

**UNIVERZITA KARLOVA**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra analytické chemie**



## **DIPLOMOVÁ PRÁCA**

**Vývoj metody na UHPSFC-PDA-MS analýzu  
ginsenosidov v potravinových doplňcích**

**Tatiana Vařková**

**Vedúci diplomovej práce: prof. PharmDr. Lucie Nováková Ph.D.**

**Hradec Králové 2024**

# ABSTRAKT

**Katedra:** Katedra analytické chemie

**Kandidát:** Tatiana Vaľková

**Školiteľ:** Prof. PharmDr. Lucie Nováková Ph.D.

**Názov diplomovej práce:** Vývoj metódy na UHPSFC-PDA-MS analýzu ginsenosidov v potravinových doplnkoch

Cieľom tejto diplomovej práce bolo vyvinúť analytickú metódu na analýzu ginsenosidov, hlavných účinných látok všehoja ázijského, v potravinových doplnkoch. K analýze bol použitý systém ultra-vysokoúčinnej superkritickej fluidnej chromatografie (UHPSFC) Acquity UPC<sup>2</sup> v spojení s detekciou pomocou fotodiódového poľa (PDA) a hmotnostným spektrometrom (MS).

Prvým krokom bol kolónový skríning 11 stacionárnych fáz (SF) v kombinácii s mobilnou fázou (MF) na báze CO<sub>2</sub> a 4 organickými modifikátormi: MeOH, MeOH/ACN (1:1), MeOH + 10 mM NH<sub>3</sub>, a MeOH + 2 % H<sub>2</sub>O. K optimalizácii metódy boli použité 4 stacionárne fázy s najlepšou selektivitou a rozlíšením píkov v rámci skríningu. Táto optimalizácia zahrňovala zmeny v zložení mobilnej fázy, zmenu nastavenia gradientovej elúcie, tlaku regulátora spätného tlaku a teploty kolóny. Ako posledný bol hodnotený vplyv prídavných kvapalín.

Finálna UHPSFC-PDA-MS metóda používala kolónu Torus 2-PIC, gradientovú elúciu a mobilnú fázu zloženú z CO<sub>2</sub> + MeOH/ACN (2:1) + 5 % H<sub>2</sub>O. Použitou prídavnou kvapalinou bol MeOH + 10 mM NH<sub>3</sub>. Eluovaných a separovaných bolo všetkých 12 analyzovaných ginsenosidov s výnimkou kritického izoméneho páru Rc + Rb<sub>2</sub>, ktorý bol separovaný s nižším rozlíšením 1,07.

Za použitia finálnej metódy bolo analyzovaných osem doplnkov stravy s obsahom kórejského ženšenu (*Panax ginseng*) a sibírskeho ženšenu (*Eleutherococcus senticosus*), v kvapalnej aj pevnej forme. Pevné vzorky boli extrahované v ultrazvukovej vani a filtrované 0,22 μm PTFE filtrom. V rámci optimalizácie boli testované vplyvy 3 extrakčných rozpúšťadiel. Najlepšie výsledky extrakcie boli dosiahnuté za použitia MeOH.

Výsledky analýz potravinových doplnkov potvrdili prítomnosť ginsenosidov vo všetkých 6 doplnkoch obsahujúcich kórejský ženšen a neprítomnosť ginsenosidov v 2 prípravkoch obsahujúcich sibírsky ženšen. Prítomnosť všetkých 12 ginsenosidov bola potvrdená v 3 z 8 analyzovaných potravinových doplnkov.

**Kľúčové slová:** UHPSFC-PDA-MS, vývoj metódy, optimalizácia, potravinové doplnky, ginsenosidy, všehoj ázijský

## ABSTRACT

**Department:** Department of analytical chemistry

**Candidate:** Tatiana Vařková

**Supervisor:** Prof. PharmDr. Lucie Nováková Ph.D.

**Title of the diploma thesis:** Method development for UHPSFC-PDA-MS analysis of ginsenosides in dietary supplements

The aim of this diploma thesis was to develop an analytical method for the analysis of ginsenosides, the main active compounds of *Panax ginseng*, in dietary supplements. Measurements were carried out with ultra-high performance supercritical fluid chromatography (UHPSFC) system Acquity UPC<sup>2</sup> coupled with photodiode array (PDA) and mass spectrometry (MS) detection.

The first step was the column screening using 11 stationary phases in combination with a CO<sub>2</sub>-based mobile phase and 4 organic modifiers: MeOH, MeOH/ACN (1:1), MeOH + 10 mM NH<sub>3</sub>, MeOH + 2 % H<sub>2</sub>O. The method optimization was carried out on 4 stationary phases with the best selectivity and peak resolution during the screening. This optimization involved changes in the composition of the mobile phase, gradient elution settings, back pressure regulator pressure, and column temperature. Finally, the effect of make-up solvents was evaluated.

The final UHPSFC-PDA-MS method used Torus 2-PIC column, gradient elution and CO<sub>2</sub> + MeOH/ACN (2:1) + 5 % H<sub>2</sub>O mobile phase. The make-up solvent used was MeOH + 10 mM NH<sub>3</sub>. The elution and separation of all 12 analyzed ginsenosides was achieved except for the isomeric critical pair Rc + Rb<sub>2</sub> which was separated with a slightly lower resolution of 1.07.

Eight dietary supplements containing Korean ginseng (*Panax ginseng*) and Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*), in both liquid and solid form, were analyzed using the final method. The solid samples were extracted using an ultrasonic bath and filtrated through a 0.22 μm PTFE filter. The effects of 3 extraction solvents were tested as a part of the optimization of sample preparation. The best extraction results were achieved using MeOH.

The results of the dietary supplements analysis confirmed the presence of ginsenosides in all 6 supplements containing Korean ginseng and the absence of ginsenosides in 2 supplements containing only Siberian ginseng.

**Key words:** UHPSFC-PDA-MS, method development, optimization, dietary supplements, ginsenosides, Panax ginseng

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové dňa 15. 5. 2024

.....

Tatiana Vaľková

## **Podakovanie**

Moje najväčšie podakovanie patrí prof. PharmDr. Lucii Novákovej, Ph.D. za odborné vedenie, cenné rady a venovaný čas pri vypracovávaní tejto diplomovej práce. Ďakujem taktiež pracovníkom Katedry analytickej chémie, hlavne PharmDr. Kateřine Plachké Ph.D za ústretovosť a poskytnuté rady. Podakovanie patrí aj mojej rodine a blízkym priateľom za podporu počas celého štúdia.

# OBSAH

ABSTRAKT .....	2
ABSTRACT .....	4
OBSAH .....	8
ZOZNAM SKRATIEK .....	10
1. ÚVOD .....	12
2. CIEĽ A ZADANIE PRÁCE .....	13
3. TEORETICKÁ ČASŤ .....	14
3.1 Superkritická fluidná chromatografia .....	14
3.1.1 Chromatografické metódy .....	14
3.1.2 Mobilná fáza v SFC .....	14
3.1.3 Stacionárne fázy v SFC .....	16
3.1.4 Účinnosť separácie v SFC .....	17
3.1.5 SFC inštrumentácia .....	18
3.2 Hmotnostne spektrometrický detektor .....	20
3.3 Všehoj ázijský .....	21
3.3.1 Štruktúra a fyzikálne chemické vlastnosti ginsenosidov .....	21
3.3.2 Publikované analytické metódy zaoberajúce sa analýzou ginsenosidov .....	27
3.4 Regulácia potravinových doplnkov .....	32
4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....	33
4.1 Prístrojové vybavenie .....	33
4.2 Laboratórne pomôcky .....	33
4.3 Použité stacionárne fázy .....	33
4.4 Použité chemikálie .....	34
4.5 Pracovný postup .....	36
4.5.1 Príprava zásobných roztokov štandardov .....	36
4.5.2 Príprava pracovných roztokov štandardov pre analýzu .....	36
4.5.3 Príprava pomocných kvapalín UHPSFC systému .....	37



4.5.4	Príprava mobilných fáz .....	37
4.5.5	Príprava prídavných kvapalín do MS .....	39
4.5.6	Príprava kalibračnej krivky.....	40
4.5.7	Príprava vzoriek analyzovaných prípravkov .....	40
4.6	Skríning separačných podmienok.....	42
4.7	Skríning zloženia prídavnej kvapaliny .....	44
5.	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	45
5.1	Základný kolónový skríning.....	45
5.2	Optimalizácia chromatografických podmienok na kolóne Cortecs HILIC.....	55
5.3	Optimalizácia chromatografických podmienok na kolóne BEH.....	58
5.4	Optimalizácia chromatografických podmienok na kolóne Torus DIOL .....	61
5.5	Optimalizácia chromatografických podmienok na kolóne Torus 2-PIC.....	63
5.6	Optimalizácia zloženia prídavnej kvapaliny MS detekcie .....	69
5.7	Finálne separačné a ionizačné podmienky .....	70
5.8	Optimalizácia prípravy vzorkov doplnkov stravy .....	72
5.9	Analýza doplnkov stravy .....	73
6.	ZÁVER .....	84
7.	POUŽITÁ LETERATÚRA.....	85

## ZOZNAM SKRATIEK

1-AA	1-aminoanthracén
2-EP	2-etylpiridín
2-PIC	2-pikolyamín
ACN	acetonitril
AmAc	octan amónny
AmF	mravenčan amónny
APCI	chemická ionizácia za atmosférického tlaku
BEH	stacionárna fáza využívajúca hybridný sorbent s etylénovými mostíkmi
BPR	regulátor spätného tlaku
CAD	detektor nabitého aerosólu
CSH	hybridné povrchovo nabité častice
DEA	dietylamín
DDD	denná doporučená dávka
ELSD	odparovací detektor rozptylu svetla
ESI	ionizácia elektrosprejom
EtOH	etanol
FA	kyselina mravčia
FID	plameňovo-ionizačný detektor
GC	plynová chromatografia
H	výškový ekvivalent teoretickej priehradky
HPLC	vysokoučinná kvapalinová chromatografia
HSS	vysoko odolný silikagél
IT	iónová pasca

LC	kvapalinová chromatografia
LC-MS	kvapalinová chromatografia v spojení s hmotnostnou spektrometriou
LF	lieková forma
log P	rozdeľovací koeficient
MeOH	metanol
MF	mobilná fáza
min	minúta
MS	hmotnostná spektrometria
<i>m/z</i>	pomer hmotnosť/náboj molekuly
PDA	fotodiódové pole
pKa	záporný dekadický logaritmus disociačnej konštanty kyseliny
PFP	pentafluorofenyl
PTFE	polytetrafluoroetylén
Q	kvadrupól
Q-IT	kvadrupól v spojení s iónovou pascou
QqQ	trojitý kvadrupól
Q-TOF	kvadrupól v spojení s analyzátorom doby letu
RSD	relatívna smerodajná odchýlka
SF	stacionárna fáza
SFC	superkritická fluidná chromatografia
SZPI	Státní zemědělská a potravinářská inspekce
TOF	analyzátor doby letu
UHSFC	ultra-vysokoúčinná superkritická chromatografia
UV	ultrafialové žiarenie
UPC <sup>2</sup>	ultra-účinná konvergenčná chromatografia

# 1. ÚVOD

Superkritická fluidná chromatografia (SFC) je spolu s kvapalinovou chromatografiou (HPLC) a plynovou chromatografiou (GC) radená medzi typické chromatografické separačné techniky. SFC využíva mobilnú fázu tvorenú oxidom uhličitým s prídavkom organických modifikátorov a aditív. Väčšina stacionárnych fáz využívaných v SFC je tvorená silikagélom v kolónovom formáte. Ultra-vysokoúčinná superkritická chromatografia (UHPSFC) je verzia SFC používajúca častice s priemerom menším ako 2 mikrometre a modifikovanú inštrumentáciu. Využitie si našla v aplikačných oblastiach ako bioanalýza, lipidomika, dopingová kontrola, analýza prírodných látok, environmentálna analýza, potravinová a farmaceutická analýza. Výhody prináša UHPSFC aj v analýzach štruktúrne podobných látok a izomérov [1, 6, 8, 14].

Schopnosť separovať štruktúrne podobné látky prírodného pôvodu sme využili pri vývoji UHPSFC metódy v spojení s PDA a MS detekciou. Analyzované boli doplnky stravy s obsahom izomérených látok zo skupiny ginsenosidov.

Ginsenosidy sú hlavné účinné látky rastliny *Panax ginseng* (všehoja ázijského). Všehoj, zvaný aj ženšen, je známi svojimi adaptogénnymi účinkami. Zároveň má pozitívny vplyv na imunitnú odpoveď a nervovú sústavu. Ginsenosidy patria štruktúrne medzi steroidné glykozidy podobné kortizolu. Izoména povaha najvýznamnejších zástupcov vychádza z rozdielnej substitúcie na kostre dammaranového typu.

Publikované práce zaoberajúce sa analýzou ginsenosidov doposiaľ zahŕňali iba metódy plynovej a kvapalinovej chromatografie. SFC má zrovnateľný rozsah aplikácií a je k týmto technikám komplementárna. Nová UHPSFC metóda by mohla ponúknuť rýchlu, účinnú a ekologickú alternatívu. Spojenie UHPSFC s hmotnostne spektrometrickou (MS) detekciou zároveň prináša vyššiu selektivitu, citlivosť a možnosť identifikácie v komplexnejších matriciach.

## 2. CIEĽ A ZADANIE PRÁCE

Zadaním tejto diplomovej práce bolo vyvinúť metódu ultra-vysokoúčinnnej superkritickej fluidnej chromatografie (UHPSFC) v kombinácii s PDA a MS detekciou na analýzu látok skupiny ginsenosidov v potravinových doplnkoch. Ginsenosidy sú látky povahy triterpénových saponínov s vysokým výskytom izomérie. Prvým cieľom bol vývoj metódy zameraný na účinnú separáciu izomérnych ginsenosidov za súčasného dosiahnutia čo najvyššieho rozlíšenia a symetrie pík. Druhým cieľom bolo využitie vyvinutej metódy k analýze potravinových doplnkov s obsahom kórejského ženšenu (všehoja ázijský) a sibírskeho ženšenu (všehojivec štetinatý) za účelom overenia prítomnosti ginsenosidov, a následného porovnania obsahov prítomných ginsenosidov s obsahmi deklarovanými výrobcami.

Základom bola počiatočná rešerš literatúry so zameraním na existujúce vyvinuté metódy, štruktúru a fyzikálne-chemické vlastnosti analytov. Nasledoval kolónový skrining, ktorého cieľom bol výber najvhodnejších kombinácií stacionárnych a mobilných fáz so zameraním na separáciu izomérnych analytov.

S cieľom zvýšenia selektivity, rozlíšenia a zlepšenia tvaru pík boli najlepšie kombinácie MF a SF podrobené optimalizácii separačných podmienok. Optimalizácia zahrňovala výber najvhodnejšej kombinácie organických modifikátorov a aditív mobilnej fáze, nastavenie gradientovej elúcie, teploty kolóny a tlaku spätného regulátora tlaku. Dielčím cieľom bol výber prídavnej kvapaliny do MS za účelom získania čo najvyššej odozvy analytov.

Nasledovala analýza potravinových doplnkov, ktorej hlavnými cieľmi boli potvrdenie/vyvrátenie prítomnosti ginsenosidov v skúmaných prípravkoch obsahujúcich extrakty všehoja ázijského a všehojivca štetinatého, a porovnanie obsahov ginsenosidov v prípravkoch s údajmi deklarovanými výrobcami. Dielčím cieľom bola optimalizácia prípravy vzorkov za účelom získania čo najvyššej odozvy a kompatibility s UHPSFC-PDA-MS systémom.

## 3. TEORETICKÁ ČASŤ

### 3.1 Superkritická fluidná chromatografia

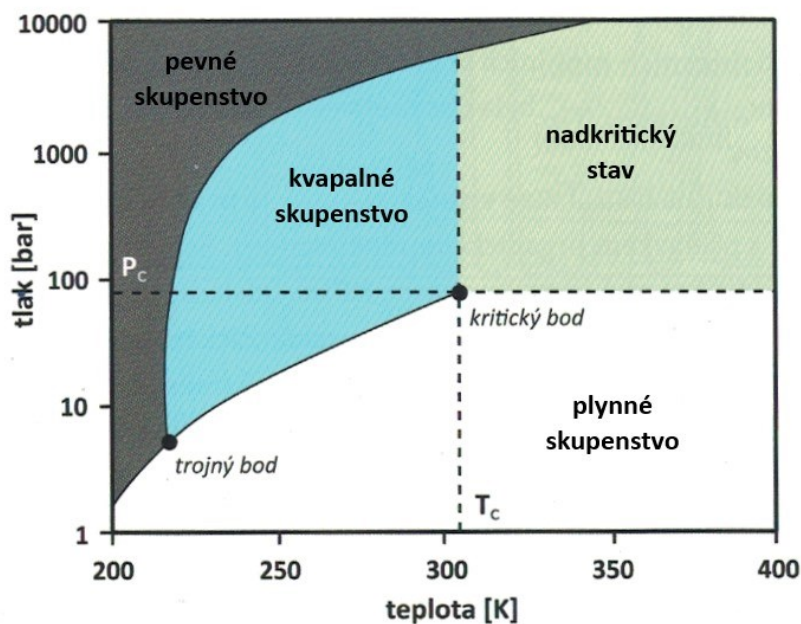
#### 3.1.1 Chromatografické metódy

Chromatografické metódy sú radené medzi separačné analytické techniky. Princíp separácie analytov je založený na rozdielnej distribúcii látok medzi dvoma vzájomne nemiesiteľnými fázami - mobilnou a stacionárnou. Stacionárna fáza (SF) sa v chromatografickej kolóne nachádza vo forme sorbentu. Mobilná fáza (MF) preteká stacionárnou fázou a je tvorená plynom, kvapalinou alebo nadkritickou kvapalinou. Pre separáciu je kľúčové opakované ustáľovanie rovnováhy separovaných analytov, s rozdielnou mierou interakcie, medzi SF a MF [1]. Podľa druhu použitej MF sa chromatografické techniky delia na plynovú chromatografiu (GC), kvapalinovú chromatografiu (LC), a superkritickú fluidnú chromatografiu (SFC).

Historicky sa prvá SFC separácia odohrala roku 1962. Cieľom prvých pokusov bola separácia analytov s vysokou teplotou varu, podliehajúcich termálnemu rozkladu pri teplotách potrebných k ich elúcii. Klesper et al. skúmali zvýšenie tlaku, ako kompenzačný mechanizmus nedostačujúcej teploty. Udržaním nadkritickej teploty tak dali zrod superkritickej fluidnej chromatografii [2, 3].

#### 3.1.2 Mobilná fáza v SFC

Superkritická fluidná chromatografia je chromatografická separačná technika používajúca mobilnú fázou v nadkritickom stave. Pohľad na podmienku nadkritického stavu MF a inštrumentácia SFC sa počas jej vývoja prudko menili [1, 3, 4]. Hlavnou zložkou MF v SFC je oxid uhličitý v nad/subkritickom stave, často v zmesi s organickým modifikátorom (OM) a prídavkom aditíva. Nadkritická kvapalina vzniká pri prekročení nadkritického bodu látky. Nadkritický bod látky je definovaný nadkritickou teplotou  $T_c$  a nadkritickým tlakom  $p_c$ . Fázový diagram na Obr. 1 graficky znázorňuje skupenské stavy  $CO_2$ , najpoužívanejšej MF pre SFC.



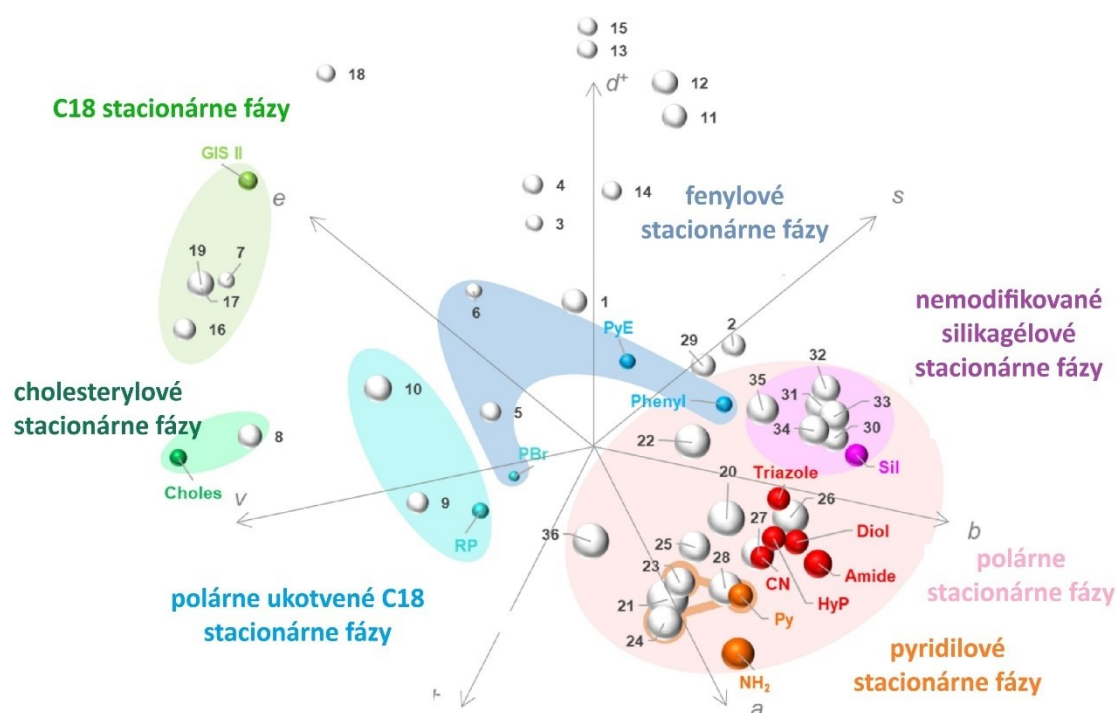
**Obr. 1:** Fázový diagram oxidu uhličitého.  $T_c$  = kritická teplota,  $p_c$  = kritický tlak, prevzaté a upravené zo zdroja [1].

Nadkritické tekutiny kombinujú výhodné fyzikálne-chemické vlastnosti kvapalín a plynov. Medzi ich hlavné výhody patrí vysoká hustota, solvatačná sila podobná kvapalinám, nízka viskozita a vysoké difúzne koeficienty podobné plynom. Nízka viskozita znižuje tlak systému, umožňuje vyšší tok MF, použitie dlhších kolón a častíc s menším priemerom. Vysoké difúzne koeficienty zvyhodňujú použitie vysokého toku MF a tak zvyšujú separačnú účinnosť, urýchľujú ekvilibráciu kolóny, elúciu analytov a čas analýzy [5, 6, 7].

Hlavnou zložkou MF je  $\text{CO}_2$ .  $\text{CO}_2$  je nepolárny plyn s ľahko dosiahnuteľnými nadkritickými podmienkami,  $p_c = 7,37 \text{ MPa}$  a  $T_c = 31,3 \text{ }^\circ\text{C}$  [1]. Výhodami  $\text{CO}_2$  sú miesiteľnosť s organickými rozpúšťadlami, chemická stabilita, slabá absorbanca v nízkej UV oblasti, netoxickosť, ekologickosť, cena a dostupnosť [3]. V dnešnej dobe sa v SFC používa ako MF  $\text{CO}_2$  v zmesi s organickými modifikátormi, najčastejšie alkoholmi s nízkou  $M_r$ , a aditívami, ako sú soli, kyseliny, báze a voda. Prítomnosť OM a aditív v MF rozširuje spektrum analyzovateľných látok, a spôsobuje posun stavu MF do subkritických hodnôt. Vďaka plynulej zmene vlastností je možné využívať výhody SFC mobilnej fázy aj mimo nadkritickú oblasť [3, 4, 6].

### 3.1.3 Stacionárne fázy v SFC

V technike SFC neexistuje univerzálna stacionárna fáza. Výber SF má veľký vplyv na retenciu analytov a selektivitu. Príkladom je možnosť separácie širokého spektra analytov za použitia jedenej MF s rôznymi SF [3]. Najčastejšie používaná klasifikácia stacionárnych fáz v SFC je založená na prístupe popisujúcom interakčný vzťah medzi analytom a chromatografickým systémom - LSER (linear solvation energy relationship) (Obr. 2) [8].



**Obr. 2:** Pavúčí diagram LSER so siedmimi deskriptormi zobrazujúci selektivitu stacionárnych fáz používaných v SFC, upravený zo zdroja [9].

Najčastejšie sa v praxi používajú polárne fázy na báze silikagélu. Všeobecne platí, že je možné využiť kolónu akejkoľvek chémie, pokiaľ znesie tlak do výšky 60 MPa a je stabilná v CO<sub>2</sub> a zmesi CO<sub>2</sub> s OM [8]. Špecifikom tejto techniky sú SF vyvinuté priamo pre achirálnu SFC separáciu, ako 2-etylpyridinová (2-EP) fáza, 1-aminoantracén (1-AA), 2-pikolyamin (2-PIC), 4-etylpyridín (4-EP), aminofenyl, benzamid, dietylamin (DEA), morfolín, propylacetamid a pyridin-amid [3]. V UHPSFC sa všeobecne využívajú kolóny s veľkosťou častíc < 2 μm a priemerom 3 mm a väčším. Širšie priemery kolón redukujú stratu chromatografickej účinnosti, zapríčinenú relatívne veľkými mimokolónovými objemami UHPSFC systémov (~ 85 μl<sup>2</sup>) [4,6].

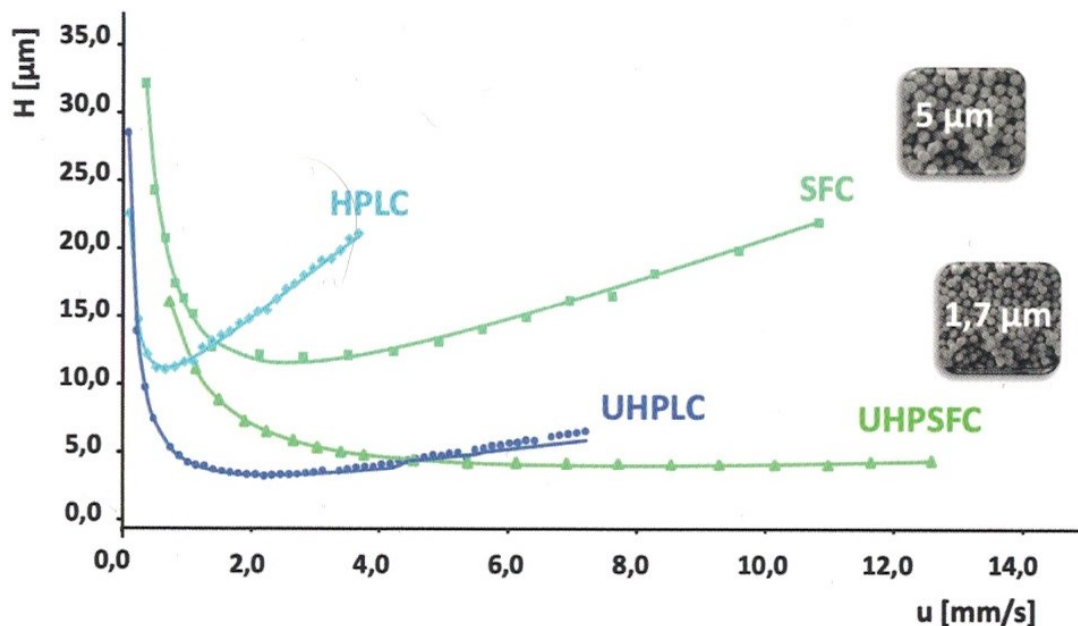


### 3.1.4 Účinnosť separácie v SFC

Závislosť účinnosti separácie na lineárnej rýchlosti toku MF a deje prispievajúce k rozmyvaniu zón separovaných látok popisuje Van Deemterova rovnica, ktorá umožňuje optimalizovať účinnosť chromatografickej kolóny, a získať tak maximálnu účinnosť separácie za daných podmienok.

Výhodou SFC je nízka viskozita MF, ktorej dôsledkom je rýchla difúzia analytov, nižší systémový tlak a zlepšená kinetika separácie. Vyššie difúzne koeficienty spôsobujú rýchlejšie ustáľovanie rovnováhy medzi SF a MF, a tým prispievajú k posunu minima van Deemterovej krivky k vyšším lineárnym rýchlostiam [1].

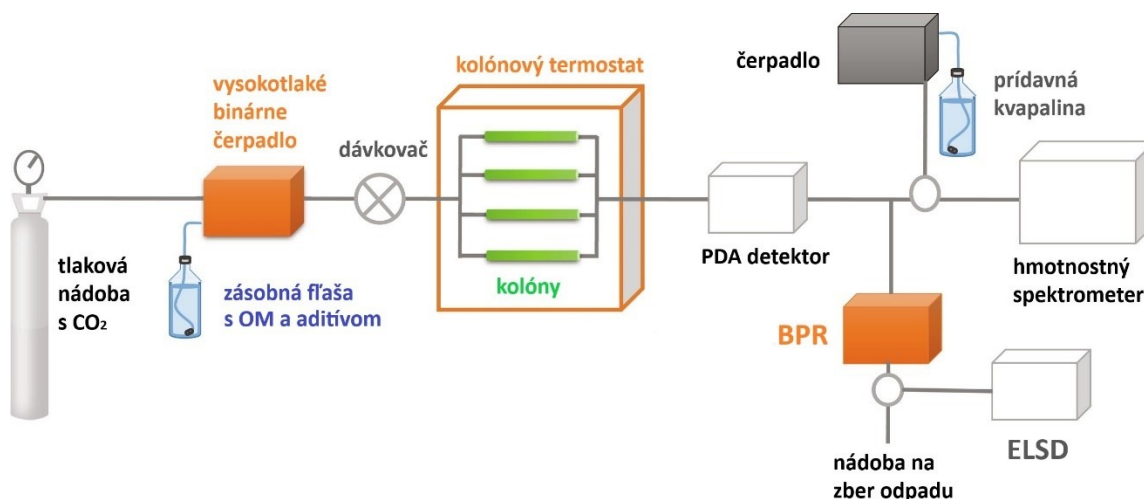
Spomínané výhody SFC vytvárajú skvelý podklad pre analýzy s využitím malých častíc a dlhších analytických kolón. Menší priemer UHPSFC častíc zvyšuje účinnosť separácie a povaha MF posúva minimum van Deemterovej krivky k vyšším rýchlostiam toku MF v porovnaní s HPLC a UHPLC. To v UHPSFC umožňuje využitie vyšších rýchlostí toku bez straty účinnosti a vedie ku kratším časom analýz (Obr. 3) [1, 53].



