

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Lucie Rozkocová

VÝVOJ METOD VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ
CHROMATOGRRAFIE KE STANOVENÍ VÝZNAMNÝCH
SLOŽEK TABÁKU

Development of high-performance liquid chromatography
methods for determination of major components of tobacco

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Ivan Jelínek, CSc.

Ing. Stanislav Ondroušek, CSc.

Praha 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 26. srpna 2016

Poděkování

Mé poděkování patří Doc. RNDr. Ivanu Jelínkovi, CSc. a Ing. Stanislavu Ondrouškovi, CSc. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce věnovali. Dále bych chtěla poděkovat všem kolegům z Celně technické laboratoře a Celně kriminalistického pracoviště, za jejich podporu, odborné rady a vstřícnost. V neposlední řadě moje díky patří rodině a přátelům, kteří při mně stáli po celou dobu mého studia.

Abstrakt

Záměrem této práce bylo vytvoření metody kapalinové chromatografie s DAD detekcí pro stanovení nikotinu v tabáku. Jako kontrolní metoda byla zvolena plynová chromatografie s upraveným pracovním postupem podle Světové zdravotnické organizace. Kapalinová chromatografie s optimalizovanými podmínkami je vhodnou metodou pro stanovení nikotinu v tabáku. Bylo dosaženo limitu detekce 0,0003 mg/ml a limitu stanovitelnosti 0,0010 mg/ml. Významnou částí práce byla optimalizace přípravy vzorku tabáku pro stanovení nikotinu. Oproti používaným postupům byl vytvořen relativně nenáročný pracovní postup přípravy vzorku. Stanovení nikotinu probíhalo z reálných vzorků tabáku, metoda byla také vyzkoušena na nikotinové náplni do elektronických cigaret, cigaretovém tabáku a na hrubém dýmkovém tabáku. U všech typů vzorků bylo dosaženo uspokojivých relativních směrodatných odchylek stanovení. Dále byla studována metoda stanovení polyfenolických látek vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s detektorem diodového pole. Z vybraných pěti analytů kyseliny chlorogenové, kyseliny kávové, rutinu, skopoletinu a quercitrinu metoda vykazovala největší citlivost pro kyselinu chlorogenovou a kyselinu kávovou. Pro všechny analyty bylo dosaženo nízkých limitů detekce a stanovitelnosti.

Klíčová slova

Kapalinová chromatografie, tabák, nikotin, polyfenoly, plynová chromatografie

Abstract

The aim of this work was development of high-performance liquid chromatography method with DAD detection for determination of nicotine in tobacco. Standard operating procedure used by World Health Organization was chosen as comparison of the developed method. Optimized high performance chromatography method is suitable for determining nicotine in tobacco. Limit of detection for this method was 0,0003 mg/ml and limit of quantification was 0,0010 mg/ml. Optimization of preparation of samples was significant part of this thesis. Sample preparation procedure was made substantially easier in comparison to other commonly used methods. Nicotine content was determined from real tobacco leaves samples, cigarette tobacco filler, nicotine cartridge for electronic cigarettes and pipe tobacco. Satisfactory relative standard deviation was achieved for all types of samples. Next part of this thesis focused on study of determining polyphenols using high-performance liquid chromatography with diode array detector. Chosen analytes were chlorogenic acid, caffeic acid, rutin, scopoletin and quercitrin. Among the five tested analytes, the highest sensitivity was achieved for chlorogenic acid and caffeic acid. All of the analytes achieved low limits of detection and quantification.

Key words

Liquid chromatography, tobacco, nicotine, polyphenols, gas chromatography

Obsah

1	Úvod	- 9 -
1.1	Cíl práce.....	- 9 -
2	Teoretická část	- 10 -
2.1	Historie tabáku.....	- 10 -
2.2	Druhy tabáku	- 11 -
2.3	Zpracování tabáku	- 12 -
2.4	Legislativa v České republice	- 13 -
2.5	Zkoumané látky	- 14 -
2.5.1	Nikotin	- 14 -
2.5.2	Polyfenolické látky	- 15 -
2.6	Metody používané ke stanovení sledovaných látek.....	- 20 -
2.6.1	Metody plynové chromatografie používané ke stanovení nikotinu v tabákových výrobcích	- 20 -
2.6.2	Metody kapalinové chromatografie používané ke stanovení nikotinu v tabákových výrobcích.....	- 21 -
2.6.3	Ostatní metody stanovení nikotinu	- 22 -
2.6.4	Metody používané ke stanovení polyfenolických látek.....	- 22 -
2.7	Statistické zpracování dat	- 23 -
2.7.1	Opakovatelnost	- 23 -
2.7.2	Mez detekce a mez kvantifikace.....	- 23 -
2.7.3	Linearita	- 24 -
2.7.4	Kalibrační křivka	- 24 -
2.7.5	Nejistota.....	- 24 -
3	Experimetální část	- 26 -
3.1	Použité chemikálie.....	- 26 -
3.2	Použité přístroje	- 26 -
3.3	Příprava roztoků.....	- 27 -
3.3.1	Stanovení nikotinu HPLC/DAD	- 27 -
3.3.2	Stanovení nikotinu GC/FID	- 27 -
3.3.3	Stanovení polyfenolů HPLC/DAD	- 28 -
3.4	Příprava vzorků tabáku	- 28 -

3.4.1	Stanovení nikotinu a polyfenolů HPLC/DAD	- 29 -
3.4.2	Stanovení nikotinu GC/FID	- 29 -
3.5	Podmínky měření	- 29 -
3.5.1	Stanovení nikotinu HPLC/DAD	- 30 -
3.5.2	Stanovení nikotinu GC/FID	- 30 -
3.5.3	Stanovení polyfenolů HPLC/DAD	- 30 -
4	Výsledky a diskuze	- 31 -
4.1	Stanovení nikotinu HPLC/DAD	- 31 -
4.1.1	Optimalizace metody HPLC/DAD stanovení nikotinu	- 31 -
4.1.2	Kalibrační závislost	- 35 -
4.1.3	Stanovení obsahu nikotinu v reálných vzorcích	- 36 -
4.2	Stanovení nikotinu GC/FID	- 37 -
4.3	Porovnání metod HPLC/DAD a GC/FID	- 39 -
4.4	Stanovení polyfenolických látek metodou HPLC/DAD	- 40 -
4.4.1	Optimalizace metody	- 40 -
4.4.2	Kalibrační závislosti	- 43 -
4.4.3	Stanovení polyfenolických látek v reálném vzorku tabáku	- 44 -
5	Závěr	- 46 -

Seznam použitých zkratk

ASTM	Americká společnost mezinárodní asociace pro testování a materiály (American Society of the International Association for Testing and Materials)
DAD	detektor diodového pole
FID	plamenově ionizační detektor
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LDL	nízkodenzitní lipoprotein (low density lipoprotein)
LDR	lineární dynamický rozsah
LOD	mez detekce
LOQ	mez kvantifikace
MISPE-DPE	extrakce na molekulárně vtištěné pevné fázi s diferenční pulzní elucí
MS	hmotnostní detekce
MTBE	methyltercbutyléter
R	mez reprodukovatelnosti
r	mez opakovatelnosti
RSD	relativní směrodatná odchylka
SPE	extrakce na pevné fázi (solid phase extraction)
U	nejistota

1 Úvod

1.1 Cíl práce

Cílem této diplomové práce je vývoj metody pro stanovení nikotinu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s detektorem diodového pole a porovnání výsledků s hodnotami z plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem. Dalším záměrem práce je vyvinout metodu pro stanovení polyfenolických složek tabákových rostlin metodou kapalinové chromatografie s detektorem diodového pole. Z poměrného zastoupení polyfenolických látek je možné získat informaci o složení různých druhů tabáku a různého původu tabáku. Tyto informace lze využít k založení databáze a následného zjišťování pravosti deklarovaného původu.

2 Teoretická část

2.1 Historie tabáku

Počátky užívání tabáku sahají až k Mayské civilizaci ve střední Americe, z nástěnných maleb v mayském chrámě je zřejmé, že kouření bylo obvyklé při náboženských rituálech kolem roku 500 n. l. Další historici věří, že kouření dýmky se rozšiřovalo ze severní Ameriky na jih. Nicméně v 10. století většina domorodých Američanů používala tabák k náboženským a politickým rituálům¹.

V roce 1493 se Kryštof Kolumbus vrátil z Ameriky s listy a semínky tabáku. Člen posádky Rodrigo de Jerez byl za kouření zatčen inkvizicí, která věřila, že je posedlý ďáblem. Ve 14. století diplomat Jean Nicot představil tabák královně Kateřině Medičejské, která si šňupáním tabáku léčila migrény a z tabáku udělala moderní záležitost. I přes pojednání krále Jakuba I. o škodlivosti tabáku bylo v Anglii v roce 1614 otevřeno 700 obchodů s tabákem. V roce 1753 botanik Carl Linné pojmenoval rod *Nicotiana* a popsal dva druhy, *Nicotiana rustica* a *Nicotiana tabacum*. Na konci 17. století se šňupání tabáku a kouření dýmek rychle rozšířilo po celé Evropě².

V 19. století byl tabák používán různými vrstvami obyvatelstva odlišnými způsoby, vyšší třídy šňupaly tabák nosem, střední třídy preferovaly kouření dýmek a chudina tabák žvýkala. Velkou popularitu získaly cigarety během 1. světové války. Ve 20. letech 20. století byli lidé podporováni v kouření přes všechna dostupná masmédiá. V 60. letech 20. století se začínalo mluvit o škodlivosti kouření. V roce 1964 byla předložena zpráva, která přímo spojovala tabák s rakovinou plic, krku a ústní dutiny, dušností, infarkty, mrtvicemi a dalšími nemocmi žaludku a jater. V 90. letech se začal objevovat pojem pasivního kouření a lidé se začali zabývat otázkou škodlivosti kouření nejen pro samotné kuřáky. Bylo zakázáno kouřit v prostředcích hromadné dopravy, letadlech, nemocnicích a vládních budovách. Boj proti kouření v posledních letech neustále stoupá, ať už je to zvyšováním ceny tabákových výrobků, varovnými nálepkami, anti-tabákovými kampaněmi či dalšími zákazy¹.

Náhradní nikotinová léčba je termín pro produkty obsahující nikotin splňující standardy jakosti a bezpečnosti. Tyto výrobky zvyšují pravděpodobnost skončení s kouřením o 50–70% s porovnáním s placebem či bez léčby. V Tab. 1 je uvedeno několik příkladů těchto výrobků^{3,4}.

Tab. 1: Příklady produktů náhradní nikotinové léčby s uvedeným obsahem nikotinu ³

Typ produktu	Množství nikotinu
Nikotinové transdermální náplasti	5 – 30 mg
Nikotinové žvýkačky	Až 4 mg
Nikotinové sublingvální tablety	2 mg
Nikotinová inhalační náplně	15 mg v náplni
Nikotinový nosní sprej	0,5 mg
Nikotinový ústní sprej	1 mg

V posledních letech je vyráběno čím dál tím více výrobků poskytujících dostačující náhradu za cigarety. Vaporizéry, vaporizační pera, tužky, elektronické cigarety a e-dýmky jsou některé z mnoha typů elektronických systémů dodávajících nikotin. Tyto produkty využívají kapalnou náplň obsahující nikotin společně s dalšími přísadami určenými k aromatizaci, jako propylenglykol a glycerin. Kapalina je topnou spirálou zahřívána na aerosol, který je následně spotřebitelem inhalován ⁵.

K nejnovějším výrobkům nahrazujícím klasické cigarety patří elektronická zařízení, která tabákovou náplň nespalují úplně, pouze ji zahřívají na cca 200 °C. V Japonsku se již běžně vykytují na trhu. Kapslové náplně obsahují upravený tabák (kolem 0,24 g) o různé síle, koncentrace nikotinu v náplni se pohybuje v rozmezí 1,5 – 3,2 mg. Pro evropský trh se stále vyvíjí výrobky odpovídající legislativním nárokům.

2.2 Druhy tabáku

Rod *Nicotiana* zahrnující přes 76 přírodně se vyskytujících druhů je šestým největším z čeledi lilkovitých. Druhy *Nicotiana* se vyskytují ve velké míře v Americe a Austrálii, kultivované druhy *Nicotiana tabacum* a *Nicotiana rustica* byly lidmi rozšířeny po celém světě. U tohoto druhu je běžná amfidiploidní hybridizace, která se jeví jako nesouvisející s lidským faktorem. Oba obchodní druhy tabáku (*N. tabacum* a *N. rustica*) a několik dalších druhů jsou amfidiploidi, což jsou mezidruhové hybridy s diploidní sadou chromozomů od každého rodiče ⁶.

Následně bude zmíněno několik běžných odrůd tabáku.

- Virginia pojímá 40% světové produkce tabáku. Má vysoký obsah cukrů a nízký obsah olejů. Barva listů se pohybuje v rozsahu od světle citrónové přes

žlutou po středně hnědou. Tabáky světlejší barvy bývají kořeněnější a ty tmavé mají komplexní a těžkou chuť. Virginia se používá zcela pro cigaretové blendy. Některé těžší listy se používají ve směsích do dýmkového tabáku. Mezi největší producenty patří Čína, USA, Brazílie, Indie a Zimbabwe ⁷.

- Burley, pokrývá cca 11 % světové produkce tabáku. Má vysoký obsah olejů a nízký obsah cukrů. Tento druh tabáku má typickou ořechovou chuť. Primárně je využíván do cigaretových směsí. Některé z těžších listů se používají ke žvýkání či do dýmkových směsí. Usušený list tohoto druhu tabáku je charakteristický zmíněným velmi nízkým obsahem cukru k poměru dusíku – vysoký obsah nikotinu. To je způsobeno vysokým množstvím dusíkatých hnojiv, sklizením v brzké době staření a sušením vzduchem dochází k fermentaci oxidaci přítomných cukrů. Mezi hlavní producenty patří USA, Itálie, Korea, Brazílie a Mexiko ⁷.

