

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



VYUŽITÍ SUPERKRITICKÉ FLUIDNÍ CHROMATOGRFIE V ANALÝZE PŘÍRODNÍCH LÁTEK

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Hradec Králové 2019

Tereza Lacmanová

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Tereza Lacmanová

Školitel: doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Název diplomové práce: Využití superkritické fluidní chromatografie v analýze přírodních látek

Cílem této diplomové práce je ověření vhodnosti UHPSFC metody s PDA a MS detekcí pro analýzu přírodních látek. Byly vybrány dva zástupci přírodních látek – alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae* účinné v léčbě Alzheimerovy choroby a fenolické látky s antioxidační aktivitou – flavonoidy rutin, kvercetin a jejich metabolity.

Analýzy proběhly na systému Acquity UPC² s PDA a MS detektorem. Základní screening byl proveden na 10 stacionárních fázích: BEH 2-EP, HSS SB C18, BEH, Torus DIOL, Torus 2-PIC, Torus DEA, CSH PFP, Torus 1-AA, Cortecs HILIC a BEH Amide. Zkoušeny byly 4 mobilní fáze: 1. CO₂ + MeOH, 2. CO₂ + MeOH + 0,1 % NH₄OH, 3. CO₂ + MeOH + 10 mM mravenčan amonný a 4. CO₂ + MeOH + 10 mM mravenčan amonný + 2 % H₂O. Podmínky separace byly nastaveny následovně: průtok 1,5 ml/min, teplota 40 °C, tlak 140 bar, gradientová eluce od 2 % do 40 % do 4. minuty, se dvěma izokratickými kroky na začátku a na konci gradientu. Optimalizace chromatografických podmínek zahrnovala změnu složení mobilní fáze, změnu nastavení gradientové eluce i hodnot tlaku a teploty.

Pro obě skupiny přírodních látek byla vyvinuta UHPSFC metoda a podmínky byly optimalizovány tak, aby bylo dosaženo co nejlepší selektivity. Ve skupině alkaloidů byla kvůli výskytu izomerů stěžejním cílem jejich účinná separace. U fenolických látek byl z důvodu různorodosti fyzikálně-chemických vlastností řešen problém eluce a separace v rámci jedné analýzy. Pro alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae* byla nejvhodnější analýza na koloně Torus DEA s mobilní fází CO₂ + MeOH/ACN (1:1) + 0,1 % NH₄OH, kde se separovaly všechny analyty. Nejvhodnější pro separaci fenolických látek byla kolona Torus DIOL s mobilní fází CO₂ + MeOH + 0,05 % NH₄OH + 2 % H₂O, nicméně eluce kvercetinu a jeho glykosidu rutinu zůstala předmětem budoucí optimalizace. Cílená analýza obou skupin přírodních látek může sloužit k vysvětlení jejich metabolismu a léčivých účinků na lidský organismus.

Klíčová slova: alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae*; fenolické látky; rutin; kvercetin; UHPSFC-PDA/MS; vývoj metody; optimalizace chromatografických podmínek

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Tereza Lacmanová

Supervisor: Assoc. Prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Title of Diploma Thesis: Application of supercritical fluid chromatography in analysis of natural compounds

The goal of this diploma thesis is to verify the suitability of UHPSFC method with PDA and MS detection for analysis of natural products. For the analyzes, two representatives of natural compounds – the alkaloids of the family *Amaryllidaceae* with effect in the treatment of Alzheimer's disease and phenolic compounds with antioxidant activity – flavonoid rutin, quercetin and their metabolites were chosen.

Separations were carried out on the UHPSFC system Acquity UPC² with PDA and MS detector. The basic screening was performed on 10 stationary phases: BEH 2-EP, HSS SB C18, BEH, Torus DIOL, Torus 2-PIC, Torus DEA, CSH PFP, Torus 1-AA, Cortecs HILIC and BEH Amide. Four mobile phases were tested: 1. CO₂ + MeOH, 2. CO₂ + MeOH + 0.1 % NH₄OH, 3. CO₂ + MeOH + 10 mM ammonium formate, and 4. CO₂ + MeOH + 10 mM ammonium formate + 2 % H₂O. Separation conditions were as follows: flow rate 1.5 ml/min, temperature 40 °C, pressure 140 bar, gradient elution from 2 % to 40 % within 4 minutes, with two isocratic steps at the beginning and at the end of the gradient. Detailed optimization of the chromatographic conditions involved changing the composition of the mobile phases, changing the gradient elution, and the pressure and temperature settings.

The UHPSFC method was developed for both groups of natural compounds and the conditions were optimized to achieve the best selectivity. In the alkaloid group, effective separation of isomers was a critical issue. In the case of phenolic compounds, the problem of elution and separation within one analysis had to be solved due to their different physicochemical properties. For the *Amaryllidaceae* family alkaloids, analysis on a Torus DEA column with CO₂ + MeOH/ACN (1:1) + 0.1 % NH₄OH mobile phase was the most suitable, and allowed separation of all analytes. The separation of phenolic compounds was achieved with Torus DIOL column with a mobile phase of CO₂ + MeOH + 0.05 % NH₄OH + 2 % H₂O. However the elution of quercetin and its glycoside rutin remained subject of future optimization. Targeted analysis of both

groups of natural compounds can be used to explain their metabolism and health effects on the human body.

Keywords: alkaloids of the *Amaryllidaceae* family; phenolic compounds; rutin; quercetin; UHPSFC-PDA/MS; method development; optimization of chromatographic conditions

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 9. 5. 2019

.....

Tereza Lacmanová

Mé největší poděkování patří doc. PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za odborné vedení, věnovaný čas a cenné rady poskytnuté při experimentální práci i zpracování diplomové práce. Děkuji také doktorandům Katedry analytické chemie za poskytnuté rady a vstřícnost. Děkuji své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

Obsah

Seznam zkratk	9
1. Úvod	11
2. Cíl a zadání práce	12
3. Teoretická část	13
3.1. Superkritická fluidní chromatografie.....	13
3.1.1. Ultra-vysokoučinná superkritická fluidní chromatografie	13
3.1.2. Instrumentace v SFC.....	14
3.1.3. Stacionární fáze.....	15
3.1.4. Mobilní fáze.....	17
3.1.5. Detekce v SFC.....	19
3.2. Analyzované přírodní látky.....	20
3.2.1. Alkaloidy čeledi <i>Amaryllidaceae</i>	20
3.2.2. Publikované metody zabývající se analýzou alkaloidů <i>Amaryllidaceae</i>	24
3.2.3. Fenolické látky – flavonoidy rutin, kvercetin a jejich metabolity	26
3.2.4. Publikované metody zabývající se analýzou fenolických látek	29
4. Experimentální část	31
4.1. Přístrojové vybavení a materiál.....	31
4.2. Stacionární fáze	31
4.3. Rozpouštědla a ostatní chemikálie.....	32
4.4. Analyzované přírodní látky.....	32
4.4.1. Alkaloidy čeledi <i>Amaryllidaceae</i>	32
4.4.2. Fenolické látky.....	33
4.5. Pracovní postup.....	33
4.5.1. Příprava jednotlivých standardů	33
4.5.2. Příprava směsí standardů.....	34
4.5.3. Příprava mobilních fází.....	35
4.6. Provedení základního screeningu stacionárních a mobilních fází.....	38
4.7. Optimalizované podmínky separace	39

5. Výsledky a diskuze	40
5.1. UHPSFC metoda pro alkaloidy čeledi <i>Amaryllidaceae</i>	41
5.1.1. Výsledky základního screeningu stacionárních a mobilních fází pro separaci alkaloidů	41
5.1.2. Optimalizace chromatografických podmínek na koloně BEH	46
5.1.3. Optimalizace chromatografických podmínek na koloně Torus DIOL.....	49
5.1.4. Optimalizace chromatografických podmínek na koloně Torus DEA.....	51
5.1.5. Optimalizované chromatografické podmínky pro UHPSFC separaci alkaloidů.....	56
5.1.6. Analýza extraktu z rostliny <i>Zephyranthes citrina</i>	57
5.1.7. Analýza extraktu z rostliny <i>Hippeastrum cv. Double King</i>	58
5.2. UHPSFC metoda pro fenolické látky.....	59
5.2.1. Výsledky základního screeningu stacionárních a mobilních fází pro separaci fenolických látek.....	59
5.2.2. Optimalizace chromatografických podmínek na koloně BEH	64
5.2.3. Optimalizace chromatografických podmínek na koloně BEH Amide.....	67
5.2.4. Optimalizace chromatografických podmínek na koloně Torus DIOL.....	70
5.2.5. Optimalizované chromatografické podmínky pro UHPSFC separaci fenolických látek .	74
6. Závěr	75
7. Citované literární zdroje	76
8. Přílohy	81

Seznam zkratek

1-AA	1-aminoantracen
2-EP	2-ethylpyridin
2-PIC	2-pikolyamin
4-MC	4-methylcatechol
ABPR	automatický regulátor zpětného tlaku
ACN	acetonitril
AMB	ambellin
AmF	mravenčan amonný
BEH	hybridní sorbent s ethylenovými můstky
C18	stacionární fáze s navázanými osmnáctiuhlíkovými řetězci
CSH	hybridní povrchově nabitá částice
DEA	diethylamin
DMG	9-O-demethylgalanthin
ELSD	odpařovací detektor rozptylu světla
EPM	epimaritidin
ESI	ionizace elektrosprejem
EtOH	ethanol
GC	plynová chromatografie
HFA	kyselina 3-hydroxyfenyloctová
HFP	kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HIP	hippeastrin
HLC	homolycorin
HMA	haemanthamin
HTD	haemanthidin
HMN	hamayn

HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HSS	vysoce odolný silikagel
HVA	kyselina homovanilinová
IRN	isorhamnetin
LYC	lycorin
LSER	klasifikační systém popisující vztah interakce mezi analytem a chromatografickým systémem (linear solvation energy relationship)
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie
ODU	odulin
PAA	kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová
PG	floroglucinol
PFP	pentafluorphenyl
PDA	fotodiodové pole
QCE	kvercetin
QSRR	kvantitativní vztah mezi strukturou a retencí
RUT	rutin
SB	selektivní pro bazické sloučeniny (selectivity for basic compounds)
SFC	superkritická fluidní chromatografie
THM	tetrahydromasonin
TZT	tazettin
TMX	tamarixetin
UHPSFC	ultra-vysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie
UND	undulatin
UV	ultrafialové záření
UPC ²	ultra-účinná konvergenční chromatografie
VIS	oblast viditelného záření
VIT	vittatin

1. Úvod

Superkritická fluidní chromatografie (SFC) je separační metoda, která v posledních dvaceti letech zažívá progresivní vývoj. Hlavní složkou mobilní fáze je oxid uhličitý, většinou s přídavkem organických modifikátorů a aditiv. Možnost analyzovat na polárních i nepolárních stacionárních fázích se stejnou mobilní fází navíc dává SFC možnost pokrýt podobný rozsah aplikací jako má kapalinová chromatografie. Pokročilou verzí SFC s použitím částic menších než 2 mikrometry je ultra-vysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie (UHPSFC). Stěžejní oblast využití UHPSFC je farmaceutická analýza, bioanalýza, analýza lipidů, toxikologie, terapeutické monitorování léčiv, environmentální aplikace a zejména pak analýza chirálních látek. Metoda UHPSFC je také často využívána pro separaci izomerů, které mají velmi podobnou strukturu.

Tato diplomová práce se zabývá UHPSFC separací ve spojení s PDA a MS detekcí pro analýzu přírodních látek. Pro vývoj UHPSFC metody byly vybrány dvě skupiny látek – alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae* a fenolické látky odvozené od kvercetinu a rutinu. Alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae* pochází z jednoděložných rostlin obsahujících kolem 100 toxických alkaloidů s antiproliferativními vlastnostmi a schopností inhibice enzymu acetylcholinesterázy, díky které jsou potenciálními látkami v boji proti Alzheimerově chorobě. Fenolické látky odvozené od flavonoidu kvercetinu a jeho glykosidu rutinu se hojně vykytují v zelenině a čajových lístcích. Tyto látky, patřící do podskupiny flavonolů, mají jednu z nejvýraznějších antioxidačních aktivit a jsou proto spojovány s prevencí kardiovaskulárních onemocnění.

Dosud publikované metody analýz těchto přírodních látek pojednávaly o separacích pomocí plynové nebo kapalinové chromatografie. Nově vyvinutá UHPSFC metoda pro stanovení vybraných přírodních látek by tak mohla být rychlou, účinnou a ekologickou alternativou. Vzhledem k mnoha výhodám, jako je vysoká rychlost, účinnost a robustnost se tato technika stává velmi důležitou na poli vědeckého výzkumu. Spojení SFC s hmotnostně spektrometrickou (MS) detekcí navíc přináší výhody v podobě citlivosti, selektivity a možnosti identifikace látek v komplexních maticích.

2. Cíl a zadání práce

Cílem této práce je ověřit vhodnost ultra-vysokoučinné superkritické fluidní chromatografie (UHPSFC) ve spojení s PDA a MS detektorem jako separační metody pro analýzu přírodních látek. Dalším záměrem bylo tuto metodu optimalizovat tak, aby bylo dosaženo co nejlepší selektivity, vysokého rozlišení a symetrických píků. Ve skupině alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae* byla z důvodu výskytu několika izomerů stěžejním krokem účinná separace těchto sloučenin. V případě fenolických látek bylo potřeba řešit problém jejich eluce a rozdělení v rámci jedné chromatografické analýzy. Tento problém byl předpokládán z důvodu různorodosti jejich chemických struktur a odlišnosti fyzikálně-chemických vlastností (odlišné hodnoty log P).

Prvním krokem bylo získání informací o analyzovaných látkách: chemických strukturách, molekulové hmotnosti, acidobazických vlastnostech, lipofilitě a rozpustnosti. Díky těmto poznatkům mohly být připraveny vzorky vhodné k následným analýzám.

Dalším krokem byl základní UHPSFC screening deseti stacionárních fází s různou selektivitou a čtyř mobilních fází. Cílem bylo vybrat vhodnou stacionární fázi a složení mobilní fáze pro každou skupinu látek zvlášť a následně tyto chromatografické podmínky optimalizovat. V rámci optimalizace separačních podmínek bylo potřeba řešit výběr vhodných detekčních parametrů, tedy vlnových délek pro PDA detekci a také vyhodnocení skenů v kladném i záporném módu ionizace elektrosprejem (ESI) v rámci MS detekce. Hledání optimálních podmínek pro separaci na vybraných stacionárních fázích zahrnovalo zvolit vhodné složení mobilní fáze – změny koncentrací a povahy organických modifikátorů, aditiv a změny nastavení gradientové eluce. Zkoumán byl i vliv tlaku a teploty na eluci a separaci analytů.

Volbou nejvhodnějších chromatografických podmínek měla být zajištěna dostatečně selektivní UHPSFC-PDA/MS analýza obou skupin přírodních látek. V případě získání rychlé a cílené metody se UHPSFC může stát komplementární, ekologickou a nákladově efektivní alternativou dosud používaných analýz pomocí plynové (GC) a kapalinové (HPLC) chromatografie.

3. Teoretická část

3.1. Superkritická fluidní chromatografie

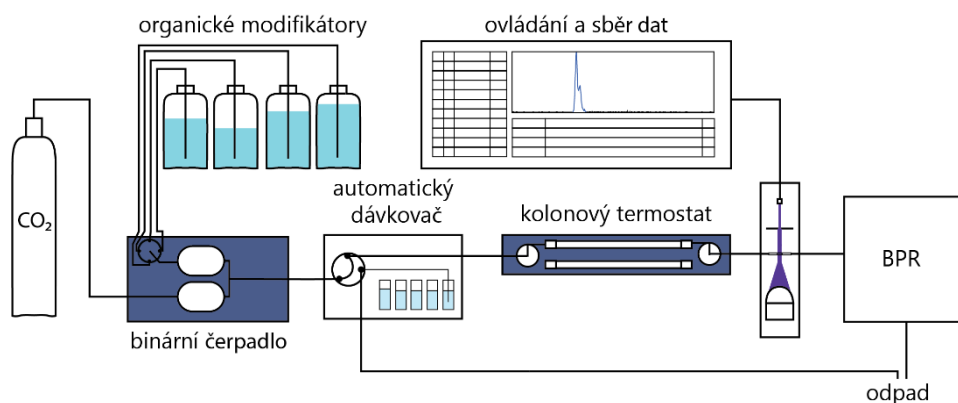
3.1.1. Ultra-vysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie

Superkritická fluidní chromatografie (SFC) je separační technika, která byla donedávna jen ojediněle využívána v porovnání s kapalinovou a plynovou chromatografií a nyní se stává ekologickou alternativní technikou [1][2]. Příčinou omezeného využití SFC byly nedostatky v tehdejší instrumentaci, tedy nízká robustnost a použití čistého oxidu uhličitého (CO_2) jako mobilní fáze a s tím související nemožnost analýzy polárnějších sloučenin. Zavedením přísad organických modifikátorů a aditiv k CO_2 se spektrum analytů rozšířilo směrem k polárnějším látkám [3]. Častější využití má nyní tato technika z důvodu robustnější instrumentace, nižší spotřeby rozpouštědel a ekologičnosti CO_2 . Obrovskou výhodou v případě analýz v preparativním měřítku je, že po obnovení atmosférického tlaku se CO_2 přemění na plynnou fázi bez nutnosti dodat energii k odpaření kapaliny jako v případě HPLC [4]. Široká škála kombinací organických modifikátorů a aditiv dává SFC možnost pokrýt podobný rozsah aplikací jako má HPLC. Stěžejní aplikací UHPSFC je farmaceutická analýza, bioanalýza, analýza chirálních látek, lipidomika, analýza potravin, olejů a agrochemikálií [1][5].

Princip SFC má své základy v „Cluster“ teorii, která pojednává o vyšší rozpustnosti molekul v nadkritické tekutině. V takové tekutině roste rozpustnost se zvyšujícím se tlakem. Tím lze ovlivnit selektivitu separace a nastavit gradientovou eluci [6]. Kromě rozpouštěcí schopnosti jsou stěžejními parametry nadkritické tekutiny také difúzní koeficienty a dynamická viskozita. Hodnoty difúzních koeficientů jsou vyšší než u kapalin, ale nižší než u plynů. Nižší dynamická viskozita oproti kapalinám je výhodná z důvodu nižšího tlakového spádu na koloně [6]. Pokročilou verzí v SFC je využití částic menších než $2 \mu\text{m}$, čili ultra-vysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie (UHPSFC). Z van Deemterovy teorie vyplývá, že s částicemi menšími než $2 \mu\text{m}$ lze dosáhnout vyšší separační účinnosti [7].

3.1.2. Instrumentace v SFC

Současná SFC instrumentace vychází ze systémů HPLC s několika podstatnými modifikacemi. Schéma SFC instrumentace je uvedeno na Obrázku 1 [8]. Hlavní odlišností je systém čerpadel a regulátor zpětného tlaku (BPR – back pressure regulator). SFC instrumentace dále zahrnuje zásobní ocelovou láhev s CO₂, zásobní láhve s modifikátory mobilní fáze, odplyňovač rozpouštědel, kolonový termostat, automatický dávkovač a detektor. Software vychází z HPLC, a navíc zde musí být striktní kontrola tlaku. Vlivem vyšších mimokolonových objemů UHPSFC systému dochází k rozšíření chromatografických zón při použití kolon s částicemi menšími než 2 μm a vlivem malých rozměrů kolon. Nejmenší ztráta účinnosti a současně nejnižší spotřeba rozpouštědel byla experimentálně určena u kolon s rozměry 100 mm x 3 mm [9] [10].



Obrázek 1: Základní schéma SFC instrumentace [8].

SFC instrumentaci lze rozlišit na dva typy: celostní systém pro SFC a hybridní systém. První je určen pouze pro SFC a v roce 2012 firma Waters uvedla na trh systém ACQUITY Ultra Performance Convergence Chromatography (UPC²). Stěžejními částmi je binární čerpadlo, autosampler (automatický dávkovač), konvergenční modul (BPR), kolonový termostat a detektor. Binární čerpadlo se skládá z čerpadla A pro vstup kapalného CO₂, které je chlazeno Peltierovým článkem k udržení CO₂ v kapalném stavu. Druhé čerpadlo (B) je spojeno se čtyřcestným ventilem přivádějícím modifikátory mobilní fáze. Konvergenční modul umožňuje vstup CO₂, je aktivním regulátorem zpětného tlaku a odtlačovává dávkovací smyčku před nástřikem vzorku. Součástí konvergenčního modulu je ABPR (automatic back pressure regulator), jenž má dvě části: statickou a dynamickou. Statická část zajišťuje nastavenou konstantní hodnotu zpětného tlaku a dynamická část zajišťuje jemnější kontrolu tlaku. Součástí autosampleru je injekční

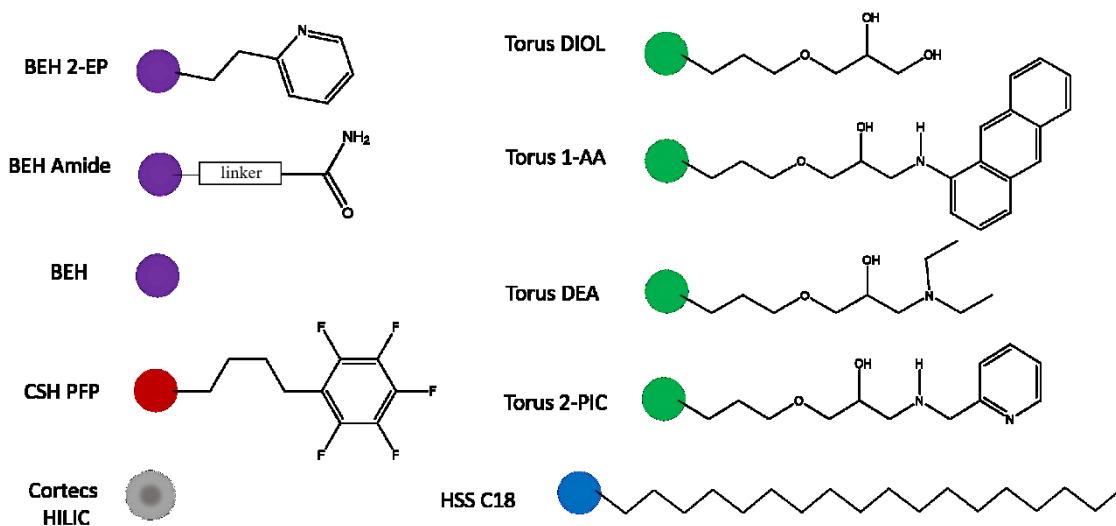
stříkačka schopná nástřiku do systému s vysokým tlakem. Firma Agilent kromě celostního typu SFC nabízí také hybridní SFC/UHPLC, který umožňuje provozovat dvě chromatografické uspořádání a oddělená čerpadla pro SFC a HPLC. Mezi analýzami na různých uspořádáních je však nutno důkladně promývat systém. Další SFC systém typu Nexera UC (Unified chromatography) SFE-SFC nabízí firma Shimadzu [9][11].

3.1.3. Stacionární fáze

SFC analýzy umožňují separaci na polárních i nepolárních stacionárních fázích se stejnou mobilní fází. Analýzy na polárních stacionárních fázích jsou podobné systému normálních fází v LC a retence na nepolárních stacionárních fázích je podobná reverzně fázové chromatografii. Dříve se využívalo LC kolon, nyní již několik firem nabízí dedikované SFC kolony. Základ kolon většinou tvoří silikagel s různými modifikacemi [12] [13]. Stacionární fáze speciálně vyrobené pro SFC jsou například Torus (diol, 2-pikolyamin, diethylamin, 1-aminoantracen), Trefoil a Viridis kolony od firmy Waters [14], dále YMC-Triart a YMC-Pack od firmy YMC a řada GreenSep kolon od firmy ES Industries.

Kvantitativní vztah mezi strukturou analytu a retencí na stacionární fázi popisuje model QSRR (quantitative structure-retention relationships). S ním souvisí interakční vztah mezi analytem a chromatografickým systémem – LSER (linear solvation energy relationship), který je popsán rovnicí s parametry analytu a konstantami chromatografického systému získanými regresí retenčních dat. Tyto konstanty souvisí s interakčními schopnostmi – přenos náboje, disperze, interakce dipól-dipól a schopnost tvořit vodíkové vazby jako donor či akceptor [15]. Nedostatkem takto vzniklého pětirozměrného diagramu bylo nezahrnutí elektrostatických interakcí ionizovatelných analytů. Rovnice tedy byla rozšířena o dva parametry – d^+ pro kladný náboj kationtů a d^- pro záporný náboj aniontů a obojetných iontů [16]. Dle paprskového diagramu se 7 deskriptory na Obrázku 2 lze rozdělit stacionární fáze na nepolární, polární a fáze se smíšeným chováním.

modifikovaná pentafluorofenylovou skupinou (CSH PFP) patří mezi fáze se smíšenými vlastnostmi. CSH PFP umožňuje dobrou retenci kyselých látek (nebo slabýchází), protože nese pozitivní náboj a díky aromatickému cyklu je vhodná také pro retenci aromatických sloučenin. Kolona HSS C18 SB patří mezi nepolární fáze s retencí hydrofobních sloučenin, např. glyceridů [17] [18]. Na Obrázku 3 je uveden přehled použitých stacionárních fází.



Obrázek 3: Chemické struktury použitých stacionárních fází.

3.1.4. Mobilní fáze

V SFC byla historicky jako mobilní fáze používána tekutina v přísně nadkritickém (superkritickém) stavu, kdy byl nastaven takový tlak a teplota, že splýval rozdíl mezi vlastnostmi plynu a kapaliny. Hustota a schopnost solvatace takové tekutiny odpovídá vlastnostem kapaliny, naproti tomu viskozita a difuzivita je podobná plynnému skupenství [9]. Pro tyto vlastnosti se testovaly oxid uhličitý, oxid dusný, argon, ethan, dichlordifluormethan a další. Nejvíce se osvědčil oxid uhličitý, který je inertní, netoxický a jeho nadkritický stav nastává při laboratorně snadno nastavitelných podmínkách – teplotě nad 31 °C a tlaku nad 74 bar (1074 psi) [10]. Oxid uhličitý však vykazuje nepolární vlastnosti, proto jsou k němu v současné době přidávány polárnější organické modifikátory. Kritické hodnoty (tlak a teplota) se výrazně mění s přítomností organického modifikátoru a nelze již hovořit o nadkritickém stavu. S přidavkem methanolu k CO₂ se kritická teplota zvýší. Analýza tedy při použití gradientové eluce může začít v nadkritickém a skončit v subkritickém stavu. Organické modifikátory zvyšují polaritu CO₂, mění hustotu a zvyšují rozpouštěcí sílu mobilní fáze. Používají se např.

methanol, ethanol, isopropanol a acetonitril. Přídavek modifikátoru podpoří tvorbu vodíkových můstků a dalších interakcí (např. dipól-dipól), což může změnit selektivitu separací. Nejvíce je používán methanol, který je mísitelný s CO₂, má nízkou viskozitu a UV absorpci (205 nm). Vhodnou volbou může být použití směsi methanolu s acetonitrilem, což nabízí lepší selektivitu a tvar píků [2][12][19]. Pro zlepšení selektivity a tvaru píků jsou často přidávána aditiva v koncentracích 0,05 – 2 %, jejichž cílem je změna polarity mobilní fáze a obsazení aktivního místa stacionárních fází. Pro kyselá látky je vhodný přídavek kyseliny mravenčí, octové nebo trifluoroctové. Eluce zásaditých látek se zlepšuje přidáním diethylaminu, triethylaminu nebo isopropylaminu. Pro zlepšení tvaru píků se také používají soli, např. mravenčan, octan nebo uhličitán amonný. Použití těkavých aditiv (amonné soli) je výhodné z hlediska kompatibility s MS detekcí. Ke zlepšení tvaru píků polárních analytů a podpoření jejich eluce je vhodný i přídavek vody (v koncentracích 1 – 5 %) [9].

V nadkritickém stavu lze eluční sílu měnit pomocí změn hustoty, kterou lze v případě použití čistého CO₂ ovlivnit tlakem a teplotou. Zvýšením tlaku se zvýší hustota, což má za následek nižší retenci. Efekt teploty je komplexní, má vliv na hustotu mobilní fáze i rozpouštěcí parametry, ale ve výsledku má malý vliv na selektivitu. S přidáním organických modifikátorů a aditiv však klesá stlačitelnost tekutiny a parametry tlak a teplota se stávají sekundárními parametry pro jemné ladění separace. Z důvodu možné fázové separace při různých hodnotách teplot a tlaků se pro primární screening doporučuje teplota cca 40 °C a tlak 120 – 150 bar. Složení mobilní fáze lze ovlivnit nastavením gradientové eluce, která v moderních SFC analýzách začíná většinou na 2 – 5 % organického modifikátoru a zvyšuje se ke 40 – 50 %. Pro počáteční screening bývá doporučena gradientová eluce od 2 – 40 % methanolu [20]. Optimální lineární rychlost je v porovnání s UHPLC posunuta k vyšším hodnotám, přibližně 3 – 5 ml/min. Pro vnitřní průměr kolon 3,0 mm a velikost částic 1,7 μm je optimální lineární rychlost kolem 2,6 ml/min. Vliv na tvar píků a citlivost detekce má také objem nástřiku vzorku, který se má pohybovat kolem 0,1 – 0,5 % objemu kolony [1,7,21].

3.1.5. Detekce v SFC

Pro detekci v SFC jsou využívány UV/VIS (spektrofotometrický), MS (hmotnostně-spektrometrický), ELSD (odpařovací detektor rozptylu světla) a CAD (detektor nabitého aerosolu) detektory. Spektrometrický detektor patří k nejčastěji používaným a měří absorpenci analytu v rozmezí 190-800 nm. Vlnová délka je měnitelná nebo lze použít detektor s diodovým polem (PDA), který snímá bez přerušení celé spektrum vlnových délek v reálném čase. Pro SFC je navíc výhodné, že CO₂ vykazuje UV absorpci při nízkých vlnových délkách (205 nm). Instrumentace však musí mít odolné cely vůči používaným vysokým tlakům. Nestálý tlak v systému a kolísání indexu lomu způsobí šum pozadí a obecně nižší citlivost detekce oproti spojení s LC.

Principem hmotnostního spektrometru je ionizace analytu v iontovém zdroji, separace iontů v analyzátoru podle poměru m/z (hmotnost k náboji) a detekce těchto rozdělených iontů dopadajících na detektor. Hmotnostní detektor je selektivní, velmi citlivý a univerzální. Slouží k identifikaci molekul, při hledání neznámých struktur i k určení elementárního složení analytů. Z důvodu dobré těkavosti CO₂ se spojení SFC-MS může zdát jednodušší než LC-MS, kde musí být kapalná fáze nejprve převedena na plyn. Stlačitelnost mobilní fáze však činí spojení SFC-MS výzvou. Před vstupem do MS detektoru má mobilní fáze nižší hustotu, protože není pod přímým vlivem regulátoru zpětného tlaku. Muže to vést k rozšiřování elučních zón a degradaci tvaru chromatografického píků. Z důvodu poklesu rozpustnosti se molekuly analytu mohou srážet a držet na stěnách kapilár – tzv. carry-over efekt. Proto je třeba zajistit efektivní spojení obou zařízení. Existuje mnoho přístupů spojení SFC-MS – přímý vstup do MS, rozdělení průtoku před UV a BPR, přímý vstup + pomocné čerpadlo, rozdělení průtoku za BPR + pomocné čerpadlo a také vstup do MS přes BPR + pomocné čerpadlo (bez rozdělení průtoku). Pomocné čerpadlo přivádí pomocnou (make-up) kapalinu, která zvyšuje účinnost ionizace. Toto přídatné rozpouštědlo zamezí jevům spojeným se sníženou rozpustností analytu a je zdrojem protonů v iontovém zdroji, čímž zvýší podíl nabitých částic vzorku [9] [18].

3.2. Analyzované přírodní látky

Pro ověření vhodnosti UHPSFC metody pro analýzu přírodních látek byly vybrány dvě skupiny přírodních látek – alkaloidy z rostlin čeledi *Amaryllidaceae* a fenolické látky odvozené od kvercetinu.

3.2.1. Alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae*

Alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae* (amarylkovité) jsou produkovány jednoděložnými, krásně kvetoucími rostlinami. Jsou to vytrvalé byliny, ve kterých se vyskytuje a do dnešní doby bylo popsáno více než 500 toxických alkaloidů s největší koncentrací v cibulích. Mají svůj původ v tropickém a subtropickém podnebném pásu a čítají kolem 75 rodů a 1100 druhů. Na Obrázku 4 jsou zástupci čeledi *Amaryllidaceae* z rodu *Narcissus* (narcis), *Leucojum* (bledule), *Lycoris* (Lykoris) a *Galanthus* (sněžěnka) –[22] [23].