**Obr. 3:** Porovnanie van Deemterových kriviek pre HPLC a SFC za použitia častíc s priemerom 5 μm, a pre UHPLC a UHPSFC za použitia častíc veľkosti 1,7 μm. Upravené a prevzaté zo zdroja [53].

### 3.1.5 SFC inštrumentácia

Inštrumentácia moderných SFC systémov (Obr. 4) vychádza z modifikovanej inštrumentácie HPLC. Hlavnými rozdielmi sú prítomnosť regulátora spätného tlaku (BPR), binárneho čerpadla, modifikácie automatického dávkovača, UV detektora a špecifické rozhranie pre spojenie s MS detekciou [1].

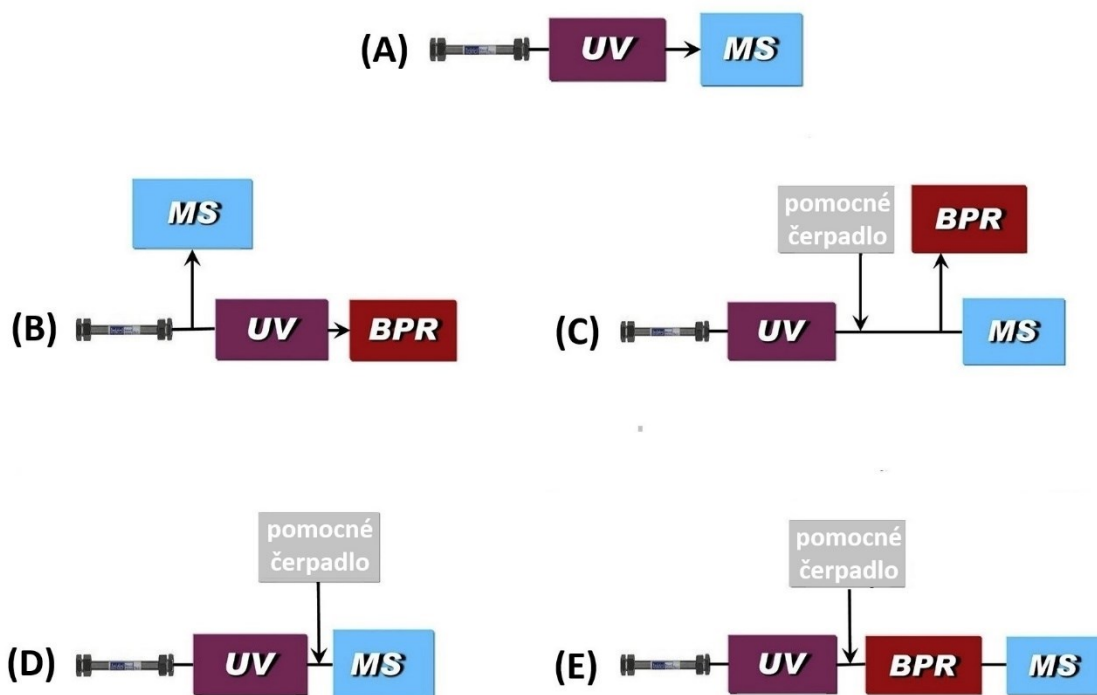


**Obr. 4:** Inštrumentácia superkritickej fluidnej chromatografie, upravené a prevzaté zo zdroja [10]. PDA – detektor diódového poľa, BPR – regulátor spätného tlaku, ELSD - odparovací detektor rozptylu svetla.

Odlišná hustota a stlačiteľnosť  $\text{CO}_2$  a OM vyžadujú v SFC systémoch použitie binárneho čerpadla.  $\text{CO}_2$  je do systému čerpaný v kvapalnom skupenstve pri teplote v rozmedzí 2-5 °C. Automatický dávkovač musí byť konštrukciou prispôsobený povahe MF a jej expanzii pri prechode medzi skupenskými stavmi. K regulácii tlaku sa používajú automatické regulátory spätného tlaku (BPR) so softvérovou kontrolou. V SFC je potrebná kontrola tlaku počas celej analýzy, preto je BPR umiestnený za detektorom. Typické hodnoty tlaku sa pohybujú v rozmedzí 12-15 MPa. Celkový tlak SFC systému je súčtom tlaku produkovaného BPR, komponentami systému a kolónou [1, 11].

Najčastejšie používané detektory sú UV detektor, odparovací detektor rozptylu svetla (ELSD), detektor nabitého aerosólu (CAD) a MS. Spojenie SFC systému s UV detekciou vyžaduje tlakovo odolnejšiu konštrukciu detekčnej cely oproti celám využívaným v HPLC [11].

Použitie kombinácie SFC s MS detekciou vyžaduje špeciálne rozhranie. Je to z dôvodu dekompresie nadkritického CO<sub>2</sub> a zamedzenia precipitácie vzorkov pri prechode do iónového zdroja. Obr. 5 zobrazuje päť najčastejšie používaných rozhraní pre spojenie SFC s MS. Najpoužívanejším je rozhranie s delením prietoku pred BPR s pomocným čerpadlom (C), ktoré umožňuje prídavok prídavnej kvapaliny. Medzi ďalšie rozhrania sú radené BPR s pomocným čerpadlom bez delenia prietoku (E), vhodný pre kombináciu s APCI ionizáciou, priame prepojenie (A), delenie prietoku pred UV a BPR bez pomocného čerpadla (B), a rozhranie pomocou kvapaliny regulujúcej tlak (D). Úlohou pomocného čerpadla je prívod pomocnej kvapaliny, ktorá zamedzuje precipitácii analytov, ovplyvňuje ich ionizáciu a odozvu MS, zabezpečuje optimálnu tvorbu spreja a upravuje prietok do iónového zdroja [12, 13].



**Obr. 5:** Rozhrania pre spojenie SFC-MS, upravené zo zdroja [12]. (A) priame prepojenie, (B) rozhranie s delením prietoku pred UV a BPR, (C) rozhranie s delením prietoku pred BPR s pomocným čerpadlom, (D) rozhranie pomocou kvapaliny regulujúcej tlak, (E) rozhranie s BPR a pomocným čerpadlom bez delenia prietoku.

### **3.2 Hmotnostne spektrometrický detektor**

Hmotnostne spektrometrická detekcia patrí medzi univerzálne, vysoko citlivé a selektívne metódy. Funguje na princípe ionizácie neutrálnych molekúl a následnej separácie iónov podľa pomeru hmotnosti a náboja ( $m/z$ ). Tento proces prebieha v troch krokoch. Prvým krokom je ionizácia analytu v iónovom zdroji, nasleduje separácia iónov v analyzátore podľa pomeru  $m/z$  a koncovým krokom je detekcia analytov detektorom. Spojenia SFC-MS zvyčajne využívajú ionizáciu za atmosférického tlaku (API). Z toho v najväčšom zastúpení, viac ako 70 % spojení, je používaná ionizácia pomocou elektrosperja (ESI) a približne 20 % tvorí chemická ionizácia za atmosférického tlaku (APCI). Zvyšných 10 % je tvorených ostatnými druhmi ionizácie. Medzi najpoužívanejšie hmotnostné analyzátory v SFC patria jednoduchý kvadrupól (Q), trojitý kvadrupól (QqQ) a analyzátor doby letu (TOF) [14].

Jednoduchý kvadrupól patrí medzi preletové analyzátory s nízkou rozlišovacou schopnosťou. Skladá sa zo štyroch tyčí, ktoré vytvárajú elektrické pole spôsobujúce osciláciu iónov v jeho strede. Amplitúda oscilácie iónu je kľúčová pre prechod analyzátorom. Prechod je umožnený iba iónom so stabilnou osciláciou zodpovedajúcou konkrétnej hodnote  $m/z$ . Výhodou jednoduchého kvadrupólu je jeho praktickosť, jednoduchosť, priestorová nenáročnosť a cena. Nevýhodou je obmedzený hmotnostný rozsah, jednotkové rozlíšenie a obmedzená skenovacia rýchlosť. Jednoduchý kvadrupól si našiel svoje uplatnenie v analýzach tabliet, vín alebo čajových extraktov [14].

Trojitý kvadrupól ponúka vysokú citlivosť, strednú až vysokú skenovaciu rýchlosť a široký dynamický rozsah. Využívaný je napríklad v analýze komplexných biologických matric, ako je plazma alebo sérum. QqQ je používaný hlavne v kvantitatívnej analýze za využitia selektívneho záznamu jednej reakcie (SRM) [1,14].

Analyzátor doby letu je často využívaný v odvetviach environmentálnej analýzy a analýzy biologických molekúl. Vysoká skenovacia rýchlosť, rozlíšenie a presnosť hmoty sú výhody vďaka ktorým sa TOF používa nielen v kvantitatívnej, ale aj kvalitatívnej analýze [1,14].

Príkladmi detektorov používaných v hmotnostnej spektrometrii sú elektrónové násobiče, fotonásobiče a Faradayove kliečky [1].

### 3.3 Všehoj ázijský

Všehoj, druhým menom ženšen, je rod rastlín spadajúci do čeľade aralkovitých (*Araliaceae*) [1]. Medzi najznámejších zástupcov tohto rodu patria *Panax ginseng* (všehoj ázijský, známy aj pod názvom kórejský ženšen), *Panax quinquefolius* (americký ženšen) a *Panax notoginseng* (ženšen notoginseng, zvaný čínsky ženšen) [15].

Najpoužívanejším druhom ženšenu je *Panax ginseng*. Ženšen si historicky našiel svoje postavenie ako potravinu a liečivo [16]. Na liečebné účely sa využíva hlavne sušený koreň rastliny s najvyšším obsahom účinných látok. Nositeľmi účinku sú ginsenosidy, triterpénové saponíny, špecifické obsahové látky rastlín rodu ženšen. Podľa spôsobu spracovania sa ženšenový koreň delí na biely ženšen (*Ginseng Radix Alba*) sušený na slnku a červený ženšen (*Ginseng Radix Rubra*), ktorý je sparený a následne sušený.

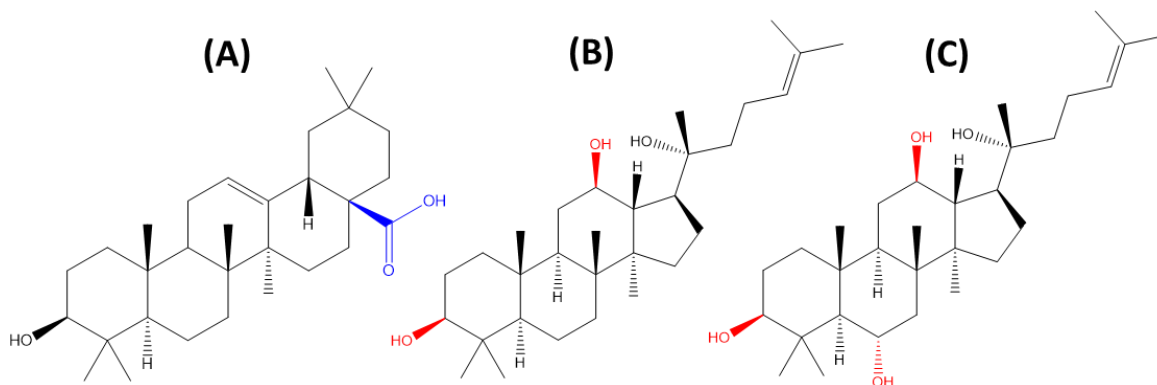
Ženšen má svoje tradičné využitie v čínskej medicíne. Historicky sa radí do skupiny drog zvyšujúcich odolnosť organizmu a zlepšujúcich schopnosť prekonávať záťaž (adaptogény) [17]. Moderné výskumy sa orientujú na skúmanie jeho účinkov na imunitný systém, protirakovinové pôsobenie a centrálny nervový systém so zameraním na neurodegeneratívne ochorenia, ovplyvnenie neurotransmisie a zlepšenie kognície [18-20].

Ženšenu taxonomicky nepríbuzné rastliny nesúce adaptogénne účinky, sú označované, ako rastliny ženšenu podobné. Príkladom je *eleutherococcus senticosus* (sibírsky ženšen), *whitania somnifera* (indický ženšen, ašvaganda), či *lepidium meyenii* (peruánsky ženšen) [21, 22].

#### 3.3.1 Štruktúra a fyzikálne chemické vlastnosti ginsenosidov

Metabolity vykazujúce adaptogénne vlastnosti je možné podľa štruktúry deliť na aromatické zlúčeniny podobné katecholamínom a steroidné saponíny podobné kortizolu [23]. Ginsenosidy sú štruktúrne steroidné glykozidy. Skladajú sa z necukornej a cukornej zložky spojenej O-glykozidovou väzbou. Necukorná, aglykónová, kostra je najčastejšie tvorená tetracyklickým cyklopentanoperhydrofenanthénom

v trans usporiadaní. Cukorná časť je vo väčšine prípadov tvorená kombináciou glukózy a ramnózy, arabinózou alebo xylózou [23]. Ginsenosidy možno deliť podľa ich aglykónovej kostry na štruktúry dammaranového a oleanového typu (Obr. 6). Viac zastúpené dammarany sú ďalej podľa pozície a počtu glykozidových zvyškov delené na protopanaxadioly a protopanaxatrioly [24].



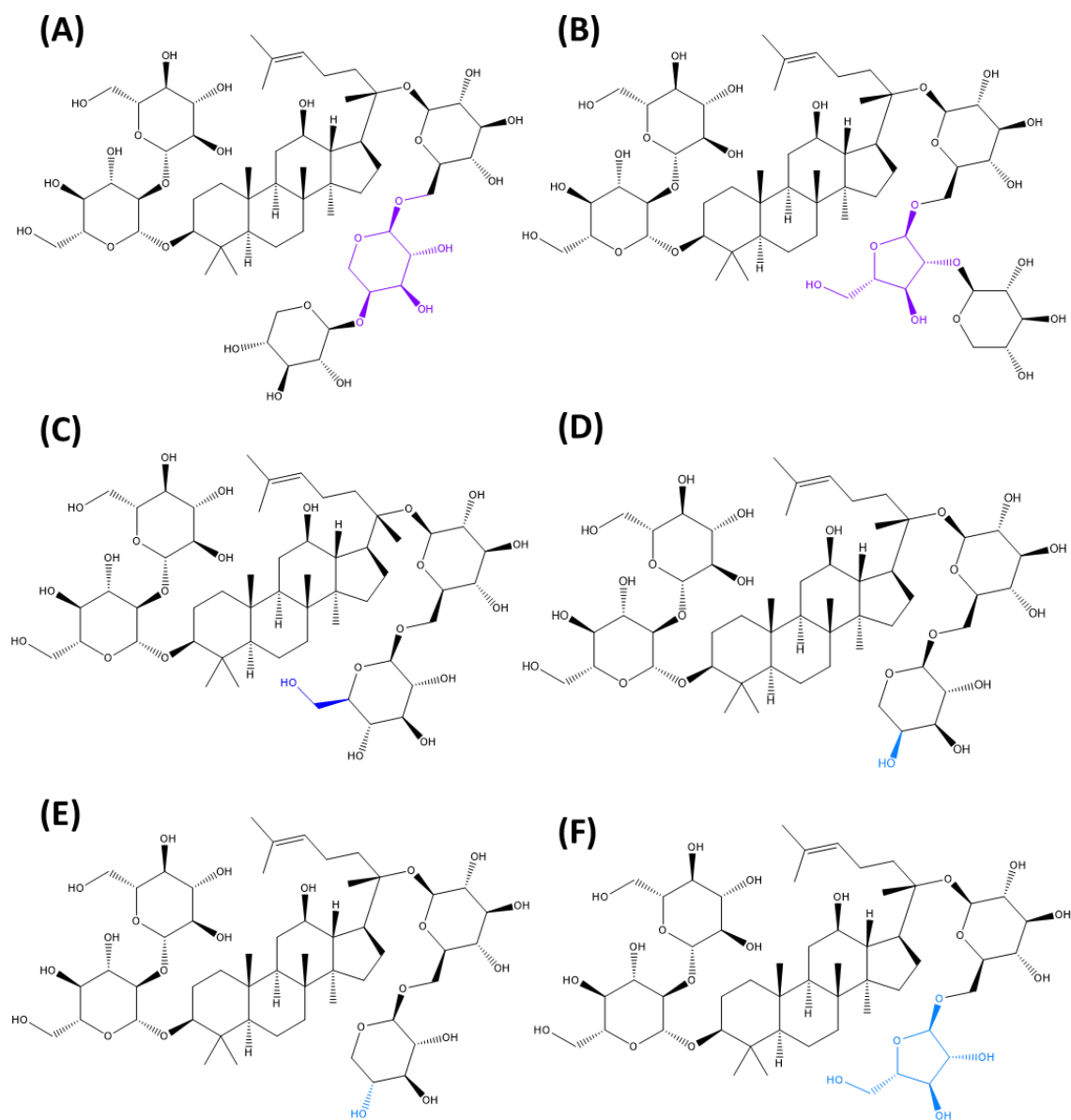
**Obr. 6:** Štruktúry základných skeletov ginsenosidov oleanového a dammaranového typu. (A) oleanová kyselina, (B) protopanaxadiol, (C) protopanaxatriol.

Medzi typické štruktúrne znaky skupiny oleanových ginsenosidov patrí modifikácia postranného reťazca na uhlíku C20. Skupina dammaranov má typické usporiadanie glykozidových väzieb na základnom skelete. Protopanaxadioly sú typické glykozidovými väzbami v polohách C3 a C20 a pre protopanaxatrioly sú charakteristické cukorné zbytky v polohách C6 a C20.

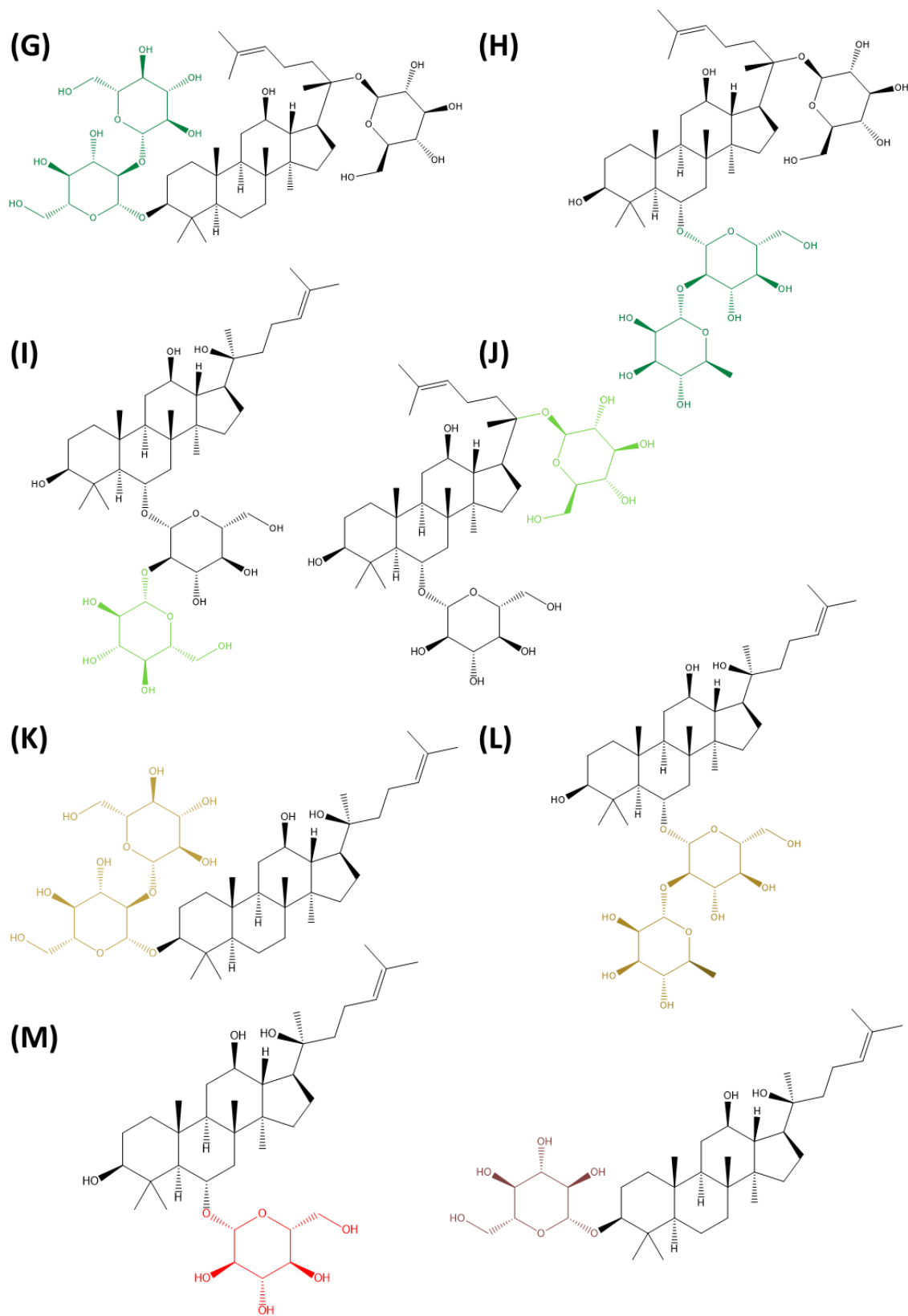
V skupine ginsenosidov je častý výskyt izomérie. Jedná sa o polohovú, funkčnú alebo stereoizomériu. Na Obr. 7 a Obr. 8 sú znázornené najvýznamnejšie ginsenosidy rozdelené do izomérnych skupín s farebne vyznačenými štruktúrnymi rozdielmi.

Najjednoduchšiu štruktúru má ginsenosid **Rh2** ( $M_r = 622,44$ ). Jedná sa o glukózu naviazanú na uhlíku C3 protopanaxadiolového skeletu. Väzbou rovnakého cukru do polohy C6 protopanaxatriolového skeletu vzniká ginsenosid **Rh1** ( $M_r = 638,44$ ). Ginsenosidy **Rg2 + Rg3** ( $M_r = 784,50$ ) a **Re + Rd** ( $M_r = 946,55$ ) sú polohové izoméry líšiace sa polohou hydroxylovej skupiny a cukorných zbytkov na steroidnom skelete. Protopanaxatriolové ginsenosidy **Rf + Rg1** ( $M_r = 800,49$ ) sú polohové izoméry, líšiace sa polohou glukózy v molekule. Skupina ginsenosidov **Rb2 +**

Rb3 + Rc (Mr = 1078,59) sa skladá z 2 stereoizomérov Rb2 + Rb3, a ich polohového a funkčného izoméru Rc. Výmenou cukorného zbytku xylózy ginsenosidu Rb3 za glukózu vzniká ginsenosid Rb1 (Mr = 1108,60). Ginsenosidy Ra1 + Ra2 (Mr = 1210,63) sú vzájomne funkčnými a polohovými izomérmi. Z dôvodu vysokej ceny štandardov neboli ginsenosidy Ra1 a Ra2 pri vývoji metódy použité.



**Obr. 7:** Prehľad najvýznamnejších ginsenosidov I. Nakreslené v ChemDraw. (A) ginsenosid Ra1, (B) ginsenosid Ra2, (C) ginsenosid Rb1, (D) ginsenosid Rb2, (E) ginsenosid Rb3, (F) ginsenosid Rc.



**Obr. 8:** Prehľad najvýznamnejších ginsenosidov II. Nakreslené v ChemDraw. (G) ginsenosid Rd, (H) ginsenosid Re, (I) ginsenosid Rf, (J) ginsenosid Rg1, (K) ginsenosid Rg3, (L) ginsenosid Rg2, (M) ginsenosid Rh1, (N) ginsenosid Rh2.



Fyzikálne-chemické vlastnosti najvýznamnejších ginsenosidov sú zhrnuté v Tab. 1. Z podstaty ginsenosidov ako steroidných glykozidov vyplýva, že ich steroidné jadro zvyšuje lipofilitu molekuly, a počet naviazaných cukorných zbytkov zvyšuje jej hydrofilitu. Toto tvrdenie podporuje aj log P (rozdeľovací koeficient), ktorý poukazuje na mierne lipofilnú až lipofilnú povahu ginsenosidov. Tieto látky sú veľmi ťažko rozpustné vo vode a dobre rozpustné v menej polárnom MeOH [26]. Ginsenosidy sú veľmi slabo kyslé analyty, ich pKa (záporný dekadický logaritmus disociačnej konštanty kyseliny) sa pohybuje v rozmedzí 12,85 – 12,91. Analyty sa v chromatografickom systéme budú chovať ako skôr neutrálne látky.

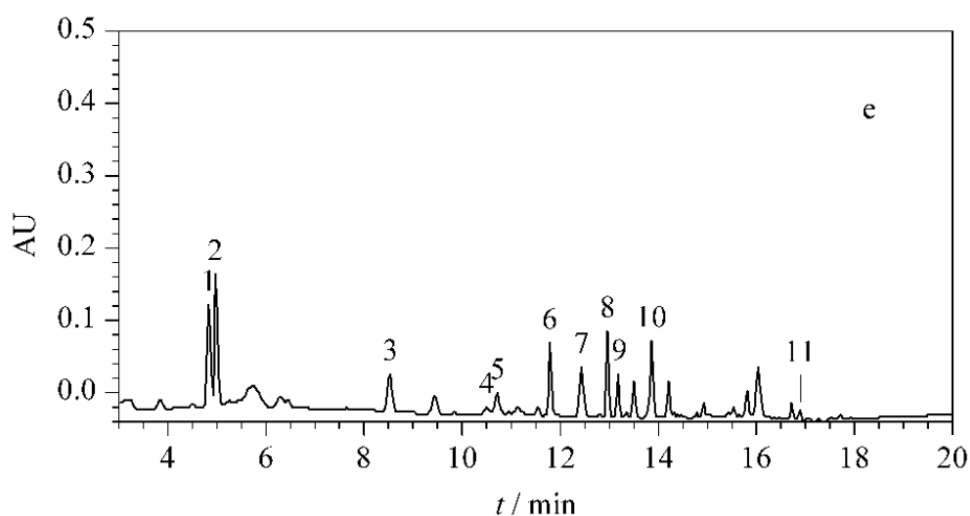
**Tab. 1:** Fyzikálne-chemické vlastnosti najvýznamnejších ginsenosidov, zdroje: SciFinder [27], ChemDraw - monoizotopická hmotnosť.

názov ginsenosidu	sumárny vzorec	monoizotopická hmotnosť	log P	pKa	donory protónov	akceptory protónov
<b>Ra1</b>	C <sub>58</sub> H <sub>98</sub> O <sub>26</sub>	1210,6346	0,056±0,994	12,85±0,70	16	26
<b>Ra2</b>	C <sub>58</sub> H <sub>98</sub> O <sub>26</sub>	1210,6346	1,824±0,971	12,85±0,70	16	26
<b>Rb1</b>	C <sub>54</sub> H <sub>92</sub> O <sub>23</sub>	1108,6029	1,876±0,908	12,85±0,70	15	23
<b>Rb2</b>	C <sub>53</sub> H <sub>90</sub> O <sub>22</sub>	1078,5924	2,799±0,940	12,85±0,70	14	22
<b>Rb3</b>	C <sub>53</sub> H <sub>90</sub> O <sub>22</sub>	1078,5924	2,799±0,940	12,85±0,70	14	22
<b>Rc</b>	C <sub>53</sub> H <sub>90</sub> O <sub>22</sub>	1078,5924	3,490±0,914	12,85±0,70	14	22
<b>Rd</b>	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> O <sub>18</sub>	946,5501	3,383±0,862	12,85±0,70	12	18
<b>Re</b>	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> O <sub>18</sub>	946,5501	1,890±0,841	12,85±0,70	12	18
<b>Rf</b>	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub>	800,4922	3,389±0,856	12,85±0,70	10	14
<b>Rg1</b>	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub>	800,4922	1,502±0,473	12,91±0,70	10	14
<b>Rg2</b>	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>13</sub>	784,4973	3,647±0,823	12,85±0,70	9	13
<b>Rg3</b>	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>13</sub>	784,4973	5,140±0,854	12,85±0,70	9	13
<b>Rh1</b>	C <sub>36</sub> H <sub>62</sub> O <sub>9</sub>	638,4934	3,289±0,435	12,91±0,70	7	9
<b>Rh2</b>	C <sub>36</sub> H <sub>62</sub> O <sub>8</sub>	622,4445	5,025±0,428	12,91±0,70	6	8

### 3.3.2 Publikované analytické metódy zaoberajúce sa analýzou ginsenosidov

V Tab. 2 sú zhrnuté doteraz publikované metódy zaoberajúce sa analýzou ginsenosidov. Najčastejšie využívané boli techniky HPLC a UHPLC za použitia UV alebo MS detekcie [29-46]. Najvyužívanejšou stacionárnou fázou pre analýzy pomocou kvapalinovej chromatografie bola kolóna C18, mobilnú fázu tvoril ACN s H<sub>2</sub>O. Plynová chromatografia bola použitá pre vývoj metódy iba v jednom prípade [28]. Časy analýz sa pohybovali v intervale 14-90 min. Priemerný počet stanovovaných analytov bol 7.