- Oriental pokrývá cca 16% celkové tabákové produkce. Je mírný s velmi charakteristickým aroma. Pryskyřice a vosky vylučované žlázovými vlasy podporují aroma. Obsah nikotinu je nízký, obvykle kolem 1,0 %. Tento typ tabáku je obvykle sušený na slunci. ⁷

Tabák se také rozděluje dle způsobu manipulace, hnojení, hustoty osázení, času a výšce topování, sklizení a sušení. Všechny tyto aspekty mají vliv na konečnou vůni a chuť tabáku ⁷.

2.3 Zpracování tabáku

Tabák je jednoletá rostlina, která se před vysazením na pole 60 dní předpěstovává v pařeništi, dokud nevyroste do výšky alespoň 15 cm a má již 4 - 5 lístků. Tabák zraje přibližně 14 až 16 týdnů, aby se docílilo požadované kvality. Květy tabáku se odlamují, aby všechny živiny mohly proudit do listů a dosáhlo se tak výrazně lepší kvality tabáku. Sklizeň listů probíhá většinou ručně, listy jsou svazovány po 20 až 25 kusech a podle druhu tabáku jsou následně sušeny ⁸.

Podle druhu tabáku a cílené chuti se vybírá způsob sušení. Viržinský tabák se nejčastěji suší v uzavřených sušárnách, do kterých je uměle vháněn teplý vzduch (flue cured), teplota vzduchu je postupně zvyšována, dokud není tabák úplně vysušen ⁹. Tabák Burley je nejčastěji sušen vzduchem (air cured) ve větraných sušárnách, které zajišťují sušení

za přirozených atmosférických podmínek, je v nich možno regulovat teplotu a vlhkost. Dále je možné sušit tabák pomocí pomalu hořícího dřeva na podlaze v uzavřených sušárnách (fire cured), takovýto tabák má specifické aroma, chuť a vysoký obsah nikotinu. Orientální tabák je specifický tím, že se sbírá pouze ručně, jeho malé listy se po jednom navlékají na provázek a jsou sušeny venku chráněné před sluncem. Usušený tabák je dále navlhčen, vzhledem k jeho křehkosti a je připraven k fermentaci, při které se dovytváří chuť a aroma. K tabáku můžou být při tomto procesu přidávána různá aditiva a ochucovadla ^{7,8}.

Přidávaná ochucovadla propůjčují výsledným tabákovým produktům jejich specifickou chuť. Některé příchutě (casing ingredients) jsou přidávány k tabáku před započítím výrobního procesu, ještě k nenařezanému tabáku. Příchutě (top flavours) jsou látky, které vyzdvihují specifickou příchut tabákových výrobků. Jsou aplikovány na zpracovaný tabák připravený k výrobě cigaret. Většinou jsou přidávány v jedné komplexní směsi ve formě roztoku, používá se například kakao, vanilin, citronový olej, linalool či hexanal ¹⁰.

Tabáková aditiva jsou látky, které se k tabáku přidávají za účelem zlepšení technologického zpracování tabáku. Mezi typická aditiva patří zvlhčovadla, udržující tabák a kouř vlhký. Typickými příklady jsou glycerol a invertní cukry ^{10,11}.

Dále se přidávají konzervanty, chránící výrobek před zkažením působením mikroorganismů, používá se například draselná sůl kyseliny sorbové a propyl-4-hydroxybenzoát ^{7,10}.

Pojiva a zpevňovače jsou látky, které umožňují udržovat fyzický stav výrobku. Mezi běžně používaná pojiva a zpevňovače patří například celulózová vlákna, karboxymethylcelulóza a xanthanová guma ¹⁰.

Plniva - látky, které přispívají k objemu přípravku, aniž by významně ovlivňovaly zápach, chuť či vůni. Příkladem je uhličitán vápenatý ¹⁰.

2.4 Legislativa v České republice

Výroba, prodej, obsah povolených látek v tabákových výrobcích a jejich distribuce se řídí národní legislativou (Zákon č. 110/1997 Sb., Vyhláška 344/2003 Sb., Zákon 379/2005 Sb.) ¹²⁻¹⁴. K výrobě tabákových výrobků je možné použít pouze surový a technologicky upravený tabák. Tabákové výrobky uváděné do oběhu nesmějí obsahovat

zakázané látky stanovené vyhláškou. U tabákových výrobků určených ke kouření musí být na obalech pro spotřebitele uvedeno jedno obecné varování a jedno dodatečné varování^{12,13}.

Obsah dehtu v cigaretách uváděných do oběhu nesmí být vyšší než 10 mg na cigaretu. Obsah nikotinu v cigaretách uváděných do oběhu nesmí být vyšší než 1 mg na cigaretu. Obsah oxidu uhelnatého v cigaretách uváděných do oběhu nesmí být vyšší než 10 mg na cigaretu. Obsahu dehtu, nikotinu a oxidu uhelnatého v cigaretách se stanoví a přesnost údajů o obsahu dehtu, nikotinu a oxidu uhelnatého uváděných na obalech cigaret se posuzuje podle zvláštního právního předpisu¹³.

Při výrobě tabákových výrobků je povoleno používat přes 200 různých látek pro zlepšení kvality, délky kouření a chuti produktů. Při výrobě tabákových produktů je zakázáno používat aromatizační složky jako kafr, kumarin, safrol a kyselinu agarovou¹³.

Je zakázáno prodávat tabákové výrobky, tabákové potřeby a elektronické cigarety osobám mladším 18 let¹⁴.

2.5 Zkoumané látky

2.5.1 Nikotin

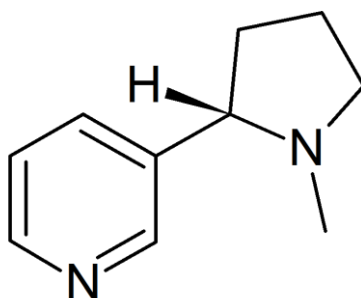
Nikotin, pyridinový alkaloid (strukturní vzorec je uveden na Obr. 1), je přírodní rostlinný insekticid vyskytující se v listech tabákových rostlin. Představuje 95 % z celkového obsahu alkaloidů v rostlině. Nikotin obsažený v tabáku je z většiny levotočivý (S)-izomer, pouze 0,1-0,6% nikotinu je tvořeno pravotočivým (R)-izomerem¹⁵. Listy *Nicotiana tabacum* obsahují mezi 20 000 až 40 000 ppm nikotinu¹⁶. Listy *Nicotiana rustica* obsahují kolem 50 000 ppm.¹⁷

Množství 60 mg nikotinu podané orálně může být letální¹⁸. Nevolnost a zvracení patří mezi nejčastější příznaky akutní otravy nikotinem u člověka. Lokalizování emetického působení nikotinu bylo předmětem rozsáhlého studia. Malé dávky nikotinu vyvolávají dávivé reflexy. Naopak velké dávky nikotinu ve skutečnosti mohou působit jako antiemetikum¹⁹.

Malé dávky nikotinu mají stimulační účinky na centrální nervovou soustavu, zatímco velké dávky ji utlumují. Studie prokázaly potlačení podmíněných reflexů u savců s podaným nikotinem. Zdá se, že nikotin ruší sílu vazby mezi podmíněným stimulem

a danou odpovědí, např. slinění. Zvyšováním dávky dochází k progresivní inhibici, která vrcholí až úplnou ztrátou podmíněných reflexů k jídlu. V současné době není známo, zdali se jedná o konkrétní místo či způsob účinku nikotinu nebo jestli se jedná jen o jeden z projevů obecného tlumivého vlivu na chování zvířat ¹⁹.

Nikotin nejdříve stimuluje nikotinové receptory autonomních ganglií a poté je zablokuje, tedy kouření může zrychlit srdeční činnost přes stimulaci parasympatiku nebo zpomalit blokem sympatiku. Okolo 80-90 % cirkulujícího nikotinu je metabolizováno v játrech, ledvinách a plicích ²⁰.



Obr. 1: Strukturní vzorec nikotinu

2.5.2 Polyfenolické látky

Polyfenolickým látkám je v posledních letech věnována pozornost, především díky jejich antioxidačním vlastnostem a hojnému výskytu v rostlinách ^{21,22}. I přes zvýšenou pozornost k těmto látkám není znám jejich přesný obsah v potravinách ani jejich metabolická dráha a rozpětí koncentrace v krevní plazmě. Byla u nich prokázána vyšší antioxidační aktivita než u vitamínu a endogenních antioxidantů. Pozornost si získaly díky jejich možné roli v prevenci onemocnění souvisejících s oxidativním stresem, jako rakovina, kardiovaskulární a neurodegenerativní onemocnění ²¹.

Ve vyšších rostlinách a několika stovkách jedlých rostlin bylo identifikováno několik tisíc molekul mající polyfenolovou strukturu. Tato struktura se skládá z více než jedné hydroxylové skupiny na aromatickém jádře. Tyto molekuly patří mezi sekundární rostlinné metabolity a jejich hlavní úlohou je obrana rostliny vůči ultrafialovému záření či patogenům. Bylo zjištěno, že obměňují aktivitu široké škály buněčných enzymů a receptorů ²²⁻²⁴. Tyto sloučeniny mohou být rozděleny do různých skupin v závislosti na počtu fenolových kruhů a strukturních prvků, na které se fenolové kruhy váží.

Polyfenolické látky jsou v rostlinách stanovovány především pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie, například s coulometrickým detektorem^{21,22}. Jejich celkový obsah je také možné zjistit díky jejich redukčním vlastnostem pomocí spektrometrické metody s Folinovým činidlem, avšak hodnoty získané touto metodou mohou být vyšší kvůli přítomnosti jiných látek s redukčními vlastnostmi²¹. Polyfenoly se rozdělují na fenolické kyseliny, flavonoidy, stilbeny a lignany²¹.

Flavonoidy, jejichž struktura se skládá se ze dvou aromatických kruhů, se dále dělí na šest podskupin dle typu heterocyklů. V závislosti na této rozmanitosti se mohou polyfenoly vázat s různými cukry a organickými kyselinami či mezi sebou.²⁵ Flavonoidy se vyskytují především v ovoci, červeném víně, zelenině a čaji²¹.

Fenolické kyseliny můžeme dělit do dvou skupin a to na deriváty benzoové kyseliny a deriváty kyseliny skořicové. Nejhojněji se vyskytují v obilovinách^{26,27}.

Lignany jsou tvořeny dvěma fenolpropanovými jednotkami²⁴. Jejich nejbohatším zdrojem je lněné semínko. Dále jsou obsaženy například v cereáliích, zrnech, ovoci a zelenině, ovšem jejich koncentrace je asi tisíckrát nižší než ve lněném semínku²⁸.

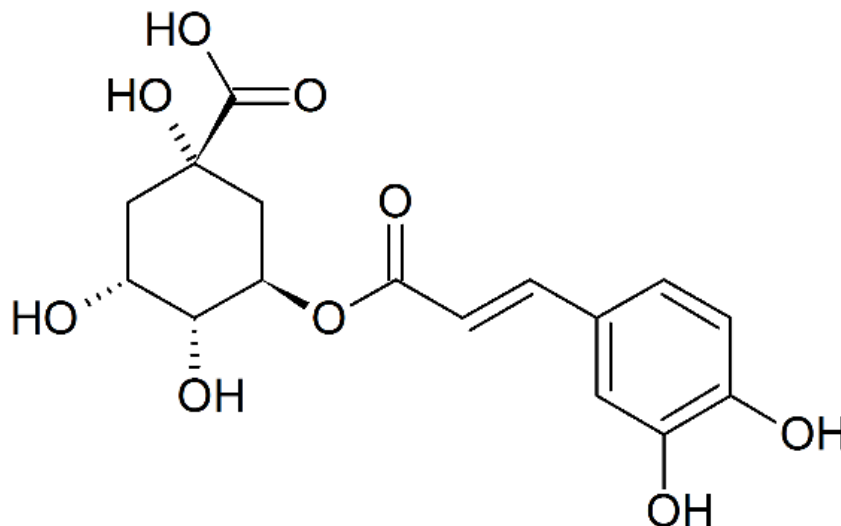
Stilbeny se nacházejí v lidské potravě pouze v malých množstvích. Jedním z nich je resveratrol, na jehož protirakovinné účinky bylo poukázáno během screeningu lékařských rostlin a byl rozsáhle studován²⁹. Stilbeny byly nalezeny například u čeledi *Pinaceae* (borovicovité), *Fabaceae* (bobovité) a *Vitaceae* (révovité)³⁰.

Z velkého množství nabízených látek bylo pro tuto studii vybráno pět zástupců vyskytujících se v listech tabáku¹⁶.

Kyselina chlorogenová

Kyselina chlorogenová (struktura viz Obr. 2), ester kyseliny kávové a kyseliny chinové, je přírodní chemickou sloučeninou, která je důležitým meziproduktem při biosyntéze ligninu³¹. Kyselina chlorogenová je jedna z polyfenolických kyselin nejběžněji se vyskytujících v lidské potravě. Ve velkém množství je obsažena v kávě, dále ji můžeme nalézt například v mrkvi, tuřínu, pastináku, broskvích, nektarinkách, anýzu a fenyklu^{32 21}. Mezi její pozitivní účinky patří zpomalování uvolnění glukózy do krevního oběhu po jídle³³. V jedné ze studií byla pozorována skupina myší s rakovinou tlustého střeva. Subjektům bylo podáváno množství kyseliny chlorogenové

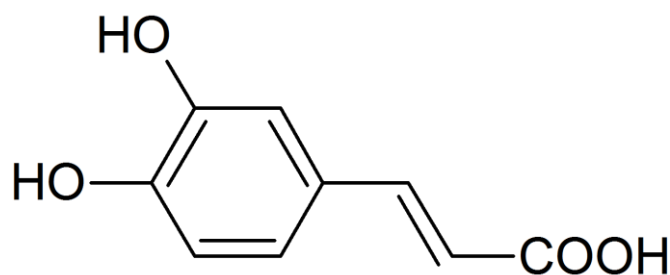
ekvivalentní třem šálkům kávy pro člověka. Výsledkem studie byl pokles výskytu rakoviny z 56 % na 18 %³⁴. I přes zjištěné mnohé pozitivní účinky na lidský organismus je kyselina chlorogenová pokládána za chemický alergen způsobující respirační potíže člověka na určité druhy rostlinných materiálů³⁵.