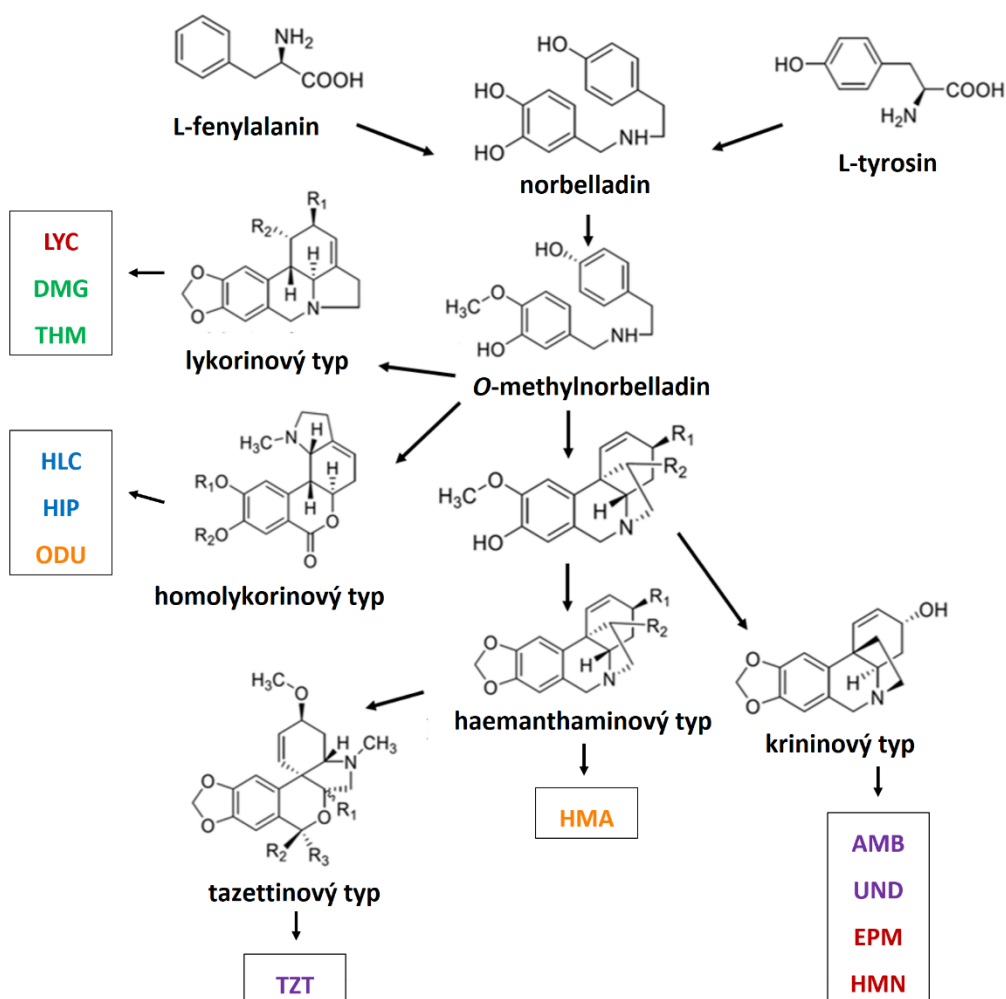
Obrázek 4: Zástupci rodu *Narcissus*, *Leucojum*, *Lycoris* a *Galanthus* [24–27].

Chemická struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti

Alkaloidy jsou sekundární metabolity vznikající přeměnou aminokyselin. Alkaloidy z rostlin čeledi *Amaryllidaceae* jsou strukturně různorodé. Z hlediska biosyntézy jsou tyto látky formálně řazeny k isochinolinovým alkaloidům a vznikají tzv. norbelladinovou cestou. Výchozím článkem jsou aromatické aminokyseliny tyrosin a fenylalanin, ze kterých vzniká přes několik stupňů klíčový meziprodukt *O*-methylnorbelladin. Z něho vzniká podle způsobu oxidativního spojení aromatických kruhů 9 základních strukturních typů – lykorinový, tazettinový, galanthaminový, homolykorinový, haemanthaminový, krininový, norbelladinový, narciklasinový a montaninový. V Tabulce 1 je přehled dvanácti vybraných alkaloidů analyzovaných v rámci této diplomové práce, jejich strukturní typ a rostlina, ze které byly získány. Triviální názvy vznikají v případě některých alkaloidů podle názvu rostliny, ze které byly poprvé izolovány [28] [29] [30]. Na Obrázku 5 [31] je vystiženo základní schéma biosyntetické cesty vedoucí ke vzniku strukturních typů analyzovaných alkaloidů [32] [33].

Tabulka 1: Analyzované alkaloidy, jejich zkratky, rostlina, ze které byly izolovány a strukturní typ.

ALKALOID	ZKRATKA	ROSTLINA	STRUKTURNÍ TYP
ambellin	AMB	<i>Nerine bowdenii</i>	krininový
hamayn	HMN	<i>Zephyranthes robusta</i>	krininový
undulatin	UND	<i>Nerine bowdenii</i>	krininový
epimaritidin	EPM	<i>Narcissus cv. PROF. EINSTEIN</i>	krininový
homolycorin	HLC	<i>Narcissus Dutch Master</i>	homolykorinový
odulin	ODU	<i>Narcissus Dutch Master</i>	homolykorinový
hippeastrin	HIP	<i>Narcissus Dutch Master</i>	homolykorinový
tazettin	TZT	<i>Chlidanthus fragrans</i>	tazettinový
haemanthamin	HMA	<i>Nerine bowdenii</i>	haemanthaminový
tetrahydromasonin	THM	<i>Narcissus Dutch Master</i>	lykorinový
9-O-demethylgalantín	DMG	<i>Zephyranthes robusta</i>	lykorinový
lycorin	LYC	<i>Chlidanthus fragrans</i>	lykorinový



Obrázek 5: Biosyntetická cesta vybraných strukturních typů alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae*, vlastní obrázek – částečně převzato z [31].

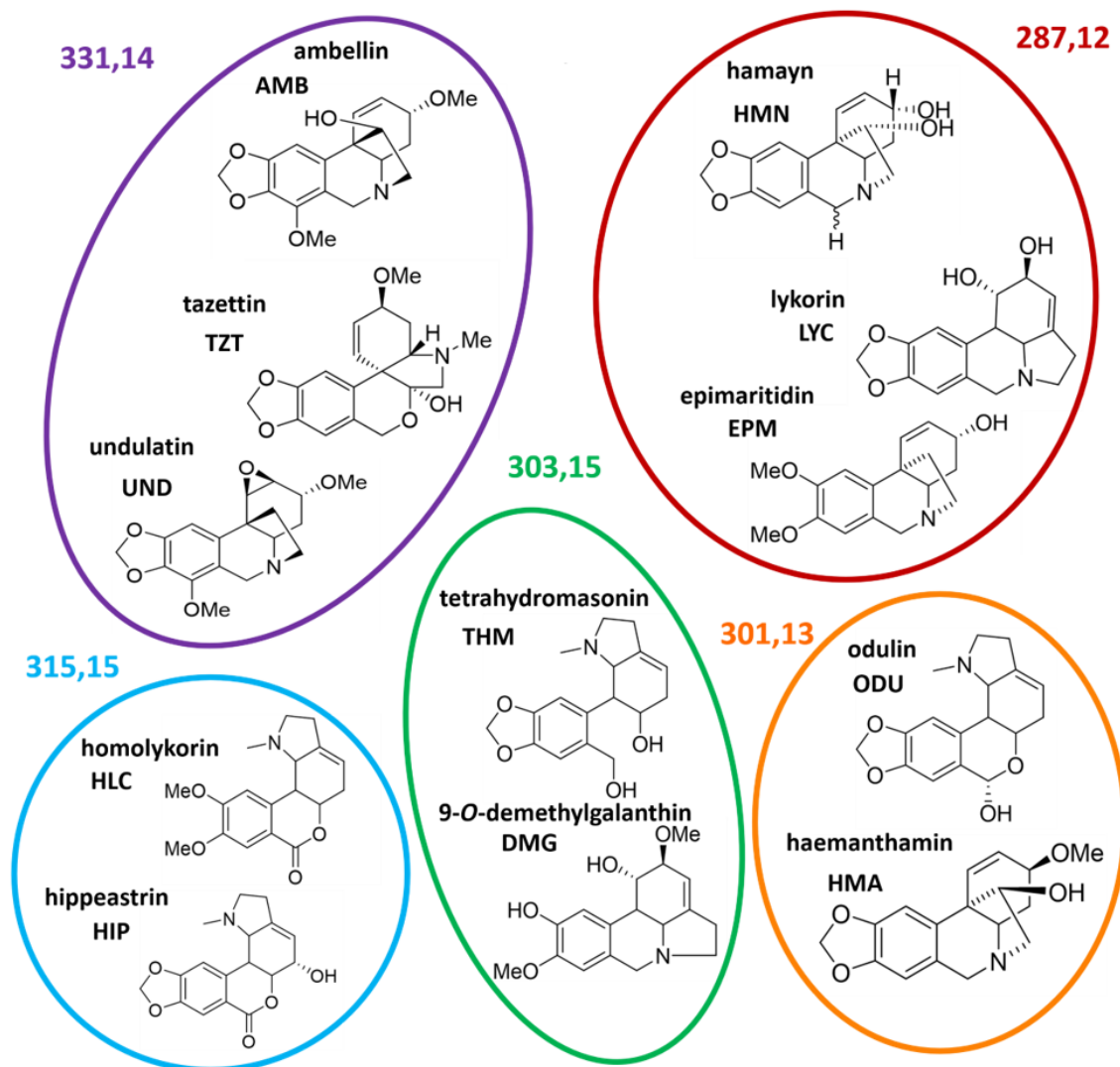
Základní fyzikálně-chemické vlastnosti analyzovaných alkaloidů jsou shrnuty v Tabulce 2. Většina analytů obsahuje jeden atom dusíku (často v heterocyklu), který může být sekundární, terciární nebo kvartérní. Základní skelet u lykorinového, krininového a haemanthaminového typu tvoří fenantridin. Základ struktur homolykorinového a tazettinového typu tvoří spojení benzopyranu s indolovým jádrem.

Tabulka 2: Fyzikálně-chemické vlastnosti alkaloidů *Amaryllidaceae*: log P – rozdělovací (distribuční) koeficient, pK_A - záporný dekadický logaritmus disociační konstanty pro kyseliny.

ANALYT	STRUKTURNÍ VZOREC	MOLEKULOVÁ HMOTNOST	log P	pK _A (kyselé funkční skupiny)	pK _A (zásadité funkční skupiny)
AMB	C ₁₈ H ₂₁ NO ₅	331,1420	1,329 ± 0,724	14,19 ± 0,40	5,68 ± 0,60
TZT	C ₁₈ H ₂₁ NO ₅	331,1420	1,650 ± 0,822	11,89 ± 0,40	7,05 ± 0,60
UND	C ₁₈ H ₂₁ NO ₅	331,1420	1,797 ± 0,742	-	6,88 ± 0,40
HLC	C ₁₈ H ₂₁ NO ₄	315,1471	3,702 ± 0,657	-	8,29 ± 0,20
HIP	C ₁₇ H ₁₇ NO ₅	315,1107	2,229 ± 1,007	13,02 ± 0,20	7,84 ± 0,40
DMG	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	303,1471	0,501 ± 0,473	9,73 ± 0,60	6,30 ± 0,60
THM	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	303,1471	2,020 ± 0,586	14,17 ± 0,10	8,59 ± 0,60
ODU	C ₁₇ H ₁₉ NO ₄	301,1314	3,271 ± 0,771	11,98 ± 0,20	8,24 ± 0,40
HMA	C ₁₇ H ₁₉ NO ₄	301,1314	1,828 ± 0,713	14,24 ± 0,40	6,06 ± 0,60
EPM	C ₁₇ H ₂₁ NO ₃	287,1521	-0,380 ± 0,515	14,03 ± 0,40	7,39 ± 0,40
HMN	C ₁₆ H ₁₇ NO ₄	287,1158	0,898 ± 0,710	13,88 ± 0,40	6,19 ± 0,60
LYC	C ₁₆ H ₁₇ NO ₄	287,1158	1,955 ± 0,656	13,55 ± 0,40	6,34 ± 0,60

Hodnoty pK_A pro zásadité funkční skupiny se pohybují v rozmezí 5 – 9, látky tedy vykazují chování bazí. Alkaloidy *Amaryllidaceae* se vyznačují dobrou rozpustností v nepolárních nebo málo polárních rozpouštědlech. Ve vodě jsou tyto látky špatně rozpustné (u většiny látek log P > 1). Většina z nich jsou bezbarvé, bílé nebo nažloutlé pevné krystalické látky. V roztoku zředěných minerálních kyselin se rozpustí a ve formě hydrochloridových solí jsou rozpustné ve vodě [32].

Ve skupině dvanácti analyzovaných alkaloidů se vyskytují 3 dvojice a 1 trojice strukturních izomerů, což je z důvodu stejného sumárního vzorce stěžejní faktor pro jejich separaci. Jejich chemické struktury a barevné rozdělení dle molekulové hmotnosti je uvedeno na Obrázku 6.



Obrázek 6: Chemické struktury alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae* a jejich rozdělení dle molekulové hmotnosti.

Biologické účinky alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae*

Amarylkovité alkaloidy se mezi sebou liší biologickou aktivitou a mají různorodé léčivé účinky. Nejlépe prozkoumanými a zároveň nejvíce se vyskytujícími alkaloidy v rámci čeledi *Amaryllidaceae* jsou galanthamin, lykorin a haemanthamin [34]. Patří sem látky účinné v boji s degenerativními onemocněními centrální nervové soustavy, kdy alkaloidy

selektivně inhibují enzym acetylcholinesterázu (AChE). Pro boj s demencí, nejčastěji Alzheimerovou chorobou, jsou stěžejní alkaloidy galanthaminového (v praxi galanthamin) a lykorinového typu [35]. Jako podpůrná léčba Alzheimerovy choroby u pacientů trpících navíc schizofrenií a kognitivními poruchami se nyní testují inhibitory prolylopeptidasy (POP) [36]. Pro schopnost této inhibice, kdy dojde ke zpomalení degradace neuropeptidů a zpomalení stárnutí, se testují mimo jiné alkaloidy undulatin a 9-*O*-demethylgalanthin [37]. Cytotoxické a antiproliferativní účinky byly dokázány u mnoha alkaloidů v rámci čeledi [38]. Mezi základní mechanismy účinku alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae* patří například interakce s eukaryotními ribozomy (inhibice proteosyntézy) a indukce apoptózy (programovaná buněčná smrt) [34]. U látek izolovaných z této čeledi byla prokázána antibakteriální, antifungální, antiplasmodiální (antiprotozoální) a také antiparazitická aktivita [38,39]. Významná je i antivirová aktivita – inhibice chřipkového viru A, viru *Herpes simplex*, flavivirů a viru HIV-1 [40].

3.2.2. Publikované metody zabývající se analýzou alkaloidů *Amaryllidaceae*

Alkaloidy se dle publikovaných prací nejčastěji stanovují chromatografickými metodami jako je GC a HPLC. Detekce bývá UV nebo MS. V Tabulce 3 jsou shrnuty dosud publikované metody stanovení alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae*. Nejčastěji analyzovaným alkaloidem je lykorin a haemanthamin. Nejčastější stacionární fází v publikovaných metodách je v rámci HPLC kolona C18 s mobilními fázemi obsahujícími methanol, acetonitril a přídavky mravenčanu či octanu amonného. U plynové chromatografie jsou používané kolony DB-1, DB-5 a HP-1, HP-5 s dusíkem či heliem jako mobilní fází. Analýzy trvaly v rozmezí 7 – 70 minut. Žádná dosud publikovaná metoda nepojednává o analýze alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae* pomocí UHPSFC-PDA/MS.

Tabulka 3: Publikované metody analýzy alkaloidů z rostlin čeledi *Amaryllidaceae*. ACN – acetonitril, DAD – detektor diodového pole, GC – plynová chromatografie, HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie, MeOH – methanol, MS – hmotnostní spektrometrie, SDS – dodecylsírán sodný, AMB – ambellin, HIP – hippeastrin, HLC – homolycorin, HMA – haemantamin, HMN – hamayn, LYC – lycorin, TZT – tazettin.

metoda	látka	stacionární fáze	mobilní fáze	průtok [ml/min]	nástřik [μl]	detekce	čas [min]	citace
GC	LYC, HMA	DB-1 DB-5 (30 m x 0,32 mm)	dusík	0,8	-	MS	-	[41]
GC	LYC	HP-5 MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 μm)	helium	0,8	-	MS	40	[42]
GC HPLC	HMA, LYC, TZT	GC: Rtx – 5 MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 μm) LC: C18 (100 x 2 mm, 3,5 μm)	GC: dusík LC: CH ₃ COONH ₄ (0,01 M), ACN	GC: 0,8 LC: 0,2	20	GC: MS LC: UV-MS (280 nm)	50	[43]
GC HPLC	TZT, LYC, HLC	GC: DB-5 MS (30 m x 0,25 mm) LC: Luna C18-HST (100 x 2,1 mm, 2,5 μm)	GC: helium LC: A: CH ₃ COOH (0,05 %) B: MeOH (100 %)	GC: 0,8 LC: 0,15	5	GC: MS LC: MS	-	[44]
HPLC	HMA, TZT, LYC	C18 (200 x 3,9 mm, 5 μm)	CH ₃ COONH ₄ (1 mM) H ₂ O, ACN, SDS (7 mM), Na ₃ PO ₄ (25 mM)	1	5	UV (241 nm)	15	[37]
HPLC	HMA, AMB	Kinetex PFP (150 x 3 mm, 2,6 μm)	A: 1 mmol/L HCOONH ₄ pufr, pH=3,8 + HCOOH B: MeOH + ACN (1:1) + 0,1 % HCOOH	0,5	-	MS	7	[45]
HPLC	TZT, HLC, HMA	Kromasil 100 C18 (150 x 3,9 mm, 5 μm)	A: H ₂ O : ACN (33:67) + 7 mM SDS + 25 mM fosfát sodný + 1 mM CH ₃ COONH ₄ B: MeOH	0,7-0,9	-	UV (280 nm)	13	[46]
UHPLC	HMN, HMA	BEH C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 μm)	A: H ₂ O + 0,05 % HCOOH B: ACN	0,3	1	DAD (280 nm) MS/MS	8	[47]
HPLC	LYC, HIP	XTerra C18 (150 x 4,6 mm, 3,5 μm)	A: ACN B: 15 mM NH ₄ OH	0,3	5	DAD (200- 350 nm)	70	[48]

3.2.3. Fenolické látky – flavonoidy rutin, kvercetin a jejich metabolity

Fenolické látky flavonoidního typu tvoří rozsáhlou skupinu sekundárních metabolitů vyskytujících se téměř ve všech rostlinách a mající rozsáhlé účinky na lidský organismus. V rostlinách jsou mechanickou oporou, tvoří ochranu před oxidačním stresem a patogeny a některé vykazují funkci signálních molekul. Jejich primárním zdrojem jsou čajové lístky, ovoce, zelenina a červené víno.

Konkrétně rutin je obsažen nejvíce v routě vonné (*Ruta graveolens*) a také v pohance obecné (*Fagopyrum esculentum* - Obrázek 7 [49]). Kvercetin je jeden z nejrozšířenějších flavonolů v přírodě [50–53].



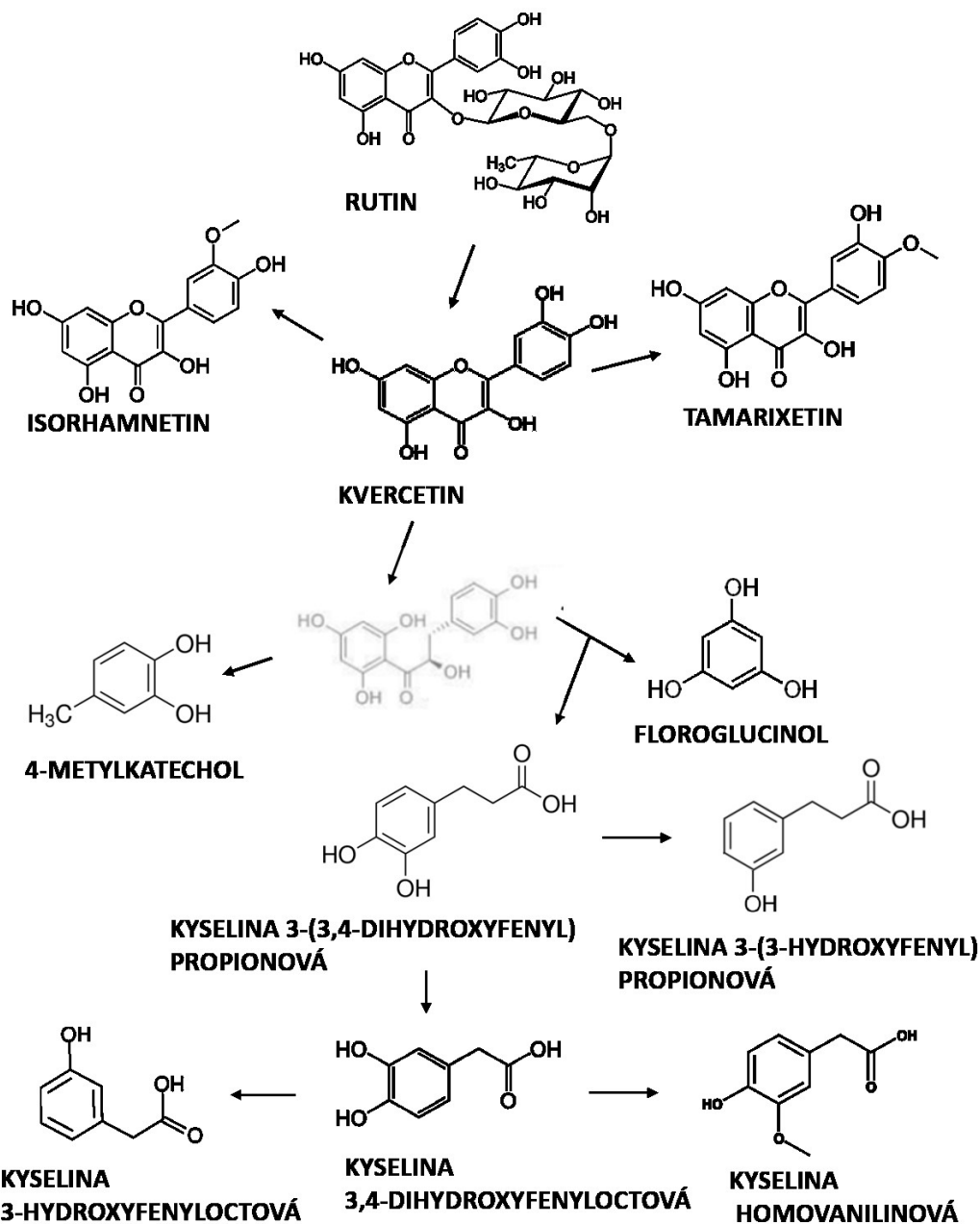
Obrázek 7: Zástupce rodu *Fagopyrum* obsahující flavonoid rutin.

Flavonoidy lze dle struktury rozdělit na podskupiny, např. flavonoly, flavanoly, flavony, anthokyanidiny, izoflavony, biflavonoidy a další. Tato práce se zabývá analýzou podskupiny flavonolů – flavonolového glykosidu rutinu, flavonolu kvercetinu a jejich metabolitů.

Chemická struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti

Flavonoidy jsou polyfenolické látky, tedy sloučeniny obsahující dvě a více hydroxylových skupin navázaných na aromatickém jádře. Základní struktura je odvozená od difenylpropanu nebo fenylochromanu. Výsledná struktura je složená ze tří kruhů, z toho dvě centra jsou aromatická a k nim je přikondenzovaný pyranový kruh. Aglykony flavonoidů jsou často v konjugaci s cukry (glukóza, rhamnóza), které zvyšují jejich rozpustnost ve vodě. Jedním z flavonolových glykosidů kvercetinu je rutin (kvercetin-3-rhamnoglukosid), který obsahuje molekulu disacharidu navázanou glykosidickou vazbou k C-3 OH skupině. Kvercetin a jeho methylované deriváty se strukturou flavonolu (isorhamnetin a tamarixetin) jsou v lidském organismu přítomny převážně v konjugované formě. Kvercetin se přes semichinonový radikál oxiduje na chinon, přičemž vznikající radikál O_2 vykazuje cytotoxickou aktivitu. Rutin díky cukerné molekule postrádá planární strukturu, nemá rovnoměrné rozložení π elektronů a vykazuje slabší antioxidační potenciál než kvercetin [52,54]. Po perorálním podání jsou glykosidické vazby rutinu štěpeny střevní mikroflórou až na fenolické kyseliny, které jsou také

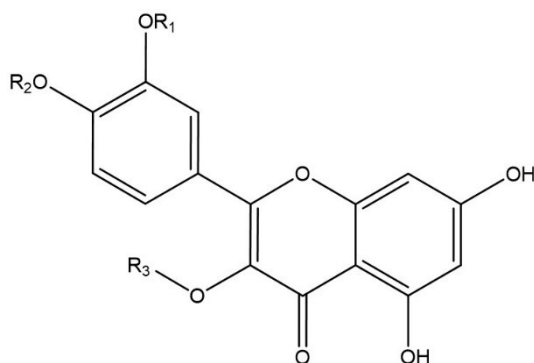
předmětem této diplomové práce. Během metabolismu rutinu a kvercetin v lidském těle vznikají konjugací metabolity jako např. kvercetin-glukuronid, kvercetin-sulfát, isorhamnetin-glukuronid. Obrázek 8 vystihuje metabolismus rutinu a kvercetin [55].



Obrázek 8: Metabolismus rutinu, kvercetin a jejich metabolitů. Vlastní obrázek – částečně převzato z [55].

Sledované flavonoidní analyty odvozené od kvercetin a jeho metabolity lze rozdělit do dvou skupin. Jednu skupinu tvoří flavonoidní látky se strukturou flavonolu: kvercetin, jeho glykosid rutin a dva methylované deriváty isorhamnetin a tamarixetin (izomery se stejnou molekulovou hmotností a stejným sumárním vzorcem) – Obrázek 9 a Tabulka 4.

Analyty s flavonoidní strukturou mají vyšší molekulovou hmotnost než jejich metabolity se strukturou fenolických kyselin. Rutin je však díky cukerné části velmi polární.

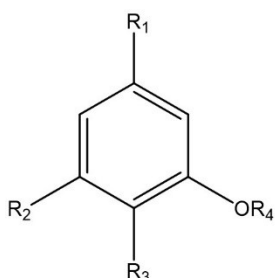


Obrázek 9: Obecná struktura flavonoidních látek typu flavonolů.

Tabulka 4: Popis substituentů obecné struktury flavonoidních látek typu flavonolů.

analyt	zkratka	R ₁	R ₂	R ₃
rutin	RUT	-H	-H	-rhamnoglukosid
kvercetin	QCE	-H	-H	-H
isorhamnetin	IRN	-CH ₃	-H	-H
tamarixetin	TMX	-H	-CH ₃	-CH ₃

Druhou skupinu tvoří fenolické kyseliny, což jsou deriváty kyseliny benzoové, fenylactové a fenylpropanové s navázanými krátkými alkyly nebo hydroxy skupinami. Podrobnější popis struktur je uveden na Obrázku 10 a v Tabulce 5.



Obrázek 10: Obecná struktura fenolických kyselin.

Tabulka 5: Popis substituentů obecné struktury fenolických kyselin.

analyt	zkratka	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
4-methylcatechol	4-MC	-CH ₃	-H	-OH	-H
floroglucinol	PG	-OH	-OH	-H	-H
kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová	HFP	-CH ₂ CH ₂ COOH	-H	-H	-H
kyselina 3-hydroxyfenylactová	HFA	-CH ₂ COOH	-H	-H	-H
kyselina 3,4-dihydroxyfenylactová	PAA	-CH ₂ COOH	-H	-OH	-H
kyselina homovanilinová	HVA	-CH ₂ COOH	-H	-OH	-CH ₃

Pomocí hodnot log P (rozdělovací koeficient) lze mezi polární analyty kromě RUT zařadit také PG, HFP, HVA, PAA a HFA. Naopak menší polaritu mají vzhledem ke své struktuře QCE, TMX a IRN. Analyty se chovají jako velmi slabé kyseliny (pK_A ~ 6 – 10) nebo slabé kyseliny (pK_A ~ 4). Přesné hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 6. Analyzované fenolické látky jsou bílé nebo žluté krystalické látky, dobře rozpustné v polárních organických rozpouštědlech [56,57].

Tabulka 6: Fyzikálně-chemické vlastnosti fenolických látek: log P – rozdělovací (distribuční) koeficient, pK_A – záporný dekadický logaritmus disociační konstanty pro kyseliny.

ANALYT	STRUKTURNÍ VZOREC	MOLEKULOVÁ HMOTNOST	log P	pK _A
4MC	C ₇ H ₈ O ₂	124,05	1,37	9,55
PG	C ₆ H ₆ O ₃	126,03	0,01	9,06
HFA	C ₈ H ₈ O ₃	152,05	1,02	4,21
HFP	C ₉ H ₁₀ O ₃	166,06	0,43	4,68
PAA	C ₈ H ₈ O ₄	168,04	0,31	4,42
HVA	C ₉ H ₁₀ O ₄	182,06	0,61	4,39
QCE	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302,04	1,99	6,31
TMX	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	316,06	2,67	6,31
IRN	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	316,06	2,68	6,31
RUT	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610,15	-0,90	6,17

Biologické účinky flavonoidů

Terapeutické využití flavonoidů je velmi široké. Jejich příjem je spojován s prevencí kardiovaskulárního onemocnění, a to díky antioxidačnímu působení, tedy schopnosti vychytávat kyslíkové radikály v organismu. V boji s infekcemi se využívá schopnosti flavonoidů potencovat účinek vitamínu C. Kvercetin působí antiflogisticky, antitromboticky, antivirově, antimikrobiálně a antikarcinogenně. Rutin se využívá běžně jako venotonikum, kdy má schopnost normalizovat permeabilitu kapilár [53].

3.2.4. Publikované metody zabývající se analýzou fenolických látek

Analýzou fenolických látek se zabývají metody shrnuté v Tabulce 7, nejčastěji GC a HPLC s UV nebo MS detekcí. Nejširší spektrum našich sledovaných látek pokrývá UHPLC metoda zabývající se separací 9 stejných analytů [58], jako v této diplomové práci. Žádná z nich se nezabývá separací všech 10 sledovaných analytů v rámci jedné analýzy. Stacionární fázi v rámci HPLC byla nejčastěji nepolární kolona C18 a mobilní fázi tvořil většinou vodný roztok kyseliny octové nebo mravenčí. Pro GC to byla kolona Sil 5B v kombinaci s heliem. Analýzy trvaly v rozmezí 7 – 80 minut. Žádná publikace dosud nepojednává o analýze těchto látek pomocí UHPSFC-PDA/MS metody.