Analýzou 12 ginsenosidov sa zaoberala technika UHPLC s PDA detekciou, za použitia nepolárnej C18 kolóny, mobilnej fáze kombinujúcej H<sub>2</sub>O a ACN a dĺžky analýzy 20 minút (Obr. 9) [29]. Analýzou najväčšieho počtu analytov, 22 ginsenosidov, sa zaoberala práca používajúca techniku UHPLC s UV detekciou a časom analýzy 80 minút [30]. Žiadna publikovaná metóda sa nezaoberala analýzou za použitia techniky UHPSFC-PDA-MS.



**Obr. 9:** Chromatogram prípravku s obsahom ginsenosidov, analyzovaný UHPLC-PDA metódou. Ginsenosid: (1) Rg1, (2) Re, (3) Rf, (4) Rh1, (5) Rg2, (6) Rb1, (7) Rc, (8) Rb2, (9) Rb3, (10) Rd, (11) Rg3, (12) Rh2. Prevzaté zo zdroja [29].

**Tab. 2:** Publikované analytické metódy pre stanovanie ginsenosidov v produktoch s obsahom ženšenu. N/A – neuvedené, FID – plameňovo ionizačný detektor, FA – kyselina mravčia, MS/MS – tandemová hmotnostná spektrometria, Q-IT – kombinácia jednoduchého kvadrupólu a iónovej pasce, UV – spektrofotometria v UV oblasti.

metóda	analyty (počet)	stacionárna fáza	mobilná fáza	čas analýzy [min]	nástrek [ $\mu$ L]	prietok [ml/min]	detekcia	rok a zdroj
GC	Rb1, Rc, Rd, Re, Rg1, Ro (6)	DB-5 (13,3 m x 0,18 mm; 0,4 $\mu$ m) DB-5 (15 m x 0,32 mm; 0,25 $\mu$ m)	hélium	14	N/A	2	FID	1995 [28]
HPLC	F11, RT5 (2)	Acclaim RSLC 120 C18 150 mm x 2,1 mm; 3 $\mu$ m	32 % ACN + 0,34 % FA	42	20	0,4	MS/MS (Q-IT)	2014 [31]
HPLC	Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rg1 (6)	Phenomenex Luna C18 150 mm x 4,6 mm; 5 $\mu$ m	A: H <sub>2</sub> O B: 80 % ACN	45	10	1,5	UV (203 nm)	2013 [32]
HPLC	Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rg1 (6)	Spherisorb ODS-2 RP-18 250 mm x 4,6 mm; 5 $\mu$ m	A: ACN B: H <sub>2</sub> O	70	10	1,6	UV (203 nm)	2002 [33]
HPLC	Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rg1 (6)	Beckman's Ultrasphere C18 250 mm x 4,6 mm; 5 $\mu$ m	A: ACN B: H <sub>2</sub> O	70	10	1,6	UV (203 nm)	2003 [34]
HPLC	Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1 (7)	YMC-Pack PVA-Sil 250 mm x 2,1 mm; 5 $\mu$ m	82,5 % ACN	20	5	0,298	UV (203 nm)	2007 [35]

**Tab. 3:** Publikované analytické metódy pre stanovanie ginsenosidov v produktoch s obsahom ženšenu – časť 2. PDA – detektor diódového poľa, AA – kyselina octová, ELSD – odparovací detektor rozptylu svetla, AmAc – octan amónny, QqQ – trojitý kvadrupól.

metóda	analyty (počet)	stacionárna fáza	mobilná fáza	čas analýzy [min]	nástretek [ $\mu$ L]	prietok [ml/min]	detekcia	rok a zdroj
HPLC	Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1 (7)	Zorbax C18 150 mm x 2,1 mm; 5 $\mu$ m	A: ACN B: H <sub>2</sub> O	56	N/A	0,2	MS/MS (Q-IT)	2001 [36]
HPLC	Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1 (7)	Zorbax C18 150 mm x 2,1 mm; 5 $\mu$ m, Altima C18 250 mm x 4,6; 5 $\mu$ m	A: ACN B: H <sub>2</sub> O	73	N/A	1,3	MS/MS (Q-IT); PDA (203 nm)	2001 [37]
HPLC	Rb1, Rb2, Rb3, Rc, Rd, Re, Rg1, Rg3 (8)	Pico Tag C18 300 mm x 3,9 mm; 4 $\mu$ m	A: H <sub>2</sub> O + 0,02 % AA B: ACN + 0,02 % AA	79	10	0,375	MS/MS	2014 [38]
HPLC	Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rg1, Rg3, Rg5, Rk1 (9)	Gemini C18 150 mm x 4,6 mm; 5 $\mu$ m	A: H <sub>2</sub> O B: ACN	70	10	1	ELSD	2016 [39]
HPLC	F11, Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Ro (9)	Adsorbosphere HS C18 150 mm x 4,6 mm; 3 $\mu$ m	A: 50 % ACN B: H <sub>2</sub> O + 10 mM AmAc	72	10	1	MS (QqQ)	2000 [40]

**Tab. 4:** Publikované analytické metódy pre stanovanie ginsenosidov v produktoch s obsahom ženšenu – časť 3. CAD – detektor nabitého aerosólu, DAD – detektor diódového poľa, MS – hmotnostná spektrometria, IT – iónová pasca, Q-TOF – jednoduchý kvadrupól v kombinácii s analyzátorom doby letu.

metóda	analyty (počet)	stacionárna fáza	mobilná fáza	čas analýzy [min]	nástrek [ $\mu$ L]	prietok [ml/min]	detekcia	rok a zdroj
HPLC	F4, Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rg1, (R)-Rg3, (S)-Rg3, Rg5, Rg6, Rh4, Rk1, Rh3 (14)	Gemini C18 250 mm x 4,6 mm; 5 $\mu$ m	A: H <sub>2</sub> O B: ACN	80	20	N/A	CAD	2013 [41]
HPLC	C-K, F1, F2, R1, Rb-1, Rb2, Rb3, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg2, Rg3, Rh1, Rh2 (16)	Acclaim RSLC 120 C18 150 mm x 2,1 mm; 2,2 $\mu$ m	A: H <sub>2</sub> O + 0,5 % FA B: ACN	45	20	0,4	DAD, MS/MS (Q-IT)	2017 [42]
HPLC	F1, F11, K, R1, RT5, Rb1, Rb2, Rb3, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg2, Rg3, Rh1, Rh2 (17)	Acclaim RSLC 120 C18 150 mm x 2,1 mm; 3 $\mu$ m	A: H <sub>2</sub> O + 0,5 % FA B: ACN	45	N/A	0,4	MS (IT)	2015 [43]
HPLC	F5, Rb1, Rb2, Rb-3, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg2, (R)-Rg3, (S)-Rg3, (R)-Rh1, (S)-Rh1, (R)-Rh2, (S)-Rh2, Rh4, Rk3, Ro (19)	Agilent Zorbax SB C18 250 mm x 4,6 mm; 5 $\mu$ m	A: H <sub>2</sub> O + 10 mM AmF B: ACN + 0,1 % FA	80	2	1	MS/MS (Q-TOF)	2014 [44]

**Tab. 5:** Publikované analytické metódy pre stanovanie ginsenosidov v produktoch s obsahom ženšenu – časť 4.

metóda	analyty (počet)	stacionárna fáza	mobilná fáza	čas analýzy [min]	nástrek [μL]	prietok [ml/min]	detekcia	rok a zdroj
UHPLC	Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rg1, Rh1 (7)	ACQUITY UPLC BEH C18 100 mm x 2,1 mm; 1,7 μm	A: H <sub>2</sub> O B: ACN	15	10	0,2	MS/MS	2016 [45]
UHPLC	Ra3, Rb1, Rd, Re, Rg1, Rg2, Rh1 (7)	ACQUITY UPLC HSS T3 100 mm x 2,1 mm ; 1,8 μm	A: H <sub>2</sub> O + 0,1 % FA B: ACN + 0,1 % FA	18	2	0,45	MS/MS (Q-TOF)	2015 [46]
UHPLC	Rb1, Rb2, Rb3, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg2, Rg3, Rh1, Rh2 (12)	ACQUITY UPLC BEH C18 50 mm x 2,1 mm; 1,7 μm	A: ACN B: H <sub>2</sub> O	20	2	0,3	PDA	2015 [29]
UHPLC	F1, F2, K, PPD, (R)-PPT, (S)-PPT, Rb1, Rb2, Rb3, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, (R)-Rg2, (S)-Rg2, (R)-Rg3, (S)-Rg3, (R)-Rh1, (S)-Rh1, (R)-Rh2, (S)-Rh2 (22)	LaChromUltra C18 100 mm x 2 mm; 2 μm  LaChromUltra C18 50 mm x 2 mm; 2 μm	A: 20 % ACN B: 80 % ACN	90	5	0,2; 0,3	UV (203 nm)	2013 [30]

### **3.4 Regulácia potravinových doplnkov**

Doplnok stravy, alebo potravinový doplnok, je zákonom č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobkoch definovaný ako [48]: „potravina, jejímž účelom je doplňovat běžnou stravu a která je koncentrovaným zdrojem vitaminů a minerálních látek nebo dalších látek s nutričním nebo fyziologickým účinkem, obsažených v potravine samostatně nebo v kombinaci, určená k přímé spotřebě v malých odměřených množstvích.“ Legislatívu potravinových doplnkov ďalej upravuje zákon č. 174/2021 Sb. a vyhláška č. 58/2018 Sb., o doplňcích stravy a složení potravin [48-51].

Zjednodušene sa dá povedať, že potravinové doplnky sú koncentrovaným zdrojom živín alebo iných látok, ktorých účelom je doplňovať bežnú stravu. Potravinové doplnky na rozdiel od liečivých prípravkov neslúžia k liečbe ani prevencii chorôb. Podľa platnej legislatívy musia mať z dôvodu jasného rozlíšenia od liečivých prípravkov na obale jasne viditeľný nápis „Doplněk stravy“ [52].

Doplnky stravy pred uvedením na trh nepodliehajú žiadnemu schvaľovaciemu procesu zo strany rezortu Ministerstva zemédelství. Povinnosťou prevádzkovateľa potravinárskeho podniku je iba informačná povinnosť, splnená zaslaním českého textu označenia vrátane povinných informácií, ktorý bude uvedený na obale výrobku. Pre splnenie informačnej povinnosti nie je nutné predkladať výsledky akýchkoľvek testov [51].

Z dôvodu absencie predbežného schvaľovania venuje Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI) kontrole potravinových doplnkov zvýšenú pozornosť. Medzi najčastejšie problémy patria: chýbajúce informácie o dávkovaní, prítomnosť liečebných tvrdení, prípravok neobsahuje látky deklarované na obale alebo ich obsahuje v nižšom množstve. O prípravkoch kvalifikovaných ako nebezpečné informuje SZPI verejnosť na svojich webových stránkach alebo pomocou tlače [52].

Táto práca bola zameraná na vývoj metódy pre analýzu ginsenosidov v potravinových doplnkoch obsahujúcich všehož ázijský, zvaný kórejský ženšen. Analyzované boli aj prípravky obsahujúce všehoživec štetinatý, zvaný sibírsky ženšen, z dôvodu možnej zámeny rastlinných extraktov zo strany výrobcu.



## **4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ**

### **4.1 Prístrojové vybavenie**

- UHPSFC systém Acquity UPC<sup>2</sup>: binárne čerpadlo, automatický dávkovač, kolónový termostat, regulátor spätného tlaku, PDA detektor, QDa detektor, Waters, Milford, USA
- Analytické váhy, Sartorius, Goettingen, Nemecko
- Automatické mikropipety so špičkami, Eppendorf, Hamburg, Nemecko
- Trepáčka IKA Vortex 3, Sigma-Aldrich, Mníchov, Nemecko
- Ultrazvuková vaňa Sonorex Digitec, Bandelin electronic, Berlín, Nemecko
- Software Empower 3, Waters, Praha, Česká republika
- Software ChemDraw Professional 17,1, PerkinElmer, Waltham, MA, USA

### **4.2 Laboratórne pomôcky**

- Injekčné ihly Medoject (1,2 mm x 40 mm), Chirana T. Injecta, a.s.; Stará Turá, Slovensko
- Injekčné jednorazové striekačky HSW HENKE-JECT, Henke Sass Wolf GmbH, Tuttlingen, Nemecko
- Striekačkové filtre CSH FilterPure, PTFE/L, 0,22 µm, Chromservis, Praha, Česká republika
- Šrubovacie vialky s uzávermi, Chromservis, Praha, Česká republika
- Šrubovacie vialky s uzávermi, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA

### **4.3 Použité stacionárne fázy**

Analytické kolóny od firmy Waters, Milford, USA

- ACQUITY UPC<sup>2</sup> CSH Fluoro-Phenyl, 100 mm x 3,0 mm, 1,7 µm
- ACQUITY UPC<sup>2</sup> Torus 1-AA Column, 100 mm x 3,0 mm, 1,7 µm

- ACQUITY UPC<sup>2</sup> Torus 2-PIC, 100 mm x 3,0 mm, 1,7µm
- ACQUITY UPLC BEH Amide, 100 mm x 2,1 mm, 1,7 µm
- ACQUITY UPLC BEH Shield RP18, 100 mm x 3,0 mm, 1,7 µm
- CORTECS HILIC, 100 mm x 3,0 mm, 2,7 µm
- Torus DEA, 100 mm x 3,0 mm, 1,7µm
- Torus DIOL, 100 mm x 3,0 mm, 1,7 µm
- Viridis BEH 2-EP, 100 mm x 3,0 mm, 1,7 µm
- Viridis BEH, 100 mm x 3,0 mm, 1,7 µm
- Viridis HSS C18 SB, 100 mm x 3,0 mm, 1,8 µm

#### **4.4 Použité chemikálie**

- Acetonitril, Acetonitrile OPTIMA<sup>®</sup> LC/MS GRADE, čistota ≥ 99,9 %, C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N, Mr = 41,05, Fisher Chemical, Waltham, MA, USA
- Metanol, Methanol OPTIMA<sup>®</sup> LC/MS GRADE, čistota ≥ 99,9 %, CH<sub>4</sub>O, Mr = 32,04, Fisher Chemical, Waltham, MA, USA
- Etanol, Ethanol OPTIMA<sup>®</sup> LC/MS GRADE, čistota ≥ 99,9%, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O, Mr = 46,07, Fisher Chemical, Waltham, MA, USA
- Voda LC/MS GRADE, H<sub>2</sub>O, Mr = 18,02, VWR International, Radnor, PA, USA
- Oxid uhličitý, čistota ≥ 99,995%, CO<sub>2</sub>, Mr = 44,01, Messer, Bad Soden am Taunus, Nemecko
- Amoniak, Ammonia solution 4M in methanol, NH<sub>3</sub>, Mr = 17,03, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Nemecko
- Kyselina mravčia, Formic acid for LC-MS, čistota ≥ 99%, HCO<sub>2</sub>H, Mr = 46,03, VWR CHEMICALS BDH, Leuven, Belgicko
- Mravenčan amónny, Ammonium formate for LC-MS, čistota ≥ 99%, HCO<sub>2</sub>NH<sub>4</sub>, Mr = 63,06, VWR CHEMICALS BDH, Leuven, Belgicko

- Octan amónny, Ammonium acetate, čistota  $\geq 99,99\%$ ,  $C_2H_7NO_2$ , Mr = 77,08, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Nemecko
- Štandardné látky ginsenosidov:
  - Rb1, čistota  $\geq 99,5\%$ ,  $C_{54}H_{92}O_{23}$ , HWI group, Rüzheim, Nemecko
  - Rb2, čistota  $\geq 98,26\%$ ,  $C_{53}H_{90}O_{22}$ , MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA
  - Rb3, čistota  $\geq 99,12\%$ ,  $C_{53}H_{90}O_{22}$ , MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA
  - Rc, čistota  $\geq 98,0\%$ ,  $C_{53}H_{90}O_{22}$ , MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA
  - Rd, čistota  $\geq 95,0\%$ ,  $C_{48}H_{82}O_{18}$ , Sigma-Aldrich, Darmstadt, Nemecko
  - Re, čistota  $\geq 97,0\%$ ,  $C_{48}H_{82}O_{18}$ , Sigma-Aldrich, Darmstadt,, Nemecko
  - Rf, čistota  $\geq 99,48\%$ ,  $C_{42}H_{72}O_{14}$ , MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA - nesprávna štandardná látka ginsenosidu Rf
  - Rf, čistota  $\geq 99,2\%$ ,  $C_{42}H_{72}O_{14}$ , HWI group, Rüzheim, Nemecko
  - Rg1 čistota  $\geq 98,0\%$ ,  $C_{42}H_{72}O_{14}$ , MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA
  - Rg2, čistota  $\geq 94,0\%$ ,  $C_{42}H_{72}O_{13}$ , Sigma-Aldrich, Darmstadt,, Nemecko
  - Rg3, čistota  $\geq 96,0\%$ ,  $C_{42}H_{72}O_{13}$ , Sigma-Aldrich, Darmstadt,, Nemecko
  - Rh1, čistota  $\geq 98,0\%$ ,  $C_{36}H_{62}O_9$ , MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA
  - Rh2, čistota  $\geq 98,11\%$ ,  $C_{36}H_{62}O_8$ , MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA
- Doplnky stravy
  - ProMan PLUS, 30 toboliek, šarža 16583, NaturaMed Pharmaceuticals s.r.o., České Budějovice, Česká republika
  - Korean Red Ginseng, 100 kapsúl, šarža 4671060, Jamieson Laboratories, Toronto, Kanada
  - Siberian Ginseng, 100 kapsúl, šarža 4747175, Jamieson Laboratories, Toronto, Kanada

- Ženšen 1000 mg, 90 tabliet, šarža 15421S4, Vitaharmony s.r.o., Brno, Česká republika
- Ženšen kórejský plus vitamín E, 30 kapsúl, šarža D2B3292, Walmark, Třinec, Česká republika
- Pharmaton GERIAVIT Vitality 50+, 30 tabliet, šarža 6759501, Rottendorf Pharma GmbH, Ennigerloh, Nemecko
- Sibiřský ženšen (eleutherokok), kvapky 50 ml, šarža 35010721, AROMATICA CZ s.r.o., Šlapanice, Česká republika
- Bylinné kapky Ženšen 1000 mg, kvapky 50 ml, šarža 100322, Valdemar Grešík – Natura s.r.o., Děčín, Česká republika

## **4.5 Pracovní postup**

### **4.5.1 Příprava zásobných roztoků standardů**

Pevný standard ginsenosidu o hmotnosti 1-2 mg bol približne presne navážený do vialky. Následne bol obsah vialky doplnený MeOH do koncentrácie ginsenosidu 5 mg/ml. Obsah vialky bol premiešaný na vortexe do úplného rozpustenia pevných kryštálov štandardu. Tento postup bol opakovaný pre všetkých 12 ginsenosidov: Rb1, Rb2, Rb3, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg2, Rg3, Rh1, Rh2. Zásobné roztoky štandardov boli uchovávané v chladničke. V čase potreby z nich boli nariadené pracovné roztoky štandardov.

### **4.5.2 Příprava pracovních roztoků standardů pro analýzu**

Zo zásobných roztoků boli riedené pracovné roztoky individuálních štandardů a zmesný pracovný roztok 12 štandardů.

#### **Příprava pracovních roztoků individuálních štandardů**

50 µl zásobného roztoku štandardu o koncentracii 5mg/ml, bolo napipetovaných do vialky a následne doplnených ACN na objem 1 ml. Roztok bol 30 s premiešavaný na vortexe. Koncentrácia roztoku bola 250 µg/ml. Tento postup bol použitý pri príprave všetkých 12 pracovních roztoků individuálních štandardů ginsenosidů: Rb1, Rb2,

Rb3, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg2, Rg3, Rh1, Rh2. Roztoky boli využívané pri identifikácii ginsenosidov.

#### **Príprava zmesného pracovného roztoku štandardov**

Z 12 zásobných roztokov ginsenosidov o koncentrácii 5 mg/ml bolo napipetovaných 50 µl roztoku do vialky. Obsah vialky bol doplnený 400 ml ACN do objemu 1 ml. Koncentrácia roztoku bola 250 mg/ml. Roztok bol využívaný pri optimalizácii separačných a ionizačných podmienok.

#### **4.5.3 Príprava pomocných kvapalín UHPSFC systému**

Ako oplachová kvapalina ihly autosampleru a oplachová kvapalina piestov čerpadiel bol použitý MeOH.

#### **4.5.4 Príprava mobilných fáz**

Všetky používané mobilné fázy boli tvorené CO<sub>2</sub> s prídavkom OM a aditíva. Základný skríning bol prevedený za použitia nasledovných 4 hlavných MF:

##### **1. MeOH**

##### **2. MeOH + 10 mM NH<sub>3</sub>**

Odmerná banka o objeme 500 ml bola vyplnená MeOH do približne 9/10 svojho objemu, následne bol v digestore do odmernej banky napipetovaný objem 1,25 ml 4 M roztoku amoniaku v MeOH a roztok bol doplnený po rysku MeOH.

##### **3. MeOH + 2 % H<sub>2</sub>O**

Odmerná banka o objeme 500 ml bola vyplnená MeOH do približne 9/10 svojho objemu, následne bolo do odmernej banky napipetovaný 10 ml vody čistoty LC/MS a roztok bol doplnený po rysku MeOH.

##### **4. MeOH/ACN v pomere 1:1**

V zásobnej nádobe pre mobilné fázy bolo zmiešaných 250 ml MeOH a 250 ml ACN.

Pri optimalizácii zloženia mobilnej fázy sa zameriavalo na zloženie OM a vplyv druhu a koncentrácie aditív na priebeh analýzy. Postup prípravy OM a aditív použitých pri optimalizácii separačných podmienok bol nasledovný:

#### **MeOH + 5 % H<sub>2</sub>O**

Odmerná banka o objeme 500 ml bola vyplnená MeOH do približne 9/10 svojho objemu. Následne bolo do odmernej banky napipetovaných 25 ml vody LC/MS čistoty a roztok bol doplnený po rysku MeOH.

#### **MeOH + 7 % H<sub>2</sub>O**

Odmerná banka o objeme 500 ml bola vyplnená MeOH do približne 9/10 svojho objemu, následne bol do odmernej banky napipetovaný 35 ml vody čistoty LC/MS a roztok bol doplnený po rysku MeOH.

#### **MeOH/ACN (2:1) + 5 % H<sub>2</sub>O**

Mobilná fáza bola pripravená zmiešaním 200 ml MeOH s 5 % prídavkom vody a 100 ml ACN s 5 % prídavkom vody do zásobnej nádoby na mobilnú fázu.

#### **MeOH/ACN (3:1) + 5 % H<sub>2</sub>O**

Mobilná fáza bola pripravená zmiešaním 300 ml MeOH s 5% prídavkom vody a 100 ml ACN s 5% prídavkom vody do zásobnej nádoby na mobilnú fázu.

#### **EtOH/ACN (2:1) + 5 % H<sub>2</sub>O**

Mobilná fáza bola pripravená zmiešaním 200 ml EtOH s 5% prídavkom vody a 100 ml ACN s 5 % prídavkom vody do zásobnej nádoby na mobilnú fázu.

#### **MeOH + 10 mM AmF**

Odmerná banka o objeme 100 ml bola vyplnená MeOH do 9/10 svojho objemu, následne bolo 63,07 mg AmF rozpustených v malom množstve MeOH a roztok bol kvantitatívne prevedený do banky a doplnený MeOH po rysku.

#### **MeOH + 10 mM AmF + 5 % H<sub>2</sub>O**

Odmerná banka o objeme 100 ml bola vyplnená MeOH do 8/10 svojho objemu, následne bolo 63,07 mg AmF rozpustených v 5 ml vody čistoty LC/MS a roztok bol kvantitatívne prevedený do banky a doplnený MeOH po rysku.

#### 4.5.5 Príprava prídavných kvapalín do MS

Počas základného skríningu a optimalizácie separačných podmienok bol ako prídavná kvapalina do MS používaný roztok **MeOH s prídavkom 10 mM NH<sub>3</sub>**.

Pri optimalizácii metódy bol skúmaný vplyv ďalších 8 prídavných kvapalín. Postup ich prípravy bol nasledovný:

##### 1. MeOH

##### 2. MeOH + 1 % H<sub>2</sub>O

Odmerná banka o objeme 100 ml bola vyplnená MeOH do 9/10 svojho objemu, následne bol pipetovaný 1 ml vody čistoty LC/MS a roztok bol doplnený MeOH po rysku.

##### 3. MeOH + 1 mM NH<sub>3</sub>

Odmerná banka o objeme 100 ml bola vyplnená MeOH do 8/10 svojho objemu, následne bolo v digestore pipetovaných 10 ml zásobného roztoku MeOH + 10 mM NH<sub>3</sub> a roztok bol doplnený MeOH po rysku.

##### 4. MeOH + 10 mM HCOOH

Odmerná banka o objeme 100 ml bola vyplnená MeOH do 9/10 svojho objemu, následne bolo v digestore pipetovaných 0,0377 ml kyseliny mravčej a roztok bol doplnený MeOH po rysku.

##### 5. MeOH + 1 mM AmF

Odmerná banka o objeme 100 ml bola vyplnená MeOH do 8/10 svojho objemu, následne bolo pipetovaných 10 ml zásobného roztoku MeOH + 10 mM AmF a roztok bol doplnený MeOH po rysku.

##### 6. MeOH + 10 mM AmF

##### 7. MeOH + 1 mM AmAc

Odmerná banka o objeme 100 ml bola vyplnená MeOH do 8/10 svojho objemu, následne bolo pipetovaných 10 ml zásobného roztoku MeOH + 10 mM AmAc a roztok bol doplnený MeOH po rysku.

## **8.MeOH + 10 mM AmAc**

Odmerná banka o objeme 100 ml bola vyplnená MeOH do 9/10 svojho objemu, následne bolo 77,1 mg octanu amónneho rozpustených v malom množstve MeOH a roztok bol kvantitatívne prevedený do banky a doplnený MeOH po rysku.

### **4.5.6 Príprava kalibračnej krivky**

Kalibračná krivka bola riedená pomocou 3 desiatkových rád. Ako začiatočný roztok bol použitý zmesný pracovný roztok štandardov o koncentrácii 250 µg/ml. Nariedené koncentrácie zmesného štandardu boli 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1 µg/ml a 0,5 µg/ml.

### **4.5.7 Príprava vzoriek analyzovaných prípravkov**

Analyzovaných bolo 8 prípravkov obsahujúcich sibírsky alebo kórejský ženšen v pevnej alebo kvapalnej forme. Príprava vzoriek analyzovaných prípravkov prebiehala vždy v dvoch opakovaníach.

#### **Postup prípravy vzoriek kvapalných prípravkov**

##### **1. Kvapky Sibířský ženšen (eleutherokok)**

Kvapky Sibířský Ženšen (eleutherokok) boli filtrované pomocou 0,22 µm PTFE filtra do vialiek.

##### **2. Kvapky Bylinné kapky Ženšen**

Kvapky Bylinné kapky Ženšen boli prefiltrované 0,22 µm PTFE filtrom a následne nariedené MeOH na koncentráciu 500 µl/ml.

#### **Optimalizácia postupu prípravy vzoriek tuhých prípravkov**

Postup prípravy vzorkov tuhých prípravkov bol optimalizovaný na prípravku ProMan PLUS. Skúmaná bola optimálna navážka prípravku a vplyv extrakčného rozpúšťadla za účelom získania čo najvyššej odozvy MS detektora. Pri výbere optimálnej navážky prípravku boli skúmané 4 navážky: 5, 10, 20 a 50 mg homogenizovaného prípravku, ktoré boli extrahované do 1 ml rozpúšťadla. Použité boli 3 rozpúšťadlá: MeOH, 50 % MeOH a ACN.



Najlepšia odozva MS detektora bola dosiahnutá za použitia navážky 50 mg homogenizovaného prípravku a MeOH ako rozpúšťadla. Výsledná navážka bola použitá pri odvodení navážok použitých pri príprave vzorkov ďalších pevných prípravkov.

#### **Postup prípravy vzoriek tuhých prípravkov**

Postup prípravy pozostával z homogenizácie 10 kapsúl/tablet prípravku do zmesi. Následne bola navážka zmesi uvedená v Tab. 6 rozpustená v 1 ml MeOH, 30 s pretrepaná pomocou vortexu a vložená na 30 min do ultrazvukového kúpeľa. Posledným krokom bola filtrácia vzorkov pomocou 0,22 µm PTFE filtra.

**Tab. 6:** Navážky prípravkov ProMan Plus, Korean Red Ginseng, Siberian Ginseng, Ženšen 1000 mg, Ženšen korejský Walmark a Pharmaton GERIAVIT použité pri príprave vzorkov prípravkov na analýzu.