Obr. 2: Strukturální vzorec kyseliny chlorogenové

Kyselina kávová

Kyselina kávová viz Obr. 3 je jedním z významných hydroxyderivátů kyseliny skořicové. V hojném množství se vyskytuje v ovoci, například v oddencích borůvky černé^{36,37}. V rostlinách se nejčastěji nachází ve formě esterů, u člověka je metabolizována katechol-O-methyltransferasou v játrech či ledvinách na vaniloylglycin přes kyselinu ferulovou a kyselinu vanilovou²¹.

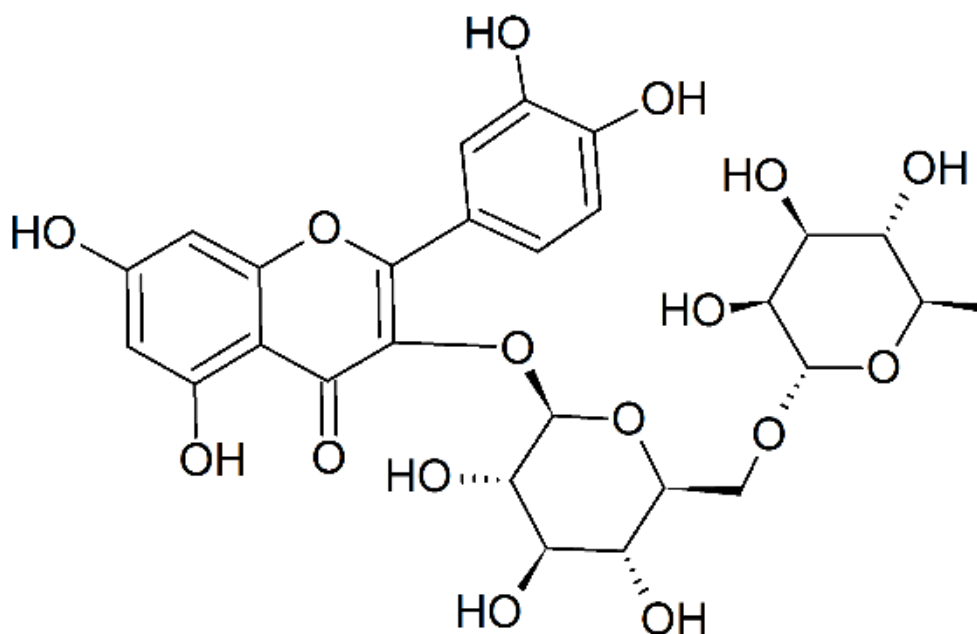


Obr. 3: Strukturální vzorec kyseliny kávové

Rutin

Rutin (Quercetin 3-rutinoside, Rutoside^{38 39}) viz Obr. 4 patřící mezi biflavonoidní glykosidy se skládá z aglykonu quercetinu a cukernaté složky rutinosy. Rutin se kromě

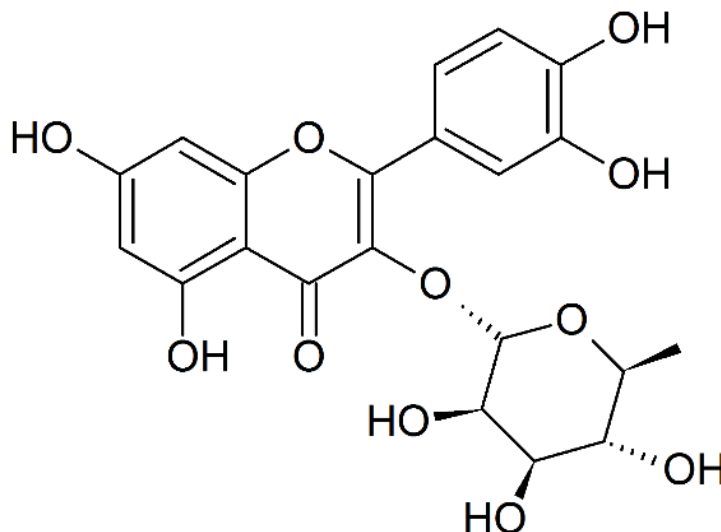
tabáku vyskytuje například v pohance, chřestu, rajčatech, broskvích, nektarinkách, švestkách a čaji^{32,40}. Glykosidy jsou jedny z nejdůležitějších prekurzorů obsažených v listech tabáku a jsou spojovány s různou chutí tabáku při kouření¹¹. Ačkoliv u něj nebyly prokázány antibakteriální účinky, byly u něj pozorovány synergické účinky s různými flavonoidy. Bylo zjištěno, že v kombinaci s quercetinem či morinem dochází ke zvýšení inhibice růstu bakterií typu *Salmonella enteritidis* a *Bacillus cereus*⁴¹. Další studie ukázaly, že po podávání tablet skupině pacientů s diabetem mellitem druhého typu, obsahujících rutin dochází k výraznému poklesu LDL cholesterolu v plazmě⁴². K dalším prokázaným účinkům rutinu patří snížení křehkosti kapilár, snížení vysokého krevního tlaku, snižování propustnosti cév, antiedemický efekt a snižuje riziko aterosklerózy⁴³.



Obr.4: Strukturní vzorec rutinu

Quercitrin

Glykosid skládající se z flavonoidu quercetinu a cukerné složky rhammosy viz Obr. 5. Je kromě tabáku obsažen například v pohance ⁴³, různých druzích dubů ⁴⁴ a třezalce tečkované⁴⁵. V německé studii byla pozorována jeho cytotoxicita ⁴⁵. Díky jeho vysoké biologické dostupnosti v trávicím traktu se o něm hovoří jako o účinnějším antioxidantu nežli o quercetinu. Působením quercitrinu docházelo k významnému snížení tvorby toxického hydroxylového radikálu při rozkladu deoxyribózy. ⁴⁶

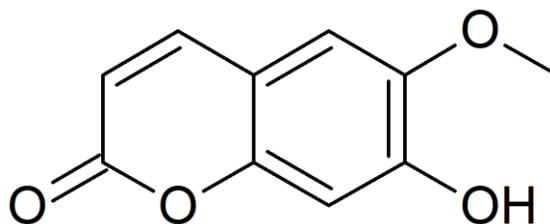


Obr. 5: Strukturální vzorec quercitrinu

Skopoletin

Skopoletin patří do skupiny kumarinů, jeho strukturální vzorec je možné vidět na Obr. 6. Skopoletin je znám pro své biologické zklidňující a anti-tumorové účinky. Díky svojí schopnosti uhasit fluorescenci hovězího sérového albuminu a vlastní fluorescenci tím zvýšit, je používán pro kvantitativní stanovení proteinů, jakožto fluorescenční sonda. O přesném mechanismu interakce se dále diskutuje ⁴⁷.

Vyskytuje se v nízkých koncentracích ve vaskulárním systému zdravých rostlin. Skopoletin se akumuluje okolo nekrotických lézí rostliny napadených virem a je následně transportován do vaskulárních svazků. Různé experimenty ukázaly, že se skopoletin hromadí jakožto výsledek poranění a jeho množství se odvíjí od typu zranění. Pro příklad se skopoletin hromadí 10x více v rostlinách tabáku napadených *Pseudomonas solanacearum* než ve zdravých rostlinách. Relativně vysoké množství je získáno z mladých tabákových rostlin, které jsou uřaty ⁴⁸.



Obr. 6: Strukturní vzorec skopoletinu

2.6 Metody používané ke stanovení sledovaných látek

2.6.1 Metody plynové chromatografie používané ke stanovení nikotinu v tabákových výrobcích

V práci Hossaina a Salehuddiniho byl nikotin stanovován metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí z listů tabáku pocházejících z různých oblastí Bangladéše. K vlastní analýze byla použita kapilární křemíková kolona typu VF-5 30 m x 0,25 i.d. mm o tloušťce filmu 0,25 μ m. Limit detekce pro tuto metodu byl stanoven 2,5 ng. Obsah nikotinu ve vzorcích tabáku z různých oblastí Bangladéše se pohyboval v rozmezí 0,9 – 3,6 % hm. Tyto rozdíly mohou být způsobeny rozdíly v úrodnosti půdy. Tato metoda by mohla být použita k rozeznávání autenticity tabáků ze sledované oblasti⁴⁹.

Plynová chromatografie s plameně-ionizační detekcí byla použita pro stanovení nikotinu a dalších alkaloidů v tabáku v práci p. Shenga a kol. Vzorky tabáku byly ošetřeny malým množstvím vodného roztoku amoniaku pro uvolnění tabákové tkáně a převedení alkaloidů do volné fáze, následně byly extrahovány směsí methanolu a dichlormethanu v poměru 1:3⁵⁰.

CORESTA (Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco) doporučuje metodu pro stanovení nikotinu v tabáku a tabákových výrobcích pomocí plynové chromatografie s plamenově ionizační detekcí. Tato metoda je založena na dvou rozdílných variantách extrakce. K extrakci nikotinu z tabáku je používán MTBE nebo n-hexan. Při analýze vzorků listů tabáku nebyly pozorovány významné rozdíly mezi

těmito dvěma způsoby extrakce. Metoda je použitelná pro vzorky obsahující nikotin v rozmezí 8 mg/g do 41 mg/g suché váhy tabáku a částice menší než 4 mm⁵¹.

Světová zdravotnická organizace publikovala standardní operační postup pro stanovení nikotinu v cigaretové náplni metodou plynové chromatografie s plamenově ionizační detekcí. Tato metoda je modifikací n-hexanové metody CORESTA a byla použita v této práci k porovnání výsledků z analýzy HPLC-VIS⁵².

V práci Stanfilla a kol. z centra kontroly a prevence onemocnění byla ke stanovení nikotinu ve šňupacích a žvýkacích tabákových výrobcích vyvinuta pomocná metoda plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Tyto specifické výrobky neposkytovaly dostatečně uspokojivé výsledky při analýze metodou GC-FID. Extrakce byla prováděna MTBE a jako interní standard byl použit chinolin. Ve výsledku bylo dosaženo rychlejší a selektivnější, avšak dražší metody. Tato metoda vykazuje velmi dobrou přesnost a robustnost⁵³.

2.6.2 Metody kapalinové chromatografie používané ke stanovení nikotinu v tabákových výrobcích

V práci L. Vlase a kol. byla popsána metoda stanovení nikotinu z tabáku metodou LC-MS-MS v ESI módu. K extrakci nikotinu z tabáku byla použita 0,1mol/l kyselina sírová. Optimalizaci metody bylo dosaženo rychlé analýzy, vysoké citlivosti a dobré selekce látek⁵⁴.

V práci Ciolina a kol. byly sledovány podmínky ion-párové kapalinové chromatografie na obrácených fázích pro stanovení nikotinu ve šňupacím a cigaretovém tabáku. Při vývoji této metody byl sledován vliv typu pufru, pH a koncentrace ion-párového činidla. Jako optimální pufr byl zvolen citrátový pufr o pH 3,0. Metoda vykazovala dobré rozdělení nikotinu a dalších alkaloidů přítomných v tabáku⁵⁵.

V práci J. A. Sauderse a D. E. Bluma byly stanovovány 4 majoritní alkaloidy obsažené v čerstvém a ve vzduchem sušeném tabáku pomocí Vzorky tabáku byly extrahovány

fosfátovým pufrům a děleny na koloně C18. Jako mobilní fáze byl použit 40% methanol, obsahující 0,2% kyseliny fosforečné, pH mobilní fáze bylo upraveno na hodnotu 7,25 pomocí triethylaminu. Detekce alkaloidů - nikotinu, nornikotinu, anabasinu a anatabinu byla prováděna při vlnové délce 254 nm. Limit detekce se pro všechny sledované analyty pohyboval v rozmezí 40 – 50 ng⁵⁶.

Pro porovnání vytvořené metody stanovení nikotinu v tabáku pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie byla vybrána metoda „Stanovení nikotinu v tabákové cigaretové náplni“ od Světové zdravotnické organizace⁵². Tato metoda využívá extrakce nikotinu přes vodu do organické fáze.

2.6.3 Ostatní metody stanovení nikotinu

V práci Mulletta a kol. byla ke stanovení nikotinu v tabáku použita a vyvinuta metoda extrakce molekulárně vtištěnou pevnou fází s diferenční pulzní elucí (MISPE-DPE). Nikotin a stopový alkaloid myosmin se byly schopny vázat na molekulárně vtištěný polymer (MIP) v mikrokoloně. Nicméně více než 95 % navázaného myosminu mohlo být desorbováno a vymyto 20 μ l pulsem methanolu, ve srovnání pouze se 43 % navázaného nikotinu. Zbylý navázaný nikotin byl desorbován 20 μ l pulsem 1% trifluoroctové kyseliny ve vodě pro přímou detekci UV při 254 nm. Tato MISPE-DPE metoda vykazovala inherentní selektivitu k nikotinu, která snižuje čas analýzy a náklady na analýzu. Bylo dosaženo limitu detekce 1,8 μ g/ml a lineárního dynamického rozsahu více než 1000 μ g/ml⁵⁷.

Ke stanovení nikotinu v tabáku byla použita v práci Švorce a kol. diferenční pulzní voltametrie s borem dopovanou diamantovou elektrodou. Tato metoda je velmi citlivá, selektivní a spolehlivá. Bylo dosaženo velmi nízkého limitu detekce 0,3 μ mol/l aniž by byl povrch elektrody aktivován během měření⁵⁸.