Tabulka 7: Publikované metody analýzy fenolických látek: ACN – acetonitril, DAD – detektor diodového pole, GC – plynová chromatografie, HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie, MeOH – methanol, MS – hmotnostní spektrometrie, HFA – kyselina 3-hydroxyfenyloctová, HFP - kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová, HVA – kyselina homovanilinová, IRN – isorhamnetin, PAA – kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová, PG – floroglucinol, QCE – kvercetin, RUT – rutin, TMX – tamarixetin

metoda	látka	stacionární fáze	mobilní fáze	průtok [ml/min]	nástřik [μl]	detekce	čas [min]	citace
GC	HFA, HVA, PAA	Sil 5B (25 m x 0,25 mm)	helium	4	1	MS	35	[59]
HPLC	QCE, RUT, IRN	HIQ SIL C18V (250 x 4,6 mm, 5 μm)	MeOH : ACN : H ₂ O (40:15:45) + 1,0 % CH ₃ COOH	1	10	DAD	15	[60]
HPLC	RUT, QCE	Aqua C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm)	A: H ₂ O + 2 % CH ₃ COOH B: H ₂ O + ACN (50:50+0,5 % CH ₃ COOH)	1	10	MS	65	[61]
HPLC	QCE, RUT	Ascentis Express C18 (50 x 2,1 mm, 2,7 μm)	A: 2 % CH ₃ COOH v H ₂ O B: 2 % CH ₃ COOH v MeOH	0,2	2	DAD - MS	30	[62]
HPLC	RUT	Nova-Pak C18 (300 x 3,9 mm, 4,0 μm)	A: H ₂ O + CH ₃ COOH B: H ₂ O + ACN + CH ₃ COOH	0,6-0,8	-	DAD	80	[63]
HPLC	QCE, RUT	PerfectSil Target ODS-3 (250 x 4,6 mm, 3 μm)	0,5 % CH ₃ COOH v H ₂ O, MeOH a ACN	1	20	DAD (190-450 nm)	50	[64]
HPLC	PG	C18 XTERRA (100 x 2,1 mm, 3,5 μm)	H ₂ O + ACN + HCOOH (580:150:0,28)	0,2	20	MS	10	[65]
HPLC	QCE, IRN, PAA, HFA, HFP	Synergi Max-RP/Hydro-RP (240 x 4,6 mm, 4 μm)	A: 1 % HCOOH / 0,25 % CH ₃ COOH B: ACN	1	200	PDA (250- 700 nm) MS/MS	65	[66]
HPLC	QCE, IRN, TMX	Nucleodur Sphinx RP C18 (125 x 4 mm, 5 μm)	A: 0,5 % HCOOH + H ₂ O B: ACN	1	50	DAD (365 nm)	40	[54]
HPLC	QCE, RUT	Diamonsil C18 (150 x 4,6 mm, 5 μm)	MeOH + 0,5 ‰ CH ₃ COOH	0,8	10	MS	8	[67]
UHPLC	PG, PAA, HVA, HFA, HFP, RUT, QCE, TMX, IRN	BEH C18, CSH C18, BEH Shield RP18, BEH PHE, CSH PHE-HEX, CSH PFP (100 x 2,1 mm, 1,7 μm)	A: 0,1 % HCOOH v H ₂ O B: MeOH	0,35	5	MS/MS	7	[58]

4. Experimentální část

4.1. Přístrojové vybavení a materiál

- UHPSFC systém Acquity UPC²: binární čerpadlo, automatický dávkovač, kolonový termostat, regulátor zpětného tlaku, PDA detektor a QDa detektor, Waters, Milford, USA
- Analytické váhy, Sartorius, Goettingen, Německo
- Automatické mikropipety se špičkami, Eppendorf, Hamburk, Německo
- Třepačka Ika Vortex Genius 3, VERKON, Praha, ČR
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Digitec, Bandelin electronic, Berlín, Německo
- Software Empower[®] 3, Waters, Praha, ČR
- Šroubovací vialky s uzávěry, Vitrum, Janov nad Nisou, ČR
- Mikrozumavky Eppendorf 2,0 ml, Sigma-Aldrich, Praha, ČR

4.2. Stacionární fáze

Analytické kolony, všechny od firmy Waters, Milford, USA

- Acquity UPC² BEH 2-EP, 100 x 3,0 mm, 1,7 μm
- Viridis HSS C18 SB, 100 x 3,0 mm, 1,8 μm
- Viridis BEH, 100 x 3,0 mm, 1,7 μm
- Acquity UPC² Torus DIOL, 100 x 3,0 mm, 1,7 μm
- Acquity UPC² Torus 2-PIC, 100 x 3,0 mm, 1,7 μm
- Acquity UPC² Torus DEA, 100 x 3,0 mm, 1,7 μm
- Acquity UPC² CSH PFP, 100 x 3,0 mm, 1,7 μm
- Acquity UPC² Torus 1-AA, 100 x 3,0 mm, 1,7 μm
- CORTECS HILIC, 100 x 2,1 mm, 2,7 μm
- Acquity UPLC BEH Amide, 100 x 2,1 mm, 1,7 μm
- Acquity UPLC BEH Amide, 100 x 3,0 mm, 1,7 μm

4.3. Rozpouštědla a ostatní chemikálie

- Acetonitril, Acetonitrile hysgrade, LC-MS LiChrosolv®, 2,5 l, C₂H₃N, Mr 41,05, čistota ≥ 99 %, Merck KGaA, Darmstadt, Německo
- Methanol, Methanol HiPerSolv CHROMANORM®, HPLC – ULTRA LC-MS, 2,5 l, CH₄O, Mr 32,04, čistota ≥ 99,9 %, Merck KGaA, Darmstadt, Německo
- Ultračistá voda, Millipore, destilovaná v přístroji Milli-Q RG, Burlington, USA
- Amoniak, Ammonia solution 25 %, LC-MS, Merck KGaA, Darmstadt, Německo
- Etanol, Ethanol absolutní p.a., Penta s.r.o., Praha, ČR
- Kyselina mravenčí, Formic acid 98 - 100 %, LC-MS, Merck KGaA, Darmstadt, Německo
- Kyselina octová, Acetic acid 100 %, LC-MS, Merck KGaA, Darmstadt, Německo
- Mravenčan amonný, Ammonium formate, čistota ≥ 98 %, Merck KGaA, Darmstadt, Německo
- Oxid uhličitý, CO₂ > 99,995 %, Messer, Bad Soden am Taunus, Německo

4.4. Analyzované přírodní látky

4.4.1. Alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae*

Všechny látky typu alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae* byly izolovány na Katedře farmaceutické botaniky, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy

- Ambellin (AMB), Mr 331,37, označení 1/003
- Epimaritidin (EPM), Mr 287,36, označení 6/019
- Haemanthamin (HMA), Mr 301,34, označení 5/134
- Hamayn (HMN), Mr 287,32, označení 5/051
- Hippeastrin (HIP), Mr 315,32, označení 6/023
- Homolycorin (HLC), Mr 315,36, označení 6/001
- Lycorin (LYC), Mr 287,12, označení 5/069
- Odulin (ODU), Mr 301,34, označení 6/009
- Tazettin (TZT), Mr 331,37, označení 2/005
- Tetrahydromasonin (THM), Mr 303,35, označení 6/013
- Undulatin (UND), Mr 331,37, označení 5/120
- 9-O-demethylgalanthin (DMG), Mr 303,15, označení 5/115

- Vittatin (VIT), Mr 271,31
- Haemanthidin (HTD), Mr 317,34
- extrakt z rostliny *Hippeastrum cv. Double King* (ve formě odparku)
- extrakt z rostliny *Zephyranthes citrina* (ve formě odparku)

4.4.2. Fenolické látky

- Isorhamnetin (IRN), čistota ≥ 99 %, Mr 316,06, Extrasysthese, Genay, Francie
- Floroglucinol (PG), čistota ≥ 99 %, Mr 126,03, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Německo
- Kyselina homovanilinová (HVA), čistota ≥ 97 %, Mr 182,06, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Německo
- Kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová (PAA), čistota > 99 %, Mr 168,04, Extrasysthese, Genay, Francie
- Kyselina 3-hydroxyfenyloctová (HFA), čistota > 95 %, Mr 152,05, Toronto Research Chemicals, North York, Kanada
- Kyselina 3-(3hydroxyfenyl)propionová (HFP), čistota > 98 %, Mr 166,06, Toronto Research Chemicals, North York, Kanada
- Kvercetin (QCE), čistota > 95 %, Mr 302,04, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Německo
- Tamarixetin (TMX), čistota > 99 %, Mr 316,06, Extrasysthese, Genay, Francie
- Rutin – hydrát (RUT), čistota > 95 %, Mr 610,15, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Německo
- 4-methylkatechol (4MC), čistota > 95 %, Mr 124,05, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Německo

4.5. Pracovní postup

4.5.1. Příprava jednotlivých standardů

Alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae*:

Pro analýzy byly připraveny zásobní roztoky standardů samostatných alkaloidů o koncentraci 1 mg/ml. V případě alkaloidů bylo do vialek naváženo přibližně přesně 1 mg krystalického standardu, rozpuštěno v 1 ml ACN za pomoci třepačky Vortex. Rozpuštění standardů bylo podpořeno vystavením vialek ultrazvuku po dobu 15 minut. K hůře rozpustným alkaloidům – ambellin, lycorin a undulatin byla přidána kyselina

mravenčí. K roztoku ambellinu stačilo k rozpuštění přidat 1 µl, k lycorinu a undulatinu bylo potřeba přidat 5 µl kyseliny mravenčí. Nejobtížněji rozpustný undulatin bylo třeba znovu vystavit ultrazvukové lázni na dobu 5 minut.

Fenolické látky:

K naváženým 0,5 mg krystalkům fenolických látek byl přidán 0,5 ml MeOH, ve kterém se po 1 minutě třepání na třepačce Vortex rozpustilo 9 z 10 vzorků. V MeOH špatně rozpustný isorhamnetin byl doplněn MeOH na 1 ml a následně k němu byl přidán 1 ml ACN. Vznikly tak zásobní roztoky standardů o koncentraci 1 mg/ml, kromě isorhamnetinu, který byl kvůli špatné rozpustnosti naředěn na koncentraci 0,25 mg/ml.

4.5.2. Příprava směsí standardů

Pro základní screening dvanácti alkaloidů byly připraveny tři směsi, přičemž každá obsahovala čtyři analyty (Tabulka 8). Jednotlivé alkaloidy byly do směsí rozděleny tak, aby jedna směs neobsahovala dva analyty se stejnou molekulovou hmotností.

Tabulka 8: Jednotlivé směsi alkaloidů pro základní screening. V závorkách jsou uvedeny molekulové hmotnosti.

směs 1	směs 2	směs 3
HMN (287,12)	LYC (287,12)	EPM (287,12)
ODU (301,13)	THM (303,15)	HMA (301,13)
DMG (303,15)	HLC (315,15)	HIP (315,15)
AMB (331,14)	TZT (331,14)	UND (331,14)

Ze zásobních roztoků standardů o koncentraci 1 mg/ml bylo odpipetováno 100 µl, tedy 4 x 100 µl do každé ze tří vialek. Objem byl poté doplněn 600 µl ACN. Koncentrace alkaloidů v každé směsi byla 0,1 mg/ml. Ze zásobních roztoků byla připravena také celková směs všech 12 alkaloidů napipetováním 100 µl každého z nich do vialky.

Fenolických látek bylo 10, proto byly rozděleny do tří vialek po třech analytech a isorhamnetin byl kvůli odlišné koncentraci pipetován do vialky zvlášť (Tabulka 9). Ve skupině flavonoidů mají stejnou molekulovou hmotnost pouze dva analyty, tamarixetin a isorhamnetin. Strategii při sestavování směsí bylo rozdělit fenolické

kyseliny s nízkou molekulovou hmotností do různých vialek, aby nedocházelo k interferenci vlivem signálu izotopů.

Tabulka 9: Jednotlivé směsi fenolických látek pro základní screening. V závorkách jsou uvedeny molekulové hmotnosti.

směs 1	směs 2	směs 3	IRN (316,16)
4MC (124,05)	PG (126,03)	HFA (152,05)	
HFP (166,06)	PAA (168,04)	HVA (182,06)	
QCE (302,04)	TMX (316,06)	RUT (610,15)	

Z roztoků standardů o koncentraci 1 mg/ml bylo odpipetováno 100 µl, tedy 3 x 100 µl a doplněno 700 µl ACN. Isorhamnetinu o koncentraci 0,25 mg/ml bylo napipetováno 400 µl a doplněno 600 µl ACN. Ze zásobních roztoků byla připravena také celková směs všech 10 fenolických analytů napipetováním 100 µl každého z nich do vialky.

4.5.3. Příprava mobilních fází

Pro základní UHPSFC screening byly použity 4 různé mobilní fáze. Hlavní složkou byl oxid uhličitý (CO₂) a k němu byly přidávány organické modifikátory a aditiva (Tabulka 10).

Tabulka 10: Složení mobilních fází použitých v základním screeningu.

	hlavní složka	organický modifikátor	aditivum
1.	CO ₂	MeOH	-
2.	CO ₂	MeOH	0,1 % NH ₄ OH
3.	CO ₂	MeOH	10 mM AmF
4.	CO ₂	MeOH	10 mM AmF + 2 % H ₂ O

Příprava organických modifikátorů s aditivem v rámci screeningu:

1. MeOH

Methanol o objemu cca 500 ml byl přímo převeden do zásobní lahve na mobilní fáze.

2. MeOH + 0,1 % NH₄OH

Odměrná baňka o objemu 500 ml byla naplněna methanolem tak, aby mohly být posléze pod digestoří napipetovány 2 ml 25 % NH₄OH a doplněny methanolem po rysku odměrné baňky.

3. MeOH + 10 mM AmF (mravenčan amonný)

Navážka 0,3153 g mravenčanu amonného (HCOONH₄) byla rozpuštěna v menším množství methanolu a kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 500 ml, následně byla doplněna methanolem po rysku.

4. MeOH + 10 mM AmF + 2 % H₂O

Navážka mravenčanu byla opět 0,3153 g, tentokrát rozpuštěna v 10 ml ultračisté H₂O. Takový roztok byl kvantitativně převeden do 500 ml odměrné baňky a ta doplněna methanolem po rysku.

V rámci optimalizace podmínek byly zkoušeny různé modifikace mobilních fází. Změny se týkaly organického modifikátoru, koncentrace nebo přídavku dalších aditiv. Pro optimalizaci byly připraveny následující mobilní fáze:

MeOH + 0,1 % HCOOH

Pro přípravu 0,1 % HCOOH v MeOH byla odměrná baňka naplněna MeOH těsně pod rysku a poté k němu pod digestoří bylo napipetováno 0,5 ml 99,9 % HCOOH. Baňka byla doplněna MeOH do objemu 500 ml.

MeOH + 0,1 % CH₃COOH

Pro přípravu 0,1 % CH₃COOH v MeOH byla odměrná baňka naplněna MeOH těsně pod rysku a poté k němu pod digestoří bylo napipetováno 0,5 ml 100 % CH₃COOH. Baňka byla doplněna MeOH do objemu 500 ml.

MeOH + 2 % H₂O

Pro přípravu 2 % H₂O v MeOH byla odměrná baňka naplněna MeOH pod rysku a poté k němu bylo napipetováno 10 ml ultračisté H₂O. Baňka byla doplněna MeOH do objemu 500 ml.

MeOH + 0,05 % NH₄OH

Pro přípravu 0,05 % NH₄OH v MeOH byla odměrná baňka naplněna MeOH těsně pod rysku a poté k němu pod digestoří bylo napipetováno 1 ml 25 % NH₄OH. Baňka byla doplněna MeOH do objemu 500 ml.

MeOH + 0,05 % NH₄OH + 2 % H₂O

Pro přípravu 0,05 % NH₄OH + 2 % H₂O bylo nejprve napipetováno 10 ml ultračisté H₂O do MeOH, poté byl pod digestoří přidán 1 ml 25 % NH₄OH. Odměrná baňka o objemu 500 ml byla doplněna MeOH po rysku.

MeOH + 0,1 % NH₄OH + 2 % H₂O

Pro přípravu 0,1 % NH₄OH + 2 % H₂O bylo nejprve napipetováno 10 ml ultračisté H₂O do MeOH, poté byl pod digestoří přidán 2 ml 25 % NH₄OH. Odměrná baňka o objemu 500 ml byla doplněna MeOH po rysku.

MeOH/ACN (1:1) + 0,1 % NH₄OH

Pro přípravu 0,1 % NH₄OH ve směsi MeOH/ACN (1:1) byly do odměrné baňky se směsí MeOH/ACN v poměru 1:1 přidány 2 ml 25 % NH₄OH pod digestoří. Odměrná baňka o objemu 500 ml byla poté doplněna směsí MeOH/ACN v poměru 1:1.

MeOH/ACN (3:1) + 0,1 % NH₄OH

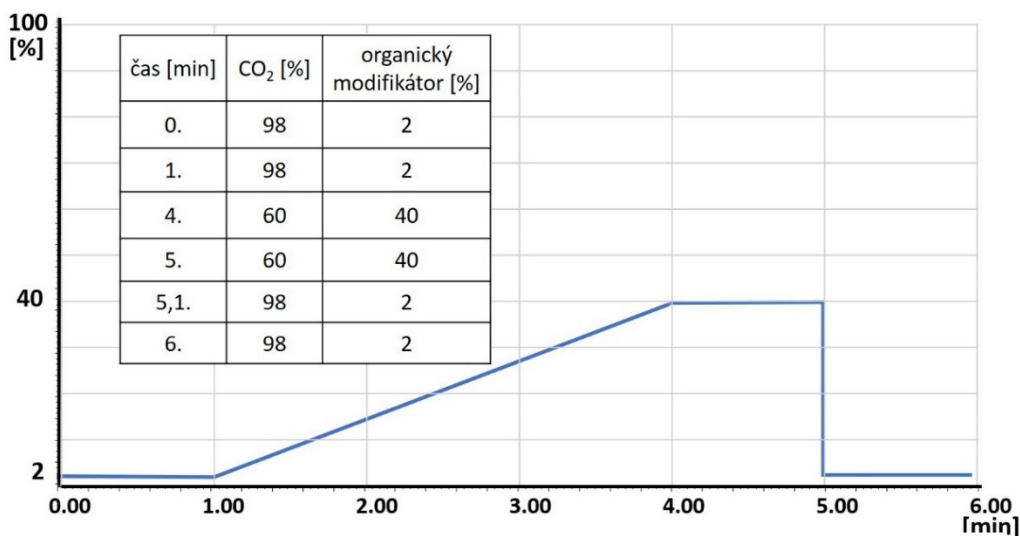
Pro přípravu 0,1 % NH₄OH ve směsi MeOH/ACN (3:1) byly do odměrné baňky se směsí MeOH/ACN v poměru 3:1 přidány 2 ml 25 % NH₄OH pod digestoří. Odměrná baňka o objemu 500 ml byla poté doplněna směsí MeOH/ACN v poměru 3:1.

EtOH + 0,1 % NH₄OH

Pro přípravu 0,1 % NH₄OH v EtOH byla nejprve odměrná baňka naplněna EtOH téměř pod rysku a poté k němu byly pod digestoří přidány 2 ml 25 % NH₄OH. Baňka byla doplněna EtOH do objemu 500 ml.

4.6. Provedení základního screeningu stacionárních a mobilních fází

Pro základní screening bylo použito 10 různých stacionárních fází s částicemi < 2 μm (kapitola 4.2.) a u každé z nich provedena analýza se 4 různými mobilními fázemi (kapitola 4.5.3.). Před analýzou bylo potřeba nastavit podmínky separace a připravit jednotlivé kolony. To zahrnovalo počáteční promytí čistým 100 % CO_2 a následovala ekvilibrace kolon mobilní fází. BPR byl nastaven na hodnotu 140 bar, což odpovídá 2030,5 psi. Ustálení systému bylo docíleno stabilizací tlaku na ABPR a čerpadle. Kontrola vstupního tlaku CO_2 byla nutná k zajištění stálosti v rozmezí 800 – 900 psi. V kolonovém termostatu byla nastavena teplota 40 °C. Teplota v autosampleru byla nastavena na 10 °C. Nastavením této teploty byla zajištěna větší stálost připravených směsí analytů. Objem nastříkovaných vzorků byl zpravidla 2 μl . Průtoková rychlost byla pro většinu kolon 1,5 ml/min. Pouze u kolony BEH Amide s velikostí částic 1,7 μm a rozměry 100 x 2,1 mm primárně určenou pro kapalinovou chromatografii byl průtok snížen. S mobilní fází CO_2/MeOH byl průtok 1,0 ml/min a pro další tři mobilní fáze s aditivou byl nastaven průtok 0,9 ml/min. Průběh gradientové eluce s izokratickými kroky na počátku i konci analýzy je naznačen prostřednictvím grafu a gradientové tabulky (Obrázku 11).



Obrázek 11: Průběh gradientové eluce nastavené v základním screeningu.

V případě alkaloidů byl v rámci UV detekce extrahován z 3D PDA dat záznam při vlnové délce 290 nm. Pro fenolické látky byl extrahován chromatogram s vlnovou délkou 220 nm. V rámci hmotnostní detekce byl vzhledem ke struktuře v případě alkaloidů nastaven kladný ESI mód, u fenolických látek naopak záporný ESI mód.

4.7. Optimalizované podmínky separace

Optimalizované chromatografické podmínky pro UHPSFC separaci alkaloidů

Analytická kolona: Torus DEA (100 x 3,0 mm, 1,7 µm; 130 Å)

Mobilní fáze: CO₂, MeOH/ACN (1:1) + 0,1 % NH₄OH

Průtok: 1,5 ml/min

Dávkovaný objem: 2 µl

Rozpouštědlo: ACN

Teplota: 40 °C

Tlak: 140 bar/2031 psi

Gradientová eluce: 4 – 20 % (Tabulka 11)

UV detekce: 290 nm

MS detekce: MS sken, ESI⁺ mód, 60 – 500 Da

Tabulka 11: Průběh gradientové eluce u optimalizované metody pro alkaloidy *Amaryllidaceae*. OM – organický modifikátor.

čas [min]	CO ₂ [%]	OM [%]
0.	96	4
4.	80	20
4,1.	96	4
6.	96	4

Optimalizované chromatografické podmínky pro UHPSFC separaci fenolických látek

Analytická kolona: Torus DIOL (100 x 3,0 mm, 1,7 µm; 130 Å)

Mobilní fáze: CO₂, MeOH + 0,05 % NH₄OH + 2 % H₂O

Průtok: 1,0 ml/min

Dávkovaný objem: 2 µl

Rozpouštědlo: MeOH

Teplota: 40 °C

Tlak: 140 bar/2031 psi

Gradient: 2 – 50 % (Tabulka 12)

UV detekce: 220 nm

MS detekce: MS sken, ESI⁻ mód, 90 – 620 Da

Tabulka 12: Průběh gradientové eluce u optimalizované metody pro fenolické látky. OM – organický modifikátor.

čas [min]	CO ₂ [%]	OM [%]
0.	98	2
4.	50	50
4,1.	98	2
6.	98	2

5. Výsledky a diskuze

Základní screening pro oba typy analytů byl proveden na 10 různých stacionárních fázích se 4 mobilními fázemi. Cílem prvotního screeningu bylo najít takovou stacionární fázi, která by poskytovala optimální selektivitu pro všechny analyty a porovnání separací na kolonách různých vlastností.

Analýzy v rámci screeningu proběhly na všech kolonách za stejných podmínek dle kapitoly 4.6. Výsledkem základního screeningu bylo pro každou skupinu analytů 40 chromatogramů. Vzhledem k velkému počtu vyhodnocovaných chromatogramů byly do této práce zařazeny především ty s nejlepšími výsledky.

Následná optimalizace metod pro separaci alkaloidů a fenolických látek zahrnovala kromě výběru nejvhodnější mobilní fáze (organických modifikátorů a aditiv) také nastavení dalších podmínek pro dosažení co nejvyšší selektivity a rozlišení mezi jednotlivými píky. Mezi tyto parametry patřilo nastavení počátečního a koncového složení mobilní fáze při gradientové eluci, tlak a teplota. Porovnáním nejlepších výsledků v rámci optimalizací vybraných kolon byly vybrány nejvhodnější podmínky pro analýzy obou skupin přírodních látek.

5.1. UHPSFC metoda pro alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae*

Cílem byla separace dvanácti alkaloidů lykorinového, homolykorinového, tazettinového, haemanthaminového a krininového typu, zejména izomerních analytů. Izomery mají stejný sumární vzorec, tedy i stejnou molekulovou hmotnost, což je klíčové při identifikaci látek pomocí hmotnostní spektrometrie.

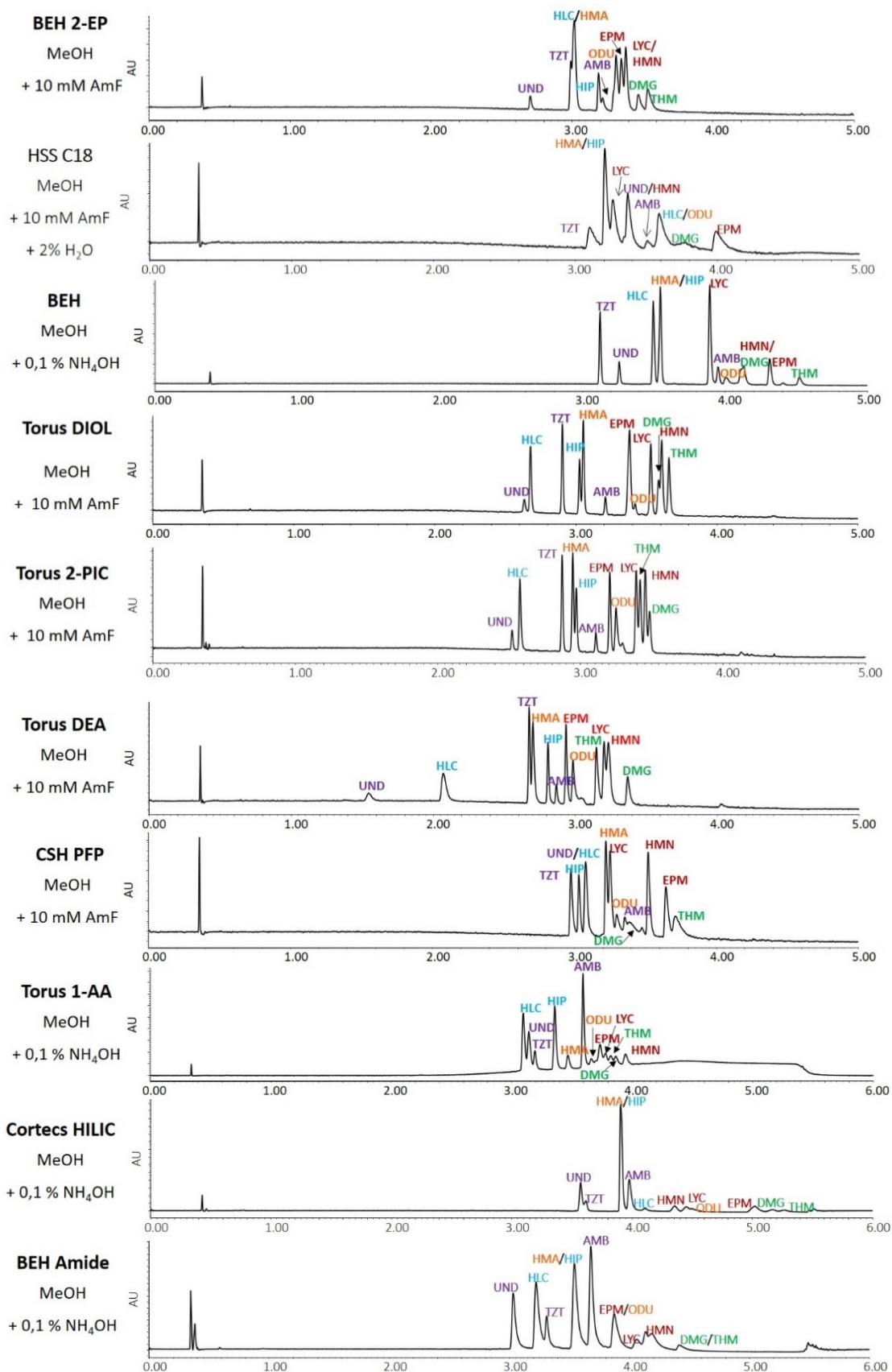
V chromatogramech jsou popisky jednotlivých identifikovaných píků alkaloidů ve zkratkách uvedených v kapitole 3.2.1. a barevně odlišeny dle molekulové hmotnosti následovně: **287,12: EPM**, **LYC**, **HMN** (červená), **301,13: HMA**, **ODU** (oranžová), **303,15: DMG**, **THM** (zelená), **315,15: HLC**, **HIP** (modrá), **331,14: AMB**, **TZT**, **UND** (fialová).

5.1.1. Výsledky základního screeningu stacionárních a mobilních fází pro separaci alkaloidů

Výsledky analýz se všemi stacionárními a mobilními fázemi jsou vyjádřeny počtem separovaných píků a eluovaných analytů v Tabulce 13. Na Obrázku 12 jsou uvedeny chromatogramy s nevhodnější mobilní fází pro každou kolonu.

Tabulka 13: Výsledky primárního screeningu pro UHPSFC analýzu alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae* vyjádřené počtem separovaných píků a eluovaných analytů.

	MeOH		MeOH + 0,1 % NH ₄ OH		MeOH + 10 mM AmF		MeOH + 10 mM AmF + 2 % H ₂ O	
	separované píky	eluované analyty	separované píky	eluované analyty	separované píky	eluované analyty	separované píky	eluované analyty
1. BEH 2-EP	9	12	9	12	10	12	9	12
2. HSS C18 SB	0	0	8	9	8	11	8	11
3. BEH	9	12	10	12	10	12	9	12
4. Torus DIOL	11	12	11	12	12	12	11	12
5. Torus 2-PIC	10	12	11	12	12	12	11	12
6. Torus DEA	12	12	12	12	12	12	12	12
7. CSH PFP	8	11	7	12	11	12	11	12
8. Torus 1-AA	7	12	12	12	10	12	10	12
9. Cortecs HILIC	4	6	11	12	8	12	10	12
10. BEH Amide	6	9	9	12	9	12	9	12



Obrázek 12: Chromatogramy nejlepších výsledků separací z primárního screeningu na jednotlivých stacionárních fázích pro UHPSFC analýzu alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae*. Chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.6.

BEH 2-EP

Z kolony BEH 2-EP se vždy eluovalo všech 12 analytů se všemi 4 mobilními fázemi (Tabulka 13). K nejlepší separaci na této koloně došlo s mobilní fází, kde byl jako aditivum použit 10 mM AmF s 10 alespoň částečně oddělenými alkaloidy (Obrázek 12). Schopnost separace izomerních analytů však nebyla na této koloně dostatečná – píky se stejnou molekulovou hmotností (EPM a LYC a HMN, THM a DMG) se eluovaly v blízkosti za sebou. Chromatografické podmínky na této koloně tedy nebyly dále optimalizovány.

HSS C18 SB

Na této koloně nedošlo se samotným MeOH bez aditiva k eluci žádných alkaloidů. Po přidání 0,1 % NH₄OH se jich eluovalo hned 9, oddělených jich bylo 8. S přidavkem 10 mM AmF a 10 mM AmF + 2 % H₂O bylo sice eluováno 11 alkaloidů, oddělených jich však bylo pouhých 8 (Obrázek 12). Tvar píků eluujících se z této kolony nebyl symetrický.

BEH

Na koloně BEH bylo eluováno 12 alkaloidů se všemi 4 mobilními fázemi, a navíc zde bylo dosaženo širšího retenčního okna než u BEH 2-EP, která je známá větší retencí bazických sloučenin. S aditivem 0,1 % NH₄OH (Obrázek 12) a 10 mM AmF se separovalo 10 analytů a díky tvaru píků se tato stacionární fáze stala vhodnou volbou pro další optimalizaci.

Torus DIOL

Nevýhodou u separací na Torus DIOL koloně bylo užší okno retenčních časů, a tudíž blízkost eluce alkaloidů se stejnou molekulovou hmotností (LYC, HMN). S aditivem 10 mM AmF (Obrázek 12) se částečně oddělilo všech 12 alkaloidů, v případě ostatních mobilních fází bylo separovaných látek 11. S každou mobilní fází se na DIOL koloně vždy eluoval plný počet alkaloidů. Podmínky na této koloně proto byly podrobeny další optimalizaci.

Torus 2-PIC

Kolona Torus 2-PIC dosahovala nejlepších separací s mobilní fází obsahující 10 mM AmF. Také na této koloně se eluovaly vždy všechny analyty, nicméně analýzy měly ještě užší retenční okno než v případě kolony Torus DIOL. Z důvodu nedostatečné separace

izomerů (LYC a HMN, THM a DMG) a blízké eluce jejich píků nebyly podmínky na koloně 2-PIC dále optimalizovány.

Torus DEA

Nejlepších separací v rámci screeningu bylo dosaženo na koloně Torus DEA, kde se částečně separovaly všechny alkaloidy. Nejvhodnější selektivita eluovaných analytů vzhledem k izomerním sloučeninám byla získána s mobilní fází obsahující 10 mM AmF (Obrázek 12). Tato kolona byla nejvhodnější také díky nejširšímu oknu retenčních časů, což bylo předpokladem k dostatečné selektivitě a oddělení všech izomerů.

CSH PFP

Z kolony CSH PFP se s přidavkem 10 mM AmF alespoň částečně separovalo 11 alkaloidů, nicméně píky byly chvostující a měly nesymetrický tvar (Obrázek 12). Se samotným methanolem se eluovaly chvostující široké píky a s přidavkem 0,1 % NH_4OH bylo výsledkem pouhých 7 oddělených analytů. Z těchto důvodů nebyla CSH PFP kolona vhodná k další optimalizaci chromatografických podmínek.

Torus 1-AA

Problémem u této kolony byl šum pozadí a nestálý průběh základní linie, a to hlavně u čistého MeOH. Nejlepší výsledek v rámci této stacionární fáze byl získán s 0,1 % NH_4OH , kdy se elovalo 12 píků a částečně separovalo 12 alkaloidů (Obrázek 12). Nevýhodou u této kolony je velmi úzké okno retenčních časů, s tím související horší selektivita a blízké eluce izomerů UND a TZT, EPM a LYC, THM a DMG.

Cortecs HILIC

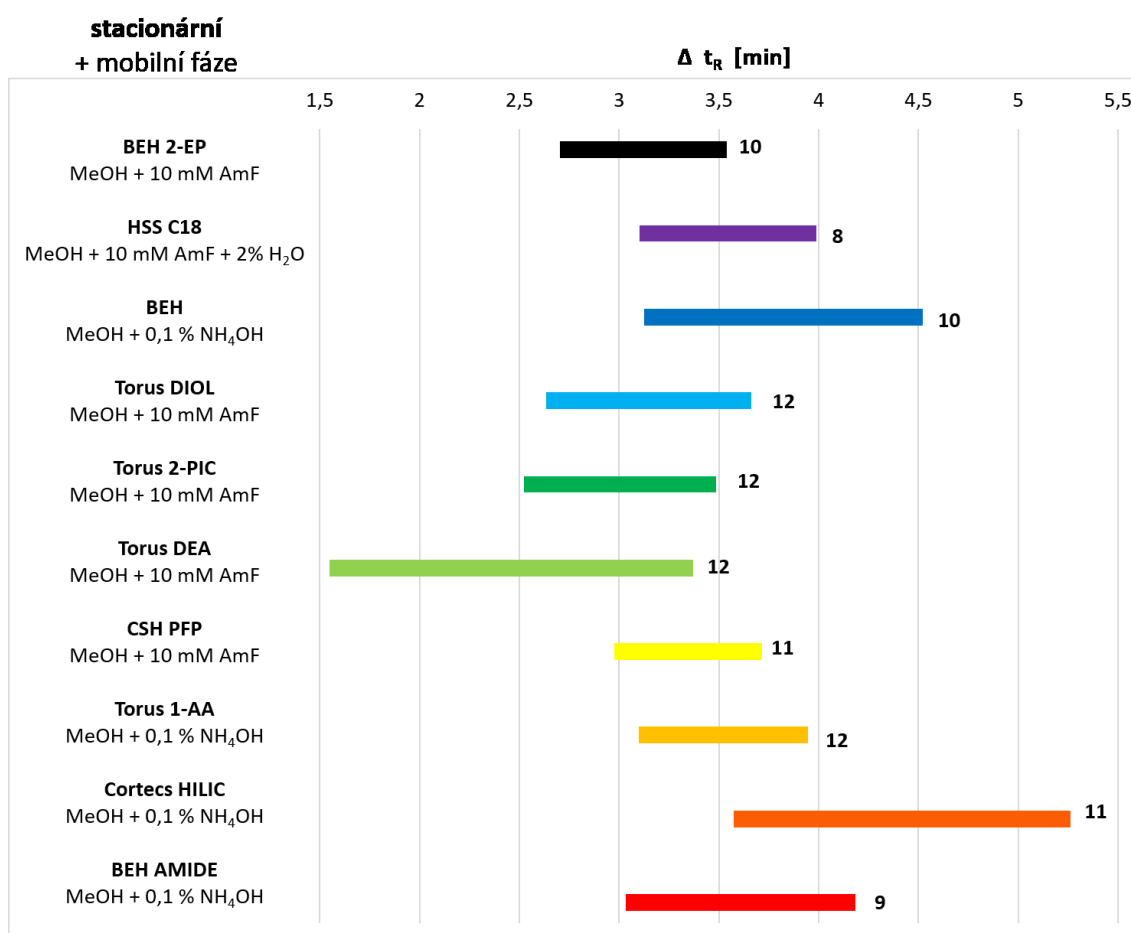
Na koloně HILIC se s výjimkou samotného MeOH elovalo s každou mobilní fází všech 12 alkaloidů. Na Obrázku 12 je ukázka chromatogramu s použitím aditiva 0,1 % NH_4OH . Docházelo zde k částečným koelucím izomerních analytů (UND a TZT, HMN a LYC, THM a DMG) a tvary píků byly asymetrické.