<b>názov prípravku</b>	<b>lieková forma</b>	<b>použitá navážka [mg]</b>
<b>3. ProMan Plus</b>	kapsuly	50
<b>4. Korean Red Ginseng</b>	tablety	60
<b>5. Siberian Ginseng</b>	tablety	50
<b>6. Ženšen 1000 mg</b>	tablety	75
<b>7. Ženšen korejský Walmark</b>	kapsuly	100
<b>8. Pharmaton GERIAVIT</b>	tablety	90

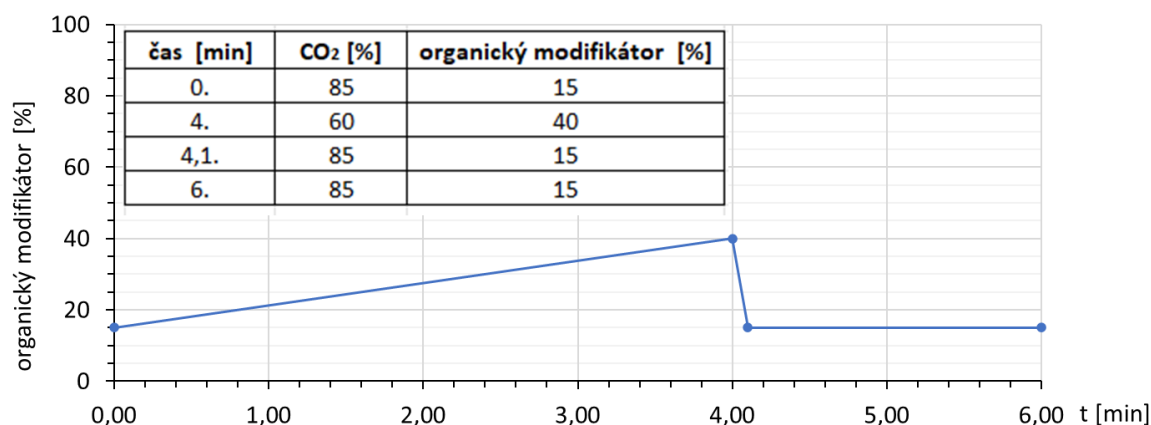
## 4.6 Skríning separačných podmienok

Základný skríning bol prevedený na 11 kolónach za použitia 4 mobilných fáz (kapitola 4.5.4) a separačných podmienok zhrnutých v Tab. 7.

**Tab. 7:** Nastavenie UHPSFC parametrov základného skríningu.

teplota autosampleru	20 °C
objem nastrekovaného vzorku	2 µl
prietok mobilnej fáze	1,5 ml/min (1 ml/min pre kolónu BEH Amide)
doba analýzy	6 min
typ elúcie	gradientová elúcia
teplota kolóny	40 °C
BPR	1886 psi
detektor	PDA (205 nm), Q (SIM)

Prietok MF na kolóne BEH Amide bol znížený z dôvodu rozmerov kolóny navrhnutých pre UHPLC systémy. Priebeh gradientovej elúcie počas analýzy je graficky znázornený na Obr. 10.



**Obr. 10:** Priebeh gradientovej elúcie pri základnom skríningu.

Z dôvodu rozdielnej veľkosti častíc, plnenia kolón a chémie stacionárnych fáz boli gradienty prispôsobené tlakovým obmedzeniam systému a elučnej sile použitej mobilnej fázy. Úpravy gradientov zobrazuje Tab. 8.

**Tab. 8:** Úprava podmienok gradientovej elúcie pre SF v rámci základného skríningu.

kolóna	MeOH + 2 % H <sub>2</sub> O	MeOH/ACN (1:1)	MeOH + 10 mM NH <sub>3</sub>	MeOH
BEH 2-EP	15-45	25-45	15-45	15-45
BEH Amide	15-45	25-45	15-45	15-45
BEH Shield RP18	15-35	25-45	15-35	15-35
Cortecs HILIC	15-45	25-60	15-45	15-45
CSH PFP	15-45	25-45	15-45	15-45
HSS C18 SB	15-45	25-60	15-45	15-45
Torus 1-AA	15-40	25-50	15-40	15-40
Torus 2-PIC	15-45	25-45	15-45	15-45
Torus DEA	15-45	25-60	15-45	15-45
Torus DIOL	15-45	25-60	15-45	15-45
BEH	15-45	25-60	15-45	15-45

Používané detektory boli PDA spektrofotometer a jednoduchý kvadrupól. MS detekcia prebiehala v zápornom ESI<sup>-</sup> móde za použitia plného skenu a ionizačných podmienok zhrnutých v Tab. 9.

**Tab. 9:** Nastavenie ionizačných podmienok MS detektora.

ionizačné podmienky	
druh ionizácie	ESI <sup>-</sup>
napätie na kapiláre	0,8 kV
teplota v zdroji	600 °C
prietok prídavnej kvapaliny	0,3 ml/min
prídavná kvapalina	MeOH + 10 mM NH <sub>3</sub>

## 4.7 Skríning zloženia prídavnej kvapaliny

Pri optimalizácii podmienok bol skúmaný vplyv zloženia 9 prídavných kvapalín na ionizáciu analytov. Skúmané prídavné kvapaliny boli:

- MeOH,
- MeOH + 1 % H<sub>2</sub>O,
- MeOH + 1 mM NH<sub>3</sub>,
- MeOH + 10 mM NH<sub>3</sub>,
- MeOH + 10 mM HCOOH,
- MeOH + 1 mM AmF,
- MeOH + 10 mM AmF,
- MeOH + 1 mM AmAc,
- MeOH + 10 mM AmAc.

Pre každú prídavnú kvapalinu boli prevedené 2 merania. Ako štandard bol používaný MeOH + 10 mM NH<sub>3</sub>. Nastavenie ionizačných podmienok MS detektora je znázornené v Tab. 9. Zber dát prebiehal pomocou SIM s rýchlosťou zberu dát 10 bodov/s po celú dobu analýzy. Sledované pomery *m/z* zodpovedajúce jednotlivým ginsenosidom za použitia ESI<sup>-</sup> sú znázornené v Tab. 10.

**Tab. 10:** Sledované pomery *m/z* zodpovedajúce ginsenosidom v SIM móde (ESI<sup>-</sup>).

ginsenosidy	<i>m/z</i>
<b>Rh2</b>	621,44
<b>Rh1</b>	637,49
<b>Rg3, Rg2</b>	783,49
<b>Rf, Rg1</b>	799,49
<b>Rd, Re</b>	945,55
<b>Rc, Rb2, Rb3</b>	1077,59
<b>Rb1</b>	1107,60

## 5. VÝSLEDKY A DISKUSIA

### 5.1 Základný kolónový skríning

Základný kolónový skríning prebiehal na 11 stacionárnych fázach za použitia 4 mobilných fáz. Cieľom bolo nájsť vhodné kombinácie stacionárnej a mobilnej fáze pre následnú optimalizáciu separačných podmienok. Analyty boli identifikované za použitia retenčných časov štandardov a ich identita bola potvrdená pomocou MS. Podmienky analýz na kolónach sú popísané v kapitole 0.

Použité MF boli: CO<sub>2</sub> + MeOH, CO<sub>2</sub> + MeOH/ACN (1:1), CO<sub>2</sub> + MeOH + 10 mM NH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub> + MeOH + 2 % H<sub>2</sub>O. OM boli vyberané s ohľadom na rozdielny charakter interakcii s analytom a SF. MeOH je OM prvej voľby pre analýzu polárnych analytov, zlepšuje tvar pík a zvyšuje elučnú silu MF. Aprotické rozpúšťadlo ACN ponúka odlišnú selektivitu a zhoršuje tvar pík. Aditívum 10 mM NH<sub>3</sub> má bázický charakter, zlepšuje tvary pík, selektivitu širokého spektra zlúčenín a ponúka dobrú kompatibilitu s MS detektorom. Voda sa v SFC správa, ako kyslé aditívum, ktoré zvyšuje solvatačnú silu MF. Používa sa v koncentrácii do 5 - 10 % a má pozitívny vplyv na selektivitu, tvar pík bázických polárnych analytov a zvyšuje elučnú silu MF. Vplyv zloženia MF na elúciu a separáciu analytov na 11 kolónach je zhrnutý v Tab. 11, zobrazujúcej počet separovaných a eluovaných analytov v čase analýzy za použitia PDA detektora.

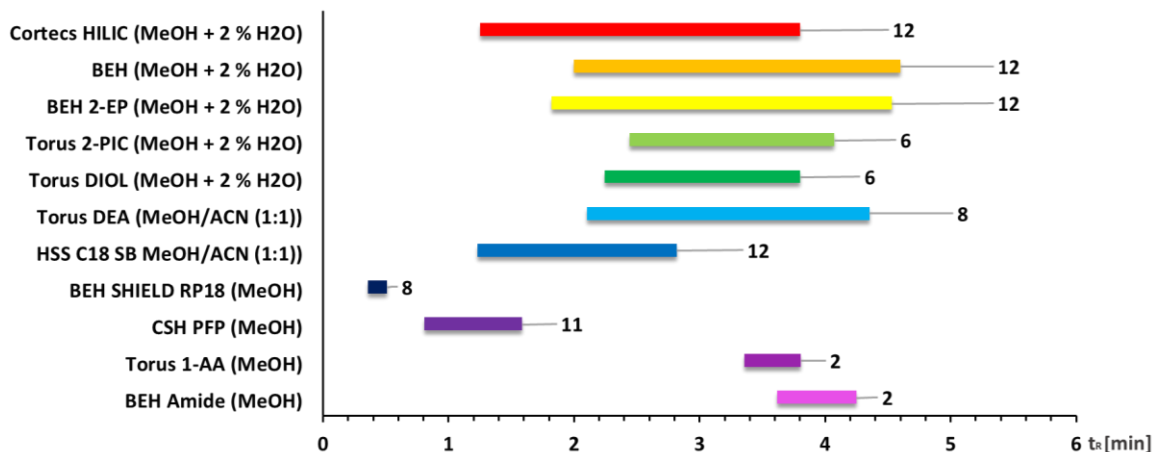
Analyty na všetkých kolónach boli eluované v poradí stúpajúcej Mr. Najuniverzálnejším OM bol MeOH + 2 % H<sub>2</sub>O, ktorý vo väčšine prípadov zlepšoval separáciu izoméneho páru Rf + Rg1 a dosahoval najväčší počet eluovaných a separovaných analytov. OM MeOH/ACN (1:1) poskytoval odlišnú selektivitu kritického páru Rf + Rg1 a nižšiu elučnú silu. MF obsahujúce čistý MeOH a MeOH + 10 mM NH<sub>3</sub>, neposkytovali zlepšenie selektivity oproti MF používajúcej vodu ako aditívum.

**Tab. 11:** Výsledky základného skrínungu vyjadrené vo forme počtu separovaných a eluovaných analytov pre všetky mobilné a stacionárne fáze. SA – počet separovaných analytov, EA – počet eluovaných analytov.

	MeOH/ACN (1:1)		MeOH + 10 mM NH <sub>3</sub>		MeOH + 2 % H <sub>2</sub> O		MeOH	
	SA	EA	SA	EA	SA	EA	SA	EA
<b>Cortex HILIC</b>	12	12	11	12	12	12	11	12
<b>BEH</b>	11	9	8	8	10	10	8	11
<b>BEH 2-EP</b>	7	8	9	12	10	12	9	12
<b>Torus 2-PIC</b>	2	2	6	6	6	6	6	6
<b>Torus DIOL</b>	5	6	6	6	6	6	6	6
<b>Torus DEA</b>	6	6	6	8	6	8	6	8
<b>HSS C18 SB</b>	6	12	6	12	7	12	7	12
<b>BEH Shield RP18</b>	2	8	3	8	2	8	3	8
<b>CSH PFP</b>	4	11	4	12	4	12	7	12
<b>Torus 1-AA</b>	2	2	2	2	2	2	2	2
<b>BEH Amide</b>	0	0	2	2	2	2	2	2

Vplyv druhu SF na separáciu a elúciu analytov bol skúmaný na 11 kolónach ponúkajúcich rozdielnu selektivitu. Jednalo sa o polárne kolóny: Cortecs HILIC, BEH, BEH 2-EP, Torus 2-PIC, Torus DIOL, Torus DEA, BEH Amide, BEH Shield RP18, nepolárna kolóna HSS C18 SB, a kolóny s aromatickým substituentom: CSH PFP, Torus 1-AA.

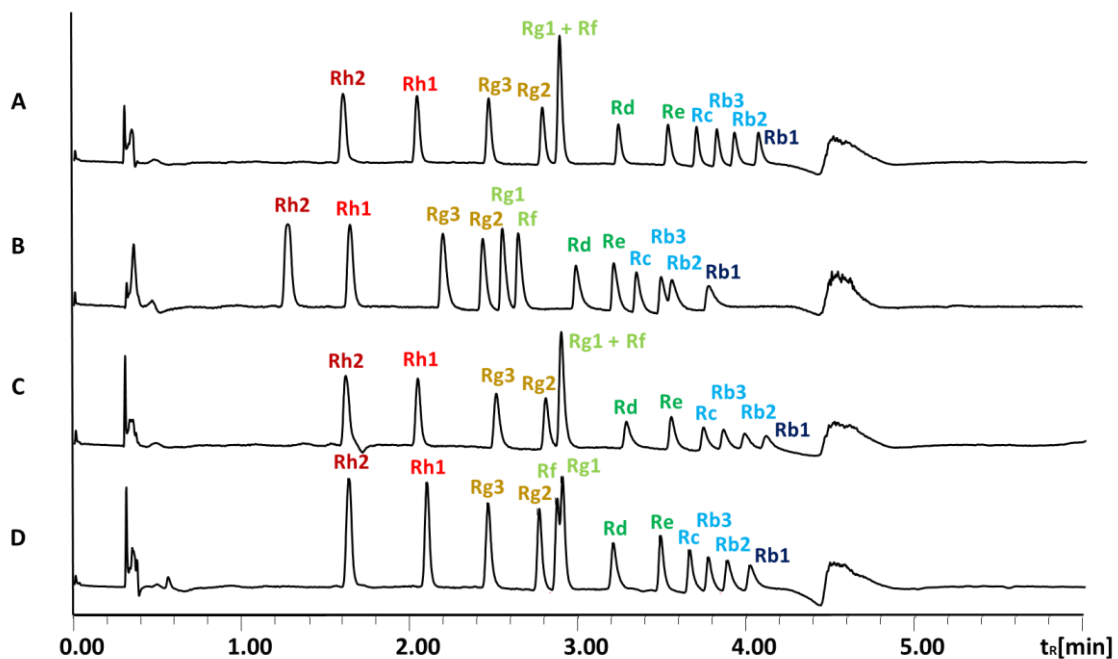
Elučné okná a počet eluovaných analytov pre najvhodnejšie kombinácie mobilných a stacionárnych fáz v rámci základného skrínungu zobrazuje graf na Obr. 11. Elučné okná analytov sú reprezentované pruhmi, číslo priradené k pruhu vyjadruje počet eluovaných analytov.



**Obr. 11:** Grafické zobrazenie elučného okna analytov za najlepších podmienok pre jednotlivé stacionárne fázy základného skrínungu.

### Cortecs HILIC

Na polárnej kolóne Cortecs HILIC bolo eluovaných vždy všetkých 12 analytov. Nevýhodou kolóny bola nízka symetria pík (Obr. 12).

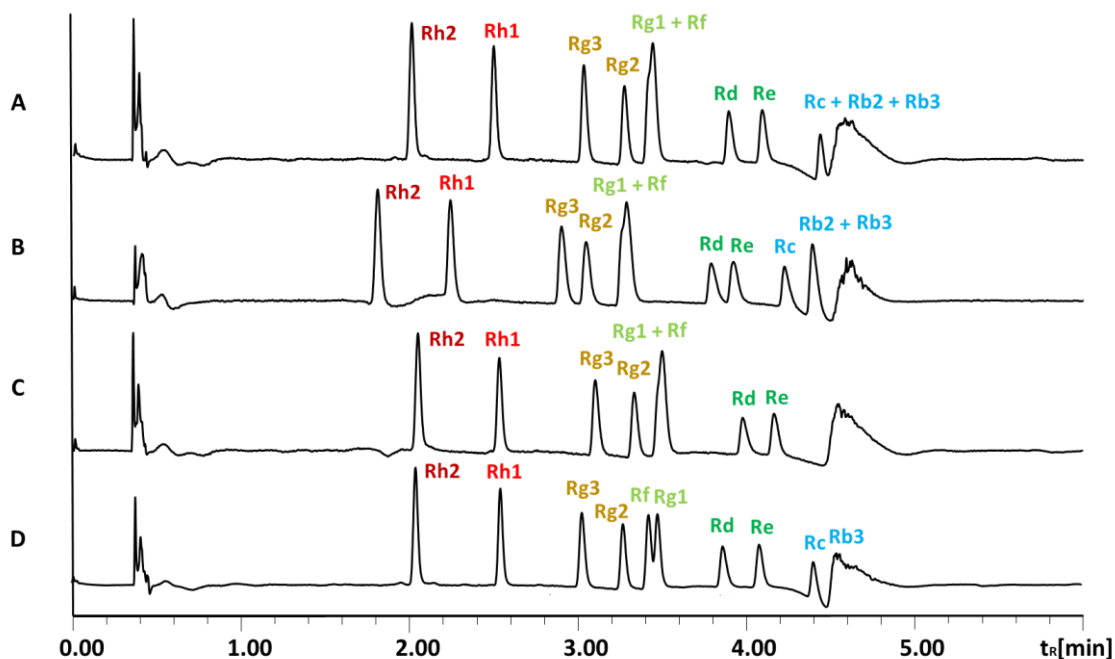


**Obr. 12:** Základný skrínung, chromatogramy kolóny Cortecs HILIC, MF CO<sub>2</sub> (A) + MeOH, gradient 15 – 45 %, (B) + MeOH/ACN (1:1), gradient 25 – 60 %, (C) + MeOH + 10 mM NH<sub>3</sub>, gradient 15 – 45 %, (D) + MeOH + 2 % H<sub>2</sub>O, gradient 15 – 45 %.

Najlepšie separačné vlastnosti ponúkali OM MeOH/ACN (1:1) a MeOH + 2 % H<sub>2</sub>O. Prídavok 2 % H<sub>2</sub>O, čiastočne separoval pár Rf + Rg1 a delil skupinu Rc + Rb2 + Rb3 na základnej línii. MeOH/ACN (1:1) ponúkal rozdielnu selektivitu a separoval pár Rg1 + Rf v opačnom poradí, jeho nevýhodou bolo zhoršenie separácie páru Rb3 + Rb2 a tvaru pík. OM MeOH + 10 mM NH<sub>3</sub> zhoršoval z dôvodu svojej bázičkej povahy tvar pík. MF obsahujúce MeOH a MeOH + 10 mM NH<sub>3</sub> neboli schopné separovať izomérny pár Rf + Rg1. Z tohto dôvodu bola k ďalšej optimalizácii zvolená MF obsahujúca 2 % H<sub>2</sub>O ako aditívum.

## BEH

Kolóna BEH, tvorená hybridným silikagélom, poskytovala podobnú selektivitu ako kolóna Cortecs HILIC. Rozdiel bol vo vyššej retencii analytov kolónou BEH.



**Obr. 13:** Základný skrining, chromatogramy kolóny BEH, MF CO<sub>2</sub> (A) + MeOH, gradient 15 – 45 %, (B) + MeOH/ACN (1:1), gradient 25 – 60 %, (C) + MeOH + 10 mM NH<sub>3</sub>, gradient 15 – 45 %, (D) + MeOH + 2 % H<sub>2</sub>O, gradient 15 – 45 %.

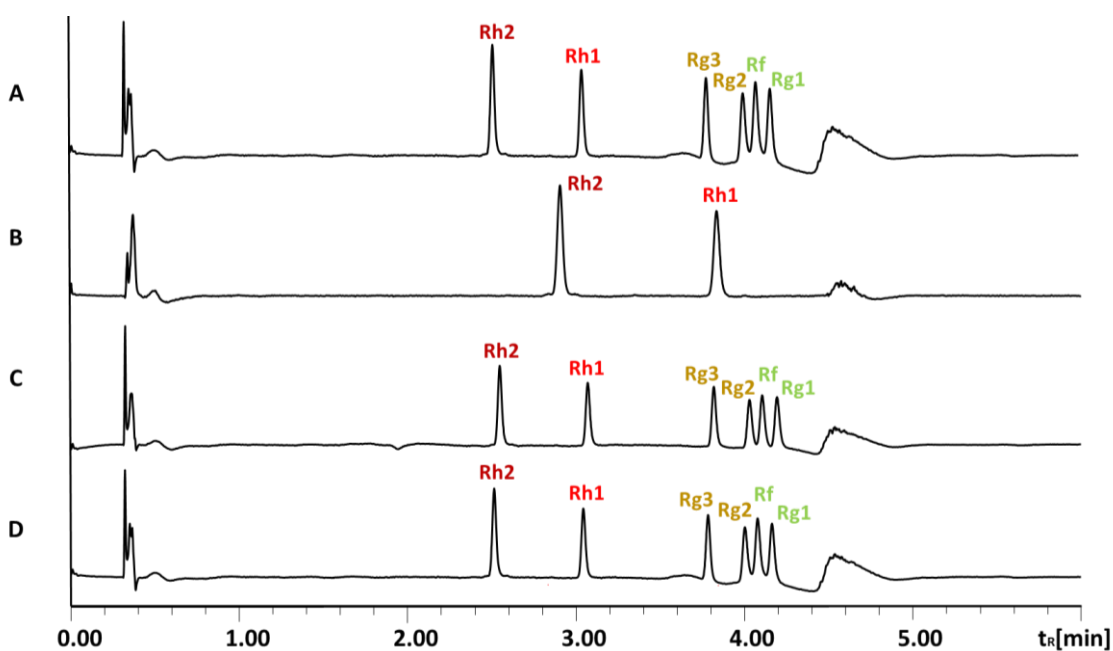
Najlepšiu selektivitu ponúkal OM MeOH + 2 % H<sub>2</sub>O, ktorý eluoval a aspoň čiastočne separoval 10 analytov vrátane kritického izomérneho páru Rf + Rg1, separovaného na základe rozdielov v polarite molekúl (Obr. 13). Prídavok OM MeOH/ACN (1:1), eluoval 11 analytov, ale nedostatočne separoval kritické izomérne páry Rf + Rg1 a Rb2 + Rb3.



OM MeOH eluoval 11 analytov a MeOH + 10 mM NH<sub>3</sub> 8 analytov. Ich nevýhodou bola koelúcia kritických izomérnych párov. Kolóna BEH mala v kombinácii s MF CO<sub>2</sub> + MeOH + 2 % H<sub>2</sub>O dobrý potenciál separácie izomérnych párov.

### Torus 2-PIC

Kolóna Torus 2-PIC ponúka symetrické píky, silnejšiu retenciu analytov a veľmi dobrú separáciu širokého spektra látok [54]. Najlepšiu selektivitu na kolóne ponúkali OM MeOH, MeOH + 2 % H<sub>2</sub>O a MeOH + 10 mM NH<sub>3</sub>, ktoré od seba čiastočne separovali ginsenosidy Rg2 + Rf + Rg1 (Obr. 14). MF obsahujúca MeOH/ACN (1:1) mala nižšiu elučnú silu spôsobenú aprotickým charakterom ACN a eluovala v čase analýzy iba 2 analyty. Kolóna Torus 2-PIC poskytovala symetrické píky a mala potenciál separovať kritické izoméne páry. Jej nevýhodou bola silná retencia analytov, ktorú bolo možné riešiť úpravou sklonu gradientu.

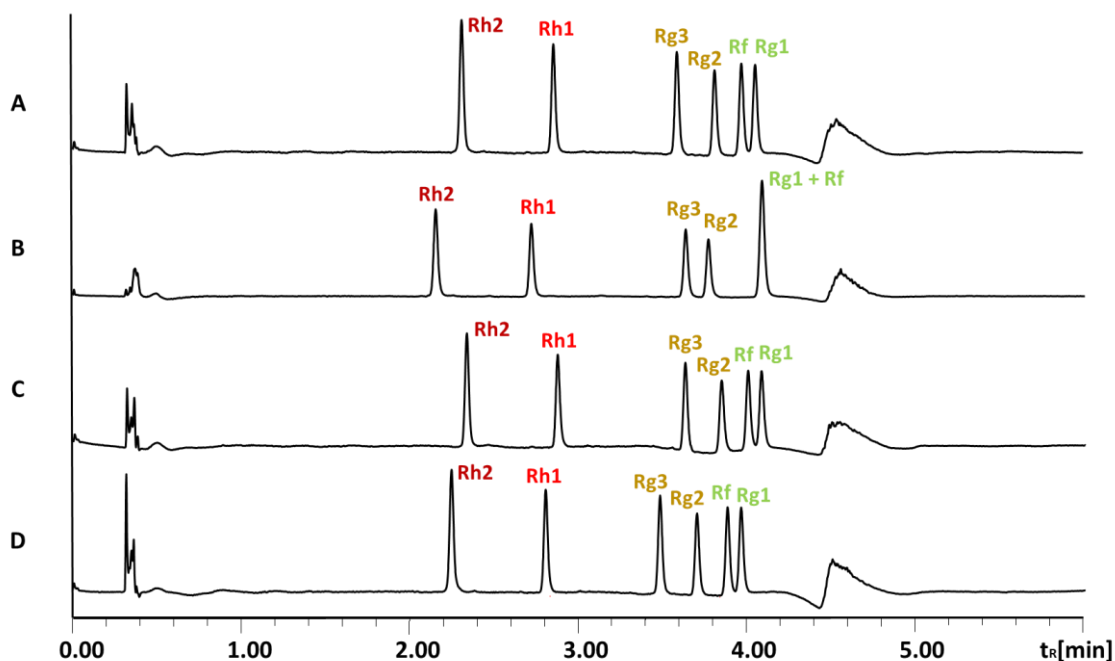


**Obr. 14:** Základný skrining, chromatogramy kolóny Torus 2-PIC, MF CO<sub>2</sub> (A) + MeOH, gradient 15 – 45 %, (B) + MeOH/ACN (1:1), gradient 25 – 45 %, (C) + MeOH + 10 mM NH<sub>3</sub>, gradient 15 – 45 %, (D) + MeOH + 2 % H<sub>2</sub>O, gradient 15-45 %.

### Torus DIOL

Kolóna Torus DIOL s polárnymi analytmi interagovala pomocou vodíkových väzieb s diolovými skupinami. Výsledky základného skriningu poukázali na minimálnu zmenu

selektivity pre OM MeOH, MeOH + 10 mM NH<sub>3</sub> a MeOH + 2 % H<sub>2</sub>O, ktoré separovali a eluovali 6 analytov. OM MeOH/ACN (1:1), spôsobil koelúciu kritického izoméneho páru Rg1 + Rf (Obr. 15). Kolóna Torus DIOL ponúkala dobrú symetriu píkov a potenciál separácie a elúcie všetkých skúmaných analytov. Jej nevýhodou bola silnejšia retencia analytov typická pre kolóny línie Torus, ktorú bolo možné riešiť úpravou sklonu gradientu.



**Obr. 15:** Základný skrining, chromatogramy kolóny Torus DIOL, MF CO<sub>2</sub> (A) + MeOH, gradient 14 – 45 %, (B) + MeOH/ACN (1:1), gradient 25 – 60 %, (C) + MeOH + 10 mM NH<sub>3</sub>, gradient 15 – 45 %, (D) + MeOH + 2 % H<sub>2</sub>O, gradient 15-45 %.

#### BEH 2-EP

Na kolóne BEH 2-EP bolo eluovaných všetkých 12 analytov. Výnimku tvoril OM MeOH/ACN (1:1), ktorý eluoval iba 8 analytov. Najlepšie podmienky boli dosiahnuté za použitia OM MeOH + 2 % H<sub>2</sub>O, ktorý ako jediný čiastočne separoval izomérený pár Rf + Rg1 (Obr. 16). Podmienky na tejto SF neboli podrobené ďalšej optimalizácii z dôvodu koelúcie izomérov R<sub>c</sub> + R<sub>b2</sub> + R<sub>b3</sub>.

#### Torus DEA

Najlepšie separačné podmienky na kolóne Torus DEA boli dosiahnuté použitím OM MeOH/ACN (1:1), ktorý eluoval 6 analytov a čiastočne separoval analyty Rg1 + Rf + Rg2

(Obr. 16). Ďalšie MF eluovali 8 analytov a spôsobovali koelúciu ginsenosidov Rg1 + Rf + Rg2.

### **HSS C18 SB**

Kolóna HSS C18 SB, s alkylovými substituentmi, eluovala všetkých 12 ginsenosidov. Nevýhodou bola vysoká miera koelúcie všetkých izomérov a extrémne nízka odozva ginsenosidov Rc + Rb2 + Rb3 a Rb1. Najlepšia separácia bola dosiahnutá za použitia OM MeOH/ACN (1:1), ktorý ako jediný čiastočne separoval skupiny izomérov Rg2 + Rg3 a Rf + Rg1 (Obr. 16).

### **BEH Shield RP18**

Kolóna BEH Shield RP18, s vloženou karbamátovou skupinou, ponúka alternatívnu selektivitu pre fenolické zlúčeniny [55]. Analyty druhu steroidných glykozidov na tejto SF vykazovali extrémne nízku retenciu. Všetky MF eluovali 8 analytov v intervale 30 s od mŕtveho retenčného času kolóny. Najlepšie podmienky boli dosiahnuté za použitia OM MeOH a MeOH + 10 mM NH<sub>3</sub>, ktoré eluovali analyty v troch píkoch (Obr. 16). OM MeOH/ACN (1:1) a MeOH + 2 % H<sub>2</sub>O spôsobili koelúciu všetkých analytov v 1 píku s výnimkou ginsenosidu Rh2.