2.6.4 Metody používané ke stanovení polyfenolických látek

Ke stanovení osmi polyfenolů v tabáku byla v práci Xie a kol. vyvinuta metoda kapalinové chromatografie s DAD detekcí. Tato metoda je jednoduchá, rychlá, citlivá

a dobře reprodukovatelná. Vzorky byly připraveny SPE extrakcí. Modifikace této metody byla použita v diplomové práci ⁵⁹.

2.7 Statistické zpracování dat

V předložené práci byla vždy pro každou přípravu vzorku obsahující nikotin provedena dvě měření. Z výsledků měření byl vypočten aritmetický průměr. Získané průměry byly vyneseny do grafů, chybové úsečky značí velikost směrodatné odchylky (s_r).

2.7.1 Opakovatelnost

Podmínkou opakovatelnosti je získání nezávislých výsledků zkoušky stejnou metodou, stejným pracovníkem, ve stejné laboratoři, za stejných podmínek měření, na stejném vzorku, na stejném přístroji, v krátkém časovém období ⁶⁰.

2.7.1.1 Mez opakovatelnosti a reprodukovatelnost

Mez opakovatelnosti udává na hladině pravděpodobnosti (95 %) o kolik se mohou lišit výsledky měření, aniž by bylo nutné měření opakovat ⁶⁰. Kritické hodnoty mezi reprodukovatelnosti, nejistoty a mezi opakovatelnosti byly vypočítány pomocí Horwitzova vztahu (2.1).

$$R = 0,0283 \times c \times 2^{(2-0,5 \times \log(c))} \quad (2.1)$$

Kde R je reprodukovatelnost c je koncentrace v % hm..

2.7.2 Mez detekce a mez kvantifikace

Mez detekce je definováno jako nejmenší množství analytu ve vzorku, které může být danou metodou detekováno. Mez detekce v experimentu byla vypočítána dle vztahu (2.2)

$$LOD = \frac{3 \times h_n}{k} \quad (2.2)$$

Kde h_n je šum na základní linii dle ASTM a k je směrnice kalibrační přímky, kalibrace vytvořené ze závislosti koncentrace analytu na výšce píků.

Mez kvantifikace udává nejmenší množství analytu, které danou metodou je možné stanovit s přijatelnou opakovatelností⁶⁰. Mez kvantifikace v experimentu byla vypočítána dle vztahu (2.3)

$$LOQ = \frac{10 \times h_n}{k} \quad (2.3)$$

2.7.3 Linearita

Schopnost metody poskytnout výsledky zkoušky, které jsou přímo úměrné koncentraci analytu, se nazývá linearita. Metoda je lineární, pokud je splněna podmínka konstantní citlivosti v použitém rozsahu koncentrací⁶⁰.

2.7.4 Kalibrační křivka

Při kalibraci je hledán vzájemný vztah mezi měřitelnou veličinou, tedy signálem, a veličinou popisující stav systému, např. koncentrací⁶¹. Principem experimentu je získání signálů odezvy analytu, které odpovídají známým hodnotám koncentrace analytu. Grafickým znázorněním je kalibrační křivka, proložením bodů je získána rovnice lineární regrese. Tvar rovnice lineární regrese je uveden ve vztahu (2.4)

$$y = k * x + q \quad (2.4)$$

Kde y je odezva přístroje (hodnota signálu), x je koncentrace analytu, q je úsek přímky a k je směrnice přímky či také citlivost metody.

2.7.5 Nejistota

Nejistota měření vymezuje interval, ve kterém je výsledek považován za přesný a pravdivý. Pro řádné určení nejistoty je důležité zahrnout všechny složky, které mohou ovlivnit hodnotu výsledku⁶¹. Je nedílnou součástí výsledku. V této práci je vypočítána nejistota podle vzorce (2.5).

$$U_c = k \times u_c \quad (2.5)$$

Kde U_c je kombinovaná rozšířená nejistota, k je koeficient rozšíření a u_c je kombinovaná standardní nejistota. Koeficient rozšíření $k = 2$ udává (přibližně) 95% hladinu spolehlivosti. .

3 Experimetální část

3.1 Použité chemikálie

Methylalkohol, $\geq 99,9\%$. Penta, Česká republika
2-propanol, p.a., Lach:ner, Česká republika
Dodecylsulfát sodný, p.a., Lach:ner, Česká republika
Kyselina fosforečná, p.a., Lach:ner., Česká republika
Acetonitril, p.a., Lach:ner a.s., Česká republika
Rutin, $\geq 98,5\%$, Merck, Německo
Quercitrin hydrát, $\geq 78\%$, Sigma, USA
Kyselina káвовá 99 %, Lach:ner a.s., Česká republika
Skopoletin, 95 %, Lach:ner a.s., Česká republika
Kyselina chlorogenová, 95 %, Sigma, USA
n-hexan, p.a., Lach:ner a.s., Česká republika
Hydroxid sodný, p.a., Lach:ner a.s., Česká republika
Dodekan, $\geq 98.5\%$, Merck, Německo

3.2 Použité přístroje

Kapalinový chromatograf - HPLC, Agilent 1200, Agilent Technologies

- Pumpa - 200 binary pump, model G1312A
- Detektor DAD - 1200 DAD, model: G1315D
- Termostatová skříň - 1200 thermostated column compartment, model: G1316A
- Autosampler - 1200 Autosampler, model: G1329A
- Termostat k autosampleru - 1200 Thermostat (k autosampleru), G1330B
- Interface - 35900E A/D interface box
- Software - SW ChemStation SW

Plynový chromatograf - Agilent 7890B Series GC Custom, Agilent Technologies

Autosampler - Autoinjektor 1: 7693A

Podavač - Tray with Heater/Mixer/Barcode 7693A

Detektor - Micro ECD with EPC G3440B231

Software – ChemStation for LC 3D System

Detektor - FID with EPC G3440B211

Autosampler - Autoinjektor 2: 7693A, ser.CN14513016

Kolona GC - Agilent DB624 (J&W) délky 30 m, vnitřního průměru 0,32 mm
a tloušťky filmu zakotvené fáze 1,8 μm

Kolony pro HPLC

Agilent Eclipse Plus C8, zrnění 3,5 μm, (4,6 x 50) mm

Agilent Eclipse Plus C8, zrnění 1,8 μm, (2,1 x 50) mm

EC 150/4,6 NUCLEOR C18 GRAVITY o zrnění 3 μm

ZORBAX SB-C18 2,1x50 mm o zrnění 1,8 μm

HALO C18 2,1x50 mm o zrnění 2,7 μm s předkolonkou

ZORBAX XDB-C8 150x4,6 mm o zrnění 5 μm

PH metr, InoLab pH/Cond Level 1, Inolab

3.3 Příprava roztoků

3.3.1 Stanovení nikotinu HPLC/DAD

Jako mobilní fáze pro kvantitativní analýzu nikotinu metodou HPLC/DAD byla zvolena směs destilované vody, acetonitrilu a dodecylsulfátu sodného v poměru 89:39:1. Bylo přibližně naváženo 640,00 g destilované vody, 7,21 g dodecylsulfátu sodného a 281,60 g acetonitrilu. Následně bylo upraveno pH směsi pomocí 1% H₃PO₄ na hodnotu 3,5.

Jako extrakční činidlo (EX1) pro kvantitativní analýzu nikotinu metodou HPLC/DAD byl použit vodný roztok methanolu (80 % obj.).

Zásobní roztok nikotinového standardu (ZN1) byl připraven navážením přibližně 0,1 g nikotinu do 25ml odměrné baňky a doplněn extrakčním činidlem (EX1) po rysku.

3.3.2 Stanovení nikotinu GC/FID

Pro kvantitativní analýzu nikotinu GC-FID byl zvolen postup podle metody Světové zdravotnické organizace⁵². Metoda byla modifikována pro potřeby a dostupné vybavení laboratoře. Extrakční činidlo (EX2) bylo připraveno odměřením 300 ml n-hexanu do 500ml odměrné baňky, ke kterému bylo přiváženo 0,2638 g dodekanu, následně byl objem doplněn n-hexanem po rysku.

Pro zajištění zásaditého prostředí extrakce, byl připraven 2mol/l roztok NaOH. Bylo naváženo 8 g NaOH do 100ml odměrné baňky a rozpuštěno v destilované vodě. Následně byl objem doplněn po rysku destilovanou vodou.

Příprava zásobního roztoku nikotinu (ZN2) - do 250 ml zábrusové Erlenmeyerovy baňky bylo odměřeno 50 ml destilované vody, k tomu bylo přiváženo 0,2402 g nikotinu, nedělenou pipetou bylo k roztoku přidáno 100 ml extrakčního činidla a následně přililo 25 ml vodného roztoku NaOH (2 mol/l). Takto připravený roztok byl pečlivě uzavřen zábrusovou zátkou a po dobu 60 min byl promícháván na třepačce. Po dalších 20 minutách stání byla sejmuta horní (organická) fáze, která se dále použila k vytvoření kalibračních roztoků. Kalibrační roztoky (KW1-KW5) byly připraveny postupným ředěním zásobního roztoku, přídavek kalibračního roztoku: 0,25 ml; 1,25 ml; 2,5 ml; 3,75 ml a 5 ml do 10ml odměrných baněk následně doplněných extrakčním činidlem.

3.3.3 Stanovení polyfenolů HPLC/DAD

Jako mobilní fáze pro stanovení polyfenolů z tabáku metodou HPLC/DAD byl připraven roztok acetonitrilu, destilované vody a kyseliny mravenčí v poměru 16,5 : 83,5 : 0,1.

Kalibrační roztok (KP) byl připraven navážením přibližně 1 mg od každého analytu do 50ml baňky a doplněním extrakčním činidlem (EX1) po rysku. Kalibrace byla měřena pomocí různých objemů nástřiku kalibračního roztoku na kolonu. V rozmezí 0,1 μ l do 6 μ l.

3.4 Příprava vzorků tabáku

Vzorky tabáku pro stanovení nikotinu byly získány ze zásob Celně technické laboratoře Generálního ředitelství cel. Pro větší rozmanitost výsledků byly dále získány vzorky tabáku od Philip Morris ČR a.s. z různých zemí a roků sklizně. Pro každou metodu byla použita rozdílná příprava vzorků, přičemž polyfenoly byly měřeny pouze metodou HPLC/DAD. Vzorky tabáku musely být během experimentu připravovány několikrát kvůli nestálosti polyfenolických složek.

3.4.1 Stanovení nikotinu a polyfenolů HPLC/DAD

Vzorky tabáku byly rozemlety pomocí mlýnku. Takto rozemletý vzorek byl přesítován přes síto z drátěné tkaniny se čtvercovým průřezem otvorů o velikosti otvorů 1 mm. Část vzorku o velikosti částic menších než 1 mm byla odebrána k analýze. Bylo naváženo přibližně přesně 0,5 g takto upraveného vzorku do 50ml odměrné baňky, k tomuto množství bylo přidáno 45 ml extrakčního činidla (EX1). Uzavřená odměrná baňka byla ponechána po dobu 20 minut v ultrazvukové lázni. Po 10 minutách chladnutí byl eluát slit přes nálevku do 100ml odměrné baňky. Extrakce se stejným postupem opakovala ještě jedenkrát. Eluát byl slit do stejné 100ml odměrné baňky a ta byla doplněna po rysku roztokem (EX1). Takto připravený vzorek byl promíchán, odebrán plastovou stříkačkou a přes injekční filtr o pórovitosti 0,45 μm byl přefiltrován do 2ml vialky uzavřené septem.

3.4.2 Stanovení nikotinu GC/FID

Příprava vzorku pro stanovení nikotinu metodou GC/FID dle Světové zdravotnické organizace⁵². Do 100ml Erlenmeyerovy baňky bylo naváženo přibližně přesně 1,5 g vzorku namletého tabáku, ke kterému bylo přidáno 20 ml destilované vody, 40 ml extrakčního činidla (EX2) a 10 ml 2mol/l NaOH. Takto připravená suspenze byla extrahována 60 min na třepačce, po dalších 20 minutách stání byla odebrána kapalná fáze, která byla přefiltrována přes filtr 0,45 μm do 2ml vialky. Kontrolní standard byl připraven obdobně jako zásobní roztok nikotinu (ZN2), bylo naváženo 0,1038 g nikotinu do 25 ml destilované vody s přídavkem 50 ml extrakčního činidla a 12,5 ml 2mol/l NaOH, roztok byl 60 min na třepačce a po uplynutí 20 min byla sejmuta horní fáze, 3 ml takto připraveného roztoku byly doplněny extrakčním činidlem na objem 10 ml.

3.5 Podmínky měření

V této kapitole jsou popsány optimální parametry metody HPLC/DAD, které byly použity pro stanovení obsahu nikotinu a polyfenolických látek ve vzorku tabáku. A odchylky od pracovního postupu Světové zdravotnické organizace.

3.5.1 Stanovení nikotinu HPLC/DAD

Ke stanovení nikotinu ze vzorku tabáku metodou HPLC/DAD byla použita kolona C8 o zrnění 1,8 μm a rozměrech (2,1 x 50) mm. Jako mobilní fáze byla zvolena směs vody, acetonitrilu a dodecylsulfátu sodného v poměru 89:39:1 s průtokovou rychlostí 0,2 ml/min. Objem nástřiku roztoku do kolony byl nastaven na 1 μl . Kolona byla temperována na 40 °C po celou dobu analýzy. Nikotin byl detekován při vlnové délce 260 nm.

3.5.2 Stanovení nikotinu GC/FID

Pro porovnání vytvořené metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie byla použita modifikace metody od Světové zdravotnické organizace viz kapitola 1.7.1. Vzhledem k dostupnému materiálu byla použita chromatografická kapilární kolona DB624 (J&W) délky 30 m, vnitřního průměru 0,32 mm a tloušťky filmu zakotvené fáze 1,8 μm . Nosným plynem byl oproti původní metodě zdravotnické organizace zvolen vodík s průtokovou rychlostí 1,5 ml/min. Jako vnitřní standard pro metodu GC/FID byl použit dodekan. Teplota kapilární kolony byla 170 °C, teplota nástřiku a detektoru byla 270 °C. Měření probíhalo ve split módu 1:10 o nástřiku vzorku na kolonu 1 μl .

