyurek, K. Guclu, B. Bektasoglu, R. Apak, *Anal. Chim. Acta* 2007, 588, 88-95.
- [16] K. Guclu, K. Sozngen, E. Tutem, M. Ozyurek, R. Apak, *Talanta* 2005, 65, 1226-1232.
- [17] T. Kleszczewski, E. Kleszczewska, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002, 29, 755-759.
- [18] Z. Legnerová, D. Šatínský, P. Solich, *Anal. Chim. Acta* 2003, 497, 165-174.
- [19] J. C. Deutsch, J. F. Kolhouse, *Anal. Chem.* 1993, 65, 321-326.

- [20] J. C. Deutsch, J. A. Butler, A. M. Marsh, C. A. Ross, J. M. Norris, *J. Chromatogr. B* 1999, 726, 79-84.
- [21] M. Romeu-Nadal, S. Torera-Pons, A. I. Castellote, M. C. López-Sabater, *J. Chromatogr. B* 2006, 830, 41-46.
- [22] A. Karlesen, R. Blomhoff, T. E. Gundersen, *J. Chromatogr. B* 2005, 824, 132-138.
- [23] P. Fontannaz, T. Kilinc, Ol. Heudi, *Food. Chem.* 2006, 94, 626-631.
- [24] M. A. Call, C. Andersen, *J. Chromatogr. B* 1999, 730, 101-111.
- [25] R. R. Howard, T. Peterson, P. R. Kastl, *J. Chromatogr.* 1987, 414, 434-439.
- [26] C. C. Tangney, *Prog. Clin. Biol. Res.* 1988, 259, 331-362.
- [27] A. Pappa-Louisi, S. Pascalidou, *Anal. Biochem.* 1998, 263, 176-182.
- [28] I. Salminen, G. Alfthan, *Clin. Biochem.* 2007, in press
- [29] P. Emadi-Konjin, Z. Verner, A. V. Levin, K. Adeli, *Clin. Biochem.* 2005, 38, 450-456.
- [30] H. Iwase, I. Ono, *J. Chromatogr. A* 1993, 654, 215-220.
- [31] H. Iwase, *Talanta* 2003, 60, 1011-1021.
- [32] H. Iwase, *J. Chromatogr. A.* 2000, 881, 317-326.
- [33] H. Iwase, *J. Chromatogr. A.* 2000, 881, 327-330.
- [34] P. Lopes, J. Drinkine, C. Saucier, Y. Glories, *Anal. Chim. Acta.* 2006, 555, 242-245.
- [35] S. A. Margolis, T. P. Davis, *Clin. Chem.* 1988, 34, 2217-2223.
- [36] W. D. Graham, D. Anette, *J. Chromatogr.* 1992, 594, 187-194.
- [37] L. D. Miller, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001, 25, 985 – 994.
- [38] A. Karlesen, R. Blomhoff, T. E. Gundersen, *J. Chromatogr. B* 2005, 824, 132-138.
- [39] R. E. Majors, HPLC columns Q's and A's, LC GC North America, January 2006
- [40] B. L. Lee, K. S. Chia, C. N. Ong, *J. Chromatogr.* 1989, 494, 303.
- [41] P. Hemström, K. Irgum, *J. Sep. Sci.*, 2006, 29, 1784-1821.
- [42] A Practical guide to HILIC, A tutorial and application book, Sequant, 2005, Sweden, 3-12
- [43] W. Yang, G. Fisher, I. Girmany, K. Irgum, *J. Chromatogr. A*, 2006, 1127, 82-91.
- [44] W. Yang et al., *Anal. Chem.*, 2003, 75, 2768-2774.