### **CSH PFP**

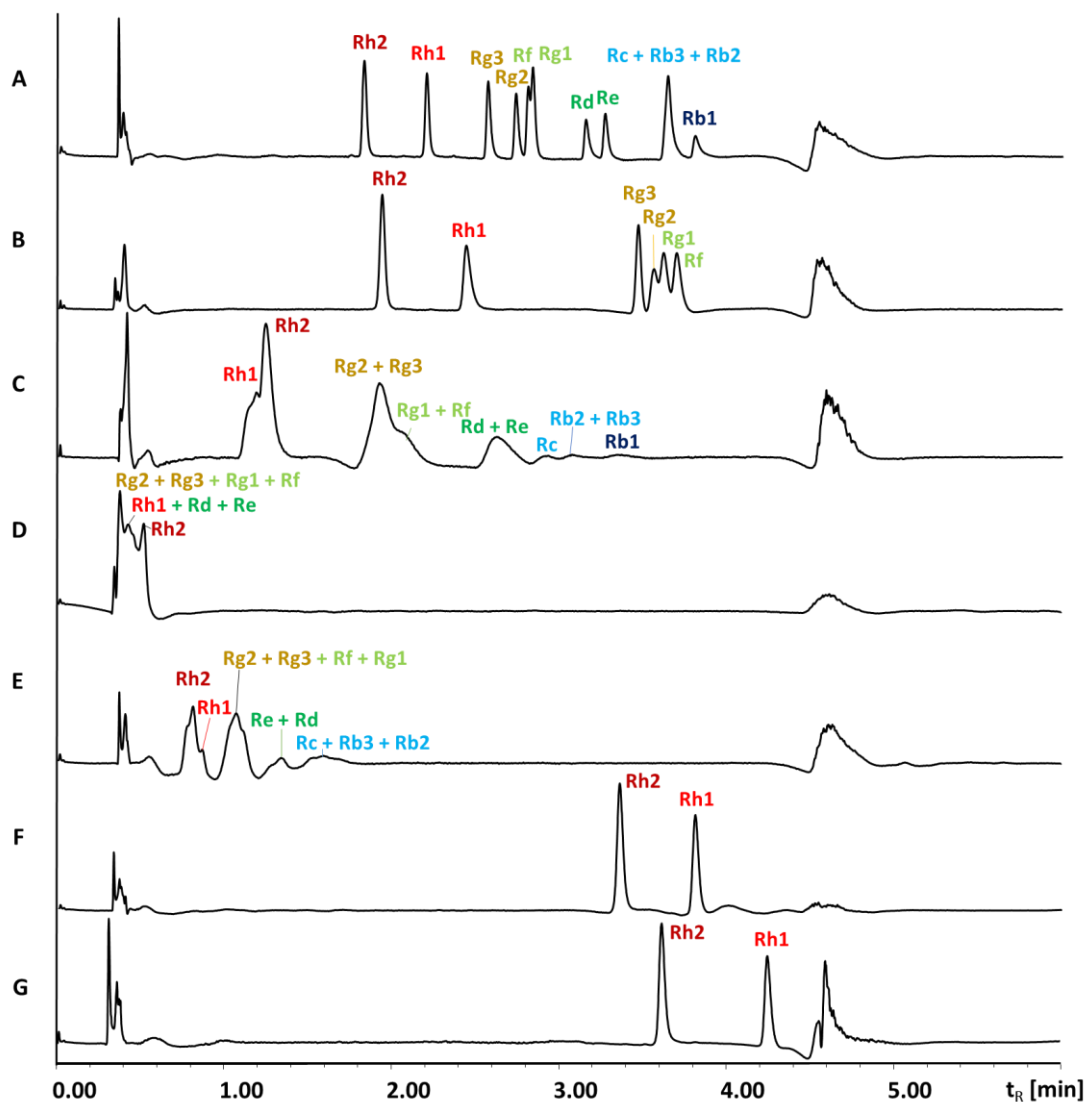
Viacmodálna hybridná aromatická SF CSH PFP ponúka odlišnú selektivitu v porovnaní s polárnymi SF a nepolárnymi alkylovými SF [1]. Na kolóne bolo bez ohľadu na zloženie MF eluovaných všetkých 12 analytov v 4 skupinách. Ginsenosid Rb-1 bol detekovateľný iba za použitia MS detekcie. Najlepšie podmienky boli dosiahnuté za použitia OM MeOH, ktorý čiastočne separoval izomérené analyty (Obr. 16).

### **Torus 1-AA**

Aromatická kolóna Torus 1-AA je vhodná pre separáciu neutrálnych až nepolárnych steroidných molekúl, s komplementárnou selektivitou ku kolóne Torus 2-PIC [54]. Kolóna z dôvodu silnej retencie steroidných zlúčenín eluovala za všetkých podmienok iba 2 ginsenosidy Rh1 a Rh2 (Obr. 16). Zmena zloženia MF mala minimálny vplyv na elučné časy analytov.

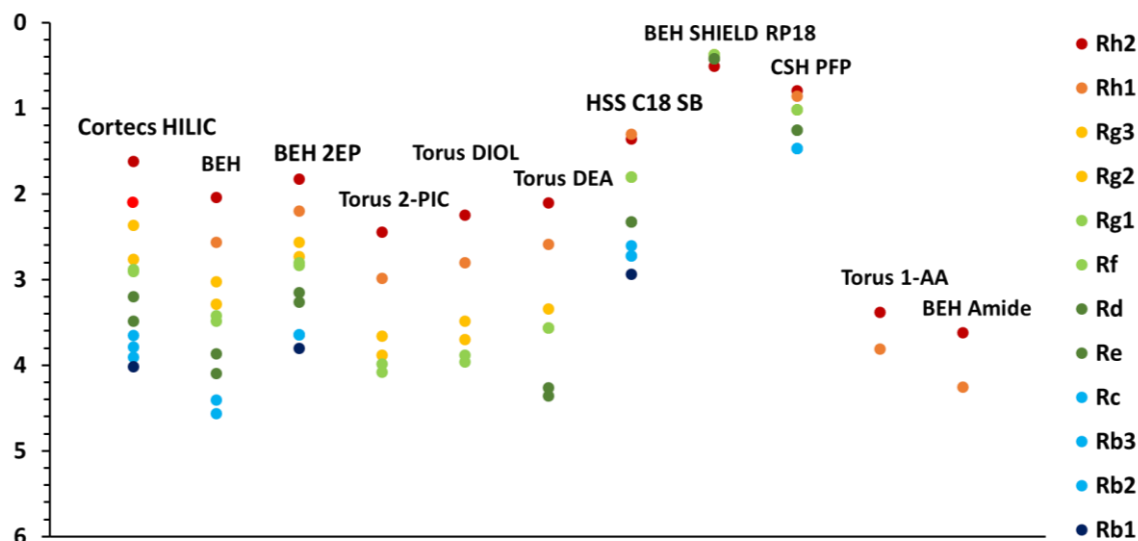
## BEH Amide

Na kolóne BEH Amide boli za použitia skúmaných MF eluované dva analyty, Rh1 a Rh2. Výnimkou bola MF s OM MeOH/ACN (1:1), za použitia ktorej neboli eluované žiadne analyty. Najlepšie výsledky boli dosiahnuté za použitia OM MeOH + 2 % H<sub>2</sub>O, s najvyššou elučnou silou (Obr. 16).



**Obr. 16:** Chromatogramy najlepších podmienok na kolónach základného skríningu, ktoré nepodstúpili optimalizáciu chromatografických podmienok. (A) BEH 2-EP, MF CO<sub>2</sub> + MeOH + 2 % H<sub>2</sub>O, (B) Torus DEA, MF CO<sub>2</sub> + MeOH/ACN (1:1), (C) HSS C18 SB, MF CO<sub>2</sub> + MeOH/ACN (1:1), (D) BEH Shield RP18, MF CO<sub>2</sub> + MeOH, (E) CSH PFP, MF CO<sub>2</sub> + MeOH, (F) Torus 1-AA, MF CO<sub>2</sub> + MeOH + 2 % H<sub>2</sub>O, (G) BEH Amide, MF CO<sub>2</sub> + MeOH + 2 % H<sub>2</sub>O.

Grafické zobrazenie elúcie analytov na SF základného skríningu za použitia najuniverzálnejšej MF CO<sub>2</sub> + MeOH + 2 % H<sub>2</sub>O stvárňuje Obr. 17. Spoločnou farbou sú vyznačené ginsenosidy so zhodnou molekulovou hmotnosťou: Mr 622,44: Rh2, Mr 638,44: Rh1, Mr 784,50: Rg2, Rg3, Mr 800,49: Rg1, Rf, Mr 946,55: Rd, Re, Mr 1078,59: Rb2, Rb3, Rc, Mr 1108,60: Rb1.



**Obr. 17:** Grafické zobrazenie elučných časov ginsenosidov pre MF MeOH + 2 % H<sub>2</sub>O v základnom skríningu SF.

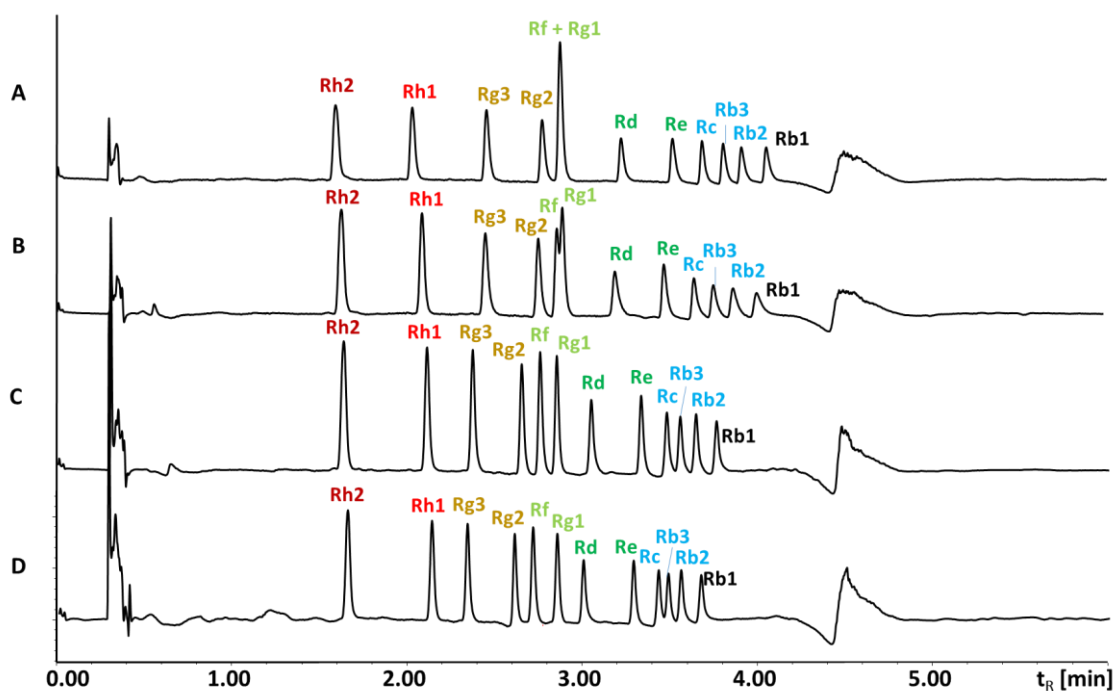
Optimalizácia chromatografických podmienok prebiehala na 4 najlepších SF a zahŕňala zmenu MF, nastavenia gradientu, dĺžky analýzy, tlaku BPR a teploty kolóny. Parametrami výberu SF pre optimalizáciu chromatografických podmienok bola selektivita, symetria pík, schopnosť separácie izomérnych analytov a ich delenie na základnej línii. K následnej optimalizácii chromatografických podmienok boli vybrané SF: Cortecs HILIC, BEH, Torus 2-PIC a Torus DIOL. Kolóna Cortecs HILIC, ako jediná ponúkala elúciu a čiastočnú separáciu všetkých 12 ginsenosidov. Optimalizácia podmienok mohla priniesť zlepšenie selektivity a tvaru pík. Na kolóne BEH bolo eluovaných 11 a separovaných 10 analytov, chromatografické podmienky boli podrobené optimalizácii za účelom separácie koeluovaného páru Rb2 + Rb3, elúcie všetkých 12 analytov v čase analýzy a zlepšenia symetrie pík. Kolóny Torus 2-PIC a Torus DIOL poskytovali silnú retenciu analytov, symetrické píky a separáciu kritického

izomérneho páru Rf + Rg1. Optimalizácia bola zameraná na zvýšenie elučnej sily MF a separáciu kritickej izomérnej skupiny Rc + Rb2 + Rb3.

Kolóny nepodrobené optimalizácii chromatografických podmienok boli: BEH 2-EP a Torus DEA, z dôvodu nedostatočnej separácie kritických izomérov Rf + Rg1 a Rc + Rb2 + Rb3, HSS C18 SB, BEH Shield RP18 a CSH PFP, z dôvodu nedostatočnej selektivity, a Torus 1-AA a BEH Amide, z dôvodu príliš silnej retencie analytov.

## 5.2 Optimalizácia chromatografických podmienok na kolóne Cortecs HILIC

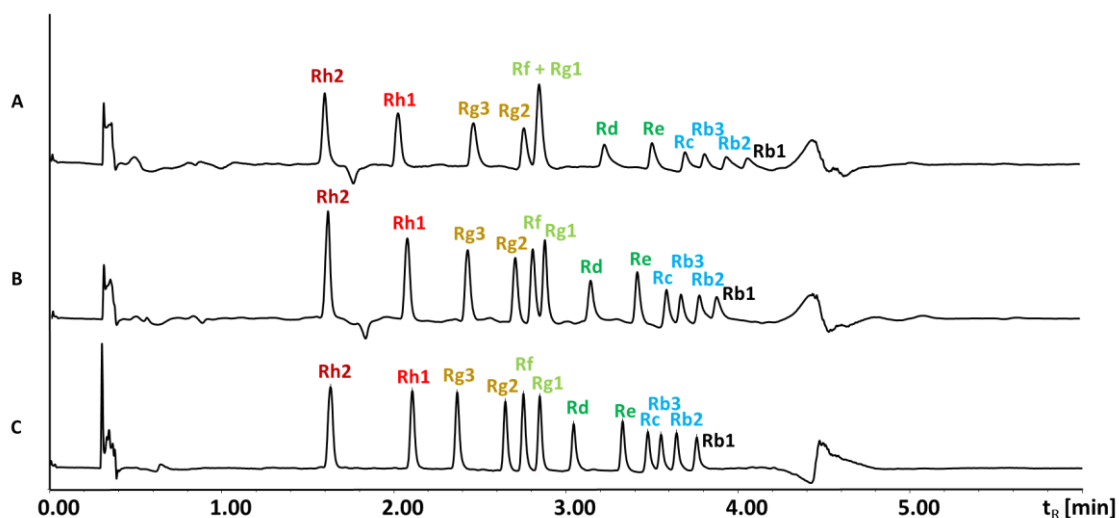
V základnom skríningu sa v kombinácii s kolónou Cortecs HILIC najviac osvedčilo použitie OM MeOH + 2 % H<sub>2</sub>O podporujúceho polárne interakcie MF, SF a analytov. Prvý krok optimalizácie sa zameriaval na vplyv koncentrácie H<sub>2</sub>O v MF v rozmedzí 0 – 7 % na separáciu izomérnych skupín ginsenosidov (Obr. 18).



**Obr. 18:** Chromatogramy optimalizácie podmienok separácie na kolóne Cortecs HILIC, porovnanie vplyvu koncentrácie H<sub>2</sub>O v MF, za použitia gradientu 15 – 45 %. MF CO<sub>2</sub> + (A) MeOH, (B) MeOH + 2 % H<sub>2</sub>O, (C) MeOH + 5 % H<sub>2</sub>O, (D) MeOH + 7 % H<sub>2</sub>O.

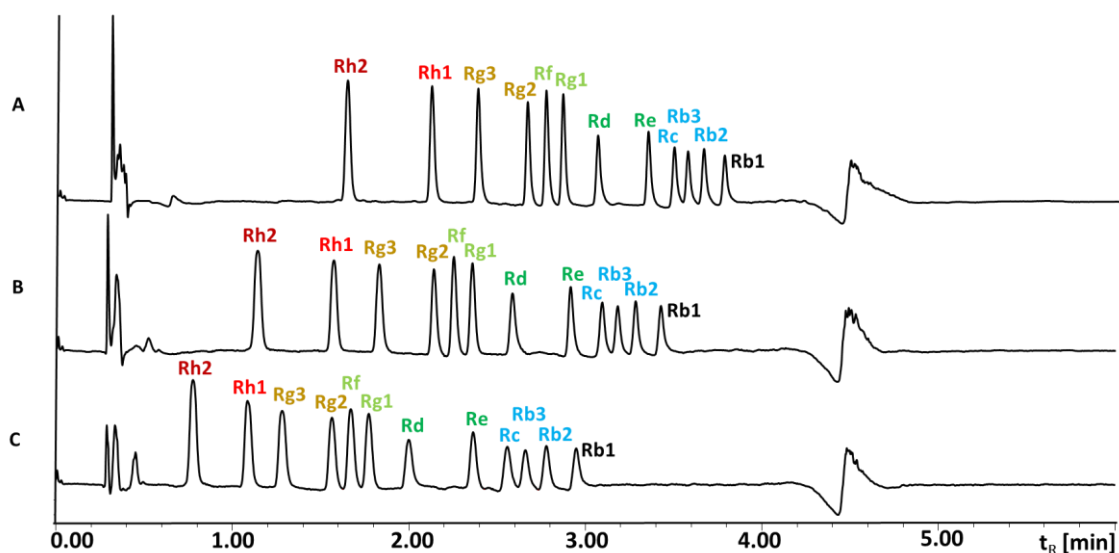
Zvyšujúca sa koncentrácia H<sub>2</sub>O zlepšovala separáciu izomérneho páru **Rf + Rg1** (rozlíšenie: 0 → 0 → 1,81 → 3,36), a zhoršovala separáciu izomérov **Rc + Rb3** (rozlíšenie: 2,59 → 1,99 → 1,36 → 0,95) a **Rb3 + Rb2** (rozlíšenie 2,09 → 1,79 → 1,47 → 1,32). Najlepšia separácia analytov bola dosiahnutá za použitia OM MeOH + 5% H<sub>2</sub>O (Obr. 18). Zvyšovanie koncentrácie H<sub>2</sub>O v MF malo pozitívny vplyv na účinnosť separácie, zlepšovalo symetriu píkovo a zvyšovalo elučnú silu MF.

Následne bol skúmaný vplyv OM MeOH + 10 mM AmF a MeOH + 10 mM AmF + 5 % H<sub>2</sub>O na zlepšenie tvaru píkovo (Obr. 19). AmF viditeľne zhoršoval tvar píkovo viac zadržovaných analytov, základnej línie a spôsobil koelúciu izomérov **Rf + Rg1**.



**Obr. 19:** Chromatogramy optimalizácie podmienok separácie na kolóne Cortecs HILIC, porovnanie vplyvu aditív, MF CO<sub>2</sub> + MeOH (A) + 10 mM AmF, (B) + 10 mM AmF + 5 % H<sub>2</sub>O, (C) + 5 % H<sub>2</sub>O za použitia gradientu 15 – 45 %.

Nasledovala optimalizácia nastavenia gradientovej elúcie, kde bol skúmaný vplyv zvýšenia začiatočnej koncentrácie gradientu v rozmedzí 15 – 25 %, s MF CO<sub>2</sub> + MeOH + 5 % H<sub>2</sub>O, na elúciu a separáciu analytov (Obr. 20). Najlepšia separácia bola dosiahnutá za pôvodného gradientu 15 – 45 %. So zvyšujúcou sa začiatočnou koncentráciou gradientu sa zhoršovala účinnosť separácie.



**Obr. 20:** Chromatogramy optimalizácie podmienok separácie na kolóne Cortecs HILIC, porovnanie vplyvu zmeny gradientu MF CO<sub>2</sub> + MeOH + 5 % H<sub>2</sub>O. Gradient (A) 15 - 45 %, (B) 20 – 45 %, (C) 25 – 45 %.



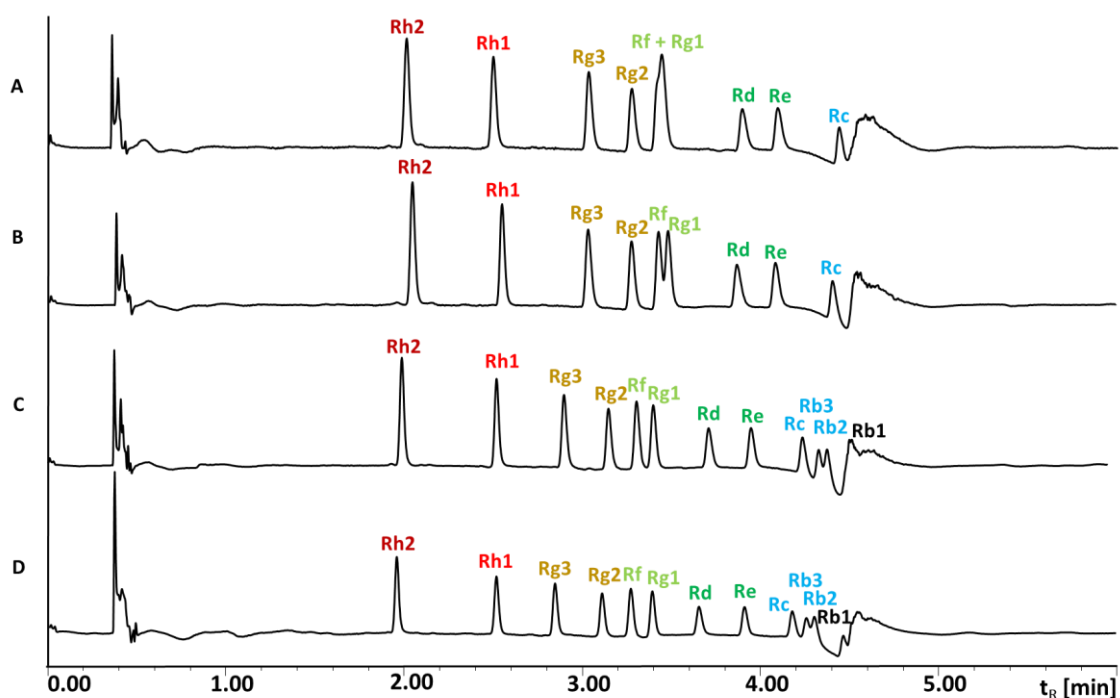
Najvýhodnejšie podmienky separácie na kolóne boli dosiahnuté za použitia OM MeOH + 5 % H<sub>2</sub>O za pôvodného gradientu 15 – 45 % (Tab. 12). Optimalizáciou podmienok sa podarilo separovať izoméne analyty Rf + Rg1 a Rc + Rb3 + Rb2, a čiastočne zlepšiť symetriu pík. Pretrvávajúci nedostatočný symetrický tvar pík Re a Rb1 bol dôvodom, prečo kolóna Cortecs HILIC nepodstúpila ďalšiu optimalizáciu parametrov.

**Tab. 12:** Vybrané parametre optimalizovaných chromatografických podmienok na kolóne Cortecs HILIC, MF CO<sub>2</sub> + MeOH + 5 % H<sub>2</sub>O, gradient 15 - 45 %.

ginsenosid	retenčný čas (t <sub>R</sub> )	retenčný faktor (k)	rozlíšenie (R <sub>S</sub> )	faktor symetrie (A <sub>S</sub> )
Rh-2	1,582	5,27		1,10
Rh-1	2,049	6,83	7,70	1,14
Rg-3	2,331	7,77	5,35	1,32
Rg-2	2,620	8,73	6,11	1,27
Rf	2,719	9,06	2,25	1,27
Rg-1	2,798	9,32	1,81	1,21
Rd	3,016	10,05	4,95	1,44
Re	3,306	11,02	6,57	1,60
Rc	3,452	11,51	3,23	1,25
Rb-3	3,535	11,78	1,36	1,30
Rb-2	3,625	12,08	1,47	1,34
Rb-1	3,744	12,58	2,54	1,55

### 5.3 Optimalizácia chromatografických podmienok na kolóne BEH

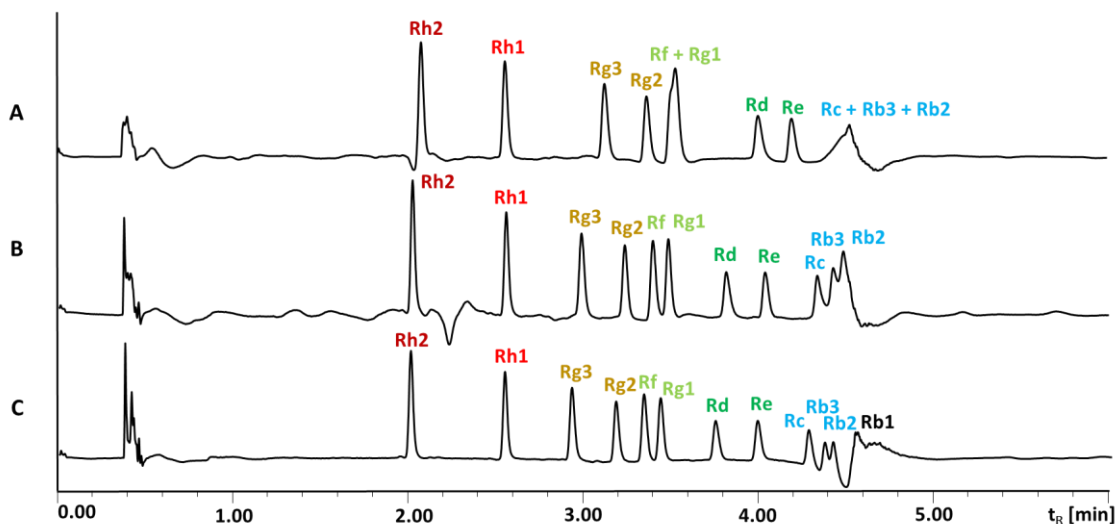
Pri optimalizácii podmienok na kolóne BEH sa postupovalo rovnakým spôsobom ako v prípade kolóny Cortecs HILIC. V prvom kroku bol skúmaný vplyv OM H<sub>2</sub>O v koncentrácii 0 - 7 % na separáciu izomérnych analytov Rf + Rg1 a Rc + Rb2 + Rb3.



**Obr. 21:** Chromatogramy optimalizácie podmienok separácie na kolóne BEH, porovnanie vplyvu koncentrácie H<sub>2</sub>O v MF za použitia gradientu 15 – 45 %. MF CO<sub>2</sub> + (A) MeOH, (B) MeOH + 2 % H<sub>2</sub>O, (C) MeOH + 5 % H<sub>2</sub>O, (D) MeOH + 7 % H<sub>2</sub>O.

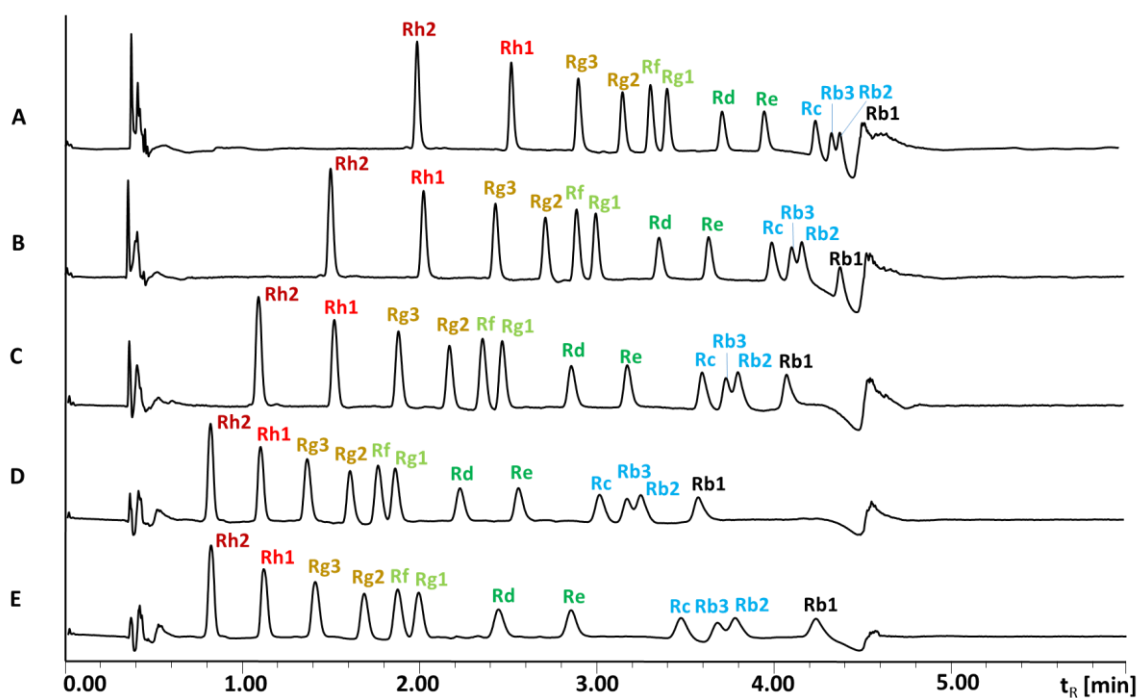
Väčšie zastúpenie H<sub>2</sub>O v MF zvyšovalo polárne interakcie analytov s MF a SF, čo malo za dôsledok vyššiu elučnú silu MF a lepšiu separáciu izomérneho páru Rf + Rg1 (rozlíšenie 0 → 0,87 → 1,39 → 3,16). Najlepšie výsledky boli dosiahnuté za použitia aditíva 5 % H<sub>2</sub>O, ktoré separovalo izoméry Rf + Rg1 a malo najlepší potenciál separácie izomérov Rb3 + Rb2 (Obr. 21).

Ďalším krokom bolo skúmanie vplyvu aditíva 10 mM AmF na separáciu kritických izomérnych párov (Obr. 22). Prídavok 10 mM AmF do MeOH a MeOH + 5 % H<sub>2</sub>O mal negatívny vplyv na tvar základnej línie a zhoršil separáciu izomérnych párov Rf + Rg1 a skupiny Rc + Rb2 + Rb3.