3.5.3 Stanovení polyfenolů HPLC/DAD

Ke stanovení polyfenolů z tabáku metodou HPLC/DAD byla použita kolona C8 o rozměrech (150 x 4,6) mm a zrnění stacionární fáze 5 μm . Jako mobilní fáze byla zvolena směs acetonitrilu, destilované vody a kyseliny mravenčí v poměru 16,5 : 83,5 : 0,1 s průtokovou rychlostí 0,4 ml/min. Standardní nástřik byl zvolen 5 μl . Polyfenoly byly detekovány při vlnové délce 340 nm.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Stanovení nikotinu HPLC/DAD

Záměrem experimentu bylo vytvoření metody stanovení nikotinu v tabáku HPLC/DAD. Nejprve byla provedena optimalizace podmínek měření na roztoku standardu nikotinu. Byla optimalizována průtoková rychlost mobilní fáze, vlnová délka detekce nikotinu a výběr vhodné kolony. Pro stanovení nikotinu byla také provedena optimalizace přípravy vzorku tabáku.

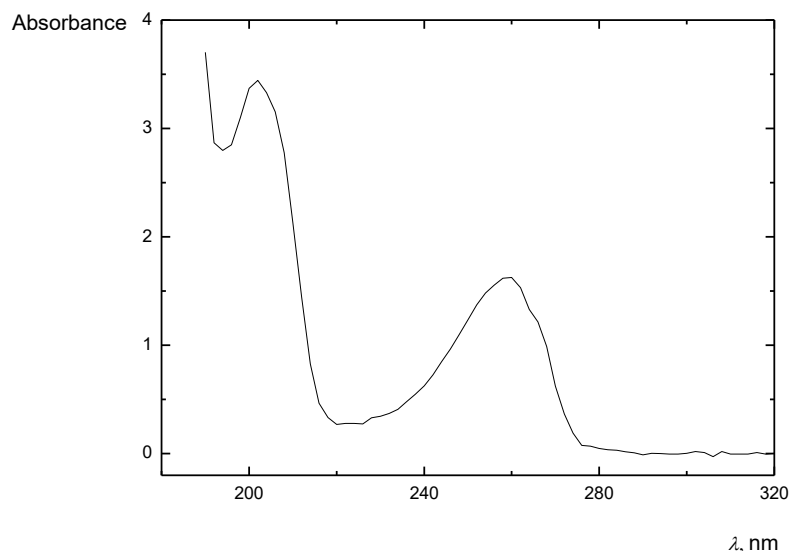
4.1.1 Optimalizace metody HPLC/DAD stanovení nikotinu

4.1.1.1 Výběr kolony, vlnové délky detekce a průtokové rychlosti mobilní fáze

Pro stanovení nikotinu v tabáku byly vyzkoušeny dva typy kolony a dvě průtokové rychlosti mobilní fáze. Retenční čas nikotinu u kolony Agilent Eclipse Plus C8, zrnění 1,8 μm , (2,1 x 50) mm při průtoku mobilní fáze 0,2 ml/min byl 6 minut. Při vyšších rychlostech průtoku mobilní fáze docházelo k přetlakování kolony. Zvýšení průtoku mobilní fáze tedy nevedlo ke zkrácení retenčního času analytu a dále nebylo experimentováno s vyššími průtoky pro tuto kolonu.

Druhou vyzkoušenou kolonou byla kolona Agilent Eclipse Plus C8, zrnění 3,5 μm , (4,6 x 50) mm. Retenční čas nikotinu při průtokové rychlosti mobilní fáze 0,2 ml/min byl 20 minut a při průtoku mobilní fáze 1,2 ml/min 4 minuty. V tomto případě došlo ke zkrácení doby analýzy s vyšší průtokovou rychlostí mobilní fáze. Nicméně byla pro další měření vybrána první kolona Agilent Eclipse Plus C8, zrnění 1,8 μm , (2,1 x 50) mm a průtok mobilní fáze 0,2 ml/min, kdy bylo dosaženo vyhovujícího retenčního času nikotinu a spotřeby mobilní fáze.

Během měření pro výběr kolony bylo detektorem diodového pole snímáno rozmezí vlnových délek 205 - 380 nm, jež je možné vidět na Obr. 7. Absorpční maximum nikotinu ve sledovaném spektru bylo nalezeno při vlnové délce 260 nm. Při této vlnové délce byla prováděna následující měření.



Obr. 7: Naměřené UV-VIS spektrum roztoku standardu nikotinu ($c = 0,8 \text{ mg/ml}$) v 80% vodném roztoku methanolu

4.1.1.2 Výběr extrakčního činidla

Z literatury⁴⁹ bylo zjištěno, že vhodným činidlem pro extrakci nikotinu z tabáku je methanol. V experimentu byl vyzkoušen čistý methanol a vodný roztok methanolu o koncentraci 80% obj. Pro zjištění optimálního složení extrakčního činidla byly připraveny v dubletu dva rozdílné vzorky tabáku. Výsledky extrakce tabáku a stanovení nikotinu je možné vidět v Tab. 2. Rozdíl mezi oběma typy extrakce nepřesahoval 5 %. Extrakce čistým methanolem byla účinnější pro vzorek tabáku č. 1, naopak pro vzorek č. 2 byl účinnější druhý typ extrakce. Jak bylo zmíněno, rozdíl mezi extrakcemi je zanedbatelný. Pro další měření byl vybrán vodný roztok methanolu o koncentraci 80% obj. z důvodu snížení nákladů na experiment a zátěže na životní prostředí.

Tab 2: Optimalizace složení extrakčního činidla tabáku pro stanovení nikotinu dvou různých vzorků tabáku

Číslo vzorku	Extrakce čistým MeOH	Extrakce 80% MeOH
	[% hm. nikotinu]	[% hm. nikotinu]
1	1,151	1,106
2	0,722	0,759

4.1.1.3 Výběr počtu následných extrakcí a velikosti částic tabáku

Pro vhodný výběr počtu extrakcí bylo naváženo přibližně přesně 1,0 g vzorku tabáku do 100ml odměrné baňky a trojnásobně extrahováno přibližně 100 ml 80% methanolu. Po každé extrakci byl sbírán eluát do oddělených vialek, které byly následně změřeny metodou HPLC s detektorem diodového pole. K měření byl použit vzorek tabáku rozemletý na částice o velikosti 1 mm a 2 mm, velikost částic byla selektována pomocí sít o velikosti otvorů 1 mm a 2 mm. Z Tab. 3 vyplývá, že velikost částic má zanedbatelný vliv na průběh extrakce nikotinu z tabáku. Rozdíl celkového obsahu nikotinu v tabáku je nižší než tři setiny hmotnostních procent. Z Tab. 3 je dále zřejmé, že k úplné extrakci nikotinu postačují dvě následné extrakce. V eluátu po třetí extrakci nebyl detekován nikotin pro obě sledované velikosti částic. Jako optimální byly tedy zvoleny dvě následné extrakce nikotinu z tabákových listů. Při dalším měření nebyl na velikost částic brán zřetel. Vzorky tabáku byly namlety na elektrickém mlýnku na prášek.

Tab 3: Obsah nikotinu v postupných eluátech a celkový obsah nikotinu v tabákovém listu o velikosti částic 1mm a 2 mm stanovený HPLC/DAD

Velikost částic tabáku	1. extrakce [% hm.] nikotinu	2. extrakce [% hm.] nikotinu	3. extrakce [% hm.] nikotinu	Celkové množství nikotinu ve vzorku [% hm.]
2 mm	0,6751	0,0486	< LOD	0,7237
1 mm	0,6593	0,0399	< LOD	0,6992

4.1.1.4 Ověření homogenity vzorku

Dále byl zkoumán vliv množství, homogenity extrahovaného vzorku a celkový objem extrakce. Byly připraveny dvě sady vzorků tabáku v tripletu.

1. příprava - přibližně přesně 1,0 g vzorku tabáku bylo kvantitativně převedeno do 100ml odměrné baňky. K němu bylo přidáno 90 ml rozpouštědla. Takto připravený vzorek byl po dobu 20 minut extrahován v ultrazvukové lázni, po 10 minutách chladnutí byl eluát slit do 250ml baňky. Ke vzorku bylo opět přidáno 90 ml extrakčního činidla a byla provedena druhá extrakce. Eluát byl přidán k eluátu z první extrakce a doplněn extrakčním činidlem po rysku na objem 250 ml.

2. příprava - přibližně přesně 0,5 g vzorku tabáku bylo kvantitativně převedeno do 50ml odměrné baňky. Ke vzorku tabáku bylo přidáno cca 45 ml rozpouštědla. Takto připravený vzorek byl po dobu 20 minut extrahován v ultrazvukové lázni, po 10 minutách chladnutí byl eluát slit do 100 ml baňky. Ke vzorku bylo opět přidáno cca 45 ml extrakčního činidla a byla provedena druhá extrakce. Eluát byl přilít k eluátu z první extrakce a doplněn extrakčním činidlem po rysku na objem 100 ml.

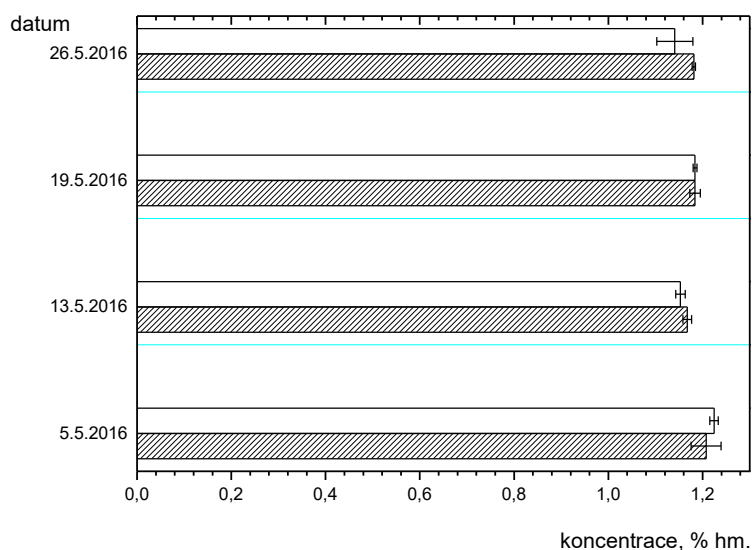
V následující Tab. 4 jsou uvedeny navážky vzorku a výsledný obsah nikotinu po dvojité extrakci. Z níže uvedené Tab. 4 vyplývá, že celková navážka vzorku tabáku nemá vliv na výslednou analýzu nikotinu. Pro další měření byla vybrána příprava č. 2, tedy navážka vzorku 0,5 g a celkový objem extrakce 100 ml (tj. extrakce 2 x 50 ml)

Tab 4: Výsledky stanovení nikotinu dvou příprav stejného vzorku tabáku o různých navážkách a celkových extrakčních objemech metodou HPLC/DAD.

typ přípravy	Navážka vzorku tabáku [g]	Obsah nikotinu ve vzorku [% hm.]
1a	1,03692	0,93
1b	1,01258	0,93
1c	1,00645	1,00
2a	0,49566	0,92
2b	0,51529	0,95
2c	0,49513	0,94

4.1.1.5 Trvanlivost extraktů tabáku

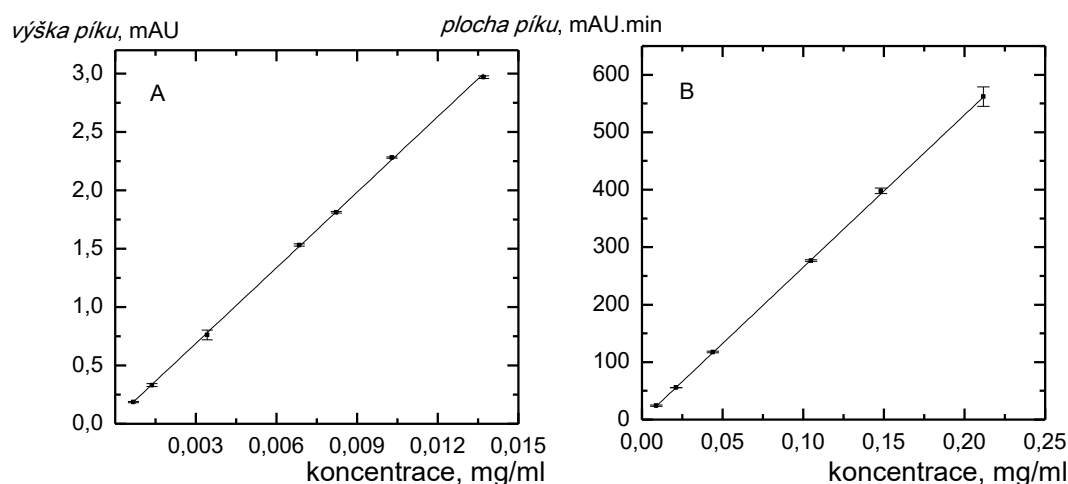
Pro zjištění trvanlivosti extrahovaných vzorků byl sledován průběh změn obsahu nikotinu v extraktu po dobu jednoho měsíce. Vzorky byly uchovávány jednak při laboratorní teplotě a jednak v mrazáku při teplotě - 17 °C. Během tohoto měsíce byl každý vzorek změřen ve čtyři různé dny, vždy dvakrát. Z výsledku měření, které jsou graficky znázorněny na Obr. 8 je patrné, že vliv teploty skladování na extrakt tabáku není významný. Dle naměřených hodnot, je možné měřit extrakty tabáku po dobu jednoho měsíce od jejich přípravy beze změny výsledku, nezávisle na typu skladování vialek.