BEH Amide

Na koloně BEH Amide byl pozorován podobný trend jako na koloně Cortecs HILIC. S první mobilní fází (MeOH) nedosahoval tvar a počet píků dobrých výsledků. S aditivou byla

separace výrazně lepší. Výhodný byl zejména přídavek 0,1 % NH₄OH (Obrázek 12), nicméně kvůli chvostujícím píkům a blízké eluci izomerů (LYC a HMN, THM a DMG) nebyla ani tato kolona vybrána k optimalizaci podmínek.

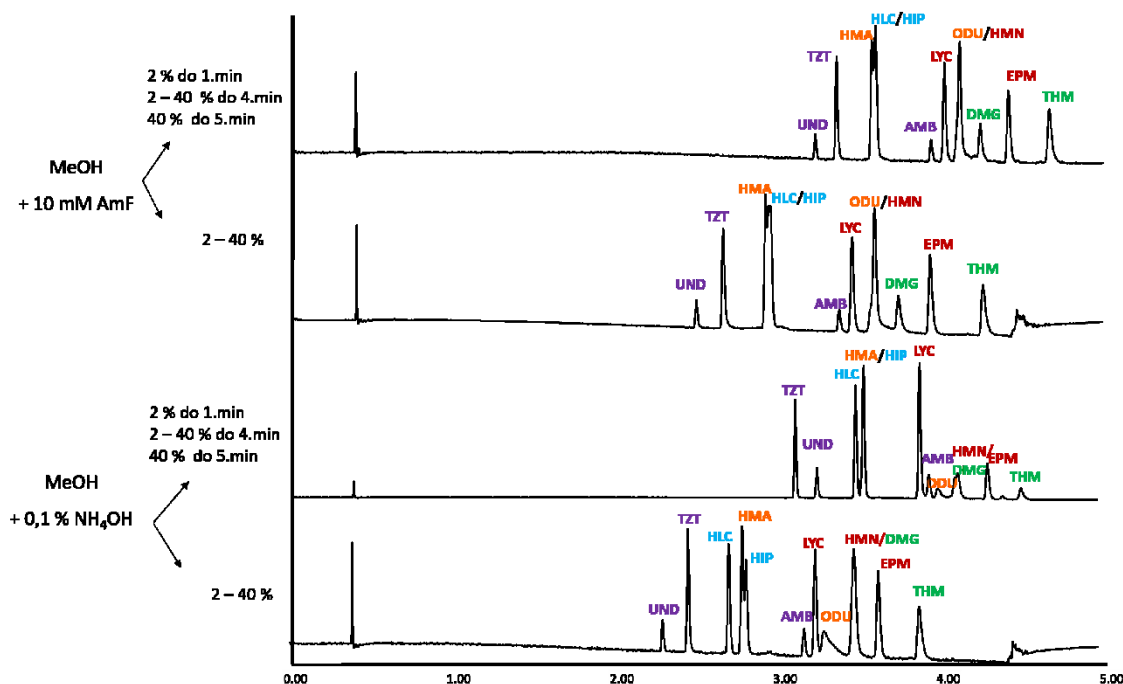
Eluce a zároveň separace všech 12 alkaloidů automaticky neznamena jistý výběr kolony k následující optimalizaci. Zřetel byl brán také na selektivitu, schopnost separace izomerů, tvar a symetrii píků a jejich oddělení na základní linii. Z tohoto důvodu nebyla vybrána například kolona Torus 2-PIC a Cortecs HILIC, přestože dosahovaly vysokého počtu částečně separovaných analytů. Pro získání přehledu o velikosti separačního okna byl zhotoven pruhový graf (Obrázek 13). Čísla za jednotlivými pruhy značí počet separovaných alkaloidů. Po pečlivém porovnání výsledků jednotlivých analýz těchto nejlepších kombinací stacionárních a mobilních fází byly vybrány tři zástupci s nejlepší selektivitou kolon pro následnou optimalizaci – kolony BEH, Torus DEA a Torus DIOL.



Obrázek 13: Velikost separačního okna dle retenčních časů eluovaných alkaloidů pro nejlepší separace základního screeningu na jednotlivých stacionárních fázích.

5.1.2. Optimalizace chromatografických podmínek na koloně BEH

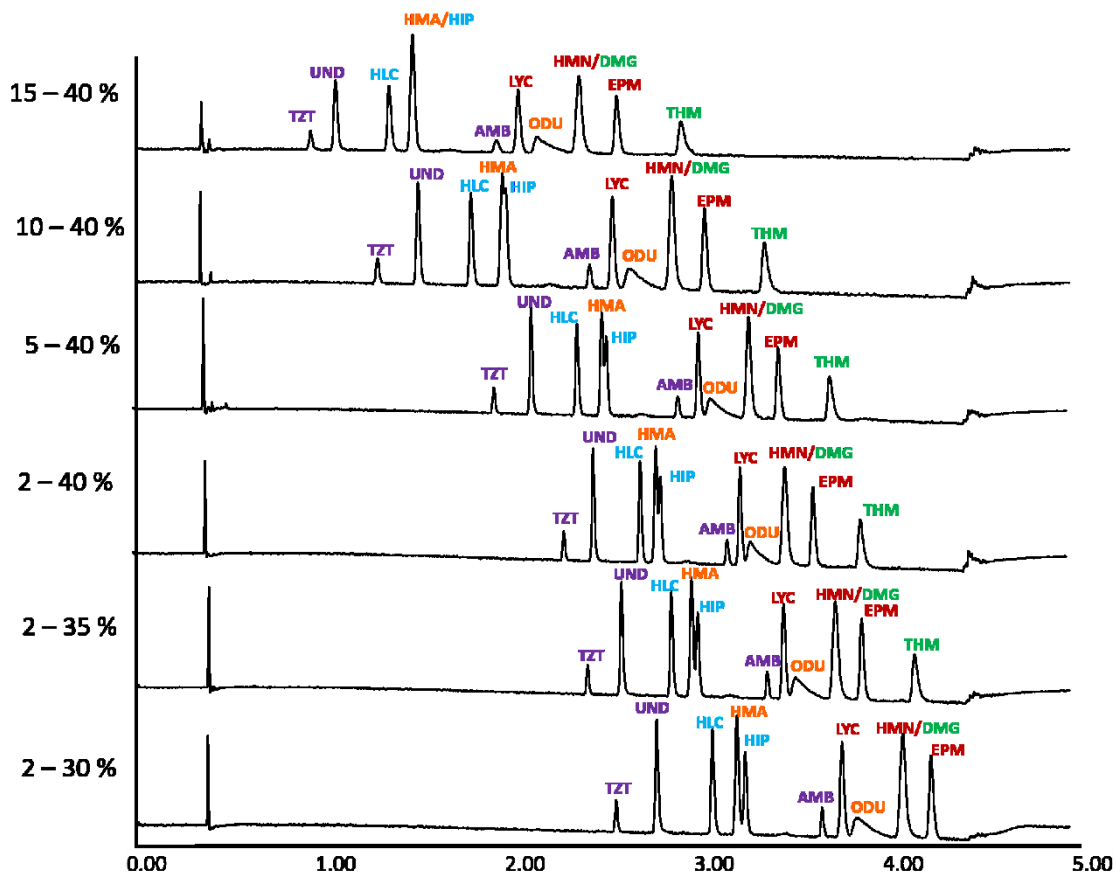
Prvním krokem při optimalizaci podmínek na koloně BEH byla volba aditiv mobilní fáze a optimalizace nastavení gradientové eluce. Jako nejlepší aditivum v primárním screeningu byl vybrán 0,1 % NH_4OH , druhým nejlepším byl 10 mM AmF. Změna nastavení gradientové eluce byla proto zkoušena s oběma aditivy. Na Obrázku 14 je uvedeno porovnání chromatogramů z primárního screeningu s chromatogramy s nově nastaveným gradientem. Tento gradient začínal složením 2 % a končil 40 % organického modifikátoru. Izokratické části byly oproti primárnímu screeningu odstraněny.



Obrázek 14: Chromatogramy UHPSFC separací na koloně BEH s mobilními fázemi $\text{CO}_2 + \text{MeOH} + 10 \text{ mM AmF}$ a $\text{CO}_2 + \text{MeOH} + 0,1 \text{ \% NH}_4\text{OH}$ porovnávající původní gradient použitý v základním screeningu a nově nastavený gradient od 2 – 40 %.

Vhodnější volbou i po úpravě gradientu byla z důvodu lepší selektivity mobilní fáze obsahující aditivum 0,1 % NH_4OH . S vynecháním izokratického kroku navíc došlo k alespoň částečnému oddělení dvou koeluovaných alkaloidů (HMA a HIP). Další optimalizace nastavení gradientové eluce se tedy týkala mobilní fáze s 0,1 % NH_4OH , kdy bylo postupně měněno složení mobilní fáze na počátku (2 %, 5 %, 10 % a 15 %) a na konci gradientu (30 %, 35 % a 40 %). Jak je vidět na Obrázku 15, nejvhodnější separace byla získána při složení od 2 – 30 %, kdy došlo k lepšímu rozlišení HMA a HIP a oddělilo se

nejvíce analytů. Při ostatních nastaveních gradientového programu docházelo ke koelucím píků.

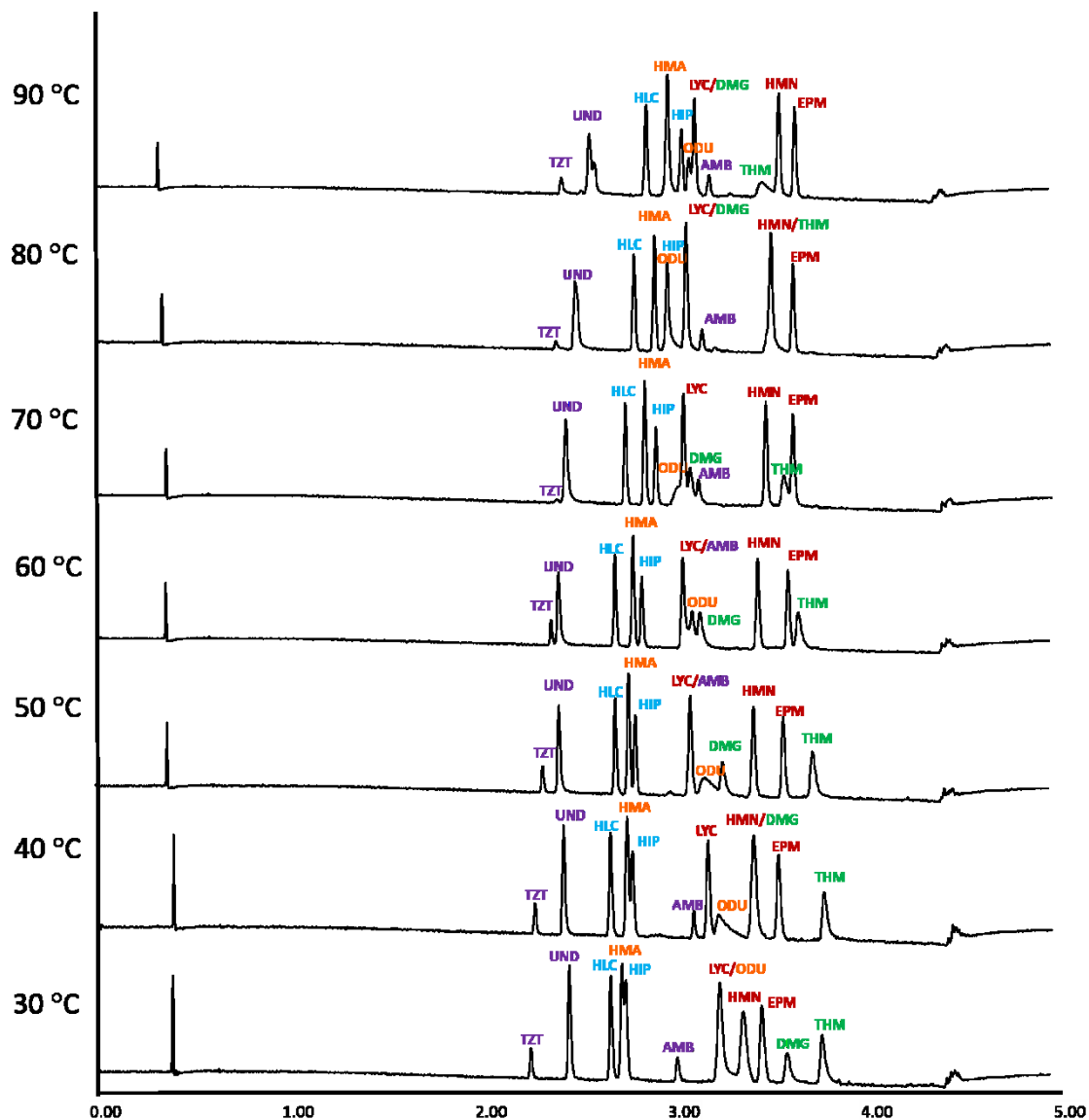


Obrázek 15: Chromatogramy UHPSFC separací na koloně BEH s mobilní fází $\text{CO}_2 + \text{MeOH} + 0,1\% \text{NH}_4\text{OH}$ porovnávající analýzy s různými gradienty mobilní fáze: 2 – 30 %, 2 – 35 %, 2 – 40 %, 5 – 40 %, 10 – 40 % a 15 – 40 %.

Schopnost separace izomerních párů byla dostačující, nicméně koelovaný pík HMN a DMG se oddělit nepodařilo.

Vliv BPR tlaku byl zkoumán směrem k vyšším i nižším hodnotám, ale změny se projevily pouze minimálním posunem retenčních časů. Z tohoto důvodu zde není uvedena ukázka chromatogramů se změněnými hodnotami tlaků. Na koloně BEH byly zkoušeny změny teplot 30 – 90 °C s nastaveným gradientem od 2 – 40 % (Obrázek 16). Nicméně změny k nižším i vyšším hodnotám způsobovaly částečné nebo úplné koeluce píků. Teploty nad 70 °C se projevily změnou selektivity – tedy jiným pořadím eluovaných alkaloidů (ODU, LYC, DMH, THM) a lepším rozlišením píků HMA a HIP. Změna teplot ale nepřinesla žádné

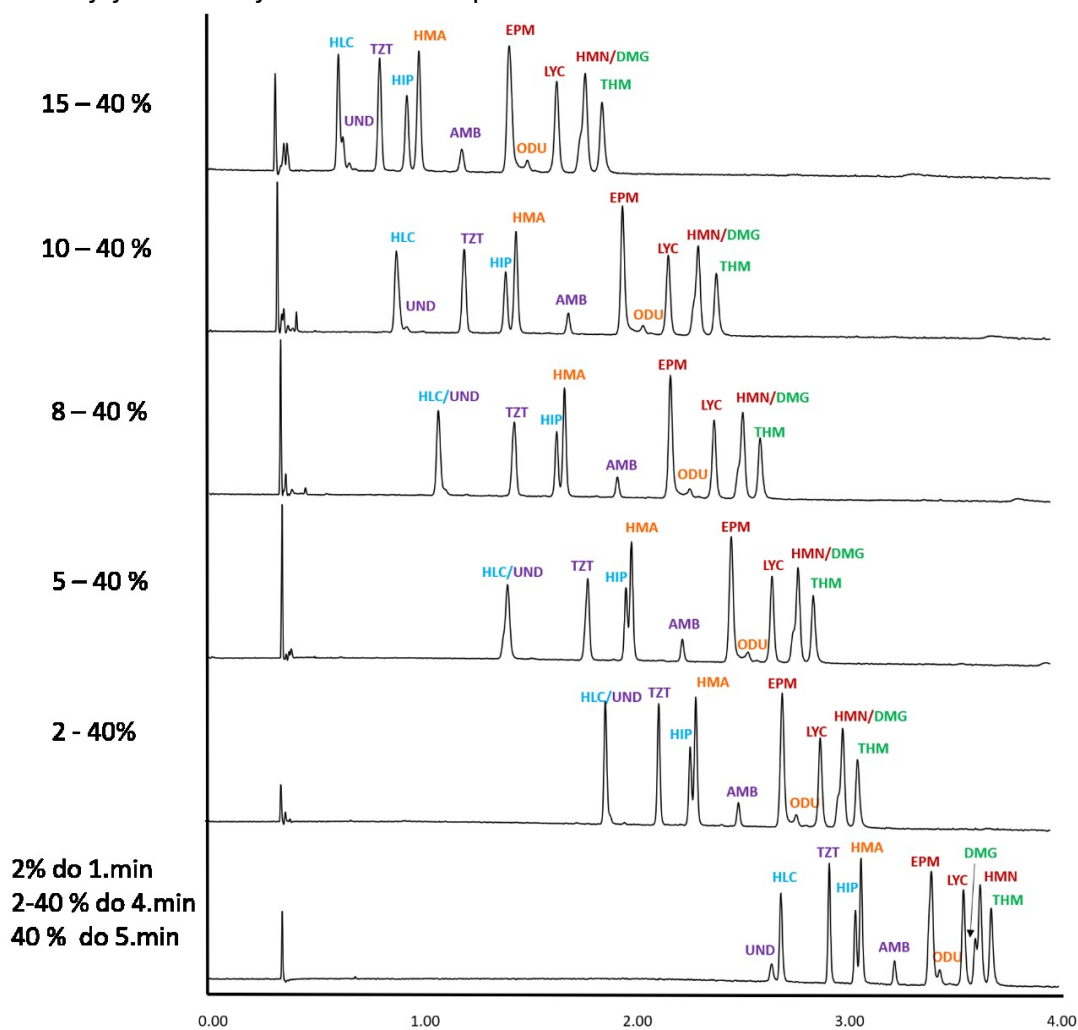
výhody vzhledem k pořadí eluovaných izomerů. Nejvhodnější byla původní teplota 40 °C.



Obrázek 16: Chromatogramy UHPSFC separací na koloně BEH s mobilní fází $\text{CO}_2 + \text{MeOH} + 0,1\% \text{NH}_4\text{OH}$, gradient 2 – 40 %, porovnávací analýzy s nastavenými teplotami: 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C a 90 °C.

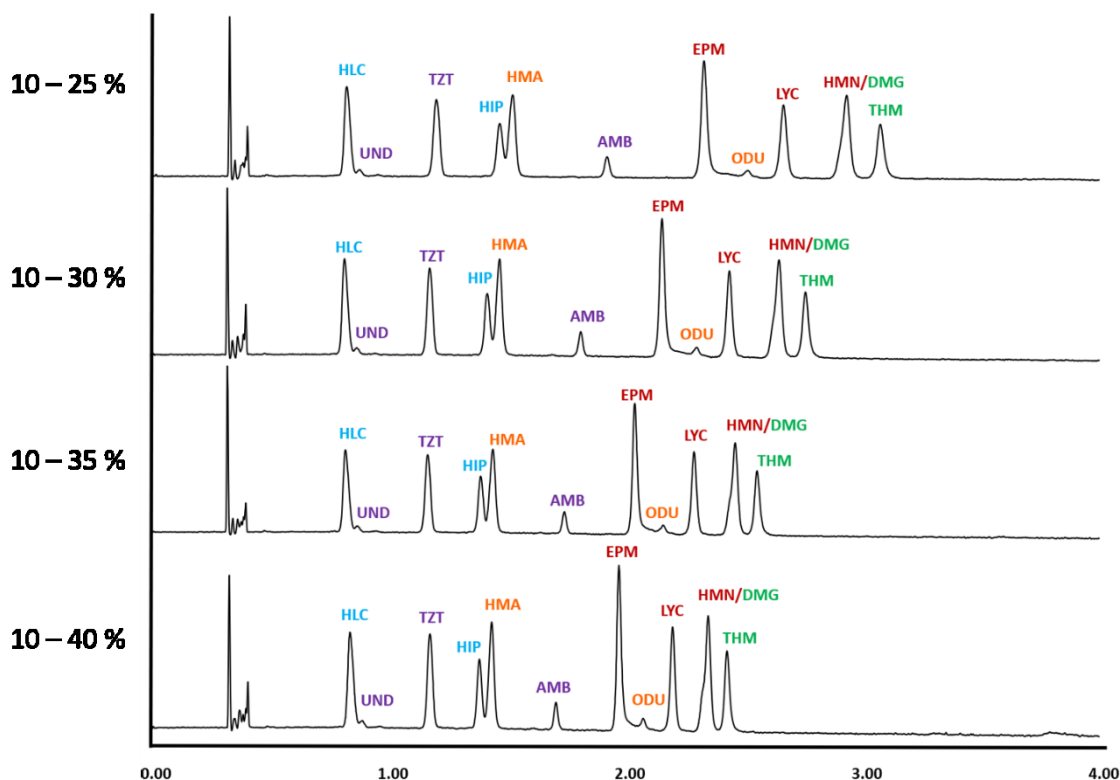
5.1.3. Optimalizace chromatografických podmínek na koloně Torus DIOL

Nejvhodnější mobilní fází pro kolonu DIOL byl MeOH s přidavkem aditiva 10 mM AmF, kdy se separovalo všech 12 alkaloidů (v případě dvojic DMG a HMN, HIP a HMA pouze částečně). Z pruhového grafu (Obrázek 13) uvedeného v kapitole 5.2.1. je evidentní úzké retenční okno eluovaných analytů. Výzvou pro optimalizaci podmínek na této koloně tak byla zejména separace analytů HMN a DMG. Obrázek 17 vystihuje zkoušené změny počátečního složení mobilní fáze: 2 %, 5 %, 8 %, 10 % a 15 % organického modifikátoru. S rostoucím obsahem organického modifikátoru na začátku gradientu lze pozorovat nejprve úplnou koeluci prvních dvou eluovaných analytů (UND a HLC) a později opačné pořadí v jejich eluci a jen částečnou separaci.



Obrázek 17: Chromatogramy UHPSFC separací na koloně Torus DIOL s mobilní fází $\text{CO}_2 + \text{MeOH} + 10 \text{ mM AmF}$ porovnávající analýzu ze základního screeningu s různými změnami gradientu mobilní fáze: 2 – 40 %, 5 – 40 %, 8 – 40 %, 10 – 40 % a 15 – 40 %.

S počátečním složením 10 % organického modifikátoru na začátku eluce bylo dále pracováno s cílem oddělit kritický pár HMN a DMG a zvětšit šířku separačního okna. Hodnoty konečného složení mobilní fáze byly nastaveny na 35 %, 30 % a 25 % organického modifikátoru (Obrázek 18). Nižší množství organického modifikátoru však způsobilo asymetričtější tvar píků a problém s koeluovanými alkaloidy HMN a DMG také nebyl vyřešen.



Obrázek 18: Chromatogramy UHPSFC separací na koloně Torus DIOL s mobilní fází $\text{CO}_2 + \text{MeOH} + 10 \text{ mM AmF}$ porovnávající gradienty 10 – 40 %, 10 – 35 %, 10 – 30 % a 10 – 25 %.

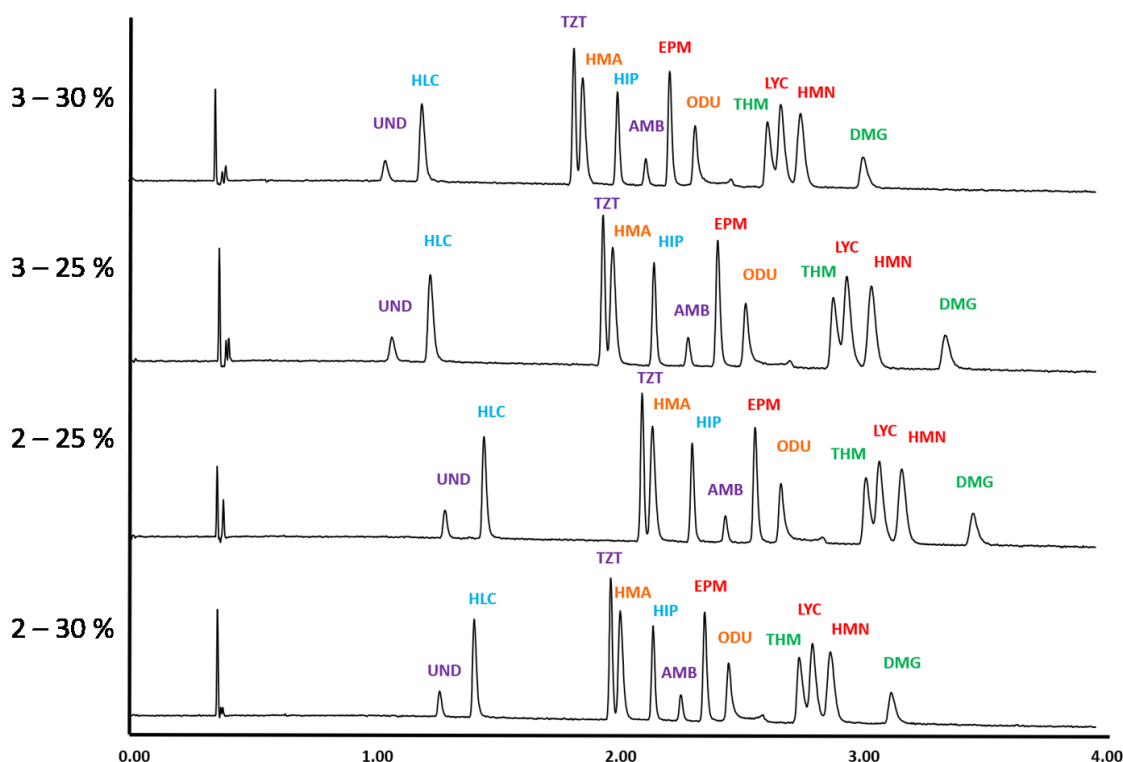
Stejně jako optimalizace složení mobilní fáze, ani změna tlaku a teploty nepřinesly výrazné zlepšení separace. Z důvodu již zmíněného úzkého rozmezí retenčních časů této analýzy i sebemenší rozdíly tlaků a teplot způsobily koeluci analytů. Blízkost retenčních časů HMN a DMG je rizikem v otázce robustnosti metody z důvodu možné koeluce.

S ostatními mobilními fázemi se separovalo 11 alkaloidů, nicméně zde byl opět problém úzkého retenčního okna. Se samotným MeOH docházelo k výraznému chvostování píků. Přídavek aditiva 0,1 % NH_4OH způsobil nesymetrický tvar eluovaných píků a přídavek 2 % H_2O k 10 mM AmF způsobil horší separaci.

5.1.4. Optimalizace chromatografických podmínek na koloně Torus DEA

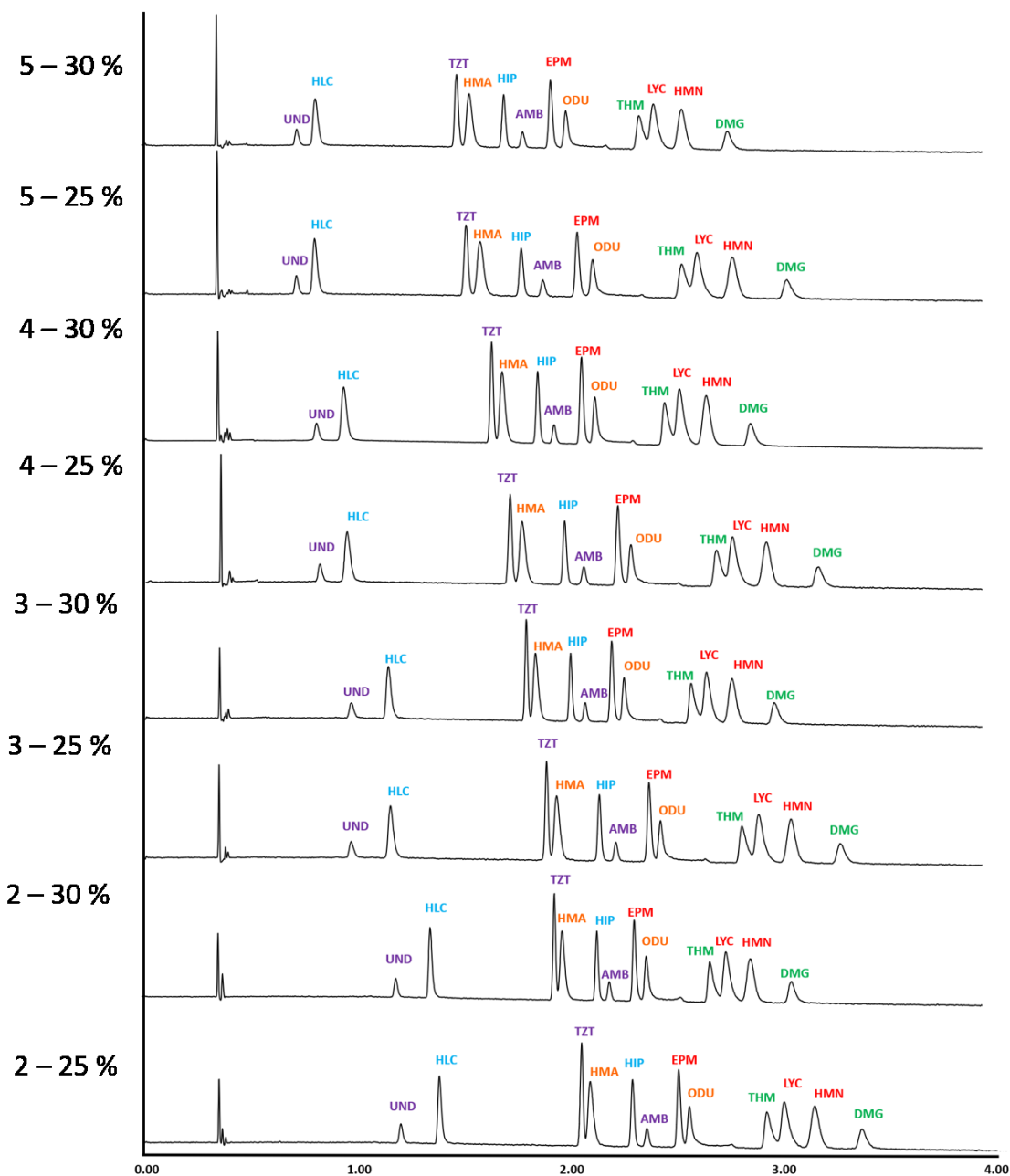
Z důvodu nejvýhodnějších separací ve smyslu selektivity a šířky retenčního okna eluovaných analytů se všemi mobilními fázemi v primárním screeningu, bylo v rámci optimalizace na koloně Torus DEA vyzkoušeno více organických modifikátorů i aditiv. S každou mobilní fází se elovalo a separovalo vždy všech 12 alkaloidů. Kritickým místem však byla blízká eluce izomerního páru LYC a HMN. Nejlepší selektivity bylo dosaženo s mobilní fází obsahující aditivum 10 mM AmF a také 0,1 % NH₄OH.

Změny nastavení gradientu byly aplikovány nejprve s aditivem 10 mM AmF. Na obrázku 19 je ukázka chromatogramů se zkušebními počátečními hodnotami 2 %, 3 % a konečným složením mobilní fáze s 25 % a 30 % organického modifikátoru. Nedostatkem byl malý rozdíl retenčních časů mezi izomerními alkaloidy LYC a HMN a tento trend se opakoval i při dalších zkušebních změnách v nastavení gradientu neuvedených v této práci.



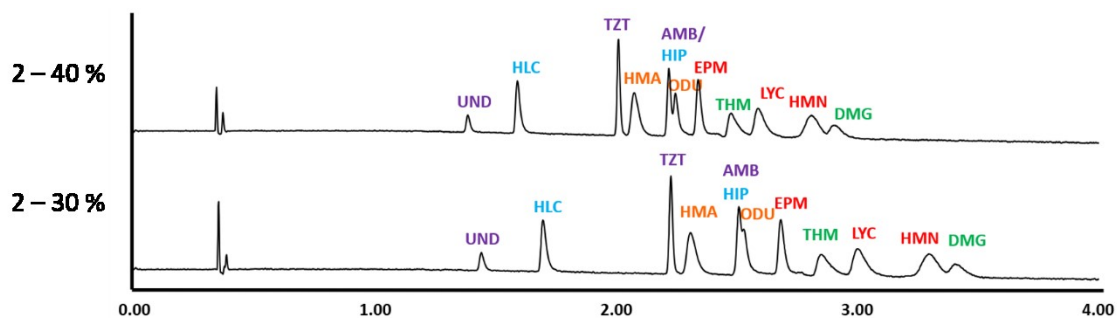
Obrázek 19: Chromatogramy UHPSFC separací na koloně Torus DEA s mobilní fází CO₂ + MeOH + 10 mM AmF porovnávající analýzy s různými gradienty mobilní fáze: 2 – 30 %, 2 – 25 %, 3 – 25 % a 3 – 30 %.

Poté byly aplikovány změny složení mobilní fáze obsahující aditivum 0,1 % NH₄OH. Na Obrázku 20 jsou uvedeny zkoušené počáteční hodnoty 2 %, 3 %, 4 % a 5 % a konečné nastavení gradientu s 25 % a 30 % organického modifikátoru a aditiva. Nejlepší schopnost separace izomerů byla s nastavením gradientů 4 – 25 %, 4 – 30 %, 5 – 25 % a 5 – 30 %.



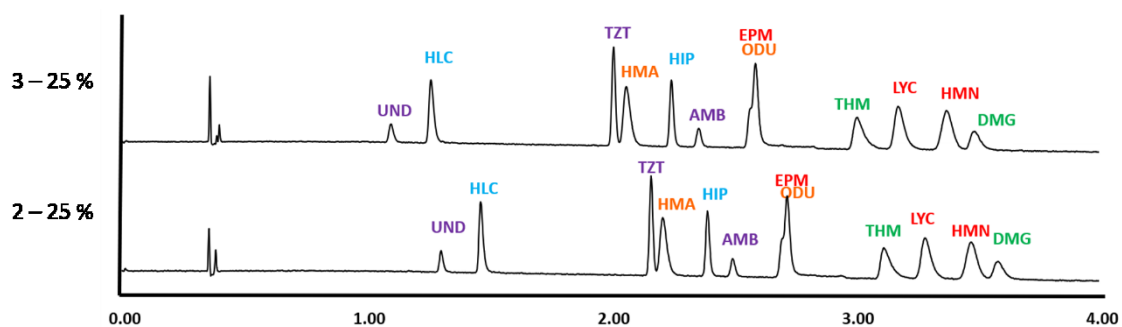
Obrázek 20: Chromatogramy UHPLC separací na koloně Torus DEA s mobilní fází CO₂ + MeOH + 0,1 % NH₄OH porovnávající analýzy s různými gradienty mobilní fáze: 2 – 25 %, 2 – 30 %, 3 – 25 %, 3 – 30 %, 4 – 25 %, 4 – 30 %, 5 – 25 % a 5 – 30 %.