**Obr. 22:** Chromatogramy optimalizácie podmienok separácie na kolóne BEH, porovnanie vplyvu aditív, MF CO<sub>2</sub> + MeOH + (A) 10 mM AmF, (B) 10 mM AmF + 5 % H<sub>2</sub>O, (C) 5 % H<sub>2</sub>O za použitia gradientu 15 – 45 %.

Nasledovala optimalizácia nastavenia gradientovej elúcie. Skúmané boli gradienty 15 – 40 %, 20 – 45 %, 25 – 45 %, 30 – 45 % a 30 – 40 % (Obr. 23).



**Obr. 23:** Chromatogramy optimalizácie separačných podmienok kolóny BEH, vplyv zmeny nastavenia gradientovej elúcie, MF CO<sub>2</sub> + MeOH + 5 % H<sub>2</sub>O. Gradient (A) 15 – 45 %, (B) 20 - 45 %, (C) 25 – 45 %, (D) 30 - 45 %, (E) 30 - 40 %.

Najlepšiu separáciu analytov dosiahol gradient 25 – 45 %, ktorý eluoval všetkých 12 analytov a zlepšil separáciu izoméneho páru **Rf + Rg1**. Začiatkový gradient 30 % OM zhoršoval účinnosť separácie. Zmena gradientu nemala vplyv na separáciu izoméneho páru **Rb2 + Rb3**.

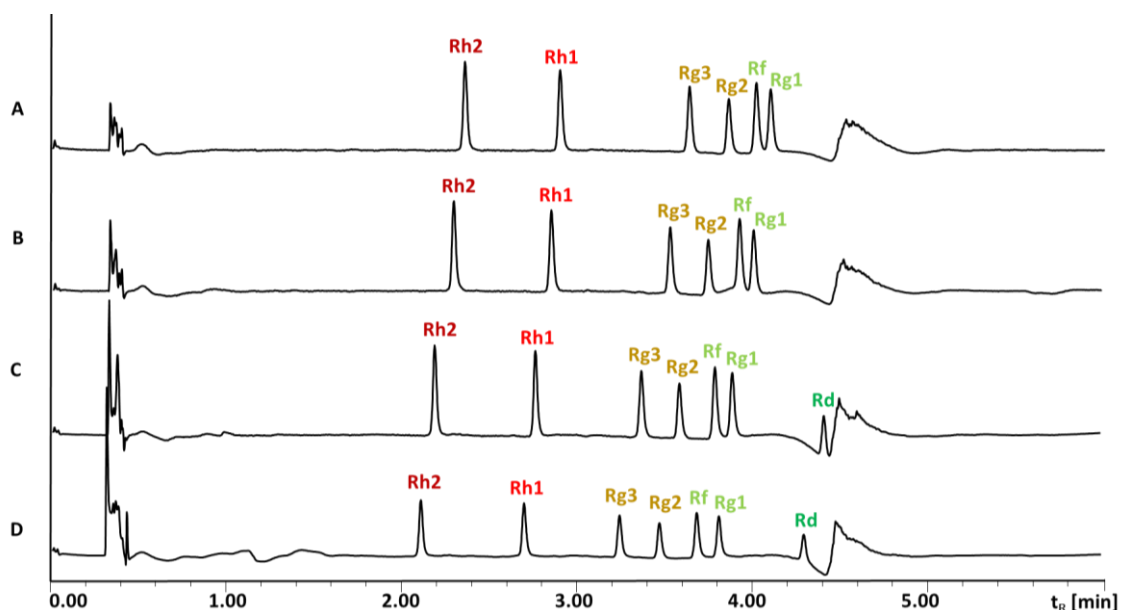
Najlepšie chromatografické podmienky na kolóne BEH boli dosiahnuté kombináciou MF CO<sub>2</sub> + MeOH + 5 % H<sub>2</sub>O a gradientu 25 – 45 % (Tab. 13). Nevýhodou kolóny BEH bola nedostatočná selektivita spôsobujúca čiastočnú koelúciu izomérov **Rb2 + Rb3**.

**Tab. 13:** Vybrané parametre optimalizovaných chromatografických podmienok na kolóne BEH, MF CO<sub>2</sub> + MeOH + 5 % H<sub>2</sub>O, gradient 25 - 45 %.

ginsenosid	retenčný čas (t <sub>R</sub> )	retenčný faktor (k)	rozlíšenie (R <sub>S</sub> )	faktor symetrie (A <sub>S</sub> )
<b>Rh-2</b>	1,083	3,09		1,19
<b>Rh-1</b>	1,514	4,33	7,09	1,18
<b>Rg-3</b>	1,879	5,37	5,74	1,20
<b>Rg-2</b>	2,169	6,20	4,36	1,25
<b>Rf</b>	2,357	6,73	2,75	1,15
<b>Rg-1</b>	2,469	7,05	1,61	1,22
<b>Rd</b>	2,861	8,17	5,33	1,24
<b>Re</b>	3,180	9,09	4,05	1,29
<b>Rc</b>	3,605	10,3	5,26	1,30
<b>Rb-2</b>	3,740	10,69	-	-
<b>Rb-3</b>	3,809	10,88	-	-
<b>Rb-1</b>	4,086	11,67	3,03	1,37

## 5.4 Optimalizácia chromatografických podmienok na kolóne Torus DIOL

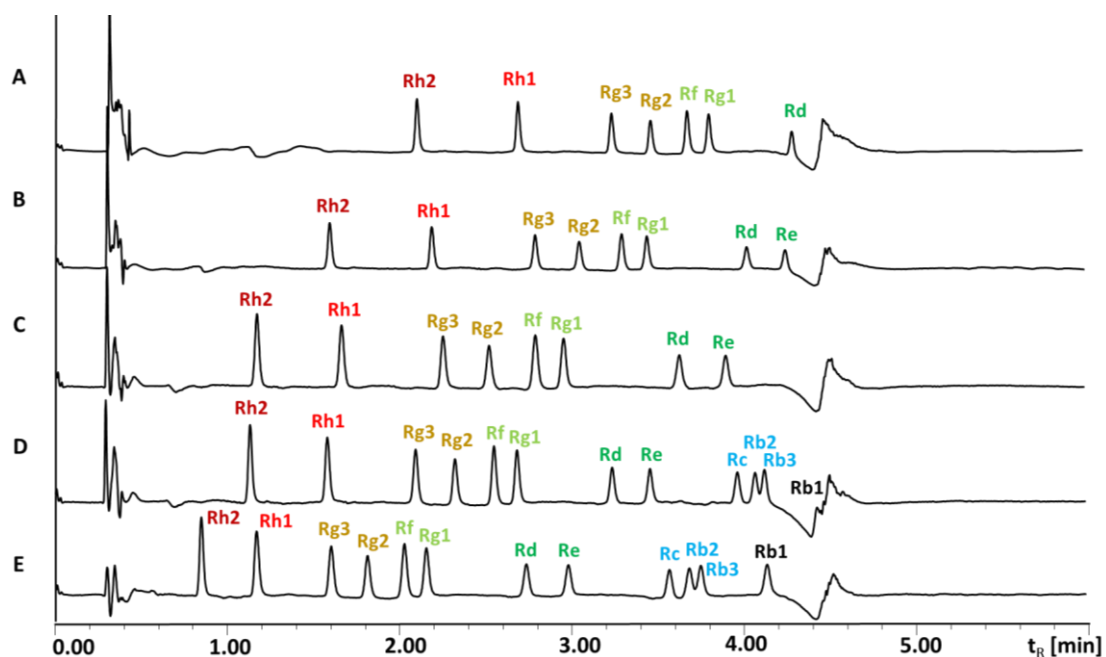
Ako prvý bol na kolóne Torus DIOL skúmaný vplyv aditíva H<sub>2</sub>O v rozmedzí koncentrácií 0 – 7 % na separáciu analytov a elučnú silu MF (Obr. 24). Väčšie zastúpenie H<sub>2</sub>O v MF zvyšovalo polárne interakcie medzi analytmi, SF a MF, čoho dôsledkom bola separácia izomérov Rf + Rg1 (rozlíšenie 1,72 → 1,73 → 2,17 → 4,83) a zvýšenie elučnej sily MF. Najlepšie výsledky boli dosiahnuté za prídavku OM MeOH + 7 % H<sub>2</sub>O do MF.



**Obr. 24:** Chromatogramy optimalizácie separačných podmienok kolóny Torus DIOL, porovnanie vplyvu koncentrácie H<sub>2</sub>O v MF za použitia gradientu 15 – 45 %. MF CO<sub>2</sub> + (A) MeOH, (B) MeOH + 2 % H<sub>2</sub>O, (C) MeOH + 5 % H<sub>2</sub>O, (D) MeOH + 7 % H<sub>2</sub>O.

Nasledovala optimalizácia nastavenia gradientovej elúcie za účelom elúcie a separácie všetkých ginsenosidov v čase analýzy. Skúmané gradienty boli 15 – 45 %, 20 – 45 %, 25 – 45 %, 25 – 50 % a 30 – 50 % (Obr. 25). Elúcia všetkých 12 ginsenosidov bola dosiahnutá iba za použitia gradientu 30 – 50 %. Zmena gradientovej elúcie nemala vplyv na separáciu izomérnych ginsenosidov Rb2 + Rb3.

Najlepšie chromatografické podmienky na kolóne Torus DIOL boli dosiahnuté kombináciou MF CO<sub>2</sub> + MeOH + 7 % H<sub>2</sub>O a gradientu 30 - 50 %. Nevýhodou bola nedostatočná separácia izomérov Rb2 + Rb3 (Tab. 14).



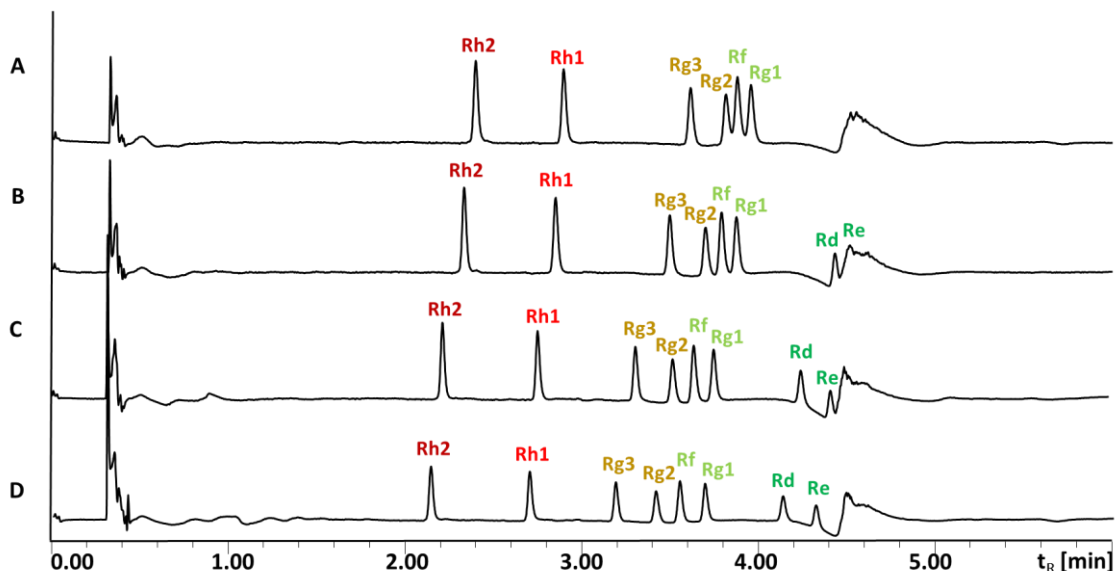
**Obr. 25:** Chromatogramy optimalizácie separačných podmienok kolóny Torus DIOL, vplyv nastavenia gradientovej elúcie, MF CO<sub>2</sub> + MeOH + 7 % H<sub>2</sub>O. Gradient (A) 15 – 45 %, (B) 20 – 45 %, (C) 25 - 45 %, (D) 25 - 50 %, (E) 30 – 50 %.

**Tab. 14:** Vybrané parametre optimalizovaných chromatografických podmienok na kolóne Torus DIOL, MF CO<sub>2</sub> + MeOH + 7 % H<sub>2</sub>O, gradient 30 - 50 %.

ginsenosid	retenčný čas (t <sub>R</sub> )	retenčný faktor (k)	rozlíšenie (R <sub>s</sub> )	faktor symetrie (A <sub>s</sub> )
<b>Rh-2</b>	0,845	2,64	-	1,17
<b>Rh-1</b>	1,167	3,65	6,92	1,20
<b>Rg-3</b>	1,602	5,01	8,30	1,19
<b>Rg-2</b>	1,813	5,67	3,87	1,16
<b>Rf</b>	2,028	6,34	3,87	1,09
<b>Rg-1</b>	2,156	6,74	2,30	1,13
<b>Rd</b>	2,738	8,56	10,16	1,02
<b>Re</b>	2,983	9,32	4,14	1,02
<b>Rc</b>	3,572	11,16	9,88	1,03
<b>Rb-2</b>	3,688	11,52	1,87	-
<b>Rb-3</b>	3,754	11,73	1,04	-
<b>Rb-1</b>	4,141	12,94	6,06	1,22

## 5.5 Optimalizácia chromatografických podmienok na kolóne Torus 2-PIC

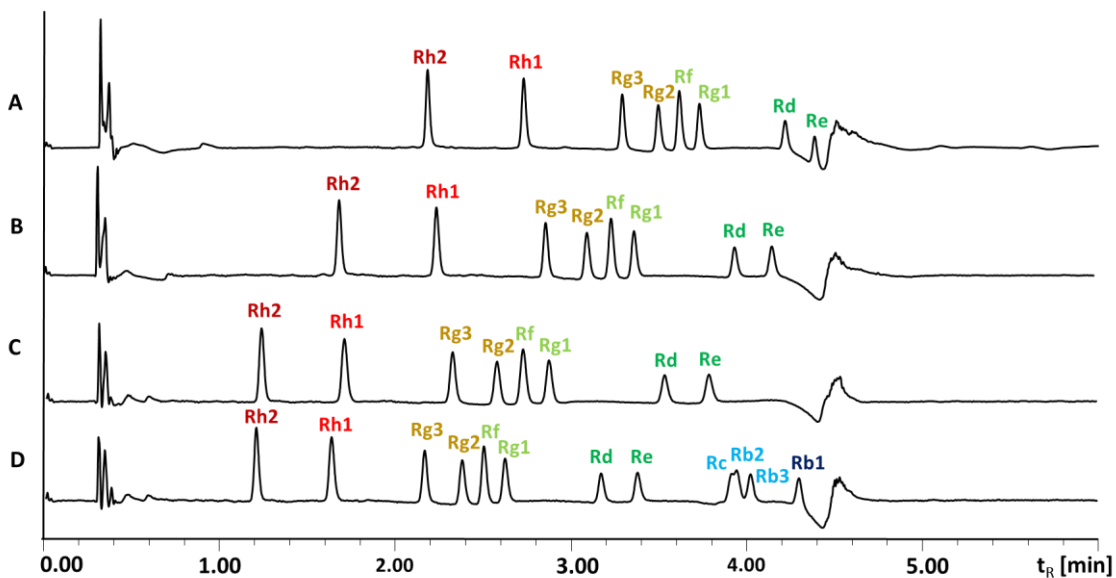
Základný skrining poukázal na výhody H<sub>2</sub>O, ako aditíva MF. Optimalizácia separácie z tohto dôvodu začala skúmaním vplyvu koncentrácie H<sub>2</sub>O v MF v rozmedzí 0 - 7 % (Obr. 26).



**Obr. 26:** Chromatogramy optimalizácie separačných podmienok kolóny Torus 2-PIC, vplyv prídavku H<sub>2</sub>O do MF za použitia gradientu 15 – 45 %. MF CO<sub>2</sub> + (A) MeOH, (B) MeOH + 2 % H<sub>2</sub>O, (C) MeOH + 5 % H<sub>2</sub>O, (D) MeOH + 7 % H<sub>2</sub>O.

Väčšie zastúpenie H<sub>2</sub>O v MF malo vďaka polárnym interakciám s analytom vplyv na zvýšenie elučnej sily MF a zlepšovalo separáciu analytov Rg2 + Rf (rozlíšenie 1,34 → 1,98 → 2,40 → 2,78) a Rf + Rg1 (rozlíšenie 1,51 → 1,78 → 2,29 → 2,99). Ideálnou koncentráciou aditíva bolo 5 % H<sub>2</sub>O.

Pre MF CO<sub>2</sub> + MeOH + 5 % H<sub>2</sub>O bolo ďalej skúmané nastavenie gradientovej elúcie za účelom elúcie všetkých analyzovaných ginsenosidov v čase analýzy. Skúmané gradienty boli 15 – 45 %, 20 – 45 %, 25 – 45 % a 25 – 50 % (Obr. 27). Najlepších výsledkov bolo dosiahnutých za použitia gradientu 25 – 50 %, ktorý ako jediný eluoval všetkých 12 ginsenosidov a čiastočne separoval izoméry Rc + Rb2. Zmena gradientu nemala zásadný vplyv na zlepšenie separácie analytov Rg1 + Rf.

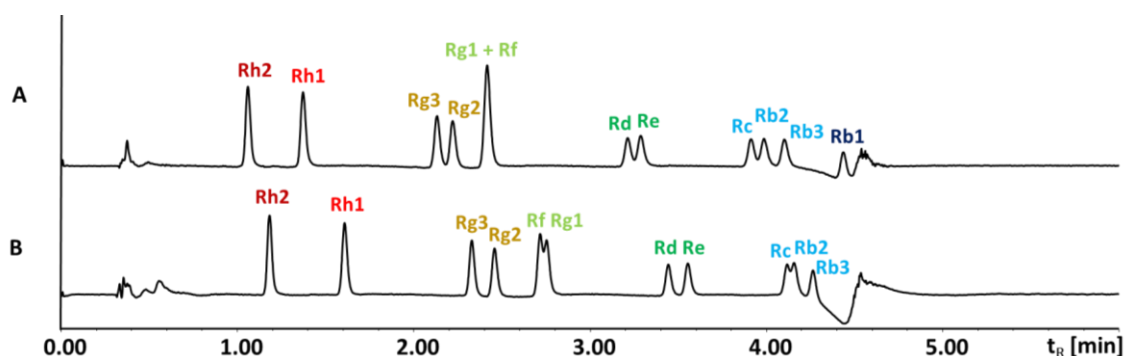


**Obr. 27:** Chromatogramy optimalizácie separačných podmienok kolóny Torus 2-PIC, optimalizácia nastavenia gradientovej elúcie, MF CO<sub>2</sub> + MeOH + 5 % H<sub>2</sub>O. Gradient (A) 15 - 45 %, (B) 20 - 45 %, (C) 25 - 45 %, (D) 25 - 50 %.

Ďalší krok bol zameraný na skúmanie vplyvu prídavku ACN v MF na separáciu kritického páru **Rc + Rb2** za účelom ich úplnej separácie. Ako prvá bola skúmaná MF CO<sub>2</sub> + MeOH/ACN (1:1). Z dôvodu nižšej elučnej sily MF bolo skúmané široké rozmedzie gradientov so začiatočnou koncentráciou od 25 do 40 % OM a koncovou koncentráciou 40 – 70 %. Najvhodnejší gradient bol 40 – 70 %, ktorý ako jediný eluoval všetky ginsenosidy v čase analýzy (Obr. 28). Prídavok ACN do MF zlepšil separáciu izomérov **Rc + Rb3** (rozlíšenie 1,04) a **Rb3 + Rb2** (rozlíšenie 1,62), ale zároveň spôsobil koelúciu izomérneho páru **Rf + Rg1** (Obr. 28).

Pozitívny vplyv ACN na delenie skupiny **Rc + Rb2 + Rb3** a vplyv H<sub>2</sub>O na delenie páru **Rf + Rg1**, poukázal na možné výhody ich kombinácie. Ďalšia skúmaná MF bola CO<sub>2</sub> + MeOH/ACN (1:1) + 5 % H<sub>2</sub>O s gradientmi 25 - 50 %, 30 – 50 %, 35 - 60 %, 35 - 70 %. Najvhodnejší bol gradient 40 – 70 % (Obr. 28), ktorý čiastočne separoval izomérené páry **Rf + Rg1** a **Rc + Rb2**.





**Obr. 28:** Chromatogram optimalizácie separačných podmienok kolóny Torus 2-PIC, gradient 40 - 70 % pre MF CO<sub>2</sub> (A) + MeOH/ACN (1:1), (B) + MeOH/ACN (1:1) + 5 % H<sub>2</sub>O.

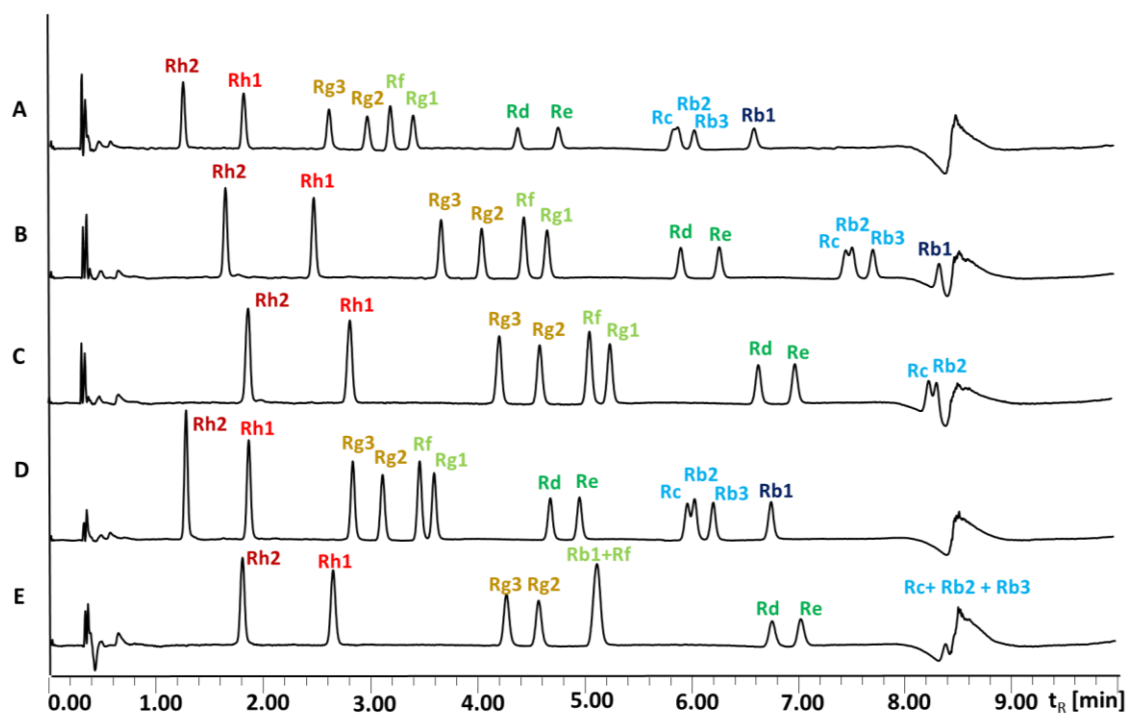
Nasledujúcim krokom optimalizácie bolo hľadanie ideálnej kombinácie zloženia MF, ktorá by ponúkala čo najlepšie delenie oboch kritických skupín izomérnych analytov. Z dôvodu rozdielnej elučnej sily skúmaných OM a aditív a zaistenia elúcie väčšiny analytov bola predĺžená dĺžka analýzy na 10 min a upravený priebeh gradientu (Tab. 15).

**Tab. 15:** Nastavenie gradientovej elúcie pre dĺžku analýzy 10 min.

čas [min]	CO <sub>2</sub> [%]	OM [%]
0	75	25
8	50	50
8,1	75	25
10	75	25

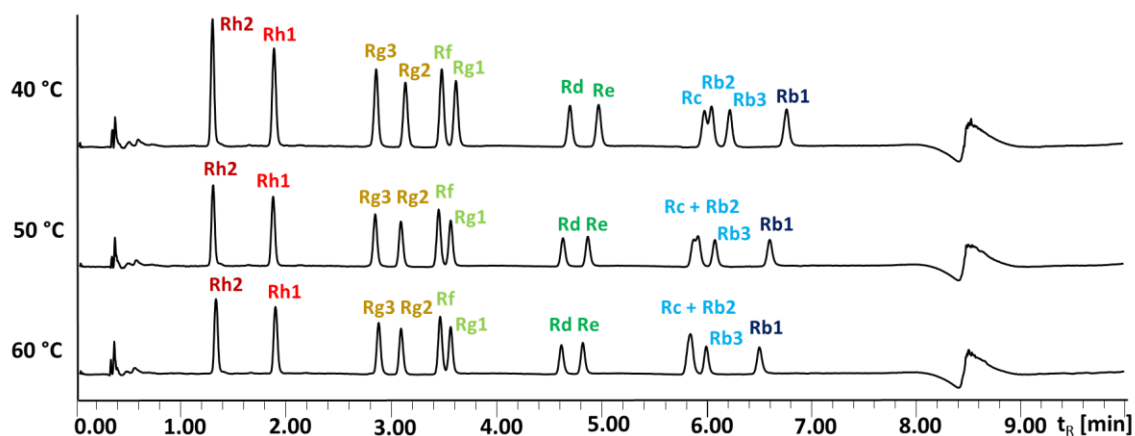
Skúmané kombinácie OM a aditív boli MeOH + 5 % H<sub>2</sub>O, MeOH/ACN (3:1) + 5 % H<sub>2</sub>O, MeOH/ACN (2:1) + 5 % H<sub>2</sub>O a EtOH/ACN (2:1) + 5 % H<sub>2</sub>O (Obr. 29). Prídavok ACN znižoval elučnú silu MF, tlak systému, zlepšoval separáciu izoméneho páru Rc + Rb2 a zhoršoval separáciu izomérov Rf + Rg1. Zmena gradientu nemala žiadny vplyv na separáciu analytov Rc + Rb2 + Rb3. Použitie EtOH znížilo elučnú silu MF a spôsobilo koelúciu izomérov Rf + Rg1.

Najlepších podmienok bolo dosiahnutých za použitia MeOH/ACN (2:1) + 5 % H<sub>2</sub>O, ako OM a gradientu 30 - 60 %. Tieto podmienky ponúkali najlepší kompromis medzi separáciou izomérov Rf + Rg1 (rozlíšenie 1,59) a Rc + Rb2, Rb2 + Rb3 (rozlíšenie 1,09).

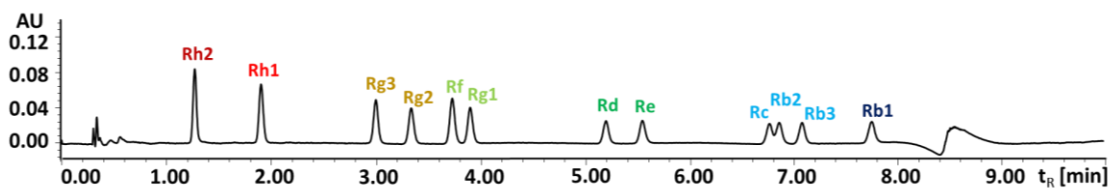


**Obr. 29:** Chromatogramy optimalizácie separačných podmienok kolóny Torus 2-PIC, porovnanie efektu OM a gradientu. (A) MeOH + 5 % H<sub>2</sub>O, 25 – 50 %, (B) MeOH/ACN (3:1) + 5 % H<sub>2</sub>O, 25 – 50 %, (C) MeOH/ACN (2:1) + 5 % H<sub>2</sub>O, 25 - 50 %, (D) MeOH/ACN (2:1) + 5 % H<sub>2</sub>O, 30 - 60 %, (E) EtOH/ACN (2:1) + 5 % H<sub>2</sub>O, 30 - 60 %.

Ďalším krokom bolo skúmanie vplyvu teploty na sepráciu na kolóne Torus 2-PIC v rozmedzí 30 – 60 °C (Obr. 30). Znižujúca teplota kolóny zvyšovala selektivitu a zlepšovala separáciu izomérov Rc + Rb2 + Rb3 a zároveň Rf + Rg1 (Obr. 30). Teplota kolóny 30 °C a gradient 30 - 55%, ponúkali najlepšiu selektivitu (Obr. 31).



**Obr. 30:** Optimalizácia teploty kolóny (40 °C, 50 °C, 60 °C) Torus 2-PIC, MF CO<sub>2</sub> + MeOH/ACN (2:1) + 5 % H<sub>2</sub>O, gradient 30 – 60 %.



**Obr. 31:** Chromatogram optimalizácie separačných podmienok na kolóne 2-PIC, teplota 30 °C, MF CO<sub>2</sub> + MeOH/ACN (2:1) + 5 % H<sub>2</sub>O, gradient 30 - 55 %.

Posledným krokom optimalizácie separačných podmienok na kolóne Torus 2-PIC bola optimalizácia vplyvu tlaku BPR. Skúmaný bol tlak BPR 14,32 MPa (2086 psi), 13 MPa (1886 psi), 11,62 MPa (1686 psi) a 10,32 MPa (1500 psi). Z dôvodu minimálnych rozdielov neboli chromatogramy uvedené. Nižšie tlaky BPR spôsobili nepatrné predĺženie retenčného retenčných časov analytov zníženie systémového tlaku. Z tohto dôvodu bol, ako najvhodnejší vybraný tlak 10,32 MPa na BPR.