Obr. 8: Vliv teploty skladování extraktů tabáku na výsledný obsah nikotinu ve vzorku tabáku; bílá oblast značí extrakt tabáku skladovaný v mrazáku při teplotě $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$, šrafovaná oblast značí extrakt tabáku ponechaný při laboratorní teplotě.

4.1.2 Kalibrační závislost

Kalibrační závislost standardu nikotinu byla změřena za zvolených optimálních podmínek tj. kolona C8, o zrnění $1,8\text{ }\mu\text{m}$ a rozměrech $(2,1 \times 50)\text{ mm}$, mobilní fáze - směs vody, acetonitrilu a dodecylsulfátu sodného v poměru 89:39:1 s průtokovou rychlostí $0,2\text{ ml/min}$ s objemem nástřiku $1\text{ }\mu\text{l}$ a temperováním kolony na $+40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Retence nikotinu byla sledována při vlnové délce 260 nm . Na Obr. 9 je uvedena kalibrační závislost ploch píků na koncentraci nikotinu. Z výsledků měření standardních roztoků v rozsahu koncentrací $0,06 - 1,20\text{ mg/ml}$ je zřejmé, že kalibrační závislost je lineární v celém měřeném rozsahu. Mez stanovitelnosti a detekce byla vypočítána z ASTM hodnoty šumu a kalibrační závislosti koncentrace nikotinu na výšce píku dle vztahu (2.3) a (2.4). Rovnice regrese pro kalibraci nikotinu v rozmezí $0,68 - 1,20\text{ mg/ml}$ $y = 219,91x$. Hodnota ASTM šumu byla $0,0176$. v Tab. 5 jsou uvedeny hodnoty vypočítaných mezí detekce a stanovitelnosti.



Obr. 9: Kalibrační závislosti koncentrace nikotinu na výšce píku (A) a na ploše píku (B) změřené metodou HPLC/DAD

Tab. 5: Parametry kalibračních závislostí odečtené z výše uvedených grafů (Obr. 9). Vypočtené LOD a LOQ z kalibrační závislosti výšky píku na koncentraci na nikotinu

Kalibrační závislost	Směrnice [mAU/ml/mg]	Úsek [mAU]	R	LOD [mg/ml]	LOQ [mg/ml]
Plocha píku	$2651,67 \pm 16,60$	$-0,17 \pm 0,47$	0,999	-	-
Výška píku	$215,84 \pm 0,61$	$0,04 \pm 0,01$	0,999	0,0003	0,0010

4.1.3 Stanovení obsahu nikotinu v reálných vzorcích

Obsah nikotinu v reálném vzorku tabáku a v nikotinové náplni do elektronických cigaret byl měřen pomocí HPLC s detektorem diodového pole za vybraných optimálních podmínek. Pro stanovení nikotinu byly vybrány různé druhy tabáků: mleté listy tabáku, cigaretová směs tabáku a dýmkový tabák. Vzorky byly několikrát připravovány, nebyly tak měřeny pouze z jedné přípravy. Tímto způsobem byla ověřena mez opakovatelnosti extrakce a celé přípravy zkoumaného roztoku. Z desetkrát opakovaného měření příprav byla vypočítána směrodatná odchylka do 0,03 % hmotnostních a relativní směrodatná odchylka nepřesahuje 2 %. Výsledky a jejich statistické zpracování můžeme vidět v Tab. 6 a 7. Pro metodu stanovení nikotinu HPLC/DAD je mez opakovatelnosti na 95% hladině pravděpodobnosti do 2,6 % hm. Dýmkový tabák přesahuje všechny zmíněné hodnoty především kvůli nehomogenitě vzorku.

Selektivita metody byla ověřena při každém měření pomocí kontroly změřeného spektra píku s knihovním spektrem nikotinu. Kontrola probíhala na začátku, uprostřed a na konci píku nikotinu. Kontrola byla prováděna vždy s každou novou sérií vzorků. Pík byl posuzován jako čistý při shodě s knihovním spektrem nad 96 %. Reprodukovatelnost byla vypočítána ze směrodatné odchylky dlouhodobé opakovatelnosti a průměrné hodnoty výsledků měření. Vypočítané hodnoty byly kontrolovány pomocí kritických hodnot Horwitzova vztahu, kdy bylo zjištěné, že pouze dýmkový tabák tyto hodnoty překračuje. Cože je způsobeno s vysokou pravděpodobností nehomogenitou vzorku.

Tab. 6: Vypočítané kritické hodnoty mezi reprodukovatelnosti, opakovatelnosti a nejistot pro různé vzorky tabáku dle Horwitzova vztahu

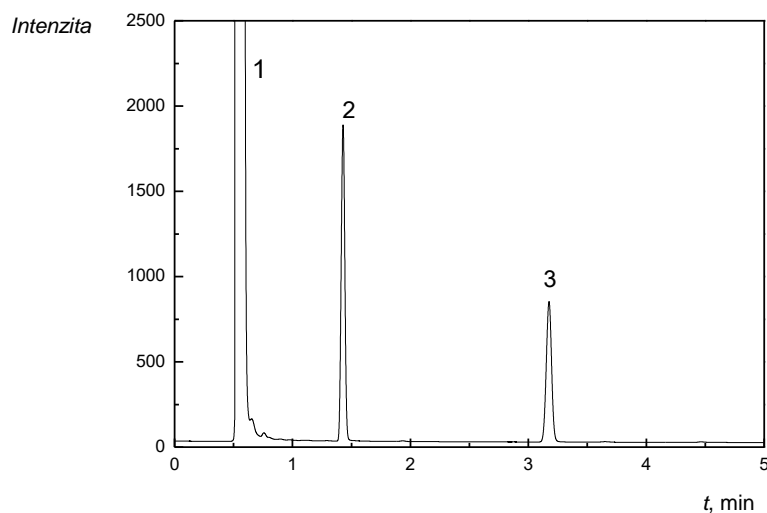
	Tabák	Cigaretový tabák	Nikotinová náplň	Dýmkový tabák
Reprodukovatelnost	0,13	0,17	0,13	0,13
Reprodukovatelnost [%]	11,06	10,51	11,14	11,07
Mez opakovatelnosti [%]	3,69	3,50	3,71	3,69
Rozšířená nejistota [%]	7,90	7,51	7,96	7,91

Tab. 7: Výsledky stanovení nikotinu metodou HPLC/DAD různých vzorků a jejich statistické zpracování.

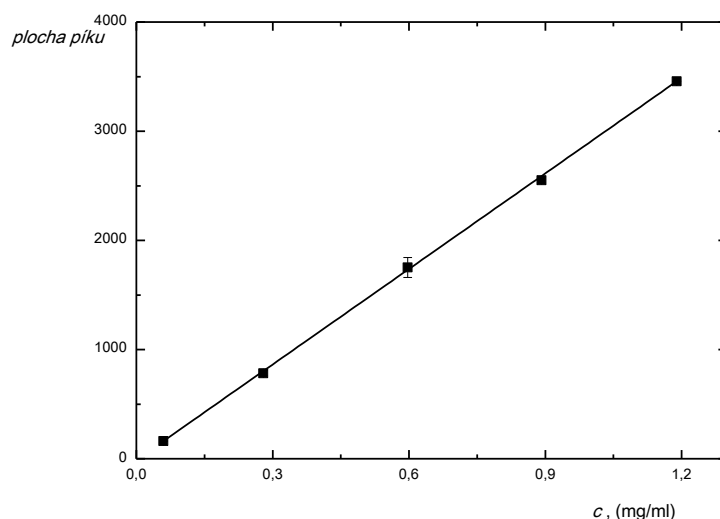
	Tabák	Cigaretový tabák	Nikotinová náplň	Dýmkový tabák
Obsah nikotinu [% hm.]	1,17	1,65	1,11	1,16
RSD [%]	1,86	1,95	1,07	5,41
Reprodukovatelnost [%]	6,75	6,83	7,78	15,62
Mez opakovatelnosti [%]	2,25	2,28	2,59	5,21
Nejistota [%]	2,41	2,44	2,78	5,58
Rozšířená nejistota [%]	4,82	4,88	5,56	11,16

4.2 Stanovení nikotinu GC/FID

Stanovení nikotinu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií bylo ověřeno pomocí plynové chromatografie s upraveným pracovním postupem Světové zdravotnické organizace (kap. 1.7.1.). Pro porovnání byl v tripletu připraven vzorek tabáku a kontrolní standard nikotinu. Pro vyhodnocení byla vybrána metoda vnitřního standardu. Měření probíhalo na plynovém chromatografu s plamenově ionizačním detektorem. Analyt a vnitřní standard byly pomocí GC/FID dobře dělitelné i když se jednalo o odchylku od pracovního postupu Světové zdravotnické organizace (Obr. 10). Po zajištění ideální separace analytu a vnitřního standardu byla proměřena modifikovanou metodou GC/FID kalibrační závislost uvedená na Obr. 11 a z ní odečtené parametry jsou uvedeny v Tab. 8.



Obr. 10: GC-FID chromatogram reálného vzorku tabáku extrahovaného do (1) n-hexanu; (2) vnitřní standard - dodekan ($c = 0,53$ mg/ml); (3) analyt - nikotin ($c = 2$ mg/ml)



Obr. 11: Kalibrační závislost koncentrace nikotinu v standardních kalibračních roztocích na ploše píku metodou GC/FID, rozsah kalibrace 0,06 - 1,19 mg/ml

Tab. 8: Parametry kalibrační závislosti odečtené z výše uvedeného grafu (Obr. 11)

Směrnice	Úsek	R
$2916,95 \pm 0,85$	$-11,68 \pm 1,02$	0,999
AU.min.ml/mg	AU	

4.3 Porovnání metod HPLC/DAD a GC/FID

Porovnání stanovení nikotinu metodou HPLC/DAD a GC/FID od Světové zdravotnické organizace⁵² probíhalo měřením stejného vzorku za optimálních podmínek obou metod, které jsou popsány v předcházejících kapitolách. Obsahy nikotinu získané měřením oběma metodami jsou uvedeny v následující Tab. 9. Jak je možné vidět, rozdíly ve stanovení nikotinu vytvořenou metodou HPLC/DAD oproti standardní metodě Světové zdravotnické organizace jsou zanedbatelné. Můžeme říci, že metoda HPLC/DAD vykazuje stejné výsledky jako metoda GC/FID. Dále jsou shrnuty vypočítané parametry kalibračních závislostí. Například meze detekce a stanovitelnosti pro obě použité metody (Tab. 10). Meze detekce a stanovitelnosti pro vyvinutou metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie jsou přibližně o dva řády nižší než uvedené hodnoty pro stanovení nikotinu metodou GC/FID. Stanovení nikotinu pomocí HPLC také vykazuje uspokojivou mez opakovatelnosti i relativní směrodatnou odchylku ploch píku

deseti za sebou jdoucích měření nikotinu. Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti plochy píků nikotinu ze vzorku tabáku nepřesahovala 2 % pro všechny studované tabáky. Výsledky obou metod HPLC/DAD a GC/FID byly porovnány Studentovým t-testem na hladině spolehlivosti 99 %. Výsledek t-testu nepřesáhl kritickou hodnotu. Díky tomuto porovnání můžeme říci, že metody vykazují stejný výsledek.

Tab. 9: Obsahy nikotinu ve vzorku tabáku uvedené v hmotnostních procentech pro obě metody (HPLC/DAD a GC/FID) se směrodatnými odchylkami

	HPLC/DAD	GC/FID
	[% hm. nikotinu ve vzorku]	
	1,51 ± 0,02	1,53 ± 0,01
	1,49 ± 0,03	1,51 ± 0,01
	1,53 ± 0,02	1,51 ± 0,00

Tab. 10: Porovnání parametrů metod HPLC/DAD a GC/FID

	HPLC/DAD	GC/FID ⁵²
Mez detekce	0,0003 mg/ml	0,05 mg/ml
Mez stanovitelnosti	0,0010 mg/ml	neuveдено
Mez opakovatelnosti	2,3 %	neuveдено
RSD %	2 %	neuveдено

4.4 Stanovení polyfenolických látek metodou HPLC/DAD

4.4.1 Optimalizace metody

Pro stanovení polyfenolických látek vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií byly optimalizovány stejné parametry jako pro stanovení nikotinu. Ani v tomto případě se bohužel nepodařilo dosáhnout stejných podmínek pro obě měření.

4.4.1.1 Výběr vhodné kolony a mobilní fáze nebo optimalizace parametru HPLC pro stanovení polyfenolických látek

Pro vybrání vhodné kolony byly vyzkoušeny 4 typy kolon, na kterých byl měřen roztok směsi sledovaných polyfenolů. Z literatury⁵⁹ byla přejata gradientová eluce a směs mobilní fáze pro analýzu skládající se z roztoku (A) 0,1% vodného roztoku kyseliny

mravenčí (FA) a roztoku (B) acetonitrilu (ACN). Program byl zpočátku 2 min isokratický s 90 % (A) a 10 % (B), od 2 do 5 minut probíhal lineární gradient do 30 % (B), dále do 6,5 minuty byl opět lineární gradient do 10 % (B), k programu bylo dále přidáno 1,5 minuty, pro dostatečné promytí kolony. Průtok mobilní fáze byl také přejet a jeho hodnota byla 0,4 ml/min.

- 1. kolona EC 150/4,6 NUCLEOR C18 GRAVITY o zrnění 3 μm

Při měření roztoku směsi polyfenolů na této koloně docházelo k přetlakování. Se snížením průtokové rychlosti a délkou kolony by délka analýzy byla nevyhovující. Analýza trvala cca 30 minut. Proto byla tato kolona vyřazena z dalších měření.

- 2. kolona ZORBAX SB-C18 2,1x50 mm o zrnění 1,8 μm

Při doporučených podmínkách tato kolona nevykazovala uspokojivé rozdělení analytů. Z tohoto důvodu byly upraveny podmínky gradientové eluce:

0-1 min	10 % B
2-5 min	30 % B
5-6,5 min	50 % B
6,7-8 min	10 % B
10 min	10 % B

Za těchto podmínek docházelo k uspokojivému dělení analytů. Retenční časy kyseliny chlorogenové a kyseliny kávové byl blízko mrtvému času. Tato kolona byla uvažována jako možná k použití pro analýzu polyfenolů s případnou další úpravou gradientové eluce.