Vzhledem k dobré selektivitě této kolony byla další analýza provedena také s organickým modifikátorem EtOH, který má nižší eluční sílu než MeOH, a aditivem 0,1 % NH₄OH. Výsledkem analýz s EtOH byly i přes relativně dobré oddělení analytů neostré, široké a asymetrické píky (Obrázek 21). EtOH nebyl jako organický modifikátor dále zkoušen.



Obrázek 21: Chromatogramy UHPSFC separací na koloně Torus DEA s mobilní fází CO₂ + EtOH + 0,1 % NH₄OH porovnávající analýzy s gradientem 2 – 30 % a 2 – 40 %.

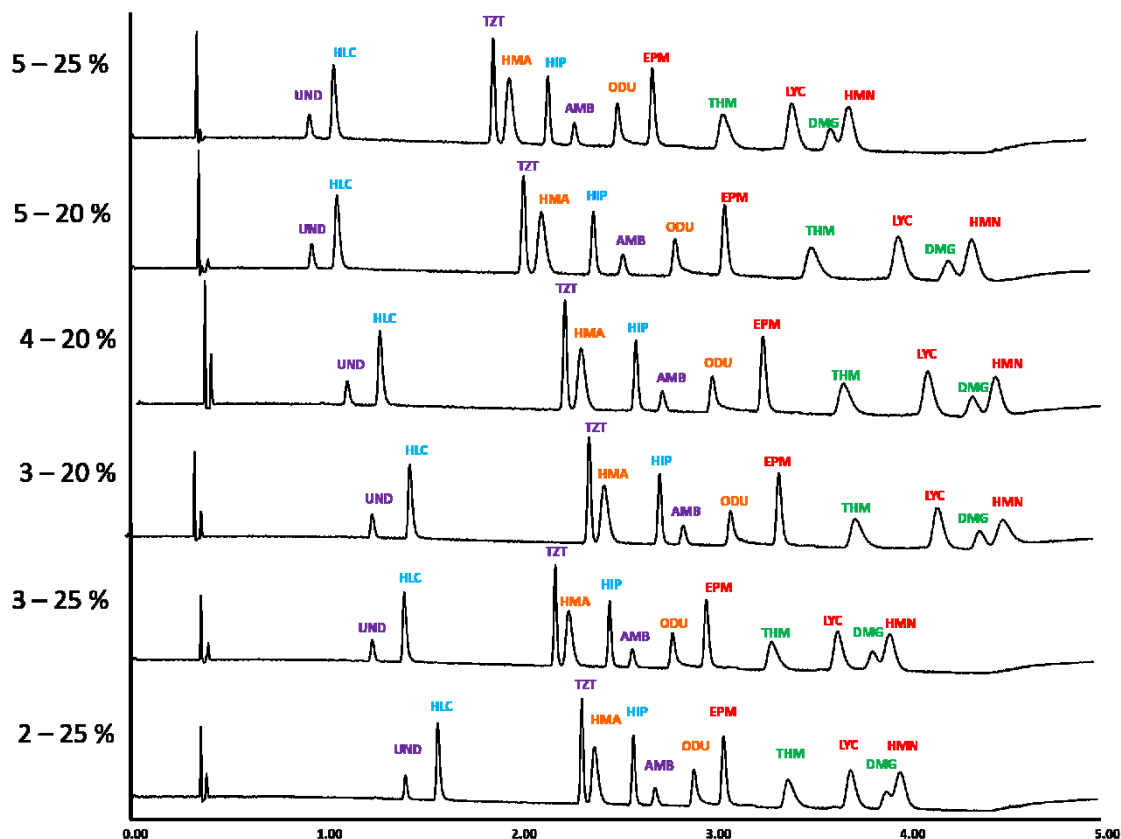
Dále byl testován přídavek acetonitrilu (ACN) jako organického modifikátoru. Mobilní fáze s obsahem MeOH/ACN (3:1) byla zkoušena s nastavením různých programů gradientové eluce, avšak u analýz docházelo ke koeluci píků EPM a ODU. S přídavkem ACN naopak došlo ke zlepšení rozlišení kritického páru LYC a HMN (Obrázek 22).



Obrázek 22: Chromatogramy UHPSFC separací na koloně Torus DEA s mobilní fází CO₂ + MeOH/ACN (3:1) + 0,1 % NH₄OH s gradienty mobilní fáze: 2 – 25 % a 3 – 25 %.

Chromatogramy s použitím mobilní fáze s obsahem MeOH/ACN (1:1) jsou uvedeny na Obrázku 23. Zde bylo nastaveno složení mobilní fáze od 2 %, 3 %, 4 % a 5 % a koncové složení na 20 % či 25 % organického modifikátoru. Analýza s gradientem od 4 % do 20 % poskytla nejlepší schopnost separace, podobně jako gradient od 5 % do 20 %, kdy došlo

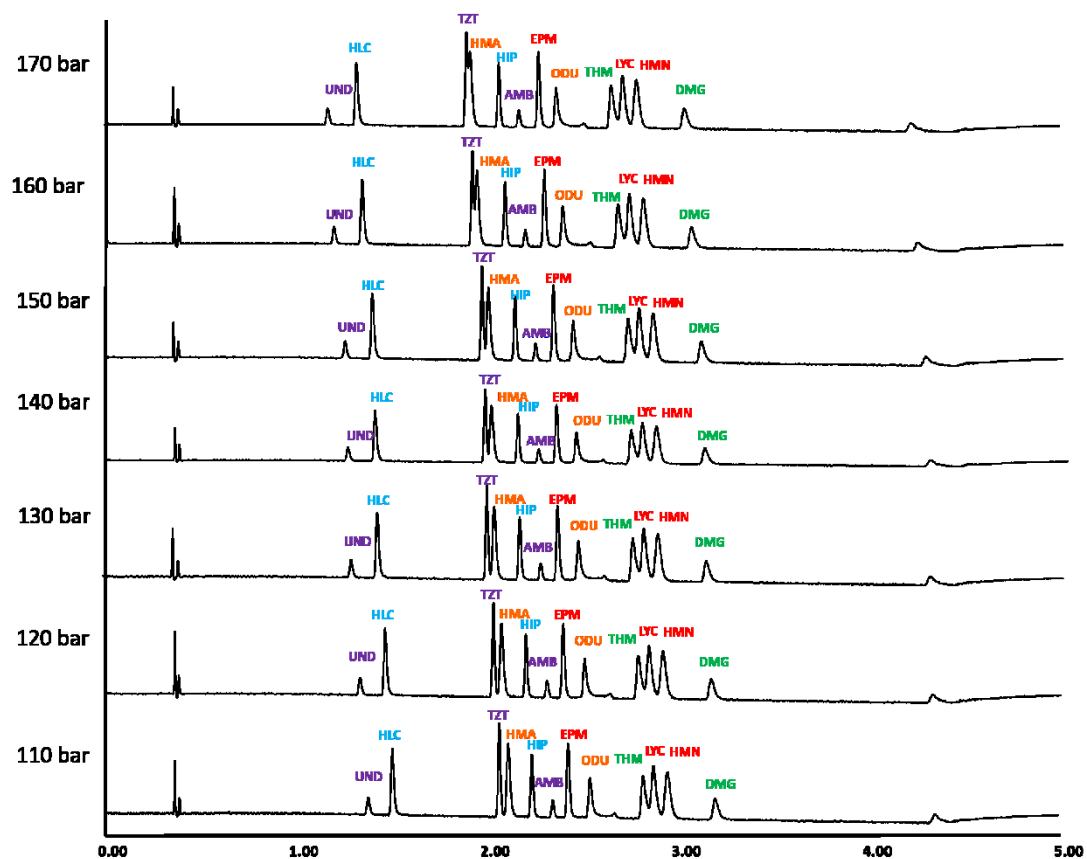
k rozdělení všech píků na základní linii. V tomto případě byl navíc splněn jeden z cílů optimalizace – alkaloidy se stejnou molekulovou hmotností nebyly eluovány v blízkosti.



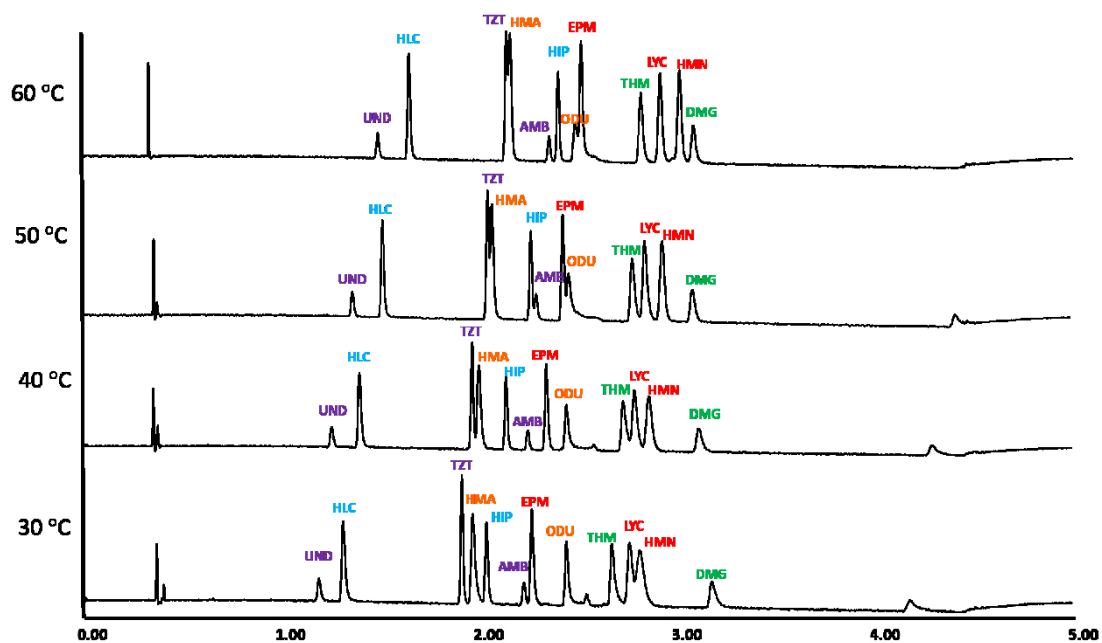
Obrázek 23: Chromatogramy UHPSFC separací na koloně Torus DEA s mobilní fází $\text{CO}_2 + \text{MeOH/ACN (1:1)} + 0,1\% \text{NH}_4\text{OH}$ porovnávající gradienty mobilní fáze: 2 – 25 %, 3 – 25 %, 3 – 20 %, 4 – 20 %, 5 – 20 % a 5 – 25 %.

Změny tlaku a teploty byly nastaveny na Torus DEA u analýz s mobilní fází s aditivem 0,1 % NH_4OH i 10 mM AmF. Stejně jako v předchozích experimentech, změnou BPR tlaku k nižším hodnotám (130 bar, 120 bar a 110 bar) nedošlo k výrazným změnám v separaci. U chromatogramů s vyšší hodnotou tlaků (160 bar a 170 bar) je patrné snížení retenčních časů, ale také nežádoucí koeluce píků – TZT a HMA (Obrázek 24).

Výrobce Torus kolon dovoluje pro analýzy použít maximální teplotu na 60 °C (Obrázek 25). U nižší teploty (30 °C) oproti výchozím 40 °C došlo k lepšímu oddělení píků TZT a HMA, ale naopak píky eluované ke konci analýzy (LYC a HMN) se začaly smývat. U teplot 50 °C a 60 °C nastala horší separace píků analytů TZT, HMA, ODU a EPM.



Obrázek 24: Chromatogramy UHPSFC separací na koloně Torus DEA s mobilní fází $\text{CO}_2 + \text{MeOH} + 10 \text{ mM AmF}$ porovnávající analýzy s různými hodnotami BPR tlaku: 110 bar, 120 bar, 130 bar, 140 bar, 150 bar, 160 bar a 170 bar.



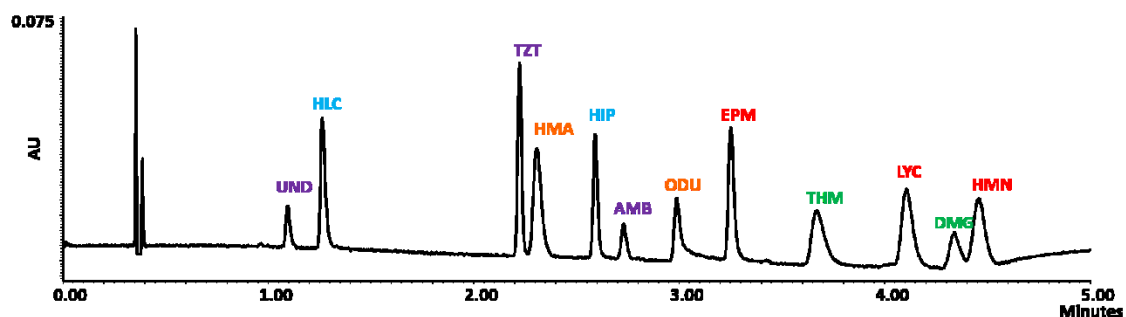
Obrázek 25: Chromatogramy UHPSFC separací na koloně Torus DEA s mobilní fází $\text{CO}_2 + \text{MeOH} + 10 \text{ mM AmF}$ porovnávající analýzy s různými hodnotami teplot: 30 °C, 40 °C, 50 °C a 60 °C.

5.1.5. Optimalizované chromatografické podmínky pro UHPSFC separaci alkaloidů

Jako nejvhodnější pro separaci alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae* byla vybrána kolona Torus DEA. Po optimalizaci chromatografických podmínek (Tabulka 14) bylo dosaženo vhodné selektivity separace a symetrických píků většiny izomerních sloučenin do 5 minut. Chromatogram separace je uveden na Obrázku 26.

Tabulka 14: Optimalizované chromatografické podmínky pro separaci alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae*.

Chromatografické podmínky	
analytická kolona	Torus DEA (100,0 x 3,0 mm, 1,7 μ m)
mobilní fáze	CO ₂ + MeOH/ACN (1:1) + 0,1 % NH ₄ OH
průtok	1,5 ml/min
dávkovaný objem	2 μ l v rozpouštědle ACN
teplota	40 °C
tlak	140 bar / 2031 psi
gradient	4 – 20 % do 4. minuty
UV detekce	290 nm
MS detekce	MS sken v ESI ⁺ módu, 60 – 500 Da



Obrázek 26: Chromatogram UHPSFC analýzy 12 vybraných alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae* na koloně Torus DEA s mobilní fází CO₂ + MeOH/ACN (1:1) + 0,1 % NH₄OH.

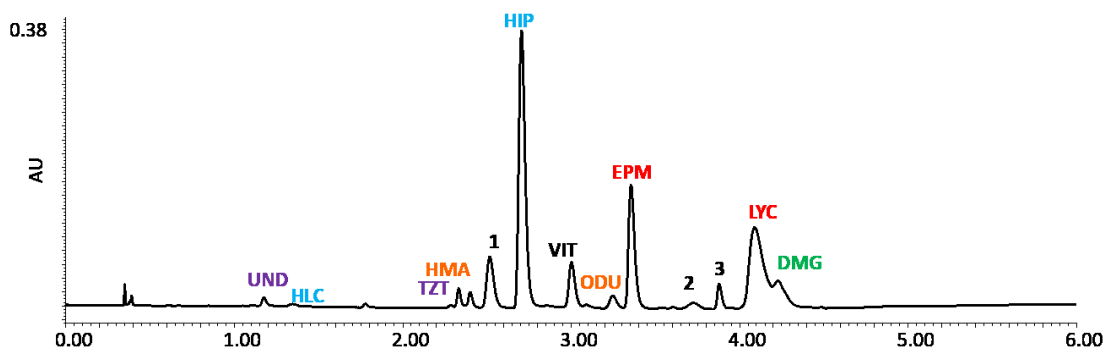
Vhodnost chromatografického systému byla potvrzena zjištěním několika parametrů testu způsobilosti systému, konkrétně: průměrný retenční čas, retenční (kapacitní) faktor, rozlišení, faktor symetrie a šířka píku v polovině výšky (Tabulka 15). Požadavek na rozlišení > 1,5 nebyl splněn pouze v jednom případě, mezi analyty DMG a HMN. Dle naměřených faktorů symetrie byl problematický analyt ODU.

Tabulka 15: Výsledky sledovaných parametrů testu způsobilosti systému pro analýzu alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae* za optimalizovaných podmínek.

ANALYT	PRŮMĚRNÝ RETENČNÍ ČAS (t_R)	RETENČNÍ (KAPACITNÍ) FAKTOR (k)	ROZLIŠENÍ (R_s)	FAKTOR SYMETRIE (A_s)	ŠÍŘKA PÍKU V POLOVINĚ VÝŠKY (w_{50})
UND	1,093	1,7325		1,14	0,02
HLC	1,262	2,1550	4,27	1,48	0,02
TZT	2,222	4,5550	25,04	1,12	0,02
HMA	2,305	4,7625	1,54	1,34	0,04
HIP	2,590	5,4750	5,07	1,20	0,02
AMB	2,728	5,8200	3,21	1,10	0,03
ODU	2,986	6,4650	5,21	1,94	0,03
EPM	3,250	7,1250	5,19	1,34	0,03
THM	3,669	8,1725	5,16	1,36	0,07
LYC	4,105	9,2625	4,15	1,26	0,06
DMG	4,338	9,8450	2,44	0,97	0,06
HMN	4,456	10,1400	1,17	1,20	0,06

5.1.6. Analýza extraktu z rostliny *Zephyranthes citrina*

Po vyvinutí metody byl analyzován rostlinný extrakt, u kterého byl předpokládán obsah většiny alkaloidů analyzovaných v rámci optimalizace metody (Obrázek 27). Konkrétně se jednalo o extrakt z rostliny *Zephyranthes citrina* čeledi *Amaryllidaceae* dodaný z Katedry farmaceutické botaniky. Dodatečně byla provedena analýza se dvěma dalšími standardy alkaloidů – vitattin (VIT) a haemanthidin (HTD). Zjištěné retenční časy těchto látek byly využity k identifikaci dalších alkaloidů v extraktu.



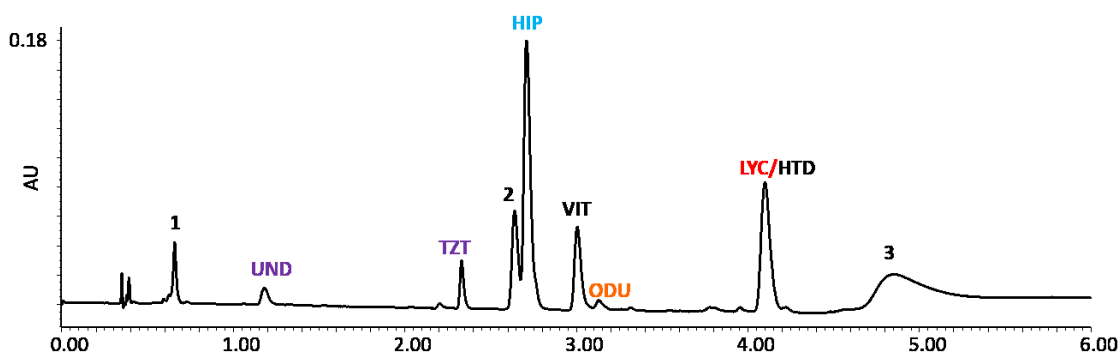
Obrázek 27: Chromatogram UHPSFC analýzy alkaloidů v extraktu z rostliny *Zephyranthes citrina* čeledi *Amaryllidaceae* na koloně Torus DEA s mobilní fází CO_2 + MeOH/ACN (1:1) + 0,1 % NH_4OH . Chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 5.1.5.

V extraktu byly identifikovány alkaloidy undulatin, homolykorin, tazettin, haemanthamin, hippeastrin, vitattin, odulin, epimaritidin, lykorin a 9-O-demethylgalanthin. Nepojmenované píky patří látkám s molekulovou hmotností 317 (pík 1), 333 (pík 2) a 305 (pík 3), které se zatím nepodařilo identifikovat.

5.1.7. Analýza extraktu z rostliny *Hippeastrum cv. Double King*

Optimalizované podmínky UHPSFC metody byly aplikovány i na druhý rostlinný extrakt dodaný z Katedry farmaceutické botaniky. Jednalo se o extrakt z rostliny *Hippeastrum cv. Double King*.

V rostlinném extraktu *Hippeastrum cv. Double King* byly identifikovány alkaloidy undulatin, tazettin, hippeastrin, vittatin, odulin, lycorin a haemanthidin (Obrázek 28). Nepojmenované píky patří látkám s molekulovou hmotností 331 (pík 1), 301 (pík 2) a 287 (pík 3), které se zatím nepodařilo identifikovat.



Obrázek 28: Chromatogram UHPSFC analýzy alkaloidů v extraktu z rostliny *Hippeastrum cv. Double King* čeledi *Amaryllidaceae* na koloně Torus DEA s mobilní fází CO₂ + MeOH/ACN (1:1) + 0,1 % NH₄OH. Chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 5.1.5.

5.2. UHPSFC metoda pro fenolické látky

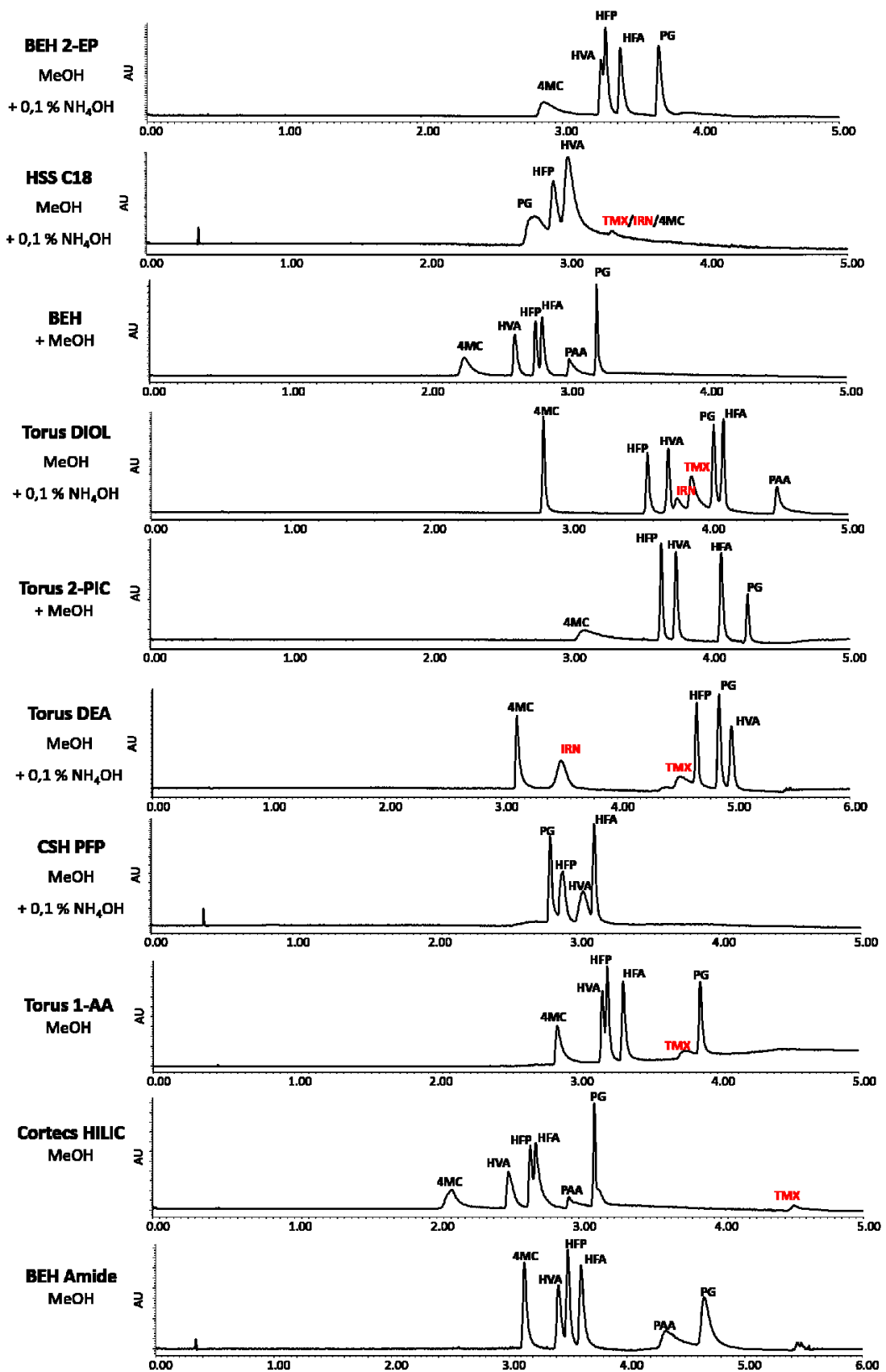
V případě fenolických látek byl z důvodu různorodosti chemických struktur a odlišnosti fyzikálně-chemických vlastností řešen problém jejich separace a zejména eluce v rámci jedné analýzy. V chromatogramech jsou popisky jednotlivých identifikovaných píků fenolických látek ve zkratkách uvedených v kapitole 3.2.3. Flavonoidní struktury jsou odlišeny červenou barvou, fenolické kyseliny černou.

5.2.1. Výsledky základního screeningu stacionárních a mobilních fází pro separaci fenolických látek

Výsledky analýz se všemi stacionárními a mobilními fázemi jsou vyjádřeny počtem separovaných píků a eluovaných analytů v Tabulce 16. Na Obrázku 29 jsou uvedeny chromatogramy s nejvhodnější mobilní fází pro každou kolonu.

Tabulka 16: Výsledky primárního screeningu pro UHPSFC analýzu fenolických látek vyjádřené počtem separovaných píků a eluovaných analytů.

	MeOH		MeOH + 0,1 % NH ₄ OH		MeOH + 10 mM AmF		MeOH + 10 mM AmF + 2 % H ₂ O	
	separované píky	eluované analyty	separované píky	eluované analyty	separované píky	eluované analyty	separované píky	eluované analyty
1. BEH 2-EP	5	5	5	5	5	5	5	5
2. HSS C18 SB	2	2	4	6	2	2	2	2
3. BEH	6	6	6	6	5	6	6	6
4. Torus DIOL	8	8	8	8	8	8	8	8
5. Torus 2-PIC	5	5	5	5	5	5	5	5
6. Torus DEA	6	6	6	6	5	5	5	5
7. CSH PFP	4	4	4	4	2	2	2	2
8. Torus 1-AA	6	6	5	5	5	5	5	5
9. Cortecs HILIC	7	7	5	5	5	5	4	4
10. BEH Amide	6	6	5	5	6	6	6	6



Obrázek 29: Chromatogramy nejlepších výsledků separací z primárního screeningu na jednotlivých stacionárních fázích pro UHPSFC analýzu fenolických látek. Chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.6.

BEH 2-EP

Kolona BEH 2-EP poskytla s každou mobilní fází pouze 5 eluovaných i separovaných analytů. Vždy se jednalo o fenolické kyseliny. Nejlepší separace bylo dosaženo s přidavkem 0,1 % NH₄OH (Obrázek 29), avšak docházelo k výraznému chvostování píku 4MC. Eluované fenolické kyseliny i jejich pořadí bylo u všech mobilních fází stejné. Podmínky na koloně BEH 2-EP nebyly dále optimalizovány.

HSS C18 SB

Na této nepolární stacionární fázi byly získány nejhorší výsledky separace fenolických látek v rámci celého základního screeningu. Mobilní fáze s přidavkem aditiva 10 mM AmF a také 10 mM AmF + 2 % H₂O vedly k eluci pouze 2 fenolických kyselin. S přidavkem 0,1 % NH₄OH se separovaly 4 analyty a 6 látek se z kolony elovalo (Obrázek 29). Pomocí QDa detektoru byla identifikována i eluce 2 flavonoidních struktur. Tvary píků elujících se z této kolony byly výrazně asymetrické.

BEH

Na koloně BEH se elovalo všech 6 zástupců fenolických kyselin. Se samotným MeOH bez aditiva byly získány mírně chvostující, ale nejlépe oddělené píky (Obrázek 29). Aditiva mobilních fází zejména měnila pořadí eluovaných fenolických kyselin. Přídavek 0,1 % NH₄OH pomohl eluci IRN, přídavek 10 mM AmF přispěl k eluci TMX, ale jeho odezva na detektoru byla oproti intenzitám ostatních analytů zanedbatelná.

Torus DIOL

S výsledkem 8 eluovaných i 8 alespoň částečně separovaných fenolických látek se všemi typy mobilních fází (Tabulka 14) byla kolona Torus DIOL stěžejním předmětem následující optimalizace. Kromě 6 fenolických kyselin se zde navíc elovaly a separovaly izomery IRN a TMX. Selektivita, tvar píků i šířka separačního okna byly řazeny k nejlepším v rámci primárního screeningu.

Torus 2-PIC

Použitím kolony Torus 2-PIC bylo dosaženo eluce pouhé poloviny výchozích analytů. Výsledkem zde byl symetrický tvar píků u látek HFP, HVA, HFA a PG s mobilní fází

obsahující MeOH bez aditiva (Obrázek 29) a také s přidavkem aditiva 0,1 % NH₄OH. Docházelo však k výraznému chvostování píku 4MC. Z kolony Torus 2-PIC se eluovaly pouze fenolické kyseliny. Z důvodu eluce malé části analytů nebyly podmínky na této koloně podrobeny další optimalizaci.

Torus DEA

Tato kolona poskytovala nejširší okno retenčních časů separovaných analytů, stejně jako v případě alkaloidů. 6 eluovaných a zároveň oddělených látek bylo dosaženo s mobilní fází obsahující MeOH bez aditiva a také s přidavkem 0,1 % NH₄OH (Obrázek 29). Z kolony DEA se eluovaly dvě flavonoidní struktury, nicméně výsledkem byly asymetrické tvary píků, proto podmínky na této koloně nebyly podrobeny další optimalizaci.

CSH PFP

Kolona CSH PFP nebyla pro fenolické analyty dostatečně selektivní. Z kolony se eluovaly pouze 4 analyty, jejichž píky navíc byly chvostující a z části koeluované (Obrázek 29). Důvodem horší separace zde byla přílišná polarita a povaha velmi slabých a slabých kyselin fenolických látek. Podmínky na koloně CSH PFP nebyly dále optimalizovány.

Torus 1-AA

U kolony 1-AA se elovalo vždy 5 fenolických látek a s mobilní fází obsahující organický modifikátor MeOH bez aditiva (Obrázek 29) se eloval 1 analyt flavonoidní struktury – TMX. Po přidavku aditiv se výrazně projevoval nestálý průběh základní linie a šum pozadí. Tvar píků 4MC a flavonoidní struktury TMX byly nesymetrické. Kolona Torus 1-AA nebyla vhodná k optimalizaci podmínek.

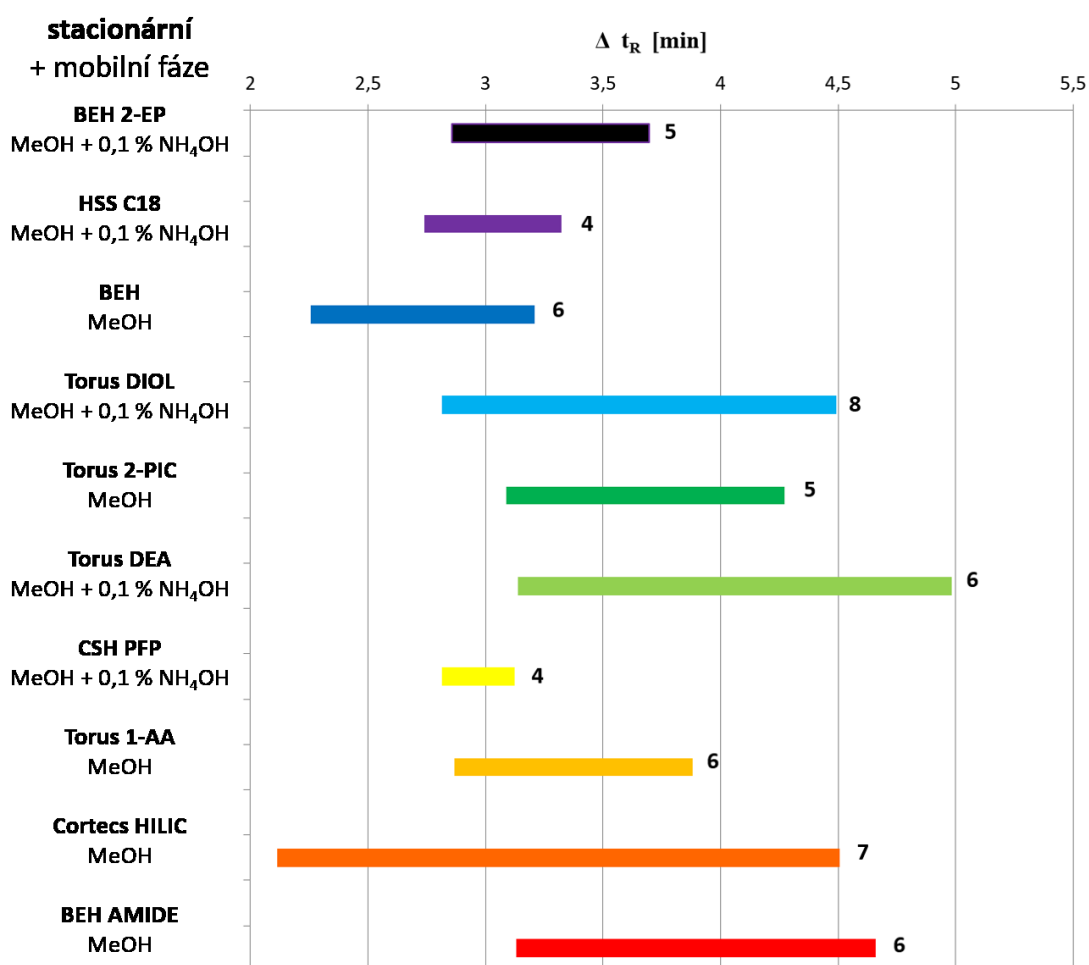
Cortecs HILIC

Nejlepšího výsledku na HILIC koloně bylo dosaženo s MeOH bez aditiva, kdy se elovalo 6 fenolických kyselin a TMX – zástupce flavonoidní struktury. Z důvodu chvostování píků, jejich koelucí a nedostatečného oddělení píků po přidavku aditiv nebyly podmínky na této koloně dále optimalizovány.