Najvhodnejšie podmienky separácie na kolóne Torus 2-PIC boli dosiahnuté za použitia OM MeOH/ACN (2:1) + 5 % H<sub>2</sub>O, gradientu 30 – 55 %, dĺžke analýzy 10 min, teploty kolóny 30 °C a tlaku regulátora spätného tlaku 10,32 MPa. Výhodou kolóny bola elúcia všetkých 12 ginsenosidov, separácia kritických izomérnych párov Rf + Rg1 (rozlíšenie 2,09), Rb2 + Rb3 (rozlíšenie 2,05) a symetrický tvar pík (faktor symetrie 0,99 – 1,17). Nevýhodou bola neúplná separácia kritického izomérneho páru Rc + Rb2 (rozlíšenie 1,07) čas analýzy 10 min (Tab. 16).

**Tab. 16:** Vybrané parametre optimalizovaných chromatografických podmienok na kolóne Torus 2-PIC, MF CO<sub>2</sub> + MeOH + 5 % H<sub>2</sub>O, gradient 30 - 55 %.

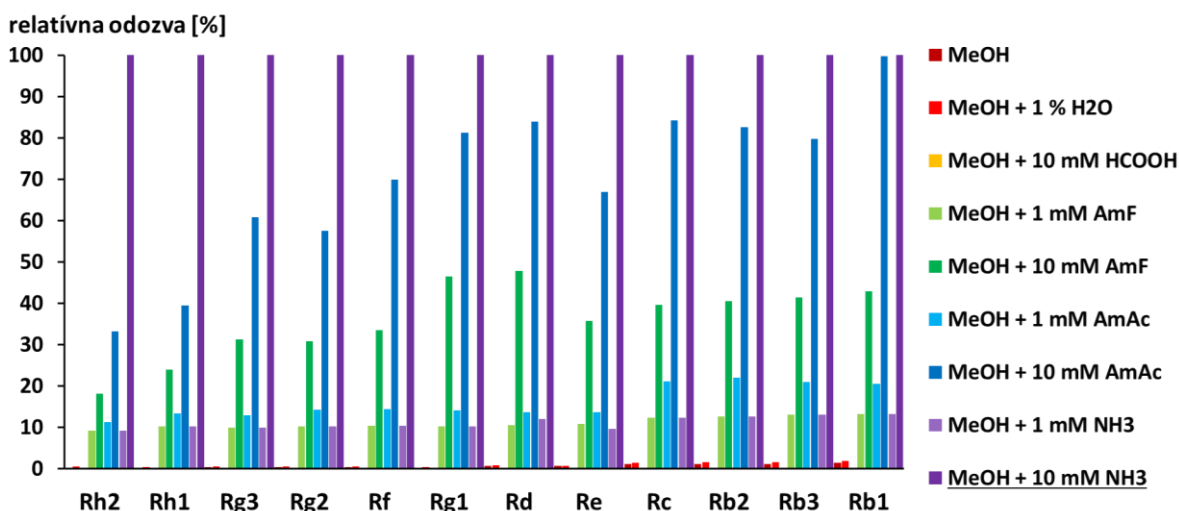
ginsenosid	retenčný čas (t <sub>R</sub> )	retenčný faktor (k)	rozlíšenie (R <sub>S</sub> )	faktor symetrie (A <sub>S</sub> )
<b>Rh2</b>	1,300	4,0625		1,11
<b>Rh1</b>	1,948	6,0875	9,61	1,17
<b>Rg3</b>	3,056	9,5500	14,31	1,13
<b>Rg2</b>	3,408	10,6500	4,09	1,14
<b>Rf</b>	3,794	11,8563	4,27	1,09
<b>Rg1</b>	3,983	12,4469	2,09	1,03
<b>Rd</b>	5,302	16,5688	14,11	1,10
<b>Re</b>	5,662	17,6938	3,60	1,04
<b>Rc</b>	6,881	21,5031	11,67	-
<b>Rb2</b>	6,998	21,8688	1,07	-
<b>Rb3</b>	7,219	22,5594	2,05	0,99
<b>Rb1</b>	7,892	24,6625	6,20	1,16

## 5.6 Optimalizácia zloženia prídavnej kvapaliny MS detekcie

Zloženie prídavnej kvapaliny vo veľkej miere ovplyvňuje ionizáciu analytov a odozvu získanú MS. Z tohto dôvodu bola ďalším krokom vo vývoji metódy optimalizácia prídavnej kvapaliny MS. Cieľom optimalizácie bolo získanie čo najvyššej odozvy analytov. Používaných bolo 9 prídavných kvapalín: MeOH, v literatúre často používané MeOH + 1 % H<sub>2</sub>O a MeOH + 10 mM HCOOH, aditíva obsahujúce amónne ióny MeOH + 1mM/10 mM NH<sub>3</sub>, MeOH + 1 mM/10 mM AmF a MeOH + 1 mM/10 mM AmAc tvoriace bázičné prostredie a uľahčujúce deprotonizáciu analytov v ESI<sup>-</sup> móde.

Pri optimalizácii boli použité finálne separačné podmienky (kapitola 5.7). Zber dát prebiehal v móde SIM, za zápornej ESI<sup>-</sup> ionizácie (kapitola 4.7). V rámci skríningu bola porovnávaná nameraná intenzita štandardov analytov v rámci analýz.

Najlepšiu odozvu všetkých analyzovaných ginsenosidov ponúkala prídavná kvapalina MeOH + 10 mM NH<sub>3</sub>, dobrú odozvu ponúkal aj 10 mM octan amónny v MeOH (Obr. 32). Aditíva obsahujúce amónne ióny všeobecne zvyšovali ionizáciu analytov. Výhodnejšie vlastnosti mali aditíva v koncentrácii 10 mM. MeOH a jeho kombinácia s H<sub>2</sub>O a HCOOH ponúkali extrémne nízku odozvu pohybujúcu sa okolo 10<sup>3</sup>.



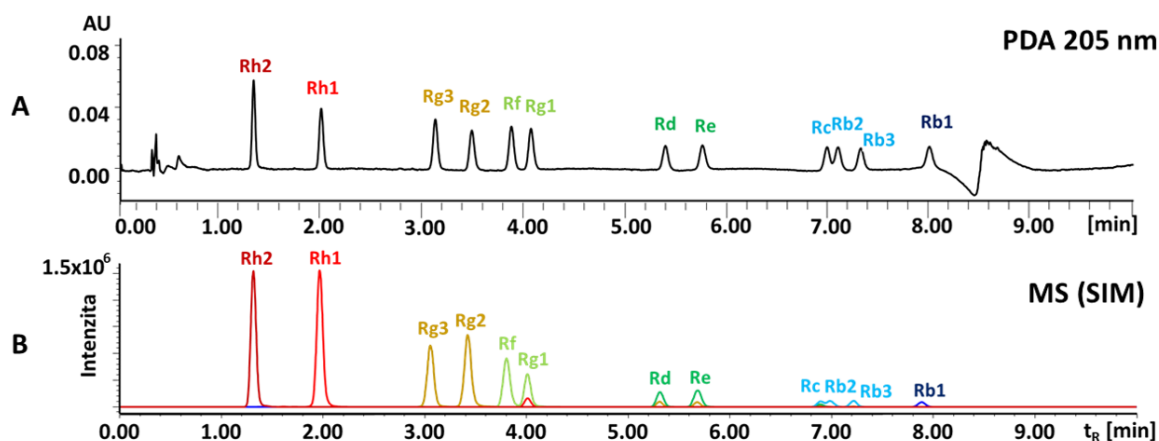
**Obr. 32:** Optimalizácia zloženia prídavnej kvapaliny do MS. Porovnanie vplyvu prídavnej kvapaliny na intenzitu odozvy analytov. Relatívna odozva vztiahnutá na odozvu MeOH + 10 mM NH<sub>3</sub>.

## 5.7 Finálne separačné a ionizačné podmienky

Ako najvhodnejšia bola vybraná kolóna Torus 2-PIC a mobilná fáza CO<sub>2</sub> + MeOH/ACN (2:1) + 5 % H<sub>2</sub>O. Optimalizované separačné podmienky (Tab. 17) dosiahli elúciu všetkých 12 analytov a úplnú separáciu 10 z nich (Obr. 33). Izoméry **Rb2 + Rc** sa podarilo separovať iba čiastočne. Finálne ionizačné podmienky používali zápornú ESI<sup>-</sup> ionizáciu a 10 mM NH<sub>3</sub> v MeOH ako prídavnú kvapalinu.

**Tab. 17:** Finálne separačné a ionizačné podmienky.

separačné a ionizačné podmienky	
inštrumentácia	UHPSFC Acquity UPC <sup>2</sup>
kolóna	Torus 2-PIC (100,0 x 3,0 mm, 1,7 μm)
mobilná fáza	CO <sub>2</sub> + MeOH/ACN (2:1) + 5 % H <sub>2</sub> O
prietok MF	1,5 ml/min
gradient	30 - 55 % do 8. min
dĺžka analýzy	10 min
dávkovaný objem	2 μL
teplota kolóny	30 °C
tlak BPR	1500 psi
UV detekcia	PDA, 205 nm
MS detekcia	Q, SIM
druh ionizácie	ESI <sup>-</sup>
metóda zberu dát	SIM
rýchlosť zberu dát	10 bodov/s
napätie na kapiláre	0,8 kV
teplota v zdroji	600 °C
prietok prídavnej kvapaliny	0,3 ml/min
prídavná kvapalina	MeOH + 10 mM NH <sub>3</sub>



**Obr. 33:** Chromatogramy optimalizovaných separačných a ionizačných podmienok na kolóne Torus 2-PIC, (A) PDA a (B) MS detekcia.

Výsledky testu spôsobilosti vybraných parametrov systému (Tab. 18) preukázali vhodnosť optimalizovanej metódy. Analyty boli separované s rozlíšením vyšším ako 1,5 s výnimkou izoméneho páru **Rb2 + Rc**, ktorý dosiahol rozlíšenia 1,07.

**Tab. 18:** Výsledky vybraných parametrov testu spôsobilosti systému finálnych separačných podmienok.

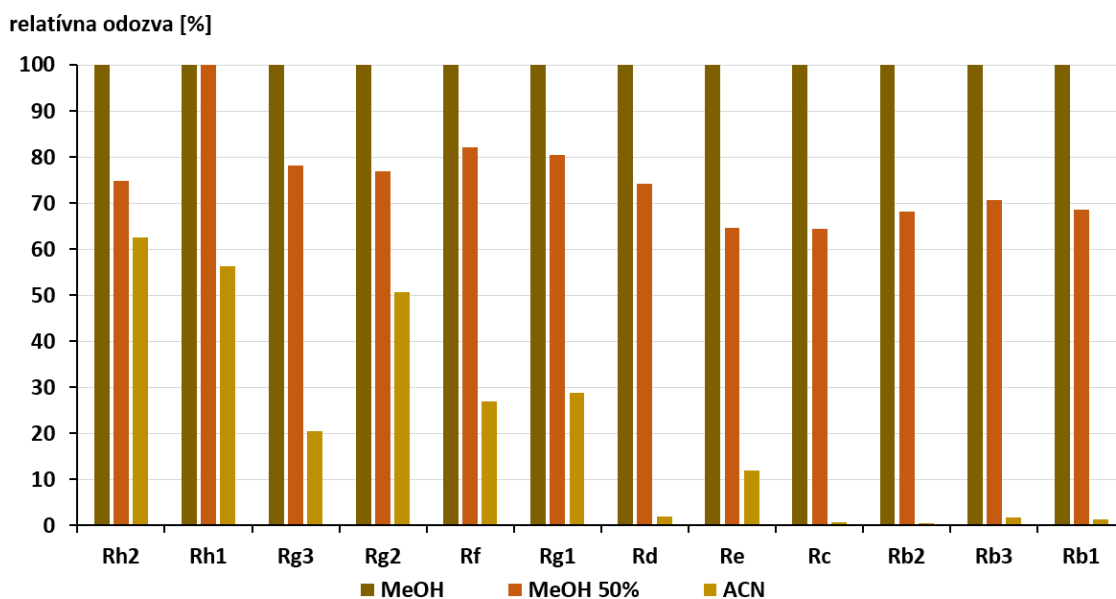
ginsenosid	priemerný retenčný čas ( $t_R$ )	retenčný faktor (k)	rozlíšenie ( $R_s$ )	faktor symetrie ( $A_s$ )	šírka píku v polovici výšky ( $w_{50}$ )
<b>Rh-2</b>	1,300	4,0625		1,11	0,04
<b>Rh-1</b>	1,948	6,0875	9,61	1,17	0,04
<b>Rg-3</b>	3,056	9,5500	14,31	1,13	0,05
<b>Rg-2</b>	3,408	10,6500	4,09	1,14	0,05
<b>Rf</b>	3,794	11,8563	4,27	1,09	0,05
<b>Rg-1</b>	3,983	12,4469	2,09	1,03	0,05
<b>Re</b>	5,302	16,5688	14,11	1,10	0,06
<b>Rd</b>	5,662	17,6938	3,60	1,04	0,06
<b>Rc</b>	6,881	21,5031	11,67	-	0,06
<b>Rb-2</b>	6,998	21,8688	1,07	-	0,07
<b>Rb-3</b>	7,219	22,5594	2,05	0,99	0,06
<b>Rb-1</b>	7,892	24,6625	6,20	1,16	0,07

## 5.8 Optimalizácia prípravy vzorkov doplnkov stravy

Cieľom optimalizácie prípravy vzorkov bol výber vhodného rozpúšťadla s čo najvyššou odozvou a kompatibilitou s UHPSFC systémom. Vplyv extrakčného rozpúšťadla na odozvu bol skúmaný na prípravku ProMan v koncentrácii 50 mg homogenizovanej zmesi na 1 ml rozpúšťadla. Vzorky boli pripravené podľa postupu v kapitole 4.5.7 v dvoch opakovaníach pre každé rozpúšťadlo

Pri optimalizácii extrakčného rozpúšťadla bol skúmaný vplyv ACN, MeOH a 50% MeOH na množstvo extrahovaných ginsenosidov. Analýza prebiehala za finálnych separačných a ionizačných podmienok (kapitola 5.7).

K vyhodnoteniu boli použité priemerné plochy pík merané pomocou MS detekcie. Získané hodnoty boli vo forme relatívnej odozvy v percentách vztiahnuté k odozve štandardu ginsenosidov o koncentrácii 250  $\mu\text{g/ml}$  (Obr. 34). Najlepšie extrakčné vlastnosti ponúkal MeOH. Najmenej vhodným bol ACN.



**Obr. 34:** Relatívna percentuálna odozva ginsenosidov v 50 mg prípravku ProMan extrahovaných rozpúšťadlami MeOH, 50% MeOH a ACN, vztiahnutá k odozve MeOH.



## **5.9 Analýza doplnkov stravy**

Použitelnosť optimalizovanej metódy bola následne overená pri analýze obsahu ginsenosidov v 8 potravinových doplnkoch obsahujúcich kórejský a sibírsky ženšen v pevnej a kvapalnej forme. Cieľom analýzy potravinových doplnkov s obsahom kórejského ženšenu (všehoj ázijský) bolo potvrdenie prítomnosti a kvantifikácia ginsenosidov, ktorých výsledky boli porovnané s obsahom deklarovaným výrobcom. Analýza prípravkov obsahujúcich sibírsky ženšen (všehojivec štetinatý) bola prevedená za cieľom potvrdenia neprítomnosti ginsenosidov v prípravku, ktorých výskyt by poukazoval na zámenu kórejského a sibírskeho ženšenu výrobcom.

Dáta boli vyhodnocované z chromatogramov získaných pomocou PDA detekcie pri vlnovej dĺžke 205 nm, ktorá je absorbovaná širokým spektrom zlúčenín. PDA detektor ponúkal lineárnu koncentračne závislú odozvu vhodnú pre kvantifikáciu analytov. Získané dáta boli doplnené informáciami z chromatogramov MS detekcie poskytujúcej vyššiu selektivitu. MS detekcia nebola použitá ku kvantifikácii z dôvodu vysokej ceny izotopicky značených štandardov.

Výsledky analýzy ginsenosidov v prípravkoch obsahujúcich všehoj ázijský sú spracované v súhrnnej Tab. 19, zobrazujúcej obsah jednotlivých ginsenosidov a celkový obsah ginsenosidov v 1 tablete/kapsule alebo dávke kvapalného prípravku.

## 1. ProMan PLUS (NaturaMed Pharmaceuticals s.r.o.)

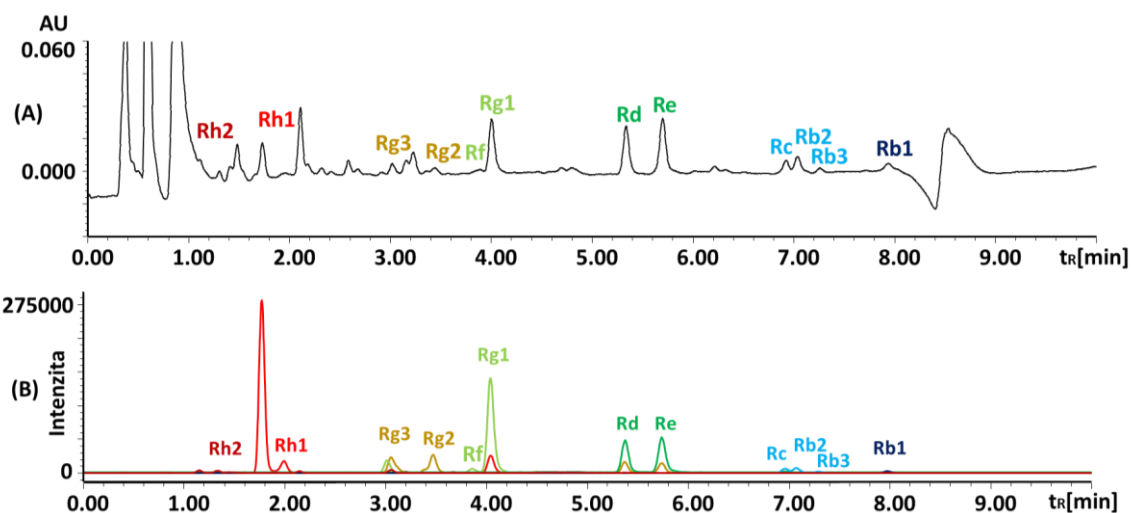
Prvým analyzovaným doplnkom stravy bol ProMan Plus od výrobcu NaturaMed Pharmaceuticals s.r.o. Jednalo sa o doplnok stravy pozostávajúci zo zmesi 4 rastlinných extraktov (všehoj ženšenový, senovka grécka, rozchodnica ružová, pantala rozkladitá), vitamínov a minerálov.



lieková forma	kapsule
doporučená denná dávka	1 kapsula
priemerná hmotnosť	553,49 mg
hmotnostná rovnomernosť	5,94 %
extraktu ženšenu v LF	50 mg

Obr. 35: Súhrn informácií a obal prípravku ProMan PLUS, upravené zo zdroja: [47].

Výrobca prípravku ProMan PLUS deklaruje v 1 kapsule obsah 50 mg extraktu koreňa kórejského ženšenu, ekvivalentného 500 mg koreňa rastliny (Obr. 35). Bližšie informácie o obsahu ginsenosidov výrobca neponúka. Analýza prípravku potvrdila obsah všetkých 12 analyzovaných ginsenosidov (Obr. 36). Celkový obsah ginsenosidov v tablete prípravku bol 38,12 mg s najvyšším zastúpením ginsenosidu Re (Tab. 19).



Obr. 36: UV a MS chromatogramy prípravku ProMan PLUS.

## 2. Korean Red Ginseng (Jamieson Laboratories)

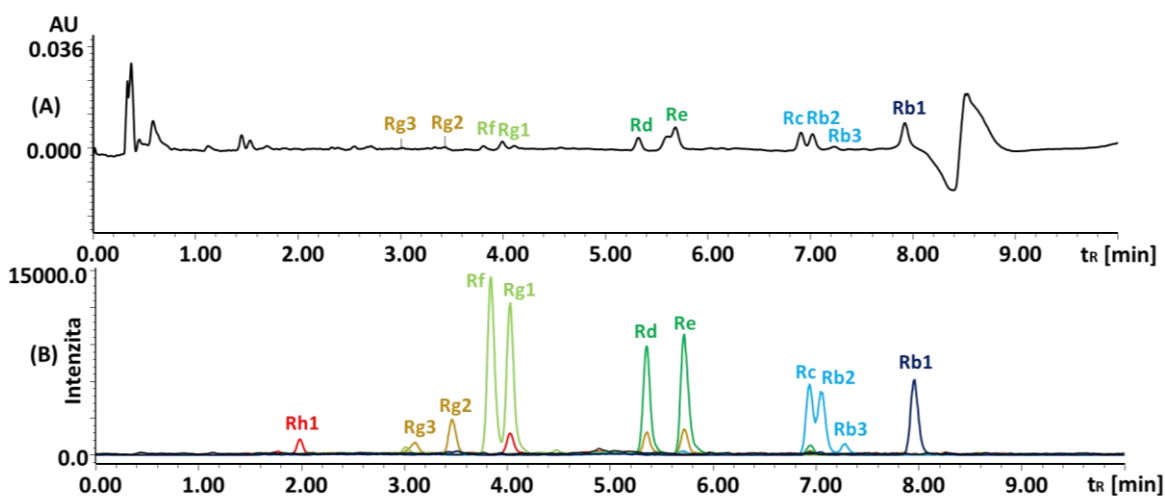
Korean Red Ginseng, je doplnok stravy od výrobcu Jamieson Laboratories, ktorý obsahoval štandardizovaný extrakt kórejského červeného ženšenu.



lieková forma	tableta
doporučená denná dávka	2 tablety
priemerná hmotnosť	404,46 mg
hmotnostná rovnomernosť	4,50 %
obsah ginsenosidov v LF	11 mg

Obr. 37: Súhrn informácií a obal prípravku Korean Red Ginseng.

Výrobca prípravku Korean Red Ginseng deklaroval v 1 tablete obsah 55 mg extraktu koreňa kórejského ženšenu štandardizovaného na obsah 20 % celkových ginsenosidov (Obr. 37). Analýza prípravku potvrdila obsah 11 analyzovaných ginsenosidov, v prípravku sa nenachádzal ginsenosid Rh2 (Obr. 38). Celkový obsah ginsenosidov v tablete prípravku bol 7,28 mg s najvyšším zastúpením ginsenosidu Rb1 (Tab. 19). Zistený obsah ginsenosidov v tablete bol nižší oproti množstvu 11 mg deklarovanému výrobcom.



Obr. 38: UV (A) a MS (B) chromatogramy prípravku Korean Red Ginseng.

### 3. Ženšen 1000 mg (Vitaharmony s.r.o.)

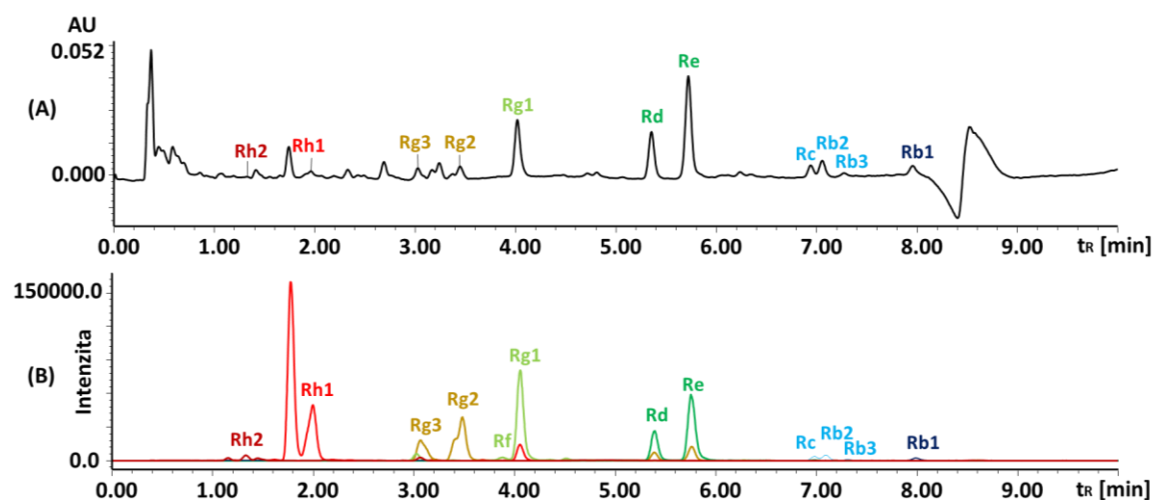
Ženšen 1000 mg od výrobcu Vitaharmony s.r.o. obsahoval štandardizovaný extrakt z koreňa všehoja ázijského.



lieková forma	tableta
doporučená denná dávka	1 tableta
priemerná hmotnosť	329,27 mg
hmotnostná rovnomernosť	0,90 %
obsah ginsenosidov v LF	100 mg

Obr. 39: Súhrn informácií a obal prípravku Ženšen 1000 mg.

Výrobca prípravku Ženšen 1000 mg deklaroval v 1 tablete obsah 1000 mg extraktu koreňa kórejského ženšenu, štandardizovaného na obsah 10 % ginsenosidov (Obr. 39). Analýza prípravku potvrdila obsah všetkých 12 analyzovaných ginsenosidov (Obr. 40). Celkový obsah ginsenosidov v tablete prípravku bol 9,73 mg s najvyšším zastúpením ginsenosidu Re (Tab. 19). Zistený obsah ginsenosidov v tablete bol výrazne nižší oproti množstvu 100 mg deklarovanému výrobcom.



Obr. 40: UV (A) a MS (B) chromatogramy prípravku Ženšen 1000 mg.

#### 4. Ženšen kórejský plus vitamín E (Walmark)

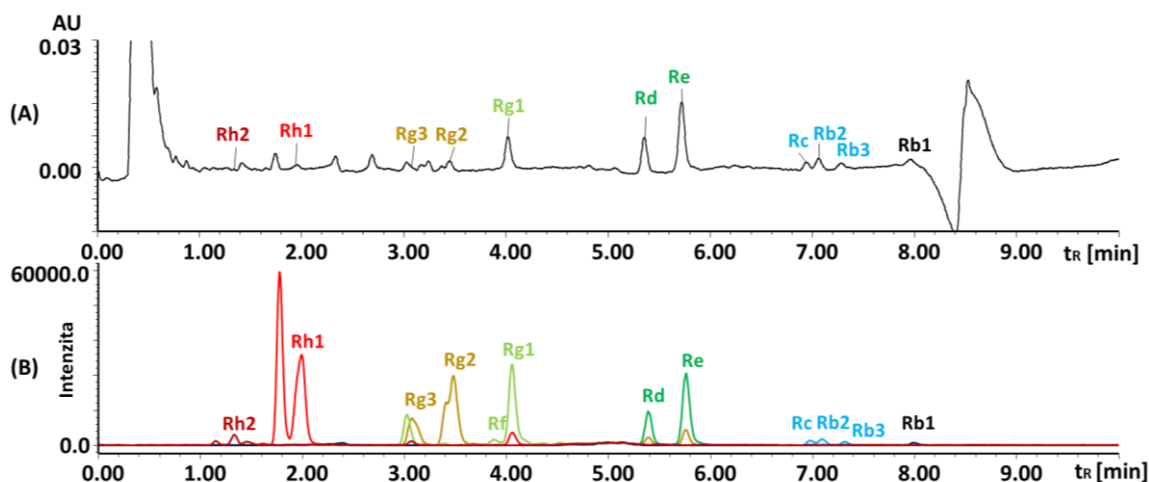
Ženšen kórejský plus vitamín E od výrobcu Walmark, obsahoval štandardizovaný extrakt ženšenu kórejského v kombinácii s vitamínom E.



lieková forma	kapsula
doporučená denná dávka	1 kapsula
priemerná hmotnosť	704,7 mg
hmotnostná rovnomernosť	1,10 %
obsah ginsenosidov v LF	10 mg

**Obr. 41:** Súhrn informácií a obal prípravku Ženšen kórejský plus vitamín E.

Výrobca prípravku Ženšen kórejský plus vitamín E deklaroval v 1 kapsule obsah 200 mg extraktu koreňa kórejského ženšenu, štandardizovaného na obsah 5 % ginsenosidov (Obr. 41). Analýza prípravku potvrdila obsah všetkých 12 analyzovaných ginsenosidov (Obr. 42). Celkový obsah ginsenosidov v tablete prípravku bol 8,35 mg s najvyšším zastúpením ginsenosidu Re (Tab. 19). Zistený obsah ginsenosidov v kapsule bol nižší oproti množstvu 10 mg deklarovanému výrobcom.



**Obr. 42:** UV (A) a MS (B) chromatogramy prípravku ženšen kórejský plus vitamín E.

## 5. Pharmaton GERIAVIT Vitality 50+ (Rottendo Pharma GmbH)

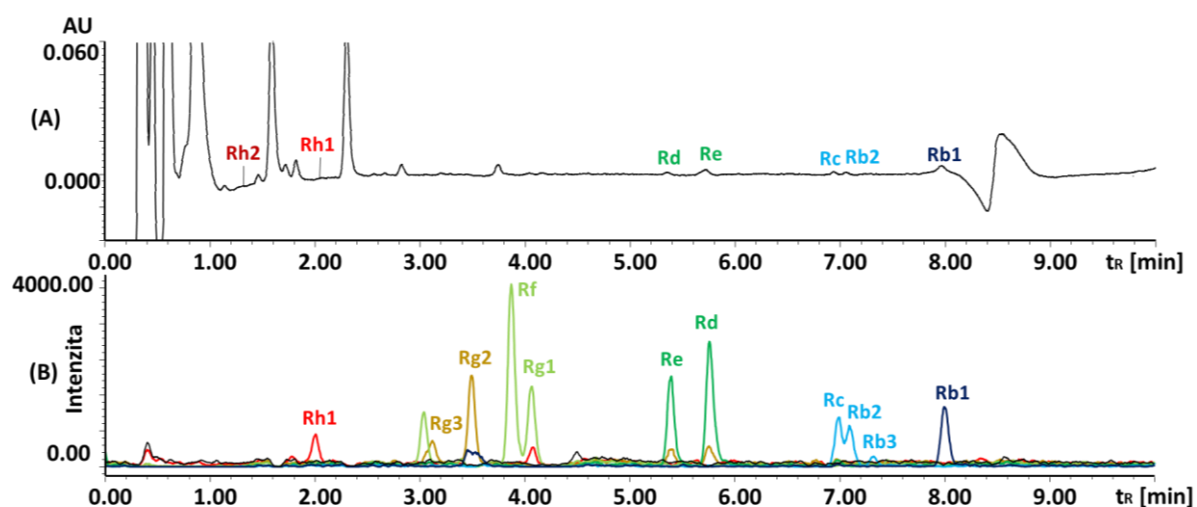
Doplnok stravy Pharmaton GERIAVIT Vitality 50+ od výrobcu Rottendo Pharma GmbH obsahoval štandardizovaný suchý extrakt z koreňa všehoja ázijského v kombinácii s vitamínmi a minerálmi.



lieková forma	tableta
doporučená denná dávka	1 tableta
priemerná hmotnosť	769,12 mg
hmotnostná rovnomernosť	0,90 %
obsah ginsenosidov v LF	1,6 mg

Obr. 43: Súhrn informácií a obal prípravku Pharmaton GERIAVIT Vitality 50+.