- 3. kolona HALO C18 2,1x50 mm o zrnění 2,7 μm s předkolonkou

Při testování této kolony byly opět několikrát pozměněny podmínky gradientové eluce, pro příklad:

0-6,5 min	0 % B
6,5-7 min	35 % B
-10 min	0 % B

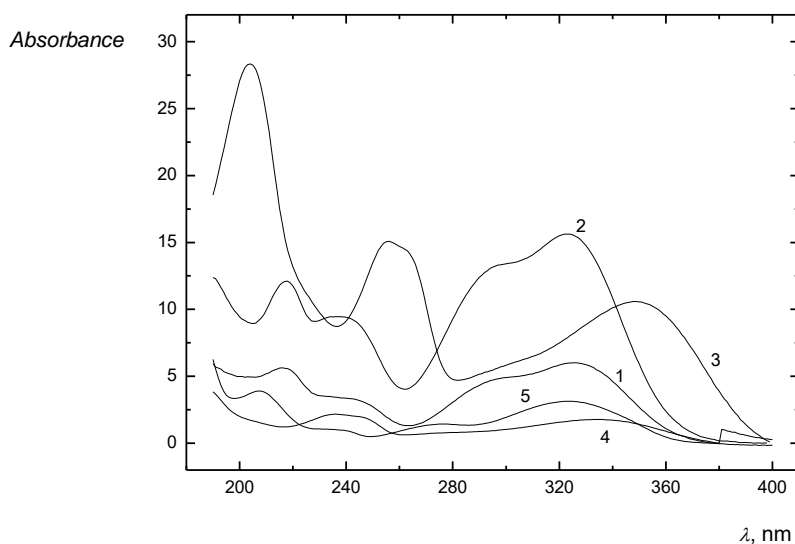
I při změnách podmínek gradientové eluce nedocházelo k uspokojivému dělení analytů. Docházelo k významné koeluci kyseliny chlorogenové a kyseliny kávové. Tato kolona nebyla uznána jako vhodná pro detekci sledovaných analytů.

- 4. kolona ZORBAX XDB-C8 150x4,6 mm o zrnění 5 μm

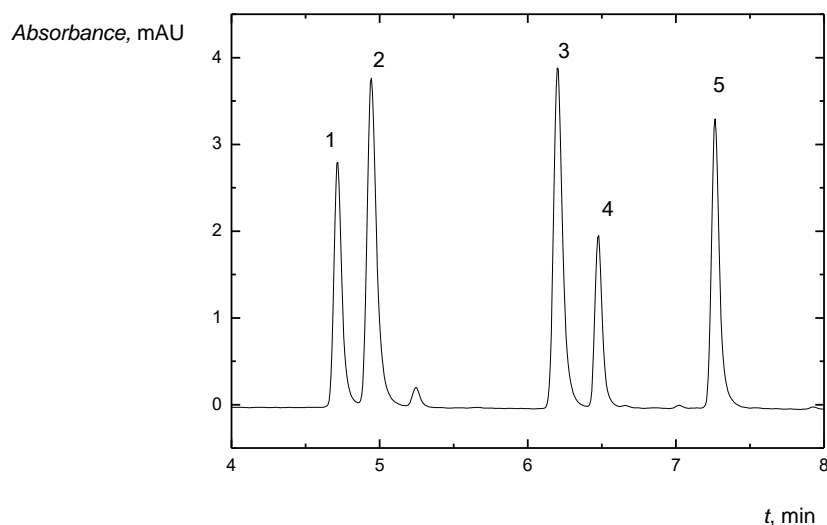
Z daných přejatých podmínek docházelo na této koloně k téměř ideálnímu dělení analytů a k uspokojivému času analýzy. Čas analýzy byl do 10 minut.

Pro zjednodušení metody byla vyzkoušena isokratická eluce o složení mobilní fáze ACN : H₂O : FA v poměru 16,5 : 83,5 : 0,1, která vykazovala uspokojivé rozdělení analytů, jež je možné vidět na Obr. 12. Pro další stanovení polyfenolů v tabáku byla používána kolona ZORBAX XDB-C8 a mobilní fáze ACN : H₂O : FA ve výše uvedeném poměru. Průtoková rychlost mobilní fáze byla 0,4 ml/min a objem nástřiku 5 μl.

Polyfenoly byly detekovány při vlnové délce 340 nm kde se absorpční spektra všech studovaných polyfenolů protínají a vykazují uspokojivou absorbanci. Absorpční spektra jsou uvedeny na Obr. 13. V níže uvedené Tab. 11 jsou zapsané retenční časy všech sledovaných polyfenolických látek.



Obr. 12: Absorbční spektra sledovaných polyfenolů v UV oblasti vlnových délek: (1) kyselina chlorogenová, (2) kyselina kávová, (3) quercitrin, (4) rutin, (5) skopoletin o přibližné koncentraci všech látek 10 μg/ml v 80% vodném roztoku methanolu.



Obr. 13: HPLC chromatogram směsi standardů polyfenolických látek - složení mobilní fáze: ACN 16,5 : H₂O 83,5 : FA 0,1; 1 – kyselina chlorogenová, 2 – kyselina kávová, 3 – rutin, 4 – skopoletin, 5 – quercitrin.

Tab. 11: Sledované polyfenolické látky a jejich retenční časy zaznamenané při vlnové délce 340 nm.

Analyt	Retenční čas [min]
Kyselina chlorogenová	4,71
Kyselina kávová	4,94
Rutin	6,20
Skopoletin	6,47
Quercitrin	7,26

4.4.2 Kalibrační závislosti

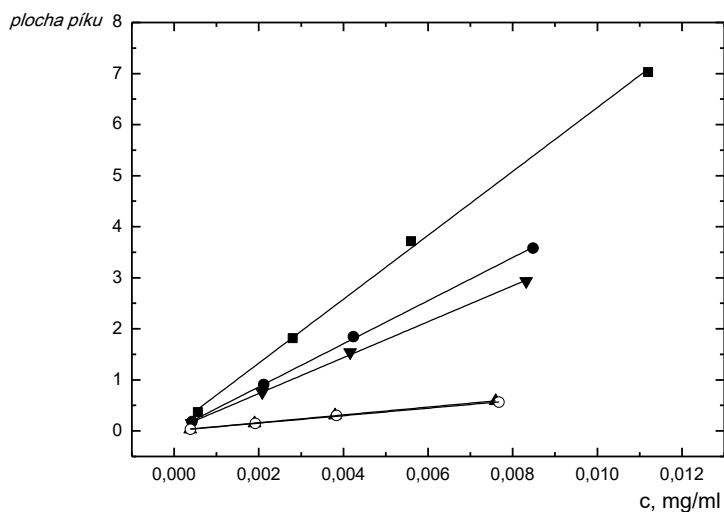
Kalibrační závislosti standardů polyfenolických látek, které jsou znázorněny na Obr. 14, byly změřeny za optimálních podmínek. Parametry kalibračních závislostí jsou uvedeny v následující Tab. 12. Z uvedených hodnot je zřejmé, že HPLC je nejcitlivější pro analýzu kyseliny kávové a naopak nejméně citlivé pro skopoletin.

Meze stanovitelnosti a detekce byly vypočítány z ASTM hodnoty šumu a kalibrační závislosti koncentrace analytů na výšce píku dle vztahu (2.2) a (2.3). Rovnice regrese pro kalibraci jednotlivých analytů a výsledné limity detekcí a stanovitelnosti jsou uvedeny v Tab. 12. Hodnota ASTM šumu pro tuto metodu byla 0,00368. Nejnižší limity

detekce byly vypočítány pro kyselinu chlorogenovou a kávovou. Tyto výsledky odpovídají změřenému absorpčnímu spektru obou látek (Obr. 12) i citlivostí metody ze směrnice kalibrační závislosti koncentrace analytu na ploše píku. Na Obr. 14 můžeme vidět kalibrační závislosti ploch píků sledovaných analytů na jejich koncentraci v roztoku. Parametry kalibrační závislosti jsou uvedeny v následující Tab. 13.

Tab. 12: Rovnice regrese a hodnoty LOD a LOQ pro jednotlivé analyty ze stanovení polyfenolů metodou HPLC/DAD z kalibrační závislosti koncentrace na výšce píku.

	Rovnice regrese	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]
Kyselina chlorogenová	$y = 387,07x + 0,16$	29	95
Kyselina kávová	$y = 575,44x + 0,31$	19	64
Rutin	$y = 70,65x + 0,03$	156	520
Skopoletin	$y = 324,59x + 0,12$	34	113
Quercitrin	$y = 67,74x + 0,02$	163	543



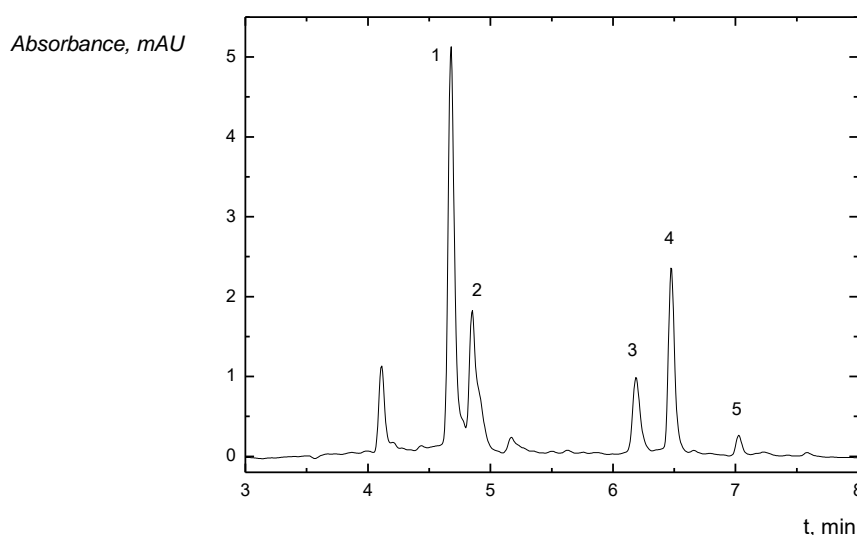
Obr. 14: Kalibrační závislosti koncentrace polyfenolických látek na ploše píků: (■) kyselina kávová, (●) kyselina chlorogenová, (▲) rutin, (▼) skopoletin, (○) quercitrin.

Tab. 13: Parametry kalibračních křivek pro studované polyfenolické látky odečtené z grafu kalibrační závislosti (Obr. 14).

Analyt	Směrnice [mg/ml]	Úsek	R
Kyselina kávová	$625,98 \pm 14,20$	$0,08 \pm 0,09$	0,999
Kyselina chlorogenová	$422,32 \pm 5,39$	$0,02 \pm 0,03$	0,999
Rutin	$351,78 \pm 7,03$	$0,03 \pm 0,03$	0,999
Skopoletin	$73,09 \pm 1,82$	$0,01 \pm 0,01$	0,999
Quercitrin	$76,62 \pm 1,52$	$0,01 \pm 0,01$	0,999

4.4.3 Stanovení polyfenolických látek v reálném vzorku tabáku

Za zvolených optimálních podmínek měření byly stanoveny polyfenolické látky ze vzorku tabáku. Příprava vzorků pro stanovení polyfenolů probíhala stejně jako příprava vzorků pro stanovení nikotinu. Z chromatogramu je zřejmé, že vzorek tabáku obsahuje všechny sledované polyfenoly. Čistota píků byla kontrolována přes knihovnu spekter. Kontrola píků proběhla v oblasti začátku, uprostřed a na konci píku. Z chromatogramu (Obr. 15) můžeme dále vidět, že ze sledovaných látek je ve vzorku tabáku nejvíce zastoupena kyselina chlorogenová. Naopak nejmenší odezvu měl quercitrin. I po provedené optimalizaci podmínek měření dochází k částečné koeluci kyseliny chlorogenové a kyseliny kávové.



Obr. 15: HPLC chromatogram stanovení polyfenolických látek ze vzorku tabáku; (1) kyselina chlorogenová, (2) kyselina kávová, (3) rutin, (4) skopoletin, (5) quercitrin.

5 Závěr

V předkládané diplomové práci byla vyvíjena metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie stanovení nikotinu s detektorem diodového pole ve vzorcích tabáku. Dále byl studován obsah polyfenolických látek. Zjištěné optimální podmínky měření jsou následující. Jako mobilní fáze byla zvolena směs vody, acetonitrilu a dodecylsulfátu sodného o pH 3,5 s průtokovou rychlostí 0,2 ml/min. Detekce nikotinu probíhala při vlnové délce 260 nm. Extrakce nikotinu z tabáku probíhala dvoukrokově a to do 80% vodného roztoku methanolu.

Jelikož neexistuje pro stanovení nikotinu tabákový standard, byla pro kontrolu vyvinuté metody použita metoda GC/FID s upraveným pracovním postupem Světové zdravotnické organizace (podle dostupného vybavení laboratoře). Vytvořená metoda kapalinové chromatografie s detektorem diodového pole vykazuje shodné výsledky s porovnávanou standardní metodou plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem od Světové zdravotnické organizace. Rozdíl stanovení nikotinu z obou metod nebyl statisticky významný.