BEH Amide

Navzdory časově delším analýzám se také u kolony BEH Amide osvědčily mobilní fáze s MeOH bez aditiva (Obrázek 29) a MeOH + 0,1 % NH₄OH. Široké okno retenčních časů a eluce 6 fenolických kyselin byly důvody pro další optimalizaci podmínek na této koloně, přestože nedošlo k eluci flavonoidních struktur.

Pro vybrané kombinace stacionárních a mobilních fází byl zhotoven pruhový graf (Obrázek 30), ukazující velikost separačního okna. Čísla za jednotlivými pruhy definují počet separovaných fenolických látek.

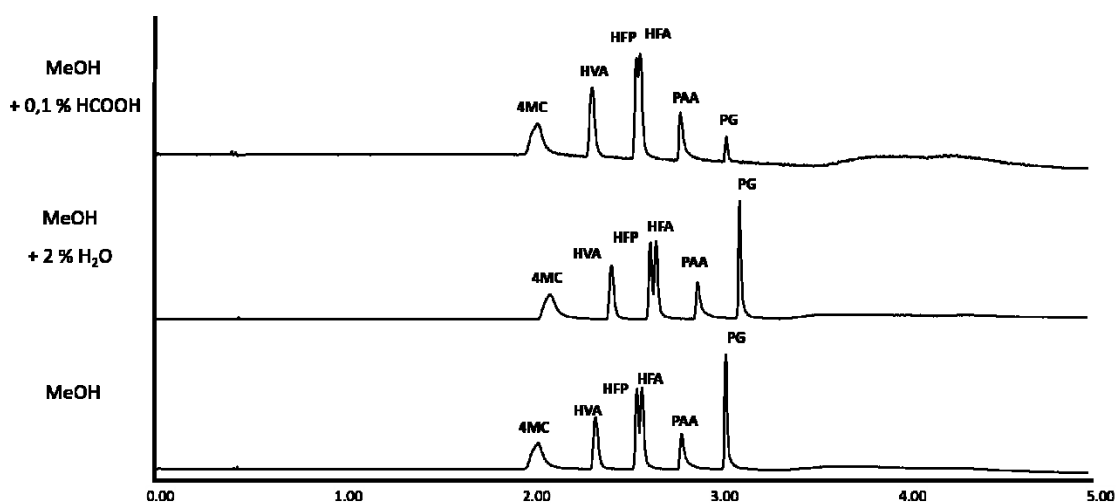


Obrázek 30: Velikost separačního okna dle retenčních časů eluovaných fenolických látek pro nejlepší separace základního screeningu na jednotlivých stacionárních fázích.

Porovnáním separací byly vybrány tři stacionární fáze s nejlepší selektivitou fenolických látek pro následnou optimalizaci. Byly to kolony BEH, Torus DIOL a BEH Amide.

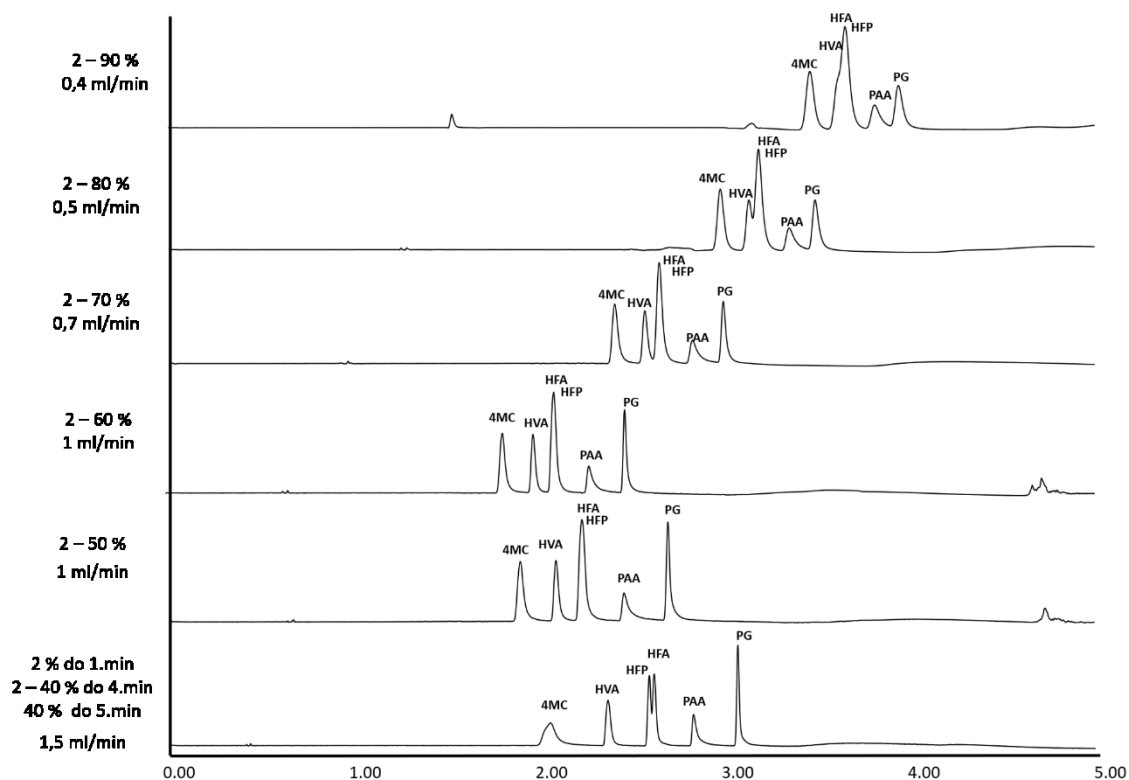
5.2.2. Optimalizace chromatografických podmínek na koloně BEH

Vzhledem k fyzikálně-chemickým vlastnostem fenolických analytů (slabé nebo velmi slabé kyseliny a polární charakter) byla při optimalizaci chromatografických podmínek testována také aditiva kyselé povahy a přídavek vody. Na Obrázku 31 jsou uvedeny chromatogramy porovnávající výchozí podmínky s mobilní fází MeOH bez aditiva a chromatogramy po přidavku 2 % H₂O a 0,1 % HCOOH. Předpoklad, že přídavek kyselého aditiva 0,1 % HCOOH zlepší eluci a selektivitu separace analytů, se nepotvrdil. Žádné aditivum k lepšímu oddělení píků nepřispělo, naopak došlo k výraznější koeluci píků HFP a HFA. K eluci flavonoidních struktur nedošlo na koloně BEH vůbec.



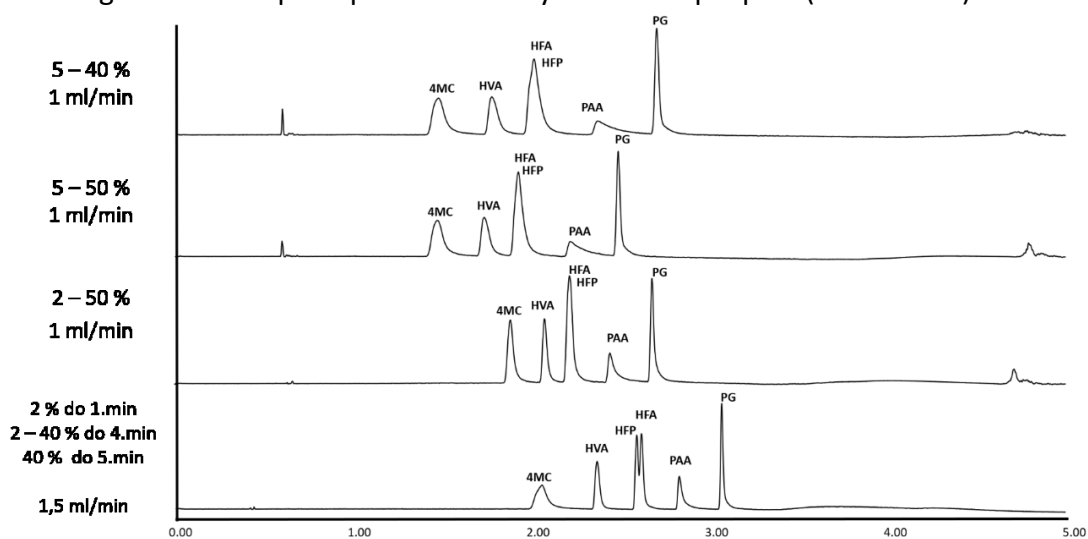
Obrázek 31: Chromatogramy UHPSFC separací na koloně BEH s mobilními fázemi CO₂ + MeOH, CO₂ + MeOH + 2 % H₂O a CO₂ + MeOH + 0,1 % HCOOH.

Dalším krokem byla změna nastavení gradientové eluce u výchozí mobilní fáze s MeOH. Protože mezi fenolickými analyty byly látky polární povahy (fenolické kyseliny a rutin), bylo zkoušeno nastavení gradientu až k 90 % organického modifikátoru. Nově nastavený gradient začínal od 2 % MeOH a postupně se zvyšoval podíl organického modifikátoru na 50 %, 60 %, 70 %, 80 % nebo 90 %. S tak vysokým procentem organického modifikátoru se analýzy pohybovaly spíše v oblasti kapalinové chromatografie. Z důvodu tlakového limitu systému tyto změny nastavení gradientu vyžadovaly snížení průtoků mobilní fáze. Na Obrázku 32 je uvedeno porovnání těchto nově nastavených podmínek s původním gradientem, který zůstal z pohledu separace nejvýhodnější. Flavonoidní struktury se neeluovaly ani s takto nastaveným složením mobilní fáze.



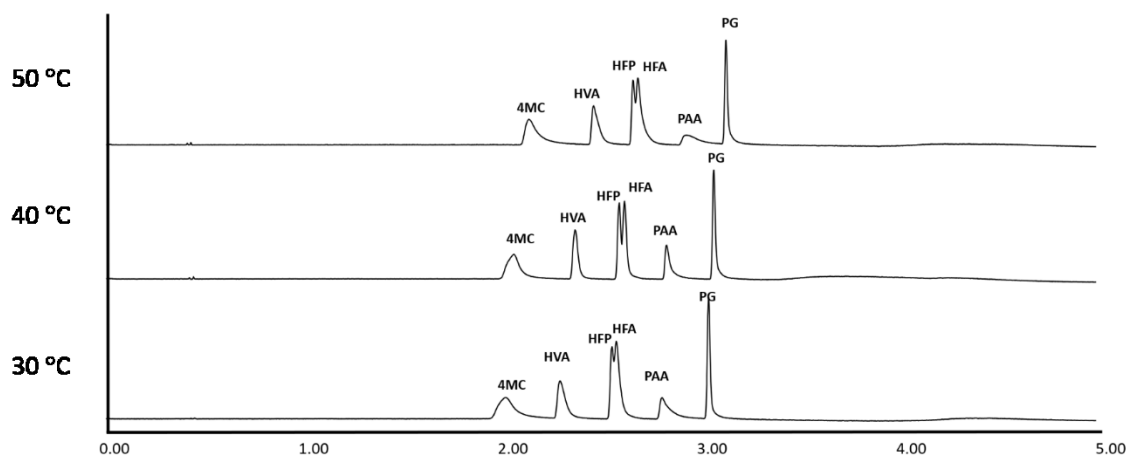
Obrázek 32: Chromatogramy UHPSFC separací na koloně BEH s mobilní fází CO₂ + MeOH porovnávající analýzu ze základního screeningu se změnami nastavení gradientu mobilní fáze: 2 – 50 % (1 ml/min), 2 – 60 % (1 ml/min), 2 – 70 % (0,7 ml/min), 2 – 80 % (0,5 ml/min) a 2 – 90 % (0,4 ml/min).

Dále byla testována procentuální změna počátečního složení mobilní fáze. Ani tato změna gradientu k lepší separaci fenolických látek nepřispěla (Obrázek 33).



Obrázek 33: Chromatogramy UHPSFC separací na koloně BEH s mobilní fází CO₂ + MeOH porovnávající analýzu ze základního screeningu se změnami gradientu mobilní fáze: 2 – 50 % (1 ml/min), 5 – 50 % (1 ml/min) a 5 – 40 % (1 ml/min).

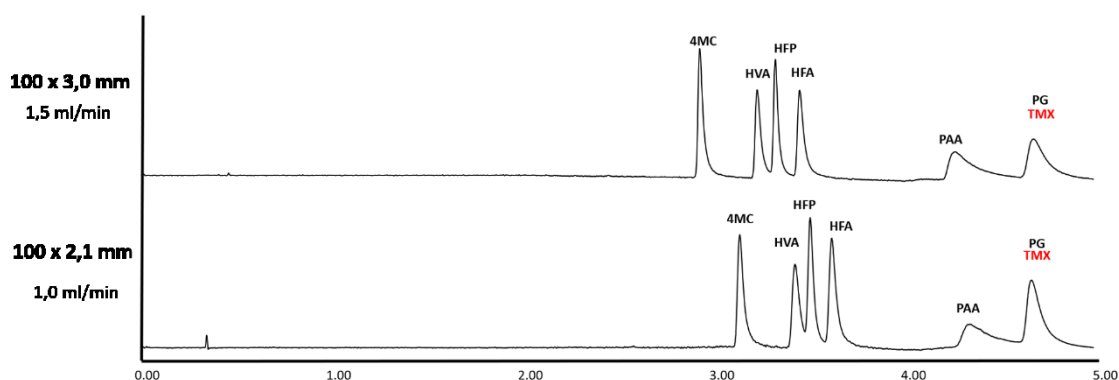
Na koloně BEH zůstala nejvhodnější analýza s mobilní fází MeOH bez aditiva, původní podmínky gradientové eluce a také původní nastavená teplota 40 °C. Zkoušená modifikace teplot (Obrázek 34) k vyšší i nižší teplotě způsobovala výraznější koeluci kritického páru píků HFP a HFA. Změny hodnot tlaku zapříčinily pouze nepatrné změny retenčních časů, proto zde nejsou chromatogramy uvedeny.



Obrázek 34: Chromatogramy UHPSFC separací na koloně BEH s mobilní fází CO₂ + MeOH, porovnávající nastavení teploty: 30 °C, 40 °C a 50 °C.

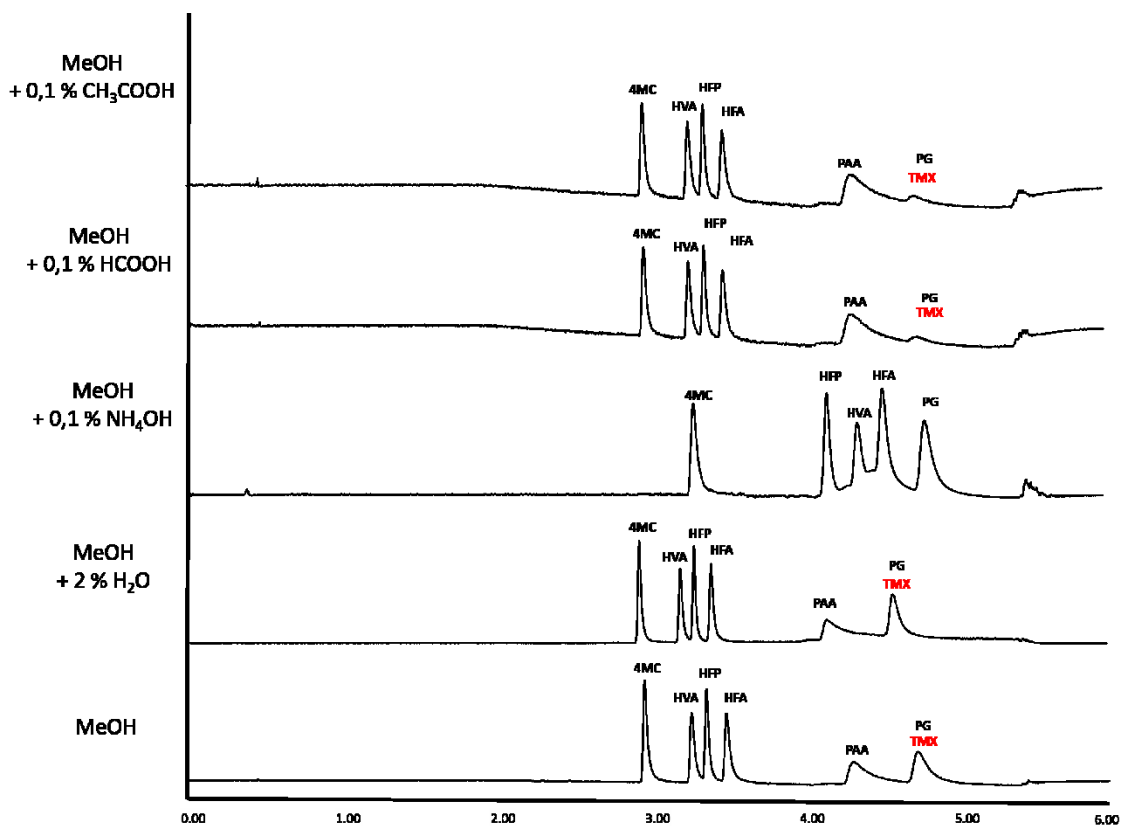
5.2.3. Optimalizace chromatografických podmínek na koloně BEH Amide

První změnou při optimalizaci podmínek na této stacionární fázi byla separace na koloně o jiných rozměrech, která v době základního screeningu nebyla k dispozici. Konkrétně šlo o větší vnitřní průměr 3,0 mm, oproti původnímu vnitřnímu průměru 2,1 mm zkoušenému v rámci základního screeningu (Obrázek 35). Širší okno retenčních časů analytů a separace užších píků na základní linii bylo hlavním důvodem v pokračování další optimalizace na koloně o větším vnitřním průměru. Důvodem lepších výsledků separace s kolonou s vnitřním průměrem 3,0 mm byla minimalizace vlivu mimokolonových objemů systému.



Obrázek 35: Chromatogram UHPSFC separace na koloně BEH Amide 100 x 2,1 mm (průtok 1,0 ml/min) ze základního screeningu a koloně BEH Amide 100 x 3,0 mm (průtok 1,5 ml/min). Obě separace proběhly s mobilní fází CO₂ + MeOH bez aditiva.

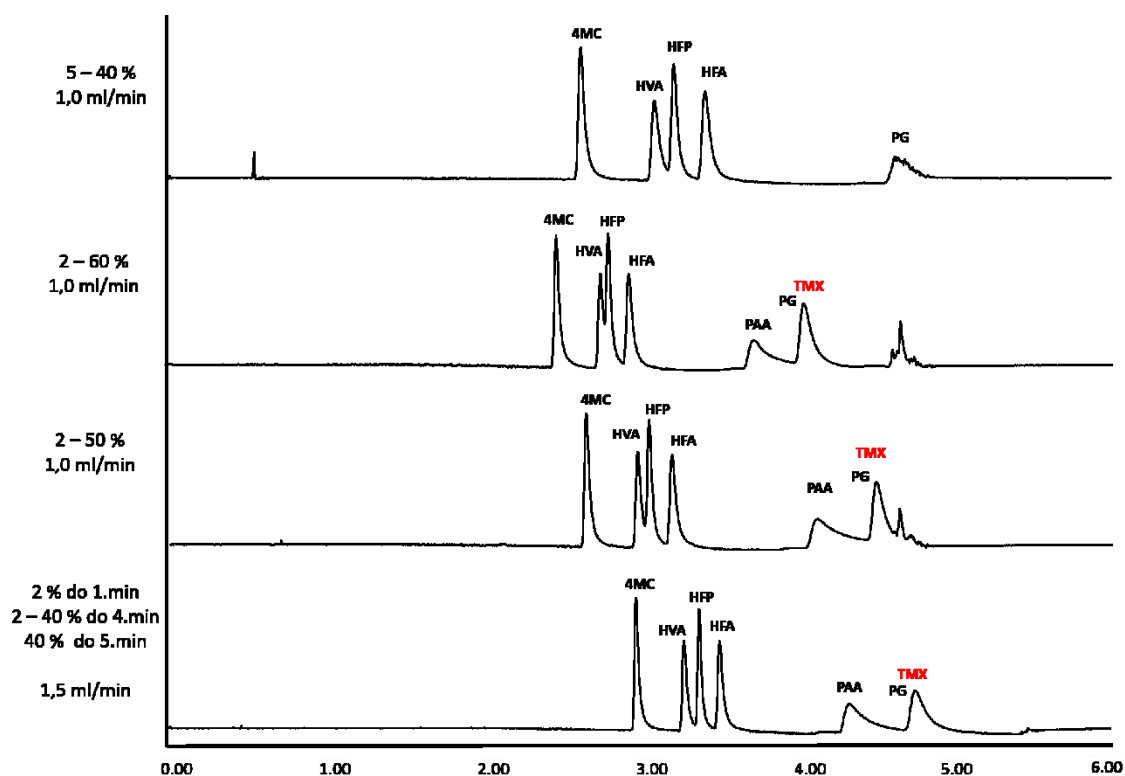
Vliv přidavku různých aditiv k MeOH je uveden na Obrázku 36. Přídavek bazického aditiva 0,1 % NH₄OH poskytoval oproti kyselým aditivům asymetričtější tvary píků. K eluci symetrických píků nepomohly ani kyseliny HCOOH a CH₃COOH v koncentraci 0,1 %. Přídavek 2 % H₂O byl z výběrů aditiv nejlepší volba, nicméně nebyla shledána žádná výhoda oproti čistému MeOH bez aditiva. Nastavení gradientu se proto dále optimalizovalo u této mobilní fáze se samotným MeOH.



Obrázek 36: Chromatogramy UHPSFC separací na koloně BEH Amide s mobilní fází $\text{CO}_2 + \text{MeOH}$ a s aditivy 2 % H_2O , 0,1 % NH_4OH , 0,1 % HCOOH a 0,1 % CH_3COOH .

Při zvýšení poměru organického modifikátoru na konci gradientu musel být opět snížen průtok mobilní fáze. Zkoušená změna 2 % na začátku a 50 % a 60 % organického modifikátoru na konci eluce nezlepšily separaci stejně jako rozmezí od 5 % do 40 %. Chromatogramy příslušných separací jsou uvedeny na Obrázku 37. Z flavonoidních látek se eluoval pouze TMX, který však koeluoval společně s PG.

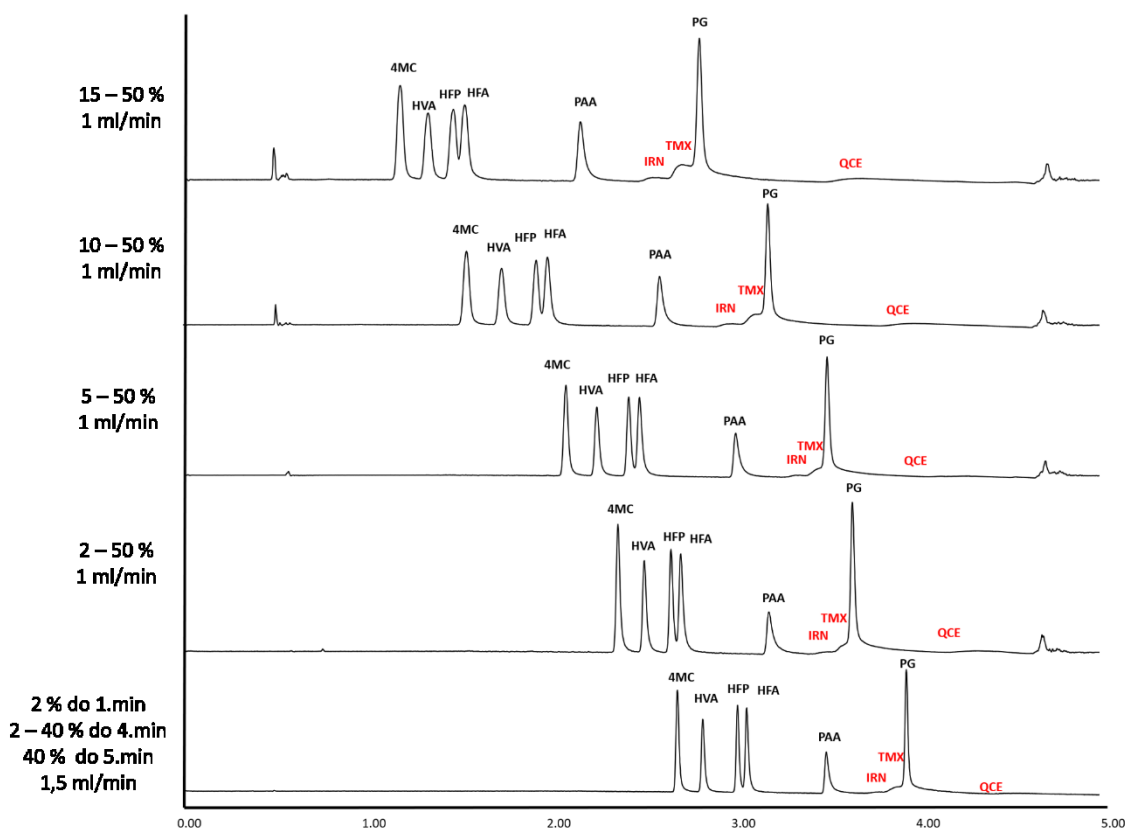
Změny teploty a tlaku nezpůsobily kromě mírných posunů retenčních časů žádné změny v eluci či selektivitě, proto zde nejsou uvedeny příslušné chromatogramy.



Obrázek 37: Chromatogramy UHPSFC separací na koloně BEH Amide s mobilní fází CO₂ + MeOH porovnávající analýzu ze základního screeningu se změnami gradientu mobilní fáze: 2 – 50 % (1 ml/min), 2 – 60 % (1 ml/min) a 5 – 40 % (1 ml/min).

5.2.4. Optimalizace chromatografických podmínek na koloně Torus DIOL

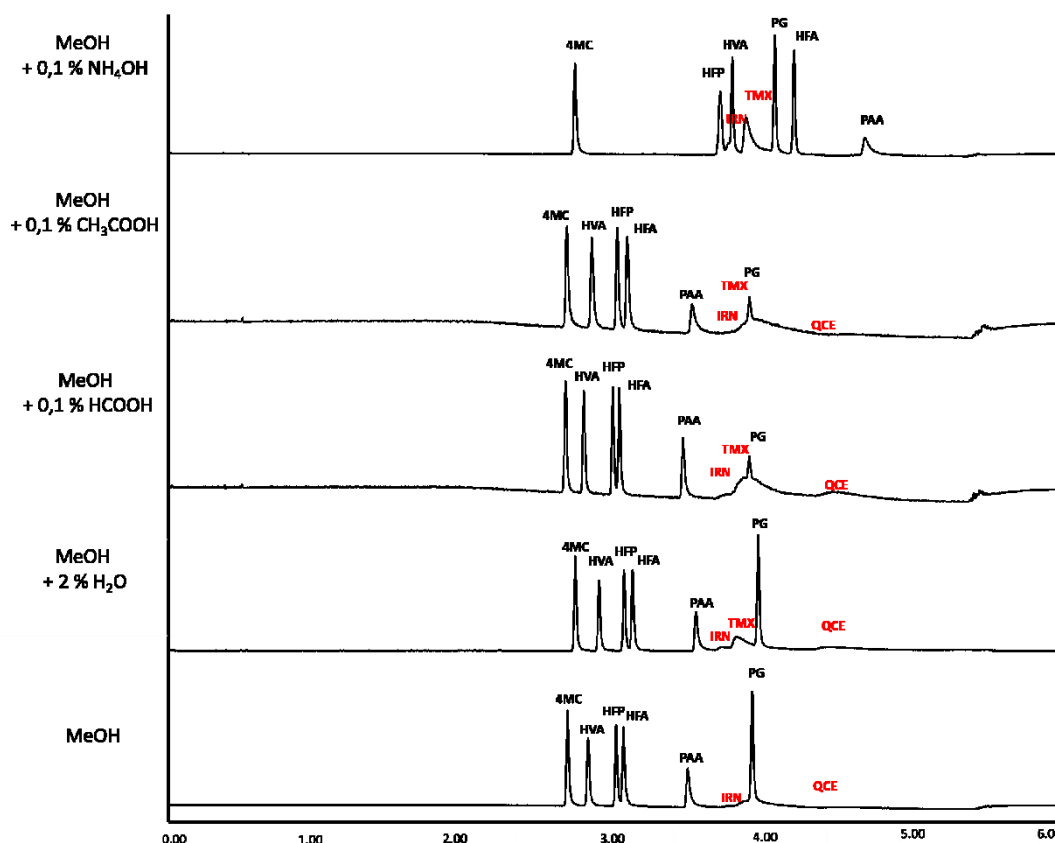
Prvním krokem byla změna nastavení gradientové eluce. Poměr organického modifikátoru MeOH byl nastaven na začátku na 2 %, 5 %, 10 % nebo 15 % a bez izokratického kroku se zvyšoval do 50 %. Z Obrázku 38 je patrné, že ani procentuální změna nepomohla eluci flavonoidních látek a přestože IRN, TMX i QCE na hmotnostním detektoru vykazovaly odezvu, jejich píky byly co do intenzity zanedbatelné oproti ostatním analytům a chvostovaly. Velmi polární rutin se z kolony neeluoval vůbec.



Obrázek 38: Chromatogramy UHPSFC separací na koloně Torus DIOL s mobilní fází $\text{CO}_2 + \text{MeOH}$ porovnávající analýzu ze základního screeningu se změnami gradientu mobilní fáze: 2 – 50 %, 5 – 50 %, 10 – 50 % a 15 – 50 %.

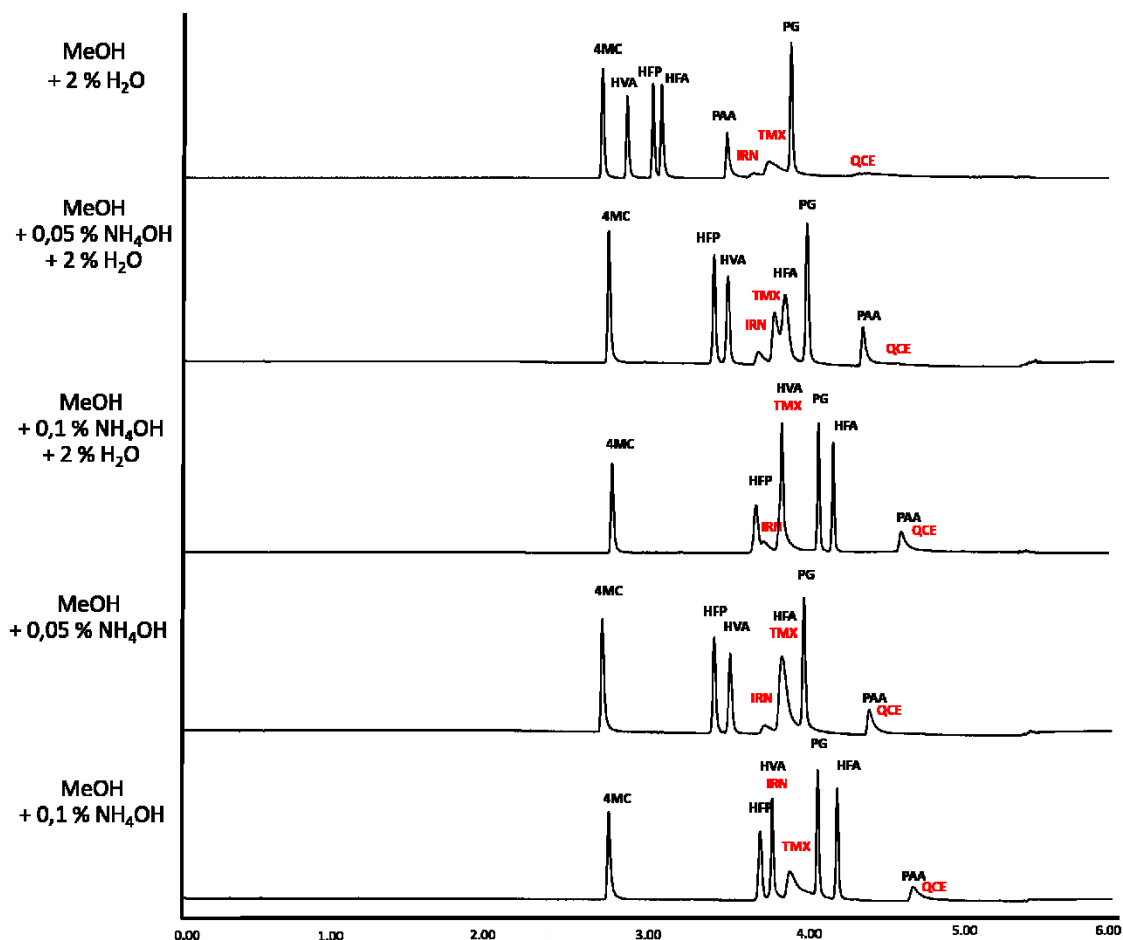
Po neúspěšných pokusech eluce flavonoidních látek s mobilní fází MeOH bez aditiva následovalo provedení množství separací s různými aditivy. Konkrétně se jednalo o 2 % H_2O , 0,1 % HCOOH , 0,1 % CH_3COOH a 0,1 % NH_4OH (Obrázek 39). Separace probíhaly za výchozích podmínek gradientové eluce ze základního screeningu. Použití kyselých aditiv (0,1 % HCOOH a 0,1 % CH_3COOH) nevedlo k lepší separaci ani eluci

problematických fenolických analytů. Přídavek 2 % H₂O přispěl k eluci flavonoidních struktur. Bazické aditivum 0,1 % NH₄OH nepřispělo k oddělení všech analytů na základní linii, nicméně poskytovalo zcela jinou selektivitu, než v případě přídavku 2 % H₂O. V další optimalizaci byla zkoušena kombinace těchto dvou aditiv v různých koncentracích.