Výrobca prípravku Pharmaton GERIAVIT Vitality 50+ deklaroval v 1 tablete obsah 40 mg extraktu koreňa kórejského ženšenu štandardizovaného na obsah 4 % ginsenosidov (Obr. 43). Analýza potvrdila obsah 11 ginsenosidov, v prípravku sa nenachádzal ginsenosid Rh2 (Obr. 44). Celkový obsah ginsenosidov v tablete bol 0,78 mg s najvyšším zastúpením ginsenosidu Re (Tab. 19). Zistený obsah ginsenosidov v tablete bol nižší oproti množstvu 1,6 mg, ktoré deklaroval výrobca.



Obr. 44: UV (A) a MS (B) chromatogramy prípravku Pharmaton GERIAVIT Vitality 50+.

## 6. Bylinné kapky Ženšen (Valdemar Grešík – Natura s.r.o.)

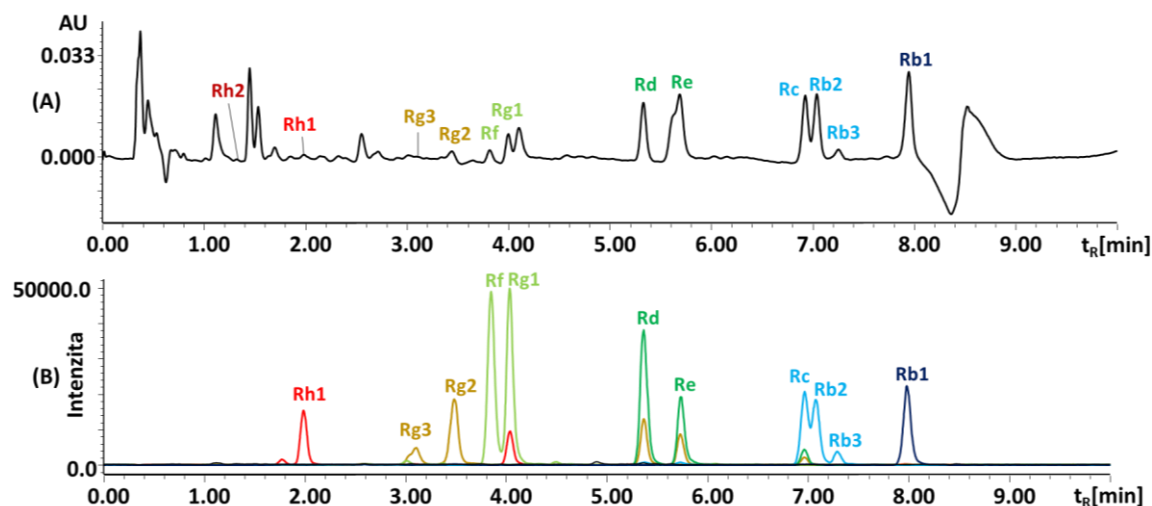
Potravinový doplnok Bylinné kvapky Ženšen od výrobcu Valdemar Grešík - Natura s.r.o. obsahoval 10 % výtlačok z koreňa všehoja ázijského v 40 % liehu



lieková forma	roztok
doporučená denná dávka	40 kvapiek (2 ml)
deklarovaný obsah sušiny	100 mg/ml

Obr. 45: Súhrn informácií a obal prípravku Bylinné kapky Ženšen.

Výrobca prípravku Bylinné kapky Ženšen deklaroval v 1 ml prípravku obsah ženšenu odpovedajúci 100 mg sušiny. Obsah ginsenosidov v sušine nebol bližšie upresnený (Obr. 45). Analýza prípravku potvrdila prítomnosť 11 ginsenosidov, v prípravku sa nenachádzal ginsenosid Rh2 (Obr. 46). Celkový obsah ginsenosidov v 2 ml prípravku bol 4,69 mg/ml s najvyšším zastúpením ginsenosidu Rb1 (Tab. 19).



Obr. 46: UV (A) a MS (B) chromatogramy prípravku Bylinné kapky Ženšen.

## 7. Siberian Ginseng (Jamieson Laboratories)

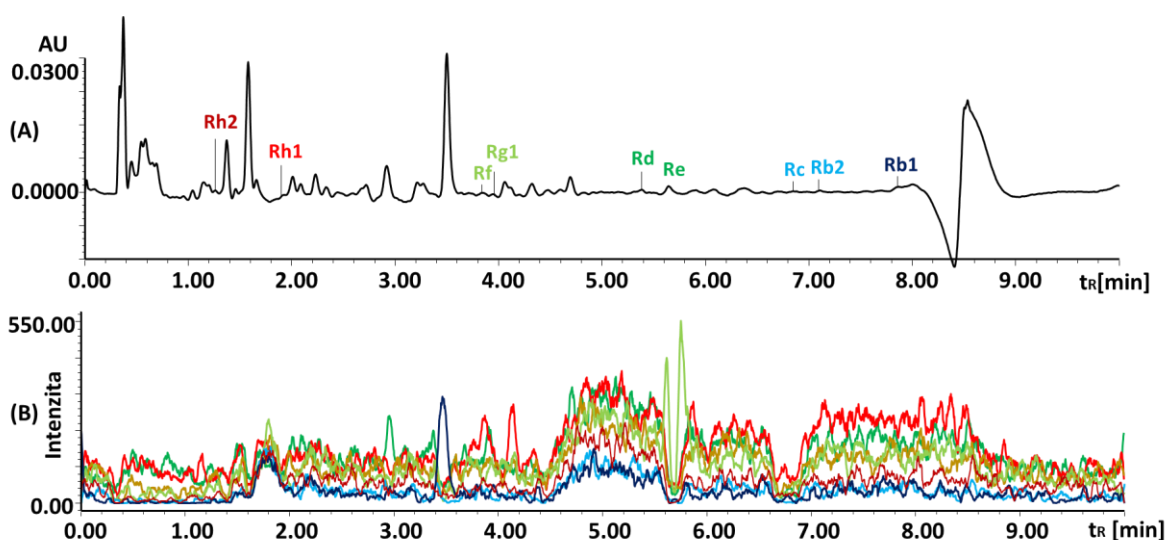
Potravinový doplnok Siberian Ginseng od výrobcu Jamieson Laboratories obsahoval extrakt koreňa všehojivca štetinatého (10:1).



lieková forma	tableta
doporučená denná dávka	2 tablety
priemerná hmotnosť	662,51 mg
hmotnostná rovnomernosť	1,20 %
obsah ginsenosidov v LF	0 mg

Obr. 47: Súhrn informácií a obal prípravku Siberian Ginseng.

Výrobca prípravku Siberian Ginseng deklaroval v 1 tablete obsah 65 mg extraktu koreňa sibírskeho ženšenu, ekvivalentného 650 mg rastliny (Obr. 47). Analýza prípravku pomocou PDA detekcie zaznamenala elúciu zložiek prípravku v retenčných časoch odpovedajúcim 10 ginsenosidom (Obr. 48). MS detekcia nepotvrdila identitu neznámych látok ako skúmaných ginsenosidov. S najvyššou pravdepodobnosťou sa jednalo o látky extrahované z koreňa sibírskeho ženšenu.



Obr. 48: UV (A) a MS (B) chromatogramy prípravku Siberian Ginseng.



## 8. Sibiřský ženšen (eleutherokok) (AROMATICA CZ s.r.o.)

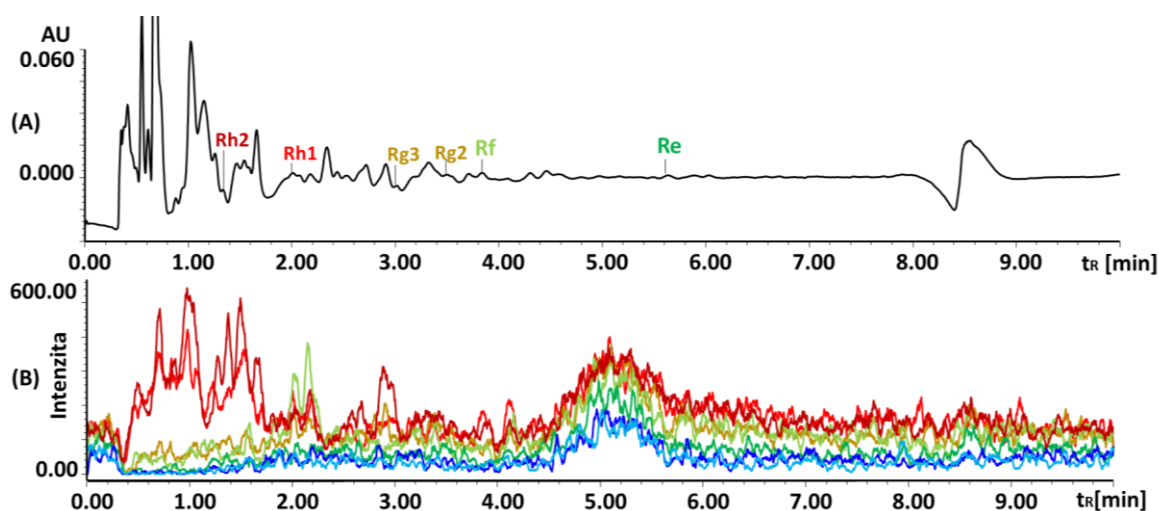
Potravinový doplnok Sibiřský ženšen (eleutherokok) od výrobcu AROMATICA CZ s.r.o obsahoval liehový extrakt z koreňa všehojivca štetinatého v minimálne 30 % alkoholu.



lieková forma	roztok
doporučená denná dávka	90 kvapiek (4,25 ml)
deklarovaný obsah sušiny	7,3 mg/ml

**Obr. 49:** Súhrn informácií a obal prípravku Sibiřský ženšen (eleutherokok).

Výrobca prípravku Sibiřský ženšen (eleutherokok) deklaruje v prípravku minimálne 0,3 % sušiny extraktu koreňa sibírskeho ženšenu (Obr. 49). Analýza prípravku pomocou PDA detekcie zaznamenala elúciu zložiek prípravku v retenčných časoch odpovedajúcim 6 ginsenosidom (Obr. 50). MS detekcia nepotvrdila identitu neznámych látok ako skúmaných ginsenosidov. S najvyššou pravdepodobnosťou sa jednalo o látky extrahované z koreňa sibírskeho ženšenu absorbujúce pri vlnovej dĺžke 205 nm.



**Obr. 50:** UV (A) a MS (B) chromatogramy prípravku Sibiřský ženšen (eleutherokok).

**Tab. 19:** Obsah ginsenosidov v analyzovaných doplnkoch stravy s obsahom všehoja ázijského.

ginsenosid	obsah ginsenosidov v tablete/kapsule/dávke kvapiek [mg]					
	ProMan PLUS	Korean Red Ginseng	Ženšen 1000 mg	Ženšen kórejský plus vitamín E	Pharmaton GERIAVIT Vitality 50+	Bylinné kapky Ženšen
<b>Rh2</b>	0,3266	0,0000	0,0158	0,0134	0,0000	0,0072
<b>Rh1</b>	0,6607	0,0054	0,0898	0,0511	0,0000	0,0500
<b>Rg3</b>	1,1110	0,0150	0,1938	0,1770	0,0000	0,0452
<b>Rg2</b>	1,1011	0,0610	0,2168	0,1680	0,0270	0,1021
<b>Rf</b>	0,7781	0,1093	0,0167	0,0114	0,0000	0,0952
<b>Rg1</b>	5,4353	0,1818	1,0975	0,5989	0,0607	0,1769
<b>Rd</b>	7,2447	0,4221	1,1382	0,8913	0,1082	0,5066
<b>Re</b>	10,7543	1,0208	2,8891	2,2221	0,3428	0,8558
<b>Rc</b>	4,4010	1,5127	0,8799	1,0395	0,0980	0,7839
<b>Rb2</b>	4,0726	1,0898	1,0800	1,1876	0,0421	0,7416
<b>Rb3</b>	2,2093	0,9607	0,7117	1,2852	0,0180	0,3899
<b>Rb1</b>	0,1082	1,9052	1,4053	1,0938	0,0869	0,9397
<b>celkovo</b>	<b>38,2029</b>	<b>7,2839</b>	<b>9,7347</b>	<b>8,7393</b>	<b>0,7838</b>	<b>4,6942</b>

Výsledky analýz skúmaných prípravkov potvrdili možnosť aplikácie vyvíjanej metódy na analýzu potravinových doplnkov. Výhodou bolo použitie dostupnej PDA detekcie. Nevýhodou bolo použitie vlnovej dĺžky 205 nm, pri ktorej absorbuje široké spektrum zlúčenín. Nízka selektivita PDA detektora bola čiastočne kompenzovaná kombináciou so selektívnejšou MS detekciou. Cieľom analýzy potravinových doplnkov s obsahom kórejského ženšenu (všehoj ázijský) bolo potvrdenie prítomnosti a kvantifikácia ginsenosidov. Výsledky analýz boli následne porovnané so zložením prípravkov deklarovaným výrobcami. Analýza prípravkov obsahujúcich sibírsky ženšen (všehojivec štetinatý) bola prevedená za cieľom potvrdenia neprítomnosti ginsenosidov v prípravku, ktorých výskyt by poukazoval na zámenu kórejského a sibírskeho ženšenu výrobcom.

Prítomnosť ginsenosidov bola potvrdená vo všetkých analyzovaných potravinových doplnkoch, ktoré deklarovali prítomnosť extraktu všehoja ázijského. Zo 6 analyzovaných prípravkov polovica obsahovala všetkých 12 skúmaných ginsenosidov. Zvyšné 3 prípravky obsahovali 11 ginsenosidov, neprítomný bol ginsenosid Rh2. Prípravok Ženšen kórejský plus vitamín E obsahoval množstvo ginsenosidov blízke (83,5 %) obsahu deklarovanému výrobcom. Prípravky Siberian Ginseng, Pharmaton GERIAVIT Vitality 50+ a Ženšen 1000 mg obsahovali výrazne nižší (66,18 %, 48,75 % a 9,73 %) ako deklarovaný obsah ginsenosidov. Výrobcovia prípravkov ProMan PLUS a Bylinné kapky Ženšen obsah ginsenosidov v prípravku nešpecifikovali. Prípravky s deklarovaným obsahom všehojivca štetinatého, neobsahovali žiadne ginsenosidy. K zámene medzi sibírskeho a kórejského ženšenu zo strany výrobcu nedošlo.

V prípade prípravkov obsahujúcich ginsenosidy bol na MS chromatogramoch pozorovaný výskyt 2 píkav o pomere m/z odpovedajúcej ginsenosidu Rh1, vyskytujúcich sa v tesnej blízkosti s rôznou intenzitou. Pravdepodobne sa jednalo o separované stereoizoméry ginsenosidu Rh1. Túto hypotézu sme neboli schopní potvrdiť pomocou analýzy štandardov z časových a finančných dôvodov.

## 6. ZÁVER

Cieľom tejto práce bolo vyvinúť novú rýchlu, účinnú a ekologickú analytickú metódu využívajúcu techniku UHPSFC v kombinácii s PDA a MS detekciou na analýzu ginsenosidov v potravinových doplnkoch.

Separáčné a ionizačné podmienky boli optimalizované s cieľom získania čo najlepšej selektivity, rozlíšenia, separácie a ionizácie analytov. Najvhodnejšie podmienky boli dosiahnuté za použitia kolóny Torus 2-PIC, mobilnej fázy o zložení CO<sub>2</sub> + MeOH/ACN (2:1) + 5 % H<sub>2</sub>O a prietoku 1,5 ml/min. Použitý gradient bol v rozmedzí 30 - 55 % do 8. minúty, teplota kolóny bola 30 °C a tlak BPR 10,34 MPa. Najlepšia ionizácia analytov bola dosiahnutá za použitia MeOH + 10 mM NH<sub>3</sub>, ako prídavnej kvapaliny. Celkový čas analýzy bol 10 minút.

Za použitia optimalizovaných separačných podmienok sa podarilo eluovať všetkých 12 skúmaných ginsenosidov a plne separovať všetky analyty s výnimkou izoméneho páru **Rc + Rb2**, u ktorého bolo dosiahnuté rozlíšenie 1,07. Optimalizované separáčné podmienky boli využité pri analýze 8 doplnkov stravy s obsahom extraktu kórejského (*Panax ginseng*) a sibírskeho ženšenu (*Eleutherococcus senticosus*). Optimalizovaná príprava vzorkov používala MeOH ako extrakčné rozpúšťadlo.

Doplňky stravy s obsahom extraktu kórejského ženšenu obsahovali v 3 prípravkoch všetkých 12 analyzovaných ginsenosidov. Ďalšie 3 analyzované prípravky obsahovali 11 ginsenosidov s absenciou ginsenosidu **Rh2**. V prípravkoch obsahujúcich kórejský ženšen bol celkový obsah ginsenosidov nižší, ako obsah deklarovaný výrobcami. V prípade 2 potravinových doplnkov výrobcovia neudávali presné množstvo ginsenosidov prítomné v prípravkoch. V doplnkoch stravy obsahujúcich sibírsky ženšen bola potvrdená neprítomnosť ginsenosidov. Tento výsledok sa zhodoval s tvrdeniami výrobcu.

Výsledky analýz skúmaných prípravkov potvrdili možnosť aplikácie vyvíjanej metódy na analýzu potravinových doplnkov. Jej výhodou bola rýchlosť analýzy, ekologickosť a komplementarita k vyvinutým UHPLC metódam. Nevýhodou bola neúplná separácia ginsenosidov **Rc + Rb2** a nízka selektivita PDA detekcie.

## 7. POUŽITÁ LEITERATÚRA

1. Nováková, L., M. Douša, and P. Česla, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Vol. 1. 2021, Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek.
2. Klesper, K., High pressure gas chromatography above critical temperatures. *J. Org. Chem*, 1962. 27: p. 700-701.
3. Tarafder, A., Metamorphosis of supercritical fluid chromatography to SFC: An Overview. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2016. 81: p. 3-10.
4. Nováková, L., K. Plachká, and P. Jakubec, *Handbooks of Advanced Chromatography/Mass Spectrometry Techniques*, ed. C. Byrdwell and M. Holčapek. 2017, Elsevier.
5. Yamamoto, K., et al., Emerging Separation Techniques in Supercritical Fluid Chromatography. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2021. 69(10): p. 970-975.
6. Nováková, L., et al., Modern analytical supercritical fluid chromatography using columns packed with sub-2 $\mu$ m particles: A tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 2014. 824: p. 18-35.
7. Fornstedt, T., Introduction to "Fundamental challenges and opportunities for preparative supercritical fluid chromatography by G. Guiochon, A. Tarafder [J. Chromatogr. A 1218 (2011) 1037-1114]". *J Chromatogr A*, 2016. 1446: p. 19-20.
8. Plachká, K., et al., Columns in analytical-scale supercritical fluid chromatography: From traditional to unconventional chemistries. *J Sep Sci*, 2023. 46(18): p. e2300431.
9. Gros, Q., et al., Characterization of stationary phases in supercritical fluid chromatography including exploration of shape selectivity. *Journal of Chromatography A*, 2021. 1639: p. 461923.
10. West, C. and E. Lesellier, Chapter 3 - Selection of SFC stationary and mobile phases, in *Separation Science and Technology*, M. Hicks and P. Ferguson, Editors. 2022, Academic Press. p. 49-71.
11. Berger, T.A., Chapter 7 - Evolution of Instrumentation for Analytical Scale Supercritical Fluid Chromatography\*\*This chapter draws upon large sections of TA Berger, "Instrumentation for supercritical fluid chromatography," *J. Chromatogr. A*, 1421 (November 2015), 171–183. Reproduced with permission from Elsevier. ©Elsevier 2015, in *Supercritical Fluid Chromatography*, C.F. Poole, Editor. 2017, Elsevier. p. 173-212.
12. Losacco, G.L., J.-L. Veuthey, and D. Guillarme, Supercritical fluid chromatography – Mass spectrometry: Recent evolution and current trends. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2019. 118: p. 731-738.
13. West, C., Current trends in supercritical fluid chromatography. *Anal Bioanal Chem*, 2018. 410(25): p. 6441-6457.
14. Gazárková, T., et al., Current state of supercritical fluid chromatography-mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2022. 149: p. 116544.
15. Panax ginseng, Taxon profile, BioLib [online], <https://www.biolib.cz/en/taxon/id62218/> [cit. 2024.26.02.].
16. Cutler, S.J., *Biologically active natural products*. 2000.
17. Khan, S., A. Tosun, and Y.S. Kim, Chapter 31 - Ginsenosides as Food Supplements and Their Potential Role in Immunological and Neurodegenerative Disorders, in *Bioactive Nutraceuticals and Dietary Supplements in Neurological and Brain Disease*, R.R. Watson and V.R. Preedy, Editors. 2015, Academic Press: San Diego. p. 303-309.
18. Zhang, M., et al., Active Compounds of Panax ginseng in the Improvement of Alzheimer's Disease and Application of Spatial Metabolomics. *Pharmaceuticals*, 2024. 17(1): p. 38.

19. Kim, H.J., P. Kim, and C.Y. Shin, A comprehensive review of the therapeutic and pharmacological effects of ginseng and ginsenosides in central nervous system. *J Ginseng Res*, 2013. 37(1): p. 8-29.
20. Ratan, Z.A., et al., Pharmacological potential of ginseng and its major component ginsenosides. *Journal of Ginseng Research*, 2021. 45(2): p. 199-210.
21. <https://www.doplInvitamin.cz/clanky/zensen-pravy-a-zensen-sibirsky-jake-jsou-mezi-nimi-rozdily/#>. 2024 [cit. 2024.26.02.].
22. Liao, L.Y., et al., A preliminary review of studies on adaptogens: comparison of their bioactivity in TCM with that of ginseng-like herbs used worldwide. *Chin Med*, 2018. 13: p. 57.
23. Chopra, P., et al., Phytochemistry of ginsenosides: Recent advancements and emerging roles. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2023. 63(5): p. 613-640.
24. Piao, X., et al., Advances in Saponin Diversity of *Panax ginseng*. *Molecules*, 2020. 25(15): p. 3452.
25. Shi, Z.Y., J.Z. Zeng, and A.S.T. Wong, Chemical Structures and Pharmacological Profiles of Ginseng Saponins. *Molecules*, 2019. 24(13).
26. Wang, H., et al., Ginsenosides emerging as both bifunctional drugs and nanocarriers for enhanced antitumor therapies. *J Nanobiotechnology*, 2021. 19(1): p. 322.
27. SciFinder, American Chemical society [online], <https://scifinder.cas.org> [cit. 2024.26.02.].
28. Cui, J.-f., Identification and quantification of ginsenosides in various commercial ginseng preparations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1995. 3(2): p. 77-85.
29. Zhang, C., S. Chen, and L. Dong, Analysis and assessment of four commercial products of Asian ginseng by ultra-performance liquid chromatography and chemometric analysis. *Se Pu*, 2015. 33(5): p. 514-21.
30. Ha, J., et al., Determination of 22 ginsenosides in ginseng products using ultra-high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr Sci*, 2013. 51(4): p. 355-60.
31. Stavriani, A.N., et al., HPLC-MS/MS determination of biomarkers of *P. quinquefolius* in plant materials and commercial products. *Journal of Analytical Chemistry*, 2014. 69(14): p. 1323-1329.
32. Brown, P.N., R. Yu, and Collaborators:, Determination of Ginsenoside Content in *Panax ginseng* C.A. Meyer and *Panax quinquefolius* L. Root Materials and Finished Products by High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Absorbance Detection: Interlaboratory Study. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 2019. 96(1): p. 12-19.
33. Li, W. and J.F. Fitzloff, HPLC DETERMINATION OF GINSENOSES CONTENT IN GINSENG DIETARY SUPPLEMENTS USING ULTRAVIOLET DETECTION. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2002. 25(16): p. 2485-2500.
34. Asafu-Adjaye, E.B. and S.K. Wong, Determination of ginsenosides (ginseng saponins) in dry root powder from *Panax ginseng*, *Panax quinquefolius*, and selected commercial products by liquid chromatography: interlaboratory study. *J AOAC Int*, 2003. 86(6): p. 1112-23.
35. Quiming, N.S., et al., High Performance Liquid Chromatographic Separation and Quantitative Analysis of Ginsenosides Using a Polyvinyl Alcohol-Bonded Stationary Phase. *Chromatographia*, 2007. 66(1): p. 5-11.
36. Ji, Q.C., et al., Quantitative determination of ginsenosides by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Phytochem Anal*, 2001. 12(5): p. 320-6.
37. Harkey, M.R., et al., Variability in commercial ginseng products: an analysis of 25 preparations. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2001. 73(6): p. 1101-1106.

38. Uhr, L., et al., Ginsenosides in Commercial Ginseng Products Analyzed by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *ISRN Analytical Chemistry*, 2014. 2014: p. 486842.
39. Lee, G.J., et al., Systematic development of a group quantification method using evaporative light scattering detector for relative quantification of ginsenosides in ginseng products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016. 128: p. 158-165.
40. Chan, T.W.D., et al., Differentiation and Authentication of Panax ginseng, Panax quinquefolius, and Ginseng Products by Using HPLC/MS. *Analytical Chemistry*, 2000. 72(6): p. 1281-1287.
41. Jia, S., et al., A new application of charged aerosol detection in liquid chromatography for the simultaneous determination of polar and less polar ginsenosides in ginseng products. *Phytochem Anal*, 2013. 24(4): p. 374-80.
42. Stavrianidi, A., et al., Combination of HPLC-MS and QAMS as a new analytical approach for determination of saponins in ginseng containing products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2017. 132: p. 87-92.
43. Stavrianidi, A., et al., Single-run HPLC/ESI-LITMS profiling of ginsenosides in plant extracts and ginseng based products. *Biomed Chromatogr*, 2015. 29(6): p. 853-9.
44. Yang, H., et al., Direct and comprehensive analysis of ginsenosides and diterpene alkaloids in Shenfu injection by combinatory liquid chromatography-mass spectrometric techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014. 92: p. 13-21.
45. Cheng, Y.Y. and T.H. Tsai, Analysis of Sheng-Mai-San, a Ginseng-Containing Multiple Components Traditional Chinese Herbal Medicine Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry and Physical Examination by Electron and Light Microscopies. *Molecules*, 2016. 21(9).
46. Liu, P., et al., A rapid method for chemical fingerprint analysis of Pan Panax notoginseng powders by ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2015. 13(6): p. 471-480.
47. ProMan Plus Naturamed Pharmaceuticals, Natural pharmaceuticals [online], <https://natural.pl/sklep/proman-plus/>. 2024 [cit. 2024.04.26].
48. Zákon č. 110/1997 Sb., AION CS, Zákony pro lidi [online], <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1997-110> [cit. 2024.04.26]
49. Zákon č. 174/2021 Sb., AION CS, Zákony pro lidi [online], <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2021-174> [cit. 2024.04.26].
50. Vyhláška č. 58/2018 Sb., AION CS, Zákony pro lidi [online], <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2018-58> [cit. 2024.04.26].
51. Ministerstvo zemědělství ČR, Doplnky stravy, eAGRI [online], <https://eagri.cz/public/portal/mze/potravinny/doplňky-stravy> [cit. 2024.04.26].
52. Státní zemědělská a potravinářská inspekce, Doplnky stravy [online], (2022). <https://www.szpi.gov.cz/clanek/doplňky-stravy.aspx> [cit. 2024.04.26].
53. Grand-Guillaume Perrenoud, Alexandre, et al., Comparison of Ultra-high Performance Supercritical Fluid Chromatography and Ultra-high Performance Liquid Chromatography for the Analysis of Pharmaceutical Compounds. *Journal of Chromatography A*, vol. 1266, 2012. p. 158-167.
54. Waters, SFC Columns - Trefoil, Torus, Viridis [online], [https://www.waters.com/waters/en\\_GB/Supercritical-Fluid-Chromatography-%28SFC%29-Columns-from-Waters---Trefoil%2C-Torus%2C-Viridis-/nav.htm?locale=en\\_GB&cid=134696052](https://www.waters.com/waters/en_GB/Supercritical-Fluid-Chromatography-%28SFC%29-Columns-from-Waters---Trefoil%2C-Torus%2C-Viridis-/nav.htm?locale=en_GB&cid=134696052) [cit. 2024.05.14].

55. Shop ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 Columns , Waters, [online], <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186002854-acquity-uplc-beh-shield-rp18-column-130a-17--m-21-mm-x-100-mm-1-.html> [cit. 2024.05.14]