Metodou HPLC/DAD byl stanovován obsah nikotinu nejen v listech tabáku, ale také v cigaretovém tabáku, dýmkovém tabáku a v nikotinových náplních do elektronických cigaret. Ze změřených výsledků a následného statistického zpracování bylo zjištěno, že metoda je vhodná pro tyto typy vzorků. Směrodatná odchylka měření do 0,03 % hmotnostních a RSD nepřesahuje 2 %. Mez opakovatelnosti byla pro vzorky listů tabáku, cigaretového tabáku a nikotinovou náplň do elektronické cigarety do 2,6% a rozšířená nejistota do 5,68 %. Pro dýmkový tabák jsou vypočítané hodnoty vyšší a to, mez opakovatelnosti 5,3 % a rozšířená nejistota 11,2 %. Metodou HPLC/DAD stanovení nikotinu bylo dosaženo limitu detekce 0,0003 mg/ml a limitu stanovitelnosti 0,0010 mg/ml. Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie je také vhodnou metodou pro sledování polyfenolických látek obsažených v tabákovém listu. Bylo dosaženo dobré citlivosti metody pro všechny studované látky, zejména pro kyselinu kávovou a chlorogenovou. Metoda byla nejméně citlivá na skopoletin a quercitrin.

Obě metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detektorem diodového pole by mohly vést ke zjištění geografického původu vzorků tabáku. Analytické cíle diplomové práce byly splněny, získaná data budou dále využita k validaci metody pro použití metody v laboratorní praxi.

Seznam použitých zdrojů

- (1) Bigelow, B. C.: UXL Encyclopedia of drugs & Addictive substances. Cook Stephanie, H. M., Hill Melissa, Krapp Kristine, Lewon Paul, Manar Elizabeth, Price Heather, Ed.; Thomson Gale, 2006; Vol. 4; pp 900.
- (2) Eriksen Michael, M. J., Ross Hana: *The Tobacco Atlas*; 4th ed.; American Cancer Society: USA.
- (3) Fagerström, K. O.; Bridgman, K.: Tobacco harm reduction: The need for new products that can compete with cigarettes. *Addictive Behaviors* **2014**, *39*, 507-511.
- (4) Stead, L. F.; Perera, R.; Bullen, C.; Mant, D.; Hartmann-Boyce, J.; Cahill, K.; Lancaster, T.: Nicotine replacement therapy for smoking cessation. *The Cochrane database of systematic reviews* **2012**, *11*, CD000146.
- (5) U.S. Food and Drug Administration, FDA's New Regulations for E-Cigarettes, Cigars, and All Other Tobacco Products dostupné z URL <http://www.fda.gov/TobaccoProducts/Labeling/RulesRegulationsGuidance/ucm394909.htm>, (cit. 25. 9. 2015)
- (6) Knapp, S.; Chase, M. W.; Clarkson, J. J.: Nomenclatural changes and a new sectional classification in Nicotiana (Solanaceae). *Taxon* **2004**, *53*, 73-82.
- (7) Otmar Geiss, D. K.: *Tobacco, Cigarettes and Cigarette Smoke*, 2007.
- (8) Philip Morris International, Naše produkty, dostupné z URL http://www.pmi.com/cs_cz/our_products/pages/our_products.aspx, (cit. 6. 8. 2015)
- (9) Song, Z.-p.; Li, T.-s.; Zhang, Y.-g.; Cao, H.-j.; Gong, C.-r.; Zhang, W.-j.: The mechanism of carotenoid degradation in flue-cured tobacco and changes in the related enzyme activities at the leaf-drying stage during the bulk curing process. *Agricultural Sciences in China* **2010**, *9*, 1381-1388.
- (10) Baker, R. R.; Pereira da Silva, J. R.; Smith, G.: The effect of tobacco ingredients on smoke chemistry. Part I: Flavourings and additives. *Food and Chemical Toxicology* **2004**, *42*, Supplement, 3-37.
- (11) Pang T, Y. Z., Dai Y, Wang C, Yang J, Peng L, Xu G.: Identification and determination of glycosides in tobacco leaves by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science* **2007**.
- (12) Zákon o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů č. 110/1997 Sb.; dostupné z URL <http://www.zakony.cz/zakony/1997/101/zakon-110-1997-Sb-zakon-o-potravinach-a-tabakovych-vyrobcich-a-o-zmene-a-doplneni-nekterych-souvisejicich-zakonu-SB1997110>, Ed.: (cit. dne 1. 5. 2016), ze dne 24. 4. 1997.
- (13) .Vyhláška, kterou se stanoví požadavky na tabákové výrobky č. 344/2003 Sb.; dostupné z URL <http://www.zakony.cz/zakony/2003/301/zakon-344-2003-Sb->

-
- vyhlaska-kerou-se-stanovi-pozadavky-na-tabakove-vyrobky-SB2003344>, Ed. (cit. dne 1. 5. 2016), ze dne 30. 9. 2003.
- (14) Zákon o opatřeních k ochraně před škodami působenými tabákovými výrobky, alkoholem a jinými návykovými látkami a o změně souvisejících zákonů č. 379/2005 Sb.; dostupné z URL <<http://www.zakony.cz/zakony/2005/351/zakon-379-2005-Sb-zakon-o-opatrenich-k-ochrane-pred-skodami-pusobenymi-tabakovymi-vyrobky-alkoholem-a-jinymi-navykovy-SB2005379>>, Ed., (cit. dne 1. 5. 2016), ze dne 19. 8. 2005.
- (15) Henningfield, J. E. L., Edythe; Pogun, Sakire *Handbook of Experimental Pharmacology*; Springer Science & Business Media, 2009.
- (16) Duke, J.: Dr. Duke's Phytochemical and ethnobotanical databases. Dostupné z URL <<https://phytochem.nal.usda.gov/phytochem/search>>, (cit. 5. 3. 2015)
- (17) El-Gayar, F.; El-Shazli, A.; Khafagy, S.; Watson, W.: Studies on the alkaloidal contents of *Nicotiana rustica* var. *Brasilia*, and its insecticidal activity against *Culex pipiens* L. (Dipt.: Culicidae) and *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lep.: Noctuidae). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* **1975**, 78, 49-55.
- (18) Mayer, B.: How much nicotine kills a human? Tracing back the generally accepted lethal dose to dubious self-experiments in the nineteenth century. *Arch Toxicol* **2014**, 88, 5-7.
- (19) Silvette, H.; Hoff, E. C.; Larson, P. S.; Haag, H. B.: The actions of nicotine on central nervous system functions. *Pharmacological Reviews* **1962**, 14, 137-173.
- (20) Ritter, J. M., Lewis L. D., Mant, T., Ferro A.: *A textbook of clinical pharmacology and therapeutics*; 5th ed.; Hodder Arnold: Londýn, 2008.
- (21) Slanina, J., Táborská, E.: Biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chemické listy* **2004**, 98, 239-245S.
- (22) Marcaníková, K., Beňová. B.: Využití coulometrického detektoru pro analýzu fenolických látek. *Chemické listy* **2010**, 104, 27-30.
- (23) Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides T. C.: The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52, 673-751.
- (24) Slanina, J.: Biologická a farmakologická aktivita ligninů. *Chemické listy* **2000**, 94, 111-116.
- (25) Manach, C., Scalbert, A., Morand, Ch., Rémésy, Ch., Jiménez, L.: Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of Clinical Nutrition* **2004**, 79, 727-747.
- (26) Fardet, A.; Rock, E.; Rémésy, C.: Is the in vitro antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected in vivo? *Journal of Cereal Science* **2008**, 48, 258-276.
- (27) Gallardo, C.; Jiménez, L.; García-Conesa, M. T.: Hydroxycinnamic acid composition and in vitro antioxidant activity of selected grain fractions. *Food Chemistry* **2006**, 99, 455-463.

-
- (28) Adlercrautz H., Mazur, W.: Phyto-oestrogens and western diseases. *Annals of Medicine* **1997**, 29, 95-120.
- (29) Bhat, K. Pezzuto, P. J.: Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Annals of New York Academy of Science* **2002**, 957, 210-229.
- (30) Jeandet, P.; Delaunois, B.; Conreux, A.; Donnez, D.; Nuzzo, V.; Cordelier, S.; Clement, C.; Courot, E.: Biosynthesis, metabolism, molecular engineering, and biological functions of stilbene phytoalexins in plants. *BioFactors (Oxford, England)* **2010**, 36, 331-41.
- (31) Boerjan, W.; Ralph, J.; Baucher, M.: Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* **2003**, 54, 519-546.
- (32) Crozier, A.; Clifford, M. N.; Ashihara, H.: *Plant secondary metabolites : occurrence, structure and role in the human diet*; Blackwell publ.: Oxford, 2006.
- (33) Johnston, K. L.; Clifford, M. N.; Morgan, L. M.: Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *Am J Clin Nutr* **2003**, 78, 728-33.
- (34) Bernstein, C.; Holubec, H.; Bhattacharyya, A.; Nguyen, H.; Payne, C.; Zaitlin, B.; Bernstein, H.: Carcinogenicity of deoxycholate, a secondary bile acid. *Arch Toxicol* **2011**, 85, 863-871.
- (35) Freedman, S. O.; Shulman, R.; Krupey, J.; Schon, A. H.: Antigenic properties of chlorogenic acid. *Journal of Allergy* **1964**, 35, 97-107.
- (36) Kašparová, M.: Borůvka černá (*Vaccinium myrtillus* L.). *Praktické lékařství* **2009**, 5, 143-145.
- (37) Riihinen, K.; Jaakola, L.; Kärenlampi, S.; Hohtola, A.: Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and 'northblue' blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*). *Food Chemistry* **2008**, 110, 156-160.
- (38) Budavari, S.: *The Merck index : an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*; Merck: Rahway, N.J., U.S.A., 1989.
- (39) Budavari, S.: *The Merck index : an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*; Merck: Rahway, N.J., U.S.A., 1989.
- (40) Kreft S, K. M., Kreft I: Extraction of rutin from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds and determination by capillary electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, 47.
- (41) Arima, H.; Ashida, H.; Danno, G.-i.: Rutin-enhanced Antibacterial Activities of Flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2002**, 66, 1009-1014.
- (42) Sattanathan, K., Dhanapal, C. K., Manavalan, R.: LDL lowering properties of rutin in diabetic patients, *International Journal of Pharma and Bio Sciences* **2010**, 1.
- (43) Fabjan, N.; Rode, J.; Košir, I. J.; Wang, Z.; Zhang, Z.; Kreft, I.: Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) as a source of dietary rutin and quercitrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, 51, 6452-6455.

-
- (44) Mämmelä, P.; Savolainen, H.; Lindroos, L.; Kangas, J.; Vartiainen, T.: Analysis of oak tannins by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2000**, *891*, 75-83.
- (45) Wilhelm, K. P.; Biel, S.; Siegers, C. P.: Role of flavonoids in controlling the phototoxicity of *Hypericum perforatum* extracts. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* **2001**, *8*, 306-9.
- (46) Wagner, C.; Fachinetto, R.; Dalla Corte, C. L.; Brito, V. B.; Severo, D.; de Oliveira Costa Dias, G.; Morel, A. F.; Nogueira, C. W.; Rocha, J. B.: Quercitrin, a glycoside form of quercetin, prevents lipid peroxidation in vitro. *Brain research* **2006**, *1107*, 192-8.
- (47) Chen, Y. J.; Yang, J. H.; Wang, Z. L.; Wu, X.; Wang, F.: Scopoletine as fluorescence probe for determination of protein. *Spectroc. Acta Pt. A-Molec. Biomolec. Spectr.* **2007**, *66*, 686-690.
- (48) Peterson, J. K.; Harrison, H. F.; Jackson, D. M.; Snook, M. E.: Biological activities and contents of scopolin and scopoletin in sweetpotato clones. *Hortscience* **2003**, *38*, 1129-1133.
- (49) Hossain, M. A., Selhuddin, M. S.: Analytical determination of nicotine in tobacco leaves by gas chromatography-mass spectrometry. *Arabian Journal of Chemistry* **2010**, *6*, 275-278.
- (50) Sheng, L. Q.; Ding, L.; Tong, H. W.; Yong, G. P.; Zhou, X. Z.; Liu, S. M.: Determination of nicotine-related alkaloids in tobacco and cigarette smoke by GC-FID. *Chromatographia* **2005**, *62*, 63-68.
- (51) CORESTA: Determination of nicotine in tobacco products by gas chromatographic analysis. In *Coresta Recommended N°62*, 2009.
- (52) WHO: Standard operating procedure for determination of nicotine in cigarette tobacco filler. In *SOP 04*; World Health Organization, 2014.
- (53) Stanfill S. B., J. L. T., Ashley D. L, Watson C. H.: Rapid and chemically selective nicotine quantification in smokeless tobacco products using GC-MS. *Journal of chromatographic science* **2009**, *47*, 902-909.
- (54) Vlase I., F. L., Mindrutau I., Leucuta S. E.: Determination of nicotine from tobacco by LC-MS-MS. *Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Physica* **2005**.
- (55) Ciolino L. A., T. J. A., McCauley H. A., Smallwood A. W., Yi T. Y.: Optimization study for the reversed-phase ion-pair liquid chromatographic determination of nicotine in commercial tobacco products. *Journal of Chromatography A* **1999**, *852*, 451-463.
- (56) Saunders J. A, D. E. B.: Quantitation of major tobacco alkaloids by high-performance liquid chromatography *Journal of Chromatography* **1981**, *205*, 147-154.
- (57) M. Mullett, W.; P. C. Lai, E.; Sellergren, B.: Determination of nicotine in tobacco by molecularly imprinted solid phase extraction with differential pulsed elution. *Analytical Communications* **1999**, *36*, 217-220.

-
- (58) Švorc L., S. D. M., Kalcher K.: Boron-doped diamond electrochemical sensor for sensitive determination of nicotine in tobacco products and anti-smoking pharmaceuticals *Diamonds & Related Materials* **2014**, 42, 1-7.
- (59) Xie F., Y. A., Dengke H., Huimin L., Ding L., Zhang S.: Rapid and sensitive analysis of eight polyphenols in tobacco by rapid resolution liquid chromatography. *American Journal of Analytical Chemistry* **2011**, 2, 929-933.
- (60) Barek, J.: Nomenklatura a terminologie. Metrologická terminologie v chemii. *Chemické listy* **2000**, 94, 439-444.
- (61) Meloun M., M. J.: *Statistická analýza experimentálních dat*; Academia: Praha, 2004.