Obrázek 39: Chromatogramy UHPSFC separací na koloně Torus DIOL s mobilní fází CO₂ + MeOH a aditivy 2 % H₂O, 0,1 % HCOOH, 0,1 % CH₃COOH a 0,1 % NH₄OH.

Na Obrázku 40 jsou uvedeny chromatogramy analýz s přídavkem 2 % H₂O, 0,1 % NH₄OH, 0,05 % NH₄OH a také kombinace 2 % H₂O + 0,1 % NH₄OH a 2 % H₂O + 0,05 % NH₄OH.

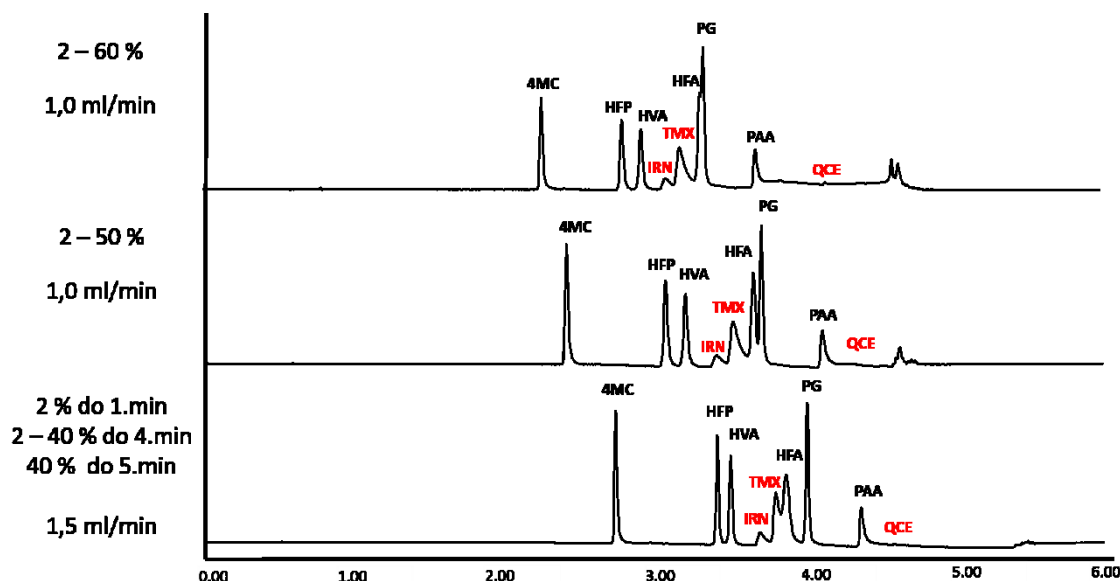


Obrázek 40: Chromatogramy UHPSFC separací na koloně Torus DIOL s mobilní fází $\text{CO}_2 + \text{MeOH}$ a aditivy 0,1 % NH_4OH , 0,05 % NH_4OH , 0,1 % $\text{NH}_4\text{OH} + 2\% \text{H}_2\text{O}$, 0,05 % $\text{NH}_4\text{OH} + 2\% \text{H}_2\text{O}$ a 2 % H_2O .

Nejlepší selektivitu separace poskytla kombinace 2 % H_2O s 0,05 % NH_4OH , proto byly s touto mobilní fází znovu vyzkoušeny změny nastavení gradientové eluce. Na Obrázku 41 je uvedeno porovnání chromatogramů s výchozím gradientem, poté gradientu od 2 % do 50 % nebo do 60 % organického modifikátoru a průtokem 1,0 ml/min. Nejlepší separaci poskytlo rozmezí gradientu od 2 % do 50 % organického modifikátoru s 8 oddělenými píky a alespoň s malým píkem kvercetinu.

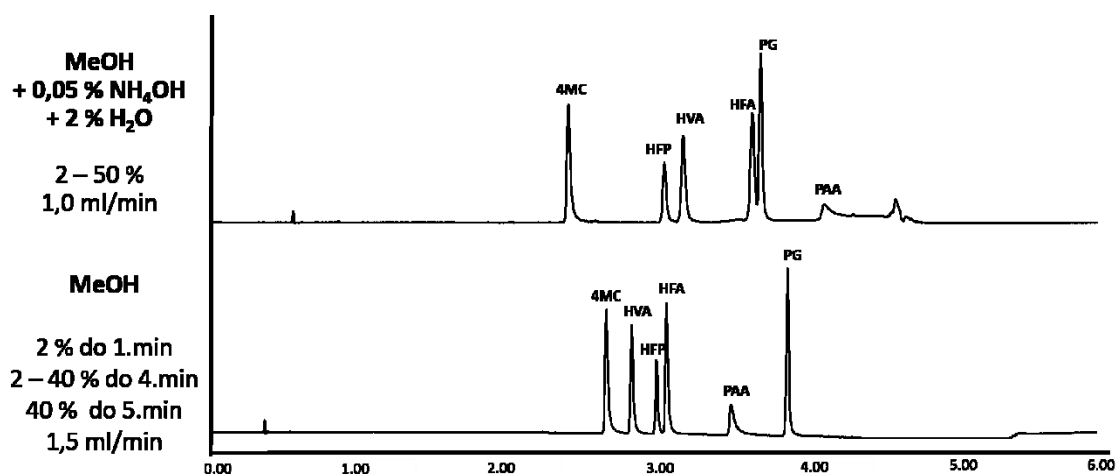
Zkoušené změny tlaku a teploty ani v tomto případě nezměnily výrazně selektivitu separace a docházelo k častějším koelucím píků, proto zde tyto chromatogramy nejsou uvedeny.

Eluce flavonoidních struktur QCE, IRN, TMX se ukázala i za optimalizovaných podmínek UHPSFC metody jako problematická. Velmi polární RUT nebyl eluován vůbec.



Obrázek 41: Chromatogramy UHPSFC separace na koloně Torus DIOL s mobilní fází $\text{CO}_2 + \text{MeOH} + 2\% \text{H}_2\text{O} + 0,05\% \text{NH}_4\text{OH}$ porovnávající gradient ze základního screeningu se změnami: 2 – 50 % a 2 – 60 % (průtok 1 ml/min).

Z dosud získaných výsledků je evidentní, že s využitím UHPSFC metody dochází k eluci a separaci všech fenolických kyselin (6 analytů). Proto byla vytvořena směs pouze těchto látek a provedena analýza s nejlépe optimalizovanými podmínkami na DIOL koloně. Na Obrázku 42 je uvedena separace s mobilní fází obsahující MeOH a původními podmínkami a také s mobilní fází obsahující $\text{MeOH} + 0,05\% \text{NH}_4\text{OH} + 2\% \text{H}_2\text{O}$ a gradientem 2 – 50 %.



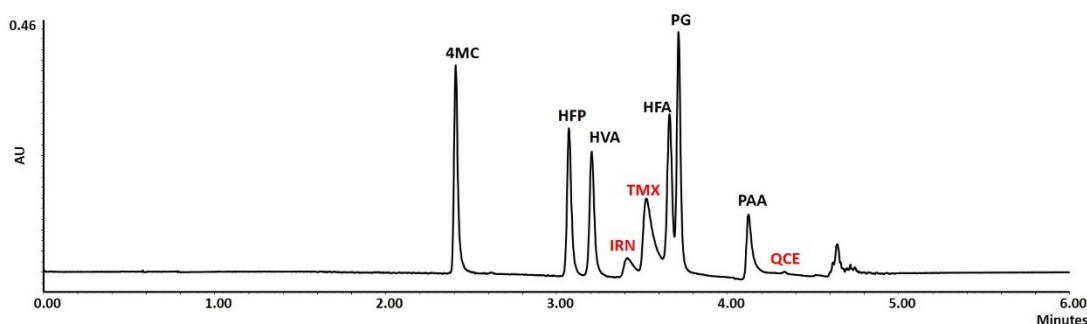
Obrázek 42: Chromatogramy UHPSFC separace fenolických kyselin na koloně Torus DIOL s mobilní fází $\text{CO}_2 + \text{MeOH}$ s podmínkami základního screeningu a s mobilní fází $\text{CO}_2 + \text{MeOH} + 2\% \text{H}_2\text{O} + 0,05\% \text{NH}_4\text{OH}$ a gradientovou elucí 2 – 50 % (průtok 1 ml/min).

5.2.5. Optimalizované chromatografické podmínky pro UHPSFC separaci fenolických látek

Nejvhodnější pro separaci fenolických látek metodou UHPSFC byla kolona Torus DIOL. Po optimalizaci chromatografických podmínek (Tabulka 17) bylo dosaženo částečné separace 9 analytů (Obrázek 43). Vhodnost chromatografického systému byla potvrzena zjištěním několika parametrů testu způsobilosti systému (Tabulka 18). Rozlišení > 1,5 nebylo dosaženo mezi píky IRN, TMX, HFA a PG.

Tabulka 17: Optimalizované chromatografické podmínky pro separaci fenolických látek.

Chromatografické podmínky	
analytická kolona	Torus DIOL (100,0 x 3,0 mm, 1,7 μm)
mobilní fáze	CO ₂ + MeOH + 0,05 % NH ₄ OH + 2 % H ₂ O
průtok	1,0 ml/min
dávkovaný objem	2 μl v rozpouštědle MeOH
teplota	40 °C
tlak	140 bar / 2031 psi
gradient	2 – 50 % do 4. minuty
UV detekce	220 nm
MS detekce	MS sken v ESI módu, 90 – 620 Da



Obrázek 43: Chromatogram UHPSFC analýzy fenolických látek na koloně Torus DIOL s mobilní fází CO₂ + MeOH + 0,05 % NH₄OH + 2 % H₂O.

Tabulka 18: Výsledky sledovaných parametrů testu způsobilosti systému pro analýzu fenolických látek za optimalizovaných podmínek.

ANALYT	PRŮMĚRNÝ RETENČNÍ ČAS (t _r)	RETENČNÍ (KAPACITNÍ) FAKTOR (k)	ROZLIŠENÍ (R _s)	FAKTOR SYMETRIE (A _s)	ŠÍŘKA PÍKU V POLOVINĚ VÝŠKY (w ₅₀)
4MC	2,413	3,826		1,34	0,02
HFP	3,080	5,160	15,95	1,21	0,03
HVA	3,218	5,436	2,93	1,17	0,03
IRN	3,419	5,838	2,94	1,27	0,05
TMX	3,533	6,066	1,18	-	0,06
HFA	3,676	6,352	1,76	-	0,03
PG	3,719	6,438	0,90	-	0,02
PAA	4,134	7,268	8,65	1,80	0,03
QCE	4,345	7,690	5,03	1,37	0,02

6. Závěr

Pro obě skupiny přírodních látek byly vyvinuty nové analytické metody s využitím UHPSFC s PDA a MS detekcí, což je účinná a ekologická alternativa dosud používaných technik. V souladu s předem stanoveným cílem byly chromatografické podmínky optimalizovány tak, aby bylo dosaženo co nejlepší selektivity, rozlišení a symetrických píků.

Pro skupinu alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae* byla nejvhodnější separace na koloně Torus DEA. Jako nejlepší organický modifikátor se ukázala kombinace MeOH s ACN, jako vhodné aditivum pro alkaloidy byl zvolen NH₄OH. Nejvhodnější mobilní fází byla směs CO₂ + MeOH/ACN (1:1) + 0,1 % NH₄OH a gradientová eluce 4 – 20 % do 4. minuty. Separace probíhala za teploty 40 °C, tlaku 140 bar a průtoku 1,5 ml/min. Za těchto podmínek byly eluovány všechny analyty a retenční časy izomerních látek byly dostatečně rozdílné. S takto optimalizovanými podmínkami byla provedena analýza rostlinných extraktů z rostlin *Zephyranthes citrina* a *Hippeastrum cv. Double King* a byly identifikovány alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae*. Tyto podmínky mohou být aplikovány pro analýzu a po přepočtu parametrů metody také pro izolaci alkaloidů z rostlinných extraktů v preparativním měřítku SFC metody. Vhodnost UHPSFC pro tento typ přírodních látek byla potvrzena.

Fenolické látky byly nejlépe eluovány a separovány na koloně Torus DIOL s mobilní fází CO₂ + MeOH + 0,05 % NH₄OH + 2 % H₂O. Gradientová eluce byla nastavena v rozmezí 2 – 50 % do 4. minuty, teplota 40 °C, tlak 140 bar a průtok 1,0 ml/min. Za těchto podmínek proběhla úspěšná separace 6 fenolických kyselin a 2 flavonoidních struktur, nicméně eluce kvercetinu poskytla pík s velmi malou intenzitou a rutin se z kolony neeluoval vůbec. Vhodnost UHPSFC metody pro tento typ přírodních látek byla potvrzena částečně. Separace flavonoidních látek tak zůstává předmětem budoucích optimalizací.

Cílená a rychlá analýza těchto dvou skupin biologicky aktivních přírodních látek pomocí nově vyvinutých UHPSFC metod s PDA a MS detekcí může sloužit k pochopení jejich metabolismu a vysvětlení léčivých účinků na lidský organismus.

7. Citované literární zdroje

- [1] V. Desfontaine, D. Guillarme, E. Francotte, L. Nováková, *Supercritical fluid chromatography in pharmaceutical analysis*, J. Pharm. Biomed. Anal. 113 (2015), 56–71.
- [2] M. Leško, D.P. Poe, K. Kaczmarski, *Modelling of retention in analytical supercritical fluid chromatography for CO₂-Methanol mobile phase*, J. Chromatogr. A. 1305 (2013), 285–292.
- [3] T.Q. Yan, C. Orihuela, J.P. Preston, F. Xia, *Supercritical Fluid Chromatography and Steady-State Recycling: Phase Appropriate Technologies for the Resolutions of Pharmaceutical Intermediates in the Early Drug Development Stage*, Chirality. 22 (2010), 922–928.
- [4] L.T. Taylor, *Supercritical fluid chromatography for the 21st century*, J. Supercrit. Fluids. 47 (2009) 566–573.
- [5] K. De Klerck, D. Mangelings, Y. Vander Heyden, *Supercritical fluid chromatography for the enantioseparation of pharmaceuticals*, J. Pharm. Biomed. Anal. 69 (2012), 77–92.
- [6] M. Saito, *History of supercritical fluid chromatography: Instrumental development*, J. Biosci. Bioeng. 115 (2013), 590–599.
- [7] L. Nováková, K. Plachká, P. Jakubec, *Ultra-high performance supercritical fluid chromatography-mass spectrometry*, Handbook of Advanced Chromatography/Mass Spectrometry Techniques (2017), Chapter 12, 445–487.
- [8] P. Jakubec, Schéma SFC instrumentace, 2018.
- [9] L. Nováková, A.G.G. Perrenoud, I. Francois, C. West, E. Lesellier, D. Guillarme, *Modern analytical supercritical fluid chromatography using columns packed with sub-2- μm particles: A tutorial*, Anal. Chim. Acta. 824 (2014), 18–35.
- [10] A.G.G. Perrenoud, J.L. Veuthey, D. Guillarme, *The use of columns packed with sub-2-μm particles in supercritical fluid chromatography*, Trends Anal. Chem. 63 (2014), 44–54.
- [11] http://www.waters.com/waters/en_US/ACQUITY-UPC2-System/nav.htm?cid=134658367&locale=en_US, 10.12.2018
- [12] E. Lesellier, *Retention mechanisms in super/subcritical fluid chromatography on packed columns*, J. Chromatogr. A. 1216 (2009), 1881–1890.
- [13] E. Lesellier, *Overview of the retention in subcritical fluid chromatography with varied polarity stationary phases*, J. Sep. Sci. 31 (2008), 1238–1251.
- [14] http://www.waters.com/waters/en_US/SFC-Columns---Trefoil%2C-Torus%2C-Viridis-/nav.htm?cid=134696052&locale=en_US, SFC columns, 18.11.2018
- [15] C. West, E. Lesellier, *A unified classification of stationary phases for packed column supercritical fluid chromatography*, J. Chromatogr. A. 1191 (2008), 21–39.
- [16] C. West, E. Lemasson, S. Bertin, P. Hennig, E. Lesellier, *An improved classification of*

- stationary phases for ultra-high performance supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1440 (2016), 212–228.
- [17] http://www.waters.com/waters/en_US/SFC-Columns---Trefoil%2C-Torus%2C-Viridis-/nav.htm?cid=134696052&locale=en_US, 18.11.2018
- [18] C. West, *Current trends in supercritical fluid chromatography*, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018), 6441–6457.
- [19] G. Guiochon, A. Tarafder, K. Kaczmarek, M. Ranger, D.P. Poe, *Use of the isopycnic plots in designing operations of supercritical fluid chromatography: IV. Pressure and density drops along columns*, *J. Chromatogr. A.* 1238 (2012), 132–145.
- [20] L. Nováková, A. Grand-Guillaume Perrenoud, R. Nicoli, M. Saugy, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, M. Rentsch, A. Grand-Guillaume Perrenoud, R. Nicoli, M. Saugy, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, *Ultra high performance supercritical fluid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for screening of doping agents. II: Analysis of biological samples.*, *Anal. Chim. Acta.* 853 (2015), 647–59.
- [21] V. Pilařová, K. Plachká, M.A. Khalikova, F. Svec, L. Nováková, *Recent developments in supercritical fluid chromatography – mass spectrometry: Is it a viable option for analysis of complex samples?*, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 112 (2019), 212–225.
- [22] A. Pavlov, S. Berkov, E. Courot, T. Gocheva, D. Tuneva, B. Pandova, M. Georgiev, V. Georgiev, S. Yanev, M. Burrus, M. Ilieva, *Galanthamine production by *Leucojum aestivum* in vitro systems*, *Process Biochem.* 42 (2007), 734–739.
- [23] S. Berkov, J. Bastida, B. Sidjimova, F. Viladomat, C. Codina, *Phytochemical differentiation of *Galanthus nivalis* and *Galanthus elwesii* (Amaryllidaceae): A case study*, *Biochem. Syst. Ecol.* 36 (2008), 638–645.
- [24] <https://www.gardenia.net/plant/narcissus-dutch-master-trumpet-daffodil>, 12.1.2019
- [25] <https://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id19517/?taxonid=42013>, 12.1.2019
- [26] <https://www.maxpixel.net/Flowers-Plant-Red-Flowers-Amaryllis-Spider-Lily-944600>, 10.12.2018
- [27] <https://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id15185/?taxonid=42015>, 23.3.2019
- [28] A.M. Takos, F. Rook, *Towards a molecular understanding of the biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids in support of their Expanding medical use*, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013), 11713–11741.
- [29] M.W. Chase, J.L. Reveal, M.F. Fay, *A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae*, *Bot. J. Linn. Soc.* 161 (2009), 132–136.
- [30] L. Torras-claveria, L. Tallini, F. Viladomat, J. Bastida, *Research in natural products : Amaryllidaceae ornamental plants as sources of bioactive compounds*, *Res. Signpost.* (2017), 69–82.
- [31] C. Codina, S. Ríos, S. Berkov, V. Martínez-Francés, J. Bastida, *Evolution of alkaloid biosynthesis in the genus *Narcissus**, *Phytochemistry.* 99 (2014), 95–106.

- [32] J. Bastida, S. Berkov, L. Torras Clavería, N.B. Pigni, J.P. De Andradre, V. Martínez, C. Codina Mahrer, F. Viladomat Meya, *Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids*, (2011)
- [33] J. van Staden, T. Birkholm, M. Molander, A.W. Meerow, G. Petersen, G.I. Stafford, A.K. Jäger, P. Mølgaard, N. Rønsted, M.R.E. Symonds, S. Christensen, N. Rasmussen, *Can phylogeny predict chemical diversity and potential medicinal activity of plants? A case study of amaryllidaceae*, *BMC Evol. Biol.* 12 (2012), 182.
- [34] M. He, C. Qu, O. Gao, X. Hu, X. Hong, *Biological and pharmacological activities of Amaryllidaceae alkaloids*, *R. Soc. Chem.* 5 (2015), 16562–16574.
- [35] M. Dalecká, R. Havelek, K. Královec, L. Brůčková, L. Cahlíková, *Alkaloidy rostlin čeledi amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocněním*, *Chem. List.* 10 (2013), 701–708.
- [36] L. Cahlíková, I. Valterová, K. Macáková, L. Opletal, *Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from Zephyranthes grandiflora by GC/MS and their cholinesterase activity*, *Brazilian J. Pharmacogn.* 21 (2011), 575–580.
- [37] S. López, J. Bastida, F. Viladomat, C. Codina, *Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts*, *Life Sci.* 71 (2002), 2521–2529.
- [38] J.J. Nair, A. Wilhelm, S.L. Bonnet, J. van Staden, *Antibacterial constituents of the plant family Amaryllidaceae*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 27 (2017), 4943–4951.
- [39] J.C. Cedrón, D. Gutiérrez, N. Flores, Á.G. Ravelo, A. Estévez-Braun, *Synthesis and antiplasmodial activity of lycorine derivatives*, *Bioorganic Med. Chem.* 18 (2010), 4694–4701.
- [40] R. Reyes-Chilpa, S. Berkov, S. Hernández-Ortega, C.K. Jankowski, S. Arseneau, I. Clotet-Codina, J.A. Esté, C. Codina, F. Viladomat, J. Bastida, *Acetylcholinesterase-inhibiting alkaloids from zephyranthes concolor*, *Molecules.* 16 (2011), 9520–9533.
- [41] M. Kreh, R. Matusch, L. Witte, *Capillary gas chromatography-mass spectrometry of Amaryllidaceae alkaloids*, *Phytochemistry.* 38 (1995), 773–776.
- [42] S. Berkov, A. Pavlov, M. Ilieva, M. Burrus, S. Popov, M. Stanilova, *CGC-MS of alkaloids in Leucojum aestivum plants and their in vitro cultures*, *Phytochem. Anal.* 16 (2005), 98–103.
- [43] R. Gotti, J. Fiori, M. Bartolini, V. Cavrini, *Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from Narcissus by GC-MS and capillary electrophoresis*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 42 (2006), 17–24.
- [44] J.P. de Andrade, N.B. Pigni, L. Torras-Claveria, S. Berkov, C. Codina, F. Viladomat, J. Bastida, *Bioactive alkaloid extracts from Narcissus broussonetii: Mass spectral studies*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 70 (2012), 13–25.
- [45] M. Hroch, S. Mičuda, R. Havelek, J. Cermanová, L. Cahlíková, A. Hošťálková, D. Hulcová, M. Řezáčová, *LC-MS/MS method for the determination of haemanthamine in rat plasma, bile and urine and its application to a pilot pharmacokinetic study*, *Biomed. Chromatogr.* 30 (2016), 1083–1091.

- [46] J. Bastida, F. Viladomat, C. Codina, S. Lo, *Solid-phase Extraction and Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography of the Five Major Alkaloids in Narcissus confusus*, *Phytochem. Anal.* 13 (2002), 311–315.
- [47] D. Katoch, S. Kumar, N. Kumar, B. Singh, *Simultaneous quantification of Amaryllidaceae alkaloids from Zephyranthes grandiflora by UPLC-DAD/ESI-MS/MS*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 71 (2012), 187–192.
- [48] T. Mroczek, J. Mazurek, *Pressurized liquid extraction and anticholinesterase activity-based thin-layer chromatography with bioautography of Amaryllidaceae alkaloids*, *Anal. Chim. Acta.* 633 (2009), 188–196.
- [49] <https://www.biolib.cz/cz/image/id151418/28&type=1>, 10.12.2018
- [50] M.J. Landram, R.A. Shanely, S.R. McAnulty, F. Jin, A.M. Knab, D.C. Nieman, *Quercetin supplementation does not alter antioxidant status in humans*, *Free Radic. Res.* 44 (2009), 224–231.
- [51] A.R. Rechner, G. Kuhnle, P. Bremner, G.P. Hubbard, K.P. Moore, C.A. Rice-Evans, *The metabolic fate of dietary polyphenols in humans*, *Free Radic. Biol. Med.* 33 (2002), 220–235.
- [52] S. Egert, A.E. Wagner, C. Boesch-Saadatmandi, G. Rimbach, A. Bosy-Westphal, M.J. Mueller, J. Frank, S. Wolfram, *Daily Quercetin Supplementation Dose-Dependently Increases Plasma Quercetin Concentrations in Healthy Humans¹*, *J. Nutr.* 138 (2018), 1615–1621.
- [53] J. Spilková, J. Martin, T. Siatka, L. Tůmová, M. Kašparová, *Farmakognozie*, 2016.
- [54] S. Egert, S. Wolfram, B. Schulze, P. Langguth, E.M. Hubbermann, K. Schwarz, B. Adolphi, A. Bosy-Westphal, G. Rimbach, M.J. Müller, *Enriched cereal bars are more effective in increasing plasma quercetin compared with quercetin from powder-filled hard capsules*, *Br. J. Nutr.* 107 (2012), 539–546.
- [55] K. Valentová, J. Vrba, M. Bancířová, J. Ulrichová, V. Křen, *Isoquercitrin : Pharmacology, toxicology, and metabolism*, *Food Chem. Toxicol.* 68 (2014), 267–282.
- [56] I. Erlund, T. Kosonen, G. Alfthan, J. Mäenpää, K. Perttunen, J. Kenraali, J. Parantainen, A. Aro, *Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers*, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 56 (2000), 545–553.
- [57] R. Choudhury, S.K. Srail, E. Debnam, C.A. Rice-Evans, *Urinary excretion of hydroxycinnamates and flavonoids after oral and intravenous administration*, *Free Radic. Biol. Med.* 27 (1999), 278–286.
- [58] V. Pilařová, K. Plachká, L. Chrenková, I. Najmanová, P. Mladěnka, F. Švec, O. Novák, L. Nováková, *Simultaneous determination of quercetin and its metabolites in rat plasma by using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*, *Talanta.* 185 (2018), 71–79.
- [59] M.B. Katan, J.M.M. van Amelsvoort, M.R. Olthof, P.C.H. Hollman, M.N.C.P. Buijsman, *Chlorogenic Acid, Quercetin-3-Rutinoside and Black Tea Phenols Are Extensively Metabolized in Humans*, *J. Nutr.* 133 (2018), 1806–1814.

- [60] Y. Zu, C. Li, Y. Fu, C. Zhao, *Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) leaves by RP-HPLC with DAD*, J. Pharm. Biomed. Anal. 41 (2006), 714–719.
- [61] A. Schieber, P. Keller, R. Carle, *Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography*. J Chromatogr A by high-performance liquid chromatography, J. Chromatogr. A. 910 (2001) 265–273. doi:10.1016/S0021-9673(00)01217-6.
- [62] B. Boros, S. Jakabová, Á. Dörnyei, G. Horváth, Z. Pluhár, F. Kilár, A. Felinger, *Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography-mass spectrometry in Thymus species*, J. Chromatogr. A. 1217 (2010), 7972–7980.
- [63] J. Pérez-Illarbe, T. Hernández, I. Estrella, *Phenolic compounds in apples: varietal differences*, Z. Lebensm. Unters. Forsch. 192 (1991), 551–554.
- [64] M.N. Irakli, V.F. Samanidou, C.G. Biliaderis, I.N. Papadoyannis, *Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in rice using solid-phase extraction and RP-HPLC with photodiode array detection*, J. Sep. Sci. 35 (2012), 1603–1611.
- [65] H. Kim, H. Roh, S.B. Han, *Sensitive determination of phloroglucinol in human plasma by liquid chromatography - Tandem mass spectrometry*, J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 792 (2003), 307–312.
- [66] I.B. Jaganath, W. Mullen, C.A. Edwards, A. Crozier, *The relative contribution of the small and large intestine to the absorption and metabolism of rutin in man*, Free Radic. Res. 40 (2006), 1035–1046.
- [67] L. Chang, Y. Ren, L. Cao, Y. Sun, Q. Sun, N. Sheng, L. Yuan, X. Zhi, L. Zhang, *Simultaneous determination and pharmacokinetic study of six flavonoids from Fructus Sophorae extract in rat plasma by LC-MS/MS*, J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 904 (2012), 59–64.

8. Přílohy

SFC 2018, Strasbourg, France, 17. – 19. 10. 2018

UHPSFC-MS in analysis of plant material: Tackling separation of alkaloids in Amaryllidaceae extracts

Lucie Nováková, Tereza Lacmanová, Anna Hošťálková, Lucie Cahlíková, František Švec

¹Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Analytical Chemistry, Heyrovského 1203, 50005 Hradec Králové, Czech Republic

²Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany, Heyrovského 1203, 50005 Hradec Králové, Czech Republic

Supercritical fluid chromatography (SFC) has witnessed important development over the recent years. The original application domain of chiral analysis and preparative chromatography has shifted towards new application fields such as bioanalysis, natural product analysis, and food analysis. Advanced instrumentation capable of operating columns packed with sub-2 μm particles featuring high efficiency is designated as ultra-high performance SFC (UHPSFC) similar to ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC). Coupling of UHPSFC with mass spectrometry (MS) brings important benefits in identification capability, selectivity, and sensitivity. Therefore, UHPSFC-MS has become an important alternative in analysis of complex matrices besides UHPLC-MS and GC-MS.

Alkaloids from Amaryllidaceae family are of interest due to their potential effect in the treatment of Alzheimer's and oncological diseases, which makes them interesting target of biological studies. They are classified in several structural types with the most important being: lycorine, galanthamine, haemantamine, homolycorine, tazetine, and crinine. Many of them have isomeric structures and the same molecular weight. Therefore, even using high resolution MS cannot resolve them without efficient chromatographic separation. Moreover, the analysis of alkaloidal extracts of Amaryllidaceae plants is often carried out by GC-MS resulting in long analytical runs and difficulty with ionization of some species.

We tested UHPSFC-MS as an alternative technique for the separation of 12 Amaryllidaceae alkaloids of different structural types. Primary screening was carried out with ten different stationary phases and four modifiers. The most successfully scoring stationary phases involved Torus DEA, Torus Diol, and BEH, all of them 100 x 3.0 mm i.d. with 1.7 μm particles. These columns were further used for fine optimization of the separation. Finally, Torus DEA using gradient elution with CO_2 and $\text{MeOH/ACN} + 0.1\% \text{NH}_4\text{OH}$ enabled baseline separation of all species in 5 min and was then used for analysis of plant extracts.

The authors acknowledge the financial support of the project EFSA-CDN (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000841) co-funded by ERDF.



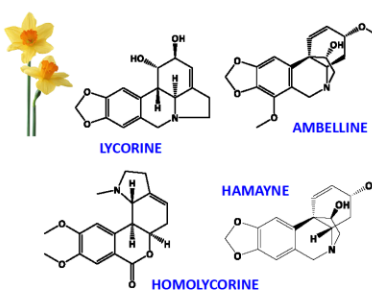
UHPSFC-MS in analysis of plant material: Tackling separation of alkaloids in Amaryllidaceae extracts

Lucie Nováková, Tereza Lacmanová, Anna Hošťálková, Lucie Cahlíková, František Švec
Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic
E-mail: novakoval@faf.cuni.cz



INTRODUCTION

Alkaloids from *Amaryllidaceae* family are of interest due to their potential effect in the treatment of Alzheimer's and oncological diseases. They are classified in several structural types with the most important being: lycorine, galanthamine, haemantamine, homolycorine, tazettine, and crinine. Many of them have isomeric structures and the same molecular weight. Therefore, even using high resolution MS cannot resolve them without efficient chromatographic separation. Moreover, the analysis of alkaloid extracts of *Amaryllidaceae* plants is often carried out by GC-MS resulting in long analytical runs and difficulty with ionization of some species.



MW	alkaloid	abbreviation
287.12	hamayne lycorine epimaritidine	HMN LYC EPM
301.13	odulin haemantamine	ODU HMA
303.15	9-O-demethylgalanthin tetrahydromasonine	DMG THM
315.15	homolycorine hippeastrin	HLC HIP
331.14	ambelline tazettine undulatine	AMB TZT UND

EXPERIMENTAL CONDITIONS

UHPSFC SCREENING METHOD

MOBILE PHASE:
CO₂ + methanol +/- additive
gradient elution: 2–40 % OM, 5 min
flow-rate: 1.5 ml/min

COLUMN TEMPERATURE: 40 °C
BACK PRESSURE REGULATOR: 140 bar
MAKE-UP: EtOH, 0.3 mL/min

INJECTION VOLUME: 2 µL
SOLVENT: ACN

UV DETECTION: 295 nm
MS DETECTION: MS scan



TESTED STATIONARY PHASES

BEH 2-EP (100 x 3.0 mm, 1.7 µm, 130Å)
HSS SB C18 (100 x 3.0 mm, 1.8 µm, 130Å)
BEH (100 x 3.0 mm, 1.7 µm, 130Å)
Torus DIOL (100 x 3.0 mm, 1.7 µm, 130Å)
Torus 2-PIC (100 x 3.0 mm, 1.7 µm, 130Å)
Torus DEA (100 x 3.0 mm, 1.7 µm, 130Å)
CSH PFP (100 x 3.0 mm, 1.7 µm, 130Å)
Torus 1-AA (100 x 3.0 mm, 1.7 µm, 130Å)
Cortecs HILIC (100 x 2.1 mm, 2.7 µm, 130Å)
BEH Amide (100 x 2.1 mm, 1.7 µm, 130Å)

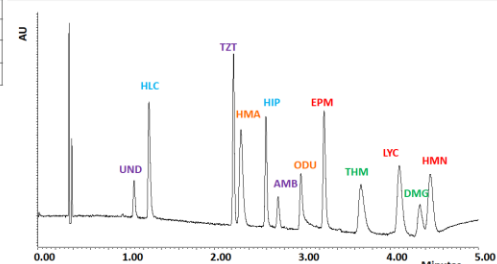
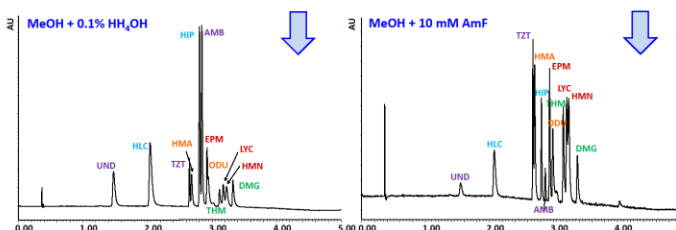
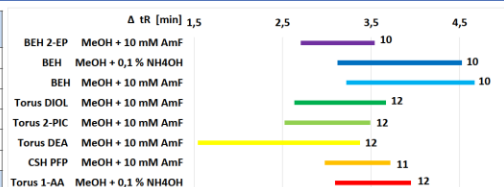
EXTRACTION OF ALKALOIDS

Fresh bulbs (3 x 15 g) were extracted 3 times with EtOH (50 mL) at room temperature for 24 h.

The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue dissolved in 10 mL 2% HCl. After removal of neutral compounds with diethyl ether (3 x 15 mL), the extract was basified with 25% ammonia solution and the alkaloids extracted with ethylacetate (3 x 15 mL). The organic solvent was evaporated.

RESULTS AND DISCUSSION

	MeOH		MeOH + 0.1 % NH ₄ OH		MeOH + 10 mM AmF		MeOH + 10 mM AmF + 2% H ₂ O	
	separated	eluted	separated	eluted	separated	eluted	separated	eluted
BEH 2-EP	9	12	9	12	10	12	9	12
HSS C18	0	0	8	9	8	11	8	11
BEH	9	12	10	12	10	12	9	12
Torus DIOL	11	12	11	12	12	12	11	12
Torus 2-PIC	10	12	11	12	12	12	11	12
Torus DEA	12	12	12	12	12	12	12	12
CSH PFP	8	11	7	12	11	12	11	12
Torus 1-AA	7	12	12	12	10	12	10	12
Cortecs HILIC	4	6	11	12	8	12	10	12
BEH Amide	6	9	9	12	9	12	9	12



Torus DEA, CO₂, MeOH + ACN (1:1), + 0.1 % NH₄OH, gradient elution: 4 – 20 %, flow-rate: 1.5 mL/min, temperature: 40°C, back-pressure regulator: 140 bar

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the project EFSA-CDN (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/000841) co-funded by ERDF.





VARIOUS CHROMATOGRAPHY APPROACHES HYPHENATED WITH MASS SPECTROMETRY FOR THE DETERMINATION OF FLAVONOIDS AND THEIR METABOLITES

Veronika Pilařová ^a, Jakub Pavlík ^a, Tereza Lacmanová ^a, Enrique Espinola ^b, Lucie Nováková ^a

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

^b University of Granada, Granada, Spain

Topic: Instrumentation and methods: Hyphenated techniques

Keywords: ultra-high performance liquid chromatography, hydrophilic interaction chromatography, supercritical fluid chromatography, mass spectrometry, quercetin, phenolic compounds

Introduction:

Quercetin is one of the most discussed flavonoid compounds with beneficial effects to human health due to its antioxidant properties. In human body, it is metabolized to two groups of health affecting metabolites with different physico-chemical properties including acidity, molecular weight, and log P. Therefore, it is difficult to determine these compounds in a single analytical run [1][2].

Methods:

Three chromatography methods with different selectivity using mass spectrometry (MS) detection in both electrospray positive and negative ion modes were chosen and optimized. These methods included reversed phase ultra-high performance liquid chromatography (RP-UHPLC), hydrophilic interaction chromatography (HILIC), and complementary supercritical fluid chromatography (UHPSFC).

Results:

We carried out columns screening with emphasis on separation of isomeric pair of tamarixetin and isorhamnetin. Shield RP18 column using methanol and 0.1% formic acid as the mobile phase enabled the baseline separation of all analytes in RP-UHPLC. Pentahydroxyl, amide, silica, and zwitterion columns with acetonitrile and different aqueous solutions in wide pH range were used for separation in HILIC mode. However, the separation of flavonoids was less successful due to the peak broadening. Ten different columns were screened for SFC. The most promising results were obtained using the diol column and methanol with the addition of organic acids, buffers, ammonium hydroxide, and water. Finally, the MS parameters were tuned to get sensitive detection.

Conclusions:

The optimized methods will be compared in the terms of selectivity, retention and sensitivity. The targeted analysis of quercetin and related compounds including small phenolic acids and large metabolites with preserved flavonoid structure in combination with high throughput sample preparation step will be used to explain their metabolism and the health effects.

Novel Aspect:

The simultaneous analysis of quercetin and its metabolites with different physico-chemical properties using various separation mechanisms with MS.

References:



VARIOUS CHROMATOGRAPHY APPROACHES HYPHENATED WITH MASS SPECTROMETRY FOR THE DETERMINATION OF FLAVONOIDS AND THEIR METABOLITES

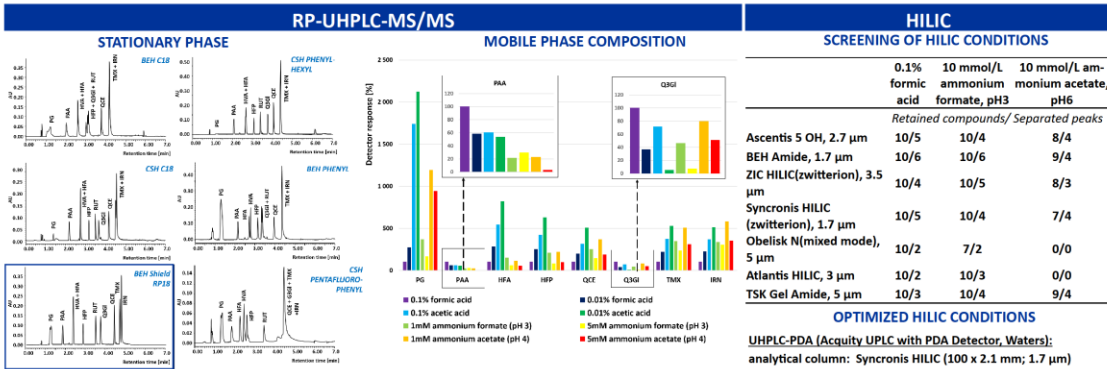
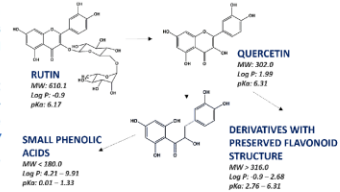
Veronika Pilařová¹, Jakub Pavlík¹, Tereza Lacmanová¹, Enrique Espinola², Lucie Nováková¹
¹Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic
²University of Granada, Granada, Spain
 E-mail: pilarov@faf.cuni.cz



INTRODUCTION

Flavonoid quercetin/QCE and its metabolites exhibit interesting effects at human health such as scavenging of free radicals, inhibition of lipid peroxidation, and reduction in production of inflammatory mediators. After the oral administration, QCE is released from its glycoside form and metabolized in two groups of metabolites differing in physicochemical properties: (1) small phenolic acids converted by gut microflora and (2) conjugates and derivatives with preserved flavonoid structure formed in the liver.

The aim of this work was to develop and critically compare three different complementary chromatography approaches including reversed phase ultra-high performance liquid chromatography (RP-UHPLC), hydrophilic interaction chromatography (HILIC), and ultra-high performance supercritical fluid chromatography (UHPSFC) with mass spectrometry (MS) detection for the selective and sensitive targeted screening of rutin /RUT, QCE and their metabolites (4-methylcatechol /4-MC, phloroglucinol /PG, 3-hydroxyphenylacetic acid /HFA, 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid /HFP, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid /PAA, homovanillic acid /HVA, tamarixetin /TMX, isorhamnetin /IRN, and quercetin-3-O-glucuronide /Q3G) to explore their effect and metabolism.



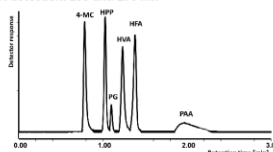
OPTIMIZED UHPLC-MS/MS CONDITIONS

Acquity UPLC with triple quadrupole Quattro Micro MS (Waters)
 analytical column: BEH Shield RP C18 (2.1 x 100 mm, 1.7 μm)
 mobile phase: MeOH/0.1% formic acid, gradient elution (5–95%)
 with flow-rate 0.35 mL/min
 temperature: 40 °C; injected volume: 5 μL
 capillary voltage: +3200 V/-2000 V
 extractor: 3.0 V; RF lens (hexapole): 0.5 V
 temperature: source 130 °C; desolvation: 450 °C
 gas flow: desolvation: 800 L/h; cone: 100 L/h

IONISATION MODE	SRM TRANSITION	DWELL TIME	CONE V [V]	COLLISION E [eV]
PG ESI ⁺	127.1 > 80.9	0.10	35	20
HVA ESI ⁺	181.05 > 137.3	0.20	25	10
PAA ESI ⁺	166.9 > 123.1	0.10	15	10
HFA ESI ⁺	150.8 > 106.8	0.05	15	10
HFP ESI ⁺	164.9 > 120.8	0.05	30	10
RUT ESI ⁺	610.9 > 303.3	0.20	20	25
Q3G ESI ⁺	479.2 > 303.1	0.05	25	15
QCE ESI ⁺	303.0 > 153.0	0.05	40	30
TMX ESI ⁺	317.2 > 302.0	0.05	40	25
IRN ESI ⁺	317.2 > 302.1	0.05	40	25
4-MC ESI ⁺	123.0 > 122.1	0.20	35	20

OPTIMIZED HILIC CONDITIONS

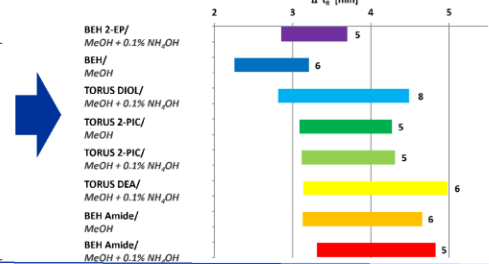
UHPLC-PDA (Acquity UPLC with PDA Detector, Waters):
 analytical column: Syncronis HILIC (100 x 2.1 mm; 1.7 μm)
 mobile phase: ACN/ 50mM Ammonium Formate; isocratic elution (92/8, v/v) with flow-rate 0.4 mL/min
 temperature: 40 °C
 injected volume: 2 μL
 PDA detection: 255 and 270 nm



UHPSFC/MS

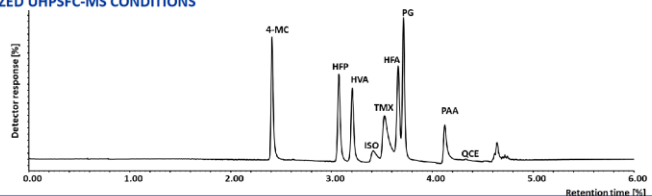
	SCREENING OF STATIONARY PHASES			
	MeOH + 0.1% NH ₄ OH	MeOH + 10 mM ammonium formate	MeOH + 10 mM ammonium formate + 2% H ₂ O	MeOH
BEH 2-Ethylpyridine (2-EP)	5/5	5/5	5/5	5/5
HSS C18 SB	2/2	4/6	2/2	2/2
BEH	6/6	6/6	5/6	6/6
Torus DIOL	8/8	8/8	8/8	8/8
Torus 2-picolylamine (2-PIC)	5/5	5/5	5/5	5/5
Torus diethylamine (DEA)	6/6	6/6	5/5	5/5
CSH pentafluorophenyl (PFP)	4/4	4/3	2/2	2/2
Torus 1-aminoanthracene (1-AA)	6/6	5/5	5/5	5/5
Cortecs HILIC	7/6	5/5	5/5	4/4
BEH Amide	6/6	5/5	7/6	7/6

COMPARISON OF T_R WINDOWS FOR SELECTED CONDITIONS



OPTIMIZED UHPSFC-MS CONDITIONS

UHPSFC-MS (Acquity UPC² with QDa Detector, Waters):
 analytical column: Torus DIOL (100 x 3.0 mm, 1.7 μm)
 mobile phase: CO₂/ MeOH + 0.01% NH₄OH + 2% H₂O
 gradient elution (2–50%) with flow rate 1 mL/min
 temperature: 40 °C
 back pressure regulator: 140 bar
 injected volume: 2 μL
 MS scan, negative electrospray ionization



CONCLUSIONS

RP-UHPLC-MS/MS method provided best separation of quercetin and selected metabolites. All compounds were separated with sufficient selectivity and separation efficiency. On the other hand, the optimization of UHPSFC-MS and HILIC method was challenging because it was difficult to achieve the retention and separation of all analytes. HILIC method provided very fast analyses especially for small phenolic acids. Derivatives with a higher molecular weight were not eluted. Thus, the method is not applicable for the analysis of samples containing the complete set of analytes. Similarly, UHPSFC-MS appears to be promising for the separation of small phenolic compounds. Molecules with a higher molecular weight were well retained compared to HILIC but the peak broadening and poor sensitivity was observed. RP-UHPLC-MS/MS enabled the analysis of all flavonoid derivatives in a single analytical run with sufficient selectivity and sensitivity. As a result, this method is applicable for the analysis of complex biological samples to determine quercetin metabolism and explain its health effects.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the project GACR 301/17/05409S and the STARSS project (Reg. No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000465) co-funded by ERDF.



O cenu Karla Štulíka 2019, Ústav chemie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity a Odborná skupina analytické chemie České společnosti chemické, 6. – 7. 2. 2019

VYUŽITÍ SUPERKRITICKÉ FLUIDNÍ CHROMATOGRAFIE V ANALÝZE PŘÍRODNÍCH LÁTEK

Tereza Lacmanová¹, Kateřina Plachká¹, Veronika Pilařová¹, Lucie Cahliková², Lucie Nováková¹

¹Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytické chemie, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové

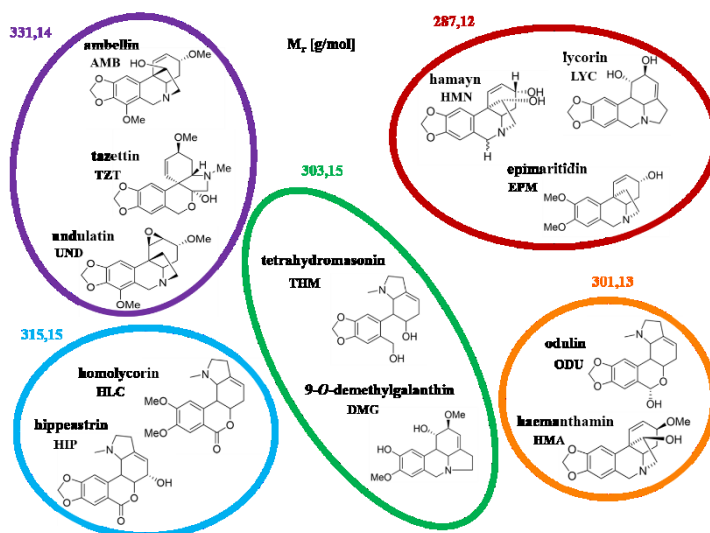
²Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové

E-mail: lacmanot@faf.cuni.cz

Úvod

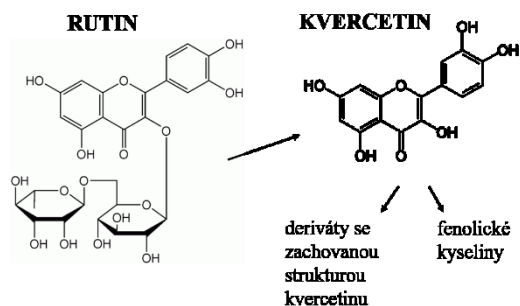
Superkritická fluidní chromatografie (SFC) je separační metoda, která byla díky moderní instrumentaci znovuobjevena teprve v posledních dvaceti letech. SFC se stala ekologickou alternativou kapalinové (HPLC) a plynové (GC) chromatografie. Jako mobilní fáze je využíván oxid uhličitý (CO₂) v nadkritickém stavu. Zavedením přísadků organických modifikátorů a aditiv k CO₂ se spektrum analytů rozšířilo směrem k polárnějším sloučeninám. Pokročilou verzí SFC využívající částic menších než 2 mikrometry je ultra-vysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie (UHPSFC). Cílem této práce bylo ověřit vhodnost UHPSFC-MS metody pro analýzu přírodních látek. Pro analýzy byly vybrány látky ze skupiny alkaloidů a fenolické sloučeniny.

První skupinou byly alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae* (amarylkovité), vykazující potenciální účinek v léčbě Alzheimerovy demence. Jejich chemické struktury, zkratky a barevné rozdělení do skupin izomerů jsou na Obrázku 1.



Obrázek 1: Chemické struktury alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae* a jejich barevné rozdělení dle molekulové hmotnosti.

Druhou skupinou byly fenolické látky – konkrétně flavonoidy rutin, kvercetin a jejich metabolity. Vzhledem k významné antioxidační aktivitě jsou tyto látky spojované s prevencí kardiovaskulárních onemocnění. V rámci této práce bylo analyzováno 10 zástupců (Obrázek 2):



rutin (RUT), kvercetin (QCE), dva deriváty se strukturou kvercetinu: tamarixetin (TMX),

Obrázek 2: Chemické struktury fenolických látek.

isorhamnetin (IRN) a šest fenolických kyselin: kyselina homovanilinová (HVA), kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová (HFP), kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová (PAA), kyselina 3-hydroxyfenyloctová (HFA), 4-methylcatechol (4MC) a floroglucinol (PG).

Experimentální část

Standardy alkaloidů byly izolovány na Katedře farmaceutické botaniky FaF UK, standardy fenolických látek pocházely z více zdrojů (Sigma-Aldrich, Extrasynthase a Toronto Research Chemicals). Rozpouštědla methanol (HiPerSolv Chromanorm) a acetonitril (Merck KGaA) byla čistoty LC-MS grade. Oxid uhličitý ($\text{CO}_2 > 99\%$) byl od firmy Messer. Mezi aditiva mobilních fází patřil 25 % roztok hydroxidu amonného (Merck KGaA) a mravenčan amonný (Sigma Aldrich). UHPSFC analýzy proběhly na systému Acquity UPC² (Waters, Milford, USA). Prvním krokem byl screening stacionárních fází (od firmy Waters): Acquity UPC² BEH 2-EP, Viridis HSS C18 SB, Acquity UPC² BEH, Torus DIOL, Torus 2-PIC, Torus DEA, Acquity UPC² CSH PFP, Torus 1-AA, Cortecs HILIC a Acquity UPLC BEH Amide. Rozměry kolon byly 100 x 3,0 mm a velikost částic 1,7 μm . Výjimkou byly rozměry 100 x 2,1 mm a velikost částic 2,7 μm u Cortecs HILIC a velikost částic 1,8 μm u HSS C18. Analýzy screeningu proběhly za podmínek: průtok 1,5 ml/min, teplota 40 $^\circ\text{C}$, BPR tlak 140 bar (2030,5 psi), nástřik vzorku byl 2 μl . Gradientová eluce začínala izokratickým krokem při 2 % organického modifikátoru s aditivem po dobu 1 minuty, od 1. do 4. minuty se zvyšovala na 40 %, od 4. do 5. minuty byl nastaven izokratický krok a poté do 7. minuty klesalo množství organického modifikátoru s aditivem na 2 %. Analyty byly detekovány pomocí Acquity UPC² PDA detektoru při vlnové délce 290 nm pro alkaloidy a 220 nm pro fenolické látky. Pro hmotnostní detekci byl využit QDa detektor, kdy alkaloidy byly ionizovány pomocí kladného (ESI⁺) a fenolické látky pomocí záporného (ESI⁻) módu.

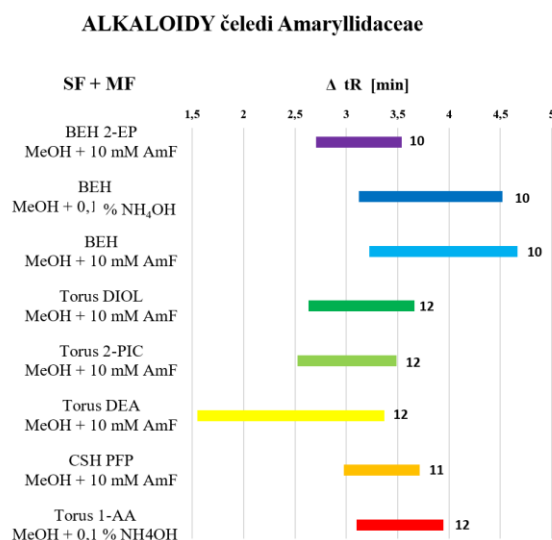
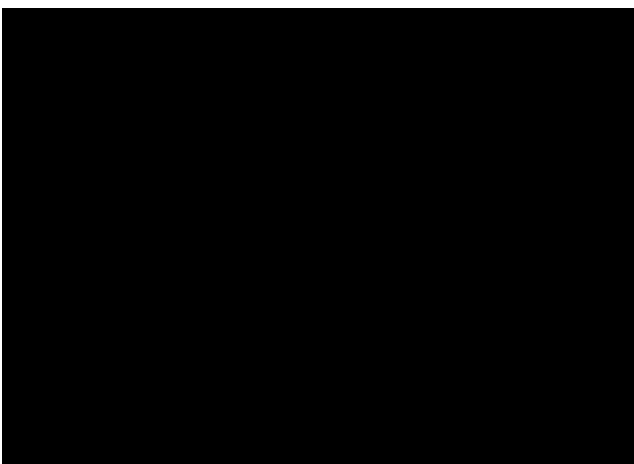
Výsledky a diskuse

Základní screening byl proveden na 10 různých stacionárních fázích se 4 mobilními fázemi: (1.) CO₂/MeOH (methanol), (2.) CO₂/MeOH + 0,1 % NH₄OH, (3.) CO₂/MeOH + 10 mM AmF (mravenčan amonný), (4.) CO₂/MeOH + 10 mM AmF + 2 % H₂O, kdy bylo získáno 40 chromatogramů pro obě skupiny látek. V rámci nejlepší stacionární a mobilní fáze byly optimalizovány chromatografické podmínky, což zahrnovalo změnu organických modifikátorů a aditiv, změny procentuálního složení gradientové eluce a dále změnu hodnot tlaku a teploty. Ve skupině alkaloidů byla kvůli výskytu několika izomerů stěžejním cílem účinná separace. V případě fenolických látek byl z důvodu různorodosti chemických struktur a odlišnosti fyzikálně-chemických vlastností řešen problém jejich separace v rámci jedné chromatografické analýzy.

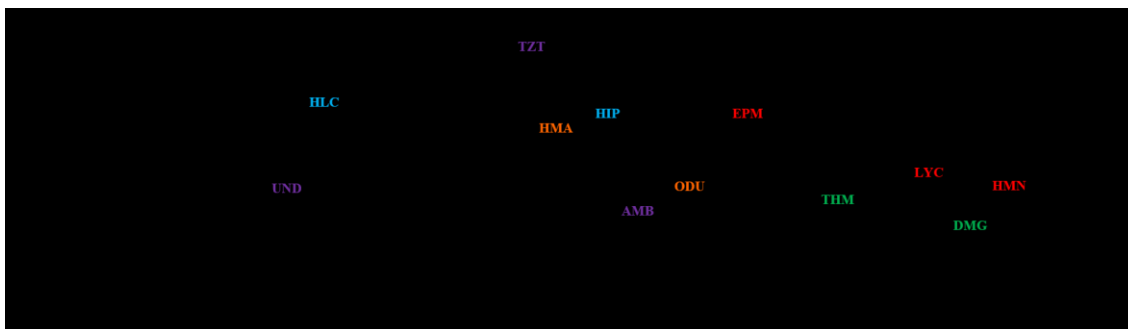
1. Optimalizace UHPSFC metody pro alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae*

Z velkého množství chromatogramů získaných v primárním screeningu (Tabulka 1) bylo vybráno 8 nejlepších kombinací stacionární a mobilní fáze (Obrázek 3). Úspěšného oddělení všech analytů bylo dosaženo na kolonách Torus DIOL, Torus 2-PIC, Torus DEA a Torus 1-AA. Nejlepších separací na základní linii bylo dosaženo se všemi mobilními fázemi na koloně Torus DEA. Z důvodu přítomnosti izomerů byla na této koloně výhodná větší šířka okna retenčních časů. Právě tato kolona byla předmětem optimalizace složení mobilní fáze a gradientové eluce. Výsledný chromatogram s optimalizovanými podmínkami je uveden na Obrázku 4.

Tabulka I: Výsledky primárního screeningu stacionárních a mobilních fází pro UHPSFC analýzu alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae* vyjádřené počtem eluovaných píků a počtem separovaných analytů.



Obrázek 3: Velikost separačního okna dle retenčních časů eluovaných alkaloidů pro 8 nejlepších separací.

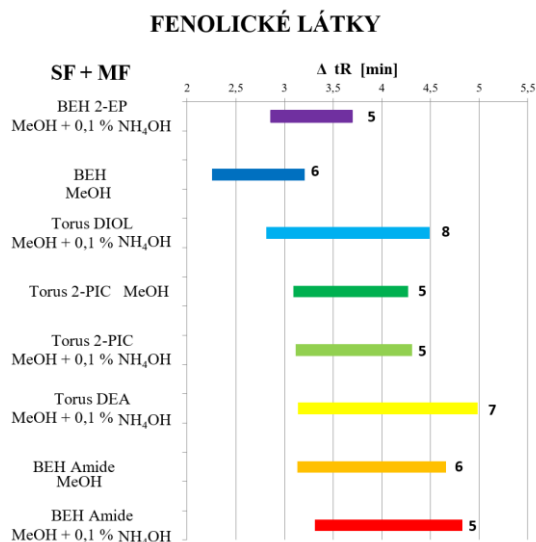
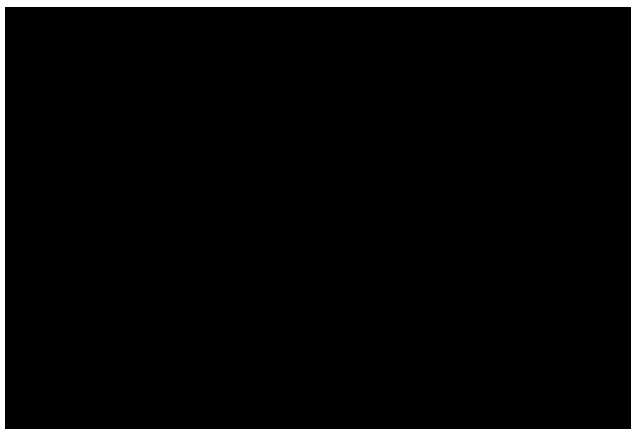


Obrázek 4: Optimální chromatografické podmínky pro UHPSFC analýzu alkaloidů: separační kolona: Torus DEA (3,0 x 100 mm; 1,7 μ m), mobilní fáze: CO₂, organický modifikátor: MeOH + ACN (acetonitril) (1:1), aditivum: 0,1 % NH₄OH, průtok: 1,5 ml/min, dávkovaný objem: 2 μ l, rozpouštědlo: ACN, teplota: 40 °C, tlak: 140 bar / 2031 psi, gradientová eluce 4 – 20 %, UV detekce: 290 nm, MS detekce: MS sken v kladném ESI⁺ módu, 60 – 500 Da.

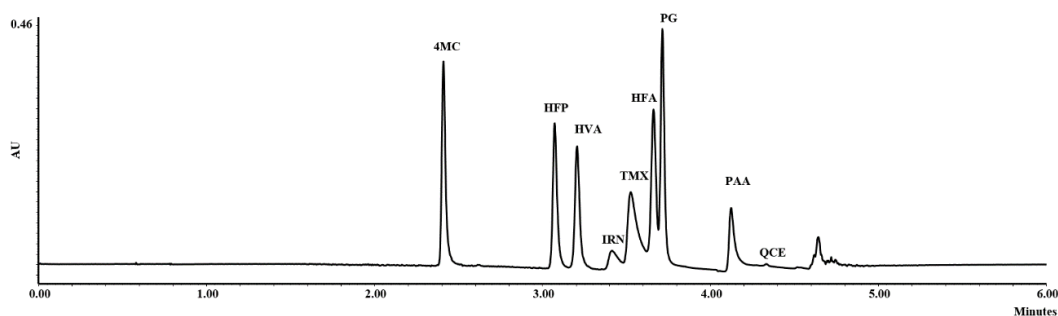
2. Optimalizace UHPSFC metody pro fenolické látky

Analýzy fenolických látek na kolonách Torus DIOL, Torus DEA, BEH a BEH Amide poskytovaly nejlepší separaci analytů (Tabulka 2). Pro vybrané podmínky separací byl vyhotoven pruhový graf znázorňující velikost separačního okna analytů (Obrázek 5). Z důvodu eluce největšího počtu analytů a symetrickému tvaru píků byla pro následující optimalizaci vybrána kolona Torus DIOL. Největším problémem zde byla eluce flavonoidů (rutin a sloučeniny odvozené od kvercetinu) z kolony. Z tohoto důvodu se tedy metoda jeví jako vhodná zejména pro fenolické kyseliny. Na Obrázku 6 je zobrazen chromatogram separace fenolických látek za použití optimalizovaných podmínek

Tabulka II: Výsledky primárního screeningu stacionárních a mobilních fází pro UHPSFC analýzu fenolických látek vyjádřené počtem eluovaných píků a počtem separovaných analytů.



Obrázek 5: Velikost separačního okna dle retenčních časů eluovaných fenolických látek pro 8 nejlepších separací.



Obrázek 6: Optimální chromatografické podmínky pro UHPSFC analýzu fenolických látek: separační kolona: Torus DIOL (3,0 x 100 mm; 1,7 μ m), mobilní fáze: CO₂, organický modifikátor: MeOH, aditivum: 0,05 % NH₄OH + 2 % H₂O, průtok: 1,0 ml/min, dávkovaný objem: 2 μ l, rozpouštědlo: MeOH, teplota: 40 °C, tlak: 140 bar / 2031 psi, gradientová eluce: 2 – 50 %, UV detekce: 220 nm, MS detekce: MS sken v negativním (ESI⁻) módu, 90 – 620 Da.

Závěr

Pro obě skupiny přírodních látek byla vyvinuta analytická metoda s využitím UHPSFC. Chromatografické podmínky byly optimalizovány tak, aby bylo dosaženo co nejlepší selektivity, vysokého rozlišení a symetrických píků. Pro skupinu alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae* byla nejvhodnější analýza na koloně Torus DEA, kde se eluovaly všechny analyty a izomery byly dostatečně separované. Za nejvýhodnější pro separaci fenolických kyselin byla shledána kolona Torus DIOL, nicméně eluce flavonoidních struktur (kvercetinu a jeho glykosidu rutinu) prozatím zůstala předmětem budoucí optimalizace. Cílená a rychlá analýza těchto dvou skupin přírodních látek může sloužit k pochopení jejich metabolismu a vysvětlení léčivých účinků na lidský organismus.

Poděkování

Tato práce vznikla za podpory projektu EFSA-CDN (reg. č.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000841) spolufinancovaného z EFRR a SVV No. 260412/2018

Literatura

1. K. Plachká, F. Švec, L. Nováková, *Anal. Chim. Acta* 1039 (2018) 149–161.
2. L. Nováková, V. Desfontaine, F. Ponzetto, R. Nicoli, M. Saugy, J.L. Veuthey, D. Guillarme, *Anal. Chim. Acta* 915 (2016) 102–110.
3. L. Torras-claveria, L. Tallini, F. Viladomat, J. Bastida, (2017) 69–82.
4. S. Egert, S. Wolfram, B. Schulze, P. Langguth, E.M. Hubbermann, K. Schwarz, B. Adolphi, A. Bosy-Westphal, G. Rimbach, M.J. Müller, *Br. J. Nutr.* 107 (2012) 539–546.

IS SUPERCRITICAL FLUID CHROMATOGRAPHY SUITABLE FOR
ANALYSIS OF NATURAL PRODUCTS?

LACMANOVÁ, T.¹, PLACHKÁ, K.¹, CAHLÍKOVÁ, L.², NOVÁKOVÁ, L.¹

¹Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles
University, Czech Republic

²Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles
University, Czech Republic

E-mail: lacmanot@faf.cuni.cz

Supercritical fluid chromatography (SFC) has been known for several decades, but the most remarkable rebirth came in the last 20 years. Advanced version using sub-2 µm particles is ultra-high performance supercritical fluid chromatography (UHPSFC). Hyphenation to mass spectrometry (MS) opened the way to application fields such as bionalysis and natural product analysis, due to high selectivity and sensitivity. The purpose of this study is to verify the suitability of UHPSFC with PDA and MS detection for analysis of natural products, namely alkaloids from *Amaryllidaceae* family with effect in the therapy of Alzheimer's disease and in oncology.

We tested UHPSFC method as an alternative technique for analysis of 12 alkaloids of different structural types. The basic screening was performed on 10 stationary phases using 4 mobile phases. The most successful separation was obtained with BEH, Torus DIOL and Torus DEA columns, that become subject of following optimization. Efficient separation was a critical step due to the presence of many isomers. The analysis on a Torus DEA column with CO₂/MeOH + ACN (1:1) + 0.1 % NH₄OH was the most suitable using gradient elution. These optimized conditions were used for analysis of plant extracts. Targeted and rapid analysis can be used to explain their metabolism and health effects on the human body.

This study was supported by EFSA-CDN (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000841) co-funded by EFRR and SVV No. 260412/2019.

References

1. NOVÁKOVÁ, L., DESFONTAINE, V., PONZETTO, F., NICOLI, R., SAUGY, M., VEUTHEY, J.L., GUILLARME, D.: *Anal. Chim. Acta* 915, 2016, 102–110.
2. PLACHKÁ, K., ŠVEC, F., NOVÁKOVÁ, L.: *Anal. Chim. Acta* 1039, 2018, 149–161.

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova
a Spolek českých studentů farmacie

XXVII. STUDENTSKÁ VĚDECKÁ KONFERENCE

Diplom za 1. místo
Terera Lacmanová

Sekce farmaceutické analýzy

J. P. R.
doc. PharmDr. Jaroslav Roh, Ph.D.
prodáván pro vědeckou činnost,
doktorské studium a akademické kvalifikace

TS
prof. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.
děkan Farmaceutické fakulty

Josef Kunrt
Josef Kunrt
prezident Spolku českých studentů farmacie



Hradec Králové
16. - 17. 4. 2019